

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

**UNIVERSITE MENTOURI – CONSTANTINE FACULTE DES SCIENCES
EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :

Série :

THESE

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie Organique
Option : Phytochimie**

Par

M^{me} LABED Fatiha

THEME

**Isolement et Détermination Structurale de Métabolites
Secondaires d'espèces des genres *Santolina* et *Centaurea*
(Asteraceae) - Activités biologiques**

Devant le jury :

MEKKIOU Ratiba,	Pr., Université Frère Mentouri, Constantine 1	Présidente
BENAYACHE Fadila	Pr., Université Frère Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse Rapporteuse
LEGSEIR Belgacem,	Pr., Université Badji Mokhtar, Annaba,	Examineur
BOUDJERDA Azzedine,	Pr., Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel,	Examineur
DRIDI Seloua,	MCA., Université El hadj Lakhdar, Batna-1,	Examinatrice

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de ma chère mère qui m'a
entouré de tant d'amour puisse Dieu
l'accueillir dans son infinie miséricorde

A mon père qui m'a élevé pour être ce que je
suis maintenant. Que Dieu te préserve santé
et longue vie.

A mon mari et mes filles pour leur grand
amour et leur soutien qu'ils trouvent ici
l'expression de ma grande gratitude

A mon frère et mes sœurs qui m'ont tant
encouragé

Et à tous mes amis et ma famille à tous ceux
qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces
années de travail.

Merci pour tout

Fatiha

Remerciements

Avant tout, je remercie le bon **Dieu**, tout puissant, sans lui ce travail n'aurait pu voir le jour. La réalisation de ce travail a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, **BENAYACHE Fadila** Professeur à l'université de Constantine 1, pour avoir mis à ma disposition le temps nécessaire à la réalisation de ce manuscrit, ainsi que pour la pertinence de ses remarques et de ses feed-back. Pour sa disponibilité et la confiance qu'elle m'a accordée. J'ai pu bénéficier de votre savoir et de votre savoir-faire au cours de nombreuses discussions. J'aimerais aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle m'a accordée, et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Mes sincères remerciements au professeur **MEKKIOU RATIBA** de l'université des frères Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur **LEGSEIRE Belkacem** professeur à l'université d'Annaba pour l'intérêt qu'il porte à la recherche scientifique, en acceptant d'examiner mon travail et en l'enrichissant par ses conseils.

Merci à Monsieur **BOUDJERDA Azzedine** professeur de l'université de Mohamed Seddik Benyahia, Jijel d'avoir bien voulu accepter d'examiner mon travail malgré ses nombreuses occupations

A Madame **DRIDI Seloua**, Maitre de conférence de l'université de El hadj Lakhder, Batna merci d'avoir accepté de juger ce travail..

J'exprime mes vifs remerciements à monsieur le professeur **BENAYACHE Samir**, professeur à l'université Frères Mentouri, Constantine 1, pour avoir mis à ma disposition deux plantes dont l'une est une plante saharienne endémique et pour

m'avoir accordé deux stages dans le cadre d'un projet de coopération (Algérie-Italie). Je le remercie également pour ses encouragements et ses conseils judicieux.

Je tiens à remercier très chaleureusement la Professeure **PIACENTE Sonia** pour son accueil, son aide, son attention et sa gentillesse tout au long du stage, qui ont fait de ces deux mois un moment très plaisant et intéressant.

Un merci tout spécial à **MASULLO Milena** pour ses impulsions et ses suggestions, son regard critique et sa relecture attentive, vos talents et votre amitié se sont manifestés jusqu'aux derniers instants.

Mes remerciements vont également au professeur **CHALARD Pierre**, pour l'hospitalité dont il a fait preuve envers moi lors du séjour que j'ai effectué à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et collègues qui m'ont apporté leurs support moral et intellectuel tout au long de ma démarche. Un grand merci.

Je remercie enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.

Liste des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle.
br s	Singulet large.
CC	Chromatographie sur colonne ouverte.
CCM	Chromatographie sur couche mince.
CI	Ionisation chimique.
COSY	Spectroscopie de corrélation.
C13-RMN	Résonance magnétique nucléaire de carbone.
<i>d</i>	Doublet.
<i>dd</i>	Doublet de doublet.
DPPH	1, 1-Dyphényl-2-picrylhydrazyle.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
Glc	Glucose.
H ₂ O	Eau distillée.
Hz	Hertz.
¹ H-RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton.
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation.
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation.
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance/pression.
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%.
<i>J</i>	Constante de couplage.
<i>m/z</i>	Masse / charge atomique.
<i>m</i>	Multiplet.
MeOH	Méthanol.
MeOH-d ₄	Méthanol deutérié.
NOESY	Spectroscopie NOE et d'échange.
ppm	Partie par million.

<i>q</i>	Quadruplet.
RMN	Résonance magnétique nucléaire.
Rha	Rhamnose.
<i>s</i>	Singulet
<i>t</i>	Triplet.
<i>t_r</i>	Temps de rétention.
uma	Unité de masse atomique.
UV	Ultraviolet.
λ max	Longueur d'onde maximal d'absorbance.
δ_C	Déplacement chimique du carbone.
δ_H	Déplacement chimique du proton.

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------	---

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1 La famille des <i>Astéracea</i>	3
I.1.1 Généralités	3
I.1.2 Caractère botanique	3
I.1.3 Classification et position systématique	5
I.1.3.1 Classification selon l'APG IV	5
I.1.3.2 Classification de Cronquist	6
I.1.3.3 Classification interne	6
I.1.4 Distribution géographique de la famille	6
I.1.5 Importance économique et utilisation	6
I.2. Le genre <i>Santolina</i>	7
I.2.1 Généralités	7
I.2.2 Composition chimique	8
I.2.3 Usages traditionnels	8
I.2.4 Propriétés biologiques de la <i>S. chamaecyparissus</i>	8
I.2.5 Etudes chimiques antérieures	9
I.3 Le genre <i>Centaurea</i>	10
I.3.1 Introduction	10
I.3.2 Description du genre <i>Centaurea</i>	10
I.3.3 Propriétés pharmacologiques et biologiques	11
I.4 Les métabolites secondaires les plus courants des genres <i>Santolina</i> et <i>Centaurea</i>	12
I.4.1 Les flavonoïdes	12
I.4.2 Les lactones sesquiterpènes	25
I.4.2.1 Les germacranolides du genre <i>Centaurea</i>	25
I.4.2.2 Les guaianolides du genre <i>Centaurea</i>	29
I.4.2.3 Les élémanolides du genre <i>Centaurea</i>	33
I.4.2.4 Les eudesmanolides du genre <i>Centaurea</i>	35
I.5 Conclusion	47
Références bibliographique	48

Chapitre II : Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

II.1 Introduction	58
II.2 Classement des métabolites secondaires	58
II.2.1 Les composés phénoliques	58
II. 2.1.1. Définition	58

II. 2.1. 2. Structure	58
II. 2.1. 3. Localisation	59
II. 2.1. 4. Classification	59
II. 2.1.4.A. Les acides phénoliques	60
II. 2. 1. 4. A.1 Définition	60
II.2 .1. 4. A.2 Les acides hydroxy benzoïques	60
II.2 .1. 4. A.3 Les acides hydroxycinnamiques	61
II.2. 1. 4. A.4 Formation du noyau aromatique	62
II.2. 1. 4. A.5 Propriétés thérapeutiques	64
II .3 Les flavonoïdes	64
II.3.1 Définition	64
II.3. 2 Classification des flavonoïdes	65
II.3.3 biosynthèse des flavonoïdes	66
II.3.3.1 Etape de biosynthèse vers les chalcones	68
II.3.3.2 Etape de biosynthèse vers les flavanones	68
II.3.3.3 Etape de biosynthèse vers les flavones	69
II.3.3.4 Etape de biosynthèse vers les dihydroflavonoïdes	69
II.3.4 Substitution du squelette flavonique	70
II.3.4.1 L'hydroxylation	70
II.3.4.2 La métoxylation	70
II.3.4.3 La O-glycosylation	70
II.3.4.4 La C-méthylation et la C-glycosylation	71
II.3.5 Propriétés des flavonoïdes	71
II.3.6 L'utilisation des flavonoïdes en thérapeutique	72
II.3.7 Analyse structurale des flavonoïdes	72
II.3.7.1 Relation entre le rapport frontal et la structure	72
II.3.7.2 La fluorescence sous la lumière de Wood	73
II.3.7.3 La spectrophotométrie UV visible	73
II.3.7.3.1 Spectre en présence de NaOH	74
II.3.7.3.2 Spectre en présence de NaOAc	74
II.3.7.3.3 Spectre en présence de NaOAc + H ₃ BO ₃	75
II.3.7.3.4 Spectre en présence d'AlCl ₃ et AlCl ₃ + HCl	75
II.3.7.4 Spectroscopie RMN proton (¹ H)	75
II.3.7.4.1 Les protons aromatiques	76
II.3.7.4.1.1 Les protons du noyau A	76
II.3.7.4.1.2 Les protons du noyau B	76
II.3.7.4.1.3 Les protons du noyau C	77
II.3.7.4.2 Les protons aliphatiques	77
II.3.7.4.2.1 Les protons méthoxyles	77
II.3.7.4.2.2 Les protons des sucres	77
II.4 Les sesquiterpènes	78
II.4.1 Généralités	78
II.4.2 Les lactones sesquiterpéniques	79
II.4.3 Nomenclature	80

II.4.4 Structures	81
II.4.5 Origine biogénétique des lactones sesquiterpéniques	83
Références bibliographique	86

Chapitre III : Travaux personnels

III.1 Etude phytochimique de l'espèce <i>S. Chamaecyparissus</i>	90
III.1.1 Choix du matériel végétal	90
III.1.2 Place dans la systématique	90
III.1.3 Description botanique	90
III.1.4 Répartition géographique	92
III.1.5 Protocole expérimental	92
III.1.5.1 Récolte du matériel végétal	92
III.1.5.2 Extraction	92
III.1.6 Séparation et purification des extraits	94
III.1.6.1 Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme	94
III 1.6.1.1 Etude des fractions de l'extrait chloroforme	95
III.1.6.2 Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol	98
III 1.6.2.1 Etude des fractions de l'extrait <i>n</i> -butanol	99
III.2 Etude phytochimique de l'espèce <i>C. Pungens</i>	102
III.2.1 Choix du matériel végétal	102
III.2.2 Place dans la systématique	102
III.2.3 Description botanique	103
III.2.4 Protocole expérimental	104
III.2.4.1 Récolte du matériel	104
III.2.4.2 Extraction	104
III.2.5 Séparation et purification des extraits	107
III.2.5.1 Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle	107
III.2.5.2 Séparation et purification des composants de l'extrait butanol	112
Références bibliographique	114

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Identification des produits isolés de l'espèce <i>S. Chamaecyparissus</i>	116
IV.1.1 Identification des produits isolés de la phase chloroforme	116
IV.1.1.1 Elucidation structurale du composé Sch 1 (SC11)	116
IV.1.1.2 Elucidation structurale du composé Sch 2 (SC14)	126
IV.1.1.3 Elucidation structurale du composé Sch 3 (SC 15-5-16)	132
IV.1.1.4 Elucidation structurale du composé Sch 4 (SC15-6-11)	139
IV.1.1.5 Elucidation structurale du composé Sch 5 (SC 15-7-27)	142
IV.1.1.6 Elucidation structurale du composé Sch 13 (FBFL-2C)	148

IV.1.2	Identification des produits isolés de la phase <i>n</i> -butanol	155
IV.1.2.1	Elucidation structurale du composé Sch6 (SC 4-107)	155
IV.1.2.2	Elucidation structurale du composé Sch 7 (SC 43)	162
IV.1.2.3	Elucidation structurale du composé Sch 8(SC 158-2)	167
IV.1.2.4	Elucidation structurale du composé Sch 9, SC 7-191-6	173
IV.1.2.5	Elucidation structurale du composé Sch 10, SC 7-1-7	181
IV.1.2.6	Elucidation structurale du composé Sch 11, SC F7-1-17	188
IV.2	Identification des produits isolés de l'espèce <i>C. Pungens</i>	195
IV.2.1	Elucidation structurale du composé CP1,(MF 17) isolé de la phase <i>n</i> -butanol	195
IV.2.2	Elucidation structurale du composé CP2 isolé de la phase Acétate d'éthyle	209
IV.2.3	Elucidation structurale du composé CP3, MF9 isolé de la phase <i>n</i> -butanol	218
IV.2.4	Elucidation structurale du composé CP4(CPA91) isolé de la phase acétate d'éthyle	225
IV.2.5	Elucidation structurale du composé CP 5 (CPA59) isolé de la phase acétate d'éthyle	232
IV.2.6	Elucidation structurale du composé CP6 (MF13) isolé de la phase <i>n</i> -butanol	238
IV.2.7:	Elucidation structurale du composé CP7 (MF1) isolé de la phase acétate d'éthyle	245
IV.2.8:	Elucidation structurale du composé CP8 isolé de la phase <i>n</i> -butanol	252
IV.2.9	Elucidation structurale du composé CP9, MF22 isolé de la phase <i>n</i> -butanol	257
	Références bibliographiques	268

Chapitre V : Activités biologiques

V.1	V.1 Introduction	270
V.	Dosage des polyphénols totaux	270
V.2.1	Introduction	270
V.2.2	Protocole expérimental	271
V.3	Evaluation de l'activité antioxydante	271
V.3.1	Analyse de la capacité antioxydante par le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH•)	271
V.3.1.1	Principes	271
V.3.1.2	Protocole expérimental	272
V.3.2	Analyse de la capacité antioxydante par le piégeage du radical cation ABTS•+ (TEAC)	273
V.3.2.1	Principe	273
V.3.2.2	Protocole expérimental	273
V.4	Résultats et discussion	274
V.4.1	Dosage des polyphénols totaux (TPC) des extraits de <i>Santolina chamaecyparissus</i>	274
V.4.2	Evaluation de l'activité antioxydante	275
V.4.2.1	Activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical DPPH des extraits de <i>S. chamaecyparissus</i>	275

V.4.2.2 Activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical ABTS ⁺ (TEAC)	275
V.5 Détermination de l'activité antimicrobienne des produits isolés de <i>centaurea pungens</i>	276
V.5.1 Méthode de diffusion en disque	276
V.5.2 Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI)	277
V.5.2.3 protocole expérimental	277
V.5.2.4 Résultats et discussion	277
Références bibliographiques	280
Conclusion générale	282

Liste des tableaux

TABLEAU I.1 : CLASSIFICATION DE LA FAMILLE ASTERACEAE SELON L'APG IV.	5
TABLEAU I.2 CLASSIFICATION DE LA FAMILLE ASTERACEAE SELON CRONQUIST	6
TABLEAU I.3: QUELQUES FLAVONOÏDES DU GENRE CENTAUREA.....	13
TABLEAU I.4 : QUELQUES LACTONES SESQUITERPENIQUES DE TYPE GERMACRANOLIDE ISOLEES DU GENRE CENTAUREA	26
TABLEAU I.5 : QUELQUES GROUPES D'ESTERS EXISTANT EN C-6 OU EN C-8 DANS LES GERMACRANOLIDES DU GENRE CENTAUREA	28
TABLEAU I.6 : DEPLACEMENTS CHIMIQUES CARACTERISTIQUES DES GERMACRANOLIDES.....	29
TABLEAU I.7: QUELQUES GUAIANOLIDES ISOLEES DU GENRE CENTAUREA	30
TABLEAU I.8 : GROUPES D'ESTERS EXISTANT EN C-8 DANS LES GUAIANOLIDES DU GENRE CENTAUREA.....	32
TABLEAU I.9 : QUELQUES LACTONES SESQUITERPENIQUES DU TYPE ELEMNOLIDE ISOLEES DU GENRE CENTAUREA.....	34
TABLEAU I.10 :QUELQUES LACTONES SESQUITERPENES DU TYPE EUDESMANOLIDE ISOLEES DU GENRE CENTAUREA.....	36
Tableau II.1: Principales classes de composés phénoliques	59
TABLEAU II.2: STRUCTURES DE DIVERS ACIDES HYDROXY BENZOÏQUES.....	60
TABLEAU II.3 PRINCIPAUX ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES	61
TABLEAU II.4 : LES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES	66
TABLEAU II.5 : RELATION ENTRE LE RF ET LA STRUCTURE FLAVONIQUE.....	72
TABLEAU II.6 : RELATION ENTRE LA FLUORESCENCE SOUS LUMIERE DE WOOD ET LES STRUCTURES FLAVONIQUES.....	73
TABLEAU II.7: DEPLACEMENT ET MULTIPLICITE DES PROTONS DU NOYAU A.....	76
TABLEAU II.8: DEPLACEMENT ET MULTIPLICITE DES PROTONS DU NOYAU B.	76
TABLEAU II.9: DOMAINE DE RESONANCE DES PROTONS ANOMERIQUES.	78
Tableau III -1 : Rendements des différents extraits	94
TABLEAU III.2 : RESULTATS DE LA SEPARATION SUR COLONNE DE L'EXTRAIT CHLOROFORME DE SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS	95
TABLEAU III.3 :TABLEAU 3 FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE EPAISSE DE LA FRACTION SC-15.....	97
TABLEAU III.4 : RESULTATS DE LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE L'EXTRAIT <i>n</i> -BUTANOL DE SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS, ELUTION ISOCRATIQUE ACOEt/ACOH/H ₂ O (6:1:1).....	98
TABLEAU III-5 : REGROUPEMENT FINAL DES FRACTIONS ISSUES DE LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT <i>n</i> - BUTANOL DE SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS.....	99
TABLEAU III-6 : FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION SB4 SUR COLONNE DE GEL DE SILICE.....	100
TABLEAU III-7 : FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION SB6 SUR COLONNE DE GEL DE SILICE... ..	100
TABLEAU III.8 : RENDEMENT DES DIFFERENTS EXTRAITS.....	107
TABLEAU III-9 : FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE DE <i>CENTAUREA</i> <i>PUNGENS</i>	108
TABLEAU III.10: REGROUPEMENT DE FRACTIONS ISSUES DE LA COLONNE DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE.....	109

TABLEAU III-11 : RESULTAT DU FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE LA FRACTION CPA-17	111
TABLEAU III-12 : FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE L'EXTRAIT N- BUTANOL (FLEURS).....	112
Tableau IV.1.1 : Données de la série spectrale UV du composé Sch1 (SC 11).....	115
TABLEAU IV.1.2 : DONNEES DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU COMPOSE SCH1(SC 11), EUPATILINE.....	123
TABLEAU IV.1.3 : DONNEES DE LA SERIE SPECTRALE UV-VIS. (AMVAX, NM)DU COMPOSE SCH2(SC 14).....	124
TABLEAU IV.1.4 : DONNEES DE LA SPECTROSCOPIE RMN (CD3OD, 400 MHZ) DU COMPOSE SCH2	128
TABLEAU IV.1.5 : DONNEES DE LA SPECTROSCOPIE RMN (CD3OD,) DU COMPOSE SCH 3	135
TABLEAU IV.1.6 : DONNEES RMN DU COMPOSE SCH 4, 1,3-PROPANEDIOL, 2-AMINO 1- (4-HYDROXY- 3-METHOXYPHENYL)	141
TABLEAU IV.1.7: DONNEES DE LA SERIE SPECTRALE UV-VIS DU COMPOSE SCH 5	142
TABLEAU IV.1.8 : DONNEES SPECTRALES DE RMN1H (DMSO-D6, 400 MHZ) DU COMPOSE SCH5 ...	145
TABLEAU IV.1.9 : DONNEES RMN DU COMPOSE SCH 6(SC4-107), PRUNASINE.....	159
TABLEAU IV.1.10 : RESULTATS DE RMN 1H (MeOH-D4, 600 MHZ) DU COMPOSE SCH7, (SC 43) LUTEOLINE 7-O-B-GLUCOPYRANOSYLE	164
TABLEAU IV.1.11 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE SCH8 (SC 158-2), SYRINGOSIDE	170
TABLEAU IV.1.12 : DONNEES SPECTRALES DE RMN 1H ET 13C.....	178
TABLEAU IV.1.13 : DONNEES SPECTRALES DE RMN 1H ET 13CDU COMPOSESCH 10	185
TABLEAU IV.1.14 : DONNEES SPECTRALES DE RMN 1H ET 13CDU COMPOSESCH 10	186
TABLEAU IV.1.15 : DONNEES DE LA SERIE SPECTRALE UV-VIS DU COMPOSE SCH 11.....	191
TABLEAU IV.2.1 : DONNEES SPECTROSCOPIQUES RMN DU COMPOSE CP.....	207
TABLEAU IV.2.2 : DONNEES SPECTROSCOPIQUES RMN 1H ET RMN 13C DU COMPOSE CP2.....	217
TABLEAU IV.2.3 : DONNEES SPECTROSCOPIQUES RMN 1H ET RMN 13C DU COMPOSE CP3, MF9 ..	223
TABLEAU IV.2.4 : RESULTAT DE LA SERIE SPECTRALE UV-VIS DU COMPOSE CP 4 (CPA 91)	226
TABLEAU IV.2.5 : DONNEES DE RMN (CD3OD) DU COMPOSE CP4 (CPA 91), CIRSILIOLE	230
TABLEAU IV.2.6 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE CP 5(CPA59), HISPIDULINE	236
TABLEAU IV.2.7 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE CP6, HISPIDULINE 7-O-B-D- GLUCURONOPYRANOSIDE.....	243
TABLEAU IV.2.8 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE CP7, APIGENINE 7-O-B-D-	250
TABLEAU IV.2.9 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE CP8 , APIGENINE 7-O-B-D-(6''- METHYLGLUCURONOPYRANOSIDE).....	255
TABLEAU IV.2.10 : DONNEES RMN (MeOH-D4) DU COMPOSE CP9, ACIDE 5-O-CAFEOYLQUINIQUE OU ACIDE CHLOROGENIQUE.....	266
TABLEAU V.1: TENEURS EN POLYPHÉNOLS TOTAUX DES EXTRAITS DE S. CHAMAECYPARISSUS.....	274
TABLEAU V.2: RÉSULTATS DES ACTIVITÉS ANTIRADICALAIRES : TESTS DPPH ET TEAC DES EXTRAITS CHCL3 ET N- BUOH DE S. CHAMAECYPARISSU.....	275
TABLEAU V.3 : LES QUATRE SOUCHES UTILISÉES POUR LE TEST ANTIBACTÉRIEN...276	
TABLEAU V.4: ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES COMPOSÉS 1 À 9, SUR LES SOUCHES TESTÉES (ZONES D'INHIBITION EN MM).....	278
TABLEAU V.5 : CONCENTRATION MINIMALE D'INHIBITION (CMI, □G/ML) DES COMPOSÉS 1 À 9 ISOLÉS DE C. PUNGENS.....	279

Liste des figures

FIGURE I.1 : DIFFERENTES FORMES DES FLEURS DES ASTERACEAE.....	4
FIGURE I.2 : QUELQUES EXEMPLES SUR LES TYPES DE FRUITS DE LA FAMILLE ASTERACEAE.	4
FIGURE I.3: LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 145-148	19
FIGURE I.4: LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 152A-152F	20
FIGURE I.5 : LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 153A -153L.....	20
FIGURE I.6:LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 154A-154F	20
FIGURE I.7: LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 155A-155T	21
FIGURE I.8: LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 156A-156G	21
FIGURE I. 9: LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 157-162	22
FIGURE I.10: STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE 172A-172F.....	23
FIGURE I. 11 : STRUCTURES DES FLAVONOÏDES DE173A-173K	23
FIGURE I. 12 : STRUCTURES DES DERIVES DE L'APIGENINE 1-4	24
FIGURE I. 13 : STRUCTURES DES DERIVES DE LA LUTEOLINE 5-7	24
FIGURE I. 14 : STRUCTURE DE LA NEPETINE	24
FIGURE I.15 : SQUELETTE DE BASE D'UN GERMACRANOLIDE FERME EN C-6	25
FIGURE I.16 : SQUELETTE DE BASE D'UN GUAIANOLIDE FERME EN C-6	30
FIGURE I.17: SQUELETTE DE BASE D'UN ELEMNOLIDE	34
FIGURE I.18 : SQUELETTE DE BASE D'UN EUDESMANOLIDE.....	35
FIGURE I.19 : LES STRUCTURES DES LACTONES SESQUITERPENIQUES DE 1 A 6.....	37
FIGURE I.20 : LES STRUCTURES DES LACTONES SESQUITERPENIQUES DE 16 A 26	38
FIGURE I.20 : LES STRUCTURES DES LACTONES SESQUITERPENIQUES DE 16 A 26	39
FIGURE II.1: EXEMPLE DE FORMES COMBINEES DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES.....	62
FIGURE II.2: FORMATION DES ACIDES PHENOLIQUES PAR LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE	63
FIGURE II.3: STRUCTURE DES FLAVONOÏDES : ENCHAINEMENT C6-C3-C6	65
FIGURE II.4: LES DIFFERENTS CLASSES ET SOUS CLASSES DE FLAVONOÏDES.....	65
FIGURE II.5: SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES	67
FIGURE II.6: SCHEMA DE FORMATION DU SQUELETTE C6-C3-C6.....	68
FIGURE II.7: ISOMERISATION STEREOSPECIFIQUE DE L'ACHALCONE EN (2S)-FLAVANONE.....	69
FIGURE II.8: OXYDATION ENZYMATIQUE D'UNE FLAVANONE EN FLAVONE	69
FIGURE II.9: 3-HYDROXYLATION D'UNE FLAVANONE EN DIHYDROFLAVONOL	70
FIGURE II.10: SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES	74
FIGURE II.10: PRINCIPAUX SQUELETTES DE LACTONES SESQUITERPENIQUES VIA UN GERMACRANOLIDE	82
FIGURE II.11: CONDENSATIONS TETE A QUEUE DES UNITES EN C5.....	83
FIGURE II.12 : BIOSYNTHESE DES GERMACRANOLIDES A PARTIR D'UNITES ACETATES VIA L'ACIDE MEVALONIQUE	84
FIGURE II.13: DIFFERENTES VOIES DE BIOGENESE DU CYCLE γ -LACTONIQUE.....	85
FIGURE II.14: FORMATION DES EREMOPILANOLIDES	85
FIGURE III.1 : FIGURE 1 ASPECT MORPHOLOGIQUE DE SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS.....	92
FIGURE III.2 : FIGURE 2 ORGANIGRAMME RECAPITULATIF DES ETAPES D'EXTRACTION DE S.CHAMAECYPARISSUS.....	93
FIGURE III.3 : FIGURE 3 PHOTOS DE CENTAUREA PUNGENS	103

FIGURE III. 4 : FIGURE 4 PROTOCOLE D'EXTRACTION DES FLEURS DE L'ESPECE CENTAUREA PUNGENS	105
.....	
FIGURE III. 5 : FIGURE 5 SCHEMA D'EXTRACTION DES FEUILLES ET TIGES DE CENTAURE APUNGENS	106
.....	
FIGURE IV.1.1: SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE DU COMPOSE SCH 1 (SC 11).....	116
FIGURE IV.1.2: SPECTRE RMN ¹ H (400 MHZ, DMSO-D ₆) DU COMPOSE SCH 1 (SC 11).....	117
FIGURE IV.1.2.1: SPECTRE RMN ¹ H (400 MHZ, DMSO-D ₆) DU COMPOSE SCH 1,	
ETALEMENT 1.....	118
FIGURE IV.1.2.2: SPECTRE RMN ¹ H (400 MHZ, DMSO-D ₆) DU COMPOSE SCH 1,	
ETALEMENT 2.....	118
FIGURE IV.1.2.3 : SPECTRE RMN ¹ H (400 MHZ, DMSO-D ₆) DU COMPOSE SCH 1,	
ETALEMENT 3.....	119
FIGURE IV.1.5: STRUCTURE DU COMPOSE SCH1 (SC 11), EUPATILINE.....	119
FIGURE IV.1.3 : SPECTRE HSQC (DMSO-D ₆ , 400MHZ) DU COMPOSE SCH 1 (SC 11).....	120
FIGURE IV.1.5 : SPECTRE HMBC (DMSO-D ₆ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 1 (SC 11).....	121
FIGURE IV.1.6.1: SPECTRE JMOD (DMSO-D ₆ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH1 (SC 11),	
ETALEMENT	122
FIGURE IV.1.6.2:SPECTRE JMOD (DMSO-D ₆ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH 1 (SC 11),	
ETALEMENT 2.....	122
.....	
FIGURE IV.1.6.3 : SPECTRE JMOD (DMSO-D ₆ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH 1,	
ETALEMENT 3.....	123
FIGURE IV.1.7 : SPECTRE RMN ¹ H (CDCL ₃ ,400 MHZ) DU COMPOSE SCH 2 (SC	
14).....	125
FIGURE IV.1.7.1: SPECTRE RMN ¹ H (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 2 (SC 14)	
ETALEMENT 1	//.....126
FIGURE IV.1.8: SPECTRE HSQC (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH2.....	126
FIGURE IV.1.9: STRUCTURE DU COMPOSE SCH 2, CIRSIMARITINE.....	127
FIGURE IV.1.10: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH2 (SC14).....	128
FIGURE IV.1.10.1 : SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE SCH2,	
ETALEMENT.....	129
FIGURE IV.1.1: SPECTRE JMOD (CDCL ₃ +CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 2.....	129
FIGURE IV.1.12 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3.....	131
FIGURE IV.1.12.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3,	
ETALEMENT 1.....	131
FIGURE IV.1.12.2: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3,	
ETALEMENT 2.....	132
FIGURE IV.1.13: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3.....	133
FIGURE IV.1.14: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3.....	134
FIGURE IV.1.15 : STRUCTURE DU COMPOSE SCH 3, CIRSIMARITINE 5-METHYL	
ETHER.....	135
FIGURE IV.1.16: STRUCTURE DU COMPOSE EN MELANGE AVEC LE COMPOSE SCH	
3,CIRSILIOL.....	136
FIGURE IV.1.12.3: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3,	
ETALEMENT 3.....	137
FIGURE IV.1.12.4 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 3,	
ETALEMENT 4	137
FIGURE IV.1.17 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE SCH 4.....	138

FIGURE IV.1.20 : ENTITE 1 PRESENTE DANS LA MOLECULE SCH 4.....	139
FIGURE IV.1.21: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE SCH 4.....	140
FIGURE IV.1.18: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE SCH 4.....	140
FIGURE IV.1.19: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE SCH 4.....	141
FIGURE IV.1.20: STRUCTURE DU COMPOSE SCH 4, 1,3-PROPANEDIOL, 2-AMINO 1- (4- HYDROXY-3-METHOXYPHENYL).....	141
FIGURE IV.1.21: DONNEES DE LA SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE DU COMPOSE SCH 5.....	144
FIGURE IV.1.22 :SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE SCH 5.....	145
FIGURE IV.1.22.1 : SPECTRE RMN ¹ H (DMSO- <i>D</i> ₆ , 400 MHZ) ETALE DU COMPOSE SCH	145
FIGURE IV.1.23: SPECTRE HSQC (DMSO- <i>D</i> ₆ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 5.....	146
FIGURE IV.1.24: STRUCTURE DU COMPOSE SCH5 ; LUTEOLINE.....	146
FIGURE IV.1.25: SPECTRE RMN ¹ H (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 13	148
FIGURE IV.1.26: SPECTRE RMN ¹³ C (CDCL ₃ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH 13.....	149
FIGURE IV.1.26.1: SPECTRE RMN ¹³ C (CDCL ₃ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH13, ETALEMENT 1.....	149
FIGURE IV.1.26.2: SPECTRE RMN ¹³ C (CDCL ₃ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH 13, ETALEMENT 2.....	150
FIGURE IV.1.27: SPECTRE DEPT 135° (CDCL ₃ , 100 MHZ) DU COMPOSE SCH 13.....	150
FIGURE IV.1.28: SPECTRE HSQC (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 13.....	152
FIGURE IV.1.29: SPECTRE COSY (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 13.....	152
FIGURE IV.1.30: SPECTRE HMBC (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH 13.....	152
FIGURE IV.1.30.1: SPECTRE HMBC (CDCL ₃ , 400 MHZ) DU COMPOSE SCH13, ETALEMENT.....	153
FIGURE IV.1.31: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE SCH 13.....	153
FIGURE IV.1.32: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE SCH 13, 6'- <i>O</i> -ACETYLPRUNAZINE OU PRUNAZINE 6'- <i>O</i> -ACETATE	154
FIGURE IV.1.33: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD,500 MHZ) DU COMPOSE SCH 6.....	155
FIGURE IV.1.33.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD,500 MHZ) DU COMPOSE SCH 6, ETALEMENT 1....	155
FIGURE IV.1.33.2 : SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 6; ETALEMENT 2.....	156
FIGURE IV.1.34: SPECTRE HSQC (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500 MHZ) DU COMPOSE SCH 6.....	156
FIGURE IV.1.35: SPECTRE COSY (500 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH 6.....	158
FIGURE IV.1.36: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE SCH 6.....	159
FIGURE IV.1.37: SPECTRE HMBC (600 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH 6.....	159
FIGURE IV.1.38: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE SCH 6, PRUNASINE.....	160
FIGURE IV.1.40 : STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE SCH 7	161
FIGURE IV.1.39:SPECTRE RMN ¹ H (600 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH 7.....	162
FIGURE IV.1.41: SPECTRE HSQC (600 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH 7.....	163
FIGURE IV.1.42: SPECTRE HMBC (600 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE SCH 7.....	164
FIGURE IV.1.43. : STRUCTURE DU COMPOSE SCH 7, LUTEOLINE 7- <i>O</i> - β - GLUCOPYRANOSYLE.....	165
FIGURE IV.1.46: ENTITE 1 PRESENTE DANS LE COMPOSE SCH8.....	167
FIGURE IV.1.44: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500MHZ) DU COMPOSE SCH8.....	167
FIGURE IV.1.44.1 : SPECTRE RMN- ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500MHZ) DU COMPOSE SCH8, ETALEMENT 1.....	167

FIGURE IV.1.44.2: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500MHZ) DU COMPOSE SCH 8, ETALEMENT 2	168
FIGURE VI.1.45 : SPECTRE HSQC (MEOH- <i>D</i> ₄ , 500MHZ) DU COMPOSE SCH 8.....	169
FIGURE IV.1.47: SPECTRE HMBC DU (CD ₃ OD, 500MHZ) DU COMPOSE SCH 8.....	170
FIGURE IV.1. 48: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE SCH 8,SYRINGOSIDE.....	171
FIGURE IV.1.49: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE SCH 9.....	172
FIGURE IV.1.49.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600MHZ), DU COMPOSE SCH 9 ETALEMENT1	173
FIGURE IV.1.50: SPECTRE COSY (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE SCH 9.....	174
FIGURE IV.I.51 : ENTITE 1 PRESENTE DANS LE COMPOSE SCH 9.....	174
FIGURE IV.1.54: ENTITE 2 PRESENTE DANS LE COMPOSE SCH 9.....	175
FIGURE IV.52: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE SCH 9.....	175
FIGURE IV.1.53: SPECTRE HMBC (DMSO- <i>D</i> ₆ , 600MHZ) DU COMPOSE SCH 9.....	176
FIGURE IV.1.55: ENTITE 3 PRESENTE DANS LE COMPOSE SCH 9.....	177
FIGURE IV.1.56: ENTITE 4 PRESENTE DANS LE COMPOSE SCH 9.....	178
FIGURE IV.1.57: STRUCTURE DU COMPOSE SCH 9 (SC-7-191-6), JUNIPEIONOLOSIDE....	179
FIGURE IV.1.61 : ENTITE 1 PRESENTE DANS LA MOLECULE SCH 10.....	182
FIGURE IV.1.62: ENTITE 2 PRESENTE DANS LA MOLECULE SCH 10.....	183
FIGURE IV.1.58: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 600 MHZ) DU COMPOSE SCH 10.....	183
FIGURE IV.1.59: SPECTRE HSQC (MEOH- <i>D</i> ₄ , 600MHZ) DU COMPOSE SCH 10.....	184
FIGURE IV.1.60:SPECTRE HMBC (MEOH- <i>D</i> ₄ , 600MHZ) DU COMPOSE SCH 10.....	184
FIGURE IV.1.63: ENTITE 3 PRESENTE DANS LA MOLECULE SCH 10.....	185
FIGURE IV.1.64 : STRUCTURE PARTIELLE LA MOLECULE SCH 10.....	186
FIGURE IV.1.65 : STRUCTURE FINALE DU COMPOSE SCH 10, CITROSIDE A.....	187
FIGURE IV.1.66: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 250MHZ) DU COMPOSE SCH 11.....	189
FIGURE IV.1.66.1: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 250 MHZ) DU COMPOSE SCH 11, ETALEMENT 1.....	190
FIGURE IV.1.66.2: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 250 MHZ) DU COMPOSE SCH 11, ETALEMENT 2.....	190
FIGURE IV.1.66.3: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 250 MHZ) DU COMPOSE SCH 11, ETALEMENT 3.....	191
FIGURE IV.1.66.4: SPECTRE RMN ¹ H (MEOH- <i>D</i> ₄ , 250 MHZ) DU COMPOSE SCH 11, ETALEMENT 4.....	191
FIGURE IV.1.67:SERIE SPECTRALE UV-VISIBLE DU COMPOSE SCH 11.....	192
FIGURE IV.1.68: STRUCTURE DU COMPOSE SCH 11,LUTEOLINE7- <i>O</i> - <i>B</i> - <i>D</i> - NEOHESPERIDOSIDE.....	193
FIGURE IV.2.1 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1 (MF17).....	196
FIGURE IV.2.1.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, MF17, ETALEMENT 1.....	197
FIGURE IV.2.1.2 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, ETALEMENT 2.....	197
FIGURE IV.2.1.3: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, ETALEMENT 3.....	198
FIGURE IV.2.1.4 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, ETALEMENT 4.....	198
FIGURE IV.2.1.5 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, ETALEMENT 5.....	199
FIGURE V.2.2 : SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, MF17.....	199

FIGURE IV.2.3: SPECTRE COSY (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP1, MF17.....	200
FIGURE IV. 2.4 : SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP1, MF17.....	201
FIGURE IV.2.5 : STRUCTURE PARTIELLE 1 DU COMPOSE CP1.....	202
FIGURE IV.2.6 : STRUCTURE PARTIELLE 2 DU COMPOSE CP1.....	202
FIGURE IV.2.7 : SPECTRE ROESY(400 MHZ, CD ₃ OD) DU COMPOSE CP1.....	205
FIGURE IV.2.8: CONFIGURATION DE LA DOUBLE LIAISON C(4)-C(5) DU COMPOSE CP1.....	205
FIGURE IV.2.9: CONFIGURATIONS DES DOUBLES LIAISONS C(4)-C(5) ET C(1)-C(10) DU COMPOSE CP1.....	206
FIGURE IV 2.10 : STRUCTURE A CE STADE DU COMPOSE CP1	206
FIGURE IV.2.11 : STRUCTURE DU COMPOSE CP1.....	207
FIGURE IV.2.12 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP2 (CPA-363-2) ...	210
FIGURE IV.2.12.1 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP2 (CPA-363-2), ETALEMENT 1.....	210
FIGURE IV.2.12.2 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP2, ETALEMENT 2.....	211
FIGURE IV.2.13: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP2	211
FIGURE IV.2.14 : SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP2.....	212
FIGURE IV.2.15: SPECTRE COSY (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP2.....	213
FIGURE IV.2.16 : SPECTRE ROESY (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP2	215
FIGURE IV.2.17: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE CP2	215
FIGURE IV.2.18 : STRUCTURE FINALE DU COMPOSE CP2, CENTAUREOLIDE B	216
FIGURE IV.2.19: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE CP1, CENTAUREOLIDE A	216
FIGURE IV.2.20: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE CP3, MF9	218
FIGURE IV.2.20.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE CP3, ETALEMENT 1.....	219
FIGURE IV.2.20.2 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE CP3, ETALEMENT 2.....	219
FIGURE IV.2.21: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE CP3	220
FIGURE IV.2.22: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE CP3.....	222
FIGURE IV.2.23 : STRUCTURE DU COMPOSE CP3.....	223
FIGURE IV.2.24: SERIE SPECTRALE EN PRESENCE DE REACTIFS DU COMPOSE CP 4 (CPA 91).....	225
FIGURE IV.2.25: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE CP 4 (CPA 91).....	226
FIGURE IV.2.26 : SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD ,400 MHZ) DU COMPOSE CP 4 ; CPA 91.....	227
FIGURE IV.2.27: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP4,CPA91/.....	228
FIGURE IV.2.28: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE CP4 (CPA 91), CIRSILIOLE.....	228
FIGURE IV.2.29: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD ,400 MHZ) DU COMPOSE CP4, CPA 91.....	230
FIGURE IV.2.30: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP 5 (CPA 59).....	232
FIGURE IV.2.31: SPECTRE DEPT 135 (CD ₃ OD, 100 MHZ) DU COMPOSE CP 5 (CPA 59).....	232
FIGURE IV.2.32: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP 5 (CPA 59).....	233
FIGURE IV.2.33: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP 5 (CPA 59).....	234
FIGURE IV.2.33.1:SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP 5 (CPA 59) ETALEMENT,	235
FIGURE IV.2.34: SPECTRE RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 100MHZ) DU COMPOSE CP 5(CPA59).....	235
FIGURE IV.2.35: STRUCTURE FINALE DU COMPOSE CP5 (CPA59), HISPIDULINE.....	236
FIGURE IV.2.39 : ENTITE O-GLUCURONOPYRANOSYLE	238

FIGURE IV.2.36: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD,600MHZ) DU COMPOSE CP6, MF 13.....	238
FIGURE IV.2.36.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHZ) DU COMPOSE CP6, ETALEMENT 1.....	239
FIGURE IV.2.36.2: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE CP6, ETALEMENT 2	239
FIGURE IV.2.36.3: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD,600MHZ) DU COMPOSE CP6, ETALEMENT 3.....	240
FIGURE IV.37: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE CP6, MF13	241
FIGURE IV.38: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 600MHZ) DU COMPOSE CP6, MF13	242
FIGURE IV.2.40: STRUCTURE DU COMPOSE CP6,HISPIDULINE 7-O-B-D- GLUCURONOPYRANOSIDE	243
FIGURE IV.2.43: SQUELETTE DE L'AGLYCONE DU COMPOSE CP7	245
FIGURE IV.2.41: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD ,400MHZ) DU COMPOSE CP7 (MF1)	246
FIGURE IV.2. 41.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD ,400MHZ) DU COMPOSE CP7 (MF1) ETALEMENT 1	246
FIGURE IV.41.2: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD ,400MHZ) DU COMPOSE CP7 (MF1) ETALEMENT 2.....	247
FIGURE IV.2.44: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP7(MF1).....	248
FIGURE IV.2.44.1: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP7(MF1)), ETALEMENT.....	248
FIGURE IV.2.44.2: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD ,400MHZ) DU COMPOSE CP7(MF1) ETALEMENT 2.....	250
FIGURE IV.2.45: STRUCTURE DU COMPOSE CP7 ; APIGENINE 7-O-B-D- GLUCURONOPYRANOSIDE.....	250
FIGURE IV.2.46: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP8.....	252
FIGURE IV.2.47: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP8.....	253
FIGURE IV.2.48: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP8.....	254
FIGURE IV.2.48.1: SPECTRE HMBC (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP8, ETALEMENT	254
FIGURE IV.2.49 : STRUCTURE DU COMPOSE CP8 :APIGENINE 7-O-B-D-(6''- METHYLGLUCURONOPYRANOSIDE.....	255
FIGURE IV.2.50: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22.....	258
FIGURE IV.2.50.1: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9,MF 22, ETALEMENT 1.....	258
FIGURE IV.2.50.2:SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ)DU COMPOSE CP9, MF 22, ETALEMENT 2.....	259
FIGURE IV.2.50.3: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22, ETALEMENT 3	259
FIGURE IV.2.50.4: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22, ETALEMENT 4	260

FIGURE IV.2.50.5: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22, ETALEMENT 5	260
FIGURE IV.2.51: SPECTRE HSQC (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22.....	261
FIGURE IV.2.53: SPECTRE COSY (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22.....	261
FIGURE IV.2.54:SPECTRE HMBC (CD ₃ OD,400MHZ) DU COMPOSE CP9,MF 22.....	262
FIGURE IV.2.50.3: SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ)DU COMPOSE CP9, MF 22 ETALEMENT 6	263
FIGURE IV.2.50.4:SPECTRE RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHZ) DU COMPOSE CP9, MF 22, ETALEMENT 7	264
FIGURE IV.2.55: STRUCTURE PARTIELLE DU COMPOSE CP9.....	265
FIGURE IV.2.55: STRUCTURE DU COMPOSE CP9 : ACIDE 5-O-CAFEOYLQUINIQUE OU ACIDE CHLOROGENIQUE	265
FIGURE V.1: REACTION D'UN ANTIOXYDANT AVEC LE RADICAL DPPH.....	272

Introduction générale

Le genre humain s'est aperçu depuis toujours du pouvoir des plantes ; bénéfiques ou maléfiques, il a dès lors commencé l'élaboration de bases théoriques et de pratiques thérapeutiques en puisant aux modèles naturels et biologiques et en utilisant les immenses ressources de la nature pour soulager la souffrance. Les plus anciens écrits, entre autres chinois, indou, égyptien, grec, inca, l'évoquent abondamment. C'est à la médecine arabe que l'on doit la conservation et le développement du savoir acquis dans l'antiquité. Ils poursuivirent leurs recherches en médecine, en traduisant les œuvres originales des Grecs en arabe, en ajoutant leurs propres observations et en introduisant de nouvelles drogues à l'usage général. Il convient de nommer dans ce contexte le médecin **Avicenne** (980 – 1037), le « Prince des médecins », auteur de la célèbre encyclopédie *Canon de la médecine*, irremplaçable jusqu'au XVII^e siècle.

L'Algérie, pays très riche dans sa biodiversité florale compte plus de 3000 espèces dont 13% endémiques et appartenant à divers familles botaniques. Ce nombre important de plantes médicinales, toxiques ou non, est une source inépuisable pour la recherche de métabolites secondaires.

Dans ce contexte, notre choix s'est porté sur deux plantes, la première, *Santolina chamaecyparissus*, appartenant à la famille des Asteraceae. Les études phytochimiques effectuées auparavant sur cette espèce ont permis d'isoler des composés phénoliques, des flavonoïdes, des lactones sesquiterpéniques et des terpénoïdes. Cette plante est connue pour ses vertus emménagogue, stimulante, tonique, antispasmodique, vermifuge, et stomachique. Elle est aussi connue pour ses huiles essentielles qui sont actuellement employées en industries pharmaceutique et cosmétique. Une seule investigation phytochimique a été réalisée au sein de notre laboratoire sur cette espèce, ce qui nous a encouragés à poursuivre son étude. La seconde, *Centaurea pungens* appartient également à la famille Asteraceae. Les études chimiques effectuées sur des espèces de ce genre ont montré leur richesse en lactones sesquiterpéniques, triterpènes, stéroïdes et flavonoïdes. Des études de recherche d'activités biologiques d'espèces de ce genre ont révélé des activités antidiabétiques, diurétiques, antirhumatismales, antifongiques, anticancéreuses et cytotoxiques. Plusieurs espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle.

Les investigations phytochimiques d'espèces du genre *Centaurea* effectuées dans notre laboratoire ont également montré leur richesse en métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques. Les critères de choix de cette espèce reposent

essentiellement sur son endémisme et sur le fait que très peu d'études ont été effectuées sur cette plante.

Nos travaux sur les deux espèces sélectionnées vont être répartis comme suit :

- Le premier chapitre regroupe une synthèse bibliographique sur la famille des Asteraceae et les principaux métabolites secondaires isolés des deux genres étudiés ainsi que les différents squelettes des flavonoïdes et des lactones sesquiterpéniques.
- Le deuxième chapitre est consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes et lactones sesquiterpéniques), les différents squelettes flavoniques leur biogenèse leur intérêt thérapeutique. On reporte également des démarches et méthodes nécessaires à leur séparation, leur purification et l'établissement de leur structure.
- Le troisième chapitre rassemble le travail expérimental effectué au cours de ces études.
- Le quatrième chapitre reporte les résultats obtenus ainsi que les interprétations structurales des différents composés isolés. Les déterminations structurales ont été réalisées en utilisant diverses expériences de résonance magnétique nucléaire (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, ROESY) ainsi que la spectrophotométrie UV-Vis.
- Le cinquième chapitre regroupe les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante, la teneur en polyphénol totaux des extraits étudiés et l'activité antibactérienne des produits isolés de *Centaurea pungens*.

Ces travaux sont terminés par une conclusion générale.

I.1 La famille des Astéracées

I.1.1 Généralités

Les Asteraceae (Martynov1820) appelée aussi composées ou Compositae (Giseke 1792) peuvent se rencontrer sur toute la surface du globe à l'exception de l'Antarctique. Néanmoins, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le bassin méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique, le Sud-ouest des Etats-Unis et les régions arides d'Amérique du Sud [1].

La famille des Astéracées est la plus vaste famille de Phanérogames, avec 1 530 genres et plus de 23 000 espèces. C'est l'une des plus importantes des angiospermes. On les trouve sous forme d'herbes, d'arbustes et même d'arbres. L'Algérie compte 109 genres et 408 espèces [2].

Les principaux genres sont *Senecio*, avec 1 500 espèces, *Vernonia*, avec 1 000 espèces, *Centaurea*, avec 700 espèces, *Cousinia*, avec 600 espèces, *Eupatorium*, avec 600 espèces, *Hieracium*, avec 500 espèces, *Helichrysum*, avec 500 espèces, *Artemisia*, avec 400 espèces, *Baccharis*, avec 400 espèces, *Saussurea*, avec 400 espèces, *Mikania* avec 300 espèces, *Cirsium*, avec 270 espèces, *Aster*, avec 250 espèces, *Jurinea*, avec 250 espèces, *Bidens*, avec 200 espèces...[3].

I.1.2 Caractère botanique

Les Asteraceae sont principalement des herbes, mais on peut rencontrer aussi quelques espèces ligneuses : lianes, arbustes et même arbres comme *Lachanodes arborea* [4]. Il est généralement facile de les distinguer des autres plantes, principalement en raison de leur inflorescence caractéristique et d'autres caractéristiques communes [5]. Cependant, la détermination des genres et des espèces de certains groupes tels que *Hieracium* est particulièrement difficile.

❖ Les feuilles

Les feuilles, toujours sont stipules, sont le plus souvent alternées mais parfois opposées (*Arnica*), verticillées, ou regroupées en rosette (*Bellis*, *Taraxacum*). Ces feuilles sont souvent simples, profondément découpées. Dans les pays tropicaux, elles peuvent devenir succulentes ou au contraire se réduire à des écailles [3]. Elles contiennent très souvent des canaux sécréteurs avec de la résine ou du latex, particulièrement commun chez les *Cichorioidea*.

❖ **Les fleurs**

Des fleurs particulières, elles sont réunies en capitules, c'est à dire serrées les unes aux autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre.



Figure I.1 : Différentes formes des fleurs des Asteraceae.

❖ **Les fruits:**

Le fruit est une Akène, surmonté ou non d'un pappus qui favorise la dispersion des graines par le vent quelques fois ailé ou épineux. La graine est souvent sans Albumen.



Laitue vivace (*Lactuca perennis*)

Figure I.2 : Quelques exemples sur les types de fruits de la famille Asteraceae.



Centauree des collines
(*Centaurea collina*)

Figure I.2 Suite: Quelques exemples sur les types de fruits de la famille Asteraceae.

I.1.3 Classification et position systématique

Les Composées, le nom original des Asteraceae, a été décrit pour la première fois en 1792 par le botaniste allemand Paul Dietrich Giseke [6]. Originellement, deux sous-familles ont été reconnues: Asteroideae (ou Tubuliflorae) et Cichorioideae (ou Liguliflorae). Néanmoins, il a été démontré que la deuxième sous-famille est largement paraphylétique et est maintenant divisée en 12 sous-familles, alors que la première est toujours en vigueur.

Bert et Hooker (1873) placent la famille sous les Gamopetalae juste après les Rubiales. Hutchinson n'a pas traité la famille comme la dernière à évoluer et a mis les Asterales sous la 6^{ème} série bien avant la dernière série Laminales; mais il l'a placé près des Rubiaceae.

Dalgreu classe la famille des astéracées dans le super ordre des Asteriflorae et dans l'ordre des astrales. Thorne a élaboré une classification selon laquelle les Asteraceae se trouvent dans le super-ordre des Asteranae et l'ordre des Astrales [7].

I.1.3.1 Classification selon l'APG IV

Tableau I.1 : Classification de la famille Asteraceae selon l'APG IV. [8]

Clade	Angiospermes
Clade	Superastéridées
Clade	Astéridées
Clade	Campanulidées
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

I.1.3.2 Classification de Cronquist

Tableau I.2 : Classification de la famille Asteraceae selon Cronquist [9]

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

I.1.3.3 Classification interne

Les Asteraceae sont subdivisées actuellement en 3 sous-familles: Barnadesioidea, elle comprend 9 genres et 92 espèces. Cichorioideae est un ensemble paraphylétique qui englobe 392 genres et 6 650 espèces. Répartis en 6 tribus dont l'une Cardueae, comprend la Centaureinae. Asteroideae, monophylétique rassemble 1 119 genres et 16 000 espèces distribués en 10 tribus dont l'une est l'Anthemideae. Anthemideae est répartie en 108 genres avec le genre *Santoline* appartenant à la sous-tribu Achilleinae [3].

I.1.4 Distribution géographique de la famille

Les espèces des Asteraceae ont une distribution cosmopolite, et sont retrouvées à travers le monde, à l'exception de l'Antarctique et de l'extrême Arctique. Elles sont particulièrement nombreuses dans les régions tropicales et subtropicales, notamment l'Amérique centrale, l'est du Brésil, la Méditerranée, une partie du Moyen-Orient, l'Afrique australe, l'Asie centrale et le sud-ouest de la Chine [1]. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées.

I.1.5 Importance économique et utilisation

Les plantes d'importance commerciale de la famille Asteraceae comprennent les plantes alimentaires : *Lactuca sativa* (laitue), *Cichorium* (chicorée), *Cynara scolymus* (artichaut), *Helianthus annuus* (tournesol), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Carthamus tinctorius* (carthame) et *Helianthus tuberosus* (artichaut de Jérusalem). Des plantes utilisées comme herbes et dans les tisanes et autres boissons : la camomille, par exemple, provient de deux espèces différentes: la *Matricaria chamomilla* annuelle (camomille allemande) et la *Chamaemelum nobile* (camomille romaine), le *Calendula*, connu sous le nom de Pot Marigold,

est cultivé commercialement pour les tisanes et pot-pourri. L'échinacée est utilisée comme thé médicinal. Le genre d'absinthe *Artemisia* comprend l'absinthe (*A. absinthium*) et l'estragon (*A. dracuncululus*). L'estragon d'hiver (*Tagetes lucida*) est couramment cultivé et utilisé comme substitut à l'estragon dans les climats où l'estragon ne survivrait pas.

Beaucoup de membres de la famille sont cultivés comme plantes ornementales pour leurs fleurs, et certains sont des cultures ornementales importantes pour l'industrie de fleur coupée. Quelques exemples sont : *Chrysanthemum*, *Gerbera*, *Calendula*, *Dendranthema*, *Argyranthemum*, *Dahlia*, *Tagetes*, *Zinnia*, et beaucoup d'autres [10].

De nombreuses espèces de cette famille possèdent des propriétés médicinales et sont utilisées comme médecine antiparasitaire traditionnelle [11].

Les Asteraceae sont également utilisées à des fins industrielles. Marigold (*Tagetes patula*) est retrouvé dans les aliments pour volailles et son huile est extraite pour des usages dans le Cola et l'industrie de la cigarette [12].

Plusieurs espèces de la famille sont des producteurs de nectar abondants [12] et sont utiles pour évaluer les populations de pollinisateurs pendant leur floraison. *Centaurea* (centaurée), *Helianthus annuus* (tournesol domestique), et certaines espèces de *Solidago* (verge d'or) sont de très importantes plantes mellifères "Honey plants" utilisés par les abeilles pendant l'hiver.

I.2 Le genre *Santolina*

I.2.1 Généralités

Le genre *Santolina* comprend 18 espèces méditerranéennes. Les espèces les plus répandues sont *Santolina veridis* W. se trouvant dans le sud de la France et le nord de l'Espagne *Santolina pectinata* se trouve dans la péninsule ibérique et *Santolina chamaecyparissus*, commune dans le bassin méditerranéen [13].

Il renferme des sous-arbrisseaux de petite taille, ligneux et rustique ; le feuillage est alterné, très finement penné, à hélice foliaire mince ; les capitules en boule, jaunes, crèmes ou blancs, longuement pédicellés, sont composés de petites fleurs tubulaires [14].

Ce genre présente des plantes ornementales [15]. Plusieurs espèces ont été utilisées en médecine traditionnelle [16]. D'autres sont utilisées aussi, dans la tradition populaire, comme insecticides car leur feuillage aromatique éloigne les insectes. Les huiles essentielles extraites du genre *Santolina* sont utilisées dans la fabrication des parfums [15, 17].

I.2.2 Composition chimique

Le genre *Santolina* est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région méditerranéenne. Plusieurs espèces ont été investiguées phytochimiquement et un nombre de composés acétyléniques [18], d'huiles essentielles [19], de coumarines [20] et de flavonoïdes [21] ont été identifiés. Il paraît que les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont des sesquiterpènes de type eudesmane, de type germacrane et de type farnesane [22, 23]; des triterpènes de type dammarane [21], des hétérocycles acétylés [24] et des acétylènes de type éther spiroketalenol [23, 24]. Les monoterpènes fréquemment rencontrés dans les huiles de Santoline sont : artemisia cétone qui représente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool et parfois le lavandulol [19,20]. Des flavones comme l'apigénine, la lutéoline ainsi que leurs glucosides (glucoronides et rhamnoglucosides), des flavanes méthoxylées comme la pectolinarininginine, l'hispiduline, la népétine et la jacéosidine et des flavonols glycosylés en position 7 (7-O-glucosyl) ont été aussi isolés à partir de *S. chamaecyparissus* [21].

I.2.3 Usages traditionnels

Les espèces du genre *Santolina* sont largement utilisées en médecine populaire grâce à leurs propriétés antispasmodiques, analgésiques, désinfectantes, anti-inflammatoires, bactéricides et fongicides [25]. En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuge pour les enfants et pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les douleurs menstruelles [26, 27]. L'infusion de la santoline a aussi une action insectifuge sur les pucerons, les acariens et les chenilles. La poudre de la santoline quant à elle, est utilisée pour soulager les douleurs liées aux piqûres des insectes. Quand elle est appliquée sur les plaies, elle accélère la cicatrisation [28, 29]. La santoline est largement utilisée dans les cas de maux de ventre, dépurative, tranquillisante et digestive pour les moutons [30].

I.2.4 Propriétés biologiques de *S. chamaecyparissus*

La plante *S. chamaecyparissus* est très prisée en phytothérapie notamment grâce à son importante teneur en composés bioactives qui lui donnent des propriétés médicinales non négligeables [26]. Les extraits de cette plante ont produit une réduction significative de l'activité spontanée chez les souris et ont montré un effet analgésique. Ils ont inhibé les contractions induites par différents agonistes incluant l'histamine et la sérotonine chez le

muscle lisse isolé, comme ils ont induit des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'œdème de la patte induit par le carraghénane. Par ailleurs, la plante s'est révélée une bonne source de composés inhibiteurs de l'activité de la phospholipase A₂ aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [19]. La santoline est aussi utilisée en phytothérapie pour traiter les différents types de dermatites [26]. Par ailleurs, son huile essentielle possède des propriétés antifongiques [31] et est utilisée en parfumerie et en cosmétique.

I.2.5 Etudes chimiques antérieures

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Santolina*, a montré qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Ce qui a permis d'isoler un grand nombre de substances connues pour leurs diverses activités biologiques, dont les plus majoritaires sont entre autres, des composés acycliques oxygénés, des sesquiterpènes de types eudesmane [20], germacrane [20, 32], des flavonoïdes, des acétylènes hétérocycliques, des triterpènes de type dammarane, et des coumarines [20].

Ces études ont montré aussi une présence importante d'huiles essentielles [33]; composés naturels, volatils et complexes, caractérisés par une forte odeur et formés par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Elles comprennent deux groupes de différentes origines : le premier est le groupe des terpènes et terpénoïdes, l'autre est le groupe des composés aromatiques et aliphatiques de faibles masses moléculaires [34]. Elles sont utilisées depuis longtemps comme bactéricide, virucide, fongicide, antiparasite, insecticide et aussi dans les applications médicinales et cosmétiques. Aujourd'hui, elles sont employées en industrie pharmaceutique, sanitaire, cosmétique et agricole [35].

Les espèces *S. chamaecyparissus*, *S. oblongifolia*, *S. ligustica*, *S. rosmarinifolia* L. et *S. canescens*, sont riches en huiles, ces dernières sont constituées principalement de monoterpènes, sesquiterpènes et de composés acétyléniques [13,33].

I.3 Le genre *Centaurea*

I.3.1 Introduction

Appartenant à la famille des astéracées, le genre *Centaurea* compte environ 700 espèces et 600 sous-espèces [36]. Il est répandu aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe méridionale, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et sur le continent américain [37]. En Algérie, le genre *Centaurea* est très présent avec 45 espèces qui sont décrites à travers le territoire [2].

Les investigations phytochimiques réalisées sur ce genre, montrent que les centaurées sont très riches en métabolites secondaires notamment les lactones sesquiterpéniques [38], les flavonoïdes [39], les composés acétyléniques [40], les alcaloïdes [41] et les stéroïdes [42]. La plupart des lactones sesquiterpéniques isolées de genre *Centaurea* sont de type germacranolide, guaianolide, élémanolide, eudesmanolide et hélangolide. Les germacranolides et les guaianolides sont les composés les plus abondants dans ce genre [43].

I.3.2 Description du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitules multiflores homomorphes ou dimorphes, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, multiflores homomorphes ou dimorphes, celle de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Le plus souvent, leur couleur varie entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou subplan est garni de soies abondantes.

Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque [2]. Les centaurées sont des plantes à résine ou à essence sans latex, elles se multiplient par touffes ou par semis, généralement au printemps. Elles se rencontrent sur différents types d'habitats tels que, les déserts et les semi-déserts, les pentes raides, les hautes montagnes, les terres arables, les zones à inondations périodiques, les zones sèches et partiellement exposées au soleil [44].

I.3.3 Propriétés pharmacologiques et biologiques

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont utilisées dans la médecine populaire pour soigner certaines maladies comme le diabète, les rhumatismes, la malaria, l'hypertension... [45]. Dans la médecine traditionnelle turque des variétés d'espèces du genre *Centaurea* sont utilisées pour soulager la douleur et l'inflammation, les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, la fièvre et les maux de tête [46].

Les utilisations des espèces du genre *Centaurea* ont été confirmées par des études scientifiques qui ont mis en évidence diverses propriétés biologiques telles que antipelluculaire, anti-diarrhéique, antirhumatisme, anti-inflammatoire, cholérétique, diurétique, digestive, stomacique, astringente, antipyrétique, cytotoxique et antibactérienne [47]. Par exemple, les fleurs de *C. Cyanus* sont connues en Europe pour leur utilisation dans la médecine traditionnelle pour traiter les petites inflammations oculaires et comme diurétique, agent cholagogue, antimicrobien, anti-inflammatoire et immunologique [48,49]. Les fleurs de *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* sont utilisées en Turquie pour traiter les ulcères peptiques, l'ulcère gastroduodéal, le paludisme, les rhumes, les maux d'estomac, les douleurs abdominales et les infections herpétiques autour des lèvres [50,51]. Beaucoup d'autres espèces du même genre sont très utilisées dans le domaine de la médecine traditionnelle. Les espèces *C. cyanus* et *C. scabiosa* sont utilisées contre la toux, les démangeaisons et en tant que remèdes ophtalmiques [52]. En outre, les espèces *C. calcitrapa*, *C. melitensis* et *C. solstitialis* sont utilisées pour leurs effets hypoglycémiantes tandis que les espèces *C. calcitrapa*, *C. iberica* et *C. Jacea* sont utilisées pour leur activité antipyrétique [53]. L'évaluation comparative des extraits méthanoliques de cinq espèces turques du genre *Centaurea* (*C. kurdica*, *C. rigida*, *C. amanicola*, *C. cheirolopha* et *C. ptosimopappoides*) a montré des activités antioxydantes diverses et que l'espèce *C. cheirolopha* est la plus active [54]. Dans une autre étude sur plusieurs espèces de centaurees, il a été montré que l'espèce *C. diffusa* a une activité antimicrobienne [55] et que les autres espèces sont utilisées pour traiter la fièvre, le diabète et comme diurétique [56]. Les parties aériennes avec ou sans fleurs de certaines espèces du genre *Centaurea* sont utilisées dans la médecine turque pour atténuer un large éventail de symptômes. Par exemple, les fleurs de *C. iberica* Trev. ex Sprengel et *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* et les parties aériennes de *C. virgata* Lam. sont utilisées contre les maux d'estomac [46]. Parmi les effets biologiques exercés par les espèces du genre *Centaurea*, il a été noté que plusieurs espèces ont été particulièrement recommandées contre les cas inflammatoires tels que les abcès et contre l'asthme (*C. iberica* Trev. Ex Sprengel), les hémorroïdes (*C. drachifolia* Sm.), la cicatrisation des plaies (*C. iberica* Trev. Ex Sprengel, *C.*

virgata Lam., *C. pterocaula* Trautv.), pour réduire la fièvre (*C. calcitrapa* L., *C. iberica* Trev. ex Sprengel, *C. jacea* L., *C. solstitialis* ssp. *solstitialis*) et les maux de tête (*C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis*) [46]. Un large éventail d'effets thérapeutiques ont également été attribués à des espèces de ce genre dans les médecines traditionnelles à travers le monde, y compris, les maladies endocriniennes (diabète), les troubles inflammatoires (douleurs rhumatismales, antipyrétique), les symptômes gastro-intestinaux (diarrhée, les indigestions et stomachique), les affections urogénitales (diurétique, pour induire les menstruations), les problèmes cardiovasculaires (hypotension), parasitaires et les infections microbiennes (antibactérienne, antipaludique) [46]. Dans la médecine traditionnelle chinoise, *C. uniflora* a été utilisée contre la fièvre et pour la désintoxication. L'extrait acétate d'éthyle de cette espèce inhibe la peroxydation lipidique membranaire et a montré un effet anti-athérosclérotique. L'extrait aqueux de *C. Chilensis* a été utilisé pour réduire la fièvre et les douleurs rhumatismales. *C. ornata* est également utilisée contre les douleurs rhumatismales et *C. sinaica* est utilisée pour réduire la fièvre. Les thés préparés à partir des parties aériennes de différentes centaurees telles que *C. ornata*, *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima* et *C. melitensis* sont également utilisées comme hypoglycémiant. En raison de la saveur amère, les centaurees sont également utilisées comme tonique digestif ou stomachique comme *C. melitensis* et *C. pallascens*. *C. melitensis*, *C. pallascens* et *C. sinaica* sont également utilisées comme diurétique. En Espagne, les parties aériennes de *C. ornata* sont utilisées comme dépuratif et cholagogue, tandis que les racines sont utilisées comme antispasmodique, cytostatique, diurétique, antipaludique, astringent, antinéoplasique, allergène, stomachique, quant à *C. sinaica* on lui attribue des propriétés tonique et emménagogue [46].

I.4 Les métabolites secondaires les plus courants des genres *Santolina* et *Centaurea*

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les genres *Santolina* et *Centaurea*, les études antérieures sur ces espèces reportent l'isolement de composés acétyléniques, de flavonoïdes et de lactones sesquiterpéniques ainsi que des études d'huiles essentielles.

I.4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très répandus dans les genres *Santolina* et *Centaurea*.

❖ **Les flavonoïdes du genre *Centaurea***

Les flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* sont nombreux et présentent une diversité structurale, le tableau I.3 reporte quelques résultats de la littérature.

Tableau I.3 : Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

Centaurées	Flavonoïdes	Structures.	Réf.
<i>C. arbutifolia</i>	Chrysoériol	152b	[57]
	kaempférol 3-methyl ether-7- <i>O</i> -rutinoside	156d	[58]
<i>C. bruguierana</i>	Cirsilinéol	155e	[59]
	Cirsimaritine	153b	
	Hispiduline 7- <i>O</i> -rutinoside	153i	
	Népétine	154a	
	Népétine 7-sulphate	154f	
<i>C. chilensis</i>	Chrysoériol	152b	[60]
	Chrysoériol 7- <i>O</i> -glucoside	152d	
	Taxifoline	159	
	Hispiduline	153a	[60]
	8-Methoxyapigénine	153j	[61]
	Népétine 3',4',7-trimethyl ether	148	[62,63]
<i>C. floccose</i>	Chrysoériol	152b	[64]
	Eriodictyol	167	
	Hispiduline	153a	
	Taxifoline	159	
<i>C. glomerata</i>	Chrysoériol	152b	[64]
	Taxifoline	159	[58]
	Eriodictyol	167	[64]
	Fisétine	164	
	Hespéridine	155f	
	Hispiduline	153a	
	Lutéoline	152a	[57,65]
	Naringénine	161	
	Rutine	157	
	Vitexine	155a	[57]
<i>C. Montana</i>	Chrysoériol 7- <i>O</i> -glucoside	152d	[66]
	Chrysoériol 6- <i>C</i> -glucoside	155r	
	Isoorientine	155k	
	Apigénine 6- <i>C</i> -glucoside	155c	
	Apigénine 6,8-di- <i>C</i> -glucoside	153e	[60]
	Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside	152c	[68]
	Lutéoline 4'- <i>O</i> -arbinoside	155o	[60,69]
	Lutéoline 4'- <i>O</i> -glucoside	155p	[66]
	Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside - <i>O</i> -glucoside	152e	
	Lutéoline 6- <i>C</i> -glucoside	153d	

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

	Vitexine Swertisine	155a 153g	
<i>C. regia</i>	Chrysoériol Vitexine	152b 155a	[70]
	Chrysoériol 6-C-glucoside Apigénine 8-C-glucoside Apigénine 6,8-di-C-glucoside Lutéoline 4'-O-glucoside Lutéoline 7-di-O-glucoside Lutéoline 6-C-glucoside Vitexine	155r 155c 153e 155p 152e 153d 155a	[71]
<i>C. napifolia</i>	Chrysoériol Cirsilinéol Cirsimaritine Hispiduline Hispiduline 7-O-glucoside Népétine 3',4',7-triméthyl ether Rutine	152b 155e 153b 153a 153c 148 157	[72] [73] [72]
<i>C. nicaeensis</i>	Chrysoériol Cirsiliol Hispiduline 7-O-glucoside Isoorientine 7-O-glucoside Apigénine 6,8-di-C-glucoside Patulétine Patulétine 7-O-glucoside Népétine Népétine 3',4',7-triméthyl ether	152b 154d 153c 154e 153e 156a 156c 154a 148	[74] [75] [74]
<i>C. sinaica</i>	Cirsiliol Isorhamnétine Isorhamnétine 3-O-méthyl ether	154d 156b 156f	[76]
<i>C. behen</i>	Cirsimaritine Jacéosidine Naringénine	153b 155h 161	[78] [77]
<i>C. furfuracea</i>	Cirsimaritine Hispiduline Hispiduline 7-O-glucoside Hispiduline 7-O-méthylglucoside Kaempférol 3-méthylether Patulétine 7-O-glucoside	153b 153a 153c 153h 173f 156c	[80] [60] [80] [79] [73]

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

<i>C. incana</i>	Corymbosine	147	[81]
	Hispiduline	153a	
	Hispiduline 7- <i>O</i> -glucoside	153c	
	Apigénine 6,8-di- <i>C</i> -glucoside	153e	
	Patulétine	156a	
	Myricétine 3-méthyl ether 7- <i>O</i> -glucoside	166	
	Népétine	154a	
	Népétine 3',4',7-triméthyl ether	148	
	Onopordine	155n	
	Rutine	157	
Tricétine 7,3',5'-triméthyl ether	162		
<i>C. arguta</i>	Eupatiline	155g	[82]
	Hespéridine	155f	
	Eupafoline	156f	[82]
	Jacéosidine	155h	
	kaempférol 3-méthyl ether 7- <i>O</i> -rutinoside	156d	
	Naringénine	161	
	4',5,7-Trihydroxy-3',6-diméthoxyflavone	155m	[57,84]
<i>C. aspera</i>	Hispiduline	153a	[85]
	Eupafoline	156f	[72]
	Jacéosidine	155h	[85,72]
	Népétine	154a	[85,86]
	4',5,7-Trihydroxy-3',6-diméthoxyflavone	155m	
<i>C. virgata</i>	Eupatiline	155g	[77]
	Eupatorine	155b	
	Isoschaftoside	155s	
	Jacéosidine	155h	
	6-Hydroxykaempférol 3,6-diméthyl ether	173h	
	Lutéoline-6- <i>C</i> -glucoside	153d	
	Népétine	154a	
<i>C. cyanus</i>	Genkwanine	145	[87,66]
	Kaempférol-7- <i>O</i> -glucoside	173a	[88,89,90]
	Vitexine	155a	[85,86]
<i>C. macrocephala</i>	Isoquercitrine	156g	[93]
	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -galactoside	156e	[92]
<i>C. kotschyi</i>	Isorhamnétine	156b	[94]
	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -galactoside	156e	
	Cirsimaritine	153b	
	Quercétagétine 6-méthyl ether 7-glucoside	156c	
	Quercétagétine 3'-méthyl ether 7- <i>O</i> -glucoside	173j	

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

<i>C. bracteata</i>	Hispiduline 7-sulphate	160	[95]
	Hispiduline	153a	[96]
	Lutéoline	152a	
	6-Méthoxylutéoline	152f	
	Népétine	154a	[95]
	Népétine 7- <i>O</i> -glucoside	154b	[96]
	Népétine 7-sulphate	154f	[95]
<i>C. horrida</i>	Apigénine 6- <i>C</i> -arabinoside	153k	[97]
	Apigénine 8- <i>C</i> -arabinoside	153l	
	Apigénine 6,8-di- <i>C</i> -glucoside	153e	
	Scutéllarine-7- <i>O</i> -glucoside	153f	
<i>C. melitensis</i>	Hispiduline 7- <i>O</i> -rutinoside	153i	[100]
	Apigénine 6,8-di- <i>C</i> -glucoside	153e	
	Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside	152c	
	Lutéoline 4'- <i>O</i> -arabinoside	155o	
	Lutéoline 8- <i>C</i> -glucoside	155q	
	Lutéoline 6- <i>C</i> -glucoside	153d	
	Népétine	154a	
	Myricétine 3,5'-diméthyl éther 7-glucoside	165	
<i>C. inermis</i>	Isovitexine 4'- <i>O</i> -rhamnosyl	155c	[77]
	Jacéosidine	155h	[99]
	Eupatorine	155b	[77]
	Hispiduline	153a	
	6-hydroxykaempférol 3,6-diméthyl éther	173h	
	Népétine	154a	
<i>C. pallescens</i>	Jacéosidine	155h	[88]
	Fiséline	164	[57]
	Hesperidine	155f	
	Dihydroquercétine	159	
	Lutéoline	152a	[65]
	Morine	158	[57]
	Naringénine	161	
	Rutine	157	
	Vitexine	155a	
<i>C. alexandrina</i>	Jacéosidine	155h	[57]
	Eupatiline	155g	[65]
	Fiséline	164	[57]
	Hespéridine	155f	
	Dihydroquercétine	159	
	Lutéoline	152a	[65]
	Naringénine	161	[57,65]
	Rutine	157	[61]
	Vitexine	155a	[57,65]

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

<i>C. cuneifolia</i>	Jacéosidine Eupatiline Eupatorine	155h 155g 155b	[107,135] [133]
<i>C. calcitrapa</i>	Dihydroquercétine Fiséline Hespéridine Hispiduline Kaempférol 3- <i>O</i> -glucoside kaempférol 6-methyl ether 7- <i>O</i> -glucoside kaempférol 6-methyl ether 3- <i>O</i> -glucoside Kaempférol 3- <i>O</i> -rutinoside Lutéoline Morine Péctolinargénine Naringénine Rutine Vitexine Jacéosidine	159 164 155f 153a 173b 173c 173d 173e 152a 158 155t 161 157 155a 155h	[57] [57,65,125] [57] [41] [125] [125] [57,65] [125] [125] [57,65] [65]
<i>C. pullata</i>	Cirsimaritine Hispiduline Hispiduline 7- <i>O</i> -glucoside Patuléline 7- <i>O</i> -glucoside	153b 153a 153c 156c	[73]
<i>C. thessala</i>	Hispiduline Jacéosidine	153a 155h	[102]
<i>C. orphanidea</i>	Cirsimaritine Lutéoline	153b 152a	[104] [134]
<i>C. scoparia</i>	Cirsimaritine Hispiduline Lutéoline	153b 153a 152a	[105] [103,106]
<i>C. cineraria</i>	Eupatiline Jacéosidine Népétine	155g 155h 154a	[107] [109] [112]
<i>C. rothmalerana</i>	Eupatiline Jacéosidine	155g 155h	[136] [77]
<i>C. affinis</i>	Eupatorine	155b	[108]
<i>C. aggregata</i>	Eupatorine	155b	[138]
<i>C. pseudomaculosa</i>	Eupatorine Népétine	155b 154a	[57,84]
<i>C. clementei</i>	Hispiduline Ladanéine Négléteine	153a 155j 155i	[110,111]

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

<i>C. phyllocephala</i>	Hispiduline Cirsiliol Jacéosidine Népétine	153a 154d 155h 154a	[113] [114,113] [115] [69,116]
<i>C. solstitialis</i>	Homoorientine 6-Hydroxykaempférol 3,6-diméthyl ether Patulétine Patulétine 7- <i>O</i> -glucosid	154c 173h 156a 156c	[128] [132] [128]
<i>C. Phrygia</i>	3', 5, 7-Trihydroxy-4',6-diméthoxyflavone	155l	[121]
<i>C. thracica</i>	Isovitéxine 4'- <i>O</i> -rhamnosyl Vitexine	155c 155a	[131] [72]
<i>C. jacea</i>	Jacéoside Jacéosidine 6-Hydroxykaempférol 3,6-diméthyl ether 4',5,7-Trihydroxy-3',6-diméthoxyflavone	155d 155h 173h 155m	[77] [127] [96]
<i>C. isaurica</i>	Kaempférol 3- <i>O</i> -glucoside	173b	[123]
<i>C. ruthenica</i>	Jacéoside Jacéosidine Patulétine Patulétine 7- <i>O</i> -glucoside Patulétine 3,7-di- <i>O</i> -glucoside Quercétagétine Quercétagétine 3'-méthyl ether 7- <i>O</i> -glucoside Quercétagétine 7- <i>O</i> -glucoside	155d 155h 156a 156c 156g 173i 173j 173k	[120] [75] [81] [75]
<i>C. kilea</i>	Jacéosidine Népétine 3',4',7-triméthyl ether	155i 148	[83] [77]
<i>C. malcitana</i>	Jacéosidine	155h	[137]
<i>C. senegalensis</i>	Jacéosidine	155h	[122]
<i>C. collina</i>	6-Hydroxykaempférol 3,6-diméthyl ether Patulétine Patulétine 7- <i>O</i> -glucoside	173h 156a 156c	[107] [63]

Tableau I.3 Suite: Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

<i>C. lippii</i>	Kaempférol 3- <i>O</i> -rutinoside	173e	[129]
	Lutéoline 6- <i>C</i> -glucoside	153d	[100]
<i>C. acaulis</i>	Kaempférol 4'-methyl ether	173g	[74]
<i>C. macrocephala</i>	Apigénine 8- <i>C</i> -arabinoside	153l	[68]
	Lutéoline 6- <i>C</i> -glucoside	153d	[117]
<i>C. pseudocabiosa</i>	Ladanéine	155j	[119]
	Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside	152c	[120,119]
	Chrysine	172a	
	Chrysine 7- <i>O</i> - glucuronide	172b	
	Chrysine 7- <i>O</i> - glucuronide methylester	172c	
	Chrysine 6- <i>C</i> - glucoside	172d	
	Chrysine 8- <i>C</i> - glucoside	172e	
<i>C. cheiranthifolia</i>	Chrysine 7- <i>O</i> - β -actopyranuronoside	172f	
	Lutéoline	152a	[111]

Les structures des différents flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.3 sont présentées dans les figures I.3 –I.11

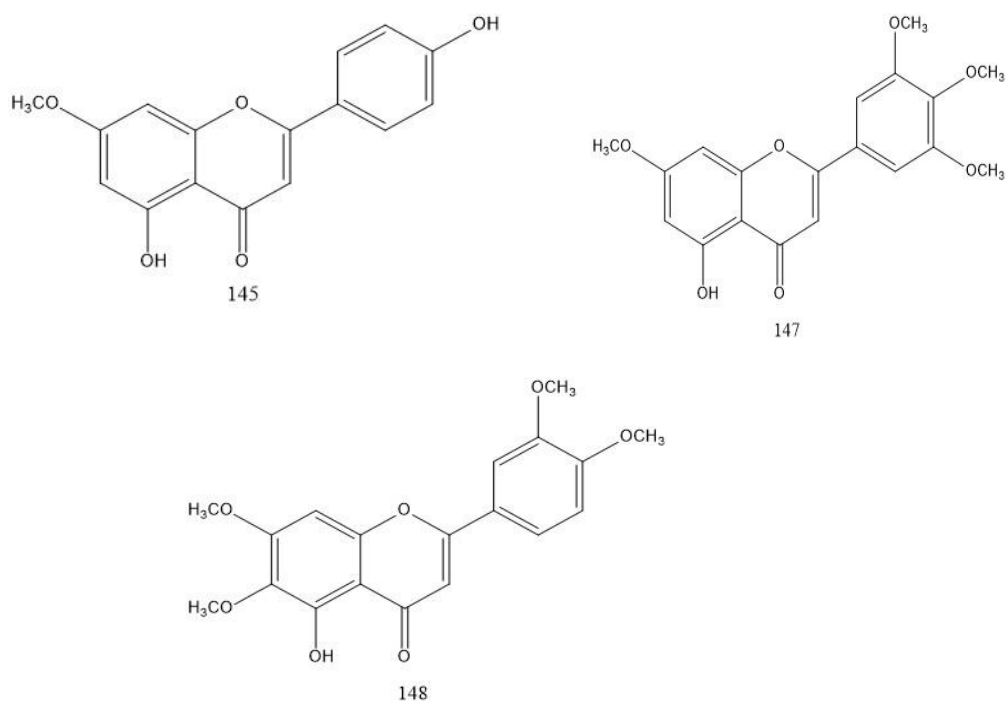
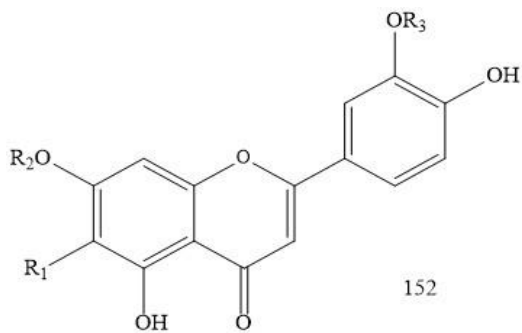
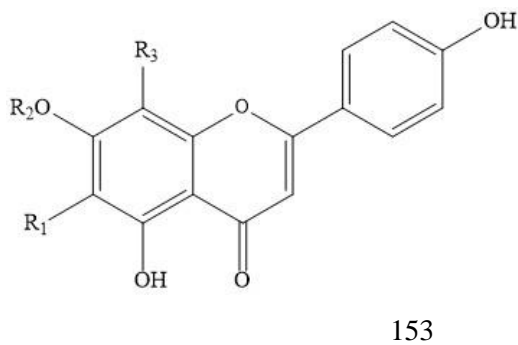


Figure I.3: les structures des flavonoïdes de 145-148



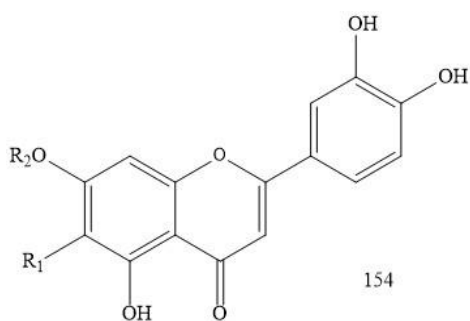
	R ₁	R ₂	R ₃
a	H	H	H
b	H	H	CH ₃
c	H	glc	H
d	H	glc	CH ₃
e	di-glc	H	H
f	glc	H	arab

Figure I.4: les structures des flavonoides de 152a-152f



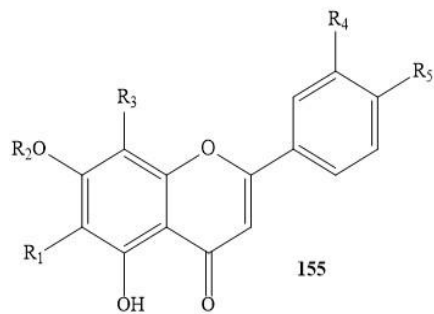
	R ₁	R ₂	R ₃
a	OCH ₃	H	H
b	OCH ₃	CH ₃	H
c	OCH ₃	glc	H
d	C-glc	H	H
e	C-glc	H	C-glc
f	OH	H	H
g	C-glc	CH ₃	H
h	OCH ₃	me-glc	H
i	OCH ₃	rut	H
j	H	H	OCH ₃
k	C-arab	H	H
l	H	H	C-arab

Figure I.5 : Les structures des flavonoides de 153a -153l



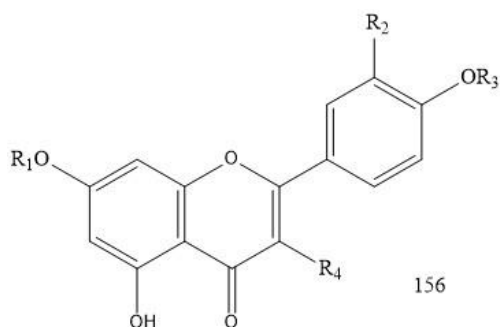
	R ₁	R ₂
a	OCH ₃	H
b	OCH ₃	glc
c	glc	H
d	OCH ₃	CH ₃
e	glc	glc
f	OCH ₃	HSO ₃

Figure I.6: Les structures des flavonoïdes de 154a-154f



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	H	H	glc	H	OH
b	OCH ₃	CH ₃	H	OH	OCH ₃
c	<i>O</i> -glc	H	H	H	OH
d	OCH ₃	glc	H	OCH ₃	OH
e	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OH
f	H	rha-glc	H	OH	OCH ₃
g	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃
h	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
i	OH	CH ₃	H	H	H
j	OH	CH ₃	H	H	OCH ₃
k	<i>C</i> -glc	H	H	OH	OH
l	OCH ₃	H	H	OH	OH
m	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
n	H	H	OCH ₃	OH	OH
o	H	H	H	OH	Oarab
p	H	H	H	OH	<i>O</i> -glc
q	H	H	glc	OH	OH
r	glc	H	H	OCH ₃	OH
s	arab	H	glc	H	OH
t	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃

Figure I.7: les structures des flavonoïdes de 155a-155t



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	H	H	OH
b	H	OCH ₃	H	OH
c	glc	OH	H	OH
d	rut	H	H	OCH ₃
e	H	OCH ₃	H	Ogal
f	H	OCH ₃	H	OCH ₃
g	H	OH	H	Oglc

Figure I.8: Les structures des flavonoïdes de 156a-156g

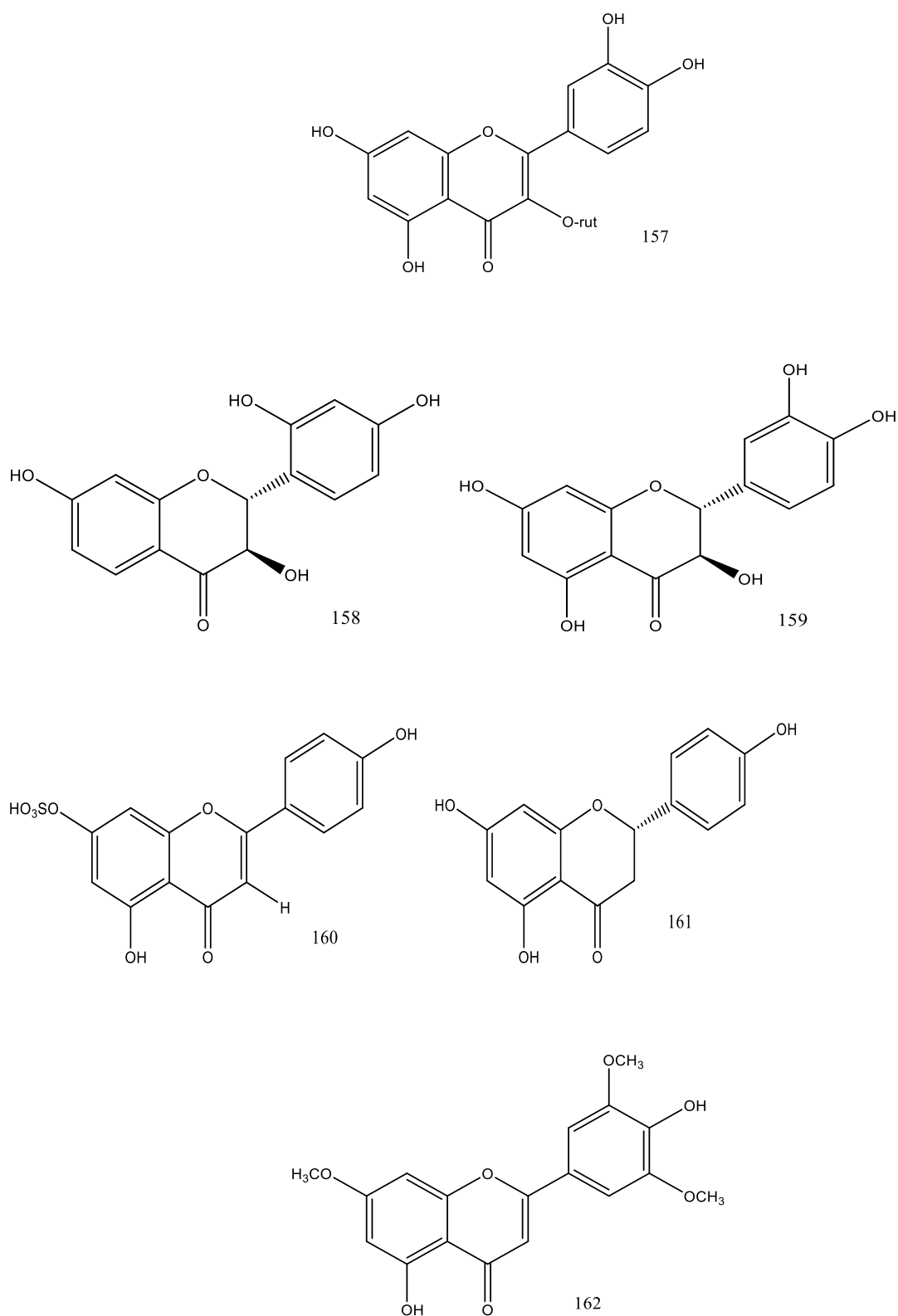


Figure I. 9: Les structures des flavonoïdes de 157-162

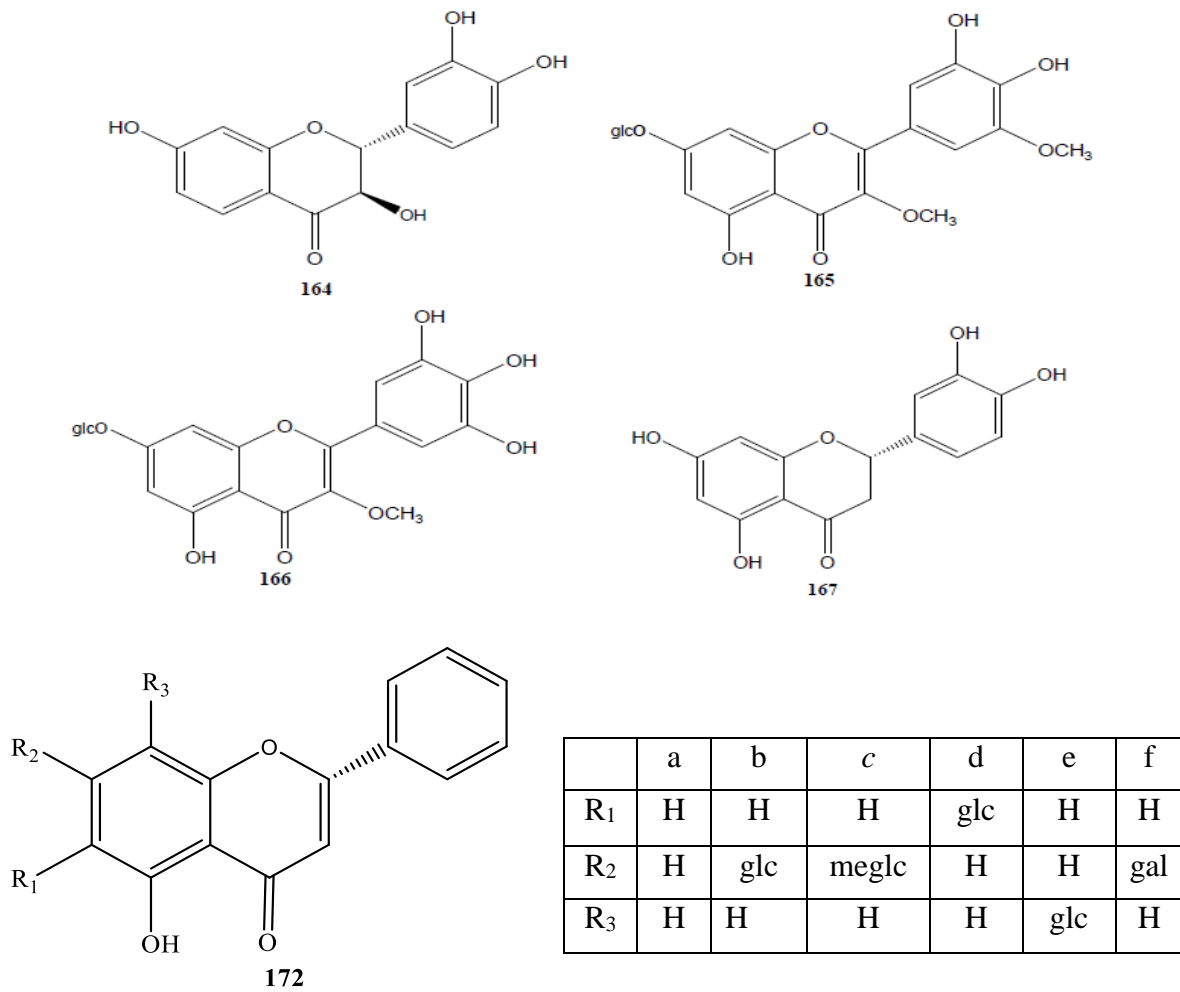


Figure I.10: Structures des flavonoïdes de 172a-172f

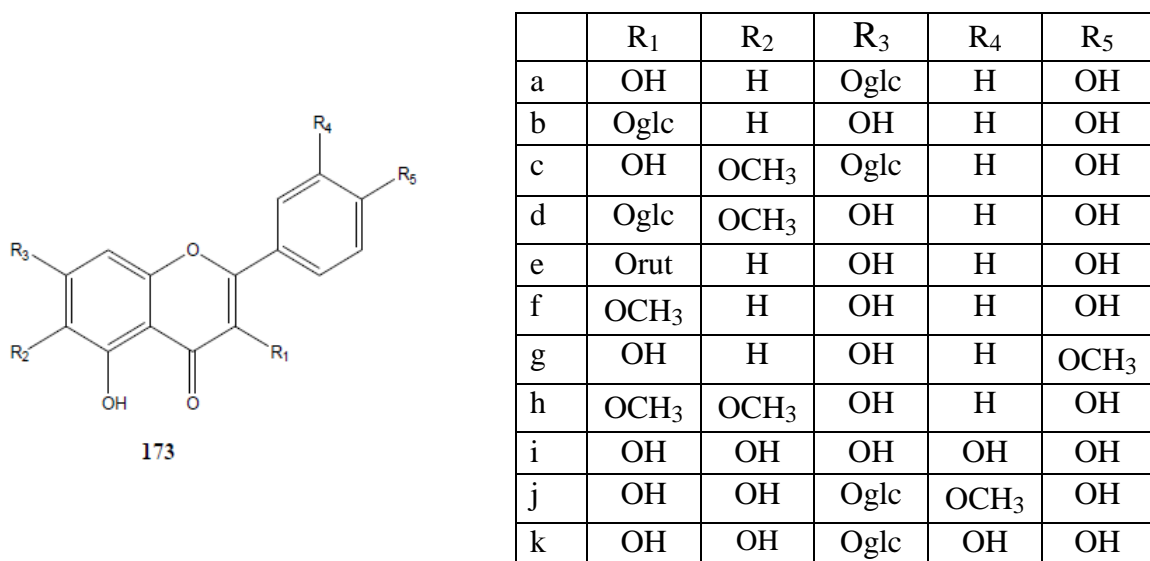


Figure I. 11 : Structures des flavonoïdes de 173a-173k

Les flavonoïdes du genre *Santolina*

Quelques flavonoïdes isolés du genre *Santolina* sont reportés dans la Figure I. 12 à I.14

- Quelques dérivés de l'apigénine

1 : Apigénine ; R=H

2 Apigénine 7-rhamnoglucoside ; R=rhamnoglucosyle

3 :Apigénine7-glucoside ; R=glucosyle

4 : Apigénine 7-glucuronide ; R=glucuronyle

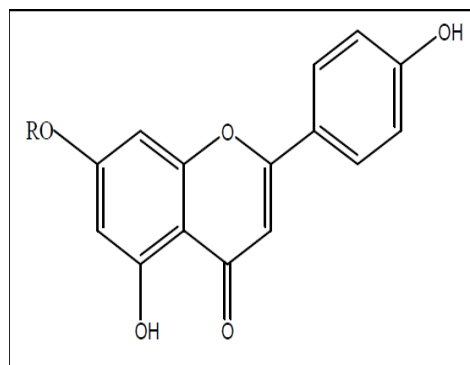


Figure I. 12 : Structures des dérivés de l'apigénine 1-4

- Quelques dérivés de la lutéoline

5 : Lutéoline ; R=H

6 : Lutéoline7-rhamnoglucoside ; R=rhamnoglucosyle

7 : Lutéoline 7-glucuronide ; R=glucuronyl

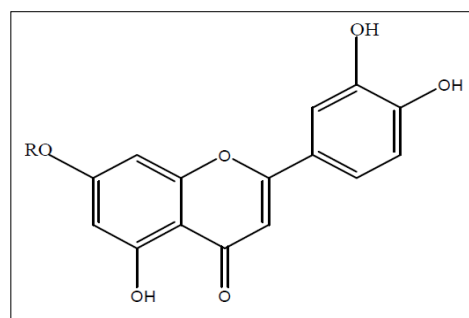


Figure I. 13 : Structures des dérivés de la lutéoline 5-7

- Népetine

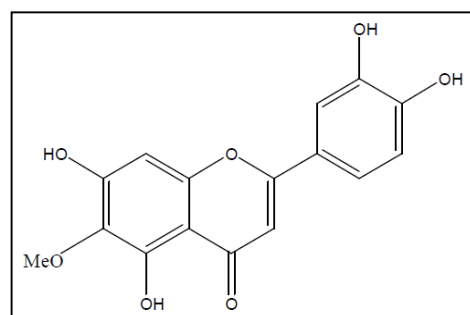


Figure I. 14 : Structure de la Népetine

I.4.2 Les lactones sesquiterpéniques

❖ Les lactones sesquiterpéniques du genre *Centaurea*

Les investigations phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont révélé une grande diversité structurale, dont les squelettes prédominant sont ceux des germacranolides, guaianolides suivis des eudesmanolides et des élémanolides et beaucoup moins des héliangolides. Quel que soit leur type de squelette, elles sont fermées soit en C-6 soit en C-8.

I.4.2.1 Les germacranolides du genre *Centaurea*

Ce type de lactones sesquiterpéniques ont comme squelette de base un cycle à dix atomes de carbone (Figure I.15). Leurs masses moléculaires ne dépassent pas 420 uma.

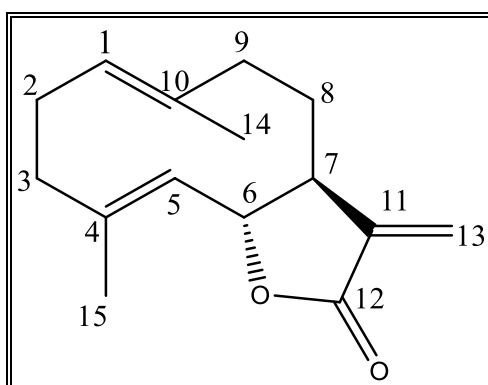


Figure I.15 : Squelette de base d'un germacranolide fermé en C-6

La majorité de ces molécules comportent deux doubles liaisons, la première entre C-1 et C-10 et la seconde entre C-4 et C-5 toutes les deux dans la plupart des cas, de configuration E. Des fonctions époxydes peuvent remplacer les doubles liaisons, dans ce cas la stéréochimie du C-1 et de C-5 est β .

Le carbone de la position 11 peut voir son hybridation changer en se réduisant. On aura alors deux possibilités : 11α -H, 13β -Me ou 11β -H, 13α -Me. Dans la plupart des composés cités (tableau I.4) le C-4 porte le groupement CH_2OH .

D'après notre étude les C-6 et C-8 sont souvent substitués par des groupes hydroxyles ou esters, que la lactone soit fermée en C-6 ou en C-8. Notons que l'orientation de ces groupements oxygénés est souvent α . La masse de ces groupes esters peut aller de 83 à 157 uma, dont quelques-uns sont reportés dans le tableau I-5.

La stéréochimie de l'hydrogène H-6 est β par contre celle de H-7 est α . Le C-9 et le C-3 sont rarement substitués.

Tableau I.4: Quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*

<u>Composé</u>	<u>Structure</u>	<u>Plante</u>	<u>Réf.</u>
Salonitenolide	<u>1a</u>	<i>C. aspera</i>	[139]
8 α -angeloylsalonitenolide	<u>1b</u>		
8 α -(5-hydroxy)-angeloylsalonitenolide	<u>1c</u>		
salonitenolide-8-O-(4'-acetoxy-5'-hydroxyangelate)	<u>1d</u>		
8 α -(Z-2-Methyl-4-acetoxybut-2-enoyloxy)-15-hydroxygermacra-1(10),E,4Z,11(13)-trien-12,6 α -olide	<u>1e</u>	<i>C. scoparia</i>	[141]
Onopordopicrine	<u>1f</u>		
Cnicine	<u>16</u>		
4'-Acetylcnicine	<u>17</u>		
11 β , 13-Dihydrosalonitenolide	<u>2</u>		
8-Oxo-15-hydroxygermacra-1(10),E, 4Z-dien-11 β H-12,6 α -olide	<u>3</u>		
Sténophylloïde	<u>4</u>		
Dihydrosténophylloïde	<u>5</u>		
Onopordopicrine	<u>1f</u>		
Cnicine	<u>16</u>		
4'-Acetylcnicine	<u>17</u>	<i>C. moesiaca</i>	[147]
3'-Acetylcnicine	<u>18</u>		
Salonitenolide-8-O-(4'-acetoxy-5'-hydroxyangelate)	<u>19</u>		
8 α -(5-Hydroxy)-angeloylsalonitenolide	<u>20</u>		
Onopordopicrine	<u>1f</u>		
8 α -Acyloxy-1,15-dihydroxy-4E,10(14),11(13)-germacratrien-12,6 α -olide	<u>25</u>		
	<u>26</u>		

Tableau I.4 Suite: Quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*

Salonitenolide	<u>1a</u>	<i>C. grisebachii</i>	<u>[143]</u>
	<u>1d</u>		
Cnicine	<u>16</u>		<u>[144]</u>
Salonitenolide	<u>1a</u>	<i>C. alba</i>	<u>[146]</u>
11 β ,13-dihydrosalonitenolide	<u>96</u>		
Salonitenolide 8- <i>O</i> -(4'-acetoxy-5'-hydroxy)-angelate	<u>1d</u>		
Cnicine 4'- <i>O</i> -acetate	<u>17</u>	<i>C. alba</i>	<u>[146]</u>
Cnicine	<u>16</u>		
Jurineolide	<u>60</u>	<i>C. scoparia</i>	<u>[148]</u>
Costunolide	<u>72</u>	<i>C. acaulis</i> L.	<u>[152]</u>
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. thessala</i>	<u>[153]</u>
4'-Acetylcnicine	<u>78</u>		
8 α -[(4-Acetoxy-5-hydroxy)-angelate salonitenolide	<u>79</u>		
11 β ,13-Dihydrocnicine	<u>96</u>		
11 β ,13-Dihydrocnicine	<u>89</u>	<i>C. pullata</i>	<u>[154]</u>
11 β ,13-Dihydro-19-desoxycnicine	<u>90</u>		
8 α - <i>O</i> -(4-Acetoxy-5 hydroxyangeloyl)-11 β ,13-dihydrocnicine	<u>91</u>		
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. diffusa</i>	<u>[155]</u>
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. cineraria</i>	<u>[157]</u>
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. paniculata</i>	<u>[97]</u>
4'-Acetylcnicine	<u>17</u>		
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. nicaeensis</i>	<u>[159]</u>
Onopordopicrine	<u>21</u>		
Dihydroamarine	<u>114</u>		
Onopordopicrine	<u>21</u>	<i>C. tweediei</i>	<u>[118]</u>
Cnicine	<u>16</u>	<i>C. affinis</i>	<u>[160]</u>
Salonitenolide	<u>1a</u>	<i>C. orphanidea</i>	<u>[124]</u>
Salonitenolide	<u>1a</u>		
Cnicine	<u>16</u>		
4'- <i>O</i> -Acetylcnicine	<u>17</u>		

Tableau I.5: Quelques groupes d'esters existant en C-6 ou en C-8 dans les germacranolides du genre *Centaurea*

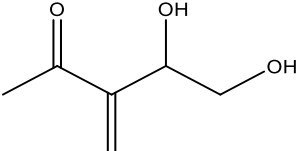
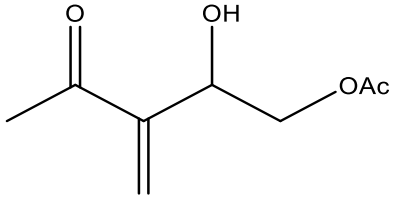
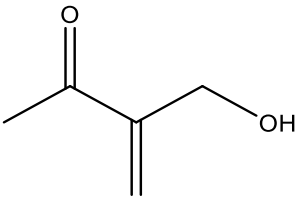
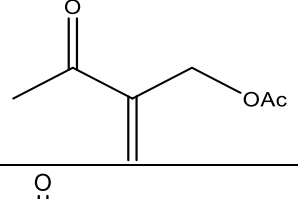
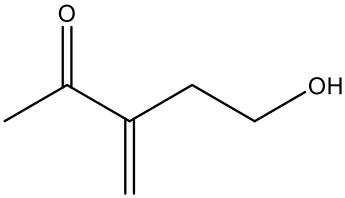
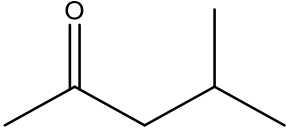
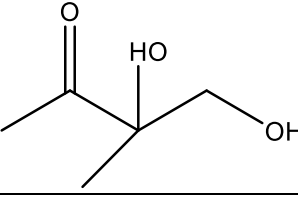
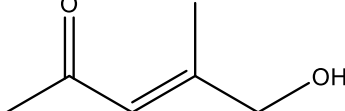
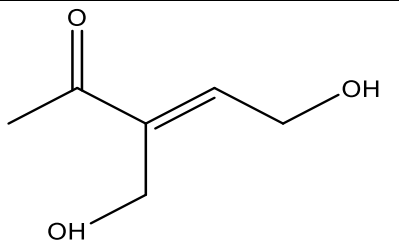
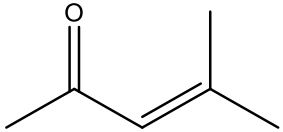
Groupe d'ester	Nom du chainon	Masse (uma)
	(1',2'-dihydroxyethyl) acrylate	115
	(1'-acetoxy-2'-hydroxyethyl) acrylate	157
	4'-hydroxymethacrylate	85
	4'-acetoxymethacrylate	127
	(1'-hydroxyethyl)acrylate	99
	isovalérate	85
	2',4'-dihydroxysenecioate	103
	4'-hydroxysenecioate	99

Tableau I.5 Suite : Quelques groupes d'esters existant en C-6 ou en C-8 dans les germacranolides du genre *Centaurea*

	4',5'-dihydroxytiglate	115
	senecioate	83

En spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton certains noyaux donnent des signaux caractéristiques. Le tableau I.6 regroupe les données relatives à quelques-uns de ces noyaux.

Tableau I.6 : Déplacements chimiques caractéristiques des germacranolides

Type de protons	Déplacements chimiques (ppm)
H-1	4.94 - 5.76
H-5	4.65 - 5.76
H-6 β	4.31 - 5.12
H-8 β α OR	4.57 - 5.25
α OH	4.08 - 4.38
H-15 (CH ₂ OH)	3.90 - 4.30
H-15' (CH ₂ OH)	4.08 - 4.25
H-13	6.28 - 6.40
H-13'	5.66 - 6.36
H-14	1.37 - 1.83

I.4.2.2 Les guaianolides du genre *Centaurea*

Les lactones sesquiterpéniques de type guaianolide ont comme squelette de base un cycle heptagonal et un deuxième pentagonal (Figure I.16). On reportera quelques guaianolides isolés du genre *Centaurea* (tableau I.7)

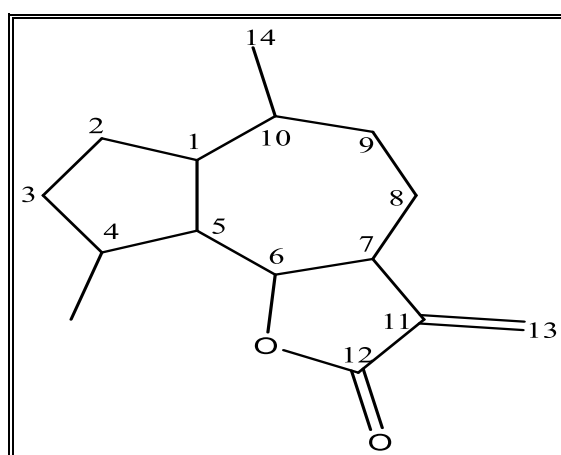


Figure I.16 : Squelette de base d'un guaianolide fermé en C-6

Les guaianolides vont se distinguer par la stéréochimie α des hydrogènes en position 1 et 5 puisque la jonction des cycles se fait entre le C-1 et C-5, sans oublier que la lactone peut se fermer en C-6 ou en C-8, l'hydrogène en position 7 aura lui aussi une stéréochimie α .

Contrairement au germacranolides, les guaianolides possèdent des doubles liaisons exocycliques en position 4 ou 10. Quelques groupes de substituants de masse comprise entre 71 et 120 uma sont reportés dans le tableau I.8

Tableau I.7 : Quelques guaianolides isolés du genre *Centaurea*

Composé	Structure	Plante	Réf.
(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-4 β -(Chlorométhyl)-3 β ,4 α -dihydroxy-8 α -(3-formyl-2-méthylpropényloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-10(14),11(13)-dien-6,12-olide	<u>11</u>	<i>C. scoparia</i>	<u>[141]</u>
(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-4 β -(Chlorométhyl)-3 β ,4 α -dihydroxy,8 α -(sarracényloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-10(14),11(13)-dien-6,12-olide	<u>12</u>		
8 α -Hydroxy-3 β -(benzoyloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olide	<u>13</u>		
3 β -Hydroxy-8 α -(3,4-diméthoxybenzoyloxy)-11 β ,13-dihydro-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14)-dien-6,12-olide	<u>14</u>		
Kandavanolide	<u>30</u>	<i>C. nicolai</i>	<u>[145]</u>
Salograviolide A	<u>31</u>		
3-Deacetyl-9- <i>O</i> -acetylsalograviolide A	<u>32</u>		
9- <i>O</i> -Acetylsalograviolide A,	<u>33</u>		
Salograviolide B	<u>34</u>		
Chlorojanérine	<u>38</u>		

Chlorohyssopifolin A (Centaurepensin)	<u>39</u>	<i>C. alba</i>	
Chlorohyssopifoline A (C-17 epimer)	<u>40</u>		
3 β ,8 α -O-Di(4-hydroxy-tigloyl)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14),11(13)-triene-6, 12-olide.	<u>41</u>	<i>C. scoparia</i>	<u>[147]</u>
Cebelline F	<u>42</u>		
8 α ,4'-(Hydroxytiglinat)-8-desacyloxysubluteolide	<u>43</u>		
8-Desacylrepin	<u>44</u>		
(1 S,3S,5R,6R,7R,8S)-8-Angelyoxy-3-hydroxyguai-3(15), 10(14) 11(13)-triene-6,12-olide	<u>45</u>		
8-Desacetylcentaurepensin-8-O-(4-hydroxytiglinat)	<u>46</u>		
Chlorohyssopifolin A	<u>47</u>		
8 α -Hydroxy-11 α ,13-dihydrozaluzanin C	<u>48</u>		
Desacylcynaropicrine	<u>49</u>		
Chlorohyssopifoline B	<u>50</u>		
Chlorojanérine	<u>38</u>	<i>C. scoparia</i>	<u>[148]</u>
8-Deacylcentaurépensine 8-O-(4-hydroxy)-tiglate	<u>52</u>		
Chloroscoparine	<u>53</u>		
Chlorohyssopifoline B	<u>54</u>		
Diaine	<u>55</u>		
Cynaropicrine	<u>56</u>		
Deacylcynaropicrine	<u>57</u>		
Janérine	<u>58</u>		
Dehydrocostus	<u>59</u>		
3-Oxo-4 α -acetoxy-15-hydroxy-1 α H, 5 α H, 6 β H, 7 α H, 11 β H-guai-10(14)-ene-6,12-olide	<u>61</u>		<i>C. musimomum</i>
3-Oxo-4 α -hydroxy-15-hydroxy-1 α H, 5 α H, 6 β H, 7 α H, 11 β H-guai-10(14)-ene-6,12-olide.	<u>62</u>		
4 β , 15-Dihydro-3-dehydrosolstitialine A monoacetate	<u>36</u>	<i>C. musimomum</i>	<u>[151]</u>
Aguérin B	<u>64</u>		
17,18-Desoxyrépine	<u>65</u>		
19-Desoxy-15-chlorojanérine	<u>66</u>		
Centaurépensine	<u>39</u>		
Chlorojanérine	<u>38</u>		
Linichlorine B diacetate	<u>67</u>		
Répine monoacetate	<u>68</u>		
Cynaropicrine diacetate	<u>69</u>		
Janérine diacetate	<u>70</u>		

Tableau I.7 Suite : Quelques guaianolides isolés du genre *Centaurea*

Zaluzanine D	<u>73</u>	<i>C. acaulis</i> L.	[152]
14-Chloro-10 β -hydroxy-10(14)-dihydrozaluzanine D	<u>74</u>		
Babyline A	<u>99</u>	<i>C. babylonica</i>	[156]
Babyline B	<u>100</u>		
Répine	<u>101</u>		
Chlorohyssopifoline	<u>102</u>		
Janérine	<u>103</u>		
Cébelline J	<u>104</u>		
Sublutéolide	<u>105</u>	<i>C. conifera</i>	[157]
Répine	<u>101</u>		
Janérine	<u>58</u>		
Zaluzanine D	<u>73</u>	<i>C. ptosimopappa</i>	[158]
Zaluzanine C	<u>107</u>		
Janérine	<u>103</u>		
Chlorojanérine	<u>38</u>		
Cynaropicrine	<u>56</u>		
Deacylcynaropicrine	<u>57</u>		
11 α ,13-Dihydro-deacylcynaropicrine	<u>109</u>		
11 β ,13-Dihydro-deacylcynaropicrine	<u>110</u>		
4 β ,15-Dihydro-3-dehydrosolstitialine A	<u>111</u>		
Chlorojanérine	<u>38</u>		
13-Acetylsolstitialine A	<u>112</u>	<i>C. solstitialis</i>	[91]
Solstitialine A	<u>113</u>		
Aguérine B	<u>64</u>	<i>C. deflexa</i>	[98]
(1R, 4S or R, 5R, 6S, 7R, 8S)-15-Hydroxy-8-(40-hydroxymethacroyloxy)-10(14), 11 (13)-guaïadien-6,12-olide	<u>119</u>	<i>C. tweediei</i>	[118]
11,13-Dihydro-desacetylcynaropicrine	<u>109</u>	<i>C. ptosimopappoides</i>	[126]
Cynaropicrine	<u>56</u>		

Tableau I.8 : Groupes d'esters existant en C-8 dans les guaianolides du genre *Centaurea*

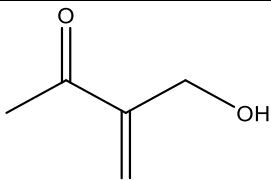
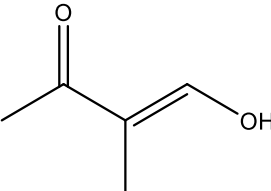
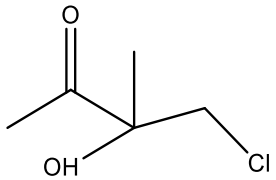
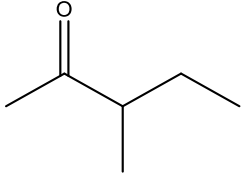
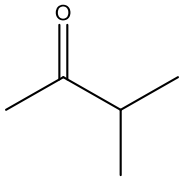
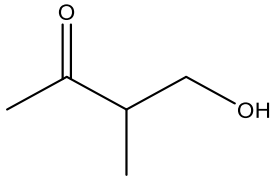
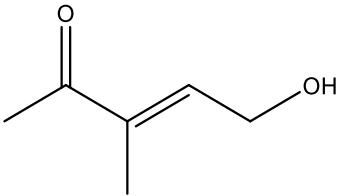
Structure de la chaîne	Nom de la chaîne	Masse (uma)
	4'-hydroxymethacrylate	85
	3'-hydroxymethacrylate	85

Tableau I.8 Suite : Groupes d'esters existant en C-8 dans les guaïanolides du genre *Centaurea*

	2'-hydroxy-4'-chloroisobutyrate	121
	2'-methylbutyrate	85
	Isobutyrate	71
	4'-hydroxymethacrylate	87
	4'-hydroxytiglate	99

I.4.2.3 Les élémanolides du genre *Centaurea*

Les lactones de type élémanolide ont comme squelette de base, un seul cycle de six atomes comme le montre la figure I.17. Elles ont une masse moléculaire n'excédant pas 390 uma

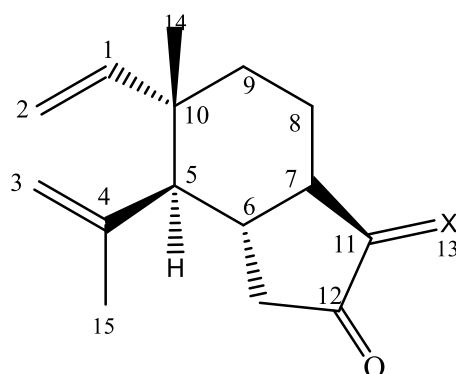


Figure I.17: Squelette de base d'un élémanolide

Selon notre étude tous les élémanolides du genre *Centaurea* possèdent deux doubles liaisons exocycliques l'une entre C-1 et C-2 et l'autre entre C-3 et C-4, en plus la stéréochimie de la liaison C-1 et C-10 est α , celle de C-4 et C-5 est β . Cette stéréochimie va influencer celles des substituants en position 5 et 10, ainsi l'hydrogène en position 5 sera α et le méthyle porté par le carbone 10 est β . Comme pour les germacranolides la double liaison peut être réduite et la lactonisation se fait essentiellement en C-6. Quel que soit le carbone de lactonisation le C-6 ou le C-8 porte des groupes esters ou hydroxyles avec une stéréochimie α . Quelques lactones de type élémanolides isolées du genre *Centaurea* sont reportées dans le tableau I.9.

Tableau I.9: Quelques lactones sesquiterpéniques du type élémanolide isolées du genre *Centaurea*

Composé	Structure	Plante	Réf.
Methyl 8 α -(Z-2-hydroxymethyl-4-acetoxybut-2-enoyloxy)-6 α ,15-dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oate	<u>6d</u>	<i>C. aspera</i>	<u>[139]</u>
Elemacarmanine	<u>6f</u>		
Hierapolitanine A	<u>7</u>	<i>C. Hierapolitana</i>	<u>[140]</u>
Hierapolitanine B	<u>8</u>		
8 α -O-(3,4-Dihydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-11 β ,13-dehydromelitensine	<u>22</u>	<i>C. moesiaca</i>	<u>[142]</u>

Tableau I.9 Suite: Quelques lactones sesquiterpéniques du type élémanolide isolées du genre *Centaurea*

8 α -O-(3,4-Dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-11 β ,13-dehydromelitensine	<u>22</u>	<i>C. grisebachii</i> ssp.	<u>[143]</u>
8 α -(3,4-Dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-dehydromelitensine	<u>80</u>	<i>C. thessala</i>	<u>[153]</u>
Méthyl 8 α -(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-6 α , 15-dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oate	<u>81</u>		
8 α -(3-Hydroxy-4-acetoxy-2-méthylènebutanoyloxy) dehydromelitensine	<u>82</u>		
8 α -O-(4-Hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy) melitensine	<u>94</u>	<i>C. pullata</i>	<u>[144]</u>
Melitensine	<u>95</u>		
Dehydromelitensine	<u>106</u>	<i>C. cineraria</i>	<u>[157]</u>
8 α -O-(3, 4 Dihydroxyméthylènebutanoyloxy) dehydromelitensine	<u>22</u>	<i>C. orphanidea</i>	<u>[124]</u>

I.V.2.4 Les eudesmanolides du genre *Centaurea*

Les lactones du type eudesmanolide ont comme squelette de base deux cycles hexagonaux (figure I.18). Leurs masses moléculaires sont comprises entre 248 et 450 uma

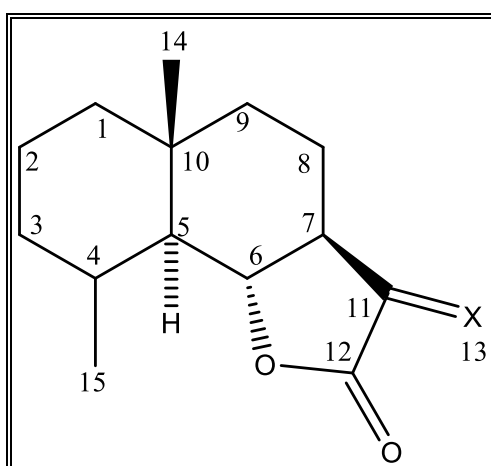


Figure I.18 : Squelette de base d'un eudesmanolide

La stéréochimie H-5 est α par contre celle du méthyle porté par le carbone 10 est β . La fermeture de la lactone se fait très rarement en C-8. La stéréochimie des hydrogènes 6 et 7 est toujours β et α respectivement. Quelques lactones de ce type sont reportées dans le tableau I.10

Tableau I.10: Quelques lactones sesquiterpènes du type eudesmanolide isolées du genre *Centaurea*.

Composé	Structure	Plante	Réf.
Hierapolitanine C	<u>9</u>	<i>C. hierapolitana</i>	<u>[140]</u>
Hierapolitanine D	<u>10</u>		
Malacitanolide	<u>23</u>	<i>C. moesiaca</i>	<u>[142]</u>
8 α -(3-hydroxy-4-acetoxy-2-methylenebutanoyloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>24</u>		
8 α -hydroxy-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>83</u>	<i>C. grisebachii</i> ssp.	<u>[143]</u>
8 α -O-(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>24</u>		
8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>23</u>		
8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro onopordaldehyde.	<u>63</u>	<i>C. granada</i>	<u>[150]</u>
β -cyclocostunolide	<u>71</u>	<i>C. acaulis</i>	<u>[152]</u>
8 α -hydroxy-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide.	<u>83</u>	<i>C. attica</i>	<u>[153]</u>
Malacitanolide	<u>84</u>		
4'-acetoxymalacitanolide	<u>85</u>		
Atticine	<u>86</u>		
4- <i>epi</i> -carmanine	<u>87</u>		
11 β , 13-dihydro-8 α -hydroxy-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>88</u>		
8 α -O-(4-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-11 β ,13-dihydrosonchucarpolide	<u>92</u>	<i>C. pullata</i>	<u>[154]</u>
8 α -O-(4-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-11 β ,13-dihydro-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>93</u>		
8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>97</u>		
8 α -hydroxy-11 β ,13-dihydro onopordaldehyde	<u>98</u>		
(1R, 4R, 5R, 6R, 7R, 8S, 10R)-1-Hydroxy-8-methacryloxy-15-oxoeudesm-11(13)en-6,12-olide	<u>116</u>	<i>C. tweediei</i>	<u>[118]</u>
(1R, 4S, 5R, 6R, 7R, 8S, 10R Methyl 1,6-dihydroxy-8-methacryloxyeudesm-11(13)-en-15-oic acid-12-oate	<u>117</u>		

Tableau I.10: Quelques lactones sesquiterpènes du type eudesmanolide isolées du genre *Centaurea*

Malacitenolide	<u>23</u>	<i>C. orphanidea</i>	<u>[124]</u>
8 α -O-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>83</u>		
8 α -O-(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	<u>24</u>		

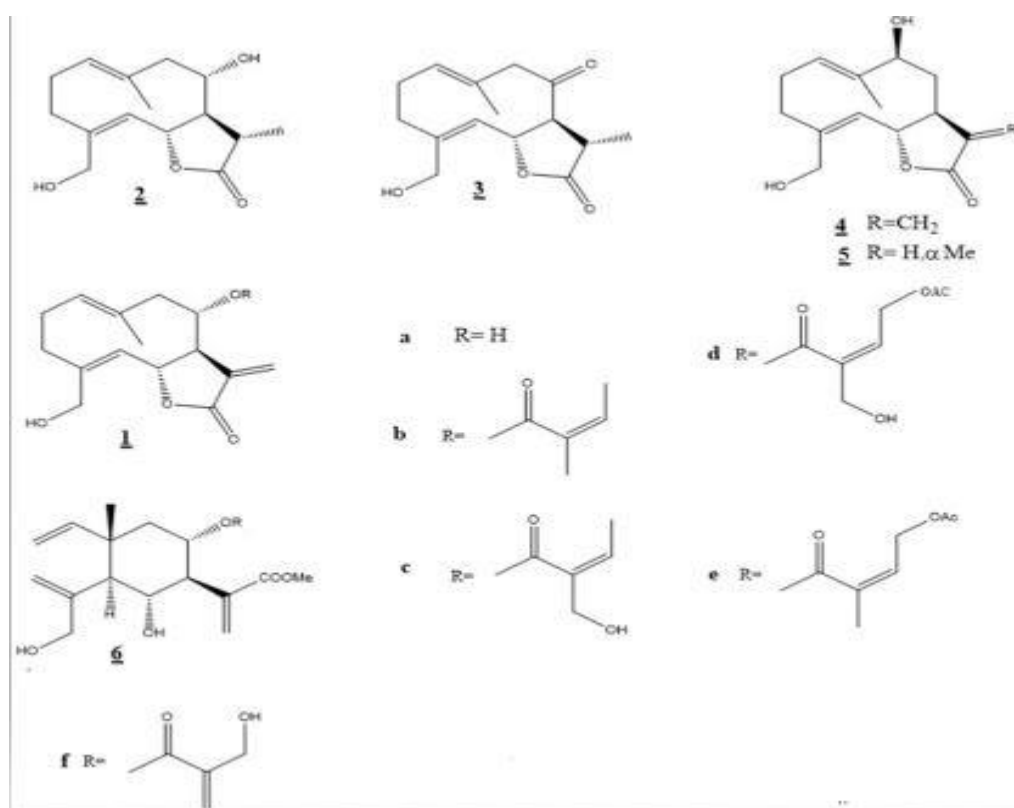
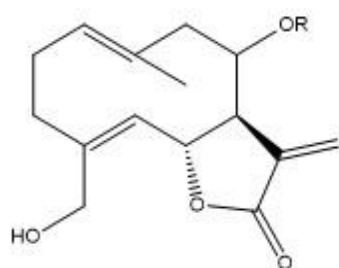
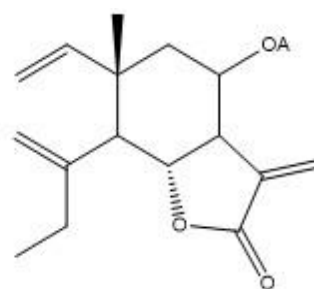


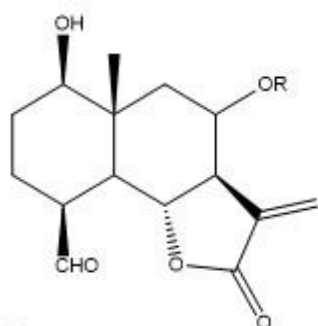
Figure I.19 : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 1 à 6



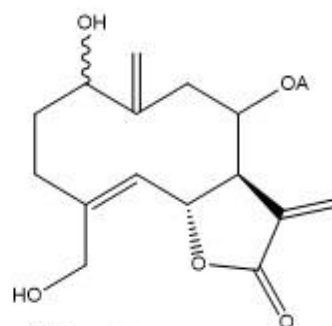
- 16** R=A **19** R=D
17 R=B **20** R=E
18 R=C **21** R=F



22



- 23** R=A
24 R=B



25 1 β -OH

26 1 α -OH

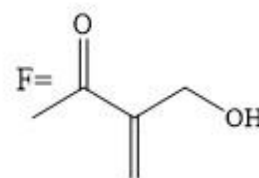
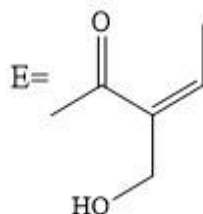
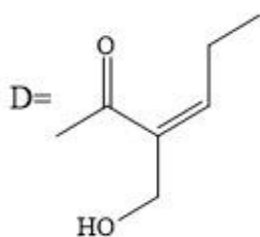
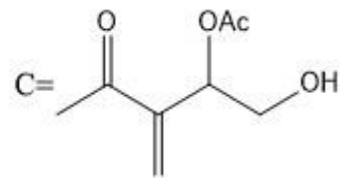
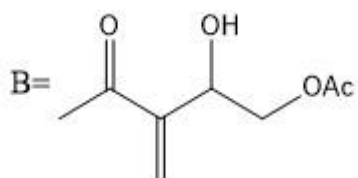
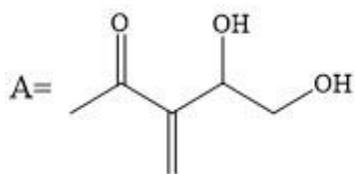


Figure I.20 : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 16 à 26

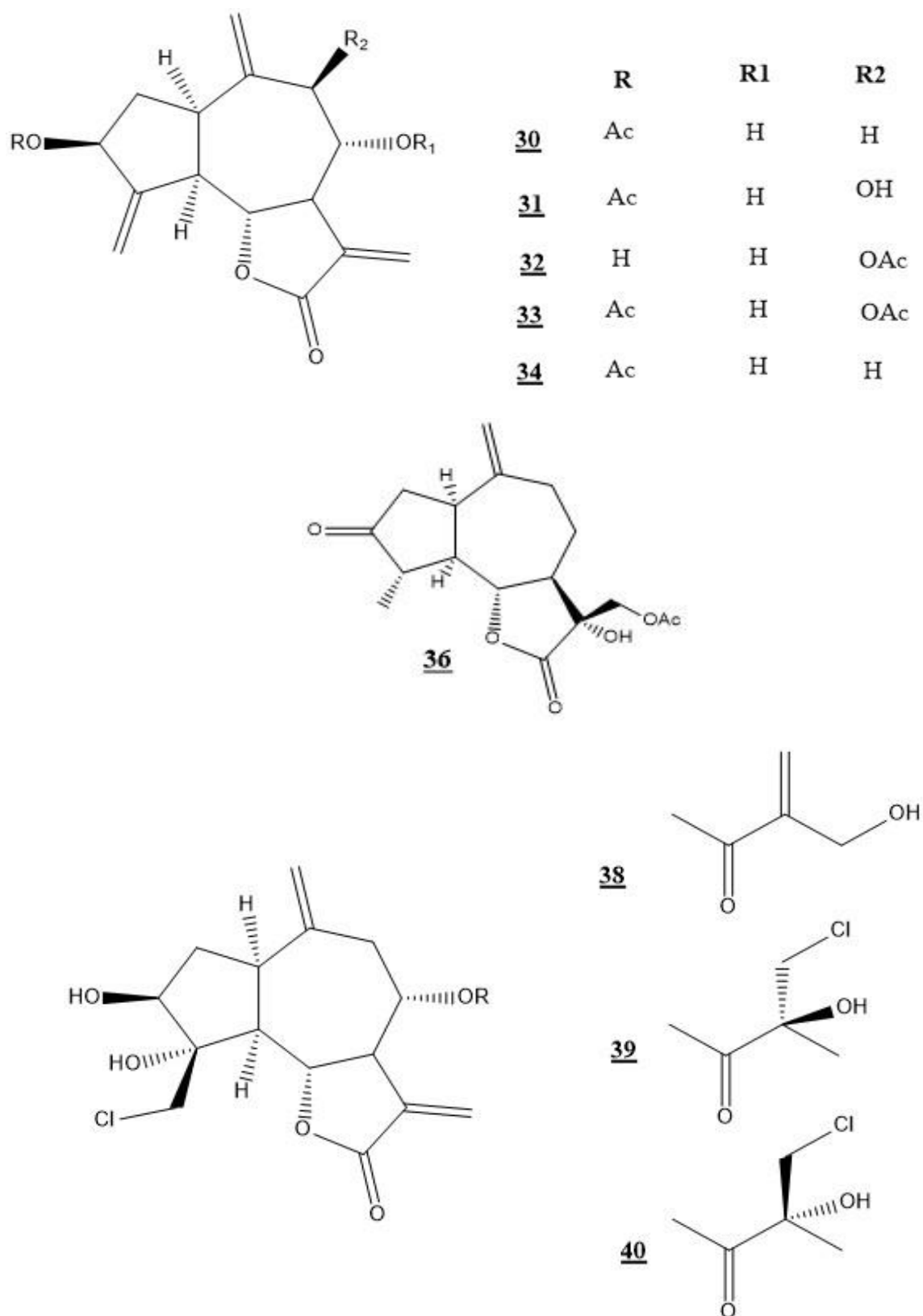


Figure I.21 : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 30 à 40

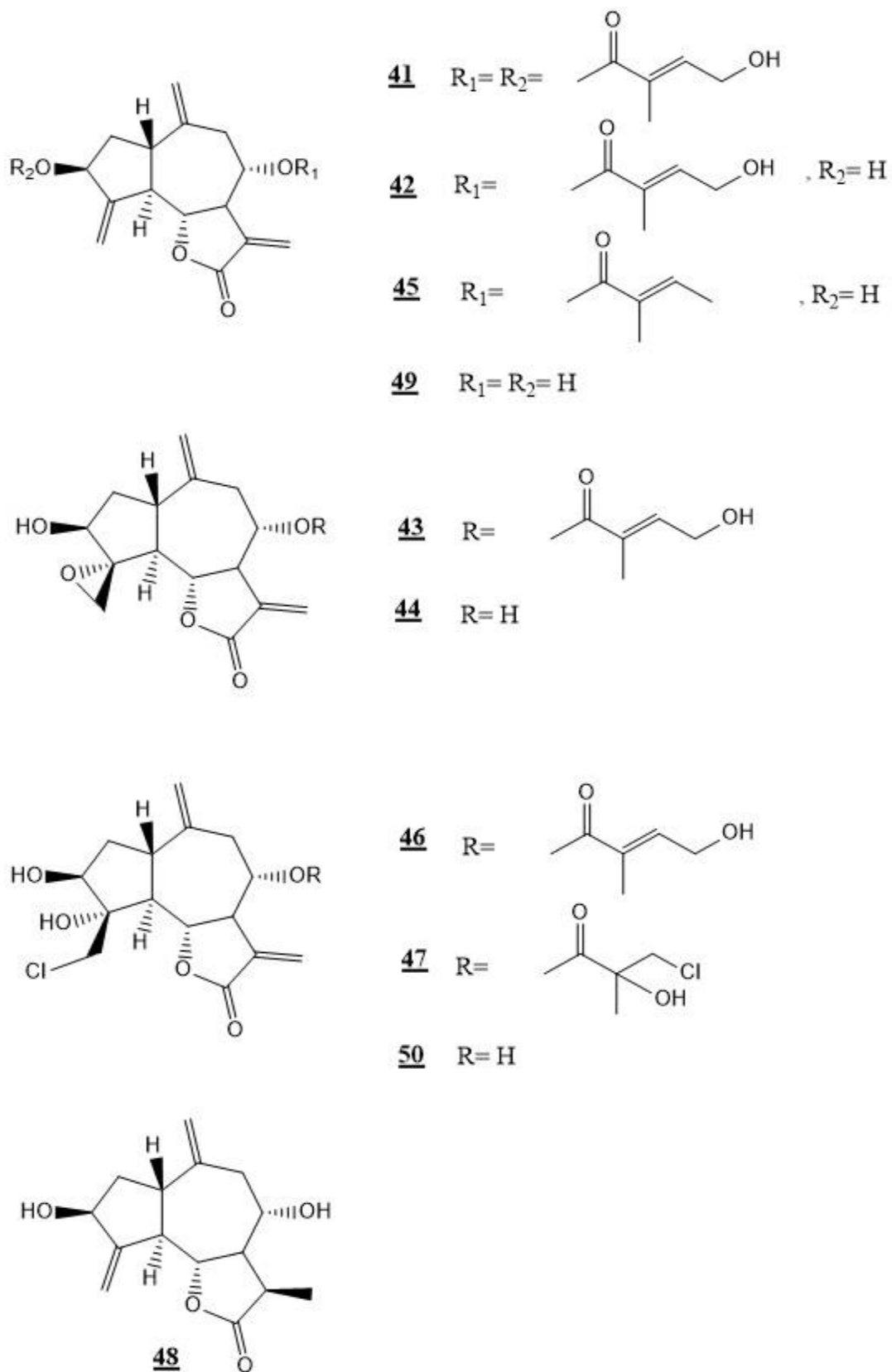


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 41 à 50

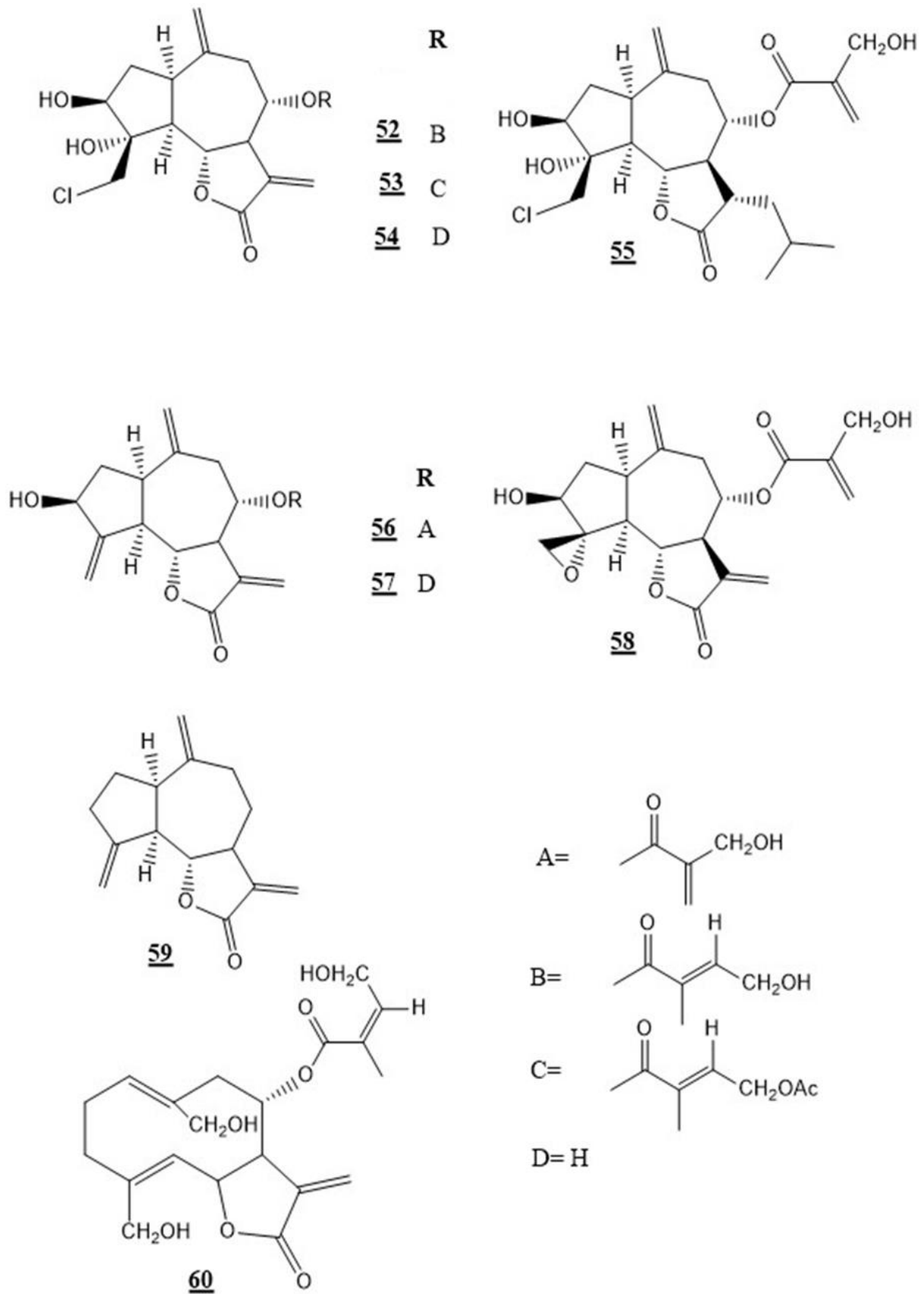


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 52à 60

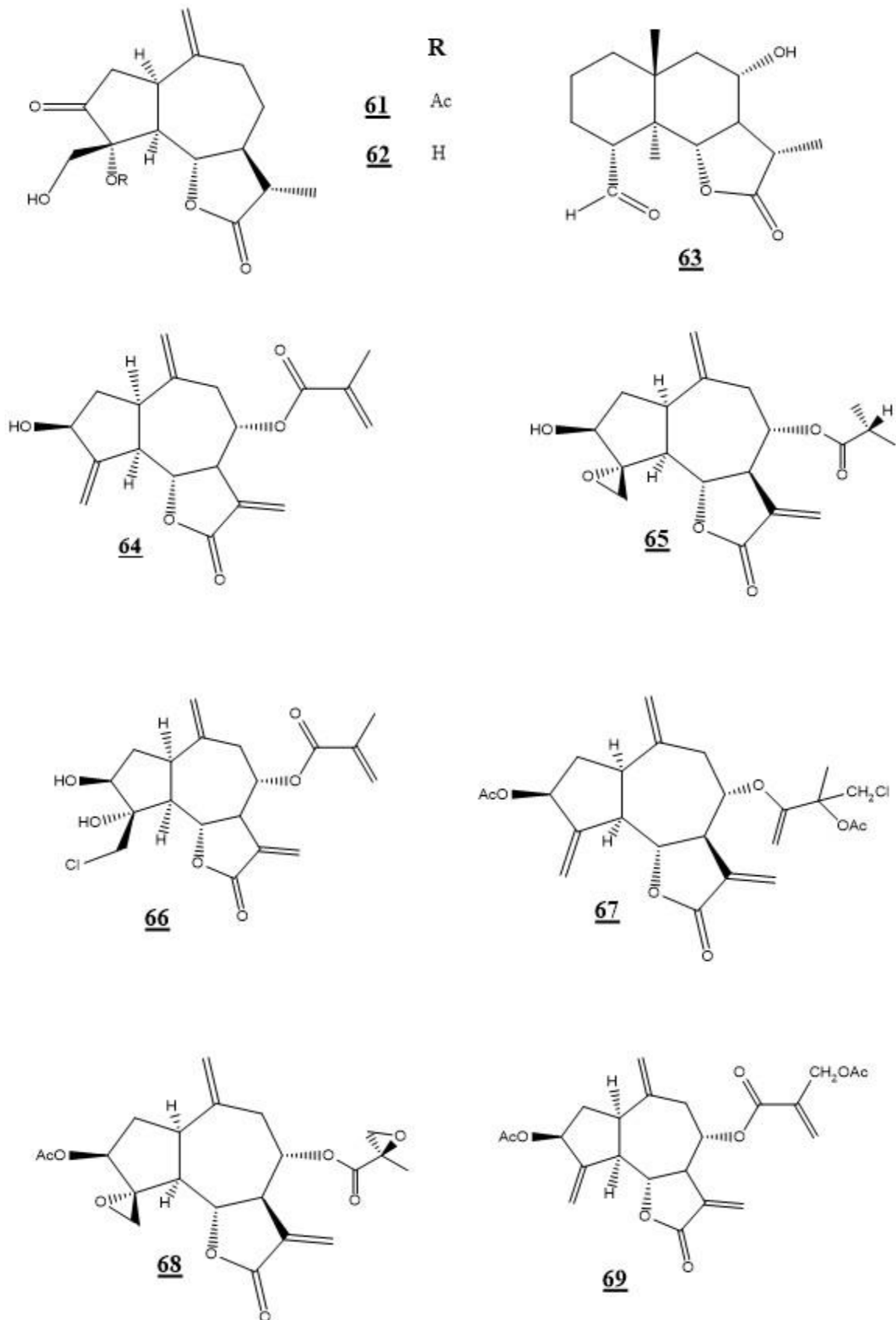


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 61 à 69

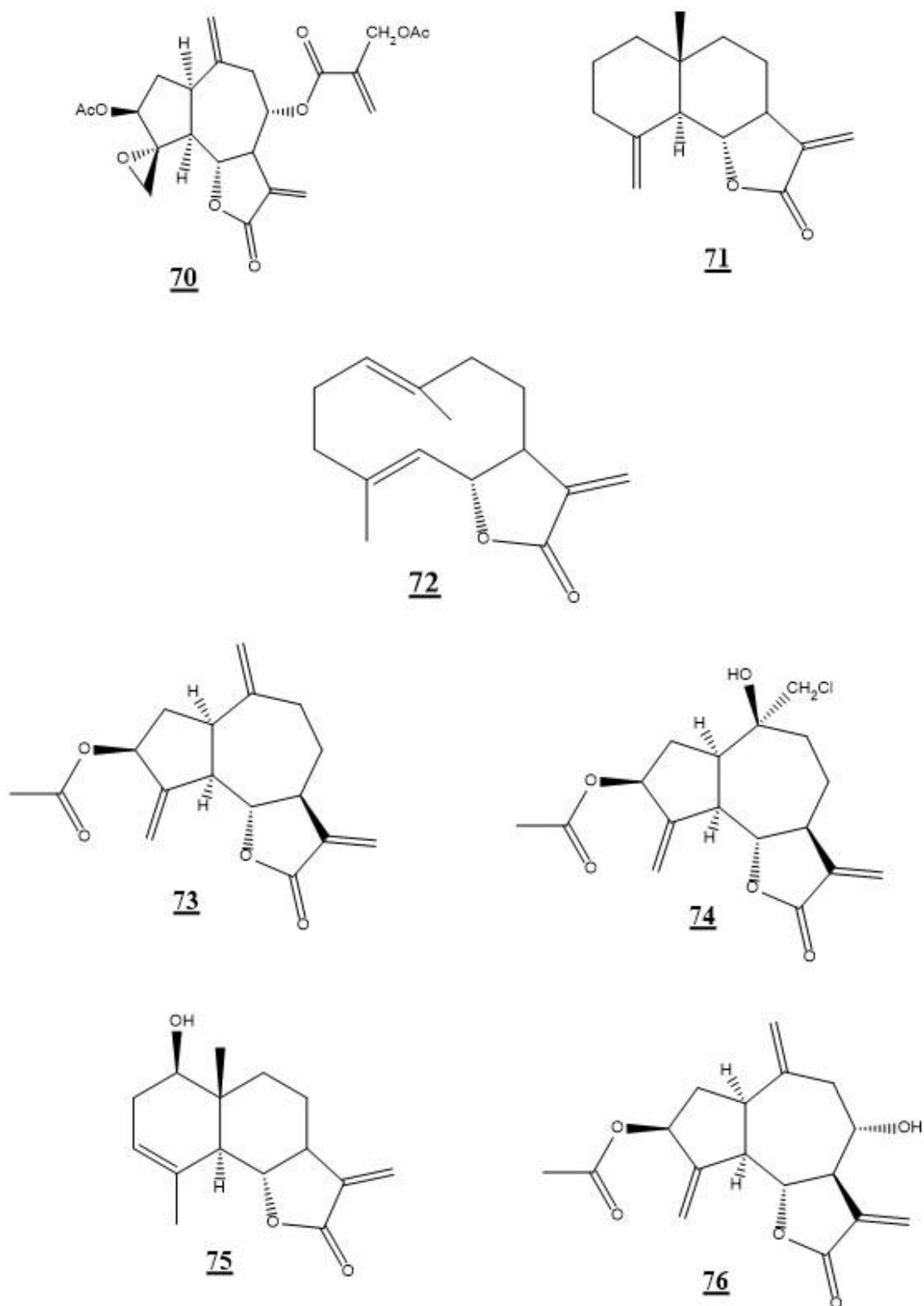


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquitérpeniques de 70 à 76

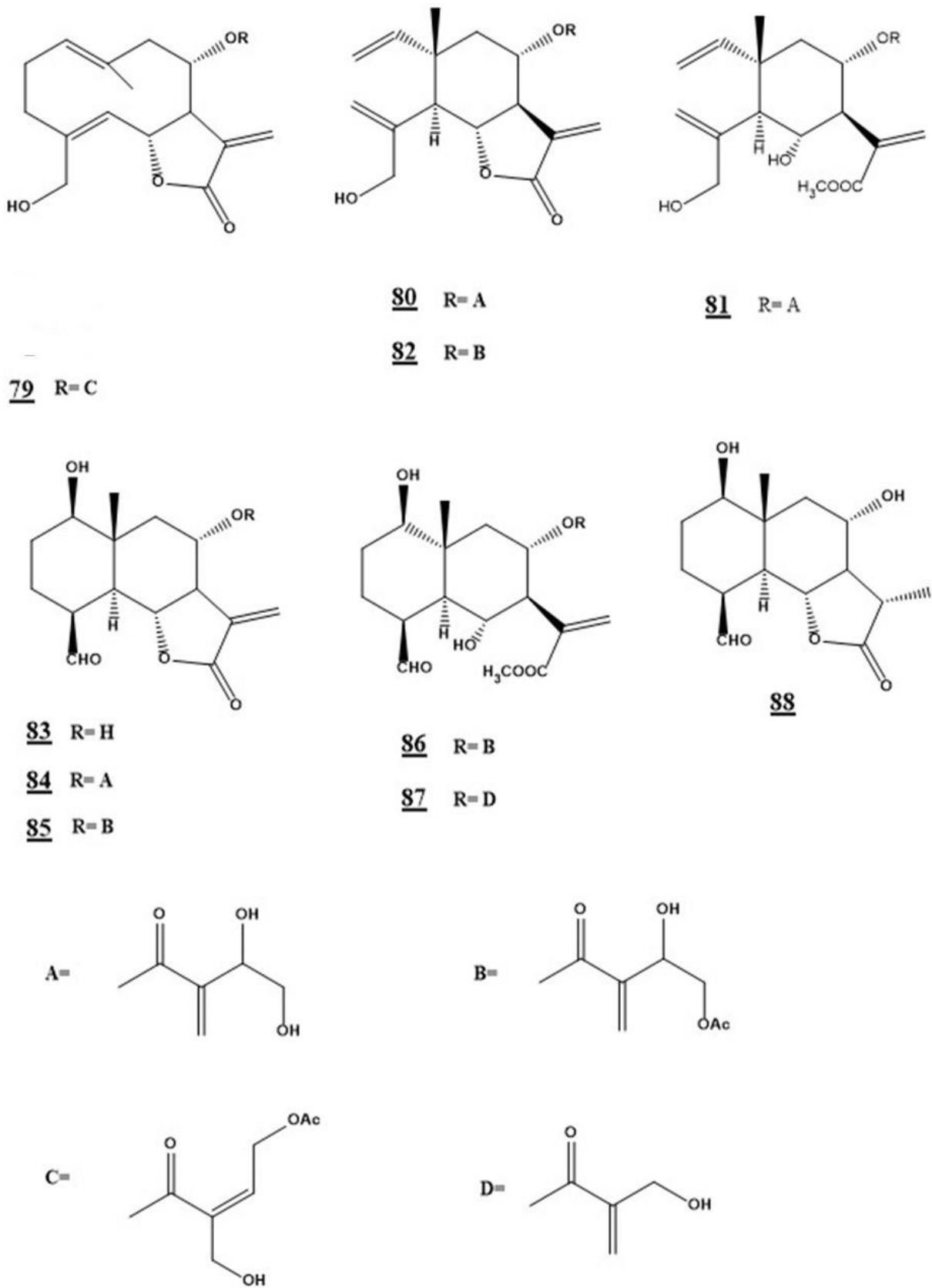
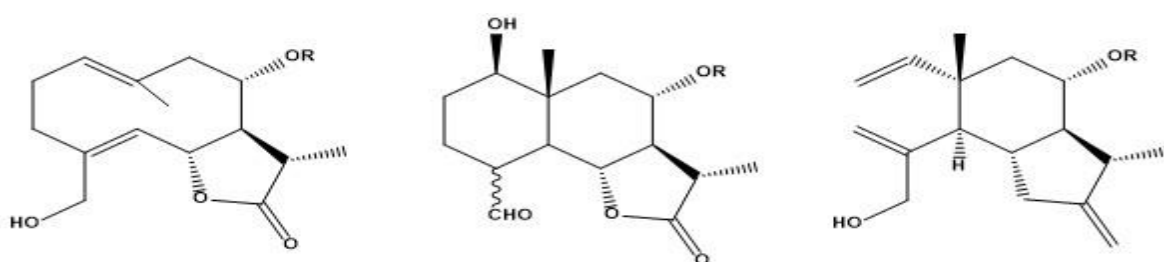


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquiterpéniques de 79 à 88



89 R= A

90 R= B

91 R= C

96 R= H

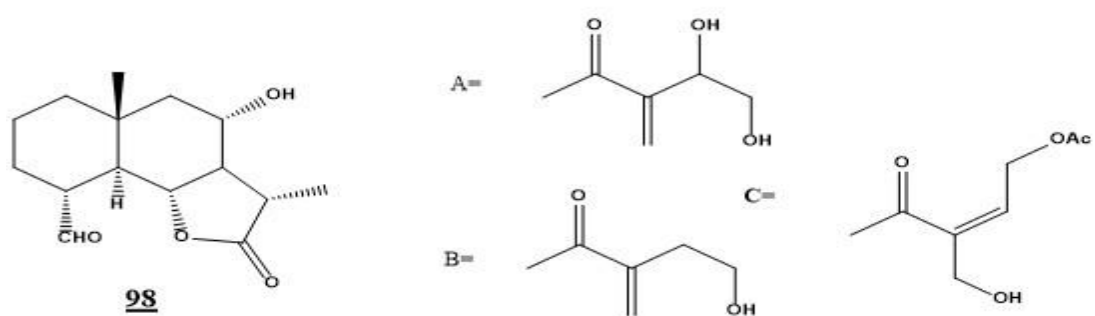
92 R= B, -CHO

93 R= B, -CHO

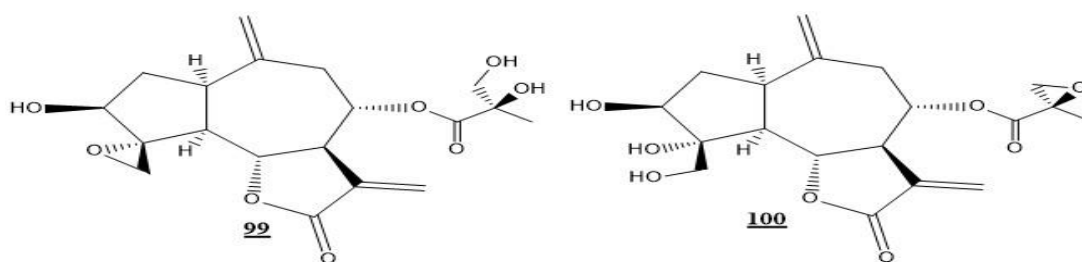
97 R= H, -CHO

94 R= B

95 R= H

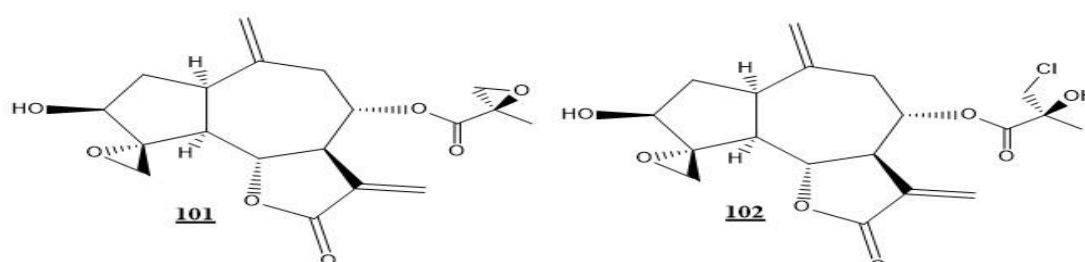


98



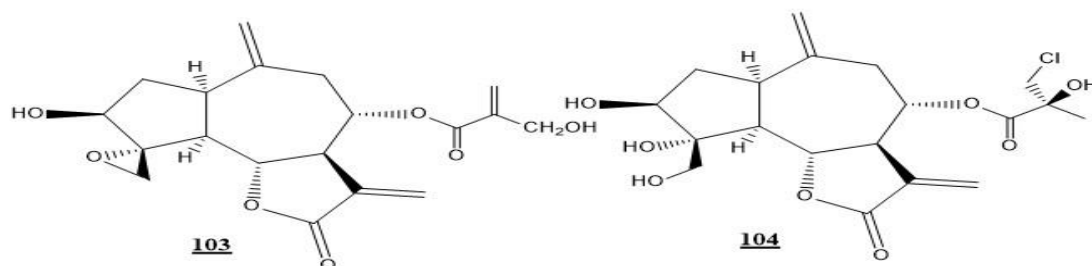
99

100



101

102



103

104

Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquitérpeniques de 89 à 104

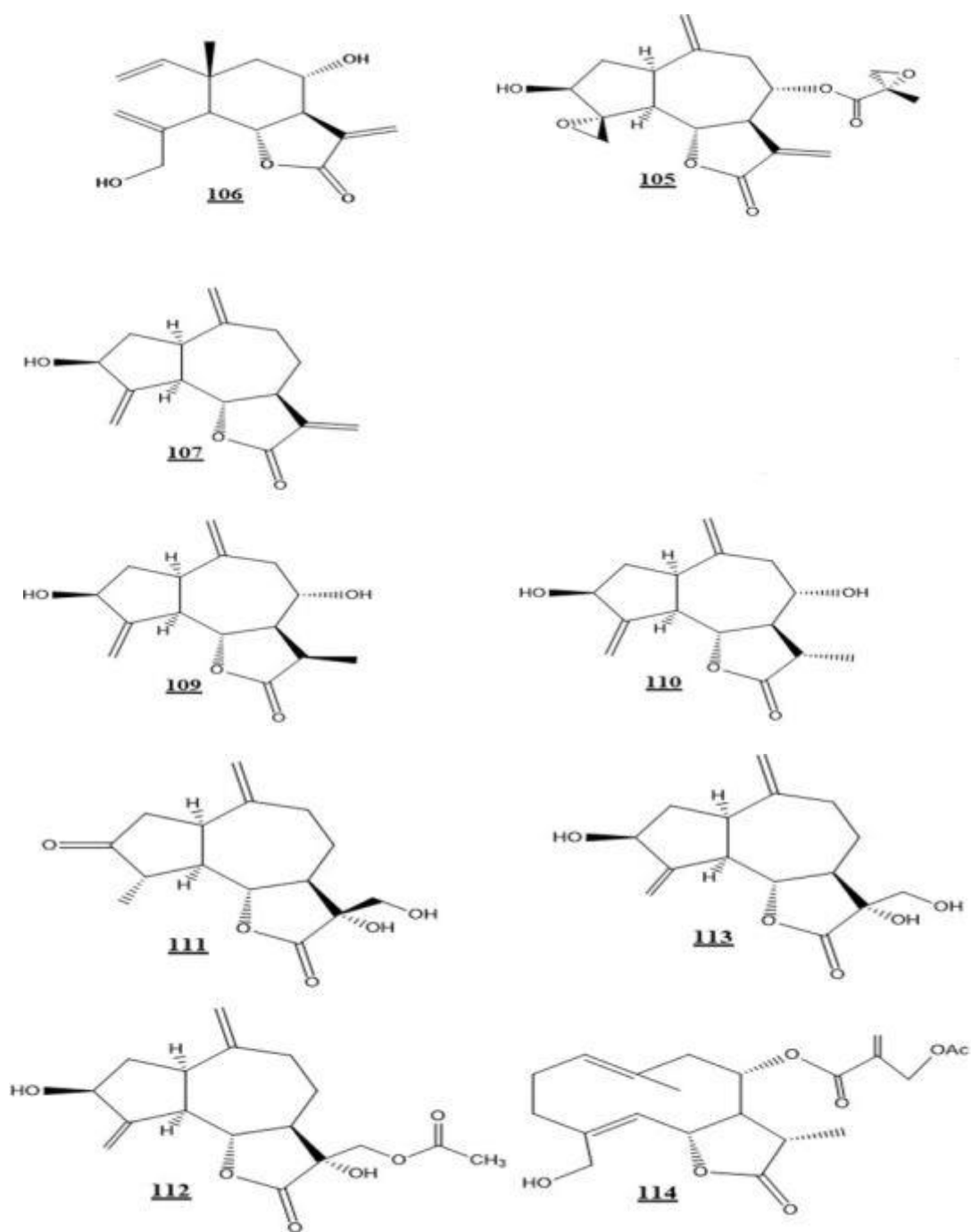


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquiterpeniques de 105 à 114

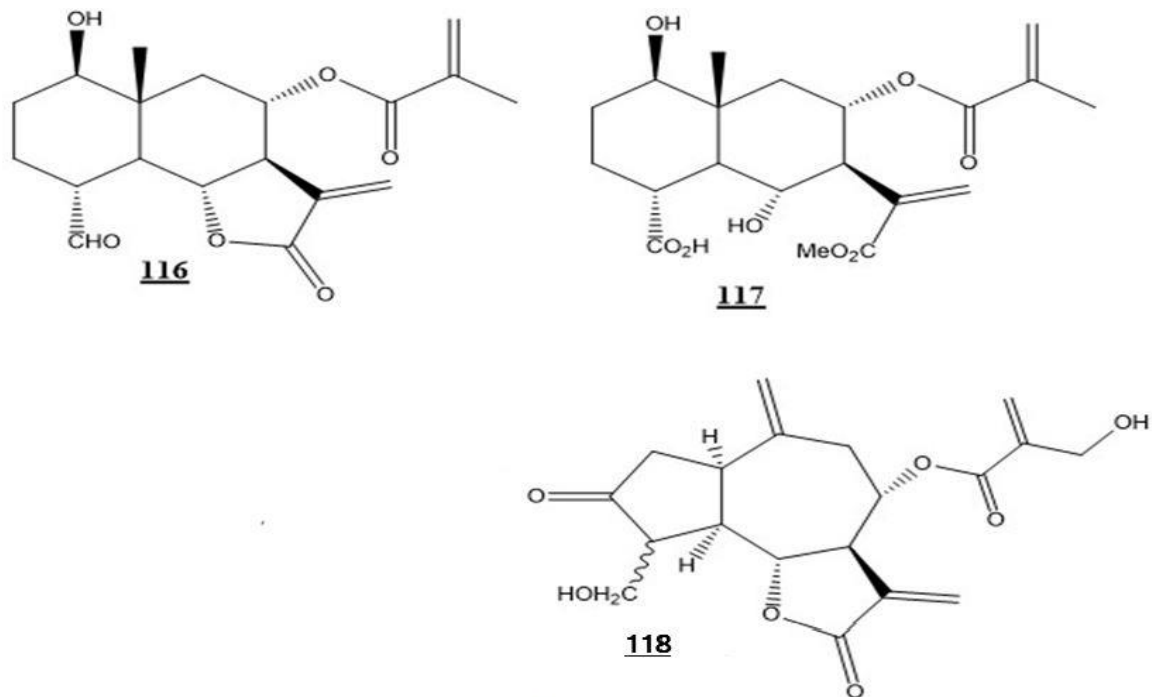


Figure I.21 Suite : Les structures des lactones sesquitérpeniques de 116 à 118

I.5 Conclusion

A la fin de cette modeste recherche bibliographique, on peut conclure que les flavonoïdes et les lactones sesquitérpeniques de type germacranolides, élemanolides, eudesmanolides et gainolides constituent la majorité des métabolites secondaires du genre *Centaurea*. D'autres métabolites n'ont pas été reportés comme les lignanes, les tritérpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes.

Les espèces du genre *Santolina* sont aussi connues pour être de bon accumulateurs de métabolites secondaires et en particulier les composés phénoliques

Cette diversité de composés est responsable des activités antioxydantes et antibactériennes.

Ces composés sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques des deux espèces du genre *Santolina* et *Centaurea* et plus particulièrement de la famille des Astéracées.

Références bibliographiques

- [1] J. L. Panero, B. S. Crozier. Asteraceae, Sunflowers, daisies. Version 27 January <http://tolweb.org/Asteraceae/20780/2.01.27> in The tree of life Web project, <http://tolweb.org/>
- [2] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du C.N.R.S. Paris, tome 2, p902.
- [3] M. Botineau, Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier (2010) 1143-1145
- [4] K. Bremer, Asteraceae-cladistics and classification. Timber Press, Portland, Oregon, (1994)
- [5] W.S. Judd, C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens, Plant systematics, a phylogenetic approach, Sinauer Associates, Sunderland. (2007).
- [6] O.T. Solbrig, Subfamilial nomenclature of compositae, (1963) *Taxon* 12, pp 229–235
- [7] R. E. Spichiger, V.V. Savolainen, M. Figeat, D. Jeanmonod, Botanique systématique des plantes à fleurs, (2004) 3^{ème} édition pp 348-349.
- [8] J.W. Byng, W.M. Chase, J.M. Maarten, An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants, APG IV, *Bot. J. Linn. Soc.* (2016) 6 1811–20
- [9] A. Cronquist, An integrated system of classification of flowering plants, Columbia University Press, (1981).
- [10] T. M. Barkely, L. Brouillet, J. L. Strother, Asteraceae, *Flora of north America*, (2006) vol 19 3-69
- [11] S.K Panda, W. Luyten, Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India, *Parasite* 25 (10) (2018).
- [12] R. Singh, A.K. Tiwari, G. Singh, Diversity of Host Plants of Aphids (Homoptera: Aphididae) Infesting Asteraceae in India, *Int. J. Zool. Invest.* 1(2) (2015) 137–167
- [13] K. Liu, P.G. Rossi, B. Ferrari, L. Berti, J. Casanova, F. Tomi, Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina Corsica* Jordan, *Phytochemistry* 68(12) (2007) 1698-705.
- [14] Y.T Utrecht, E. Suzette, S.R. Bennekom, T.S. Haaksbergen, *Série Le Jardin (Arbustes)*, (1995) 63.
- [15] J.A. Gardner, *Herbs in bloom: a guide to growing herbs as ornamental plants*, (2005) 296-298.
- [16] J. Palá-Paúl, J. Usano-Alemany, E. Granda, AC. Soria, Antifungal and antibacterial activity of the essential oil of *Chamaecyparis lawsoniana* from Spain. *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 1383-36.
- [17] L. Cornara, A. La Rocca, S. Marsili, M.G Mariotti, Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Ethnopharmacology* 125 (2009) 16-30.

- [18] LP. Christensen Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry* 31 (1) (1992) 7-49.
- [19] A. Sala, M.C Recio, R.M. Giner, S. Manez, J.L. Rios. Anti-phospholipase A₂ and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Life Science*, 66 (2000) 35-40.
- [20] B. Ferrari, F. Tomi, P. Richomme, J. Casanova, Two new irregular acyclic sesquiterpenes aldehydes from *Santolina corsica* essential oil. *Magn. Reson. Chem.* 43(2005) 73-74.
- [21] RM. Giner Pons, JL.Rios Canavate, *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Fitoterapia* 1 (2000) 27-34
- [22] J.F. Sanz, A. Garcia-Sarrion A, J.A Marco, Germacrane derivatives from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytochemistry* 30 (1991) 3339-3342.
- [23] A. F. Barrero, M. M. Herrador, J. F. Quilez, R. Alvarez-Manzaneda, D. Portal, J. A. Gavin, D. G.Gravalos. M.S. Simmonds, W. M. Blaney, Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*, A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry* 51 (1999) 529-41.
- [24] G. Cherchi, D. Deidda, B. De Gioannis, B. Marongiu, R. Pompei, S. Porcedda, Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide, influence of some process parameters and biological activity, *Flav. Frag.J.* 16 (2001)35-43.
- [25] R. Fdil, I. Lmacharaa, N. Fdil, A. Ezoubeiri, C. A. Gadhi, Huile essentielle des parties aériennes de *Santolina Africana*, *Bull. Soc. Pharm.* 150 (2011) 47-60.
- [26] J.A.Teixeira Da Silva, Mining the essential oils of the Anthemidea, *Afr. J. Biotechnol.* 3 (2004) 706-20]
- [27] C. Grosso, A. Cristina, F. J. Burillo, A. M. Mainar, J. S. Urieta, J. G. Barroso, J. A. Coelho, A. M. F. Palavra, Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3215-3222.
- [28] A. Ahuja, SK. Bakshi, SK. Sharma, RK. Thappa, SG. Agarwal, SK. Kichlu, R. Paul R, MR. Kaul, Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flav. Frag. J.* 20 (2005) 403-406
- [29] V. Lopez, S.Akerreta, E. Casanova, J. M. Garca-Mina, R. Y. Cavero, M. I. Calvo, Screening of Spanish medicinal plants for Antioxidant and antifungal activities, *Pharm. Biol.* 46 (2008) 602-609
- [30] S. Akerreta, R.Y. Cavero, V. López, M. I. Calvo. Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*3 (2007) 16
- [31] B. Suresh , S. Sriram , S.A. Dhanaraj , K. Elango , K. Chinnaswamy, Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil, *J. Ethnopharmacol.* 55(2) (1997) 151-159
- [32] W. Kisiel, R. Dawid-Paó, H. Grabarczyk, G. Nowak, Germacrane derivatives from *Santolina pinnata* subs. *neapolitana*. *Z.Naturforsch.* 58c (2003) 793-796.

- [33] M. Ben jemia, F. Senatore, M. Bruno, S. Bancheva, Components from the essential oil of *Centaurea aeolico Guss.* And *C. diluta Aiton* from Sicily, Italy. *Rec. Nat. Pro.* 9 (4) (2015) 580-585.
- [34] F.A. Lohmueller, *The botanical system of the plants (Das Botanisches System der Pflanzen)* (2006)
- [35] F. Bakkali, S. Averbek, D. Averbek, M. Idaomar, Biological effects of essential oils, *Food. Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446-475
- [36] G. F. Trease, W. C. Evans, *Pharmacognosy* Bailliére, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janeiro, Tokyo, Hong Kong. , (1983) 225-514,
- [37] D. J. Mabberley, *The plant book*, Cambridge University Press (1987) 110
- [38] A. M. Fortuna, E.C. Riscala, C.A.N. Catalan, T.E. Gedris, W. Herz, Sesquiterpene lactones from *Centaurea Tweediei*, *Biochem. Syst. Ecol.* 29 (2001) 967-971.
- [39] G. Flamini, C. Bulleri, C. Bulleri, I. Morelli, A. Manunta, A New Flavonoid Glycoside from *Centaurea horrida*, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 622-663.
- [40] F. Bohlman, T. Burkhardt, C. Zdero, *Naturally Occuring Acetylenes*, Academic. Press. London. (1973) 452.
- [41] Z. F. Ahmed, F.M. Hammoud, A.M. Rizk, S.L. Ismail, *Planta. Med.* 18 (1970) 227-231.
- [42] M. Picher, T. Savane, T.J. Ampara, *J. Nat. Prod.* 47 (1984) 184-185.
- [43] C. Karamenderes, E. Bedir, R. Pawar, S. Baykam, I. A. Khan. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpeneglycosides from *centaurea hierapolitana*, *Pytochemistry* 68 (2007) 609-615
- [44] F.H. Hellwig, *Centaureinae (Asteraceae)* in the mediterranean history of ecogeographical radiation. *Plant. Syst. Evol.* 246 (2004) 137-162.
- [45] S. Mohammad, C. Sezgin, J. Marcel, K. Yashodharan, M.M. Stephen, N. Lutfun, K.T. Paul, D. S. Satyajit, Isolation structure elucidation and bioactivity of schischkinin, a unique indole alkaloid from the seeds of *centaurea schischkinii*, *Tetrahedron* 61 (2005) 9001–9006.
- [46] E. Kupeli. Akkol, R. Arif, F. Erguna, E. Yesilada, Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from *centaurea* species, *J. Ethnopharmacol.* 122 (2009) 210–215.
- [47] Y. Bülent Köse; G. İşcan, B. Demirci; K.H.C. Başer, S. Çelik, Antimicrobial activity of the essential oil of *centaurea aladagensis*, *Fitoterapia* 78 (2007) 253–254.
- [48] S. Mohammad, M.M. Stephen, J. Marcel, T. Jioji, N. Lutfun, K.T. Paul, D. S. Satyajit, Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *centaurea Montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells, *Tetrahedron* 62 (2006) 11172–11177.
- [49] D.S. Satyajit, L. Anuszka, N. Lutfun, K. Yashodharan, J. Marcel, Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae), *Phytochemistry* 57(8) (2001) 1273-1276.

- [50] E. Yesilada, G. Honda, E. Sezik, M. Tabata, T. Fujita, R. Tanaka, Y. Takeda, Y. Takaishi, Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains, *J. Ethnopharmacol* 46 (1995) 133–152.
- [51] B. Ozcelik, I. Gurbuz, T. Karaoglu, E. Yesilada, Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis*, *Microbiol. Res.* 164 (8) (2009) 545-552
- [52] K.H. Base, G. Honda, W. Miki, Herb drugs and herbalist in Turkey, *Ilca Studia Culturae Islamicae*, Tokyo, 1996.
- [53] J.L. Masso, M.N. Bertran, T. Adzet, Chemical and pharmacological study of some *Centaurea* species (Compositae) *Plant. Méd. Phytother.* 13 (1979) 41-45.
- [54] A. Abdurrahman, Z. Gokhan, O.G. Gokalp, S.C. Yavuz., D. Ahmet, Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora *Food. Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2914–2920.
- [55] M.I. Skliar, M.S. Toribio, D.S. Oriani, Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*, *Fitoterapia* 76(2005) 737– 739.
- [56] P. Font Quer, *Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado*. Editorial Labor SA, (1995) 851.
- [57] Z.F. Ahmed, H. Rimpler, F.M. Hamouda, A.M. Rizk, S.I. Ismail, the flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt, *Phytochemistry* 9(7) (1970) 1595-1601.
- [58] G.A. Breton, A.G. Gonzales, M.R. Rodriguez, flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, *Anales de Quimica*, 64(2) (1969) 297- 301.
- [59] H.M. Fathallah, F.F. Kassem, N.S. El-Shaer *Alexandria J. Pharm.Sci.* 8(3), (1994) 219-222.
- [60] R.E. Negrett, I. Lator, N. Backhouse, R. Pena, C. Delporte, Some flavonoids of *Centaurea floccosa* Hook and Arn, *Plantes Medicinal et Phytotherapie* 22(1) (1988) 1-10.
- [61] R.M.A. Mansour, M.F. Abdalla, N. A.M. Saleh, Quercetin 3,7-disulfate from *Centaurea alexandrina*, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2 (1988) 45-46.
- [62] F. Orallo, M. Lamella, M. Carnica, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*, *Planta Medica.* 64 (1988) 116-119.
- [63] K. Kamanzi, J. Raynaud, B. Voirin, flavone glycosides of *Centaurea melitensis* *Compositae*, *Die Pharmazie* 37 (1982) 454-455.
- [64] R.E. Negrete, N. Backhouse. B. Bravo, S. Erazo, R. Garcia. S. Avendano, Quelques flavonoïdes de *Centaurea floccosa* Hook et Arn, *Plantes Medicinal et Phytotherapie.* 21(2) (1987) 168-172.
- [65] M.M.A. Amer, O.M. Salama, A.A. Omar, methylated flavonoid aglycones from *Centaurea alexandrina*, *Acta Pharmaceutica Jugosavial.* 34(4) (1984) 257-259.

- [66] J.F. Gonnet, Flavonoid glycoside variations in the progeny of wild specimens of *Centaurea montana* and comments on the origin of their natural diversity. *Biochem Syst. Ecol.* 24(5) (1996) 447-460.
- [67] B. Maurizio, M. Antonella, R. Sergio, E.G. Thomas, H. Warner, Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea paniculata* ssp. *Castellana*, *Biochem Syst Ecol.* 30(4) (2002) 379-381.
- [68] N.L. Ribeiro, L. Nahar, Y. Kumarasamy, N. Mir-Babayev, S.D. Sarker, flavonoid C-glucosides and lignans from *Centaurea macrocephala*, *Biochem Syst Ecol.* 30 (2002) 1097–1100
- [69] A. Ulubelen, S. Oksuz, cytotoxic flavones from *Centaurea urvillei*, *J.Nat.Prod* 45(3) (1982) 373
- [70] A. Ulubelen, S. Oksuz, A.H. Mercilli, Palmitic acid ester of sitosteryl 3 β -glucoside from *Centaurea regia*, *Phytochemistry.* 27(12) (1988) 3964-3965.
- [71] J.F. Gonnet, flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea triumfetti* (Compositae) and comments on its relationships with *centaurea Montana* based on flavonoid fingerprints, *Biochem Syst Ecol.* 21(3) (1993) 389-396.
- [72] S. Akkal, F. benayache, F. Tillequin, A. Bentamene, K. Medjroubi, E. Seguin, Flavonoids aglycones from *Centaurea napifolia*, *Chem. Nat. Compd.* 39(2) (2003) 219–220
- [73] K. Medjroubi, S. Mezhoud, F. Benayache, E. Seguin, F. Tillequin, flavonoids of the aerial parts of *Centaurea pullata*, *Chem. Nat. Compd.* 41(2) (2005) 226-227.
- [74] G. Athmani, F. Benayache, S. Benayache, H. Dendougui, *J. Soc.Alg. Chimie.* 8(1) (1998) 29-36
- [75] T. Mishio, T. Honma, T. Iwashina, yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments, *Bioch. Syst. Ecol.* 34 (2006) 180-184.
- [76] H.S. Al-Easa, Thesis, University of Reading, Reading England. (1990).
- [77] S. Oksuz, C. Johansson, 6-metoxylated and C-glycosyl flavonoids from *Centaurea* species, *J. Nat. Prod.* 47(5) (1984) 902-903.
- [78] S. Oksuz, H. Ayyildiz, sesquiterpene lactones from *Centaurea cornopifolia*, *Phytochemistry* 25(2) (1986) 535-537.
- [79] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache, K. Medroubi, M. Jay, F. Tillequin, E. Seguin, a new flavones glycoside from *Centaurea*, *Fitoterapia* 70 (1999) 368-370
- [80] S. Akkal, F. Benayache, K. Medjroubi, F. Tillequin, E. Seguin, flavonoid aglycones from *Centaurea furfuracea*, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 641–643.
- [81] K. Kamanzi, B. Voirin, J. Raynaud, the C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea malitensis*, *Plantes Medicinales et Phytotherapie.* XVII (1) (1983) 47- 51.
- [82] E. Gadeschi, Z.D. Jorge, G.M. Massanet, F.R. Lurs, two derivatives of costic acid from *Centaurea arguta*, *Phytochemistry* 28(8) (1989) 2204-2206.

- [83] A.G. Gonzales, J.Bermejo, J.L.Breton, J.Triana, flavonoids of *Centaurea hyssopifolia*, *Anales de Quimica*. 67(7-8) (1971) 795-799.
- [84] M.T. Picher, E. Seoane, A. Tortajada, 9 α ,15-dihydroxygermacra-1(10)-dien-11 β ,13-dihydro-6 α ,12-olide, a germacranolide isolated from *Centaurea aspera* subsp *stenophylla*, *Phytochemistry* 23(12) (1984) 2956-2958.
- [85] F. Ferreres, F.Tomas, flavonoids of the *Centaurea aspera* (Compositae), *Liaison-Groupe polyphenol* 9 (1980) 294-301.
- [86] F. Ferreres, F. Tomas, derivados urònicos de la apigenina en la *Centaurea aspera* (Compositae). *Anales de Quimica Series C*. 76(1) (1980) 92-93.
- [87] S. Asen, R.M. Horowitz, Apigenin 4'-O- β -D-glucoside 7-O- β -D)- glucuronide: The copigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry* 13(7) (1974) 1219-1223.
- [88] Y.E. Ali, A.A. Omar, T.M. Sarg and D.J. Slatkin, chemical constituents of *Centaurea pallescens*, *Planta Medica*. 53(5) (1987) 503-504
- [89] Litvinenko VI, Bubenchikova VN. Phytochemical study of *Centaurea cyanus*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 6 (1988) 792-795
- [90] H. Tamura, T. Kondo, Y. Kato, T. Goto, Structures of succinyl anthocyanin and a malonyl flavone two constituents of the complex blue pigment of cornflower *Centaurea cyanus*, *Tetrahedron. Lett.* 24 (51) (1983) 5749- 5752.
- [91] G. Ilhan, Y. Erdem, Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques, *J. ethnopharmacol.* 112(2) (2007) 284-291.
- [92] Z.F. Mahmoud, F.F. Kasem, N.A. Abdessalam, phytochemical study of *centaurea calcitrapa*, *Egypt. J. Pharm.Sci.* 27(1-4) (1986) 283-289.
- [93] G.G. Zapesochonaya, R.I. Evstratova, M.N. Muthan, *Khimiya Prirodnykh Soedini.* 5 (1977) 705-707.
- [94] S. Oksuz, E. Putun, sesquiterpene lactones from an unspecified variety of *Centaurea*, *Doga: Kim.Ser.* 11(2) (1987) 66-71.
- [95] G. Flamini, M. Pardini, I. Morelli, a flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*, *Phytochemistry* 58 (2001) 1229–1233.
- [96] G. Flamini, E. Antognoli, I. Morelli, two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy, *Phytochemistry* 57 (2001) 559–564.
- [97] G. Flamini, C. Bulleri, I. Morelli, secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning, *Biochem.Syst. Ecol.* 30 (2002) 1051-1054.
- [98] A. Chicca, M. Tebano, B. Adinolfi, K. Ertugrul, G. Flamini, P. Nieri, Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*, *Eur.J. Med.Chem.* 46 (2011) 3066-3070.
- [99] P.J. Jones, D.E. MacDougall, F. Ntanios, C.A. Vanstone, dietary phytosterol as cholesterol-lowering agents in humans, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75 (1997) 217-27.

- [100] K. Kamanzi, J. Raymond, B. Voirin, the C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea malitensis*, *Plantes Medicinal et Phytotherapie*. 17(1) (1983) 47-51.
- [101] K.H. Pegel, The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition, *S. Afric. J.Sci.* 93 (1997) 263-268.
- [102] E. Georgiadou, *Georg. M. Sc. Athens*. (1999)
- [103] X. Yan, J.K. Liang, composition chimique des aliments *Sonchus oleraceus* L., *J. Chin Pharmac. Univ*, 36 (5) (2005) 411-413.
- [104] C. Gousiadou, Skaltsa, Hsecondary metabolites from *Centaurea orphanidea*, *Biochem Syst. Ecol.* 31(4) (2003) 389– 39
- [105] D. Youssef, W.F. August, constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*, III. phenolic constituents of the aerial parts, *Planta Medica*, 61(1995) 570-573
- [106] H.H. Chou, M. Parvez, M. Shaiq Ali, A. Shakeel, A. Waqar, cirsimaritin, *Acta Crystallographica Section E*, 58 (3)(2002) 285–287.
- [107] M. Bruno, W. Herz, sesquiterpene lactones and flavones from *Centaurea 227 cineraria* subsp *umbrosa*, *Phytochemistry* 27(6) (1988) 1873-1875.
- [108] J.K. Pedja, T. Vele, M. Slobodan, V. Vlatka, D. Petar, *Marin Biochem. Syst. Ecol.* 32(2004) 355–357.
- [109] M. Bruno, W. Herzsesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea cineraria* ubp.*Umbroa*, *Phytochemistry* 27(6) (1988)1837-1875.
- [110] I.G. Collado, F.A. Macias, G.M. Massanet, F.R. Lius, (1985), flavonoids from *Centaurea clemente* L., *J. Nat. Prod.*48(5), 819-822.
- [111] I.G. Collado, F.A. Macias, G.M. Massanet, F.R. Liusstructure, chemistry and stereochemistry of clementeins, Sesquiterpene lactones from *Centaurea clementei*, *Tetrahedron lett.*42(13) (1986) 3611-3622.
- [112] S. Oksuz, H. Ayyildiz, Sesquiterpene lactones from *Centaurea cornopifolia*, *Phytochemistry* 25(2) (1986) 535-537.
- [113] H.A.A. Twaij, A. Kery, N.K. Al-Khazraji, some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*, *J. Ethnopharm.* 9(2-3) (1983) 299-314
- [114] A.Kery, H.A.A.Tawaij, N.K. El-Khazraji, Methylated flavones from *Centaurea phyllocephala*, *L.Herba.Hungarica*. 24 (1985) 183-194.
- [115] S.M.B.P. Santos, F.B. Balma, M.B. Grande, Flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, an endemic species of Portugal.*Bull.liason, Groupe Polyphenol*, (16) (1992) 153-156.
- [116] H.X. Wei, W.Y. Gao, Y.K. Tian, Y.K.Guan, M.H. Huang, D.L. Cheng, New eudesmane sesquiterpene and thiophene derivatives from the Roots of *Rhaponticum uniflorum*, *Pharmazie* 52(3) (1997) 245-247.

- [117] N.L. Ribeiro, L. Nahar, Y. Kumarasamy, N. Mir-Babayev, S.D. Sarker, Flavonoid C-glucosides and a lignan from *Centaurea macrocephala* (Compositae), *Biochem.Syst.Ecol.* 30 (2002) 1097–1100.
- [118] A.M. Fortuna, E.C. de Riscalca, C.A.N. Catalan, T.E. Gedris, W. Herz, Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*, *Biochem.Syst.Ecol.* 29(9) (2001) 967-971.
- [119] M. Aqil, I.Z. Khan, A.D. Goni, Flavonoids from *Centaurea senegalensis* DC compositae, *Bull. Chem.Soc.Ethiop.*12 (2) (1998) 177-180.
- [120] G. Flaminia, M. Pardinia, I. Morellia, K. Ertugrulb, A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *centaurea bracteata*, *Phytochemistry* 58(2001) 1229–1233.
- [121] H. Roesler, A.E. Star, T.J. Mabry, New 6- methoxyflavonols from *Centaurea jacea*, *Phytochemistry* 10(2)(1971) 450-451.
- [122] F. Bohlmann, C. Zdero, isolation of Centaureidin from *Centaurea species*, *Tetrahedron Lett.* (33)(1967) 3239-3242.
- [123] G. Flamini, G. Stoppelli, I. Morelli, K. Ertugrul, H. Dural, O. Tugay, H. Demirelma, secondary metabolites from *Centaurea isaurica*, *Biochem. Syst. Ecol.* 32(2004) 553–557.
- [124] H. Wagner, R. Hoer, T. Murkami, L. Farkas, Studies on the glycosides of *Centaurea jacea* L.IV isolation, structure analysis and synthesis of 4',5,7 trihydroxy 3'-6-dimethoxy flavones-7-mono beta-D- glucopyranoside (jaccosid), a new flavones glycoside from the root of *Centaurea jacea* L, *Chem Ber.* 106(1) (1973) 20-27.
- [125] S. Akkal, Thèse de doctorat d'état, Université de Constantine. (2001).
- [126] O. Sevil, S. Sema, Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*, *Phytochemistry* 46(03) (1997) 545-548.
- [127] L.P. Christensen, J. Lam flavones and other constituents from *Centaurea species*, *Phytochemistry* 30(8) (1991) 2663-2665.
- [128] K. Kamanzi, J. Raymond, B. Voirin, flavone glycosides of *Centaurea melitensis* (Compositae), *Die Pharmazie*, 38(7) (1982) 494-495.
- [129] N. Ahmed, R. Bibi, Chemical investigation of *Centaurea iberica*, *Fitoterapia* 50(5) (1979) 199-200.
- [130] K. Kamanzi, J. Raymond, B. Voirin, *Planta Medica*, 16(1) (1982)30-33
- [131] F. Gavina, J. Delgado, M. Gonzalles, E. Villar, *Quimica*, 70(12) (1974) 1035- 229 1036.
- [132] K. Kamanzi, J. Raymond, B. Voirin, *Plantes Medicinal et Phytotherapie*, 17(1) (1983) 47-51.
- [133] S. Oksuz, B. Halfon, B. Teremflavonoids of *Centaurea cuneifolia*, *Planta Medica*, 54(1) (1988) 89.
- [134] C. Gousiadou, H. Skaltsa, Secondary metabolites from *Centaurea Orphanidea*, *Biochem. Syst. Ecol.*31 (4) (2003) 389-396.

- [135] F. Ferreres, F. Tomas, derivados uronicos de la apigenina en la *Centaurea aspera* (Compositae), *Anales de Quimica Series C*, 76(1) (1980), 92-93.
- [136] M.B.P. Santos, F. Broti Balma, M.B Grande, flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, *Groupe Polyphenol*, (1992) 153-156.
- [137] F.E. Barrero, J.F Sanchez, I. Rodriguez, Germacranolides from *Centaurea melitensis*, *Phytochemistry* 28 (7) (1989) 1975-1976.
- [138] NS.M. Kupchan, Flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, *Groupe Polyphenol*, *J. Pharma. Sci*, 54 (1965) 929
- [139] J.A. Marco, J.F. Sanz-Cervera, Y. Alberto, F. Sancenon, M. Carda, *Phytochemistry* 66 (14) (2005) 1644-1650.
- [140] C. Karamenders, B. Erdal, P. Rahul, B. Sura, A.K. Ikhlas, Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*, *Phytochemistry*, 68 (5) (2007) 609-615.
- [141] Y.T.A. Diaa, Sesquiterpene lactones of *Centaurea scoparia* *Phytochemistry* 49(06)(1998) 1733-1737.
- [142] A. Trendafilova, M. Todorova, S. Bancheva, Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*, *Biochem. Syst. Ecol.* 36 (8) (2007) 544-548.
- [143] S. Djeddi, C. Argyropoulout, H. Skaltsa, Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii ssp. grisebachii* . *Biochem. Syst. Ecol.* 35(7-8) (2008) 336-339.
- [145] J. Kahl, T. Hoffmann, D. Klockow, Differentiation between de novo synthesized and constitutively released terpenoids from *Fagus sylvatica* *Phytochemistry* 51(3) (1999) 383-386.
- [146] A. Christine, J. Williams, C. Onyilagha, J B. Harborne, Flavonoid profiles in leaves, flowers and stems of forty-nine members of the phaseolinae , *Phytochemistry* 38(6)(1995) 655-657.
- [147] A. Strand, S. Shivaji, S. -Jensen, Bacterial carotenoids 55. C50-carotenoids 25.† revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus* *Phytochemistry* 45 (3) (1997) 547-552
- [148] Y. Diaa, W.F. August, *Phytochemistry* 41(04) (1998) 1107-1111
- [149] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, N. Khalfallah E. Seguin, *Phytochemistry* 49 (8) (1998) 2425-2427.
- [151] K. Medjroubi, F. Benayache et J. Bermejo. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 76(7-8) (2005) 744-746.
- [152] A. Bentaméne, S. Beneyache, J. Créche, G. Petit, F. Beneyache, A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae), *Biochem.Syst. Ecol.* 33(6)(2005) 1061-1065.
- [154] S. Djeddi, A. Karioti, M. Sokovic, C. Koukouista H. Skaltsa, A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties, *Bioorg.Med.Chem.* 16(7) (2005) 3725-3731.

- [153] A.M. Fortun; E.C. de Riscalá, C.A.N. Catalan, T.E.Gedris, W.Hertz, *Biochem. Syst. Ecol*, 30(22) (2002) 5805-808.
- [156] B. Maurizio,R. Sergio, M. Antonela, A.R. Rosa. A.A.Nelly, *Biochem. Syst. Ecol*, 33(3) (2005) 817-825.
- [157] B. Maurizio, V. Nadia, F. Caterina, E.G. Thomas, H. Wermer, *Biochem. Syst.Ecol*. 6 (6) (1998), 801-803.
- [158] S. Çelik,S. Rosselli, A.M. Maggio, R.A. Raccuglia,Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*, *Biochem.Systematics.Ecol*. 34(2006) 349-352.
- [159] B. Maurizio, P.P. Maria, E.G. Thomas, H. Werner.Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea nicaensis*, *Phytochemistry* 41(01) (1996) 335-336.
- [160] J.K. Pedja, T. Vele, M. Slobodan, V. Vlatka, D.M. Petar, *Biochem.Syst.Ecol*. 32 (2004) 335-357.

II.1.Introduction

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une partie importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques assurent la survie de la plante, ils se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante. Ces derniers constituent les quatre grandes classes des métabolites primaires.

Par contre les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Dans cette étude, nous nous intéresserons particulièrement aux composés qui constituent les métabolites secondaires.

II. 2. Classement des métabolites secondaires

Les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes sont les trois classes principales de métabolites secondaires [1,2]. A l'heure actuelle plus de 100000 produits ont été identifiés.

II. 2. 1. Les composés phénoliques

II. 2. 1. 1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide [3].Le terme polyphénol a été introduit en 1980[2].

II. 2.1. 2. Structure

Comme leurs noms l'indiquent, les composés phénoliques sont caractérisés par au moins un noyau aromatique auquel est directement lié un groupe, hydroxyle libre ou engagé dans une

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

autre fonction comme éther, ester ou un hétéroside [4]. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

II. 2.1.3. Localisation

Les composés phénoliques sont présents dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles, les fruits, les graines... [3]. On les retrouve dans les fruits rouges comme les cerises, le raisin [2]. Parmi les composés, on peut citer les lignanes, les coumarines, les xanthones, les quinones phénoliques et les flavonoïdes. A l'heure actuelle plus de 8000 composés ont été répertoriés [4].

II. 2. 1. 4. Classification

La classification des composés phénoliques a été établie sur la base du nombre de carbone constituant leur squelette. Les différentes classes prédominantes [5] sont regroupées dans le **tableau II.1: Principales classes de composés phénoliques**

Squelette carboné	Classe	Exemple de molécules	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ - C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C ₆ - C ₄	Napthoquinones	Juglone	Noix
C ₆ - C ₂ - C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne,
C ₆ - C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélagonidine Catéchine, épicatechine Narigénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C ₆ - C ₃) ₂	Lignanes	pinorésinol	Pin
(C ₆ - C ₃) n	Lignines		Bois, noyaux des fruits
(C ₁₅) n	Tanins		Raisin rouge, kaki

Les acides phénoliques et les flavonoïdes forment le groupe de composés phénoliques le plus important. Dans ce qui suit, nous présenterons quelques notions sur cette classe de métabolites secondaire

II.2.1.4.A. Les acides phénoliques

II.2.1.4.A.1 Définition

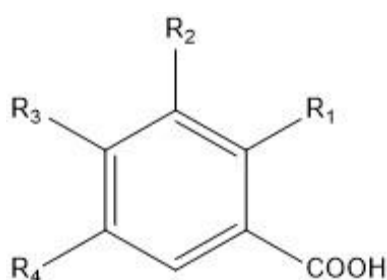
Un acide phénolique est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique [6].

Les acides phénoliques se divisent en deux groupes: les acides hydroxy cinnamiques et les acides hydroxy benzoïques.

II.2.1.4.A.2 Les acides hydro benzoïques

Les acides hydroxy benzoïques dérivent de l'acide benzoïque, ils sont constitués d'un squelette à sept atomes de carbones (C6-C1). Ces acides sont considérés parmi les formes les plus répandues chez les gymnospermes et chez les angiospermes. Ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Quelques structures d'acides hydroxy benzoïques sont illustrées dans le tableau II.2

Tableau II.2: Structures de divers acides hydroxy benzoïques



Acides hydroxybenzoïques				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide para-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH ₃	H	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

Chapitre II

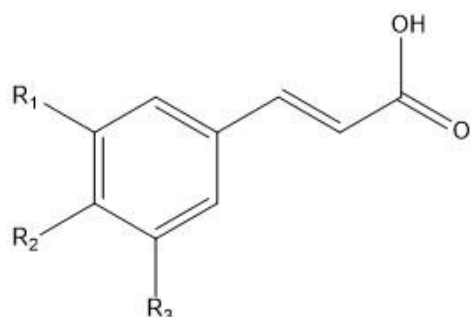
Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

II.2.1.4.A.3 Les acides hydroxycinnamiques

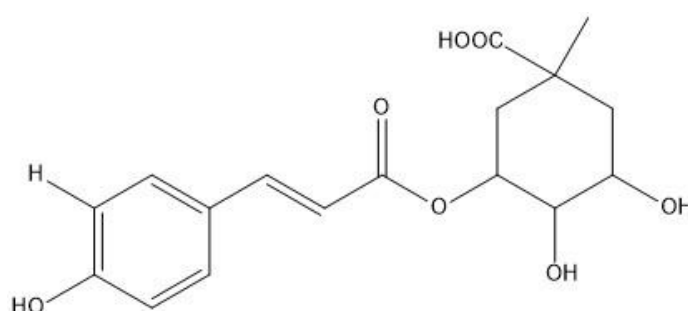
Les acides hydroxy cinnamiques dérivent de l'acide cinnamique, leurs squelettes de base sont de type C₆-C₃. La molécule de base est l'acide para coumarique sous ses deux formes, l'isomère *trans* est le plus fréquent, mais le *cis* existe aussi.

Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides [6] ; l'acide caféique est la molécule la plus répandue chez les végétaux, elle est présente sous forme d'acide chlorogénique (ester 5- caféoylquinique) dans le café, d'acide caféoylshikimique dans la datte, d'acide caféoylmalique dans le radis. Le tableau II.3 illustre quelques exemples d'acides hydroxycinnamiques

Tableau II.3 : Principaux acides hydroxycinnamiques



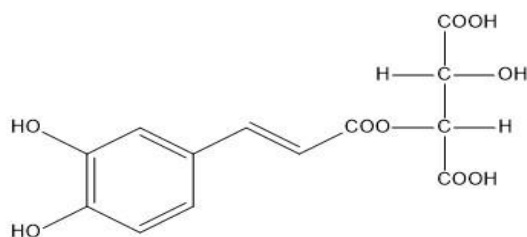
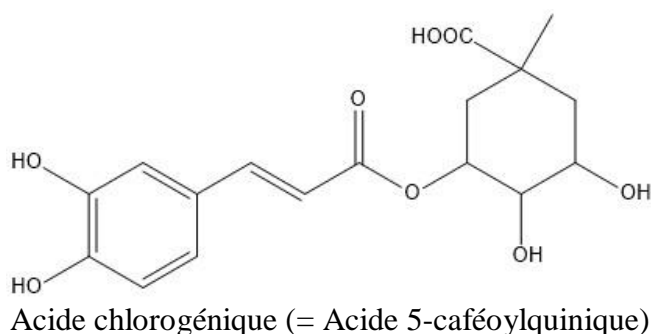
Acides hydroxycinnamiques			
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide cinnamique	H	H	H
Acide <i>p</i> -coumarique	H	OH	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>E</i> -anéthol	H	OCH ₃	H



Acide *p*-coumaroylquinique

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques



Acide caféoyltartrique

Figure II.1: Exemple de formes combinées des acides hydroxycinnamiques

II.2.1.4.A.4 Formation du noyau aromatique

Le principal mode de cette formation emprunte l'acide shikimique (acide en C₆-C₁), lequel donne naissance à l'acide phénylpyruvique puis à l'acide cinnamique (acide en C₆-C₃)

Un mode de formation plus secondaire consiste en la cyclisation de chaînes polycétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupements acétates.

- **Voie de l'acide shikimique**

Cette voie débute par la condensation de l'acide phosphoénol pyruinique (**PEP**) (1) avec l'érythrose 4-phosphate (2) qui produisent un corps en C₇ donne naissance au 5-déshydroquinatate (3) respectivement au quinate (4), tous deux dérivés du cyclohexane. De là se détache une voie de synthèse vers les acides phénols carboxyliques qui est plutôt caractéristique des micro-organismes. Une déshydratation conduit au déshydroshikimate (5), qui est réduit en shikimate (6) à l'acide de NADPH+H⁺. Par phosphorylation et réaction avec du phosphoénolpyrate en position 3, il se forme d'abord un énoéthère activé, le chorimate (7). A cette étape, les aiguillages sont en place pour diverses voies : l'une d'entre elles conduit par l'intermédiaire de l'anthranilate (8) à l'acide aminé aromatique tryptophane (9), à partir duquel se forme l'acide indolacétique (10), la deuxième voie qui nous intéresse ici produit l'acide

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

cinnamique (14) respectivement l'acide *p*-coumarique comme premier dérivé(15).

On voit sur le schéma que l'embranchement se situe au niveau du préphénate (11). Le préphénate est transaminé en arognate, qui est ensuite transformé en phénylalanine (12) sous l'action d'une arognatedéshydratase (décarboxylante) ou en tyrosine (13) sous l'action d'une NADP arognate déshydrogénase (décarboxylante).

La désamination oxydative de la phénylalanine (12) en acide cinnamique (14) et de la tyrosine (13) en acide *p*-coumarique est catalysée par des enzymes spécifiques [7]. Toutes ces étapes sont montrées dans la figure II.2.

Les systèmes aromatiques sont aussi formés par voie acétate malonate ou bien par voie de l'acétate mévalonate

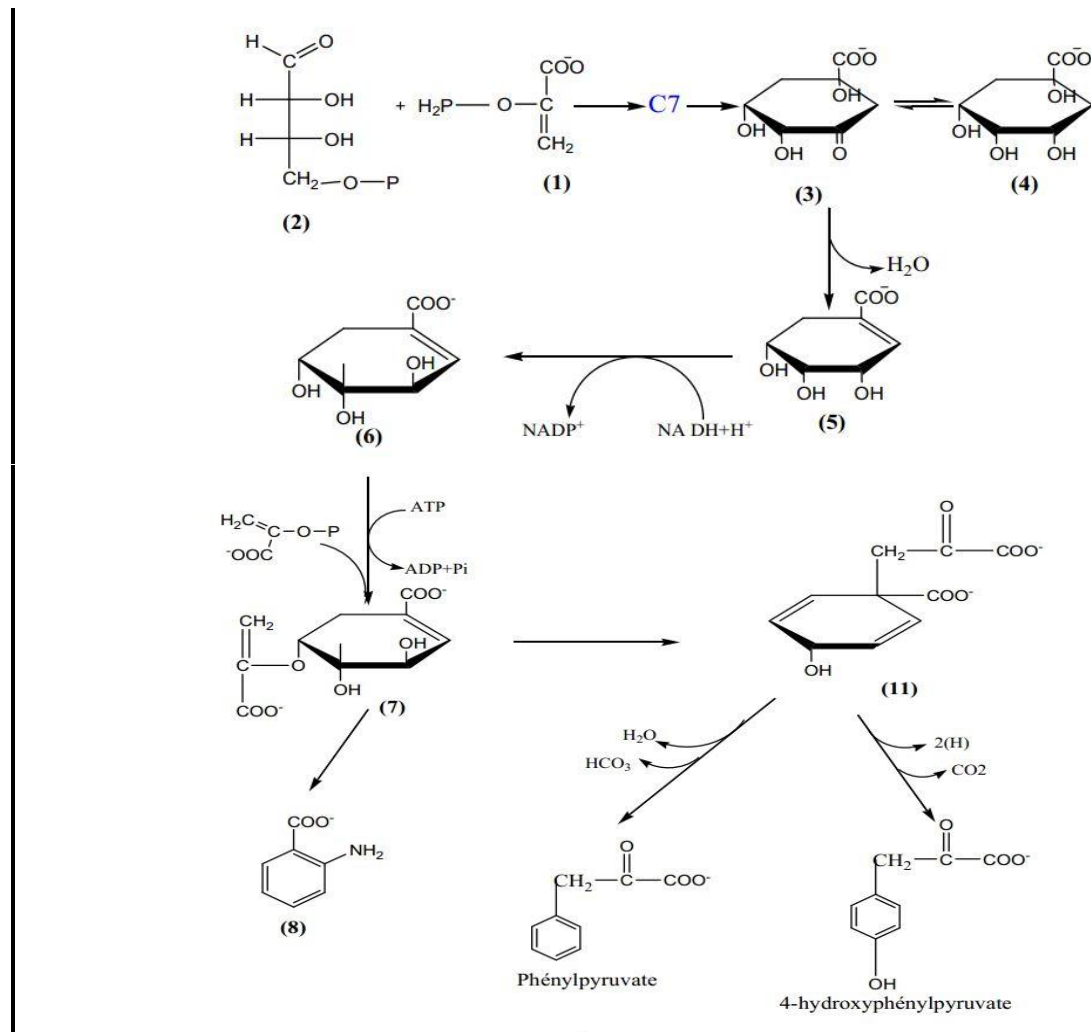


Figure II.2: Formation des acides phénoliques par la voie de l'acide shikimique

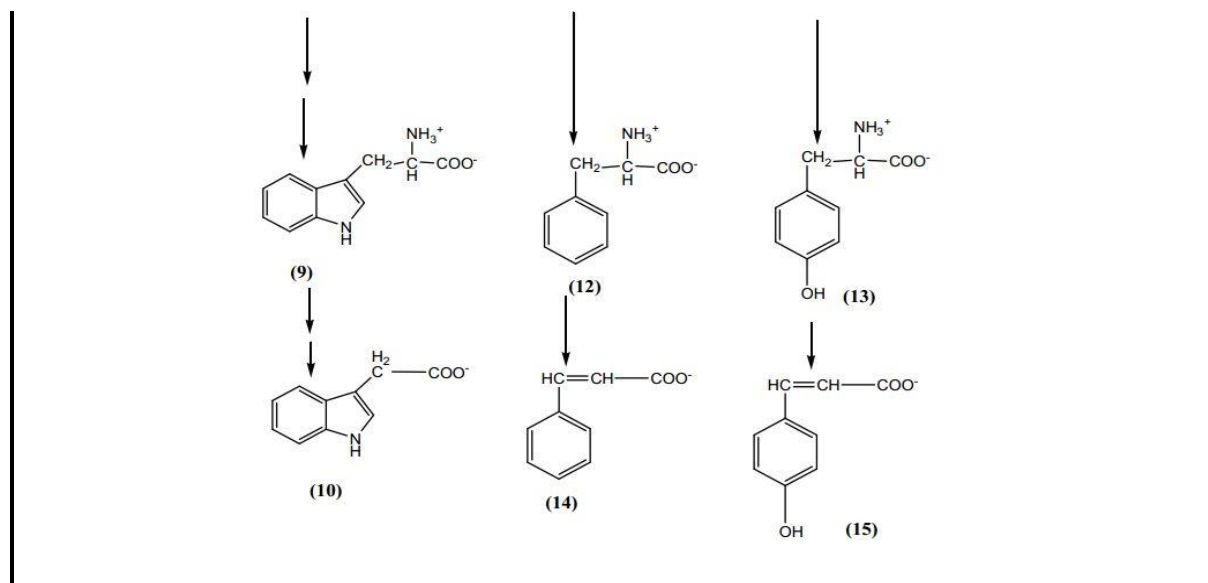


Figure II. 2 Suite : Formation des acides phénoliques par la voie de l'acide shikimique

II.2.1.4.A.5 Propriétés thérapeutiques

Les acides phénoliques sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotiques, de chélation et anti-inflammatoires. Leur toxicité est faible. Comme l'acide caféique, l'acide férulique empêche la formation du cancer des poumons chez les souris [8]. L'acide gallique inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats [9], quant à l'acide rosmarinique, il possède une activité anti-inflammatoire, enfin les acides phénoliques sont connus aussi pour leurs propriétés antibactériennes [10] et antifongiques [11].

II.3 Les flavonoïdes

II.3.1 Définition

Le terme flavonoïde provenant du latin « flavus » signifiant « jaune » désigne la classe des flavonoïdes, une des plus abondantes du règne végétal. Des flavonoïdes ont été isolés par le scientifique Eugène Chevreul en 1814, mais, ils n'ont été réellement découverts qu'en 1937 par Albert Szent-Györgyi, qui mit en évidence leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. A ce jour plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées [12]. On attribue aux flavonoïdes des propriétés variées, notamment veinotonique, anti tumorale, anti radicalaire, anti inflammatoire, analgésique, anti allergique, anti spasmodique, anti bactérienne et hépato protectrice [13].

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

La structure de base d'un flavonoïde s'organise autour d'un squelette C₆-C₃-C₆. Les deux cycles benzéniques A et B sont reliés par un chaînon propyle C₃ qui peut être complété par une fonction éther formant le cycle C (Figure II.3).

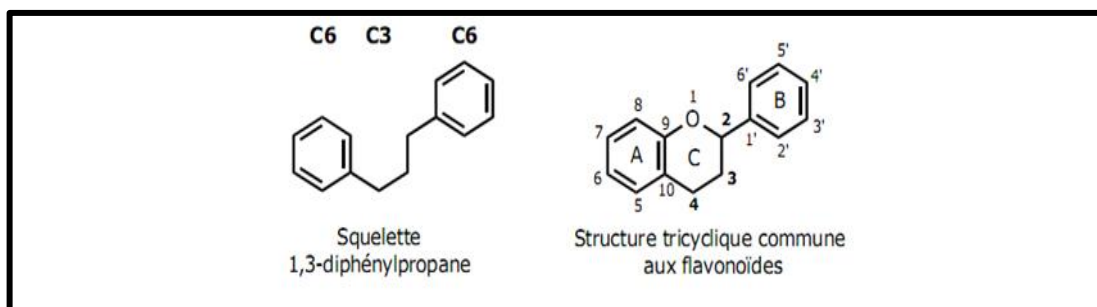


Figure II.3: Structure des flavonoïdes : enchainement C₆-C₃-C₆

II.3. 2 Classification des flavonoïdes

La classe des flavonoïdes se divise en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Figure II.4). Cette diversité peut augmenter puisque les cycles A et B peuvent être substitués par des hydroxyles, des méthyles, des phényles ou autres.

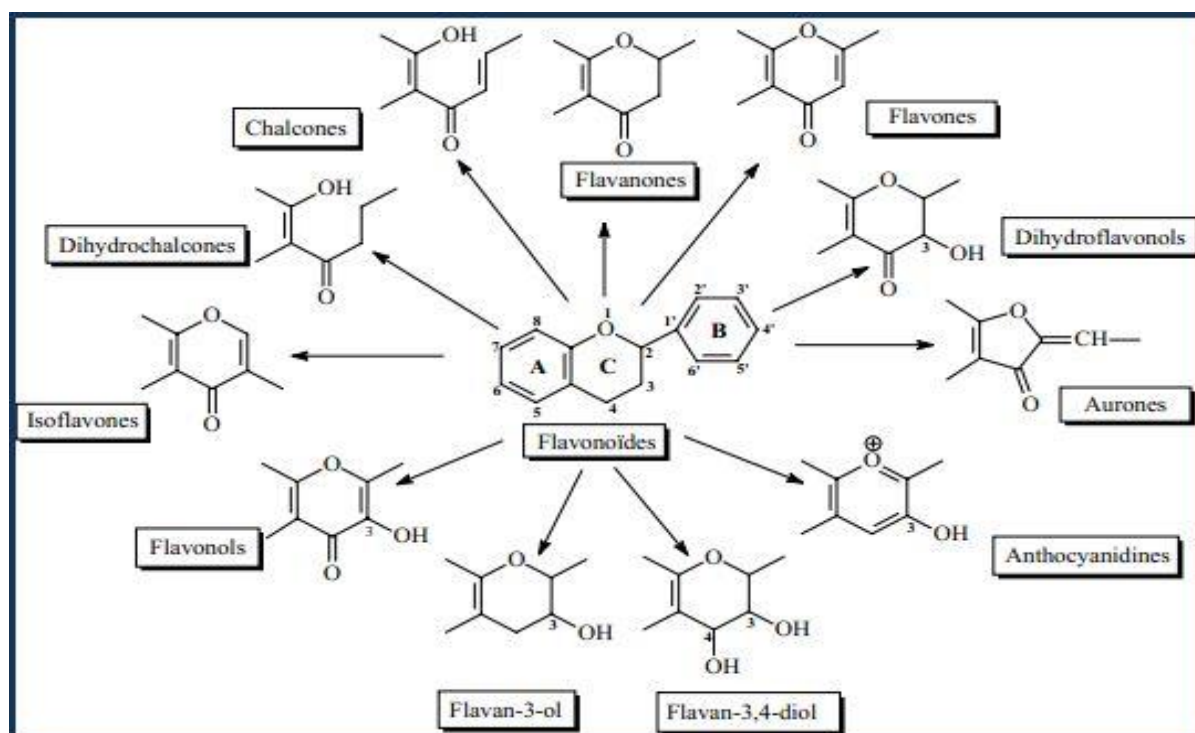


Figure II.4: Les différents classes et sous classes de flavonoïdes

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

II.3.3 Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes est l'une des plus élaborées en rapport avec les métabolites secondaires. Elle se fait en plusieurs étapes (Figure II.5 et tableau II.4). Le précurseur commun des flavonoïdes est la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone métabolisée sous l'action de l'enzyme chalcone-synthase. La cyclisation des chalcones est catalysée par l'enzyme chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant aux (2S)-flavanones [40].

Tableau II.1 : Les molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes

	Enzymes	intermédiaires
2-1	CHS (chalconesynthase)	Chalcone
2-2	CHI (chalconeisomérase)	Flavanone
2-3	FS (flavonesynthase)	Flavone
2-4	F3H (flavanone-3-hydroxylase)	dehydroflavonol
2-5	FLS (flavonolsynthase)	Flavonol
2-6	chaîne enzymatique (FNR, ANS, GT)	dérivésanthocyaniques

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

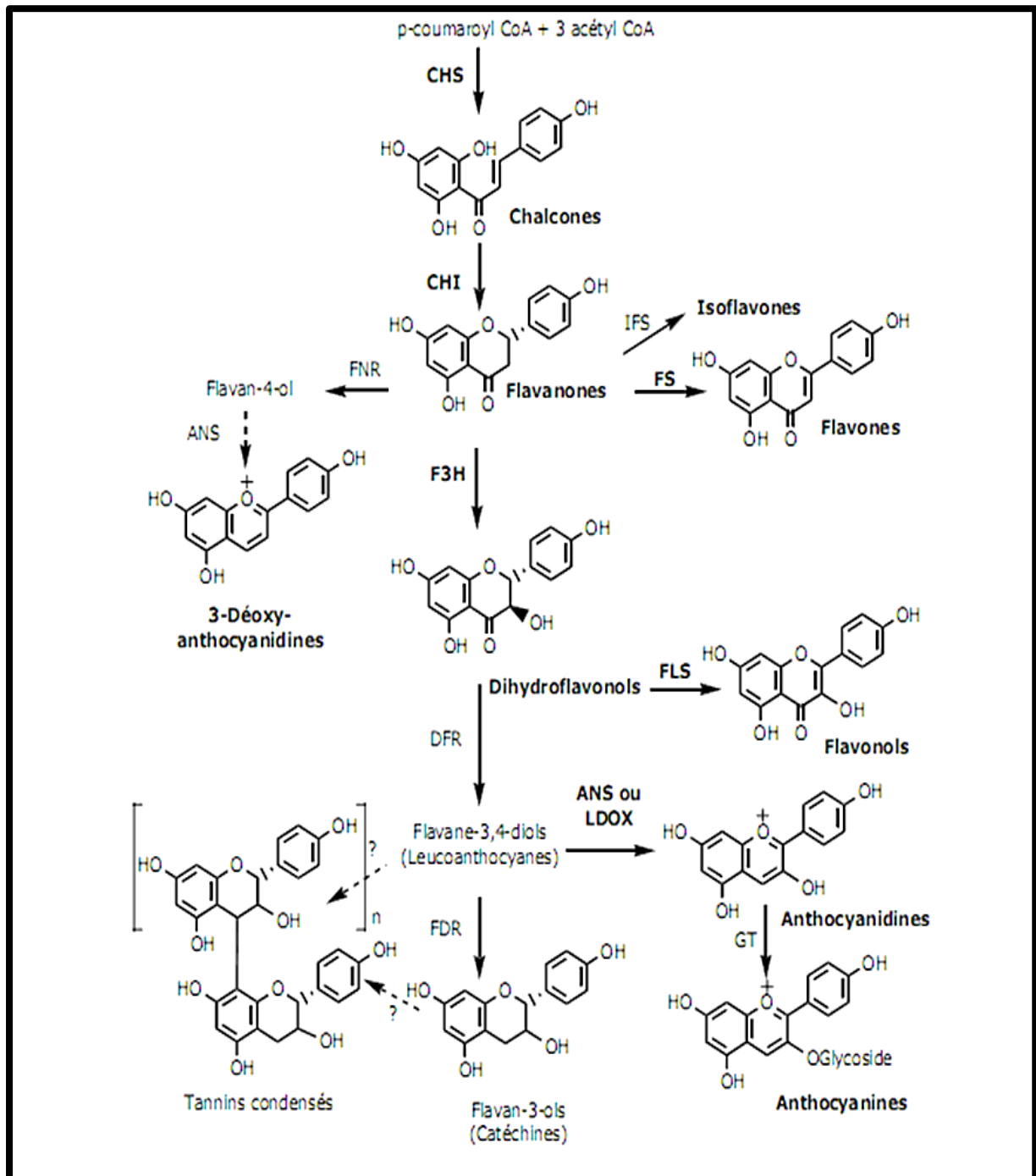


Figure II.5: Schéma de biosynthèse des flavonoïdes

Nous allons élucider quelques étapes de biosynthèse, on commencera par les chalcones puis les flavanones, les flavones et enfin les dihydroflavonols.

II.3.3.1 Etape de biosynthèse vers les chalcones

La chalcone est la première molécule qui ouvre la voie de biosynthèse des flavonoïdes avec la formation du squelette $C_6-C_3-C_6$ (Figure II.6) : l'ester CoA de p-coumaryle et trois molécules d'ester CoA de malonyl subissent une décarboxylation, cyclisation intramoléculaire et aromatisation par l'action d'une enzyme, la chalconesynthase (CHS).

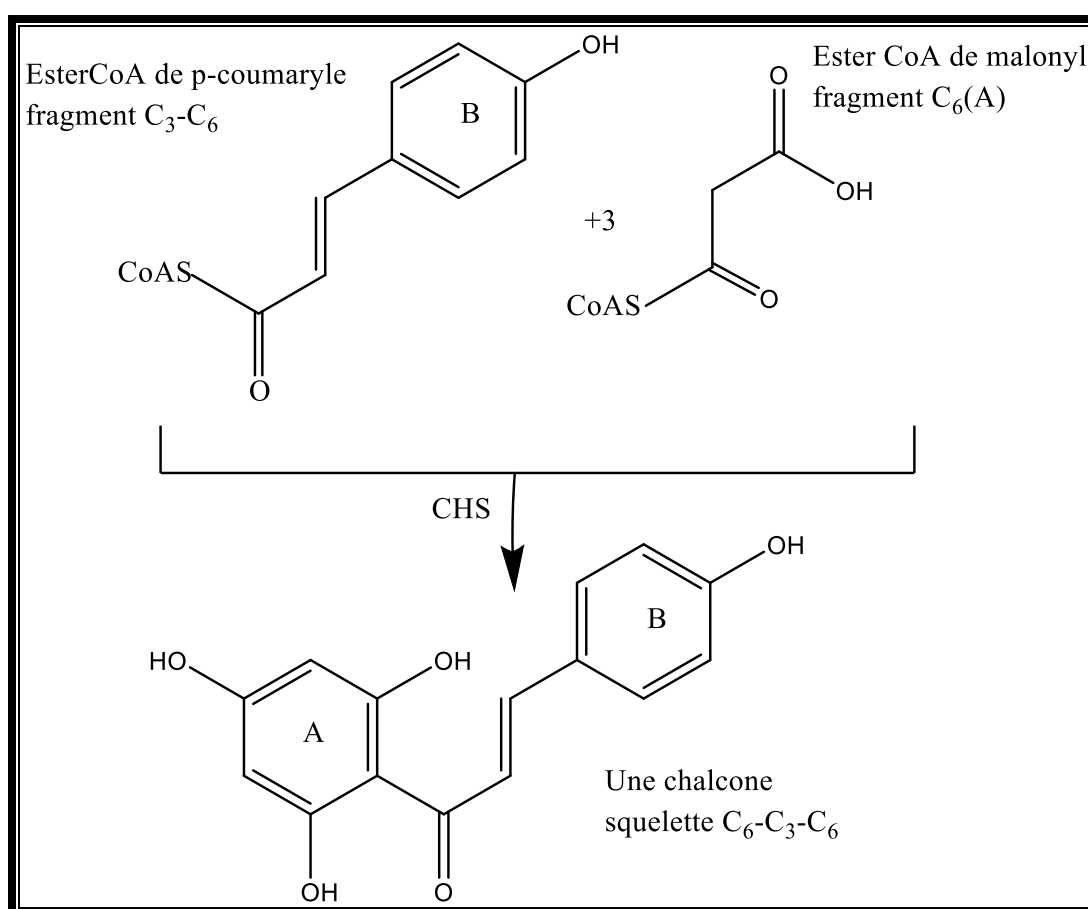


Figure II.6: Schéma de formation du squelette $C_6-C_3-C_6$

II.3.3.2 Etape de biosynthèse vers les flavanones

Les flavanones sont des isomères des 2'-hydroxychalcones, issues de la transformation du motif linéaire en motif cyclique [14]. La chalcone isomérase (CHI) catalyse la cyclisation de la chalcone en flavanone, la naringénine, créant un centre stéréogène en position 2 [15], grâce à la stéréospécificité de cette réaction enzymatique, la grande majorité des flavanones sont de configuration 2S (Figure II.7)

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

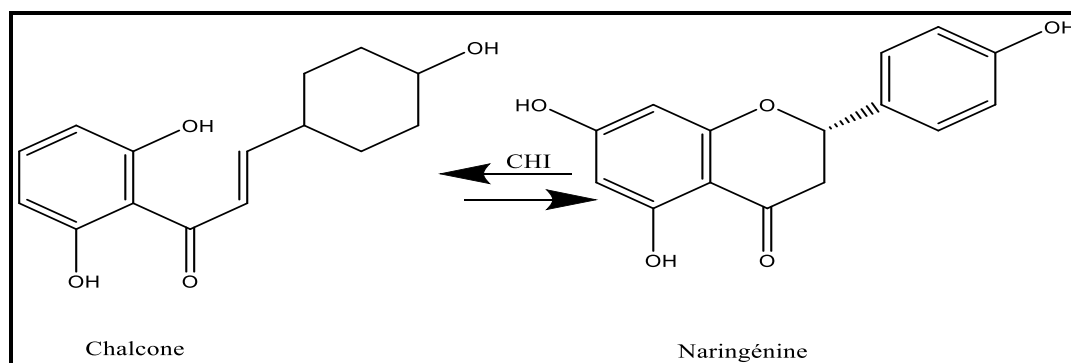


Figure II.7: Isomérisation stéréospécifique de lachalcone en (2S)-flavanone

II.3.3.3 Etape de biosynthèse vers les flavones

Par rapport aux flavanones les flavones possèdent en plus une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C. La flavanone (naringénine) peut être oxydée par la flavone synthase pour former une flavone l'apigénine (Figure II.8). La transformation (2S) flavanone en flavone entraîne la perte du centre stéréogène en position 2.

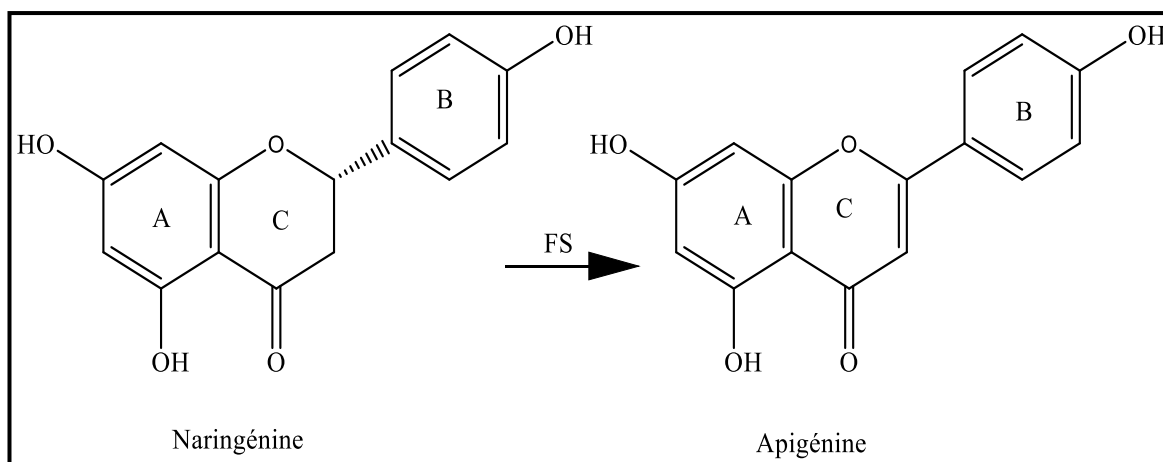


Figure II.8: Oxydation enzymatique d'une flavanone en flavone

II.3.3.4 Etape de biosynthèse des dihydroflavonols

Les dihydroflavonols se caractérisent par un groupe hydroxyloxy sur le cycle C, créant un centre stéréogène en position 3, les (2S)-flavanones sont converties en (2R, 3R)-dihydroflavonols par action de 3 beta-hydroxylase (**F3H**) Figure II.9. Cette étape de biosynthèse n'est autre qu'une α -hydroxylation énantiospécifique en position 3 de la naringénine en dihydrokaempférol [16].

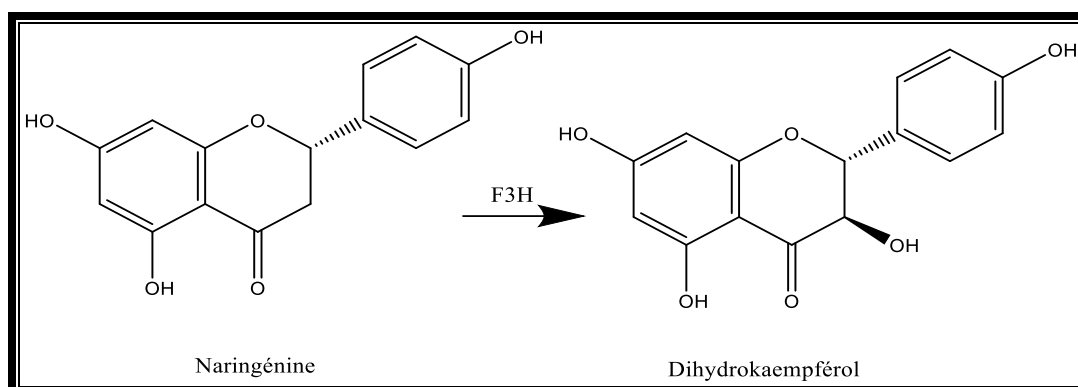


Figure II.9: 3-hydroxylation d'une flavanone en dihydroflavonol

II.3.4 Substitution du squelette flavonique

Le squelette flavonique peut être substitué par des groupements hydroxyles, méthoxyles ou même des sucres (glucose, rhamnose...)

II.3.4.1 L'hydroxylation

Les réactions de biogénèse montrent que dans le cas des flavones et des flavonols, les hydroxyles en position 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B existent avant la formation du noyau chalcone [17] mais la substitution ou l'hydroxylation du noyau B en position 3' ne se fera qu'après la formation du squelette chalcone. La polyhydroxylation sur le noyau B (3',4',5') n'est possible que grâce à l'enzyme hydroxylase [18,19]. Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées [20].

II.3.4.2 La méthylation

La méthylation nécessite la présence d'une enzyme (*O*-methyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du groupement méthyle, cette réaction peut se faire sur le noyau A (carbones 5,6,7) et le noyau B (carbone 2', 3', 4' et 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) sachant que toutes les méthylations se font après la formation du noyau chalcone [18,21].

II.3.4.3 La *O*-glycosylation

L'enzyme responsable de cette réaction est la glucosyltransferase qui joue le rôle de donneur de sucre UDP-Glu (uridinediphosphate glucose). Cette réaction s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose,

galactose et arabinose). Les deux sites préférentiels de cette glycosylation sont la position 7 dans le cas des flavones et la position 3 dans celui des flavonols [22].

II.3.4.4 La C-méthylation et la C-glycosylation

Le radical méthyle ou glycolyse dans ce type de substitution se lie directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Lors de l'hydrolyse acide la liaison C-C résiste [23]. Dans ce cas de substitution les positions C-6 et C-8 sont privilégiées.

II.3.5 Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties de la plante : racines, tiges, feuilles, pollens, graines... Certains sont plus spécifiques, ils sont localisés dans les fruits, les fleurs comme pour les anthocyanes, par contre les chalcones se trouvent surtout dans les fleurs.

La principale propriété reconnue aux flavonoïdes est d'être vaso-actifs, c'est-à-dire d'être capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Ils peuvent être anti-allergiques, hépatoprotecteurs (isobutrine, hispiduline, flavolignanes), antispasmodiques sur l'iléon de cobaye stimulé par divers agonistes (flavonoïdes du thym et autres lamiacées), hypocholestérolémiantes (flavanones), diurétiques, antibactériens, antiviraux *in vitro* (3-hydroxy et 3-méthoxyflavones) [24].

La propriété antioxydante est étroitement liée à la structure chimique du flavonoïde.

- ✓ La présence du radical hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C-2 – C-3 et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle C en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante [25]. Cette activité est accentuée quand le noyau B est substitué par un système *ortho*-dihydroxyle.
- ✓ Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3' et 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [26].
- ✓ L'*O*-méthylation des substitutions hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes [27, 28].
- ✓ La capacité antioxydante revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion [29].
- ✓ Les groupements hydroxyles en position 5, 7 et la double liaison C-2 – C-3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par cette dernière [30].

II.3.6 L'utilisation des flavonoïdes en thérapeutique

Les flavonoïdes seuls ou associés sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs et veinotoniques cas des jambes lourdes, varices ...

- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.
- Dans les cas de baisse d'acuité.
- Traitement du lymphœdème du membre supérieur après traitement chirurgical du cancer du sein.

II.3.7 Analyse structurale des flavonoïdes

L'identification des structures moléculaires réside en l'utilisation de plusieurs techniques spectroscopiques comme la RMN du proton, du carbone¹³, DEPT, COSY, HMBC, HSQC... ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la technique de choix pour ce genre de composé [31,32].

II.3.7.1 Relation entre le rapport frontal et la structure

La relation R_f - structure a été établie par Bate-Smith et Westall, il est défini comme étant le rapport de la distance entre l'origine et la tache du produit après élution d'une part et la distance entre l'origine et le front du solvant d'autre part. Cette valeur dépend du type de squelette flavonique (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition de ses différentes substitutions [31-33]. Dans le cas où le produit très soluble dans la phase mobile et non retenu par la phase stationnaire, le R_f est égal à 1. Le tableau II.5 montre l'impact de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f

Tableau II.2 : Relation entre le R_f et la structure flavonique

Structure flavonique	R_f
Augmentation des groupes hydroxyles	diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
Glycosylation	augmente dans les solvants aqueux diminue dans les solvants organiques
Méthylation des hydroxyles	diminue dans les systèmes de solvants aqueux et augmente dans les systèmes de solvants organiques

II.3.7.2 La fluorescence sous lumière de Wood

La fluorescence des substances flavoniques sous lumière de Wood (365 nm) donne certaines informations sur leurs structures chimiques. Le tableau II.6 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [34,35].

Tableau II.3 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques

La fluorescence	Les structures possibles
Noire violette	Flavones avec 5,6,7 ou 5,7,8 Trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR Chalones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavanol avec 3-OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanones sans 5-OH

II.3.7.3 La spectrophotométrie UV-visible

C'est une des méthodes les plus importantes pour l'identification des structures flavoniques. Elle permet de localiser les groupements hydroxyles sur le squelette flavonique. Le spectre UV du produit pris dans le méthanol est caractérisé par deux bandes d'absorption principales :

- La bande I, présentant un maximum d'absorption entre 320 et 380 nm est caractéristique du système cinnamoyl faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle C-4 avec la double liaison (C-2 - C-3) et le noyau B.
- La bande II, présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm est attribuée au système benzoyl qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A

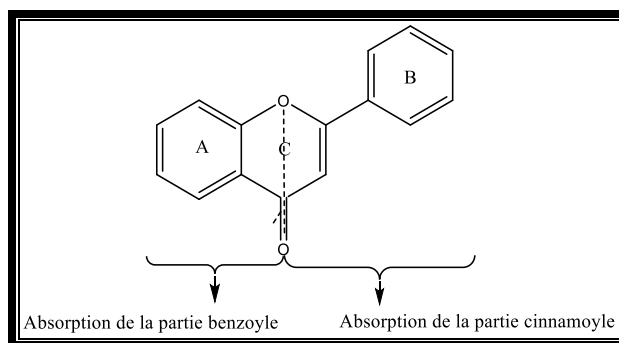


Figure II.10: Squelette de base des flavonoïdes

Le spectre pris dans le méthanol va subir des modifications après l'addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl. Ces changements se traduisent par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant ainsi la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

II.3.7.3.1 Spectre en présence de NaOH

NaOH ou (NaOMe), base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique, il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols (3-OH libre) ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [35]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335nm par rapport au spectre MeOH indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et/ou 4' et 7

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est *ortho*-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [32].

II.3.7.3.2 Spectre en présence de NaOAc

L'acétate de sodium NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH. Un faible déplacement bathochrome de

la bande II des flavones et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [32].

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [27], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [32].

II.3.7.3.3 Spectre en présence de NaOAc + H₃BO₃

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H₃BO₃) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système *ortho*-dihydroxyle sur le cycle B (3',4') ou sur le cycle A (6 et 7 ou 7 et 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande II [32].

II.3.7.3.4 Spectre en présence de AlCl₃ et AlCl₃ + HCl

La présence du chlorure d'aluminium dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles *ortho* du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part, la formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes *ortho*-dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [36], par contre ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables [37,38]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I, par rapport au spectre après addition d'AlCl₃ et un déplacement bathochrome moins important comparé au spectre pris dans le MeOH.

II.3.7.4 La spectroscopie RMN-¹H

On utilise cette méthode dans l'analyse qualitative des flavonoïdes pour déterminer :

- Le degré d'oxydation des noyaux A, B et C.
- La position et le nombre de molécules de sucre et le type de liaison anomérique (α ou β) entre le sucre et l'aglycone.
- La position et le nombre de groupements méthoxyles présents dans la molécule.
- Le nombre de proton et cela à partir de la courbe d'intégration.

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

Les solvants les plus utilisés dans le cas des flavonoïdes sont CDCl_3 ou CD_3OD . Dans le cas des flavonoïdes glycosylés on utilise le DMSO-d_6 comme solvant. Ce dernier n'est pas très approprié car en plus de son degré d'évaporation élevé, le pic caractéristique de ce solvant apparaît à 3.5 ppm (solvant contaminé par des molécules H_2O) couvre les signaux des protons du sucre relié à l'aglycone.

II.3.7.4.1 Les protons aromatiques

II.3.7.4.1.1 Les protons du noyau A

Les déplacements chimiques et la multiplicité des protons H-5, H-6 et H-8 varient en fonction des substitutions de ce noyau. Ces données sont résumées dans le tableau II-7.

Tableau II.4: Déplacement et multiplicité des protons du noyau A

Flavonoïdes	H-5 $\delta_{\text{ppm}} J(\text{Hz})$	H-6 $\delta_{\text{ppm}} J(\text{Hz})$	H-8 $\delta_{\text{ppm}} J(\text{Hz})$
5-7 Dihydroxy	-	6,16 -6,25 ; d (2,5)	6,39 – 6,59 ; d (2,5)
5-OH 7-Hydroxy, glycoside	-	6,20 – 6,40 ; d (2,5)	6,50 -7,00 ; d (2,5)
5, 6 ,7 –OR R=H , sucre	-	-	6,3 ; s
5,7 ,8 OR	-	6,3 ; s	-
7-OR R=H, sucre	8,00 ; d (9,00)	6,70 -7,10 ; dd (9,00 ; 2,5)	6,70 -7,10 ; d (2,5)

II.3.7.4.1.2 Les protons du noyau B

Les déplacements chimiques des protons de ce noyau se situent dans l'intervalle 6, 80–8,10ppm et dépendent du nombre de substitution et du degré d'oxydation du noyau C. Ces valeurs sont résumées dans le tableau II.8.

Tableau II.5: Déplacement et multiplicité des protons du noyau B.

Flavonoïdes	H-2',H-6' $\delta_{\text{ppm}} J(\text{Hz})$	H-3',H-5' $\delta_{\text{ppm}} J(\text{Hz})$
4' –hydroxyflavone	7,70 -7,90 ; d (8,5)	6,50 -7,10 ; d (8,5)
4' –hydroxyflavonol	7,90 – 8,10 ;d (8,5)	5,50 -7,0 ; d (8,5)

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

3',4'-dihydroxy	7,20 -7,90 ; d (2,1) et dd ; d (8,5; 2,1)	6,00 – 6,75 ; d (8,5)
3',4',5' trihydroxy	6,50 -7,50 ; s	-

Tableau II.8 Suite : Déplacement et multiplicité des protons du noyau B.

II.3.7.4.1.3 Protons du noyau C

Dans la flavone, le proton H-3 résonne sous forme de singulet dans l'intervalle 6,20-6,40 ppm.

II.3.7.4.2 Les protons aliphatiques

II.3.7.4.2.1 Protons des méthoxyles

Ils se présentent sous la forme de singulets dans l'intervalle 3,50 – 4,50 ppm.

II.3.7.4.2.2 Protons des sucres

Les valeurs des déplacements chimiques du proton anomérique dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre aglycone. La constante de couplage du proton anomérique permet de déterminer la nature de la liaison sucre – aglycone (α ou β).

Dans le cas du glucose, le proton anomérique résonne sous forme d'un doublet avec une constante de couplage d'environ 7 Hz car sa biogénèse lui impose la position β . Le proton anomérique du rhamnose donne également un doublet mais sa constante de couplage est d'environ 2,5 Hz (position α), en plus son spectre présente un signal entre 0,8 et 1,2 ppm avec une constante de couplage d'environ 6Hz caractéristique du groupement méthyle. Si le rhamnose est en position C-3 du squelette flavonique, le signal du méthyle apparaît entre 0,72 et 0,86 ppm ; s'il est en C-7 l'intervalle sera entre 1,04 et 1,21 ppm.

Si le sucre est relié par un atome de carbone à l'aglycone comme dans les 6-C-glucosides ou 8-C-glucoside le proton anomérique résonne dans l'intervalle 4,48 à 4,90 ppm. Dans le tableau II.9 sont reportés les déplacements chimiques des protons anomériques de quelques sucres.

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

Tableau II.6: Domaine de résonance des protons anomériques.

H-1'', δ_{ppm}	Sucre
5,35 -5,56	3- <i>O</i> -glucoside
4,90 -5,25	7- <i>O</i> -glucoside
4,96 -5,36	3- <i>O</i> -rhamnoside
5,22 - 5,75	7- <i>O</i> -rhamnoside
5,48 – 5,68	3- <i>O</i> -glucuronide
5,10 -5, 18	7- <i>O</i> -glucuronide

- ✓ Si la partie glycoside est constituée de deux sucres, la valeur du déplacement chimique du proton anomérique du sucre relié à l'aglycone est supérieure à celle du deuxième sucre. On observe le cas inverse si le premier sucre est du type C-glycoside.
- ✓ Si la partie osidique est composée d'un glucose comme premier sucre et d'un rhamnose comme second (rhamnoglucoside), on peut différencier la forme (1-6) rhamnoglucoside connue sous le nom de rutinoside de la forme (1-2) rhamnoglucoside connue sous le nom neohesperidoside par le déplacement chimique des protons anomériques du glucose et du rhamnose.

Dans le cas du rutinoside, le proton anomérique du glucose résonne à 5,3 ppm et celui du rhamnose à 4,4 ppm. Si on est en présence du neohesperidoside ces déplacements chimiques seront de 5,7 et 4,4 ppm, respectivement.

II.4 Les sesquiterpènes

II.4.1 Généralités

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone. A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. Ils sont présents dans tous les organismes vivants. La dénomination des différentes

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre :

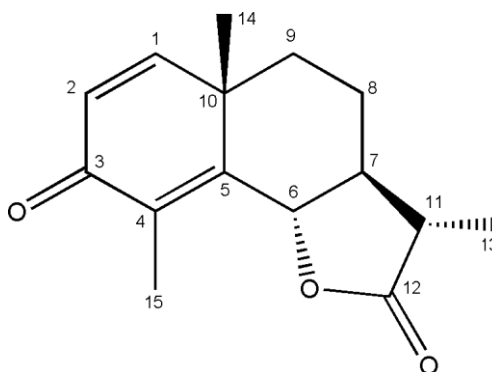
- Les monoterpènes, constitués de deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- les sesquiterpènes qui comportent 3 unités isoprènes soit 15 atomes
- Les diterpènes qui comportent une unité supplémentaire soit 20 atomes de carbone.
- Les sesterpènes qui comptent 25 atomes de carbone les triterpènes qui sont constitués de 30 atomes de carbone
- les tétraterpènes qui contiennent 40 atomes de carbone

Quant aux stéroïdes, dont le précurseur commun est le cholestérol (27 atomes de carbone), lui-même synthétisé à partir du squalène, ils n'obéissent pas à la règle du nombre de répétitions du motif isoprénique. Tous les stéroïdes partagent la même structure de base, le noyau stérol soit un cyclo pentanoperhydrophénantrène : 3 cycles hexagonaux et 1 cycle à 5 atomes de carbone. Différents groupements chimiques peuvent se fixer sur le noyau stérol formant ainsi différents stéroïdes et expliquant la grande diversité structurale de ce type de molécules. Le plus abondant et le plus connu des stéroïdes est le cholestérol.

II.4.2 Les lactones sesquiterpéniques

Les lactones sesquiterpéniques, représentent un ensemble important en nombre de substances naturelles. Plus de 3000 structures ont été isolées. L'isolement de ce type de structures remonte à plus d'un siècle. En effet, l' α -santonine a été isolée pour la première fois en 1930[39].

α -Santonine



Les lactones sesquiterpéniques sont métabolisées par un éventail de familles de plantes. Extraites des champignons et des bryophytes, elles ont été mises en évidence dans les

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

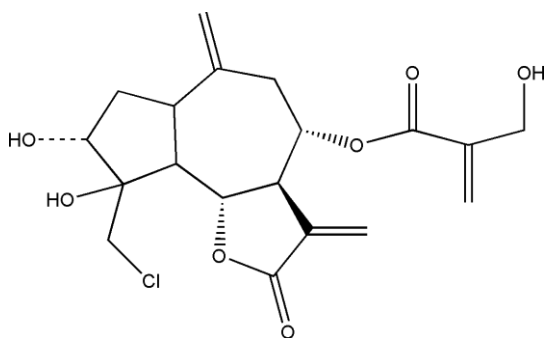
angiospermes (Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae, ...) et très abondamment dans les Astéracées d'où l'intérêt de ce travail.

Les lactones sesquiterpéniques sont en général issues des parties aériennes et localisés dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Elles sont par contre rares dans les parties souterraines d'où quelques rares structures ont été isolées, notamment la lactucine des racines de la chicorée et l'hélénaline de l'aunée.

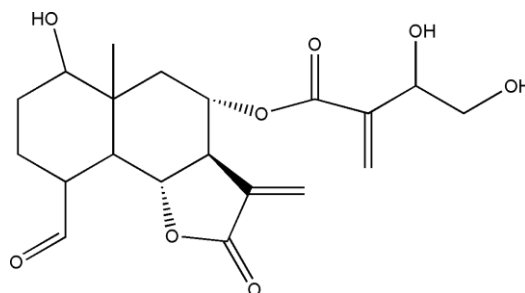
La particularité structurale des lactones sesquiterpéniques leur confère des possibilités de réactivité biologique incontestable compte tenu de l'enchaînement α -méthylène γ -lactone et des fonctions époxydes fréquentes dans la majeure partie de ces molécules. Ces fonctions constituent des sites réactifs vis-à-vis des nucléophiles biologiques principalement le groupe thiol des amines de diverses enzymes (glycogène synthase, ADN polymérase, thymidylate synthase, ...) donnant ainsi des alkylations irréversibles d'où une gamme très importante d'activité biologique [40].

II.4.3 Nomenclature

Elle consiste à ajouter le suffixe olide au nom du squelette sesquiterpénique indiquant le caractère lactonique ou au nom trivial le plus souvent inspiré par l'origine botanique de la structure. On citera comme exemple : la chlorojanérine qui est un guaianolide extrait de *Centaurea jeneri*, de même pour le malacitanolide qui est un eudesmanolide extrait de *Centaurea malicitana*.



Chlorojanérine



Malacitanolide

II.4.4 Structures

Les structures des lactones sesquiterpéniques sont variées mais, dérivent toutes du produit de cyclisation cyclodécadiénylique du 2E, 6E, farnesylpyrophosphate. Bien que les preuves expérimentales soient rares, il est admis que les principaux squelettes sesquiterpéniques se forment *via* les germacranolides eux-mêmes issus de la cyclisation du cation cyclodécadiénylique. Logiquement, la structure du produit de cyclisation dépend de la conformation initiale adoptée par le macrocycle et la position des doubles liaisons qui permettent des cyclisations intramoléculaires variées. En fait, l'enzyme impliquée dans cette réaction doit en principe conditionner la stéréospécificité du processus [40] (Figure II.10).

Les variations structurales secondaires sont nombreuses et portent :

- Sur le cycle lactonique, en général de type α -méthylène γ -lactone. Dans tous les cas (sauf chez les lactones issues des bryophytes) le proton H-7 est α autrement dit la liaison entre C-7 et C-11 est β . La fermeture de la lactone peut être *cis*-12,6 ; *cis*-12,8 ; *trans*-12,6 ou *trans*-12,8 solide.
- Sur les groupes méthyles souvent fonctionnalisés (alcools, acides carboxyliques, époxydes, esters....)
- Sur les insaturations qui peuvent être réduites ou oxydées (époxydes, hydroxyles qui sont fréquemment estérifiés).

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

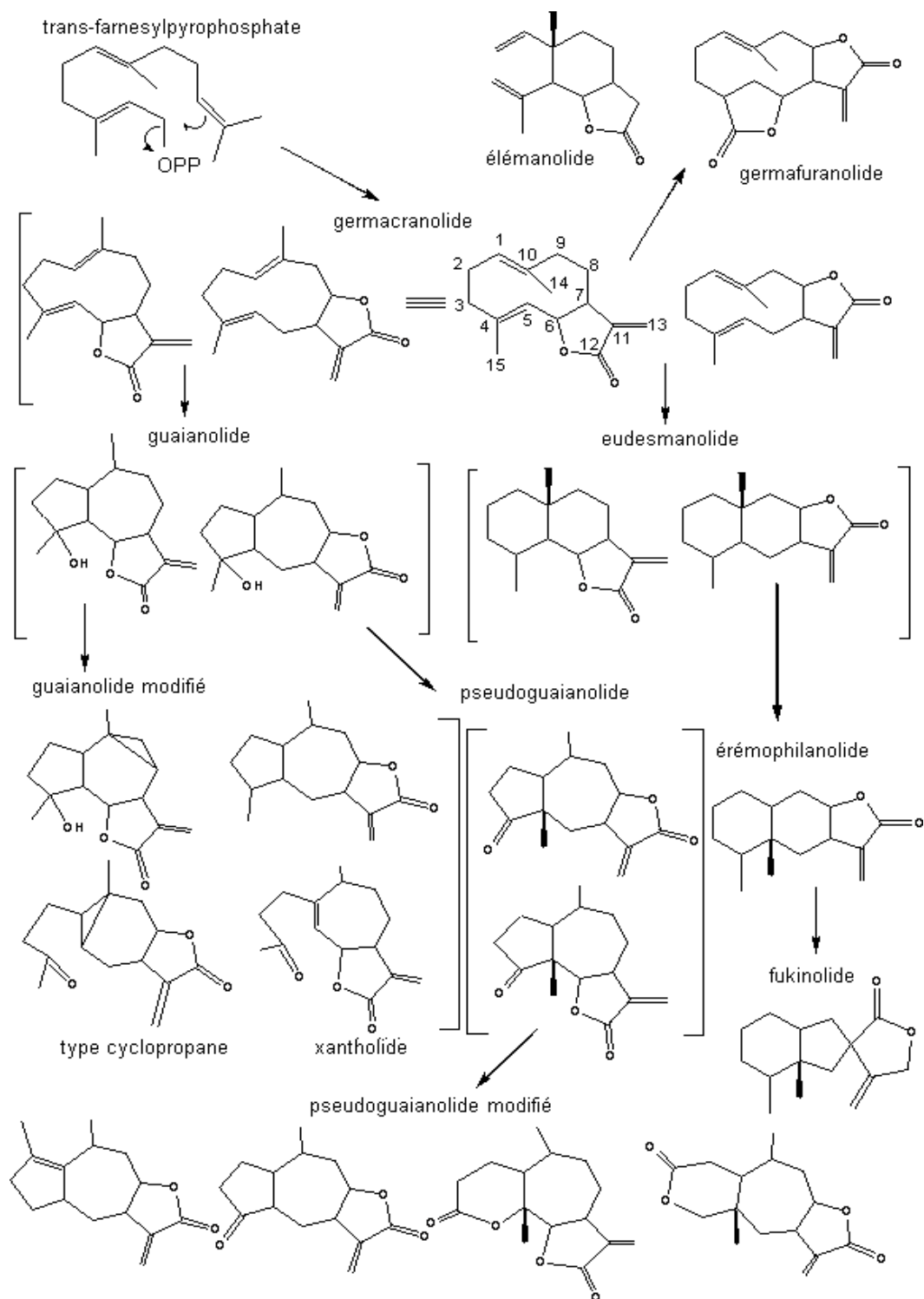


Figure II.11: Principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques via un germacranolide

II.4.5 Origine biogénétique des lactones sesquiterpéniques

En 1887, O. Wallach envisageait la construction des terpènes à partir de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques (Figure II.11).

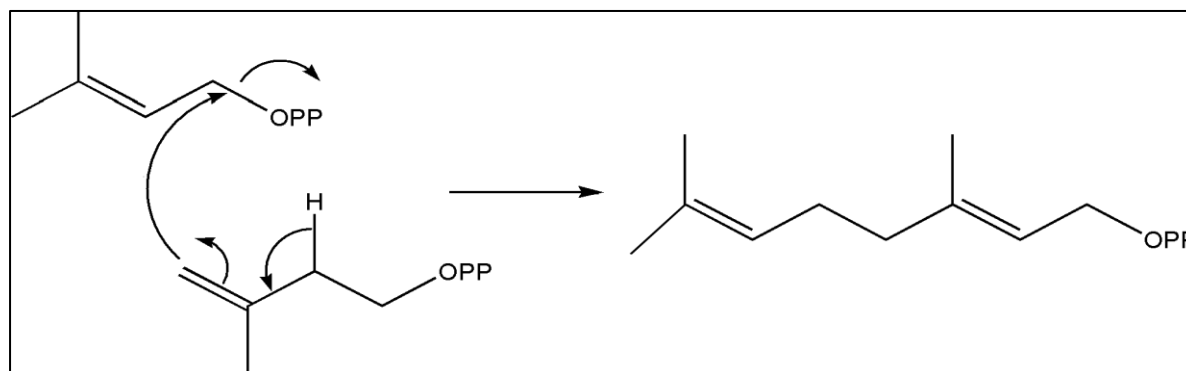


Figure II.11: Condensations tête à queue des unités en C5

Cette hypothèse sur la biogenèse des composés terpéniques a été transformée en règle générale par Ruzika [41,42] puis, plus tard par Hendrickson [43] qui avait envisagé toutes les étapes possibles de la biosynthèse notamment à partir des unités acétates.

Initialement, le marquage isotopique permet de montrer que le squelette carboné des terpènes provenait de l'acétate.

Ultérieurement il fut démontré que l'acide mévalonique était un précurseur universel de ces composés terpéniques (Figure II.12)

Le farnesylpyrophosphate (FPP), précurseur universel des sesquiterpènes lactones peut exister sous quatre isomères géométriques. Ces isomères formés à la base de germacra-1(10),4(5)-diène-6,12-olide ont une structure qui peut être déduite de l'isomère géométrique de FPP correspondant, après cyclisation, oxydation d'un groupe méthyle de l'isopropyle, oxydation du carbone 6 et fermeture sur l'oxygène de la fonction hydroxyle.

Un grand nombre de lactones sesquiterpéniques caractérisées par le groupe γ -lactonique en 6 ou en 8 proviennent de la cyclisation du FPP. Il existe d'autres groupes de lactones sesquiterpéniques dont les drimanolides et les tutimanolides où la fonction oxo du groupe γ -lactonique est formée à partir des autres groupes méthyliques du squelette sesquiterpénique. Les autres structures sesquiterpéniques sont formées par des réactions intramoléculaires de cyclisation, ruptures de liaisons etc.,

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

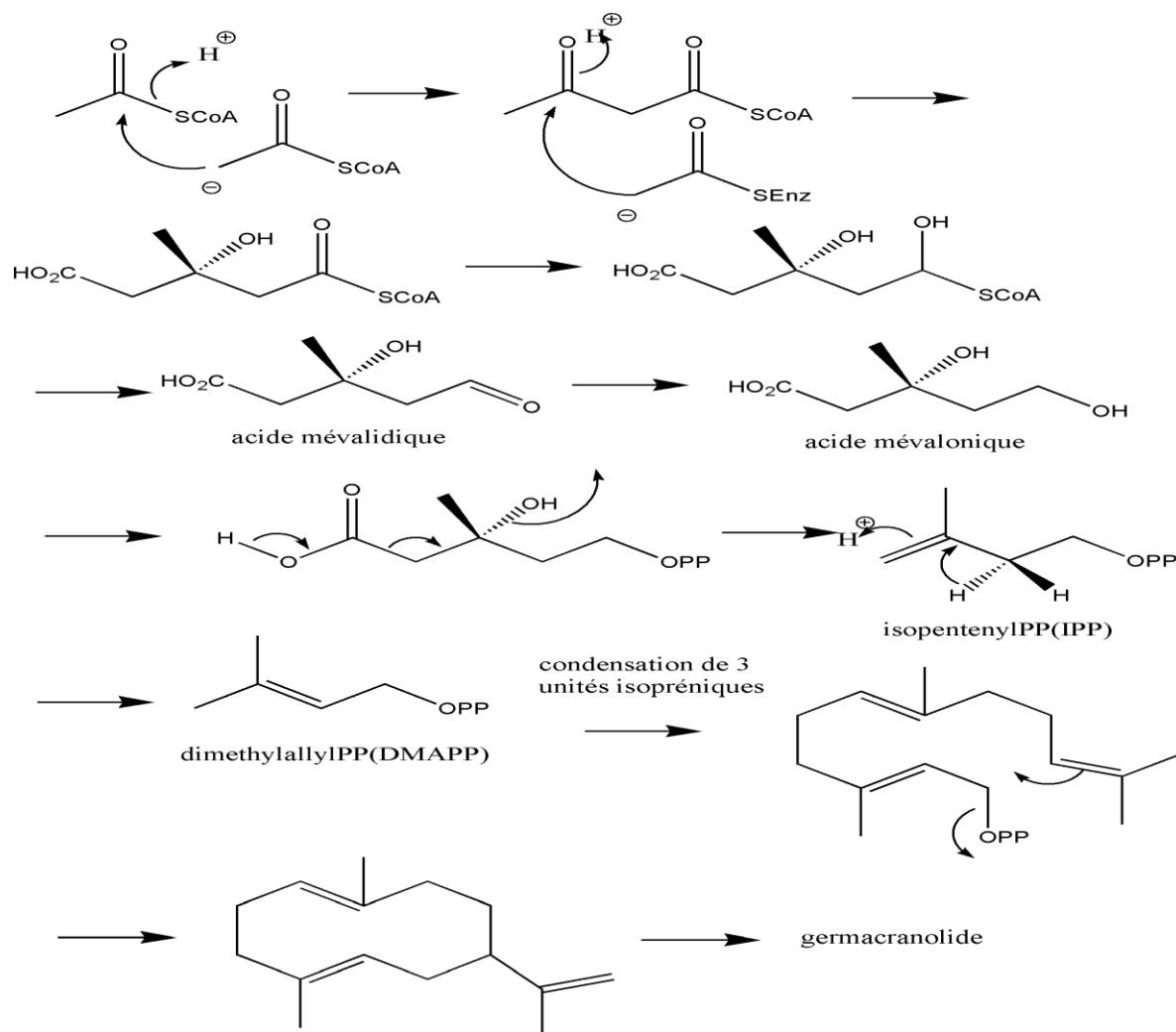


Figure II.12 : Biosynthèse des germacranolides à partir d'unités acétates via l'acide

La biogenèse du cycle γ -lactonique renferme plusieurs possibilités [44,45]. L'une d'elles montre l'oxydation sur C-11 par l'intermédiaire de la fonction époxyde, une autre, par l'hydroxypéroxyde, les dernières font apparaître un groupe aldéhyde ou carboxyle qui se lactonisent dans les positions 6 ou 8 où était déjà présent le groupe hydroxyle par oxydation enzymatique (Figure II.13)

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

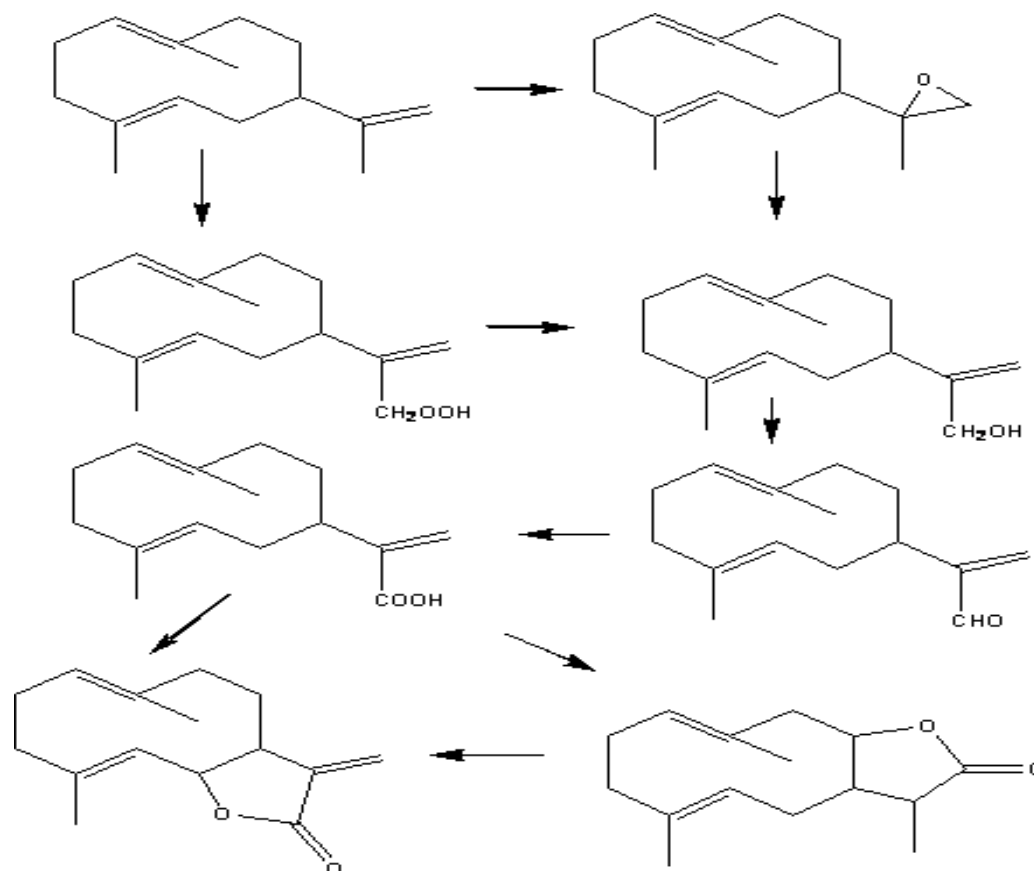


Figure II.13: Différentes voies de biogenèse du cycle γ -lactonique

Une autre hypothèse concerne le groupe furanique qui par oxydation donne le groupe γ -lactonique α, β insaturé (Figure II.14) Cette hypothèse est confirmée par le fait que les furanoérémofilanes qui sont facilement oxydés par l'oxygène de l'air pour former les érémofilanolides.

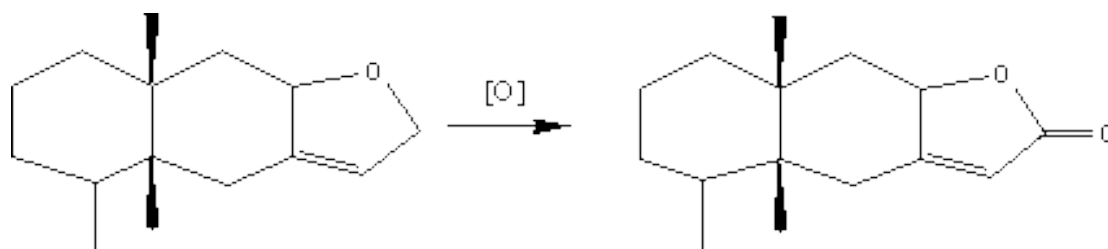


Figure II.14: Formation des érémofilanolides

Les composés intermédiaires très importants dans la biosynthèse sont surtout des composés avec des groupes époxydes. Ils donnent des réactions de cyclisation et des hydroperoxydes [46,47]. De même, ils ouvrent des possibilités de formation d'autres types de squelettes sesquiterpéniques[48].

Références bibliographiques

- [1] Pichersky. E, Gang. D. R, **2000**. Genetics and biochemistry of specialized metabolites in plant. An evolutionary perspective. Trends. Plant .Sci.(5) 439-445
- [2] Dave-Oomah. B, **2003**, *Bulletin IBP*, numéro 1, Canada
- [3] Boizot. N., Charpentier. N. J. ,**2006**, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration génétique et physiologie Forestières, Laboratoire d'analyses biochimiques, *le cahier des techniques de l'INRA*, 79-80.
- [4] Laraoui Habiba, **2007**, Etude phytochimique de l'extrait chloroformique de *Bulpleurumatlanticum*, *Thèse de Magister*, Université El Hadj Lakhdar Batna.
- [5] Macheix. J. J. ,Fleuriet. A., Jay-Allemand. C, *Les composés phénoliques des végétaux . Un exemple de métabolites secondaire d'importance économique*, presses polytechnique et universitaires romandes (2005) p VIII, 1, 3, 5, 7,10.
- [6] Sarni-Manchado. P, Cheynier. V, **2006**. *Les polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 03.
- [7] Gerhard. R., **1988**, *Métabolisme des Végétaux (Physiologie et Biochimie)*, 5^{ème} édition, Georg Thème Verlag, Rudigestraße 14, D-7000S Stuttgart 30
- [8] Psotova. J, Lasovsky. J, **2003**, Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics, *Biomed. Paper*, 147(2), 147-153.
- [9] Hale. A. L, **2003**, Screening Potato, genotypes for antioxidants activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet Norkotah Strains using AFLP and microsatellite marker analysis. Office of Graduate Studies of Texas A and M University.
- [10] N. Didry.; M. Pinkas, M. Torck , Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverse espèce de grindelia, *Pl. Med. Phytother.* XVI, 1982 7–15.
- [11] H. Ravn, C. Andary, G. Kovacs, P. Molgaard, Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi, *Biochem. Syst. Ecol.*, 17 1989 175–184.
- [12] Harborne, J. B., Baxter., *The handbook of naturel flavonoids*, John Willey & Sons: Chichester, 1999. Harborne, J. B. ; *The flavonoids. Advances in research since 1986* ; Chapman & Hall : London

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

- [13] Raskin, I. ; Ribnicky, D. ; Komarnytsky, S. ; Ilic, N. ; Poulev, A. ; Borisjuk, N. ; Brinker, A. ; Moreno, D. ; Ripoll, C. ; Yaboki, N. ; O'Neal, T. ; Postor, I. ; Fridlender, B. ; Trends Biotechnol.,
- [14] R.J.Grayer ,C.Veitch, Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications; O. M. Andersen., K. R .Markham., CRC Press, Boca. Raton.2006, p917-918.
- [15] K. M.Davies, K. E. Schwinn, Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications, O.M. Andersen , K. R. Markham,CRC Press, Boca Raton,(2006) p 154-155.
- [16] K. M.Davies,K. E.Schwinn, Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications, O.M.Andersen , K. R. Markham, CRC Press,Boca Raton (2006)p 156.
- [17] J. B.Harborne,Flavonoids in phytochemistry, Vol. II, Edition P. L. Lawrence, Vol. II (197 Litton Educational Publishing.
- [18] W.Heller, G.Forkmann,In the flavonoids advances in theresearch since 1980. Ed. J.B.Harborne, Chapman and hall, London, (1988) pp 399-425.
- [19] V.Deluca,R.KIbrahim,Enzymatic synthesis of polymethylatedflavonols in Chrysospleniumamericanum.II. Substrate interaction and product inhibition studies of flavonol3-, 6-, and 4'-O-methyltransferases, Arch. Biochem. Biophysics. 238, issue 2 (1985) 606-618.
- [20] M.Iinuma, M. Mizuno, Phytochemistry, 1989, 28, p 681.
- [21] J.Ebel, K.Hahlbrock, In the flavonoids advances in research editions J.B. Harbonne ,T. J. Mabry, Chapman , Hall, London,1982, pp641-659.
- [22] J.B.Harborne, C. A. Williams,In the flavonoids advances in research since 1986. Ed. J.B. Harborne, Chapman , Hall. 1988, p 303.
- [23] J.Chopin, Actualité de phytochimiefondamentale IIème série, édition Masson, Paris, 1966, p119.
- [24] J.Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales, 3 Ed. Tec, Doc, Paris. 1999.
- [25] R.D-H.Murray, Fortschr. C, Naturally Occurring Plant Coumarins, Chem. Org. Naturstoffe1978, p 199.

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

- [26] M.J. HSU, J.S. Cheng, H.C. Huang, Effect of saikosaponin, a triterpenesaponin, on apoptosis in lymphocytes, association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA, *Br. J. Pharmacol.* 2000, pp 1285-1293.
- [27] B. Rodriguez, N. Quim, *AusWurzeln und Kraut Atisan- und Kaurande-rivate*, 1979, p936.
- [28] J.B. Harborne, C. Williams, *Phytochemistry, Advances in flavonoid research since 1992*, 2000, pp 481-504.
- [29] G. Corsi, B.D. Biasci, Secretory structures and localization of alkaloids in *Conium maculatum* L. (Apiaceae), *Ann. Botany.* (81) 1998, pp 157-162.
- [30] A. T. Henry, *The plant Alkaloids*, Fourth edition, The Blakiston Company, Toronto, 1949.
- [31] K.R. Markham, *Technique of flavonoids identification*, Academic press, London 1982.
- [32] T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag NK.R. New York, Heidelberg, 1970 p254.
- [33] A. Berthillier, *La chromatographie et ses applications*, Dunod Paris. 1972.
- [34] J.B. Harbone, *Flavonoids in phytochemistry*, Vol III, Edition P. L. Lawrence, Vol II, Litton Educational Publishing. 1975.
- [35] J.B. Ribereau-Gayou, *The phenolic compounds of vegetal*, Edition Dunod, Paris 1968.
- [36] L. Jurd, R. Horowitz, *Spectral properties of flavonoids compounds*, Pergamon press, Oxford, 1962, 107-2055.
- [37] L. Horhammer, R. Hansel, *Arch. Pharm.*, 1952 pp 285-438.
- [38] L. Jurd, T.A. Geissman, *J. Org. Chem.*, (21) 1952 p 1395.
- [39] W. Kahle, *Arch. Pharm.*, 34, 318, *Beilsteins Handbuch der organischen chemie*, 17 1933 p 499.
- [40] J. Bruneton, *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales*, Techniques et documentations Lavoisier, 1993.
- [41] L. Ruzika, *Experientia* 9 1953, 357.
- [42] L. Ruzika, *Proc. chem. Soc.* 1953, 541.

Chapitre II

Les métabolites secondaires : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques

- [43] J.B.Hendrickson, Tetrahedron, 7 1959, 82.
- [44] T.A.Geissaman, The biosynthesis of sesquiterpenes lactones of the compositae, In recent Advances in phytochemistry ,vol 6 1973,p65 ,New york and London AcademPress.chemistry.
- [45] W.Herz, Biogenetic aspects of sesquiterpenes lactones chemistry, Israel J. Chem., 19,1977 p 32.
- [46] R.W.Doskotch, F.S.Elferaly, E. Fairchild, C.Huang, 1957. Chemcommun. 402.
- [47] F.S.Elferaly, R.W Doskotch, E.Fairchild, Y.M. Chan, 1973, Tetrahedronlett. 1977.
- [48] T.J.Mabry, Terpenoids , structure, biogenesis and distribution, Recent.Adv. phytochem.1973 V6

III.1 Etude phytochimique de *Santolina Chamaecyparissus*

III.1.1 Choix du matériel végétal

Le genre *Santolina* est représenté par plusieurs espèces, les composés phytochimiques les plus répandus sont les lactones sesquiterpéniques de types eudesmane et germacrane, les triterpènes et les monoterpènes. Ces derniers sont fréquemment rencontrés dans les huiles. Les huiles essentielles de *Santolina chamaecyparissus* ont montré une bonne action sur les souches de bactéries et de champignons. La fleur de cette espèce est utilisée en médecine populaire en raison de son effet antispasmodique [1,2].

Contrairement au genre *Centaurea*, le genre *Santolina* a fait l'objet d'une seule étude dans notre laboratoire, ce qui nous a encouragé à poursuivre son investigation phytochimique.

III.1.2 Place dans la systématique

Notre espèce est classée comme suit

Règne : Plantae,

Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs),

Classe : Dicotylédones,

Sous classe : Asteridae Gamopétales,

Ordre : Asterales,

Division : Magnoliophyta (angiospermes phanérogames, plantes à fleurs et à fruits)

Famille : Asteraceae,

Tribu : Anthemideae

Genre : *Santolina*,

Espèce : *Santolina chamaecyparissus*

III.1.3 Description botanique

Santolina chamaecyparissus ou santoline petit cyprès ou santoline est un sous-arbrisseau très décoratif et très aromatique de 20 à 60 cm de hauteur. Elle possède de très nombreuses tiges ligneuses ramifiées qui se développent en touffes denses. Les rameaux minces dressés et pubescentes, pennatifides, sessiles, découpés en lobes très courts ne dépassant pas 2 mm sur 2 rangs de part et d'autre de l'axe, subcylindriques ou obovales. Les capitules bombés d'un jaune

vif, dépourvus de ligules, large de 8 à 10 mm, sont solitaires au sommet des rameaux. Les coroles en tube dilaté à la base et coiffant l'ovaire. Sur un réceptacle muni d'écailles étroites et obtuses, sont entourées d'un involucre glabre à bractées portant des nervures saillantes sur le dos. Les fruits à 4 angles sont dépourvus d'aigrettes [1].

Le feuillage qui persiste est couvert d'une sorte de duvet argenté comme les jeunes rameaux, constituent l'attrait principal de la santoline qui par ailleurs dégage une bonne odeur aromatique, cette odeur qui rappelle celle de la lavande lui a valu le nom de lavande coton.

De juillet à août, les fleurs jaunes s'épanouissent, elles sont relativement petites mais nombreuses et leur couleur lumineuse produit un bel effet sur le fond plus sombre des plantes voisines, la fin de la floraison est l'occasion idéale pour tailler la plante. La santoline n'est pas exigeante sur le type de sol à condition qu'il ne garde pas l'eau ; il faut par contre une exposition ensoleillée.



Figure III.1 : Aspect morphologique de *Santolina chamaecyparissus*

III.1.4 Répartition géographique

Cette espèce est d'origine méditerranéenne. Elle est présente en Espagne, France, Italie, Croatie et Afrique septentrionale. En France, on la retrouve dans les Pyrénées orientales et les Alpes maritimes. Elle est absente en Corse [3].

III.1.5 Protocole expérimental

III.1.5.1 Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée au mois de mai 2012 le long de la route de Sétif et authentifiée par le professeur Kaabeche de l'université de Sétif. Un spécimen a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, université Frères Mentouri, Constantine.

Après séchage du matériel végétal dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont pesées puis broyées: 2500g.

III.1.5.2 Extraction

Les parties aériennes de *Santolina chamaecyparissus* sont mises à macérer à température ambiante dans un mélange hydro-alcoolique (éthanol/eau; 70/30 ; V /V) pendant 48 heures. L'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant chaque 48 heure.

Après filtration, le filtrat est concentré à une température n'excédant pas 35 degrés Celsius. L'extrait hydroéthanolique obtenu est dilué avec de l'eau distillé à raison de 400ml pour un kilogramme de matière sèche. Le filtrat va subir trois extractions successives de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante, chloroforme, acétate d'éthyle et on termine par le *n*-butanol. Les trois phases organiques sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre puis filtrées, concentrées à sec et pesées. Le protocole d'extraction est résumé par l'organigramme reporté dans la figure III.2

Les rendements des phases organiques sont reportés dans le tableau III.1

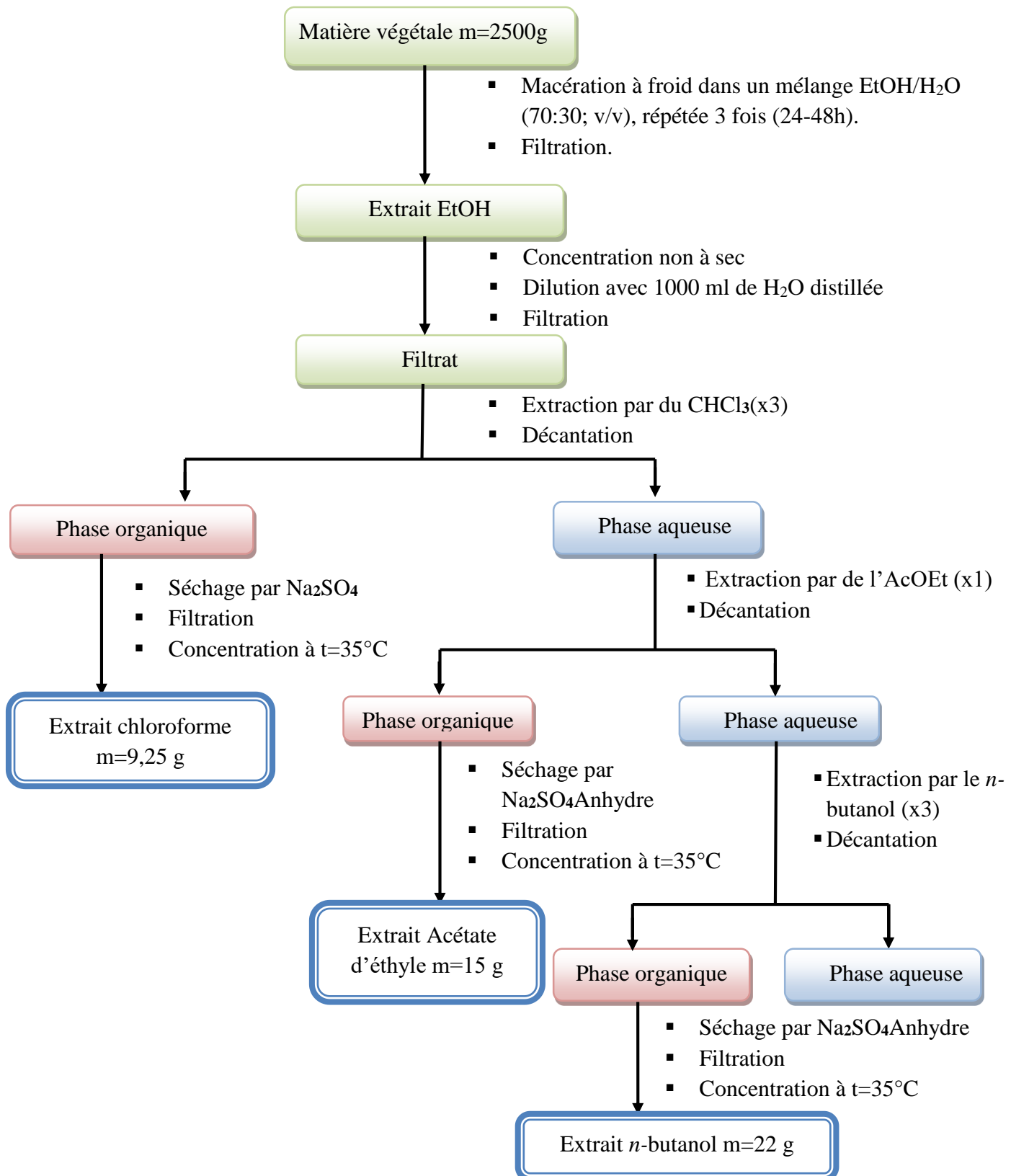


Figure III.2 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de *S.chamaecyparissus*

Tableau III.1 : Rendements des différents extraits

Matériel végétal (2500 g)	Poids (g)	Rendement (%)
Extrait chloroforme	9,25	0,37
Extrait acétate d'éthyle	15	0,6
Extrait <i>n</i> -butanol	22	0,88

III.1.6 Séparation et purification des extraits

Pour mettre au point le système d'élution le plus adéquat, les différents extraits ont été soumis à des tests chromatographiques sur plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice. Nos résultats nous ont permis de privilégier l'extrait chloroforme et l'extrait *n*-butanol vu leur richesse en composés phénoliques.

III.1.6.1 Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme

Les tests chromatographiques effectués sur plaques analytiques, ont montré une meilleure séparation avec le système cyclohexane/acétate d'éthyle. Ainsi un premier fractionnement de l'extrait chloroforme (5,5 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice. L'extrait dissout dans du chloroforme est mélangé avec une petite quantité de gel de silice, après évaporation, la poudre homogène obtenue est déposée sur une colonne préparée dans le cyclohexane (environ 30g de gel de silice pour 1 g d'extrait). L'élution est réalisée par le système cyclohexane - acétate d'éthyle en gradient de polarité avec un fractionnement tous les 25ml et introduction du MeOH vers la fin de l'élution de la colonne. Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'acide phosphomolibdique suivi de chauffage pendant 2 minutes. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Résultats de la séparation sur colonne de l'extrait chloroforme de *Santolina chamaecyparissus*

Lot de fractions	N° de la fraction	% C ₆ H ₁₂	% AcOEt	% MeOH	Poids (mg)
1-26	SC-1	90	10	0	18,07
27-35	SC-2	90	10	0	34,10
36-52	SC-3	90	10	0	27,99
53-68	SC-4	90	10	0	15,17
69-90	SC-5	90	10	0	56,84
91-113	SC-6	80	20	0	60,5
114-127	SC-7	80	20	0	55,54
128-135	SC-8	80	20	0	38,64
136-179	SC-9	80	20	0	196,25
180-220	SC-10	70	30	0	154,3
221-231	SC-11	70	30	0	50,4
232-242	SC-12	60	40	0	60,4
243-249	SC-13	60	40	0	69,00
250-270	SC-14	60	40	0	265,7
271-292	SC-15	50	50	0	155,86
293-310	SC-16	50	50	0	208,06
311-334	SC-17	40	60	0	256,8
335-354	SC-18	40	60	0	215,55
355-369	SC-19	20	80	0	369,91
370-428	SC-20	10	90	0	400,14
429-459	SC-21	0	90	10	541,71
460-483	SC-22	0	50	50	578,57
484-520	SC-23	0	0	100	867,9

III.1.6.1.1 Etude des fractions de l'extrait chloroforme

Une première analyse chromatographique sur plaque CCM nous a permis de sélectionner certaines fractions, soit à cause de leur simplicité soit à cause de leur poids relativement important.

❖ **Etude de la fraction SC-2**

La fraction SC-2 de masse 34,1 mg a subi une séparation sur plaque préparative (de gel de silice 60 sur support d'aluminium) en utilisant comme système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9,5/0,5). Après deux éluions trois produits ont été récupérés : SC-2-1, SC-2-2 et SC-2-3 de masse respectives 2,1 ; 1,6 et 2,9 mg avec comme seul produit pur SC-2-2 (1,6 mg) les deux autres se sont avérés être des mélanges.

❖ **Etude de la fraction SC-5**

Une partie de la fraction SC-5 de masse 56,84 mg a subi une séparation sur plaque préparative de gel de silice en utilisant comme système d'élution éther de pétrole/acétate d'éthyle/chloroforme (8/1/1), le produit majoritaire de masse 8,5 mg est noté **Sch 13**

❖ **Etude des fractions SC-8 et SC-9**

Le test analytique sur plaque CCM de gel de silice des fractions SC-8 et SC-9 avec comme système d'élution cyclohexane/acétate d'éthyle (8 /2) a révélé leur similitude. Le mélange des deux fractions (234,89mg) est déposé sur une colonne de gel de silice, éluee par le système *n*-Hexane/acétate d'éthyle en gradient de polarité. La chromatographie sur colonne nous a permis d'obtenir 10 sous-fractions (Fr1-Fr10). La sous-fraction Fr2 (24mg) renferme des cristaux qui après lavage avec du cyclohexane nous a permis d'obtenir un produit pur **SC8-Fr2** de masse 10mg.

❖ **Etude des fractions SC-11 et SC-12**

La chromatographie sur couche mince sur plaque d'aluminium, des fractions SC-11 et SC-12 a révélé la similitude des deux fractions. Ces dernières ont été regroupées (110,8 mg) et ont montré la formation d'un précipité qui a été filtré puis lavé au méthanol. Le produit pur obtenu est une poudre jaune de masse 63,7 mg nous le notons **Sch 1**

❖ **Etude de la fraction SC-14**

La fraction SC-14 de masse 265,7 mg comporte également un précipité, ce dernier est filtré puis lavé à plusieurs reprises avec du méthanol. Le produit obtenu est une poudre jaune de masse 50,4 mg nous le notons **Sch 2**

❖ **Etude de la fraction SC-15**

La fraction SC-15 d'une masse de 155,86 mg. Une quantité de cette fraction a subi une séparation sur plaques de gel de silice en utilisant comme système d'élution : éther de pétrole /AcOEt (7 : 3) . Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III -3.

Tableau III.3 : Fractionnement par chromatographie sur couche épaisse de la fraction SC-15

Sous-fraction	Poids	Remarques
SC-15-1	8,8	Mélange
SC-15-2	4,1	Mélange
SC-15-3	8,4	Mélange
SC-15-4	5,2	Mélange
SC-15-5	10	Produit de fluorescence noir violette sous UV (365 nm)
SC-15-6	12	Produit de fluorescence bleu fluorescente sous UV (365 nm)
SC-15-7	10	Produit de fluorescence noir violette sous UV (365nm)

Les sous fractions SC-15-5 , SC-15-6 et SC-15-7 ont subi une ultime purification sur colonne de Sephadex LH-20 éluee par du méthanol, les produits purs obtenus SC-15-5-16, SC-15-6-11 et SC15-7-27 que nous reportons, respectivement sous les codes **Sch 3** (3mg), **Sch 4** (2mg) et **Sch 5** (1mg).

On note que la purification des fractions SC-6, SC-7 s'est avérée difficile puisqu'elles contenaient en grande partie de la chlorophylle

L'extrait chloroforme de l'espèce *Santolina chamaecyparissus* a permis d'isoler huit produits purs : SC2-2, Sch 13, SC8-Fr2, Sch 1, Sch2, Sch3, Sch4, Sch5,

Une Co-chromatographie de ces produits nous a révélé que les produits SC2-2 et Sch 2 étaient identiques.

En conclusion l'extrait chloroforme de l'espèce *Santolina chamaecyparissus* a permis l'obtention de **sept produits**.

III.1.6.2 Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol

L'extrait *n*-butanol a été testé avec plusieurs systèmes de solvants différents, la meilleure séparation a été obtenue avec le système isocratique AcOEt/AcOH/H₂O (6:1:1). Environ 18 g de l'extrait *n*-butanol a subi une séparation par chromatographie d'adsorption sur colonne de gel de silice de granulométrie moyenne (230-400 mesh). L'extrait *n*-butanol dissout dans du méthanol est mélangé à une petite quantité de gel de silice, puis séché sous vide et pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre a été déposée en haut d'une colonne de gel de silice. Le poids du gel de silice correspond approximativement à 30 fois le poids de l'extrait. Le fractionnement a été fait tous les 50 ml. Le rassemblement de ces fractions est effectué sur la base des données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par l'anisaldéhyde puis chauffées à 100° C pendant 2 min. L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau III-4.

Tableau III.4 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *Santolina chamaecyparissus*, élution isocratique AcOEt/AcOH/H₂O (6:1:1)

Lots	Nom de la fraction	Poids (mg)
1-4	B1	120
5-13	B2	90
14-19	B3	31
20-33	B4	970
34-42	B5	1400
43-46	B6	600
47-51	B7	1070
52-62	B8	539.9
63-68	B9	810
69-74	B10	506
75-83	B11	987
84-88	B12	450
89-100	B13	80
101-117	B14	810
118-135	B15	200
136-141	B16	600
142-149	B17	130
150-161	B18	220
162-167	B19	920
168-173	B20	862
174-178	B21	530
179-185	B22	420
186-192	B23	230

Tableau III.4 Suite: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *Santolina chamaecyparissus*, élution isocratique AcOEt/AcOH/H₂O (6:1:1)

193-194	B24	920
195-206	B25	950
207-212	B26	720
213-224	B27	900
225-238	B28	1200

Les fractions sont testées dans d'autres systèmes, avec différentes proportions, ceci nous a permis de faire un second regroupement qui est présenté dans le tableau III-5.

Tableau III-5 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanol de *Santolina chamaecyparissus*

N des fractions	Nouvelle nomination	Observation
1-19	SB1	Graisses
20-33	SB2	Mélange séparable
34-46	SB3	Mélange séparable
47-62	SB4	Mélange
63-74	SB5	Mélange
75-88	SB6	Mélange séparable
89-100	SB7	Mélange
101-117	SB8	Mélange séparable
118-135	SB9	Mélange
136-141	SB10	Mélange
142-149	SB11	Mélange
150-161	SB12	Mélange
163-173	SB13	Mélange
174-178	SB14	Mélange
179-185	SB15	Mélange
186-192	SB16	Mélange
193-194	SB17	Mélange
195-206	SB18	Mélange
207-212	SB19	Mélange
213-238	SB20	Mélange

III.1.6.2.1 Etude des fractions de l'extrait *n*-butanol

❖ Etude de la fraction SB2

La fraction SB2 de masse 970 mg a subi une séparation sur colonne de gel de silice (200-400 mesh) avec comme système d'élution CHCl₃/MeOH en gradient de polarité. Le

rassemblement final des fractions a été effectué sur la base d'analyse par CCM analytique cela nous a permis de récolter 10 fractions.

Le résultat de cette colonne chromatographique est rassemblé dans le tableau III-6.

Tableau III-6 : Fractionnement de la fraction SB2 sur colonne de gel de silice

Lot de pots	Nom de la fraction ; % d'élution CHCl ₃ /MeOH	Observation
1-8	B1 100/0	/
9-17	B2 95/5	/
18-27	B3 95/5	Mélange complexe
28-39	B4 90/10	Mélange complexe
40-47	B5 90/10	Mélange complexe
48-56	B6 80/20	Mélange séparable
57-64	B7 70/30	Mélange complexe
65-71	B8 60/40	Mélange complexe
72-83	B9 50/50	Mélange complexe
84-95	B10 20/80	Mélange complexe

La fraction B6 comporte un produit qui a été purifié par recristallisation dans de l'acétone, le produit pur obtenu de masse 50,4 mg est noté **Sch 6** .

❖ Etude de la fraction SB3

Cette fraction de masse 1,4 g ayant montré un précipité avant évaporation, est lavée à plusieurs reprises avec du méthanol, le produit obtenu de masse 47,8 mg est noté **Sch7**.

❖ Etude de la fraction SB6

La fraction de masse 1437 mg est déposée sur une colonne de 150 g de gel de silice (200, 400 mesh, Merck) élué par le système CHCl₃/MeOH, en gradient de polarité. Des pots de 25 ml ont été récupérés et rassemblés en fonction de leur profil chromatographique. Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le tableau III.7

Tableau III-7 : Fractionnement de la fraction SB6 sur colonne de gel de silice

Lot de fraction	N° de la fraction	% système d'élution CHCl ₃ /MeOH	Poids (mg)
1-3	C1	100/0	20,9
4-9	C2	100/0	38,9
10-31	C3	90/10	42,85
32-51	C4	85/15	41,32
52-82	C5	85/15	60,5
83-114	C6	80/20	75,1

Tableau III-7 Suite : Fractionnement de la fraction SB6 sur colonne de gel de silice

115-157	C7	80/20	148,2
158-182	C8	80/20	79
183-190	C9	70/30	63,9
191-200	C10	70/30	80
201-213	C11	60/40	85,3
214-230	C12	60/40	79,8
231-240	C13	50/50	194
241-252	C14	40/60	68,5
253-262	C15	20/80	25,2
263-295	C16	0 /100	185,8

Parmi les 16 fractions récoltées, nous avons procédé à la purification des fractions C7, C8 et C10 à cause de leurs poids relativement important.

❖ Etude de la fraction C7

La fraction C7 de masse 148,2 mg a subi une séparation par HPLC-IR (MeOH /H₂O,40%), a permis d'obtenir trois produits purs, le premier noté **Sch 10** (1,2mg ; T_R= 9.2 min) , le second **Sch 11** (1,2mg ; T_R = 12,2 min) et le dernier **Sch 12** (1,1mg ; T_R = 38 min).

❖ Etude de la fraction C8

La fraction C8 de masse 79 mg a été purifiée par HPLC-IR (MeOH/H₂O,40%) a permis d'obtenir le produit **Sch 8** (0,7 mg).

❖ Etude de la fraction C10

La fraction C10 de masse 80 mg a été purifiée par HPLC-IR (MeOH/H₂O, 40%) a permis d'obtenir le produit **Sch 9** (1 mg ; T_R =7,8 min).

❖ Etude de la fraction SB8

De poids relativement important (810 mg),la fraction SB8 a subit une séparation sur papier wattman (30% acide acétique). On a pu récupérer 6 bandes,seules les bandes SB8-4 et SB8-6 ont été purifiées sur colonne de Sephadex LH-20 éluée par du méthanol. On a obtenu deux produits purs P1 et P2 de poids respectifs 15 mg et 10 mg , de fluorescence noir violette sous lumière de Wood.

Une co-chromatographie des différents produits isolés de l'extrait *n*-butanol a restreint le nombre de composés isolés puisque le produit P1 est identique à Sch 7 quant à P2 il est similaire à Sch 11

En conclusion l'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Santolina chamaecyparissus* a permis l'obtention de 7 produits purs.

III.2 Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea pungens*

III.2.1 Choix du matériel végétal

Centaurea pungens appartient à la famille des Asteraceae. Pour le genre *Centaurea* plusieurs activités biologiques ont été mises en évidence : astringente, dépurative, antiseptique, cytotoxique, antipyrétique, antibactérienne, antifongique, antirhumatismale, anti inflammatoire, diurétique et fébrifuge [4,6]. Citons comme exemple les fleurs de *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* sont utilisées en Turquie pour traiter les ulcères peptiques, l'ulcère gastro-duodéal, le paludisme, les rhumes, les maux d'estomac, les douleurs abdominales et les infections herpétiques autour des lèvres [7,8] L'espèce *cyanus* est réputée pour son traitement des affections oculaires. La décoction des fleurs atténue la toux..Elle possède aussi des activités antimicrobienne, anti-inflammatoire et immunologique [9,10]. Du point de vue composition chimique, les espèces de ce genre sont réputées par l'accumulation des métabolites secondaires de type flavonoïdes et lactones sesquiterpéniques. Les résultats des investigations phytochimiques obtenus sur ces types d'espèces dans notre laboratoire depuis plus d'une trentaine d'années, nous ont encouragés à entreprendre cette étude à la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

III.2.2 Place dans la systématique

Notre espèce est classée comme suit

Règne : Plantae,

Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs),

Classe : Dicotylédones,

Sous classe : Asteridae Gamopétales,

Ordre : Asterales,

Division : Magnoliophyta (angiospermes phanérogames, plantes à fleurs et à fruits)

Famille : Asteraceae,

Genre : *Centaurea*,

Espèce : *Centaurea pungens*

III.2.3 Description botanique

Centaurea pungens est une plante vivace basse. D'une taille allant de 30 à 40 cm. Les feuilles, sont découpées et non épineuses. Les capitules ont des bractées munies d'une longue épine (2 à 3 cm) avec des épines secondaires dans la partie inférieure. Les fleurons sont violets [11]

On retrouve *C. pungens* à Ihérir et dans le Tassili Hoggar. C'est une espèce endémique saharienne.



Figure III.3 : Photos de *Centaurea pungens*

III.2.4 Protocole expérimental

III.2.4.1 Récolte du matériel

Le matériel végétal a été récolté à 80Km de la ville de Bechar sur la route menant à Béni-abbes, sud-ouest (Algérie) en mai 2015 et authentifié par M.Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de la préservation de la nature de Bechar . Un spécimen (CP145/11) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL université frères Mentouri Constantine.

III.2.4.2 Extraction

Les parties aériennes de la plante sont séchées à l'abri des rayons solaires et de l'humidité. Les fleurs ont été coupées en petits morceaux et séparées (720 g) des autres parties de la plante (tiges et feuilles). Les 720 g de fleurs ont subi une macération dans un mélange hydroalcoolique MeOH/H₂O (70/30) pendant 72 heures. L'extrait obtenu est concentré sous pression réduite et à température ne dépassant pas 35°C. La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Les extraits récoltés sont rassemblés et concentrés. Le résidu obtenu est additionné de 300 ml d'eau distillée sous agitation magnétique, la solution ainsi obtenue est laissée au repos pendant une nuit et au frais (4°C) pour décantation. Après filtration la solution aqueuse obtenue subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le CHCl₃, puis AcOEt et enfin le *n*-butanol. Les trois phases organiques sont séchées (Na₂SO₄ anhydre) puis concentrées à sec sous pression réduite puis pesées.

Les parties aériennes restantes (feuilles et tiges) de poids 645,21 g ont subi la même extraction sauf que cette fois ci on a commencé par de l'éther de pétrole suivi par le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol .

Les protocoles d'extraction des fleurs et des feuilles tiges sont résumés dans les organigrammes reportés dans les figures III.4 et III.5.

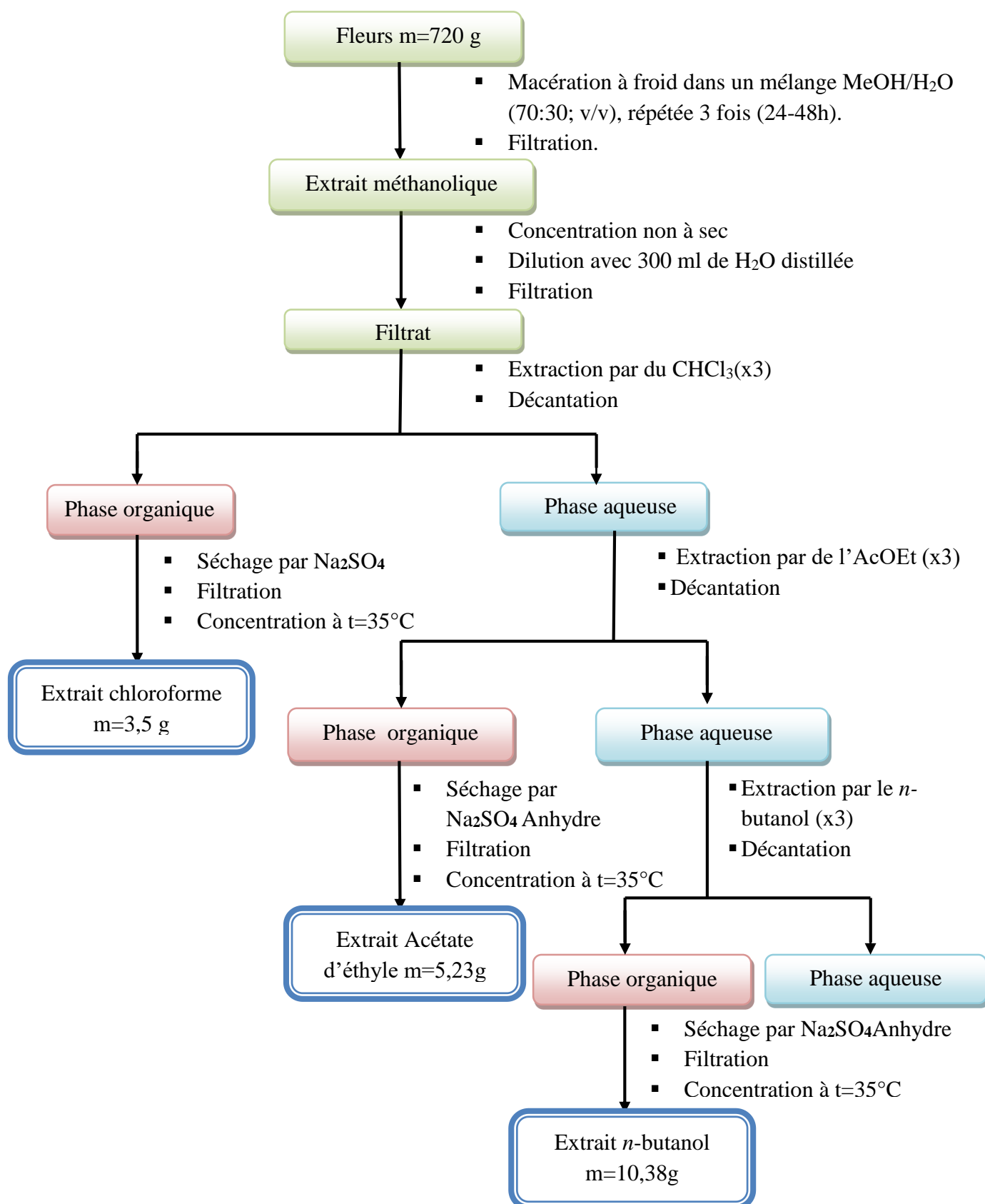


Figure III. 4 : Protocole d'extraction des fleurs de l'espèce *Centaurea pungens*

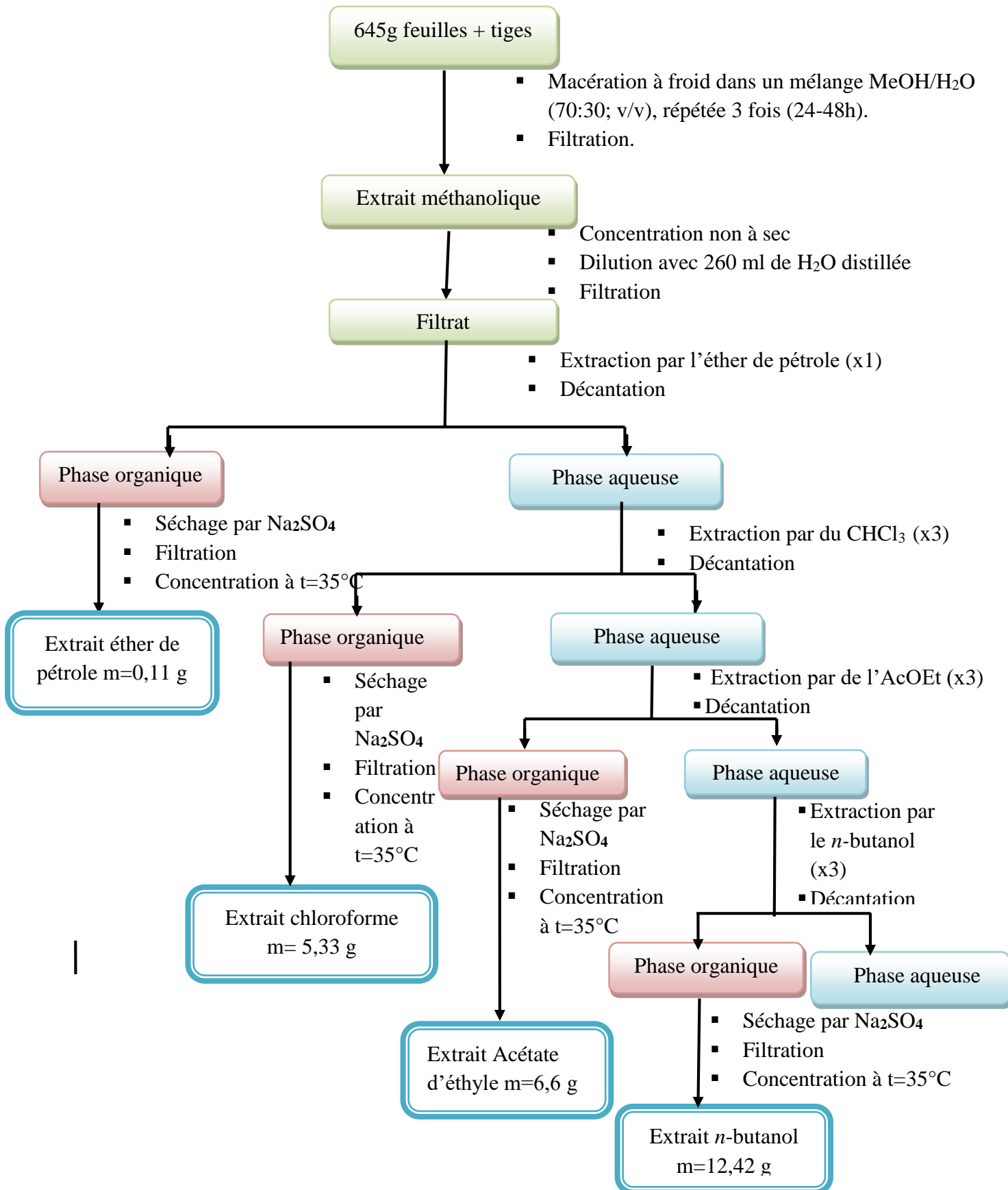


Figure III. 5 : Schéma d'extraction des feuilles et tiges de *Centaurea pungens*

Les rendements des différents extraits sont reportés dans le tableau III.8

Tableau III.8 : Le rendement des différents extraits

	720 g de Fleurs			645,21g Feuilles et Tiges			
Extraits	CHCl ₃	AcOEt	<i>n</i> -butanol	Ether de pétrole	CHCl ₃	AcOEt	<i>n</i> -butanol
Poids (g)	3,54	5,23	10,38	0,11	5,33	6,67	12,42
Rendement (%)	0,49	0,73	1,44	0,02	0,83	1,03	1,93

III.2.5 Séparation et purification des extraits

Des tests chromatographiques sur plaque d'aluminium de gel de silice ont été effectués sur les différents extraits avec différentes polarités, notre choix s'est porté sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol vu leurs poids relativement important. La séparation de l'extrait chloroforme, s'est avérée difficile car en plus de sa faible quantité l'extrait contient en majorité de la chlorophylle.

III.2.5.1 Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'éthyle

Le système d'élution qui a donné la meilleure séparation est CHCl₃/acétone (8/2, V/V). Environ 4,5g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissous dans le méthanol puis mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide et pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans du CHCl₃. L'élution est réalisée par le système CHCl₃/acétone en gradient de polarité. Le fractionnement a débuté par des volumes de 50 ml (les dix premiers pots) et a continué tous les 25 ml. Notons que le suivi de la colonne a été effectué sur la base d'analyses par chromatographie sur plaque d'aluminium recouvert de gel de silice. Ainsi 30 fractions ont été obtenues. Le résultat de cette opération est rapporté dans le tableau III.9.

Tableau III.9 : Fractionnement sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea pungenis*

Lots de pots	Fraction	Système d'élution (%) CHCl ₃ /acétone
1-2	F1	100/0
3-6	F2	100/0
7-9	F3	100/0
10-11	F4	99/1
12-16	F5	99/1
17-19	F6	99/1
20-23	F7	98/2
24-31	F8	98/2
32-36	F9	96/4
37-42	F10	96/4
43-58	F11	96/4
59-67	F12	94/6
68-74	F13	94/6
75-85	F14	94/6
86-90	F15	92/8
91-95	F16	92/8
96-105	F17	92/8
106-117	F18	90/10
118-126	F19	90/10
127-138	F20	88/12
139-144	F21	88/12
145-155	F22	86/14
156-162	F23	86/14
163-188	F24	84/16
189-198	F25	84/16
199-214	F26	80/20
215-224	F27	80/20
225-229	F28	80/20
230-238	F29	80/20
239-248	F30	75/25
249-254	F31	75/25
255-267	F32	75/25
268-277	F33	75/25
278-284	F34	70/30
285-290	F35	70/30
291-300	F36	70/30
301-311	F37	65/35
312-315	F38	65/35

Tableau III-9 Suite: Fractionnement sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea pungens*

316-321	F39	65/35
322-338	F40	60/40
339-348	F41	60/40
349-359	F42	60/40
360-366	F43	55/45
367-376	F44	50/50
377-391	F45	40/60
392-400	F46	20/80
401-418	F47	0/100

Après chromatographie sur couche mince sur plaques d'aluminium révélées par l'anisaldéhyde puis chauffées à 100°C, nous avons pu faire un second regroupement. Les résultats sont réunis dans le tableau III.10.

Tableau III.10: Regroupement de fractions issues de la colonne de l'extrait acétate d'éthyle

Lots de fractions	Fractions finales	Masse des fractions finales (mg)
F1-F5	CPA-1	73 ,1
F6-F8	CPA-2	56,1
F9-F10	CPA-3	52,4
F11	CPA-4	44,2
F12	CPA-5	58
F13	CPA-6	26,2
F14	CPA-7	33,4
F15	CPA-8	12,2
F16-F17	CPA-9	191,5
F18	CPA-10	37
F19	CPA-11	24,7
F20	CPA-12	74 ,6
F21	CPA-13	81,9
F22	CPA-14	59,6
F23-F24	CPA-15	126,1
F25-F27	CPA-16	151
F28-F30	CPA-17	1300
F31-F35	CPA-18	103,6

Tableau III.10 Suite: Regroupement de fractions issues de la colonne de l'extrait acétate d'éthyle

F36	CPA-19	72,9
F37	CPA-20	155,9
F38	CPA-21	81,5
F39	CPA-22	205,8
F40	CPA-23	189,5
F41	CPA-24	125,7
F42	CPA-25	250,2
F43	CPA-26	165,7
F44	CPA-27	102,8
F45	CPA-28	150,9
F46	CPA-29	299,8
F47	CPA-30	65,4

❖ **Etude de la fraction CPA -5**

La fraction CPA-5 (58 mg) comporte un précipité. Après plusieurs lavages au méthanol, le produit obtenu de masse 39,6 mg est noté **CP5**,

❖ **Etude de la fraction CPA-9**

La fraction CPA-9 (191,5mg) renferme un produit majoritaire sous forme de précipité. Filtré puis lavé avec du méthanol, le composé obtenu de masse 20,8 mg est noté **CP4**.

❖ **Etude de la fraction CPA-17**

La fraction CPA 17 (1300 mg) a subi une séparation sur colonne de gel de silice. L'élution est effectuée par un système de polarité croissante. Le système d'élution utilisé est CHCl₃/MeOH. Environ 1,2 g sont dissous dans une petite quantité de gel de silice puis séchés sous vide, la masse obtenue est pulvérisée jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Le fractionnement se fait tous les 50 ml. A partir du quinzième pot, le volume de chaque pot est réduit de moitié (25ml). Le suivi de la composition des pots a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur plaques d'aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254,365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C pendant 3

min, 20 sous-fractions ont été obtenues. Le résultat de cette opération est reporté dans le tableau III-11.

Tableau III-11 : Résultat du fractionnement sur colonne de la fraction CPA-17

Lots de pots	Sous-fractions	Système d'éluion CHCl ₃ /MeOH	Poids (mg)
1-14	A17-1	100/0	7,7
15-26	A17-2	99 /1	4,3
27-32	A17 -3	99/1	11,3
33-39	A17-4	97/3	33,9
40-46	A17-5	96/4	66,1
47-52	A17-6	94/6	70,9
53-60	A17-7	94/6	112,3
61-63	A17-8	92/8	54,6
64-66	A17-9	92/8	46,9
67-70	A17-10	90/10	68,5
71-74	A17-11	88/12	59,4
75-83	A17-12	85/15	56,8
84-92	A17-13	85/15	104,5
93-102	A17-14	80/20	75,7
103-111	A17-15	80/ 20	43,7
112-119	A17-16	80/20	67,8
120-130	A17-17	75/20	60,1
131-140	A17 -18	70/30	77,8
141-156	A17-19	60/40	88

❖ **Séparation et purification de la fraction CPA 17**

➤ **Etude de la sous-fraction A17-9**

Cette sous-fraction de masse 46,9 mg comporte un précipité. Ce dernier est lavé à plusieurs reprises avec du méthanol. Le produit obtenu est noté **CP7** (12mg)

❖ **Etude de la fraction CPA 26**

Cette fraction de masse 165,7 mg a subi un premier fractionnement par chromatographie d'exclusion sur une colonne séphadex LH-20 éluée par le MeOH, 10 sous fractions de 12ml F26-1 à F26-10 ont été récupérées, la sous fraction F26-6 présente sur plaque CCM un produit majoritaire. Une ultime purification sur une colonne de séphadex LH-20 éluée par le méthanol a permis d'obtenir le composé **CP 2** (5mg).

III.2.5.2 Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol

Une chromatographie sur couche mince de gel de silice des deux extraits *n*-butanol (fleurs) et *n*-butanol (feuilles+tiges) a montré une bonne séparation dans le système (CHCl₃/MeOH/H₂O ; 26:14:3).

Notre choix s'est porté sur l'extrait *n*-butanol fleurs. Environ 2,7g de cet extrait sont déposés sur une colonne de gel de Sephadex éluée par du méthanol, 96 pots contenant des volumes de 10 ml ont été récupérés. Sur la base de leurs profils chromatographiques sur plaques d'aluminium de gel de silice, les 96 pots ont été regroupés en 19 fractions. Les résultats de cette analyse sont reportés dans le tableau III-12.

Tableau III-12 : Fractionnement sur colonne de l'extrait *n*-butanol (fleurs).

Lots de pots	Fractions	Poids (mg)
1-20	CPB-1	Traces
21-22	CPB-2	289,9
23-25	CPB-3	516,4
26	CPB-4	310,9
27-28	CPB-5	319,8
29-30	CPB-6	236,5
31-33	CPB-7	126,2
34-36	CPB-8	48,2
37-41	CPB-9	44,6
42-43	CPB-10	17,7
44-46	CPB-11	23,3
47-54	CPB-12	54,9
55-62	CPB-13	49,1
63-69	CPB-14	26,3
70-73	CPB-15	17,4
74	CPB-16	7,6
75-82	CPB-17	15,9
83-87	CPB-18	14
88-96	CPB-19	23

❖ Etude de la fraction CPB-3

La fraction CPB-3 (516,4mg) de poids relativement important, est la fraction la plus riche. Une partie de cette fraction a subi une séparation par chromatographie liquide à haute

performance (HPLC) semi préparative, utilisant le système d'élution MeOH/H₂O (40 / 60). La purification de cette fraction nous a permis d'obtenir trois produits purs.

- Le produit **CP1** (MF 12) de masse 1 mg avec T_R=8,8 min
- Le produit **CP3** (MF 9) de masse 1,4 mg avec T_R=11,2 min
- Le produit **CP6** (MF 13) de masse 2,2 mg avec T_R=14 min

❖ **Etude de la fraction CPB-9**

La fraction CPB-9 (44,6 mg) a subi une purification par HPLC semi préparative, le système d'élution étant MeOH/H₂O (35 / 65).Après trois injections, nous avons obtenu le produit **CP9** (MF 22) de masse 1,6 mg, T_R=6 min.

❖ **Etude de la fraction CPB-17**

Cette fraction de masse 15,9 mg a été filtrée, le précipité obtenu est lavé à plusieurs reprises avec du méthanol. Le produit CP8 (MF 1) obtenu possède une masse de 4,4 mg.

En conclusion l'investigation phytochimique des extraits chloroforme et *n*-butanol de l'espèce *Centaurea pungens* a permis d'obtenir 9 composés.

Références bibliographique

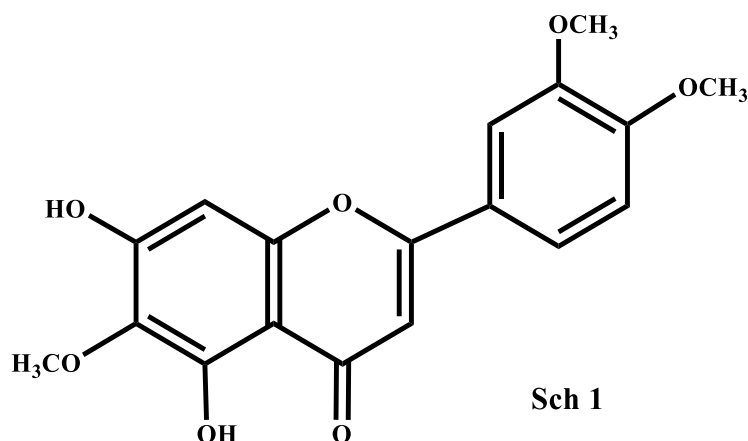
- [1] R. M. Giner Pons, J. L. Rios Canavate , (2000). *Santolina chamaecyparissus*: Espèce méditerranéenne avec des applications thérapeutiques potentielles dans les processus inflammatoires et les troubles digestifs. *Revista de Fitoterapia*, 1,(2000) 27-34.
- [2] C. Boudoukha, H. Bouriche, E. Ortega, A. Senator Immunomodulatory effects of *Santolina chamaecyparissus* leaf extracts on human neutrophil functions, *Pharmaceutical Biology*, 54:4(2016) 667-673
- [3] https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/197354/tab/statut
- [4] M.Derbesy, J. Touche, A. Zola. The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Essent. Oil Res.*, 1, (1989) 269-275.
- [5] A.F.Barrero, M.M Herrador, P. Arteaga, E. Cabrera, I.Rodríguez-García, M. García-Moreno and D.G.Gravalos . Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp.ramosissima and *Centaurea malacitana* , *Fitoterapia*, 68(3) (1997) 281-283.
- [6] F.Orallo, M. Lamela, M. Camina, E.Uriarte, M.Calleja. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of Centaurein and Centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis* , *Planta Medica*, 64 (2) (1998) 116-119.
- [11] P. Quezel, S. Santa, *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*, Vol II CNRS Paris, 1963, pp 1016-1032
- [7] E. Yesilada, G. Honda, E. Sezik, M. Tabata , T. Fujita, R. Tanaka., Y. Takeda, Y. Takaishi. 1995, *Journal of Ethnopharmacology*, 46 (1995) 133–152.
- [8] Y. Erdem, G. Ilhan, B. Erdal, T. Irem, A. K. Ikhlas 2004, *Journal of Ethnopharmacology*, 95 (2004) 213–219.
- [9] S. Mohammad, M.M. Stephen , J. Marcel, T. Jioji., N. Lutfun , K.T. Paul, et D.S. Satyajit , *Tetrahedron*, 62 (2006) 11172–11177.
- [10] D.S. Satyajit , L. Anuszká., N. Lutfun , K. Yashodharan, J. Marcel. *Phytochemistry*, 67 (2001) 1273-1276.

[11] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Desertiques Meridionales, Vol II CNRS Paris, 1963, pp 1016-1032

IV.1 Identification des produits isolés de *Santolina chamaecyparissus*

IV.1.1 Identification des produits isolés de la phase chloroforme

IV.1.1.1 Elucidation structurale du composé Sch 1 (SC11)



La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3 (3-OR).

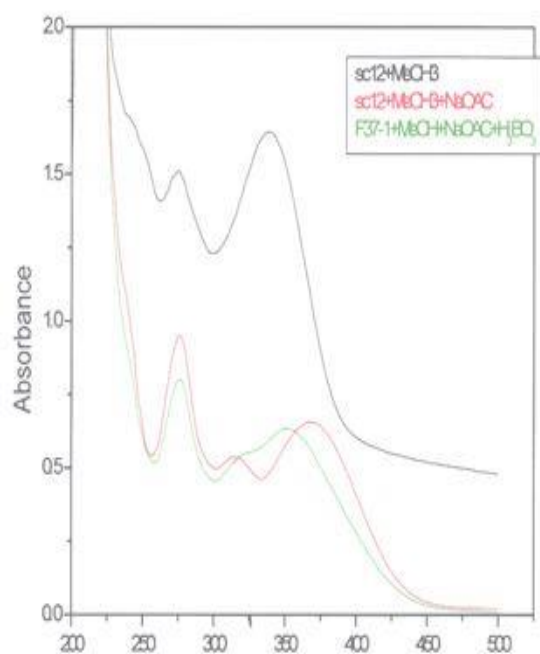
L'examen de la série spectre UV-visible (Figure IV.1.1) permet d'obtenir les indications suivantes : dans le spectre enregistré dans le MeOH, la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I, 338 nm indique une structure relative à une flavone. Le spectre après addition de NaOH montre un déplacement bathochrome de la bande I de 37 nm avec une diminution de l'intensité indiquant l'absence d'un OH libre en C-4'. Ce spectre montre l'apparition d'une nouvelle bande avec une absorption maximale à 320 nm en faveur d'un OH libre en C-7. Après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ dans la solution méthanolique on observe un effet bathochrome de la bande I de 27 nm indiquant la présence d'un OH libre en C-5 et une oxygénation en C-6. La comparaison des spectres après addition de AlCl_3 et après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ dans la solution méthanolique ne montrant aucune différence significative entre les deux spectres, indique l'absence d'un système ortho-dihydroxyle sur le noyau B. Après addition de NaOAc dans la solution méthanolique, le spectre montre un léger déplacement bathochromique de la bande II confirmant la présence d'un OH libre en C-7 avec une oxygénation en C-6. Le spectre enregistré en présence de NaOAc et H_3BO_3 confirme l'absence d'un système ortho-dihydroxyle sur le noyau B. Toutes ces données sont rassemblées dans le tableau IV.1.1.

Chapitre IV

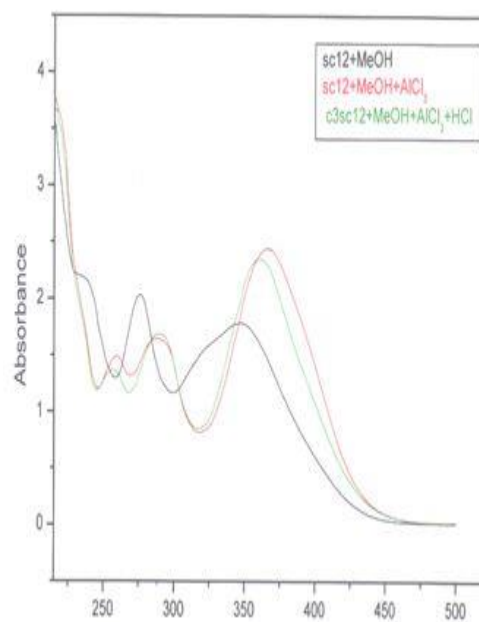
Résultats et discussions

Tableau IV.1.1 : Données de la série spectrale UV du composé Sch1 (SC 11).

Réactifs	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	338	275	Flavone
+NaOH (effet hypochrome)	375	275, 320	OH libre en C-7 et OR en C-4'
+NaOH après 5min	375	275, 320	
+AlCl ₃	365	275	OH en C-5 et OR en C-6
+AlCl ₃ +HCl	362	275	
+NaOAc	349	279	7-OH et 6-OR
+NaOAc +H ₃ BO ₄	350	275	Absence d' <i>ortho</i> -di OH sur le noyau B



Longueur d'onde (nm)



Longueur d'onde (nm)

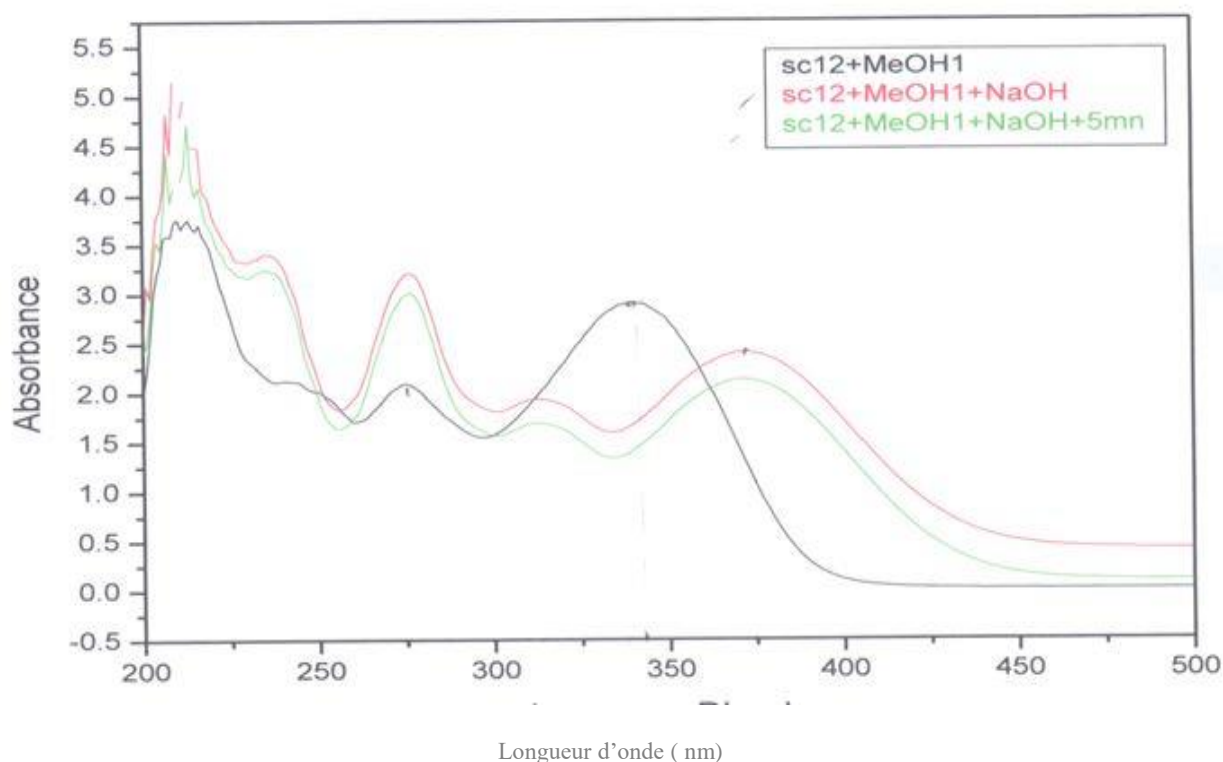


Figure IV.1.1: Spectrophotométrie UV-Visible du composé Sch 1 (SC 11)

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figures IV.1.2 ; IV.1.2.1 ; IV.1.2.2 et IV.1.2.3) montre la présence de :

- Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=13,05$ ppm attribuable au proton du OH de la position C-5 du squelette flavonique
- Un signal sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=7,69$ ppm ($J = 8,5 ; 2,1$ Hz) attribuable à H-6' de cette flavone
- Deux signaux sous forme de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=7,57$ ppm ($J = 2,1$ Hz) et à $\delta_{\text{H}}=7,13$ ppm ($J=8,5$ Hz) attribuables à H-2'et H-5', respectivement
- Deux signaux sous forme de deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=6,97$ et $\delta_{\text{H}}=6,65$ ppm. Le premier est attribué à H-8, vu sa corrélation sur le spectre HSQC (Figure IV.1.3), avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=94,35$ ppm, dont la valeur du déplacement chimique est caractéristique du carbone C-8 d'un flavonoïde. Le second proton est par conséquent, attribué au proton H-3, vu la nature flavone de cette molécule. La résonance du carbone C-3 est relevée à $\delta_{\text{C}}=103,34$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone est en parfait accord avec cette attribution.

- Trois signaux sous forme de singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}}=3,89$ ppm; 3,86 ppm et 3,76 ppm indiquant la présence de 3 groupements méthoxyles dans cette flavone.

Ces données de RMN additionnées à celles de la série spectrale UV-Visible permettent d'ores et déjà de placer les 3 groupements méthoxyles dans les positions C-3', C-4' et C-6 et ainsi le composé Sch 1 (SC11) est donc la 5,7-dihydroxy-6, 3',4'-triméthoxyflavone connue sous le nom d'eupatiline (Figure IV.1.4).

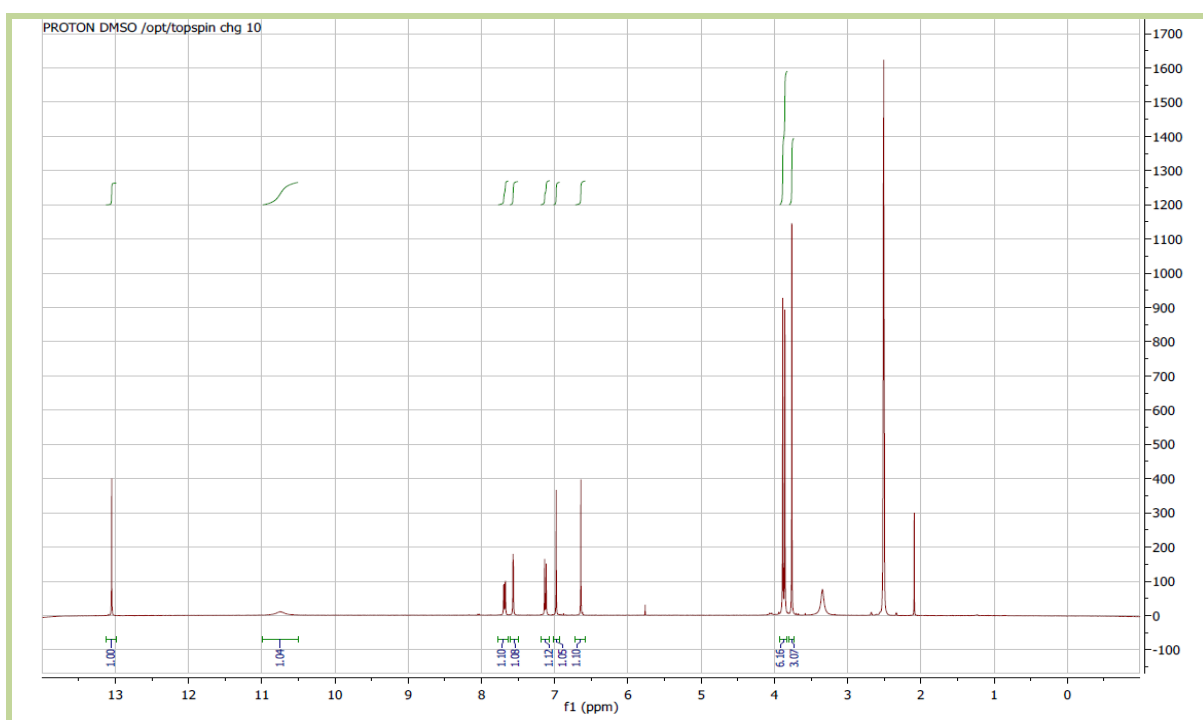


Figure IV.1.2: Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé Sch 1 (SC 11)

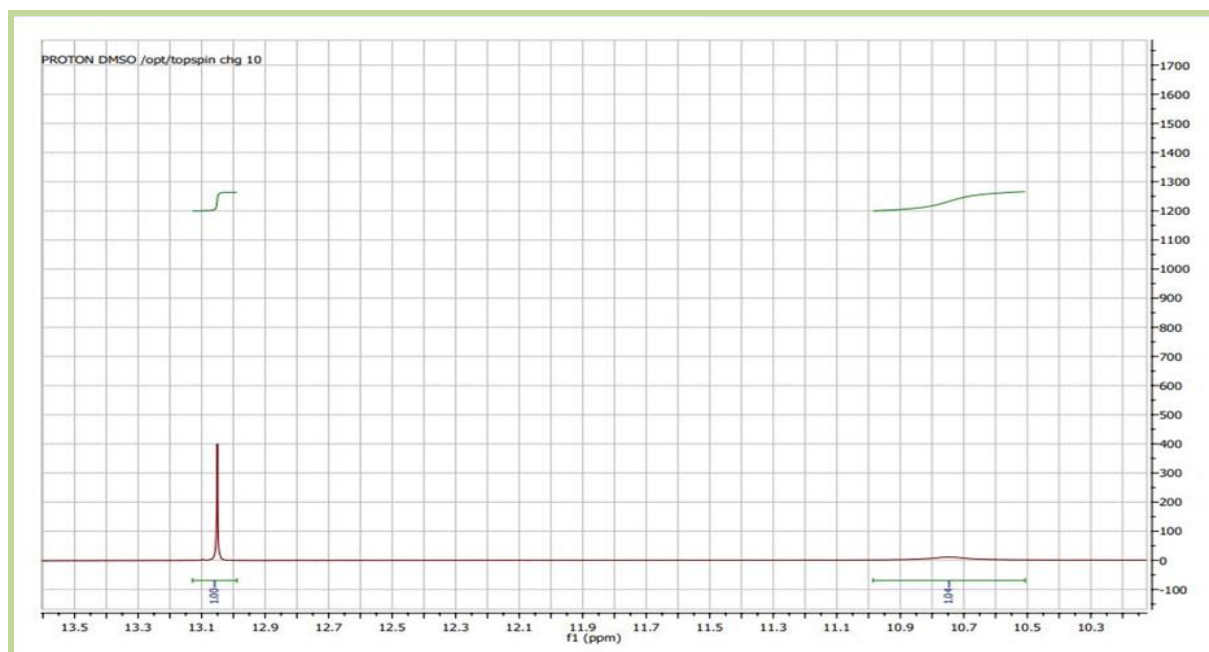


Figure IV.1.2.1: Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé Sch 1, étalement 1

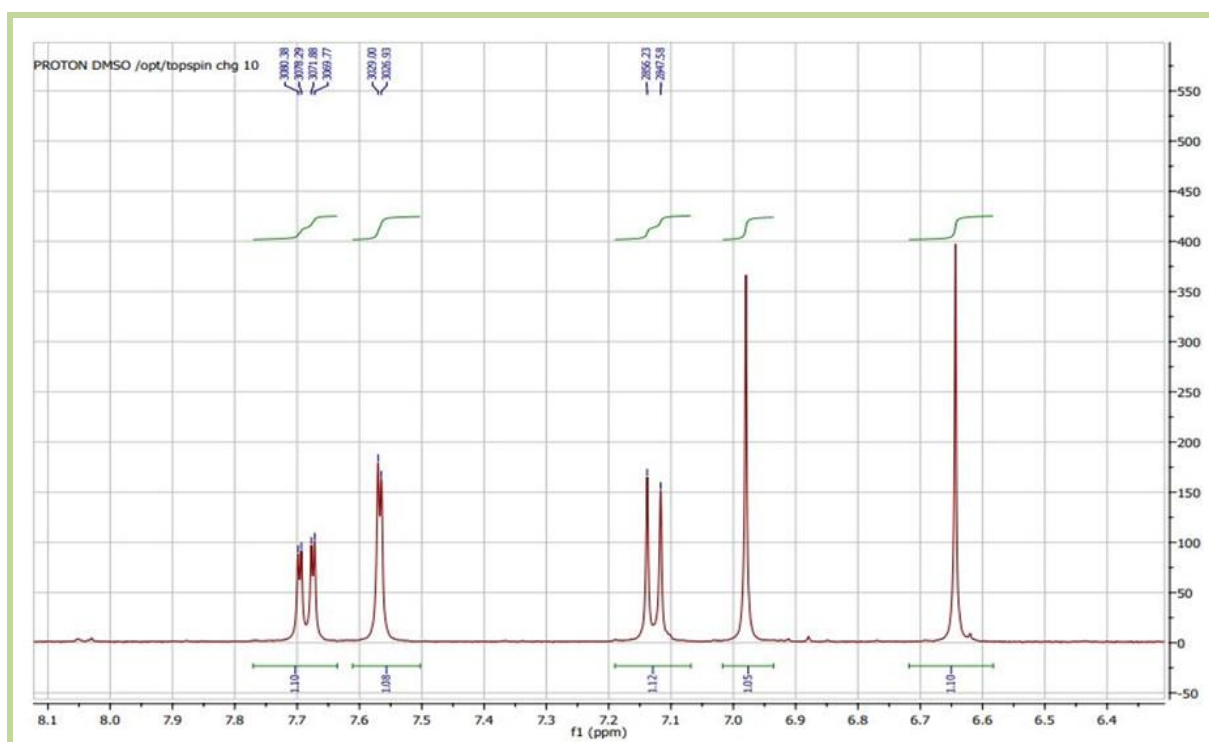


Figure IV.1.2.2: Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé Sch 1, étalement 2

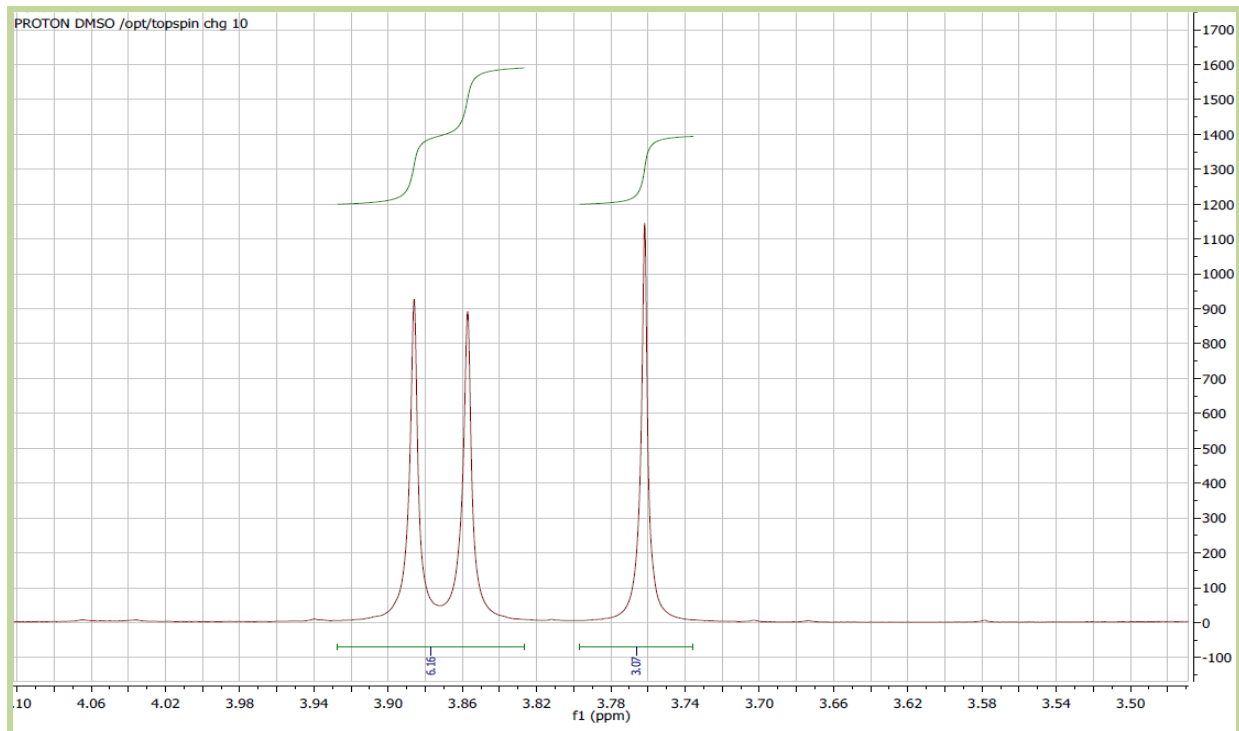


Figure IV.1.2.3 : Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé Sch 1, étalement 3

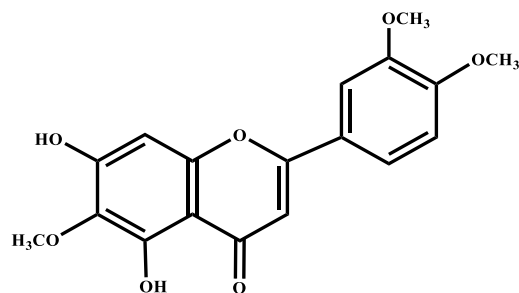


Figure IV.1.5: Structure du composé Sch1 (SC 11), eupatiline

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Figure IV.1.3) permet l'attribution des protons aux atomes de carbone correspondants, en effet:

- Une tache de corrélation entre le proton en position 6' et le carbone à $\delta_C=119,98$ ppm permettant ainsi l'attribution de ce carbone au C-6'.
- Le proton H-2' permet l'attribution de C-2' au carbone résonant à $\delta_C=109,36$ ppm.
- Le proton H-5' permet l'attribution de C-5' au carbone résonant à $\delta_C=111,62$ ppm.
- La résonance du carbone du méthoxyle dont les protons résonnent à $\delta_H=3,89$ ppm est relevée à $\delta_C=55,70$ ppm.
- La résonance du carbone du méthoxyle dont les protons résonnent à $\delta_H=3,86$ ppm est relevée à $\delta_C=55,82$ ppm.

- La résonance du carbone du méthoxyle dont les protons résonnent à $\delta_H=3,76$ ppm est relevée à $\delta_C=59,93$ ppm.

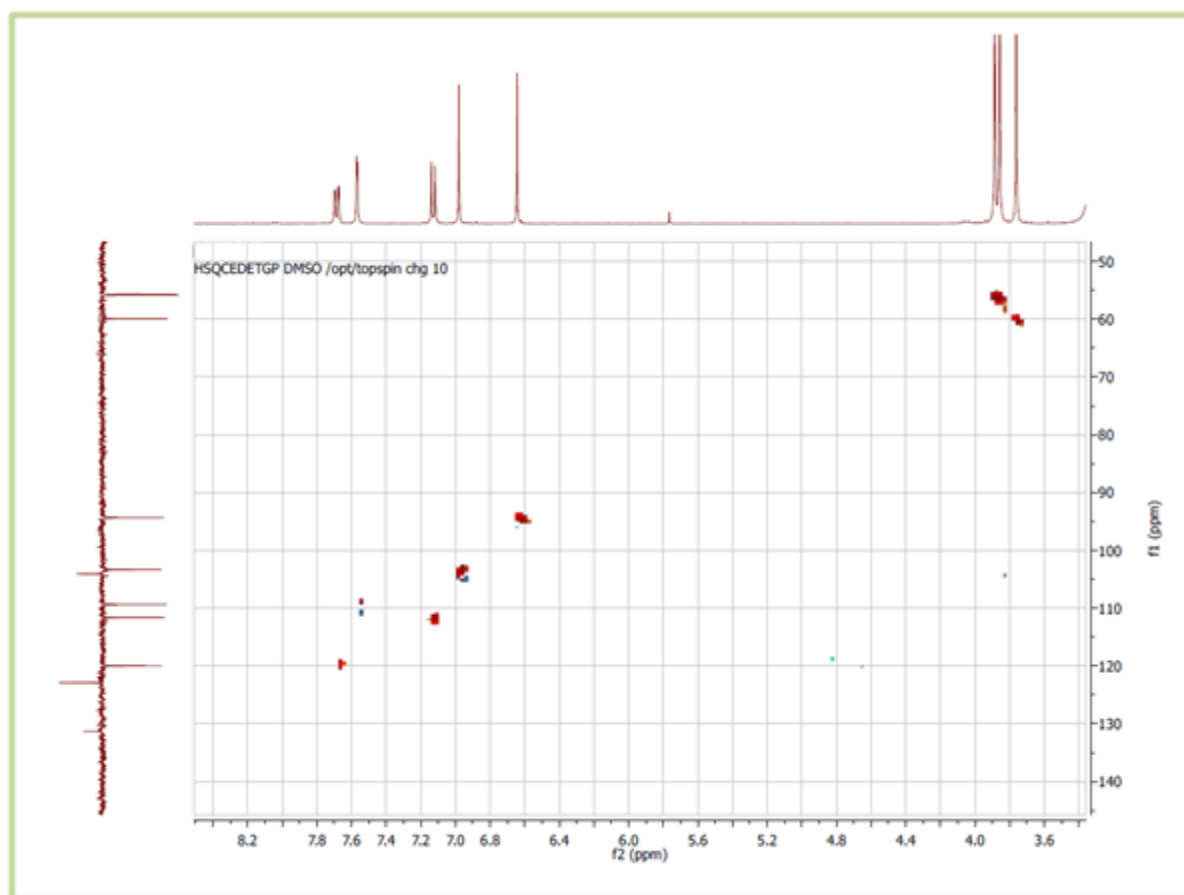


Figure IV.1.3 : Spectre HSQC (DMSO- d_6 , 400MHz) du composé Sch 1 (SC 11)

Pour procéder à l'attribution des carbones quaternaires, et surtout pour attribuer les méthoxyles à leur carbones porteurs, nous avons examiné le spectres relatifs aux expériences HMBC (Figure IV.5) et J_{mod} (Figures IV.1.6.1 ; IV.1.6.2 ; IV.1.6.3). Cette analyse est facilitée par le signal du OH en C-5, qui permet aisément l'attribution du C-5 au signal résonant à $\delta_C=152,71$ ppm, du C-6 à la résonance à $\delta_C=131,33$ ppm et du C-10 à la résonance à $\delta_C=104,09$ ppm, grâce à leur corrélation avec le proton de cet hydroxyle sur le spectre HMBC. La valeur du déplacement chimique du carbone C-6, confirme bien sa methoxylation. Le spectre HMBC permet de placer le méthoxyle resonant à $\delta_H=3,76$ ppm ($\delta_C=59,93$ ppm) en cette position grâce à sa corrélation avec les protons de ce méthoxyle. Le spectre HMBC permet également d'attribuer :

- Le carbone C-2 au signal résonant à $\delta_C=163,33$ ppm, grâce à sa corrélation aux protons H-3 et H-2'
- Le carbone C-7 au signal résonant à $\delta_C=157,67$ ppm, grâce à la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation avec le proton H-8
- Le carbone C-9 résonant à $\delta_C=152,42$ ppm, grâce à sa corrélation avec le proton H-8
- Le carbone C-4 résonant à $\delta_C=182,18$ ppm, grâce à la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation avec les protons H-8 et H-3
- Le carbone C-1' résonant à $\delta_C=122,89$ ppm, grâce à la valeur de son déplacement chimique et ses corrélation avec les proton H-3 et H-5'
- Le carbone C-3' résonant à $\delta_C = 148,97$ ppm, grâce à la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation avec les proton H-2' et H-5'
- Le carbone C-4' résonant à $\delta_C=152,08$ ppm, grâce à la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation avec les proton H-2' et H-5'

Un ré-examen attentif du spectre HMBC a permis de déduire que le methoxyle dont les protons résonnent à $\delta_H=3,89$ ppm ($\delta_C=55,70$ ppm) est en position C-3' et que celui dont les protons résonnent à $\delta_H=3,86$ ppm ($\delta_C=55,82$ ppm) est en position C-4'.



Figure IV.1.5 : Spectre HMBC (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé Sch 1 (SC 11)

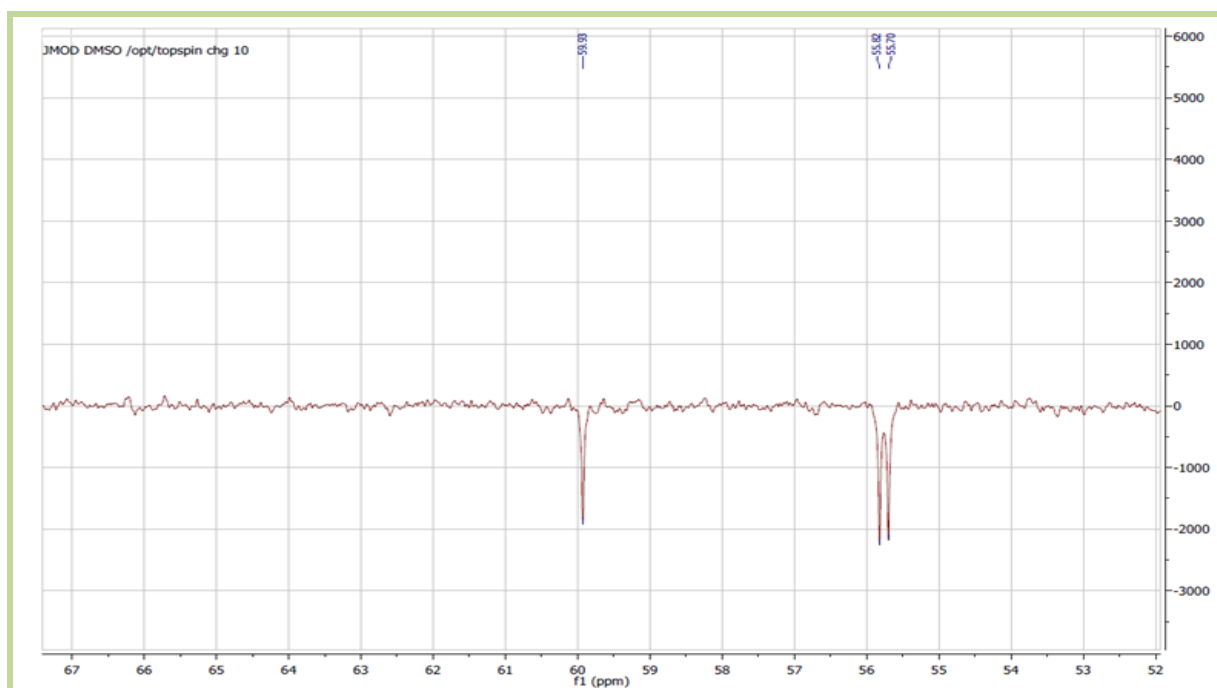


Figure IV.1.6.1: Spectre *J*mod (DMSO-*d*₆, 100 MHz) du composé Sch1 (SC 11), étalement 1

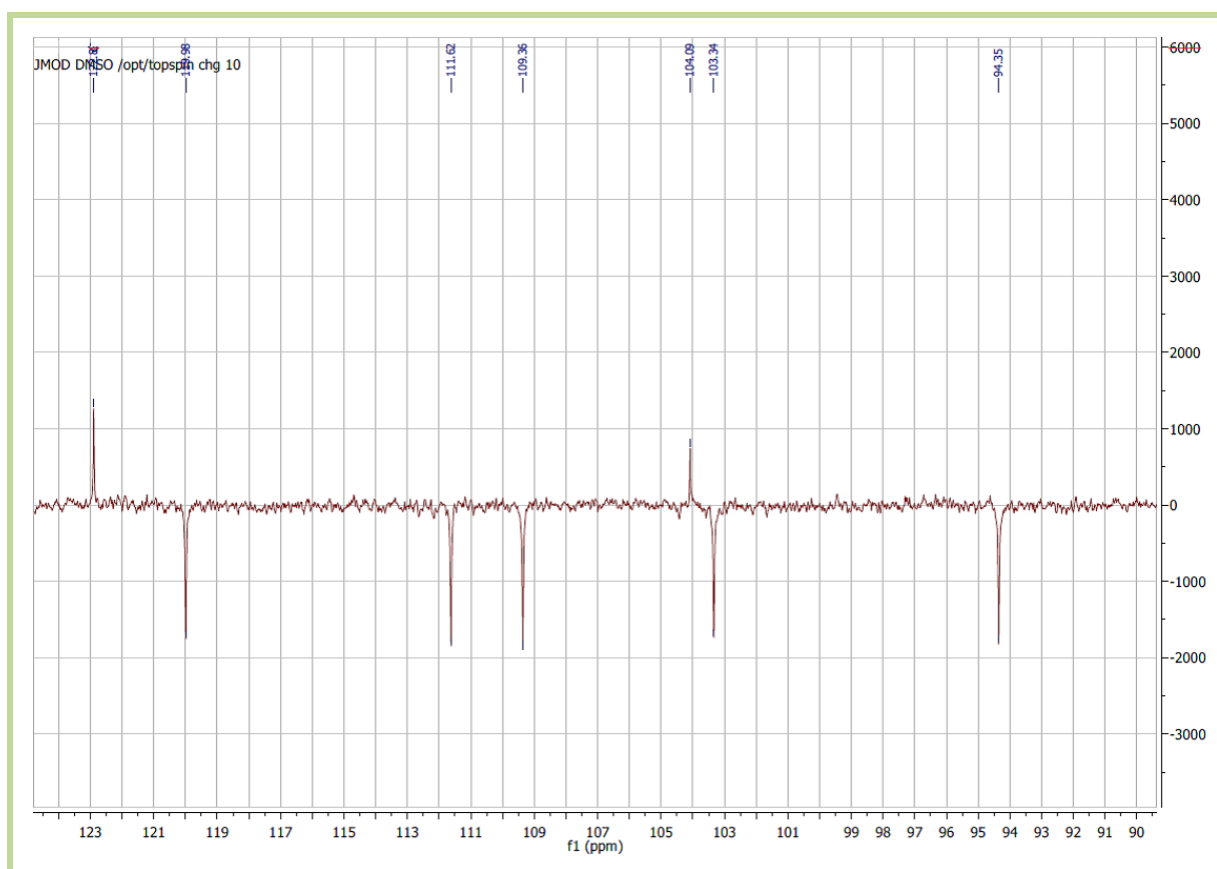


Figure IV.1.6.2: Spectre *J*mod (DMSO-*d*₆, 100 MHz) du composé Sch 1 (SC 11), étalement 2

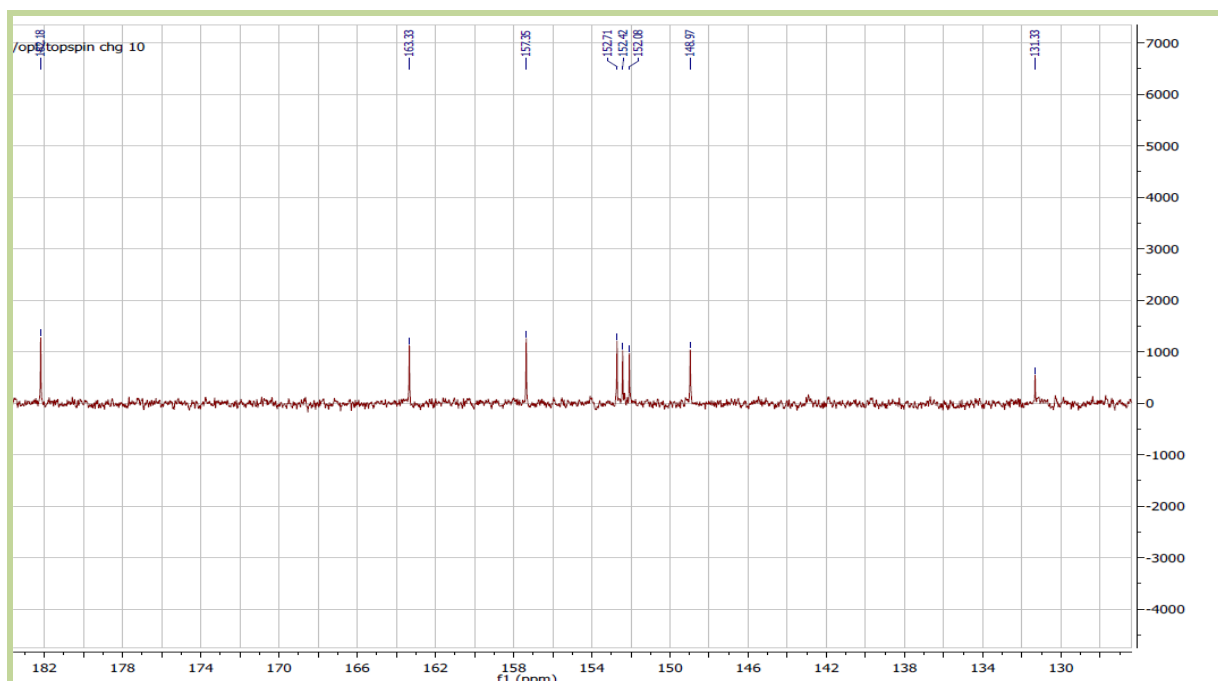


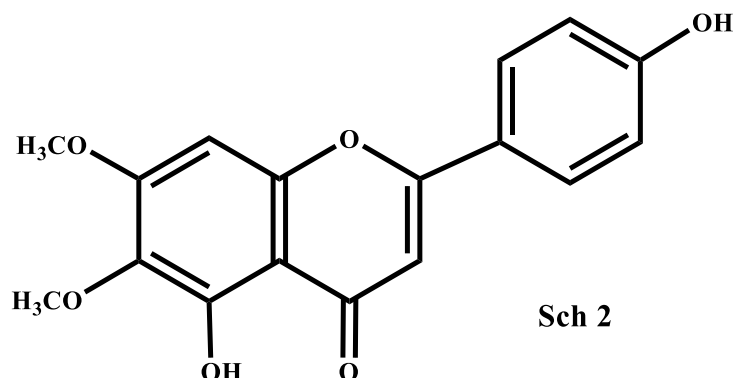
Figure IV.1.6.3 : Spectre J_{mod} (DMSO- d_6 , 100 MHz) du composé Sch 1, étalement 3

Tous les résultats de ces analyses spectroscopiques sont reportés dans le tableau IV.1.2.

Tableau IV.1.2 : Données de la spectroscopie RMN du composé Sch1(SC 11), eupatiline

Position	^1H δ_{ppm} $J(\text{Hz})$ 400 MHz, DMSO- d_6	$J_{\text{mod}}\delta_{\text{ppm}}$, 100 MHz, DMSO- d_6
2	-	163,33
3	6,65 s	103,34
4	-	182,18
5	-	152,71
6	-	131,33
7	-	157,67
8	6,97 s	94,35
9	-	152,42
10	-	104,09
1'	-	122,89
2'	7,57 d (2,1)	109,97
3'	-	148,97
4'	-	152,08
5'	7,13 d (8,5)	111,62
6'	7,69 dd (8,5 ; 2,1)	119,98
6-OCH ₃	3,76	59,93
3'-OCH ₃	3,89	55,70
4'-OCH ₃	3,86	55,82

IV.1.1.2 Elucidation structurale du composé Sch 2 (SC14)



La chromatographie sur couche mince de ce composé sous lumière de Wood ($\lambda=365$ nm) révèle une fluorescence noir violette , couleur caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en C-3, ceci est réconforté par la valeur 332 nm de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I du spectre enregistré dans le MeOH largement en faveur d'une flavone. Par ailleurs la série spectrale UV-Visible en présence de réactifs montre :

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement de la bande I de ($\Delta\lambda=+44$ nm) avec un effet hyperchrome révèle la présence d'un OH libre en C-4'.
- Le déplacement bathochrome ($\Delta\lambda=+ 24$ nm) de la bande I , après addition de ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) indique la présence d'un OH libre en C-5 avec une oxygénation en position C-6.
- L'addition de NaOAc n'ayant aucun effet notable sur la longueur d'onde de la bande II comparé au spectre enregistré dans le MeOH, indique un 7-OR

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau IV.1.3

Tableau IV.1.3 : Données de la série spectrale UV-Vis. (λ_{mvax} , nm)du composé Sch2(SC 14)

Réactifs	Bande I	Bande II	Remarque
MeOH	332	277	Flavone
+NaOH	376 avec effet hyperchrome	276	OH libre en C-4'
+ALCl ₃	360	300	Pas de système <i>ortho</i> -diOH sur le noyau B, OH en C-5 et OR en C-6
+AlCl ₃ +HCl	356	300	
NaOAc	336	276	OR en C-7
+NaOAc +H ₃ BO ₃	336	276	Pas de système <i>ortho</i> -diOH

La combinaison des données des spectres RMN ¹H (Figure IV.1.7) et HSQC (Figure IV.1.8) montrent la présence de :

- Un doublet d'intégration 2H à $\delta_H=7,83$ ppm ($J=8,8$ Hz ; $\delta_C=128,16$ ppm) attribuable à H-6' et H-2'.
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta_H=6,97$ ppm ($J=8,8$ Hz ; $\delta_C=115,92$ ppm) attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_H=6,59$ ppm ($\delta_C=104,03$ ppm) et $\delta_H=6,56$ ppm ($\delta_C=90,34$ ppm) attribuables à H-3 et H-8, respectivement vu les valeurs caractéristiques des déplacements chimiques de leurs carbones porteurs.
- Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_H=3,97$ ppm ($\delta_C=55,72$ ppm) et $\delta_H=3,94$ ppm ($\delta_C=60,68$ ppm) attribuables à deux groupements méthoxyles.

La combinaison des données spectrales de la série UV-Vis en présence de réactifs et de RMN ^1H permettent de placer les deux groupements méthoxyles dans les positions C-6 et C-7. Comme la série spectrale UV-Vis indique une hydroxylation du C-4' du noyau B, il est donc évident que ce composé Sch2 est la 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Figure IV.1.9). Cette molécule est connue sous le nom de cirsimaritrine [1].

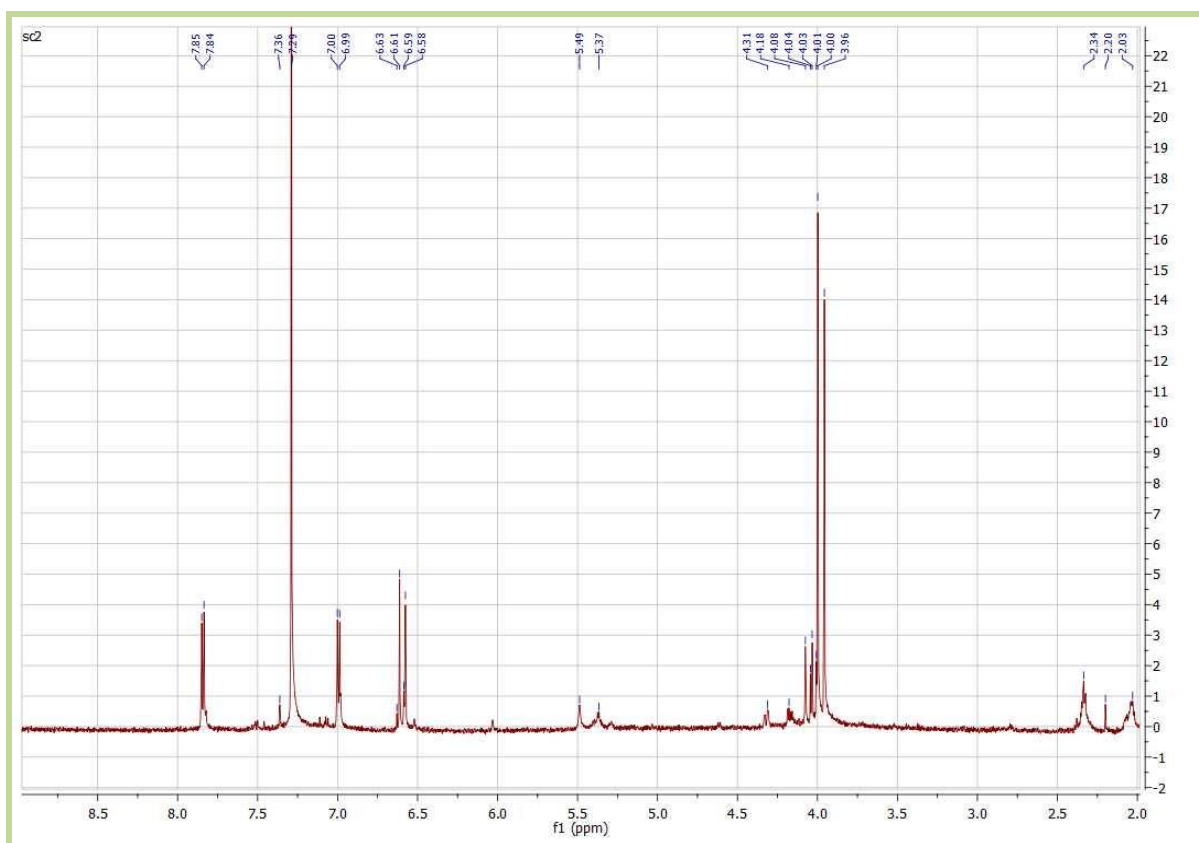


Figure IV.1.7 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé Sch 2 (SC 14)

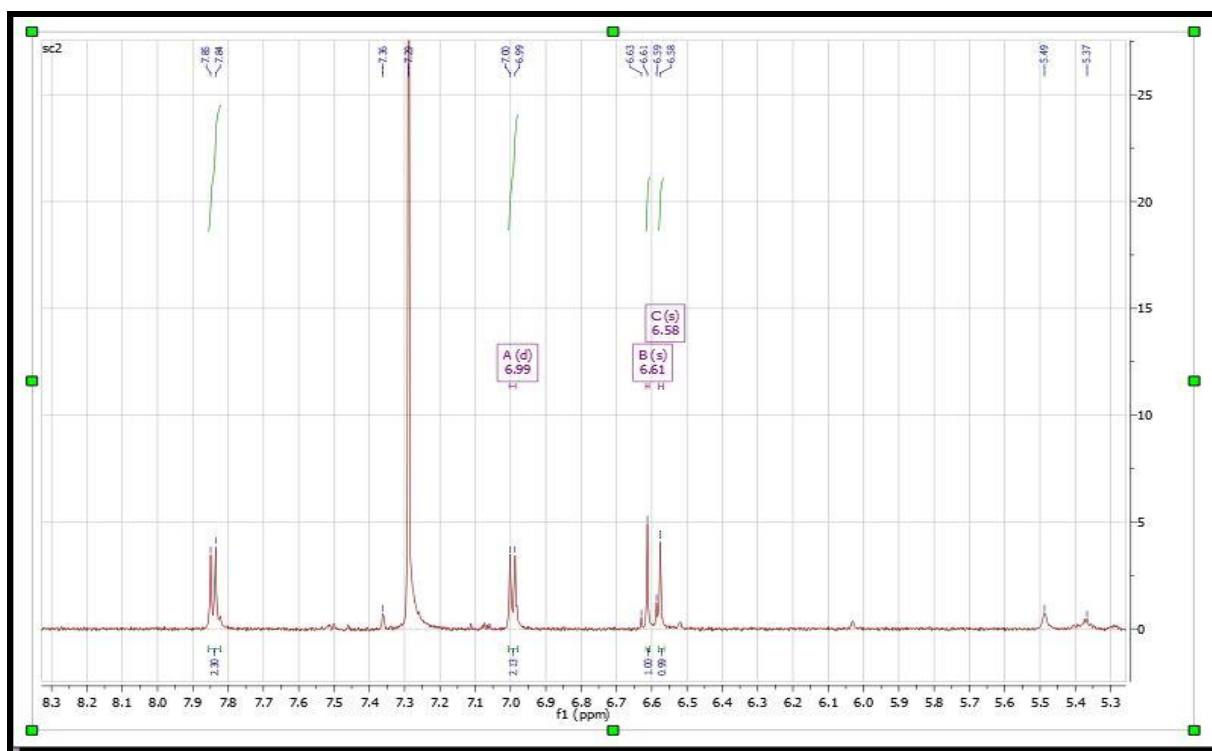


Figure IV.1.7.1: Spectre RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé Sch 2 (SC 14) étalement 1

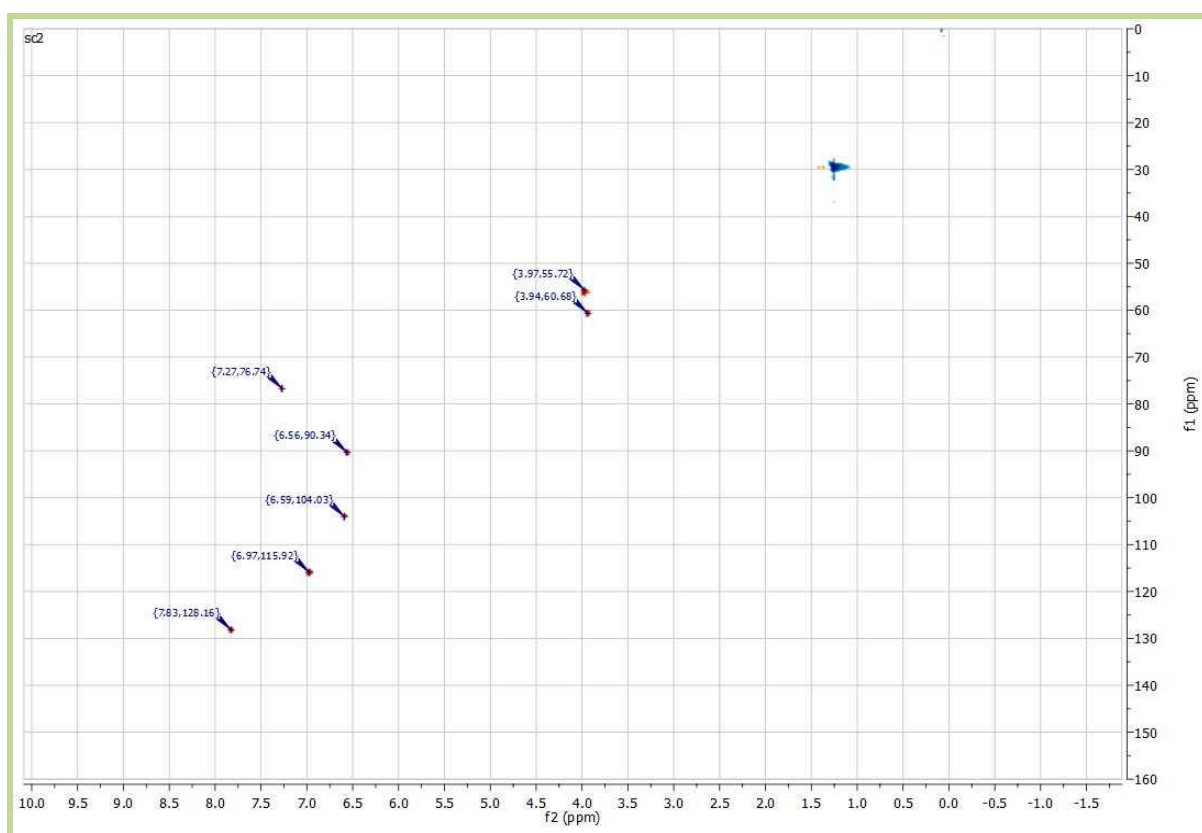


Figure IV.1.8: Spectre HSQC (CDCl₃, 400 MHz) du composé Sch2

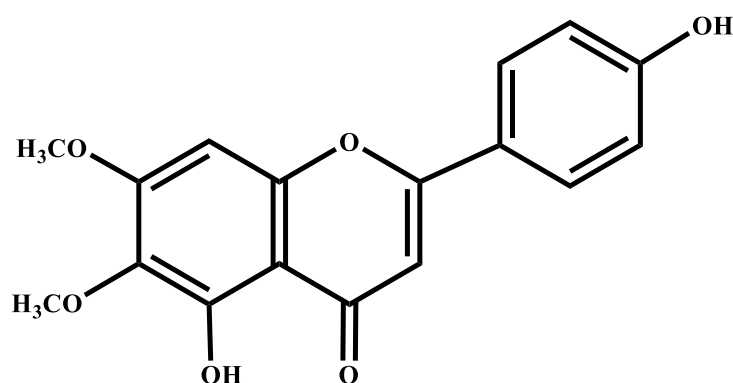


Figure IV.1.9: Structure du composé Sch 2, cirsimaritine

L'attribution des autres atomes de carbone a été effectuée par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Figure IV.1.10) et du spectre jmod (Figure IV.1.11) en effet :

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle résonant $\delta_H=3,94$ ppm ($\delta_C=60,68$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=132,55$ ppm que nous pouvons attribuer sans ambiguïté à C-6, vu la valeur de son déplacement chimique et sa corrélation (HMBC) avec H-8.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle résonant $\delta_H=3,97$ ppm ($\delta_C=55,72$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=158,70$ ppm attribuable de fait à C-7, vu la substitution du carbone en position 7 par un méthoxyle signalée plus haut.

Des taches de corrélation entre H-3 et H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=106,11$ ppm permettant l'attribution de ce carbone à C-10.

Une tache de corrélation entre H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=153,14$ ppm permettant l'attribution de ce carbone à C-9.

Une tache de corrélation entre H-3 et le carbone résonant à $\delta_C=164,04$ ppm permettant l'attribution de ce carbone à C-2.

Le carbone C-4 est attribué à la résonance à $\delta_C=182,75$ ppm.

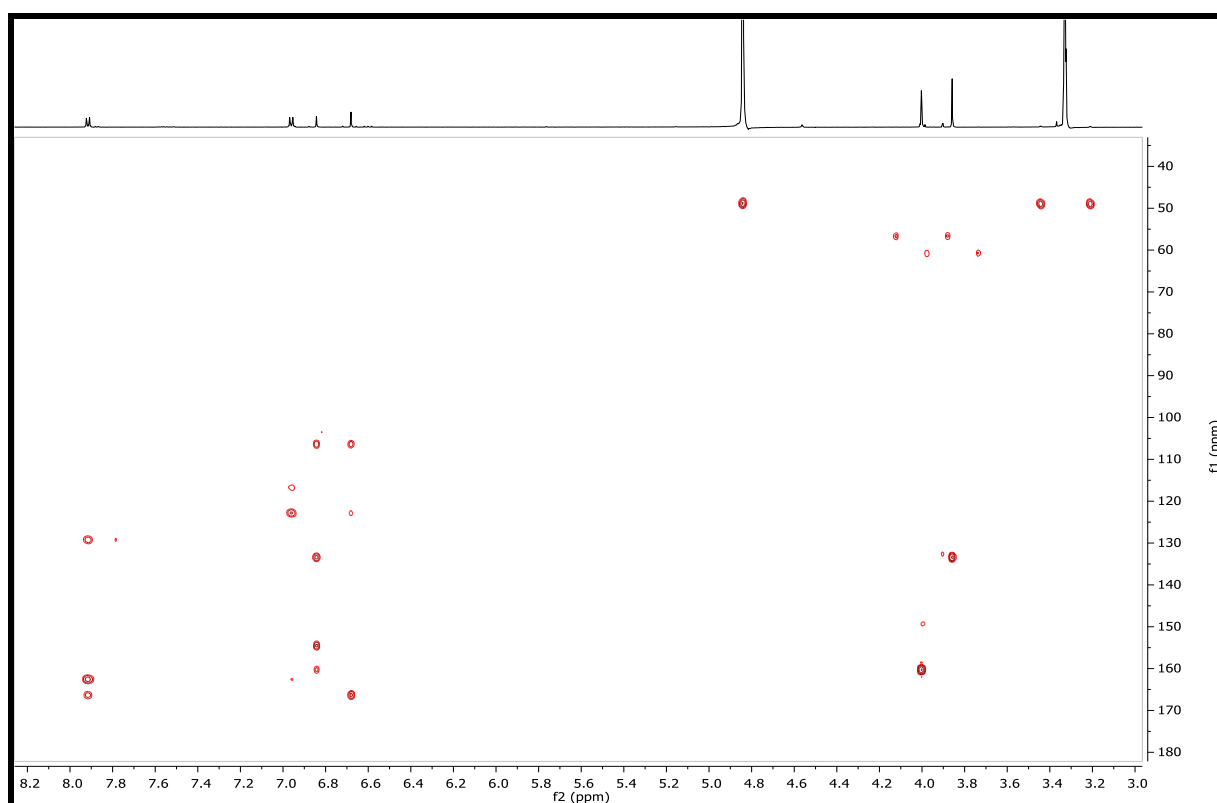


Figure IV.1.10: Spectre HMBC (CD₃OD) du composé Sch2 (SC14)

Les données des spectres RMN de cette molécule sont regroupées dans le tableau IV.1.4.

Tableau IV.1.4 : Données de la spectroscopie RMN (CD₃OD, 400 MHz) du composé Sch2

Positions	¹ H δ _{ppm} <i>J</i> (Hz)	¹³ C δ _{ppm}
2	-	164,04
3	6,59 <i>s</i>	104,03
4	-	182,75
5	-	nd*
6	-	132,55
7	-	158,70
8	6,56 <i>s</i>	90,34
9	-	153,14
10	-	106,12
1'	-	nd*
2' et 6'	7,83 <i>d</i> (8,8)	128,16
3' et 5'	6,97 <i>d</i> (8,8)	115,92
4'	-	nd*
6-OCH ₃	3,94 <i>s</i>	60,68
7-OCH ₃	3,97 <i>s</i>	55,72

nd* : non détecté

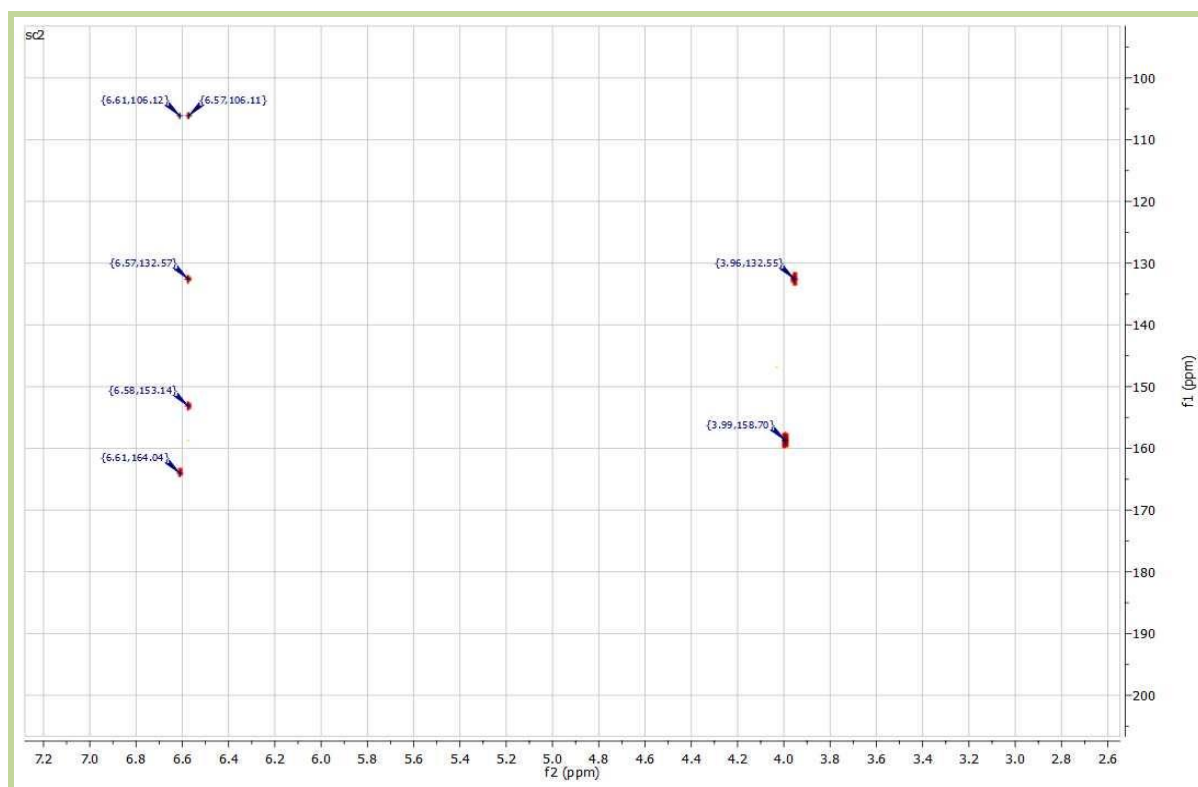


Figure IV.1.10.1 : Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé Sch2, étalement

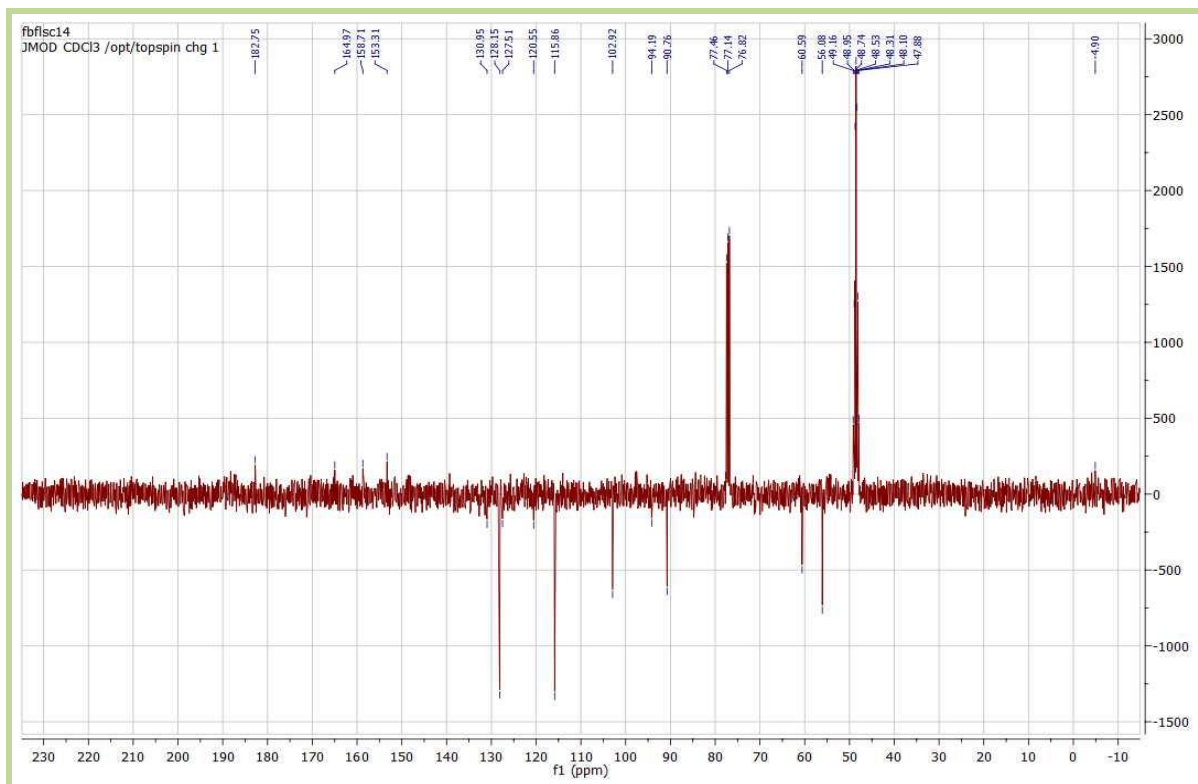
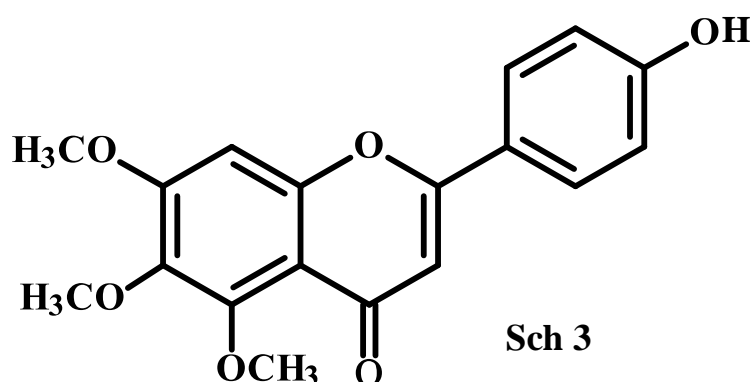


Figure IV.1.1: Spectre jmod (CDCl₃+CD₃OD, 400 MHz) du composé Sch 2

IV.1.1.3 Elucidation structurale du composé Sch 3 (SC15-5-16)



Le spectre RMN ^1H (Figure IV.1.12) du composé Sch 3 montre des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone, cette dernière est contaminée par un autre flavonoïde. En tenant compte de l'intégration des signaux de ce spectre, on relève concernant cette flavone :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AX ($J=8,0$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=7,93$ et $6,97$ ppm. Ces signaux attribuables aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5' ; respectivement du noyau B, indiquent une substitution de ce noyau en position C-4'.
- Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}}=6,87$ et $6,70$ ppm attribuables soit à H-8 et H-3 soit à H-3 et H-6. Cette observation permet de conclure que cette molécule est une flavone vu la présence de H-3.

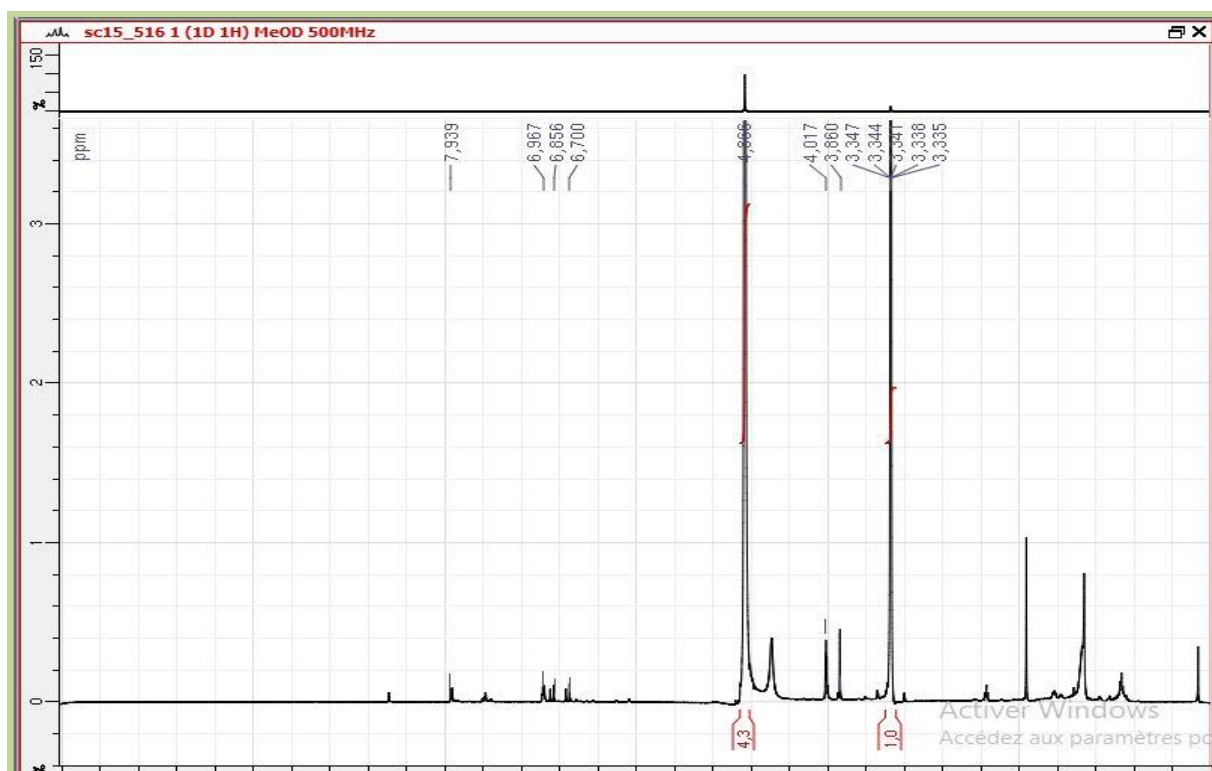


Figure IV.1.12 : Spectre RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) du composé Sch 3.

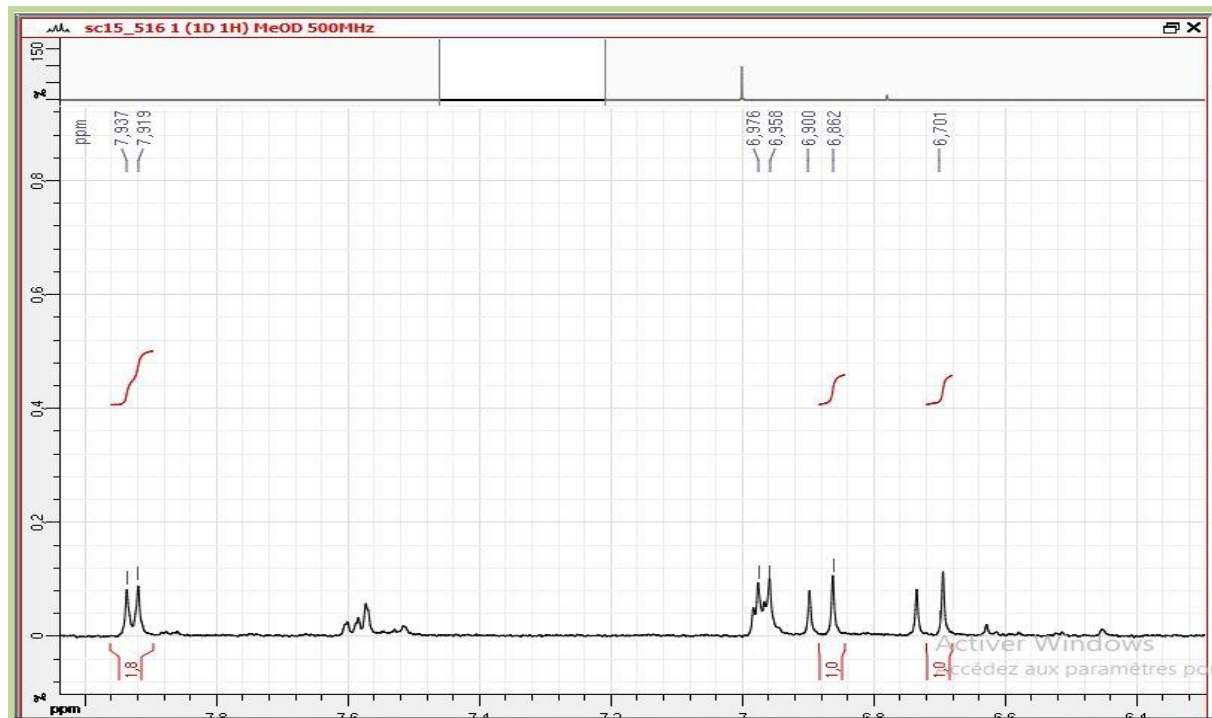


Figure IV.1.12.1: Spectre RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) du composé Sch 3, étalement 1

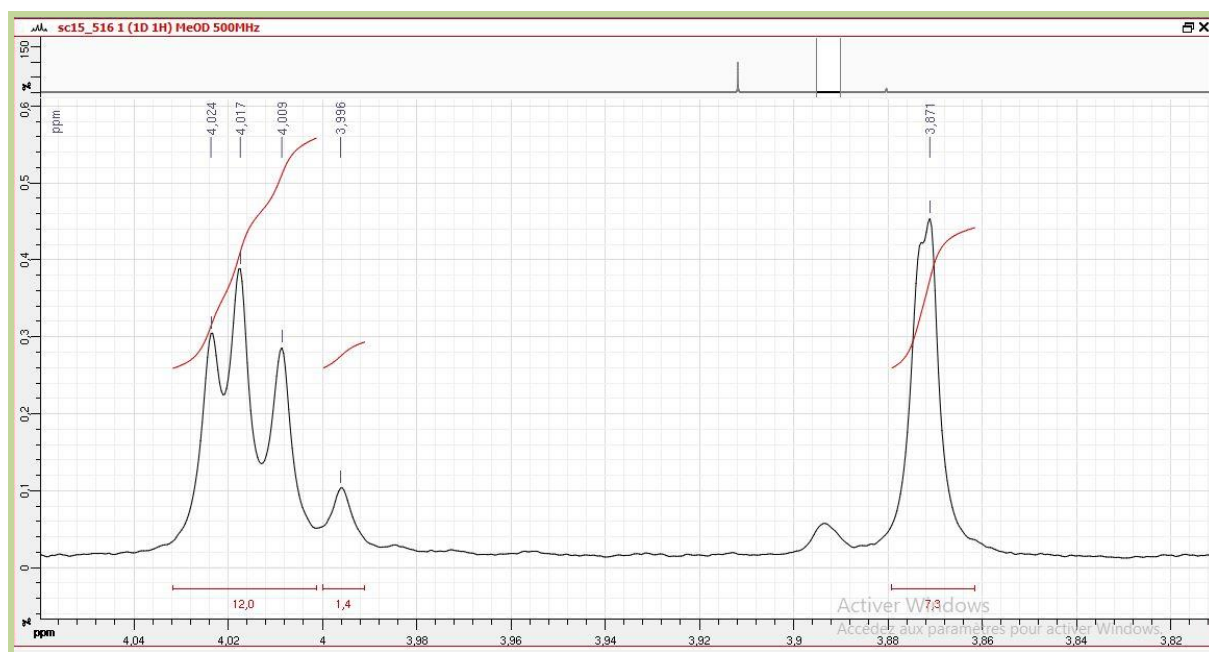


Figure IV.1.12.2: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé **Sch 3**, étalement 2

L'examen du spectre HSQC (Figure IV.1.13) permet de relever les résonances des carbones porteurs de ces deux protons. En effet celle du premier proton ($\delta_{\text{H}}=6,87$ ppm) apparaît à $\delta_{\text{C}}=90,85$ ppm. Cette valeur du déplacement chimique est caractéristique du carbone C-8. Celle du deuxième proton ($\delta_{\text{H}}=6,70$ ppm) apparaît à $\delta_{\text{C}}=102,83$ ppm. Cette valeur du déplacement chimique confirme bien que ce carbone n'est autre que le C-3. On conclut à ce stade qu'on est bien en présence d'une flavone substituée dans les positions C-4', C-5, C-6 et C-7.

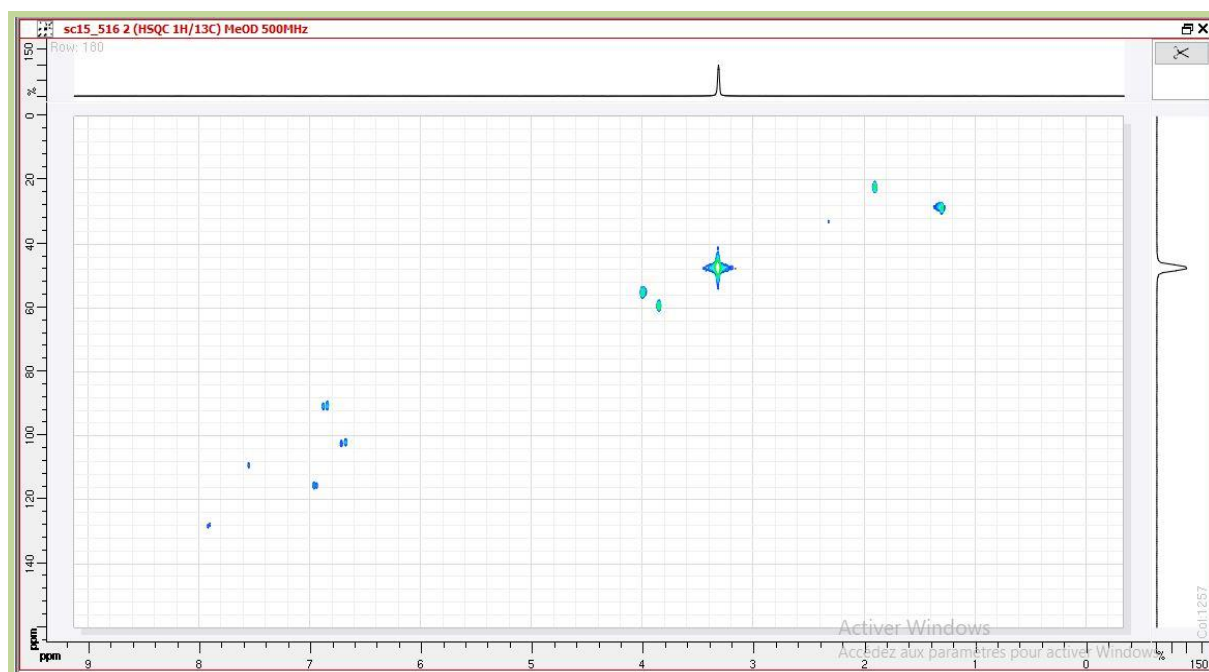


Figure IV.1.13: Spectre HSQC (CD₃OD, 500 MHz) du composé **Sch 3**

L'examen attentif et simultané des spectres RMN ¹H et HSQC montre la présence de trois méthoxyles. Les deux premiers montrent des signaux très proches sur le spectre proton ($\delta_{\text{H}}=4,02$ et $4,01$ ppm) et des carbones résonant à des déplacements chimiques identiques à $\delta_{\text{C}}=54,93$ ppm sur le spectre HSQC. Sur le spectre HMBC (Figure IV.1.14) les protons de ces deux méthoxyles montrent des corrélations nettes avec les carbones quaternaires oxygénés résonant à $\delta_{\text{C}}=160,91$ et $150,49$ ppm, respectivement. Toujours sur le spectre HMBC le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=160,91$ ppm, montre une tache de corrélation avec H-8. Cette observation et la valeur $160,91$ ppm de son déplacement chimique permettent son attribution au C-7. Le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=150,49$ ppm ne montrant aucune corrélation avec H-8 et les protons du cycle B est obligatoirement attribué au C-5, vu la valeur de son déplacement chimique. Concernant le troisième méthoxyle résonant à $\delta_{\text{H}}=3,87$ ppm ($\delta_{\text{C}}=59,13$ ppm), on observe des corrélations nettes entre ses protons, le proton H-8 et le carbone quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}}=132,14$ ppm. Ces corrélations additionnées à la valeur $132,14$ ppm du déplacement chimique de ce carbone suffisent largement pour attribuer ce carbone à la position C-6. Grâce toujours au spectre HMBC, la résonance du C-10 est relevée à $\delta_{\text{C}}=107,09$ ppm vu ses corrélations avec H-8 et H-3 ; la résonance du C-9 est relevée à $\delta_{\text{C}}=154,14$ ppm, vu sa corrélation avec H-8 ; la résonance à $\delta_{\text{C}}=167,21$ ppm est attribuée au C-2 vu ses corrélations

avec H-3, H-2' et H-6' et la résonance à $\delta_C=121,22$ ppm est attribuée au C-1' vu sa corrélation avec H-3' et H-5'.

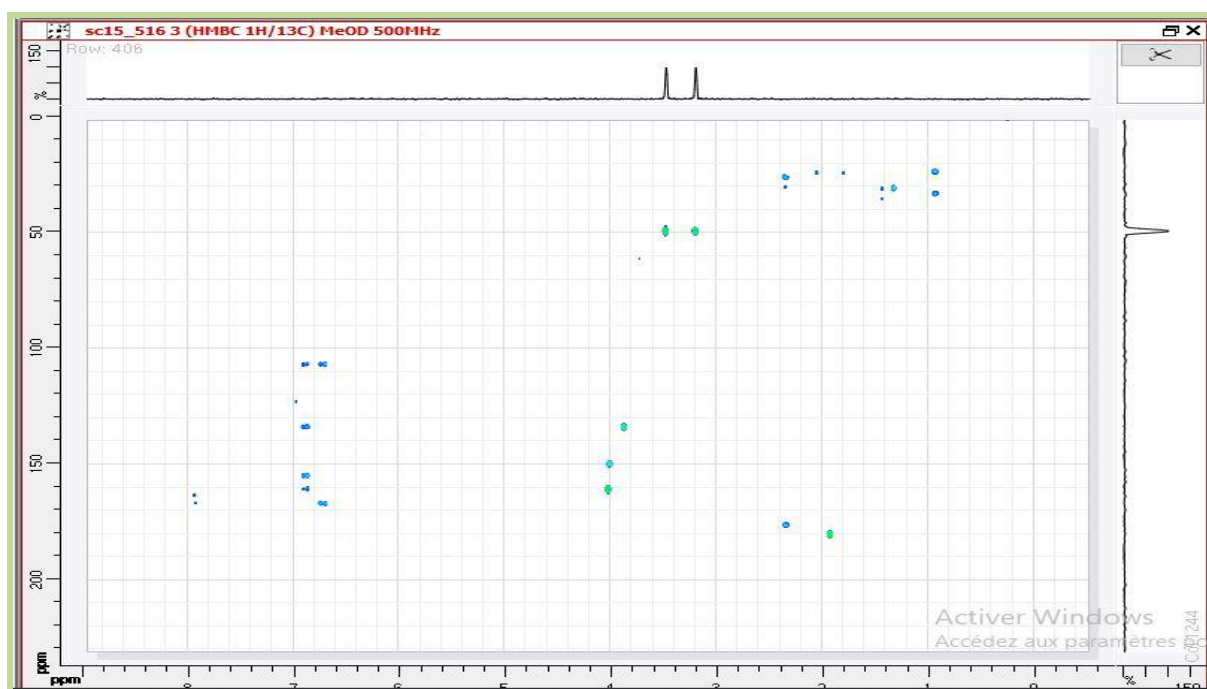


Figure IV.1.14: Spectre HMBC (CD₃OD, 500 MHz) du composé **Sch 3**

On retient donc, que ce composé est C-5, C-6 et C-7 triméthoxylé.

L'ensemble de ces analyses permet de déduire que ce composé est substitué par un groupement hydroxylé en position C-4'. Ceci est confirmé par la corrélation observé entre les protons H-2' et H-6' et le carbone dont la résonance apparait à $\delta_C=160,2$ ppm attribuable sans aucune ambiguïté au C-4' de cette flavone.

Toutes ces données reportées dans le tableau IV.1.5 mènent à la molécule connue sous le nom de 4'-hydroxy-5, 6,7-trimethoxyflavone ou cirsimaritrine 5-methyl éther (Figure IV.1.15).

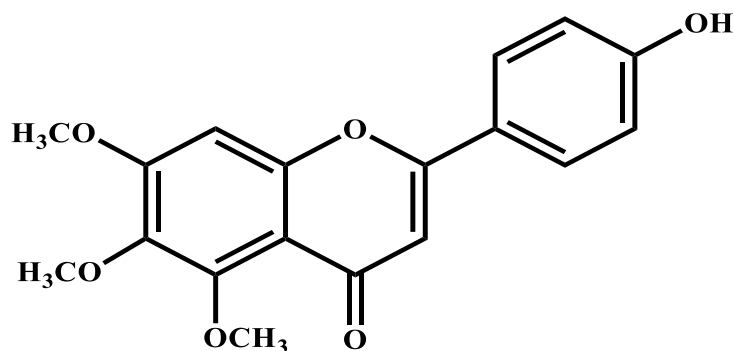


Figure IV.1.15 : Structure du composé **Sch 3**, cirsimaritrine 5-méthyl éther.

Tableau IV.1.5 : Données de la spectroscopie RMN (CD_3OD),) du composé Sch 3

Positions	1H (500 MHz) δ_{ppm} J (Hz)	^{13}C (125 MHz) δ_{ppm}
2	-	167,21
3	6,70 _s	102,83
4		Non détecté
5	-	150,49
6	-	132,14
7	-	160,91
8	6,87 <i>s</i>	90,84
9	-	154,14
10	-	107,09
1'	-	121,22
2' et 6'	7,93 <i>d</i> (8,00)	128,08
3' et 5'	6,97 <i>d</i> (8,00)	116,09
4'	-	160.2
5-OCH ₃	4.01 <i>s</i>	54,93
6-OCH ₃	3,87 <i>s</i>	59,13
7-OCH ₃	4,02 <i>s</i>	54,93

En réexaminant le spectre proton de ce composé et en faisant abstraction des signaux du composé **Sch 3** (cirsimaritine 5-méthyl éther), on s'aperçoit que ce spectre renferme des signaux caractéristiques d'une flavone C-6 et C-7 diméthoxylée. Les protons du méthoxyle en C-6 admettent un déplacement chimique assez proche mais légèrement supérieur à ceux du méthoxyle en C-6 du composé Sch 3 ($\delta_H=3,87$ ppm, *s*). Les protons du méthoxyle en C-7, admettent également un déplacement chimique très proche mais légèrement supérieur à celui de leurs correspondants dans le composé Sch 3 ($\delta_H=4,02$ ppm, *s*). Ces attributions ont été faites sur la base de l'analyse du spectre HMBC, ce spectre a d'ailleurs montré que les carbones C-6 et C-7 de cette molécule admettent des déplacements chimiques très proches de ceux de leurs correspondants dans le composé Sch 3 ($\delta_C=132,14$ et 160,91 ppm, respectivement). Concernant les autres protons de cette flavone on relève deux singulets à $\delta_H=6,90$ et 6,74 ppm attribuables aux protons H-8 et H-3 respectivement. Ces attributions sont bien justifiées par le spectre HSQC qui montre des taches

de corrélation nettes entre ces protons et des carbones dont les résonances sont très proches de ceux de C-8 et C-3 du composé **Sch 3**. Les signaux des protons du cycle B, relevés à $\delta_{\text{H}}=7,59$ ppm (dl, $J=8$ Hz), $\delta_{\text{H}}=7,57$ ppm (sl) et $\delta_{\text{H}}=6,97$ ppm (d, $J=8$ Hz) et attribués à H-6', H-2' et H-5', respectivement, indiquent la substitution de ce cycle dans les positions C-3' et C-4'. L'absence d'autres signaux de groupements méthoxyles ou autres groupements, indique que cette flavone est C-3', C-4', C-5 trihydroxylée. La synthèse des résultats de cette analyse indique qu'il s'agit de la 5,3',4'-trihydroxy-6,7-diméthoxyflavone, molécule connue sous le nom de cirsiol (Figure IV.1.16).

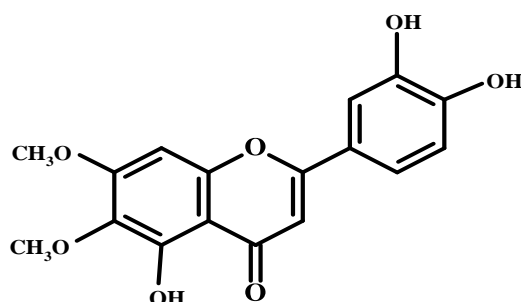


Figure IV.1.16: Structure du composé en mélange avec le composé **Sch 3**, cirsiol

Nous avons isolée cette molécule à l'état pur de la deuxième plante étudiée dans le cadre de ce travail (*Centaurea pungens*). Nous avons décrit sa structure en détail et reporté ses données de RMN (voir composé **CP4** ou composé CPA 91).

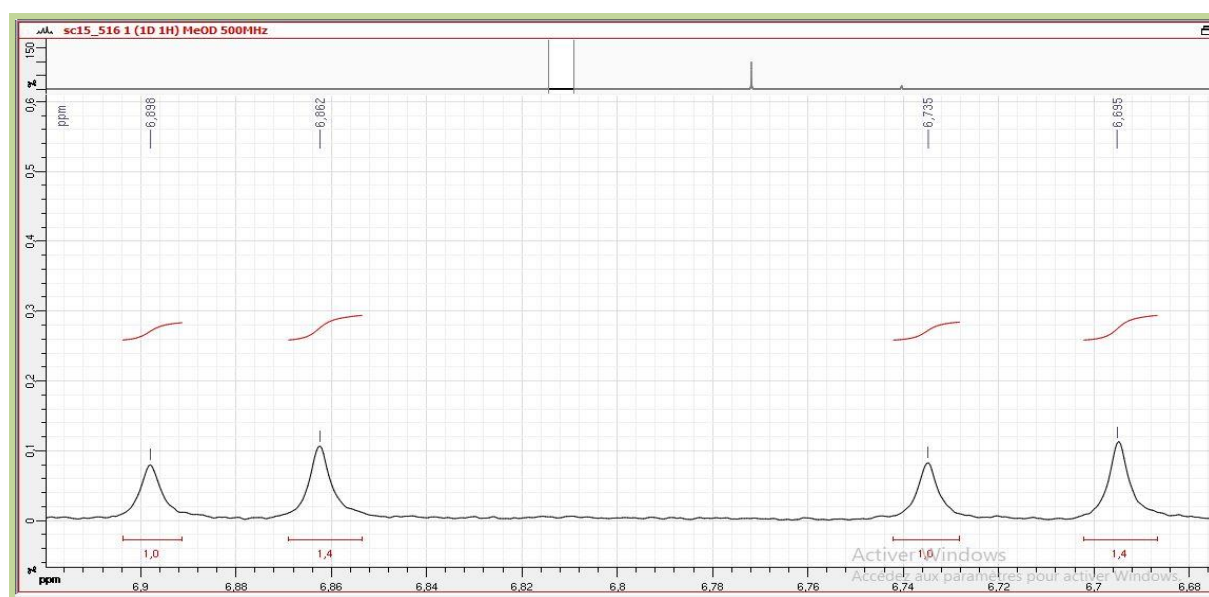


Figure IV.1.12.3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé **Sch 3**, étalement 3

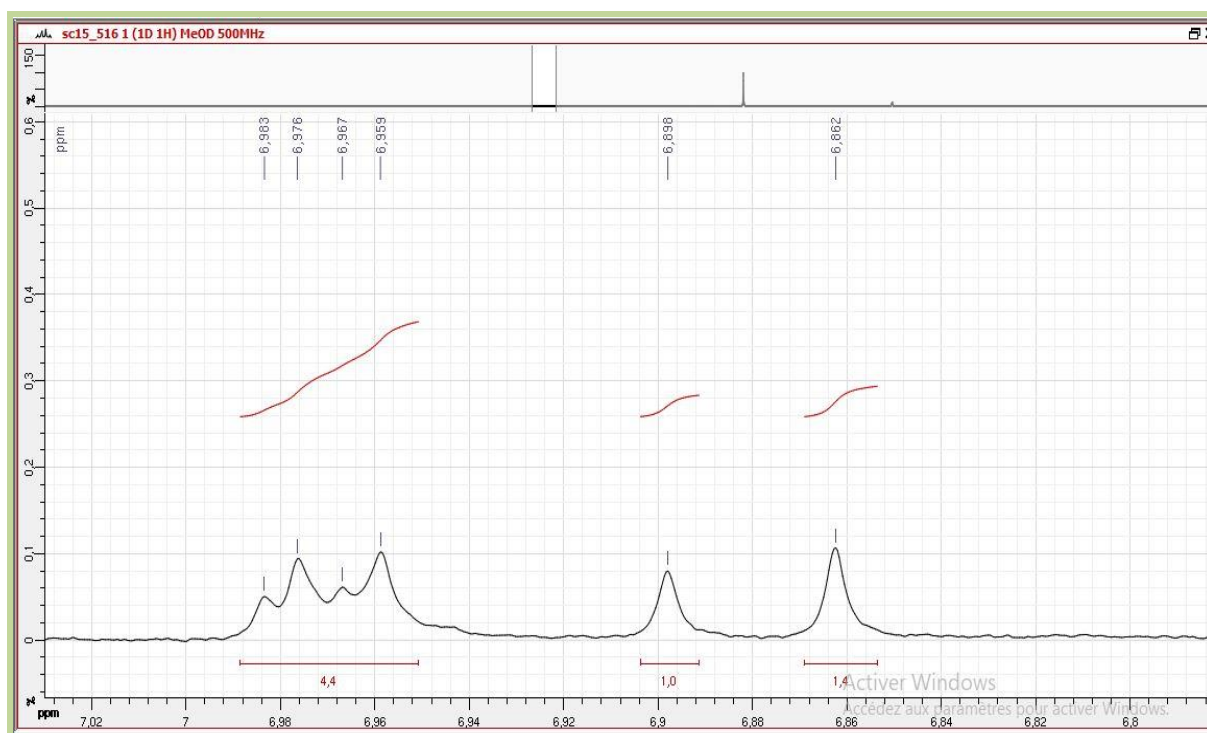
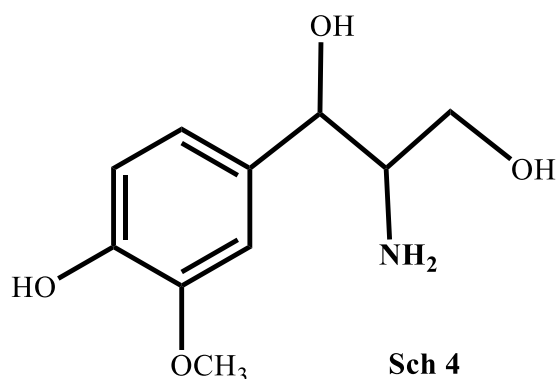


Figure IV.1.12.4 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé Sch 3, étalement 4

Grâce au spectre RMN ^1H et notamment les intégrales des signaux de H-3 (1,4) de la molécule Sch 3 (cirsimaritrine 5-méthyl éther) et H-3 (1,0) du contaminant soit le cirsiolol, nos calculs ont montré que cet échantillon renferme des pourcentages de 58,33 et 41,67 en faveur bien entendu, de la cirsimaritrine 5-méthyl éther.

IV.1.1.4 Elucidation structurale du composé Sch 4 (SC15-6-11)



L'examen du spectre RMN ^1H (Figure IV.1.17) enregistré dans le $\text{MeOH-}d_4$ montre la présence de signaux relatifs à un noyau aromatique trisubstitués dans les positions 1,3 et 4.

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,97$ ppm ($J=1,6$ Hz)

- Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,84$ ppm ($J=8,2$; 1,6 Hz)
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,78$ ppm ($J=8,2$ Hz)

D'après leur multiplicité ces signaux sont attribuables aux protons H-2, H-6 et H-5, respectivement du noyau aromatique.

Ce spectre montre également un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}=3,92$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.

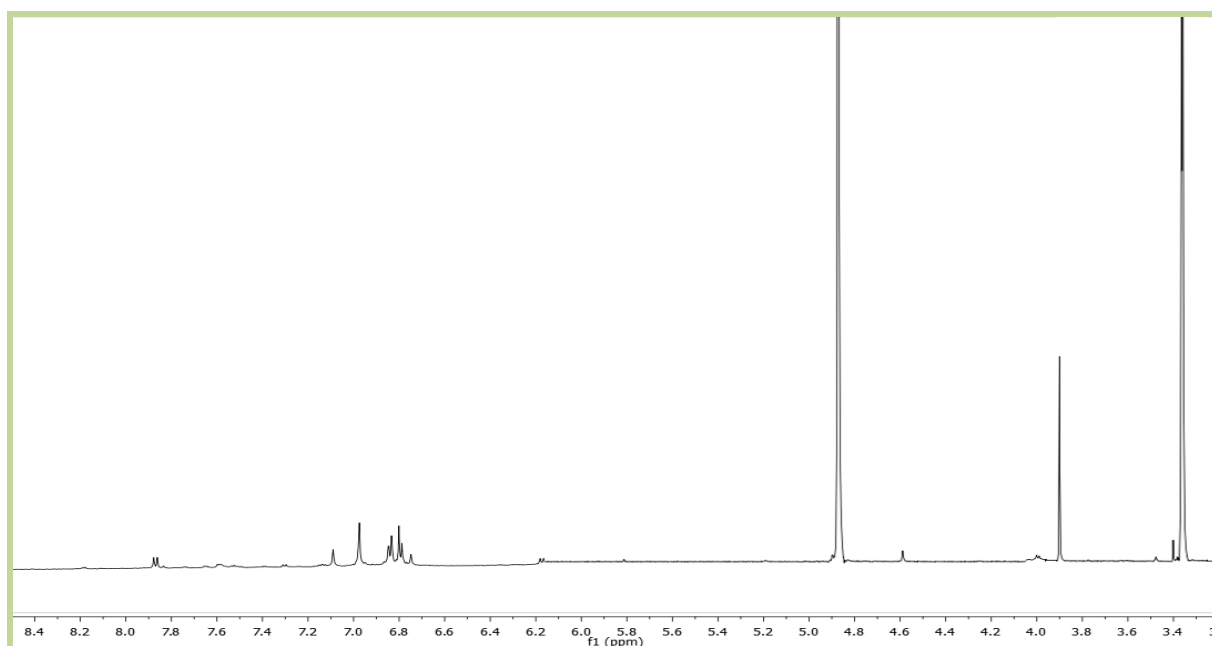


Figure IV.1.17 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé **Sch 4**

L'analyse simultanée des spectres RMN ^1H et HSQC (Figure IV.1.18) permet d'attribuer les carbones porteurs des trois protons aromatiques notamment le C-2 au carbone résonant $\delta_{\text{C}}=109,42$ ppm, le C-6 au carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=118,53$ ppm et le C-5 au carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=114,58$ ppm. L'examen du spectre HMBC (Figure IV.1.19) permet de relever les résonances des trois carbones quaternaires du noyau aromatique, notamment:

- le C-4 à $\delta_{\text{C}}=148,86$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-2 et H-6 ;
- le C-3 à $\delta_{\text{C}}=151,18$ ppm grâce à sa corrélation avec H-5, ce carbone montre également une corrélation nette avec les protons du méthoxyle précédemment évoqué permettant alors de placer ce méthoxyle dans la position C-3 du noyau aromatique ;
- le C-1 à $\delta_{\text{C}}=135,85$ ppm grâce à sa corrélation avec H-5.

On retiendra de cette analyse que ce noyau aromatique est méthoxylé en C-3 et oxygéné en C-4, vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone, et bien entendu, ce composé est

substitué en C-1. Ceci est d'ailleurs tout indiqué par le spectre HMBC qui montre une corrélation entre C-2 du noyau aromatique et le proton d'un méthine aliphatique résonant à $\delta_H=4,64$ ppm (d, $J=4,7$ Hz). Cette valeur de son déplacement chimique est en faveur d'un oxyméthine. A ce stade de notre analyse nous pouvons proposer la présence dans cette molécule de l'entité reportée dans la figure IV.1.20.

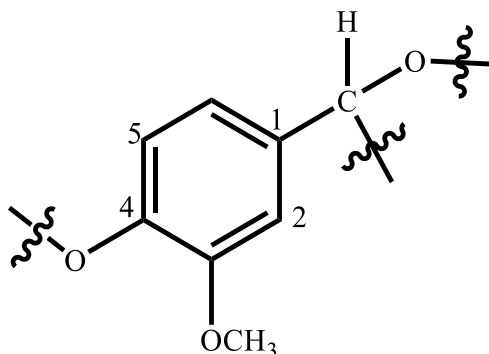


Figure IV.1.20 : Entité 1 présente dans la molécule Sch 4

L'examen du spectre HSQC permet de relever la résonance du carbone de l'oxyméthine à $\delta_C=85,98$ ppm et permet également de relever la présence d'un autre méthine résonant à $\delta_C=53,77$ ppm ($\delta_H=3,15$ ppm ; m) et d'un oxyméthylène à $\delta_C=72,02$ ppm, $\delta_H=4,26$ ppm (dd, $J=8,7$; 6,4 Hz) et 3,86 ppm (dd, $J=8,7$; 3,3 Hz). Le signal de ce dernier proton est partiellement recouvert par le signal du méthanol résiduel. D'après la multiplicité de ces signaux, il est évident que ce noyau est substitué par une chaîne comportant trois atomes de carbone (Figure IV.1.21) et que par conséquent, nous sommes en présence d'un phénylpropanoïde.

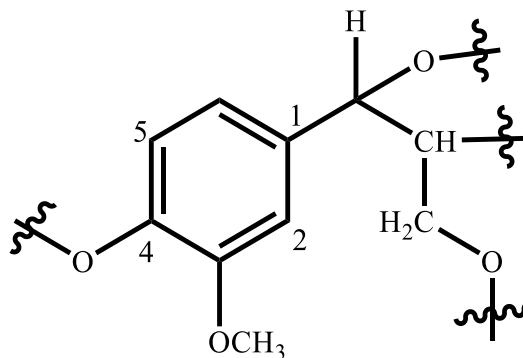


Figure IV.1.21: Structure partielle du composé Sch 4

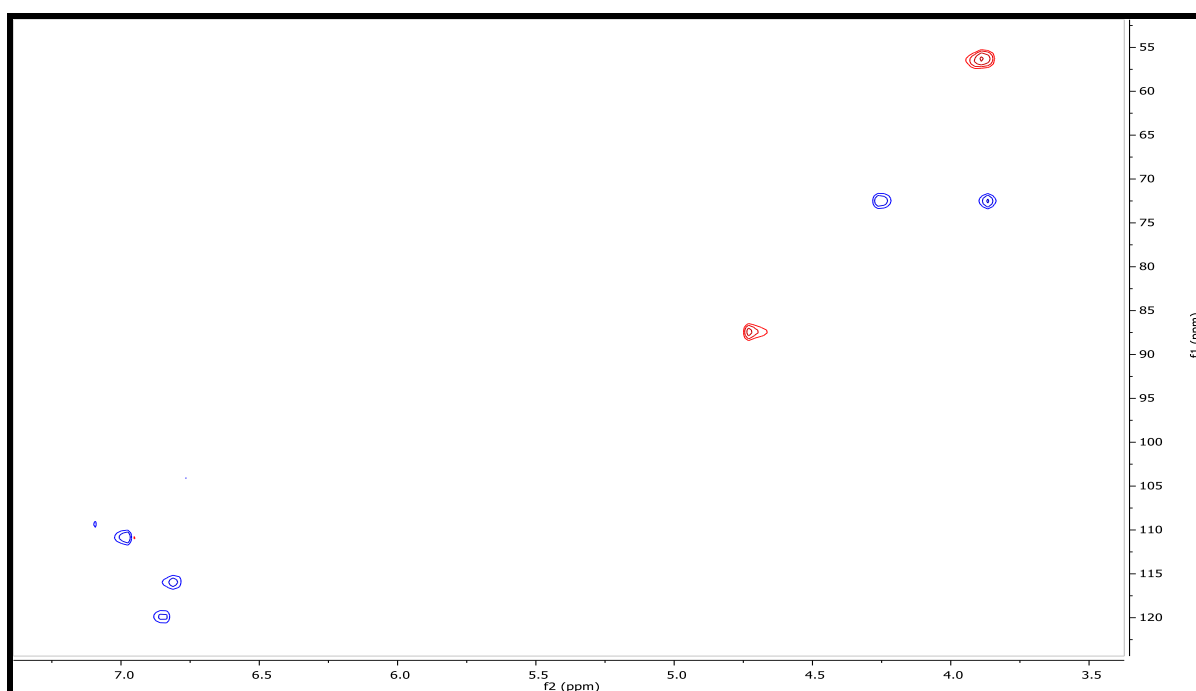


Figure IV.1.18: Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé Sch 4

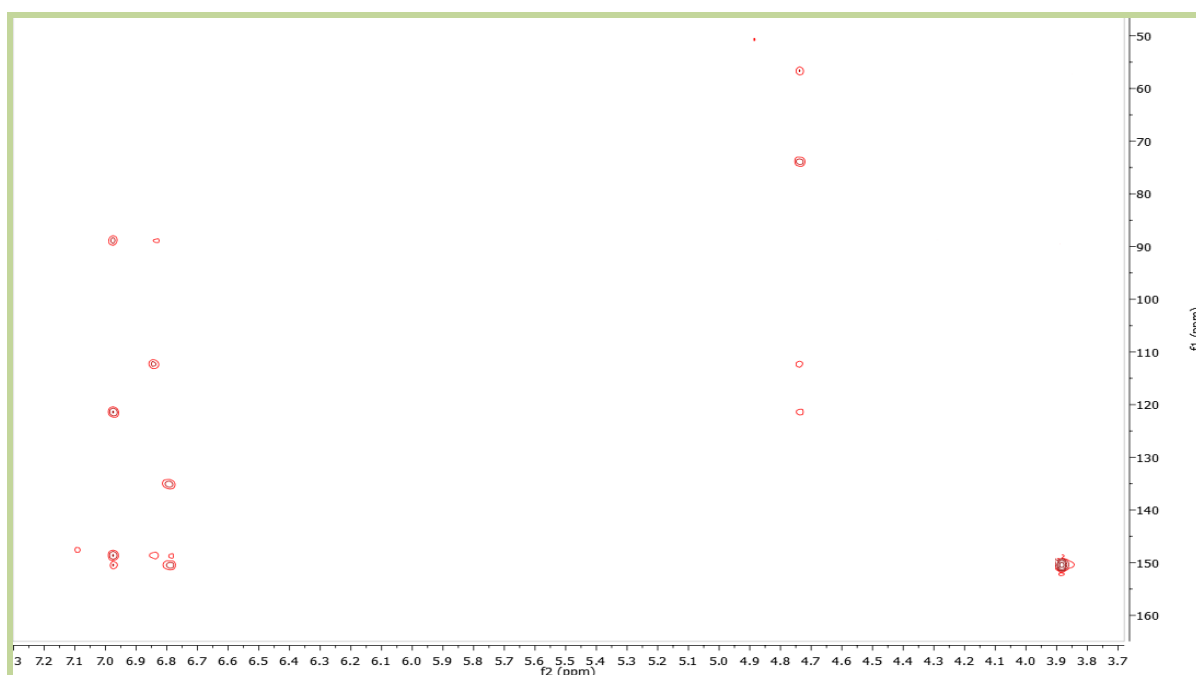


Figure IV.1.19: Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé Sch 4

L'examen attentif des spectres HSQC et HMBC ne montrant aucun autre atome de carbone ni de groupements hydrocarbonés permet alors de déduire la présence de trois groupements hydroxylés dans cette molécule en C-4 du phényle et les deux autres sur la chaîne latérale. Le premier sur le méthine attaché au noyau aromatique est le second sur le CH₂. Le groupement

méthine restant ne peut être qu'azoté vu les valeurs de déplacement chimique de son proton ($\delta_H=3,15$ ppm) et de son carbone à ($\delta_C=53,77$ ppm). L'absence de groupements hydrocarbonés dans cette molécule permet de proposer un groupement NH_2 dans cette position. Cette molécule est donc le 1,3-propanediol, 2-amino 1- (4-hydroxy-3-méthoxyphényl) (Figure IV.1.20)

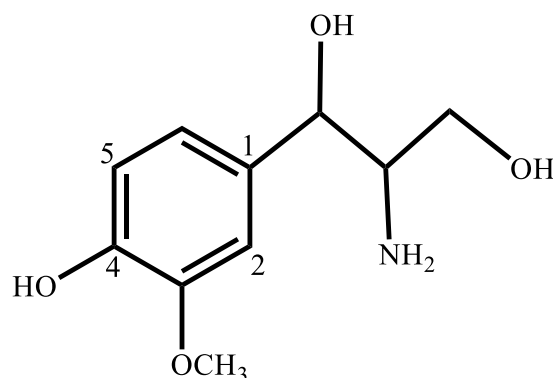


Figure IV.1.20: Structure du composé **Sch 4**, 1,3-propanediol, 2-amino 1- (4-hydroxy-3-méthoxyphényl).nomenclature

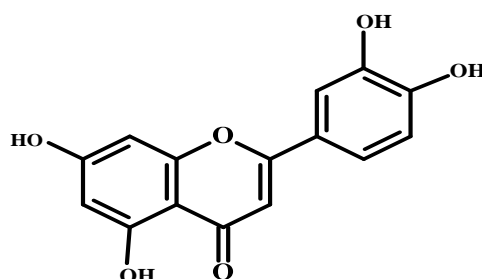
Les données de RMN de cette molécule sont rassemblées dans le tableau IV.1.6.

Tableau IV.1.6 : Données RMN du composé Sch 4, 1,3-propanediol, 2-amino 1- (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)

Position	1H $\delta_{ppm}J(Hz)$	^{13}C δ_{ppm} ,
1	-	135,85
2	6,97 d (1,6)	109,7
3	-	151,18
4	-	148,86
5	6,78 d (8,2)	114,55
6	6,84 dd (8,2 ; 1,6)	118,52
1 Prop	4,64 d (4,7)	85,98
2 Prop	3,15 m	53,77
3 Prop	4,26 dd (8,7 ; 6,4) 3,86 dd (8,7 ; 3,3)	72,02
OCH ₃	3,92 s	54,82

*Prop : Chaîne propanique

IV.1.1.5 Elucidation structurale du composé Sch 5 (SC 15-7-27)



Sch 5

La fluorescence noir- violette de ce composé sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou flavonol 3-OR. Le spectre enregistré dans le méthanol montre une absorption maximale à 350 nm.

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement de la bande I (+47 nm) avec une augmentation de l'intensité, indique l'existence d'un OH libre en C-4'.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement de la bande II (+28 nm), toujours par rapport au spectre en présence du MeOH oriente vers l'existence d'un OH en C-7. Cette idée est appuyée par l'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm dans le spectre après addition de NaOH.
- Enfin après addition de (AlCl₃+ HCl), la bande I subit un déplacement de (+18 nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH ce qui indique l'existence d'un OH libre en position 5. La comparaison de ce spectre (AlCl₃+ HCl) avec celui obtenu après addition de AlCl₃ montre un déplacement hypsochrome de la bande I de 26 nm. Cette observation est en faveur de la présence d'un système ortho-diOH sur le noyau B.

Les résultats de la série spectrale UV(Figure IV.1.23) du composé Sch 5 (SC15-5-27) sont reportés dans le tableau IV.1.7

Tableau IV.1.7: Données de la série spectrale UV-Vis du composé Sch 5

Réactifs	Bande I (nm)	Autres Bandes	Bande II (nm)	Interprétations
MeOH	356	271	259	
+NaOH	403	330	270	OH libre en 4'
+AlCl ₃	440	358	276	OH libre en 5 ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ +HCl	374	354/	269	
+NaOAc	384	327	273	OH libre en 7
NaOAc+H ₃ BO ₃	383	322	264	Ortho di-OH sur le noyau B

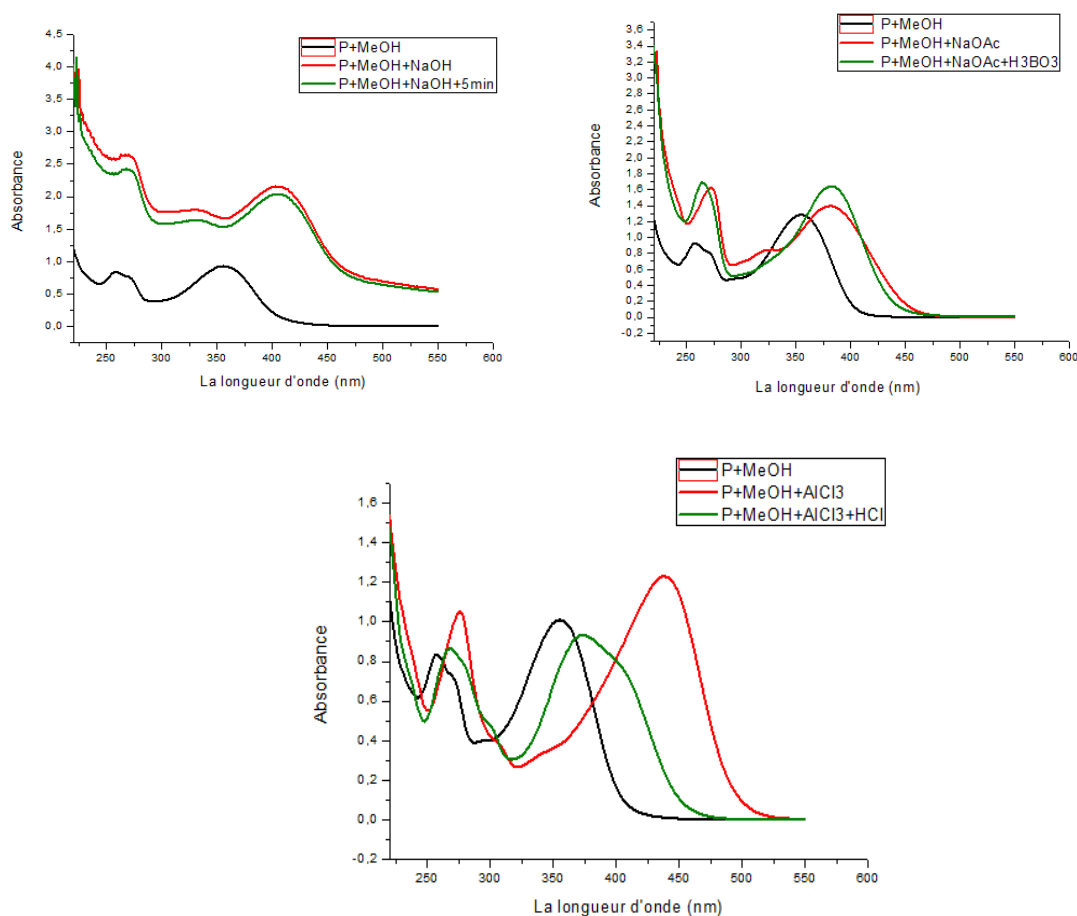


Figure IV.1.21: Données de la spectrophotométrie UV-Visible du composé Sch 5

L'examen des spectres RMN ^1H (Figure IV.1.22 ; IV.1.22.1) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ présente:

- Un signal à 7,42 ppm d'intégration 2H attribuable à H-6' et H-2'. Ce signal correspond à deux signaux superposés, l'un sous forme d'un doublet de doublets ($J=8,1 ; 2,1$ Hz) correspondant à H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J=2,1\text{Hz}$) caractérisant H-2'.
- Un autre doublet à 6,86 ppm avec une constante de couplage ($J=8,1\text{Hz}$) attribuable à H-5'.
- Un signal à 6,66 ppm d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable à H-3.
- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H formant un système AM à 6,43 ppm et 6,18 ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuables à H-8 et H-6, respectivement.

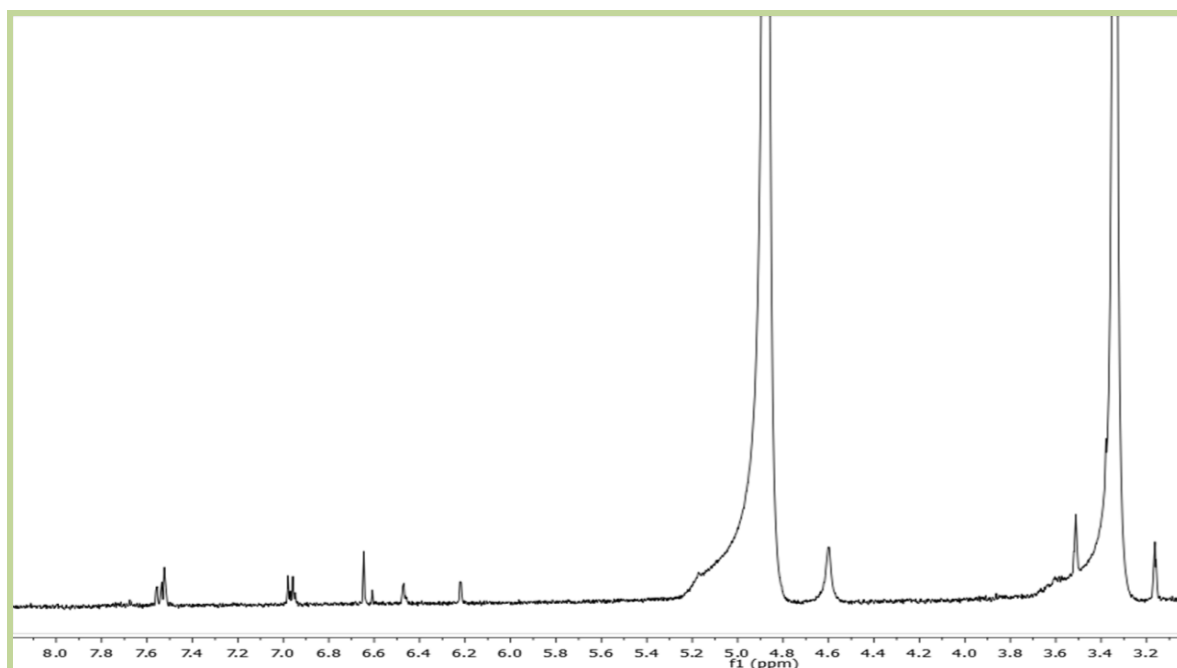


Figure IV.1.22 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600MHz) du composé Sch 5

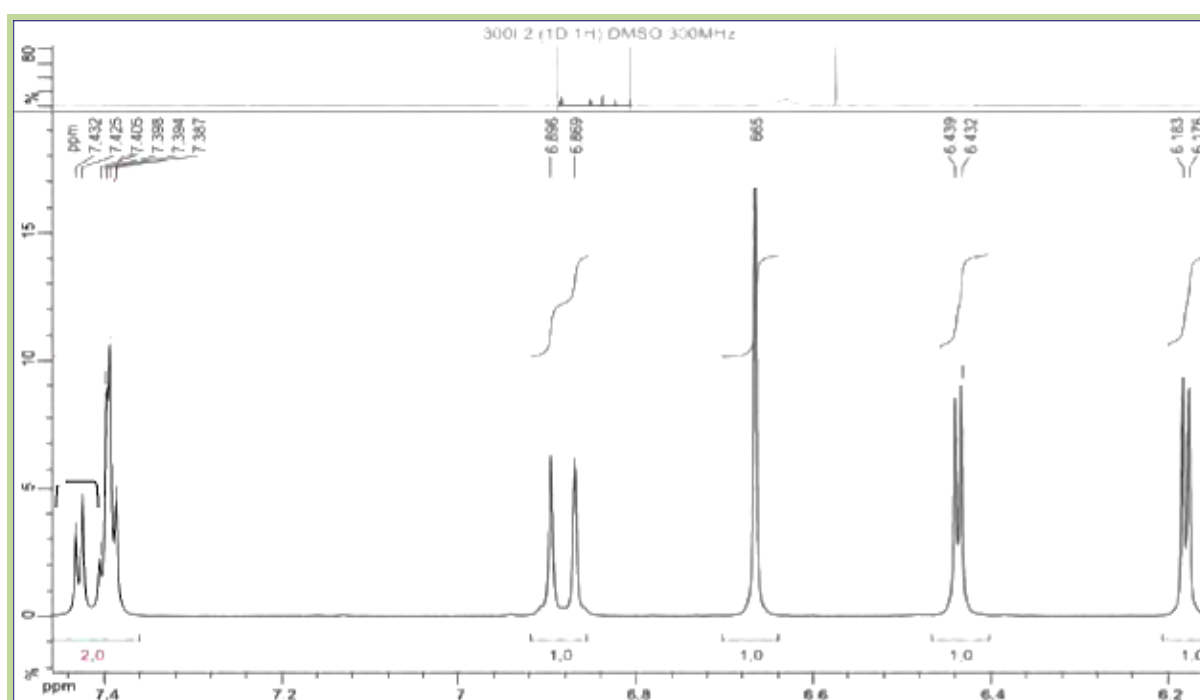


Figure IV.1.22.1 : Spectre RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) étalé du composé Sch 5

Les données de la RMN ^1H (Tableau IV.1.8), du spectre HSQC (Figure IV.1.23) additionnées de celles de spectrophotométrie UV-Vis permettent confirmer la structure du composé Sch 5 connu sous le nom de lutéoline (Figure IV.1.24)

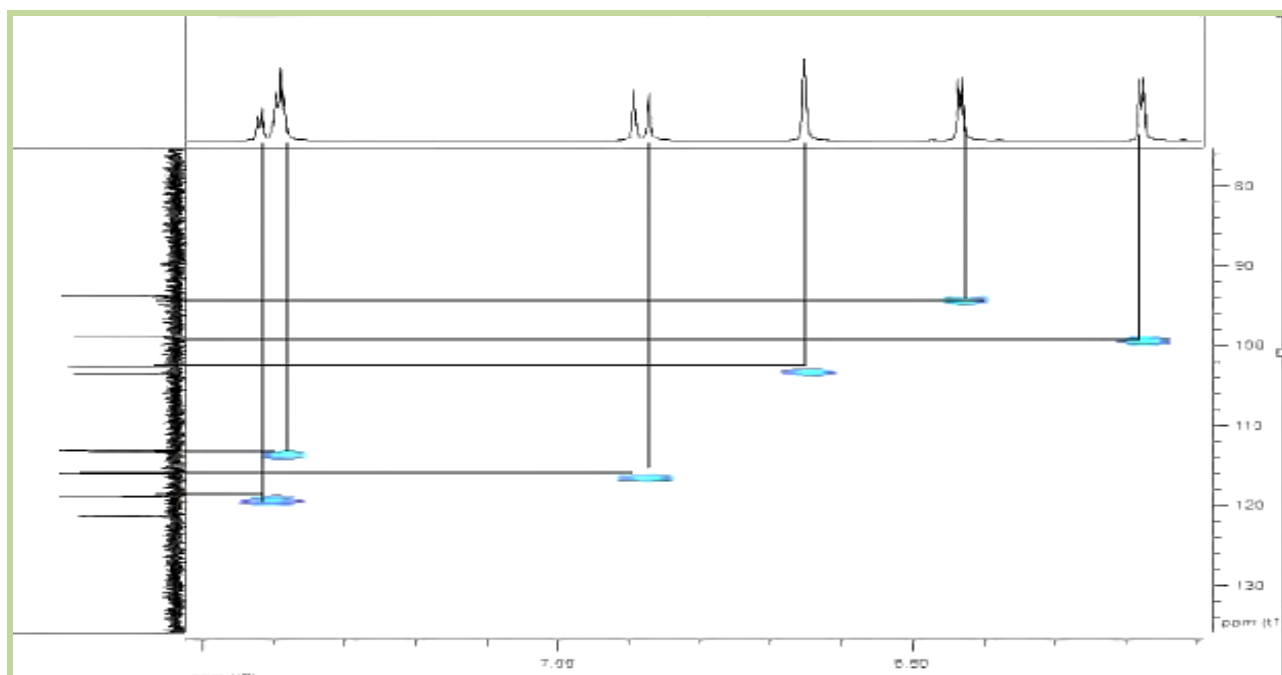


Figure IV.1.23: Spectre HSQC (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé Sch 5

Tableau IV.1.8 : Données spectrales de RMN¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) du composé Sch5

Déplacement chimique	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
7,42	1H	dd (8,1 ; 2,1)	H-6'
7,38	1H	d (2,1)	H-2'
6,86	1H	d (8,1)	H-5'
6,66	1H	s	H-3
6,43	1H	d (2,1)	H-8
6,18	1H	d(2,1)	H-6

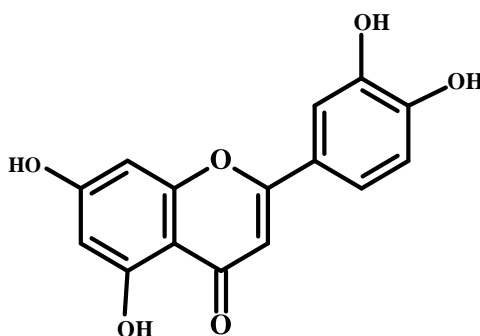
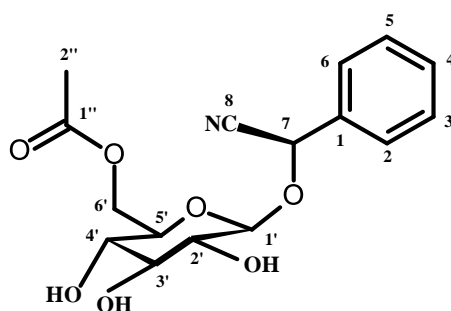


Figure IV.1.24: Structure du composé Sch5 ; lutéoline

IV.1.2.6 Elucidation structurale du composé Sch 13 (FBFL-2C)



Sch 13

L'examen des spectres RMN ^1H (Figure IV.1.25), RMN ^{13}C (Figures IV.1.26 ; IV.1.26.1 ; IV.1.26.2), DEPT 135° (Figure IV.1.27) et HSQC (Figure IV.1.28) enregistrés dans du chloroforme deutéré additionné de quelques gouttes de DMSO- d_6 , on relève en effet, la présence de signaux caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué. Il s'agit de deux multiplets, le premier d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=7,46$ ppm correspondant aux résonances des protons H-2 et H-6 ($\delta_{\text{C}}=128,24$ ppm) et le second d'intégration 3H, à $\delta_{\text{H}}=7,38$ ppm correspondant aux protons H-3 et H-5 ($\delta_{\text{C}}=129,58$ ppm) et H-4 ($\delta_{\text{C}}=130,64$ ppm). Ce spectre montre également un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=5,49$ ppm corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=68,59$ ppm. On relève également la présence d'un multiplet centré à $\delta_{\text{H}}=4,27$ ppm dont l'intégrale totale correspondant à trois protons. L'analyse du spectre HSQC-DEPT 135° , montre que ce multiplet correspond à deux protons d'un méthylène dont le carbone résonne à $\delta_{\text{C}} = 63,68$ ppm et un proton d'un groupement CH dont le carbone résonne à $\delta_{\text{C}} = 102,00$ ppm. La valeur du déplacement de ce carbone est en faveur de la présence d'une entité sucre dans cette molécule car cette valeur correspond bien à celle d'un carbone anomérique relié à une aglycone par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. Cette idée, confortée par la présence du méthylène précédent et par la présence dans le spectre proton du massif d'intégration 4H situé dans l'intervalle 3,25 à 3,50 ppm; indique donc que ce sucre est de type hexose. Cette observation est appuyée par le spectre COSY (Figure IV.1.29) qui montre des corrélations entre les protons du multiplet ($\delta_{\text{H}}=4,27$ ppm) et des protons du massif (intervalle 3,25 à 3,50 ppm). L'examen du spectre HSQC permet en effet, de relever des corrélations entre les protons résonant dans cet intervalle et les carbones de 4 groupements CH résonant à $\delta_{\text{C}}=77,41$; $74,70$; $73,53$ et $70,23$. La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones de ces 4 oxyméthines avec les données de la littérature permet de déduire que cet hexose est de type glucose. On peut alors sur la base des résultats de notre analyse des spectres proton et HSQC du composé Sch 6 soit la prunasine, attribuer ces 4 carbones aux hydroxyméthines C-5', C-3', C-2' et C-4', respectivement. (* : Ces deux

attributions peuvent être interchangeables). Il est bien entendu que la carbone du méthylène résonant à $\delta_C=63,68$ ppm, est attribuable au C-6' de cette hexose. On remarque que le déplacement chimique de ce carbone est relativement élevé, ce qui laisse attendre une acylation de ce sucre en cette position. Cette substitution est fortement envisageable vu la présence d'un groupement méthyle résonant à $\delta_H=2,07$ ppm ($\delta_C=21,16$ ppm) attribuable au méthyle d'un groupement acétate.

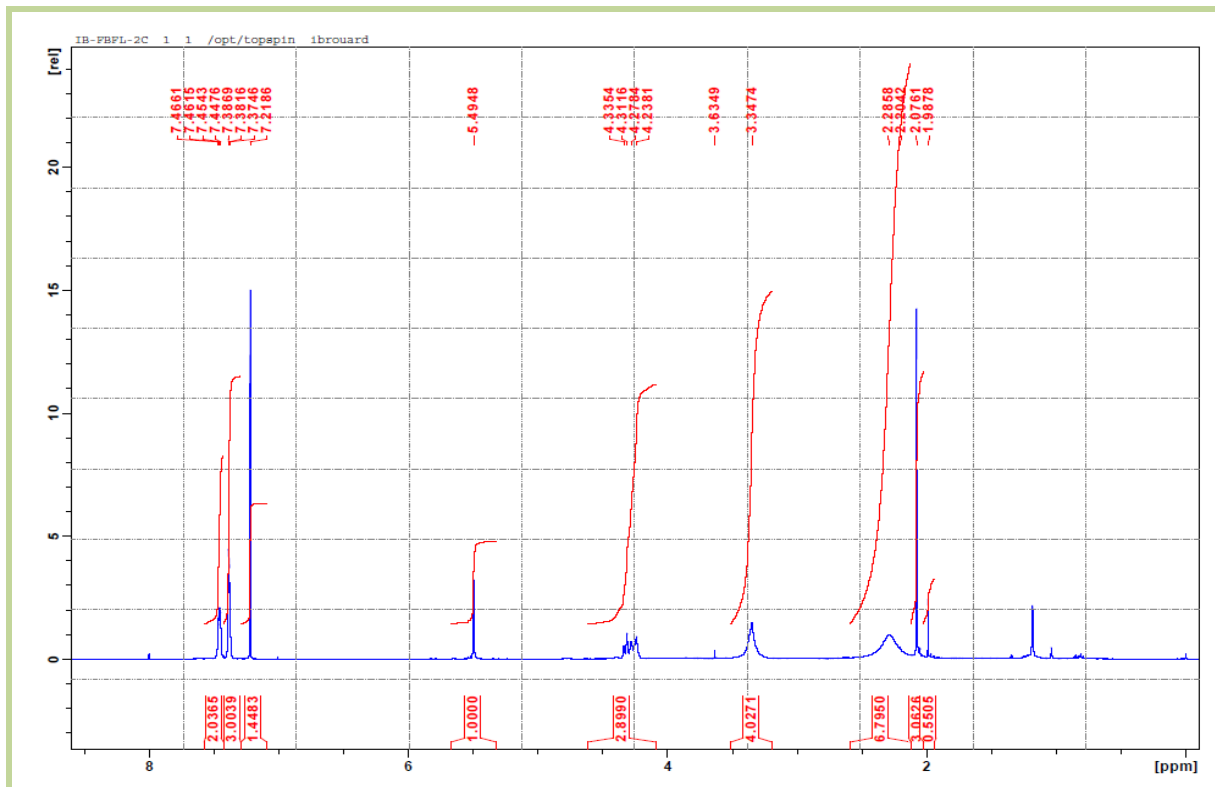


Figure IV.1.25: Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé Sch 13

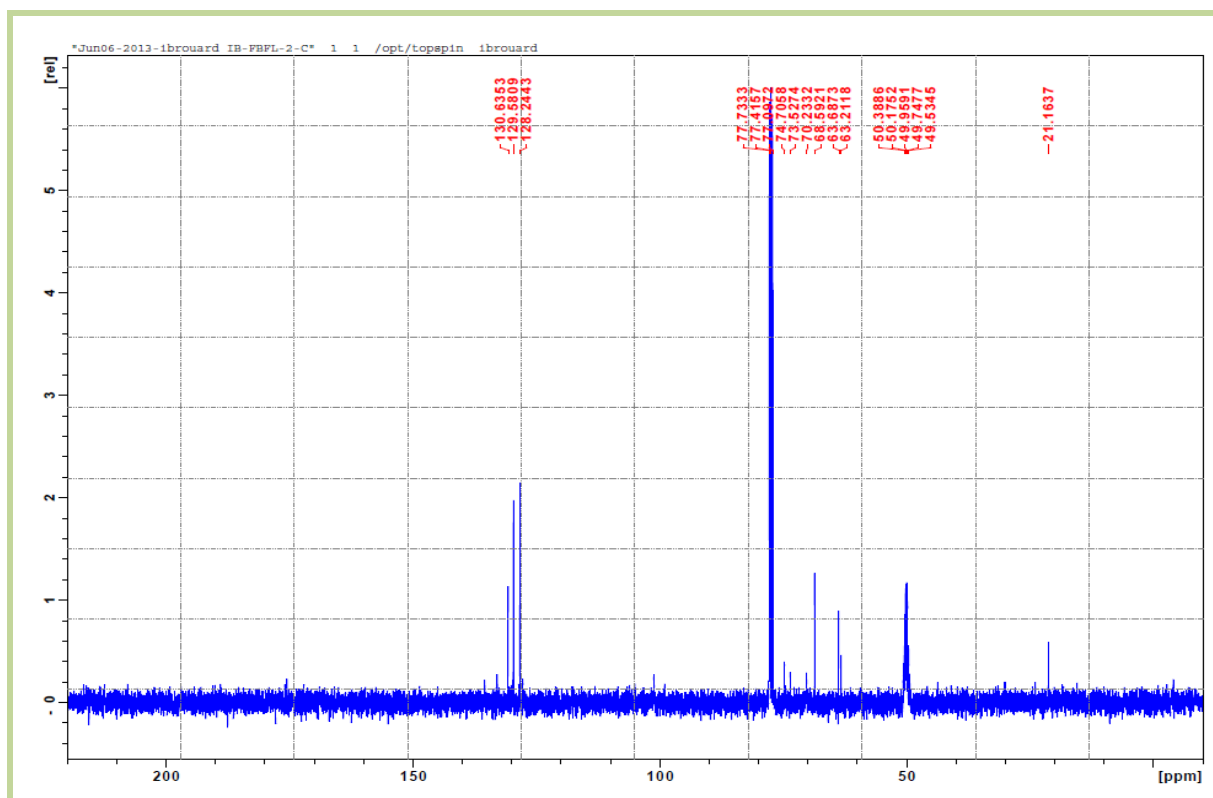


Figure IV.1.26: Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé Sch 13

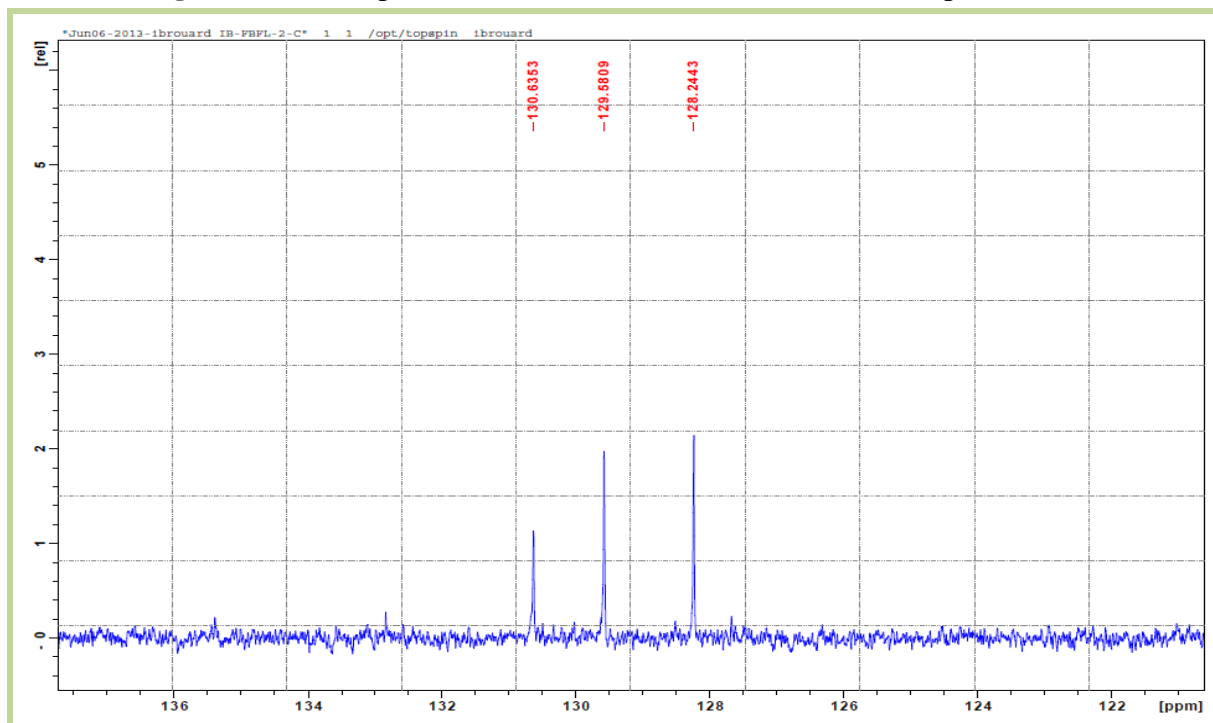


Figure IV.1.26.1: Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé Sch13, étalement 1

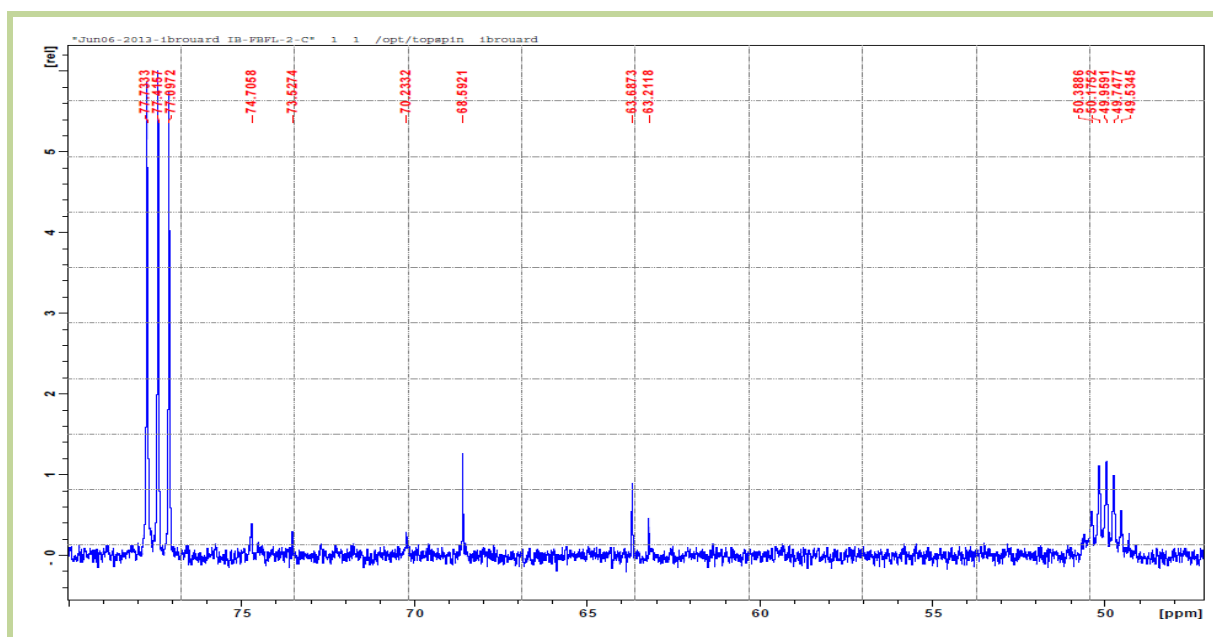


Figure IV.1.26.2: Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé Sch 13, étalement 2

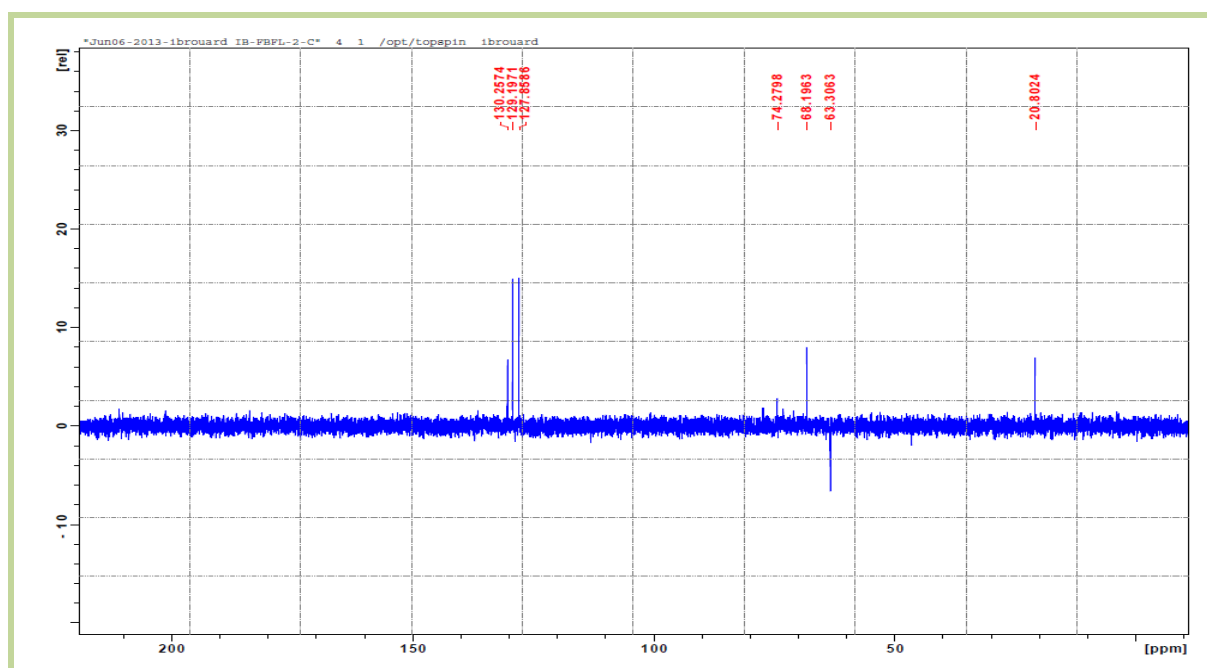


Figure IV.1.27: Spectre DEPT 135° (CDCl₃, 100 MHz) du composé Sch 13

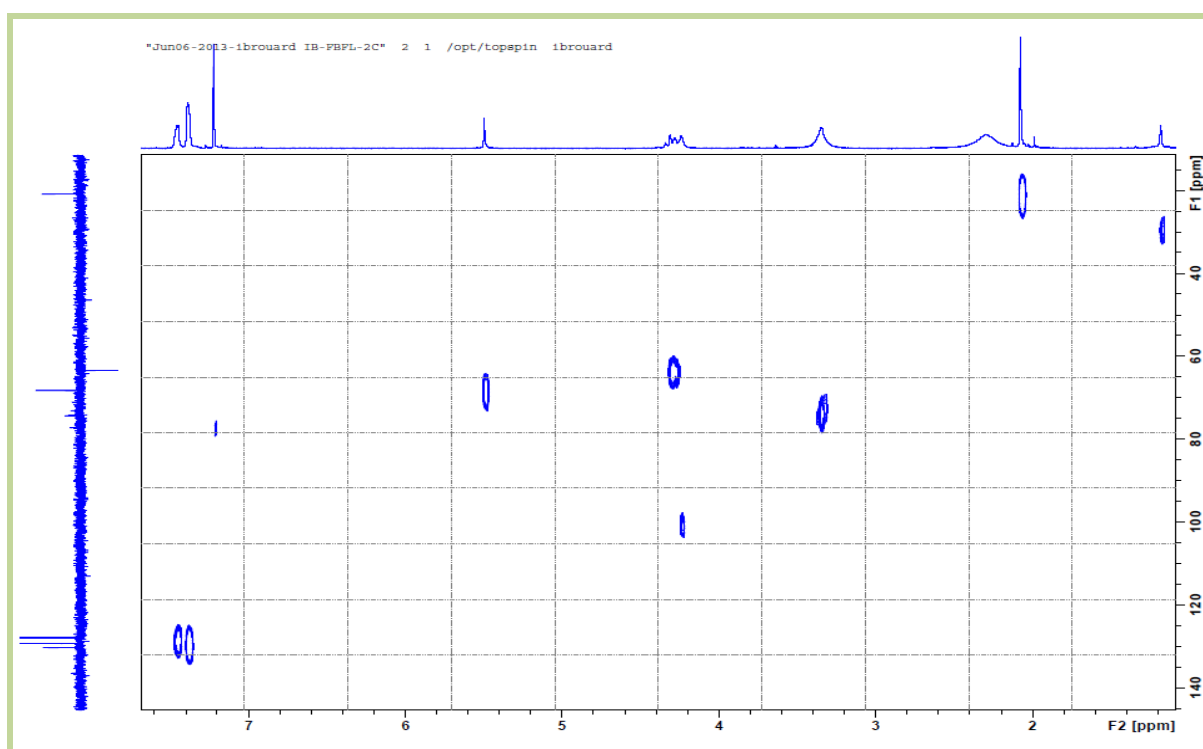


Figure IV.1.28: Spectre HSQC (CDCl₃, 400 MHz) du composé Sch 13

Cette hypothèse est confirmée par le spectre HMBC (Figure IV.1.30) dans lequel on relève une tache de corrélation nette entre les protons de ce méthyle et le carbone de ce méthylène soit le C-6' du groupement *O*-glucopyranosyle confirmant donc l'acétylation de ce sucre en cette position. Toujours sur le spectre HMBC, on relève quatre autres taches de corrélation importantes pour l'établissement de la structure de ce composé. Ces quatre taches sont relevées entre le proton du groupement méthine précédemment évoqué ($\delta_{\text{H}}=5,49$ ppm ; $\delta_{\text{C}}=68,59$ ppm) et :

- Le carbone anomérique du groupement *O*-glucopyranosyle indiquant alors que cette entité sucre est portée par ce méthine,
- un carbone quaternaire résonant à 117,90 ppm caractéristique d'un groupement nitrile indiquant la présence de ce type de groupement sur ce méthine, la présence de ce groupement cyano en cette position explique l'abaissement significatif du déplacement chimique du carbone de ce méthine ($\delta_{\text{C}}=68,59$ ppm), du fait qu'il bénéficie de la proximité de la zone de blindage de la triple liaison,
- les carbones C-2 et C-6 du noyau aromatique indiquant que ce cycle est bien porté par ce méthine,

- le carbone C-1 du noyau aromatique ($\delta_C=132,78$ ppm) confortant et confirmant la substitution de ce méthine par le noyau aromatique.

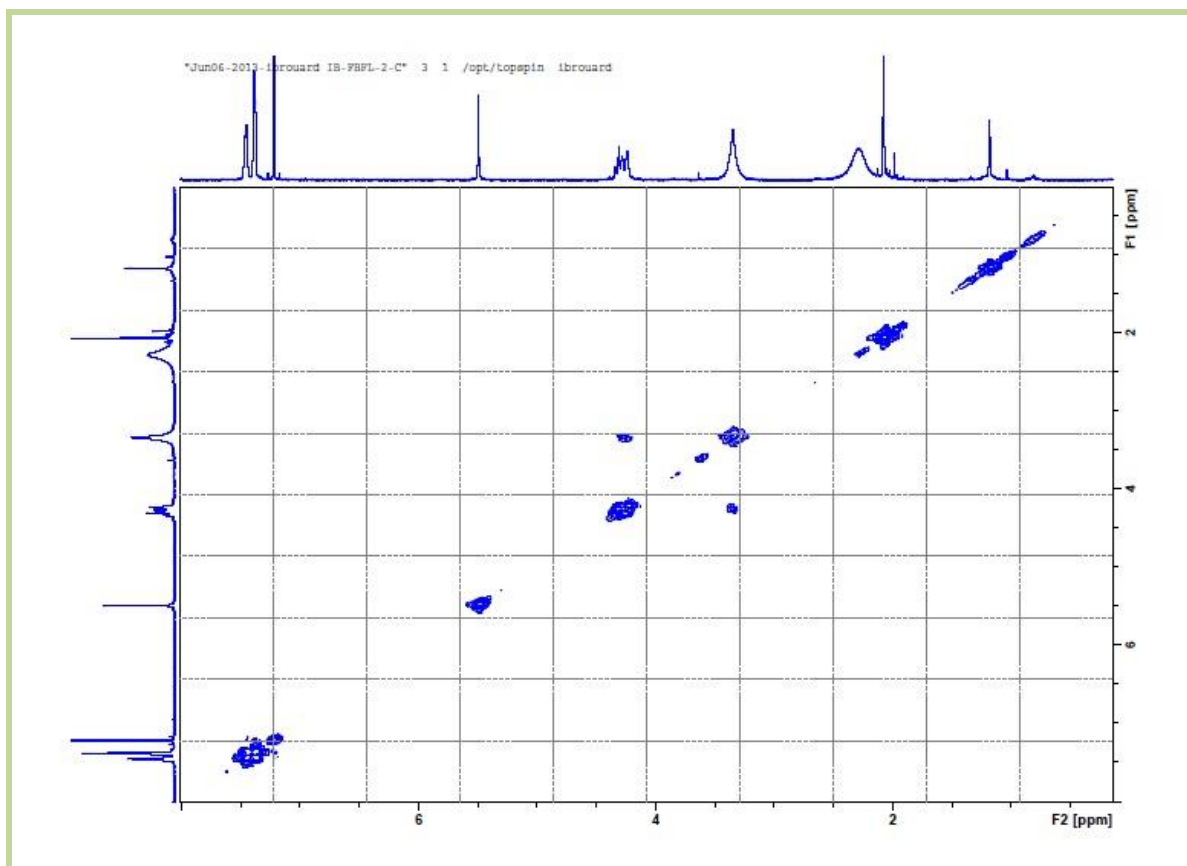


Figure IV.1.29: Spectre COSY (CDCl₃, 400 MHz) du composé Sch 13

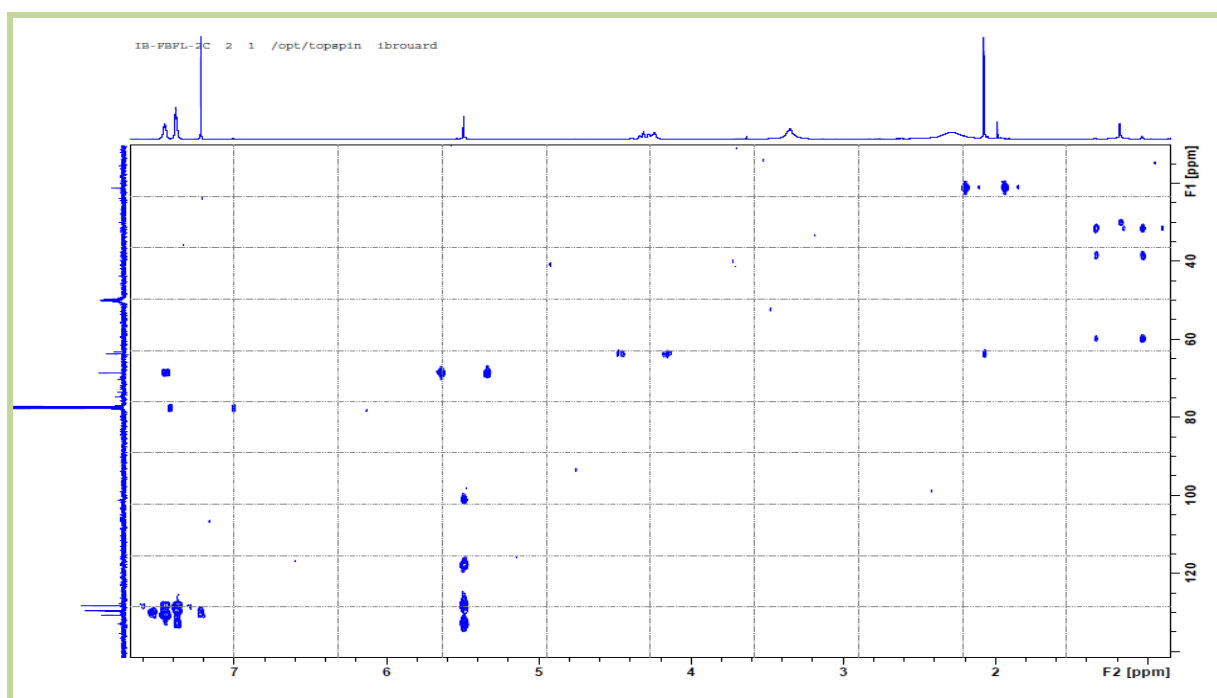


Figure IV.1.30: Spectre HMBC (CDCl₃, 400 MHz) du composé Sch 13

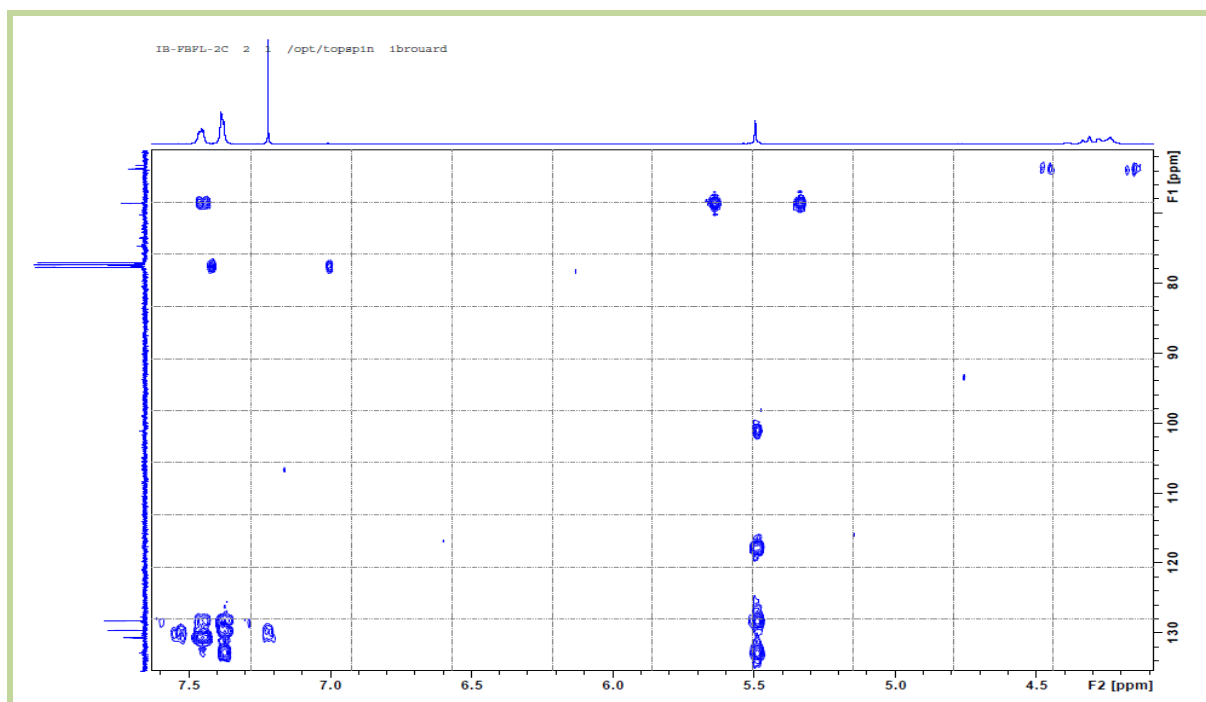


Figure IV.1.30.1: Spectre HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) du composé Sch13, étalement
Toutes ces données rassemblées dans le tableau IV.1.9, convergent vers la structure partielle
reportée dans la figure IV.1.31

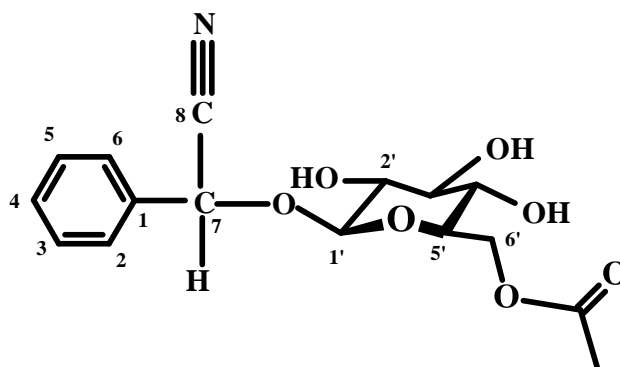


Figure IV.1.31: Structure partielle du composé Sch 13

Selon la configuration absolue du centre chiral C-7, cette molécule est soit la 6'-*O*-acétylprunasine ou prunazine 6'-*O*-acétate soit la 6'-*O*-acétylsambunigrine ou sambunigrine 6'-*O*-acétate. Pour cela, et conformément aux résultats des travaux reportés dans la littérature, nous nous sommes basés sur la valeur du déplacement chimique du proton anomérique dont la valeur relativement faible δ_{H} proche de 4,27 ppm est en accord avec la configuration absolue (R) de ce centre chiral (Figure IV.1.32) [2].

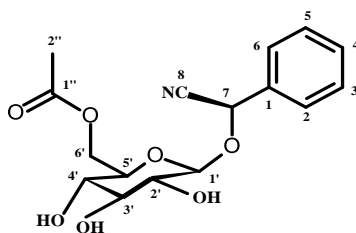
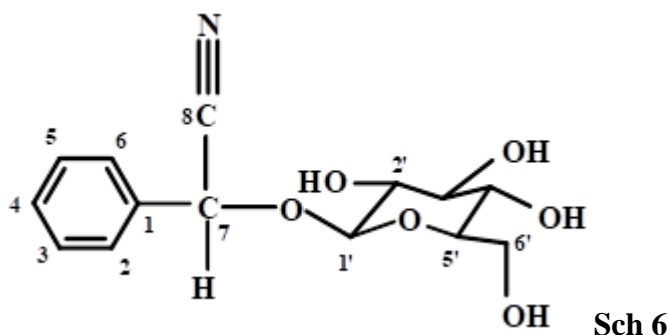


Figure IV.1.32: Structure finale du composé Sch 13, 6'-*O*-acétylprunazine ou prunazine 6'-*O*-acétate

IV.1.2 Identification des produits isolés de la phase *n*-butanol

IV.1.2.1 Elucidation structurale du composé Sch6 (SC 4-107)



L'examen du spectre RMN ^1H (Figures IV.1.33, IV.1.33.1, IV.1.33.2) montre la présence de deux signaux, le premier d'intégration 2H sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}}=7,62$ ppm, le second d'intégration 3H, sous forme de multiplet à $\delta_{\text{H}}=7,49$ ppm, ces signaux sont caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué.

Ce spectre montre également un ensemble de signaux caractéristiques d'un hexose, notamment :

- Un signal sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}}=4,29$ ppm ($J=7,3$ Hz) attribuable au proton anomérique que nous noterons H-1'. La valeur de la constante de couplage relevée dans ce signal indique qu'il s'agit d'un sucre de configuration β .
- Deux signaux d'intégration 1H chacun attribuables respectivement à H-6'a et H-6'b à $\delta_{\text{H}}=3,95$ ppm (dd ; $J=12,2$; 1,8 Hz) et à $\delta_{\text{H}}=3,72$ ppm (dd ; $J=12,2$; 6,1 Hz).
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,25 -3,37 ppm attribuable aux protons 2', 3', 4' et 5' de l'hexose.
- De plus, ce spectre montre un signal d'intégration 1H sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}}=5,94$ ppm porté par un carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=66,11$ ppm d'après le spectre HSQC (Figure IV.1.34). La valeur du déplacement chimique de ce proton indique qu'il

s'agit d'un oxyméthine substitué par des groupements électroattracteurs. Quant à la valeur du déplacement chimique ($\delta_C=66,1$ ppm) de son carbone porteur, elle est indicatrice de la présence très probable de ce carbone dans la zone positivante d'un cône d'anisotropie d'un groupement présent dans cette molécule.

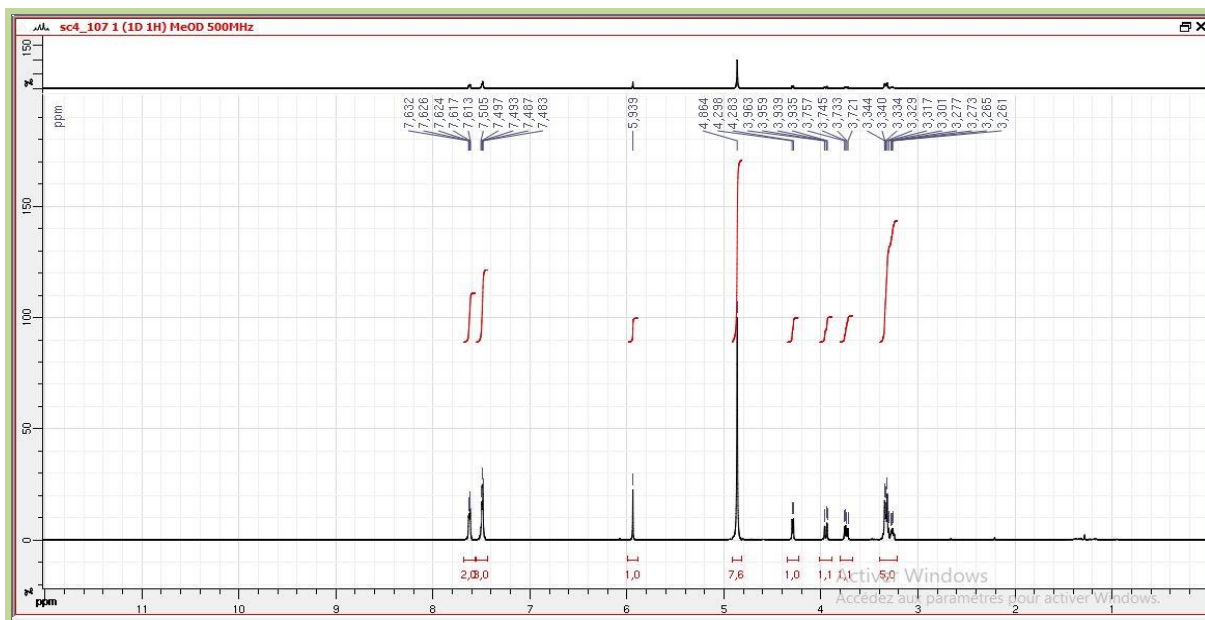


Figure IV.1.33: Spectre RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) du composé Sch 6

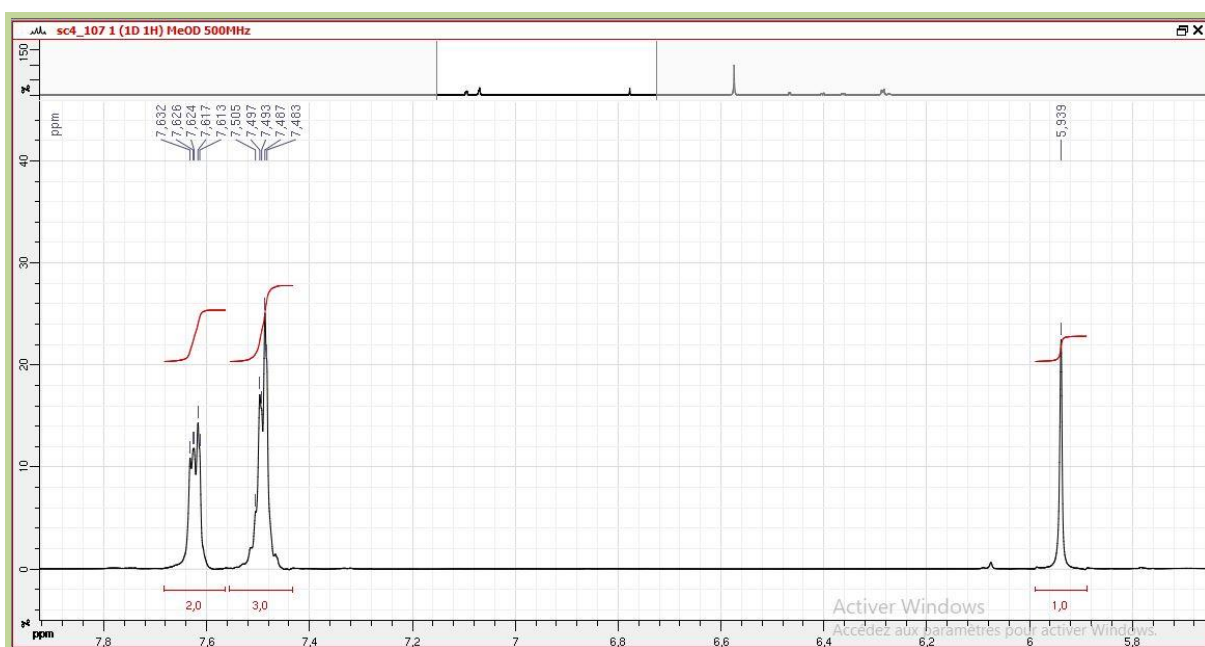


Figure IV.1.33.1: Spectre RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) du composé Sch 6, étalement 1

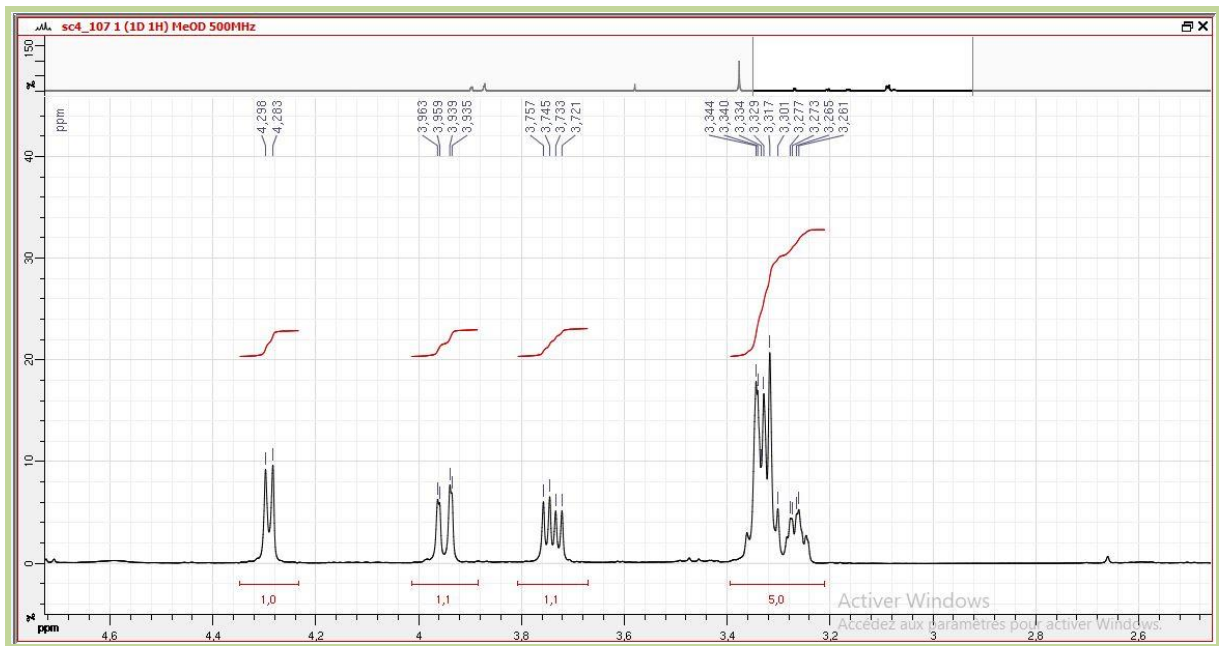


Figure IV.1.33.2 : Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 500 MHz) du composé Sch 6; étalement 2

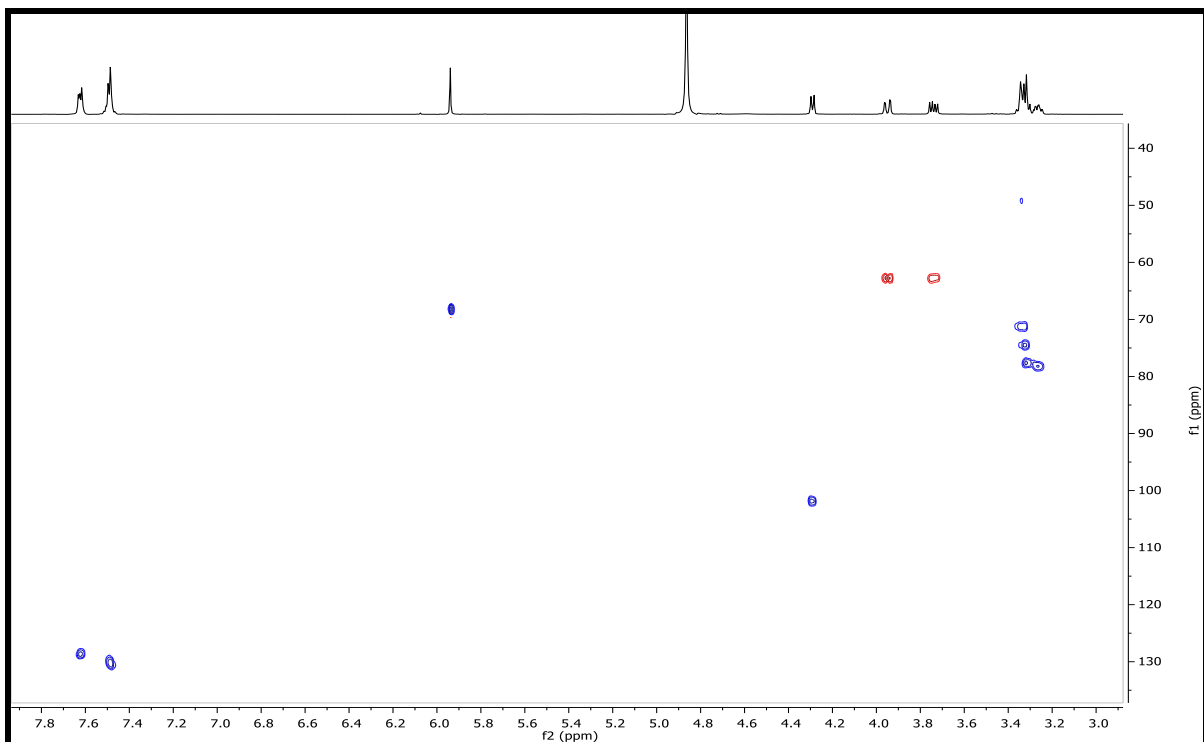


Figure IV.1.34: Spectre HSQC (MeOH-*d*₄, 500 MHz) du composé Sch 6

L'analyse approfondie du spectre HSQC relatif à ce composé permet de localiser le carbone anomérique de ce sucre grâce à sa corrélation avec H-1' à $\delta_C=100,79$ ppm. La valeur de ce déplacement chimique indique que cet hexose est relié à l'aglycone par le

biais d'un atome d'oxygène . Toujours sur le même spectre et dans l'intervalle des protons du sucre (3.20 – 3.4), on relève quatre corrélations avec les carbones résonant à $\delta_C = 73,19 ; 76,92 ; 70,01$ et $77,85$ ppm. Les protons du groupement CH_2 (position C-6 de l'hexose) montrent une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_C = 61,40$ ppm.

L'examen du spectre COSY (Figure IV.1.35) et la combinaison de ses données avec celles du spectre HSQC permet d'attribuer le carbone résonant à $\delta_C = 77,85$ ppm au C-5' (position C-5 de l'hexose) grâce à la corrélation de son proton avec les protons H-6'a et H-6'b. Vu cette corrélation, le proton H-5' sera attribué au multiplet à $\delta_H = 3,26$ ppm. La combinaison des analyses de ces deux spectres permet également d'attribuer le carbone résonant à $\delta_C = 73,19$ ppm au carbone C-2' (position C-2 de l'hexose) grâce à la corrélation de son proton avec le proton anomérique. Avec la même idée, le carbone résonant à $\delta_C = 76,92$ ppm sera attribué au C-3' et celui résonant à $\delta_C = 70,01$ ppm au carbone C-4'. Les protons H-2' et H-4' seront par conséquent attribués au multiplet centré à $\delta_H = 3,34$ ppm et le proton H-3' sera attribué au triplet à $\delta_H = 3,32$ ppm ($J = 9,0$ Hz). La valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-3' indique des orientations axiales pour les protons H-2', H-3' et H-4'. Cette observation oriente donc vers le fait que cette entité sucre est un glucopyranosyle. Cette hypothèse est largement appuyée par les valeurs des déplacements chimiques des carbones de cet hexose qui sont en parfait accord avec les données de la littérature pour ce type de groupement [3].

Concernant le noyau aromatique monosubstitué comme signalée plus haut, le spectre HSQC permet d'attribuer les carbones C-2 et C-6 (magnétiquement équivalents), à la résonance à $\delta_C = 128,05$ ppm grâce à leur corrélation avec les deux protons relatifs au multiplet centré à $\delta_H = 7,62$ ppm. Les carbones C-3 et C-5 (magnétiquement équivalents) seront attribués à la résonance à $\delta_C = 129,20$ ppm. Le carbone C-4 sera attribué à la résonance à $\delta_C = 130,10$ ppm.

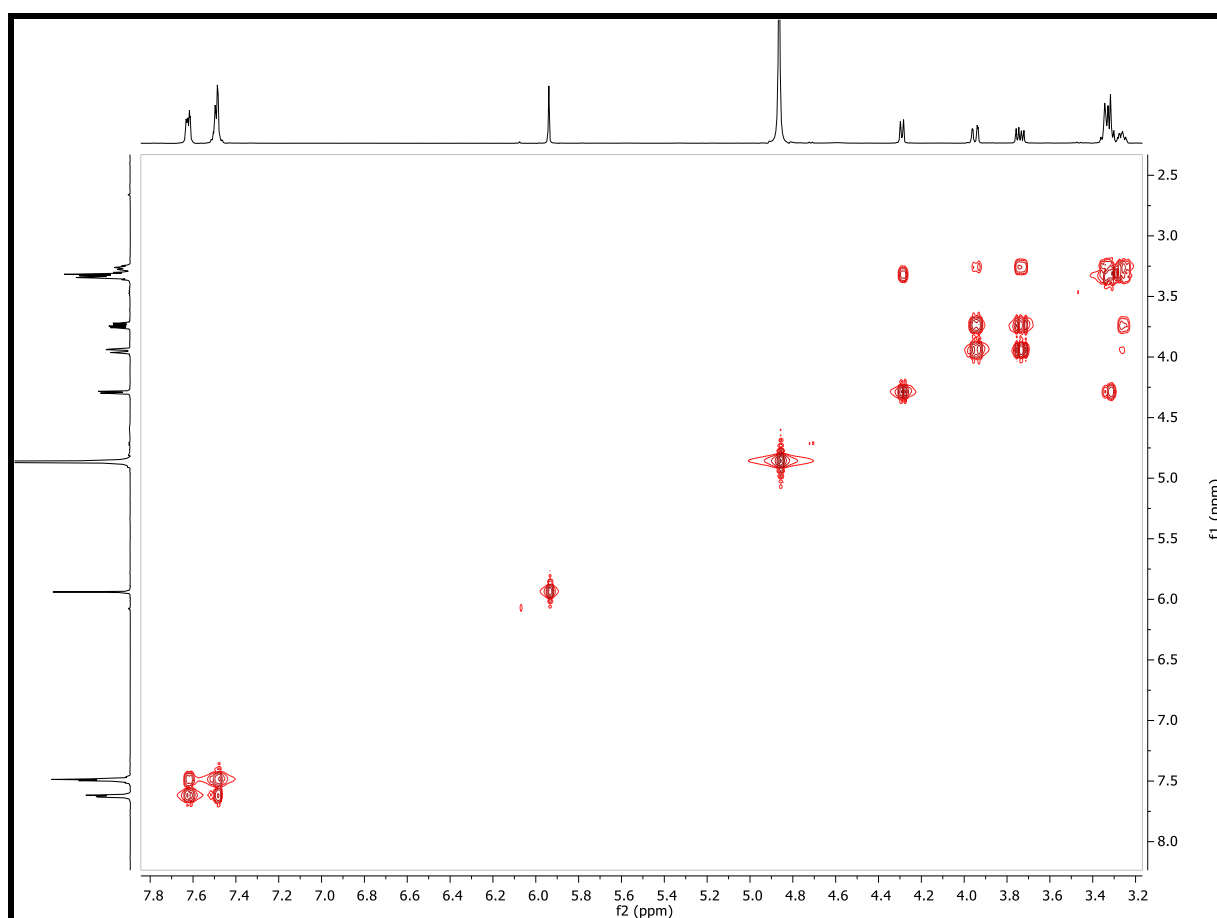


Figure IV.1.35: Spectre COSY (500 MHz, CD₃OD) du composé Sch 6

Le carbone C-1, point de substitution de ce noyau aromatique (Figure IV.1.36) sera attribué à la résonance à $\delta_C=133,10$ ppm grâce au spectre HMBC (Figure IV.1.37) où l'on observe des taches de corrélation entre les protons H-2, H-6, H-3 et H-5 et ce carbone quaternaire.

Par ailleurs, le spectre HMBC montre des corrélations entre le proton de l'oxyméthine ($\delta_H=5,94$ ppm) évoqué précédemment et les carbones C-1, C-2, C-6 et C-1' (carbone anomérique) et un carbone quaternaire résonant à $\delta_C=118,50$ ppm. De ces corrélations, nous pouvons déduire que ce méthine est substitué par le groupement phényle, l'entité sucre soit le groupement *O*-glucopyranosyle et un groupement nitrile vu d'une part le déplacement chimique (autour de 118 ppm) caractéristique de ce type de carbone et d'autre part, le nombre impair d'atomes d'hydrogène trouvés dans cette molécule (17 atomes) qui ne peut se traduire que par la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote dans cette molécule (Figure IV.1.38). La présence du groupement nitrile sur cet oxyméthine est confortée par l'abaissement de la valeur du déplacement chimique de son carbone $\delta_C = 66,11$ ppm résultant de la présence de ce carbone dans la zone positivante du cylindre d'anisotropie du groupement nitrile.

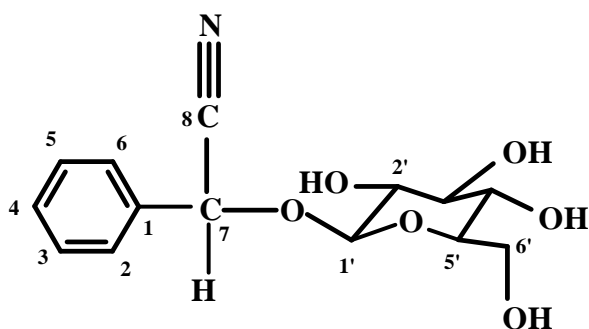


Figure IV.1.36: Structure partielle du composé Sch 6

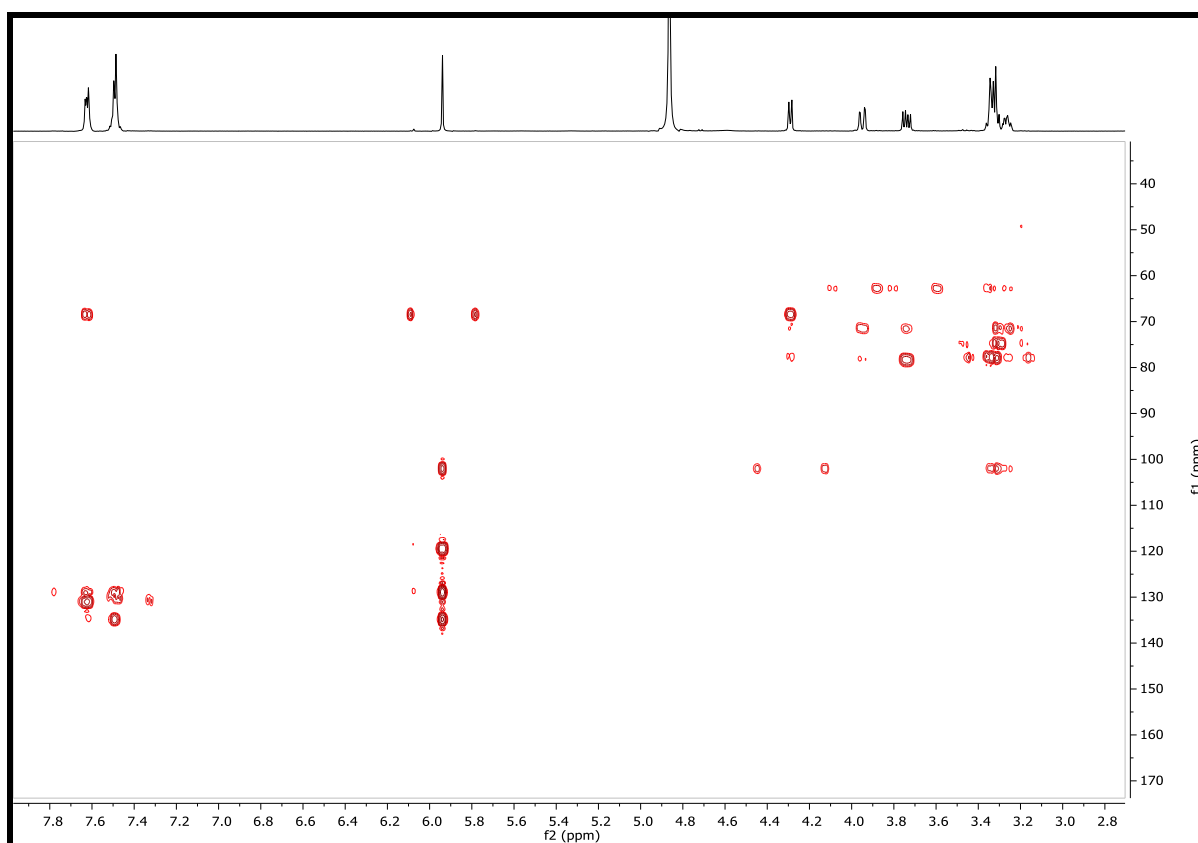


Figure IV.1.37: Spectre HMBC (600 MHz, CD₃OD) du composé Sch 6

La comparaison de nos données à celles de la littérature a permis d'établir la stéréochimie (R) du centre asymétrique de cette molécule. En effet nos résultats sont en parfait accord avec ceux d'une molécule naturelle isolée de *Centaurea aspera* var. *subinermis* [4], de *Perilla frutescens* var. *acuta* [5] et de *Centaurea nicaeensis* All. var. *waliana* Maire [6]. Cette molécule est connue sous le nom de prunasine (Figure IV.38).

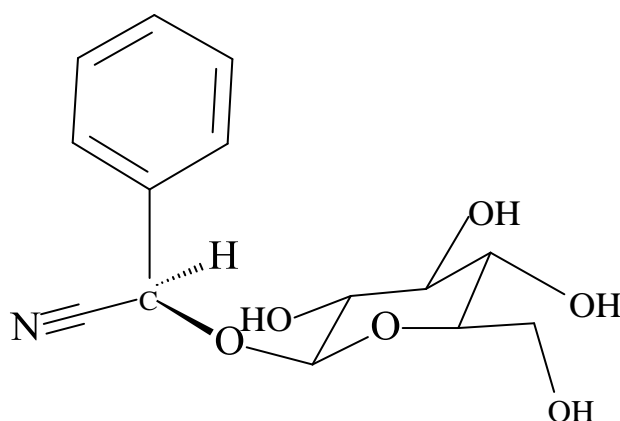


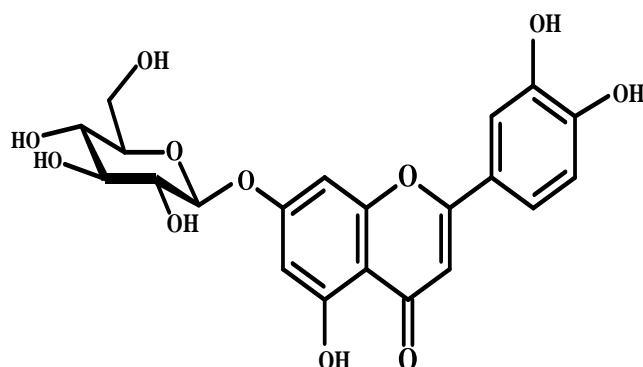
Figure IV.1.38: Structure finale du composé Sch 6, prunasine

Les données RMN de cette molécule, sont regroupées dans le tableau IV.1.10

Tableau IV.1.9 : Données RMN du composé SCH 6(SC4-107), prunasine

Position	^1H δ_{ppm} (Hz)	^{13}C δ_{ppm} ,
1	-	133,10
2	7,62 m	128,05
3	-	129,20
4	-	130,1
5	-	129,20
6	7,62 m	128,05
7	5,94 s	66,11
8	-	118,50
1'	4,29 d (7,3)	100,79
2'	3,34 m	73,19
3'	3,32 t (9)	76,92
4'	3,34 m	70,01
5'	3,26	77,85
6'	3,95 dd (12,2; 1,8) 3,75 dd (12,2; 6,1)	61,40

IV.1.2.2 Elucidation structurale du composé Sch 7 (SC 43)



Sch7

L'examen des spectres RMN-¹H (Figure IV.1.39) de ce composé, montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par les signaux :

- Un signal d'intégration 1H sous forme de doublet dédoublé à $\delta_H = 7,46$ ppm ($J=8,3 ; 2,3$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet à $\delta_H=7,42$ ppm ($J=2,3$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un signal d'intégration 1H sous forme de doublet à $\delta_H = 6,93$ ppm ($J = 8,3$ Hz) attribuable à H-5'.
- Deux doublets formant un système AM à $\delta_H=6,84$ et $6,53$ ppm ($J=2,2$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6, respectivement, du noyau A d'un flavonoïde
- Un signal d'intégration 1H sous forme de singulet à $\delta_H=6,65$ ppm attribuable au H-3 d'une flavone.

A ce stade de notre analyse nous pouvons attendre la structure partielle reportée dans la figure IV.1.40

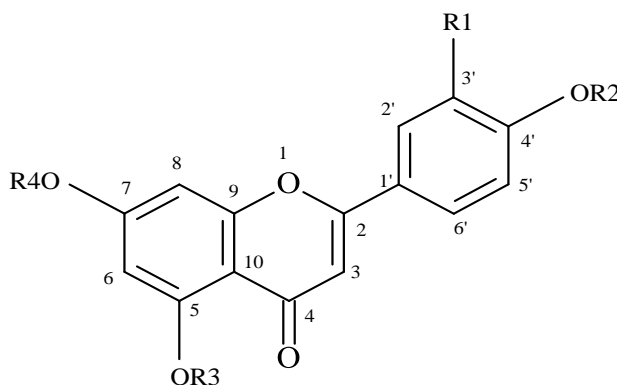


Figure IV.1.40 : Structure partielle du composé Sch 7

Ce spectre proton montre également un signal d'intégration 1H sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}}=5,09$ ppm ($J=7,3$ Hz) attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène, la valeur de la constante de couplage indique une configuration β du carbone anomérique.

Enfin un ensemble de signaux dans l'intervalle 4,0 à 3,4 ppm attribuable aux autres protons du sucre avec notamment un doublet de doublets ($J=12,0$; 1,6 Hz) relatif au proton H-6''a à $\delta_{\text{H}}=3,94$ ppm, un doublet de doublets relatif au proton H-6''b ($J=12,0$; 5,6 Hz) à $\delta_{\text{H}}=3,74$ ppm ; un multiplet $\delta_{\text{H}}=3,56$ ppm attribuable à H-5'' vu sa multiplicité. Les protons H-3'' et H-2'' résonnent sous forme d'un multiplet centré à $\delta_{\text{H}}=3,52$ ppm et le proton H-4'' sous forme d'un triplet à $\delta_{\text{H}}=3,43$ ($J=8,8$ Hz). Ce signal montre un effet de toit avec le signal de H-3''. La valeur 8,8 Hz de la constante de couplage mesurée dans le signal de H-4'' et la valeur de celle relevée dans le signal du proton anomérique de ce sucre, indiquent des orientations axiales des protons H-1'', H-2'', H-3'', H-4'' et H-5'' de ce sucre. De ce fait, ce substituant sucre est un glucopyranosyle.

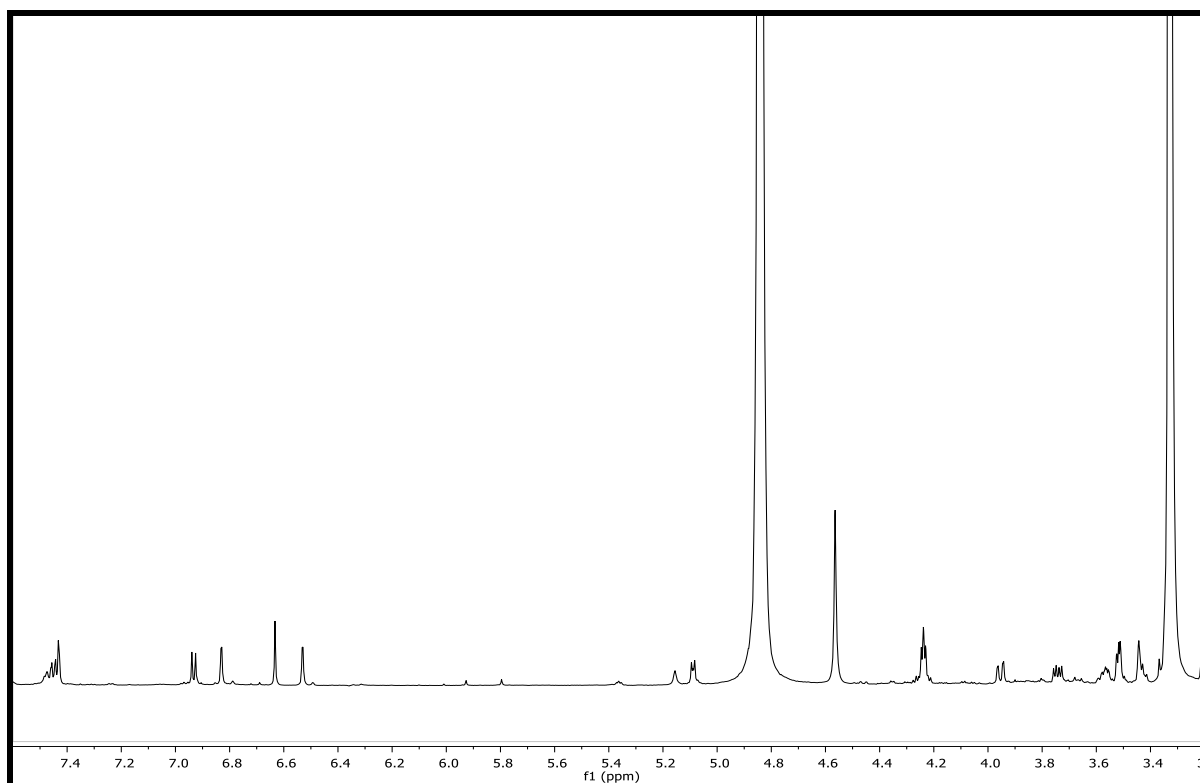


Figure IV.1.39: Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du composé Sch 7

Le spectre HSQC de ce composé (Figure IV.1.41), permet d'attribuer les carbones porteurs de protons dans cette molécule, ainsi les atomes de carbone de l'aglycone C-6', C-5', C-2', C-3, C-6 et C-8 seront attribués aux résonances à $\delta_{\text{C}} = 119,90$; 115,10 ; 113,01 ;

102,50 ; 99,10 et 94,80 ppm, respectivement ; les carbones C-1'', C-5'', C-3'', C-2'', C-4'' et C-6'' du groupement glucopyranosyle seront attribués aux résonances à $\delta_C=100,05$; 77,05 ; 76,10 ; 73,50 ; 69,91 et 61,02 ppm, respectivement.

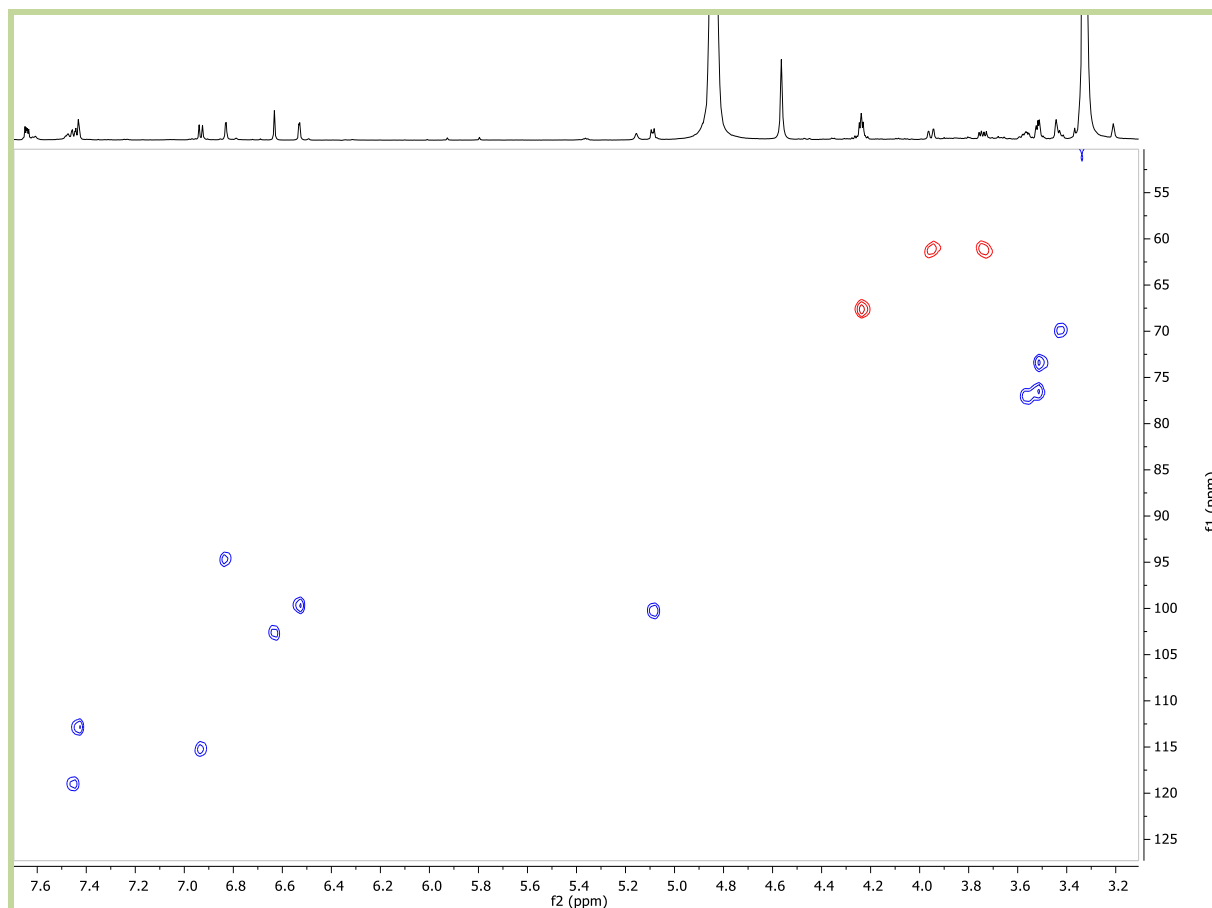


Figure IV.1.41: Spectre HSQC (600 MHz, CD₃OD) du composé SCh 7

Pour attribuer les carbones quaternaires, nous avons analysé les corrélations de ces carbones avec les protons de cette molécule grâce au spectre HMBC (Figure IV.1.42), on relève notamment :

- Des corrélations entre les protons H-8, H-3 et H-6 et le carbone résonant à $\delta_C=105,10$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-10.
- Des corrélations entre les protons H-5' et H-3 et le carbone résonant à $\delta_C=122,01$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-1'.
- Des corrélations entre les protons H-5' et H-2' et le carbone résonant à $\delta_C=147,20$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-3'.
- Des corrélations entre les protons H-6', H-5' et H-2' et le carbone résonant à $\delta_C=149,30$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-4'.

- Une corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=157,20$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-9.
- Des corrélations entre les protons H-6 et H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=164,30$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-7. Sur ce même spectre, ce carbone C-7, montre une tache de corrélation avec le proton anomérique du groupement glucopyranosyle. Cette observation indique que l'entité *O*-glucopyranosyle est attachée au carbone C-7.
- Des corrélations entre les protons H-6', H-2' et H-3 et le carbone résonant à $\delta_C= 166,40$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-2.
- Une corrélation entre le proton H-3 et le carbone résonant à $\delta_C=182,25$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-4. Cette attribution est confortée par la valeur du déplacement chimique de ce carbone.

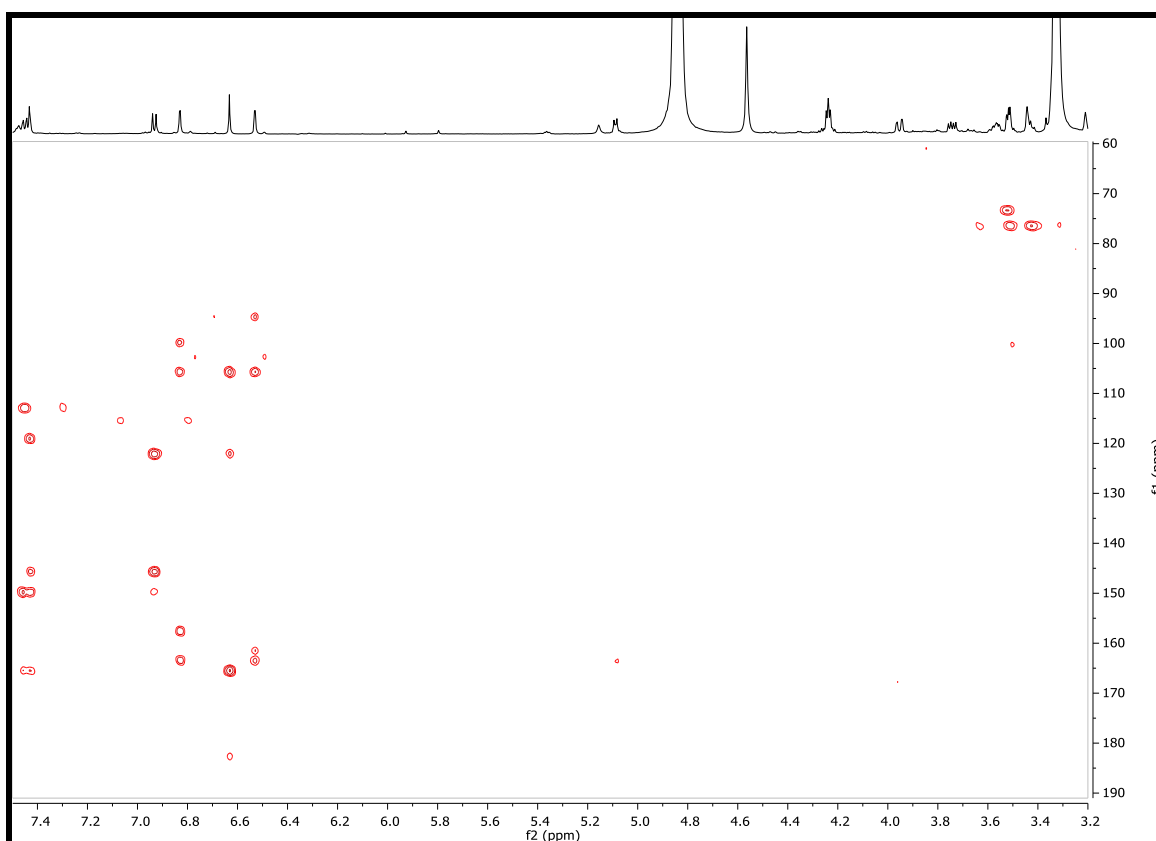


Figure IV.1.42: Spectre HMBC (600 MHz, CD₃OD) du composé SCh 7

En tenant compte des valeurs des déplacements chimiques de C-5, C-3' et C-4' et de l'absence d'autres groupements hydrocarbonés, il est évident que ces positions sont hydroxylées.

Toutes ces données rassemblées dans le tableau IV.1.11 mènent à la structure reportée dans la figure IV.1.43. Cette molécule est connue sous le nom de lutéoline 7-*O*- β -glucopyranosyle [7].

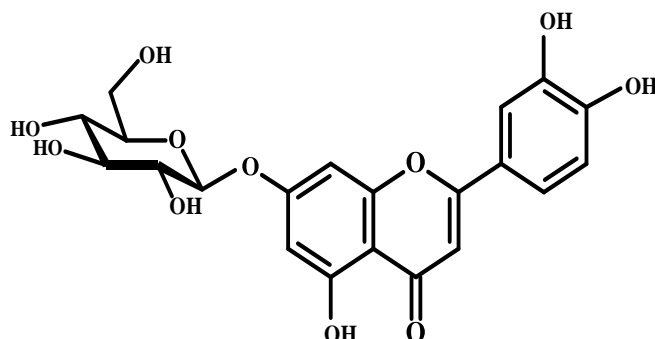
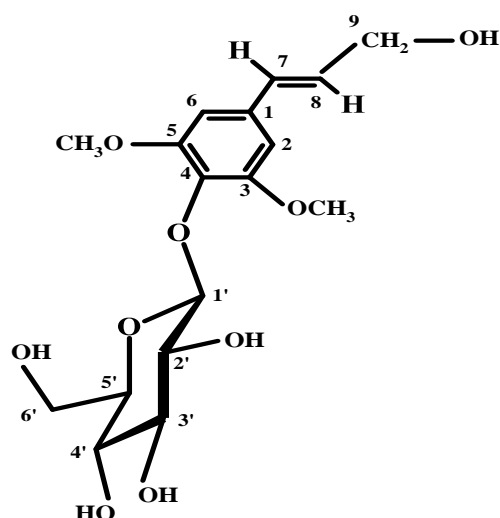


Figure IV.1.43. : Structure du composé Sch 7, lutéoline 7-*O*- β -glucopyranosyle

Tableau IV.1.10 : Résultats de RMN 1H (MeOH-d₄, 600 MHz) du composé Sch7, (SC 43) lutéoline 7-*O*- β -glucopyranosyle

Position	¹ H δ_{ppm} /J(Hz)	¹³ C δ_{ppm} ,
2	-	166,40
3	6,65 s	102,50
4	-	182,25
5	-	-
6	6,53 d (2,2)	99,1
7	-	164,30
8	6,84 d (2,2)	94,80
9	-	157,20
10	-	105,1
1'	-	122,01
2'	7,42 d (2,3)	113,01
3'	-	147,20
4'	-	149,30
5'	6,93 d (8,83)	115,10
6'	7,42 dd 8,3; 2,3	119,90
1''	5,09 d (7,3)	100,05
2''	3,52 m	73,50
3''	2,52 m	76,10
4''	3,43 t (8,8)	69,91
5''	3,56 m	77,05
6''	3,94 dd (12;1,6) 3,74 dd (12; 5,6)	61,02

IV.1.2.3 Elucidation structurale du composé Sch 8 (SC 158-2)



Sch 8

L'examen du spectre RMN-¹H (Figures IV.1.44, IV.1.44.1 , IV.1.44.2) dans le MeOH-*d*₄, montre que ce produit n'est pas bien pur mais permet de relever la présence d'un signal relatif à deux protons aromatiques magnétiquement équivalents car résonant sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}}=6,79$ ppm. Ce signal oriente vers la présence dans cette molécule d'un noyau aromatique tétrasubstitué où au moins deux des substituants sont identiques et placés de façon symétrique sur ce noyau aromatique. Ce spectre montre également la présence de deux groupements CH éthyléniques vicinaux ayant une configuration *trans*. Le proton du premier, résonant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}}=6,60$ ppm ($J=15,5$ Hz), indique qu'il est relié à un carbone quaternaire vu la multiplicité de son signal. Celui du second résonant sous forme d'un doublet de triplets à $\delta_{\text{H}}=6,36$ ppm ($J=15,5 ; 5,5$ Hz) indique qu'il est relié à un groupement CH₂. Cette hypothèse est confirmée par la présence du signal d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=4,26$ ppm ($J=5,5$ Hz). La valeur du déplacement chimique des protons de ce CH₂ ainsi que celle de son carbone porteur relevée grâce au spectre HSQC (Figure IV.1.46) à $\delta_{\text{C}}=62,12$ ppm, sont en faveur d'une oxygénation à ce niveau. On peut donc à ce stade de notre analyse, dire que le composé Sch 8 renferme en plus du noyau aromatique tétrasubstitué, l'entité reportée dans la figure IV.1.46

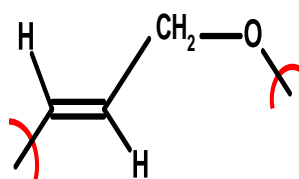


Figure IV.1.46: Entité 1 présente dans le composé Sch8

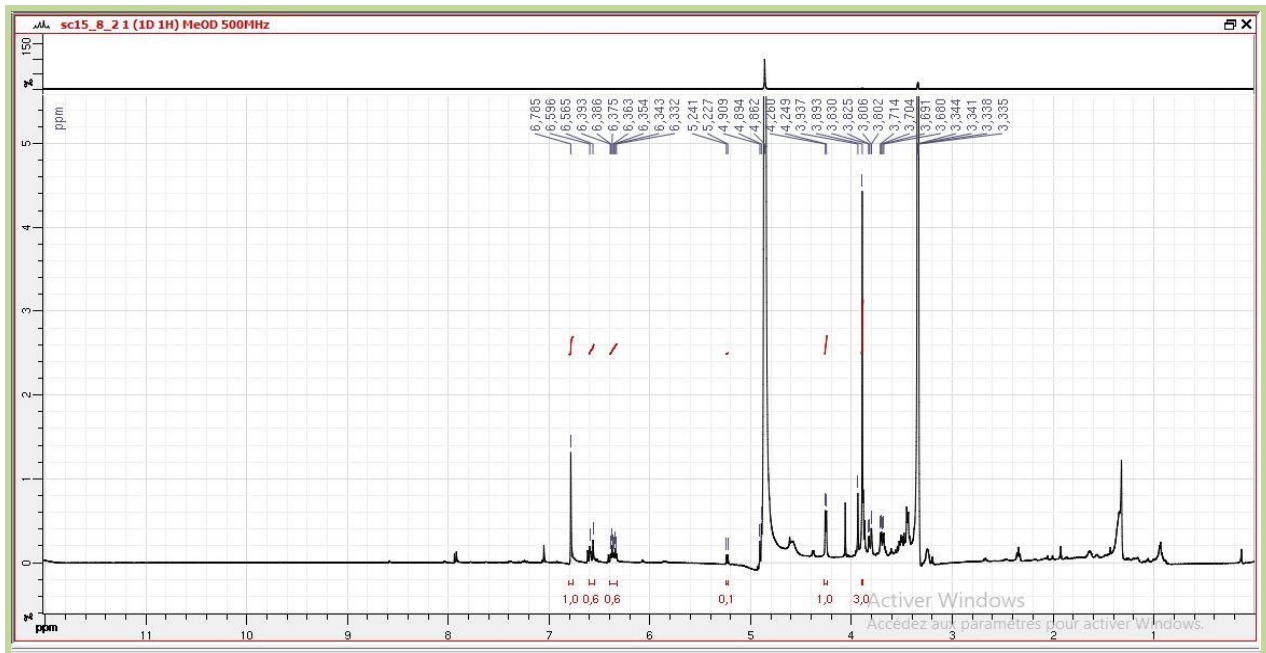


Figure IV.1.44: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 500MHz) du composé Sch8

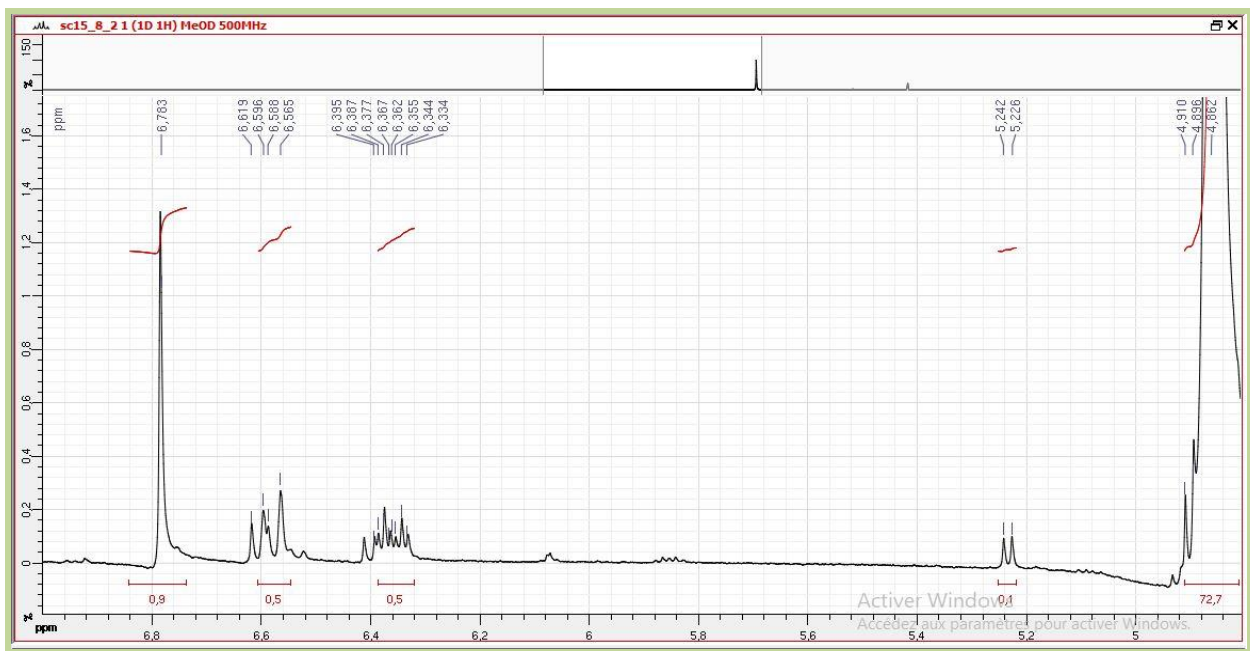


Figure IV.1.44.1 : Spectre RMN-¹H (MeOH-*d*₄, 500MHz) du composé Sch8, étalement 1

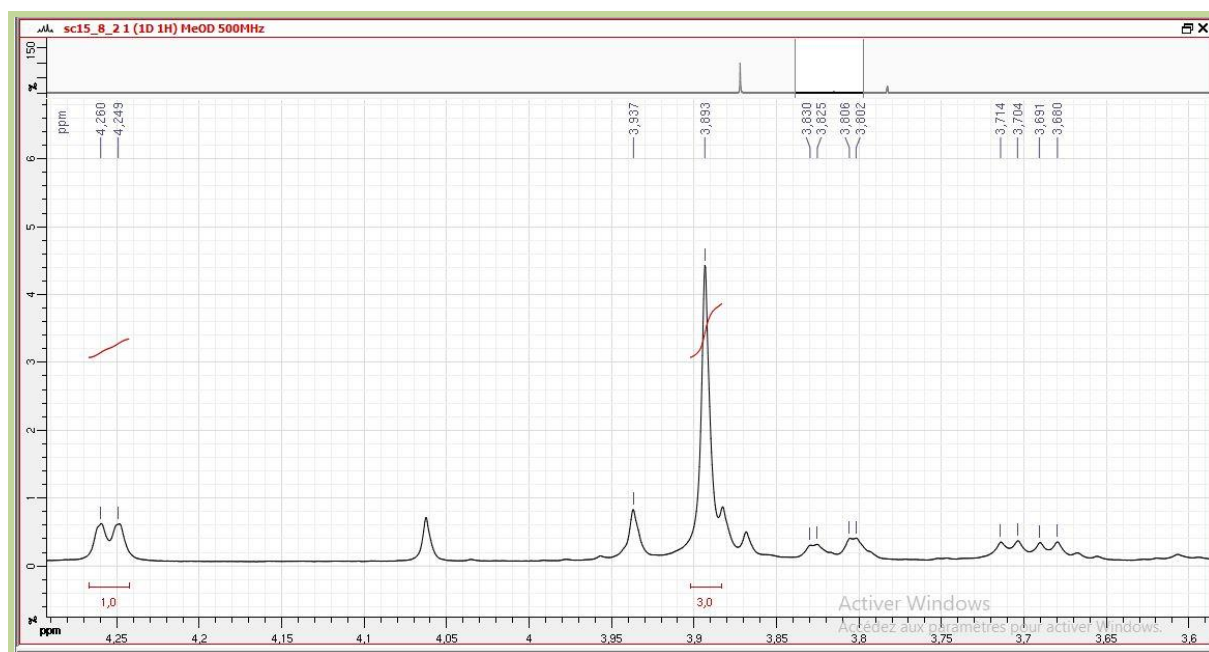


Figure IV.1.44.2: Spectre RMN-¹H (MeOH-*d*₄, 500MHz) du composé Sch 8, étalement 2

L'examen attentif du spectre proton permet de distinguer deux doublets de doublets à $\delta_{\text{H}}=3,81$ ppm ($J=12,5$; $1,1$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=3,69$ ppm ($J=12,5$; $5,5$ Hz) ; caractéristiques des protons de la position C-6 d'une entité sucre de type hexose, nous les numérotions H-6'a et H-6'b, respectivement. La nature hexose du sucre est déduite du spectre HSQC où l'on relève la présence de taches de corrélation notamment.

- celles entre H-6'a et H-6'b et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}= 61,05$ ppm, permettant son attribution au C-6'.
- 5 taches relatives à des groupements CH dont les carbones résonnent à $\delta_{\text{C}}= 74,21$; $76,92$; $70,15$; $76,72$ et $103,90$ ppm. D'après la valeur de son déplacement, le dernier carbone de cette liste ne peut être que le carbone anomérique, on relève alors, le signal du proton anomérique à $\delta_{\text{H}}=4,91$ ppm, totalement recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré. Quant aux 4 autres méthines, la comparaison des déplacements chimiques de leurs carbones avec les données de la littérature a permis leur attribution aux C-2, C-3, C-4 et C-5, respectivement d'un groupement *O*- β -glucopyranosyle. Les protons de ces quatre méthines résonnent entre 3,20 et 3,50 ppm.

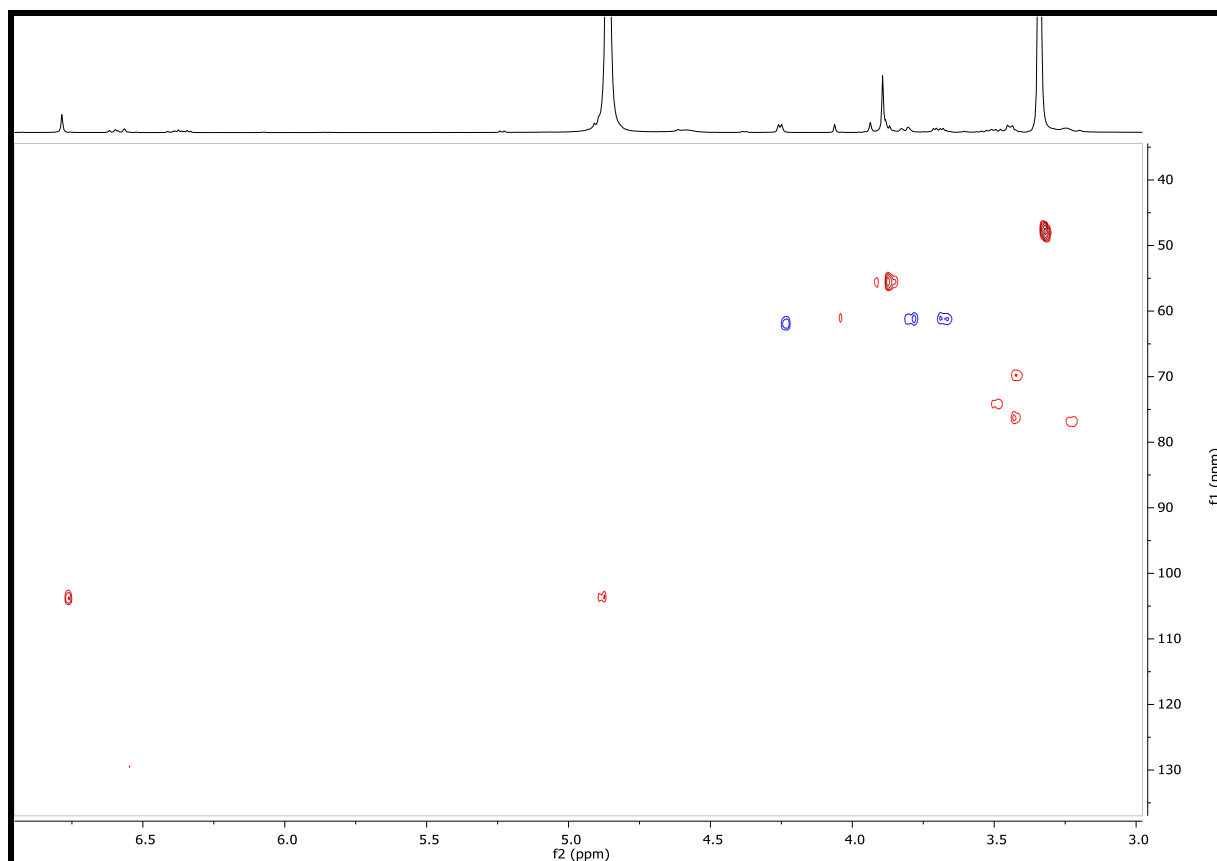


Figure VI.1.45 : Spectre HSQC (MeOH-*d*₄, 500MHz) du composé Sch 8

L'étalement du spectre proton de ce composé permet de relever la présence d'un singulet d'intégration 6H à $\delta_{\text{H}}=3,89$ ppm correspondant sur le spectre HSQC au signal à $\delta_{\text{C}}=56,01$ ppm. Ces données ne peuvent correspondre qu'à deux groupements méthoxyles magnétiquement équivalents, portés par conséquent par deux carbones magnétiquement équivalents.

Sur le spectre HMBC (Figure IV.1.47), les résonances des carbones porteurs de ces deux méthoxyles sont relevées $\delta_{\text{C}}=153,81$ ppm. La valeur des déplacements chimiques de ces deux carbones indiquent qu'ils appartiennent au noyau aromatique précédemment signalé, de plus, vu la symétrie attendue au niveau de ce noyau aromatique, il est évident que ces deux méthoxyles sont soit en C-2 et C-6, soit en C-3 et C-5. De ce fait les deux protons aromatiques magnétiquement équivalents et précédemment signalés sont soit en C-3 et C-5, soit en C-2 et C-6. Ceci est appuyé par la tache de corrélation (spectre HMBC) entre les carbones porteurs des deux méthoxyles ($\delta_{\text{C}}=153,81$ ppm) et ces deux protons aromatiques. Toujours sur le spectre HMBC, ces deux protons aromatiques et les protons du méthylène aliphatique oxygéné, précédemment signalé ($\delta_{\text{H}}=4,26$ ppm) montrent des taches de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=130,90$ ppm. Ce carbone ne peut être que le CH de la double liaison éthylénique

précédemment signalée ($\delta_{\text{H}}=6,60$ ppm ; d ; $J=15,5$ Hz). Cette observation permet d'une part de relier l'entité représentée dans la figure IV.47 au noyau aromatique dans la position C-1 et d'autre part de placer les deux groupements méthoxyyles dans les positions C-3 et C-5 car pour avoir ces corrélations, les deux protons de ce noyau aromatique doivent occuper les positions C-2 et C-6. Grâce au spectre HSQC, les résonances des carbones C-2 et C-6 sont relevées confondues avec celle du carbone anomérique du *O*- β -glucopyranosyle à $\delta_{\text{C}}=103,90$ ppm. Le spectre HMBC montre également une tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=135,02$ ppm qui ne peut être que le carbone C-4 du noyau aromatique, permettant alors de placer le groupement *O*- β -glucopyranosyle en cette position.

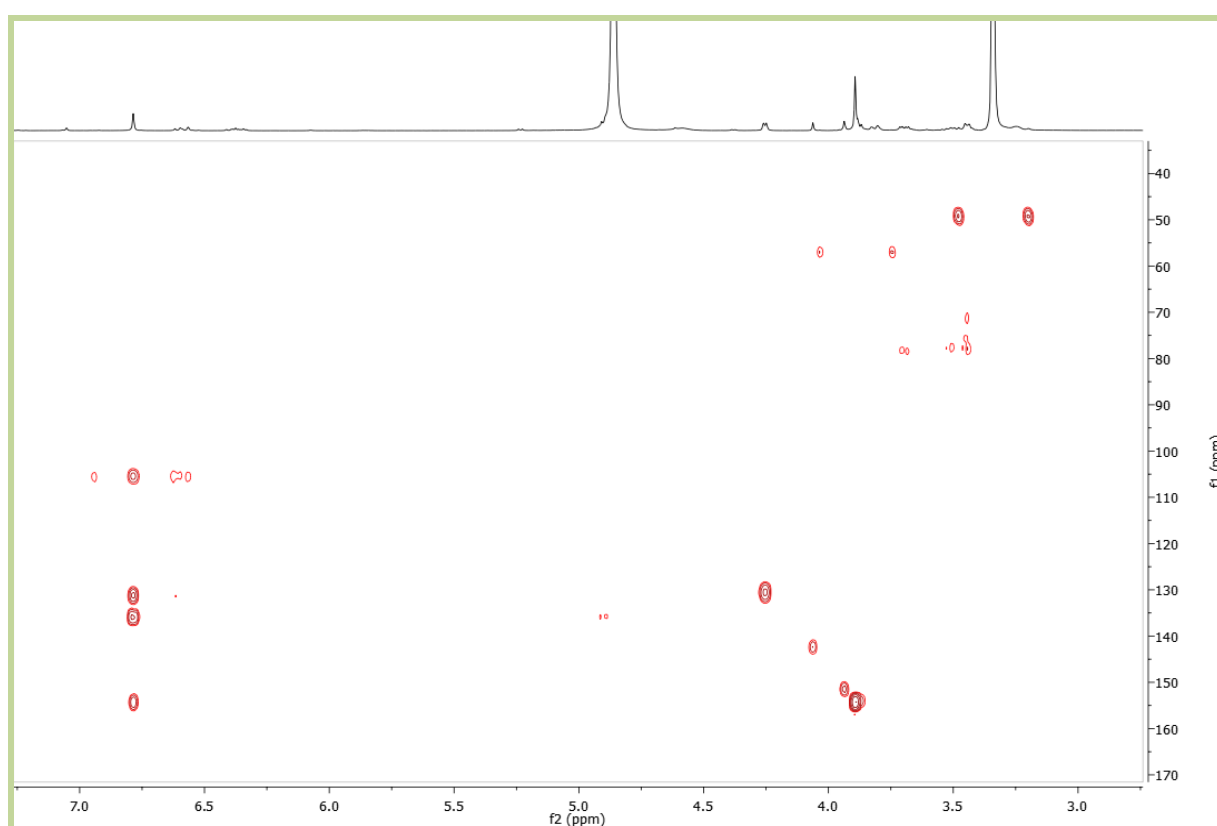


Figure IV.1.47: Spectre HMBC du (CD_3OD , 500MHz) du composé Sch 8

A l'issue de cette analyse, et vu la valeur du déplacement chimique du CH_2 oxygéné ($\delta_{\text{C}}=62,12$ ppm) et l'absence d'autres corrélations entre ce carbone ou ses protons avec d'autres noyaux, il est évident que ce groupement est hydroxylé et que par conséquent, nous sommes en présence de l'alcool *trans*-sinapylique substitué en C-4 par un groupement *O*- β -glucopyranosyle (Figure IV.1.48). Cette molécule est connue sous les noms de syringine et syringoside [8] mais également sous les noms de éléutheroside B, ligustrine, lilacine, magnolénine A, méthoxyconiférine, syrigine et syringénine.

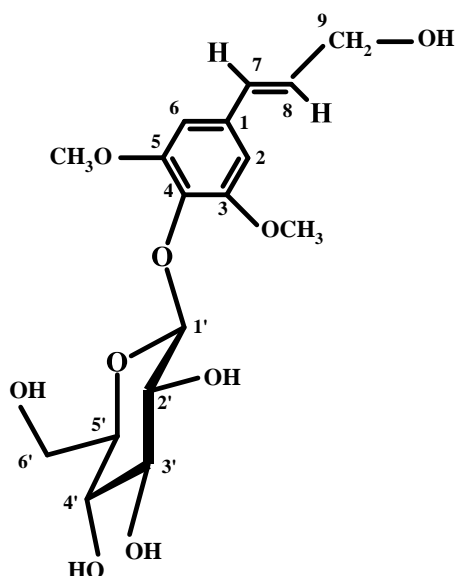


Figure IV.1. 48: Structure finale du composé Sch 8, syringoside

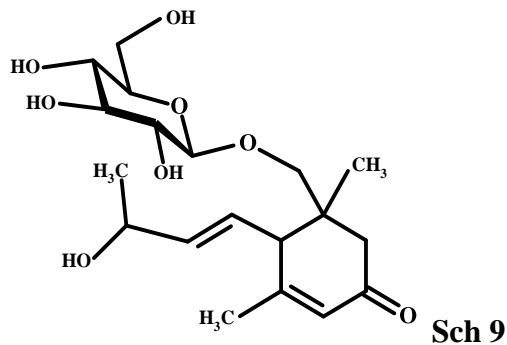
Les données de RMN relatives à ce composé sont regroupées dans le tableau IV.12

Tableau IV.1.11 : Données RMN (MeOH-d₄) du composé Sch8 (SC 158-2), syringoside

Position	¹ H δ _{ppm} J(Hz)	¹³ C δ _{ppm} ,
1	-	Non détecté dans la HMBC
2 et 6	6,79 ; <i>s</i>	103,9
3 et 5	-	153,81
4	-	135,02
7	6,60 ; <i>d</i> (15,5)	130,90
8	6,36 ; <i>dt</i> (15,5; 5,5)	129,36
9	4,26 ; <i>d</i> (5,5)	62,12
1'	4,91*	103,90
2'	3,20 – 3,50 ; <i>m</i>	74,21
3'		76,92
4'		70,15
5'		76,72
6'a		3,81 <i>dd</i> (12,5 ; 1,1)
6'b	3,69 <i>dd</i> (12,5 ; 5,5)	
OCH ₃	3,95	56,01

* Signal totalement recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré

IV.1.2.4 Elucidation structurale du composé Sch 9, SC 7-191-6



L'examen du spectre RMN ^1H (Figures IV.1.50, IV.1.50.1) révèle la présence d'un CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}}=5,58$ ppm ($J=15,2$; 10,0 Hz) et un autre proton éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets large à $\delta_{\text{H}}=5,83$ ppm ($J=15,2$; 5,8 Hz) orientant vers la présence d'une double liaison de configuration *trans* dans cette molécule.

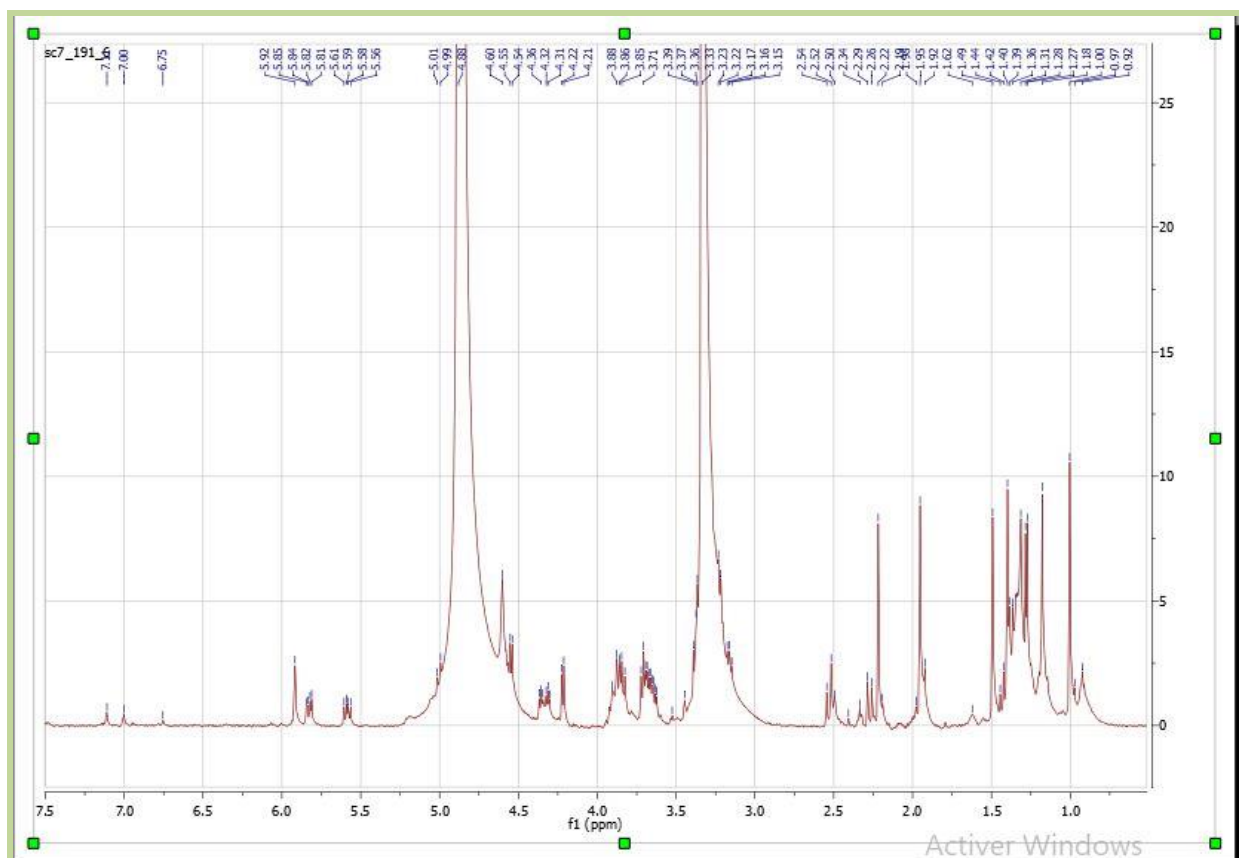


Figure IV.1.49: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé Sch 9

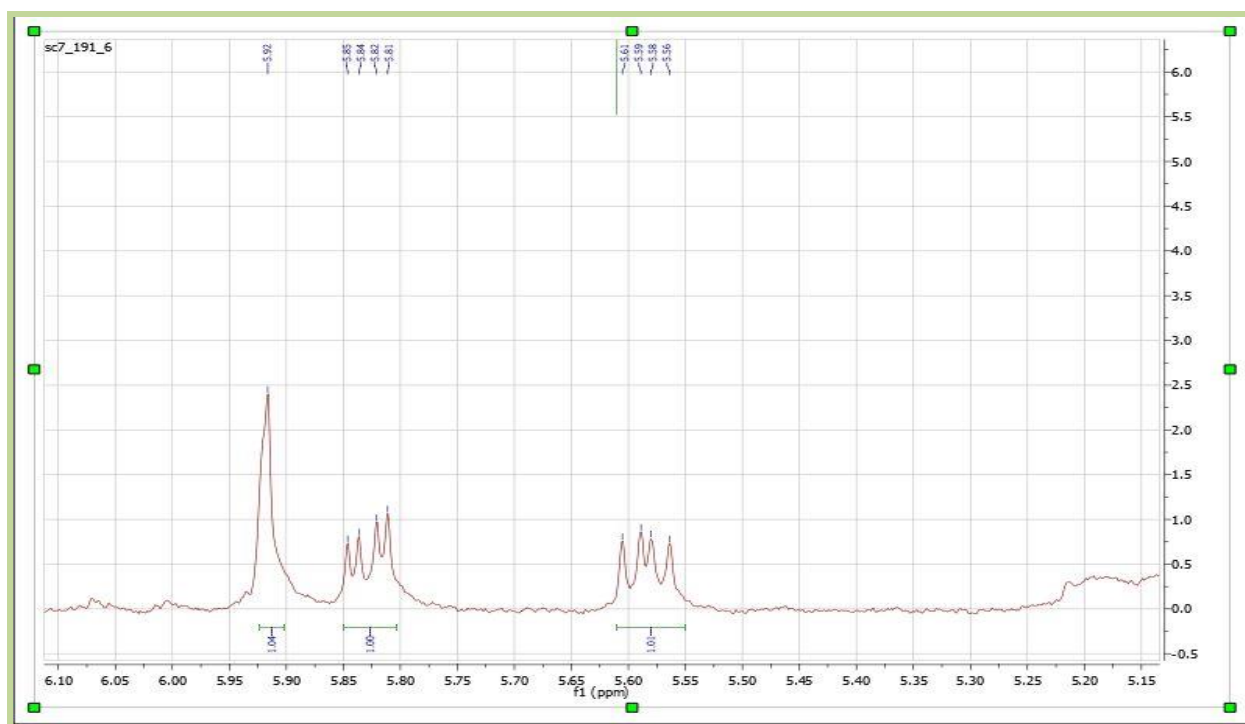


Figure IV.1.49.1: Spectre RMN¹H (CD₃OD, 600MHz), du composé Sch 9 étalement 1

Le spectre COSY (Figure IV.1.50) confirme bien le voisinage de ces deux protons éthyléniques en montrant des taches de corrélation entre eux; le fait qu'ils soient éthyléniques est appuyé par la valeur de leurs déplacements chimiques. Le spectre COSY montre par ailleurs une corrélation nette entre le proton à $\delta_{\text{H}}=5,83$ ppm et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}}=4,33$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce dernier proton indique qu'il est porté par un carbone oxygéné. Le spectre COSY confirme bien cette hypothèse et montre des taches de corrélation entre ce proton oxygéné et les protons du méthyle résonant sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}}=1,28$ ppm ($J=6,4$ Hz). La présence de ce méthyle en cette position est également justifiée par la tache de corrélation observée entre le proton éthylénique ($\delta_{\text{H}}=5,83$ ppm) et les protons de ce méthyle, montrant ainsi un couplage scalaire à longue distance (4J) entre les protons de ces deux groupements.

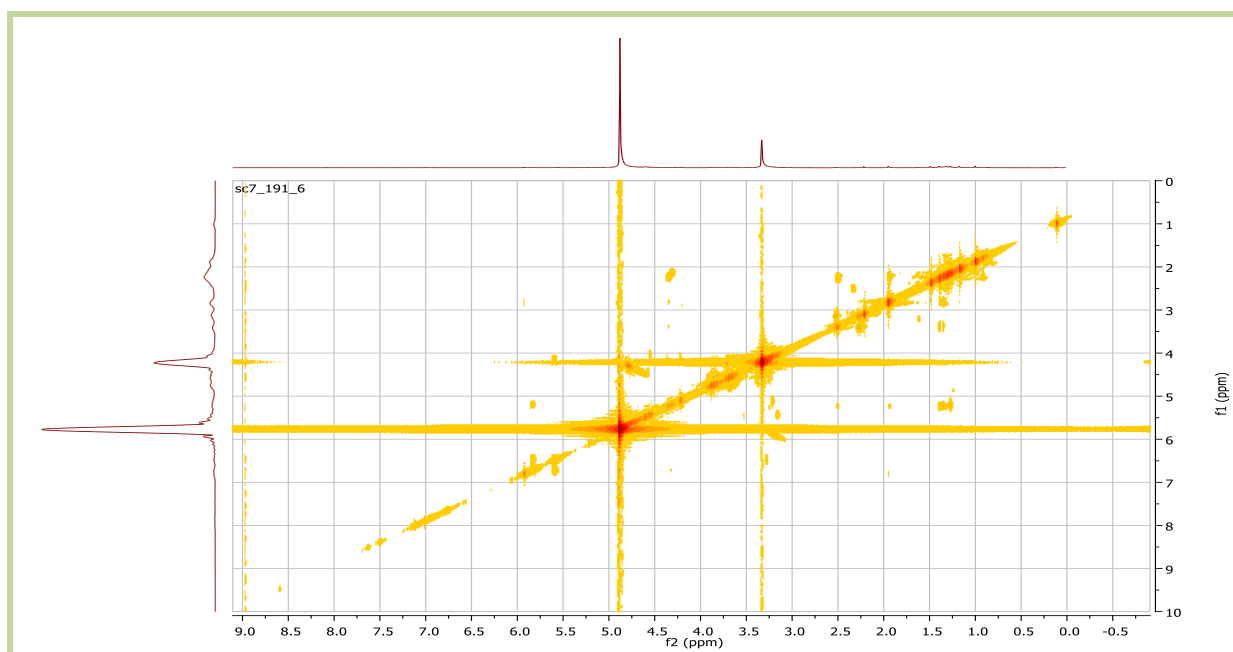


Figure IV.1.50: Spectre COSY (CD₃OD, 600MHz) du composé **Sch 9**

A ce stade de notre analyse nous pouvons proposer la présence dans cette molécule, de l'entité 1 reportée dans la figure IV.1.51 .

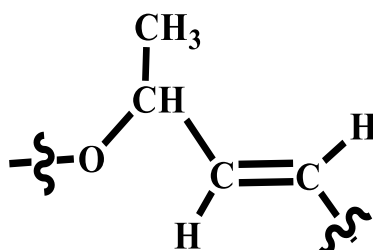


Figure IV.I.51 : Entité 1 présente dans le composé Sch 9.

Toujours sur le spectre COSY le deuxième proton éthylénique invoqué (celui résonnant à $\delta_{\text{H}}=5,58$ ppm) montre une tache de corrélation avec le proton dont le signal est recouvert par celui du solvant et d'autres signaux à $\delta_{\text{H}}=3,20$ ppm le fait que ce signal soit attribué à un seul proton est déduit de la multiplicité du proton éthylénique voisin, dont le signal est sous forme d'un doublet de doublets. Sur le spectre HSQC (Figure IV.1.52) on relève la présence d'un CH₂ dont les protons diastéréotopiques résonnent à $\delta_{\text{H}}=3,4$ et $3,69$ ppm ($\delta_{\text{C}}=76,49$ ppm). D'après la valeur des déplacements chimiques de son carbone et de ses protons, ce groupement méthylène est oxygéné. Sur le spectre HMBC (Figure IV.1.53) le carbone de ce groupement méthylène montre une tache de corrélation avec le proton précédemment

évoqué (celui résonnant à $\delta_{\text{H}}=3,20$ ppm) ; cette observation indique que le carbone de ce groupement CH_2 est à trois liaisons de ce proton; ce qui permet de déduire l'entité 2 reportée dans la figure IV.1.54 dans cette molécule.

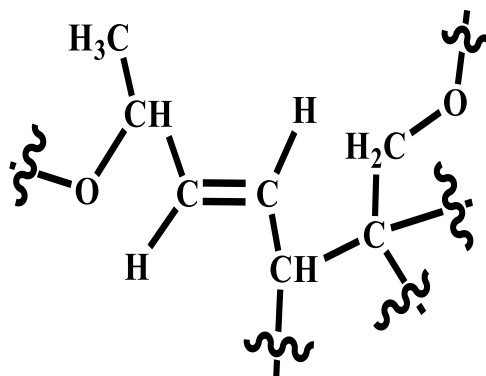


Figure IV.1.54: Entité 2 présente dans le composé Sch 9

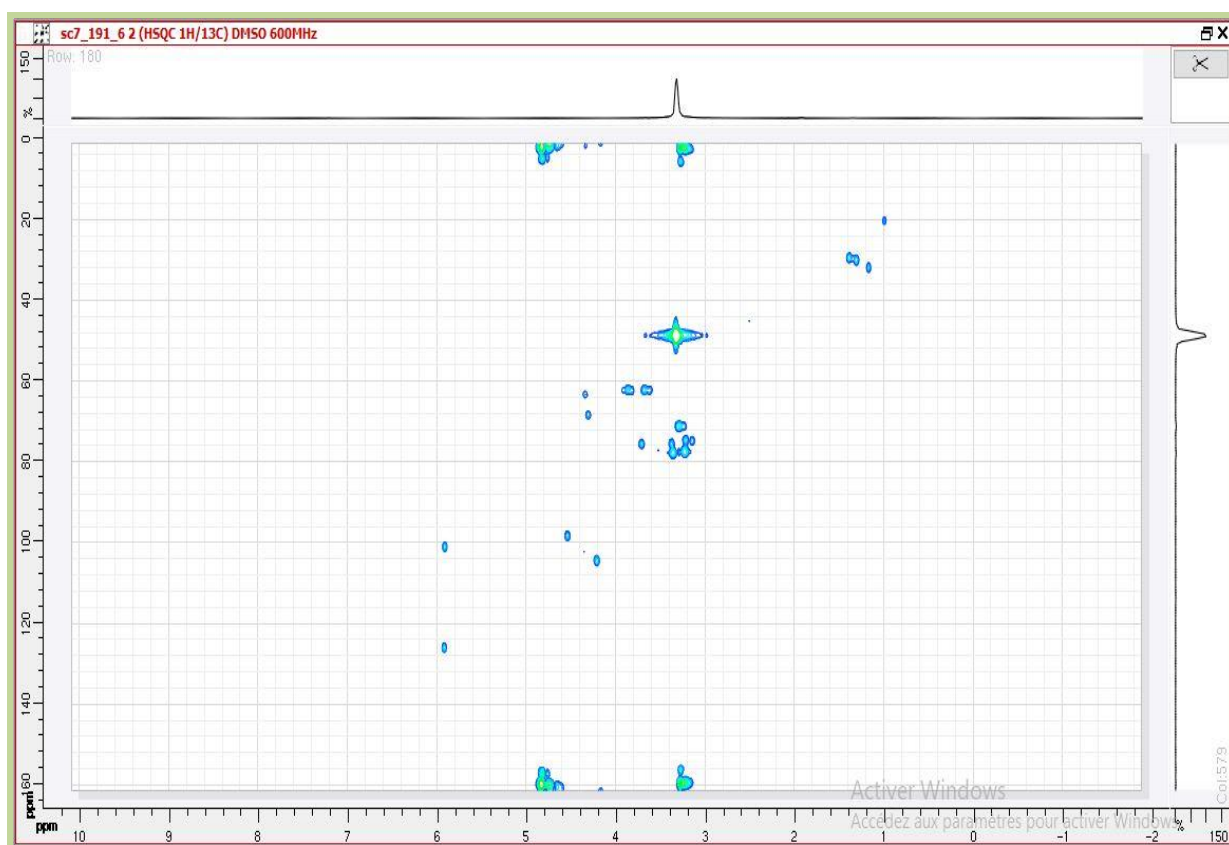


Figure IV.52: Spectre HSQC (CD_3OD , 600MHz) du composé Sch 9



Figure IV.1.53: Spectre HMBC (DMSO-d₆, 600MHz) du composé Sch 9

L'étude du spectre proton et celle du spectre du HSQC montre la présence d'un méthyle résonant sous forme d'un singulet à $\delta_H=1,00$ ppm ($\delta_C=19,58$ ppm). Les valeurs des déplacements chimiques des protons et du carbone de ce méthyle indiquent clairement qu'il est porté par un atome de carbone, quant à sa multiplicité, elle indique que son carbone porteur est quaternaire. Sur le spectre HMBC les protons de ce groupement méthyle montrent une tache de corrélation nette avec le carbone du méthylène oxygéné précédent. Cette observation indique que ce groupement méthyle et ce méthylène oxygéné sont portés par le même atome de carbone quaternaire. Par ailleurs la combinaison des données des spectres proton et HSQC montre clairement la présence d'un autre groupement méthylène dont les protons diastéréotopiques résonnent sous forme d'un système AB à $\delta_H=2,53$ et $2,27$ ppm ($J=16,9$ Hz ; $\delta_C=43,91$ ppm). La valeur du déplacement chimique du carbone de ce méthylène indique qu'il est voisin de deux atomes de carbone, quant à la multiplicité des signaux de ses protons, elle indique que ces deux carbones voisins sont quaternaires. Sur le spectre HMBC, le proton correspondant à la résonance à $\delta_H=2,27$ ppm montre une tache de corrélation avec le carbone du méthylène oxygéné précédent ($\delta_C=76,49$ ppm) ce qui signifie que ces deux groupements méthylènes sont portés par le même atome de carbone quaternaire. Un résumé de l'ensemble de ces données permet de proposer la présence l'entité 3 dans cette molécule (Figure IV.1.55).

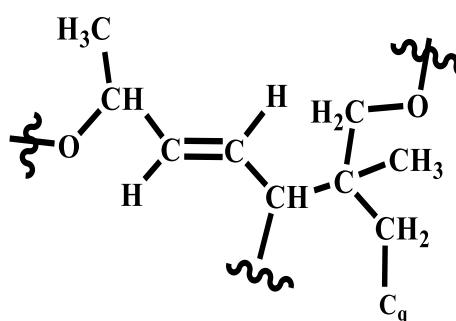


Figure IV.1.55: Entité 3 présente dans le composé Sch 9

Un retour vers les spectres RMN ^1H et HSQC permet de localiser un autre groupement méthyle résonant sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}}=1,85$ ppm ($\delta_{\text{C}}=23,8$ ppm). Sur le spectre HMBC, le carbone de ce méthyle montre une corrélation nette avec le proton du groupement méthine dont la résonance a été précédemment signalée à $\delta_{\text{H}}=3,20$ ppm. Cette observation permet d'une part, de placer ce méthyle sur un carbone quaternaire vu la multiplicité du signal de ses protons et d'autre part, de le placer de façon à ce que son carbone soit à trois liaisons du proton du méthine en question.

Toujours sur le spectre HMBC les protons de ce méthyle ($\delta_{\text{H}}=1,85$ ppm) montrent des taches de corrélation très nettes avec un carbone éthylénique quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}}=164,79$ ppm et un CH éthylénique résonant à $\delta_{\text{C}}=124,8$ ppm. Cette observation indique que le carbone quaternaire porteur de ce méthyle n'est autre que le carbone quaternaire éthylénique ($\delta_{\text{C}}=164,79$ ppm). Cette hypothèse est d'ailleurs en parfait accord avec la valeur du déplacement chimique ($\delta_{\text{H}}=1,85$ ppm) des protons de ce méthyle, quant au proton éthylénique de cette double liaison, la multiplicité de son signal (singulet large à $\delta_{\text{H}}=5,92$ ppm) indique que son carbone est lié à un autre carbone quaternaire.

Un retour vers le spectre HMBC permet de relever des taches de corrélation nettes entre les deux protons du méthylène précédent ($\delta_{\text{H}}=2,53$ et $2,27$ ppm) et le carbone d'une fonction cétone résonant à $\delta_{\text{C}}=202,19$ ppm. Cette observation permet de déduire que le carbone quaternaire précédemment indiqué à la figure IV.1.56 n'est autre que celui de cette cétone. Le déplacement chimique relativement faible de cette cétone est en faveur du fait que cette cétone est conjuguée avec une double liaison. Cette double liaison ne peut être que celle précédemment invoquée. Ainsi nous pouvons donc relier ce carbonyle de cétone au CH éthylénique précédent obtenant ainsi un cycle à six chaînons substitué par une chaîne en C_4 dans la position C-6 et trois en C_1 dont deux dans la position C-1 et une dans la position C-5. Ce type de substitution est propre aux mégastigmanes. En adoptant

la numérotation utilisée pour ce type de structure, nous pouvons donc proposer la présence de l'entité 4, dans ce composé Sch 9 (Figure IV.1.56).

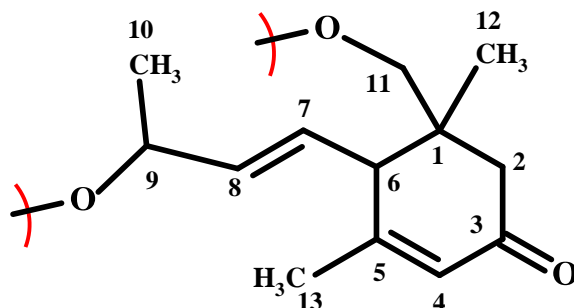


Figure IV.1.56: Entité 4 présente dans le composé Sch 9

En faisant abstraction de l'ensemble des signaux faisant partie de cette entité 4, on remarque la présence de signaux caractéristiques d'un hexose, notamment un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=4,22$ ppm ($J=7,7$ Hz) attribuable au proton anomérique de ce sucre que nous numérotions H-1'. La valeur de la constante de couplage indique qu'il est de configuration β . Grâce au spectre HSQC la résonance du carbone anomérique est repérée à $\delta_{\text{C}}=103,5$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone confirme bien une jonction de ce sucre à la génine par le biais d'un atome d'oxygène. Les signaux des autres carbones de ce sucre sont relevés à:

- $\delta_{\text{C}}=61,20$ ppm (CH_2 , $\delta_{\text{H}}=3,83$ et $3,66$ ppm) pour celui de la position C-6'. Ses deux protons résonant sous forme d'un multiplet chacun, sont de ce fait attribués à H-6'a et H-6'b, respectivement. Ces signaux sont superposés à d'autres signaux.
- $\delta_{\text{C}}=69,9$ ppm ($\delta_{\text{H-4}'}=3,28$ ppm) pour le C-4'
- $\delta_{\text{C}}=73,64$ ppm ($\delta_{\text{H-2}'}=3,21$ ppm) pour le C-2'
- $\delta_{\text{C}}=78,2$ ppm ($\delta_{\text{H-3}'}=3,33$ ppm) pour le C-3'
- $\delta_{\text{C}}=77,49$ ppm ($\delta_{\text{H-5}'}=3,34$ ppm) pour le C-5'

Il est à noter que les signaux de H-2', H-3', H-4' et H-5' ne sont pas résolus et sont recouverts par le signal du solvant.

Les valeurs des déplacements chimiques de ces atomes de carbone sont compatibles avec ceux des carbones d'un groupement *O*-glucopyranosyle [3].

Ainsi ce mégastigmane de type 3-oxo α -ionol est substituée par un groupement *O*- β -glucopyranosyle. En réexaminant le spectre HMBC, on relève une tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone du méthylène oxygéné ($\delta_{\text{C}}=76,49$ ppm) correspondant à la

position C-11 du squelette mégastigmane. Cette observation indique d'une part, que cette molécule est *O*-glucosylée en cette position et d'autre part, qu'elle est hydroxylée en C-9 vu que ce carbone est oxygéné en cette position et qu'il n'y a plus de groupements hydrocarbonés sur les spectres de ce composé. La valeur du déplacement chimique de ce carbone ($\delta_C=68,8$ ppm) est en excellent accord avec cette hypothèse. D'après nos résultats comparés à ceux de la bibliographie le composé **Sch 9** est : 3-oxo- α ionol 11-*O*- β -D-glucopyranoside connu sous le nom de junipeionolosite [9] (Figure IV .1.57). Cette molécule isolée pour la première fois du genre *Santolina*, est nouvelle pour toute la famille Asteraceae.

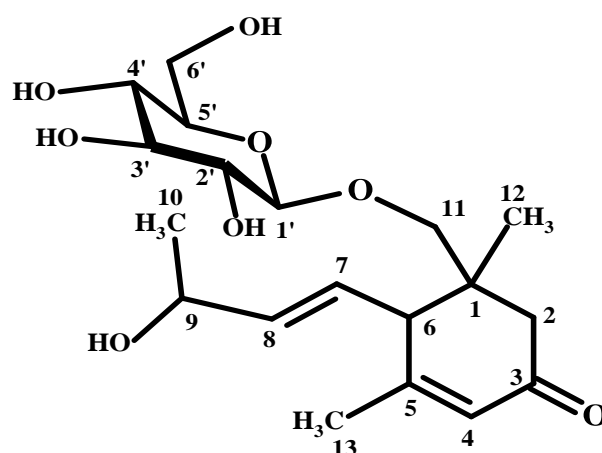


Figure IV.1.57: Structure du composé Sch 9 (SC-7-191-6), junipeionolosite

Les données de RMN relatives à cette molécule sont reportées dans le tableau IV.1.13.

Tableau IV.1.12 : données spectrales de RMN ^1H et ^{13}C

	^1H δ_{ppm} /J(Hz)	^{13}C δ_{ppm}
1	-	41,8
2a	2,53 <i>d</i> (16,9)	43,91
2b	2,27 <i>d</i> (16,9)	
3	-	202,19
4	5,92 <i>sl</i>	124,8
5	-	164,79
6	3,20 <i>m</i> *	50,6
7	5,58 <i>dd</i> (15,2 ; 9,8)	126,4
8	5,83 <i>dd</i> (15,2 ; 5,8)	141,2
9	4,33 <i>m</i>	68,8

Tableau IV.1.13 Suite: données spectrales de RMN ^1H et ^{13}C

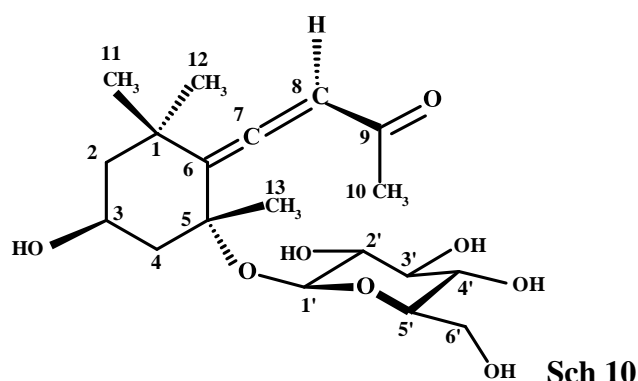
10	1,28 <i>d</i> (6,4)	23,8
11a	3,69 §	76,49
11b	3,34 *	
12	1,00 <i>s</i>	19,58
13	1,85 <i>s</i>	23,8
1'	4,22 <i>d</i> (7,7)	103,5
2'	3,19 *	74,64
3'	3,37 *	78,2
4'	3,28 *	71,4
5'	3,21 *	77,49
6'a	3,83 <i>m</i> §§	61,20
6'b	3,66 <i>m</i> §	

* : Signaux non résolus se chevauchant et recouverts par le signal du solvant.

§ : Signaux non résolus car partiellement recouverts

§§ : Signaux non résolus car partiellement recouverts

IV.1.2.5 Elucidation structurale du composé Sch 10, SC 7-1-7



L'examen des spectres RMN ^1H (Figure IV.1.58) et HSQC (Figure IV.1.59) enregistrés dans le MeOH- d_4 sur un spectromètre opérant à 600 MHz, indique la présence de signaux caractéristiques d'un hexose, notamment un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=4,55$ ppm ($J=7,5$ Hz) attribuable au proton anomérique de ce sucre, que nous numéroterons H-1'. La valeur de la constante de couplage indique qu'il est de configuration β . Grâce au spectre HSQC la résonance du carbone anomérique est repérée à $\delta_{\text{C}}=97,39$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone indique bien une jonction de ce sucre à la génine par le biais d'un atome d'oxygène. Les résonances des autres carbonos de ce sucre sont relevés à :

- $\delta_{\text{C}}=60,10$ ppm pour celui de la position C-6' (CH_2 , $\delta_{\text{H}}=3,85$ et 3,65 ppm). Ses deux protons résonant sous forme d'un doublet de doublets chacun, sont alors attribués à H-6'a et H-6'b, respectivement.
- $\delta_{\text{C}}=70,36$ ppm pour le C-4'

- $\delta_C=73,20$ ppm pour le C-2'
- $\delta_C=76,10$ ppm pour le C-3'
- $\delta_C=75,76$ ppm pour le C-5'

Sur le spectre proton, les signaux de H-2', H-3', H-4' et H-5' apparaissent dans l'intervalle 3,15 à 3,36 ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de cet hexose sont en faveur d'un groupement *O*-glucopyranosyle [3].

On retiendra donc, que cette molécule est un glucopyranoside.

La poursuite de l'analyse des spectres RMN ^1H et HSQC indique la présence de signaux caractéristiques d'un mégastigmane notamment la présence de 2 méthyles résonant sous forme de singulets à $\delta_H=1,41$ ppm ($\delta_C=29,24$ ppm) et $\delta_H=1,18$ ppm ($\delta_C=31,6$ ppm). Sur le spectre HMBC (Figure IV.1.61) les protons de l'un corrélient avec le carbone de l'autre et vis-versa. Cette observation indique qu'ils sont géminés, vu leurs multiplicités, leur carbone porteur est quaternaire. Nous attribuons la position C-1 à ce carbone quaternaire dont la résonance est relevée à $\delta_C=37,21$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons de ces deux méthyles que nous attribuons alors aux positions C-11 et C-12, respectivement, de ce mégastigmane. D'après les valeurs des déplacements chimiques des protons de ces méthyles on déduit que le CH₃-11 admet une orientation équatoriale soit β et le CH₃-12 admet par conséquent, une orientation axiale soit α . Toujours sur le spectre HMBC, les protons de ces 2 méthyles corrélient avec le carbone d'un groupement CH₂ résonant à $\delta_C=48,8$ ppm ; cela indique que ce CH₂ est relié au carbone C-1, nous pouvons alors attribuer la position C-2 au carbone de ce méthylène. Grâce au spectre HSQC, on relève les signaux de H-2a soit H-2eq et H-2b soit H-2ax à $\delta_H=1,91$ ppm (m) et 1,34 ppm (t, 12 Hz), respectivement. Sur le spectre HMBC, le proton H-2ax montre une corrélation en 2J avec le carbone résonant à $\delta_C=63,8$ ppm. D'après le spectre HSQC, ce carbone est un méthine, la résonance de son proton est relevée à $\delta_H=4,36$ ppm sous forme d'un multiplet. D'après les valeurs des déplacements chimiques de ce carbone et de son proton, il s'agit d'un oxyméthine que nous attribuons alors, à la position C-3. D'après les valeurs des constantes de couplage relevées dans le signal de H-2ax, il est clair que H-3 admet une orientation axiale soit α . De ce fait, le groupement oxygéné substituant le carbone C-3, admet une orientation équatoriale soit β . Nous pouvons alors proposer la présence de l'enchaînement reporté dans la figure IV.1.61 dans cette molécule.

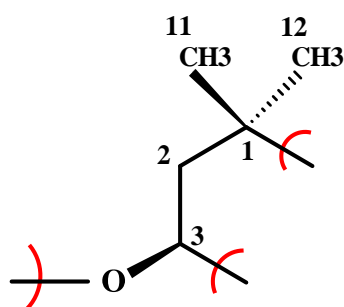


Figure IV.1.61 : Entité 1 présente dans la molécule Sch 10

Les protons des deux méthyles précédents et toujours sur le même spectre (HMBC), montrent des taches de corrélation avec un carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C=119,34$ ppm. Cette nouvelle observation indique que ce carbone quaternaire éthylénique est relié au C-1. Vu que nous sommes en présence d'un squelette de type mégastigmane, ce carbone éthylénique quaternaire sera affecté à la position C-6. Sur le spectre proton, on relève la présence d'un troisième méthyle à $\delta_H=1,50$ ppm ($\delta_C=26,16$ ppm) dont les protons corrélient sur le spectre HMBC avec un carbone quaternaire oxygéné résonnant à $\delta_C=78,82$ ppm. Ce dernier carbone montre une corrélation nette avec le proton anomérique du glucopyranosyle. Cette observation indique que ce groupement méthyle est le groupement glucopyranosyle sont portés par le même carbone quaternaire oxygéné (celui résonnant à $\delta_C=78,82$ ppm). On remarque également une corrélation nette entre les protons de ce troisième méthyle et le carbone éthylénique précédent, ces hypothèses sont en faveur d'une jonction entre le carbone éthylénique et le carbone quaternaire oxygéné porteur de ce méthyle et de l'entité glucopyranosyle. Ce carbone quaternaire oxygéné sera donc affecté à la position C-5 du squelette mégastigmane, quant au carbone de ce troisième méthyle, il sera affecté à la position C-13. A ce stade de notre analyse nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la figure IV.1.62 dans la molécule Sch 10.

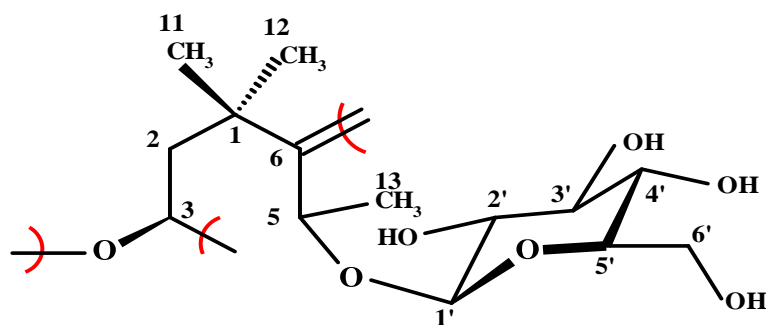


Figure IV.1.62: Entité 2 présente dans la molécule Sch 10

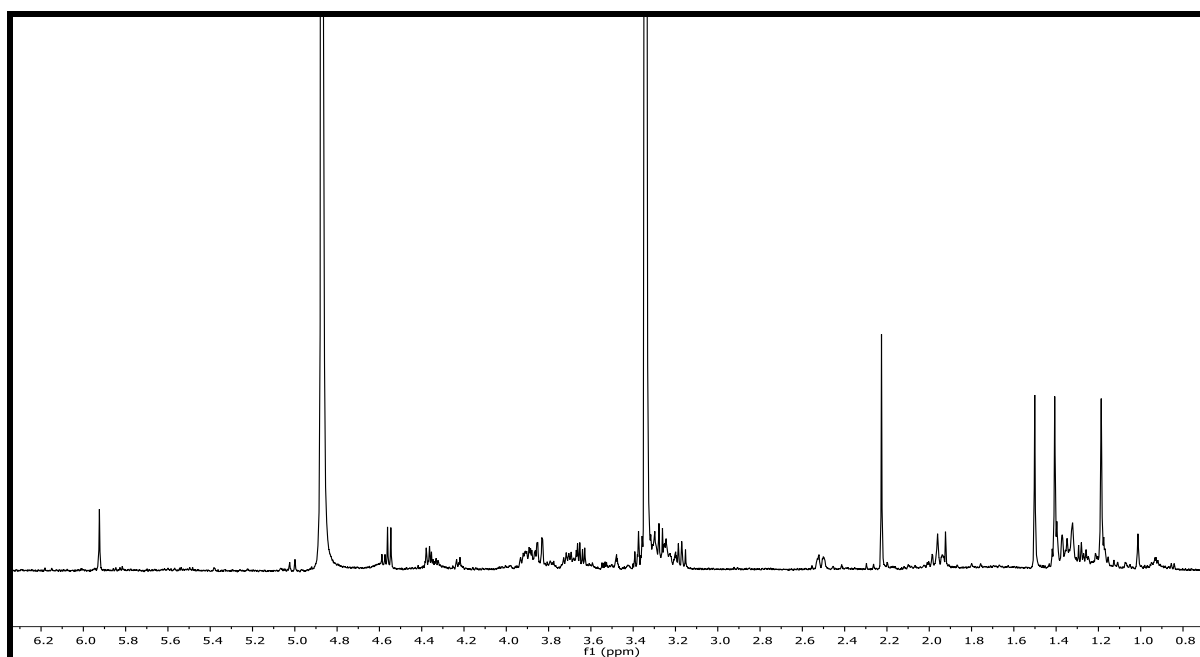


Figure IV.1.58: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) du composé Sch 10

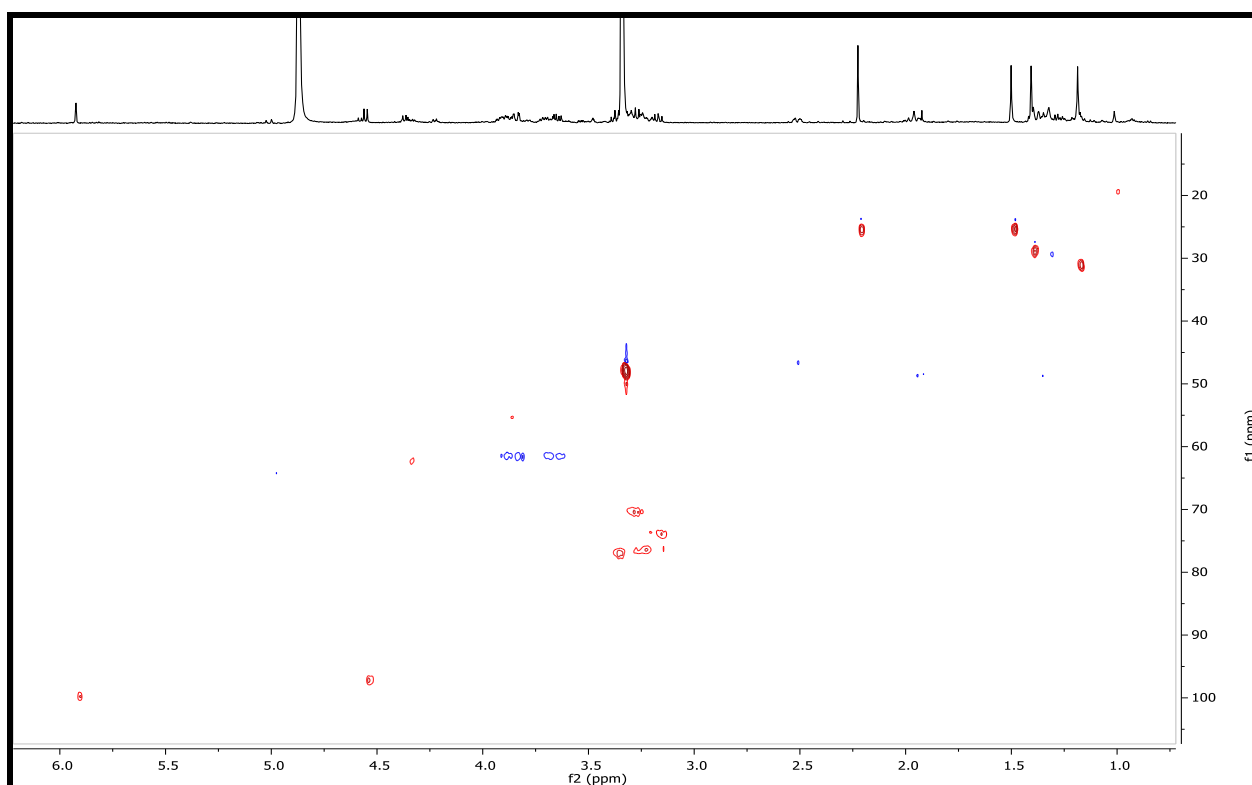


Figure IV.1.59: Spectre HSQC (MeOH-*d*₄, 600MHz) du composé Sch 10

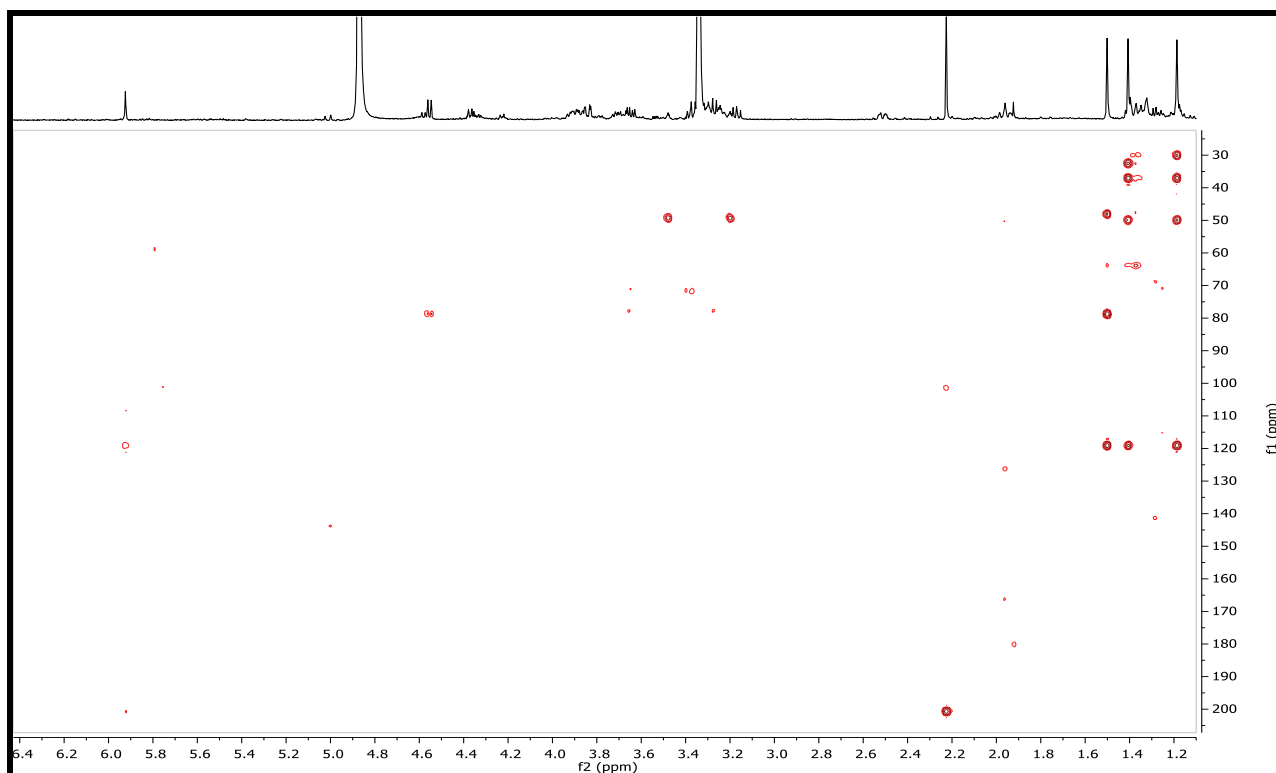


Figure IV.1.60: Spectre HMBC (MeOH- d_4 , 600MHz) du composé Sch 10

On observe également (spectre HMBC) une corrélation entre les protons du troisième méthyle et le carbone d'un groupement méthylène résonant $\delta_C=47,95$ ppm. Cette autre observation indique que ce méthylène est attaché au carbone porteur du groupement glucopyranosyle et de ce méthyle et sera donc affecté à la position C-4. Sur le spectre HSQC on relève la résonance des protons de ce méthylène, soient H-4a ou H-4eq à $\delta_H=2,51$ ppm et H-4b ou H-4ax à $\delta_H=1,36$ ppm (Figure IV.1.63).

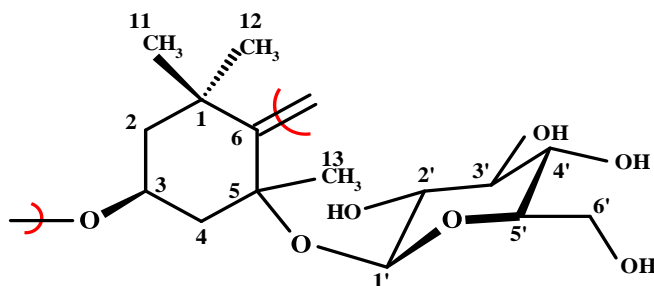


Figure IV.1.63: Entité 3 présente dans la molécule Sch 10

Le spectre RMN ^1H montre par ailleurs la présence d'un singulet d'intégration 1H à $\delta_H=5,92$ ppm ; sur le spectre HSQC, le carbone porteur de ce proton résonne à $\delta_C=99,76$ ppm. Les

valeurs des déplacements chimiques de ce carbone et son proton, indiquent qu'il s'agit d'un méthine éthylénique. Ce spectre montre également la présence d'un quatrième méthyle dont les protons résonnent à $\delta_H=2,23$ ppm ($\delta_C=26,16$ ppm). Les valeurs des déplacements chimiques des protons et du carbone de ce méthyle sont en faveur de sa présence en α d'un carbonyle [10]. Sur le spectre HMBC, les protons de ce méthyle corrélerent avec le carbone du méthine éthylénique ($\delta_C=99,76$ ppm). Cette observation indique d'une part, que ces protons et ce carbone sont situés à trois liaisons de distance, ce qui appuie la présence du groupement acétyle préconisé par les données de RMN et explique la valeur du déplacement chimique relativement basse du carbone du méthine éthylénique due à la conjugaison de sa double liaison avec le carbonyle de l'acétyle. Il est évident que cet enchainement de trois carbones fait partie de la chaîne en C₄ placée en position C-6 du squelette mégastigmane. Il est clair que le CH₃ de cette entité représente le bout de cette chaîne, nous pouvons d'ores et déjà lui attribuer la numérotation C-10 ; le carbone du carbonyle correspond donc à la position C-9, le carbone du méthine éthylénique à la position C-8. Cette hypothèse est largement supportée par les corrélations relevées sur le spectre HMBC entre les protons H₃-11, H₃-12, H₃-13 et H-8 et le carbone éthylénique C-6 ($\delta_C=119,34$ ppm). Vu le fait que les carbones C-6 et C-8 sont hybridés sp², il est évident que le carbone C-7 est hybridé sp. En effet et toujours sur le spectre HMBC, on relève des corrélations entre les protons H₃-10, et H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=200,74$ ppm qui ne peut être que le C-7. La valeur du déplacement chimique de ce carbone C-7 confirme bien son état d'hybridation sp.

Ces données mènent à la structure partielle reportée dans la figure IV.1.64

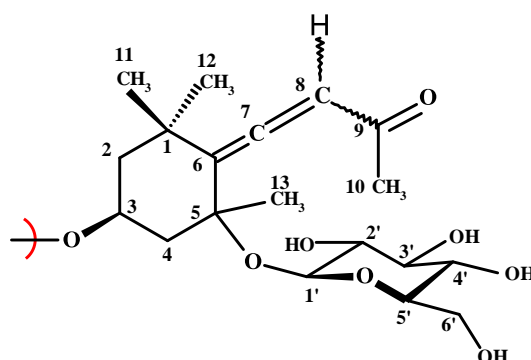


Figure IV.1.64 : Structure partielle la molécule Sch 10

Vu la valeur du déplacement chimique du carbone C-3 ($\delta_C=63,8$ ppm) il est évident que ce carbone est hydroxylé. En matière de stéréochimie, l'orientation équatoriale (β) du groupement hydroxyle est déjà établie ; de même l'orientation équatoriale (β) du méthyle C-13 est déduite

de la valeur du déplacement chimique de ses protons qui est relativement élevée ($\delta_{\text{H}}=1,50$ ppm), on peut par conséquent déduire que le groupement glucopyranosyle admet une orientation axiale (α). A ce stade de notre, on peut dire selon l'orientation α ou β de H-8 dans l'entité allène, cette molécule est soit le citroside A soit le citroside B. Pour trancher entre les deux, nous nous sommes basés sur le déplacement de ce proton dont la valeur relativement basse est en faveur d'une orientation α .

Ainsi, l'ensemble des données de la RMN mono et bidimensionnelle, rassemblées dans le tableau IV.1.14, mène à la structure du composé **Sch 10** (Figure IV.1.65) qui est donc le citroside A [10]. Cette molécule est nouvelle pour la famille Asteraceae.

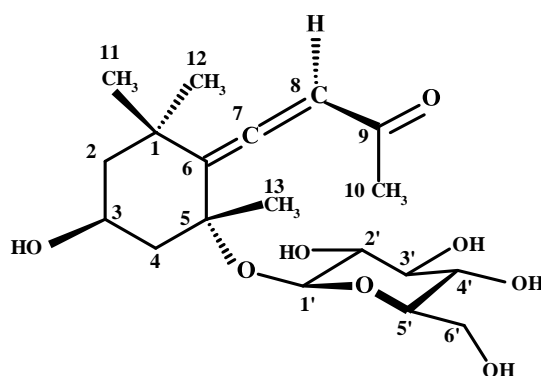


Figure IV.1.65 : Structure finale du composé **Sch 10**, citroside A

Tableau IV.1.13 : données spectrales de RMN ^1H et ^{13}C du composé Sch 10

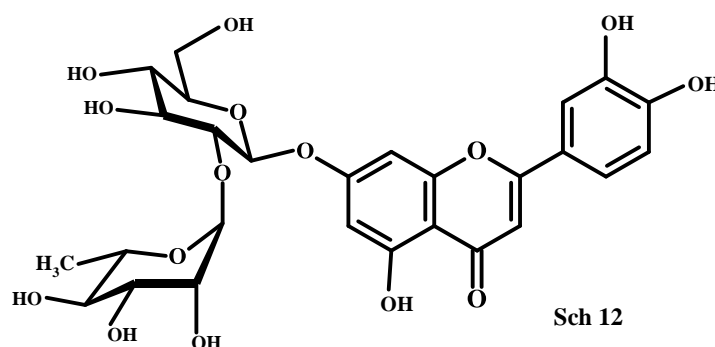
	^1H δ_{ppm} / $J(\text{Hz})$	^{13}C δ_{ppm}
1	-	37,21
2-ax	1,34 <i>t</i> (12)	48,8
2-eq	1,91 <i>m</i>	
3	4,36 <i>m</i>	63,8
4-ax	1,36 <i>t</i> (12)	47,95
4-eq	2,51 <i>m</i>	
5	-	78,82
6	-	119,34
7	-	200,9
8	5,92 <i>s</i>	99,76
9	-	Non détecté, (213,1)*
10	2,23 <i>s</i>	26,16
11	1,41 <i>s</i>	29,24
12	1,18 <i>s</i>	31,6

Tableau IV.1.14 : données spectrales de RMN ^1H et ^{13}C du composé Sch 10

13	1,50 <i>s</i>	26,16
1'	4,55 <i>d</i> (7,5)	97,39
2'	3,15-3,36	73,2
3'		76,1
4'		70,36
5'		75,76
6'a		3,85 <i>dd</i> (11 ; 2)
6'b	3,65 <i>dd</i> (11 ; 5,5)	

*: Résultat bibliographique [10]

IV .1.2.6 Elucidation structurale du composé Sch 11, SC F7-1-17



L'examen du spectre RMN ^1H (Figure IV.1.66) du composé Sch 11 montre la présence de signaux caractéristiques d'un flavonoïde reconnaissable en particulier par :

- Un signal d'intégration 2H constitué d'un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}}=7,47$ ppm ($J=8,2$; 2,2 Hz) partiellement recouvert par un autre doublet centré à $\delta_{\text{H}}=7,46$ ppm ($J=2,2$ Hz) attribuable aux protons H-6' et H-2', respectivement.
 - Un proton qui résonne en un doublet à $\delta_{\text{H}}=6,96$ ppm ($J=8,2$ Hz) attribuable à H-5'
 - Deux doublets d'intégration 1H chacun, à $\delta_{\text{H}}=6,79$ ppm ($J=2,1$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=6,58$ ppm ($J=2,1$ Hz) attribuables à H-8 et H-6, respectivement.
 - Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,66$ ppm attribuable à H-3
- Ces données sont en faveur d'une flavone de type lutéoline.

Ce spectre montre également des signaux orientant vers la présence de 2 sucres grâce aux signaux caractéristiques de 2 protons anomériques. Le premier résonant à $\delta_{\text{H}}=5,1$ ppm ($J=7,3$ Hz) et le second à $\delta_{\text{H}}=4,78$ ppm ($J=1,3$ Hz).

L'hydrolyse acide de ce composé et la cochromatographie de la phase aqueuse (concentrée) avec des sucres témoins indiquent la présence d'un glucose et d'un rhamnose. La présence du

rhamnose est largement appuyée par un doublet d'intégration 3H ($J=6,2$ Hz) à $\delta_H=1,25$ ppm sur le spectre RMN ^1H , attribuable au CH_3-6 et également la valeur de la constante de couplage ($J=1,3\text{Hz}$) de son proton anomérique d'où l'on peut déduire une configuration $\alpha\text{-L}$ du rhamnose ce qui est généralement observé pour ce type de sucre. Vu la valeur du déplacement chimique du proton anomérique du glucose ($\delta_H=5,1$ ppm), on déduit qu'il est relié à la génine par le biais d'un atome d'oxygène, quant à la valeur de la constante de couplage relevée dans son signal, elle indique une configuration β de son carbone anomérique. Les signaux des autres protons des deux sucres apparaissent dans l'intervalle 3,4- 4,2 ppm.

Pour placer les 2 sucres sur le squelette lutéoline, nous avons fait appel à la série spectrale UV-visible (Figure IV.1.67 ; tableau IV.1.15) du composé natif. En effet, enregistré dans le méthanol, le spectre UV de ce composé montre 2 bandes la première à $\lambda_{\text{max}}=349$ nm et la seconde à $\lambda_{\text{max}}=256$ nm confirmant la nature flavone de cette molécule. L'addition d' AlCl_3 dans la solution méthanolique montre un déplacement bathochrome de la bande I indiquant une complexation de AlCl_3 par des sites. Après addition de HCl dans la solution précédente, le spectre montre un effet hypsochrome de la bande I indiquant ainsi la présence d'un système *ortho* di-OH sur le noyau B notamment dans les positions C-3' et C-4'. La comparaison de ce dernier spectre avec le spectre pris dans le méthanol montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=39$ nm) indiquant donc la présence d'un complexe stable avec AlCl_3 et par conséquent un OH libre en C-5.

A ce stade de notre analyse nous sommes donc en présence d'une lutéoline substituée en C-7 par un groupement *O*-gluc-*O*-rham c'est-à-dire que les deux sucres sont reliés entre eux et ne peuvent être qu'en position C-7. Concernant la jonction rhamnose-glucose les valeurs des déplacements chimiques des protons anomériques ($\delta_H = 5,1$ et $4,78$ ppm) permettent de proposer une jonction 1-2 [11] et la comparaison par cochromatographie. De ce fait l'entité sucre en C-7 de la lutéoline est le groupe néohesperidoside.

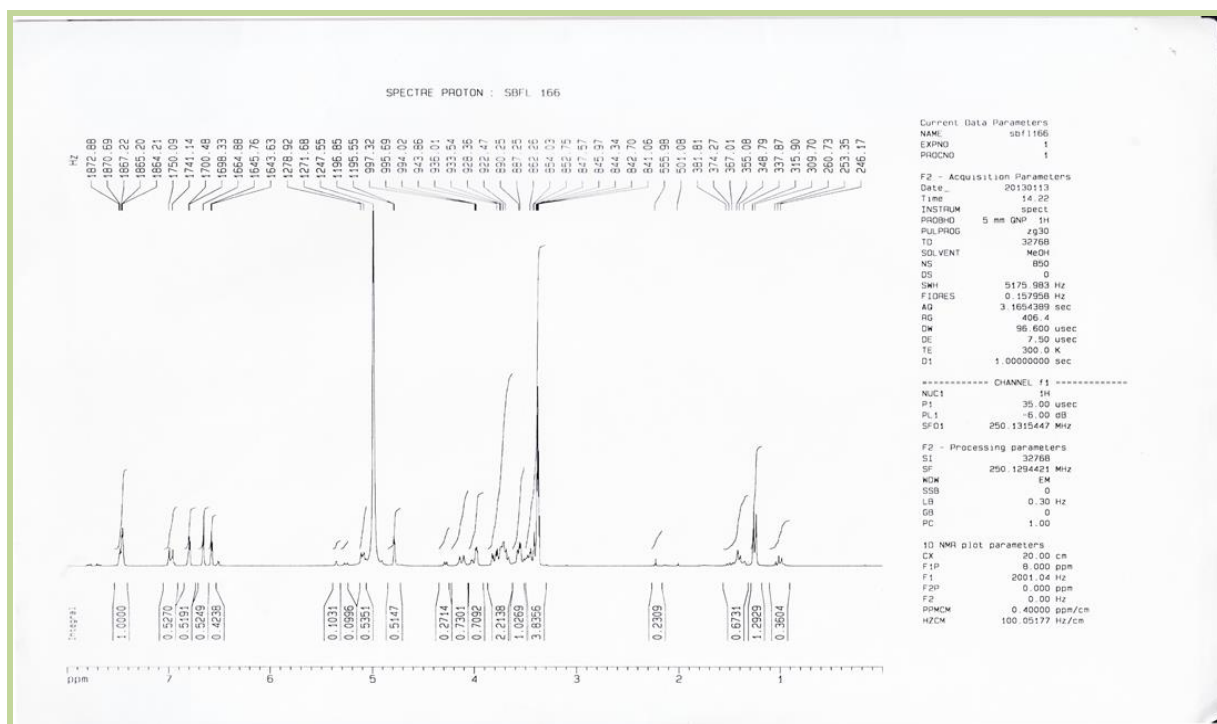


Figure IV.1.66: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 250MHz) du composé Sch 11

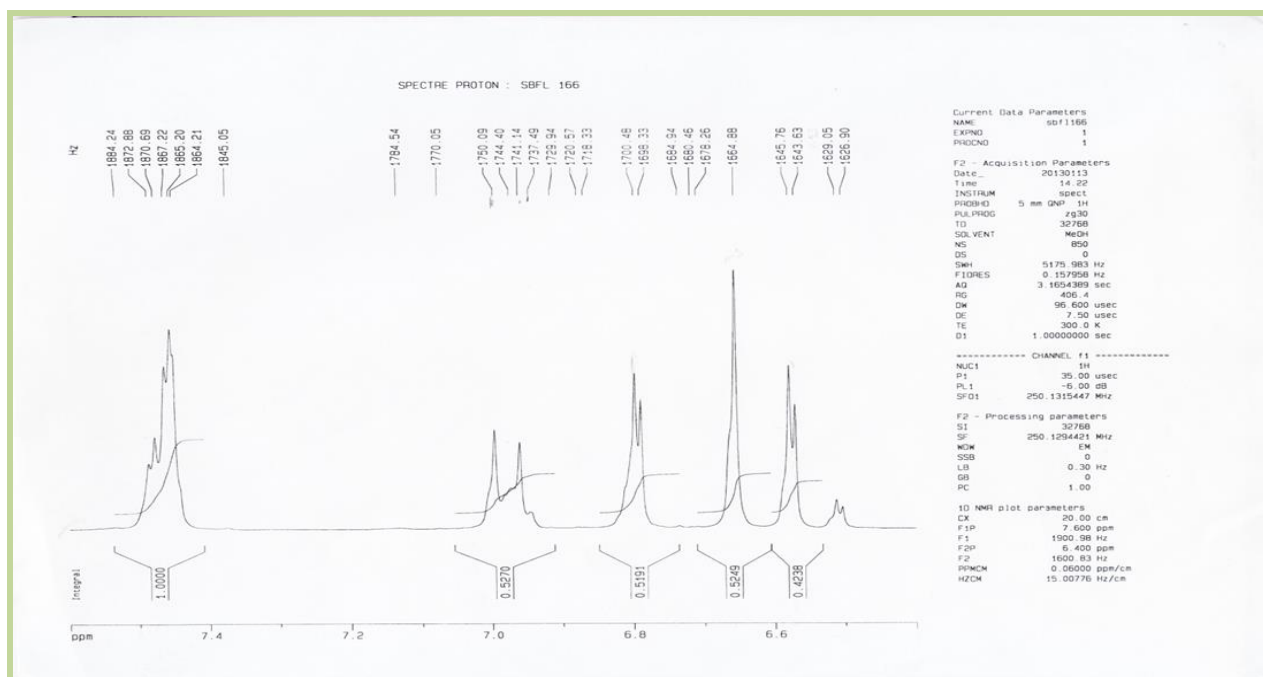


Figure IV.1.66.1: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 250 MHz) du composé Sch 11, étalement 1

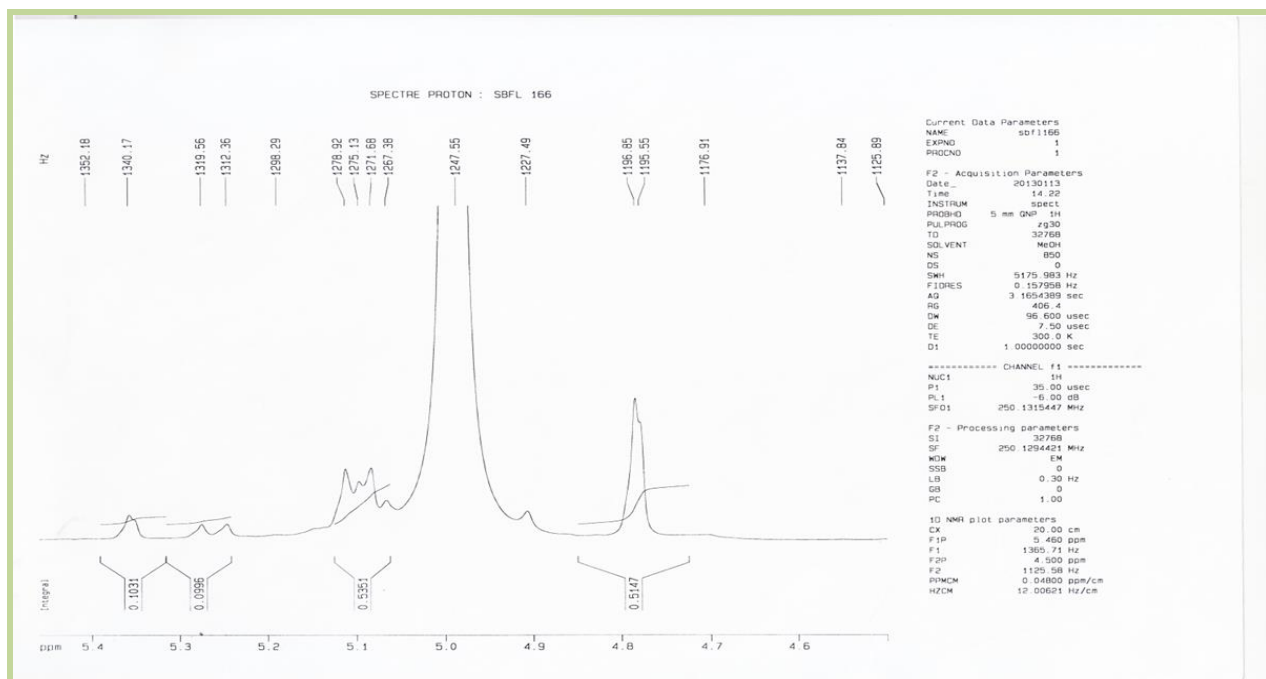


Figure IV.1.66.2: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 250 MHz) du composé Sch 11, étalemt 2

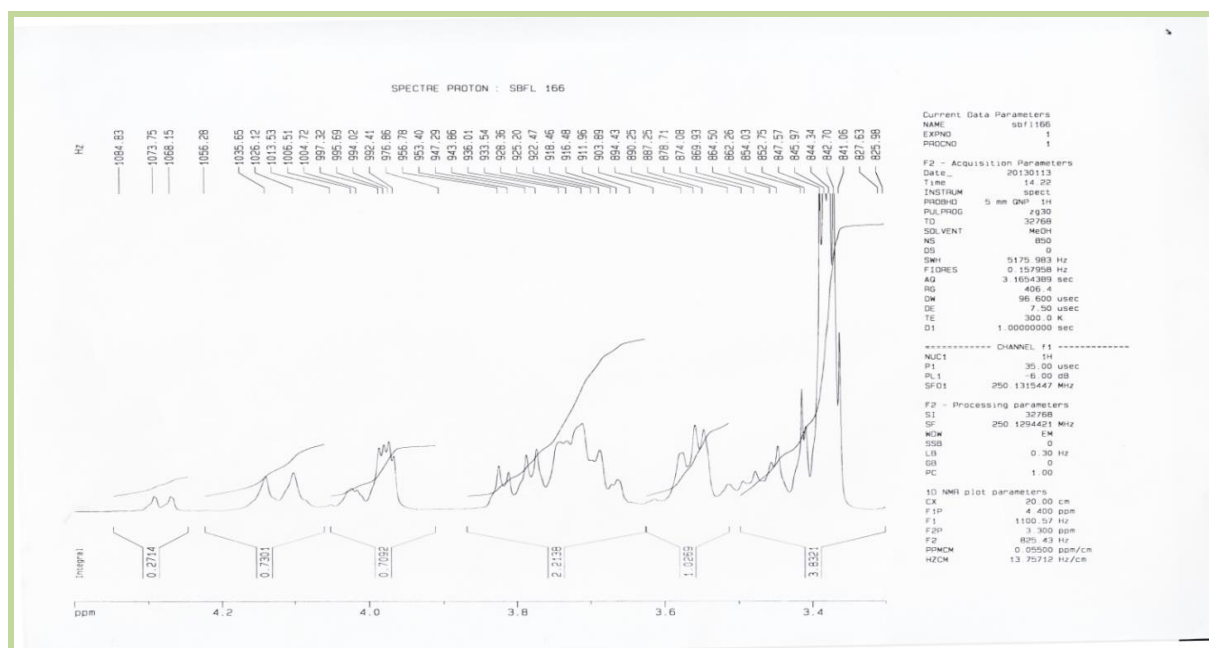


Figure IV.1.66.3: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 250 MHz) du composé Sch 11, étalemt 3

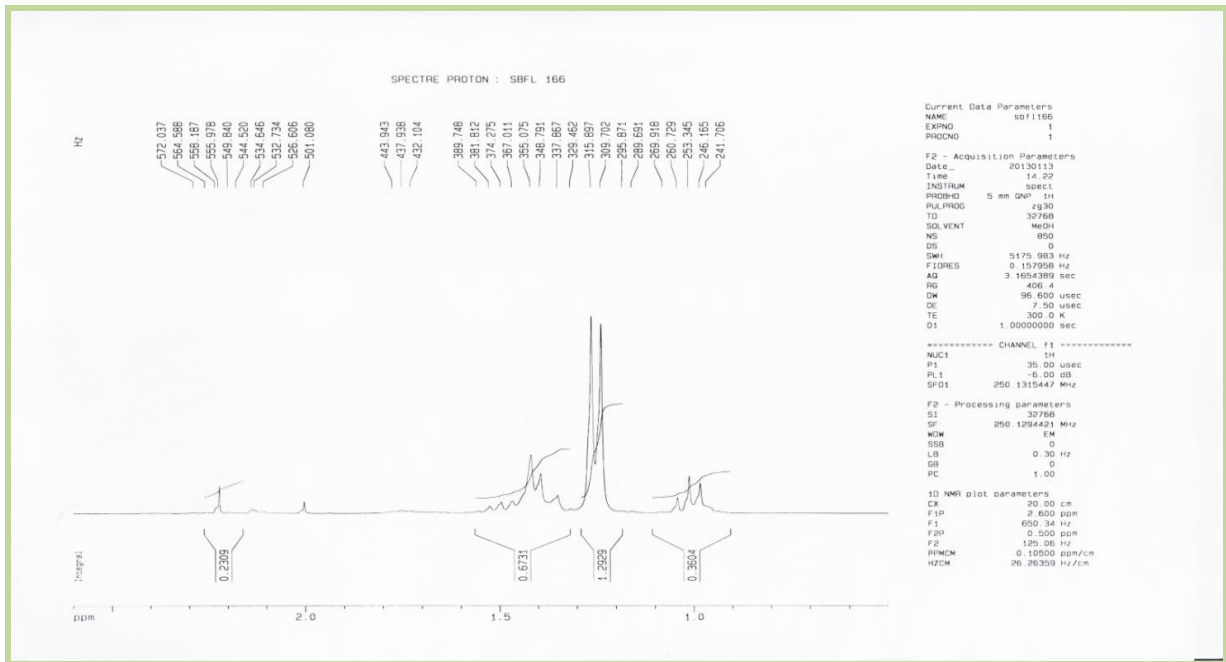
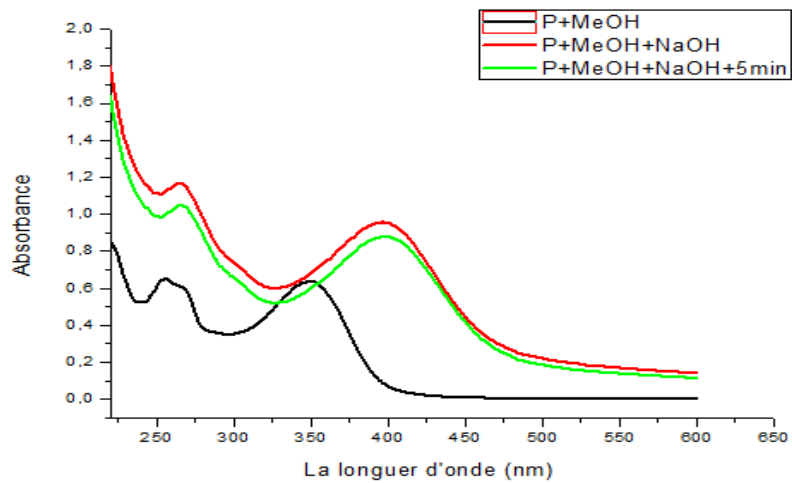


Figure IV.1.66.4: Spectre RMN¹H (MeOH-*d*₄, 250 MHz) du composé Sch 11, étalement 4



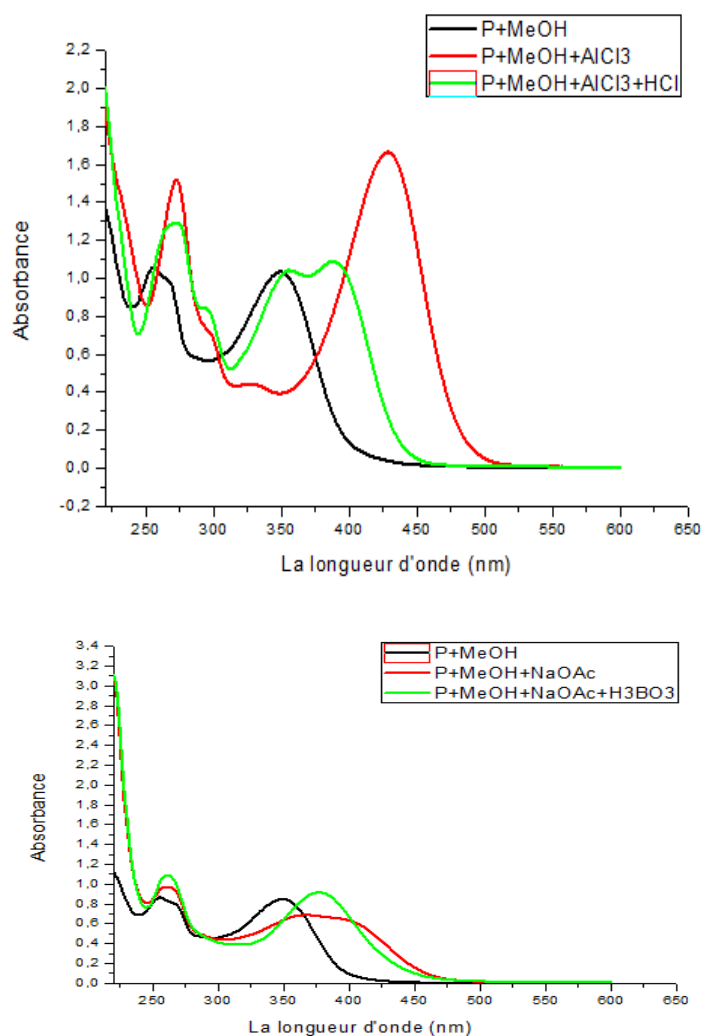


Figure IV.1.67:série spectrale UV-Visible du composé Sch 11

Tableau IV.1.15 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé Sch 11

Réactifs	Bande I (nm)	Autres Bandes (nm)	Bande II (nm)	Interprétations
MeOH	349		256	
+NaOH	398		264	OH libre en 4'
+AlCl ₃	429	327	274	OH libre en 5 <i>o</i> -di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ +HCl	373		261	
+NaOAc	373		258	7-OR
NaOAc+H ₃ BO ₃	376		262	<i>o</i> -di-OH sur le noyau B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn, confirme la nature flavone				

Les données de RMN ^1H regroupées à ceux de la spectroscopie UV-Visible mènent à la structure du composé Sch 12 (Figure IV.1.68), molécule connu sous le nom de lutéoline 7-*O*- β -D-néohesperidoside, lonicérine. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Santolina*.

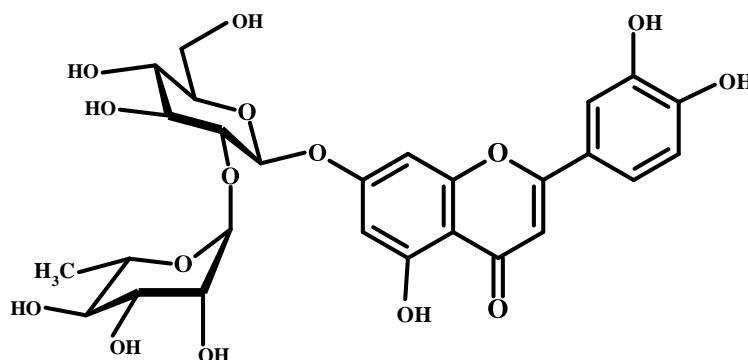
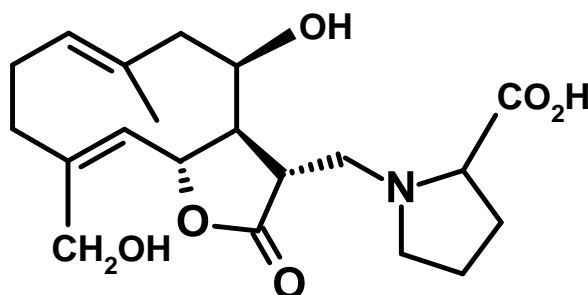


Figure IV.1.68: Structure du composé Sch 11, lutéoline 7-*O*- β -D-néohesperidoside

IV.2 Identification des produits isolés de l'espèce *Centaurea pungens*

IV.2.1 Elucidation structurale du composé CP1 (MF 17) isolé de la phase *n*-butanol



CP1

Le spectre de masse à haute résolution de ce composé enregistré en mode electrospray négatif [HR-ESIMS (-)] montre un ion quasi- moléculaire à $m/z=378,1925$ correspondant à l'ion $[M-H]^-$ indiquant une formule $C_{20}H_{28}NO_6$ (calculé pour $C_{20}H_{28}NO_6$: 378,1917) et orientant alors vers une molécule de formule brute $C_{20}H_{29}NO_6$ de masse 379 Da, soit une molécule comportant 7 insaturations. La présence de l'atome d'azote dans cette molécule est justifiée d'une part par la haute résolution et donc la recherche de la composition élémentaire et d'autre part par le fait que la masse de cette molécule est impaire indiquant alors la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote.

L'examen du spectre d'absorption infrarouge montre la présence d'une bande à 1775 cm^{-1} en faveur d'un groupe de type γ - lactone.

La combinaison des données des spectres RMN ^1H (Figure IV.2.1) et HSQC (Figure IV.2.2) de cette molécule montre la présence de :

- 1 CH_3 à $\delta_{\text{H}}=1,44$ ppm résonant sous forme d'un singulet dont le carbone est localisé à $\delta_{\text{C}}=16,9$ ppm.
- 8 groupements CH_2 que nous pouvons répartir grâce aux valeurs de leurs déplacements chimiques et de leurs carbones porteurs comme suit :

- ❖ 5 CH₂ non oxygénés
 - $\delta_{\text{H}}=2,20$ ppm ; m; $\delta_{\text{C}}=26,6$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=2,62$ ppm ; m et 1,95 ppm ; m ; $\delta_{\text{C}}=35,3$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=2,62$ ppm ; m et 2,40 ppm ; m ; $\delta_{\text{C}}=52,6$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=2,15$ ppm ; m et 2,00 ppm ; m ; $\delta_{\text{C}}=24,5$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=2,47$ ppm ; m et 2,32 ppm ; m ; $\delta_{\text{C}}=29,8$ ppm
- ❖ 1CH₂ Oxygéné
 - $\delta_{\text{H}}=4,23$ ppm d ($J=13,3$ Hz) et 4,00 ppm d ($J=13,3$ Hz) ; $\delta_{\text{C}}=60,5$ ppm
- ❖ 2CH₂ Azotés, vu les valeurs des déplacements chimiques de leurs protons et de leurs carbones et surtout la présence d'un atome d'azote dans cette molécule.
 - $\delta_{\text{H}}=3,63$ ppm dd ($J=12,9$; 5,5 Hz) et 3,67 ppm dd ($J=12,9$; 6,6 Hz) ; $\delta_{\text{C}}=57,9$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=3,86$ ppm m et 3,23 ppm ; m ; $\delta_{\text{C}}=55,9$ ppm

Le spectre RMN ¹H présente également 7 groupements CH que nous pouvons répartir grâce aux valeurs de leurs déplacements chimiques et de leurs carbones porteurs comme suit :

- ❖ 2 CH oxygénés
 - $\delta_{\text{H}}=5,16$ ppm t ($J=9,6$ Hz) ; $\delta_{\text{C}}=78,1$ ppm. Le déplacement chimique élevé du carbone de ce méthine est caractéristique d'un CH de la fermeture d'une γ -lactone. Cette hypothèse est consolidée par la famille et le genre de l'espèce étudiée. En effet, le genre *Centaurea* est connu pour être un excellent accumulateur de lactones sesquiterpéniques [12]
 - $\delta_{\text{H}}=4,05$ ppm ddl ($J=12,0$; 3,2 Hz); $\delta_{\text{C}}=71,8$ ppm
- ❖ 2 CH non oxygénés
 - $\delta_{\text{H}}=2,35$ ppm td ($J=9,6$; 3,2 Hz) ; $\delta_{\text{C}}=58,3$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=3,32$ ppm m ; $\delta_{\text{C}}=43,9$ ppm
- ❖ 2 CH éthyléniques
 - $\delta_{\text{H}}=5,00$ ppm dd ($J=10,6$; 5,9Hz) ; $\delta_{\text{C}}=129,4$ ppm
 - $\delta_{\text{H}}=4,82$ ppm d ($J=10,0$ Hz) ; $\delta_{\text{C}}=129,2$ ppm
- ❖ 1 CH azoté, vu la valeur du déplacement chimique de son proton et surtout la présence d'un atome d'azote dans cette molécule.
 - $\delta_{\text{H}}=3,98$ ppm dd ($J=9,2$; 3,7 Hz); $\delta_{\text{C}}=71,4$ ppm

La valeur du déplacement chimique du carbone de ce dernier groupement méthine oriente vers en plus de la présence à son voisinage de l'atome d'azote celle d'un groupement électroattracteur.

Un décompte des atomes invoqués dans l'ensemble de ces groupements y compris la γ -lactone, mène à la formule brute partielle $C_{17}H_{26}NO_4$. Connaissant la formule brute de cette molécule ($C_{20}H_{29}NO_6$) on peut déduire la présence dans cette molécule de 3 carbones quaternaires en plus de celui du carbonyle de la γ -lactone et trois protons échangeables vu que le solvant utilisé est le $MeOH-d_4$. Sachant que l'atome d'azote est trisubstitué (relié à 2 méthylènes et 1 méthine), on peut déduire la présence de 3 groupements OH dans cette molécule.

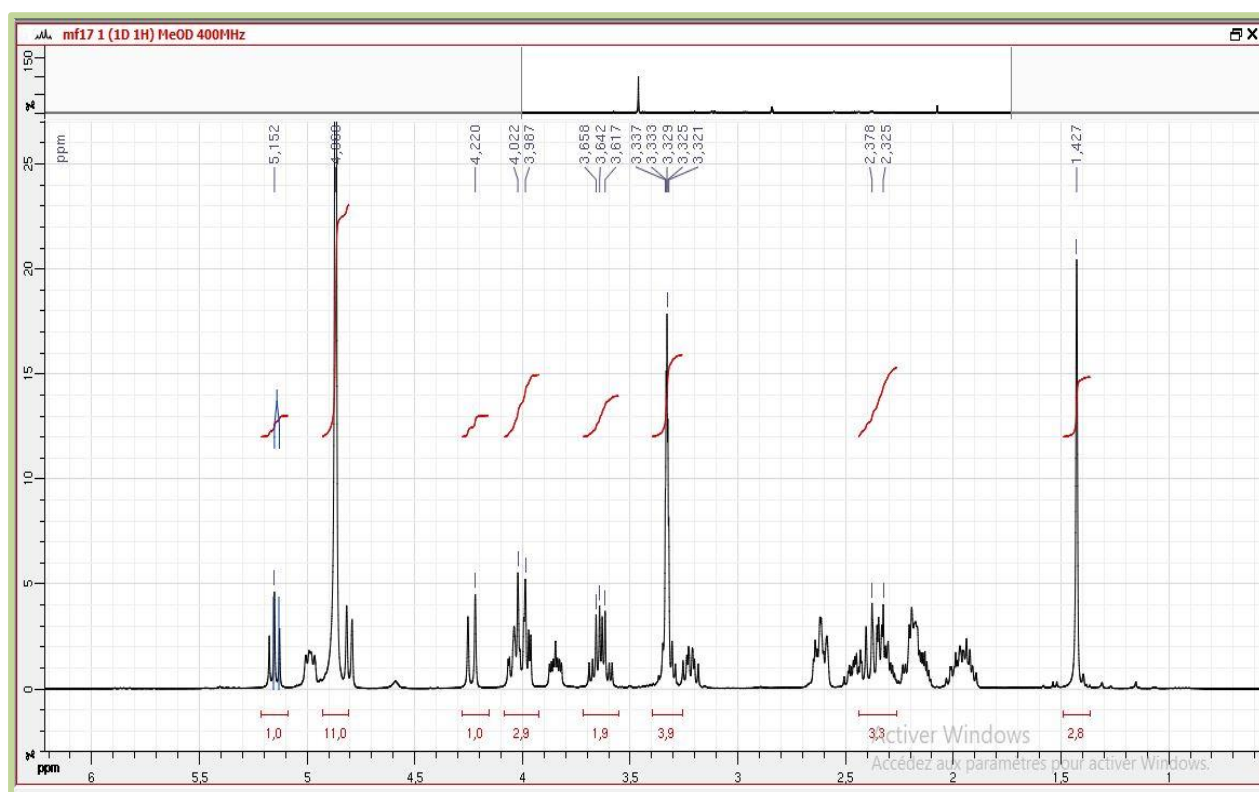


Figure IV.2.1 : Spectre RMN¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé **CP1** (MF17)

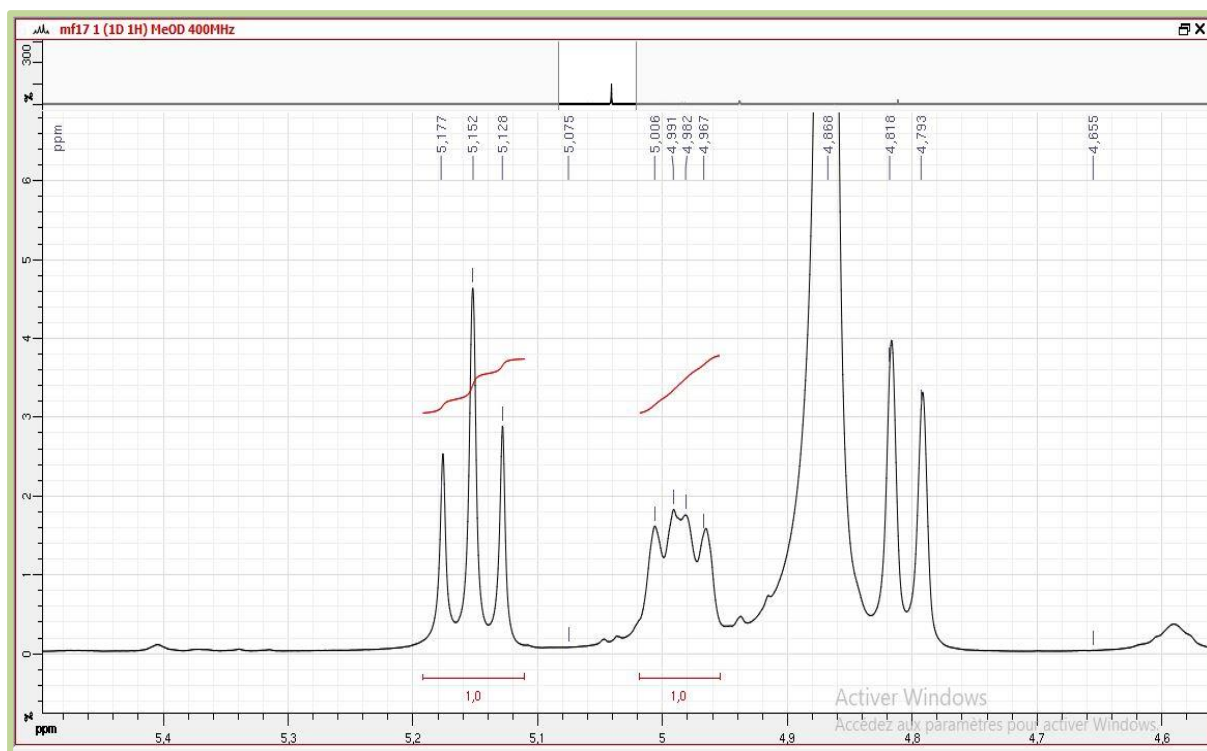


Figure IV.2.1.1: Spectre RMN¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP1, MF17, étagement 1

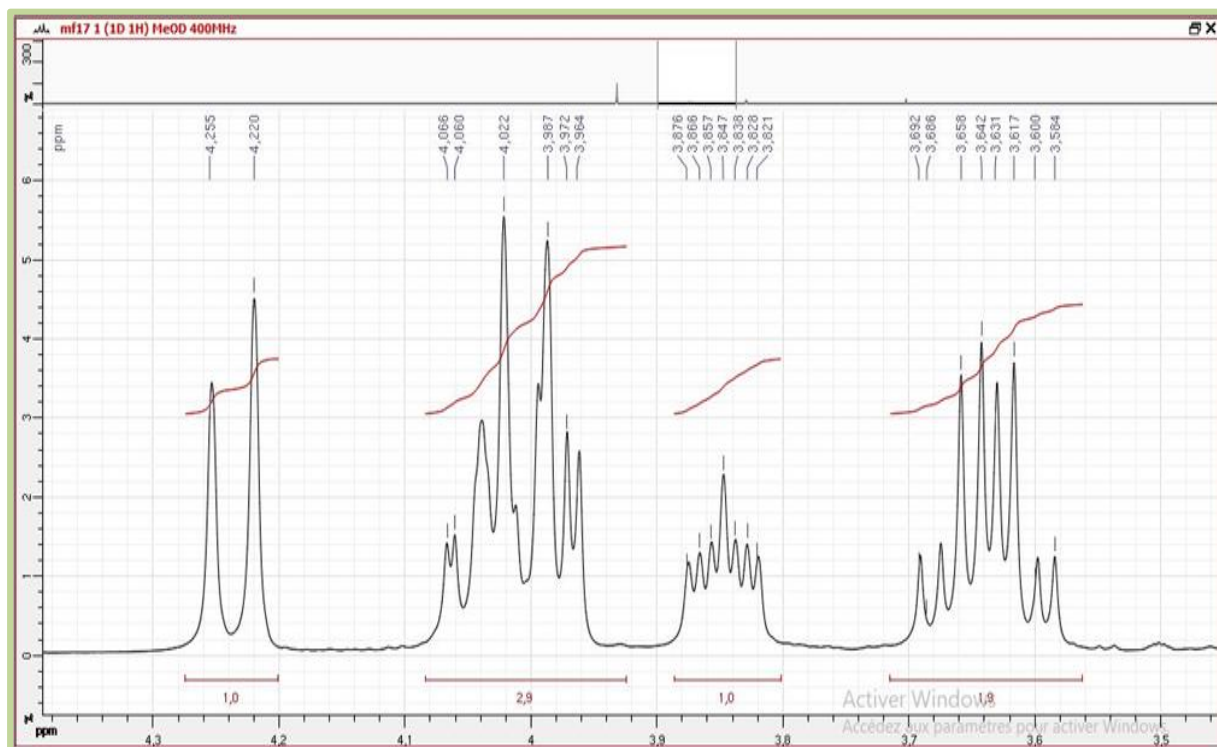


Figure IV.2.1.2 : Spectre RMN¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP1, étagement 2

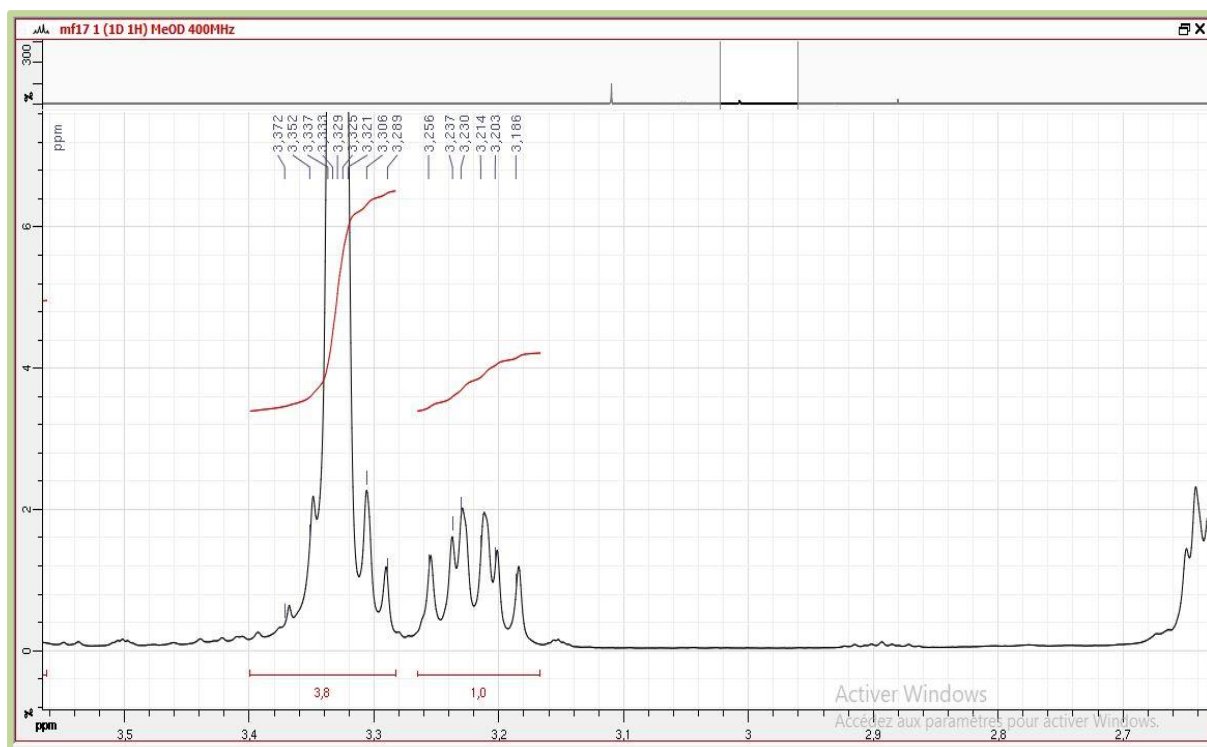


Figure IV.2.1.3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP1, étalement 3

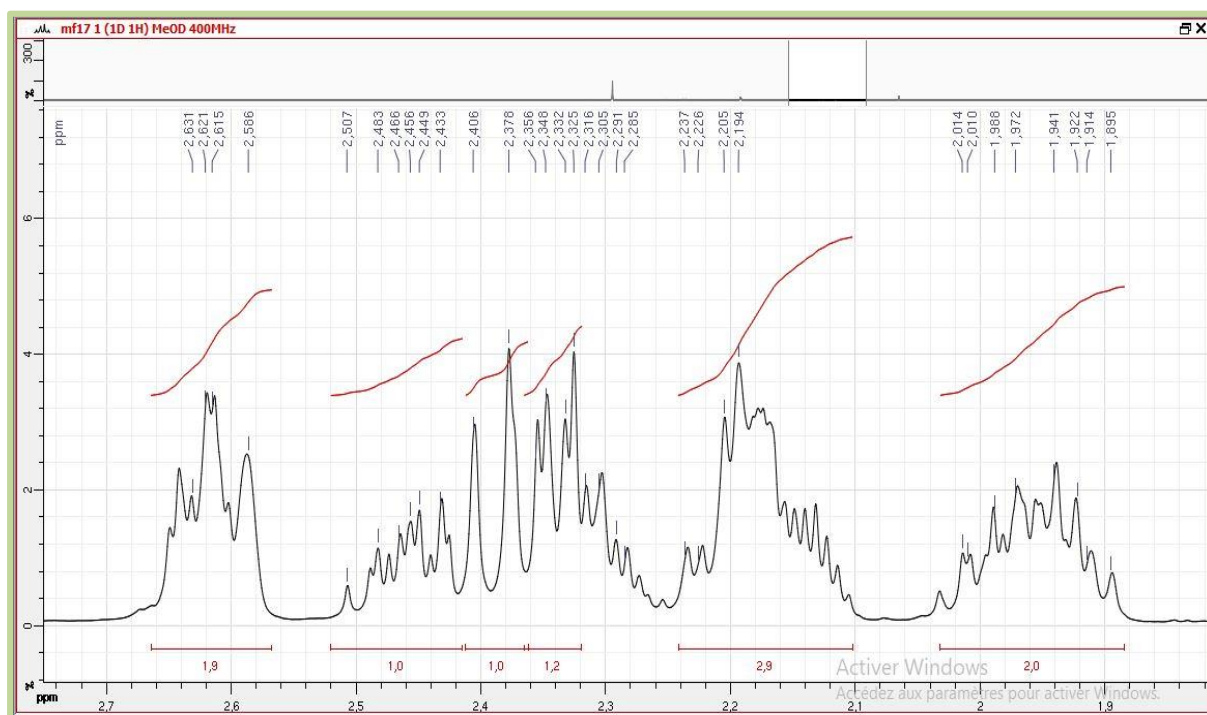


Figure IV.2.1.4 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP1, étalement 4

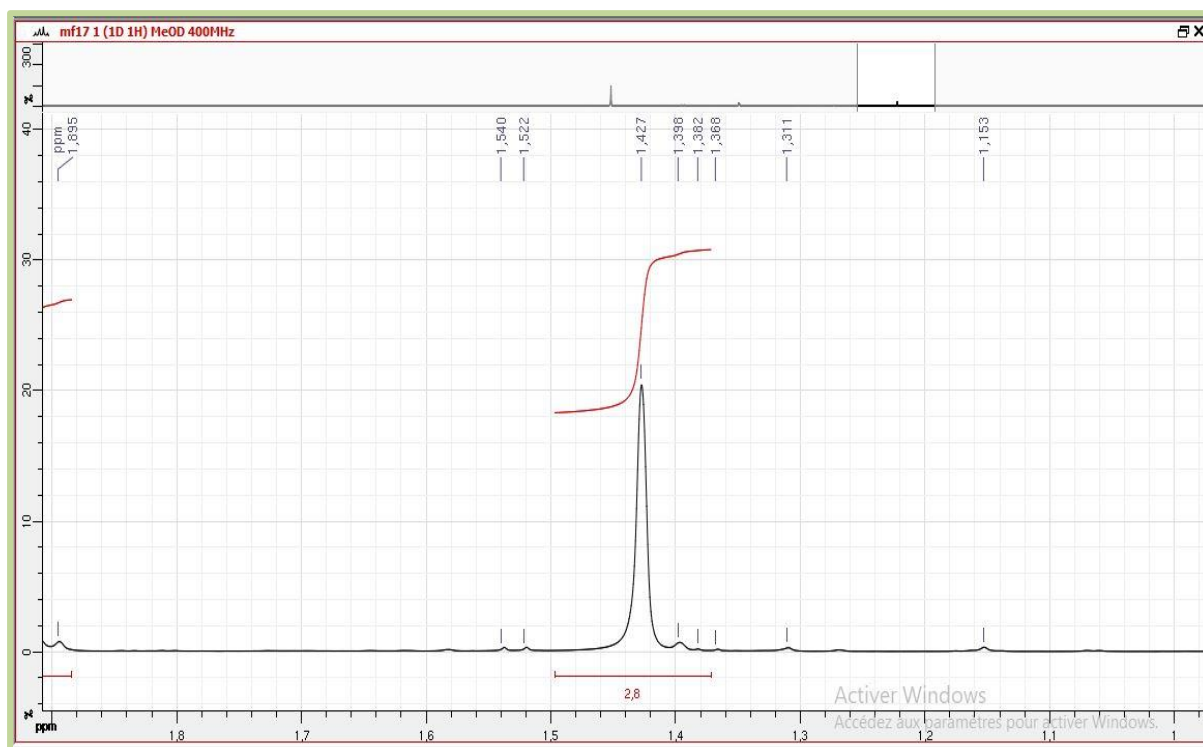


Figure IV.2.1.5 : Spectre RMN¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP1, étalement 5

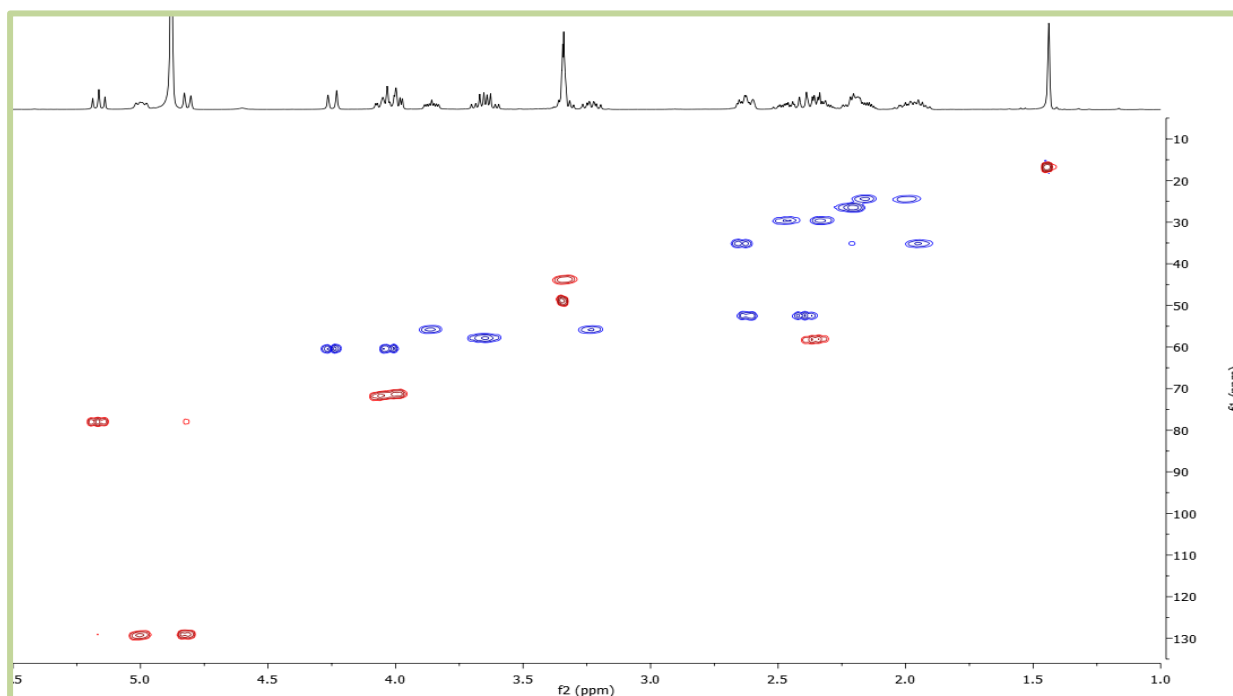


Figure V.2.2 : Spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP1, MF17

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Figure IV.2.3) les protons des 2 CH éthyléniques ne montrent aucune corrélation entre eux, ce qui permet de déduire qu'ils appartiennent à deux doubles liaisons et que ces deux doubles liaisons sont délimitées par des carbones quaternaires en plus des deux CH éthyléniques. Nous pouvons donc déduire que parmi les 4 carbones quaternaires de cette molécule deux sont éthyléniques.

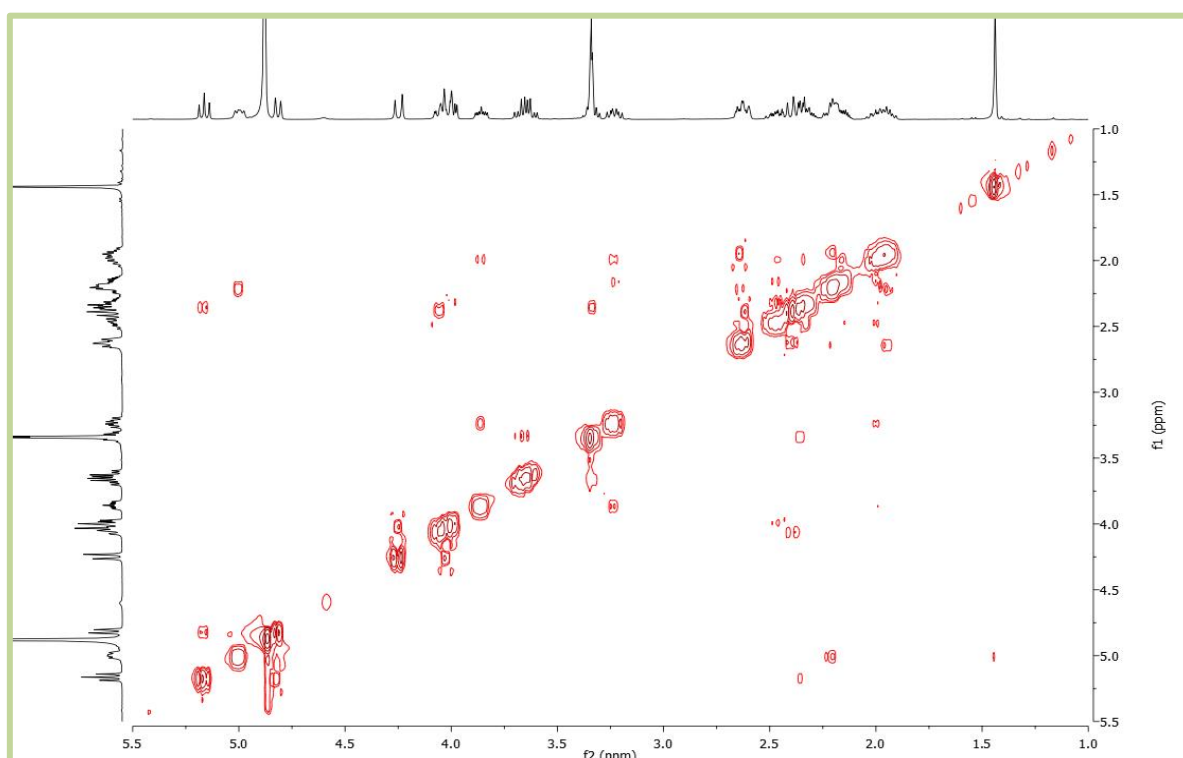


Figure IV.2.3: Spectre COSY (CD₃OD, 400 MHz) du composé **CP1**, MF17

L'examen du spectre HMBC (Figure IV.2.4) montre que le proton du méthine azoté signalé plus haut ($\delta_H=3,98$ ppm) montre une corrélation avec le carbone résonant à $\delta_C=173,2$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone oriente vers la présence d'une fonction carboxylique ceci conforte l'hypothèse faite plus haut que ce méthine est voisin d'un groupement électroattracteur. Cette observation a permis donc la mise en évidence du quatrième carbone quaternaire de cette molécule. Ces carbones quaternaires sont donc : 2 carbones éthyléniques, le carbonyle de la γ -lactone et un carbonyle d'acide. Cette dernière fonction acide suppose donc la présence à ce niveau d'un des trois groupements OH attendus.

Par ailleurs, vu que cette molécule comporte une γ -lactone il est évident d'après nos données que le CH à $\delta_C=78,1$ ppm ($\delta_H=5,16$ ppm ; t ; $J=9,6$ Hz) ne peut être que le point de fermeture de cette γ -lactone, de plus cette valeur du déplacement chimique du carbone de ce méthine est caractéristique d'une γ -lactone sesquiterpénique comme signalé plus haut. On peut donc à ce stade, affirmer que le CH oxygéné à $\delta_C=71,8$ ppm ne peut être qu'hydroxylé, il en est de même pour le CH₂ ($\delta_C=60,5$ ppm) qui doit donc porter le troisième hydroxyle.

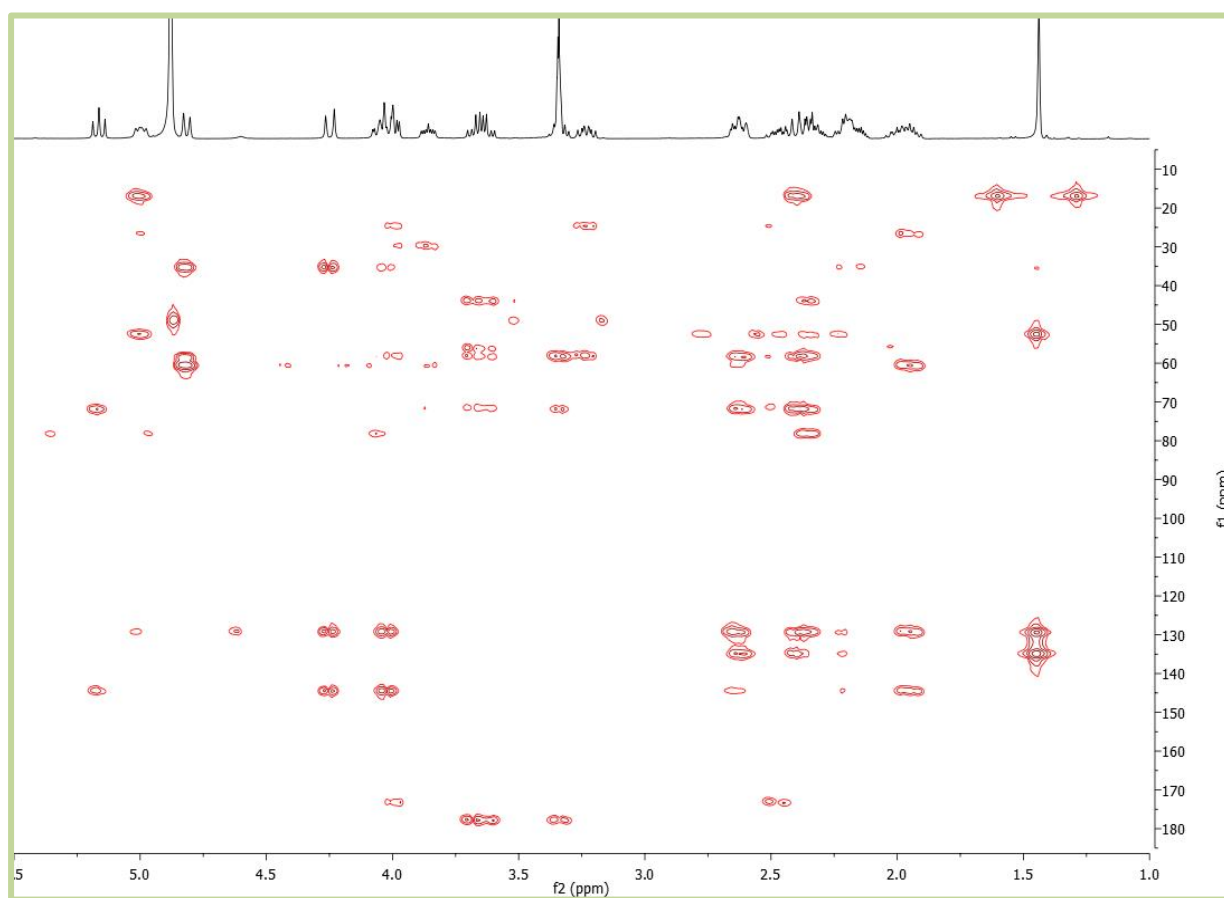


Figure IV. 2.4 : Spectre HMBC (CD₃OD, 400MHz) du composé **CP1**, MF17

Sur le spectre COSY, le proton du CH azoté montre une corrélation avec les protons du groupement méthylène non oxygéné résonant sous forme de deux multiplets à $\delta_H=2,47$ et $2,32$ ppm ($\delta_C=29,8$ ppm). Sur le même spectre ces 2 derniers protons montrent des taches de corrélations avec les protons du groupement méthylène résonant également sous forme de deux multiplets à $\delta_H=2,15$ et $2,00$ ppm ($\delta_C=24,5$ ppm).

A ce stade de notre analyse nous pouvons attendre dans cette molécule l'enchaînement reporté dans la Figure IV.2.5

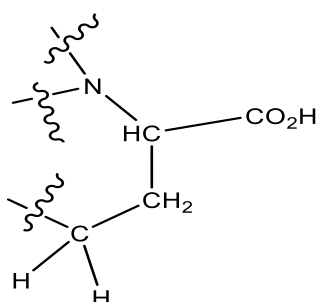


Figure IV.2.5 : Structure partielle 1 du composé CP1

Comme l'analyse précédente nous a permis d'annoncer la présence de 2 CH₂ azotés, nous pouvons donc attendre l'enchaînement reporté sur la figure IV.2.6

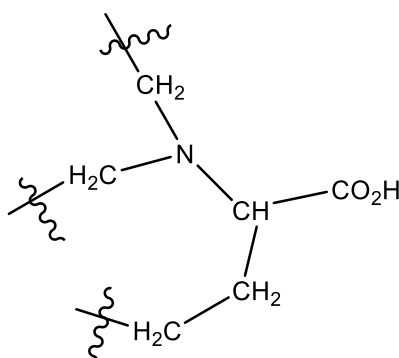


Figure IV.2.6 : Structure partielle 2 du composé CP1

Toujours sur le spectre COSY, le CH₂ azoté résonant à $\delta_H=3,86$ et $3,23$ ppm sous forme de multiplets ($\delta_C=55,9$ ppm) montre des corrélations nettes avec le CH₂ précédent. Cette observation est en faveur d'une jonction entre les deux méthylènes donnant ainsi un cycle azoté à cinq chaînons de type proline soit une proline N-substituée.

En faisant abstraction des atomes consommés par l'entité proline (C₅H₈O₂N), l'entité restante de formule C₁₅H₂₁O₄ confirme bien la nature sesquiterpénique de cette γ -lactone. A ce stade, nous avons donc une lactone sesquiterpénique substituée par l'entité proline et deux groupements hydroxyles.

Comme signalé plus haut cette molécule contient 7 insaturations. On peut d'ores et déjà indiquer 2 qui sont dans l'entité proline, 2 consommées par les 2 doubles liaisons et 2 consommées par le cycle et le carbonyle de la γ -lactone soit 6 insaturations. Il en reste donc une seule insaturation qui ne peut être engagée que dans un cycle ; par conséquent le squelette de cette lactone sesquiterpénique est monocyclique. Cette hypothèse écarte parmi les lactones sesquiterpéniques les plus métabolisées par le genre *Centaurea* : les gainolides, les

eudesmanolides et même les élémanolides vu la présence de 2 carbones quaternaires éthyléniques dans cette molécule. On peut donc s'attendre à un germacranolide dont la stéréochimie des deux doubles liaisons obligatoirement endocycliques, sera précisée ultérieurement. Sachant que les acides sesquiterpéniques se ferment en C-6 ou en C-8, pour essayer de trancher en matière de fermeture de cette lactone sesquiterpénique, nous avons examiné le spectre relatif à l'expérience COSY ; ce spectre montre en effet, que le proton de fermeture de la lactone, et le proton de l'hydroxyméthine corrélient avec le même proton dont le signal apparait à $\delta_H=2,35$ ppm (td ; $J=9,6$ et $3, 2$ Hz ; $\delta_C=58,3$ ppm). De cette observation on conclut que, quel que soit le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique, ce dernier proton est attribuable au H-7, ceci d'une part ; d'autre part on peut affirmer que cette lactone est soit fermée en C-6 et hydroxylée en C-8 soit fermée en C-8 et hydroxylée en C-6. Pour trancher définitivement, nous sommes revenus au signal du proton de fermeture de cette lactone où l'on relève un triplet avec une constante de couplage de $9,6$ Hz ; sur le spectre COSY, ce proton montre une tache de corrélation avec le proton éthylénique résonant à $\delta_H=4,82$ ppm (d ; $J=10,0$ Hz ; $\delta_C=129,2$ ppm) orientant vers la présence d'une double liaison en α de ce CH. Cette situation n'est possible que pour le CH-6 d'un germacranolide ce qui confirme donc l'idée d'un squelette de type germacranolide par la présence de cette double liaison entre C-4 et C-5. De ce fait, cette molécule est donc un germacranolide lactonisé en C-6. Ainsi, le CH éthylénique est attribué à la position C-5 (H-5 et C-5) et l'hydroxyméthine résonant à $\delta_H=4,05$ ppm (dd ; $J=12,0$ et $3,2$ Hz ; $\delta_C=71,8$ ppm) est attribué à la position C-8. Par ailleurs et toujours grâce au spectre COSY, l'attribution de H-7 mène à celle de H-11 du cycle γ -lactonique à $\delta_H=3,32$ ppm (m ; $\delta_C=43,9$ ppm). Ce proton (H-11) corréle avec les protons du CH₂ résonant sous forme de deux doublets de doublets à $\delta_H=3,63$ ppm ($J=12,9$ et $5,5$ Hz) et à $\delta_H=3,67$ ppm ($J=12,9$ et $6,6$ Hz) ; $\delta_C=57,9$ ppm permettant alors l'attribution de ce méthylène au carbone et protons de la position 13. D'après les données précédentes ce carbone est azoté. Nous pouvons donc déduire que l'entité proline est attachée au squelette germacranolide en cette position (C-13).

Par ailleurs, l'attribution de H-8 permet grâce, toujours à l'analyse du spectre COSY de localiser les signaux des protonsc H-9a (H-9 β) à $\delta_H=2,62$ ppm (m) et H-9b (H-9 α) à $\delta_H=2,40$ ppm (m). La résonance du carbone C-9 est relevée à $\delta_C=52,6$ ppm grâce au spectre HSQC. Dans le même spectre COSY on remarque une corrélation entre le groupement méthyle (CH₃) résonant sous forme d'un singulet large à $\delta_H=1,44$ ppm et le proton H-9a (H-9 β), cela indique que ce méthyle est porté par le carbone voisin, en l'occurrence le C-10 qui, de plus doit être

quaternaire et éthylénique vu la multiplicité du signal des protons de ce méthyle, la valeur de leur déplacement chimique (1,44 ppm) et les résultats de notre analyse précédente. D'après la numérotation adoptée pour les squelettes sesquiterpéniques le carbone de ce groupement méthyle est numéroté C-14 et ses protons H₃-14. Toujours sur le même spectre, les protons H₃-14 corrélaient avec le proton du groupement CH éthylénique résonant à $\delta_{\text{H}}=5,00$ ppm attribuable de ce fait à H-1 (dd ; $J=10,6$; $5,9$ Hz). La présence de cette double liaison entre C-1 et C-10 en plus de celle entre C-4 et C-5 signalée précédemment conforte et confirme bien la nature germacranolide de cette lactone sesquiterpénique. La localisation de H-1 permet d'attribuer les deux protons H₂-2 au signal à $\delta_{\text{H}}=2,20$ ppm (m ; $\delta_{\text{C}}=26,6$ ppm) suite à leurs corrélations avec H-1. Toujours sur le spectre COSY les protons H₂-2 corrélaient avec les protons du groupement méthylène résonant sous forme de deux multiplets à $\delta_{\text{H}}=2,62$ ppm et à $\delta_{\text{H}}=1,95$ ppm ($\delta_{\text{C}}=35,3$ ppm) attribuables alors aux protons H-3a et H-3b, respectivement.

Sur le spectre HMBC les protons H-3a, H-3b, H₂-2 et H-6 montrent des taches de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=144,3$ ppm. Ce carbone ne peut être que le C-4 du squelette germacranolide de cette molécule. La valeur de son déplacement chimique indique bien qu'il est éthylénique et quaternaire, ceci est bien en accord avec la multiplicité de H-5 (d ; $J=10,0$ Hz). Ceci est appuyé par le fait que le groupement hydroxyméthylène précédemment évoqué ne peut être placé qu'en C-4, son carbone est donc attribué à la position C-15. On relève en effet, sur le spectre proton un système AB à $\delta_{\text{H}}=4,23$ ppm (d ; $J=13,3$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=60,5$ ppm) et à $\delta_{\text{H}}=4,00$ ppm (d ; $J=13,3$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=60,5$ ppm) attribuable à H-15a et H-15b. La position de cet hydroxyméthylène en C-4 est confortée par les corrélations de ses protons avec le carbone C-4, sur le spectre HMBC.

A l'issue de cette analyse, nous sommes donc en présence d'une lactone sesquiterpénique ayant un squelette de type germacranolide et substituée par une entité prolineen C-13, un hydroxyle en C-8 et un autre hydroxyle en C-15. Il reste à préciser les configurations des deux doubles liaisons du macrocycle pour trancher entre un mélampolide, un héliangolide, un *cis*, *cis*-germacranolide ou un *trans*, *trans*-germacranolide.

Pour établir la configuration de la double liaison entre C-4 et C-5, nous nous sommes basés sur la valeur du déplacement chimique de H-6 qui est de 5,16 ppm. Cette valeur montrant un bon déblindage de ce proton indique que le groupement hydroxyméthylène en C-4 et ce proton H-6 sont en position 1,3-diaxiales ce qui impose une configuration *trans* à cette double liaison [13]. L'orientation 1,3 diaxiale de H-6 et du groupement

hydroxyméthylène (C-15) est confirmée par le spectre ROESY (Figure IV.2.7) où l'on relève une tache de corrélation entre H-6 et le proton H-15a.

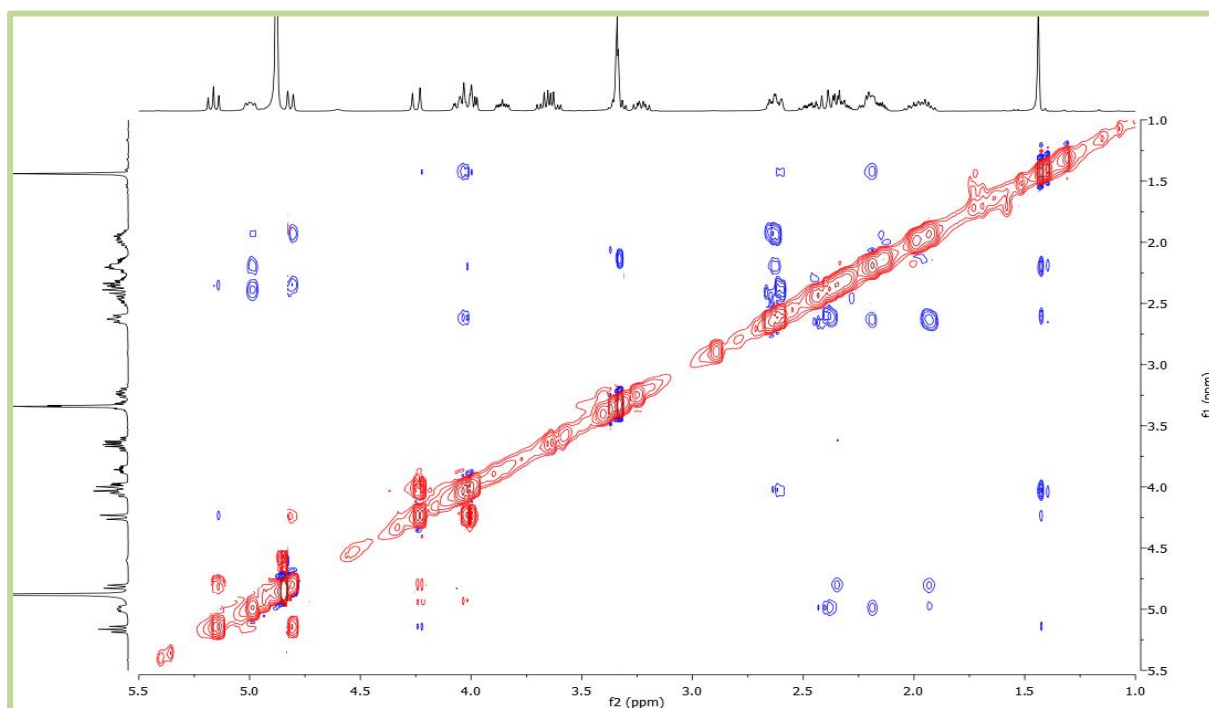


Figure IV.2.7 : Spectre ROESY(400 MHz, CD₃OD) du composé **CP1**

Cette hypothèse est confortée par les valeurs des constantes de couplage relevées entre H-6/H-5 (10, 0 Hz) et H-6/H-7 (9,6 Hz) qui indiquent des dispositions anti pour ces paires de protons permettant de déduire des orientations β (axiale) pour H-6 et α (axiales) pour H-5 et H-7 (Figure IV.2.8)

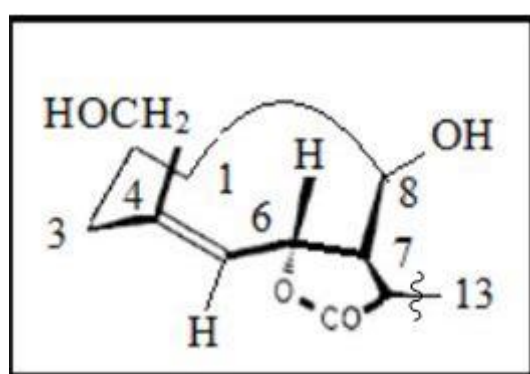


Figure IV.2.8: Configuration de la double liaison C(4)-C(5) du composé **CP1**

En ce qui concerne la configuration de la double liaison entre C-1 et C-10, elle est déduite *trans* vu la valeur inférieure à 20 ppm du déplacement chimique du carbone du CH₃-14 (Figure IV.2.9) [14].

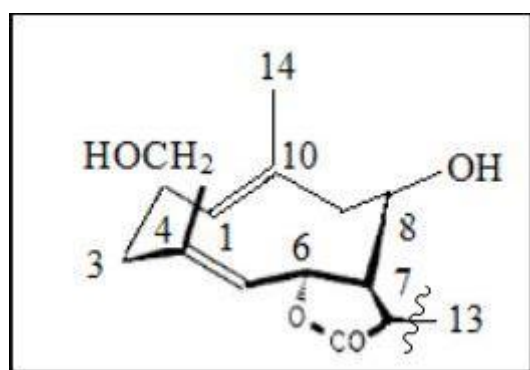


Figure IV.2.9: Configurations des doubles liaisons C(4)-C(5) et C(1)-C(10) du composé **CP1**

A ce stade de notre discussion, le composé **CP1** est donc un *trans, trans*-germacranolide dit également germacranolide.

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans la Figure IV.2.10

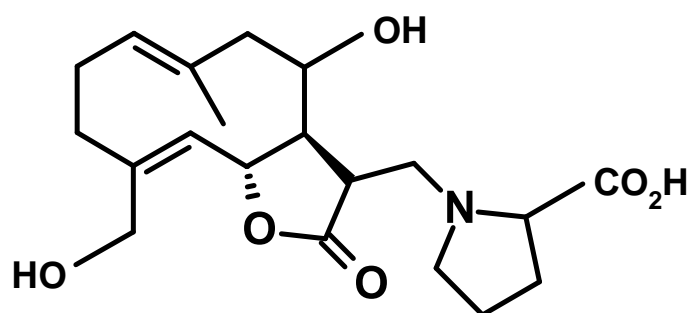


Figure IV 2.10 : Structure à ce stade du composé **CP1**

En matière de stéréochimie des centres chiraux restants notamment C-8 et C-11, l'orientation α de H-8 est déduite de sa constante de couplage avec H-7 (lui-même α) où l'on relève une valeur de 3,2 Hz, signifiant une interaction $H\alpha$ - $H\alpha$ entre H-8 et H-7. On relève également une constante de couplage de 9,6 Hz entre H-7 et H-11, cette valeur signifiant une disposition anti de ces deux noyaux, indique donc une orientation β de H-11. L'orientation α de H-8 est confirmée par l'analyse du spectre ROESY qui ne montre aucune corrélation entre ce proton et le proton H-6 β observable aisément dans le cas où H-8 est β [15,16]. Toutes ces données convergentes vers la structure reportée dans la Figure IV.2.11 qui est 8 β -hydroxy, 11 β , 13-dihydro-8-deoxysalonitenolide 13-N-proline, cette molécule est nouvelle, nous la reportons dans la littérature pour la première fois.

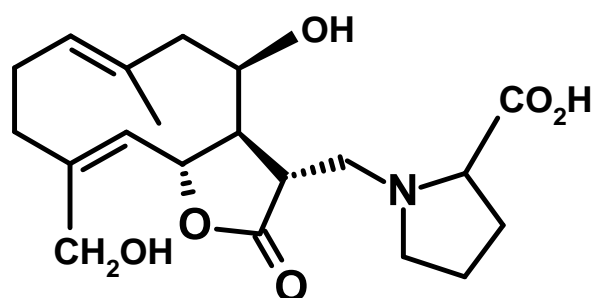


Figure IV.2.11 : Structure du composé CP1

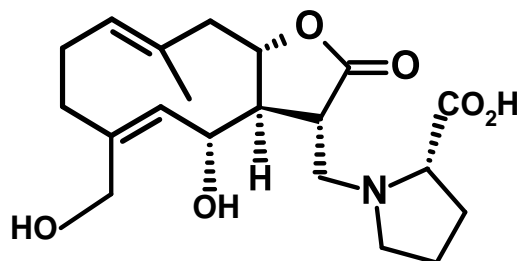
La stéréochimie du centre chiral stable restant, soit celle du centre C-2 de la proline sera déterminée plus tard lors de l'élucidation structurale de la molécule CP2

Les données relatives à l'analyse des spectres de RMN sont reportées dans le tableau IV.2.1.

Tableau IV.2.1 : Données spectroscopiques RMN du composé CP1

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)J(Hz)
1	129,4	5,00 dd (10,6 ; 5,9)
2	26,6	2,20 m
3	35,3	2,62 m; 1,95
4	144,3	-
5	129,2	4,82 d (10,0)
6	78,1	5,16 t (9,6)
7	58,3	2,35 td (9,6 ; 3,2)
8	71,8	4,05 dd (12,0 ; 3,2)
9	52,6	2,62 m ; 2,40
10	134,8	-
11	43,9	3,32 m
12	177,5	-
13	57,9	3,63 dd (12,9 ; 5,5) 3,67 dd (12,9 ; 6,6)
14	16,9	1,44 s
15	60,5	4,23 d (13,3) 4,00 d (13,3)
Proline		
1	173,2	-
2	71,4	3,98 dd (9,2 ; 3,7)
3	29,8	4,47 m ; 2,32
4	24,5	2,15 m ; 2,00
5	55,9	3,86 m ; 3,23

IV.2.2 Elucidation structurale du composé CP2 isolé de la phase Acétate d'éthyle



CP2

Ce produit se présente sous forme d'un solide amorphe de couleur blanche. Le spectre de masse à haute résolution de ce composé enregistré en mode electrospray négatif [HR-ESIMS (-)] montre un ion quasi- moléculaire à $m/z=378,1925$ correspondant à l'ion $[M-H]^-$ indiquant une formule $C_{20}H_{28}NO_6$ (calculé pour $C_{20}H_{28}NO_6$: 378,1917) et orientant alors vers une molécule de formule brute $C_{20}H_{29}NO_6$ de masse 379 Da, soit une molécule comportant 7 insaturations.

La présence de l'atome d'azote dans cette molécule est justifiée comme dans le cas de la molécule précédente, d'une part par la haute résolution et donc la recherche de la composition élémentaire et d'autre part, par le fait que la masse de cette molécule est impaire indiquant alors la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote.

L'examen du spectre d'absorption infrarouge montre la présence d'une bande à 1775 cm^{-1} en faveur d'un groupe γ - lactonique de type sesquiterpénique vu les similitudes des premiers résultats de l'analyse structurale de cette molécule et ceux de la molécule précédente. Cette idée est largement soutenue par la famille et le genre de la plante étudiée.

La combinaison des données des spectres RMN 1H (Figure IV.2.12), HSQC (Figure IV.2.13) montre la présence de :

- 1 CH_3 à $\delta_H=1,53$ ppm résonant sous forme d'un singulet dont le carbone est localisé à $\delta_C=16,5$ ppm.
- 8 groupements CH_2 que nous pouvons répartir grâce aux valeurs de leurs déplacements chimiques et de leurs carbones porteurs comme suit :
 - ❖ 5 CH_2 non oxygénés
 - $\delta_H=2,31$ ppm ; m et 2,20 ppm ; m ; $\delta_C=26,0$ ppm
 - $\delta_H=2,63$ ppm ; m et 1,99 ppm ; m ; $\delta_C=35,3$ ppm

- $\delta_H=2,70$ ppm ; dl ; $J=12,4$ Hz ; $\delta_C=47,7$ ppm
 - $\delta_H=2,49$ ppm ; m et 2,19 ppm ; m ; $\delta_C=29,5$ ppm
 - $\delta_H=2,17$ ppm ; m et 1,99 ppm ; m ; $\delta_C=24,3$ ppm
- ❖ 1CH₂ Oxygéné
- $\delta_H=4,23$ ppm d ($J=12,9$ Hz) et 3,88 ppm d ($J=12,9$ Hz) ; $\delta_C=59,6$ ppm
- ❖ 2 CH₂ Azotés (cette hypothèse est confortée par la présence de l'atome d'azote signalé plus haut).
- $\delta_H=3,62$ ppm dd ($J=13$; 9,6 Hz) et 3,52 ppm dd ($J=13$; 6,6 Hz) ; $\delta_C=58,2$ ppm
 - $\delta_H=3,88$ ppm m et 3,17 ppm m ; $\delta_C=54,8$ ppm
- 7 groupements CH que nous pouvons répartir grâce aux valeurs des déplacements chimiques de leurs protons et de leurs carbones porteurs comme suit :
- ❖ 2 CH oxygénés
- $\delta_H=4,53$ ppm t ($J=9,3$ Hz) ; $\delta_C=68,6$ ppm.
 - $\delta_H=4,34$ ppm tl ($J=9,6$ Hz) ; $\delta_C=81,0$ ppm
- ❖ 2 CH non oxygénés
- $\delta_H=2,55$ ppm m ; $\delta_C=58,4$ ppm
 - $\delta_H=3,37$ ppm m ; $\delta_C=44,4$ ppm
- ❖ 2 CH éthyléniques
- $\delta_H=5,05$ ppm dl ($J= 10,7$ Hz) ; $\delta_C=131,2$ ppm
 - $\delta_H=4,97$ ppm d ($J=10,3$ Hz) ; $\delta_C=135,00$ ppm
- ❖ 1 CH azoté vu la valeur du déplacement chimique de son proton et surtout la présence d'un atome d'azote dans cette molécule.
- $\delta_H=3,94$ ppm dd ($J=9,2$; 5,7 Hz) ; $\delta_C=71,5$ ppm

Comme dans le cas de la molécule CP1, la valeur du déplacement chimique du carbone de ce dernier groupement méthine oriente vers en plus de la présence à son voisinage de l'atome d'azote celle d'un groupement électroattracteur.

A l'issue de cette analyse, il apparait clairement que les résultats des spectres RMN ¹H et HSQC sont similaires à ceux du composé CP1. On déduit en effet, la présence de 4 carbones quaternaires dont celui du carbonyle de la γ -lactone. Par ailleurs on retrouve tous les signaux de l'entité proline, notamment le carbone de la fonction acide à $\delta_C=173,2$ ppm aisément repérable grâce à sa corrélation avec le proton du méthine azoté à $\delta_H=3,94$ ppm (C-2_{proline}) et ses corrélations avec les protons du méthylène à $\delta_H=2,49$ et 2,19 ppm sur le spectre HMBC

(Figure IV.2.14), attribuables alors aux protons H-3a_{proline} et H-3b_{proline} ; ceci est bien confirmé par le spectre COSY (Figure IV.2.15) qui montre leurs corrélations avec H-2_{proline}.

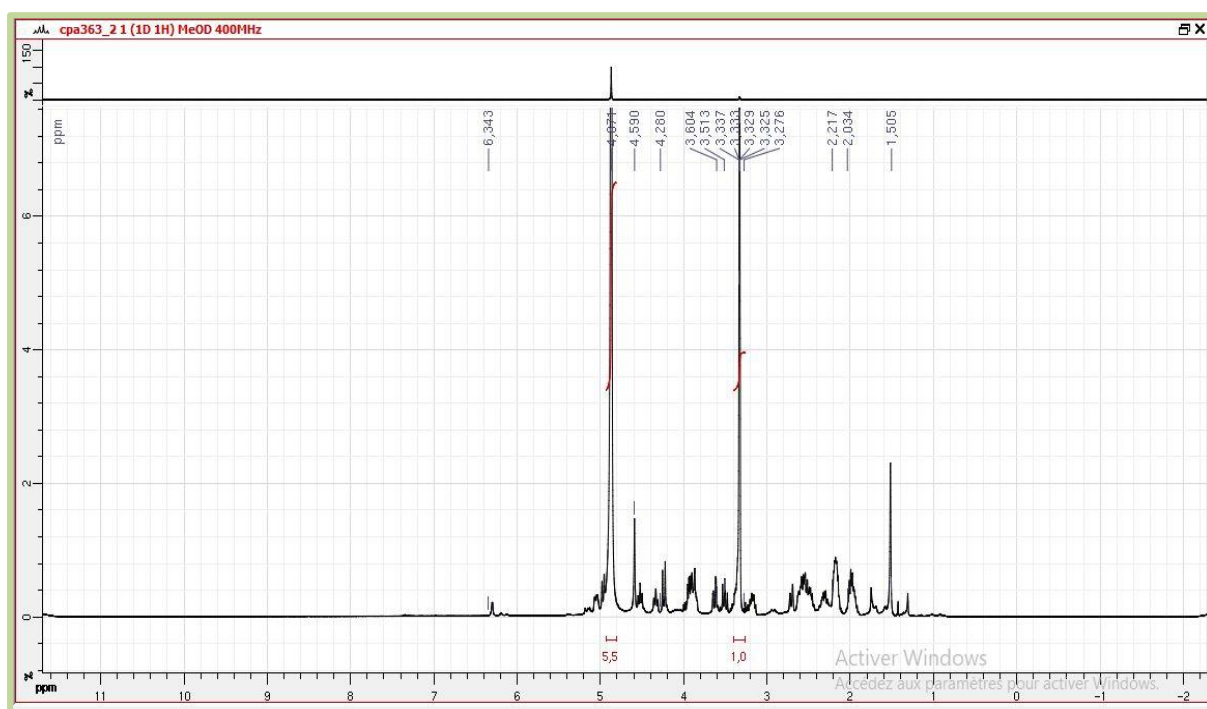


Figure IV.2.12 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé **CP2** (CPA-363-2)

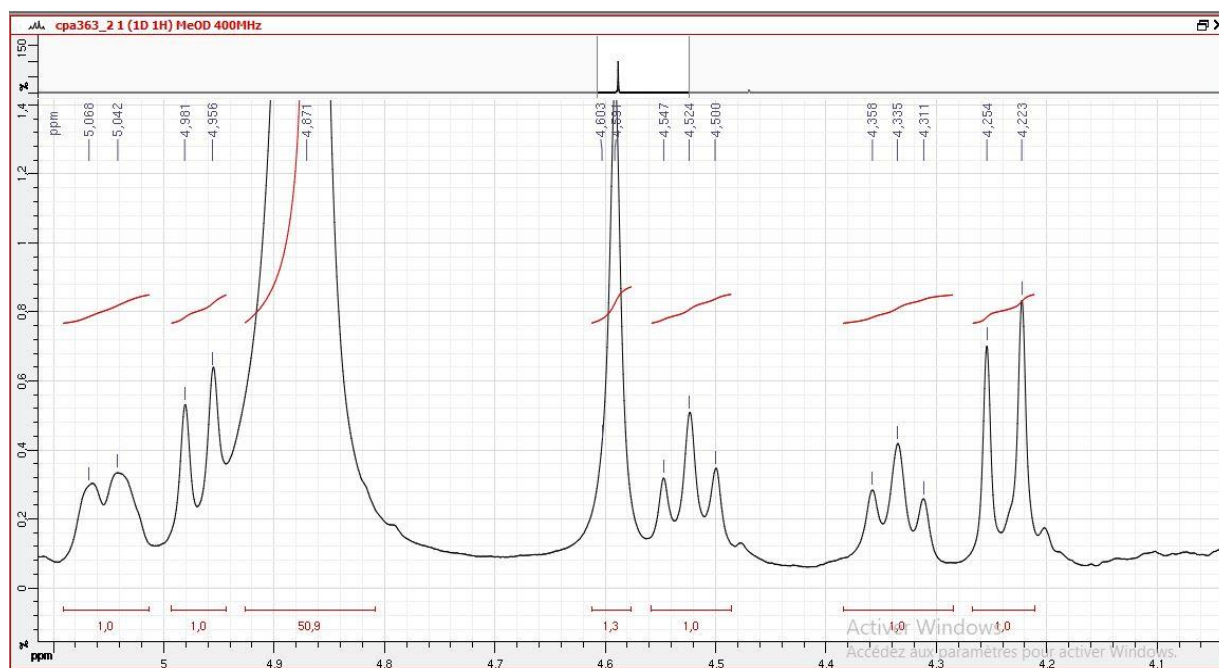


Figure IV.2.12.1 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé **CP2** (CPA-363-2),
étalement 1

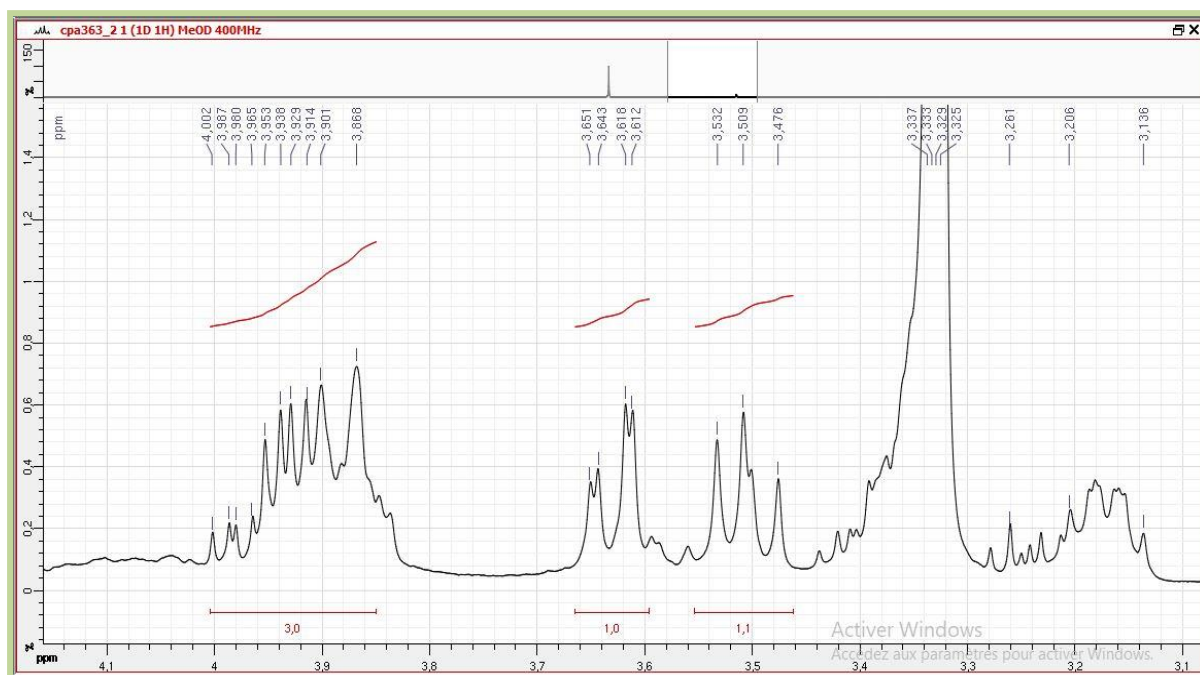


Figure IV.2.12.2 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé **CP2**, étalement 2

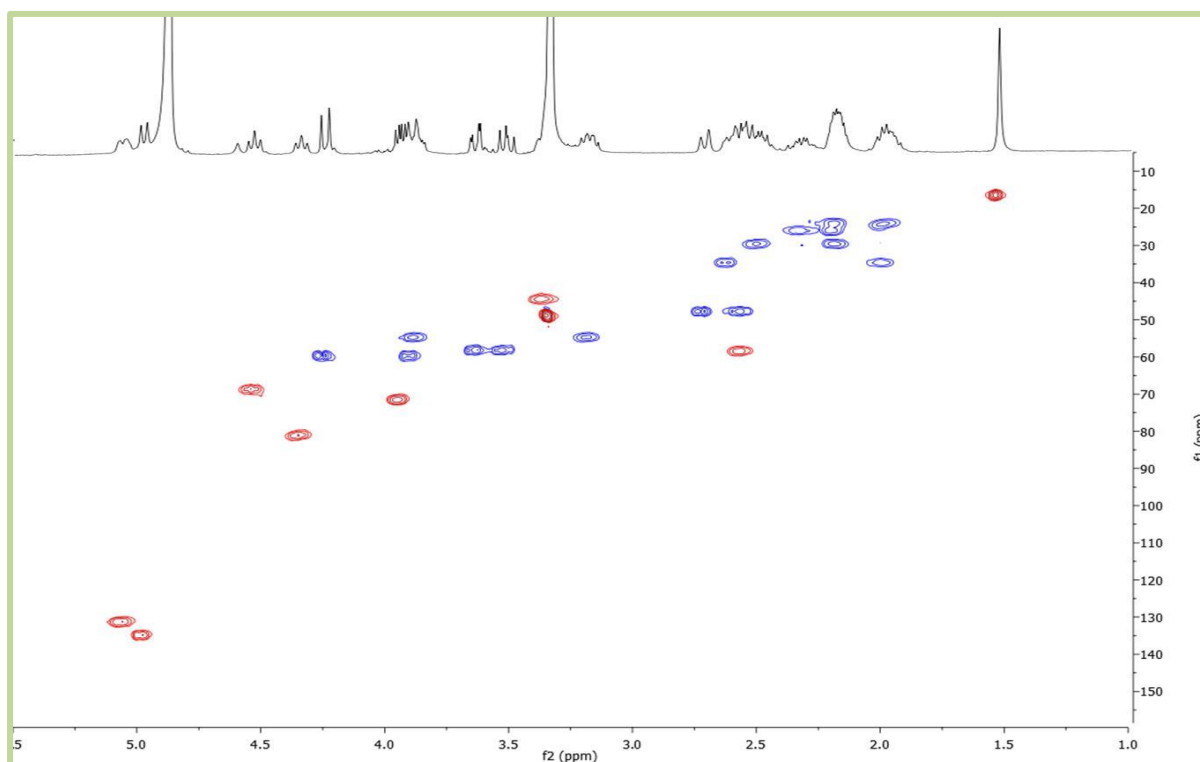


Figure IV.2.13: Spectre HSQC (CD_3OD , 400MHz) du composé **CP2**

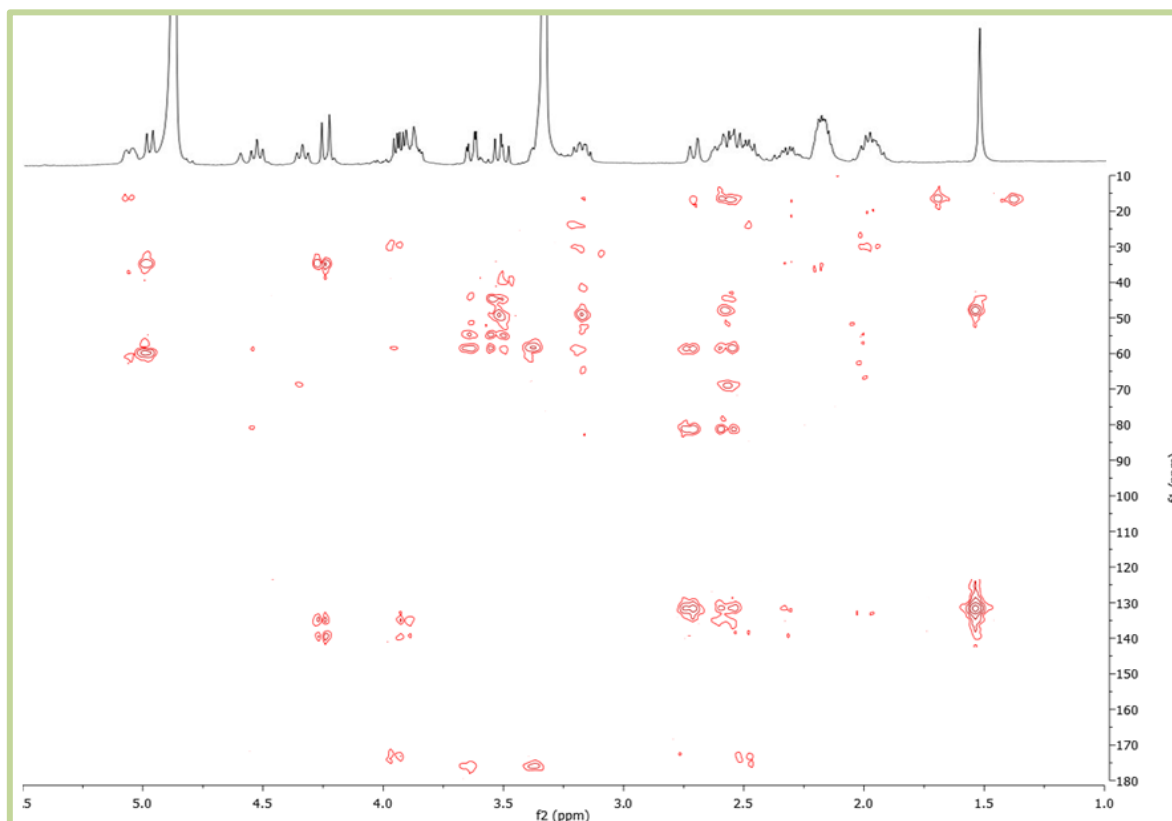


Figure IV.2.14 : Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé **CP2**

L'analyse des autres corrélations relevées dans le spectre COSY permet d'attribuer les protons du méthylène de la position C-4_{proline} aux signaux à $\delta_{\text{H}}=2,17$ et 1,99 ppm et ceux de la position C-5_{proline} aux signaux à $\delta_{\text{H}}=3,88$ et 3,17 ppm. L'examen du spectre HSQC permet de relever les résonances des carbones C-3_{proline}, C-4_{proline} et C-5_{proline} à $\delta_{\text{C}}=29,5$; 24,3 et 54,8 ppm, respectivement. Le C-2_{proline} est relevé à $\delta_{\text{C}}=71,5$ ppm. L'augmentation considérable de son déplacement chimique est justifiée par sa substitution par la fonction acide en plus de l'atome d'azote.

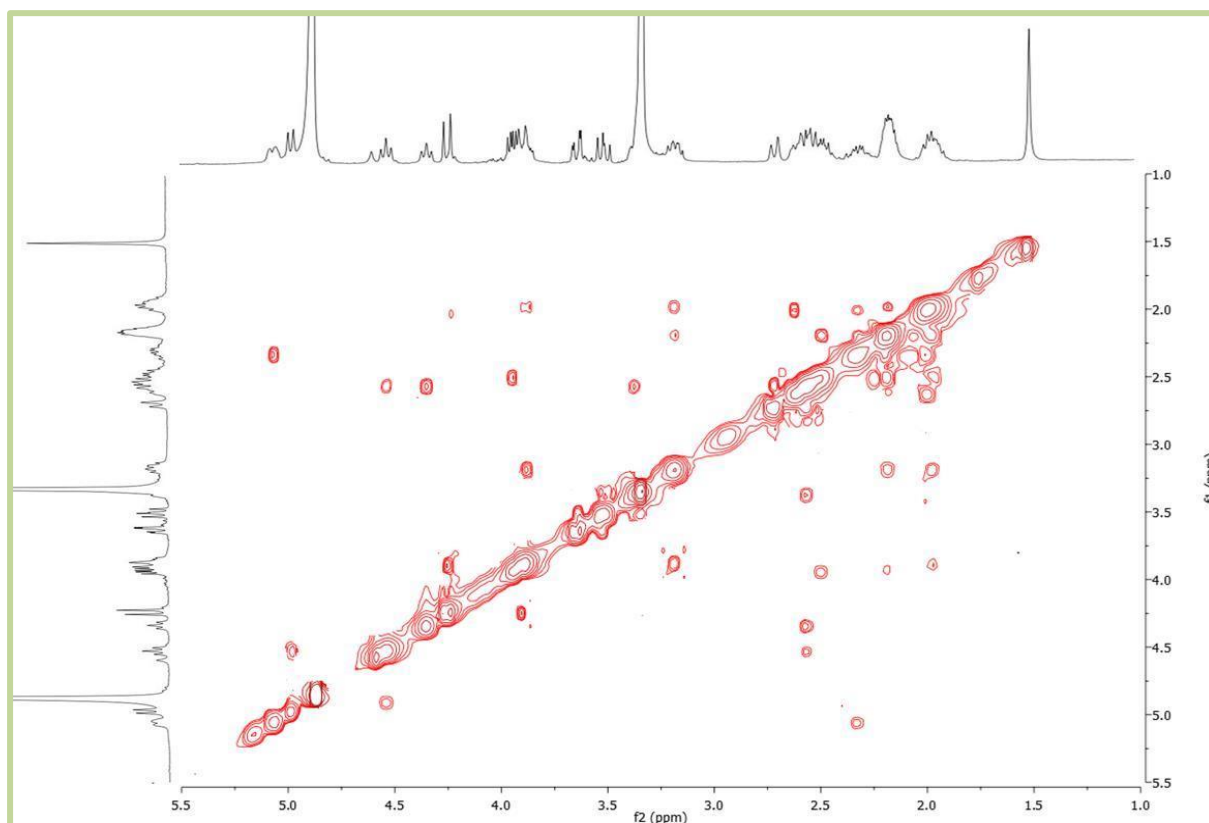


Figure IV.2.15: Spectre COSY (CD₃OD, 400MHz) du composé **CP2**

Sur le spectre HMBC les protons du CH₂ azoté résonant sous forme de deux dd à $\delta_{\text{H}}=3,62$ ppm ($J=13,0$; 9,6 Hz) et 3,53 ppm ($J=13,0$; 2,9 Hz), montrent des taches de corrélation avec le carbone du carbonyle de la γ - lactone ($\delta_{\text{C}}=175,6$ ppm). Cette donnée permet de déduire que l'entité proline est reliée au squelette de la lactone sesquiterpénique dans la position C-13. A ce stade de cette analyse est vue la formule brute de notre molécule, les différents groupements qu'elle contient notamment les deux doubles liaisons éthyléniques, la fonction acide, le cycle de la proline, la γ - lactone ; il est clair que le squelette sesquiterpénique est d'une part, monocyclique est d'autre part, de type germacranolide. On peut également déduire que cette lactone sesquiterpénique porte en plus du substituant proline, deux groupements hydroxyles, ces derniers étant portés par un CH₂ et un CH. Par ailleurs, il est évident que le méthine de fermeture de cette γ - lactone est celui dont le carbone résonne à $\delta_{\text{C}}=81,0$ ppm ($\delta_{\text{H}}=4,34$ ppm, triplet large, $J=9,6$ Hz). Ce carbone est par conséquent soit le C-8 soit le C-6.

Un réexamen du spectre COSY montre que ce proton de fermeture de la γ - lactone ne corréle avec aucun des protons éthyléniques. De ce fait, ce proton ne peut être que le H-8. Ainsi cette lactone sesquiterpénique de type germacranolide est fermée en C-8. Le spectre

COSY permet alors de localiser H-7 à $\delta_{\text{H}}=2,55$ ppm résonant sous forme d'un multiplet ($\delta_{\text{C}}=58,4$ ppm). La localisation de H-7 permet, toujours grâce au spectre COSY de montrer que le premier groupement hydroxyle est en position C-6. En effet, ce spectre montre clairement une corrélation entre H-7 et le proton du méthine oxygéné résonant à $\delta_{\text{H}}=4,53$ ppm (t, $J=9,3$ Hz) qui ne peut par conséquent, être attribué qu'au proton H-6. Sur le spectre HMBC, le carbone C-8 montre des corrélations avec les deux protons d'un méthylène résonant sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}}=2,70$ ppm ($J=2,4$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=2,56$ ppm (m) attribuables de ce fait à H-9a (H-9 β) et H-9b (H-9 α), respectivement. La résonance du carbone C-9 est alors relevée à $\delta_{\text{C}}=47,7$ ppm grâce au spectre HSQC.

On retient donc que cette lactone sesquiterpénique de type germacranolide est fermée en C-8, hydroxylée en C-6 et substituée en C-13 par l'entité proline. Un retour vers le spectre COSY, permet de relever un couplage entre H-6 et le proton éthylénique à $\delta_{\text{H}}=4,97$ ppm (d ; $J=10,3$ Hz). Cette corrélation permet d'une part de confirmer la nature germacranolide de cette molécule et d'attribuer ce proton à H-5 ($\delta_{\text{C}}=135,0$ ppm). L'examen approfondi du spectre HMBC permet alors, d'une part d'attribuer la résonance à $\delta_{\text{C}}=139,2$ ppm au carbone éthylénique quaternaire C-4 grâce à ses corrélations avec H-6 et H-5 et d'autre part, de déduire que le deuxième groupement hydroxyle ne peut être qu'en C-15 vu les taches de corrélations nettes que montrent le deux carbones éthyléniques C-5 et C-4 avec les protons résonant sous forme d'un système AB à $\delta_{\text{H}}=4,23$ et $3,88$ ppm ($J=12,9$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=59,6$ ppm). De ce fait, ces deux protons sont attribués à H-15a et H-15b, respectivement et leur carbone porteur C-15. A l'issue de ces attributions le méthyle résonant à $\delta_{\text{H}}=1,53$ ppm ($\delta_{\text{C}}=16,5$ ppm) ne peut être attribué qu'à la position C-14. La valeur du déplacement chimique du carbone de ce méthyle étant inférieure à 20 ppm indique que cette double liaisons C-1=C-10 admet une configuration *trans*. La configuration de la double liaison C-4=C-5 est également *trans* vu la valeur de la constante de couplage ($J=10,3$ Hz) relevée dans le signal de H-5 signifiant une disposition *trans* H-5 / H-6. Ces dernières données complètent notre structure qui est donc un *trans,trans*germacranolide β , 15-dihydroxylé, fermé en C-8 et portant une entité proline en C-13. Les stéréochimies des centres chiraux de l'entité lactone sesquiterpénique qui sont C-6, C-7, C-8 et C-11 sont déduites des valeurs des interactions de couplage entre :

- ✓ H-6 / H-7 : $J=9,3$ Hz indiquant une disposition anti de ces deux protons (H-6 β et H-7 α)

- ✓ H-7 / H-8 : $J = 9,6$ Hz signifiant une disposition anti de ces deux protons et indiquant par conséquent une orientation β de H-8 (H-8 β).

L'orientation β de H-11 est déduite de l'analyse du spectre ROESY (Figure IV.2.16) qui montre des taches de corrélations entre H-7 α et les deux protons H-13a et H-13b, signifiant une orientation α du méthylène portant l'entité proline (Figure IV.2.17).

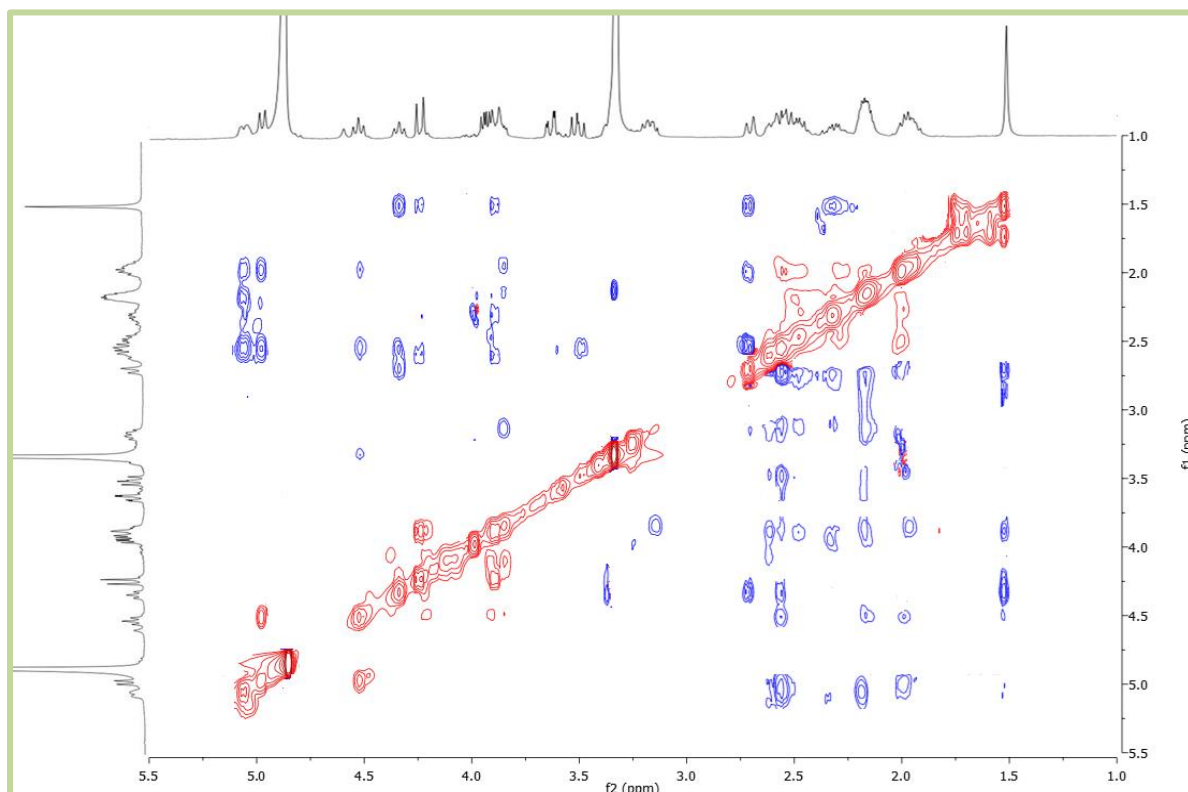


Figure IV.2.16 : Spectre ROESY (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP2

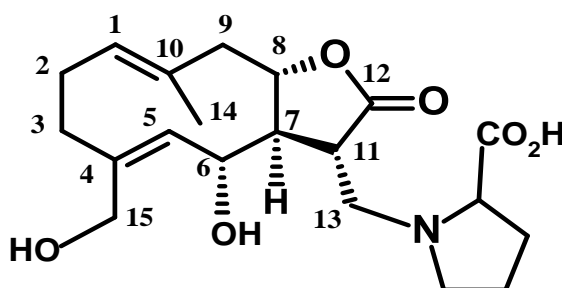


Figure IV.2.17: Structure partielle du composé CP2

A ce point de notre analyse, il nous reste à déterminer la stéréochimie du centre chirale de la proline. Pour cela nous avons eu recours au traitement acide de notre γ -lactone afin d'en

détacher la proline. Ainsi 5 mg du composé **CP2** ont été traités par HCl (1%) à température ambiante. Le mélange réactionnel a été soumis à une purification par HPLC sur une colonne RP18 donnant ainsi la proline à l'état pur. La mesure du pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a révélé qu'elle est lévogyre $[\alpha]_D^{25} = -80,2$ (C=0.001, MeOH). La proline lévogyre est connue pour avoir une configuration L [17] dans le cas de la proline cette configuration correspond à la stéréochimie (S) du centre C-2_{proline}.

Cette analyse mène à la structure finale reportée dans la figure IV.2.18. Cette molécule est nouvelle, nous la reportons pour la première fois dans la littérature. Il s'agit du salonitolide 13-N-proline dans lequel la proline est L. Nous lui avons attribué le nom de centaureolide B.

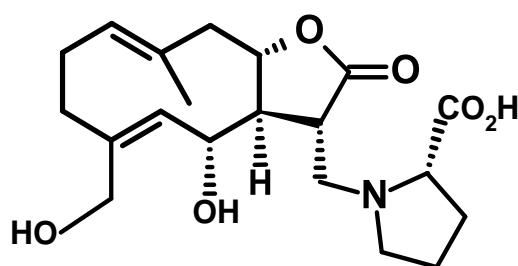


Figure IV.2.18 : Structure finale du composé **CP2**, centaureolide B

Concernant la molécule **CP1**, d'après les données de RMN ¹H de l'entité proline, qui sont très similaires à celles de l'entité proline du composé **CP2**, le centre chiral C-2_{proline} du composé **CP1** admet donc une configuration absolue (S) comme reporté dans la figure IV. 2.19 Cette molécule est nouvelle, nous la reportons pour la première fois dans la littérature. Il s'agit du 8β-hydroxy, 11β, 13-dihydro-8-deoxysalonitenolide 13-N-proline, dans lequel la proline est L. Nous lui avons attribué le nom de centaureolide A.

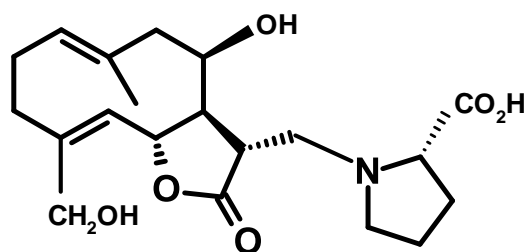


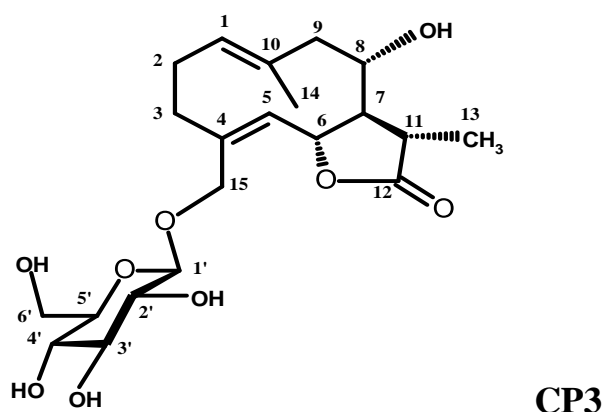
Figure IV.2.19: Structure finale du composé **CP1**, centaureolide A

Les données de RMN de la molécule **CP2**, le centaureolide B, sont reportées dans le tableau IV.2.2.

Tableau IV.2.2 : Données spectroscopiques RMN ¹H et RMN ¹³C du composé CP2

Carbone	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	131,2	5,05 dl (10,7)
2	26,0	2,31 m ; 2,20 ; m
3	34,6	2,63 m ; 1,99 ; m
4	139,2	-
5	135,0	4,97 d (10,3)
6	68,6	4,53 t (9,3)
7	58,4	2,55 m
8	81,0	4,34 tl (9,6)
9	47,7	2,70 dl (12,4) 2,56 m
10	139,5	-
11	44,4	3,37 m
12	175,6	-
13	58,2	3,62 dd (13,0 ; 9,6) 3,52 dd (13,0 ; 2,9)
14	16,5	1,53 s
15	59,6	4,23 d (12,9) 3,88 d (12,9)
Proline		
1	173,2	-
2	71,5	3,94 dd (9,2 ; 5,7)
3	29,5	2,49 m ; 2,19 m
4	24,3	2,17 m ; 1,99 m
5	54,8	3,88 m ; 3,17 m

IV.2.3 Elucidation structurale du composé CP3, MF9 isolé de la phase *n*-butanol



L'analyse simultanée des spectres RMN ¹H (Figure IV.2.20), HSQC (Figure IV.2.21) et HMBC (Figure IV.2.22) du composé CP3 mène à des résultats similaires à ceux du composé

CP1 à l'exception des signaux de la chaîne latérale. En effet, on remarque la disparition des signaux correspondant à l'entité proline. En revanche on a l'apparition de signaux caractéristiques d'une entité sucre de type hexose notamment celle d'un doublet à $\delta_H=4,31$ ppm ($J=7,8$ Hz) attribuable à son proton anomérique H-1'. La résonance du carbone anomérique C-1' est relevée à $\delta_C=104,5$ ppm. La valeur du déplacement de ce carbone indique qu'il est relié à l'aglycone par un pont oxygène quant à la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-1', elle permet de déduire une configuration β du carbone anomérique et également une orientation axiale du proton H-2', ce qui élimine les sucres de type mannose et rhamnose.

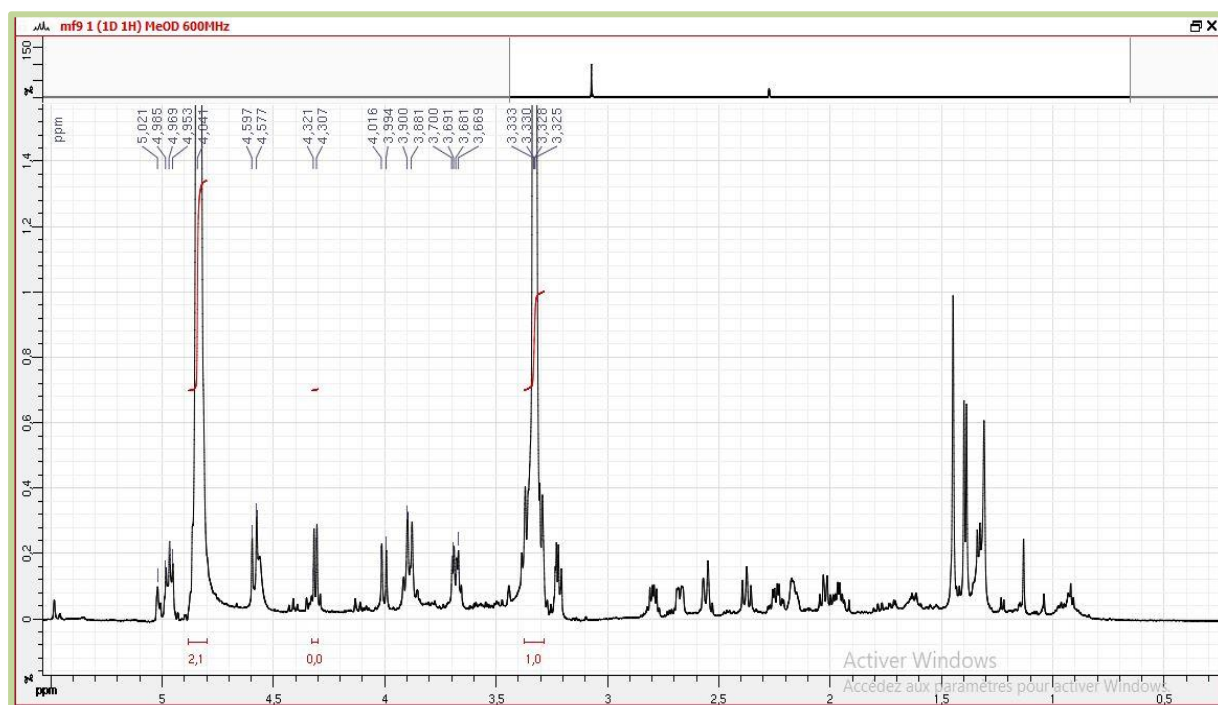


Figure IV.2.20: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé **CP3**, MF9

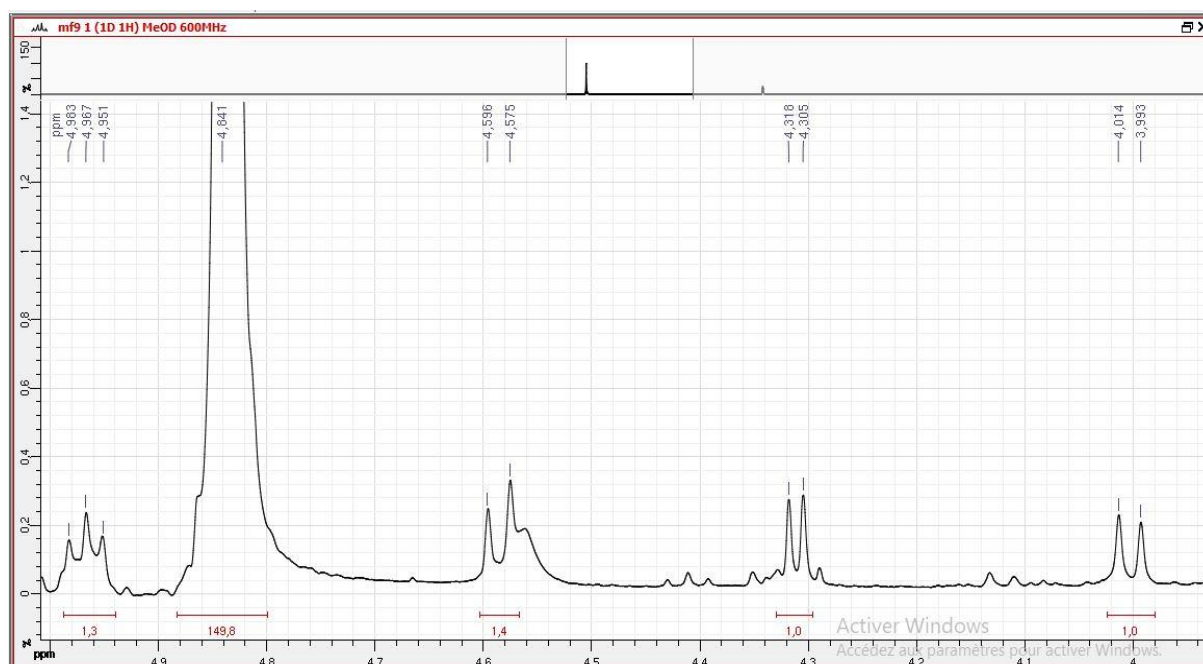


Figure IV.2.20.1: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé CP3, étagement 1

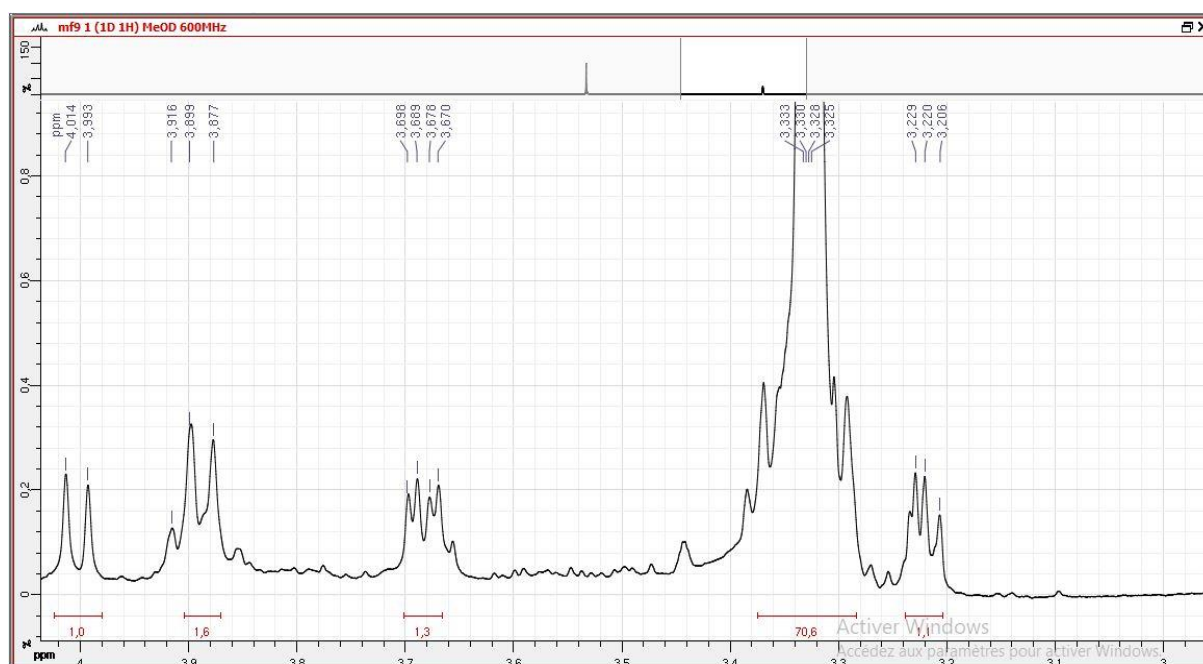


Figure IV.2.20.2 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé CP3, étagement 2

Comme autres signaux caractéristiques de cet hexose on relève un doublet large intégrant pour un proton à $\delta_{\text{H}}=3,89$ ppm ($J=13,2$ Hz) et un doublet de doublets intégrant pour un proton à $\delta_{\text{H}}=3,68$ ppm ($J=12,6$; 4,8 Hz) attribuables aux protons H-6'a et H-6'b, respectivement. Le signal du carbone C-6' est relevé à $\delta_{\text{C}}=62,5$ ppm. Les signaux des autres

protons de l'hexose apparaissent dans l'intervalle 3,45 – 3,20 ppm partiellement recouverts par les signaux du méthanol résiduel et des molécules de méthanol partiellement deutérées. Les signaux des autres atomes de carbone de cet hexose, sont relevés grâce au spectre HSQC à $\delta_C=75,00$; 78,2 ; 72,5 et 77,8 ; ppm. Ces valeurs des déplacements chimiques sont conformes à celles des positions C-2', C-3', C-4' et C-5', respectivement, d'un glucopyranosyle [3]. De ce fait et toujours grâce au spectre HSQC, les signaux des protons H-2', H-3', H-4' et H-5' sont relevés à $\delta_H=3,25$; 3,37 ; 3,31 et 3,29 ppm, respectivement.

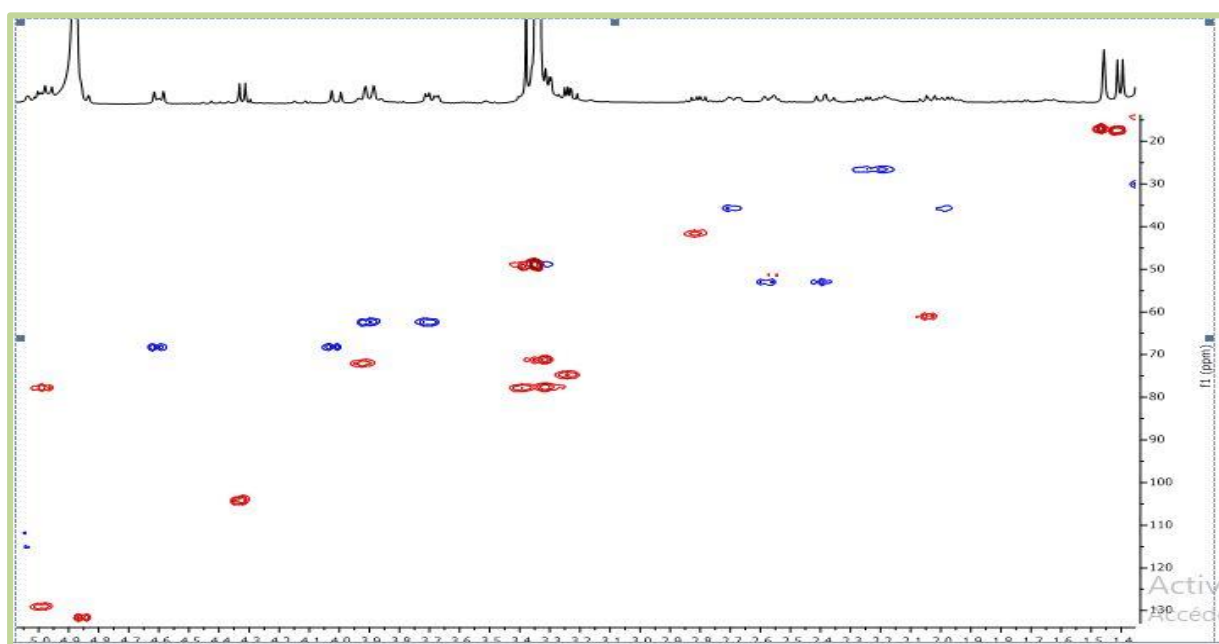


Figure IV.2.21: Spectre HSQC (CD₃OD, 600MHz) du composé CP3

A ce stade de notre analyse et vu la grande similitude structurale de ce composé et le composé CP1, nous pouvons attendre que le composé CP3 soit une lactone sesquiterpénique substituée entre autre par un groupement *O*-glucopyranosyle.

Sur le spectre HMBC le proton anomérique montre une tache de corrélation nette avec le carbone du méthylène résonant à $\delta_C=68,6$ ppm, grâce au spectre HSQC, on relève que les protons de ce méthylène résonnent sous forme d'un système AB à $\delta_H=4,58$ ppm et $\delta_H=4,00$ ppm ($J=12$ Hz). Comme nous sommes en présence d'un squelette de lactone sesquiterpénique, ce méthylène ne peut être attribué qu'à la position C-13, C-14 ou C-15. La position C-13 est vite écartée, en effet toujours sur le spectre HMBC, les protons du méthyle résonant sous forme d'un doublet à $\delta_H=1,40$ ppm ($J=7,2$ Hz) montrent une tache de corrélation avec le carbone du carbonyle de la γ -lactone orientant donc, vers le fait que ce méthyle n'est autre

que le C-13 ($\delta_C=17,8$ ppm). Toujours sur le spectre HMBC, les protons H₃-13 montrent une tache de corrélation avec le carbone du méthine résonant à $\delta_C=61,3$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-7. On relève alors, que H-7 résonne sous forme d'un quadruplet à $\delta_H=2,02$ ppm ($J=9,6$ Hz). Toujours sur le même spectre le C-7 montre des taches de corrélations avec les protons d'un méthylène résonant sous forme d'un doublet large à $\delta_H=2,56$ ppm ($J=10,8$ Hz) et d'un triplet à $\delta_H=2,37$ ppm ($J=10,8$ Hz) ; ces signaux sont de ce fait, attribués aux protons H-9a (H-9 β) et H-9b (H-9 α), respectivement. On relève sur le spectre HSQC la résonance du C-9 à $\delta_C=53,3$ ppm. L'examen approfondi du spectre HMBC montre que H-9a et H-9b corrélient avec le carbone d'un CH éthylénique et un carbone quaternaire éthylénique résonant à $\delta_C=129,9$ ppm et $\delta_C=135,4$ ppm, respectivement. Ces corrélations permettent d'attribuer ces carbones éthyléniques aux positions C-1 et C-10, respectivement. Le signal du proton H-1 est alors localisé à $\delta_H=5,05$ ppm (m). Toujours sur le même spectre les 2 carbones éthyléniques C-1 et C-10 montrent des taches de corrélation nettes et intenses avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à $\delta_H=1,44$ ppm permettant alors d'affecter ce méthyle à la position C-14. Le signal du C-14 est localisé à $\delta_C=17,4$ ppm. Cette analyse nous permet alors d'attribuer le méthylène portant le groupement *O*-glucopyranosyle et les deux carbones éthyléniques résonant à $\delta_C=140,9$ ppm et $\delta_C=139,9$ ppm, aux positions C-15, C-4 et C-5, respectivement, du squelette germacranolide. On relève alors, le signal de H-5 à $\delta_H=4,82$ ppm (spectre HSQC) partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du CD₃OD.

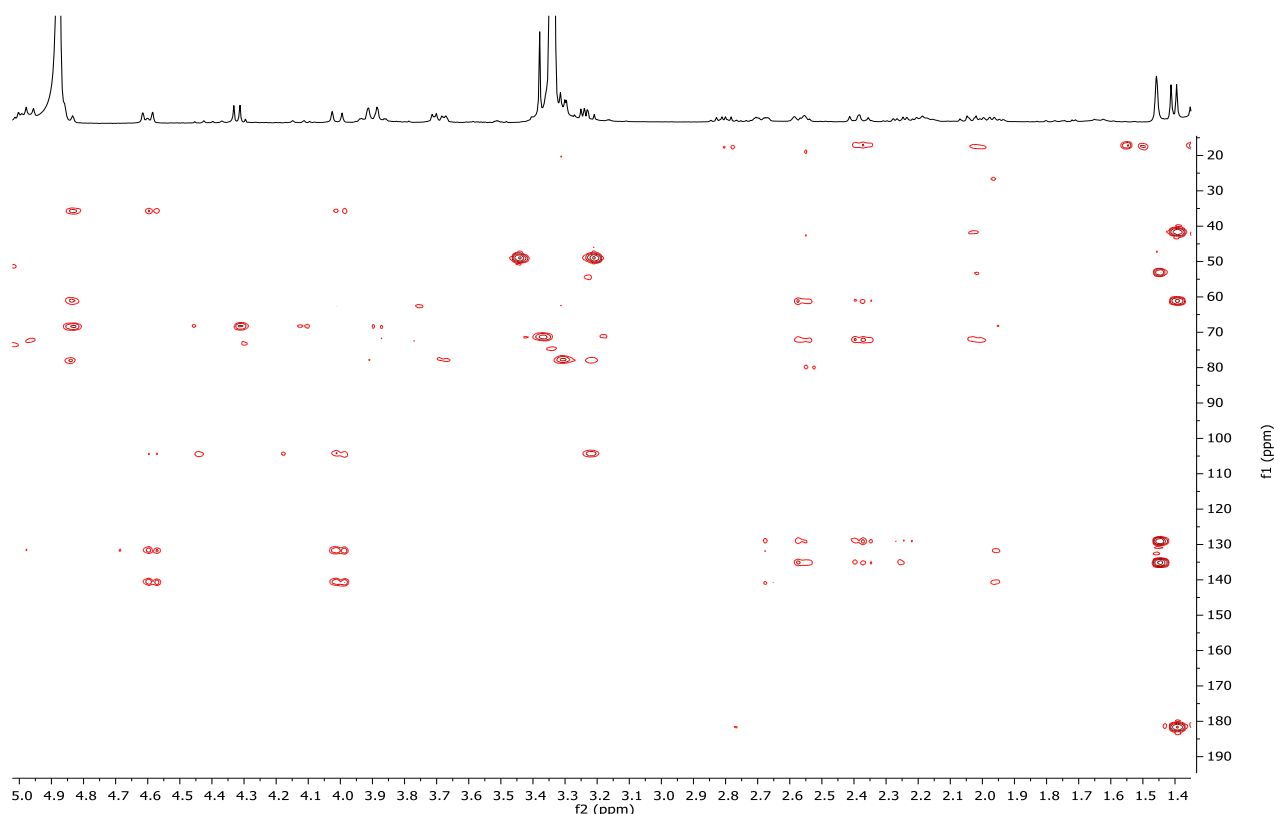


Figure IV.2.22: Spectre HMBC (CD₃OD, 600MHz) du composé CP3

A ce stade de notre analyse, il est évident que le méthine de fermeture de cette γ -lactone est celui dont la résonance du carbone est située à $\delta_C=78,1$ ppm. Ce carbone corrélant avec le proton résonant sous forme d'un triplet ($J=9,6$ Hz) à $\delta_H=4,97$ ppm sur le spectre HSQC, est en faveur d'une fermeture en C-6vu la multiplicité du signal de son proton. Un retour vers le spectre HMBC permet de relever une corrélation entre ce proton H-6 et le carbone du méthine oxygéné résonant à $\delta_C=71,5$ ppm ($\delta_H=3,88$ ppm, m). Le carbone de ce méthine est de ce fait attribué à C-8 et son proton à H-8. Ainsi ce germacranolide est hydroxylé en C-8 et n'est pas substitué en C-2 et en C-3 vu la présence de deux autres groupements CH₂. Le premier dont les protons résonnent sous forme de deux multiplets à $\delta_H=2,66$ ppm et $\delta_H=1,96$ ppm est attribué à la position C-3 [$\delta_C=36$ ppm ; $\delta_H=2,66$ ppm (H-3a) ; $\delta_H=1,96$ ppm (H-3b)] vu la corrélation de H-3b avec le carbone C-15 relevée sur le spectre HMBC. De ce fait le deuxième CH₂ sera attribué à la position C-2 [$\delta_C=26,9$ ppm ; $\delta_{H-2a}=2,21$ ppm (m) ; $\delta_{H-2b}=2,17$ ppm (m)] ; cette attribution est confortée par la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC, entre H-2b et C-10. A ce stade de notre analyse la molécule **CP3** est un germacranolide fermé en C-6, hydroxylé en C-8 et *O*-glucosylé en C-15. Les configurations des deux doubles liaisons sont déduites *trans-trans* grâce à la valeur du déplacement chimique inférieure à 20 ppm du carbone du méthyle C-14 et la valeur du

déplacement chimique du proton H-6 proche de 5 ppm. Quant à la stéréochimie des centres chiraux C-6, C-7, C-8 et C-11 elle est déduite de la valeur 9,6 Hz relevé dans le signal de H-6 et le signal de H-7 indiquant une disposition anti de H-6 et H-7 (H-6 β et H-7 α), une disposition anti de H-7 et H-8 (H-7 α et H-8 β), une disposition anti de H-7 et H-11 (H-7 α et H-11 β). Cette dernière donnée indique une orientation α du CH₃-13.

L'ensemble de ces données mènent à la molécule : 11 β , 13-dihydrosalonitenolide 15-O- β -glucopyranoside (Figure IV.2.23).

Les données RMN de cette molécule sont regroupées dans le tableau IV.2.3

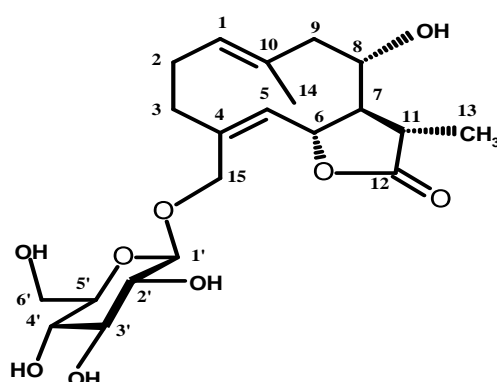


Figure IV.2.23 : Structure du composé **CP3**

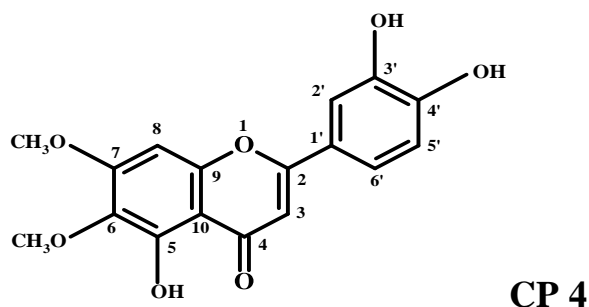
Tableau IV.2.3 : Données spectroscopiques RMN 1H et RMN 13C du composé **CP3**, MF9

Position	δ_H ppm J (Hz)	δ_C ppm
1	4,9 m	129,9
2a	2,21 m	26,9
2b	2,17 m	
3a	2,66 m	36
3b	1,96 m	
4	-	140,9
5	4,8 1H	131,9
6	4,97 1H	78,1
7	2,02 1H q ($j=9,6$ Hz)	61,3
8	3,92 1H m	71,5
9a	2,56 1H dl (10,8)	53,3
9b	2,37 1H t (10,8)	
10	-	135,4
11	2,83 1H	41,9
12	-	182
13	1,39 3H d 7,2	17,8
14	1,44 3H s	17,4

Tableau IV. 2.3 Suite : Données spectroscopiques RMN ¹H et RMN ¹³C du composé CP3, MF9

15a	4,59	1H d 12,0	68,6
15b	4,00	1H d 12,0	
1'	4,31	1H d 7,8	104,5
2'	3,23	1H	75,1
3'	3,39	1H	78,2
4'	3,34	1H	72,4
5'	3,27	1H	77,9
6'a	3,89	1H dl 12,9	62,7
6'b	3,68	1H dd 12,9 ; 6,0	

IV.2.4 Elucidation structurale du composé CP 4 (CPA91) isolé de la phase acétate d'éthyle



La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR. Le spectre UV enregistré dans le méthanol montre deux bandes, la bande I à λ_{max} 342 nm et la bande II à λ_{max} 273 nm confirmant la nature flavonique de ce composé.

Le spectre enregistré après addition de NaOH montrant un déplacement bathochrome de la bande I (+62 nm) avec un effet hyperchrome, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position C-4'.

Le spectre obtenu après addition de NaOAc dans la solution méthanolique ne montrant pas de déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre enregistré dans le méthanol oriente vers la présence d'un 7-OR dans ce flavonoïde.

Le spectre obtenu après addition de AlCl₃+HCl dans la solution méthanolique montrant un déplacement bathochrome de (+17 nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement OH libre en position C-5 avec une oxygénation de la position C-6.

La comparaison des spectres enregistrés après addition d' AlCl_3 et AlCl_3+HCl montrant un effet hypsochrome de la bande I dans le deuxième spectre par rapport au premier oriente alors, vers la présence d'un système *ortho*-diOH sur le noyau B de ce flavonoïde. Cette hypothèse est confortée par le spectre enregistré en présence de $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ qui, comparé au spectre enregistré dans le méthanol, montre un déplacement bathochrome de la bande I (+13 nm).

Les spectres d'absorption UV-Vis de cette série spectrale en présence de réactifs sont regroupés dans la figure IV.2.24.

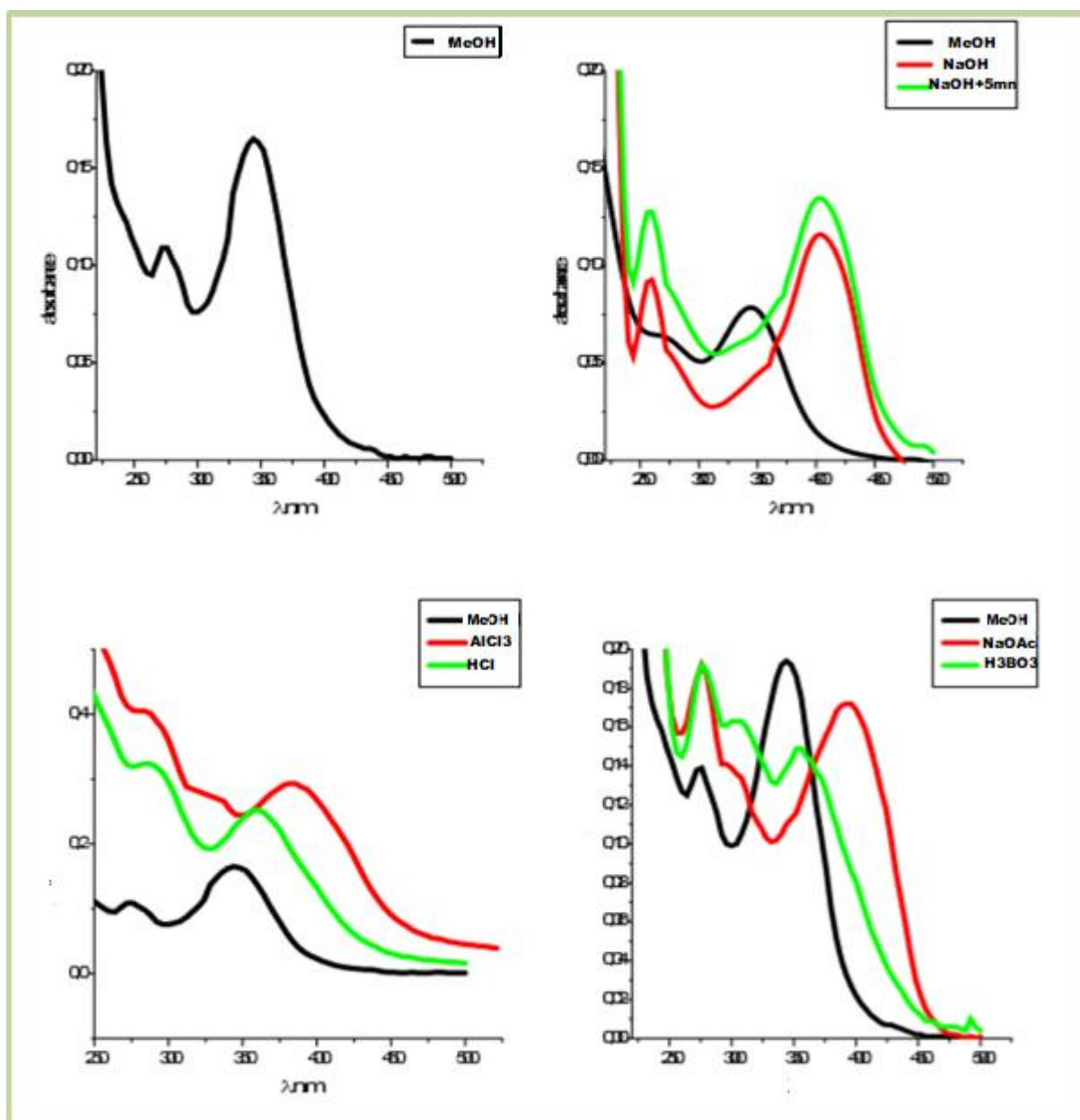


Figure IV.2.24: Série spectrale en présence de réactifs du composé CP 4 (CPA 91)

Toutes ces données réunies dans le tableau IV.2.4 mènent à la structure partielle illustrée dans la figure IV.2.25

Tableau IV.2.4 : Résultat de la série spectrale UV-Vis du composé **CP 4** (CPA 91)

Réactif	Bande I	Bande II	Observations
MeOH	342	273	
NaOH	405, effet hyperchrome	260	4'-OH
AlCl ₃	383	288	5-OH et 6-OR <i>ortho</i> -diOH sur le noyau B
AlCl ₃ + HCl	360	288	
NaOAc	393	273, 303	7-OR
NaOAc + H ₃ BO ₃	355	277, 307	<i>ortho</i> -diOH sur le noyau B

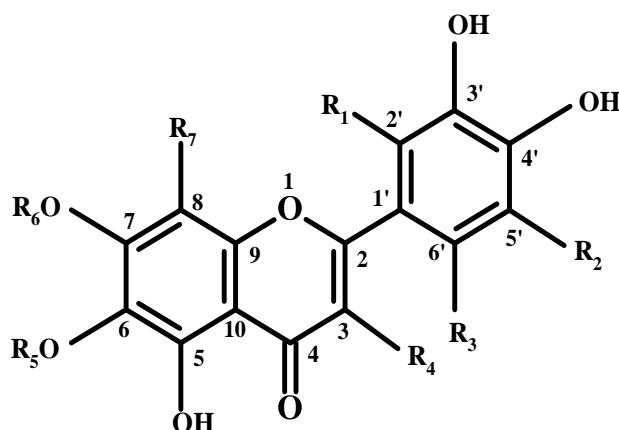


Figure IV.2.25: Structure partielle du composé CP 4 (CPA 91)

L'examen des spectres RMN ¹H (Figure IV.2.26), et HSQC (Figure IV.2.27) confirme bien la nature flavonique de cette molécule par la présence de signaux caractéristiques notamment :

- ✓ un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_H=7,47$ ppm ($J=8,6 ; 2,0$ Hz) attribuable au proton H-6' ($\delta_C=120,10$ ppm)
- ✓ un doublet d'intégration 1H à $\delta_H=7,44$ ppm ($J=2,0$ Hz) attribuable au proton H-2' ($\delta_C=113,20$ ppm)
- ✓ un doublet d'intégration 1H à $\delta_H=6,94$ ppm ($J=8,6$ Hz) attribuable au proton H-5' ($\delta_C=115,90$ ppm)

- ✓ un singlet d'intégration 1H à $\delta_H=6,83$ ppm, corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à $\delta_C=92,06$ ppm attribuable de ce fait au proton H-8 vu la valeur du déplacement chimique de son carbone porteur
- ✓ un singlet d'intégration 1H à $\delta_H=6,64$ ppm, corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à $\delta_C=104,06$ ppm attribuable de ce fait au proton H-3 vu la valeur du déplacement chimique de son carbone porteur
- ✓ deux singlets d'intégration 3H chacun à $\delta_H=4,02$ ppm ($\delta_C=57,02$ ppm) et $\delta_H=3,88$ ppm ($\delta_C=60,91$ ppm) attribuables à deux groupements méthoxyles.

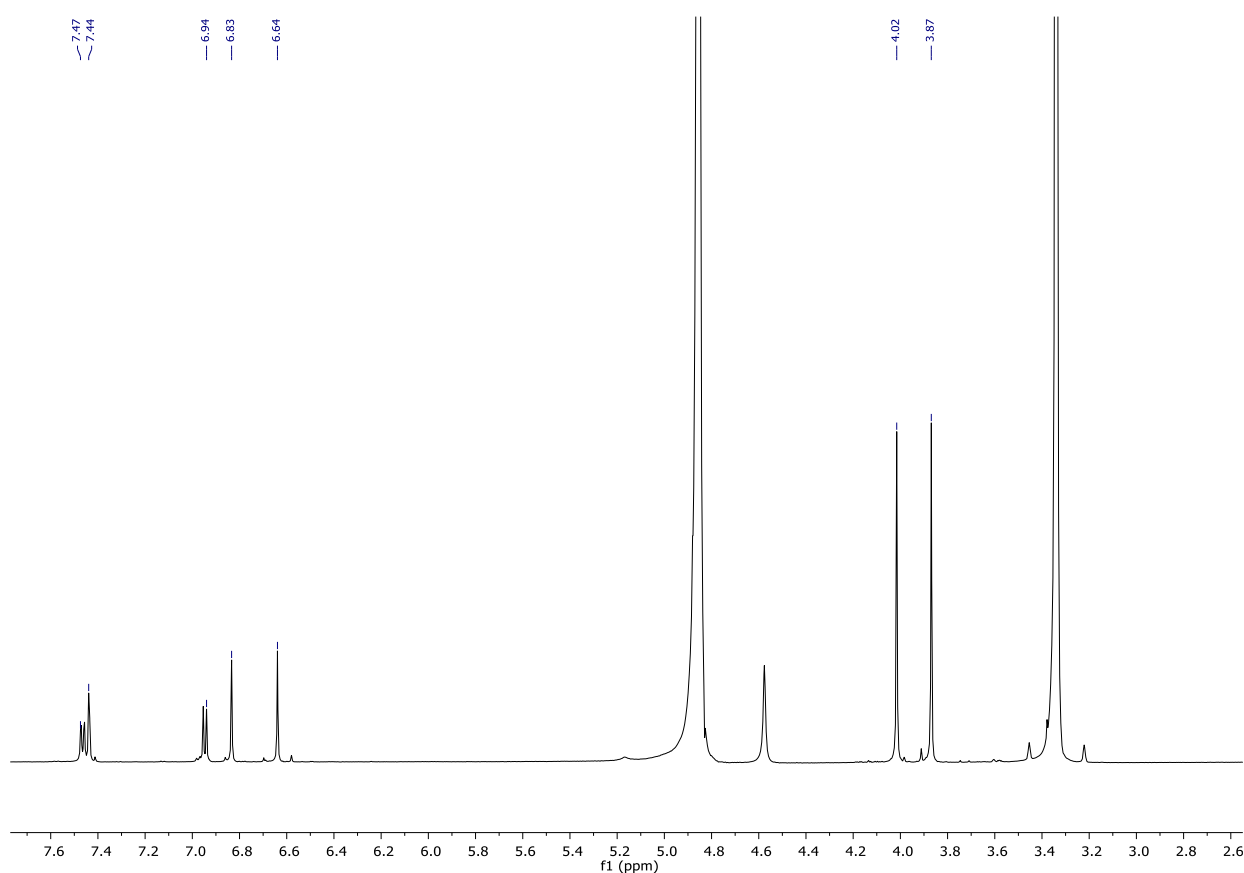


Figure IV.2.26 : Spectre RMN ^1H (CD $_3$ OD ,400 MHz) du composé CP 4 ; CPA 91

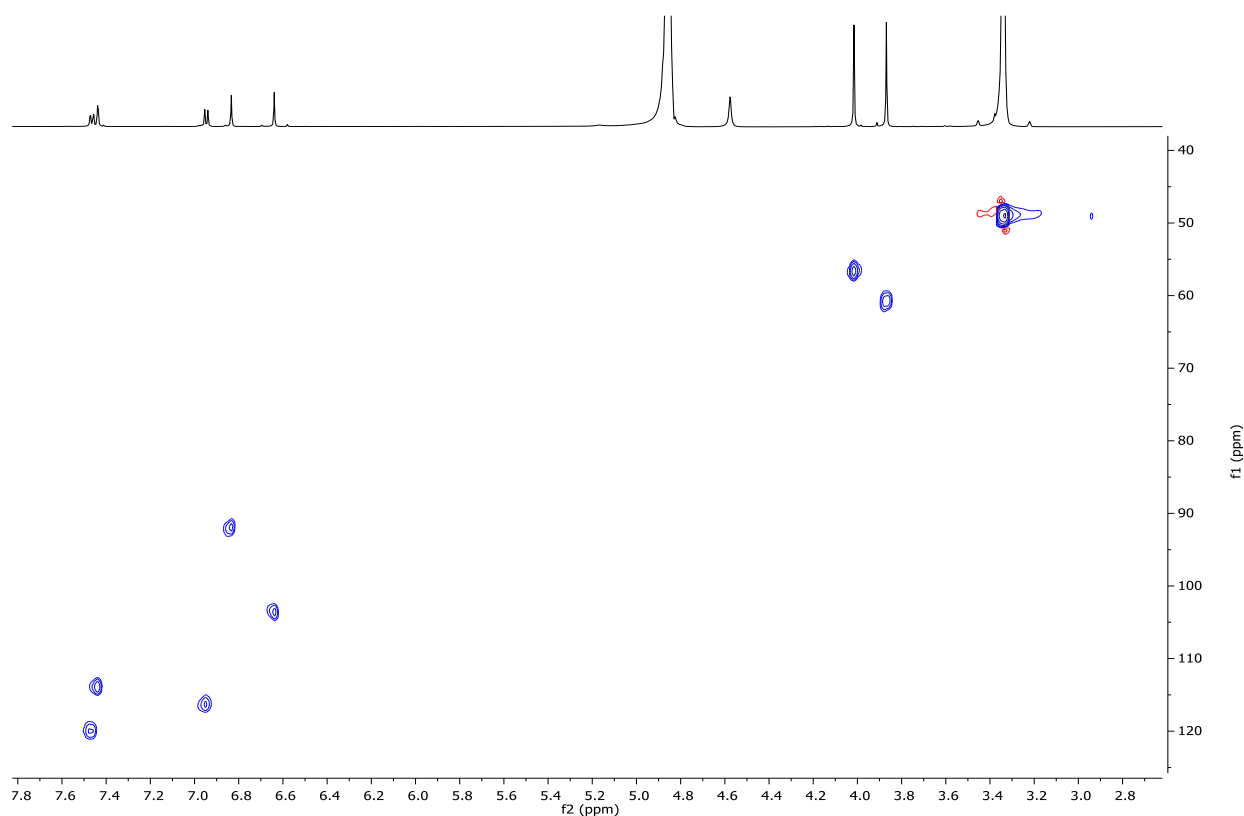
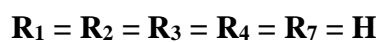


Figure IV.2.27: Spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP4, CPA91

A ce stade de notre analyse, nous pouvons d'ores et déjà déduire que les groupements **R₁**, **R₂**, **R₃**, **R₄**, **R₅**, **R₆** et **R₇** de la structure partielle précédente sont comme suit :



La structure finale de ce composé est par conséquent la 5,3',4'-trihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Figure IV.2.28). Cette molécule est connue sous le nom de cirsiol [18].

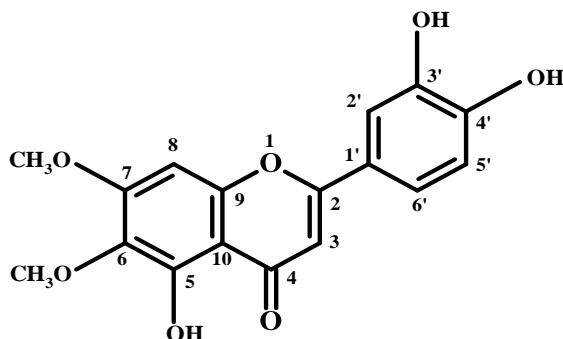


Figure IV.2.28: Structure finale du composé CP4 (CPA 91), cirsiol

Pour compléter les données de RMN relatives à cette molécule et notamment attribuer les carbones quaternaires, nous avons analysé le spectre relatif à l'expérience HMBC (Figure IV2.29) où l'on relève :

- ✓ Des corrélations entre les protons H-8 et H-3 et le carbone résonant à $\delta_C = 106,41$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-10.
- ✓ des corrélations entre les protons H-3 et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C = 121,90$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-1'.
- ✓ une corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_C = 133,10$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-6 vu la valeur de son déplacement chimique. On relève toujours sur le même spectre, une tache de corrélation entre ce carbone quaternaire (C-6) et les protons du méthoxyle résonant à $\delta_H = \delta = 3,88$ ppm ($\delta_C = 60,91$ ppm), confirmant ainsi la méthylation de cette molécule en C-6.
- ✓ une corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_C = 154,93$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-9, vu la valeur de son déplacement chimique
- ✓ une corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_C = 160,05$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-7 vu la valeur de son déplacement chimique et surtout le fait qu'il montre une corrélation avec les protons du méthoxyle résonant à $\delta_H = 4,02$ ppm ($\delta_C = 57,02$ ppm) confirmant ainsi la méthylation de ce composé dans la position C-7.
- ✓ Des corrélations entre les protons H-2' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C = 146,00$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-3'.
- ✓ Des corrélations entre les protons H-6' et H-2' et le carbone résonant à $\delta_C = 150,92$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-4'.
- ✓ Des corrélations entre les protons H-2', H-6' et H-3 et le carbone résonant à $\delta_C = 166,10$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-2.

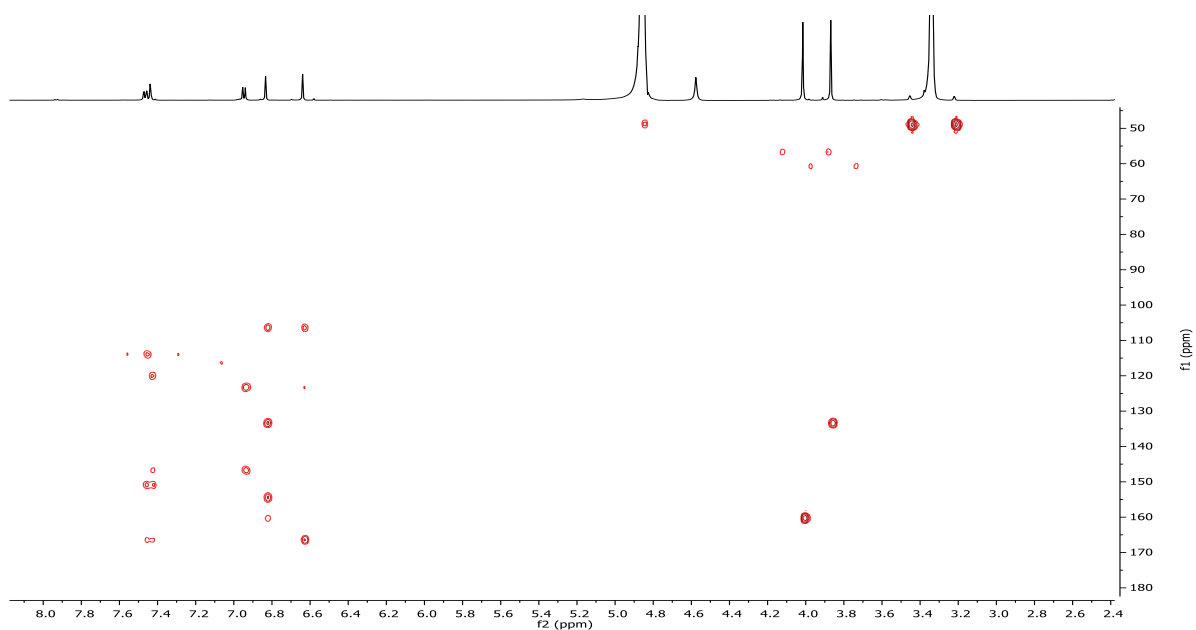


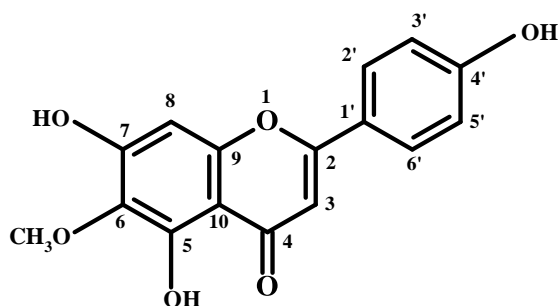
Figure IV.2.29: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP4, CPA 91

Toutes les données issues de l'analyse des spectres RMN ¹H, HSQC et HMBC sont regroupées dans le tableau IV.2.5

Tableau IV.2.5 : Données de RMN (CD₃OD) du composé **CP4** (CPA 91), cirsiol

Position	¹ H δ _{ppm} , J(Hz) δ _{ppm} ,	¹³ C δ _{ppm} ,
2	-	166,10
3	6,64 ; s	104,06
4	-	Non détecté dans la HMBC
5	-	Non détectable dans la HMBC
6	-	133,10
7	-	160,05
8	6,83 ; s	92,06
9	-	154,93
10	-	106,41
1'	-	121,90
2'	7,44 ; d (2,0)	113,20
3'	-	146,00
4'	-	150,92
5'	6,94 ; d (8,6)	115,90
6'	7,47 ; d (8,6 ; 2,0)	120,10
6-OCH ₃	3,88 ; s	60,91
7-OCH ₃	4,02 ; s	57,02

IV.2.5 Elucidation structurale du composé CP 5 (CPA59) isolé de la phase acétate d'éthyle



CP 5

La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR. Les signaux relevés sur le spectre RMN¹H (Figure IV.2.30), DEPT 135 (Figure IV.2.31) et HSQC (Figure IV.2.32), HMBC (Figure IV.2.33) et RMN ¹³C (Figure IV.2.34) confirment bien la nature flavonique de cette molécule notamment :

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=13,07$ ppm attribuable au proton du OH en position C-5.
- ✓ Un doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=7,93$ ppm ($J=8,4$ Hz) attribuable aux protons H-2' et H-6' ($\delta_{\text{C}}=128,43$ ppm)
- ✓ Un doublet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=6,93$ ppm ($J=8,4$ Hz) attribuable aux protons H-3' et H-5' ($\delta_{\text{C}}=115,94$ ppm)
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,78$ ppm, corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=102,36$ ppm attribuable de ce fait au proton H-3
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,60$ ppm corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=94,21$ ppm attribuable au proton H-8 vu la valeur du déplacement chimique de son carbone porteur
- ✓ Un dernier singulet d'intégration 3H à $\delta=3,76$ ppm ($\delta_{\text{C}}=59,91$ ppm) attribuable à un groupement méthoxyle

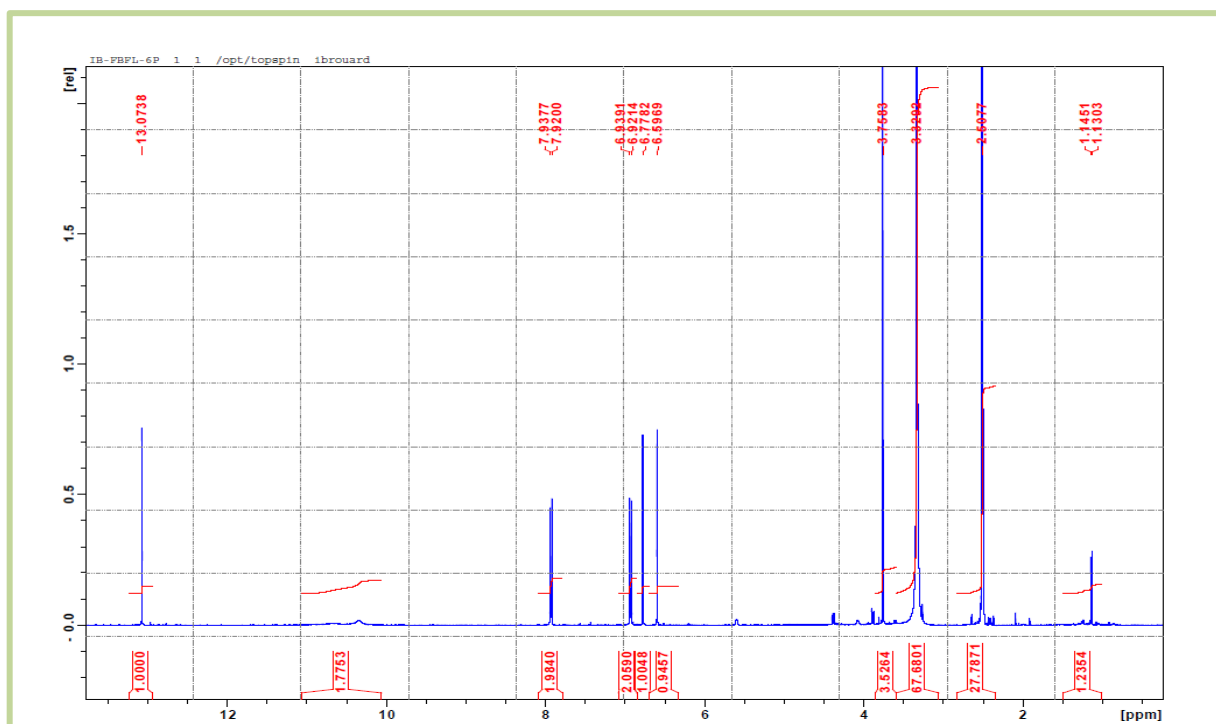


Figure IV.2.30: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP 5 (CPA 59)

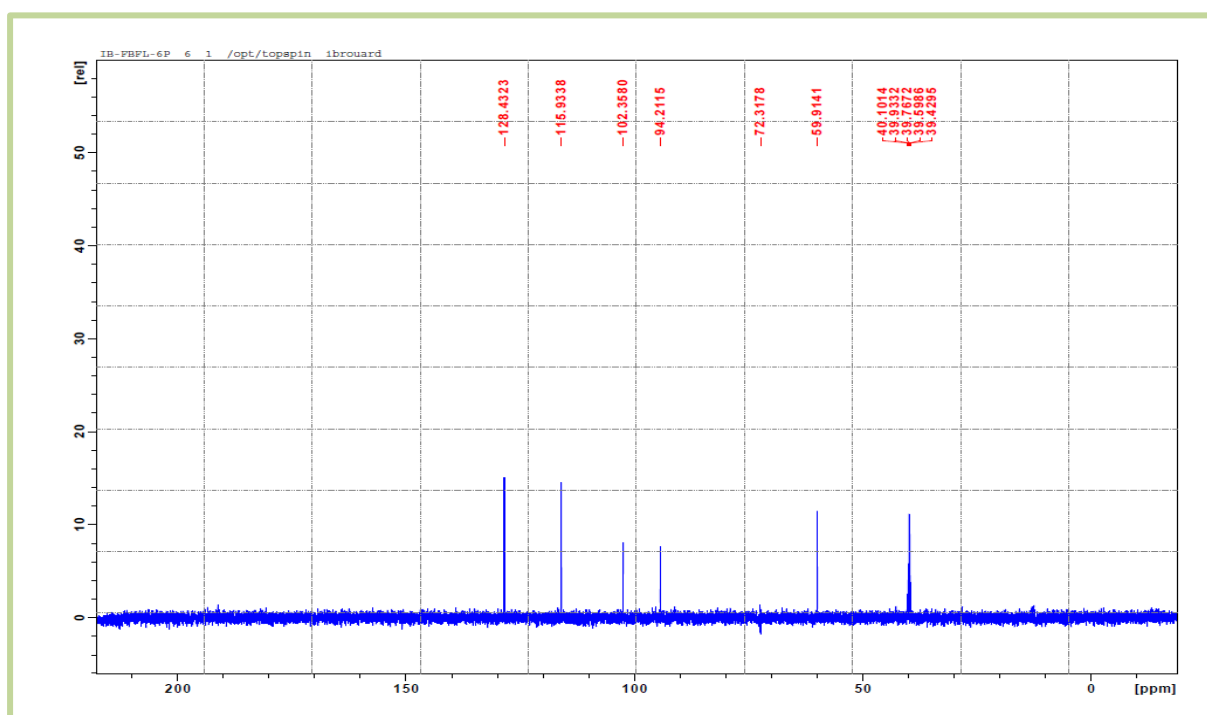


Figure IV.2.31: Spectre DEPT 135 (CD_3OD , 100 MHz) du composé CP 5 (CPA 59)

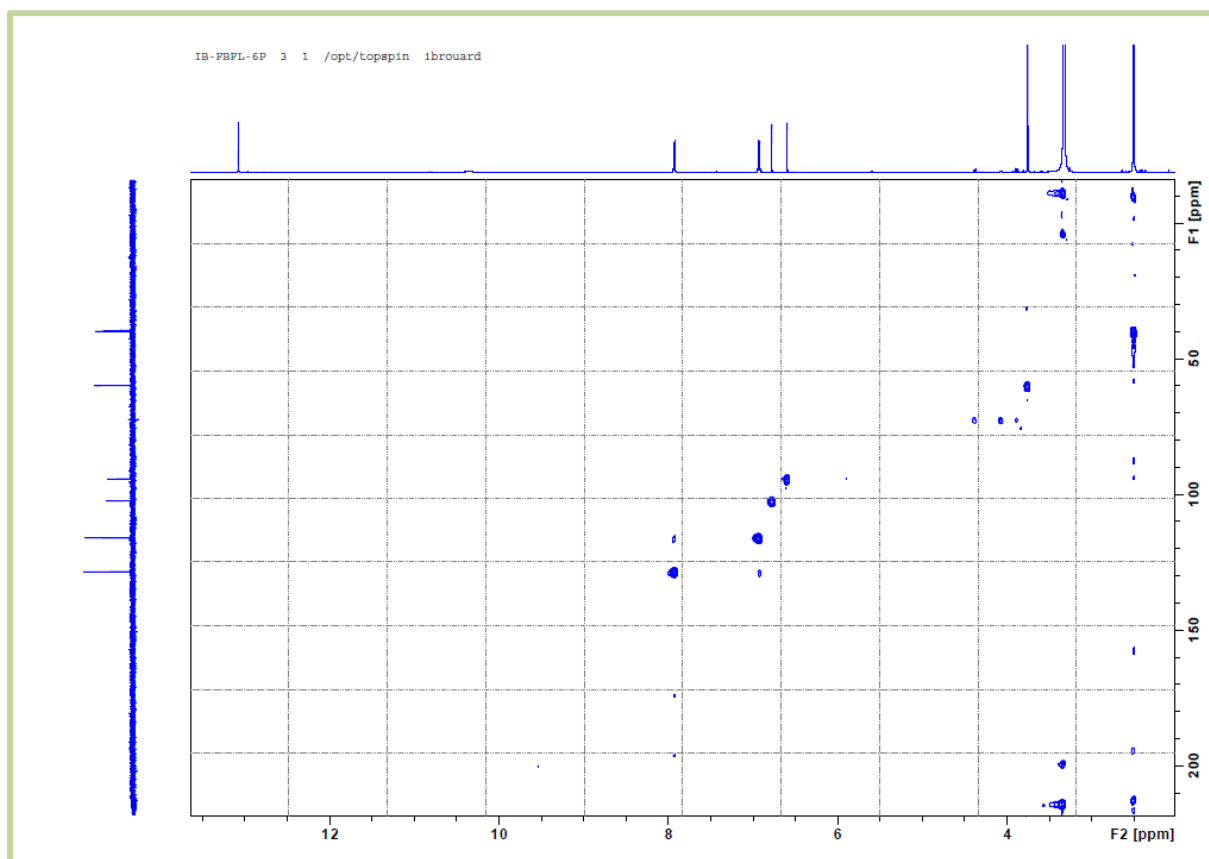


Figure IV.2.32: Spectre HSQC (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP 5 (CPA 59)

L'attribution des carbones quaternaires, a été réalisée grâce aux corrélations de ces carbones avec les protons de cette molécule. On relève notamment sur le spectre HMBC:

- ✓ des corrélations entre les protons H-8, H-3 et le proton du OH en position C-5 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 104,04$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-10
- ✓ des corrélations entre les protons H-3, H-3' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 121,20$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-1'
- ✓ des corrélations entre le proton H-8 et le proton du OH en position C-5 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 131,35$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-6 vu la valeur de son déplacement chimique. On relève toujours sur le même spectre, une tache de corrélation entre ce carbone quaternaire (C-6) et les protons du méthoxyle précédemment invoqué, ce qui indique que cette molécule est méthoxylée en cette position
- ✓ une corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 152,36$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-9.

- ✓ une corrélation entre le proton du OH en position C-5 et le carbone résonant à $\delta_C = 152,74$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-5.
- ✓ des corrélations entre le proton H-8 et le proton du OH en position C-5 et le carbone résonant à $\delta_C = 157,24$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-7 vu la valeur de son déplacement chimique
- ✓ des corrélations entre les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C = 161,13$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-4'
- ✓ des corrélations entre les protons H-6', H-2' et H-3 et le carbone résonant à $\delta_C = 163,79$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-2
- ✓ des corrélations entre les protons H-3 et le carbone résonant à $\delta_C = 182,09$ ppm ; permettant son attribution au carbone C-4. Cette attribution est confortée par la valeur du déplacement chimique de ce carbone.

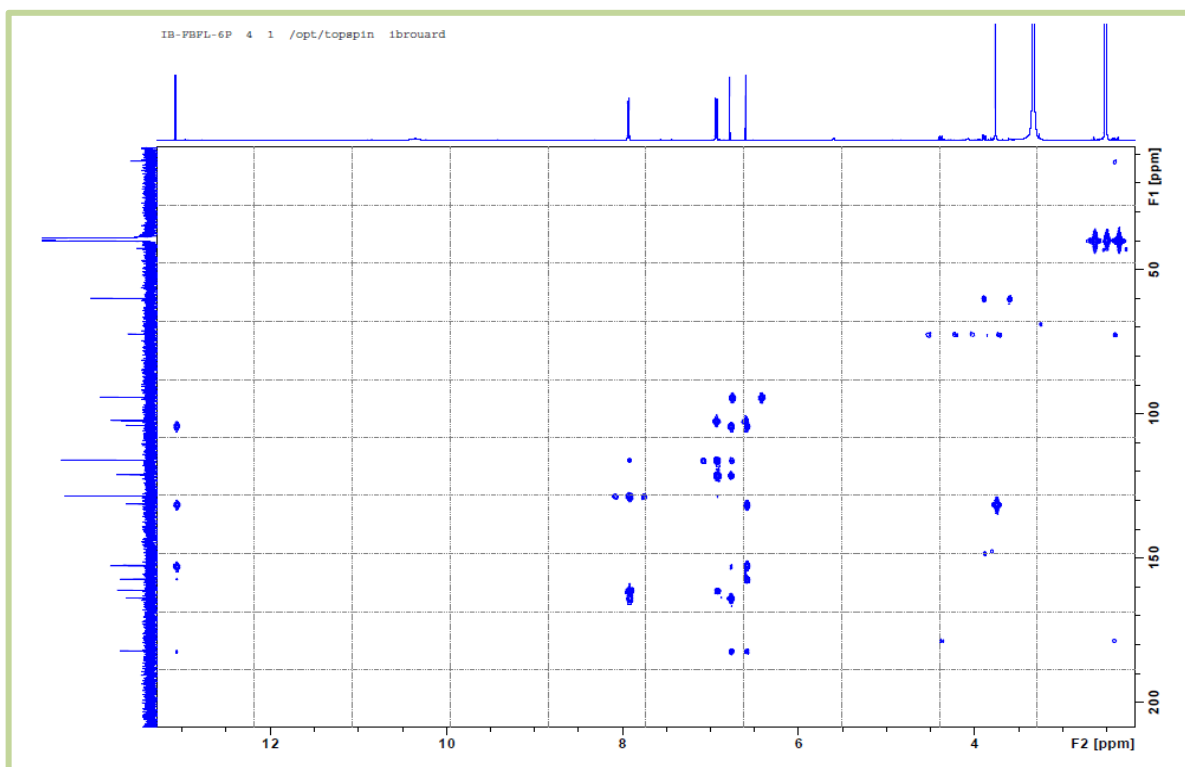


Figure IV.2.33: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP 5 (CPA 59)

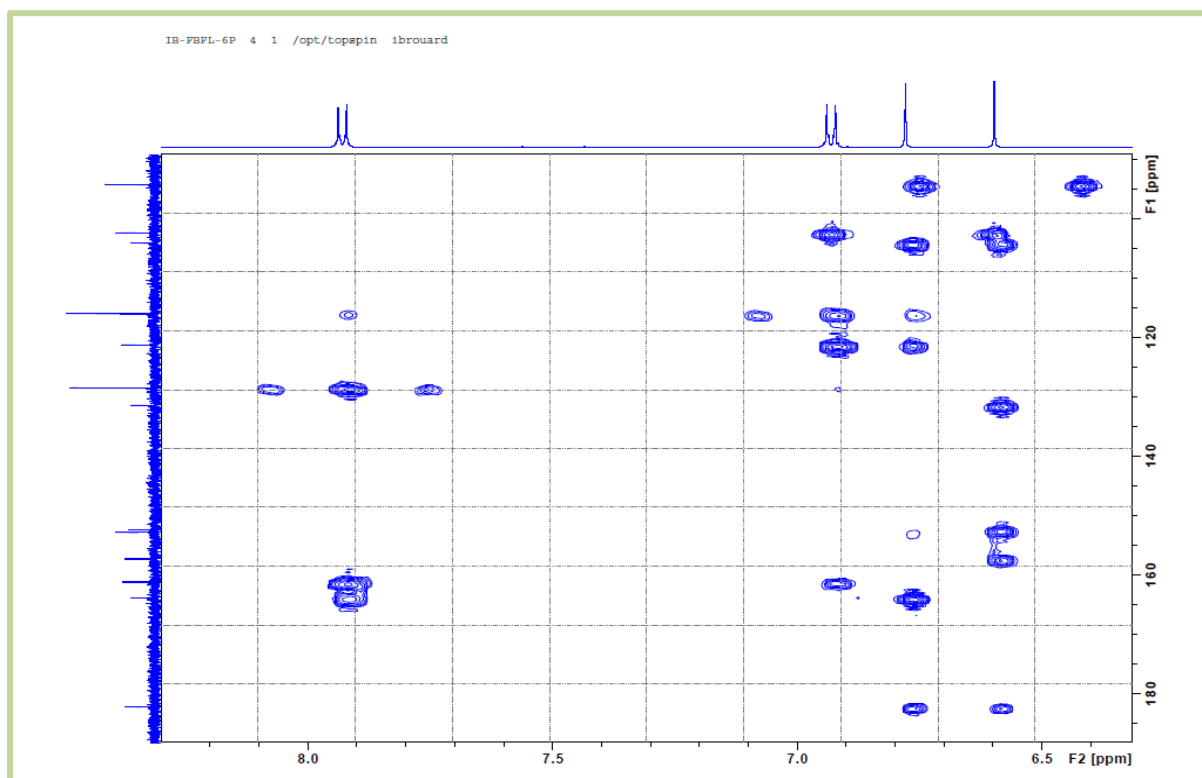


Figure IV.2.33.1: Spectre HMBC (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP 5 (CPA 59) étalé,

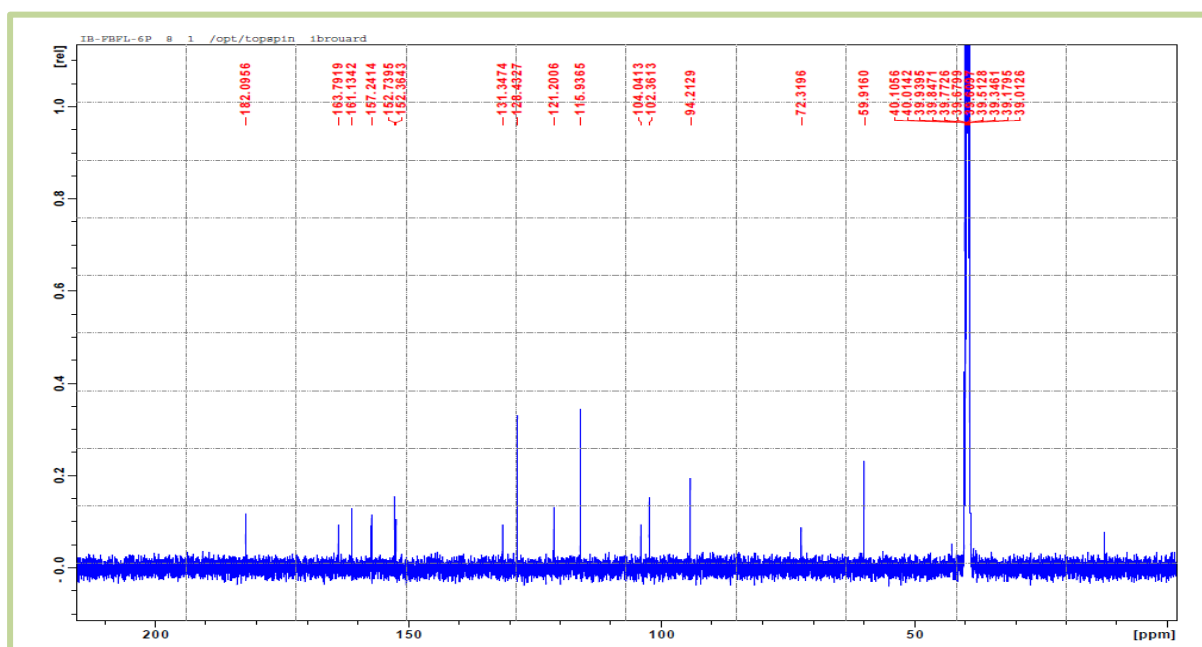


Figure IV.2.34: Spectre RMN¹³C (CD_3OD , 100MHz) du composé CP 5(CPA59)

Vu l'absence d'autres groupements hydrocarbonés d'après les spectres de RMN, il est évident que les positions C-4' et C-7 sont hydroxylées. Ainsi l'ensemble des données de RMN reportées dans le tableau IV.2.6 mènent à la 5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone connue sous le nom de hispiduline (Figure IV.2.35).

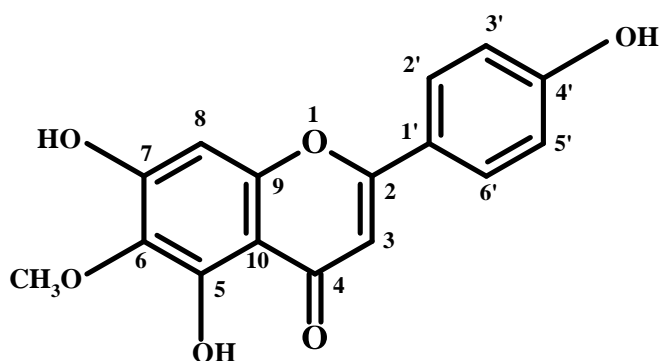
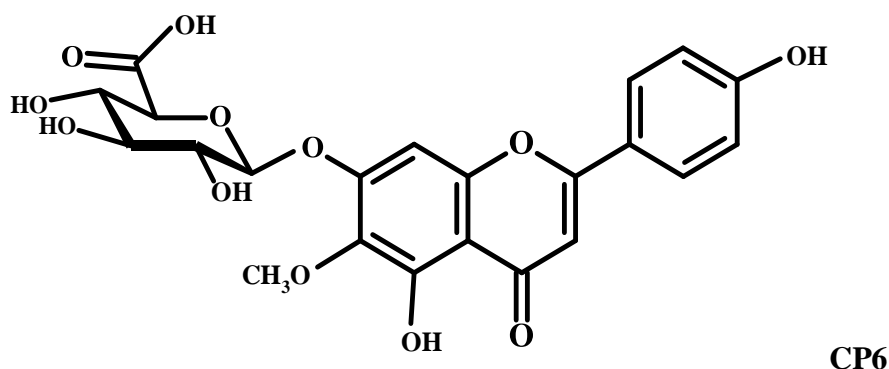


Figure IV.2.35: Structure finale du composé CP5 (CPA59), hispiduline

Tableau IV.2.6 : Données RMN (MeOH-d₄) du composé CP 5(CPA59), hispiduline

Position	¹ H δ _{ppm} /J(Hz)	¹³ C δ _{ppm} ,
2	-	163,19
3	6,78 ; s	102,36
4	-	182,09
5	-	152,74
6	-	131,35
7	-	157,24
8	6,60 ; s	94,21
9	-	152,36
10	-	104,04
1'	-	121,20
2' et 6'	7,93 ; d (8,4)	128,43
3' et 5'	6,93 ; d (8,4)	115,94
4'	-	161,13
6-OCH ₃	3,76 ; s	59,91
5-OH	13,07 ; s	-

IV.2.6 Elucidation structurale du composé CP6 (MF13) isolé de la phase *n*-butanol



La fluorescence noir-violet sous la lumière UV (365 nm) indique que ce composé possède une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

L'examen du spectre RMN ^1H (Figure IV.2.36) montre la présence d'un ensemble de signaux que nous pouvons répartir en deux groupes. Le premier groupe comporte :

- deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à $\delta_{\text{H}}=7,93$ ppm et à $\delta_{\text{H}}=6,95$ ppm ($J=9$ Hz), attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5', respectivement, indiquant ainsi une oxygénation du noyau B en position 4'
- un singulet à $\delta_{\text{H}}=7,03$ ppm intégrant pour un proton attribuable à H-8 grâce à la tache de corrélation observée sur le spectre HSQC (Figure IV.2.37) avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=95,6$ ppm valeur caractéristique du C-8 d'un flavonoïde. La multiplicité du signal de ce proton indique une substitution de la position C-6.
- un singulet à $\delta_{\text{H}}=6,68$ ppm intégrant pour un proton attribuable à H-3 indiquant ainsi une structure de type flavone.

Après examen et analyse approfondie des spectres proton, HSQC et HMBC (Figure IV.2.38), le deuxième groupe caractérisant en partie un hexose comporte :

- doublet à $\delta_{\text{H}}=5,17$ ppm ($J=7,8$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène vu la valeur de son déplacement chimique. La valeur de la constante de couplage permet de déduire une configuration β de ce carbone anomérique que nous numérotions C-1''.
- des signaux montrant des effets de toit, intégrant ensemble pour 3H et résonant, respectivement sous forme d'un doublet de doublets ($J=9 ; 7,8$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=3,61$ ppm ; d'un triplet ($J=9$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=3,59$ ppm et également sous forme d'un triplet ($J=9$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=3,47$ ppm attribuables par conséquent à des protons de cet hexose. D'après la multiplicité de

leurs signaux et les valeurs de leurs déplacements chimiques, ces protons sont attribuables à H-2'', H-4'' et H-3'', respectivement. A ce propos on remarque l'absence des signaux caractéristiques des protons de la position C-6'' ; par contre on relève la présence d'un singulet à $\delta_H=3,92$ ppm attribuable à un groupement méthoxyle, ce signal recouvre partiellement un signal relatif à un proton car l'intégrale totale de ces deux signaux équivaut à 4H. Ce proton ne peut être attribué qu'à H-5'', son déplacement chimique est évalué à environ $\delta_H=3,94$ ppm. Cette valeur du déplacement chimique de H-5'' additionnée à l'absence de protons en C-6'' et aux valeurs des constantes de couplage relevées dans les signaux de H-2'', H-3'' et H-4'', indiquent que cette entité sucre est de type *O*-glucuronopyranosyle (Figure IV.2.39).

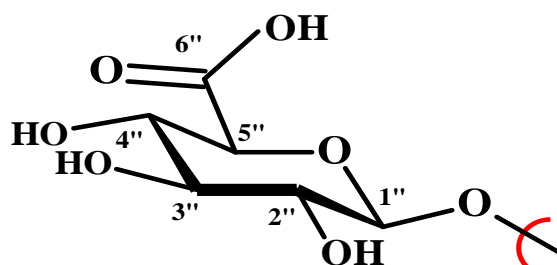


Figure IV.2.39 : Entité *O*-glucuronopyranosyle

A ce niveau nous pouvons attendre une flavone substituée en C-4', C-5, C-6 et C-7. Les quatre substituants attendus sont : un méthoxyle, un *O*-glucuronopyranosyle et par conséquent deux hydroxyles.

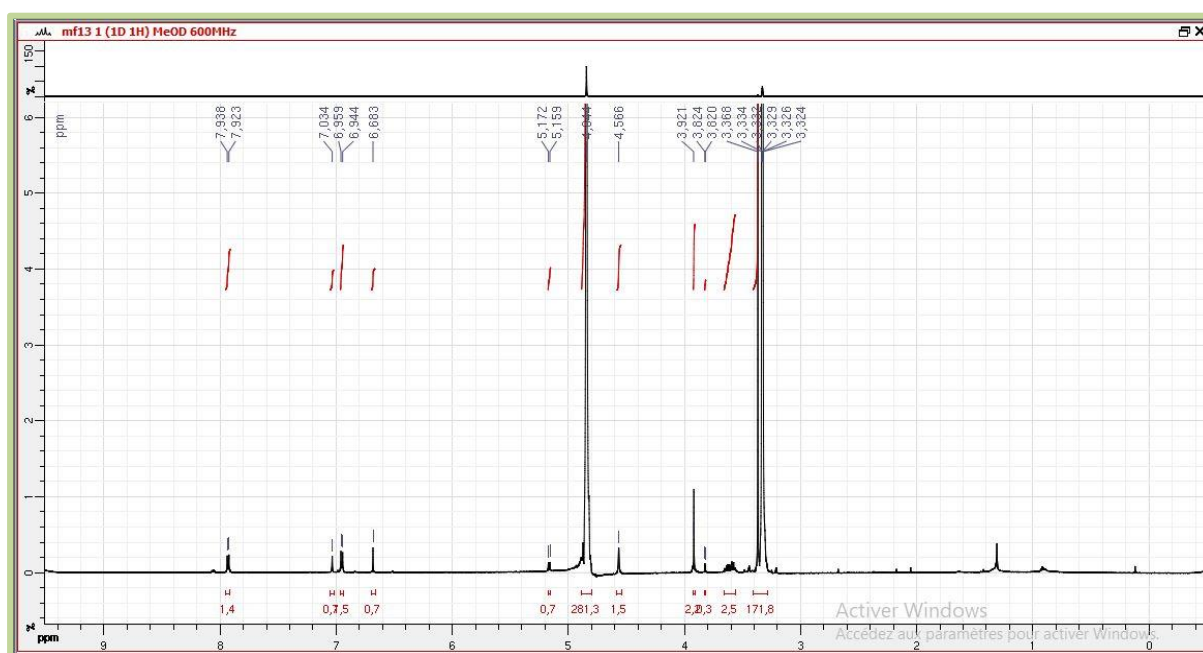


Figure IV.2.36: Spectre RMN¹H (CD₃OD,600MHz) du composé CP6, MF 13

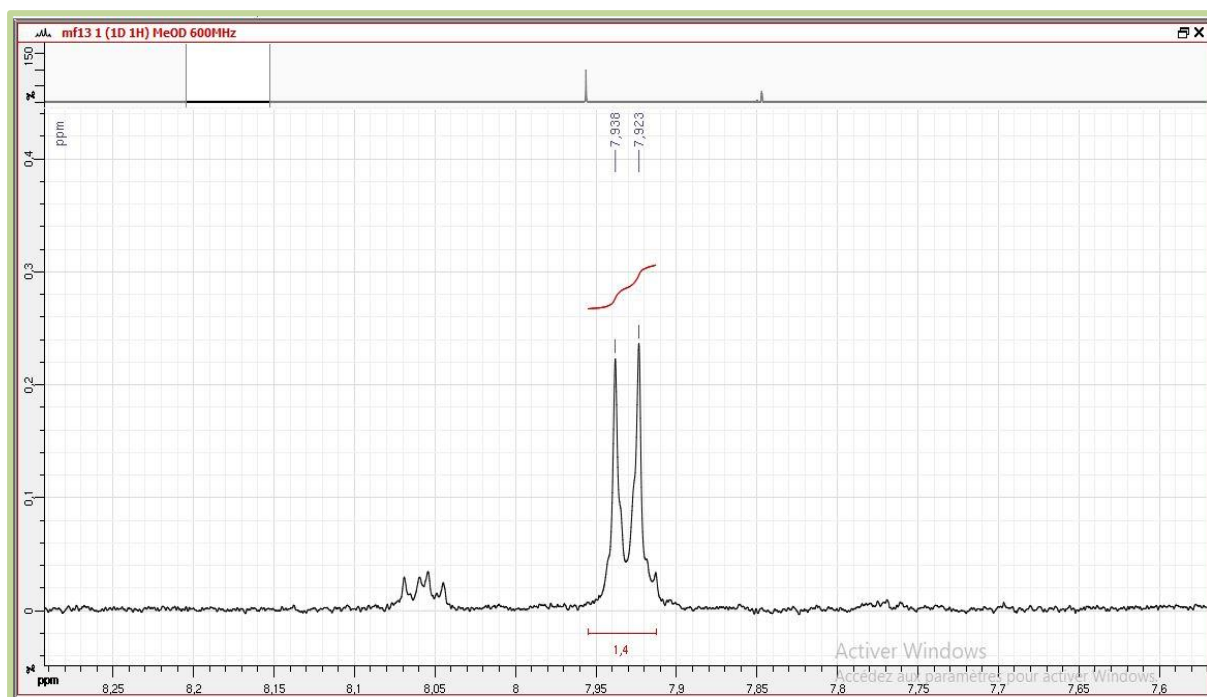


Figure IV.2.36.1: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé **CP6**, étalement 1

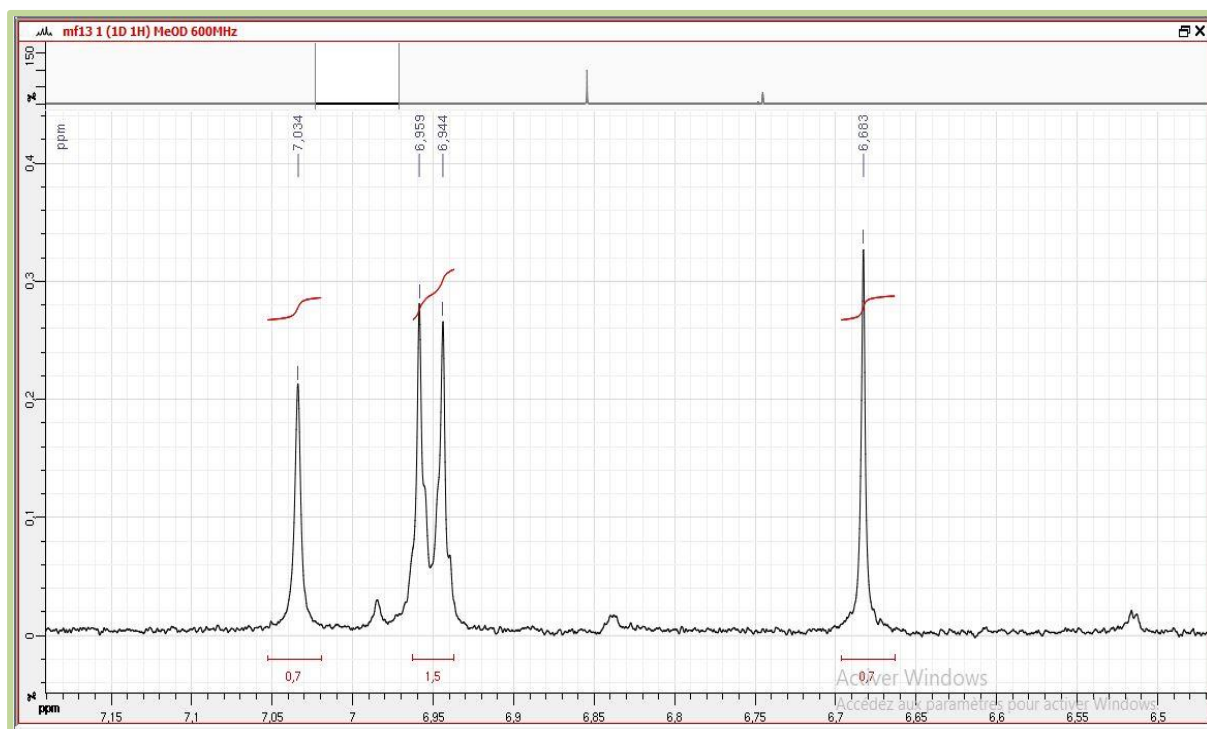


Figure IV.2.36.2: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600MHz) du composé **CP6**, étalement 2

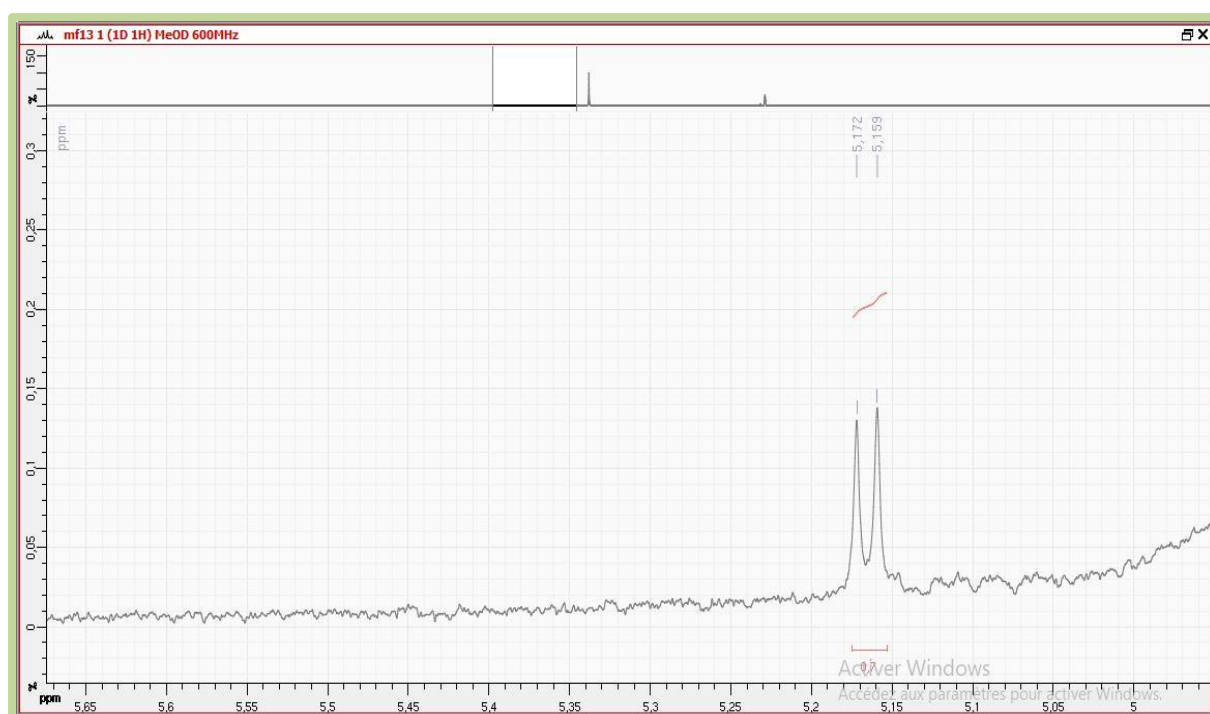


Figure IV.2.36.3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600MHz) du composé CP6, étalement 3

L'analyse du spectre HSQC nous a permis de reporter les données :

- le signal des protons H-2' et H-6' permet la localisation du signal des carbones C-2' et C-6' à $\delta_{\text{C}}=129,9$ ppm
- le signal des protons H-3' et H-5' permet la localisation du signal des carbones C-3' et C-5' à $\delta_{\text{C}}=116,9$ ppm
- la résonance du C-3 est localisée à $\delta_{\text{C}}=102,3$ ppm
- comme signalé plus haut, le C-8 est localisé à $\delta_{\text{C}}=95,6$ ppm
- le proton anomérique H-1'' ($\delta_{\text{H}}=5,17$ ppm) permet la localisation de la résonance du C-1'' à $\delta_{\text{C}}=102,48$ ppm
- la résonance du carbone du groupement méthoxyle est relevée à $\delta_{\text{C}}=61,09$ ppm

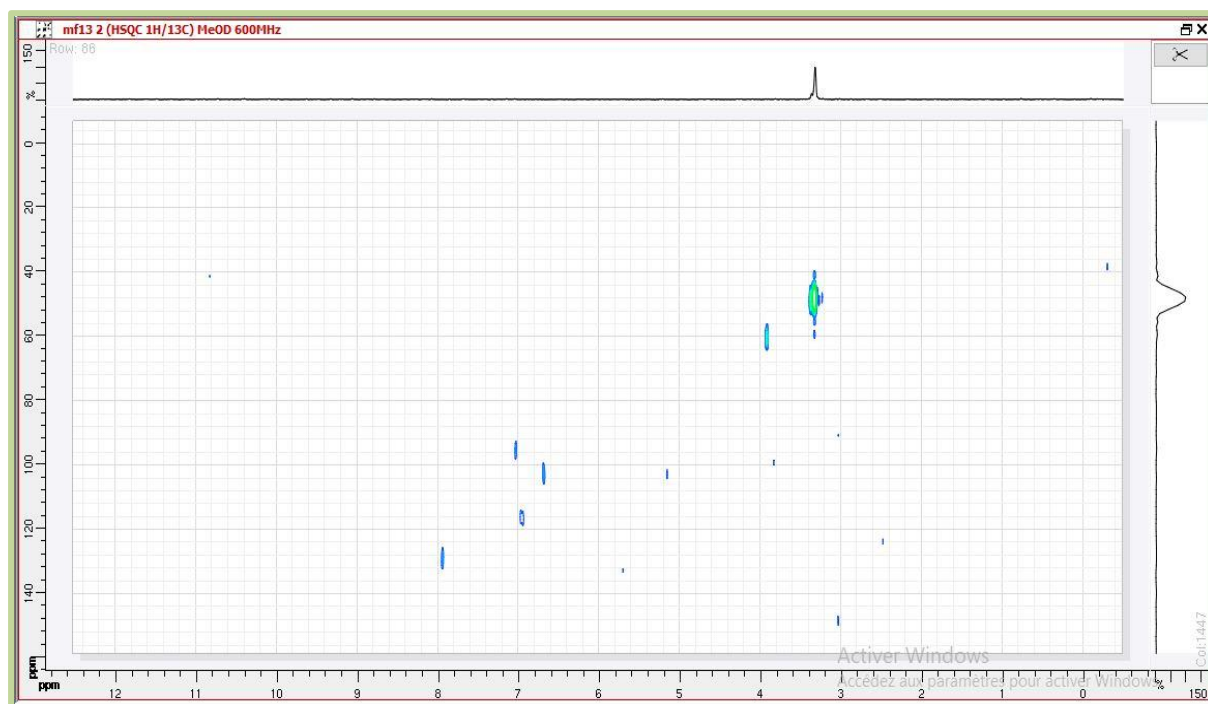


Figure IV.37: Spectre HSQC (CD₃OD, 600MHz) du composé CP6, MF13

Les déplacements chimiques des carbones quaternaires de la génine ont été établis grâce à l'examen du spectre HMBC (Figure IV.2.38) qui montre en effet :

- des taches de corrélation entre les protons H-8 ($\delta_H=7,03$ ppm), H-3 et le carbone résonant à $\delta_C=106,9$ permettant ainsi son attribution au C-10.
- une tache de corrélation entre le proton H-8 ($\delta_H=7,03$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=134,04$ ppm permettant ainsi son attribution au C-6, vu la valeur de son déplacement chimique. On relève également une corrélation entre ce carbone (C-6) et les protons du méthoxyle précédemment invoqué. Cette corrélation indique une méthylation de cette molécule en cette position et écarte la possibilité d'une estérification de la position C-6'' du groupement *O*- β -glucuronopyranosyle.
- une tache de corrélation entre le proton H-8 ($\delta_H=7,03$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=153,93$ ppm permettant ainsi son attribution au C-9, vu la valeur de son déplacement chimique.
- des taches de corrélation entre les protons H-3 ($\delta_H=6,68$ ppm), H-2' et H-6', et le carbone résonant à $\delta_C=167,5$ ppm permettant ainsi son attribution au C-2.
- des taches de corrélation entre les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C=163,15$ ppm permettant ainsi son attribution au C-4'.
- une tache de corrélation entre les protons magnétiquement équivalents H-3' et H-5' et le

carbone résonant à $\delta_C=123,37$ ppm permettant ainsi son attribution au C-1', vu la valeur de son déplacement chimique.

- une tache de corrélation entre le proton H-8 ($\delta_H=7,03$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=158,60$ ppm permettant ainsi son attribution au C-7, vu la valeur de son déplacement chimique. On relève également une corrélation entre ce carbone (C-7) et le proton anomérique du groupement *O*- β -glucuronopyranosyle précédemment invoqué. Cette corrélation indique que cette entité est reliée à cette position.
- une tache de corrélation entre le proton H-5'' du sucre ($\delta_H=3,94$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=176,21$ ppm permettant ainsi son attribution au C-6''. Vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone, il est clair que cette position est bien une fonction acide carboxylique.

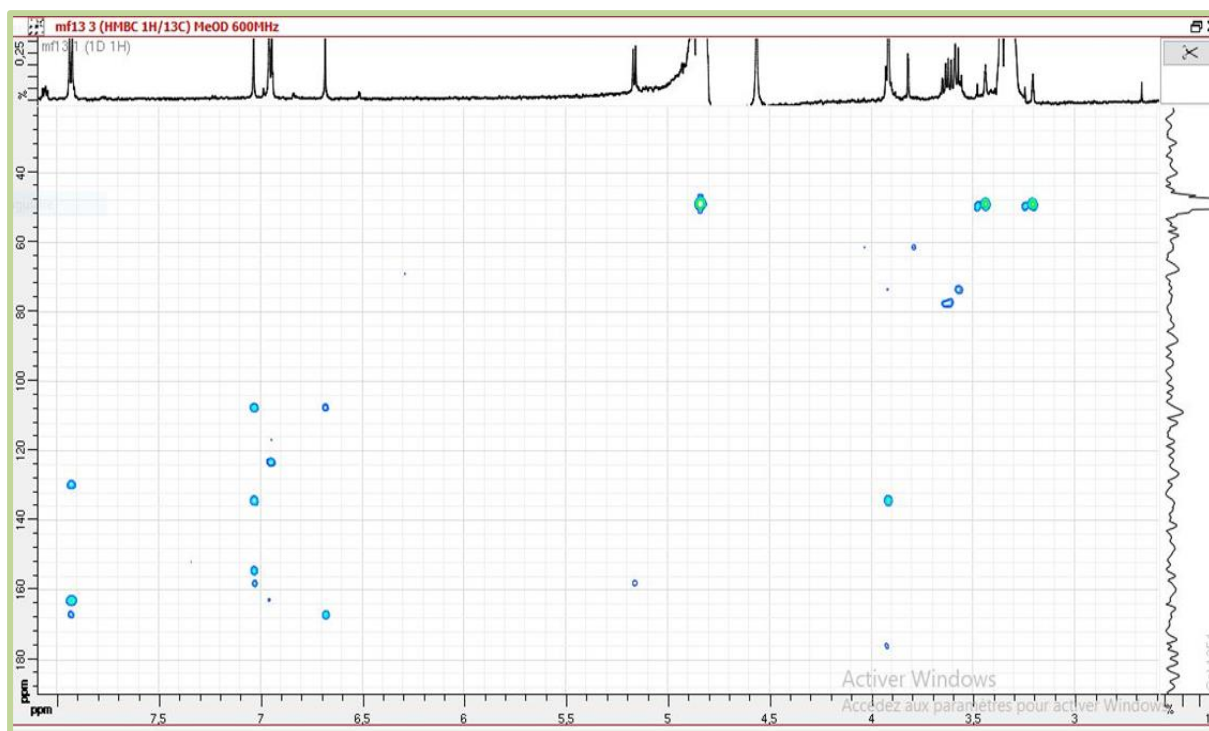


Figure IV.38: Spectre HMBC (CD₃OD, 600MHz) du composé CP6, MF13

L'ensemble des données de cette analyse indique que cette molécule est l'hispiduline substituée en C-7 par un groupement *O*- β -D-glucuronopyranoside, ce qui mène à la molécule connue sous le nom de hispiduline 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (Figure IV.2.40)

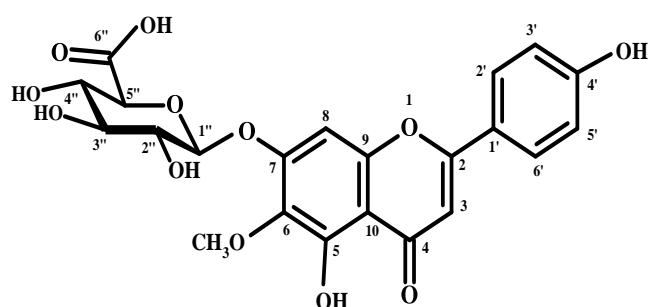


Figure IV.2.40: Structure du composé **CP6**, hispiduline 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside

Les résultats de RMN, relatifs à cette molécule sont reportés dans le tableau **IV.2.7**.

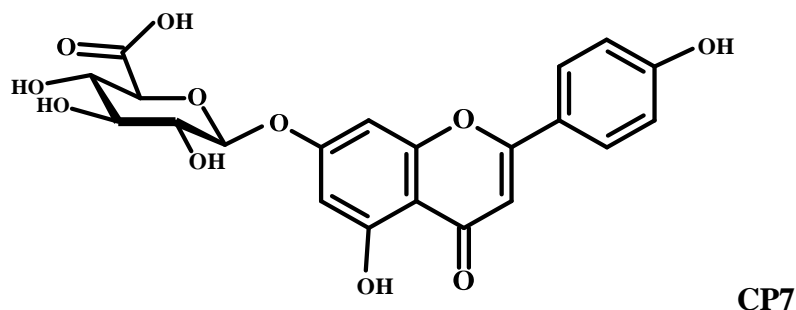
Tableau IV.2.7 : Données RMN (MeOH- d_4) du composé **CP6**, hispiduline 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside

Position	^1H δ_{ppm} $J(\text{Hz})$	^{13}C δ_{ppm} ,
2	-	167,5
3	6,68 s	102,3
4	-	Non détecté
5	-	Non détectable par la HMBC
6	-	134,04
7	-	158,60
8	7,03 s	95,60
9	-	153,93
10	-	106,9
1'		123,37
2',6'	7,93 d (9)	129,9
3',5'	6,95 d (9)	116,9
4'	-	163,15
1''	5,17 d (7,8)	102,48
2''	3,61 dd (9 ; 7,8)	74,5 [§]
3''	3,47 t (9)	77,5 [§]
4''	3,59 t (9)	73,1 [§]
5''	3,94*	76,6 [§]
6''	-	176,21
6-OCH ₃	3,92 s	61,09

* : partiellement recouvert par le signal du méthoxyle

§ : Valeurs déduites des corrélations HMBC

IV.2.7: Elucidation structurale du composé CP7 (MF1) isolé de la phase acétate d'éthyle



Dissout dans du méthanol, déposé sur du papier Whatman et examiné sous la lumière de Wood, ce composé montre une fluorescence noir-violet, couleur caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

L'examen du spectre de RMN ^1H (Figure IV.2.41) enregistré dans le CD_3OD présente un ensemble de signaux dans la zone des protons aromatiques et un deuxième ensemble de signaux caractéristiques d'un groupement glycoside reconnu grâce au déplacement chimique du proton anomérique. Ces signaux sont très similaires à ceux de la molécule précédente (CP6)

La combinaison des données des spectres RMN ^1H et HSQC (Figure IV.2.42) permet de relever en effet :

- la résonance de H-2' et H-6' à $\delta_{\text{H}} = 7,69$ ppm (2H ; d ; $J = 8,8$ Hz), permet la localisation de la résonance de C-2' et C-6' à $\delta_{\text{C}} = 128,14$ ppm
- la résonance de H-3' et H-5' à $\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm (2H ; d ; $J = 8,8$ Hz), permet la localisation de la résonance de C-3' et C-5' à $\delta_{\text{C}} = 118,68$ ppm
- la résonance de H-8 à $\delta_{\text{H}} = 6,72$ ppm (d ; $J = 2,2$ Hz), permet la localisation de la résonance de C-8 à $\delta_{\text{C}} = 95,32$ ppm
- la résonance de H-6 à $\delta_{\text{H}} = 6,39$ ppm (d ; $J = 2,2$ Hz), permet la localisation de la résonance de C-6 à $\delta_{\text{C}} = 101,25$ ppm
- la résonance de H-3 à $\delta_{\text{H}} = 6,45$ ppm (s), permet la localisation de la résonance de C-3 à $\delta_{\text{C}} = 102,64$ ppm

A ce stade, ces données sont en faveur d'un squelette apigénine comme aglycone dans cet hétéroside (Figure IV.2.43).

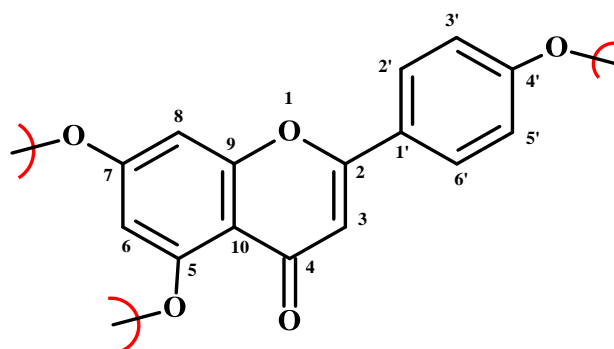


Figure IV.2.43: Squelette de l'aglycone du composé **CP7**

On relève par ailleurs :

- un doublet à $\delta_{\text{H}}=5,00$ ppm ($J=7,3$ Hz), d'intégration 1H attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, par un pont oxygène. Ceci est déduit de la valeur du déplacement chimique de ce proton et de son carbone porteur dont la résonance est relevée grâce au spectre HSQC à $\delta_{\text{C}}=100,2$ ppm. La valeur de la constante de couplage de ce proton indique une configuration β du carbone anomérique (H-1'' axial) et indique également une orientation axiale de H-2''.
- un doublet à $\delta_{\text{H}}=3,76$ ppm ($J=10$ Hz), attribuable au proton H-5''. La valeur de la constante de coupage relevée dans ce signal indique une orientation axiale de H-4''. Cette donnée indique également l'absence de protons en position C-6''.
- des signaux sous forme de multiplets dans l'intervalle 3,36 – 3,48 ppm attribuables par conséquent aux protons H-2'', H-3'' et H-4'' du substituant sucre.

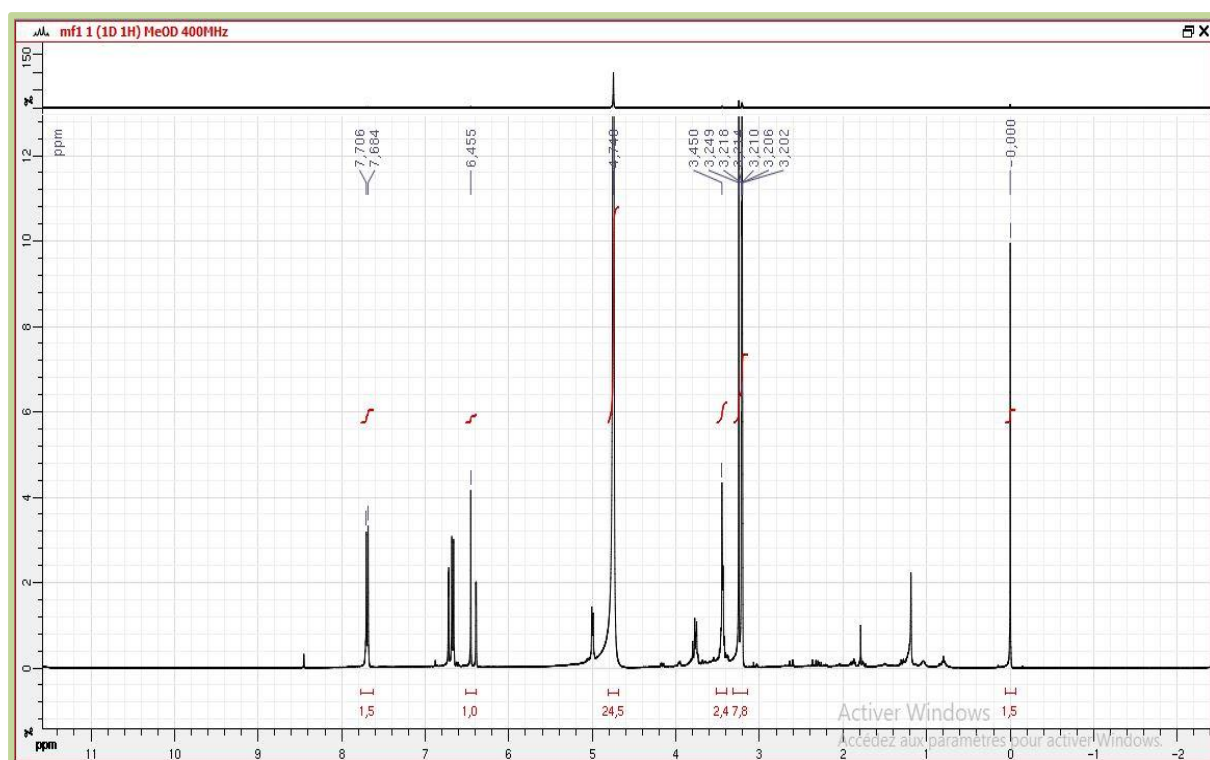


Figure IV.2.41: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP7 (MF1)

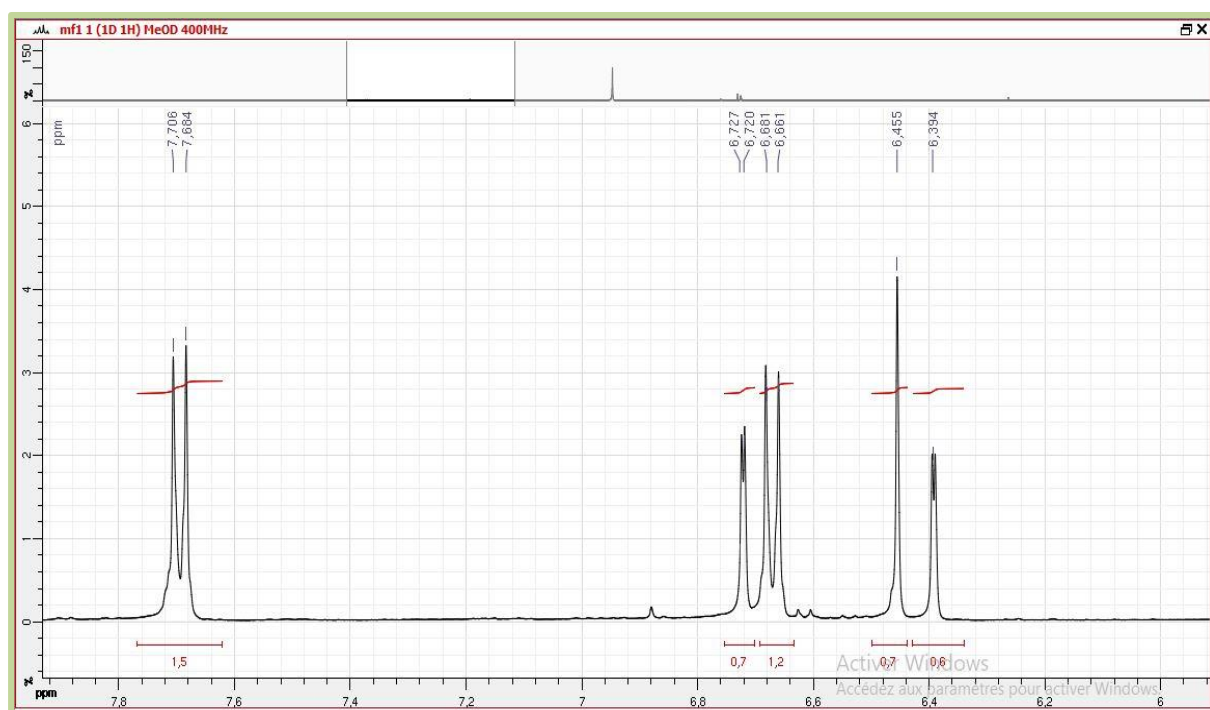


Figure IV.2. 41.1: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP7 (MF1) étalement 1

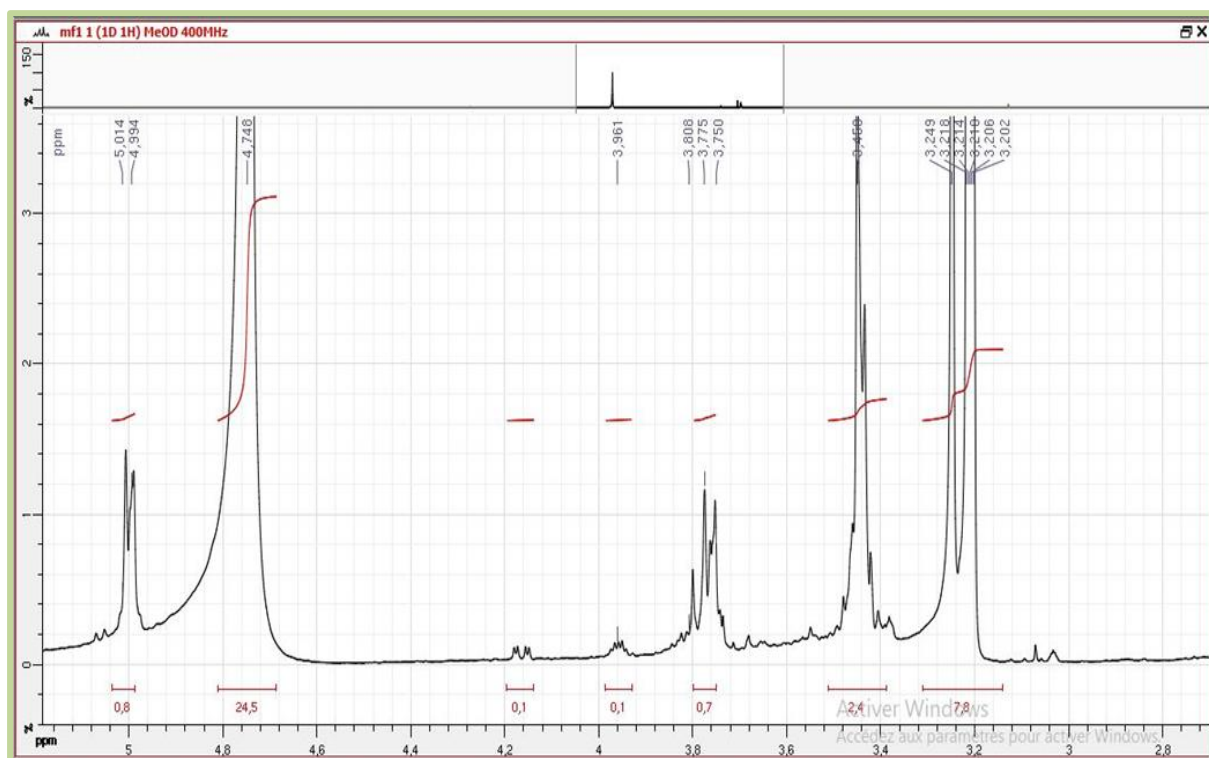


Figure IV.41.2: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP7 (MF1) étalement 2

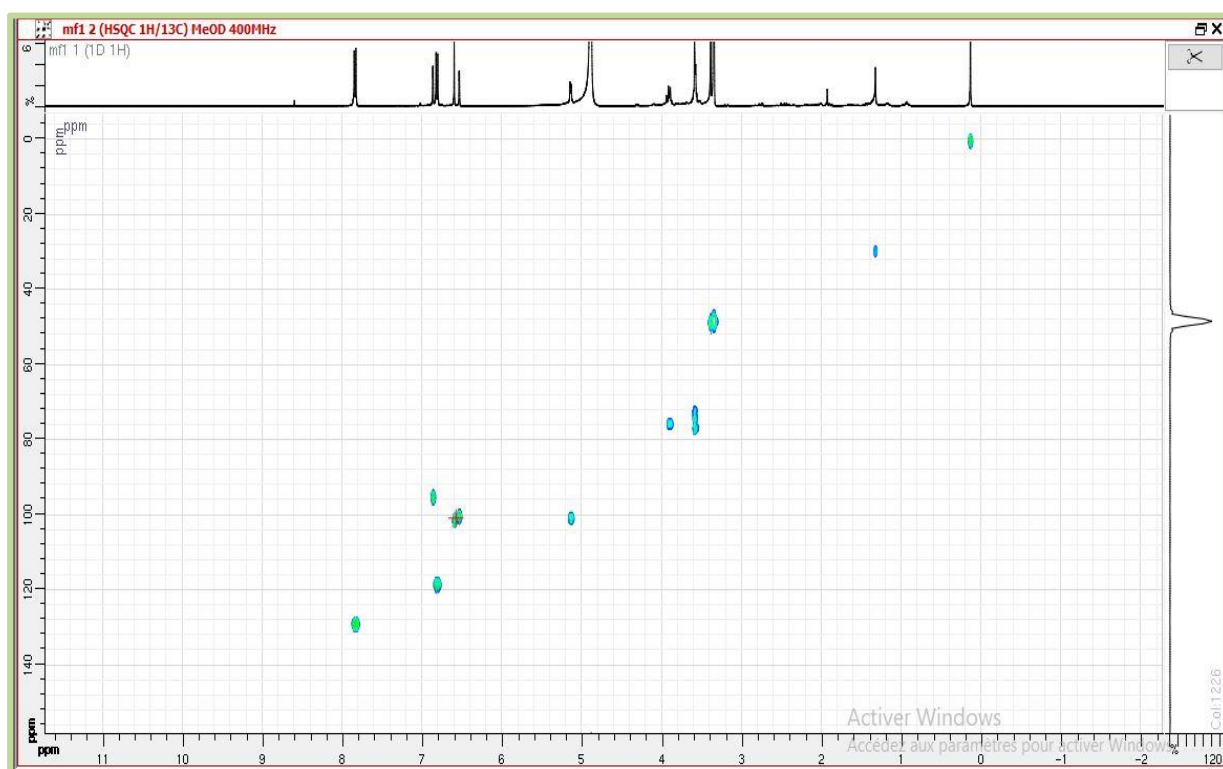


Figure IV.42: Spectre HSQC (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP7, (MF1)

Chapitre IV Résultats et discussions

Le spectre HSQC permet de relever aisément les résonances des carbones C-5'', C-3'', C-2'' et C-4'' à $\delta_C=76,12$; $78,02$; $74,21$ et $72,03$ ppm, respectivement.

Sur le spectre HMBC (Figure IV.2.44.1), on relève une tache de corrélation entre le proton H-5'' et le carbone quaternaire résonant à $\delta_C=175,18$ ppm attribuable de ce fait au carbone C-6'', la valeur du déplacement chimique de ce carbone, indique qu'il s'agit d'un CO₂H. Cette donnée indique donc la présence d'un groupement *O*- β -glucuronopyranosyle dans cette molécule.

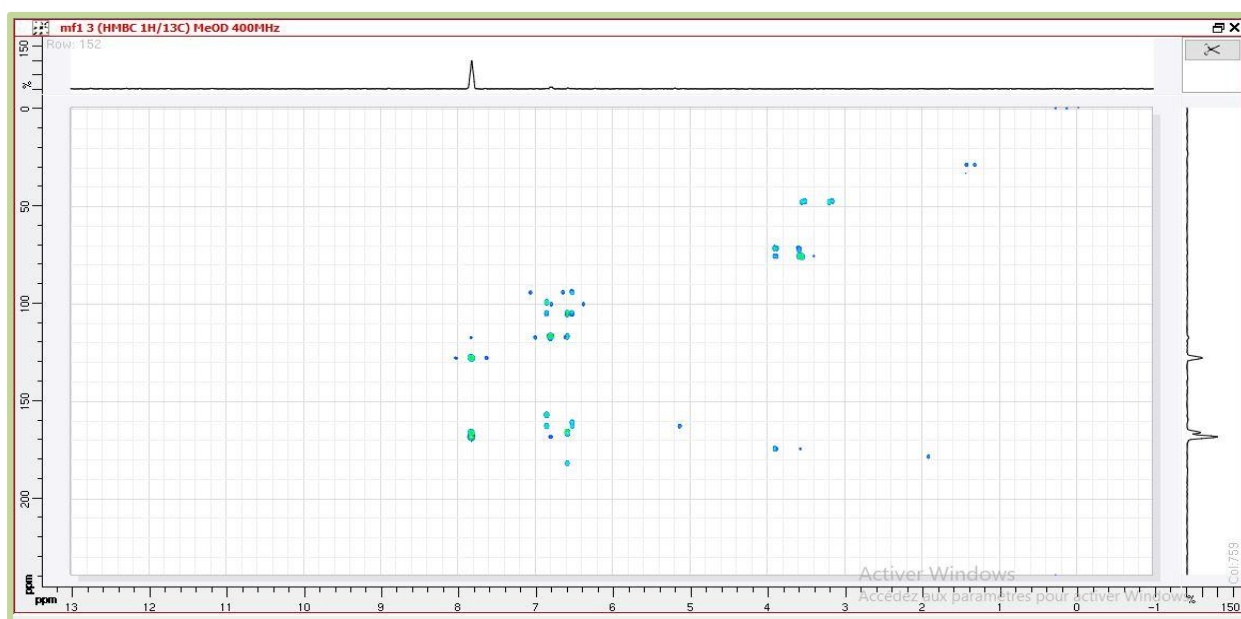


Figure IV.2.44: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP7(MF1)



Figure IV.2.44.1: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP7(MF1)), étalement

La localisation des carbones restant de cette molécule est obtenue suite à leurs corrélations avec les protons situés à deux et trois liaisons de ces carbones. En effet, on relève :

- des taches de corrélation entre les protons H-8, H-3 et H-6 et le carbone résonant à $\delta_C=104,84$ permettant ainsi son attribution au C-10.
- une tache de corrélation entre le proton H-8 et le carbone résonant à $\delta_C=156,93$ ppm permettant ainsi son attribution au C-9.
- des taches de corrélation entre les protons H-3, H-2' et H-6', et le carbone résonant à $\delta_C=166,41$ ppm permettant ainsi son attribution au C-2.
- des taches de corrélation entre les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C=167,90$ ppm permettant ainsi son attribution au C-4'.
- une tache de corrélation entre les protons H-3, H-3' et H-5' et le carbone résonant à $\delta_C=119,37$ ppm permettant ainsi son attribution au C-1'.
- une tache de corrélation entre les protons H-8 et H-6 le carbone résonant à $\delta_C=163,03$ ppm permettant ainsi son attribution au C-7. On relève également une corrélation entre ce carbone (C-7) et le proton anomérique du groupement *O*- β -glucuronopyranosyle précédemment invoqué. Cette corrélation indique que cette entité est reliée à cette position.
- une tache de corrélation entre le proton H-3 et le carbone résonant à $\delta_C=182,26$ ppm permettant ainsi son attribution au C-4 vu la valeur de son déplacement chimique
- une tache de corrélation entre le proton H-5'' du sucre ($\delta_H=3,76$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_C=175,18$ ppm confirmant ainsi son attribution au C-6''. Vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone, il est clair que cette position est bien une fonction acide carboxylique.

L'ensemble des données RMN réunies dans le tableau IV.2.8 mènent à la structure illustrée dans la figure IV.2.45, molécule connue sous le nom, apigénine 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

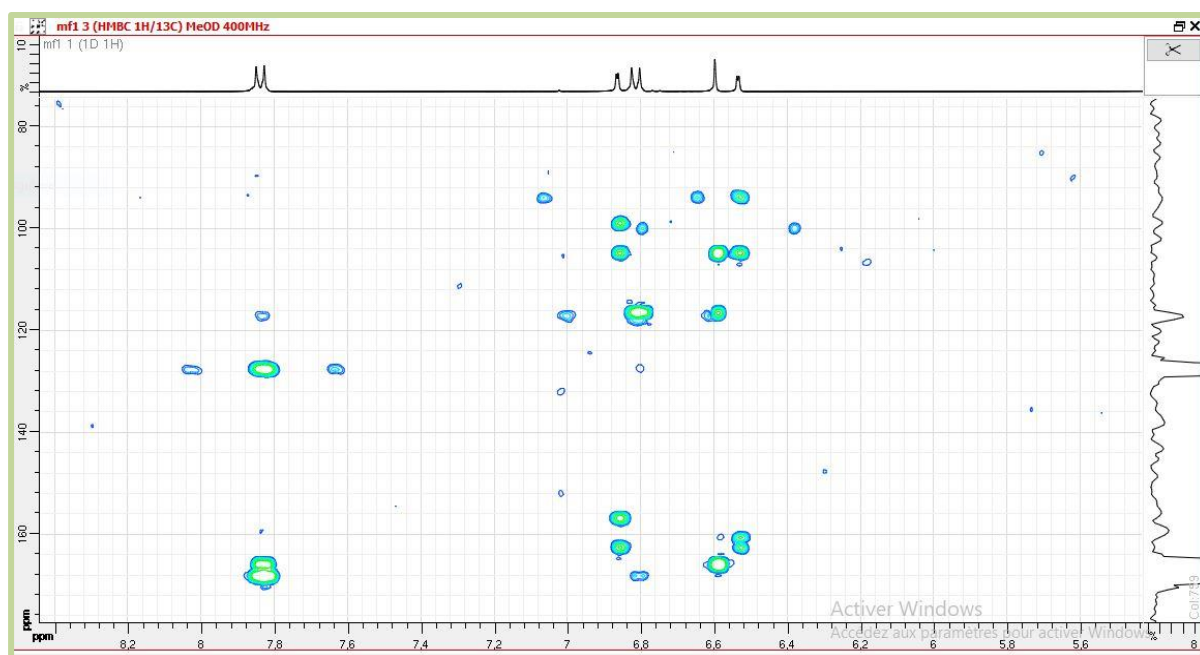


Figure IV.2.44.2: Spectre HMBC (CD₃OD ,400MHz) du composé CP7(MF1)étalement 2

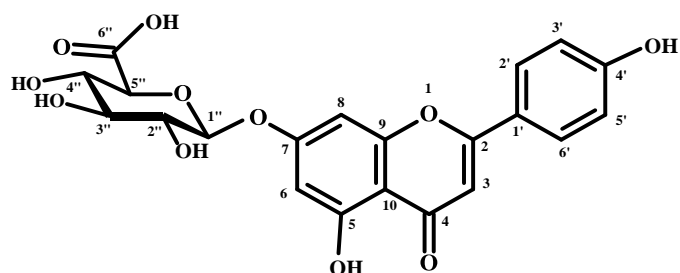


Figure IV.2.45: Structure du composé CP7 ; Apigénine 7-O-β-D-glucuronopyranoside

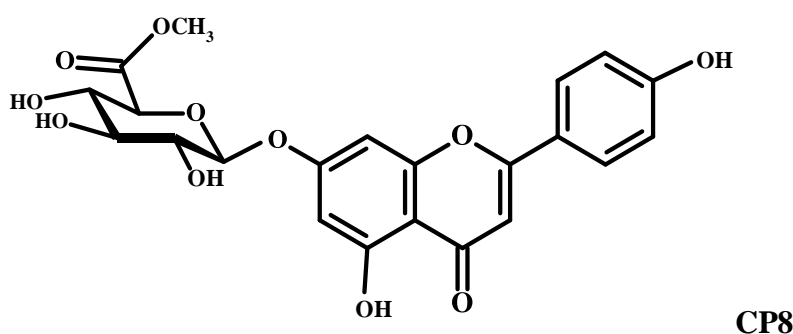
Tableau IV.2.8 : Données RMN (MeOH-d₄) du composé CP7, apigénine 7-O-β-D-

Position	¹ H δ _{ppm} /J(Hz)	¹³ C δ _{ppm}
2	-	166,41
3	6,45 s	102,64
4	-	182,26
5	-	160,02
6	6,39 d (2,2)	101,25
7	-	163,03
8	6,72 d (2,2)	95,32
9	-	156,93
10	-	104,84
1'	-	119,37
2',6'	7,69 d (8,9)	128,14
3',5'	6,67 d (8,9)	118,68

Tableau IV.2.8 Suite : Données RMN (MeOH-*d*₄) du composé **CP7**, apigénine 7-*O*-β-D-glucuronopyranoside

4'	-	167,90
1''	5,00 d (7,3)	100,2
2''	3,36-3,48	74,21
3''		78,02
4''		72,03
5''		3,76 (10)
6''	-	175,18

IV.2.8 Elucidation structurale du composé **CP8** isolé de la phase *n*-butanol



La fluorescence sous la lumière UV (365 nm) de ce composé est noir-violet, indiquant une structure de type flavone ou flavonol 3-OR.

L'examen des spectres de RMN ¹H (Figure IV.2.46) et HSQC (Figure IV.2.47), montre la présence d'un hétéroside dont l'aglycone n'est autre que l'apigénine que l'on reconnaît aisément grâce aux signaux :

- deux doublets d'intégration 2H chacun formant un système AM ($J = 8,5$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=7,93$ ppm ($\delta_{\text{C}}=129,26$ ppm) et $\delta_{\text{H}}=7,04$ ppm ($\delta_{\text{C}}=116,4$ ppm) attribuables à H-2', H-6' et à H-3', H-5', respectivement,
- deux doublets d'intégration 1H chacun, formant un système AM ($J = 2,2$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=6,95$ ppm ($\delta_{\text{C}}=95,6$ ppm) et $\delta_{\text{H}}=6,46$ ppm ($\delta_{\text{C}}=101,40$ ppm), caractéristiques des protons H-8 et H-6, respectivement,
- un signal à $\delta_{\text{H}} = 6,68$ ppm ($\delta_{\text{C}}=103,21$ ppm) d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au proton H-3.

La partie osidique est caractérisée par les signaux suivants :

- un doublet ($J=7,4$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5,23$ ppm $\delta_{\text{C}}=101,40$ ppm, attribuable au proton anomérique H-1'', la valeur de son déplacement chimique indique que ce sucre est lié à l'aglycone par

un atome d'oxygène et celle de sa constante de couplage, une configuration β du carbone anomérique et une orientation axiale du proton H-2'' ,

- un doublet d'intégration 1H ($J=9,6$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=4,23$ ppm ($\delta_{\text{C}}=76,4$ ppm) attribuable au proton H-5'' , la multiplicité du signal de ce proton indique l'absence de protons en C-6'' quant à la valeur de sa constante de couplage, elle indique une orientation axiale de H-4'' .
- un triplet d'intégration 1H ($J=9,6$ Hz) à $\delta_{\text{H}}=3,72$ ppm ($\delta_{\text{C}}=72,85$ ppm) attribuable au proton H-4'' vu la valeur du déplacement de son carbone. La multiplicité du signal de ce proton confirme son orientation axiale et indique une orientation axiale de H-3''
- un multiplet dans l'intervalle (3,50 - 3,60 ppm) d'intégration 2H, ne pouvant correspondre qu'aux protons H-2'' et H-3'' . Sur le spectre HSQC, ces protons corrélient avec les carbones résonant à $\delta_{\text{C}}=75,21$ et 77,40 ppm. Vu les orientations axiales de tous les protons des oxyméthines de ce sucre, il est donc clair qu'il dérive du glucose, de ce fait la résonance à $\delta_{\text{C}}=75,21$ ppm sera attribuée au C-2'' et celle à 77,40 ppm sera attribuée au C-3'' .
- un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,73$ attribuable à un groupement méthoxyle ($\delta_{\text{C}} = 52,8$ ppm).

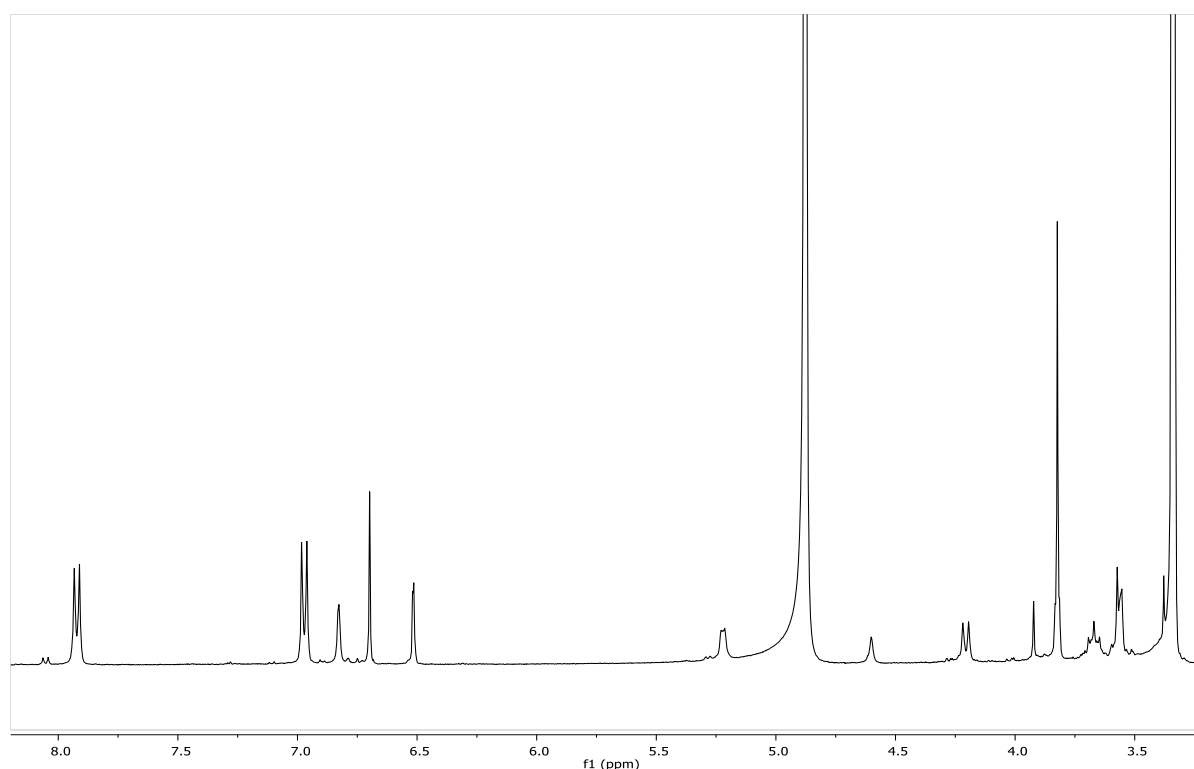


Figure IV.2.46: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé **CP8**

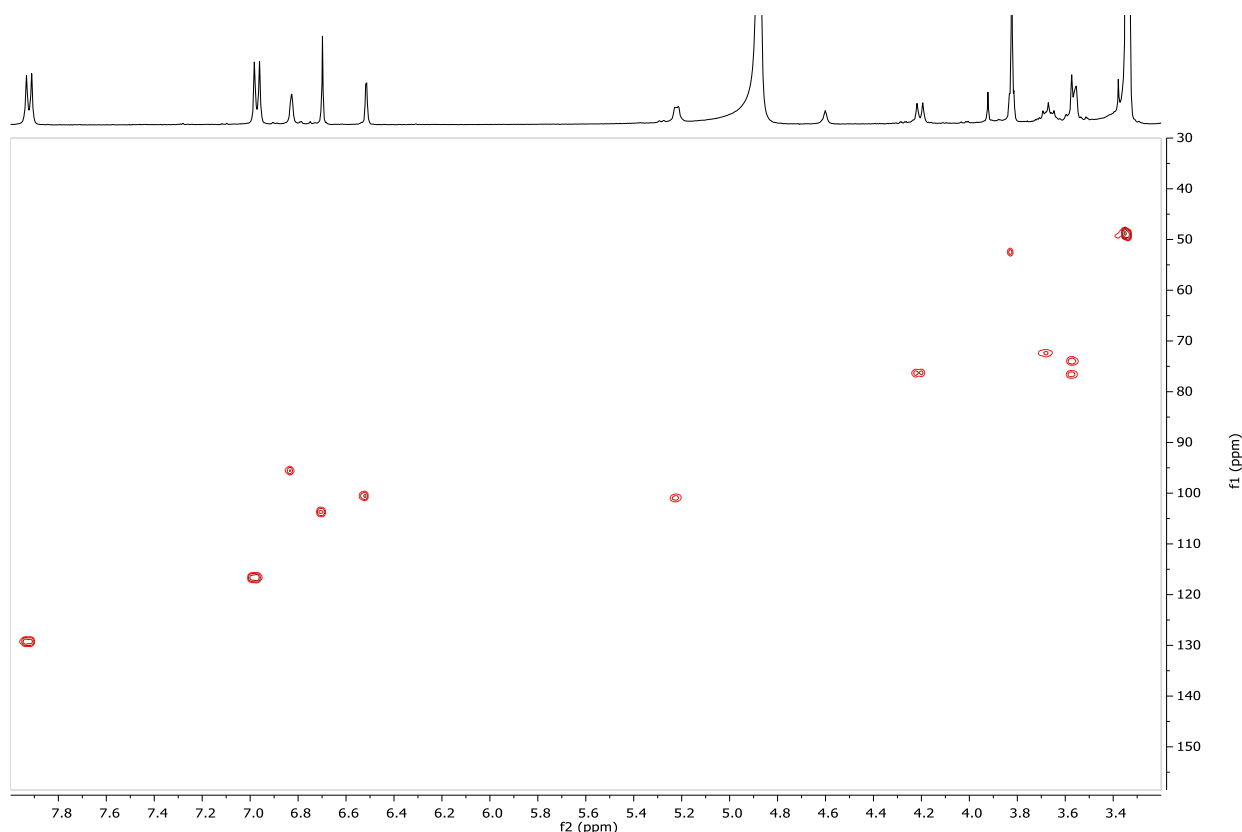


Figure IV.2.47: Spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé **CP8**

L'examen du spectre HMBC (Figure IV.2.48) montre des taches de corrélation entre le proton H-5'' ($\delta_{\text{H}}=4,23$ ppm) et le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=168,61$ ppm. Ce carbone dont le déplacement chimique correspond à un carbonyle d'ester est attribué au C-6''. Cette hypothèse est claire sur le spectre HMBC, où l'on relève une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et le carbone de ce carbonyle. Ces données orientent donc vers la présence d'un groupement *O*- β -D-glucuronopyranosyl méthyl ester relié à l'apigénine comme aglycone.

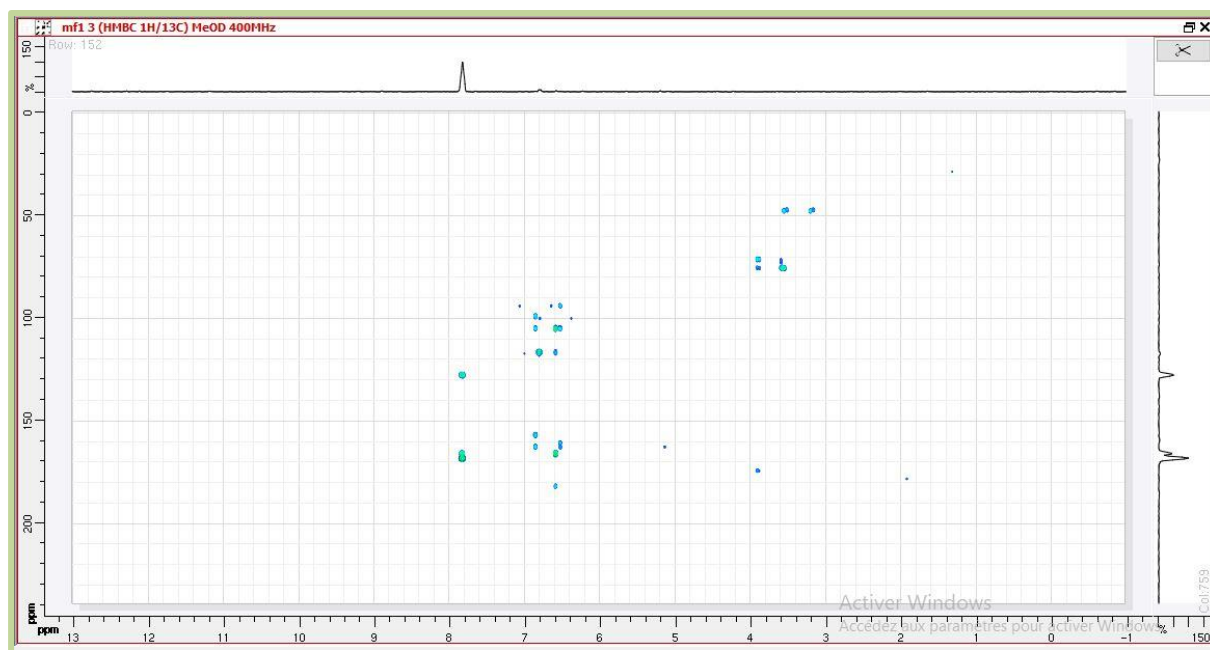


Figure IV.2.48: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP8

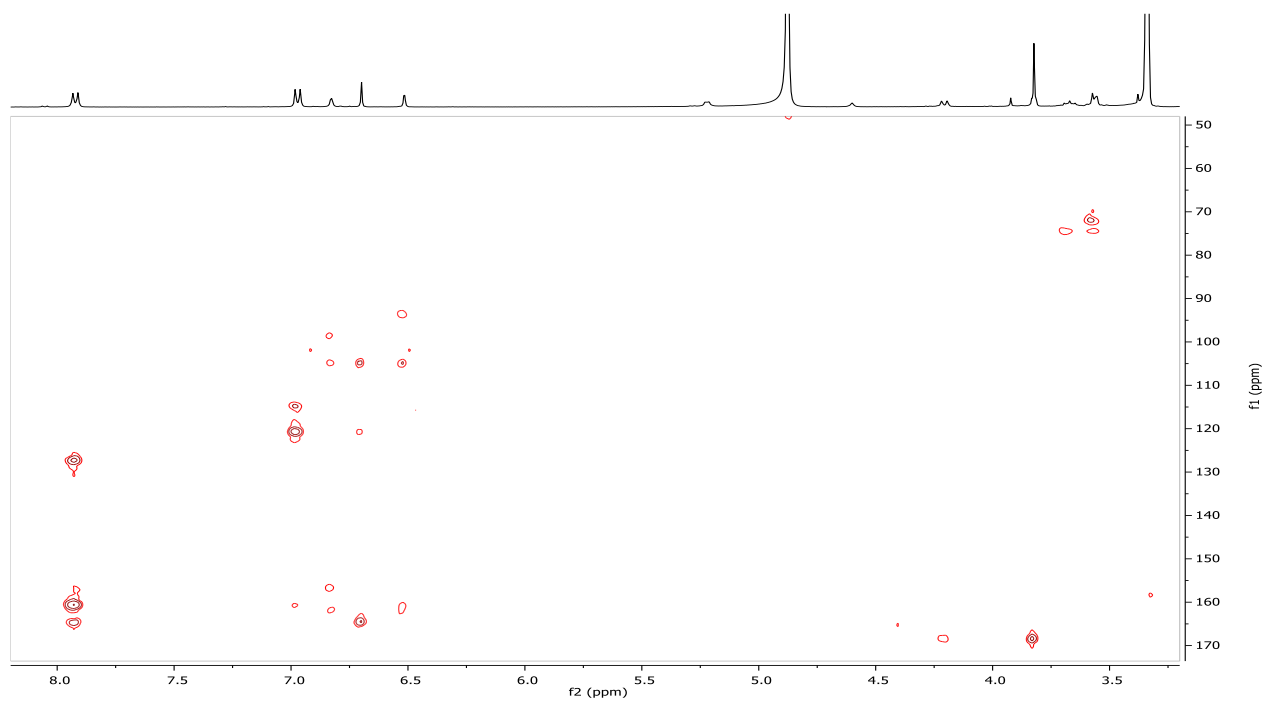


Figure IV.2.48.1: Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé CP8, étalé

Toujours sur le spectre de l'expérience HMBC, la résonance du C-10 est repérée à $\delta_C=104,15$ ppm grâce à ses taches de corrélation avec les protons H-8, H-3 et H-6 ; la résonance du C-5 est relevée à $\delta_C=161,52$ ppm grâce à sa corrélation avec le proton H-6. Les protons H-6 et H-8 montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné résonant à $\delta_C=163,11$ ppm, ce qui permet l'attribution de ce dernier au C-7. Par ailleurs sur le même spectre, le carbone C-7 montre une tache de corrélation avec le proton anomérique indiquant alors que le groupement *O*- β -D-glucuronopyranosyl methyl ester est attaché en C-7 du squelette apigénine. On relève aussi que le proton H-8 corrèle avec le carbone résonant à $\delta_C=156,40$ ppm qui ne peut être que le C-9. De même, les protons H-3', H-5' et H-3, mènent à la localisation de C-1' à $\delta_C = 121,62$ ppm ; les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' permettent l'attribution de C-4' à $\delta_C=161,45$ ppm. On relève également la résonance du C-2 à $\delta_C=165,62$ ppm grâce à ses corrélations avec H-3, H-2' et H-6' et la résonance du C-4 à $\delta_C=181,92$ ppm grâce à sa corrélation avec H-3.

Les résultats de toutes ces analyses par RMN reportés dans le tableau IV.2.9 mène à la structure :apigénine 7-*O*- β -D-(6''-méthylglucuronopyranoside) reportée dans la figure IV.2.49. Cette molécule est commune pour le genre *Centaurea* (Asteraceae) [19].

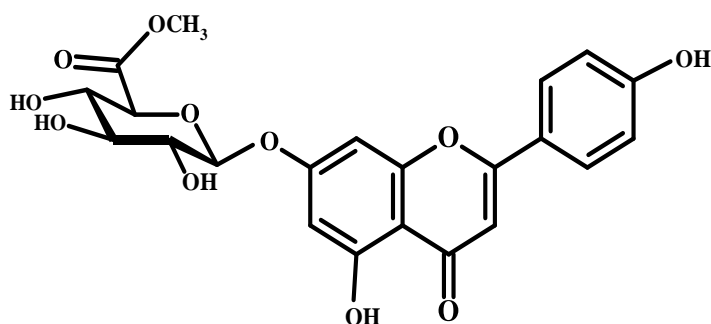


Figure IV.2.49 : Structure du composé **CP8** :apigénine 7-*O*- β -D-(6''-méthylglucuronopyranoside)

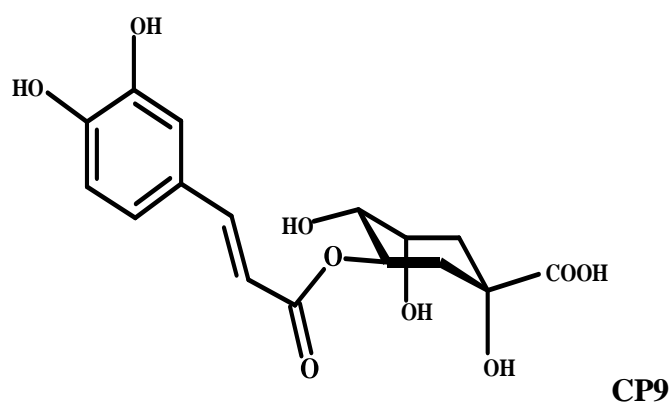
Tableau IV.2.9 : Données RMN (MeOH-d₄) du composé **CP8** , apigénine 7-*O*- β -D-(6''-méthylglucuronopyranoside)

Position	¹ H δ_{ppm} /J(Hz)	¹³ C δ_{ppm}
2	-	165,62
3	6,68 s	103,21
4	-	181,92
5	-	161,52
6	6,46 d (2,2)	101,40

Tableau IV.2.9 Suite: Données RMN (MeOH-*d*₄) du composé CP8 , apigénine 7-O-β-D- (6''-méthylglucuronopyranoside)

7	-	163,11
8	6,95 d (2,2)	95,60
9	-	156,40
10	-	104,15
1'	-	121,62
2', 6'	7,93 d (8,5)	129,26
3', 5'	7,04 d (8,5)	116,40
4'	-	161,45
1''	5,23 d (7,4)	101,40
2''	3,50 - 3,60	75,21
3''		77,40
4''	3,72 t (9,6)	72,85
5''	4,23 d (9,6)	76,40
6''	-	168,61
OCH ₃	3,73 s	52,80

IV.2.9 Elucidation structurale du composé CP9, MF22 isolé de la phase *n*-butanol



L'examen des spectres RMN ¹H (Figure IV.2.50) et HSQC (Figure IV.2.51), montre des signaux caractéristiques d'un acide quinique où un des hydroxyles est acylé par une entité O-caféoyle [20,21]

En adoptant la nouvelle recommandation de l'IUPAC en matière de numérotation du cycle de l'acide quinique (Figure IV.2.52), le squelette acide quinique est clairement reconnaissable par les signaux :

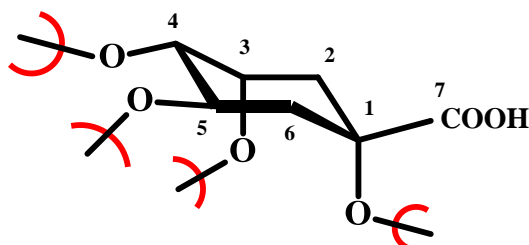


Figure IV.2.52: Numérotation selon la nouvelle recommandation de l'IUPAC du squelette de l'acide quinique

Le squelette acide quinique est clairement reconnaissable par les signaux

- un triplet de doublets ($J=9,2 ; 4,8$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=5,25$ ppm attribuable à H-5, vu les valeurs des constantes de couplage relevées dans ce signal, lesquelles indiquent bien que H-5 et son voisin H-4 admettent des orientations axiales. Sur le spectre HSQC la résonance du carbone C-5 est relevée à $\delta_{\text{C}}=71,88$ ppm.
- un doublet de doublets ($J=9,2 ; 3,4$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=3,61$ ppm attribuable à H-4, vu les valeurs des constantes de couplage relevées dans ce signal confirmant des orientations axiale de H-4 et équatoriale de H-3. Cette attribution est en parfait accord avec le spectre COSY (Figure IV.2.53) qui montre une tache de corrélation entre ces deux protons H-5 et H-4. La résonance du carbone C-4 est relevée à $\delta_{\text{C}}=73,14$ ppm
- un quadruplet ($J=3,4$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=4,06$ ppm attribuable à H-3. La valeur de la constante de couplage relevée dans ce signal est en accord avec les deux interactions équatoriales/équatoriales et l'interaction équatoriale/axiale qu'il subit. La résonance du carbone C-3 est relevée à $\delta_{\text{C}}=71,25$ ppm
- deux multiplets d'intégration 2H chacun. Le premier centré à $\delta_{\text{H}}=2,08$ ppm est attribué aux protons H-2_{éq} et H-6_{éq}, le second centré à $\delta_{\text{H}}=1,95$ ppm est attribué aux protons H-2_{ax} et H-6_{ax}. Ces attributions sont conformes aux données du spectre COSY où l'on relève que les protons relatifs à ces deux multiplets corrélient aussi bien avec H-5 qu'avec H-3. Sur le spectre HSQC, les résonances des carbones de ces deux méthylènes sont relevées confondues à $\delta_{\text{C}}=38,50$ ppm.

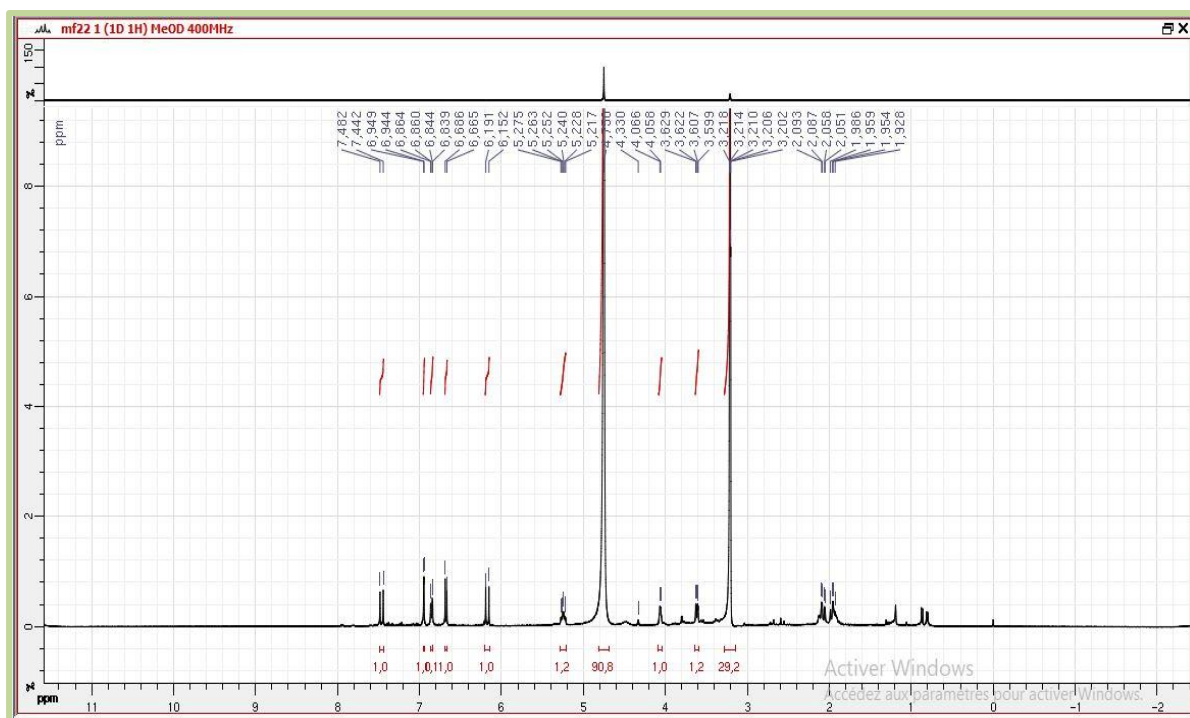


Figure IV.2.50: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé CP9, MF 22.

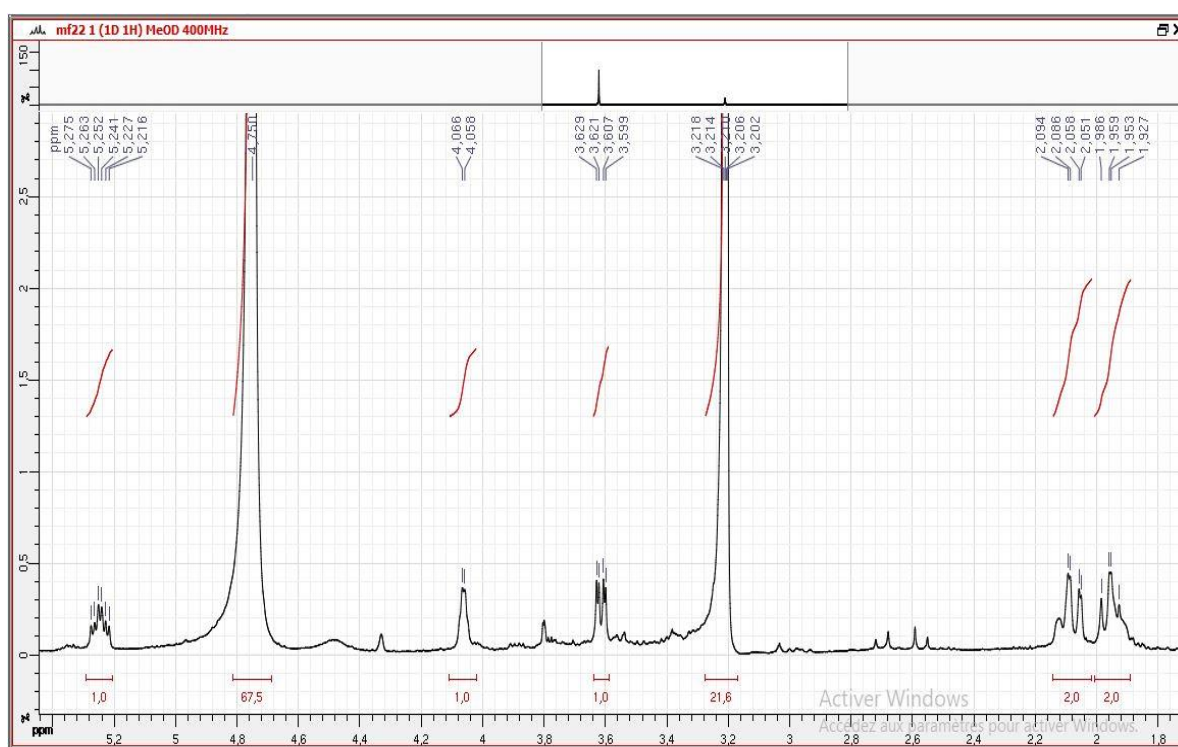


Figure IV.2.50.1: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP9, MF 22, étalement



Figure IV.2.50.2: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé **CP9**, MF 22, étalement 2

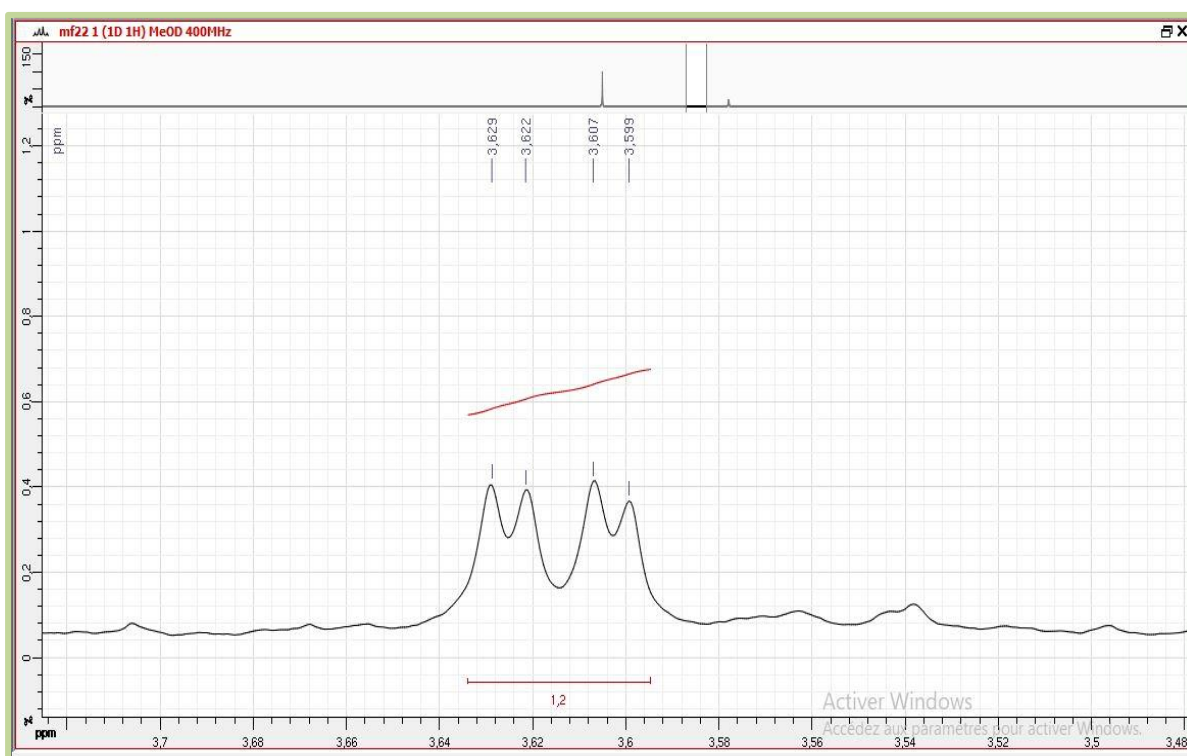


Figure IV.2.50.3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé **CP9**, MF 22, étalement 3

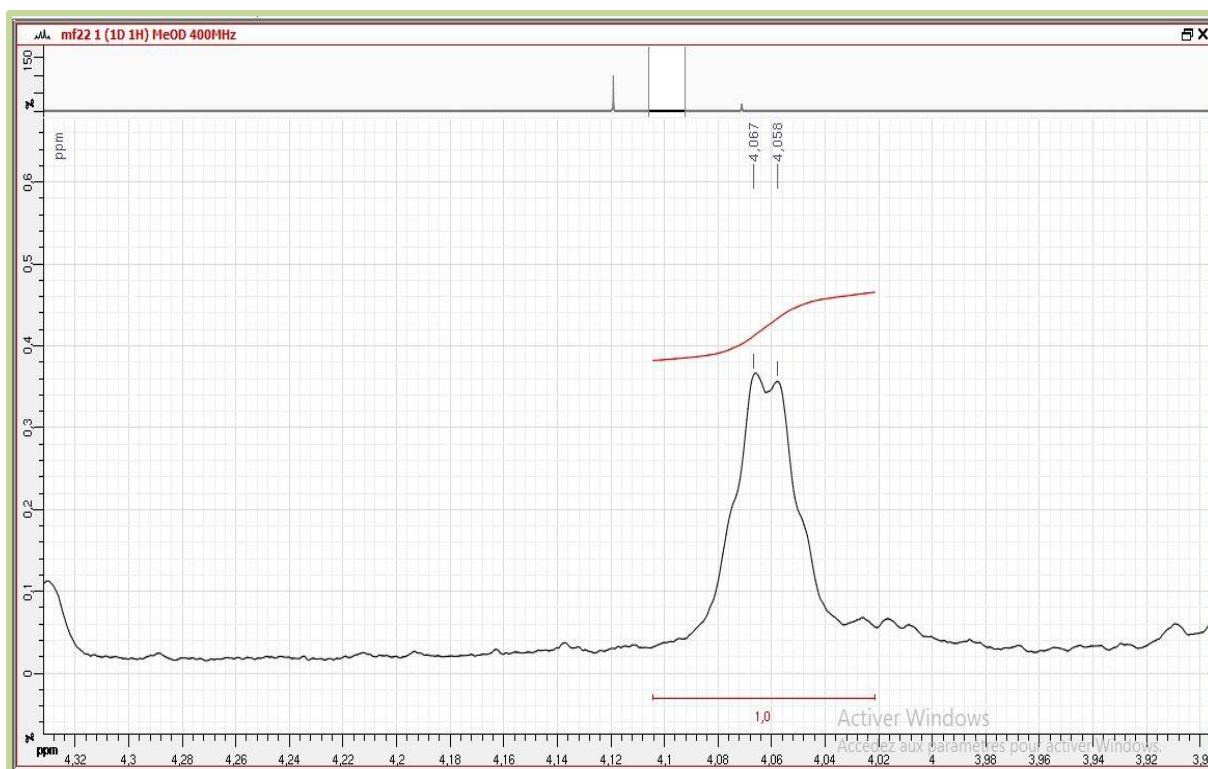


Figure IV.2.50.4: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP9, MF 22, étalement

4

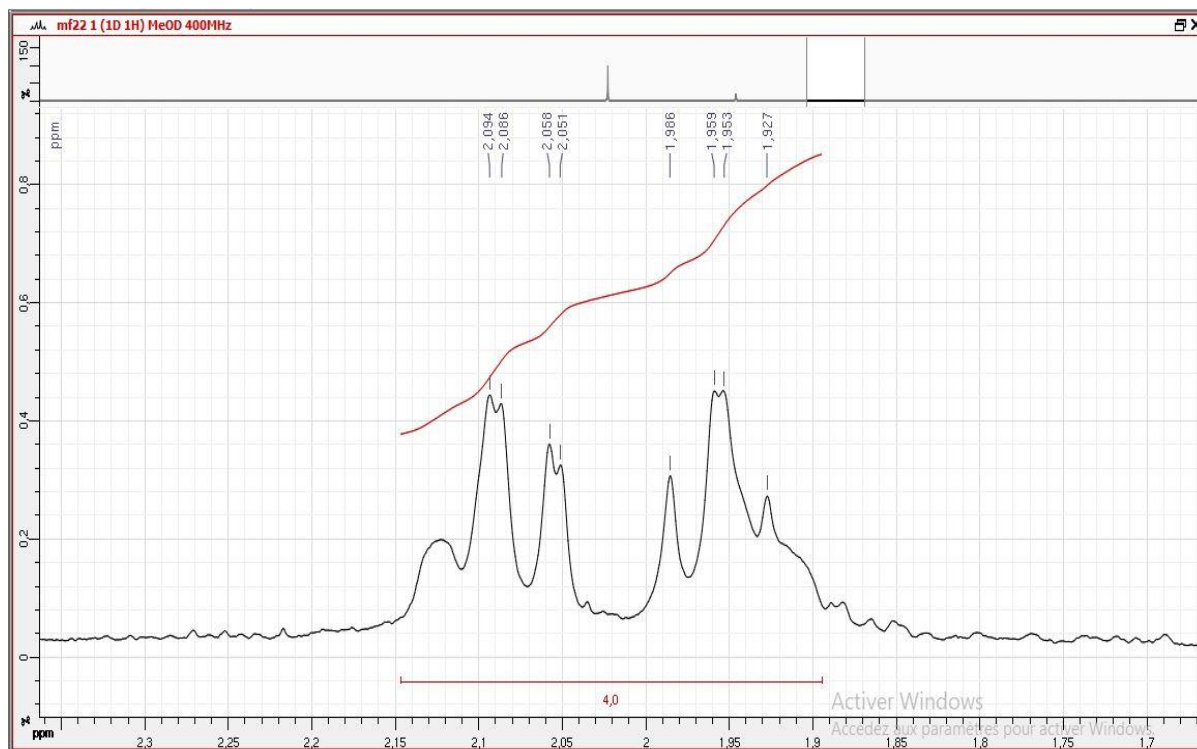


Figure IV.2.50.5: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP9, MF 22, étalement

5

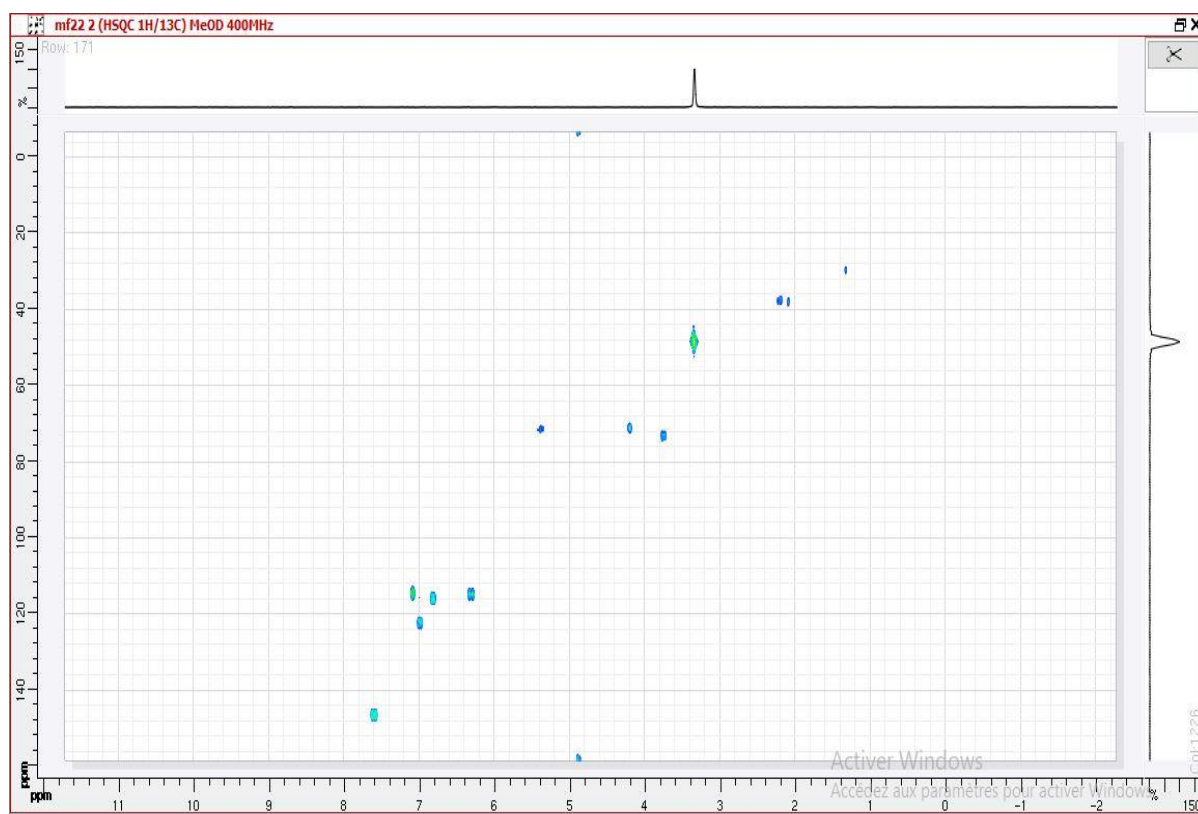


Figure IV.2.51: Spectre HSQC (CD₃OD, 400MHz) du composé CP9, MF 22.

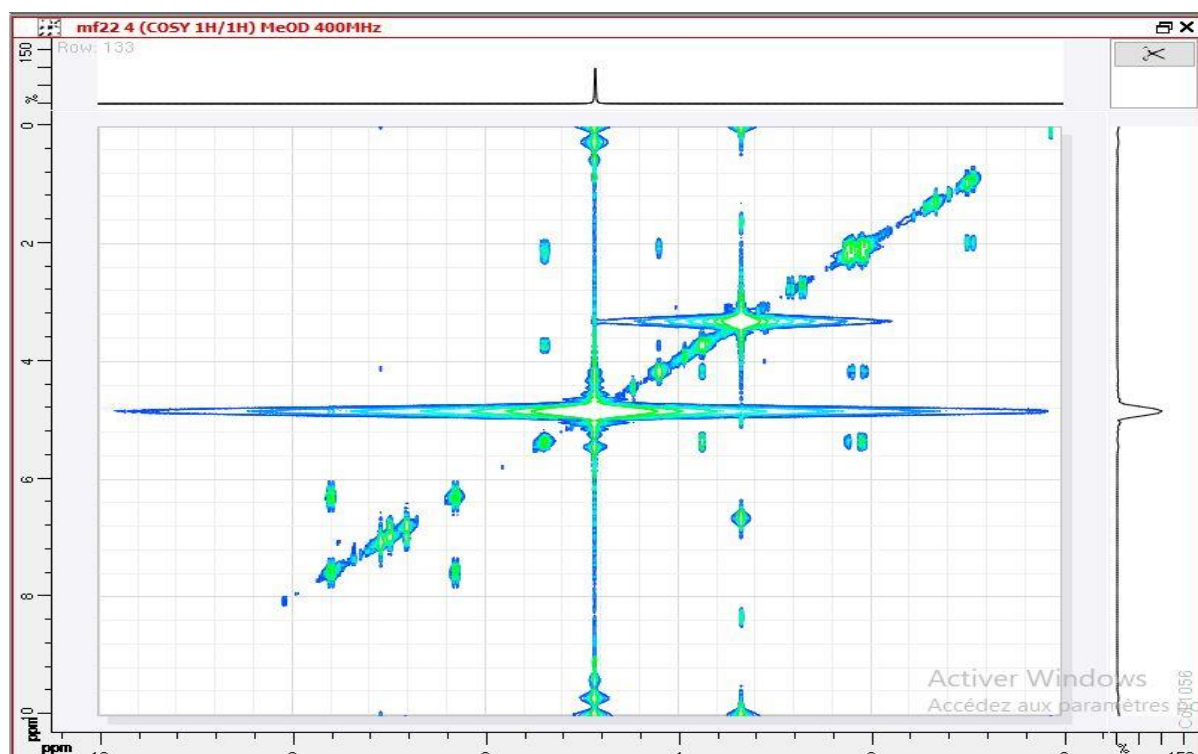


Figure IV.2.53: Spectre COSY (CD₃OD, 400MHz) du composé CP9, MF 22.

Sur le spectre HMBC (Figure IV.2.54), la résonance du carbone C-1 est relevée à $\delta_C=78,00$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H₂-2 et H₂-6.

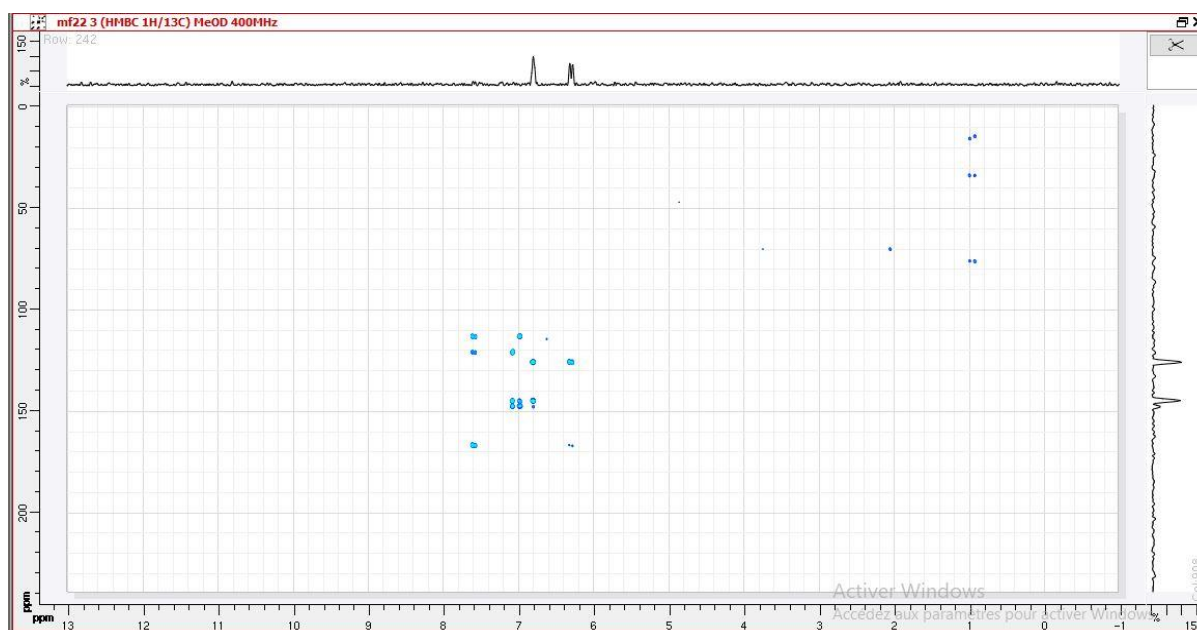


Figure IV.2.54: Spectre HMBC (CD₃OD, 400MHz) du composé CP9, MF 22.

En faisant abstraction des signaux de l'entité acide quinique, les spectres RMN ¹H et HSQC montrent la présence de signaux caractéristiques d'une entité dérivant d'un acide phénolique où le noyau aromatique est substitué dans les positions 3 et 4. On relève en effet, deux doublets d'intégration 1H chacun et formant un système AX ($J=16$ Hz) à $\delta_H=7,47$ et $6,17$ ppm. Cette proximité est supportée par le spectre COSY qui montre leur corrélation. Sur le spectre HSQC, le premier proton corrèle avec le carbone résonant à $\delta_C=146,6$ ppm et le second corrèle avec le carbone résonant à $\delta_C=115,5$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques relatifs à ces noyaux montrent clairement qu'ils sont éthyléniques, la valeur de la constante de couplage indique que cette double liaison est de configuration *trans*.

Le spectre RMN ¹H montre également des signaux caractérisant la présence du cycle aromatique trisubstitué, les protons de ce dernier sont répartis comme suit :

- un doublet d'intégration 1H à $\delta_H=6,95$ ppm ($J=2$ Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à $\delta_C=115,20$ ppm
- un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_H=6,85$ ppm ($J=8,5 ; 2$ Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à $\delta_C=116,50$ ppm

- un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,68$ ppm ($J=8,5$ Hz) montrant sur le spectre HSQC une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C=123,00$ ppm

Les valeurs des déplacements chimiques de ces 3 protons ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un cycle aromatique trisubstitué. L'ensemble de ces résultats confirme la présence d'un cycle aromatique trisubstitué en positions 1, 3 et 4 d'une entité acide phénolique. De ce fait, ces trois protons aromatiques seront attribués à H-2', H-6' et H-5', respectivement.

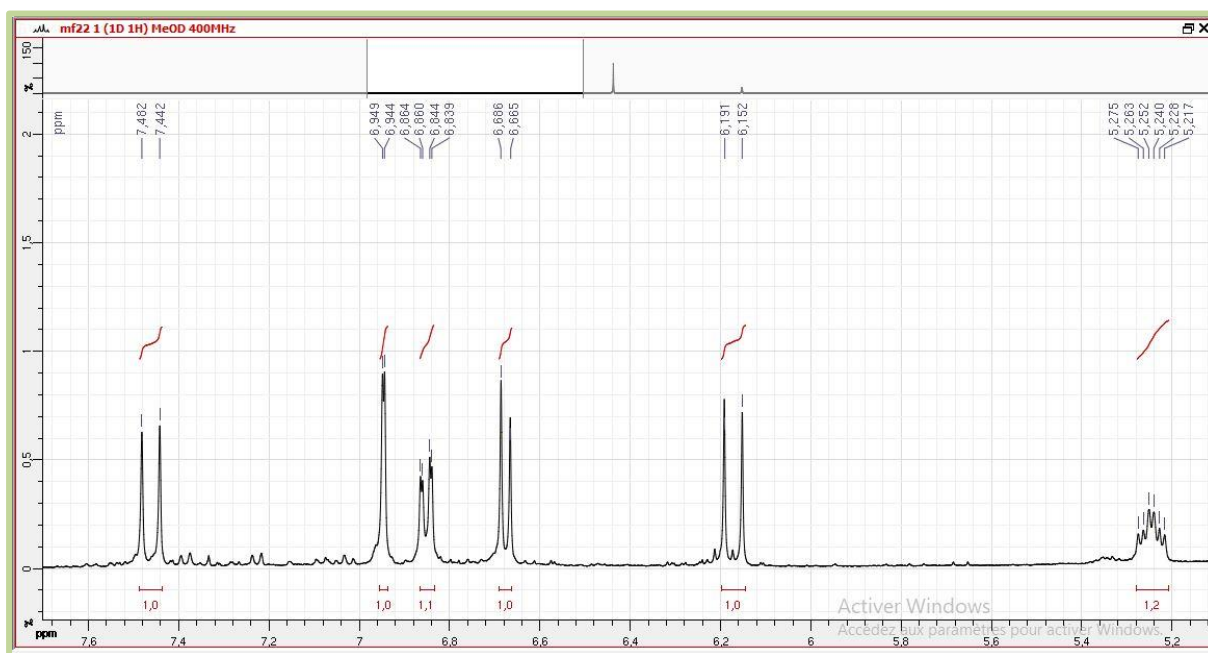


Figure IV.2.50.3: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé CP9, MF 22, étalement 6

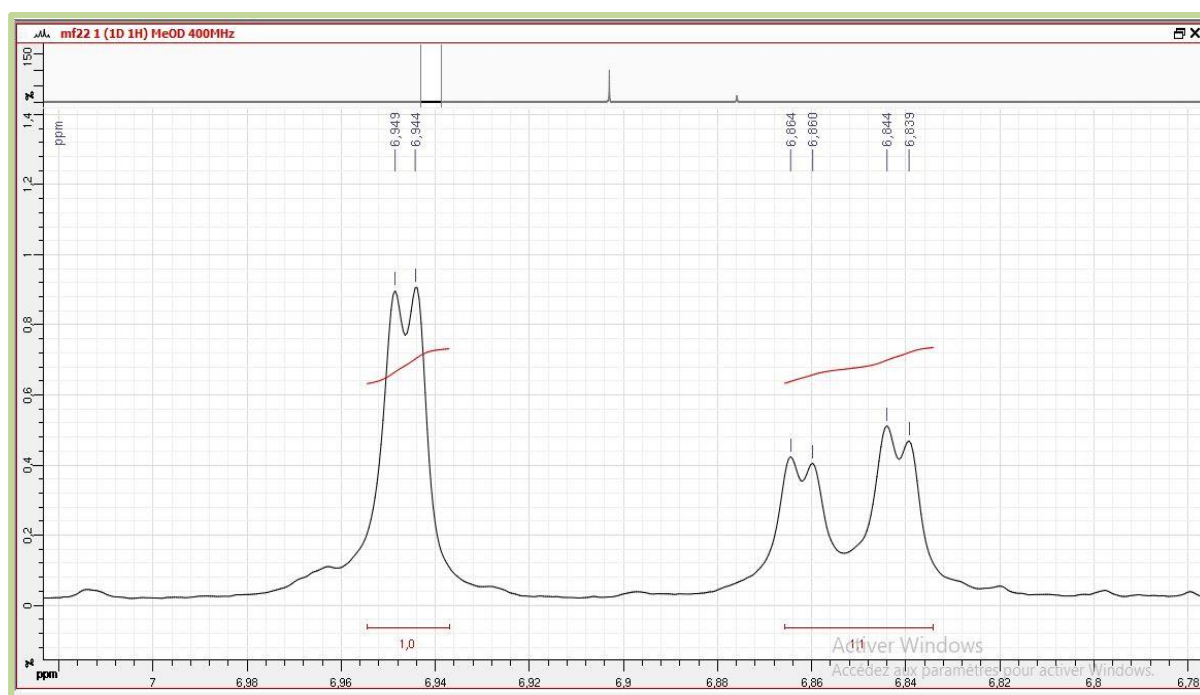


Figure IV.2.50.4: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) du composé **CP9**, MF 22, étalement 7

L'analyse du spectre HMBC permet de relever la résonance du carbonyle d'ester à $\delta_{\text{C}}=166,70$ ppm grâce à ses taches de corrélation avec les protons de la double liaison précédemment évoquée. On observe en effet, une tache de corrélation entre le proton résonant à $\delta_{\text{H}}=7,47$ ppm et le carbone de ce carbonyle d'ester. Il en est de même pour le proton résonant à $\delta_{\text{H}}=6,17$ ppm. Ainsi, ces deux protons occuperont les positions C-7' et C-8', respectivement. Le carbone du carbonyle sera de ce fait, affecté à la position C-9'. La position C-1' reviendra au carbone relié à cette double liaison. La résonance de ce carbone C-1 est relevée à $\delta_{\text{C}} = 125,90$ ppm grâce aux corrélations de ce carbone avec les protons H-5' et H-8'.

Le spectre HMBC permet également de relever des taches de corrélation le proton H-5' et le carbone quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}}=145,78$ ppm attribuable au carbone oxygéné C-3', quant au proton H-2', il corréle avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=148,20$ ppm attribuable par conséquent au carbone C-4'. Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones aromatiques quaternaires indiquent bien leur oxygénation.

A ce stade de notre analyse on peut proposer la structure partielle illustrée dans la figure IV.2.55

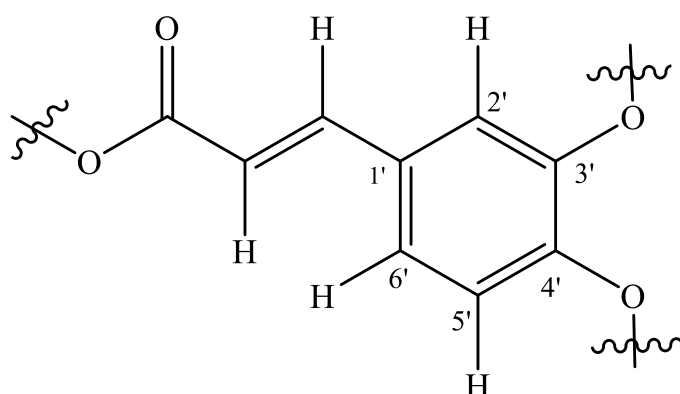


Figure IV.2.55: Structure partielle du Composé CP9

Une lecture minutieuse du spectre RMN ^1H ne permet de relever aucun autre signal correspondant à des groupements hydrocarbonés, de ce fait et vu les valeurs de leurs déplacements chimiques, les carbones C-3' et C-4' sont hydroxylés. Cette donnée permet donc de déduire que ce composé est l'acide quinique où un des hydroxyles est remplacé par un groupement *O*-caféoyle. A ce propos, la valeur du déplacement chimique de H-5 suffit pour placer ce groupement *O*-caféoyle en C-5

Tous ces résultats reportés dans le tableau IV.2.10, permettent d'identifier le composé CP9 (MF22) comme étant l'acide 5-*O*-caféoylquinique [22] connu également sous le nom d'acide chlorogénique (Figure IV.2.56)

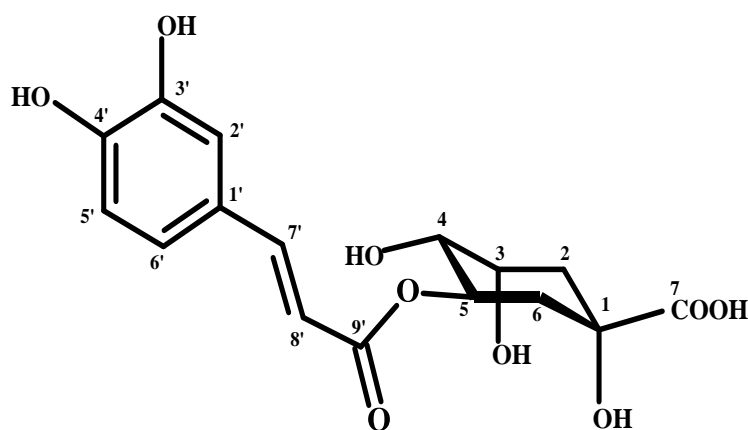


Figure IV.2.55: Structure du composé CP9 : acide 5-*O*-caféoylquinique ou acide chlorogénique

Tableau IV.2.10 : Données RMN (MeOH-d4) du composé **CP9**, acide 5-O-caféoylquinique ou acide chlorogénique

Position	^1H δ_{ppm} /J(Hz)	^{13}C δ_{ppm}
1	-	78,00
2 _{éq}	2,08 m	38,50
2 _{ax}	1,95 m	
3	4,06 q (3,4)	71,25
4	3,61 dd (9,2 ; 3,4)	73,14
5	5,25 td (9,2 ; 4,8)	71,88
6 _{éq}	2,08 m	38,50
6 _{ax}	1,95 m	
7	-	Nd*
1'	-	125,90
2'	6,95 d (2)	115,20
3'	-	145,78
4'	-	148,20
5'	6,68 d (8,5)	123,00
6'	6,85 dd (8,5 ; 2)	116,50
7'	7,47 d (16)	146,60
8'	6,17 d (16)	115,50
9'	-	166,70

Nd*: non détecté

Références bibliographiques

- [1] E. Wollenweber, K. Mann, KM. Valant-Vetschera, External flavonoid aglycons in *Artemisia* and further Anthemideae (Asteraceae), *Fitoterapia*, 60 (1989) 460-463.
- [2] C.S.Kim, J. Oh, L.Subedi, S.Y. Kim, S.U. Choi, K.R. Lee, Two new phenolic glycosides from *Sorbus commixta*, *Chem. Pharm. Bull.* 66 (2018) 839–842
- [3] P.K. Agrawal, NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 31 (1992) 3307-3330
- [4] L. Cardona, I. Fernandez, J.R. Pedro, R. Vidal, Polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea aspera* var. *subinermis*, *Phytochemistry*, 31(10)(1992) 3507-3509.
- [5] M. Aritomi, T. Kumori, T. Kawasaki, Cyanogenic glucosides in leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta*, *Phytochemistry*, 24(10) (1985) 2438-2439.
- [6] L. Hammoud, R. Seghiri, S. Benayache, P. Paul Mosset, A. Lobstein, M. Chaabi, F. León, I. Ignacio Brouard, J. Bermejo, F. Benayache, A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. Nat. Prod. Res. Vol. 26 (3) (2012) 203–208
- [7] G. Flamini, G. Ghelli, L.Caroti Pistelli, I. Morelli , Phenolic compounds from *Santolina pinnata*, *Planta Medica*, 60 (1996) 97.
- [8] J. Duan, P. Hou, Y. Tang, P.Liu, S.Su, H. Liu, A new sesquiterpene and other constituents from *Saussurea lappa* root, *Nat.Prod. Com*, 5 (2010) 1531-1534.
- [9] Y. Champavier, G. Comte, J. Vercauteren, DP. Allais, AJ. Chulia, Norterpene and sesquiterpene glucosides from *Jumiperus phoenicea* and *Galega officianalis*, *Phytochemistry*, 50 1219-1223.
- [10] L. Qiu, F.Zhao, H. Liu, L. Chen, Z.Jiang, H. Liu, N.Wang, X. Yao, F.Qiu, Two megastigmane glycosides, physanosides A and B, from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, a,d their effect on NO release in macrophage, *Chemistry & Biodiversity*, 5(2008) 758-763.
- [11] T.J Mabry, K.R Markham, M.B Thomas. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1970, Page 270.
- [12] A. Bentaméne, S. Beneyache, J. Créche, G. Petit, F. Beneyache, A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae), *Biochem.Syst. Ecol.*33(6) (2005) 1061-1065.

- [13] E.J.Olivier, The structure elucidation of germacranolide sesquiterpene lactones of the genus *Melanpodium* by chemical and spectral methods, LSU historical dissertations and theses, (1980) 3568.
- [14] M. Budesinsky, M. Saman, Annual reports on NMR spectroscopy, Academic press limited, Oval Road, London NW1 7DX.30 (1995) 231-475.
- [15] C.Cheng, Y.Fu, L.Shen, M.Gerstein, Identification of yeast cell cycle regulated genes based on genomic features BMC.Syst.Biol. (2013).
- [16] D. Lazari, B. Garcia, H. Skaltsa, J. Pedro, C. Harvala, Sesquiterpene lactones from *Onopordon laonicum* and *O. sibthorpiatum*, *Phytochemistry* 47 (1998) 415–422.
- [17] S. Demir, C. Karaalp, E. Bedir, Specialized metabolites from the aerial parts of *Centaurea polyclada* DC. *Phytochemistry* 143 (2017) 12-18.
- [18] L.M. Vieira, A. Kijjoa, J.A. Pereira, T.E. Gedris, W. Herz, Germacranes and flavonoids from *ageratum*, *Phytochemistry* 45(1997) 111-115 .
- [19] M.F. Abdalla, N.A.M. Saleh, S. Gabr, A.M. Abu-Eyta, H. El-Said, Flavone glycosides of *Salvia triloba*, *Phytochemistry* 22 (1983) 2057-2060.
- [20] S.Boussaha , thèse de doctorat de 3^{ème} cycle (LMD), université Frères Mentouri, mai 2015, Constantine. Algérie.
- [21] S. Boussaha, K. Bekhouche, A. Boudjerda, F. León, S. Koldaş, A. S. Yaglioglu, I. Demirtas, I. Brouard, E. Marchioni, D. Zama, S. Benayache, F. Benayache, Chemical constituents, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderiacoronopifolia* Coss. subsp.eu-*coronopifolia* M. var. *typica* M. extract. *Rec. Nat. Prod.* 9(3) (2015) 312-322.
- [22] E.W.C. Chan, Y.Y. Lim, S.K. Ling, S.P. Lim, M.G.H. Khoo, Caffeoylquinic acids from leaves of *Etilingera species* (Zingiberaceae), *LWT-FOOD. TECHNOL.* 42 (2009) 1026-1030.

V. Activités biologiques

V.1 Introduction

La valorisation des plantes des points de vue pharmacologique et médicinal, gagne du terrain de jour en jour grâce à la réhabilitation du savoir traditionnel en matière de leur utilisation contre diverses maladies. Ainsi, l'analyse phytochimique et l'étude des activités biologiques des extraits végétaux, constituent actuellement un des axes de recherche privilégiés compte tenu de la forte corrélation qui existe entre la composition chimique des plantes et leurs intérêts et potentiels biologiques. C'est dans ce contexte et dans le but de valider leur utilisation en médecine traditionnelle que nous nous sommes intéressés à l'étude de deux plantes de la famille Asteraceae, la première du genre *Santolina* et la seconde du genre *Centaurea*, notamment *S. chamaecyparissus* et *C. pungens*.

Nos expérimentations sur *S. chamaecyparissus* ont concerné en premier lieu le dosage des phénols totaux des fractions chloroforme et *n*-butanol dérivées de l'extrait hydroéthanolique (70%) des parties aériennes puis l'évaluation de leur activité antioxydante par les tests de réduction du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH[•]) et de la *capacité antioxydante en équivalent trolox* (TEAC). Concernant nos travaux sur *C. pungens*, nos études du point de vue biologique ont porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des 9 produits isolés de la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle et la fraction soluble dans le *n*-BuOH de l'extrait MeOH 70% des fleurs. Ces 9 produits ont été testés contre les souches à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* et les souches à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fragi*.

V.2 Dosage des polyphénols totaux

V.2.1 Introduction

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux contenus dans l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué en utilisant la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) décrite par Santos et al. (2017) [1]. Ce réactif est formé d'acide phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleue. La coloration bleue qui apparaît, proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'échantillon, admet une

absorption maximale aux environs de 750 nm.

V.2.2 Protocole expérimental

L'extrait à étudier est dissout dans du méthanol afin d'obtenir une concentration de 0,5 mg/mL. Le réactif Folin-Ciocalteu (0,5 mL) est ajouté dans des tubes à centrifuger contenant 0,5 mL de la solution d'extrait. 1 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium est ajouté à chaque tube, le volume est ensuite ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. Le contenu des tubes est soigneusement mélangé au vortex et maintenu à température ambiante pendant 45 minutes (jusqu'à l'apparition de la couleur bleue caractéristique), puis centrifugé à 3 000 tours/min pendant 5 minutes. L'absorbance du surnageant clair est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Un contrôle sans réactif FC et un blanc avec du méthanol à la place de l'échantillon ont été inclus dans le test. Le contenu polyphénolique total a été exprimé en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique :

$$y = 0,0027 x + 0,0982 \text{ avec } R^2 = 0,9929$$

Dans nos travaux, ce protocole a été adopté pour les extraits chloroforme et *n*-butanol.

V.3 Evaluation de l'activité antioxydante

V.3.1 Analyse de la capacité antioxydante par le piégeage du radical

1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH')

V.3.1.1 Principes

Le test de piégeage du radical DPPH est l'une des premières méthodes qui étudia la relation qui existe entre la structure des composés phénoliques et leurs activités antioxydantes [2]. Plusieurs modifications ont été introduites et un paramètre important a été ajouté qui n'est autre que le facteur CI_{50} introduit par Brand-Williams et al.[3]. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'un inhibiteur entraînant une diminution de 50% de l'absorbance. A cette concentration la moitié du DPPH' est sous forme réduite. Le facteur CE_{50} (concentration efficace médiane) est également utilisé, il correspond à la concentration d'un échantillon nécessaire à l'obtention de 50% d'effet antioxydant.

Dans cette analyse, le radical libre stable DPPH' qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 515 à 520 nm est de couleur pourpre [3], il est réduit par les molécules dites

antioxydantes en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine de couleur jaune pâle (Figure V.1). La capacité de piégeage est généralement évaluée dans des milieux organiques en suivant la diminution de l'absorbance.

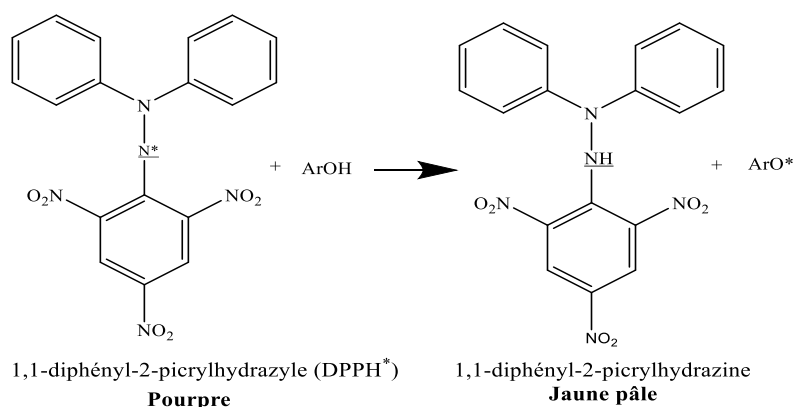


Figure V.1: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Le radical DPPH est un radical de taille relativement grande, ainsi seules les petites molécules ont un meilleur accès pour l'inhiber et auront donc une capacité antioxydante plus élevée [4]. C'est pour cela que beaucoup de composés antioxydants de taille moléculaire élevée qui répondent rapidement avec des radicaux de petite taille peuvent réagir lentement ou même être inertes dans cette analyse. Par ailleurs la solubilité du radical DPPH limitée aux solvants organiques, essentiellement les alcools, constitue une limite majeure de cette technique [5] en outre, la présence d'impuretés (basiques ou acides) dans le solvant, influe sur l'équilibre d'ionisation des composés testés et conduit soit à une diminution soit à une amélioration des constantes de vitesses mesurées [6].

V.3.1.2 Protocole expérimental

Les activités antiradicalaires des extraits *n*-butanol et chloroforme et de la vitamine C (témoin positif) ont été déterminées à l'aide du test du radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH*) selon la procédure précédemment décrite par Kirmizibekmez [7]. Une aliquote (37,5 μ L) de la solution de méthanol contenant différentes quantités de chaque extrait ou de vitamine C, a été ajoutée à 1,5 mL de la solution de DPPH* fraîchement préparée (0,025 g/L dans MeOH) ; la concentration maximale utilisée était de 200 μ g/mL. Un volume égal (37,5 μ L) de méthanol seul a été ajouté aux tubes témoins. L'absorbance a été mesurée à 517 nm sur un spectrophotomètre UV-visible (Evolution 201, Thermo Fisher

Chapitre V

Activités biologiques

Scientific, Italie) 10 min après le début de la réaction. La concentration de DPPH[•] dans le milieu réactionnel a été calculée à partir de la courbe de calibration (intervalle 5–36 µg/mL) analysée par régression linéaire ($y = 1,215x + 15,857$, $R^2 = 0,96$ et $y = 0,296x - 0,603$, $R^2 = 1$). Les concentrations efficaces médianes (CE₅₀, µg/mL) ont été calculées et les résultats sont rapportés plus loin dans la partie réservée aux discussions.

V.3.2 Analyse de la capacité antioxydante par le piégeage du radical cation ABTS^{•+} (TEAC)

V.3.2.1 Principe

Le radical cation ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) de coloration vert-bleu, est formé par oxydation de l'ABTS incolore, par des composés comme le peroxyde d'oxygène [8], le dioxyde de manganèse [9] ou le persulfate de potassium. Le test est basé sur la capacité des composés à piéger le radical cation ABTS. La méthode consiste à ajouter le composé à tester au radical cation ABTS. L'étendue de la décoloration de la couleur bleu-vert, quantifiée comme une diminution de l'absorbance à 734 nm, dépend de la durée de la réaction, de l'activité antioxydante intrinsèque et de la concentration dans l'échantillon en antioxydants. Comme les autres tests de balayage de radicaux, le test TEAC peut soit suivre la décroissance de l'absorbance avec le temps, soit la chute à un certain point final. Lorsqu'elle est utilisée en tant que test de point final, la méthode TEAC nécessite une détermination fiable du point final de la réaction pour une évaluation quantitative de l'activité antioxydante [4]. Les résultats obtenus par le test TEAC sont exprimés en équivalents trolox. Ainsi, plus l'absorbance est faible, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace [10].

V.3.2.2 Protocole expérimental

A une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) est ajoutée un même volume d'une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. Le mélange est agité pendant une nuit dans le noir à température ambiante pour former le radical cation ABTS^{•+}. La réaction est toujours incomplète, même si elle commence immédiatement elle ne se stabilise qu'après 12 heures au minimum. La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. Avant utilisation, la solution est diluée pour obtenir une absorbance

Chapitre V

Activités biologiques

voisine de 0,70 à 734 nm et à 30°C. Cette solution est considérée prête à l'emploi, ainsi les activités antioxydantes *in vitro* des extraits chloroforme et *n*-butanol de *S. Chamaecyparissus* L. ont été déterminées par le dosage de la capacité antioxydante en équivalents trolox (TEAC) [11]. Les extraits sont dilués dans du méthanol afin d'obtenir les concentrations suivantes : 0,25 ; 0,50 ; 0,75 et 1 mg/mL. La réaction est initiée par addition de 1,5 mL d'ABTS⁺⁺ dilué (A = 0,70 à 734 nm), à 15 µL de chaque solution d'échantillon à tester. Les analyses sont répétées trois fois pour chaque échantillon. Le pourcentage d'inhibition de l'absorbance à 734 nm a été calculé pour chaque concentration par rapport à un blanc (MeOH). Les activités antioxydantes sont exprimées en valeurs TEAC et sont comparées à l'activité TEAC de la quercétine 3-*O*-glucoside utilisée comme composé de référence. Sachant que le TEAC est défini comme étant la concentration d'une solution standard de trolox ayant la même capacité antioxydante qu'un extrait à tester de 1 mg/mL.

V.4 Résultats et discussion

V.4.1 Dosage des polyphénols totaux (TPC) des extraits de *Santolina*

chamaecyparissus

Les valeurs reportées dans le tableau V.1 montrent un taux élevé en polyphénols avec 240,20±0.0001 mg EAG /g extrait pour l'extrait *n*-butanol, cette richesse en polyphénols est l'une des spécificités de la famille des composées, en plus les polyphénols sont solubles dans le *n*-butanol sans oublier le climat qui stimule la biosynthèse des métabolites secondaires [12] quant à l'extrait chloroforme, son taux est nettement inférieur puisqu'il est de 6,62±0,03 mg EAG /g extrait.

Tableau V.1: Teneurs en polyphénols totaux des extraits de *S. chamaecyparissus*

	<i>n</i> -BuOH	CHCl ₃
TPC (mg EAG/g extrait ^{a,b}	240,20±0,001	6,62±0,03

^a Evalués par la méthode de Folin-Ciocalteu. ^b Exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait

V.4.2 Evaluation de l'activité antioxydante

V.4.2.1 Activité antiradicalaire par l'effet scavenger du radical DPPH des extraits de *S. chamaecyparissus*

Le test du radical DPPH des extraits de *Santolina chamaecyparissus* étudiés, représenté par les pourcentages de la concentration efficace médiane (Tableau V.2) a montré une meilleure activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol ($CE_{50}=28,11\pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) par rapport à l'extrait chloroforme ($CE_{50}=160,90\pm 0,02 \mu\text{g/mL}$). Ceci peut être dû à la richesse de l'extrait *n*-BuOH en composés phénoliques. Cependant cette activité reste inférieure à celle de la vitamine C utilisée comme standard ($CE_{50}=4,40\pm 0,07 \mu\text{g/mL}$).

V.4.2.2 Capacité antioxydante par le piégeage du radical cation ABTS^{•+} (TEAC)

Les valeurs TEAC des extraits *n*-butanol et chloroforme (Tableau V.2) de *S. chamaecyparissus* ont été comparées à celle de la quercétine 3-*O*-glucoside prise comme contrôle positif. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le test DPPH, révélant que l'extrait *n*-butanol présente une activité de piégeage des radicaux libres supérieure à celle de l'extrait chloroformique. On relève que l'activité de l'extrait *n*-butanol est comparable à celle de la quercétine 3-*O*-glucoside (TEAC = 1,81 mM).

Tableau V.2: Résultats des activités antiradicalaires : tests DPPH et TEAC des extraits CHCl₃ et *n*-BuOH de *S. Chamaecyparissus*

	DPPH (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) ^d	TEAC ($\text{mg/mL M}\pm\text{SD}$) ^c
<i>n</i> -BuOH	28,11±0,02	1,52±0,011
CHCl ₃	168,90±0,02	0,758±0,003
Quercetine 3- <i>O</i> - glucoside ^e	-	1,813±0,009
Vitamine C ^f	4,40±0,07	-

^c Déterminé par le test TEAC; Intervalle des concentrations testées [0.25–1.00 mg/mL].

^d Déterminé par le test DPPH. Intervalle des concentrations testées [2.5–50 $\mu\text{g/mL}$].

^{e,f} Contrôles Positifs, (mM ± SD) pour le test TEAC.

V.5 Détermination de l'activité antimicrobienne des produits isolés de *Centaurea pungens*

Chapitre V

Activités biologiques

Dans le but de valider l'utilisation de *C. pungens* en médecine traditionnelle, l'activité antimicrobienne des composés isolés de ses parties aériennes a été évaluée contre les souches à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* et les souches à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fragi*.

V.5.1 Méthode de diffusion sur disques

L'activité antibactérienne des composés **1** à **9** isolés de *C. pungens* a été testée par la méthode de diffusion sur disque [13] sur des plaques de gélose contre *Bacillus cereus* (DSM 4313 et DSM 4384), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Pseudomonas fragi* (DSM 3456) et *Listeria innocua* (DSM 20649) fournis par Deutsche Sammlung von Mikroorganismen et Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) (Tableau V. 3).

Chaque souche a été incubée à 37°C pendant 18 h dans un bouillon Luria-Bertrani (Sigma-Aldrich, Milan, Italie). Les suspensions microbiennes [1×10^8 unités formant colonies (UFC)/mL] ont été uniformément réparties sur des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Les disques de papier filtre Wattman N° 1 (5 mm de diamètre) ont été imprégnés d'extrait (quantité finale comprise entre 5 et 20 µg/disque). Après un séchage de 60 minutes à température ambiante, ils sont placés individuellement sur les plaques inoculées. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures, selon la souche. L'activité des composés a été évaluée en mesurant le diamètre (en mm) des zones d'inhibition autour des disques. Le diméthylsulfoxyde stérile (DMSO, Sigma-Aldrich, Milan, Italie) et la gentamycine (8 µg/disque; Sigma-Aldrich Milano, Italy) ont été utilisés comme témoin négatif et témoin positif, respectivement. Les échantillons ont été testés en triplicata et les résultats sont exprimés par la moyenne des 3 valeurs \pm SD.

Tableau V.3 : Les quatre souches utilisées pour le test antibactérien

Noms des souches	References	Fournisseurs
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 4313	Braunschweig
	DSM 4384	DSMZ Allemagne
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456	-
<i>Listeria innocua</i>	DSM 20649	-

V.5.2 Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI)

V.5.2.1 protocole expérimental

Chapitre V

Activités biologiques

Les valeurs de CMI pour les composés isolés **1** à **9** ont été évaluées par le dosage à la résazurine sur microplaque [14]. Les échantillons ont été dissous dans du DMSO et distribués dans une plaque multipuits avec différents volumes de bouillon Muller-Hinton (Sigma-Aldrich, Milano, Italie). Deux dilutions en série ont été effectuées de manière à ce que chaque puits contienne 50 μL du matériel à tester à des concentrations décroissantes en série. Une quantité de 35 μL de bouillon iso-sensibilisé et 5 μL de résazurine, utilisée comme solution indicatrice, ont été ajoutés à un volume final/puits de 240 μL . Enfin, 20 μL de suspension bactérienne ont été ajoutés à chaque puits pour atteindre une concentration d'environ 5×10^5 CFU/mL. Le diméthylsulfoxyde stérile (DMSO, Sigma-Aldrich) et la ciprofloxacine (1 mg/mL dans du DMSO) ont été utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement. Les plaques ont été préparées en triplicata et incubées à 37°C pendant 24 heures. La concentration la plus basse à laquelle un changement de couleur s'est produit (du violet foncé à incolore) correspond à la concentration minimale d'inhibition qui n'est autre que la valeur de la CMI.

V.5.3 Résultats et discussion

Les résultats des travaux effectués sur l'activité antibactérienne réalisée par la méthode de diffusion sur disque, des composés **1** à **9** isolés de *C. pungens*, sont présentés dans le tableau V.4, Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont reportées dans le tableau V.5. L'analyse de l'ensemble de ces travaux, montre que *Pseudomonas aeruginosa* était la souche présentant la sensibilité la plus élevée vis-à-vis de tous les composés isolés de *C. pungens*. Cette souche était déjà active à 10 $\mu\text{g}/\text{disque}$, avec des halos d'inhibition supérieurs à 4 mm et des CMI pas plus grandes que 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Par contre, *Pseudomonas fragi* a montré une plus grande résistance aux composés testés, seuls les composés CP1 (centauréolide A) et CP6 (hispiduline 7-O- β -D-glucuronopyranoside) ont montré une faible activité inhibitrice contre cette souche, produisant des halos d'inhibition ne dépassant pas 4 mm à 20 $\mu\text{g}/\text{disque}$. Les deux souches de *Bacillus cereus* étaient sensibles au composé CP8 (apigenin-7-O-(6-methoxy)- β -D-glucuronopyranoside) avec une CMI = 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

L'hispiduline (CP5) a montré l'efficacité antimicrobienne la plus élevée. En effet, la présence de 20 μg d'hispiduline sur le disque de papier filtre a mené à la formation d'un halo d'inhibition d'environ 14 mm de diamètre contre *Listeria innocua* et un halo d'inhibition d'environ 8,7 mm contre *P. aeruginosa*, avec des valeurs de CMI de 40 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

Chapitre V

Activités biologiques

respectivement. Dans la littérature, l'activité antimicrobienne de l'hispiduline obtenue à partir d'*Inula viscosa*, contre *B. cereus* de *Cirsium arvense* contre *P. aeruginosa* [15] a été constatée.

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des lactones sesquiterpéniques est connue, notamment celle des lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea*, en particulier contre *P. aeruginosa*. De plus, l'activité de certains des composés testés contre *Listeria*, en particulier l'hispiduline, ouvre des perspectives intéressantes sur l'utilisation de ce composé comme agent de conservation naturel, y compris dans d'autres domaines, tels que la science alimentaire. Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser ce composé comme agent conservateur de certains aliments qui, s'ils n'étaient pas transformés ou stockés de manière appropriée, pourraient être contaminés par la souche *Listeria*.

Tableau V.4: Activité antimicrobienne des composés 1 à 9, sur les souches testées (zones d'inhibition en mm)

	5 µg/disque					10 µg/disque					20 µg/disque				
	BC 4384	BC 4313	PA	PF	LI	BC 4384	BC 4313	PA	PF	LI	BC 4384	BC 4313	PA	PF	LI
1	0	0	2,67± 0,57	0	5±0	0	0	5±0	0	5±0	0	0	6,67± 0,57	3,67± 0,57	0
2	0	0	2,33± 0,15	0	0	0	0	6±0	0	0	0	0	10±0	0	0
3	0	0	0	0	0	3,67± 0,57	0	5±0	0	0	4±0	6,67± 0,57	6±0	0	0
4	0	0	2,33± 0,15	0	5,67± 0,57	0	0	6,67± 0,57	0	6,67± 0,57	0	0	8,67± 0,57	0	8±0
5	0	0	2,33± 0,15	0	10±0	0	0	7±0	0	10±0	10±0	8,67± 0,57	8,67± 0,57	0	13,67± 0,57
6	0	0	3,67± 0,57	0	4±0	0	0	6±0	0	4,67± 0,57	0	0	6,67± 0,57	3,67± 0,57	0
7	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	7,67± 0,57	7,67± 0,57	0	0
8	0	0	2,33± 0,57	0	3,67± 0,57	5±0	6,67± 0,57	4,67± 0,57	0	3±0	5,67± 0,57	7±0	5±0	0	5±0
9	0	0	2,67± 0,57	0	0	0	8±0	4,67± 0,57	0	0	0	10±0	6±0	0	0
Gentamicine (8 µg/disk)											14,67± 0,57	16,83± 1,04	15,33± 0,57	16,67± 0,57	18,83± 0,57

Les valeurs sont exprimées en millimètres. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 3).
 BC4384 E: *Bacillus cereus* DSM 4384 ; BC 4313: *Bacillus cereus* 4313; PA : *Pseudomonas aeruginosa* ; PF: *Pseudomonas fragi* ; LI : *Listeria innocua*.

Chapitre V

Activités biologiques

Tableau V.5 : Concentration minimale d'inhibition (CMI, $\mu\text{g/mL}$) des composés 1 à 9 isolés de *C. pungens*

Souches testées	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bacillus cereus</i> 4384	1000	1000	160	1000	300	1000	1000	160	1000
<i>Bacillus cereus</i> 4313	1000	1000	300	1000	300	1000	300	160	160
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	100	160	100	100	100	160	100	100
<i>Pseudomonas fragi</i>	400	1000	1000	1000	1000	400	1000	1000	1000
<i>Listeria innocua</i>	400	1000	1000	80	40	80	1000	100	1000

Références bibliographiques

- [1] C.C. Santos, M. Masullo, A. Cerulli, A. Mari, C.S. Estevam, C. Pizza, S. Piacente. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling, *Phytochemistry* 140 (2017) 45–51.
- [2] M. S. Blois. Antioxidant determinations by the use of stable free radical, *Nature* 181 (1958) 1199-1200
- [3] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food. Sci. Technol.* 28 (1995) 25-30.
- [4] D.J. Huang, B.X. Ou, R.L. Prior. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food. Chem.* 53(6) (2005) 1841-1856.
- [5] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals. *Trends, Food. Sci. Technol.* 11 (2000) 419-568.
- [6] L.K. Mac Donald-Wicks, L.G. Wood, M.L. Gary, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*, *Sci. Food. Agric.* 86 (13) (2006) 20-46
- [7] H. Kirmizibekmez, G.B. Uysal, M. Masullo, F. Demirci, Y. Bagci, Y. Kan, S. Piacente, Prenylated polyphenolic compounds from *Glycyrrhiza iconica* and their antimicrobial and antioxidant activities, *Fitoterapia* 103 (2015) 289-293.
- [8] A. Cano, O. Alcaraz, M. Acosta, M.B. Arnao, On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox rep.* 7 (2002) 103-109.
- [9] N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley, C.A. Rice-Evans. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS. Letter* 384 (1996) 240-42.
- [10] K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, R. Bitsch. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods, *Free. Rad. Res.* 36 (2002), 177-87.
- [11] M. Masullo, A.I. Hamed, U.A. Mahalel, C. Pizza, S. Piacente. Phenolic compounds from the fruits of *Medemia argun*, a food and medicinal plant of ancient Egypt, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 279-82.
- [12] H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaib, N. Karray-Bouroui, N. Trabelsi, M. Boulaaba, C. Abdelly. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities, *CR. Biol.* 331 (2008) 372-379.
- [13] L. Aliberti, L. Caputo, V. De Feo, L. De Martino, F. Nazzaro, L.F. Souza, Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, cytotoxic, and central nervous system activities of the

Chapitre V

Activités biologiques

essential oils of *Citrus medica* L. cv. 'Liscia' and *C. medica* cv. 'Rugosa' cultivated in Southern Italy, *Molecules* 21(9) (2016) 1244.

[14] A. Cerulli, G. Lauro, M. Masullo, V. Cantone, B. Olas, B. Kontek, F. Nazzaro, G. Bifulco, S. Piacente, Cyclic diarylheptanoids from *Corylus avellana* green leafy covers: determination of their absolute configurations and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 1703–1713.

[15] Z.U.H. Khan, Y. Wan. *In vitro* antimicrobial activity of the chemical constituents of *Cirsium arvense* (L). Scop, *J. Med. Plants Res.* 7 (2013) 1894-1898.

Conclusion générale

Les travaux que nous avons développés dans le cadre de cette thèse ont porté sur des investigations phytochimiques et biologiques de deux plantes de la famille des Astéracées, *Santolina chamaecyparissus* et *Centaurea pungens*. Les parties aériennes des deux plantes ont été récoltées en période de floraison optimale. Après séchage dans un endroit aéré à l'abri des rayons solaires et de l'humidité, le mélange feuilles et fleurs de *S. chamaecyparissus* et les fleurs de *C. pungens* sont mises à macérer séparément dans de l'éthanol à 70% pour la première et du MeOH à 70% pour le seconde, trois fois avec renouvellement du solvant et à température ambiante. Après filtration et concentration sous pression réduite à une température n'excédant pas 35°C, les extraits hydroalcooliques sont dilués dans de l'eau distillée à raison de 400 mL pour 1 kg de matière végétale sèche, sous agitation magnétique et laissés reposer pendant une nuit à 4°C pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, les deux solutions obtenues ont subi des épuisements avec des solvants de polarité croissante notamment le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol pour obtenir les extraits correspondants.

Les travaux effectués sur *S. chamaecyparissus* ont concerné les extraits chloroforme et *n*-butanol et ont débuté par le dosage des phénols des deux extraits en utilisant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en phénols exprimées en mg d'équivalent acide gallique par g d'extrait ont montré que l'extrait *n*-BuOH (240,20 mg GAE/g d'extrait *n*-BuOH) est beaucoup plus riche en phénols que l'extrait chloroforme (6,62 mg GAE/g d'extrait CHCl₃). Les travaux biologiques ont porté sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des deux extraits en utilisant le test de réduction du radical DPPH et le test TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Le test du radical DPPH a montré que l'activité antiradicalaire de l'extrait *n*-BuOH (EC₅₀ = 28,11 µg/mL) est plus importante que celle de l'extrait chloroforme (EC₅₀ = 168,90 µg/mL), cependant l'extrait *n*-BuOH est moins actif que la vitamine C, utilisée comme contrôle positif (EC₅₀ = 4,40 µg/mL). Les résultats du test TEAC étaient en accord avec ceux du test du radical DPPH, en montrant que l'activité de l'extrait *n*-BuOH était plus importante que celle de l'extrait chloroforme et est comparable à celle de la quercétine 3-*O*-glucoside (1,813 mM) utilisée comme contrôle positif. A la lumière de ses résultats et dans le but de rechercher la différence entre les deux extraits nous sommes intéressés à l'étude de leur composition chimique.

Ainsi l'extrait chloroforme a été fractionné sur une colonne de gel de silice. Les fractions obtenues ont été séparées et purifiées par CCM et/ou sur colonne de Sephadex LH-20, pour donner **6 composés** : eupatiline, circimaritine, circimaritine 5-méthyl etheret circiliolen mélange (58,53 et 41,47%, respectivement), le 1,3-propanediol,2-amino 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) et lutéoline. L'investigation de l'extrait butanolique a mené à l'isolement à l'état pur, et la détermination de **7 composés** : prunasine, prunazine 6'-O-acétate, lutéoline 7-O-β-D-glucopyranoside, syringoside, junipeionolosite, citroside A, lonicérine et apigénine 7-O-β-D-néohesperidoside. Les structures ont été élucidées par les méthodes spectroscopiques incluant la RMN-1D (¹H, ¹³C) et les expériences de RMN-2D (COSY, HSQC, HMBC) ainsi que la ESIMS.

Il faut noter que la prunasine, la prunazine 6'-O-acétate et le syringoside n'ont jamais été reportés dans le genre *Santolina* mais décrites dans d'autres genres de la famille Asteraceae. A ce jour, la lutéoline 7-O-β-D-glucopyranoside a été isolée de *S. insularis* et de *S. pinnata*, un petit arbuste considéré comme une sous-espèce de *S. chamaecyparissus* L., tandis que la lonicérine et l'apigénine 7-O-β-D-néohespéridoside n'ont jamais été isolées du genre *Santolina*. Le junipeionolosite, un 3-oxo-α-ionol glucoside peu commun a été reporté uniquement de *Juniperus phoenicea* et *Galega officinalis*, par contre le citroside A est un mégastigmane jamais rencontré dans le genre *Santolina*. Ces deux mégastigmanes sont nouveaux pour la famille Asteraceae.

Ces résultats expliquent bien la bonne activité antioxydante de l'extrait *n*-BuOH. Les travaux effectués sur *C. pungens* ont concerné les extraits acétate d'éthyle et *n*-BuOH des fleurs. Les mêmes protocoles expérimentaux suivis pour *S. chamaecyparissus* ont été adoptés pour cette espèce. Les travaux de séparation et de purification par diverses méthodes chromatographiques ont permis l'isolement de **9 composés à l'état pur**. Il s'agit de :

- 3 lactones sesquiterpéniques : le centaureolide A, le centaureolide B et le 11β, 13-dihydrosalonitenolide 15-O-β-glucopyranoside. Les 2 premières sont nouvelles et sont donc décrites pour la première fois dans la littérature.
- 2 flavonesméthoxylées : l'hispiduline et la 6-méthoxylutéoline 7-méthyl ether
- 3 flavonesglucosylées : l'hispiduline 7-O-β-D-glucuronopyranoside, l'apigénine 7-O-β-D-glucuronopyranoside et l'apigénine 7-O-β-D-(6''-méthylglucuronopyranoside).
- un dérivé de l'acide quinique : l'acide 5-O-caféoylquinique.

Dans le but de valider l'utilisation de *C. pungens* en médecine traditionnelle, nous avons évalué l'activité antimicrobienne des composés isolés contre les souches à Gram positif : *Bacillus cereus* 4313 et DSM 4384, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* et les souches à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fragi*. Nos résultats ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* était la souche présentant la sensibilité la plus élevée vis-à-vis de tous les composés isolés de *C. pungens* qui ont montré une activité à 10 µg/disque, avec des halos d'inhibition supérieurs à 4 mm et des valeurs de la CMI ne dépassant pas à 160 µg/mL. Par contre, *Pseudomonas fragi* a montré une plus grande résistance aux composés testés, où seuls le centaureolide A et l'hispiduline 7-O-β-D-glucuronopyranoside ont montré une faible activité inhibitrice contre cette souche produisant un halo d'inhibition ne dépassant pas 4 mm à 20 µg/disque. Les deux souches de *Bacillus cereus* étaient sensibles à l'apigénine 7-O-(6-méthoxy)-β-D-glucuronopyranoside (CMI=160 µg/mL). L'hispiduline a montré l'efficacité antimicrobienne la plus élevée, en effet, la présence de 20 µg d'hispiduline sur le disque de papier filtre a conduit à la formation d'un halo d'inhibition d'environ 14 mm de diamètre contre *Listeria innocua* et une auréole d'environ 8,7 mm contre *P. aeruginosa*, avec des valeurs de la CMI de 40 µg/mL et 100 µg/mL, respectivement. Nos résultats concernant l'activité antimicrobienne de l'hispiduline contre *B. cereus* et *P. aeruginosa* sont en accord avec ceux reportés dans la littérature. Il en est de même pour les résultats relatifs à l'activité antimicrobienne de nos lactones sesquiterpéniques confirmant l'efficacité de ce type de molécule reportée dans la littérature en particulier contre *P. aeruginosa*. Les résultats de nos tests concernant une partie des composés testés contre *Listeria innocua* et notamment l'hispiduline, ouvrent des perspectives attrayantes sur l'utilisation de ce composé comme agent naturel de conservation dans des domaines, tels que les sciences alimentaires.

Résumé

Ce travail fait partie du programme de recherche établi par notre unité de recherche et qui consiste en l'investigation phytochimique de plantes médicinales algériennes, appartenant à des familles réputées pour leur richesse en métabolites secondaires à activités biologiques potentielles. Dans ce contexte, deux espèces ont été sélectionnées : *Santolina Chamaecyparissus* et *Centaurea pungens*, vu leur appartenance à la famille Asteraceae dont la richesse en composés bioactifs n'est plus à démontrer.

Connues surtout pour leurs huiles essentielles, les parties aériennes de *S. chamaecyparissus* (feuilles + fleurs) ont subi une extraction par macération dans l'éthanol à 70%. Après filtration, concentration et dilution à l'eau distillée, l'extrait hydroalcoolique obtenu est soumis à des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante (CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) pour donner les trois extraits dérivés correspondants. Nos expérimentations ont concerné les extraits CHCl₃ et *n*-BuOH et ont porté en premier lieu sur le dosage des phénols totaux des deux extraits puis l'évaluation de leur activité antioxydante par le test de réduction du radical DPPH et le test TEAC. Les résultats ont montré que l'extrait *n*-BuOH est plus riche en composés phénoliques et qu'il est meilleur antioxydant que l'extrait CHCl₃ dans le test de piégeage du radical DPPH avec la vitamine C contrôle positif. Dans le test TEAC, les résultats étaient en accord avec ceux du radical DPPH, en effet l'extrait *n*-BuOH a montré une activité importante et similaire à celle de la quercétine 3-*O*-glucoside utilisée comme contrôle positif. Suite à ces résultats encourageants, les deux extraits ont été soumis aux techniques chromatographiques et 15 composés ont été isolés des deux extraits. Les structures de 14 de ces composés ont été déterminées. Il s'agit de 5 flavones aglycones dont 4 méthoxylées, 3 flavones glycosylées dont 2 nouvelles pour le genre *Santolina*, 2 mégastigmanes glucosides nouveaux pour la famille Asteraceae, 2 phénylpropanoïdes nouveaux pour le genre *Santolina* et 2 composés cyanogéniques également nouveaux pour le genre *Santolina*.

L'investigation phytochimique de *Centaurea pungens* (Fleurs) menée de façon similaire à celle reportée pour *S. chamaecyparissus*, a permis d'isoler 9 produits à l'état pur : 3 lactones sesquiterpéniques dont 2 décrites pour la première fois dans la littérature, 2 flavonesméthoxylées, 3 flavonesglucosylées et un dérivé de l'acide quinique. Afin de valider l'utilisation de *C. pungens* en médecine traditionnelle, l'activité antimicrobienne des 9 composés isolés, a été évaluée contre les souches à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* et les souches à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fragi*.

Mots clés : *Santolina chamaecyparissus*, *Centaurea pungens*, Asteraceae, Métabolites secondaires, Activité antioxydante, Dosage des phénols et flavonoïdes totaux. Activité antimicrobienne.

Ces travaux ont fait l'objet de deux publications internationales dans des revues de catégorie A.

Abstract

This work is part of the research program established by our research unit which consists in the phytochemical investigation of Algerian medicinal plants belonging to families known for their richness in secondary metabolites with potential biological activities. In this context, two species were selected: *Santolina chamaecyparissus* and *Centaurea pungens*, given their belonging to the family Asteraceae whose richness in bioactive compounds is well established.

Known mainly for their essential oils, the aerial parts of *S. chamaecyparissus* (leaves + flowers) were macerated in 70% ethanol. After filtration, concentration and dilution with distilled water, the obtained hydroalcoholic extract is subjected to successive extractions by solvents of increasing polarity (CHCl₃, AcOEt and *n*-BuOH) to give the three corresponding derivative extracts. Our experiments concerned the CHCl₃ and *n*-BuOH extracts and focused on the determination of the total phenols of the two extracts and then the evaluation of their antioxidant activity by the DPPH radical reduction and TEAC tests. The results showed that the *n*-BuOH extract is richer in phenolic compounds and is better antioxidant than the CHCl₃ extract in the DPPH radical scavenging assay with vitamin C as positive control. In the TEAC test, the results were in agreement with those of the DPPH radical test, in fact the *n*-BuOH extract showed a significant and similar activity to that of quercetin 3-*O*-glucoside used as positive control. Following these encouraging results, both extracts were subjected to chromatographic techniques and 15 compounds were isolated. The structures of 14 of these compounds were determined. These are 5 flavone aglycones including 4 methoxylated; 3 glycosylated flavones, 2 of which were new for *Santolina* genus; 2 megastigmane glucosides new for Asteraceae family; 2 phenylpropanoids new for the genus *Santolina* and 2 cyanogenic compounds also new for the genus *Santolina*.

The phytochemical investigation of *Centaurea pungens* (Flowers) conducted by similar methods as reported for *S. chamaecyparissus*, allowed the isolation of 9 pure products: 3 sesquiterpene lactones, 2 of which were described for the first time in the literature, 2 methoxylated flavones, 3 glycosylated flavones and a derivative of quinic acid. In order to validate the use of *C. pungens* in traditional medicine, the antimicrobial activity of the 9 isolated compounds was assessed against Gram-positive strains: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua*, and Gram-negative strains: *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fragi*.

Keywords: *Santolina chamaecyparissus*, *Centaurea pungens*, Asteraceae, Secondary metabolites, Antioxidant activity, Determination of phenol content, Antimicrobial activity.

This work has been the subject of two international publications in category A journals.

ملخص

هذا العمل هو جزء من البرنامج البحثي الذي أنشأته وحدة البحث الخاصة بنا والذي يتكون من دراسة كيميائية نباتية للنباتات الطبية الجزائرية ، التي تنتمي إلى أسر معروفة بثروتها في الأيضات الثانوية مع أنشطة بيولوجية محتملة. في هذا السياق ، تم اختيار نوعين: *Santolina Chamaecyparissus* و *Centaurea pungens* ، نظرًا

لاتتمائهم إلى عائلة *Asteraceae* المعروفة بمركباتها النشطة بيولوجيًا

تم استخراج الأجزاء الهوائية من *S. chamaecyparissus* (الأوراق + الزهور) بواسطة *maceration* في 70 ٪ من الإيثانول. بعد الترشيح والتركيز والتخفيف بالماء المقطر ، يخضع المستخلص المائي الكحولي لمصادمات متتالية بواسطة مذيبات ذات قطبية متزايدة (*CHCl3* ، *AcOEt* و *n-BuOH*) لإعطاء المستخلصات الثلاثة. كانت تجاربنا تتعلق بمستخلصات *CHCl3* و *n-BuOH* وركزت في المقام الأول على تحديد مجموع الفينولات من المستخلصين ومن ثم تقييم نشاطها المضاد للأكسدة بواسطة اختبار الاختزال الجذري *DPPH* واختبار *TEAC*. أظهرت النتائج أن مستخلص *n-BuOH* الأكثر ثراءً في المركبات الفينولية ومضاد للأكسدة أفضل من مستخلص *CHCl3* في مقايضة مسح جذور *DPPH* بالتحكم الإيجابي لفيتامين C. في اختبار *TEAC* ، كانت النتائج متطابقة مع تلك الموجودة في *DPPH* الجذري ، أظهر مستخلص *n-BuOH* بالفعل نشاطاً مهماً ومماثلًا لنشاط الجلوكوزايد كيرسيتينين O-3 المستخدم كعنصر تحكم إيجابي. بعد هذه النتائج المشجعة ، تعرض كل من المستخلصات لتقنيات الكروماتوغرافيا وتم عزل المركبات من كلا المستخلصات. تم تحديد هياكل 14 من هذه المركبات. هذه هي 5 فلافون *aglycone* بما في ذلك 4 *methoxylates* ، و 3 *flavones glycosylated* ، 2 منها جديد بالنسبة لجنس *Santolina* ، واثنين من الجلوكوزيدات *megastigma* الجديدة لعائلة *Asteraceae* ، واثنين من *phenylpropanoids* جديدين لجنس *Santolina* و 2 *cyanogéniques*

سمح التحقيق الكيميائي النباتي لعجول سنتوريا (زهور) بطريقة مماثلة لتلك التي أبلغت عنها *S. chamaecyparissus* ، بعزل 9 منتجات نقية: 3 لاكتونات سيسكيتروبيين ، تم وصف 2 منها لأول مرة ، 2 فلافون ميثوكسيلاطي ، 3 فلافونات جلوكوزيلاطي ومشتق من حمض الكينيك. من أجل التحقق من استخدام *C. pungens* في الطب التقليدي ، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من 9 مركبات معزولة ضد سلالات إيجابية الغرام: *Bacillus cereus* ، *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* وسلالات سلبية الغرام: *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fragi*.

الكلمات المفتاحية: *Santolina chamaecyparissus* ، بنغوريات *Centaurea* ، *Asteraceae* ، الأيضات الثانوية ، نشاط مضادات الأكسدة ، تقدير الفينولات والفلافونيدات الكلية. نشاط مضادات الميكروبات.

كان هذا العمل موضوع منشورين دوليين في مجلات الفنة أ.



Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity

Fatiha Labeled^{a,1}, Milena Masullo^{b,1}, Virginia Mirra^b, Filomena Nazzaro^c, Fadila Benayache^a, Samir Benayache^a, Sonia Piacente^{b,*}

^a Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université des Frères Mentouri Constantine, Algeria

^b Università degli Studi di Salerno, Dipartimento di Farmacia, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano (SA), Italy

^c Istituto di Scienze dell'Alimentazione CNR-ISA, Via Roma 64, 83100 Avellino, Italy



ARTICLE INFO

Keywords:

Amino acid-sesquiterpene lactones

Germacrane derivatives

Centaurea genus

Asteraceae

Antimicrobial activity

ABSTRACT

Two new amino acid-sesquiterpene lactone conjugates, named centaureolide A (1) and centaureolide B (2) along with a germacrane derivative (3), five flavonoids (4–8) and one quinic acid derivative (9) have been isolated from the aerial parts of *Centaurea pungens* (Asteraceae). Their structures were established by a combination of one- and two-dimensional NMR techniques, and mass spectrometry. The never reported sesquiterpene lactones have been determined as germacrane derivatives (1 and 2) characterized by the unusual occurrence of a proline moiety. In order to validate the use of the extract of *C. pungens* in folk medicine, the antimicrobial activity of the isolated compounds against the Gram-positive strains *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua* and the Gram-negative strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fragi* was evaluated.

1. Introduction

The genus *Centaurea* (tribe Cynareae, family Asteraceae), represented by herbaceous thistle-like flowering plants, is widely distributed all over the world [1]. It includes more than 500 species, 45 of which growing spontaneously in Algeria, with 7 species localized in the Sahara desert [2]. Many *Centaurea* species are used in the folk medicine of many countries for treatment of cancer, microbial infections and as stimulant, tonic, diuretic and anti-rheumatic remedy [3,4]. The main secondary metabolites of *Centaurea* species are represented by triterpenes, flavonoids, lignans, and sesquiterpene lactones [3,5,6].

C. pungens is a herbaceous plant with spined bracts on the flower-head, of rocky and sandy pasturages in Algeria and Mauritania, occurring throughout the Sahara area. It provides good grazing for all stock. Moreover, this species is used as condiment and in folk medicine for the treatment of respiratory infections [7].

To the best of our knowledge, there is no report on the secondary metabolites of *C. pungens* and their biological activity. In the frame of our ongoing researches on Algerian plants, the phytochemical study of the aerial parts of *C. pungens* was carried out with the aim to investigate the chemical composition and to validate the antimicrobial activity attributed to this plant by folk medicine. Herein, the isolation and

structural elucidation of two germacrane derivatives (1–2), never reported in literature, along with seven known compounds among which one germacranolide (3), five flavonoids (4–8) and one quinic acid derivative (9) has been reported. Their structures were established by a combination of one- and two-dimensional NMR techniques, along with mass spectrometry. The two previously unreported germacrane derivatives (1 and 2) are characterized by the unusual occurrence of a proline moiety. In order to validate the use of the extract of *C. pungens*, and on the basis of the antimicrobial activity reported for germacrane derivatives [8], the antimicrobial activity of the isolated compounds against the Gram-positive strains *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua* and the Gram-negative strains *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas fragi* was evaluated.

2. Results and discussion

The MeOH/H₂O extract of the flowers of *C. pungens* was fractionated by chromatographic methods, to afford two germacrane derivatives never reported in literature (1–2), one germacranolide (3), five flavonoids (4–8) and one quinic acid derivative (9) (Fig. 1). Their structures were established by 1D and 2D NMR experiments in combination with HR-ESIMS analyses (Table 1).

* Corresponding author.

E-mail address: piacente@unisa.it (S. Piacente).

¹ These authors contributed equally to the work

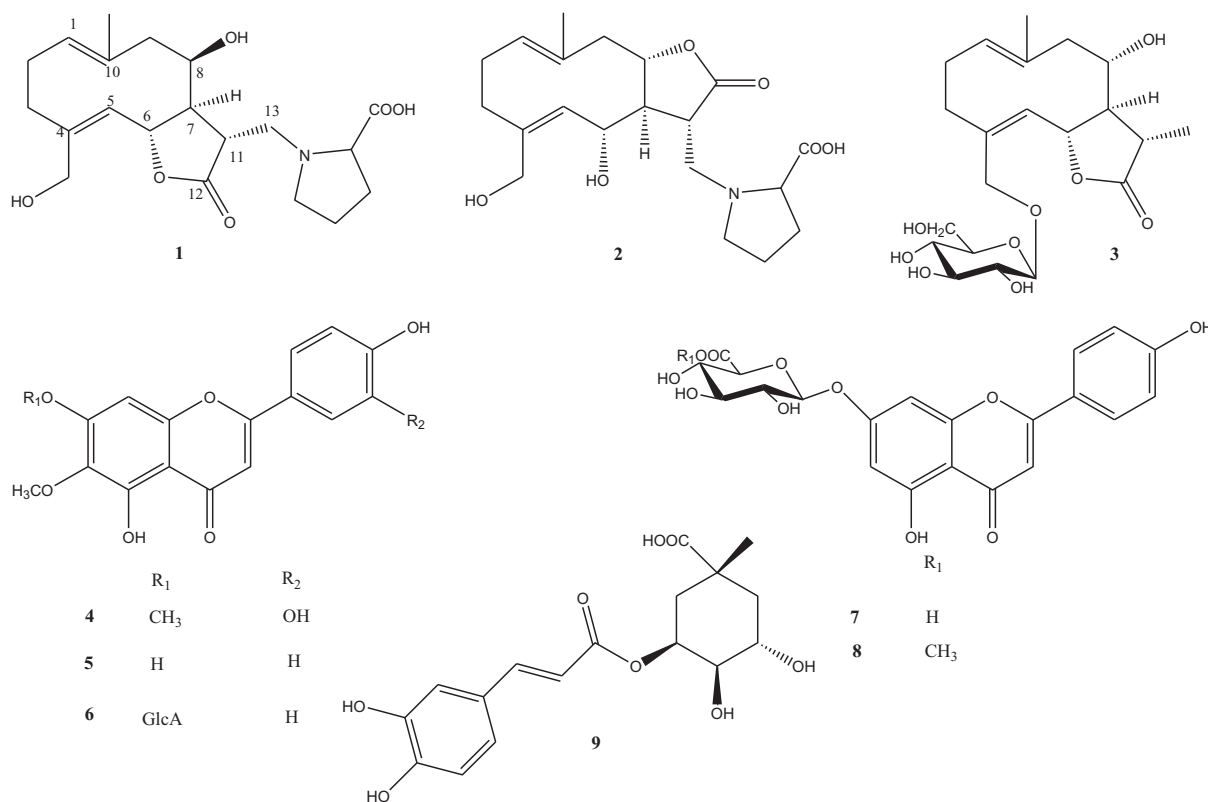


Fig. 1. Chemical structures of secondary metabolites isolated from *Centaurea pungens*.

Table 1
¹H (600 MHz) and ¹³C (150 MHz) NMR spectroscopic data for compounds 1–2.

	1		2	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
1	129.4	5.00, dd (5.9, 10.6)	131.2	5.05, brd (10.7)
2	26.6	2.20 (2H), m	26.0	2.31, 2.20, m
3	35.3	2.62, 1.95, m	34.6	2.63, 1.99, m
4	144.3	–	139.2	–
5	129.2	4.82, d (9.6)	135.0	4.97, d (9.3)
6	78.1	5.16, t (9.6)	68.9	4.53, t (9.3)
7	58.3	2.35, td (9.6, 3.2)	58.4	2.55, m
8	71.8	4.05, dd (3.2, 12.0)	81.3	4.34, t (9.6)
9	52.6	2.62, 2.40, m	47.7	2.70, brd (12.4), 2.56, m
10	134.8	–	139.5	–
11	43.9	3.32, m	44.4	3.37, ddd (2.9, 9.6, 10.0)
12	177.5	–	175.6	–
13	57.9	3.63, dd (5.5, 12.9) 3.67, dd (6.6, 12.9)	58.2	3.52, dd (10.0, 13.0) 3.62, dd (2.9, 13.0)
14	16.9	1.44, s	16.5	1.53, s
15	60.5	4.23, d (13.3) 4.00, d (13.3)	59.6	4.23, d (12.9) 3.88, d (12.9)
Proline			Proline	
1'	173.2	–	173.2	–
2'	71.4	3.98, dd (3.7, 9.2)	71.5	3.94, dd (5.7, 9.2)
3'	29.8	2.47, 2.32, m	29.5	2.49, 2.19, m
4'	24.5	2.15, 2.00, m	24.3	2.17, 1.99, m
5'	55.9	3.86, 3.23, m	54.8	3.88, 3.17, m

The molecular formula of compound 1 (C₂₀H₂₉NO₆) was determined by ¹³C NMR and HR-ESIMS data (*m/z* 378.1925 [M-H][–], calcd for C₂₀H₂₈NO₆ at *m/z* 378.1917). The IR spectrum of compound 1 showed a band at 1775 cm^{–1} attributed to a γ-lactone group. The features of the ¹H and ¹³C NMR spectra suggested a germacranolide ring with two double bonds at Δ^{1,10} and Δ⁴ [9]. In detail, the proton spectrum showed signals at δ 5.00 (dd, *J* = 5.9 and 10.6 Hz) and at δ 4.82

(d, *J* = 9.6), assigned to H-1 and H-5 of the germacranolide moiety, at δ 4.23 and 4.00 (each, d, *J* = 13.3 Hz), ascribable to a primary alcoholic function, at δ 5.16 (t, *J* = 9.6 Hz) and 4.05 (brdd, *J* = 3.2, 12.0 Hz), typical of protons linked to oxymethine carbons, and at δ 1.44 (s) corresponding to a vinyl methyl group. The primary alcoholic function was assigned to C-15 on the basis of the HMBC correlations between the proton signals at δ 4.23 and 4.00 with the carbon resonances at δ 144.3 (C-4), 129.2 (C-5) and 35.3 (C-3). The alcoholic function at δ 4.05 was located at C-8 by COSY and HMBC correlations. The presence of an oxygenated function at C-6a (δ 78.1) was suggested by the correlation in the COSY spectrum of proton at δ 5.16 (t, *J* = 9.6 Hz) with the signals at δ 4.82 (H-5) and δ 2.35 (H-7). The HMBC correlation between the proton signal at δ 5.16 (H-6) and the carbon resonance at δ 177.5 (C-12) allowed us to identify a γ-lactone unit. Further signals at δ 3.67 (dd, *J* = 6.6 and 12.9 Hz) and 3.63 (dd, *J* = 5.5 and 12.9 Hz), along with the typical spin system of a proline unit were observed in the ¹H NMR spectrum (Table 1). A detailed analysis of NMR data suggested that compound 1 possessed a germacranolide unit, characterized by the presence of protons linked to an aminomethylene carbon, instead of the secondary methyl group occurring at C-13. The ¹³C resonance of C-13 at δ 57.9 along with key HMBC correlations between the signals at δ 3.67 and 3.63 with the carbon signals at δ 43.9 (C-11), 58.3 (C-7), 177.5 (C-12), 71.4 (C-2') and 55.9 (C-5') allowed to establish the site of linkage of the proline unit.

The relative stereochemistry of 1 was attributed by analysis of the coupling constants and ROESY correlations, in comparison with literature. The β orientation of H-11 was deduced from the coupling constant (9.6 Hz) between H-7 and H-11, typical of a trans-diaxial disposition of H-7 and H-11 [10]. The β-orientation of the hydroxy function at C-8 was deduced by the coupling constant (3.2 Hz) between H-7 and H-8, and confirmed by the absence of the ROESY correlation between H-6 and H-8, observable in case of an α-oriented hydroxy group at C-8 [10]. Therefore, the structure of compound 1 has been established as depicted in Fig. 1 and named centaureolide A.

The molecular formula of compound **2** (C₂₀H₂₉NO₆) was determined by ¹³C NMR and HR-ESIMS data (*m/z* 378.1922 [M-H]⁻, calcd for C₂₀H₂₈NO₆ at *m/z* 378.1917). The IR spectrum of compound **2** showed a band at 1775 cm⁻¹ indicative of the presence of a γ -lactone group. The analysis of NMR data of **2** revealed also for this compound a germacrane skeleton with a γ -lactone group. In particular, the proton spectrum showed signals at δ 5.05 (brd, *J* = 10.7 Hz, H-1), 4.97 (d, *J* = 9.3, H-5), 4.23 and 3.88 (each, d, *J* = 12.9 Hz, H-15), 4.53 (t, *J* = 9.3 Hz, H-6), 4.34 (t, *J* = 9.6 Hz, H-8), and at δ 1.53 (3H, s, H-14). The location of the γ -lactone unit was established on the basis of the downfield shift of C-8 at δ 81.3 and the upfield shift of C-6 at δ 68.9 revealing the occurrence of a C-8/C-12 olide ring. A detailed analysis of 2D-NMR (HSQC, HMBC and COSY) experiments revealed that compound **2** showed chemical features similar to those reported for 11,13-dihydroartemisiifolin [11], differing from it by replacement of Me-13 with an aminomethylene function (δ_{H} 3.52 and 3.62, δ_{C} 58.2). In a previous study, the conformations of germacranolides, showing broadened NMR spectra or even multiple NMR signals indicative of their conformational mobility, were investigated by means of ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and quantum mechanical calculations [11]. For 11,13-dihydroartemisiifolin a major conformer (in a ratio 85:15) was described; its NMR data are in agreement with those of compound **2**. As for 11,13-dihydroartemisiifolin, a coupling constant of 9.6 Hz between H-7 and H-11 and a ROE correlation between H-7 and the CH₂-13 was observed for compound **2**.

Additionally, the proton spectrum of **2** revealed the presence of a proline unit. Key HMBC correlations between the signals at δ 3.52 and 3.62 with the carbon signal at δ 71.5 (C-2') and 54.8 (C-5') were observed. Therefore, the structure of compound **2** was elucidated as depicted in Fig. 1 and named centaureolide B.

To determine the absolute configuration of proline, compound **2** was taken into acid hydrolysis study because of its higher quantity if compared to **1**. The absolute configuration of the proline unit was determined by acid hydrolysis of compound **2** as L-proline and was assigned on the basis of its optical rotation value [12].

To the best of our knowledge, the previously undescribed compounds, centaureolides A (**1**) and B (**2**), are very unusual representatives of a group of sesquiterpenes containing amino acid residues, in this case L-proline. A recent study reports an unusual adenine-substituted germacrane sesquiterpene lactone, isolated from *Elephantopus tomentosus* [13]. So far, the only one germacrane linked to a proline unit is represented by saussureamine A, isolated from *Saussurea lappa* [14]. Noteworthy, compounds **1** and **2** represent the first report in *Centaurea* genus of germacrane-amino acid conjugates, following the recent report of elemene-amino acid conjugates from *C. polyclada* [12].

Additionally, 11 β ,13-dihydrosalonitenolide 15-O- β -glucopyranoside (**3**) [15], 6-methoxy,7-methyl-luteolin (**4**) [16], hispidulin (**5**) [17], hispidulin 7-O- β -D-glucuronopyranoside (**6**) [18], apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside (**7**) [18], apigenin-7-O-(6-methoxy)- β -D-glucuronopyranoside (**8**) [18] and 5-O-caffeoylquinic acid (**9**) [17] have been isolated.

With the aim to validate the use of *C. pungens* in folk medicine, the antimicrobial activity of the isolated compounds against the Gram-positive strains *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua* and the Gram-negative strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* was evaluated. Results are shown in Table S1. The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) are reported in Table 2.

Pseudomonas aeruginosa was the strain exhibiting the highest sensitivity to all the compounds isolated from *C. pungens* which resulted active already at 10 μ g/disk, with inhibition halos greater than 4 mm, and with MIC values not higher than 160 μ g/mL. On the contrary, *Pseudomonas fragi* showed a greater resistance to the tested compounds, only compounds **1** and **6** showed a weak inhibitory activity against this strain, producing an inhibition halo not higher than 4 mm at 20 μ g/disk. Both two strains of *Bacillus cereus* were sensitive to compound **8**

Table 2
Minimal Inhibitory Concentration (MIC, μ g/mL) of Compounds **1–9** of *Centaurea pungens*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4384 BCE	1000	1000	160	1000	300	1000	1000	160	1000
4313 BCE	1000	1000	300	1000	300	1000	300	160	160
PA	100	100	160	100	100	100	160	100	100
PF	400	1000	1000	1000	1000	400	1000	1000	1000
LI	400	1000	1000	80	40	80	1000	100	1000

4384 BCE: *Bacillus cereus* DSM 4384; 4313 BCE: *Bacillus cereus* 4313; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; PF: *Pseudomonas fragi*; LI *Listeria innocua*.

(MIC = 160 μ g/mL).

Hispidulin (**5**) exhibited the highest antimicrobial effectiveness: the presence of 20 μ g of hispidulin on the filter paper disk led to the formation of an inhibition halo of about 14 mm in diameter against *Listeria innocua*, and a halo of about 8.7 mm against *P. aeruginosa*, with MIC values of 40 μ g/mL and 100 μ g/mL, respectively. In literature the antimicrobial activity of hispidulin obtained from *Inula viscosa*, against *B. cereus* [19] and from *Cirsium arvense* against *P. aeruginosa* [20] is reported.

The antimicrobial activity of sesquiterpene lactones is known as well as that exhibited by sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea* genus, especially against *P. aeruginosa* [20]. Moreover, the activity of some of the tested compounds against *Listeria*, in particular hispidulin, opens appealing perspectives on the use of this compound as a natural preservative agent also in other fields, such as food science. The results obtained suggest the possibility of using this compound as a preservative agent of certain foods that, if not processed or stored in an appropriate manner, could be contaminated by *Listeria*.

3. Experimental section

3.1. General instrumentation

Optical rotations were measured on a Autopol IV (Rudolph Research Analytical) polarimeter. IR measurements were obtained on a Bruker IFS-48 spectrometer. NMR experiments were carried out on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpinGmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe at 300 K. All 2D-NMR spectra were acquired in MeOD₄ (99.95%, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and standard pulse sequences and phase cycling were used for DQF-COSY, HSQC, HMBC, and ROESY spectra. The NMR data were processed using TopSpin 3.2 software. HRESIMS data were acquired on an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) operating in negative ion mode.

3.2. Plant material

The aerial parts of *Centaurea pungens* were collected in the flowering stage on May 2015 from the region of Bechar in the south west of Algeria and authenticated by Professor Mohamed Kaabeche from the University of Setif. A voucher specimen CP145/11 has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, Frères Mentouri University, Constantine 1.

3.3. Extraction and isolation

Air-dried flowers (720 g) of *Centaurea pungens* were extracted at room temperature with MeOH/H₂O (7:3) for 72 h, three times. The combined ethanolic extracts were evaporated at room temperature, suspended in water (400 mL) under magnetic stirring, and kept in the refrigerator for one night to precipitate a maximum of chlorophylls. After filtration, the resulting solution was successively partitioned with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. The organic phases were dried with

Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuum up to 35 °C to obtain the following extracts: CHCl_3 (3.54 g), EtOAc (5.22 g) and *n*-BuOH (16.41 g). A part of the EtOAc extract (4.5 g) was fractionated on silica gel column eluted with CHCl_3 /acetone step gradients to yield 30 fractions monitored by TLC. Fraction 5 (CHCl_3 /acetone, 94:6) (58 mg) and fraction 9 (CHCl_3 /acetone, 92:8) (191 mg) gave precipitates which were filtered and washed with methanol to afford compound 5 (39.6 mg) and compound 4 (20.8 mg), respectively. Fraction 17 (1300 mg) was subjected to a silica gel 60 column using CHCl_3 /MeOH as eluent, to give 20 subfractions (1–20). Subfraction 9 (CHCl_3 /MeOH, 92:8) showed the formation of a precipitate, which was filtered and washed with MeOH to afford compound 7 (8.6 mg). From fraction 26 (265.5 mg) (CHCl_3 /acetone, 55:45), an aliquot was purified on a Sephadex LH₂₀ column eluted with MeOH, to yield compound 2 (5 mg).

A part of the *n*-BuOH extract (2.7 g) was fractionated on a Sephadex (LH20) column eluted with MeOH to give 19 fractions. Fraction 3 (516.4 mg) was submitted to a semipreparative HPLC separation, using MeOH- H_2O (40/60) as mobile phase (flow rate 2.5 mL/min) to yield compounds 1 (1 mg, t_R = 8.8 min), 3 (1.4 mg, t_R = 11.2 min) and 6 (2.2 mg, t_R = 14.1 min). Fraction 9 (44.6 mg) was purified by semipreparative HPLC using MeOH- H_2O (35/65) as mobile phase (Flow rate 2.5 mL/min) to yield compound 9 (1.6 mg, t_R = 6 min). Fraction 17 (15.9 mg) showed the formation of a precipitate which was filtered and washed with MeOH to afford compound 8 (4.4 mg).

3.3.1. Centaureolide A (1)

Amorphous white solid; $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_6$; $[\alpha]_D^{25} + 11.3$ (c 0.1 MeOH); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3430 (> OH), 2920 (> CH), 1775 (C=O), 1630 (C=C); for ^1H and ^{13}C NMR (CD_3OD , 600 MHz and 150 MHz, respectively) data see Table 1; HR-ESIMS $[\text{M}-\text{H}]^- m/z$ 378.1925 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_6$ at m/z 378.1917).

3.3.2. Centaureolide B (2)

Amorphous white solid; $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_6$; $[\alpha]_D^{25} + 9.1$ (c 0.05 MeOH); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3435 (> OH), 2930 (> CH), 1775 (C=O), 1645 (C=C); for ^1H and ^{13}C NMR (CD_3OD , 600 MHz and 150 MHz, respectively) data see Table 1; HR-ESIMS $[\text{M}-\text{H}]^- m/z$ 378.1922 ($[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_6$ at m/z 378.1917).

3.4. Acid treatment of centaureolide B (2)

Compound 2 (5 mg) was treated with 1% HCl at room temperature and the reaction mixture was purified with RP-18 column chromatography. Optical rotation measurement of purified proline revealed its absolute configuration as L ($[\alpha]_D^{25} - 80.2$, c. 0.001, MeOH) [12,21].

3.5. Determination of antimicrobial activity

3.5.1. Inhibition halo test

The antibacterial activity of compounds 1–9 isolated from *C. pungens* was assayed by the inhibition halo test [22] on agar plates against *Bacillus cereus* (DSM 4313 and DSM 4384), *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Pseudomonas fragi* (DSM 3456) and *Listeria innocua* (DSM 20649) provided by Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany). Each strain was incubated at 37 °C for 18 h in Luria Bertani broth (Sigma-Aldrich, Milano, Italy). The microbial suspensions (1×10^8 colony forming units (cfu)/mL) were uniformly spread on the solid media plates ($\Phi = 90$ mm dishes). Sterile Whatman grade 1 paper filter disks ($\Phi = 5$ mm), were impregnated with samples (final amount ranging from 5 to 20 $\mu\text{g}/\text{disk}$) and, after 60-min drying at room temperature, they were individually placed on the inoculated plates. Plates were subsequently incubated at 37 °C for 24–48 h, depending on the strain. The activity of compounds was evaluated by measuring the diameter (in mm) of the inhibition zones around the disks. Sterile di-methyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Milano, Italy) and gentamycin (8 $\mu\text{g}/\text{disk}$; Sigma-Aldrich,

Milano, Italy) were used as negative and positive control, respectively. The samples were tested in triplicate, and the results are expressed as the mean values \pm standard deviations.

3.5.2. Minimum inhibitory concentration

The MIC values for samples 1–9 were evaluated by the resazurin microtiter-plate assay [23]. Samples were dissolved in DMSO and distributed in a multiwell plate with different volumes of Muller-Hinton broth (Sigma-Aldrich, Milano, Italy). Twofold serial dilutions were performed such that each well had 50 μL of the test material in serially descending concentrations. A 35 μL amount of $3.3 \times$ strength isosensitized broth and 5 μL of resazurin, used as indicator solution, were added to a final volume/well of 240 μL . Finally, 20 μL of bacterial suspension was added to each well to achieve a concentration of about 5×10^5 cfu/mL. Sterile di-methyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and ciprofloxacin (1 mg/mL in DMSO) were used as negative and positive control, respectively. Plates were prepared in triplicate and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration at which a color change occurred (from dark purple to colorless) revealed the MIC value.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

This work has been performed in the frame of the bilateral project Algeria-Italy “Exploitation of endemic plants of Algerian Sahara: chemical investigation and biological evaluation”, granted by the Italian Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation (MAECI). The authors thank the MAECI General Management for the Cultural Promotion and Cooperation, for its support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.12.001>.

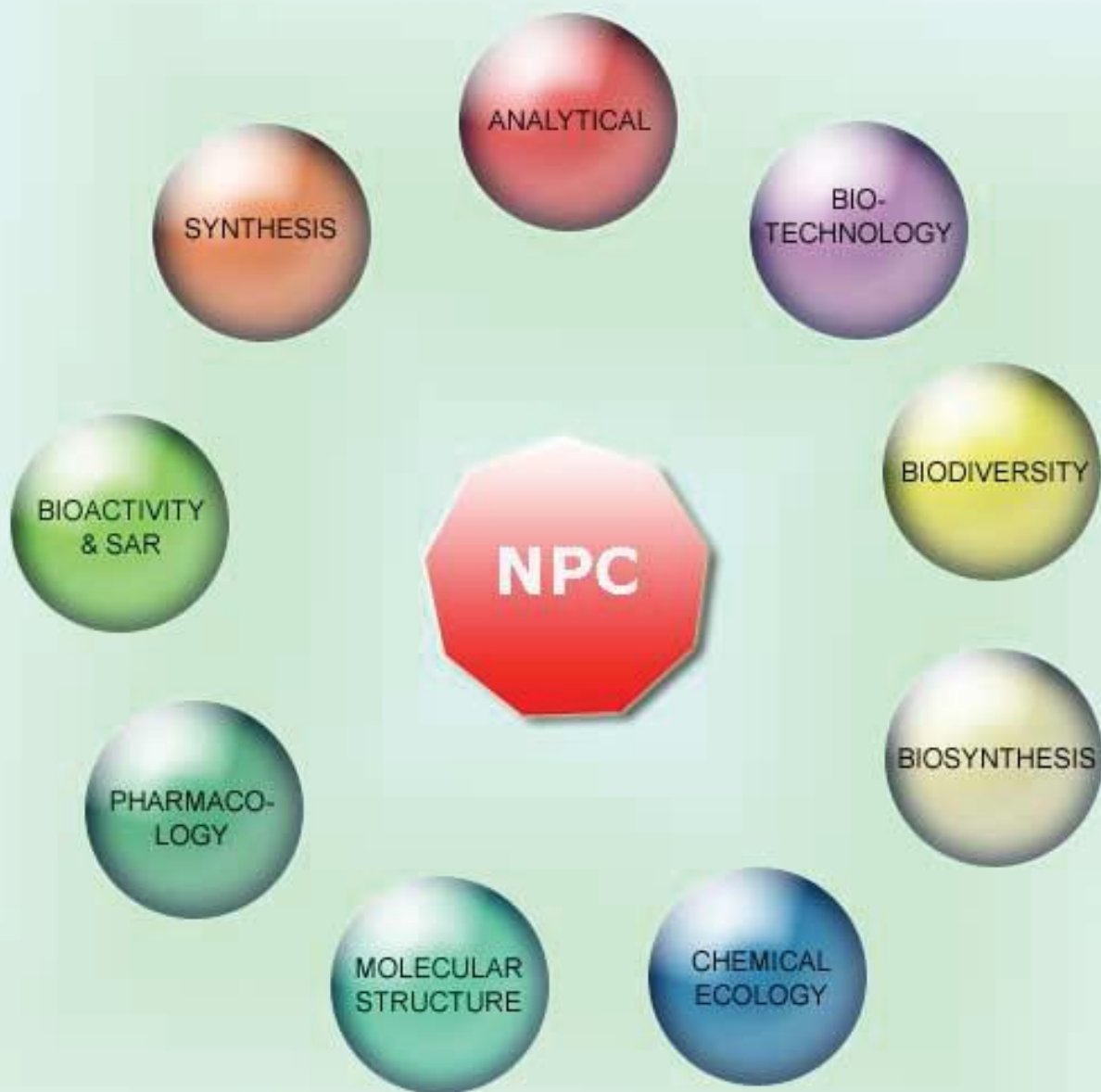
References

- [1] P. Forgo, I. Zupko, J. Molnar, A. Vasas, G. Dombi, J. Hohmann, Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L, *Fitoterapia* 83 (2012) 921–925.
- [2] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol. II CNRS Paris, 1963, pp. 1016–1032.
- [3] C. Formisano, C. Sirignano, D. Rigano, G. Chianese, G. Zengin, E.J. Seo, T. Efferth, O. Taghialatela-Scafati, Antiproliferative activity against leukemia cells of sesquiterpene lactones from the Turkish endemic plant *Centaurea drabifolia* subsp. *detonsa*, *Fitoterapia* 120 (2017) 98–102.
- [4] M.I. Skliar, M.S. Toribio, D.S. Oriani, Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*, *Fitoterapia* 76 (2005) 737–739.
- [5] A. Shakeri, E. Amini, J. Asili, M. Masullo, S. Piacente, M. Iranshahi, Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo, *Nat. Prod. Res.* (2017) 1–5.
- [6] S.M. Adekenov, Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity, *Fitoterapia* 121 (2017) 16–30.
- [7] J. Bellakhdar, Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc, la situation actuelle, les produits, Thesis of the University of Metz (1997).
- [8] M. Bruno, S. Bancheva, S. Rosselli, A. Maggio, Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): distribution, ^{13}C NMR spectral data and biological properties, *Phytochemistry* 95 (2013) 19–93.
- [9] X.-D. Wu, L.-F. Ding, W.-C. Tu, H. Yang, J. Su, L.-Y. Peng, Y. Li, Q.-S. Zhao, Bioactive sesquiterpenoids from the flowers of *Inula japonica*, *Phytochemistry* 129 (2016) 68–76.
- [10] D. Lazari, B. Garcia, H. Skaltsa, J. Pedro, C. Harvala, Sesquiterpene lactones from *Onopordon laconicum* and *O. sibthorpiatum*, *Phytochemistry* 47 (1998) 415–422.
- [11] M.L. Jimeno, M.D. Aprea-Rojas, F.H. Cano, B. Rodriguez, NMR and x-ray conformational study of artemisiifolin and three other related germacranolides, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 474–483.
- [12] S. Demir, C. Karaalp, E. Bedir, Specialized metabolites from the aerial parts of *Centaurea polyclada* DC, *Phytochemistry* 143 (2017) 12–18.
- [13] Z.K. Guo, B. Wang, C.H. Cai, S.Z. Huang, J.Z. Yuan, W.L. Mei, H.F. Dai,

- Tomenphantadenine, an unprecedented germacranolide-adenine hybrid heterodimer from the medicinal plant *Elephantopus tomentosus* L, *Fitoterapia* 125 (2018) 217–220.
- [14] M. Yoshikawa, S. Hatakeyama, Y. Inoue, J. Yamahara, A. Saussureamines, C. B, D, and E, new antiulcer principles from Chinese *Saussureae Radix*, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 214–216.
- [15] Y. Peng, Y. Jian, A. Zulfiqar, B. Li, K. Zhang, F. Long, C. Peng, X. Cai, I.A. Khan, W. Wang, Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*, *Nat. Prod. Res.* 31 (2017) 2211–2217.
- [16] L.M. Vieira, A. Kijjoa, J.A. Pereira, T.E. Gedris, W. Herz, Germacranes and flavonoids from *Achillea ageratum*, *Phytochemistry* 45 (1997) 111–115.
- [17] G. Flamini, M. Pardini, I. Morelli, K. Ertugrul, H. Dural, Y. Bagci, M. Kargioglu, Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey, *Phytochemistry* 61 (2002) 433–437.
- [18] M.F. Abdalla, N.A.M. Saleh, S. Gabr, A.M. Abu-Eyta, H. El-Said, Flavone glycosides of *Salvia triloba*, *Phytochemistry* 22 (1983) 2057–2060.
- [19] W.H. Talib, M.H. Abu Zarga, A.M. Mahasneh, Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*, *Molecules* 17 (2012) 3291–3303.
- [20] Z.U.H. Khan, S. Khan, Y. Chen, P. Wan, In vitro antimicrobial activity of the chemical constituents of *Cirsium arvense* (L.) Scop, *J. Med. Plants Res.* 7 (2013) 1894–1898.
- [21] A. Fadel, N. Lahrache, An Efficient Synthesis of Enantiomerically Pure (R)-Pipelicolic Acid, (S)-Proline, and their N-Alkylated Derivatives, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 1780–1784.
- [22] L. Aliberti, L. Caputo, V. De Feo, L. De Martino, F. Nazzaro, L.F. Souza, Chemical composition and in vitro antimicrobial, cytotoxic, and central nervous system activities of the essential oils of *Citrus medica* L. cv. 'Liscia' and *C. medica* cv. 'rugosa' cultivated in Southern Italy, *Molecules* 21 (2016).
- [23] A. Cerulli, G. Lauro, M. Masullo, V. Cantone, B. Olas, B. Kontek, F. Nazzaro, G. Bifulco, S. Piacente, Cyclic diarylheptanoids from *corylus avellana* green leafy covers: determination of their absolute configurations and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 1703–1713.

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 12. Issue 10. Pages 1529-1672. 2017
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry, University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR MAURIZIO BRUNO

Department STEBICEF,
University of Palermo, Viale delle Scienze,
Parco d'Orleans II - 90128 Palermo, Italy
maurizio.bruno@unipa.it

PROFESSOR VLADIMIR I. KALININ

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Pr. 100-letya Vladivostoka 159, 690022,
Vladivostok, Russian Federation
kalinin@piboc.dvo.ru

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimaki@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry, University of Wollongong,
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry, Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR PING-JYUN SUNG

National Museum of Marine Biology and Aquarium
Checheng, Pingtung 944
Taiwan
pjsung@nmmba.gov.tw

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
david.thurston@kcl.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Norbert Arnold
Halle, Germany

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Vassaya Bankova
Sofia, Bulgaria

Prof. Roberto G. S. Berinck
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Francesco Epifano
Chieti Scalo, Italy

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Judith Hohmann
Szeged, Hungary

Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Göttingen, Germany

Prof. Marie Lacaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoen-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. Leandros A. Skaltsounis
Zografou, Greece

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2017 subscription price: US\$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,995 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Chemical Constituents of the Aerial Parts of *Santolina chamaecyparissus* and Evaluation of Their Antioxidant Activity

Fatiha Labeled^{a,§}, Milena Masullo^{b,§}, Antonietta Cerulli^b, Fadila Benayache^a, Samir Benayache^a and Sonia Piacente^{b,*}

^aUnité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université des Frères Mentouri Constantine

^bDipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Salerno, Via Giovanni Paolo II n. 132, 84084 Fisciano, Salerno, Italy

[§] Authors contributed equally

piacente@unisa.it

Received: March 2nd, 2017; Accepted: May 4th, 2017

Santolina chamaecyparissus is an aromatic evergreen herb growing in North Africa and near the Mediterranean coasts of Southern Europe. Literature data focused mainly on the investigation of the essential oil content of the aerial parts of *S. chamaecyparissus*, but few is known on the chemical composition of its polar extract. Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity of the *n*-butanol and chloroform fractions of *S. chamaecyparissus* was tested by Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) assays. Difference of the phenolic content and of the antioxidant activity between the two extracts prompted us to investigate their chemical composition. Five compounds, eupatilin (1), circimaritin (2), 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone (3), 1,3-propanediol,2-amino 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) (4) and luteolin (5) have been isolated from the chloroform extract, while the investigation of butanolic extract led to the isolation of seven compounds, prunasin (6), luteolin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (7), syringoside (8), junipeonoloside (9), citrose A (10), lonicerin (11) and apigenin 7-*O*-β-D-neohesperidoside (12). Their structures were elucidated by extensive spectroscopic methods including 1D-(¹H, ¹³C and TOCSY) and 2D-NMR (DQF-COSY, HSQC, HMBC) experiments as well as ESIMS analysis.

Keywords: *Santolina chamaecyparissus*, Aerial parts, Phenolic compounds, Folin-Ciocalteu method, TEAC assay, DPPH assay.

The genus *Santolina* (Asteraceae, tribe Anthemideae) is represented by more than 10 species widely distributed in Mediterranean area [1]. The medicinal interest of plants belonging to *Santolina* genus is evident from the several phytochemical investigations, which revealed the presence of compounds belonging to flavonoid, terpenoid, coumarin and polyacetylene classes [2].

Among *Santolina* species, *S. viridis* W. (south of France and north of Spain), *S. pectinata* Lag. (Iberian peninsula) and *S. chamaecyparissus* L. (which grows wild all around the Mediterranean basin) are the most widespread.

S. chamaecyparissus L. is also known as “Suntoline”, a name which derived from the word “Santo” referring to the medicinal properties of the herb, while in England it is called as “Cotton Lauender,” in the U.S.A. it is known as “Lavender Cotton” [1]. *S. chamaecyparissus* is an aromatic evergreen herb that grows wild in North Africa and near the Mediterranean coasts of Southern Europe. It is used in traditional medicine against intestinal worms, as a spasmolytic, anti-inflammatory, antiseptic, bactericide and was reported in phytotherapy for different kinds of dermatitis [3]. The composition of essential oil represents a main topic of the study of *Santolina chamaecyparissus*. In fact several studies reported the composition of its essential oil from species growing in various Mediterranean regions and in India [1,4-6]. Our previous study focused on the chemical composition of the essential oil of this species [7]. Herein the phytochemical investigation of the aerial parts of *S. chamaecyparissus* is reported. The aerial parts of *S. chamaecyparissus* were extracted with EtOH/H₂O and the obtained extract was dissolved in H₂O and successively partitioned with CHCl₃ and *n*-BuOH to obtain the two corresponding fractions.

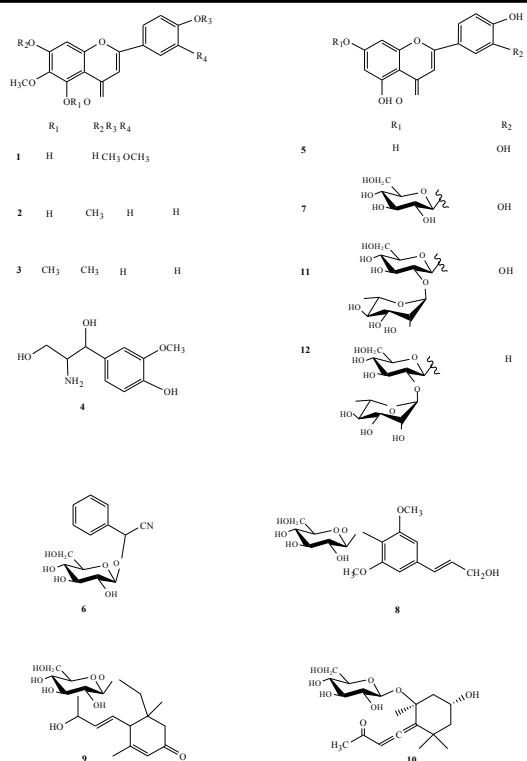


Figure 1: Compounds 1-12 isolated from the aerial parts of *Santolina chamaecyparissus*.

Total phenolic content (TPC), measured by the colorimetric method Folin-Ciocalteu has been determined for the fractions. Differences

in the phenolic content of the chloroformic and the butanol fractions were observed. The total phenolic content, expressed as gallic acid equivalents (GAE), was 6.62 mg of GAE/g chloroformic fraction and 240.20 mg of GAE/g *n*-butanol fraction (Table 1). The antioxidant activity of the chloroformic and *n*-butanol fractions were tested by the DPPH and TEAC assays.

The fractions exhibited a concentration-dependent free radical scavenging activity expressed as EC₅₀, µg/mL of antioxidant required to decrease the initial DPPH• concentration by 50%. This assay revealed that the antiradical activities of *n*-butanol fraction (EC₅₀ = 28.11) was higher than that shown by the chloroformic fraction (EC₅₀ = 168.90).

The TEAC values of *S. chamaecyparissus n*-butanol fraction and chloroformic fraction were compared to that of quercetin 3-*O*-glucoside (Table 1). The results were in agreement with those shown in DPPH assay, revealing that the *n*-butanol fraction exhibited higher free-radical-scavenging activity than chloroformic fraction and comparable to that of quercetin 3-*O*-glucoside (TEAC value of 1.81 mM). With the aim to explore the difference of the phenolic composition between the two fractions, the chemical investigations of the butanolic and chloroformic fractions were carried out.

The CHCl₃ fraction was fractionated on silica gel column and successively purified by different chromatographic steps to obtain five compounds, eupatilin (**1**) [8], circimaritin (**2**) [8], 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone (**3**), 1,3-propanediol,2-amino 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) (**4**) and luteolin (**5**) [9] (Figure 1). Their structures were elucidated by extensive spectroscopic methods including 1D- (¹H, ¹³C and TOCSY) and 2D-NMR (DQF-COSY, HSQC, HMBC) experiments as well as ESIMS analysis.

Compounds **1-3** are unusual flavones with a methoxy group at C-6 and other additional methoxyl groups at C-5, C-3', and C-4', previously isolated from *Santolina* spp. [8,10].

The investigation of butanolic fraction led to the isolation of seven compounds, prunasin (**6**) [11], luteolin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (**7**) [12], syringoside (**8**) [11], junipeionolide (**9**) [13], citroside A (**10**) [14], lonicerin (**11**) [15] and apigenin 7-*O*-β-D-neohesperidoside (**12**) [16] (Figure 1).

Prunasin (**6**) and syringoside (**8**) are never reported in *Santolina* genus but described from other spp. of Asteraceae family [11,17]. To date, luteolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (**7**) has been isolated from *S. insularis* and from *S. pinnata*, a small perennial shrub considered as sub-species of *S. chamaecyparissus* L. [10,12], while lonicerin (**11**) and apigenin 7-*O*-β-D-neohesperidoside (**12**) have never been isolated from *Santolina* genus.

Junipeionolide (**9**) is an unusual 2-oxo-α-ionol glucoside reported only from the aerial parts of *Juniperus phoenicea* and *Galega officinalis* [13], while citroside A (**10**) is a sesquiterpene never found in *Santolina* genus. Both compounds **9** and **10** have never been reported in the Asteraceae family.

To the author's knowledge a dated paper reported the presence of patuletin and luteolin from the capitula and leaves of *S. chamaecyparissus* [18], so far investigated mainly for the essential oil content. This study provides deeper insight into the chemistry of the phenolic fraction of the aerial parts of *S. chamaecyparissus*, highlighting also the good antioxidant activity of the butanolic fraction.

Table 1: Total Phenolic and Free Radical Scavenging Activity of butanolic and chloroformic fractions.

	total phenolic content ^{a,b}	TEAC (mg/mL M ± SD) ^c	free radical scavenging activity (EC ₅₀ , µg/mL) ^d
BuOH fraction	240.20±0.001	1.562± 0.011	28.11±0.02
CHCl ₃ fraction	6.62± 0.03	0.758± 0.003	168.90±0.02
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside ^e		1.813 ± 0.009	
Vitamin C ^f			4.40±0.01

^aEvaluated by Folin-Ciocalteu method. ^bExpressed as milligrams of GAE per gram of extract.

^cDetermined by TEAC assay; range of tested concentrations (0.25–1.00 mg/mL).

^dDetermined by DPPH test. Range of tested concentrations (2.5–50 µg/mL). ^ePositive control (mM ± SD) for TEAC assay.

Experimental

General procedures: NMR experiments were performed on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpinGmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe at 300 K. All 2D-NMR spectra were acquired in methanol-*d*₄ (99.95%, Sigma-Aldrich) and standard pulse sequences and phase cycling were used for DQF-COSY, HSQC, HMBC and ROESY spectra. The NMR data were processed using Topspin 3.2 software. Column chromatography was performed over Sephadex LH-20 (Pharmacia). HPLC separations were carried out on a Waters 590 system equipped with a Waters R401 refractive index detector, a Knauer Prep MSC18 column (300 x 8 mm i.d.), and a Rheodyne injector. TLC was performed on silica gel F254 (Merck) plates, and reagent grade chemicals (Carlo Erba) were used throughout.

Plant material: Aerial parts of *Santolina chamaecyparissus* were collected in the flowering stage on May 2011 from the area of Constantine (North Eastern Algeria) and authenticated by Professor Mohamed Kaabache (Ferhat Abbas University, Setif, Algeria). A voucher specimen (SC 22/05/11) has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, Frères Mentouri University, Constantine.

Extraction: Air dried aerial parts (2.500 kg) of *Santolina chamaecyparissus* were extracted at room temperature with EtOH/H₂O (7:3) for two days, three times. The crude extract was concentrated (up to 35°C), dissolved in distilled H₂O (1000 mL) under magnetic stirring and put in the refrigerator for one night. After filtration the resulting solution was successively partitioned with CHCl₃ and *n*-BuOH. The organic layers were dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the following fractions: CHCl₃ (9.25 g) and *n*-BuOH (22 g).

Determination of Total Phenolic Content (Folin–Ciocalteu Method):

The butanolic and chloroformic fractions of *Santolina chamaecyparissus* L. were analyzed for their total phenolic content according to the Folin-Ciocalteu (FC) colorimetric method [19] determined according to the procedure previously reported. Butanolic and chloroformic fractions were dissolved in methanol to obtain a concentration of 0.5 mg/mL. Folin-Ciocalteu phenolic reagent (0.5 mL) was added to centrifuge tubes containing 0.5 mL of the extracts. The contents were mixed, and 1 mL of a saturated sodium carbonate solution was added to each tube, followed by adjusting the volume to 10 mL with distilled water. The contents in the tubes were thoroughly mixed by vortex and kept at room temperature for 45 min (until the characteristic blue color developed) and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min (International Equipment Co.). Absorbance of the clear supernatant was measured at 517 nm on a UV-visible spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Fisher Scientific, Italy). A control without FC reagent and a blank with methanol instead of sample were included in the assay. The total polyphenolic content was expressed

as gallic acid equivalents (GAE mg/g extract, means \pm SD of three determinations) calculated by calibration curves ($y=0.0027x+0.0982$ $R^2=0.9929$)

Antioxidant activity (TEAC assay): The *in vitro* antioxidant activities of the chloroformic and butanol fractions of *S. chamaecyparissus* L were determined by the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay as previously reported [20].

The extracts were diluted with methanol to produce solutions of 0.25, 0.50, 0.75, and 1 mg/mL. The reaction was initiated by the addition of 1.5 mL of diluted ABTS to 15 μ L of each sample solution. Determinations were repeated three times for each sample solution. The percentage inhibition of absorbance at 734 nm was calculated for each concentration relative to a blank absorbance (methanol) and was plotted as a function of concentration of compound or standard, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK). The antioxidant activities are expressed as TEAC values in comparison with TEAC activity of quercetin 3-*O*-glucoside, used as reference compound. The TEAC value is defined as the concentration of a standard Trolox solution with the same antioxidant capacity as a 1 mg/mL of the tested extract.

Determination of DPPH Radical Scavenging Activity. The antiradical activities of butanolic and chloroformic fractions and vitamin C (positive control) were determined using the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \bullet) and the procedure previously described by Kirmizibekmez [21]. An aliquot (37.5 μ L) of the methanol solution containing different amounts of each extract, fraction, or compound was added to 1.5 mL of daily prepared DPPH \bullet solution (0.025 g/L in MeOH); the maximum concentration employed was 200 μ g/mL. An equal volume (37.5 μ L) of the vehicle alone was added to the control tubes. Absorbance at 517 nm was measured on a UV-visible spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Fisher Scientific, Italy) 10 min after starting the reaction. The DPPH \bullet concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve (range = 5–36 μ g/mL) analyzed by linear regression ($y = 1.215x + 15.857$, $R^2 = 0.96$ and $y = 0.296x - 0.603$, $R^2 = 1$). The mean effective scavenging concentrations (EC₅₀, μ g/mL) were calculated, and the results are reported in Table 1.

References

- [1] Derbesy M, Touche J, Zola A. (1989) The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 269–275.
- [2] Ferrari B, Tomi F, Casanova J. (2005) Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 445–449.
- [3] Teixeira da Silva JA. (2004) Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*, **3**, 706–720.
- [4] El-Sahhar KF, Nassar DM, Farag HM. (2011) Morphological and anatomical studies of *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae) II. Anatomical characteristics and volatile oil. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, **7**, 413–422.
- [5] Djeddi S, Djebile K, Hadjbourega G, Achour Z, Argyropoulou C, Skaltsa H. (2012) *In vitro* antimicrobial properties and chemical composition of *Santolina chamaecyparissus*. Essential oil from Algeria. *Natural Product Communications*, **7**, 937–940.
- [6] Garg SN, Gupta D, Mehta VK, Kumar S. (2001) Volatile constituents of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* Linn. from the southern hills of India. *Journal of Essential Oil Research*, **13**, 234–235.
- [7] Zaiter L, Beghidja N, Benayache F, Chalard P, Figueredo G, Chalchat JC, Marchioni E, Benayache S. (2015) Essential oils of *Santolina africana* Jord. & Fourr. and *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential oils Bearing plants*, **18**, 1338–1342.
- [8] Wollenweber E, Mann K, Valant-Vetschera KM. (1989) External flavonoid aglycons in *Artemisia* and some further Anthemideae (Asteraceae). *Fitoterapia*, **60**, 460–463.
- [9] Carlsen SCK, Mortensen AG, Oleszek W, Piacente S, Stochmal A, Fomsgaard IS. (2008) Variation in flavonoids in leaves, stems and flowers of white clover cultivars. *Natural Product Communications*, **3**, 1299–1306.
- [10] Cottiglia F, Casu L, Bonsignore L, Casu M, Floris C, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R. (2005) Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, **60**, 63–66.
- [11] Duan J, Hou P, Tang Y, Liu P, Su S, Liu H. (2010) A new sesquiterpene and other constituents from *Saussurea lappa* root. *Natural Product Communications*, **5**, 1531–1534.
- [12] Flamini G, Ghelli G, Caroti Pistelli L., Morelli I. (1994) Phenolic compounds from *Santolina pinnata*. *Planta Medica*, **60**, 97.

Isolation of compounds 1–12: Part of the CHCl₃ fraction (5.5 g) was purified on silica gel with a gradient (flow rate 15.0 mL/min) of cyclohexane/ethyl acetate as eluent to afford 23 subfractions (8 mL) monitored by TLC. Subfraction 12 (110.8 mg) and subfraction 14 (265.7 mg) which contained yellowish precipitates were filtered. The obtained precipitates were washed with methanol to afford compound **1** (63.7 mg) and compound **2** (50.4 mg), respectively. Subfraction 15 (155.86 mg) was purified by preparative TLC

(Petroleum ether:ethyl acetate 7:3) to give 7 fractions (S1–S7). Fractions S5 (10mg), S6 (12mg), and S7 (10mg) were purified on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) column (100 x 5 cm) with MeOH as mobile phase to give compounds **3** (1mg), **4** (2 mg), and **5** (1 mg).

Part of the BuOH fraction (18 g) was purified on silica gel with an isocratic system of ethyl acetate: acetic acid: water (6:1:1) as eluent to afford 20 subfractions (8 mL) monitored by TLC. Subfraction 4 (970 mg) was further purified by column of silica gel using as eluent CHCl₃/MeOH to give ten sub-subfractions (B1–B10). Sub-subfraction B6 contained compound **6** (50.4 mg). Sub-subfraction B5 (1.4 g) was washed by methanol then filtered to give the pure compound **7** (47.8 mg). Subfraction 6 (0.6 g) was further purified on silica gel column eluted with a gradient of CHCl₃:MeOH (flow rate 15.0 mL/min) to afford 16 sub-subfractions (C1–C16) (8 mL) monitored by TLC.

Sub-subfraction C8 (79 mg) was analyzed by semipreparative HPLC using MeOH–H₂O (4:6) as mobile phase (flow rate 2.5 mL/min) to yield compound **8** (0.7 mg, $t_R = 7.2$ min). Sub-subfraction C10 (80 mg) was analyzed by semipreparative HPLC using MeOH–H₂O (4:6) as mobile phase (flow rate 2.5 mL/min) to yield compound **9** (1.0 mg, $t_R = 7.8$ min). Sub-subfraction C7 (148.2 mg) was analyzed by semipreparative HPLC using MeOH–H₂O (4:6) as mobile phase (flow rate 2.5 mL/min) to yield compounds **10** (1.2 mg, $t_R = 9.2$ min), **11** (1.2 mg, $t_R = 22.2$ min), and **12** (1.1 mg, $t_R = 38$ min)

Acknowledgments - This work has been performed in the frame of the bilateral project Algeria–Italy “Exploitation of endemic plants of Algerian Sahara: chemical investigation and biological evaluation”, granted by the Italian Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation (MAECI). The authors thank the MAECI General Management for the Cultural Promotion and Cooperation, for its support.

- [13] Champavier Y, Comte G, Vercauteren J, Allais DP, Chulia AJ. (1999) Nortriterpenoid and sesquiterpenoid glucosides from *Juniperus phoenicea* and *Galega officinalis*. *Phytochemistry*, **50**, 1219-1223.
- [14] Qiu L, Zhao F, Liu H, Chen L, Jiang Z, Liu H, Wang N, Yao X, Qiu F. (2008) Two new megastigmane glycosides, physanosides A and B, from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, and their effect on NO release in macrophages. *Chemistry & Biodiversity*, **5**, 758-763.
- [15] Marzouk MSA, Gamal-Eldeen AM, Mohamed MA, El-Sayed MM. (2006) Antioxidant and anti-proliferative active constituents of *Tecoma stans* against tumor cell lines. *Natural Product Communications*, **1**, 735-743.
- [16] Russo M, Bonaccorsi I, Torre G, Cotroneo A, Dugo P, Mondello L. (2013) Determination of bioactive compounds in the juice of pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Natural Product Communications*, **8**, 171-174.
- [17] Kwon HC, Lee KR. (2001) An acetylene and a monoterpene glycoside from *Adenocaulon himalaicum*. *Planta Medica*, **67**, 482-484.
- [18] Adzet T, Iglesias J, Comber H. (1973) The flavonoids of *Santolina chamaecyparissus* L. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **7**, 279-283.
- [19] Santos CC, Masullo M, Cerulli A, Mari A, Estevam CS, Pizza C, Piacente S. (2017) Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. *Phytochemistry*, **140**, 45-51.
- [20] Masullo M, Hamed AI, Mahalel UA, Pizza C, Piacente S. (2016) Phenolic Compounds from the Fruits of *Medemia argun*, a Food and Medicinal Plant of Ancient Egypt. *Natural Product Communications*, **11**, 279-82.
- [21] Kirmizibekmez H, Uysal GB, Masullo M, Demirci F, Bagci Y, Kan Y, Piacente S. (2015) Prenylated polyphenolic compounds from *Glycyrrhiza iconica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Fitoterapia*, **103**, 289-293.

Pseudoalteromone C: a Novel Ubichromenol Derivative from Bacterium <i>Pseudoalteromonas</i> sp. CGH2XX Isolated from the Cultured-type Octocoral <i>Lobophytum crassum</i> Yu-Hsin Chen, Wu-Fu Chen, Juan-Cheng Yang, Mei-Chin Lu, Jimmy Kuo, Jui-Hsin Su, Ching-Feng Weng, Yang-Chang Wu and Ping-Jyun Sung	1615
Non-alkaloid Constituents from <i>Mahonia bealei</i> Bui Van Thanh, Nguyen Thi Van Anh, Do Hoang Giang, Nguyen Hai Dang, Luu Dam Ngoc Anh, Bui Van Huong, Ngo Duc Phuong and Nguyen Tien Dat	1619
Zingerone Suppresses the Shedding of Endothelial Protein C Receptor In-Chul Lee, Dae Yong Kim and Jong-Sup Bae	1623
Suppressive Effects of Sulforaphane on TGFβ1-mediated Sepsis In-Chul Lee and Jong-Sup Bae	1627
Enzyme-treated Asparagus Extract (ETAS) Enhances Memory in Normal Rats and Induces Neurite-outgrowth in PC12 Cells Tomoko Koda, Jun Takanari, Kentaro Kitadate and Hideki Imai	1631
<i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> Evidence for the Antihyperuricemic, Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of a Traditional Ayurvedic Medicine, Triphala Vilasinee Hirunpanich Sato, Bunleu Sungthong, Narawat Nuamnaichati, Prasob-orn Rinthong, Supachoke Mangmool and Hitoshi Sato	1635
Comparison of Volatiles of <i>Sideritis caesarea</i> Specimens Collected from Different Localities in Turkey Tuğba Günbatan, Betül Demirci, İlhan Gürbüz, Fatih Demirci and Ayşe Mine Gençler Özkan	1639
Chemical Composition of Essential Oil among Seven Populations of <i>Zanthoxylum armatum</i> from Himachal Pradesh: Chemotypic and Seasonal Variation Vinod Bhatt, Sushila Sharma, Neeraj Kumar, Upendra Sharma and Bikram Singh	1643
Composition, <i>in vitro</i> Antibacterial and Anti-mildew Fungal Activities of Essential Oils from Twig and Fruit Parts of <i>Eucalyptus citriodora</i> Yu-Chang Su, Kuang-Ping Hsu and Chen-Lung Ho	1647
Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of <i>Thymus guyonii</i> Essential Oil Assia Zeghib, Ahmed Kabouche, Souheila Laggoune, Claude-Alain Calliste, Alain Simon, Philippe Bressolier, Mahjoub Aouni, Jean-Luc Duroux and Zahia Kabouche	1651
Chemoinformatic Investigation of Antibiotic Antagonism: The Interference of <i>Thymus glabrescens</i> Essential Oil Components with the Action of Streptomycin Budimir S. Ilić, Dragoljub L. Miladinović, Branislava D. Kocić, Boban R. Spalović, Marija S. Marković, Hristina Čolović and Dejan M. Nikolić	1655
Insecticidal Effect of Essential Oils Against Fall Webworm (<i>Hypantria cunea</i> Drury (Lepidoptera: Arctiidae)) Temel Gokturk, Saban Kordali and Ayse Usanmaz Bozhuyuk	1659

Natural Product Communications

2017

Volume 12, Number 10

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Fungal Biotransformation of Cyclademoil and Antimicrobial Activities of Its Metabolites Ismail Kiran, Özge Özşen, K. Hüsnü Can Başer and Fatih Demirci	1529
Quantitative Analysis and Pharmacological Effects of <i>Artemisia ludoviciana</i> Aqueous Extract and Compounds Isabel Rivero-Cruz, Gerardo Anaya-Eugenio, Araceli Pérez-Vásquez, Ana Laura Martínez and Rachel Mata	1531
Guaiane Sesquiterpenes from the Rhizome of <i>Curcuma xanthorrhiza</i> and Their Inhibitory Effects on UVB-induced MMP-1 Expression in Human Keratinocytes Ji-Hae Park, Mohamed Antar Aziz Mohamed, Nhan Nguyen Thi, Kyeong-Hwa Seo, Ye-Jin Jung, Sabina Shrestha, Tae Hoon Lee, Jiyoung Kim and Nam-In Baek	1535
Further Guaianolides from <i>Chrysophthalmum montanum</i> Perihan Gürbüz and Şengül D. Doğan	1539
Anti-allergic and Cytotoxic Effects of Sesquiterpenoids and Phenylpropanoids Isolated from <i>Magnolia biondii</i> Thi Tuyet Mai Nguyen, Thi Thu Nguyen, Hyun-Su Lee, Bomi Lee, Byung Sun Min and Jeong Ah Kim	1543
Metabonomic and Proteomic Analysis of the Response of <i>Angelica acutiloba</i> after Herbivore Attack Risa Kato, Yusuke Morita, Atsutoshi Ina, Yoshiaki Tatsuo, Takayuki Tamura, Yasuhiro Tezuka and Ken Tanaka	1547
Two New Abietane-type Diterpenes from the Bark of <i>Cryptomeria japonica</i> Chi-I Chang, Chien-Chih Chen, Che-Yi Chao, Horng-Huey Ko, Hsun-Shuo Chang, Sheng-Yang Wang, Jih-Jung Chen, Cheng-Chi Chen and Yueh-Hsiung Kuo	1553
Complete Structure Elucidation of New Steviol Glycosides Possessing 9 Glucose Units Isolated from <i>Stevia rebaudiana</i> Indra Prakash, Sangphyo Hong, Gil Ma, Cynthia Bunders, Krishna P. Devkota, Romila D. Charan, Catherine Ramirez and Tara M. Snyder	1557
Cytotoxic Activities of Different Iranian Solanaceae and Lamiaceae Plants and Bioassay-Guided Study of an Active Extract from <i>Salvia lachnocalyx</i> Hossein H. Mirzaei, Omidreza Firuzi, Ian T. Baldwin and Amir Reza Jassbi	1563
Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Betulin-Triazole-AZT Hybrids Dang Thi Tuyet Anh, Le Nhat Thuy Giang, Nguyen Thi Hien, Dinh Thi Cuc, Nguyen Ha Thanh, Nguyen Thi Thu Ha, Pham The Chinh, Nguyen Van Tuyen and Phan Van Kiem	1567
A Novel Cycloartane Triterpenoid Bisdesmoside from <i>Actaea vaginata</i> Qiongyu Zou, Meichun Wu, Yindi Zhu, Jinping Shen, Guoxu Ma, Xudong Xu, Gui Chen, Li Zhang, Zijian Zhao, Dizhao Chen and Haifeng Wu	1571
Triterpene Saponins from <i>Wisteria floribunda</i> “macrobotrys” and “rosea” Anne-Sophie Champy, Anne-Claire Mitaine-Offer, Thomas Paululat, Anna-Maria Papini and Marie-Aleth Lacaille-Dubois	1573
Magnunosides B₃, B₄ and C₃, Mono- and Disulfated Triterpene Tetraosides from the Vietnamese Sea Cucumber <i>Neothyridium (= Massinium) magnum</i> Alexandra S. Silchenko, Anatoly I. Kalinovsky, Sergey A. Avilov, Vladimir I. Kalinin, Pelageya V. Andrijaschenko, Pavel S. Dmitrenok, Ekaterina A. Chingizova, Svetlana P. Ermakova, Olesya S. Malyarenko and Tatyana N. Dautova	1577
Chemical Analysis of the Edible Mushroom <i>Tricholoma populinum</i>: Steroids and Sulfinyladenosine Compounds Bernadett Kovács, Zoltán Béni, Miklós Dékány, Orsolya Orbán-Gyapai, Izabella Sinka, István Zupkó, Judit Hohmann and Attila Ványolós	1583
A New Steroidal Glycoside Granuloside C from the Starfish <i>Choriaster granulatus</i>, Unexpectedly Combining Structural Features of Polar Steroids from Several Different Marine Invertebrate Phyla Natalia V. Ivanchina, Timofey V. Malyarenko, Alla A. Kicha, Anatoly I. Kalinovsky, Pavel S. Dmitrenok and Valentin A. Stonik	1585
A Novel Cytotoxic Physalin from <i>Physalis angulata</i> Jia-Jia Fan, Xia Liu, Xi-Long Zheng, Hai Yu Zhao, Huan Xia and Yi Sun	1589
Efficient Bioproduction of Mycosporine-2-glycine, Which Functions as Potential Osmoprotectant, using <i>Escherichia coli</i> Cells Tanutchai Patipong, Takashi Hibino, Rungaroon Waditee-Sirisattha and Hakuto Kageyama	1593
Anti-inflammatory Effect of Discretamine, a Protoberberine Alkaloid Isolated from <i>Duguetia moricandiana</i> Danilo Eduardo Costa Vieira Lemos, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva, Éssia de Almeida Lima, Adriano Francisco Alves, Ana Silvia Suassuna Carneiro Lúcio, José Maria Barbosa-Filho and Sandra Rodrigues Mascarenhas	1595
Asymmetric Synthesis of Tetrahydroisoquinoline Alkaloids Using Ellman's Chiral Auxiliary Y. Vikram Reddy, Dhanraj. O. Biradar, B. Jagan Mohan Reddy, Aravinda Rathod, M. Himabindu and B. V. Subba Reddy	1599
Chemical Constituents of the Aerial Parts of <i>Santolina chamaecyparissus</i> and Evaluation of Their Antioxidant Activity Fatiha Labeled, Milena Masullo, Antonietta Cerulli, Fadila Benayache, Samir Benayache and Sonia Piacente	1605
Phenolic Composition of Leaf extracts of <i>Ailanthus altissima</i> (Simaroubaceae) with Antibacterial and Antifungal Activity Equivalent to Standard Antibiotics Danijela Poljuha, Barbara Sladonja, Ivana Šola, Slavica Dudaš, Josipa Bilić, Gordana Rusak, Katlego E Motlhatlego and Jacobus N Eloff	1609
Synthesis of an Antileukemic Pyrone from <i>Alternaria phragmospora</i> Yang Qu and George A. Kraus	1613

Continued inside backcover