#### REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1 FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre : 44/D3C/2023 Série : 05/CH/2023

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle

#### (LMD)

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Option : Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de

substances bioactives

Par

### **M<sup>elle</sup> DOUDACH Selma**

Intitulée

## Évaluation de l'activité antioxydante et détermination structurale des métabolites secondaires de *Lathyrus latifolius* L., *Inula conyza* DC et *Centaurea incana* Desf.

Devant	le j	ury	:
--------	------	-----	---

Pr. BOUMAZA Ouahiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Pr. BICHA Sabrina	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. SEGHIRI Ramdane	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinateur
MCA. BAALI Nacera	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. BENMEKHBI Lotfi	Université Salah Boubnider, Constantine 3	Examinateur

#### 06/07/2023

#### Remerciements

Avant tout, je remercie **DIEU** tout puissant, pour m'avoir donné la force, le courage et la patience pour achever ce modeste travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mes vives reconnaissances et mes sincères remerciements à Madame **BICHA Sabrina**, Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, ma directrice de thèse, pour sa disponibilité, ses conseils précieux, ses remarques constructives, ses orientations, ses encouragements, ses qualités scientifiques ainsi que humaines. Je la remercie infiniment pour sa gentillesse, son soutien et bien que pour son énergie positive qu'elle partage.

J'adresse ma profonde gratitude au Professeur **SEGHIRI Ramdane** pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes, Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse, je le remercie également pour avoir accepté de juger ce travail.

Je suis très honorée que Mesdames **BOUMAZA Ouahiba**, **MEKKIOU Ratiba**, Professeurs à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 et Madame **BAALI Nacera**, Maitre de conférences classe A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, ont acceptée de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie également Monsieur **BENMEKHBI Lotfi**, Professeur à l'Université Salah Boubnider, Constantine 3, pour avoir accepté de juger mon travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Madame **Nunziatina De TOMMASI**, Professeur au département de pharmacie, Université de Salerno, Italie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour la réalisation des analyses physico-chimiques de quelques produits.

Je remercie également Madame Valentina PARISI, Docteur à l'université de Salerno, pour sa disponibilité et son aide.

J'exprime mes remerciements à Monsieur **BENSOUICI Chaouki**, Docteur au Centre de Recherche en Biotechnologie CRBT, Constantine, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son aide et sa disponibilité afin de réaliser les activités biologiques.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **AKKAL Salah**, Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, et à Monsieur **ATALAR Mehemt Nuri**, Docteur au département de nutrition et de diététique, faculté des sciences de la santé, à l'Université d'Idgir, Turquie, pour la réalisation d'analyse LC-MS.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **REBBAS Khellaf**, Professeur à l'Université Mohamed Boudiaf, M'sila, pour l'identification botanique des plantes.

Je tiens à remercier Monsieur **TOUIL Ahmed**, Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, pour ses précieux conseils, son aide et pour sa gentillesse.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **HAZMOUNE Hichem** et Madame **TEBBOUB Nawel**, ingénieurs de l'unité de recherche VARENBIOMOL, pour leur aide, leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie également toute l'équipe de l'unité de recherche VARENBIOMOL pour leur disponibilité, leur soutien, leur encouragement et les bons souvenirs qu'on a partagés ensemble, particulièrement : Hanène, Sara Z, Sara K, Wafa, Maroua, Halima, Nadjeh, Chama, Souhir, Amina, Faten, Jalel et Aida.

Mes chaleureux remerciements vont à mes amies : Wissem, Azza, Rania, Sara et Maissa pour leur disponibilité, leur soutien moral et ainsi que leur encouragement.

Je suis très reconnaissante à toutes les personnes qui ont collaboré, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

A mes chers parents, Nadia et Mohamed Salah, pour leur sacrifice, leur amour, leur prières, leur soutien, leur encouragement, leur conseils judicieux tout au long de ma vie. Que ce modeste travail soit un témoignage de ma profonde gratitude, et que **DIEU** le tout puissant, vous garde pour moi.

A mes chères sœurs, Hadjer, Khadidja et Djihed.

A mon cher petit frère Mohamed Yaakoub.

A mes chers neveux et nièces, Kossai, Takoua, Ahmed et Tasnime.

> A toute la famille Doudach et Bouremiz. A toutes mes amies et mes collègues.



#### Abréviation :

DPPH : 2,2'-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyle ABTS : Acide 2,2'-Azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique) CUPRAC: CUPric Reducing Antioxidant Capacity FCR: Réactif du Folin Ciocalteu AChE : Acétyle Choline Estérase BChE : Butyryle Choline Estérase NA : Non Absorbé NT : Non Testé BHA : Butyl Hydroxyanisole BHT : Butyl Hydroxy toluène DACQ : Di-O-Acide Caféoyle Quinique ACQ : Acide Caféoyle Quinique CC : Chromatographie sur Colonne CCM: Chromatographie sur Couche Mince HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation COSY: COrrelated SpectroscopY GC-MS: Gas Chromatography- Mass Spectrometry

LC-ESI/MS: Liquid Chromatography Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry

## Listes des figures

## Chapitre I : Rappel Bibliographique

Figure I. 1 : L'espèce Inula conyza	4
Figure I. 2 : Structures des composés phénoliques et flavonique isolées à partir d'I. conyza	<i>1</i> 5
Figure I. 2 (Suite) : Structures des composés phénoliques et flavonique isolées à partir	d' <i>I</i> .
conyza	6
Figure I. 3 : Les terpénoïdes isolés à partir de l'espèce <i>I. conyza</i>	7
Figure I. 3 (Suite) : Les terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.	8
Figure I. 4: L'espèce Centaurea incana.	10
Figure I. 5 : Structures des flavonoïdes isolés à partir de <i>C. incana</i>	11
Figure I. 6 : Structures des lactones et d'alcène isolées à partir de <i>C. incana</i>	132
Figure I. 6 (Suite): Structures des lactones et d'alcène isolées à partir de C. incana	13
Figure I. 7: L'espèce Lathyrus latifolius.	15
Figure I. 8 : Structures des acides aminés isolés à partir de L. latifolius	16
Figure I. 9 : Structures des acides aminés et de l'ester isolés à partir de L. latifolius	17
Figure I. 10 : Oxydation des composés phénoliques lors de la réduction de FCR	18
Figure I. 11 : La capacité d'inhibition des radicaux DPPH	20
Figure I. 12 : Réduction du radical ABTS <sup>+</sup> en présence d'un agent antioxydant	20
Figure I. 13 : Structure du radical Galvinoxyl	21
Figure I. 14 : Réaction de réduction du réactif CUPRAC	22
Figure I. 15 : Réduction du fer en présence d'un antioxydant	22
Figure I. 16 : Réaction de formation du complexe Fer(II)-phénanthroline	23

## **Chapitre II : Travaux Personnels**

Figure II. 1 : L'espèce Inula conyza après séchage
Figure II. 2: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes d
l'espèce Inula conyza2
Figure II. 3 : Organigramme de la séparation de l'extrait chloroforme de l'espèce I. conyze
Figure II. 4 : Organigramme de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>I. conyze</i>
Figure II. 5 : L'espèce Centaurea incana après séchage

Figure II. 6 : Organigramme de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle de l	l'espèce C. incana.
Figure II. 7 : L'espèce Lathyrus latifolius après séchage.	
Chapitre III : Résultats et Discussion	
Figure III. 1 : Structure plane du composé IC1.	
Figure III. 2: Graveolide	
Figure III. 3 : Structure plane du composé IC2.	
Figure III. 4 : L'acide ilicique.	
Figure III. 5 : Axillarine.	74
Figure III. 6 : Axillaroside	
Figure III. 7 : Structure partielle du composé IC5	
Figure III. 8: Acide-1,5-di-O-caféoylquinique	
Figure III. 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	
Figure III. 10: Courbe d'étalonnage de la quercétine.	
Figure III. 11: Hispiduline.	
Figure III. 12 : Le 6-méthoxy kaempférol.	
Figure III. 13 : Le tyrosol.	
Figure III. 14: Apigénine	
Figure III. 15 : Lutéoline.	
Figure III. 16 : Chromatogramme GC-MS de l'extrait chloroforme de l'	'espèce Centaurea
incana	
Figure III. 17 : Spectres de masse de l'isovanilline, l'alcool trans-coniféryl	e et du loliolide de
l'extrait chloroforme.	
Figure III. 18 : Spectres de masse de l'alcool cis-sinapylique et d'arctig	génine de l'extrait

## Liste des tableaux

## Chapitre I : Rappel Bibliographique

<b>Tableau I. 1 :</b> Les composés phénoliques isolés de l'espèce <i>I.conyza</i> .	5
<b>Tableau I. 2:</b> Terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.	6
Tableau I. 2 (Suite): Terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.	7
<b>Tableau I. 3:</b> Flavonoïdes isolés à partir de l'espèce C. incana.	10
Tableau I. 3 (Suite): Flavonoïdes isolés à partir de l'espèce C. incana.	101
<b>Tableau I. 4:</b> Sesquiterpènes lactones isolés de l'espèce C. incana.	122
<b>Tableau I. 5:</b> Acides aminés isolés à partir de L. latifolius	15
<b>Tableau I. 5 (Suite) :</b> Acides aminés isolés à partir de L. latifolius	

## **Chapitre II : Travaux Personnels**

<b>Tableau II. 1 :</b> Classification de l'espèce Inula conyza
Tableau II. 2 : Masses et rendements des extraits de l'espèce I. conyza
<b>Tableau II. 3 :</b> Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme d' <i>I. conyza.</i> 28
Tableau II. 3 (Suite) : Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme d'I. conyza 29
<b>Tableau II. 4 :</b> Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de la fraction ICC2.
Tableau II. 4 (Suite) : Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de la fraction
ICC2
<b>Tableau II. 5 :</b> Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de la fraction ICC21.
Tableau II. 6 : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle d' <i>I. conyza</i>
Tableau II. 6 (Suite) : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle d' <i>I. conyza</i> 33
Tableau II. 7 : Résultat de la séparation chromatographique sur colonne sephadex de la fraction
ICA4
Tableau II. 7 (Suite) : Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de sephadex
de la fraction ICA4
Tableau II. 8 : Classification de l'espèce Centaurea incana.    35
Tableau II. 9 : Masses et rendements des extraits de l'espèce C. incana
Tableau II. 10 : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de C. incana 37
Tableau II. 10 (Suite) : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de C. incana.
<b>Tableau II. 11 :</b> Résultat de la séparation chromatographique de la fraction CIA3.       39

Tableau II. 12 : Résultat de la séparation chromatographique de la sous-fraction CIA	43-540
Tableau II. 13 : Résultat de la séparation sur colonne de sephadex de la fraction CIA	<b>\</b> 20 41
Tableau II. 14 : Classification de l'espèce Lathyrus latifolius.	
Tableau II. 15 : Masses et rendements des extraits de l'espèce L. latifolius. Erreur	! Signet
non défini.44	

Tableau II.	<b>16 :</b> Méthodes du criblage phytochimique	45
Tableau II.	16 (Suite): Méthodes du criblage phytochimique	56

## Chapitre III : Résultats et Discussion

<b>Tableau III. 1 :</b> Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé IC1
<b>Tableau III. 2 :</b> Résultats RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C relatives au composé IC2.       66
<b>Tableau III. 3 :</b> Résultats RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C relatives au composé IC3.       74
Tableau III. 4 : Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H et RMN <sup>13</sup> C du composé IC484
Tableau III. 5 : Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé IC595
Tableau III. 5 (Suite) : Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé IC5 96
Tableau III. 6: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce I. conyza. 98
<b>Tableau III. 7 :</b> Résultats des activités antioxydantes testés des extraits d' <i>I. conyza</i> 99
Tableau III. 8 : Les valeurs des CI <sub>50</sub> de l'activité anti-cholinestérase des extraits d'I. conyza.100
Tableau III. 9 : Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H et RMN <sup>13</sup> C du composé CI- 1 107
Tableau III. 10 : Résultats de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C relatives au composé CI2 113
<b>Tableau III. 11 :</b> Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé CI3119
<b>Tableau III. 12 :</b> Résultats de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé CI4.       122
<b>Tableau III. 13 :</b> Résultats de spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé CI5.       125
Tableau III. 14 : Composition chimique identifiée par GC-MS de l'extrait chloroforme de
l'espèce Centaurea incana126
Tableau III. 14 (Suite) : Composition chimique identifiée par GC-MS de l'extrait chloroforme
de l'espèce Centaurea incana
Tableau III. 15 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce C. incana.
Tableau III. 16: Résultats des activités antioxydantes testés des extraits de C. incana 131
Tableau III. 16 (Suite): Résultats des activités antioxydantes testés des extraits de C. incana.
Tableau III. 17: Les valeurs des CI <sub>50</sub> de l'activité anti-cholinestérase des extraits de <i>C. incana</i> .

Tableau III. 18: Résultats de la caractérisation des composés présents dans les extraits de
Lathyrus latifolius
Tableau III. 19: Composés phénoliques identifiés par LC-ESI-MS/MS des extraits de L.
latifolius
Tableau III. 19 (Suite): Composés phénoliques identifiés par LC-ESI-MS/MS des extraits de
L. latifolius
Tableau III. 20: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce L. latifolius.
<b>Tableau III. 21</b> : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce L. latifolius 137

## Liste des spectres

<b>Spectre 1 :</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz, δ ppm) du composé IC1	. 52
Spectre 2 : HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) du composé IC1.	. 52
<b>Spectre 3 :</b> HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (5,35-6,35 ppm) du composé IC1	. 53
<b>Spectre 4 :</b> COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (5,35-6,35 ppm) du composé IC1	. 54
<b>Spectre 5 :</b> COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (1,00-3,00 ppm) du composé IC1	54
Spectre 6: COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (1,00-4,60 ppm) du composé IC1	. 55
<b>Spectre 7 :</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,60 ppm) du composé IC1	. 55
<b>Spectre 8 :</b> HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,70 ppm) du composé IC1	. 56
<b>Spectre 9 :</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz, δ ppm) du composé IC2	. 59
Spectre 10 : HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) du composé IC2.	. 60
Spectre 11 : HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (2,20-6,20 ppm) du composé IC2	. 60
Spectre 12 : COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (2,20-6,20 ppm) du composé IC2	. 61
Spectre 13 : COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,70 ppm) du composé IC2	. 62
Spectre 14 : HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (0,70-2,10 ppm) du composé IC2	. 63
Spectre 15 : HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (0,80-2,10 ppm) du composé IC2	. 64
<b>Spectre 16:</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz, δ ppm) du composé IC3	. 68
Spectre 17: RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz, $\delta$ ppm) étalé (6,40-7,80 ppm) du composé IC3.	. 68
<b>Spectre 18:</b> COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,30-7,90 ppm) du composé IC3	. 69
Spectre 19 : HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,50-7,70 ppm) du composé IC3	. 69
<b>Spectre 20:</b> HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (3,68-4,02 ppm) du composé IC3	.70
Spectre 21: HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (3,71-3,97ppm) du composé IC3	.70
Spectre 22: HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,15-6,80 ppm) du composé IC3	.71
Spectre 23 : HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,70-7,80 ppm) du composé IC3	.72
Spectre 24 : RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz), étalé (55-125 ppm) du composé IC3	.73
Spectre 25 : RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz), étalé (130-182 ppm) du composé IC3	.73
<b>Spectre 26:</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz, δ ppm) du composé IC4	.75
<b>Spectre 27:</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (5,00-7,90 ppm) du composé IC4	.77
Spectre 28 : COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,75-7,85 ppm) du composé IC4	.77
Spectre 29 : HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (5,00-7,80 ppm) du composé IC4	. 78
<b>Spectre 30:</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (3,05-4,25 ppm) du composé IC4	. 79
<b>Spectre 31 :</b> COSY (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (4,40-5,10 ppm) du composé IC4	. 80
<b>Spectre 32 :</b> HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (3,00-4,40 ppm) du composé IC4	. 80

Spectre 42 : RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d6, 100 MHz), étalé (113-128 ppm) du composé IC5............90 Spectre 43 : HMBC (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (5,80-7,60 ppm) du composé IC5......91 **Spectre 50 :** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,30-8,50 ppm) du composé CI-1...... 102 Spectre 53 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,00-4,50 ppm) du composé CI-1...... 104 Spectre 55 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,10-6,85 ppm) du composé CI-1...... 105 Spectre 58 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CI2......109 Spectre 60 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,40-4,40 ppm) du composé CI2......110 **Spectre 64:** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (2,35-3,70 ppm) du composé CI3...... 115 

Spectre 67 : RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz) du composé CI3.	117
Spectre 68 : HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (6,16-7,15 ppm) du composé CI3	118
Spectre 69 : HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz), étalé (2,1-4,1 ppm) du composé CI3	118
<b>Spectre 70 :</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6, 250 MHz, δ ppm) du composé CI4	120
Spectre 71 : RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6, 250 MHz), étalé (6,00-8,00 ppm) du composé CI4	121
Spectre 72 : RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6, 250 MHz) du composé CI5	123
Spectre 73 : RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6, 250 MHz), étalé (6,00-7,60 ppm) du composé CI5	124

## Table des matières

Introduction Générale	1
<b>Chapitre I. Rappel Bibliographique</b>	
I.1. Généralités sur le genre Inula :	3
I.2. Description botanique de l'espèce Inula conyza DC :	3
I.3. Travaux antérieurs :	4
I.3.1. Les composés phénoliques :	4
I.3.2. Les terpénoïdes :	6
I.4. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :	8
I.5. Généralités sur le genre Centaurea :	8
I.6. Description botanique de l'espèce Centaurea incana Desf :	9
I.7. Travaux antérieurs :	10
I.7.1. Les flavonoïdes :	10
I.7.2. Les sesquiterpènes lactones :	12
I.8. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :	13
I.9. Généralités sur le genre Lathyrus :	13
I.10. Description botanique de l'espèce Lathyrus latifolius L :	14
I.11. Travaux antérieurs :	15
I.12. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :	18
I.13. Activités Biologiques :	18
I.13.1. Détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes :	18
I.13.1.1. Teneur en polyphénols totaux :	18
I.13.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux :	19
I.13.2. Évaluation du potentiel antioxydant :	19
I.13.2.1. Piégeage du radical libre DPPH :	19
I.13.2.2. Activité anti-radicalaire ABTS :	20
I.13.2.3. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène :	20

I.13.2.4. Piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :	21
I.13.2.5. Piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin:	21
I.13.2.6. La capacité antioxydante de réduire le cuivre (CUPRAC) :	
I.13.2.7. Pouvoir réducteur du Fer :	
I.13.2.8. Activité de phenanthroline :	23
I.13.3. Activité anti-cholinestérase :	23

## **Chapitre II. Travaux Personnels**

II.1. Étude phytochimique de l'espèce Inula conyza :	. 25
II.1.1. Place dans la systématique :	. 25
II.1.2. Synonymes :	. 25
II.1.3. Récolte du matériel végétal :	. 25
II.1.4. Méthode d'extraction :	. 26
II.1.5. Fractionnement de l'extrait chloroforme :	. 27
II.1.5.1. Séparation et purification des fractions :	. 29
II.1.6. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle :	. 32
II.1.6.1. Séparation et purification des fractions :	. 33
II.2. Étude phytochimique de l'espèce Centaurea incana :	. 35
II.2.1. Place dans la systématique :	. 35
II.2.2. Synonymes :	. 36
II.2.3. Récolte du matériel végétal :	. 36
II.2.4. Méthode d'extraction :	. 36
II.2.5. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle :	. 37
II.2.5.1. Séparation et purification des fractions :	. 38
II.2.6. Analyse chromatographique par GC-MS de l'extrait chloroforme de <i>C. incana</i> :	. 42
II.3. Étude phytochimique de l'espèce Lathyrus latifolius :	. 43
II.3.1. Place dans la systématique :	. 43
II.3.2. Synonymes :	. 43

II.3.3. Récolte du matériel végétal :
II.3.4. Méthode d'extraction :
II.3.5. Screening phytochimique :
II.3.6. Analyse chromatographique par LC-ESI-MS/MS :
II.4. Activités Biologiques :
II.4.1. Détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes :
II.4.1.1. Teneur en polyphénols totaux :
II.4.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux :
II.4.2. Évaluation du potentiel antioxydant :
II.4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH :
II.4.2.2. Activité anti-radicalaire ABTS :
II.4.2.3. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène :
II.4.2.4. Piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :
II.4.2.5. Piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin :
II.4.2.6. La capacité antioxydante de réduire le cuivre (CUPRAC) :
II.4.2.7. Pouvoir réducteur du Fer :
II.4.2.8. Activité de phenanthroline :
II.4.3. Activité anti-cholinestérase :

## Chapitre III. Résultats et Discussion

III.1. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce Inula conyza :	. 51
III.1.1. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait chloroforme :	. 51
III.1.1.1.Détermination structurale du composé IC1 :	. 51
III.1.1.2. Détermination structurale du composé IC2 :	. 59
III.1.2. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle :	. 66
III.1.2.1.Détermination structurale du composé IC3 :	. 66
III.1.2.2. Détermination structurale du composé IC4 :	. 75
III.1.2.3. Détermination structurale du composé IC5 :	. 85

III.2. Résultats des activités biologiques de l'espèce Inula conyza :	
III.2.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :	
III.2.2. Évaluation du potentiel antioxydant :	
III.2.3. Activité anti-cholinestérase :	
III.3. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce Centaurea incana :	101
III.3.1. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle :	101
III.3.1.1.Détermination structurale du composé CI-1 :	101
III.3.1.2. Détermination structurale du composé CI2 :	107
III.3.1.3.Détermination structurale du composé CI3 :	113
III.3.1.4.Détermination structurale du composé CI4 :	119
III.3.1.5.Détermination structurale du composé CI5 :	122
III.3.2. Analyse chromatographique par GC-MS de l'extrait chloroforme de C. incana	ı : 125
III.4. Résultats des activités biologiques de l'espèce Centaurea incana :	129
III.4.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :	129
III.4.2. Évaluation du potentiel antioxydant :	
III.4.3. Activité anti-cholinestérase :	
III.5. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce Lathyrus latifolius :	
III.5.1. Screening phytochimique :	133
III.5.2. Analyse chromatographique par LC-ESI/MS :	
III.6. Résultats des activités Biologiques de l'espèce Lathyrus latifolius :	135
III.6.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :	135
III.6.2. Évaluation du potentiel antioxydant :	
Conclusion Générale	
Références Bibliographiques	

## **Introduction Générale**

#### **Introduction Générale**

#### **Introduction Générale**

Les plantes médicinales ont toujours joué un rôle clé dans de nombreuse culture pour maintenir, prévenir et guérir les maladies. Elles sont l'une des principales sources de découverte de médicaments. La littérature arabe ancienne a rapporté que nos ancêtres connaissaient le pouvoir de guérison des plantes de manière empirique. Par conséquent, les remèdes naturels à base de plantes ont été longtemps les principaux agents de traitement et de lutte contre les maladies (**Leduc** *et al.*, **2006**).

Par ailleurs, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 65% de la population mondiale dépend principalement des médicaments traditionnels. Dans une enquête réalisée sur les composés purs dérivés de plantes utilisés comme étant des médicaments, l'OMS a déclaré que sur 122 composés identifiés provenaient de seulement 94 espèces végétales, 80% se sont avérés être utilisés à des fins ethno-médicales identiques ou connexes à celles utiliser en médecine traditionnelle (**Cragg et al., 2012**).

En 2020, Covid-19 a influencé le monde entier, et la population mondiale a toujours appelé les plantes à renforcer son système immunitaire pour prévenir les virus en attendant que les chercheurs explorent des vaccins efficaces pour lutter contre ce virus. Jusqu'à présent, la médecine moderne et traditionnelle est pratiquée en particulier dans les pays en voie de développement.

En Algérie, le traitement par les plantes médicinales fait partie de la culture locale, il constitue la plus importante et parfois la seule source thérapeutique. De part sa situation géographique et sa diversité climatique, l'Algérie est l'un des plus riches pays africain avec 3000 espèces végétales appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques (**Quezel et Santa. 1963, Ozenda. 2004**). Ce potentiel floristique, reste très peu exploité du point de vue phytochimique bien que pharmacologique.

L'endémicité et l'utilisation possible en médecine traditionnelle demeurent nos critères principaux de sélection des plantes pour la recherche chimique. L'objectif de ces recherches est d'approfondir les connaissances en phytochimie et en biologie.

Dans le cadre d'un programme de recherche initié par notre unité de recherche VARENBIOMOL, visant à valoriser des ressources naturelles, en se basant sur l'isolement et l'identification des molécules bioactives issus des plantes algériennes. Nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et biologique de trois espèces médicinales : *Inula conyza* 

**DC**, *Centaurea incana* **Desf** appartenant à la famille Asteraceae, et *Lathyrus latifolius* **L.**qui appartient à la famille Fabaceae.

Notre travail sera présenté en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique qui résume la description botanique, les études phytochimiques antérieurs réalisées sur les espèces ciblées ainsi que leur utilisation traditionnelle et leurs activités biologiques.
- Le deuxième chapitre décrit le matériel utilisé, l'extraction du matériel végétal suivi par les différentes méthodes chromatographiques utilisées pour la séparation et la purification des composés et également les procédures des activités biologiques testées.
- Le troisième chapitre regroupe les déterminations structurales des composés isolés de chacune des espèces étudiées par les méthodes spectroscopiques RMN 1D et RMN 2D et par la comparaison avec les données de la littérature ainsi que les discussions des résultats de LC-MS et GC-MS et les résultats des tests biologiques réalisés sur les extraits des plantes.

Enfin une conclusion résumera les travaux réalisés ainsi que les perspectives envisagées à réalisés.

#### I.1. Généralités sur le genre Inula :

Le genre *Inula* appartenant à la famille des Asteraceae (Compositae), largement distribué en Asie, en Europe, en Afrique et prédominant dans la région méditerranéenne, comprennent plus de 100 espèces (**Asraoui** *et al.*, **2021**). Plusieurs espèces de ce genre possèdent une valeur médicinale réputée. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde, particulièrement en Chine (**Seca** *et al.*, **2014**).

Il a été démontré que les plantes appartenant à ce genre possèdent diverses activités biologiques : anti-inflammatoires, antitumorales, antibactériennes, antitussifs, antiprolifératifs, antioxydants, antidiabétiques et hépatoprotecteurs. De ce fait, les espèces d'*Inules* deviennent la cible de diverses investigations, visant à trouver leurs principes actifs, de nouvelles applications pharmacologiques et de nouveaux produits naturels. Les composés les plus étudiés sont les terpénoïdes (lactones sesquiterpéniques), les composés phénoliques (acides phénoliques) et les flavonoïdes auxquels l'activité biologique des espèces *Inula* est principalement attribuée (**Trendafilova** *et al.*, **2020a** ; **2020b**).

#### I.2. Description botanique de l'espèce Inula conyza DC :

*Inula conyza* DC ou également appelée : *I. squarrosa* (L.) Bernh, herbes aux mouches (*inule conyze* : nom français) (Quezel et Santa. 1963) ou encore *I. conyza* (Griess.) (Wollenweber *et al.*, 2005).

*Inula conyza* est une herbe indigène, présente en abondance dans les communautés végétales envahies (**Řezáčová** *et al.*, **2020**), c'est une plante vivace de 50-100 cm de longueur, sa tige est dressée, pubescente et rameuse au sommet avec des feuilles elliptiques-lancéolées ou oblongues-lancéolées, entières ou denticulées, d'involucre à bractées internes lancéolées-aiguës et ciliées, se termine par des akènes velus. Les feuilles inférieures et moyennes sont atténuées en pétiole, cependant, les feuilles supérieures sont sessiles, pubescentes et atténuées à la base. Les fleurs sont jaunâtres ou rougeâtres dont les capitules sont subcylindriques, petites (environ 1cm de diamètre), agglomérées au sommet des rameaux en grappes compactes et corymbiformes (Quezel et Santa. 1963). (Figure I.1).



Figure I. 1 : L'espèce Inula conyza. (Site 1)

#### I.3. Travaux antérieurs :

L'espèce *Inula conyza* a fait l'objet de quelques études dans lesquelles ils ont pu séparer deux types de métabolites secondaires : des composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Péter et Dósa. 2002, Wollenweber** *et al.*, **2005, Trendafilova** *et al.*, **2020a, Sorokopudov** *et al.*, **2021**) ainsi que des terpénoïdes sous forme de stérols, acides diterpèniques et également des triterpénoïdes : alcools, acétates et palmitates (**Trendafilova** *et al.*, **2021**).

#### I.3.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques représentent une vaste classe de métabolites secondaires jouant plusieurs rôles pour la défense et la survie des plantes. La variation dans leur structure donne lieu à leur classification en groupes selon le squelette de base (**Tsimogiannis et Oreopoulou. 2019**). Parmi ces groupes, on cite les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les plus abondants dans notre espèce, se présente sous forme de flavonols, flavonol-3-OR et de dérivés de l'acide chlorogénique respectivement (Tableau I.1, Figure I.2).

Composés Phénoliques	Structures	Références
Flavonoïdes		
Kaempféride	1	- Wellenweben et al
Bétulétol	2	
Tanetine	3	2005
Mikanine	4	
3-Méthyle mikanine	5	1
Quercétine	6	Péter et Dósa. 2002
Quercétagétine	7	Sorokopudov et <i>al.</i> , 2021
Acides phénoliques		
Acide caféique	8	Péter et Dósa. 2002
Acide chlorogénique (5-acide caféoyle	9	Péter et Dósa. 2002
quinique)		Trendafilova et <i>al.</i> , 2020a
3,4-diacide caféoyle quinique (DACQ)	10	
3,5-DACQ	11	Trendafilova et <i>al.</i> , 2020a
1,5-DACQ	12	
4,5-DACQ	13	

Tableau I. 1: Les composés phénoliques isolés de l'espèce I.conyza.



Figure I. 2 : Structures des composés phénoliques et flavonique isolées à partir d'*I. conyza*.



Figure I. 2 (Suite) : Structures des composés phénoliques et flavonique isolées à partir d'*I. conyza*.

#### I.3.2. Les terpénoïdes :

Les terpènes sont constitués d'un groupe de 30 000 produits chimiques signalés (**Kiyama**. **2017**). Un certain nombre de terpénoïdes comprennent les stérols, les acides diterpèniques et les triterpénoïdes (alcools, acétates, palmitates) ont été isolés à partir d'*I. conyza* par **Trendafilova** *et al.* (**2021**) (Tableau I.2, Figure I.3).

Tableau I. 2 : Terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.

Terpénoïdes	Structures
Triterpènes alcools	
β-Amyrine	14
α-Amyrine	15
Taraxastérol	16
ψ-Taraxastérol	17
Triterpènes acétates	
Acétate- $\beta$ -amyrine	18
Acétate-α-amyrine	19
Acétate de taraxastérol	20
Acétate- <i>ψ</i> -taraxastérol	21
Acétate de lupéol	22
Triterpènes palmitates	
Palmitate- $\beta$ -amyrine	23
Palmitate- <i>a</i> -amyrine	24

Triterpènes palmitates	
Palmitate de taraxastérol	25
Palmitate- <i>\psi</i> -taraxastérol	26
Acides diterpèniques	
Acide kaurénoïque	27
Acide ent-15α-(3-	28
méthylpentanoyloxy)-kaur -16-en-	
19-oique	
Acide ent-15α-(3-	29
méthylbutanoyloxy)-kaur-16-en-19-	
oique	
Stérols	
β-sitostérol	30

Tableau I. 2 (Suite) : Terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.



Figure I. 3 : Les terpénoïdes isolés à partir de l'espèce *I. conyza*.



Figure I. 3 (Suite) : Les terpénoïdes isolés à partir de l'espèce I. conyza.

#### I.4. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :

Les espèces du genre *Inula* sont bien connues pour leurs valeurs thérapeutiques, mais *Inula conyza* est peu citée dans la médecine traditionnelle.

La population marocaine utilise la décoction de l'ensemble des feuilles et des fleurs d'*Inula conyza* avec *I. viscosa* et *I. helenium* pour le traitement du diabète (**Belayachi. 2015**).

Une étude réalisée par Trendafilova sur l'extrait méthanolique des fleurs et des feuilles de l'espèce *I. conyza* a montré des potentiels modérés de l'activité antioxydante ainsi qu'enzymatique. Il a été observé également qu'il y avait une bonne corrélation entre la teneur en composés phénoliques totaux, les acides mono- et di-caféoylquiniques (ACQ et DACQ) et les activités antioxydantes (DPPH et ABTS), ainsi que les activités inhibitrices des enzymes tyrosinase et acétylcholinestérase (**Trendafilova** *et al.*, **2020a**).

#### I.5. Généralités sur le genre Centaurea :

*Centaurea* est le quatrième plus grand genre de la famille des Astéracées. Il comprend plus de 700 espèces de plantes vivaces herbacées. Ces espèces sont réparties dans le monde

entier, particulièrement dans les régions méditerranéennes dont 45 poussent spontanément en Algérie, avec 7 espèces localisées dans la région du Sahara (Lahneche *et al.*, 2019, Reda *et al.*, 2021, Sharonova *et al.*, 2021).

De nombreuses espèces du genre *Centaurea* ont été largement consommées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses infections notamment : rhume, fièvre, constipation, diarrhée, hémorroïde, ulcères gastro-duodénaux et augmentation de l'appétit (**Abad** *et al.*, **2013**, **Lahneche** *et al.*, **2019**, **Sharonova** *et al.*, **2021**).

La composition chimique des plantes du genre *Centaurea* est riche en composés bioactifs (**Reda** *et al.*, **2021**, **Sharonova** *et al.*, **2021**). Les plus caractéristiques sont les lactones sesquiterpéniques (**Bicha** *et al.*, **2013a**, **Kebbi** *et al.*, **2021**), les flavonoïdes (**Bentamene** *et al.*, **2010**, **Bicha** *et al.*, **2011**), les lignanes (**Shoeb** *et al.*, **2004**, **Milošević Ifantis** *et al.*, **2013**).

Les extraits ainsi que les métabolites secondaires isolés de ces espèces ont montré des effets antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydants, anti-inflammatoires et cytotoxiques (Bicha et *al.*, 2013a, Ayad et Akkal. 2019).

#### I.6. Description botanique de l'espèce Centaurea incana Desf :

*Centaurea incana* Desf., *C. amourensis* Pomel ou *C. pubescens* Willd est une espèce endémique du Sahara septentrional. C'est une plante cendrée, canescente, un peu laineuse ou parfois glabre. Ses bractées sont moyennes, très étroit et spiniforme, longueur de 1,5-2 cm et portant à la base des laciniures sur les deux côtés. Ses feuilles radicales 1-2 pennatipartites, les caulinaires sont décroissantes et non décurrentes sur la tige et des gros capitules ovoïdes-coniques. Les akènes sont à hile poilu et à aigrette nettement plus longue que le corps (**Quezel et Santa. 1963, Garcia Jacas et Susanna. 1993, Ozenda. 2004**). (Figure I.4).



Figure I.4 : L'espèce Centaurea incana. (Site 2)

#### I.7. Travaux antérieurs :

Des études antérieures réalisées sur l'espèce *C. incana* ont permis la séparation et l'identification de quelques flavonoïdes et sesquiterpènes lactones.

#### I.7.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes se présentent dans les tissus végétaux comme étant des agents protecteurs contre le stress biotique tels que les agents pathogènes et insectes et abiotique tels que les rayons UV (**Gutiérrez-Grijalva** *et al.*, **2018**). Quatorze flavonoïdes reportés dans le tableau I. 3 ont été isolé par **Akkal** *et al.* (**1997**) dont six sont glycosylés (Figure I.5).

Flavonoïdes	Structures
7,3',4',5'-tetraméthyltricétine	31
7,3',5'-triméthyltricétine	32
3,5'-diméthylmyricétine-7-O-glucoside	33
Apigénine-7-(6''-méthylgalacturonide)	34
3'-méthylmyricétine-7-O-glucoside	35
Méloside A	36
Hispiduline-7-O-glucoside	37

Tableau I. 3 : Flavonoïdes isolés à partir de l'espèce C. incana.

Flavonoïdes	Structures
Patulitrine	38
Rutine	39
Violantine	40
Hispiduline	41
Népétine	42
6-méthoxykaempférol	43
Patulétine	44

 Tableau I. 3 (Suite) : Flavonoïdes isolés à partir de l'espèce C. incana.



Figure I. 5 : Structures des flavonoïdes isolés à partir de C. incana.

#### I.7.2. Les sesquiterpènes lactones :

Les sesquiterpènes lactones représentent un groupe diversifié de terpénoïdes avec plus de 5000 différentes structures élucidées. La diversité structurale et le large spectre d'activités biologiques ont suscité un intérêt significatif dans les applications pharmacologiques de sesquiterpènes lactones (**Salazar-Gómez** *et al.*, **2020**).

Deux études réalisées par Massiot *et al.* (1986) et Barrero *et al.* (2000) ont permis la séparation des sesquiterpènes lactones de type guaianolide et germacranolide (Tableau I.4), alors que Cossy a pu isoler un seul alcène : aplotaxène 52 (Cossy et Aclinou. 1990) (Figure I.6).

Sesquiterpènes lactones	Structures	Références
Guaianolides		
Répdiolide triole	45	
Repine monochlorhydrine	46	
Desoxyrepine	47	– Massiot et <i>al.</i> , 1986
Janerine	48	_
Repine ou Sublutéolide	49	_
Acroptiline	50	_
Germacranolide		
(+)-Onopordopicrine	51	Barrero et al., 2000
	R <sub>2</sub> H0	
$R_1 R_2$		Ö
<b>45</b> OH $CH_3C=CH_2$ <b>46</b> Cl $CH_3 \swarrow_O$		47 R=Me 48 R=CH <sub>2</sub> OH

**Tableau I. 4 :** Sesquiterpènes lactones isolés de l'espèce C. incana.

Figure I.6 : Structures des lactones et isolées à partir de C. incana.



Figure I. 6 (Suite) : Structures des lactones et d'alcène isolées à partir de C. incana.

#### I.8. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :

Les racines de *C. incana* sont utilisées traditionnellement en Algérie pour traiter les maladies du foie dans la région des Aurès (Lahneche *et al.*, 2019).

Selon la récente étude effectuée par **Boubelloutaa** *et al.* (2021), l'extrait méthanolique des parties aériennes du *C. incana* possède des propriétés antioxydantes, ainsi qu'un effet hépatoprotecteur contre les lésions hépatiques. Le germacranolide identifié par Barrero : (+)-onopordopicrine a également montré une activité antifongique (**Barrero** *et al.*, 2000).

#### I.9. Généralités sur le genre Lathyrus :

Le genre *Lathyrus* est un membre de la famille des légumineuses (Fabaceae), il se compose d'environ 160 espèces répartis dans tout l'hémisphère Nord avec une disjonction en Amérique du Sud. Le fief du genre est l'Eurasie occidentale, en particulier autour de la méditerranée orientale, avec plus d'un tiers des espèces originaires de la Turquie (**Kenicer** *et al.*, 2005, Kenicer. 2008).

De nombreuses espèces du genre *Lathyrus* contiennent une quantité considérable de protéines, et sont utilisées comme fourrage, aliment de famine ou des suppléments nutritionnels.

Certaines d'entre eux sont également utilisées comme agents de nitrifications des sols, comme plante ornementale, dans la médecine traditionnelle et dans la recherche génétique (**Chavan** *et al.*, 2001, **Prenner. 2003, Kenicer** *et al.*, 2005, **Abbas** *et al.*, 2012, **Llorent-Martínez** *et al.*, 2017b,).

Les études réalisées sur les espèces du genre *Lathyrus* révèlent la richesse de ce dernier en composants biologiquement actifs tels que les flavonoïdes (**Llorent-Martínez** *et al.*, **2017b**), les terpénoïdes (**Bao** *et al.*, **2020**) et les acides aminés (**Wang** *et al.*, **2000**). Il a été démontré également que le genre *Lathyrus* possède des propriétés antioxydante, antidiabétique et antialzheimer (**Haydari** *et al.*, **2015**, **Llorent-Martínez** *et al.*, **2017a**, **Llorent-Martínez** *et al.*, **2017b**).

#### I.10. Description botanique de l'espèce Lathyrus latifolius L :

*Lathyrus latifolius* L, = *L. megalanthus* (**Țiței et al., 2017**) = *L. ensifolius* Bad, = pois vivace (nom Français) ou Khoud el farès (nom Arabe). C'est une plante vivace, élevée, à tiges grimpantes de 1-2 m. elle se trouve sous forme de broussaille dans les forêts, pâturages, le Tell et sur les montagnes. Les pédoncules portent de 4 à 12 fleurs. Ces fleurs sont de couleur rose très vif, de grande taille (20-25 mm), très long et dépassent la feuille correspondante avec des gousses de 60-90 x 7-9 mm (**Quezel et Santa. 1962**). (Figure I.7).



Figure I.7 : L'espèce Lathyrus latifolius. (Site 3)

#### I.11. Travaux antérieurs :

Les travaux antérieurs effectués sur l'espèce *Lathyrus latifolius* ont permis l'isolement et l'identification des acides aminés reportés dans le tableau I.5 et les figures I.8 et I.9. En plus de vingt-trois acides aminés séparés, l'ester hétérocyclique 4-chloroindole-3-acétate de méthyle (**77**) (Figure I.9) a été également isolé par **Engvild** *et al.* (**1980**).

Acides Aminés	Structures	Références
Acide -L-α,γ-diamino- butyrique	53	Arthur Bell <i>et al.</i> , 1996 Bell et O'Donovan. 1966 Krüger <i>et al.</i> , 2010 Possion <i>et al.</i> , 1961
Acide-L-α-amino-γ- oxalylaminobutyrique	54	Arthur Bell <i>et al.</i> , 1901 Bell et O'Donovan. 1966
Acide-L- $\alpha$ -oxalylamino- $\gamma$ -aminobutyrique	55	Bell et O'Donovan. 1966
Acide-L-α-amino-β- oxalylaminopropanoïque	56	Arthur Bell <i>et al.</i> , 1996 Bell et O'Donovan. 1966 Krüger <i>et al.</i> , 2010

**Tableau I.5 :** Acides aminés isolés à partir de L. latifolius.

Acides Aminés	Structures	Références
Acide-L-α-oxalylamino- β-aminopropanoïque	57	Bell et O'Donovan. 1966
Argenine	58	Bell et O'Donovan. 1966 Teleuță. 2015
β-cyano-L-alanine	59	Ikegami <i>et al.</i> , 1988
Homoserine	60	Arthur Bell et al., 1996
O-oxalylhomoserine	61	
Asparagine	62	
Thréonine	63	
Sérine	64	
Glutamine	65	
Proline	66	
Glycine	67	
Alanine	68	Teleuță. 2015
Valine	69	
Méthionine	70	
Isoleucine	71	
Leucine	72	
Tyrosine	73	
Phénylalanine	74	
Histidine	75	
Lysine	76	

Tableau I.5 (Suite) : Acides aminés isolés à partir de L.	. latifolius.
---	---------------



Figure I. 8 : Structures des acides aminés isolés à partir de *L. latifolius*.



Figure I. 9 : Structures des acides aminés et de l'ester isolés à partir de *L. latifolius*.
#### I.12. Utilisation traditionnelle et activités biologiques :

Les espèces du genre *Lathyrus* ont été utilisées en médecine traditionnelle à plusieurs fins, telles que l'analgésie et l'anti-inflammatoire (Llorent-Martínez *et al.*, 2017a). Cependant, il existe peu de preuves scientifiques à l'appui de ces utilisations. Aucune utilisation en médicine traditionnelle n'est spécifiquement enregistrée pour *Lathyrus latifolius*. La seule étude biologique effectuée sur cette espèce était celle réalisée par **Pastor-cavada** *et al.* (2009) qui a montré une faible teneur en polyphénols ainsi qu'une activité antioxydante modéré. *Lathyrus latifolius* est cultivée comme étant une plante ornementale (Vaz Patto et Rubiales. 2014).

#### I.13. Activités Biologiques :

#### I.13.1. Détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes :

#### I.13.1.1. Teneur en polyphénols totaux :

La quantification de la teneur en polyphénols totaux est basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi. 1965**). La combinaison entre les deux acides : phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) permis la production du réactif Folin-Ciocalteu (FCR). Les composés phénoliques vont être oxydés en mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ), lors de la réduction du réactif FCR (Figure I.10). L'apparition de la couleur bleu dans la solution correspond à la teneur en phénols totaux, dont l'absorbance est maximale à 765 nm.



Figure I. 10 : Oxydation des composés phénoliques lors de la réduction de FCR.

#### I.13.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux :

Le dosage de la teneur en flavonoïdes totaux selon **Topçu** *et al.* (2007) est basée sur le suivi du complexe formé entre les flavonoïdes et les cations  $A1^{+3}$  issus des nitrates d'aluminium utilisés.

#### I.13.2. Évaluation du potentiel antioxydant :

De nos jours, la biologie des radicaux libres présente un rôle très important, cela est dû à leur implication dans de nombreuses maladies chroniques telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires. De nombreuses méthodes ont été utilisées pour tester le potentiel antioxydant : DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotène, GOR, superoxyde DMSO alcalin, CUPRAC, pouvoir réducteur, phenanthroline.

#### I.13.2.1. Piégeage du radical libre DPPH :

Le radical DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. 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, donc le DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ambiante. La délocalisation provoque aussi la couleur violet bien caractéristique de la solution de DPPH<sup>•</sup> (Figure I.11) (**Popovici** *et al.*, 2009). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (**Blois. 1958**).



Figure I. 11 : La capacité d'inhibition des radicaux DPPH.

#### I.13.2.2. Activité anti-radicalaire ABTS :

L'ABTS incolore est oxydé par le persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) afin d'obtenir son radical cation ABTS<sup>+</sup> de couleur bleu-vert. La présence d'un agent antioxydant en solution va décolorer cette dernière (Figure I.12), indiquant la réduction du radical ABTS<sup>+</sup> (**Re** *et al.*, **1999**).



**Figure I.12 :** Réduction du radical ABTS<sup>+</sup> en présence d'un agent antioxydant.

#### I.13.2.3. Test de blanchiment de β-carotène :

Le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène décrit par **Marco. (1968)** est basé sur une méthode colorimétrique. Les radicaux libres formés lors de l'auto-oxydation de l'acide linoléique en émulsion aqueuse sont piégés par la  $\beta$ -carotène, résultant d'une décoloration de cette dernière. La mesure de l'activité antioxydante suit la diminution de la densité optique en fonction du temps à 470 nm.

#### I.13.2.4. Piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :

D'après sa structure (Figure I. 13), le galvinoxyl est une molécule plutôt stable, de couleur jaune à faible concentration, si cette molécule accepte un électron ou un radical hydrogène, elle devient stable et diamagnétique, elle peut être réduit irréversiblement.

En raison de l'électron impair du galvinoxyl, il présente une forte bande d'absorption à 428 nm, au fur et à mesure que l'électron est apparié, l'absorption s'annule et la décoloration résultante est proportionnelle au nombre d'électrons acceptés. L'activité peut être mesurée en profitant du changement de couleur du galvinoxyl en présence d'un antioxydant (**Shi** *et al.*, **2001**).



Figure I.13 : Structure du radical Galvinoxyl.

#### I.13.2.5. Piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin :

L'activité de piégeage du radical superoxyde a été déterminée par la méthode DMSO alcaline décrite par **Kunchandy et Rao.** (1990) pour tester la capacité des échantillons à éliminer les anions superoxydes. Le DMSO alcalin est utilisé comme étant un système générateur du superoxyde. Par sa réaction avec le NBT (chlorure de tétrazolium bleu de nitro) pour donner du TNBT diformazan coloré, la concentration du superoxyde dans ce système est proportionnelle à celle d'oxygène dissous dans le DMSO. Le radical superoxyde est stable plus de 24 h s'il est gardé à l'abri d'oxygène atmosphérique, sinon, il va être dégradé progressivement. La diminution de l'absorbance à 560 nm avec des antioxydants indique la consommation du superoxyde généré (Harput *et al.*, 2011).

#### I.13.2.6. La capacité antioxydante de réduire le cuivre (CUPRAC) :

L'activité CUPRAC est décrite par **Apak** *et al.* (2004). Elle est essentiellement basée sur le suivi de l'absorbance à 450 nm, du complexe cuivre I et néocuproïne (Nc), résultant de la réduction du complexe initial [Cu<sup>2+</sup>-Nc] par arrachement d'un électron à partir de l'antioxydant présent en solution (Figure I.14).



Figure I. 14 : Réaction de réduction du réactif CUPRAC.

#### I.13.2.7. Pouvoir réducteur du Fer :

Le pouvoir réducteur des échantillons est déterminé par ces capacités de réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) de couleur jaune, en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) de couleur bleue verte en présence de ferricyanure de potassium  $K_3$ Fe(CN)<sub>6</sub> (Figure I.15) (**Oyaizu. 1986**).



Figure I.15 : Réduction du fer en présence d'un antioxydant.

#### I.13.2.8. Activité de phenanthroline :

Le complexe rouge Fer(II)-phénanthroline est largement appliqué dans la spectrophotométrie classique pour la détermination du fer (Figure I.16). Cependant, une autre méthode a été utilisée pour la détermination des capacités antioxydante, basée sur la formation de complexe ferreux-phénanthroline (**Szydlowska-Czerniaka. 2008**).



Figure I.16 : Réaction de formation du complexe Fer(II)-phénanthroline.

#### I.13.3. Activité anti-cholinestérase :

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative, qui se traduit par une perte fonctionnelle progressive des cellules nerveuses. Les premières lésions apparaissent dans les zones du cerveau impliquées dans la mémoire, au fur et à mesure de son évolution, la maladie va affecter de nouvelles régions du cerveau résultant des difficultés du langage, de raisonnement, des capacités gestuelles et des troubles du comportement (**Somboro** *et al.*, **2013**).

L'acétylcholine, un neurotransmetteur qui assure plusieurs fonctions cérébrales telles que la mémorisation et l'apprentissage, par ailleurs, le cholinestérase est une enzyme qui détruit l'acétylcholine dans le cerveau (**Eyer** *et al.*, **2020**), qui contient de son côté deux formes principales de cholinestérases (ChE) : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) (**Ozarowski** *et al.*, **2013**).

L'inhibiteur de la ChE peut stabiliser les fonctions cognitives ainsi que les capacités fonctionnelles en moyenne pendant six mois, et ralentir même au-delà de cette période la dégradation des facultés mentales (**Eyer** *et al.*, **2020**).

L'inhibition des activités enzymatiques de l'AChE et de la BChE est une approche thérapeutique moderne de la prise en charge de la maladie d'Alzheimer, entraînant une

augmentation de communication entre les terminaisons nerveuses ainsi que de l'activité dans les voies cholinergiques dans le cerveau (Ademosun <u>et al., 2015</u>), ce qui stabilise les fonctions cognitives ainsi que les capacités fonctionnelles chez les personnes atteintes la maladie d'Alzheimer (Eyer *et al., 2020*).

## Chapitre II :

# Travaux Personnels

Ce chapitre décrit brièvement toutes les techniques d'études phytochimique qui permettent l'extraction et l'identification des métabolites secondaires présents dans les différentes phases organiques issues des parties aériennes des plantes ciblés.

#### II.1. Étude phytochimique de l'espèce Inula conyza :

#### II.1.1. Place dans la systématique :

La classification botanique de l'espèce Inula conyza est présentée dans le tableau II.1.

Classification			
Règne	Plantae		
Sous-Règne	Viridaeplantae		
Classe	Equisetopsida		
Sous- Classe	Magnoiidae		
Ordre	Asterales		
Famille	Asteraceae (Composeae)		
Sous-Famille	Asteroideae		
Tribu	Inuleae		
Genre	Inula L.		
Espèce	Inula conyza (Greiss.) DC		

Tableau II. 1 : Classification de l'espèce Inula conyza.

#### II.1.2. Synonymes :

*Inula conyza* DC, *I. squarrosa* (L.) Bernh, herbes aux mouches (*inule conyze* : nom français) (Quezel et Santa. 1963) ou *I. conyza* (Griess.) (Wollenweber *et al.*, 2005).

#### II.1.3. Récolte du matériel végétal :

Le matériel végétal de l'espèce *Inula conyza* a été récolté de la région de Yemma Gouraya de la ville de Béjaïa, en septembre 2017 et identifié par le Professeur Khellaf Rebbas, département des sciences de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf, M'sila. Les parties aériennes ont été séchées à l'abri de la lumière et l'humidité (Figure II.1) puis broyées et pesées (1kg).



Figure II. 1 : L'espèce Inula conyza après séchage.

#### **II.1.4.** Méthode d'extraction :

Environ 1Kg des parties aériennes séchées de la plante a été soumise à une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau ; 70/30 ; v/v) à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 24h. Cette macération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après filtration et évaporation du solvant sous vide à 37 °C, l'extrait brut est additionné à 400 mL d'eau distillée (400 mL d'H<sub>2</sub>O distillée pour 1Kg de matériel végétal sec) et laissé reposer pendant une nuit avant filtration pour faire précipiter un maximum de cires et de chlorophylle.

La solution obtenue a subit des affrontements avec des solvants organiques de polarité croissante en commençant par le chloroforme, après l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. Les phases organiques obtenues ont été filtrées puis concentrées sous pression réduite à sec puis pesées, les masses et les rendements sont rapportés dans le tableau II.2. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure II.2.

Matériel végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement(%)
sec			
	Chloroforme	8,77	0,88
1Kg	Acétate d'éthyle	2,47	0,25
	<i>n</i> -butanol	15	1,5

Tableau II. 2 : Masses et rendements des extraits de l'espèce I. conyza.



Figure II. 2: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Inula conyza*.

#### II.1.5. Fractionnement de l'extrait chloroforme :

Une masse d'environ 6 g de l'extrait chloroforme dissout dans le CHCl<sub>3</sub> a été déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans du chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité croissante du système CHCl<sub>3</sub>/Acétone. Le suivi

des fractions est réalisé par chromatographie sur CCM. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) et révélées par la suite avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 min à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II.3.

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CHCl <sub>3</sub>	Acétone	(mg)
ICC1	1-3			22,9
ICC2	4-5	100	0	775,4
ICC3	6-9	•		242,6
ICC4	10-15	-		213,4
ICC5	16-26			308,1
ICC6	27-31	-		507,73
ICC7	32-33	•		345,15
ICC8	34-45	95	5	474,02
ICC9	46-47	•		53,9
ICC10	48-50	•		124,68
ICC11	51-52	-		101,06
ICC12	53-55			131,68
ICC13	56			34,6
ICC14	57-62	90	10	169,34
ICC15	63-72			201,32
ICC16	73-83	85	15	229,4
ICC17	84-90			56,4
ICC18	91-95	75	25	90,6
ICC19	96-112			184,9
ICC20	113-120	65	35	77,1
ICC21	121-149	55	45	245,78
ICC22	150-166	45	55	142,65

Tableau II. 3 : Résultat du fractionnement de l'extrait chloroforme d'I. conyza.

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CHCl3	Acétone	(mg)
ICC23	167-176	45	55	51,98
ICC24	177-190	35	65	97
ICC25	191-212	30	70	98,6
ICC26	213-256	25	75	149,1
ICC27	257-277	15	85	57,3
ICC28	278	5	95	112,5
ICC29	279-283	0	100	104,6

Tableau II. 3 (Suite) : Résultat du fractionne	ement de l'extrait chloroforme d'I. conyza.
--	---

#### II.1.5.1.Séparation et purification des fractions :

#### Étude de la fraction ICC2 :

Une masse d'environ 490 mg de la fraction ICC2 dissoute dans le toluène a été déposée sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité croissante du système (Toluène/ acétate d'éthyle ; 98/2-90/10). Parmi les fractions obtenues (Tableau II.4), la fraction ICC2-10 se présente sous forme d'un précipité blanc (1,6 mg), nommé **IC1**.

Sous-fractions	Système d'élution(%)		Poids des sous-fractions
	Toluène	AcOEt	(mg)
ICC2-1			15,8
ICC2-2	98	2	9,9
ICC2-3	97,8	2,2	4
ICC2-4	97,6	2,4	1,2
ICC2-5			1
ICC2-6	97,2	2,8	3,4
ICC2-7			2,4
ICC2-8	96,8	3,2	29,6
ICC2-9			6

Tableau II. 4 : Résul	at de la séparation	chromatographique su	ur colonne de la fraction ICC2
-----------------------	---------------------	----------------------	--------------------------------

Sous-fractions	Système d'	élution(%)	Poids des sous-fractions
	Toluène	AcOEt	(mg)
ICC2-10			1,6
ICC2-11	06.9	2.2	5,6
ICC2-12	- 90,8	3,2	26,6
ICC2-13	_		21,9
ICC2-14	_		92,6
ICC2-15	96,2	3,8	7,2
ICC2-16	95,2	4,8	1,7
ICC2-17	93,75	6,25	6,1
ICC2-18	90,9	9,1	33,5
ICC2-19	90	10	31,4

 Tableau II. 4 (Suite) : Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de la fraction

 ICC2.

#### > Étude de la fraction ICC14 :

La fraction ICC14 renferme des cristaux incolores, qui ont subi une purification par recristallisation avec un mélange de solvant (chloroforme/méthanol ; 3/1). Le produit **IC2** est alors obtenu (16,74 mg).

#### Étude de la fraction ICC21 :

Une masse d'environ 245,78 mg de la fraction ICC21 a été séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) éluée par le système éther de pétrole/acétate d'éthyle (50/50 à 0/100). Les sous-fractions résultantes de cette séparation sont présentées dans le tableau II.5.

Sous-fractions	Système d'élution(%)		Poids des sous-fractions
	Ether de pétrole	AcOEt	(mg)
ICC21-1			5,1
ICC21-2		50 50	3,2
ICC21-3	50		8,6
ICC21-4	50		11,7
ICC21-5			17,8
ICC21-6			19,15
ICC21-7			21,5
ICC21-8	22.4	66.6	4,7
ICC21-9	55,4	00,0	18,4
ICC21-10	25	75	51,69
ICC21-11	20	80	4,5
ICC21-12	0	100	19,7

**Tableau II. 5 :** Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de la fraction ICC21.

La sixième sous fraction ICC21-6 comporte un précipité blanc, après lavage au chloroforme et quelques gouttes du méthanol, on a pu obtenir le produit ICC21-6-P avec une masse de 2,75 mg. L'analyse spectroscopique par RMN a montré qu'il s'agit du même produit précédemment séparé **IC2**.

#### Étude de la fraction ICC27 :

La fraction ICC27 comporte une poudre blanche. Après plusieurs lavages au méthanol et séparation du surnageant, on a pu obtenir le produit **ICC27-P** (8 mg) qui est en cours d'identification.

Un organigramme récapitulatif des séparations et purifications effectuées sur l'extrait chloroformique est présentés dans la figure II.3.



Figure II. 3 : Organigramme de la séparation de l'extrait chloroforme de l'espèce I. conyza.

#### II.1.6. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle :

Une masse d'environ 2g de l'extrait acétate d'éthyle a été fractionnée (dépôt solide) par une colonne chromatographique de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck). L'élution est réalisée par un gradient de polarité croissante du système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). Le rassemblage des lots possédant le même profile chromatographique sur CCM analytique a conduit à la récupération de 18 fractions. Ces fractions sont présentées dans le tableau II.6.

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CHCl <sub>3</sub>	MeOH	(mg)
ICA1	1-2	100	0	24,52
ICA2	3-8			21,78
ICA3	9-14			58,6
ICA4	15-16	95	5	176,6
ICA5	17-23			260,5
ICA6	24-28	90	10	224,4
ICA7	29-31			149,7

Tableau II. 6 : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle d'*I. conyza*.

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CHCl3	MeOH	– (mg)
ICA8	32-42	85	15	305,3
ICA9	43-46	-		90,4
ICA10	47-49	80	20	68,3
ICA11	50-61			97,5
ICA12	62-80	75	25	188,7
ICA13	81-88	65	35	80,78
ICA14	89-112	50	50	34,1
ICA15	113-126	35	65	31,04
ICA16	127-137	25	75	17,1
ICA17	138-142	10	90	7,6
ICA18	143-157	0	100	29,6

Tableau II. 6 (Suite) : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle d'I. conyza.

#### II.1.6.1.Séparation et purification des fractions :

#### Étude de la fraction ICA4 :

La fraction ICA4 a été fractionnée par une colonne de Sephadex LH-20 et éluée par le méthanol. Le suivi de la colonne a été effectué dans une chambre noire, sous lumière de la lampe UV (365 et 254 nm). Le fractionnement a conduit à la récupération de 11 sous-fractions (Tableau II.7) dont la septième révèle la présence d'un précipité jaune, il a été rincé par un mélange de chloroforme et acétate d'éthyle donnant ainsi un produit pur nommé **IC3** (1,1 mg).

**Tableau II. 7 :** Résultat de la séparation chromatographique sur colonne Sephadex de la fraction ICA4.

Sous-fractions	Poids des sous-fractions (mg)
ICA4-1	2
ICA4-2	4,2
ICA4-3	74,5

Sous-fractions	Poids des sous-fractions (mg)
ICA4-4	15,9
ICA4-5	23,7
ICA4-6	3,9
ICA4-7	4
ICA4-8	2,2
ICA4-9	12,1
ICA4-10	10
ICA4-11	1,5

 Tableau II. 7 (Suite) : Résultat de la séparation chromatographique sur colonne de Sephadex

 de la fraction ICA4.

#### Étude de la fraction ICA8 :

La fraction ICA8 renferme des cristaux sous forme d'aiguilles de couleur jaune, ils ont subi un lavage avec le mélange chloroforme / éther de pétrole. Ce qui a permis de récupérer le composé **IC4** (4,3 mg).

#### Étude de la fraction ICA12 :

La fraction ICA12 a révélé la présence d'une poudre jaune, qui est lavée successivement par le méthanol. Le produit obtenu est nommé **IC5** de 5,6 mg.

L'ensemble des séparations et purifications réalisées sur l'extrait acétate d'éthyle ainsi que les résultats obtenus sont représentés dans l'organigramme ci-dessous (Figure II.4).



Figure II. 4 : Organigramme de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce I. conyza.

#### II.2. Étude phytochimique de l'espèce Centaurea incana :

#### II.2.1. Place dans la systématique :

La classification botanique de l'espèce *Centaurea incana* est rapportée dans le tableau II.8.

Classification			
Règne	Plantae		
Classe	Magnoliopsida		
Ordre	Asterales		
Famille	Asteraceae (Composeae)		
Sous-Famille	Tubiflores		
Tribu	Cynarées		
Genre	Centaurea L.		
Espèce	Centaurea incana Desf		

Tableau II. 8 : Classification de l'espèce Centaurea incana.

#### II.2.2. Synonymes :

*Centaurea incana* Desf. ou encore *C. amourensis* Pomel, *C. pubescens* Willd (Quezel et Santa. 1963, Garcia Jacas et Susanna. 1993).

#### II.2.3. Récolte du matériel végétal :

La plante *Centaurea incana* a été collectée de la région de Djelfa, au mois de juin de l'année 2016. La détermination botanique de cette plante a été réalisée par le Professeur Khellaf Rebbas, professeur au département des sciences de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf, M'sila. Les parties aériennes de cette plante ont été séchées dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires (Figure II.5), puis coupées en petits morceaux et pesées (2100 g).



Figure II. 5 : L'espèce Centaurea incana après séchage.

#### II.2.4. Méthode d'extraction :

Les parties aériennes séchées (2100g) ont subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/eau ; 7/3) pendant 24 heures. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Après filtration et concentration sous pression réduite à une température inférieure à  $37^{\circ}$ C, la solution hydroalcoolique obtenue est diluée avec de l'eau distillée. Après décantation, le filtrat subit des extractions liquide-liquide successives en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées (Tableau II.9). Le protocole d'extraction est résumé dans la figure II.2.

Matériel végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement(%)
sec			
	Chloroforme	3,45	0,16
2,1Kg	Acétate d'éthyle	12,26	0,58
	<i>n</i> -butanol	50,32	2,40

**Tableau II. 9 :** Masses et rendements des extraits de l'espèce C. incana.

#### II.2.5. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle :

Une masse de 9 g de l'extrait acétate d'éthyle a été déposée sous forme solide sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), éluée par un gradient de polarité dichlorométhane/ méthanol. Le regroupement des lots obtenus selon leurs profiles chromatographique sur CCM analytiques a donné 29 fractions (Tableau II. 10).

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	(mg)
CIA1	1-28	100	0	157,6
CIA2	29-35			166,7
CIA3	36-42	98	2	164,1
CIA4	43-48			279,8
CIA5	49-54			144,5
CIA6	55-56	97	3	190,3
CIA7	57-60			156,5
CIA8	61-62			171
CIA9	63-72			399,5
CIA10	73-79	96	4	338,7
CIA11	80-94			425,2
CIA12	95-100	95	5	209,2
CIA13	101-104			119,3
CIA14	105-108	1		144
CIA15	109-114	93	7	269,9
CIA16	115-121	1		313,9

Tableau II. 10 : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de C. incana.

Fractions	Lots	Système d'élution(%)		Poids des fractions
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	МеОН	(mg)
CIA17	122-124	93	7	209,3
CIA18	125-128	90	10	240
CIA19	129-135			445,6
CIA20	136-143	85	15	459,9
CIA21	144-154	-		821,2
CIA22	155-164	80	20	600,9
CIA23	165-175	70	30	518,1
CIA24	176-181	70	30	264,7
CIA25	182-191	60	40	298
CIA26	192-197	50	50	154,2
CIA27	198-205	40	60	168,5
CIA28	206-212	20	80	222,8
CIA29	213-224	0	100	297,8

Tableau II. 10 (Suite) : Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de C. incana.

#### II.2.5.1.Séparation et purification des fractions :

#### Étude de la fraction CIA3 :

La fraction CIA3 contient un précipité jaune, il a été lavé avec du méthanol pour donner un produit pur d'une masse 5,7 mg nommé **CIA3-P**. Ce composé est en cours d'identification.

Le reste de la fraction a été séparé par une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), élué avec le système en gradient de polarité dichlorométhane / méthanol. Selon la similitude des profils chromatographiques, les tubes recueillis sont regroupés donnant ainsi 15 sous-fractions. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II.11.

Sous-fractions	Système d'élution(%)		Poids des sous-fractions
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	( <b>mg</b> )
CIA3-1			1,7
CIA3-2	100	0	2,3
CIA3-3	-		1,5
CIA3-4			2,9
CIA3-5	98	2	59,5
CIA3-6	-		21,3
CIA3-7	94	6	8,3
CIA3-8	-		5,3
CIA3-9	90	10	6,6
CIA3-10	86	14	3,6
CIA3-11	76	24	3,8
CIA3-12	66	34	3,4
CIA3-13	40	60	6,4
CIA3-14	20	80	1,2
CIA3-15	0	100	12,6

Tableau II. 11 : Résultat de la séparation chromatographique de la fraction CIA3.

Les deux sous-fractions CIA3-5 et CIA3-6 comportent un précipité jaune. Après lavage avec le dichlorométhane et traitement par une chromatographie sur CCM, il s'est avéré qu'il s'agit du même produit, après regroupement, on a pu obtenir le produit pur **CI-1** avec une masse 6,8 mg.

#### Étude de la sous-fraction CIA3-5 :

Le reste de la sous-fraction CIA3-5 a été rechromatographié sur une colonne de Sephadex LH-20 éluée avec du méthanol, des tubes de 5 mL sont recueillis, concentrés et analysés par CCM. Suivant la similitude des profils chromatographiques, les contenus des tubes sont regroupés dans le tableau II.12. La sous fraction CIA3-5-7 comporte un précipité jaune, après lavage avec du chloroforme, on a pu obtenir le composé **CI2** (1,3 mg).

Sous-fractions	Poids des sous-fractions (mg)
CIA3-5-1	1,4
CIA3-5-2	14,5
CIA3-5-3	15,4
CIA3-5-4	3,3
CIA3-5-5	5,2
CIA3-5-6	1,8
CIA3-5-7	1,3
CIA3-5-8	0,8

Tableau II. 12 : Résultat de la séparation chromatographique de la sous-fraction CIA3-5.

#### Étude de la fraction CIA5 :

Une quantité de la fraction CIA5 a été chromatographiée sur plaque préparative (gel de silice 60 GF<sub>254</sub>, Merck) éluée deux fois avec le système (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt ; 3/1) et visionnée par la lumière de Wood. Ces plaques ont permis la séparation d'une bande qui était la plus intense par sa fluorescence noire-violette (4,6 mg). Cette dernière a également subi une purification sur plaque CCM en utilisant le même système d'élution, on a pu obtenir le produit pur **CI3** (1,2 mg).

#### Étude de la fraction CIA6 :

La fraction CIA6 comporte un précipité jaune pâle qui a subi plusieurs lavages avec le méthanol, donnant ainsi le composé pur **CI4** (6,6 mg).

#### Étude de la fraction CIA18 :

Une poudre jaune apparait au font du tube de la fraction CIA18, après des lavages successive par le méthanol, on a obtenu le produit nommé **CI5** (4 mg).

#### Étude de la fraction CIA20 :

La fraction CIA20 a été soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le méthanol comme éluant, donnant ainsi 12 sous-fractions représentées dans le tableau II.13.

Sous-fractions	Poids des sous-fractions
	(ing)
CIA20-1	122,9
CIA20-2	88
CIA20-3	44,7
CIA20-4	38,8
CIA20-5	14,4
CIA20-6	14,2
CIA20-7	15,7
CIA20-8	15,3
CIA20-9	15,2
CIA20-10	12,6
CIA20-11	14
CIA20-12	5,7

**Tableau II. 13 :** Résultat de la séparation chromatographique de la fraction CIA20.

Une masse de CIA20-11 (5,4 mg) a subi une séparation sur CCM préparative éluée par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2 puis 9/1) afin d'obtenir le produit **CIA20-11-2** (1,7 mg) qui est en cours d'identification.

#### Étude de la fraction CIA22 :

La fraction CIA22 renferme un précipité jaune a subi plusieurs lavages avec le méthanol pour l'obtention de 5,7 mg du produit **CIA22-P** qui est en cours d'identification. Sa fluorescence jaune sous lumière de Wood oriente vers un flavonoïde de type flavonol 3-OH.

L'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle nous a permis d'isoler huit produits purs. Le protocole présenté dans la figure II.6 résume les travaux de fractionnement, séparation et purification des produits issus de cet extrait.



Figure II. 6 : Organigramme de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. incana.* 

#### II.2.6. Analyse chromatographique par GC-MS de l'extrait chloroforme de C. incana :

L'analyse de l'échantillon a été réalisée à l'aide d'un instrument SHIMADZU GC/MS-QP2020, équipé d'une colonne capillaire fusionnée Rxi®-5ms (Phase : Crossbond® 5% diphényl/ 95% diméthyl polysiloxane), ses dimensions sont : 30 m × 0,25 mm et 0,25  $\mu$ m d'épaisseur de film, cette colonne a une phase similaire aux colonnes suivantes : HP-1ms, HP-1msUI, DB-1ms, DB-5ms, DB-1msUI, Ultra-1, VF-1ms, ZB-1, ZB-1ms et également considéré comme équivalent aux phases USP G1, G2, G38.

L'échantillon a été préparé dans le chloroforme à 10% de volume. Un volume de 0,5  $\mu$ l de cette solution a été injecté en mode fractionné (80:1). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 250 °C et 320 °C respectivement. La température de la colonne a été programmée à 60 °C fixe pendant 3 min, puis augmentée à 320 °C avec un incrément croissant de 3°C/min, puis maintenue à 320°C pendant 3 min. Le gaz porteur utilisé était l'hélium (pureté 99,995%) avec un débit de 1 mL/min. Les conditions du spectromètre de masse étaient les suivantes : tension d'ionisation 70 eV, température de la source d'ions 200°C. Les données des spectres de masse ont été acquises dans le mode de balayage de gamme de 60-500 m/z.

Les constituants chimique de l'extrait chloroforme ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de la littérature, déterminés par apport à une série homologue de n-alcanes (C7-C33) injectés dans les mêmes conditions que celles de l'extrait. En outre, l'identification des composants a été faite par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux stockés dans la bibliothèque NIST 17 ou avec les spectres de la littérature (**Adams. 2007**).

Les pourcentages relatifs des composés ont été calculés par la méthode de normalisation des aires sans utilisés les facteurs de correction.

#### II.3. Étude phytochimique de l'espèce Lathyrus latifolius :

#### II.3.1. Place dans la systématique :

L'espèce Lathyrus latifolius appartient au taxon décrit dans le tableau II-14.

Classification			
Règne	Plantae		
Sous-Règne	Tracheobionta		
Classe	Magnoliopsida		
Sous- Classe	Rosidae		
Ordre	Fabales		
Famille	Fabaceae		
Sous-Famille	Faboideae		
Tribu	Inuleae		
Genre	Lathyrus		
Espèce	Lathyrus latifolius L.		

Tableau II. 14 : Classification de l'espèce Lathyrus latifolius.

#### **II.3.2.** Synonymes :

*Lathyrus latifolius* L,= *L. ensifolius* Bad, = pois vivace (nom Français) ou Khoud el farès (nom Arabe) (**Quezel et Santa. 1962**), ou encore *Lathyrus megalanthus* (**Țiței** *et al.*, **2017**).

#### II.3.3. Récolte du matériel végétal :

L'espèce *Lathyrus latifolius* a été récoltée à Sétif, Est Algérien, pendant la période de floraison en juin 2021. L'identification botanique a été réalisée par Professeur Khellaf Rebbas,

professeur au département des sciences de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf, M'sila. Les parties aériennes ont été séchées à l'abri de la lumière et l'humidité (Figure II.7), puis broyées et pesées (200g).



Figure II. 7 : L'espèce Lathyrus latifolius après séchage.

#### **II.3.4.** Méthode d'extraction :

Les parties aériennes pesées ont été macérées trois fois dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol-Eau ; 70/30 ; v/v) pendant 24 heures à température ambiante. La solution hydroalcoolique a été concentrée, en évaporant le solvant sous vide, puis diluée avec l'eau distillée et laissée au repos. Après filtration, la phase aqueuse a été extraite par l'extraction liquide-liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme après l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. Les solutions organiques ont été concentrées jusqu'à 37°C sous vide et pesées. Les masses des extraits obtenus ainsi que leur rendement sont résumés dans le tableau II.15.

Tableau II.15 : Masses et rendements des extraits de l'espèce L. late	folius
---	--------

Matériel végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement (%)
sec			
	Chloroforme	0,32	0,16
200g	Acétate d'éthyle	0,54	0,27
	<i>n</i> -butanol	6,43	3,21

#### **II.3.5.** Screening phytochimique :

Un criblage phytochimique a été effectué sur les différents extraits organique (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) de l'espèce de *L. latifolius*. Il permet l'identification des différents constituants chimiques actifs présents dans cette espèce, tels que : les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stérols, les flavonoïdes, les saponines et les tanins, en utilisant des méthodes phytochimiques standard avec une légère modification comme il est décrit dans le tableau II.16.

Composé	Test	Méthode	Observation	Référence
phytochimique				
		2 mL d'extrait +	Coloration de la	Yadev et al.,
Stérols	Salkowski	2 mL CHCl <sub>3</sub> +	phase	2014
		2mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	chloroformique	
		(conc.)	en rouge	
		1 mL extrait +	Précipité rouge-	Dhivya et
Alcaloïdes	Wagner	2mL du réactif	brun	Manimegalai.
		de Wagner		2013 ; Parekh
				et al., 2006
		2 mL d'extrait +	Mousse	Parekh et
Saponines	Mousse	2 mL H <sub>2</sub> O	persistante	Chanda. 2007
		distillée et bien		
		agiter		
		2 mL d'extrait +	Coloration verte	Kumar <i>et al.</i> ,
Tanins	Braymer	2 mL H <sub>2</sub> O	ou bleu foncée	2007 ; Parekh
		distillée		et Chanda.
		bouillante + 1mL		2007
		FeCl <sub>3</sub> (5%)		
		2 mL d'extrait+	Coloration rouge	Kumar <i>et al.</i> ,
		1mL HCl (conc.)	ou rose	2007 ; Parekh
Flavonoïdes	Shinoda	+ quelques		<i>et al.</i> , 2006
		grains de		
		copeaux de		
		magnésium		

Tableau II. 16 : Méthodes du criblage phytochimique.

Composé	Test	Méthode	Observation	Référence
phytochimique				
		2 mL d'extrait +	Anneau brun	Aiyegoro et
Terpénoïdes	Liebermann-	0,5mL anhydride	rougeâtre à la	Okoh. 2010 ;
	Burchardt	acétique + 0,5mL	jonction	Kumar <i>et al.</i> ,
		$CHCl_3 + 1 mL$		2007
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc.)		

Tableau II. 16 (Suite) : Méthodes du criblage phytochimique.

#### II.3.6. Analyse chromatographique par LC-ESI-MS/MS :

L'analyse qualitative et quantitative des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol a été réalisée par un système de chromatographie liquide 1260 Infinity II (technologie Agilent) associé à un spectromètre de masse Triple Quad 6460 et à une colonne Poroshell 120 EC-C18 (100 mm  $\times$  4,6 mm I.D., 2,7 µm).La phase mobile utilisée est constituée de :

Phase mobile A : 0,1 % d'acide formique et 5 mM de formiate d'ammonium dans l'eau.

Phase mobile B : 0,1 % d'acide formique et 5 mM de formiate d'ammonium dans le méthanol. Le gradient de solvant appliqué dans la phase mobile B est : 1-12 min 15 %, 12-30 min 50 %, 30-32 min 90 % et 32-35 min 10 %.

Le débit est de 0,4 mL/min, la température de la colonne est maintenue à 40°C et le volume d'injection est de 4,0  $\mu$ L. Le mode d'ionisation par électro-pulvérisation (ESI) était négatif et positif, fonctionnant avec de l'azote gazeux à 300 ° C qui s'écoule avec un débit de 11 mL/min, une tension capillaire à 4000 V et une pression de nébuliseur à 15 psi. Avant l'analyse LC-ESI-MS/MS, les solutions des extraits (2 mg/mL) ont été filtrées à travers des filtres de 0,45  $\mu$ m et transférées dans des flacons pour analyse.

#### II.4. Activités Biologiques :

Les espèces ciblées sont connues pour leurs utilisations thérapeutiques en médecine traditionnelle et l'activité biologique est indispensable pour notre étude.

Cette partie couvre l'activité antioxydante (*in vitro*) et l'activité anti-Alzheimer pour les trois extraits (chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique) des trois espèces : *Inula conyza*, *Centaurea incana* et *Lathyrus latifolius*. Un lecteur de microplaque (Perkin Elmer, Enspire), à

96 puits de volume 200 µl pour chaque puits a été utilisé pour mesurer l'absorbance de chaque activité.

#### II.4.1. Détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes :

#### II.4.1.1. Teneur en polyphénols totaux :

Un volume de 20  $\mu$ L d'échantillon (1 mg/mL), 100  $\mu$ l de FCR (0,2 M), 75  $\mu$ L de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ; 7,5%) ont été mélangés. L'absorbance du mélange a été mesurée à 765 nm après son incubation pendant 2h à l'obscurité (**Muller** *et al.*, **2010**).

Une gamme d'étalon et ainsi un blanc échantillon ont été préparés en remplaçant l'échantillon par l'acide gallique et les réactifs par le méthanol respectivement. La teneur en polyphénols est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

#### II.4.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux :

Un mélange de 50  $\mu$ L d'échantillon (1mg/mL), 130  $\mu$ L de méthanol, 10  $\mu$ L d'une solution d'acétate de potassium (CH<sub>3</sub>COOK ; 1M) et 10  $\mu$ L d'une solution de nitrate d'aluminium (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 10%) a été incubé pendant 40 min à température ambiante (**Topçu** *et al.*, **2007**).

Un blanc échantillon et une gamme d'étalonnage de la quercétine ont été également préparés. L'absorbance a été mesurée à 415 nm. Un blanc échantillon est ainsi préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

#### II.4.2. Évaluation du potentiel antioxydant :

#### II.4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH :

Un volume de 40  $\mu$ L de chaque échantillon à des concentrations croissante (3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50, 100 ; 200  $\mu$ L) a été mis dans une microplaque à 96 puits, suivi par l'ajout de 160  $\mu$ L de DPPH (0,1mM) dissout dans le méthanol, l'absorbance est de 0,5 à 517 nm. Un blanc a été également soumis sur la même microplaque en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesuré à 517 nm (**Blois. 1958**).

Les résultats sont exprimés en  $CI_{50}$  (concentration nécessaire pour inhibé 50% des radicaux libres), le BHA et le BHT ont été utilisés comme des antioxydants standards. La capacité de piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation :

#### (%) d'inhibition DPPH = [(Acontrôle - Aéchantillon) / Acontrôle] X 100

#### II.4.2.2. Activité anti-radicalaire ABTS :

Le cation radical  $ABTS^{+}$  a été préparé à partir de l'ABTS (7 mM) et du persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>; 2,45mM). Les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'obscurité pendant 12- 16h. Avant l'utilisation, la solution obtenue a été ajustée par de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm.

Un mélange de 160  $\mu$ L du radical ABTS<sup>+</sup> et de 40  $\mu$ L de l'échantillon testé est mis en incubation à l'abri de la lumière pendant 10 min avant que l'absorbance soit mesurée à la même longueur d'onde, le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards (**Re** *et al.*, **1999**). Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés selon l'équation suivante :

#### (%) d'inhibition ABTS = [(A<sub>Contrôle</sub> - A<sub>échantillon</sub>) / A<sub>Contrôle</sub>] X 100

#### II.4.2.3. Test de blanchiment de β-carotène :

0,5 mg de β-carotène, 200 µL de Tween 40, 25 µL d'acide linoléique et 1mL de chloroforme ont été mélangés ensemble puis mis sous évaporateur rotatif afin d'éliminer le solvant. Par la suite, 50 mL de H<sub>2</sub>O (barboter à l'oxygène pendant 30 min avec un débit de 100 mL/min) ont été ajoutées pour l'obtention de la solution A. L'absorbance de cette dernière doit être entre 0,8-0,9 à 470 nm, sinon, elle peut être ajustée par l'ajout de l'eau oxygéné H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 40 µL d'échantillon et 160 µL de la solution A ont été incubés pendant 120 min à 45°C. L'absorbance a été mesurée à 0 min et à 120 min à une longueur d'onde égale à 470 nm. Le BHA et BHT ont été utilisés comme étant des standards (**Marco. 1968**). Le pourcentage d'inhibition de l'activité de blanchiment β-carotène a été calculé selon l'équation :

#### (%) d'inhibition $\beta$ -carotène = [1- (A<sub>H0</sub> - A<sub>Ht</sub>) / (A<sub>C0</sub> - A<sub>Ct</sub>)] × 100

A<sub>H0</sub>: L'absorbance de l'échantillon à t=0

- A<sub>C0</sub>: L'absorbance du contrôle à t=0
- A<sub>Ht</sub>: L'absorbance de l'échantillon à t=120 min

A<sub>Ct</sub>: L'absorbance du contrôle à t=120 min

#### II.4.2.4. Piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :

Un volume de 40  $\mu$ L d'échantillon et 160  $\mu$ L du radical galvinoxyl (0,1mM) ont été incubés pendant 120 min à température ambiante avant que l'absorbance soit mesurée à 428 nm (**Shi** *et al.***, 2001**). Les résultats sont exprimés en CI<sub>50</sub>, les standards utilisés sont : BHA et BHT.

#### II.4.2.5. Piégeage du radical superoxyde par la méthode DMSO alcalin :

Un volume de 40  $\mu$ L d'échantillon, 130  $\mu$ L du DMSO alcalin (5 mM de NaOH dans le DMSO) et 30  $\mu$ L du NBT (1mg/mL de H<sub>2</sub>O) ont été mélangés. L'absorbance a été mesurée à 560 nm avec les standards :  $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique (**Kunchandy et Rao. 1990**). La concentration d'inhibition du superoxyde DMSO alcalin a été calculée en utilisant la formule suivante :

#### (%) d'inhibition DMSO alcalin = [(Aéchantillon - AContrôle) / Aéchantillon] X 100

#### II.4.2.6.La capacité antioxydante de réduire le cuivre (CUPRAC) :

Un mélange de 40  $\mu$ L d'échantillon, 60  $\mu$ L d'une solution tampon d'acétate d'ammonium (AcNH<sub>4</sub> ; 1M ; pH= 7), 50  $\mu$ L d'une solution de chlorure de cuivre (II) (CuCl<sub>2</sub> ; 10 mM), 50  $\mu$ L d'une solution alcoolique de néocuproine (7,5 mM) a été incubé pendant 1h. L'absorbance est mesurée à 450 nm (**Apak** *et al.*, **2004**). Les standards utilisés sont le BHT et le BHA. Les résultats ont été exprimés en A0,50 (concentration correspondante à 0,5 d'absorbance).

#### II.4.2.7. Pouvoir réducteur du Fer :

10 µL d'échantillon, 60 µL d'un tampon phosphate (0,2M, pH = 6,6) et 50 µL de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ; 1%) ont été incubés 20 min à 50 °C. Par la suite, 50 µL d'acide trichloroacétique (TCA ; 10%), 40 µL d'eau distillée et 10 µL de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub> ; 0,1%) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm et les résultats ont été exprimés en A<sub>0,50</sub> en utilisant le α-tocophérol et l'acide ascorbique comme standards (**Oyaizu. 1986**).

#### II.4.2.8. Activité de phenanthroline :

10  $\mu$ L d'échantillon, 50  $\mu$ L de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (0,2%), 30  $\mu$ L de phenanthroline (0,5%) et 110  $\mu$ L de méthanol ont été incubés à l'abri de la lumière durant 20 min à 30°C. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 510 nm. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme standards. Les résultats sont exprimés par A<sub>0.50</sub> (**Szydlowska-Czerniaka. 2008**).

#### II.4.3. Activité anti-cholinestérase :

Un mélange de 150  $\mu$ L d'un tampon phosphate sodique (100 mM, pH= 8), 10  $\mu$ L d'échantillon, 20  $\mu$ L d'enzyme AChE (5,32 x 10<sup>-3</sup> U) ou BChE (6,85 x 10<sup>-3</sup> U) a été incubé pendant 15 min à 25°C, puis 10  $\mu$ L du DTNB (5,5'-dithio-bis (acide-2-nitrobenzoïque)) et 10  $\mu$ L du substrat iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM) ont été ajoutés. La lecture de l'absorbance a été faite à deux reprises : t=0 min et t= 15 min à une longueur d'onde égale 412 nm (**Ellman** *et al.*, **1961**). Les résultats sont exprimés par CI<sub>50</sub> et la Galantamine est utilisée comme référence. Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme (AChE et BChE) est déterminé par la formule :

#### > Analyse des résultats de l'activité biologique :

Les tests sont réalisés en triple (n= 3), les résultats sont analysés par Excel et exprimés en valeur moyenne  $\pm$  ET. Les valeurs A<sub>0.50</sub> et CI<sub>50</sub> sont calculées par régression linéaire.

### Chapitre III :

### **Résultats et Discussion**

III.1. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce Inula conyza :

III.1.1. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait chloroforme :

III.1.1.1 Détermination structurale du composé IC1 :



Ce produit a été séparé sous forme d'un précipité blanc, qui a une fluorescence noire sous lumière UV à la longueur d'onde 254 nm ainsi qu'une coloration jaune après révélation par l'anisaldéhyde, cette coloration change avec le temps en rose.

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 1) et HSQC (Spectre 2) montre une corrélation entre le groupement CH<sub>2</sub> éthylénique à  $\delta_C$ = 119,4 ppm et les deux protons résonants à  $\delta_H$ = 6,12 ppm (d ; *J* = 3 Hz) et  $\delta_H$ = 5,56 ppm (d ; *J* = 3 Hz) indiquant un couplage allylique caractéristique d'un groupement CH<sub>2</sub> conjugué avec le carbonyle d'une  $\gamma$ -lactone sesquiterpénique (**Abdel-Mogib** *et al.*, **1990**). Cela est confirmé par la corrélation de ces deux protons avec le carbonyle à  $\delta_C$  = 170,4 ppm (HMBC, Spectre 3). Ces deux protons sont par conséquent attribuables à H-13a et H-13b respectivement de la double liaison exocyclique C-11/C-13. Le carbone du groupement CH<sub>2</sub> est attribué au C-13 alors que le carbonyle de l'ester du cycle lactonique est noté C-12.


**Spectre 1 :** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé IC1.



Spectre 2 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé IC1.



Spectre 3 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (5,35-6,35 ppm) du composé IC1.

L'examen du spectre COSY (Spectre 4, 5 et 6) et la connaissance de H-13a et H-13b permettent la localisation de H-7 résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{H}$ = 2,97 ppm. Ce dernier corrèle avec les trois protons résonant sur le spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 1 et Spectre 7) à  $\delta_{H}$ = 4,43 ppm (td ; *J* = 9,1 ; 2,8 Hz),  $\delta_{H}$ = 2,50 ppm (m) et  $\delta_{H}$ = 1,49 ppm (m). Le premier signal corrèle sur le spectre HSQC (Spectre 2) avec un carbone à  $\delta_{C}$ = 82 ppm et les deux autres corrèlent avec un seul carbone résonant à  $\delta_{C}$ = 34,8 ppm. Vu les valeurs de leurs déplacement chimique, ayant de multiplicité triplet de doublet et multiplets, sont attribuables à H-8, H-6a et H-6b respectivement.

Ces attributions permettent de tirer deux informations : la corrélation de H-8 sur le spectre HSQC (Spectre 2) avec le carbone du CH à  $\delta_C$ = 82 ppm dont la valeur du déplacement chimique est caractéristique du point de fermeture du  $\gamma$ -lactone sesquiterpénique fermée en C-8. Par ailleurs, la multiplicité du signal de H-8 permet de déduire l'absence de substituants en C-9.

En effet, le même spectre COSY (Spectre 5 et 6) permet aisément de localiser le proton H-9a à  $\delta_{H}$ = 2,40 ppm (m) et H-9b à  $\delta_{H}$ = 1,45 ppm (m). Ces deux protons du carbone C-9 ( $\delta_{C}$ = 45 ppm) permettent de localiser le H-10 résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{H}$ = 2,01 ppm.

Ce dernier corrèle d'une part avec les protons du groupement méthyle résonant sous forme d'un doublet à  $\delta_{H}$ = 1,12 ppm avec une constante de couplage J = 6,4Hz ( $\delta_{C}$ = 20 ppm), permet son attribution au C-14. D'autre part, le H-10 corrèle avec un proton à  $\delta_{H}$ = 2,09 ppm résonant sous forme de multiplet attribuable à H-1.



Spectre 4 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (5,35-6,35 ppm) du composé IC1.



Spectre 5 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (1,00-3,00 ppm) du composé IC1.



Spectre 6: COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (1,00-4,60 ppm) du composé IC1.



Spectre 7 : RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,60 ppm) du composé IC1.

Sur le spectre HMBC (Spectre 8) on révèle une tache de corrélation entre le H-1 et le carbone quaternaire résonant à  $\delta c = 49,5$  ppm attribuable à C-5, cela indique que la liaison entre C-1 et C-5 délimite la jonction des deux cycles du squelette sesquiterpénique.

Sur le même spectre, le C-5 corrèle avec des protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{H} = 1,06$  ppm ( $\delta_{C} = 21,7$  ppm), cela indique que le C-5 est substitué par le méthyle qu'on lui confère le numéro 15. La valeur du déplacement chimique du méthyle angulaire indique qu'il est voisin d'un groupement électroattracteur, qui ne peut être que le groupement carbonyle localisé en position C-4. Cette hypothèse est confirmée par la tache de corrélation sur le spectre HMBC (Spectre 8) entre les protons du méthyle C-15 et le C-4 ( $\delta_{C} = 224$  ppm).

Suite à cette analyse, c'est-à-dire la jonction C-1 et C-5 ainsi que la localisation des groupements méthyle, cela oriente vers un squelette de type pseudo-guaianolide.



Spectre 8 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,70 ppm) du composé IC1.

Revenons au spectre COSY (Spectre 5 et 6) qui permet d'attribuer les protons restants notamment :

-Le H-1 ( $\delta H = 2,09$  ppm,  $\delta c = 48,2$  ppm) montre une tache de corrélation avec le proton à  $\delta H = 1,67$  ppm qui corrèle à son tour avec le proton à  $\delta H = 2,11$  ppm attribuables aux protons H-2b et H-2a respectivement.

-Le H-2b montre deux taches de corrélation, la première avec le proton résonant à  $\delta H = 2,52$  ppm et la seconde avec le proton à  $\delta H = 2,22$  ppm, attribuables à H-3a et H-3b respectivement qui corrèlent entre eux également.

L'ensemble de ces données mène à un hélénanolide reporté dans la figure III.1.



Figure III. 1 : Structure plane du composé IC1.

La stéréochimie des centres asymétrique du sesquiterpène lactone isolé est établie comme suit :

-L'orientation  $\alpha$  du proton H-7 est établie par la biogenèse des sesquiterpènes lactones.

-L'orientation  $\beta$  du H-8 est déduite de la valeur de son interaction de couplage (J = 9,1; 2,8 Hz) qui mène à une interaction 1,2-diaxiales entre H-7 et H-8.

-L'orientation  $\beta$  du groupement méthyle en C-5 est déduite de la valeur du déplacement chimique.

-Les configurations des centres asymétriques sont : 1S, 5R, 7R, 8S et 10S.

La combinaison de l'ensemble des résultats de cette analyse ainsi que la comparaison avec les résultats de la littérature (**Abdel-Mogib** *et al.*, **1990**) mène à la structure représentée dans la figure III.2 : (1S, 5R, 7R, 8S, 10S) 4-acétoxy-5 $\beta$ -méthyl-7 $\alpha$ H-8 $\beta$ H-guaian-11(13)-ene-8-12-olide, connue sous le nom graveolide. Les résultats spectroscopiques de la RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont rassemblés dans le tableau III.1.



Figure III. 2: Graveolide.

Tableau III. 1	: Données s	pectroscopique	s RMN <sup>1</sup> H et	<sup>13</sup> C du com	posé IC1.
----------------	-------------	----------------	-------------------------	------------------------	-----------

Position	δн (ppm), intégration,	δc (ppm)
	multiplicité, J (Hz)	
1	2,09 (1H ; m)	48,2
2a	2,11 (1H ; m)	24,3
2b	1,67 (1H ; m)	-
<b>3</b> a	2,52 (1H ; m)	35,9
<b>3</b> b	2,22 (1H; m)	-
4	-	224,0
5	-	49,5
6a	2,50 (1H ; m)	
6b	1,49 (1H ; m)	34,8
7	2,97 (1H ; m)	45,6
8	4,43 (1H ; td ; 9,1 ; 2,8 Hz)	82,0
9a	2,40 (1H ; m)	45,0
9b	1,45 (1H ; m)	-
10	2,01 (1H ; m)	30,1
11	-	141,4
12	-	170,4
13a	6,12 (1H ; d ; 3 Hz)	119,4
13b	5,56 (1H ; d ; 3 Hz)	1
14	1,12 (3H ; d ; 6,4 Hz)	20,0
15	1,06 (3H ; s)	21,7

#### III.1.1.2. Détermination structurale du composé IC2 :



Le composé IC2 se présente sous forme des cristaux incolores. L'examen simultané des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 9), HSQC (Spectre 10) et HMBC (Spectre 11) montre la présence de deux singulets large d'intégration 1H chacun à  $\delta_H = 6,17$  ppm et 5,62 ppm qui corrèlent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à  $\delta_C = 122,3$  ppm, ces signaux sont caractéristiques d'un groupement CH<sub>2</sub> éthylénique d'une liaison exocyclique caractéristique d'un squelette sesquiterpénique. Cela est confirmé par la corrélation de ces deux protons sur le spectre HMBC avec le carbonyle à  $\delta_C = 169,3$  ppm, noté C-12, le carbone du CH<sub>2</sub> éthylénique noté C-13 et leurs protons H-13a et H-13b respectivement.



**Spectre 9 :** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé IC2.



Spectre 10 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé IC2.



Spectre 11 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (2,20-6,20ppm) du composé IC2.

L'examen du spectre COSY (Spectre 12) montre une tache de corrélation entre le proton H-13b et le proton résonant sous forme de triplet à  $\delta_{H}$  = 2,52 ppm (J = 12 Hz), ce proton montre également une tache de corrélation sur le spectre HSQC (Spectre 10) avec le carbone à  $\delta_{C}$  = 41,4 ppm. Ce dernier corrèle à son tour avec les protons éthylénique H-13a et H-13b sur le spectre HMBC (Spectre 11), cela confirme qu'il s'agit bien du H-7. Sur le même spectre HMBC apparait deux taches de corrélation entre les protons H-13a, H-7 et le carbone à  $\delta_{C}$  = 146,3 ppm, attribuable au deuxième carbone formant la liaison exocyclique C-11.



Spectre 12 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), étalé (2,20-6,20 ppm) du composé IC2.

L'examen du spectre COSY (Spectre 13) et HSQC (Spectre 14) montre quatre taches de corrélation entre le H-7 et les protons de deux groupements CH<sub>2</sub> notamment :

-Le premier CH<sub>2</sub> à  $\delta c = 27,1$  ppm, leurs protons résonants sous forme d'un doublet large chacun à  $\delta H = 1,98$  ppm (J = 12 Hz) et à  $\delta H = 1,28$  ppm (J = 12 Hz), qui corrèlent également entre eux sur le spectre COSY, attribuables à H-6a et H-6b respectivement.

-Le second CH<sub>2</sub> à  $\delta c = 28$  ppm, leurs protons résonants sous forme d'un multiplet chacun à  $\delta H = 1,67$  ppm et  $\delta H = 1,50$  ppm attribuables aux protons H-8a et H-8b respectivement.

D'après cette analyse, on peut déduire que les positions de part et d'autre du C-7 (C-6 et C-8) sont libres et non substituées, ce qui implique que notre sesquiterpène ne contient pas une partie lactonique.

L'examen du spectre COSY (Spectre 13) montre également :

-Une tache de corrélation entre le H-6a et le proton d'un CH ( $\delta c = 56,9$  ppm) résonant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta H = 1,39$  ppm (J = 12,6; 1,6 Hz) qui ne peut être que le H-5.

-La corrélation entre les protons H-8a et H-8b et un proton du CH<sub>2</sub> ( $\delta c = 43,3$  ppm) résonant sous forme d'un doublet à  $\delta H = 1,78$  ppm (J = 12,5 Hz) attribuable à H-9a, par conséquent, le proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta H = 1,47$  ppm sera attribué à H-9b.



Spectre 13 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (0,90-2,70 ppm) du composé IC2.



Spectre 14 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), étalé (0,70-2,10 ppm) du composé IC2.

L'examen du spectre HMBC (Spectre 15) montre une tache de corrélation entre les protons H-5 et H-9b et le carbone quaternaire résonant à  $\delta c = 33,8$  ppm attribuable à C-10, cela indique que la liaison entre C-5 et C-10 délimite la jonction entre les deux cycles du sesquiterpène.

Sur le même spectre, le carbone C-5 corrèle également avec les protons du groupement méthyle résonants sous forme d'un singulet à  $\delta H = 0,97$  ppm ( $\delta c = 18,8$  ppm) caractéristique d'un méthyle angulaire porté par le C-10, noté C-14 d'une structure eudesmanolide.

Toujours sur le spectre HMBC qui révèle des taches de corrélation entre les protons du groupement méthyle angulaire H-14 et les carbones C-5, C-9 et le carbone résonant à  $\delta c = 41,6$  ppm attribuable à C-1. Ce dernier montre sur le spectre HSQC (Spectre 14) une tache de corrélation avec deux protons :

-L'un résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta H = 1,43$  ppm, le second résonant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta H = 1,17$  pp (J = 13; 4 Hz) attribuables à H-1a et H-1b respectivement.



Spectre 15 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (0,80-2,10ppm) du composé IC2.

L'examen du spectre COSY (Spectre 13) montre une tache de corrélation entre le H1-b et les deux protons résonant sous forme d'un multiplet chacun à  $\delta_H = 1$ , 64 ppm et  $\delta_H = 1,60$  ppm attribuables à H-2a et H-2b respectivement. Ces deux protons corrèlent également avec deux protons : le premier résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 1,49$  ppm et le second résonant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_H = 1,32$  ppm (J = 13 ; 4 Hz) attribuables à H-3a et H-3b respectivement.

Le spectre HSQC (Spectre 14) permet l'attribution des carbones de deux groupements CH<sub>2</sub> notamment :

-Le C-2 à  $\delta c = 20,8$  ppm grâce à sa corrélation avec les protons H-2a et H-2b.

-Le C-3 à  $\delta c = 44,3$  ppm grâce à sa corrélation avec les protons H-3a et H-3b.

Revenons au spectre HMBC (Spectre 15) qui montre une corrélation entre le H-5 et le carbone quaternaire à  $\delta c = 71,3$  ppm attribuable à C-4.

Le même spectre montre ainsi une corrélation entre le C-4 et les protons du groupement méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\rm H} = 1,12$  ppm ( $\delta_{\rm C} = 21,9$  ppm) qui ne peut être que le groupement méthyle C-15 en position C-5, sa multiplicité suppose bien une substitution en C-4 de ce squelette sesquiterpénique, cette substitution ne peut être qu'un hydroxyle.

L'absence des corrélations sur spectre HMBC avec le carbonyle C-12 indique qu'il s'agit d'un acide carboxylique  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturé.

La combinaison de ces données oriente vers un sesquiterpène type eudesmane représenté dans la figure III.3.



Figure III. 3 : Structure plane du composé IC2.

La stéréochimie des centres asymétriques est déduite des données des spectres RMN notamment :

-Le C-14 ne peut avoir qu'une orientation  $\beta$  vu son faible déplacement chimique ( $\delta H = 0,97$  ppm) conférant une position axiale sur le cycle cyclohexanique.

-Le H-7 ne peut avoir qu'une orientation  $\alpha$ .

-Le C-15 étant sous forme de groupement méthyle porté par un carbone quaternaire oxygéné à un déplacement chimique relativement faible ( $\delta_{\rm H} = 1,12$  ppm). Cette valeur du déplacement chimique lui confère une position axiale d'où une orientation  $\beta$  pour ce groupement.

-La stéréochimie du C-5 découle du signal de son proton dans lequel on révèle une constante de couplage d'environ 12,6 Hz signifiant une interaction 1-2 diaxiales. Cette interaction ne peut avoir lieu qu'entre le H-6 axial et le H-5, d'où une orientation  $\alpha$  pour ce dernier.

-La configuration des centres asymétriques est établie comme suit : 4R, 5S, 7S et 10S.

L'ensemble de ces résultats et par comparaison avec les données de la littérature (**Guilhon et Müller. 1998**) oriente vers la structure de (4R, 5S, 7S, 10S) Acide 4 $\alpha$ -hydroxyeudesm-11(13)-ene-5 $\alpha$ H, 7 $\alpha$ H-12-oique, connu sous le nom d'acide ilicique (Figure III.4).



Figure III. 4 : L'acide ilicique.

L'ensemble des données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont reportés dans le tableau III.2.

Position	<b>δ</b> н ( <b>ppm</b> ), intégration,	δc (ppm)
	multiplicité, J (Hz)	
1a	1,43 (1H, m)	41,6
1b	1,17 (1H ; dd ; 13 ; 4 Hz)	-
2a	1,64 (1H ; m)	20,8
<b>2b</b>	1,60 (1H ; m)	
3a	1,49 (1H ; m)	44,3
<b>3</b> b	1,32 (1H ; dd ; 13 ; 4 Hz)	
4	-	71,3
5	1,39 (1H ; dd ; 12,6 ; 1,6 Hz)	55,9
6a	1,98 (1H ; dl ; 12 Hz)	
6b	1,28 (1H ; dl ; 12 Hz)	27,1
7	2,52 (1H ; t ; 12 Hz)	41,4
8a	1,67 (1H ; m)	28,0
8b	1,50 (1H ; m)	
9a	1,78 (1H ; d ; 12,5 Hz)	43,3
9b	1,47 (1H ; m)	
10	-	33,8
11	-	146,3
12	-	169,3
<b>13a</b>	6,17 (1H ; sl)	122,3
13b	5,62 (1H ; sl)	
14	0,97 (3H ; s)	18,8
15	1,12 (3H ; s)	21,9

**Tableau III. 2 :** Résultats RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C relatives au composé IC2.

III.1.2. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle :

III.1.2.1. Détermination structurale du composé IC3 :



Le produit IC3 se présente sous forme d'un précipité jaune. Sa fluorescence noire-violette sous la lumière de Wood indique une structure de type flavone ou flavonol substitué en position C-3.

L'examen simultané des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 16 et 17), COSY (Spectre 18) et HSQC (Spectre 19 et 20) montre la présence des signaux caractéristiques d'une flavone flavonol et permet les attributions suivantes :

-Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  = 7,64 ppm (J = 2,2 Hz), indicateur d'un couplage méta, corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{\rm C}$  = 115 ppm, attribuable à H-2'.

-Le proton H-2' corrèle sur le spectre COSY avec le proton résonant sous forme d'un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$ = 7,56 ppm (*J* = 8,5 ; 2,2 Hz), indicateur d'un couplage ortho et méta, ce dernier corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{\rm C}$  = 120,9 ppm, qui permet son attribution au proton H-6'.

-Le H-6' montre également sur le spectre COSY une tache de corrélation avec le proton qui résonne sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  = 6,92 ppm (*J* = 8,5 Hz), indicateur d'un couplage ortho, que l'on peut attribuer à H-5'. Ce dernier corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{\rm C}$  = 115,3 ppm.

-Un signal d'intégration 1H apparait sur le spectre RMN <sup>1</sup>H sous forme d'un singulet à  $\delta_H = 6,52$  ppm, qui sera attribuer soit à H-3, H-6 ou H-8. Sur le spectre HSQC, ce proton corrèle avec son carbone à  $\delta_C = 93,5$  ppm, selon la valeur du déplacement chimique et par comparaison avec les données de la littérature, ce carbone ne peut être attribué qu'au carbone C-8 (**Liu et Marby. 1982 ; Al-Yahya** *et al.*, **1988 et**), de ce fait, le proton à  $\delta_H = 6,52$  ppm est attribuable à H-8.

-L'apparition de deux singulets d'intégration 3H chacun à  $\delta_H$ = 3,81 ppm ( $\delta_C$  = 59,1 ppm) et  $\delta_H$  = 3,90 ppm ( $\delta_C$  = 59,5 ppm) indique la présence de deux groupements méthoxyles.

L'étalement du spectre HMBC (Spectre 21) montre une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle qui résonnent à  $\delta_H = 3,81$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 137,8$  ppm attribuable à C-3. L'autre méthoxyle à  $\delta_H = 3,90$  ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_C = 131,3$  ppm qui ne peut être que le C-6, permettant ainsi de localiser ces groupements méthoxyles en position C-3 et C-6.



**Spectre 16:** RMN  $^{1}$ H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé IC3.



**Spectre 17:** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, δ ppm) étalé (6,40-7,80ppm) du composé IC3.



Spectre 18: COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,30-7,90 ppm) du composé IC3.



Spectre 19 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,50-7,70 ppm) du composé IC3.



Spectre 20: HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,68-4,02 ppm) du composé IC3.



Spectre 21: HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,71-3,97ppm) du composé IC3.

L'expérience HMBC (Spectre 22 et 23) a permis également l'attribution des carbones quaternaires :

-Une tache de corrélation entre le H-8 et chacun des carbones à :  $\delta c = 105,2$  ppm,  $\delta c = 131,3$  ppm,  $\delta c = 151,7$  ppm,  $\delta c = 152,4$  ppm,  $\delta c = 157,3$  ppm et  $\delta c = 178,6$  ppm attribuables à : C-10, C-6, C-5, C-9, C-7 et C-4 respectivement.

-Le H-5' corrèle avec les carbones résonants à  $\delta c = 121,3$  ppm,  $\delta c = 145,1$  ppm et  $\delta c = 148,4$  ppm attribuables aux atomes de carbones quaternaires du cycle B : C1', C-3' et C-4' respectivement.

-La corrélation entre le H-2' et le carbone à  $\delta c = 145,1$  ppm confirme le C-3'.



Spectre 22: HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,15-6,80 ppm) du composé IC3.



Spectre 23 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,70-7,80 ppm) du composé IC3.

L'étude du spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 24 et 25) permet la confirmation de tous les carbones identifiés précédemment par l'étude des expériences bidimensionnelles HSQC et HMBC, en addition du carbone qui apparait à  $\delta_C = 156,4$  ppm, qui ne peut être que le C-2.



Spectre 24 : RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz), étalé (55-125 ppm) du composé IC3.



**Spectre 25 :** RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz), étalé (130-182 ppm) du composé IC3.

Toutes ces données spectrales ainsi que la comparaison avec la littérature (Liu et Marby. 1982 ; Al-Yahya *et al.*, 1988) nous permettent d'identifier le composé IC3 comme étant le

3',4',5,7-tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavone ou encore le 3,6-diméthoxy lutéoline connu sous le nom d'axillarine (Figure III.5). L'ensemble des données spectrales RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont représentés dans le tableau III.3.



Figure III. 5 : Axillarine.

**Tableau III. 3 :** Résultats RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C relatives au composé IC3.

Position	$\delta_{\rm H}$ (ppm), intégration,	δ <sub>C</sub> (ppm)
	multiplicité, <i>J</i> (Hz)	
2	-	156,4
3	-	137,8
4	-	178,6
5	-	151,7
6	-	131,3
7	-	157,3
8	6,52 (1H ; s)	93,5
9	-	152,4
10	-	105,2
1'	-	121,3
2'	7,64 (1H ; d ; 2,2 Hz)	115,0
3'	-	145,1
4'	-	148,4
5'	6,92 (1H ; d ; 8,5 Hz)	115,3
6'	7,56 (1H ; dd ; 8,5 ; 2,2 Hz)	120,9
<b>3-OCH</b> <sub>3</sub>	3,81 (3H ; s)	59,1
6-OCH3	3,90 (3H;s)	59,5

#### III.1.2.2. Détermination structurale du composé IC4 :



Le produit IC4 se présente sous forme des cristaux jaune, sa fluorescence noire-violette sous la lumière de Wood oriente vers le squelette d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol substitué en C-3.

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 26) confirme la présence d'un flavonoïde glycosylé, cela est caractérisé par la présence de deux types de protons dont le premier type se trouve dans la zone aromatique située dans l'intervalle [6,93-7,69 ppm] et le second type se situe dans la zone osidique s'étalant de 3,44 ppm à 5,14 ppm.



**Spectre 26:** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé IC4.

L'étude simultanée des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 27), COSY (Spectre 28) et HSQC (Spectre 29) permet de relever les informations suivantes :

-Un doublet d'intégration 1H (J = 1,8 Hz), résonant à  $\delta_{H} = 7,69$  ppm corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{C} = 116,2$  ppm que l'on peut attribuer à H-2'. Ce même proton montre sur le spectre COSY une tache de corrélation avec le proton résonant à  $\delta_{H} = 7,61$  ppm, qui apparait sur le spectre RMN <sup>1</sup>H sous forme d'un doublet de doublet d'intégration 1H et montrant ainsi un couplage ortho (J = 7,5 Hz) et un couplage méta (J = 1,8 Hz) ce qui permet son attribution au proton H-6'. Ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{C} = 122,4$  ppm assignable au carbone C-6'.

-Le proton H-6' corrèle sur le spectre COSY avec le proton résonant à  $\delta_{\rm H}$ = 6,93 ppm, ce dernier apparait sur le spectre RMN <sup>1</sup>H sous forme de doublet (*J* = 7,5 Hz) d'intégration 1H, ce qui permet son attribution au proton H-5'. Ce dernier proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_{\rm C}$ = 116,1 ppm.

-Un singulet résonant à  $\delta_{\rm H}$ = 6,95 ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, H-6 ou bien H-8. Sur le spectre HSQC, ce proton montre une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_{\rm C}$ = 95,5 ppm, vu la valeur du déplacement chimique et par comparaison avec la littérature, ce carbone ne peut être que le C-8 (**Schmeda-Hirschmann** *et al.*, 2004), par conséquent, le proton résonant à  $\delta_{\rm H}$ = 6,95 ppm est le H-8.

-Deux singulets d'intégration 3H chacun à  $\delta_H = 3,84$  et 3,92 ppm, attribuables aux deux groupements méthoxyles.

-Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$ = 5,14 ppm (*J* = 7,5 Hz). D'après la valeur du déplacement chimique ainsi que la constante de couplage de ce proton anomérique, le sucre est lié à l'aglycone par une jonction *O*-sucre, et cette entité peut être un glucose ou un galactose avec configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine (**Schmeda-Hirschmann** *et al.*, **2004**).



Spectre 27: RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (5,00-7,90 ppm) du composé IC4.



Spectre 28 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,75-7,85 ppm) du composé IC4.



**Spectre 29 :** HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (5,00-7,80 ppm) du composé IC4.

De même que précédemment, l'analyse simultanée des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 27 et 30), COSY (Spectre 31) et HSQC (Spectre 29 et 32) permet l'attribution des signaux de la partie osidique comme suit :

-Le proton anomérique H-1'' (d ; 5,14 ppm ; J = 7,5 Hz) montre une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_C = 101,5$  ppm. Ce proton anomérique corrèle sur le spectre COSY avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 3,58$  ppm ( $\delta_C = 74,6$  ppm), que l'on peut attribuer à H-2''. Ce dernier montre sur le même spectre une tache de corrélation avec le proton résonant à  $\delta_H = 3,54$  ppm ( $\delta_C = 78$  ppm) sous forme d'un triplet (J = 9 Hz) attribuable à H-3''. Ce même proton corrèle avec un signal résonant sous forme d'un triplet (J = 9 Hz) à  $\delta_H = 3,44$  ppm que l'on peut attribuer à H-4'' ( $\delta_C = 68,3$  ppm).

-La multiplicité de H-3" et la valeur de sa constante de couplage supposent des interactions axiale-axiale entre H-3"/H-2" et H-3"/H-4", cela indique des orientations axiales pour le H-3" et H-4" donc le sucre est un glucose.

-Le H-4'' montre une tache de corrélation avec le proton résonant à  $\delta_H$ = 3,60 ppm ( $\delta_C$ = 78,3 ppm) sous forme d'un multiplet, il ne peut être que le H-5''. Ce dernier proton montre deux

taches de corrélation avec deux protons : l'un à  $\delta_{\rm H}$ = 3,96 ppm résonant sous forme d'un doublet large (*J* = 12 Hz) et l'autre à  $\delta_{\rm H}$ = 3,74 ppm résonant sous forme d'un doublet de doublet (*J* = 12 ; 6 Hz) attribuable à H-6''a et H-6''b respectivement. Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec leur carbone à  $\delta_{\rm H}$ = 62,09 ppm.

Toutes ces informations ainsi que les valeurs des déplacements chimiques des carbones du sucre confirme que l'entité sucre n'est autre que le glucose.



**Spectre 30:** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,05-4,25 ppm) du composé IC4.



Spectre 31 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (4,40-5,10 ppm) du composé IC4.



Spectre 32 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,00-4,40 ppm) du composé IC4.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 33, 34 et 35) permet de déduire facilement toutes les valeurs des déplacements chimiques de tous les carbones quaternaires et aussi de positionner l'entité glucose ainsi que les deux groupements méthoxyle.

Les taches de corrélation sur l'étalement du spectre HMBC (Spectre 33) permettent de tirer les indications suivantes :

-Le proton H-8 montre des taches de corrélations avec :

- Le carbone à  $\delta_C = 177,7$  ppm, vu la valeur de son déplacement chimique, il ne peut être que le groupement carbonyle C-4.
- Deux carbones résonants à  $\delta_C = 152,1$  et 151,2 ppm correspondants aux C-9 et C-5 respectivement.
- L'atome de carbone quaternaire à  $\delta_{\rm C} = 107,7$  ppm, attribuable au carbone C-10.

-Le C-1' à  $\delta c = 121,1$  ppm, grâce à sa corrélation avec le H-2' et H-5'.

-Le C-3' à  $\delta c = 145,1$  ppm, grâce à sa corrélation avec le H-5'.

-Le C-4' à  $\delta c = 148,9$  ppm, grâce à sa corrélation avec les protons H-2' et H-6'.

-Le proton H-6' montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta c = 157,6$  ppm, attribuable à C-2.

En effet, le spectre 34 (Spectre HMBC étalé) montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' ( $\delta_H = 5,14$  ppm) et le signal à  $\delta_C = 155,7$  ppm qui ne peut être attribué qu'au carbone C-7.

Une tache de corrélation est remarquée sur l'étalement du spectre HMBC (Spectre 35) entre le groupement méthoxyle à  $\delta_H = 3,84$  ppm et le carbone à  $\delta_C = 137,7$  ppm attribuable au carbone C-3. Les protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,92$  ppm corrèlent avec le carbone résonant à  $\delta_C = 132,1$  ppm qui ne peut être que le C-6.



Spectre 33 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,60-7,70 ppm) du composé IC4.



Spectre 34 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (4,65-5,40 ppm) du composé IC4.



Spectre 35 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,50-4,20 ppm) du composé IC4.

Toutes les données de la série spectrale et la comparaison avec la littérature (**Schmeda-Hirschmann** *et al.*, **2004**) permettent d'identifier le composé IC4 comme étant le 3',4',5-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside ou axillarine7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside connu sous le nom axillaroside (Figure III.6).



Figure III. 6 : Axillaroside.

Les données relatives à la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de ce composé sont reportées dans le tableau III.4.

Position	$\delta_{\rm H}$ (ppm), intégration,	δ <sub>C</sub> (ppm)
	multiplicité, J (Hz)	
2	-	157,6
3	-	137,7
4	-	177,7
5	-	151,2
6	-	132,1
7	-	155,7
8	6,95 (1H ; s)	95,5
9	-	152,1
10	-	107,7
1'	-	121,1
2'	7,69 (1H ; d ; 1,8 Hz)	116,2
3'	-	145,1
4'	-	148,9
5'	6,93 (1H ; d ; 7,5 Hz)	116,1
6'	7,61 (1H ; dd ; 7,5 ; 1,8 Hz)	122,4
1"	5,14 (1H ; d ; 7,5 Hz)	101,5
2"	3,58 (1H ; m)	74,6
3"	3,54 (1H ; t ; 9 Hz)	78,0
4"	3,44 (1H ; t ; 9 Hz)	68,3
5"	3,60 (1H ; m)	78,3
6"a	3,96 (1H ; dl ; 12 Hz)	62,0
6"b	3,74 (1H ; dd ; 12 ; 6 Hz)	
<b>3-OCH</b> <sub>3</sub>	3,84 (3H ; s)	59,7
6-OCH <sub>3</sub>	3,92 (3H ; s)	60,8

**Tableau III. 4 :** Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé IC4.





Ce composé a été isolé sous forme d'une poudre jaune. L'examen de son spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 36 et 37) enregistré dans le DMSO- $d_6$  indique la présence des signaux des protons d'un noyau aromatique et d'autres éthyléniques qui peuvent être réparti comme suit :

-Deux doublets d'intégration 1H chacun avec une constante de couplage J = 1,5 Hz, résonants à  $\delta_{\rm H} = 7,07$  ppm et 7,02 ppm.

-Deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun (J = 8,2 et 1,5 Hz) à  $\delta_{H} = 6,95$  et 6,90 ppm.

-Un signal sous forme d'un doublet (J = 8,2 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 6,74 \text{ ppm}$ .

La somme de ces informations indique la présence de six protons dans la zone aromatique ainsi que les constantes de couplages orientent vers la présence de deux types de couplage, J = 1,5 Hz un couplage méta tandis que J = 8,2 Hz un couplage ortho. Cela indique la présence de deux noyaux aromatiques trisubstitué dans les positions 1',3'et 4' pour le premier noyau et dans les positions 1'', 3'' et 4'' pour le second.



Par conséquent, on peut attribuer les protons H-2'' ( $\delta_H = 7,07 \text{ ppm}$ ), H-2' ( $\delta_H = 7,02 \text{ ppm}$ ), H-6'' ( $\delta_H = 6,95 \text{ ppm}$ ), H-6' ( $\delta_H = 6,90 \text{ ppm}$ ), H-5''et H-5' ( $\delta_H = 6,74 \text{ ppm}$ ). Cela est confirmé par la présence des taches de corrélations sur le spectre COSY (Spectre 37) entre H-2' et H-6', H-6' et H-5' du premier cycle et entre H-2'' et H-6'', H-6'' et H-5'' du second cycle.

Par ailleurs, sur le même spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 36 et 37), les protons éthyléniques sont réparti comme suit : quatre signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun (J= 15,9 Hz) à  $\delta_{\rm H}$ = 7,45 ppm ; 7,38 ppm ; 6,24 ppm et 6,16 ppm.

Le spectre COSY (Spectre 38) montre également des taches de corrélations entre les protons résonants à  $\delta_{\rm H}$ = 7,45 ppm et  $\delta_{\rm H}$ = 6,24 ppm et entre les protons résonants à  $\delta_{\rm H}$ = 7,38 ppm et  $\delta_{\rm H}$ = 6,16 ppm. Ce qui confirme la présence de deux groupements éthyléniques. Selon la valeur de la constante de couplage (*J*= 15,9 Hz), la configuration de la double liaison est trans, ces protons sont conférés aux H-7" ( $\delta_{\rm H}$ = 7,45 ppm), H-7" ( $\delta_{\rm H}$ = 7,38 ppm), H-8" ( $\delta_{\rm H}$ = 6,16 ppm).



**Spectre 36 :** RMN <sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé IC5.



**Spectre 37 :** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (5,80-7,70 ppm) du composé IC5.



**Spectre 38 :** COSY (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (5,80-7,60 ppm) du composé IC5.
Par ailleur, l'examen du spectre RMN  $^{13}C$  (Spectre 39 et 40 ) révèle la présence de 25 carbones dont un carbonyle d'un acide carboxylique à  $\delta_C = 173,5$  ppm, noté C-7 et deux carbonyles d'esters conjugués à  $\delta_C = 166,5$  ppm et 165,2 ppm, notés C-9'' et C-9' respectivement.



Spectre 39 : RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) du composé IC5.



**Spectre 40 :** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz), étalé (138-176 ppm) du composé IC5

Le spectre HSQC (Spectre 41) mène à l'attribution des carbones apparaissant sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 42) correspondants à leurs protons notamment : C-2' ( $\delta_C = 114,8$  ppm), C-2'' ( $\delta_C = 114,8$  ppm), C-5' ( $\delta_C = 116$  ppm), C-5'' ( $\delta_C = 115,9$  ppm), C-6' ( $\delta_C = 120,5$  ppm), C-6'' ( $\delta_C = 121,5$  ppm), C-7' ( $\delta_C = 143,5$  ppm), C-7'' ( $\delta_C = 144,9$  ppm), C-8'' ( $\delta_C = 114,6$  ppm).



**Spectre 41 :** HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (6,10-7,50 ppm) du composé IC5.



**Spectre 42 :** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz), étalé (113-128 ppm) du composé IC5.

L'étude de spectre HMBC (Spectre 43) montre une tache de corrélation entre les protons H-7', H-8' et les carbones à  $\delta_C = 126$  ppm et à  $\delta_C = 165,2$  ppm attribuables à C-1' et C-9' respectivement. Par ailleurs, les protons H-7'', H-8'' corrèlent avec les carbones à  $\delta_C = 125,6$  ppm et 166,5 ppm attribuables à C-1'' et C-9'' respectivement, confirmant que les groupements éthyléniques sont liés d'une part aux noyaux aromatiques et d'une autre part aux groupements carbonyles.

Ce même spectre permet également de localiser les carbones quaternaires ainsi :

-Le C-3' à  $\delta c = 145,9$  ppm, grâce à sa corrélation avec H-2' et H-5'.

-Le C-4' à  $\delta c = 148,8$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2' et H-6'.

-Le H-5" corrèle avec le carbone à  $\delta c = 145,9$  ppm correspond à C-3".

-Les protons H-2'' et H-6'' montrent une tache de corrélation avec le même carbone à  $\delta c =$  148,1 ppm, attribuable à C-4''.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-3', C-3'', C-4' et C-4'' indiquent qu'ils sont porteurs des groupements hydroxyle.



**Spectre 43 :** HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (5,80-7,60 ppm) du composé IC5.

L'analyse spectrale fait jusqu'à présent nous permet de proposer la première entité du composé IC5 figurant au-dessous (Figure III.7).



Figure III. 7 : Structure partielle du composé IC5.

Revenons au spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 36) qui montre des signaux dans l'intervalle [1,5-5,5 ppm], caractérisé par un triplet de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  = 5,24 ppm (*J* = 9,8 ; 4,3 Hz) correspond à H-5 de l'acide quinique (**Chan** *et al.*, **2009 ; Danino** *et al.*, **2009**).

Le spectre COSY (Spectre 44) montre que le proton H-5 corrèle avec les protons résonants à :

 $-\delta_{\rm H} = 3,51$  ppm, attribuable à H-4.

 $-\delta_{\rm H} = 2,33$  ppm, sous forme d'un doublet large (J = 9,6 Hz), attribuable à H-6ax.

 $-\delta_{\rm H} = 1,79$  ppm, sous forme d'un doublet de doublet (J = 12 Hz), attribuable à H-6eq, ces deux protons (H-6ax et H-6eq) corrèlent également entre eux.

Le H-4 corrèle à son tour avec le proton à  $\delta_{\rm H}$  = 4,00 ppm résonant sous forme d'un doublet (*J* = 3,1 Hz), qui ne peut être que H-3.

Le H-3 montre deux taches de corrélation avec un proton à  $\delta_H = 2,49$  ppm (son signal dissimulé sous le pic du DMSO- $d_6$ ), et un autre résonant à  $\delta_H = 2,17$  ppm, sous forme d'un doublet large (J = 12 Hz), attribuables à H-2ax et H-2eq respectivement, ces deux derniers protons corrèlent ainsi entre eux.

Par conséquent, on peut attribuer les protons de l'acide quinique comme le montre l'étalement du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 45).



**Spectre 44 :** COSY (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (1,40-5,60 ppm) du composé IC5.



**Spectre 45 :** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (1,40-5,40 ppm) du composé IC5.

L'étude de spectre HSQC (Spectre 46) permet de positionner le C-2 ( $\delta c = 35$  ppm), C-3 ( $\delta c = 69,1$  ppm), C-4 ( $\delta c = 72,6$  ppm), C-5 ( $\delta c = 70,6$  ppm) et C-6 ( $\delta c = 37,7$  ppm).



**Spectre 46 :** HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (1,50-5,50 ppm) du composé IC5.

L'examen du spectre HMBC (Spectre 47) permet de localiser le C-1 à  $\delta c = 82,4$  ppm grâce à sa corrélation avec les protons H-3 et H-5. Par ailleurs, la corrélation entre le H-5 et le C-9'' impose de mettre un groupement caféoyle en position C-5. Une tache de corrélation également apparait entre H-6ax et C-9'. L'étalement du spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 48) montre l'ensemble des carbones de l'acide quinique.



**Spectre 47 :** HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), étalé (1,60-5,40 ppm) du composé IC5.



**Spectre 48 :** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz), étalé (34-84 ppm) du composé IC5.

Les valeurs des déplacements chimiques des H-3, H-4 et C-1, l'absence de corrélation entre H-3 ou H-4 et C -9' et par comparaison avec la littérature (**Danino** *et al.*, **2009** ; **Xiao-Wei** *et al.*, **2015**), les groupements caféoyles sont en position C-1 et C-5, par conséquent, la structure du composé IC5 est l'acide-1,5-di-*O*-caféoylquinique (Figure III.8).

Ce composé est précédemment isolé par Trendafilova de la même espèce *Inula conyza* (**Trendafilova** *et al.*, **2020a**).



Figure III. 8: Acide-1,5-di-O-caféoylquinique.

Les données des résultats RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont réunis dans le tableau III.5.

Tableau III. 5 : Données de	e la spectroscopie RMN	<sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé IC5.
-----------------------------	------------------------	---

Position	$\delta_{\rm H}$ (ppm), intégration,	δ <sub>C</sub> (ppm)
	multiplicité, J (Hz)	
1	-	82,4
2ax	2,49 (1H ; m)	35,0
2eq	2,17 (1H ; dl ; 12 Hz)	
3	4,00 (1H ; d ; 3,1 Hz)	69,1
4	3,51 (1H ; m)	72,6
5	5,24 (1H ; td ; 8,9 ; 4,3 Hz)	70,6
6ax	2,33 (1H ; dl ; 9,6 Hz)	37,7
6eq	1,79 (1H ; dd ; 12 Hz)	
7	-	173,5

Position	δ <sub>H</sub> (ppm), intégration,	δ <sub>C</sub> (ppm)
	multiplicité, J (Hz)	
1'	-	126,0
2'	7,02 (1H ; d ; 1,5 Hz)	114,8
3'	-	145,9
4'	-	148,8
5'	6,74 (1H ; d ; 8,2 Hz)	116,0
6'	6,90 (1H ; dd ; 8,2 ; 1,5 Hz)	120,5
7'	7,38 (1H ; d ; 15,9 Hz)	143,5
8'	6,16 (1H ; d ; 15,9 Hz)	116,4
9'	-	165,2
1"	-	125,6
2"	7,07 (1H ; d ; 1,5 Hz)	114,8
3"	-	145,9
4"	-	148,1
5"	6,74 (1H ; d ; 8,2 Hz)	115,9
6"	6,95 (1H ; dd ; 8,2 ; 1,5 Hz)	121,5
7"	7,45 (1H ; d ; 15,9 Hz)	144,9
8"	6,24 (1H ; d ; 15,9 Hz)	114,6
9"	-	166,5

**Tableau III. 5 (Suite) :** Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé IC5.

# **III.2.** Résultats des activités biologiques de l'espèce *Inula conyza* :

# III.2.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :

La teneur en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes totaux des extraits de l'espèce *Inula conyza* a été évaluée en basant sur les équations obtenues à partir des courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine (Figure III.9 et III.10).

Les résultats sont exprimés par milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g**) pour la teneur en polyphénols. La teneur en flavonoïdes est exprimée par milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (**mg EQ/g**).



Figure III. 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



Figure III. 10: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats collectés dans le tableau III.6 révèlent que l'extrait acétate d'éthyle possède le taux le plus élevé en composés polyphénoliques ( $693,29\pm5,00$  mg EAG/g d'extrait) et également en flavonoïdes ( $280,17\pm3,18$  mg EQ/g d'extrait) par rapport l'extrait butanolique ( $491,73\pm10,39$  mg EAG/g d'extrait et  $174,50\pm3,03$  mg EQ/g d'extrait). Par ailleurs, l'extrait CHCl<sub>3</sub> ne montre aucune réaction vis-à-vis les réactifs utilisés pour les deux dosages testés.

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
Chloroforme	NA	NA
Acétate d'éthyle	693,29±5,00	280,17±3,18
<i>n</i> -Butanol	491,73±10,39	174,50±3,03

**Tableau III. 6 :** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce *I. conyza*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3). NA : non absorbé

#### III.2.2. Évaluation du potentiel antioxydant :

La détermination des activités biologiques des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*butanol a été estimée par cinq méthodes : DPPH, ABTS,  $\beta$ -Carotène, CUPRAC et le pouvoir réducteur, dont les résultats sont représentés dans le tableau III.7.

Parmi les trois extraits testés, l'extrait acétate d'éthyle a montré une excellente activité lors des essais anti-radicalaire utilisés (DPPH, ABTS et  $\beta$ -Carotène) avec des CI<sub>50</sub>=19,74±0,39 ; 5,94±0,03 et 1,17±0,01 µg/mL respectivement. L'extrait butanolique a également montré des valeurs considérables avec les mêmes essais (CI<sub>50</sub>=34,50±0,28 ; 10,55±0,25 et 2,45±0,08 µg/mL respectivement), par contre, l'extrait chloroformique possède une activité beaucoup moins importante que celles des deux autres extraits.

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont également montré une bonne capacité de réduction vis-à-vis des cations ferriques (pouvoir réducteur) ainsi que cuivriques (CUPRAC) avec une légère supériorité pour l'extrait AcOEt par rapport aux standards utilisés (Tableau III.7) alors que l'extrait chloroformique montre des concentrations  $A_{0.50}$  supérieures à 200 µg/mL pour les deux activités.

L'extrait AcOEt possède une activité presque identique à celle du standard BHT utilisé dans les tests  $\beta$ -Carotène (CI<sub>50</sub>= 1,05±0,01µg/mL) et CUPRAC (A<sub>0.50</sub> = 8,97±3,94µg/mL), et une activité deux fois plus importante que celle du  $\alpha$ -tocophérol (A<sub>0.50</sub> = 34,93±2,38µg/mL) dans le test du pouvoir réducteur. Il est a noté également que l'extrait *n*-BuOH montre une capacité antioxydante remarquable par rapport aux standards cités.

Les puissants résultats obtenus de l'extrait AcOEt ne peuvent être expliqués que par sa richesse en composés phénoliques et flavoniques comme les dosages réalisés l'apparient. Cette

forte activité est probablement due aux flavonoïdes et l'acide phénolique isolés de cet extrait : axilarine, axillaroside et l'acide-1,5-di-O-caféoylquinique qui ont montré des activités antioxydantes puissantes (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2004 ; Hu *et al.*, 2017 ; Trendalifova *et al.*, 2020a).

Extraits	DPPH	ABTS	β-Carotène	Pouvoir Réducteur	CUPRAC
		CI <sub>50</sub> (µg/mL)	)	A <sub>0.50</sub> (	μg/mL)
Chloroforme	>200	180,53±0,82	10,06±0,72	>200	>200
Acétate d'éthyle	19,74±0,39	5,94±0,03	1,17±0,01	11,20±0,69	8,59±0,17
<i>n</i> -Butanol	34,50±0,28	10,55±0,25	2,45±0,08	20,48±0,61	12,14±0,46
ВНА	6,14±0,41	1,81±0,10	0,90±0,02	NT	6,62±0,05
BHT	12,99±0,41	1,29±0,30	1,05±0,01	NT	8,97±3,94
α-Tocophérol	NT	NT	NT	34,93±2,38	NT
Acide ascorbique	NT	NT	NT	6,37±0,42	NT

Tableau III. 7 : Résultats des activités antioxydantes testés des extraits d'I. conyza.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3). NT : non testé.

### III.2.3. Activité anti-cholinestérase :

L'activité anti-cholinestérase a servi de déterminer la capacité des extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH à inhiber les enzymes AChE et BChE (Tableau III.8).

L'extrait chloroforme montre une capacité d'inhibition contre la BChE à une concentration  $CI_{50}= 140,20\pm1,11\mu$ g/mL cependant, l'extrait acétate d'éthyle montre une activité négligeable dont la concentration est supérieure à 200 µg/mL, alors que l'extrait *n*-butanol est inactif.

L'extrait chloroformique montre également une très faible activité contre l'enzyme AChE dont la concentration dépasse 200  $\mu$ g/mL, par ailleurs, aucun des extraits acétate d'éthyle et butanolique n'est actif.

	AChE	BChE
Extraits	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
Chloroforme	>200	140,20±1,11
Acetate d'éthyle	NA	>200
<i>n</i> -Butanol	NA	NA
Galantamine	6,27±1,15	34,75±1,99

Tableau III. 8 : Les valeurs des CI<sub>50</sub> de l'activité anti-cholinestérase des extraits d'I. conyza.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3) NA : non absorbé.

Une étude biologique ultérieure réalisée par **Trendafilova** *et al.* (**2020a**) a également présenté des activités biologiques modérées de l'extrait méthanolique des fleurs et des feuilles de l'espèce *I. conyza*. La teneur en polyphénols de notre extrait acétate d'éthyle est sept fois plus importante que celle trouvée par l'étude citée (96,87±0,85 mg EAG/g d'extrait MeOH des fleurs).

Notre extrait AcOEt possède presque la même activité DPPH que leur extrait MeOH des feuilles (21,89±0,32  $\mu$ g/mL), alors que notre extrait *n*-BuOH possède une double capacité antioxydante de l'activité DPPH que celle de leur extrait MeOH des fleurs (68,58±0,52  $\mu$ g/mL).Nos extraits ainsi que les siens montrent une faible activité contre l'enzyme AChE.

Le taux des composés bioactifs dans les plantes varie en fonction de plusieurs facteurs notamment : la période de récolte, les conditions de stockage, génétiques, environnementales ou climatiques, la méthode d'extraction, le type d'espèces réactives ainsi que le protocole des méthodes utilisées. Tous ces facteurs affectent la composition phytochimique des plantes (Aires. 2015).

III.3. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea incana* :
III.3.1. Détermination structurale des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle :
III.3.1.1. Détermination structurale du composé CI-1 :



Le composé CI-1 a été isolé sous forme d'un précipité jaune, sa fluorescence violette sous lumière de Wood oriente vers une flavone ou un flavonol substitué en position C-3.

L'examen simultané des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 49 et 50), COSY (Spectre 51) et HSQC (Spectre 52) confirme qu'il s'agit d'un flavonoïde caractérisé par :

-Un doublet (J = 8 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{H} = 7,90$  ppm, ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à  $\delta_{C} = 129,4$  ppm, attribuable aux protons H-2'et H-6'.

-Un doublet (J = 8 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{\rm H} = 6,98$  ppm, ce dernier montre une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_{\rm C} = 117$  ppm, qu'on peut attribuer aux protons H-3', H-5'.

-Ces deux signaux corrèlent entre eux également sur le spectre COSY, confirmant ainsi la parasubstitution du noyau B.

-Deux singulets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\rm H}$ = 6,65 ppm et 6,62 ppm, attribuables à H-3 et H-6 ou alors à H-3 et H-8. On remarque sur le spectre HSQC des taches de corrélation entre ces protons et leurs carbones correspondants à  $\delta_{\rm C}$ = 103 ppm et 95,3 ppm. Vu les valeurs des déplacements chimique de ces carbones ainsi que la comparaison avec la littérature permet l'attribution de ces carbone aux C-3 et C-8 respectivement (**Salama** *et al.*, **2011 ; Bicha** *et al.*, **2013b ; Aly. 2016**), par conséquent, les protons à  $\delta_{\rm H}$ = 6,65 ppm et 6,62 ppm sont attribuables aux H-3 et H-8 respectivement.

-Un signal sous forme d'un singulet, intégrant de 3H, à  $\delta_H$  = 3,93 ppm ( $\delta_C$  = 60,9 ppm) caractéristique d'un groupement méthoxyle qui montre sur l'étalement du spectre HMBC

(Spectre 53), une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_{\rm C} = 132,9$  ppm, attribuable à C-6, ce qui nous permet de mettre le groupement méthoxyle en position C-6.



Spectre 49 : RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, ppm) du composé CI-1.



Spectre 50 : RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,30-8,50 ppm) du composé CI-1



Spectre 51 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CI-1.



Spectre 52 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), du composé CI-1.



**Spectre 53 :** HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,00-4,50 ppm) du composé CI-1.

L'analyse de spectre HMBC (Spectre 54 et 55) permet l'attribution des carbones quaternaires comme suit :

-Le carbone C-2 à  $\delta c = 166,4$  ppm, grâce à sa corrélation avec H-3 et H2', H-6'.

-Le C-1' résonant à  $\delta c = 123,3$  ppm, grâce à sa corrélation avec le H-3, H-3' et H-5'.

-Le C-4' à  $\delta c = 162,7$  ppm grâce à sa corrélation avec le H2', H-6'ainsi qu'avec le H-3', H-5'.

-Le groupement carbonyle C-4 à  $\delta c = 184,3$  ppm vu la valeur de son déplacement chimique, ainsi que sa corrélation avec le H-3 et H-8.

-Les protons H-3 et H-8 corrèlent avec le carbone à  $\delta c = 105,8$  ppm, qui ne peut être que le C-10.

-L'apparition des taches de corrélations entre le H-8 et les atomes de carbone à  $\delta c = 154$  ppm, 154,7 ppm et 158,8 ppm, permet l'attribution de C-5, C-9 et C-7 respectivement.

-Une tache de corrélation confirmative entre H-8 et C-6.



Spectre 54 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,80-7,90 ppm) du composé CI-1.



**Spectre 55 :** HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,10-6,85 ppm) du composé CI-1.

Les informations extraites des spectres RMN 2D, HSQC et HMBC, permet de positionner les atomes de carbones sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 56).



Spectre 56 : RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) du composé CI-1.

L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec celles de la littérature (**Salama** *et al.*, **2011 ; Bicha** *et al.***, <b>2013b ; Aly. 2016**), nous permet d'identifier le composé CI-1 comme étant le 4',5,7-trihydroxy-6-méthoxyflavone ou le 6-méthoxyapigénine, connu sous le nom d'hispiduline (Figure III.11), antérieurement séparé de la même espèce par **Akkal** *et al.* (**1997**).



Figure III. 11: Hispiduline.

L'ensemble des résultats RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C sont rassemblés dans le tableau III.9.

Position	$\delta_{\rm H}$ (ppm), intégration,	δ <sub>C</sub> (ppm)	
	multiplicité, J (Hz)		
2	-	166,4	
3	6,65 (1H ; s)	103,0	
4	-	184,3	
5	-	154,0	
6	-	132,9	
7	-	158,8	
8	6,62 (1H ; s)	95,3	
9	-	154,7	
10	-	105,8	
1'	-	123,3	
2',6'	7.90 (2H ; d ; 8 Hz)	129,4	
3',5'	6,98 (2H ; d ; 8 Hz)	117,0	
4'	-	162,7	
6-OCH <sub>3</sub>	3,93 (3H ; s)	60,9	

Tableau III. 9 : Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé CI- 1.

#### III.3.1.2. Détermination structurale du composé CI2 :



Le composé CI2 a été séparé sous forme de précipité jaune. La fluorescence jaune de ce produit sous lumière de Wood ( $\lambda = 365$  nm) est caractéristique d'un flavonol (3-OH libre).

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 57) enregistré dans le CD<sub>3</sub>OD montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde reconnaissable par :

Deux doublets, intégrants 2H chacun à  $\delta_{\rm H}$ = 8,09 ppm et 6,90 ppm (*J* = 8,9 Hz), attribuables aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Le spectre COSY (Spectre 58) montre une tache de corrélation entre ces deux signaux, ce qui confirme le couplage ortho entre les protons du noyau B.

Revenons au spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 57), on remarque un signal sous forme d'un singulet à  $\delta_{\rm H}$ = 6,50 ppm, d'intégration 1H attribuable à H-6 ou H-8. Toutefois, le spectre HSQC (Spectre 60) montre que ce proton est corrélé au carbone dont le signal apparait à  $\delta_{\rm C}$  = 93,3 ppm, selon la valeur du déplacement chimique de ce carbone, il ne peut être attribué qu'au carbone C-8 (**Umadevi** *et al.*, **2005**), de ce fait, ce proton sera attribué à H-8.

Sur le même spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 57), il apparait un singulet à  $\delta_H$  = 3,88 ppm, d'intégration 3H indique la présence d'un groupement méthoxyle qui corrèle à son tour sur le spectre HMBC (Spectre 59), avec un atome de carbone résonant à  $\delta_C$  = 130,8 ppm, caractéristique du carbone en position C-6.



**Spectre 57 :** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, ppm) du composé CI2.



Spectre 58 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CI2.



Spectre 59 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,40-4,40 ppm) du composé CI2.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 60) permet d'attribuer les atomes de carbones à leurs protons correspondants :

-Les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' corrèlent avec les carbones résonants à  $\delta c = 129,3$  ppm et 114,9 ppm, qui ne peuvent être que le C-2', C-6' et le C-3', C-5' respectivement.

-Les protons du groupement méthoxyle corrèlent avec leur carbone à  $\delta c = 50,5$  ppm.



Spectre 60 : HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,40-4,40 ppm) du composé CI2.

L'examen du spectre HMBC (Spectre 61) mène à la localisation des carbones quaternaires ainsi :

-Le H-8 permet l'attribution des signaux à  $\delta c = 103,5$  ppm, 130,8 ppm, 151,6 ppm, 152,2 ppm, 157,1 ppm et 176,2 ppm, aux carbones C-10, C-6 (précédemment identifié), C-5, C-9, C-7 et C-4 respectivement.

-Le C-4' à  $\delta c = 159,2$  ppm, grâce à sa corrélation avec les protons H-2', H-6' et H-3', H-5'.

-Les protons H-3', H-5' corrèlent avec l'atome de carbone à  $\delta c = 122,3$  ppm, caractéristique du C-1'.

-Les protons H-2', H-6' montrent une tache de corrélation avec le carbone résonant à  $\delta c = 146,9$  ppm, qui ne peut être que le C-2.



Spectre 61 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (3,60-8,20 ppm) du composé CI2.

Sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 62), figurant un signal en plus des carbones déjà identifié, à  $\delta c = 135,4$  ppm, il ne peut être que le C-3, la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygené, et comme la fluorescence de ce composé est jaune sous lumière de Wood, cette oxygénation ne peut être qu'un groupement hydroxyle (3-OH).



Spectre 62 : RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) du composé CI2.

On peut conclure que le composé CI2 est le 4',5,7-trihydroxy-6-méthoxyflavonol connu sous le nom 6-méthoxy kaempférol (Figure III.12), précédemment isolé de la même espèce par **Akkal** *et al.* (1997), dont les résultats de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C sont réunis dans le tableau III.10.



Figure III. 12 : Le 6-méthoxy kaempférol.

Position	δ <sub>H</sub> (ppm), intégration,	<b>ð</b> с ( <b>ppm</b> )
	multiplicité, J (Hz)	
2	-	146,9
3	-	135,4
4	-	176,2
5	-	151,6
6	-	130,8
7	-	157,1
8	6,50 (1H ; s)	93,3
9	-	152,2
10	-	103,5
1'	-	122,3
2',6'	8,09 (2H ; d ; 8,9 Hz)	129,3
3',5'	6,90 (2H ; d ; 8,9 Hz)	114,9
4'	-	159,2
6-OCH3	3,88 (3H ; s)	59,5

**Tableau III. 10 :** Résultats de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C relatives au composé CI2.

### III.3.1.3. Détermination structurale du composé CI3 :



Le composé CI3 a été séparé sous forme d'une poudre amorphe. L'examen des spectres RMN <sup>1</sup>H (Spectre 63 et 64) montre la présence d'un noyau aromatique para substitué. En effet, l'étude simultanée des spectres RMN <sup>1</sup>H, HSQC (Spectre 65) et COSY (Spectre 66) permet de tirer les indications suivantes :

-Un doublet (J = 8,5 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{H} = 6,92$  ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{C} = 129,4$  ppm attribuable à H-3, H-5.

-Un doublet (J = 8,5 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 6,60$  ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{\text{C}} = 114,7$  ppm attribuable à H-2, H-6.

Ces résultats sont en bon accord avec l'expérience COSY (Spectre 66) qui montre des taches de corrélation entre ces protons.

-Un triplet (J = 7,2 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{H} = 3,58$  ppm, ce signal corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_{C} = 63,1$  ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et de leur carbone indiquent clairement qu'il s'agit d'un CH<sub>2</sub> oxygéné attribuable à CH<sub>2</sub> qu'on va noter 8.

-Un autre triplet (J = 7,2 Hz) d'intégration 2H à  $\delta_{H} = 2,61$  ppm qui corrèle avec le carbone à  $\delta_{C}$ = 38 ppm. Vu les valeurs de ces déplacement chimique, il ne peut être qu'un CH<sub>2</sub> benzylique. De ce fait, ce CH<sub>2</sub> est porté par le cycle aromatique, ce qui permet son attribution à CH<sub>2</sub> noté 7.

La mesure de l'expérience COSY (Spectre 66) représente des taches de corrélations entre les protons de ces deux groupements indiquant qu'ils sont voisins.



**Spectre 63:** RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé CI3.



Spectre 64: RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (2,35-3,70 ppm) du composé CI3.



Spectre 65: HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CI3.



Spectre 66 : COSY (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) du composé CI3.

L'examen du spectre RMN <sup>13</sup>C (Spectre 67) confirme ces résultats et montre la présence de deux autres signaux dont :

-Un carbone quaternaire aromatique portant un groupement hydroxyle à  $\delta_C = 155,4$  ppm attribuable à C-1.

-Le second quaternaire aromatique à  $\delta_{\rm C} = 129,5$  ppm, qui ne peut être que le C-4.



Spectre 67 : RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) du composé CI3.

L'analyse des corrélations du spectre HMBC (Spectre 68 et 69) confirme le positionnement des atomes établi :

-Les protons H-3 et H-5 corrèlent avec les carbones à  $\delta_C$  = 38 ppm, 129,5 ppm et 155,4 ppm, confirment le positionnement de C-7, C-4 et le C-1 respectivement.

-Les protons H-2 et H-6 montrent trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_{\rm C} = 129,4$  ppm, confirme les carbones C-3 et C-5.
- La deuxième avec le carbone à  $\delta_{\rm C} = 129,5$  ppm, confirme le C-4.
- La troisième avec le carbone à  $\delta_C = 155,4$  ppm, confirme le C-1.

-Le H-8 montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_{\rm C} = 38$  ppm, confirme le C-7.
- La deuxième avec le carbone à  $\delta_C = 129,4$  ppm, confirme les carbones C-3 et C-5.
- La troisième avec le carbone à  $\delta_C = 129,5$  ppm, confirme le C-4.

-Le H-7 corrèle avec les carbones à  $\delta_C = 63,1$  ppm, 129,4 ppm, 129,5 ppm, confirmant les carbones C-8, C-3, C-5 et C-4 respectivement.



Spectre 68 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (6,15-7,15 ppm) du composé CI3.



Spectre 69 : HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), étalé (2,1-4,1 ppm) du composé CI3.

L'ensemble de ces données spectrales et la comparaison avec les données de la littérature (**Yadav** *et al.*, **2019**) montre qu'il s'agit de 4(2-hydroxyéthyle) phénol, connu sous le nom de tyrosol (Figure III.13). L'ensemble des résultats de la RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont réunis dans le tableau III.11.



Figure III. 13 : Le tyrosol.

Position	δн (ppm), intégration, multiplicité, <i>J</i> (Hz)	δc ( <b>ppm</b> )
1	-	155,4
2,6	6,60 (2H, d ; 8,5 Hz)	114,7
3,5	6,92 (2H, d ; 8,5 Hz)	129,4
4	-	129,5
7	2,61 (2H ; t ; 7,2 Hz)	38,0
8	3,58 (2H ; t ; 7,2 Hz)	63,1

**Tableau III. 11 :** Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé CI3.

III.3.1.4. Détermination structurale du composé CI4 :



Ce composé a été séparé sous forme d'un précipité jaune pâle, de fluorescence noireviolette sous lumière de Wood oriente vers une flavone ou un flavonol 3-OR.

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H et son étalement (Spectre 70 et 71) indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par :

-Un singulet à  $\delta_H = 6,79$  ppm intégrant d'un proton, correspond à H-3.

-Deux doublets d'intégration 1H chacun, l'un à  $\delta_{\rm H} = 6,19$  ppm et l'autre à 6,49 ppm (J = 2 Hz) attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.

-Deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\rm H} = 6,93$  ppm et l'autre à 7,94 ppm avec une constante de couplage J = 8,7 Hz indiquant un couplage ortho, attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement, confirmant la para-substitution du noyau B.

-Un singulet à  $\delta_H$  = 12,97 ppm, d'intégration 1H, caractéristique d'un groupement hydroxyle en position 5.



Spectre 70 : RMN <sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ , 250 MHz,  $\delta$  ppm) du composé CI4.



**Spectre 71 :** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250MHz), étalé (6,00-8,00ppm) du composé CI4.

L'ensemble de ces données présente une flavone 4',5,7-trihydroxyflavone, connu sous le nom d'apigénine (**aly. 2016**) dont la structure est présentée dans la figure III.14, Alors que les données spectrales de la RMN <sup>1</sup>H sont collectées dans le tableau III.12.

L'apigénine a été largement isolée de plusieurs espèces du genre *Centaurea* (Bentamene et al., 2007 ; Hammoud et al., 2012 ; Kolli et al., 2012 ; Kitouni et al., 2015).



Figure III. 14: Apigénine.

Position	<b>бн (ppm)</b>	Intégration	Multiplicité J (Hz)
3	6,79	1H	S
6	6,19	1H	d (2 Hz)
8	6,49	1H	d (2 Hz)
2', 6'	7,94	2H	d (8,7 Hz)
3', 5'	6,93	2H	d (8,7 Hz)
5-OH	12,97	1H	S

### III.3.1.5. Détermination structurale du composé CI5 :



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, sa fluorescence noire-violette sous lumière de Wood indique un squelette de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre 72) ainsi que le spectre étalé (Spectre 73) montre la présence d'un flavonoïde de type flavone par des signaux caractéristiques :

-Un singulet à  $\delta_H = 6,69$  ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui confirme la structure de type flavone.

-Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\rm H} = 6,20$  ppm et le second à  $\delta_{\rm H} = 6,46$  ppm avec une constante de couplage J = 2 Hz (couplage méta), correspondant à H-6 et H-8 respectivement, indiquant ainsi un noyau A disubstitué en position C-5 et C-7.

-Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  = 6,90 ppm avec une constante de couplage J = 8,2 Hz indiquant un couplage ortho attribuable à H-5'.

-Un signal sous forme d'un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  = 7,40 ppm (*J* = 8,2 ; 2 Hz), attribuable à H-6'.

-Un signal d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H} = 7,44$  ppm, résonant sous forme d'un doublet avec une constante de couplage J = 2 Hz, indiquant un couplage méta attribuable à H-2'.

-Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  = 12,99 ppm, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.



Spectre 72 : RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250 MHz) du composé CI5.


**Spectre 73 :** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250 MHz), étalé (6,00-7,60 ppm) du composé CI5.

L'ensemble de ces données spectrales et par comparaison avec la littérature (**Lin et al., 2015**) indique que le composé CI5 est une flavone 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone connue sous le nom de lutéoline (Figure III.15) dont les données spectrales de la RMN <sup>1</sup>H sont collectées dans le tableau III.13.

La lutéoline a été précédemment isolée du genre Centaurea (Kolli et al., 2012).



Figure III. 15 : Lutéoline.

#### Chapitre III. Résultats et Discussion

Position	<b>б</b> н ( <b>ppm</b> )	Intégration	Multiplicité J (Hz)
3	6,69	1H	S
6	6,20	1H	d (2 Hz)
8	6.46	1H	d (2 Hz)
2'	7.44	1H	d (2 Hz)
5'	6,90	1H	d (8,2 Hz)
6'	7.40	1H	dd (8,2 ; 2 Hz)
5-OH	12,99	1H	S

**Tableau III. 13 :** Résultats de spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé CI5.

#### III.3.2. Analyse chromatographique par GC-MS de l'extrait chloroforme de C. incana :

L'identification des composés a été effectuée par comparaison des indices de rétention et des spectres de référence d'une banque de données gérée dans un système informatique. Les composés identifiés sont cités dans le tableau III.14 et la figure III.16 par ordre d'élution. L'analyse de l'extrait chloroforme de *C. incana* a permis l'identifier 28 constituants qui correspond à 79,13 % de la totalité de cet extrait.

L'extrait chloroforme de l'espèce *Centaurea incana* collectée de la région de Djelfa est composé principalement de lignanes représenté par l'arctigénine (ATG ; 33,97 %), d'alcools (19,06 %), de terpènes (10,49 % dont 2,36 % étaient des sesquiterpènes), d'alcanes (4,02 %), d'acides (1,49 %) et des composés hétérocycliques (10,10 %).

En plus du produit majoritaire (ATG), les composés les plus abondant dans l'extrait chloroforme étaient également l'alcool trans-coniférylique (12,56 %), le loliolide (7,26 %), l'alcool cis-sinapylique (5,40 %) et l'isovanilline (4,58 %). Les spectres de masse de ces composés enregistrés par GC-MS sont représentés dans les figures III.17 et III.18.

Les lignanes sont largement distribués dans le règne végétal, ils se trouvent dans plus de 70 familles (**Pan et al., 2009**). L'arctigénine est antérieurement isolé à partir de plusieurs espèces du genre *Cen0ijtaurea* (**Bruno et al., 1991 ; Marco et al., 1992 ; Celik et al., 2006 ; Shoeb et al., 2006 ; Djeddi et al., 2008, Güzel. 2020**). Ce lignane a montré ainsi des effets antiviraux et anticancéreux intéressant (**Cui et al., 2020**)

N°	TR	IR	Composés	0⁄2
de pic		ш	Composes	70
01	3,110	746	Méthyldiéthyle carbinol	0,12
02	20,263	842	Éthylméthylmaleimide	0,39
03	21,008	1259	Acide-α-Toluique	0,27
04	26,194	1377	p-Oxybenzaldéhyde	0,66
05	26,983	1395	Trans-sobrerol	0,24
06	27,860	1416	Isovanilline	4,58
07	28,962	1443	3-(Hydrazinylméthyle) Phénol	0,70
08	29,693	1461	Alpha-Chamigrène	0,97
09	34,809	1590	Acide vanillique	0,41
10	38,697	1695	Syringaldéhyde	1,79
11	39,789	1725	3-Hydroxy-5,6-époxy-β-ionone	
12	41,621	1777	Alcool trans-Coniféryle	12,56
13	42,712	1809	Loliolide	7,26
14	42,941	1816	Acide acétylsyringique, méthylester	0,81
15	43,542	1833	Vomifoliol	1,39
16	48,549	1987	5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-	1,86
			1H,6H-dipyrrolo[1,2-a :1',2'-	
			d]pyrazine	
17	49,327	2011	Scopolétine	0,82
18	50,491	2049	Alcool cis-sinapylique	5,40
19	65,498	2596	Hexacosane	0,39
20	68,102	2704	Heptacosane	0,46
21	69,496	2764	(E)-3,3'-diméthoxy-4,4'-	0,28
			dihydroxystilbène	
22	70,617	2812	Octacosane	0,78
23	72.042	2020	Nonacosane	0.80
	/3,043	2920	ronacosane	0,00
24	73,043	3028	Triacontane	0,54
24 25	73,043 75,379 77,653	3028       3137	Triacontane       Hentriacontane	0,54 0,34

**Tableau III. 14 :** Composition chimique identifiée par GC-MS de l'extrait chloroforme de l'espèce *Centaurea incana*.

N° de pic	TR	IR	Composés	%
26	79,832	3245	Dotriacontane	0,23
27	80,339	3270	Arctigénine (ATG)	33,97
28	81,959	3300	Tritriacontane	0,48
Total des c	79,13%			
Lignanes		33,97%		
Terpènes		10,49%		
Alcools		19,06%		
Alcanes	4,02%			
Acides	1,49%			
Autre composés (composés hétérocyclique)				

**Tableau III. 14 (Suite) :** Composition chimique identifiée par GC-MS de l'extrait

 chloroforme de l'espèce *Centaurea incana*.

<sup>a</sup>TR Temps de rétention

<sup>b</sup>IR (indice de rétention) mesuré relativement à n-alcanes (C7-C33)







Figure III. 17 : Spectres de masse de l'isovanilline, l'alcool trans-coniféryle et du loliolide de l'extrait chloroforme.



Figure III. 18 : Spectres de masse de l'alcool cis-sinapylique et d'arctigénine de l'extrait chloroforme.

# III.4. Résultats des activités biologiques de l'espèce Centaurea incana :

#### III.4.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de la plante *Centaurea incana* sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) et par milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g) respectivement.

Les résultats obtenus par ces dosages, reportés dans le tableau III.15, montrent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols (713,33±0,00 mg EAG/g d'extrait), ainsi qu'en flavonoïdes (450,83±4,96 mg EQ/g d'extrait), suivi par l'extrait *n*-BuOH (406,44±2,04 mg EAG/g d'extrait et 151,33±1,42mg EQ/g d'extrait), cependant, l'extrait

#### **Chapitre III. Résultats et Discussion**

chloroformique contient 187,11 $\pm$ 0,38 mg EAG/g d'extrait en polyphénols et 9,67 $\pm$ 1,01 mg EQ/g d'extrait en flavonoïdes.

Nos résultats sont largement supérieurs à ceux trouvés par une étude antérieure réalisée en 2021 (**Boubellouta** *et al.*, **2021**) dont ces teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique est de 15,056±0,016 mg EAG/g d'extrait et 12,782±0,027 mg EQ/g d'extrait respectivement.

Tableau III. 15 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce C. incana.

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
Chloroforme	187,11±0,38	9,67±1,01
Acétate d'éthyle	713,33±0,00	450,83±4,96
n-Butanol	406,44±2,04	151,33±1,42

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3)

#### III.4.2. Évaluation du potentiel antioxydant :

Afin d'évaluer la capacité antioxydante des trois extraits de *Centaurea incana*, six méthodes différente ont été exploitées : DPPH, ABTS, GOR, CUPRAC, pouvoir réducteur et phenanthroline.

D'une part, l'extrait acétate d'éthyle a montré la meilleure activité anti radicalaire dans les trois tests utilisés : DPPH, ABTS et GOR à des CI<sub>50</sub> égale à 14,16±0,06 ; 8,93±0,02 et 5,55±0,06 µg/mL respectivement. Ces valeurs sont assez proches des standards utilisés dont les valeurs des CI<sub>50</sub> sont comme suit : 12,99±0,41 µg/mL pour le BHT (DPPH) et 5,38 ±0,06 µg/mL pour le BHA (GOR). À l'exception du test ABTS où la valeur de CI<sub>50</sub> de l'extrait AcOEt (8,93±0,02 µg/mL) est cinq fois inférieure à celle du BHA (1,81±0,10 µg/mL).

Par ailleurs, les deux autres extraits : CHCl<sub>3</sub> et *n*-BuOH ont des CI<sub>50</sub> modérés pour les même tests DPPH, ABTS et GOR (Tableau III.16).

De l'autre part, le même extrait AcOEt présente la plus puissante capacité de réduire les complexes formés lors de chacune des méthodes testés : CUPRAC, pouvoir réducteur et phenanthroline à des concentrations  $A_{0.50}=14,86\pm0,05$ ;  $9,59\pm0,32$  et  $4,11\pm0,02$  µg/mL respectivement.

#### **Chapitre III. Résultats et Discussion**

Les extraits CHCl<sub>3</sub> et *n*-BuOH ont des capacités réductrices presque identique pour le test CUPRAC (20,33±0,38 et 20,22±0,07  $\mu$ g/mL respectivement) et phenanthroline (6,85±0,04 et 6,77±0,09  $\mu$ g/mL respectivement).

Concernant la méthode de pouvoir réducteur, l'extrait butanolique est deux fois plus efficace que l'extrait chloroformique à des concentrations  $A_{0.50}$ = 40,36±0,28 et 83,56±0,80 µg/mL respectivement.

Le travail réalisé par **Boubellouta** *et al.* (2021) présente des résultats assez différents de ceux qu'on a trouvés dans de ce présent travail. L'activité anti radicalaire DPPH de leur extrait MeOH ( $CI_{50}=87,51\pm0,42 \mu g/mL$ ) est moins importante que celles de nos extraits. Cependant, la capacité de réduction de leur extrait ( $A_{0.50}=0,161\pm0,027 \mu g/mL$ ) est beaucoup plus élevé par rapport à nos extraits testés en utilisant la méthode de pouvoir réducteur. L'activité anti radicalaire ABTS ne peut pas être comparée car leurs résultats sont exprimés en capacité antioxydante équivalente au trolox (CAET) égale à  $0,07\pm0,002$  CAET.

Cette variété des résultats est due probablement à plusieurs facteurs ainsi que la méthode, le solvant d'extraction utilisée, la situation géographique, la période de récolte et les procédures des activités utilisées.

Les résultats de toutes les activités antioxydantes testées sont en accord que l'extrait acétate d'éthyle est un excellent agent antioxydant, confirmant ses taux élevés en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes, ces derniers sont caractérisés par leurs propriétés antioxydantes puissantes, d'ailleurs c'est l'une de leur propriétés les plus appréciées (**Kurek-Górecka** *et al.*, **2014**). Ces forts résultats de l'extrait acétate d'éthyle sont probablement dus à l'apigénine et la lutéoline isolés de cet extrait (**Hu** *et al.*, **2017**).

Extraits	DPPH	ABTS	GOR	Pouvoir Réducteur du Fer	Phenanthr -oline	CUPRAC
		$CI_{50}$ (µg/mL)			$A_{0.50}(\mu g/mL)$	)
Chloroforme	64,95±0,32	23,09±0,16	74,83±0,15	83,56±0,80	6,85±0,04	20,33±0,38
Acétate d'éthyle	14,16±0,06	8,93±0,02	5,55±0,06	14,86±0,05	4,11±0,02	9,59±0,32
<i>n</i> -Butanol	29,13±0,40	19,86±0,43	16,44±0,13	40,36±0,28	6,77±0,09	20,22±0,07

Tableau III.16 : Résultats des activités antioxydantes testés des extraits de C. incana.

Standards	DPPH	ABTS	GOR	Pouvoir Réducteur du Fer	Phenanthr- oline	CUPRAC
BHA	6,14±0,41	1,81±0,10	5,38 ±0,06	NT	0,93±0,07	6,62±0,05
BHT	12,99±0,41	1,29±0,30	3,32±0,18	NT	2,24±0,17	8,97±3,94
α-Tocophérol	NT	NT	NT	34,93±2,38	NT	NT
Acide ascorbique	NT	NT	NT	6,37±0,42	NT	NT

 Tableau III. 16 (Suite) : Résultats des activités antioxydantes testés des extraits de C.

 incana.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3). NT : non testé

#### III.4.3. Activité anti-cholinestérase :

La détermination de l'activité anti-cholinestérase des extraits a été réalisée par l'utilisation de deux enzymes : AChE et BChE dont les résultats sont reportés dans le tableau III.17.

L'extrait CHCl<sub>3</sub> présente une action active vis-à-vis de la BChE à une concentration  $CI_{50}$ = 81,83±1,16 µg/mL par apport au standard utilisé ( $CI_{50}$  = 34,75±1,99 µg/mL), par ailleurs, les deux autres extraits ne présentent aucune activité. Pour le test AChE, les trois extraits testés ont montré une faible activité avec des valeurs de  $CI_{50}$  supérieures à 200 µg/mL.

Tableau III.17 : Les valeurs des CI<sub>50</sub> de l'activité anti-cholinestérase des extraits de *C. incana*.

	AChE	BChE
Extraits	CI <sub>5</sub>	<sub>0</sub> (μg/mL)
Chloroforme	>200	81,83±1,16
Acétate d'éthyle	>200	NA
<i>n</i> -Butanol	>200	NA
Galantamine	6,27±1,15	34,75±1,99

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3). NA : non absorbé.

# III.5. Résultats de l'étude phytochimique de l'espèce Lathyrus latifolius :

#### **III.5.1. Screening phytochimique :**

Les résultats obtenus par le criblage phytochimique ont montré la présence des stérols, des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes et des terpénoïdes dans tous les extraits. Les saponines étaient plus abondantes dans l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanol, alors que dans l'extrait chloroforme les saponines ont été totalement absentes (Tableau III.18).

 

 Tableau III.18 : Résultats de la caractérisation des composés présents dans les extraits de Lathyrus latifolius.

Composés	Extrait CHCl <sub>3</sub>	Extrait AcOEt	Extrait n-BuOH
Stérols	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+
Saponines	-	+	+
Tanins	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+
Terpénoïdes	+	+	+

#### III.5.2. Analyse chromatographique par LC-ESI/MS :

Une analyse qualitative et quantitative des constituants présents dans les extraits acétate d'éthyle et butanol de *Lathyrus latifolius* a été réalisée par LC-ESI/MS.

Cette méthode a été optimisée, validée et appliquée pour la détermination simultanée de 29 composés phytochimiques dans les deux extraits (Tableau III.19), y compris :

-11 acides phénoliques :acide shikimique, acide gallique, acide protocatéchuique, acide gentisique, 4-acide hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide caféique, acide syringique, acide p-coumarique, acide salicylique et l'acide trans-férulique.

-16 flavonoïdes : taxifoline, querciméritrine, scutellarine, cynarine, hyperocide, quercétine-3glucoside, quercétine-3 -D-xyloside, hespéridine, kaempférol-3-glucoside, fisétine, quercétine, naringénine, kaempférol, tamarixétine, biochanine A, diosgénine.

-Une Coumarine et un hydroxybenzaldéhyde.

#### **Chapitre III. Résultats et Discussion**

En observant les résultats globaux des deux extraits, les quantités des composés les plus significatives sont l'hespéridine (583,31  $\mu$ g/mL), la quercétine-3-D-xyloside (27,467  $\mu$ g/mL), l'acide P-coumarique (12,07  $\mu$ g/mL), l'acide salicylique (11,945  $\mu$ g/mL), l'acide vanilique (8,011  $\mu$ g/mL), l'acide syringique (7,847  $\mu$ g/mL) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (6,395  $\mu$ g/mL).

Nos résultats indiquent que la composition chimique des différents extraits varie qualitativement et quantitativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction. En général, les résultats obtenus lors de ce présent travail sont assez proches de ceux rapportés par les études antérieurs réalisées sur le genre *Lathyrus* (**Ranabahu et Harborne. 1993 ; Bagci et Sahin. 2004**).

N°	Composés	Extrait AcOEt (µg/mL)	Extrait <i>n</i> -butanol ( <u>µg</u> /mL)	TR (min)
01	Acide shikimique	ND	1,080	1,17
02	Acide gallique	0,492	ND	1,60
03	Acide protocatéchuique	0,544	0,009	2,77
04	Acide gentisique	0,392	ND	3,10
05	Acide -4- hydroxybenzoïque	6,395	0,168	4,52
06	4-Hydroxy-benzaldéhyde	0,071	0,019	5,72
07	Acide vanillique	8,011	ND	5,87
08	Acide caféique	1,531	0,257	5,96
09	Acide syringique	7,847	ND	6,98
10	Acide p-coumarique	12,070	1,570	8,47
11	Acide salicylique	11,945	0,525	8,72
12	Taxifoline	0,565	ND	9,55
13	Acide trans-férulique	1,778	0,279	9,54
14	Querciméritrine	0,121	ND	10,68
15	Coumarine	0,212	0,073	10,56
16	Scutellarine	0,048	0,122	11,06
17	Cynarine	0,218	ND	11,29

 Tableau III. 19 : Composés phénoliques identifiés par LC-ESI-MS/MS des extraits de L.

 latifolius.

N°	Composés	Extrait	Extrait	TR
		AcOEt	butanol	(min)
		(µg/mL)	( <u>µg</u> /mL)	
10	II-m - m - c' de	0.161	0.011	11.76
18	Hyperocide	0,161	0,011	11,76
19	Quercétine-3-glucoside	0,017	ND	11,88
20	Quercétine-3-D-xyloside	27,467	1,812	12,48
21	Hespéridine	583,31	3,360	12,47
22	Kaempférol-3-glucoside	0,027	0,009	13,35
23	Fisétine	ND	0,010	13,56
24	Quercétine	0,196	ND	15,04
25	Naringénine	0,156	0,007	15,15
26	Kaempférol	0,411	ND	16,97
27	Tamarixétine	0,045	0,010	17,51
28	Biochanine A	0,230	0,287	20,54
29	Diosgénine	0,025	ND	30,48

 Tableau III.19 (Suite) : Composés phénoliques identifiés par LC-ESI-MS/MS des extraits de

 L. latifolius.

ND : Non détecté, TR : temps de rétention

#### III.6. Résultats des activités Biologiques de l'espèce Lathyrus latifolius :

#### III.6.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *Lathyrus latifolius* ont été quantifiées à l'aide des équations de régressions des courbes d'étalonnage : l'acide gallique et la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les extraits (Figure III.9 et III.10).

Les résultats présentés dans le tableau III.20 montrent que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait acétate d'éthyle renferme des taux très élevés en polyphénols totaux (248,62±3,85 mg EAG/g d'extrait) suivi par l'extrait butanolique (159,51±5,39 mg EAG/g d'extrait) et l'extrait chloroforme (153,96±1,54 mg EAG/g d'extrait). La quantification des flavonoïdes a donné des taux considérables uniquement pour l'extrait *n*-BuOH (89,50 ± 3,93 mg EQ/g d'extrait) et l'extrait l'extrait AcOEt (71,17±5,16 mg EQ/g d'extrait ; Tableau III.20). Notre étude montre des valeurs supérieures à celle menée par **Pastor-Cavada** *et al.* (2009).

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
Chloroforme	153,96±1,54	Traces
Acétate d'éthyle	248,62±3,85	71,17±5,16
<i>n</i> -Butanol	159,51±5,39	89,50±3,93

**Tableau III.20 :** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce L.latifolius.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3)

#### III.6.2. Évaluation du potentiel antioxydant :

Six méthodes ont été utilisées pour déterminer la capacité antioxydante des extraits de piéger les radicaux libres (DPPH, ABTS, DMSO alcalin et  $\beta$ -Carotène) et de réduire les ions (Pouvoir réducteur et CUPRAC). Les résultats sont représentés dans le tableau III.21.

Dans toutes les méthodes utilisées, les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol ont été les plus actifs par apport à l'extrait chloroformique qui était le moins actif.

Les extraits *n*-BuOH et AcOEt étaient plus actifs  $(20,73\pm0,29 \text{ et } 21,56\pm1,00 \text{ }\mu\text{g/mL} \text{ respectivement})$  que le  $\alpha$ -tocophérol  $(31,52\pm2,22 \text{ }\mu\text{g/mL})$  dans le test DMSO alcalin, signifiant une capacité de piégeage des anions superoxyde générés dans le milieu réactionnel.

Nos résultats suggèrent une corrélation entre les composés phénoliques (acide salicylique), les flavonoïdes (hespéridine) identifiés par analyse chromatographique LC-ESI/MS et les activités antioxydantes (Al-Ashaal et El-Sheltawy. 2011 ; Golkar *et al.*, 2019).

Peu de recherches ont été réalisées sur les propriétés antioxydantes des espèces *Lathyrus* dont l'algérienne semble avoir la meilleure capacité antioxydante que celles de la Turquie et d'Espagne (**Pastor-Cavada** *et al.*, **2009 ; Haydari** *et al.*, **2015**).

Extraits	DPPH	ABTS	DMSO alcalin	β-Carotène	Pouvoir Réducteur	CUPRAC
		CI <sub>50</sub> (µ	g/mL)		A <sub>0.50</sub> (µ	g/mL)
Chloroforme	141,84±0,66	20,90±0,51	73,00±0,97	>200	249,00±1,00	82,02±0,14
AcOEt	83,53±0,26	33,06±0,55	21,56±1,00	93,34±0,59	234,33±1,15	48,17±0,07
<i>n</i> -Butanol	97,38±0,28	36,71±0,76	20,73±0,29	147,29±1,70	209,00±0,00	59,39±0,38
BHA	6,14±0,41	1,81±0,10	>200	0,90±0,02	7,99±0,87	6,62±0,05
BHT	12,99±0,41	1,29±0,30	>200	1,05±0,01	>200	8,97±3,94
α-Tocophérol	13,02±5,17	7,59±0,53	31,52±2,22	1,79±0,03	34,93±2,38	19,92±1,46
A-ascorbique	13,94±2,81	1,74±0,10	7,59±1,16	52,59±1,98	6,37±0,42	12,43±0,09
A-tannique	7,74±0,19	1,01±0,16	0,94±0,22	7,46±0,26	41,07±2,36	3,76±0,73

**Tableau III.21** : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce L. latifolius.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (n=3)

# Conclusion Générale

# **Conclusion Générale**

Dans le présent travail, les trois espèces algériennes : *Inula conyza* DC, *Centaurea incana* Desf et *Lathyrus latifolius* L ont été exploitées sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan biologique.

L'étude phytochimique réalisée sur les extraits des deux espèces : *Inula conyza* DC et *Centaurea incana* Desf a conduit à l'isolement de 14 produits purs, dont 10 ont été identifiés. Ils appartiennent à différentes classes chimiques : deux sesquiterpènes dont un est lactonique, six flavonoïdes dont un est glycosylé et deux composés phénoliques. Il s'agit de :

- ✓ Graveolide.
- ✓ Acide ilicique.
- ✓ Axillarine.
- ✓ Axillaroside (axillarine-7-O-glucoside)
- ✓ Acide-1,5-di-O-caféoylquinique.
- ✓ Hispiduline.
- ✓ Le 6-méthoxy kaempférol.
- ✓ Tyrosol.
- ✓ Apigénine.
- ✓ Lutéoline.

La séparation et la purification des composés isolés ont été basées sur les méthodes chromatographiques : chromatographie sur colonne (CC) et la chromatographie sur couche mince (CCM).

L'identification structurale a été effectuée en s'appuyant sur la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques RMN 1D (RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C) et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) ainsi que la comparaison avec la littérature.

L'analyse de l'extrait chloroforme de *Centaurea incana* par GC-MS a permis l'identification de 28 produits dominé par le lignane arctigénine (ATG).

L'évaluation du potentiel antioxydant des extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des espèces : *Inula conyza* DC et *Centaurea incana* Desf a été effectuée par

#### **Conclusion Générale**

plusieurs méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, pouvoir réducteur, phenanthroline et  $\beta$ -Carotène.

Les résultats obtenus des activités antioxydantes montrent que l'extrait acétate d'éthyle des deux espèces est un excellent agent antioxydant, confirmant ses taux élevés en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes. L'extrait chloroforme des deux espèces présentes également une activité anti-cholinestérase modéré par rapport au standard utilisé.

Les résultats d'analyse par LC-ESI/MS des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de l'espèce *Lathyrus latifolius* nous ont révélé la présence de 29 composés phytochimiques, dont 11 acides phénoliques, 16 flavonoïdes, une coumarine et un hydroxybenzaldéhyde. L'hespéridine est le produit majoritaire pour l'extrait acétate d'éthyle (583 µg/mL) ainsi que pour l'extrait *n*-butanol (3,36 µg/mL).

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *Lathyrus latifolius* ont été quantifiées ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes. Les extraits acétate d'éthyle et butanol ont été les plus actifs dans toutes les méthodes utilisées, cette activité est due probablement aux acides phénoliques et aux flavonoïdes identifiés précédemment par analyse LC-ESI/MS.

En fin, vu la diversité de nos résultats, on peut conclure que les résultats obtenus à travers ce travail sont très favorables pour la valorisation des ressources végétales (extraits végétaux) de plantes médicinales algériennes. Nous souhaiterons que cette étude contribue d'une manière ou d'une autre à la valorisation des produits naturels en tant qu'antioxydants naturels.



#### **Références Bibliographiques**

#### A.

- Abad, M. J., Bedoya, L. M., Bermejo, P. 2013. Essential oils from the Asteraceae family active against multidrug-resistant bacteria. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. Chapter 14: 205–221.
- Abbas, M. N., Rana, S. A., Shahid, M., Rana, N., Mahmood-ul-Hassan, M., Hussain, M. 2012. Chemical evaluation of weed seeds mixed with wheat grains at harvest. The Journal of Animal & Plant Sciences, 22(2): 283-288.
- Abdel-Mogib, M., Jakupovic, J., Dawidar, A. M., Metwally, M. A., Abou-Elzahab, M. 1990.
  Sesquiterpene lactones from kaurane glycosides from *Francoeuria cripsa*.
  Photochemistry, 29(8): 2581-2584.
- Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Vol. 456. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., Ayeni, P. O. 2015. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 21(4): 1–7.
- Aires, A. 2015. Brassica composition and food processing. Processing and Impact on Active Components in Food, Chapter 3: 17–25.
- Aiyegoro, O. A., I Okoh, A. I. 2010. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. BMC Complementary and Alternative Medicine, 10(1), 21:1-8.
- Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Jay, M. 1997. Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology, 25(4): 361-362.

Al-Ashaal, H. A., El-Sheltawy, S. T. 2011. Antioxidant capacity of hesperidin from *Citrus* peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. Pharmaceutical Biology, 49(3) : 276–282.

- Aly, M. S. A-E. 2016. Phytochemical and biological investigation of *Ixora finlaysoniana* wall. Ex. G. Don. Growing in Egypt. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, 54 (6): 86-102.
- Al-Yahya, M. A., El-Sayed, A. M., Mossa, J. S., Kozlowski, J. F., Antoun, M. D., Ferin, M., Baird, W. M., Cassady, J. M. 1988. Potential cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria crispa*. Journal of Natural Products, 51(3): 621–624.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26): 7970–7981.
- Arthur Bell, E., Christopher Perera, K. P. W., Nunn, P. B., Simmonds, M. S. J., Blaney, W.
   M. 1996. Non-protein amino acids of *Lathyrus latifolius* as feeding deterrents and phagostimulants in *Spodoptera littoralis*. Phytochemistry, 43(5): 1003–1007.
- Asraoui, F., Kounnoun, A., Cacciola, F., El Mansouri, F., Kabach, I., Oulad El Majdoub, Y., Alibrando, F., Arena, K., Trovato, E., Mondello, L., Louajri, A. 2021. Phytochemical profile, antioxidant capacity, α-amylase and α-glucosidase inhibitory potential of wild moroccan *inula viscosa* (L.) aiton leaves. Molecules, 26(11), 3134:1-14.
- Ayad, R., Akkal, A. 2019. Chapter12: Phytochemistry and biological activities of Algerian *Centaurea* and related genera. Studies in Natural Products Chemistry, 67: 357-414.

# **B.**

- Bagci, E., Sahin, A. 2004. Fatty acid patterns of the seed oils of some *Lathyrus* species L. (*Papilionideae*) from Turkey, a chemotaxonomic approach. Pakistan Journal of Botany, 36(2): 403-414.
- Bao, T., Shadrack, K., Yang, S., Xue, X., Li, S., Wang, N., Wang, Q., Wang, L., Gao, X., Cronk, Q. 2020. Functional characterization of terpene synthases accounting for the volatilized-terpene heterogeneity in *lathyrus odoratus* cultivar flowers. Plant and Cell Physiology, 61(10): 1733-1749.

- **B**arrero, A. F., Oltra, J. E., Alvarez, M., Raslan, D. S., Saude, D. A., Akssira, M. 2000. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. Fitoterapia, 71(1): 60-64.
- Belayachi, L. 2015. Characterization of the anti-tumor activity of plants extracts from north Africa: Morocco. Thèse doctorat. Université Mohammed-V de Rabat, Maroc et l'université des îles Baléares, Espagne.
- **B**ell, E. A., O'Donovan, J. P. 1966. The isolation of  $\alpha$  and  $\gamma$ -oxalyl derivatives of  $\alpha$ , $\gamma$ diaminobutyric acid from seeds of *Lathyrus latifolius*, and the detection of the  $\alpha$ -oxalyl isomer of the neurotoxin  $\alpha$ -amino- $\beta$ -oxalylaminopropionic acid which occurs together with the neurotoxin in this and other species. Phytochemistry, 5(6): 1211–1219.
- Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Bermejo, J., Benayache, F. 2007. Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*. Chemistry of Natural Compounds, 43(6): 749–750.
- Bentamene, A., Boucheham, R., Baz, M., Benayache, S., Creche, J., Benayache, F. 2010. Flavonoid glucosides from *Centaurea sphaerocephala*. Chemistry of Natural Compounds, 46(3): 252-253.
- Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V. P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. 2011. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. Chemistry of Natural Compounds, 47(1): 105-106.
- Bicha, S., Chalard, P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, V. P., Lobstein, A., Bentamene, A., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F. 2013a. Maroccanin: A new γ-lactone and other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). Records of Natural Products, 7(2):114-118.
- Bicha, S., Amrani, A., Benaissa, O., León, F., Zama, D., Brouard, I., Benayache, S.,
  Bentamene, A., Benayache, F. 2013b. A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea Acaulis* L. Der Pharmacia Lettre, 5(6):24-30.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable fee radical. Nature, 181 (4617): 1119-1200.

- **B**oubellouta, H., Khelifi Touhami, F., Mahdi, D. 2021. *In vivo* and *in vitro* hepatoprotective effect of three endemic plants against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. Acta Scientifica Naturalis, 8(1):15-36.
- Bruno, M., Diaz, J. G., Herz, W. 1991. Guaianolides and lignans from *Centaurea solstitialis* subs Schouwii. Phytochemistry, 30(12): 4165–4166.

# С.

- Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K.,
- Bruno, M. 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*.Biochemical Systematics and Ecology, 34: 349–352.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Ling, S.K., Tan, S.P., Lim K.K., Khoo, M.G.H. 2009. Caffeoylquinic acids from leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae). Food Science and Technology, 42(5): 1026–1030.
- Chavan, U. D., Shahidi, F., Nazak, M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. Food Chem (75): 509-512.
- Cossy, J., Aclinou, P. 1990. Isolation and total synthesis of the major constituent of the roots of *centaurea incana* : aplotaxene. Tetrahedron Letters, 31(52): 7615–7618.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., Newman, D. J. 2012. Natural products in drug discovery: recent advances. Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, practices, and perspectives, 4<sup>ème</sup>édition: 1-42.
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., Rong, L. 2020. Lignans and their derivatives from plants as antivirals. Molecules, 25(1), 183:1-17.

#### D.

Danino, O., Gottlieb, H. E., Grossman, S., Bergman, M. 2009. Antioxidant activity of 1,3dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. Food Research International, 42(9):1273–1280.

- Dhivya, R., Manimegalai, K. 2013. Preliminary phytochemical screening and GC- MS profiling of ethanolic flower extract of *Calotropis gigantea* Linn. (Apocynaceae). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2 (3): 28-32.
- Djeddi, S., Argyropoulou, C., Skaltsa, H. 2008. Secondary metabolites from *Centaurea* grisebachii ssp. grisebachii. Biochemical Systematics and Ecology, 36(5-6): 336–339.

#### E.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, J<sub>R</sub>., Featherston, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical. Pharmacology, 7(2): 88–95.
- Engvild, K. C., Egsgaard, H., Larsen, E. 1980. Determination of 4-chloroindole-3-acetic acid methyl ester in *Lathyrus*, *Vicia* and *Pisum* by gas chromatography - mass spectrometry. Physiologia Plantarum, 48(4) : 499–503.
- Eyer, S., Kressig, R. W., Studer, A. 2020. Les médicaments procognitifs pour traiter la maladie d'Alzheimer. Alzheimer Suisse, 1-4.

#### G.

Garcia Jacas, N. Susanna, A. 1993. *Centaurea xaveri* (Compositae), a new species from North Africa. Willdenowia, 23: 97-102.

Golkar, P., Taghizadeh, M., Yousefian, Z. 2019. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137(3), 575–585.

- Guilhon, G. M. S. P., Müller, A. H. 1998. Eudesmane sesquiterpenoids from *Pluchea quitoc*. Phytochemistry, 47(2) : 227–229.
- Gutiérrez-Grijalva, E., Picos-Salas, M., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M., Vazquez-Olivo, G., Heredia, J. 2018. Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. Plants, 7(1), 2: 1-23.
- Güzel, Y. 2020. Specialized natural product analysis and chemophenetics of some Turkish endemic *Centaurea* L. (Asteraceae) taxa by electrospray ionization mass spectrometry

fingerprinting and liquid chromatography-tandem mafss spectrometry. Biochemical Systematics and Ecology, 91, 104079: 1-14.

#### H.

- Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. 2012. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. Natural Product Research, 26(3):203– 208.
- Harput, U. S., Genç, Y., Khan, N., Saracoglu, I. 2011. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. Records on Natural Products, 5(2): 100-107.
- Heydari, H., Saltan, G., Acikara, Ö. B., Yilmaz, S., Çoban, T., Tekin, M. 2015. Antioxidant activity of five *Lathyrus* L. Species growing in Turkey. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(3): 369-376.
- Hu, J., Ma, W., Li, N., Wang, K. J. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory flavonoids from the flowers of chuju, a medical cultivar of *Chrysanthemum Morifolim* Ramat. Journal of the Mexican Society, 61(4): 282-289.

# I.

Ikegami, F., Takayama, K., Murakoshi, I. 1988. Purification and properties of β-cyano-lalanine synthase from *Lathyrus latifolius*. Phytochemistry, 27(11): 3385–3389.

# K.

- Kebbi, S., Ciavatta, M. L., Mahmoud, A. M., Carbone, M., Ligresti, A., Seghiri, R., Gavagnin, M. 2021. Sesquiterpene lactones with the 12,8-guaianolide skeleton from Algerian *Centaurea omphalotricha*. Biomolecules, 11(7), 1053: 1-10.
- Kenicer, G. J., Kajita, T., Murata, J., Pennington, R. T. 2005. Systematics and biogeography of *Lathyrus* (fabaceae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. American Journal of Botany, 92(7): 1199-1209.
- Kenicer, G. 2008. An introduction to the genus *Lathyrus* L. Curtis's Botanical Magazine, 25(4): 286–295.

- Kitouni, R. Benayache, F., Benayache, S. 2015. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. Chemistry of Natural Compounds, 51(4): 762–763.
- **K**iyama, R. 2017. Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. European Journal of Pharmacology, 815: 405–415.
- Kolli, E. H., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Bermejo, J., Benayache, S. 2012. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23(5), 977–983.
- Krüger, T., Mönch, B., Oppenhäuser, S., Luckas, B. 2010. LC–MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. Toxicon, 55(2-3), 547–557.
- Kumar, G.S., Jayaveera, K.N., Kumar, C.K.A., Sanjay, U.P., Swamy, B.M.V., Kumar, D.V.K. 2007. Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 6(2): 717-723.
- Kunchandy, E., Rao, M. N. A. 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. International Journal of Pharmaceutics, 58(3): 237–240.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Świerczek-Zięba, G. 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. Molecules, 19(1):78–101.

#### L.

- Lahneche, A. M., Boucheham, R., Ozen, T., Altun, M., Boubekri, N., Demirtas, I., Bicha, S., Bentamene, A., Benayache, F., Benayache, S., Zama, D. 2019. *In vitro* antioxidant, DNAdamaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephla* L. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 91(3), e20180462:1-11.
- Leduc, C., Coonishish, J., Haddad, P., Currier, A. 2006. Plants used by Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. Journal of Ehtnopharmacology, 105(1-2): 55-63.

- 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.
- Liu, Y.L., Mabry, T. J. 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. ludoviciana. Phytochemistry, 21(1):209–214.
- Llorent-Martínez, E. J., Zengin, G., Fernández-de Córdova, M. L., Bender, O., Atalay, A., Ceylan, R., Mollica, A., Mocan, A., Uysal, S., Guler, G. O., Aktumsek, A.
  2017a. Traditionally used *Lathyrus* species: phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory properties, cytotoxic effects, and in silico studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia*. Frontiers in Pharmacology, 8, 00083: 1-20.
- Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Mocan, A., Simirgiotis, M. J., Ceylan, R., Uysal, S., Aktumsek, A. 2017b. Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus* : Potential sources of bioactive compounds for the food industry. Food and Chemical Toxicology, 107(B): 609–619.

#### М.

- Marco, G.J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. The Journal of the Americain Oil Chemist's Society, 45(9): 594–598.
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M. 1992. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. Phytochemistry, 31(10): 3527–3530.
- Massiot, G., Morfaux, A. M., Le Men-Olivier, L., Bouquant, J., Madaci, A., Mahamoud, A., Chopova, M., Aclinou, P. 1986. Guaianolides from the leaves of *centaurea incana*. Phytochemistry, 25(1): 258-261.
- Milošević Ifantis, T., Solujić, S., Pavlović-Muratspahić, D., Skaltsa, H.2013. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. Phytochemistry, 94: 159-170.

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.

#### 0.

- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44(6): 307-315.
- Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Szulc, M., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozlowska, T., Czerny, B., Mrozikiewicz, P. M. 2013. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. Fitoterapia, 91: 261–271.
- Ozenda, P. 2004. Flore et végétation du Sahara. 3ème édition. Ed CNRS, Paris : 50.

# **P.**

- Pan, J.Y., Chen, S.L., Yang, M.H., Wu, J., Sinkkonen, J., Zou, K. 2009. An update on lignans: natural products and synthesis. Natural Product Reports, 26(10), 1251–1292.
- Parekh, J., Karathia, N., Chanda, S. 2006. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegate* L. bark. African Journal of Biomedical Research, 9: 53-56.
- Parekh, J., Chanda, S. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. Turkish Journal of Biology, 31(1): 53-58.
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., Vioque, J. 2009. Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain. LWT - Food Science and Technology, 42(3): 705–709.
- Péter, A., Dósa, G. 2002. Detection of phenoloids in some Hungarian *Inula* and *Centaurea* species. Acta Botanica Hungarica, 44(1–2):129–135.

- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel, 4: 25-39.
- Prenner, G. 2003. Floral ontogeny in *Lathyrus latifolius* (Fabaceae-Vicieae). Phyton (Horn, Austria), 43 (2) : 392-400.

# Q.

- Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tom II. Ed CNRS, Paris : 231, 284-285.
- Quezel, P., Santa, S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tom I. Ed CNRS, Paris: 348.

#### R.

- Ranabahu, P., Harborne, J. B. 1993. The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparison of flavonoid patterns within the tribe Vicieae. Biochemical systematics and ecology, 21(6-7): 715-722.
- 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.
- Reda, E. H., Shakour, Z. T. A., El-Halawany, A. M., El-Kashoury, E.-S. A., Shams, K. A., Mohamed, T. A., Saleh, I., Elshamy, A. I., Atia, M. A. M., El-Beih, A. A., Abdel-Azim, N. S., El-Seedi, H. R., Hegazy, M.-E. F. 2021. Comparative study on the essential oils from five wild Egyptian *Centaurea* species: Effective extractiom techniques, antimicrobial activity and *in-silico* nalyses. Antibiotics, 10(3), 252: 1-18.
- **R**essler, C., Redstone, P. A., Erenberg, R. H. 1961. Isolation and identification of a neuroactive factor from *Lathyrus latifolius*. Science, 134(3473): 188–190.
- Řezáčová, V., Řezáč, M., Gryndlerová, H., Wilson, G. W. T., Michalová, T. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi favor invasive Echinops sphaerocephalus when grown in competition with native *Inula conyzae*. Scientific Reports, 10(1): 1-10.

- Salama, M. M., Ezzat, S. M., Sleem, A. A. 2011. A new hepatoprotective flavone glycoside from the flowers of *Onopordum alexandrinum* growing in Egypt. Zeitschrift Für Naturforschung C, 66(5-6): 251–259.
- Salazar-Gómez, A., Ontiveros-Rodríguez, J. C., Pablo-Pérez, S. S., Vargas-Díaz, M. E., Garduño-Siciliano, L. 2020. The potential role of sesquiterpene lactones isolated from medicinal plants in the treatment of the metabolic syndrome – A review. South African Journal of Botany, 135: 240–251.
- Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Lopez, S., Feresin, G. E. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Tagetes mendocina*. Zeitschrift für Naturforschung, 59(5-6):345-353.
- Seca, A. M. L., Grigore, A., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S. 2014. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. Journal of Ethnopharmacology, 154 (2): 286–310.
- Sharonova, N., Nikitin, E., Terenzhev, D., Lyubina, A., Amerhanova, S., Bushmeleva, K., Rakhmaeva, A., Fitsev, I., Sinyashin, K. 2021. Comparative assessment of the phytochemical composition and biological activity of extracts of flowering plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. Plants, 10 (7), 1279: 1-19.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. 2001. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. Methods in Enzymology, 335(14): 157-166.
- Shoeb, M., Rahman, M. M., Nahar, L., Delazar, A., Jaspars, M., Macmanus, S. M., Sarker, S. D. 2004. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea Macrocephala*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 12 (3): 87-93.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P. K., Nazemiyeh, H., Sarker, S. D. 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. Phytochemistry, 67(21): 2370–2375.

- Singleton, V.L and Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Americain Journal of Enology and Viticulture, 16(3):144-58.
- Somboro, A. A., Diallo, D., Sidibe, L., Traore, N., Fofana, B., Bouare, S., Chalard, P., Chalchat, J.C., Figueredo, G. Troin, Y. 2013. Activités anticholinestérasiques des alcaloïdes totaux extraits des feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de tronc de *Guiera senegalensis*, une plante médicinale Malienne. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 7(4): 1723-1728.
- Sorokopudov, V., Kabanov, A., Bamatov, I. 2021. Features of the introduction of representatives of the genus *Inula L*. Bio Web of Conferences, 32, 01001: 1-6.
- Szydlowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. Talanta, 76(4): 899-905.

#### T.

- Teleuță, A. 2015. Biological peculiarities and forage value of the some perennial species of the genus *Lathyrus* L. in Moldova. Revista Botanică, 2(11): 119-126.
- Ţiţei, V., Mazăre, V., Teleuţă, A., Ţiţei, V. 2017. The agrobiological features some nontraditional leguminous fodder plants and the quality of the hay. Research Journal of Agricultural Science, 1(49):145-151.
- 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.
- Trendafilova, A., Ivanova, V., Rangelov, M., Todorova, M., Ozek, G., Yur, S., Ozek, T.,
  Aneva, I., Veleva, R., Moskova-Doumanova, V., Doumanov, J., Topouzova-Hristova,
  T. 2020a. Caffeoylquinic acids, cytotoxic, antioxidant, acetylcholinesterase and
  tyrosinase enzyme inhibitory activities of six *Inula* species from Bulgaria. Chemistry &
  Biodiversity, 17(4): e2000051, 1-12.

- Trendafilova, A., Todorova, M., Ozek, T., Ozek, G., Aneva, I. 2020b. Volatile constituents of four *Inula* species of Bulgarian origin. Biochemical Systematics and Ecology, 90, 104035:1-6.
- Trendafilova, A., Ivanova, V., Todorova, M., Staleva, P., Aneva, I. 2021. Terpenoids in four *Inula* species from Bulgaria. Journal of the Serbian Chemistry Society, 86 (12): 1229– 1240.
- Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2019. Chapter 16 classification of phenolic compounds in plants. Polyphenols in Plants (2): 263–284.

# U.

Umadevi, S., Mohanta, G. P., Balakrishna, K., Manavalan, R. 2005. Phytochemical investigation of the leaves of *Flaveria Trinervia*. Natural Products Sciences, 11(1): 13-15.

# V.

Vaz Patto, M. C., Rubiales, D. 2014. *Lathyrus* diversity: available resources with relevance to crop improvement – *L. sativus* and *L. cicera* as case studies. Annals of Botany, 113(6) : 895–908.

# W.

- Wang, F., Chen, X., Chen, Q., Qin, X., Li, Z. 2000. Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl-2,3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by precolumn derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Journal of Chromatography A, 883(1-2): 113–118.
- Wollenweber, E., Christ, M., Dunstan, R. H., Roitman, J. N., Stevens, J. F. 2005. Exudate flavonoids in some gnaphalieae and *inuleae* (Asteraceae). Zeitschrift für Naturforschung C, 60(9-10): 671-678.

# X.

Xiao-Wei, Z., Dan, L., Ya-Ping, L., Zhi-Long, X., Hong-Bin, X. 2015. A new polyphenol, 1, 3-di-O-caffeoyl-5-O-(1-methoxyl-2-O-caffeoyl-4-maloyl)-quinic acid, isolated from

cultured cells of *Saussurea involucrata*. Chinese Journal of Natural Medicines, 13(4): 295–298.

# Y.

- Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K., Watal, G. 2014. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(5): 539-542.
- Yadav, T. C., Kumar, N., Raj, U., Nidhi, G., Vardawaj, P. K., Prasad, R., Pruthi, V. 2019. Exploration of interaction mechanism of tyrosol as a potent anti-inflammatory agent. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 38(2): 382–397.

# Webographie

- Site 1 : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\_nom/945856/tab/fiche
- Site 2 : http://atlas-sahara.org/Asteraceae/Centaurea%20pubescens/Centaurea%20pubescens.html
- Site 3 : https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-37921-illustrations



# FIRST REPORT ON PHYTOCONSTITUENTS, LC-ESI/MS PROFILE AND IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF LATHYRUS LATIFOLIUS GROWING IN ALGERIA

Doudach Selma<sup>1</sup>, Slougui Nabila<sup>1,2</sup>, Rebbas Khellaf<sup>3</sup>,Benmkhebi Lotfi<sup>4</sup>, , Bensouici Chawki<sup>5</sup>, Mehmet Nuri Atalar<sup>6</sup>, Akkal Salah<sup>1</sup>, Bicha Sabrina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unit of Valorization of Natural Resources, Bioactive Molecules and Physicochemical andBiological Analyzes, Department of Chemistry, Faculty of Exact Sciences, Universityof Mentouri Brothers, P.B. 325 Route Ain El Bey, Constantine, Algeria <sup>2</sup>Ecole nationale polytechnique de Constantine. BP 75, A, Nouvelle ville RP, Constantine.

Algérie

<sup>3</sup>Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Science, University Mohamed Boudiaf of M'Sila, 28 000, Agro-Biotechnology and Nutrition Laboratory in Arid and Semi-Arid Zones /Natural Resources Management and Environment Team. Ibn Khaldoun University, Tiaret,

Algeria

<sup>4</sup>Laboratory of Materials Chemistry, University of Mentouri Brothers, P.B. 325 Route Ain El Bey, Constantine, Algeria

<sup>5</sup>Biotechnology Research Center, Ali Mendjli Nouvelle Ville UV03,BPE73,Constantine,Algeria <sup>6</sup>Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics,I\_gdir University, Igdir, Turkey

> \**Corresponding Author: E-mail: bichasabrina2016@gmail.com*

(Received 21<sup>st</sup> October 2022; Accepted 30<sup>th</sup> November 2022)

a: 0000-0003-3435-4934, b: 0000-0003-4342-5212c: 0000-0002-2846-3838,d 0000-0002-3654-2966,e 0000-0003-4612-4642, 0000-0003-3076-8072, 0000-0002-4999-5673, 0000-0003-4274-6567

**ABSTRACT.** For the first time, this work is devoted to the phytochemical and biological study of a medicinal plant belonging to the Algerian flora Lathyrus latifolius. This research was conducted to assess the phytochemical composition of ethyle acetate ,butanolic and chloroform extracts using LCMS/MS, following by testing in vitro antioxidant ability using DPPH, ABTS·+, O2 – DMSO alkalin, Reducing power,  $\beta$ -Carotene-linoleic acid and CUPRAC assays. The liquid chromatography results showed that ethyle acetate extract have a high amount of Hesperidin (583.31 $_$ g/ml) and Quercetin-3-D-xyloside(27.467 $_$ g/ml), while the amounts present in the butanolic extract are respectively (3.360  $_$ g/ml) and (1.812µg/ml). Furthermore, butanol and ethyle acetate extracts had good antioxidant activity in all tests used. Indeed, the presence of phenolic compounds may contribute to their antioxidant activity.

Key words: Lathyrus latifolius, antioxidant activity, hesperidin,

#### INTRODUCTION

Reactive oxygen species have a major role in the development of numerous neurodegenerative diseases like autism, ischemia, Parkinson's syndrome, Alzheimer's disease, obesity, diabetes, cancer, cataracts, aging and hepatic disorders [1].

Human cells exhibit various mechanisms that involve free scavenging, metal chelating and enzymatic activities to neutralize free radicals after their development in order to reduce or inhibit the oxidative damage. In addition, supplementation with antioxidants can be helpful in reducing tissue damage caused by oxidative stress when these mechanisms have failed to cope with body need [2]. Due to the antioxidant potential of plants[3-5], the phenolics have attracted great attention in recent years[6]. There are two main antioxidants, natural and synthetic, the synthetic ones were found to have long-termtoxicological consequences, including cancer[7]. For this reason, there is a growing interest in finding advantageous, less toxic and more effective antioxidants medicinal remove from species. to synthetic antioxidants such butylatedhydroxytoluene (BHT) and butylatedhydroxyanisole (BHA). In this study one medicinal species was used, Lathyrus latifolius. The genus lathyrus belongs to the Fabaceae family, many species of this genus are important economically and are used as fodder, food for humans, feed animals, ornamental plants and nitrates to soil [8].In Algeria, Lathyrus genus is represented by 22 taxa, this genus is characterized by a calyx with five equal or unequalteeth. Orbicular standard. Stamensdiadelphes or monadelphes, with trans versely truncated tube [9]. The species Lathyrus contain flavonoids [10], fattyacids and protein [11]. Despite the importance of Lathyrus plants as a source of phenolic compounds and our continued efforts tofind effective and safe antioxidant products [12-13], here we describe for the first time the antioxidant activities of the Algerian Lathyrus latifolius using six methods and compared these activities with five antioxidant standards (BHT,BHA, a tocopherol, ascorbic and Tannic acids).

# MATERIALS AND METHODS

#### Plant material

During the flowering period, *Lathyrus latifolius* (Fabaceae) was harvested from Setif, Algeria,in june2021. A specie was identified by Dr Khellaf REBBAS. Species deposited in M'silaUniversity (K. Rebbas, Herbier de labo de Botanique, Univ. de M'sila, N°KR0004).

#### Extraction of plant

About 200g of aerial parts of *Lathyrus Latifolius* were macerated 3 times in a watermethanol mixture (70/30, v / v) for 24 hours at room temperature. The solution was condensed, evaporating the solvent under vacuum, diluted with 100ml of water, after filtration, the aqueous phase was extracted by a liquid-liquid method, using solvents with increasing polarity, starting with chloroform after ethyl acetate and n-butanol. The organic solutions were concentrated up to 37 ° C under vacuum. Extracts obtained: chloroform extract, ethyl acetate extract, and butanol extract.

#### Phytochemical Screening

A phytochemical screening of *L.latifolius* was performed to identify the various active chemical constituents present in this spice, such as alkaloids, coumarins, terpenoids, triterpenoids, sterols, anthocyanins, flavonoids, saponins and tannins, using standard phytochemical methods [14-15].

# **Determination of bioactive Constituents**

# Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content of Lathyrus latifolius extracts was calculated spectrophthometrically according to the Folin – Ciocalteu method [16] and the findings were expressed as micrograms of gallic acid equivalents per milligrams of extract (µg GAE / mg)

# Determination of Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content of the Lathyrus latifolius extracts has been calculated using the spectrophthometric method defined by Tel et al [17] and the results were expressed as micrograms equivalent to quercetin per milligram of extract ( $\mu g QE / mg$ ).

#### Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry analysis LC-ESI-MS/MS:

The quantification of different phytochemical compounds was achieved by 1260 Infinity II liquid chromatography System (Agilent technology) united with 6460 Triple Quad mass spectrometer and Poroshell 120 EC-C18 (100mm  $\times$  4.6mm I.D., 2.7µm) column. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid and 5mM ammonium format in water (A mobile phase) and 0.1% formic acid and 5mM ammonium format in methanol (B mobile phase), respectively. The flow rate was 0.4mL/min, the column temperature was maintained at 40°C and the injection volume was 4.0µL. The solvent gradient involved in B mobile phase was follows: 1-12min 15%, 12-30min 50%, 30-32min 90% and 32-35min 10%. An electrospray ionization (ESI) mode was negative and positive operating with nitrogen gasat 300°C wich flow to 11L/min, capillary voltage to 4000V and nebulizer pressure to 15psi.

The ethyl acetate and butanol extracts (2mg/mL). Consequently, the solution was filtered through 0.45µm filters and transferred into vials prior to LC-ESI-MS/MS analysis [18].

# Antioxidant activity evaluation

# **DPPH** free radical scavenging test

Radical scavengers were performed according to Blois [19]. The findings are compared to the antioxidant standards. The results are reported as inhibition at 50 percent concentration (IC<sub>50</sub>).

#### **ABTS cation radical test**

The capture process of ABTS was performed using Re et al. [20], BHT, BHA,  $\alpha$  tocopherol, ascorbic and Tannic acids are used as antioxidants standard. Results are expressed as inhibition at 50% concentration ( $IC_{50}$ ).

#### Cupric reducing antioxidant capacity test

The reduction in copper(II) antioxidant capacity was determined using the Apak method [21]. BHT, BHA, a tocopherol, a scorbic and Tannic acids are used as antioxidant standards for activity comparison. Results are reported as A0.50.

#### **Reducing power assay**

The performance reduction of lathyrus latifolius extracts was calculated according to the Oyaizu method [22]. Results were given as absorbance and compared to BHT, BHA,  $\alpha$  tocopherol, ascorbic and Tannic acids. Results were given as A 0.50, referring to the 0.5 absorbance concentration.
# β-carotene/linoleic acid bleaching assay

The antioxidant activity was assessed using the Marco method of  $\beta$ -carotene-linoleic acid test [23]. BHT, BHA, $\alpha$ tocopherol, ascorbic and Tannic acids are used to compare the operation to antioxidant requirements. Results were given as a concentration of inhibition of 50% (IC<sub>50</sub>).

# Superoxide radical scavenging assay by alkaline DMSO

The scavenging activity of *Lathyrus latifolius* extracts was determined with a slight degree by the alkaline DMSO as described by Madan, [24] Shift optimized for microplate-reader. BHA and BHT,  $\alpha$  tocopherol, ascorbic and Tannic acids have been used to compare the operation to antioxidant requirements. The results were given as a concentration of inhibition of 50 percent (IC<sub>50</sub>).

## Statistical analysis

Results of the three measurements are stated as mean value  $\pm$  SD; linear regression analysis and one-way .ANOVA variance analysis were used to detect important variations (p < 0.05) using XLSTAT.

## **RESULTS AND DISCUSSION** *phytochemical screening*

Table1 shows that sterols, alkaloids, tannins,flavonoids and terpenoids were present in all extracts. However, saponins were present in ethyl acetate and butanol extracts and were not detected in chloroform extract.

Constituents	Chloroform extract	Ethylacetate extract	Butanol extract		
Sterols	+	+	+		
Alkaloids	+	+	+		
Saponins	-	+	+		
Tannins	+	+	+		
Flavonoids	+	+	+		
Terpenoids	+	+	+		

**Table 1:** Phytochemical constituents present in each extract of Lathyrus latifolius

# Total phenol content and total flavonoid content

The total phenol contents of *L.latifolius* extracts were quantified. The regression equation of calibration curve of gallic acid was y = 0.0034x + 0.1044 ( $R^2 = 0.9972$ ). The results showed that the linear relationship was good in the detection ranges. Ethyl acetate extract had the highest total polyphenol (248.62±3.85 µg GAE /mg extract). The total flavonoid content of *L.latifolius* extracts were measured,the standard,the curve equation of quercetin was y = 0.0048x ( $R^2 = 0.997$ ). Butanolic and ethyl acetate extract had small amount of flavonoids (89.50±3.93 QE/mg extract, 71.17±5.16 QE/mg extract), while chloroform extract contain traces. Our study shows higher values than that conducted by Elena Pastor [25]. Our results are similar to those performed on plants known for their excellent antioxidant activity, such as *Echinacea pallida* , *Echinacea* purpurea, mint and *Hypericum* species [26-28].

Extracts	Total polyphenols content (µg GAE/mg extract)	Total flavonoid content ( μg QE/mg extract)
CHCl3 extract	153.96±1.54	traces
EtOAc extract	248.62±3.85	71.17±5.16
<i>n</i> -BuOH extract	159.51±5.39	89.50±3.93

**Table 2:** Total phenol content and total flavonoid content

## Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry analysis

A qualitative analysis of constituents present in ethyl acetate and butanolic extracts was performed by LC-ESI/MS. This method was developed, optimized and validated has been applied for the simultaneous determination of 29 phytochemicals as shown in table 3, in the two extracts of *L.latifolius* including 11phenolic acids(Shikimic acid, Gallic acid, Protocatechuic acid, Gentisic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, Caffeic Acid, Syringic acid, P-coumaric acid, Salicylic Acid, Trans-ferulic acid), 16 flavonoids were identified (Taxifolin, Quercimeritrin, Scutellarin, Cynarin, Hyperocide, Quercetin-3-glucoside, Quercetin-3-D-xyloside, Hesperidine, Kaempferol-3-glucoside, Fisetin, Quercetin, Naringenin, Kaempferol, Tamarixetin, Biochanin A, Diosgenin), one Coumarin and one hydroxybenzaldehyde. Looking at the overall results of the two L. latifolius extracts, a high amount of hesperidin (583.31µg/ml),Quercetin-3-Dxyloside (27.46 7 µg/ml), P-coumaric acid (12.07 µg/ml), Salicylic acid (11.945 µg/ml), Vanilic acid (8.011 µg/ml), Syringic acid (7.847 µg/ml) and 4-Hydroxybenzoic acid (6.395 µg/ml).Our results indicate that the chemical composition of the different extracts varies qualitatively and quantitatively depending on the solvent used during the extraction. Therefore, the methods used are complementary and practical to gether. Overall our study is quite close to those found in previous research on Lathyrus genus [10-11].

## Antioxidant activity

Seven methods were used to determine antioxidant capacity, In our study, the free radical scavenging ability and reducing power results are shown in table4. IC<sub>50</sub> and A<sub>0.5</sub> values were compared with antioxidant standards (BHT, BHA,  $\alpha$ -Tocopherol, ascrobic and tannic acids). Of all the methods used, ethyl acetate and butanol extracts were the most active. The chloroform extract was least activie. Furthermore, butanol and ethyle acetate extracts were more active than  $\alpha$ -Tocopherol in O2– DMSO alkaline assay. Furthermore, butanolic and ethyle acetate extracts showed good antioxidant activity in all methods used. Our findings suggest a correlation between phenolics, flavonoids and antioxidant activities. Little research has been done on the antioxidant properties of *Lathyrus* species. *Lathyrus* from Algeria appears to have the best antioxidant capacity than *Lathyrus* species from Turkey and Spain [25,29]. comparing our study with other studies carried out on *Origuanum* species, widely used in traditional medicine, our results were consistent to those found by ramzan et al[30-31].

No	Compounds	Ethyl acetate extract (μg \ml)	Butanol extract ( <u>µg</u> \ml)	RT (min)	Pre.I(m/z) -> Pro.I (m/z)	Ion polarity	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LinearityRa nge (µg/L	R <sup>2</sup>
1	Shikimic acid	ND	1.080	1.17	173.0 -> 93.1	Negative	68.25	210.24	500-8000	0.991
2	Gallic acid	0.492	ND	1.60	169.0 -> 125.0	Negative	4.8	15.25	31.25-1000	0.999
3	Protocatechuic acid	0.544	0.009	2.77	152.9 -> 108.9	Negative	4.62	14.77	31.25-1000	0.997
4	Gentisic acid	0.392	ND	3,10	153.0 -> 109.0	Negative	9.45	32.5	125-2000	0.996
5	4-Hydroxybenzoic acid	6.395	0.168	4.52	137.0 -> 93.1	Negative	19.25	54.12	250-8000	0.999
6	4-Hydroxybenzaldehyde	0.071	0.019	5.72	121.0 -> 92.0	Negative	8.78	26.7	62.5-2000	0.998
7	Vanillic acid	8.011	ND	5.87	167.0 -> 151.8	Negative	22.54	52.1	125-4000	0.999
8	Caffeic Acid	1.531	0.257	5.96	178.9 -> 135.1	Negative	2.63	10.8	31.25-1000	0.999
9	Syringic acid	7.847	ND	6.98	197.1 -> 181.8	Negative	26.98	83.2	250-8000	0.994
10	P-coumaric acid	12.070	1.570	8.47	163.0 -> 119.0	Negative	2.25	7.8	15.625-1000	0.999
11	Salicylic Acid	11.945	0.525	8.72	137.0 -> 93.1	Negative	15.94	47.84	125-4000	0.999
12	Taxifolin	0.565	ND	9.55	304.8 -> 258.9	Positive	39.3	139.2	500-8000	0.998
13	Trans-ferulic acid	1.778	0.279	9.54	193.1 -> 133.9	Negative	12.45	35.32	62.5-4000	0.997
14	Quercimeritrin	0.121	ND	10.68	464.8 -> 302.9	Positive	3.13	10.21	31.25-2000	0.998
15	Coumarin	0.212	0.073	10.56	147.1 -> 91.3	Positive	5.63	15.62	62.5-2000	0.999
16	Scutellarin	0.048	0.122	11.06	462.8 -> 286.8	Positive	2.3	6.2	12.5-800	0.997
17	Cynarin	0.218	ND	11.29	516.8 -> 162.9	Positive	9.39	28.3	62.5-2000	0.994
18	Hyperocide	0.161	0.011	11.76	464.8 -> 302.8	Positive	0.38	2.06	6.25-800	0.998
19	Quercetin-3-glucoside	0.017	ND	11.88	464.8 -> 302.9	Positive	1.04	3.12	12.5-800	0.999
20	Quercetin-3-D-xyloside	27.467	1.812	12.48	432.7 -> 299.5	Negative	45.85	125.8	500-8000	0.999
21	Hesperidin	583.31	3.360	12.47	611.0 -> 302.9	Positive	10.6	38.3	62.5-2000	0.999
22	Kaempferol-3-glucoside	0.027	0.009	13.35	448.8->286.9	Positive	0.61	2.31	6.25-200	0.999
23	Fisetin	ND	0.010	13.56	286.8->137.1	Positive	20.8	68.5	125-4000	0.996
24	Quercetin	0.196	ND	15.04	300.7->150.9	Negative	4.54	12.6	15.625-1000	0.999
25	Naringenin	0.156	0.007	15.15	270.9->119.1	Negative	2.8	7.81	31.25-4000	0.999
26	Kaempferol	0.411	ND	16.97	284.9 -> 116.9	Negative	37.26	128.1	500-8000	0.998
27	Tamarixetin	0.045	0.010	17.51	315.0 -> 299.9	Negative	4.73	15.86	31.25-8000	0.999
28	Biochanin A	0.230	0.287	20.54	284.9 -> 151.9	Positive	2.45	7.81	62.5-2000	0.999
29	Diosgenin	0.025	ND	30.48	415.0 -> 271.0	Positive	3.13	8.19	25-800	0.999

#### Table 3: phenolic compounds in different extracts of Lathyrus latifolius

ND: Not detected, Pre.I: Precursor Ions, Pro.I: Product Ions, RT: retention time, LOD and LOQ: limit of detection and limit of quantification

Extracts	DPPH∙assay IC50 µg/mL	ABTS+assay IC50 µg/mL	O2– DMSO Alkaline assay IC50 µg/mL	Reducing power assay A0.50 μg/mL	β-Carotenelinoleic acidassay IC50 μg/mL	CUPRAC assay A0.50 μg/mL
Chloroformic extract	141.84±0.66	20.90±0.51	73.00±0.97	249.00±1.00	>200	82.02±0.14
Ethyl acetate extract	83.53±0.26	33.06±0.55	21.56±1.00	234.33±1.15	93.34±0.59	48.17±0.07
Butanolic extract	97.38±0.28	36.71±0.76	20.73±0.29	209.00±0.00	147.29±1.70	59.39±0.38
BHA	6.14±0.41°	1.81±0.10°	>200	$7.99{\pm}0.87^{d}$	0.90±0.02°	6.62±0.05 <sup>e</sup>
BHT	12.99±0.41 <sup>b</sup>	1.29±0.30°	>200	>200	1.05±0.01°	8.97±3.94 <sup>e</sup>
a-Tocopherol	13.02±5,17 <sup>b</sup>	7.59±0.53 <sup>b</sup>	31.52±2.22ª	34.93±2.38 <sup>b</sup>	1.79±0.03 <sup>e</sup>	19.92±1.46 <sup>e</sup>
Ascrobic acid	13.94±2.81 <sup>b</sup>	1.74±0.10°	7.59±1.16 <sup>d</sup>	$6.37 \pm 0.42^{d}$	52.59±1.98 <sup>b</sup>	12.43±0.09 <sup>d</sup>
Tannic acid	7.74±0.19°	1.01±0.16 <sup>c</sup>	0.94±0.22 <sup>e</sup>	41.07±2.36ª	$7.46{\pm}0.26^{d}$	$3.76{\pm}0.73^{\rm f}$

#### Table 4: Antioxidant activities (IC50 µg/mL) of Lathyrus latifolius extracts

IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub>values is defined as the concentration of 50% inhibition percentages and the concentration at 0.50 absorbance respectively. IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub> were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean±SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c,d or f) in the same columns are significantly different (p < 0.05)

# CONCLUSION

According to some studies, some plant species on earth possess therapeutic value, and many medicinal plants have high antioxidant capacity. The butanol and ethyle acetate extracts of *Lathyrus latifolius* have good antioxidant activity due to the presence of flavonoids such as hesperidin, Quercimeritrin, Cynarin as well as phenolic acids like Gallic and Ferulic acids. Furthermore, this antioxidant capacity is due to synergy effect between the components present in extracts.

## Acknowledgments

The authors thank MESRES and DGRSDT for financial support. The authors declare that there is no conflict of interest in publishing this manuscript.

## REFERENCES

- Geier, D. A., Kern, J. K., Garver, C. R., Adams, J. B., Audhya, T., & Geier, M. R. (2009). A prospective study of transsulfuration biomarkers in autistic disorders. *Neurochemical research*, 34(2), 386-393.
- [2] ul Haq, U., Hussain, M. A., Sharif, A., Akram, M., Tahir, I. M., Abbaass, W., Rida,Z. & Khan, I. (2019). Antioxidant Potential of Cuscuta reflexa and Lathyrus odoratus. *Pak J Med Biol Sci*, 2(1),12-17.
- [3] Topçu, G., Erenler, R., Çakmak, O., Johansson, C. B., Çelik, C., Chai, H. B., & Pezzuto, J. M. (1999). Diterpenes from the berries of Juniperus excelsa.*Phytochemistry*, 50(7), 1195-1199.
- [4] Yaglioglu, A. S., Akdulum, B., Erenler, R., Demirtas, I., Telci, I., & Tekin, S. (2013). Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and

(E)-1, 8-pentadecadiene from Echinacea pallida (Nutt.) Nutt. roots. *Medicinal Chemistry Research*, 22(6), 2946-2953.

- [5] Elmastas, M., Ozturk, L., Gokce, I., Erenler, R., & Aboul- Enein, H. Y. (2004). Determination of antioxidant activity of marshmallow flower (Althaea officinalis L.). *Analytical letters*, *37*(9), 1859-1869.
- [6] Demirtas, I., Erenler, R., Elmastas, M., & Goktasoglu, A. (2013). Studies on the antioxidant potential of flavones of Allium vineale isolated from its water-soluble fraction. *Food chemistry*, *136*(1), 34-40.
- [7] Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916-4922.
- [8] Kenicer, G. J., Kajita, T., Pennington, R. T., & Murata, J. (2005). Systematics and biogeography of Lathyrus (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany*, *92*(7), 1199-1209.
- [9] Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- [10] Ranabahu, P., & Harborne, J. B. (1993). The flavonoids of the genus Lathyrus and a comparison of flavonoid patterns within the tribe Vicieae. *Biochemical systematics and ecology*, 21(6-7), 715-722.
- [11] Bagci, E., & Sahin, A. (2004). Fatty acid patterns of the seed oils of some Lathyrus species L.(Papilionideae) from Turkey, a chemotaxonomic approach. *Pakistan Journal of Botany*, *36*(2), 403-414.
- [12] Bicha, S., Amrani, A., Benaissa, O., León, F., Zama, D., Brouard, I., ... & Benayache, F. (2013). A flavonoid with high antioxidant effect from Centaurea acaulis L. *Der Pharmacia Lettre*, 5(6), 24-30.
- [13] Ouissem, B. S., Sabrina, B., Lotfi, B., Khellaf, R., Chawki, B., Ibrahim, D., ... & Fadila, B. (2018). HPLC Analysis and Antioxidant Properties of Algerian Lepidium draba Ethyl acetate Extract. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8(4), 265-271.
- [14] Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.* springer science & business media.
- [15] Khandelwal, K. R. (2001). Preliminary phytochemicals screening: Practical Pharmacognosy-Techniques and Experiments. 149-156.
- [16] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in enzymology. 299, 152-178.
- [17] Tel G, Apaydın M, Duru ME, Öztürk, M. (2012). Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three Tricholoma species with total phenolic and flavonoid contents: the edible mushrooms from Anatolia. Food Analytical Methods. 5(3), 495-504.
- [18] Yilmaz, M.A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. Industrial Crops and Products. 149,112-347,
- [19] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- [23] Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.
- [24] Pandey, M. M., Govindarajan, R., Rawat, A. K. S., & Pushpangadan, P. (2005). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala biljke Saussarea costus. Acta Pharmaceutica, 55(3), 297-304.
- [25] Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2009). Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild Lathyrus species from South Spain. LWT-Food Science and Technology, 42(3), 705-709.
- [26] Erenler, R., Telci, I., Ulutas, M., Demirtas, I., Gul, F., Elmastas, M., & Kayir, O. (2015). Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of E chinacea purpurea (L.) M oench and E chinacea pallida (N utt.) N utt. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 622-630.
- [27] Yaman, C., Önlü, Ş., Ahmed, H. A. A., & Erenler, R. (2022). Comparison of phytochemicals and antioxidant capacity of hypericumpericum perforatum; wild plant parts and in vitro samples. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, *32*(2).
- [28] Elmastaş, M., Telci, İ., Akşit, H., & Erenler, R. (2015). Comparison of total phenolic contents and antioxidant capacities in mint genotypes used as spices/Baharat olarak kullanılan nane genotiplerinin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(6), 456-462.
- [29] Heydari, H., Saltan, G., Acikara, Ö. B., Yilmaz, S., Çoban, T., & Tekin, M. (2015). Antioxidant activity of five Lathyrus L. Species growing in Turkey. *Turk J Pharm Sci*, 12(3), 369-376.
- [30] Erenler, R., Sen, O., Aksit, H., Demirtas, I., Yaglioglu, A. S., Elmastas, M., & Telci, I. (2016). Isolation and identification of chemical constituents from Origanum majorana and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 822-836.
- [31] Erenler, R., Meral, B., Sen, O., Elmastas, M., Aydin, A., Eminagaoglu, O., & Topcu, G. (2017). Bioassay-guided isolation, identification of compounds from Origanum rotundifolium and investigation of their antiproliferative and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1646-1653.

# Résumé

L'objectif de notre travail est de réaliser des études phytochimique et biologique sur les plantes algériennes *Inula conyza* DC, *Centaurea incana* Desf appartenant à la famille des Asteraceae, et *Lathyrus latifolius* L appartenant à la famille des Fabaceae.

L'investigation phytochimique des deux espèces : *Inula conyza* DC et *Centaurea incana* Desf a permis d'isoler 10 produits : deux sesquiterpènes, six flavonoïdes et deux composés phénoliques. L'élucidation structurale a été basée sur la combinaison des méthodes spectroscopiques RMN 1D (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC). D'autre part, une analyse par GC-MS de la phase apolaire chloroforme de *Centaurea incana* a permis la détection de 28 composés dont le lignane arctigénine était le produit majoritaire avec 33,97% de la composition totale de l'extrait.

L'évaluation du potentiel antioxydant d'*Inula conyza* DC et *Centaurea incana* Desf a été effectuée par plusieurs méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, pouvoir réducteur, phenanthroline et  $\beta$ -Carotène. Les résultats ont montrés l'extrait acétate d'éthyle des deux espèces comme étant un excellent agent antioxydant, ce qui est confirmé par les taux élevés en composés phénoliques.

La détection et la quantification des flavonoïdes et des acides phénoliques présents dans les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *Lathyrus latifolius* ont été réalisées par LC-ESI/MS, ce qui a permis l'identification de 29 composés phytochimiques : 11 acides phénoliques, 16 flavonoïdes, une coumarine et un hydroxybenzaldéhyde.

La quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits de *Lathyrus latifolius* a été réalisée bien que l'évaluation des activités antioxydantes. Les extraits acétate d'éthyle et butanol possèdent le meilleur potentiel antioxydant.

**Mots clés :** *Inula conyza* DC, *Centaurea incana* Desf, *Lathyrus latifolius* L, RMN 1D et 2D, activité antioxydante, GC-MS, LC-ESI/MS.

# Abstract

The objective of our work is to carry out phytochemical and biological studies on the Algerian plants *Inula conyza* DC, *Centaurea incana* Desf belonging to the Asteraceae family, and *Lathyrus latifolius* L of the Fabaceae family.

The phytochemical investigation of the two species: *Inula conyza* DC and *Centaurea incana* Desf allowed the separation of 10 products: two sesquiterpenes, six flavonoids and two phenolic compounds. The structural determination was based on the combination of 1D (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) and 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR spectroscopic methods. Furthermore, a GC-MS analysis of the chloroform extract of *Centaurea incana* allowed the detection of 28 compounds, of which the lignan arctigenin was the main product with 33.97% of the total composition of the extract.

The evaluation of the antioxidant potential of *Inula conyza* DC and *Centaurea incana* Desf was carried out by different methods: DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, reducing power, phenanthroline and  $\beta$ -Carotene. The results showed that the ethyl acetate extract of both species was an excellent antioxidant agent, which was confirmed by the high levels of phenolic compounds.

The detection and the quantization of flavonoids and phenolic acids present in the ethyl acetate and n-butanol extracts of the specie *Lathyrus latifolius* were carried out by LC-ESI/MS, which allowed the identification of 29 phytochemicals compounds: 11 phenolic acids, 16 flavonoids, 1 coumarin and a hydroxybenzaldehyde.

The quantification of polyphenols and total flavonoids of *Lathyrus latifolius* L extracts was carried out, as well as the evaluation of antioxidant activities. The ethyl acetate and butanol extracts showed the best antioxidant activity.

**Key words**: *Inula conyza* DC, *Centaurea incana* Desf, *Lathyrus latifolius* L, 1D and 2D NMR spectroscopy, antioxidant activity, GC-MS, LC-ESI/MS.

# ملخص

الهدف من هذا العمل هو إجراء در اسات فيتوكيميائية وبيولوجية على النبنتين Inula conyza DC و Asteraceae اللتان تنتميان إلى عائلة Asteraceae والنبتة Lathyrus latifolius L من عائلة Fabaceae.

سمحت الدراسة الفيتوكميائية للنوعين Centaurea incana Desf و Inula conyza DC بفصل 10 مركبات منها 2 من نوع سسكيتربين, 6 فلافونويدات و 2 من المركبات الفينولية. تم التعرف على بنيات المركبات المستخلصة عن طريق الجمع بين تقنيات التحليل الطيفي، الرنين المغناطيسي النووي احادي وثنائي البعد:COSY,HMBC, HSQC, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H: وثنائي البعد, 13 من جهة أخرى، سمح تحليل GC-MS لمستخلص الكلوروفورم للنوع Centaurea Desf بتحديد 28 مركبا, المركب الرئيسي منها كان اللينيان "اركتيجينين" بنسبة % 33,97 من التركيبة الإجمالية للمستخلص.

تم اجراء تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للنوعين *Centaurea incana* Des و Inula conyza DC بعدة طرق مختلفة: pouvoir réducteur, phenanthroline, β-Carotène, GOR, CUPRAC, ABTS, DPPH.

أظهرت النتائج أن مستخلص أسيتات الإيثيل لكلا النوعين يعتبر عامل ممتاز كمضاد للأكسدة، وهذا ما اكدته مستوياته العالية من المركبات الفينولية.

تم تحديد والكشف عن الفلافونويدات والاحماض الفينولية الموجودة في مستخلصات اسيتات الايثيل والبوتانول للنوع Lathyrus latifolius بواسطة LC-ESI/MS, مما سمح بتحديد 29 مركب فيتوكميائي مكون لهذه النبتة: 11 مركب من الاحماض الفينولية، 16 فلافونويد، كومارين واحد وهيدروكسي بنز الديهايد واحد.

القياس الكمي لمجموع المركبات الفينولية والفلافونويدات بالإضافة الى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات النبتة Lathyrus latifolius أظهرت ان مستخلصات أسيتات الإيثيل والبيوتانول يعتبر ان أفضل مضادات للأكسدة.

الكلمات المفتاحية : LC-ESI/MS, Lathyrus latifolius, Centaurea incana Desf, Inula conyza DC ، الفعالية المضادة للأكسدة، الرنين المغناطيسي النووي احادي وثنائي البعد.