

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1



Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie

# THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du  
Diplôme de Doctorat en Sciences

par :

**Mme. Siham SIFOUANE**

Thème :

---

**Etude phytochimique de deux plantes *Atractylis humilis* et  
*Carduncellus pinnatus* (Asteraceae)**

---

*Spécialité : Chimie Organique*

Soutenue le 15/07/2021

**Devant le jury :**

Président :	Benkhaled Mohamed	Professeur	Université de Batna-1
Rapporteur :	Haba Hamada	Professeur	Université de Batna-1
Examineurs :	Bouzaher Yassine	Professeur	Université de Batna-1
	Bitam Fatma	Professeur	Université de Batna-2
	Atmani Djebbar	Professeur	Université de Bejaia
	Benkiki Naima	M.C.A	Université de Batna-2

**2020/2021**

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE) de la Faculté de Sciences de la Matière de l'Université de Batna-1.

A la fin de ce travail j'adresse mes sincères remerciements à mon Dieu qui m'a guidé dans mes travaux pour aboutir à ces résultats.

Il est temps pour moi d'exprimer mes remerciements à tous ceux qui m'ont apporté aides et conseils durant la réalisation de ce travail, mon directeur de thèse Monsieur **Pr. Hamada HABA**, pour m'avoir suivi et encadré efficacement pendant toutes les années de ma formation doctorale, sa disponibilité de tous les jours et ses nombreux et fructueux conseils et orientations qui ont fortement contribué à créer d'excellentes conditions de travail.

Je voudrais remercier Monsieur **Mohammed BENKHALED**, professeur à l'université de Batna 1, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de doctorat. Mes remerciements vont s'adresser également aux membres de jury d'avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat, Monsieur le Professeur **Yassine BOUZAHER** de l'université de Batna-1, Madame le Professeur **Fatma BITAM** de l'université de Batna-2, Monsieur le Professeur **Djebbar ATMANI** de l'université de Bejaia et Madame **Naima BENKIKI** Maître de conférences A à l'université de Batna-2.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame **Soumia MOUFFOUK** Maître de conférences B à l'université de Batna-1, qui a fortement contribué dans la réalisation et l'enrichissement de la partie biologique.

Je ne peux jamais oublier l'aide de mes collègues **Wassila BENCHADI, Mohamed Ibrahim BADAoui, Salih BESBES** et **Mouna MOKHTARI**, pour l'échange des conseils et suggestions durant la réalisation de ma thèse de Doctorat.

De même je suis très reconnaissante à toute personne, qui de près ou de loin ayant généreusement contribué à l'élaboration de ce travail. Si par mégarde, j'ai oublié quelqu'un, qu'il me pardonne et qu'il soit remercié pour tout.

## *Dédicaces*

*A l'esprit de mon cher père Boujemaa, puisse Dieu t'accueillir dans son  
Vaste Paradis.*

*Je dédie ce modeste travail à ma mère, je tiens à lui exprimer ma  
profonde gratitude et tous mes respects pour toute son aide, son  
affection et son sacrifice.*

*A mon mari Adél témoignage de ma reconnaissance, pour l'immense  
effort qu'il a fourni le long de mes études.*

*A mes chers enfants : Abd El Rahman, Loudjain et Issraa.*

*A mes frère et sœurs : Hamza, Fairouz, Halima, Safia et ma petite  
chère Ibtissem.*

*A ma belle-famille particulièrement ma belle-mère Mebrouka, Warda,  
Nawel, Abir et la petite Selsabîle.*

*A tous ceux qu'un jour profitera de ce travail.*

## *Abréviations*

### *Solvants*

<b>EP</b>	Ether de pétrole	<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -Butanol
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlorométhane	<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme	<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle	<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>EtOH</b>	Ethanol	<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré

### *Chromatographie*

<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince	<b>VLC</b>	Chromatographie liquide sous vide
<b>CC</b>	Chromatographie sur colonne ouverte	<b>SiO<sub>2</sub></b>	Gel de silice normale
<b>CCE</b>	Chromatographie sur couche épaisse	<b>RP-18</b>	Silice greffée en C-18

### *Spectroscopie*

<b>HR-ESI-MS</b>	Spectrométrie de masse à haute résolution	<b>COSY H-H</b>	Correlation spectroscopy H-H
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Résonance magnétique nucléaire du proton	<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum correlation
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13	<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple bond correlation
<b>uma</b>	Unité de masse atomique	<b><i>m/z</i></b>	Masse/charge d'un ion
<b>δ</b>	Déplacement chimique en ppm	<b><i>J</i></b>	Constante de couplage en Hz
<b><i>s</i></b>	Singulet	<b><i>d</i></b>	Doublet
<b><i>dd</i></b>	Doublet de doublets	<b><i>td</i></b>	Triplet de doublets
<b><i>m</i></b>	Multiplet	<b><i>éq</i></b>	Equatorial
<b>ax</b>	Axial	<b>Glc</b>	Glucose

### *Biologie*

<b>ATCC</b>	American type culture collection	<b>FRAP</b>	Pouvoir réducteur du fer
<b>DPPH</b>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	<b>PPM</b>	Phosphomolybdate
<b>EGA</b>	Equivalent gramme d'acide galique	<b>EQ</b>	Equivalent de la quercétine
<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé	<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration efficace à 50 %

# Sommaire

## Introduction

### *Chapitre I. Atractylis et Carduncellus : Synthèse bibliographique*

I.1. Famille Asteraceae .....	4
I.1.1. Généralité sur la famille .....	4
I.1.2. Historique de la classification de la famille .....	4
I.2. Aperçu sur la tribu Cardueae .....	5
I.2.1. Classification tribale .....	5
I.2.2. Origine de la tribu Cardueae .....	7
I.2.3. Classification sous-tribale .....	7
a. Sous-tribu Carlininae .....	7
b. Sous-tribu Echinopsinae .....	7
c. Sous-tribu Carduinae .....	8
d. Sous-tribu Centaureinae .....	8
e. Sous-tribu Cardopatiinae .....	8
I.3. Aperçu sur les genres <i>Atractylis</i> et <i>Carduncellus</i> .....	8
I.3.1. Genre <i>Atractylis</i> .....	8
I.3.2. Espèce <i>Atractylis humilis</i> .....	9
I.3.3. Genre <i>Carduncellus</i> .....	9
I.3.4. Espèce <i>Carduncellus pinnatus</i> .....	10
I.4. Travaux phytochimiques antérieurs .....	11
I.4.1. Genre <i>Atractylis</i> .....	11
a. Diterpènes .....	11
b. Triterpènes .....	12
c. Saponines et alcaloïdes .....	13
d. Acétylènes .....	14
e. Flavonoïdes .....	15
I.4.2. Genre <i>Carduncellus</i> .....	16
a. Diterpènes .....	16
b. Flavonoïdes .....	16
I.5. Usage traditionnel et intérêt biologique .....	18
I.5.1. Genre <i>Atractylis</i> .....	18
I.5.2. Genre <i>Carduncellus</i> .....	18

## ***Chapitre II. Résultats et discussion phytochimiques***

II.1. Plans extractif et purificatif des deux plantes .....	20
II.1.1. Espèce <i>Atractylis humilis</i> .....	20
a. Extraction .....	20
b. Purification .....	20
II.1.2. Espèce <i>Carduncellus pinnatus</i> .....	23
a. Extraction .....	23
b. Purification .....	24
II.2. Elucidation structurale des composés isolés .....	25
II.2.1. Elucidation structurale des composés isolés de la plante <i>A. humilis</i> .....	25
1. Composé <b>TH1</b> .....	25
2. Composé <b>TH2</b> .....	42
3. Composé <b>TH3</b> .....	53
4. Composé <b>TH4</b> .....	63
5. Composé <b>TH5</b> .....	68
6. Composé <b>TH6</b> .....	75
7. Composé <b>TH7</b> .....	83
8. Composé <b>TH8</b> .....	92
9. Composé <b>TH9</b> .....	95
10. Composé <b>TH10</b> .....	97
11. Composé <b>TH11</b> .....	101
12. Composé <b>TH12</b> .....	105
13. Composé <b>TH13</b> .....	108
14. Composé <b>TH14</b> .....	115
II.2.2. Elucidation structurale des composés isolés de la plante <i>C. pinnatus</i> .....	116
1. Composé <b>CP1</b> .....	116
2. Composé <b>CP2</b> .....	120
3. Composé <b>CP3</b> et <b>CP4</b> .....	126
II.3. Conclusion .....	127

## ***Chapitre III. Résultats et discussion des activités biologiques***

III.1. Détermination de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux .....	130
III.1.1. Résultats des deux espèces <i>Atractylis humilis</i> et <i>Carduncellus pinnatus</i> .....	130
III.1.2. Discussion .....	131
III.2. Activités antioxydantes réalisées sur les deux plantes .....	132

III.2.1. Activités antioxydantes réalisées sur l'espèce <i>A. humilis</i> .....	132
a. Résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH .....	132
b. Résultats de l'activité du piégeage de l'ABTS .....	133
c. Résultats de l'activité de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR) .....	134
d. Résultats de l'activité par la méthode de phénanthroline .....	135
III.2.2 Activités antioxydantes réalisées sur l'espèce <i>C. pinnatus</i> .....	136
a. Résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH .....	136
b. Teste de phosphomolybdate PPM .....	137
c. Pouvoir réducteur du fer FRAP .....	138
d. Piégeage de peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	139
III.2.3. Discussion .....	140
III.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	141
III.3.1. Résultats de l'espèce <i>A. humilis</i> .....	141
III.3.2 Résultats de l'espèce <i>C. pinnatus</i> .....	142
III.3.3. Discussion .....	143
III.4. Activité antibactérienne .....	143
III.4.1. Résultats de l'espèce <i>A. humilis</i> .....	143
III.4.2. Résultats de l'espèce <i>C. pinnatus</i> .....	144
III.4.3. Discussion .....	147
a. Absence de l'activité antibactérienne .....	147
b. Présence de l'activité antibactérienne .....	147
III.5. Conclusion .....	148
<b>Chapitre IV. Matériel et méthodes expérimentales</b>	
IV.1. Matériel et méthodes expérimentales .....	150
IV.1.1. Matériel végétale .....	150
IV.1.2. Méthodes chromatographiques .....	150
a. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	150
b. Chromatographie sur couche épaisse (CCE) .....	150
c. Chromatographie liquide sous vide (VLC) .....	151
d. Chromatographie liquide sur colonne (CC) .....	151
IV.1.2. Méthodes spectroscopiques .....	151
a. Pouvoir rotatoire [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> .....	151
b. Spectrométrie de masse .....	151
c. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	152
VI.2. Partie expérimentale phytochimique .....	152

IV.2.1. Etudes phytochimiques de l'espèce <i>A. humilis</i> .....	152
a. Extraction .....	152
b. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle .....	152
c. Fractionnement de l'extrait butanolique .....	156
d. Structures des composés isolés .....	157
IV.2.2. Etudes phytochimiques de l'espèce <i>C. pinnatus</i> .....	161
a. Extraction .....	161
b. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle .....	162
c. Structures des composés isolés .....	163
VI.3. Activités biologiques des deux espèces <i>A. humilis</i> et <i>C. pinnatus</i> .....	165
IV.3.1. Dosages des teneurs totaux en polyphénols et flavonoïdes .....	165
a. Détermination de la teneur en polyphénols totaux .....	165
b. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux .....	165
IV.3.2. Activités antioxydantes .....	166
a. Activité antiradicalaire par DPPH .....	166
b. Activité du piégeage de l'ABTS .....	166
c. Activité de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR) .....	167
d. Activité réductrice par la méthode de phénanthroline .....	167
e. Test de phosphomolybdate PPM .....	168
f. Pouvoir réducteur du fer FRAP .....	168
g. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	168
IV.3.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	169
IV.3.4. Activité antibactérienne .....	169
IV.3.5 Analyse statistique .....	170

## **Conclusion générale**

## **Bibliographie**

## **Résumés**



# Introduction

## **Introduction**

L'utilisation des plantes est une pratique bien connue depuis l'antiquité et joué un rôle primordial dans l'émancipation des anciennes civilisations. En effet, la vie de l'homme a reposé, dans une certaine mesure, sur les plantes de son environnement, soit pour se soigner, se nourrir ou même se protéger des dangers qu'il guette sans cesse. Au cours de ce dernier siècle, les plantes ont été introduites dans plusieurs domaines industriels : l'industrie des cosmétiques, agroalimentaire, pharmaceutique...etc. Afin de préserver la vie et la santé de l'être humaine contre les diverses maladies (la fièvre, la diarrhée, le choléra, le diabète, l'ulcère, le cancer, ...etc) qui l'attrapent, une importance capitale est dédiée au développement de nouveaux médicaments à base de plantes médicinales. A cet effet, les chercheurs se sont intéressés à extraire les principes actifs, qui peuvent traiter ces maladies, à partir des plantes médicinales utilisées par leurs ancêtres pour se soigner. A nos jours, de nombreuses populations Africaines, Asiatiques et Américaines (Amérique latine) se soignent avec des traitements à base de plantes médicinales préconisés et transmises par la tradition.

Les statistiques se rapportant au potentiel floristique dévoilent que seulement une petite partie de la flore végétale mondiale a fait l'objet d'investigations phytochimiques et pharmacologiques <sup>[1]</sup>. L'Algérie, avec le climat méditerranéen au nord, sec à l'intérieur et le Sahara au sud, offre une importante couverture végétale riche et diverse en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires. Cette flore regroupe environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques (Asteraceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Cistaceae, Caryophyllaceae, Lamiaceae ...etc.) et parmi lesquelles 15 % sont endémiques <sup>[2]</sup>. Cette diversité floristique est considérée une source de substances biologiquement actives très particulière.

A cet effet, et dans un but de découvrir de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs susceptibles d'être utilisés face aux diverses maladies comme celles développant particulièrement une résistance médicamenteuse ; la recherche des principes actifs efficaces et doux à partir des extraits végétaux aromatiques et médicinales revêt une importance capitale. Pour cela, l'investigation phytochimique et biologique des ressources végétales constitue une thématique de recherche très prometteuse et rentre systématiquement dans les objectifs tracés par notre laboratoire de recherche depuis une vingtaine d'années.

Dans cet ordre d'idées, deux plantes médicinales de la famille Asteraceae nommées *Atractylis humilis* L. et *Carduncellus pinnatus* DC. connues pour leurs utilisations locales en médecine traditionnelle ont été choisies pour une investigation phytochimique et une évaluation biologique afin d'apporter notre contribution quant à la valorisation des bioressources de la région des Aurès et du nord de Sahara en particulier, et l'Algérie en générale. Les travaux réalisés sur ces deux plantes sont considérés les premières études entreprises sur le plan phytochimique et/ou biologique.

La famille Asteraceae est parmi les plus vastes familles du monde végétal et de plantes à fleurs. Cette famille est connue pour sa richesse en composés bioactifs appartenant à différentes classes de substances naturelles à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les lignanes, les terpénoïdes, les glycérides et les alcaloïdes ayant des activités biologiques prometteuses. La première plante étudiée au cours de ce travail de doctorat est *Atractylis humilis* L., c'est une plante annuelle, largement distribuée dans les montagnes des Aurès, connue pour ses vertus thérapeutiques et appartenant au genre *Atractylis*. Il est à signaler qu'un programme de recherche visant l'investigation phytochimique et biologique des espèces de ce genre telles que *A. flava* [3,4], *A. serratuloides* [5] et *A. cancelata* [6] a été lancé par notre laboratoire depuis une dizaine d'années ; et a conduit à l'identification de nouveaux métabolites secondaires appartenant à diverses classes chimiques à savoir les flavonoïdes et les alcaloïdes et à la mise en évidence de bioactivités telles que les activités anticholinestérase, tyrosinase et antioxydante. La deuxième plante sélectionnée est *Carduncellus pinnatus* DC. du genre *Carduncellus* Adans. connue par sa richesse en molécules bioactives de types flavonoïdes et diterpènes [7-11]. Cette plante est réputée en médecine traditionnelle locale.

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à la composition chimique des deux espèces *A. humilis* et *C. pinnatus*, particulièrement les lignanes, flavonoïdes, phénols, terpénoïdes et glycérides et l'évaluation biologique *in vitro* de leurs extraits organiques (activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne). A cet effet, cette thèse s'articulera autour de quatre chapitres comme suit :

Le premier chapitre est consacré aux connaissances bibliographiques des deux plantes objet de cette recherche ; où nous nous sommes intéressés à citer les aspects botaniques en expliquant la description et la classification et la répartition géographique de la famille, du genre et de l'espèce. Les principales investigations phytochimiques antérieures effectuées sur les deux genres *Atractylis* L. et *Carduncellus* Adans. seront aussi développées dans ce chapitre.

Finalement, les utilisations traditionnelles ainsi que les évaluations biologiques relatives à quelques espèces des deux genres sont également décrites.

Le deuxième chapitre est dédié aux travaux phytochimiques effectués sur les deux espèces *A. humilis* et *C. pinnatus*. La première étape est accordée à l'extraction des matières végétales suivi par la séparation et la purification des extraits et fractions préparés en vue d'en isoler les métabolites secondaires. La dernière étape comporte l'identification structurale de tous les composés obtenus à l'état pur **TH1-TH14** isolés de l'espèce *A. humilis* et **CP1-CP4** purifiés de la plante *C. pinnatus*, en utilisant les différentes expériences spectroscopiques à savoir la RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (HR-ESI-MS et ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$  ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

Les résultats des activités biologiques sont représentés, analysés et discutés au niveau du troisième chapitre. On y compare les analyses quantitatives des contenus en polyphénols et flavonoïdes ainsi que les évaluations des pouvoirs antioxydants, anti-inflammatoires et antibactériens *in vitro* des extraits des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus*.

Le quatrième chapitre résume les travaux expérimentaux établis en représentant le matériel végétal, les méthodes et les appareils chromatographiques et spectroscopiques utilisés lors de l'investigation phytochimique et les protocoles expérimentaux suivis lors de la réalisation des activités biologiques *in vitro*.

La conclusion de ce travail avec des perspectives envisageables seront évoquées à la fin de ce manuscrit suivie par une bibliographie et des résumés en trois langues (Français, Anglais et Arabe).

## Chapitre I

- › *Atractylis et Carduncellus*  
*Synthèse bibliographique*

## **I.1. Famille Asteraceae**

### **I.1.1. Généralité sur la famille**

La famille Asteraceae est parmi les plus grandes familles d'angiospermes appelées aussi Composées (Compositae, nom latin) ou, plus rarement des composacées <sup>[12]</sup>. Elle compte environ 24 000 espèces regroupées dans 1 600 à 1 700 genres <sup>[13]</sup>, ce qui en fait la deuxième plus vaste famille du monde végétal et des plantes à fleurs, derrière les Orchidaceae (25 000 espèces) mais devant les Fabaceae <sup>[14]</sup>. En Algérie, seule en petite Kabylie (les Babors), on compte 49 genres et 69 espèces <sup>[15]</sup>.

Le métabolisme secondaire, l'inflorescence capitulaire et la plasticité écologique sont responsables du succès évolutif de cette famille et de la répartition biogéographique mondiale (sauf l'Antarctique, l'inlandsis du Groenland et l'archipel arctique canadien) <sup>[16]</sup>, mais principalement dans les régions tempérées <sup>[17]</sup>. Les principaux représentants de cette famille se développent essentiellement dans les régions sujettes à la sécheresse, en dehors de la compétition des arbres des forêts tropicales humides <sup>[17]</sup>. La diversité au sein de la famille Asteraceae le fait certainement l'objet de nombreuses recherches dans de nombreux domaines de la science végétale pure et appliquée. Il est à signaler que jusqu'à 1990 des rapports scientifiques concernant la chimie d'environ 5000 espèces ont mis en évidence plus de 7000 constituants phytochimiques <sup>[18]</sup>.

La famille Asteraceae se rencontre dans les régions tempérées <sup>[19]</sup>, les régions sèches, comme le bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique, le Sud-Ouest des états-Unis et les régions arides d'Amérique du Sud <sup>[20]</sup>. Les espèces de cette famille peuvent aussi pousser dans les régions froides <sup>[21]</sup>.

### **I.1.2. Historique de la classification de la famille**

En premier temps, il apparaît la classification classique qui est basée sur l'organisation des capitules des différentes espèces de cette famille, d'où les astéracées ont été divisées plus ou moins en trois groupes <sup>[22]</sup> :

- > Des espèces dont les capitules sont composés exclusivement de grandes fleurs tubulées formant le groupe appelé Tubuliflores ou Cynarocéphales.
- > Des espèces dont les capitules ne contiennent que des fleurs ligulées, constituant un groupe nommé Liguliflores ou Chicoracées.

- › Des espèces dont les capitules recèlent de petites fleurs tubulées au centre et des fleurs ligulées en périphérie, sont celles que l'on nomme les Radiées ou Corymbifères.

La première tentative de classer les composées a été faite par Cassini (1819), qui a défini 20 tribus <sup>[23]</sup>. Après et exactement en 1873, la classification des plantes Asteraceae en trois groupes sur la seule base de l'organisation de l'inflorescence ne tenait plus, d'où Benthman a classifié cette famille en deux sous-familles Asteroideae et Cichorioideae <sup>[24]</sup>. Cette classification a été restée utilisée dans certaines flores et manuels (handbooks) pendant des années <sup>[25]</sup>.

Les données moléculaires du XXI<sup>e</sup> siècle ont sensiblement modifié la classification de la famille des astéracées avec l'existence de divers systèmes de classification en parallèle, qui se sont basés essentiellement sur l'ADN des chloroplastes <sup>[26]</sup>.

Cependant, les botanistes ont adopté des meilleurs arbres phylogénétiques échantillonnés et résolus des astéracées basales, ces échantillons sont employés jusqu'à maintenant et forment la topologie « de la colonne vertébrale » des constructions de méta-arbres qui ont été utilisées récemment pour étudier l'origine et le temps de divergence des espèces de cette famille. Selon la synthèse de Bremer et al. (1994) <sup>[27]</sup> et Kim et Jansen (1995) <sup>[28]</sup>, les tribus des composées peuvent être regroupées en trois sous-familles :

- › Barnadesioideae : monophylétique, limité à une tribu
- › Cichorioideae : paraphylétique, avec six tribus (Arctoteae, Mutisieae, Cardueae, Lactuceae, Vernonieae et Liabeae)
- › Asteroideae : monophylétique, avec les dix tribus restantes.

Ensuite, et sur la base de 10 à 14 marqueurs d'ADN chloroplastique (ADNcp), Panero et Funk (2002, 2008) <sup>[29,30]</sup> et Panero et al. (2014) <sup>[31]</sup> ont reconstruit le « squelette » robuste des astéracées avec 12 à 13 clades majeurs (sous-familles) identifiés.

## **I.2. Aperçu sur la tribu Cardueae**

### **I.2.1. Classification tribale**

La tribu Cardueae est l'une des plus importantes tribus des Asteraceae, avec environ de 2 500 espèces rassemblées dans 83 genres <sup>[27,32]</sup>, soit 10,8 % des espèces et 5,4 % des genres de toute la famille. La tribu Cardueae occupait une grande importance taxonomique et phylogénétique. Cette tribu est considérée comme un groupe-sœur au Tarchonantheae <sup>[29]</sup>. Les

Cardueae sont également connus pour leur richesse en métabolites secondaires ayant des activités biologiques intéressantes et pour leur utilisation en médecine populaire [33]. La classification de la tribu Cardueae est compliquée en raison de la grande diversité morphologique, du grand nombre d'espèces et des controverses taxonomiques incluant au niveau des tribus, des sous-tribus et des genres [32].

La problématique réelle de la tribu Cardueae est généralement portée sur la classification des quatre entités taxonomiques : Echinopeae, Carlineae, Centaureinae et Carduinae voisines de la tribu Cardueae. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la première classification a été définie par Cassini (1819) [23] reconnaissant trois tribus, Echinopeae, Carlineae et Cardueae. Cette dernière est subdivisée en deux sous-tribus : Carduinae et Centaureinae [23]. En revanche, Bentham (1873) [24] et Hoffmann (1894) [34], ont suggéré une large tribu Cardueae comprenant quatre sous-tribus : Echinopsidinae, Carlininae, Carduinae et Centaureinae. Cette classification a été acceptée pendant longtemps. Toutefois, le problème est survenu de nouveau après l'étude de Wagenitz (1976) [35] qui considère les Echinopeae comme une tribu distincte et les sous-tribus Carduinae et Centaureinae sont très proches en caractères phylogénétiques. Ceci a été supporté par l'étude de Petit en 1988 [36] en suivant l'approche de Wagenitz [35]. Les analyses moléculaires les plus récentes publiées durant les années quatre-vingt-dix du siècle passé tels que : chloroplast DNA restriction site data [37,38], *rbcL* sequences [28] et Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences [39], confirment que la tribu Cardueae est monophylétique et comprend quatre sous-tribus : Echinopsidinae, Carlininae, Carduinae et Centaureinae [28,37,38]. Cependant, tous ces résultats n'ont pas réglé définitivement la discussion. D'ailleurs, petit (1997) [40] a de nouveau conclu en se basant sur une analyse cladistique des caractères morphologiques, que les Echinopeae ne devraient pas être incluses dans la tribu Cardueae.

Après toute cette polémique, la classification en vigueur et qui est approuvée par la plupart des scientifiques est celle qui dénombre quatre sous tribus [41-43], avec la possibilité de définir un nouveau sous-tribu appelé Cardopatiinae [41-43]. Le tableau II.1.1 ci-dessous résume les différentes classifications indiquées précédemment.



Tableau I.1. Différentes classifications de la tribu Cardueae

Cassini (1819)	Bentham (1873) Hoffmann (1894) Kim et Jansen (1995) Jansen et al. (1990, 1991) Susanna et al. (1995, 2009) Garcia-Jacas et al. (2002) Barres et al. (2013)	Wagenitz (1976) Petit (1988, 1997)
Tribu Echinopeae	Tribu Cardueae	Tribu Echinopeae
Tribu Carlineae	Sous-tribu Echinopsidinae	Tribu Cardueae
Tribu Cardueae	Sous-tribu Carlininae	Sous-tribu Carduinae-Centaureinae
Sous-tribu Carduinae	Sous-tribu Carduinae	Sous-tribu Carlininae
Sous-tribu Centaureinae	Sous-tribu Centaureinae	

### I.2.2. Origine de la tribu Cardueae

L'origine des Cardueae remonte à l'Eocène moyen (âge moyen : 41,56 millions d'années) en Asie de l'Ouest, qui est également la zone ancestrale de la plupart des sous-tribus<sup>[42]</sup>. Chaque sous-tribu revient à la période **Oligocène – Miocène** sauf pour la sous-tribu Carlininae qui reste indéterminée<sup>[42]</sup>.

### I.2.3. Classification sous-tribale

#### a. Sous-tribu Carlininae

La sous-tribu Carlininae comprend les genres *Atractylis*, *Atractyloides*, *Carlina*, *Thevenotia* et *Tugarinovia*<sup>[32]</sup>. Un caractère frappant et probablement plésiomorphe est la présence de véritables fleurs de rayon dans les genres de la sous-tribu Carlininae comme *Atractylis* L., tandis que les autres sous-tribus n'ont que des fleurs de disque. Les capitules sont généralement sous-tendus par des bractées en forme de feuilles pectinées-pinnatisées ; les lobes de la corolle sont très courts, seulement 1–3 mm de long, et le pappus a de longs poils plumeux, souvent connés à la base formant des écailles plus larges et robustes<sup>[41]</sup>.

**b. Sous-tribu Echinopsinae**

La sous-tribu Echinopsinae ne comprend que le genre *Echinops* <sup>[31,40]</sup>. Les Echinopsinae sont facilement caractérisés par leurs inflorescences de second ordre (capitules uniflores regroupées en une grande inflorescence) <sup>[41]</sup>.

**c. Sous-tribu Carduinae**

Certains groupes informels ont été définis au sein de la sous-tribu paraphylétique Carduinae <sup>[41,43]</sup> comme : le groupe *Xeranthemum*, les groupes *Berardia* et *Staehelina*, le groupe *Onopordum*, le groupe *Cynara*, le groupe *Carduus-Cirsium*, le groupe *Arctium-Cousinia* et le groupe *Jurinea-Saussurea*. Tous les genres de ces groupes ont des akènes avec une aréole d'insertion basale ou baso-abaxiale et généralement un simple pappus, et sont souvent épineuses <sup>[32]</sup>.

**d. Sous-tribu Centaureinae**

La sous-tribu Centaureinae est la plus diversifiée comprenant 31 genres avec plus de 800 espèces <sup>[32,41]</sup>. Les Centaureinae se caractérisent par des akènes avec une aréole d'insertion latérale-axiale, un double pappus et à quelques exceptions, des feuilles non armées. Cependant, l'examen des limites entre Carduinae et Centaureinae représente un défi, car les différences résident dans les microcaractères de l'akène et du pappus qui sont difficiles à observer dans les herbiers incomplets ou immatures.

**e. Sous-tribu Cardopatiinae**

La sous-tribu Cardopatiinae comprend deux genres monotypiques : *Cardopatium* et *Cousiniopsis* <sup>[32,41]</sup>.

**I.3. Aperçu sur les genres *Atractylis* et *Carduncellus*****I.3.1. Genre *Atractylis***

Le genre *Atractylis* a été lectotypifié (classifié comme un nouveau taxon) par Green (1929) <sup>[44]</sup> après l'identification de l'espèce *A. cancellata* L. comme espèce type de ce genre, les subdivisions du genre qui en suivent sont examinées en fonction de cette proposition.

Le genre *Atractylis* n'a jamais fait l'objet d'une définition absolument satisfaisante, il est mal délimité et les auteurs s'accordent mal sur le nombre d'espèces à lui attribuer <sup>[45]</sup>.

Par exemple, le Chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) a été rangé au début dans le genre *Atractylis* par Linné (1753). Par la suite, Lessing (1832) l'a inclus dans le genre *Carlina*,

cette classification a été reprise par De Candolle (1837), Boissier (1875) et Rouy (1903). A l'opposé, Bentham et Hooker (1873) et la plupart des auteurs postérieurs ont partagé la proposition de Linné. Par ailleurs Cassini (1827) a créé pour cette espèce un genre appelé *Chamaeleon* qui serait, selon l'avis d'Arènes (1953), intermédiaire entre les genres *Carlina* et *Atractylis* [45].

La classification qui a été faite en 1889 par Battandier et Trabut [46] repose sur la création d'un rang nommé *Carlinoideae* pour réunir les espèces algériennes de ce genre à savoir : *Atractylis caespitosa* Desf., *A. humilis* L., *A. polycephala* Coss., *A. phaeolepis* Pom., *A. echinata* Pom., *A. serratuloides* (Sieh. ex Cas.) et *A. carduus* (Forssk.). Bien que le rang des *Carlinoideae* ne soit pas clairement mentionné dans la classification de ce genre à l'époque et donc ce nom (*Carlinoideae*) est rendu invalide surtout après le 1<sup>er</sup> janvier 1953 où le rang des *Carlinoideae* désigne une section et peut servir comme un basionyme (une combinaison des genres) [47].

Le genre *Atractylis* est caractérisé par les anthères à caudicules soudés mais surtout par le trichome des akènes (poils filamenteux et poils de Nobbe) [44]. Le genre *Atractylis* est abondamment développé dans les zones steppiques, sous des bioclimats semi-arides, arides à saharien, au Sud de la Méditerranée [44].

### **I.3.2. Espèce *Atractylis humilis***

L'espèce *A. humilis* L. appartenant au genre *Atractylis* L. est connue sous le nom commun "Atractyle humble" et "Chardon-fuseau". L'espèce *A. humilis* poussant généralement dans les pâturages rocheux, est une plante herbacée annuelle à fleurs violettes [45] (Figure III.1.1).



**Figure I.1 : Photos de l'espèce *Atractylis humilis***

**I.3.3. Genre *Carduncellus***

Beaucoup d'études génétiques ont essayé de résoudre la confusion se rapportant aux deux genres *Carduncellus-Carthamus* pour leur délimitation et clarification de leur frontières [48]. Dans la plupart du temps, le duo *Carduncellus-Carthamus* est considéré comme un seul et même genre, malgré l'existence de plusieurs des tentatives de révision qui ont toutes échoué ou elles n'ont pas été suffisamment acceptées [48]. Et pour résoudre cette ambiguïté, les spécialistes ont recouru à l'ITS (Internal Transcribed Spacers), une méthode qui utilise les séquences des régions de l'espaceur ribosomal nucléaire interne transcrit. Ils sont arrivés à des résultats indiquant que le complexe *Carduncellus-Carthamus* doit être classé en quatre genres : *Carduncellus*, *Carthamus*, *Femenisia* et *Phonus*. Par ailleurs, cette classification ne s'accorde qu'avec la classification biogéographique et non pas avec les caractères morphologiques [48]. Le groupe *Carduncellus-Carthamus* est très répandu dans le bassin Méditerranéen. En effet, les *Carduncellus* se présentent dans l'Ouest de la Méditerranée (Péninsule Ibérique et les pays du Maghreb) tandis que les espèces *Carthamus* occupent beaucoup plus l'Est de la Méditerranée (Egypte, Liban), à l'exception de quelques espèces trouvées dans le sud Espagnol et au Maroc, ainsi que l'observation de quelques espèces hybrides un peu partout dans le monde surtout les régions ayant un climat semblable à celui de la zone méditerranéenne (en Argentine par exemple ou en Californie aux Etats-Unis) [48]. Il est à noter que ces deux genres renferment plus de 50 espèces partageant un espace géographique qui commun s'étend du Maroc au Proche Orient [48].

Les caractéristiques botaniques du genre *Carduncellus* sont définis par des capitules homogames et multiflores. Des fleurs sont tubuleuses, égales et toutes fertiles. Des involucre à bractées imbriquées sur plusieurs rangs inégales comportent un involucre supplémentaire de bractées foliacées et épineuses. Ils ont aussi un réceptacle plan garni de paillettes sétacées courtes. Des akènes quadrangulaires à aigrette longue de soies nombreuses et plumeuses (différence avec *Carthamus*) sont soudées à la base et issues d'une seule pièce (*Carduncellus pinnatus* fait cependant exception, son aigrette est à poils courts et espacés) [49].

**I.3.4. Espèce *Carduncellus pinnatus***

*Carduncellus pinnatus* DC. est parmi les espèces les plus abondantes dans certaines régions de l'Est Algérien, comme l'affirme une étude faite par Fenni et collaborateurs sur la flore Constantinoise (la ville de Constantine et ses environs) [50]. Également, cette espèce pousse beaucoup dans les régions des Aurès et le Nord du Sahara, mais peu d'études botaniques lui sont consacrées (Figure I.2).



**Figure I.2 : Photos de l'espèce *Carduncellus pinnatus***

#### **I.4. Travaux phytochimiques antérieurs**

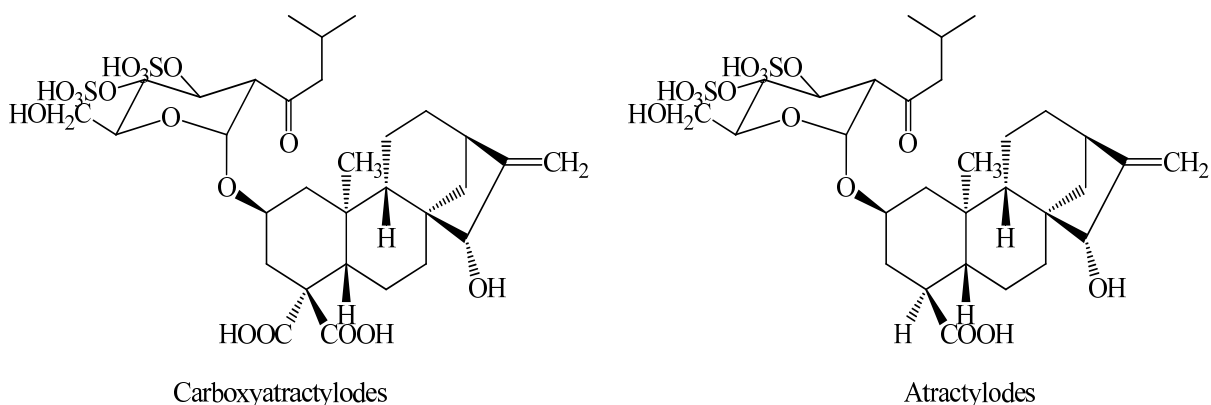
##### **I.4.1. Genre *Atractylis***

Malgré le nombre limité d'études phytochimiques qui sont référenciées dans la littérature sur les espèces du genre *Atractylis*, celles-ci ont montré une richesse remarquable des plantes *Atractylis* en divers métabolites secondaires. En effet, des substances naturelles appartenant à plusieurs classes chimiques à savoir les diterpènes, les triterpènes, les saponines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les flavonoïdes C-glucosylés et composés phénoliques ont été identifiés [3-6,51-60].

Néanmoins, il convient de noter que les trois espèces *A. flava* [3,4], *A. serratuloides* [5] et *A. cancellata* [6] poussant en Algérie ont déjà fait l'objet d'études phytochimiques et plusieurs composés ont été isolés dont la plupart appartient aux classes chimiques mentionnées précédemment.

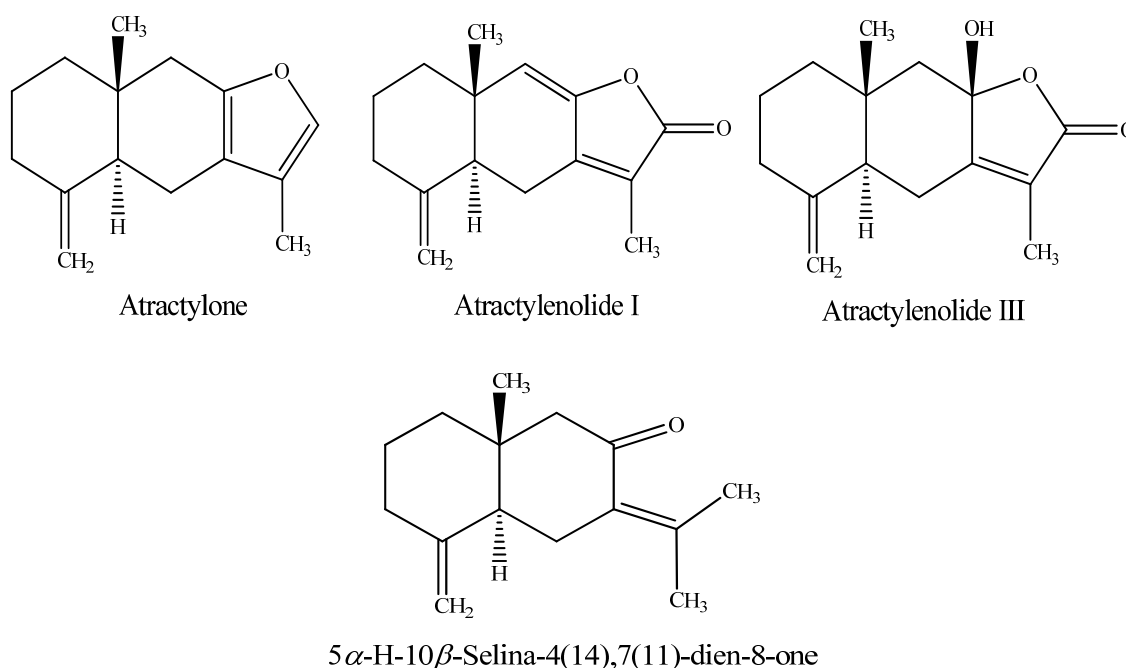
##### **a. Diterpènes**

La plante *A. gummifera* est la plus ancienne espèce qui a été étudiée sur le plan phytochimique ou bien biologique. En effet, les premières investigations phytochimiques ont été réalisées sur l'extrait méthanol des racines de l'espèce *A. gummifera* L. conduisant à la purification et l'identification de deux diterpènes glycosylés Carboxyatractylodes [51] et Atractylodes [52] (Figure I.3), alors que les études biologiques établies plus tard, ont montré que ce sont les métabolites responsables de la forte toxicité due à cette plante [53,54].



**Figure I.3 : Structures des diterpènes isolés de l'espèce *A. gummifera* L.**

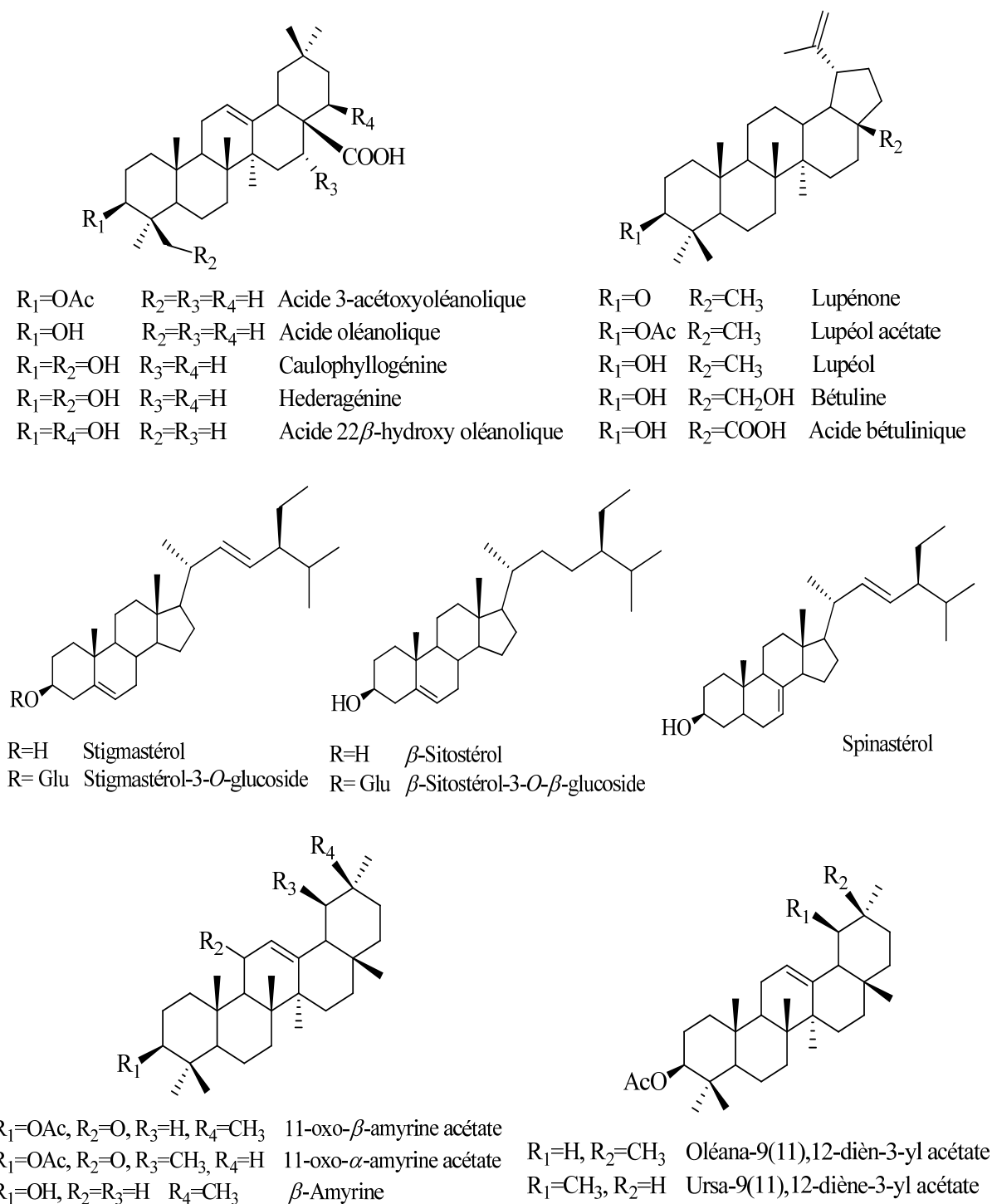
Par ailleurs, une autre étude réalisée sur l'extrait éther de pétrole en utilisant les racines de la plante *A. koreana* [55] a mis en évidence la présence de quatre composés à squelette diterpénique oxydé, dont trois sont considérés comme nouveaux (Figure I.4).



**Figure I.4 : Structures des diterpènes isolés de l'espèce *A. koreana* L.**

### b. Triterpènes

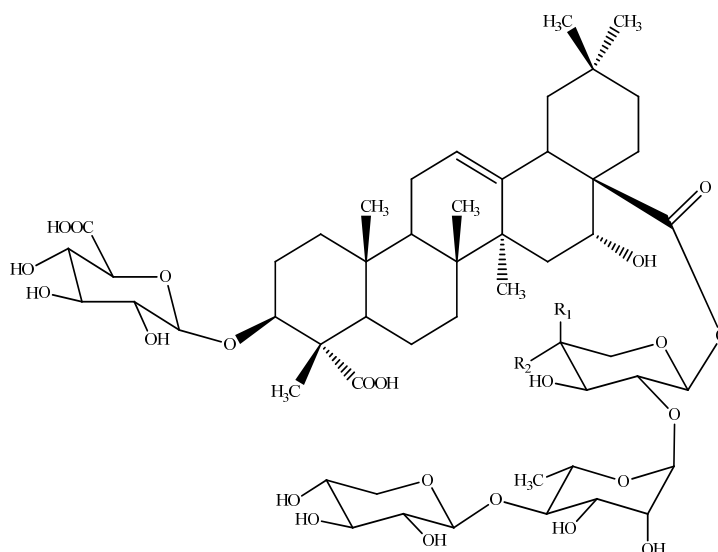
Les triterpènes de type tétra et pentacycliques isolés des espèces *A. flava* [3,4,56], *A. serratuloides* [5] et *A. cancellata* [6] sont des dérivés de l'acide oléanolique, du lupéol ou des phytostérols (Figure I.5). La majorité de ces dérivés sont purifiés des extraits  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et *n*-BuOH de la plante entière *A. flava* [3,4] poussant en Algérie.

Figure I.5 : Structures des triterpènes isolés du genre *Atractylis*

## c. Saponines et alcaloïdes

Ces deux classes des composés ne sont pas mentionnées auparavant dans le genre *Atractylis*, à l'exception de deux travaux qui sont réalisés dans notre laboratoire. En effet, le

travail phytochimique mené par Chabani et al. [4] sur l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *A. flava* a conduit à la caractérisation de trois saponines nouvelles dérivées de l'acide gypsogénique et l'acide quillaïque (Figure I.6).

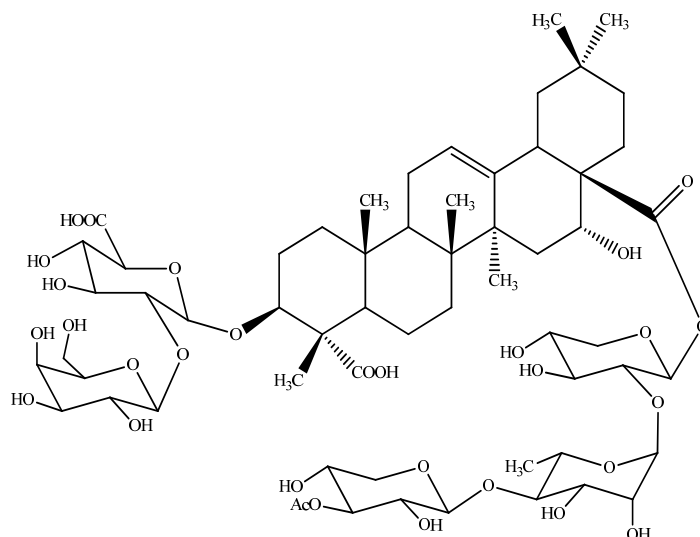


R1=H, R2=OH

Acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-16 $\alpha$ -hydroxy gypsogénique

R1=OH, R2=H

Acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]-16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique



Acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[[(3-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-((2-*O*-acetyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]- quillaïque

**Figure I.6 : Structures des saponines isolées de l'espèce *A. flava***



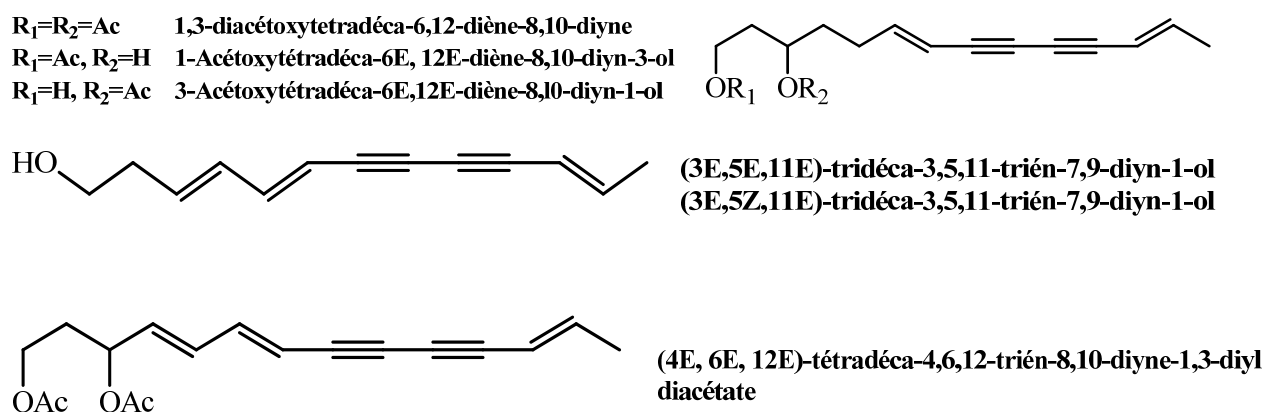
Tandis que, l'étude qui a été consacrée à la constitution chimique de l'extrait *n*-BuOH de la plante entière *A. cancellata* L. menée par Badaoui et al. [6], a permis d'isoler deux alcaloïdes dont un est nouveau (Figure I.7).



**Figure I.7 : Structures des alcaloïdes isolés de l'espèce *A. cancellata*L.**

#### d. Acétylènes

Six composés acétyléniques (Figure I.8) ont été identifiés en 1990 par Pachaly et ses collaborateurs [57] qui ont étudié l'extrait éther de pétrole des racines de l'espèce *A. koreana*.



**Figure I.8 : Structures des acétylènes isolés de l'espèce *A. koreana***

#### e. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme des métabolites secondaires les plus répandus au sein du genre *Atractylis*, malgré le nombre limité des espèces étudiées. Les travaux phytochimiques ont décrit des flavonoïdes non glycosylés, des flavonoïdes mono et diglycosylés, à partir de différents extraits utilisés des espèces *A. cancellata* [6], *A. gummifera* [58,59] et *A. flava* [3,4,60]. Les sucres sont établis au glucose, galactose, rhamnose, xylose et arabinose et ils sont connectés en C-3, C-6, C-7 et C-8 avec des liaisons C-O ou bien C-C à la génine flavonoidique (Figure I.9).

*Atractylis et Carduncellus*  
Synthèse bibliographique

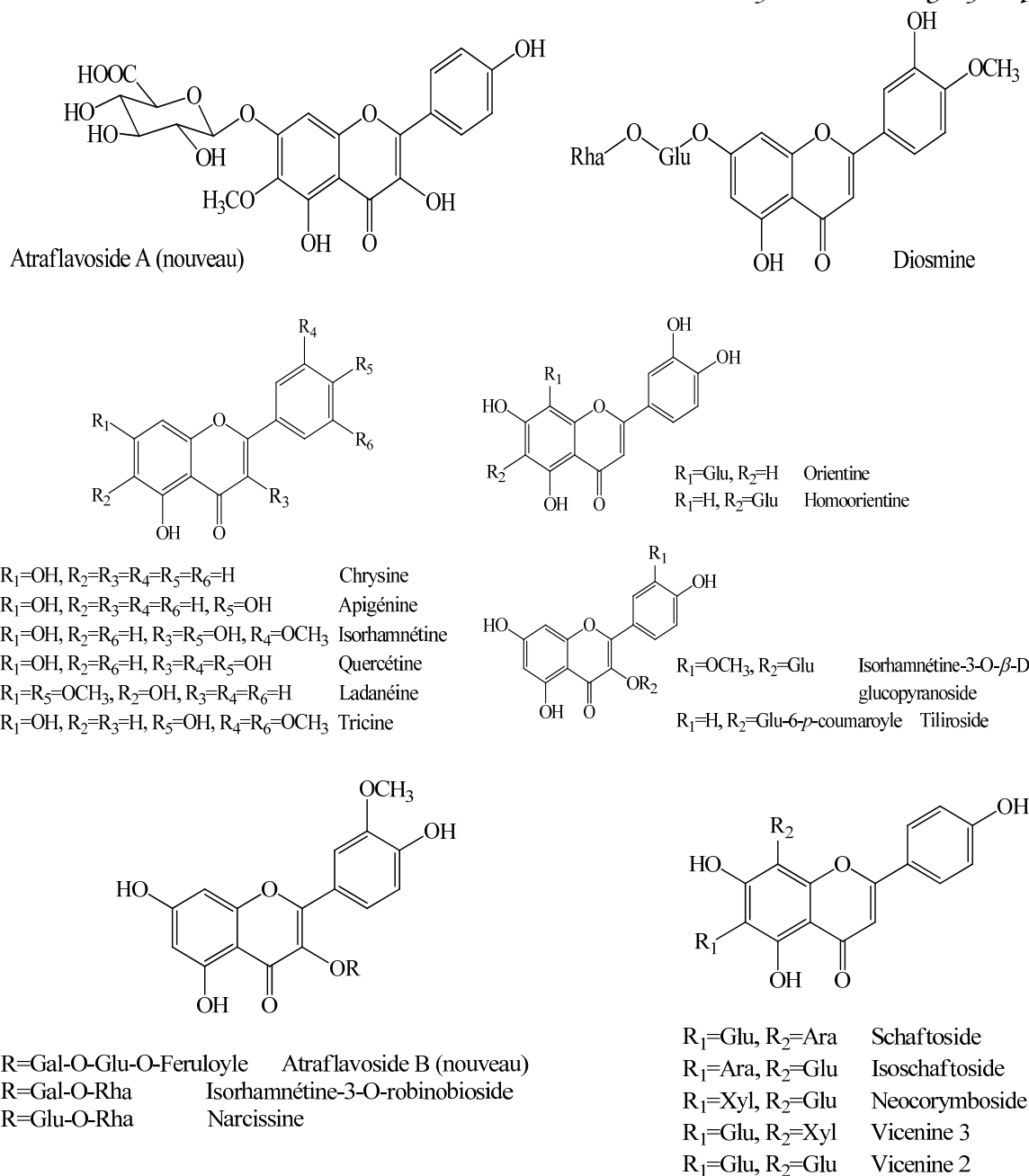


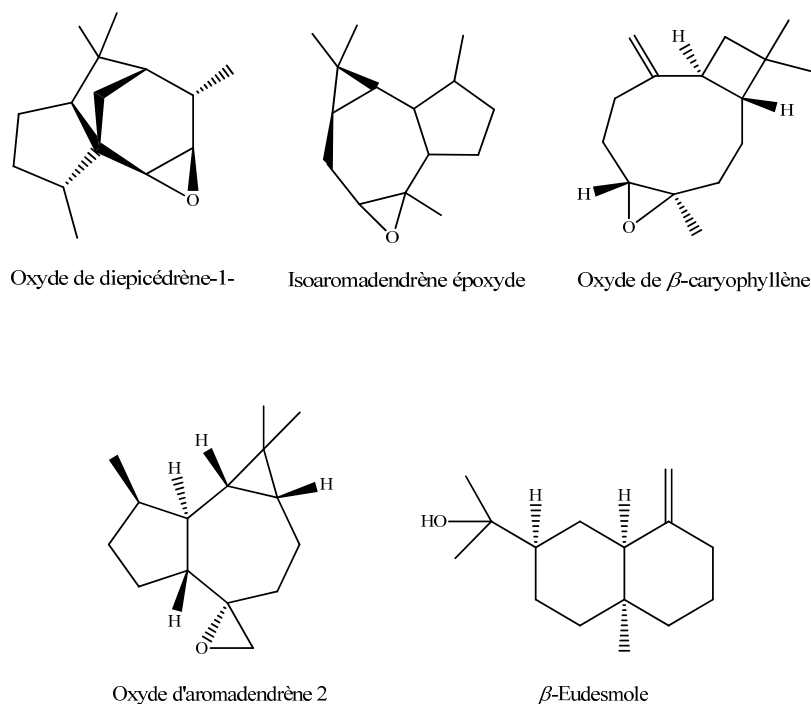
Figure I.9 : Structures des flavonoïdes isolés du genre *Atractylis*

#### I.4.2. Genre *Carduncellus*

Seulement quatre études phytochimiques ont été menés sur des extraits issus des espèces du genre *Carduncellus*. Elles ont conduit particulièrement à l'isolement et l'élucidation structurale de quelques composés de nature flavonoïdique et diterpénique.

##### a. Diterpènes

En 2016, les parties aériennes de l'espèce *C. helenioides* (Desf.) [7] a fait l'objet d'une étude chimique portant sur l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation. Cette étude a conduit à l'isolement et la caractérisation de cinq produits diterpéniques (Figure I.10).



**Figure I.10 : Structures des diterpènes isolés de l'espèce *C. helenioides* (Desf.)**

### b. Flavonoïdes

L'équipe de Shabana et al. [8-9] a largement contribué à l'étude des espèces du genre *Carduncellus*. Leurs travaux publiés en 2007 [8] et 2008 [9] ont investigué l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *C. eriocephalus* et l'extrait éthanolique de l'espèce *C. mareoticus*. Ces travaux ont permis d'identifier une vaste gamme des produits flavonoïdiques, deux d'entre eux ont été considérés nouveaux.

De plus et à partir des parties aériennes de *C. eriocephalus*, une autre étude phytochimique a permis l'isolement et l'identification de six flavonoïdes qui sont signalés pour la première fois dans cette espèce [10].

Tandis que la quercétine, le lutéoline et son dérivé glucosylé sont les trois flavonols qui ont été isolés des tiges et des feuillues de *C. monspeliensium*. Ces composés ont été caractérisés par chromatographie sur papier et la spectroscopie UV [11].

Les structures de tous les produits flavonoïdiques isolés sont schématisées dans la figure ci-dessous (Figure I.11).

*Atractylis et Carduncellus*  
Synthèse bibliographique

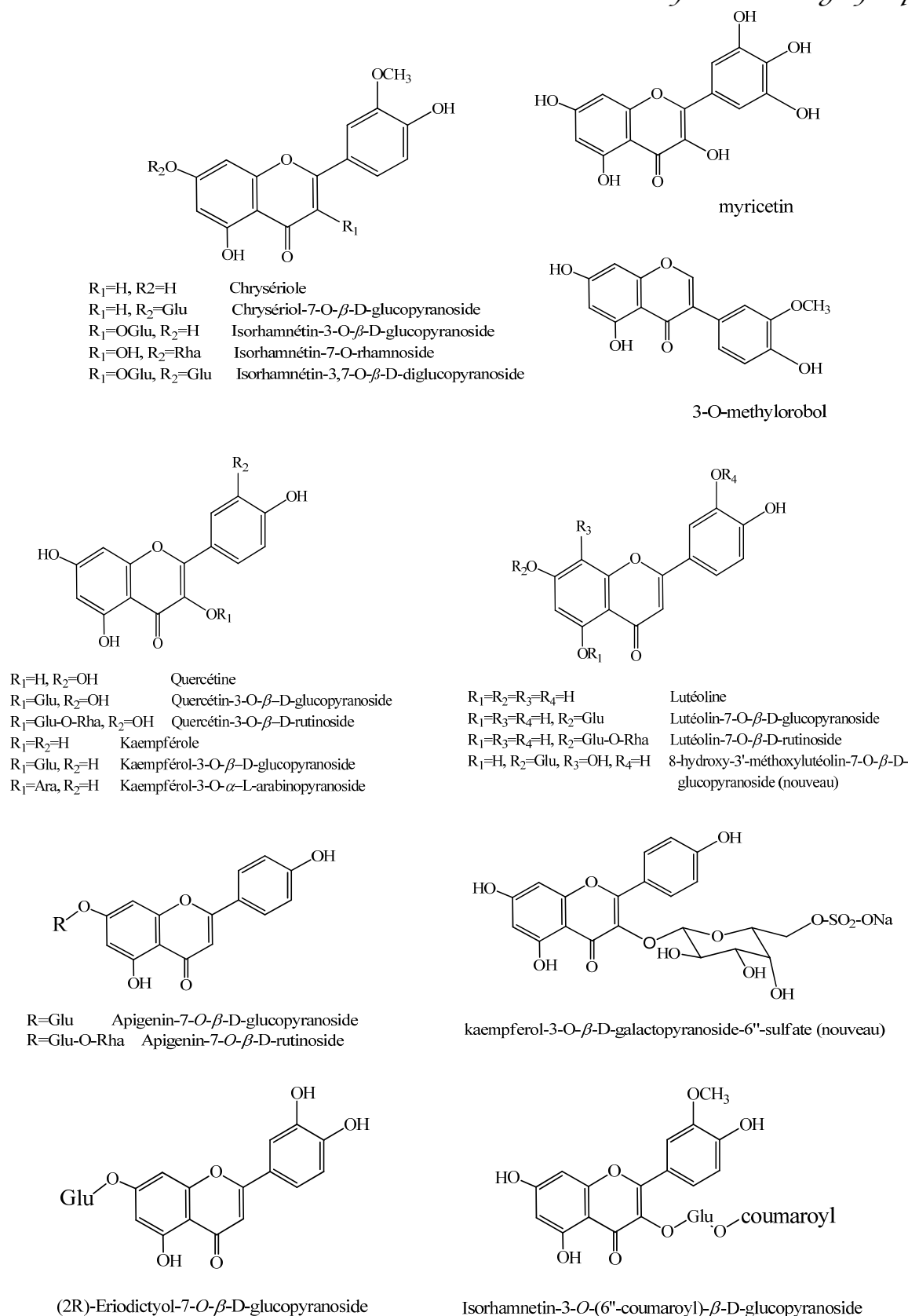


Figure I.11 : Structures des flavonoïdes isolés du genre *Carduncellus*

I.5. Usage traditionnel et intérêt biologique

**I.5.1. Genre *Atractylis***

Les plantes du genre *Atractylis* sont connues pour leurs propriétés thérapeutiques et usage populaire pour le traitement de diverses maladies telles que la cholélithiase, les troubles tumoraux et circulatoires, les parasites intestinaux, les ulcères, l'intoxication par morsure de serpents et l'hépatite, et pour leurs effets diurétiques [61-63]. En Europe du Sud, les fleurs de l'espèce *A. humilis* sont utilisées pour coaguler le lait [64]. Localement, dans la région des Aurès en Algérie (hautes montagnes de Bellezma, Batna), la plante *A. humilis* est connue sous le nom de "Degâa" et sa poudre est employée comme pommade pour traiter l'acné juvénile. L'espèce *A. humilis* est appelée "Knoud" dans la région d'El-Bayadh, ses racines sont préconisées sous forme de décoction pour leur effet gastralgique [65].

De plus, plusieurs activités biologiques de diverses plantes de ce genre ont été bien documentées à savoir les propriétés diurétiques, purgatives [66], anti-inflammatoires, antipyrétiques [67] et antiprolifératives [68].

**I.5.2. Genre *Carduncellus***

Les données de la littérature ne révèlent aucun usage des espèces du genre *Carduncellus* en médecine populaire, sauf que l'usage interne des fruits de l'espèce *C. pinnatus* dans la région d'El-Bayadh est recommandé comme dépuratif et tonique [65]. Localement, l'espèce *C. pinnatus* connue sous le nom vernaculaires « *Guern el djedien* arabe dialectale » ou « *Iless Oufounass* en Tamazight » est utilisée en phytothérapie. En effet, des témoignages de gens surtout âgés de différentes localités des Aurès (Ichmoul, Ras El Ayoun et Timgad) sur l'espèce en question indiquent que les akènes de cette plante sont comestibles et consommés dans des soupes ou des salades ; et le reste de sa partie aérienne est broyée pour être utilisée comme remède contre les maux d'estomac.

Peu d'études ont été consacrées aux activités biologiques des plantes *Carduncellus*. En effet, Les études menées par Shabana et al. [8,9] s'intéressant à la composition chimique des espèces *C. mareoticus* et *C. eriocephalus*, ont montré des activités antihyperglycémiques et antihyperlipidémiques de l'extrait éthanolique de l'espèce *C. eriocephalus* [8] et des activités antihyperlipidémiques de l'extrait éthanolique de la plante *C. mareoticus* [9]. De plus, l'extrait de cette dernière a exhibé une puissante activité cytotoxique contre une lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus et une activité modérée contre une lignée cellulaire de cancer du sein [9].

Par ailleurs, les résultats de l'investigation phytochimique de Meratate et al.<sup>[7]</sup> ont révélé que les huiles essentielles extraites et analysées par la méthode GC/EIMS de l'espèce *C. helenioides* possèdent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## Chapitre II

- › *Résultats et discussion  
phytochimiques*

## I.1. Plans extractif et purificatif des deux espèces

### II.1.1. Espèce *Atractylis humilis*

#### a. Extraction

La plante entière *A. humilis* L. (1,5 kg) séchée et broyée a été macérée dans un mélange hydroalcoolique eau-éthanol (70%) à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique a été filtré, puis concentré afin d'obtenir 500 mL d'extrait aqueux. Cet extrait a été traité par la suite à l'aide de différents solvants à polarité croissante (3 x 150 mL, pour chaque solvant). La décontation et l'évaporation de ces trois filtrats ont produit 1 g de l'extrait éther de pétrole, 14 g de l'extrait AcOEt et 17,5 g de l'extrait *n*-butanol. Le schéma ci-dessous récapitule les différentes étapes de l'extraction (Figure II.1).

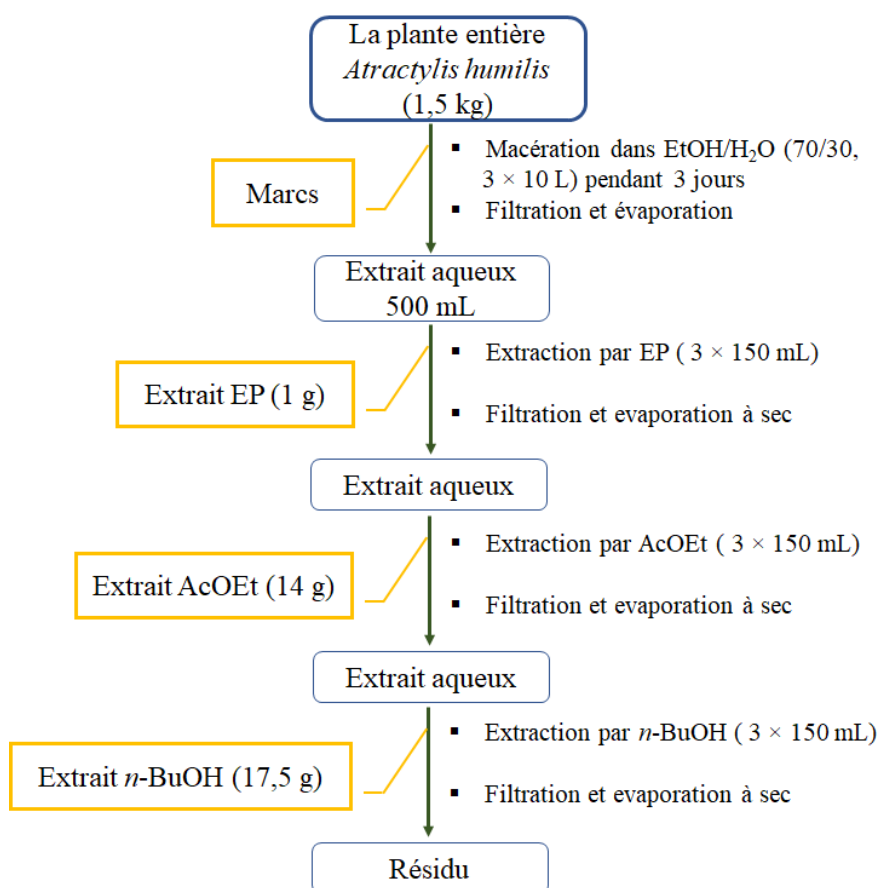


Figure II.1 : Schéma d'extraction de l'espèce *Atractylis humilis*

#### b. Purification

Les trois extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH ont été analysés par chromatographie sur couche mince CCM, en utilisant différents systèmes d'élution (éther de pétrole/acétate d'éthyle), (dichlorométhane/méthanol) et (chloroforme/méthanol). Les CCM ont montré un mélange



complexe et riche en métabolites secondaires, cette constatation distingue bien ce genre de plantes. Pour cela, et compte tenu à priori aussi de l'intérêt de la composition chimique et leur masse importante, les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont été choisis pour investigation en les soumettant à une série d'étapes chromatographiques ultérieures indiquées dans les protocoles résumés dans les figures II.2 et II.3 respectivement.

7 g de l'extrait AcOEt on fait l'objet d'une séparation par la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire et des gradients d'acétate d'éthyle pour augmenter la polarité dans de l'éther de pétrole et AcOEt/méthanol comme phases mobiles. Cette étape a permis de récupérer 9 fractions majoritaires A1-A9.

Les fractions A4, A5 et A6 ont été ensuite soumises aux différentes opérations de purification, notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice ou de sephadex et la chromatographie sur couche mince en phase inverse (RP-18), ainsi que l'usage de différents systèmes d'éluion et des procédures de précipitation. L'ensemble de ces techniques de purification a conduit à l'isolement de 6 composés (Figure II.2).

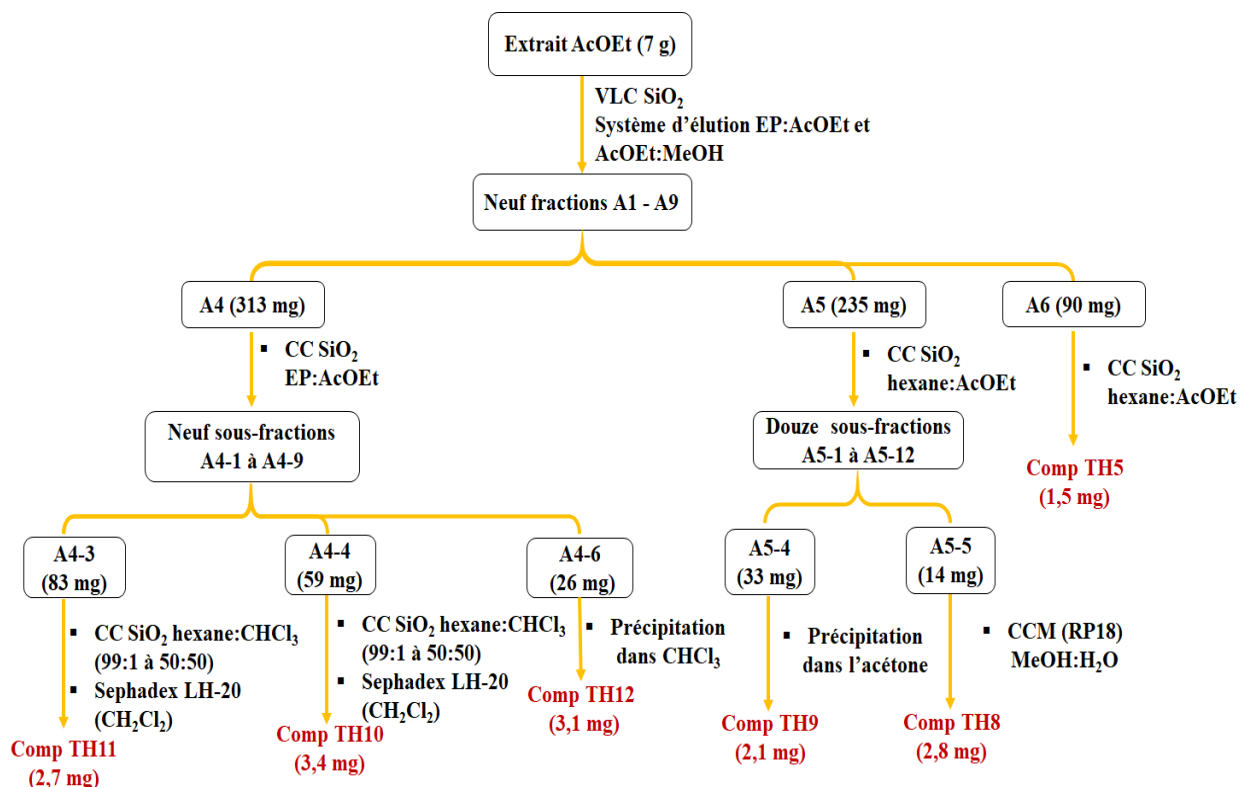


Figure II.2 : Schéma de séparation et purification de l'extrait AcOEt

A son tour, l'extrait butanolique (7g) a été fractionné par une chromatographie VLC effectuée sur gel de silice SiO<sub>2</sub>. L'utilisation du chloroforme et un gradient croissant de

méthanol dans le chloroforme jusqu'à 100% de méthanol permettent d'obtenir 18 fractions de 100 ml qui ont été combinées ensemble selon leurs profil chromatographique CCM en dix fractions majoritaires B1-B10.

Les sous-fractions B3, B5 et B6 sont mises à l'analyse par chromatographie sur colonne en utilisant différents supports stationnaires (gel de silice, polyamide et sephadex) ainsi que par chromatographie CCM sur phase inverse et des protocoles de précipitation. Huit composés sont isolés parmi lesquels un nouveau lignane **TH1** (Figure II.3).

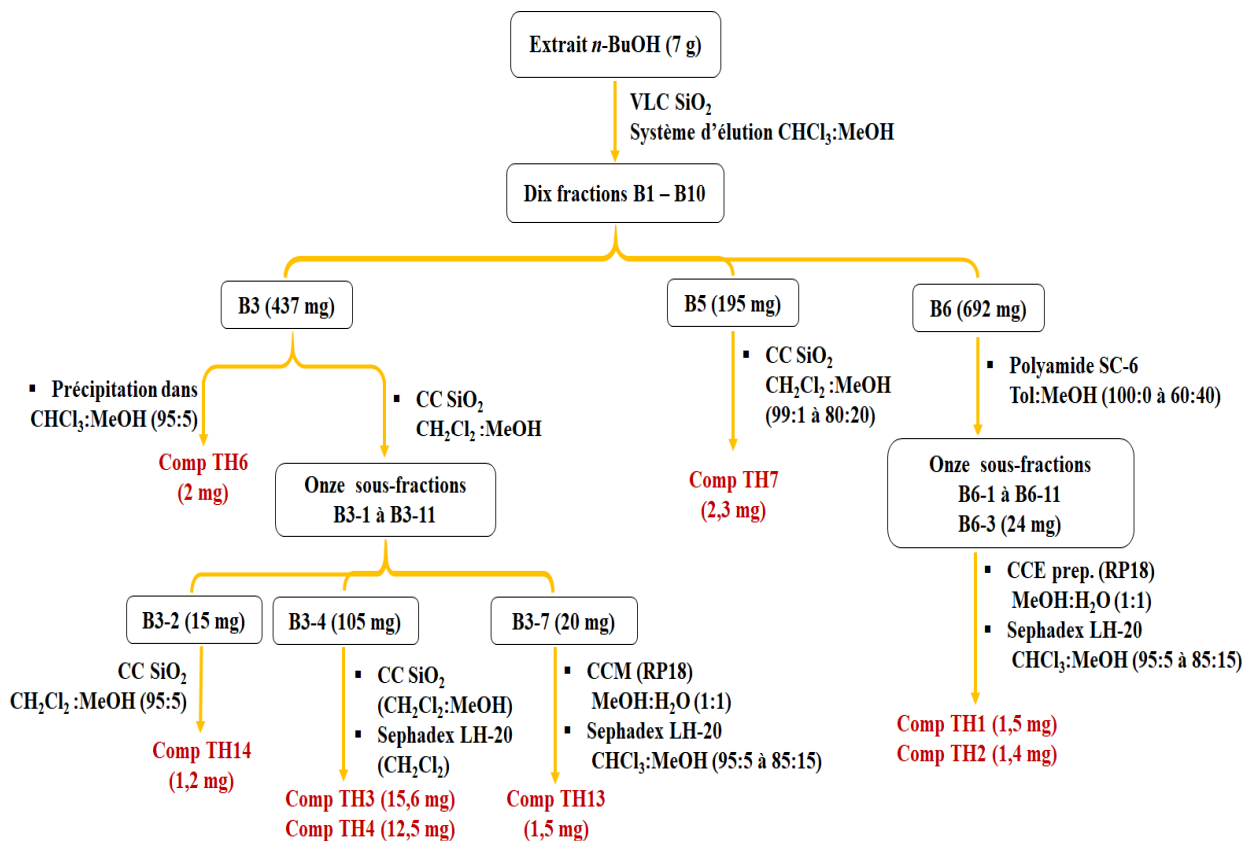
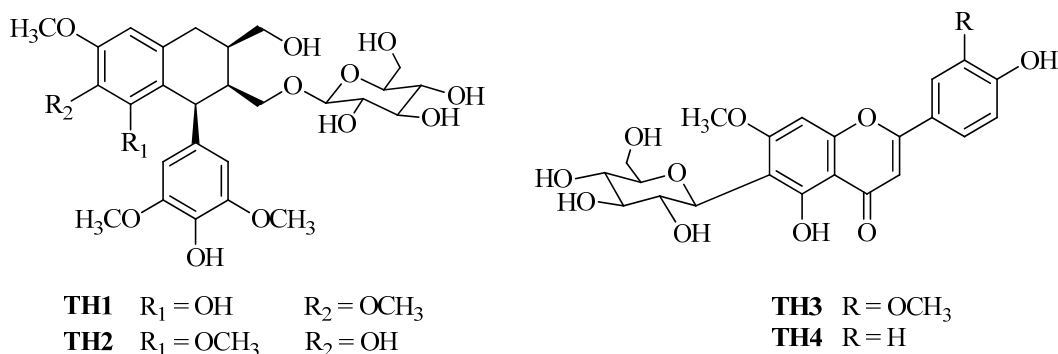


Figure II.3 : Schéma de séparation et purification de l'extract *n*-BuOH

La figure II.4 ci-dessous illustre toutes les structures des métabolites secondaires isolés à partir des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis humilis*.



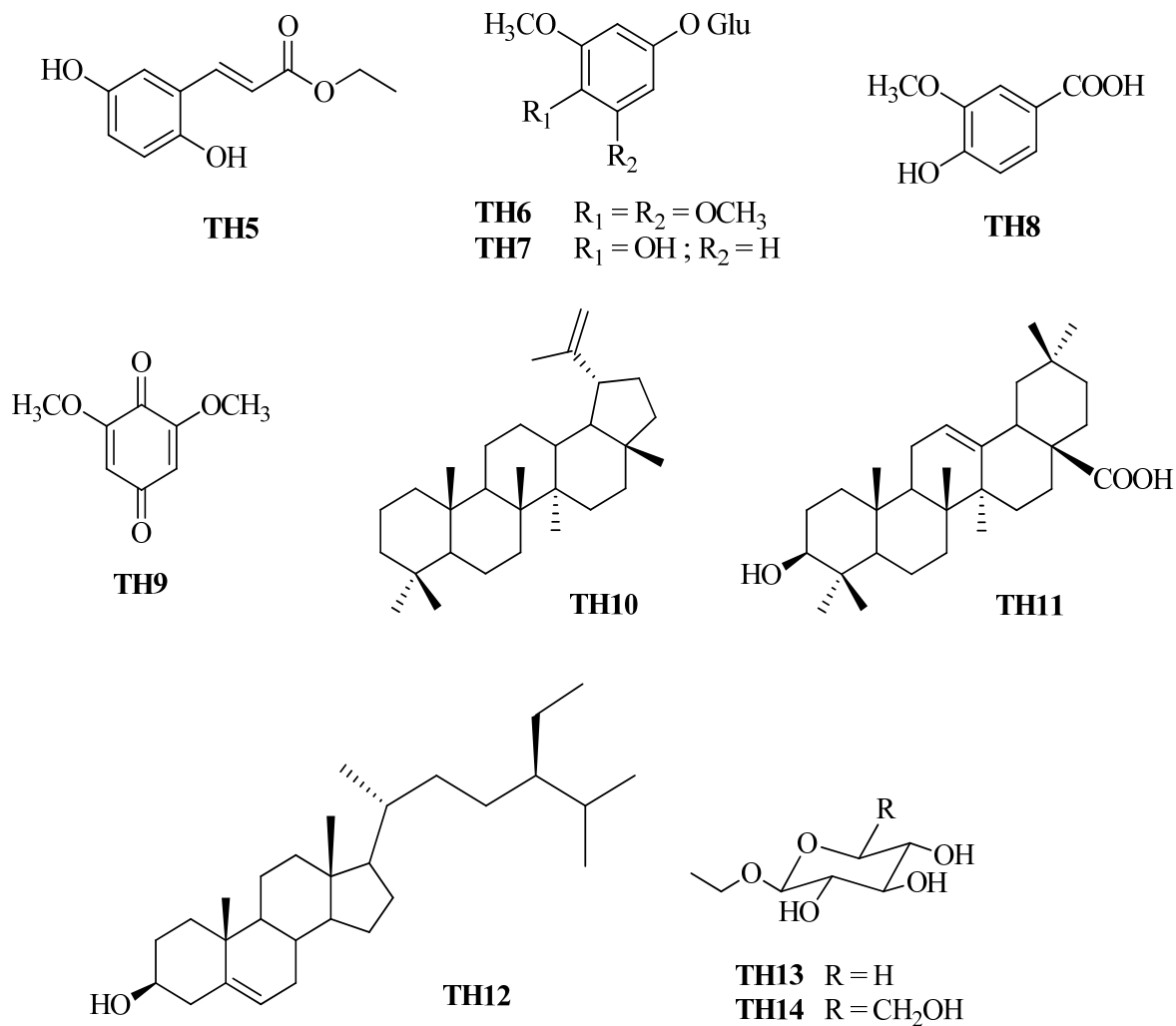


Figure II.4 : Structures des métabolites secondaires isolés de l'espèce *A. humilis*

### II.1.2. Espèce *Carduncellus pinnatus*

#### a. Extraction

Le matériel végétal (parties aériennes et racines, 1,5 kg) de la plante *Carduncellus pinnatus* séché et finement broyé, est mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique eau-éthanol (70%) à une température ambiante pendant deux jours. L'extrait hydroalcoolique a été filtré et soumis à une évaporation afin d'obtenir 400 mL d'extrait aqueux. Cet extrait subit par la suite une série d'extractions liquide-liquide à l'aide de différents solvants de polarités croissantes comportant l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol (3 x 200 mL, pour chaque solvant). Après décantation et évaporation à sec, on obtient 11 g d'extrait éther de pétrole, 9,5 g d'extrait acétate d'éthyle et 26 g d'extrait butanolique. Les différentes étapes de cette extraction sont schématisées dans la figure ci-dessous (Figure I.2.1).

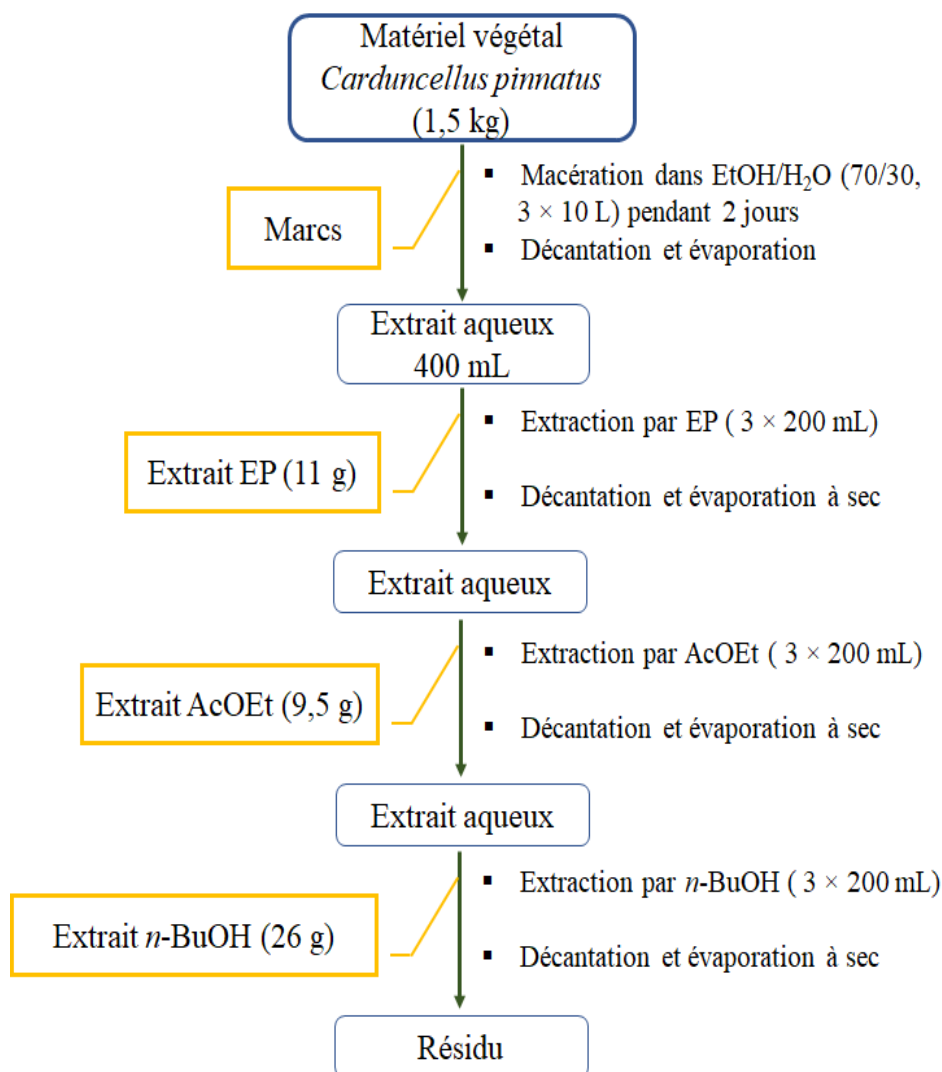


Figure II.5 : Schéma d'extraction de l'espèce *Carduncellus pinnatus*

### b. Purification

Les profils chromatographiques des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont retenu notre attention en premier temps pour leur richesse en produits. A cette effet, l'extractum acétate d'éthyle (5g) a été fractionné grossièrement par la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice normale en employant deux systèmes d'élution EP/AcOEt puis AcOEt/méthanol. Cette étape s'est soldée par l'obtention de 8 fractions majoritaires P1-P8.

Les fractions P3 et P5 ont été purifiées par chromatographie sur colonnes de gel de silice ou de sephadex en utilisant différents systèmes de solvants. Ceci a conduit à l'isolement des produits CP1-CP4 à l'état pur (Figure II.6).

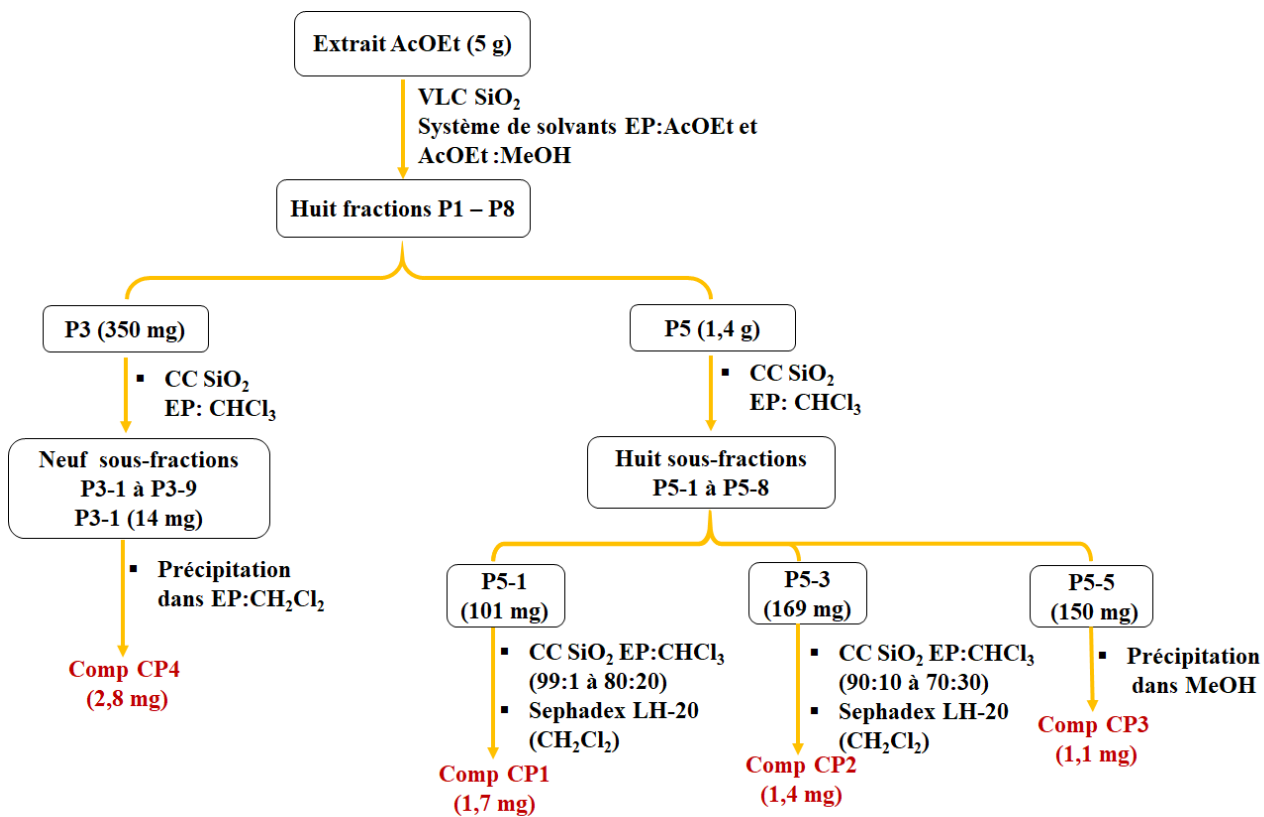


Figure II.6 : Schéma de séparation et purification de l'extract AcOEt

Toutes les structures des métabolites secondaires isolés à partir de cet extrait (AcOEt) sont regroupées dans la figure II.7.

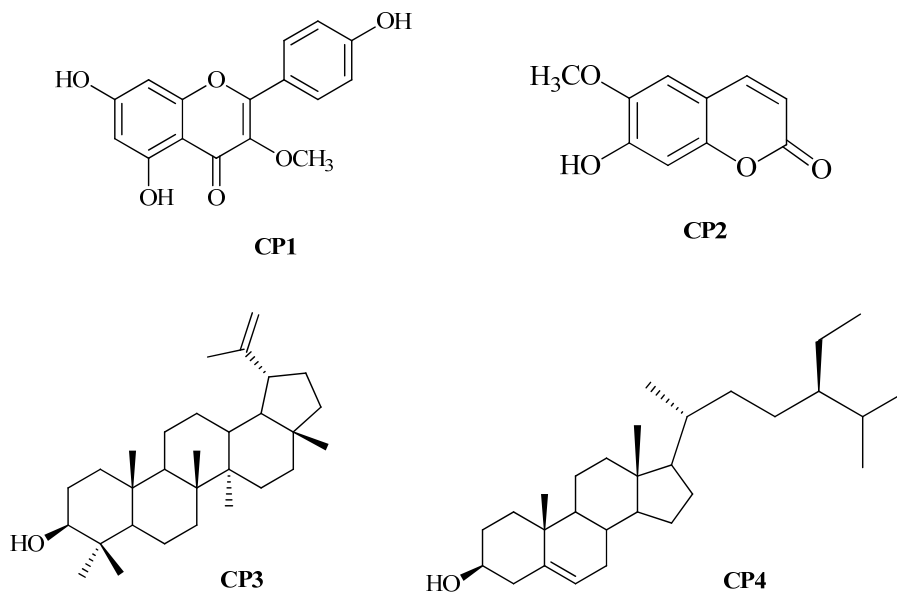


Figure II.7 : Structures des métabolites secondaires isolés de l'espèce *C. pinnatus*

## II.2. Elucidation structurale des composés isolés de deux espèces

Diverses techniques d'analyse spectroscopiques ont été exploitées afin d'identifier et de caractériser la nature des composés isolés, telles que RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  (*J*-modulé), RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY), la spectrométrie de masse ESI-MS et la mesure du pouvoir rotatoire, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

### II.2.1. Elucidation structurale des composés isolés de l'espèce *A. humilis*

#### 1. Composé TH1

Ce composé (Figure II.8) est obtenu sous forme d'une poudre jaune amorphe, donnant une tache visible sur CCM sous la lumière UV (254 et 366 nm). Il se colore en bleu après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

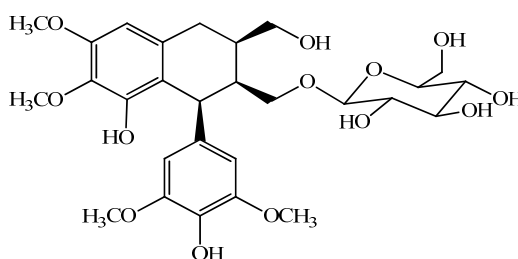
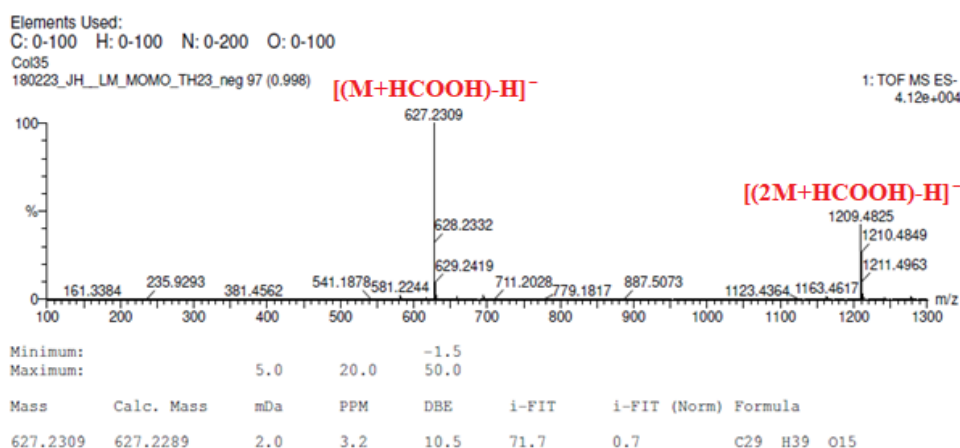


Figure II.8 : Structure du composé TH1

Les spectres de masse de ce composé en haute résolution HR-ESI (Figure II.9) réalisés en deux modes permettent de sélectionner plusieurs pics d'ions pseudomoléculaires, où le mode positif présente des pics à  $m/z$  583,2392  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 605,2202  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1165,4746  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  et 1187,4598  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , tandis que le mode négatif exhibe des pics à  $m/z$  627,2309  $[(\text{M}+\text{HCOOH})-\text{H}]^-$  et 1209,4825  $[(2\text{M}+\text{HCOOH})-\text{H}]^-$ , ceci montre que le composé **TH1** a une masse moléculaire de 582 uma attribuable à une formule brute en  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ . Ces données sont en accord avec les masses calculées et la formule proposées (cal.  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_{13}$ , 583,2391).



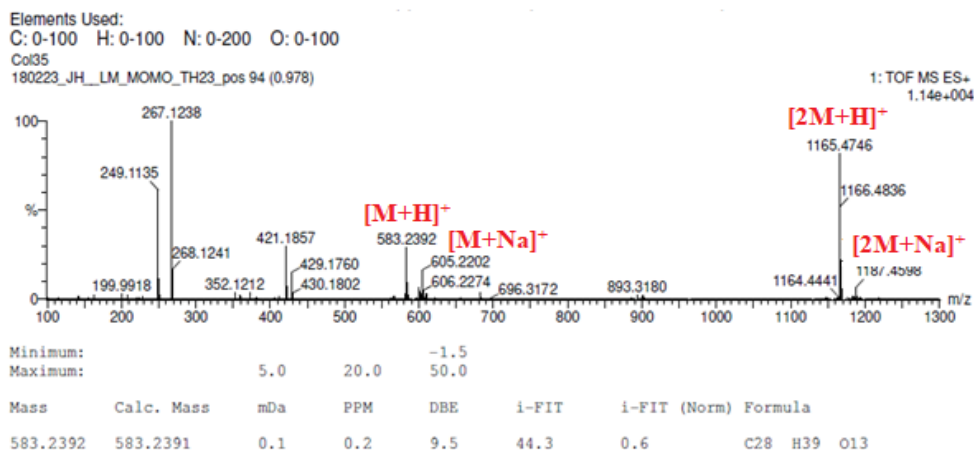


Figure II.9 : Spectres de masse HR-ESI en modes positif et négatif du composé TH1

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé illustre plusieurs types de protons comme le montre la figure suivante (Figure II.10). La zone aromatique allant de 6,20 jusqu'à 6,80 ppm, montre uniquement la présence de deux résonances protoniques singulets. Ceci n'exprime pas en premier temps le nombre des unités aromatiques formant le squelette du composé TH1. A côté de cette partie aromatique, ce spectre révèle des signaux protoniques osidiques de 3,20 à 3,90 ppm, aliphatiques de 1,70 à 2,80 ppm et méthoxyles à  $\delta_{\text{H}}$  3,74, 3,86 et 3,95.

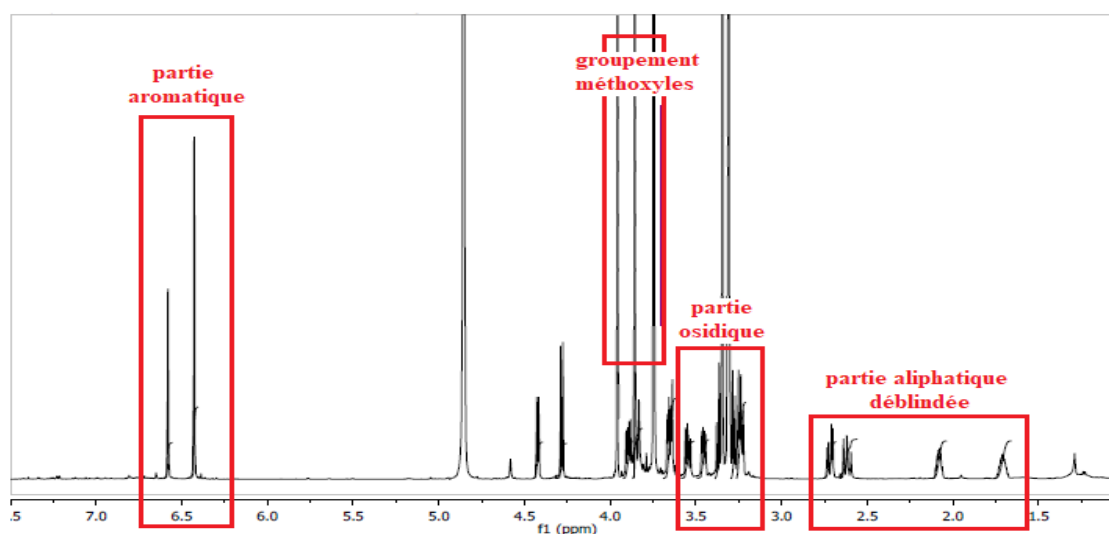
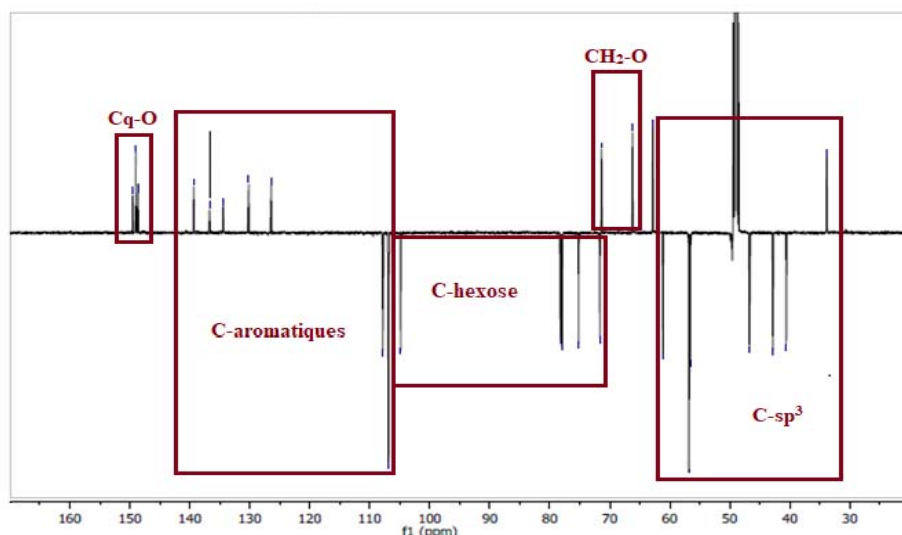


Figure II.10 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH1 enregistré dans le MeOD (600 MHz)

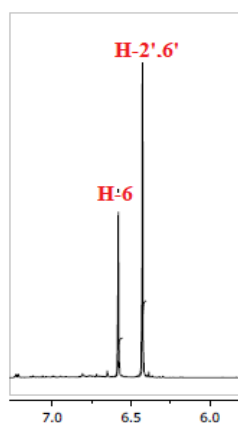
Contrairement au spectre RMN  $^1\text{H}$ , l'analyse spectrale de la partie aromatique sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure II.11), attire l'attention quant à la présence d'un ensemble de pics importants correspondant aux carbones aromatiques qui s'interprètent probablement par l'existence de deux fragments benzeniques. Ce spectre abrite aussi parmi ses signaux, des signaux de carbones osidiques et d'autres carbones hybridés  $\text{sp}^3$ .



**Figure II.11 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH1 (MeOD, 150 MHz)**

La masse moléculaire élevée de ce composé et la comparaison initiale de ses données spectrales préliminaires (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé) avec celles de différentes classes chimiques des substances naturelles reportées dans la littérature suggèrent l'appartenance du composé **TH1** à la classe des lignanes <sup>[69]</sup>.

Pour bien traiter les données de la partie aromatique sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.12), il est évident que le signal singulet repéré à 6,58 ppm correspond à un proton unique appelé H-6 d'un cycle aromatique penta-substitué nommé A justifié par sa multiplicité sous forme d'un singulet et son intégration 1H. L'autre signal d'une intégration 2H est large et intense résonant à 6,43 ppm. Ceci signifie la présence de deux protons aromatiques équivalents appelés H-2',6' appartenant à un cycle aromatique tetra-substitué symétrique nommé B.



**Figure II.12 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des protons aromatiques du composé TH1**

Ces protons sont portés par des carbones aromatiques qui sont déterminés suite aux taches de corrélation observées sur le spectre HSQC (Figure II.13) à  $\delta_{\text{H}}$  6,58/ $\delta_{\text{C}}$  107,8 et  $\delta_{\text{H}}$



6,43/ $\delta_c$  106,8. Ces groupements méthines aromatiques sont affectés aux positions 6 pour le cycle A et 2',6' pour le cycle B

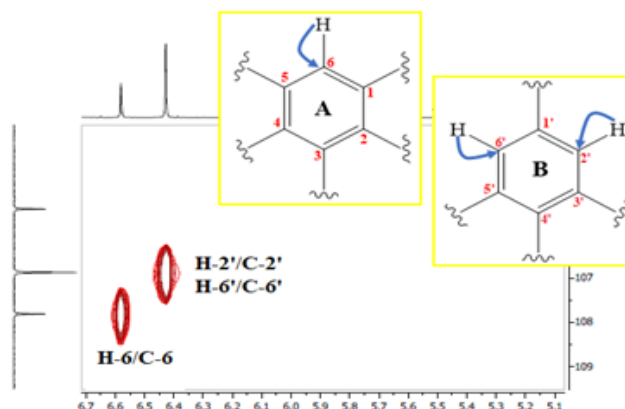


Figure II.13 : Spectre HSQC du composé TH1

Afin d'identifier les substituants des deux cycles et de les placer précisément, les expériences COSY, HSQC et HMBC sont utiles et révèlent beaucoup de taches de corrélation. Comme mentionné précédemment sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , un signal singulet intense est visualisé à 3,95 ppm (3H, s) correspondant à des protons d'un groupement méthoxyle, et corrélant sur le spectre HSQC (Figure II.14) avec leur carbone à  $\delta_c$  61,1.

Un deuxième signal singulet intense sortant à 3,95 ppm (3H, s) est attribué à des protons d'un deuxième groupement méthoxyle, lié sur le spectre HSQC (Figure II.14) avec un carbone qui absorbe à  $\delta_c$  56,5.

Le troisième signal qui est très intense apparaît à 3,72 ppm, l'intégration de ce signal estimée à 6 protons convient aussi à deux groupements méthoxyles identiques et dont leur carbone est repéré à  $\delta_c$  56,8 selon la corrélation marquée sur le spectre HSQC (Figure II.14).

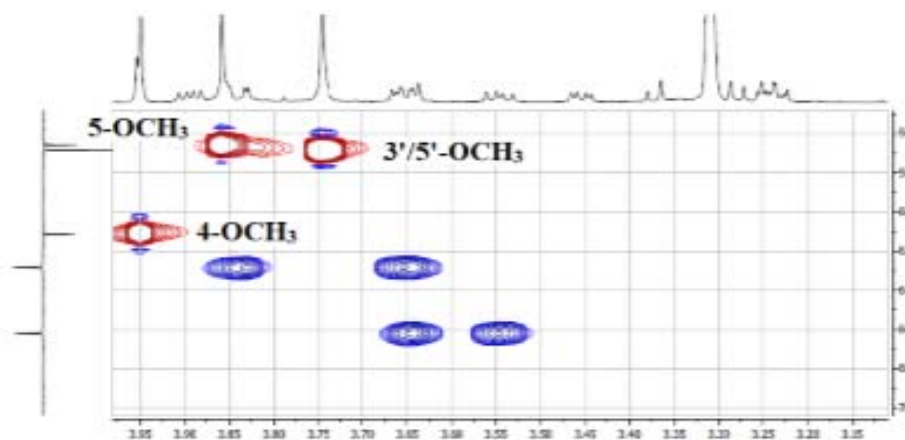
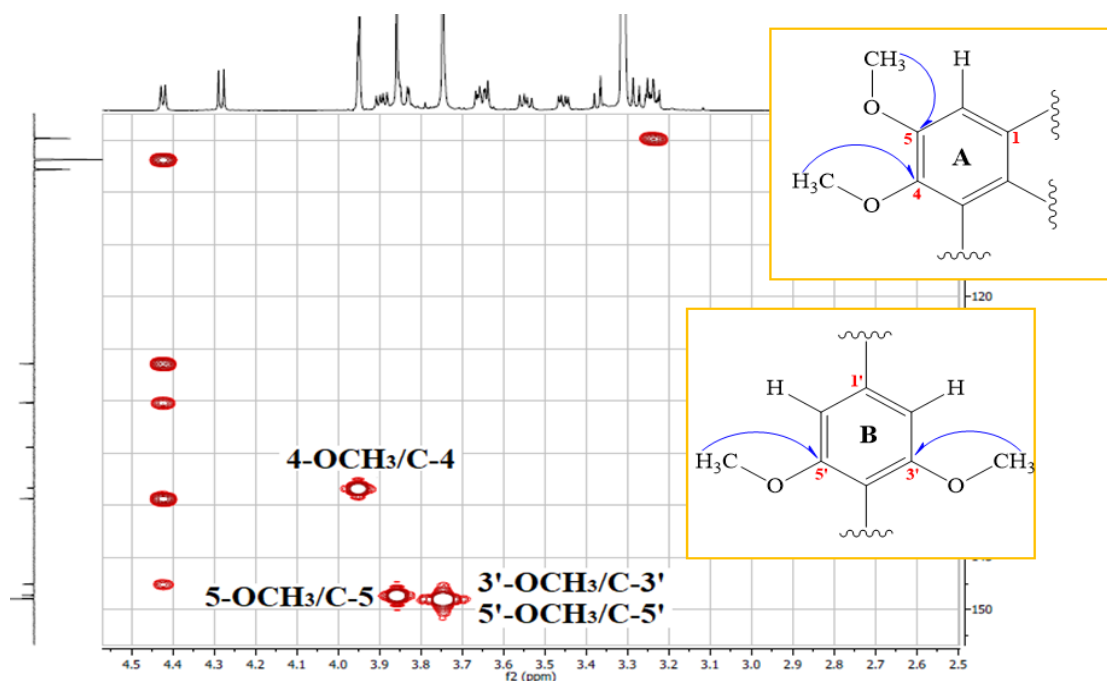


Figure II.14 : Spectre HSQC du composé TH1

Ces trois groupements structurels distincts précédemment ont été connectés aux cycles A et B suite à un ensemble des corrélations H/C en  $^3J$  décrites sur le spectre HMBC (Figure II.15) :

- › Les protons localisés à 3,95 ppm et le carbone noté C-4 ( $\delta_c$  137,1).
- › Les protons détectés à 3,86 ppm et le carbone nommé C-5 ( $\delta_c$  148,5).
- › Les protons repérés à 3,72 ppm et les carbones designés C-3'/C-5' ( $\delta_c$  148,9).



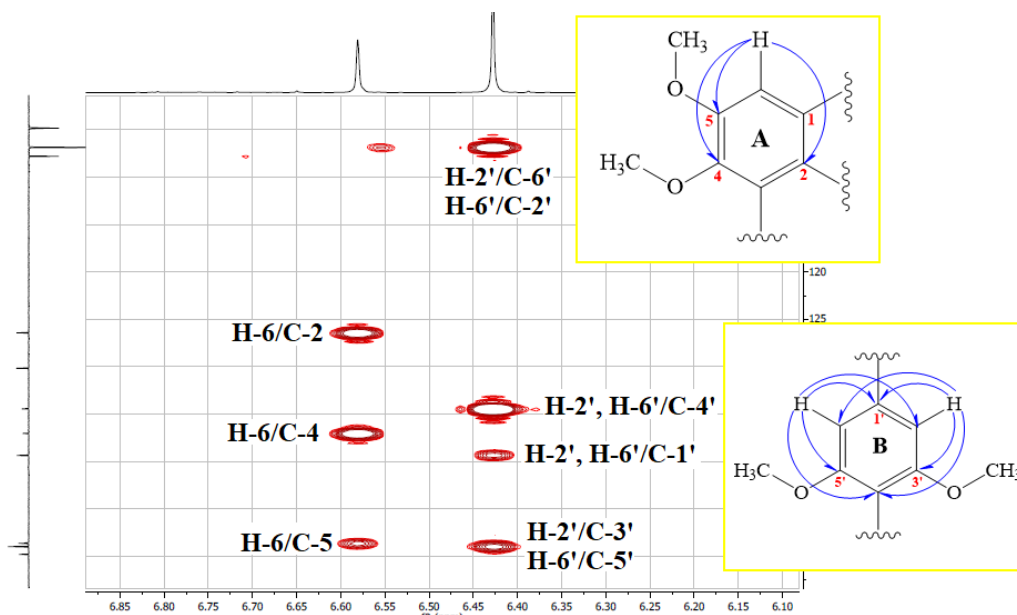
**Figure II.15 : Spectre HMBC du composé TH1**

La localisation de ces groupements à leurs positions 4, 5, 3' et 5' dans les cycles A et B est fortement alignée avec les données extraites d'après le diagnostic du spectre HMBC, où l'existence des protons aromatiques au niveau des deux cycles aide à créer des corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  avec les carbones avoisinants comme affichées sur la figure II.16 :

- › Les corrélations entre H-6 et les carbones C-4 et C-5 au niveau du cycle A.
- › Les corrélations entre H-2'/C-3', H-6'/C-5', H-2'/C-6' et H-6'/C-2' au niveau du cycle B.

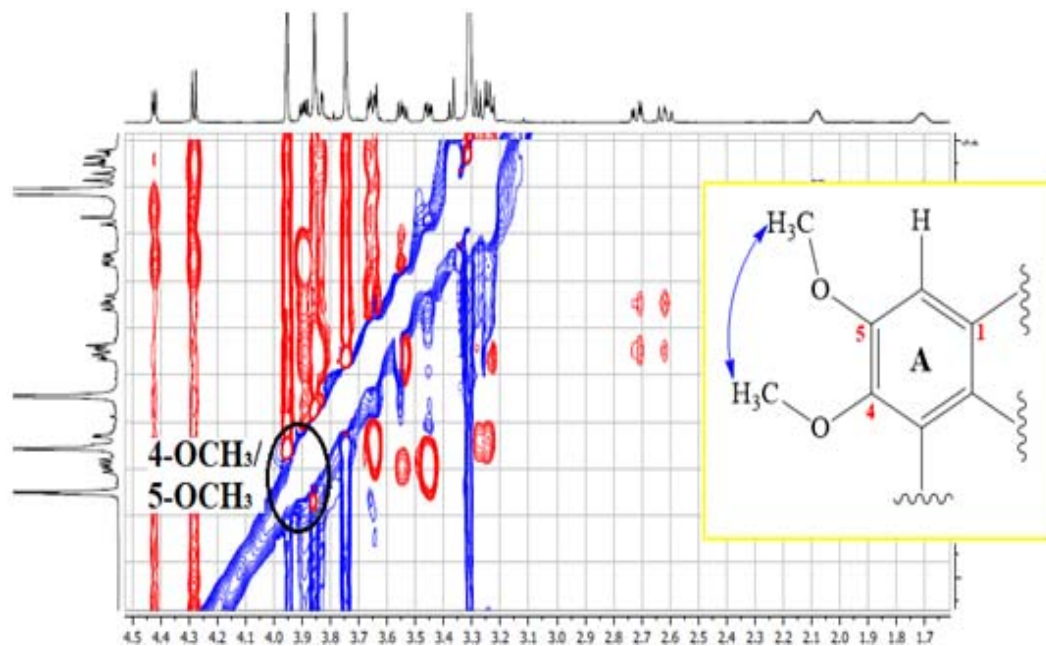
Et au fur et à mesure, la même expérience conduit à la détermination des autres carbones du cycle B suite aux corrélations suivantes (Figure II.16) :

- › Les corrélations entre les protons H-2', H-6' et le carbone C-1' visualisé à  $\delta_c$  139,3.
- › Les corrélations entre les protons H-2', H-6' et le carbone C-4' résonant à  $\delta_c$  134,4.



**Figure II.16 : Spectre HMBC du composé TH1**

En plus de toutes ces constatations, l'apparition d'une tache de corrélation sur le spectre ROESY entre les protons des groupements méthoxyles 4-OCH<sub>3</sub> et 5-OCH<sub>3</sub> au niveau du cycle A confirme une fois de plus leurs positionnements exacts (Figure II.17).



**Figure II.17 : Spectre ROESY du composé TH1**

Après cette étape de l'élucidation structurale des deux cycles aromatiques, et revenant au spectre RMN <sup>1</sup>H, on trouve dans l'intervalle de 1 à 5 ppm quatre signaux typiques de protons aliphatiques (Figure II.18). Leurs carbones sont déduits à travers les projections qui sont faites sur le spectre HSQC (Figure II.19) :

- > Le signal détecté à  $\delta_H$  1,73 sous forme d'un multiplet (*m*) et d'une intégration 1H est attribué au proton nommé H-8, son carbone apparaît à  $\delta_C$  40,6.
- > Le signal enregistré à  $\delta_H$  2,08 sous forme d'un multiplet (*m*) aussi et d'une intégration 1H est accordé au proton H-8', son carbone est localisé à 46,7 ppm.
- > Les deux signaux d'une intégration 1H chacun, localisés à  $\delta_H$  2,72 ( $J= 15,1, 4,7$  Hz) et 2,62 ( $J= 15,1, 11,5$  Hz) sous forme d'un doublet de doublets (*dd*) correspondent aux protons géminés en position 7 (H-7a et H-7b respectivement) portés par le même carbone C-7 détecté à  $\delta_C$  33,8.
- > Le signal repéré à  $\delta_H$  4,45 ( $J= 6,2$  Hz) sous forme d'un doublet (*d*) et d'une intégration 1H est attribué au proton H-7', son carbone est repéré à 42,8 ppm.

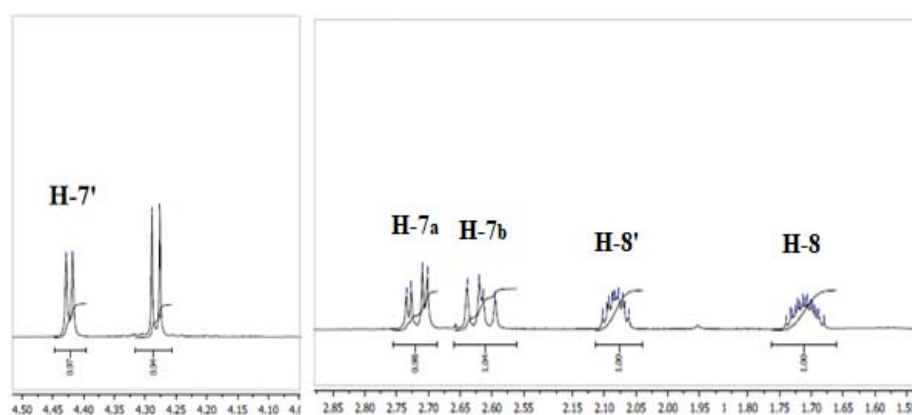


Figure II.18 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé TH1

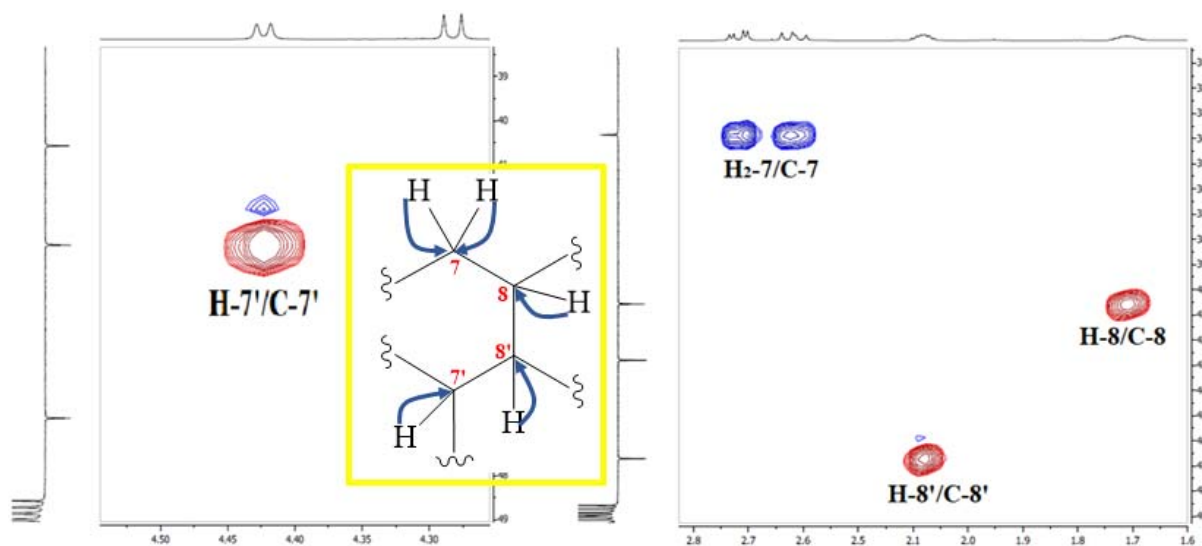


Figure II.19 : Spectres HSQC du composé TH1

L'interprétation minutieuse de l'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure II.20) permet de constater que les protons mentionnés précédemment font partie d'un système de spins H/H à 5

protons ; ceci indique la présence d'un enchaînement aliphatique déblindé. La figure II.20 révèle tout d'abord le couplage entre les protons géminés H<sub>2</sub>-7, ainsi la corrélation entre ces derniers avec le proton voisin H-8. Ce dernier montre un couplage scalaire avec le proton H-8', qui à son tour présente un couplage avec le proton H-7'.

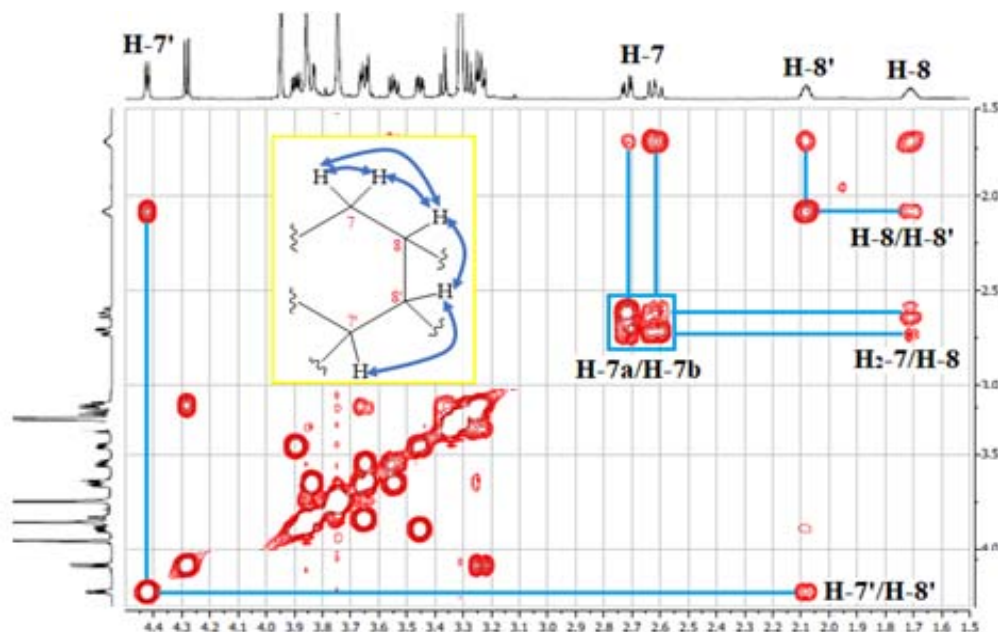


Figure II.20 : Spectre COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H du composé TH1

L'ensemble de ces données spectrales conduit à trois principaux fragments d'un squelette cyclo-lignanique de type aryltetraline correspondant au composé **TH1**. Il ne nous reste qu'à exposer les points de jonctions entre la chaîne aliphatique et les deux noyaux aromatiques à travers les corrélations constatées sur l'expérience HMBC ; cela nous a permis aussi d'identifier les déplacements chimiques de quelques carbones aromatiques restants inconnus jusqu'à maintenant.

Suite au couplage en <sup>2</sup>J remarqué entre les protons géminés H<sub>2</sub>-7 et le carbone C-1(130,0 ppm), on peut établir clairement la jonction entre le carbone C-7 et le carbone quaternaire C-1 du cycle A. Cette jonction se trouve renforcée une autre fois par le couplage en <sup>3</sup>J observé entre le proton aromatique H-6 et le carbone aliphatique C-7 (Figure II.21).

La jonction conjointe des cycles A (en position 2) et B (en position 1') avec le carbone C-7' est établie suite au couplage en <sup>3</sup>J entre le proton H-7' et le carbone quaternaire C-3 situé à 149,4 ppm, ainsi les couplages en <sup>2</sup>J et <sup>3</sup>J observés entre le proton H-7' et les carbones C-1 et C-2 (Figure II.21). En outre, le spectre HMBC (Figure II.21) permet de visualiser les couplages entre le proton H-7' et les carbones C-1', C-2' et C-6'.

Concernant les carbones quaternaires aromatiques C-3 et C-4', leurs valeurs de déplacements chimiques élevés à 149,4 et 134,4 ppm respectivement suggèrent qu'ils sont porteurs de groupements hydroxyles.

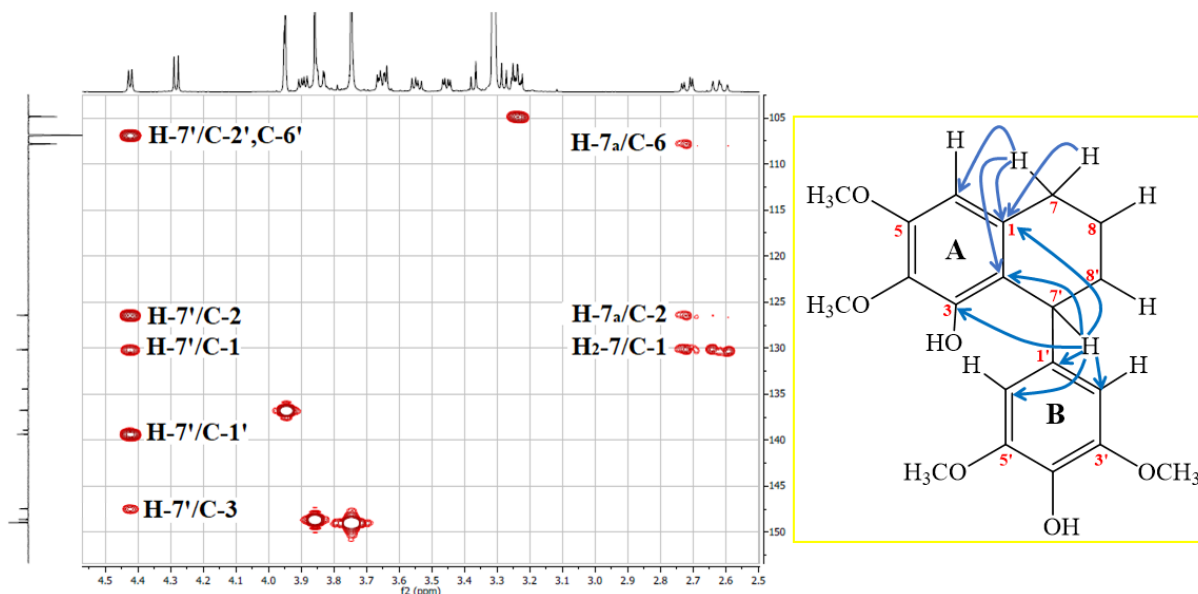


Figure II.21 : Spectre HMBC du composé TH1

Egalement, les protons H<sub>2</sub>-7 et H-7' couplent sur le spectre HMBC (Figure II.22) en <sup>2</sup>J et <sup>3</sup>J avec les carbones méthines 8-CH et 8'-CH. L'ensemble de ces corrélations conduit à la formation d'un cycle à six chaînons.

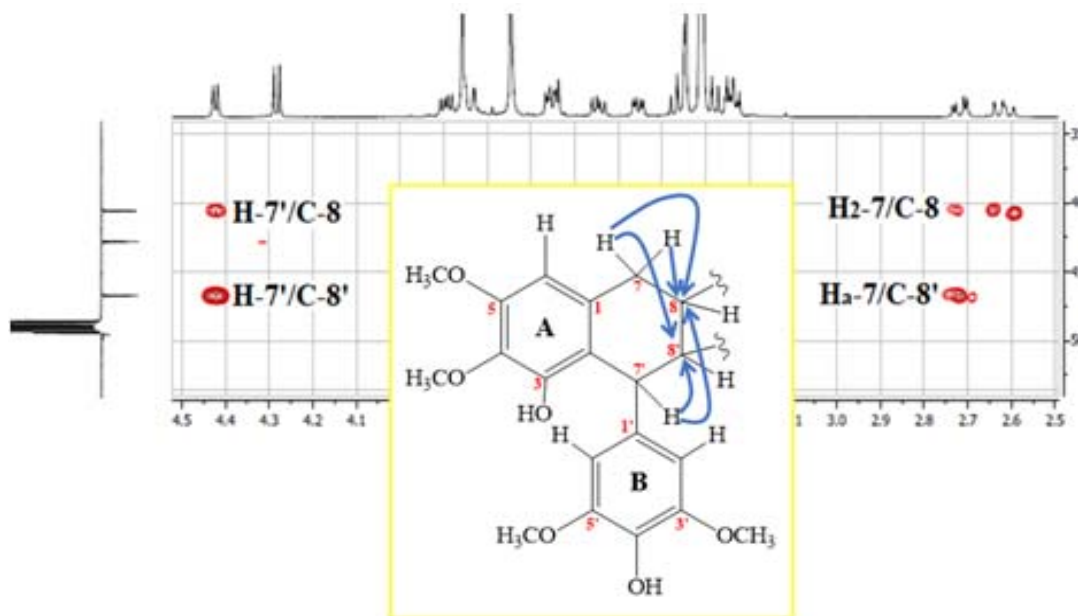
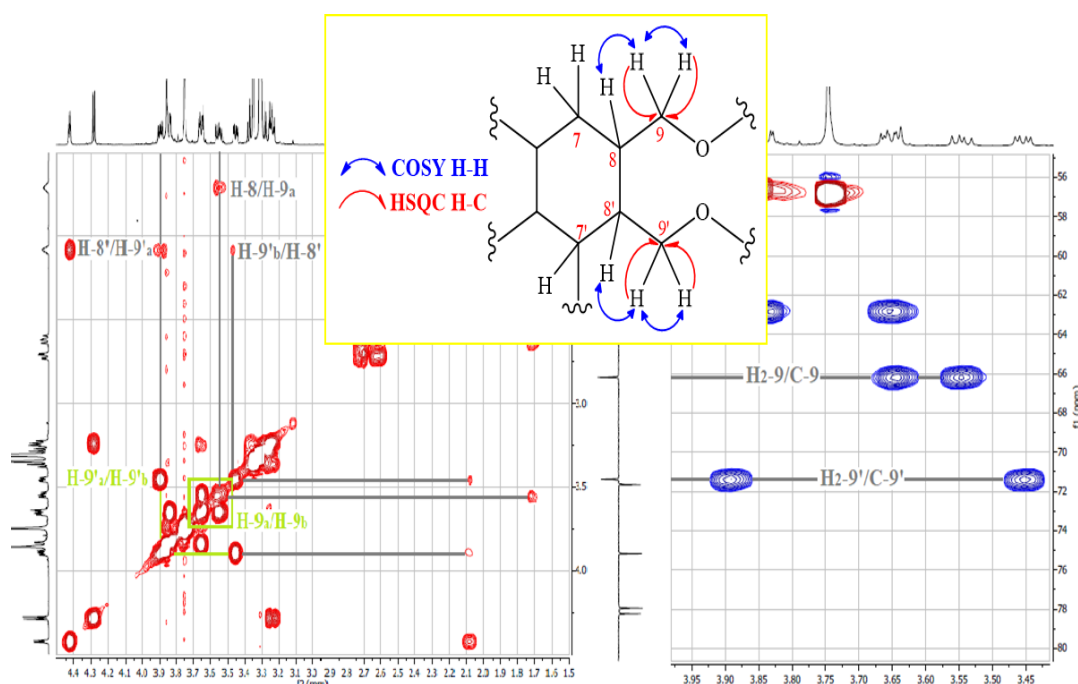


Figure II.22 : Spectre HMBC du composé TH1

Dans la dernière partie de l'analyse structurale, et partant des protons H-8 et H-8', l'expérience COSY (Figure II.23) permet d'assigner plusieurs couplages. Le proton H-8 présente une tache de corrélation avec le proton du groupement oxyméthylène H-9a repéré à 3,64 ppm (1H ; *m*), ce dernier corrèle aussi avec le proton géminé non équivalent H-9b qui résonne à 3,55 ppm (1H ; *dd* ;  $J = 10,8 ; 6,6$  Hz). Le carbone C-9 de ce groupement est localisé à 66,1 ppm d'après le spectre HSQC (Figure II.23).

De la même façon, des couplages sont constatés sur le spectre COSY H-H (Figure II.23) entre le proton H-8' et deux autres protons repérés à 3,89 ppm (1H ; *dd* ;  $J = 9,8 ; 5,5$ Hz) et à 3,45 ppm (1H ; *dd* ;  $J = 9,8 ; 4,1$ Hz), ces derniers correspondant à des protons géminés non équivalents appelés H-9'a et H-9'b respectivement d'un groupement oxyméthylène 9'-CH<sub>2</sub>O vu l'interaction visualisée entre eux sur le même spectre. Le carbone C-9' sortant sur le spectre HSQC a un déplacement chimique déblindé à 71,4 ppm explique la liaison 9'-CH<sub>2</sub> – O-attracteur. Toutes ces attributions sont schématisées dans la figure II.23.



**Figure II.23 : Spectres COSY et HSQC du composé TH1**

L'examen des corrélations HMBC (Figure II.24) nous a aidé à distinguer des couplages entre les protons H<sub>2</sub>-9 et le carbone C-7, ainsi qu'entre les protons H<sub>2</sub>-9' et les carbones C-8' et C-8. L'absence d'autres taches de corrélations sur le spectre HMBC pour les protons oxyméthylènes H<sub>2</sub>-9 suggère que le carbone C-9 est lié à un groupement hydroxyle.

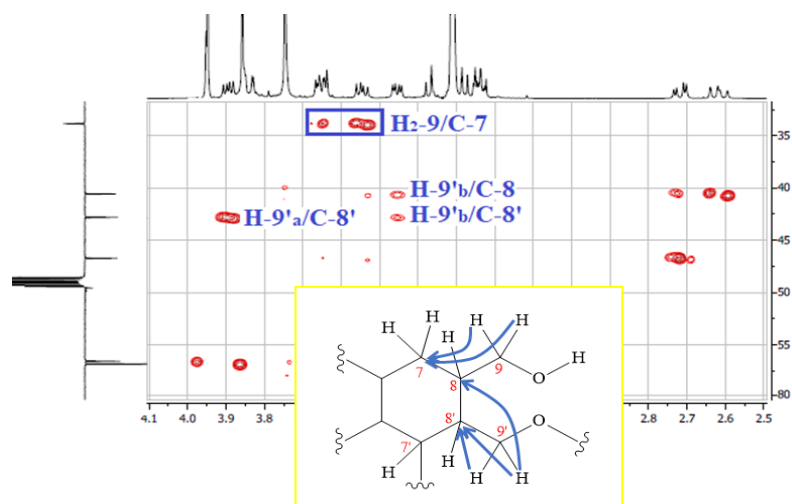


Figure II.24 : Spectre HMBC du composé TH1

Par ailleurs, un simple calcul massique met en évidence une différence entre la masse totale du composé **TH1** et la masse de la structure partielle déjà définie, ceci conduit à une masse de -179 uma correspondant à une unité osidique.

Effectivement, l'absorption observée à 4,28 ppm sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.25) sous forme d'un doublet et s'intégrant pour un proton ne s'exprime que la présence d'un proton anomérique H-1".

A partir de ce proton (H-1",  $\delta_{\text{H}}$  4,28,  $d$ ,  $J = 7,7$  Hz), l'expérience COSY H-H (Figure II.25) nous conduit à définir toute la séquence de protons de cet hexose de H-2" à H<sub>2</sub>-6. En effet, ce spectre met en évidence les couplages suivants :

- > Le proton anomérique H-1" et le proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,25 (1H ;  $m$ ) attribué au proton H-2".
- > Le proton H-2" et le proton H-3" localisé à  $\delta_{\text{H}}$  3,37 (1H ;  $t$  ;  $J = 8,8$  Hz).
- > Le proton H-3" et le proton H-4" repéré à  $\delta_{\text{H}}$  3,28 ( $t$  ;  $J = 8,7$  Hz).
- > Le proton H-4" et le proton H-5" situé à  $\delta_{\text{H}}$  3,25 (1H ;  $m$ ).
- > Le dernier proton et les protons H-6"a ( $\delta_{\text{H}}$  3,84 ; 1H ;  $m$ ) et H-6"b ( $\delta_{\text{H}}$  3,65 ; 1H ;  $m$ ).

Les grandes valeurs des constantes de couplage des protons H-2", H-3" et H-4", en plus du doublet de proton anomérique H-1" ( $J = 7,8$  Hz), indiquent une orientation *trans*-diaxiale pour tous les protons de cet hexose. Cette stéréospécificité atteste la présence d'un  $\beta$ -D-glucose (Figure II.26).



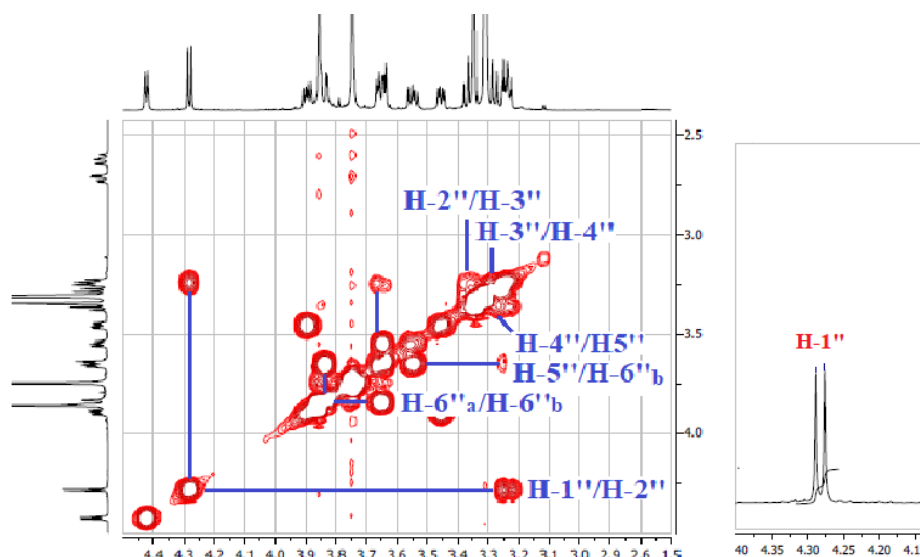


Figure II.25 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY du composé TH1

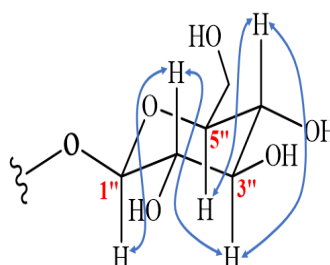


Figure II.26 : Corrélations COSY H-H de l'unité  $\beta$ -D-glucose du composé TH1

Les déplacements chimiques des carbones de ce glucose ont été déterminés à partir des corrélations H/C illustrées sur le spectre HSQC (Figure II.27) à  $\delta_c$  104,8 (C-1''), 75,1 (C-2''), 78,2 (C-3''), 71,6 (C-4''), 77,0 (C-5'') et 62,8 (C-6'').

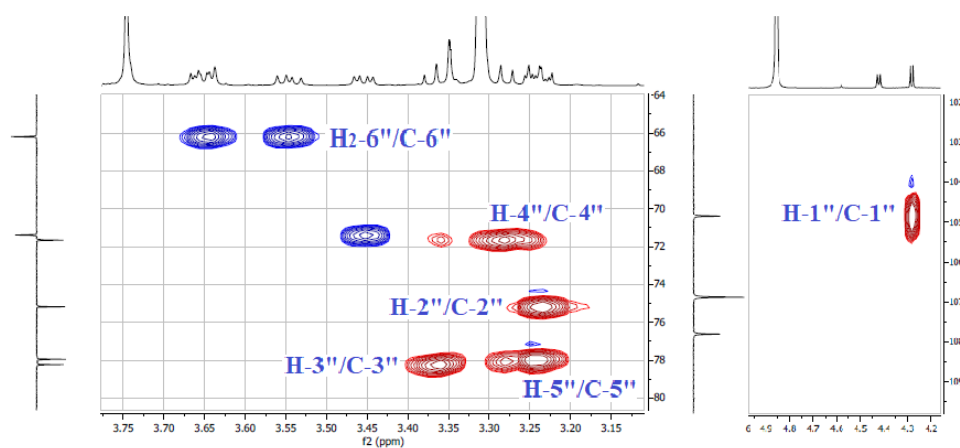
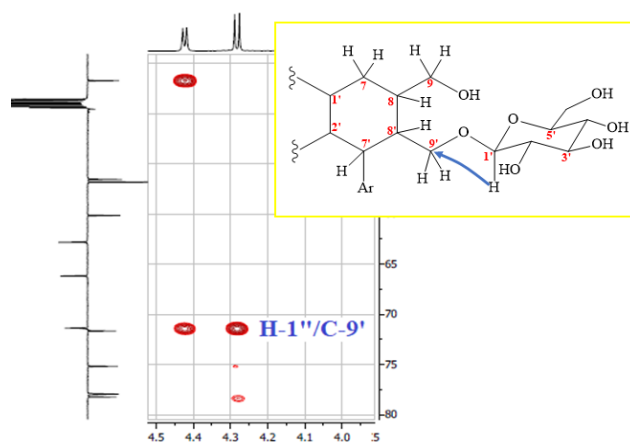


Figure II.27 : Corrélations HSQC de l'unité glucose du composé TH1

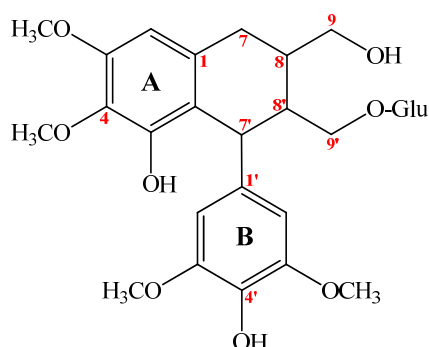
La valeur de déplacement chimique de C-9' ( $\delta_c$  71,4) montre clairement un déblindage significatif par rapport à celui de C-9 ( $\delta_c$  66,1) suggérant que l'unité glucose est placée en

position C-9' <sup>[1]</sup>. En outre, le spectre HMBC (Figure II.28), confirme une autre fois le branchement de ce glucose en position 9' suite à la corrélation du proton anomérique H-1'' avec le carbone C-9'.



**Figure II.28 : Corrélation HMBC du proton anomérique du composé TH1**

L'ensemble de ces données spectroscopiques et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'assigner au composé **TH1** la structure plane suivante (Figure II.29) :



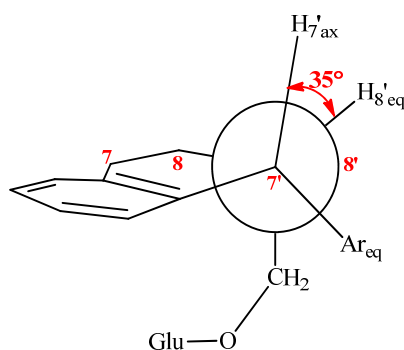
**Figure II.29 : Structure plane du composé TH1**

L'arrangement stéréochimique relatif proposé au niveau des carbones chiraux C-7', C8' et C-8 a été en effet fourni par l'examen minutieux de l'expérience ROESY, et corroboré par l'inspection des constantes de couplage des protons aliphatiques H<sub>2</sub>-7, H-7', H-8 et H-8'.

Selon Ayres <sup>[70]</sup> et Brewer <sup>[71]</sup>, l'orientation du proton en position 8 vers la face  $\alpha$  est due à la grande valeur de constante de couplage  $J_{H-7,H-8}$ , ce qui atteste un couplage diaxial des protons vicinaux H-7 et H-8. Dans notre cas, la constante de couplage entre les protons H-7<sub>b</sub> ( $\delta_H$  2,62) et H-8 qui est de l'ordre de  $J = 11,5$  Hz est la plus grande par rapport à la valeur  $J = 4,7$  Hz enregistrée entre les protons H-7<sub>a</sub> ( $\delta_H$  2,72) et H-8, ceci implique une orientation

diaxiale pour les deux protons H-7b et H-8<sup>[70-72]</sup>, et permettrait donc de positionner le substituant en C-8 en position équatoriale (face  $\beta$ ).

En revanche, la constante de couplage  $J = 6,2$  Hz entre H-7' et H-8', donnant un angle dièdre de  $35^\circ$  selon les modèles de dreiding et l'équation de Karplus<sup>[73]</sup>, conduit à un aplatissement du cyclohexane, cela permet de diriger ces protons en deux orientations probables (H-7'ax / H-8'eq ou H-7'eq / H-8'ax). Alors que le calcul de multiplet à mi-hauteur de H-8 ( $W_{1/2} = 13,2$  Hz) et de H-8' ( $W_{1/2} = 11,3$  Hz), qui sont inférieurs à 15 Hz, supporte un positionnement co-facial pour les deux protons H-8 et H-8'. En se basant sur cet argument, la position axiale pour le proton H-7' est la plus favorable<sup>[74,75]</sup>. La figure ci-dessous permet de représenter le cyclohexane aplati selon Newman (Figure II.30).



**Figure II.30 : Représentation de Newman des carbones C-7' et C-8' du composé TH1**

Finalement, le cyclohexane dans les lignanes de type aryltétraline peut posséder différentes conformations relatives<sup>[76]</sup>. La configuration proposée pour ce composé a été confirmée par l'interprétation de l'expérience ROESY, qui privilège la forme conformationnelle demi-chaise à cause de la corrélation spatiale entre les protons H-7ax et H-8'<sup>[77]</sup> (Figure II.31).

Il est à noter qu'aucune corrélation ROE n'a été observée entre les protons aromatiques H-2', H-6' du cycle B et les protons hydroxyméthylènes H<sub>2</sub>-9. Cet effet est exclusivement observé sur le spectre ROESY dans le cas d'une conformation demi-bateau<sup>[77]</sup> (Figure II.31).

Dans le même contexte, la forme conformationnelle enveloppe est bien supportée par des effets ROEs entre H-8'/H<sub>2</sub>-9' et H-2',6'/H-7ax, cependant ce dernier effet est impossible à être détecté en cas de la conformation demi-chaise<sup>[72]</sup> (Figure II.31). Ceci est appuyé par l'absence de ces effets sur le spectre ROESY du composé **TH1**.

Suite à cette analyse stéréochimique, la conformation demi-chaise est attribuée au composé **TH1**.

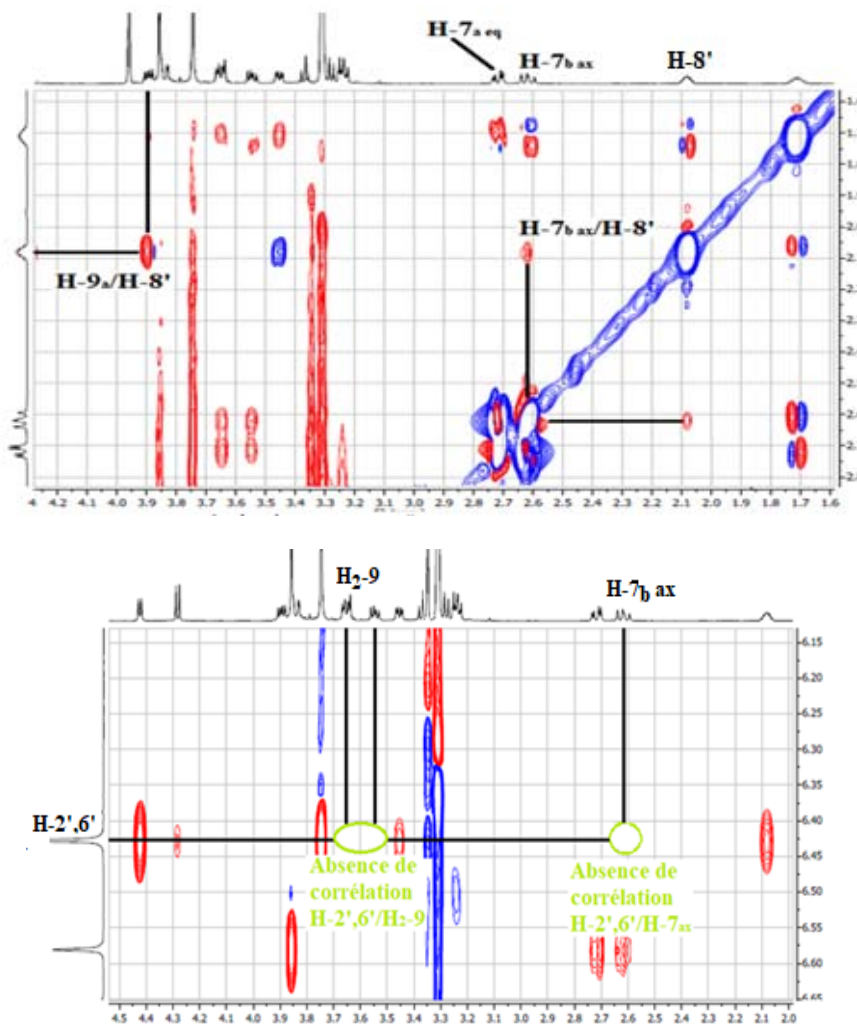


Figure II.31 : Corrélations ROESY montrant la stéréochimie du composé TH1

En plus des corrélations qui expliquent la configuration relative du composé TH1, la figure II.32 représente la molécule dans l'espace avec quelques corrélations ROEs spécifiques couramment remarquées sur le spectre ROESY : H-6/5-OCH<sub>3</sub>, H-2',6'/3',5'-OCH<sub>3</sub>, H-2',6'/H-7', H-2',6'/H-8', H-7'/H-8' et H-1'/H-9'.

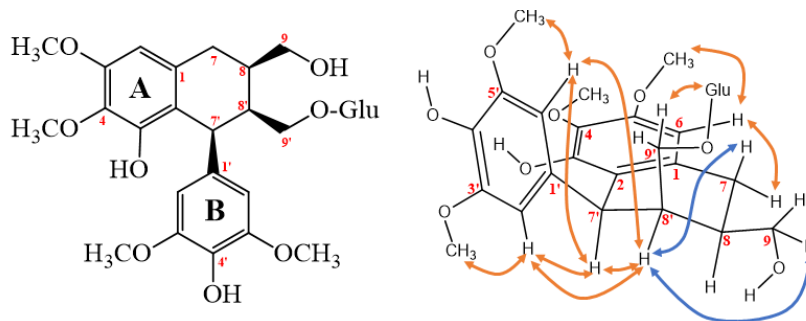


Figure II.32 : Structure spatiale du composé TH1 montrant les corrélations ROESY

L'ensemble des données spectrales accumulées et la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = +22,4$  (c 0,125, MeOH) ont fortement soutenu la configuration relative des centres chiraux en C-8, C-7' et C-8' pour le cyclohexane du composé **TH1** comme 8R, 7'S et 8'S. Par conséquent, le composé **TH1** s'est avéré à être un nouveau lignane identifié comme étant **(7'S,8R,8'S)-9'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4',9-trihydroxy-3',4,5,5'-tétraméthoxy-2,7'-cyclo-lignane** nommé **Humilisane A**. Le tableau II.1 réunit toutes les données spectrales concernant les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **TH1**.

**Tableau II.1: Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH1 dans  $\text{CH}_3\text{OD}$  à 600 MHz**

Position	TH1	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	130,0
2	-	126,4
3	-	149,4
4	-	137,1
5	-	148,5
6	6,60 (1H ; s)	107,8
7a	2,72 (1H ; dd ; 15,1 ; 4,7)	33,8
7b	2,62 (1H ; dd ; 15,1 ; 11,5)	
8	1,73 (1H ; m ; $W_{1/2}$ 13,2 Hz)	40,6
9a	3,64 (1H ; m)	66,1
9b	3,55 (1H ; dd ; 10,8 ; 6,6)	
4-OCH <sub>3</sub>	3,95 (3H ; s)	61,1
5-OCH <sub>3</sub>	3,86 (3H ; s)	56,5
1'	-	139,3
2'	6,43 (1H ; s)	106,8
3'	-	148,9
4'	-	134,4
5'	-	148,9
6'	6,43 (1H ; s)	106,8
7'	4,45 (1H ; d ; 6,2)	42,8
8'	2,08 (1H ; m ; $W_{1/2}$ 11,3 Hz)	46,7
9'a	3,89 (1H ; dd ; 9,8, 5,5)	71,4
9'b	3,45 (1H ; dd ; 9,8, 4,1)	
3'-OCH <sub>3</sub>	3,72 (6H ; s)	56,8
5'-OCH <sub>3</sub>		
1''	4,28 (1H ; d ; 7,7)	104,8
2''	3,25 (1H ; m)	75,1
3''	3,37 (1H ; t ; 8,8)	78,2
4''	3,28 (1H ; t ; 8,7)	71,6
5''	3,25 (1H ; m)	77,0
6''a	3,84 (1H ; m)	62,8
6''b	3,65 (1H ; m)	

## 1. Composé TH2

Le composé **TH2** (Figure II.33) est isolé aussi sous forme d'un solide jaune amorphe, il est visible sur CCM sous la lumière UV (254 et 366 nm) se révélant en bleu par l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

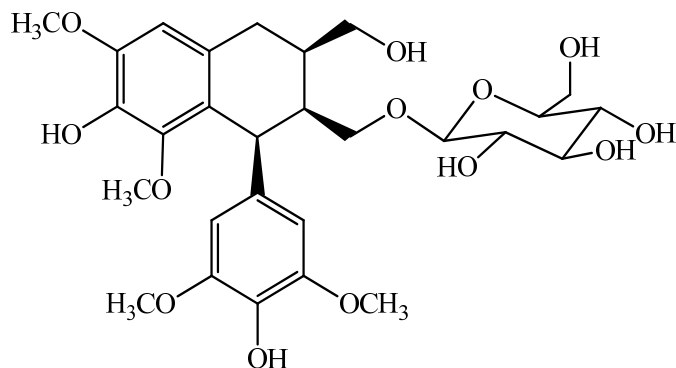


Figure II.33 : Structure du composé TH2

Tous les spectres de ce composé montrent une très grande ressemblance avec ceux du composé **TH1** sauf quelques différences mineures, qui seront évoquées plus tard lors de l'interprétation spectrale.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure II.34), qui révèle deux pics d'ions pseudomoléculaires protonés à  $m/z$  583,2392  $[M+H]^+$  et 1165,4746  $[2M+H]^+$ , en plus de deux pics moléculaires sodés à  $m/z$  605,2202  $[M+Na]^+$  et 1187,4598  $[2M+Na]^+$ , ces données sont compatibles avec la formule moléculaire en  $C_{28}H_{38}O_{13}$  ( $M = 582$  uma).

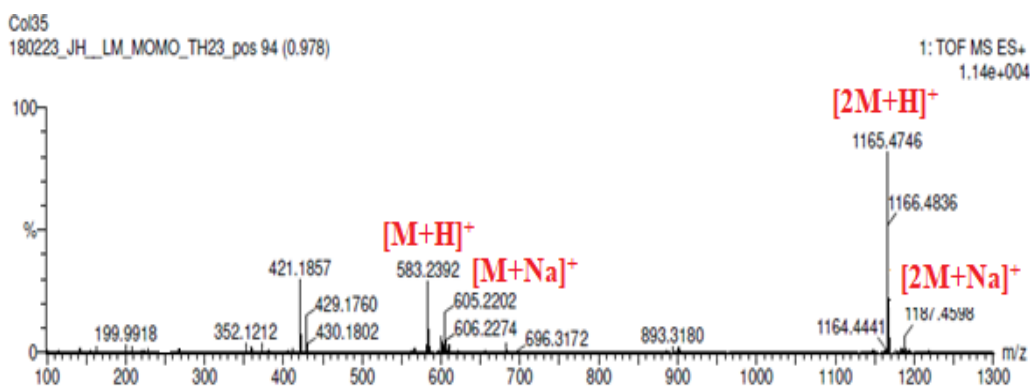


Figure II.34 : Spectre de masse ESI-MS en mode positif du composé TH2

L'analyse du spectre RMN  $^1H$  (Figure II.35) du composé **TH2a** immédiatement imposé la grande similitude à celui du composé **TH1** confirmant davantage l'attribution structurale à un squelette lignanique. En effet, ce spectre renferme deux signaux de protons aromatiques, trois

signaux des protons méthoxyles, cinq signaux de protons aliphatiques et une région de protons osidiques entrecoupées par des protons oxyméthyléniques (Figure II.35).

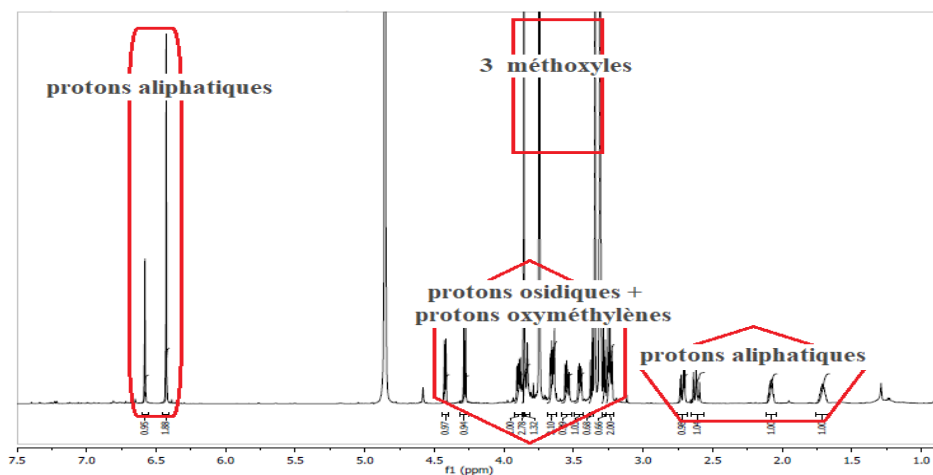


Figure II.35 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH2 ( $\text{CH}_3\text{OD}$ , 600 MHz)

La seule différence notable entre les deux spectres des composés TH1 et TH2 réside dans le changement de résonance de l'un des trois méthoxyles que l'on visualisé aisément dans la figure II.36.

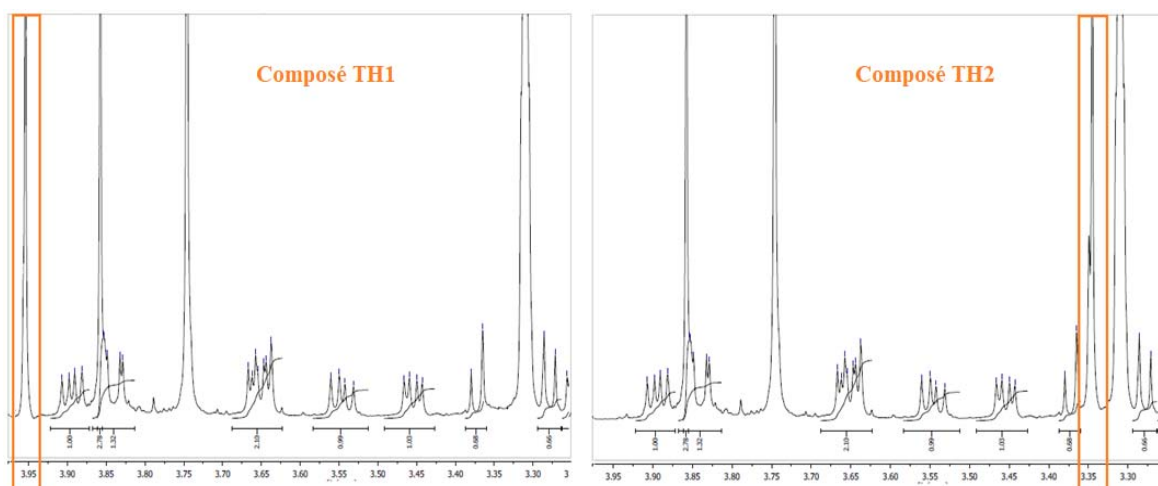


Figure II.36 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés TH1 et TH2

De manière analogue avec le composé TH1, la partie aromatique du composé TH2 comme le montre la figure II.37 est constituée de deux singlets larges sortant à 6,60 et 6,43 ppm, d'intégration 1H et 2H respectivement.

L'expérience HSQC indique l'attachement de ces protons avec leurs carbones suite aux corrélations remarquées entre  $\delta_{\text{H}} 6,60/\delta_{\text{C}} 107,6$  et  $\delta_{\text{H}} 6,43/\delta_{\text{C}} 106,8$ , permettant de former trois groupements méthines aromatiques appelés 6-CH et 2',6'-CH respectivement (Figure II.37).

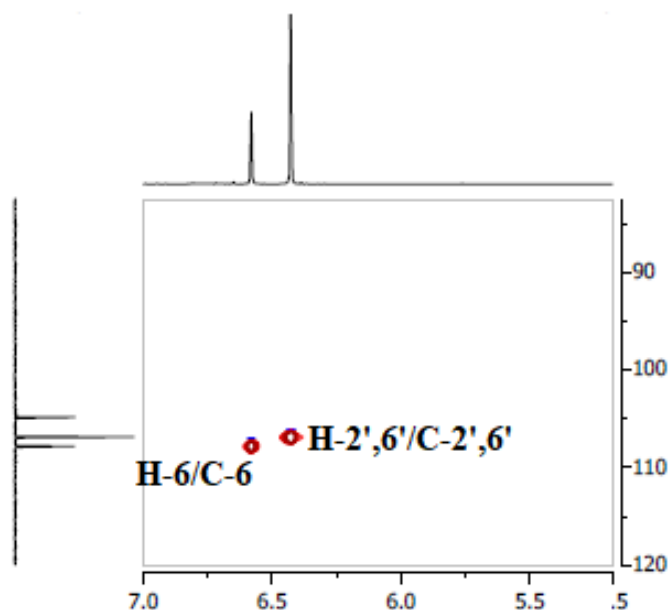


Figure II.37 : Spectre HSQC du composé TH2

L'absence de corrélations entre ces protons sur le spectre COSY et la multiplicité observée pour chaque proton aromatique sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  suggèrent l'existence de plus d'un élément aromatique. Cette suggestion est effectivement confirmée par les données fournies de l'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figures II.38), qui caractérise dans les champs forts neuf signaux correspondant aux carbones aromatiques quaternaires. Ce nombre de carbones permet de composer deux cycles aromatiques notés A et B, où le cycle A comporte un proton et l'autre cycle B révèle deux protons comme il a été constaté pour le composé **TH1** déjà identifié.

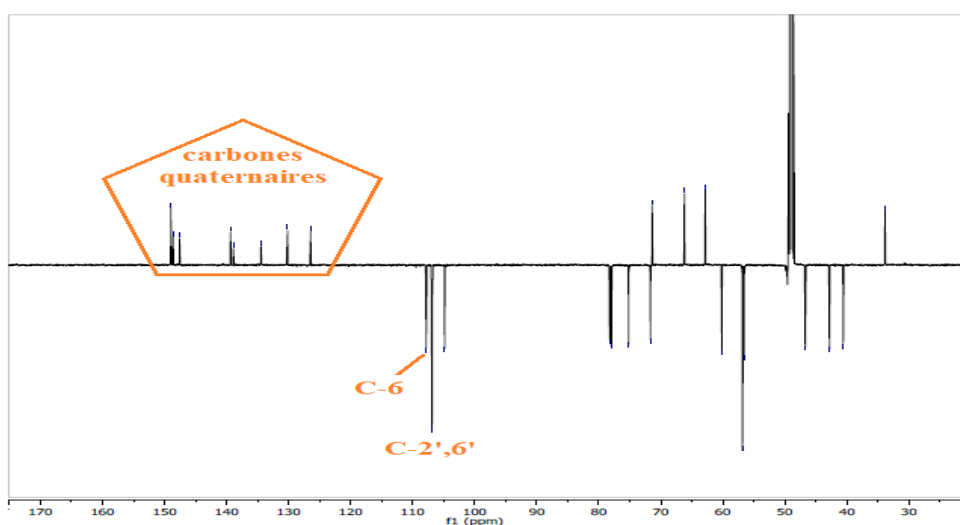


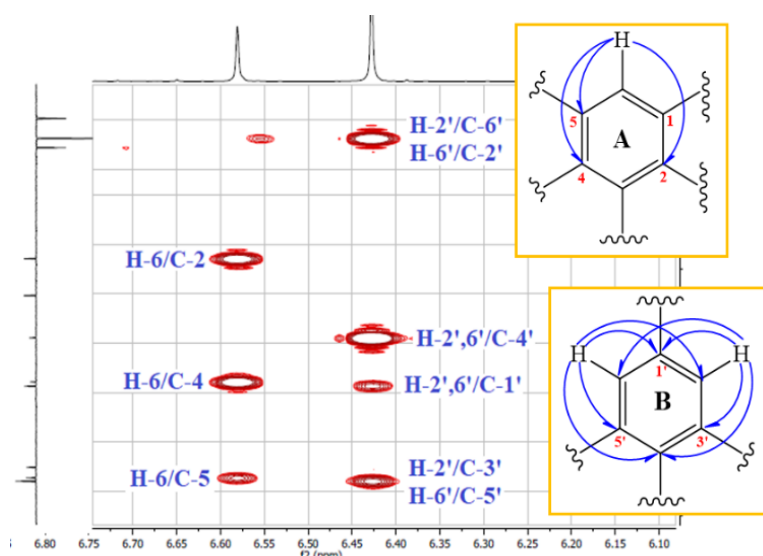
Figure II.38 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH2 ( $\text{CH}_3\text{OD}$ , 600 MHz)



Afin de répartir ces carbones  $sp^2$  entre les deux cycles A et B, l'analyse du spectre HMBC nous aide de les relier à travers les corrélations des protons H-6 et H-2',6'.

Alors, on voit clairement que la symétrie au niveau du cycle B est assumée à cause de l'intégration enregistré (2H), ainsi que par les corrélations constatées sur le spectre HMBC (Figure II.39) entre les protons H-2',6' et les carbones C-3', C-5' (148,9 ppm), C-1' (139,4 ppm), C-4' (134,1 ppm), C-2',6' (106,5 ppm).

Le cycle A, comme le montre la figure II.39, révèle trois corrélations : H-6/C-2 (126,5 ppm), H-6/C-4 (138,9 ppm) et H-6/C-5 (148,7 ppm)



**Figure II.39 : Spectre HMBC du composé TH2**

Sur le spectre RMN  $^1H$  du composé **TH2**, trois groupements méthoxyles sont détectés par l'apparition de trois singulets intenses s'intégrant pour trois protons chacun. Ensuite, l'étude combinée des spectres HSQC et HMBC (Figures II.40 et II.41) permet d'élaborer la structure des deux noyaux aromatiques tout en assignant ces groupements méthoxyles comme suite :

Le signal singulet repéré à  $\delta_H$  3,34 (3H) et corrélant sur le spectre HSQC (Figure II.40) avec le carbone situé à  $\delta_C$  60,1 est attribuable au groupement méthoxyle 3-OCH<sub>3</sub>. Ce dernier est porté par le carbone quaternaire C-3 du cycle A caractérisé à 147,6 ppm suite à la tache de corrélation en  $^3J$  distinguée sur le spectre HMBC (Figure II.41).

Les protons du groupement méthoxyle 5-OCH<sub>3</sub> sont représentés par le signal singulet localisé à  $\delta_H$  3,86 (3H). Ces protons sont liés selon le spectre HSQC (Figure II.40) avec leur carbone déterminé à 56,7 ppm. La corrélation observée sur le spectre HMBC (Figure II.41)

entre les protons de ce groupement et le carbone quaternaire déblindé C-5 confirme leur fixation en position 5 au niveau du cycle A.

Finalement, le singulet détecté à  $\delta_H$  3,75 (6H) correspond aux groupements méthoxyles 3',5'-OCH<sub>3</sub>, leur carbone a été localisé à 56,8 ppm selon le spectre HSQC (Figures II.40). Ces groupements sont liés au cycle B, suite aux corrélations en  $^3J$  affichées sur le spectre HMBC (Figure II.41) entre leurs protons et les carbones C-3',5' déjà mentionnés précédemment.

Par conséquent, les carbones en positions 4 et 4' sont inévitablement attachés à des groupements hydroxyles et leurs absorptions devraient être en  $\delta_C$  138,9 (C-4) et 134,1 (C-4').

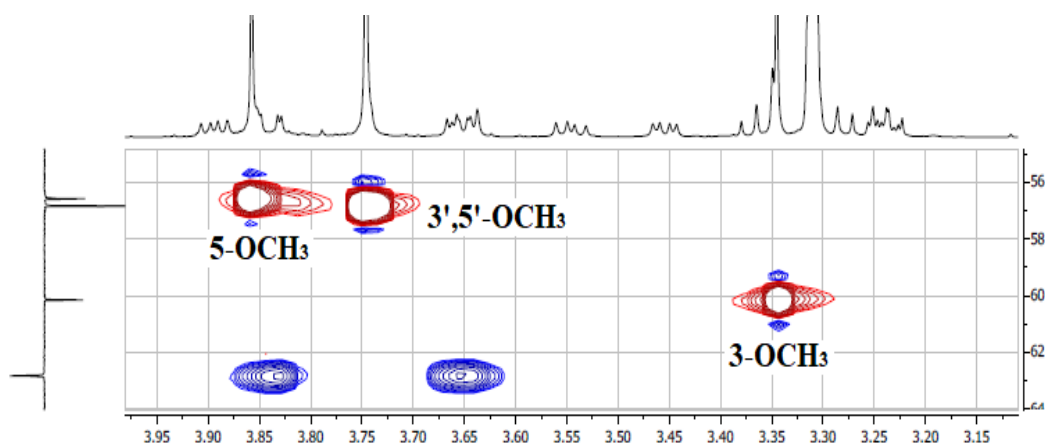


Figure II.40 : Spectre HSQC du composé TH2

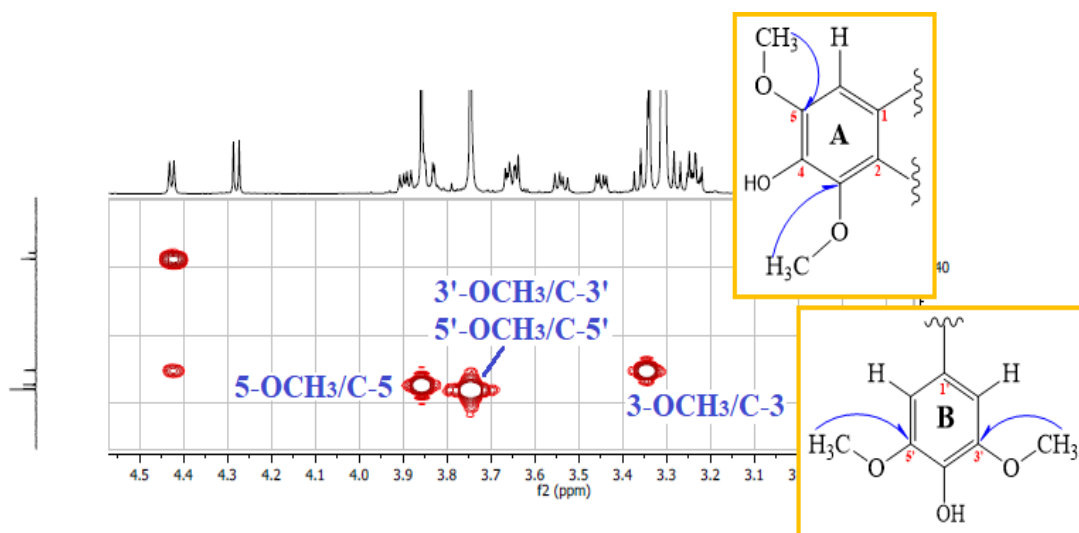


Figure II.41 : Spectre HMBC du composé TH2

L'affectation de ces groupements méthoxyles à leurs positions est distinctement confirmée suite aux corrélations ROEs observées sur le spectre ROESY (Figure II.42). En effet, on détecte des corrélations qui sont similaires à celles du composé TH1 telles que H-6/5-OCH<sub>3</sub>,

H-2'/3'-OCH<sub>3</sub> et H-6'/5'-OCH<sub>3</sub> ; toutefois, aucune interaction spatiale n'a été remarquée entre les protons des deux méthoxyles 3-OCH<sub>3</sub> et 5-OCH<sub>3</sub> comme l'avait notablement constatée pour le composé **TH1**, confirmant encore de plus les attributions déjà établies pour les substituants du cycle A du composé **TH2**.

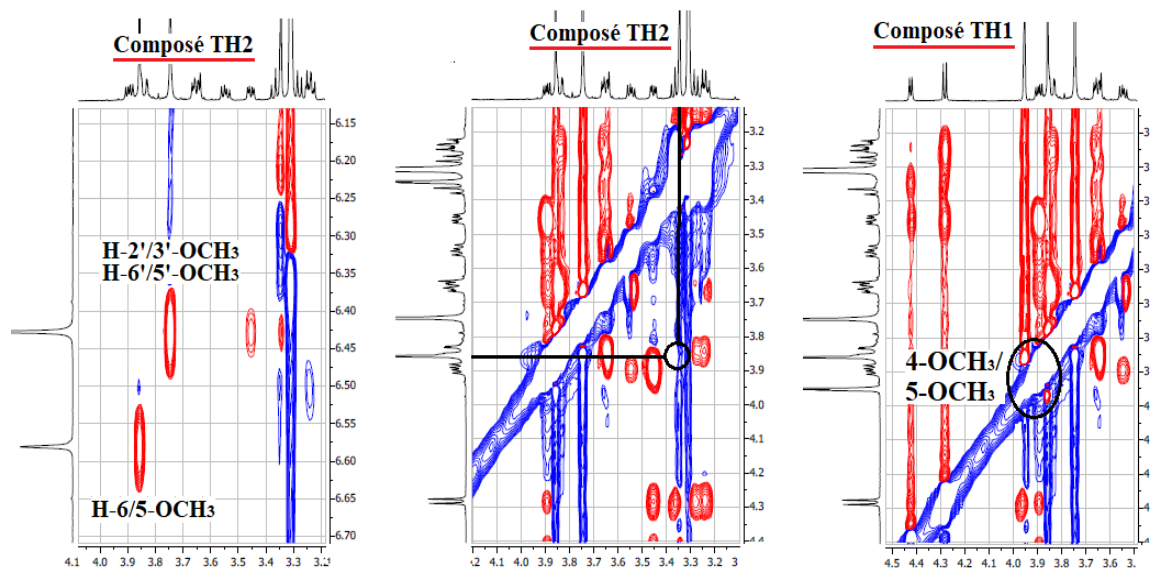
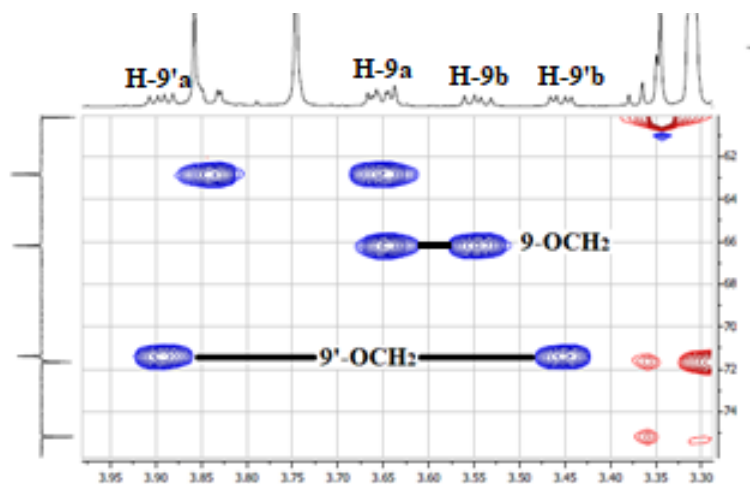


Figure II.42 : Spectres ROESY des composé TH1 et TH2

Cependant, les spectres RMN <sup>1</sup>H et HSQC de ce composé montrent une grande similitude avec ceux du composé **TH1** déjà identifié, surtout au niveau de la partie aliphatique ; d'où on met en évidence la présence de trois groupements méthines à ( $\delta_H$  1,71/ $\delta_C$  40,5), ( $\delta_H$  2,08/ $\delta_C$  46,9) et ( $\delta_H$  4,45/ $\delta_C$  42,8) correspondant aux 8-CH, 8'-CH et 7'-CH respectivement ; un groupement méthylène ( $\delta_H$  2,72 et 2,61/ $\delta_C$  34,0) attribuable à 7-CH<sub>2</sub> et deux groupements oxyméthylènes ( $\delta_H$  3,65 et 3,55/ $\delta_C$  66,3) et ( $\delta_H$  3,90 et 3,46/ $\delta_C$  71,5) assignés aux 9-OCH<sub>2</sub> et 9'-CH<sub>2</sub> respectivement (Figure II.43). L'ensembles de ces groupements sont caractéristiques d'un squelette de nature lignanique.



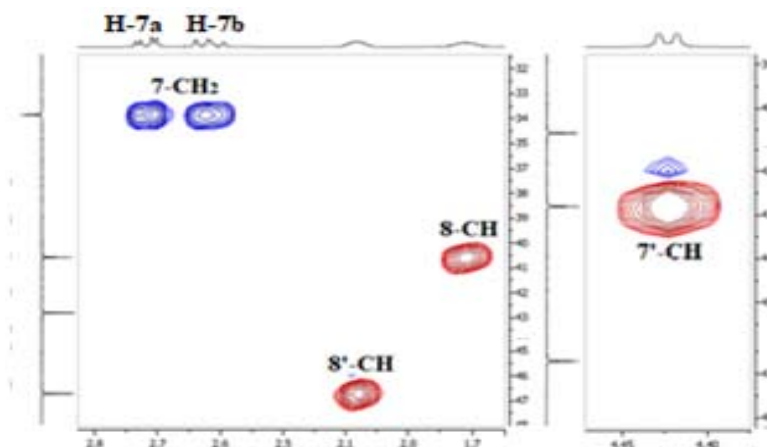


Figure II.43 : Spectre HSQC du composé TH2

Ces groupements forment selon le spectre COSY (Figure II.44) le fragment structural  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{O})\text{-CH}(\text{CH}_2\text{O})\text{-CH-}$  proposé à partir des corrélations entre H-7a/H-7b, H<sub>2</sub>-7/H-8, H-8/H-8', H-7'/H-8', H-9a/H-9b, H-9a/H-8, H-9'a/H-9'b et H<sub>2</sub>-9'/H-8'.

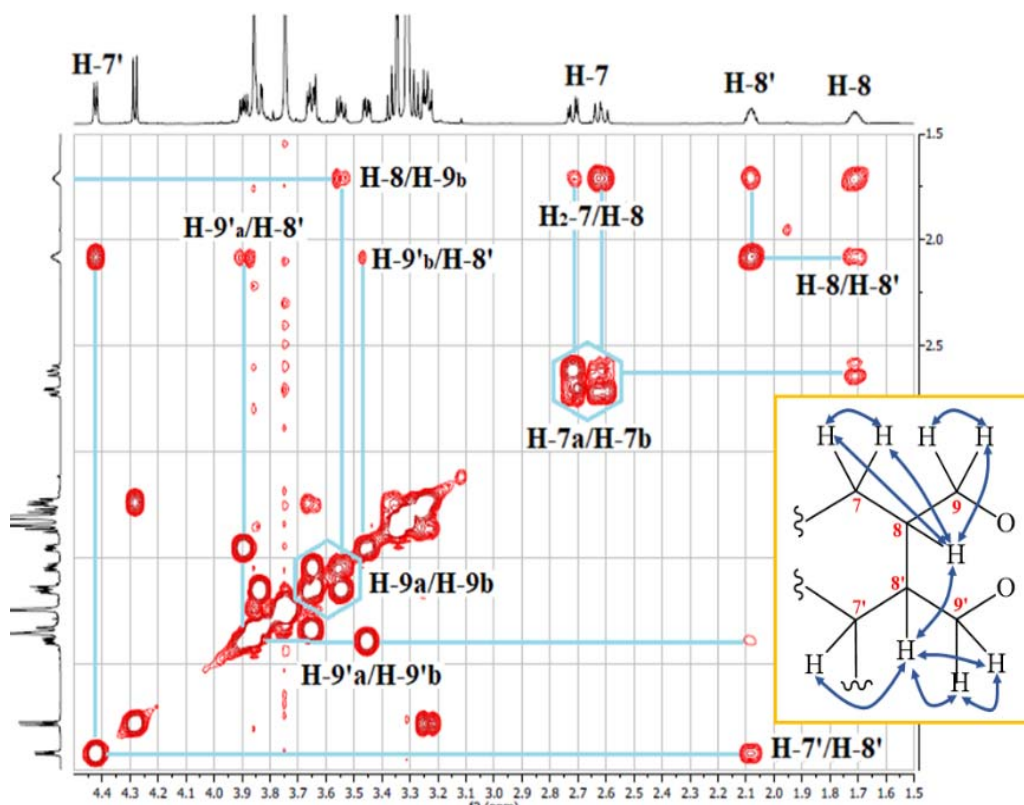


Figure II.44 : Spectre COSY du composé TH2

Sur la base des corrélations remarquées notamment lors de l'analyse de l'expérience HMBC de ce fragment, le composé **TH2** est classé comme dérivé d'un lignane de type aryltétraline. Par ailleurs, la figure suivante (Figure II.45) révèle ces corrélations mettant en exergue la caractérisation de quelques carbones aromatiques qui restent non identifiés.

- › Les corrélations entre les protons H<sub>2</sub>-7 et les carbones C-6 déjà assigné, C-1 situé à 130,2 ppm et C-2 repéré à 126,5 ppm.
- › Les corrélations entre le proton H-7' et les carbones C-1, C-2, C-3, C-1' et C-2',6'.
- › Les corrélations entre H-6/C-7 et H-2',6'/C-7'.

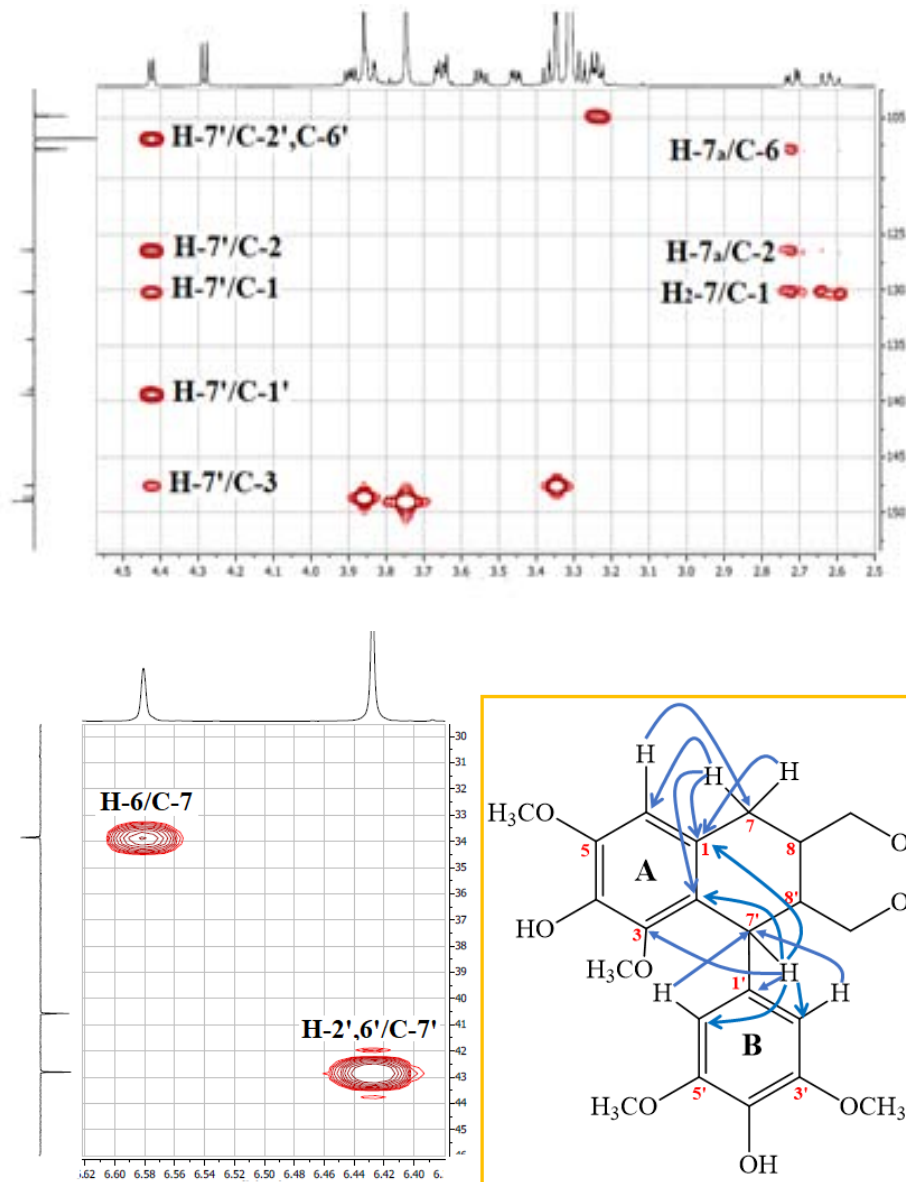


Figure II.45 : Spectres HMBC du composé TH2

De la même manière pour le composé précédent TH1, un ensemble de signaux dus à un fragment osidique a été également observé. Le signal sous forme d'un doublet sortant à 4,28 ppm (*s*, 1H,  $J = 7,8$  Hz) revient au proton anomérique H-1". L'analyse des expériences COSY et HSQC permet d'identifier tous les protons et les carbones d'un glucose (Figure II.46). La valeur de la constante de couplage élevée du proton anomérique H-1" ( $J = 7,8$  Hz) atteste la présence d'un  $\beta$ -D-glucose.

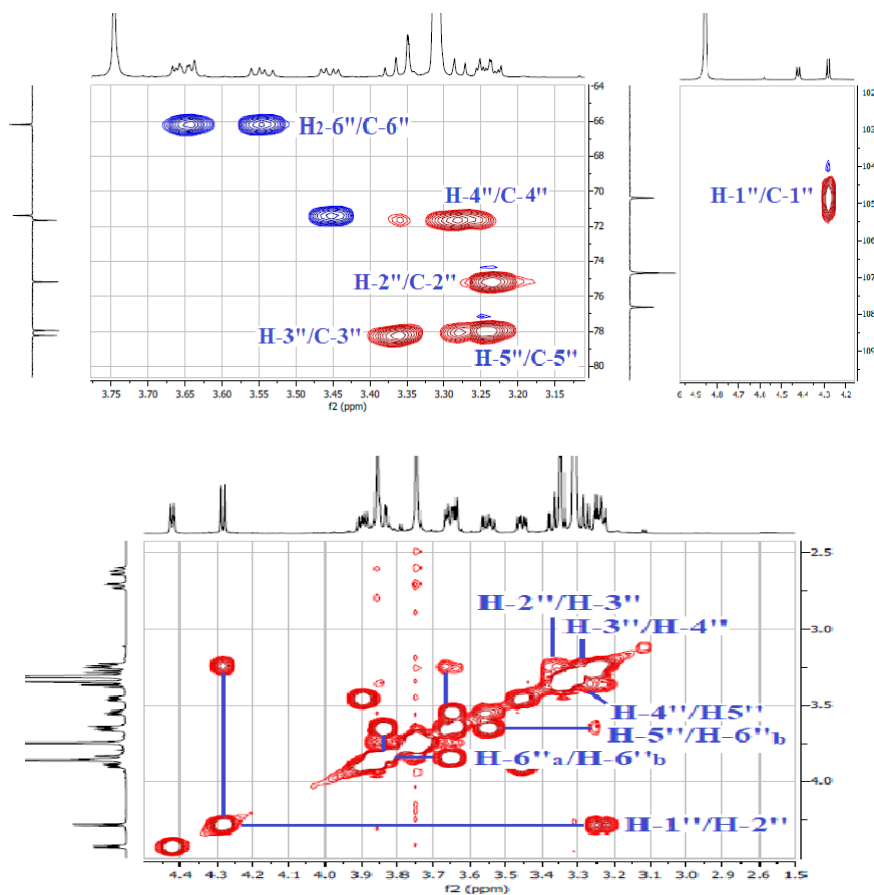


Figure II.46 : Spectres COSY et HSQC du composé TH2

De plus, la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomère H-1'' et le carbone oxyméthylène C-9' confirme l'existence de la liaison C-1''-O-C-9'. Par conséquent, le carbone C-9 est donc porteur d'un hydroxyle libre (Figure II.47).

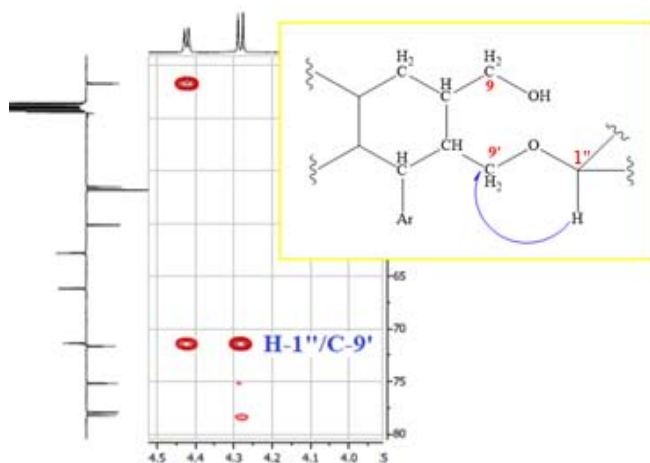


Figure II.47 : Corrélation HMBC du proton anomérique du composé TH1

Afin d'établir la stéréochimie relative du composé TH2. Il est judicieux d'appliquer la même procédure suivie pour le composé TH1 en se basant sur l'analyse des valeurs des

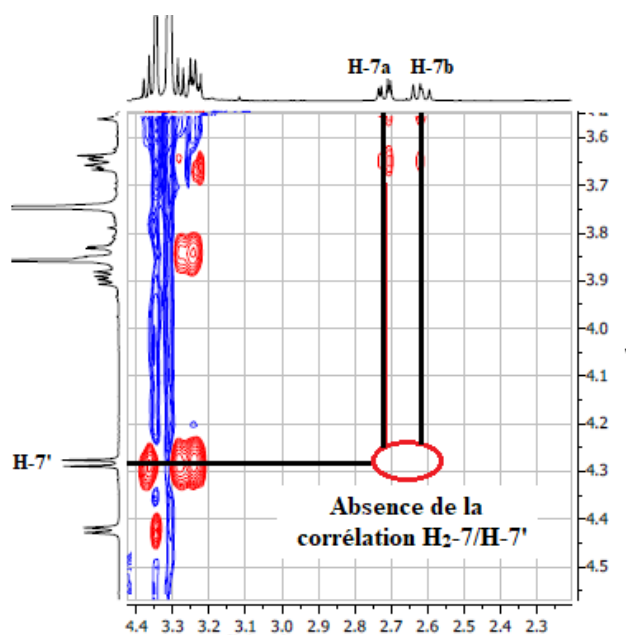
constantes de couplage des protons H-7', H-8 et H-8', ainsi que les données obtenues à partir du spectre ROESY et la comparaison avec la littérature.

La valeur de la constante de couplage  $J = 6,2$  Hz entre les protons vicinaux H-7'/H-8' ainsi que les corrélations ROEs entre H-2',6'/H-7' observées sur le spectre ROESY (Figure II.2.15) suggèrent que les protons H-7' et H-8' sont dans une relation axiale/équatoriale c'est-à-dire H-7'ax/H-8'eq ou bien H-7'eq/H-8'ax. D'autre part, le calcul de multiplet à mi-hauteur  $W_{1/2}$  de H-8 ( $W_{1/2} = 13,2$  Hz) et de H-8' ( $W_{1/2} = 11,3$  Hz) indique pour ces deux protons ont des valeurs inférieures à 15 Hz. Ceci suggère une interaction co-faciale pour les deux protons H-8 et H-8'. En parallèle, les constantes de couplage entre H-7b/ H-8 ( $J = 11,5$  Hz) et H-7a/ H-8 ( $J = 4,7$  Hz) imposent une orientation axiale pour le proton H-8 [69].

Les données ci-dessus sont en faveur d'une orientation *cis* pour tous les protons H-7', H-8' et H-8, d'où une configuration relative  $\alpha$  pour l'ensemble de ces protons, avec des positions H-7'ax, H-8'eq et H-8ax [69].

L'analyse conformationnelle de ce composé est basée sur l'interprétation de l'expérience ROESY (Figure II.48). En effet, l'interaction dipolaire entre les protons H-7ax/H-8' permet d'attribuer la conformation demi-chaise exactement comme pour le produit **TH1** déjà identifié [69].

Cependant, l'assignement conformationnel demi-chaise est complètement renforcé par l'observation de corrélations sur le spectre ROESY (Figures II.48 et II.49) telles que : H-7'/H-8 et H-8'/H-8 et aussi par l'absence des effets ROEs entre : H<sub>2</sub>-7/H-7' et H<sub>2</sub>-7/H-2',6' [69].



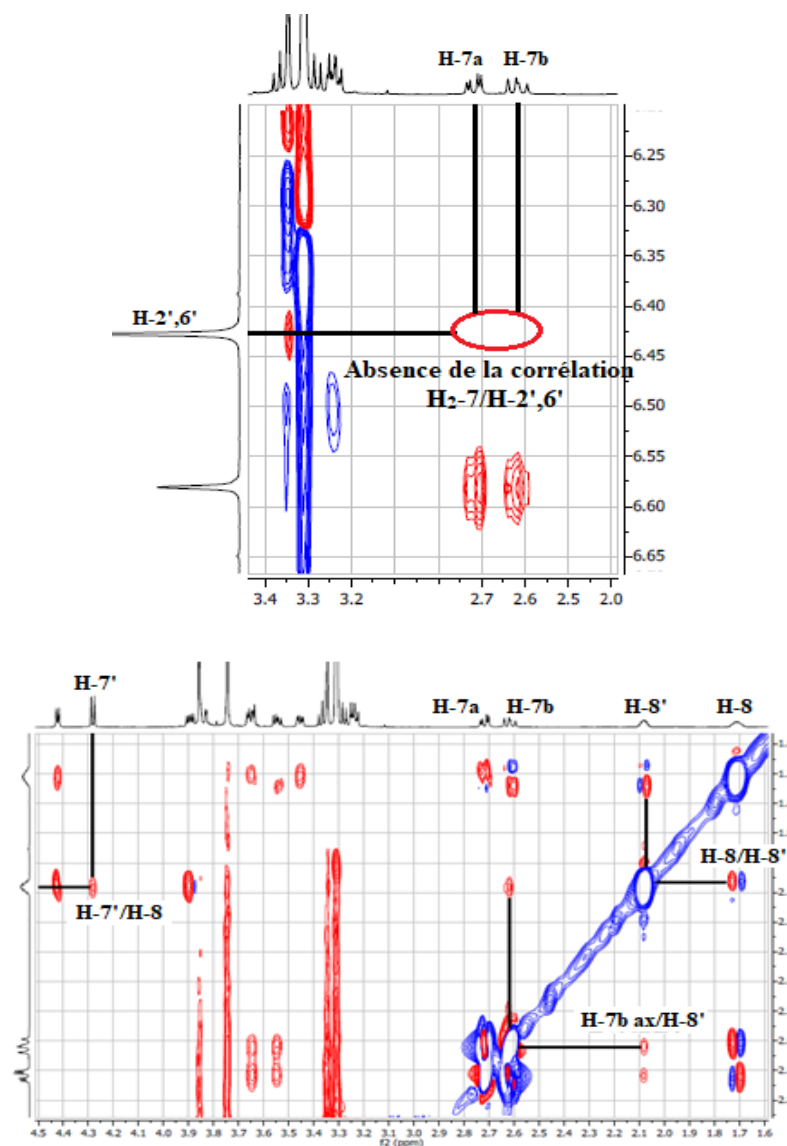


Figure II.48 : Spectres ROESY du composé TH2

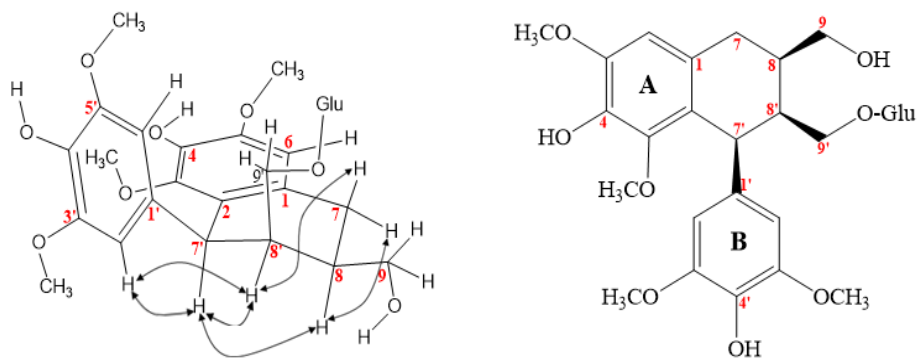


Figure II.49 : Corrélations ROESY du composé TH2

Les résultats spectraux obtenus (Tableau II.2), la mesure de la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = +23,2$  (c 0,117, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature <sup>[69]</sup>,



confirment que le présent composé est totalement identique à (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -glucopyranosyl)-oxy] lyoniésinol (Figure II.49).

Le composé **TH2** n'a jamais été trouvé dans aucune espèce du genre *Atractylis*, il a été isolé de la famille des astéracées pour la première fois. Le composé **TH2** n'a été rapporté que dans quelques publications, il a été obtenu à partir de certaines espèces végétales des autres familles telles que *Annona squamosa* (Annonaceae) [69], *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) [78], *Aegel marmelos* (Rutaceae) [79] et *Carissa carandas* (Apocynaceae) [80].

**Tableau II.2 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH2 dans  $\text{CH}_3\text{OD}$  à 600 MHz**

Position	TH2	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	130,0
2	-	126,4
3	-	147,6
4	-	138,9
5	-	148,6
6	6,60 (1H ; s)	107,8
7a	2,72 (1H ; dd ; 15,1 ; 4,7)	33,8
7b	2,62 (1H ; dd ; 15,1 ; 11,5)	
8	1,73 (1H ; m ; $W_{1/2}$ 13,2 Hz)	40,6
9a	3,64 (1H ; m)	66,2
9b	3,55 (1H ; dd ; 10,8 ; 6,6)	
3-OCH <sub>3</sub>	3,34 (3H ; s)	60,1
5-OCH <sub>3</sub>	3,86 (3H ; s)	56,5
1'	-	139,3
2'	6,43 (1H ; s)	106,8
3'	-	148,9
4'	-	134,4
5'	-	148,9
6'	6,43 (1H ; s)	106,8
7'	4,45 (1H ; d ; 6,2)	42,8
8'	2,08 (1H ; m ; $W_{1/2}$ 11,3 Hz)	46,7
9'a	3,89 (1H ; dd ; 9,8, 5,5)	71,4
9'b	3,45 (1H ; dd ; 9,8, 4,1)	
3'-OCH <sub>3</sub>	3,72 (6H ; s)	56,8
5'-OCH <sub>3</sub>		
1''	4,28 (1H ; d ; 7,7)	104,8
2''	3,25 (1H ; m)	75,1
3''	3,37 (1H ; t ; 8,8)	78,2
4''	3,28 (1H ; t ; 8,7)	71,6
5''	3,25 (1H ; m)	77,0
6''a	3,84 (1H ; m)	62,8
6''b	3,65 (1H ; m)	

## 2. Composé TH3

Le composé **TH3** (Figure II.50) est purifié sous forme d'une poudre jaune pâle. La coloration jaune de ce produit sur CCM, avant et après la révélation à l'aide d'un révélateur acide et la visibilité de sa tache sous la lumière UV, nous orientent vers une structure de nature flavonoïdique. Ce composé a été isolé en grande quantité, représentant le composant majoritaire de l'extrait *n*-butanolique de la plante.

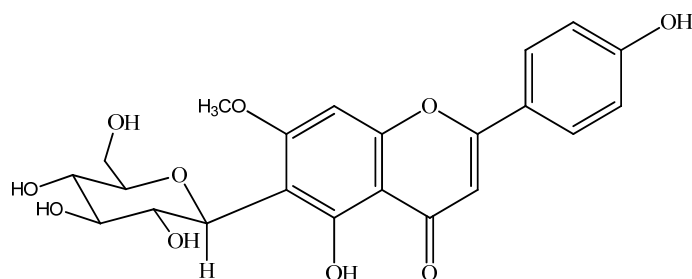


Figure II.50 : Structure du composé TH3

La formule moléculaire du composé **TH3** a été déduite comme étant  $C_{22}H_{22}O_{10}$  (soit 9 degrés d'insaturation) par les spectres de masse ESI-MS (ionisation douce, Figure II.51). Ces spectres affichent en mode positif deux pics d'ions pseudo-moléculaires à  $m/z$  447,1  $[M+H]^+$  et 915,2  $[2M+Na]^+$ , et en mode négatif deux pics d'ions pseudo-moléculaires à  $m/z$  445,1  $[M-H]^-$  et 891,2  $[2M-H]^-$ , correspondant à la masse moléculaire de 446 uma.

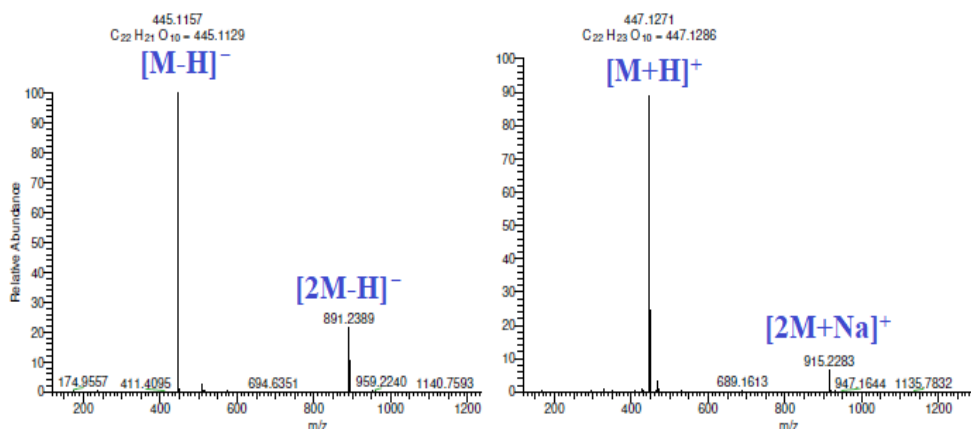


Figure II.51 : Spectres de masse ESI-MS (modes positif et négatif) du composé TH3

Les déplacements chimiques remarquables sur le spectre RMN  $^1H$  (Figure II.52) ainsi que le nombre des signaux observés sur le spectre RMN  $^{13}C$  *J*-modulé (Figure II.53) sont en accord avec la présence d'un hétéroside flavonique. Par ailleurs, le spectre RMN  $^1H$  comporte deux zones spectrales : une zone déblindée (6,70 à 8,20 ppm) qui révèle trois signaux indiquant la

présence des protons aromatiques et une zone moyennement déblindée qui s'étale de 3 à 5 ppm, montrant l'existence des protons osidiques et méthoxyles.

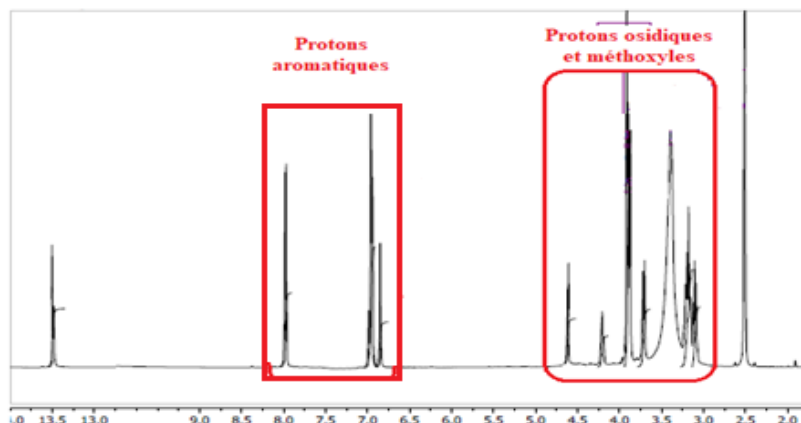


Figure II.52 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH3 enregistré dans le DMSO

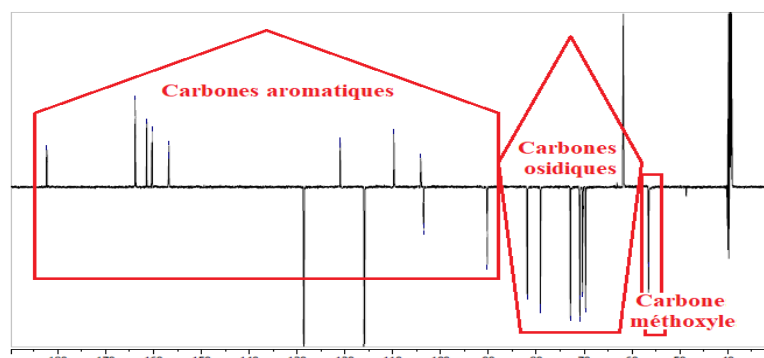
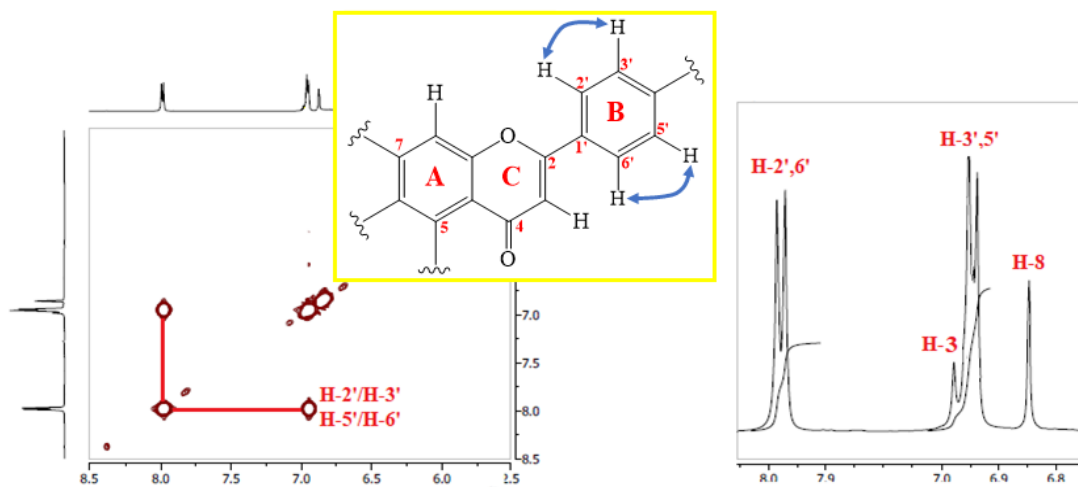


Figure II.53 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ J-modulé du composé TH3 enregistré dans le DMSO

Les données obtenues à partir de la partie aromatique en combinant les expériences RMN  $^1\text{H}$  et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure II.54) suggèrent la présence d'un système de spins  $\text{A}_2\text{X}_2$  assumé au cycle B entre les protons équivalents H-2',6' repérés à  $\delta_{\text{H}}$  7,98 (*d*, 2H,  $J = 8,5$  Hz) et les protons identiques H-3',5' situés à  $\delta_{\text{H}}$  6,95 (*d*, 2H,  $J = 8,5$  Hz). Ces protons sont *ortho*-couplés deux à deux H-2'/H-3' et H-5'/H-6' sur le spectre COSY (Figure II.54) à cause de la valeur élevée de la constante de couplage ( $J = 8,5$  Hz), en plus de l'intégration calculée (2H), ceci forme donc un noyau aromatique B symétrique et *para*-substitué.

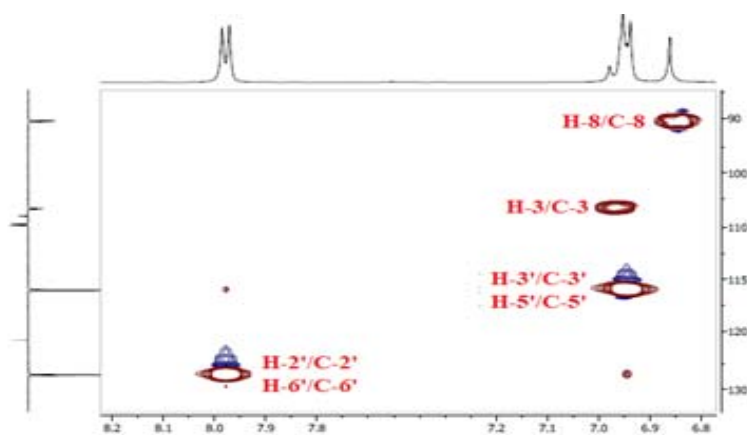
Reste encore sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  deux signaux caractérisant le squelette flavonique, le signal singulet qui absorbe à 6,84 ppm est attribué à un proton aromatique. Son carbone est détecté à 90,2 ppm selon l'expérience HSQC (Figure II.55). Il s'agit d'un groupement méthylène 8-CH du cycle A. L'absence d'une corrélation de ce proton sur le spectre COSY montre que la position 6 est substituée. Le signal singulet résonant à 6,98 ppm correspond au proton H-3.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre aussi l'existence d'un singulet très déblindé s'intégrant pour 1H localisé à 13,50 ppm, attribuable à un proton d'un groupement OH libre (5-OH).



**Figure II.54 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY du composé TH3 (partie aglycone)**

L'expérience HSQC (Figures II.55) permet d'assigner aux protons analysés, les déplacements chimiques de leurs carbones porteurs à 128,5 ppm (C-2',6'), 116,0 ppm (C-3',5'), 103,4 ppm (C-3) et 90,2 (C-8).



**Figure II.55 : Spectre HSQC du composé TH3**

Les principaux couplages hétéronucléaires H/C longue distance sont visualisés sur le spectre HMBC (Figure II.56) par des taches de corrélation qui permettent d'assigner les carbones inconnus de ce composé.

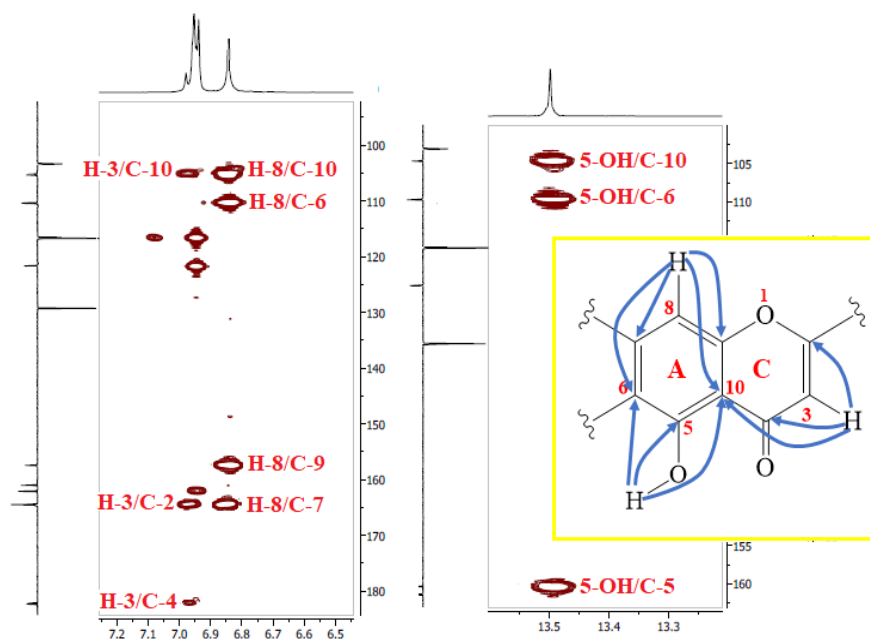
En débutant par le cycle A, la tache de corrélation en  $^2J$  remarquable entre le proton du groupement hydroxyle 5-OH et le carbone très déblindé situé à  $\delta_c$  160,3 indique son branchement au niveau du carbone C-5.

Ce proton (5-OH) corrèle aussi en  $^3J$  avec le carbone quaternaire C-10 résonnant à  $\delta_c$  104,1 et le carbone moyennement déblindé C-6 localisés à  $\delta_c$  109,6. La valeur de déplacement chimique de ce dernier lui exclut d'être porteur d'un atome électronégatif.

Les valeurs de déplacements chimiques des carbones C-6 et C-10 sont effectivement confirmés en prenant en considération les interactions en  $^3J$  établies entre le proton H-8 et ces carbones (Figure II.56).

Le même proton H-8 couple également avec les carbones C-7 repéré à une valeur élevée estimée à  $\delta_c$  163,9, suggérant sa connectivité à un atome d'oxygène faisant partie d'un méthoxyle ou d'un oside. Le déplacement chimique du carbone de jonction C-9 est enregistré près de 156,8 ppm dû à la tache de corrélation visualisée entre H-8/C-9.

De son tour, le proton H-3 du cycle C montre sur le spectre HMBC (Figure II.56), un couplage en  $^3J$  avec le carbone quaternaire déjà caractérisé C-10. Ce spectre révèle aussi des couplages en  $^2J$  de ce proton avec le carbone C-2 qui résonne à  $\delta_c$  163,8, et le carbone qui absorbe à  $\delta_c$  182,0 ne pouvant être que le carbonyle C-4.



**Figure II.56 : Spectre HMBC du composé TH3**

Les carbones du cycle symétrique B restant non identifiés sont caractérisés de la même façon à partir de l'analyse de l'expérience HMBC (Figure II.57). Les protons H-2' et H-6' indiquent évidemment les corrélations en  $^3J$  avec les carbones méthines C-6' et C-2' respectivement. Ces protons montrent aussi des corrélations en  $^3J$  avec le carbone oxygéné C-2 et le carbone quaternaire déblindé C-4' localisé à  $\delta_c$  161,4.

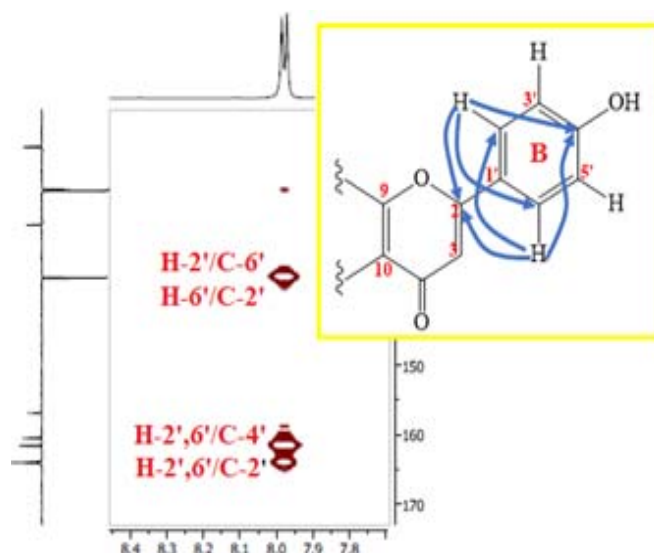


Figure II.57 : Corrélations HMBC du cycle B du composé TH3

De la même manière, les protons H-3' et H-5' exhibent des corrélations en  $^3J$  avec les carbones C-5' et C-3' respectivement, ainsi  $^2J$  avec le carbone oxygéné C-4', et ils corréleront aussi en  $^3J$  avec le carbone quaternaire aromatique C-1' situé à  $\delta_c$  120,9 (Figure II.58).

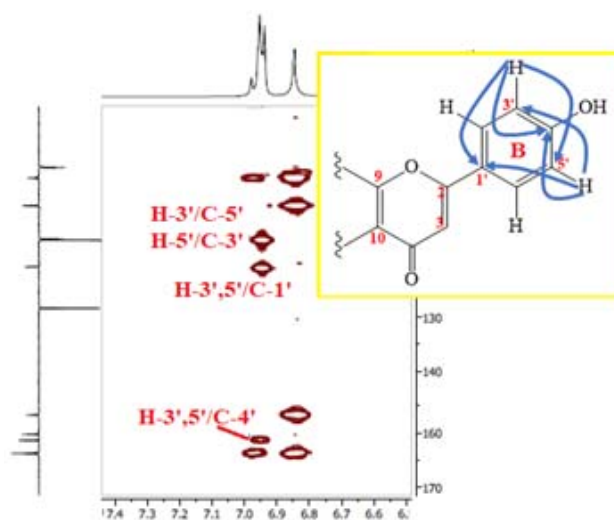


Figure II.58 : Corrélations HMBC du cycle B du composé TH3

Les substituants de l'aglycone du composé **TH3** sont représentés par les signaux moyennement déblindés (Figure II.59) :

- > Un signal intense situé à  $\delta_H$  3,90 apparaissant sous forme d'un singulet et d'intégration de 3H est attribuable à un groupement méthoxyle.
- > Des signaux correspondant aux protons osidiques sont distinctement observés dans l'intervalle de 3 à 5 ppm. Le proton anomérique résonne à  $\delta_H$  4,60 (*d*,  $J = 7,7$  Hz).

La détermination des protons de cette séquence osidique est démontrée par les corrélations qui font partie d'un même système de spins, remarquées sur le spectre COSY (Figure II.59) entre les protons H-1'' et H-2'' ( $\delta_H$  4,21, *dd*,  $J = 7,9 ; 7,1$  Hz), H-2'' et H-3'' ( $\delta_H$  3,19, *m*), H-3'' et H-4'' ( $\delta_H$  3,10, *t*,  $J = 8,2$ ), H-4'' et H-5'' ( $\delta_H$  3,19, *m*), H-5'' et H-6''b ( $\delta_H$  3,41, *m*), H-6''b et H-6''a ( $\delta_H$  3,71, *dd*,  $J = 11,7 ; 5,8$  Hz).

Tous les protons de cet hexose sont axialement corrélés entre eux en raison des constantes de couplage qui sont supérieures à 7 Hz, il s'agit donc d'un  $\beta$ -D-glucose.

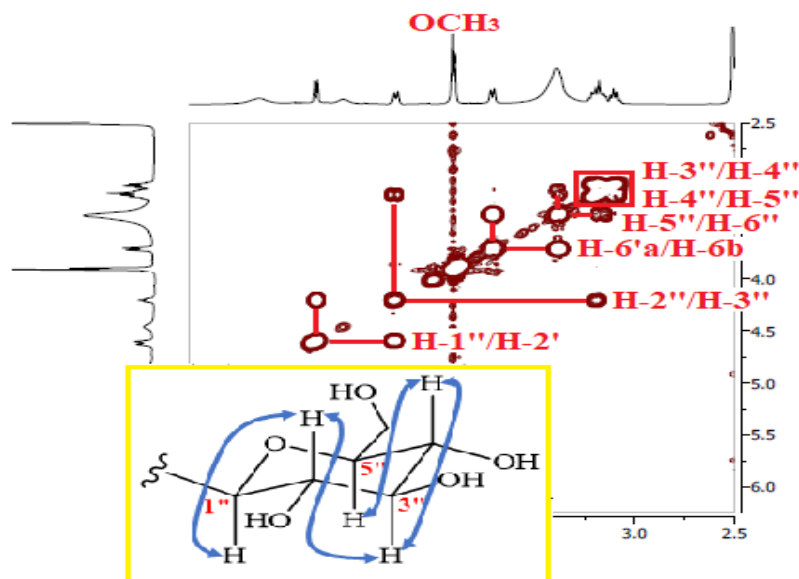


Figure II.59 : Corrélations COSY de la partie osidique du composé TH3

Les carbones du  $\beta$ -D-glucose et groupement méthoxyle sont localisés à 72,6 ppm (C-1''), 69,7 ppm (C-2''), 81,7 ppm (C-3''), 70,9 ppm (C-4''), 79,1 ppm (C-5''), 61,9 ppm (C-6'') et 56,5 ppm (OCH<sub>3</sub>) suite à leurs taches de corrélation sur le spectre HSQC (Figure II.60).

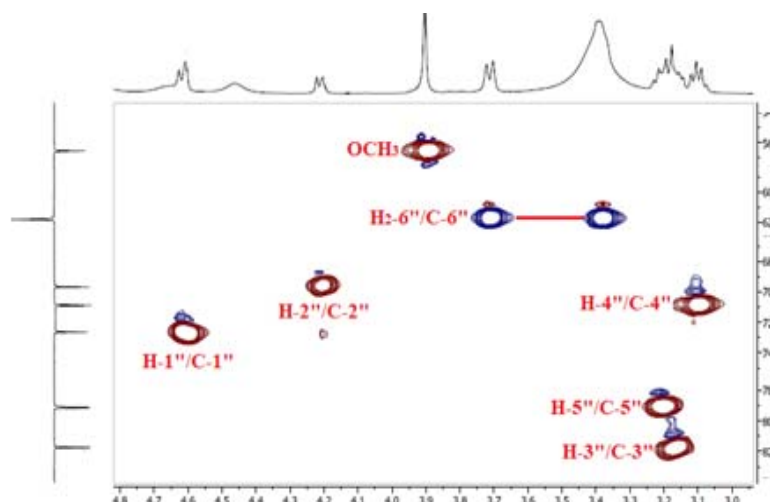
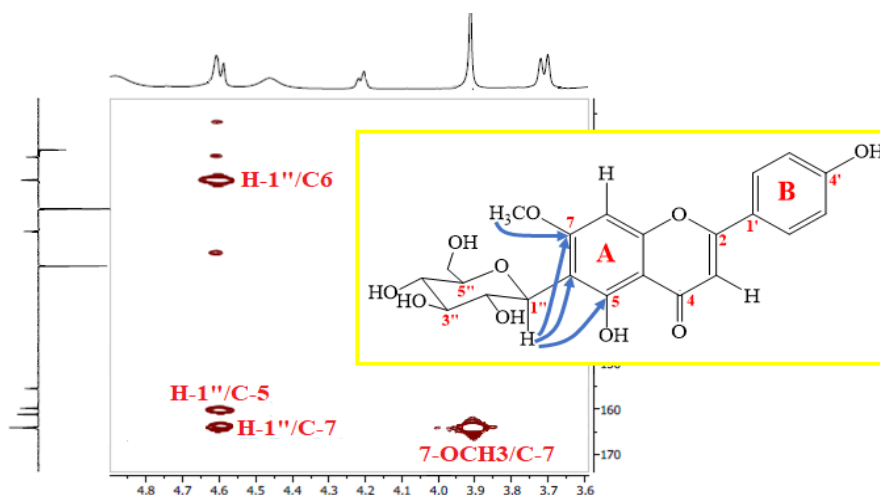


Figure II.60 : Spectre HSQC du composé TH3

Dans le but d'établir les points de jonctions de ces substituants, en commençant par le groupement méthoxyle ; l'expérience HMBC (Figure II.61) met en évidence la présence d'une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone C-7, ceci suggère l'emplacement de ce groupement en position 7 du cycle A.

La tache de corrélation marquée sur le spectre HMBC (Figure II.61) entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-6 conduit à la fixation du fragment osidique sur le carbone C-6 (109,6 ppm). Le blindage de ce carbone est clairement remarqué par la valeur de son déplacement chimique mettant en exigence d'une liaison C-C entre les carbones C-6 et C-1''. Il en résulte que le composé **TH3** est un C-glycosylflavone. Le proton H-1'' montre aussi des interactions avec les carbones C-5, C-7 du cycle A.

Le substituant en position C-4 est déduit comme étant un groupement hydroxyle en raison de son déplacement chimique très déblindé ( $\delta_C 161,4$ ).



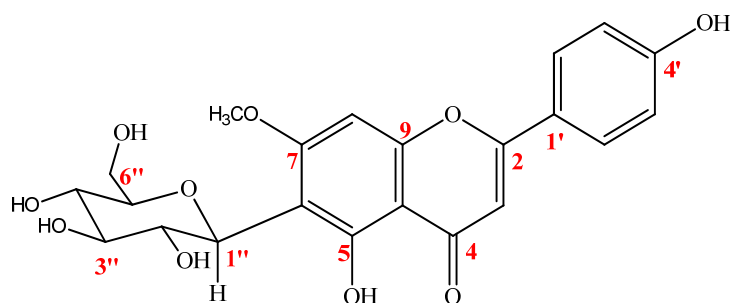
**Figure II.61: Spectre HMBC montrant l'emplacement des substituants du composé TH3**

La comparaison des constantes spectrales avec celles de la littérature, permet de proposer pour le composé **TH3** la structure de **Swertisine** nommé aussi **Isovitexin-7-O-méthylether** ou **C-glycosyl-6 Genkwanine** [81-84] (Figure II.62). Le tableaux II.3 rassemble tous les déplacements chimiques des protons et des carbones de ce composé.

Il est très important de rappeler que l'isolement des dérivés de C-glycosylflavones à partir des plantes *Atractylis* est très limité. Cependant, la Schaftoside, la Vicénine 3 et l'Isoorietine ont été déjà caractérisées à partir de certaines espèces qui poussent en Algérie (Batna) comme *A. cancellata* [6] et *A. flava* [3]. La **Swertisine** a été isolée pour la première fois de la plante *Swertia japonica* appartenant à la famille Gentianaceae par Nakaoki [85]. Il est à noter que le composé **TH3** n'a jamais été isolé des espèces du genre *Atractylis*.



L'étude biologique réalisée *in vitro* et *in vivo* montre que la **Swertisine**, est un composé anti-diabétique, facilite la néogenèse des îlots à partir de cellules souches/progénitrices du pancréas via la voie p-38 MAP Kinase-SMAD [86].



**TH3**

**Figure II.62 : Swertisine (TH3)**

**Tableau II.3 : Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé TH3 (DMSO)**

Position	TH3	
	$\delta_H$ (ppm), [Int, m, J (Hz)]	$\delta_C$ (ppm)
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	-	163,8
<b>3</b>	6,98 (1H, s)	103,4
<b>4</b>	-	182,0
<b>5</b>	-	160,3
<b>6</b>	-	109,6
<b>7</b>	-	163,9
<b>8</b>	6,84 (1H, s)	90,3
<b>9</b>	-	156,8
<b>10</b>	-	104,1
<b>1'</b>	-	121,0
<b>2'</b>	7,98 (1H, d, 8.46)	128,5
<b>3'</b>	6,95 (1H, d, 8.51)	116,0
<b>4'</b>	-	161,4
<b>5'</b>	6,95 (1H, d, 8.51)	116,0
<b>6'</b>	7,98 (1H, d, 8.46)	128,6
<b>5-OH</b>	13,5	-
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,90 (3H, m)	56,2
<b>6-C-glu-1''</b>	4,60 (1H, d, 9,3)	72,6
<b>2''</b>	4,01 (1H, dd, 9,3 ; 7,1)	70,4
<b>3''</b>	3,19 (1H, m)	81,9
<b>4''</b>	3,10 (1H, t, 8,2)	70,9
<b>5''</b>	3,19 (1H, m)	79,1
<b>6''a</b>	3,71 (1H, dd, 11,7 ; 5,8)	61,9
<b>6''b</b>	3,42 (1H, m)	

### 3. Composé TH4

Le composé **TH4** (Figure II.63) est obtenu dans les mêmes conditions et possède les mêmes caractéristiques chromatographiques que le composé précédent **TH3**. La poudre jaune pâle et la coloration jaune de sa tache sur CCM après la révélation à l'aide d'une solution acide et chauffage plaident en faveur d'un squelette flavonoïdique pour ce composé.

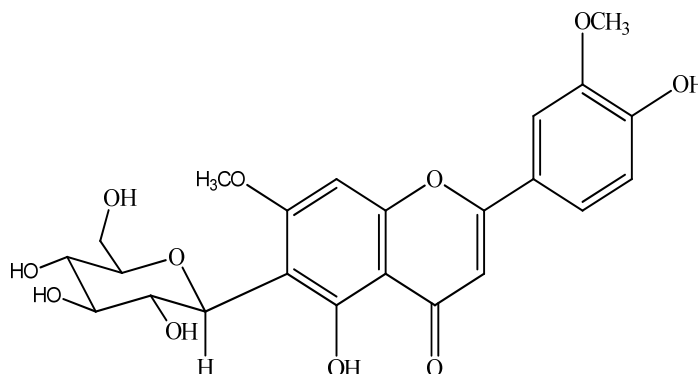


Figure II.63 : Structure du composé TH4

Le spectre de masse (Figure II.64) obtenu en mode positif exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  477,1  $[M+H]^+$  et 975,2  $[2M+Na]^+$ , ainsi que le spectre en mode négatif affiche deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  475,1  $[M-H]^-$  et 951,2  $[2M-H]^-$ , correspondant à une masse moléculaire 476 uma et une formule brute en  $C_{23}H_{25}O_{11}$ .

Les deux composés **TH3** et **TH4** sont très similaires, et c'est clairement déduit en premier temps des masses moléculaires de ces deux composés, qui indiquent une différence de masse estimé à 31 uma due à un fragment d'un groupement méthoxyle.

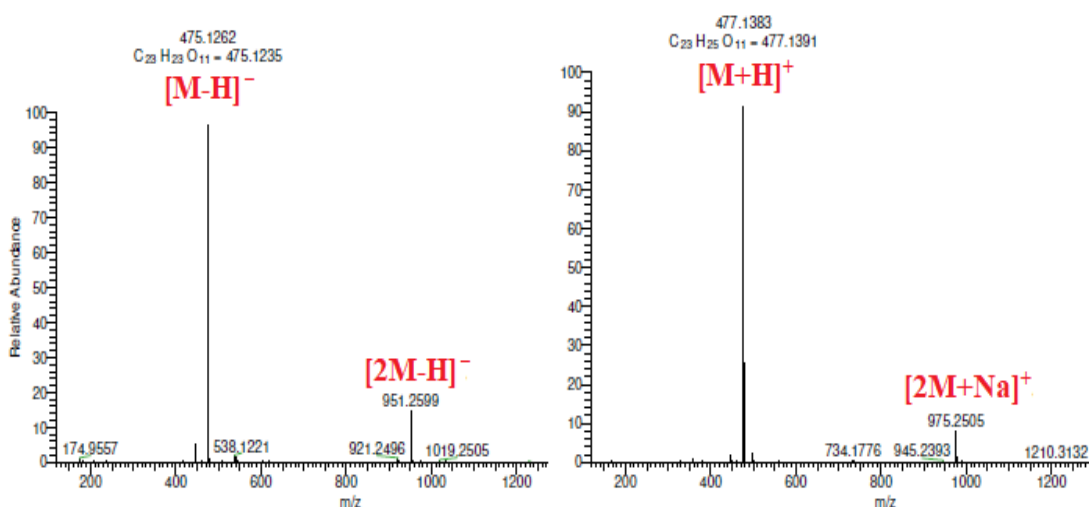


Figure II.64 : Spectres de masse ESI-MS en mode positif et négatif du composé TH4

Cette similitude est encore confirmée par l'ensemble des données rassemblées à partir des spectres RMN  $^1\text{H}$ , COSY H-H (Figure II.65) et HSQC (Figure II.66) accordant au composé **TH4** une structure flavonique ; en particulier au niveau des cycles A et C qui sont représentés par les signaux qui absorbent à  $\delta_{\text{H}}$  6,86/ $\delta_{\text{C}}$  103,1 et  $\delta_{\text{H}}$  6,84/ $\delta_{\text{C}}$  91,1 attribuables aux groupements méthines 3-CH et 8-CH respectivement (Figure II.65 et II.66).

La différence notable par rapport au composé **TH3** est constatée au niveau du cycle B, qui révèle l'existence de trois signaux protoniques à  $\delta_{\text{H}}$  7,61 (*s*, 1H), 7,63 (*d*, 1H,  $J = 8,7$ ) et à  $\delta_{\text{H}}$  6,95 (*d*, 1H,  $J = 8,7$ ), configurant un système AX, accordés aux protons H-2', H-6' et H-5' respectivement. Le spectre HSQC (Figure II.66) permet d'assigner aux protons identifiés précédemment, leurs carbones localisés à 120,5 ppm (C-6'), 110,2 ppm (C-2'), 115,5 ppm (C-5').

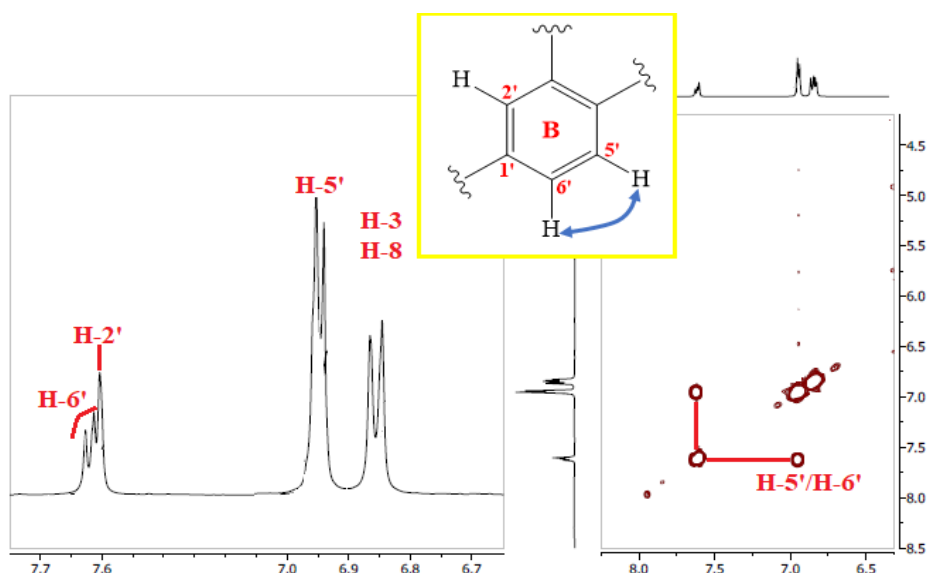


Figure II.65 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY H-H du composé TH4 (DMSO)

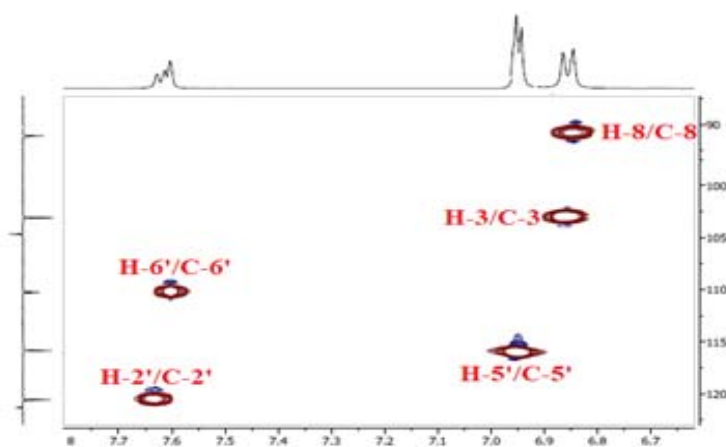


Figure II.66 : Spectre HSQC du composé TH4

Le traitement de l'expérience COSY H-H (Figure II.67) met en évidence la présence d'un enchainement qui comporte 7 protons dû à un fragment  $\beta$ -D-glucose. Cet hexose forme un système de corrélations avec des constantes de couplages supérieures à 7 Hz, en partant du proton anomérique H-1'' ( $\delta_H$  4,62 (*d*,  $J = 9,5$  Hz)/C-1'' ( $\delta_C$  72,8), on distingue les protons et les carbones : H-2'' ( $\delta_H$  4,01, *t*,  $J = 9,2$  Hz)/C-2'' ( $\delta_C$  70,4), H-3'' ( $\delta_H$  3,19, *t*,  $J = 7,9$  Hz)/C-3'' ( $\delta_C$  81,7), H-4'' ( $\delta_H$  3,10, *t*,  $J = 7,9$ )/C-4'' ( $\delta_C$  70,8), H-5'' ( $\delta_H$  3,19, *m*)/C-5'' ( $\delta_C$  79,1) et H<sub>2</sub>-6'' [( $\delta_H$  3,41, *m*)/( $\delta_H$  3,71, *d*,  $J = 11,5$  Hz)]/C-6'' ( $\delta_C$  61,9) (Figure II.67).

Finalement, les protons qui sont représentés sur le spectre RMN  $^1H$  par deux signaux intenses situés à  $\delta_H$  3,91 et 3,88 et s'intégrant pour 3H chacun, expriment l'existence de deux groupements méthoxyles. Leurs carbones sur le spectre HSQC sont localisés à 56,1 ppm et 56,3 ppm respectivement.

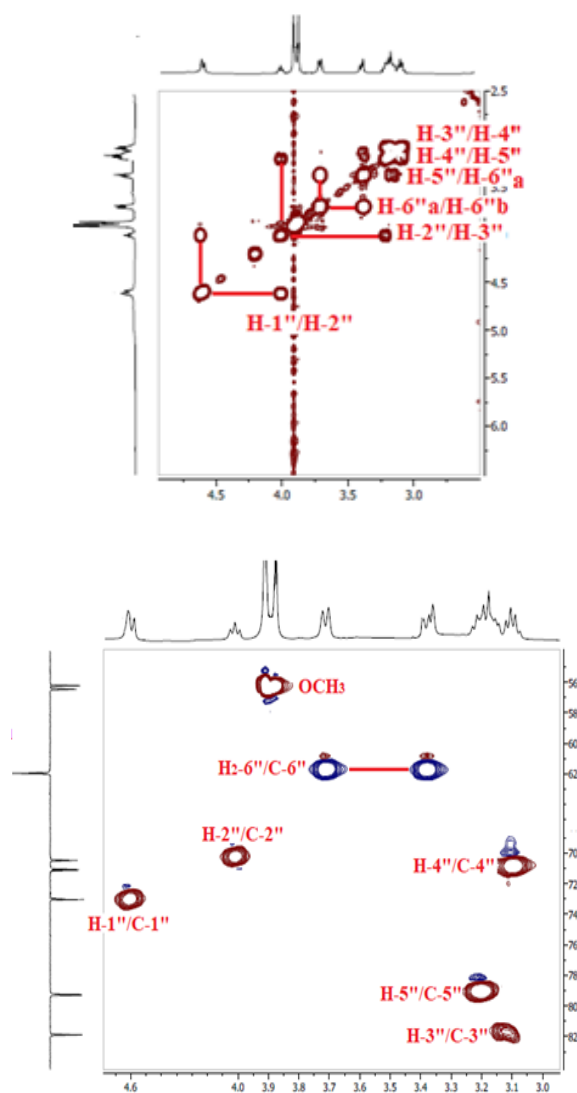


Figure II.67 : Spectres COSY et HSQC du composé TH4

Toutes les corrélations hétéronucléaires H/C visualisées sur le spectre HMBC (Figure II.68) permettent de structurer le noyau A du composé **TH4** ressemblant à celui du composé **TH3**. Par ailleurs, les taches de corrélation remarquées sur ce spectre du proton anomère H-1" et des protons du groupement OCH<sub>3</sub> assurent les connectivités du glucose au carbone C-6 localisé à  $\delta_c$  109,7 et le groupement méthoxyle au carbone C-7 situé à  $\delta_c$  165,0. Par conséquent, les déplacements chimiques des carbones C-6 ( $\delta_c$  109,7) et C-1" ( $\delta_c$  72,8) considérés blindés mettent en évidence l'existence d'une liaison C-C entre ces deux carbones et permettent de classer le composé **TH4** comme un C-glycosylflavone.

En plus, le signal protonique apparaissant à 13,52 ppm donne lieu à un groupement OH branché sur le carbone C-5 résonant à  $\delta_c$  159,6 suite à la tache de corrélation observée en  $^2J$  sur le spectre HMBC (Figure II.68)

En poursuivant le même raisonnement, on peut distinguer d'autres corrélations qui forment le squelette de ce composé comme : le proton 5-OH et les carbones C-6 et C-10 ( $\delta_c$  104,6), le proton H-8 et les carbones C-6, C-7 et C-9 (156,8) ppm et le proton H-1" et les carbones C-5 et C-7.

Le même spectre (Figure II.68) permet d'assigner pour le proton H-3, la corrélation H/C avec le carbone quaternaire C-1' résonant à 121,0 ppm. Tandis que, la tache d'interaction de ce proton avec un signal sortant à  $\delta_c$  182,3 est accordée au carbonyle en position 4.

Les substituants du cycle B sont établis au moyen de l'expérience HMBC (Figure II.68), en se basant sur les interactions visualisées comme suite :

- > Les protons *para* H-2' et H-5' possèdent des corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  respectivement avec le carbone C-3' situé à 148,1 ppm. Ce dernier est lié à un groupement méthoxyle via la tache de corrélation observée entre ses protons et ce carbone (C-3').
- > Les protons *méta* H-2' et H-6' révèlent une tache de corrélation avec le carbone oxygéné C-2 à 163,2 ppm, en plus les couplages mutuels entre eux H-2'/C-6' et H-6'/C-2'.
- > Tous les protons H-2', H-5' et H-6' corrélaient également avec le carbone C-4' par les taches de corrélation qui sont alignées sur la même valeur de 151,0 ppm, le déblindage de ce déplacement chimique et la masse moléculaire déduite, suggèrent la fixation d'un hydroxyle à ce carbone.

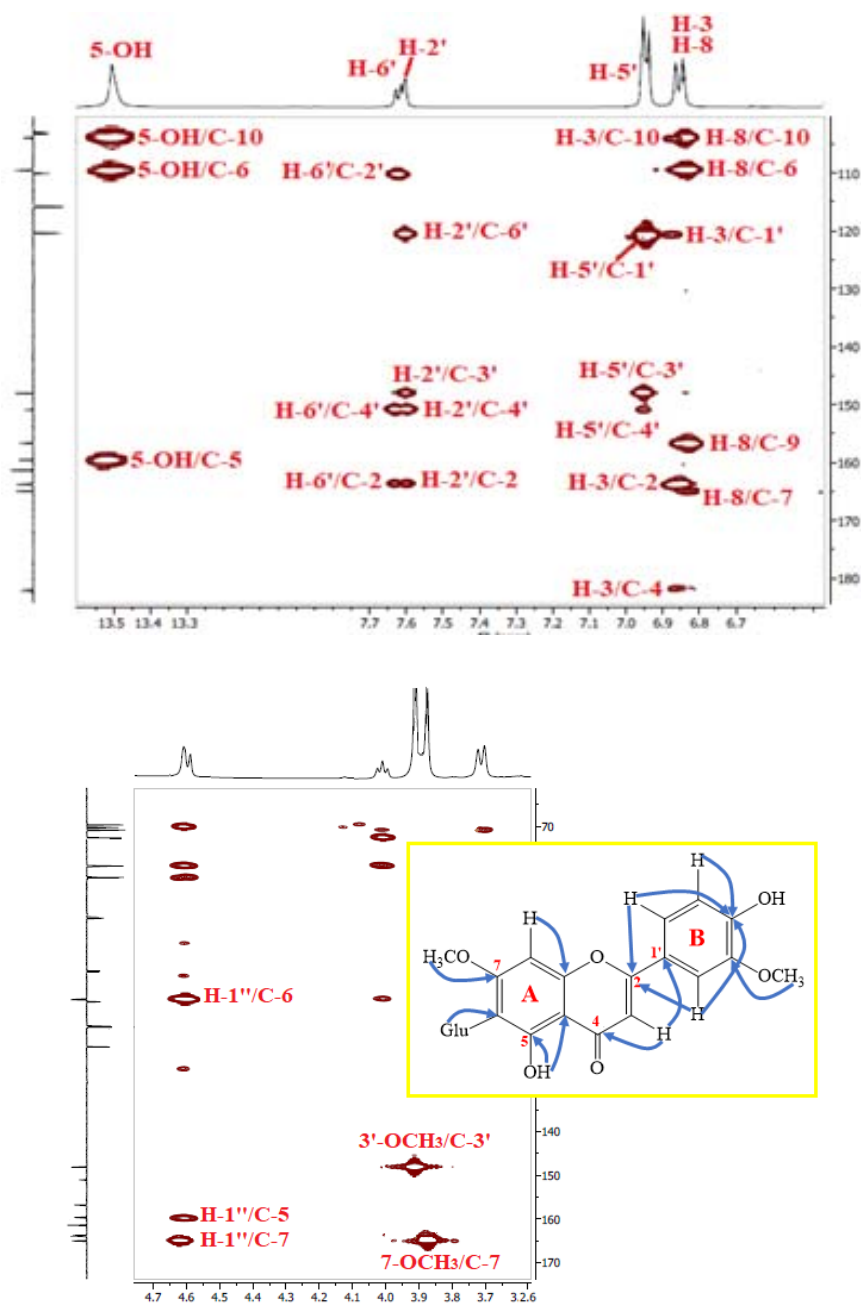


Figure II.68 : Spectre HMBC du composé TH4

L'ensemble des données spectrales (Tableaux II.4.) permet de caractériser sans ambiguïté le composé **TH4** comme étant **Isoorientine-7,3'-diméthylether** nommé aussi **3',7-diméthyl Isoorientine** [82,87] (Figure II.69). Le dérivé de l'Isoorientine **TH4** a été décrit antérieurement pour la première fois en 1980 dans l'espèce *Achillea cretica* (Asteracées) [84]. Il est isolé pour la première fois dans le genre *Atractylis*. Il a été isolé de la mélasse de canne à sucre et il montre une activité antibactérienne contre les bactéries cariogènes *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* avec une CMI de 4 mg/mL [88].

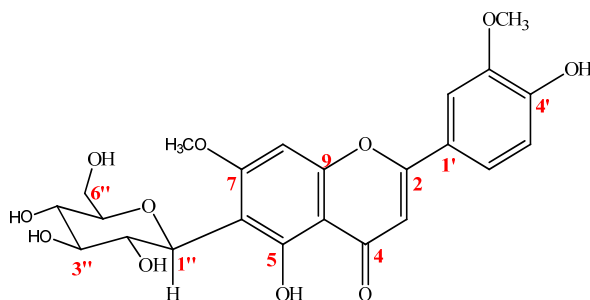


Figure II.69 : Isoorientine-3',7-diméthyl (TH4)

Tableau II.4 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH4 (DMSO)

Position	TH4	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	-
2	-	163,8
3	6,86 (1H, s)	103,1
4	-	182,3
5	-	159,6
6	-	109,7
7	-	165,0
8	6,84 (1H, s)	91,1
9	-	156,7
10	-	104,6
1'	-	121,0
2'	7,63 (1H, s)	110,5
3'	-	148,1
4'	-	151,0
5'	6,95 (1H, d, 8,7)	115,8
6'	7,61 (1H, d, 8,7)	120,7
5-OH	13,42	-
7-OCH <sub>3</sub>	3,91 (3H, s)	56,3
3'-OCH <sub>3</sub>	3,88 (3H, s)	56,1
6-C-glu-1''	4,60 (1H, d, 9,2)	72,8
2''	4,21 (1H, t, 9,2)	69,7
3''	3,19 (1H, t, 7,9)	81,7
4''	3,11 (1H, t, 7,9)	70,8
5''	3,19 (1H, m)	79,1
6''a	3,71 (1H, t, 11,5)	61,9
6''b	3,42 (1H, m)	

## 5. Composé TH5

La poudre blanche est l'aspect physique qui distingue l'isolement de ce produit (Figure II.70). Le test CCM de cette poudre soluble dans le chloroforme, montre une tache visible sous la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en noire après exposition à une solution d'acide sulfurique et chauffage.

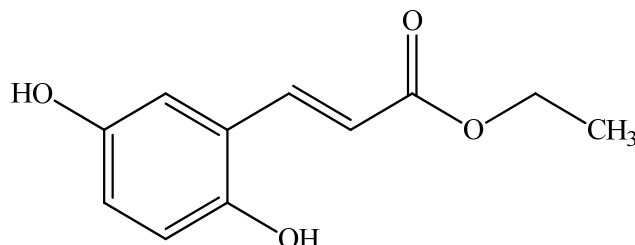


Figure II.70 : Structure du composé TH5

Le spectre ESI-MS (ESI<sup>-</sup>) (Figure II.71) du composé TH5 exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  207 [M-H]<sup>-</sup> et 415 [2M-H]<sup>-</sup> compatibles avec la formule moléculaire C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> (une masse moléculaire de 208 uma).

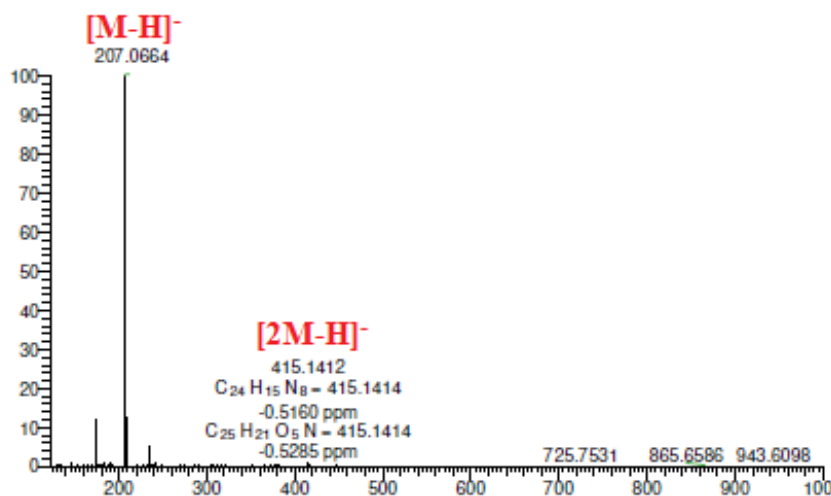


Figure II.71 : Spectre de masse (ions négatifs) du composé TH5

La petite masse moléculaire indiquée pour ce composé explique le nombre limité des absorptions observées sur les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. En effet, le spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure II.72) se divise en deux parties : la partie aromatique qui compte cinq signaux s'intégrant pour 1H chacun et une partie aliphatique exprimée par deux signaux, l'un est déblindé sortant à 4,22 ppm sous forme d'un quadruplet et s'intégrant pour 2H correspondant à un groupement CH<sub>2</sub>, et le deuxième se révèle à 1,31 ppm sous forme d'un triplet et d'intégration 3H attribuable au groupement CH<sub>3</sub>.



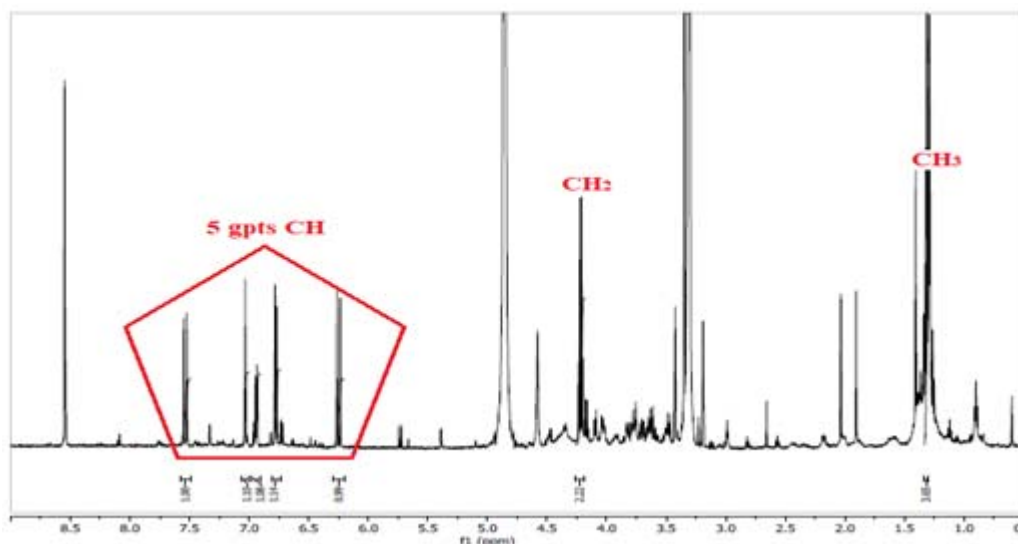


Figure II.72 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH5 enregistré dans le MeOD

Alors que le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure II.73) qui est moins prononcé par rapport au spectre RMN  $^1\text{H}$  revenant surtout à la mauvaise pureté d'un côté et la faible quantité d'un autre côté du composé TH5 ; révèle l'existence d'un pic déblindé correspond à un carbone tertiaire, quatre pics des groupements CH et deux derniers pics expliquant l'absorption de deux carbones aliphatiques, l'un entre eux est plus déblindé.

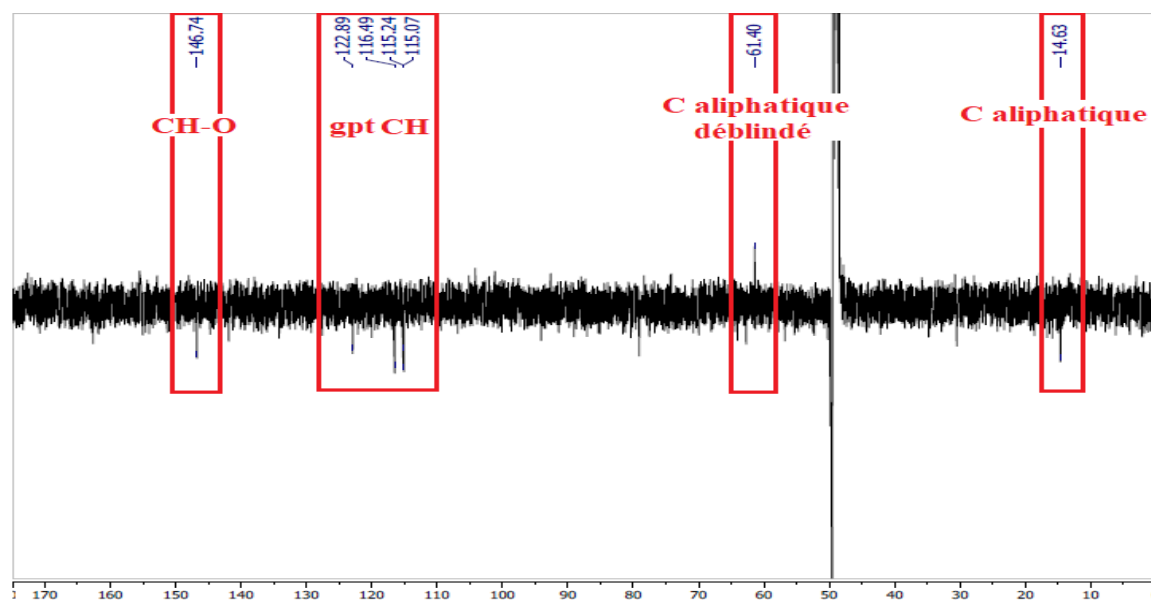


Figure II.73 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH5 enregistré dans le MeOD

Par ailleurs, on peut distinguer deux fragments qui forment le squelette de ce composé à travers les corrélations visualisées sur l'expérience COSY H-H. L'interaction forte entre les groupements  $\text{CH}_2$  (4,22 ppm) et  $\text{CH}_3$  (1,31 ppm) sur le spectre COSY (Figure II.74) est interprétée par la valeur élevée de la constante de couplage estimée par  $J = 7,1$  Hz, ceci traduit

un système de couplage faible  $A_3X_2$  facile à détecter et donc indiquant la présence d'un enchainement nommé ( $-^4\text{CH}_2-^5\text{CH}_3$ ). Le déplacement chimique des protons du groupement  $\text{CH}_2$  déblindé suppose l'existence d'un groupement étoxyle ( $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

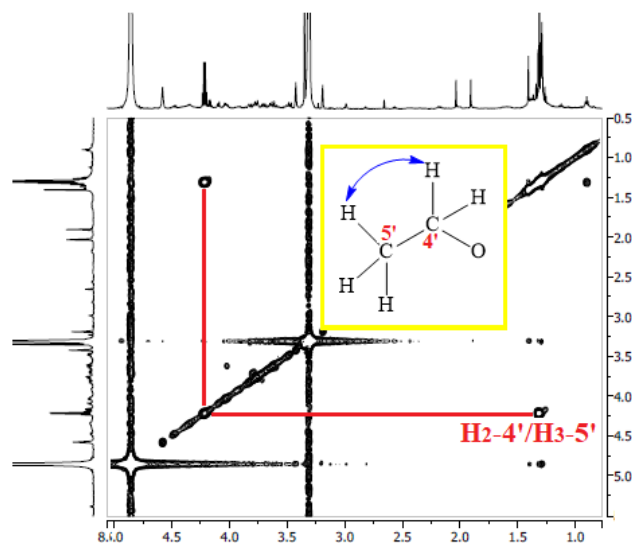


Figure II.74 : Spectre COSY du composé TH5

Les taches de corrélation observées de ce fragment sur le spectre HSQC (Figure II.75) permettent de localiser ses carbones à 14,5 ppm ( $5'-\text{CH}_3$ ) et 61,3 ppm ( $4'-\text{CH}_2$ ) ; le déplacement chimique du carbone de ce dernier traduit fermement sa connectivité à un oxygène comme nous l'avons déjà mentionné.

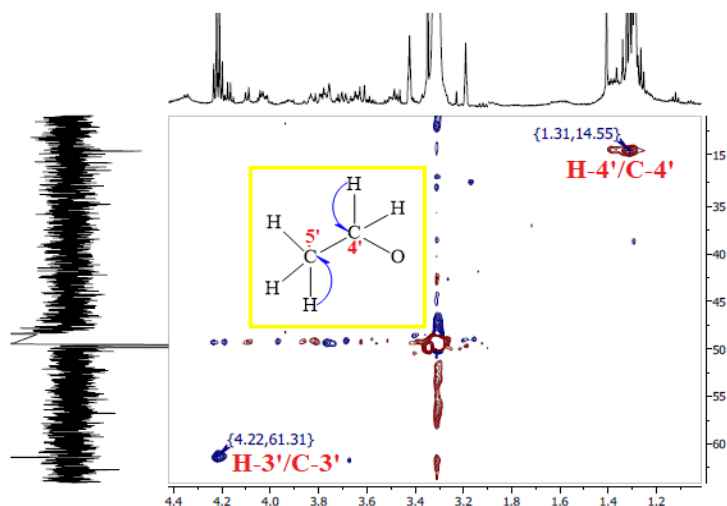


Figure II.75 : Spectre HSQC du composé TH5

Dans la continuation d'analyser le spectre COSY (Figure II.76), les signaux situés à  $\delta_{\text{H}}$  6,77, 6,94 et 7,03 sont engagés dans un système de spin de type ABX d'un noyau benzénique

tri-substitué. Les valeurs de constantes de couplage calculés et les multiplicités se représentent comme suit :

- › Les signaux à  $\delta_H$  6,77 (1H, *d*) et  $\delta_H$  6,94 (1H, *dd*) attribuables aux protons H-3 et H-4 respectivement, sont fortement couplés entre eux, dus à la grande valeur de constante de couplage qui est de l'ordre de  $J = 8,2$  Hz (couplage *ortho*).
- › Les signaux à  $\delta_H$  6,94 (1H, *dd*) et  $\delta_H$  7,03 (1H, *d*) correspondant aux protons H-4 et H-6 respectivement, considérant comme faiblement couplés, vu la petite valeur  $J = 2,1$  Hz (couplage *méta*).

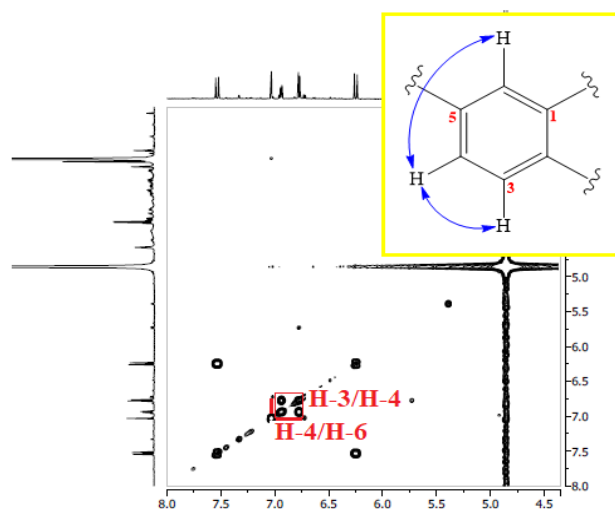


Figure II.76 : Spectre COSY du composé TH5

L'analyse du spectre HSQC (Figure II.77) conduit tout simplement à caractériser les carbones C-3, C-4 et C-6 à  $\delta_C$  116,5, 122,9 et 115,1 respectivement.

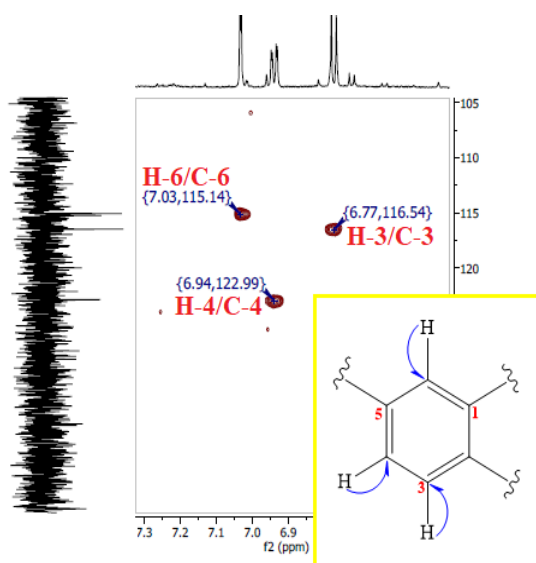
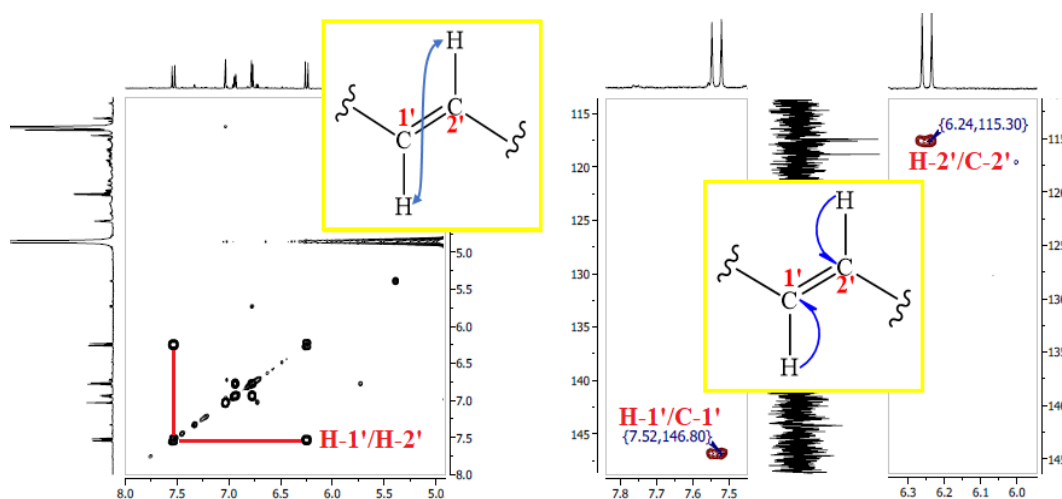


Figure II.77 : Spectres HSQC du composé TH5

Restant dans la même zone spectrale du spectre COSY (Figure II.78), on distingue une corrélation entre deux protons localisés à  $\delta_H$  6,25 et 7,53 faisant partie d'un système de spins AX, d'un fragment éthylénique ( $^1\text{CH}=\text{}^2\text{CH}$ ) avec une constante de couplage  $J = 15,8$  Hz (couplage *trans*).

L'analyse du spectre HSQC (Figure II.78) assigne aux carbones C-1' et C-2' les résonances suivantes :  $\delta_C$  146,8 et 115,3 respectivement.



**Figure II.78 : Spectres COSY et HSQC du composé TH5**

La discussion est achevée en explorant les données du spectre HMBC via la caractérisation des carbones non déterminés et positionnant les fragments structuraux précédents les uns par rapport aux autres.

En effet, ce spectre (Figure II.79) visualise les corrélations en  $^2J$  entre les protons H-4 et H-6 et un carbone aromatique oxygéné C-2 situé à  $\delta_C$  149,6. On remarque également que les mêmes protons (H-4, H-6) montrent des corrélations en  $^3J$  avec un carbone aromatique oxygéné C-5 à  $\delta_C$  146,9. Les grandes valeurs de déplacements chimiques de ces carbones, ainsi que l'absence des fractions substitutionnelles lors de cette analyse suggèrent l'emplacement des groupements hydroxyles en positions 2 et 5.

Par ailleurs, le proton H-3 permet de caractériser le déplacement chimique du carbone C-1 à 127,7 ppm, vu sa corrélation H-3/C-1 sur le spectre HMBC (Figure II.79).

Concernant le groupement éthylène, son point de fixation (Figure II.79) est déterminé suite à la tache d'interaction entre le proton H-1' et le carbone aromatique C-1 déjà identifié. On distingue également sur le spectre HMBC d'autres corrélations entre H-6/C-4, H-4/C-6 et H-1'/C-6.

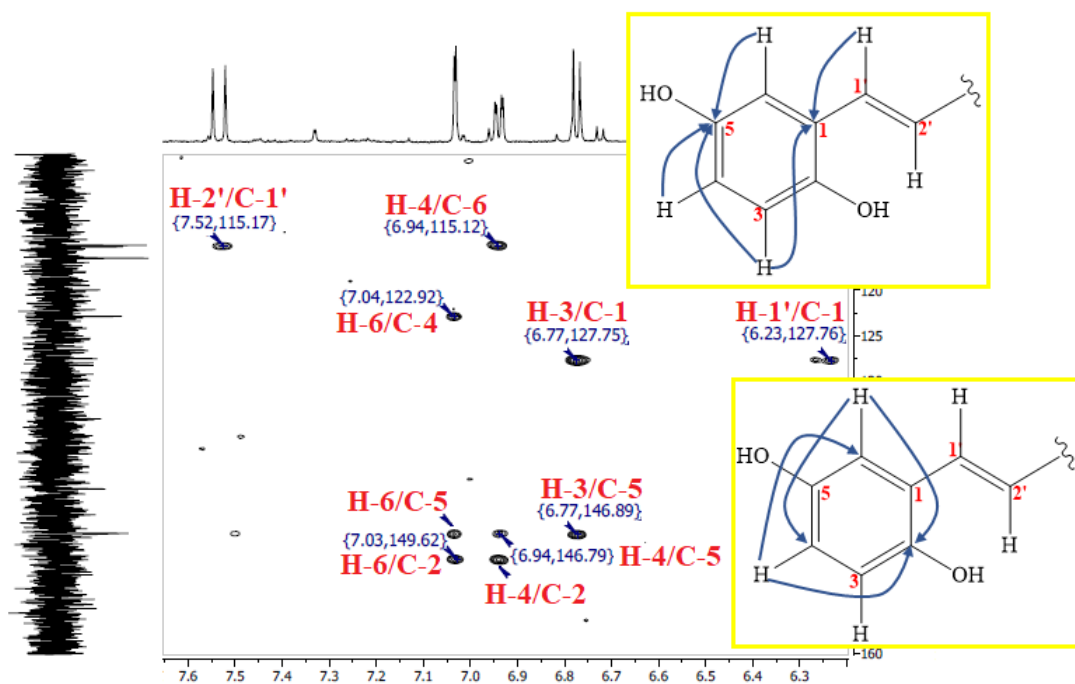


Figure II.79 : Spectre HMBC du composé TH5

La tache de corrélation observée sur le spectre HMBC (Figure II.80) entre les protons H<sub>2</sub>-4' du groupement éthoxyle et un carbone très déblindé résonant à  $\delta_c$  169,3 attribué à un carbonyle en position C-3'. Ce spectre exhibe aussi une corrélation longue distance en  $^3J$  entre le proton vinylique H-1' et ce carbonyle C-3' permettant de former la structure finale du composé TH5.

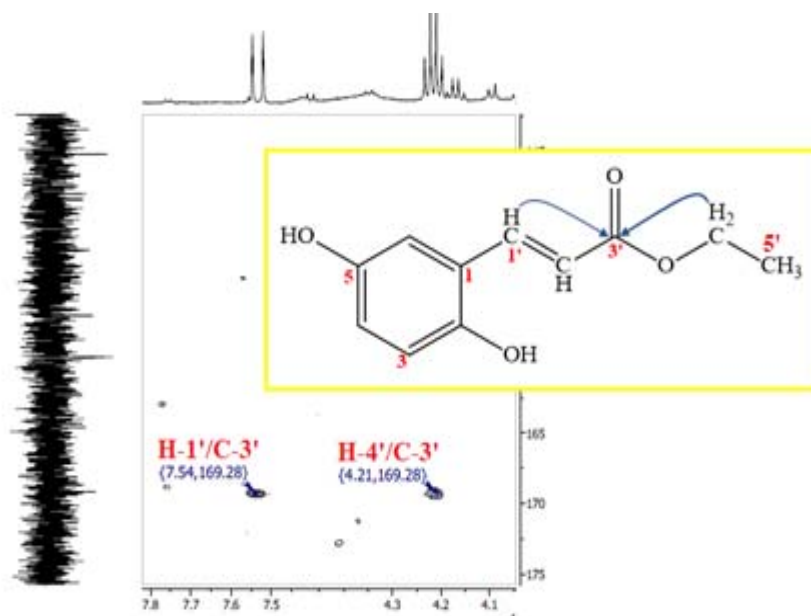


Figure II.80 : Spectre HMBC du composé TH5

Ce composé a été identifié sans ambiguïté au **2,5-dihydroxyethyl cinnamate** (Figure II.81) suite à la comparaison de ses données spectrales (Tableau II.5), avec celles de la littérature [89]. Ce composé est évalué pour leurs activités antifongiques *in vitro* contre quatre champignons phytopathogènes par la méthode du taux de croissance du mycélium [89].

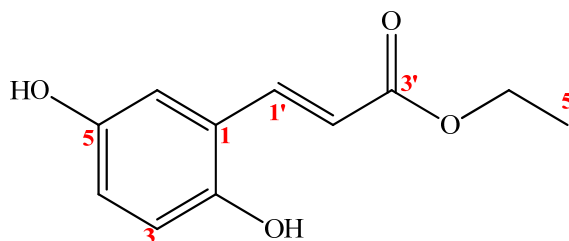


Figure II.81 :2,5-dihydroxyethyl cinnamate (TH5)

Tableau II.5 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH5 (MeOD)

Position	TH5	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, M, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	127,7
2	-	149,6
3	6,77 (1H, <i>d</i> ,8,2)	116,5
4	6,94 (1H, <i>dd</i> ,8,2 ; 2,1)	122,9
5	-	146,9
6	7,03 (1H, <i>d</i> ,2,1)	115,1
1'	7,53 (1H, <i>d</i> , 15,8)	146,8
2'	6,25 (1H, <i>d</i> , 15,8)	115,3
3'	-	169,2
4'	4,22 (2H, <i>q</i> ,7,1)	61,3
5'	1,31 (1H, <i>t</i> ,7,1)	14,5

## 6. Composé TH6

Le composé **TH6** (Figure II.82) est isolé sous forme d'une poudre blanche. Le test CCM de ce composé montre une tache visible sous la lumière UV à 254 nm qui se colore en rouge marron après la révélation par l'acide sulfurique et chauffage.

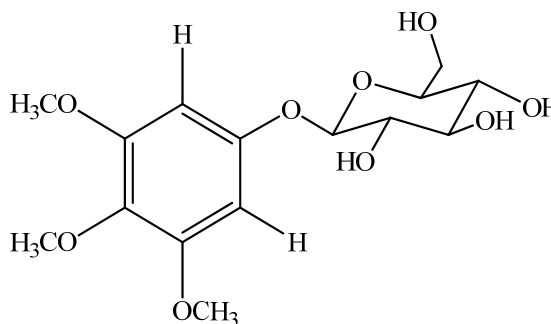


Figure II.682: Structure du composé TH6

La formule moléculaire  $C_{15}H_{22}O_9$  du composé **TH6**, établie par le spectre de masse ESI-MS (Figure II.83) s'accorde bien avec les pics pseudomoléculaires à  $m/z347$   $[M+H]^+$  (ion positif) et à  $m/z391$   $[(M+HCOOH)-H]^-$  (ion négatif). Les valeurs sont compatibles avec une masse moléculaire de 346 uma.

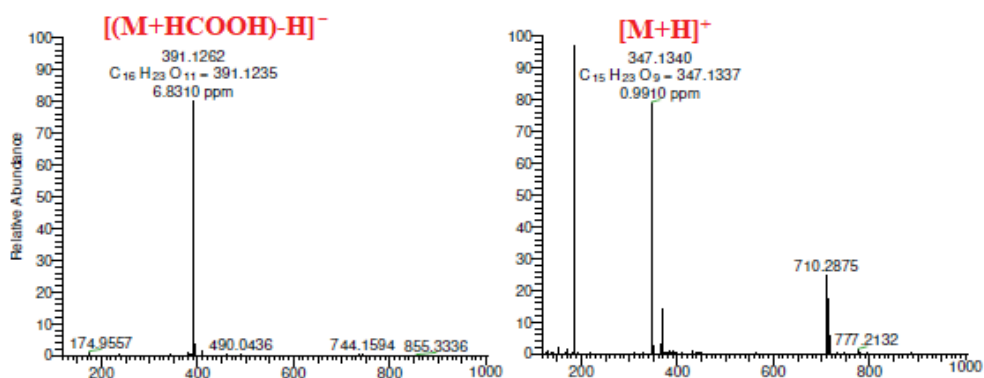


Figure II.83 : Spectre de masse du composé TH6

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure II.84) de ce composé réunit des pics de résonances magnétiques qui représentent différents types de protons appartenant à des environnements chimiques aromatiques et aliphatiques.

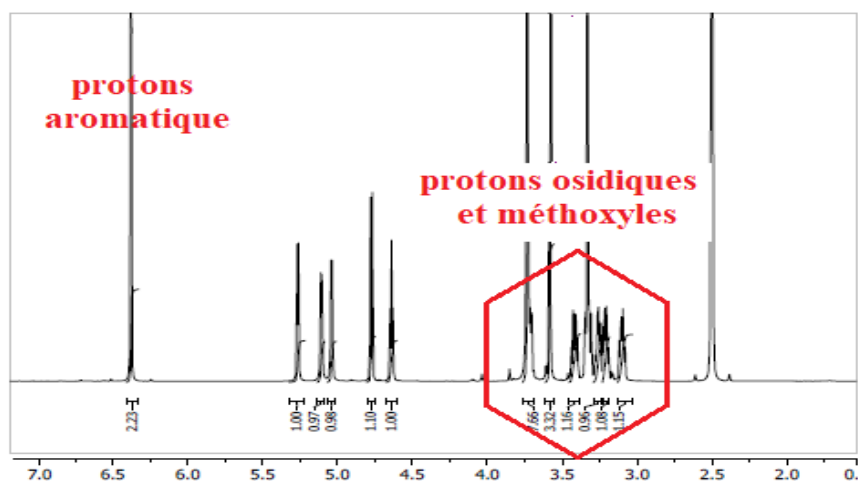


Figure II.84 : Spectre RMN  $^1H$  du composé TH6 (DMSO)

Le spectre RMN  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figure II.85) révèle des signaux d'absorption qui démontrent le caractère phénolique du composé **TH6**, dont l'intensité de certains pics implique la résonance de plus d'un carbone considéré équivalents ; ceci suppose bien évidemment la symétrie dans cette molécule. En plus, ce spectre indique l'existence des signaux d'un substituant osidique et de groupements méthoxyles.

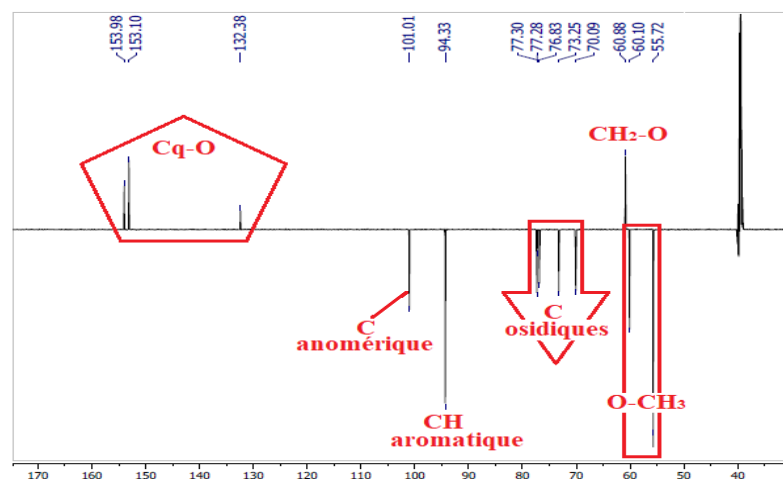


Figure II.86 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH6 (DMSO)

Le diagnostic conjoint des spectre RMN  $^1\text{H}$  et COSY (Figure II.87) du composé TH6 atteste la présence d'un noyau aromatique symétrique tétra-substitué. En fait, le spectre RMN  $^1\text{H}$  exhibe une zone aromatique très claire contenant un seul pic singulet très intense déterminé par la valeur 6,38 ppm et s'intégrant pour 2H correspondant à deux protons aromatiques équivalents nommés H-2',6' *mé*ta-positionnés l'un par rapport à l'autre. L'absence d'une interaction H-H sur le spectre COSY dans cette zone plaide en faveur d'une symétrie de ce noyau. Leurs carbones ont été déterminés à 94,2 ppm suite à la corrélation H/C visualisée sur le spectre HSQC (Figure II.87).

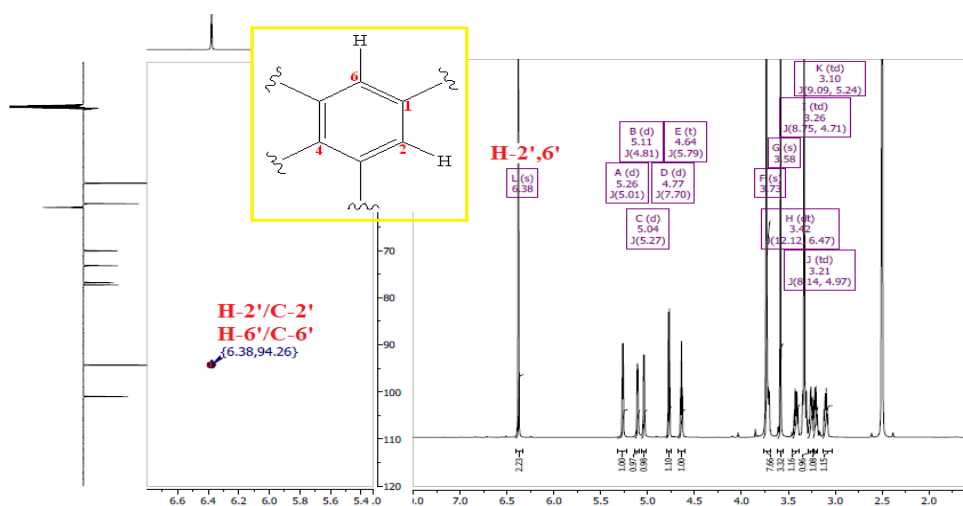
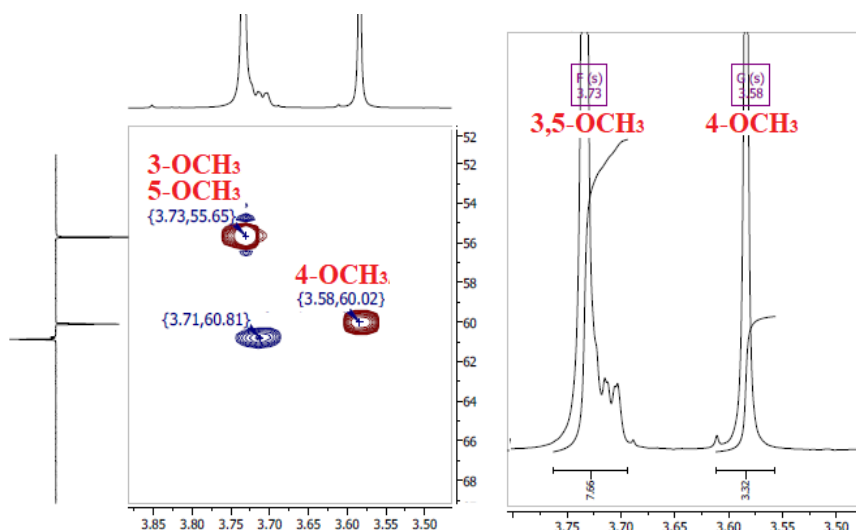


Figure II.87 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC du composé TH6 (DMSO)

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.88) contient également les résonances protoniques sous formes de singulets ayant des intensités fortes qui témoignent structurellement de l'existence des groupements méthoxyles, le premier signal situé à  $\delta_{\text{H}}$  3,58 (3H) correspondant au 4-OCH<sub>3</sub> et le deuxième localisé à  $\delta_{\text{H}}$  3,73 (6H) attribuable à deux groupements symétriques 3,5-OCH<sub>3</sub>.

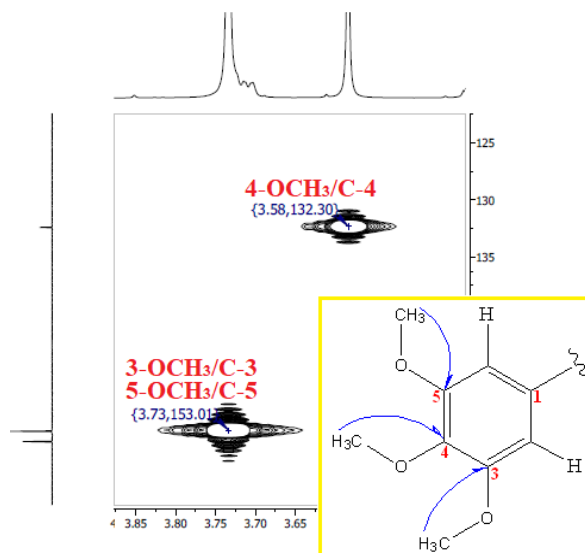


Les déplacements chimiques des leurs carbones sont assignés à travers l'expérience HSQC (Figure II.88) à 60,0 ppm (4-OCH<sub>3</sub>) et 55,6 ppm (3,5-OCH<sub>3</sub>).



**Figure II.88 : Spectres RMN <sup>1</sup>H et HSQC du composé TH6 (DMSO)**

La mise en ordre de ces groupements est notablement établie sur la base des données extraites de l'expérience HMBC via les corrélations en <sup>3</sup>J créées par les protons 4-OCH<sub>3</sub> avec le carbone C-4 qui absorbe à 132,3 ppm, et les corrélations symétriques en <sup>3</sup>J produites par les protons 3,5-OCH<sub>3</sub> avec les carbones C-3,5 localisés à 153,0 ppm (Figure II.89).



**Figure II.89 : Spectre HMBC du composé TH6 montrant le branchement des groupements méthoxyles**

On remarque effectivement sur le même spectre (Figure II.90) les interactions longue distance qui confirment bien la localisation des carbones assignés à ce noyau : H-2/C-6, H-6/C-2, H-2,6/C-4, H-2/C-3 et H-6/C-5.

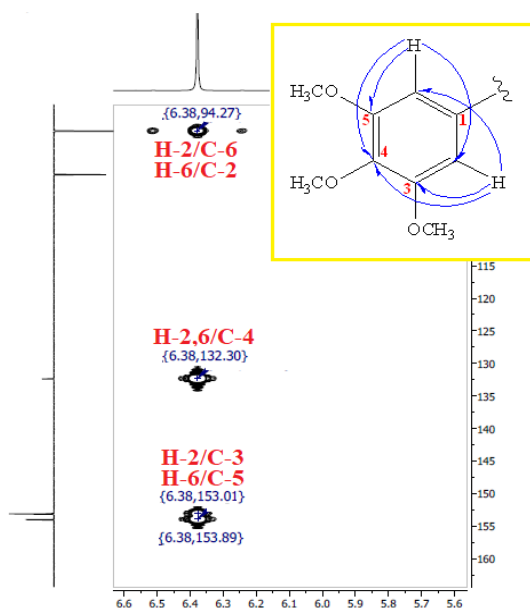
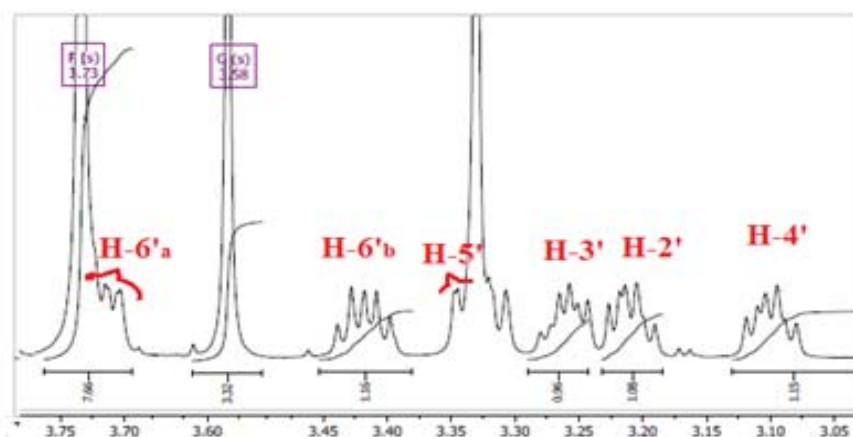


Figure II.90 : Spectre HMBC du composé TH6

Le fragment hexose a été représenté par l'ensemble des signaux restants sur les spectres RMN <sup>1</sup>H (Figure II.90) et COSY (Figure II.91) :

- > Le signal du proton anomérique H-1' à  $\delta_H$  4,77 (*d*,  $J = 7,7$  Hz).
- > Les autres signaux qui absorbent à  $\delta_H$  3,21 ; 3,26 ; 3,10 ; 3,33 ; 3,71 et 3,42 sont affectés aux protons H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a et H-6'b respectivement.
- > Les signaux relatifs aux protons des hydroxyles libres de cet hexose situés à  $\delta_H$  5,26 (*d*,  $J = 5,0$  Hz, 2'-OH),  $\delta_H$  5,11 (*d*,  $J = 4,8$  Hz, 3'-OH),  $\delta_H$  5,04 (*d*,  $J = 5,3$  Hz, 4'-OH) et  $\delta_H$  4,64 (*t*,  $J = 5.6$  Hz, 6'-OH).

La  $\beta$ -D-glucose est l'unité établie dans notre cas vu les constantes de couplage élevées de tous les protons et surtout le proton anomérique ( $J_{H-1'/H-2'} = 7,7$  Hz).



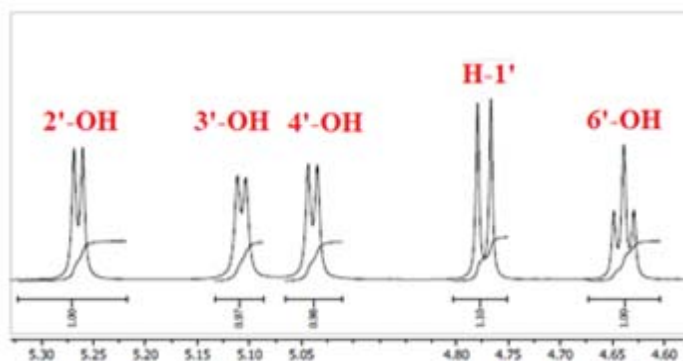


Figure II.91 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  de la partie osidique du composé TH6 (DMSO)

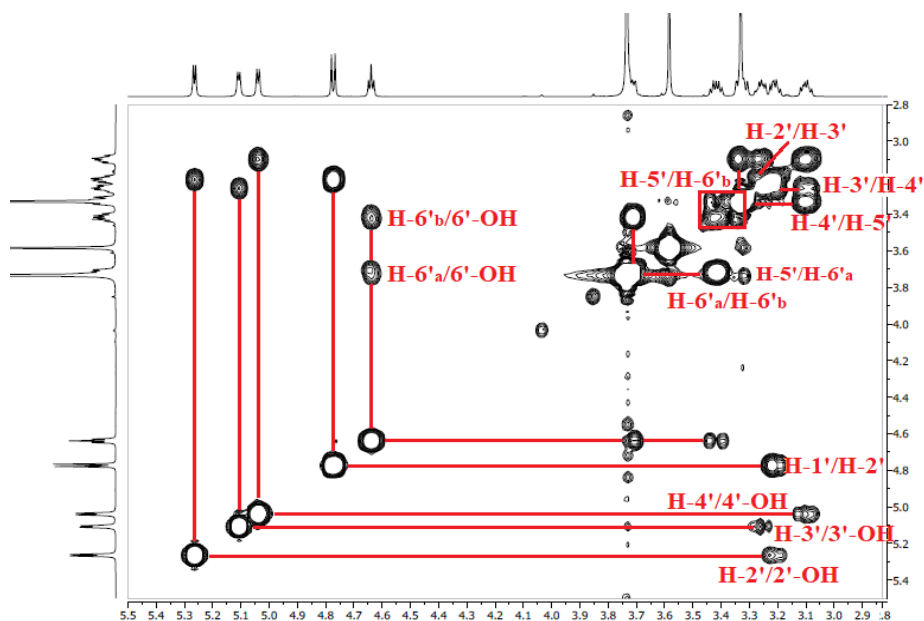
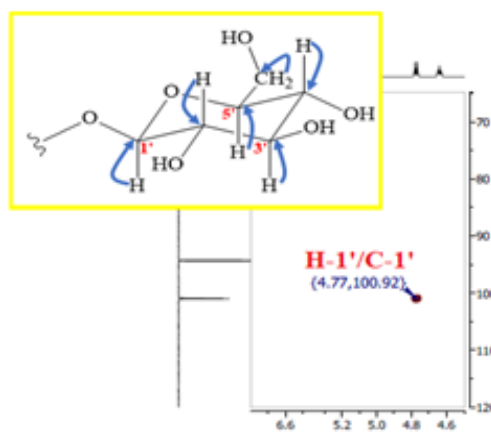
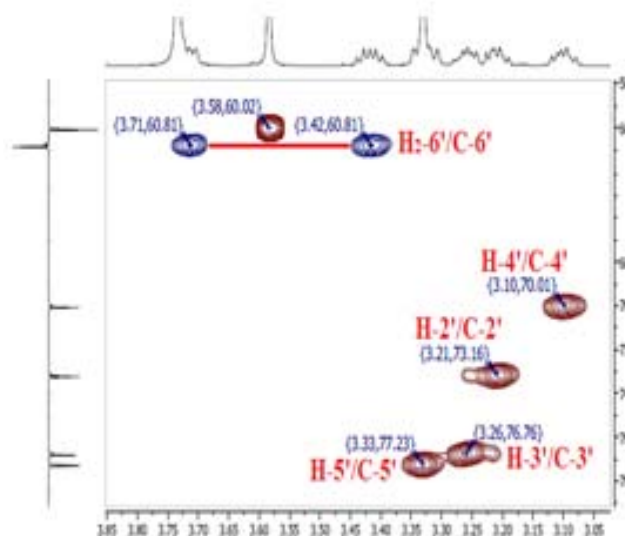


Figure II.92 : Corrélations sur le spectre COSY de la partie osidique du composé TH6

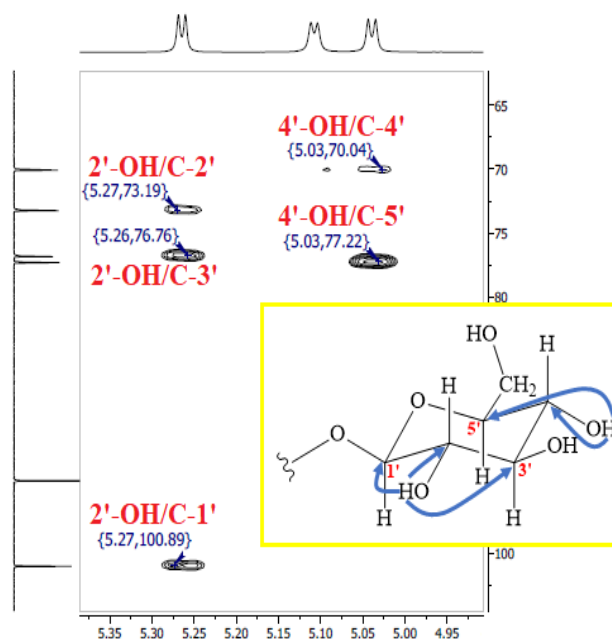
Par ailleurs, les couplages en HSQC (Figure II.93) facilitent l'identification des carbones osidiques résonant à  $\delta_{\text{C}}$  100,9 (C-1'), 73,2 (C-2'), 76,8 (C-3'), 70,0 (C-4'), 77,2 (C-5') et 60,8 (C-6').





**Figure II.93 : Corrélations HSQC de la partie osidique du composé TH6**

Le spectre HMBC (Figure II.94) montre quelques corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  du  $\beta$ -D-glucose entre les protons des groupements hydroxyles et les carbones qui les portent ou adjacents : 2'-OH/C-1', C-2'/C-3', 4'-OH/C-4' et C-5'.



**Figure II.94 : Corrélations HMBC de la partie osidique du composé TH6**

Le carbone aromatique quaternaire C-1 est déterminé à  $\delta_H$  154,0 comme un point d'encrage du fragment glucosidique avec le noyau aromatique à travers la corrélation en  $^3J$  visualisé sur le spectre HMBC (Figure II.95) entre le proton anomérique H-1' et ce carbone (C-1). En parallèle, le spectre HMBC exhibe les corrélations des protons H-2',6' avec le carbone C-1.

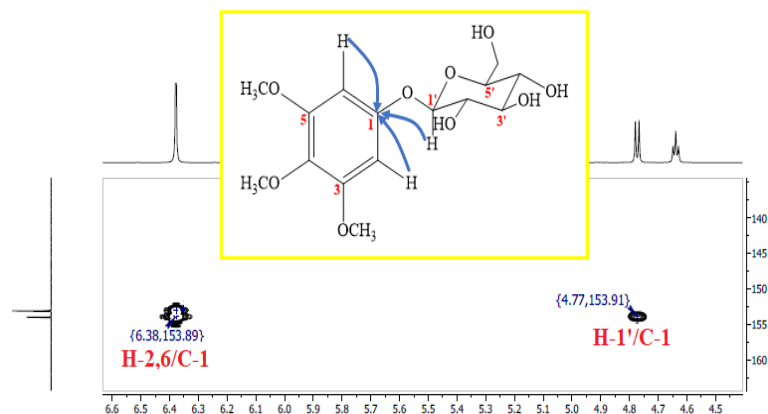


Figure II.95 : Corrélations HMBC du composé TH6

Les protons aromatiques H-2,6 et le proton anomérique H-1' sont considérés spatialement très proches suite à l'interaction ROE observée sur le spectre ROESY (Figure II.96), ce qui confirme l'attachement de cette unité glucosidique au carbone C-1.

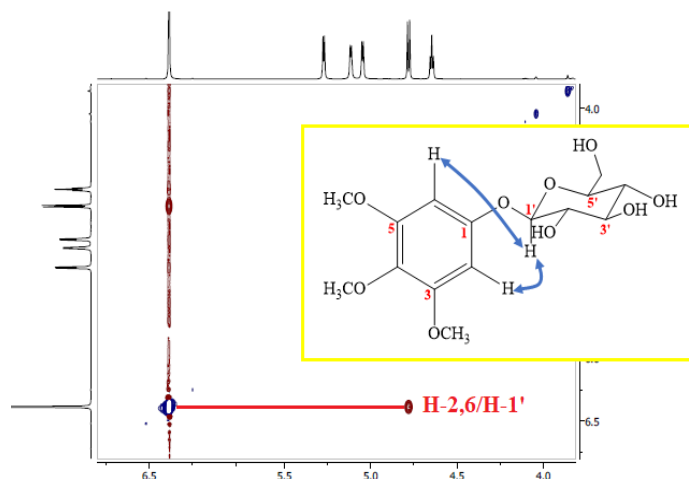


Figure II.96 : Corrélations ROESY du composé TH6

Ces données spectroscopiques (Tableau II.6) comparées avec celles de la littérature <sup>[90]</sup> ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -21,0$  ( $c$  0,23, MeOH), nous ont conduit à attribuer au composé TH9 (Figure II.97) le squelette ci-dessous nommé : **3,4,5-triméthoxyphényl  $\beta$ -D-glucopyranoside**.

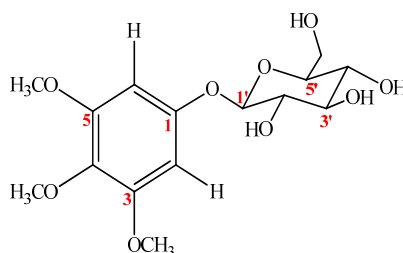


Figure II.97 : 3,4,5-triméthoxyphényl  $\beta$ -D-glucopyranoside (TH6)

Tableau II.6 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH6 (DMSO)

Position	TH6	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	153,9
2	6,38 (1H, s)	94,2
3	-	153,0
4	-	132,3
5	-	153,0
6	6,38 (1H, s)	94,2
1'	4,77 (1H, d, 7,70)	146,8
2'	3,21(1H, td, 8,14 ; 4,97)	115,3
3'	3,26 (1H, td, 8,75 ; 4,71)	169,2
4'	3,10 (1H, td, 9,09 ; 5,24)	61,3
5'	3,33 (1H, m)	14,5
6'a	3,31 (1H, m)	101,0
6'b	3,42 (1H, dt, 12,12 ; 6,47)	
3-OCH <sub>3</sub>	3,73 (3H, s)	73,1
4-OCH <sub>3</sub>	3,58 (3H, s)	76,7
5-OCH <sub>3</sub>	3,73 (3H, s)	70,0
2'-OH	5,26 (1H, d, 5,01)	77,2
3'-OH	5,11 (1H, d, 4,81)	60,8
4'-OH	5,04 (1H, d, 5,27)	55,6
6'-OH	4,64 (1H, d, 5,79)	60,0

## 7. Composé TH7

La poudre blanche, la visibilité de la tache sous la lumière UV à 254 nm suite à un test CCM et sa coloration en jaune noire après révélation et chauffage sont les caractéristiques qui distinguent le produit TH7 (Figure II.98) dans son état pur.

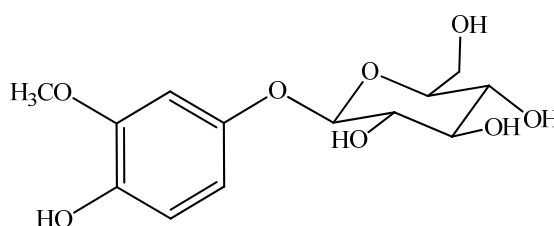


Figure II.98 : Structure du composé TH7

Le composé TH7 révèle un pic d'ion pseudomoléculaires  $[(\text{M}+\text{HCOOH})-\text{H}]^-$  à  $m/z$  347 dans le spectre de masse MS-ESI en mode négatif, et deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  accordant à  $m/z$  325 et  $m/z$  627 respectivement dans le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure II.99). Ces calculs massiques sont tous compatibles avec une masse moléculaire de 302 uma et une formule brute en  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_8$ .

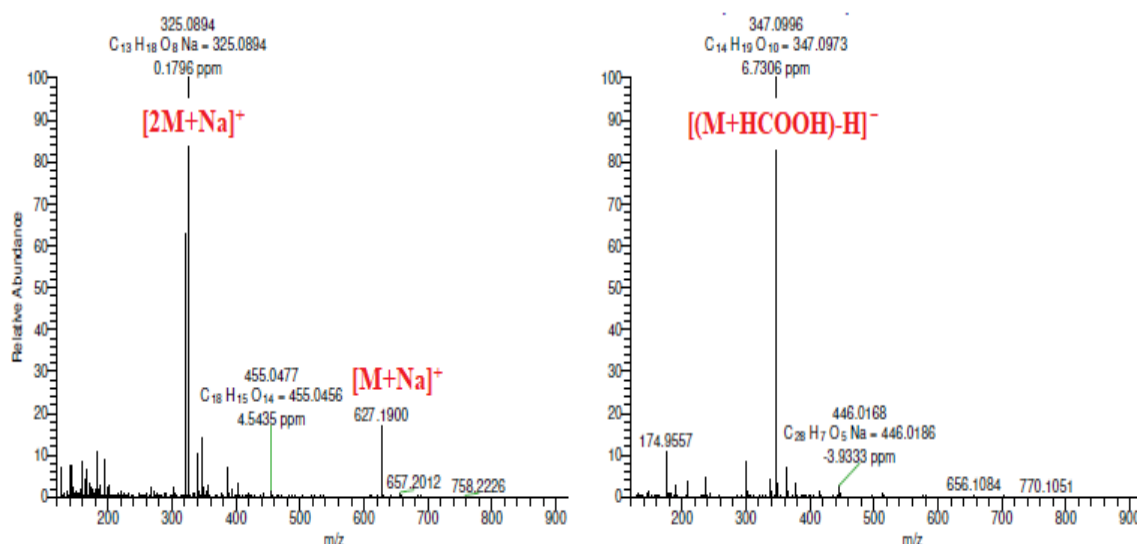


Figure II.99 : Spectres de masse en modes positif et négatif du composé TH7

Une zone aromatique en addition à une autre zone osidique moins sont les parties principales constituant le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.100) de ce composé. Les caractéristiques spectrales mettent en évidence une structure phénolique monoglucosylée, comme dans le cas du composé précédent TH6.

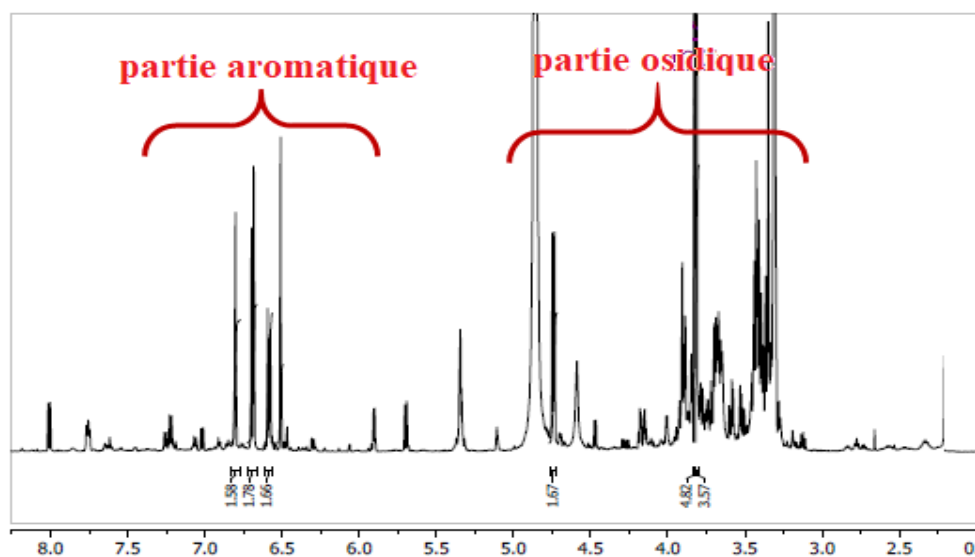


Figure II.100 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH7 (MeOD)

Analogiquement avec le spectre RMN  $^1\text{H}$ , les données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure II.101) révèlent le même type de signaux du composé TH7 comprenant des carbones aromatiques distribués entre des carbones quaternaires oxygénés Cq-O et des groupements aromatiques C-H et des carbones osidiques.

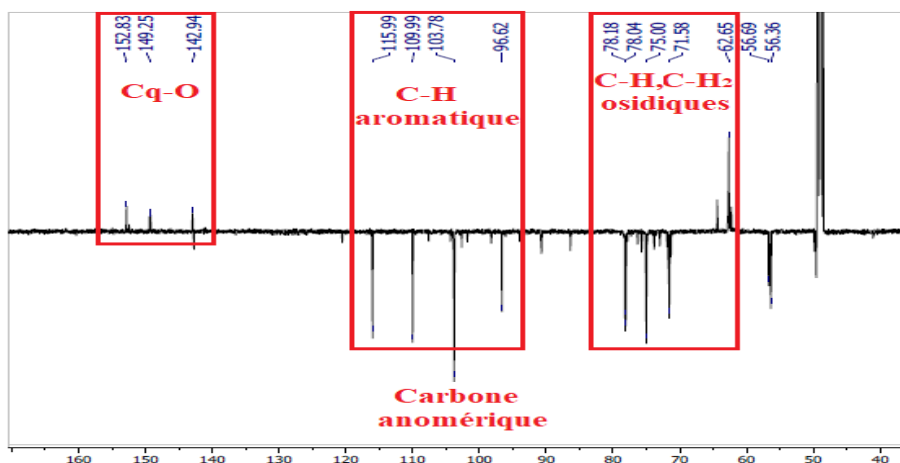


Figure II.101 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH7 (MeOD)

Contrairement à son analogue TH6, les trois signaux existants sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.100) couplent entre eux. Les corrélations H-H sont illustrées sur le spectre COSY (Figure II.102) ce qui exclut la symétrie au niveau du noyau aromatique. Sur la base des facteurs de la multiplicité et les valeurs de constantes de couplage, il à noter ce qui suit :

- > Le pic résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,58 correspondant à un proton appelé H-6, il couple avec un proton nommé H-2 sortant à  $\delta_{\text{H}}$  6,80 sous forme d'un doublet avec une petite constante de couplage calculé  $J = 2,6$  Hz qui laisse envisager un *mé*ta-couplage entre eux.
- > D'autre part, le même proton H-6 corrèle avec un autre proton appelé H-5 qui absorbe à  $\delta_{\text{H}}$  6,69 en un *ortho*-couplage traduisant par la grande valeur de constante de couplage  $J = 8,6$  Hz.

De ce fait, l'apparition de proton H-6 en une multiplicité de doublet de doublet (*dd*) est fortement justifiée en raison des interactions des protons H-2 et H-5.

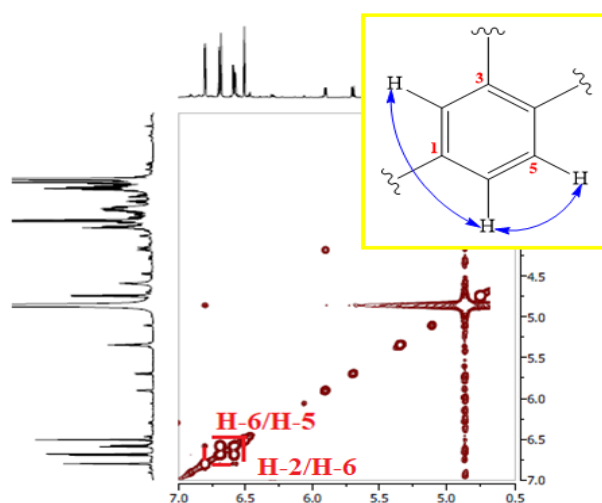


Figure II.102 : Spectre COSY du composé TH7



La traçabilité de ces trois protons sur le spectre HSQC (Figure II.103) aboutit à identifier aux carbones porteurs les déplacements chimiques suivants :  $\delta_C$  103,7 (C-2), 109,9 (C-6) et 116,0 (C-5).

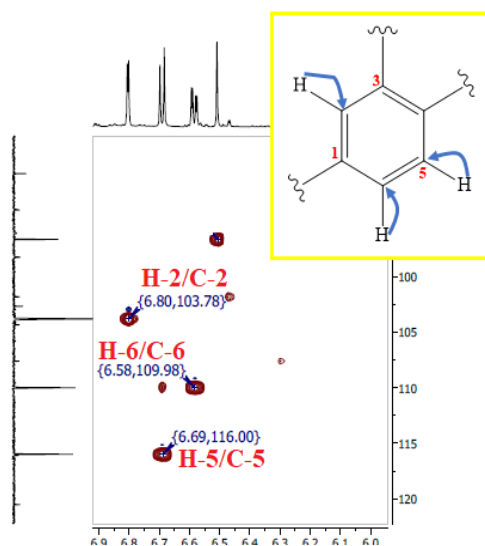


Figure II.103 : Spectre HSQC du composé TH7

Des taches de corrélations en  $^3J$  entre H-2/C-6 et H-6/C-2 sont établies en analysant le spectre HMBC (Figure II.104).

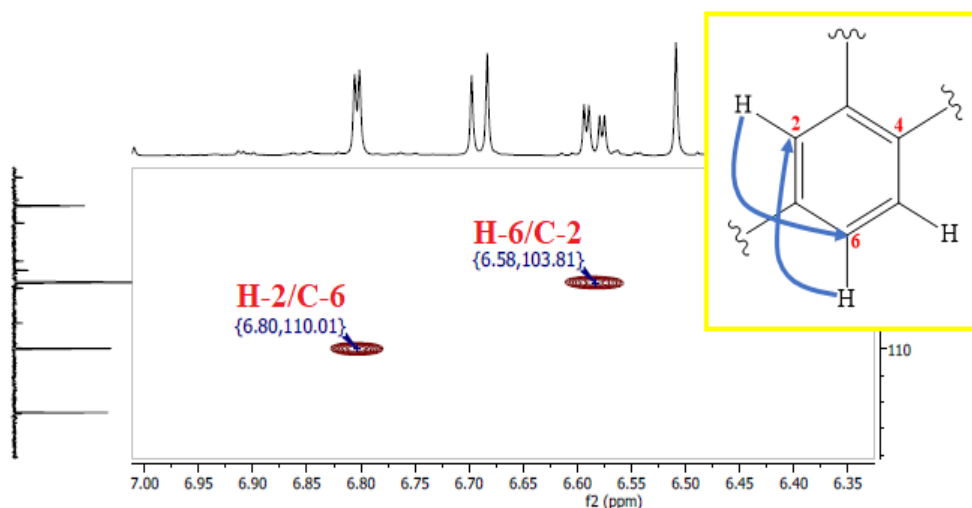


Figure II.104 : Spectre HMBC du composé TH7

Comme il a été mentionné précédemment, l'unité glycosidique est notamment constatée par l'absorption de son proton anomérique sur le spectre RMN  $^1H$  à  $\delta_H$  4,74 (1H, *d*) avec une constante de couplage  $J = 7,4$  Hz considérant élevé, ce qui permet de conclure que cette unité à une configuration  $\beta$  attendue. Les autres protons et leurs carbones (Tableau II.7) sont

caractérisés à travers le diagnostic combiné des expériences COSY (Figure II.105) et HSQC (Figure II.106).

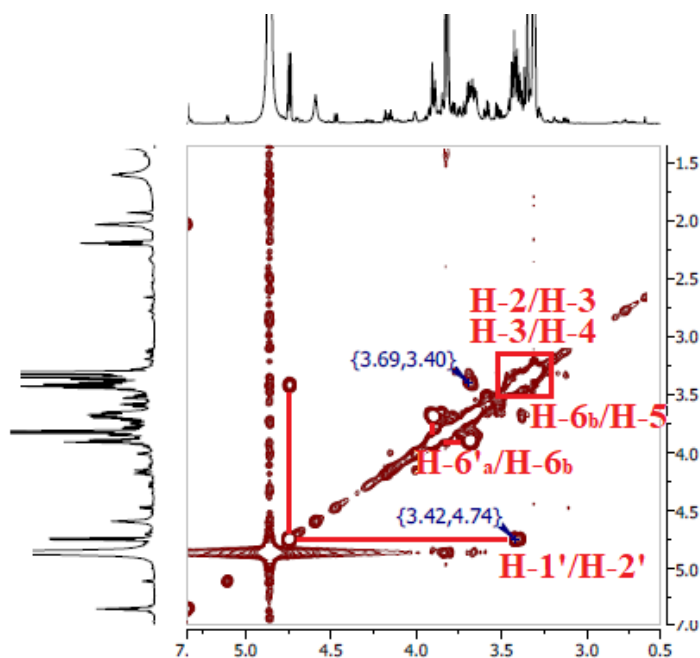


Figure II.105 : Spectre COSY de la partie osidique du composé TH7

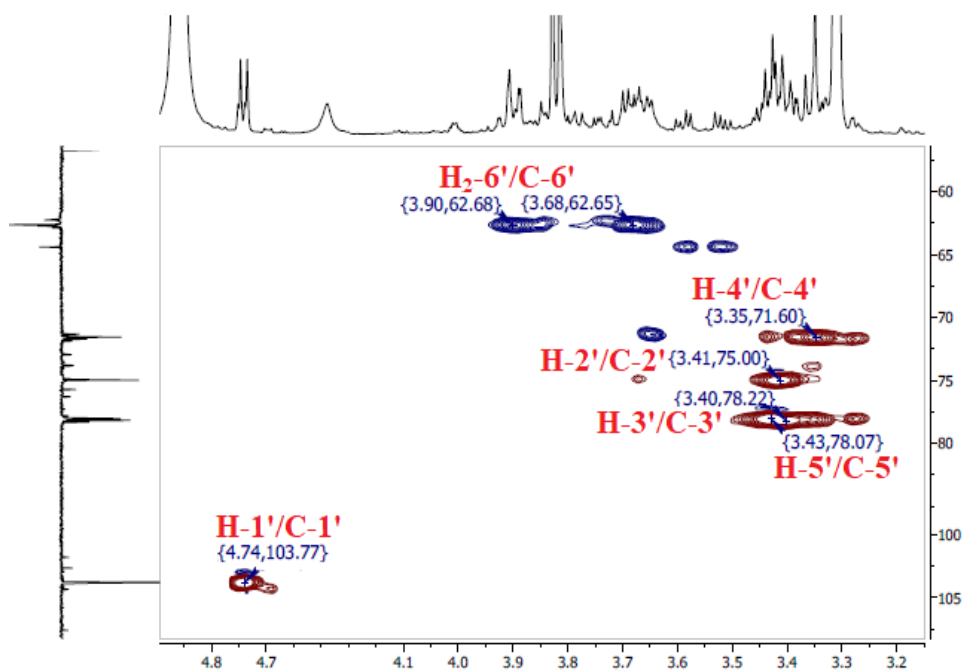
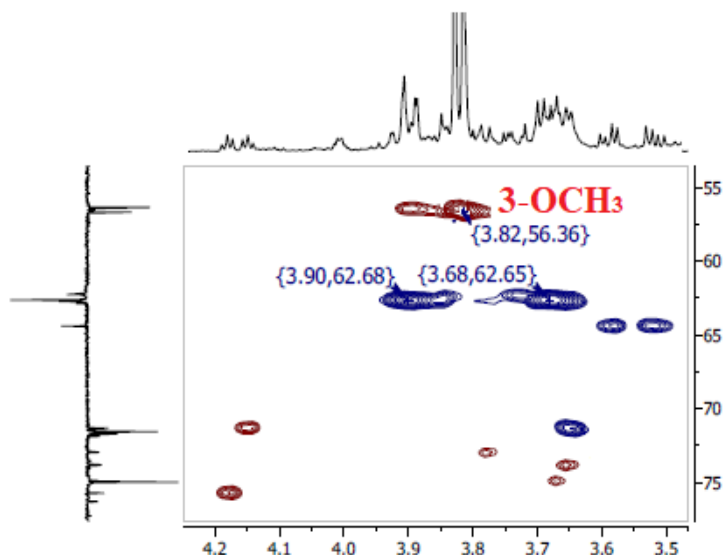


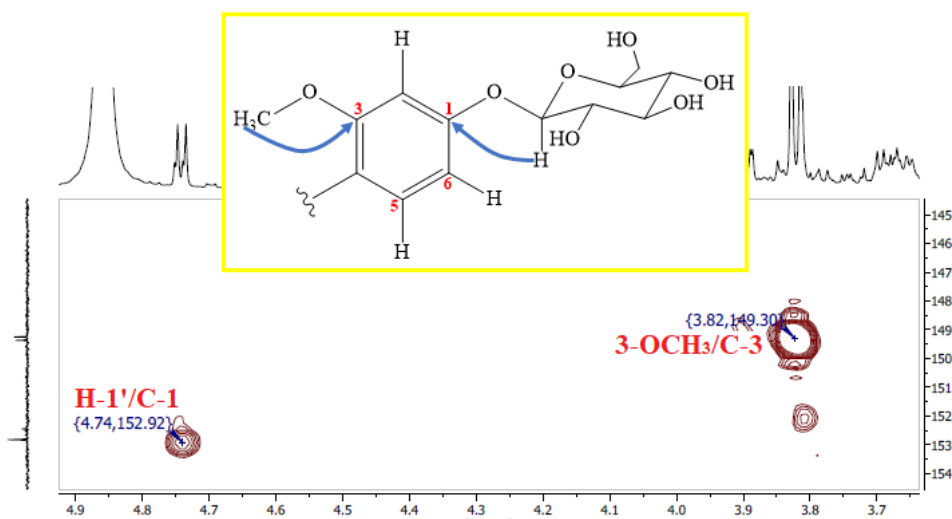
Figure II.106 : Spectre HSQC de la partie osidique du composé TH7

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  exhibe aussi un signal singulet intense situé à  $\delta_{\text{H}}$  3,81 accordé aux protons d'un groupement méthoxyle. Leur carbone résonne à  $\delta_{\text{C}}$  56,3 vu la corrélation marquée sur le spectre HSQC (Figure II.107).



**Figure II.107 : Spectre HSQC du substituant méthoxyle du composé TH7**

La structure de ce composé est devenue plus claire après avoir déterminé soigneusement les sites substitutionnels, en analysant l'expérience HMBC (Figure II.108). En effet, on distingue l'interactions entre le proton anomérique H-1' et un carbone quaternaire déblindé qui absorbe à  $\delta_{\text{C}}$  152,9 attribuable au carbone C-1 exprimant le point de branchement du  $\beta$ -D-glucosyle. L'interaction des trois protons méthoxyliques avec le carbone quaternaire localisé à  $\delta_{\text{C}}$  149,3 explique l'emplacement du méthoxyle sur le carbone C-3.



**Figure II.108 : Spectre HMBC du composé TH7 (MeOD)**

Le spectre HMBC (Figure II.109) permet aussi d'observer des corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  entre les protons H-2, H-5 et H-6 avec les carbones C-1 et C-3 précédemment identifiés.

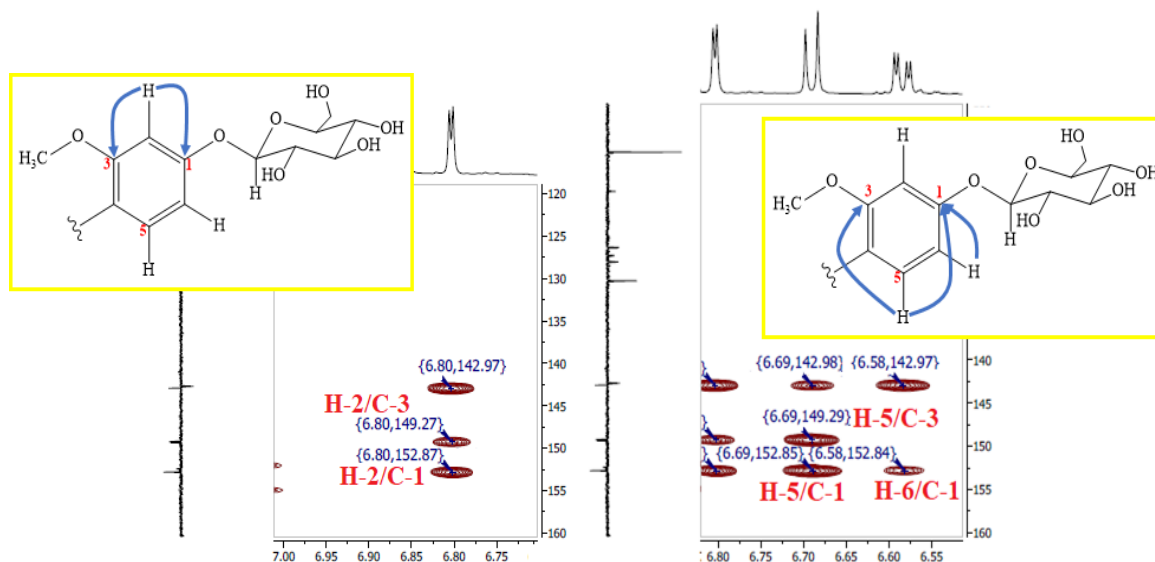


Figure II.109 : Spectres HMBC du composé TH7

Comme le diagnostic NOESY met en évidence les corrélations des protons qui sont spatialement proches, on remarque les corrélations entre H-2/H-1' et H-2/3-OCH<sub>3</sub> qui orientent effectivement ces substituants aux positions déjà décrites : 1-OGlu et 3-OCH<sub>3</sub> (Figure II.110).

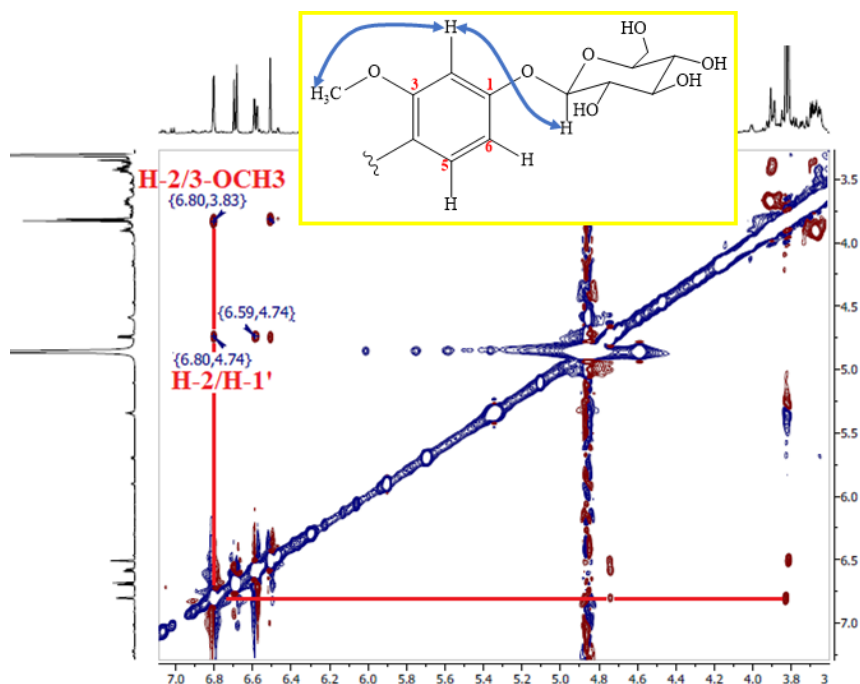


Figure II.110 : Spectre NOESY du composé TH7

Il reste le site 4 à caractériser ; en fait, l'examen du spectre HMBC (Figure II.111) montre trois taches d'interactions en  $^2J$  et  $^3J$  des trois protons H-2, H-5 et H-6 corrélant avec un carbone quaternaire oxygéné localisé à 142,9 ppm, cela ne pouvant être que le carbone C-4. Ce

carbone est attaché à un groupement OH en prenant en considération la valeur élevée de son déplacement chimique ainsi que la masse moléculaire déduite du spectre de masse.

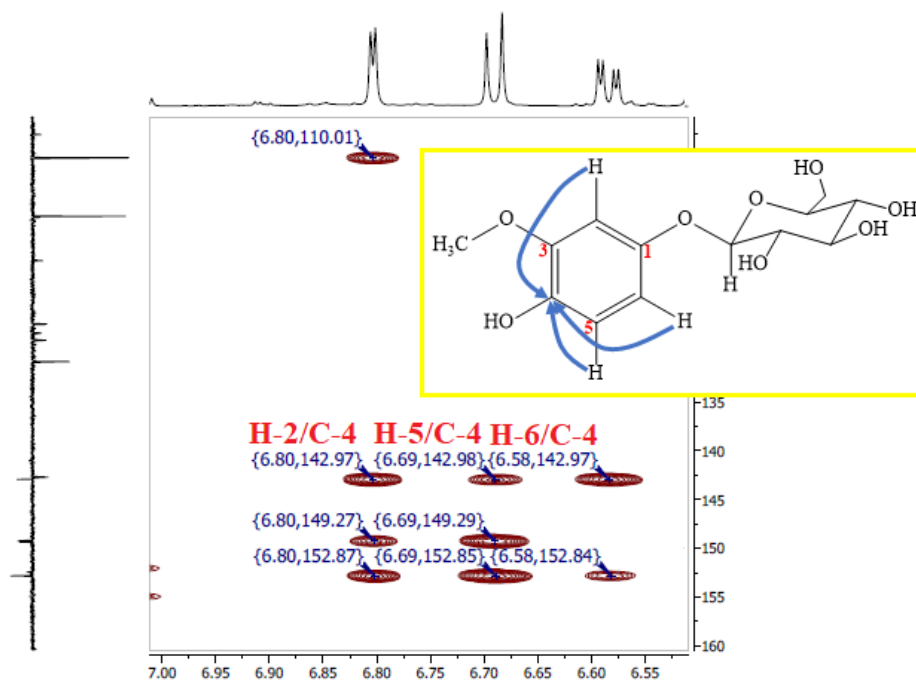


Figure II.111 : Spectre HMBC du composé TH7

Finalement, le composé **TH7** a été confirmé comme étant le **Tachioside** (Figure II.112), après une recherche avancée <sup>[91]</sup> en comparant ses constantes spectrales et la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -55,4$  (c 0,2, MeOH). Ce composé a été isolé antérieurement à partir de diverses espèces de *Bambou* et dévoile une capacité antioxydante significative contre le DPPH <sup>[92]</sup>. Le **Tachioside** a également des activités anti-obésité, antioxydante et inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase, il diminue la teneur en lipides dans les adipocytes 3T3-L1 en inhibant la lipogenèse, qui présente des activités anti-obésité <sup>[93]</sup>. Ce composé peut aussi inhiber la production d'oxyde nitrique dans les cellules RAW 264,7 stimulées par les lipopolysaccharides avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 12,14  $\mu$ M <sup>[93]</sup>.

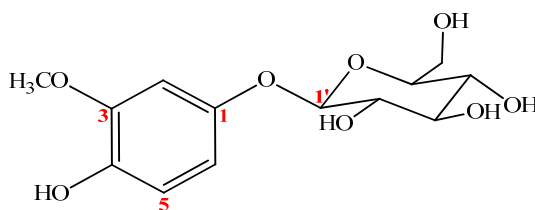


Figure II.112 : Tachioside (TH7)

Toutes les attributions protoniques et carboniques de ce composé sont reportées dans le tableau suivant (Tableau II.7).

Tableau II.7 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH7 (MeOD)

Position	TH7	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	152,8
2	6,80 (1H, d, 2,6)	96,6
3	-	149,2
4	-	142,9
5	6,69 (1H ;d, 8,6)	116,0
6	6,58 (1H ; dd, 8,6 ; 2,6)	109,9
1'	4,74 (1H ; d, 7,4)	103,7
2'	3,41 (1H ;d, 7,4)	75,0
3'	3,40 (1H ;dd, 9,3 ; 8,5)	78,2
4'	3,35 (1H ;t, 8,5)	71,6
5'	3,43 (1H ;m)	73,0
6'a	3,89 (1H ;dd, 10,9 ; 5,6)	62,6
6'b	3,68 (1H ;m)	
3-OCH <sub>3</sub>	3,81 (3H, s)	56,3

## 8. Composé TH8

Le composé **TH8** (Figure II.113) a été purifié sous forme d'une poudre blanche visible à la lumière UV (254 et 366 nm). Il donne une coloration jaune pâle en contact avec les vapeurs d'iode.

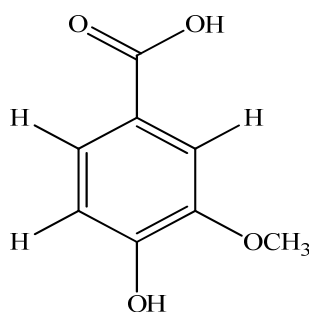
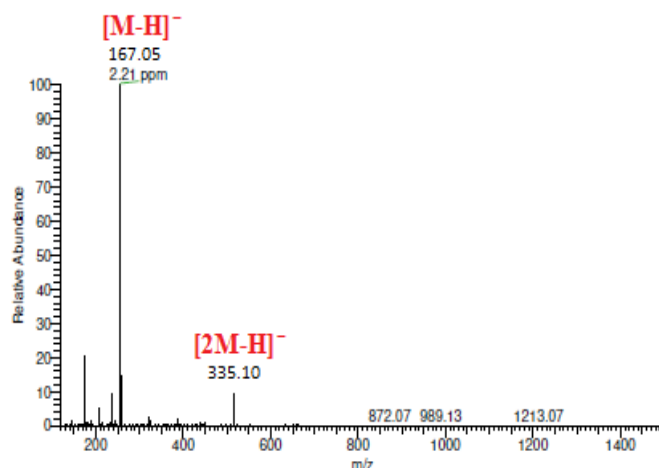


Figure II.113 : Structure du composé TH8

Le spectre de masse ESI-MS (Figure II.113) enregistré en mode négatif du composé **TH8** exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 167$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  et  $m/z = 335$   $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , ils se trouvent en concordance avec une masse moléculaire de 168 uma et une formule brute en  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ .



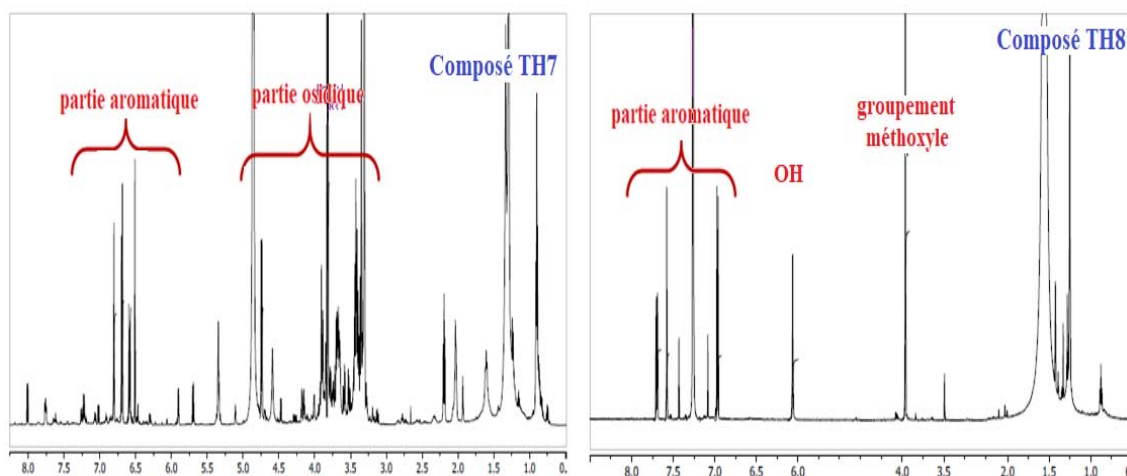
**Figure II.113 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé TH8**

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **TH8** montre qu'il est étroitement lié à celui du composé **TH7**, en particulier dans la partie aromatique. En effet, ce spectre (Figure II.114) révèle trois pics d'absorption à  $\delta_{\text{H}}$  7,58 (*d*,  $J = 1,9$  Hz), 6,97 (*d*,  $J = 8,3$  Hz) et 7,70 (*dd*,  $J = 8,3$  ; 1,9 Hz) correspondant aux protons appelés H-2, H-5 et H-6 respectivement, en formant un système de spins de type ABX d'un cycle aromatique tri-substitué.

On note aussi la présence d'un signal singulet intense à  $\delta_{\text{H}}$  3,96 correspondant à un groupement méthoxyle  $-\text{OCH}_3$ .

La différence remarquable du spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé par rapport à celui du composé **TH7** est la disparition des signaux du monoglucoside dans la zone de 3 à 5 ppm.

Le signal qui apparaît également sous forme d'un singulet à 6,06 ppm et ne convient sur spectre HSQC à aucun atome de carbone est assigné à un proton d'une fonction OH.



**Figure II.114 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés TH7 et TH8 ( $\text{CDCl}_3$ )**

L'assignement des carbones du composé **TH8** est effectué par l'analyse des spectres HSQC et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure II.115) dont les groupements aromatiques CH résonnent à  $\delta\text{c}$  112,2 (C-2), 114,3 (C-5) et 125,2 (C-6), et le carbone méthoxyle est localisé à  $\delta\text{c}$  56,2.

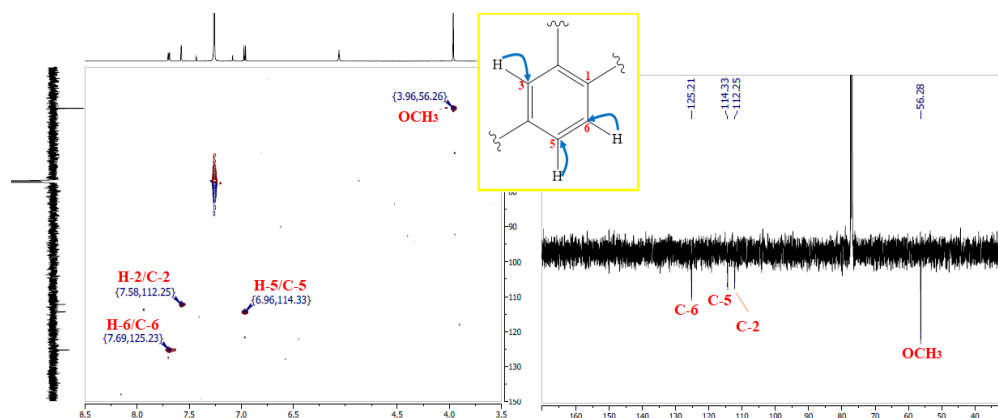


Figure II.115 : Spectres HSQC et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **TH8** ( $\text{CDCl}_3$ )

L'attachement du groupement méthoxyle est réalisé suite à l'interaction observée sur le spectre HMBC (Figure II.116) entre ses protons et le carbone C-3 sortant à 146,3 ppm. Le même spectre exhibe d'autres corrélations en  $^3J$  du proton H-5 avec le carbone C-3 et le carbone aromatique quaternaire C-1 déterminé à 121,1 ppm.

Les corrélations en HMBC (Figure II.116) qui sont établies par les protons H-2 et H-6 avec un carbone déblindé à 150,8 ppm suggèrent que ce dernier est le carbone hydroxylé C-4. Ces deux protons couplent aussi en  $^3J$  avec un carbone résonnant à  $\delta\text{c}$  168,3 attribué à un carbonyle exo-cyclique C-7. Compte tenu de la masse moléculaire du composé ( $M = 168$  uma), il en résulte que le carbone C-7 fait partie d'une fonction acide. D'autres corrélations ont été observées également sur ce spectre à savoir H-2/C-6, H-6/C-2 et 4-OH/C-5.

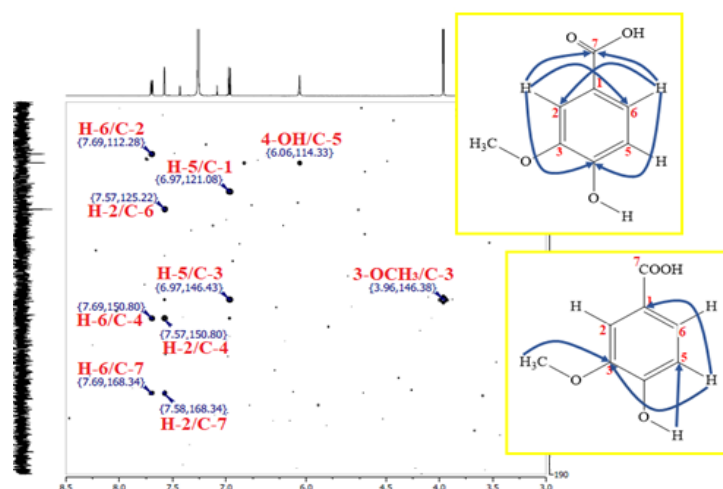


Figure II.116 : Spectre HMBC du composé **TH8**



En conclusion de cette interprétation spectrale, la structure du produit **TH8** a été établie comme étant **Acide vanillique** (Figure II.117). Cette élucidation structurale a été confirmée par la comparaison des déplacements chimiques du composé **TH8** avec ceux rapportés dans la littérature [94]. Ce composé a été détecté dans les parties aériennes de l'espèce *Cistusladanifer* [95] et connu pour des propriétés antimicrobiennes, il inhibe la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la croissance de *Zymomonas mobilis* [96].

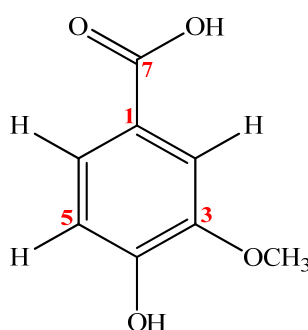


Figure II.117 : Acide vanillique (**TH8**)

Le tableau ci-dessous récapitule tous les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **TH8** (Tableau II.8).

Tableau II.8 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **TH8** ( $\text{CDCl}_3$ )

Position	<b>TH8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
<b>1</b>	-	121,1
<b>2</b>	7,58 (1H, d, 1,9)	112,2
<b>3</b>	-	146,3
<b>4</b>	-	150,80
<b>5</b>	6,97 (1H ;d, 8,2)	114,3
<b>6</b>	7,70 (1H ; dd, 8,3 ; 2,6)	125,2
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	3,96 (3H, s)	168,3
<b>4-OH</b>	6,06 (1H, s)	-

## 9. Composé **TH9**

Le composé **TH9** (Figure II.118) est un précipité obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le chloroforme est visible à la lumière UV à 254 nm. La couleur jaune de sa tache sur plaque CCM avant révélation, se colore en orange après pulvérisation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

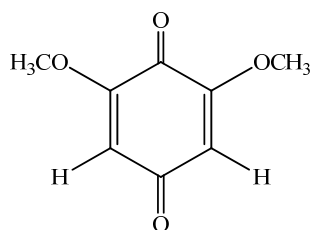


Figure II.118 : Structure du composé TH9

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif de ce composé présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  169  $[M+H]^+$  en cohérence avec la formule brute  $C_8H_8O_4$  et une masse moléculaire de 168 uma, ce qui traduit une identité phénolique pour ce composé.

La symétrie dans le produit **TH9** est fortement imposée car son spectre RMN  $^1H$  (Figure II.119) n'expose au long de la barre des ppm que deux signaux seulement, le premier est sorti à 5,86 ppm sous forme d'un singulet et d'une intégration de 2H qui donne lieu à deux protons symétriquement équivalents nommés H-3 et H-5 ; et le deuxième apparaît sous forme aussi d'un singulet intense à 3,82 ppm s'intégrant pour 6H correspondant à deux groupements méthoxyles complètement symétriques. Il est à noter qu'à cause de cette symétrie totale, aucune interaction H-H n'a été détectée sur le spectre COSY (Figure II.119) de ce produit.

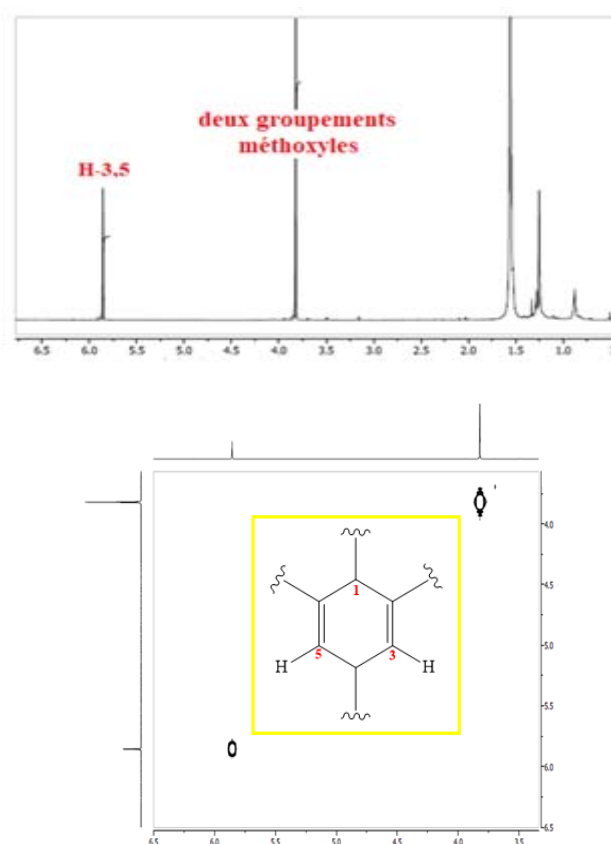
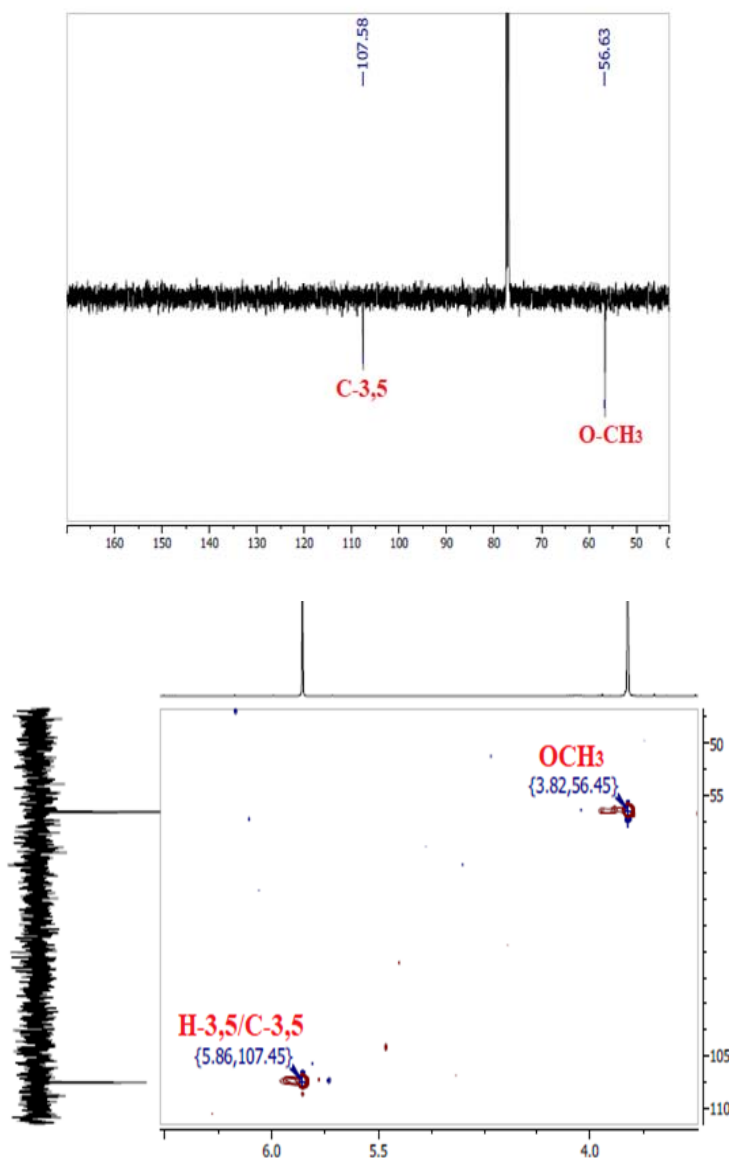


Figure II.119 : Spectres RMN  $^1H$  et COSY du composé TH9 ( $CDCl_3$ )

Le déplacement chimique des carbones C-3,5 sont déterminés à 107,4 ppm à travers le pic d'absorption remarqué sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé, ainsi que les couplages affichés sur spectre HSQC (Figure II.120). Du même, les carbones des groupements méthoxyles sont situés à 56,4 ppm sur les mêmes spectres (Figure II.120).



**Figure II.120 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé et HSQC du composé TH9 ( $\text{CDCl}_3$ )**

Passant au spectre HMBC, et commençant par les groupements méthoxyles qui sont trouvés *ortho* orientés en 2,6-OCH<sub>3</sub> suite aux corrélations visualisées sur le spectre HMBC (Figure II.121) entre leurs protons et les carbones C-2,6 caractérisés à 157,4 ppm. On remarque aussi les taches de corrélation à longue distance entre H-3/C-5, H-5/C-3, H-3/C-2 et H-5/C-6. L'examen de ce spectre permet d'identifier les deux derniers carbones de ce cycle aromatique par l'observation des interactions entre :

- > Les protons H-3,5 et un carbone déblindé résonant à  $\delta_c$  176,8 qui s'accorde au carbonyle C-1.
- > Les mêmes protons (H-3,5) et un carbone très déblindé qui absorbe à  $\delta_c$  186,9, ce déplacement chimique très élevé est assigné au deuxième carbonyle C-4.

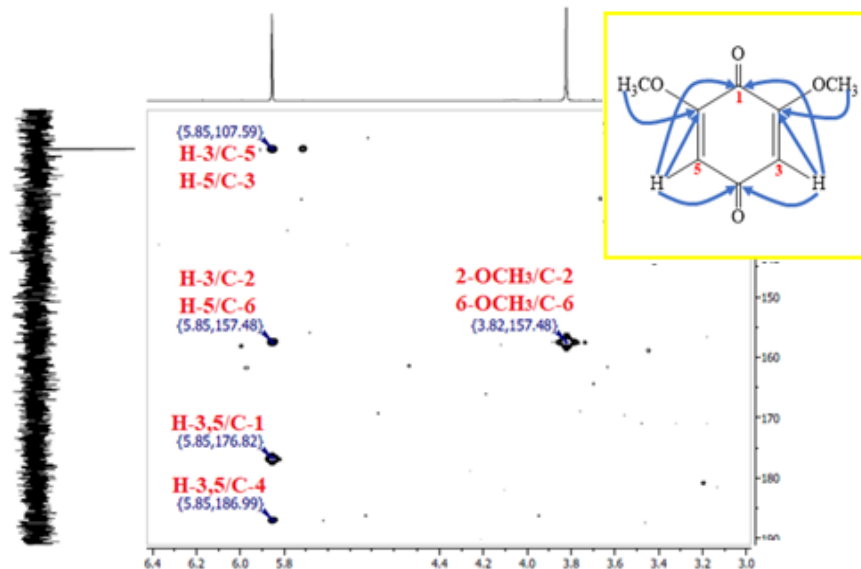


Figure II.121 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et HSQC du composé TH9

Toute cette analyse spectrale ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [97], permet d'assigner sans ambiguïté pour ce composé phénolique, la structure suivante : **2,6-diméthoxy-1,4-benzoquinone** (Figure II.122). L'isolement de ce composé est rapporté pour la première fois à partir de sépales d'hortensia (*Hydrangea macrophylla*) et connu pour son activité déodorante contre le méthylmercaptopan [97].

A des concentrations physiologiques, la **2,6-diméthoxybenzoquinone** est une substance antibactérienne [98]. Tandis que, à des concentrations plus élevées, il est prouvé qu'il est mutagène [99,100], cytotoxique [100], génotoxique [101], et hépatotoxique [102-104].

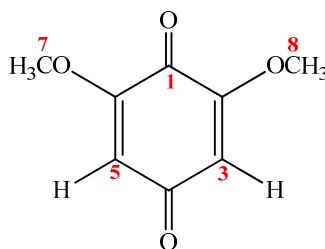


Figure II.122 : 2,6-diméthoxy 1,4-benzoquinone (TH9)

Le tableau ci-dessous récapitule tous les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé TH9 (Tableau II.9).

Tableau II.9 : Données spectroscopique du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH9 ( $\text{CDCl}_3$ )

Position	TH9	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [M, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	176,8
2	-	157,4
3	5,86 (1H, s)	107,4
4	-	186,9
5	5,86 (1H, s)	107,4
6	-	157,4
2-OCH <sub>3</sub>	3,82 (3H, s)	56,4
6-OCH <sub>3</sub>	3,82 (3H, s)	56,4

### 10. Composé TH10

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche invisible sous les deux longueurs d'ondes de la lumière UV 254 et 366 nm. Après la révélation et chauffage, la CCM de ce composé donne une couleur orange-marron. Ce qui permet de proposer prédominamment une nature triterpénique à ce composé (Figure II.123).

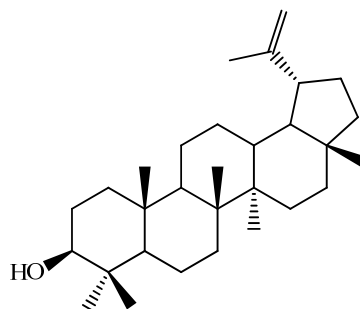


Figure II.123 : Structure du composé TH10

Le spectre de masse ESI-MS (Figure II.124) du composé TH10 en mode positif montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  449  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et 876  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  indiquant que la masse moléculaire est 426 uma convenable avec la formule moléculaire  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ .

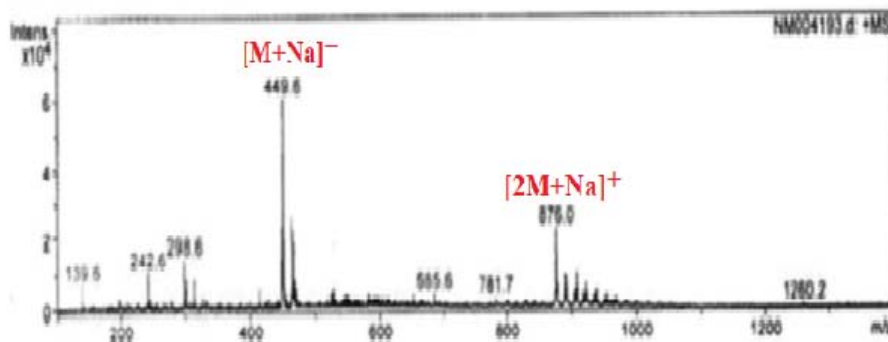


Figure II.124 : Spectre de masse ESI-MS du composé TH10

La caractéristique spectrale de ce genre de composés (les triterpènes) est l'existence des signaux condensés dans la zone de 0,5 à 1,8 ppm correspondant aux groupements méthyles. Pour cela, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.125) s'accorde bien avec ce raisonnement par l'apparition de six signaux de groupements méthyles attachés à des carbones quaternaires hybridés  $\text{sp}^3$  résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  0,97 (23- $\text{CH}_3$ , *s*), 0,73 (24- $\text{CH}_3$ , *s*), 0,82 (25- $\text{CH}_3$ , *s*), 1,01 (26- $\text{CH}_3$ , *s*), 0,92 (27- $\text{CH}_3$ , *s*), 0,76 (28- $\text{CH}_3$ , *s*) et un groupement méthyle vinylique à  $\delta_{\text{H}}$  1,54 (30- $\text{CH}_3$ , *s*) [41].

Il est observé aussi sur ce spectre deux signaux doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  4,66 (*d*,  $J = 2,3$  Hz) et 4,54 (*d*,  $J = 2,3$  Hz) dûs à un groupement exo-méthylène. En plus, un autre signal visualisé à  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (*m*) est attribuable à un groupement méthine hydroxylé (3-CHO). Toutes ces indices attestent une fois de plus le squelette triterpénique suggéré.

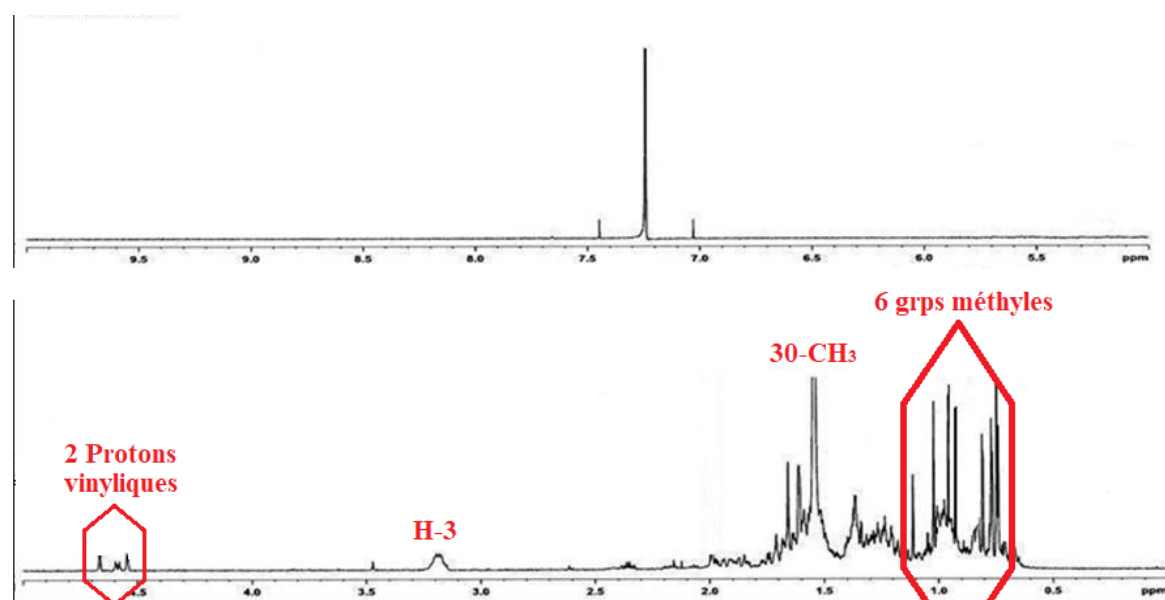


Figure II.125 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé TH10 ( $\text{CDCl}_3$ )

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé de ce composé (Figure II.126) révèle dans les champs forts sept carbones primaires ( $\text{CH}_3$ ) résonnant entre 14,5 et 27,9 ppm, trois carbones tertiaires de jonctions ( $\text{CH}$ ) sortant entre 45 et 55 ppm et plus de dix carbones secondaires et quaternaires localisés dans l'intervalle de 20 à 40 ppm.

Tandis que, les champs faibles sur ce spectre montrent l'existence d'un pic typique à  $\delta_{\text{C}}$  79,2 revenant au carbone oxydé C-3, ainsi que les carbones éthyléniques, l'un secondaire ( $\delta_{\text{C}}$  109,5) et l'autre quaternaire ( $\delta_{\text{C}}$  151,2).

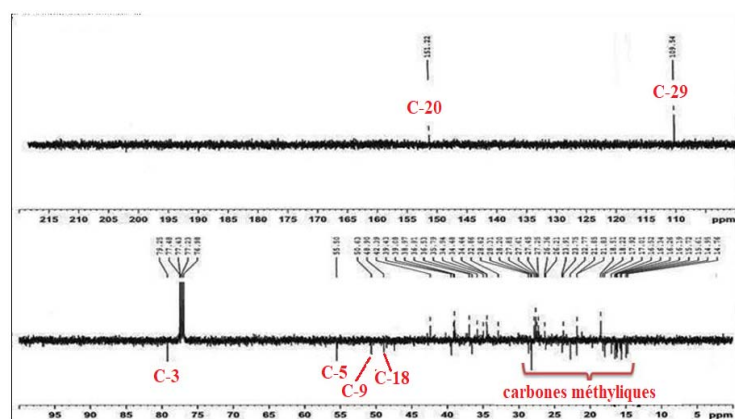


Figure II.126 : Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé TH10 ( $\text{CDCl}_3$ )

La comparaison des valeurs de déplacement chimique (Tableau II.10) du composé **TH10** avec celles rapportées dans la littérature pour les alcools triterpénoïdes et la comparaison aussi de sa CCM avec un échantillon témoin disponible au niveau de notre laboratoire tenant compte qu'il a été isolé antérieurement des trois espèces *Atractylis* : *A. cancellata*, *A. flava* et *A. serratuloides* [3,4,6]; conduisent à l'identifier comme étant **Lupéol** (Figure II.127). Il est connu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoire et anticancéreuse [105].

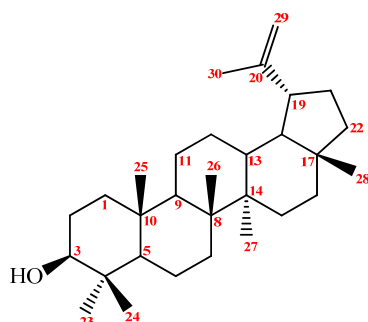


Figure II.127 : Lupéol (TH10)

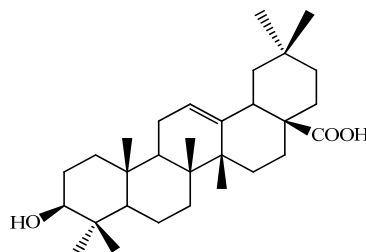
Tableau II.10 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH10 ( $\text{CDCl}_3$ )

Position	TH10	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), [Int, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
<b>1a</b>	1,65 (1H, <i>m</i> )	38,8
<b>1b</b>	0,88 ( <i>m</i> )	38,8
<b>2</b>	1,57 (2H, <i>m</i> )	27,4
<b>3<math>\alpha</math></b>	3,20 (1H, <i>m</i> )	79,2
<b>4</b>	-	39,9
<b>5<math>\alpha</math></b>	0,67 (1H, <i>m</i> )	55,5
<b>6a</b>	1,48 (1H, <i>m</i> )	18,5
<b>6b</b>	1,35 (1H, <i>m</i> )	18,5
<b>7</b>	1,35 (2H, <i>m</i> )	34,2
<b>8</b>	-	41,1

<b>9<math>\alpha</math></b>	1,25 (1H, <i>s</i> )	50,6
<b>10</b>	-	37,1
<b>11a</b>	1,38 (1H, <i>m</i> )	21,1
<b>11b</b>	1,23 (1H, <i>m</i> )	
<b>12</b>	1,64 (2H, <i>m</i> )	25,3
<b>13</b>	1,62 (1H, <i>m</i> )	38,5
<b>14</b>	-	43
<b>15a</b>	1,61(1H, <i>m</i> )	27,2
<b>15b</b>	0,96 (1H, <i>m</i> )	
<b>16</b>	1,44 (2H, <i>m</i> )	35,8
<b>17</b>	-	43,2
<b>18</b>	1,32 (1H, <i>m</i> )	48,9
<b>19</b>	2,34 (1H, <i>m</i> )	47,6
<b>20</b>	-	151,2
<b>21a</b>	1,88 (1H, <i>m</i> )	30
<b>21b</b>	1,27 (1H, <i>m</i> )	
<b>22a</b>	1,35 (1H, <i>m</i> )	40,2
<b>22b</b>	1,15 (1H, <i>m</i> )	
<b>23</b>	0,97 (3H, <i>s</i> )	28,3
<b>24</b>	0,73 (3H, <i>s</i> )	15,6
<b>25</b>	0,82 (3H, <i>s</i> )	15,7
<b>26</b>	1,01 (3H, <i>s</i> )	16,2
<b>27</b>	0,92 (3H, <i>s</i> )	14,9
<b>28</b>	0,76 (3H, <i>s</i> )	17,9
<b>29a</b>	4,66 (1H, <i>d</i> , 2,3)	109,5
<b>29b</b>	4,54 (1H, <i>d</i> , 2,3)	
<b>30</b>	1,54 (3H, <i>s</i> )	19,7

### 11. Composé TH11

Le composé **TH11** (Figure II.128) présente les mêmes caractéristiques que le composé précédent **TH11**. En effet, il a été purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme et donne une tache invisible à la lumière UV (254 et 366) se révélant en marron par une solution acide et chauffage à 100 °C.

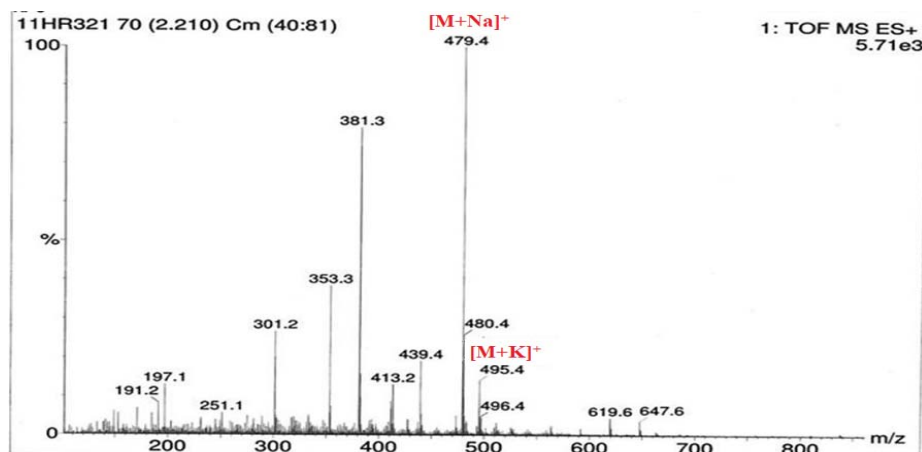


**Figure II.128 : Structure du composé TH11**

Ce composé a une formule brute en  $C_{30}H_{48}O_3$  comme déduit à partir du spectre de masse ESI-MS obtenu en mode positif (Figure II.129) qui indique l'existence de deux pics d'ions



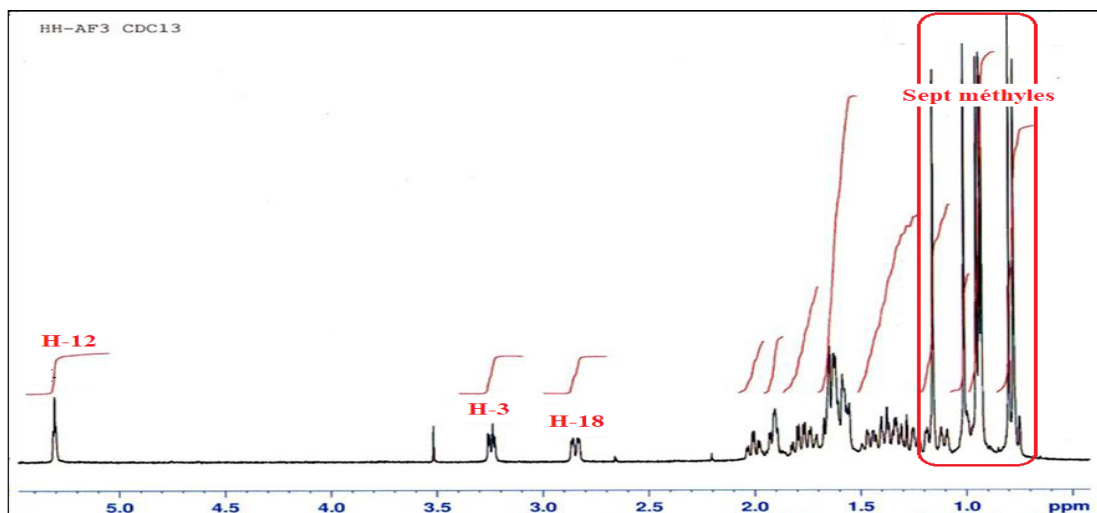
pseudomoléculaires à  $m/z$  479  $[M+Na]^+$  et 495  $[M+K]^+$ , traduisant une masse moléculaire de 456 uma.



**Figure II.129 : Spectre de masse ESI-MS du composé TH11**

L'observation du spectre RMN  $^1H$  (Figure II.130) du métabolite **TH11** ne diffère pas beaucoup par rapport à celui du composé précédent, à savoir Lupéol **TH10** ; de sorte qu'il impose un massif de signaux s'étalant de 0,2 jusqu'à 2,5 ppm comportant un nombre appréciable de pics singulets fins d'intégration 3H chacun correspondant aux substituants méthyles. Cette attribution primaire permet de le positionner dans la classe des triterpènes.

Il est remarqué sur ce spectre aussi (Figure II.130), trois signaux séparés assignés au proton éthyllénique H-12 à  $\delta_H$  5,27 (1H, *t*,  $J = 3,5$  Hz), le proton carbinole H-3 à  $\delta_H$  3,18 (1H, *dd*,  $J = 10 ; 6,2$  Hz) et le proton H-18 à  $\delta_H$  2,84 (1H, *dd*,  $J = 13,9 ; 4,1$  Hz). Tous ces arguments suggèrent l'appartenance de ce composé à la classe des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène.



**Figure II.130 : Spectre RMN  $^1H$  global du composé TH11 ( $CDCl_3$ )**

Les sept méthyles angulaires de ce composé sont bien visualisés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.11.4) à  $\delta_{\text{H}}$  0,98 (Me-23), 0,78 (Me-24), 0,92 (Me-25), 0,80 (Me-26), 1,15 (Me-27), 0,90 (Me-29) et 0,93 (Me-30). Le spectre HSQC (Figure II.131) met en évidence la localisation de ces méthyles en  $\delta_{\text{C}}$  28,3 ; 15,8 ; 15,5 ; 17,1 ; 26,1 ; 33,3 et 23,7 respectivement.

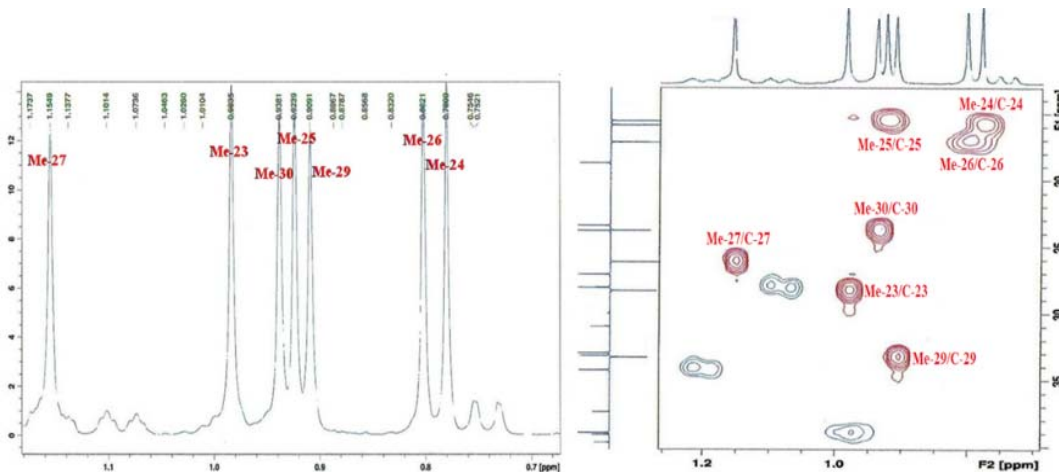


Figure II.131 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC des méthyles du composé TH11

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé DEPT (Figures II.132) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-3, C-12 et C-18 à  $\delta_{\text{C}}$  79,1 ; 122,8 et 41,7 respectivement ; en plus des autres carbones cités au tableau ci-dessous (Tableau II.11.6).

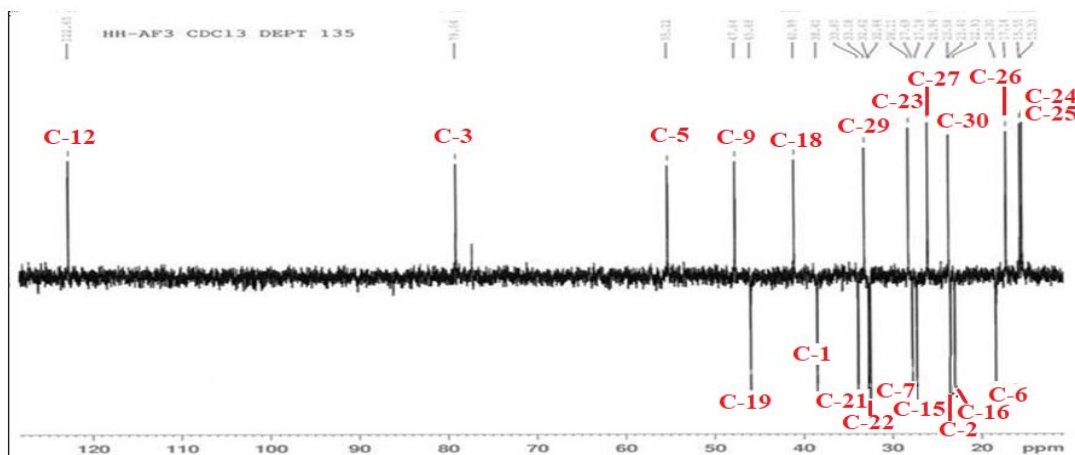


Figure II.132 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH11 ( $\text{CDCl}_3$ )

L'ensemble de ces données (Tableau II.11) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature, conduisent à l'identification du composé TH11 à l'acide oléanolique (Figure II.133). Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces de la famille Asteraceae *Baccharis solieri*, *Baccharis linearis* [106] et *Aster hipidus* [107], et notamment des espèces *Atractylis* : *A. cancellata*, *A. flava* et *A. serratuloides* [3,4,6] qui ont fait l'objet antérieurement

d'études phytochimiques dans notre laboratoire. Il est connu pour ses activités anti-inflammatoires <sup>[108]</sup> et anticancéreuse <sup>[109]</sup>.

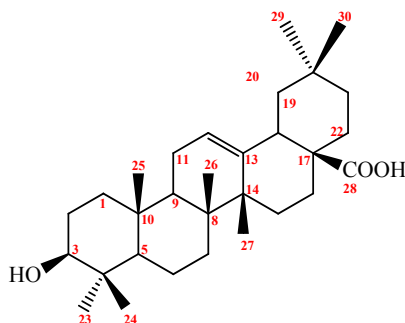


Figure II.133 : Acide oléanolique (TH11)

Tableau II.11 : Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé TH11 (CDCl<sub>3</sub>)

Position	TH11	
	$\delta_H$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_C$ (ppm)
<b>1a</b>	1,60 (1H, m)	38,9
<b>1b</b>	0,97 (1H, m)	
<b>2</b>	1,58 (1H, m)	27
<b>3</b>	3,18 (1H, dd, 10; 6,2)	79,1
<b>4</b>	-	39,7
<b>5</b>	0,75 (1H, dl, 10)	55,7
<b>6a</b>	1,54 (1H, m)	18,7
<b>6b</b>	1,37 (1H, m)	
<b>7a</b>	1,75 (1H, m)	32,9
<b>7b</b>	1,57 (1H, m)	
<b>8</b>	-	39,1
<b>9</b>	1,58 (1H, m)	48,1
<b>10</b>	-	37,4
<b>11</b>	1,88 (1H, dt, 7,1 ; 3,5)	23,8
<b>12</b>	5,27 (1H, t, 3,5)	122,8
<b>13</b>	-	144,6
<b>14</b>	-	42,1
<b>15a</b>	1,73 (1H, m)	28,1
<b>15b</b>	1,07 (1H, m)	
<b>16a</b>	1,98 (1H, td, 13,5; 3,9)	23,4
<b>16b</b>	1,61 (1H, m)	
<b>17</b>	-	46,8
<b>18</b>	2,84 (1H, dd, 13,9; 4,1)	41,7
<b>19a</b>	1,65 (1H, m)	46,4
<b>19b</b>	1,15 (1H, m)	
<b>20</b>	-	30,9
<b>21a</b>	1,36 (1H, m)	34,2
<b>21b</b>	1,20 (1H, m)	
<b>22a</b>	1,48 (1H, m)	33,2
<b>22b</b>	1,31 (1H, m)	
<b>23</b>	0,98 (3H, s)	28,3

24	0,78 (3H, s)	15,8
25	0,92 (3H, s)	15,5
26	0,80 (3H, s)	17,1
27	1,15 (3H, s)	26,1
28	-	181,5
29	0,90 (3H, s)	33,3
30	0,93 (3H, s)	23,7

## 12. Composé TH12

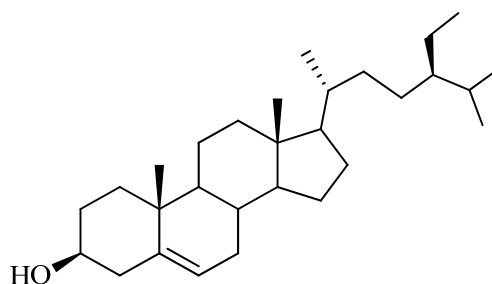


Figure II.134 : Structure du composé TH12

Le composé **TH12** a été facilement identifié comme  **$\beta$ -sitostérol** (Figure II.134) par comparaison de ses données ESIMS et RMN  $^1\text{H}$  avec la littérature <sup>[3]</sup> et il est reconnu pour son activité anti-inflammatoire <sup>[110]</sup>. Le spectre de masse ESI de ce composé enregistré en mode négatif (Figure II.135) présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 413$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ , correspondant à une masse moléculaire de 414 uma et une formule brute en  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ . Tandis que, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.136) enregistré dans  $\text{CDCl}_3$  indique les signaux caractéristiques d'un stérol C29 dus à six groupements méthyles résonant à 0,73 ppm (*s*, H<sub>3</sub>-18), 1,06 ppm (*s*, H<sub>3</sub>-19), 0,97 ppm (*d*,  $J = 6.5$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0,88 ppm (*d*,  $J = 5$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0,86 ppm (*d*,  $J = 5$  Hz, H<sub>3</sub>-27) et 0,89 ppm (*t*,  $J = 6.5$  Hz, H<sub>3</sub>-29), une double liaison tri-substituée dans le cycle B représentée par son proton H-6 qui absorbe à 5,41 ppm (*dd*,  $J = 5,2 ; 2,3$  Hz) et le proton hydroxyméthine 3-CH-OH sortant à  $\delta_{\text{H}}$  3,58 (*tt*,  $J = 10,4 ; 5,2$  Hz).

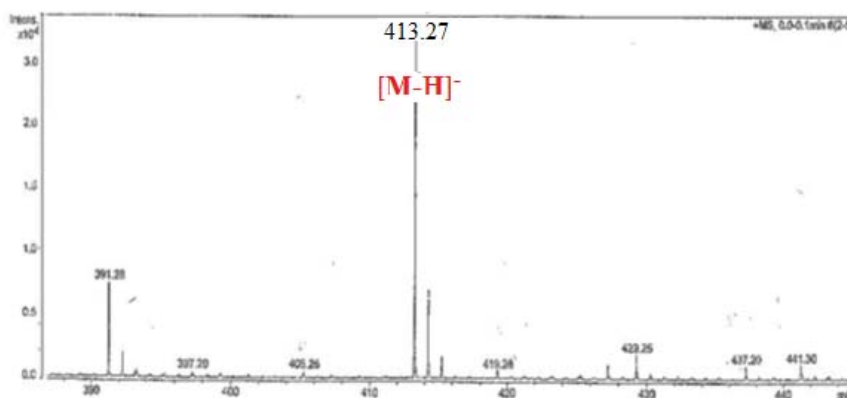


Figure II.135 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé TH12

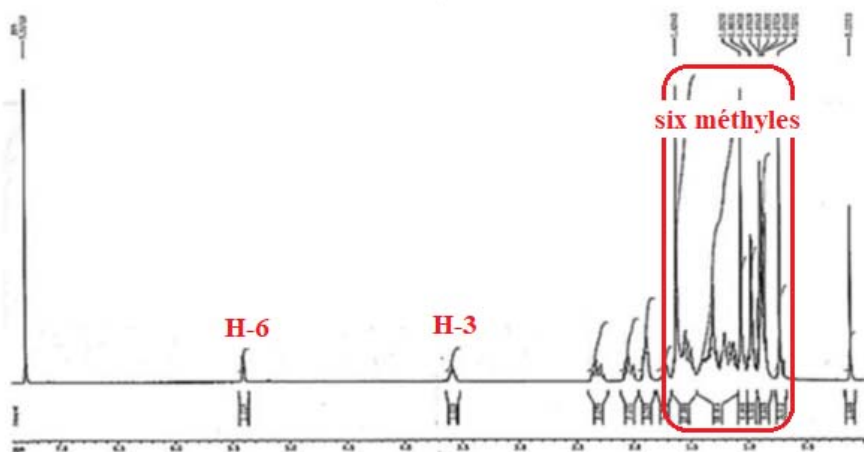


Figure III.136 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH12 ( $\text{CDCl}_3$ )

Tous les déplacements chimiques du proton et carbone sont accumulés dans le tableau ci-dessous (Tableau II.12).

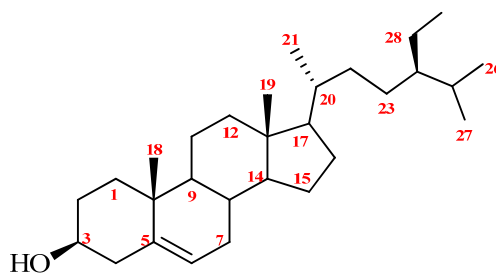


Figure II.137 :  $\beta$ -sitostérol (TH12)

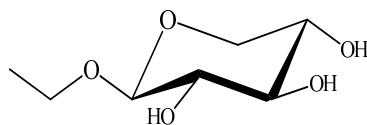
Tableau II.12 : Données spectroscopique du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH7 ( $\text{CDCl}_3$ )

Position	TH12	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1a	1,92 (1H, m)	37,2
1b	1,12 (1H, m)	
2a	1,89 (1H, m)	31,6
2b	1,56 (1H, m)	
3	3,58 (1H, tt, 10,4;5,2)	71,8
4a	2,35 (1H, m)	42,3
4b	2,30 (1H, m)	
5	-	140,7
6	5,41 (1H, dd, 5,2;2,3)	121,7
7a	2,05 (1H, ddd, 12,4;7,5;2,4)	31,9
7b	1,56 (1H, m)	
8	1,52 (1H, m)	31,8
9	0,97 (1H, m)	50,1
10	-	36,5
11a	1,57 (1H, m)	21,1
11b	1,50 (1H, qd, 10,8;4,6)	
12a	2,07 (1H, m)	39,7

<b>12b</b>	1,21 (1H, <i>m</i> )	
<b>13</b>	-	42,3
<b>14</b>	1,04 (1H, <i>m</i> )	56,7
<b>15a</b>	1,62 (1H, <i>m</i> )	
<b>15b</b>	1,12 (1H, <i>m</i> )	24,3
<b>16a</b>	1,88 (1H, <i>m</i> )	
<b>16b</b>	1,30 (1H, <i>m</i> )	28,2
<b>17</b>	1,17 (1H, <i>m</i> )	56,0
<b>18</b>	0,73 (3H, <i>s</i> )	11,8
<b>19</b>	1,06 (3H, <i>s</i> )	19,4
<b>20</b>	1,40 (1H, <i>m</i> )	36,1
<b>21</b>	0,97 (3H, <i>d</i> , 6,5)	18,8
<b>22a</b>	1,37 (1H, <i>m</i> )	
<b>22b</b>	1,06 (1H, <i>m</i> )	33,9
<b>23a</b>	1,21 (1H, <i>m</i> )	
<b>23b</b>	1,19 (1H, <i>m</i> )	26,0
<b>24</b>	0,94 (1H, <i>m</i> )	45,8
<b>25</b>	1,72 (1H, <i>m</i> )	29,1
<b>26</b>	0,88 (3H, <i>d</i> , 5)	19,8
<b>27</b>	0,86 (3H, <i>d</i> , 5)	19,0
<b>28a</b>	1,33 (1H, <i>m</i> )	
<b>28b</b>	1,28 (1H, <i>m</i> )	23,0
<b>29</b>	0,89 (3H, <i>t</i> , 6,5)	12,0

### 13. Composé TH13

Le composé **TH13** (Figure II.138) est isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. On caractérise ce composé sur test CCM par une tache invisible sous la lumière UV qui se révèle en noire par une solution acide et chauffage à 100 °C.



**Figure II.138 : Structure du composé TH13**

Le spectre de masse ESI-MS (Figure II.139) de ce composé révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 201$   $[M+Na]^+$  correspondant à une masse moléculaire de 178 uma et une formule brute en  $C_7H_{14}O_5$ .

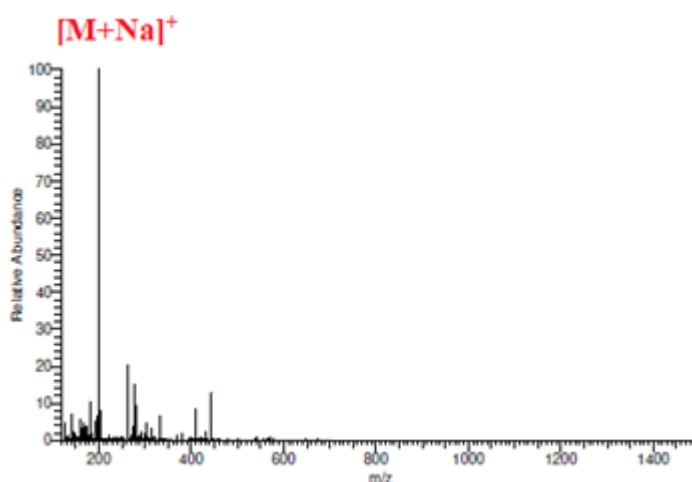


Figure II.139 : Spectre de masse ESI-MS du composé TH13 (MeOH)

L'analyse des spectres RMN monodimensionnels du proton et carbone-13 suggère qu'il s'agit d'une seule structure possible convenant à un mono-oside ; dont le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.140) exhibe six signaux moyennement déblindés d'intégration 1H chacun, résonnant dans l'intervalle de 3,10 à 4,20 ppm caractérisant des protons osidiques, en plus d'un signal triplet blindé à 1,22 ppm s'intégrant pour 3H correspondant aux protons d'un groupement méthyle appelé H<sub>3</sub>-2'. En outre, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.141) indique l'existence de quatre carbones tertiaires détectés à  $\delta_{\text{C}}$  104,9, 77,9, 74,9 et 71,2, deux carbones secondaires résonant à  $\delta_{\text{C}}$  66,9 et 66,2 et le carbone primaire du groupement méthyle C-2' qui absorbe à  $\delta_{\text{C}}$  15,4 (Figure II.12.4).

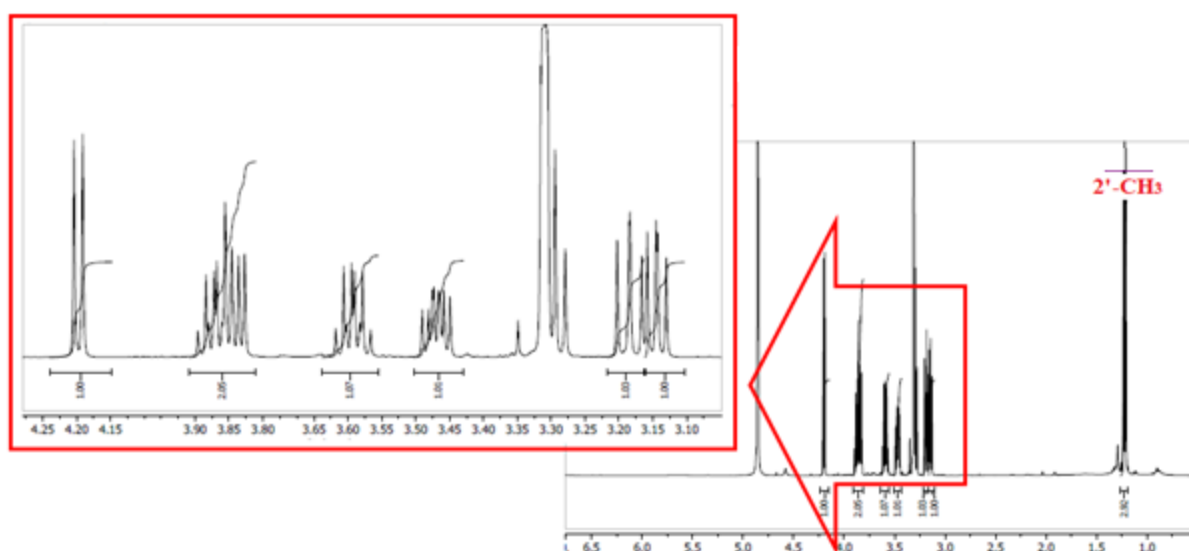


Figure II.140 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH13 (MeOH)

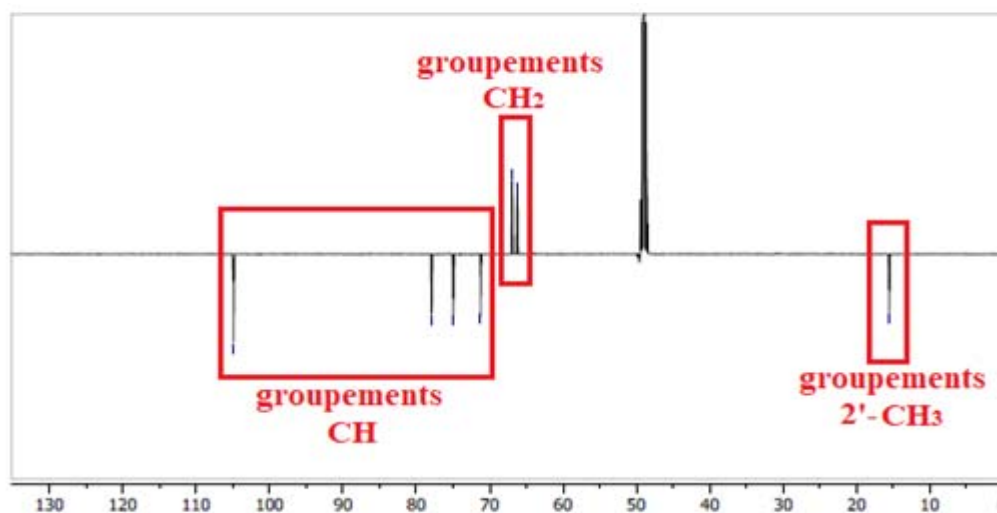


Figure II.141 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé TH13 (MeOH)

Un groupement éthyle est clairement déduit dans la structure du composé **TH13**, de fait que les protons du groupement 2'-CH<sub>3</sub> corrélient sur le spectre COSY (Figure II.142) avec deux protons sortant à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 et 3,59 nommés H-1'a et H-1'b respectivement.

Ces deux protons non équivalents sont considérés comme protons géminés, en raison de leurs interactions avec le même carbone C-1' situé à  $\delta_{\text{C}}$  66,2 sur le spectre HSQC (Figure II.143), en plus de leur corrélation entre eux sur le spectre COSY (Figure II.144).

Les déplacements chimiques que ce soit des protons ou du carbone du groupement méthylène 1'-CH<sub>2</sub> considérés élevés, ce qui explique son attachement à un atome électro-attractif qui est l'oxygène.

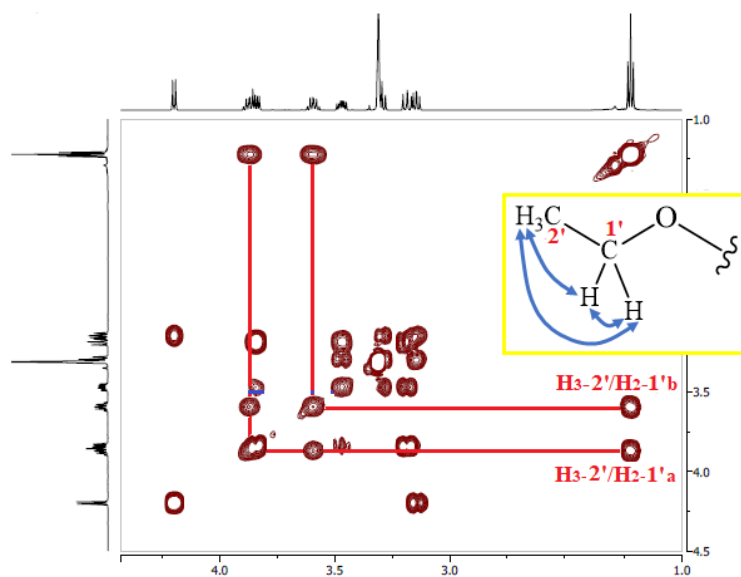
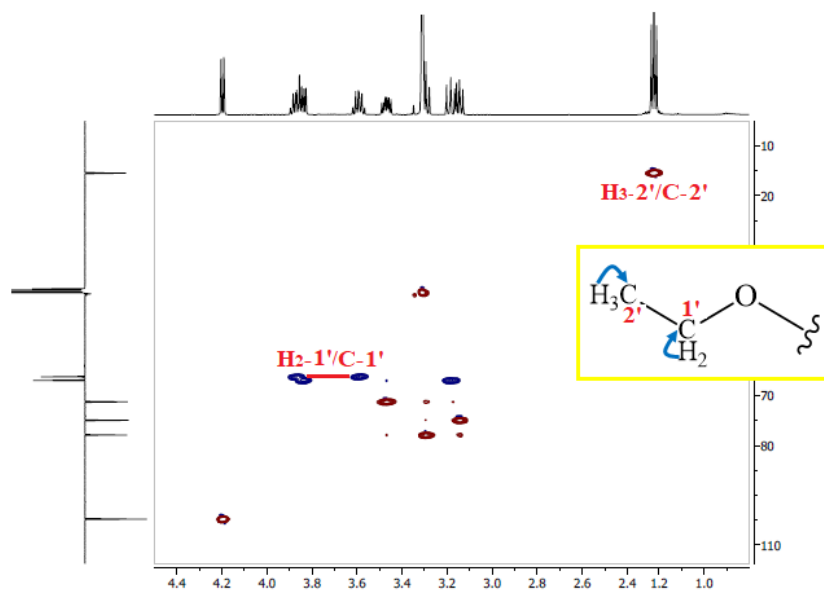


Figure II.143 : Spectre COSY du composé TH13





**Figure II.144 : Spectre HSQC du composé TH13**

La nature osidique précité de ce composé est concrétisée non seulement à travers le signal de son proton anomérique observé à 4,20 ppm ( $d$ ,  $J = 7,6$ ) sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.140), mais surtout de l'ensemble du système de corrélations visualisé sur le spectre COSY (Figure II.145) comme suite :

- › Le proton anomérique et le signal résonant à 3,14 ppm ( $dd$ ,  $J = 9,1, 7,6$  Hz) attribuable au proton H-2, qui sont considérés axialement orientés à cause de la valeur élevée de la constante de couplage ( $J_{\text{H-1}/\text{H-2}} = 7,6$  Hz).
- › Le proton H-2 et le signal qui absorbe à 3,29 ppm ( $m$ ) qui ne peut être que le proton H-3, ces deux protons corrélient entre eux avec une constante de couplage élevée ( $J_{\text{H-2}/\text{H-3}} = 9,1$  Hz) imposé une orientation opposée ( $\alpha$  axial) par rapport au proton H-2.
- › Le proton H-3 et le proton H-4 qui apparait sur le point d'absorption de 3,47 ppm ( $ddd$ ,  $J = 10,2, 8,9, 5,4$  Hz), où la constante de couplage  $J_{\text{H-3}/\text{H-4}} = 8,9$  Hz indique aussi une orientation *trans* pour les protons H-3 et H-4.
- › Le proton H-4  $\beta$  axial et les deux protons géminés non équivalents H-5a et H-5b qui sont enregistrés à 3,83 ( $m$ ) et 3,18 ( $dd$ ,  $J = 11,4, 10,3$ ) respectivement. Ce dernier (H-5b) occupe la face  $\alpha$  pour coupler avec le proton H-4 avec une constante de couplage élevée  $J_{\text{H-4}/\text{H-5b}} = 10,3$  Hz d'un côté ; et de l'autre avec le proton H-5a qui occupe automatiquement la face  $\beta$  avec une constante de couplage  $J_{\text{H-4}/\text{H-5a}} = 5,4$  Hz.
- › Et dernièrement, la corrélation observée entre les protons H-5a/H-5b avec une constante de couplage  $J_{\text{H-5a}/\text{H-5b}} = 11,4$  Hz.

Le squelette d'un aldohexose de type  $\beta$ -D-xylopyranose est confirmée bien évidemment tenant compte de ces constatations préliminaires.

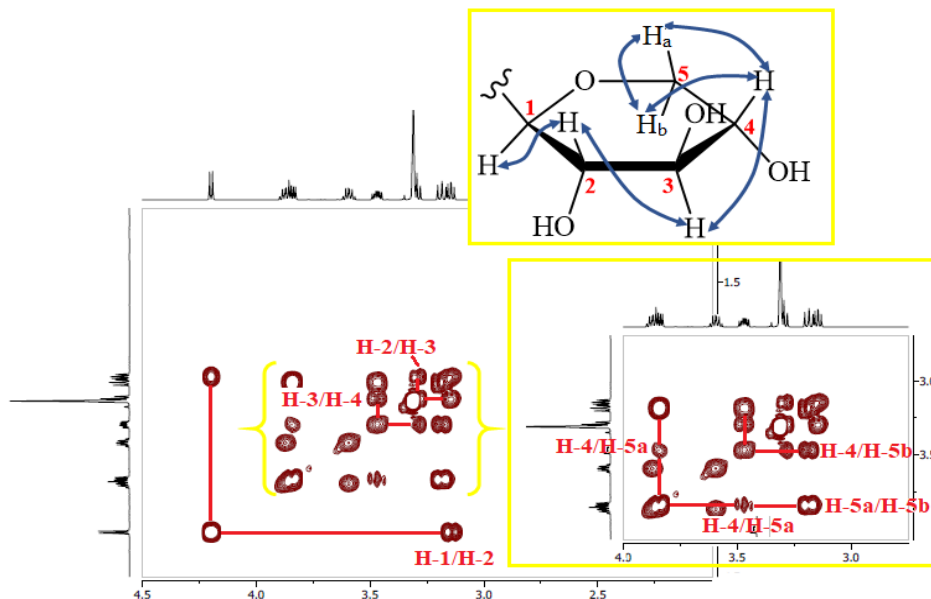


Figure II.145 : Spectre COSY du composé TH13

L'attribution des carbones de ce sucre est réalisée à travers le diagnostic du spectre HSQC (Figure II.146) qui montre les couplages scalaires H/C et conduit à les caractériser comme suite :  $\delta_c$  104,9 (C-1), 74,6 (C-2), 77,9 (C-3), 71,2 (C-4) et 66,2 (C-5).

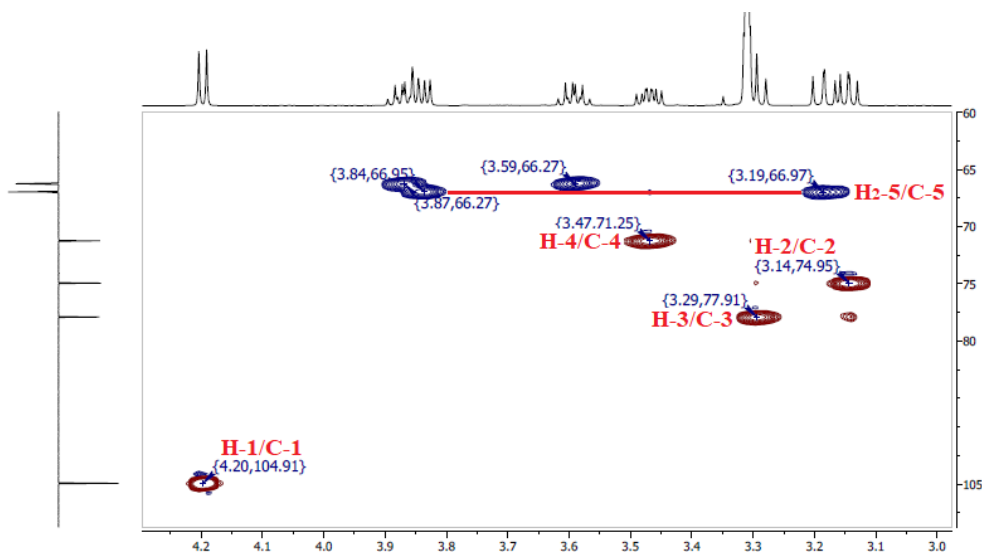


Figure II.146 : Spectre HSQC du composé TH13

Les taches de corrélation visualisées entre H-1'a/C-1, H-1'b/C-1 et H-1/C-1' sur le spectre HMBC (Figure II.147) témoignent que le groupement éthyle est un substituant exocyclique en position 1 qui occupe la face  $\beta$ .

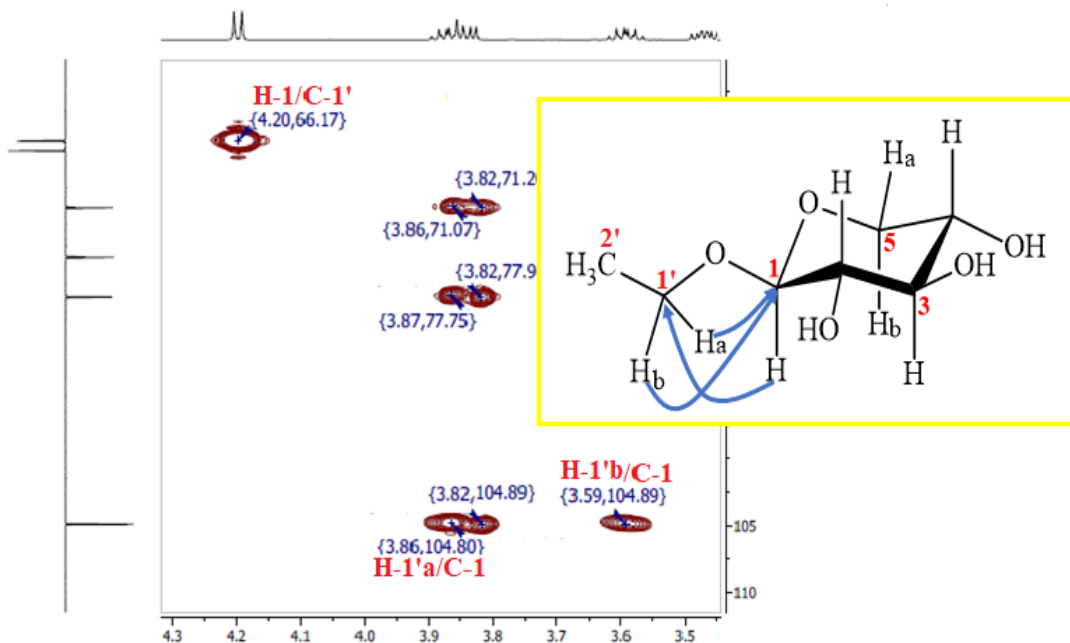


Figure II.147 : Spectre HMBC du composé TH13

Toutes les interactions restantes sur le spectre HMBC (Figure II.148) confirme bien la structure élucidée de ce composé ; y compris : H-2/C-3, H-3/C-2 et C-4, H-4/C-3 et C-5, H<sub>2</sub>-5/C-1, C-3 et C-5, H-1'a/C-4 et C-5.

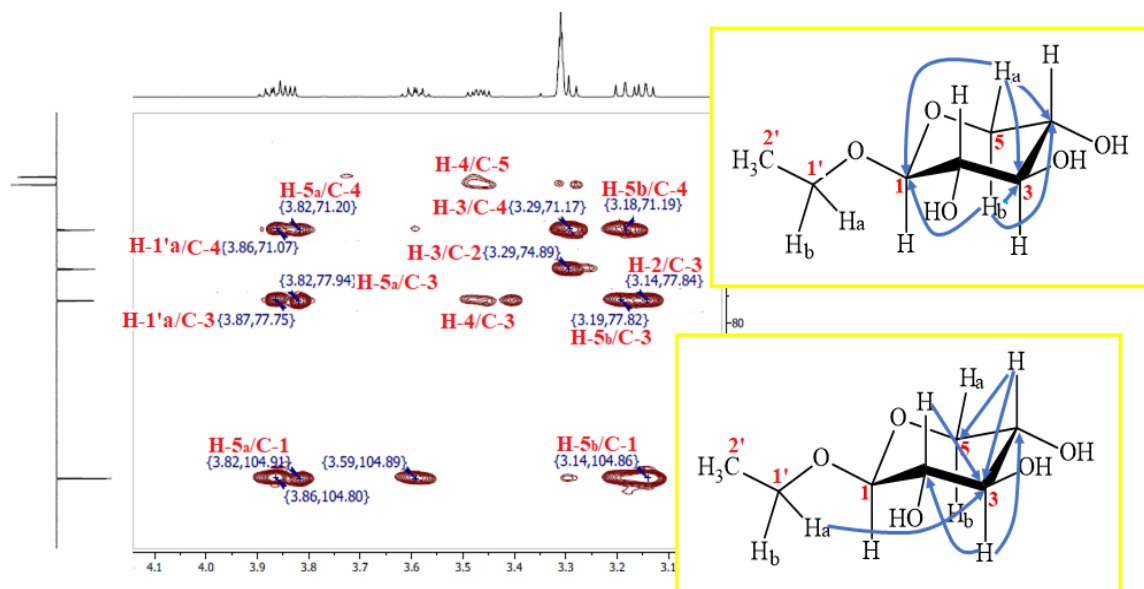
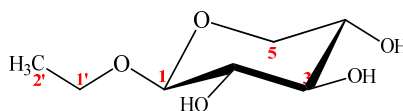


Figure II.148 : Spectre HMBC du composé TH13

Sur la base des résultats spectraux décrits précédemment et leurs comparaisons avec ceux cités dans la littérature <sup>[111]</sup>, le composé **TH13** (Figure II.149) a été caractérisé comme étant : **1-O-ethyl-β-D-xylose**.

Figure II.149 : 1-O-ethyl-  $\beta$ -D-xylose (TH13)

Le tableau ci-dessus (Tableau II.13) englobe tous les assignements de protons et carbones du composé TH13.

Tableau II.13 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH13 (MeOH)

Position	TH13	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	4,20 (1H, d, 7,6)	104,9
2	3,14 (1H, dd, 7,6 ; 9,1)	74,9
3	3,29 (1H, m)	77,9
4	3,47 (1H, ddd, 5,4 ; 8,8 ; 10,2)	71,2
5a	3,83 (1H, m)	66,9
5b	3,18 (1H, dd, 10,3 ; 11,4)	
1'a	3,86 (1H, m)	66,2
1'b	3,59 (1H, dq, 7,0 ; 9,6)	
2'	1,22 (3H, t, 7,0)	15,4

#### 14. Composé TH14

Ce composé (Figure II.150) est isolé sous forme de cristaux blancs solubles dans le méthanol. Le teste CCM montre une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm, et il se colore en noire par une solution révélatrice acide et chauffage à 100 °C.

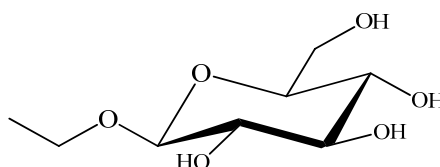


Figure II.150 : Structure du composé TH14

Le squelette d'un hexose est ce qui structure le composé TH14 suite à l'interprétation de ces spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figures II.51 et II.52) dont les multiplicités de ces signaux permettent de le classer dans la série des aldoses, alors que les constantes de couplage de ses protons traduisent bien l'existence d'un  $\beta$ -D-glucose (Tableau II.14.1).

Ces deux spectres indiquent aussi la présence d'un groupement  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  par l'apparition des signaux d'un 1'- $\text{CH}_2$  déblindé à ( $\delta_{\text{H}}$  3,36, q,  $J = 7,0$  Hz)/( $\delta_{\text{C}}$  64,7) et d'un groupement 2'- $\text{CH}_3$  à ( $\delta_{\text{H}}$  1,17, t,  $J = 7,1$  Hz)/( $\delta_{\text{C}}$  14,0).

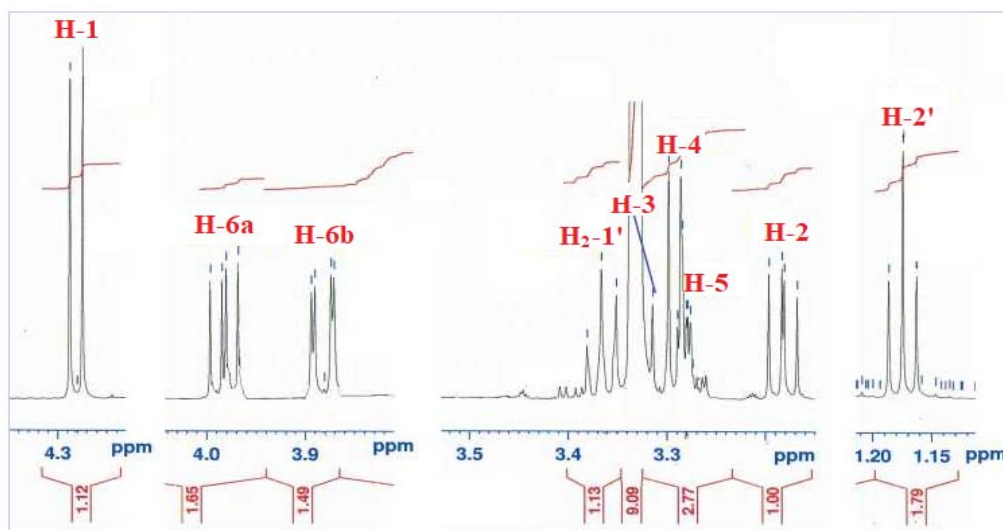


Figure II.151 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé TH14 (MeOH)

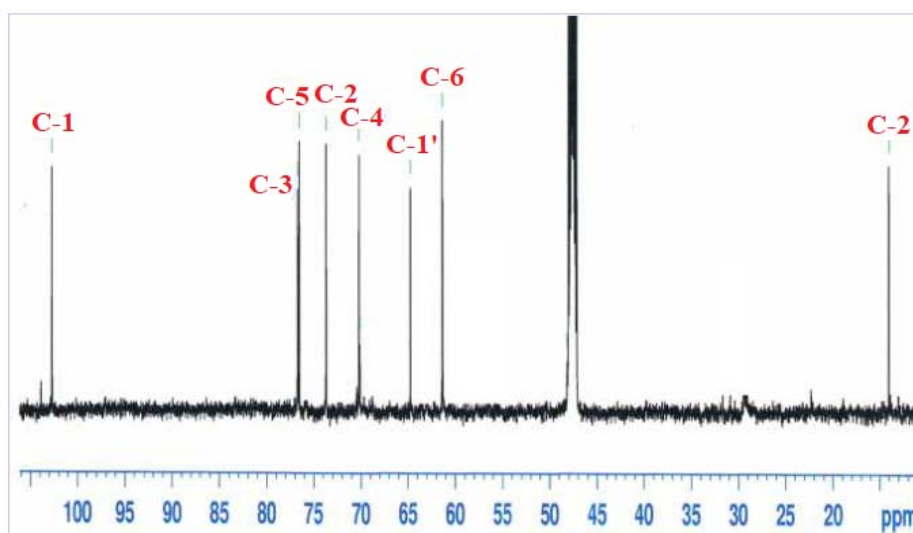


Figure II.152 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé TH14 (MeOH)

La comparaison de ces données spectrales avec celles trouvées dans la littérature <sup>[112,113]</sup> permet de brancher le groupement  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  au carbone anomérique C-1 du glucose. Ceci conduit à attribuer au composé TH14 la structure : **1-O-éthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside** (Figure II.153). Ce composé a été isolé antérieurement des espèces *Phlomis oppositiflora* (Lamiaceae) <sup>[114]</sup> et *Ustilago maydis* (Ustilaginaceae) <sup>[115]</sup>.

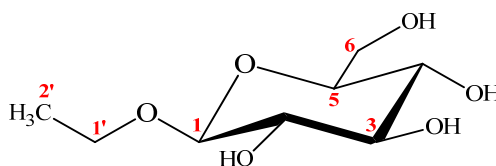


Figure II.153 : 1-O-éthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (TH14)

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **TH14** sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau II.14).

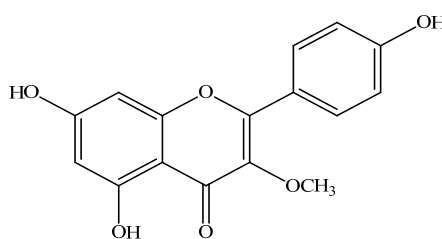
**Tableau II.14 : Données spectroscopique du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé TH14 (MeOH)**

Position	TH14	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
<b>1</b>	4,50 (1H, <i>d</i> , 7,8)	102,7
<b>2</b>	3,18 (1H, <i>dd</i> , 9,1 ;7,8)	76,5
<b>3</b>	3,30 (1H, <i>t</i> , 9,1)	73,6
<b>4</b>	3,28 (1H, <i>t</i> , 9,1)	70,4
<b>5</b>	3,27 (1H, <i>m</i> )	75,8
<b>6a</b>	3,98 (1H, <i>dd</i> , 11,7 ; 5,0)	61,3
<b>6b</b>	3,88 (1H, <i>dd</i> , 11,8 ; 2,1)	
<b>1'</b>	3,36 (2H, <i>q</i> , 7,0)	64,7
<b>2'</b>	1,17 (1H, <i>t</i> , 7,0)	14,0

## II.2.2. Elucidation structurale des composés isolés de l'espèce *C. pinnatus*

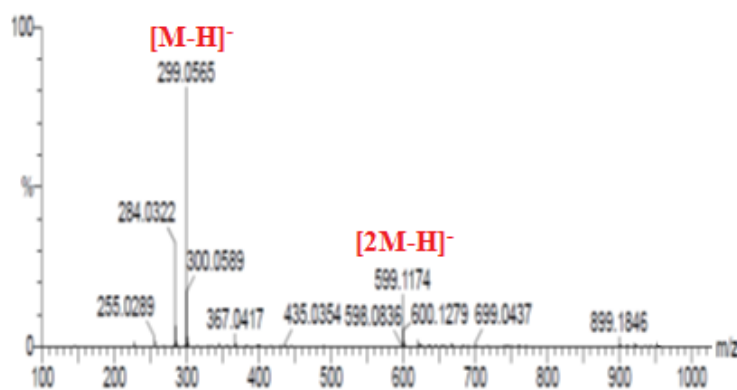
### 1. Composé CP1

Le composé **CP1** (Figure II.154) est isolé sous forme d'une poudre jaune. En CCM, ce composé est visible sous la lumière UV à 254 et 366nm et apparaît sous forme d'une tache jaune après pulvérisation par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Sa fluorescence jaune sous la lumière UV à 366 nm suggère la présence d'un flavonoïde de type flavonol.



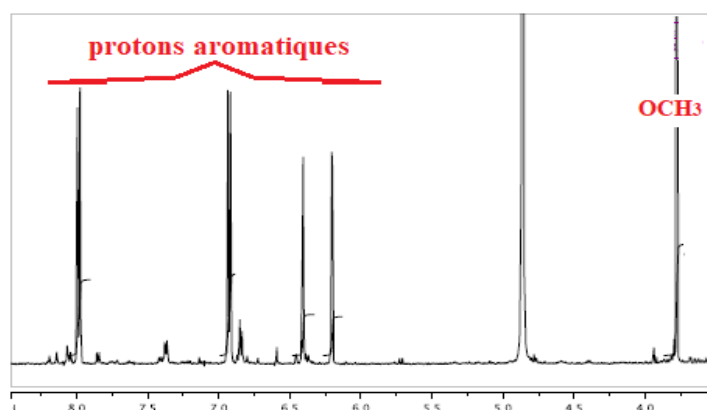
**Figure II.154 : Structure du composé CP1**

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **CP1** enregistré en modes négatif (Figure II.155) exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 299,0565$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  et  $599,1174$   $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_6$  (calc. 299,0556). Ce composé possède donc une formule brute en  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$  correspondant à une masse moléculaire de 300 uma et suggérant ainsi 11 degrés d'insaturation.



**Figure II.155 : Spectre de masse ESI-MS (ions négatifs) du composé CP1**

L'aspect aromatique de ce composé est bien mentionné sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.156) par la zone qui s'étale de 6,0 à 8,0 ppm incluant six groupements aromatiques C-H dont deux sont équivalents à cause de l'intégration 2H, ce qui impose donc la symétrie au niveau du cycle B dans le squelette de ce flavonol. Aussi, ce spectre révèle la présence de protons aliphatiques représentés par le signal d'un groupement méthoxyle qui absorbe à 3,78 ppm.



**Figure II.156 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé CP1 (MeOD, 600 MHz)**

Le traitement combiné des expériences RMN  $^1\text{H}$  et COSY (Figure II.157) de ce composé montre l'existence de deux systèmes de spins, mettant en évidence l'identification des protons équivalents H-2',6' à  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (2H, *d*,  $J = 9,2$ ) qui corrélient avec les deux protons équivalents H-3',5' à  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (2H, *d*,  $J = 9,2$ ), tous appartenant au cycle B *para*-disubstitué. Les protons H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,20, *d*) et H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,41, *d*) du cycle A sont *mé*ta-couplés s'exprimant par la petite constante de couplage  $J = 2,1$  Hz.

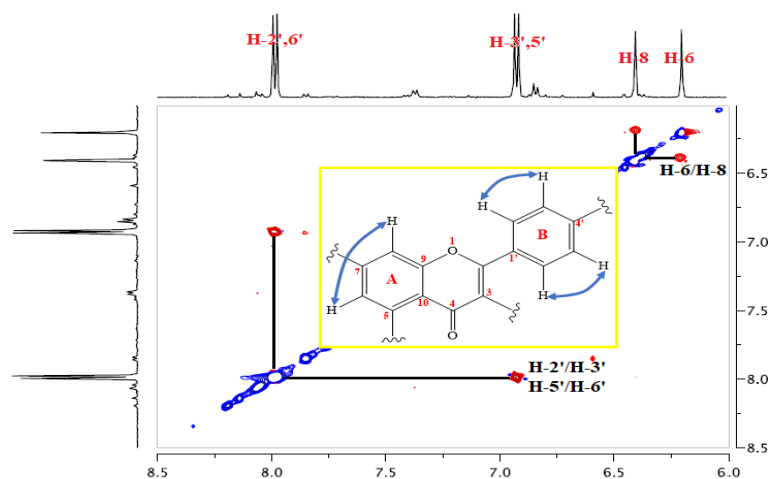


Figure II.157 : Spectre COSY du composé CP1

Les protons déjà cités sont portés par les carbones repérés sur le spectre HSQC (Figure II.158) à  $\delta_c$  99,6 (C-6), 94,6 (C-8), 116,4 (C-2', C-6'), 131,2 (C-3', C-5') et 60,3 (OCH<sub>3</sub>).

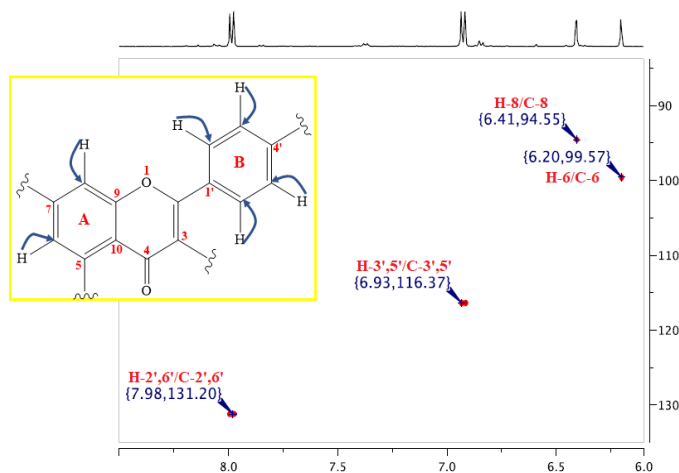


Figure II.158 : Spectre HSQC du composé CP1

Les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation indirecte <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC (Figure II.159), permettent de visualiser les corrélations du proton H-6 avec les carbones quaternaires oxygénés C-5 à  $\delta_c$  162,8 et C-7 à  $\delta_c$  165,7 et le carbone moyennement déblindé C-10 à  $\delta_c$  105,6 et la corrélation H-6/C-8.

Le couplage en <sup>2</sup>J du proton H-8 et le carbone quaternaire oxygéné C-9 est détecté à une valeur élevée de 158,2 ppm, en plus d'autres couplages avec des carbones déjà cités H-8/C-6, H-8/C-7 et H-8/C-10 (Figure II.159).

En ce qui concerne le cycle B, tous ses protons corrélient avec le carbone quaternaire déblindé C-4' qui absorbe à 161,4 ppm, ce carbone est porteur d'un groupement hydroxyle. Les protons H-2'-6' présentent des couplages en <sup>2</sup>J et <sup>3</sup>J avec les carbones C-6', C-2', C-2' ( $\delta_c$  157,7).



Les protons restants H-3'-5' couplent avec les carbones C-1' ( $\delta_c$  122,3), C-3' et C-5' (Figure II.159).

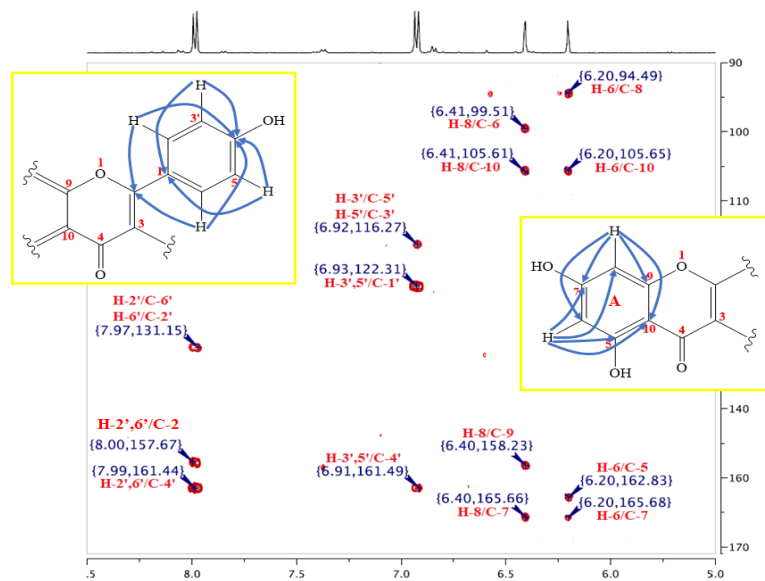


Figure II.159 : Spectre HMBC du composé CP1

Il reste à déterminer les déplacements chimiques des carbones quaternaires C-3 et C-4 du cycle C ne montrant aucune tache de corrélation sur le spectre HMBC avec les protons aromatiques mentionnés précédemment. Par ailleurs, l'existence d'une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et un carbone localisé à 139,2 ppm (Figure II.160), permet de caractériser ce carbone comme étant le carbone C-3. Tandis que, le déplacement chimique du carbone C-4 est assigné à  $\delta_c$  179,5 selon le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé.

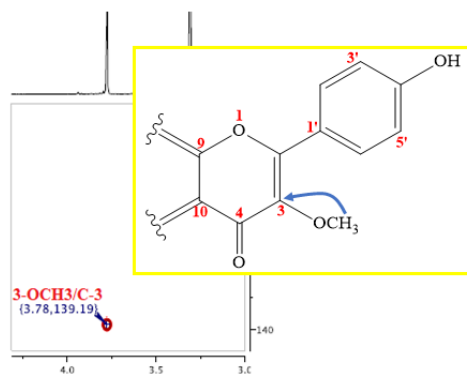


Figure II.160 : Spectre HMBC du composé CP1

Les constantes spectroscopiques des protons et carbones (Tableau II.15) du composé **CP1** sont en adéquation avec celles obtenues pour un composé nommé **Isokaempferide** (Figure II.161) décrit dans la littérature <sup>[116]</sup>. Antérieurement, ce composé est isolé de l'espèce

*Amburanacearensis* de la famille Fabaceae <sup>[117]</sup>. Ce composé possède des activités biologiques intéressantes hépatoprotectrice <sup>[118]</sup>, antimicrobienne <sup>[119]</sup> et antiproliférative <sup>[120]</sup>.

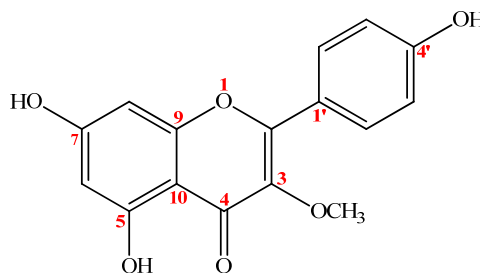


Figure II.161 : Isokaempferide (CP1)

Tableau II.15: Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé CP1 dans MeOD à 600 MHz

Position	CP1	
	$\delta_H$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_C$ (ppm)
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	-	157,7
<b>3</b>	-	139,2
<b>4</b>	-	179,5
<b>5</b>	-	162,8
<b>6</b>	6,20 (1H ; d ; 2,1)	99,6
<b>7</b>	-	165,7
<b>8</b>	6,41 (1H ; d ; 2,1)	94,6
<b>9</b>	-	158,2
<b>10</b>	-	105,6
<b>1'</b>	-	122,3
<b>2'</b>	7,99 (1H ; d ; 9,2)	131,2
<b>3'</b>	6,93 (1H ; d ; 2,1)	116,4
<b>4'</b>	-	161,5
<b>5'</b>	6,93 (1H ; d ; 2,1)	131,2
<b>6'</b>	7,99 (1H ; d ; 9,2)	116,4
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	3,78 (1H ; s)	60,3

## 2. Composé CP2

Le composé **CP2** (Figure II.162) se présente sous forme de cristaux blancs soluble dans le chloroforme. Après exposition de sa CCM à une solution d'acide sulfurique et visualisation sous UV (254 et 365 nm), une tache jaunâtre et une fluorescence violette sont observées, ceci est en faveur de l'existence d'une structure coumarinique.

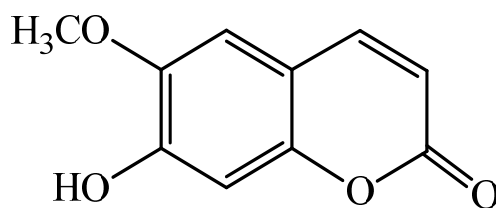


Figure II.162 : Structure du composé CP2

Les spectres de masse de ce composé effectués en haute résolution HR-ESI-MS (Figure II.162) indiquent des masses calculées en mode positif à  $m/z = 193,0501$  correspondant à une formule brute en  $C_{10}H_9O_4$  et en mode négatif à  $m/z = 191,0344$  en accord avec la formule brute en  $C_{10}H_7O_4$ . Le mode positif de ce spectre a généré deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+H]^+$  et  $[2M+Na]^+$  à  $m/z = 193,0517$  et  $407,0775$  respectivement. Tandis que, le mode négatif a révélé deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 191,0343$   $[M-H]^-$ ,  $m/z = 383,0739$   $[2M-H]^-$ . Ceci suggère que le composé **CP2** possède donc la formule brute  $C_{10}H_8O_4$  qui comportant 7 insaturations, soit une masse moléculaire de 192 uma.

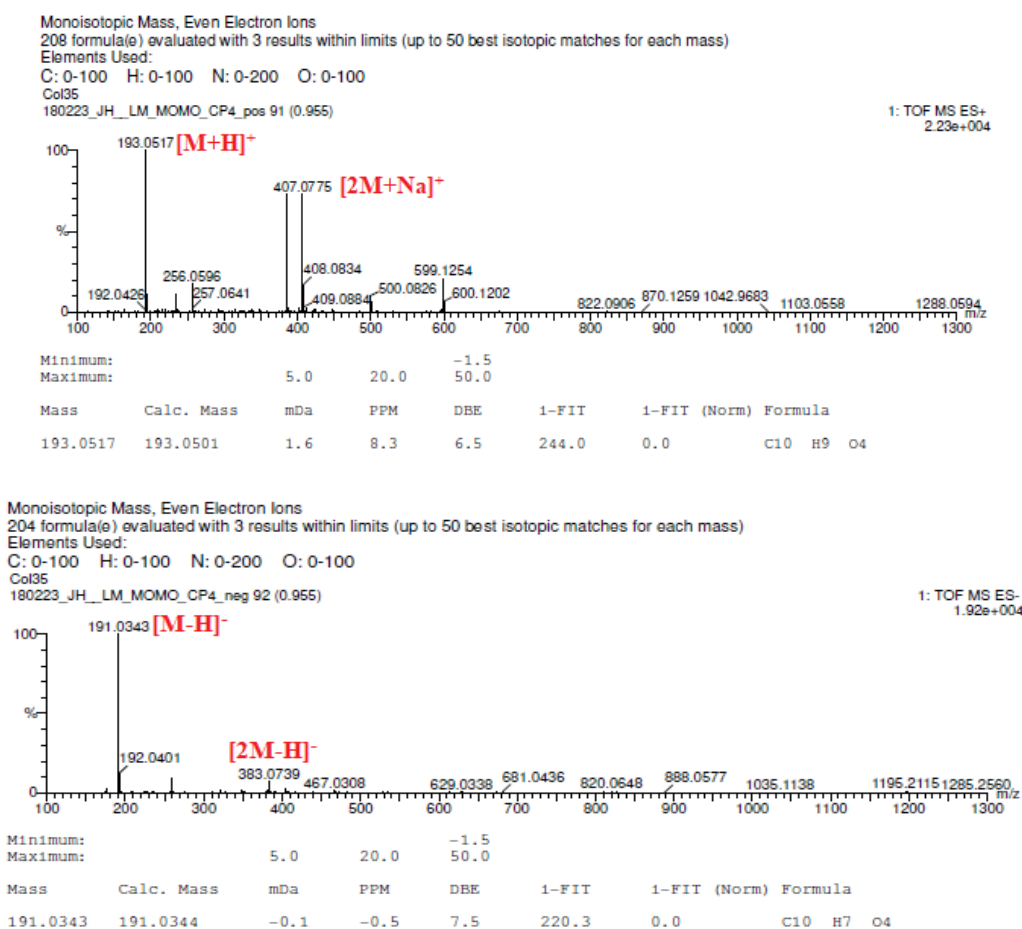
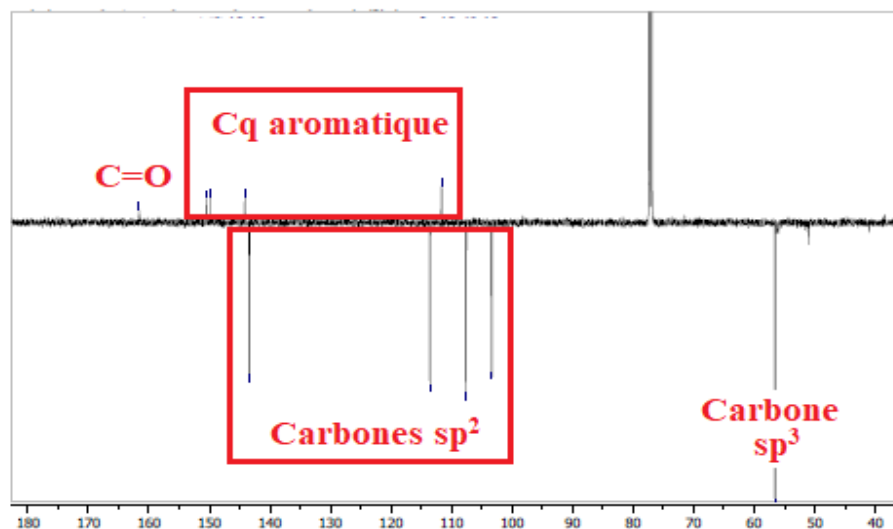


Figure II.162 : Spectres de masse HR-ESI-MS en modes négatif et positif du composé CP2

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure II.163) enregistré dans  $\text{CDCl}_3$  dénombre tous les dix carbones de la formule brute proposée pour ce composé, incluant quatre CH hybridé  $\text{sp}^2$ , cinq carbones aromatiques quaternaires dont un carbonyle d'une lactone et un carbone hybridé  $\text{sp}^3$ .

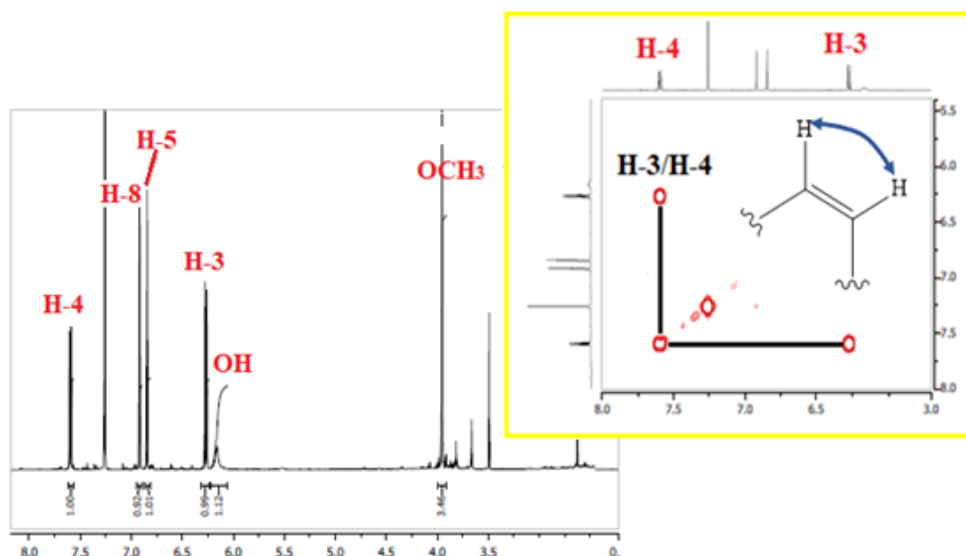


**Figure II.163 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé CP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  et les informations supplémentaires fournies par l'expérience COSY (Figures II.164), permettent de distinguer dans les champs faibles :

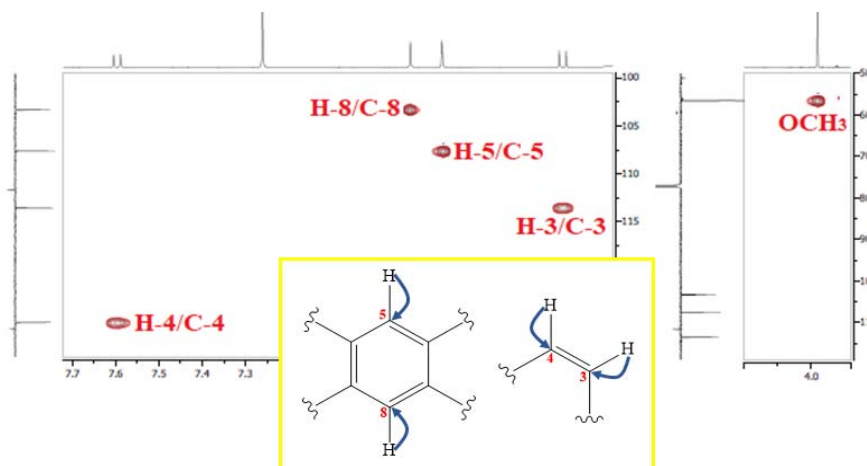
- > Deux signaux singulets détectés à 6,85 et 6,92 ppm attribuables aux protons nommés H-5 et H-8 respectivement, sont *para*-positionnés sur un noyau aromatique *tétra*-substitué.
- > Deux autres signaux sous forme de doublets localisés à 7,60 et 6,27 ppm sont caractéristiques d'une double liaison conjuguée et couplent entre eux avec une constante de couplage  $J = 9,4$  Hz, ce qui envisage une configuration *cis*. Les déplacements chimiques précédents sont affectés aux protons en positions 4 et 3 respectivement du squelette coumarinique.

Il est bien évident de noter que le squelette de ce composé porte deux substituants, le premier est un substituant méthoxyle qui est clairement apparu sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  à travers un signal singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  3,95 ; et le deuxième est un substituant hydroxyle détecté par le signal singulet large à  $\delta_{\text{H}}$  6,16, et qui ne convient sur le spectre HSQC avec aucun atome de carbone.



**Figure II.164 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY du composé CP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)**

Ces protons sont portés par les carbones caractérisés à  $\delta_c$  113,5 (C-3), 143,4 (C-4), 107,6 (C-5), 103,3 (C-8) et 56,5 (OCH<sub>3</sub>), suite à l'expérience HSQC (Figures II.165).



**Figure II.165 : Spectre HSQC du composé CP2**

L'analyse du spectre HMBC nous permet de reconstituer le squelette de la molécule en prenant comme point de départ les protons aromatiques. Les deux protons H-5 et H-8 corréleront sur ce spectre (Figure II.166) avec le carbone quaternaire C-7 à 149,8 ppm, son déplacement chimique élevé on suppose qu'il est connecté à un atome d'oxygène. Le proton H-5 tout seul corréle avec le carbone C-4 déjà caractérisé.

Le carbone quaternaire C-6 résonant à  $\delta_c$  144,1, est déterminé par la corrélation entre lui et le proton H-8 sur le spectre HMBC (Figure II.166). Ce carbone (C6) est substitué par le groupement méthoxyle déjà identifié, suite à la tache de corrélation des protons remarquée sur

le même spectre. Le proton H-8 corrèle aussi avec le carbone quaternaire de jonction C-10 localisé à  $\delta_c$  111,6. Finalement, le carbone C-7 porteur du groupement hydroxyle est détecté à  $\delta_c$  149,8 suite au couplage 7-OH/C-7.

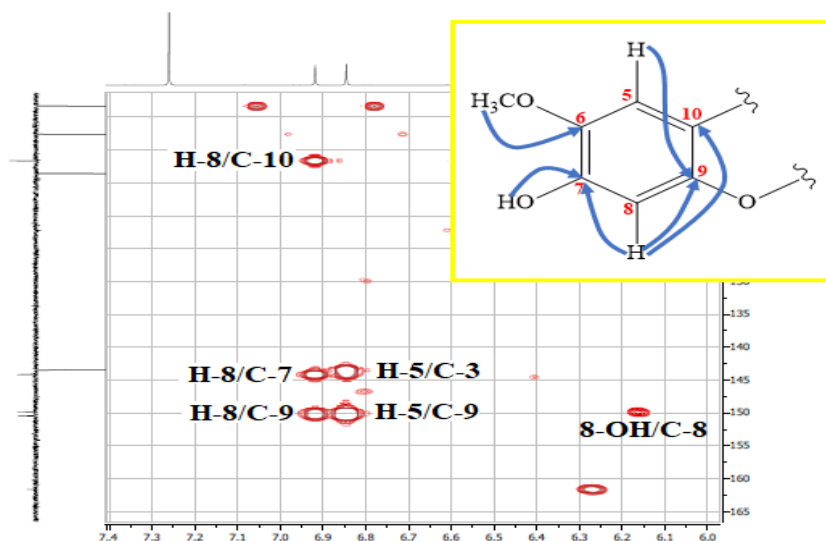


Figure II.166 : Spectre HMBC du composé CP2

Le proton H-4 corrèle à son tour sur le spectre HMBC (Figure II.167) avec deux carbones C-5 et C-9 à 150,9 ppm, ce qui justifie l'emplacement du carbone C-4 du fragment éthylénique à proximité deux carbones, exactement sur le carbone C-10. Cette attribution est fortement confirmée par la tache d'interaction en  $^3J$  entre le proton H-3 et C-10. On observe sur le même spectre (Figure II.2.8) des interactions en  $^2J$  et  $^3J$  des protons H-3 et H-4 avec un carbone très déblindé résonnant à 161,6 ppm attribué à un carbonyle, ceci permet de composer un cycle lactonique.

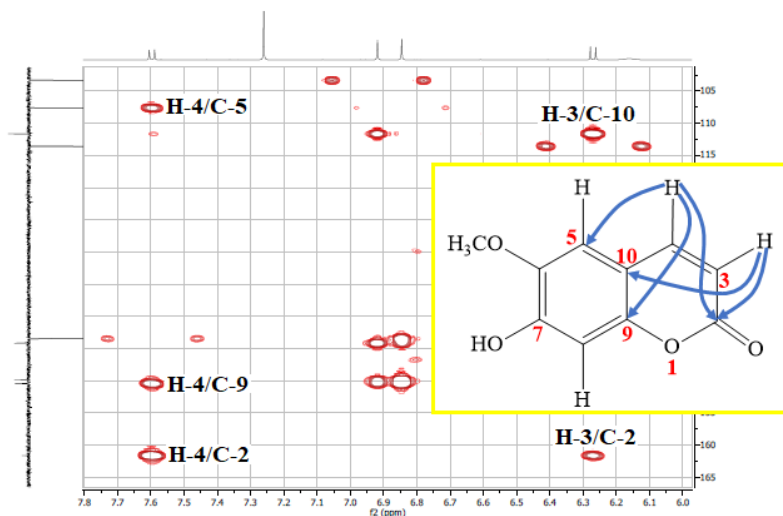


Figure II.167 : Spectre HMBC du composé CP2

La structure moléculaire élucidée par l'analyse spectrale précédente, est bien confirmée grâce à d'autres corrélations remarquées sur l'expérience ROESY. En effet, le couplage vicinal entre H-3/H-4, le couplage allylique entre H-4/H-5 qui n'apparaît pas sur le spectre COSY et le couplage dipolaire en espace entre H-5/6-OCH<sub>3</sub> permettent de conclure que tous ces protons sont orientés à leurs positions exactes (Figure II.168).

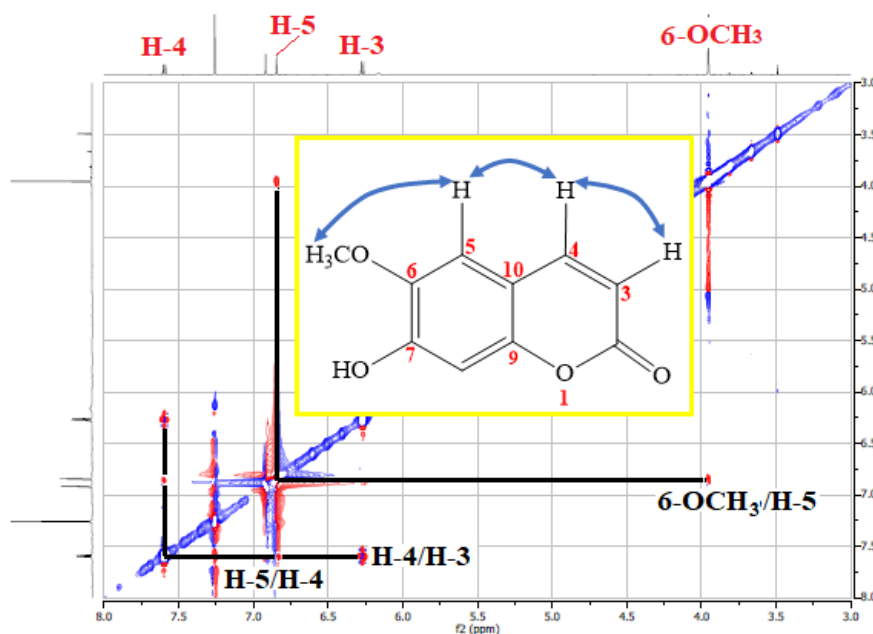


Figure II.168 : Spectre ROESY du composé CP2

Les données spectrales RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C que nous avons obtenues, sont en accord avec les données de son analogue isolé à partir de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* par Aichour et al. [121], nous ont permis de caractériser le composé CP2 comme étant le **6-méthoxy-7-hydroxycoumarine**, communément appelée **Scopolétine** (Figure II.169). Il a été isolé antérieurement aussi de l'espèce *Magnolia fargesii* [122].

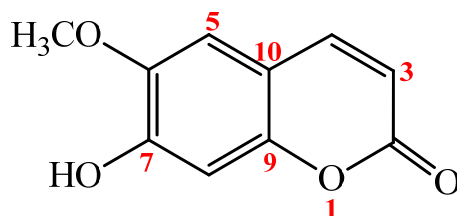


Figure II.169 : 6-méthoxy-7-hydroxycoumarine ou Scopolétine (CP2)

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CP2 sont présentés dans le tableau II.16.

Tableau II.16 : Données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé CP2 dans  $\text{CDCl}_3$  à 600 MHz

Position	CP2	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [Int, m, J (Hz)]	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	-
2	-	161,6
3	6,27 (1H ; d ; 9,4)	113,5
4	7,60 (1H ; d ; 9,4)	143,4
5	6,85 (1H ; s)	107,6
6	-	144,1
7	-	149,8
8	8,92 (1H ; s)	103,3
9	-	150,4
10	-	111,6
6-OCH <sub>3</sub>	3,95 (3H ; s)	56,5
7-OH	6,16	-

### 3. Composés CP3 et CP4

Les composés CP3 et CP4 sont identifiés comme étant  $\beta$ -sitosterol et Lupéol (Figures II.170) par comparaison de leurs CCM avec des échantillons témoins au laboratoire. Ces deux métabolites secondaires se présentent sous forme des poudres blanches solubles dans le chloroforme et invisibles sous la lumière UV à 254 nm. Après la révélation et chauffage, le composé CP3 montre une tache marron et le composé CP4 donne une couleur orange-marron.

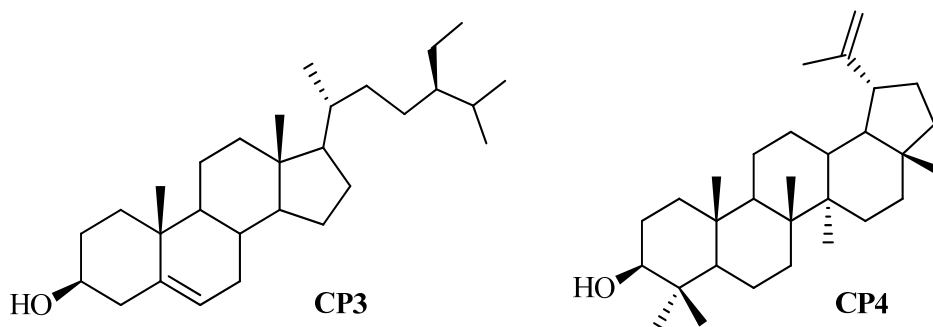


Figure II.170 :  $\beta$ -sitostérol (CP3) et Lupéol (CP4)

### II.3. Conclusion

Ce chapitre a conduit à la détermination de la composition chimique de deux plantes de la famille Astaeraceae, appartenant à deux genres différents *Atractylis* et *Carduncellus* largement rencontrés dans la région des Aures, à savoir *Atractylis humilis* L. et *Carduncellus pinnatus* DC.



On rapporte 14 métabolites secondaires au cours de l'investigation phytochimique de la plante entière *Atractylis humilis* L. Cette plante médicinale n'a pas été l'objet d'études chimique et biologique antérieures.

Les composés naturels purifiés et caractérisés 1-14 ont été obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle (6 métabolites secondaires) et de l'extrait *n*-butanolique (8 substances), comprenant :

- › Deux lignanes de type aryltétraline, dont un est un nouveau composé.
- › Deux flavonoïdes C-glucosylés.
- › Cinq composés phénoliques.
- › Trois triterpènes.
- › Deux dérivés osidiques.

La composition chimique de l'espèce *Atractylis humilis* confirme bien que les polyphénols sont des composants majeurs, notamment les flavonoïdes des plantes du genre *Atractylis*.

Par ailleurs, et tenant compte de la littérature, les cyclolignanes en général et ceux de type lyoniresinol en particulier comme les composés isolés **TH1** et **TH2**, sont des métabolites secondaires qui n'ont été jamais trouvés dans les espèces *Atractylis*. Cette étude a permis également de conclure que ce genre de composés a été détecté pour la première fois dans la famille Asteraceae. Cette révélation pourrait être d'une valeur taxonomique importante pour les études chimiotaxonomiques sur le genre *Atractylis* et la famille Asteraceae, et elle peut ouvrir un champ de recherche considérable pour les phytochimistes s'intéressant à la composition chimique des plantes du genre *Atractylis* particulièrement les lignanes.

Il est à noter que la configuration relative des sites chiraux 7', 8' et 8 du nouveau composé (7'S,8R,8'S)-9'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4',9-trihydroxy-3',4,5,5'-tétraméthoxy-2,7'-cyclolignane nommé Humilisane A (**TH1**) a été établie en analysant minutieusement les effets dipolaires observés dans l'expérience NOESY, et les valeurs de constantes de couplage des protons présents au niveau et au voisinage de ces sites et la comparaison avec les données de la littérature.

Il est très important de signaler que la présence de composés flavonoidiques de type C-glycosylflavone semble être restreinte parmi les plantes *Atractylis*. Néanmoins, la 7,3'-

diméthyléther isoorientine (**TH3**) et la Swertisine (**TH4**) ont été détectés pour la première fois dans les espèces *Atractylis*.

Les composés restants comprenant trois triterpènes **TH5-TH7**, cinq phénoliques **TH8-TH12** et deux osides **TH13, TH14** sont des composés communs pour la majorité des plantes et ils ont une faible valeur taxonomique.

L'investigation phytochimique de la plante *Carduncellus pinnatus* a porté sur l'extrait acétate d'éthyle et a permis l'isolement et l'identification de quatre métabolites secondaires, un flavonoïde Isokaempferide, une coumarine Scopolétine et deux triterpènes  $\beta$ -sitostérol et Lupéol. Ces quatre composés n'expriment pas vraiment la constitution chimique de cet extrait vu son profil CCM qui montre une richesse énorme et intéressante. La difficulté lors de la séparation et l'isolement des produits est due peut-être à des Rf très proches, de fait que des composés monotaches sur CCM se révèlent à la fin de la purification d'être des mélanges de plusieurs produits et nécessitent donc des méthodes de séparation et de purification plus efficaces et modernes comme l'HPLC. L'extrait *n*-BuOH présente également sur CCM un mélange complexe de taches difficile à le séparer par les moyens chromatographiques classiques.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été entièrement caractérisées au moyen des méthodes spectrales, y compris des expériences de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (ESI-HR et ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$  et la comparaison de leurs données spectrales avec celles rapportées dans la littérature.

## Chapitre III

› *Résultats et discussion des activités  
biologiques*

### III. Résultats et discussion des activités biologiques

#### III.1. Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux

Afin de déterminer les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits bruts (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) issus des deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus*, une analyse quantitative par dosage spectrophotométrique a été réalisée.

##### III.1.1. Résultats des deux espèces *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus*

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *A. humilis*, ainsi que des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *C. pinnatus* ont été déterminées à partir des courbes d'étalonnage établies par l'acide gallique et la quercétine respectivement (Figures III.1 et III.2). Les résultats ont été rapportés en termes de microgrammes d'équivalent de standards par milligramme d'extrait végétal (Tableaux III.1 et III.2).

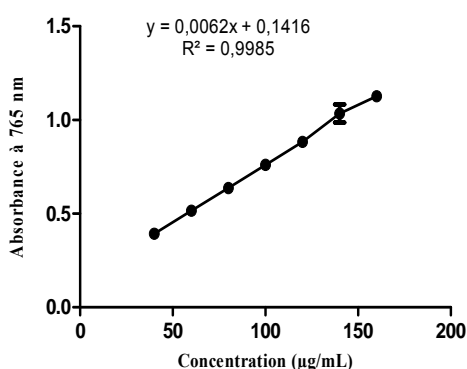


Figure III.1 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne  $\pm$  SD)

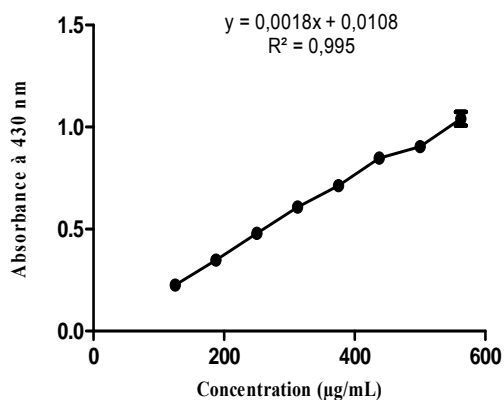


Figure III.2 : Droite d'étalonnage de la quercétine (Moyenne  $\pm$  SD)

**Tableau III.1 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits bruts de la plante *A. humilis***

<i>Extraits</i>	<i>Teneur totale en polyphénols<sup>a</sup> (<math>\mu\text{g EAG/mg d'extrait végétal}</math>)</i>	<i>Teneur totale en flavonoïdes<sup>b</sup> (<math>\mu\text{g EQ/mg d'extrait végétal}</math>)</i>
<i>AcOEt</i>	140,97 $\pm$ 0,53	107,40 $\pm$ 0,55
<i>n-BuOH</i>	113,77 $\pm$ 0,62	97,91 $\pm$ 0,25

<sup>a</sup> La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique/mg d'extrait végétal.

<sup>b</sup> La teneur en flavonoïdes a été exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de la quercétine/mg d'extrait végétal.

**Tableau III.2 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits bruts de la plante *C. pinnatus***

<i>Extraits</i>	<i>Teneur totale en polyphénols<sup>a</sup> (<math>\mu\text{g EAG/mg d'extrait végétal}</math>)</i>	<i>Teneur totale en flavonoïdes<sup>b</sup> (<math>\mu\text{g EQ/mg d'extrait végétal}</math>)</i>
<i>EP</i>	196,19 $\pm$ 0,77	60,23 $\pm$ 0,43
<i>AcOEt</i>	452,91 $\pm$ 0,21	106,07 $\pm$ 0,1
<i>n-BuOH</i>	470,71 $\pm$ 0,50	117,95 $\pm$ 0,35

<sup>a</sup> La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique/mg d'extrait végétal.

<sup>b</sup> La teneur en flavonoïdes a été exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de la quercétine/mg d'extrait végétal.

### III.1.2. Discussion

Les résultats présentés dans les tableaux II.1.1 et II.12 indiquent que la quantité de polyphénols et de flavonoïdes varie considérablement entre les différents extraits. En effet, les extraits de l'espèce *C. pinnatus* possèdent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes plus élevées que celles des extraits de l'espèce *A. humilis*. D'autre part, l'extrait *n*-BuOH (470,71  $\mu\text{g EAG/mg ex}$ ) de l'espèce *C. pinnatus* s'est avéré le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à tous les extraits testés suivi par les extraits AcOEt (452,91  $\mu\text{g EAG/mg ex}$ ) et EP (196,19  $\mu\text{g EAG/mg ex}$ ) de la même plante. En outre, l'extrait AcOEt (140,97  $\mu\text{g EAG/mg ex}$ ) de l'espèce *A. humilis* renferme une quantité en polyphénols supérieure à celle de l'extrait *n*-BuOH (113,77  $\mu\text{g EAG/mg ex}$ ) de la même espèce.

A partir de ces résultats, on déduit que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux des extraits de la plante *C. pinnatus*, dépendent de la polarité des solvants utilisés dans le processus d'extraction, ce qui est incohérent dans le cas des teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits d'*Atractyllis humilis*.

Les quantités de composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits bruts peuvent varier en fonction de divers facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, l'intensité lumineuse et les minéraux. Cependant, d'autres facteurs comme la culture et les lieux de culture, les procédures de stockage et les conditions opératoires d'extraction peuvent également affecter ces contenus [123,124].

Les extraits végétaux sont considérés très riches en polyphénols qui sont rencontrés souvent avec des structures fortement hydroxylées ; ce qui rend la majorité de ce genre de métabolites secondaires comme des agents anti-oxydants puissants, et explique par le fait leur absorption des radicaux libres dans les systèmes biologiques [125]. Toutefois, il s'avère que ces polyphénols possèdent aussi une caractéristique remarquable concernant la précipitation des protéines et des polyamides [126].

Très peu d'études ayant été consacrées à l'évaluation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits des espèces du genre *Atractylis*. En effet l'étude réalisée sur l'espèce *A. babelii* a révélé des teneurs plus faibles en polyphénols et flavonoïdes par rapport à nos résultats [127]. Une autre recherche s'intéressant au contenu en flavonoïdes dans l'extrait *n*-BuOH de la plante *A. carduus*, a montré une teneur extrêmement positive [128]. Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de l'espèce *A. serratuloides* ont fait l'objet d'une investigation phytochimique afin de déterminer leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes, les résultats obtenus ont indiqué contrairement à la présente étude, des teneurs plus élevées dans l'extrait *n*-butanolique suivi par l'extrait acétate d'éthyle [129].

Concernant les plantes du genre *Carduncellus*, aucune étude n'a été rapportée sur les teneurs en polyphénols et/ou flavonoïdes, mais la variation de nos résultats démontre la capacité de la plante *C. pinnatus* à jouer un rôle important en tant qu'agents anti-oxydants puissants.

### III.2. Activités antioxydantes

Les extraits bruts obtenus à partir des deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* et les molécules standards (BHA et BHT) ont été étudiés pour leurs propriétés antioxydantes. En effet, quatre méthodes différentes comprenant le piégeage des radicaux libres DPPH, ABTS et galvinoxyle (GOR) et le dosage de la phénanthroline sont utilisées pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'espèce *A. humilis* ; et également quatre méthodes ont été réalisées pour l'espèce *C. pinnatus*, à savoir : le piégeage des radicaux libres DPPH, le test de phosphomolybdate (PPM), le pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le piégeage de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### III.2.1. Activités antioxydantes réalisées sur l'espèce *A. humilis*

#### a. Piégeage des radicaux libres DPPH

Les résultats de ce test ont montré que les extraits bruts AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *A. humilis*, ainsi que les antioxydants standards BHA et BHT utilisés, agissent tous comme des agents antioxydants de manière dépendante de la concentration (Figure III.3).

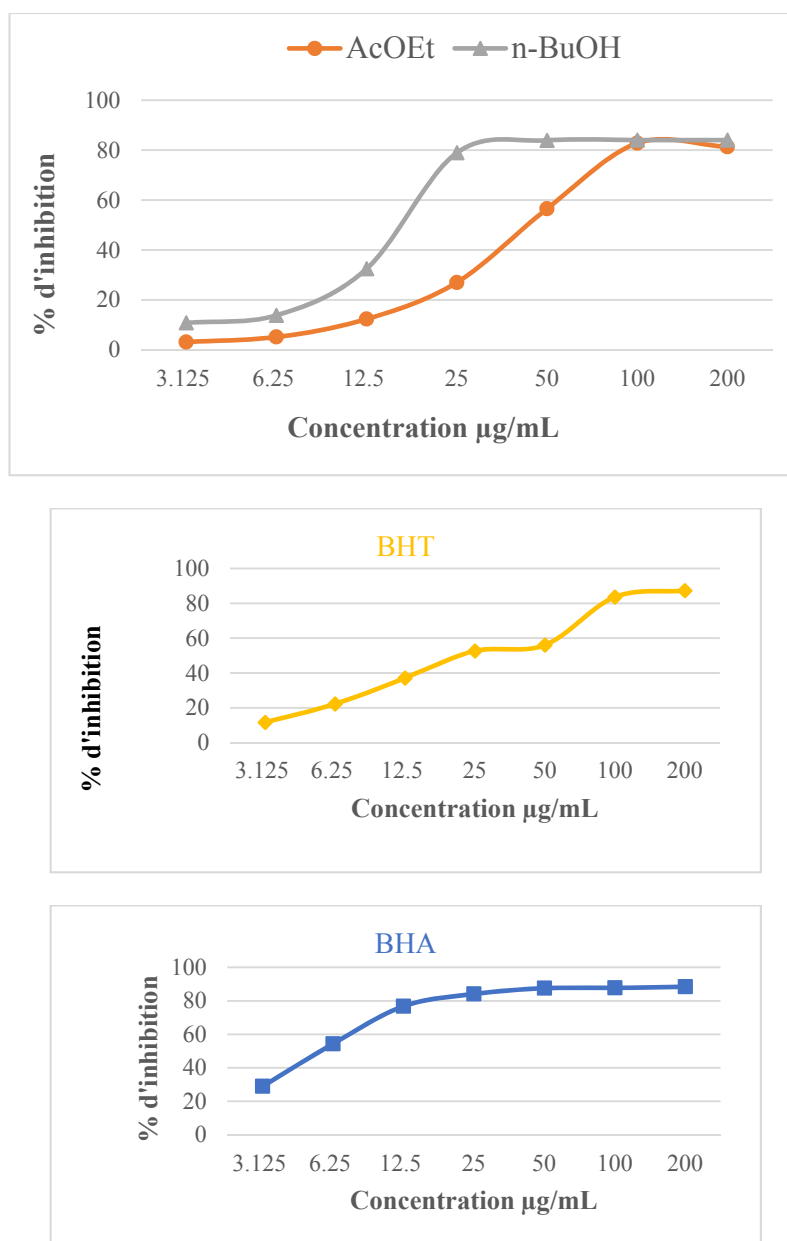


Figure II.3 : Activité anti-oxydante des extraits bruts (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *A. humilis* et des antioxydants standards (BHA et BHT) vis-à-vis du radical DPPH

La comparaison de la capacité antioxydante entre les extraits testés et les antioxydants standards, révèle que l'extrait *n*-BuOH possède un pouvoir antioxydant puissant que celui de l'extrait AcOEt et le BHT comme molécule de référence (Tableau II.3).

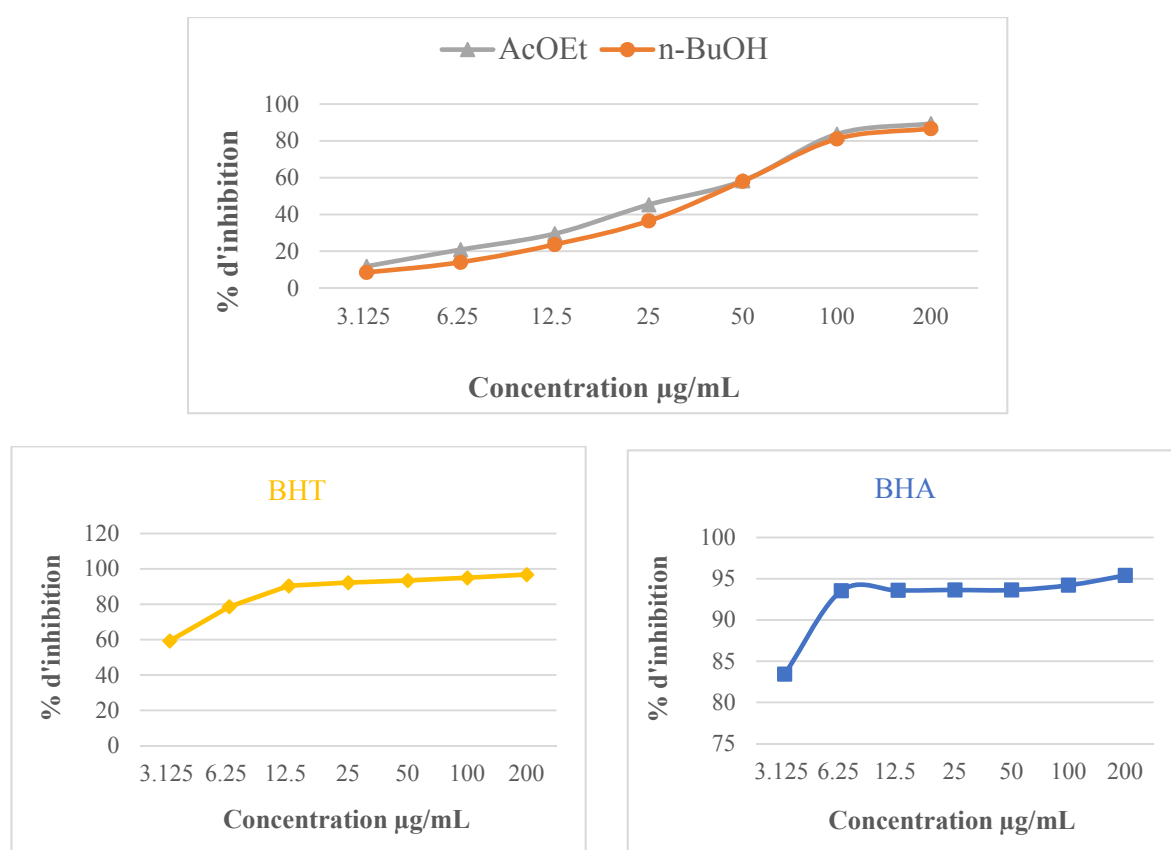
**Tableau II.2.1 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits bruts de la plante *A. humilis* et standards par DPPH**

Extraits et standards	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>AcOEt</i>	49,98 ± 0,16
<i>n-BuOH</i>	16,94 ± 0,52
<i>BHA</i> *	5,73 ± 0,41
<i>BHT</i> *	22,32 ± 1,19

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD de trois mesures (p < 0,05); \* Molécules standards

### b. Piégeage des radicaux libres ABTS

Les résultats de ce test montrent que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *A. humilis* ainsi que les standards BHA et BHT, agissent positivement sur le radical ABTS (Figure III.4).



**Figure III.4 : Activité anti-oxydante des extraits bruts (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *A. humilis* et des antioxydants standards (BHA et BHT) vis-à-vis du radical ABTS**

L'extrait AcOEt présente une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait *n*-BuOH, mais elle est relativement inférieure à celles des antioxydants standards BHA et BHT (Tableau III.4).



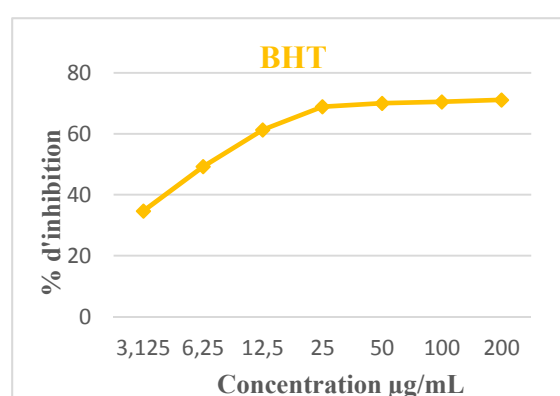
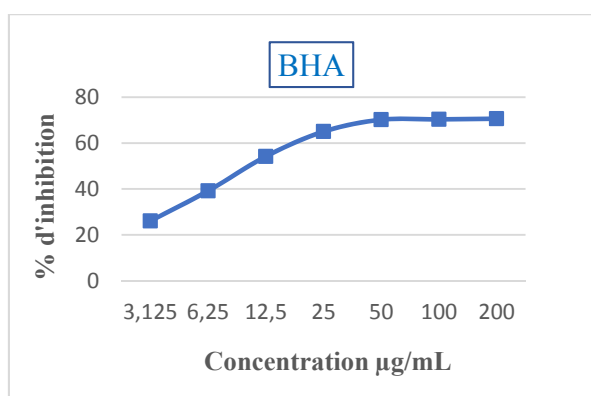
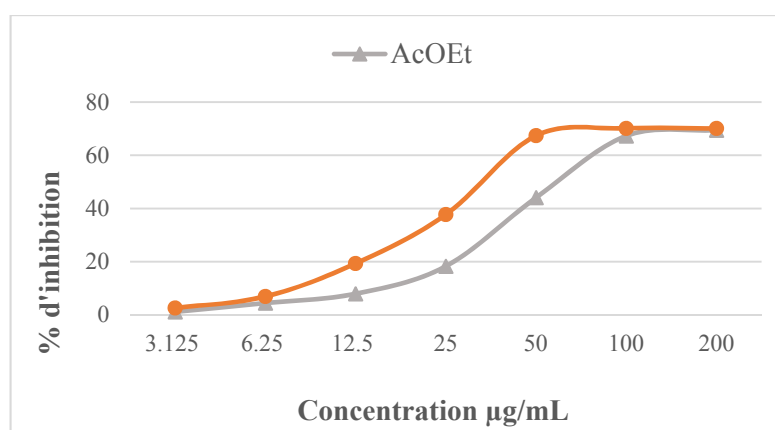
**Tableau III.4 : Activités antioxydantes des extraits de la plante *A. humilis* et standards par le test ABTS**

Extraits et standards	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>AcOEt</i>	33,84 ± 2,60 <sup>b</sup>
<i>n-BuOH</i>	43,47 ± 1,85 <sup>a</sup>
<i>BHA</i> <sup>*</sup>	1,81 ± 0,10 <sup>c</sup>
<i>BHT</i> <sup>*</sup>	1,29 ± 0,30 <sup>c</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD de trois mesures (p < 0,05) ; \* Molécules standards

### c. Résultats de l'activité de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

Tous les extraits testés et les molécules standards (BHA et BHT) montrent une activité antioxydante qui varie d'une manière dose dépendante. (Figure III.5).



**Figure III.5 : Activité anti-oxydante des extraits bruts (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *A. humilis* et des antioxydants standards (BHA et BHT) vis-à-vis du radical galvinoxyle**

Ces résultats ont dévoilé une similarité avec ceux du test DPPH, où on trouve que l'extrait *n*-BuOH a une capacité plus élevée que l'extrait AcOEt dans l'activité de piégeage des radicaux galvinoxyles (Tableau III.5).

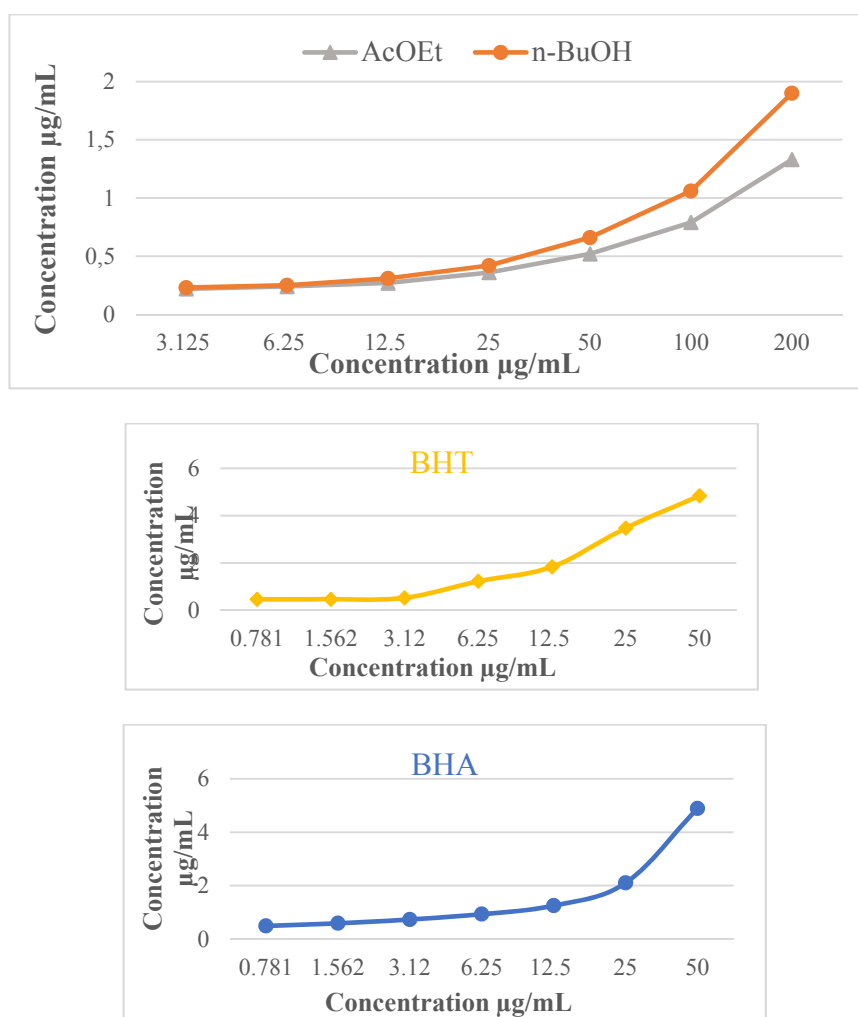
**Tableau III.5 : Activités antioxydantes des extraits de la plante *A. humilis* et standards par le piégeage des radicaux galvinoxyles**

<i>Extraits et standards</i>	<i>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</i>
<i>AcOEt</i>	69,22 ± 2,33 <sup>a</sup>
<i>n-BuOH</i>	35,90 ± 0,13 <sup>b</sup>
<i>BHA</i> *	4,35 ± 0,13 <sup>c</sup>
<i>BHT</i> *	4,99 ± 0,06 <sup>c</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD de trois mesures (p < 0,05) ; \* Molécules standards

#### d. Activité antioxydante par la méthode de phénanthroline

Les résultats obtenus indiquent que les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont une capacité modérée à réduire le fer III en fer II par rapport à celles du BHA et BHT en tant que molécules de référence (Figure III.6 et Tableau III.6).



**Figure III.6 : Activité antioxydante par phénanthroline des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *A. humilis* et standards**

**Tableau III.6 : Activité antioxydante des extraits de la plante *A. humilis* et standards par la méthode de phénanthroline**

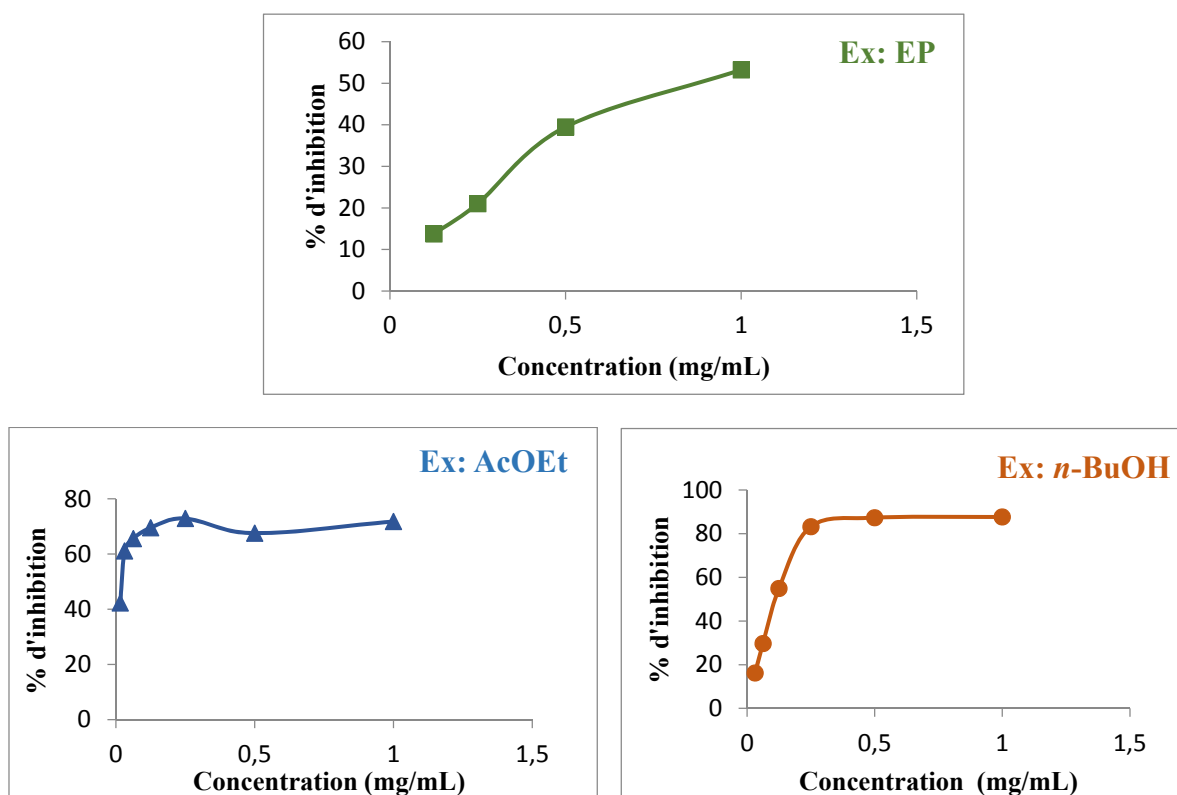
Extraits et standards	essai $A_{0.5}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>AcOEt</i>	$48,77 \pm 2,35^a$
<i>n-BuOH</i>	$33,10 \pm 1,00^b$
<i>BHA</i> *	$0,93 \pm 0,07^d$
<i>BHT</i> *	$2,24 \pm 0,17^c$

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD de trois mesures ( $p < 0,05$ ); \* Molécules standards

### III.2.2. Activités antioxydantes réalisées sur l'espèce *C. pinnatus*

#### a. Résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH

Les résultats obtenus indiquent que les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *C. pinnatus*, ainsi que les antioxydants standards (BHA, BHT et acide ascorbique) ont une capacité à réduire le radical libre DPPH de manière dépendante à la concentration (Figure III.7).



**Figure III.7 : Activité antioxydante des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *C. pinnatus* et standards vis-à-vis du radical DPPH**

L'extrait AcOEt est doté d'une capacité antioxydante modérée et proche de celle du BHT suivie par l'extrait *n*-BuOH, tandis que l'extrait EP montre la plus faible activité antioxydante (Tableau III.7).

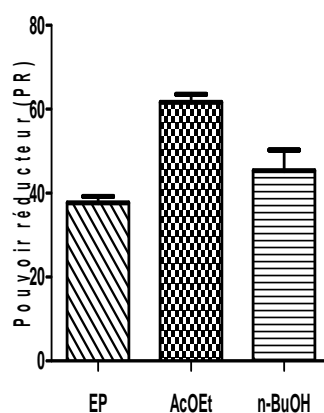
**Tableau III.7 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits de la plante *C. pinnatus* et standards par le test de DPPH**

<i>Extraits et standards</i>	<i>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</i>
<i>EP</i>	872,2 ± 0,02
<i>AcOEt</i>	22,05 ± 0,03
<i>n-BuOH</i>	130,37 ± 0,002
<i>BHA</i> *	6,82 ± 0,49
<i>BHT</i> *	22,32 ± 0,02
<i>A. ascorbique</i> *	7,74 ± 0,19

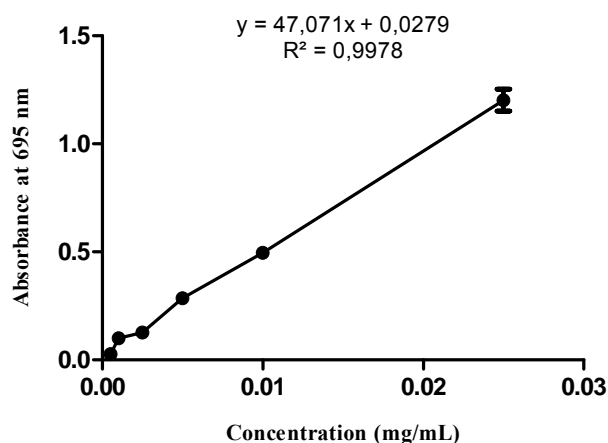
Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD de trois mesures ( $p < 0,05$ ) ; \* Molécules standards

#### b. Test de phosphomolybdate (PPM)

L'ensemble des extraits analysés (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *C. pinnatus* révèle des propriétés antioxydantes intéressantes ; du fait que l'extrait AcOEt présente une forte activité antioxydante avec une valeur de l'ordre de  $62,17 \pm 0,0019 \mu\text{g EAA/mg ex}$ , suivie respectivement par les extraits *n*-butanolique ( $46,78 \pm 0,005 \mu\text{g EAA/mg ex}$ ) et éther de pétrole ( $36,76 \pm 0,004 \mu\text{g EAA/mg ex}$ ). La capacité antioxydante de ces extraits est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAA/mg ex}$ ) et l'acide ascorbique est utilisé comme molécule standard pour établir la droite d'étalonnage (Figures III.8 et III.9).



**Figure III.8 : Activité antioxydante par PPM des trois extraits de la plante *C. pinnatus* (Moyenne ± SD)**

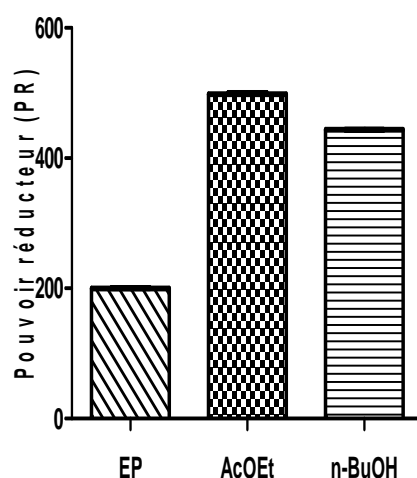


**Figure III.9 : Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique vis-à-vis du test PPM**

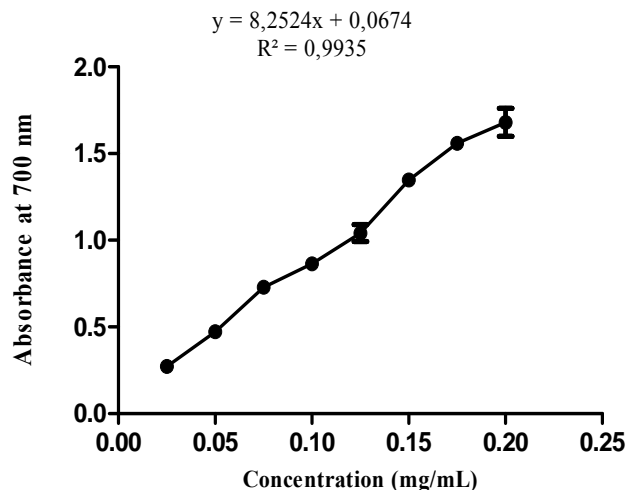
(Moyenne  $\pm$  SD)

### c. Pouvoir réducteur du fer FRAP

Ce test est basé sur le pouvoir antioxydant des extraits à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), où les résultats sont exprimés par rapport à l'acide ascorbique comme molécule de référence en tant que microgrammes d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait ( $\mu g$  EAA/mg ex). Les résultats ont montré que la capacité de l'extrait AcOEt à réduire le  $Fe^{3+}$  est la plus élevée ( $498,29 \pm 1,74 \mu g$  EAA/mg d'extrait), suivie par l'extrait *n*-BuOH ( $443,50 \pm 0,41 \mu g$  EAA/mg d'extrait). Tandis que, le pouvoir antioxydant de l'extrait éther de pétrole est le plus petit ( $199,66 \pm 0,56 \mu g$  EAA/mg d'extrait) (Figures III.10 et III.11).



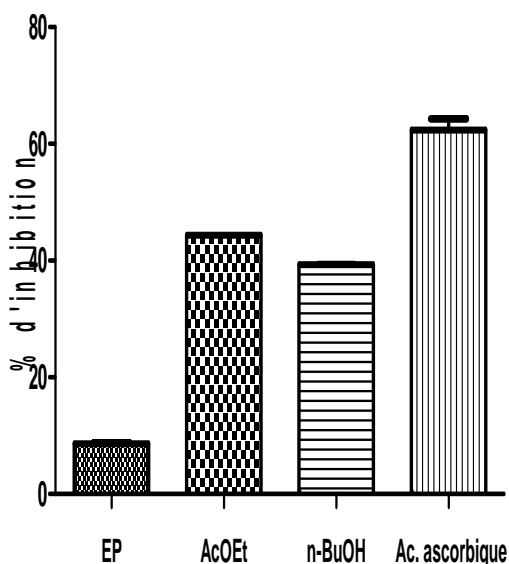
**Figure III.10 : Activité antioxydante par FRAP des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *C. pinnatus* (Moyenne  $\pm$  SD)**



**Figure III.11 : Droite d'étalonnages de l'acide ascorbique vis-à-vis du test FRAP  
(Moyenne  $\pm$  SD)**

#### d. Piégeage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Parmi les trois extraits de la plante *C. pinnatus*, l'extrait AcOEt est le plus efficace contre le radical de peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 44,36%, suivi par l'extrait *n*-BuOH (39,32 %) et enfin l'extrait EP (8,65 %). Ces résultats sont comparés par rapport à l'acide ascorbique (62,36 %) qui a montré un pouvoir antioxydant supérieur à tous les extraits testés (Figure III.12 et Tableau III.8).



**Figure III.12 : Pourcentage d'inhibition des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce  
*C. pinnatus* vis-à-vis du test  $H_2O_2$  (Moyenne  $\pm$  SD)**

**Tableau III.8 : Pourcentage Moy% des extraits de la plante *C. pinnatus* et standards par le test de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

<i>Extraits et standards</i>	<i>Moy%</i>
<i>EP</i>	8,65 ± 0,66
<i>AcOEt</i>	44,36 ± 0,66
<i>n-BuOH</i>	39,32 ± 0,66
<i>A. ascorbique*</i>	62,36 ± 1,91

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD de trois mesures (p < 0,05); \* Molécules standards

### III.2.3. Discussion

En général, tous les extraits testés ont indiqué une capacité antioxydante comparative-ment au BHA, BHT et acide ascorbique comme molécules de référence dans toutes les méthodes testées.

Les propriétés antioxydantes des extraits de plantes sont principalement dues à leur richesse en composés polyphénoliques, en particulier les flavonoïdes, qui sont connus comme de potentiels piègeurs de radicaux libres, ou de donneurs des atomes d'hydrogène ou des électrons pour inhiber la peroxydation lipidique. Ces constatations peuvent expliquer l'activité antioxydante des extraits des deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus*. En fait, de nombreux flavonoïdes et polyphénols ont été isolés de ces deux espèces au cours de l'investigation chimique.

Des études antérieures menées sur l'activité antioxydante des espèces du genre *Atractylis* ont montré des variations dans leurs résultats. En effet, l'espèce *Atractylis babelii* a montré une activité antioxydante puissante dans les tests DPPH et ABTS [127]. De plus, les espèces *A. gummifera* et *A. flava* ont exhibé une capacité antioxydante inférieure dans le test DPPH par rapport aux résultats de l'espèce *A. humilis* [130,131]. La variation des résultats des activités antioxydantes peut être expliquée par la différence de réactivité des extraits bruts due à leur composition chimique, leurs interactions synergétiques ou antagoniques et la polarité des systèmes [132].

Par contre, les espèces du genre *Carduncellus* n'ont pas fait l'objet d'investigations biologiques se rapportant aux activités antioxydantes de leurs extraits. Selon nos résultats, il est envisagé que le pouvoir antioxydant des trois extraits de l'espèce *C. pinnatus* est dû probablement à la présence de composés phénoliques et flavonoïdes. D'autre part, la forte activité antioxydante de l'extrait éther de pétrole dans le test de piégeage de peroxyde

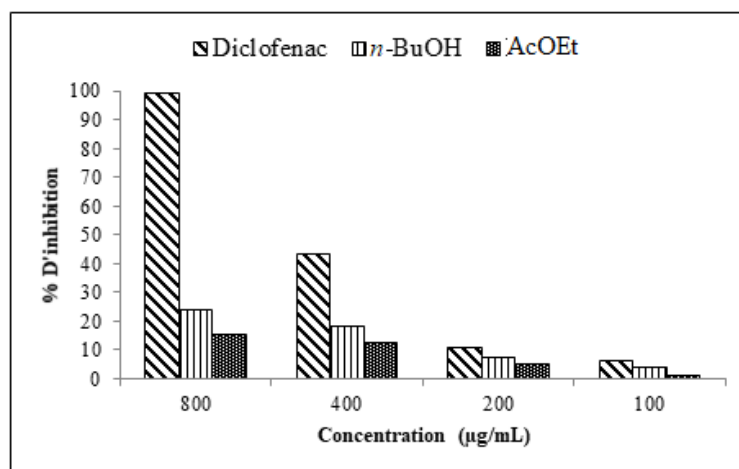
d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pourrait être expliquée par la présence d'autres molécules bioactives telles que les caroténoïdes, les huiles essentielles et les vitamines, ainsi que les acides gras qui peuvent réagir dans les systèmes apolaires <sup>[133]</sup>.

### III.3. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts préparés à partir des espèces *A. humilis* et *C. pinnatus*, et Diclofénac sodique comme standard a été évaluée par la dénaturation de l'albumine d'œuf. Les résultats ont montré que tous les extraits bruts et le médicament standard empêchent la dénaturation de la protéine (albumine) de manière dépendante de la concentration.

#### III.3.1. Résultats de l'espèce *A. humilis*

Dans le cas des extraits de la plante *A. humilis*, le diclofénac révèle le pourcentage d'inhibition maximal à 99,23 % à la concentration de 800  $\mu\text{g/mL}$ . De plus, à la même concentration, les extraits AcOEt et *n*-BuOH présentent des valeurs de pourcentage d'inhibition à 15,33 % et 24,14 % respectivement (Figure III.13).

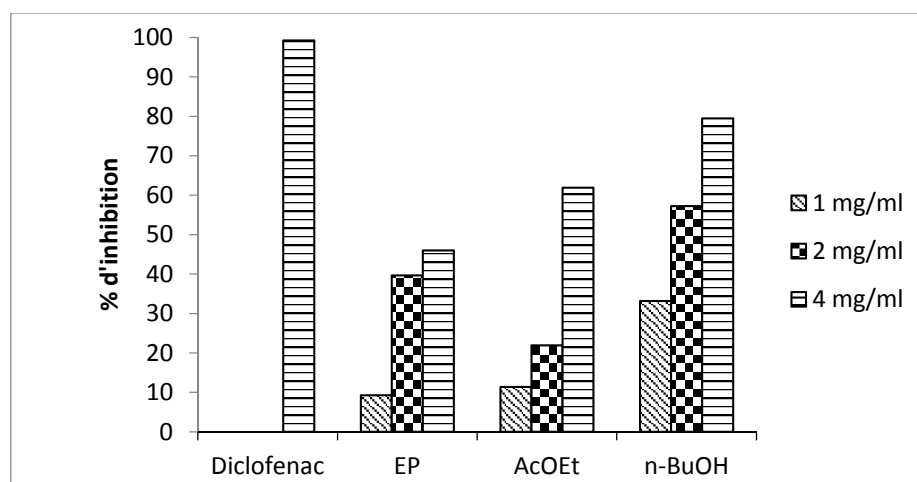


**Figure III.13 : Activité anti-inflammatoire par dénaturation de l'albumine d'œuf des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *A. humilis* et le diclofénac comme médicament standard**

#### III.3.2. Résultats de l'espèce *C. pinnatus*

A la concentration de 4  $\text{mg/mL}$ , le diclofénac a montré le pourcentage d'inhibition maximal à 99,8 %, tandis que les trois extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH exhibent des valeurs de pourcentage d'inhibition à 45,99, 61,90 et 79,45 % respectivement (Figure III.14).





**Figure III.14 : Activité anti-inflammatoire par dénaturation de l'albumine d'œuf des extraits bruts de la plante *C. pinnatus* et le diclofénac comme médicament standard**

### III.3.3. Discussion

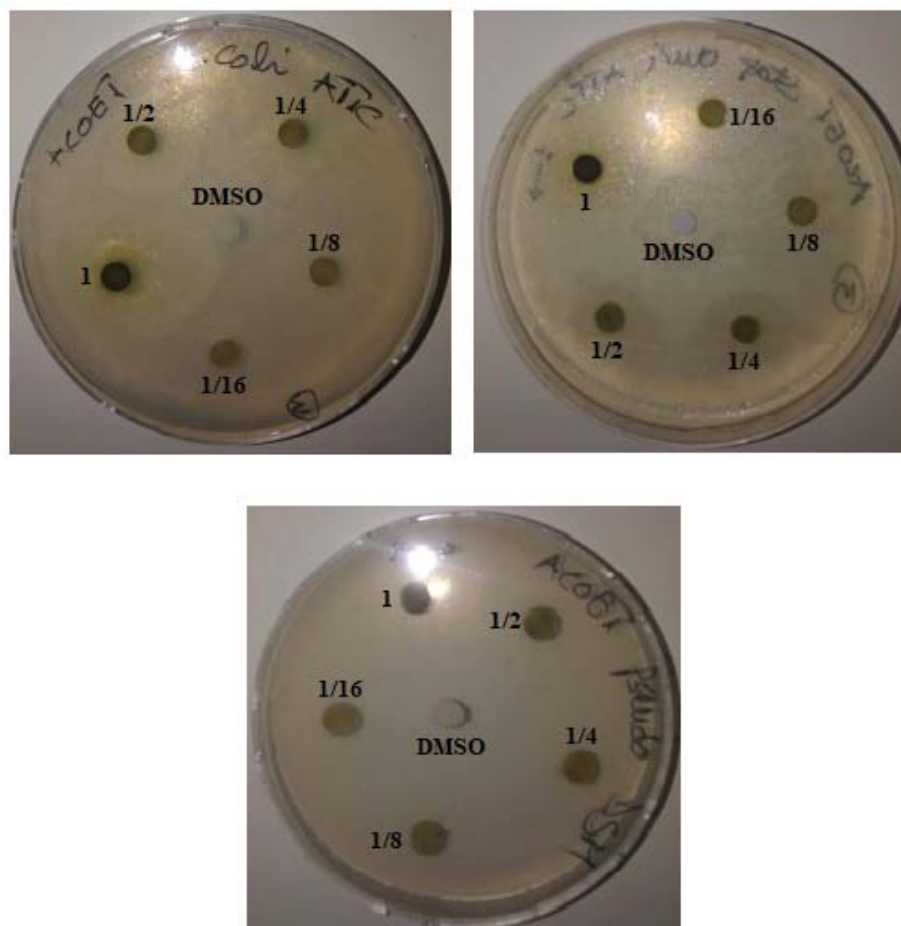
La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par l'application des agents externes tels que les solutions acides ou basiques, les sels inorganiques, les solvants et la chaleur ; ces applications induisent des modifications de leur fonction biologique et leurs propriétés <sup>[11]</sup>. La dénaturation des protéines est un aspect bien documenté de la polyarthrite rhumatoïde due à la production d'auto-antigènes dans certaines maladies rhumatismales <sup>[12]</sup>. L'activité anti-inflammatoire observée dans les extraits des deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* peut être attribuée aux interactions entre les composés phytochimiques présents dans les extraits bruts et la région aliphatique autour du résidu lysine sur la protéine albumine <sup>[13]</sup>.

### III.4. Activité antibactérienne

Dans le but d'en découvrir davantage l'influence de différentes activités biologiques sur les plantes, on y intéresse de plus de reconnaître la capacité des plantes étudiées (*A. humilis* et *C. pinnatus*) à inhiber la croissance des souches bactériennes qui a été évaluée *in vitro*.

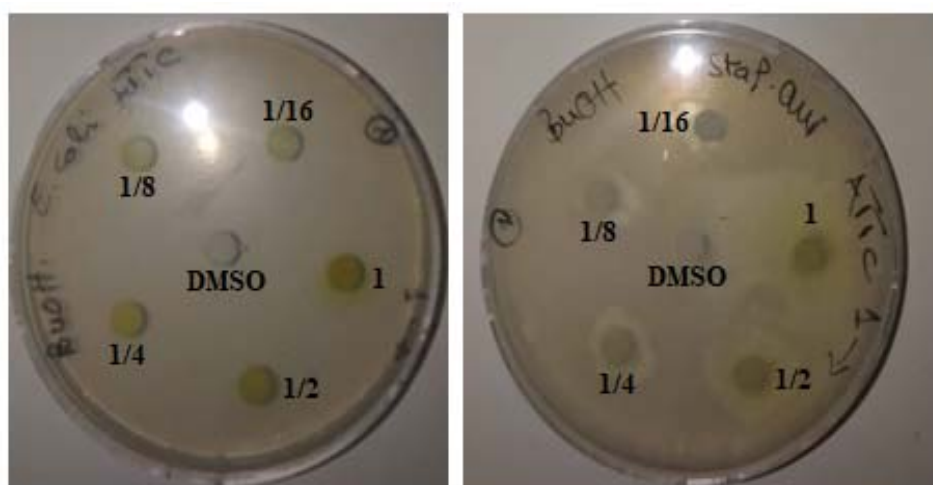
#### III.4.1. Résultats de l'espèce *Atractylis humilis*

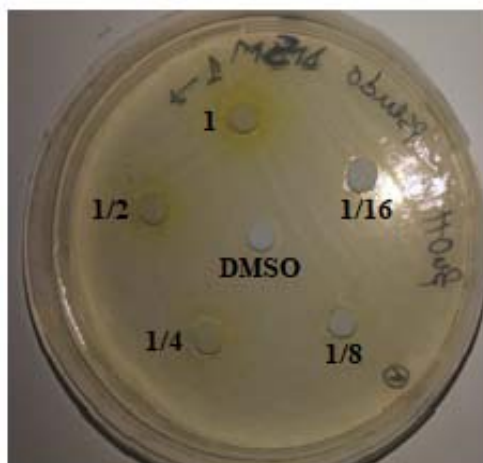
Les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* présentent une sensibilité vis-à-vis de l'extrait AcOEt à différentes concentrations. Alors que, la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa* a montré une résistance aux différentes concentrations de l'extrait AcOEt de l'espèce *A. humilis* (Figure III.15).



**Figure III.15 : Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt de l'espèce *A. humilis***

Par ailleurs, les zones d'inhibition observées autour du disque imprégné par l'extrait *n*-BuOH contre les souches à Gram positif *S. aureus* et à Gram négatif *P. aeruginosa* montrent bien diverses sensibilités. Cependant, l'extrait *n*-BuOH n'a indiqué aucun effet inhibiteur de croissance contre la bactérie à Gram négatif *E. coli* (Figure III.16).





**Figure III.16 : Activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *A. humilis***

Les résultats de l'activité antibactérienne réalisée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique sont réunis dans le tableau III.9.

**Tableau III.9 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) des extraits AcOEt et *n*-BuOH contre les souches bactériennes**

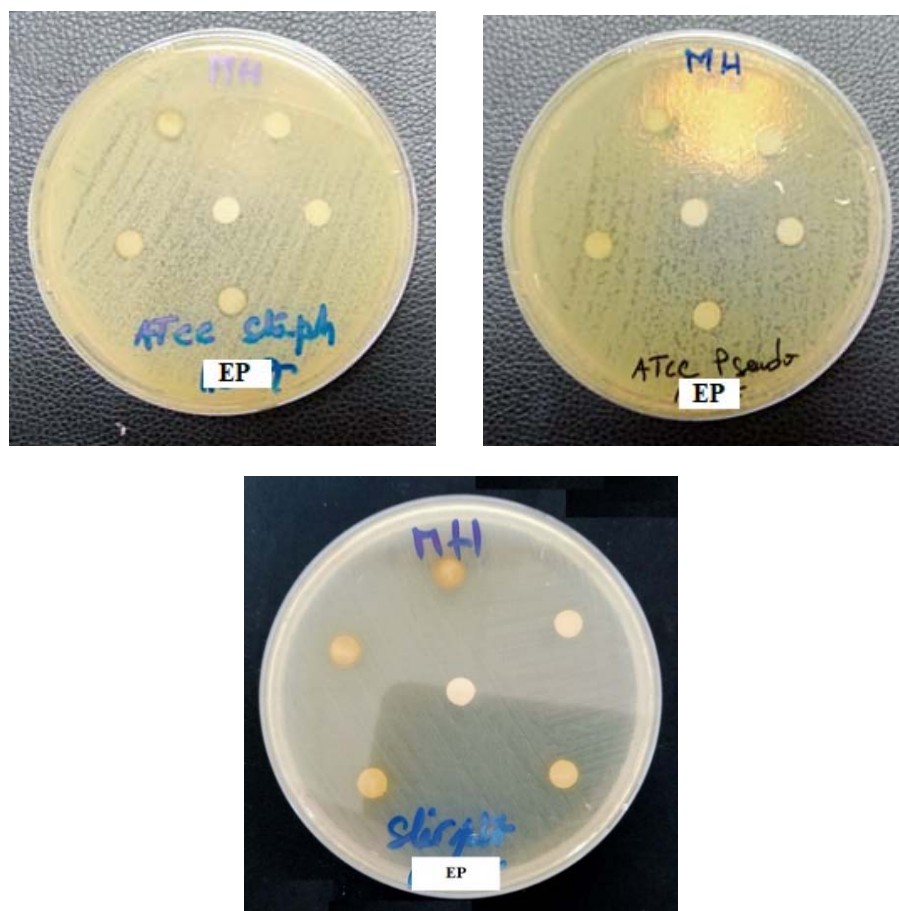
Extrait	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zone d'inhibition (mm)		
		<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>AcOEt</i>	100	-	10	14
	50	-	8	10
	25	-	8	8
	12,5	-	7	6
	6,25	-	-	6
<i>n-BuOH</i>	100	10	20	-
	50	8	12	-
	25	8	10	-
	12,5	-	8	-
	6,25	-	8	-

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD de trois mesures ( $p < 0,05$ ). (-) Aucune zone d'inhibition autour des disques ; (C) Concentration.

#### III.4.2. Résultats de l'espèce *Carduncellus pinnatus*

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que l'extrait EP de la plante *C. pinnatus* possède un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries à Gram positif *S. aureus* et à Gram négatif *P. aeruginosa*, avec les concentrations 100, 50 et 25  $\mu\text{g/mL}$ , cette inhibition qui diminue relativement avec l'abaissement de la concentration. Par contre, les souches à Gram

négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*) et à Gram positif (*S. mutans*) ont révélé une résistance aux différentes concentrations testées du même extrait (Figure III.17).



**Figure III.17 : Activité antibactérienne de l'extrait EP de l'espèce *C. pinnatus***

De plus, les analyses du pouvoir antibactérien ont évoqué également une sensibilité des trois souches bactériennes *P. aeruginosa* (Gram négatif), *S. aureus* (Gram positif) et *S. mutans* (Gram positif) vis-à-vis l'extrait AcOEt. Il est à noter que le même extrait (EP) s'avère inactif à l'égard de deux bactéries à Gram négatif *E. coli* et *K. pneumoniae* (Figure III.18).





Figure III.18 : Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. pinnatus*

L'extrait *n*-BuOH est considéré actif et manifeste un effet antibactérien contre les souches *P. aeruginosa* (Gram négatif), *S. aureus* (Gram positif) et *S. mutans* (Gram positif) à des degrés d'inhibition très rapprochés à différentes concentrations. Par contre, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée avec les souches à Gram négatif *E. coli* et *K. pneumoniae* (Figure III.19).

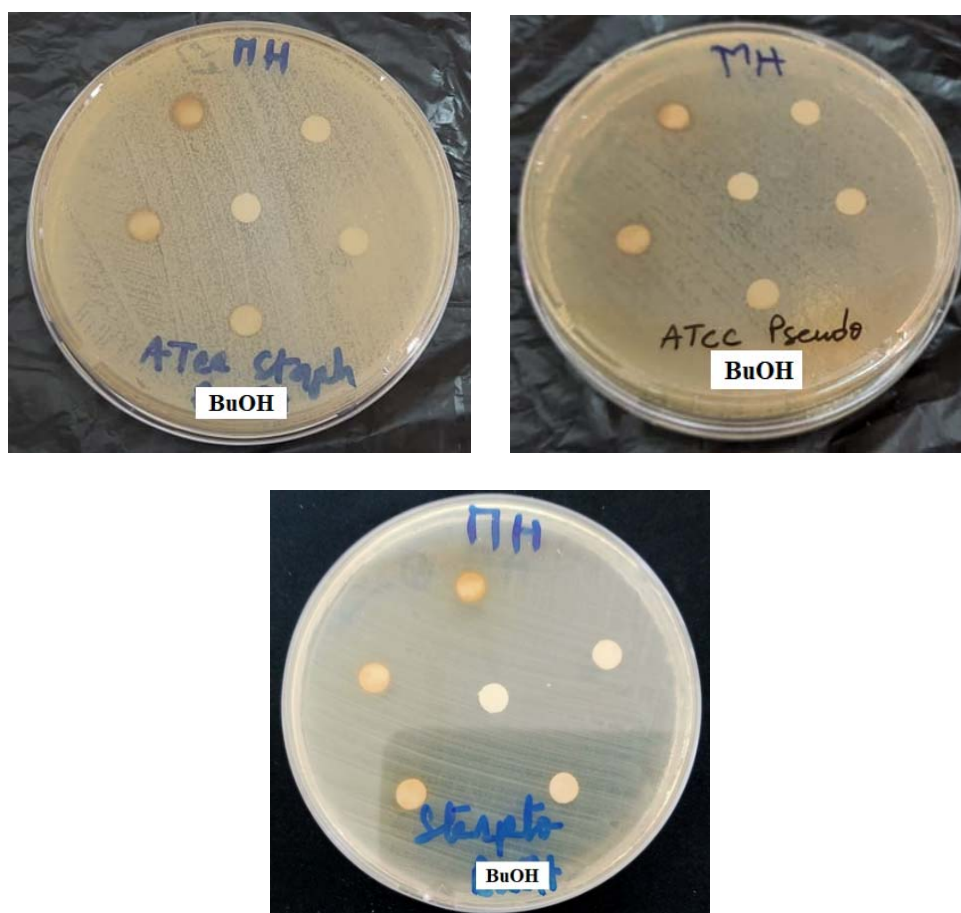


Figure III.19 : Activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *C. pinnatus*

Les résultats expérimentaux de l'activité antibactérienne sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau III.10).

**Tableau III.10** Diamètre des zones d'inhibition (mm) des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH contre les souches bactériennes

Extrait	C (g/mL)	Zone d'inhibition (mm)				
		Bactéries sauvages			Bactéries pathogènes	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. mutans</i>
EP	100	-	8	9	-	-
	50	-	7	8	-	-
	25	-	7	8	-	-
	12,5	-	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-	-
AcOEt	100	-	9	9	-	9
	50	-	9	8	-	8
	25	-	8	8	-	8
	12,5	-	-	8	-	-
	6,25	-	-	-	-	-
<i>n</i> -BuOH	100	-	9	8	-	8
	50	-	7	8	-	8
	25	-	-	-	-	8
	12,5	-	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-	-

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD de trois mesures ( $p < 0,05$ ). (-) Aucune zone d'inhibition autour des disques ;(C) Concentration.

### III.4.3. Discussion

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* ont révélé des effets inhibiteurs variables entre négligeables et importants selon le type de la souche et l'extrait testé.

#### a. Absence de l'activité antibactérienne

A la fin de ces tests antibactériens, il est clair de constater l'absence d'effet inhibiteur de deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *A. humilis* envers la croissance des souches bactériennes à Gram négatif *P. aeruginosa* et *E. coli* respectivement. On remarque également l'absence des inhibitions de la croissance bactérienne de tous les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *C. pinnatus* vis-à-vis des souches *E. coli* et *K. pneumoniae* (Gram négatif). Aussi la bactérie à Gram positif *S. mutans* a révélé une résistance envers l'extrait EP.

De nombreux facteurs peuvent justifier l'absence de l'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH vis-à-vis des souches *P. aeruginosa* et *E. coli*, à savoir :

- › La nature du taxon ou/et la période de sa récolte : toutefois les extraits des plantes ne contiennent pas des molécules possédant une activité antibactérienne, ou également leur présence en quantités très faibles ne favorise par la mise en évidence d'un pouvoir antibactérien <sup>[137]</sup>.
- › Selon les travaux de Hayouni et al (2007), la mauvaise technique utilisée dans le processus de l'extraction ainsi que le choix des solvants peuvent influencer le résultat de l'activité antibactérienne <sup>[138]</sup>.
- › Un autre facteur est lié à la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne. En effet, plusieurs études <sup>[139,140]</sup> ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée que la méthode de diffusion en milieu gélosé pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques des plantes.

#### **b. Présence de l'activité antibactérienne**

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH exercent un effet inhibiteur variable envers les différentes concentrations testées contre la souche à Gram positive *S. aureus*, tandis que la bactérie *P. aeruginosa* a présenté une sensibilité contre l'extrait *n*-BuOH et la bactérie *E. coli* a exhibé aussi une sensibilité contre l'extrait AcOEt.

L'étude d'Abdel Rahman et ses collaborateurs (2011) <sup>[141]</sup> menée sur plusieurs plantes appartenant aux différentes familles botaniques parmi elles les *Atractylis*, a montré que la majorité des extraits naturels de ces plantes révèlent des effets inhibiteurs contre les souches de *Staphylocoque*, malgré la résistance exercée par les micro-organismes de ce genre de bactérie aux médicaments.

L'extraction du matériel végétal a été généralement faite à l'aide de solvants ayant diverses capacités pour solubiliser les constituants phytochimiques, y compris les huiles essentielles, les stéroïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les triterpénoïdes et les composés phénoliques aux groupements hydroxyles libres <sup>[142]</sup>. Plusieurs études ont démontré que les classes de métabolites secondaires citées précédemment sont responsables des activités antimicrobiennes mises en évidence par les extraits des végétaux <sup>[143,144]</sup>.

### III.5. Conclusion

L'importance des extraits végétaux n'apparaît pas seulement à leurs contenus chimiques évalués par la richesse en métabolites secondaires, mais aussi d'avoir possédé un potentiel biologique intéressant justifiant par la présence des substances naturelles bioactives responsables de l'effet thérapeutique, et pourrait par la suite de les transférer vers des nouvelles applications médicales et pharmacologiques. Pour cela, cette partie du travail vise la valorisation biologique de deux plantes *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* appartenant à la famille Asteraceae, en adoptant l'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et l'évaluation des activités biologiques incluant l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne.

La quantification en polyphénols totaux est estimée en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteuvarie considérablement entre les différents extraits de deux plantes, où on constate l'existence des quantités relativement importantes en polyphénols dans les extraits de l'espèce *C. pinnatus* par rapport à ceux de l'espèce *A. humilis*. Le dosage des flavonoïdes est fait par la méthode du trichlorure d'aluminium, qui révèle des quantités moyennement importantes de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *C. pinnatus* comparées à celles des extraits AcOEt de deux espèces *A. humilis* et *C. pinnatus*. Les extraits EP de l'espèce *A. humilis* et *n*-BuOH de l'espèce *C. pinnatus* montrent les très faibles quantités en composés flavonoidiques.

Les extraits bruts obtenus à partir de deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus* ont été testés pour leurs activités antioxydantes par différentes méthodes incluant : le piégeage des radicaux libres par DPPH, ABTS et GOR et le dosage de la phénanthroline pour l'espèce *A. humilis* ; et le piégeage des radicaux libres DPPH, le teste de phosphomolybdate PPM, le pouvoir réducteur du fer FRAP et le piégeage de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilisés pour l'espèce *C. pinnatus*, tout en comparant les résultats obtenus avec des molécules de référence telles que : BHA, BHT et acide ascorbique. Les résultats de cette investigation indiquent que ces plantes possèdent des potentiels antioxydants variés dus à la présence des molécules considérées comme des agents antioxydants.

Tous les extraits des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus* ont été testés pour l'activité anti-inflammatoire évaluée par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf. Les extraits de l'espèce *C. pinnatus* ont montré des réponses positives par rapport au standard diclofénac attribuées certainement à la prépondérance des substances biologiquement actives. Tandis que, les extraits de l'espèce *A. humilis* ont enregistré des potentiels anti-inflammatoires très faibles



par rapport au standard diclofénac, ce résultat est difficile à expliquer et de le mettre en liaison avec la composition chimique riche de cette plante.

Finalement, la dernière partie de ce chapitre expose l'estimation de l'activité antibactérienne des extraits de deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus*, en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre des souches à Gram positif et d'autres à Gram négatif. Les résultats de cette activité qui expriment une variété des effets inhibiteurs entre négligeables et importants, démontrant l'intérêt de ces plantes locales dans le domaine de la pharmacopée.

## Chapitre IV

› *Matériel et méthodes  
expérimentales*

## IV.1. Matériel et méthodes expérimentales

### IV.1.1. Matériel végétal

La récolte de la plante *Atractylis humilis* a été effectuée au mois de Mai à la localité de Chenaoura (Wilaya de Batna).

La récolte de l'espèce *Carduncellus pinnatus* a été faite durant le mois de Mai dans la région d'Ariss (Wilaya de Batna).

Les deux plantes étudiées ont été identifiées par le Professeur Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna

### IV.1.2. Méthodes chromatographiques

Le fractionnement et la purification ont été essentiellement basés sur différentes techniques et méthodes chromatographiques qui combinent :

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

C'est une technique analytique facile et rapide, permettant de contrôler les constituants chimiques au cours de la purification, elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption ou de partage. La phase stationnaire utilisée soit en phase normale [Kieselgel 60 F254, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)], soit en phase inverse [RP-18 F254S, Merck® 200 µm (20 × 20 cm)] sur feuille d'aluminium (20 x 20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec un éluant déterminé qui pourrait être un mélange de deux ou trois solvants selon l'échantillon à tester et le type de séparation souhaitée. Les révélateurs utilisés sont les vapeurs d'iode et/ou un mélange acide (50% eau, 25% acide acétique et 25% acide sulfurique). Les plaques CCM sont testées sous une lampe UV à 254 et 365 nm.

#### b. Chromatographie sur couche épaisse (CCE)

Les analyses sur couche épaisse (CCE) sont utilisées au dernier stade pour isoler et purifier un composé à l'état pur. Les phases stationnaires sont celles adhérentes sur plaques CCM où on utilise la phase normale [Kieselgel 60 F254, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)], ou bien la phase inverse [RP-18 F254S, Merck® 200 µm (20 × 20 cm)] placées sur un support en verre ou une feuille d'aluminium (20 x 20 cm). Les conditions de travail sur ces plaques sont les mêmes que celles indiquées précédemment pour les plaques CCM concernant l'élution et la révélation.

#### c. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide est une technique de séparation grossière des extraits bruts, se distinguant par sa rapidité et consommation faible de solvants. Elle a été effectuée sur des phases stationnaires en gel de silice normale (Kieselgel Merck® 70-230

mesh), gel de silice greffée (Lichroprep RP-18 Merck® 40-63 µm) ou polyamide SC6, dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

#### **d. Chromatographie liquide sur colonne (CC)**

C'est un moyen de fractionnement et de purification des fractions. L'isolement de produits par cette technique se fait sur colonne ouverte en verre, où la masse d'échantillon à étudier est celle qui contrôle la taille et le diamètre de la colonne à utiliser. Les phases stationnaires employées sont : Gel de silice en phase normale Kieselgel Merck® (70-230 mesh), Polyamide SC6 et Sephadex LH-20.

La quantité de la phase stationnaire et les conditions d'élution ont été adaptées aussi avec la quantité et la nature de l'échantillon. Le rassemblement final des fractions est effectué sur la base des tests CCM.

#### **IV.1.3. Méthodes spectroscopiques**

Les métabolites secondaires isolés à l'état pur ont été structurellement mis à contribuer par différents instruments et appareils spectroscopiques tels que : la spectrométrie de masse, la RMN 1D et 2D et la polarimétrie  $[\alpha]_D$ .

##### **a. Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$**

Le pouvoir rotatoire a été mesuré dans MeOH sur un polarimètre Perkin-Elmer 341 à 20-25°C. La source de lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm) dans une cuve de longueur 10 cm et de volume 1 ml, à température ambiante.

##### **b. Spectrométrie de masse**

Les spectres de masse ESI et HR-ESI ont été enregistrés sur un spectromètre de masse type Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer de l'Ecole des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève (Suisse).

##### **c. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres RMN ont été effectués au Centre Médical Universitaire de l'Université de Genève (Suisse), sur un appareil Varian/Agilent Inova, RMN à 600 MHz pour  $^1\text{H}$  et 150 MHz pour  $^{13}\text{C}$ .

### **VI.2. Partie expérimentale phytochimique**

#### **IV.2.1. Etude phytochimiques de l'espèce *Atractylis humilis***

##### **a. Extraction**

Après la récolte, la plante entière *Atractylis humilis* a été mise à l'air libre et à l'abri de la lumière pour séchage et broyage. 1,5 Kg de la poudre de cette plante est soumis à une macération dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H<sub>2</sub>O : 70/30). La filtration et

l'évaporation de l'extrait hydroalcoolique permet d'obtenir 500 mL d'un résidu aqueux, ce dernier a subi ensuite des extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante (EP, AcOEt et *n*-BuOH).

La décontation et l'évaporation après chaque extraction ont fourni trois extraits organiques : l'extrait éther de pétrole (1 g), l'extrait acétate d'éthyle (14 g) et l'extrait *n*-butanolique (17,5 g).

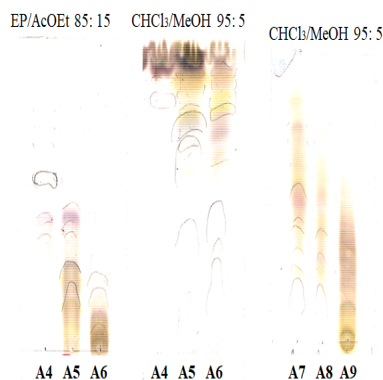
#### b. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait AcOEt (7 g) a été fractionné sur VLC en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire (SiO<sub>2</sub>). L'élution a été réalisée par un système de solvants éther de pétrole (EP), EP/AcOEt et AcOEt/MeOH pour fournir neuf fractions majeures B1-B9 (Tableau IV.1).

**Tableau IV.1 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de la plante *A. humilis***

<i>Fractions</i>	<i>Éluant</i>	<i>Poids de la fraction (mg)</i>
	EP/AcOEt	
<i>A1</i>	100 : 0 ; 99 : 1 ; 97 : 3 ; 95 : 5	10
<i>A2</i>	90 : 10	10
<i>A3</i>	80 : 20 70 : 30	15
<i>A4</i>	70 : 30	313
<i>A5</i>	60 : 40 50 : 50	230
<i>A6</i>	40 : 60	100
<i>A7</i>	30 : 70 20 : 80	210
<i>A8</i>	10 : 90 0 : 100	186
<i>A9</i>	AcOEt/MeOH	270
	97 : 3 ; 95 : 5 ; 90 : 10	

Les fractions A4, A5 et A6 semblent intéressantes à examiner pour un deuxième fractionnement chromatographique, en regard les profils CCM (Figure IV.1) et les masses des fractions obtenues (Tableau IV.1).



**Figure IV.1 : profils CCM des fractions A4-A9 de l'extrait AcOEt**

La fraction A4 d'une masse de 313 mg, elle a fait l'objet d'une purification en utilisant une colonne chromatographique de gel de silice en phase normale éluée par EP/AcOEt, ce qui permis de recueillir neuf sous fractions nommées A4-1 – A4-9. La progression de cette colonne est montrée dans le tableau suivant (Tableau IV.2).

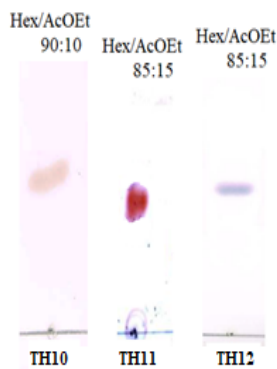
**Tableau IV. 2 : Fractionnement de la fraction A4 de la plante *A. humilis***

<i>Fractions</i>	<i>Éluant (%)</i>	<i>Poids de la fraction (mg)</i>
	EP/AcOEt	
<i>A4.1</i>	100 : 0 ; 99 : 1 ; 97 : 3 ; 95 : 5 ; 93 : 7	21
<i>A4.2</i>	93 : 7	22
<i>A4.3</i>	90 : 10	15
<i>A4.4</i>	90 : 10	19
<i>A4.5</i>	90 : 10	23
<i>A4.6</i>	80 : 20	27
<i>A4.7</i>	70 : 30	110
<i>A4.8</i>	60 : 40	126

La sous fraction A4.3 (15 mg) est soumise à une CC de SiO<sub>2</sub> en phase normale dans le système d'élution hexane/CHCl<sub>3</sub> conduisant à l'isolement du composé **TH11**(3,4 mg).

Les mêmes conditions sont appliquées sur la sous fraction A4.4 (19 mg) donnant le composé **TH10** (2,7 mg).

Le composé **TH12** (3,1 mg) a été isolé et purifié sous forme d'un précipité dans le chloroforme à partir de la sous fraction A4-6 (27 mg). La Figure IV.2 montre les CCM de ces composés à l'état pur.



**Figure IV.2 : Composés TH10, TH11 et TH12 à l'état pur sur CCM en phase normale**

La fraction A5 (230 mg) a été séparée sur une colonne de SiO<sub>2</sub> en phase normale éluee par le mélange EP/AcOEt pour obtenir plusieurs sous fractions (A5.1-A5.6) recueillies dans le tableau IV.3.

**Tableau IV. 3 : Fractionnement de la fraction A5 de la plante *A. humilis***

<i>Fractions</i>	<i>Éluant (%)</i>	<i>Poids de la fraction (mg)</i>
	EP/AcOEt	
<i>A5.1</i>	97 : 3	15
	95 : 5	
<i>A5.2</i>	90 : 10	16
<i>A5.3</i>	80 : 20	18
<i>A5.4</i>	80 : 20	33
<i>A5.5</i>	80 : 20	14
	70 : 30	
<i>A5.6</i>	60 : 40	58

La sous fraction A5.4 (33 mg) a été soumise à une séparation sur une colonne de gel de silice en phase normale en utilisant le mélange hexane/CHCl<sub>3</sub> (95-5, 90-10, 80-20, 70-30), suivie par une précipitation dans l'acétone. Ceci conduit à isoler le composé **TH9** (2.1 mg) (Figure IV.3).

Le composé **TH8** (1,5 mg) est récupéré en appliquant une chromatographie sur couche épaisse CCE de gel de silice en phase inverse RP-18 sur la sous fraction A5.5 (14 mg) dans le système d'élution MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50) (Figure IV.3).

A son tour, la fraction A6 (100 mg) est traitée par une série de CC SiO<sub>2</sub> éluee par hexane/AcOEt et hexane/CHCl<sub>3</sub>, et finalisée par une colonne de sephadex LH-20 éluee par le solvant CHCl<sub>3</sub> fournissant le composé **TH5** (1,5 mg).



**Figure IV.3 : Composés TH8 et TH5 à l'état pur sur CCM en phase normale**

#### b. Fractionnement de l'extrait *n*-butanolique

L'extrait *n*-butanolique (7 g) a été séparée par une chromatographie liquide sous vide VLC effectuée sur gel de silice SiO<sub>2</sub>. L'utilisation du chloroforme et un gradient croissant de méthanol dans le chloroforme jusqu'à 100% de méthanol permettent d'obtenir 18 fractions de 100 ml qui ont été combinées ensemble selon leurs profils chromatographiques CCM en dix fractions majoritaires B1-B10 (Tableau IV.4).

**Tableau IV.4 : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de la plante *A. humilis***

<i>Fractions</i>	<i>Éluant (%)</i>	<i>Poids de la fraction (mg)</i>
	CHCl <sub>3</sub> /MeOH	
<b>B1</b>	97 : 3	53
	95 : 5	
<b>B2</b>	95 : 5	52
<b>B3</b>	90 : 10	437
<b>B4</b>	90 : 10	418
<b>B5</b>	90 : 10	195



<b>B6</b>	90 : 10	692
<b>B7</b>	90 : 10 80 : 20	292
<b>B8</b>	80 : 20	1560
<b>B9</b>	70 : 30	969
<b>B10</b>	50 : 50	528

Le composé **TH6** (2 mg) se précipite à partir de la fraction B3 (437 mg) dans un mélange de solvants CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95 : 5).

La fraction B3 (437 mg) a été reprise par une chromatographie sur colonne de SiO<sub>2</sub> en phase normale, éluée par un système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100 : 0 ; 99,5 : 0,5 ; 99 : 1 ; 93 : 3 ; 95 : 5 ; 90 : 10), permettant d'obtenir 8 sous-fractions.

La sous fraction B3.2 (15 mg) est soumise à une filtration sur colonne de sephadex LH-20, en employant le chloroforme comme phase mobile afin d'obtenir le composé **TH14** (1,2 mg).

La sous fraction B3.7 (20 mg) est chromatographiée sur plaque CCE en phase inverse menée dans un mélange d'élution H<sub>2</sub>O/MeOH (50 : 50), suivie par une filtration sur une colonne de sephadex LH-20 (MeOH) aboutissant à l'isolement du composé **TH13** (1,5 mg).

La purification de mélange de composés **TH3** et **TH4** (36,5 mg) a été réalisée sur la sous fraction B3.4 (105 mg) par une CC de polyamide SC-6 dans un mélange toluène/MeOH (100 : 0 ; 0 : 100) suivie par une filtration sur colonne de sephadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

La fraction B5 (195 mg) a fait l'objet d'une CC de SiO<sub>2</sub> en phase normale éluée de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100 : 0 ; 99 : 1 ; 98 : 2 ; 97 : 3 ; 95 : 5) donnant plusieurs sous fractions B5.1-B5.5. La sous fraction B5.4 (34 mg) est ensuite filtrée sur une colonne de sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) pour fournir le composé **TH7** (2,3 mg).

Finalement, la fraction B6 (692 mg) a subi une série de colonnes chromatographies sur colonne de gel de silice en phase normale en utilisant les systèmes d'élution toluène/MeOH et CHCl<sub>3</sub>/MeOH, afin d'isoler les composés **TH1** et **TH2** en mélange. Une purification sur CCE en phase inverse dans MeOH/H<sub>2</sub>O (50 : 50) suivi d'une filtration sur colonne de sephadex LH-20 (MeOH) permettant de purifier chaque composé dans son état pur, **TH1** (1,5 mg) et **TH2** (1,4 mg).

**d. Structures des composés isolés****1. Composé TH1**

› Nom : (7'S,8R,8'S)-9'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4',9-trihydroxy-3',4,5,5'-Tétraméthoxy-2,7'-cyclo lignane (Humilisane A)

› Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub>

› Masse moléculaire : 582 uma

› MS : HR-ESI

$$m/z = 583,2392 [M+H]^+$$

$$m/z = 605,2202 [M+Na]^+$$

$$m/z = 1165,4746 [2M+H]^+$$

$$m/z = 1187,4598 [2M+Na]^+$$

$$m/z = 627,2309 [(M+HCOOH)-H]^-$$

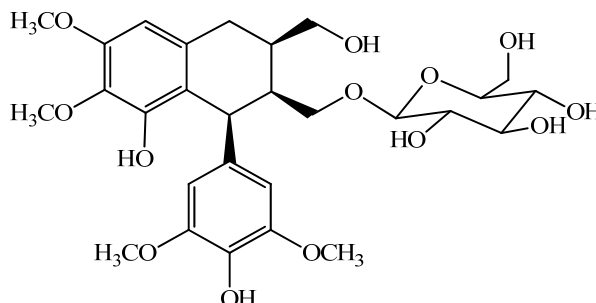
$$m/z = 1209,4825 [(2M+HCOOH)-H]^-$$

› Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = +22,4$  (c 0,125, MeOH)

› RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD

› RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD

› Données spectrales : Tableau II.1, page 42.

**2. Composé TH2**

› Nom : (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -glucopyranosyl)-oxy] lyoniresinol

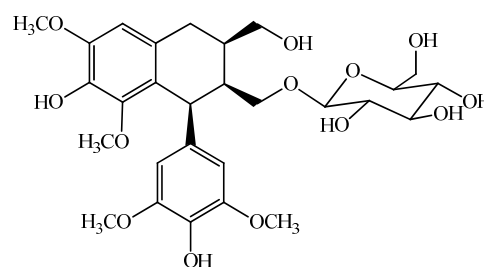
› Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub>

› Masse moléculaire : 582 uma

› MS : HR-ESI

$$m/z = 583,2392 [M+H]^+$$

$$m/z = 605,2202 [M+Na]^+$$



› Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = +23,2$  (c 0,117, MeOH)

› RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD

› RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD

› Données spectrales : Tableau II.2, page 53.

**3. Composé TH3**

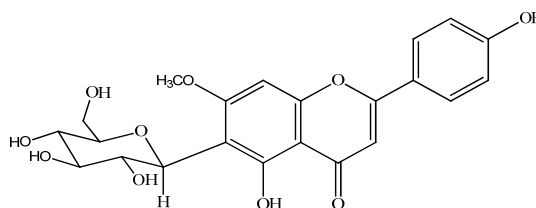
- › Nom : Swertisine
- › Formule brute : C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>
- › Masse moléculaire : 446 uma
- › MS : HR-ESI

$$m/z = 447.1251 [M+H]^+$$

$$m/z = 915.2282 [2M+Na]^+$$

$$m/z = 445.1157 [M-H]^-$$

$$m/z = 891.2389 [2M-H]^-$$



- › Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = -10,1$  (c 0,9, pyridine)
- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.3, page 62.

**4. Composé TH4**

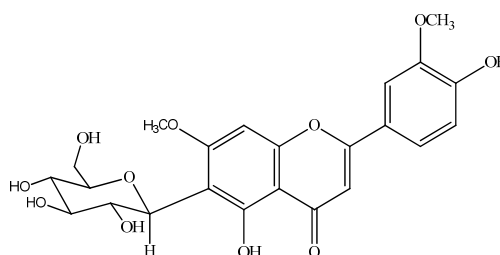
- › Nom : 3',7-diméthyl isoorientine
- › Formule brute : C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>11</sub>
- › Masse moléculaire : 476 uma
- › MS : HR-ESI

$$m/z = 477 [M+H]^+$$

$$m/z = 975.2505 [2M+Na]^+$$

$$m/z = 475.1262 [M-H]^-$$

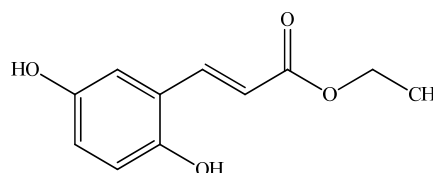
$$m/z = 951.2599 [(2M-H)]^-$$



- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.4, page 68.

**5. Composé TH5**

- › Nom : 2,5-dihydroxyethyl cinnamate
- › Formule brute : C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>
- › Masse moléculaire : 208 uma
- › MS : ESI-MS



$$m/z = 207 [(M-H)^-]$$

$$m/z = 415 [(2M-H)^-]$$

- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- > Données spectrales : Tableau II.5, page 75.

### 6. Composé TH6

- > Nom : 3,4,5-trimethoxyphenyl β-D-glucopyranoside

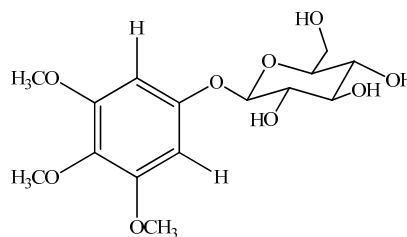
- > Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

- > Masse moléculaire : 346 uma

- > MS : ESI-MS

$$m/z = 347 [M+H]^+$$

$$m/z = 391 [M+HCOOH-H]^+$$



- > Pouvoir rotatoire : [α]<sub>D</sub> = -21,0 (c 0,23, MeOH)

- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD

- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD

- > Données spectrales : Tableau II.6, page 83.

### 7. Composé TH7

- > Nom : Tachioside

- > Formule brute : C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>

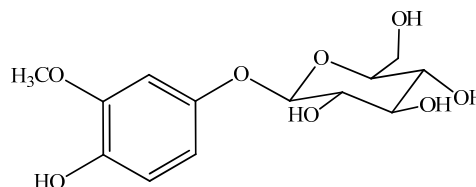
- > Masse moléculaire : 302 uma

- > MS : ESI-MS

$$m/z = 325 [M+Na]^+$$

$$m/z = 627 [2M+Na]^+$$

$$m/z = 347 [(M+HCOOH)-H]^+$$



- > Pouvoir rotatoire : [α]<sub>D</sub> = -53,4 (c 0,2, MeOH)

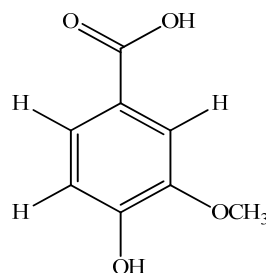
- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD

- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD

- > Données spectrales : Tableau II.9.10, pages 88

**8. Composé TH8**

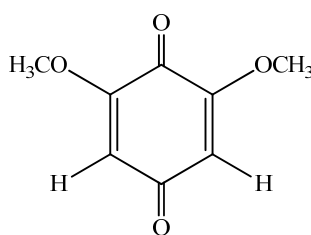
- > Nom : Acide vanillique
- > Formule brute : C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>
- Masse moléculaire : 168 uma
- > MS : ESI-MS
  - $m/z = 167 [M-H]^-$
  - $m/z = 335 [2M-H]^-$



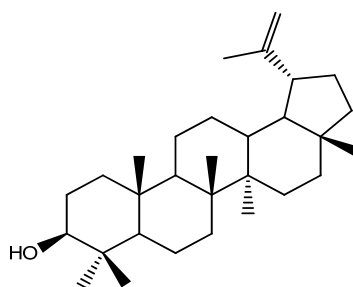
- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- > Données spectrales : Tableau II.8, page 95.

**9. Composé TH9**

- > Nom : 2,6-dimethoxy 1,4-benzoquinone
- > Formule brute : C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>
- > Masse moléculaire : 136 uma
- > MS : HR-ESI
  - $m/z = 169[M+H]^+$
- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- > Données spectrales : Tableau II.9, page 98.

**10. Composé TH10**

- > Nom : Lupéol
- > Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O
- > Masse moléculaire : 426 uma
- > MS : ESI-MS
  - $m/z = 449 [M+Na]^+$
  - $m/z = 876 [2M+Na]^+$



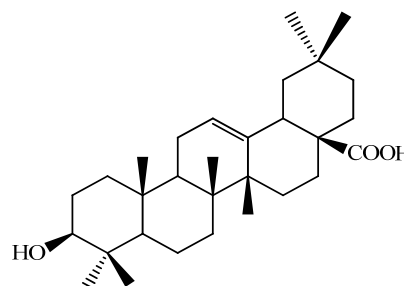
- > Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = +22,4$  (c 0,183, MeOH)
- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- > Données spectrales : Tableau II.10, page 101

**11. Composé TH11**

- › Nom : Acide oléanolique
- › Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>
- › Masse moléculaire : 456 uma
- › MS : ESI-MS

$$m/z = 495 [M+K]^+$$

$$m/z = 479 [M+Na]^+$$

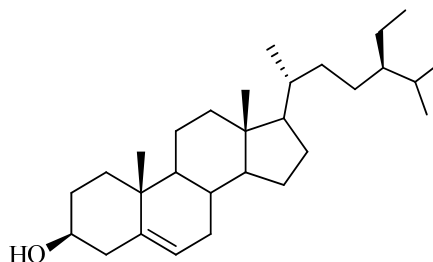


- › Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = + 80,2$  (c 0,94, CHCl<sub>3</sub>)
- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.11, page 105.

**12. Composé TH12**

- › Nom :  $\beta$ -sitosterol
- › Formule brute : C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O
- › Masse moléculaire : 414 uma
- › MS : ESI-MS

$$m/z = 413 [(M-H)^-]$$

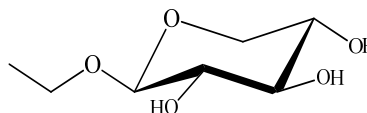


- › Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = -30,1$  (c 0,8, CHCl<sub>3</sub>)
- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.12, page 108.

**13. Composé TH13**

- › Nom : 1-O-ethyl- $\beta$ -D-xylose
- › Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>
- › Masse moléculaire : 178 uma
- › MS : ESI-MS

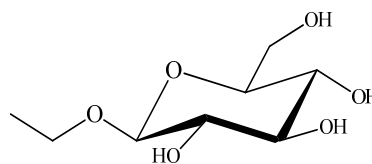
$$m/z = 201 [M+Na]^+$$



- › Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = + 18,7$  (c 0,8, MeOH)
- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.13, pages 112.

**14. Composé TH14**

- › Nom : 1-*O*-éthyl- $\beta$ -D-glucofuranoside
- › Formule brute : C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>
- › Masse moléculaire : 208 uma
- › Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D = +19,6$  (c 0,8, MeOH)
- › RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- › Données spectrales : Tableau II.14, pages 114.

**IV.2.2. Études phytochimiques de l'espèce *Carduncellus pinnatus*****a. Extraction**

Le protocole d'extraction décrit dans le chapitre II (Page 24, Figure II.5) explique nettement les différentes étapes qui se débutent par le broyage du matériel végétal séché et la macération de la poudre dans un mélange EtOH-H<sub>2</sub>O (prop. 70 : 30, pendant 48h), suivi par la filtration et la concentration du contenu hydroalcoolique. L'extraction liquide-liquide du résidu aqueux avec des solvants à polarité croissante (EP, AcOEt et *n*-BuOH) et l'évaporation à sec, nous ont permis d'obtenir les trois extraits organiques étheropétrolique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique.

**b. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle**

Une masse de 5 g de l'extrait AcOEt a été fractionné grossièrement par la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC), sur gel de silice normale en utilisant deux systèmes d'élution EP/AcOEt puis AcOEt/méthanol pour fournir huit fractions majeures P1-P8 (Tableau IV.5).

**Tableau IV.5 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de la plante *C. pinnatus***

<i>Fractions</i>	<i>Éluant</i>	<i>Poids de la fraction (mg)</i>
	EP/AcOEt	
<i>P1</i>	95 : 5 ; 90 : 10	7
<i>P2</i>	80 : 20 ; 70 : 30	30
<i>P3</i>	70 : 30 ; 60 : 40	350
<i>P4</i>	60 : 40 ; 50 : 50 ; 30 : 70 ; 20 : 80	1471
<i>P5</i>	10 : 90 ; 100 : 0	294

	AcOEt/MeOH	
<b>P7</b>	95 : 5 ; 90 : 10 ; 20 : 80 ; 60 : 40	204
<b>P8</b>	40 : 60 ; 20 : 80	200
<b>P9</b>	0 : 100	508

La purification de la fraction P3 (350 mg) a été faite par une chromatographie sur colonne de gel de silice normale en utilisant EP:CHCl<sub>3</sub> (100:0 à 30:70) comme système d'élution, neuf sous fractions sont regroupées P3-1 à P3-9. Le produit **CP3** (2,8 mg) se précipite lors de la purification de la fraction P3-1 (14 mg) dans un mélange EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50). La sous fraction P3-4 (33 mg) a été purifiée sur colonne de SiO<sub>2</sub> en phase normale éluee par le mélange EP/AcOEt pour conduire au composé **CP4** à l'état pur.

Le traitement de la fraction P5 (1,4 g) est réalisé sur une colonne de gel de silice normale en utilisant EP:CHCl<sub>3</sub> (100:0 à 30:70) comme système d'élution, menant à huit sous fractions nommées P5-1 à P5-8, qui sont collectées et récapitulées en fonction de leurs profils sur CCM.

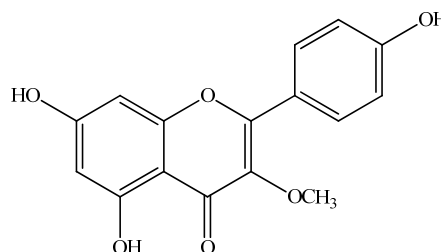
Les sous fractions P5-1 et P5-3 sont traitées par chromatographie sur colonne de gel de silice normale (SiO<sub>2</sub>) avec un gradient d'élution EP:CHCl<sub>3</sub> (99:1 à 80:0), puis sont purifiées sur colonne de sephadex afin d'isoler les produits **CP1** (1,7 mg) et **CP2** (1,4 mg).

La sous-fraction P5-5 a fait l'objet d'une purification par précipitation dans le méthanol et conduit à isoler le composé **CP5** (1,1 mg) à l'état pur.

### c. Structures des composés isolés

#### 1. Composé CP1

- > Nom : Isokaempferide
- > Formule brute : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>
- > Masse moléculaire : 300 uma
- > MS : ESI-MS  
 $m/z = 299,0565 [M-H]^-$
- > RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD
- > RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD
- > Données spectrales : Tableau II.15, page 120.





**2. Composé CP2**

› Nom : Scopolétine (6-méthoxy-7-hydroxycoumarine)

› Formule brute : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

› Masse moléculaire : 192 uma

› MS : ESI-MS

$$m/z = 193,0517 \quad [M+H]^+$$

$$m/z = 407,0775 \quad [2M+Na]^+$$

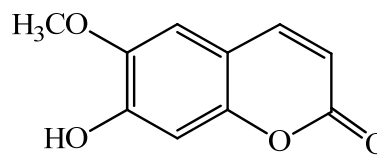
$$m/z = 191,0343 \quad [M-H]^-$$

$$m/z = 383,0739 \quad [2M-H]^-$$

› RMN <sup>1</sup>H : 600 MHz, MeOD

› RMN <sup>13</sup>C : 150 MHz, MeOD

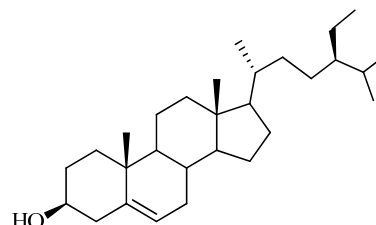
› Données spectrales : Tableau II.16, page 126.

**3. Composé CP3**

› Nom : β-sitosterolé

› Formule brute : C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O

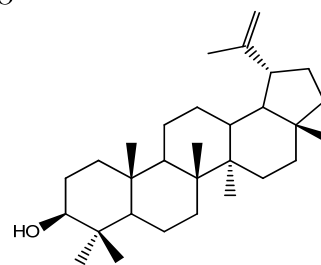
› Données spectrales : Tableau II.12, page 108.

**4. Composé CP4**

› Nom : Lupéol

› Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O

› Données spectrales : Tableau II.10, page 101.

**VI.3. Activités biologiques des deux espèces *A. humilis* et *C. pinnatus***

Les activités antioxydantes de la plante *A. humilis* ont été effectuées au Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBt, Constantine, Algérie), elles ont été réalisées en microplaques à 96 puits, et la mesure d'absorbance a été faite par un lecteur microplaques multimode En Spire de Perkin Elmer.

Les activités antibactériennes des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus* ont été réalisées au niveau du laboratoire Microbio Lab Malim et le Centre Anti Cancer (CAC) de Batna respectivement.

Le dosage des teneurs totaux en polyphénols et flavonoïdes et les activités anti-inflammatoires des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus*, ainsi que les activités antioxydantes

de la plante *C. pinnatus* ont été effectuées au sein de notre Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement LCCE (université de Batna-1). Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Vis-7220G dans une cellule de quartz.

### IV.3.1. Dosages des teneurs totaux en polyphénols et flavonoïdes

#### a. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu [145]. La courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence de l'acide gallique (GAE) par mg d'extrait brut. La méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi 1999 où le réactif se réduit dans un milieu alcalin en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques contenus dans l'échantillon analysé.

L'extrait dilué (200 µL) est mélangé avec 1 mL du réactif Folin-Ciocalteu. Après 4 minutes en ajoutant 800 µL d'une solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 75g/L. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 2 heures. L'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

#### b. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

L'analyse quantitative des composés flavonoïdiques totaux est effectuée par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes [146]. Une courbe d'étalonnage de la quercétine est réalisée et les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de Quercétine (QE) par milligramme d'extrait.

L'extrait (1 mL) et la quercétine (échantillon témoin 1 mL) sont mélangés avec le même volume d'une solution méthanolique à 2% de trichlorure d'aluminium. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 430 nm par un spectrophotomètre UV-visible pour chaque échantillon (extrait et standard).

### IV.3.2. Activités antioxydantes

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits issus des deux plantes (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été réalisée par sept techniques chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, piégeage du radical ABTS, activité de piégeage des

radicaux galvinoxyle (GOR), la méthode dephénanthroline, le teste de phosphomolybdate PPM, le pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le piégeage de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### a. Activité antiradicalaire par DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits oraganiques obtenus à partir des espèces *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* a été évaluée par le radical libre DPPH selon le protocole décrit par Blois (1958) [147].

Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, un volume de 25 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 975 µL de la solution méthanolique du DPPH (0,025mg/mL) fraîchement préparée. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 517nm. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieures. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Piégeage du DPPH (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}})/A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A<sub>Blanc</sub> est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

A<sub>extrait</sub> est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

Les expériences ont été réalisées en trois essaies et les résultats ont été transmis sous forme de moyenne (valeurs ± SD).

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

L'activité de piégeage ABTS des extraits préparés (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été réalisée par la méthode spectrophotométrique décrites par Re et ses collaborateurs [148]. L'ABTS a été produit par une réaction entre 5 mL de solution de ABTS<sup>+</sup> (14 mM) et 5 mL d'une solution de persulfate de potassium (4,9 mM). Le mélange est stocké dans l'obscurité à une température ambiante pendant 16 heures.

Avant l'utilisation, l'ABTS a été dilué par l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,708 ± 0,025 à 734 nm. Dans un volume final de 1 mL, le mélange réactionnel comprend 950 µL de solution ABTS<sup>+</sup> et 50 µL d'extraits végétaux et standards (BHA et BHT) à différentes concentrations.

Ensuite, le mélange réactionnel a été homogénéisé et après 30 minutes, les absorbances ont été enregistrées à 734 nm. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage des ABTS<sup>•+</sup> a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité de piégeage par ABTS (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{Blanc}}$  : Absorbance du contrôle.

$A_{\text{Extrait}}$  : Absorbance de l'échantillon.

### c. Activité de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

160  $\mu\text{L}$  d'une solution de galvinoxyle d'une concentration de 0,1 mM préparée dans le méthanol, ont été ajoutés aux échantillons de 40  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations (extraits ou standards). Les tubes obtenus ont été incubés pendant 2 heures dans un endroit sombre à température ambiante et les absorbances ont été lues à 428 nm en utilisant un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition du radical Galvinoxyle a été calculé à l'aide de l'équation suivante <sup>[149]</sup> :

$$\text{Activité de piégeage du galvinoxyle (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{Blanc}}$  est l'absorbance du blanc.

$A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance des extraits bruts ou des standards.

### d. Activité réductrice par la méthode de phénanthroline

La capacité des extraits bruts à réduire le fer III en fer II a été évaluée par spectrophotométrie <sup>[150]</sup>. Une solution de phénanthroline (30  $\mu\text{L}$ , 0,5%) préparée dans le méthanol, a été mélangée avec 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  (0,2%), 10  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations des extraits ou standards et 110  $\mu\text{L}$  de méthanol. Le mélange préparé a été incubé pendant 20 minutes à 30°C, puis les absorbances ont été mesurées à 510 nm. Les résultats ont été calculés comme  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et la capacité de réduction des extraits a été comparée à celle du BHA et BHT comme standards.

### e. Teste de phosphomolybdate PPM

Ce test qui a été réalisé selon la méthode décrite par Prieto et al. (1999) <sup>[151]</sup>, est basée sur la réduction du molybdate Mo (VI) par les composés anti-oxydants contenus dans les

extraits végétaux, en molybdate Mo (V) avec la formation d'un complexe vert de ce dernier qui peut être évalué spectrophotométriquement à un maximum d'absorption à 695 nm.

Cette méthode consiste à introduire 100  $\mu\text{L}$  de solution d'extrait dans un tube Epindorff, en ajoutant 900  $\mu\text{L}$  d'un réactif composé de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,6 M), de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube bien fermé, est ensuite incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm. En parallèle, on prépare le contrôle négatif dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par 100  $\mu\text{L}$  de méthanol. L'acide ascorbique est utilisé comme référence pour calculer le potentiel anti-oxydant des extraits exprimé en mg d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (mg EVA/mg d'extrait).

#### f. Pouvoir réducteur du ferFRAP

Cette activité est fondée sur le pouvoir des extraits à réduire les ions  $\text{Fe}^{3+}$  présents dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en ions fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) distingués par la présence d'une couleur bleu dans le milieu réactionnel, et qui on peut l'évaluer en mesurant la densité de cette couleur à 700 nm [152]. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode préconisée par Oyaizu en 1986 [153].

Un mL de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain à 50 °C pendant 20 minutes. 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ensuite ajoutés pour arrêter la réaction et le tout est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. A l'issue de cette centrifugation, 2,5 mL du surnageant sont mélangés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) fraîchement préparé à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, où l'extrait est remplacé par l'eau distillée.

#### f. Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène $\text{H}_2\text{O}_2$

L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été réalisé selon la méthode de Rush et al. (1989) [154]. Une solution de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 43 mM) a été préparé dans un tampon de phosphate (0,1 M, pH 7,4). Tous les extraits bruts et les standards antioxydants ont été préparés à la concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans un tampon de phosphate. Les échantillons préparés ont été ajoutés à 0,6 mL de solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 230 nm après 10 minutes d'incubation. La solution à blanc contenait le tampon

phosphate sans peroxyde d'hydrogène et le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène des échantillons (extraits et standards) a été calculé comme suit :

$$\text{Activité de piégeage du H}_2\text{O}_2 \text{ (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}})/A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{Blanc}}$  est l'absorbance du blanc.

$A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance des extraits bruts ou des standards.

#### IV.3.3. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-inflammatoire *in vitro* d'extraits bruts (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *A. humilis* a été évalué par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œufs <sup>[155]</sup>. Un volume d'albumine d'œufs (200 µL, provenant d'œufs de poule frais) a été ajouté à 2,8 mL de solution saline tamponnée de phosphate (PBS, pH 6,4) et 2 mL d'échantillons à différentes concentrations (extraits et Diclofénac sodique comme standard). Les tubes obtenus ont été incubés pendant 15 minutes à 37 °C puis chauffés pendant 5 minutes à 70 °C. Après refroidissement à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 660 nm. Une solution témoin a été préparée en remplaçant les échantillons par l'eau distillée et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [V_s / V_c - 1]$$

Où  $V_s$  est l'absorbance de l'échantillon d'essai et  $V_c$  est l'absorbance du témoin.

#### IV.3.4. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne *in vitro* des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus* a été examinée contre une gamme de micro-organismes par la méthode de diffusion sur disque décrite par Falleh et ses collaborateurs (2008) <sup>[156]</sup> incluant huit souches bactériennes. Les souches bactériennes sont préalablement revivifiées en milieu BHIB (24 h à 37 °C), isolées en colonies par la méthode des stries sur milieu Mueller Hinton, puis réincubées à 37°C pendant 24 h sur le même milieu.

Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure ont été transférées dans 5 mL de bouillon nutritif. La suspension bactérienne a été homogénéisée et incubée à 37 °C pendant 10 à 24 heures. Après incubation, une lecture de la densité optique (DO) de 1 mL d'inoculum a été faite par un spectrophotomètre à 625 nm. L'opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland.

Un échantillon de chaque inoculum est utilisé pour inoculer des disques de Petri contenant Mueller Hinton par écouvillonnage. Des disques de papier Wathman (6 mm) ont été

imprégnés avec 10  $\mu$ L de différentes concentrations d'extraits et déposés soigneusement sur la surface de la gélose inoculée avec des pinces stériles.

Les disques des contrôles négatifs ont été imprégnés de DMSO et les disques des contrôles positifs contiennent les antibiotiques de référence (la Pénicilline, 10  $\mu$ g / disque). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Les tests ont été réalisés en trois essais (trois essais pour chaque concentration d'extrait, d'antibiotique et pour chaque souche) et les résultats ont été exprimés par les diamètres des zones d'inhibition autour des disques produits.

#### **IV.3.5. Analyse statistique**

Les expériences ont été réalisées en trois essais et les résultats ont été donnés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $p < 0,05$ ) de trois mesures parallèles pour chaque échantillon. Les données ont été analysées par ANOVA à un facteur (Graph Pad Prism 5) et par test de Tukey. Les calculs de  $IC_{50}$  sont réalisés pour les activités de piégeage des radicaux DPPH, ABTS et GOR,  $A_{0.5}$  pour la méthode phénanthroline,  $\mu$ g EAA/mg ex pour les activités par PPM et FRAP, le pourcentage moyen Moy% pour le piégeage par  $H_2O_2$  et le pourcentage d'inhibition (%) pour les tests anti-inflammatoires.

La CMI de façon générale, est la plus faible concentration des extraits ayant une activité antibactérienne visible à l'œil nu capable d'inhiber toute croissance après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Une solution contenant des concentrations connues des fractions à tester est diluée dans un volume connu de gélose de MH en surfusion ; après solidification, une suspension bactérienne est déposée à la surface du milieu gélifié.

## *Conclusion générale*



## Conclusion générale

Les études portant sur les substances naturelles appelées aussi principes actifs, obtenus à partir des espèces végétales, restent un sujet très dominant et contribuent avec les efforts de la communauté scientifique visant à valoriser ce patrimoine floristique notamment les plantes médicinales et la pharmacopée traditionnelle.

Dans ce contexte, cette thèse s'y est inscrite tout en impliquant deux grands aspects majeurs, la caractérisation phytochimique et l'évaluation biologique *in vitro* des extraits organiques issus de deux plantes médicinales poussant abondamment dans la région des Aurès à savoir *Atractylis humilis* L. et *Carduncellus pinnatus* DC. appartenant à la famille Asteraceae. L'investigation chimique de ces deux espèces a pour objectif principal la découverte de nouveaux principes actifs d'une part, et d'autre part de valoriser la flore algérienne en tant que sources de molécules bioactives.

La caractérisation phytochimique a porté sur la chimie des substances naturelles en soumettant les plantes objet de cette investigation aux différentes techniques d'extraction et d'analyses chromatographiques et spectroscopiques à savoir la macération, l'extraction, le fractionnement et la purification par des méthodes chromatographiques : CCM, CCE, CC (SiO<sub>2</sub>, polyamide SC6 et Sephdex LH-20), des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Atractylis humilis* et de l'extrait AcOEt de l'espèce *Carduncellus pinnatus*. Ce travail purement chimique a permis l'obtention de 18 métabolites secondaires. L'élucidation structurale des composés isolés a été parachevée par l'analyse conjointe des différentes méthodes et expériences spectroscopiques telles que : la RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (ESI-HR et ESI-MS) et la mesure du pouvoir rotatoire [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>, ainsi que la comparaison avec les données bibliographiques.

L'investigation phytochimique réalisée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis humilis* a permis d'isoler quatorze produits à l'état pur, se répartissant en :

- › Un nouveau lignane identifié comme (7'S,8R,8'S)-9'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4,9-trihydroxy-3',4,5,5'-tétraméthoxy-2,7'-cycloignanenommé Humilisane A (**TH1**) avec un autre connu déterminé à (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -glucopyranosyl)-oxy]-lyoniresinol (**TH2**). Ces deux lignanes sont de type aryltétraline.
- › Deux flavonoïdes C-glucosylés nommés Swertisine (**TH3**) et 3',7-diméthyl-Isoorientine (**TH4**).

- › Cinq composés phénoliques : 2,5-dihydroxyéthyl cinnamate (**TH5**), 3,4,5-triméthoxyphenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (**TH6**), Tachioiside (**TH7**), Acide vanillique (**TH8**) et 2,6-diméthoxy 1,4-benzoquinone (**TH9**).
- › Trois triterpènes : Lupéol (**TH10**), Acide oléanolique (**TH11**) et  $\beta$ -sitostérol (**TH12**).
- › Deux dérivés osidiques : 1-O-éthyl- $\beta$ -D-xylose (**TH13**) et 1-O-éthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**TH14**).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés à partir de l'extrait AcOEt de l'espèce *Carduncellus pinnatus* a été réalisée aussi grâce à l'analyse des différents spectres RMN et Masse, conduisant ainsi à la caractérisation d'un flavonoïde nommé Isokaempferide (**CP1**), une coumarine Scopolétine (**CP2**) et deux triterpènes Lupéol (**CP3**) et  $\beta$ -sitostérol (**CP4**).

Au long de ce travail de recherche, les métabolites secondaires purifiés et caractérisés dans l'espèce *A. humilis* appartiennent à différentes classes chimiques à savoir les lignanes, les flavonoïdes, les triterpènes, les composés phénoliques et les dérivés osidiques. Cette chemo-diversité contribue davantage à la connaissance de la composition phytochimique des espèces du genre *Atractylis* en général, et complète les études chimiques sur les espèces *A. flava*, *A. serratuloides* et *A. cancellata* entreprises au sien de notre laboratoire depuis une dizaine d'années en particulier. Cette diversité chimique participe à mieux cerner la problématique de la signification chimiotaxonomique des différents métabolites secondaires ainsi que leur rôle dans le genre *Atractylis*. Il est important de mentionner que l'extrait éther de pétrole (EP) montre sur CCM un profil phytochimique qui n'est pas moins intéressant que les extraits déjà étudiés et pour cela, il est souhaitable d'entamer des investigations chimiques sur cet extrait.

Contrairement, les résultats chimiques obtenus lors de l'étude de l'espèce *C. pinnatus* ne reflètent en aucun cas son contenu phytochimique. Des investigations chromatographiques plus poussées impliquant les méthodes modernes de séparation et de purification sont plus que nécessaires pour mettre en exergue la composition phytochimique de cette plante en métabolites secondaires et de faire des propositions concernant leur signification chimiotaxonomique pour le genre *Carduncellus*. Ceci fait appel à des analyses phytochimiques plus approfondies surtout les extraits de la plante *C. pinnatus*.

L'évaluation biologique des deux plantes *A. humilis* et *C. pinnatus* a trait particulièrement à la détermination des teneurs en phénols et flavonoïdes totaux, ainsi que la

mise en évidence *in vitro* des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des différents extraits organiques issus de ces deux plantes.

La détermination quantitative des contenus phénoliques et flavonoïdiques des deux espèces *A. humilis* et *C. pinnatus* a été réalisée selon les méthodes de Folin-Ciocalteu et du trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats révèlent des teneurs variables d'un extrait à un autre, où on enregistre les concentrations les plus élevées en phénols et flavonoïdes dans l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *C. pinnatus*.

Les capacités antioxydantes des différents extraits analysés ont été évaluées *in vitro* au moyen de quatre tests : DPPH, ABTS, GOR et le dosage de la phénanthroline pour l'espèce *A. humilis* ; et quatre méthodes aussi : DPPH, PPM, FRAP et le piégeage par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour la plante *C. pinnatus*. Les résultats biologiques obtenus des deux plantes ont montré des propriétés antioxydantes modérées par rapport aux composés BHA, BHT et acide ascorbique utilisés comme standards.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts préparés à partir des espèces *A. humilis* et *C. pinnatus*, et Diclofénac sodique comme standard par le test de dénaturation de l'albumine d'œuf, exhibe un bon pourcentage d'inhibition à la concentration de 4 mg/mL de l'extrait *n*-BuOH obtenu de la plante *C. pinnatus* comparativement aux extraits AcOEt et EP de la même plante et les extraits AcOEt et *n*-BuOH issus de la plante *A. humilis* présentant des activités modérées.

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis humilis* a été estimée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, contre trois souches bactériennes *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négative) et *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif) ; et les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Carduncellus pinnatus* contre trois souches bactériennes (ATTC) dont *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négative) et *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif), et deux souches pathogènes : *Klebsiella pneumoniae* (bactérie à Gram négative) et *Streptococcus mutans* (bactérie à Gram positive).

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis humilis* n'ont révélé aucun effet inhibiteur envers la croissance des souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* respectivement. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH issus de la même plante manifestent une activité antibactérienne contre la souche *Staphylococcus aureus* avec des

valeurs de CMI égale à 12,5 et 6,25 µg/mL respectivement. Tandis que l'extrait AcOEt présente une activité vis-à-vis de la souche bactérienne *Escherichia coli* avec une valeur de CMI de 6,25 µg/mL, et l'extrait *n*-BuOH révèle un effet inhibiteur contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* avec une valeur de CMI de 25 µg/mL.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'espèce *Carduncellus pinnatus* ont montré que les bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* présentent une résistance à l'égard de tous les extraits à différentes concentrations. Les analyses du pouvoir antibactérien ont enregistré une faible sensibilité des trois souches bactériennes restantes *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans* vis-à-vis les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH issus de la plante *C. pinnatus* avec des valeurs de CMI variant de 12,5 à 25 µg/mL.

A l'issue de cette investigation biologique, il est à constater que les travaux réalisés sur les différents extraits des espèces *Atractylis humilis* et *Carduncellus pinnatus* ont exhibé des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes considérées parfois importantes et d'autre fois modérées. Ceci est dû probablement à la composition moléculaire en polyphénols et flavonoïdes des extraits organiques de chaque plante. Pour bien dévoiler l'intérêt pharmacologique de ces plantes, il serait préférable faire des tests biologiques sur les métabolites secondaires isolés dans le cadre de cette étude et de réaliser d'autres activités plus intéressantes comme l'activité anticancéreuse, anticholinestérase, antityrosinase, antivirale, antidiabétique ... etc. *in vitro* et *in vivo*. Aussi, il est souhaitable d'établir les corrélations entre les activités biologiques et l'utilisation en médecine traditionnelle de ces plantes locales.

## *Bibliographie*

**Bibliographie**

- [1] Rate, SMK. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
- [2] Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS Ed., 1-2, Paris.
- [3] Chabani, S., Haba, H., Lavaud, C., Benkhaled, M., Harakat, D. 2013. Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochem. Lett.* 6, 9–13.
- [4] Chabani, S., Lavaud, C., Benkhaled, M., Harakat, D., Long, C., Haba, H. 2016a. Three new oleanane-type triterpene saponins from *Atractylis flava*. *Phytochem. Lett.* 15, 88–93.
- [5] Chabani, S., Haba, H., Long, C., Benkhaled, M. 2016b. Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*. *Ind Crops Prod.* 88, 91–95.
- [6] Badaoui, M.I., Alabdul Majid, A., Benkhaled, M., Benswissi, C., Harakat, D., Voutquenne-nazabadioko, L., Haba, H. 2019. Pyrroloquinolone A, a new alkaloid and other phytochemicals from *Atractylis cancellata* L. with antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1682575>.
- [7] Meratate, F., Lalaoui, F., Akkal, S. 2016. Chemical composition of the essential oil of *Carduncellus helenioides* (Desf.). *Oriental Journal of Chemistry*, 32(3), 1305-1312.
- [8] Shabanaa, MM., El-Shereia, MM., Moussaa, MY., Sleemb AA., Abdallaha, HM. 2007. Investigation of Phenolic Constituents of *Carduncellus eriocephalus* Boiss. var. *albiflora* Gauba and their Biological Activities. *Natural Product Communications*, 2(8), 823-828
- [9] Shabanaa, MM., El-Shereia, MM., Moussaa, MY., SleembAA., Abdallaha, HM. 2008. Flavonoid constituents of *Carduncellus mareoticus* (Del.) hanelt and their biological activities. *Natural Product Communications*, 3(5), 779-784.
- [10] Grace, MH., Mohamed, TK., Khattab, AM. Flavonoids of *Carduncellus eriocephalus*. 1999. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4-6), 409-416.
- [11] Proliac, A. 1976. Contribution to the chemical study of *Carduncellus monspeliensis* All. From *Fitoterapia*, 47(3), 113-14. Language : French, Database : CAPLUS.
- [12] Définitions lexicographiques et étymologiques de « Composées » du Trésor de la langue française informatisé, sur le site du Centre national de ressources textuelles et lexicales (consulté le 14 mai 2016).

- [13] Funk, VA., Susanna, A., Stuessy, TF., Bayer, RJ. 2009. Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- [14] Jeffrey, C. 2007. Compositae: Introduction with key to tribes. In J. J. W. Kadereit, & C. Jeffrey (Eds.), Flowering plants: Eudicots; asterales, 8, 61–87.
- [15] Gharzouli, R., Djellouli, Y. 2005. Diversité floristique de la Kabylie des Babors (Algérie). *Sécheresse*, 16(3), 217-23.
- [16] Sherwin C. 1976. «*Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae*». *Aliso*, 8(4),465.
- [17] Cox, CB., Moore, PD., Ladle, R. 2016. *An Ecological and Evolutionary Approach*, John Wiley & Sons. *Biogeography*, 42-43
- [18] Zdero, C., Bohlmann, F. 1990. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist plant systematics and Evolution. 171, 1–14.
- [19] Dupont, F., Guignard JL. 2005. Botanique : Systématique moléculaire. 13th ed, Masson.
- [20] Botineau, M. 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier. Paris.
- [21] Bruneton, J. 2007. Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. 3e édition. Lavoisier, Paris.
- [22] Régnier, V., Chadefaud, M. 1939. Histoire naturelle première année. Librairie Delagrave éd.
- [23] Cassini, H. 1819. Various articles In : Dictionnaire de Sciences Naturelles, Paris. Cited by King, R., Dawson, HW. 1975. Cassini on Compositae. Oriole, New York.
- [24] Bentham G. 1873. Compositae. In: Bentham, G., Hooker, JD. eds. *Genera Plantarum*, 2 (1), London: Reeve, 163–533.
- [25] Ling, Y., Chen, YL., Shih, C. 1985a. Compositae. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, Beijing : Science Press 74, 1–2.
- [26] Bayer, RJ., Starr, JR. 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL intron and trnL/ trnF intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85, 242–256.

- [27] Bremer, K. 1994. *Asteraceae: cladistics and classification*. Portland, Oregon: Timber Press.
- [28] Kim, KJ., Jansen, RK. 1995. *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 10379–10383.
- [29] Panero, JL., Funk, VA. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115: 909–922.
- [30] Panero, JL., Funk, VA. 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies, majorclades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 757–782.
- [31] Panero, JL., Susana, EF., Espinar, LA., Crozier, BS., Barboza, GE., Cantero, JJ. 2014. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 80: 43–53.
- [32] Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R., Garnatje, T. 2006. The Cardueae (Compositae) revisited: insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann Missouri Bot Gard*, 93,150–171.
- [33] Kurt, A., Ozcan, M., Colak, N., Ozogul, Y., Glew, R., Ozogul, F., Ayaz, FA. 2019. Fatty acids of oil and northeast Anatolia (Turkey). *Bot Serb*, 43, 31–45.
- [34] Hoffmann, O. 1894. Compositae. In “Die Natu<sup>r</sup>lichen Pflanzenfamilien” (A. Engler and K. Prantl, Eds.), 324–333. Engelmann, Leipzig.
- [35] Wagenitz, G. 1976. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Pl. Syst. Evol.* 125,29–46.
- [36] Petit, DP. 1988. Le genre *Echinops* L. (Compositae, Cardueae). 1. Position phylétique et interprétation de l’incapitulescence. *Candollea*, 43,467–481.
- [37] Jansen, RK., Holsinger, KE., Michaels, HJ., Palmer, JD. 1990. The phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site data at higher taxonomic levels: An example from the Asteraceae. *Evolution*, 44,2089–2105.



- [38] Jansen, RK., Holsinger, KE., Palmer, JD. 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. *Syst. Bot.* 16,98–115.
- [39] Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, DE., Soltis, PS. 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *Am. J. Bot.* 82,1056–1068.
- [40] Petit, DP. 1997. Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): A cladistic analysis of morphological data. *Pl. Syst. Evol.* 207,173–203.
- [41] Susanna, A., Garcia-Jacas, N. 2009. Cardueae (Carduoideae). In: Funk, VA., Susanna, A., Stuessy, TF., Bayer, RJ. (eds) Systematics evolution and biogeography of the compositae. IAPT, Vienna, 293–313.
- [42] Garcia-Jacas, TG., Susanna, A., Vilatersana, R. 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Molec. Phylogenet. Evol.* 22: 51–64.
- [43] Barres, L., Sanmartin, I., Anderson, CL., Susanna, A., Buerki, S., Galbany-Casals, M., Vilatersana, R. 2013. Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe Cardueae (Compositae). *Am. J. Bot.* 100,867–882.
- [44] Green, ML. 1929. *Prop. Brit. Bot.* 179.
- [45] Petit, DP. 1987. Analyse cladistique du genre *Atractylis* L. (Compositae, Cardueae). *Bull. Soc. bot. Fr.* 134, Lettres bot. (2), 165-184.
- [46] Battandier, JA., Trabut, L. 1889. *Flore de L'Algérie*, Paris.
- [47] Petit, DP. 1988. Note nomenclaturale sur les subdivisions du genre *Atractylis* L. *Bull. Soc. bot. Fr.* 135, Lettres bot. (1), 71-72.
- [48] Vilatersana, R., Susanna, A. 2000. Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Carthus* complex (Asteraceae) based on ITS sequences. *Plant Systematics and Evaluation*, 221, 89-105.
- [49] Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Centre national de la recherche scientifique 15, quai Anatole-France Paris 7<sup>ème</sup> ed. 2, 992-1043.
- [50] Fenni, M., Shakir, J. 2001. Floristic and agronomic aspect of cereal weeds in the Constantine high plains. *National Library of Medicine*, 66 (2b),797-801.

- [51] Danieli, B., Boumbardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B. 1972. Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. *Phytochemistry*, 11, 3501-3504.
- [52] Riccio, P., Scherer, B., Klingenberg, M. 1973. Isolation of a new Atractyloside type compound. *FEBS Letters*. 31(1), 11-14.
- [53] Calmes, M., Crespin, F., Maillard, C., Ollivier, E., Balansard, G. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from *Atractylis gummifera* L. *Journal of Chromatography A*, 663(1), 119-122.
- [54] Chen, LY., Hu, A., Chang, CJ. 2013. The degradation mechanism of toxic Atractyloside in herbal medicines by decoction. *Molecules*, 18, 2018-2028.
- [55] Pachaly, P., Lansing, A., Seog Sin, K. 1989. Constituents of *Atractylis koreana*. *Planta Med.* 55, 59–61.
- [56] Melek, FR., Radwan, AS., Ahmed, AA., Hamman, AA., Aboutabl, EA. 1989. Triterpenes from *Atractylis carduus* L. *Pharmazie*, 44(10), 735.
- [57] Pachaly, P., Lansing, A., Neugebauer, M., Seog Sin, K. 1990. Acetylenes from *Atractylis koreana*. *Planta Med.* 56, 469–471.
- [58] Chaboud, A., Dellamonica, G., Raynaud, J. 1988. Neocorymboside, a di-C-glycosylflavone from *Atractylis gummifera*. *Phytochemistry*, 27, 2360–2361.
- [59] Raynaud, MJ., Dombri, A. 1978. Contribution à l'étude des C-glycosyl flavonoides des feuilles d'*Atractylis gummifera* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 12, 220–224.
- [60] Melek, FR., Aboutabl, EA., El-Shabrawy, O., Radwan, AS., Hilal, SH., Hammam, A. 1992. *Atractylis carduus* var. *angustifolia* flavonoids and antiinflammatoire activite. *Egyptian journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(1-2), 11-19.
- [61] Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., Mazzanti, G. 2005. *Atractylis gummifera* L. Poisoning: an ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 175–181.
- [62] El Rhaffari, L., Zaid, A. 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. In *Des sources du savoir aux médicaments du future*, IRD editions, Paris, 293–318.

- [63] Yong-guang, B., Ding-long, Y., XIAO-jun, H., Yu-min, L., Min-xia, H., 2012. Study on Ultrasonic-assisted Extraction of Polysaccharide of *Atractylis macrocephala* koidz of Experiment1. *Energy Procedia*, 17, 1778–1785.
- [64] Gray, SF., Redwood, T. 1848. *Gray's supplement to the pharmacopoeia: Being a concise but comprehensive dispensatory and manual of facts and formulae, for the chemist and druggist and medical practitioner.* Longman and Company, London.
- [65] Cheriti, A., Rouisset, A., Sekkoum, K., Balanard. G. 1995. Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie). *Fitoterapia*, LXVI, 6.
- [66] Larrey, D., Pageaux, GP. 1995. Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Semin Liver Dis.* 15, 183–188.
- [67] Melakhessou, MA., Benkiki, N., Marref, S.E., Bouzidi, S. 2018. Anti-Inflammatory, anti-pyretic and acute toxicity effects of *n*-Butanol extract of *Atractylis flava* Desf. in Rats. *Pharmacognosy Journal*, 10, 763–767.
- [68] Guo, WQ., Li, LZ., He, ZY., Zhang, Q., Liu, J., Hu, CY., Qin, FJ., Wang, TY. 2013. Anti-proliferative Effects of *Atractylis lancea* (Thunb.) DC. via Down-regulation of the c-myc/hTERT/Telomerase Pathway in Hep-G2 Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6363-6367.
- [69] Yang, YL., Chang, FR., Wu, YC. 2005. Squadinor lignoside: A novel 7,9'-dinorlignan from the stems of *Annona squamosa*. *Helv. Chim. Sci.* 88, 2731–2737.
- [70] Ayres, DC., Harris, JA., Jenkins, PN., Phillips, L. 1972. Lignans and related phenols. Part XII. Application of nuclear magnetic double resonance to the aryltetrahydronaphthalene class. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 11343–1350.
- [71] Brewer, CF., Loike, JD., Horwitz, SB. 1979. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners. Structure–activity relationship in microtubule assembly. *J. Med. Chem.* 22: 215–221.
- [72] Jullian-Pawlicki, N., Lequart-Pillon, M., Huynh-Cong, L., Lesur, D., Cailleu, D., Mesnard, F., Laberche, JC., Gontier, E., Boitel-Conti, M. 2015. Arylnaphthalene and aryltetralin-type lignans in hairy root cultures of *Linum perenne*, and the stereochemistry of 6-methoxypodophyllotoxin and one diastereoisomer by HPLC-MS and NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 26, 310–319.

- [73] Coxon, B. 2009. Developments in the Karplus equation as they relate to the NMR coupling constants of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 62, 17–82.
- [74] Ouyang, MA., Wein, YS., Su, RK., Kuo, YH. 2007. Rhusemialins A-C, new cyclolignan esters from the roots of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 804–807.
- [75] Yean, MH., Kim, JS., Le, JH., Kang, SS. 2010. Lignans from *Lonicerae caulis*. *Nat. Prod. Sci.* 16, 15–19.
- [76] Berova, N., Polavarapu, PL., Nakanishi, K., Woody, RW. 2012. Comprehensive chiroptical spectroscopy: applications in stereochemical analysis of synthetic compounds. *Natural Products and Biomolecules*, John Wiley and Sons, Inc., Canada.
- [77] Buske, A., Schmidt, J., Porzel, A., Adam, G. 2001. Alkaloidal, megastigmane and lignan glucosides from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). *Eur. J. Org. Chem.* 18, 3537–3543.
- [78] Klyne, W., Stevenson, R., Swan, R J. 1966. Optical rotatory dispersion. Part XXVIII. The absolute configuration of otobain and derivatives. *J. Chem. Soc. (C)*, 893–896.
- [79] Ohashi, K., Watanabe, H., Okumura, Y., Uji, T., Kitagawa, I. 1994. Indonesian medicinal plants. XII. Four isomeric lignan-glucosides from the bark of *Aegle marmelos* (Rutaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1924–1926.
- [80] Wangteeraprasert, R., Likhitwitayawuid, K. 2009. Lignans and a sesquiterpene glucoside from *Carissa carandas* Stem. *Helv. Chim. Acta.* 92, 1217–1223.
- [81] Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., Ma, L., Liaoc, N., Xuc, X. 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *Spinosa*. *Tetrahedron*, 56, 8915–8920.
- [82] Zhu, L., Zhao, Z., Yu, S., Zhu, S. 2010. Isolation and purification of flavonoid glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice by high-speed counter-current chromatography. *International sugar journal*, 112, 1333.
- [83] Jay, M., Viricel, MR. 1980. Les flavonoides des feuilles du *Phragmites australis* : essai de difinition du profil polyphenolique de l'espèce. *Phytochemistry*, 19, 2627–2628.
- [84] Valant, K., Besson, E., Chopin, J. 1980. Isoorientin 7,3'-dimethyl ether, a new c-glycosylflavone from *Achillea cretica*. *phytochemistry*, 19, 156.

- [85] T. Nakaoki, 1927. J. Pharm. Soc. Japan, 144.
- [86] Dadheech, N., Srivastava, A., Paranjape, N., Gupta, S., Dave, A., Shah, GM., Bhonde, RR., Gupta, S. 2015. Swertisin an Anti-Diabetic Compound Facilitate Islet Neogenesis from Pancreatic Stem/Progenitor Cells via p-38 MAP Kinase-SMAD Pathway : An *In-vitro* and *In-vivo* Study. PLoS ONE 10(6), e0128244.
- [87] Peng, J., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y. 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A, 1074, 111–115.
- [88] Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M. 2007 Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. Journal of Oleo Science, 56(11), 611-614.
- [89] Zhou, K., Chen, D., Li, B., Zhang, B., Miao, F., Zhou, L., 2017. Bioactivity and structure-activity relationship of cinnamic acid esters and their derivatives as potential antifungal agents for plant protection. PLoS ONE 12, e0176189.
- [90] Saijo, R., Nonaka, GI., Nishioka, I. 1989. Phenol glucoside gallates from *Mallotus japonicus*. Phytochemistry, 28, 2443–2446.
- [91] Inoshiri, S., Sasaki, M., Kohda, H., Otsu, H., Yamasaki, K. 1987. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa*. Phytochemistry, 26, 2811–2814.
- [92] Li, T., Park, MH., Kim, MJ. 2008. Tachioside, an antioxidative phenolic glycoside from *Bamboo* species. Food Science and Biotechnology, 17(6), 1376-1378.
- [93] Luyen, BTT., Tai, BH., Thao, NP., Yang, SY. Cuong, NM., Kwon, YI., Jang, HD., Kim, YH. 2014. A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. Bioorg Med Chem Lett. 1, 24(17), 4120-4.
- [94] Leslie, JH., Sia, GL., Sim, KY., Tan, HTW., Connolly, JD., Lavaud, C., Massiot, G. 1995. A ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesapaniculata*. Phytochemistry, 38, 1497–1500.

- [95] Barros, L., Duenas, M., Alves, CT., Silva, S., Henriques, M., Buelga, CS., Ferreira, ICFR. 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, 41-45.
- [96] Yvonne K. 2006. Antibakterielle Wirkung von ausgewählten Naturstoffenaufdas Wachstum von *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit.
- [97] Harasawa, A., Tagashira, A. 1994. Isolation of 2,6-dimethoxy 1,4-benzoquinone from brian hydrangea (*hydrangea macrophylla* seringe var. *otaksamakino*) and its deodorant activity against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2073–2074.
- [98] Nishina, A., Hasegawa, K., Uchibori, SH., Osawa, T. 1991. "2,6-Dimethoxy-*p*-benzoquinone as an antibacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *Pubescens*, a species of thick-stemmedbamboo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 266–269.
- [99] Canonero R., Poggi C. 1988. Mutagenic activity of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, produced during the nitrosation of dimethophrine, in V 79 cells. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 64(1), 61-8
- [100] Brambilla, G., Robbiano, L., Cajelli, E., Martelli, A., Turmolini, F., Mazzei, M. 1988. Cytotoxic, DNA-damaging and mutagenicproperties of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, formed by dimethophrine-nitrite interaction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244(3), 1011-5
- [101] Mazzei, M., Roma, G., Balbi, A., Sottofattori, E., Robbiano, L. 1988. Formation of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, a highlygenotoxic compound, from the reaction of sodium nitrite with the sympathomimetic drug dimethophrine in acidic aqueous solution. *Il Farmaco ; edizione scientifica*, 43(6): 523-38
- [102] Moore, GA., Rossi, L., Nicotera, P., Orrenius, S., O'Brien, PJ. 1987. Quinone toxicity in hepatocytes : studies on mitochondrial calcium release induced by benzoquinone derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259(2), 283-95.
- [103] Siraki, AG., Chan, TS., O'Brien, PJ. 2004. Application of Quantitative Structure-ToxicityRelationships for the Comparison of the Cytotoxicity of 14 *p*-Benzoquinone Congeners in Primary Cultured Rat Hepatocytes Versus PC12 Cells. *Toxicological Sciences*, 81(1), 148-159.

- [104] Chan, K., Jensen, N., O'Brien, P.J. 2008. Structure-activity relationships for thiol reactivity and rat or human hepatocytotoxicity induced by substituted *p*-benzoquinone compounds. *Journal of Applied Toxicology*. 28(5), 608-620.
- [105] Gallo, M.B.C., Sarachine, M.J. 2009. Biological activities of lupeol. *Int. J. Biomed. Pharmac. Sci.* 3, 46–66.
- [106] Labbe, C., Roviroso, J., Faini, F., Mahu, M., San-Martin, A., Castillo, M. 1986. Secondary Metabolites from Chilean *Baccharis* species. *J. Nat. Prod.* 49, 517–518.
- [107] Lee, S.O., Choi, S.Z., Choi, S.U., Ryu, S.Y., Lee, K.R. 2004. Phytochemical constituents of the aerial parts from *Aster hipidus*. *Nat. Prod. Sci.* 10, 335–340.
- [108] Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57–68.
- [109] Feng, J.H., Chen, W., Zhao, Y., Ju, X.L. 2009. Anti-Tumor Activity of Oleanolic, Ursolic and Glycyrrhetic Acid. *Open Nat. Prod. J.* 2, 48–52.
- [110] Nirmal, S.A., Pal, S.C., Mandal, S.C., Patil, A.N. 2012. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbor-tristis* leaves. *Inflammopharmacology*, 20, 219–224.
- [111] Klai, N., Bidjou-Haiour, C., Bouquillon, S. 2015. D-Xylose based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. *C. R. Chimie*, 18, 599–606.
- [112] Prawat, H., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwuttikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W.C., Pakawatchai, C., Skelton, B.W., Whittell, A.H. 1995. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, 40, 1167–1173.
- [113] Liang, Y.S., Choi, Y.H., Kim, H.K., Linthorst, H.J.M., Verpoorte, R. 2006. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 67, 2503-2511.
- [114] Calis, I., Bedir, E., Kirmizibekmez, H., Ersöz, T., Dönmez, A.A., Khan, I.A. 2005. Secondary metabolites from *Phlomis oppositiflora*. *Natural Product Research*, 9, 4993-501.

- [115] Wang, SQ., Wang, XN., Li, YY., Di, XX., Lou HX. 2014. Identification of purine derived compounds ustilagomaydisin A-C from the plant pathogen *Ustilago maydis* and their modulating effects on multidrug-resistant (MDR) tumors. *Phytochemistry Letters*, 10, 193-197.
- [116] Dreyer, DL. 1978. Kaempferol methylethers from flowers of *Dodonaea viscosa*. *Rev Latinoam Quim.* 9, 97-98.
- [117] Canuto, KM., Lima, MAS., Silveira, ER. 2010. Amburosides C-H and 6-O-protocatechuoyl coumarin from *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc.* 21(9), 1746-1753.
- [118] Banskota, AH, Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Xiong, Q., Hase, K., Tran. K.Q., Tanaka, K., Saiki, I., Kadota, S. 2000. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. *Biol Pharm Bull.* 23(4), 456-460.
- [119] De-Meyer, N., Haemers, A., Mishra, L., Pandey, HK., Pieters, LA. Vanden-Berghe, DA., Vlietinck, AJ. 1991. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. *J Med Chem.* 34(2),736-746.
- [120] Costa-Lotufo, LV., Jimenez, PC., Wilke, DV., Leal, LKAM., Cunha, GM., Viana, GSB. 2003. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Z Naturforsch C*, 58, 675-680.
- [121] Aichour, S., Haba, H., Benkhaled, M., Hrakat, D., Lavaud, C. 2014. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. *Phytochemistry Letters*, 10, 198-203.
- [122] Lee, J., Kim, NH., Nam, JW., Lee, YM., Jang, DS., Kim, YS., Nam, SH., Seo, EK., Yang, MS., Kim, JS. 2010. Scopoletin from the flowerbuds of *Magnolia fargesii* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis *ex Vivo*. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1317-1323.
- [123] Akula, R., Ravishankar, GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior*, 6(11), 1720-1731.
- [124] González-Chavira, MM., Herrera-Hernández, MG., Guzmán-Maldonado, H., Pons-Hernández, JL. 2018. Controlled water deficit as abiotic stress factor for enhancing the phytochemical content and adding-value of crops. *Scientia Horticulturae*, 234, 354-360.



- [125] Hagerman, AE., Riedl, KM., Jones, GA., Sovik, KN., Ritchard, NT., Hartzfeld, PW. Riechel, TL. 1998. High molecular weight plant polyphenolic (tannins) as biological antioxidant. *J Agric Food Chem.* 46(5), 1887-1892.
- [126] Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible mode of action. *J Nat Prod.* 59(2), 205-215.
- [127] Boudebaz, K., Nia, S., Ayadi, MT., Cherif, JK. 2015. The effect of extraction method on antioxidant activity of *Atractylis babelii* Hochr. leaves and flowers extracts. *Algerian Journal Of Natural Products*, 3(2), 146-152.
- [128] Abdel Rahman, SM., Abd-Ellatif, SA., Deraz, SF., Khalil, AA. 2011. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *Afr. J. Biotechnol.* 10(52), 10733-10743.
- [129] Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M., Sayadi, S. 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7017-7027.
- [130] Khadhri, A., Ridha, E.M., Smiti, S. 2013. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu : *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*.
- [131] Melakhessou, MA., Benkiki, N., Marref, SE. 2018. Determination of Antioxidant Capacity, Flavonoids and Total Phenolic Content of Extracts from *Atractylis flava* Desf. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(12), 5221-5226.
- [132] Craft, BD., Kerrihard, AL., Amarowicz, R., Pegg, RB. 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.
- [133] Adaramola, B., Onigbinde, A. 2016. Effet extraction solvant on the phenolic content, flavinoid content and antioxydant capacity of clovebud. *Int. Biol. Sci.* 11(3), 33-8.
- [134] Sangeetha, G., Vidhya, R. 2016. *In vitro* anti-inflammatory activity of different parts of *Pedalium murex* (L.). *International Journal of Herbal Medicine*, 4(3), 31-36.

- [135] Ingle, PV., Patel, DM. 2011. C-reactive protein in various disease condition—an overview. *Asian J Pharm Clin Res.* 4(1), 9-13.
- [136] Williams, LAD., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, JA., Kraus, W. 2008. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat-treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*, 57(4), 327-331.
- [137] Mouffouk, S., Marcourt, L., Benkhaled, M., Boudiaf, K., Wolfender, JL., Haba, H., 2017. Two new prenylated isoflavonoids from *Erinacea anthyllis* with antioxidant and antibacterial activities. *Natural Product Communications*, 12(0).
- [138] Hayouni, EA., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 105(3), 1126-1134.
- [139] Natarajan, D., Britto, SJ., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., Perumal, G. 2005. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol.* 102(1), 123-126.
- [140] Fazeli, MR., Gholamreza, A., Attari, AMM., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18, 646-649.
- [141] AbdelRahman, SM., Abd-Ellatif, SA., Deraz, SF. Khalil, AA. 2013. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *African Journal of Biotechnology*, 10(52), 10733-10743.
- [142] Marjorie MC. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
- [143] Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.

- [144] Nweze EI., Okafor JI., Njoku O. 2004. Antimicrobial activities of methanolic extracts of *Trema guineensis* (Schumm and Thorn) and *Morinda Lucida* Benthused in Nigeria herbal medicinal practice. J. Biol. Res. Biot. 2: 36-39.
- [145] Li, HB., Cheng, KW., Wong, CC., Fan, KW., Chen, F., Tian, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. Food Chem. 102, 771-776.
- [146] Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittelforschung, 46,1086-1089.
- [147] Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. Nature, 4617(181), 1119-1200.
- [148] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. Free Radical Bio. Med. 26, 1231–1237.
- [149] Shi H, Noguchi N, Niki E. 2001. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. Methods Enzymol, 335:157-66.
- [150] Szydłowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. Talanta, 76, 899-905.
- [151] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E. analytical. Biochem. 269, 337-341.
- [152] Chung, YC., Chang, CT., Chao, WW., Lin, CF., Chou, ST. 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. J Agr Food Chem. 50, 2454-2458.
- [153] Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Jpn J Nut. 44, 307-315.

- [154] Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen* 10, 1003–1008.
- [155] Sunmathi, D., Sivakumar, R., Ravikumar, K. 2016. *In vitro* Anti-inflammatory and antiarthritic activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R. BR. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem*, 5, 109-115.
- [156] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

*Résumés*

## Résumé

Dans le cadre de la poursuite de nos travaux de recherche phytochimiques portant sur la découverte de nouveaux métabolites secondaires bioactifs et la valorisation des ressources végétales et des espèces médicinales poussant dans la région des Aurès et du nord de Sahara en Algérie, deux plantes médicinales nommées *Atractylis humilis* L. et *Carduncellus pinnatus* DC. de la famille Asteraceae ont été étudiées sur les plans phytochimiques et biologiques. Ces espèces largement représentées dans la région des Aurès n'ont pas faits l'objet d'investigations phytochimiques et/ou biologiques antérieures.

Les espèces sélectionnées ont fait partie des genres *Atractylis* L. et *Carduncellus* Adans. connues pour leur richesse en biomolécules appartenant à diverses classes chimiques, ainsi que pour l'intérêt biologique et la bonne réputation de leur utilisation en médecine traditionnelle.

L'isolement et la purification chromatographiques des phytoconstituants se reposent principalement sur différentes techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide sous vide VLC, la chromatographie sur colonne CC, la chromatographie sur couche mince et épaisse CCM et CCE, en utilisant divers supports stationnaires comme le gel de silice en phase normale SiO<sub>2</sub> et phase inverse RP-18, polyamide SC-6 et sephadex LH-20.

Les analyses exhaustives et combinatoires des spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C *J*-modulé) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), les spectres de masse (ESI-HR et ESI-MS) et du pouvoir rotatoire [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> ont permis d'élucider les structures des dix-huit biomolécules isolées. Il est à noter qu'un nouveau lignane **TH1** a été purifié et caractérisé en plus de **13** produits connus **TH2-TH14** se répartissant en **1** lignane, **2** flavonoïdes, **5** composés phénoliques, **3** triterpènes et **2** dérivés osidiques des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis humilis*. Les travaux réalisés sur l'extrait AcOEt de la plante *Carduncellus pinnatus* ont mené à l'identification de quatre composés **CP1-CP4** dont **1** flavonoïde, **1** coumarine et **2** triterpénoides. La plupart des métabolites secondaires isolés sont réputés pour leurs vertus thérapeutiques et activités biologiques intéressantes.

Les extraits bruts AcOEt et *n*-BuOH obtenus de la plante *A. humilis* et les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH issus de la plante *C. pinnatus* sont testés pour leurs activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne et ont donné des résultats intéressants.

**Mots clés :** *Atractylis humilis*, *Carduncellus pinnatus*, lignane, aryltétraline, flavonoïde C-glycosylé, RMN, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antibactérienne.

## Abstract

As a part of the continuation of our research focused on the discovery of new bioactive secondary metabolites and the enhancement of plant resources and medicinal species growing in the regions of Aures and north of Sahara in Algeria, we are interested in the chemical investigation and the *in vitro* biological evaluation of two plants named *Atractylis humilis* and *Carduncellus pinnatus*; belonging to the family Asteraceae. These species which are widely distributed in Aures Mountains are not previously studied phytochemically and/or biologically.

The selected species belonged to the genera *Atractylis* and *Carduncellus* known for their richness in biomolecules with various chemical classes, as well as for their biological interest and the good reputation of their use in traditional medicine.

The chromatographic isolation and purification of phytoconstituents is mainly based on different chromatographic techniques such as vacuum liquid chromatography VLC, column chromatography CC, thin and thick layer chromatography TLC and prep. TLC, using different stationary supports like normal phase and RP-18 reversed phase of silica gel SiO<sub>2</sub>, polyamide SC-6 and sephadex LH-20.

The exhaustive analyzes of 1D-NMR spectra (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C *J*-modulated) and 2D- NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC and NOESY), mass spectra (ESI-HR and ESI-MS) and the measurement of optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> allowed to elucidate the structures of eighteen secondary metabolites. Overall, a new lignan **TH1** was purified and characterized along with 13 known products **TH2-TH14** distributed into **1** lignan, **2** flavonoids, **5** phenolic compounds, **3** triterpenes and **2** osidic derivatives from the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the *Atractylis humilis*. The EtOAc extract of the plant *Carduncellus pinnatus* lead to the characterization of four compounds **CP1-CP4** including **1** flavonoid, **1** coumarin and **2** triterpenoids. Most of the isolated secondary metabolites are known for their therapeutic properties and interesting biological activities.

The crude extracts (EtOAc and *n*-BuOH) obtained from *A. humilis* and the PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts prepared from *C. pinnatus* are evaluated for their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities. Consequently, these extracts exhibited interesting results.

**Keywords :** *Atractylis humilis*, *Carduncellus pinnatus*, lignan, aryltetralin, C-flavonoïd glycosides, NMR, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities.

## ملخص

في إطار الاستمرارية في اعمال البحث في الفيتوكيمياء المتمحورة حول استكشاف مستقلبات ثانوية جديدة نشطة بيولوجياً وتثمين الموارد النباتية والأصناف الطبية التي تنمو في منطقة الأوراس وشمال الصحراء في الجزائر، تم اخييار نباتين *Atractylis humilis* و *Carduncellus pinnatus*؛ المنتميان الى عائلة Asteraceae ودراستهما من الناحية الكيميائية والبيولوجية.

تنتمي الأنواع المختارة إلى جنس *Atractylis* و *Carduncellus* المعروفين بثرائهما بالجزينات الحيوية التي تنتمي إلى فئات كيميائية مختلفة، فضلاً عن الفائدة البيولوجية والسمعة الجيدة لاستخدامها في الطب التقليدي.

اعتمد العزل والتنقية الكروماتوغرافية للمكونات النباتية بشكل أساسي على تقنيات الكروماتوغرافيا المختلفة مثل كروماتوجرافيا السائل الفراغي VLC و كروماتوجرافيا العمود CC و كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة والسميكة CCE و CCM، وذلك باستخدام وسائط ثابتة متنوعة مثل هلام السيليكا SiO<sub>2</sub> في الطور العادي والطور العكسي RP 18-،البولي أميد SC-6 و Sephadex LH-20.

سمحت التحليلات الشاملة و التوافقية لأطياف الرنين المغناطيسي النووي احادي البعد (RMN 1D <sup>1</sup>H) و (<sup>13</sup>C *J*-modul وثنائي البعد (RMN 2D (COSY، HSQC، HMBC و NOESY)، أطياف الكتلة (-ESI- HR و ESI-MS) والدوران البصري [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> من تحديد وتوضيح 18 هيكلًا لجزينات حيوية معزولة. تجدر الإشارة إلى أنه تم تنقية وتمييز وتمييز مركب لينيانى جديد TH1 بالإضافة الى 13 منتجاً معروفاً TH2-TH14 موزعة الى 1 مركب لينيانى و 2 مركبات الفلافونويد سي-جليكوزيلي و 5 مركبات فينولية و 3 مركبات تربينية و 2 مركبات سكرية من المستخلصات العضوية AcOEt و *n*-BuOH للـ *Atractylis humilis*. أدت الاعمال المنجزة على المستخلص العضوي AcOEt للـ *Carduncellus pinnatus* إلى تحديد أربعة CP1-CP4 التي تضم 1 مركب فلافونويدي و 1 مركب كومارينى و 2 مركبات تربينية. معظم المستقلبات الثانوية المعزولة معروفة بخصائصها العلاجية وأنشطتها البيولوجية المهمة.

تم اختبار المستخلصات العضوية الخام AcOEt و *n*-BuOH التي تم الحصول عليها من نبات *A. humilis* والمستخلصات العضوية الخام EP و AcOEt و *n*-BuOH التي تم الحصول عليها من الصنف *C. Pinnatus* من حيث نشاطها كمضادات للأكسدة ومضادات للالتهابات ومضادات للبكتيريا وأسفرت عن نتائج مهمة.

**الكلمات المفتاحية:** *Atractylis humilis*، *Carduncellus pinnatus*، لينيان، اريل تيترايين، فلافونويد سي-جليكوزيلي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للالتهاب، نشاط مضاد للبكتيريا.





## A new aryltetralin lignan and other phytoconstituents from *Atractylis humilis*

Siham Sifouane<sup>a</sup>, Imane Benabdelaziz<sup>a</sup>, Mohammed Benkhaled<sup>a</sup>, Santiago Gómez-Ruiz<sup>b</sup>, Sandra Carralero<sup>b</sup>, Hamada Haba<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement, Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Batna, 05000, Algeria

<sup>b</sup>COMET-NANO Group, Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos, 28933, Móstoles, Madrid, Spain



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Atractylis humilis*  
Asteraceae  
Lignan  
Lyoniresinol  
NMR

### ABSTRACT

Phytochemical research of the whole plant *Atractylis humilis* (Asteraceae family) led to the isolation of one cyclolignan, namely (8R,7'S,8'S)-9'-β-D-glucopyranosyl-3,4',9-trihydroxy-3',4,5,5'-tetramethoxy-2,7'-cyclo-lignan (**1**), together with thirteen known phytochemicals **2–14** from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts. The structures of all isolated secondary metabolites **1–14** were elucidated by spectroscopic analysis (1D and 2D-NMR, HR-ESI-MS) and measurement of optical rotation  $[\alpha]_D$ , whereas the known compounds were described by spectral comparison data with those published in the literature. This is the first report of lignans in the genus *Atractylis*. Furthermore, the chemotaxonomic significance of isolates was discussed.

### 1. Subject and source

Species *Atractylis humilis* L. belongs to the genus *Atractylis* L. of the family Asteraceae (called also Compositae). The plants of this family are herbs, shrubs and trees spread throughout the world, and growing in sunlit places of typical temperate and subtropical regions (Ozenda, 1991). *Atractylis humilis* which usually grows in rocky pastures, is an herbaceous annual plant with purple flowers (Quezel and Santa, 1963). The genus *Atractylis* is heavily developed in steppe areas, under semi-arid, arid to Saharan bioclimates and in south of the Mediterranean basin (Petit, 1987).

### 2. Previous work

*Atractylis* plants are known for their popular therapeutic properties for the treatment of various diseases such as cholelithiasis, tumor and circulatory disorders, intestinal parasites, ulcers, snake-bite poisoning and hepatitis, and for their diuretic effects (Daniele et al., 2005; El Rhaffari et al., 2002; Yong-guang et al., 2012). In South Europe, flowers of the species *A. humilis* are used to coagulate milk (Gray and Redwood, 1848). Locally, in the Aures region of Algeria (high mountains of Bel-lezma, Batna), the plant *A. humilis* is known as "Degâa" and its powder is used as an ointment to treat juvenile acne. Chemically, previous investigations indicated the richness of *Atractylis* plants in diverse secondary metabolites. Indeed, the species *A. gummifera*, which was the subject of many studies, was found to contain saponin sterols (Hammiche et al., 2013), diterpenes (Danieli et al., 1972; Piozzi et al.,

1969) and flavonoids (Chaboud et al., 1988; Ahmed et al., 2002). The species *A. koreana* consisted of C-14 selinane sesquiterpenoids (Pachaly et al., 1989) and polyacetylene compounds (Pachaly et al., 1990). The work performed on *A. flava*, *A. serratulooides* and *A. cancellata* has allowed the isolation of numerous phytochemicals like saponins, flavonoids, phenolics, triterpenoids and alkaloids (Badaoui et al., 2019; Chabani et al., 2013, Chabani et al., 2016, Chabani et al., 2016). Despite the phytochemical investigations carried out on the genus *Atractylis*, it should be noticed that there is no reference study on the species *A. humilis*. In addition, several biological activities of various plants of this genus have been well documented to have diuretic, purgative (Larrey and Pageaux, 1995), anti-inflammatory, antipyretic (Melakhessou et al., 2018) and antiproliferative properties (Guo et al., 2013).

### 3. Present study

As a part of the continuation of our studies on the species of *Atractylis* genus growing in Aures region of Algeria, focused on the discovery of new secondary metabolites (Badaoui et al., 2019; Chabani et al., 2013, Chabani et al., 2016, Chabani et al., 2016), we, herein, focused on the whole plant *A. humilis*, describing in this paper the isolation and structure elucidation of fourteen compounds belonging to various classes of phytochemicals. The isolated compounds include one new cyclolignan named (8R,7'S,8'S)-9'-β-D-glucopyranosyl-3,4',9-tri-hydroxy-3',4,5,5'-tetramethoxy-2,7'-cyclo-lignan (**1**), a known cyclo-lignan **2**, two flavonoids **3** and **4**, three triterpenes **5–7**, five phenolic

Corresponding author. Tel.: +213 5 56 92 34 25; fax: +213 33 31 90 09.

E-mail addresses: [haba.hamada@yahoo.fr](mailto:haba.hamada@yahoo.fr), [hamada.haba@univ-batna.dz](mailto:hamada.haba@univ-batna.dz) (H. Haba).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104018>

Received 20 December 2019; Received in revised form 20 February 2020;

Accepted 23 February 2020

0305-1978/ © 2020 Published by Elsevier Ltd.

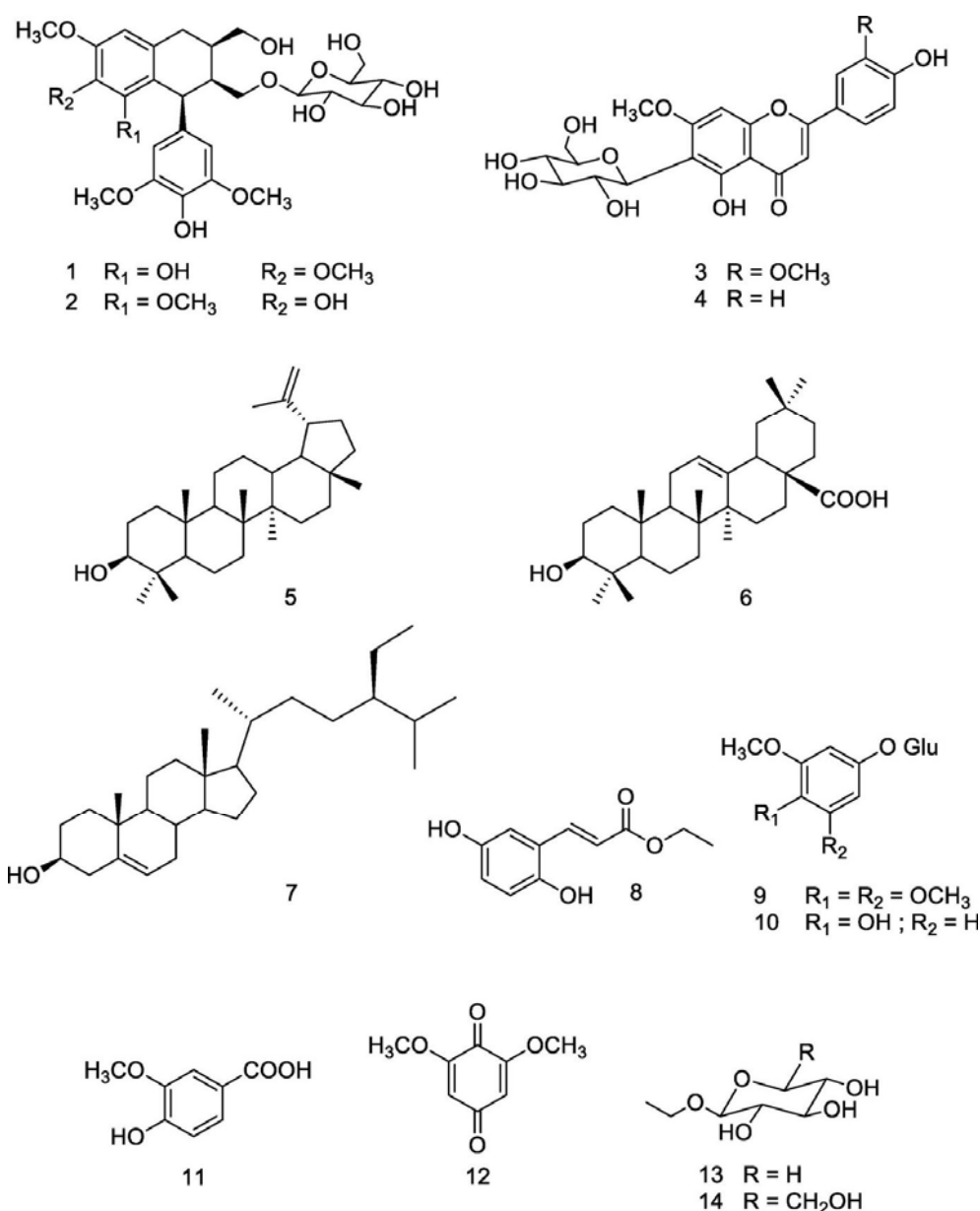


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–14.

compounds 8–12, and two osides 13 and 14 (Fig. 1).

### 3.1. General experimental conditions

Optical rotations were recorded on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. MS spectra were measured by a Bruker Esquire MSQ-Trap (ESI-MS) and Bruker Micromass Q-TOF (HR-ESI-MS) spectrometers; in  $m/z$ . The 1D- $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  and 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY and ROESY) spectra were performed in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  or DMSO using Varian/Agilent Inova spectrometer at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR.  $\delta$  in ppm rel. to  $\text{Me}_4\text{Si}$  as internal standard,  $J$  in Hz. Column chromatography (CC) was carried out using silica gel ( $\text{SiO}_2$ ; 320–400 mesh; Merck), RP-18 reversed phase  $\text{SiO}_2$  (40–63  $\mu\text{m}$ , Merck), Polyamide (SC-6) and Sephadex LH-20 (25–100  $\mu\text{m}$ ). TLC and prep. TLC: Pre-coated silica gel (Kieselgel 60 F254, Merck) and RP-18 reversed-phase  $\text{SiO}_2$  (Kieselgel 60 F254S, Merck) plates, detection at 254 and 366 nm and by spraying with sulfuric acid reagent (50%) and heating.

### 3.2. Plant material

The whole plant *Atractylis humilis* L. was collected during the flowering period (April 2016) in Chenaoura, Batna (Algeria) and identified by Prof. Bachir Oudjehih, Institute of Agronomy of University of Batna-1 (Algeria). A voucher specimen accession number 971/LCCE was deposited.

### 3.3. Extraction and isolation

Dried and powdered whole plant *A. humilis* (1.5 kg) was macerated with 70% EtOH (3  $\times$  10 L) at room temperature. The hydroalcoholic extract was then treated using solvents with increasing polarities (3  $\times$  150 mL, for each solvent) to yield 1 g of petroleum ether (PE), 14 g of ethyl acetate (EtOAc) and 17.5 g of *n*-butanol extracts.

The *n*-butanol extract (7 g) was subjected to VLC chromatography performed over silica gel using chloroform and increasing amount of methanol up to 100% to obtain ten total major fractions A1–A10. The fraction A6 (692 mg) was purified on polyamide SC-6 CC eluted with

toluene:MeOH (100:0 to 60:40) allowing the isolation of compounds **1** (1.5 mg) and **2** (1.4 mg). The fraction A3 (437 mg) was precipitated in a mixture of CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5) to provide 8 mg of compound **9**. The filtrate of the same fraction A3 was purified by repeated silica gel CC using CHCl<sub>3</sub>:MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH and Sephadex LH-20, followed by prep. TLC (RP-18) developed with MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) to give **3** (15.6 mg), **4** (19.5 mg), **13** (1.5 mg) and **14** (2.9 mg). Finally, the fraction A5 (195 mg) was subjected to silica gel CC using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1 to 80:20) as eluent to afford pure compound **10** (2.3 mg).

The EtOAc extract (7 g) was fractionated on VLC (SiO<sub>2</sub>). The elution was performed with PE:EtOAc and EtOAc:MeOH to provide nine major fractions B1–B9. The fraction B4 (313 mg) was purified by silica gel CC (gradient PE:EtOAc) to yield nine sub-fractions B4-1 to B4-9. The sub-fractions B4-3 (83 mg) and B4-4 (59 mg) were chromatographed over silica gel CC eluted with hexane–chloroform (99:1 to 50:50) followed by Sephadex LH-20 CC in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to afford compounds **5** (3.4 mg) and **6** (2.7 mg). The sub-fraction B4-6 (26 mg) was precipitated in CHCl<sub>3</sub> to afford 3.1 mg of compound **7**. The fraction B5 (235 mg) was subjected to silica gel CC, eluting with PE:EtOAc to obtain compounds **11** (2.8 mg) and **12** (2.1 mg). Finally, the fraction B6 (90 mg) was applied to CC over silica gel using a gradient of hexane:ethyl acetate to give compound **8** (1.5 mg) after precipitation in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### 3.4. Structural elucidation of compound **1**

The TLC chromatographic analysis of EtOAc and *n*-BuOH extracts obtained from *Atractylis humilis* showed very complex and substantially secondary metabolites distinguishing this genus of plants. The EtOAc and *n*-butanol extracts were tested in subsequent chromatographic steps (see experimental and supplementary material) to afford fourteen pure metabolites, consisting of one new cyclolignan, namely, (8R,7'S,8'S)-9'-β-D-glucopyranosyl-3,4',9-trihydroxy-3',4,5,5'-tetramethoxy-2,7'-cyclolignan (**1**), as well as thirteen known compounds, including (7'S,8R,8'S)-7a-[(β-D-glucopyranosyl)-oxy]lyoniresinol (**2**) (Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009), 7,3'-dimethylether isoorientin (**3**) (Peng et al., 2005), swertisin (**4**) (Cheng et al., 2000), lupeol (**5**), oleanolic acid (**6**) and β-sitosterol (**7**) (Chabani et al., 2016), 2,5-dihydroxyethyl cinnamate (**8**) (Zhou et al., 2017), 3,4,5-trimethoxyphenol 1-O-β-D-glucopyranoside (**9**) (Saijo et al., 1989), tachioside (**10**) (Inoshiri et al., 1987), vanillic acid (**11**) (Leslie et al., 1995), 2,6-dimethoxy 1,4-benzoquinone (**12**) (Harasawa and Tagashira, 1994), 1-O-ethyl-D-xylose (**13**) and 1-O-ethyl-β-D-glucopyranoside (**14**) (Prawat et al., 1995).

Compound (**1**) was isolated as a yellow amorphous solid with  $[\alpha]_D^{25} = +22.4$  (c 0.125, MeOH). The negative and positive HR-ESI mass spectra of **1** presented molecular ion adducts at  $m/z$  627.2309 [(M + HCOOH)-H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>15</sub>, 627.2294) and 583.2392 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>13</sub>, 583.2385) establishing a molecular formula to be C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub>. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of **1** were closely identical to those of known lignan, (7'S,8R,8'S)-7a-[(β-D-glucopyranosyl)-oxy]lyoniresinol (**2**) (Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009) isolated also in this study. Indeed, the <sup>13</sup>C NMR spectrum showed signals for tetra- and penta-substituted benzene rings, four methoxyl carbons, hexose carbons and six sp<sup>3</sup> carbons two of which were O-substituted (Table 1). The <sup>1</sup>H NMR spectrum displayed two signals in the region of aromatic protons with no correlation in the COSY experiment. The first one at 6.60 ppm (1H, s) assigned to the isolated proton H-6 of the aromatic ring A. The second is a large singlet signal at 6.43 ppm of (2H) attributed to two symmetrical aromatic protons H-2' and H-6' belonging to the aromatic ring B. These protons were correlated in the HSQC spectrum with their carbon atoms C-6 and C-2'/6' at δ<sub>c</sub> 107.8 and 106.8, respectively. The <sup>1</sup>H NMR spectrum indicated also the presence of four methoxyl groups. Two signals at 3.95 ppm (3H, s) and 3.86 ppm (3H, s) were correlated on the HSQC spectrum with their carbons at (δ<sub>c</sub> 61.1) and (δ<sub>c</sub> 56.5) respectively. Their location was evidently deduced from the HMBC cross-peaks at δ<sub>c</sub>149.4 (C-4) and δ<sub>c</sub> 148.5 (C-5) of ring A and the ROESY spectrum which revealed

**Table 1**

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data for the new aryltetralin lignan (**1**) in CD<sub>3</sub>OD.

Position	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)	δ <sub>C</sub>
1	-	130.0
2	-	126.4
3	-	136.6
4	-	149.4
5	-	148.5
6	6.60 (1H; s)	107.8
7a	2.72 (1H; dd; 15.1, 4.7)	33.8
7b	2.62 (1H; dd; 15.1, 11.5)	
8	1.73 (1H; m; W <sub>1/2</sub> 13.2 Hz)	40.6
9a	3.64 (1H; m)	66.1
9b	3.55 (1H; dd; 10.8, 6.6)	
4-OCH <sub>3</sub>	3.95 (3H; s)	61.1
5-OCH <sub>3</sub>	3.86 (3H; s)	56.5
1'	-	139.3
2'	6.43 (1H; s)	106.8
3'	-	148.9
4'	-	134.4
5'	-	148.9
6'	6.43 (1H; s)	106.8
7'	4.45 (1H; d; 6.2)	42.8
8'	2.08 (1H; m; W <sub>1/2</sub> 11.3 Hz)	46.7
9'a	3.89 (1H; dd; 9.8, 5.5)	71.4
9'b	3.45 (1H; dd; 9.8, 4.1)	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.72 (6H; s)	56.8
5'-OCH <sub>3</sub>		
1''	4.28 (1H; d; 7.7)	104.8
2''	3.25 (1H; m)	75.1
3''	3.37 (1H; t; 8.8)	78.2
4''	3.28 (1H; t; 8.7)	71.6
5''	3.25 (1H; m)	77.0
6''a	3.84 (1H; m)	62.8
6''b	3.65 (1H; m)	

correlations between H-6/5-OCH<sub>3</sub> and 4-OCH<sub>3</sub>/5-OCH<sub>3</sub> (Fig. 2). Another downfield signal at 3.72 ppm (6H, s) was attributed to two identical methoxyl groups according to HSQC spectrum (δ<sub>c</sub> 56.8) and bearing by the carbons C-3'/5' (148.9 ppm) due to the HMBC correlation, that were clearly part of the substitution of the aromatic ring B. However, detail analysis of <sup>13</sup>C NMR, HSQC and HMBC data enabled the precise assignment of all carbons of benzene rings A and B and afforded the attachment of hydroxyl groups at δ<sub>c</sub> 136.6 (C-3) for ring A and at δ<sub>c</sub>134.4 (C-4') for ring B. Furthermore, the <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and HSQC spectra displayed main features of lignan skeleton with the presence of three methine groups at (δ<sub>H</sub> 1.73/δ<sub>C</sub> 40.6), (δ<sub>H</sub> 2.08/δ<sub>C</sub> 46.7) and (δ<sub>H</sub> 4.45/δ<sub>C</sub> 42.8), one methylene group at (δ<sub>H</sub> 2.72 and 2.62/ δ<sub>C</sub> 33.8) and two oxymethylene groups at (δ<sub>H</sub> 3.64 and 3.55/δ<sub>C</sub> 66.1) and (δ<sub>H</sub> 3.89 and 3.45/δ<sub>C</sub> 71.4). These groups showed in the COSY spectrum the structural fragment –CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>2</sub>O)-CH(CH<sub>2</sub>O)-CH- proposed from the correlation between H<sub>2</sub>-7 (δ<sub>H</sub> 2.72 and 2.62)/H-8 (δ<sub>H</sub> 1.73)/H<sub>2</sub>-9 (δ<sub>H</sub> 3.64 and 3.55) and between H-8/H-8' (δ<sub>H</sub> 2.08)/H-7' (δ<sub>H</sub> 4.45) and H-8'/H<sub>2</sub>-9' (δ<sub>H</sub> 3.89 and 3.45). Detailed examination of cross-peaks of this fragment, noticed particularly during HMBC experiment, led to the identification of compound **1** as a derivative of aryltetralin lignan (Ohashi et al., 1994), on the basis of <sup>2</sup>J<sub>H/C</sub> and <sup>3</sup>J<sub>H/C</sub> correlations from protons H<sub>2</sub>-7 to carbons C-1 (δ<sub>c</sub> 130.0), C-2 (δ<sub>c</sub> 126.4) and C-6 (δ<sub>c</sub> 107.8) of ring A and from proton H-7' to carbons C-1, C-2 and C-3 of ring A and C-1' (δ<sub>c</sub> 139.3) and C-2'/6' (δ<sub>c</sub> 106.8) of ring B (Fig. 2). The presence of a glucose moiety was concluded from its <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra with a β configuration according to the chemical shift of the anomeric proton H-1'' and its high coupling constant value (δ<sub>H</sub> 4.28, d, J = 7.8 Hz). The chemical shift of C-9' (δ<sub>c</sub> 71.4) showed significant deshielding to that of C-9 (δ<sub>c</sub> 66.1) (Yang et al., 2005) suggested that the glucose moiety could be placed on position C-9'. This attachment was confirmed by the HMBC cross-peak between the anomeric proton H-1'' and C-9' (Fig. 2).

The coupling constant values of aliphatic protons (H-7a, H-7b, H-7',

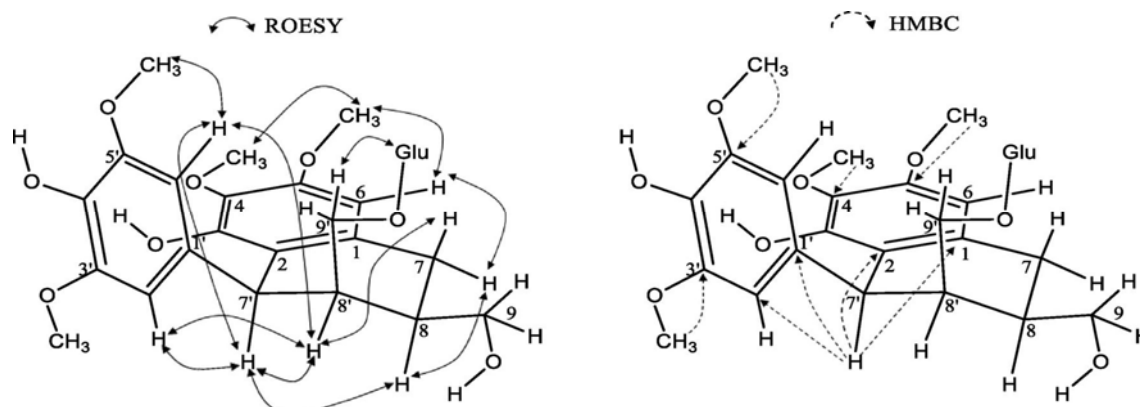


Fig. 2. Key ROESY (H ↔ H) and HMBC (H → C) correlations of compound 1.

H-8 and H-8') provided clues to determine the relative stereochemistry of this compound. Indeed, the values of  $J = 4.7$  Hz between H-7a/H-8 and  $J = 11.5$  Hz between H-7b/H-8 evidenced that H-8 is in axial position. However, the coupling constant  $J = 6.2$  Hz between H-7' and H-8', giving a dihedral angle of  $35^\circ$  according to the dreiding models and Karplus equation (Coxon, 2009), suggested two orientations for these protons (H-7'<sub>ax</sub>/H-8'<sub>eq</sub> or H-7'<sub>eq</sub>/H-8'<sub>ax</sub>). While the multiplet at half height of H-8' ( $W_{1/2} = 11.3$  Hz) and of H-8 ( $W_{1/2} = 13.2$  Hz) both showing  $W_{1/2} \leq 15$  Hz revealed that H-8 and H-8' were co-facial, and consequently confirmed an equatorial orientation for H-8', resulting an axial position for proton H-7' (Ouyang et al., 2007; Yean et al., 2010). Taking into account that cyclohexane ring of aryltetralin lignans could possess different conformation (Berova et al., 2012), the relative configuration of this compound was determined by ROESY experiment, which exhibited the expected correlation for half-chair conformation form between H-7<sub>ax</sub> and H-8' (Buske et al., 2001). It also noticed that no correlation was observed between protons H-2', H-6' and H-9 depicted in the case of half-boat conformation (Buske et al., 2001). Moreover, this spectrum indicated the absence of interaction between H-2', H-6' and H-7<sub>ax</sub> recorded in the case of half-boat and envelope conformations, but impossible to observe in half-chair form (Buske et al., 2001; Yang et al., 2005). Based on the above evidence, a half-chair conformation was proposed for cyclohexane ring of this compound (Fig. 2) (Berova et al., 2012; Jullian-Pawlicki et al., 2015; Zhao et al., 2008). All these spectral data, and the positive sign and value of the optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 22.4 (c 0.125, MeOH) strongly supported the relative con-figuration of the chiral centers at C-8, C-7' and C-8' for cyclohexane ring of compound 1 as 8R, 7'S and 8'S. Hence, 1 was found to be a new lignan identified as (7'S,8R,8'S)-9- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4',9-tri-hydroxy-3',4,5,5'-tetramethoxy-2,7'-cyclo-lignan and named humilisan A. Compound (2) was isolated as a yellow amorphous solid and was optically active [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 23.2 (c 0.117, MeOH). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, HMBC, ROESY, ESI-MS and optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> data of 2 were similar to those of the isolariciresinol-type lignan glycoside named (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oxy]lyoniresinol ([ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 22.7 (c 0.04, MeOH)) isolated previously from the species *Carissa carandas* of the family Apocynaceae (Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009). Further-more, the ROESY effects (Supplementary Material Fig. S11) between H-8/ H-8', H-8/H-7', H-8'/H-7', H-8/H-7a(eq), H-7a/H-6, H-8'/H-7b(ax) and H-2',6'/H8' obviously supported that 2 possesses the absolute configuration at chiral carbons C-7'S, C-8R and C-8'S (Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009; Yang et al., 2005). From the above evidence, 2 was identified as (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oxy]lyoniresinol

(Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009). (8R,7'S,8'S)-9- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4',9-tri-hydroxy-3',4,5,5'-tétraméthoxy-2,7'-cyclo-lignan (1): yellow amorphous solid, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 22.4 (c 0.125, MeOH), <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): see Table 1; HR-ESI-MS  $m/z$  605.2202 [M+Na]<sup>+</sup>,

583.2392 [M+H]<sup>+</sup>, 1187.4598 [2M + Na]<sup>+</sup>, 1165.4746 [2M + H]<sup>+</sup>, 627.2309 [(M + HCOOH)-H]<sup>-</sup>, 1209.4825 [(2M + HCOOH)-H]<sup>-</sup>. (7'S,8R,8'S)-7a-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oxy]lyoniresinol (2): yellow amorphous solid, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 23.2 (c 0.117, MeOH), <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$  6.58 (1H, s, H-6), 6.43 (2H, s, H-2', H-6'), 4.42 (1H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-7'), 4.28 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd,  $J = 9.9, 4.1$  Hz, H-9'a), 3.86 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (1H, m, H-6'a), 3.75 (6H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.65 (2H, m, H-6'b, H-9'a), 3.55 (1H, dd,  $J = 10.7, 6.6$  Hz, H-9'b), 3.45 (1H, dd,  $J = 9.9, 4.1$  Hz, H-9'b), 3.37 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-3''), 3.34 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.28 (1H, t,  $J = 8.7$  Hz, H-4''), 3.24 (2H, m, H-2'', H-5''), 2.72 (1H, dd,  $J = 15.1, 4.7$  Hz, H-7a), 2.62 (1H, dd,  $J = 15.1, 11.5$  Hz, H-7b), 2.08 (1H, dtd,  $J = 12.3, 5.7, 4.1$  Hz, H-8'), 1.71 (1H, dddt,  $J = 11.3, 8.9, 6.6, 4.6$  Hz, H-8), <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  148.9 (C-3', C-5'), 148.7 (C-5), 147.6 (C-3), 139.4 (C-1'), 138.9 (C-4), 134.4 (C-4'), 130.2 (C-1), 126.5 (C-2), 107.6 (C-6), 106.8 (C-2', C-6'), 104.8 (C-1''), 78.2 (C-3''), 77.9 (C-5''), 75.2 (C-2''), 71.6 (C-4''), 71.3 (C-9'), 66.2 (C-9), 62.8 (C-6''), 60.1 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.8 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 56.7 (5-OCH<sub>3</sub>), 46.7 (C-8'), 42.8 (C-7'), 40.5 (C-8), 33.8 (C-7), ESI-MS  $m/z$ : 583 [M+H]<sup>+</sup>, 1165 [2M + H]<sup>+</sup>, 627 [(M + HCOOH)-H]<sup>-</sup>.

#### 4. Chemotaxonomic significance

The genus *Atractylis* L. belongs to the tribe Cardueae of the Asteraceae family, which is one of the largest botanical families following to the last taxonomic classification mentioned by Panero and Funk (2008). Indeed, this family was divided into 12 subfamilies and 35 tribes and one of these tribes is Cardueae Cass. (called also the tribe of Thistles) of the subfamily Carduoideae (Panero and Funk, 2008). This tribe represents one of the largest tribes, with four subtribes: Carduinae, Centaureinae, Echinopeae and Carlininae, and consists over 2400 species distributed among 73 genera (Susanna and Garcia-jacas, 2009). The tribe cardueae occupied a great taxonomic and phylogenetic importance. It is also known for its richness in secondary metabolites having interesting biological activities and for the use in folk medicine (Kurt et al., 2019).

The present work reports 14 secondary metabolites obtained from the whole plant *Atractylis humilis* L. The isolates comprise nine poly-phenols including two lignans of aryltetralin-type, two flavonoids C-glucosides and five phenolics, three triterpenes and two oside derivatives. This study confirms that polyphenols are the major components of plants belonging to the *Atractylis* genus. In this context, and regarding our extensive research, the new compound 1 and the known 2 are Lyoniresinol-type cyclo-lignan and this type of secondary metabolites has never been found in any *Atractylis* species, and was isolated from Asteraceae family for the first time. This finding could be of taxonomic importance for the chemotaxonomical studies, particularly in the *Atractylis* genus and the Asteraceae family. Nevertheless, compound 2

was merely reported from a few literature, it was obtained from some plant species of other families such as *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae) (Klyne et al., 1966), *Aegelmarmelos* (Rutaceae) (Ohashi et al., 1994), *Annona squamosa* (Annonaceae) (Yang et al., 2005) and *Carissa carandas* (Apocynaceae) (Wangteeraprasert and Likhitwitayawuid, 2009). Within the tribe Cardueae, several lignan-types are frequent in the genus *Centaurea* of the subtribe Centaureinae such as dibenzylbutyr-olactone-type. In addition, furanofuran-type and epoxy lignan have been found in *C. orphanidea* (Gousiadou and Skaltsa, 2003, *C. calcitrapa* L. (Marco et al., 1992), *C. cyanus* (Shoeb et al., 2004). Moreover, these lignans occur in various species of other tribes and subtribes of the Asteraceae family like *Lychnophora ericoides* (subtribe of Lychnophor-inae, tribe of Vernonieae) (Borsato et al., 2000), *Scorzonera humilis* (subtribe of Scorzonerinae, tribe of Lactuceae) (Zidorn et al., 2003), *Achillea holosericea* (subtribe of Achilleinae, tribe of Anthemideae) (Ahmed et al., 2002). The genera *Atractylis*, *Carlina* and *Atractylodes* belonging to the subtribe carlininae are closely related systematically, and more than *Atractylis* was considered to be a sister to *Carlina* (Petit, 1997). To the best of our knowledge, the lignans content in *Atractylodes* is very limited. Only, two studies were performed on *A. lancea* and allowed the isolation of dibenzylbutanes and furanofuran-type lignans (Long et al., 2019; Xu et al., 2016), while, no review was reported previously on the occurrence of lignans in *Atractylis* and *Carlina* species.

It is very important to indicate that C-glycosylflavones appeared to be of restricted isolation within the *Atractylis* plants. However, schaf-toside, vicenin 3 and isoorietin have been already characterized from some species like *A. flava* (Chabani et al., 2013) and *A. cancellata* (Badaoui et al., 2019). 7,3'-dimethylether isoorientin (**3**) which is a derivative of isoorientin was never isolated from any *Atractylis* species, but it was found in the Asteraceae plants like *Achillea cretica* L. (tribe of Anthemideae) (Valant-Vetschera, 1985). Furthermore, isoorientin widely elucidated in various genera of Asteraceae family was identified from *Carlina* and *Atractylodes* (subtribe Carlininae) and *Centaurea* (subtribe Centaureinae), namely *Carlina vulgaris* L., *C. macrocephala*, *C. acanthifolia* L. and *C. acaulis* L. (Valant-Vetschera, 1985), *Atractylodes japonica* (Kim et al., 2005), *Centaurea solstitialis* L., and *C. melitensis* L. (Kamanzi et al., 1983). Swertisin (**4**) which is also a flavonoid C-glu-coside was first time isolated and reported from the *Atractylis* species. Moreover, this compound was not detected in other genera of the same subtribe such as *Carlina* and *Atractylodes* and could serve as an inter-esting compound along with flavonoids for the chemotaxonomic profile of the tribe Cardueae. However, swertisin (**4**) has been found in the following studied taxa: *Achillea* species (tribe Anthemideae), *Helenium* species (tribe Heliantheae), and *Tragopogon* species (tribe Lactuceae) (Valant-Vetschera, 1985).

The remaining compounds including three triterpenes **5–7**, five phenolics **8–12** and two osides **13, 14** are the basic compounds, so common for the majority of plants and they have a small taxonomic value. Nevertheless, it is noteworthy that the three triterpenes **5–7** are already isolated from *Atractylis* species such as *A. flava*, *A. serratuloides* and *A. cancellata* growing in Algeria (Chabani et al., 2013, Chabani et al., 2016; Badaoui et al., 2019).

#### CRedit authorship contribution statement

**Siham Sifouane:** Conceptualization, Methodology, Software, Data curation, Writing - original draft. **Imane Benabdelaziz:** Visualization, Investigation. **Mohammed Benkhaleed:** Software, Validation. **Santiago Gómez-Ruiz:** Writing - review & editing. **Sandra Carralero:** Data curation, Writing - original draft. **Hamada Haba:** Supervision, Writing - review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors wish to express thanks to the DGRSDT and Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for PRFU Project (B00L01UN050120180001) and the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (grant no. RTI2018-094322-B-I00) for financial support. We would also like to thank Centro de Apoyo Tecnológico Universidad Rey Juan Carlos of Móstoles (Madrid) Spain, and Phytochemistry and Bioactive Natural Products, School of Pharmaceutical Science, EPGL, University of Geneva, Geneva, Switzerland for providing research facilities and technical support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104018>.

#### References

- Ahmed, A.A., Mahmoud, A.A., Ali, E.T., Tzakou, O., Couladis, M., Mabry, T.J., Gáti, T., Tóth, G., 2002. Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*. *Phytochemistry* 59, 851–856.
- Badaoui, M.I., Alabdul Majid, A., Benkhaleed, M., Benswissi, C., Harakat, D., Voutquenne-nazabadioko, L., Haba, H., 2019. Pyrroloquinolone A, a new alkaloid and other phytochemicals from *Atractylis cancellata* L. with antioxidant and anticholinesterase activities. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1682575>.
- Berova, N., Polavarapu, P.L., Nakanishi, K., Woody, R.W., 2012. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products and Biomolecules*. John Wiley and Sons, Inc., Canada.
- Borsato, M.L.C., Graef, C.F.F., Souza, G.E.P., Lopes, N.P., 2000. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 55, 809–813.
- Buske, A., Schmidt, J., Porzel, A., Adam, G., 2001. Alkaloidal, megastigmene and lignan glucosides from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). *Eur. J. Org. Chem.* 18, 3537–3543.
- Chabani, S., Haba, H., Lavaud, C., Benkhaleed, M., Harakat, D., 2013. Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochem. Lett.* 6, 9–13.
- Chabani, S., Haba, H., Long, C., Benkhaleed, M., 2016. Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*. *Ind. Crop. Prod.* 88, 91–95.
- Chabani, S., Lavaud, C., Benkhaleed, M., Harakat, D., Long, C., Haba, H., 2016. Three new oleanane-type triterpene saponins from *Atractylis flava*. *Phytochem. Lett.* 15, 88–93.
- Chaboud, A., Dellamonica, G., Raynaud, J., 1988. Neocorymboside, a di-C-glycosyl-flavone from *Atractylis gummifera*. *Phytochemistry* 27, 2360–2361.
- Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., Ma, L., Liaoc, N., Xuc, X., 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *Spinosa*. *Tetrahedron* 56, 8915–8920.
- Coxon, B., 2009. Developments in the Karplus equation as they relate to the NMR coupling constants of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 62, 17–82.
- Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., Mazzanti, G., 2005. *Atractylis gummifera* L. Poisoning: an ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 97, 175–181.
- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., 1972. Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. *Phytochemistry* 11, 3501–3504.
- Ei Rhaffari, L., Zaid, A., 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilaleh). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. In: Fleurentin, J., Pelt, J., Mazars, G. (Eds.), *Des sources du savoir aux médicaments du futur*. IRD éditions, Paris, pp. 293–318.
- Gousiadou, C., Skaltsa, H., 2003. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochem. Systemat. Ecol.* 31, 389–396.
- Gray, S.F., Redwood, T., 1848. *Gray's supplement to the pharmacopoeia: Being a concise but comprehensive dispensatory and manual of facts and formulae, for the chemist and druggist and medical practitioner*. Longman and Company, London.
- Guo, W.Q., Li, L.Z., He, Z.Y., Zhang, Q., Liu, J., Hu, C.Y., Qin, F.J., Wang, T.Y., 2013. Anti-proliferative effects of *Atractylis lancea* (Thunb.) DC. via down-regulation of the c-myc/hTERT/Telomerase pathway in Hep-G2 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 6363–6367.
- Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., 2013. *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Springer-Verlag, Paris.
- Harasawa, A., Tagashira, A., 1994. Isolation of 2,6-dimethoxy 1,4-benzoquinone from brian hydrangea (*Hydrangea macrophylla* seringe var. *otaksa* makino) and its deo-dorant activity against methyl mercaptan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2073–2074.
- Inoshiri, S., Sasaki, M., Kohda, H., Otsun, H., Yamasaki, K., 1987. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry* 26, 2811–2814.
- Julian-Pawlicki, N., Lequart-Pillon, M., Huynh-Cong, L., Lesur, D., Cailleu, D., Mesnard, F., Laberche, J.C., Gontier, E., Boitel-Conti, M., 2015. Arylnaphthalene and arylte-tralin-type lignans in hairy root cultures of *Linum perenne*, and the stereochemistry of 6-methoxy podophyllotoxin and one diastereoisomer by HPLC-MS and NMR

- spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 26, 310–319.
- Kamanzi, K., Raynand, J., Voirin, B., 1983. Les C-glycosyl flavonoides des fleurs de *Centaurea solstitialis* L. (Composées). *Pharmazie* 38, 494–495.
- Kim, Y.C., Jun, M., Jeong, W.S., Chung, S.K., 2005. Antioxidant properties of flavone C-glycosides from *Atractylodes japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation. *J. Food Sci.* 70, S575–S580.
- Klyne, W., Stevenson, R., Swan, R.J., 1966. Optical rotatory dispersion. Part XXVIII. The absolute configuration of otobain and derivatives. *J. Chem. Soc. C* 893–896.
- Kurt, A., Ozcan, M., Colak, N., Ozogul, Y., Glew, R., Ozogul, F., Ayaz, F.A., 2019. Fatty acids of oil and antioxidant capacity of phenolics from fruits of 11 Cardueae (Carduoideae, Asteraceae) taxa from northeast Anatolia (Turkey). *Bot. Serb.* 43, 31–45.
- Larrey, D., Pageaux, G.P., 1995. Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Semin. Liver Dis.* 15, 183–188.
- Leslie, J.H., Sia, G.L., Sim, K.Y., Tan, H.T.W., Connolly, J.D., Lavaud, C., Massiot, G., 1995. A ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesa paniculata*. *Phytochemistry* 38, 1497–1500.
- Long, L., Wang, L., Qi, S., Yang, Y., Gao, H., 2019. New sesquiterpenoid glycoside from the rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553170>.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M., 1992. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 31, 3527–3530.
- Melakhessou, M.A., Benkiki, N., Marref, S.E., Bouzidi, S., 2018. Anti-inflammatory, anti-pyretic and acute toxicity effects of *n*-butanol extract of *Atractylis flava* Desf. in rats. *Pharmacogn. J.* 10, 763–767.
- Ohashi, K., Watanabe, H., Okumura, Y., Uji, T., Kitagawa, I., 1994. Indonesian medicinal plants. XII.<sup>1)</sup> Four isomeric lignan-glycosides from the bark of *Aegle marmelos* (Rutaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1924–1926.
- Ouyang, M.A., Wein, Y.S., Su, R.K., Kuo, Y.H., 2007. Rhusemialins A-C, new cyclolignan esters from the roots of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 804–807.
- Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara, 3ème édition. CNRS, Paris, France.
- Pachaly, P., Lansing, A., Seog Sin, K., 1989. Constituents of *Atractylis koreana*. *Planta Med.* 55, 59–61.
- Pachaly, P., Lansing, A., Neugebauer, M., Seog Sin, K., 1990. Acetylenes from *Atractylis koreana*. *Planta Med.* 56, 469–471.
- Panero, J.L., Funk, V.A., 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies, major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 757–782.
- Peng, J., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y., 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1074, 111–115.
- Petit, D., 1987. Analyse cladistique du genre *Atractylis* L. (Compositae, Cardueae). *Bulletin de la Société Botanique de France. Lett. Bot.* 134, 165–184.
- Petit, D.P., 1997. Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): a cladistic analysis of morphological data. *Plant Systemat. Evol.* 207, 173–203.
- Piozzi, F., Savona, G., Mondelli, R., 1969. Minor norditerpenoid component from *Atractylis gummifera*. *Gazz. Chim. Ital.* 99, 373–380.
- Prawat, H., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwuttikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W.C., Pakawatchai, C., Skelton, B.W., Whittell, A.H., 1995. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry* 40, 1167–1173.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome. vol. 2 CNRS, Paris.
- Saijo, R., Nonaka, G.I., Nishioka, I., 1989. Phenol glucoside gallates from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry* 28, 2443–2446.
- Shoeb, M., Jaspars, M., Mac Manus, S.M., Majinda, R.R.T., Sarker, S.D., 2004. Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Biochem. Systemat. Ecol.* 32, 1201–1204.
- Susanna, A., Garcia-jacas, N., 2009. Cardueae (Carduoideae). In: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F., Bayer, R.J. (Eds.), *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. International association for plant taxonomy, Vienna, pp. 293–313.
- Valant-Vetschera, K.M., 1985. C-Glycosylflavones as an accumulation tendency: a critical review. *Bot. Rev.* 51, 1–52.
- Wangteeraprasert, R., Likhitwitayawuid, K., 2009. Lignans and a sesquiterpene glucoside from *Carissa carandas* Stem. *Helv. Chim. Acta* 92, 1217–1223.
- Xu, K., Yang, Y.N., Feng, Z.M., Jiang, J.S., Zhang, P.C., 2016. Six new compounds from *Atractylodes lancea* and their hepatoprotective activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 5187–5192.
- Yang, Y.L., Chang, F.R., Wu, Y.C., 2005. Squadinorlignoside: a novel 7,9'-dinorlignan from the stems of *Annona squamosa*. *Helv. Chim. Sci.* 88, 2731–2737.
- Yean, M.H., Kim, J.S., Le, J.H., Kang, S.S., 2010. Lignans from *Lonicerae caulis*. *Nat. Prod. Sci.* 16, 15–19.
- Yong-guang, B., Ding-long, Y., Xiao-jun, H., Yu-min, L., Min-xia, H., 2012. Study on ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide of *Atractylis macrocephala* Koidz of experiment. *Energy Procedia* 17, 1778–1785.
- Zidom, C., Ellmerer, E.P., Sturm, S., Stuppner, H., 2003. Tyrollobenzyls E and F from *Scorzonera humilis* and distribution of caffeic acid derivatives, lignans and tyrollobenzyls in European taxa of the subtribe Scorzonerinae (Lactuceae, Asteraceae). *Phytochemistry* 63, 61–67.
- Zhao, L., Tian, X., Fan, P.C., Zhan, Y.J., Shen, D.W., Jin, Y., 2008. Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1210, 168–177.
- Zhou, K., Chen, D., Li, B., Zhang, B., Miao, F., Zhou, L., 2017. Bioactivity and structure-activity relationship of cinnamic acid esters and their derivatives as potential anti-fungal agents for plant protection. *PLoS One* 12, e0176189.

