

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre :119/D3C/2018

Série :24/Ch/2018

THESE

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

SPECIALITE : Chimie pharmaceutique

OPTION : Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de substances bioactives

THEME

Etude phytochimique et pharmacologique d'espèces de deux familles

Lamiacées et Apiacées

***Salvia phlomoides* Asso. et *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur.**

Par

M^{me} Lamia BENNIOU Ep GHERBI

Devant le jury

M^{me} Djamila ZAMA, Pr

M^f Samir BENAYACHE, Pr

M^{me} Fadila BENAYACHE, Pr

Université Frères Mentouri Constantine 1

Université Frères Mentouri Constantine 1

Université Frères Mentouri Constantine 1

Présidente

Directeur de thèse

**Rapporteuse pour
la soutenance**

M^f Belgacem LEGSEIR, Pr

M^{me} Sabrina BICHA, MCA

M^{me} Ouahiba BENAÏSSA, MCA

Université Badji Mokhtar Annaba

Université Frères Mentouri Constantine 1

Université Mostefa Ben Boulaid Batna 2

Examineur

Examinatrice

Examinatrice

07 Novembre 2018

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer l'amour, la gratitude et la reconnaissance...

C'est tout simplement que je dédie cette thèse aux êtres les plus chers
à mon cœur :

La plus belle perle du monde...ma tendre mère

Celui qui a toujours été présent pour moi...mon généreux père

Celles qui ont donné du goût à notre famille...mes adorables sœurs

L'homme de ma vie...mon merveilleux mari

Ma plus grande joie...mon petit bonhomme *Madjeddine*

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier *Dieu* le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail durant ces longues années.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Monsieur *Samir BENAYACHE*, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, de m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail tant pour ses qualités professionnelles incontestables, que pour ces conseils tout au long de mon parcours scientifique, ainsi que Monsieur *Mohamed Kaabache*, Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1 pour l'identification botanique.

Je suis très honorée à remercier les membres du jury, Madame *Djamila ZAMA*, Professeure à l'université Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir assuré la présidence du jury, Madame *Fadila BENAYACHE*, Professeure à l'université Frères Mentouri Constantine 1 d'être rapporteure pour la soutenance, Monsieur *Belgacem LEGSEIR*, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, Madame *Sabrina BICHA*, Maître de Conférences A à l'université Frères Mentouri Constantine 1 et Madame *Ouahiba BENAÏSSA*, Maître de Conférences A à l'université Mostefa Ben Boulaid Batna 2, en qualité d'examineurs, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Je tiens à remercier vivement Madame la Professeure *Dulcie MULHOLLAND*, chef département de chimie de l'université de Surrey au Royaume-Uni, pour m'avoir accueillie au sein de son institution, et pour l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux de recherche, ainsi que le Docteur *Moses K Langat*, enseignant chercheur à l'université de Surrey au Royaume-Uni, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements lors de mon stage au sein de laboratoire de produits naturels.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire de produits naturels pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignée durant mon stage.

Je remercie l'Institut National du Cancer des Etats Unis pour leur aide, concernant la réalisation de l'étude de l'activité anticancéreuse, ainsi que Monsieur le Professeur *Colin Sparrow* de l'université d'Oxford au Royaume-Uni, pour sa réalisation des analyses de spectrométrie de masse.

Je remercie aussi le Docteur **Chawki BENSOUICI**, responsable du laboratoire de biochimie du centre de recherche en biotechnologie à Constantine, je le remercie pour tout ce que j'ai appris en matière d'évaluation des activités biologiques durant mon stage.

Et bien sûr merci à mes collègues de l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, particulièrement ma chère amie **Nesrine, Massika, Nawel et Hichem**.

A titre personnel, je remercie chaleureusement mon très cher mari, **Bahaeddine** d'avoir cru en mes capacités, pour l'encouragement et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ma thèse, et surtout d'avoir supporté mon absence et d'être patient avec moi.

Finalement, ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail : **mes parents, mes sœurs * Leila, Boutheina et Rania***, et **ma grand-mère** qu'elle était pour moi un véritable bouclier par ses prières.

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I. La famille des lamiacées, le genre *Salvia* et l'espèce *Salvia phlomoides*

I.1. Présentation de la famille des Lamiacées3

I.2. Le genre *Salvia*.....3

I.2.1. Description et classification botanique3

I.2.2. Distribution géographique4

I.2.3. Utilisation5

I.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Salvia*.....6

I.2.4.1. Flavonoïdes et tritérpénoïdes isolés du genre *Salvia*.....6

I.3. L'espèce *Salvia phlomoides*7

I.3.1. Description botanique8

I.3.2. Distribution géographique8

I.3.3. Etudes phytochimiques antérieures de l'espèce *Salvia phlomoides*9

Chapitre II. La famille des Apiacées, le genre *Ferula* et l'espèce *Ferula vesceritensis*

II.1. Présentation de la famille des Apiacées 13

II.2. Le genre *Ferula* 13

II.2.1. Description et classification botanique..... 13

II.2.2. Distribution géographique..... 14

II.2.3. Utilisation 14

II.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Ferula* 15

II.3. L'espèce *Ferula vesceritensis*..... 18

II.3.1. Description botanique..... 18

II.3.2. Distribution géographique.....	18
II.3.3. Etudes phytochimiques antérieures de l'espèce <i>Ferula vesceritensis</i>	19

Chapitre III. Etude phytochimique

III.1. <i>Salvia phlomoides</i>	23
III.1.1. Récolte du matériel végétal	23
III.1.2. Protocole d'extraction	23
III.1.3. Etude des extraits	25
III.1.3.1. Fractionnement de l'extrait chloroforme.....	25
III.1.3.2. Etude des fractions de l'extrait chloroforme.....	27
III.1.3.3. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	28
III.1.3.4. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle.....	29
III.2. <i>Ferula vesceritensis</i>	32
III.2.1. Récolte du matériel végétal	32
III.2.2. Protocole d'extraction	32
III.2.3. Etude des extraits	34
III.2.3.1. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	34
III.2.3.2. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle.....	35

Chapitre IV. Analyse structurale des composés isolés

IV.1. Appareillage	36
IV.1.1. Spectroscopie de RMN	36
IV.1.2. Spectrométrie de masse	36
IV.1.3. Spectroscopie IR.....	36
IV.2. Détermination structurale des composés isolés de <i>Salvia phlomoides</i>	36
IV.2.1. Détermination structurale du composé 1	36
IV.2.2. Détermination structurale du composé 2	49
IV.2.3. Détermination structurale du composé 3	58
IV.2.4. Détermination structurale du composé 4	65
IV.2.5. Détermination structurale du composé 5	72
IV.2.6. Détermination structurale du composé 6	79

IV.2.7. Détermination structurale du composé 7	84
IV.2.8. Détermination structurale du composé 8	89
IV.2.9. Détermination structurale du composé 9	94
IV.3. Détermination structurale des composés isolés de <i>Ferula vesceritensis</i>	101
IV.3.1. Détermination structurale du composé 10	101
IV.3.2. Détermination structurale du composé 11	103
IV.3.3. Détermination structurale du composé 12	105

Chapitre V. Activités biologiques

V.1. Activité anticancéreuse	111
V.2. Méthode d'évaluation de l'activité anticancéreuse	112
V.2.1. Principe de la méthode NCI-60	112
V.2.2. Mode opératoire	116
V.2.2.1. Culture cellulaire	116
V.2.2.2. Test de cytotoxicité	117
V.2.2.3. Calcul	117
V.2.3. Résultats	118
V.3. Dosage des polyphénols totaux	125
V.3.1. Mode opératoire	125
V.3.2. Résultats	126
V.4. Dosage des flavonoïdes totaux	128
V.4.1. Mode opératoire	128
V.4.2. Résultats	129
V.5. Activité antioxydante	130
V.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	131
V.6.1. Piégeage du radical libre DPPH [•]	131
V.6.1.1. Principe de la méthode	131
V.6.1.2. Mode opératoire	133
V.6.1.3. Résultats	133
V.6.2. Réduction du radical cation ABTS ^{•+}	135
V.6.2.1. Principe de la méthode	135

V.6.2.2. Mode opératoire.....	135
V.6.2.3. Résultats.....	136
V.6.3. Piégeage du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$	137
V.6.3.1. Principe de la méthode.....	138
V.6.3.2. Mode opératoire.....	138
V.6.3.3. Résultats.....	139
V.6.4. CUPRAC.....	140
V.6.4.1. Principe de la méthode.....	140
V.6.4.2. Mode opératoire.....	141
V.6.4.3. Résultats.....	143
V.6.5. Réduction des ions ferriques (FRAP).....	143
V.6.5.1. Principe de la méthode.....	143
V.6.5.2. Mode opératoire.....	143
V.6.5.3. Résultats.....	144

Chapitre VI. Huiles essentielles

VI.1. <i>Salvia phlomoides</i>	146
VI.1.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Salvia</i>	146
VI.1.2. Extraction des huiles essentielles de <i>Salvia phlomoides</i>	150
VI.1.3. Analyse et identification des composants des huiles essentielles de <i>Salvia phlomoides</i>	150
VI.2. <i>Ferula vesceritensis</i>	153
VI.2.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Ferula</i>	153
VI.2.2. Extraction des huiles essentielles de <i>Ferula vesceritensis</i>	156
VI.2.3. Analyse et identification des composants des huiles essentielles de <i>Ferula vesceritensis</i>	156
Conclusion générale	163
Références bibliographiques	165
Résumés	179
Article	182

Liste des figures

		Page
Figure 1	Distribution géographique du genre <i>Salvia</i> .	4
Figure 2	<i>Salvia phlomoides</i> .	8
Figure 3	Distribution géographique de l'espèce <i>Salvia phlomoides</i> .	8
Figure 4	Distribution géographique du genre <i>Ferula</i> .	14
Figure 5	<i>Ferula vesceritensis</i> .	18
Figure 6	Protocole d'extraction de <i>Salvia phlomoides</i> .	24
Figure 7	Protocole d'extraction de <i>Ferula vesceritensis</i> .	33
Figure 8	Structure du composé 1 .	36
Figure 9	Spectre de masse HR-ESI du composé 1 .	37
Figure 10	Spectre IR du composé 1 .	37
Figure 11	Spectre RMN ¹ H du composé 1 dans CDCl ₃ .	38
Figure 12	Spectre RMN ¹ H élargi -1- du composé 1 dans CDCl ₃ .	38
Figure 13	Spectre RMN ¹ H élargi -2- du composé 1 dans CDCl ₃ .	39
Figure 14	Spectre HSQC élargi -1- du composé 1 dans CDCl ₃ .	39
Figure 15	Spectre HSQC élargi -2- du composé 1 dans CDCl ₃ .	39
Figure 16	Spectre RMN ¹³ C du composé 1 dans CDCl ₃ .	40
Figure 17	Superposition des spectres RMN ¹³ C et DEPT-135 du composé 1 dans CDCl ₃ .	40
Figure 18	Structure d'un triterpène de type oléanane.	41
Figure 19	Spectre HSQC élargi -3- du composé 1 dans CDCl ₃ .	41
Figure 20	Spectre HSQC élargi -4- du composé 1 dans CDCl ₃ .	42
Figure 21	Spectre HMBC élargi -1- du composé 1 dans CDCl ₃ .	42
Figure 22	Spectre HMBC du composé 1 dans CDCl ₃ .	42
Figure 23	Spectre COSY du composé 1 dans CDCl ₃ .	43
Figure 24	Spectre HMBC élargi -2- du composé 1 dans CDCl ₃ .	43
Figure 25	Spectre COSY élargi -1- du composé 1 dans CDCl ₃ .	44
Figure 26	Spectre HMBC élargi -3- du composé 1 dans CDCl ₃ .	44
Figure 27	Spectre HSQC élargi -5- du composé 1 dans CDCl ₃ .	45
Figure 28	Spectre HMBC du composé 1 dans CDCl ₃ .	45
Figure 29	Spectre HMBC élargi-4- du composé 1 dans CDCl ₃ .	46
Figure 30	Spectre NOESY -1- du composé 1 dans CDCl ₃ .	46
Figure 31	Spectre HSQC élargi -6- du composé 1 dans CDCl ₃ .	46
Figure 32	Spectre NOESY -2- du composé 1 dans CDCl ₃ .	47
Figure 33	Structure du composé 2 .	49
Figure 34	Spectre de masse HR-ESI du composé 2 .	49
Figure 35	Spectre IR du composé 2 .	50
Figure 36	Spectre RMN ¹ H du composé 2 dans CDCl ₃ .	50
Figure 37	Spectre RMN ¹ H élargi -1- du composé 2 dans CDCl ₃ .	51
Figure 38	Spectre RMN ¹ H élargi -2- du composé 2 dans CDCl ₃ .	51
Figure 39	Spectre HSQC du composé 2 dans CDCl ₃ .	52
Figure 40	Spectre COSY -1- du composé 2 dans CDCl ₃ .	52

Figure 41	Spectre HMBC élargi -1- du composé 2 dans CDCl ₃ .	52
Figure 42	Spectre RMN ¹³ C du composé 2 dans CDCl ₃ .	53
Figure 43	Spectre DEPT-135 du composé 2 dans CDCl ₃ .	53
Figure 44	Spectre RMN ¹ H élargi -3- du composé 2 dans CDCl ₃ .	54
Figure 45	Spectre RMN ¹ H élargi -4- du composé 2 dans CDCl ₃ .	54
Figure 46	Spectre HSQC élargi -1- du composé 2 dans CDCl ₃ .	54
Figure 47	Spectre COSY -2- du composé 2 dans CDCl ₃ .	55
Figure 48	Spectre HMBC du composé 2 dans CDCl ₃ .	55
Figure 49	Spectre NOESY du composé 2 dans CDCl ₃ .	56
Figure 50	Structure du composé 3 .	58
Figure 51	Spectre de masse HR-ESI du composé 3 .	58
Figure 52	Spectre IR du composé 3 .	59
Figure 53	Spectre RMN ¹ H du composé 3 dans CDCl ₃ .	60
Figure 54	Spectre RMN ¹ H élargi -1- du composé 3 dans CDCl ₃ .	60
Figure 55	Spectre RMN ¹ H élargi -2- du composé 3 dans CDCl ₃ .	60
Figure 56	Spectre RMN ¹³ C du composé 3 dans CDCl ₃ .	61
Figure 57	Spectre DEPT-135 du composé 3 dans CDCl ₃ .	61
Figure 58	Spectre HSQC du composé 3 dans CDCl ₃ .	61
Figure 59	Spectre HMBC élargi du composé 3 dans CDCl ₃ .	62
Figure 60	Spectre COSY du composé 3 dans CDCl ₃ .	62
Figure 61	Spectre NOESY du composé 3 dans CDCl ₃ .	63
Figure 62	Structure du composé 4 .	65
Figure 63	Spectre RMN ¹ H du composé 4 dans CDCl ₃ .	65
Figure 64	Spectre RMN ¹ H élargi -1- du composé 4 dans CDCl ₃ .	66
Figure 65	Spectre RMN ¹ H élargi -2- du composé 4 dans CDCl ₃ .	66
Figure 66	Spectre HSQC du composé 4 dans CDCl ₃ .	67
Figure 67	Spectre RMN ¹³ C du composé 4 dans CDCl ₃ .	67
Figure 68	Spectre DEPT-135 du composé 4 dans CDCl ₃ .	68
Figure 69	Spectre HSQC élargi -1- du composé 4 dans CDCl ₃ .	68
Figure 70	Spectre COSY du composé 4 dans CDCl ₃ .	69
Figure 71	Spectre HSQC élargi -2- du composé 4 dans CDCl ₃ .	69
Figure 72	Spectre HMBC du composé 4 dans CDCl ₃ .	70
Figure 73	Spectre HMBC élargi du composé 4 dans CDCl ₃ .	70
Figure 74	Structure du composé 5 .	72
Figure 75	Spectre RMN ¹ H du composé 5 dans CDCl ₃ .	73
Figure 76	Spectre RMN ¹ H élargi 1 du composé 5 dans CDCl ₃ .	74
Figure 77	Spectre RMN ¹ H élargi 1 du composé 5 dans CDCl ₃ .	74
Figure 78	Spectre COSY du composé 5 dans CDCl ₃ .	74
Figure 79	Spectre HSQC du composé 5 dans CDCl ₃ .	75
Figure 80	Spectre RMN ¹³ C du composé 5 dans CDCl ₃ .	76
Figure 81	Spectre DEPT-135 du composé 5 dans CDCl ₃ .	76
Figure 82	Spectre HMBC élargi du composé 5 dans CDCl ₃ .	76
Figure 83	Spectre HMBC élargi du composé 5 dans CDCl ₃ .	77
Figure 84	Structure du composé 6 .	79

Figure 85	Spectre RMN ^1H du composé 6 dans CD_3OD .	79
Figure 86	Spectre RMN ^1H élargi du composé 6 dans CD_3OD .	80
Figure 87	Spectre HSQC du composé 6 dans CD_3OD .	80
Figure 88	Spectre RMN ^{13}C du composé 6 dans CD_3OD .	81
Figure 89	Spectre DEPT-135 du composé 6 dans CD_3OD .	81
Figure 90	Spectre HMBC du composé 6 dans CD_3OD .	82
Figure 91	Spectre COSY du composé 6 dans CD_3OD .	82
Figure 92	Structure du composé 7 .	84
Figure 93	Spectre RMN ^1H du composé 7 dans CD_3OD .	85
Figure 94	Spectre RMN ^1H élargi du composé 7 dans CD_3OD .	85
Figure 95	Spectre HSQC du composé 7 dans CD_3OD .	85
Figure 96	Spectre RMN ^{13}C du composé 7 dans CD_3OD .	86
Figure 97	Spectre DEPT-135 du composé 7 dans CD_3OD .	86
Figure 98	Spectre HMBC du composé 7 dans CD_3OD .	87
Figure 99	Spectre COSY du composé 7 dans CD_3OD .	87
Figure 100	Structure du composé 8 .	89
Figure 101	Spectre RMN ^1H du composé 8 dans CD_3OD .	89
Figure 102	Spectre RMN ^1H élargi du composé 8 dans CD_3OD .	90
Figure 103	Spectre COSY du composé 8 dans CD_3OD .	90
Figure 104	Spectre RMN ^{13}C du composé 8 dans CD_3OD .	91
Figure 105	Spectre DEPT-135 du composé 8 dans CD_3OD .	91
Figure 106	Spectre HSQC élargi du composé 8 dans CD_3OD .	91
Figure 107	Spectre HMBC élargi du composé 8 dans CD_3OD .	92
Figure 108	Structure du composé 9 .	94
Figure 109	Spectre RMN ^1H du composé 9 dans CD_3OD .	94
Figure 110	Spectre COSY élargi -1- du composé 9 dans CD_3OD .	95
Figure 111	Spectre HSQC élargi -1- du composé 9 dans CD_3OD .	95
Figure 112	Spectre RMN ^{13}C du composé 9 dans CD_3OD .	96
Figure 113	Spectre DEPT-135 du composé 9 dans CD_3OD .	96
Figure 114	Spectre HSQC élargi -2- du composé 9 dans CD_3OD .	97
Figure 115	Spectre COSY élargi -2- du composé 9 dans CD_3OD .	97
Figure 116	Spectre HMBC élargi du composé 9 dans CD_3OD .	98
Figure 117	Spectre HMBC élargi du composé 9 dans CD_3OD .	98
Figure 118	Spectre HMBC du composé 9 dans CD_3OD .	99
Figure 119	Structure du composé 10 .	101
Figure 120	Spectre RMN ^1H du composé 10 dans CD_3OD .	101
Figure 121	Spectre RMN ^{13}C du composé 10 dans CD_3OD .	102
Figure 122	Structure du composé 11 .	103
Figure 123	Spectre RMN ^1H du composé 11 dans CD_3OD .	104
Figure 124	Spectre RMN ^{13}C du composé 11 dans CD_3OD .	104
Figure 125	Structure du composé 12 .	105
Figure 126	Spectre RMN ^1H du composé 12 dans CD_3OD .	106
Figure 127	Spectre HSQC élargi du composé 12 dans CD_3OD .	107
Figure 128	Spectre RMN ^{13}C du composé 12 dans CD_3OD .	107

Figure 129	Spectre DEPT-135 du composé 12 dans CD ₃ OD.	108
Figure 130	Spectre COSY du composé 12 dans CD ₃ OD.	108
Figure 131	Spectre HMBC élargi -1- du composé 12 dans CD ₃ OD.	109
Figure 132	Spectre HMBC élargi -2- du composé 12 dans CD ₃ OD.	109
Figure 133	Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 1 .	121
Figure 134	Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 2 .	121
Figure 135	Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 3 .	122
Figure 136	Structure de l'acide gallique.	125
Figure 137	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	127
Figure 138	Structure de la quercétine.	128
Figure 139	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	129
Figure 140	Piégeage du radical libre DPPH [•] .	132
Figure 141	Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH [•] .	134
Figure 142	Réduction du radical cation ABTS ^{•+} .	135
Figure 143	Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode de réduction du radical cation ABTS ^{•+} .	137
Figure 144	Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode du piégeage du radical superoxyde O ₂ ^{•-} .	139
Figure 145	CUPRAC.	140
Figure 146	Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode CUPRAC.	142
Figure 147	Réduction des ions ferriques (FRAP).	143
Figure 148	Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode FRAP.	144

Liste des tableaux

		Page
Tableau 1	Classification botanique du genre <i>Salvia</i> .	4
Tableau 2	Activités pharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Salvia</i> .	5
Tableau 3	Flavonoïdes isolés du genre <i>Salvia</i> .	6
Tableau 4	Oléananes isolés du genre <i>Salvia</i> .	7
Tableau 5	Diterpénoïdes isolés de <i>Salvia phlomoides</i> .	9-11
Tableau 6	Triterpénoïdes isolés de <i>Salvia phlomoides</i> .	11-12
Tableau 7	Classification botanique du genre <i>Ferula</i> .	14
Tableau 8	Activités pharmacologiques d'espèces du genre <i>Ferula</i> .	15
Tableau 9	Sesquiterpènes de type daucane isolés du genre <i>Ferula</i> .	16
Tableau 10	Sesquiterpènes coumariniques isolés du genre <i>Ferula</i> .	16-17
Tableau 11	Flavonoïdes isolés du genre <i>Ferula</i> .	17-18
Tableau 12	Sesquiterpènes isolés de <i>Ferula vesceritensis</i> .	19-20
Tableau 13	Sesquiterpènes coumariniques isolés de <i>Ferula vesceritensis</i> .	20-21
Tableau 14	Sesquiterpènes daucanes isolés de <i>Ferula vesceritensis</i> .	22
Tableau 15	Masse et rendement des extraits de <i>Salvia phlomoides</i> .	23
Tableau 16	Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme de <i>Salvia phlomoides</i> .	26-27
Tableau 17	Résultats de la séparation sur colonne de la fraction 9.	28
Tableau 18	Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Salvia phlomoides</i> .	29
Tableau 19	Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 5.	30
Tableau 20	Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 9.	31
Tableau 21	Masse et rendement des extraits de <i>Ferula vesceritensis</i> .	32
Tableau 22	Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Ferula vesceritensis</i> (Est).	34
Tableau 23	Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 5.	34
Tableau 24	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 1 .	48
Tableau 25	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 2 .	56-57
Tableau 26	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 3 .	63-64
Tableau 27	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 4 .	71-72
Tableau 28	Attribution HSQC du composé 5 .	75
Tableau 29	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 5 .	78
Tableau 30	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 6 .	83
Tableau 31	Attribution HSQC du composé 7 .	86
Tableau 32	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 7 .	88
Tableau 33	Attribution HSQC du composé 8 .	92

Tableau 34	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 8 .	93
Tableau 35	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 9 .	100
Tableau 36	Déplacements chimiques RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé 10 .	102
Tableau 37	Déplacements chimiques RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé 11 .	105
Tableau 38	Données relatives aux spectres RMN ¹³ C, DEPT-135 et RMN ¹ H du composé 12 .	110
Tableau 39	Exemples d'anticancéreux issus des extraits végétaux (plantes et arbres).	112
Tableau 40	Liste des 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines utilisées dans le criblage dans l'Institut National du Cancer des Etats Unis.	113- 115
Tableau 41	Résultats du pourcentage de croissance de la dose unique anti tumorale.	119- 120
Tableau 42	Résultats de l'inhibition de croissance des cellules tumorales (Effet anti tumorale des composés testés 1, 2 et 3).	122- 124
Tableau 43	Dilutions de l'acide gallique.	126
Tableau 44	Résultats de la teneur en polyphénols totaux des extraits.	127
Tableau 45	Dilutions de la quercétine.	129
Tableau 46	Résultats de la teneur en flavonoides totaux des extraits.	130
Tableau 47	Résultats du piégeage du radical libre DPPH [•] .	134
Tableau 48	Résultats du test de réduction du radical cation ABTS ^{•+} .	137
Tableau 49	Résultats du test de piégeage du radical superoxyde O ₂ ^{•-} .	140
Tableau 50	Résultats du test CUPRAC.	142
Tableau 51	Résultats du test de réduction des ions ferriques.	144
Tableau 52	Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre <i>Salvia</i> étudiées durant les dernières années.	146- 148
Tableau 53	Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre <i>Salvia</i> étudiées en Algérie.	148- 150
Tableau 54	Composition des huiles essentielles de <i>Salvia phlomoides</i> .	152
Tableau 55	Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre <i>Ferula</i> étudiées durant les dernières années.	153- 155
Tableau 56	Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre <i>Ferula</i> étudiées en Algérie.	154- 155
Tableau 57	Composition des huiles essentielles de <i>Ferula vesceritensis</i> (Bechar).	157- 158
Tableau 58	Composition des huiles essentielles de <i>Ferula vesceritensis</i> (Constantine).	159- 162

Liste des abréviations

MeOH	Méthanol
CD ₃ OD	Méthanol deutéré D-4
CHCl ₃	Chloroforme
DCM	DiChloroMéthane
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
AcOEt	Acétate d'Ethyle
CH ₃ COCH ₃	Acétone
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
H ₂ O	Eau
TCA	Acide Tri Chloroacétique
THF	TétraHydroFurane
PP	PolyPropylène
NBT	Nitro Blue Tétrazolium
BHA	ButylHydroxyAnisole
BHT	ButylHydroxyToluène
FCR	Folin Ciocalteu Reagent
ADN	Acide DésoxyriboNucléic
ARN	Acide RiboNucléique
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SRB	SulfoRhodamine B
v/v	volume par volume
l	litre
ml	millilitre
µl	microlitre
mM	milliMole
ppm	partie par million
g	gramme
µg	microgramme
m	mètre
cm	centimètre
mm	millimètre
µm	micromètre
nm	nanomètre
°C	degré Celsius
Hz	Hertz
H	Heure
min	minute
sec	seconde
eV	électron Volts
UV	Ultra Violet
IR	Infra Rouge
IRTF	Infra Rouge à Transformée de Fourier

SM	Spectroscopie de Masse
SM-HR-ESI	Spectre de Masse à Haute Résolution en mode Ionisation par ElectroSpray
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 1 D	Résonance Magnétique Nucléaire Monodimensionnelle
RMN 2 D	Résonance Magnétique Nucléaire Bidimensionnelle
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone treize
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
COSY	CORrelation SpectroscopY
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
TMS	TétraMéthylSilane
<i>J</i>	Constante de couplage
s	singulet
d	doublet
dd	doublet de doublets
t	triplet
m	multiplet
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CPG/SM	Chromatographie Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
NCI	National Cancer Institute
INC	Institut National du Cancer
PDT	Programme de Développement Thérapeutique
CSN	Cancer du Système Nerveux
ICT	Inhibition de la Croissance Totale
CL ₅₀	Concentration Létale pour 50 % des individus
IC ₅₀	Inhibition de la croissance à 50 %
DPPH	2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
ABTS	2,2'-Azino-Bis(3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique)
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FvB	<i>Ferula vesceritensis</i> Bechar
FvS	<i>Ferula vesceritensis</i> Sud
FvC	<i>Ferula vesceritensis</i> Constantine
FvE	<i>Ferula vesceritensis</i> Est
VARENBIOMOL	Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques
N _i	Nombre d'insaturation
Réf	Référence

Introduction générale

La recherche des substances naturelles à activité pharmacologique connaît depuis quelques années une importance progressive, et elle suscite de plus en plus l'intérêt des scientifiques, les plantes étant considérées comme une source importante de ces substances. La flore mondiale comprend environ 390 800 espèces. Jusqu'à présent, moins de 10 % des plantes ont été étudiées en terme de recherche de substances potentiellement thérapeutiques et le nombre de molécules bioactives issues du monde végétal qui restent encore à découvrir est inestimable [1, 2].

Les régions tempérées telles que la région méditerranéenne sont caractérisées par la richesse et la diversité de leur flore. Les Lamiacées ou Labiacées constituent une famille distribuée dans le monde entier, mais la région méditerranéenne offre le meilleur exemple de la grande diversité de cette famille [3]. Cette famille présente un intérêt qui se manifeste par des applications variées. Dans le domaine de la parfumerie, elle est une importante source d'huiles essentielles, telles que : celles des fleurs de la menthe (*Mentha*), de la lavande (*Lavandula*) et du patchouli (*Pogostemon*). Dans le domaine agroalimentaire, elle renferme de nombreuses herbes et condiments qui sont importants pour notre alimentation, telles que : le basilic (*Ocimum basilicum*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le thym (*Thymus vulgaris*), et la sauge (*Salvia officinalis*) [4, 5].

Nous nous sommes intéressés aux sauges qui forment le genre *Salvia*. Plusieurs espèces de ce genre ont été étudiées du point de vue phytochimique et biologique [4-12]. C'est pour cette raison que notre choix a porté sur l'espèce *Salvia phlomoides*, qui est étudiée pour la première fois en Algérie dans le cadre de ce travail.

Notre deuxième choix a concerné la famille des Apiacées ou Ombellifères. L'importance de cette famille est considérable, elle fournit à l'alimentation des légumes comme : la carotte (*Daucus carota*) et le céleri (*Apium graveolens*), des condiments et des épices comme : le persil (*Petroselinum crispum*), le cumin (*Cuminum cyminum*) et la coriandre (*Coriandrum sativum*), et à la médecine des plantes ayant des activités pharmacologiques comme : le fenouil (*Foeniculum vulgare*), l'angélique (*Angelica sylvestris*) et *Ferula asafoetida gumpour* ses propriétés antispasmodiques [13].

Le genre *Ferula* dont plusieurs espèces ont fait l'objet d'études phytochimiques occupe une place importante dans cette famille [14-17].

Nous présenterons dans ce travail une étude sur l'espèce *Ferula vesceritensis* récoltée dans deux régions différentes, de Constantine d'une part et de Mogheul au sud ouest de Bechar d'autre part.

Nous discuterons dans le cadre de ce travail les études phytochimiques et pharmacologiques de deux espèces citées plus haut : *Salvia phlomoides* et *Ferula vesceritensis*, en se basant sur la recherche et l'isolement des métabolites secondaires de ces espèces, l'identification de leur structure et l'évaluation de l'activité biologique des extraits et des composés isolés, ainsi que la détermination de la composition chimique de leur huile essentielle.

Une partie de l'étude phytochimique a été réalisée au sein de l'unité de recherche VARENBIOMOL (Université Frères Mentouri Constantine 1), elle a été complétée par un stage de un mois au laboratoire de produits naturels (Université de Surrey et Université d'Oxford au Royaume Uni).

Les activités biologiques ont été étudiées à l'Institut National du Cancer des Etats Unis, et au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

Les résultats de cette étude seront présentés sous forme d'une introduction et de six chapitres, **Le premier chapitre** présente une revue bibliographique sur la famille des Lamiacées, le genre *Salvia* et l'espèce *Salvia phlomoides*.

Le deuxième chapitre présente une revue bibliographique sur la famille des Apiacées, le genre *Ferula* et l'espèce *Ferula vesceritensis*.

Le troisième chapitre est consacré aux travaux personnels concernant l'étude phytochimique des deux espèces, qui comprend l'extraction, le fractionnement des extraits et la purification des produits obtenus.

Le quatrième chapitre reporte la discussion des résultats obtenus et la détermination structurale des composés isolés des deux espèces.

Le cinquième chapitre reporte les résultats de l'évaluation des activités biologiques des extraits et des composés isolés.

Le sixième chapitre porte sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des deux espèces.

Une conclusion générale clôturera la présentation de ce travail et une liste des références bibliographiques.

Chapitre I

**La famille des Lamiacées,
le genre *Salvia*
et l'espèce *Salvia phlomoides***

La famille des Lamiacées est l'une des plus étudiées. Elle est connue pour ses espèces médicinales et aromatiques. Notre travail concerne l'espèce *Salvia phlomoides*.

I.1. Présentation de la famille des Lamiacées

Les Lamiacées sont nommées d'après le genre *Lamier*, la francisation du nom « *Lanium* » qui désignait ces plantes chez les romains, signifiant « ortie », en référence à la ressemblance superficielle de ses larges feuilles dentées avec celles de l'ortie. Précédemment appelées Labiacées, dérive du latin « *labia* » qui veut dire « lèvre » qui caractérise ses fleurs qui ont une forme de « gueule » entourée de deux lèvres [18].

Les Lamiacées ou Labiacées sont une importante famille botanique, elle regroupe environ 200 genres et 5500 espèces [19].

Les plantes sont généralement aromatiques produisant des huiles essentielles, herbacées, annuelles ou vivaces, à tiges quadrangulaires, de 30-150 cm de hauteur, avec des fleurs attrayantes à symétrie bilatérale, à deux lèvres en différentes couleurs, généralement de rose à rouge ou de violet à bleu [20].

Cette famille est distribuée à travers le monde, mais est particulièrement présente dans les régions tropicales et tempérées et en région méditerranéenne [3].

En Algérie, la famille des Lamiacées comprend 28 genres et 146 espèces [21].

I.2. Le genre *Salvia*

Le nom *Salvia* dérive du latin « *salvare* » signifiant « sauver » ou « être sûr et indemne », résume ses propriétés thérapeutiques vis-à-vis de nombreux types de maladies et sa popularité en médecine traditionnelle. Il est également connu sous le nom commun « sauge (sage) » en français et « sawge » en ancien anglais [22].

Salvia est l'un des plus grands et des plus importants genres de la famille des Lamiacées, il est représenté par plus de 900 espèces [19].

I.2.1. Description et classification botanique

Les plantes de ce genre comprennent des espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces.

Les tiges sont généralement quadrangulaires inclinées comme les autres membres de la famille des lamiacées. Les feuilles sont généralement entières, mais parfois dentées ou pennées [23]. Les fleurs se regroupent en inflorescences de type grappes ou panicules, dont les couleurs vont du bleu au rouge, et rarement du blanc au jaune. La corolle est formée de deux lèvres. Les fruits sont ovoïdes lisses ou nutlets oblongues et dans de nombreuses espèces

ils ont un revêtement mucilagineux. Plusieurs espèces de ce genre sont pourvus de poils au niveau des feuilles, des tiges et des fleurs. Parfois, les poils sont glandulaires et sécrètent des huiles volatiles donnant généralement une odeur distincte à la plante. Lorsque les poils sont frottés ou brossés, certaines des cellules oléifères sont rompues, libérant ainsi l'huile essentielle [24].

Le genre *Salvia* appartient à la classification suivante [25] :

Tableau 1. Classification botanique du genre *Salvia*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Phanérogames
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Astéride
Ordre	Lamiales (Labiales)
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Salvia</i>

I.2.2. Distribution géographique

Ce genre est distribué dans différentes régions dans le monde, y compris les zones tempérées et chaudes telles que : l'Amérique centrale et l'Amérique du sud (530 espèces), l'Asie centrale / méditerranée (250 espèces), l'Asie de l'Est (90 espèces) et l'Afrique du Sud (30 espèces) [26,27]. Les espèces recensées en Algérie sont : *Salvia balansae* de Noé, *Salvia officinalis* L., *Salviachudaei* Batt. et Trab., *Salvia triloba* L., *Salvia lavandulaefolia* Vahl., *Salvia aucheri* Benth., *Salvia phlomoides* Asso., *Salvia jaminiana* de Noé, *Salvia verbenaca* L. Briq., *Salvia horminum* L., *Salvia aegyptiaca* L., *Salvia silvestris* L., *Salvia tingitana* Ette., *Salvia sclarea* L., *Salvia aethiops*L., *Salvia algeriensis* Desf., *Salvia barrelieri* Ettling. et *Salvia argentea* L. [21].

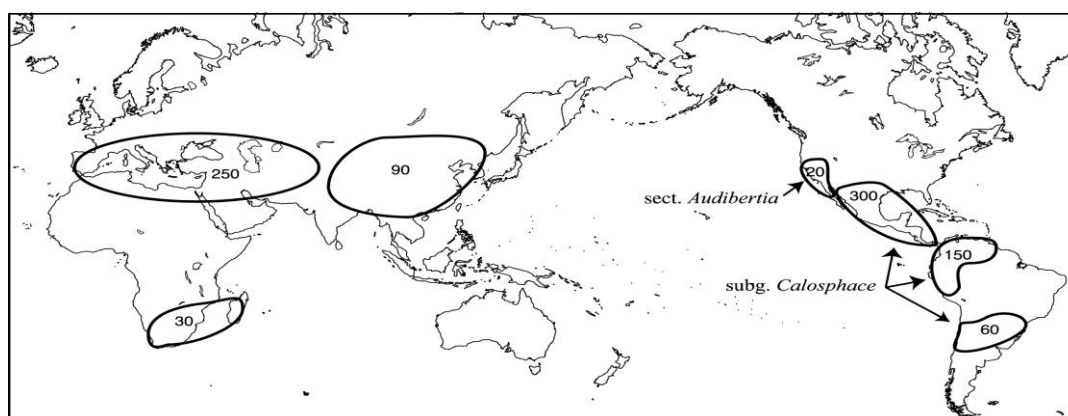


Figure 1. Distribution géographique du genre *Salvia*

I.2.3. Utilisation

Plusieurs espèces du genre *Salvia* ont montré des activités pharmacologiques, notamment antioxydantes, neuroprotectrices, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, cytotoxiques et antitumorales.

Le tableau ci-dessous regroupe quelques exemples d'espèces du genre *Salvia* avec leurs activités pharmacologiques.

Tableau 2. Activités pharmacologiques de quelques espèces du genre *Salvia*

Espèces	Activités	Réf
<i>S. officinalis</i> L. <i>S. hydrangea</i> <i>S. lachnocalyx</i> <i>S. macilenta</i> <i>S. multicalis</i> <i>S. sclarea</i> <i>S. xanthocheila</i>	Anti-oxydante	[5] [6]
<i>S. hydrangea</i> <i>S. lachnocalyx</i> <i>S. macilenta</i> <i>S. multicalis</i> <i>S. sclarea</i> <i>S. xanthocheila</i>	Neuro-protectrice	[7]
<i>S. africana-caerulea</i> <i>S. africana-lutea</i> <i>S. albicaulis</i> <i>S. aurita</i> <i>S. chamelaeagnea</i> <i>S. disermas</i> <i>S. dolomitica</i> <i>S. garipensis</i> <i>S. lanceolata</i> <i>S. namaensis</i>	Anti-inflammatoire	[8]
<i>S. pratensis</i> L. <i>S. glutinosa</i> L. <i>S. aethiopsis</i> L.	Antimicrobienne	[9]
<i>S. officinalis</i>	Antivirale	[10]
<i>S. hypargeia</i>	Cytotoxique	[11]
<i>S. menthifolia</i>	Anti tumorale	[12]

I.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Salvia*

134 espèces du genre *Salvia* ont été étudiées jusqu'à 2011, permettant l'isolation de 773 molécules, nous pouvons les classer en sept groupes : les sesquiterpénoïdes, les diterpénoïdes, les sesterpénoïdes, les triterpénoïdes, les stéroïdes, les polyphénols et autres composés [4].

Il considère comme une source de nombreux constituants naturels, y compris les triterpénoïdes et les flavonoïdes qui sont les principaux composés des parties aériennes [28].

I.2.4.1. Flavonoïdes et tritérpénoïdes isolés du genre *Salvia*

Les tableaux 3 et 4 regroupent les molécules de type flavonoïdes et triterpénoïdes (Oléananes) isolées de différentes espèces du genre *Salvia*.

- **Flavonoïdes :**

Tableau 3. Flavonoïdes isolés du genre *Salvia*.

N°	Molécules	Espèces	Réf
01	Nubatine	<i>S. nubicola</i>	[29]
02	6,8-di-C-glucosylapigénine (vicenin-2)	<i>S. officinalis</i>	[30, 31]
03	Lutéoline-7-O-β-D-glucoside	<i>S. officinalis</i>	[30,31]
		<i>S. triloba</i>	[32]
04	Lutéoline-7-O-glucuronide	<i>S. officinalis</i>	[30, 31]
05	Lutéoline-3'-O-glucuronide	<i>S. officinalis</i>	[30, 31]
06	6-hydroxylutéoline 7-O-glucoside	<i>S. officinalis</i>	[30, 31]
07	6-méthoxylutéoline 7-O-glucoside	<i>S. tomentosa</i>	[33]
08	6-hydroxylutéoline 5-O-glucoside	<i>S. verticillata</i>	[34]
		<i>S. tomentosa</i>	[35]
09	6-hydroxylutéoline 7-O-glucuronide	<i>S. officinalis</i>	[30]
10	Apigénine-7-O-β-D-glucopyranosyl-(1''→4'')-β-D-glucopyranoside	<i>S. uliginosa</i>	[36]
11	Apigénine-7,4'-O-di-β-D-glucopyranoside	<i>S. uliginosa</i>	[36]
12	Delphinidine-3-O-[6-O-(p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]-5-O-[4-O-acetyl-6-O-malonyl-β-D-glucopyranoside]	<i>S. uliginosa</i>	[37]
13	Genkwanine-4'-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranoside	<i>S. moorcroftiana</i>	[38]
14	Genkwanine-4'-O-{α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-galactopyranoside}	<i>S. moorcroftiana</i>	[38]
15	Genkwanine-4'-[O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside]	<i>S. moorcroftiana</i>	[39]
16	Genkwanine-4'-[O-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranoside]	<i>S. moorcroftiana</i>	[39]
17	8-méthoxygenistein 7-O-α-L-rhamnoside 4'-O-β-D-glucoside	<i>S. triloba</i>	[40]

▪ **Triterpénoïdes :**

De nombreux triterpénoïdes ont été isolés des espèces de *Salvia* depuis 1976.

Selon leur structure, ces triterpénoïdes sont classés en six sous-groupes : triterpénoïdes de type ursane ; oléanane ; lupane ; dammarane ; stéroïdes et autres triterpénoïdes.

Le tableau ci-dessous présente les triterpénoïdes de type oléanane isolés du genre *Salvia*.

Tableau 4. Oléananes isolés du genre *Salvia*

N°	Molécules	Espèces	Réf
01	Acide 2 α ,3 β -dihydroxyoléan-28-oïque	<i>S.hierosolymitana</i>	[41]
02	1 β ,2 α ,3 β ,11 α -tetrahydroxyoléan-12-ène	<i>S. kronenburgii</i>	[42]
03	3 β -acétoxyoléan-12-ène-2 α ,11 α -dial	<i>S. argentea</i>	[43]
04	3 β -acétoxyoléan-12-ène-1 β ,2 α ,11 α -triol	<i>S. argentea</i>	[43]
05	Acide 3 β -hydroxy-1-oxo-oléan-12-èn-28-oïque	<i>S. virgata</i>	[44]
06	Acide 3 α ,6 α ,24-trihydroxyoléan-12-èn-28-oïque (salvin B)	<i>S. santolinifolia</i>	[45]
07	Salvinemorol	<i>S. nemorosa</i>	[46]
08	24-nor-2 α ,3 β -dihydroxyoléan-4(23),12-ène	<i>S.hierosolymitana</i>	[41]
09	Acide 2R,3R-dihydroxy-24-nor 4(23),12-oléandièn-28- oïque	<i>S. carduacea</i>	[47]
10	Acide 2 α ,3 α ,16 α -trihydroxy-24-nor-4(23),12-oléandièn-28-oïque	<i>S. palaestina</i>	[48]
11	Acide przewanoïque B	<i>S. przewalskii</i>	[49]
12	Acide przewanoïque A	<i>S. przewalskii</i>	[49]
13	1 β ,11 α -dihydroxyoléan-18-èn-3-one	<i>S. deserta</i>	[50]
14	23-hydroxygermanicone	<i>S. pomifera</i>	[51]
15	Oléan-13(18)-ène-2 α ,3 β ,11 α -triol	<i>S. pinnata</i>	[52]
16	Oléan-(13)18-ène-2 β ,3 β -diol	<i>S. horminum</i>	[53]
17	3 β -hydroxyoléanan-13 β -28-lactone	<i>S. lanigera</i>	[54]
18	2 α ,20 β -dihydroxy-3 β -acétoxyurs-9(11),12-diène	<i>S. kronenburgii</i>	[55]
19	1 β ,2 α -dihydroxy-3 β -acétoxyurs-9(11),12-diène	<i>S. kronenburgii</i>	[55]
20	Déacétyloxysessein-7 α -(3 β -hydroxyoléan-12-èn-28-oate)(Reglin)	<i>S. regla</i>	[56]

I.3. L'espèce *Salvia phlomoides*

Dans l'espèce *Salvia phlomoides* (Famille des Lamiacées), le mot *phlomoides* vient du grec « *phlomis* » et « *phlomon* » qui signifie « brûler » et « flamme ». Les Grecs donnent ce nom aux plantes dont les feuilles étaient utilisées comme mèches de lampes [57].

I.3.1. Description botanique

C'est une plante à tige droite, obtusément tétragone, sillonnée au milieu des faces et rameuse dont les rameaux sont opposés et montants. Les feuilles pétiolées, ovales-oblongues, bordées de dents peu profondes et écartées, vertes en dessus, pâles en dessous. Toute la plante garnie de poils blancs avec fleurs axillaires de couleur violet à bleu, assez distantes, disposées par paires, ou verticillées de nombre de 2 à 4, et formant une sorte d'épi terminal, garni de bractées [58].



Figure 2. *Salvia phlomoides*

I.3.2. Distribution géographique

Cette espèce est présente en Espagne, en Algérie, au Maroc et en Tunisie [59, 60].

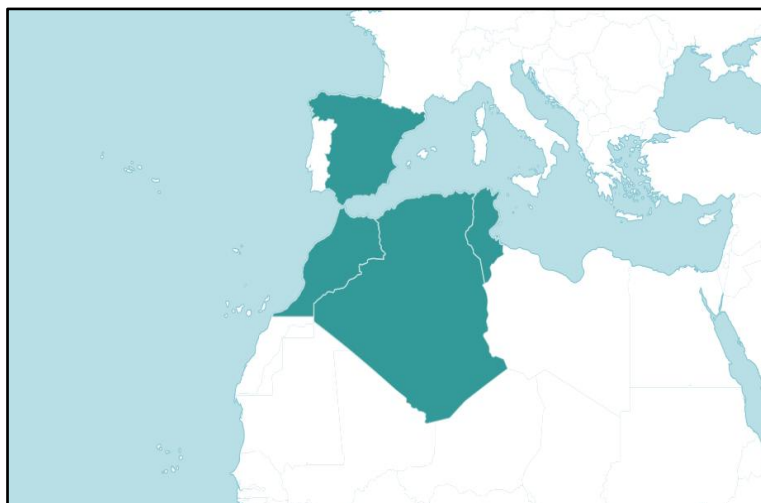


Figure 3. Distribution géographique de l'espèce *Salvia phlomoides*

I.3.3. Etudes phytochimiques antérieures de *Salvia phlomoides*

Précédemment, quatre investigations ont été menées sur l'espèce *Salvia phlomoides*.

Une plante a été étudiée en Espagne (racines et parties aériennes). Cette investigation phytochimique a permis l'isolement des composés terpéniques, essentiellement des diterpénoïdes et des triterpénoïdes.

▪ Diterpènes :

L'étude phytochimique de l'extrait acétone des racines a permis l'isolement des diterpénoïdes suivants :

Tableau 5. Diterpénoïdes isolés de *Salvia phlomoides*

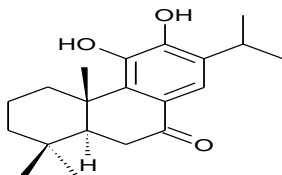
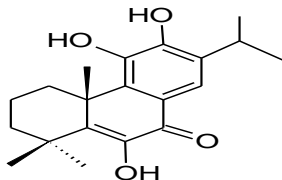
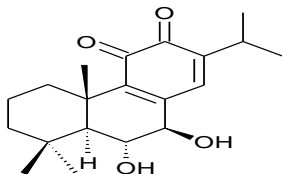
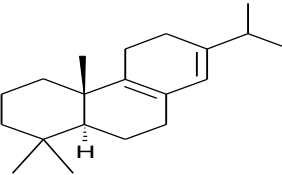
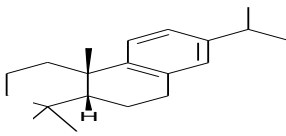
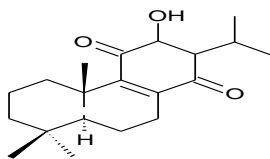
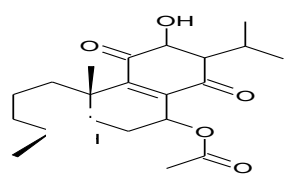
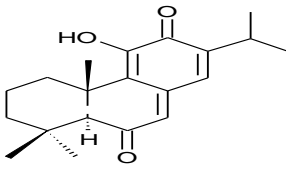
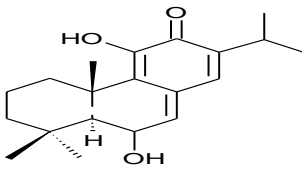
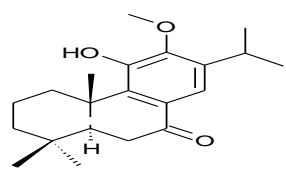
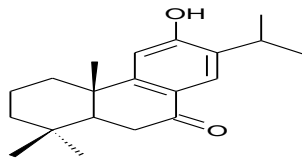
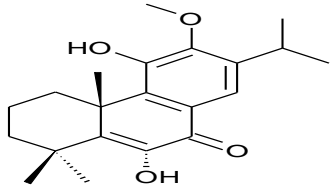
N°	Molécules	Structures chimiques	Réf
01	Déméthylcryptojaponol		[61]
02	14-deoxycoléon U		[61]
03	Salviplomone		[61]
04	8,13-abiétadiène		[61]

Tableau 5. Diterpénoïdes isolés de *Salvia phlomoides* (suite)

N°	Molécules	Structures chimiques	Réf
05	8, 11,13-abiétatriène		[61]
06	Royléanone		[61]
07	7 α -acétoxyroyléanone		[61]
08	Taxodione		[61]
09	Taxodone		[61]
10	Cryptojaponol		10
11	Sugiol		[61]

Une nouvelle étude de l'extrait acétone des racines de *Salvia phlomoides* a permis l'isolement d'un diterpénoïde de structure abiétane.

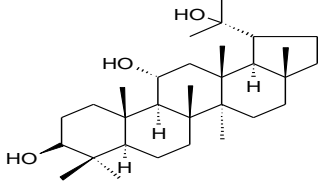
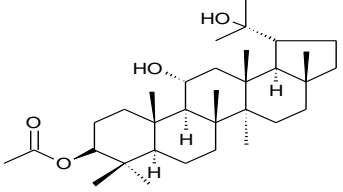
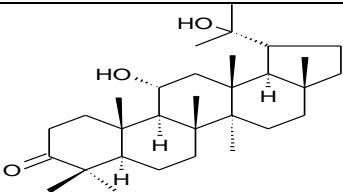
Tableau 5. Diterpénoïdes isolés de *Salvia phlomoides* (suite)

N°	Molécule	Structure chimique	Réf
12	6,11-dihydroxy-12-méthoxyabiéta-5,8,11,13-tetraèn-7-one		[62]

▪ **Triterpènes :**

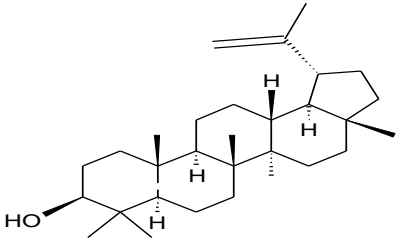
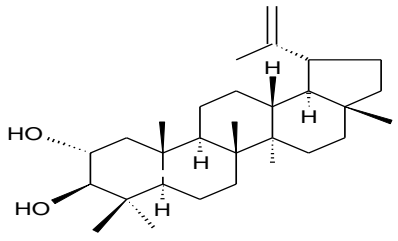
Une étude phytochimique de la partie aérienne de la plante *Salvia phlomoides* a conduit à l'isolement de trois triterpénoïdes :

Tableau 6. Triterpénoïdes isolés de *Salvia phlomoides*

N°	Molécules	Structures chimiques	Réf
14	Lupane-3 β ,11 α ,20-triol		[63]
15	3 β -acétylupane-11 α ,20-diol		[63]
16	3-keto-lupane-11 α ,20-diol		[63]

Une autre étude phytochimique de l'extrait acétone de *Salvia phlomoides* a permis d'isoler les triterpénoïdes suivants :

Tableau 6. Triterpénoïdes isolés de *Salvia phlomoides* (suite)

N°	Molécules	Structure chimique	Réf
17	Lupéol		[64]
18	Lup-20(29)-ène-2 α ,3 β -diol		[64]

A la lumière de ces données, on peut confirmer le profil chimique pour le genre *Salvia*, on trouve couramment des flavonoïdes et des triterpénoïdes dans leurs parties aériennes. C'est pour cette raison que cette étude s'est concentrée à l'investigation phytochimique de l'espèce *Salvia phlomoides*, et aussi qu'elle n'a jamais fait l'objet d'études auparavant en Algérie.

Chapitre II

**La famille des Apiacées,
le genre *Ferula*
et l'espèce *Ferula vesceritensis***

La famille des Apiacées est l'une des plus importantes. Elle renferme un grand nombre d'espèces aromatiques et alimentaires. Notre travail concerne l'espèce *Ferula vesceritensis*.

II.1. Présentation botanique de la famille des Apiacées

Le nom Apiacée vient du latin « *Apis* » et « *Apium* » qui signifient « abeille » et « Céleri », en référence à leurs fleurs qui attirent les abeilles, et à l'espèce la plus connue de cette famille. Elle est plus connue sous le nom Ombellifères qui vient du latin « *Umbella* » et « *Umbra* » qui signifient « Ombrelle ou Parasol » et « Ombre », caractérisant leur inflorescence typique, une ombelle, qui permet évidemment de se mettre un peu à l'ombre [65].

Ils forment une importante famille qui comprend près de 3500 espèces réparties en 463 genres [66].

Ce sont principalement des plantes herbacées annuelles souvent aromatiques, parfois bisannuelles ou vivaces, certaines ne fleurissent qu'une fois par an comme le genre *Ferula*.

Les tiges sont parfois robustes, peuvent atteindre deux mètres de haut. Elles sont souvent cannelées (sillons dans le sens de la longueur) et deviennent généralement creuses par résorption de la moelle. Les feuilles, stipulées ou non, sont alternes, parfois simples, et parfois composées, mais généralement profondément à folioles finement découpées. Les fleurs, généralement de petite taille due à l'inflorescence relativement condensée, à symétrie pentamère, sont le plus souvent blanches ou jaunâtres ou encore pourpres [65, 67].

Cette famille est distribuée à travers le monde, mais particulièrement dans les régions tempérées [68].

En Algérie, la famille des Apiacées comprend 55 genres [69].

II.2. Le genre *Ferula*

Le nom latin « *Ferula* » signifie « canne » en référence aux tiges cannelées de ce genre.

Ferula est l'un des genres les plus importants de la famille des Apiacées. Il regroupe environ 170 espèces [70].

II.2.1. Description et classification botanique

Les plantes du genre *Ferula* sont vivaces, à tige de 1 à 4 m de hauteur, robuste et creuse.

Les feuilles sont toutes composées en lanières linéaires. Les fleurs sont petites, en ombelles de 5 à 40 rayons, de couleur jaune, les latérales plus petites que la centrale. Les fruits sont ovales ou oblongs, comprimés par le dos, glabres, entourés d'un rebord plan [71].

Le genre *Ferula* appartient à la classification phylogénétique suivante [25] :

Tableau 7. Classification botanique du genre *Ferula*

Règne	Plantes
Sous règne	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiacées
Genre	<i>Ferula</i>

II.2.2. Distribution géographique

Les plantes du genre *Ferula* sont originaires du bassin méditerranéen, ainsi que de l'Asie occidentale et centrale [72].

Ce genre est distribué dans différentes régions de l'Afrique [73-76].

En Algérie, il est représenté par 7 espèces [69], qui sont : *Ferula communis* L., *Ferula cossoniana* B. et T., *Ferula longipes* Coss., *Ferula lutea*, *Ferula sulcata* Desf., *Ferula tingitana* L., *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur.

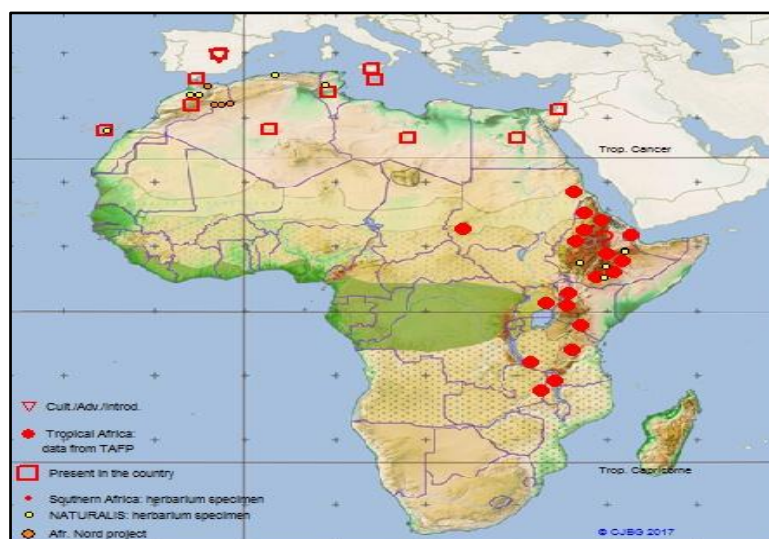


Figure 4. Distribution géographique du genre *Ferula*

II.2.3. Utilisation

De nombreuses espèces du genre *Ferula* sont utilisées pour leurs activités pharmacologiques, y compris, cytotoxiques, antimicrobiennes, antioxydantes, antispasmodiques, hypotensives, antifongiques et anti-inflammatoires.

Le tableau ci-dessous représente les activités pharmacologiques de quelques espèces du genre *Ferula*.

Tableau 8. Activités pharmacologiques d'espèces du genre *Ferula*

Espèces	Activités	Réf
<i>F. ovina</i> <i>F. szowitsiana</i> <i>F. persica</i> <i>F. diversivittata</i> <i>F. flabellilob</i> <i>F. gummosa</i> <i>F. persica</i>	Cytotoxique	[77]
<i>F. heuffelii</i> Griseb. <i>F. assafoetida</i> <i>F. gummosa</i>	Antimicrobienne	[78] [79] [80]
<i>F. gummosa</i> Boiss. <i>F. assafoetida</i> <i>F. szovitsiana</i>	Antioxydante	[81] [82] [83]
<i>F. asafoetida</i> gum.	Antispasmodique Hypotensive	[13]
<i>F. latisecta</i> <i>F. narthex</i> Boiss. <i>F. persica.</i>	Antifongique	[84] [85] [86]
<i>F. hermonis</i> <i>F. gummosa</i> Boiss.	Anti-inflammatoire	[87] [88]

II.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Ferula*

De nombreuses études phytochimiques ont été réalisées sur le genre *Ferula*, elles ont conduit à l'extraction de centaines de métabolites secondaires, dont la plupart sont des terpénoïdes, plus précisément des dérivés sesquiterpéniques de type daucane et sesquiterpènes coumariniques. Les tableaux 9 et 10 regroupent les molécules de sesquiterpènes de type daucane et coumariniques isolées de différentes espèces du genre *Ferula*.

D'autres espèces du genre *Ferula* ont mis en évidence la présence des flavonoïdes. Des exemples de flavonoïdes isolés du genre *Ferula* sont résumés dans le tableau 11.

▪ **Sesquiterpènes de type daucane**

Tableau 9. Sesquiterpènes de type daucane isolés du genre *Ferula*

N°	Molécules	Espèces	Réf
01	4-(4'-hydroxybenzoyloxy)dauc-4,8-diène	<i>F. sinaica</i>	[89]
02	14-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzoyloxy)dauc-4,8-diène		
03	(1R,4R)-4-Hydroxydauca-7-èn-6-one	<i>F. hermonis</i>	[90]
04	(1R,4R)-4-Hydroxydauca-7-ène-6,9-dione		
05	(1R,3S,8S)-3-éthoxy-8-angéloyloxydauca-4-èn-9-one	<i>F. hermonis</i> Boiss.	[91]
06	Ferushermonin B		
07	4 β ,8 β -dihydroxy-6 α - <i>p</i> -hydroxybenzoyl-dauc-9-ène		
08	4 β ,8 β -dihydroxy-6 α -(4-hydroxy-3-méthoxybenzoyl)-dauc-9-ène		
09	Ferushermonin A		
10	Lancerdiol- <i>p</i> -hydroxybenzoate		
11	Lancerdiol vanillate		
12	Lancerotriol benzoate		
13	Lancerotriol- <i>p</i> -hydroxybenzoate		
14	Lancerotriol vanillate		
15	2,3-époxy-jaeschkeanadiolbenzoate		
16	Jaeschkeanin		
17	2,3-époxy-jaeschkeanadiol vanillate		
18	Vaginatine		
19	Jaeschkeanadiol benzoate		
20	Jaeschkeanadiol- <i>p</i> -hydroxybenzoate		
21	Jaeschkeanadiol vanillate		

▪ **Sesquiterpènes coumariniques**

Tableau 10. Sesquiterpènes coumariniques isolés du genre *Ferula*

N°	Molécules	Espèces	Réf
01	Szowitsiacoumarine A	<i>F. szowitsiana</i>	[14]
02	Szowitsiacoumarine B		
03	Assafoetidnol A	<i>F. assa-foetida</i>	[15]
04	Assafoetidnol B		
05	Farnesiferone B	<i>F. flabelliloba</i>	[92]
06	Flabellilobine A		
07	Flabellilobine B		
08	Fukanefuomarine A	<i>F. fukanensis</i>	[93]
09	Fukanefuomarine B		
10	Fukanefuomarine C		

Tableau 10. Sesquiterpènes coumariniques isolés du genre *Ferula* (suite)

N°	Molécules	Espèces	Réf
11	Fukanefuromarine D	<i>F. fukanensis</i>	[93]
12	Fukanemarine A		
13	Gumosine	<i>F. gumosa</i>	[94]
14	Gumosides A		
15	Gumosides B		
16	Conferone	<i>F. badrakema</i>	[95]
17	Mogoltacine		
18	Fésélol		
19	Férocaulidine		
20	Ligupersine A		
21	tunetacoumarine A	<i>F. tunetana</i> Pom.	[96]
22	<i>epi</i> -conferdione	<i>F. foetida</i>	[97]
23	Isoferine	<i>F. teterrima</i>	[98]
24	Lehmannolol	<i>F. sinkiangensis</i>	
25	Sinkianone		
26	Fnarthexone	<i>F. narthex</i> Boiss.	[99]

▪ **Flavonoïdes**

Tableau 11. Flavonoïdes isolés du genre *Ferula*

N°	Molécules	Espèces	Réf
01	Apigénine	<i>F. longipes</i>	[100]
02	Apigénine-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside		
03	Quercétine 3- <i>O</i> -α-L-rhamnoside		
04	Quercétine-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside-7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -cafféoyl]-β-D-glucopyranoside		
05	Quercétine-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside		
06	Kaempférol- 3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside		
07	kaempférol-3- <i>O</i> - α-L-rhamnopyranoside -7- <i>O</i> - β-D-glucopyranoside		
08	Isorhamnétine-3,7-di- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside		
09	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside		

Tableau 11. Flavonoïdes isolés du genre *Ferula* (suite)

N°	Molécules	Espèces	Réf
10	Lutéoline	<i>F. assafoetida</i>	[16]
		<i>F. conocaula</i>	[101]
		<i>F. schair</i>	[102]
11	Lutéoline-7-O-β-D-glucoside	<i>F. assafoetida</i>	[16]
		<i>F. varia</i>	[17]
		<i>F. schair</i>	[102]
12	Narcissine	<i>F. lutea</i>	[103]

II.3. L'espèce *Ferula vesceritensis*

Ferula vesceritensis est une espèce endémique algérienne appartenant à la famille des Apiacées.

II.3.1. Description botanique

Ferula vesceritensis est une plante vivace, de 1 à 2 m de haut, avec une tige rigide et feuilles à division allongée droite, fleurs jaunes à vertes à pétales larges portant des poils sur leur nervure dorsale. Fruits ovales à sommets pointus [104, 105].



Figure 5. *Ferula vesceritensis*

II.3.2. Distribution géographique

L'espèce *Ferula vesceritensis* est présente dans le Sahara septentrional [106].

II.3.3. Etudes phytochimiques antérieures de *Ferula vesceritensis*

Les investigations phytochimiques de *Ferula vesceritensis* ont conduit à la détermination de composés sesquiterpéniques.

▪ Sesquiterpènes

Le fractionnement de l'extrait dichlorométhane de la partie aérienne de *Ferula vesceritensis* a permis l'isolement des sesquiterpènes suivants :

Tableau 12. Sesquiterpènes isolés de *Ferula vesceritensis*

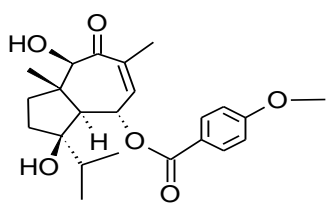
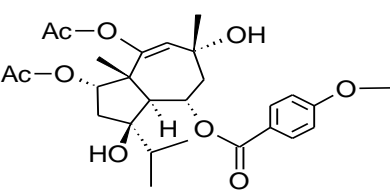
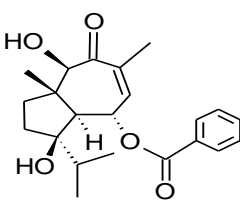
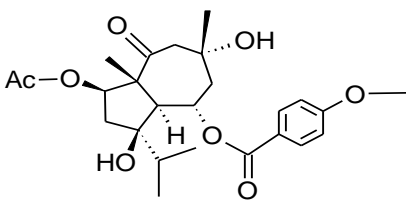
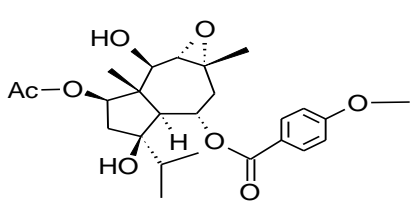
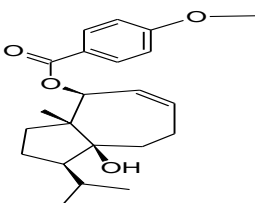
N°	Molécule	Structure chimique	Réf
01	10-Hydroxylancérodiol-6-anisate		[107]
02	2,10-Diacétyl-8-hydroxyferutriol-6-anisate		[107]
03	10-Hydroxylancérodiol-6-benzoate		[107]
04	Vesceritenone		[107]

Tableau 12. Sesquiterpènes isolés de *Ferula vesceritensis* (suite)

N°	Molécule	Structure chimique	Réf
05	Epoxy-vesceritenol		[107]
06	Lasidiol-10-anisate		[107]

▪ **Sesquiterpènes coumariniques :**

Le fractionnement de l'extrait dichlorométhane des racines de *Ferula vesceritensis* a permis l'isolement des sesquiterpènes coumariniques suivants :

Tableau 13. Sesquiterpènes coumariniques isolés de *Ferula vesceritensis*

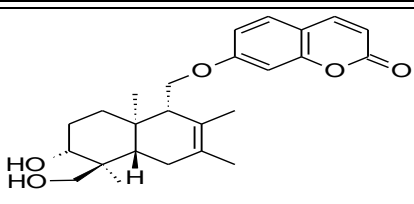
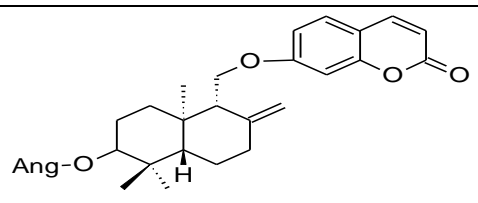
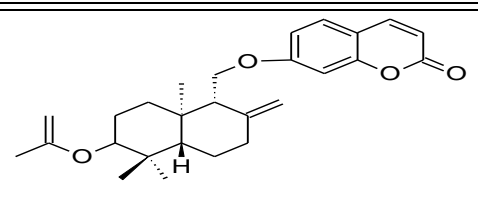
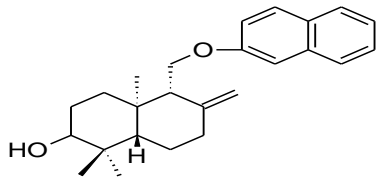
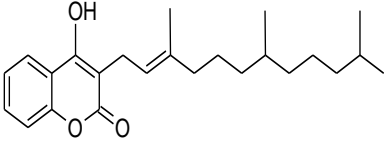
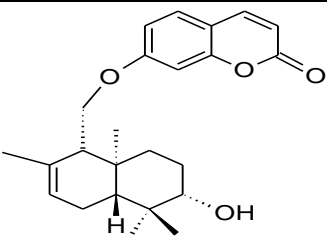
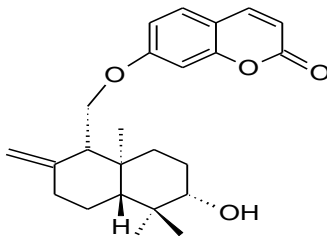
N°	Molécule	Structure chimique	Réf
01	13-Hydroxyfésélol		[108]
02	3-Angeloxycolladine		[108]
03	Colladine		[108]

Tableau 13. Sesquiterpènes coumariniques isolés de *Ferula vesceritensis* (suite)

04	Colladonine		[108]
05	Ferulénol		[109]

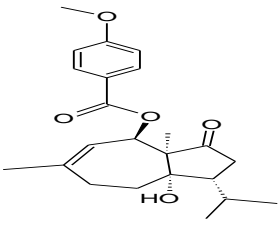
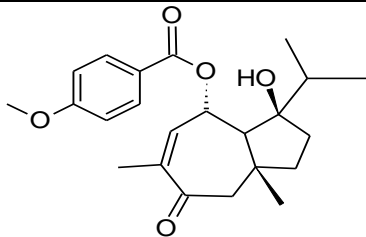
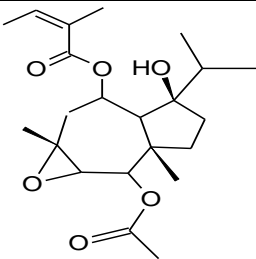
Ainsi, le fractionnement de l'extrait dichlorométhane de la partie aérienne de *Ferula vesceritensis* conduit à l'isolement des sesquiterpènes coumariniques suivants :

Tableau 13. Sesquiterpènes coumariniques isolés de *Ferula vesceritensis* (suite)

N°	Molécule	Structure chimique	Réf
01	Fésélol		[107]
02	Farnésiférol		[107]

Un autre traitement de l'extrait dichlorométhane des racines de *Ferula vesceritensis* a permis d'isoler les sesquiterpènes de type daucane suivants :

Tableau 14. Sesquiterpènes daucanes isolés de *Ferula vesceritensis*

N°	Molécule	Structure chimique	Réf
01	Fercomine		[110]
02	Lancerodiol- <i>p</i> -méthoxybenzoate		[110]
03	Lapiférine		[110, 111]

Sur la base de ces données, nous avons voulu mettre en relief la richesse de l'espèce *Ferula vesceritensis* en métabolites secondaires. Et pour avoir une meilleure connaissance de la composition chimique de cette espèce, la plante a été récoltée dans deux régions différentes de l'Algérie.

Chapitre III

Etude phytochimique

Notre travail concerne l'étude phytochimique de deux espèces : *Salvia phlomoides* et *Ferula vesceritensis*.

III.1. *Salvia phlomoides*

III.1.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée dans la région de Constantine, Est de l'Algérie au mois d'Avril de l'année 2012. Elle a été identifiée par Monsieur Mohamed Kaabache, Professeur au département de biologie et écologie végétales de l'université Ferhat Abbas Sétif 1. Un spécimen (SP-125-5-06) a été déposé à l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Les feuilles et les fleurs sont soumises à un séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires. Elles ont été ensuite broyées et pesées : 1400 g.

III.1.2. Protocole d'extraction

L'étude phytochimique de *Salvia phlomoides* a été réalisée à partir de la partie aérienne (feuilles et fleurs) préalablement broyée.

1400 g de feuilles et de fleurs sont laissés macérer dans un mélange de solvants MeOH/H₂O (8/2, v/v) à température ambiante pendant 72 heures. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, le macérât est filtré et le filtrat est récupéré.

L'extrait hydroalcoolique obtenu est concentré sous vide (à température 30-35°C), puis il est repris avec 560 ml d'eau distillée (à raison de 400 ml pour 1000 g du matériel végétal sec) légèrement chauffée (25-30 °C), on agite le mélange et on le laisse pendant une nuit au frais, puis on filtre.

La solution ainsi obtenue (Filtrat) est soumise à une extraction de type liquide-liquide successivement avec de l'éther de pétrole, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et du *n*-butanol. Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées, pour donner les masses suivantes :

Tableau 15. Masse et rendement des extraits de *Salvia phlomoides*

Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Extrait éther de pétrole	0,24	0,017
Extrait chloroformique	6	0,42
Extrait acétate d'éthyle	6	0,42
Extrait <i>n</i> -butanol	12	0,85

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 6.

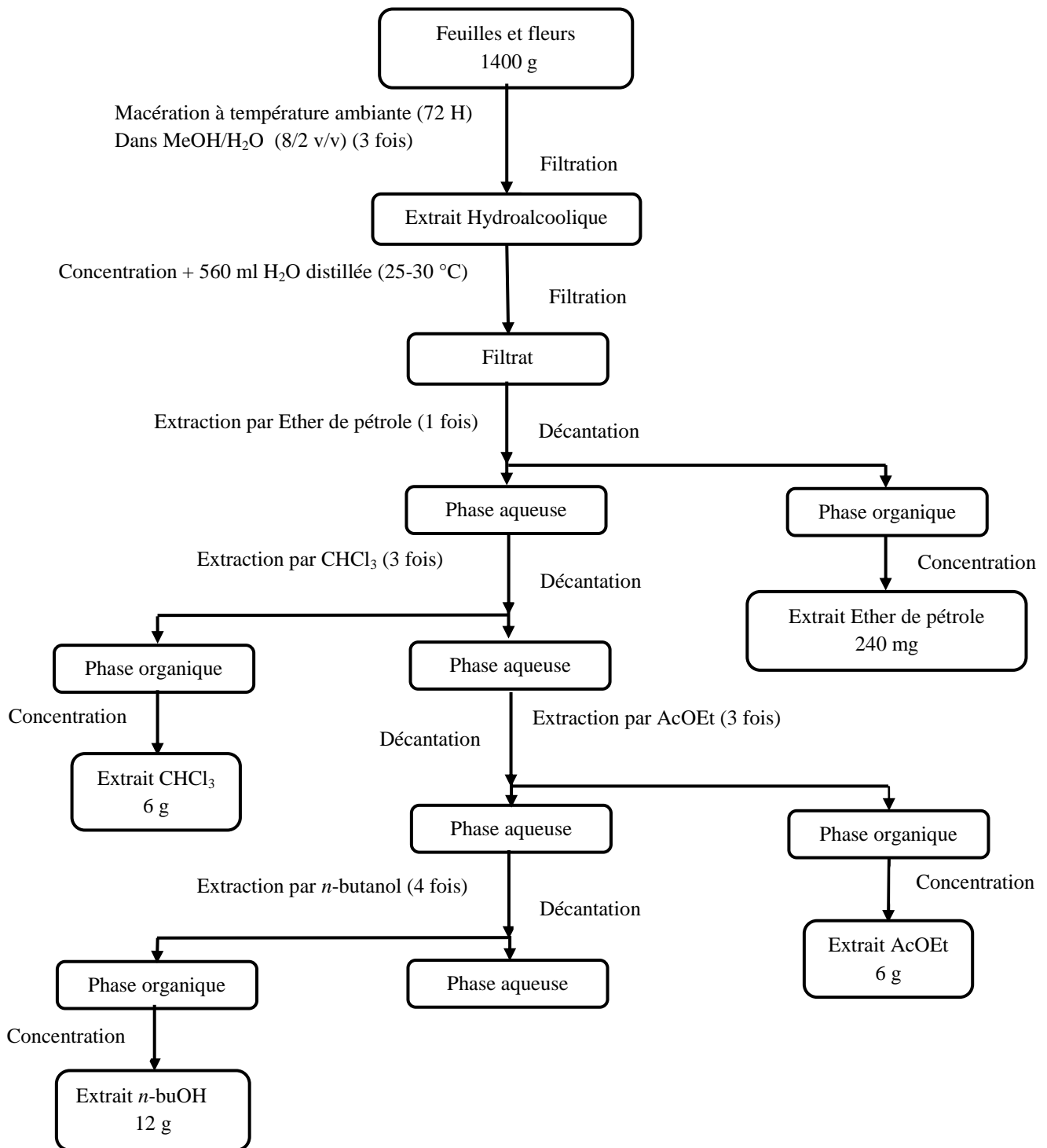


Figure 6. Protocole d'extraction de *Salvia phlomoides*

III.1.3. Etude des extraits

Les extraits obtenus ont été analysés par CCM pour déterminer le meilleur système d'élution pour la séparation en CC.

Nous avons retenu les extraits dont le profil chromatographique montre la richesse en métabolites secondaires, à savoir, les extraits acétate d'éthyle et chloroforme.

Ces deux extraits ont subi la première étape de fractionnement sur colonne conduisant à l'obtention d'un certain nombre de fractions.

Les fractions obtenues ont été analysées par CCM pour réunir les fractions qui présentent le même profil chromatographique, et déterminer un nouveau système de solvants susceptible de mieux séparer les composés.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées avec des colonnes de gel de silice (Merck 230-400 mesh) de différents diamètres (15 et 40 mm), ou des colonnes de séphadex (LH-20) de 15 mm de diamètre.

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de gel de silice 60 F254 sur feuilles d'aluminium (Merck). Après développement, les plaques ont été observées sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm). Ensuite, elles ont été pulvérisées avec une solution de vanilline- H_2SO_4 à 1 %, puis chauffées jusqu'à apparition de taches de différentes couleurs.

III.1.3.1. Fractionnement de l'extrait chloroforme

L'extrait chloroforme a subi une séparation préliminaire par CC.

En effet, cet extrait est dissous dans un volume de 6 ml de MeOH, puis mélangé à une petite quantité de gel de silice. Le mélange est séché jusqu'à obtention d'une poudre homogène.

La poudre obtenue est déposée sur une colonne (diamètre 40 mm), remplie d'une phase stationnaire constituée de 180 g de gel de silice (à raison de 30 g de gel de silice pour 1 g d'extrait de plante), élué par un gradient DCM/ CH_3COCH_3 de polarité croissante.

Des volumes de 100 ml sont recueillis et regroupés selon la similitude de leur profil chromatographique sur CCM, pour donner vingt et une fractions.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme de *Salvia phlomoides*

Système de Solvants (%)		Fractions	Fractions regroupées	N° de la fraction	Poids (mg)
DCM	CH ₃ COCH ₃				
100	0	1-10	1-10	1	130
99	1	11-20	11-20	2	112
98	2	21-30	21-30	3	170
97	3	31-40	31-40	4	92
96	4	41-50	41-50	5	78
95	5	51-60	46-70	6	220
94	6	61-70			
93	7	71-80	71-90	7	145
92	8	81-90			
91	9	91-100	91-125	8	303
90	10	101-110			
89	11	111-120			
88	12	121-130	126-155	9	400
87	13	131-140			
86	14	141-150			
85	15	151-160	156-170	10	177
84	16	161-170			
83	17	171-180	171-200	11	262
82	18	181-190			
81	19	191-200			
80	20	201-210	201-215	12	106
75	25	211-220	216-225	13	171
70	30	221-230	226-230	14	56
65	35	231-240	231-245	15	184
60	40	241-250	246-260	16	197
55	45	251-260			
50	50	261-270	261-310	17	407
45	55	271-280			
40	60	281-290			
35	75	291-300			
30	70	301-310			
25	75	311-320	311-340	18	202
20	80	321-330			
15	85	331-340			
10	90	341-350	341-370	19	288
5	95	351-360			
0	100	361-370			

Tableau 16. Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme de *Salvia phlomoides* (suite)

CH ₃ COCH ₃	MeOH	Fractions	Fractions regroupées	N° de la fraction	Poids (mg)
95	5	371-375	371-405	20	312
90	10	376-385			
85	15	386-390			
80	20	391-395			
75	25	396-400			
70	30	401-405			
60	40	406-415	406-440	21	394
50	50	416-420			
40	60	421-425			
30	70	426-430			
15	85	431-435			
0	100	436-440			

III.1.3.2. Etude des fractions de l'extrait chloroforme

▪ Etude de la fraction 14

Cette fraction contient un précipité de couleur blanche ($m_{\text{précipité}} = 30 \text{ mg}$). Ce précipité est filtré, lavé avec CH₃COCH₃ et dissous dans CHCl₃, puis testé sur une plaque CCM analytique de gel de silice, élué avec le système DCM/CH₃COCH₃ (9/1, v/v). Il a donné une seule tache de couleur rose après pulvérisation avec de la Vanilline- H₂SO₄ à 1% et chauffage.

C'est le composé **1** isolé des fractions regroupées **226-230**.

▪ Etude de la fraction 9

Cette fraction a subi une séparation par CC. Elle est déposée en haut d'une colonne (diamètre 15 mm). La quantité de gel de silice utilisée comme phase stationnaire est de 30 g. L'élution a été réalisée par un système isocratique DCM/AcOEt (1/1, v/v). Des volumes de 5 ml sont recueillis et regroupés selon la similitude de leur profil chromatographique sur CCM, pour donner six fractions.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 17.

Tableau 17. Résultats de la séparation sur colonne de la fraction 9

Système de solvants	Sous fractions regroupées	N° de la sous fraction	Poids (mg)
50% DCM 50% AcOEt	1-11	1	54
	12	2	27
	13-20	3	67
	21	4	24
	22-29	5	78
	30-54	6	113

L'analyse des sous fractions N° 2 et 4 sur plaque CCM avec le système d'élution DCM/MeOH (9/1, v/v) donnent pour les deux, une seule tache de couleur rose après pulvérisation avec de la Vanilline-H₂SO₄ à 1% et chauffage, ce sont les composé **2** et **3** isolés des sous fractions **21** et **12** respectivement.

▪ Etude de la fraction 5

Un précipité de couleur blanche a été formé, ce précipité est filtré ($m_{\text{précipité}} = 50 \text{ mg}$). Il est dissous dans CHCl₃ et testé en utilisant une plaque CCM analytique avec un système d'élution isocratique 100 % DCM. Il a donné une seule tache de couleur rose après pulvérisation avec de la Vanilline-H₂SO₄ à 1% et chauffage, c'est le composé **4** isolé des fractions regroupées **41-50**.

▪ Etude de la fraction 3

Un précipité de couleur jaune a été formé, ce précipité est filtré ($m_{\text{précipité}} = 110\text{mg}$). Il est dissous dans CHCl₃ et testé en utilisant une plaque CCM analytique avec un système d'élution isocratique 100 % DCM. Il a donné une seule tache de couleur violette sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$), c'est le composé **5** isolé des fractions regroupées **21-30**.

III.1.3.3. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait acétate d'éthyle a été fractionné par CC.

Il est dissous dans un volume de 6 ml de MeOH, puis mélangé à une petite quantité de gel de silice. Le mélange est séché jusqu'à obtention d'une poudre homogène.

Cette poudre est déposée sur une colonne (diamètre 40 mm) remplie de gel de silice utilisé comme phase stationnaire (une quantité de 180 g de gel de silice a été utilisée, à raison de 30 g de gel de silice pour 1 g d'extrait de plante), et élué avec un gradient CHCl₃/CH₃COCH₃ de

polarité croissante. Des volumes de 100 ml sont recueillis et regroupés selon la similitude de leur profil chromatographique sur CCM, pour donner seize fractions.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 18.

Tableau 18. Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides*

Système de solvants (%)		Fractions	Fractions regroupées	N° de la fraction	Poids (mg)
CHCl ₃	CH ₃ COCH ₃				
100	0	1-14	1-14	01	285
95	5	15-23	15-23	02	97
90	10	24-31	24-31	03	110
88	12	32-50	32-53	04	270
86	14	51-67	54-67	05	490
84	16	68-83	68-75	06	160
82	18	84-95	76-91	07	136
80	20	96-107	92-115	08	133
78	22	108-115			
76	24	116-127	116-135	09	193
74	26	128-139	136-151	10	145
72	28	140-151			
70	30	152-167	152-191	11	456
68	32	168-179			
66	34	180-191			
60	40	192-203	192-231	12	676
55	45	204-211			
50	50	212-219			
45	55	220-227			
40	60	228-242	232-235	13	86
34	66	243-247	236-247	14	325
30	70	248-260	248-269	15	246
26	74	251-258			
20	80	259-266			
16	84	267-274	270-300	16	279
10	90	275-282			
5	95	283-290			
0	100	291-300			

III.1.3.4. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle

Parmi les fractions regroupées, seules N° 5, 9 et 13 ont été étudiées, à cause de leur simplicité et de leur poids relativement important.

▪ **Etude de la fraction 5**

Cette fraction est soumise à une séparation par CC. Elle est déposée sur une colonne (diamètre 15 mm). La quantité de la phase stationnaire est de 30 g de gel de silice, éluée avec un gradient $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ de polarité croissante. Des volumes de 5 ml sont recueillis et regroupés selon leur profil chromatographique sur CCM, pour donner dix sous fractions. Les résultats de cette séparation sont comme suit :

Tableau 19. Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 5

Système de solvants (%)		Sous fractions	Sous fractions regroupées	N° de la sous fraction	Poids (mg)
CHCl_3	CH_3COCH_3				
100	0	1-17	1-56	1	26
99	1	18-39			
98	2	40-48			
97	3	49-56			
96	4	57-63	57-85	2	20
95	5	64-70			
94	6	71-78			
93	7	79-85			
92	8	86-92			
91	9	93-100	86-100	3	23
90	10	101-108	101-126	4	29
89	11	109-126			
88	12	127-143	127-143	5	230
87	13	144-152	144-152	6	23
86	14	153-178	153-160	7	19
85	15	179-187	161-187	8	155
84	16	188-206	188-289	9	31
83	17	207-227			
82	18	228-253			
81	19	254-280			
80	20	281-289			
79	21	290-310			
78	22	311-329	290-370	10	29
77	23	330-342			
76	24	343-349			
75	25	350-356			
50	50	357-363			
0	100	364-370			

Les deux sous fractions N° 5 et 8 donnent chacune une seule tache de couleur violette sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm) en utilisant une plaque CCM analytique et un système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ (7/3, v/v). Ce fractionnement conduit à l'isolement des composés **6** et **7** des sous fractions **5** et **8** respectivement.

▪ **Etude de la fraction 9**

La fraction N° 9 a subi une séparation par perméation de gel selon le poids moléculaire. Elle est déposée sur une colonne (diamètre 15 mm), remplie de 30 g de gel sephadex LH 20, en utilisant un système isocratique DCM/MeOH (9/1, v/v) comme éluant. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau 20. Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 9

Système de solvants	Sous fractions regroupées	N° de sous fraction	Poids (mg)
90% DCM 10% MeOH	1-10	1	36
	11-33	2	47
	34-39	3	35
	40-47	4	33
	48-52	5	21

Le test sur plaque CCM de la sous fraction N° 3 éluee par le système de solvants DCM/MeOH (9/1, v/v) donne sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm) une tache de couleur bleue. C'est le composé **8** isolé des sous fractions regroupées **34-39**.

▪ **Etude de la fraction 13**

Un précipité de couleur jaune s'est formé. Ce précipité est filtré ($m_{\text{précipité}} = 56$ mg). Il est dissous dans CH_3COCH_3 et testé en utilisant une plaque CCM avec un système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3$ (7/3, v/v). Il a donné une seule tache de couleur violette sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm). C'est le composé **9** isolé des fractions regroupées **232-235**.

III.2. *Ferula vesceritensis*

III.2.1. Récolte du matériel végétal

La plante *Ferula vesceritensis* a été récoltée en Mai 2013, dans deux régions différentes, l'une dans la région de Constantine (Est de l'Algérie), et l'autre dans la région de Mogheul (Sud Ouest de Bechar (Sud de l'Algérie)). Elles ont été identifiées par Monsieur Mohamed KAABACHE, Professeur au Département de Biologie et Ecologie Végétales, Université Ferhat Abbas Sétif 1. Des spécimens ont été déposés à l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1. Après un séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les parties aériennes ont été broyées et pesées :

m_1 : masse *Ferula vesceritensis* de Constantine : 1000 g

m_2 : masse *Ferula vesceritensis* de Mogheul (Bechar) : 1000 g

III.2.2. Protocole d'extraction

Les parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Ferula vesceritensis* (Constantine et Bechar) sont mises à macérer dans un mélange de solvants EtOH/H₂O (7/3, v/v) à température ambiante pendant 72 heures. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macérâts sont filtrés et les filtrats sont récupérés.

Les extraits hydroalcooliques obtenus sont concentrés sous vide (à température 30-35 °C), puis ils sont dilués avec l'eau distillée (à raison de 400 ml pour 1000 g du matériel végétal sec) légèrement chauffée (25-30 °C), on agite les mélanges et on les laisse pendant une nuit au frais, puis on filtre.

Les solutions ainsi obtenues (Filtrats) sont soumises à une extraction de type liquide-liquide successivement avec de l'éther de pétrole, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et du *n*-butanol.

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées pour donner les masses suivantes :

Tableau 21. Masse et rendement des extraits de *Ferula vesceritensis*

Plante	<i>F. vesceritensis</i> (FvC)		<i>F. vesceritensis</i> (FvB)	
	Masse (g)	Rendement (%)	Masse (g)	Rendement (%)
Ether de pétrole	0,04	0,004	0,05	0,005
Chloroformique	5	0,5	4	0,4
Acétate d'Ethyle	5	0,5	4	0,4
<i>n</i> -Butanol	10	1	8	0,8

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 7.

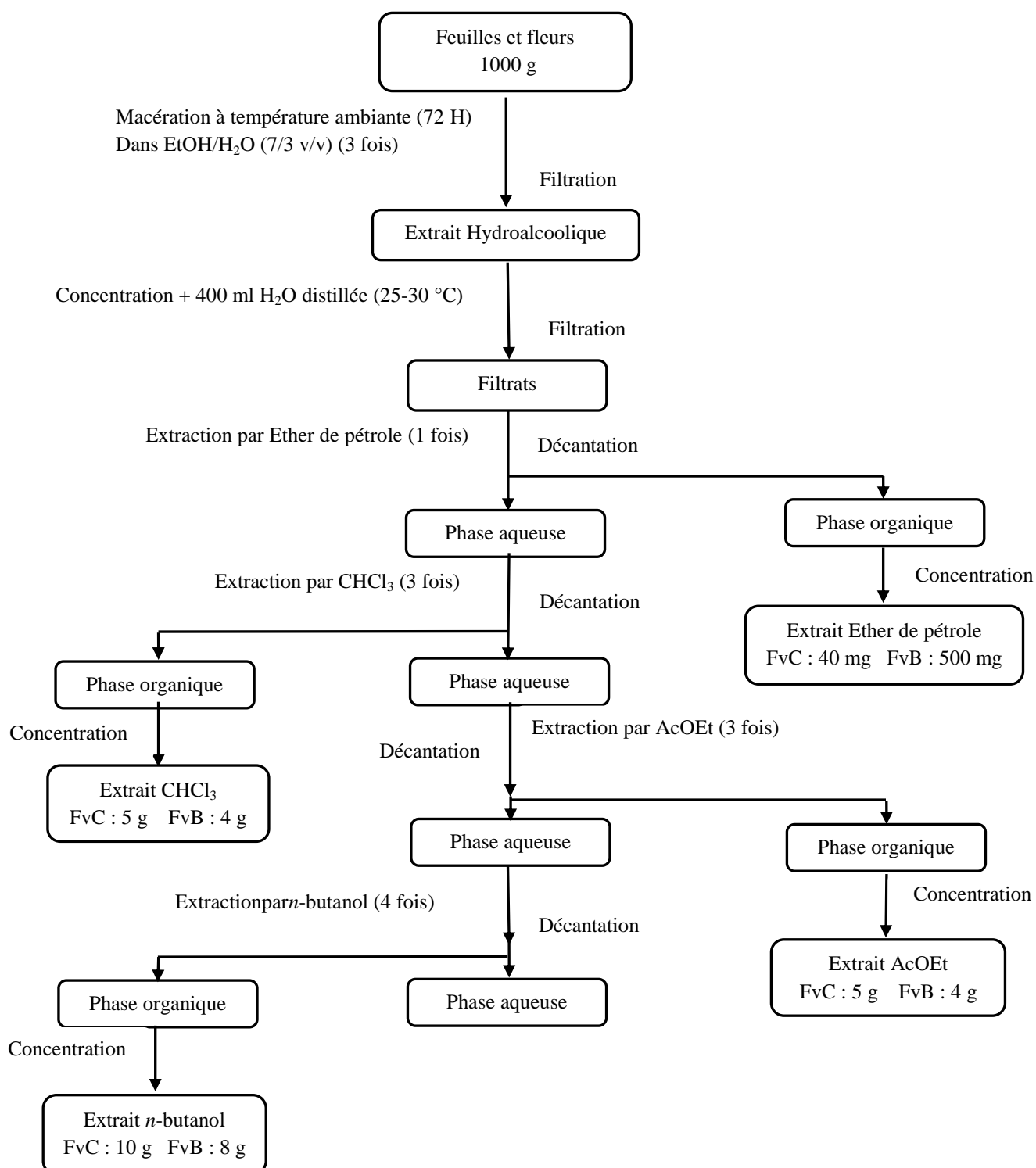


Figure 7. Protocole d'extraction de *Ferula vesceritensis*

III.2.3. Etude des extraits

Les extraits obtenus sont analysés par CCM pour déterminer le meilleur système d'élution qui donne les meilleurs résultats de séparation en CC.

Et comme la majorité des composés isolés précédemment de *Ferula vesceritensis* proviennent de l'extrait dichlorométhane, nous avons choisi d'étudier l'extrait acétate d'éthyle.

Nous retenons l'extrait dont le profil chromatographique signale la richesse en métabolites secondaires, à savoir, l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Constantine).

L'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Constantine) a subi une première étape de fractionnement sur colonne conduisant à l'obtention de certain nombre de fractions.

Les fractions obtenues sont analysées par CCM pour réunir les fractions qui présentent le même profile chromatographique, et de déterminer un nouveau système de solvants susceptible de mieux séparer les composés.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne de séphadex LH-20 de diamètres 40 mm, et une colonne de gel de silice (Merck 230-400 mesh) de diamètre 15 mm.

Les analyses par CCM ont été effectuées surdes plaques de gel de silice 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck). Après développement dans des cuves, les plaques ont été observées sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm). Ensuite, elles ont été pulvérisées par le réactif de la Vanilline- H_2SO_4 à 1%, puis chauffées jusqu'à apparition de taches de différentes couleurs.

III.2.3.1. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait acétae d'éthyle a subi une séparation par perméation selon le poids moléculaire.

Il a été déposé en haut d'une colonne (diamètre 40 mm), sur une couche de 20 cm de séphadex, élué par le système isocratique DCM/MeOH (9/1, v/v).

Des volumes de 50 ml sont recueillis et regroupés selon leur profil chromatographique sur CCM, pour donner cinq fractions. Le tableau 22 résume les résultats obtenus.

Tableau 22. Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Constantine).

Système de solvants	Fractions regroupées	N° de la fraction	Poids (mg)
90%DCM 10%MeOH	1-16	1	505
	17-25	2	410
	26-39	3	465
	40-61	4	653
	62-100	5	1423

III.2.3.2. Etude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle

On a procédé la séparation de la fraction N° 5 à cause de son poids relativement important.

▪ Etude de la fraction 5

La fraction N° 5 est soumise à une séparation par CC. Elle est déposée en haut d'une colonne (diamètre 15 mm), sur une couche de 30 cm de gel de silice utilisé comme phase stationnaire, et éluée par le système de solvants isocratique DCM/MeOH (7/3, v/v). Des volumes de 10 ml sont recueillis et regroupés selon leur profile chromatographique sur CCM, pour donner dix fractions.

Tableau 23. Résultat de la séparation sur colonne de la fraction 5

Système de solvants	Sous fractions regroupées	N° de la sous fraction	Poids (mg)
70 % DCM 30 % MeOH	1-20	1	70
	21-28	2	54
	29-33	3	44
	34-44	4	96
	45-70	5	180
	71-90	6	214
	91-110	7	177
	111-173	8	275
	174-190	9	186
	191-200	10	39

Les sous fractions N° 2, 4 et 9 donnent chacune une tache de couleur violette sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) en utilisant une plaque CCM et un système d'élution DCM/MeOH (9/1, v/v). Ce sont les composés 10, 11 et 12 isolés des sous fractions regroupées **21-28 (62-100)**, **34-44 (62-100)** et **174-190 (62-100)** respectivement.

Les travaux de séparation et de purification des composés isolés des deux espèces ont abouti à l'obtention de neuf composés de *Salvia phlomoides* et trois composés de *Ferula vesceritensis*.

Chapitre IV

Analyse structurale des composés isolés

Les composés isolés des deux espèces *Salvia phlomoides* et *Ferula vesceritensis* sont soumis à des analyses structurales pour identifier leur structure chimique.

IV.1. Appareillage

IV.1.1. Spectroscopie de RMN

Les spectres RMN 1D et 2D ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AVANCE III, 500 MHz pour ^1H et 125 MHz pour ^{13}C , en utilisant les solvants deutérés CDCl_3 et CD_3OD .

Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du TMS, utilisé comme référence interne (0 ppm).

Les constantes de couplage J ont été mesurées en Hz.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel TopSpin.

IV.1.1.2. Spectrométrie de masse

Les SM-HR-ESI ont été réalisés sur un spectromètre Brucker MicroToF en utilisant un système CLHP Agilent 1100 pour introduire les échantillons.

IV.1.1.3. Spectroscopie IR

Les spectres IR ont été enregistrés en utilisant un spectrophotomètre Perkin-Elmer (2000 IRTF), avec une fenêtre KBr.

IV.2. Détermination structurale des composés isolés

IV.2.1. Détermination structurale du composé 1

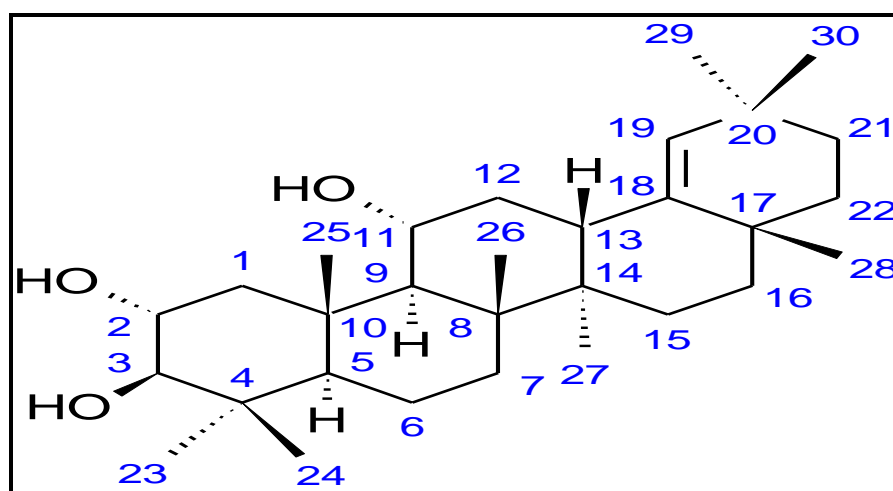


Figure 8. Structure du composé 1

La révélation de la plaque CCM du composé **1** avec de la Vanilline-H₂SO₄ à 1% suivi du chauffage donne une tache de couleur rose persistante. Ceci est en faveur de la présence d'un triterpène.

Le spectre de masse HR-ESI (Figure 9) du composé **1** montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 481,36522$ correspondant à $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 458,37545 indiquant une formule brute C₃₀H₅₀O₃, et un nombre d'insaturation $N_i = 6$.

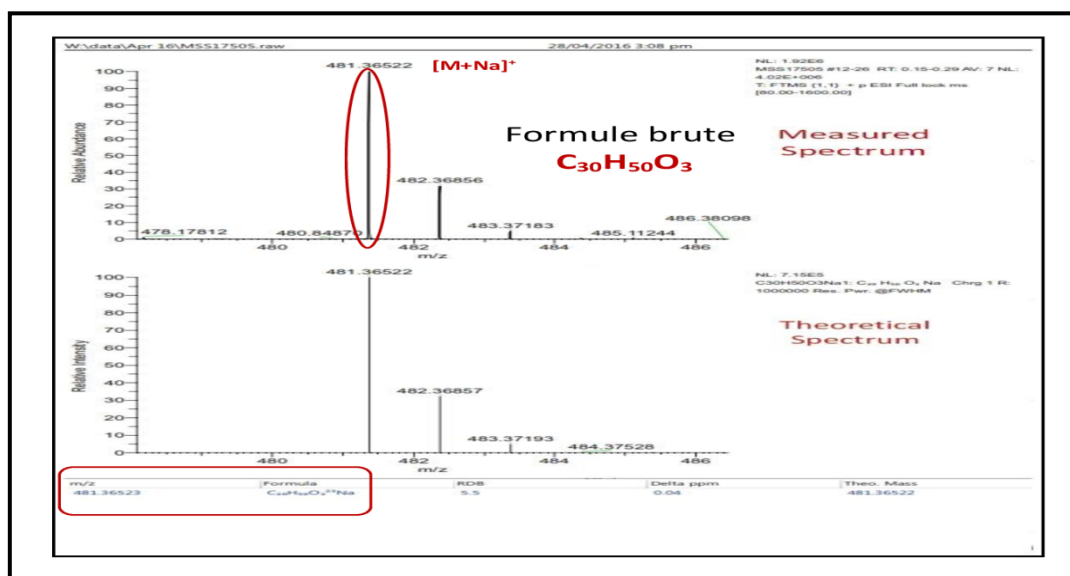


Figure 9. Spectre de masse HR-ESI du composé **1**

Le spectre IR (Figure 10) du composé **1** indique la présence de deux bandes caractéristiques : un groupe hydroxyle (-OH) à 3365,61 cm⁻¹, et une double liaison (C=C) à 1452,09 cm⁻¹.

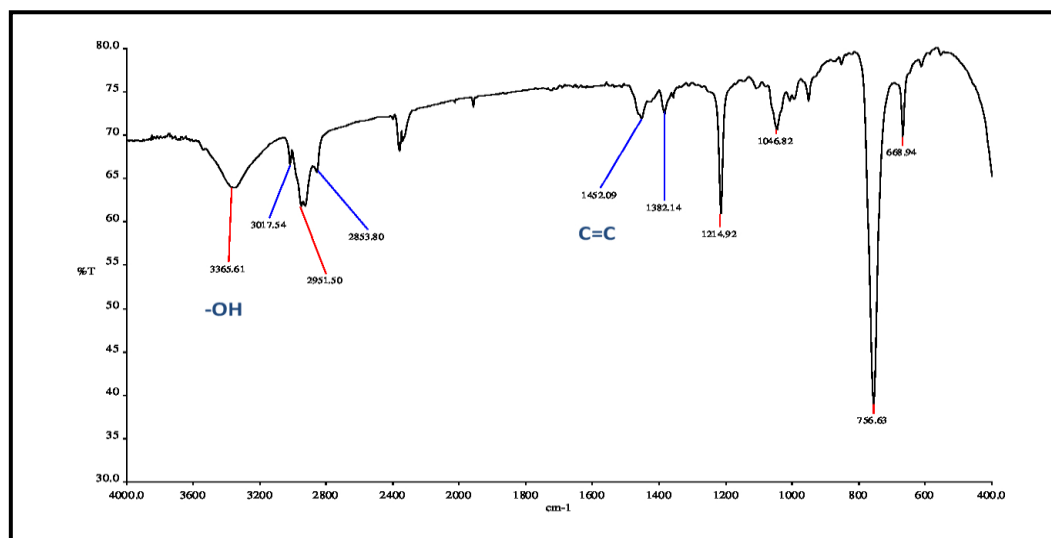


Figure 10. Spectre IR du composé **1**

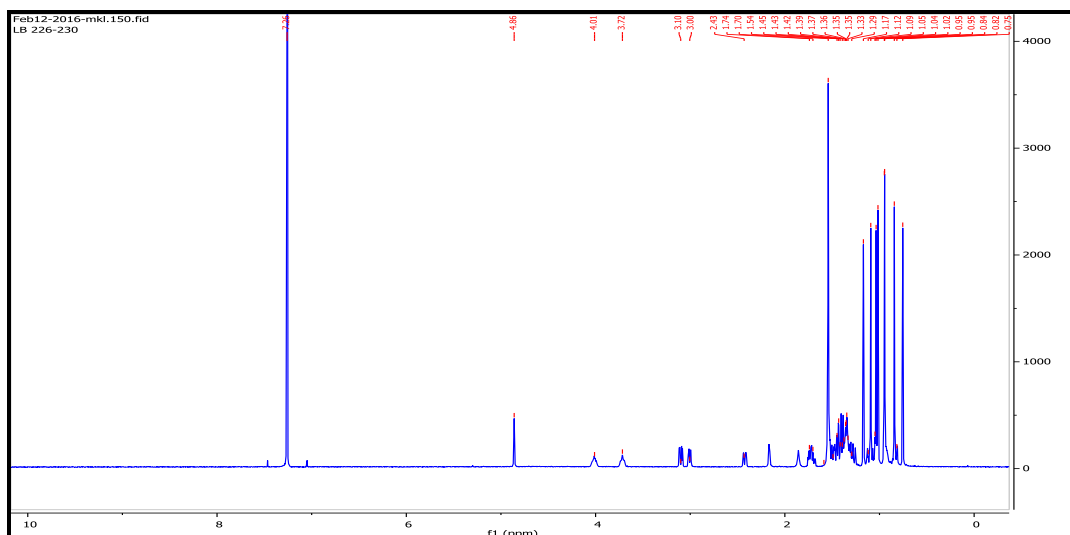


Figure 11. Spectre RMN¹H du composé **1** dans CDCl₃

Le spectre RMN ¹H (Figure 11-12) montre la présence de huit signaux sous forme de singlets dans la région blindée entre 0,75 et 1,17 ppm d'intégration de trois protons chacun, correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique, résonant à δ_H 0,75 ; 0,84 ; 0,94 ; 0,95 ; 1,01 ; 1,03 ; 1,09 et 1,17 ppm.

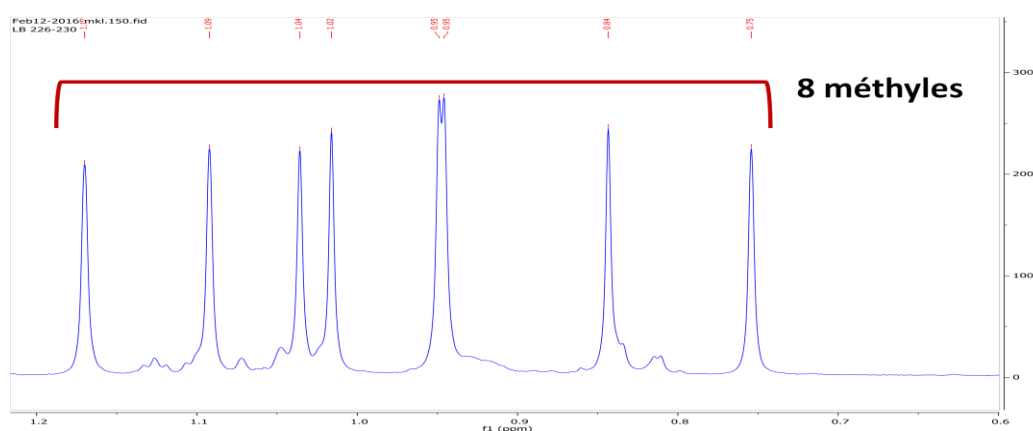


Figure 12. Spectre RMN¹H élargi -1- du composé **1** dans CDCl₃

Il montre aussi (Figure 13) un signal à δ_H 4,86 ppm sous forme d'un singlet large ($W_{1/2} = 4,1$ Hz) correspondant à un proton éthylénique, et trois signaux : deux sous forme d'un multiplet à δ_H 3,72 et 4,01 ppm, et un sous forme d'un doublet de doublets ($J = 9,6 ; 3,2$ Hz) à δ_H 3,00 ppm, correspondants à des protons de type oxyméthine.

A partir de ces protons, l'analyse des corrélations hétéronucléaire ¹J_{H-C} observées sur le spectre HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones les portant (Figure 14, 15).

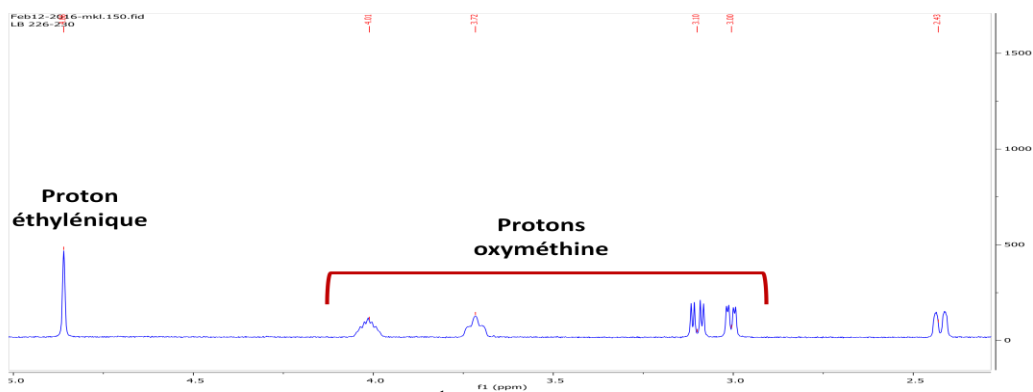


Figure 13. Spectre RMN¹H élargi -2- du composé **1** dans CDCl₃

δ_H 0,75 ppm, δ_C 14,6 ppm

δ_H 0,94 ppm, δ_C 31,5 ppm

δ_H 1,01 ppm, δ_C 25,5 ppm

δ_H 1,09 ppm, δ_C 17,6 ppm

δ_H 3,00 ppm, δ_C 83,6 ppm

δ_H 4,01 ppm, δ_C 71,1 ppm

δ_H 0,84 ppm, δ_C 17,0 ppm

δ_H 0,95 ppm, δ_C 29,3 ppm

δ_H 1,03 ppm, δ_C 28,9 ppm

δ_H 1,17 ppm, δ_C 18,3 ppm

δ_H 3,72 ppm, δ_C 69,5 ppm

δ_H 4,86 ppm, δ_C 130,2 ppm

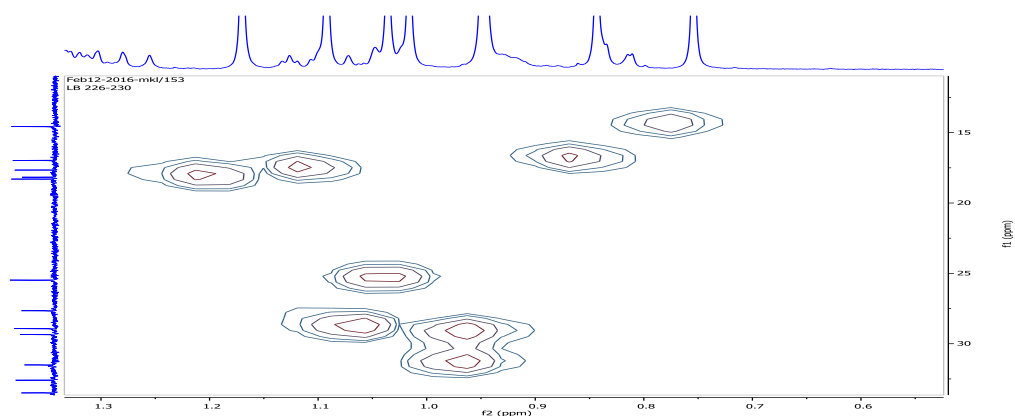


Figure 14. Spectre HSQC élargi -1- du composé **1** dans CDCl₃

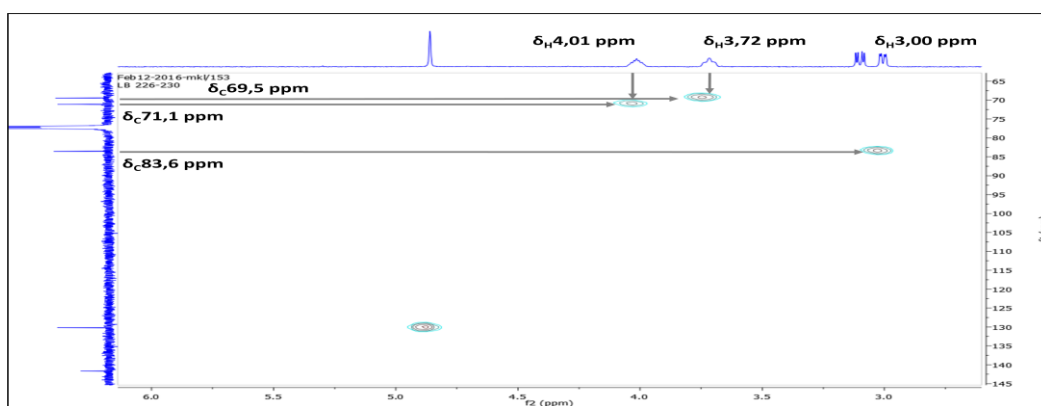
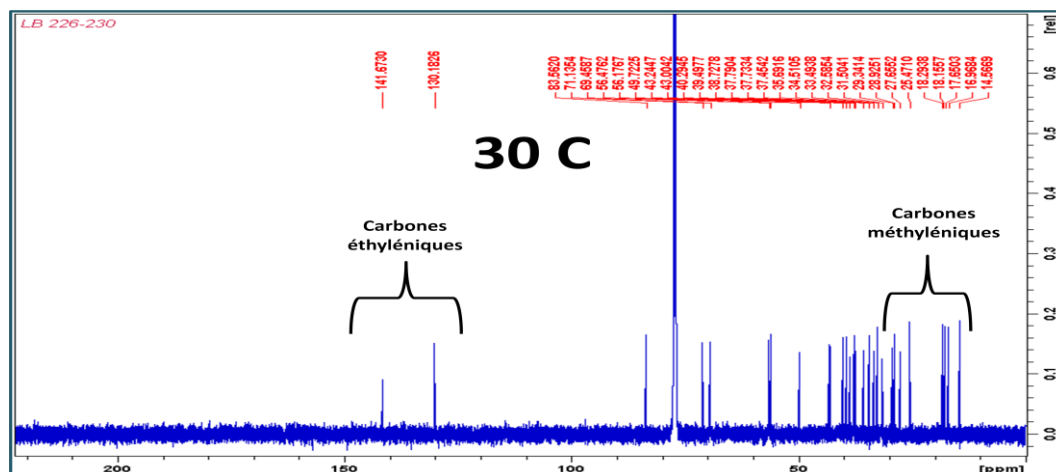


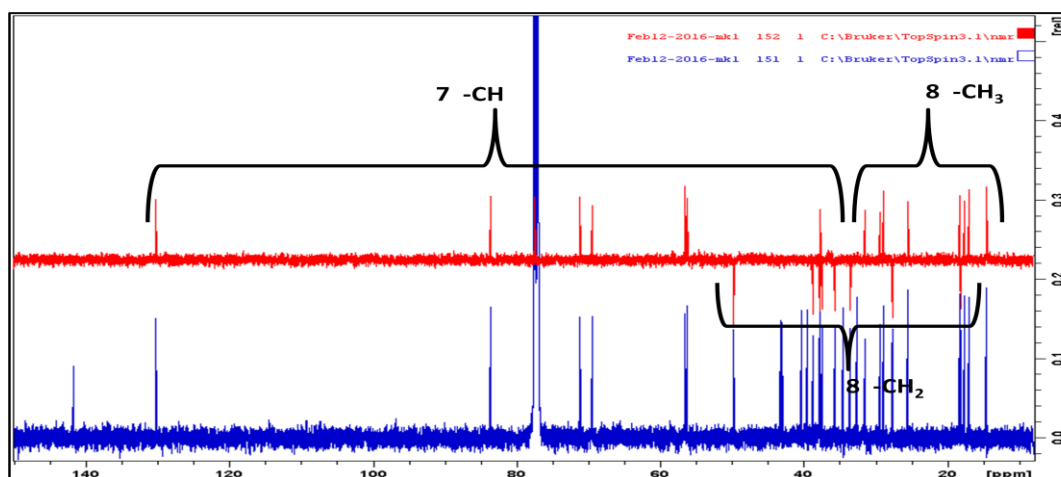
Figure 15. Spectre HSQC élargi -2- du composé **1** dans CDCl₃

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 16) du composé **1** révèle clairement la présence de trente atomes de carbone. Il confirme la présence d'un triterpène. Il nous a permis de distinguer huit signaux dans la région blindée entre 14,6 et 31,5 ppm correspondants aux huit méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique [**112**] résonant à δ_{C} 14,6 ; 17,0 ; 17,6 ; 18,3 ; 25,5 ; 28,9 ; 29,3 et 31,5 ppm, et dans la région déblindée deux signaux résonants à δ_{C} 130,2 et 141,7 ppm correspondant aux déplacements chimiques des carbones éthyléniques d'une double liaison.



La superposition des spectres RMN ^{13}C et DEPT-135 (Figure 17) du composé **2** montre la présence de :

- Sept carbones quaternaires résonant à δ_{C} 32,6 ; 34,5 ; 39,5 ; 40,3 ; 43,0 ; 43,2 ; et 141,7 ppm,
- Huit méthylènes résonant à δ_{C} 18,2 ; 27,7 ; 33,5 ; 35,7 ; 37,5 ; 37,8 ; 38,7 et 49,7 ppm,
- Et sept méthines résonant à δ_{C} 37,6 ; 56,2 ; 56,5 ; 70,1 ; 77,4 ; 81,0 et 130,2 ppm.



Cette analyse signifie un triterpène de type oléanane (Figure 18).

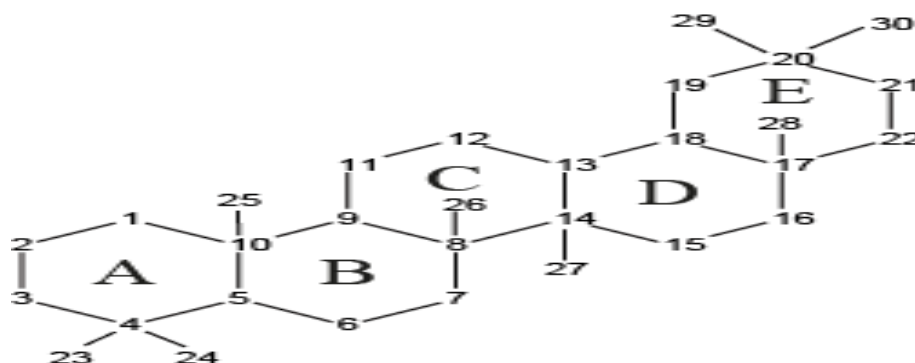


Figure 18. Structure d'un triterpène de type oléanane

La comparaison des données spectrales des groupements méthyles caractéristiques d'un squelette triterpénique pentacyclique identifiés précédemment (Figure 19) avec ceux rapportés dans la littérature [112], confirme l'identité des C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 et C-30. Les valeurs des δ_C et δ_H sont répertoriées dans le tableau 24.

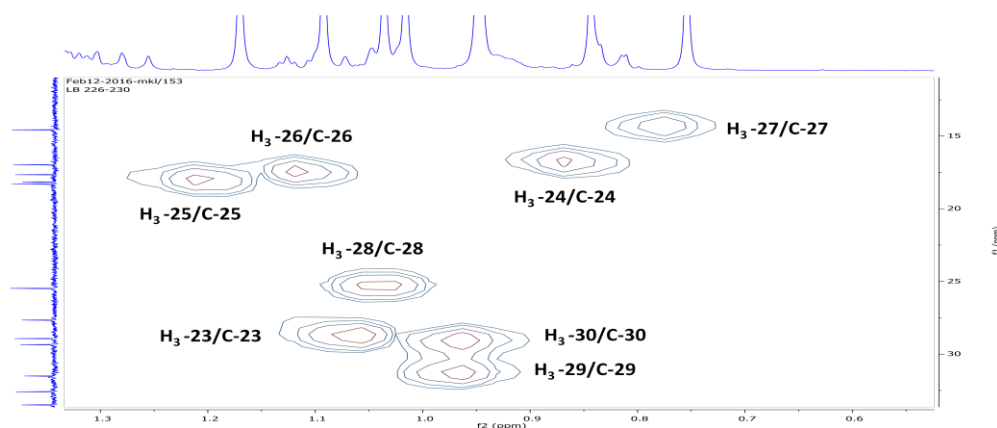


Figure 19. Spectre HSQC élargi -3- du composé **1** dans $CDCl_3$

A partir du proton résonant à δ_H 0,82 ppm, l'analyse des corrélations hétéronucléaire $^1J_{H-C}$ observées sur le spectre HSQC (Figure 20) permet d'attribuer le déplacement chimique de carbone le portant δ_C 56,2 ppm. Ce méthine d'après les données de la littérature [112] est attribuable à C-5.

Cette attribution est confirmée par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure 21) de ce carbone (C-5) avec les protons des groupements méthyles H_3 -23 (δ_H 1,03 ppm), H_3 -24 (δ_H 0,84 ppm) et H_3 -25 (δ_H 1,17 ppm), et un proton résonant à δ_H 1,39 ppm attribuable à H-9.

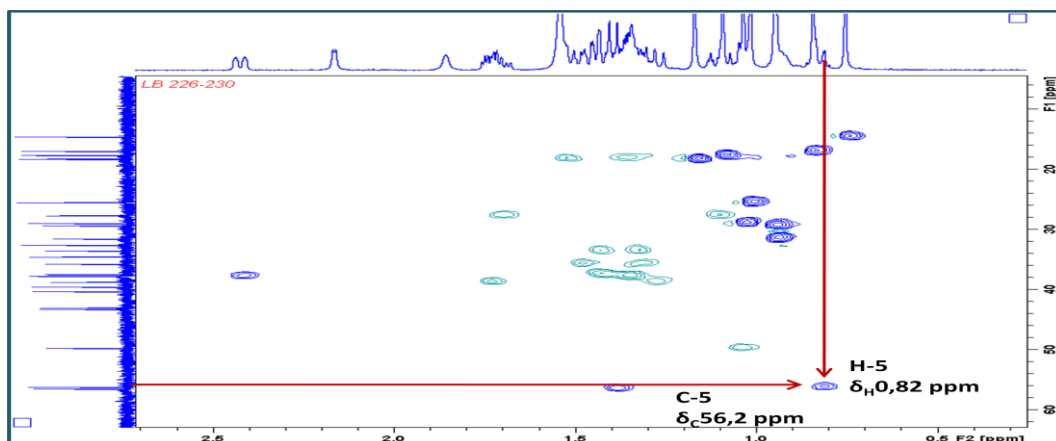


Figure 20. Spectre HSQC élargi -4- du composé 1 dans CDCl_3

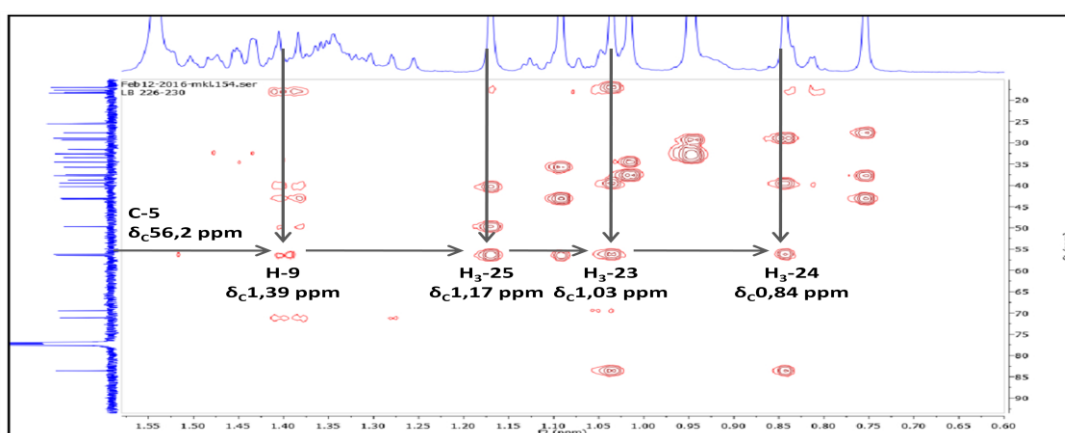


Figure 21. Spectre HMBC élargi -1- du composé 1 dans CDCl_3

Toujours sur le spectre HMBC (Figure 22), il montre aussi une tache de corrélation avec le proton oxyméthine résonnant sous forme d'un doublet de doublets ($J = 9,6 ; 3,2 \text{ Hz}$) à $\delta_{\text{H}} 3,00 \text{ ppm}$ attribuable à H-3, ce qui permet de placer un groupement hydroxyle (-OH) dans la position C-3.

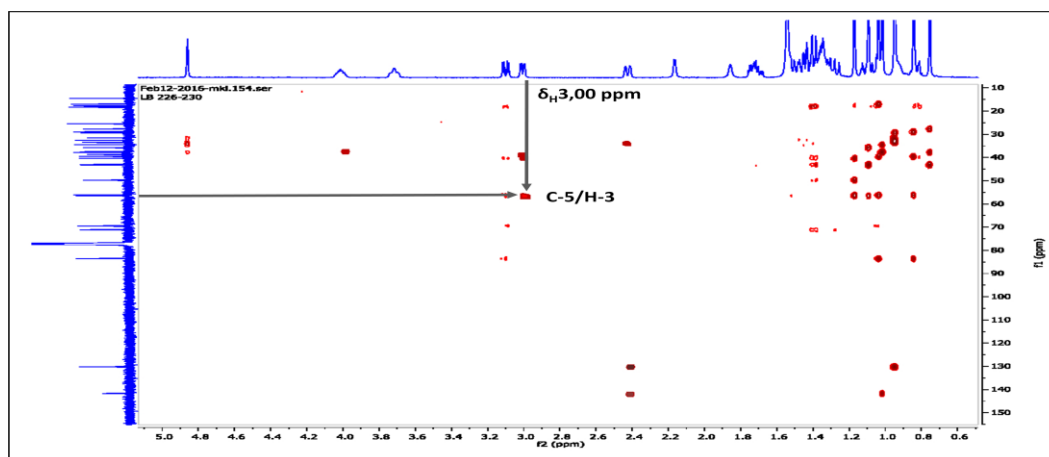


Figure 22. Spectre HMBC du composé 1 dans CDCl_3

Sur le spectre COSY (Figure 23), le proton oxyméthine H-3 montre une tache de corrélation avec l'oxyméthine résonant sous forme d'un multiplet à δ_H 3,72 ppm qui ne peut être attribué qu'au H-2. Cela permet de placer un deuxième groupement hydroxyle (-OH) en C-2.

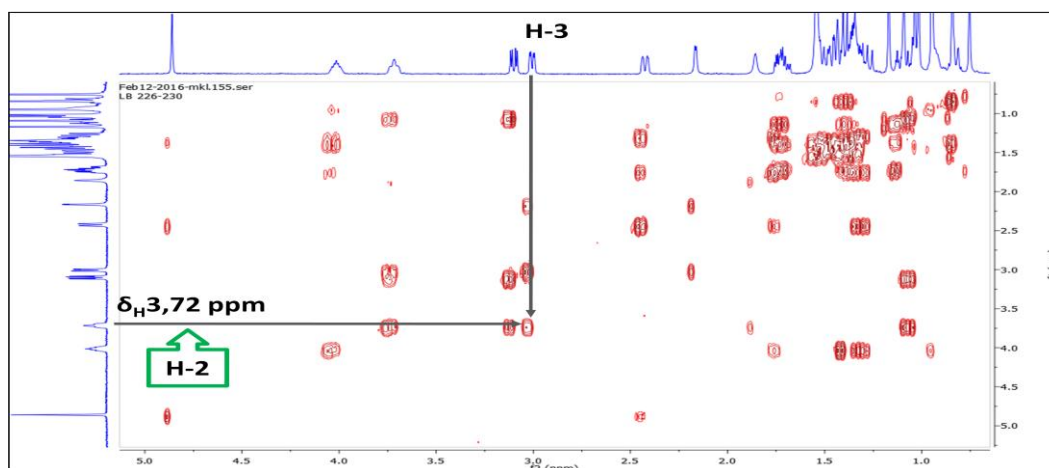


Figure 23. Spectre COSY du composé **1** dans $CDCl_3$

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure 24) entre le proton oxyméthine H-3 et les carbones quaternaires résonants à δ_C 39,5 ppm et δ_C 40,3 ppm permettent l'attribution de ces carbones à C-4 et C-10 respectivement.

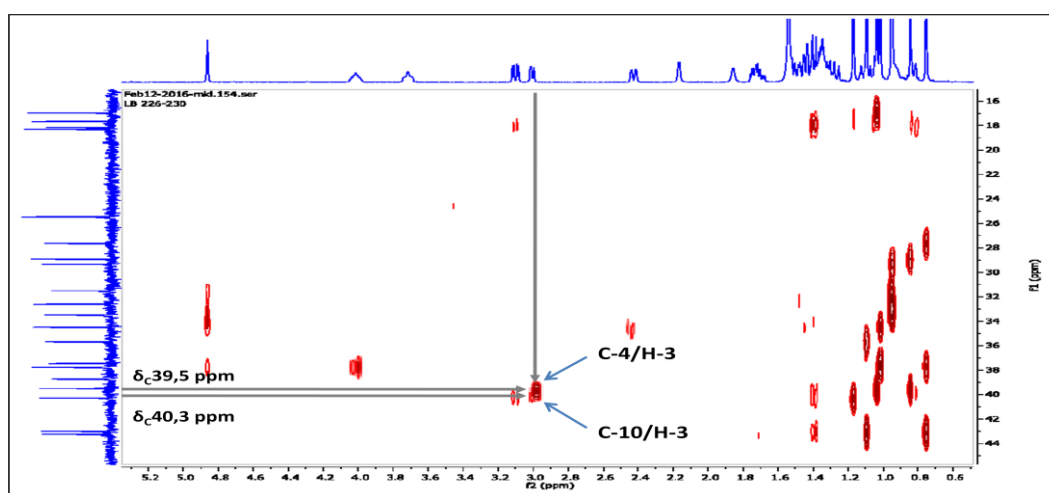


Figure 24. Spectre HMBC élargi -2- du composé **1** dans $CDCl_3$

Sur le spectre COSY (Figure 25), la tache de corrélation entre le proton H-9 (δ_H 1,39 ppm) et le proton oxyméthine résonant sous forme d'un multiplet à δ_H 4,01 ppm permet son attribution au proton H-11, ce qui confirme l'emplacement d'un troisième groupement hydroxyle (-OH) en C-11.

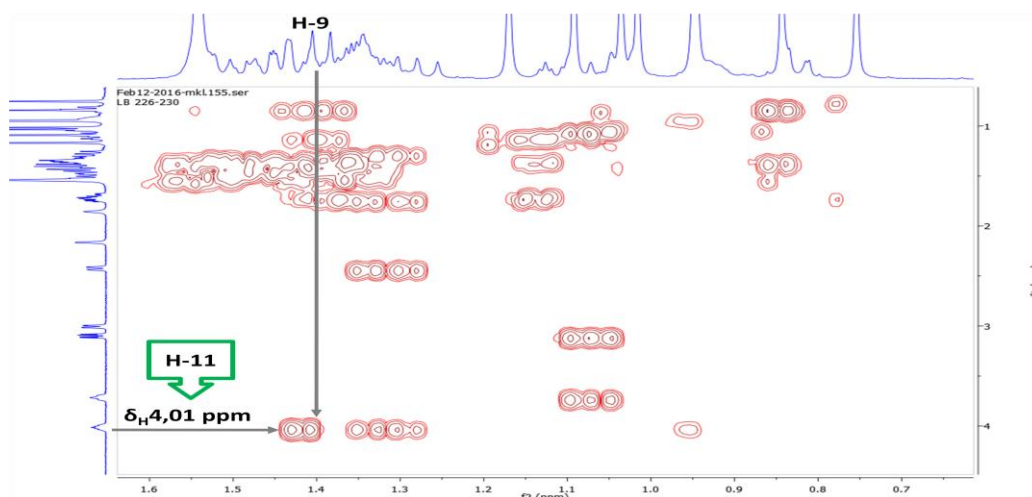


Figure 25. Spectre COSY élargi -1- du composé **1** dans CDCl_3

Sur le spectre HMBC (Figure 26), le proton H-11 (δ_{H} 4,01 ppm) montre une tache de corrélation avec le méthine résonant à δ_{C} 37,7 ppm, et ce dernier corrèle avec les protons H₃-27 (δ_{H} 0,75 ppm) et le proton éthylénique résonant sous forme d'un singulet large à δ_{H} 4,86 ppm.

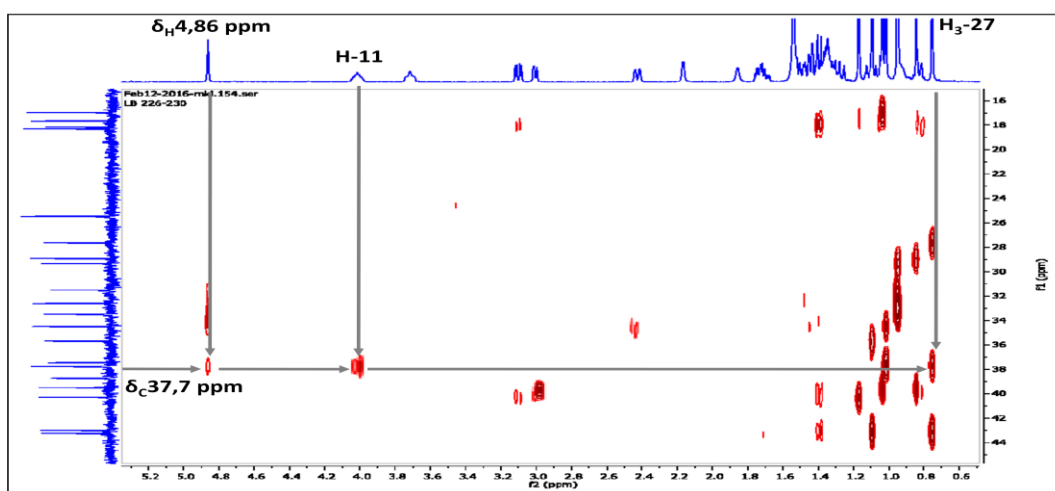


Figure 26. Spectre HMBC élargi -3- du composé **1** dans CDCl_3

Et selon le spectre HSQC (Figure 27), ce méthine (δ_{C} 37,7 ppm) porte le proton résonant sous forme d'un doublet large à δ_{H} 2,43 ppm, ce signal est attribuable sans ambiguïté à H-13.

Le spectre HMBC (Figure 28) montre également des taches de corrélation entre le proton H-13 (δ_{H} 2,43 ppm) et les carbones quaternaires résonant à δ_{C} 34,5 et 141,7 ppm, ainsi que le méthine résonant à δ_{C} 130,2 ppm, ces taches de corrélation permettent l'attribution de ces carbones à C-17, C-18 et C-19 respectivement. Ce dernier, et selon le spectre HSQC (Figure 15), porte le proton éthylénique résonant sous forme d'un singulet large à δ_{H} 4,86 ppm.

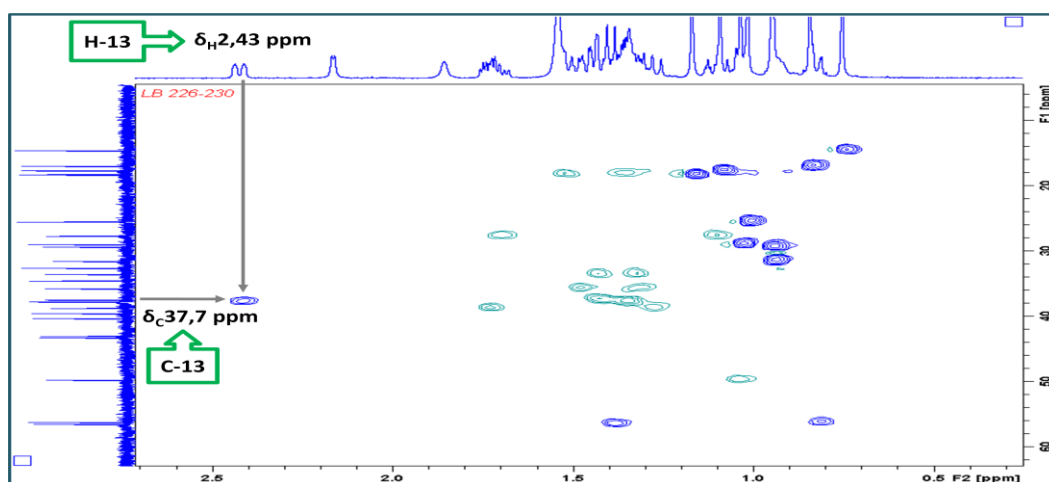


Figure 27. Spectre HSQC élargi -5- du composé **1** dans CDCl_3

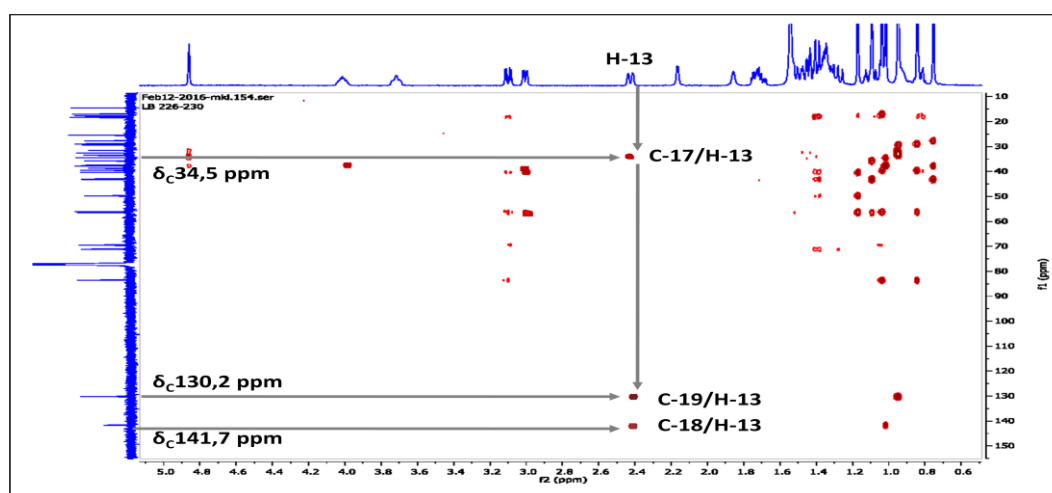


Figure 28. Spectre HMBC du composé **1** dans CDCl_3

Cette attribution est confirmée grâce aux corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure 29) entre le carbone résonant à δ_C 130,2 ppm attribuable à C-19 et les protons H₃-30 (δ_H 0,95 ppm) et H₃-29 (δ_H 0,94 ppm), et entre le carbone résonant à δ_C 141,7 ppm attribuable à C-18 et les protons H₃-28 (δ_H 1,01 ppm). Cela nous a permis de localiser la double liaison entre C-18 et C-19.

La configuration relative du composé **1** a été déterminée en utilisant le spectre NOESY (Figure 30). Les corrélations observées entre H-3/H₃-23, H-3/H-5, H-2/H₃-24, H-2/H₃-25, H₃-24/H₃-25, H-5/H-9, H-9/H₃-27, H-11/H₃-26, H-11/H₃-25, H-13/H₃-26, H-13/H₃-28, H-19/H-12 α et β , H-19/H₃-29, H-19/H₃-30, confirment que les groupements hydroxyles portés par C-2 et C-11 sont de configuration α , et le groupement hydroxyle porté par C-3 est de configuration β .

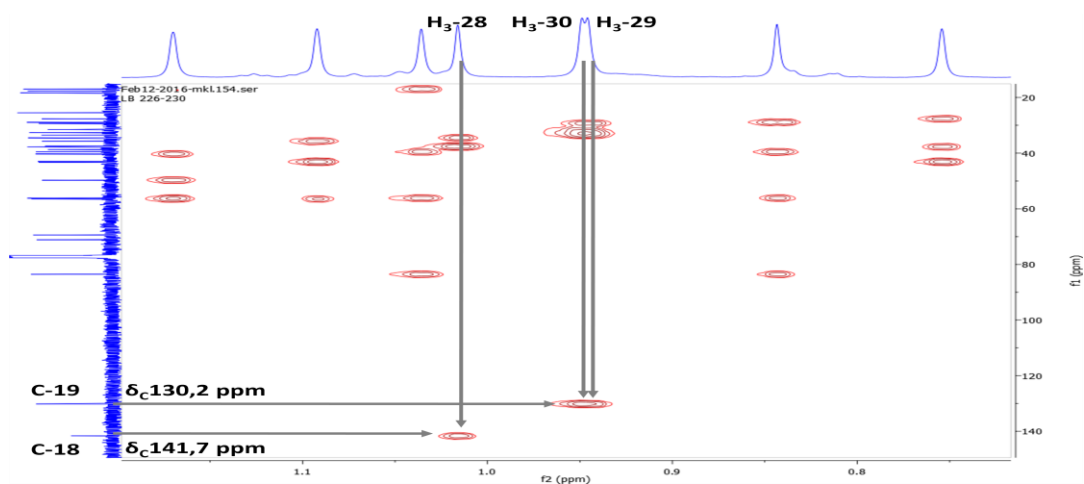


Figure 29. Spectre HMBC élargi-4- du composé 1 dans CDCl_3

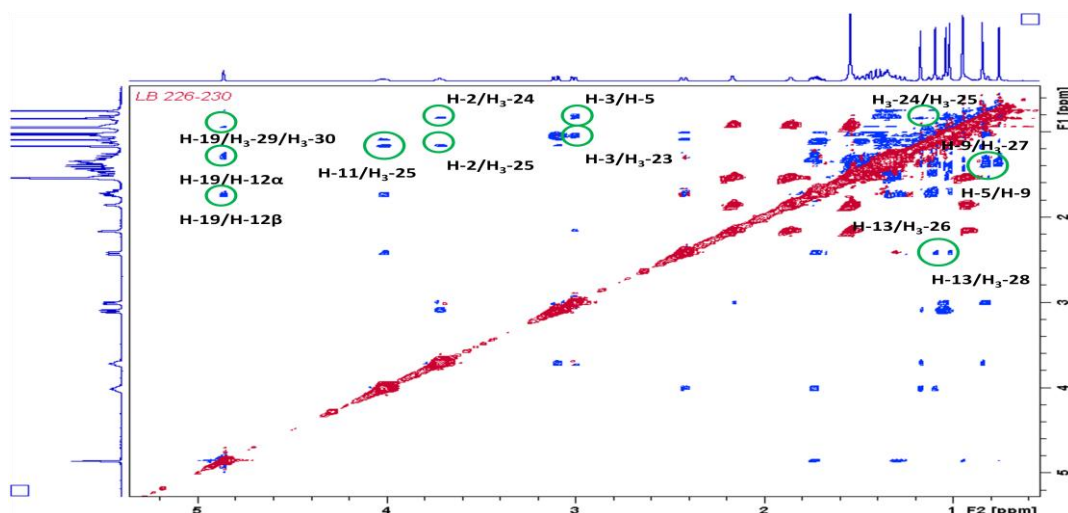


Figure 30. Spectre NOESY -1- du composé 1 dans CDCl_3

Le spectre HSQC (Figure 31) indique l'attribution du déplacement chimique du carbone C-1 résonant à δ_C 49,7 ppm avec les protons H-1 résonant à δ_H 1,05 et 3,10 ppm.

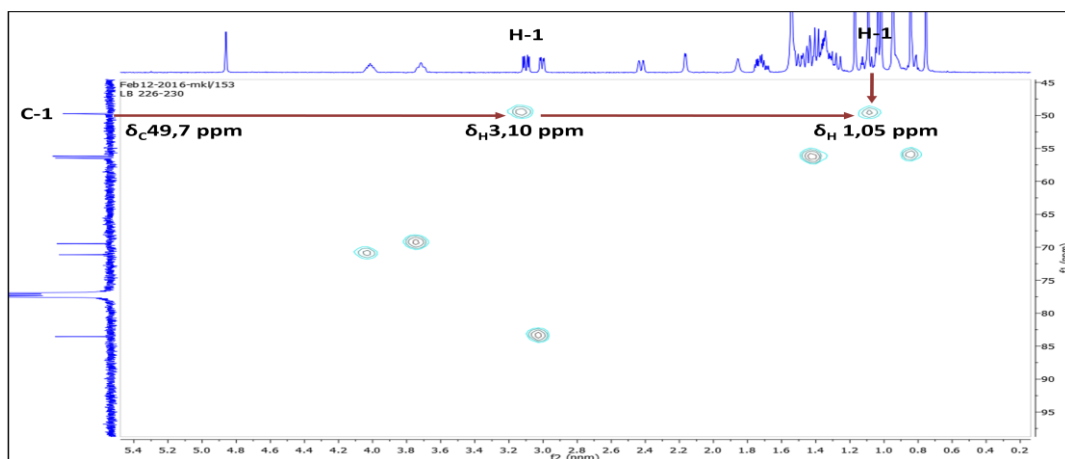


Figure 31. Spectre HSQC élargi -6- du composé 1 dans CDCl_3

Le proton résonant à δ_H 3,10 ppm corrèle avec les protons H₃-25 résonant à δ_H 1,17 ppm sur le spectre NOESY (Figure 32), ce signal est attribuable à H-1 β . La valeur du déplacement chimique de H-1 β indique que celui-ci est fortement déblindé, ceci est dû à l'influence des deux groupements hydroxyles en position C-2 α et C-11 α . Celui-ci est en position équatoriale, il se trouve spatialement entre les atomes d'oxygène de ces deux groupements qui sont également en position équatoriale.

L'effet du groupe 11 α -hydroxy sur la résonance de H-1 β a été également observé dans le composé 3 β , 11 α , 28-trihydroxyolean-18-ène, dans lequel le proton H-1 β résonne à δ_H 2,67 ppm [113].

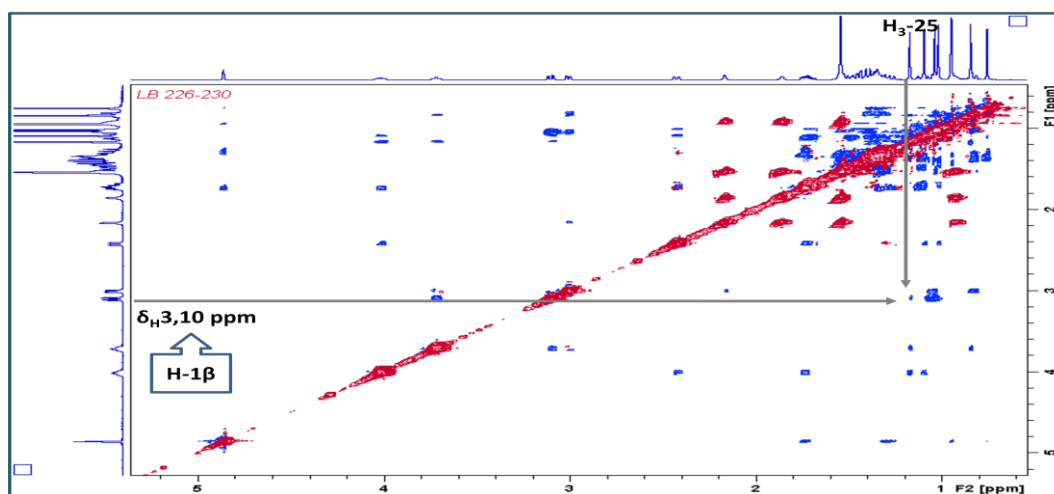


Figure 32. Spectre NOESY -2- du composé **1** dans CDCl₃

Dans le cas de notre composé, les effets simultanés des groupements hydroxyles en C-11 α et C-2 α provoquent un déblindage déplaçant la résonance vers δ_H 3,10 ppm. Cette attribution est confirmée par la valeur des constantes de couplage ($J = 12,8 ; 4,6$ Hz), au couplage géminale avec le proton H-1 α (12,8 Hz), et au couplage axial-équatorial avec le proton H-2 β (4,6 Hz).

L'ensemble de ces données permet d'attribuer au composé **1** la structure 2 α , 3 β , 11 α -trihydroxyoléane-18-ène. C'est une nouvelle structure d'un triterpène pentacyclique décrite pour la première fois dans la littérature.

Les données relatives aux spectres RMN ¹³C, DEPT-135 et RMN ¹H du composé **1** sont reportées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **1**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
1	49,7	CH ₂	δ 1,05 m β 3,10 dd ($J = 12,8 ; 4,6$ Hz)
2	69,5	CH	3,72 m
3	83,6	CH	3,00 dd ($J = 9,6 ; 3,2$ Hz)
4	39,5	C	-
5	56,2	CH	0,82 m
6	18,2	CH ₂	δ 1,58 m β 1,37 m
7	37,5	CH ₂	δ 1,35 m β 1,49 m
8	43,2	C	-
9	56,5	CH	1,39 m
10	40,3	C	-
11	71,1	CH	4,01 m
12	38,7	CH ₂	δ 1,29 m β 1,74 m
13	37,7	CH	2,43 doublet large ($W_{1/2} = 19,7$ Hz)
14	43,0	C	-
15	27,7	CH ₂	δ 1,12 m β 1,70 m
16	35,7	CH ₂	δ 1,35 m β 1,43 m
17	34,5	C	-
18	141,7	C	-
19	130,2	CH	4,86 singulet large ($W_{1/2} = 4,1$ Hz)
20	32,6	C	-
21	33,5	CH ₂	δ 1,33 m β 1,45 m
22	37,8	CH ₂	δ 1,35 m β 1,42 m
23	28,9	CH ₃	1,03 s
24	17,0	CH ₃	0,84 s
25	18,3	CH ₃	1,17 s
26	17,6	CH ₃	1,09 s
27	14,6	CH ₃	0,75 s
28	25,5	CH ₃	1,01 s
29	31,5	CH ₃	0,94 s
30	29,3	CH ₃	0,95 s

IV.2.2. Détermination structurale du composé 2

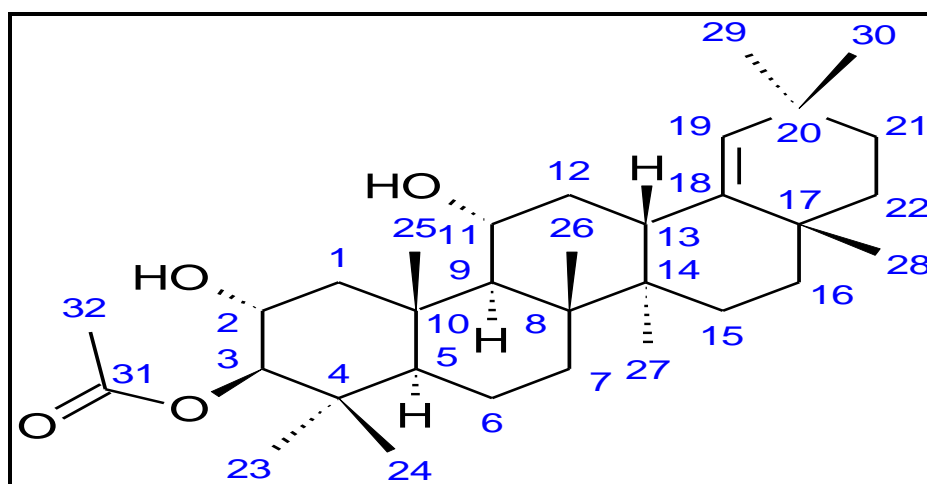


Figure 33. Structure du composé 2

La révélation de la plaque CCM du composé 2 avec de la Vanilline-H₂SO₄ à 1% suivi du chauffage donne une tache de couleur rose persistante. Ceci est en faveur de la présence d'un triterpène.

Le spectre de masse HR-ESI (Figure 34) du composé 2 montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 523,37570$ correspondant à $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 500,385931 indiquant une formule brute C₃₂H₅₂O₄ et un nombre d'insaturation $N_i = 7$.

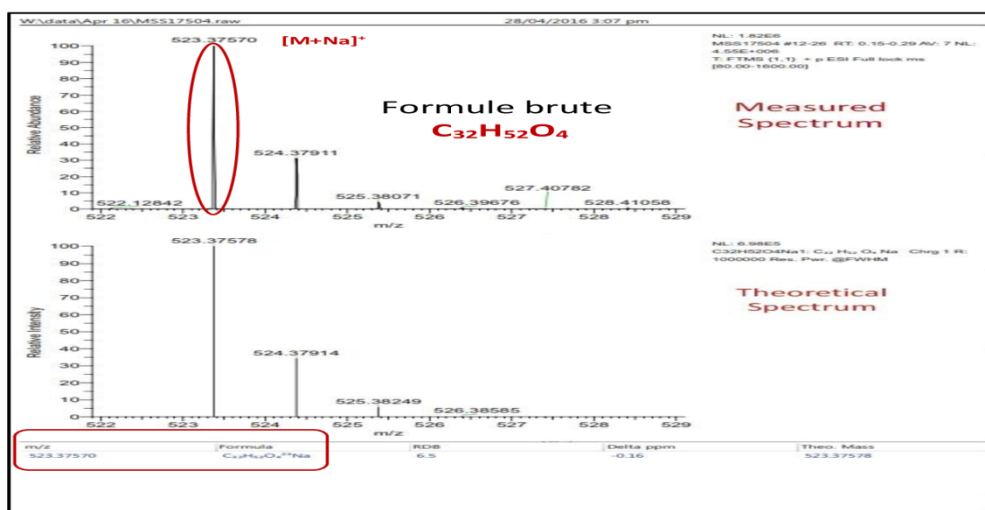


Figure 34. Spectre de masse HR-ESI du composé 2

Le spectre IR (Figure 35) indique la présence de trois bandes caractéristiques : un groupe hydroxyle (-OH) à 3368,53 cm⁻¹, un carbonyle (C=O) à 1720,55 cm⁻¹, et une double liaison (C=C) à 1453,59 cm⁻¹.

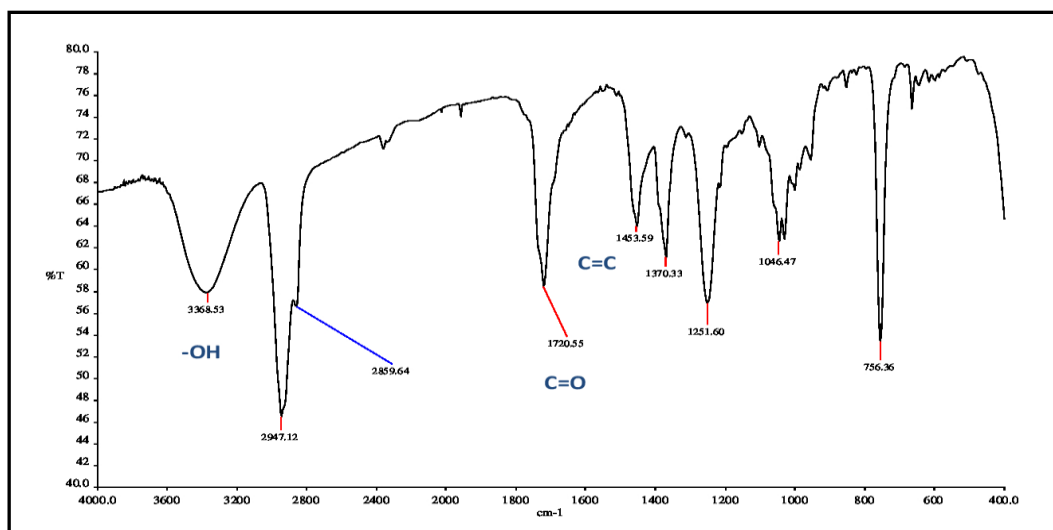


Figure 35. Spectre IR du composé 2

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé 2 présentent de grandes similitudes avec ceux du composé 1 décrit précédemment, avec l'existence de quelques différences.

Le spectre RMN ^1H (Figure 36, 37) montre la présence des huit signaux correspondant aux huit méthyles oléaniques résonant à δ_{H} 0,75 ($\text{H}_3\text{-27}$); 0,88 ($\text{H}_3\text{-24}$); 0,94 ($\text{H}_3\text{-29}$); 0,95 ($\text{H}_3\text{-30}$); 0,99 ($\text{H}_3\text{-23}$); 1,01 ($\text{H}_3\text{-28}$); 1,08 ($\text{H}_3\text{-26}$) et 1,17 ($\text{H}_3\text{-25}$) ppm.

Il montre par ailleurs (Figure 38), les autres signaux de type oxyméthine à δ_{H} 3,81 et 4,01 ppm correspondant aux protons $\text{H-2}\beta$ et $\text{H-11}\beta$ ainsi que le signal à δ_{H} 4,87 ppm correspondant au proton H-19 .

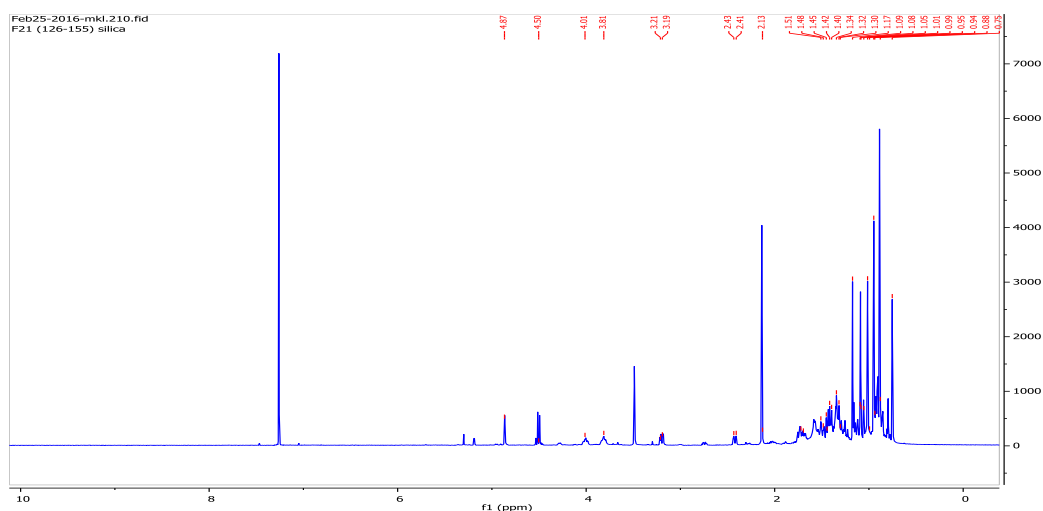


Figure 36. Spectre RMN ^1H du composé 2 dans CDCl_3

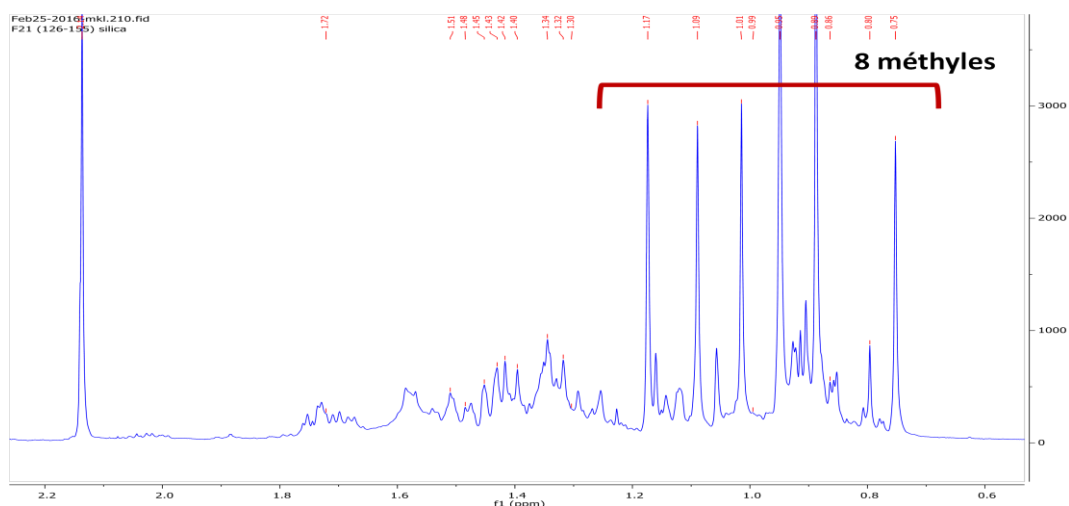


Figure 37. Spectre RMN¹H élargi -1- du composé **2** dans CDCl₃

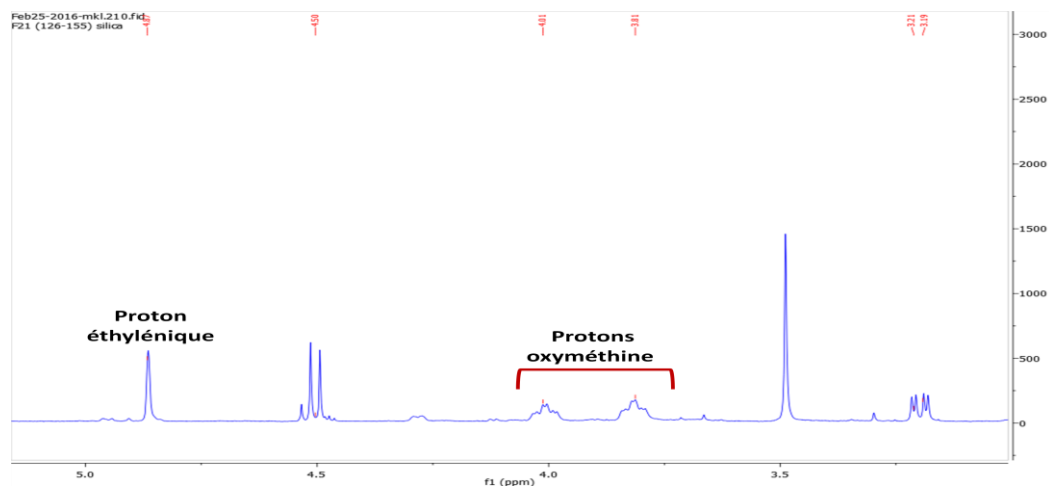


Figure 38. Spectre RMN¹H élargi -2- du composé **2** dans CDCl₃

Comme dans le composé **1**, il existe deux groupements hydroxyles en C-2 et C-11. Ceci est confirmé par l'observation de corrélations sur le spectre HSQC (Figure 39) qui permet d'associer les protons de type oxyméthine H-2 (δ_H 3,81 ppm) et H-11 (δ_H 4,01 ppm) aux carbones résonant respectivement à δ_C 67,8 et δ_C 71,0 ppm, et sur le spectre COSY (Figure 40) qui montre les taches de corrélation entre H-9 (δ_H 1,40 ppm) et H-11 (δ_H 4,01 ppm).

De même, la double liaison est localisée entre C-18 (δ_C 141,6 ppm) et C-19 (δ_C 130,2 ppm), le spectre HMBC (Figure 41) montre les taches de corrélation entre C-18 et H₃-28, entre C-19 et H₃-29, et entre C-19 et H₃-30.

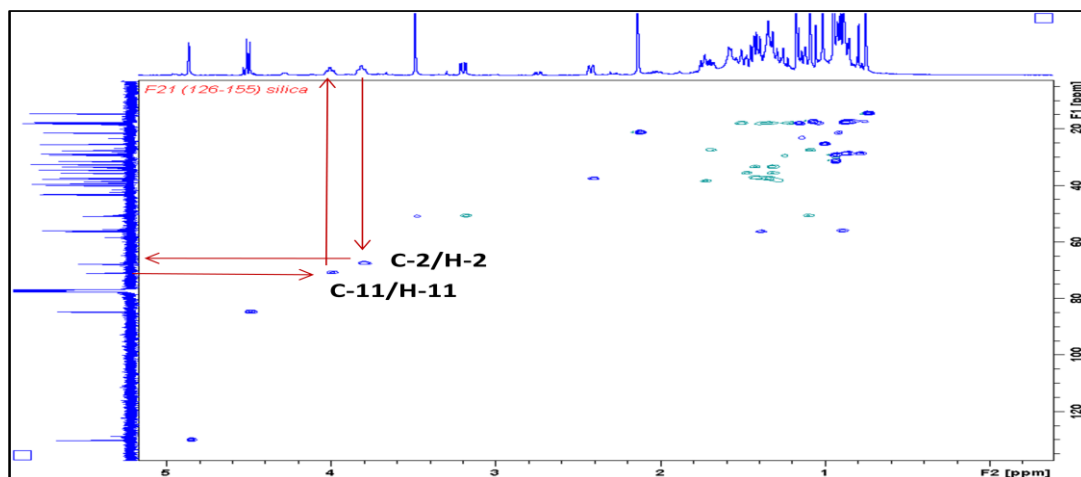


Figure 39. Spectre HSQC du composé **2** dans CDCl_3

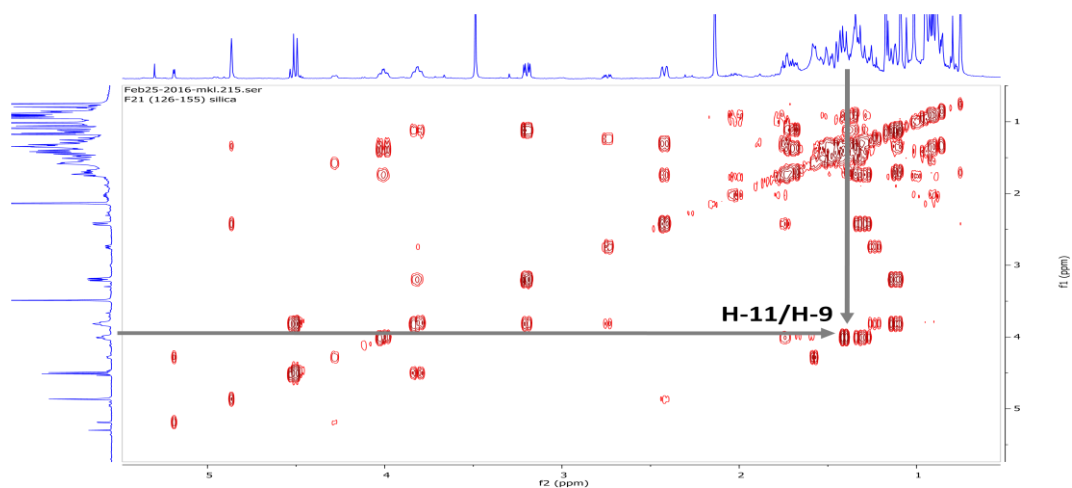


Figure 40. Spectre COSY -1- du composé **2** dans CDCl_3

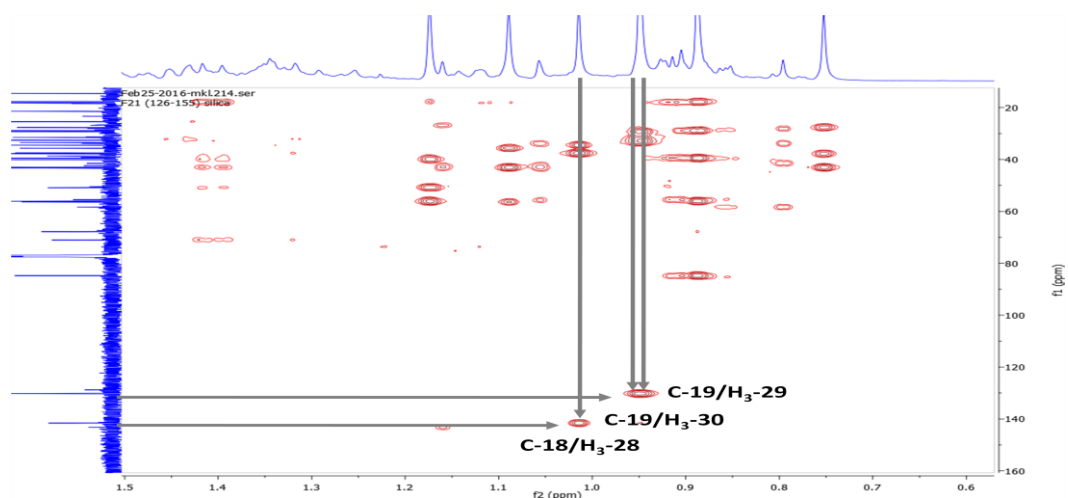


Figure 41. Spectre HMBC élargi -1- du composé **2** dans CDCl_3

L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT-135 (Figure 42 et 43) du composé **2** montre la présence de trente-deux signaux au lieu de trente. Ils nous permettent de distinguer les huit méthyles oléaniques résonant à δ_{C} 14,6 ; 17,6 ; 17,8 ; 18,2 ; 28,9 ; 29,3 ; 25,5 et 31,5 ppm attribuables respectivement aux C-27, C-24, C-26, C-25, C-23, C-30, C-28, C-29, les sept carbones quaternaires résonant à δ_{C} 32,6 ; 34,5 ; 39,5 ; 40,1 ; 43,0 ; 43,2 et 141,6 ppm, et les huit méthylènes résonant à δ_{C} 18,2 ; 27,7 ; 33,5 ; 35,6 ; 37,5 ; 37,8 ; 38,7 et 50,9 ppm.

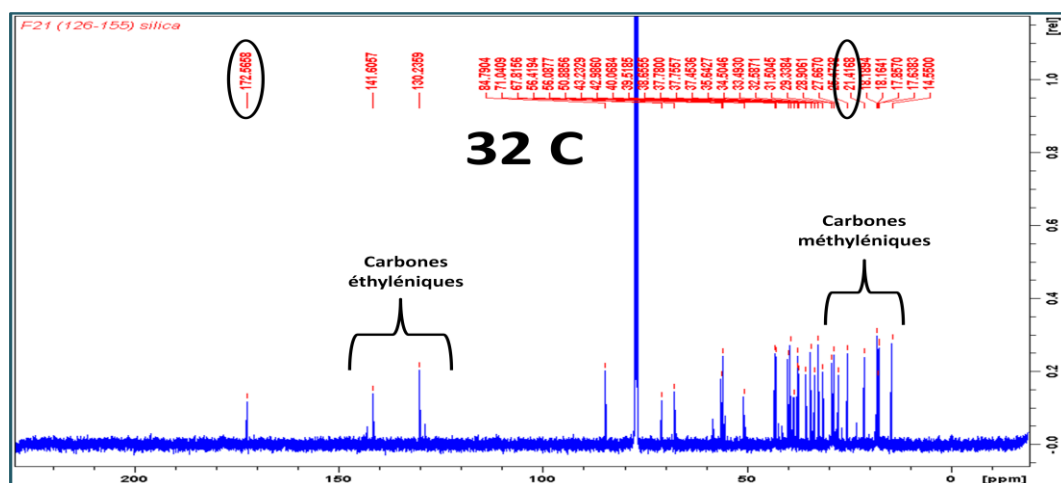


Figure 42. Spectre RMN ^{13}C du composé **2** dans CDCl_3

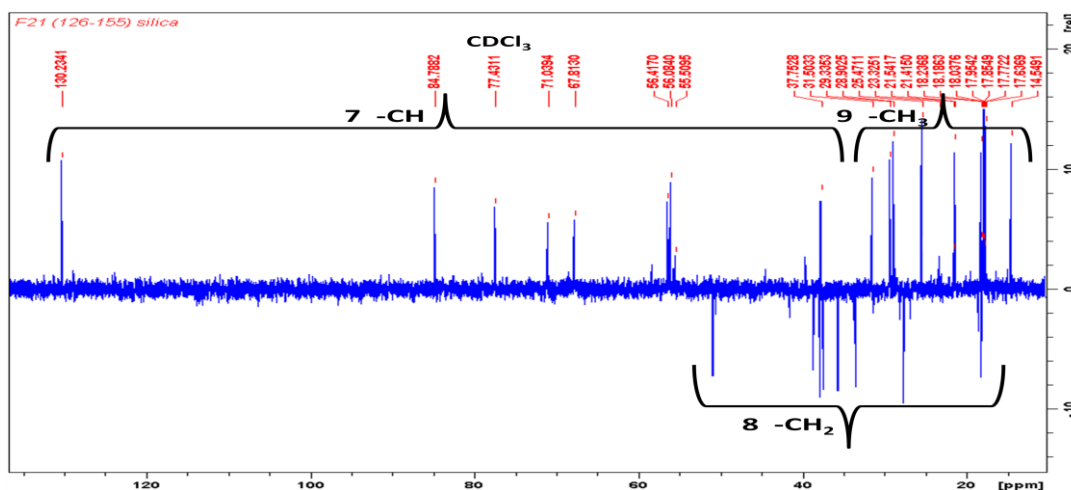


Figure 43. Spectre DEPT-135 du composé **2** dans CDCl_3

L'apparition d'un autre méthyle résonant à δ_{H} 2,13 ppm (Figure 44), le déblindage du signal H-3 α à δ_{H} 4,50 ppm (d, $J = 10,0$ Hz) (Figure 45), et l'apparition de deux carbones supplémentaires résonant à δ_{C} 21,4 et 172,6 ppm (Figure 42), indiquent la présence d'un groupement acétate porté par le carbone C-3 dans le composé **2**.

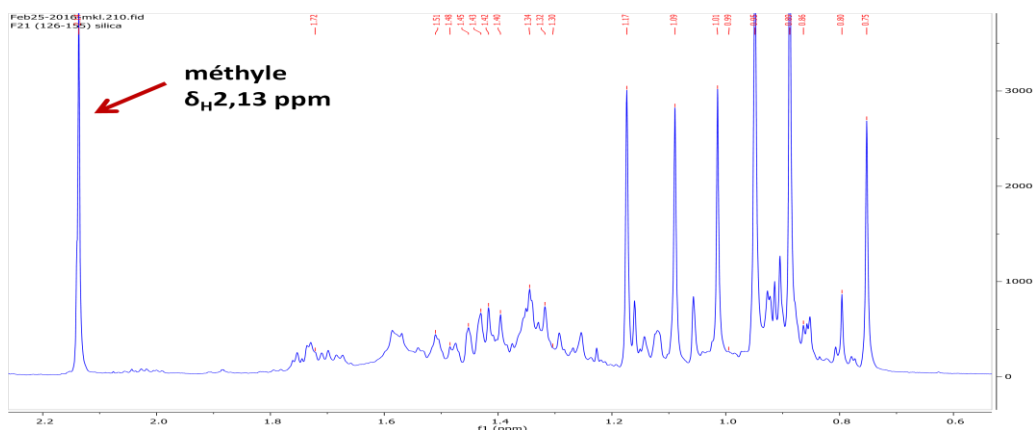


Figure 44. Spectre RMN¹H élargi -3- du composé **2** dans CDCl₃

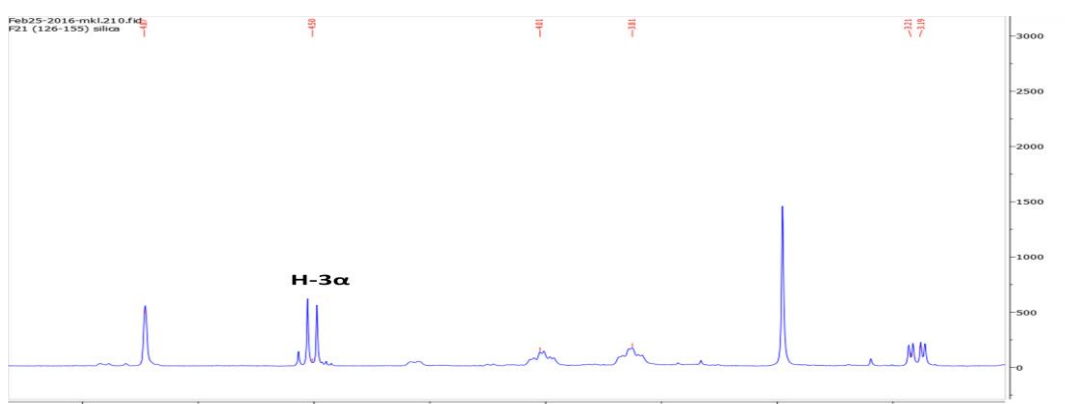


Figure 45. Spectre RMN¹H élargi -4- du composé **2** dans CDCl₃

Ceci est confirmé par la valeur du déplacement chimique du carbone C-3 à δ_C 84,8 ppm identifié grâce à sa corrélation avec le proton H-3 sur le spectre HSQC (Figure 46), et par les taches de corrélation entre H-3 α (δ_H 4,50 ppm), H-2 β (δ_H 3,81 ppm), H-1 β (δ_H 3,20 ppm) et H-1 α (δ_H 1,05 ppm) sur le spectre COSY (Figure 47).

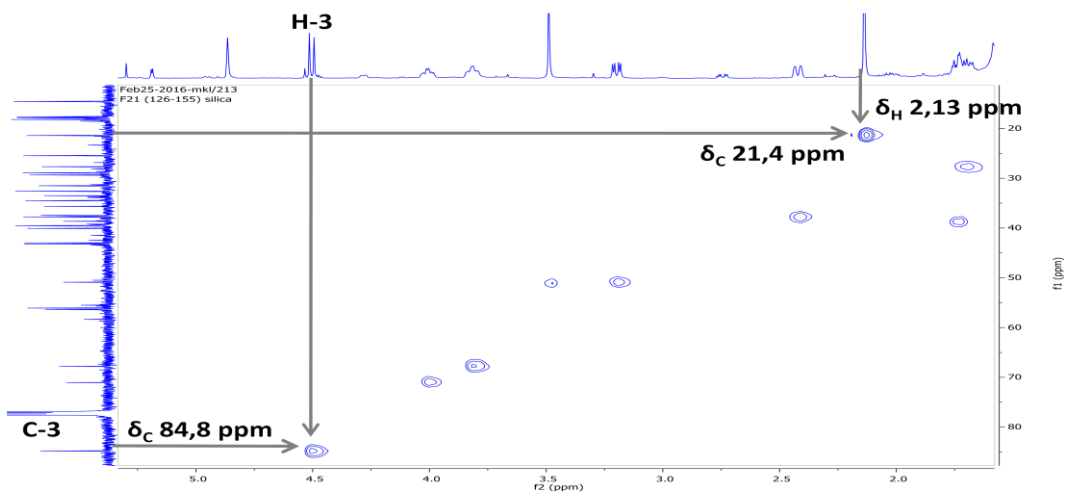


Figure 46. Spectre HSQC élargi -1- du composé **2** dans CDCl₃

De plus, la tache de corrélation observée entre le méthyle (δ_H 2,13 ppm) et le carbonyle (δ_C 172,6 ppm) sur le spectre HSQC (Figure 46).

Ainsi que les corrélations entre le carbone quaternaire (δ_C 21,4 ppm) et le proton H-3 (δ_H 4,50 ppm) sur le spectre HMBC (Figure 48).

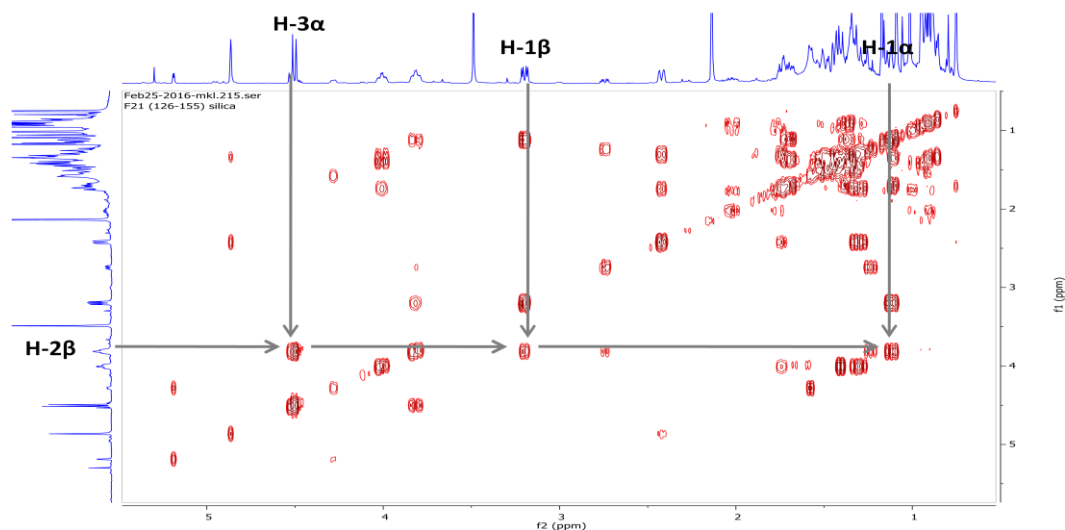


Figure 47. Spectre COSY -2-du composé **2** dans $CDCl_3$

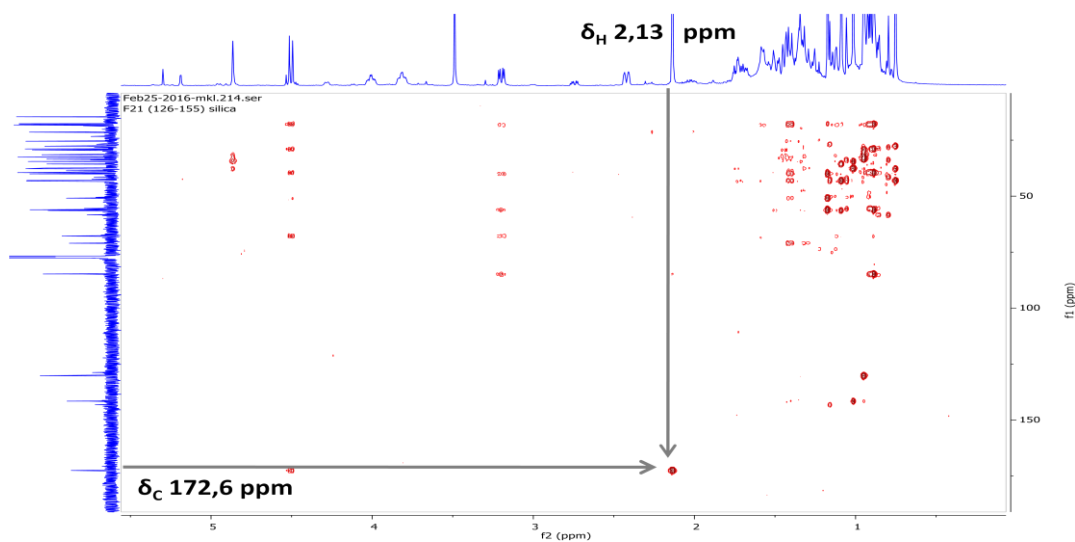


Figure 48. Spectre HMBC du composé **2** dans $CDCl_3$

Les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figure 49) entre H-3/H₃-23 (δ_H 4,50/0,99 ppm), H-2/H₃-25 (δ_H 3,81/1,17 ppm), H₃-24/H₃-25 (δ_H 0,88/1,17 ppm) confirment que la configuration du groupement hydroxyle en C-2 est α , et celle du groupement acétoxy en C-3 est β .

De même, les corrélations entre H-11/H₃-25 (δ_{H} 4,01/1,17 ppm), H-13/H₃-26 (δ_{H} 2,42 /1,08 ppm), H-13/H₃-28 (δ_{H} 2,42/1,01 ppm) et H-13/H-11 (δ_{H} 2,42/4,01 ppm) confirment que tous ces groupements ont une configuration β , et que le groupe hydroxyle en C-11 est α .

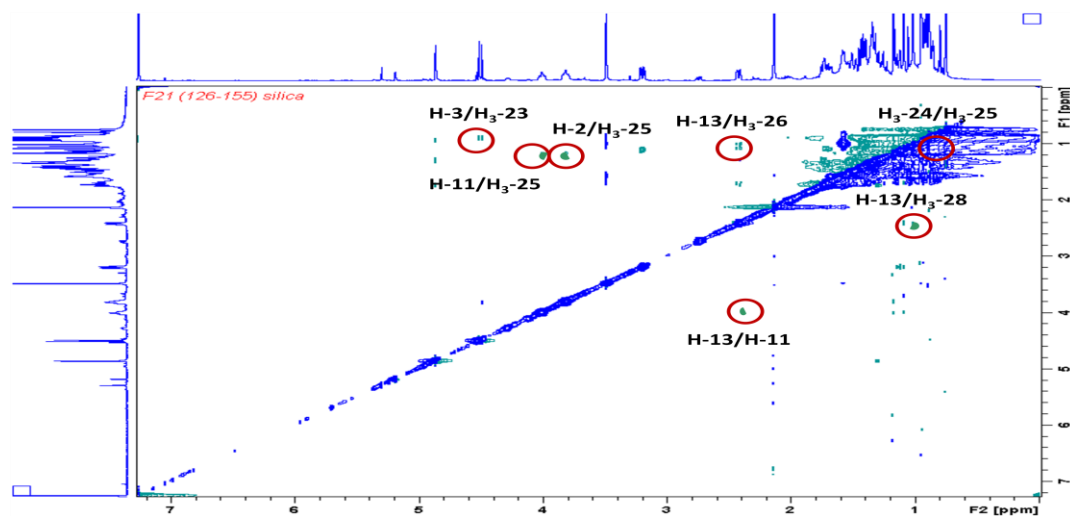


Figure 49. Spectre NOESY du composé **2** dans CDCl_3

L'ensemble de ces données permet d'attribuer la structure 3β -acétoxy, 2α , 11α -dihydroxy oléane-18-ène au composé **2**. C'est une nouvelle structure d'un triterpène pentacyclique qui est décrite pour la première fois dans la littérature.

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **2** sont reportées dans le tableau 25.

Tableau 25. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **2**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
1	50,9	CH ₂	α 1,05 m β 3,20 dd ($J = 12,9 ; 4,7$ Hz)
2	67,8	CH	3,81 d ($J = 10,0$ Hz)
3	84,8	CH	4,50 m
4	39,5	C	-
5	56,1	CH	0,88 m
6	18,2	CH ₂	α 1,51 m β 1,38 m
7	35,6	CH ₂	α 1,32 m β 1,48 m
8	43,2	C	-
9	56,4	CH	1,40 m
10	40,1	C	-

Tableau 25. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **2**
(suite)

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
11	71,0	CH	4,01 m
12	38,7	CH ₂	α 1,30 m β 1,72 m
13	37,7	CH	2,42 doublet large ($W_{1/2} = 19,8$ Hz)
14	43,0	C	-
15	27,7	CH ₂	α 1,09 m β 1,69 m
16	37,5	CH ₂	α 1,34 m β 1,45 m
17	34,5	C	-
18	141,6	C	-
19	130,2	CH	4,87 singulet large ($W_{1/2} = 4,1$ Hz)
20	32,6	C	-
21	33,5	CH ₂	α 1,32 m β 1,44 m
22	37,8	CH ₂	1,34 m 1,42 m
23	28,9	CH ₃	0,99 s
24	17,6	CH ₃	0,88 s
25	18,2	CH ₃	1,17 s
26	17,8	CH ₃	1,08 s
27	14,6	CH ₃	0,75 s
28	25,5	CH ₃	1,01 s
29	31,5	CH ₃	0,94 s
30	29,3	CH ₃	0,95 s
31	172,6	C	-
32	21,4	CH ₃	2,13 s

IV.2.3. Détermination structurale du composé 3

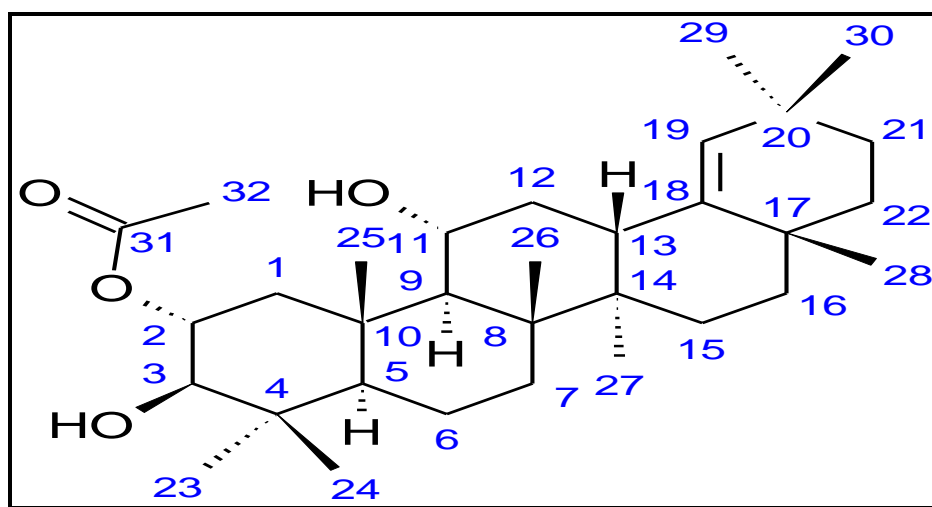


Figure 50. Structure du composé 3

La révélation de la plaque CCM du composé 3 avec de la Vanilline-H₂SO₄ à 1% suivi du chauffage donne une tache de couleur rose persistante. Ceci est en faveur de la présence d'un triterpène.

Le spectre de masse HR-ESI (Figure 51) montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 523,37570$ correspondant à $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 500,385931 indiquant une formule brute C₃₂H₅₂O₄ et un nombre d'insaturation $N_i = 7$, identiquement au composé 2.

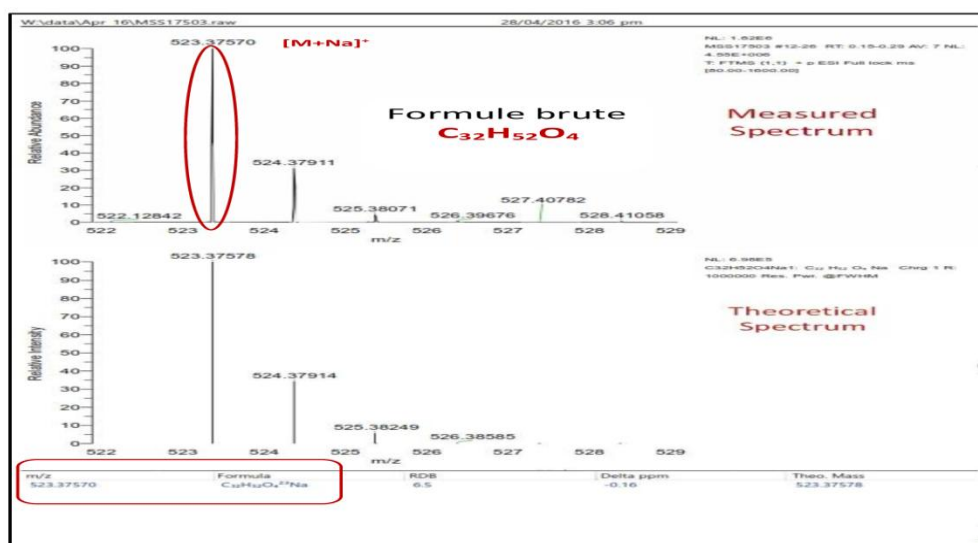


Figure 51. Spectre de masse HR-ESI du composé 3

Le spectre IR (Figure 52) présente les mêmes bandes caractéristiques du composé **2** : le groupe hydroxyle (-OH) à 3461,98 cm^{-1} , le carbonyle (C=O) à 1720,90 cm^{-1} et la double liaison (C=C) à 1460,83 cm^{-1} .

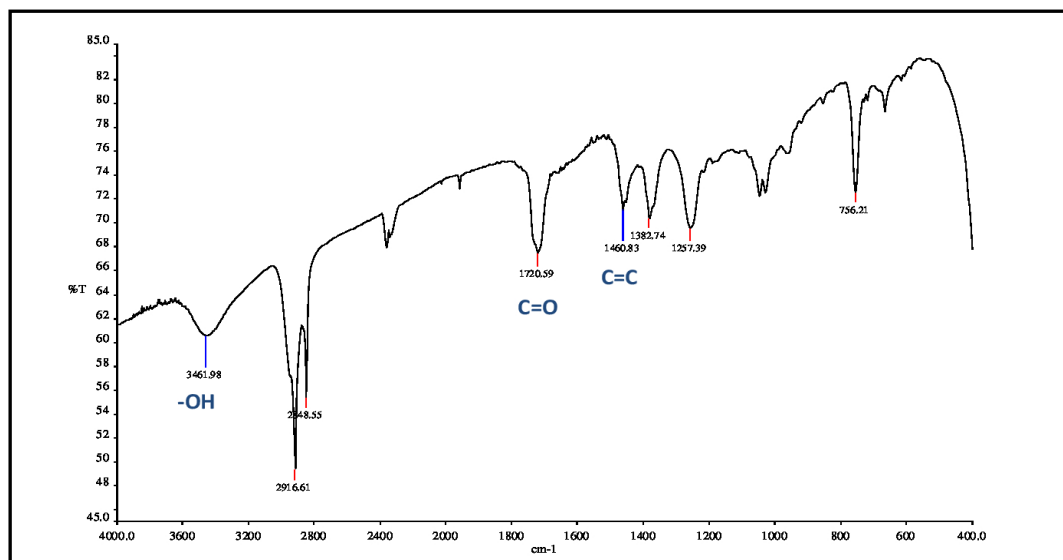


Figure 52. Spectre IR du composé **3**

Les spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et DEPT-135 (Figure 53-57) du composé **3** montrent les mêmes signaux caractéristiques du composé **2** :

- Neuf groupes de méthyle résonant sous forme de singulets à δ_{H} 0,75; 0,87; 0,94; 0,95; 1,01; 1,04; 1,09; 1,20 et 2,06 ppm, et δ_{C} 14,5; 16,9; 17,6; 18,0; 21,7; 25,5; 28,8; 29,3 et 31,5 ppm.
- Deux signaux résonant à δ_{H} 3,17 et 4,01 ppm attribuables aux protons de type oxyméthine. Le spectre HSQC (Figure 57) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones les portant δ_{C} 81,0 et 70,1 ppm.
- Un signal sous forme d'un singulet large ($W_{1/2} = 4,5$ Hz) à δ_{H} 4,85 ppm correspondant à un proton éthylénique, corrèle avec le carbone résonant à δ_{H} 130,2 ppm sur le spectre HSQC (Figure 58)
- Huit carbones quaternaires résonant à δ_{C} 32,6 ; 34,5 ; 40,2 ; 43,0 ; 43,2 ; 141,7 et 172,6 ppm.
- Huit méthylènes résonant à δ_{C} 18,1 ; 27,7 ; 33,5 ; 35,6 ; 37,5 ; 37,8 ; 38,6 et 48,6 ppm.
- Sept méthines résonant à δ_{C} 37,6 ; 56,0 ; 56,1 ; 70,1 ; 77,4 ; 81,0 et 130,2 ppm.

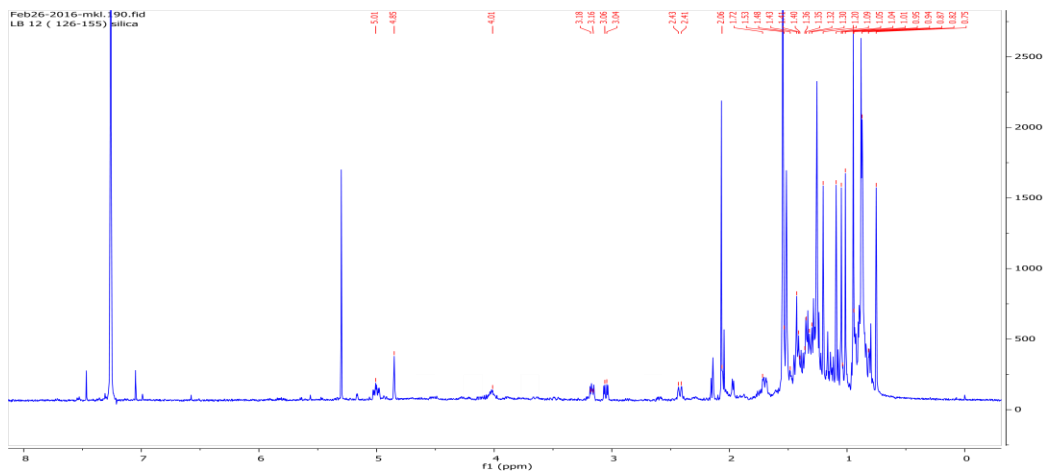


Figure 53. Spectre RMN ^1H du composé 3 dans CDCl_3

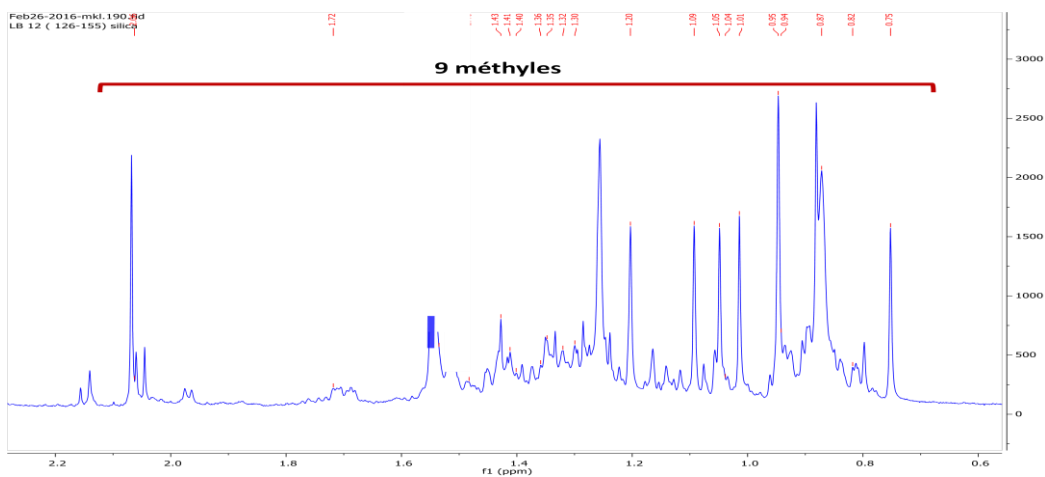


Figure 54. Spectre RMN ^1H élargi -1- du composé 3 dans CDCl_3

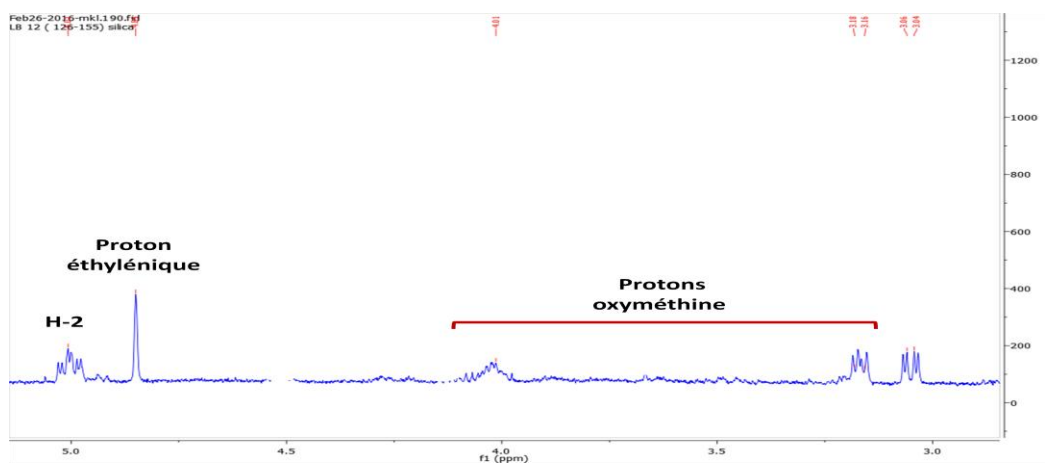


Figure 55. Spectre RMN ^1H élargi -2- du composé 3 dans CDCl_3

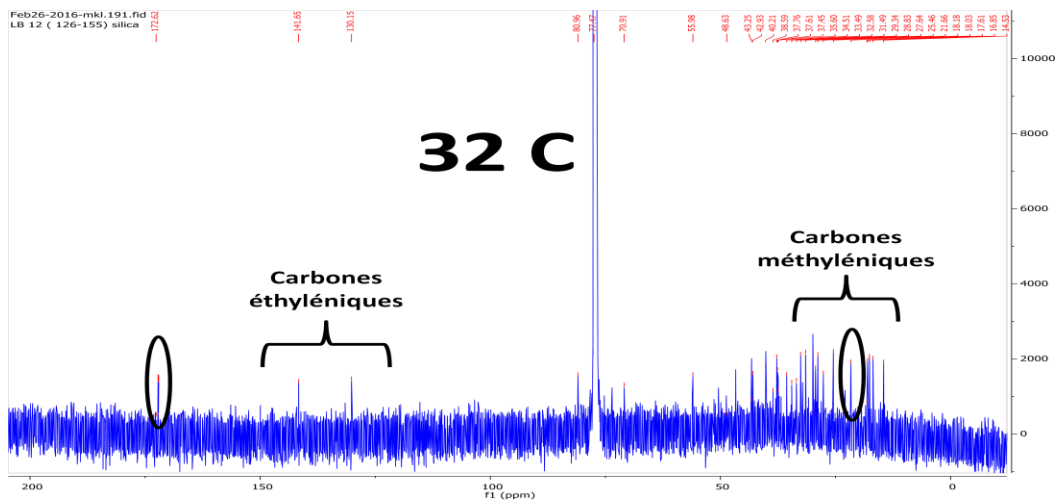


Figure 56. Spectre RMN¹³C du composé **3** dans CDCl₃

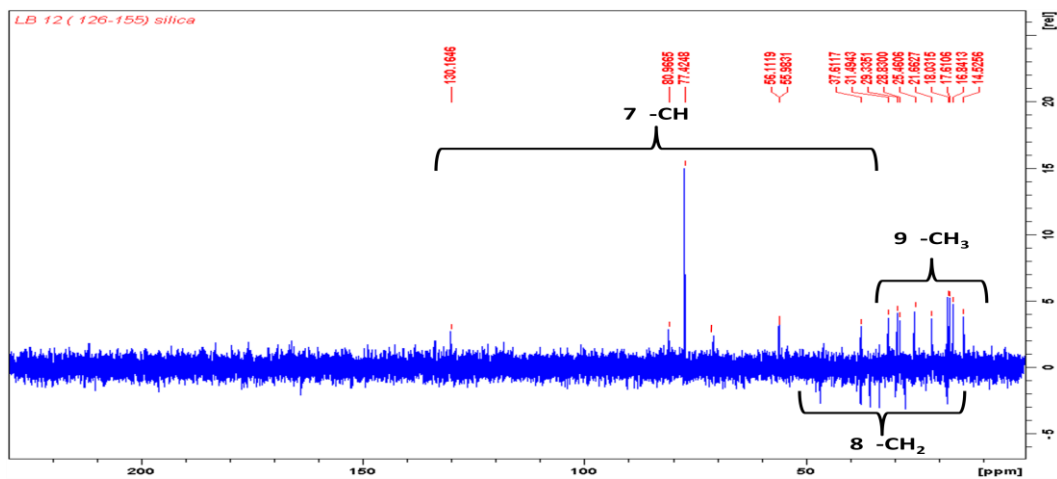


Figure 57. Spectre DEPT-135 du composé **3** dans CDCl₃

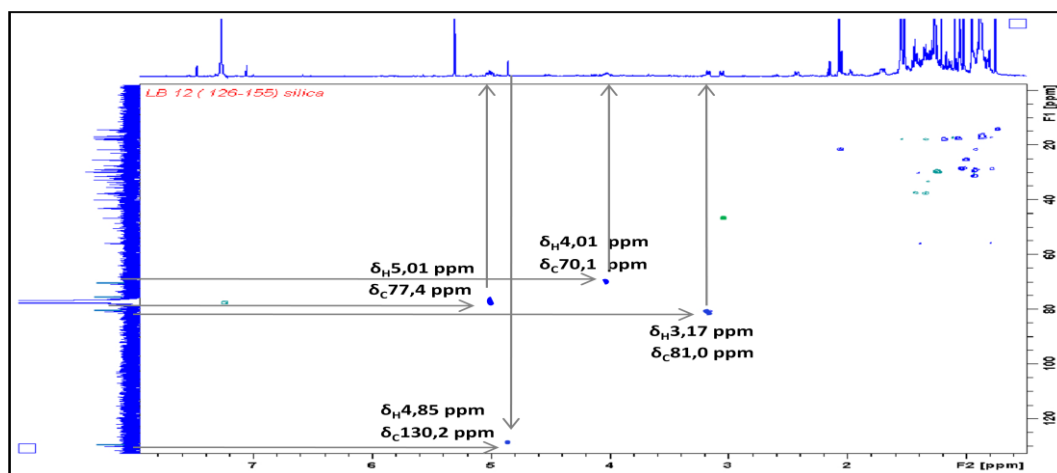


Figure 58. Spectre HSQC du composé **3** dans CDCl₃

Cependant, l'apparition des signaux à δ_C 172,6 et 21,7 ppm, et à δ_H 2,06 ppm, indiquent la présence d'un groupement acétate. Le spectre HMBC (Figure 59) montre une tache de corrélation entre le groupement carbonyle à δ_C 172,6 ppm et les protons à δ_H 2,06 ppm.

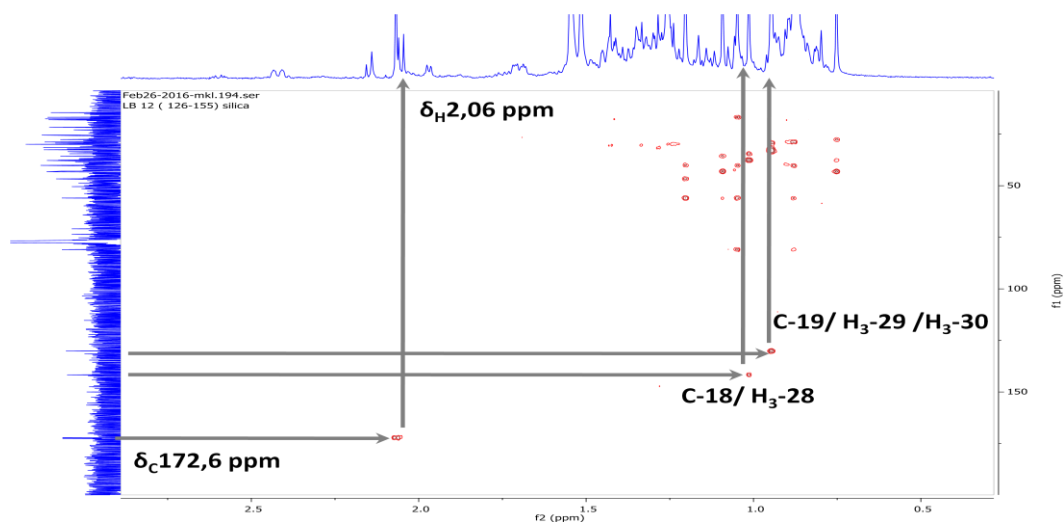


Figure 59. Spectre HMBC élargi du composé **3** dans CDCl₃

Par ailleurs, le deblindage du proton H-2 de δ_H 3,72 ppm dans le composé **1** à δ_H 5,01 ppm dans le composé **3** indique l'acétylation de ce composé en cette position. Le spectre HSQC (Figure 58) montre la tache de sa corrélation avec le carbone C-2 résonant à δ_C 77,4 ppm, et avec H-3 (δ_H 3,17 ppm), H-1 α (δ_H 1,05 ppm) et H-1 β (δ_H 3,05 ppm) sur le spectre COSY (Figure 60).

La position de la double liaison est confirmée dans le spectre HMBC (Figure 59) par les taches de corrélation entre le carbone C-19 (δ_C 130,2 ppm) et les protons H₃-29 (δ_H 0,94 ppm) et H₃-30 (δ_H 0,95 ppm), et entre le carbone C-18 (δ_C 141,67 ppm) et les protons H₃-28 (δ_H 1,01 ppm).

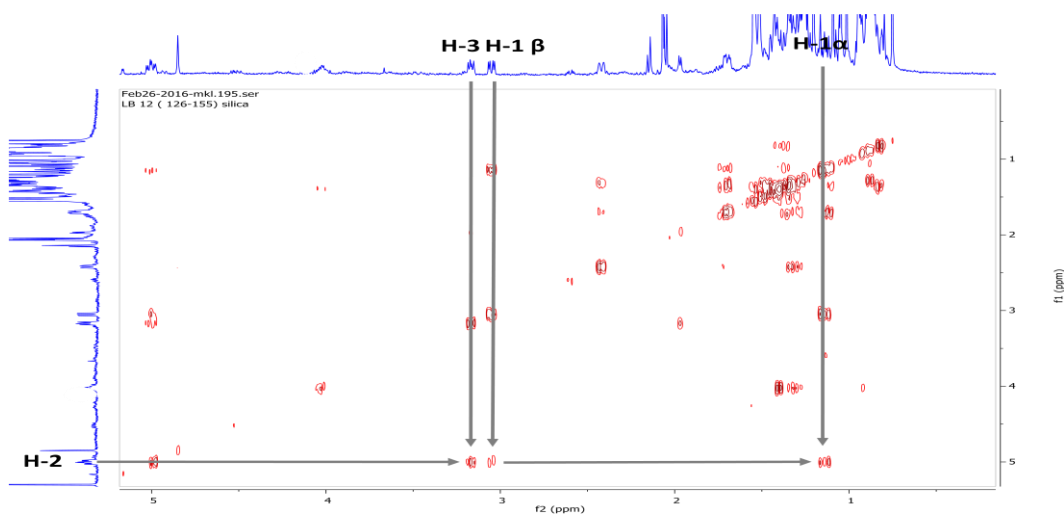


Figure 60. Spectre COSY du composé **3** dans CDCl₃

Les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figure 61) entre H-3 et H₃-23 (δ_H 3,17/1,04 ppm), H-2 et H₃-25 (δ_H 5,01/1,17 ppm), H₃-24 et H₃-25 (δ_H 0,87/1,17 ppm) confirment que la configuration du groupe acétoxy en C-2 est α , et celle du groupe hydroxyle en C-3 est β .

Les corrélations entre H-11 et H₃-25 (δ_H 4,01/1,20 ppm), H-13 et H₃-26 (δ_H 2,42/1,09 ppm) et H-13 et H₃-28 (δ_H 2,42/1,01 ppm), H-13 et H-11 (δ_H 2,42/4,01 ppm) confirment qu'ils ont tous une configuration β et le groupement hydroxyle en C-11 est α .

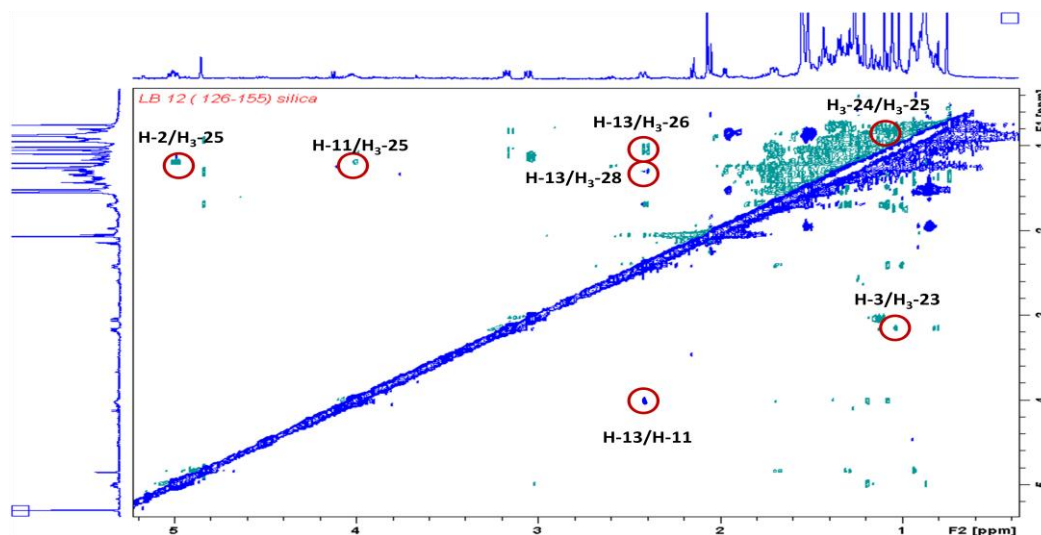


Figure 61. Spectre NOESY du composé **3** dans $CDCl_3$

L'ensemble de ces résultats permet d'attribuer au composé **3** la structure 2α -acétoxy, 3β , 11α -dihydroxy oléane-18-ène. C'est une nouvelle structure d'un triterpène pentacyclique qui est décrite pour la première fois dans la littérature.

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN 1H du composé **3** sont reportées dans le tableau 26.

Tableau 26. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN 1H du composé **3**

Position	$\delta^{13}C$	DEPT-135	δ^1H
1	48,6	CH ₂	α 1,05 m β 3,05 dd ($J = 4,8 ; 11,6$ Hz)
2	77,4	CH	5,01 m
3	81,0	CH	3,17 dd ($J = 6,4 ; 10,3$ Hz)
4	30,2	C	-
5	56,0	CH	0,82 m
6	18,1	CH ₂	α 1,53 m β 1,36 m

Tableau 26. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **3**
(suite)

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
7	3,6	CH_2	α 1,32 m β 1,48 m
8	43,2	C	-
9	56,1	CH	1,40 m
10	40,2	C	-
11	70,1	CH	4,01 m
12	38,6	CH_2	α 1,30 m β 1,72 m
13	37,6	CH	2,42 doublet large ($W_{1/2} = 28,0$ Hz)
14	43,0	C	-
15	27,7	CH_2	α 1,09 m β 1,69 m
16	37,5	CH_2	α 1,32 m β 1,48 m
17	34,5	C	-
18	141,7	C	-
19	130,2	CH	4,85 singulet large ($W_{1/2} = 4,5$ Hz)
20	32,6	C	-
21	33,5	CH_2	α 1,32 m β 1,43 m
22	37,8	CH_2	α 1,35 m β 1,41 m
23	28,8	CH_3	1,04 s
24	16,9	CH_3	0,87 s
25	18,0	CH_3	1,20 s
26	17,6	CH_3	1,09 s
27	14,5	CH_3	0,75 s
28	25,5	CH_3	1,01 s
29	31,5	CH_3	0,94 s
30	29,3	CH_3	0,95 s
31	172,6	C	-
32	21,7	CH_3	2,06 s

IV.2.4. Détermination structurale du composé 4

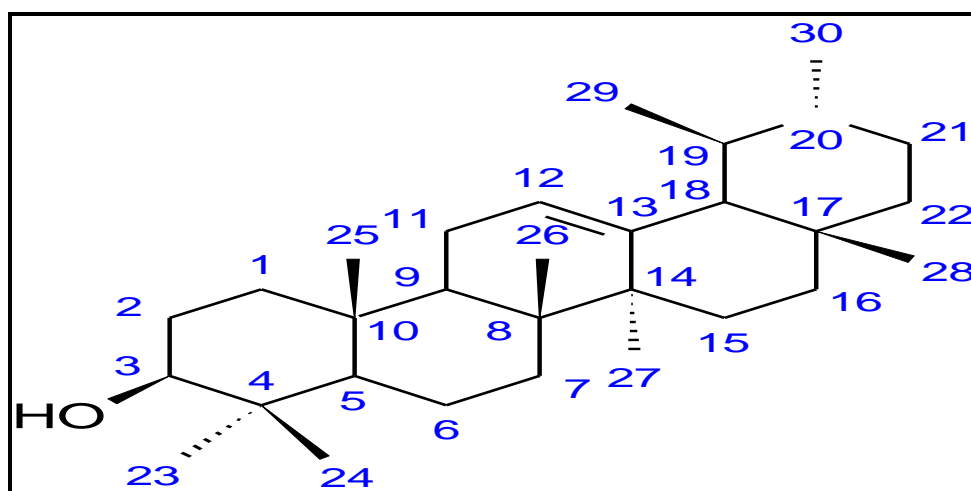


Figure 62. Structure du composé 4

La révélation de la plaque CCM du composé 4 avec de la Vanilline- H_2SO_4 à 1% suivi du chauffage donne une tache de couleur rose persistante. Ceci est en faveur de la présence d'un triterpène.

Le spectre RMN 1H (Figure 63 et 64) du composé 4 montre dans la zone comprise entre δ_H 0,77 et 1,08 ppm, huit signaux sous forme de six singulets et de deux doublets, correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique de type ursane. Ceci est confirmé par les deux signaux apparaissant à δ_C 126,1 et δ_C 138,1 ppm correspondant aux déplacements chimiques des carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison.

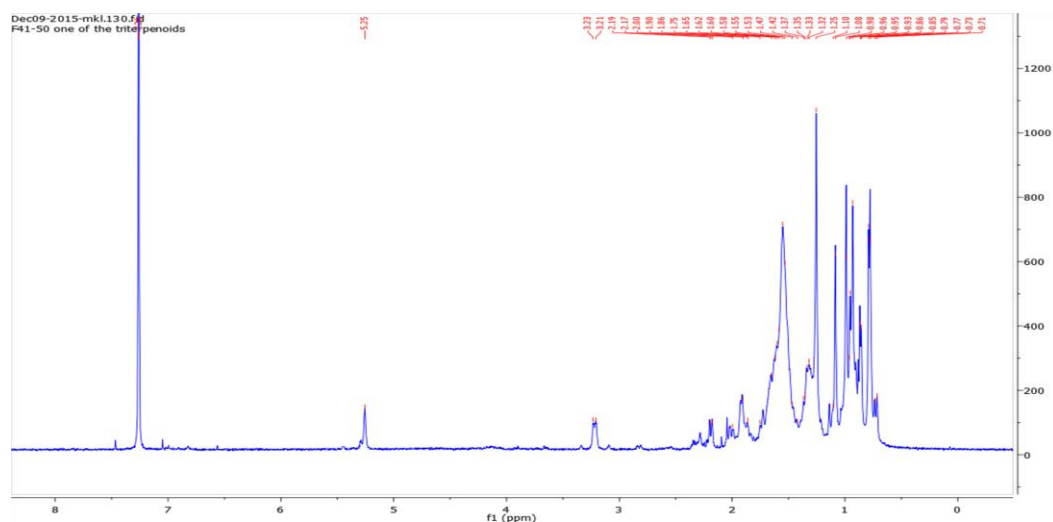


Figure 63. Spectre RMN 1H du composé 4 dans $CDCl_3$

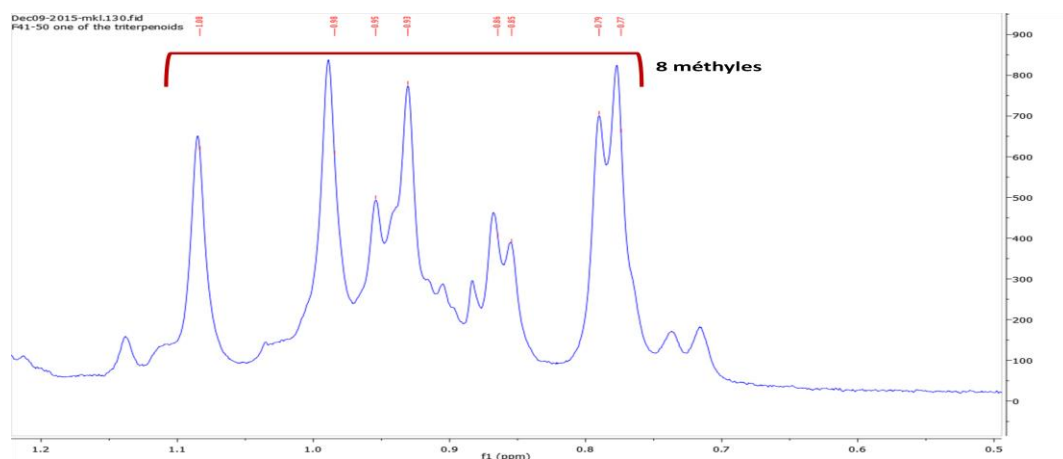


Figure 64. Spectre RMN¹H élargi -1- du composé **4** dans CDCl₃

Le spectre RMN ¹H (Figure 65) montre aussi un singulet large à δ_H 5,25 ppm ($J = 3,2$ Hz) caractéristique du proton éthylénique H-12 comme sa corrélation dans le spectre HSQC (Figure 66) avec le carbone C-12 résonant à δ_C 126,1 ppm.

Il montre également un doublet de doublets à δ_H 3,22 ppm ($J = 10,8 ; 5,11$ Hz) correspondant au proton oxyméthine H-3 d'un triterpène.

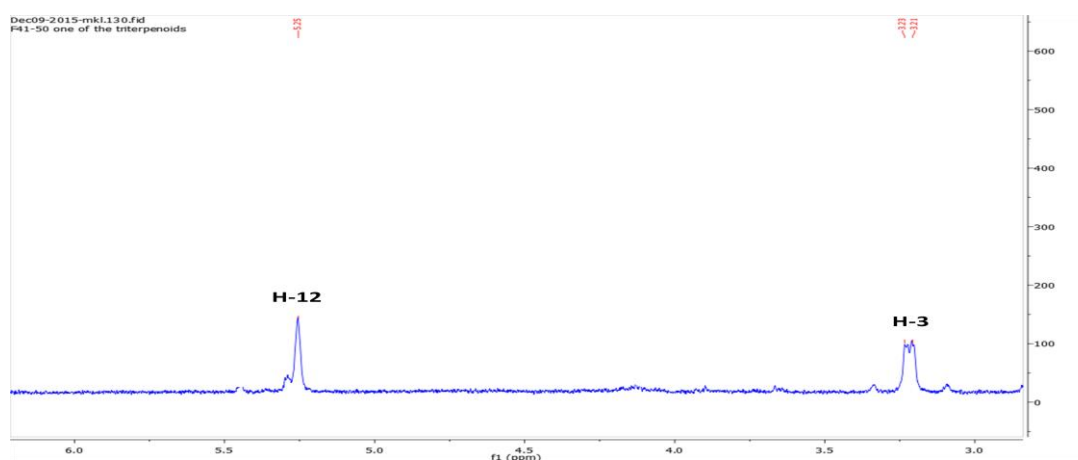


Figure 65. Spectre RMN¹H élargi -2- du composé **4** dans CDCl₃

Le spectre RMN ¹³C (Figure 67) indique la présence de trente atomes de carbone, il nous permet de distinguer, et particulièrement dans la région blindée, huit signaux résonant à δ_C 15,6 ; 15,8 ; 17,2 ; 17,3 ; 23,8 ; 28,3 ; 28,3 et 21,3 ppm, confirmant la présence d'un squelette triterpénique pentacyclique [112], et dans la région déblindée, trois signaux caractéristiques résonant à δ_C 79,2 ; 126,1 et 138,1 ppm attribuables respectivement aux carbones C-3, C-12 et C-13 (Figure 56).

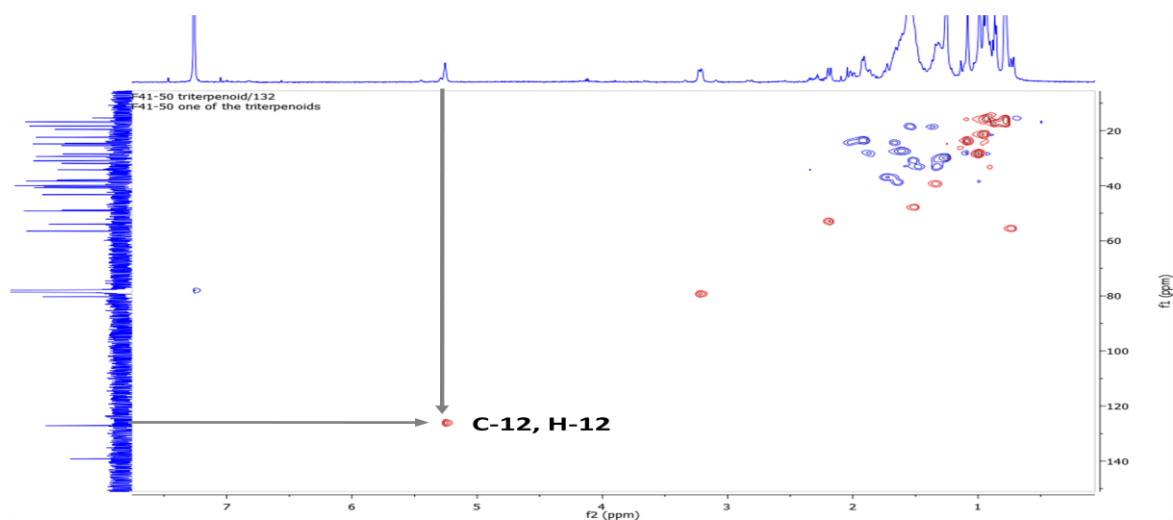


Figure 66. Spectre HSQC du composé **4** dans CDCl_3

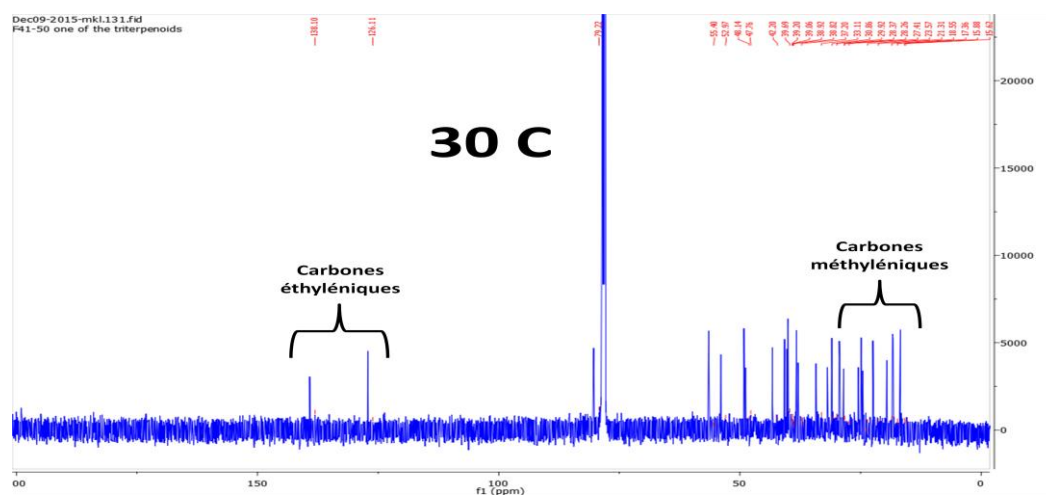


Figure 67. Spectre RMN^{13}C du composé **4** dans CDCl_3

Aussi, on peut confirmer selon le spectre DEPT-135 (Figure 68), la présence de six carbones quaternaires, sept méthines et neuf méthylènes. Les valeurs de leurs déplacements chimiques sont répertoriées dans le tableau 27.

L'analyse des corrélations hétéronucléaires $^1J_{\text{H-C}}$ sur le spectre HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones méthyléniques avec leurs protons (Figure 69).

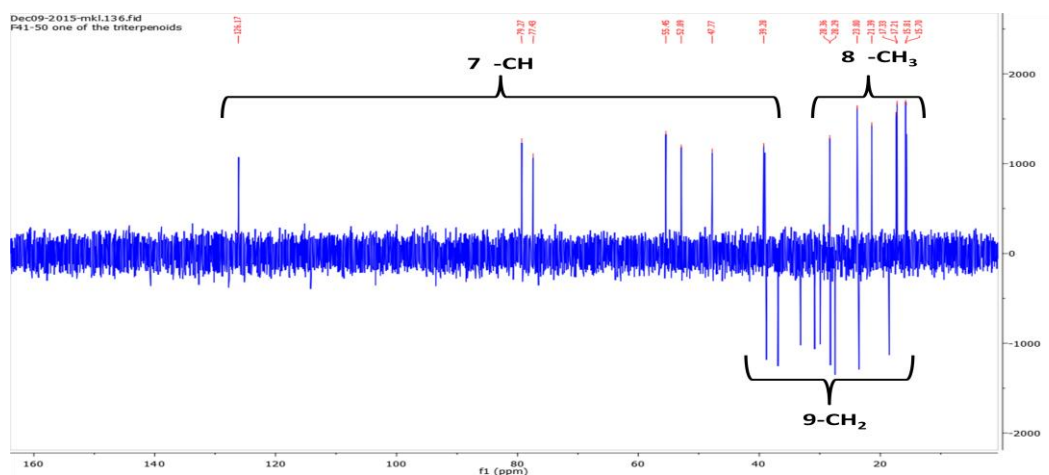


Figure 68. Spectre DEPT-135 du composé **4** dans CDCl_3

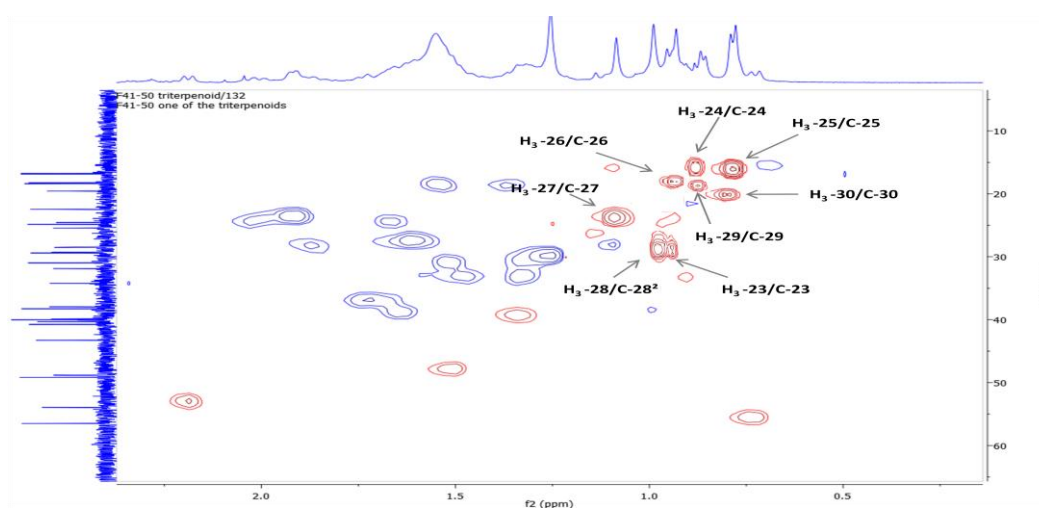


Figure 69. Spectre HSQC élargi -1- du composé **4** dans CDCl_3

A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, le spectre COSY (Figure 70) permet de déterminer les déplacements chimiques:

- Des protons H-2 résonant à δ_{H} 1,26 et 1,60 ppm grâce à leurs corrélations avec le proton vicinal H-3.
- Des protons H-1 résonant à δ_{H} 1,65 et 1,75 ppm grâce à leurs corrélations avec le proton H-2.
- Des protons H-11 résonant à δ_{H} 1,90 et 2,00 ppm grâce à leurs corrélations avec le proton vicinal H-12.
- Du proton H-9 résonant à δ_{H} 1,55 grâce à sa corrélation avec le proton H-11.

Les déplacements chimiques des carbones correspondants sont déterminés par l'examen du spectre HSQC (Figure 71).

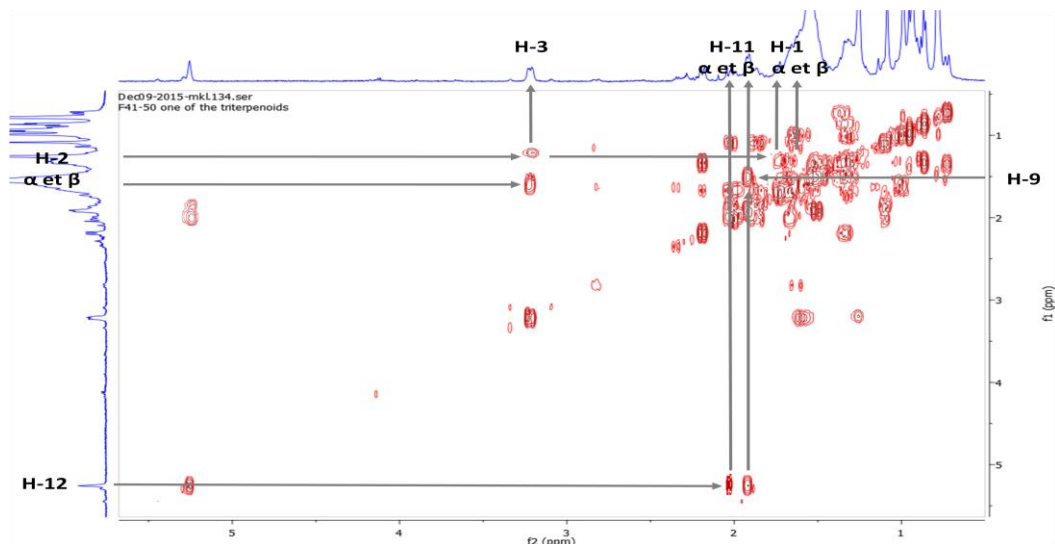


Figure 70. Spectre COSY du composé **4** dans CDCl_3

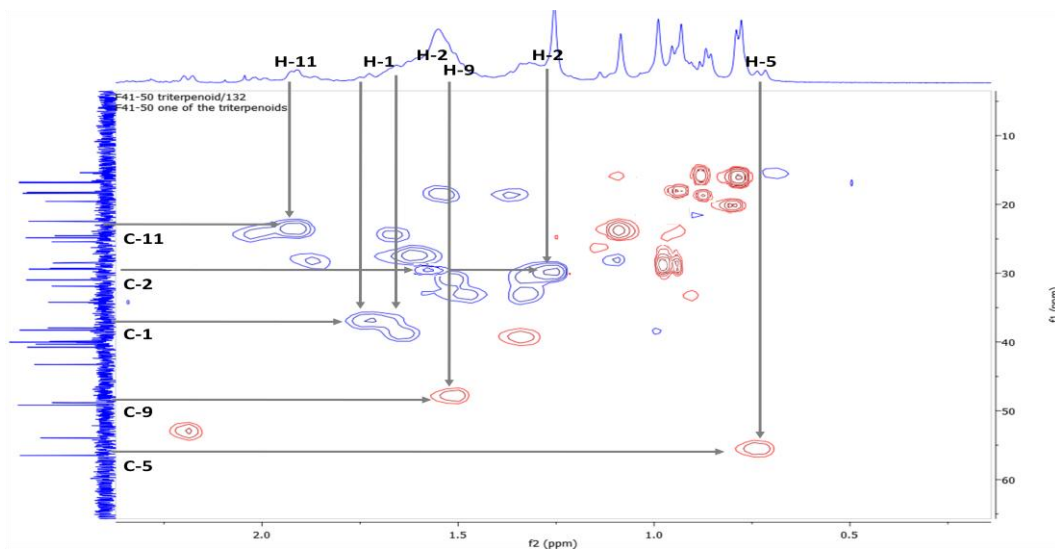


Figure 71. Spectre HSQC élargi -2- du composé **4** dans CDCl_3

Le signal de carbone C-3 résonant à δ_{C} 79,2 ppm présente sur HMBC des corrélations avec les protons des groupements méthyles H₃-23 (δ_{H} 0,95 ppm) et H₃-25 (δ_{H} 0,77 ppm) (Figure 72).

Toujours sur le spectre HMBC (Figure 72), le proton H-3 résonant à δ_{H} 3,22 ppm corrèle avec le carbone C-24 (δ_{C} 15,6 ppm), le méthylène résonant à δ_{C} 29,9 ppm (attribuable à C-2), et le méthine résonant à δ_{C} 55,4 ppm (attribuable à C-5), ceci est confirmé par ses corrélations sur le spectre HSQC (Figure 71).

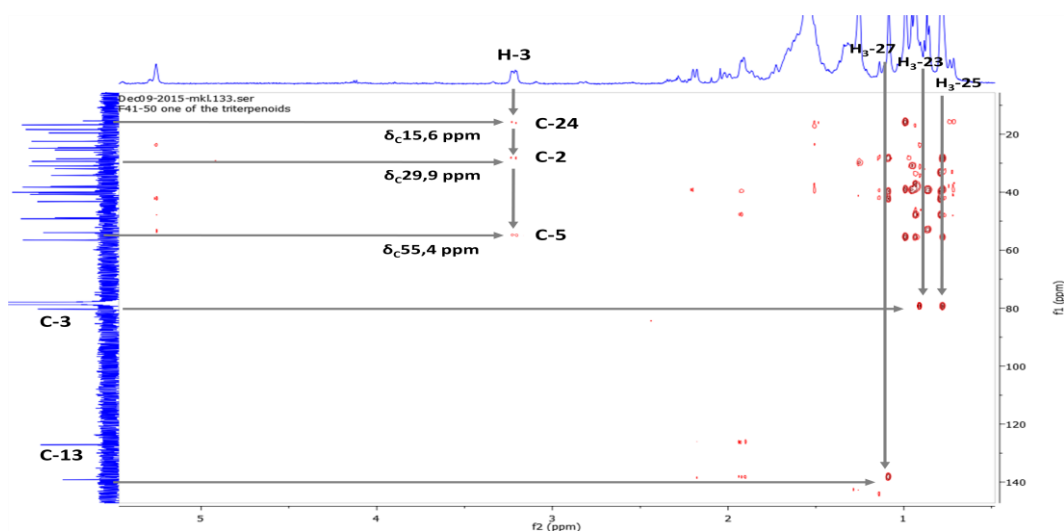


Figure 72. Spectre HMBC du composé **4** dans CDCl_3

Il montre également (Figure 73) des taches de corrélation entre les protons du groupement méthyle :

- $\text{H}_3\text{-25}$ (δ_{H} 0,77 ppm), le méthine résonant à δ_{C} 47,7 ppm et le carbone quaternaire résonant à δ_{C} 38,9 ppm,
- $\text{H}_3\text{-23}$ (δ_{H} 0,95 ppm) et le carbone quaternaire résonant à δ_{C} 38,9 ppm,
- $\text{H}_3\text{-27}$ (δ_{H} 1,08 ppm), le carbone quaternaire résonant à δ_{C} 42,2 ppm, le méthylène résonant à δ_{C} 28,2 ppm et C-13 (δ_{C} 138,1 ppm).
- $\text{H}_3\text{-29}$ (δ_{H} 0,86 ppm), le carbone quaternaire résonant à δ_{C} 38,8 ppm, et le méthine résonant à δ_{C} 52,9 ppm,
- $\text{H}_3\text{-30}$ (δ_{H} 0,79 ppm) et le méthine résonant à δ_{C} 39,0 ppm.

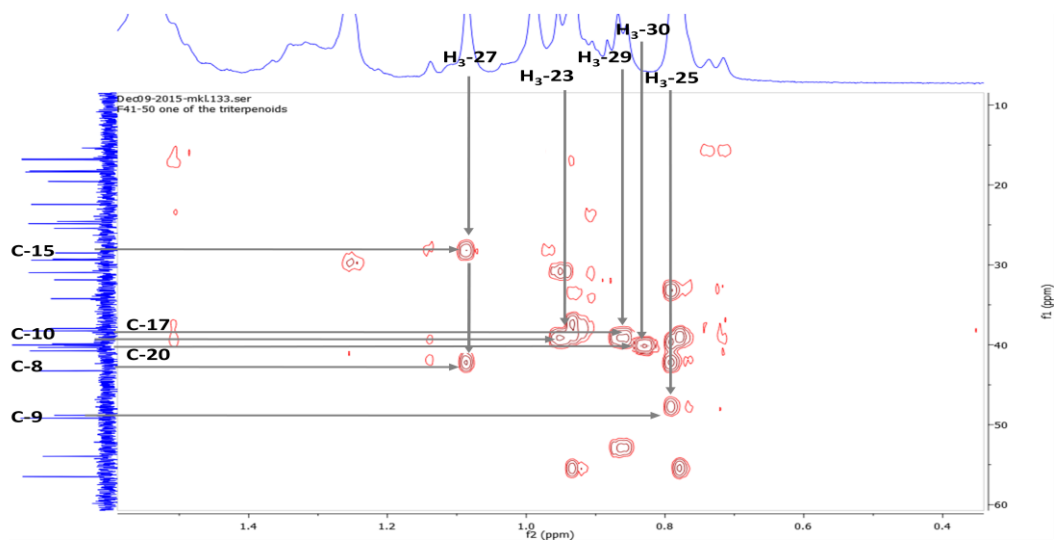


Figure 73. Spectre HMBC élargi du composé **4** dans CDCl_3

Toutes ces corrélations permettent de repérer les carbone C-8 (δ_C 42,2 ppm), C-9 (δ_C 47,7 ppm), C-10 (δ_C 38,9 ppm) et C-15 (δ_C 28,2 ppm), C-17 (δ_C 38,8 ppm), C-18 (δ_C 52,9 ppm) et C-20 (δ_C 39,0 ppm).

L'ensemble de ces données permet d'attribuer au composé **4** la structure de l' α -amyrine.

Il s'agit d'un triterpène pentacyclique, isolé notamment de *Salvia pilifera* [114], *Orthosiphon stamineus* [115] (Famille des Lamiacées), et de *Pyrus bretschneideri* Rehd. (Famille des Rosacées) [116], mais il est décrit pour la première fois dans l'espèce *Salvia phlomoides*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données décrites dans la littérature [117].

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **4** sont reportées dans le tableau 27.

Tableau 27. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **4**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
1	36,9	CH ₂	1,65 m 1,75 m
2	29,9	CH ₂	1,26 m 1,60 m
3	79,2	CH	3,22 dd ($J = 10,8 ; 5,11$ Hz)
4	39,7	C	-
5	55,4	CH	0,72 d ($J = 11,4$ Hz)
6	18,5	CH ₂	1,37 m 1,58 m
7	33,1	CH ₂	1,32 m 1,47 m
8	42,2	C	-
9	47,7	CH	1,55 m
10	38,9	C	-
11	23,5	CH ₂	1,90 m 2,00 m
12	126,1	CH	5,25 t ($J = 3,2$ Hz)
13	138,1	C	-
14	48,1	C	-
15	28,2	CH ₂	1,86 m 1,10 m

Tableau 27. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **4** (suite)

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
16	27,4	CH_2	1,32 m 1,62 m
17	38,8	C	-
18	52,9	CH	2,18 m
19	39,2	CH	0,96 m
20	39,0	CH	1,33 m
21	30,8	CH_2	1,32 m 1,53 m
22	37,2	CH_2	1,35 m 1,42 m
23	28,3	CH_3	0,95 s
24	15,6	CH_3	0,85 s
25	15,8	CH_3	0,77 s
26	17,2	CH_3	0,93 s
27	23,8	CH_3	1,08 s
28	28,3	CH_3	0,98 s
29	17,3	CH_3	0,86 d ($J = 6,4$ Hz)
30	21,3	CH_3	0,79 d ($J = 7,2$ Hz)

IV.2.5. Détermination structurale du composé **5**

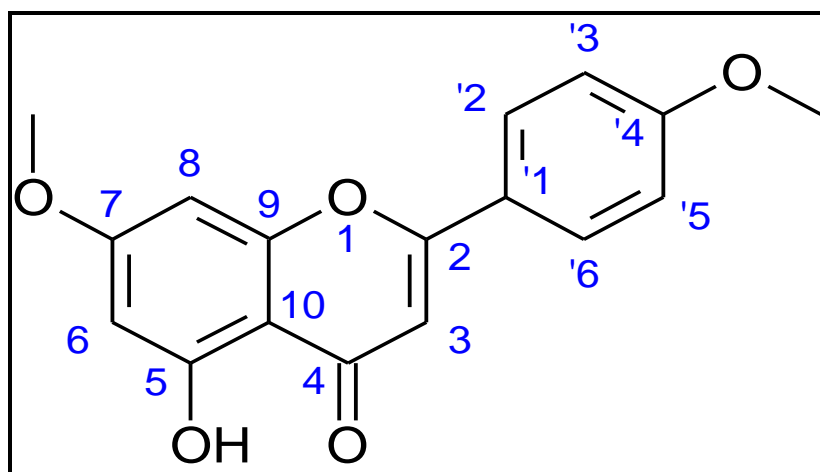


Figure 74. Structure du composé **5**

La fluorescence violette du composé **5** sous lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm) désigne un composé flavonique.

Le spectre RMN¹H (Figure 75-77) de ce composé montre qu'il s'agit d'un flavonoïde. Il comporte les signaux suivants:

- Deux signaux aromatiques résonant sous forme d'un doublet d'intégration 2H chacun à δ_H 7,02 ppm ($J = 8,4$ Hz) et δ_H 7,85 ppm ($J = 8,4$ Hz), caractéristiques des protons du noyau B d'un flavonoïde substitué en position 4'. Ils sont attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6'. Le spectre COSY montre des taches de corrélation entre ces protons (Figure 78).
- Deux signaux aromatiques résonant sous forme d'un doublet d'intégration 1H chacun à δ_H 6,36 ppm ($J = 1,6$ Hz) et δ_H 6,48 ppm ($J = 1,6$ Hz), attribuables à H-6 et H-8 respectivement, indiquant un noyau A d'un flavonoïde disubstitué en position 5 et 7. Le spectre COSY montre des taches de corrélation entre ces deux protons (Figure 78).
- Un signal résonant sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_H 6,57 ppm caractéristique du proton H-3.
- Un signal résonant sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_H 12,80 ppm, ceci est caractéristique d'un groupement hydroxyle (-OH) en position 5 d'un flavonoïde.
- Deux signaux résonant sous forme d'un singulet d'intégration 3H chacun à δ_H 3,88 et 3,89 ppm correspondant à deux groupements méthoxyles (O-CH₃).

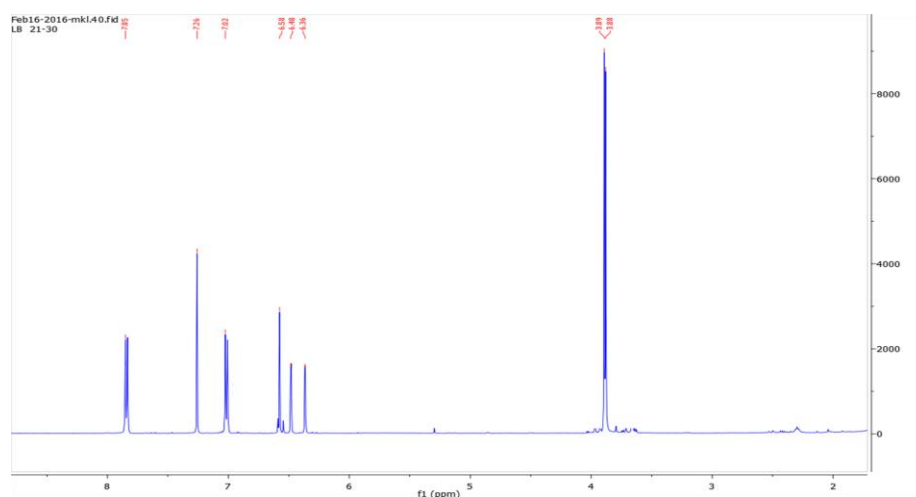


Figure 75. Spectre RMN ¹H du composé **5** dans CDCl₃

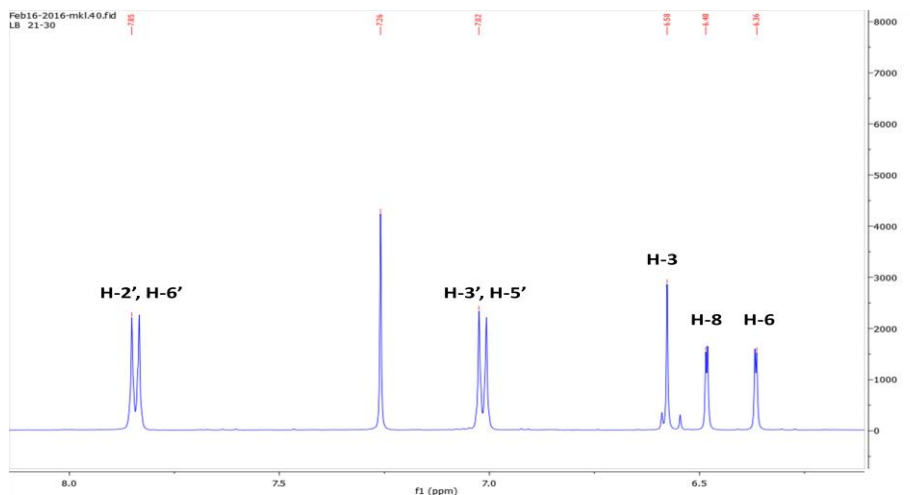


Figure 76. Spectre RMN ^1H élargi 1 du composé **5** dans CDCl_3

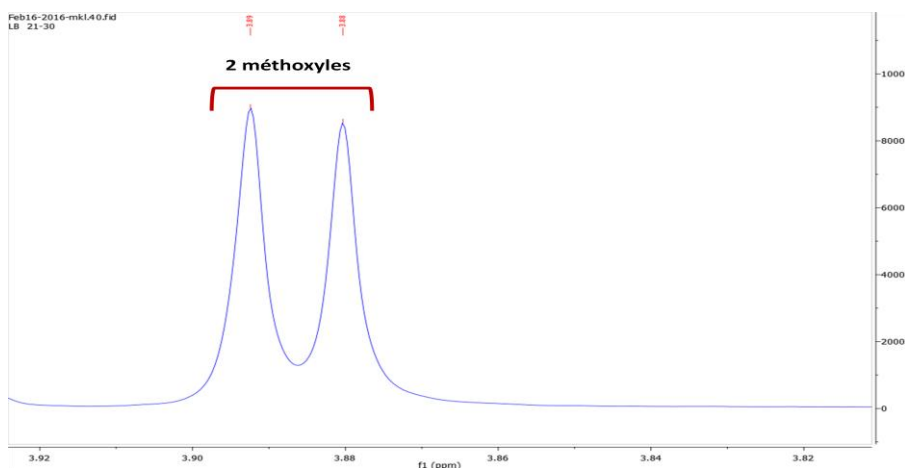


Figure 77. Spectre RMN ^1H élargi 1 du composé **5** dans CDCl_3

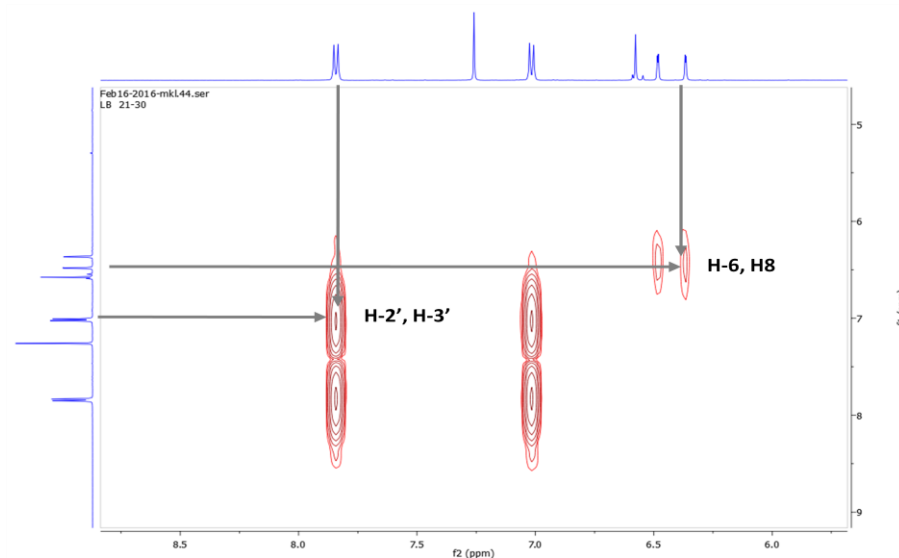


Figure 78. Spectre COSY du composé **5** dans CDCl_3

L'attribution de ces protons avec leurs carbones est obtenue par analyse du spectre HSQC (Figure 79).

Tableau 28. Attribution HSQC du composé **5**

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
3	104,5	6,57
6	98,2	6,36
8	92,8	6,48
2', 6'	128,2	7,85
3', 5'	114,7	7,02
a	56,0	3,89
b	55,7	3,88

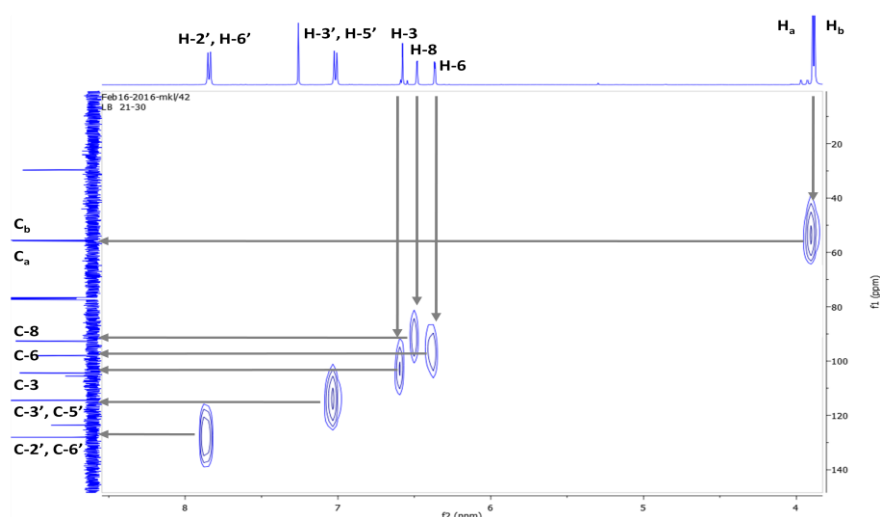


Figure 79. Spectre HSQC du composé **5** dans $CDCl_3$

L'analyse des spectres $RMN^{13}C$ (Figure 80) et DEPT-135 (Figure 81) indique la présence de dix-sept atomes de carbone dans la structure du composé **5**, dont :

- Huit carbones quaternaires aromatiques résonant à δ_C 105,7 ; 123,8 ; 157,9 ; 162,4 ; 162,8 ; 164,2 ; 165,6 et 182,6 ppm, (le signal à δ_C 182,6 ppm relatif au groupement carbonyle).
- Pas de méthylènes.
- Sept méthines aromatiques résonant à δ_C 92,8 et 98,2 ppm (noyau A), δ_C 104,5 ppm (noyau C), δ_C 114,7 et 128,2 ppm (noyau B (C-3', C-5') et (C-2', C-6')),
- Deux méthyles résonant à δ_C 55,7 et 56,0 ppm.

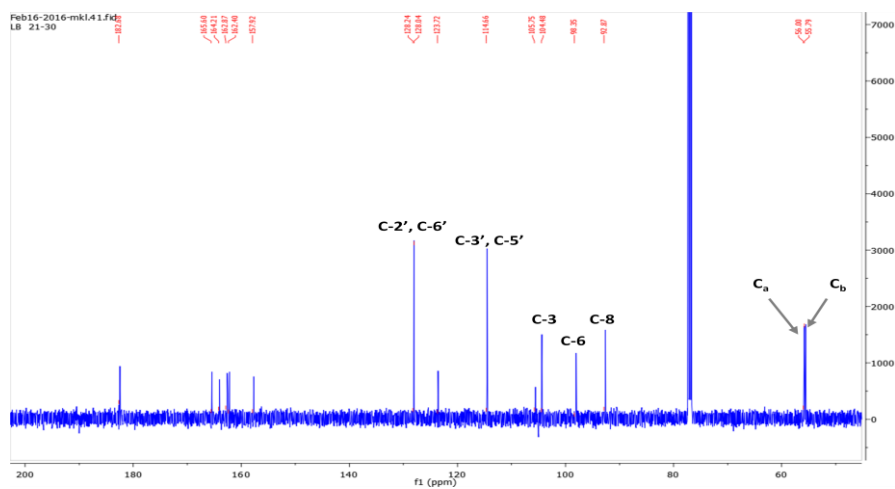


Figure 80. Spectre RMN ^{13}C du composé **5** dans CDCl_3

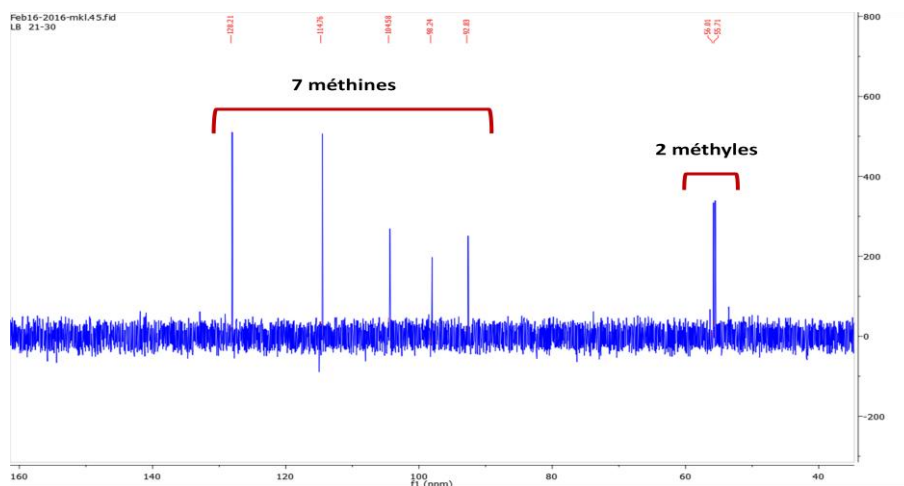


Figure 81. Spectre DEPT-135 du composé **5** dans CDCl_3

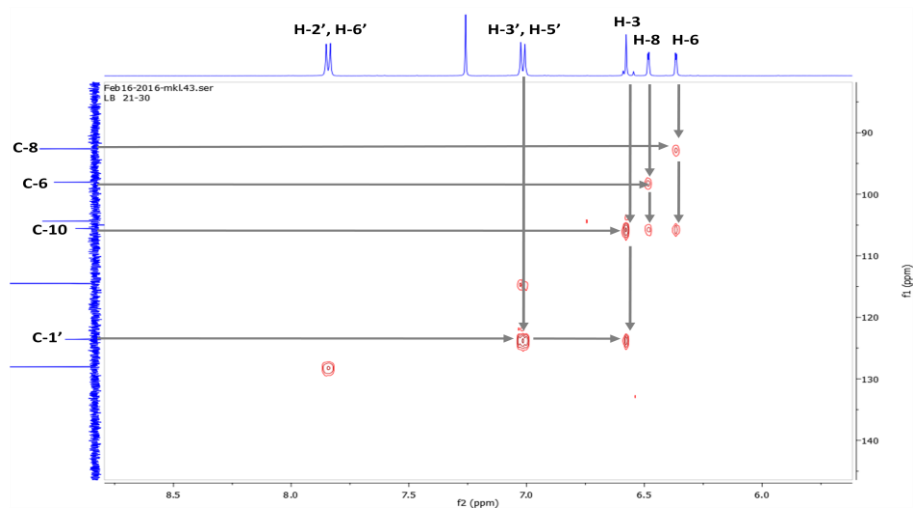


Figure 82. Spectre HMBC élargi du composé **5** dans CDCl_3

L'analyse du spectre HMBC (Figure 82) permet d'assigner les déplacements chimiques des autres carbones et protons de ce composé.

Il montre des taches de corrélation entre le singulet aromatique H-3 (δ_H 6,57 ppm) et les deux carbones quaternaires résonant à δ_C 105,7 et δ_C 123,8 ppm attribuables respectivement aux carbones C-10 et C-1' du noyau A et C d'un flavonoïde.

Il montre également des taches de corrélation entre les protons du noyau A, H-6 avec les carbones résonant à δ_C 92,8 et 105,7 ppm attribuables respectivement aux carbones C-8 et C-10, et le proton H-8 avec les carbones résonant à δ_C 92,8 et 105,7 ppm attribuables respectivement aux carbones C-6 et C-10.

Ainsi, des corrélations entre les protons du noyau B, H-3' et H-5' avec le carbone quaternaire résonant à δ_C 123,8 attribuable à C-1'

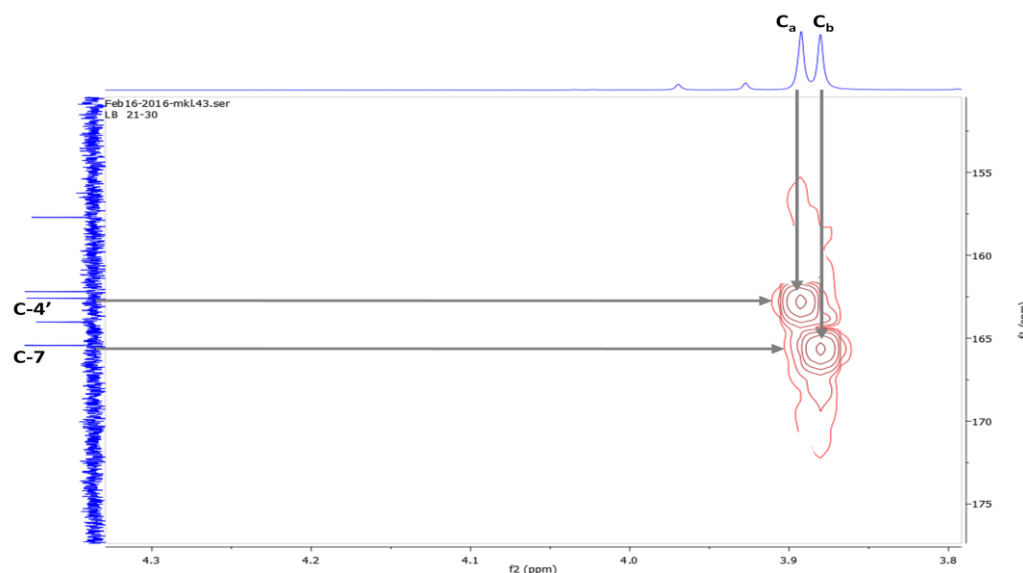


Figure 83. Spectre HMBC élargi du composé **5** dans $CDCl_3$

Toujours sur le spectre HMBC (Figure 83), les taches de corrélation entre les deux méthoxyles résonant à δ_H 3,88 et 3,89 ppm attribuable à C_b et C_a avec les carbones quaternaires résonant à δ_C 164,24 et 162,41 ppm attribuables au carbone C-7 et C-4' confirment leurs localisations en position C-7 et C-4'.

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN 1H du composé **5** sont reportées dans le tableau 29.

L'ensemble des données précédentes nous permet d'établir la structure du composé **5** comme étant la 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy flavone, connue sous le nom de l'apigénine 7,4-diméthyléther.

Il s'agit d'un flavonoïde, isolé précédemment de *Salvia reuterana* Boiss. [118], *Thymus vulgaris* L. [119] (Famille des Lamiacées), et de *Kaempferia parviflora* [120] (Famille des Zingibéracées), mais c'est la première fois qu'il a isolé de l'espèce *Salvia phlomoides*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données décrites dans la littérature [121].

Tableau 29. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **5**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
2	165,6	C	-
3	104,5	CH	6,57 s
4	182,6	C	-
5	157,9	C	-
6	98,2	CH	6,36 d ($J = 1,6$ Hz)
7	164,2	C	-
8	92,8	CH	6,48 d ($J = 1,6$ Hz)
9	162,8	C	-
10	105,7	C	-
1'	123,8	C	-
2'	128,2	CH	7,85 d ($J = 8,4$ Hz)
3'	114,7	CH	7,02 d ($J = 8,4$ Hz)
4'	162,4	C	-
5'	114,7	CH	7,02 d ($J = 8,4$ Hz)
6'	128,26	CH	7,85 d ($J = 8,4$ Hz)
a	56,00	CH ₃	3,89 s
b	55,74	CH ₃	3,88 s

IV.2.6. Détermination structurale du composé 6

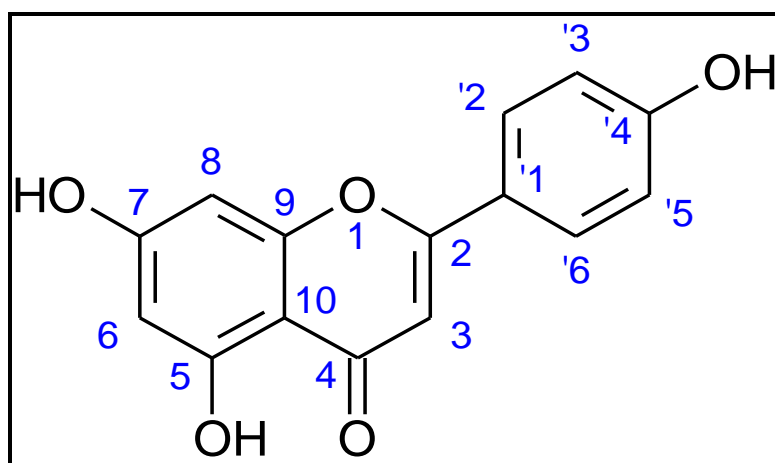


Figure 84. Structure du composé 6

La fluorescence violette du composé 6 sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) est caractéristique d'un squelette flavonique.

Le spectre RMN ^1H (Figure 85 et 86) de ce composé permet d'observer des signaux entre 6 et 8 ppm caractéristiques des noyaux aromatiques d'un flavonoïde :

- Deux doublets d'intégration 2H, le premier à $\delta_{\text{H}} 7,88 \text{ ppm}$ et le second à $\delta_{\text{H}} 6,95 \text{ ppm}$ avec une constante de couplage $J = 8,4 \text{ Hz}$ due à un couplage ortho, attribués aux protons H-2' et H-6', H-3' et H-5' respectivement, indiquant un noyau B parasubstitué.
- Deux doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} 6,23 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{H}} 6,48 \text{ ppm}$ avec une constante de couplage $J = 2,3 \text{ Hz}$ due à un couplage méta, attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement, indiquant un noyau A substitué dans les positions 5 et 7.
- Un signal sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}} 6,62 \text{ ppm}$ attribuable au proton H-3.

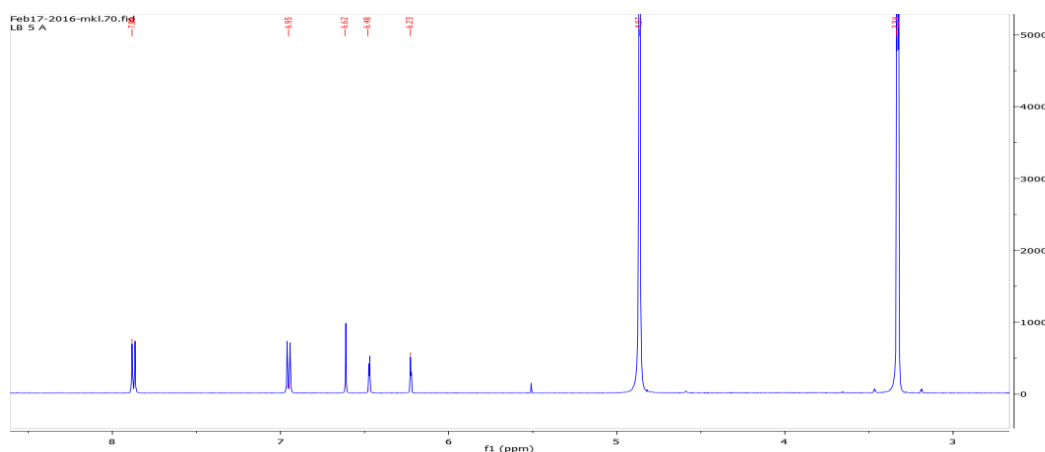


Figure 85. Spectre RMN ^1H du composé 6 dans CD_3OD

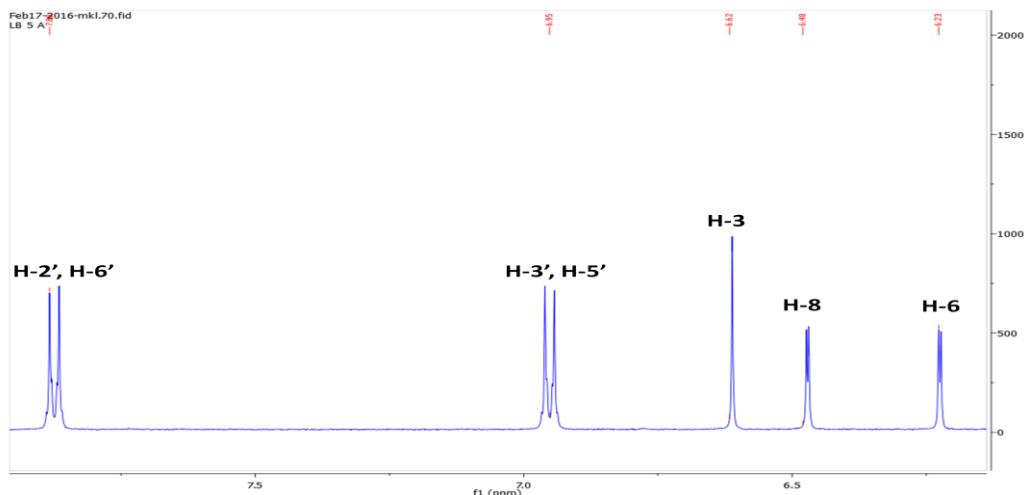


Figure 86. Spectre RMN ^1H élargi du composé **6** dans CD_3OD

A partir de ces protons caractéristiques, le spectre HSQC (Figure 87) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones les portant (C-3, C-6, C-8, C-2', C-3', C-5' et C-6').

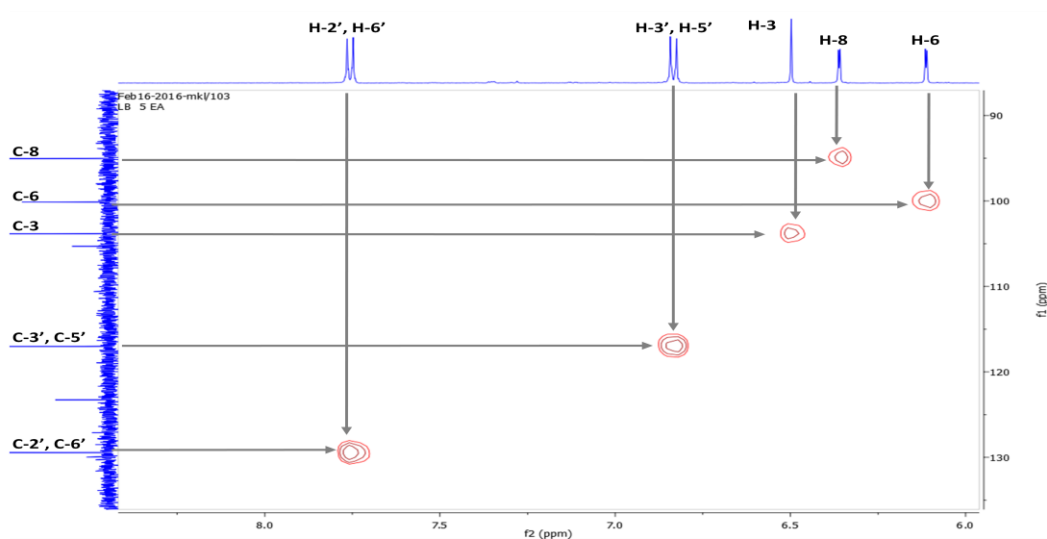


Figure 87. Spectre HSQC du composé **6** dans CD_3OD

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 88) révèle la présence de treize signaux, dont les deux déplacements chimiques δ_{C} 117,0 ppm et δ_{C} 129,4 ppm sont attribuables à deux carbones chacun, et un signal de carbonyle à δ_{C} 183,9 ppm.

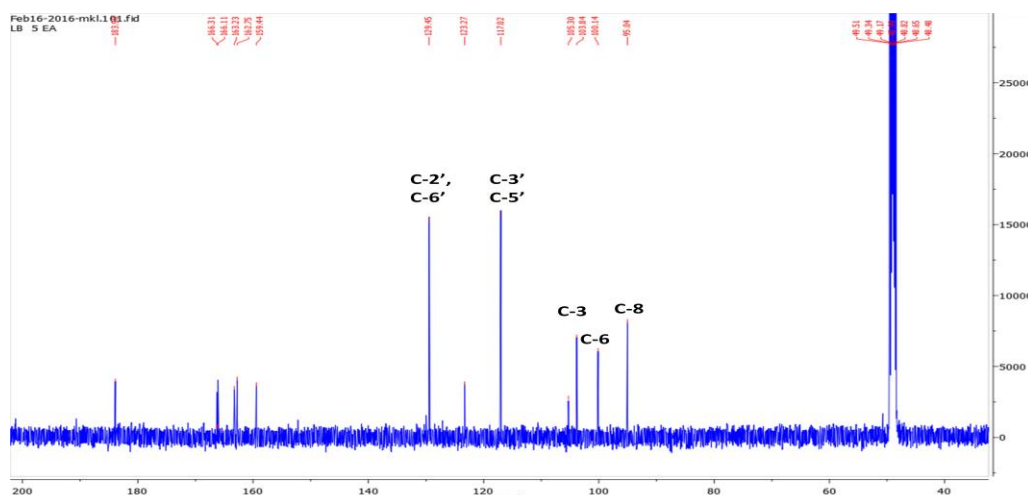


Figure 88. Spectre RMN ^{13}C du composé **6** dans CD_3OD

L'analyse de spectre DEPT-135 (Figure 89) révèle la présence de huit carbones quaternaires résonant à δ_{C} 105,3 ; 123,8 ; 159,4 ; 162,7 ; 163,2 ; 166,1 ; 166,3 et 183,9 ppm, et confirme les sept méthines identifiés précédemment C-8 (δ_{C} 95,0 ppm); C-6 (δ_{C} 100,1 ppm); C-3 (δ_{C} 103,8 ppm); C-3',C-5' (δ_{C} 117,0 ppm) et C-2',C-6' (δ_{C} 129,4 ppm).

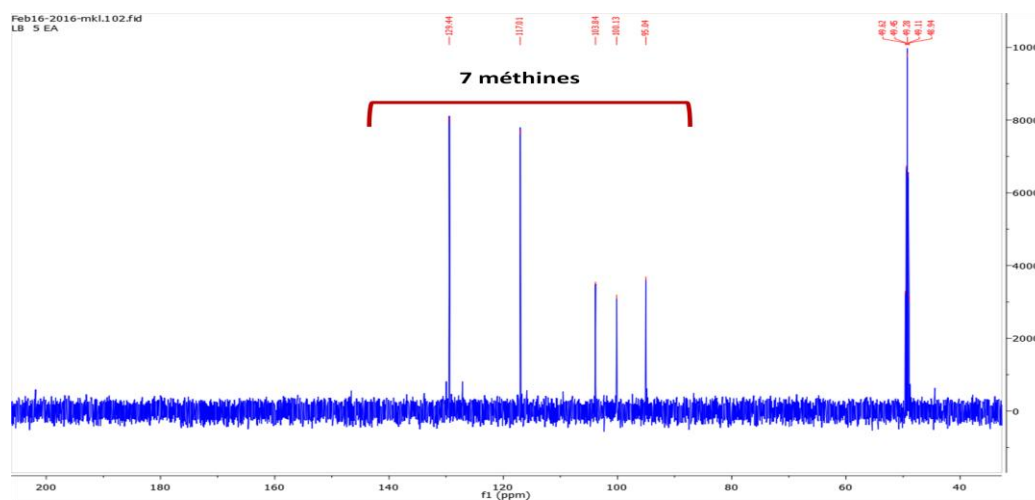


Figure 89. Spectre DEPT-135 du composé **6** dans CD_3OD

L'analyse du spectre HMBC (Figure 90) permet d'identifier les autres carbones. Les corrélations observées entre le proton H-8 (δ_{H} 6,48 ppm) avec le méthine à δ_{C} 100,1 ppm et le carbone quaternaire à δ_{C} 105,3 ppm, et les corrélations entre le proton H-6 (δ_{H} 6,23 ppm) avec le carbone quaternaire à δ_{C} 105,3 ppm permettent l'attribution de ces carbones au C-6 et C-10 respectivement du noyau A d'un flavonoïde. Le spectre COSY (Figure 91) indique une tache de corrélation entre ces deux derniers protons.

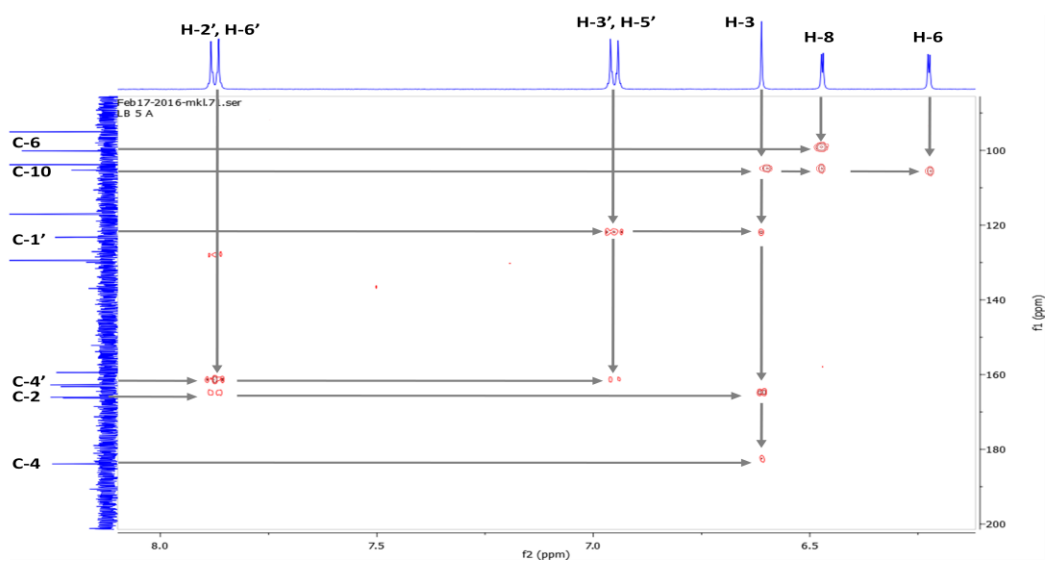


Figure 90. Spectre HMBC du composé **6** dans CD₃OD

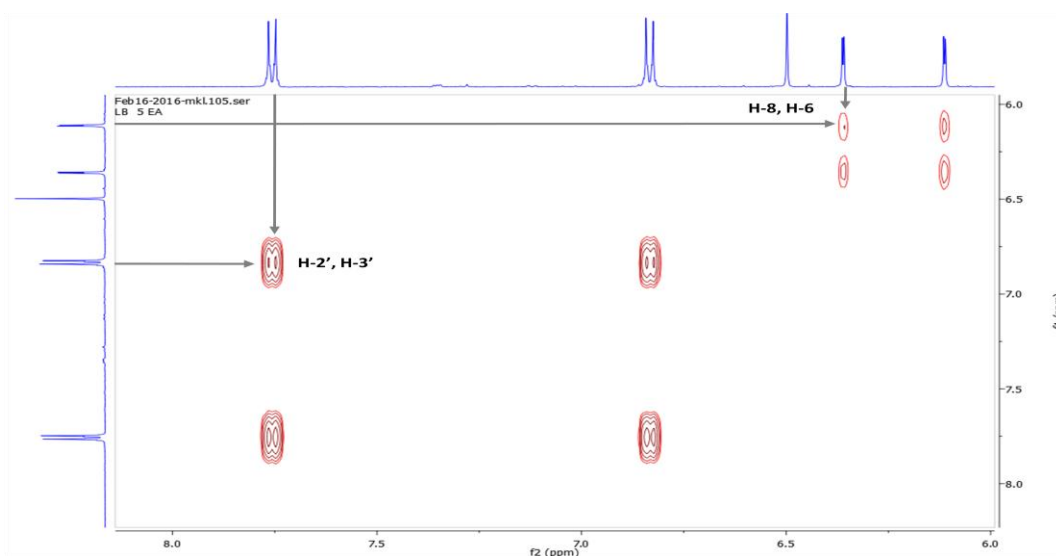


Figure 91. Spectre COSY du composé **6** dans CD₃OD

Toujours sur le spectre HMBC (Figure 90), les taches de corrélation entre les protons H-3', H-5' (δ_H 6,95 ppm) et les carbones quaternaires résonant à δ_C 123,2 et 162,7 ppm, permettent l'attribution de ces carbones à C-1' et C-4'. Ainsi que les taches de corrélation entre les protons H-2' et H-6' (δ_H 7,88 ppm) et les carbones quaternaires résonant à δ_C 166,1 et 162,7 ppm permettent leurs attribution à C-2 et C-4', confirmant la présence d'un système AA'XX' du noyau B d'un flavonoïde.

Par ailleurs sur le spectre HMBC (Figure 90), le proton oléfinique H-3 (δ_{H} 6,62 ppm) donne des taches de corrélation avec les carbones quaternaires C-10 (δ_{C} 105,30 ppm), C-1' (δ_{C} 123,28 ppm), C-2 (δ_{C} 166,1 ppm), et le carbonyle résonant à δ_{C} 183,9 ppm attribuable à C-4.

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **6** sont reportées dans le tableau 30.

L'ensemble de ces données permet d'affirmer que le composé **6** est l'apigénine.

Il s'agit d'une flavone très commune, précédemment isolée de *Salvia microstegia* Boiss. et Bal. [122], *Thymus sibthorpii* Benth. [123] (Famille des Lamiacées), et de *Lysimachia vulgaris* L. [124] (Famille des Primulacées).

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données décrites dans la littérature [125].

Tableau 30. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **6**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
2	166,1	C	
3	103,8	CH	6,62 s
4	183,9	C	
5	163,2	C	
6	100,1	CH	6,23 d ($J = 2,3$ Hz)
7	166,3	C	
8	95,0	CH	6,48 d ($J = 2,3$ Hz)
9	159,4	C	
10	105,3	C	
1'	123,2	C	
2'	129,4	CH	7,88 d ($J = 8,4$ Hz)
3'	117,0	CH	6,95 d ($J = 8,4$ Hz)
4'	162,7	C	
5'	117,02	CH	6,95 d ($J = 8,4$ Hz)
6'	129,45	CH	7,88 d ($J = 8,4$ Hz)

IV.2.7. Détermination structurale du composé 7

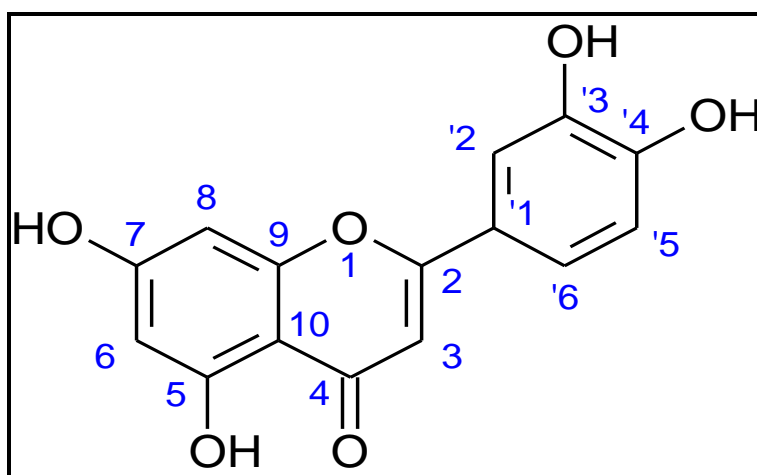


Figure 92. Structure du composé 7

La fluorescence violette du composé 7 sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) suggère une structure flavonique.

Les spectres RMN¹H et RMN ¹³C présentent des similitudes avec ceux du composé 6. Ils permettent de reconnaître tous les signaux caractéristiques des noyaux aromatiques d'un flavonoïde.

Le spectre RMN ¹H (Figure 93, 94) révèle clairement la présence de :

- Deux protons résonant sous forme de doublets à δ_{H} 6,22 et 6,46 ppm avec une constante de couplage $J = 2,0 \text{ Hz}$ caractéristiques des protons H-6 et H-8, indiquant un noyau A disubstitué en position C-5 et C-7.
- Trois protons aromatiques sous forme de : deux doublets résonant à δ_{H} 6,93 ppm ($J = 8,2 \text{ Hz}$) attribuable à H-5' et à δ_{H} 7,39 ppm ($J = 2,3 \text{ Hz}$) attribuable à H-2', et un doublet de doublets résonant à δ_{H} 7,41 ppm ($J = 8,2 ; 2,3 \text{ Hz}$) attribuable à H-6', indiquant un noyau B disubstitué en position C-3' et C-4'.
- Un singulet résonant à δ_{H} 6,56 ppm attribuable au proton H-3.

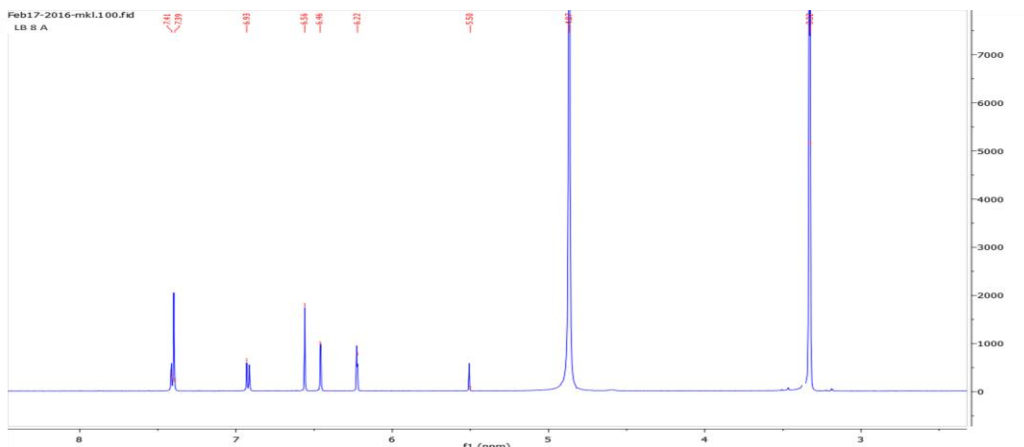


Figure 93. Spectre RMN ^1H du composé **7** dans CD_3OD

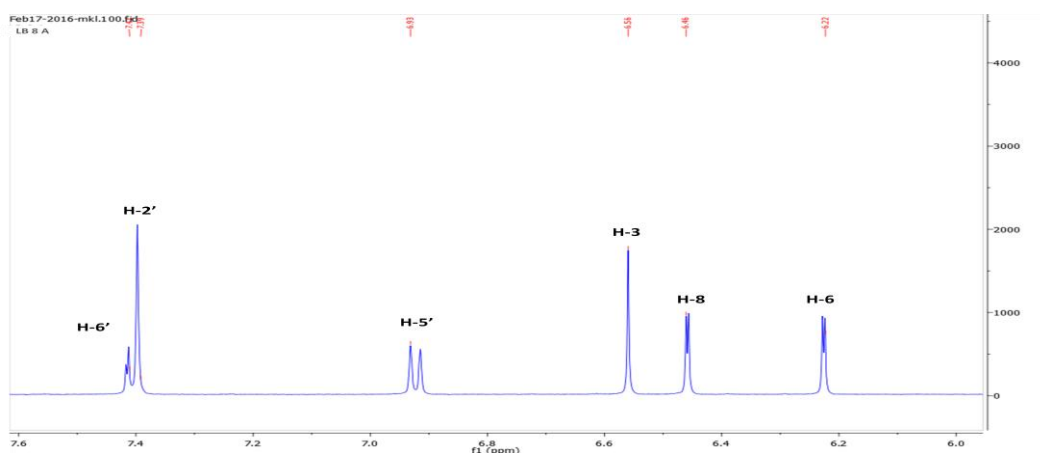


Figure 94. Spectre RMN ^1H élargi du composé **7** dans CD_3OD

Les déplacements chimiques des carbones C-3, C-6, C-8, C-2', C-5' et C-6' ont été déterminés par l'analyse du spectre HSQC (Figure 95).

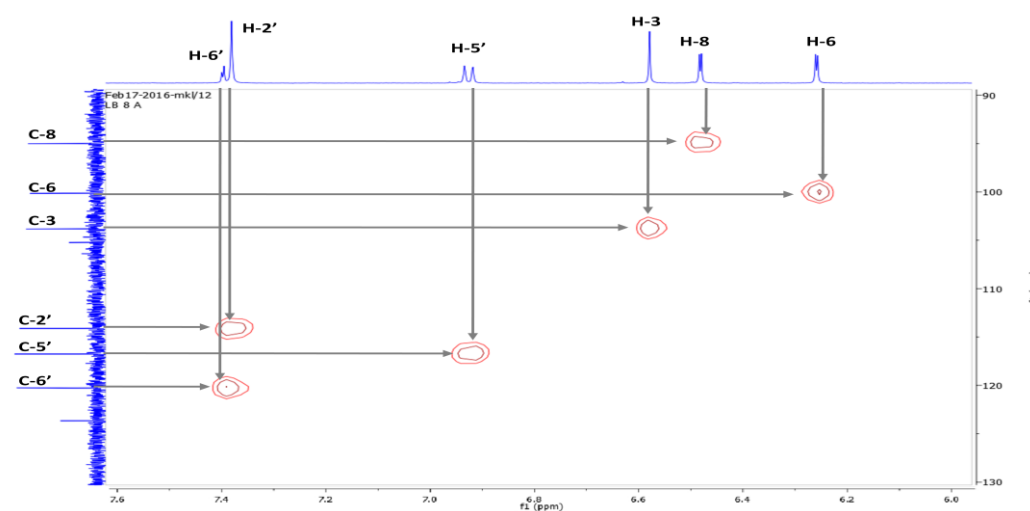


Figure 95. Spectre HSQC du composé **7** dans CD_3OD

Tableau 31. Attribution HSQC du composé **7**

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
3	103,8	6,56
6	100,1	6,22
8	95,0	6,46
2'	114,1	7,39
5'	116,7	6,93
6'	120,2	7,41

L'analyse combinée du spectre RMN ^{13}C (Figure 96) et DEPT-135 (Figure 97) révèle la présence de quinze atomes de carbone répartis en :

- Neuf carbones quaternaires à δ_C 105,2 ; 123,6 ; 147,0 ; 151,0 ; 159,4 ; 183,8 ; 163,2 ; 166,2 et 166,3 ppm, dont le déplacement chimique δ_C 183,8 ppm correspondant à une fonction carbonyle,
- Six méthines à δ_C 95,0 ; 100,1 ; 103,8 ; 114,1 ; 116,7 et 120,2 ppm. (Identifiés précédemment par examen du spectre HSQC : C-8, C-6, C-3, C-2', C-5' et C-6').

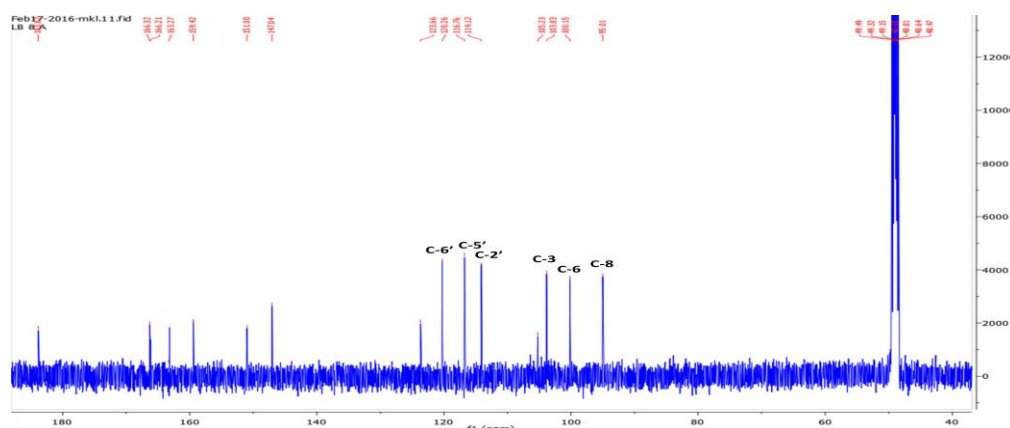


Figure 96. Spectre RMN ^{13}C du composé **7** dans CD_3OD

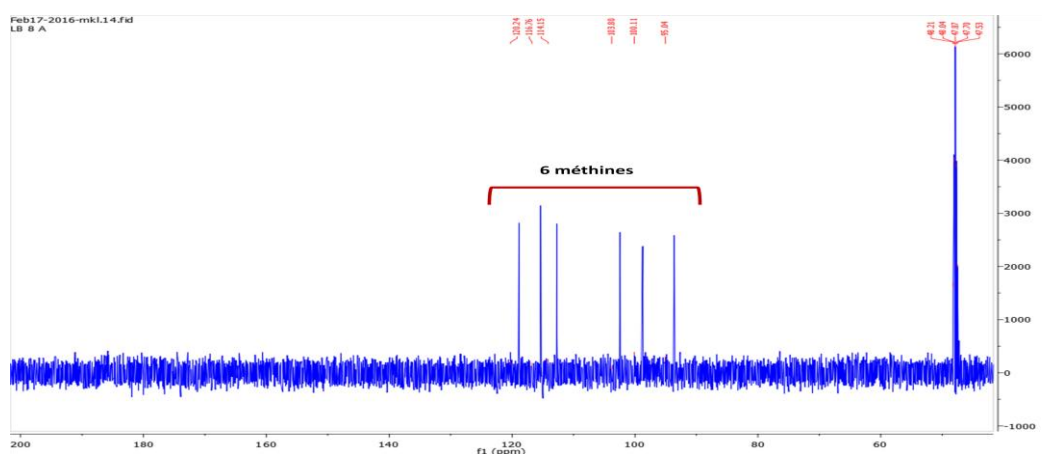


Figure 97. Spectre DEPT-135 du composé **7** dans CD_3OD

L'attribution des autres carbones est obtenue par analyse du spectre HMBC (Figure 98).

Les taches de corrélation entre le singulet aromatique H-3 (δ_H 6,56 ppm) et les carbones quaternaires à δ_C 105,2 ; 123,6 ; 166,2 et 183,8 ppm permettent leurs attributions aux carbones C-10, C-1', C-2 et le carbonyle en position C-4.

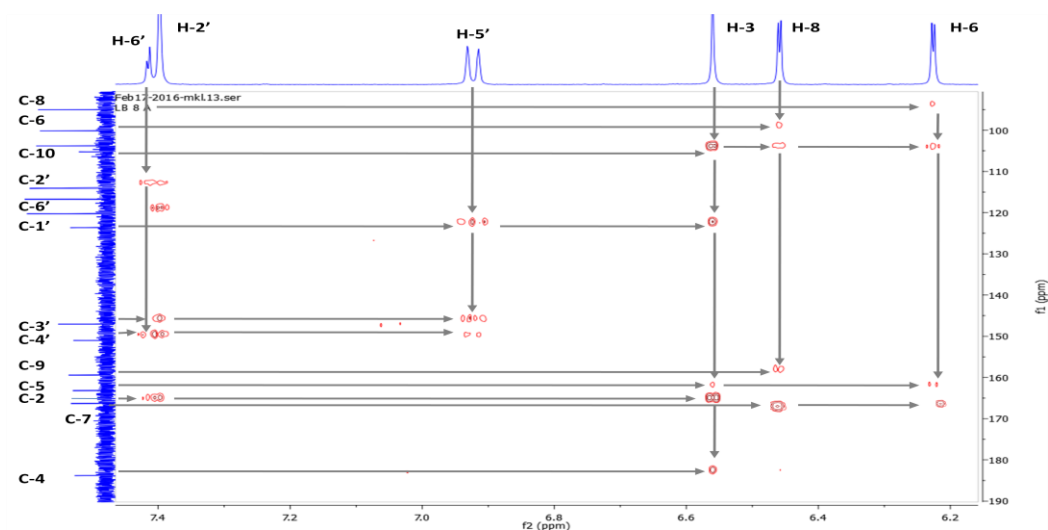


Figure 98. Spectre HMBC du composé **7** dans CD₃OD

Parmi les corrélations observées du noyau B, le spectre HMBC (Figure 98) montre des taches de corrélation entre le proton H-5' (δ_H 6,93 ppm) et les carbones quaternaires à δ_C 123,6 ; 147,0 et 151,0 ppm. Ils sont attribuables à C-1', C-3' et C-4'. Et la corrélation entre le proton H-6' (δ_H 7,41 ppm) et le méthine à δ_C 114,1 ppm permet son attribution à C-2'.

Le proton H-5' corrèle à son tour avec le proton H-6' sur le spectre COSY (Figure 99).

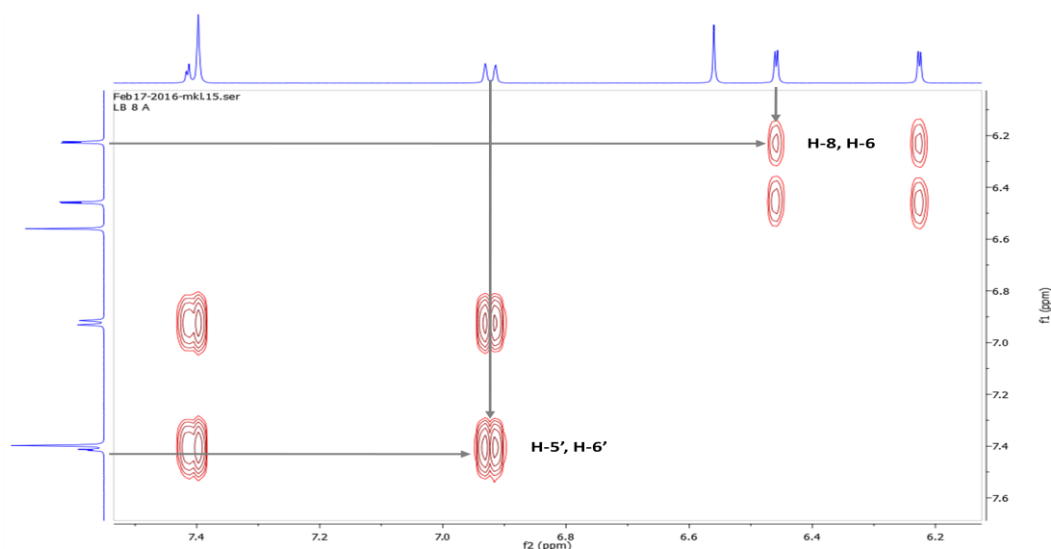


Figure 99. Spectre COSY du composé **7** dans CD₃OD

Le spectre HMBC (Figure 98) montre également des taches de corrélation entre le proton H-6 (δ_{H} 6,22 ppm) et les carbones quaternaires résonant à δ_{C} 163, et 166,3 ppm attribuables à C-5 et C-7, et la corrélation entre le proton H-8 (δ_{H} 6,46 ppm) et le carbone quaternaire résonant à δ_{C} 159,4 ppm permet son attribution au carbone C-9.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones quaternaires C-3' (δ_{C} 147,0 ppm), C-4' (δ_{C} 151,0 ppm), C-5 (δ_{C} 163,2 ppm) et C-7 (δ_{C} 166,3 ppm) indiquent qu'ils sont des carbones oxygénés, et le composé **7** est tétra-substitué, dont les deux noyaux A et B ont deux groupes hydroxyles chacun.

Les données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **7** sont reportées dans le tableau 32.

L'ensemble de ces données permet d'attribuer au composé **7** la structure de la lutéoline.

Il s'agit d'une flavone, isolée auparavant de *Salvia chloroleuca* [126], *Solenostemon monostachys* Briq. [127] (Famille des Lamiacées), et de *Lysimachia nummularia* L. [124] (Famille des Primulacées), mais isolée pour la première fois de l'espèce *Salvia phlomoides*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données de la littérature [128].

Tableau 32. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **7**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
2	166,2	C	-
3	103,8	CH	6,56 s
4	183,8	C	-
5	163,2	C	-
6	100,1	CH	6,22 d ($J = 2,0$ Hz)
7	166,3	C	-
8	95,0	CH	6,46 d ($J = 2,0$ Hz)
9	159,4	C	-
10	105,2	C	-
1'	123,6	C	-
2'	114,1	CH	7,39 d ($J = 2,3$ Hz)
3'	147,0	C	-
4'	151,0	C	-
5'	116,7	CH	6,93 d ($J = 8,2$ Hz)
6'	120,2	CH	7,41 dd ($J = 8,2 ; 2,3$ Hz)

IV.2.8. Détermination structurale du composé 8

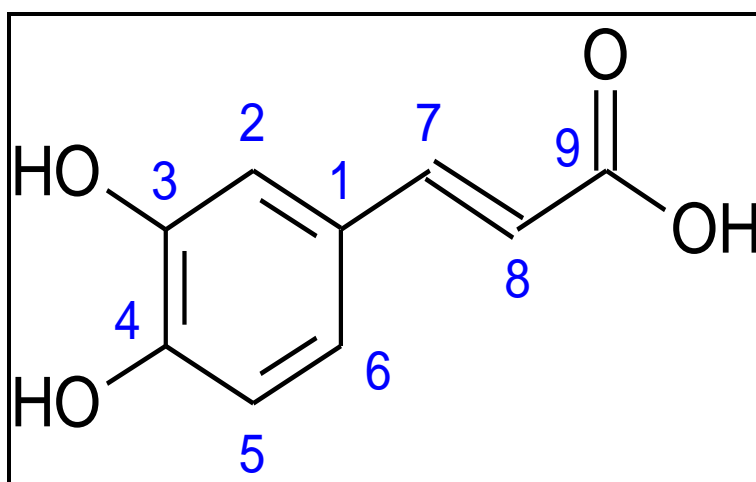


Figure 100. Structure du composé 8

Le composé 8 donne une fluorescence bleue sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$), suggérant une structure d'un acide phénolique.

Le spectre RMN¹H (Figure 101, 102) montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4, avec notamment :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, un résonant à $\delta_{\text{H}} 6,77 \text{ ppm}$ ($J = 8,2 \text{ Hz}$), et l'autre résonant à $\delta_{\text{H}} 7,03 \text{ ppm}$ ($J = 2,1 \text{ Hz}$), attribuables à H-5 et H-2 respectivement.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H ($J = 8,2 ; 2,1 \text{ Hz}$) à $\delta_{\text{H}} 6,92 \text{ ppm}$, attribuable à H-6. Le spectre COSY (Figure 103) montre des taches de corrélation entre ces protons indiquant la substitution du noyau aromatique en position 3 et 4.

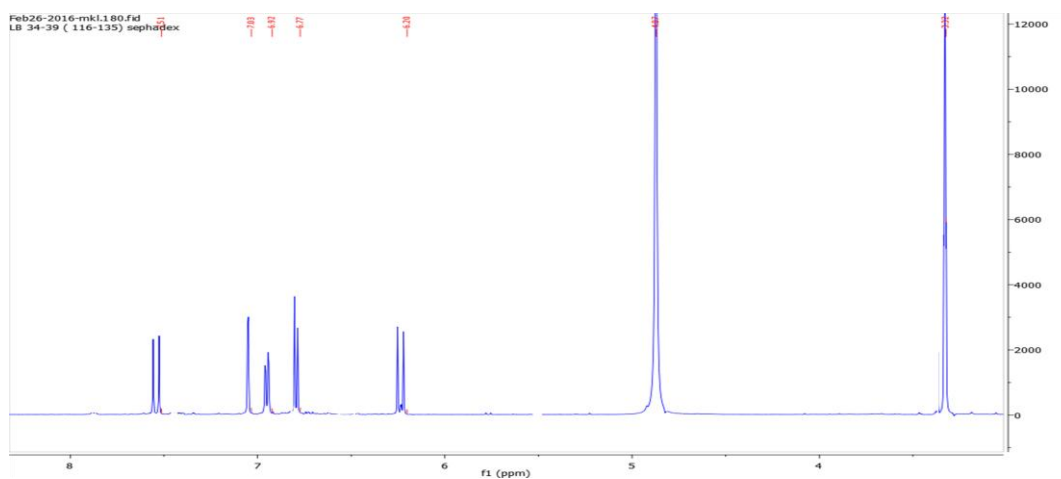


Figure 101. Spectre RMN¹H du composé 8 dans CD₃OD

Le spectre RMN¹H montre aussi deux doublets d'intégration 1H chacun à δ_H 7,51 et δ_H 6,20 ppm ($J = 15,9$ Hz), cette valeur de constante de couplage indique la présence de deux protons éthyléniques en position trans. Ce système est caractéristique des groupements de type cinnamique rencontrés dans les acides phénoliques.

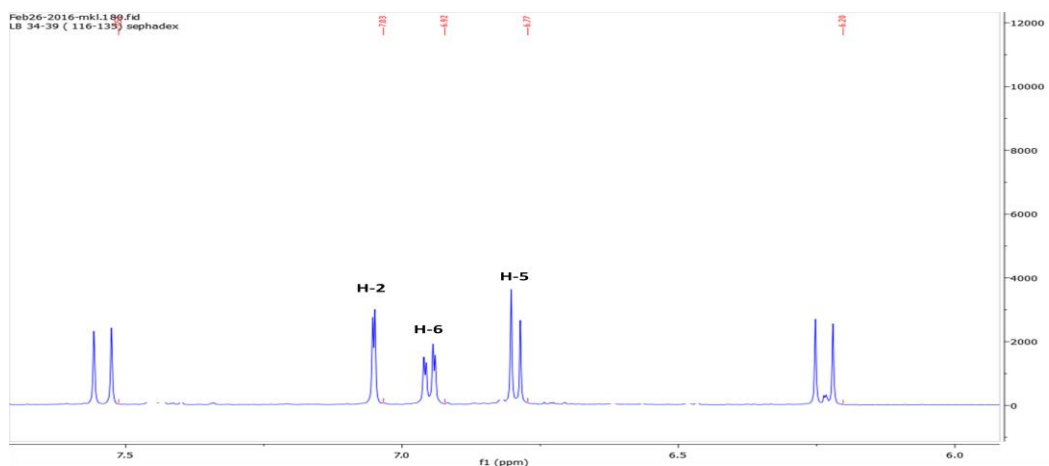


Figure 102. Spectre RMN ¹H élargi du composé **8** dans CD₃OD

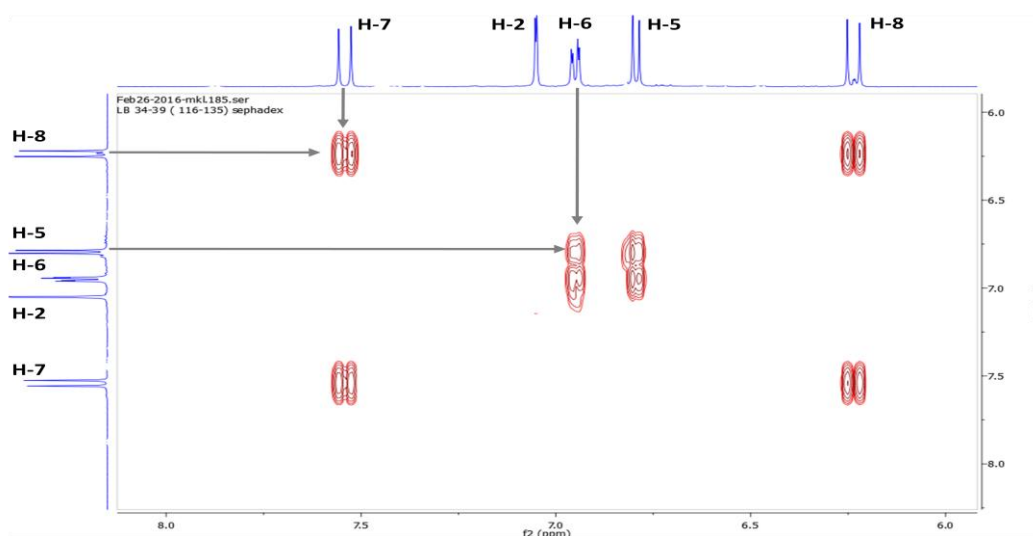


Figure 103. Spectre COSY du composé **8** dans CD₃OD

L'analyse des spectres RMN ¹³C (Figure 104) et DEPT-135 (Figure 105) permis de mettre en évidence la présence de neuf atomes de carbone avec une fonction carboxylique à δ_C 171,21 ppm, parmi lesquels on dénote la présence de quatre carbones quaternaires à δ_C 127,8 ; 149,4 ; 146,8 et 171,2 ppm, pas de carbones éthyléniques, et cinq méthines à δ_C 115,0 ; 115,7 ; 116,4 ; 122,7 et 146,8 ppm. Les déplacements chimiques des protons correspondants sont déterminés par spectre HSQC (Figure 106).

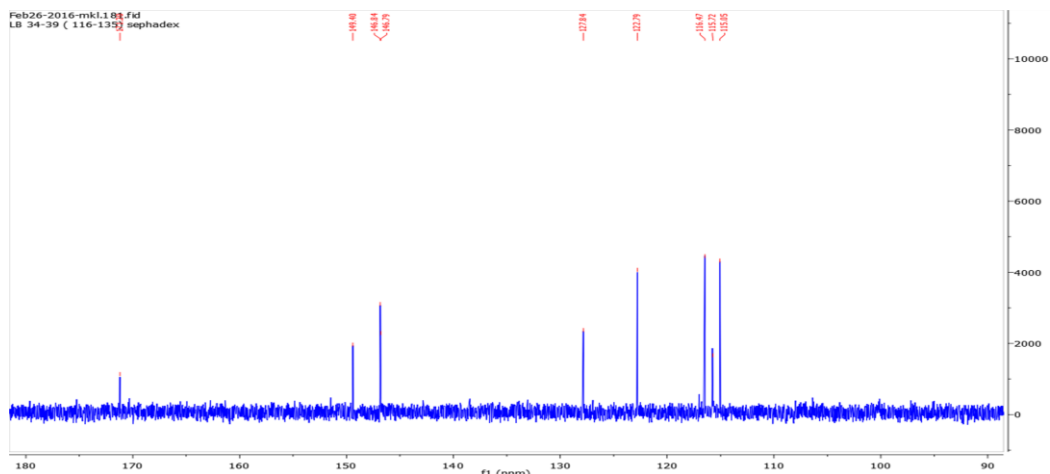


Figure 104. Spectre RMN ^{13}C du composé **8** dans CD_3OD

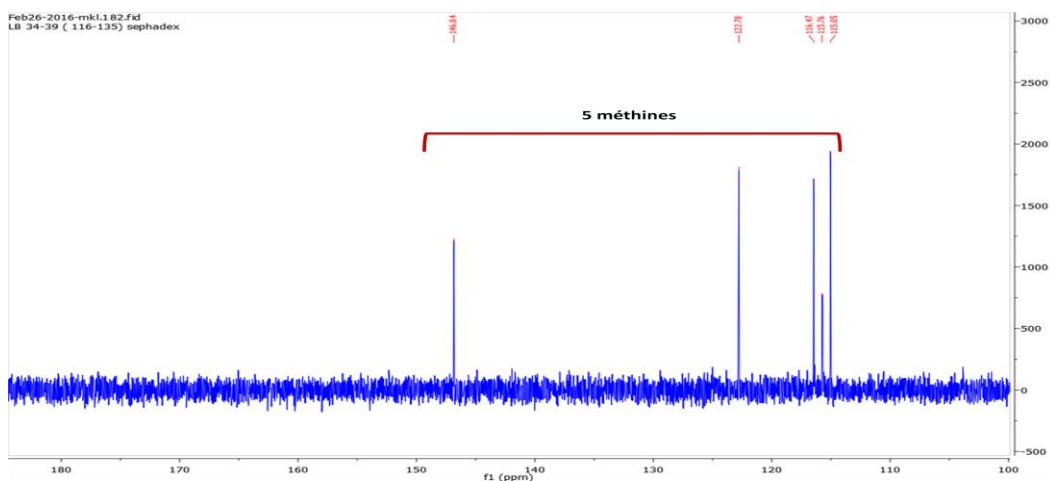


Figure 105. Spectre DEPT-135 du composé **8** dans CD_3OD

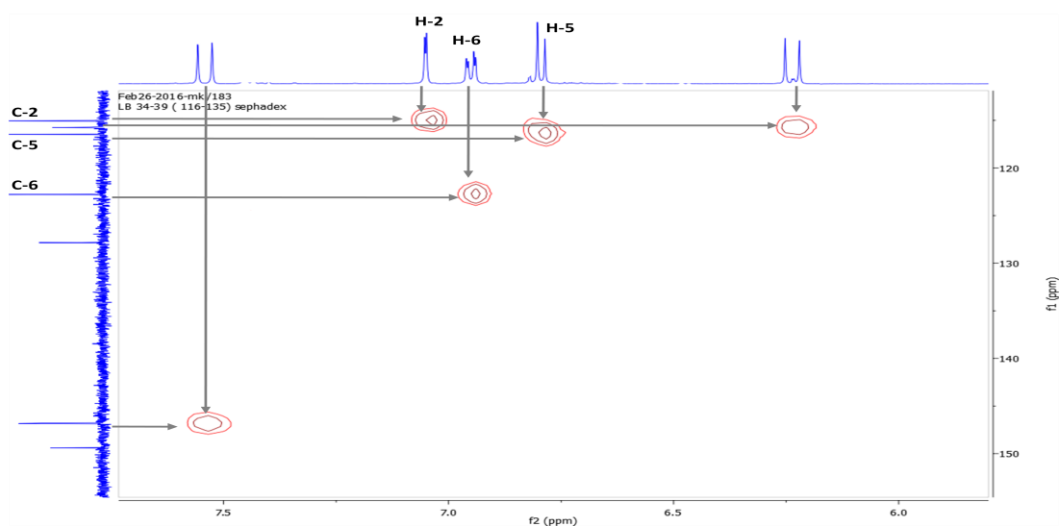


Figure 106. Spectre HSQC élargi du composé **8** dans CD_3OD

Tableau 33. Attribution HSQC du composé **8**

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
2	115,0	7,03
5	116,4	6,77
6	122,7	6,92
-	146,8	7,51
-	115,7	6,20

Les carbones résonant à δ_C 115,0 ; 116,4 et 122,7 ppm indiquent la présence d'un pyrocatechol.

Le spectre HMBC (Figure 107) permet la localisation de la fonction carboxylique et les carbones éthyléniques.

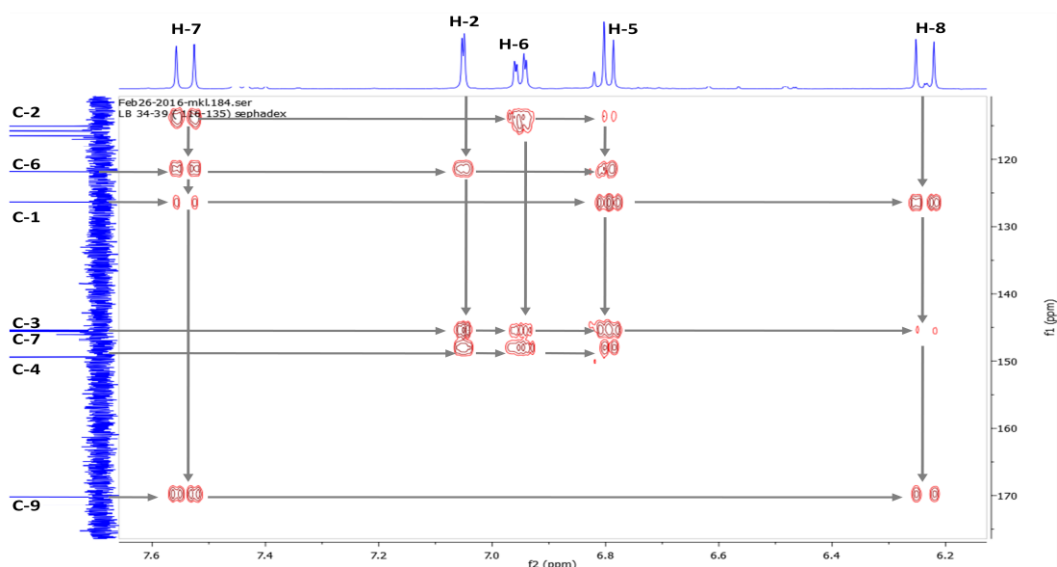


Figure 107. Spectre HMBC élargi du composé **8** dans CD₃OD

Il montre des taches de corrélation entre le proton résonant à δ_H 7,51 ppm et les carbones C-2, C-6, le carbone quaternaire résonant à δ_C 127,8 ppm qui ne peut être attribué qu'à C-1, permettant son attribution au proton H-7. Ce proton corrèle à son tour avec le carbone à δ_C 146,8 ppm (C-7) sur le spectre HSQC (Figure 106) et avec le proton à δ_H 6,20 ppm sur le spectre COSY (Figure 103).

Les corrélations entre le proton résonant à δ_H 6,20 ppm et les carbones C-1 et C-7 confirment son attribution au proton H-8, et les corrélations observées entre les protons H-2, H-5, H-6, H-8 et le carbone C-7 confirme la localisation de la double liaison entre C-7 et C-8.

Toujours sur le spectre HMBC (Figure 107), les corrélations entre les protons H-2, H-5 et H-6 avec le carbone quaternaire à δ_C 149,4 ppm permettent l'attribution de ce carbone à C-4.

Il ne reste que le signal résonant à δ_C 146,7 ppm que nous pouvons par conséquent l'attribuer à C-3.

Par toutes ces corrélations, on constate que la fonction carboxylique est en position 9.

Les déplacements chimiques à δ_C 146,7 et 149,4 ppm relatifs aux carbones oxygénés attribuables aux C-3 et C-4 indiquent que deux groupements hydroxylés sont liés aux positions 3 et 4. L'absence de carbones supplémentaires dans le spectre RMN¹³C indique qu'il s'agit de deux groupements hydroxyles (-OH).

Les données relatives aux spectres RMN ¹³C, DEPT-135 et RMN ¹H du composé **8** sont reportées dans le tableau 34.

Ces résultats permettent d'établir la structure de l'acide caféique.

C'est un acide phénolique présent dans plusieurs plantes telles que *Salvia officinalis* L. [129], *Thymus vulgaris* L. [130] (Famille des Lamiacées), et *Cinnamomum verum* [131] (Famille des Lauracées), mais isolé pour la première fois de l'espèce *Salvia phlomoides*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données de littérature [132].

Tableau 34. Données relatives aux spectres RMN ¹³C, DEPT-135 et RMN ¹H du composé **8**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
1	127,8	C	-
2	115,0	CH	7,03 d ($J = 2,1$ Hz)
3	146,8	C	-
4	149,4	C	-
5	116,4	CH	6,77 d ($J = 8,2$ Hz)
6	122,7	CH	6,92 dd ($J = 2,1 ; 8.2$ Hz)
7	146,8	CH	7,51 d ($J = 15,9$ Hz)
8	115,7	CH	6,20 d ($J = 15,9$ Hz)
9	171,2	C	-

IV.2.9. Détermination structurale du composé 9

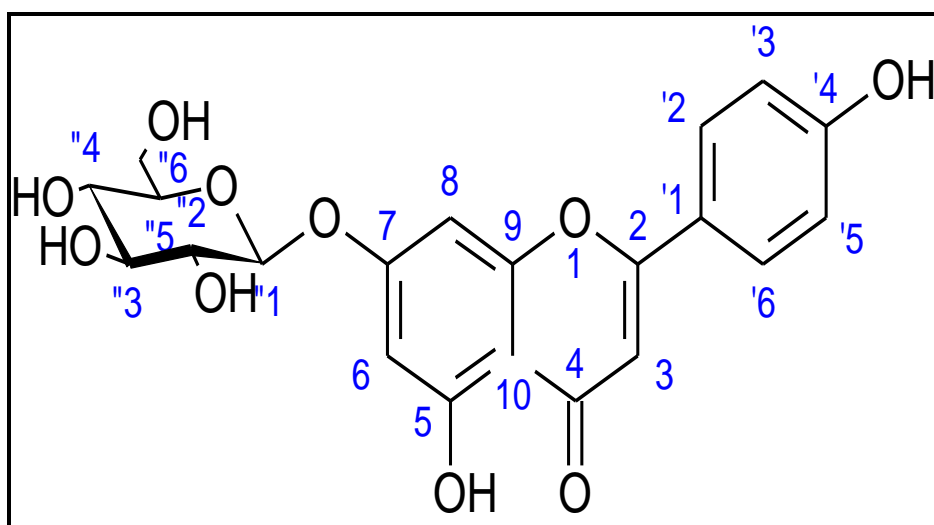


Figure 108. Structure du composé 9

La fluorescence violette du composé 9 sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) est caractéristique d'un squelette flavonique.

Les spectres RMN¹H (Figure 109) et RMN ¹³C (Figure 112) du composé 9 présentent des similitudes avec ceux du composé 6 identifié comme l'apigénine.

Cette ressemblance a été vue sur le spectre RMN ¹H du composé 9 à partir des deux doublets à δ_{H} 6,50 ppm (H-6) et δ_{H} 6,65 ppm (H-8) du noyau A d'un flavonoïde, deux doublets à δ_{H} 7,90 ppm (H-2', H-6'), et δ_{H} à 6,93 ppm (H-3',H-5'), et un proton oléfinique à δ_{H} 6,82 ppm (H-3) du noyau C.

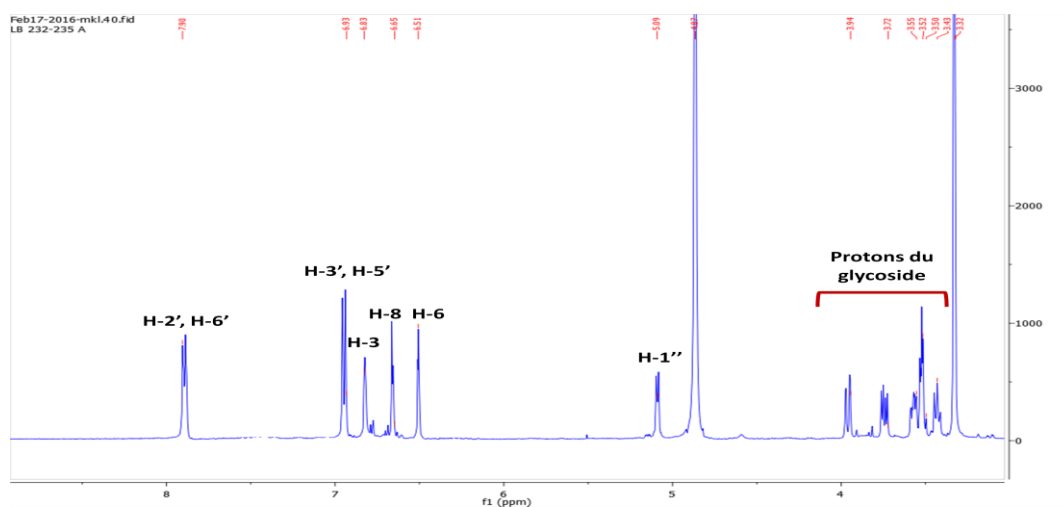


Figure 109. Spectre RMN¹H du composé 9 dans CD₃OD

Le spectre COSY (Figure 110) montre les taches de corrélation entre H-6 et H-8, et entre H-2' et H-3'.

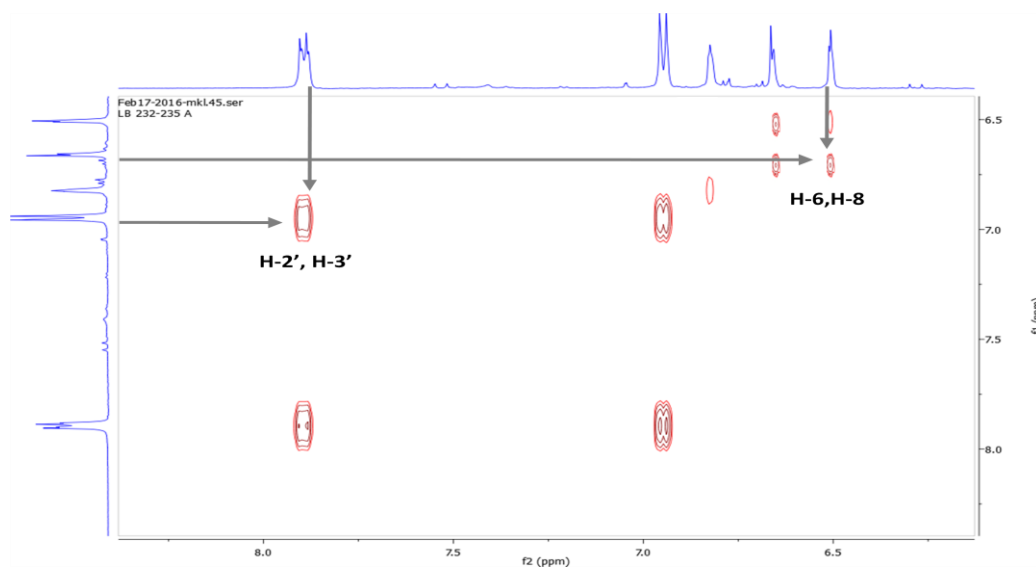


Figure 110. Spectre COSY élargi -1- du composé **9** dans CD₃OD

Les corrélations observées sur le spectre HSQC (Figure 111) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones les portant.

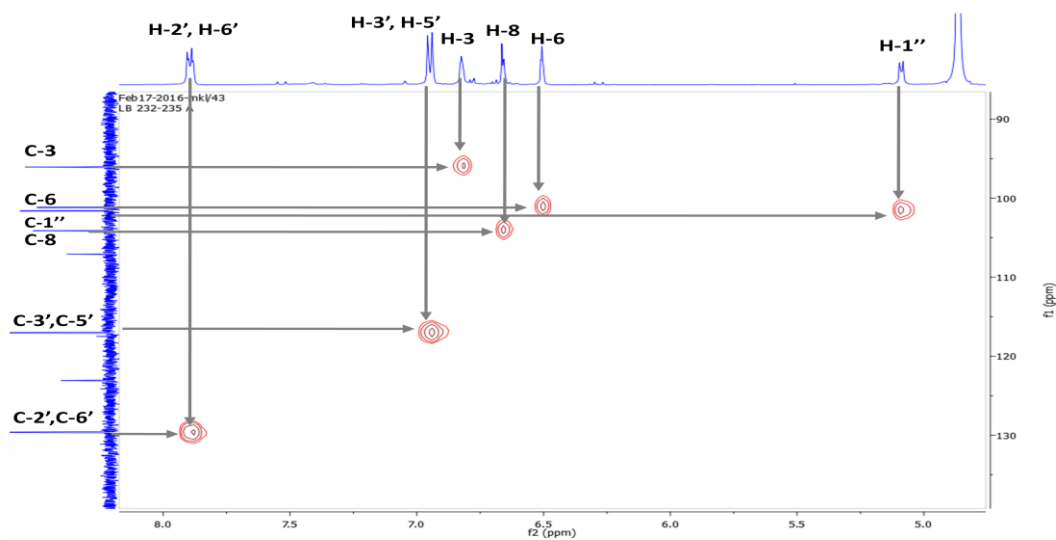
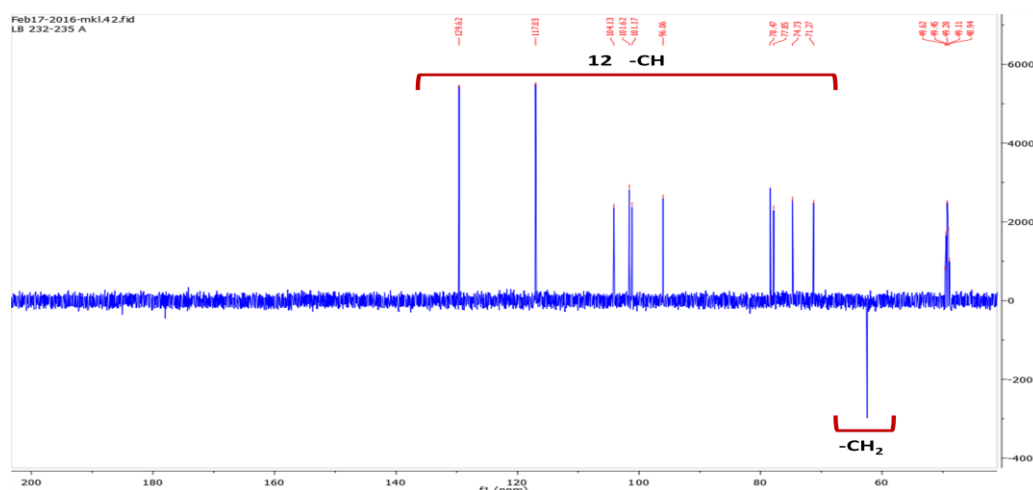
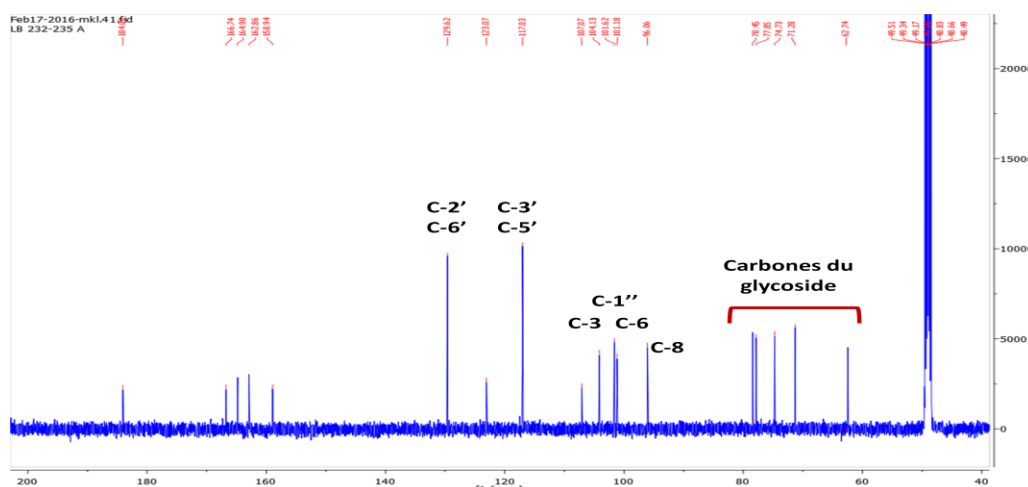


Figure 111. Spectre HSQC élargi -1- du composé **9** dans CD₃OD

La différence réside dans l'apparition des signaux entre δ_H 3,42-3,94 ppm, caractéristiques des protons du sucre, représenté par un doublet résonant à δ_H 5,09 ppm avec une constante de couplage $J = 7,4$ Hz caractéristique du proton anomérique H-1'', porté par le carbone résonant à δ_C 101,6 ppm attribuable au C-1'' d'après le spectre HSQC (Figure 111) signifiant une configuration β -O-glycosidique.

L'analyse des spectres RMN ^{13}C (Figure 112) et DEPT-135 (Figure 113) révèle la présence de vingt et un atomes de carbone, parmi lesquels on distingue un méthylène, huit carbones quaternaires et douze méthines.



Conformément au spectre RMN ^1H , les carbones résonant à δ_{C} 62,7 ; 71,2 ; 74,7 ; 77,8 ; 78,4 et 101,6 ppm sur le spectre RMN ^{13}C (Figure 112) montre bien la présence d'un sucre.

Ces valeurs sont indicatives d'un groupement glucopyranosyle attribuables à C-6'', C-4'', C-2'', C-5'', C-3'' et C-1'' [133].

Le spectre HSQC (Figure 114) permet de démontrer leur attribution aux protons résonant respectivement à δ_{H} 3,94 ($\text{H}_{\text{a}}\text{-6}''$) et 3,72 ($\text{H}_{\text{b}}\text{-6}''$) ; 3,42 ($\text{H-4}''$) ; 3,50 ($\text{H-2}''$) ; 3,52 ($\text{H-5}''$) ; 3,55 ($\text{H-6}''$) et 5,09 ($\text{H-1}''$) ppm.

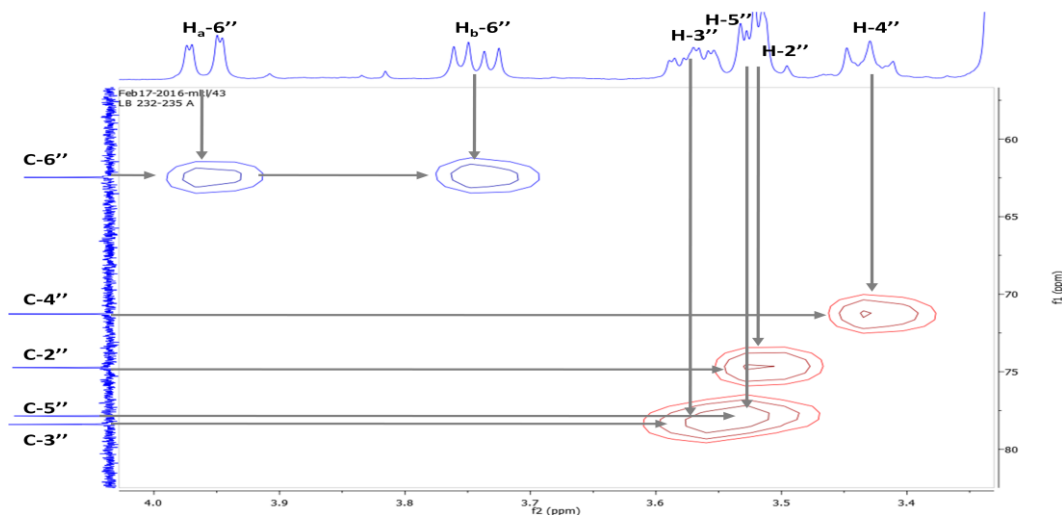


Figure 114. Spectre HSQC élargi -2- du composé **9** dans CD₃OD

Les corrélations observées sur le spectre COSY (Figure 115) confirment les attributions des protons du groupement glucopyranosyle, entre le proton anomérique H-1'' et H-2''. H-2'' et H-3'', H-3'' et H-4'', H-4'' et H-5'', H_a-6'' et H_b-6''.

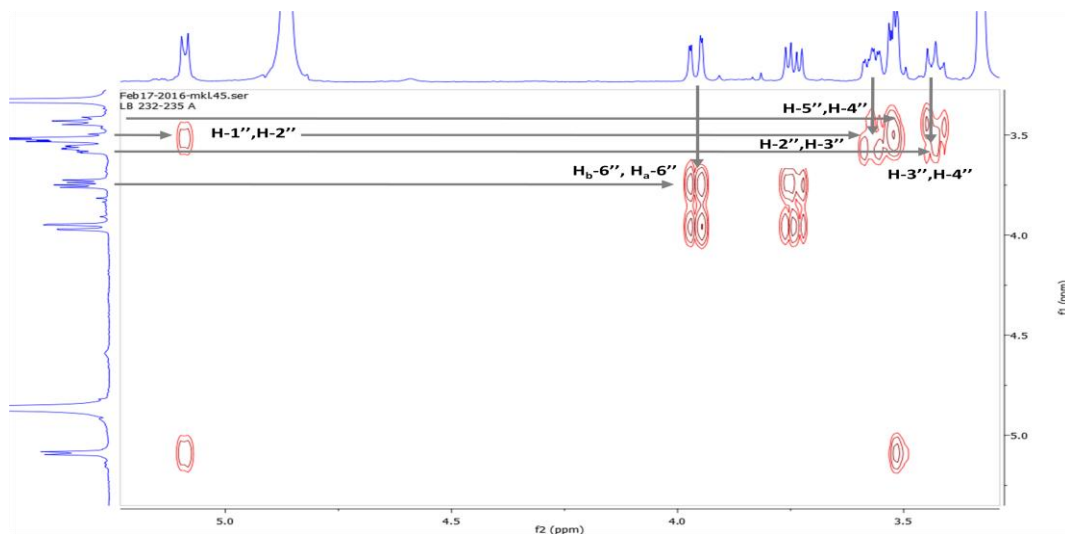


Figure 115. Spectre COSY élargi -2- du composé **9** dans CD₃OD

Le spectre RMN ¹³C (Figure 112) montre également des signaux entre δ_C 104,1 et le signal d'un carbonyle à δ_C 184,0 ppm relatifs à un squelette flavonique :

δ_C : 162,9 ; 101,1 ; 164,8 et 104,1 ppm pour le noyau A.

δ_C : 123,0 ; 129,6 ; 117,0 et 162,8 ppm pour le noyau B.

δ_C : 164,8 ; 96,0 ; 184,0 ; 158,9 et 107,0 ppm pour le noyau C.

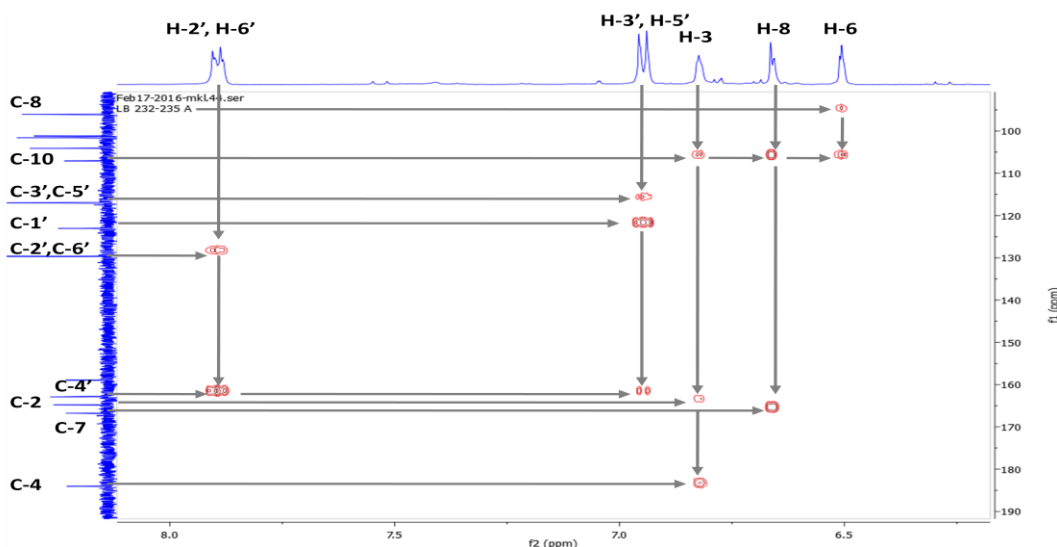


Figure 116. Spectre HMBC élargi du composé **9** dans CD₃OD

Sur le spectre HMBC (Figure 116) :

- Les corrélations entre le proton H-3, H-6, H-8 et le carbone quaternaire à δ_C 107,0 ppm attribuable à C-10.
- Les corrélations entre les protons H-2', H-6' ; H-3', H-5' et le carbone quaternaire oxygéné permet son attribution à C-4'.
- Les corrélations entre le proton H-3 et le carbone quaternaire à δ_C 164,8 ppm et le carbonyle à δ_C 184,0 ppm permettent l'attribution de ces carbones à C-2 et C-4 respectivement.
- La tache de corrélation entre le proton H-8 et le carbone quaternaire à δ_C 166,7 ppm permet l'attribution de ce carbone à C-7.

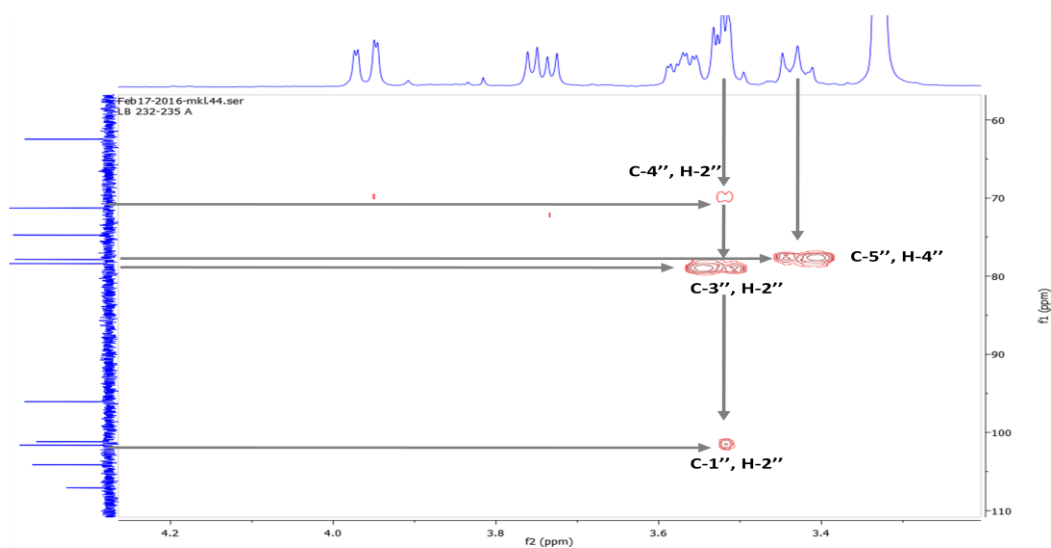


Figure 117. Spectre HMBC élargi du composé **9** dans CD₃OD

Le spectre HMBC (Figure 117), montre également des taches de corrélation entre le proton H-2'' et les carbones C-4'', C-3'' et C-1'', et entre le proton H-4'' et le carbone C-5''.

Par ailleurs, la tache de corrélation (Figure 118) entre le le proton anomérique H-1'' et le carbone C-7 permet de localiser le groupement glucopyranosyle en position 7.

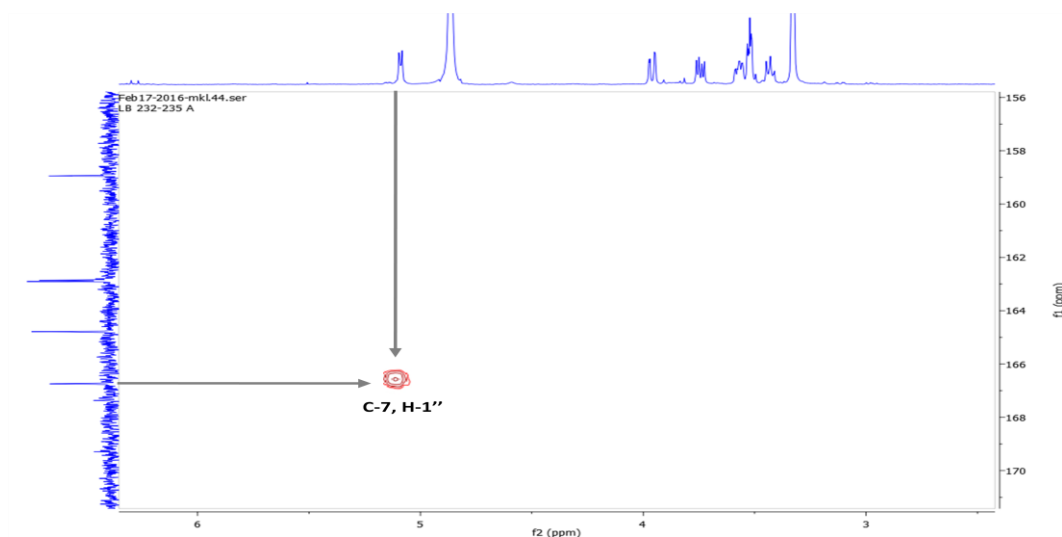


Figure 118. Spectre HMBC du composé **9** dans CD₃OD

Les données relatives aux spectres RMN ¹³C, DEPT-135 et RMN ¹H du composé **9** sont reportées dans le tableau 35.

Ces données permettent d'établir la structure de l'apigénine -7-O-β- glucoside.

Il s'agit d'une flavone, plus précisément un hétéroside, isolé antérieurement de *Salvia macrosiphon* Boiss. [134], *Stachys tibetica* Vatke. [135] (Famille des Lamiacées), et de *Saussurea stella* Maxim. [136] (Famille des Asteracées), mais isolé pour la première fois de l'espèce *Salvia phlomoides*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données décrites dans la littérature [137].

Tableau 35. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **9**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
2	164,8	C	-
3	96,0	CH	6,82 s
4	184,0	C	-
5	162,9	C	-
6	101,1	CH	6,50 d ($J = 2,3$ Hz)
7	166,7	C	-
8	104,1	CH	6,65 d ($J = 2,3$ Hz)
9	158,9	C	-
10	107,0	C	-
1'	123,0	C	-
2'	129,6	CH	7,90 d ($J = 8,4$ Hz)
3'	117,0	CH	6,93 d ($J = 8,4$ Hz)
4'	162,8	C	-
5'	117,0	CH	6,93 d ($J = 8,4$ Hz)
6'	129,6	CH	7,90 d ($J = 8,4$ Hz)
1''	101,6	CH	5,09 d ($J = 7,4$ Hz)
2''	74,7	CH	3,50 m
3''	78,4	CH	3,55 m
4''	71,2	CH	3,42 m
5''	77,8	CH	3,52 m
6''	62,7	CH_2	H _a 3,94 dd ($J = 12,0 ; 1,9$ Hz)
			H _b 3,72 dd ($J = 12,0 ; 6.3$ Hz)

IV.3. Détermination structurale des composés isolés de *Ferula vesceritensis*

IV.3.1. Détermination structurale du composé 10

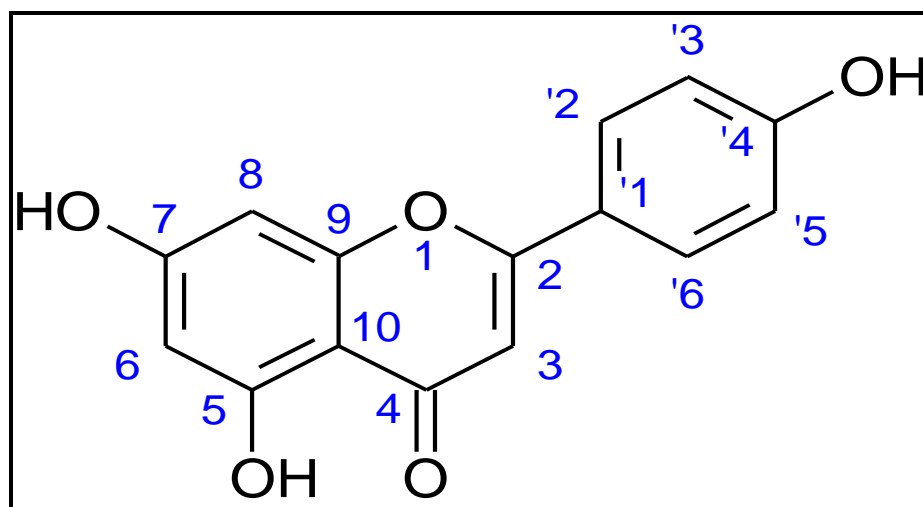


Figure 119. Structure du composé 10

La fluorescence violette de ce composé sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) est caractéristique d'un squelette flavonique.

D'après l'analyse des deux spectres RMN ^1H (Figure 120) et RMN ^{13}C (Figure 121), ce composé est le même que celui isolé de la phase acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* (composé 6).

Le spectre RMN ^1H indique la présence d'un signal résonant sous forme d'un singulet à δ_{H} 6,61 ppm attribuable au proton H-3 du noyau C d'un flavonoïde.

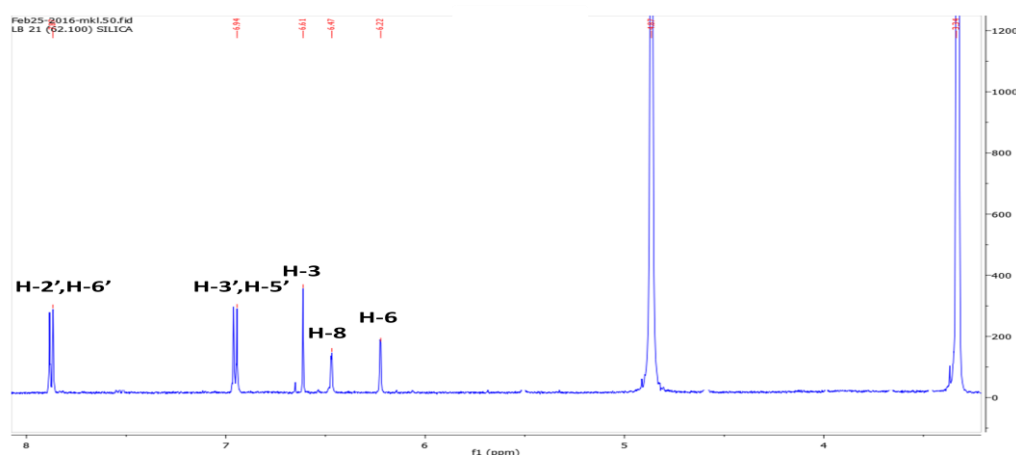


Figure 120. Spectre RMN ^1H du composé 10 dans CD_3OD

Il montre aussi quatre doublets : deux doublets à δ_H 6,22 et 6,47 ppm ($J = 2,3$ Hz) d'intégration 1H chacun, attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du noyau A. Et deux autres doublets à δ_H 6,94 et 7,87 ppm ($J = 8,4$ Hz) d'intégration 2H chacun, caractéristiques d'un noyau B substitué en position 4'. Ils sont attribués aux protons H-3' et H-5', H-2' et H-6' respectivement. Ce spectre proton est celui de l'apigénine.

Le spectre RMN¹³C présente les signaux correspondants à ceux de cette molécule.

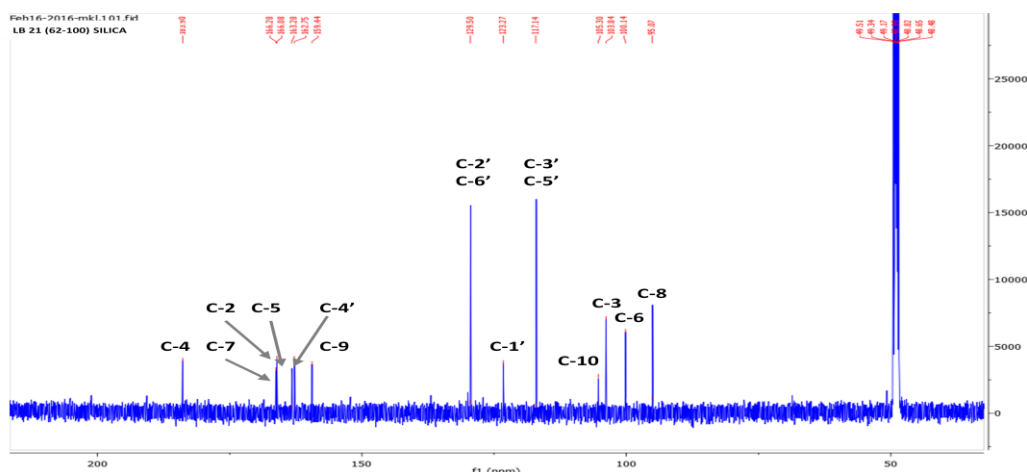


Figure 121. Spectre RMN¹³C du composé **10** dans CD₃OD

L'ensemble de ces données est représenté dans le tableau 36.

Tableau 36. Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **10**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	166,0	-
3	103,8	6,61 s
4	183,8	-
5	162,7	-
6	100,1	6,22 d ($J = 2,3$ Hz)
7	166,3	-
8	95,0	6,47d ($J = 2,3$ Hz)
9	159,4	-
10	105,3	-
1'	123,2	-
2'	129,5	7,87 d ($J = 8,4$ Hz)
3'	117,1	6,94 d ($J = 8,4$ Hz)
4'	163,2	-
5'	117,1	6,94 d ($J = 8,4$ Hz)
6'	129,2	7,87 d ($J = 8,4$ Hz)

Il s'agit d'une flavone, isolée précédemment de *Ferula longipes* [100], *Ammoides atlantica* [138] (Famille des Apiacées), et de *Lysimachia vulgaris* L. [124] (Famille des Primulacées), mais isolée pour la première fois de l'espèce *Ferula vesceritensis*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données de la littérature [125].

IV.3.2. Détermination structurale du composé 11

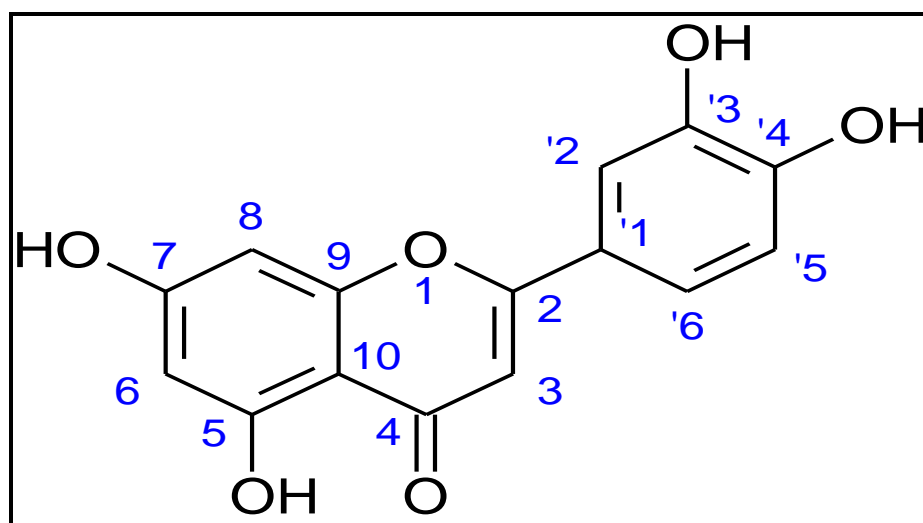


Figure 122. Structure du composé 11

La fluorescence violette de ce composé sous lampe de Wood ($\lambda = 365 \text{ nm}$) suggérant une structure de type flavonique.

D'après l'analyse des deux spectres RMN ^1H (Figure 123) et RMN ^{13}C (Figure 124), ce composé est le même que celui isolé de la phase acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* (composé 7).

Le spectre RMN ^1H a révélé la présence d'un singulet aromatique à $\delta_{\text{H}} 6,55 \text{ ppm}$ attribué à H-3, et des protons aromatiques méta couplés résonant à $\delta_{\text{H}} 6,21$ et $6,45 \text{ ppm}$ apparaissant sous forme de doublets ($J = 2,0 \text{ Hz}$) attribués à H-6 et H-8 respectivement, ainsi que d'autres protons aromatiques résonant à $\delta_{\text{H}} 7,40$; $6,91$ et $7,42 \text{ ppm}$ attribués à H-2', H-5' et H-6' respectivement. Ce spectre est celui de la lutéoline.

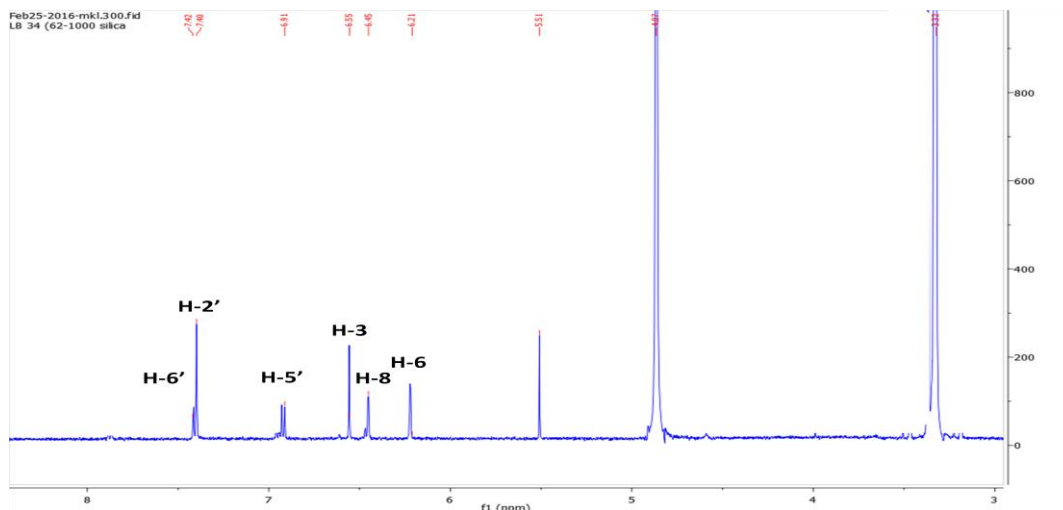


Figure 123. Spectre RMN¹H du composé **11** dans CD₃OD

Le spectre RMN¹³C présente les signaux correspondants à ceux de la lutéoline.

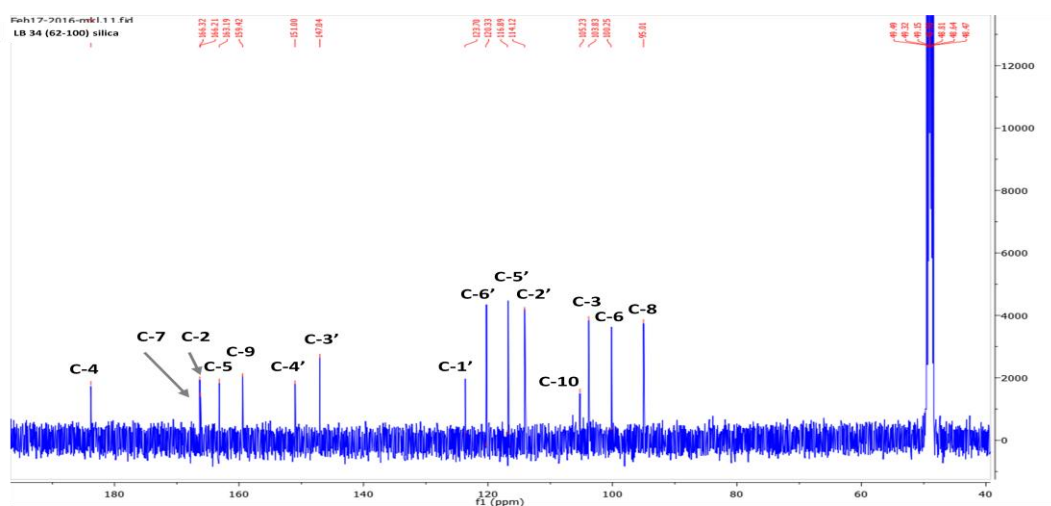


Figure 124. Spectre RMN¹³C du composé **11** dans CD₃OD

L'ensemble de ces données est représenté dans le tableau 37.

Le composé **11** a donc été identifié comme étant la lutéoline. Il s'agit d'une flavone, isolée antérieurement de *Ferula conocaula* [101], *Ammoides atlantica* [138] (Famille des Apiacées), et de *Lysimachia nummularia* L. [124] (Famille des Primulacées), mais isolée pour la première fois de l'espèce *Ferula vesceritensis*.

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données de la littérature [128].

Tableau 37. Déplacements chimiques RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **11**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	166,2	-
3	103,8	6,55 s
4	183,8	-
5	163,2	-
6	100,1	6,21 d ($J = 2,0$ Hz)
7	166,3	-
8	95,0	6,45 d ($J = 2,0$ Hz)
9	159,4	-
10	105,2	-
1'	123,6	-
2'	114,1	7,40 d ($J = 2,3$ Hz)
3'	147,0	-
4'	151,0	-
5'	116,7	6,91 d ($J = 8,2$ Hz)
6'	120,2	7,42 dd ($J = 8,2 ; 2,3$ Hz)

IV.3.3. Détermination structurale du composé **12**

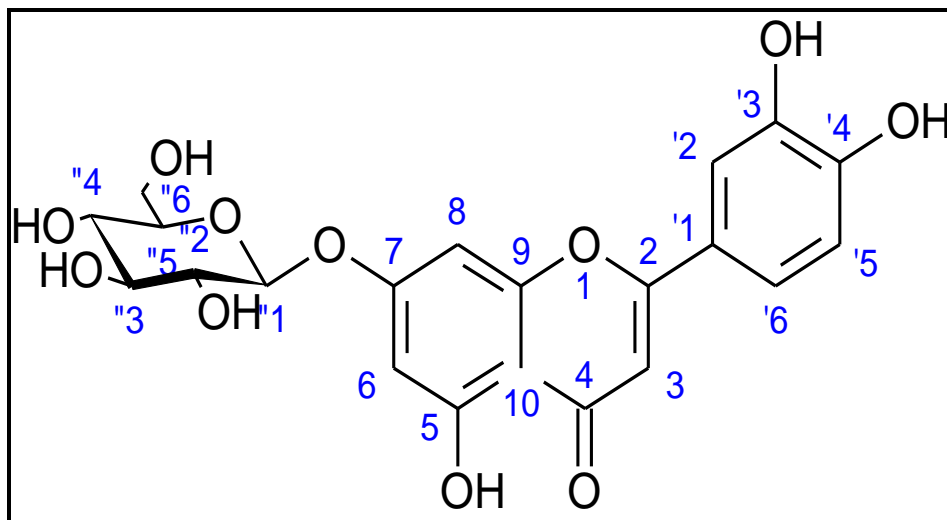


Figure 125. Structure du composé **12**

La fluorescence violette de ce composé sous la lampe de Wood ($\lambda = 365$ nm) suggère une structure de type flavonique.

Le spectre RMN ^1H (Figure 126) révèle la présence de :

- Deux doublets à δ_{H} 6,51 et 6,80 ppm d'intégration 1H chacun, attribuables aux H-6 et H-8.
- La présence du système ABX à δ_{H} 7,42 (H-6'), 7,40 (H-2') et 6,91 (H-5') ppm caractéristique d'un phényl 1,2,4 trisubstitué du noyau B.
- Un singulet à δ_{H} 6,62 ppm d'intégration 1H attribuable à H-3.

Lorsqu'on compare le spectre RMN ^1H du composé **12** avec celui du **11**, la différence observée se situe dans la région (δ_{H} 3,43 - 3,94 ppm) correspondant à un fragment du sucre supplémentaire dans le composé **12**. Avec l'apparition d'un doublet à δ_{H} 5,08 ppm ($J = 7,5$ Hz) correspondant à un proton anomérique. Ce proton corrèle avec le carbone résonant à δ_{C} 101,6 ppm selon le spectre HSQC (Figure 127). Ces résonances avec la valeur de constante de couplage sont caractéristiques de la position anomérique C-1'' d'un -O- β glycoside.

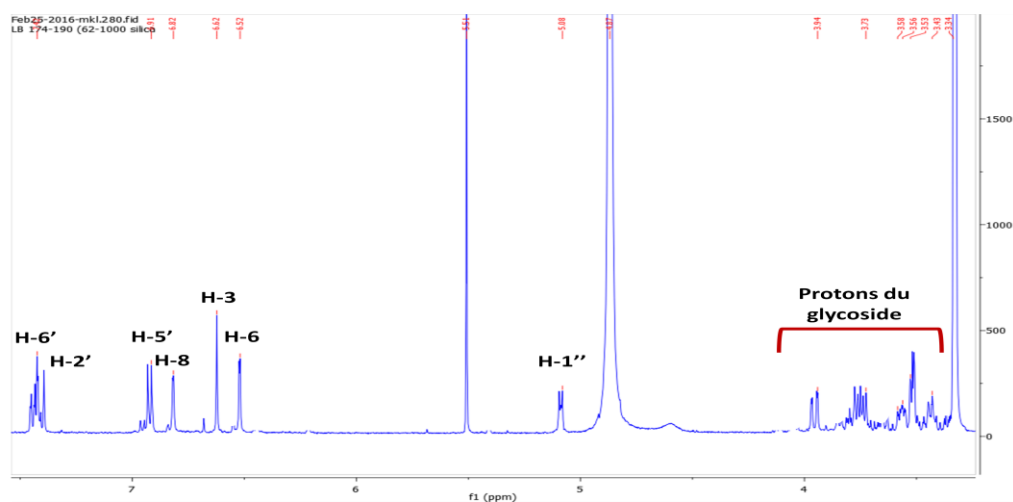


Figure 126. Spectre RMN ^1H du composé **12** dans CD_3OD

A partir de ces protons caractéristiques, l'analyse des corrélations sur le spectre HSQC (Figure 127) permet l'attribution des carbones les portants.

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 128) indique la présence de vingt et un atomes de carbone, dont quinze sont attribués à la génine et six au sucre.

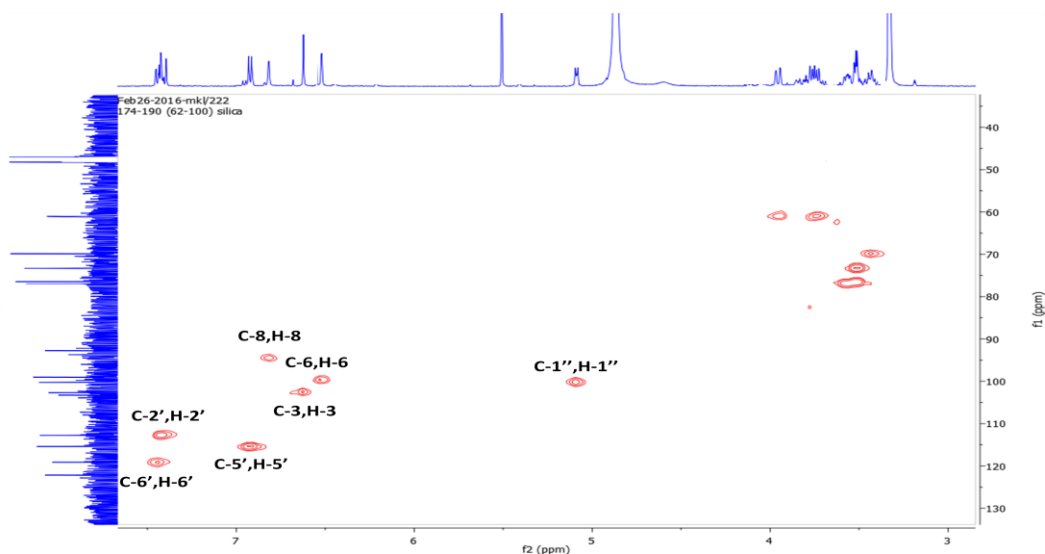


Figure 127. Spectre HSQC élargi du composé **12** dans CD₃OD

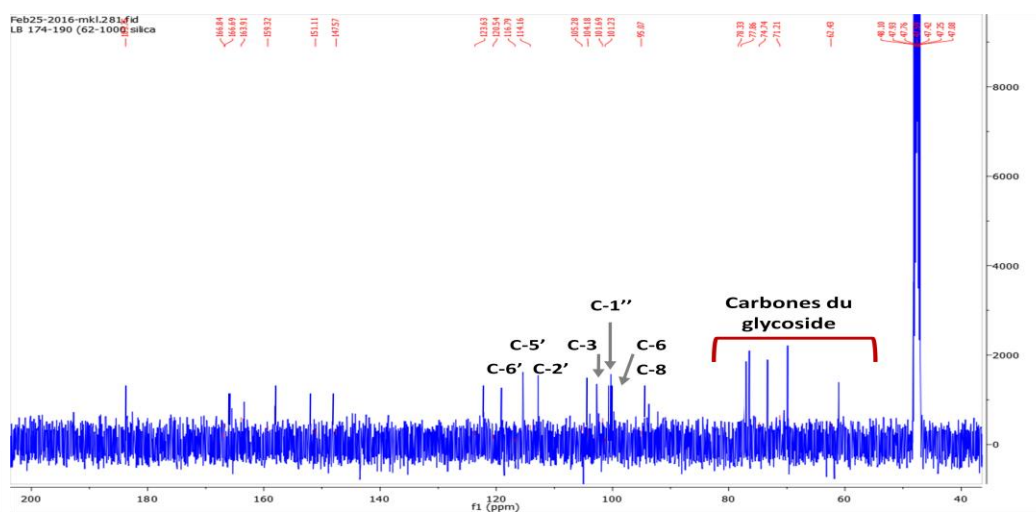


Figure 128. Spectre RMN¹³C du composé **12** dans CD₃OD

Le spectre DEPT-135 (Figure 129) nous permet de distinguer neuf carbones quaternaires, un méthylène et onze méthines, parmi lesquels les signaux à δ_C 62,4 ; 71,2 ; 74,7 ; 77,8 ; 78,3 et 101,6 ppm correspondant aux déplacements des carbones d'un groupement glucopyranosyle [133], corrént respectivement avec les protons résonant à δ_H 3,73 et 3,94 ; 3,43 ; 3,53 ; 3,56 ; 3,58 et 5,08 ppm selon l'analyse du spectre HSQC (Figure 127).

Le spectre COSY (Figure 130) du composé **12** montre des taches de corrélation entre les protons H-6 et H-8 du noyau A, et entre le proton H-5' et H-6' du noyau B.

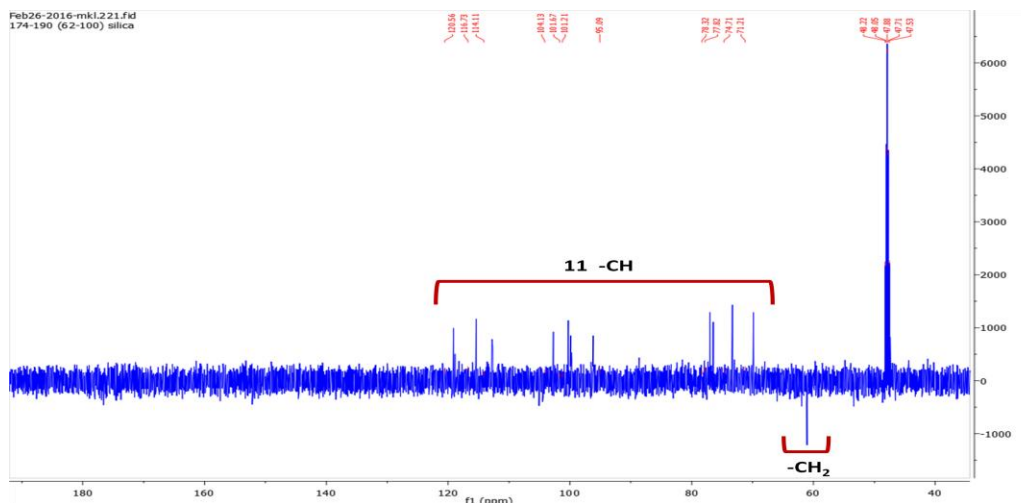


Figure 129. Spectre DEPT-135 du composé **12** dans CD_3OD

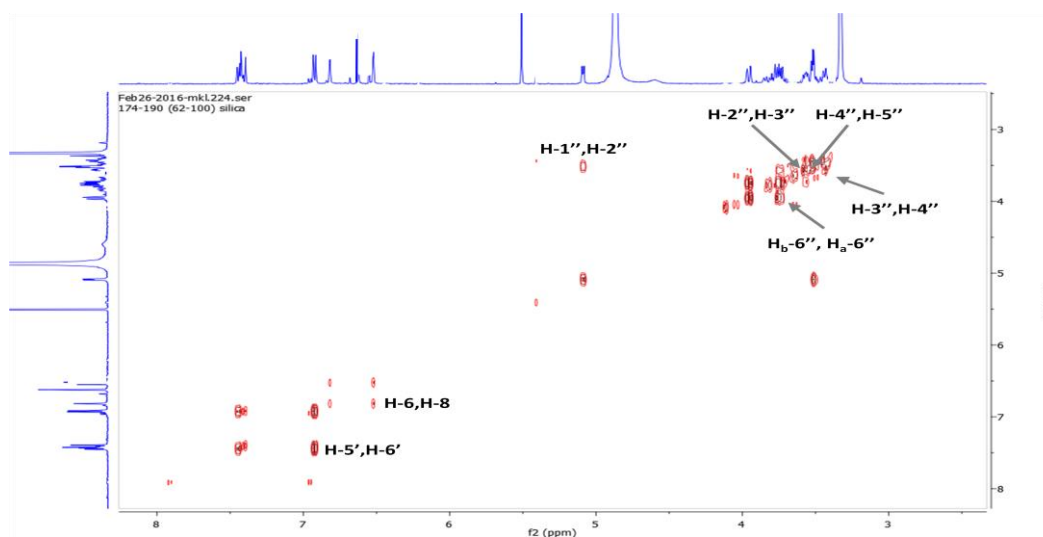


Figure 130. Spectre COSY du composé **12** dans CD_3OD

Il montre également une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le proton à δ_{H} 3,53 ppm permet son attribution à H-2'', ce proton H-2'' corrèle à son tour avec le proton à δ_{H} 3,58 ppm permet l'attribution de ce proton à H-3''. Toujours sur le spectre COSY, le proton H-3'' corrèle avec le proton à δ_{H} 3,43, qu'il est attribuable à H-4''. Ce proton corrèle avec le proton à δ_{H} 3,56 ppm permet son attribution au proton H-5''.

Sur le spectre HMBC (Figure 131), les corrélations entre le proton H-3 et les carbones quaternaires résonant à δ_{C} 105,2 ; 123,6 ; 166,6 et 183,7 ppm permettent l'attribution de ces carbones à C-10, C-1', C-2 et C-4.

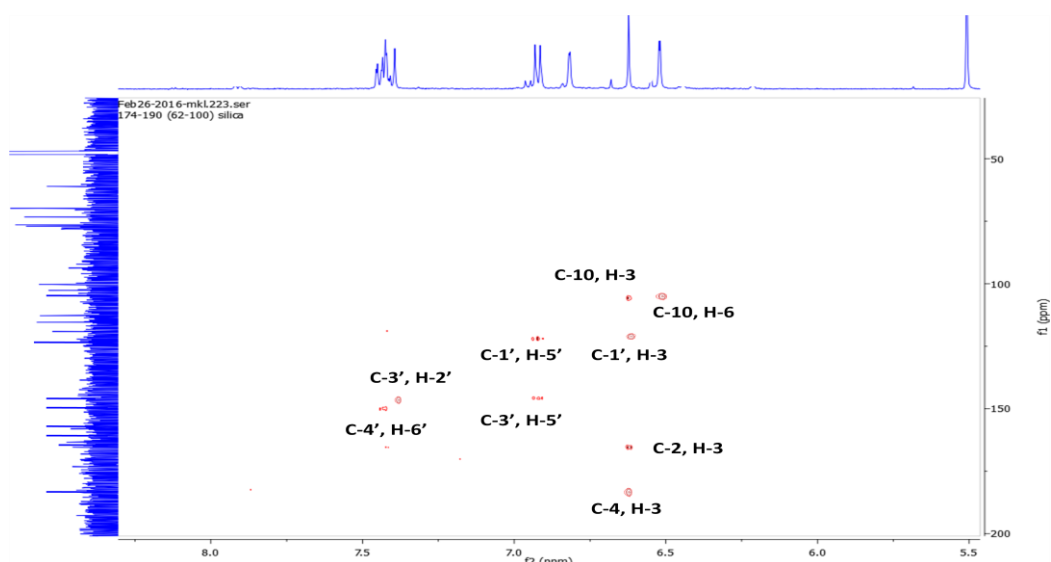


Figure 131. Spectre HMBC élargi -1- du composé **12** dans CD₃OD

Aussi, les corrélations entre les protons H-2', H-5' et le carbone quaternaire oxygéné à δ_C 147,7 ppm permettent son attribution à C-3', et la tache de corrélation entre H-6' et le carbone quaternaire oxygéné à δ_C 151,1 ppm permet l'attribution de ce carbone à C-4'.

Le spectre HMBC (Figure 132) montre également des taches de corrélation entre H-2'' et les carbones C-4'', C-3'' et C-1'', et entre H-4'' et le carbone C-5'', et il permet de relier le C-1'' en C-7, ceci grâce à la tache de corrélation observée entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-7.

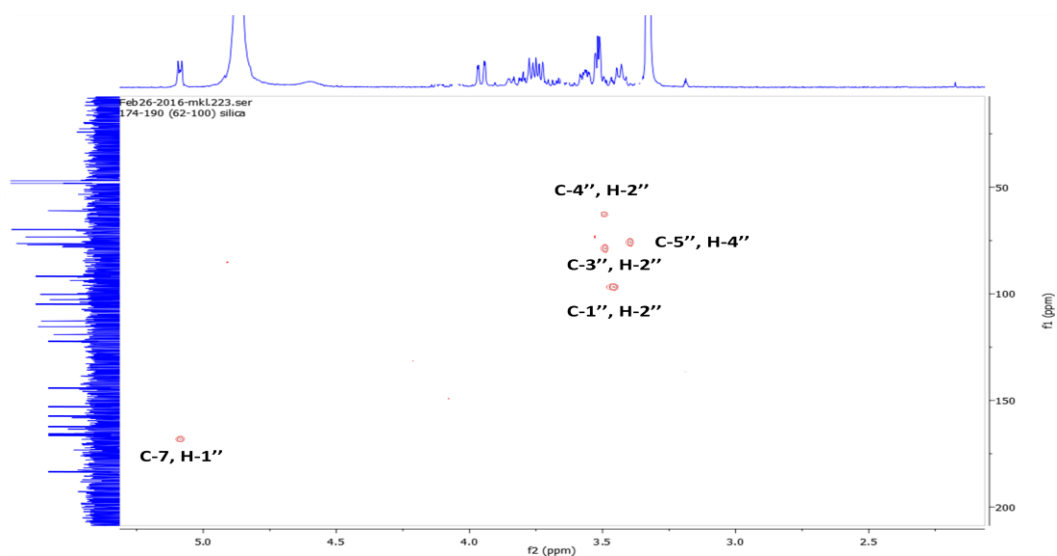


Figure 132. Spectre HMBC élargi -2- du composé **12** dans CD₃OD

Les données relatives aux spectres RMN ¹³C, DEPT-135 et RMN ¹H du composé **12** sont reportées dans le tableau 38.

Tableau 38. Données relatives aux spectres RMN ^{13}C , DEPT-135 et RMN ^1H du composé **12**

Position	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT-135	$\delta^1\text{H}$
2	166,6	C	-
3	104,1	CH	6,62 s
4	183,7	C	-
5	163,9	C	-
6	101,2	CH	6,52d ($J = 1,9$ Hz)
7	166,8	C	-
8	95,0	CH	6,81d ($J = 1,9$ Hz)
9	159,3	C	-
10	105,2	C	-
1'	123,6	C	-
2'	114,1	CH	7,40 d ($J = 2,0$ Hz)
3'	147,5	C	-
4'	151,1	C	-
5'	116,7	CH	6,91d ($J = 8,5$ Hz)
6'	120,5	CH	7,42dd ($J = 8,5 ; 2,0$ Hz)
1''	101,6	CH	5,07 d ($J = 7,5$ Hz)
2''	74,7	CH	3,53 m
3''	78,3	CH	3,58 m
4''	71,2	CH	3,43 m
5''	77,8	CH	3,56 m
6''	62,4	CH ₂	H _a 3,94 dd ($J = 10,0 ; 1,3$ Hz)
			H _b 3,73 dd ($J = 10,0 ; 5,2$ Hz)

L'ensemble des données permettent de définir le composé **12** comme étant la lutéoline -7- *O*- β - glucoside, connue également sous les noms de glucolutéoline, lutéoloside, cinaroside et cynaroside.

Il s'agit d'une flavone plus précisément un hétéroside, isolé notamment de *Ferula varia* [17], *Foeniculum vulgare* [139] (Famille des Apiacées), et de *Dendranthema morifolium* [140] (Famille des Asteracées).

Cette structure a été confirmée en comparant ces données spectrales avec les données de la littérature [140].

Chapitre V

Activités biologiques

L'étude des activités biologiques des extraits végétaux et des composés issues des plantes est actuellement un parmi les thèmes de recherche les plus importants.

Les résultats de l'étude phytochimique de *Salvia phlomoides* et *Ferula vesceritensis* ont montré une richesse en triterpènes et en flavonoides.

Les triterpènes présentent un véritable panel de propriétés pharmacologiques qui comporte par exemple des activités antimicrobiennes, antivirales et anti-inflammatoires. Ces activités sont variées selon les types de squelette triterpénique.

Les ursanes, les oléananes et les lupanes sont les principaux squelettes de base des triterpènes pentacycliques, ils ont montré une cytotoxicité significative sur des lignées cellulaires tumorales [141].

Aussi, les flavonoïdes sont bien connus pour leurs propriétés pharmacologiques comme l'activité vasculoprotectrice, antihépatotoxique, antiallergique, anti-inflammatoire et essentiellement pour leurs actions antitumorales et antioxydantes [142].

En vue d'explorer ces activités biologiques, les nouvelles structures des triterpènes isolés de l'espèce *Salvia phlomoides* ont été évaluées pour leurs propriétés anticancéreuses, et les extraits ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes en utilisant différentes méthodes.

V.1. Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse d'un composé correspond à sa capacité à bloquer la prolifération des cellules cancéreuses qui se différencient des cellules normales par la présence d'anomalies génétiques et fonctionnelles.

Il existe des anticancéreux dits cycle-dépendants qui attaquent les cellules présentes dans le cycle et des anticancéreux dits phase-dépendants qui attaquent les cellules pendant une certaine phase du cycle, enfin ceux dits non cycle-dépendants qui peuvent agir sur toutes les populations cellulaires en division. Ceci explique pourquoi, avant l'administration d'un anticancéreux phase ou cycle-dépendant, il est indispensable que le maximum de cellules se trouvent en évolution dans le cycle et non pas en période de repos.

Certains anticancéreux permettent de recruter les cellules en période de repos et de les faire entrer dans le cycle, d'autres permettent de bloquer les cellules dans une phase déterminée du

cycle. C'est pourquoi la chimiothérapie est basée sur l'association de plusieurs médicaments anticancéreux afin de potentialiser leur action.

La séquence de chimiothérapie consiste généralement en l'administration d'un agent qui recrute le maximum de cellules dans le cycle, d'un agent qui les synchronise dans une phase de mitose par exemple et d'un ou plusieurs produits qui agissent sur les cellules bloquées dans cette phase [143].

Les anticancéreux sont d'origine naturelle, synthétique ou hémisynthétique.

En effet, les anticancéreux d'origine naturelle appartiennent aux différentes classes chimiques telles que les alcaloïdes, les monoterpènes, les diterpènes et les triterpènes.

Le tableau suivant donne quelques exemples des anticancéreux issus des produits naturels.

Tableau 39. Exemples d'anticancéreux issus des extraits végétaux (plantes et arbres)

Molécule	Source	Classe chimique	Réf
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca-alcaloïde	[144]
Vincristine	(<i>Pervenche de Madagascar</i>)		
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Diterpène	[145]
Les épothilones A et B	<i>Sorangium cellulosum</i>	Macrolide	[146]
CombretastatinA-4	<i>Combretum caffrum</i>	Stilbène	[145]
Camptothécine	<i>Camptotheca acuminata</i>	Alcaloïde	[147]
Omacetaxine (homoharringtonine)	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Alcaloïde	[148]
Flavopiridol	<i>Betula sp</i>	Triterpène	[145]
β -Lapachone	<i>Tabebuia avellaneda</i>	Quinone	[149]
Alcool périllique	<i>Lavandula sp</i>	Monoterpène	[150]
Thapsigargin	<i>Thapsia garganica</i>	Sesquiterpène	[151]

V.2. Méthode d'évaluation de l'activité anticancéreuse

La cytotoxicité *in vitro* des composés **1** (2α , 3β , 11α -trihydroxyoléan-18-ène), **2** (3β -acétoxy, 2α , 11α -dihydroxyoléan-18-ène) et **3** (2α -acétoxy, 3β , 11α -dihydroxyoléan-18-ène) a été évaluée sur un panneau de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines, appelé le NCI-60.

V.2.1. Principe de la méthode NCI-60

Les composés soumis au criblage à l'INC sont testés initialement à une seule dose de 10^{-5} M (ou 15 $\mu\text{g/mL}$) dans un panneau de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines dérivées de neuf types de cellules cancéreuses : leucémie, poumon, mélanome, colon, système nerveux central, ovaires, rein, prostate et sein [152]. Seuls les composés qui présentent une inhibition

de croissance significative dans le criblage à dose unique (10^{-5} M) sont évalués par rapport au panneau de 60 cellules à cinq niveaux de concentration (10^{-4} M, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} M). Le pourcentage d'inhibition de croissance à cinq doses est effectué pour une évaluation efficace des composés ayant une activité antiproliférative.

Le tableau 40 présente la liste des cellules cellulaires cancéreuses humaines utilisées.

Tableau 40. Liste des 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines utilisées dans le criblage dans l'Institut National du Cancer des Etats Unis [153].

Panneau	Ligne cellulaire	Temps de doublement (heure)	Densité d'inoculation (cellules/puits)
Leucémie	CCRF-CEM	26,7	40000
	HL-60(TB)	28,6	40000
	K-562	19,6	5000
	MOLT-4	27,9	30000
	RPMI-8226	33,5	20000
	SR	28,7	20000
Cancer du poumon	A549/ATCC	22,9	7500
	EKVX	43,6	20000
	HOP-62	39	10000
	HOP-92	79,5	20000
	NCI-H226	61	20000
	NCI-H23	33,4	20000
	NCI-H322M	35,3	20000
	NCI-H460	17,8	7500
	NCI-H522	38,2	20000
Cancer du côlon	COLO 205	23,8	15000
	HCC-2998	31,5	15000
	HCT-116	17,4	5000
	HCT-15	20,6	10000
	HT29	19,5	5000
	KM12	23,7	15000
	SW-620	20,4	10000

Tableau 40. Liste des 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines utilisées dans le criblage dans l'Institut National du Cancer des Etats Unis (suite)

Panneau	Ligne cellulaire	Temps de doublement (heure)	Densité d'inoculation (cellules/puits)
Cancer du SNC	SF-268	33,1	15000
	SF-295	29,5	10000
	SF-539	35,4	15000
	SNB-19	34,6	15000
	SNB-75	62,8	20000
	U251	23,8	7500
Mélanome	LOX IMVI	20,5	7500
	MALME-3M	46,2	20000
	M14	26,3	15000
	MDA-MB-435	25,8	15000
	SK-MEL-2	45,5	20000
	SK-MEL-28	35,1	10000
	SK-MEL-5	25,2	10000
	UACC-257	38,5	20000
	UACC-62	31,3	10000
Cancer des ovaires	IGR-OV1	31	10000
	OVCAR-3	34,7	10000
	OVCAR-4	41,4	15000
	OVCAR-5	48,8	20000
	OVCAR-8	26,1	10000
	NCI/ADR-RES	34	15000
	SK-OV-3	48,7	20000
Cancer du rein	786-0	22,4	10000
	A498	66,8	25000
	ACHN	27,5	10000
	CAKI-1	39	10000
	RXF 393	62,9	15000
	SN12C	29,5	15000
	TK-10	51,3	15000
	UO-31	41,7	15000
Cancer de la prostate	PC-3	27,1	7500
	DU-145	32,3	10000

Tableau 40. Liste des 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines utilisées dans le criblage dans l'Institut National du Cancer des Etats Unis (suite)

Panneau	Ligne cellulaire	Temps de doublement (heure)	Densité d'inoculation (cellules/puits)
Cancer du sein	MCF7	25,4	10000
	MDA-MB-231/ATCC	41,9	20000
	MDA-MB-468	62	2000
	HS 578T	53,8	20000
	MDA-N	22,5	15000
	BT-549	53,9	20000
	T-47D	45,5	20000

Ce panel est associé à deux programmes :

- Le premier (Compare) vise à comparer les profils de cytotoxicité des molécules testées avec ceux des agents connus, de mécanisme d'action bien identifié, afin de rechercher des modèles de chimiosensibilité pouvant permettre d'identifier rapidement des mécanismes d'action réalisables, et surtout des molécules susceptibles d'atteindre des cibles originales.
- Le second (Discovery) vise à associer les profils de chimiosensibilité des lignées cellulaires à leurs caractéristiques moléculaires, afin d'identifier les déterminants de la chimiosensibilité et de la chimiorésistance des cancers **154**].

Une base de données pharmacologiques et moléculaires obtenues sur le panneau NCI-60 :

- **Données pharmacologiques:**

La cytotoxicité d'un composé sur une lignée cellulaire est exprimée sous la forme de la concentration inhibitrice de 50 % de la croissance cellulaire (CI₅₀) dans un test standardisé, les CI₅₀ ayant été normalisées pour obtenir un z-score (logarithme de la CI₅₀ auquel est retranchée la moyenne des valeurs obtenues sur les 60 lignées, le résultat étant divisé par l'écart-type). Cette normalisation permet de comparer les composés entre eux, même s'ils possèdent des grandes différences de cytotoxicité intrinsèque (les platines ou le 5-fluoro-uracile sont actifs à des concentrations de l'ordre du micromolaire, alors que les taxanes sont actifs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire).

▪ **Données moléculaires :**

- Profils d'expression génique : à partir des microarrays d'ADN réalisés sur plusieurs plates-formes sur le panneau des 60 lignées.
- Profils d'expression des micro-ARN.
- Profils d'expression de 94 protéines.
- Nombre de copies des gènes.
- Profil de méthylation d'un ensemble de gènes, en particulier suppresseurs de tumeurs.
- Données issues du séquençage d'exome (exomeseq) [154].

V.2.2. Mode opératoire

V.2.2.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires tumorales humaines se développent régulièrement dans un milieu de culture spécifique pour chaque cellule (RPMI 1640 pour les cellules du cancer du sein, contenant 5 % de sérum fœtal bovin et 2 mM de L-glutamine).

Pour un test de criblage spécifique, les cellules sont inoculées dans des plaques de microtitrage à 96 puits de 100 µl aux densités de 5 000 à 40 000 cellules par puits (en fonction du temps de doublement des lignées cellulaires).

Après inoculation de cellules, les plaques de microtitrage sont incubées à 37 ° C dans une atmosphère saturée contenant 5 % de CO₂, 95 % d'air et 100 % d'humidité relative pendant 24 h avant l'addition du composé testé [153].

Après 24 H, deux plaques de chaque lignée cellulaire sont fixées *in situ* avec TCA, pour mesurer la population cellulaire pour chaque lignée au moment de l'addition du composé (Tz).

Les composés testés sont solubilisés dans DMSO à 400 fois la concentration finale désirée, et conservés à l'état congelé (à -20 °C) avant l'utilisation. Une aliquote congelée est décongelée et diluée à deux fois la concentration finale désirée dans un milieu complet contenant 50 µg / ml de gentamicine lors de l'utilisation.

Des dilutions sont effectuées pour avoir un total de cinq concentrations du composé plus le contrôle.

Des aliquotes de 100 µl des différentes dilutions du composé sont ajoutées dans des puits de microtitrage appropriés contenant 100 µl du milieu, ce qui donne les concentrations finales requises [153].

Remarque :

La plupart des composés sont solubilisés dans de l'eau ou du DMSO.

Les solubilisations nécessitant du THF, de l'Ethanol, du Méthanol ou d'autres solvants volatils sont préparées à l'état frais pour réduire l'évaporation.

Après l'ajout du composé, les plaques sont incubées pendant 48 heures supplémentaires à 37 °C dans une atmosphère saturée contenant 5 % de CO₂, 95 % d'air et 100 % d'humidité relative, ainsi qu'une bande d'étalons (Adriamycine, NSC 123127 préparée et conservée de la même manière que les composés). Une solution de TCA froid (50 % à 0°C) est ajoutée pour bien séparer les cellules adhérentes (les cellules encore en agrégats).

Les cellules sont fixées *in situ* par l'addition de 50 µl de TCA froid (50 % à 0°C) et incubées à 4 °C pendant 60 minutes. Le surnageant est éliminé, et les plaques sont lavées cinq fois avec de l'eau de robinet et séchées à l'air.

V.2.2.2. Test de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité cellulaire a été réalisé en utilisant la SulfoRhodamine B.

C'est un colorant aminoxanthène de couleur rose vif qui peut former un complexe électrostatique avec des résidus basiques des acides aminés des protéines dans des conditions légèrement acide [155].

Une solution de SulfoRhodamine B (SRB) (100 µl à 0,4 %) dans de l'acide acétique (à 1 %) est ajoutée à chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante.

Après incubation, les plaques de coloration non liée sont lavées cinq fois à l'acide acétique à 1 % et séchées à l'air, et les plaques avec coloration liée sont ensuite solubilisées avec Tris base (Trisma 10 mM, pH = 10,5).

L'absorbance est déterminée par lecture sur un lecteur de plaques à une longueur d'onde de 515 nm à temps zéro (T_z), contrôle de la croissance (C) et croissance en présence du composé testé de différentes concentrations (T_i) [153].

V.2.2.3. Calcul

On effectue 7 mesures de l'absorbance, [temps zéro, (T_z), contrôle de la croissance (C), et test de croissance en présence de composé expérimental aux cinq niveaux de concentration (T_i)].

La croissance des cellules tumorales est calculée à chaque niveau de concentration du composé testé, et l'inhibition de la croissance des cellules tumorales est exprimée en pourcentage et calculée comme suit :

$[(T_i - T_z)/(C - T_z)] \times 100$ (concentrations pour lesquelles $T_i \geq T_z$)

$[(T_i - T_z)/T_z] \times 100$ (concentrations pour lesquelles $T_i < T_z$)

IC₅₀ est calculée à partir de $[(T_i - T_z) / (C - T_z)] \times 100 = 50$: Concentration qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire.

ICT est calculée à partir de $T_i = T_z$: Concentration causant une inhibition totale de la croissance des cellules tumorales.

CL₅₀ est calculée à partir de $[(T_i - T_z) / T_z] \times 100 = -50$: Concentration causant la mort de 50 % des cellules tumorales [153].

V.2.3. Résultats

Les résultats à la dose de 10^{-5} M sont présentés sous forme graphique de pourcentage de la croissance des cellules tumorales par rapport au contrôle et au nombre de cellules au temps zéro.

les valeurs concernant chaque lignée figurant sous forme d'une barre centrée sur la moyenne, dirigée à droite quand la valeur est supérieure à la moyenne calculée dans les 60 lignées, et à gauche dans le cas inverse (quand la valeur est inférieure à la moyenne calculée dans les 60 lignées) [156].

Cela permet de détecter l'inhibition de la croissance (valeurs comprises entre 0 et 100) et la létalité (valeurs inférieurs à 0).

Exemples :

Une valeur de ≥ 100 signifie : pas une inhibition de croissance.

Une valeur de 0 signifie : pas de croissance nette au cours de l'expérience.

Une valeur de -40 signifie : 40 % de létalité.

Une valeur de -100 signifie que toutes les cellules sont mortes [153].

Le tableau ci dessous résume les résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales lors du test à la dose 10^{-5} M en présence des composés testés 1, 2 et 3.
(Voir figure 133, 134 et 135).

Exemple : pour le composé 2, une valeur de 61,78 pour de la lignée cellulaire RPMI-8226 de leucémie signifie une inhibition de croissance égale à 38,22 % de la cellule tumorale.

Tableau 41. Résultats du pourcentage de croissance de la dose unique anti tumorale

Pann/ligne cell	1/ NSC793185	2/ NSC793186	3/ NSC793187
Leucémie			
CCRF-CEM	111,57	88,69	106,19
HL-60 (TB)	114,24	116,49	120,25
K-562	116,86	97,27	107,71
MOLT-4	102,42	88,43	87,10
RPMI-8226	111,16	61,78	124,21
SR	91,29	84,38	87,14
Cancer du poumon			
A549/ATCC	93,94	76,68	93,99
EKVX	102,21	90,34	96,51
HOP-62	93,02	102,68	101,38
HOP-92	113,44	122,61	114,78
NCI-H226	100,58	99,94	99,36
NCI-H23	102,49	99,48	95,73
NCI-H322M	106,14	102,09	117,52
NCI-H460	103,57	63,73	102,21
NCI-H522	88,65	65,59	102,74
Cancer du côlon			
COLO 205	90,82	94,50	117,08
HCC-2998	102,50	98,54	106,62
HCT-15	107,03	95,45	100,49
HT29	100,40	69,64	97,83
KM12	102,88	98,29	104,81
SW-620	103,97	109,35	98,74
Cancer du SNC			
SF-268	103,04	99,27	101,36
SF-295	98,85	98,34	103,87
SF-539	97,03	103,20	101,61
SNB-19	108,29	106,52	104,01
SNB-75	94,53	91,77	91,56
U251	103,23	96,39	97,55

Tableau 41. Résultats du pourcentage de croissance de la dose unique anti tumorale (suite)

Mélanome			
LOX IMVI	96,83	95,62	98,71
MALME-3M	103,76	104,92	106,72
M14	103,05	94,26	99,26
MDA-MB-435	103,60	106,31	99,76
SK-MEL-2	106,63	103,01	107,29
SK-MEL-28	106,68	108,80	105,97
SK-MEL-5	106,59	104,72	114,04
UACC-257	106,50	105,60	110,42
UACC-62	106,75	105,72	97,43
Cancer des ovaires			
IGROV1	103,96	102,34	105,83
OVCAR-3	106,41	98,56	101,27
OVCAR-4	108,69	108,25	106,19
OVCAR-5	106,39	117,97	105,92
OVCAR-8	102,19	97,56	103,90
NCI/ADR-RES	104,58	93,77	103,58
SK-OV-3	78,17	88,32	107,19
Cancer du rein			
786-0	104,12	99,25	99,28
A498	109,33	115,80	118,79
ACHN	105,95	97,00	102,49
RXF 393	121,14	121,49	111,25
SN12C	104,34	109,17	99,92
TK-10	106,34	114,83	103,76
UO-31	90,55	91,11	84,15
Cancer de la prostate			
PC-3	91,61	86,06	84,93
DU-145	108,30	101,90	106,54
Cancer du sein			
MDA-MB-231/ATCC	118,22	117,81	113,04
HS 578T	100,41	101,57	99,14
BT-549	102,24	87,70	101,56
T-47D	82,44	71,85	82,28
MDA-MB-468	110,40	112,88	115,66

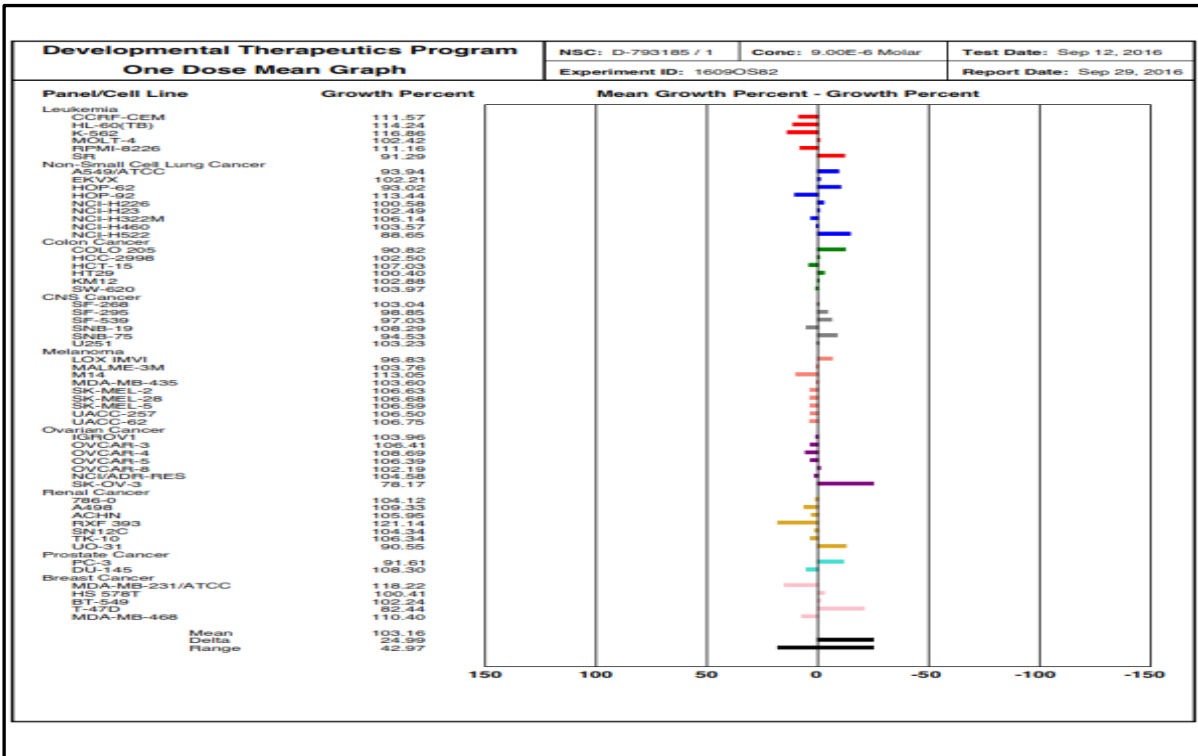


Figure 133. Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 1

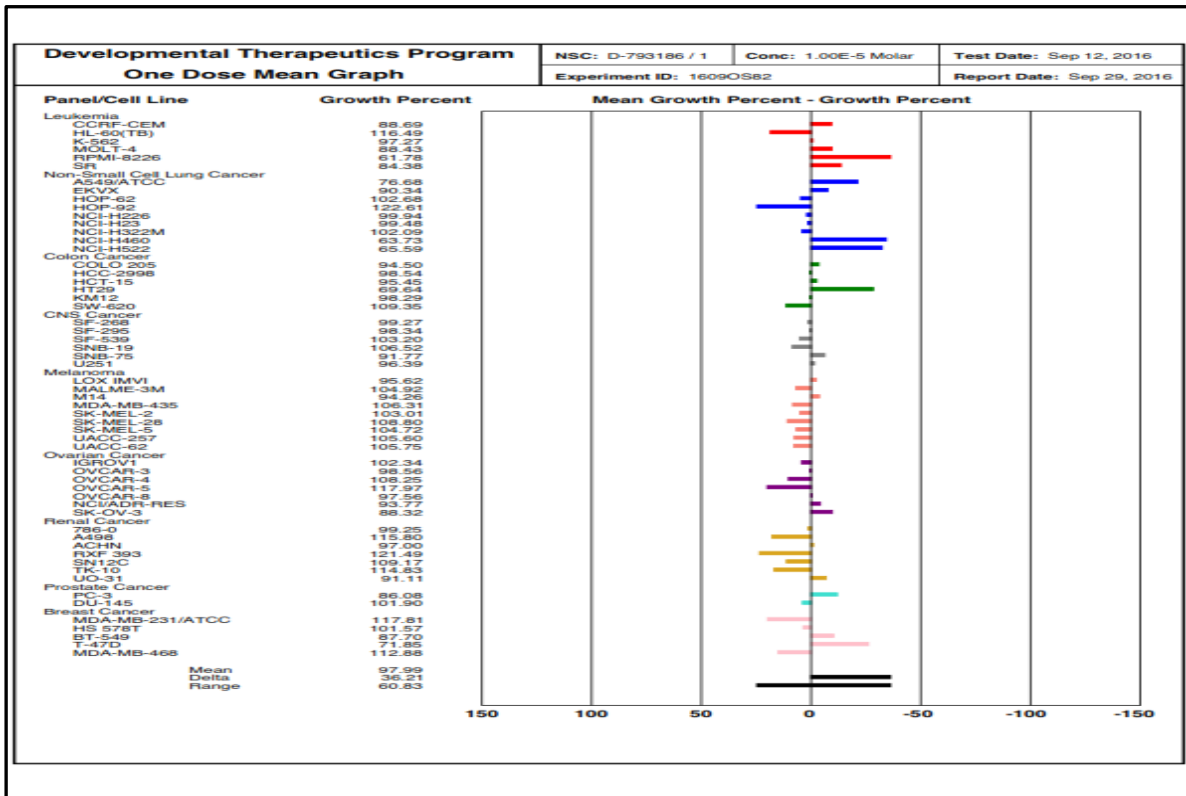


Figure 134. Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 2

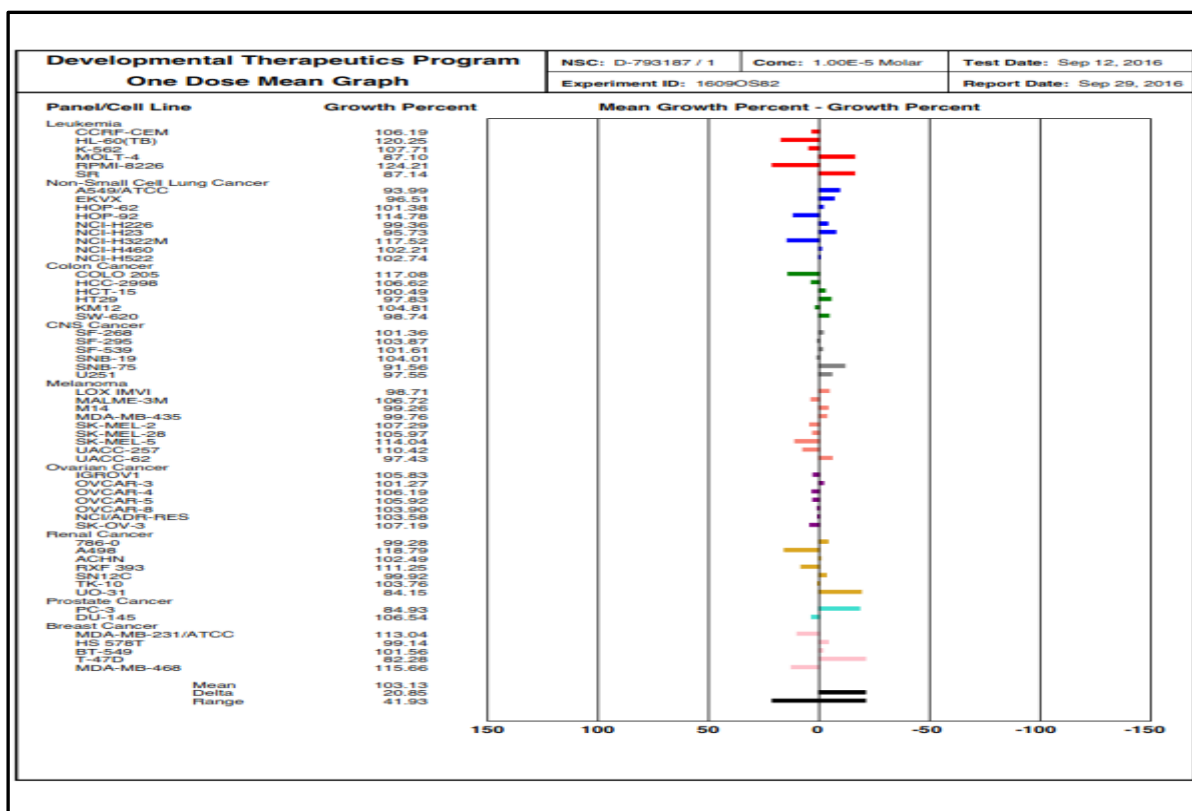


Figure 135. Résultats du pourcentage de croissance des cellules tumorales en présence du composé 3

Le tableau ci-dessous montre les résultats de l'inhibition de croissance des cellules tumorales exprimés en pourcentage en présence des composés testés 1, 2 et 3.

(100 – pourcentage de croissance des cellules)

PI : Pas d'Inhibition.

Tableau 42. Résultats de l'inhibition de croissance des cellules tumorales (Effet anti tumorale des composés testés 1, 2 et 3).

<u>Pann/ligne cell</u>	<u>1/ NSC793185</u>	<u>2/ NSC793186</u>	<u>3/ NSC793187</u>
Leucémie			
CCRF-CEM	PI	11,31	PI
HL-60 (TB)	PI	PI	PI
K-562	PI	2,73	PI
MOLT-4	PI	11,57	12,90
RPMI-8226	PI	38,22	PI
SR	8,71	15,06	12,86

Tableau 42. Résultats de l'inhibition de croissance des cellules tumorales (suite)

<u>Pann/ligne cell</u>	<u>1/ NSC793185</u>	<u>2/ NSC793186</u>	<u>3/ NSC793187</u>
Cancer du poumon			
A549/ATCC	6,06	23,22	6,01
EKVX	PI	9,66	3,49
HOP-62	6,98	PI	PI
HOP-92	PI	PI	PI
NCI-H226	PI	0,06	0,64
NCI-H23	PI	0,52	4,27
NCI-H322M	PI	PI	PI
NCI-H460	PI	36,27	PI
NCI-H522	11,35	34,41	PI
Cancer du côlon			
COLO 205	9,18	5,50	PI
HCC-2998	PI	1,46	PI
HCT-15	PI	4,55	PI
HT29	PI	30,36	2,17
KM12	PI	1,71	PI
SW-620	PI	PI	1,26
Cancer du SNC			
SF-268	PI	0,73	PI
SF-295	1,15	1,66	PI
SF-539	2,97	PI	PI
SNB-19	PI	PI	PI
SNB-75	5,47	8,23	8,44
U251	PI	3,61	2,45
Mélanome			
LOX IMVI	3,17	4,38	1,29
MALME-3M	PI	PI	PI
M14	PI	5,74	0,74
MDA-MB-435	PI	PI	0,24
SK-MEL-2	PI	PI	PI
SK-MEL-28	PI	PI	PI
SK-MEL-5	PI	PI	PI
UACC-257	PI	PI	PI
UACC-62	PI	PI	2,57

Tableau 42. Résultats de l'inhibition de croissance des cellules tumorales (suite)

Pann/ligne cell	1/ NSC793185	2/ NSC793186	3/ NSC793187
Cancer des ovaires			
IGROV1	PI	PI	PI
OVCAR-3	PI	1,44	PI
OVCAR-4	PI	PI	PI
OVCAR-5	PI	PI	PI
OVCAR-8	PI	2,44	PI
NCI/ADR-RES	PI	6,23	PI
SK-OV-3	21,83	11,68	PI
Cancer du rein			
786-0	PI	0,75	0,72
A498	PI	PI	PI
ACHN	PI	3,00	PI
RXF 393	PI	PI	PI
SN12C	PI	PI	0,08
TK-10	PI	PI	PI
UO-31	9,45	8,89	15,85
Cancer de la prostate			
PC-3	8,39	13,92	15,07
DU-145	PI	PI	PI
Cancer du sein			
MDA-MB-231/ATCC	PI	PI	PI
HS 578T	PI	PI	0,86
BT-549	PI	12,30	PI
T-47D	17,56	28,15	17,72
MDA-MB-468	PI	PI	PI

Parmi les 3 composés, le composé **2** (3β -acétoxy, 2α , 11α -dihydroxyolean-18-ène) est le plus actif à la dose de 10^{-5} M, il présente un effet inhibiteur contre 32 lignées de cellules tumorales, les souches les plus sensibles sont la lignée RPMI-8226 de la leucémie avec un pourcentage de 38,22 % de l'inhibition de croissance des cellules tumorales, ainsi que les lignées NCI-H460 et NCI-522 du cancer du poumon avec un pourcentage de 36,27 % et 34,41 % d'inhibition de croissance des cellules tumorales respectivement. Il présente aussi un effet inhibiteur contre des lignées cellulaires du cancer du côlon, cancer du SNC, cancer des ovaires, mélanome, cancer du rein, cancer de la prostate et cancer du sein.

V.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [157] selon la méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller [158].

Le réactif FCR constitué par un mélange d'acide phospho tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phospho molybdtique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes de tungsten (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux possédant une absorption maximale aux environs de $\lambda = 750-765$ nm.

L'acide gallique est utilisé comme étalon.

La courbe d'étalonnage est obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations (25-200 $\mu\text{g/ml}$) en fonction de l'absorbance de chaque solution déterminée à $\lambda = 760$ nm.

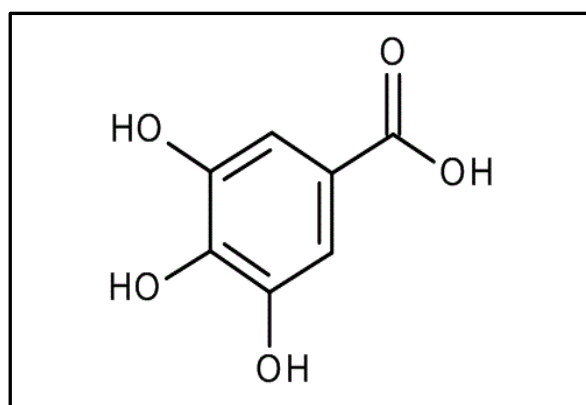


Figure 136. Structure de l'acide gallique

V.3.1. Mode opératoire

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1 g d'extrait est dissous dans un volume de 1 ml de MeOH.

Extraits utilisés :

- Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.
- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

▪ Préparation de la solution de Carbonate de Sodium Na_2CO_3 à 7,5%

7,5 g de Na_2CO_3 sont dissous dans 100 ml H_2O distillée (solution S_1).

- **Préparation de la solution de Folin Ciocalteu FCR dilué 10 fois**

1 ml de la solution FCR concentré (2 M) est complété à 10 ml avec de l'eau distillée (9 ml) (solution S₂).

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique**

1 mg de l'acide gallique est dissous dans un volume de 5 ml de MeOH donne la solution S₃ (0,2 mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme suit :

Tableau 43. Dilutions de l'acide gallique

Concentrations de l'acide gallique (µg/ml)	Volume S ₃ (µl)	Volume MeOH (µl)
25	25	175
50	50	150
75	75	125
100	100	100
125	125	75
150	150	50
175	175	25
200	200	00

- **Procédure**

Un mélange constitué de : 20 µl d'extrait de plante + 100 µl de S₂ (1:10) + 75 µl de S₁ (7,5 %) est mis à l'obscurité pendant une heure. La lecture est faite à 765 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (MeOH).

Pour l'étalon de l'acide gallique : 20 µl de chaque dilution sont transférées dans une microplaque + 100 µl S₂ (1:10) + 75 µl de S₁ (7,5 %). Le mélange est incubé pendant une heure. La lecture est effectuée à 765 nm.

V.3.2. Résultats

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été tracée en utilisant les valeurs des absorbances obtenues pour les différentes solutions de l'acide gallique ainsi préparées. Elle est représentée dans la figure 137. L'analyse quantitative des phénols totaux a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant l'acide gallique par les extraits des plantes.

La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en équivalant d'acide gallique en milligramme par un gramme de matière végétale (mg/g).

L'analyse a été réalisée en trois essais, après on a calculé la moyenne des teneurs.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

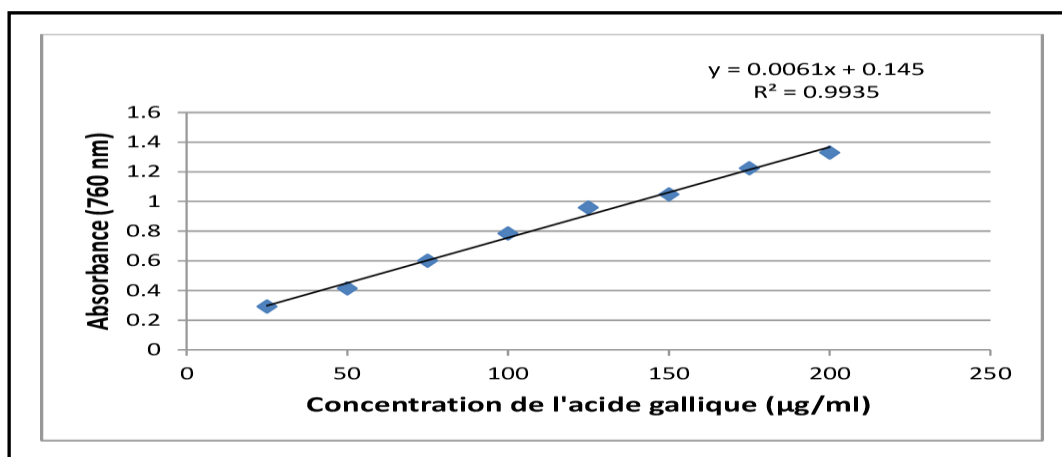


Figure 137. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 44. Résultats de la teneur en polyphénols totaux des extraits

Espèce	Extrait	Teneur en polyphénols mg/g d'extrait			Moyenne	Ecart type
		T ₁	T ₂	T ₃		
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	225,66	235,83	219,5	226,99	8,24
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	119,66	138,16	128,5	128,77	9,25
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	163,00	162,83	153,00	159,61	5,72
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	40,66	40,83	30,00	37,16	6,20

Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* est plus riche en polyphénols avec une teneur de **226,99 mg/g** d'extrait, que l'extrait *n*-butanol avec une teneur de **128.77 mg/g** d'extrait. Ainsi qu'une grande richesse aux polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est) avec une teneur de **159,61 mg/g** d'extrait par rapport à celui de *Ferula vesceritensis* (Sud) qui présente une faible teneur égale à **37,16 mg/g** d'extrait, et aux résultats obtenus de celui de *Ferula vesceritensis* de la région de Ghardaia étudiée précédemment avec une teneur de **61,91 mg/g** d'extrait [159].

V.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+} et les groupements hydroxyles des phénols (flavonoïdes). Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde $\lambda = 415 \text{ nm}$ [160].

La quercétine est utilisée comme étalon. La courbe d'étalonnage est obtenue à partir des solutions de la quercétine de différentes concentrations (25 - 200 $\mu\text{g/ml}$) en fonction de l'absorbance de chaque solution déterminée à $\lambda = 415 \text{ nm}$.

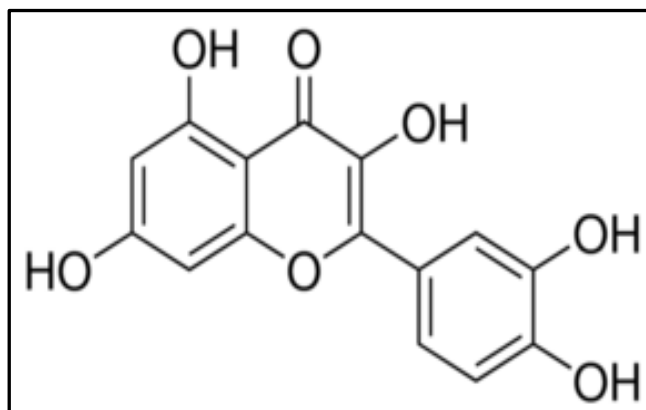


Figure 138. Structure de la quercétine

V.4.1. Mode opératoire

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1 mg d'extrait est dissous dans 1 ml de MeOH.

Extraits utilisés :

- Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.
- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

▪ Préparation de la solution d'acétate de potassium CH_3COOK 1M

9,80 g de CH_3COOK sont dissous dans 10 ml de H_2O distillée (solution S_1).

▪ Préparation de la solution de nitrate d'aluminium $(Al(NO_3)_3, 9H_2O)$ 10%

10 g de $(Al(NO_3)_3)$ sont dissous dans 100 ml de H_2O distillée (solution S_2).

▪ Préparation de la gamme d'étalonnage de la quercétine

1 mg de la quercétine dans un volume de 5 ml de MeOH donne une solution S_3 de 0,2 mg/ml.

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme suit :

Tableau 45. Dilutions de la quercétine

Concentrations de la quercétine (µg/ml)	Volume S ₃ (µl)	Volume MeOH (µl)
25	25	175
50	50	150
75	75	125
100	100	100
125	125	75
150	150	50
175	175	25
200	200	00

▪ **Procédure**

Pour l'extrait de plante : 50 µl d'extrait de plante + 130 µl MeOH + 10 µl S₁ + 10 µl S₂.

La lecture est faite à 415 nm après 40 min.

Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le MeOH (50 µl d'extrait de plante + 150 µl MeOH).

Pour l'étalon de la quercétine : 50 µl de chaque dilution sont transférées dans une microplaque de 96 puits + 130 µl MeOH + 10 µl S₁ + 10 µl S₂.

La lecture est faite à 415 nm après 40 min.

V.4.2. Résultats

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été tracée en utilisant les valeurs des absorbances obtenues pour les différentes solutions de la quercétine préparées. Elle est représentée dans la figure 139. L'analyse quantitative des flavonoïdes totaux a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant la quercétine par les extraits des plantes.

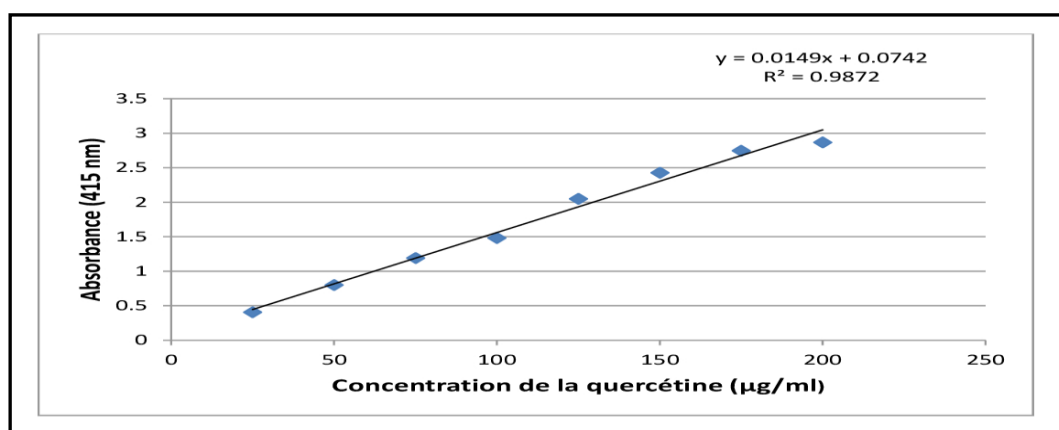


Figure 139. Courbe d'étalonnage de la quercétine

La quantité des flavonoides totaux dans les extraits est exprimée en équivalent de la quercétine en milligramme par un gramme de matière végétale (mg/g).

L'analyse a été réalisée en trois essais, après on a calculé la moyenne des teneurs.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 46.

Tableau 46. Résultats de la teneur en flavonoides totaux des extraits

Espèce	Extrait	Teneur en flavonoides mg/g d'extrait			Moyenne	Ecart type
		T ₁	T ₂	T ₃		
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	49,21	58,78	53,50	53,83	4,79
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	23,50	26,42	26,71	25,54	1,77
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	158	168,14	188,71	171,61	15,64
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	11,92	11,92	12	11,94	0,04

Conformément aux résultats des teneurs en polyphénols totaux, les résultats des teneurs en flavonoides montrent que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* est plus riche en flavonoides avec une teneur de **53,83 mg/g** d'extrait, que l'extrait *n*-butanol avec une teneur de **25,54 mg/g** d'extrait. Ainsi qu'une grande richesse en flavonoides de l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est) avec une teneur de **171,61 mg/g** d'extrait par rapport à celui de *Ferula vesceritensis* (Sud) qui présente une faible teneur égale à **11,94 mg/g** d'extrait.

A titre de comparaison, une étude sur l'extrait acétate d'éthyle effectuée sur un échantillon de la région de Ghardaia a montré une teneur de **10,57 mg/g** d'extrait [159].

V.5. Activité antioxydante

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement [161-163].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques.

En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en

partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH[•]) et superoxydes (O₂[•]) [164-167].

V.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode définitive par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Généralement il faut combiner les réponses de tests différents pour avoir une indication sur l'activité antioxydante du composé à tester [168-170].

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* ou *in vivo*, l'activité antioxydante. Parmi ces méthodes, on a choisi d'appliquer cinq méthodes, à savoir : Piégeage du radical libre DPPH[•], Réduction du radical cation ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-Azino-Bis (3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique), Piégeage du radical superoxyde O₂[•], CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), pour étudier la capacité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*, et l'extrait d'acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (région Est (Constantine) et région Sud (Bechar)).

V.6.1. Piégeage du radical libre DPPH[•]

Le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant les groupes-SH, -NH et -OH [171]. Il s'effectue à température ambiante, pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé pour l'évaluation des extraits très riches en composés phénoliques [172-183].

V.6.1.1. Principe de la méthode

Le composé 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [184-185].

Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire.

La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH[•].

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie à $\lambda = 517 \text{ nm}$.

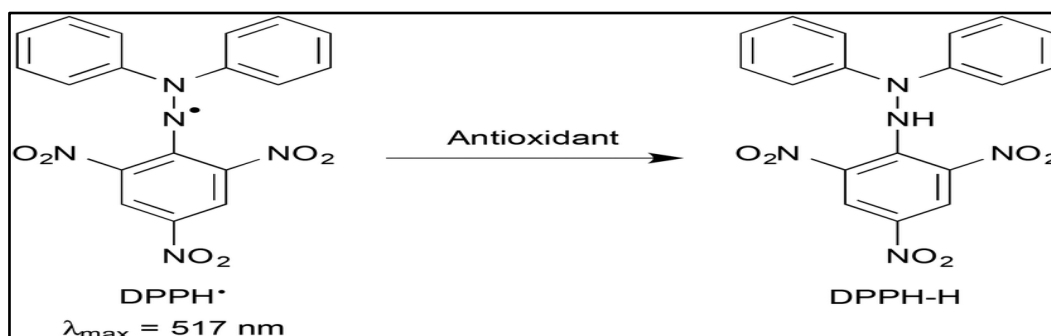


Figure 140. Piégeage du radical libre DPPH[•]

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- 1- la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;
- 2- la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) [163,174].

Dans le cas des composés phénoliques ($\Phi\text{-OH}$), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH[•] alors transformé en une molécule stable DPPHH [186, 187].

L'évaluation de l'activité antioxydante s'est faite par la détermination de IC_{50} , c'est la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH[•] [187,188]. Les IC_{50} sont calculés graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et les standards.

Dans cette approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t :

$$\% \text{ de piégeage du radical DPPH}^{\bullet} = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_t) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100\%.$$

$Abs_{\text{contrôle}}$: absorbance du contrôle.

Abs_t : absorbance en présence d'extrait.

Chaque test est répété trois fois, le résultat est présenté par la moyenne des trois essais.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E [186].

V.6.1.2. Mode opératoire

L'activité anti radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie, par le dosage du DPPH selon le protocole décrit par Blois. M. S. 1958 [184]. Le BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

▪ Préparation de la solution d'extrait de plante

1 mg d'extrait est dissous dans 1 ml de MeOH.

Différentes concentrations d'extraits de plantes ont été utilisées : 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,125 µg/mL.

Extraits utilisés : - Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.

- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

▪ Préparation de la solution de DPPH

6 mg de DPPH est dissous dans un volume de 100 ml de MeOH, cette solution est conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

L'absorbance est de 0,5 nm (à $\lambda = 517$ nm) dans le spectrophotomètre.

▪ Procédure

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits, et il a été réalisé en trois répétitions :

Une solution de 160 µl de DPPH + 40 µl de solution d'extrait de plante est préparée. La lecture est effectuée à 517 nm après 30 min dans l'obscurité en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits.

V.6.1.3. Résultats

Les radicaux libres stables de couleur bleue ont été réduits à diphenyl picrylhydrazine de couleur jaune en présence d'un antioxydant.

Le graphique linéaire de la concentration en fonction des pourcentages d'inhibition a été préparé et les valeurs des CI_{50} exprimées en $\mu\text{g/ml}$ ont été calculées par analyse de régression linéaire (Figure 141).

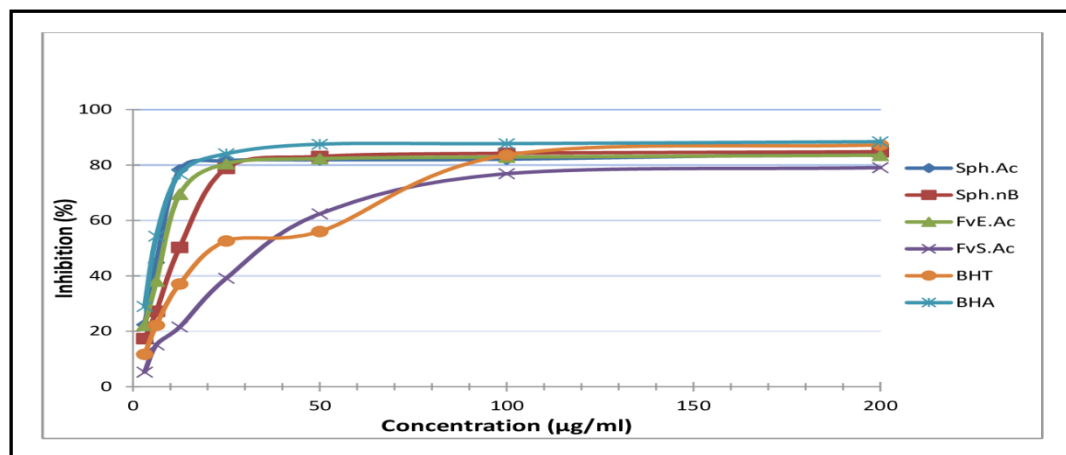


Figure 141. Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH*

Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé ($CI_{50} = 7,55 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$) en comparaison avec l'extrait *n*-butanol ($CI_{50} = 13,79 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$), et meilleur que celui du standard BHT ($CI_{50} = 22,32 \pm 1,19 \mu\text{g/ml}$).

Ainsi que l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est) est plus actif par rapport à celui de *Ferula vesceritensis* (Sud) et meilleure que le standard BHT. Ils possèdent des valeurs des $CI_{50} = 8,44 \pm 0,48$ et $CI_{50} = 38,30 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$ et $CI_{50} = 22,32 \pm 1,19$ respectivement.

Les résultats ont été enregistrés en moyenne \pm écart type (Tableau 47).

Tableau 47. Résultats du piégeage du radical libre DPPH*

Espèce	Extrait	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	$7,55 \pm 0,27$
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	$13,79 \pm 0,46$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	$8,44 \pm 0,48$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	$38,30 \pm 0,64$
BHT		$22,32 \pm 1,19$
BHA		$5,73 \pm 0,41$

V.6.2. Réduction du radical cation ABTS^{•+}

La méthode de radical ABTS figure parmi les tests les plus utilisés pour déterminer la concentration des radicaux libres.

V.6.2.1. Principe de la méthode

Elle est basée sur la capacité d'un antioxydant à inhiber le radical libre cationique ABTS^{•+} de coloration bleue obtenu à partir de l'ABTS en le transformant en ABTS⁺ incolore par piégeage d'un proton par l'antioxydant [189].

La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

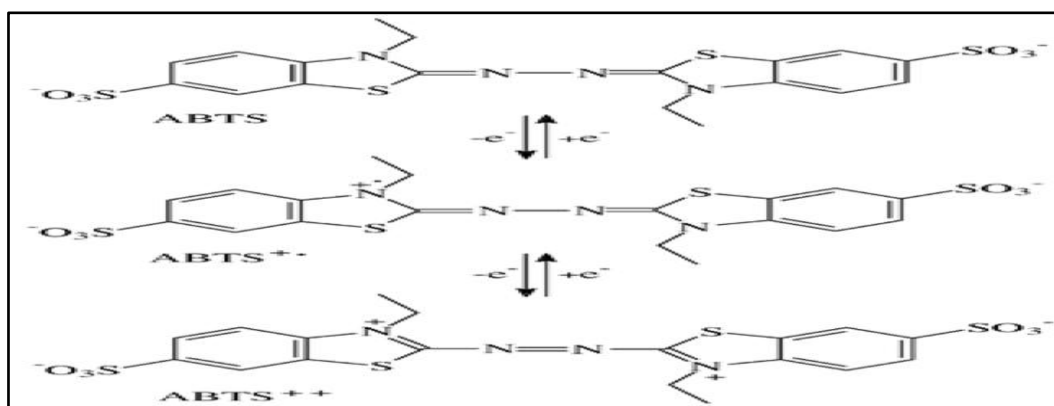


Figure 142. Réduction du radical cation ABTS^{•+}

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition du radical ABTS}^{\bullet+} = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_t) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100 \%$$

Abs_{contrôle} : absorbance du contrôle.

Abs_t : absorbance en présence d'extrait.

Chaque test est répété trois fois, le résultat est présenté par la moyenne des trois essais [190].

L'évaluation de l'activité antioxydante est faite par la détermination de IC₅₀, c'est la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de ABTS^{•+}. Les IC₅₀ sont calculés graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et les standards.

V.6.2.2. Mode opératoire

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et al. 1999 [189].

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1mg d'extrait est dissout dans 1ml de MeOH.

Différentes concentrations d'extraits de plantes ont été utilisées : 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,125 µg/mL.

Extraits utilisés :

- Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.
- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Constantine et Bechar).

▪ Préparation de la solution ABTS⁺

Deux solutions de 7 mM ABTS (19,2 mg ABTS (M (ABTS) = 548,68 g/mol) dans 5 ml H₂O distillée) et 2,45 mM persulfate de potassium (3,3 mg K₂S₂O₈(M (K₂S₂O₈) = 270,32 g/mol) dans 5ml H₂O distillée) sont préparées et mises à l'abri de la lumière pendant 16 heures.

Attendre 16 H à l'abri de la lumière.

Les deux produits en solution aqueuse ABTS et K₂S₂O₈ sont mélangées et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16 H. L'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par de l'eau distillée à 0,700 ± 0,020 à 734 nm avant l'usage.

▪ Procédure

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits, et il a été réalisé en trois répétitions :

Une solution de 160 µl (ABTS⁺) + 40 µl extrait de plante de différentes concentrations est préparée.

Une quantité égale (160 µl solution ABTS⁺) a été ajoutée au contrôle (40 µl de MeOH).

Le BHT et le BHA ont été utilisés comme des antioxydants de référence.

La lecture est faite à 734 nm après 10 min en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits.

L'activité ABTS⁺ a été exprimée en % et calculée pour chaque concentration par rapport à l'absorbance du contrôle par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du radical ABTS}^{+\cdot} = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_t) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100\%.$$

V.6.2.3. Résultats

Les radicaux libres ABTS⁺ de coloration bleue ont été réduits en ABTS⁺ incolore en présence d'un antioxydant.

Le graphique linéaire de la concentration en fonction des pourcentages d'inhibition a été préparé et les valeurs des CI_{50} exprimées en $\mu\text{g/ml}$ ont été calculées par analyse de régression linéaire (Figure 143).

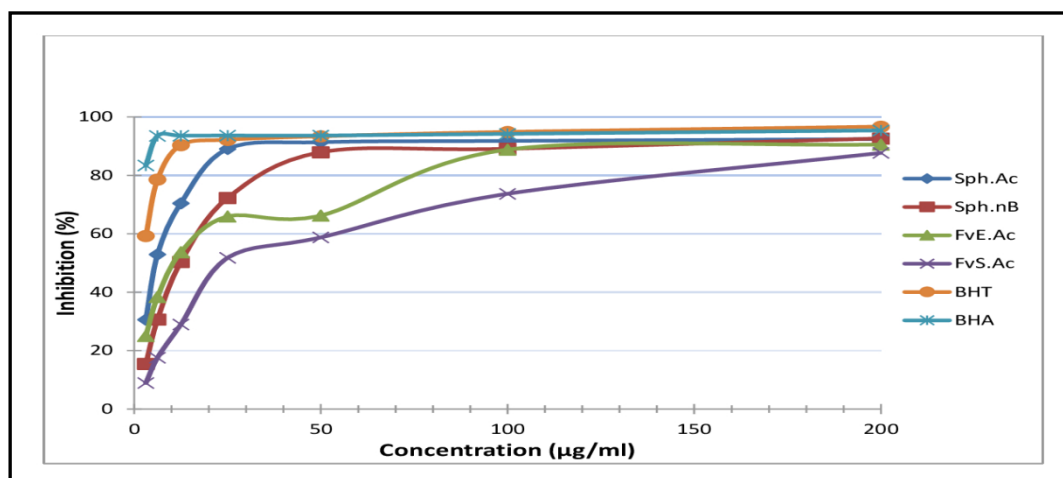


Figure 143. Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode de réduction du radical cation $ABTS^{+}$

Les résultats du test de réduction du radical $ABTS^{+}$ montrent que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* possède la meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits avec une valeur de la $CI_{50} = 6,96 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, mais il reste moins actif que les standards utilisés BHT ($CI_{50} = 1,29 \pm 0,30$) et BHA ($CI_{50} = 1,81 \pm 0,10$). Cependant, l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Sud) présente une $CI_{50} = 19,25 \pm 6,20 \mu\text{g/ml}$ est moins actif que celui de *Ferula vesceritensis* (Est) ($CI_{50} = 12,44 \pm 1,89$).

Les résultats ont été enregistrés en moyenne \pm écart type (Tableau 48).

Tableau 48. Résultats du test de réduction du radical cation $ABTS^{+}$

Espèce	Extrait	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	$6,96 \pm 0,21$
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	$14,25 \pm 1,29$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	$12,44 \pm 1,89$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	$19,25 \pm 6,20$
BHT		$1,29 \pm 0,30$
BHA		$1,81 \pm 0,10$

V.6.3. Piégeage du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Le test au radical superoxyde est utilisé pour évaluer la capacité d'un produit à capter un radical libre $O_2^{\cdot-}$.

V.6.3.1. Principe de la méthode

Dans cette méthode, le radical réduit le NBT²⁺ (Nitro Blue Tétrazolium) de couleur jaune en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à $\lambda = 560$ nm.

Le radical libre superoxyde a été formé par du DMSO alcalin qui réagit avec le NBT pour produire du formazan coloré [191]. Un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune.

Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT²⁺ par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant. On trace une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de composé testé et on détermine la CI₅₀ (concentration inhibant 50 % de l'activité) [192].

Le taux de réduction du NBT est déterminé par lecture de l'absorbance spectrophotométrique à $\lambda = 560$ nm [192]. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du NBT selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition du NBT} = [(Abs_t - Abs_{\text{contrôle}}) / Abs_t] \times 100\%.$$

Abs_t : absorbance en présence d'extrait.

Abs_{contrôle} : absorbance du contrôle.

Chaque test est répété trois fois, le résultat est présenté par la moyenne des trois essais.

V.6.3.2. Mode opératoire

L'activité antioxydante piégeage du radical superoxyde O₂^{•-} est déterminée par la méthode de Rao and Kunchandy 1990 [191].

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1 mg d'extrait est dissout dans 1ml de MeOH.

Différentes concentrations d'extraits de plantes ont été utilisées : 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,125 µg/mL.

Extraits utilisés :

- Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.
- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

▪ Préparation de la solution DMSO alcalin

20 mg de NaOH sont dissous dans 1 ml de H₂O complété à 100 ml par le DMSO.

▪ **Préparation de la solution de NitroBlue Tetrazolium (NBT)**

10 mg de NBT sont dissous dans 10 ml de H₂O distillée.

▪ **Procédure**

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits, et il a été réalisé en trois répétitions :

Une solution de 40 µl extrait de plante de différentes concentrations + 130 µl DMSO alcalin + 30 µl NBT est préparée.

Une quantité égale (130 µl DMSO alcalin + 30 µl NBT) a été ajoutée au contrôle (40 µl de MeOH).

Le α-Tocophérol et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des antioxydants de référence.

La lecture est faite à 560 nm en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits.

V.6.3.3. Résultats

La courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des composés testés a été préparé et les valeurs des CI₅₀ exprimées en µg/ml ont été calculées par analyse de régression linéaire (Figure 144).

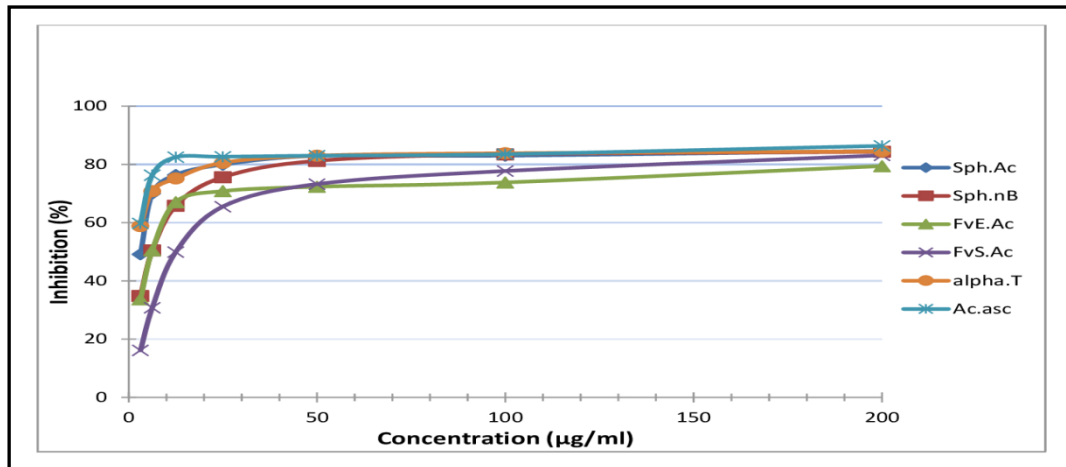


Figure 144. Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode du piégeage du radical superoxyde O₂^{•-}

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical superoxyde O₂^{•-} montre que les deux extraits acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* et de *Ferula vesceritensis* (Est) sont les plus actifs, présentant des valeurs des CI₅₀ = 1,54 ± 0,53 et 3,40 ± 2,52 µg/ml respectivement. Ces deux valeurs sont meilleures que celle de l'α-Tocophérol (CI₅₀ = 3,89 ± 1,02 µg/ml). Les résultats ont été enregistrés en moyenne ± écart type (Tableau 49).

Tableau 49. Résultats du test de piégeage du radical superoxyde O₂⁻

Espèce	Extrait	CI ₅₀ (µg/ml)
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	1,54 ± 0,53
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	7,12 ± 1,02
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	3,40 ± 2,52
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	15,31 ± 0,22
α-Tocophérol		3,89 ± 1,02
Acide ascorbique		1,16 ± 0,07

V.6.4. CUPRAC

CUPRAC ou test de capacité antioxydante par réduction de cuivre est une méthode utilisée pour déterminer l'activité antioxydante pour les polyphénols y compris les flavonoïdes [193].

V.6.4.1. Principe de la méthode

La méthode CUPRAC est basée sur la réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ en présence du réactif de Néocuproïne (2,9 -diméthyl- 1,10-phénanthroline). Le suivi de la diminution de l'absorbance est fait par spectrophotométrie à λ = 450 nm suite à la réduction du complexe Cuivre-Néocuproïne en présence d'un antioxydant [194].

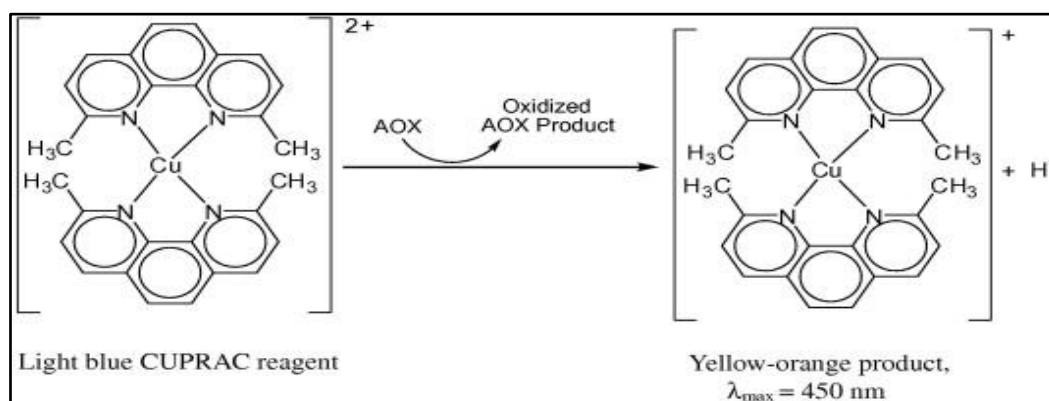


Figure 145. CUPRAC

Le pourcentage de la réduction du Cu²⁺ est calculé selon la formule :

$$\% \text{ de la réduction du Cu}^{2+} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \%$$

A₀ : absorbance de CuCl₂.

A₁ : absorbance de CuCl₂ en présence d'extrait.

Chaque test est répété trois fois, le résultat est présenté par la moyenne des trois essais.

V.6.4.2. Mode opératoire

Le Cupric Reducing Antioxidant Capacity ou la Capacité Antioxydante par réduction du Cuivre est déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak et al. 2004 [194].

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1 mg d'extrait est dissous dans 1 ml de MeOH.

Différentes concentrations d'extraits de plantes ont été utilisées : 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,125 µg/mL.

Extraits utilisés :

- Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.
- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

▪ Préparation de la solution d'ACNH₄

Un mélange de 1,927 g d'acétate d'ammonium (ACNH₄ M (ACNH₄) = 77 g/mol) + 25 ml H₂O distillée est préparé, il donne une solution transparente S₁ (pH = 7.0).

▪ Préparation de la solution de CuCl₂·2H₂O

Un mélange de 0,042625 g de CuCl₂·2H₂O (M (CuCl₂·2H₂O) : 170,50 g/mol) + 25 ml H₂O distillée est préparé, il donne la solution S₂ de coloration bleue.

▪ Préparation de la solution de Néocuproïne

Un mélange de 0,039 g Neocupronin (M (Néocuproïne) = 205,27 g/mol) + 25 ml EtOH est préparé, il donne la solution S₃.

▪ Procédure

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits, et il a été réalisé en trois répétitions :

Une solution de 40 µl extrait de plante de différentes concentrations + 60 µl S₁+ 50 µl S₂+ 50 µl S₃ est préparée.

Une quantité égale (60 µl S₁+ 50 µl S₂+ 50 µl S₃) a été ajoutée au contrôle (40 µl de MeOH).

Le BHT et le BHA ont été utilisés comme des antioxydants de référence.

La lecture est faite à 450 nm après une heure de temps en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits.

V.6.4.3. Résultats

La courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration des extraits testés a été préparée et les valeurs des $A_{0,50}$ ont été déterminées (Figure 146).

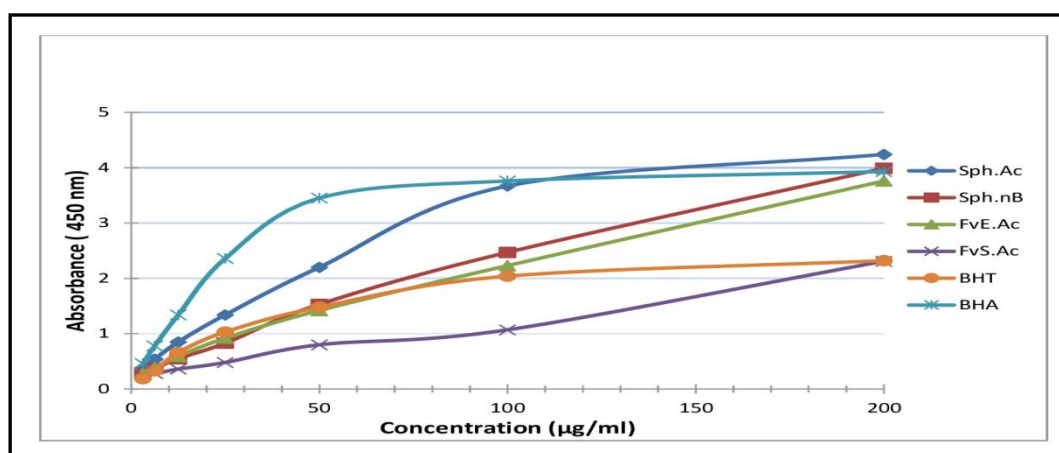


Figure 146. Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode CUPRAC

Les résultats du test CUPRAC confirment les résultats des tests précédents. Il montre aussi que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* est le plus actif. Cet extrait avec une valeur de $A_{0,50} = 5,53 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ montre une meilleure activité antioxydante par rapport au BHT ($A_{0,50} = 9,62 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* de (Sud) avec une valeur de ($A_{0,50} = 26,19 \pm 0,53$) montre une faible activité par rapport aux standards BHT ($A_{0,50} = 9,62 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$) et BHA ($A_{0,50} = 3,64 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$), par contre celui de *Ferula vesceritensis* (Est) avec une valeur de ($A_{0,50} = 10,07 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$) montre une activité proche de celle de BHT.

Les résultats ont été enregistrés en moyenne \pm écart type (Tableau 50).

Tableau 50. Résultats du test CUPRAC

Espèce	Extrait	$A_{0,50}$ (µg/ml)
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	$5,53 \pm 0,26$
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	$11,44 \pm 0,48$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	$10,07 \pm 0,20$
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	$26,19 \pm 0,53$
BHT		$9,62 \pm 0,87$
BHA		$3,64 \pm 0,19$

V.6.5. Réduction des ions ferriques (FRAP)

Le pouvoir réducteur du Fer (Fe^{3+}) est un test utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits dans un milieu neutre en mesurant le pouvoir des antioxydants.

V.6.5.1. Principe de la méthode

La méthode de réduction du Fer est basée sur la réduction des ions Fe^{3+} à des ions de Fe^{2+} par les antioxydants qui donnent la couleur bleue [195].

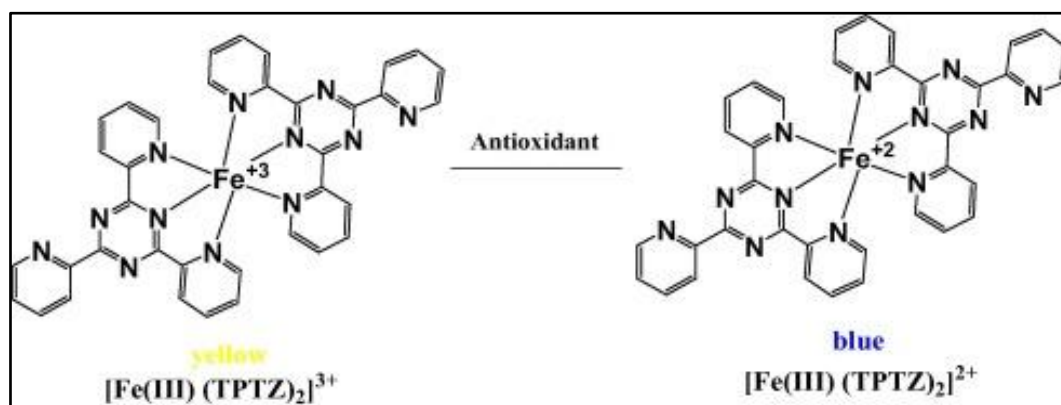


Figure 147. Réduction des ions ferriques (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits est comparée par rapport aux BHA, BHT et l'acide ascorbique (Vitamine C) en traçant une courbe d'étalonnage. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits [157].

Le pourcentage du pouvoir réducteur du Fer est calculé selon la formule :

$$\% \text{ du pouvoir réducteur du Fer} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%.$$

A_0 : absorbance de FeCl_3 ; A_1 : absorbance de FeCl_3 en présence d'extrait.

Chaque test est répété trois fois, le résultat est présenté par la moyenne des trois essais [195].

V.6.5.2. Mode opératoire

L'activité Reducing power est déterminée par la méthode Oyaizu 1986 [195, 196].

▪ Préparation de la solution de l'extrait de plante

1 mg d'extrait est dissout dans 1 ml de MeOH.

Différentes concentrations d'extraits de plantes ont été utilisées : 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,125 $\mu\text{g/mL}$.

Extraits utilisés : - Acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*.

- Acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est et Sud).

- **Préparation de la solution de $K_3Fe(CN)_6$**

1 g de $K_3Fe(CN)_6$ est dissout dans 100 ml d' H_2O distillée.

- **Préparation de la solution de TCA 10%**

1 g de TCA est dissous dans 10 ml de H_2O distillée.

- **Préparation de la solution de $FeCl_3$ 0.1%**

1g $FeCl_3$ est dissous dans 100 ml de H_2O distillée.

- **Procédure**

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits, et il a été réalisé en trois répétitions :

Une solution de 10 μ l extrait de plante de différentes concentrations + 40 μ l phosphate buffer + 50 μ l $K_3Fe(CN)_6$ est préparée et incubée à 50 °C pendant 20 min

Après incubation, 50 μ l TCA 10 % + 40 μ l H_2O distillée + 10 μ l $FeCl_3$ 0.1 % sont rajoutés.

Un blanc est préparé en remplaçant l'extrait de plante par le MeOH. (10 μ l MeOH + 40 μ l phosphate buffer + 50 μ l $K_3Fe(CN)_6$: incubation à 50°C pendant 20 min + 50 μ l TCA 10 % + 40 μ l H_2O distillée + 10 μ l $FeCl_3$ 0.1 %).

Le BHT, le BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des antioxydants de référence.

La lecture est faite à 700 nm en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits.

V.6.5.3. Résultats

La courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration des extraits testés a été préparée et les valeurs des $A_{0.50}$ ont été déterminées (Figure 148).

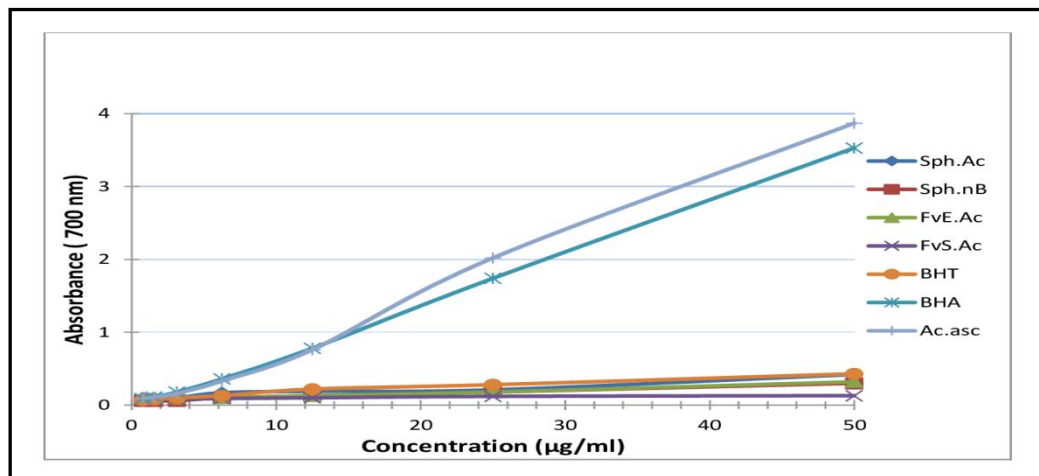


Figure 148. Courbe représentant l'activité antioxydante mesurée par la méthode du FRAP

Tous les extraits ont montré une valeur de ($A_{0,50} > 50 \mu\text{g/ml}$) selon le test de FRAP. Ils possèdent tous une activité inférieure aux BHA ($A_{0,50} = 8,41 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$) et l'acide ascorbique ($A_{0,50} = 9,01 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$).

Tableau 51. Résultats du test de réduction des ions ferriques

Plante	Extrait	$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Salvia phlomoides</i>	Acétate d'éthyle	> 50
<i>Salvia phlomoides</i>	<i>n</i> -butanol	> 50
<i>Ferula vesceritensis</i> (Est)	Acétate d'éthyle	> 50
<i>Ferula vesceritensis</i> (Sud)	Acétate d'éthyle	> 50
BHT		> 50
BHA		$8,41 \pm 0,67$
Acide ascorbique		$9,01 \pm 1,46$

L'activité antioxydante doit être conclue sur la base de plusieurs méthodes d'évaluation. Dans cette étude, les deux espèces *Salvia phlomoides* et *Ferula vesceritensis* montrent une capacité antioxydante élevée en appliquant cinq méthodes différentes.

Ces méthodes ont révélées une très bonne inhibition des radicaux libres DPPH[•] et O₂^{•-}, en particulier, l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Salvia phlomoides* et l'espèce *Ferula vesceritensis* (Est) comparée aux résultats obtenus dans les autres tests (Réduction du radical cation ABTS^{•+}, CUPRAC et FRAP) où les extraits ont montré une faible activité.

Ce résultat est dû aux principaux composés antioxydants retrouvés dans l'extrait acétate d'éthyle des deux espèces.

Chapitre VI

Les huiles essentielles

Les Lamiacées et les Apiacées figurent parmi les grandes et les plus importantes familles des plantes aromatiques, elles sécrètent des huiles essentielles qui leurs confèrent des odeurs et saveurs caractéristiques, ce qui explique leur utilisation comme aliments et condiments, en cosmétique et en phytothérapie.

Salvia phlomoides Asso. et *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. ont fait l'objet d'une analyse de leurs huiles essentielles.

VI.1. *Salvia phlomoides*

VI.1.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Salvia*

Plusieurs espèces du genre *Salvia* récoltées dans différentes régions du monde ont fait l'objet d'études de leurs huiles essentielles.

Parmi les travaux les plus récents, on peut citer ceux menés sur les huiles essentielles de quelques espèces du genre *Salvia* dans le tableau 52.

Tableau 52. Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Salvia* étudiées durant les trois dernières années (2014-2018).

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S. ringens</i>	1.8-cinéole	31,99	Macédoine	[197]
	Camphène	17,06		
	Bornéol	11,94		
	α -Pinène	11,52		
<i>S. officinalis</i>	1,8-Cinéole	27,5	Albanie	[198]
	Camphor	11,5		
<i>S. officinalis</i>	α -Thujone	16,5	Grèce	[198]
	β -Thujone	16,4		
	1,8-cinéole	8,8		
<i>S. montbretii</i>	β -Caryophyllène	32,8	Turquie	[199]
	β -pinène	9,8		
	α -Humulène	8,2		
	12-Hydroxy- β -caryophyllèneacétate	6,6		
	Germacrène D	4,9		
	α -Pinène	4,5		

Tableau 52. Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Salvia* étudiées durant les trois dernières années (2014-2018) (suite).

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S. staminea</i>	Linalyl acétate	23,30	Turquie	[200]
	Linalool	22,05		
	Spathulenol	10,02		
	Oxidede caryophyllène	5,45		
	α -Terpinéol	4,89		
	sclareol	4,85		
	Sclareoloxide	2,89		
<i>S. syriaca</i>	1, 6-Cinéole	46,45	Iran	[201]
	Camphre	27,58		
<i>S. aristata</i>	Benzène, 1,3-bis-pheoxypheoxy	95,42	Iran	[201]
<i>S. discolor</i>	Intermedeol	57,37	Allemagne	[202]
	E-caryophyllene	17,81		
	Germacrène D	3,98		
	α -Humulène	3,11		
	Linalool	3,00		
<i>S. sclarea</i>	Linalyl acétate	36,33	Allemagne	[202]
	Linalool	23,47		
	Sclareol	14,62		
	α -Terpinéol	8,12		
<i>S. plebeian</i>	Oxidede caryophyllène	15,54	Chine	[203]
	γ -Eudesmol	14,03		
	τ -Cadinol	10,21		
	Calamenène	9,63		
	Copaène	5,70		
	γ -Cadinène	5,30		
	Cadalène	5,28		
	α -Muuroène	5,19		
	Ledol	5,14		
	α -Cadinol	5,08		

Tableau 52. Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Salvia* étudiées durant les trois dernières années (2014-2018) (suite).

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S. lavandulifolia</i>	β -Caryophyllène	11,87	Pérou	[204]
	Spathulenol	8,13		
	Néomenthol	7,75		
	Pulégone	6,97		
	AcideHexadécanoïque	6,85		
	Germacrène-D	5,70		
	Bicyclogermacrène	4,53		
	Oxide de caryophyllène	3,97		
	Humulène	3,29		
<i>S. pratensis</i> L.	E-caryophyllène	21,9	Croatie	[205]
	Germacrène D	10,2		
	Linalool	17,7		
	Linalool acétate	15,3		
	Limonène	9,8		
<i>S. indica</i>	Hexahydrofarnesyl acétone	24,6	Iran	[206]
	β -Ionone	10,7		
	Acide palmitique	9,6		
	Manoyloxyde	7,8		

Cependant, seulement quatre espèces *S. officinalis*, *S. algeriensis*, *S. Barrelieri* et *S. chudaei* Batt. Et Trab., parmi celles déterminées en Algérie, ont été étudiées pour leurs huiles essentielles.

Tableau 53. Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre *Salvia* étudiées en Algérie

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S. officinalis</i>	α -Thujone	24,52	Algérie	[207]
	1,8- Cinéole	15,92		
	Camphre	16,86		
	β -Thujone	6,50		
	Veridiflorol	6,35		

Tableau 53. Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre *Salvia* étudiées en Algérie (suite)

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S.algeriensis</i>	Feuilles		Algérie	[208]
	β -Demascenone	22,96		
	β -Guaiène	11,31		
	2-Butanone, 1(2, 3,6-triméthylphenyl)	6,31		
	1-(2-Cyanoethyl)-2-éthyl-4-méthylimidazole	4,24		
	Benzèneéthanal, 4 [1,1diméthyléthyl] α -méthyl	4,02		
	2-Naphthalenamine,5,6,7,8-tetrahydro	3,9		
	Fleurs			
	β -Guaiène	34,32		
	Camphre	15,27		
<i>S.algeriensis</i>	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one,1,7,7-triméthyl	7,73	Algérie	[208]
	Bornyl acétate	5,99		
	Eucalyptol (1,8 Cinéole)	4,88		
	Myrtenyl acétate	4,66		
	β -Gurjunène	4,05		
<i>S. Barrelieri</i>	Feuilles		Algérie	[208]
	2-Butène 1one,1(2,6,6-triméthyl-1,3cyclohexadiène-1yl)E	8,05		
	Propanal, 2-méthyl-3-phenyl	7,32		
	Mégastigmatrienone III	6,59		
	α -Thujenal	3,28		
	Acid hexadécanoïque	2,91		
	Phytol	2,8		
	Mégastigmatrienone I	2,76		
	3-Nonen-5-one	2,52		
	1-(3-Méthylbutyl)-2,3,5-triméthylbenzène	2,08		
	Fleurs			
	3-Cyclohexen-1-one, 2-iso propyl-5-méthyl-	13,72		
	Geranyl acétate	9,2		
	Phénol, 3-methoxy-2,4,5-tri méthyl-	7,06		
	Oxide de caryophyllène	4,66		
	α -Terpinéol	4,53		
	Linalool	3,81		
	Caryophyllène	3,18		

Tableau 53. Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre *Salvia* étudiées en Algérie (suite)

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>S. chudaei</i> Batt. et Trab	Bornyl acétate	20,5	Algérie	[209]
	β -Eudesmol	13,6		
	β -Caryophyllène	10,6		
	Valencene	9,3		
	τ -Cadinol	9,3		
	α -Pinène	6,9		
	γ -Cadinène	5,8		

Ces résultats ont montré que les huiles essentielles des espèces du genre *Salvia* différaient dans leurs compositions chimiques au niveau qualitatif et quantitatif.

Par ailleurs des échantillons de la même espèce provenant de régions géographiques différentes peuvent produire des huiles essentielles de composition différente.

En ce qui concerne l'espèce *Salvia phlomoides*, aucune étude chimique n'a été réalisée auparavant sur cette espèce.

VI.1.2. Extraction des huiles essentielles de *Salvia phlomoides*

La partie aérienne de la plante *Salvia phlomoides* a été soumise à une distillation par entraînement à la vapeur d'eau. Cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter.

200 g des parties aériennes sont mises dans un ballon traversé par de la vapeur d'eau. Le passage de la vapeur à travers la plante provoque l'éclatement des cellules qui libèrent l'huile essentielle. La vapeur chargée d'huile essentielle est condensée par refroidissement dans un condenseur avant d'être récupérée. Le distillat, de densité différente, se sépare au niveau du séparateur, dont l'huile essentielle constitue la phase supérieure.

L'huile essentielle obtenue était de coloration jaune avec un rendement de 1 %, elle est conservée dans un flacon en verre ambré au réfrigérateur à 4 °C.

VI.1.3. Analyse et identification des constituants des huiles essentielles de *Salvia phlomoides*

L'huile essentielle a été analysée sur un chromatographe Agilent Technology 6890 N équipé d'un détecteur FID et couplé à un spectromètre de masse Agilent MSD 5975 B inerte, et muni d'une colonne de type HP-5 MS (20 m * 180 μ m, épaisseur du film : 0,18 μ m).

La température initiale du four est de 50 °C, puis augmentée à 325 °C à raison de 8 °C par minute. L'injection s'est faite par mode split avec un rapport de split de 150 : 1.

Les conditions opératoires sont :

Pour la CG/FID :

- Température : 280 min
- Gaz vecteur : H₂ (flux : 35 ml/min)
- Flux d'air : 450 ml/min

Pour la CG/MS :

- Vitesse linéaire : 48 cm/sec
- Potentiel d'ionisation : 70 eV
- Temps de scan : 3 min
- Bande de scan : de 30 à 400 u

Les composants d'huiles essentielles ont été identifiés en fonction de leur indice de rétention (ou bien Indice de Kovats), déterminés par référence à une série homologue d'alcanes relatifs analysée en parallèle aux mêmes conditions chromatographiques que les huiles essentielles.

Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau suivant.

Les résultats de l'analyse des huiles essentielles de *Salvia phlomoides* montrent la présence de 23 composés (97,44 %). Les constituants majoritaires sont : 6,10,14-Triméthyl-pendécane-2-one (28,26 %), Dibutyle Phtalate (14,51 %), Phytol (7,23 %), α -Humulène (5,83 %), Oxyde de Caryophyllène (5,66 %) et β -Caryophyllène (4,94 %).

Ces constituants majoritaires représentent 66,43 % des composés totaux.

Cette huile est caractérisée par la présence :

- Des apocaroténoïdes, avec un pourcentage de 28,26 % de 6,10,14-triméthyl-pendécane-2-one (Hexahydrofarnesyl acétone) et 1,81 % de E- β -ionone.
- Des phtalates : la présence de Dibutylephtalate avec une teneur de 14,51 %.
- Des composés oxygénés : α -Humulène est le composé sesquiterpénique principal avec une teneur de 5,83 %, on trouve également le terpénoïde Oxyde de Caryophyllène (5,66 %) et le β -Caryophyllène (4,94 %).
- Des alcools terpéniques : Phytol est le composé majoritaire avec un pourcentage de 7,23 %, tandis que Terpinèn-4-ol, α -Terpinéol et Linalool sont présents avec des teneurs de 2,14 ; 1,94 et 1,33 % respectivement.
- Des composés hydrocarbonnés, parmi lesquels : Heptacosane est le composé majoritaire 3,55 %

Tableau 54. Composition des huiles essentielles de *Salvia phlomoides*

N°	Indice de Rétention	Composé	Pourcentage (%)
01	1098	Linalool	1,33
02	1100	Nonanal	1,79
03	1174	Terpinèn-4-ol	2,14
04	1186	α -Terpinéol	1,94
05	1255	Carvenone	1,00
06	1383	β -Damascenone-E	1,47
07	1402	Méthyl eugénol	3,23
08	1417	β -Caryophyllène	4,94
09	1434	Nerylacétone	0,34
10	1452	α -Humulène	5,83
11	1487	E- β -Ionone	1,81
12	1582	Oxyde de Caryophyllène	5,66
13	1670	2-Pentadécane	1,52
14	1701	Geranylglate	0,96
15	1766	Bornyl Benzoate	1,20
16	1840	6,10,14-Triméthyl-pendécane-2-one	28,26
17	1913	Farnésyl Acétone <5E,9E>	2,42
18	1964	Dibutyle Phtalate	14,51
19	2099	Méthyloléate	1,61
20	2105	Phytol	7,23
21	2135	Acide Oléique	3,33
22	2483	Pentacosane	1,37
23	2672	Heptacosane	3,55

En accord avec les résultats d'analyses précédentes, les huiles essentielles de certaines espèces du genre *Salvia*, les composés Hexahydrofarnésyl acétone, Phytol, α -Humulène, Oxyde de caryophyllène et β -Caryophyllène sont trouvés comme composés majoritaires.

Par contre, Dibutyle Phtalate était trouvé avec des pourcentages plus faibles.

VI.2. *Ferula vesceritensis*

VI.2.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Ferula*

Les huiles essentielles du genre *Ferula* ont fait l'objet de plusieurs investigations au cours des dernières années.

Le tableau 55 présente les composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Ferula*.

Tableau 55. Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Ferula* étudiées durant les trois dernières années (2014-2018)

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>F. tingitana</i> L	Feuilles		Lybie	[210]
	α -Thujène	2,3		
	Elemol	8,3		
	Eudesmol	9,7		
	Cadinol	13,8		
	Fleurs			
	α -Thujène	13,5		
	Elemol	8,9		
	Eudesmol	0,6		
	Cadinol	2,2		
<i>F. gummosa</i>	γ -Elemène	14,1	Iran	[211]
	Germacrène B	11,8		
	(E)- γ -Bisabolène	10,7		
	Viridiflorène	8,1		
	Epizonaren	6,2		
<i>F. lutea</i>	δ -3-Carène	72,6	Tunisie	[212]
	α -Pinène	5,8		
	Myrcène	5,1		
	α -Phellandrène	4,0		
<i>F. cupularis</i>	D-Limonène	25,04	Iran	[213]
	δ -2-Carène	15,81		
	Sabinène	7,96		
	β -Phellandrène	6,8		
	α -Terpinolène	5,61		
	δ -3-Carène	5,21		
	<i>p</i> -Mentha-1-en-9-ol	2,75		
	γ -Terpinène	2,19		

Tableau 55. Composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Ferula* étudiées durant les trois dernières années (2014-2018) (suite)

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>F. communis L</i>	Feuilles		Italie	[214]
	β -Eudesmol	12,1		
	α -Eudesmol	12,1		
	Hedycariol	10,3		
	Fleurs			
	α -Pinène	10,5		
	γ -Terpinène	7,6		
	Hedycariol	8,4		
	Fruits			
	α -Pinène	55,9		
	β -Pinène	16,8		
	Myrcène	5,9		
<i>F. communis L</i>	Racines		Italie	[214]
	(<i>E</i>)- β -Farnesène	9,5		
	β -Cubebène	8,2		
	(<i>E</i>)-Caryophyllène	7,2		
<i>F. elaeochytris</i>	α -Pinène	71,8	Liban	[215]
<i>F. gummosa</i> Boiss	β -Pinène	19,88	Iran	[216]
	Guaiol	8,00		
	Shyobunone	6,96		
	δ -Cadinène	4,65		
	α -Pinène	3,16		
	β -Phellandrène	3,28		
	Myrtenol	2,8		

Cependant, seulement les deux espèces *Ferula lutea* et *Ferula vesceritensis*, parmi celles déterminées en Algérie, ont été étudiées pour leurs huiles essentielles.

Tableau 56. Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre *Ferula* étudiées en Algérie

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>F. lutea</i>	2,3,6-Triméthylbenzène	25,0	Algérie	[217]
	Cis-chrysanthenol	20,8		
	α -Pinène	10,9		
	Thymol	10,2		

Tableau 56. Composants majoritaires des huiles essentielles d'espèces du genre *Ferula* étudiées en Algérie (suite)

Espèces	Composants majoritaires	(%)	Région	Réf
<i>F. vesceritensis</i>	Fleurs		Algérie (Ghardaia)	[218]
	α -Pinène	16,1		
	α -Phellandrène	24,3		
	Elixène	6,3		
	Carotol	10,7		
	Tiges			
	α -Pinène	17,4	Algérie (Ghardaia)	[219]
	β -Pinène	8,9		
	Fenchylacétate	8,8		
	Carotol	10,8		
	Aristolone	14,1	Algérie (Ghardaia)	[220]
	Aristolène	9,6		
	Í-Cadino	5,1		
	α -Cadinol	4,8		
	5,9-Tétraddécadyne	24,72	Algérie (Ghardaia)	[221]
	Germacrène D	24,51		
	Cububène	8,57		
	α - Bisabolène	8,57		
	Dihydrocarvylacétate	6,20		
	Nerylaceton	4,45		
	β -Pinène	24,3	Algérie (Ghardaia)	[222]
	α -Pinène	17,3		
Limonène	10,0			
β -Pyrène	6,6			
Carotol	6,1			
Shyobunol	18,1	Algérie (Ghardaia)		
δ -Cadinène	14,2			

L'espèce *Ferula vesceritensis* récoltée dans la même région (Ghardaia) a fait l'objet de plusieurs études qui ont montré l'extrême diversité de cette espèce.

Dans ce travail, *Ferula vesceritensis* est récoltée dans les régions de Bechar et de Constantine.

VI.2.2. Extraction des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis*

Les feuilles et les fleurs de *Ferula vesceritensis* cueillies précédemment dans la région de Bechar (Sud), ont été soumises à une distillation par entraînement à la vapeur d'eau. Une quantité de 200 g du matériel végétal est mise dans un ballon dans lequel est injecté de la vapeur d'eau fournie par une chaudière. Les vapeurs de l'eau chargées d'huile essentielle se condensent en contact du réfrigérant, et le distillat se sépare au niveau du séparateur, dont l'huile essentielle constitue la phase supérieure.

L'huile de cette plante était de coloration jaune avec un rendement de 1 %, elle est conservée dans un flacon en verre ambré au réfrigérateur à 4 °C.

Les parties aériennes de *Ferula vesceritensis* cueillies précédemment dans la région de Constantine (Est) ont été hydrodistillées selon la méthode de Clevenger.

150 g du matériel végétal et 1,7 l de l'eau distillée sont introduits dans un ballon réacteur de 2 l et portés à l'ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs de l'eau chargées d'huile essentielle se condensent en contact du réfrigérant, et le distillat se sépare au niveau du séparateur, dont l'huile essentielle constitue la phase supérieure.

L'huile était de coloration jaune avec un rendement de 0,66 %, elle est conservée dans un flacon en verre ambré au réfrigérateur à 4 °C.

VI.2.3. Analyse et identification des constituants des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis*

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* (Sud) a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse CPG Hewlett-Packard 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A. La CPG est équipée d'un détecteur FID et d'une colonne de type DB-5 MS (20 m * 180 µm * 0,18 µm). Un volume de 0,2 µl de l'huile est injecté en mode split avec une température d'injection de 300 °C et un rapport split de 200 :1. La température initiale du four est de 50 °C pendant 3 min, puis augmentée à 320 °C (8°C / min).

Les conditions opératoires pour la CG-FID :

- Température : 300 min
- Gaz vecteur : H₂ (débit : 1 ml/min)

Les paramètres d'exploitation SM :

- Potentiel d'ionisation : 70 eV
- Vitesse linéaire : 44 cm / sec
- Bande de scan : de 50 à 550 u

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* (Est) a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse CPG Varian CP3800 couplé à un spectromètre de masse SM Saturn 2200. La CPG est équipée d'une colonne de type HP-5 MS Ultra Inert (30 m * 250 µm * 0,25 µm), l'Hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1.2 ml/min. Un volume de 0,1 µl de l'huile est injecté en mode split avec une température d'injection de 240 °C. La température initiale du four est de 50 °C, puis augmentée à 260 °C (9°C / min).

Les paramètres d'exploitation SM :

- Potentiel d'ionisation : 70 eV
- Vitesse linéaire : 29 cm / sec
- Rapport de split : 1 : 30
- Temps de scan : 4 min
- Bande de scan : de 30 à 350 u

L'identification des constituants est basé sur leur temps de rétention, leur indice de rétention (ou bien Indice de Kovats), déterminés par référence à une série homologue d'alcane relatifs analysée en parallèle aux mêmes conditions chromatographiques que les huiles essentielles, et par comparaison avec les spectres de masse de la base de données de l'appareil.

Les résultats de cette analyse sont présentés dans les deux tableaux suivants (Tableaux 57 et 58).

Tableau 57. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Bechar)

N°	Indice de Rétention	Composé	Pourcentage (%)
1	979	α-Pinène	1,13
2	989	β-Pinène	0,75
3	995	Limonène	0,34
4	1004	Benzèneacétaldéhyde	0,67
5	1028	Linalool	0,75
6	1035	Acide butanoïque	0,65
7	1043	Iso-pentanoate de 2-méthyl-butan-1-yle	0,77
8	1046	2-n-Butylacrolein	0,56
9	1070	Trans-Verbenol	0,46
10	1085	2-Méthyl-2-acide buténoïque	1,58
11	1096	Cis-méta-mentha-2,8-diène	0,42
12	1099	Exo-Acétate de Fenchyle	0,77
13	1109	Acétate de Bornyle	1,07
14	1161	2-Undecanone	0,88
15	1183	2-Dodecanol	0,83

Tableau 57. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Bechar) (suite)

N°	Indice de Rétention	Composé	Pourcentage (%)
16	1198	4-Vinyl-2-méthoxy-phenol	0,28
17	1222	1-Ethyl-3-piperidone	1,3
18	1226	α -Cubébène	2
19	1252	β -Bourbonnène	0,56
20	1257	2,4-Undecadiène	1,49
21	1263	E- α -Caryophyllène	1,32
22	1265	1-Pentadecene	1,49
23	1302	β -Copaène	0,63
24	1311	Géranyl acétone	0,9
25	1318	(Tetrahydropyran-4-yl)-(n-pentyl)-éther	0,73
26	1321	α -Humulène	0,31
27	1350	7- α -H,10- β -H-cadina-1(6),4-diène	0,7
28	1357	Germacrène-D	2.14
29	1369	Cis-Muurola 4,14-5-diène	0,72
30	1376	α -Muuroloène	3,53
31	1381	γ -Cadinène	4,78
32	1387	δ -Cadinène	15.49
33	1400	Isolédène	4.64
34	1411	Cadina-1,4-diène	0,49
35	1461	α -Cadinène	0,93
36	1464	γ -Calacorène	1,05
37	1478	Erémophilène	0,46
38	1480	Dauca-5,8-diène	4,1
39	1512	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,79
40	1514	Gaiol	1,63
41	1532	Epicubénol (Origan)	0,44
42	1579	β -Maaliène	0,63
43	1622	Epi- α -Cadinol	3,48
44	1625	Sélina-3,7(11)-diène	2,87
45	1669	α -Cadinol	2,9
46	1677	Bulnésol	0,91
47	1716	4-Acetyl-2,2,6-triméthyl-indanone	0,37
48	1751	Shyobunol	18,28
49	1758	Isodalauca-6,9-diène	0,4
50	1799	α -Sinensal	0,76
51	1722	2-Pentadécanone-6,10,14-triméthyl	0,54
52	1726	Isobutyl benzoate	0,27
53	1745	Pentyl benzoate	0,46
54	1760	Cyclopentylcyclohexane	0,68

Les huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* récoltée dans la région de Bechar sont caractérisées par la présence de 54 constituants. Les composants majoritaires sont : Shyobunol (18,28 %), δ -Cadinène (15,49 %), γ -Cadinène (4,78 %), Isolédène (4,64 %) et Dauca-5,8-diène (4,1 %). En accord avec la littérature, tous ces composants ont été trouvés auparavant dans les huiles essentielles du genre *Ferula*. L'échantillon de Ghardaia à titre d'exemple est constitué principalement de Shyobunol (18,1 %) et de δ -Cadinène (14,2 %) [222].

Tableau 58. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Constantine)

N°	Temps de Rétention	Composé	Pourcentage (%)
1	4.182	α -Thujène	0,15
2	4.304	α -Pinène	4,07
3	4.516	Camphène	0,19
4	4.870	Sabinène	0,54
5	4.935	β -Pinène	1,84
6	5.018	6-Méthyl-5-hepten-2-one	0,10
7	5.091	β -Myrcène	0,50
8	5.136	Ethylamylcarbinol	0,20
9	5.520	Trans-Sabinène hydraté	0,23
10	5.649	<i>p</i> -Cymène	1,32
11	5.733	D-Limonène	4,12
12	5.775	1,8-Cinéole	2,12
13	5.946	Salicyaldéhyde	0,36
14	6.189	γ -Terpinène	1,33
15	6.319	Terpinéol	0,23
16	6.672	2-Nonanone	0,20
17	6.809	Linalool	0,42
18	6.935	n-Amylisovalerate	0,37
19	7.178	3-Octanyl acétate	0,21
20	7.509	Trans-Pinocarveol	0,27
21	7.581	Cis-Verbenol	0,22
22	7.733	<i>p</i> -Menth-3-one	0,10
23	7.813	2-Décanone	0,10
24	7.942	Endo-Bornéol	1,22
25	8.117	4-Terpinéol	0,39
26	8.212	Neo-Menthol	0,19
27	8.360	6-Undécanol	1,56
28	8.436	Cis-Dihydrocarvone	1,03
29	8.794	Trans-(+)-Carveol	0,82
30	8.912	Pulégone	0,10
31	9.003	Cis- <i>p</i> -Menth-2,8-dienol	0,69
32	9.109	<i>p</i> -Menth-4(8)-en-3-one	0,24

Tableau 58. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Constantine) (suite)

N°	Temps de Réention	Composé	Pourcentage (%)
33	9.261	D-Carvone	13,10
34	9.372	Cis-Piperitoneoxide	1,32
35	9.471	1,1'-Bicyclopentyl	0,12
36	9.512	Cis-Salvène	0,09
37	9.619	Seudenone	0,12
38	9.676	1-Dodécanol	0,41
39	9.874	Thymol	1,80
40	9.972	2-Undecanol	0,34
41	10.018	Carvacrol	0,34
42	10.432	Dihydrocarvyl acétate	0,78
43	10.676	Car-3-en-2-one	0,13
44	10.969	Trans-Carveyl acétate	0,56
45	11.113	Rotundifolone	8,49
46	11.174	3-Piperidinone	0,36
47	11.227	α -Cubébène	0,38
48	11.273	2-Butanone	0,27
49	11.372	β -Bourbonene	0,57
50	11.436	β -Elémène	0,33
51	11.508	Cis-Jasmone	0,31
52	11.577	Cinérolon	0,46
53	11.733	2,4-Undecadiène	0,81
54	11.828	2,4-Décadienal	0,15
55	11.885	Caryophyllène	1,40
56	11.957	Cis-Géranylacétone	0,12
57	12.223	Trans-Géranylacétone	0,74
58	12.276	Trans- β -Farnesène	0,25
59	12.364	α -Humulène	0,22
60	12.486	Germacrène D	0,42
61	12.649	γ -Muuroène	0,68
62	12.695	α -Curcumène	0,20
63	12.744	β -Cubébène	1,43
64	12.968	α -Muuroène	0,81
65	13.086	Germacrène A	0,21
66	13.181	γ -Cadinène	1,15
67	13.292	δ -Cadinène	2,49
68	13.485	α -Cadinène	0,25
69	13.535	α -Copaene-8-ol	0,24
70	13.573	Calacorène	0,30
71	13.649	2-Isopropyl-1-pyrroline	0,63
72	13.744	Nerolidol	0,44

Tableau 58. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Constantine) (suite)

N°	Temps de Réention	Composé	Pourcentage (%)
73	13.831	α -Calacorène	0,19
74	13.915	α -Bisabolol	0,22
75	14.022	Germacrène D-4-ol	0,95
76	14.060	Spathulénol	0,43
77	14.147	Caryophyllèneoxide	0,55
78	14.284	Guaiol	0,77
79	14.409	Aromadendrène	0,24
80	14.482	Alloaromadendreneoxide	0,25
81	14.531	α -Copaène	0,47
82	14.603	1-Cyano-8-hydroxy-7 methoxyisoquinoline	0,23
83	14.702	Cadina-1,4-diène	0,86
84	14.782	Ethanone	1,42
85	14.873	tau.-Cadinol	2,21
86	14.926	Epizonaren	2,64
87	15.044	α -Cadinol	3,13
88	15.196	5-Azulenemethanol	0,69
89	15.250	α -Selinène	0,48
90	15.333	Dehydroaromadendrene	0,68
91	15.497	1H-Indène	2,85
92	15.554	2,3,4,5-Tetrahydropyridazine	2,28
93	15.664	Naphthalène	0,86
94	15.759	Farnésol	0,13
95	15.904	3-(4'-Methoxyphenyl)isoxazol-5(4H)-one	0,14
96	16.021	Trans-Farnesal	0,18
97	16.105	α -Hexyl-5-Isopropylidène-6-methyldeca-3,6, 9-trien-2-one	0,09
98	16.181	Trans-Calamenène	0,09
99	16.291	Deacetyl-Coralloidin-B	0,12
100	16.550	Isobutyl benzoate	0,32
101	16.793	(3S,4R,5S,6R,7S)-Aristol-9-en-3-ol	0,15
102	16.869	Quinoline	0,15
103	16.953	Spathulénol	0,16
104	17.006	Acide pPentadécanoïque	0,10
105	17.090	Trans-Nuciferol	0,10
106	17.189	2-Pentadécanone	0,13
107	17.364	1,2-Ethanediol	0,13
108	17.500	Acide Phthalique	0,25
109	18.113	Cis-Nerolidol	0,14
110	18.470	Acide Palmitique	0,24
111	18.504	Cyclopentylcyclohexane	0,18
112	18.546	Dibutylphthalate	0,25

Tableau 58. Composition des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* (Constantine) (suite)

N°	Temps de Rétention	Composé	Pourcentage (%)
113	18.763	Phenyl benzoate	0,36
114	20.093	Phytol	0,16
115	21.466	Acide 3-Methylbut-2-enoïque	0,10

Les composés identifiés représentent 94,37 % des composés qui constituent l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* récoltée dans la région de Constantine (115 produits).

Cette huile est caractérisée par la présence de plus d'une centaine de constituants, la plupart sont présents en faible proportion, et les composants majoritaires sont : D-Carvone (13,10 %), Rotundifolone (8,49 %), D-Limonène (4,12 %), α -Pinène (4,07 %) et α -Cadinol (3,13 %). Cette composition est différente par rapport à l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* étudiée précédemment.

A noter que c'est la première fois pour le genre *Ferula* que les composants majoritaires sont D-Carvone et Rotundifolone.

Par contre le monoterpène bicyclique α -Pinène, le sesquiterpène α -Cadinol et l'hydrocarbure terpénique D-Limonène ont été trouvés parmi les composés majoritaires dans les huiles essentielles de certaines espèces du genre *Ferula*. Cette différence dans la composition des huiles essentielles des deux plantes peut être due principalement au changement géographique et climatique, mais le type d'extraction des huiles essentielles, les conditions opératoires de l'analyse ainsi que les méthodes d'identification peuvent influencer aussi les résultats de la composition chimique des huiles essentielles.

Conclusion générale

Ce sujet de recherche à caractère phytochimique et pharmacologique, est axé sur l'étude de la chimie de deux espèces, l'une *Salvia phlomoides* Asso. de la famille des Lamiacées, et l'autre *Ferula vesceritensis* Coss.et Dur. de la famille des Apiacées. De même l'évaluation de l'activité biologique des extraits et des composés isolés de ces deux espèces, ainsi que l'étude de la composition de leurs huiles essentielles ont été effectuées.

Les phases acétate d'éthyle et chloroforme de *Salvia phlomoides* et la phase acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* (Est) ont subi des fractionnements par utilisation des techniques chromatographiques (CC et CCM). Ils ont abouti à la séparation de douze composés.

Les structures chimiques des composés isolés ont été établies par les différentes méthodes d'analyse spectrale (RMN 1D, RMN 2D, SM-HR-ESI et IR), et la comparaison avec les données spectroscopiques rapportées dans la littérature.

Les composés isolés sont :

- De *Salvia phlomoides* :
 - 2 α , 3 β , 11 α -trihydroxyoléane-18-ène (**1**)
 - 3 β -acétoxy, 2 α , 11 α -dihydroxyoléane-18-ène (**2**)
 - 2 α -acétoxy, 3 β , 11 α -dihydroxyoléane-18-ène (**3**)
 - α -amyrine (**4**)
 - 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone (**5**)
 - Apigénine (**6**)
 - Lutéoline (**7**)
 - Acide caféique (**8**)
 - Apigénine-7-O- β -glucoside (**9**)
- De *Ferula vesceritensis* (Est):
 - Apigénine (**10**)
 - Lutéoline (**11**)
 - Lutéoline-7-O- β -glucoside (**12**)

Les composés **1**, **2** et **3** sont de nouvelles structures, isolés pour la première fois à partir d'une plante, et les composés **4**, **5**, **6**, **7**, **8** et **9** sont nouveaux pour l'espèce *Salvia phlomoides*.

Les composés **10**, **11** et **12** sont nouveaux pour l'espèce *Ferula vesceritensis*.

La cytotoxicité *in vitro* des composés **1**, **2** et **3** a été évaluée sur un panneau de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines, désignées par « NCI-60 ». Le composé **2** était le plus actif, il présente un effet inhibiteur contre 32 lignées de cellules tumorales, les souches les plus sensibles sont les RPMI-8226 de la leucémie avec un pourcentage de 38,22 % d'inhibition de croissance des cellules tumorales.

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des deux espèces montrent une grande teneur en polyphénols et en flavonoïdes. Leur activité antioxydante a été évaluée par plusieurs méthodes (Piégeage du radical libre DPPH[•], réduction du radical cation ABTS^{•+}, piégeage du radical superoxyde O₂^{•-}, CUPRAC et réduction du Fer FRAP). Les résultats montrent un potentiel antioxydant remarquable des extraits testés, dont l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* est le plus élevé, et l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* de l'Est est plus actif que celui du Sud.

L'huile essentielle de *Salvia phlomoides* a été étudiée pour la première fois dans ce travail, cette étude est une contribution à une meilleure connaissance de sa composition, en vue de sa valorisation. Les résultats de l'analyse et l'identification par CG-SM montrent la présence de 23 composés, dont les composés majoritaires sont 6,10,14-triméthyl-pendécane-2-one (Hexahydrofarnesyl acétone) (28,26 %), Dibutylephtalate (14,51 %), Phytol (7,23 %), α -Humulène (5,83 %), Oxyde de caryophyllène (5,66 %) et β -Caryophyllène (4,94 %).

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Ferula vesceritensis* récoltées de Bechar montre après analyse par CG-SM la présence de 54 Composés, dont les composés majoritaires sont : Shyobunol (18,28 %), δ -Cadinène (15,49 %), γ -Cadinène (4,78 %), Isolédène (4,64%) et Dauca-5,8-diène (4,1 %), par contre celle récoltée de Constantine est majoritairement composé de D-Carvone (13,10%), Rotundifolone (8,49 %), D-Limonène (4,12 %), α -Pinène (4,07 %) et α -Cadinol (3,13%). Il est important de mentionner que c'est la première fois pour le genre *Ferula* que les composants majoritaires sont D-Carvone et Rotundifolone.

Références bibliographiques

- [1] Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world. 2nd ed. Canberra, Australia : Report for the Australian Biological Resources Study, 84.
- [2] Abraham, I., El Sayed, K., Chen, Z. S., & Guo, H. (2012). Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Marine drugs*, 10 (10), 2312-2321.
- [3] Major Groups, Families, and Genera: Lamiaceae (Labiatae). Science & Horticulture, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2003. <http://www.rbgekew.org.uk/scihort/lamwhat.html>.
- [4] Wu, Y. B., Ni, Z. Y., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C., & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical reviews*, 112(11), 5967-6026.
- [5] Ben Farhat, M., Jordán, M. J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., & Sotomayor, J. A. (2009). Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10349-10356.
- [6] Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaili, M. A., Sonboli, A., Ansari, N., & Khodagholi, F. (2010). In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1341-1349.
- [7] Orhan, I. E., Senol, F. S., Ozturk, N., Akaydin, G., & Sener, B. (2012). Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. *Food chemistry*, 132(3), 1360-1367.
- [8] Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., & Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119(2), 684-688.
- [9] Veličković, D. T., Randelović, N. V., Ristić, M. S., Šmelcerović, A. A., & Veličković, A. S. (2002). Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopsis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 67(10), 639-646.
- [10] Schnitzler, P., Nolkemper, S., Stintzing, F. C., & Reichling, J. (2008). Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*, 15(1-2), 62-70.
- [11] Topcu, G., Turkmen, Z., Schilling, J. K., Kingston, D. G. I., Pezzuto, J. M., & Ulubelen, A. (2008). Cytotoxic activity of some Anatolian *Salvia*. Extracts and isolated abietane diterpenoids. *Pharmaceutical biology*, 46(3), 180-184.
- [12] Fiore, G., Massarelli, P., Sajeva, M., & Franchi, G. G. (2012). Anti-tumor activity of the methanolic extracts of *Salvia menthifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 381-387.
- [13] Fatehi, M., Farifteh, F., & Fatehi-Hassanabad, Z. (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of ethnopharmacology*, 91(2), 321-324.
- [14] Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., ...& Pizza, C. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry*, 68(4), 554-561.
- [15] El-Razek, M. H. A., Ohta, S., Ahmed, A. A., & Hirata, T. (2001). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula assafoetida*. *Phytochemistry*, 58(8), 1289-1295.
- [16] Pangarova, T. T., & Zapesochay, G. G. (1973). Flavonoids of *Ferula assafoetida*. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(6), 768-768.

- [17] Maksumova, N. S., Yuldashev, M. P., & Batirov, E. K. (1994). Luteolin glucosides from *Ferula varia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(5), 627-628.
- [18] Couplan, F. (2012). *Les plantes et leurs noms: histoires insolites*. Editions Quae, p 76-77
- [19] Morhardt, S., & Morhardt, E. (2004). *California desert flowers: an introduction to families, genera, and species*. Univ of California Press. P 171
- [20] Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey and The Aegean Islands*. Edinburgh. University Press, 7, 401-461.
- [21] Quézel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8). Editions Centre National de la Recherche Scientifique, 1170.
- [22] Ulubelen, A., Birman, H., Öksüz, S., Topçu, G., Kolak, U., Barla, A., & Voelter, W. (2002). Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. *Planta medica*, 68(09), 818-821.
- [23] Scully, R. (2008). *Key to Lamiaceae of Colorado (Mint Family)*. Colorado. Univ Colorado Press. USA, 1-6.
- [24] Sutton, J. (1999). *Gardener's guide to growing salvias*. David & Charles. Portland. Oregon. Timber Press, 160.
- [25] Byng, J. W., Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Judd, W. S., Mabberley, D. J., ... & Briggs, B. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20.
- [26] Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., & Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Menthaeae*. *American Journal of Botany*, 91(7), 1115-1125.
- [27] Mohammadhosseini, M., Pazoki, A., & Akhlaghi, H. (2008). Chemical composition of the essential oils from flowers, stems, and roots of *Salvia multicaulis* growing wild in Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(1), 127-128.
- [28] Topçu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of natural products*, 69(3), 482-487.
- [29] Ali, M. S., Ahmed, S., Ibrahim, S. A., & Tareen, R. B. (2005). Characterization and bioscreening of a new triterpenoid and a flavanone isolated from *Salvia nubicola*. *Chemistry & biodiversity*, 2(7), 910-916.
- [30] Lu, Y., & Foo, L. Y. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55(3), 263-267.
- [31] Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food chemistry*, 75(2), 197-202.
- [32] Abdalla, M. F., Saleh, N. A., Gabr, S., Abu-Eyta, A. M., & El-Said, H. (1983). Flavone glycosides of *Salvia triloba*. *Phytochemistry*, 22(9), 2057-2060.
- [33] Ulubelen, A., Miski, M., Neuman, P., & Mabry, T. J. (1979). Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *Journal of Natural Products*, 42(3), 261-263.
- [34] Ulubelen, A., & Topçu, G. (1984). Flavonoids and terpenoids from *Salvia verticillata* and *Salvia pinnata*. *Journal of natural Products*, 47(6), 1068-1068.

- [35] Ulubelen, A., Miski, M., & Mabry, T. J. (1981). Further flavones and triterpenes and the new 6-hydroxyluteolin 5- β -D-glucoside from *Salvia tomentosa*. *Journal of Natural Products*, 44(5), 586-587.
- [36] Veitch, N. C., Grayer, R. J., Irwin, J. L., & Takeda, K. (1998). Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry*, 48(2), 389-393.
- [37] Ishikawa, T., Kondo, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Inaba, S., Takeda, K., ...& Veitch, N. C. (1999). An acetylated anthocyanin from the blue petals of *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry*, 52(3), 517-521.
- [38] Zahid, M., Ishrud, O., Pan, Y., Asim, M., Riaz, M., & Ahmad, V. U. (2002). Flavonoid glycosides from *Salvia moorcroftiana* Wall. *Carbohydrate research*, 337(5), 403-407.
- [39] Zahid, M., Saeed, M., Asim, M., Ishrud, O., Wu, S., Ahmad, V. U., & Pan, Y. (2003). New glycosides from *Salvia moorcroftiana* (Lamiaceae). *Helvetica chimica acta*, 86(6), 2021-2027.
- [40] El-Sayed, N. H., Khalifa, T. I., Ibrahim, M. T., & Mabry, T. J. (2001). Constituents from *Salvia triloba*. *Fitoterapia*, 72(7), 850-853.
- [41] De Felice, A., Bader, A., Leone, A., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., & De Tommasi, N. (2006). New polyhydroxylated triterpenes and anti-inflammatory activity of *Salvia hierosolymitana*. *Planta medica*, 72(07), 643-649.
- [42] Topçu, G., & Ulubelen, A. (1999). Terpenoids from *Salvia kronenburgii*. *Journal of natural products*, 62(12), 1605-1608.
- [43] Bruno, M., Savona, G., Hueso-Rodríguez, J. A., Pascual, C., & Rodríguez, B. (1987). Ursane and oleanane triterpenoids from *Salvia argentea*. *Phytochemistry*, 26(2), 497-501.
- [44] Ulubelen, A., & Ayanoğlu, E. (1976). Vergatic acid, a new pentacyclic triterpene from *Salvia virgata*. *Phytochemistry*, 15(2), 309-311.
- [45] Mehmood, S., Riaz, N., Nawaz, S. A., Afza, N., Malik, A., & Choudhary, M. I. (2006). New butyrylcholinesterase inhibitory triterpenes from *Salvia santolinifolia*. *Archives of pharmacal research*, 29(3), 195-198.
- [46] Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U., & Eris, C. (1994). Terpenoids from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*, 35(4), 1065-1067.
- [47] Ballesta-Acosta, M. C., Pascual-Villalobos, M. J., & Rodríguez, B. (2002). A new 24-nor-oleanane triterpenoid from *Salvia carduacea*. *Journal of natural products*, 65(10), 1513-1515.
- [48] Cioffi, G., Bader, A., Malafrente, A., Dal Piaz, F., & De Tommasi, N. (2008). Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palaestina* Benth. *Phytochemistry*, 69(4), 1005-1012.
- [49] Wang, N., Niwa, M., & Luo, H. W. (1988). Triterpenoids from *Salvia przewalskii*. *Phytochemistry*, 27(1), 299-301.
- [50] Savona, G., Bruno, M., Rodríguez, B., & Marco, J. L. (1987). Triterpenoids from *Salvia deserta*. *Phytochemistry*, 26(12), 3305-3308.
- [51] Topcu, G., Ulubelen, A., & Eriş, C. (1994). Di- and triterpenoids of *Salvia pomifera*. *Phytochemistry*, 36(3), 743-745.
- [52] Ulubelen, A., & Topçu, G. (1984). Triterpenoids from *Salvia pinnata*. *Phytochemistry*, 23(1), 133-134.
- [53] Ulubelen, A., Brieskorn, C. H., & Oezdemir, N. (1977). Triterpenoids of *Salvia horminum*, constitution of a new diol. *Phytochemistry*, 16(6), 790-791.

- [54] Al-Hazimi, H. M., Miana, G. A., & Deep, M. S. H. (1987). Terpenoids from *Salvia lanigera*. *Phytochemistry*, 26(4), 1091-1093.
- [55] Topçu, G., Türkmen, Z., Ulubelen, A., Schilling, J. K., & Kingston, D. G. (2004). Highly Hydroxylated Triterpenes from *Salvia kronenburgii*. *Journal of natural products*, 67(1), 118-121.
- [56] Ortega, A., Cárdenas, J., Gage, D. A., & Maldonado, E. (1995). Abietane and clerodane diterpenes from *Salvia regla*. *Phytochemistry*, 39(4), 931-933.
- [57] De Sève, J. E. (1817). *Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique, à la médecine, etc.* (Vol. 25), p 533.
- [58] Dumont-Courset. (1802). *Le Botaniste cultivateur, ou description, culture et usages de la plus grande partie des plantes étrangères, naturalisées et indigènes, cultivées en France et en Angleterre.* (Vol.4). Fuchs, p 44.
- [59] *Index synonymique de la flore d'Afrique du nord.* (2012). Éditions des conservatoires et jardin botaniques (4). Genève, p 1-431,
- [60] *Flora Iberica.* (2010). Editions des jardin botanique royal (12), CSIC, Madrid, p 1-650.
- [61] Hueso-Rodríguez, J. A., Jimeno, M. L., Rodríguez, B., Savona, G., & Bruno, M. (1983). Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry*, 22(9), 2005-2009.
- [62] Rodríguez, B. (2003). Methoxyabietane Diterpenoid from the Root of *Salvia phlomoides* and Structural Correction of Another Diterpene from *Cryptomeria japonica*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 58(4), 324-327.
- [63] García-Alvarez, M. C., Savonat, G., & RODRIGUEZ, B. (1981). Triterpenoids from *Salvia phlomoides*, three new lupane derivatives. *Phytochemistry*, 20(3), 481-483.
- [64] Savona, G., & Rodriguez, B. (1980). LUP-20 (29)-ENE-2ALPHA, 3BETA-DIOL IN SALVIA-PHLOMOIDES ASSO. *ANALES DE QUIMICA SERIE C-QUIMICA ORGANICA Y BIOQUIMICA*, 76(2), 187-188.
- [65] Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs.* Editions Tec & doc, p 1080-1085.
- [66] Magee, A. R., Calviño, C. I., Liu, M. R., Downie, S. R., Tilney, P. M., & Wyk, B. E. V. (2010). New tribal delimitations for the early diverging lineages of Apiaceae subfamily Apioideae. *Taxon*, 59(2), 567-580.
- [67] Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (1989). *Flore forestière française: Région méditerranéenne* (Vol. 3). Forêt privée française, p 719.
- [68] Heywood, V. H. (1996). *Les plantes à fleurs: 306 familles de la flore mondiale.* Nathan.
- [69] Quézel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8). (Vol. 2), p 676.
- [70] Pimenov, M. G., & Leonov, M. V. E. (1993). *The genera of the Umbelliferae: a nomenclator.* Royal Botanic Gardens, Kew.
- [71] Coste, H., & Flahault, C. (1903). *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes* (Vol. 2). P. Klincksieck.
- [72] Pimenov, M. G., & Leonov, M. V. (2004). The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian taxa. *Turkish Journal of Botany*, 28(1-2), 139-145.

- [73] Lebrun, J. P., & Stork, A. L. (1992). Enumeration des plantes a fleurs d'Afrique tropicale: 2. Chrysobalanaceae a Apiaceae. Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève, publication hors-serie, (7a), p 238.
- [74] Kurzyna-Młynik, R., Oskolski, A. A., Downie, S. R., Kopacz, R., Wojewódzka, A., & Spalik, K. (2008). Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant systematics and evolution*, 274(1-2), 47.
- [75] LEBRUN, J.P., STORK, A.L. Tropical African Flowering Plants: Ecology and Distribution. (2011). Vol.6. Burseraceae – Apiaceae. Édition Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. P 266
- [76] Dobignard, A., & Chatelain, C. (2011). Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord, volume 3, Dicotyledonae Balsaminaceae à Euphorbiaceae. Édition des Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève. P 94.
- [77] Valiahdi, S. M., Iranshahi, M., & Sahebkar, A. (2013). Cytotoxic activities of phytochemicals from *Ferula* species. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 39.
- [78] Pavlović, I., Petrović, S., Milenković, M., Stanojković, T., Nikolić, D., Krunić, A., & Niketić, M. (2015). Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Extracts of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuff. and Its Metabolites. *Chemistry & biodiversity*, 12(10), 1585-1594.
- [79] Rahman, M. U., Gul, S., & Odhano, E. A. (2008). Antimicrobial activities of *Ferula assafoetida* oil against gram positive and gram negative bacteria. *American-Eurasian Journal of Agriculture*, 4, 203-206.
- [80] Bazzaz, B. F., Parsaei, H., & Shoshtari, G. H. A. (1997). Evaluation of antinociceptive and antimicrobial activities of galbanum plant (*Ferula gumosa* Boiss). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 1-22.
- [81] Kavooosi, G., & Rowshan, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: effect of collection time. *Food chemistry*, 138(4), 2180-2187.
- [82] Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S., & Mohammad, N. S. (2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y aceites*, 60(4), 405-412.
- [83] Dehghan, G., Shafiee, A., Ghahremani, M. H., Ardestani, S. K., & Abdollahi, M. (2007). Antioxidant potential of various extracts from *Ferula szovitsiana*. in relation to their phenolic content. *Pharmaceutical Biology*, 45(9), 691-699.
- [84] Iranshahi, M., Fata, A., Emami, B., Shahri, B. M. J., & Bazzaz, B. F. (2008). In vitro antifungal activity of polysulfides-rich essential oil of *Ferula latisecta* fruits against human pathogenic dermatophytes. *Nat Prod Commun*, 3, 1543-1546.
- [85] Bashir, S., Alam, M., Ahmad, B., & Aman, A. (2014). Antibacterial, anti-fungal and phytotoxic activities of *Ferula narthex* Boiss. *Pak. J. Pharm. Sci*, 27(6), 1819-1825.
- [86] Mirjani, R., Shahverdi, A. R., Iranshahi, M., Amin, G., & Shafiee, A. (2005). Identification of Antifungal Compounds from *Ferula persica*. var. *persica*. *Pharmaceutical biology*, 43(4), 293-295.
- [87] Geroushi, A., Auzi, A. A., Elhwuegi, A. S., Elzawam, F., Elsherif, A., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2011). Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, 25(5), 774-777.

- [88] Mandegary, A., Sayyah, M., & Heidari, M. R. (2004). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of *Ferula gummosa* Boiss in mice and rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 58-62.
- [89] Ahmed, A. A. (1999). Sesquiterpene coumarins and sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, 50(1), 109-112.
- [90] Lhuillier, A., Fabre, N., Cheble, E., Oueida, F., Maurel, S., Valentin, A., & Moulis, C. (2005). Daucane Sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of natural products*, 68(3), 468-471.
- [91] Ibraheim, Z. Z., Abdel-Mageed, W. M., Dai, H., Guo, H., Zhang, L., & Jaspars, M. (2012). Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytotherapy Research*, 26(4), 579-586.
- [92] Iranshahi, M., Kalategi, F., Sahebkar, A., Sardashti, A., & Schneider, B. (2010). New sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula flabelliloba*. *Pharmaceutical biology*, 48(2), 217-220.
- [93] Motai, T., Daikonya, A., & Kitanaka, S. (2004). Sesquiterpene Coumarins from *Ferula fukanensis* and Nitric Oxide Production Inhibitory Effects 1. *Journal of natural products*, 67(3), 432-436.
- [94] Iranshahi, M., Masullo, M., Asili, A., Hamedzadeh, A., Jahanbin, B., Festa, M., ...& Piacente, S. (2010). Sesquiterpene coumarins from *Ferula gumosa*. *Journal of natural products*, 73(11), 1958-1962.
- [95] Iranshahi, M., Rezaee, R., Sahebkar, A., Bassarello, C., Piacente, S., & Pizza, C. (2009). Sesquiterpene coumarins from the fruits of *Ferula badrakema*. *Pharmaceutical biology*, 47(4), 344-347.
- [96] Jabrane, A., Jannet, H. B., Mighri, Z., Mirjolet, J. F., Duchamp, O., Harzallah-Skhiri, F., & Lacaille-Dubois, M. A. (2010). Two New Sesquiterpene Derivatives from the Tunisian Endemic *Ferula tunetana* Pom. *Chemistry & biodiversity*, 7(2), 392-399.
- [97] Abd El-Razek, M. H., Wu, Y. C., & Chang, F. R. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula foetida*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54(1), 235-238.
- [98] Yang, J. R., An, Z., Li, Z. H., Jing, S., & Qina, H. L. (2006). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula sinkiangensis* and *Ferula teterrima*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(11), 1595-1598.
- [99] Bashir, S., Alam, M., Adhikari, A., Shrestha, R. L. S., Yousuf, S., Ahmad, B., ...& Choudhary, M. I. (2014). New antileishmanial sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex* Boiss. *Phytochemistry Letters*, 9, 46-50.
- [100] Bouratoua, A., Khalfallah, A., Bensouici, C., Kabouche, Z., Alabdul Magid, A., Harakat, D., ...& Kabouche, A. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury. *Natural product research*, 1-8.
- [101] Kuliev, Z. A., Khasanov, T. K., & Malikov, V. M. (1982). Coumarins of *Ferula concocaula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(1), 114-115.
- [102] Batirov, É. K., Yuldashev, M. P., Nezhinskaya, G. A., & Malikov, V. M. (1979). Flavonoids of *Ferula schair* and *F. samarkandica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(5), 642-643.
- [103] Znati, M., Ben Jannet, H., Cazaux, S., Souchard, J. P., Harzallah Skhiri, F., & Bouajila, J. (2014). Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. *Molecules*, 19(10), 16959-16975.

[104] Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2, p 611.

[105] Un spécimen de *Ferula vesceritensis* appartenant au Muséum National d'Histoire Naturelle. Publié sur Internet https://science.mnhn.fr/institution/mnhn/list?full_text=ferula+vesceritensis

[106] Quézel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581.965 Q8). Tome II, Ed. CNRS, Paris

[107] Oughlissi-Dehak, K., Lawton, P., Michalet, S., Bayet, C., Darbour, N., Hadj-Mahammed, M., ...& Guilet, D. (2008). Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. *Phytochemistry*, 69(9), 1933-1938.

[108] Ahmed, A. A., Hegazy, M. E. F., Zellagui, A., Rhouati, S., Mohamed, T. A., Sayed, A. A., ...& Hirata, T. (2007). Ferulsinaic acid, a sesquiterpene coumarin with a rare carbon skeleton from *Ferula* species. *Phytochemistry*, 68(5), 680-686.

[109] Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P. A., & Morin, D. (2007). Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(1), 252-257.

[110] Zellagui, A., Gherraf, N., Hegazy, M. E., Akkal, S., Rhouati, S., Dendougui, H., & Ahmed, A. A. (2012). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of crude extract of the roots of *Ferula vesceritensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1-2.

[111] Gamal-Eldeen, A. M., & Hegazy, M. E. (2010). A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Natural product research*, 24(3), 246-257.

[112] Mahato, S. B., & Kundu, A. P. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6), 1517-1575.

[113] Osorio, A. A., Muñoz, A., Torres-Romero, D., Bedoya, L. M., Perestelo, N. R., Jiménez, I. A., ...& Bazzocchi, I. L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF-κB and Sp1 dependent transcription. *European journal of medicinal chemistry*, 52, 295-303.

[114] Kolak, U. (2007). New diterpenoids from the aerial parts of *Salvia pilifera*. *Turkish Journal of Chemistry*, 31(3), 363-369.

[115] Hossain, M. A., & Ismail, Z. (2013). Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arabian Journal of Chemistry*, 6(3), 295-298.

[116] Li, X., Zhang, J., Gao, W., & Wang, H. (2012). Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3673-3679.

[117] Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (2013). Ursane And Olenane Triterpenes From *Astragalus Propinquus*. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci* 2(4), 503-506.

[118] Jamzad, M., Roostaiyan, A., Masoudi, S., Chalabian, F., & Jamzad, Z. (2014). Antibacterial Activity of *Salvia reuterana* Constituents. *Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*, 2(3), 103-109.

[119] Miura, K., & Nakatani, N. (1989). Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agricultural and biological chemistry*, 53(11), 3043-3045.

- [120] Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., & Kummee, S. (2008). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 191-193.
- [121] Yang, H. O., Suh, D. Y., & Han, B. H. (1995). Isolation and characterization of platelet-activating factor receptor binding antagonists from *Biota orientalis*. *Planta medica*, 61(01), 37-40.
- [122] Sukal, Z., Halfon, B., & Ulubelen, A. (2015). Flavonoids of *Salvia microstegia*. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31, 37-40.
- [123] Kontogiorgis, C., Ntella, M., Mpompou, L., Karallaki, F., Athanasios, P., Hadjipavlou-Litina, D., & Lazari, D. (2016). Study of the antioxidant activity of *Thymus sibthorpii* Benth (Lamiaceae). *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(sup4), 154-159.
- [124] Hanganu, D., Olah, N. K., Mocan, A., Vlase, L., Benedec, D., Raita, O., & Toma, C. C. (2016). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of two Romanian *Lysimachia* species. *Studies*, 15, 16.
- [125] Alwahsh, M. A. A., Khairuddean, M., & Chong, W. K. (2015). Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Records of Natural Products*, 9(1), 159-163.
- [126] Salimikia, I., Monsef-Esfahani, H. R., Gohari, A. R., & Salek, M. (2016). Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Salvia chloroleuca* Aerial Extracts. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(8).
- [127] Taiwo, B. J., Obuotor, E. M., Onawunmi, G. O., & Ogundaini, A. O. (2015). Radical scavenging compound from the aerial parts of *Solenostemon monostachys* briq (Lamiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(6), 140-144.
- [128] Lee, J. H., Park, K. H., Lee, M. H., Kim, H. T., Seo, W. D., Kim, J. Y., ... & Ha, T. J. (2013). Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food chemistry*, 136(2), 843-852.
- [129] Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compound produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162(6), 981-987.
- [130] Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
- [131] Shahwar, D., Raza, M. A., Shafiq-Ur-Rehman, Abbasi, M. A., & Atta-Ur-Rahman. (2012). An investigation of phenolic compounds from plant sources as trypsin inhibitors. *Natural product research*, 26(12), 1087-1093.
- [132] Dürüst, N., Özden, S., Umur, E., Dürüst, Y., & Küçükislamoğlu, M. (2001). The isolation of carboxylic acids from the flowers of *Delphinium formosum*. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(1), 93-97.
- [133] Agrawal, P. K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330.
- [134] Gohari, A. R., Ebrahimi, H., Saeidnia, S., Foruzani, M., Ebrahimi, P., & Ajani, Y. (2011). Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(2), 247.

- [135] Kumar, D., & Bhat, Z. A. (2014). Apigenin 7-glucoside from *Stachys tibetica* Vatke and its anxiolytic effect in rats. *Phytomedicine*, 21(7), 1010-1014.
- [136] Shen, J., Liang, J., Peng, S., & Ding, L. (2004). Chemical constituents from *Saussurea stella*. *Natural Product Research and Development*, 16(5), 391-394.
- [137] Güvenalp, Z., Özbek, H., Ünsalar, T., Kazaz, C., & Demirezer, L. Ö. (2006). Iridoid, flavonoid, and phenylethanoid glycosides from *Wiedemannia orientalis*. *Turkish Journal of Chemistry*, 30(3), 391-400.
- [138] Louaar, S., Akkal, S., Bayet, C., Laouer, H., & Guilet, D. (2008). Flavonoids of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Ammoides atlantica*. *Chemistry of natural compounds*, 44(4), 516-517.
- [139] Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2004). Separation and characterization of phenolic compound in Fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography– negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 3679-3687.
- [140] Lin, L. C., Pai, Y. F., & Tsai, T. H. (2015). Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7700-7706
- [141] Yang, H., Kim, H. W., Kim, Y. C., & Sung, S. H. (2017). Cytotoxic activities of naturally occurring oleanane-, ursane-, and lupane-type triterpenes on HepG2 and AGS cells. *Pharmacognosy magazine*, 13(49), 118.
- [142] Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy*, 3(4), 162-169.
- [143] Le-cancer-definition-mecanisme-et-resultat. Publié sur Internet <http://www.maison-et-sante.com/le-cancer-definition-mecanisme-et-resultat/>
- [144] Bohuon, C., & Monneret, C. (2009). Revues de livres Fabuleux hasards–Histoire de la découverte des médicaments. *Ann Toxicol Anal*, 21(1), 207-209.
- [145] Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- [146] Conlin, A. M, Fornier, C. Hudis. S. Kar, and PI Kirkpatrick. (2007). Ixabepilone. *Nat. Rev. Drug Discov*, 6, 953-954.
- [147] Srivastava, V., Negi, A. S., Kumar, J. K., Gupta, M. M., & Khanuja, S. P. (2005). Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(21), 5892-5908.
- [148] *European Medicines Agency* (EMA). (2010). Published on the Internet. www.ema.europa.eu
- [149] Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365-378.
- [150] Bailey, H. H., Attia, S., Love, R. R., Fass, T., Chappell, R., Tutsch, K., ...& Stewart, J. A. (2008). Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 62(1), 149.

- [151] Jakobsen, C. M., Denmeade, S. R., Isaacs, J. T., Gady, A., Olsen, C. E., & Christensen, S. B. (2001). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells. *Journal of medicinal chemistry*, 44(26), 4696-4703.
- [152] Boyd, R.M., Paul, D.K. (2009). Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug development research*. 34, 91-109.
- [153] TheNCI Development Therapeutics Program (DTP). Published on the Internet <https://dtp.cancer.gov>
- [154] Le Morvan V, Robert J. L'exploration in silico des collections de cellules et de tumeurs permet-elle l'innovation ? *Innov Ther Oncol* 2016 ; 2 : 36-42.
- [155] Réactifs et instruments pour l'immunologie, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire. <https://www.clinisciences.com/>
- [156] Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 813-823.
- [157] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [158] Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- [159] Bouchouka, E., Djilani, A., & Bekkouche, A. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from Algerian Sahara. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11(1), 61-65.
- [160] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.
- [161] Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- [162] Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *médecine/sciences*, 20(4), 458-463.
- [163] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856
- [164] Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- [165] Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- [166] Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- [167] Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5-21.
- [168] Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.

- [169] Saint-Cricq de Gaulejac, N., Provost, C., & Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 47(2), 425-431.
- [170] Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., & Wang, H. (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6), 67-73.
- [171] Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Riceevans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322(2), 339-346.
- [172] Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compound from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*, 78(25), 2872-2888.
- [173] Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
- [174] Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., & Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), 895-902.
- [175] Maataoui, B. S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006). Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [*Opuntia ficus indica*]. *Lebanese science journal*, 7(1), 3-8.
- [176] Sendra, J. M., Sentandreu, E., & Navarro, J. L. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*, 223(5), 615-624.
- [177] Cherif, J. K., M'Rabet, I., El Habiri, M., Abidi, R., & Albrecht-Gary, A. M. (2006). Mesure de l'activité antiradicalaire du jus et des peaux d'oranges tunisiennes par le radical DPPH. *Fruits*, 61(2), 99-107.
- [178] Angelov, G., Boyadzhiev, L., & Georgieva, S. (2008). Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *J. Int. Sci. Publ.: Mater., Methods Technol*, 3(1), 143-150.
- [179] Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource technology*, 98(15), 2963-2967.
- [180] Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589-598.
- [181] Bozan, B., Tosun, G., & Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food chemistry*, 109(2), 426-430.
- [182] Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 255-260.
- [183] Hatzidimitriou, E., Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105(4), 1504-1511.

- [184] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- [185] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [186] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- [187] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- [188] Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- [189] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237
- [190] Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Afolayan, A. J., & Masika, P. J. (2008). Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(1), 54.
- [191] Kunchandy, E., & Rao, M. N. A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 58(3), 237-240.
- [192] Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.
- [193] Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., ...& Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
- [194] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- [195] Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.
- [196] Ghaisas, M. M., Navghare, V. V., Takawale, A. R., Zope, V. S., & Deshpande, A. D. (2008). In-vitro antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. *Pharmacologyonline*, 3, 296-305.
- [197] Alimpić, A., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Knežević, A., Čurčić, M., Veličković, D., ...& Marković, S. (2015). Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 702-709.
- [198] Couladis, M., & Koutsaviti, A. (2017). Chemical composition of the essential oils of *Salvia officinalis*, *S. fruticosa*, *Melissa officinalis*, and their infusions. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 54(1), 36-41.
- [199] Abak, F., Yildiz, G., Atamov, V., & Kurkuoglu, M. (2018). Composition of the Essential Oil of *Salvia montbretii* Benth. from Turkey.
- [200] Çolak, N. U., Yıldırım, S., Bozdeveci, A., Yaylı, N., Çoşkunçelebi, K., Fandaklı, S., & Yaşar, A. (2017). Essential Oil Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Salvia staminea*. *Records of Natural Products*, 12(1).

- [201] Farshid, F., Rashid, J., & Reza, H. (2015). Comparison of essential oil components and antioxidant activity between *salvia syriaca* and *salvia aristata* in their natural habitats in west azerbaijan province, Iran. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3, 400-404.
- [202] Sharopov, F. S., Satyal, P., Setzer, W. N., & Wink, M. (2015). Chemical compositions of the essential oils of three *Salvia* species cultivated in Germany. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod*, 3, 26-29.
- [203] Zhu, S., Liu, X. C., Liu, Z. L., & Xu, X. (2015). Chemical composition of *Salvia plebeian* R. Br. essential oil and its larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(5), 831-836.
- [204] Ihsan, S. A., Zaki, M. Z. A. A. A., & Khan, S. I. K. I. A. (2017). Chemical Analysis and Biological Activities of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Essential Oil. Chemical Analysis*, 7(2).
- [205] Dunkić, V., & Bezić, N. (2015). Comparison of Essential Oils Composition from the Leaves and Flowers of *Salvia pratensis* L. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Environmental and Ecological Engineering*, 2(10).
- [206] Mohammadi, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Rahmati, S., & Imanzadeh, G. (2010). Volatile Constituents of *Salvia ceratophylla* L. and *Salvia indica* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 774-780.
- [207] Lakhali, H., Ghorab, H., Chibani, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., ...& Kabouche, Z. (2013). Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5(3), 310-314.
- [208] Merouane, A. (2013). Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (*Salvia algeriensis*, *Salvia argentea* et *Salvia barrelieri*) (Doctoral dissertation, SAADI. A).
- [209] Krimat, S., Dob, T., Toumi, M., Lamari, L., & Dahmane, D. (2015). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Salvia chudaei* Batt. et Trab. endemic plant from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 27(5), 447-453.
- [210] Elghwaji, W., El-Sayed, A. M., El-Deeb, K. S., & ElSayed, A. M. (2017). Chemical composition, antimicrobial and antitumor potentiality of essential oil of *Ferula tingitana* L. apiaceae grow in Libya. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 3), S446.
- [211] Mohammadhosseini, M., Mahdavi, B., & Shahnama, M. (2015). Chemical composition of essential oils from aerial parts of *Ferula gummosa* (Apiaceae) in Jajarm Region, Iran using traditional hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods: A comparative approach. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1321-1328.
- [212] Ben Salem, S., Znati, M., Jabrane, A., Casanova, J., & Ben Jannet, H. (2016). Chemical composition, antimicrobial, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of the root essential oil from the Tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire (Apiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(4), 897-906.
- [213] Alipour, Z., Taheri, P., & Samadi, N. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from flower, leaf and stem of *Ferula cupularis* growing wild in Iran. *Pharmaceutical biology*, 53(4), 483-487.
- [214] Maggi, F., Papa, F., Dall'Acqua, S., & Nicoletti, M. (2016). Chemical analysis of essential oils from different parts of *Ferula communis* L. growing in central Italy. *Natural product research*, 30(7), 806-813.

- [215] Khoury, M., El Beyrouthy, M., Eparvier, V., Ouaini, N., & Stien, D. (2018). Chemical diversity and antimicrobial activity of the essential oils of four Apiaceae species growing wild in Lebanon. *Journal of Essential Oil Research*, 30(1), 25-31.
- [216] Mazandarani, M., Zeinali, Z., & Ghafourian, M. (2015). Autecology essential oil composition, antibacterial, anti candidacies and ethnopharmacological survey of *Ferula gummosa* L. as anti infection to treat of vaginal infections in traditional medicine of Razavi Khorasan province (North East of Iran).
- [217] Chibani, S., Bensouici, C., Kabouche, A., Aburjai, T., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2012). Analysis of the essential oil of aerial parts of *Ferula lutea* Poiret from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(4), 682-685
- [218] Labeled-Zouad, I., Labeled, A., Laggoune, S., Zahia, S., Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2015). Chemical Compositions and Antibacterial Activity of Four Essential Oils from *Ferula vesceritensis* Coss. & Dur. Against Clinical Isolated and Food-Borne Pathogens. *Records of Natural Products*, 9(4), 518.
- [219] Dehak-Oughlissi, K., Hammoudi, R., Mahfoud, H. M., & Yacine, A. (2013). Analyse de l'huile essentielle des parties aeriennes de *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. de la localité de Sebseb.
- [220] Zellagui, A., Gherraf, N., Rhouati, S. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. leaves, endemic in Algeria. *Org. Med. Chem. Lett.*(2) 31.
- [221] Bouratoua, A., Ferhat, M., Kabouche, A., Laggoune, S., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2014). Comparative compositions of essential oils of *Ferula*. *J. Mater. Environ. Sci*, 5(4), 1214-1217.
- [222] BENCHABANE, O. (2014). Chemical composition and insecticidal activities of essential oils of two Algerian endemic plants: *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus palleescens* de Noe. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 4(6), 185-191.

RESUME

Ce travail concerne l'étude phytochimique et pharmacologique de deux espèces *Salvia phlomoides* Asso .de la famille des Lamiacées et *Ferula vesceritensis* Coss.et Dur. de la famille des Apiacées.

La séparation et la purification par les méthodes chromatographiques des extraits chloroforme et acétate d'éthyle de *Salvia phlomoides* ont permis d'isoler neuf composés, quatre triterpènes dont trois nouvelles structures, quatre flavonoides et un acide phénolique, et trois composés de type flavonoides del'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis*. La détermination structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres IR, SM-HR-ESI, RMN 1D et 2D (RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY et NOESY), ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

L'évaluation de la cytotoxicité des nouveaux triterpènes a montré un effet inhibiteur sélectif contre le panneau des lignées cellulaires tumorales humaines INC-60 de l'institut National du Cancer des Etats Unis. L'évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Salvia phlomoides*, et de l'extrait acétate d'éthyle de *Ferula vesceritensis* indiquent une capacité antioxydante importante.

L'analyse par CG et CG-SM des huiles essentielles des deux espèces a montré que celle de *Salvia phlomoides*, étudié pour la première fois, est majoritairement composée de Hexahydrofarnesyl acétone, Dibutyle phtalate, Phytol, α -Humulène, Oxyde de caryophyllène et β -Caryophyllène, et les composants majoritaires de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* (Sud) sont : Shyobunol, δ -Cadinène, γ -Cadinène, Isolédène, et Dauca-5,8-diène. Alors que pour *Ferula vesceritensis* (Est), D-Carvone et Rotundifolone ont été trouvés comme composants majoritaires pour la première fois dans le genre *Ferula*.

Mots clés : Lamiacées, *Salvia phlomoides*, triterpènes, oléananes, cytotoxicité, Apiacées, *Ferula vesceritensis*, flavonoides, activité antioxydante

ABSTRACT

This work deals with phytochemical and pharmacological study of two species *Salvia phlomoides* Asso. from Lamiaceae family and *Ferula vesceritensis* Coss. Et Dur. from the Apiaceae family.

The separation and purification by chromatographical methods of chloroform and ethyl acetate extract of *Salvia phlomoides* led to the isolation of nine compounds including four triterpenoids from which three are new, four flavonoids, one phenolic acid, and three flavonoids from the ethyl acetate extract of *Ferula vesceritensis*. The structural determination of the isolated compounds was established on the basis of spectral analysis IR; ESI-HR-MS, 1D and 2D NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY and NOESY), and comparison with literature data.

Evaluation of the cytotoxicity of the new triterpenoids showed a selective inhibitory effect against the panel of human tumor cell lines NCI-60 of the National Cancer Institute of the United States of America. Evaluation of the antioxidant activity by different methods of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Salvia phlomoides* and ethyl acetate extract of *Ferula vesceritensis* indicates an important antioxidant capacity.

The GC and GC-MS analysis of the essential oils of the two species showed that the essential oil of *Salvia phlomoides* (studied for the first time) was mainly represented by Hexahydrofarnesyl acetone, Dibutyle phtalate, Phytol, α -Humulene, Caryophyllene Oxide and β -Caryophyllene, and major components of the essential oil of *Ferula vesceritensis* (South) were Shyobunol, δ -Cadinene, γ -Cadinene, Isoledene and Dauca-5,8-diene, while for *Ferula vesceritensis* (East), D-Carvone and Rotundifolone were found as major components for the first time in the genus *Ferula*.

Key words : Lamiaceae, *Salvia phlomoides*, oleanane triterpenoids, cytotoxicity screening, Apaiaceae, *Ferula vesceritensis*, flavonoids, antioxidant activity.

ملخص

هذا العمل يتضمن دراسة فيتوكيميائية و فرماكولوجية لنوعين من النباتات *Salvia phlomoides* Asso من عائلة Lamiaceae و *Ferula vesceritensis* Coss et Dur من عائلة Apiacées. نتج عن عمليات الفصل و التنقية بالطرق الكروماتوغرافية لمستخلصات الكلوفورم واسيتات الايثيل للنباتة *Salvia phlomoides* عزل تسع مركبات تتضمن اربعة تريترين منها ثلاثة جديدة، اربعة فلافونويد و حمض فينولي ، وثلاثة مركبات من نوع فلافونويد لمستخلص اسيتات الايثيل للنباتة *Ferula vesceritensis*. تم تحديد الهيكل البنوي لهذه المركبات باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء IR , طيف الكتلة عالي الدقة SM-HR-ESI وطيف الرنين المغناطيسي النووي ذو بعد واحد وذو بعدين بمختلف تطبيقاته NOESY ,RMN¹H, RMN¹³C, DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY وكذلك بالمقارنة مع النتائج المرجعية. اظهر تقييم السمية الخلوية لمركبات تريترين الجديدة تأثير مثبت انتقائي ضد مجموعة الخلايا السرطانية البشرية لمعهد السرطان الوطني في الولايات المتحدة الامريكية . كذلك اشار تقييم نشاط مضادات الاكسدة باستخدام عدة طرق لمستخلصات اسيتات الايثيل و البوتانول للنباتة *Salvia phlomoides* و مستخلصات اسيتات الايثيل للنباتة *Ferula vesceritensis* الى وجود فعالية مهمة ضد الاكسدة. التحليل الكروماتوغرافي الغازي الى جانب التحليل الكتلي للزيوت الاساسية العطرية للنباتة *Salvia phlomoides* والتي درست لأول مرة اظهر انها تتكون اساسا من Hexahydrofarnesyl acétone, Dibutylephtalate, Phytol و التي درست لأول مرة اظهر انها تتكون اساسا من β -Caryophyllène و Oxyde de caryophyllène, α -Humulène . بينما الزيوت الاساسية العطرية للنباتة *Ferula vesceritensis* (جنوب) فمكوناتها الاساسية هي δ -Cadinène, Isolédone, Shyobunol ,Dauca-5,8-diène و γ -Cadinène . على عكس *Ferula vesceritensis* (شرق) فمكوناتها Rotundifolone و D-Carvone وجدت لأول مرة كمكونات اساسية للنوع *Ferula*.

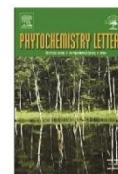
الكلمات المفتاحية

Salvia phlomoides, Lamiaceae, تريترين, سمية خلوية, Apiaceae, *Ferula vesceritensis*, فلافونويد, مضاد الاكسدة.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Oleanane triterpenoids from the Algerian *Salvia phlomoides*

Lamia Benniou^a, Moses K. Langat^{b,c}, Dulcie A. Mulholland^{b,c}, Fadila Benayache^a, Samir Benayache^{a,*}

^a Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physico-Chimique et Biologique (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie

^b Natural Products Research Group, Department of Chemistry, Faculty of Engineering and Physical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, UK

^c School of Chemistry and Physics, University of KwaZulu-Natal, Durban 4041, South Africa



ARTICLE INFO

Keywords

Lamiaceae
Salvia phlomoides
 Oleanane triterpenoids
 Cytotoxicity screening

ABSTRACT

Three previously unreported triterpenoids 2 α ,3 β ,11 α -trihydroxyolean-18-ene **1**, 3 β -acetoxy,2 α ,11 α -dihydroxyolean-18-ene **2** and 2 α -acetoxy,3 β ,11 α -dihydroxyolean-18-ene **3** were isolated from the chloroform extract of aerial parts (leaves and flowers) of *Salvia phlomoides* collected from the Constantine region in the east of Algeria. Structures were determined using NMR spectroscopy and HR-ESI mass spectrometry. Compounds **1**, **2** and **3** were tested against the NCI panel of human tumour cell lines at a single dose of 10 μ M. Compound **2** was the most active showing a 38% growth inhibition against the leukaemia RPMI-8226 line.

1. Introduction

Salvia, one of the largest genera of the Lamiaceae family, is represented by over 900 species (Standley and Williams, 1973). Many species from the *Salvia* genus have been reported to produce compounds with pharmacological properties including antioxidant, neuroprotective (Asadi et al., 2010; Ben Farhat et al., 2009; Orhan et al., 2012), anti-inflammatory (Kamatou et al., 2010), antimicrobial (Veličković et al., 2002), antiviral (Schinitzler and Nolkemper, 2008), cytotoxic (Topçu et al., 2008) and antitumor (Fiore et al., 2012) activities. The major constituents of the aerial parts of the genus are flavonoids and triterpenoids (Topçu, 2006). This investigation of the chemical constituents of *Salvia phlomoides* was undertaken to investigate the flora of Algeria, and it led to the isolation of previously unreported oleanane triterpenoids **1**, **2** and **3**. Previously root material sourced in Spain was investigated and yielded a range of abietane diterpenoids (Hueso-Rodríguez et al., 1983; Rodríguez, 2003) and aerial parts yielded a range of 3,11- and 2,3 oxygenated lupane derivatives (Savona and Rodríguez, 1980; García-Alvarez et al., 1981).

2. Results and discussion

Fractionation of the chloroform extract of the aerial parts of *Salvia phlomoides* led to the isolation of three unreported triterpenoids, compounds **1–3** (Fig. 1), α -amyrin and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone. The EtOAc extract yielded caffeic acid and the flavonoids, apigenin,

luteolin and apigenin-7-*O*-glycoside, all reported for the first time from this species.

The HR-ESI spectrum of compound **1**, isolated as a white solid, showed a $[M + Na]^+$ ion at $m/z = 481.36522$, consistent with the molecular formula $C_{30}H_{50}O_3$ for the compound. The IR spectrum showed a hydroxy group stretch at 3365 cm^{-1} . The ^{13}C NMR spectrum in conjunction with the DEPT spectrum (Table 1) showed 30 signals including 8 upfield methyl group proton signals of a pentacyclic triterpenoid (Mahato and Kundu, 1994), two signals in the alkene region ($\delta_{\text{C}}130.2$ and $\delta_{\text{C}}141.7$) six fully substituted, eight methylene and six methine (including three oxymethine) carbons indicating an oleanane triterpenoid. A resonance at $\delta_{\text{C}}56.2$ was assigned as C-5 and it showed correlations in the HMBC spectrum with the 3H-23 ($\delta_{\text{H}}1.03$), 3H-24 ($\delta_{\text{H}}0.84$), oxymethine H-3 ($\delta_{\text{H}}3.00$, dd, $J = 3.2, 9.6\text{ Hz}$), 3H-25 ($\delta_{\text{H}}1.17$) and H-9 ($\delta_{\text{H}}1.39$) resonances. The H-3 resonance showed coupling in the COSY spectrum with the H-2 oxymethine resonance ($\delta_{\text{H}} 3.72$, m), which, in turn, showed correlations in the HMBC spectrum with the C-4 ($\delta_{\text{C}}39.5$) and C-10 ($\delta_{\text{C}}40.3$) resonances. The COSY spectrum showed coupling between the H-9 and H-11 oxymethine resonance ($\delta_{\text{H}} 4.01$, m) so the third hydroxy group was placed at C-11. The H-11 resonance showed a correlation in the HMBC spectrum with the methine C-13 ($\delta_{\text{C}} 37.7$) resonance, which, in turn, showed a correlation with the 3H-27 ($\delta_{\text{H}}0.75$) and alkene H-19 ($\delta_{\text{H}}4.86$) resonances. The H-13 resonance ($\delta_{\text{H}}2.43$) showed correlations in the HMBC spectrum with the C-18 ($\delta_{\text{C}}141.7$), C-19 ($\delta_{\text{C}} 130.2$) and C-17 ($\delta_{\text{C}} 34.5$) resonances, the C-18 resonance showed correlations with the 3H-28 ($\delta_{\text{H}}1.01$) resonance, and

* Corresponding author.

E-mail address: sbenayache@yahoo.com (S. Benayache).

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.02.004>

Received 12 December 2017; Received in revised form 31 January 2018; Accepted 9 February 2018
 1874-3900/ © 2018 Published by Elsevier Ltd on behalf of Phytochemical Society of Europe.

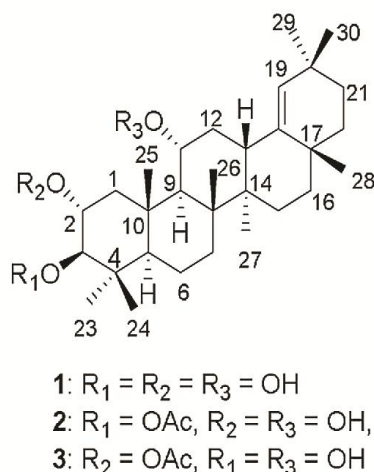


Fig. 1. Structures of compounds 1, 2 and 3 isolated from *Salvia phlomoides*.

the H-19 ($\delta_{\text{H}}4.86$) resonance showed correlations with the 3H-29 ($\delta_{\text{H}}0.95$) and 3H-30 ($\delta_{\text{H}}0.95$) methyl group proton resonances. Thus the double bond was placed at C-18.

The relative configuration of compound 1 was determined using the NOESY spectrum where correlations were seen between the H-3/3H-23, H-3/H-5; H-2/3H-24, H-2/3H-25, H-5/H-9, H-9/3H-27, H-11/3H-26, H-11/3H-25, H-13/3H-26, H-13/3H-28, H-19/H-12 α and β , H-19/3H-29, H-19/3H-30, 3H-24/3H-25 resonances confirming that the hydroxy groups were at C-2 α , C-3 β and C-11 α . The downfield chemical shift of H-1 α was unusual. The HSQC spectrum clearly showed a correlation between the C-1 resonance ($\delta_{\text{C}}49.7$) and the H-1 resonances at $\delta_{\text{H}}3.10$ and $\delta_{\text{H}}1.05$. The unusually downfield H-1 resonance at $\delta_{\text{H}}3.10$ was seen to correlate with the 3H-25 ($\delta_{\text{H}}1.17$) resonance in the NOESY spectrum and was thus assigned as H-1 β . This assignment was confirmed by the two coupling constants ($J = 4.6, 12.8$ Hz), the 12.8 Hz coupling constant would be due to geminal coupling with H-1 α and the 4.6 Hz coupling constant would be due to axial/equatorial coupling with H-2 β . A model shows that H-1 β lies directly between the oxygens of the hydroxy groups at C-2 α and C-11. A literature search on the effect of a 11 α -hydroxy group on the H-1 β resonance showed that in 3 $\beta, 11\alpha, 28$ -trihydroxyolean-18-ene, the two H-1 resonances occurred at $\delta_{\text{H}}1.14$ and $\delta_{\text{H}}2.67$ (Osorio et al., 2012), thus a hydroxy group at C-11 α has a marked downfield effect on the H-1 β resonance here, and the hydroxy group at C-2 α in compound 1 causes an additional deshielding effect moving the resonance to the unusual downfield shift of $\delta_{\text{H}}3.10$. Thus compound 1 was identified as 2 $\alpha, 3\beta, 11\alpha$ -trihydroxyolean-18-ene.

Compound 2 was isolated as a white solid. HR-ESI analysis indicated a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ peak at $m/z = 523.37570$, indicating a molecular formula of $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ for the compound. The IR spectrum displayed bands at 3368 and 1720 cm^{-1} ascribed to hydroxy and carbonyl stretches respectively. The NMR spectra were very similar to those of compound 1 except that the ^{13}C NMR spectrum showed an extra carbon resonance at $\delta_{\text{C}}172.6$ and nine methyl group carbon resonances. The ^1H NMR spectrum showed an additional downfield methyl group proton resonance at $\delta_{\text{H}}2.13$, indicating that one of the hydroxy groups present in compound 1 had been converted to an acetate. The acetate was placed at C-3 β as the H-3 resonance seen at $\delta_{\text{H}}3.00$, in compound 1 had shifted downfield to $\delta_{\text{H}}4.50$ ($d, J = 10.0$ Hz) in compound 2. Coupling between the H-3 α /H-2 β ($\delta_{\text{H}}3.81$)/two H-1 ($\delta_{\text{H}}3.20, \delta_{\text{H}}1.05$) resonances was seen in the COSY spectrum. Thus compound 2 was identified as 3 β -acetoxy, 2 $\alpha, 11\alpha$ -dihydroxyolean-18-ene.

Compound 3 was obtained as a white solid, and the HR-ESI mass spectrum displayed an $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion at $m/z = 523.37570$ corresponding to a molecular formula of $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ as for compound 2. The IR spectrum showed bands at 3461 and 1720 cm^{-1} characteristic of hydroxy group and carbonyl stretches respectively. The ^{13}C and ^1H NMR spectra again indicated the presence of a monoacetate with resonances at $\delta_{\text{C}}172.6$ and $\delta_{\text{C}}21.7$ and $\delta_{\text{H}}2.06$ and the resonance ascribed to H-2 in compound 1 shifted downfield to $\delta_{\text{H}}5.01$. The COSY spectrum showed coupling between the H-3 ($\delta_{\text{H}}3.17$), H-2 ($\delta_{\text{H}}5.01$) and two H-1 ($\delta_{\text{H}}3.05$ and 1.05) resonances confirming the structure to be 2 α -acetoxy-3 $\beta, 11\alpha$ -dihydroxyolean-18-ene.

Compounds 1–3 have not been reported previously. Analogous 2,3,11-hydroxylupenyl derivatives have been reported from *Salvia phlomoides* from Spain, and 2 $\alpha, 3\beta$ -dihydroxyolean-18-ene was reported from *Salvia cabulica* (Shazia et al., 2001) so it is not surprising that these oleanyl derivatives have now been found in the Algerian collection.

Compounds 1–3 showed weak selective inhibitory effects in the NCI60 human tumour cell line screen at a single dose of 10 μM , with compound 2 the most active. Compound 2 showed 38% growth inhibition against the RPMI-8226 leukaemia cell line, 36 and 34% against the non-small cell lung cancer NCI-H460 and NCI-H522 cell lines respectively, and 30% inhibition of the colon cancer HT29 cell line. Full screening data is supplied in the Supplementary data.

3. Experimental section

3.1. General experimental procedures

IR spectra were recorded using a Perkin-Elmer (2000 FTIR) spectrophotometer using KBr windows. ^1H , ^{13}C and 2D NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III NMR spectrometer, operating at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C , using standard experiments from the Bruker pulse programs library. Chemical shifts are reported in ppm (δ) referencing the solvent signal (CDCl_3 or CD_2OD) as internal standard respect to TMS (0 ppm), and coupling constants (J) are measured in Hz. HR-ESIMS was performed on a Bruker MicroToF Mass Spectrometer, using an Agilent 1100 HPLC to introduce samples. Gravity column chromatography was performed using silica gel (Merck 230–400 mesh) packed 1 or 4 cm diameter columns. Compounds were visualized under UV light at 365 nm, followed by spraying with 1% vanillin- H_2SO_4 spray reagent and heating.

3.2. Plant material

Aerial parts (leaves and flowers) of *Salvia phlomoides* were collected in April 2012 from Constantine in the east of Algeria (Coordinates: N 36°32'44.97" E 6°62'34.35", 680 m a.m.s.l.) and authenticated by Prof Mohamed Kaabache, Department of Biology and Plant Ecology, University of Setif 1, Algeria. A voucher specimen (SP-125-5-06) has been deposited at the VARENBIOMOL Research Unit Herbarium, University of Constantine 1, Algeria.

3.3. Extraction and isolation

Aerial parts of *Salvia phlomoides* (1400 g of flowers and leaves) were shade dried and macerated with $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8/2, v/v) at room temperature for 3 \times 48 h, followed by filtration. After filtration, the extracts were concentrated using a rotary evaporator and diluted with distilled water (500 ml, 25 $^\circ\text{C}$), agitated and left to stand overnight. The resulting aqueous solution was extracted successively with petroleum ether, CHCl_3 , EtOAc and *n*-butanol. The organic extracts were concentrated to obtain to yield four extracts: petroleum ether (0.24 g), CHCl_3 (6.0 g), EtOAc (6.0 g) and *n*-butanol (12.0 g). The chloroform and ethyl acetate extracts were examined in this work.

The chloroform extract was fractionated by column chromatography over silica gel 60 (Merck 230–400 mesh), with gradient elution

Table 1
NMR data of compounds 1–3 in CDCl₃.

No	1	2	3	No	1	2	3
¹³ C NMR data				¹ H NMR data			
1	49.7	50.9	48.6	1α	1.05 m	1.05 m	1.05 m
2	69.5	67.8	77.4	β	3.10 dd (<i>J</i> = 4.6, 12.8)	3.20 dd (<i>J</i> = 4.7, 12.9)	3.05 dd (<i>J</i> = 4.8, 11.6)
3	83.6	84.8	81.0	2	3.72 m	3.81 m	5.01 m
4	39.5	39.5	30.2	3	3.00 dd (<i>J</i> = 3.2, 9.6)	4.50 d (<i>J</i> = 10.0)	3.17 dd (<i>J</i> = 6.4, 10.3)
5	56.2	56.1	56.0	4	–	–	–
6	18.2	18.2	18.1	5	0.82 m	0.88 m	0.88 m
7	35.7	35.6	35.6	6α	1.58 m	1.51 m	1.53 m
8	43.2	43.2	43.2	β	1.37 m	1.38 m	1.36 m
9	56.5	56.4	56.1	7α	1.35 m	1.32 m	1.32 m
10	40.3	40.1	40.2	β	1.49 m	1.48 m	1.48 m
11	71.1	71.0	70.1	8	–	–	–
12	38.7	38.7	38.6	9	1.39 m	1.40 m	1.40 m
13	37.7	37.7	37.6	10	–	–	–
14	43.0	43.0	43.0	11	4.01 m	4.01 m	4.01 m
15	27.7	27.7	27.7	12α	1.29 m	1.30 m	1.30 m
16	37.5	37.5	37.5	β	1.74 m	1.72 m	1.72 m
17	34.5	34.5	34.5	13	2.43 br d (<i>W</i> _{1/2} = 19.7)	2.42 br d (<i>W</i> _{1/2} = 19.8)	2.42 br d (<i>W</i> _{1/2} = 28.0)
18	141.7	141.6	141.7	14	–	–	–
19	130.2	130.2	130.2	15α	1.12 m	1.09 m	1.09 m
20	32.6	32.6	32.6	β	1.70 m	1.69 m	1.69 m
21	33.5	33.5	33.5	16α	1.35 m	1.34 m	1.32 m
22	37.8	37.8	37.8	β	1.43 m	1.45 m	1.48 m
23	28.9	28.9	28.8	17	–	–	–
24	17.0	17.6	16.9	18	–	–	–
25	18.3	18.2	18.0	19	4.86 br d (<i>W</i> _{1/2} = 4.1)	4.87 br d (<i>W</i> _{1/2} = 4.1)	4.85 br d (<i>W</i> _{1/2} = 4.5)
26	17.6	17.8	17.6	20	–	–	–
27	14.6	14.6	14.5	21α	1.33 m	1.32 m	1.32 m
28	25.5	25.5	25.5	β	1.45 m	1.44 m	1.43 m
29	31.5	31.5	31.5	22α	1.35 m	1.34 m	1.35 m
30	29.3	29.3	29.3	β	1.42 m	1.42 m	1.41 m
Ac	–	172.6	172.6	23	1.03 s	0.99 s	1.01 s
3-OH	–	21.4	21.7	24	0.84 s	0.88 s	0.87 s
2-OH	–	–	–	25	1.17 s	1.17 s	1.20 s
				26	1.09 s	1.08 s	1.09 s
				27	0.75 s	0.75 s	0.75 s
				28	1.01 s	1.01 s	1.04 s
				29	0.95 s	0.94 s	0.94 s
				30	0.95 s	0.95 s	0.95 s
				Ac	–	2.13 s	2.06 s
				3-OH	2.17 d (<i>J</i> = 3.2 Hz)	–	–
				2-OH	1.86 br s (<i>W</i> _{1/2} = 10.5 Hz)	–	–

*Values in parenthesis are *J* or *W*_{1/2} in Hz.

using CH₂Cl₂/acetone with increasing polarity to yield 21 fractions of 100 cm³. Fraction 3 gave a yellow precipitate (110 mg) identified as 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (Yang et al., 1995), fraction 5 gave a white precipitate (50 mg) identified as α-amyrin (Chaturvedula and Prakash, 2013), fraction 14 gave compound 1 as a pure white precipitate (30 mg) which was separated by filtration. Fraction 9 was fractionated further using flash chromatography using a 1/1: CH₂Cl₂/EtOAc solvent mixture collecting 10 cm³ fractions. Sub-fractions 21 and 12, gave pure compounds 2 (24 mg) and 3 (27 mg) respectively.

The ethyl acetate extract was fractionated by column chromatography over silica gel 60 (Merck 230–400 mesh), with gradient elution using CHCl₃/acetone with increasing polarity to yield 16 fractions of 100 cm³. Fraction 5 was further separated to yield apigenin (230 mg) (Alwahsh et al., 2015) and luteolin (155 mg) (Lee et al., 2013), fraction 9 yielded, after further purification, caffeic acid (35 mg) (Dürst et al., 2001) and fraction 13 yielded apigenin-7-*O*-glucoside (56 mg) (Güvenalp et al., 2006).

The structures of known compounds were confirmed by comparison of NMR data against literature values as referenced above. A detailed separation scheme is provided in the Supporting information.

3.4. Compound screening

The anticancer activity of compounds 1–3 was evaluated at a single dose of 10 μM against the NCI60 panel of human tumour cell line which is derived from nine cancer cell types: leukaemia, lung, melanoma, colon, nervous system, ovary, renal, prostate and breast cancer according to the NCI protocol (Shoemaker, 2006).

4. Compound characterization

2α,3β,11α-trihydroxyolean-18-ene (1): white solid; IR (neat on KBr windows) ν_{max} 3365 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) data are given in Table 1; HR-ESIMS *m/z* 481.36522 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O₂Na, 481.36576).

3β-acetoxy,2α,11α-dihydroxyolean-18-ene (2): white solid; IR (neat on KBr windows) ν_{max} 3368 and 1720 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) data are given in Table 1; HR-ESIMS *m/z* 523.37570 [M]⁺ (calcd for C₃₂H₅₂O₄Na, 523.37630).

2α-acetoxy-3β,11α-dihydroxyolean-18-ene (3): white solid; IR (neat on KBr windows) ν_{max} 3461 and 1720 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz)

and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) data are given in Table 1; HR-ESIMS m/z 523.37570 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$, 523.376330).

Acknowledgments

LB thanks the Natural Products Research Group, Department of Chemistry, University of Surrey, Guildford, United Kingdom, for hosting her to undertake this work and the Developmental Therapeutics Program (DTP) of the National Cancer Institute of the United States (U.S.A) for compound screening. The authors thank Colin Sparrow of the University of Oxford for MS analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.02.004>.

References

- Alwahsh, Mohamed, Ali, A., Khairuddean, Melati, Keng Chong, Wong, 2015. Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Rec. Nat. Prod.* 9 (1), 159–163.
- Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaili, M.A., Sonboli, A., Khodagholi, F., Ansari, N., 2010. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1341–1349.
- Ben Farhat, M., Jordán, M.J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., Sotomayor, J.A., 2009. Variations in essential oil, phenolic compounds and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10349–10356.
- Chaturvedula, P.S.V., Prakash, L., 2013. Ursane and olenane triterpenes from *Astragalus propinquus*. *Int. J. Res. Dev. Pharm. Life Sci.* 2, 503–506.
- Dürüst, N., Özden, S., Umrur, E., Dürüst, Y., Küçükislamoğlu, M., 2001. The isolation of carboxylic acids from the flowers of *Delphinium formosum*. *Türk. J. Chem.* 25, 93–97.
- Fiore, G., Maseralli, P., Sajeve, M., Franchi, G.G., 2012. Anti-tumor activity of the methanolic extracts of *Salvia menthifolia*. *Braz. J. Pharmacogn.* 22, 381–388.
- Güvenalp, Z., Özbeki, H., Ünsalar, T., Kazaz, C., Demirezer, L.O., 2006. Iridoid, flavonoid, and phenylethanoid glycosides from *Wiedemannia orientalis*. *Türk. J. Chem.* 30, 391–400.
- García-Alvarez, M.C., Savonat, G., Rodríguez, B., 1981. Triterpenoids from *Salvia phlomoides*, three new lupane derivatives. *Phytochemistry* 20, 481–483.
- Hueso-Rodríguez, J.A., Jimeno, M.L., Rodríguez, B., Savona, G., Bruno, M., 1983. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry* 22, 2005–2009.
- Kamatou, G., Viljoen, A., Steenkamp, P., 2010. Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.* 119, 684–688.
- Lee, J.H., Park, K.H., Lee, M.-H., Kim, H.-T., Seo, W.D., Kim, J.Y., Baek, I.-Y., Jang, D.S., Ha, T.J., 2013. Identification, characterization and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean *perilla* (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chem.* 136, 846–852.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., 1994. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1573.
- Orhan, I.E., Şenol, F.S., Öztürk, N., Akaydin, G., Sener, B., 2012. Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. *Food Chem.* 132, 1360–1367.
- Osorio, A.A., Muñoz, A., Torres-Romero, D., Bedoya, L.M., Perestelo, N.R., Jiménez, I.A., Alcamí, J., Bazzocchi, I.L., 2012. Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependant transcription. *Eur. J. Med. Chem.* 52, 295–303.
- Rodríguez, B., 2003. A methoxyabietane diterpenoid from the root of *Salvia phlomoides* and structural correction of another diterpene from *Cryptomeria japonica*. *Z. Naturforsch.* 58 (B), 324–327.
- Savona, G., Rodríguez, B., 1980. *An. Quim.* 76, 187–188.
- Schinitzler, P., Nolkemper, S., 2008. Comparative in vitro study on the antihyperlipidemic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extract of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine* 15, 62–70.
- Shazia, A., Akbar, A., Muhammad, Z., Bksh, T.R., Uddin, A.V., 2001. Chemical constituents of *Salvia cubilica*. *J. Chem. Soc. Pak.* 23, 240–242.
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI 60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823.
- Standley, P.C., Williams, L.O., 1973. Labiatae. Flora of Guatemala. *Fieldiana Bot.* 24, 237–317.
- Topçu, G., Türkmen, Z., Schilling, J.K., Kingston, D.G.I., Pezzuto, J.M., Ulubelen, A., 2008. Cytotoxic activity of some Anatolian *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids. *Pharm. Biol.* 46, 180–184.
- Topçu, G., 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69, 482–487.
- Velicković, D., Randelović, N., Ristić, M., Šmelcerović, A., Veličković, A., 2002. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiops* L. *J. Serb. Chem. Soc.* 67 (10), 639–646.
- Yang, O.H., Suh, D., Han, B.H., 1995. Isolation and characterization of platelet-activating factor receptor binding antagonists from *Biota orientalis*. *Planta Med.* 61, 37–40.