

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE1**  
**FACULTE DES SCIENCES EXACTES**  
**DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :.....

Série :.....

## **THESE**

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences**  
**Spécialité: Chimie Organique**

**Par : TEBBOUB Omar**

**Thème**

**Etude phytochimique et biologique de deux  
plantes du nord algérien**

**Devant le jury:**

Sabrina BICHA	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Ramdane SEGHIRI	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Rapporteur
Lotfi BENMEKHBI	MCA , Université Salah Bounider Constantine 3	Examineur
Thamer CHERIET	MCA , Université Mohamed boudiaf M'sila	Examineur
Mohamed BOUHROUM	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine 1	Membre Invité

2020/2021

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Bouheroum Mohammed, pour m'avoir accueilli au sein de L'unité de Chimie organique (VARENBIOMOL) et me permis de faire mon travail de thèse. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et particulièrement de sa patience et tous les efforts qu'il a consentis sans cesse durant de la réalisation de cette thèse, que je n'oublierai jamais.*

*Je remercie sincèrement, Monsieur SEGHIRI Ramdane, Professeur à l'Université de constantine-1, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde, Je tiens aussi à lui adresser un grand merci pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'être le rapporteur de ma thèse de Doctorat.*

*Je remercie sincèrement, Madame BICHA Sabrina, Professeur à l'Université de constantine-1, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse de Doctorat*

*Je suis très honorée à la présence de monsieur le docteur BENMEKHBI Lotfi de l'Université de Constantine- 3 d'avoir examiné ce travail , également pour monsieur le docteur CHERIET Thamer de l'Université de M'sila. Je tiens à les assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail et le temps consacré à la lecture de cette thèse.*

*A monsieur, le Professeur BENAYACHE Samir EX-directeur de l'unité de recherche et madame BENAYACHE Fadila, Professeur à la Faculté de science exacte de l'Université de constantine-1. Recevez ici mes sincères remerciements pour les conseils et leur constant soutien.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur HAZMOUNE Hichem l'ingénieur de l'unité de recherche VARENBIOMOL pour leur soutien et les facilités accordées pour la réalisation de ce travail*

*Je remercie tous mes amis et mes collègues de L'unité de recherche, merci pour les conseils techniques, scientifiques et pour votre chaleureuse amitié.*

## *Dédicace*

*Cette thèse est dédiée à :*

*A mes chers parents qui m'ont encouragé à être ce que je suis, avec  
tant d'amour.*

*A ma chère femme Naoual, qui par sa compréhension, sa tendresse,  
ses encouragements, et son soutien morale, raison de trouver la  
lumière durant la réalisation de ce travail.*

*A mes chers enfants : Abd el Mouize, Rahil et Kacem pour leur amour*

*A mes chers frères et sœurs ainsi que ma famille pour leurs  
encouragements*

*A tous mes amis et collègues.*

## **Abréviations et symboles**

**MeOH** Méthanol

**DMSO** Diméthylsulfoxyde

**CDCl<sub>3</sub>** Chloroforme deutérié

**GC-MS** chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

**SM** Spectroscopie de masse

**IE** impact électronique

**uma** Unité de masse atomique

**UV** Ultraviolet

**RMN** Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN <sup>1</sup>H** Spectre Résonance Magnétique Nucléaire dproton

**RMN <sup>13</sup>C** Spectre Résonance Magnétique Nucléaire de carbone 13

**DEPT 135** Spectre de carbone 13 réalisé en Distortionless Enhancement by Polarisation transfer

**HMQC** Heteronuclear multiple Quantum Corrélation

**HMBC** Heteronuclear multiple Bond Connectivity

**COSY** Spectroscopie de corrélation

**CCM** Chromatographie sur couche mince

**ppm** Partie par million

**δ** Déplacement chimique

**nm** Nanomètre

**Hz** Hertz

**J** Constante de couplage

**s** Singulet

**d** Doublet

**dd** Doublet des doublets

**m** Multiplet

**t** Triplet

**HPLC** chromatographie liquide haute performance

**RP18** Silice greffée

**CI50** Concentration inhibitrice 50 %

**DPPH** 1-1 Diphényl 2- Picril Hydrazine

**R<sub>f</sub>** Rapport frontal

**I** indice de Kovats

**NADPH** nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**IPP** isopentényl diphosphate

Introduction general.....	1
<b>Chapitre I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Partie I : Etude botanique.....</b>	<b>3</b>
I.1. La flore Algerienne.....	3
I.1.1. Ordre des <i>ASTRALES</i> .....	3
I.1.2. La famille des <i>ASTRACEAE</i> .....	4
I.1.3. <i>Galactites</i> .....	7
I.1.4. <i>Galactites elegans</i> .....	7
I.1.5. Ordre des <i>SOLANALES</i> .....	8
I.1.6. La famille des <i>SOLANACEAE</i> .....	8
I.1.7. <i>Solanum</i> .....	10
I.1.8. <i>Solanum rostratum</i> .....	11
I.2.Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre galactites.....	12
I.3.Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre solanum.....	13
<b>Partie II : Les Principaux Métabolites Secondaire.....</b>	<b>17</b>
II. 1. Introduction.....	17
II. 2. Classement des métabolites secondaires .....	17
II. 2-1 terpénoïdes.....	17
II. 2-1-1 Généralités.....	17
II. 2. 1. 2. Classification.....	18
II. 2-2 flavonoïdes.....	23
II.2.2.1 introduction .....	23
II-2.2.2. structure chimique et classification.....	24
II.2.2.2.1 flavones et flavonols.....	24
II.2.2.2.2 flavanones et dihydroflavonols .....	25
II.2. 2.2.3flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidol.....	25
II 2.2.2.4. Chalcones et aures.....	25
II.2.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	27
II.2.2.4 substitution du squelette flavonique.....	29
a) l'hydroxylation.....	29
b) la méthylation ou méthoxylation.....	29
c) La O-glycosylation.....	29
d) La C-glycosylation :.....	29

II.2.2.5. Distribution et localisation.....	30
II.2.2.6. Propriétés des flavonoïdes.....	32
II.3. activité antioxydante.....	32
a) Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavonoïdes.....	33
b) Importance de l'ortho-dihydroxy du cycle B des flavonoïdes.....	33
c) Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et la double liaison C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> .....	33
d) L'effet de la glycosylation et la O-méthylation sur l'activité des flavones et flavanones...	34
II.6.2. autres activités biologiques des flavonoïdes.....	35
II-4 Lignanes.....	35
II-4-1. Classification des lignanes.....	36
II-4-2 Activités biologiques des lignanes .....	37
<b>Chapitre II. TRAVAUX EXPERIMENTALE</b>	
II. 1. Etude phytochimique de l'espèce <i>solanum rostratum</i> .....	38
II. 1. 1. description botanique de l'espèce.....	38
a) place dans la systématique.....	38
b) description botanique .....	38
II. 1. 2. matériel végétal.....	39
II.1. 3. Extraction.....	39
II. 1. 4. séparation et purification.....	42
II. 1. 4. 1. Traitement de l'extrait chloroformique.....	42
Etude la fraction f13.....	43
II. 1. 4. 2. Traitement de l'extrait EtOAc.....	43
Etude la fraction F9.....	44
II. 1. 4. 3. traitement de l'extrait n-butanol.....	44
Etude la fraction F17.....	45
II. 2. étude phytochimique de l'espèce <i>galactites elegans</i> .....	46
II. 2. 1. description botanique de l'espèce <i>galactites élégans</i> .....	46
a) place dans la systématique.....	46
b) description botanique.....	46
II. 2. 2. matériel végétal.....	48
II. 2. 3. extraction.....	48
II. 2. 4. séparation et purification.....	50

II. 2. 4. 1. traitement de l'extrait Chloroformique .....	50
Séparation par HPLC.....	51
Etude la fraction F4... ..	51
Etude la fraction F10 .....	51
Etude la fraction F11 .....	51
Etude la fraction F12 .....	52
Etude la fraction F15 .....	52
II. 2. 4. 2. Traitement de l'extrait Butanolique.....	52
Etude la fraction F22 .....	54
Etude la fraction F6 .....	54
Etude la fraction F8 .....	54
Etude la fraction F9 .....	55
Etude la fraction F14 .....	55
<b>Chapitre III : RESULTAT ET DISCUSSION</b>	
III-1- <i>Identification du produit SOR1</i> .....	57
III-2- <i>Identification du produit SOR2</i> .....	63
III-3- <i>Identification du produit SOR3</i> .....	72
III-4- <i>Identification du produit SOR4</i> .....	81
III-5- <i>Identification du produit GE3-2</i> .....	91
III-6- <i>Identification du produit GE3-3</i> .....	97
III-7- <i>Identification du produit GE3-13</i> .....	98
III-8- <i>Identification du produit GE3-20</i> .....	106
III-9- <i>Identification du produit GE3-24</i> .....	113
III-10- <i>Identification du produit GE3-27</i> .....	117
III-11- <i>Identification du produit GE4-9</i> .....	124
III-12- <i>Identification du produit GE5-8</i> .....	130
III-13- <i>Identification du produit GE6-10</i> .....	142
III-14- <i>Identification du produit GE10-7</i> .....	150
III-15- <i>Identification du produit GE10-17</i> .....	154
III-16- <i>Identification du produit GE10-18</i> .....	159
III-17- <i>Identification du produit GE12-7</i> .....	161
III-18- <i>Identification du produit GE13-10</i> .....	172
III-19- <i>Identification du produit GE13-18</i> .....	179
III-20- <i>Identification du produit GE13-26</i> .....	183

III-21- <i>Identification du produit GE13-9</i> .....	191
III-22- <i>Identification du produit GE11-5</i> .....	191
III-23- <i>Identification du produit GE11-7</i> .....	192
Conclusion.....	292
<b>Chapitre IV : ACTIVITE BIOLOGIQUE.</b>	
IV-1 Introduction.....	193
IV.2 Évaluation de l'activité antioxydante.....	193
IV.2.1 Dosage spectrophotométrique (Estimation quantitative des polyphénols totaux).....	193
IV.2.2 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	194
IV.2.3 Pouvoir chélateur du Fer.....	195
IV.2.3 Potentiel antioxydant des composés testés par cytofluorométrie.....	196
IV.3 Résultats et discussion.....	198
IV.3.1 <i>Solanum rostratum</i> .....	198
IV.3.2 <i>Galactites elegans</i> .....	199
IV.3.2.1 Activités antioxydantes des extraits et des composants de <i>Galactites elegans</i> .....	199
IV.3.2.1.1 Dosage des phénols totaux.....	199
IV.3.2.1.2 Activité de pillage des radicaux libre DPPH.....	200
IV.3.2.1.3 Pouvoir chélateur du Fer.....	200
IV.3.2.1.4 Potentiel antioxydant des composés testés par cytofluorométrie.....	201
Conclusion générale.....	204

# *Introduction générale*

La santé et la beauté font parties des préoccupations de l'homme qui continue toujours de chercher le meilleur moyen de les entretenir. Ses recherches ont connu un changement considérable ces dernières années. Plusieurs industriels tels que les firmes pharmaceutiques et l'industrie du cosmétique ont suivi une nouvelle révolution : le retour à la nature. Ainsi, la médecine douce propose des traitements plus doux, moins agressifs et surtout plus acceptés par le malade et la cosmétologie propose des préparations à base de produits naturels plus appréciées et plus recherchées par le consommateur.

L'efficacité des plantes utilisées dans la médecine populaire est due à la présence des produits chimiques. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent.

De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires. La plupart de ces composés sont des "antibiotiques" au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes. Donc, les plantes font une riche source de médicament parce qu'elles produisent une foule

de molécules bioactives, dont la plupart jouent le rôle de défense chimique contre les prédateurs ou des agents infectieux [1]. Elles restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement. Environ 40 % des médicaments sont ainsi dérivés de la nature [2].

L'intensité des ressources naturelles qui caractérise l'Algérie [3] ayant l'intérêt biomédical a poussé les chercheurs Algériens à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique [4, 5].

L'objectif de mon travail de thèse consiste à isoler des substances naturelles qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique. De deux plantes, la première c'est *Galactites Elegans* appartient à la famille Asteraceae et la deuxième *Solanum Rostratum* appartient à la famille Solanaceae. Ces deux plantes font l'objet d'une étude phytochimique et biologique

Ce travail sera présenté comme suit :

- Dans un premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques des deux familles Asteraceae Solanaceae et sur les deux genres étudiés. Nous aborderons également un aperçu général sur les terpènes, les flavonoïdes, principaux constituants de ces deux plantes.

- Le second chapitre sera consacré aux travaux personnels consistant en la séparation et la purification des composés obtenus. Nous présenterons également dans ce chapitre un aperçu botanique sur chaque plante.
- L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés seront détaillées dans le troisième chapitre.
- L'évaluation biologique de la majorité des composés isolés des deux espèces sera présentée dans le quatrième chapitre.
- À la fin, une conclusion générale portera une lecture attentive par les différents résultats obtenus.

***CHAPITRE I : RAPPEL  
BIBLIOGRAPHIQUES***

# *Partie 1 : Etude Botanique*

## **I. Etude botanique.**

### **I.1. La flore Algérienne**

La répartition des végétaux à la surface du globe est conditionnée par trois facteurs principaux: l'eau, la température et la lumière. Lorsque ces trois conditions d'humidité, de chaleur et d'éclairement sont suffisamment bien remplies, le tapis végétal atteint son plein développement [6].

La végétation sous le climat semi-tropical de l'Algérie diffère sous beaucoup de rapports de celle du centre et du nord de l'Europe. Les arbres et arbustes étant presque tous à feuilles persistantes donnent au paysage d'hiver un très grand charme et la campagne algérienne au printemps, c'est-à-dire en mars et avril, est un magnifique jardin fleuri [7].

La Flore d'Algérie est riche de plusieurs milliers d'espèces botaniques, Il n'existe pas, en Algérie, de mise au point permettant d'avoir une idée précise de la richesse floristique. Les chiffres avancés par les auteurs sont très variables. La biodiversité algérienne globale (naturelle et agricole) compte environ 3150 espèces dont 2700 se retrouvent en région méditerranéenne réparties sur 917 genres et 131 familles[7], avec un niveau d'endémisme qui peut dépasser 6,51%.[9]

#### **I. 1.1. Ordre des Asterales**

Les plantes Asterales forment un ordre de dicotylédones à fleurs qui comprend la grande famille des Astéracées (ou composées) connue pour les fleurs composites en fleurettes, et dix familles liées à la famille des Asteraceae, dans la sous-classe des astéridées.

Selon la classification phylogénétique d'APG IV (2016) l'ordre des Asterales renferme un peu plus de 26000 espèces réparties dans 11 familles dont la plus représentée est la famille des Astéracées.

Les Asterales sont des organismes qui semblent avoir évolué d'un ancêtre commun. Leurs caractéristiques d'identification sont surtout morphologiques, biochimiques et de synapomorphies (partagés par deux ou plusieurs groupes à travers le développement évolutif). Les plantes comprennent la présence d'inuline oligosaccharide, une molécule de stockage d'éléments nutritifs utilisés à la place de l'amidon; et une unique étamine. Les étamines sont habituellement trouvés dans le style sont, soit densément agrégées ou

fusionnées dans un tube, probablement une adaptation pour la pollinisation qui est commune parmi les familles de l'ordre, dans lequel le pollen est recueilli et stocké sur toute la longueur du pistil. [10].

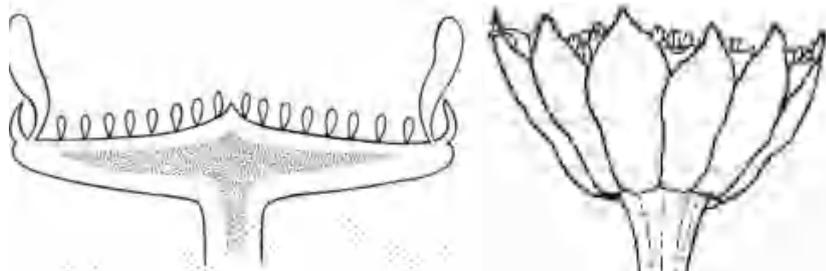
### **I. 1.2 La famille des Astraceae :**

La famille des Astéracées (asteraceae) ou Composées (Compositae), C'est la plus vaste famille des plantes dicotylédones Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc.). Cette famille comprenant plus de 1500 genres et 13000 espèces (varie selon les auteurs) [11]. formant approximativement 10% de la flore du monde [12]. Le sol algérien compte environ 109 genres et plus de 408 espèces[13].

Son nom scientifique: asteraceae a été introduit par Martynov en (1820).Le nom Compositae revient à Giseke dès (1792).

#### **Description botanique**

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre. [14].



[14] **Figure I.1** : Inflorescence en capitule.

Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de chardon, ou de pissenlit... n'est en réalité pas « une » fleur mais un capitule de fleurs.

Les fleurs des astéracées, appelées aussi fleurons, se présentent sous deux formes :

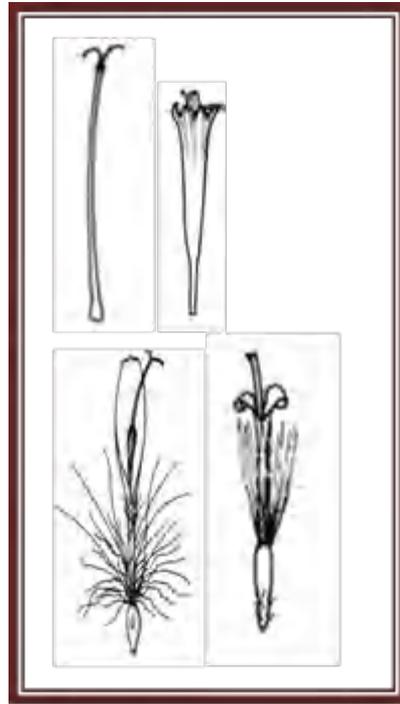
- des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissables seulement aux dents de la languette

**Figure [I.2].**

- des tubes terminés par des lèvres imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes. **Figure [I.3].**



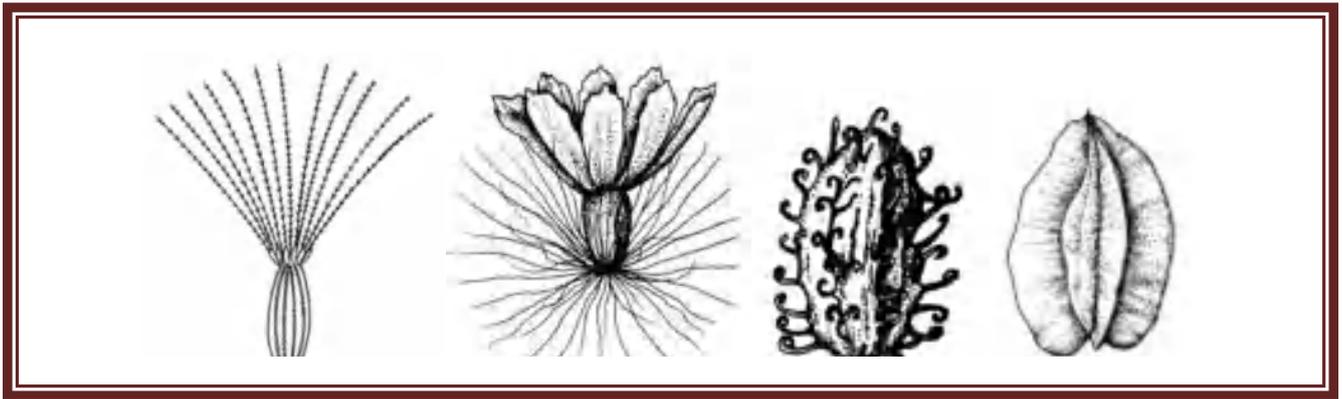
[15] *Figure [I.2]*



[15] *Figure [I.3].*

Dans le premier cas on parle de fleurons ligulés, dans le second, de fleurons tubulés. Le capitule peut présenter trois aspects différents [15]. :

- fleurons tous ligulés (chicorée, pissenlit, laitue etc.);
- fleurons tous tubulés (chardon, cirse, centaurée etc.);
- fleurons périphériques ligulés entourant un disque de fleurons tubulés (marguerite, aster, séneçon etc.). [16]



[17] **Figure [I.4]** : les type des akènes des Astéracées



Fleurons ligulés et  
tubulés



Fleurons tous tubulés



Fleurons tous ligulés

[16] **Figure [I.5]** : les différents types des fleurs des Astéracées

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée *pappus* qui favorise la dispersion des graines par le vent [17].

Pour déterminer la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défloris, portant des fruits mûrs ou au moins déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante.

Dans cette famille nombreuse, certains genres fournissent des légumes :

- *Lactuca*, les laitues.
- *Cichorium*, les chicorées dont le chicon.
- *Cynara*, l'artichaut.

• *Tragopogon*, le salsifis.

Plus de 200 genres sont cultivés comme plantes ornementales (aster, chrysanthème, etc.). Certains comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi [18], d'autres enfin sont connus pour le caractère allergène de leur pollen (genre *Ambrosia*).

Certaines Astéracées sont des plantes succulentes, principalement dans les genres *Senecio* et *Othonna*.

On peut aussi citer une plante emblématique de la flore montagnarde, l'edelweiss.

Certaines plantes de cette famille ont des utilisations importantes dans la médecine traditionnelle comme par exemple: Les préparations de drogue riche en flavanoïdes.  
*Helichrysum*

*Arenarium* a été employé comme remède des infections hépatiques. L'artichaut (*Cynara Scolymus*) est également apprécié pour sa grande réputation dans la médecine populaire, la propriété de protection du foie est attribuée aux extraits des feuilles de cette plante [19] [20]

### **I. 1-3 Galactites :**

*Galactites* est un genre de plantes à fleurs de la famille des *Asteraceae*, appelées *galactites* ou *galactitès*. Son nom est dérivé du grec γάλακτος (= "lait").

Ce genre a été décrit pour la première fois en 1794 par le botaniste allemand Conrad Moench (1744-1805) [21]

Le genre botanique *Galactites* est essentiellement représenté par l'espèce *Galactites elegans*, le chardon laiteux, une plante d'origine méditerranéenne proche des chardons et des cirses (synonyme : *Galactites tomentosa*).

#### **I. 1.4. Galactites elegans :**

Chardon

Arab. : Choiik el-Hamir. — Italy: ScarUne. — Anglais : Thistle.

Espèce de chardon très commun dans les champs, à feuille portant comme des taches de lait, à limbe découpé en sorte de grosse arête. Tige florale cannelée, épineuse, haute d'un mètre environ et portant des fleurs blanches teintées de violet. [22]

### **I. 1.5. Ordre des Solanales :**

Les ordres de Solanales, Garryales, Gentianales et Lamiales constituent le sous-clade EUSTERIDES, qui se caractérise par des fleurs à sympétalie tardive, dont les pétales se forment séparés avant de se souder entre eux, l’ovaire est presque toujours supère, l’androcée est isotone ou parfois oligostémone, et les métabolites secondaires sont généralement des iridoïdes ou des alcaloïdes. L’ordre des Solanales correspond à des plantes essentiellement herbacées, à feuilles alternes, dont les fleurs sont de grande taille, régulières, hermaphrodites, gamopétales, isostémones. Les ovules sont toujours unitégumentés et ténuinucellés. Depuis la séparation des Boraginaceae de cet ordre, celui-ci se limite désormais à environ 4 800 espèces regroupées en 5 familles [23].

Les Solanacées comprennent entre 3 000 et 4 000 espèces, réparties en 90 genres aux morphologies variées : arbres, arbustes, lianes, herbes vivaces ou annuelles.

Cette famille, présente dans le monde entier et plus spécialement en Amérique du Sud, revêt une grande importance économique car beaucoup de plantes ornementales (pétunia, datura, tabac), industrielles (tabac) et surtout bon nombre de fruits et légumes (tomate, aubergine, piments, poivrons, pomme de terre...).

À celles-ci s’ajoutent des plantes officinales, toxiques, voire hallucinogènes, que le folklore associe à des histoires mythologiques et aux rituels de sorcellerie, telles que la belladone, la jusquiame, la stramoine et la mandragore.

### **I. 1.6 La famille des Solanaceae :**

La famille solanaceae fait partie des grandes familles, elle comprend près de 147 genres et environ 2 900 espèces réparties dans les régions chaudes et tempérées, avec un important centre de dispersion en Amérique du Sud. Cette famille est subdivisée en trois sous-familles, les Solanoideae, les Cestroideae et les Nolanoideae. La tribu des Solaneae, qui appartient à la sous famille des Solanoideae comprend plusieurs genres au nombre desquels Capsicum (piment), Lycopersicon (la tomate) et Solanum (pomme de terre et aubergine), plantes utilisées dans l’alimentation humaine, les Solanacées sont les plus cultivées dans le monde [23].

## Description botanique

La Première caractéristique des Solanacées est que toutes les plantes de cette famille contiennent des substances toxiques, variablement selon leurs organes, et sont donc de dangereux poisons.



[153] *Schéma n° I.6*: Dessins de solanum Dulcamara

Toutes Les solanacées contiennent de la solanine, en quantité toxique et leur ingestion peut être mortelle, les baies mûres sont les parties en contenant le moins, d'ailleurs les fruits des variétés actuelles n'en contiennent plus par sélection, d'où leur consommation possible par l'être humain.

La solanine n'est d'ailleurs pas présente dans les tubercules des pommes de terre mais s'y développe si le tubercule est exposé à la lumière du soleil, le rendant potentiellement toxique. Certaines contiennent de dangereux alcaloïdes (atropine, hyoscamine, scopolamine, nicotine), contrées différemment dans les différents organes de la plante. De ce fait elles ont été utilisées depuis des siècles pour leurs propriétés psychotropes, ou en moindre quantité à but médicinal.

Caractéristiques générales permettant de reconnaître une plante appartenant à cette famille :

- fleurs hermaphrodites et le plus souvent régulières ;

- sépales soudés et persistants, à 5 divisions peu profondes ;
- 5 pétales soudés, formant une corolle en étoile (lobes soudés seulement à leur base) ou en tube (lobes soudés quasiment jusqu'au sommet) ;
- étamines soudées aux pétales, en même nombre que ces derniers (5 dans nos régions) et égales ;
- ovaire généralement à 2 loges ; - fruit pouvant être une baie (morelle, belladone, tomate...) ou une capsule (datura, jusquiame...) ;
- graines rondes et plates, très nombreuses dans chaque fruit.



[154] **Figure I.7** : *Solanum tuberosum* (pomme de terre)

### **I. 1.7 Solanum**

Le *Solanum* est l'un des plus grands genres de plantes vasculaires avec 1 000 à 1 500 espèces, dont environ 1 000 seraient d'origine américaine [24]. La taxonomie du genre et de ses sept sous-genres a subi de nombreuses révisions, mais le genre global consiste en herbes, arbustes, arbres ou vignes herbacées ou ligneuses, généralement avec des épines ou des piquants, glabres ou pubescents avec des poils simples ou étoilés [25]. Le genre *Solanum* comprend la pomme de terre sauvage, *S. tuberosum*, la tomate, *S. lycopersicum* et l'aubergine, *S. melongena*, et de nombreux autres membres sont cultivés à des fins médicinales et ornementales. Bien que l'étymologie du nom scientifique du genre ne soit pas claire, elle peut être dérivée du mot latin «sol», signifiant «soleil», se référant à son affinité pour la lumière du soleil ou au mot latin «solare» signifiant «apaiser». , le mot latin "solamen", signifiant "un

confort", ou le mot akkadien "sululu", signifiant "heureux", en référence aux effets narcotiques de certaines espèces de *Solanum* après l'ingestion [26].

Le genre *Solanum* a été divisé en sept sous-genres, qui sont subdivisés en sections et sous-sections. L'espèce *Solanum rostratum* appartient au sous-genre épineux *Solanum Leptostemonum* et à la section *Androceras*. La section *Androceras* est caractérisée par une répartition principalement tempérée du nord et des fleurs zygomorphes, hétéranthèmes et énantiostyliques distinctes et des tubes de calice épineux qui enveloppent étroitement et complètement les baies [27][28].

Ce sont des arbres, arbustes, plantes sarmenteuses ou herbes. Les feuilles sont alternes ou géminées, simples ou entières à lobées ou composées; le pétiole est présent ou non. Les inflorescences sont terminales, axillaires, latérales (extra-axillaires) ou pseudo-terminales, cymeuses, mais pas à la base. Les fleurs sont racémeuses en panicules ou solitaires. Les pédicelles sont présents ou non. Les bractées sont le plus souvent présentes ou absentes. Les fleurs 5-mères (pièces florales par multiple de 5) sont ♂ et ♀ (ou plantes andromonoïques). Le calice est généralement campanulé ou cupulaire, le plus souvent lobé. La corolle est parfois campanulée, peu ou profondément lobée. Les étamines sont insérées à la base du tube de la corolle. L'ovaire à 2 carpelles possède parfois 4 loges par formation de fausses cloisons. Les baies sont juteuses, charnues ou sèches à la fin. Les graines sont le plus souvent nombreuses et comprimées et les embryons sont fortement courbés [29].

### **I. 1.8 *Solanum Rostratum***

#### **Description botanique**

Les plantes individuelles atteignent 1-1,5 m de haut, avec des feuilles une fois ou deux fois pinnatifides, et des piquants abondants sur les tiges et les feuilles. Il produit des fleurs jaunes avec des corolles pentagonales de 2-3,5 cm de diamètre et faiblement symétriques bilatéralement [27].

Dans son aire de répartition naturelle, *S. rostratum* est pollinisé par des abeilles de taille moyenne à grande, y compris des bourdons[30]. Les fleurs portent deux séries d'anthères de taille inégale et peuvent être nettement colorées[31]. Le fruit, une baie, est entouré d'un calice épineux et les graines sont libérées lorsque les baies sèchent et se fendent alors qu'elles sont encore attachées à la plante. [32].

## Type de plante

Annuel

Herbacé

Graine propagée

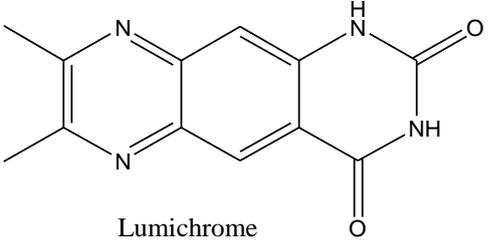
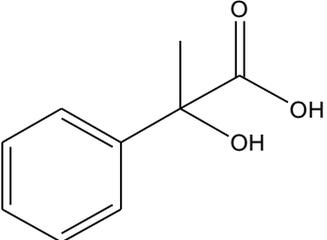
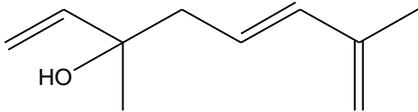
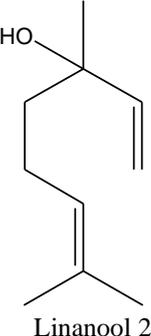
## Distribution

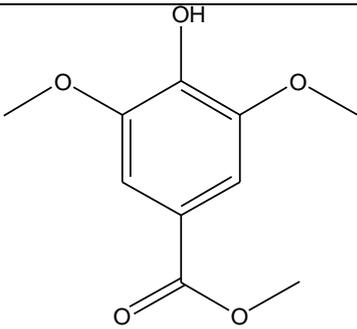
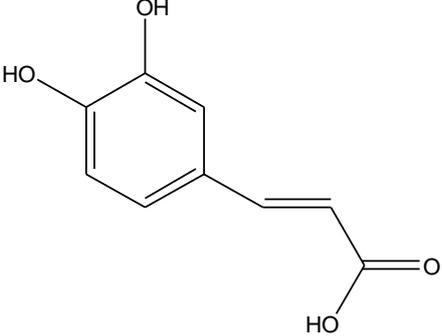
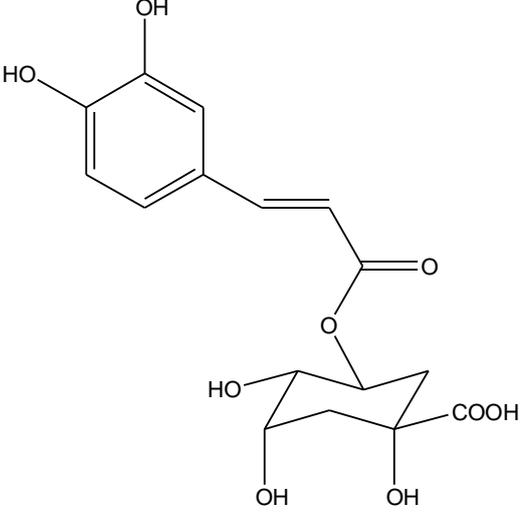
*S. rostratum* est considéré comme indigène au Mexique, où il présente la plus grande diversité génétique [33], ainsi qu'aux États-Unis, en particulier dans la région des Grandes Plaines [27] et est largement naturalisé et invasif dans les régions tropicales et tropicales du monde [34] [35]. En tant qu'espèce introduite, elle n'est pas aussi répandue en Afrique ou en Inde, étant une introduction relativement récente [36][37], comme en Australie, où elle a été qualifiée, dans certaines régions, d'agriculture et d'environnement. mauvaise herbe [34].

## I.2 Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Galactites*

Les seuls travaux effectués sur *Galactites elegans* ont mené à l'isolement et la détermination de quelque produit comme suit :

**Tableau I.1** : Les produits isolés d'espèce *galactites elegans*

Structures		Ref
 Lumichrome	 Acide phenyllactique	[38]
 Hotrienol 2	 Linanool 2	[39]

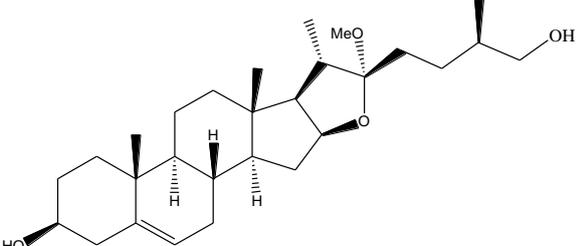
STRUCTURES		Ref
 <p>Methyl syringate</p>		[40]
 <p>Acide cafeique</p>	 <p>Acide chorigenique</p>	[41]

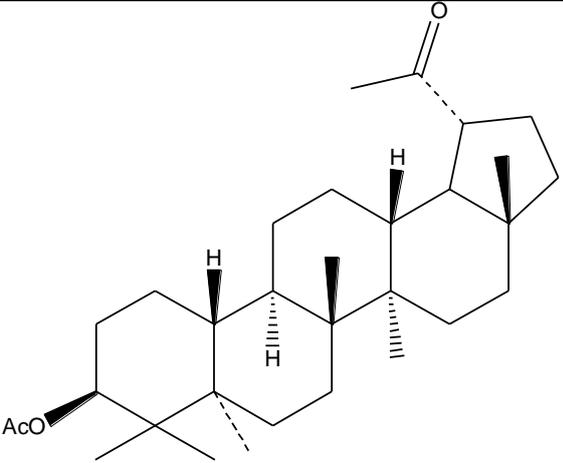
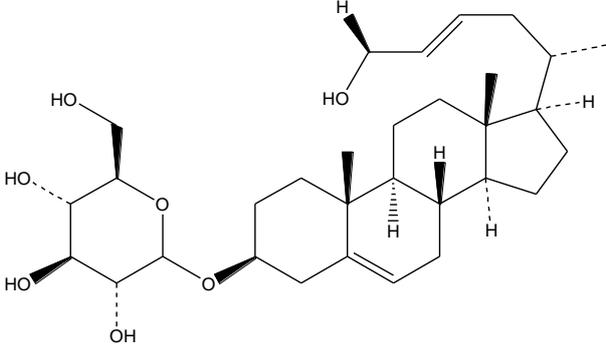
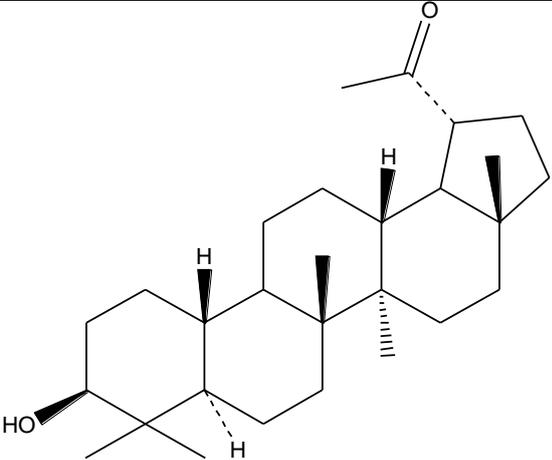
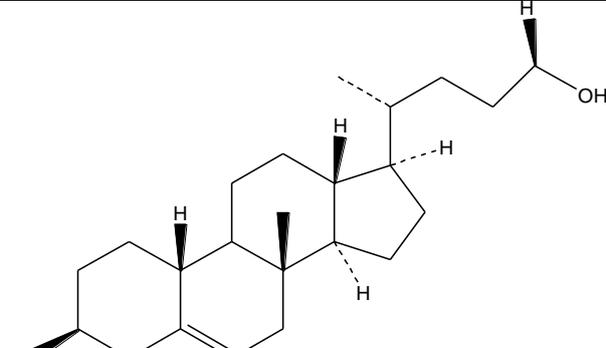
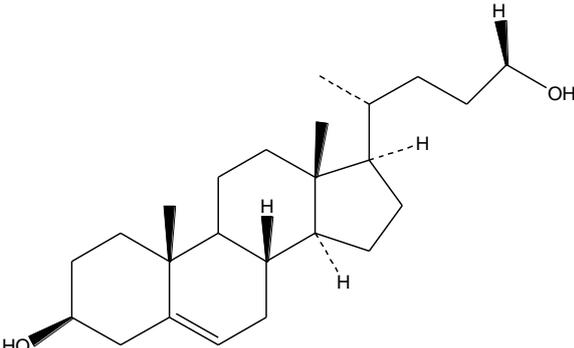
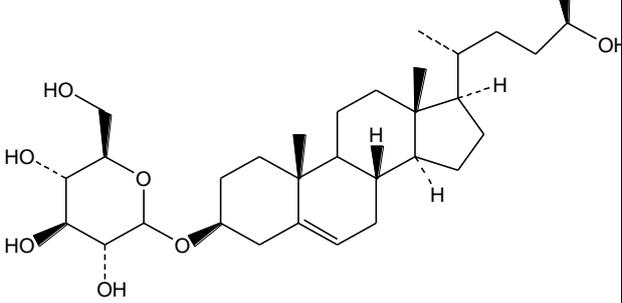
### 1.3 Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre solanum

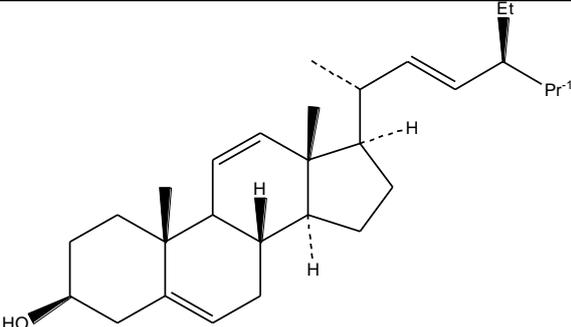
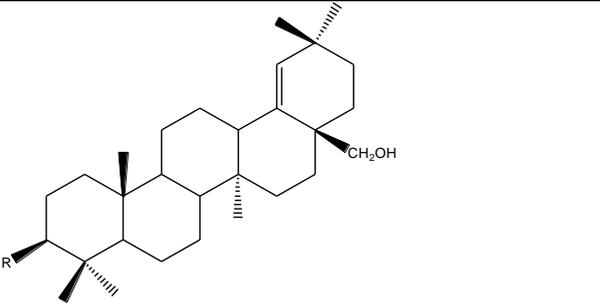
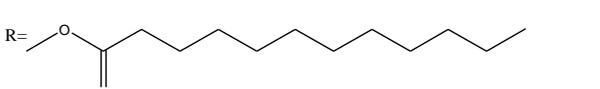
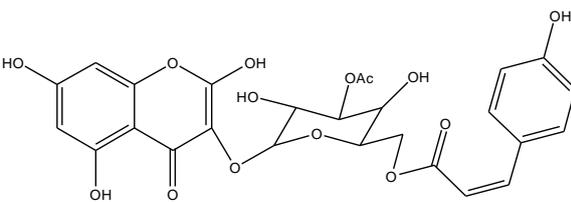
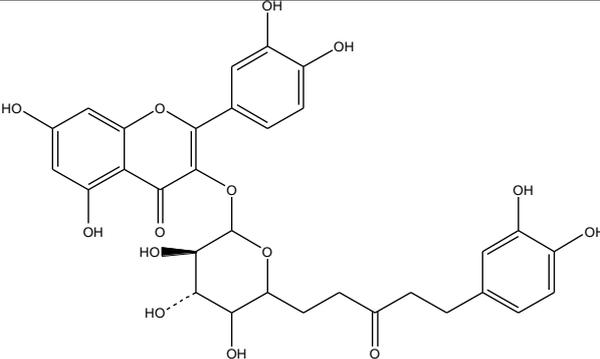
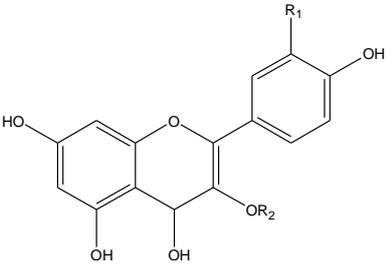
#### Rostratum :

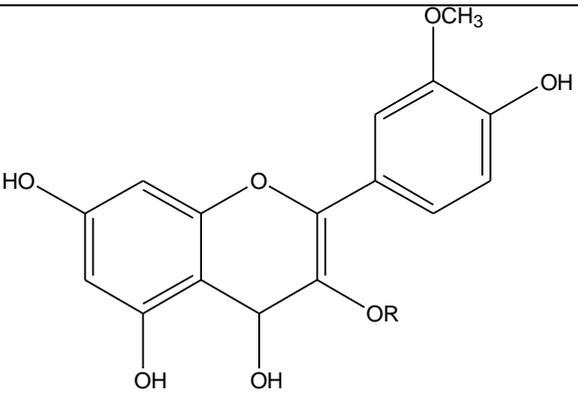
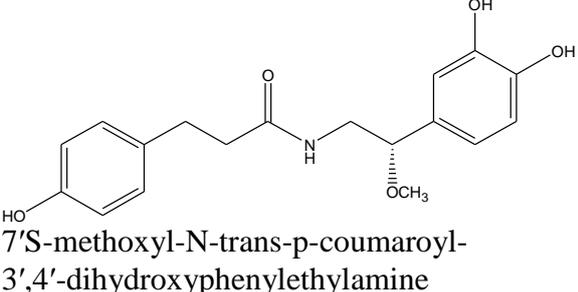
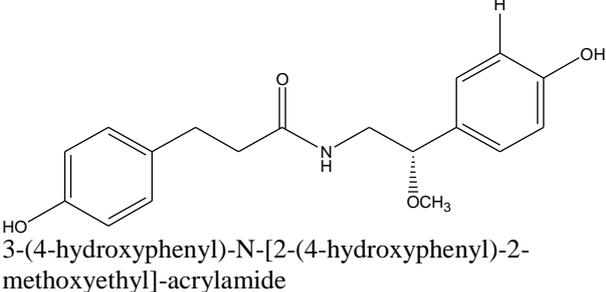
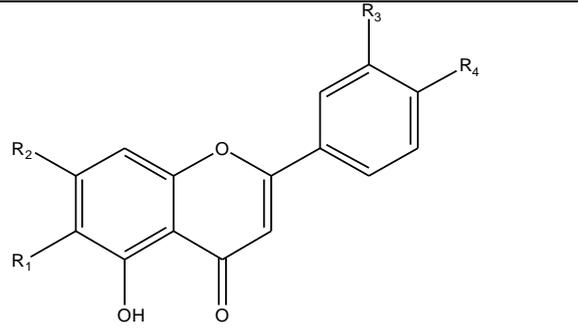
Les seuls travaux effectués sur *Galactites elegans* au sein de laboratoire mené à l'isolement et la détermination de quelque produit suivant :

*Tableau I.2* : Les produits isolés d'espece *Solanum rostratum*

STRUCTURES		Ref
 <p>furost-5-ene-3,2diol,22-methoxy</p>		[41]

STRUCTURES		Ref
 <p>Lup-20(29)-en-3-β-ol,acetate</p>	 <p>Stigmasta-5,22-diene, 3β-(β-glucopyranosyloxy)</p>	[42]
 <p>Lup-20(29)-en-3-β-ol</p>	 <p>stigmast-5-en-3 β-ol</p>	[43]
 <p>Olean-12-en-28-oic acide 3β-Hydroxy</p>	 <p>β-D-glucopyranoside, (3β)stigmast-5-en-3-yl</p>	[44]

STRUCTURES		Ref															
 <p>Stigmasta-5,22dien-3-ol (3β,22E)</p>	 <p>3β-tetradecanoyloxy-28-hydroxylolean-18ene</p>  <p>3β-dodecanoyloxy-28-hydroxylolean-18ene</p>	[45]															
 <p>luteoline-3'-(6E-p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside)</p>	 <p>Quercetin 3-(6-E-p-coumaroyl-β-Dglucopyranoside)</p>	[46]															
	<table border="0"> <tr> <td>R1</td> <td>R2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>H</td> <td>Quercetin</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>glc</td> <td>Kaempferol-3-O-β-d-glucopyranoside</td> </tr> <tr> <td>OCH3</td> <td>gal</td> <td>Quercetin 3'-methoxy-3-O-β-d-galactopyranoside</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>gal</td> <td>Quercetin-3-O-β-d-galactoside</td> </tr> </table>	R1	R2		OH	H	Quercetin	H	glc	Kaempferol-3-O-β-d-glucopyranoside	OCH3	gal	Quercetin 3'-methoxy-3-O-β-d-galactopyranoside	OH	gal	Quercetin-3-O-β-d-galactoside	28
R1	R2																
OH	H	Quercetin															
H	glc	Kaempferol-3-O-β-d-glucopyranoside															
OCH3	gal	Quercetin 3'-methoxy-3-O-β-d-galactopyranoside															
OH	gal	Quercetin-3-O-β-d-galactoside															

STRUCTURES		Ref
	<p><b>R=Glc</b> 3'-O-Methylquercetin 3-O-β-D-glucopyranoside</p> <p><b>R=Gal</b> 3'-O-Methylquercetin 3-O-β-D-galactopyranoside</p>	29
 <p>7'S-methoxyl-N-trans-p-coumaroyl-3',4'-dihydroxyphenylethylamine</p>	 <p>3-(4-hydroxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-acrylamide</p>	30
		

**Tableau I.3:** Flavonoïdes isolés de solanum Rostratum

R1	R2	R3	R4	Composés
H	OMe	H	OH	5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone. Genkwanine [46].
H	OH	H	OH	7,4'-dihydroxy-5-méthoxyflavone [42].

***Partie 11 : Les Principaux Métabolites  
Secondaire***

## **II composés phénoliques et terpéniques**

### **II. 1 Introduction :**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse [47].

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du 19<sup>ème</sup> siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type [47].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux, en particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines [47].

### **II. 2- Classement des métabolites secondaires :**

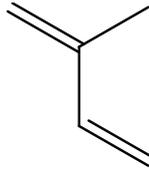
Les métabolites secondaires dépassant actuellement 100 000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales [48][49] :

- \* Les terpénoïdes
- \* Les composés phénoliques
- \* Les alcaloïdes

#### **II. 2-1 terpénoïdes :**

##### **II. 2-1-1 Généralités**

Dans le règne végétal, les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène (à 5 atomes de carbone) [50,51,52]. A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels: hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes,(C40) et polyterpènes.



*Isoprene*

*Schéma n° I.8: Structure de base des terpénoïdes*

## **II. 2-1-2 classification ;**

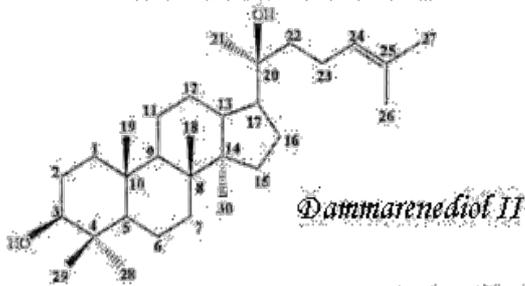
Les divers squelettes triterpéniques peuvent être classés en :

- composés aliphatiques comme le squalène, surtout rencontré dans le règne animal et qui se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, lin, arachide).
  - composés tricycliques comme l'onocérane.
  - composés tétracycliques tels les stéroïdes et les phytostérols.
  - composés pentacycliques très fréquents chez les plantes comme les  $\alpha$  et  $\beta$  amyrines.

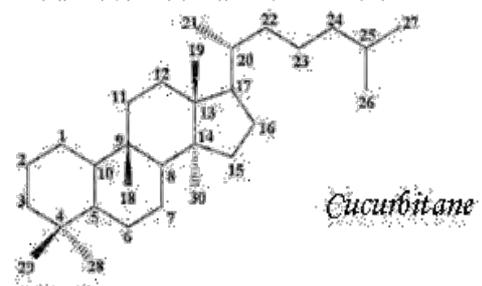
Cette classification est basée sur la structure du squelette carboné de l'hydrocarbure saturé dont dérivent les triterpènes [53], ces métabolites sont regroupés en triterpènes tétracycliques (Dammaranes, Cucurbitanes, Lanostanes) et pentacycliques (Lupanes, Ursanes, Oléananes et Friedelanes) (Schéma I-9).

## Triterpènes tétracycliques :

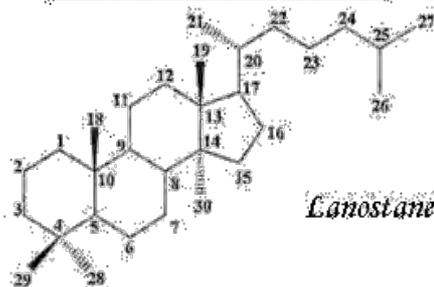
### La série des Dammaranes :



### La série des Cucurbitanes :

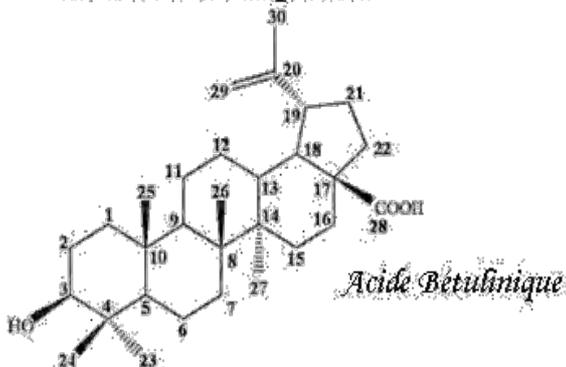


### La série des Lanostanes :

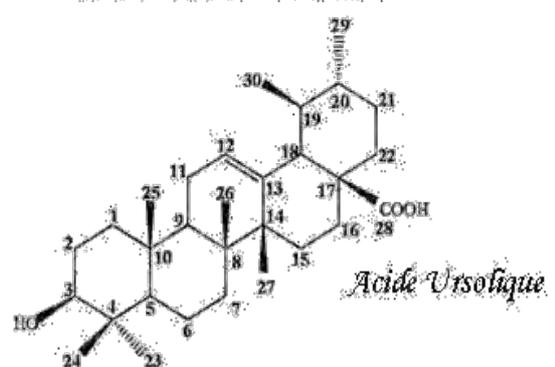


## Triterpènes pentacycliques :

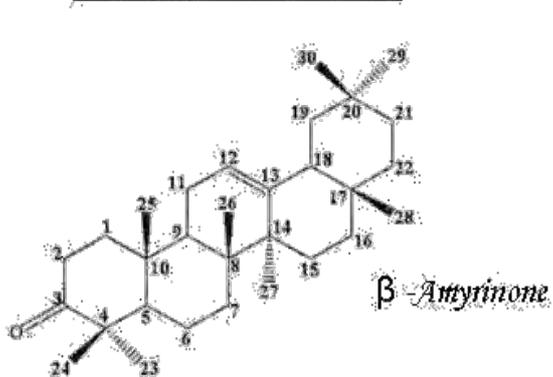
### La série des Lupanes :



### La série des Ursanes :



### La série des Oléananes :



### La série des Friedelanes :

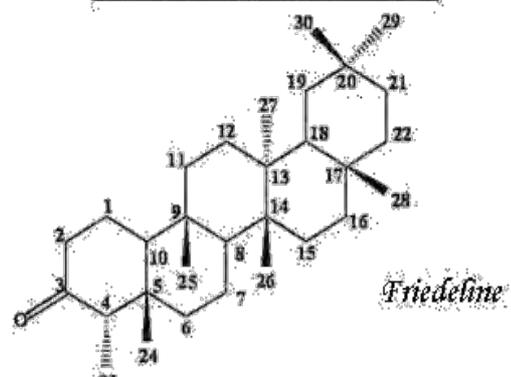
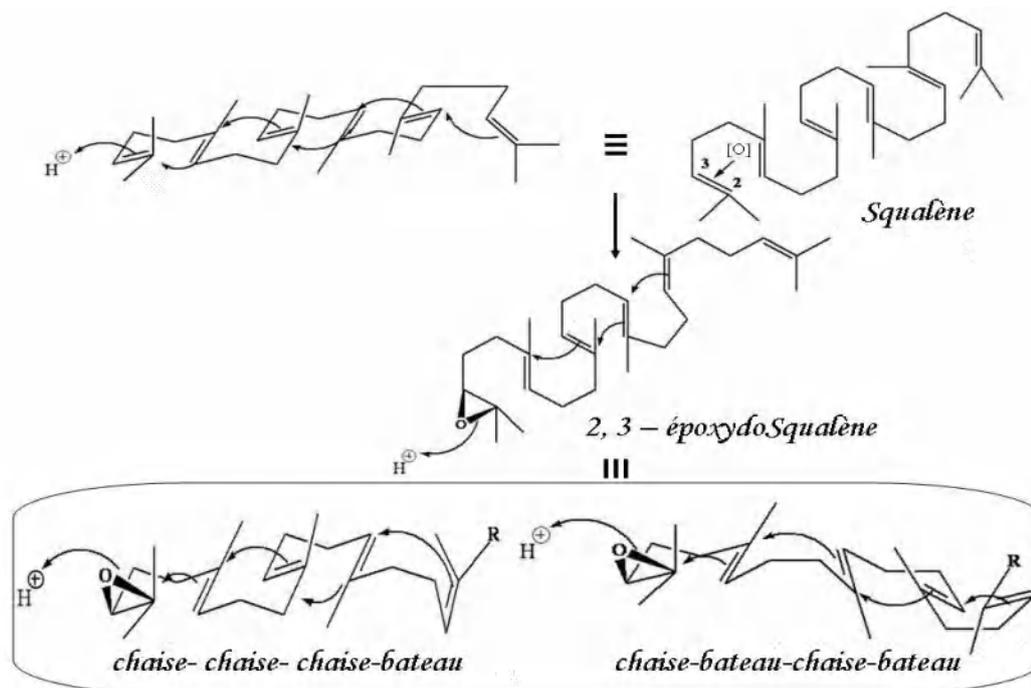


Schéma n° I – 9 : Principaux classes des triterpènes.

La diversité au niveau structurale des triterpènes résulte des nombreuses conformations que peut adopter le substrat acyclique. Pour une réaction de cyclisation donnée, c'est l'enzyme qui impose cette conformation via ses interactions enzymes / substrat au sein du site actif [54].

Par exemple, les enzymes prényl-transférase et terpène synthase sont responsable de la diversification des triterpènes par deux réactions opérées sur des différents substrats : L'une de l'addition répétitive d'unité C<sub>5</sub>, l'autre de la cyclisation.



**Schéma n° I-10 :** Oxydation du squalène. [55]

C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme que dépend l'orientation de la biosynthèse vers stéroïdes et les triterpènes d'autre part.

1 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane précurseur immédiat, par une suite de migration 1, 2 de protons et de méthyles, des cycloartanes et des cucurbitanes (ces migrations sont rendues possibles par la disposition trans-antiparallèle des protons et méthyles en C-17, C-13, C-14 et C-8).

2 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise- chaise- chaise-bateau, la cyclisation conduite à un cation dammarane, qui peut aussi se réarranger :

— soit par des migrations concertées conduisant au tirucallol et à l'euphol, précurseurs des limonoïdes et quassinoïdes.

— soit, et c'est le cas le plus fréquent, par formation d'un cycle supplémentaire ce qui conduit aux triterpènes pentacycliques : Oléananes, Ursanes, Lupanes, Friedelanes et taraxastanes, etc., [56].

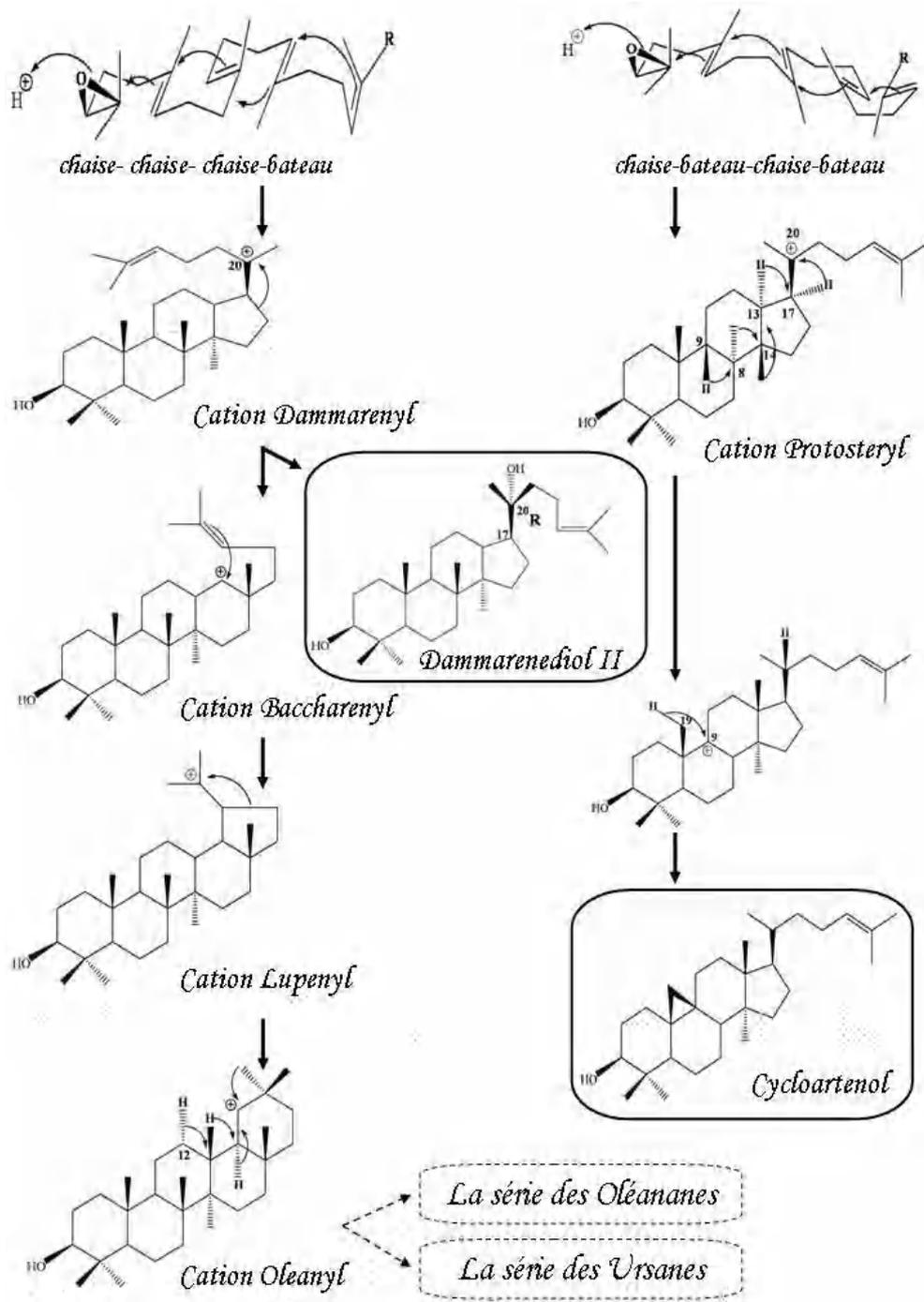


Schéma n°1 – 11 : Principaux cations dans la biosynthèse. [57]

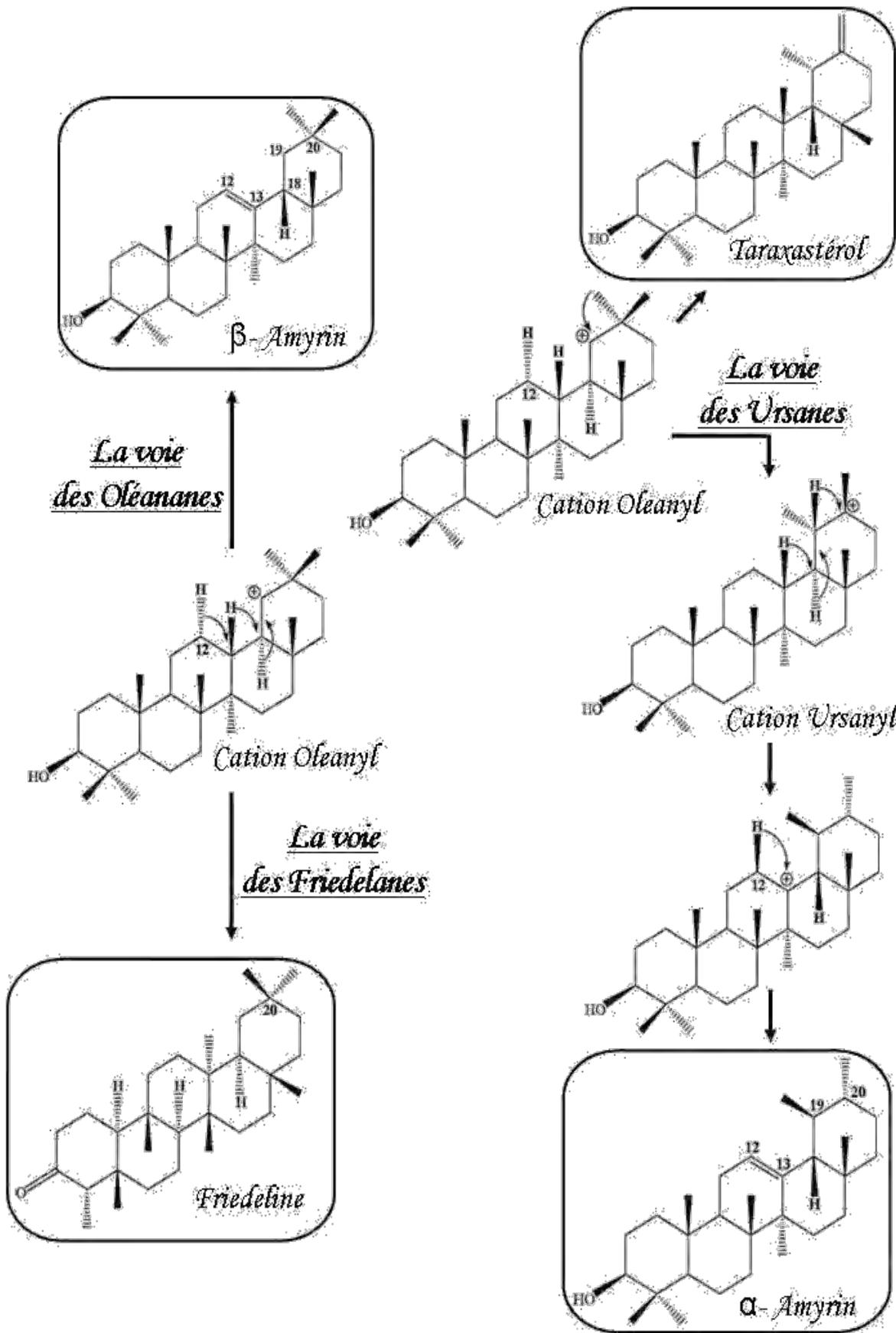


Schéma n°I – 12 : La voie des Oléananes, Friedelines et Ursanes. [58]

## II. 2-2 FLAVONOÏDES

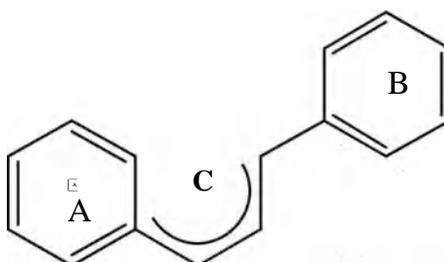
### II.2.2.1 INTRODUCTION :

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaune mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $OH^\cdot$ ) et superoxydes ( $O_2^\cdot$ )

Nous aborderons dans un premier lieu la biosynthèse des flavonoïdes, puis nous présenterons leur classification et leur distribution nutritionnelle. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par une présentation de leurs activités biologiques.

Vers l'an 2000 plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés [1]. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en  $C_6$  (A et B), reliés par une chaîne en  $C_3$  soit un système  $C_6-C_3-C_6$  [2], comme le montre la Figure II.13 [3].

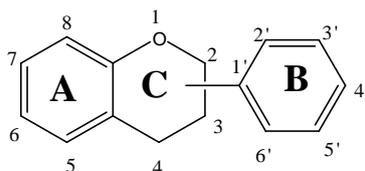


*Schéma n°I-13*: Squelette de base des flavonoïdes

### **II-2.2.2. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION :**

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C 3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [12].

Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 comme le montre la figure II.7.



**Schéma n° I.-14**

Le Schéma I.-14 et le tableau I-4 montre les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes

**Tableau I.4:** Division des flavonoïdes

<b>Flavones</b>	<b>Flavonols</b>	<b>Flavonone</b>	<b>Isoflavones</b>	<b>Chalcones</b>	<b>Aurones</b>
Apigénine Lutéoline	Kaempférol quercétine	Eriodictyol	Génistéine	Butéine Phlorétine	Sulfurétine

#### **II.2.2.2.1 FLAVONES ET FLAVONOLS :**

Comme nous avons mentionné ci-dessus, tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (schéma I.-14), cela étant, l'un d'entre eux peut être absent. Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes

hydroxyles (OH) comme peuvent être des méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3.

#### **II.2.2.2 FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS :**

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> et par la présence de centres d'asymétrie (Schéma I.-14). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols.

#### **II. 2.2.3 FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOL**

A la différence des flavonoïdes décrits ci-dessus, ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés.

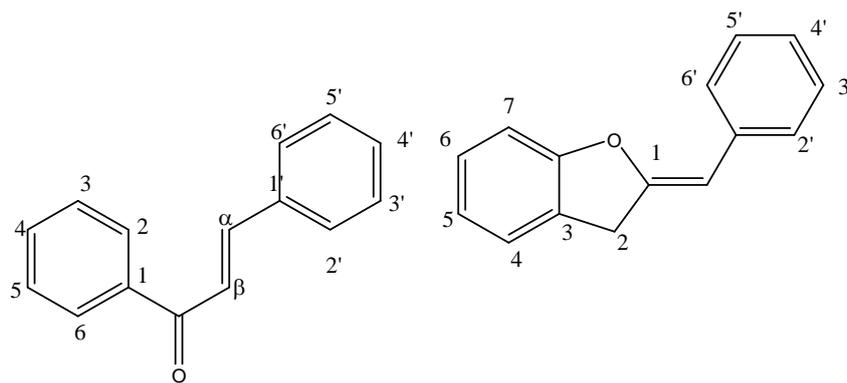
Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélagonidine-3-O-glucoside et le cyanidine-3-O-rutose ou kéraçyanine. Les plus fréquents sont le pélagonidine et la cyanidine.

#### **II 2.2.2.4. CHALONES ET AURONES :**

Les chalcones sont différents des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. D'une part l'ouverture du noyau pyranique central d'autre part elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique,  $\alpha,\beta$ -insaturée (**Figure I.15**). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (**Figure I.15**).



Chalcone

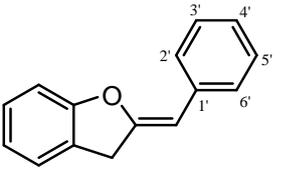
Aurone

**Schéma I.-15:** Structure des chalcone et Aurone

**Tableau I.5 :** les différentes classes de flavonoïdes

CLASSES		PRINCIPALES SUBSTANCES		
Dérivés	Structure	Nom de la famille	Nom	Hydroxylation
<b>Phenyl-2-chromone</b>		Flavone Flavonol Flavanone (C2-C3 liaison simple)	Apigénine myricétine butine	5, 7, 4' 3, 5, 7, 3', 4', 5' 7, 3', 4'
<b>Phenyl-2-chromone</b>		Catéchines (flavanols-3)	gallo catechine	5, 7, 3', 4', 5'
<b>Phenyl-3-chromone</b>		Isoflavone	Genisteine	5, 7, 4'
<b>Flavylium</b>		Anthocyanidine	cyanidine	3, 5, 7, 3', 4'
<b>Chalcone</b>		Chalcone	Buteine	3, 4, 2', 4'

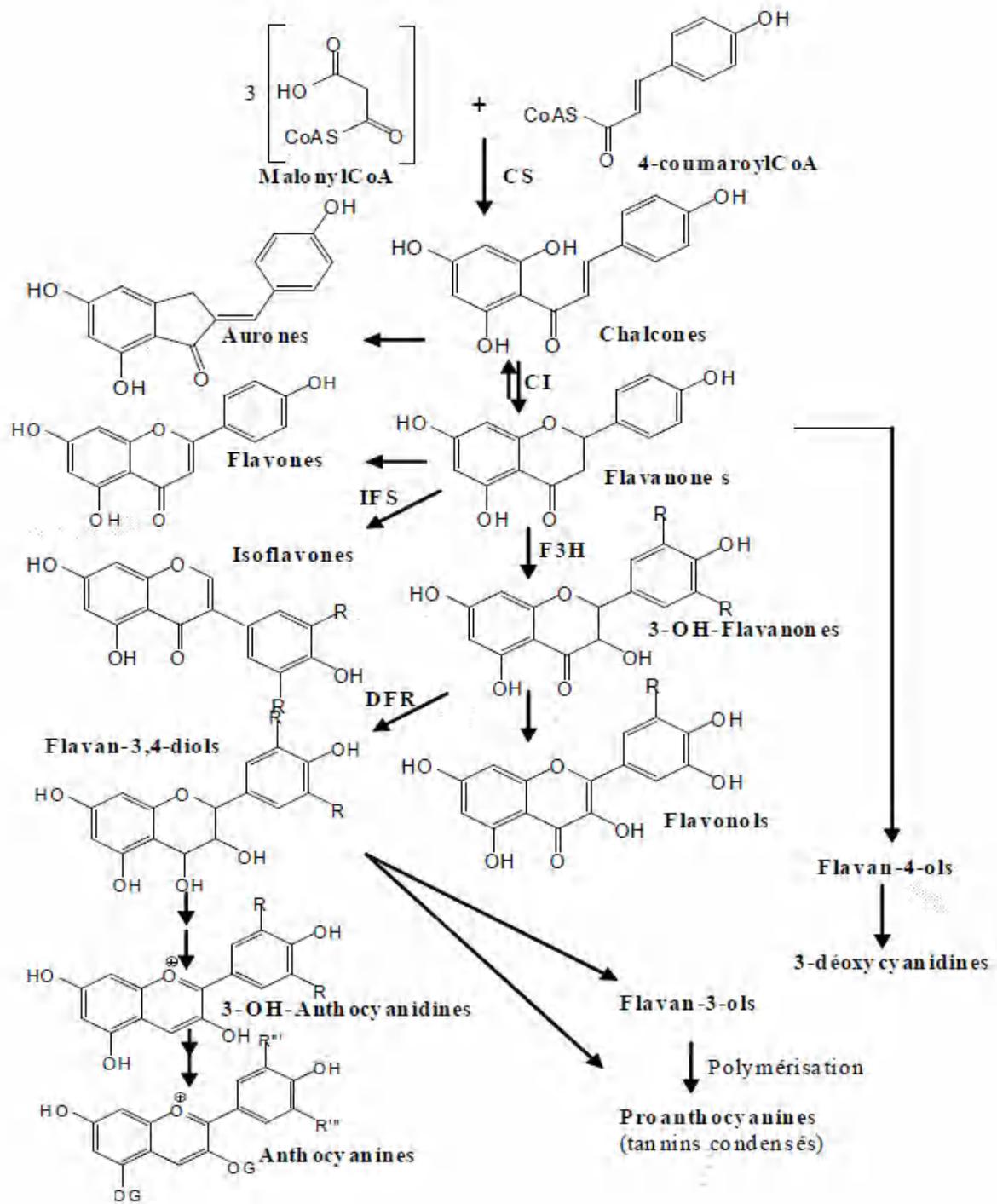
**Tableau I.5 : (suite)**

Aurone		Aurone	aureusidin	4, 6, 3', 4'
--------	---	--------	------------	--------------

### **II.2.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes :**

Les composés de départ sont la malonyl-CoA et les dérivés-CoA de l'acide cinnamique (cinnamoyl-CoA) : ces derniers se forment avec l'intervention de cinnamoyl-CoA ligase. C'est l'acétyl-CoA carboxylase qui prépare le malonyl-CoA où trois molécules de cette dernière et a cinnamoyl-CoA produisent à l'aide de la chalcone synthase, la structure de base en C-15 sous forme d'une chalcone soit la 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone [59]. Ce chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec les flavanoïdes. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme la chalcone isomérase, cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition syn. sur la double liaison) conduisant à la seule (2S)-flavanone [60].

- ◆ Les aurones dérivent directement des chalcones;
- ◆ L'oxydation des flavanones suivi de réarrangement, c'est-à-dire le déplacement d'un groupement aryle de C-2 à C-3 en présence de l'enzyme Isoflavone synthase conduit à la formation d'isoflavone ; elle est considérée comme une réaction spécifique pour la biogenèse des isoflavonoïdes [61] où le composé 2-hydroxy isoflavone est considéré comme un intermédiaire [62];
- ◆ L'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les flavanones conduit à la formation des flavones cette réaction est catalysée par deux types d'enzymes différentes: la flavone synthase I et la flavone synthase II (FNSI et FNSII);
- ◆ L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux dihydroflavonols, cette réaction est catalysée par l'enzyme flavanone 3-hydroxylase;
- ◆ Le dihydroflavonol est considéré comme un intermédiaire direct pour la synthèse des flavonols et des flavan-3,4-diols. Ce dernier est un intermédiaire biosynthétique dans la formation des proanthocyanidines des anthocyanidines et catéchines (flavanols);
- ◆ Les flavonols sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les dihydroflavonols en présence d'enzyme flavonol synthase.



**Schéma I-16:** schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes.

## **II.2.2.4 SUBSTITUTION DU SQUELETTE FLAVONIQUE :**

### **a) L'hydroxylation :**

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogenèse (figure I.16), les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [63].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [64, 65].

Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées [64].

### **b) La méthylation ou méthylation :**

La méthylation se fait uniquement en C-6 et ou C-8 par contre la fixation du groupement éthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (*O*-ethyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [66, 67].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [66].

### **c) La O-glycosylation**

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose). La *O*-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glycosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose).

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 [68].

### **d) La C-glycosylation :**

Les flavonoïdes *C*-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [69]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [70].

D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et ou en position C-8.

### **II.2.2.5. DISTRIBUTION ET LOCALISATION :**

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, oranges, pamplemousses, et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, brocolis, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales.

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [71-73]. Le **tableau I.6** regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes [71-73].

**Tableau I.6:** Sources alimentaires des flavonoïdes

Flavonoïdes	Aliments
<b>Flavanones</b>	
Naringénine	fruits du genre <i>citrus</i>
<b>Flavones</b>	
Chrysin	peau des fruits
apigénine	persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	persil, céleri

Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectés dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l'héspérétine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes [72]. Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de quercétine. Cette dernière comme flavonol se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également détecté. Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois. En effet, cela est reporté dans le **tableau I.7** où on a la répartition des 4-oxo flavonoïdes dans quelques fruits et légumes.

**Tableau I.7 : Teneur en 4-oxo-flavonoïdes de quelques fruits et légumes [73]**

<b>Fruits et l'égumes</b>	<b>mg/kg poids</b>	<b>Aglycones</b>
Persil	500	Apigénine
Ciboulette	110	Quercétine + Kaempférol
Chou frisé	150	Quercétine + Kaempférol
Chou frisÉé (serré)	105	Quercétine + Kaempférol
Laitue	320	Quercétine
Oignon	300	Quercétine + Kaempférol
Endives	290	Kaempférol
Poireau	100	Quercétine + Kaempférol
Céleri	100	Apigénine + Luteoline
Haricots verts	70	Quercétine + Kaempférol
Choux de Bruxelles	65	Quercétine + Kaempférol
Brocolis	35	Quercétine + Kaempférol
Tomate	10	Quercétine + Kaempférol
Chou-fleur	3	Quercétine + Kaempférol
Pomme de terre	3	Quercétine + Kaempférol
Orange	1700/2800	Hespérétine
Pamplemousse	2700/6000	Naringénine
Myrtilles cultivÉes	165	Quercétine
Cerises aigres	86/100	Quercétine + Kaempférol
Cerises douces	12	Quercétine + Kaempférol

Les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les raisins et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis.

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. Par exemple la chrysin, la quercétine, et la galangine se trouvent dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires.

### **II.2.2.6. PROPRIETES DES FLAVONOÏDES :**

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937) [74], chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P ét nt a première lettre du mot perméabilité).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permettent pas en suite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

### **II.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE:**

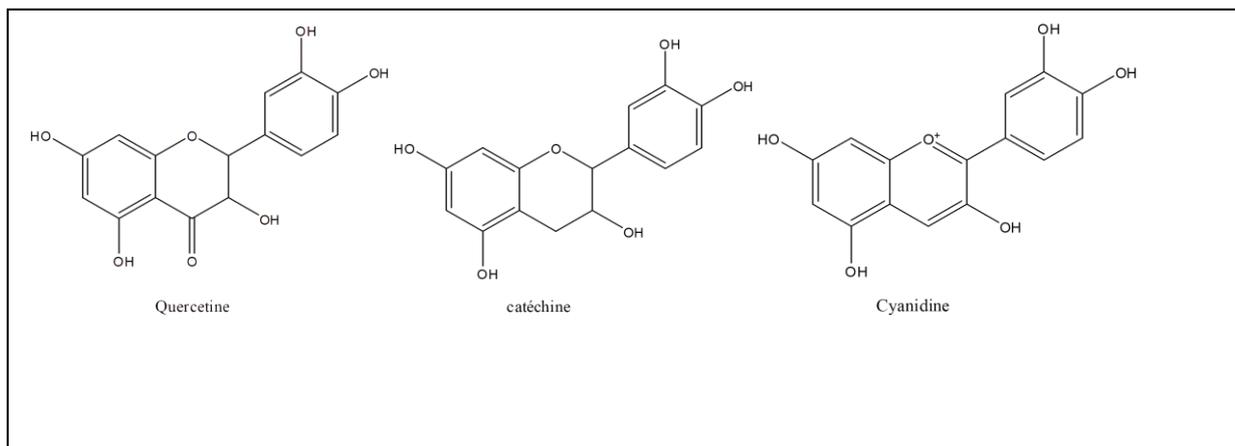
L'oxygène est essentiel à la vie, mais en même temps représente une source d'agression constante pour les organismes vivants par les radicaux libres. Si la production de ces derniers n'est pas contrôlée d'une manière adéquate, ces formes réactives de l'oxygène causent des dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, modifiant leurs propriétés et par là, la structure et la fonction des cellules. Les radicaux libres participent à la pathogenèse d'un nombre croissant de maladies, dont le cancer et l'artériosclérose. Ils sont aussi impliqués dans l'asthme, l'inflammation, la neurodégénérescence, la maladie de Parkinson et le mongolisme. Les inhibiteurs de radicaux libres tels que les polyphénols constituent de ce fait une arme relativement efficace pour la prévention et le traitement de ces diverses affections. En effet au sein de l'organisme, les flavonoïdes protègent les acides gras insaturés, les protéines et le

matériel génétique. Ils contribuent également à prévenir les cancers et les maladies cardiovasculaires, à renforcer l'activité du système immunitaire, à faire face aux polluants exogènes de toutes origines et enfin à ralentir le processus de vieillissement [75].

Les résultats obtenus pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes, ont montré que leur activité antioxydante est essentiellement liée à leur structure.

**a) Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavonoïdes**

Une étude de l'activité antioxydante de trois flavonoïdes (figure I.17) hydroxyles aux mêmes positions [un flavonol (la quercétine) ; un flavan-3-ol (la catéchine) et un anthocyanine (la cyanidine)] a montré que l'activité de la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine. Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> et une fonction 4-oxo. La cyanidine avec une structure conjuguée, a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine [75].



*Schéma I.-17: 3,5,7,3',4' –pentahydroxy flavonoïdes*

**b) Importance de l'ortho-dihydroxy du cycle B des flavonoïdes :**

La présence de deux groupements hydroxyles ortho sur le cycle B d'un flavonoïde (quercétine) lui donne une activité meilleure que celle où on a deux hydroxyles en position méta, ou un seul hydroxyle. Ce qui montre l'importance de la structure ortho-dihydroxy du cycle B [75].

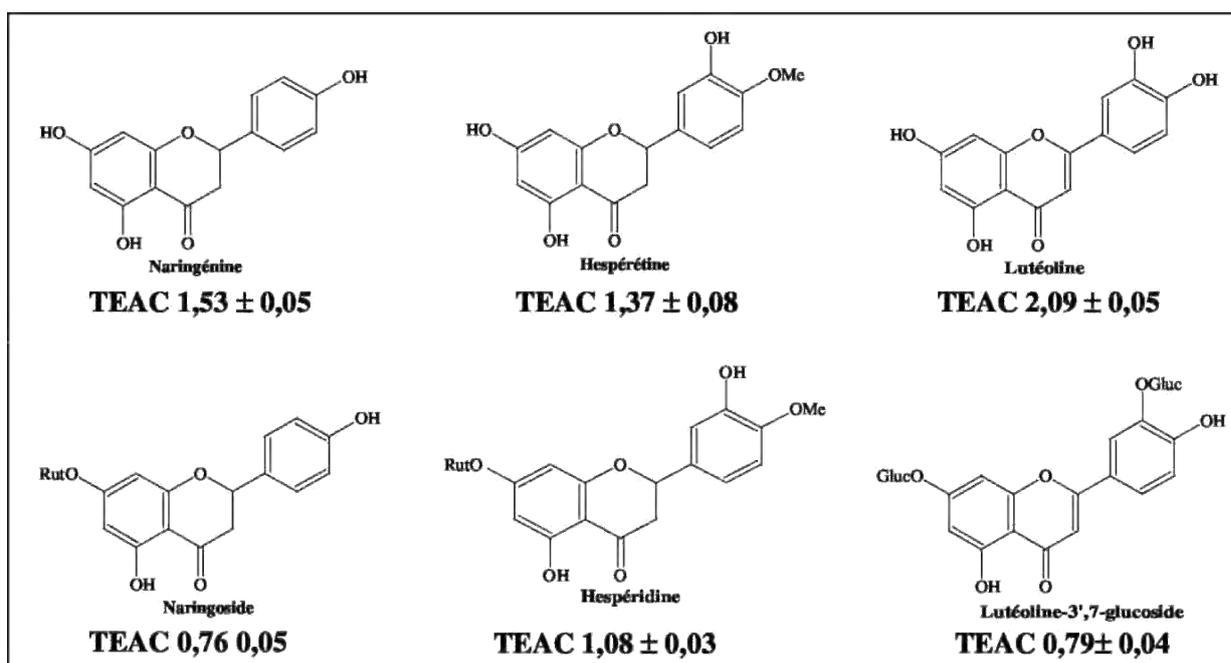
**c) Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> :**

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante. Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> adjacente à la fonction 4-oxo [74,75].

#### **d) L'effet de la glycosylation et la O-méthylation sur l'activité des flavones et**

##### **flavanones :**

La comparaison de la naringénine avec le naringoside (Figure I.18) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité antioxydante. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucosides. La O-méthylation du groupe 7-OH a donné des résultats semblables [75-76] et [78-79].



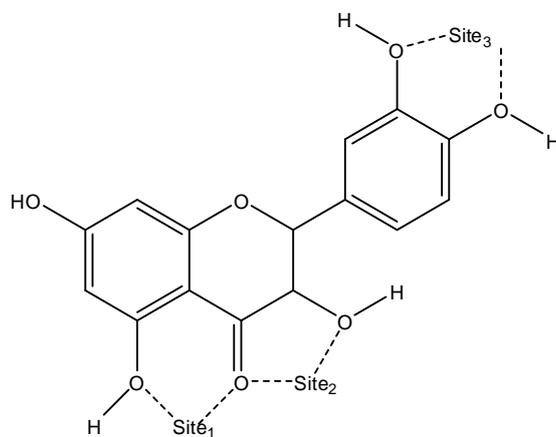
**Schéma I.-18:** Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones des flavones

et des flavanones (les valeurs sont exprimées en mM) [75]

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C<sub>2</sub>- C<sub>3</sub> en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol. Sa structure articulièrè lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation co uné

ent admis pour les flavonoïdes figure I.19. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [75].



Quercetine

**Schéma I.-19:** structure de la quercétine, numérotation des sites potentiels de chélation

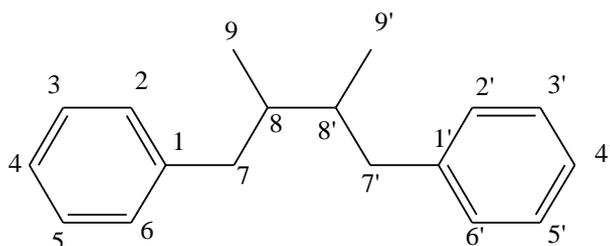
### **II.3.1. AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES :**

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

Ils sont notamment : antiallergiques [79,80], anti-inflammatoires [81, 82], antihypertenseurs [83], anti-influenzas [84], antifongiques [85], antivirales [86], antiulcéreux [79, 87], antiradicalaires [88,89], et on leur reconnaît également une activité anti-malaria [90]. Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [91]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [92, 93].

### **II-4 Lignanes**

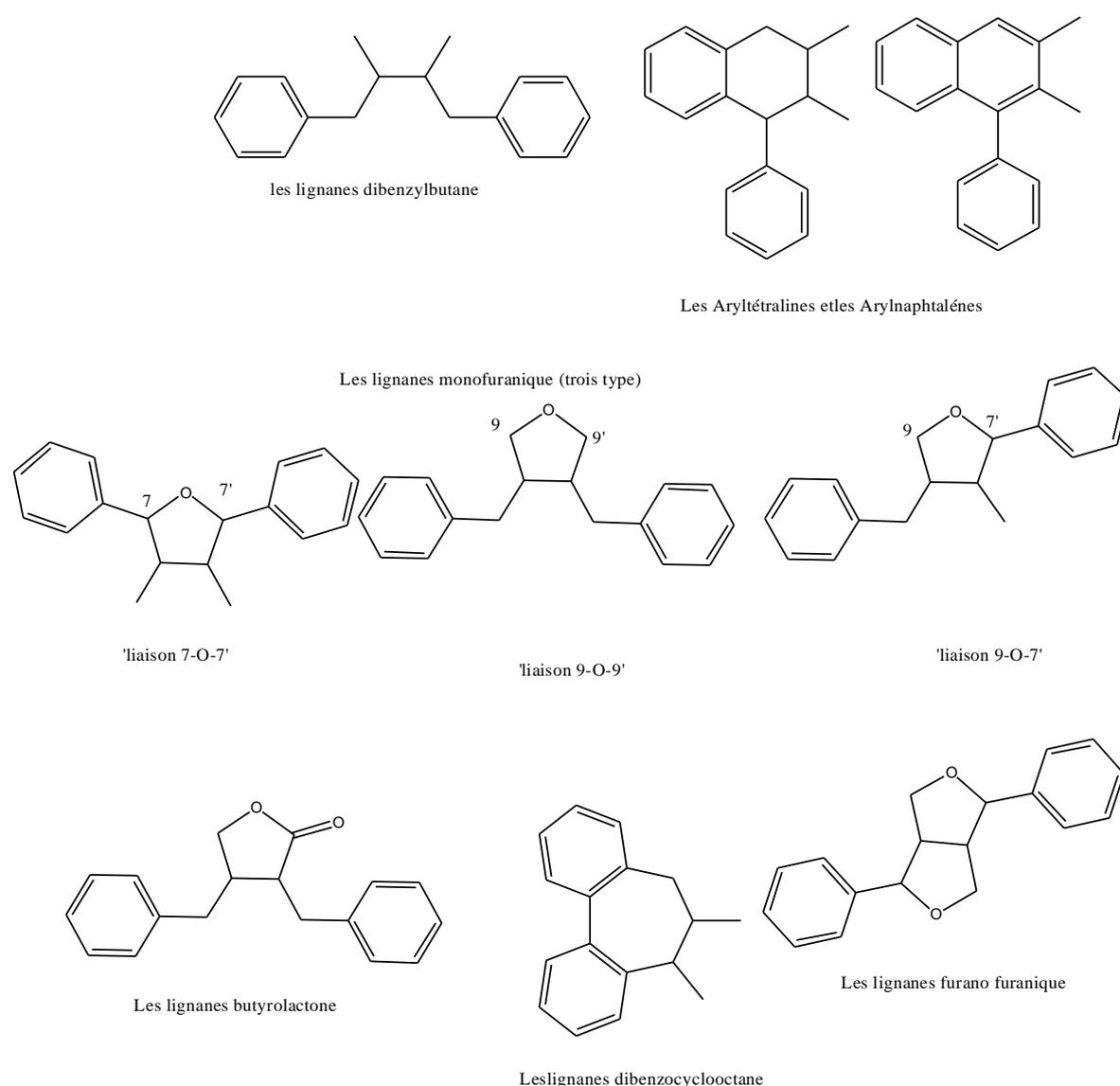
Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936 [94], désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8') (Figure I-20)



**Schéma I-20 :** structure de base de lignane

## II-4-1. Classification des lignanes

Selon le mode de jonction de l'atome d'oxygène (un ou plusieurs) dans le squelette carboné, et selon le type de cyclisation, on peut classer les lignanes en six groupes structuraux (Figure I-21), [95]



**Schéma I.- 21:** Principaux types des lignanes

À cette diversité structurale des lignanes, la présence des centres chiraux ajoute à ces molécules une diversité énantiomérique dépendante de la configuration absolue des carbones asymétriques. Ces métabolites existent soit uniquement sous la forme d'un seul énantiomère (dibenzylbutanes), ou en mélange d'énantiomères dont la composition peut être variable (les furofuranes et les furanes), et parfois sous forme d'un mélange racémique. [96].

#### **II-4-2 Activités biologiques des lignanes**

Les fonctions biologiques des lignanes restent inconnues. La forte toxicité de certains de ces composés, tels que la podophyllotoxine, a mené au postulat, généralement bien accepté, que les lignanes pourraient être des molécules de défense protégeant la plante contre les herbivores et les pathogènes . À l'appui de ce postulat, il existe des travaux qui ont mis en évidence des propriétés insecticides, antifongique ou encore antibactérienne, antivirale, antihépatotoxique, anticancéreux, et antimicrobienne. Les lignanes possèdent également des propriétés antioxydante [97,98]. Leur accumulation dans certaines graines oléagineuses (dans les graines de lin par exemple), pourrait suggérer un rôle de protection des acides gras contre les phénomènes d'oxydation. Les lignanes diarylfuranofuraniques tels que le sésaminol ont démontré des propriétés antioxydante expliquant ainsi la stabilité de cette huile [99].

*Chapitre II : Travaux  
Experimental*

## **II. 1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE SOLANUM**

### **ROSTRATUM :**

#### **II. 1. 1. DESCRIPTION BOTANIQUE DE L'ESPECE :**

- **a) PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE :**

**Embranchement:**

\* **Classe:** Magnoliopsida

\* **Ordre:** Solanales

\* **Famille:** Solanaceae

\* **Sous-famille:** Asteridae

\* **Genre :** *Solanum*

\* **Espèce:** *Solanum rostratum*

- **b) DESCRIPTION BOTANIQUE :**

Herbe annuelle à c. 1 m, vert ou gris-vert, pubescent avec des poils stellaires et minuscules glandulaires; piquants à 1 cm de long, abondants sur la plupart des parties.

Feuilles ovales ou ovales-oblongues; limbe de 2-10 cm de long, 1-8 cm de large, concolore, lobé; les lobes obovaires, les inférieurs formant souvent des folioles; pétiole à 5 cm de long, décurrent.

Inflorescence à 10 fleurs; pédoncule de 15-30 mm de long; rachis jusqu'à 6 cm de long, pédicelles de 5 à 10 mm de long. Calice de 6-10 mm de long, agrandi en fruits; lobes étroitement triangulaires, 3-5 mm de long. Corolle irrégulièrement en rotation, 30-40 mm de diamètre, jaune vif. Quatre anthères de 6-8 mm de long, droites, la cinquième de 10 mm de long, incurvées.

Berry globuleux, 10 mm de diamètre, séchant noirâtre, peau de papier. Graines de 2-2,5 mm de long, brunâtre foncé ou noires. [100]



[155]Figure n° III-1 : Photo de *Solanum rostratum*

### **II. 1. 2. MATERIEL VEGETAL :**

Les parties aériennes de *S. rostratum* ont été récoltées à la fin avril 2009 (stade de floraison) à Constantine, en Algérie. Les parties aériennes fraîches ont été séchées jusqu'à température ambiante.

### **II. 1. 3. EXTRACTION :**

Le poids de la matière végétale séchée est de 1400g. Les parties aériennes sont coupées en petits morceaux, elles sont ensuite extraites par macération dans un mélange Méthanol-Eau température ambiante (80 :20 V) pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois. Les

diverses fractions récupérées sont ensuite réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieure à 70 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. Ce dernier est repris par de l'eau bouillante, une décantation pendant une nuit permet l'élimination de la chlorophylle.

Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau, puis filtrées et enfin concentrées à sec sous pression réduite et pesées.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant (figure n° III.2) et le rendement des phases organiques sont donnés dans le **tableau n° III.1**.

*Tableau n° III.1 : Rendement des extraits*

<b>Matériel végétal</b>	<b>Extrait</b>	<b>Masse (g)</b>	<b>Rendement (%)</b>
1430g	Chloroforme	2,1	0,15
	Acétate d'éthyle	5,44	0,38
	<i>n</i> -butanol	17	1,19

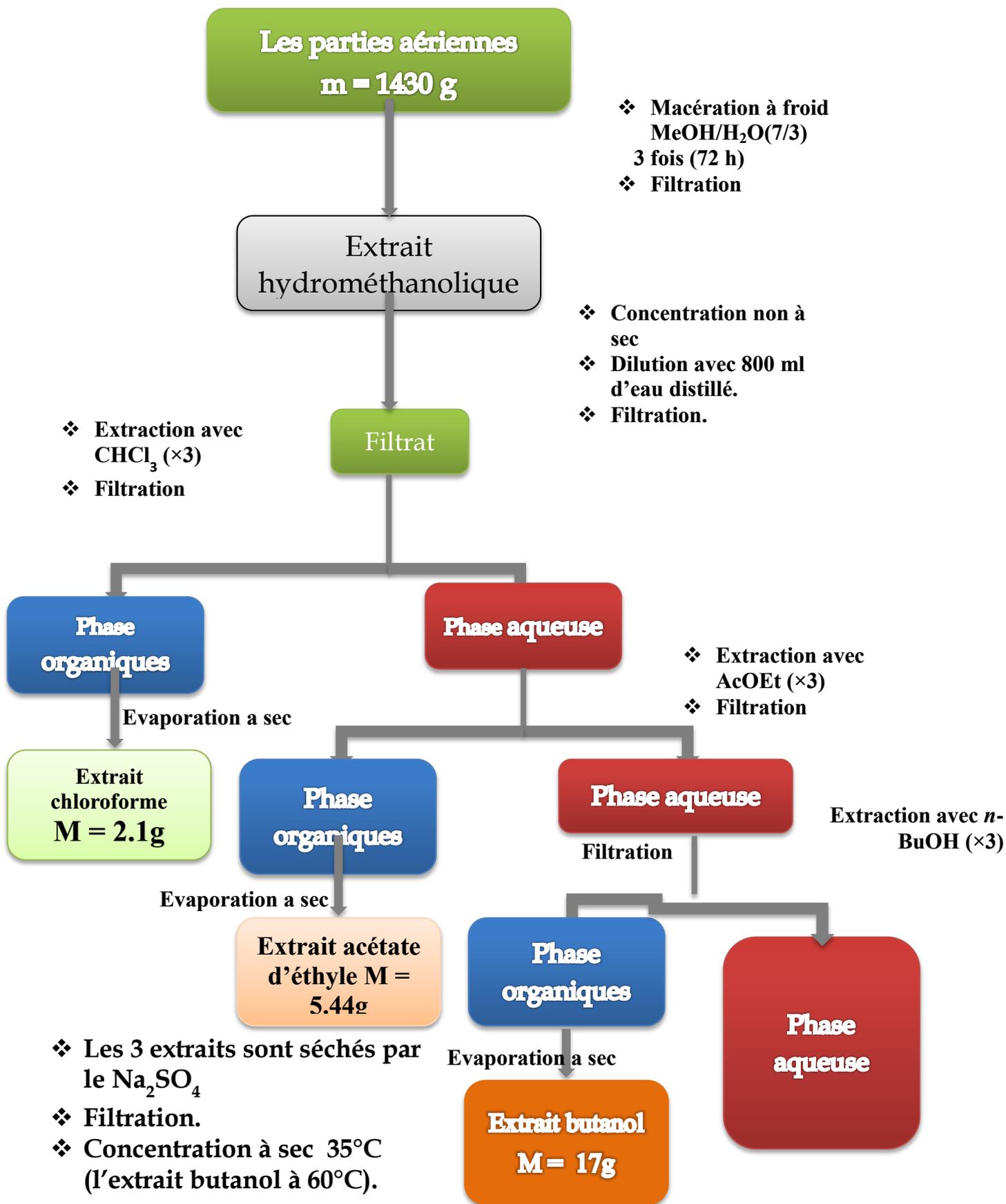


Figure n°III.2 : Récapitulatif de l'extraction des parties aériennes de *Solanum rostratum*

## **II. 1. 4. SEPARATION ET PURIFICATION :**

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats.

### **II. 1. 4. 1. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE :**

Une masse d'environ 2,1 g d'extrait chloroformique est déposée sur une colonne de gel de silice (20-45µm, Merck) préparée dans de le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme -méthanol en commençant par le chloroforme pur avec un fractionnement tous les 20 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de la vanilline sulfurique et chauffées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le **tableau III-2**.

*Tableau III-2:* Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroformique de *S. rostratum*

<b>Solvant d'élution (CHCl<sub>3</sub>-MeOH)</b>	<b>Fractions recueillies</b>	<b>Masse (mg)</b>
100-0	<b>F1</b> 1 à 14	08
100-0	<b>F2</b> 15 à 18	03
99-1	<b>F3</b> 19 à 21	06
99-1	<b>F4</b> 22 à 26	15
98-2	<b>F5</b> 27 à 31	50
98-2	<b>F6</b> 32 à 33	-
95-5	<b>F7</b> 34 à 46	57
95-5	<b>F8</b> 47 à 49	06
90-10	<b>F9</b> 50 à 59	18
90-10	<b>F10</b> 60 à 75	92
70-30	<b>F11</b> 76 à 90	117
60-40	<b>F12</b> 91 à 101	13
60-40	<b>F13</b> 102 à 121	84
50-50	<b>F14</b> 122 à 157	129
50-50	<b>F15</b> 158 à 200	208
50-50	<b>F16</b> 201 à 223	814
0-100	<b>F17</b> 224 à 246	200
0-100	<b>F18</b> 247 à 295	157

### ➤ Etude de la fraction F13

La fraction 13 (84,1 mg) a été purifiée sur une colonne de HPLC C18 préparative avec un gradient de MeOH-H<sub>2</sub>O (30:70, v / v) pour donner le composé SOR1 (3 mg).

En conclusion, l'extrait chloroformique de l'espèce *S.Rostratum* a permis l'obtention de 1 produit pur.

#### II. 1. 4. 2. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT EtOAc :

Une masse d'environ 5 g d'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (20-45µm, Merck) préparée dans de le éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système éther de pétrole- éther diéthylique- MeOH en commençant par l'éther de pétrole pur. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de la vanilline sulfurique et chauffées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-3.

**Tableau III-3:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *S. Rostratum*

Solvant d'élution	Fractions recueillies	Masse (mg)
EP	F1	86
EP	F2	140
EP-Et <sub>2</sub> O 90-10	F3	150
EP -Et <sub>2</sub> O 80-20	F4	156
EP-Et <sub>2</sub> O 70-30	F5	150
EP-Et <sub>2</sub> O 60-40	F6	147
EP -Et <sub>2</sub> O 50-50	F7	357
EP -Et <sub>2</sub> O 40-60	F8	184
EP -Et <sub>2</sub> O 30-70	F9	812
EP -Et <sub>2</sub> O 20-80	F10	319
EP -Et <sub>2</sub> O 10-90	F11	220
Et <sub>2</sub> O	F12	336
Et <sub>2</sub> O -MeOH 90-10	F13	284
Et <sub>2</sub> O -MeOH 80-20	F14	600
Et <sub>2</sub> O -MeOH 65-35	F15	397
Et <sub>2</sub> O -MeOH 50-50	F16	514
MeOH	F17	368

### ➤ Etude de la fraction F9

Environ 800 mg de la fraction F9 a subit une autre séparation sur colonne de gel de silice (20-45 µm, Merck) L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système CHCl<sub>3</sub>-Méthanol, pour donner 13 sous-fractions.

La chromatographie sur plaque CCM préparative de la sous fraction SF7 (128mg) en utilisant comme système d'élution : EtOAc-MEOH-H<sub>2</sub>O (8-1-1) permis d'obtenir 2 produits pur. Les résultats obtenus sont reportés sur le **tableau III-4**.

**Tableau III-4** : Résultat de séparation de la sous-fraction 7

Sous fraction	Remarque
SOR2	(09 mg), Produit pur
SOR3	(11 mg), Produit pur

En conclusion, l'extrait acétate de l'espèce *S.rostratum* a permis l'obtention de 2 produits purs.

#### **II. 1. 4. 3. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT n-BUTANOL :**

Le résultat des tests chromatographiques obtenu en vue de la séparation sur colonne de l'extrait *n*-butanol ont conduit à l'utilisation du système d'élution EtOAc-MeOH en gradient de polarité.

Environ 14 g de l'extrait *n*-butanol sont déposés sur une colonne de gel de silice (type Merck, 35-70µm), préparé dans le EtOAc. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du type EtOAc –MeOH.

Le fractionnement a été faits tous les 200 ml. Le suivi des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par la vanilline sulfurique. Le rassemblement des pots effectué sur la base des données analytique des plaques a permis l'obtention de 9 fractions. **Le tableau III-5** regroupe la progression de cette colonne.

**Tableau III-5:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanolique de *S. Rostratum*

Fractions recueillies	Masse (mg)
F1	40
F2	245
F3	200
F4	157
F5	180,2
F6	450,5
F7	635,0
F8	750,5
F9	369,5
F10	430,5
F11	345,3
F12	445,5
F13	755,5
F14	530,5
F15	890,3
F16	925,5
F17	193
F18	1290,5
F19	1180,5
F20	1750
F21	470,1
F22	1620,5

➤ **Etude de la fraction F17**

Une partie du précipité jaune de la fraction 17 (193 mg) a été purifié par CCM en éluant avec un mélange EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (8: 1: 1, v / v / v) pour donner le composé SOR4 (5 mg).

En conclusion, l'extrait acétate de l'espèce *S.rostratum* a permis l'obtention d'un produit pur.

## II. 2. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE GALACTITES

### ELEGANS :

#### II. 2. 1. DESCRIPTION BOTANIQUE DE L'ESPECE *Galactites élégans* :

##### - a) PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE

###### **Embranchement:**

- \* **Classe:** Magnoliopsida
- \* **Ordre:** Asterales
- \* **Famille:** Asteraceae
- \* **Sous-famille:** Asteridae
- \* **Genre :** *Galactites*
- \* **Espèce:** *Galactites élégans*

##### - b) DESCRIPTION BOTANIQUE :

Plante annuelle ou bisannuelle surtout présente dans l'ouest du bassin méditerranéen (Portugal, Espagne, Languedoc-Roussillon), mais qui peut remonter jusqu'à la Saône-et-Loire et qu'on rencontre aussi, moins fréquente, le long des côtes atlantiques. Elle apprécie les terrains sablonneux et secs, avec une légère préférence pour les sols acides.

C'est une adventice des plantations d'oliviers ou des vignes.

- Floraison : d'avril à août
- Pollinisation : entomogame
- Dissémination : anémochore

Confusion possible

---

Les nervures soulignées de blanc rappellent les marbrures du Chardon-Marie (*Silybum marianum*), au feuillage moins découpé ou les nervures de plantes comme *Scolymus maculatus*, dont la floraison est jaune.

Morphologie générale et végétative

À l'exception de la partie supérieure de la tige, toute la plante est très épineuse. Sa hauteur, très variable, va de 20 à 80 cm. Tige très ramifiée en haut, tomenteuse. Les feuilles sont longues et étroites, lancéolées, pennatifides, à segments lancéolés terminés par des épines. Nervures et taches blanchâtres.

---

## Morphologie florale

---

Les capitules sont assez grands (3 cm de diamètre environ), avec un involucre formé de nombreuses bractées érigées, terminées par de longues épines, souvent entourées d'un voile arachnéen. Toutes les fleurs sont tubulées. Les extérieures sont grandes et rayonnantes, de couleur pourprée ou violacée (il existe aussi des spécimens à fleurs presque blanches), stériles, profondément découpées en cinq lanières rigides. Les intérieures, plus petites, sont hermaphrodites.

## Fruit et graines

Les fruits sont des akènes bruns et glabres, à peu près cylindriques, portant des aigrettes à soies plumeuses [101-105].



[156] *Figure n° II-3* : Photo de *Galactite élégans*

## **II. 2. 2. MATERIEL VEGETAL :**

Les parties aériennes de *Galactites elegans*, vaucher spieceman (Gae alg0312-2012), ont été récoltées fin mars 2013 (stade de floraison) à Hamma Bouziane, Constantine, Algérie. Les parties aériennes fraîches ont été séchées à l'obscurité et à température ambiante.

## **II. 2. 3. EXTRACTION :**

Le poids de la matière végétale séchée est de 966g. Les parties aériennes sont coupées en petits morceaux, elles sont ensuite extraites par macération dans un mélange Methanol-Eau à chaud (80 :20 V) pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois. Les diverses fractions récupérées sont ensuite réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieure à 70 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. Ce dernier est repris par de l'eau bouillante, une décantation pendant une nuit permet l'élimination de la chlorophylle.

Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau, puis filtrées et enfin concentrées à sec sous pression réduite et pesées.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant (figure n° III.4) et le rendement des phases organiques sont donnés dans **le tableau n° III.6**.

*Tableau n° III.6 : Rendement des extraits*

<b>Matériel végétal</b>	<b>Extrait</b>	<b>Masse (g)</b>	<b>Rendement (%)</b>
966g	Chloroforme	2	0,20
	Acétate d'éthyle	5,5	0,57
	<i>n</i> -butanol	19	1,97

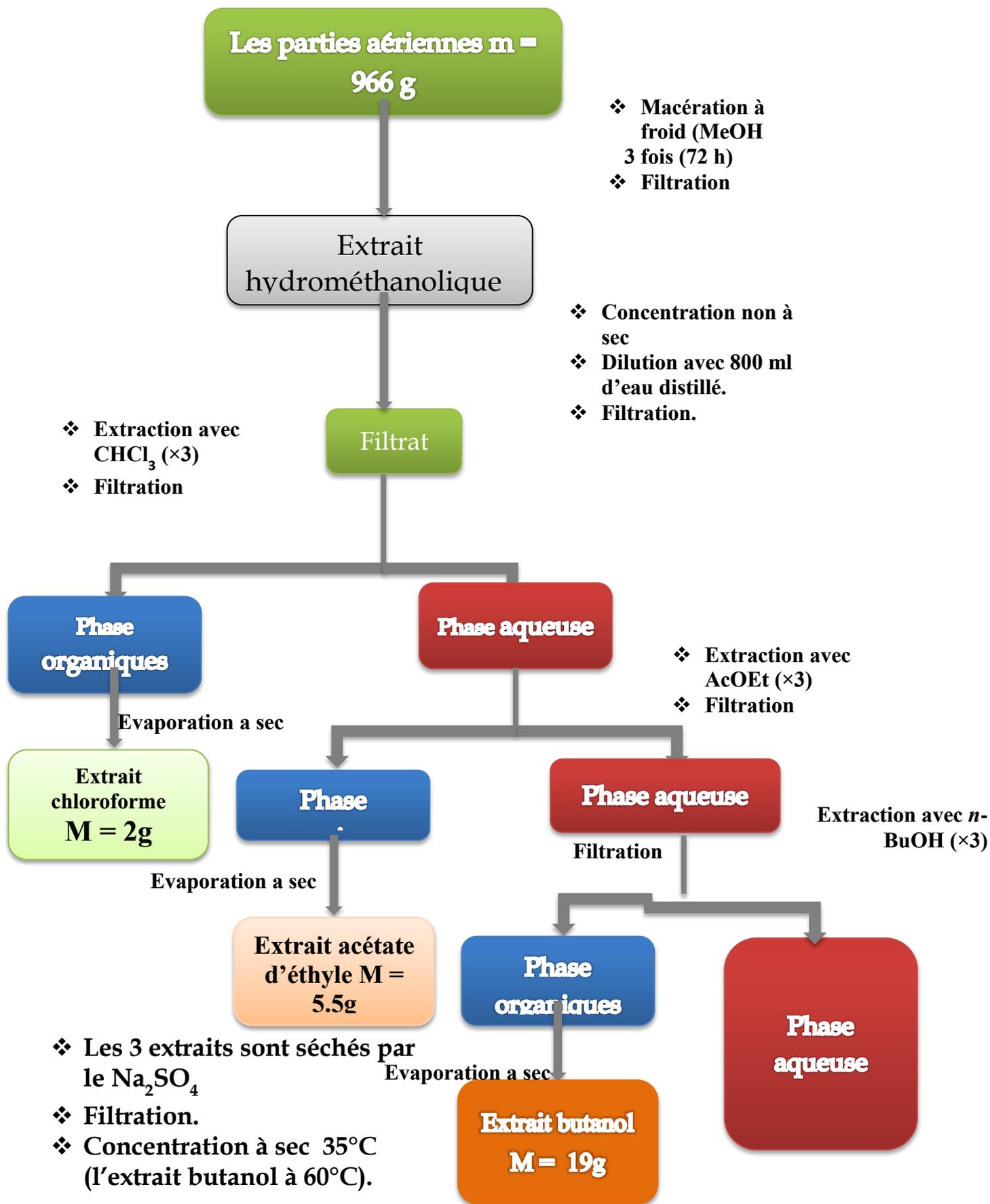


Figure n° III.4 : Récapitulatif de l'extraction des parties aériennes de *Galactites elegans*

## II. 2. 4. SEPARATION ET PURIFICATION :

### II. 2. 4. 1. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE :

L'extrait de  $\text{CHCl}_3$  (1,87 g) a été fractionnée par chromatographie sur colonne (CC) de gel de silice élué avec du  $\text{CHCl}_3$ , suivie par une augmentation de polarité par le MeOH dans le  $\text{CHCl}_3$  (entre 0 % et 100 %), les fractions ont été collectées et contrôlées par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice (type 60, F-254mesh, Merck) sur support verre. pour obtenir 20 fractions.

La progression de cette colonne est rassemblée dans le **tableau III-7**.

**Tableau III-7: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait  $\text{CHCl}_3$  de *G. élégans***

Fractions recueillies ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH)		( $\text{CHCl}_3$ -MeOH) %	Masse (mg)
<b>F1</b>	4 à 7	100-0	-
<b>F2</b>	8 à 11	100-0	45,1
<b>F3</b>	12 à 15	100-0	31,9
<b>F4</b>	16 à 23	99-1	148,4
<b>F5</b>	24 à 28	99-1	17,9
<b>F6</b>	29 à 36	98-2	11,7
<b>F7</b>	37 à 43	98-2	0,8
<b>F8</b>	44 à 46	97-3	75,7
<b>F9</b>	47 à 50	95-5	51,9
<b>F10</b>	51 à 56	90-10	83,3
<b>F11</b>	57 à 63	80-20	232,4
<b>F12</b>	64 à 68	80-20	135,4
<b>F13</b>	69 à 74	70-30	118,5
<b>F14</b>	75 à 79	70-30	35,9
<b>F15</b>	80 à 98	70-30	177,2
<b>F16</b>	99 à 109	60-40	185,2
<b>F17</b>	110 à 112	60-40	37,8
<b>F18</b>	113 à 129	50-50	102,9
<b>F19</b>	130 à 140	0-100	160,8
<b>F20</b>	141	0-100	208,7

## Séparation par HPLC :

### ➤ Conditions de Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C18 $\mu$ -phenomenex (25cm\*10mm, 10  $\mu$ m eau, 2.0ml min<sup>-1</sup>) (phase inverse).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-8A.
- Débit : 2 ml/min.

### ➤ Etude de la fraction F4 :

La fraction 4 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (2:3, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 100 min. On obtient 23 sous fractions. L'étude de 4 sous fractions obtenues est donnée dans le **tableau III-8**.

**Tableau III-8 : Résultat de séparation de la fraction 4**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE13-9</b>	<b>10</b>	<b>0,7mg</b> produit pur composé 5
<b>GE13-10</b>	<b>40</b>	<b>1,9mg</b> produit pur composé 6
<b>GE13-18</b>	<b>48</b>	<b>1,2mg</b> produit pur composé 7
<b>GE13-26</b>	<b>57</b>	<b>2,1mg</b> produit pur composé 8

### ➤ Etude de la fraction F10 :

Une partie de la fraction 10 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (35:65, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 60min. on obtient 24 sous fractions. La sous fractions obtenue est donné dans le **tableau III-9**.

**Tableau III-9 : Résultat de séparation de la fraction 10**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE11-5</b>	<b>10</b>	<b>1,8mg</b> produit pur composé 9

### ➤ Etude de la fraction F11 :

La fraction 11 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (2:3, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 60 min. on obtient 22 sous fractions. La sous fraction obtenue est donné dans le **tableau II-10**.

**Tableau II-10 : Résultat de séparation de la fraction 11**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE12</b>	<b>38</b>	<b>2,2mg</b> produit pur composé 10

➤ **Etude de la fraction F12 :**

La fraction 12 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (35:65, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 150 min.on obtient 25 sous fractions. Les sous fractions obtenues sont donnés dans le **tableau II-11**.

**Tableau II-11: Résultat de séparation de la fraction 12**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE10-7</b>	<b>16</b>	<b>0,7mg</b> produit pur composé11
<b>GE10-18</b>	<b>17</b>	<b>1,1mg</b> produit pur composé 12

➤ **Etude de la fraction F15 :**

Une partie de la fraction 15 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (7:18, v/v) comme phase mobile avec 7 injections le temps de l'injection est 100 min. On obtient 13 sous fractions. La sous fraction obtenue est donné dans le **tableau III-12**.

**Tableau III-12 : Résultat de séparation de la fraction 15**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE11-7</b>	<b>64</b>	<b>1,3mg</b> produit pur composé 13

**II. 2. 4. 2. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT n-BUTANOL :**

Une masse d'environ 2,79 g d'extrait n-butanol est déposée sur une colonne de sephadex LH-20. L'élution est réalisée par le méthanol avec un fractionnement tous les 10 ml (1ml/min). Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (type 60, F-254mesh, Merck) sur support verre. Les plaques sont éluées avec le CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O

(80:18:2, v/v/v) et le BAW : n-but/AcOH/H<sub>2</sub>O(60:15:25, v/v/v) visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) et regroupés pour obtenir 26 fractions

La progression de cette colonne est rassemblée dans le **tableau III-13**.

**Tableau III-13: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-Butanol de *G. élégans***

Fractions recueillies MeOH		Masse (mg)
<b>F1</b>	1 à 12	34,4
<b>F2</b>	13 à 14	80,1
<b>F3</b>	15 à 16	173,6
<b>F4</b>	17 à 18	220,9
<b>F5</b>	19 à 22	596,8
<b>F6</b>	23 à 24	115,7
<b>F7</b>	25 à 26	85,3
<b>F8</b>	27 à 29	223,2
<b>F9</b>	30 à 32	294,7
<b>F10</b>	33 à 34	130,3
<b>F11</b>	35 à 37	86,6
<b>F12</b>	38 à 40	42,7
<b>F13</b>	41	22,4
<b>F14</b>	42 à 44	85,2
<b>F15</b>	45 à 46	52,7
<b>F16</b>	47 à 50	34,7
<b>F17</b>	51 à 53	29,2
<b>F18</b>	54 à 57	42,9
<b>F19</b>	58 à 60	50,8
<b>F20</b>	61	19,8
<b>F21</b>	62 à 64	44,6
<b>F22</b>	65 à 69	12,3
<b>F23</b>	70 à 75	31,3
<b>F24</b>	76 à 81	6,2
<b>F25</b>	82 à 84	185,4
<b>F26</b>	85	86,9

➤ **Etude de la fraction F22 :**

A partir de la fraction F22 on obtient le composé **GE6-10** (7,3 mg)

➤ **Etude de la fraction F6 :**

Une partie de la fraction 6 a subi une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (42:58, v/v) comme phase mobile avec 8 injections le temps de l'injection est 50 min. on obtient 10 sous fractions. La sous fraction obtenue est donnée dans le **tableau III-14**.

**Tableau III-14: Résultat de séparation de la fraction 6**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE5-8</b>	<b>36</b>	<b>1,1mg</b> produit pur composé15

➤ **Etude de la fraction F8 :**

La fraction 8 a subi une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (37:63, v/v) comme phase mobile avec 10 injections le temps de l'injection est 150 min. on obtient 25 sous fractions. Les sous fractions obtenues sont données dans le **tableau III-15**.

**Tableau III-15: Résultat de séparation de la fraction 8**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE3-2</b>	<b>8</b>	<b>8,1mg</b> produit pur composé16
<b>GE3-3</b>	<b>9</b>	<b>3,0mg</b> produit pur composé17
<b>GE3-13</b>	<b>27</b>	<b>19.2mg</b> produit pur composé18
<b>GE3-20</b>	<b>52</b>	<b>3,0mg</b> produit pur composé19
<b>GE3-24</b>	<b>62</b>	<b>1,4mg</b> produit pur composé20
<b>GE3-27</b>	<b>82</b>	<b>1,9mg</b> produit pur composé21

➤ **Etude la fraction F9 :**

La fraction 9 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (35:65, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 150 min.on obtient 16 sous fractions. La sous fraction obtenues est donné dans le **tableau III-16**.

**Tableau III-16: Résultat de séparation de la fraction 9**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE4-9</b> [122]	<b>23</b>	<b>24,7mg</b> produit pur composé <sup>22</sup>

➤ **Etude la fraction F14 :**

Une partie de la fraction 14 a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/EAU : (2:3, v/v) comme phase mobile avec 6 injections le temps de l'injection est 150 min.on obtient 12 sous fractions. La sous fraction obtenue est donné dans le **tableau III-17**.

**Tableau III-17: Résultat de séparation de la fraction 14**

Sous fraction	Temps de rétention tr(min)	Remarque
<b>GE4-9</b>	<b>34</b>	<b>5,7mg</b> produit pur composé <sup>23</sup>

**II. 3 Conclusion :**

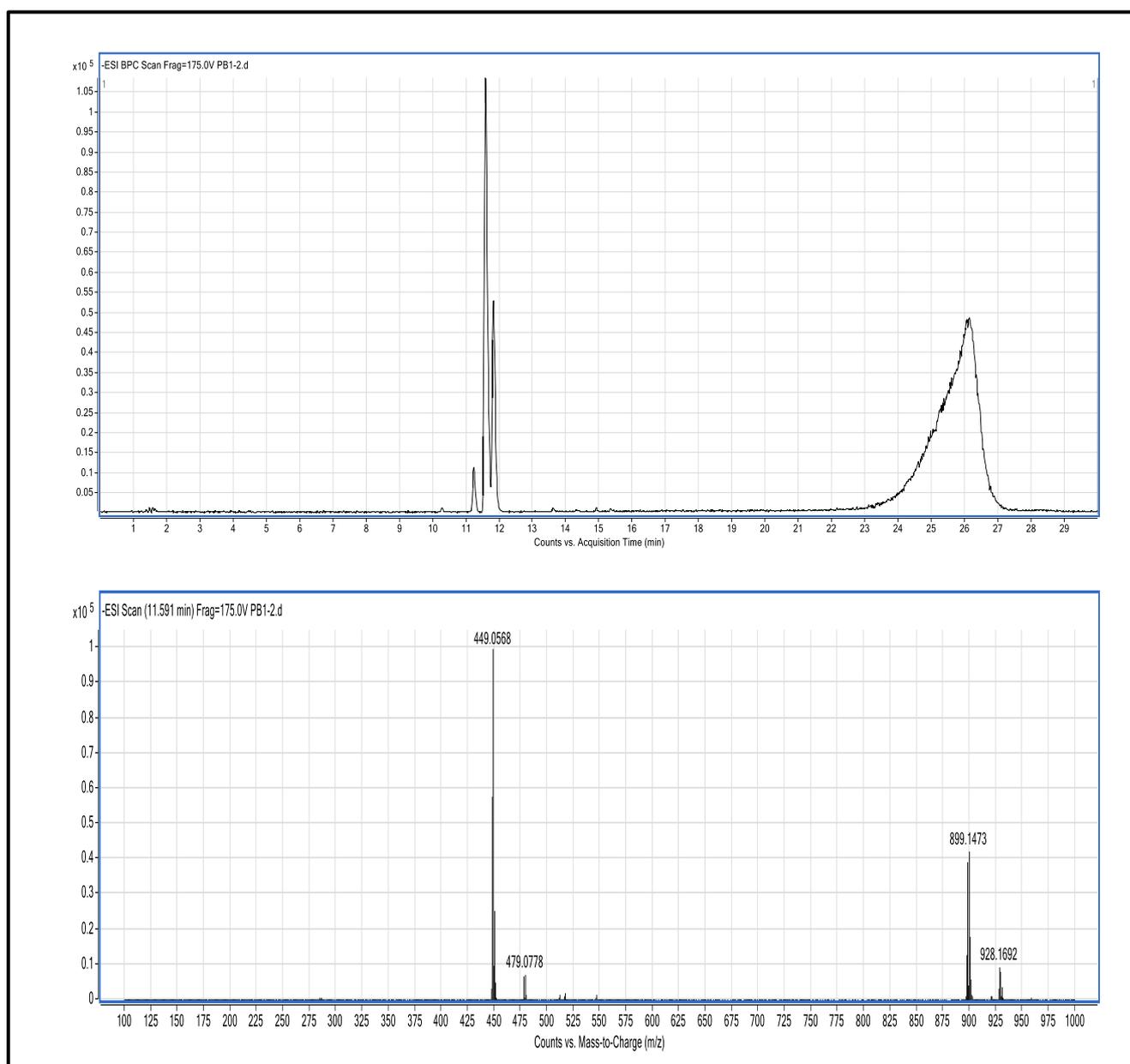
L'investigation phytochimique de l'espèce *Solanum rostratum* nous a permis d'isoler quatre produits, par contre L'investigation phytochimique de l'espèce *Galactites élégans* d'isoler dix-neuf produits.

Par la combinaison des méthodes chromatographiques Tous ces produits ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'établir leurs structures. Les résultats et discussions de ces analyses été développés au chapitre III.

*Chapitre III : Résultats Et  
Discussions*

### III-1- Identification du produit SOR1 :

Le spectre de masse en mode ESI positif à haute résolution de ce composé (SpectreIII-1), donne un pic quasi moléculaire de masse exacte 449,0568 Da correspondant à la formule brute  $[M+H] C_{21}H_{21}O_{11}$  (calculée 449,0568). Ce résultat mène à une molécule de formule brute  $C_{21}H_{20}O_{11}$ , de masse 448 Da,



*Spectre III-1: Spectre SMHR (ESI)<sup>+</sup> du composé SOR1.*

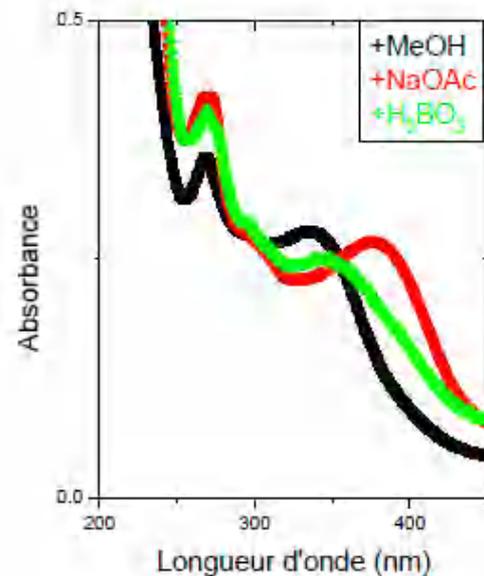
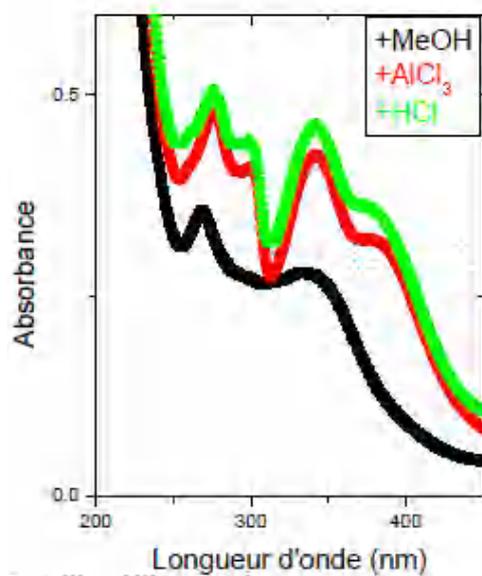
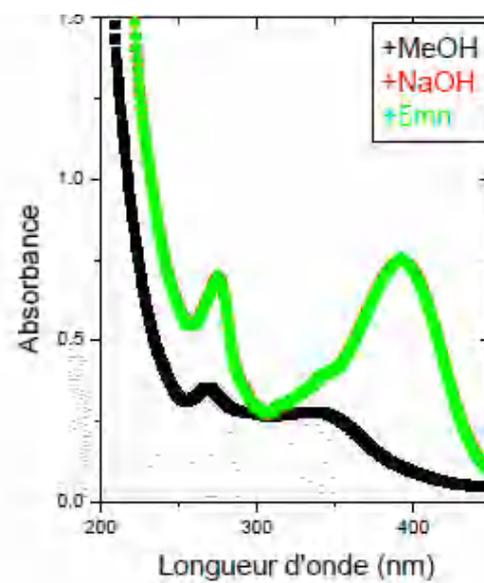
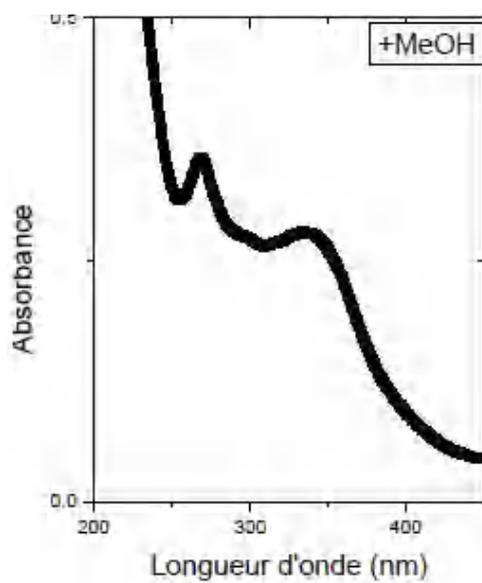
La fluorescence sous la lumière de Wood de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

Les données de la série spectrale UV (spectre n° III-44, tableau n° III-1) montrent :

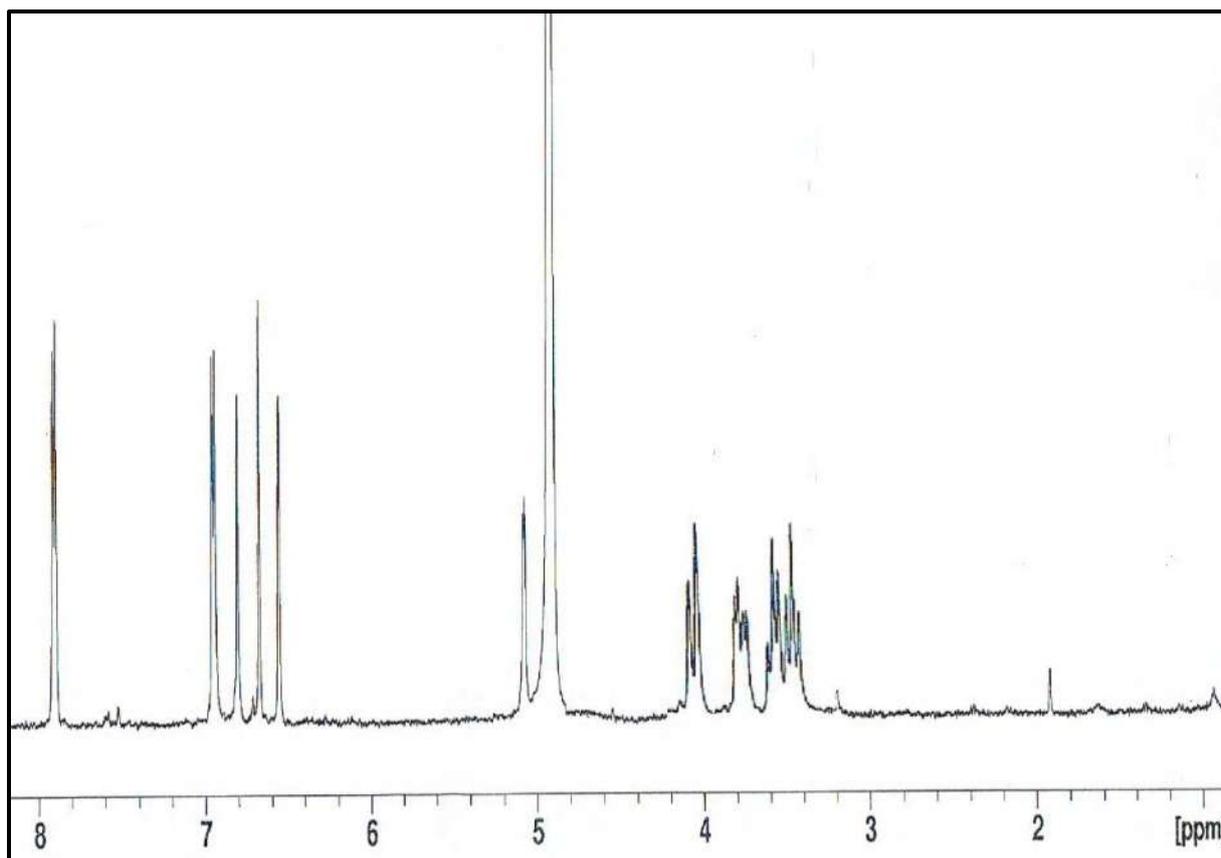
- Le maximum d'absorption de la bande I à 334 nm indique le squelette d'une flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 58$  nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande dans l'intervalle [320-335] indique une substitution de la position 7.
- L'addition de NaOAc ne provoquant pas d'effet notable sur la bande II par rapport au spectre MeOH confirme la substitution en 7 (7- OR).
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl<sub>3</sub>+ HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ( $\Delta\lambda = + 45$  nm) confirme la présence d'un OH libre en 5.
- Le faible déplacement de la bande I en comparant les spectres AlCl<sub>3</sub> + HCl et AlCl<sub>3</sub>, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

**Tableau III-1:** Données de la série spectrale UV

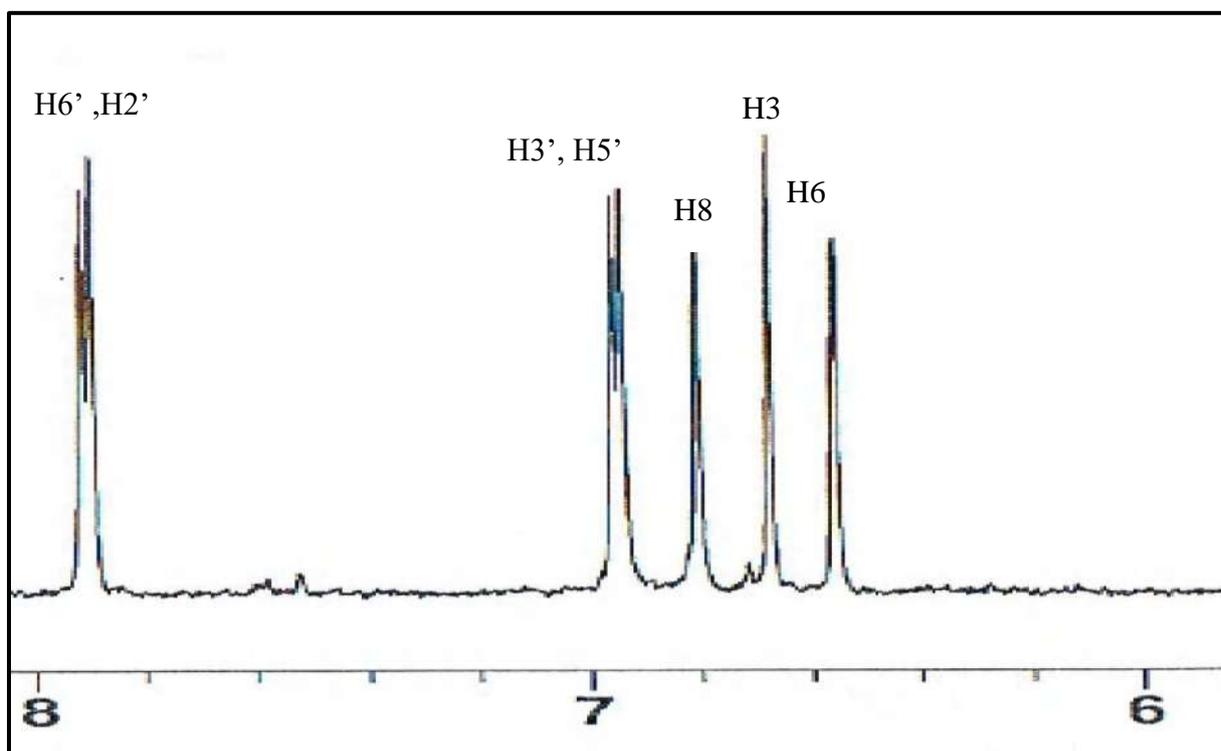
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	334	268	/	Flavone
+ NaOH	381	275	/	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
+AlCl <sub>3</sub>	381	273	340 299	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl <sub>3</sub> /HCl	379	272	341 299	
+NaOAc	373	269	/	OR en 7
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340	269	/	
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				



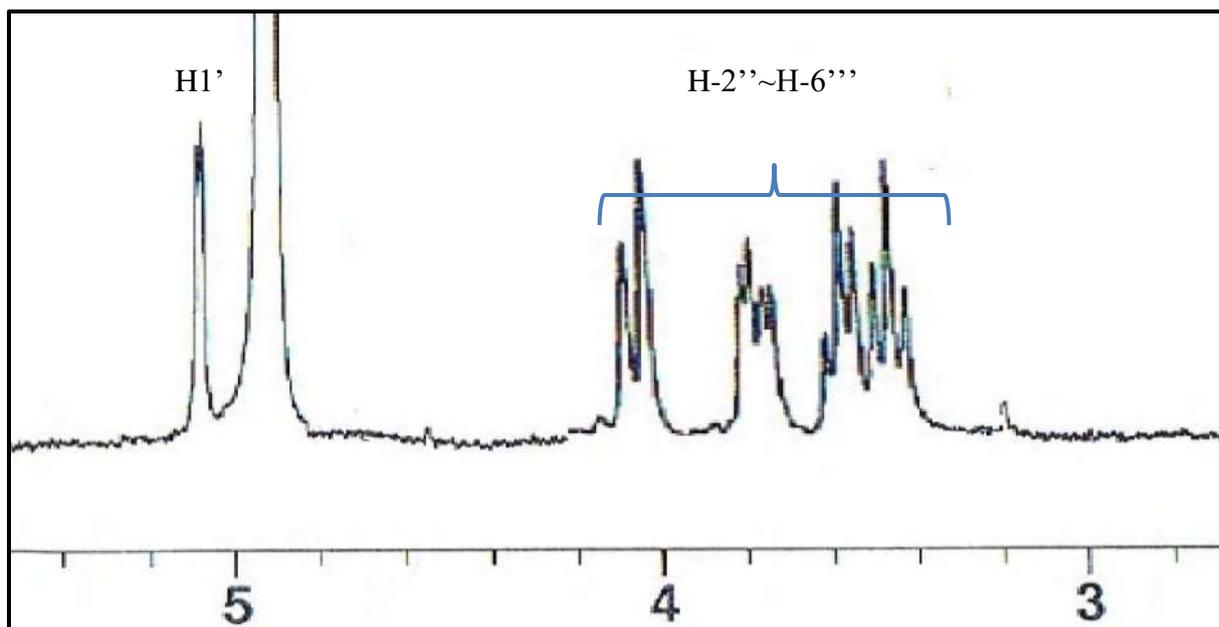
*Spectre III-2 : série spectrale UV du composé SOR1*



*Spectre III-3: Spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé SOR1*



*Spectre III-4: Spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé SOR1 (Etalement)*



*Spectre III-5: Spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé SOR1 (Etalement)*

L'examen du spectre de RMN <sup>1</sup>H (Spectre III-2) enregistré dans le CD<sub>3</sub>OD confirme bien qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, formant un système AM à  $\delta_H = 6,82$  ppm et  $\delta_H = 6,64$  ppm, ( $J = 2,0$  Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à  $\delta_H = 7,91$  ppm et  $\delta_H = 6,94$  ppm, ( $J = 8,5$  Hz) attribuables à H-2', H-6' et à H-3', H-5' respectivement, indiquant ainsi une oxygénation du noyau B en position 4' d'un flavonoïde.
- un signal à  $\delta_H = 6,67$  ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone.
- Un doublet à  $\delta_H = 5,18$  ppm ( $J = 7,7$  Hz) d'intégration 1H, attribuable au proton anomérique H-1'' d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène (d'après la valeur de son déplacement chimique).

La valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique avec son voisin en C-2'' oriente vers un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration  $\beta$  du carbone anomérique.

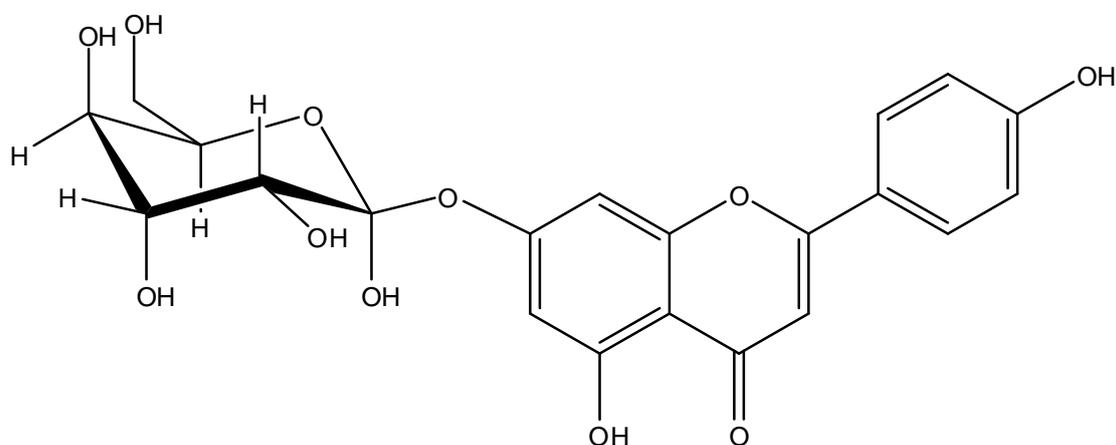
Les données de la RMN <sup>1</sup>H sont résumées dans le tableau III-2

**Tableau III-2:** Données de la RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm), (m, J (Hz))
3	103.29	6.67 (1H, s)
6	100.49	6.82 (1H, d, J = 2.0 Hz )
8	95.37	6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz )
2'-6'	128.20	7.91 (2H, d, J = 8.5 Hz )
3'-5'	116.22	6.94 (2H, d, J = 8.5 Hz )
1''	103.30	5.78 (1H, d, J = 7.7 Hz )
2''~ 6''	61.65~ 77.90	3.27~ 4.10

La nature de ce substituant a été d'ailleurs vérifiée par hydrolyse acide et co-chromatographie avec des échantillons de référence.

Toutes ces données complètent la structure précédente en attribuant les différents radicaux à des protons. Donc le composé est 4', 5-dihydroxy 7-O-  $\beta$ -D glucosylflavone connue sous le nom de 7-O-  $\beta$ -D-glucosyl apigénine.



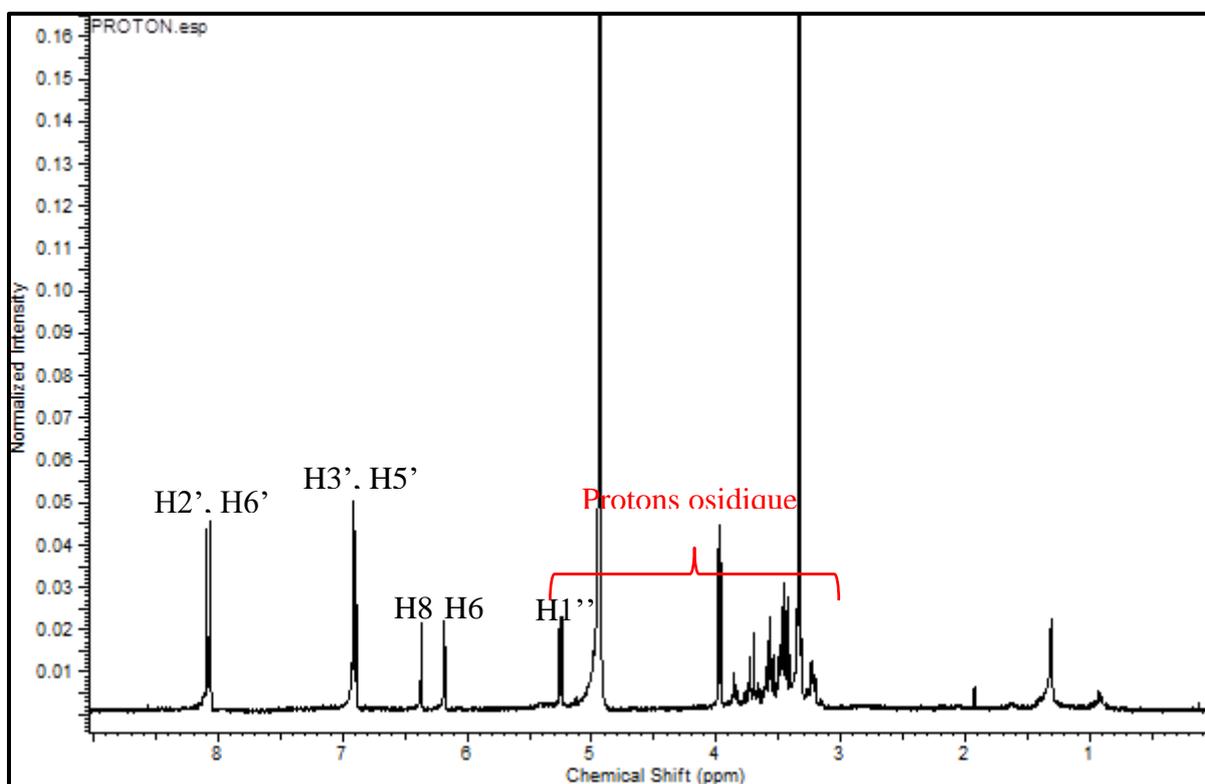
**Figure III-1:** Structure du composé *Apigenine-7-O-  $\beta$ -D glucoside*

### III-2- Identification du produit SOR2 :

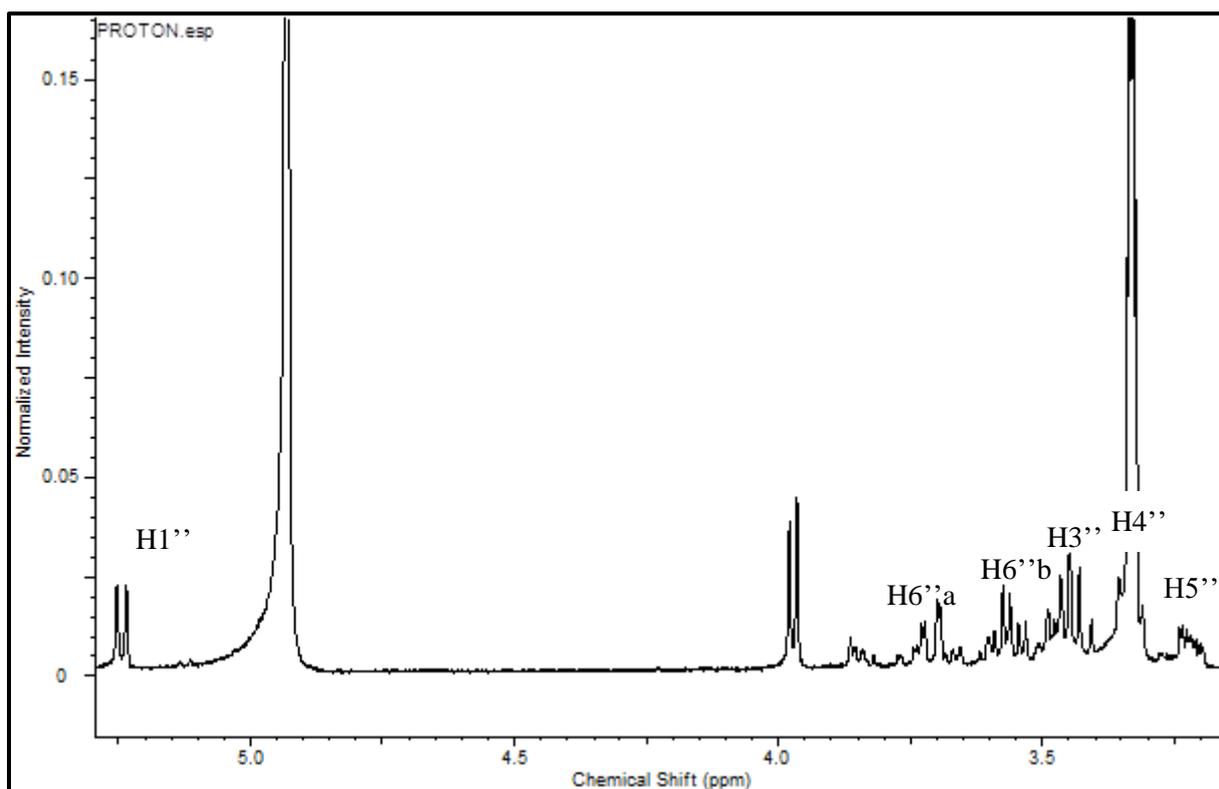
Le spectre de masse en mode ESI positif à haute résolution de ce composé **SOR2** (Spectre III-4), donne un pic quasimoléculaire de masse exacte 449,0568 Da correspondant à la formule brute  $[M+H] C_{21}H_{21}O_{11}$  (calculée 449,0568). Ce résultat mène à une molécule de formule brute  $C_{21}H_{20}O_{11}$ , de masse 448 Da,

Les données des spectres RMN 1H (spectre n° III-7) et son étalement (spectre n° III-8) indiquent que le composé est un flavonoïde glycosylé, en effet l'étude des signaux de la zone des protons aromatiques a permis de mettre en évidence la présence :

- d'une paire de doublets couplant en position ortho à  $\delta_H = 8,07$  ppm (d,  $J = 9.1$  Hz) d'intégration 2H correspondant à H-2' et H-6' et  $\delta = 6,90$  ppm (d,  $J = 9.1$  Hz) correspondant à H-3' et H-5'.
- La présence de deux signaux à  $\delta_H = 6,37$  ppm,  $J = 1,8$  Hz et  $\delta_H = 6,18$  ppm  $J = 1,8$  Hz correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A.
- La partie osidique est représentée par le pic anomérique H-1'' ( $\delta_H = 5,24$  ppm, 1 H, d,  $J = 8.28$  Hz). Le déplacement chimique implique une jonction O-glycosyle. Les autres protons du sucre sont situés entre 3,22 et 3,73



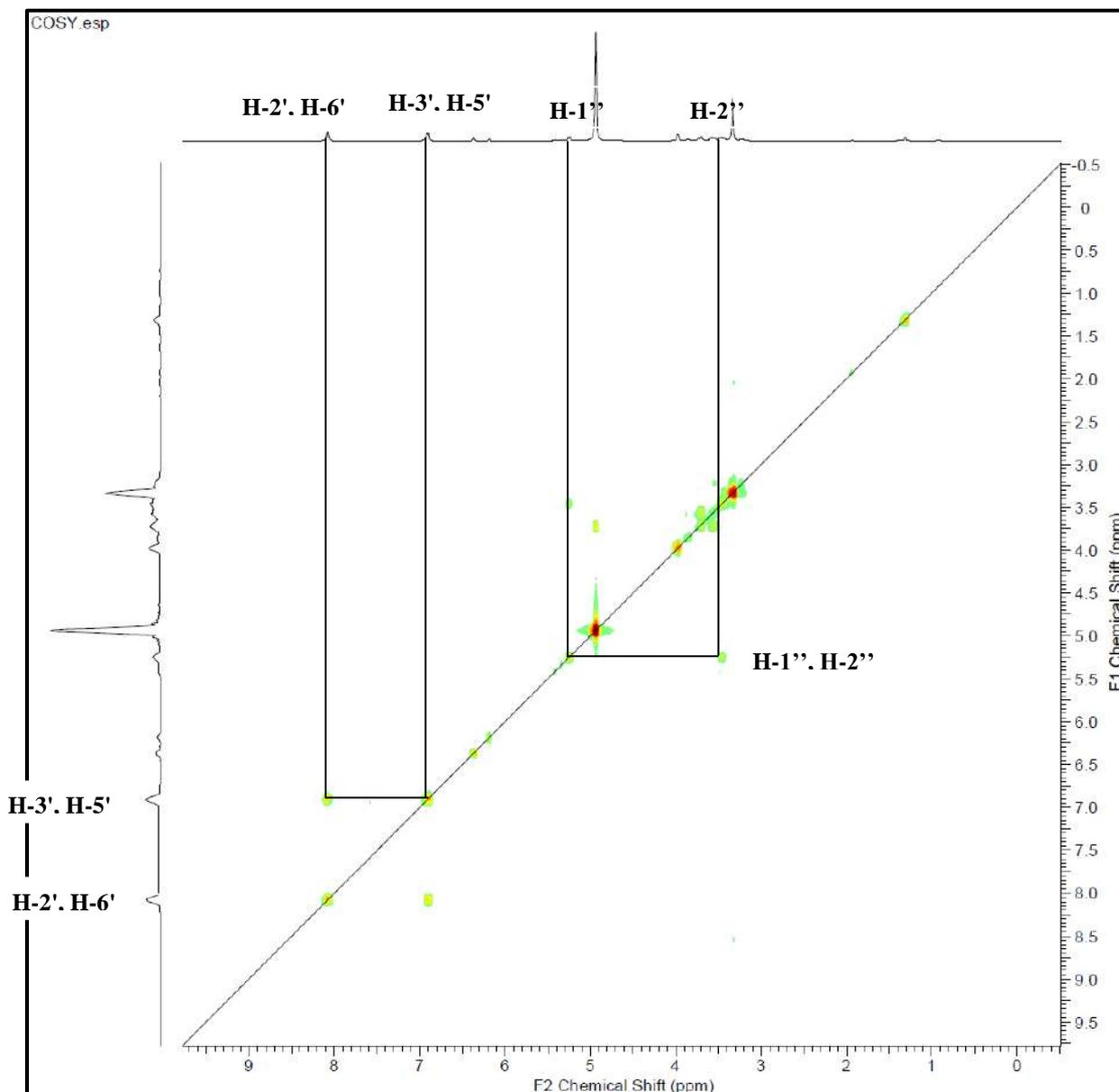
*Spectre n° III-6: Spectre RMN 1H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé SOR 2*



**Spectre III-7:** Spectre RMN1H ( $CD_3OD$ , 600 MHz) du composé SOR2 (Etalement)

L'examen du spectre RMN 2D, COSY ( $^1H$ - $^1H$ ) (spectre n° III-8) confirme la structure et montre :

- Une tache de corrélation entre les protons H-3', H-5' et les protons H-2', H-6' ce qui confirme la substitution du noyau B en position 4'.
- Une tache de corrélation entre le H-1'' à  $\delta_H = 5,24$  (proton anomérique) du sucre avec un proton à  $\delta = 3,43$  ppm qui ne peut être que le H-2''.
- Une tache de corrélation entre H-2'' et un proton résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_H = 3,31$  ppm attribuable à H-3''.
- Une tache de corrélations entre H-3'' et un proton résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_H = 3,21$  ppm attribuable à H-4''.
- Une tache de corrélations entre H-4'' et un proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 3,10$  ppm attribuable à H-5''.
- Le H-5'' corrèle avec H-4'' et deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun à  $\delta_H = 3,57$  ppm ( $J=12,2 ; 2,1$ ) et  $\delta_H = 3,43$  ppm ( $J=12,2 ; 6,1$ ). Ils sont attribuables aux deux protons H-6''a et H-6''b du sucre.

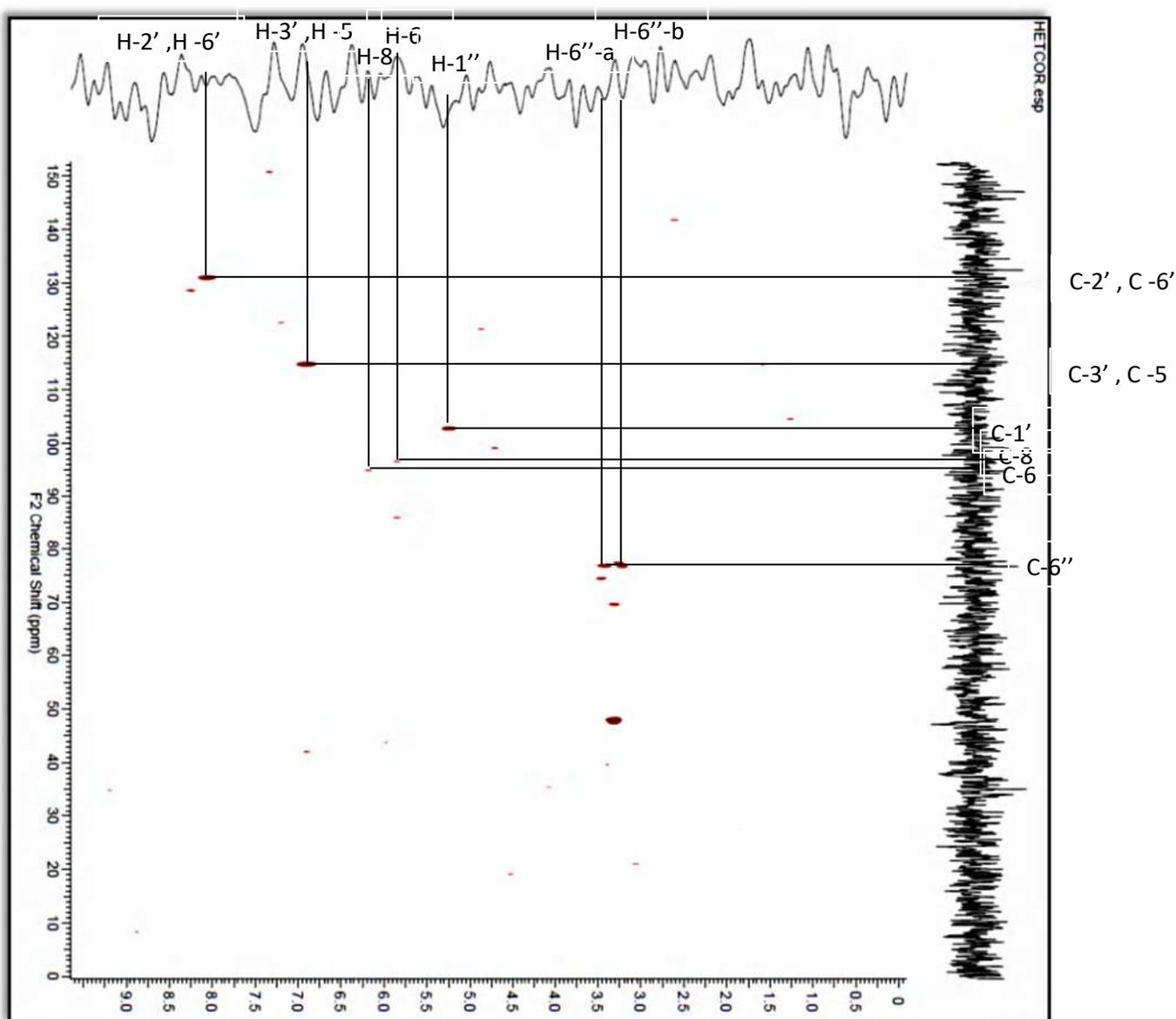


**Spectre n° III-8:** Specter COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm)  
du composé **SOR 2**

L'examen du spectre HETCOR (spectre n° III-9) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et deux atomes de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 114,78$  ppm attribuables à C-3' et C-5'.

- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et deux atomes de carbones à  $\delta_C = 130,84$  ppm attribuables à C-2' et C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à  $\delta_C = 99.28$  ppm qui est le C-6.
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_C = 96,76$  ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre le proton H-1'' et un atome de carbone à  $\delta_C=102,83$  ppm qui ne peut être que le carbone C-1''.



*Spectre n° III-9: Spectre HETCOR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm)  
du composé SOR 2*

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC et son étalement (spectre n° III-10 et III-11) mettent en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-8 montre quatre taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 99,28$  ppm attribuable à C-6.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 103,42$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone oxygéné à  $\delta_C = 157,47$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9.
- La quatrième avec un autre atome de carbone oxygéné représenté par le signal à  $\delta_C = 165,89$  ppm qui ne peut que le C-7.

Les protons H-3' et H-5' montre trois taches de corrélation :

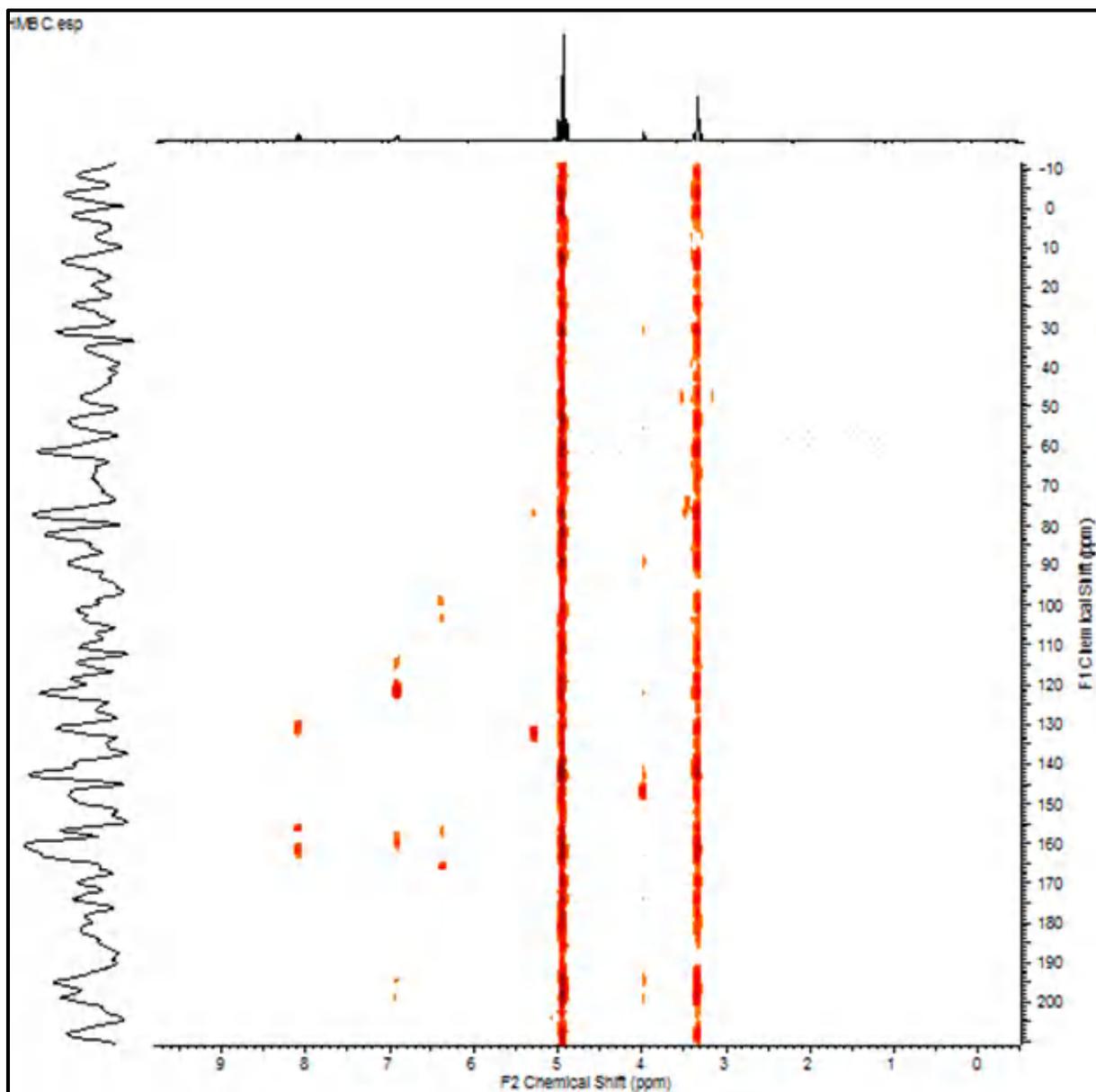
- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 114,78$  ppm confirme le C-3' et C-5'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 121,44$  ppm attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 160,21$  qui ne peut être que C-4'.

Les protons H-2' et H-6' montrent:

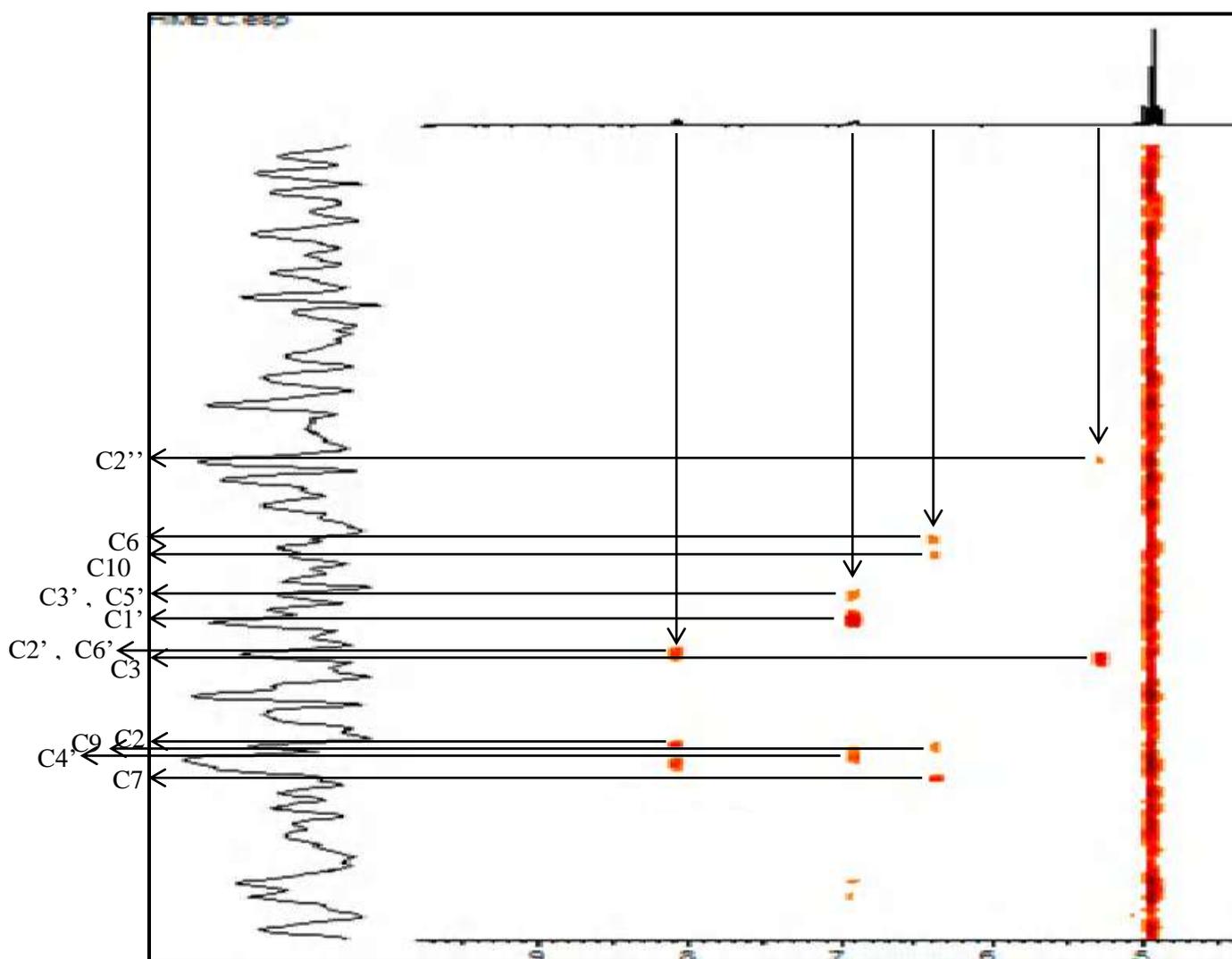
- Deux taches de corrélation confirme les deux carbones C-2' et C-6' à  $\delta_C = 130,84$  ppm
- Deux taches de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 157,28$  ppm attribuable à C-2.
- Deux taches de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 160,21$  ppm confirme le C-4'.

Le proton H-1'' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 74,33$  ppm qui ne peut être que le C-2''.
- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 133,97$  ppm qui ne peut être que le C-3.



*Spectre n° III-10: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé SOR 2*



*Spectre n° III-11: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé SOR 2  
(Étalement)*

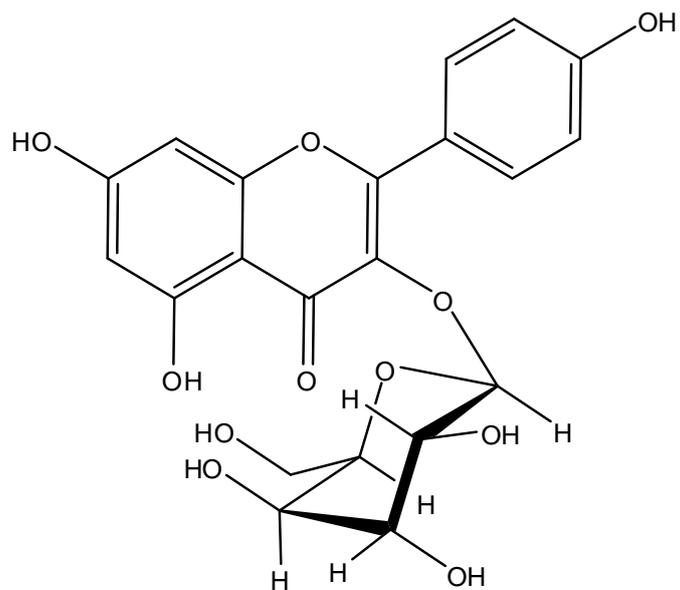
L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-3

**Tableau III-3:** Données de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (600 MHz, 150 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm), (m, J (Hz))
2' - 6'	130,84	8,07 (2H, d, J = 8.5 Hz )
3' - 5'	114,78	6,90(2H, d, J = 8.5 Hz )
8	96,76	6,36 (1H, d, J = 2.1Hz)
6	99,28	6,18 (1H, d, J = 2.1Hz)
2	157,28	-
3	133,97	-
4	178,03	-
5	163,35	-
7	165,89	-
9	157,49	-
10	103,42	-
1'	121,44	-
2'	160,21	-
1''	102,83	5,24 (1H, d, J = 7.53Hz)
2''	74,33	-
3''	75,88	-
4''	69,95	-
5''	77,01	-
6''	61,32	-

Tous ces données mènent la structure finale: **3-O-glucosyl Kaempférol** connue sous le nom :

**Astragaline** reportée dans le schéma n° III.2

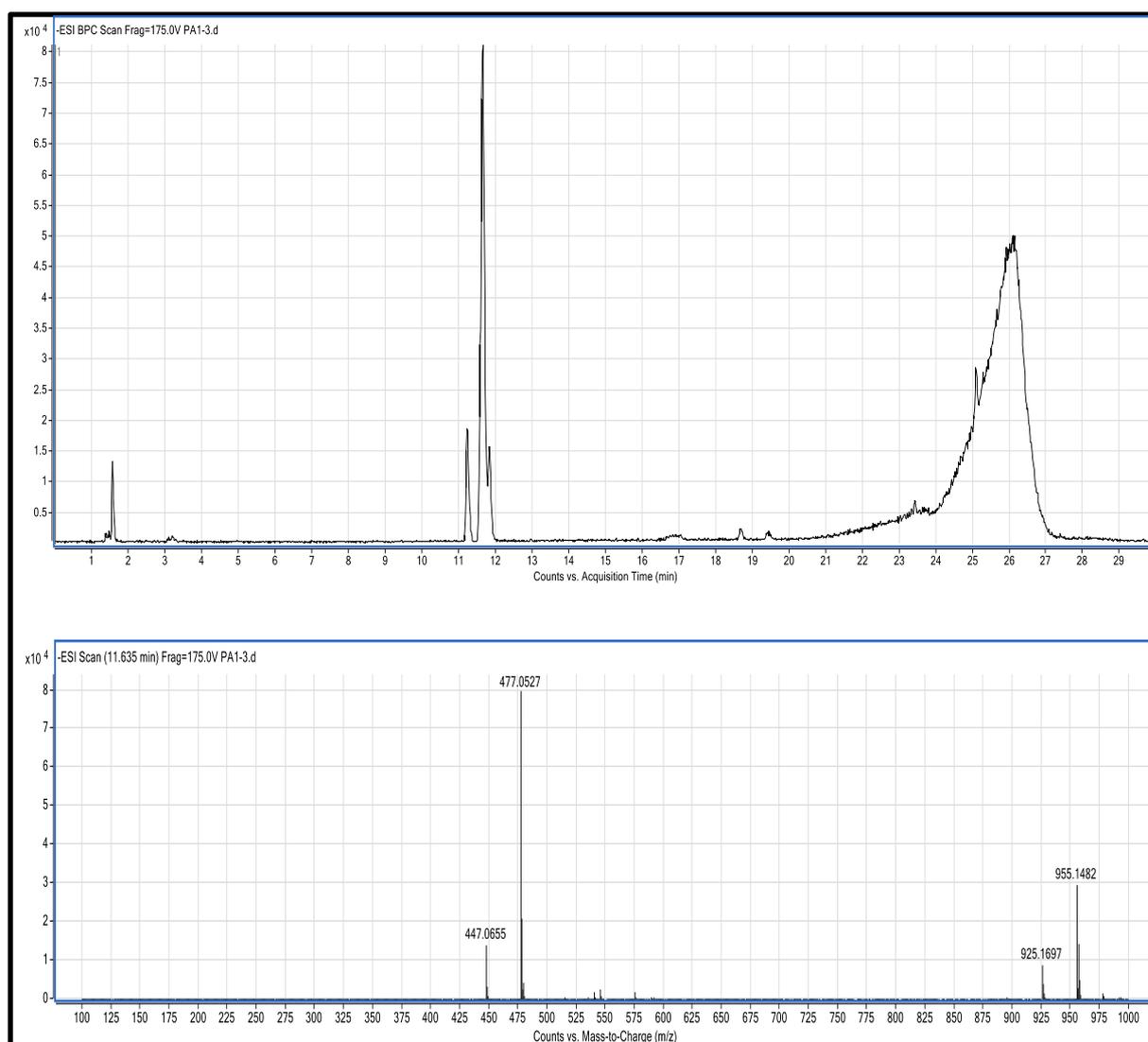


*Figure n° III-2 : structure du composé l'Astragaline*

### III-3- Identification du produit SOR3 :

Le spectre de masse, obtenu à haute résolution en mode électrospray (HR-SMESI) du composé SOR 3 (Spectre n°III.12), montre la présence d'un ion pseudo moléculaire [M+H] à  $m/z = 477,0528$  en ionisation négative, suggérant une masse moléculaire de 478.

Cette masse est compatible avec la formule brute  $C_{22}H_{22}O_{12}$ .

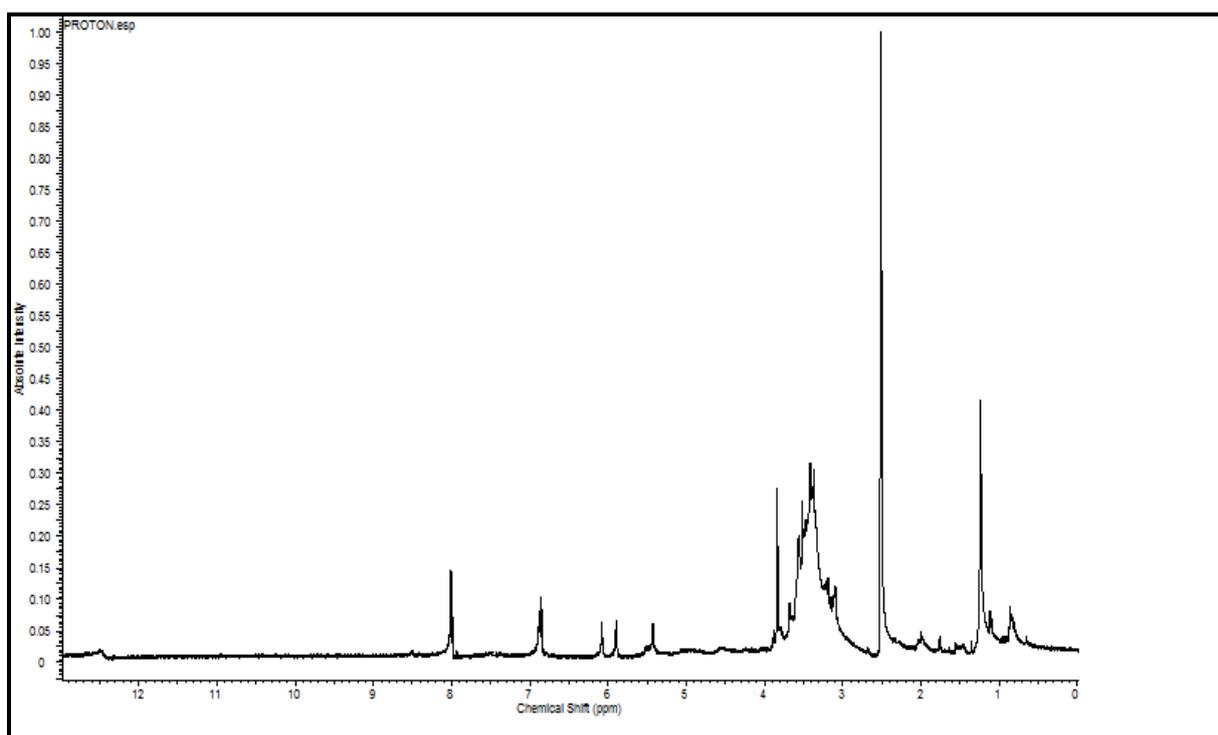


*Spectre III-12 : Spectre SMHR (ESI)<sup>+</sup> du composé SOR 3.*

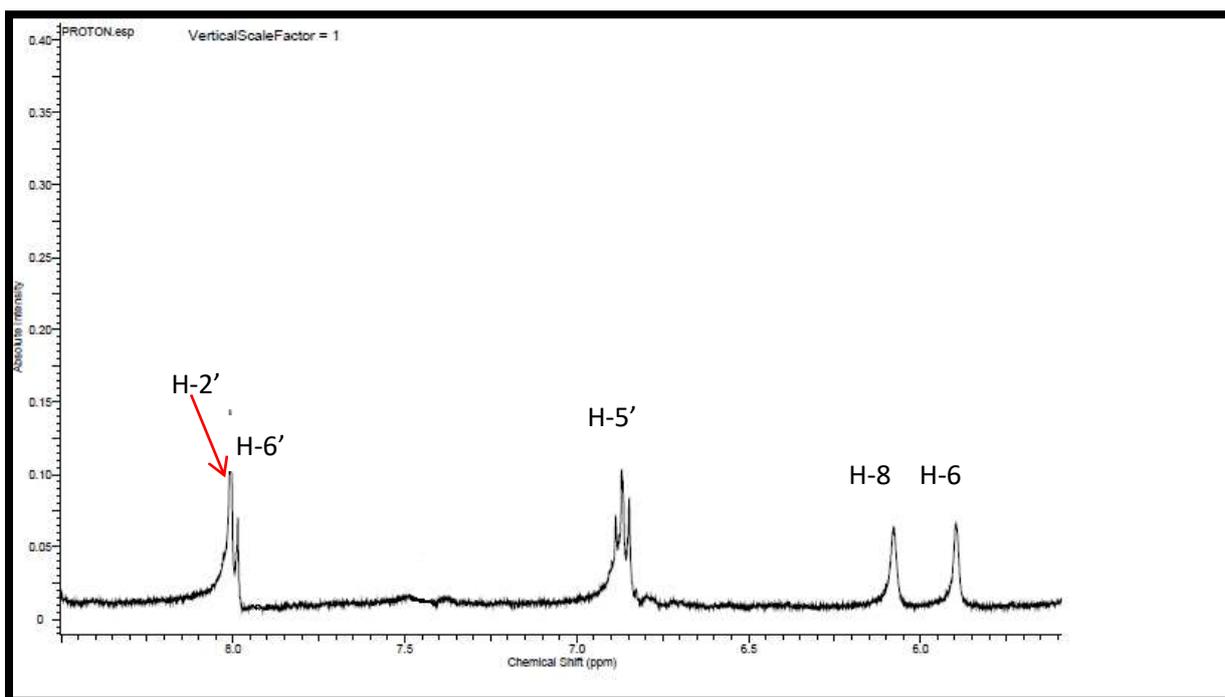
Le spectre de RMN du <sup>1</sup>H enregistré dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> et son étalement (spectre n° III.13, III.14 et III.15) indiquent que le composé SOR 3 est un flavonoïde glycosylé : on observe un système ABX:

- un singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}} = 3,83$  ppm attribuable à un groupement OCH<sub>3</sub>
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier a  $\delta_{\text{H}} = 5,90$  ppm et le second a  $\delta_{\text{H}} = 6,0$  avec une constante de couplage de  $J = 2,3$  Hz attribuables à H-6 et H-8 respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,87$  ppm avec une constante de couplage de  $J = 8,8$  Hz attribuable à H-5',
- Un doublet de doublet d'intégration 1H a  $\delta_{\text{H}} = 7,98$  ppm ( $J = 2,5 ; 8,8$  Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H a  $\delta_{\text{H}} = 8,0$  ppm avec une constante de couplage de  $J = 2,5$  Hz attribuable à H-2'.

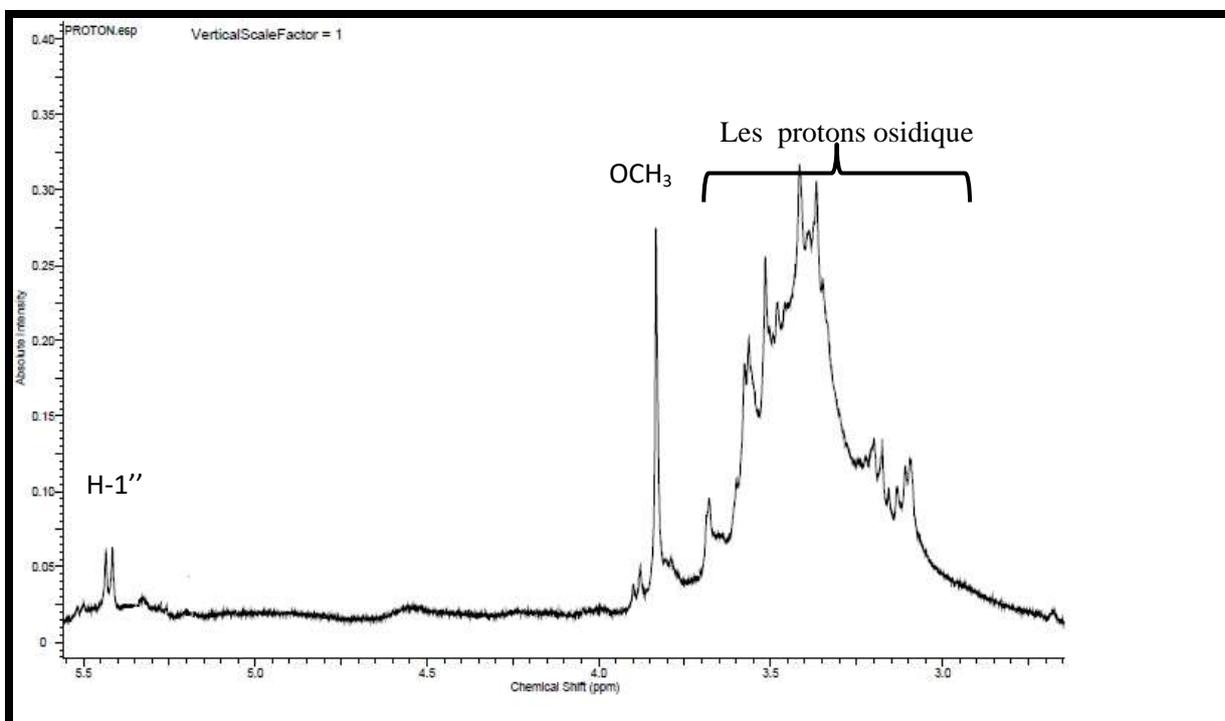
Dans le spectre de RMN du <sup>1</sup>H, on observe un signal correspondant au proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} = 5,42$  (d,  $J = 7,53$  Hz).



*Spectre n° III-13: Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) du composé SOR 3*

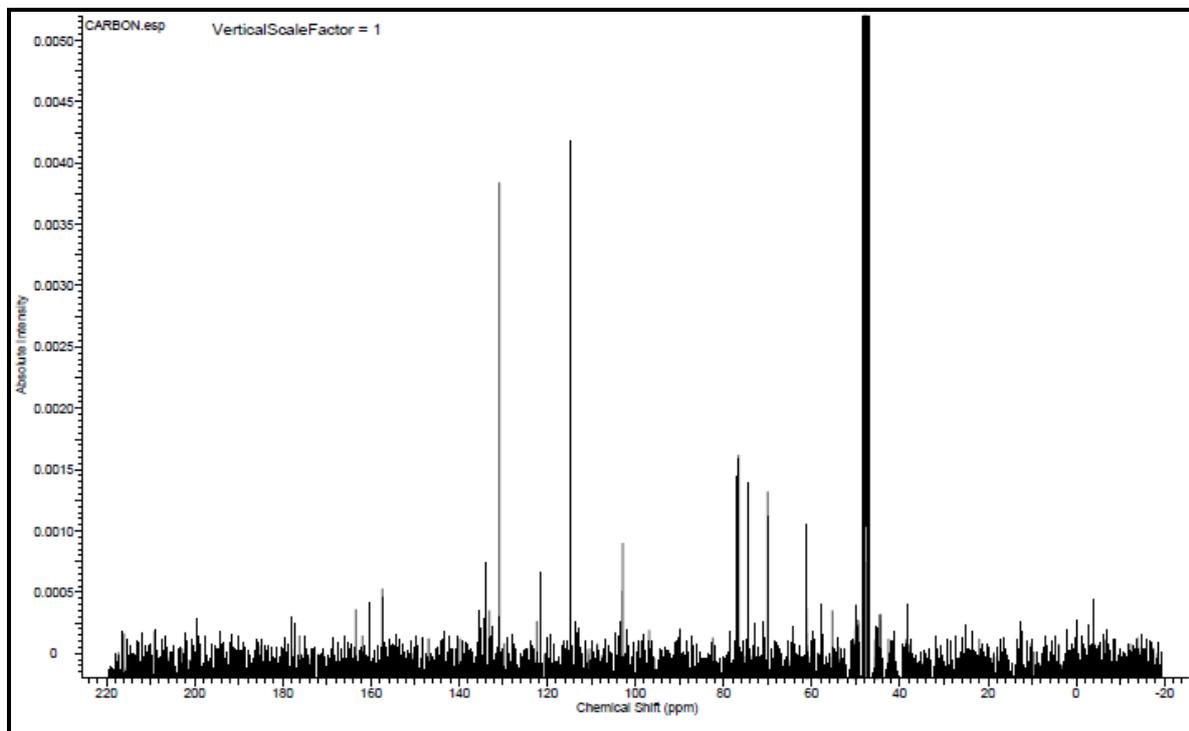


*Spectre n° III-14: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé SOR 3 (Étalement)*



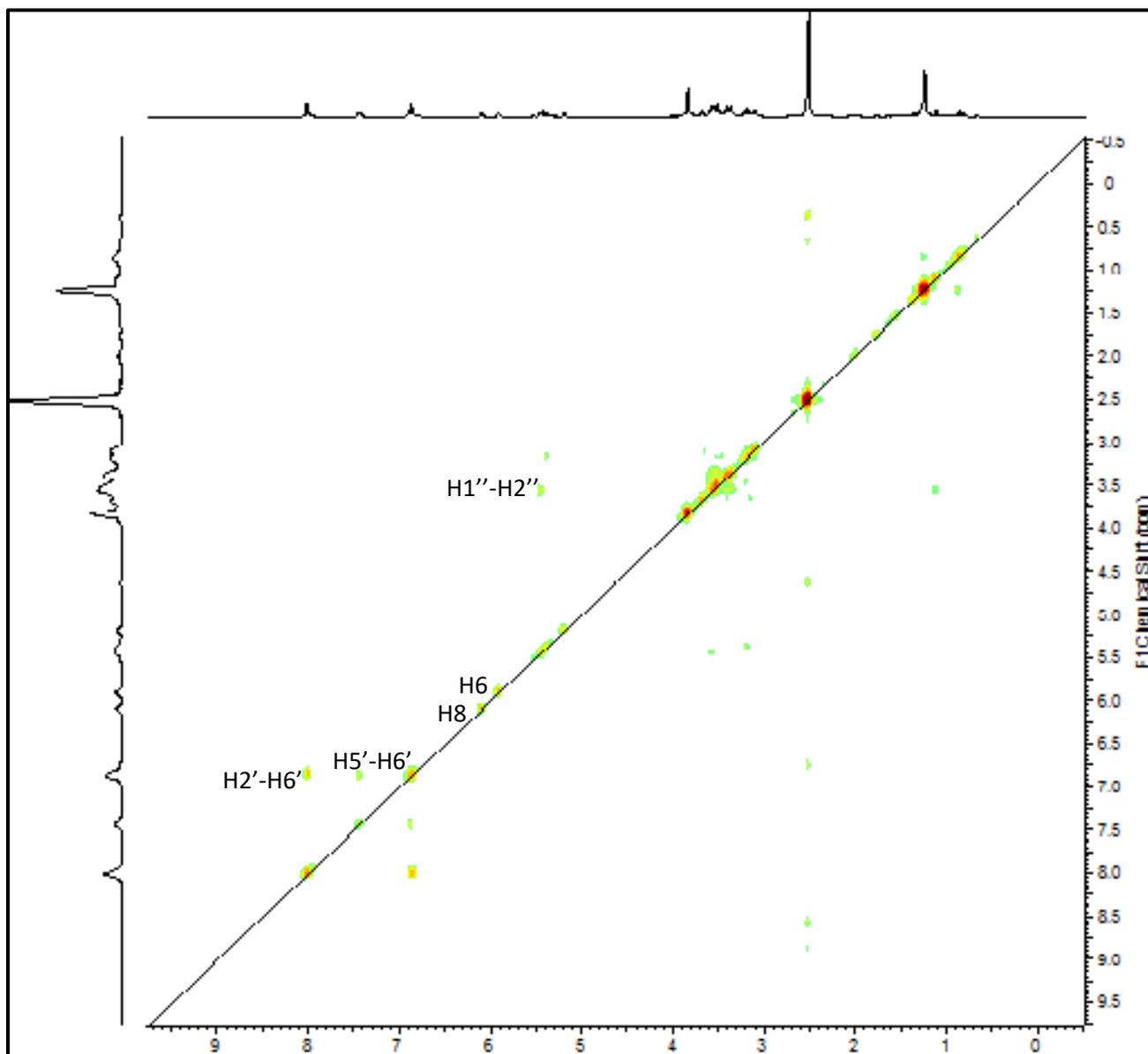
*Spectre n° III-15: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMS- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé SOR 3 (Étalement)*

Le spectre du RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre n° III-16) montre bien la présence d'un substituent osidique dont la majorité de ses carbones résonne entre 67 ppm et 76 ppm. Le spectre permet l'observation des signaux à  $\delta_{\text{C}} = 101.35$  ppm correspondant au proton anomériques de glucose.

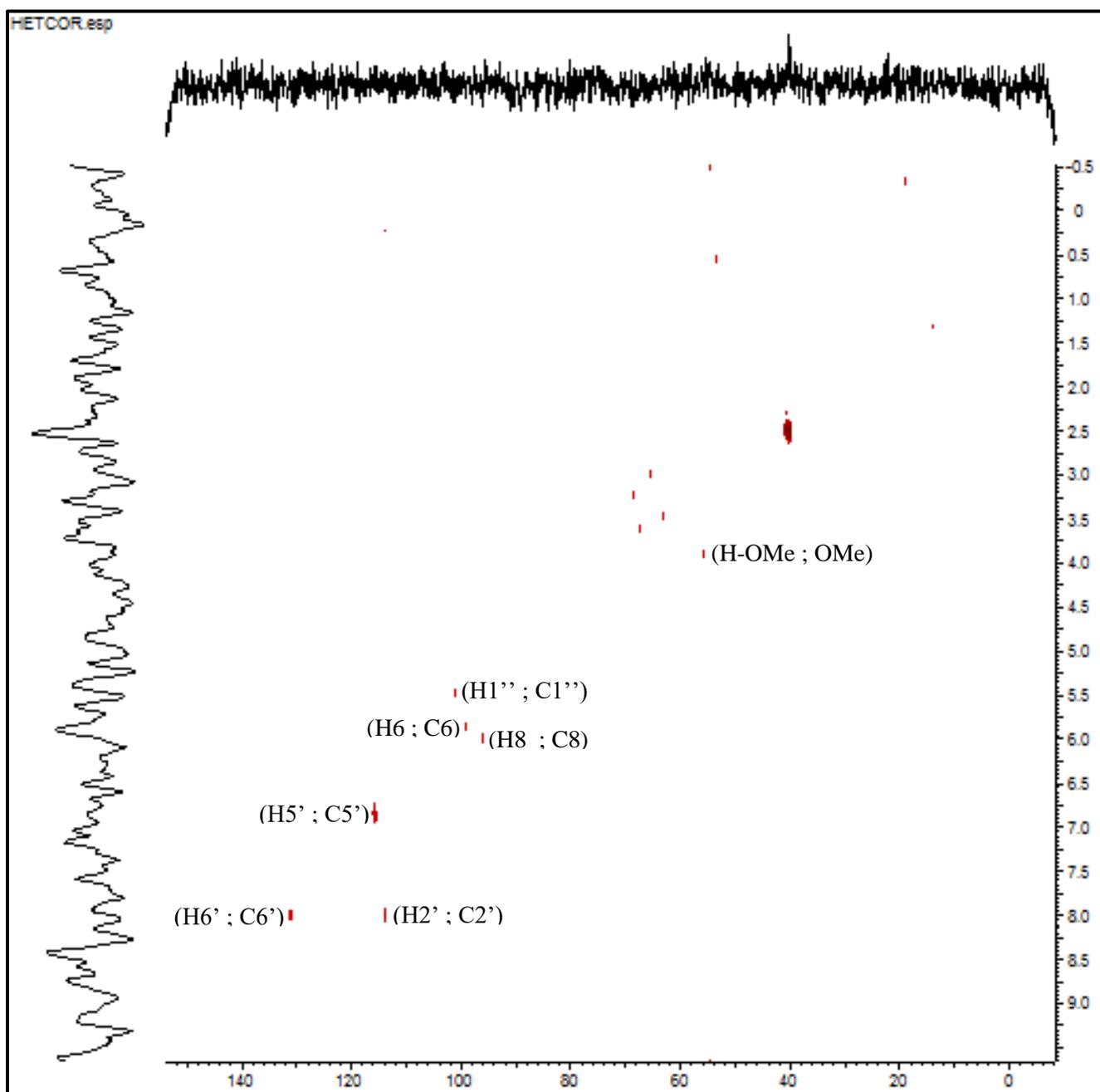


*Spectre n° III-16: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé SOR 3*

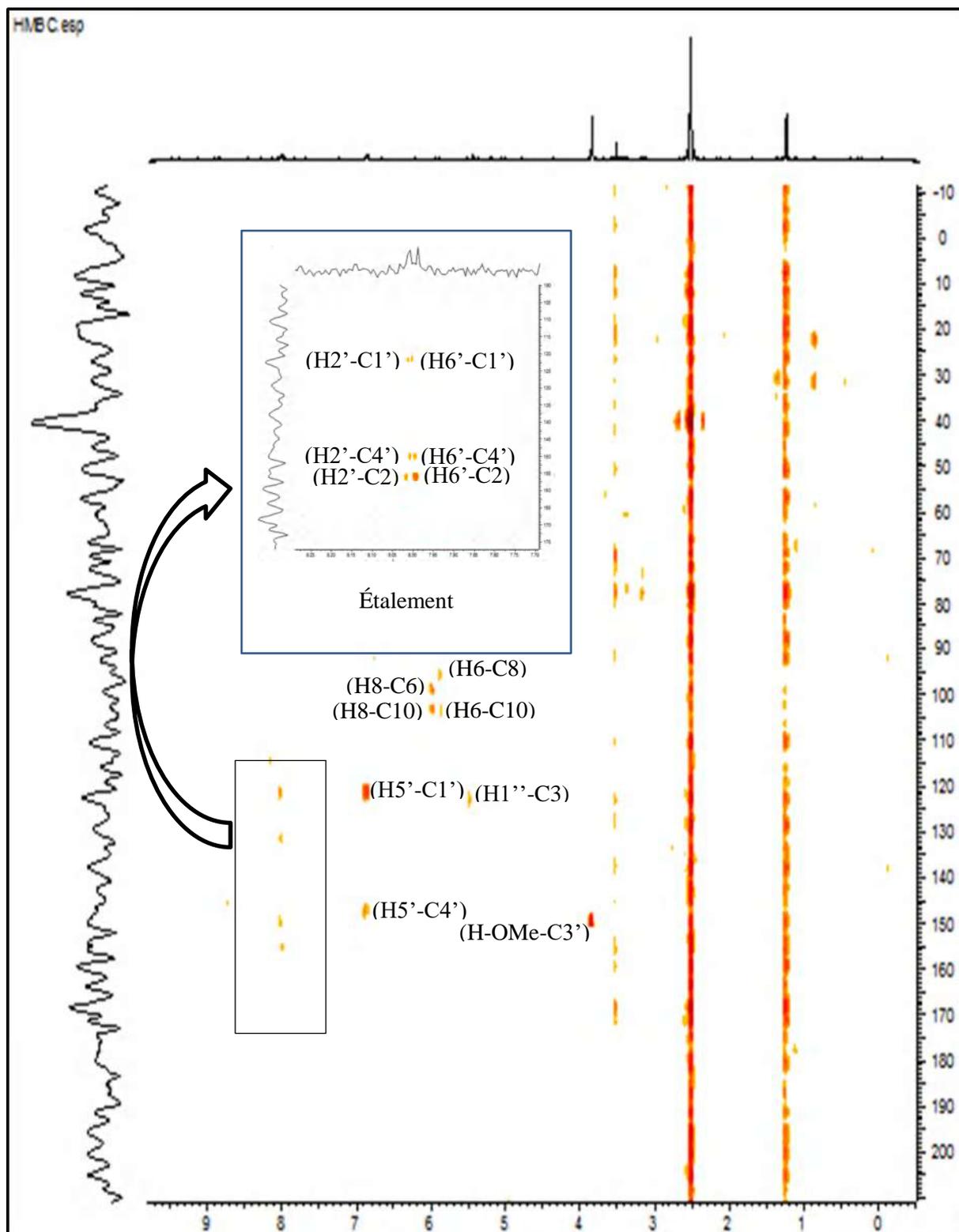
Les techniques HSQC, COSY et HMBC permettent l'attribution de tous les signaux de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  pour le produit naturel SOR 3.



*Spectre n° III-17: Spectre TEO\_ COSY (<sup>1</sup>H-'H) (600 MHz, DMSO-d6, δ ppm)  
du composé SOR 3*



*Spectre n° III-18: Spectre HSQC (600 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  ppm) du composé SOR 3*



**Spectre n° III-19:** Spectre HMBC (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) du composé **SOR 3**

Le signal à  $\delta_H = 5,41$  ppm (H-1'') du proton anomérique du glucose corrèle avec le signal à  $\delta_C = 123,5$  ppm (C-3) de l'aglycone, indique que la position 3 de l'aglycone est glycosylée. De

plus, le signal du méthoxyle à  $\delta_H = 3.89$  ppm est corrélé avec le signal C-3' à  $\delta_C = 149.99$  ppm du cycle B, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché au carbone C-3'.

Le tableau suivant (III-4) rassemble les données spectrales de produit **SOR 3**.

**Tableau III-4:** Données de la RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (600 MHz, 150 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>)

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta H$ (ppm), (m, J (Hz))
2	155,78	-
3	133,50	-
4	177,70	-
5	161,30	-
6	99,68	5,90 (1H, d, J = 2,26 Hz )
7	165,10	-
8	95,60	6,00 (1H, d, J = 2,26 Hz )
9	156,60	-
10	103,80	-
1'	121,59	-
2'	113,50	8,00 (1H, d, J = 2,50 Hz )
3'	149,99	-
4'	147,59	-
5'	115,55	6,87 (1H, d, J = 8, 8 Hz )
6'	131,16	7,98 (1H, dd, J = 8, 8 ; 2,50 Hz )
1''	101,35	5,42 (1H, d, J = 7,53 Hz )
2''	72,93	3,68~3,09 (6H, , m)
3''	73,70	
4''	69,93	
5''	77,81	
6''	60,91	
OMe	56,88	3,83 (3H, s )

A partir de toutes ces données, la structure du composé SOR 3 a donc pu être établie comme étant l'Isorhamnetin-3-O-glucoside

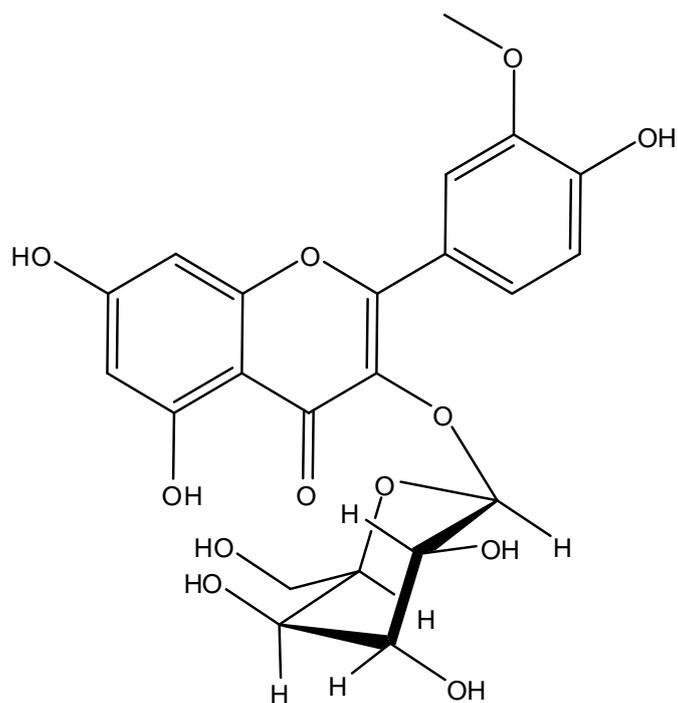
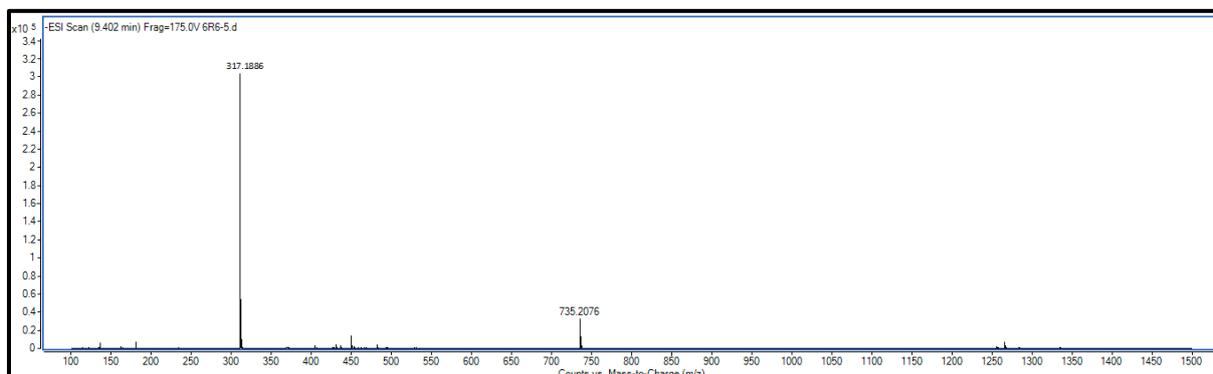
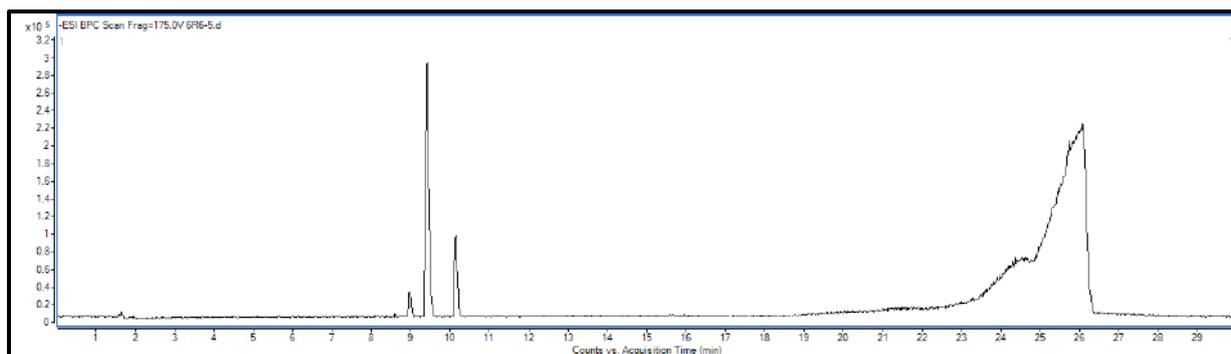


Figure n° III.3 : la structure de l'Isorhamnetin-3-O-glucoside

### III-4- Identification du produit SOR4 :

Le spectre de masse en mode ESI positif à haute résolution de ce composé (SpectreIII-20), donne un pic quasi moléculaire de masse exacte 317,1886 Da correspondant à la formule brute  $[M+H]^+ C_{16}H_{29}O_6$  (calculée 317,1886). Ce résultat mène à une molécule de formule brute  $C_{16}H_{28}O_6$ , de masse 316Da,

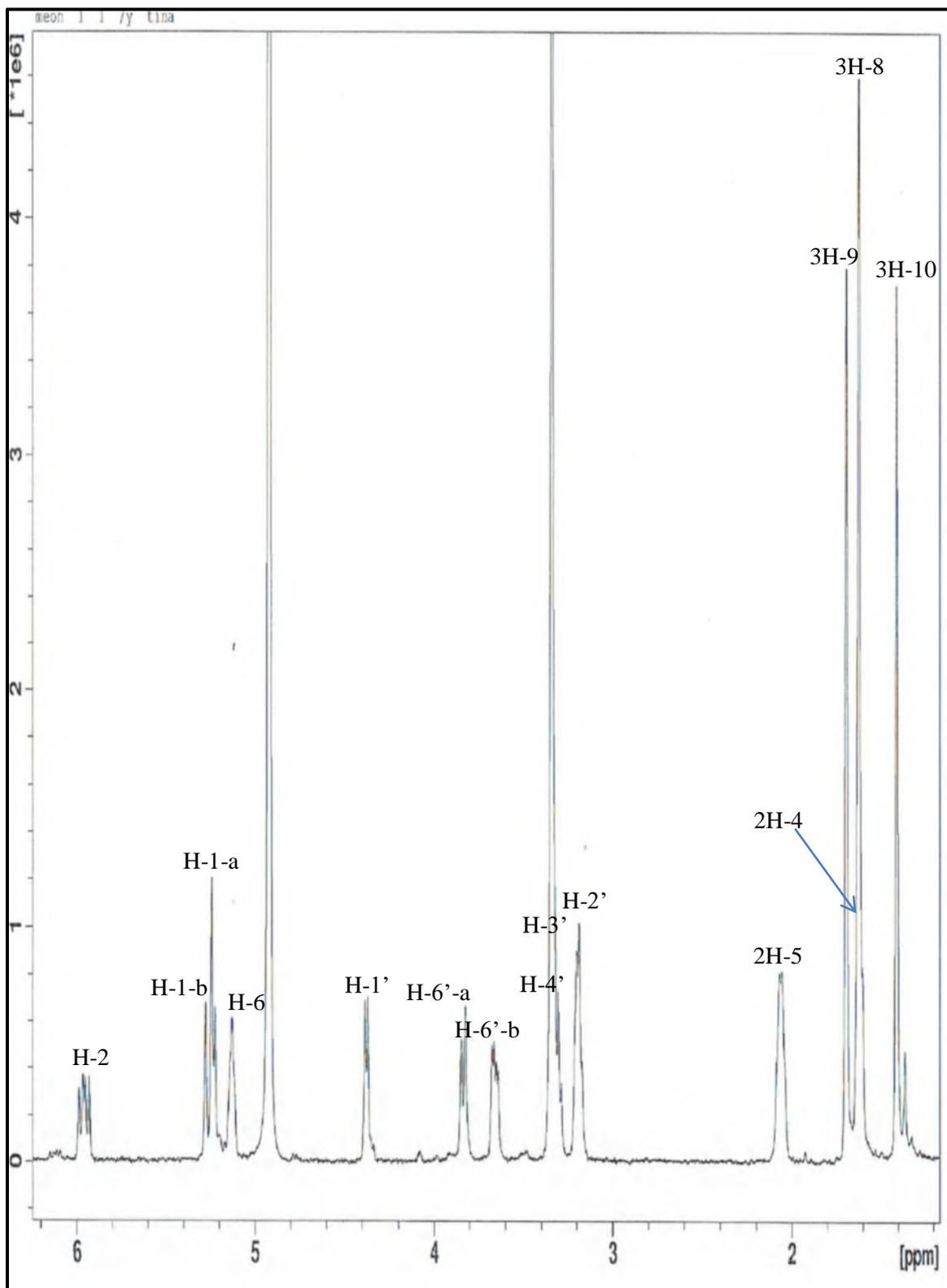




**Spectre III-20** : Spectre SMHR (ESI)<sup>+</sup> du composé SORA.

Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (spectres III.21 et III.22), indiquent la présence de :

- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta_H = 1,39$  ppm attribuable à un
- Deux autres méthyle à  $\delta_H = 1,61$  ppm (H-8) et  $\delta_H = 1,69$  ppm (H-9) qui peut se connecter avec un carbone oléfinique vu leur déplacement de bas de champ des méthyles.
- Deux signaux d'intégration 1H chacun caractéristique de deux méthines oléfiniques, le premier doublet de doublet ( $J = 17,5 ; 11,0$  Hz) à  $\delta_H = 5,99$  ppm et le second un doublet large à  $\delta_H = 5,12$  ppm, attribuable à H-2 et H-6 respectivement.
- Deux signaux d'intégration 1H de deux méthylènes oléfiniques, le premier doublet ( $J = 11,0$  Hz) à  $\delta_H = 5,22$  ppm et le second un doublet ( $J = 17,5$  Hz) à  $\delta_H = 5,27$  ppm, attribuable à H-1a et H-1b respectivement.
- deux signaux d'intégration 2H chacun le premier un multiplet à  $\delta_H = 1,61$  ppm et le second un multiplet à  $\delta_H = 2,06$  attribuable à CH<sub>2</sub>-4 et CH<sub>2</sub>-5 .
- un doublet ( $J = 7,5$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H = 4,36$  ppm caractéristique d'un proton anomérique.
- Cinq signaux d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  3,18 (m, H-2'), 3,29 (m, H-3'), 3,39 (m, H-4'), 3,19 (m, H-5'), 3,65 (dd,  $J = 11,8 ; 5,4$  Hz, H-6'-b) et 3,81 (dd,  $J = 11,8 ; 2,2$  Hz, H-6). Caractéristiques des autres protons du groupement glycosylé.

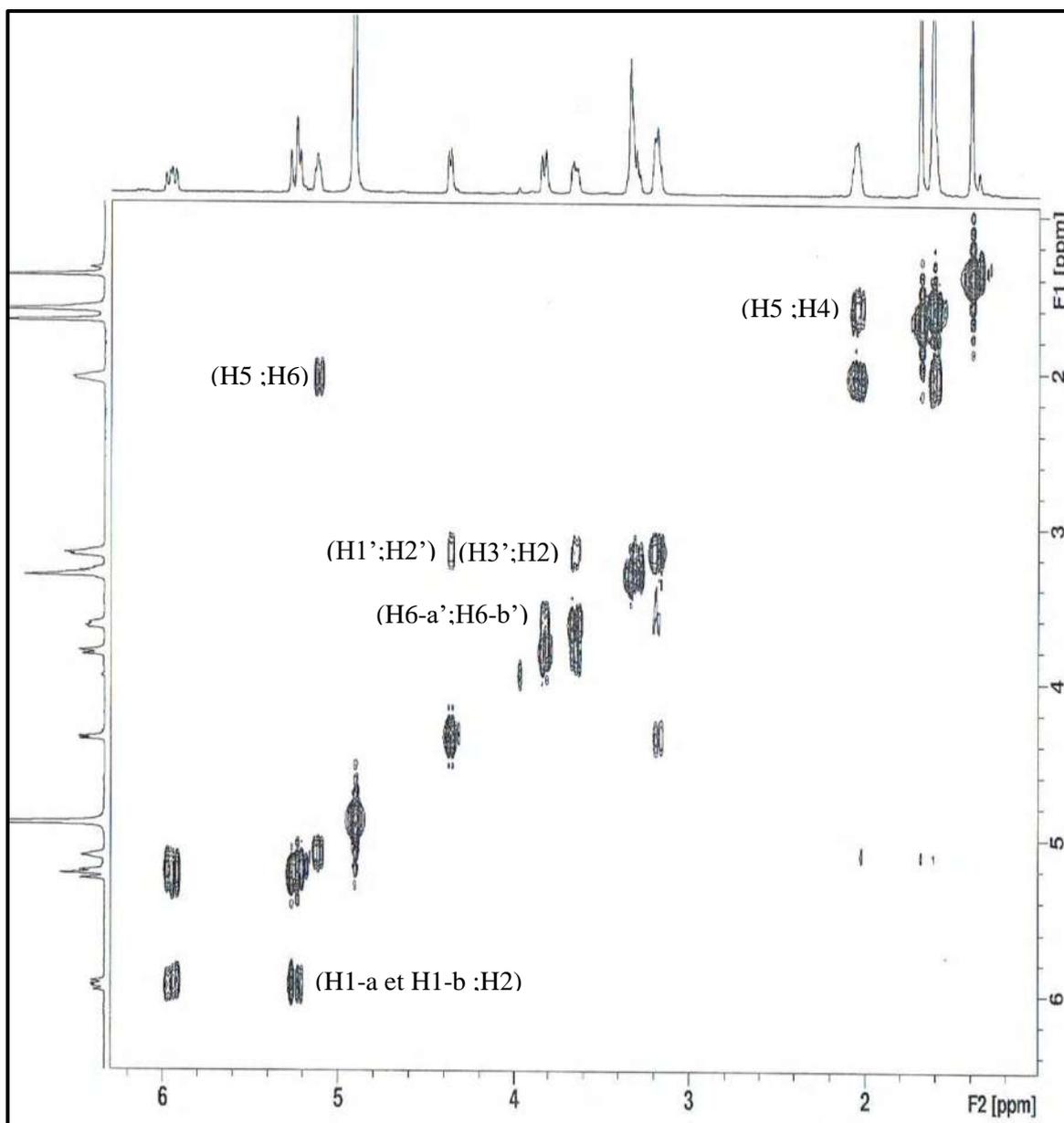


**Spectre n° III-21:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **SOR 4**

L'examen des spectres cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.21) montre :

- Deux taches de corrélations entre les protons H-1a et H-1b ( $\delta_{\text{H}} = 5,22$  et  $\delta_{\text{H}} = 5,27$  ppm) et un signal à  $\delta_{\text{H}} = 5,99$  ppm qui ne peut être que H-2

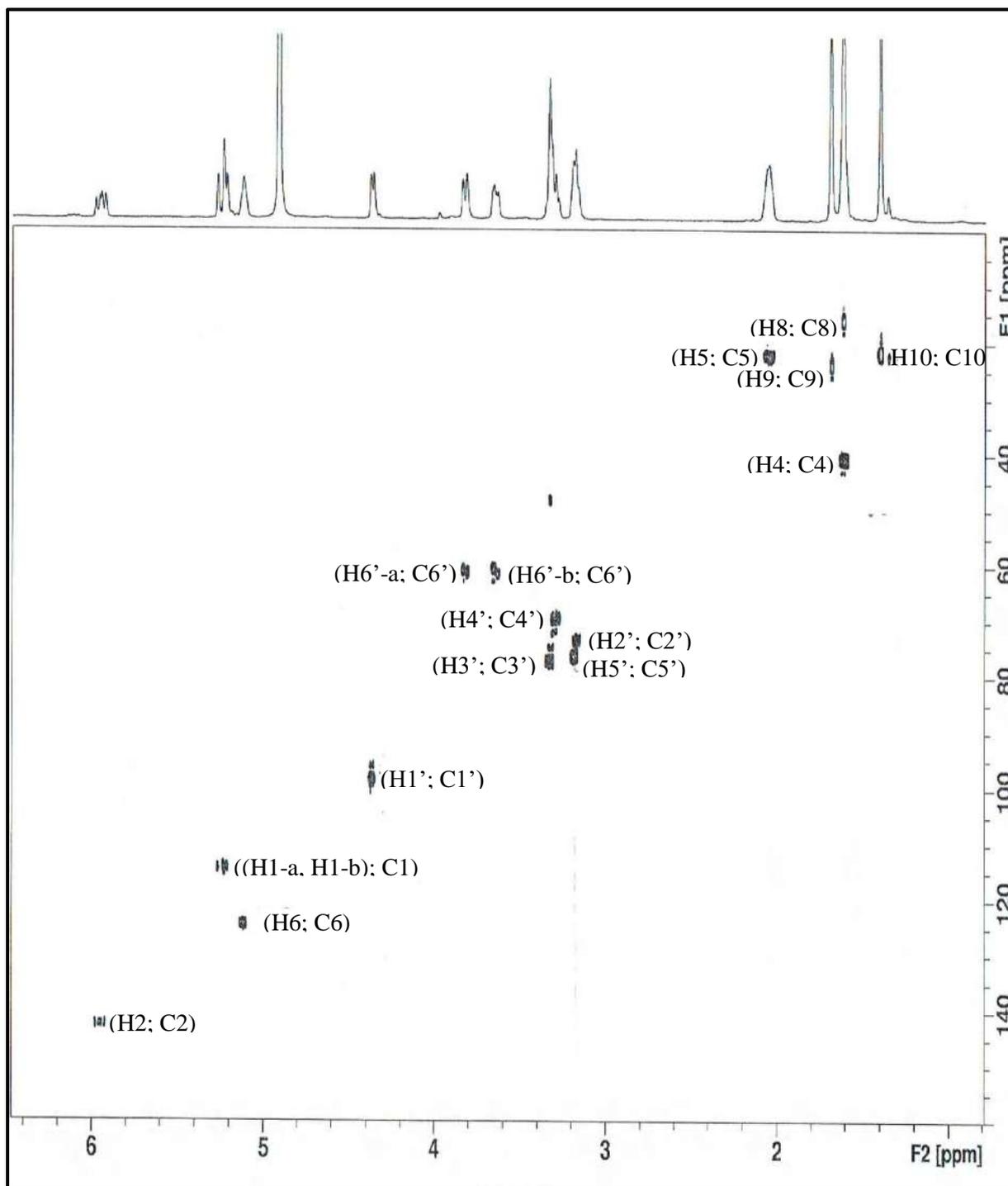
- Une tache de corrélation entre les protons H4 ( $\delta_H = 1,61$  ppm) et le proton H5 ( $\delta_H = 2,06$  ppm) .
- Une tache de corrélation entre les protons H-5 ( $\delta_H = 2,06$  ppm) et H-6 ( $\delta_H = 5,12$  ppm)
- Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1' ( $\delta_H = 4,36$  ppm) et H-2' ( $\delta_H = 3,18$  ppm) .
- Une tache de corrélation entre les protons H-2' et H-3' ( $\delta_H = 3,29$  ppm) .
- Une tache de corrélation entre les protons H-5' ( $\delta_H = 3,19$  ppm) et le protons H-6'-b ( $\delta_H = 3,65$  ppm) .



**Spectre n° III.22:** Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé SOR 4

L'examen des spectres HETCOR (spectre n° III.23) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

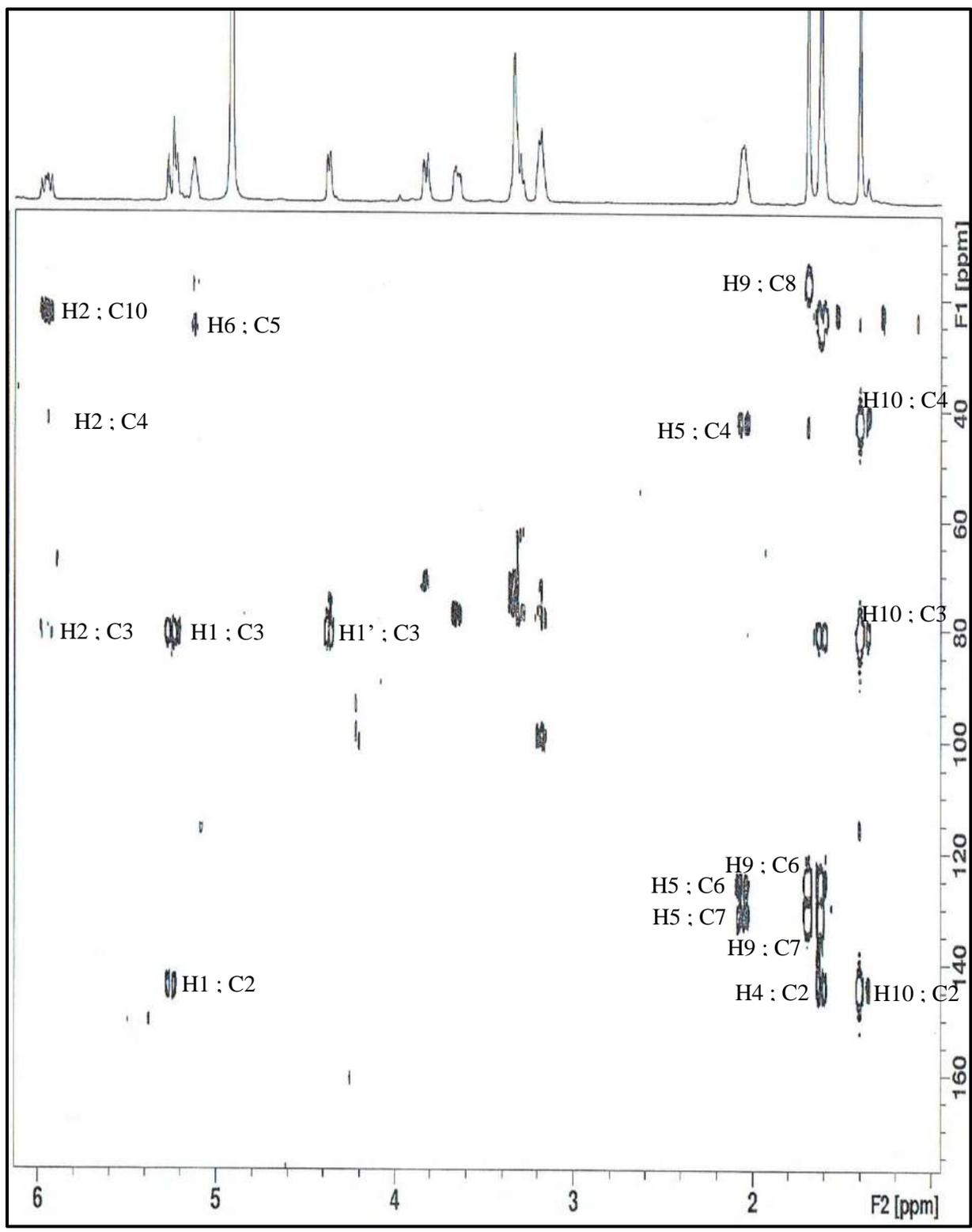
- Une tache de corrélation entre H-10, H-9, H-8 et trois atomes de carbones à C-10  $\delta_C = 21,9$  ppm, C-9  $\delta = 24,0$  ppm C-8  $\delta = 16,0$  ppm attribuables à C-10, C-9 et C-8.
- Une tache de corrélation entre H-7, H-6 et deux atomes de carbones à  $\delta_C = 130,6$  ppm et  $\delta_C = 124,4$  ppm attribuables à C-7 et C- 6.
- Une tache de corrélation entre H-5 et un atome de carbone à  $\delta_C = 22,7$  ppm qui est le C-5.
- Une tache de corrélation entre H-4 et un atome de carbone à  $\delta_C = 40,0$  ppm qui est le C-4.
- Une tache de corrélation entre H-3 et un atome de carbone à  $\delta_C = 81,0$  ppm qui est le C-3.
- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone à  $\delta_C = 142,5$  ppm qui est le C-2.
- Une tache de corrélation entre H-1 et un atome de carbone à  $\delta_C = 114,4$  ppm qui est le C-1.
- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone à  $\delta_C = 61,4$  ppm qui est le C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à  $\delta_C = 76,8$  ppm qui est le C-5'.
- Une tache de corrélation entre H-4' et un atome de carbone à  $\delta_C = 70,2$  ppm qui est le C-4'.
- Une tache de corrélation entre H-3' et un atome de carbone à  $\delta_C = 77,0$  ppm qui est le C-3'.
- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone à  $\delta_C = 73,0$  ppm qui est le C-2'.
- Une tache de corrélation entre H-1' et un atome de carbone à  $\delta_C = 98,7$  ppm qui est le C-1'.
- En comparant les données spectrales (COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , HSQC) avec ceux de la littérature nous a orientés vers une entité glucopyranosyle [123].



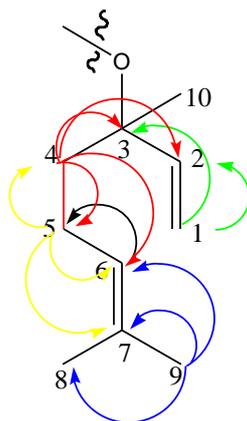
*Spectre n° III.23: Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé SOR 4*

Les attributions des autres atomes de carbone ont été complétées par l'étude des spectres de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC spectre III-24 qui montrent :

- Trois taches de corrélation entre H2 et trois atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 21,9$  ; 40,0 et 81,0 ppm attribuables à C10 ; C4 et C3 respectivement.
- Deux taches de corrélation entre H1 et deux atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 142,5$  et 81,0 ppm attribuables à C2 ; C3 respectivement.
- Une tache de corrélation entre H6 et un atome de carbone résonant à  $\delta_C = 22,7$  ppm qui ne peut être que le C5.
- Trois taches de corrélation entre H5 et trois atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 40,0$  ; 124,4 et 130,6 ppm attribuables à C4 ; C6 et C7 respectivement.
- Trois taches de corrélation entre H9 et trois atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 16,0$  ; 124,4 et 130,6 ppm attribuables à C8 ; C6 et C7 respectivement.
- Une tache de corrélation entre le proton anomérique H1' et un atome de carbone résonant à  $\delta_C = 81,0$  ppm qui ne peut être que le C3.
- Trois taches de corrélation entre H8 et trois atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 21,9$  ; 124,4 et 130,6 ppm attribuables à C10 ; C6 et C7 respectivement.
- Quatre taches de corrélation entre H4 et quatre atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 22,7$  ; 81,0 ; 124,4 et 142,5 ppm attribuables à C5 ; C3 ; C6 et C2 respectivement.
- Trois taches de corrélation entre H10 et trois atomes de carbone résonants à  $\delta_C = 40,4$  ; 81,0 et 142,5 ppm attribuables à C4 ; C3 et C2 respectivement



*Spectre n° III.24: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé SOR 4*



**schéma III-4** : montre les différentes corrélations HMBC

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n°III.5.

**Tableau n° III.5** : Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) ; 600 MHz

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$  ; 150 MHz de SOR 4

Position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), (m, J (Hz))
1-a	114,4	5,22 (1H, d, $J=11,0$ Hz, H-1-a)
1-b		5,27 (1H, d, $J=17,5$ Hz, H-1-b)
2	142,5	5,99 (1H, dd, $J=17,5; 11,0$ Hz, H-2)
3	81,0	-
4	40,0	1,61 (2H, m, H-4)
5	22,7	2,06 (2H, m, H-5)
6	124,4	5,12(1H, br t, $J=7,0$ Hz, H6)
7	130,6	-
8	16,0	1,61 (3H, s, H-8)
9	24,0	1,69 (3H, s, H-9)
10	21,9	1,39 (3H, s, H-10)
1'	98,7	4,36 (d, $J=7,5$ Hz, H-1')
2'	73,0	3,18 (m, H-2')
3'	77,0	3,29 (m, H-3')
4'	70,2	3,39 (m, H-4')
5'	76,8	3,19 (m, H-5')

Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), (m, J (Hz))
6'-a	61,4	3.81 (dd, $J= 11,8; 2,2$ Hz, H-6'-a)
6'-b		3.65 (dd, $J= 11,8; 5,4$ Hz, H-6'-b)

A partir de toutes ces données, la structure du composé SOR 4 a donc pu être établie comme étant **Linalyl- $\beta$ -glucopyranoside**

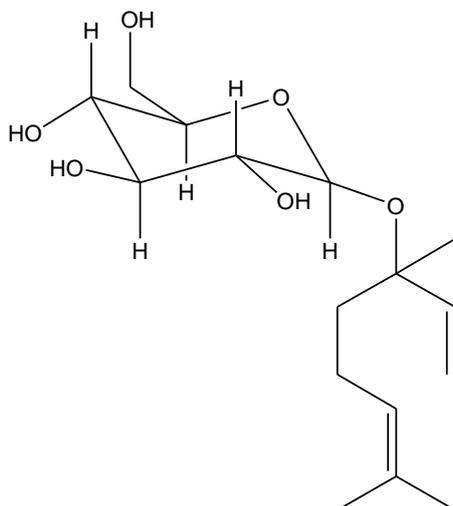


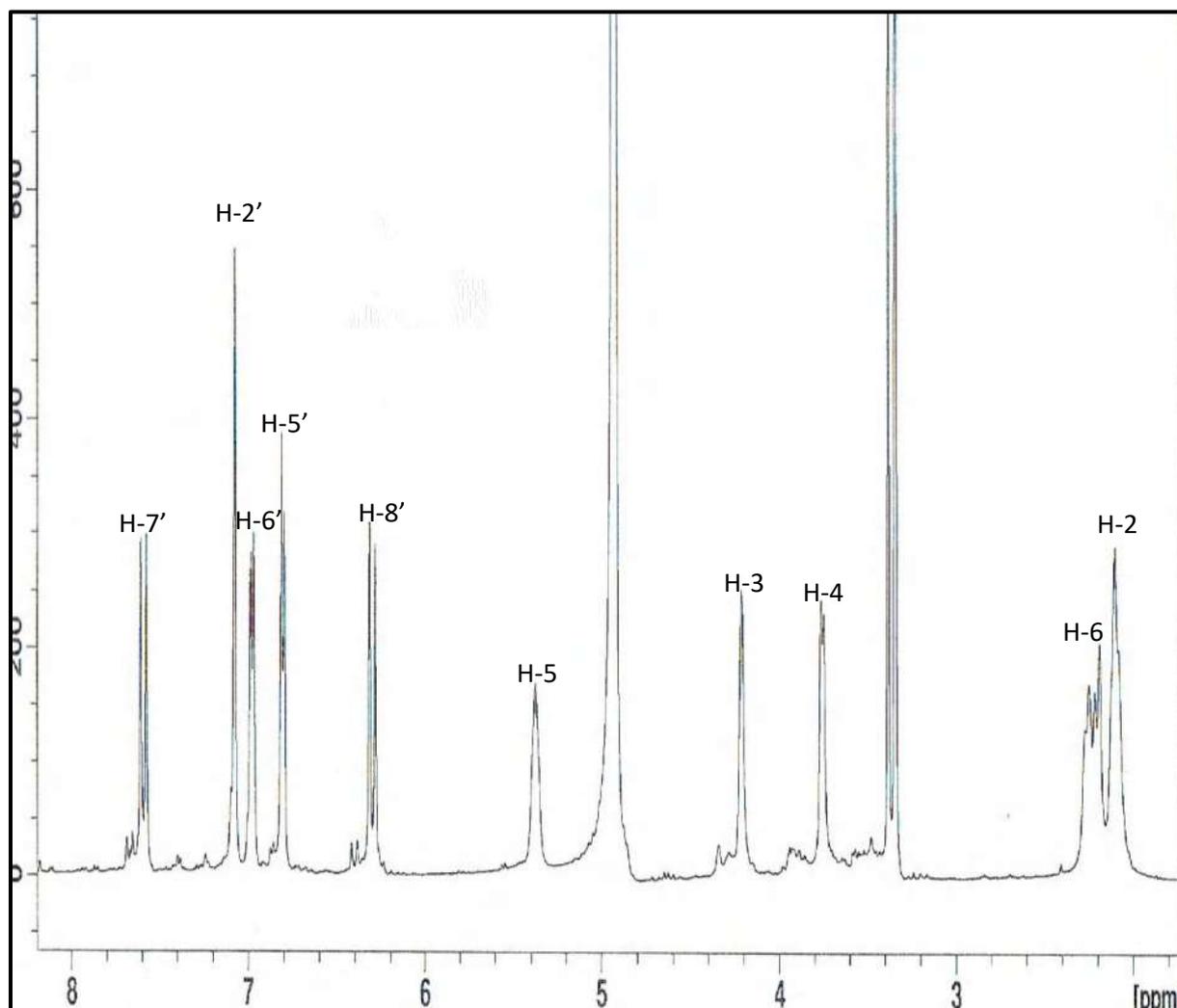
Figure n° III. -4-1: la structure de **Linalyl- $\beta$ -glucopyranoside**

### III-5- Identification du produit GE3-2 :

La formule moléculaire et poids moléculaire étaient  $C_{16}H_{18}O_9$  et 354.31, respectivement.

Le spectre RMN  $^1H$  de ce composé enregistré à 600 MHz dans  $CD_3OD$  (spectres III.25), indique la présence de :

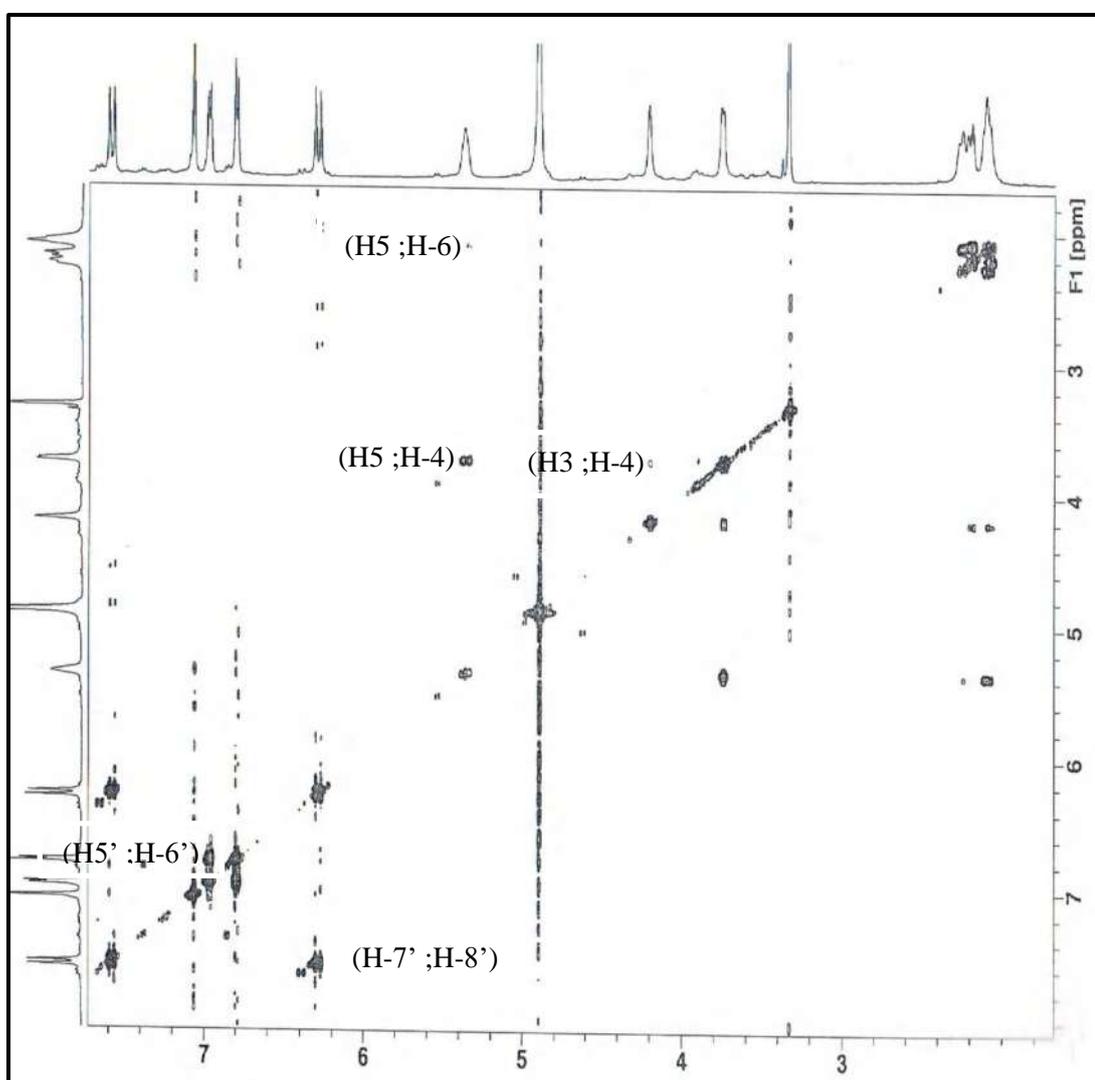
- Des signaux attribuables à un noyau aromatiques trisubstitué résonant à  $\delta_H$  7.08 (1H, s, H-2'), 6,93 (1H, d, 8,3, H-6'), 6, 80 (1H, d, 8,3, H-5').
- Deux signaux attribuables à une doubles liaison avec une géométrie *trans* résonant à  $\delta_H$  7,61 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-7'), 6,30 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-8').
- Un singulier large à  $\delta_H$  5.40 (1H, sl, H-5).
- Un autre singulier large à  $\delta_H$  4.20 (1H, sl, H-3).
- Un doublet à  $\delta_H$  3,76ppm (1H, d,  $J=8,1$  Hz, H-4).
- Des signaux à 1,98–2,26 (4H, m, H-2 et H-6).



Spectre n° III.25: Spectre RMN  $^1H$  (600 MHz,  $CD_3OD$  du composé GE3-2

L'examen des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.26) permet l'attribution des protons:

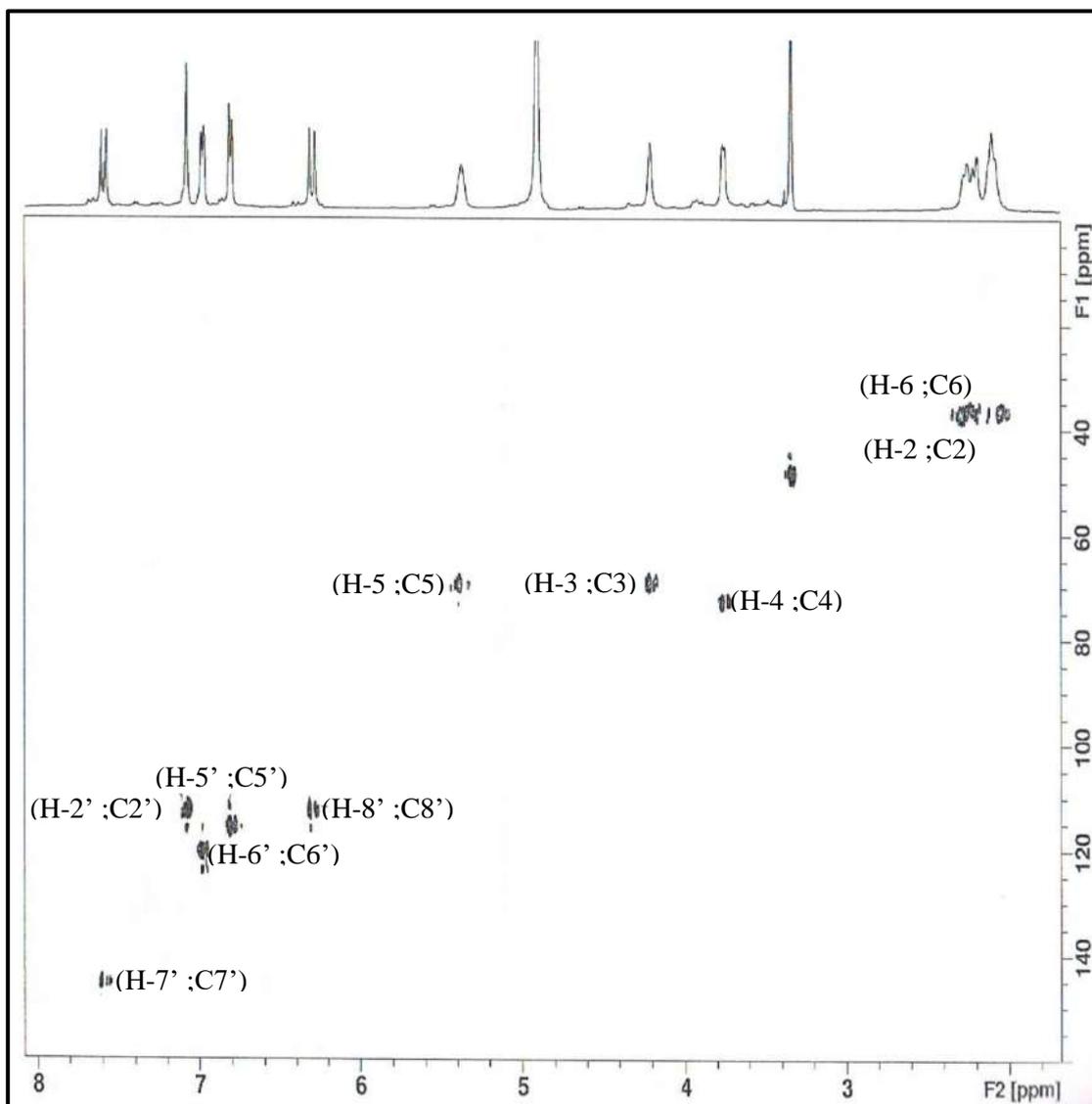
- Une tache de corrélation entre le proton H-7'  $\delta_{\text{H}}$  7,61 ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}$  6,30 qui ne peut être que le proton H-8'.
- Une tache de corrélation entre le proton H-6'  $\delta_{\text{H}}$  6,93 ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}$  6,80 qu'il est le proton H-5'.
- Une tache de corrélation entre le proton H-5  $\delta_{\text{H}}$  5,40 ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,76 ppm qui ne peut être que le proton H-4.
- Une tache de corrélation entre le proton H-4  $\delta_{\text{H}}$  3,76 ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}$  4,20 ppm qui ne peut être que le proton H-3
- Une tache de corrélation entre le proton H-5 et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}$  2,26 ppm qui ne peut être que le proton H-6.



*Spectre n° III.26: Spectre COSY  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE3-2*

L'examen des spectres HSQC (spectre n° III.27) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-7' et l'atome de carbones à C-7'  $\delta_c = 145,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2' et l'atome de carbones à C-2'  $\delta_c = 113,8$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6' et l'atome de carbones à C-6'  $\delta_c = 120,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-5' et l'atome de carbones à C-5'  $\delta_c = 115,0$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-8' et l'atome de carbones à C-8'  $\delta_c = 112,6$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-5 et l'atome de carbones à C-5  $\delta_c = 69,9$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-3 et l'atome de carbones à C-3  $\delta_c = 69,6$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-4 et l'atome de carbones à C-4  $\delta_c = 72,8$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6 et l'atome de carbones à C-6  $\delta_c = 36,4$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2 et l'atome de carbones à C-2  $\delta_c = 36,4$  ppm.



Spectre n° III.27: Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz CD<sub>3</sub>OD du composé GE3-2

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III-28) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-7' montre trois taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 168,7$  ppm attribuable à C-9'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 127,8$  ppm attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 112,6$  ppm qui ne peut être attribué qu'à C-8'.

Le proton H-2' montre trois taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 145,1$  ppm attribuable à C-7'.
- La deuxième confirme le C-1' à  $\delta_C = 146,8$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 127,8$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3'.

Le proton H-6' montre trois taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 145,1$  ppm attribuable à C-7'.
- La deuxième confirme le C-1' à  $\delta_C = 127,8$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 116,54$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-5'.

Le proton H-5' montre deux taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 113,8$  ppm attribuable à C-2'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 127,8$  ppm attribuable à C-1'.

Le proton H-8' montre deux taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 145,1$  ppm attribuable à C-7'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 168,7$  ppm attribuable à C-9'.

Le proton H-5 montre quatre taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 168,7$  ppm attribuable à C-9'.
- La deuxième confirme le C-4 à  $\delta_C = 72,8$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 69,6$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 36,4$  ppm attribuable à C-6 et C-2.

Le proton H-3 montre trois taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 72,8$  ppm attribuable à C-4.
- La deuxième confirme le C-5 à  $\delta_C = 69,9$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 36,4$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6 et C-2.

Le proton H-4 montre trois taches de corrélation :

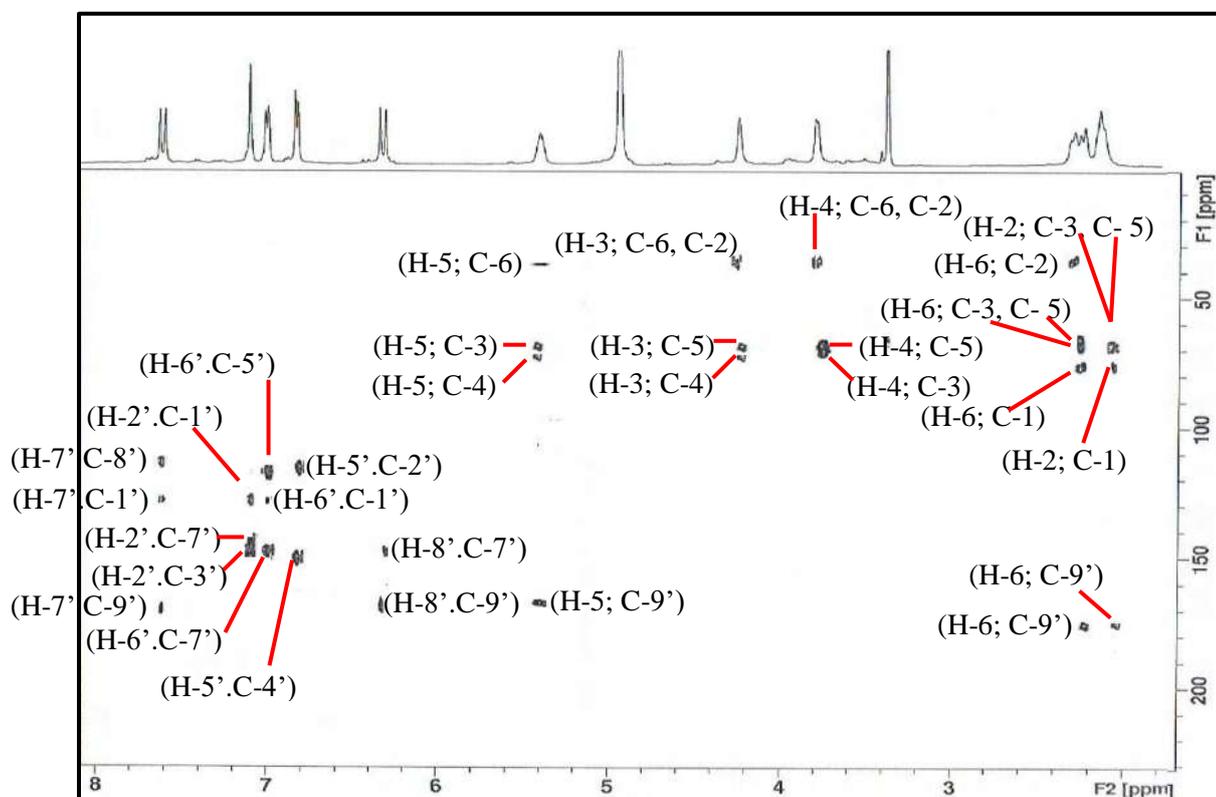
- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 69,9$  ppm attribuable à C-5.
- La deuxième confirme le C-3 à  $\delta_C = 69,6$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 36,4$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6 et C-2.

Le proton H-6 montre cinq taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 177,3$  ppm attribuable à C-7.
- La deuxième confirme le C-1 à  $\delta_C = 76,3$  ppm.
- La troisième confirme le C-4 à  $\delta_C = 72,8$  ppm.
- La quatrième confirme le C-5 à  $\delta_C = 69,9$  ppm
- La cinquième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 36,4$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-2.

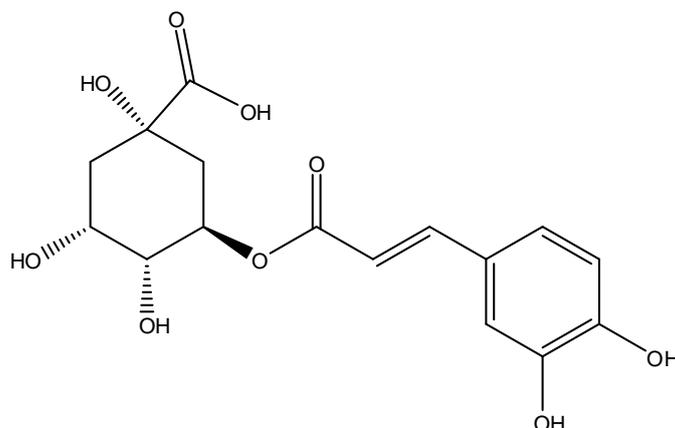
Le proton H-2 montre deux taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 177,3$  ppm attribuable à C-7.
- La deuxième confirme le C-1 à  $\delta_C = 76,3$  ppm.
- La quatrième confirme le C-3 à  $\delta_C = 69,6$  ppm



**Spectre n° III-28:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **GE3-2**

A partir de toutes ces données en comparant celles de la littérature [117], la structure du composé GE3-2 a donc pu être établie comme étant : **acide chlorogénique**



**Figure n° III.5:** la structure de l'acide chlorogénique

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-6

**Tableau n° III.6 :** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) ; 600 MHz

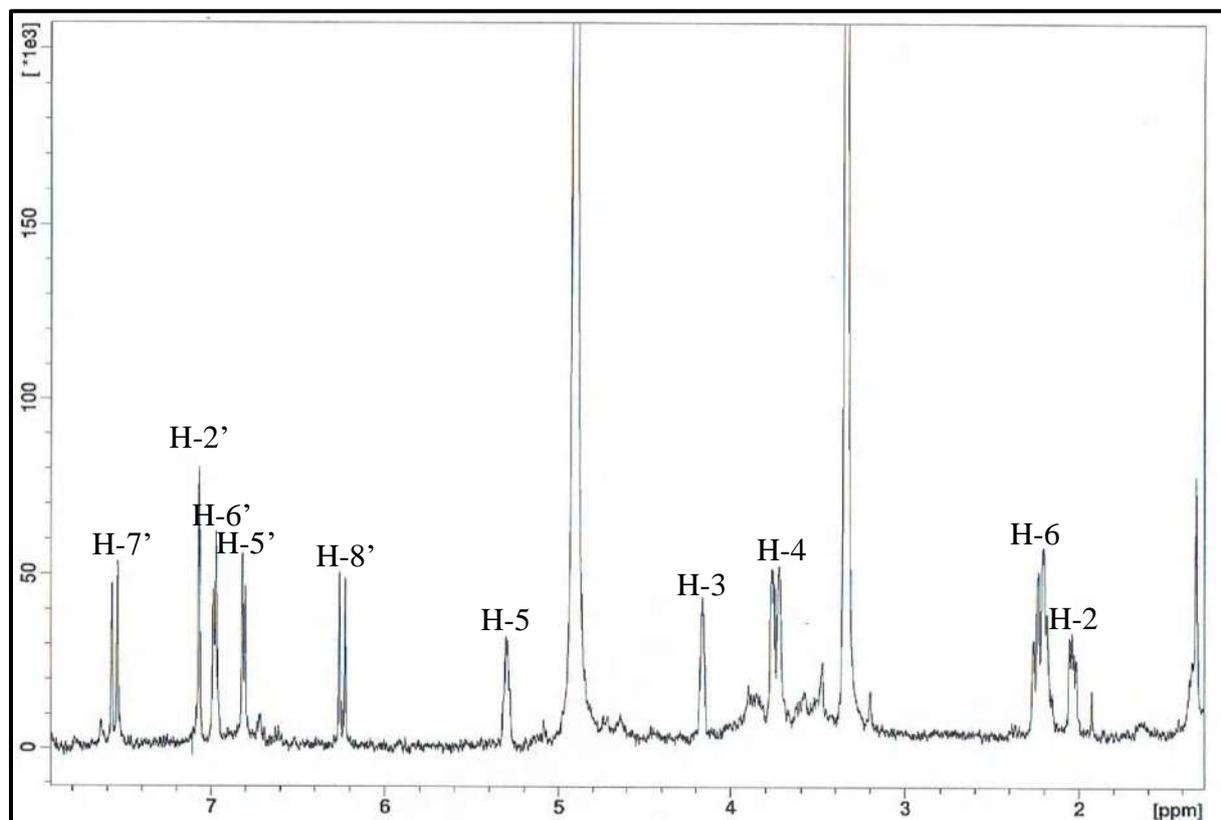
RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD) ; 150 MHz de **GE3-2**

position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), (m, J (Hz))
1	76,3	-
2	36,4	1,98–2,26 (2H, m)
3	69,6	4,20 (1H, sl)
4	72,8	(1H, d, $J=8.1$ Hz)
5	69,9	5,40 (1H, sl)
6	36,4	2,26 (2H, m)
7	177,3	-
1'	127,8	-
2'	113,8	7,08 (1H, s)
3'	146,8	-
4'	149,5	-
5'	115,0	6,80 (1H, d, 8,3 Hz)
6'	120,1	6,93 (1H, d, 8,3 Hz)
7'	145,1	7,61 (1H, d, $J=16,0$ Hz)
8'	112,6	6,30 (1H, d, $J=16,0$ Hz)
9'	168,7	-

### III-6- Identification du produit GE3-3

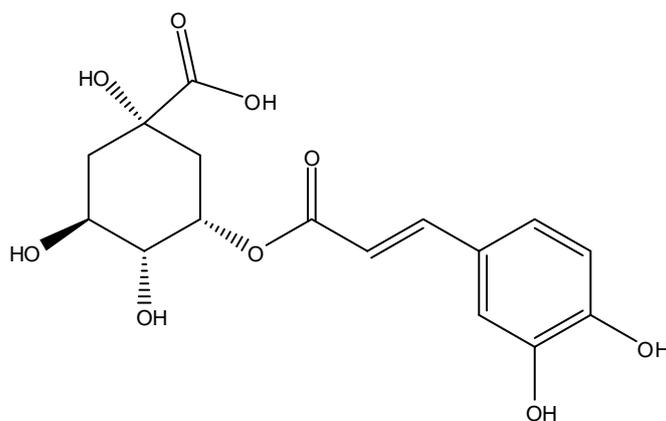
La formule moléculaire et poids moléculaire étaient  $C_{16}H_{18}O_9$  et 354.311 respectivement.

Le spectre RMN  $^1H$  de ces composés enregistré à 600 MHz dans  $CD_3OD$  (spectres III.29) montre un spectre identique au (spectre III.25).



**Spectre n° III.29:** Spectre NMR  $^1H$  (600 MHz,  $CD_3OD$  du composé **GE3-4**)

La comparaison du temps de rétention et le spectre RMN  $^1H$  avec ceux de la littérature [118], nous permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé **GE3-4**, la structure suivante :  
**acide neochlorogénique**



**Figure n° III.6:** la structure de l'acide Neochlorogénique

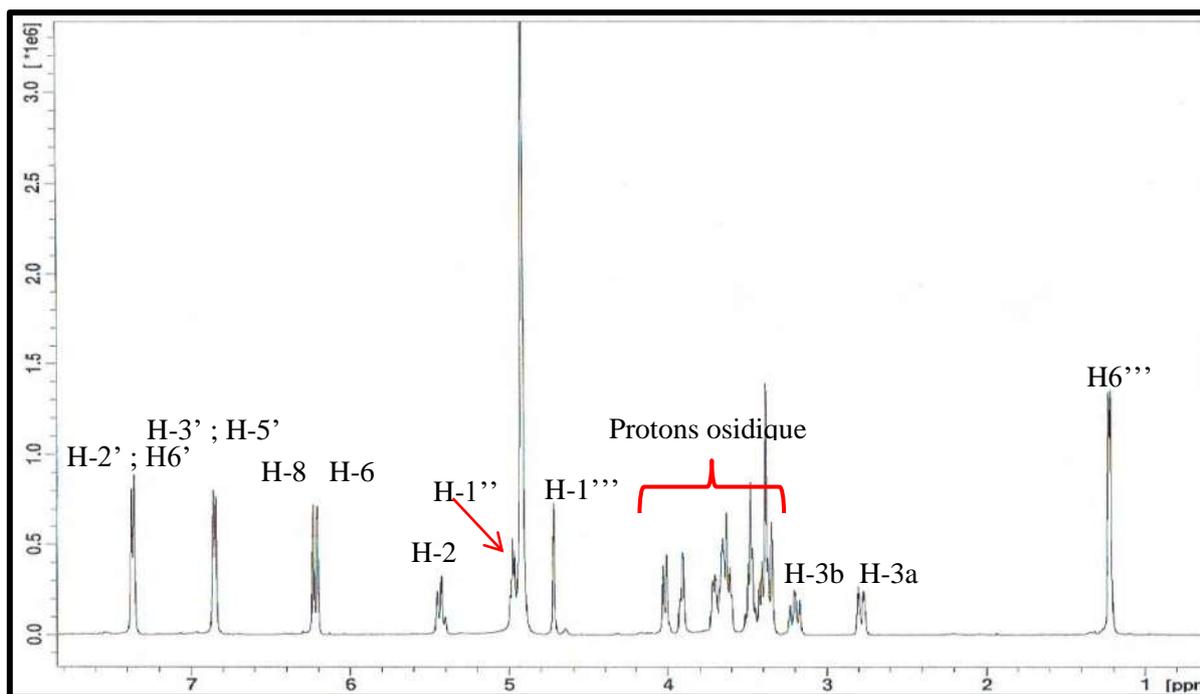
### III-7- Identification du produit GE3-13

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.30) du composé **GE 3.20** montre les six protons aromatiques caractéristiques de la naringénine :

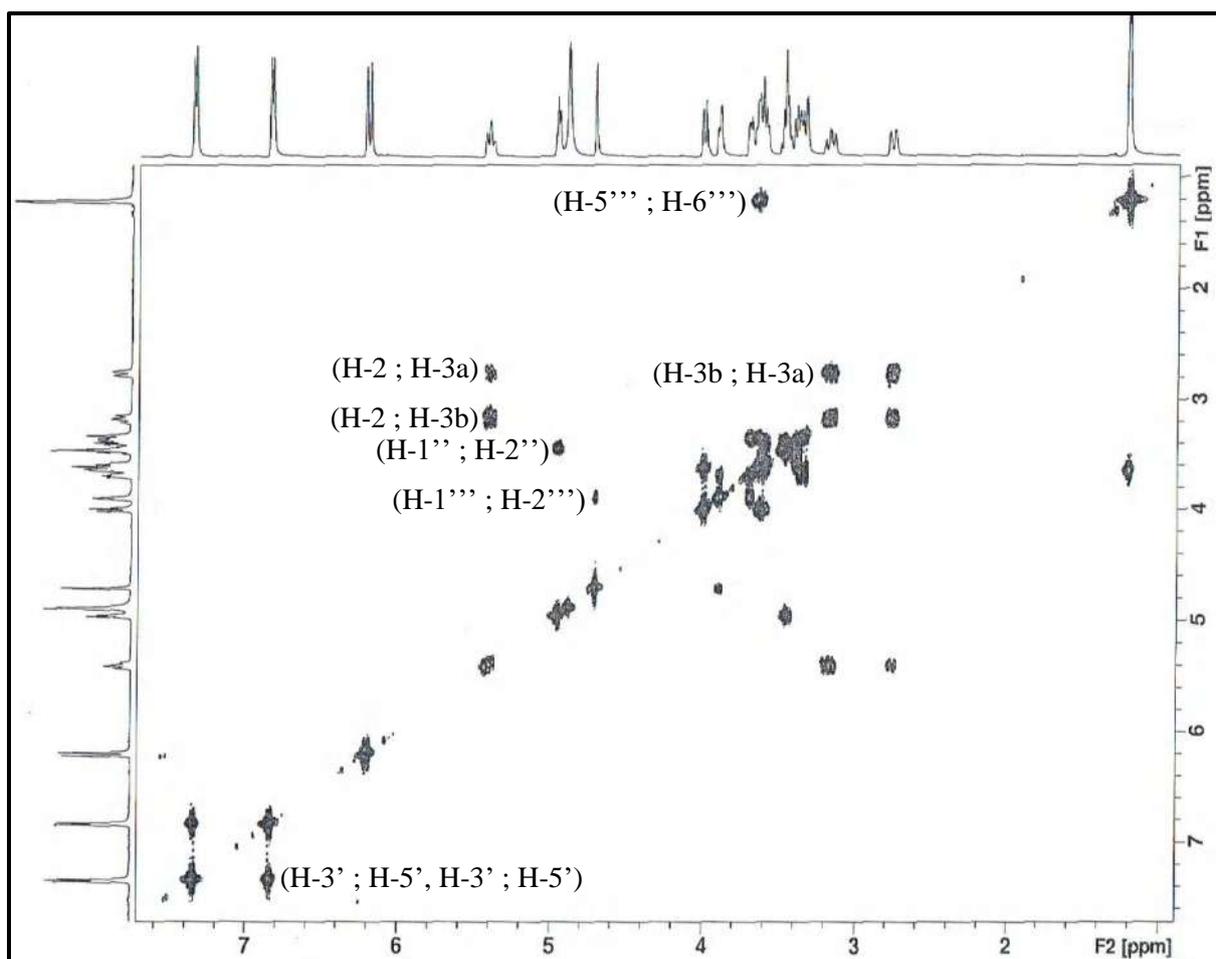
- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}= 7,36$  ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}= 6,85$  ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz), attribués respectivement aux protons (H-2', H6') et (H-3', H5') du cycle B d'un flavonoïde substitué en C-4'. Ceci est confirmé par expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.31).
- Deux autres signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}= 6,21$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}=6,22$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Ceci est confirmé par expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.31).
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}= 5,42$ ppm (1H, *dd*,  $J = 12,2 ; 2,7$  Hz) attribuable à H-2.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}= 2,78$ ppm (1H, *dd*,  $J = 17,6 ; 2,7$  Hz) attribuable à H-3a.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}= 3,15$ ppm (1H, *dd*,  $J = 17,6 ; 12,2$  Hz) attribuable à H-3b.

Dans ce spectre on observe aussi la présence de deux protons anomériques dont le premier résonne à  $\delta_{\text{H}}= 4,96$  ppm (1H,  $J = 7,2$  Hz) et le second à  $\delta_{\text{H}}= 4,73$  sous forme d'un singulet large.

- Le glucose qui est identifié par son proton anomérique H-1" qui résonne à  $\delta_{\text{H}}= 4,96$ ppm (spectre III.30) sous forme d'un doublet  $J = 7,2$  Hz indique une configuration  $\beta$  pour ce sucre.
- Le rhamnose aussi est identifié par son proton anomérique H-1'" qui résonne à  $\delta_{\text{H}}= 4,73$ ppm (spectre III.30) sous forme d'un singulet large, et le signal du méthyle sortant à  $\delta_{\text{H}}= 1,23$ ppm.



*Spectre n° III.30: Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3-13***



*Spectre n° III.31: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3-13***

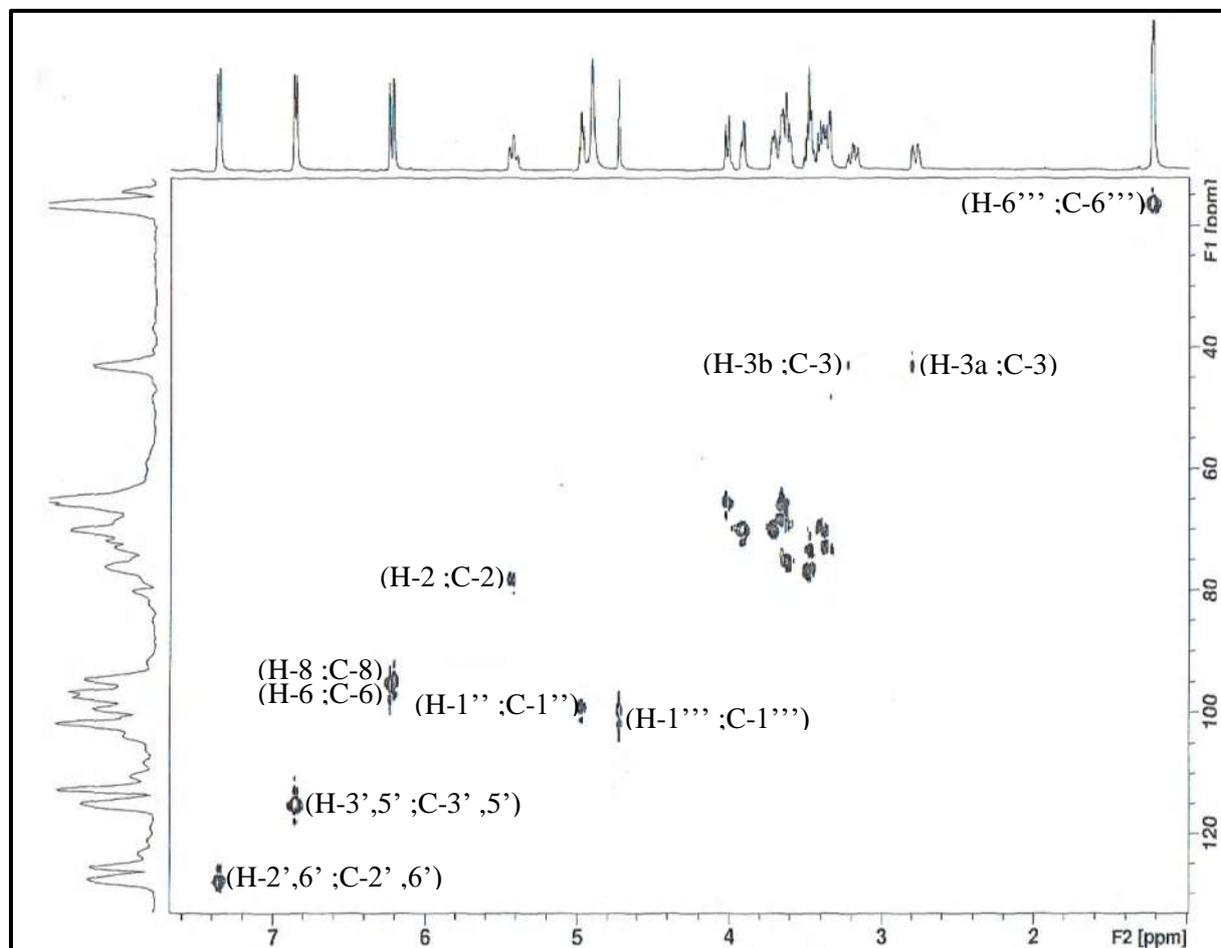
L'examen des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.31) permet l'attribution des protons:

- Une tache de corrélation entre les protons (H-2' ; H-6')  $\delta_{\text{H}} = 7,36$  ppm et autres protons à  $\delta_{\text{H}} = 6,85$  qui ne peut être que les protons (H-3' ; H-5').
- Deux taches de corrélation entre le proton H-2  $\delta_{\text{H}} = 5,42$  ppm et deux autres protons à  $\delta_{\text{H}} = 2,78$  et  $\delta_{\text{H}} = 3,15$  ppm ce sont les protons H-3a et H-3b respectivement.
- Une tache de corrélation entre le proton H-3b  $\delta_{\text{H}} = 3,15$  ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}} = 2,78$  ppm qui ne peut être que le proton H-3a.
- Le proton anomérique H-1'' [ $\delta_{\text{H}} 4,97$  (d,  $J = 7,2$  Hz)] corrèle avec le proton H-2''  $\delta_{\text{H}} 3,45$  ppm (dd,  $J = 6,1 ; 7,2$  Hz), qui corrèle sur ce même spectre avec H-3'' [ $\delta_{\text{H}} 3,47$  (d,  $J = 6,1$  Hz)], ce dernier montre une tache de corrélation avec le H-4'' ( $\delta_{\text{H}} = 3,32$  (m) qui lui-même montre une tache de corrélation avec H-5'' ( $\delta_{\text{H}} = 3,38$  (m)) qui corrèle à son tour avec le proton H-6''a ( $\delta_{\text{H}} = 4,01$  (d,  $J = 10,0$  Hz)) et le H-6''b ( $\delta_{\text{H}} = 3,60$  (dd,  $J = 10,0 ; 7,1$  Hz)).

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Spectre III.32) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et deux atomes de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 128,0$  ppm et attribuables à C-2' et C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et deux atomes de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 115,0$  ppm et attribuables à C-3' et C-5'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 96,1$  ppm qui est le C-6
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 94,8$  ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 78,3$  ppm qui est le C-2.
- Deux taches de corrélation entre les protons H-3a, H-3b et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 42,4$  ppm qui est le C-3.
- Une tache de corrélation entre H-1'' et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 99,0$  ppm qui est le C-1''.
- Une tache de corrélation entre H-1''' et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 101,0$  ppm qui est le C-1'''.
- Une tache de corrélation entre H-6''' et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 16,0$  ppm qui est le C-6'''.

L'examen du spectre HSQC permet l'attribution des carbones porteurs des protons du groupement glycosylé  $\delta_C$  C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6''. En comparant ces données spectrales avec celles de la littérature [3]. On déduit que notre groupement glycosylé est un glucose.



**Spectre n° III.32:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz  $CD_3OD$  du composé **GE3-2**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III.33) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Les protons H-6 et H-8 montrent trois taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 96,1$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 104,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 165,0$  ppm attribuable à C-7.

Les protons H-3' et H-5' montrent trois taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 115,8$  ppm confirme le C-3' et C-5'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 130,0$  ppm attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 159,0$  qui ne peut être que C-4'.

Les protons H-2' et H-6' montrent:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 78,3$  ppm attribuable à C-2.
- Une tache de corrélation confirme les deux carbones C-2' et C-6' à  $\delta_C = 128,0$  ppm
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 159,0$  qui ne peut être que C-4'.

Le proton H-2 montre deux taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 130,0$  ppm confirme le C-1'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 198,0$  ppm attribuable à C-4.

Le proton H-3b montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 78,3$  ppm attribuable à C-2.
- Une tache de corrélation confirme le carbone C-1' à  $\delta_C = 130,0$  ppm
- Une tache de corrélation avec l'atome de carbone C-4 à  $\delta_C = 198,0$ .

Le proton H-3a montre:

- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 198,0$  qui est le C-4

Le proton H-1'' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 165,0$  ppm qui ne peut être que le C-7.

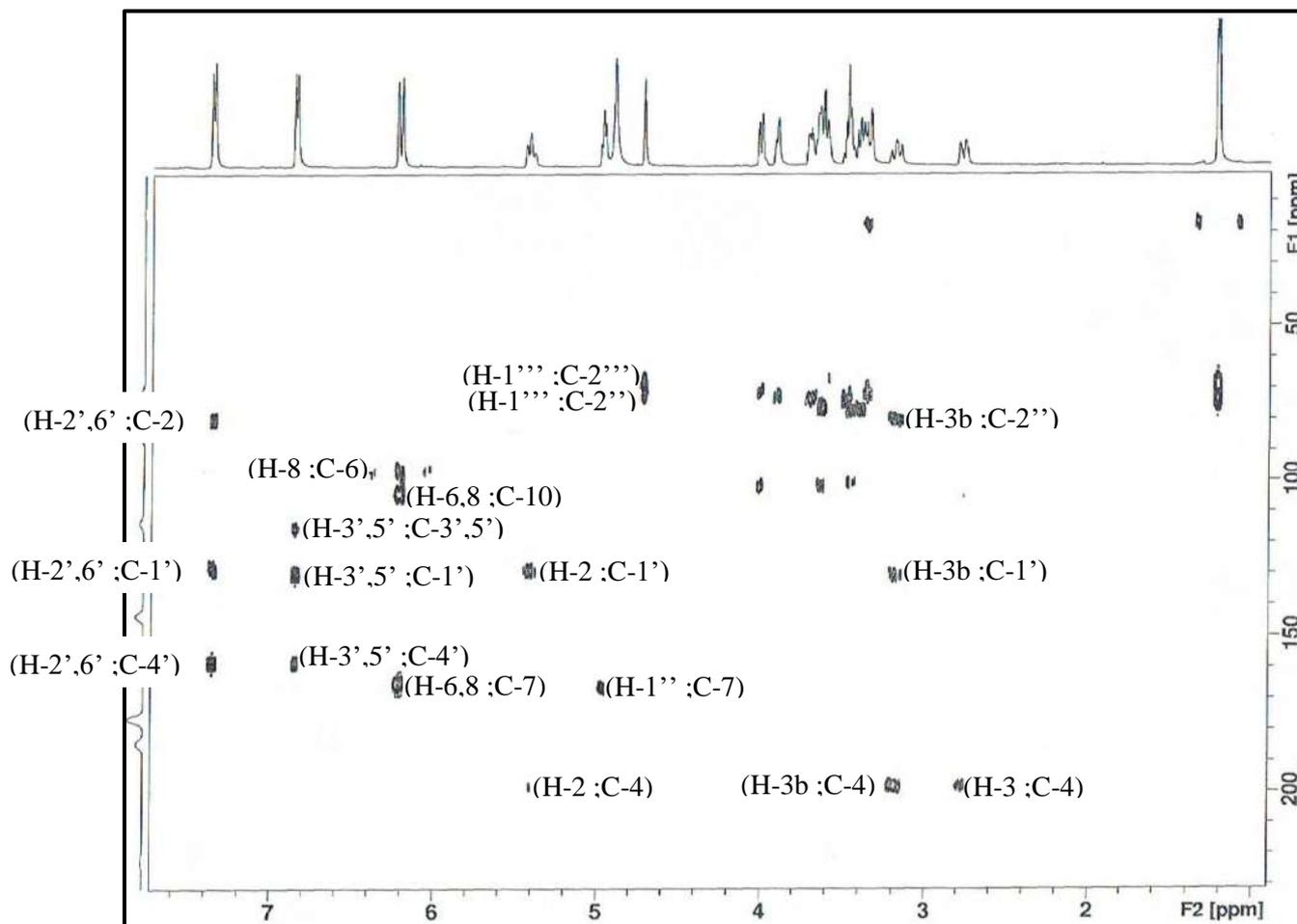
Le proton H-1''' montre deux taches de corrélation:

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 76,3$  ppm confirme le C-2''.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 72,0$  ppm attribuable à C-2'''.

Les spectres RMN des rutinosides et des néohespéridosides ont des caractéristiques différentes. Le proton rhamnose C-1''' dans les rutinosides présente un pic de 4,25 à 4,35 ppm et un pic de méthyle large à 0,8-0,95 ppm, tandis que le signal proton du rhamnose C-1''' dans les néohespéridosides apparaît à 4,85 ppm et un doublet ( $J = 7$  Hz) à 1,2 ppm est observé pour le groupe méthyle.

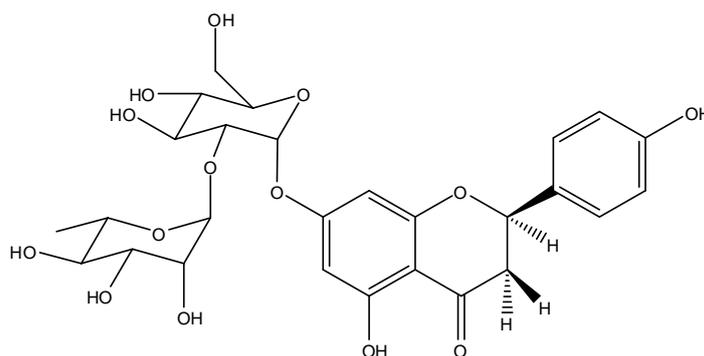
Le spectre de RMN<sup>1</sup>H montre des signaux des protons anomérique H-1'' et H-1''' à  $\delta_H = 4,97$  ppm et  $\delta_H = 4,72$  ppm et le C-6''' à  $\delta = 1,23$  ppm sous forme d'un doublet qui confirme la présence de sucre  $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1→2)- $\beta$ -glucopyranosyl (néohespéridosides).

Le néohespéridoside est fixé sur la génine Naringénine en position 7 comme atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-7 et le proton anomérique H-1'' du glucose.



*Spectre n° III.33: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé GE3-13*

A partir de toutes ces données [119], la structure du composé GE3-2 a donc pu être établie comme étant : **naringenin-7-O-neohesperidoside**



*Figure n° III.7: la structure du naringenin-7-O-neohesperidoside*

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-6

Tableau n° III.7 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz

RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE3-13

position	C δ (ppm)	δH (ppm), (m, J (Hz))
1	-	-
2	78,3	(1H, dd, J = 12,2 ; 2,7 Hz)
3a	42,4	2,78ppm (1H, dd, J = 17,6 ; 2,7 Hz)
3b		3,15ppm (1H, dd, J = 17,6 ; 12,2 Hz)
4	198,0	-
5	163,0	-
6	96,1	6,21(1H, d, J=2,1 Hz)
7	165,0	
8	94,8	6,21(1H, d, J=2,1 Hz)
9	162,3	-
10	104,0	-
1'	130,0	-
2'	128,0	7,36(1H, d, J=8,5 Hz)
3'	115,0	6,85(1H, d, J=8,5 Hz)
4'	159,0	-
5'	115,0	6,85(1H, d, J=8,5 Hz)
6'	128,0	7,36(1H, d, J=8,5 Hz)
1''	99,0	4,97(1H, d, J=7,0 Hz)
2''	76,3	3,42 (dd ; J=6,1 ; 7,2 Hz)
3''	76,5	3,47 (d, J=6,1 Hz)
4''	70,1	3,32 (m)
5''	75,8	3,37 (m)
6''	61,2	4,02 (d ; 10,0) H-6"a 3,60 (dd ; 10 ; 7,1) H-6"b
1'''	101,0	4,73(sl)
2'''	70,3	3,91 (d ; J=4,5 Hz)

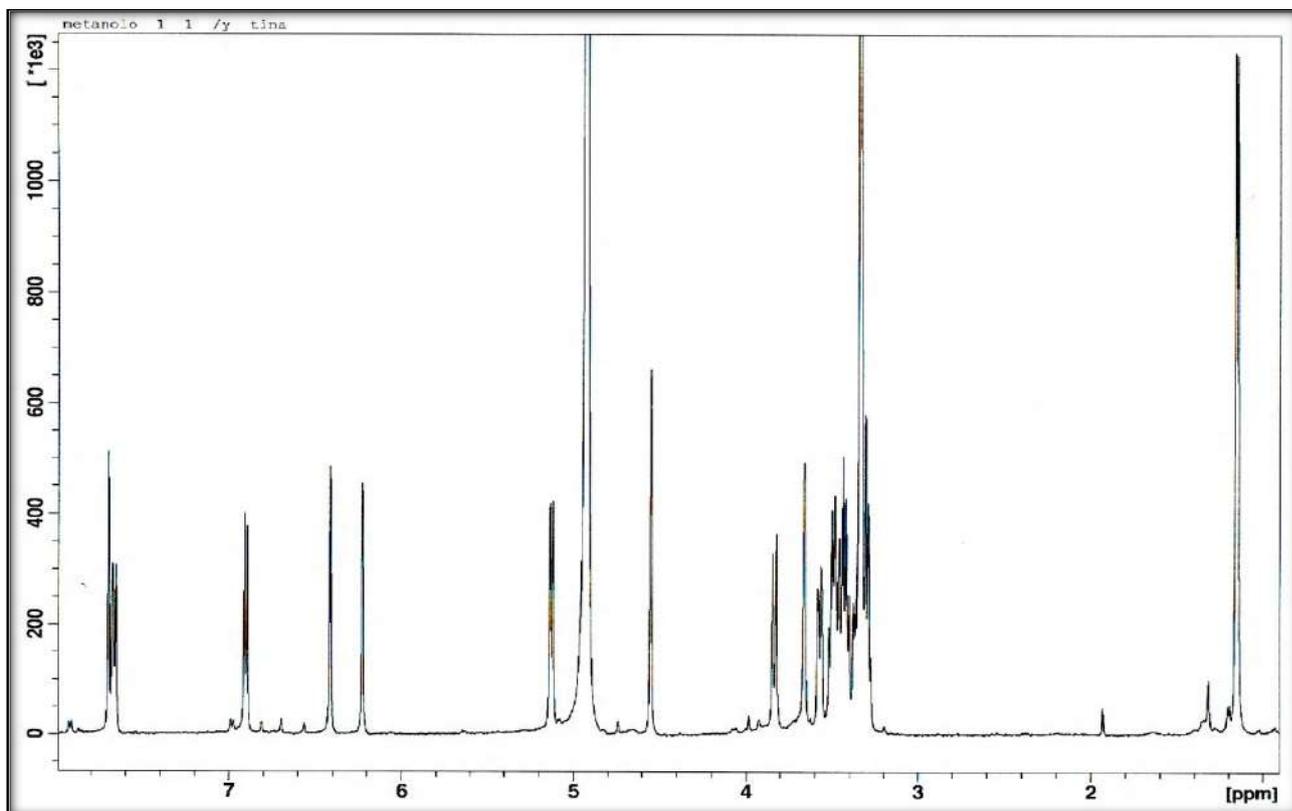
<b>position</b>	<b>C <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta H</math> (ppm), (m, J (Hz))</b>
3'''	70,7	3,46 (dd ; J= 8,2 ; 4,5 Hz)
4'''	72,0	3,75(m)
5'''	68,2	3,60(m)
6'''	16,0	1,23 (s)

### III-8- Identification du produit GE3-20

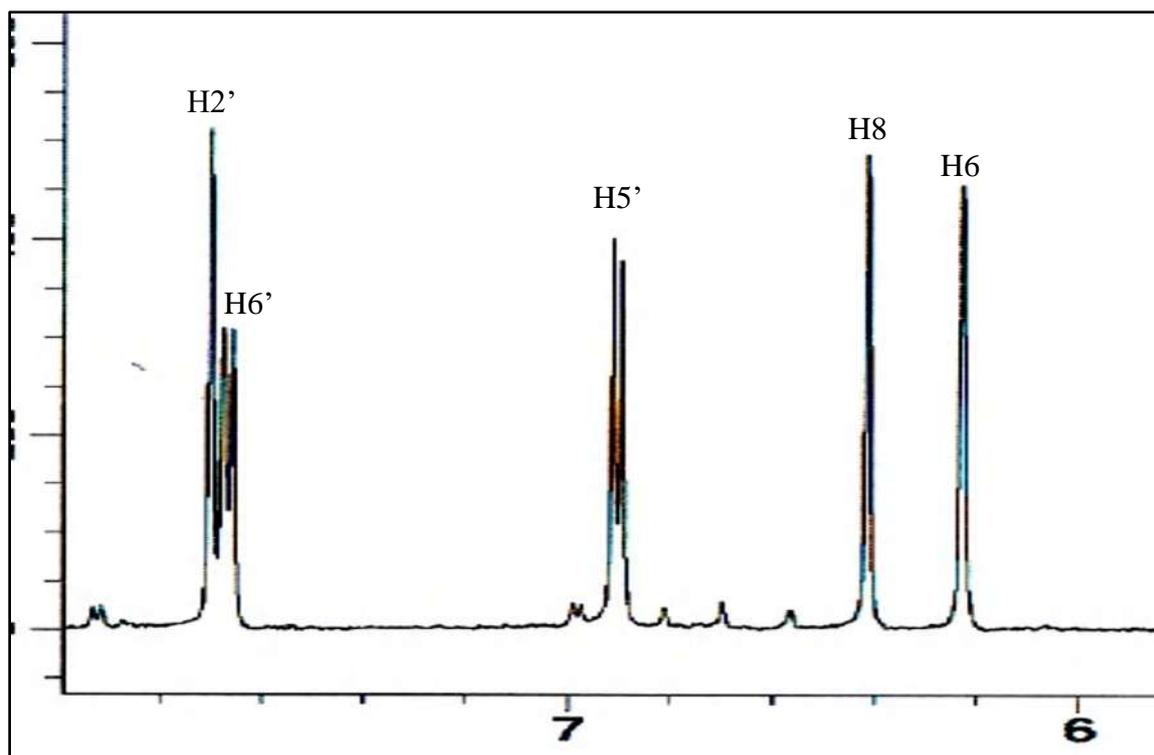
Le composé **GE3.20** se présente sous forme d'une poudre jaune,

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  est sont étalements montrent (spectres III.34 ; III.34.1 ; III.34.2) du composé **GE 3.20** montrent les cinq protons aromatiques caractéristiques de la quercétine.

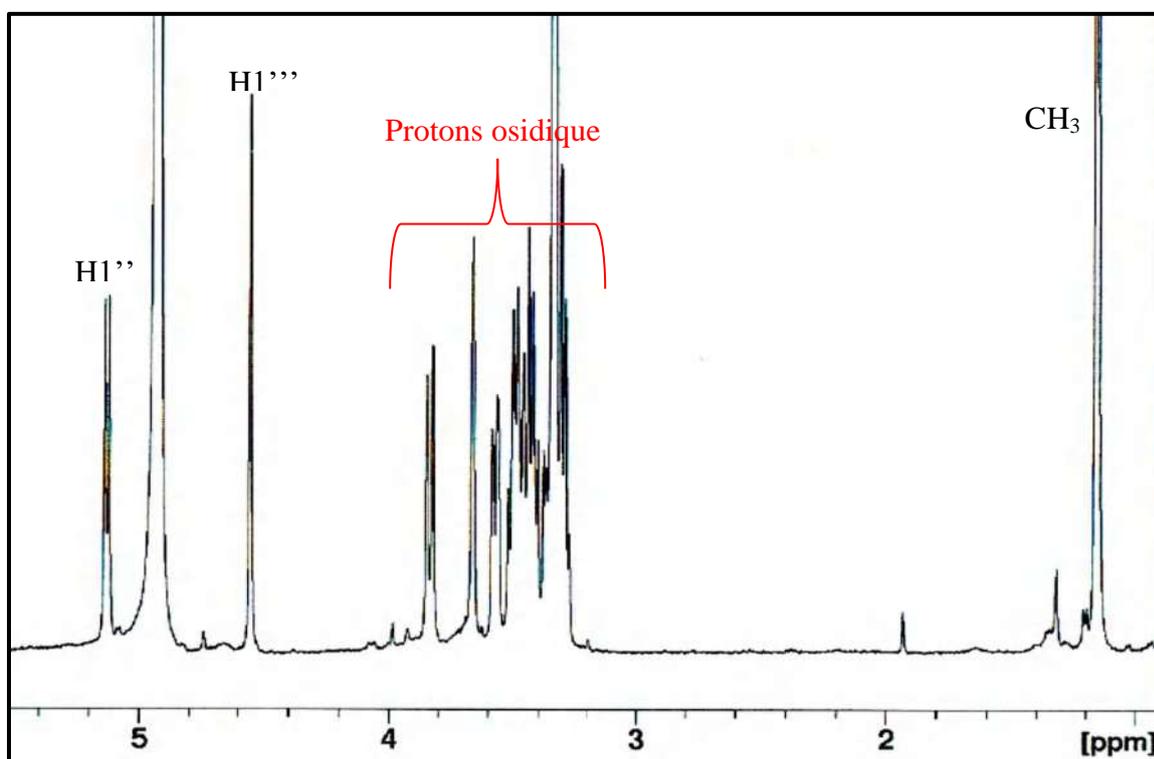
- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  6,25 (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz) et 6,40 (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Ceci est confirmé par expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.35).
- trois signaux déblindés résonant à  $\delta_{\text{H}}$  7,74 (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), 7,65 (1H, *d*,  $J = 8,5 ; 2,1$  Hz) et 6,97 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz), attribuables respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B bisubstitué en positions 3' et 4' comme le montre également l'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.35).



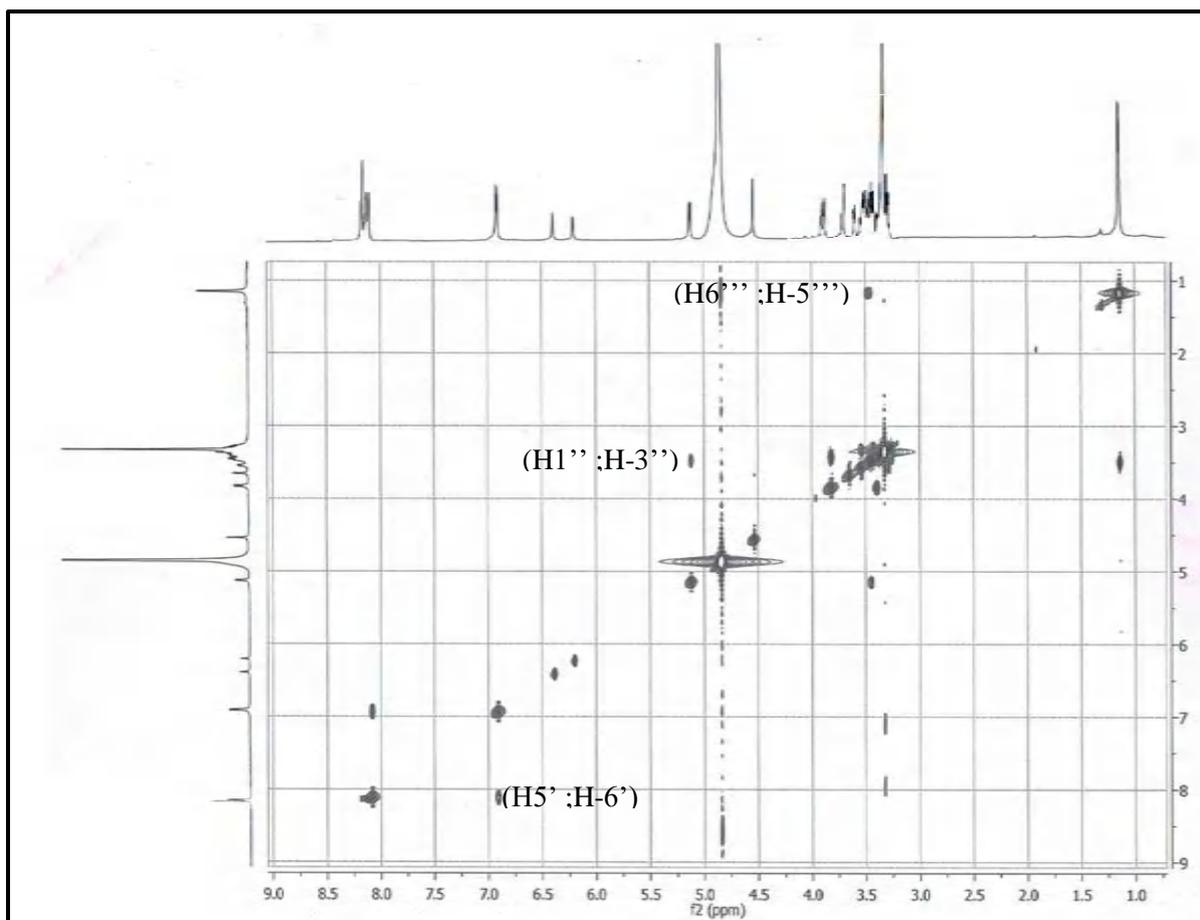
**Spectre n° III.34:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3.20**



*Spectre n° III.34.1: Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE3.20  
Proton aromatique.*



*Spectre n° III.34.2: Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE3.20  
Proton de sucres*



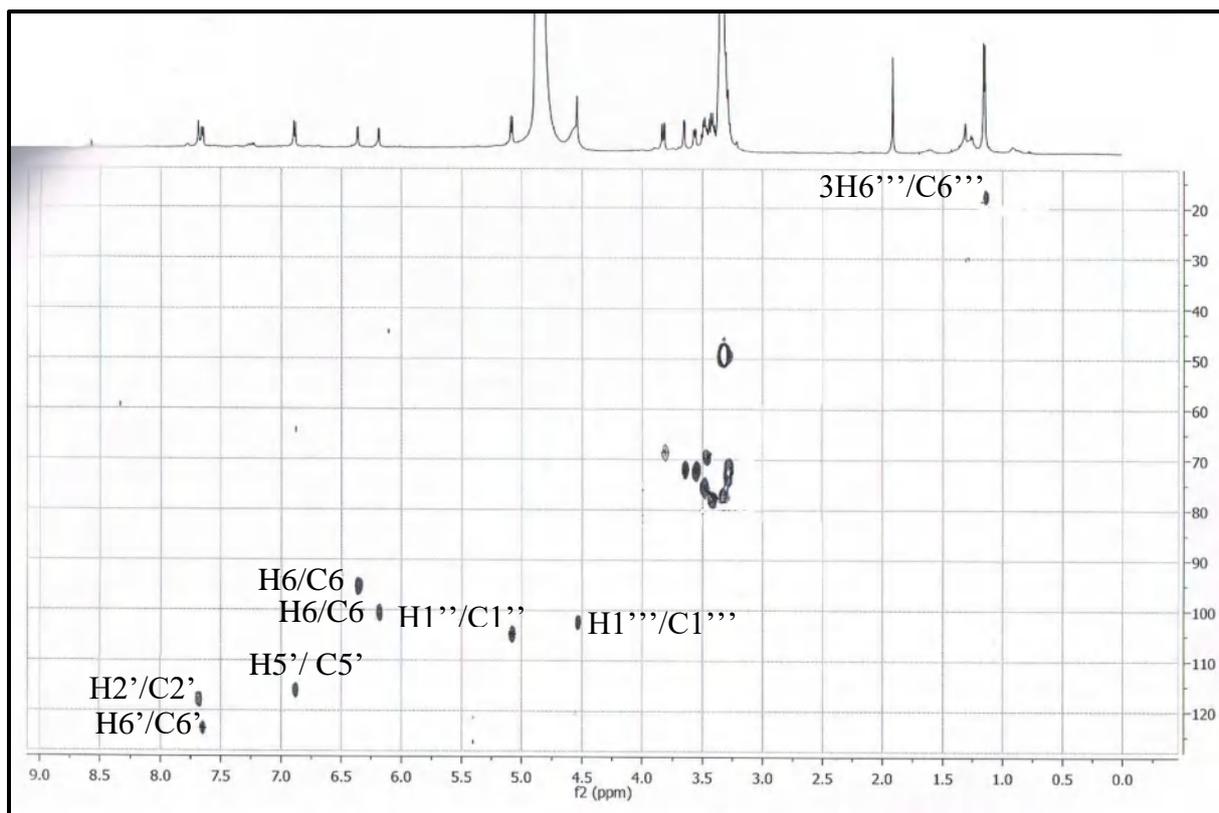
**Spectre n° III.35: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé GE3.20**

En dehors des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  permet de repérer deux protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  ( $d$ ,  $J = 7,7$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} = 4,60$  ppm ( $d$ ,  $J = 1,4$  Hz). Ces données suggèrent la présence de deux unités osidiques.

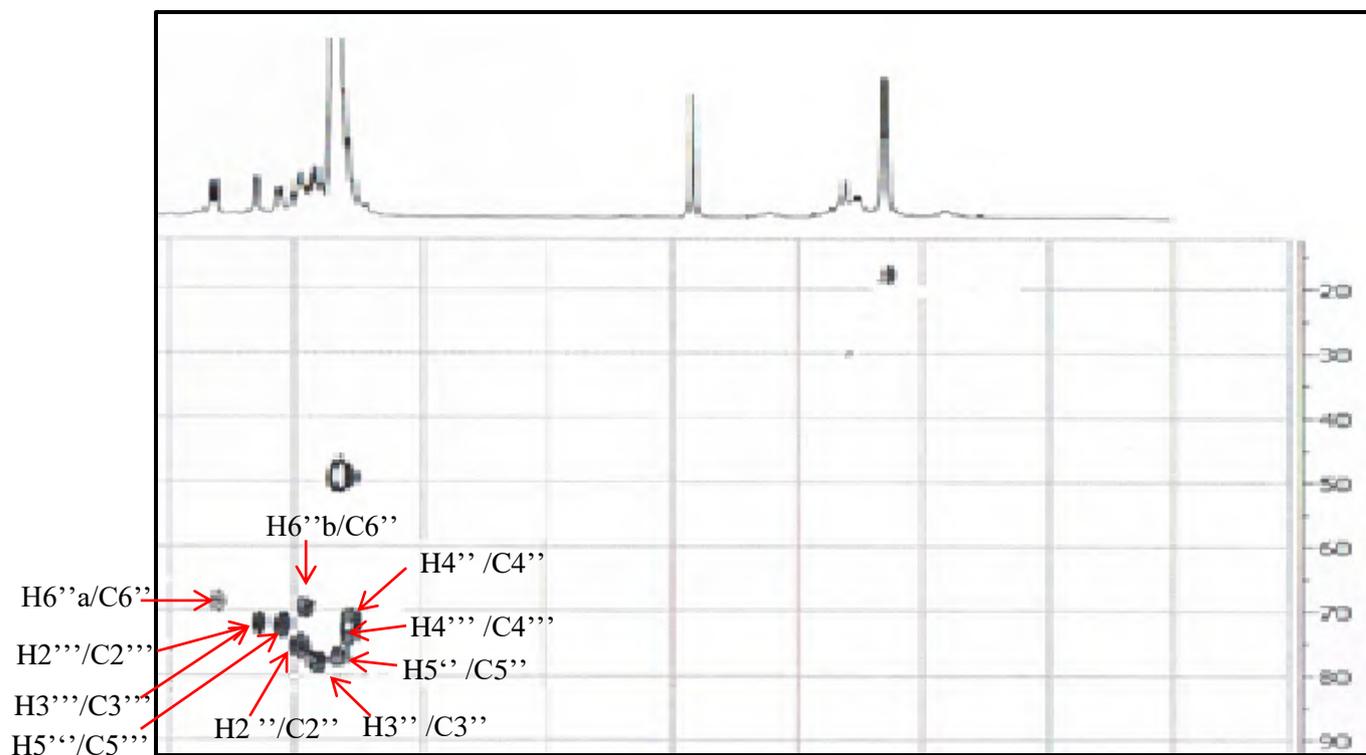
L'analyse des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.35) et HSQC (spectre III.36) permet d'identifier les deux sucres comme étant :

- un  $\beta$ -D-glucopyranose à partir de l'anomère à  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  ppm, caractérisées par les protons H-2'', H-3'', H-4'' et H-5'' trans-diaxiaux,
- un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose à partir de l'anomère à 4,60 ppm, caractérisées par son méthyle doublet à  $\delta_{\text{H}} = 1,28$  ppm ( $d$ ,  $J = 6,2$  Hz, H-6''').

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones porteurs des protons (spectre III.36). Ces derniers sont repérés à  $\delta_{\text{C}}$  100,86 (C-6), 95,97 (C-8), 116,66 (C-2'), 123,53 (C-6'), 113,49 (C-5'), 104,81 (C-1'') et 100,80 (C-1''').



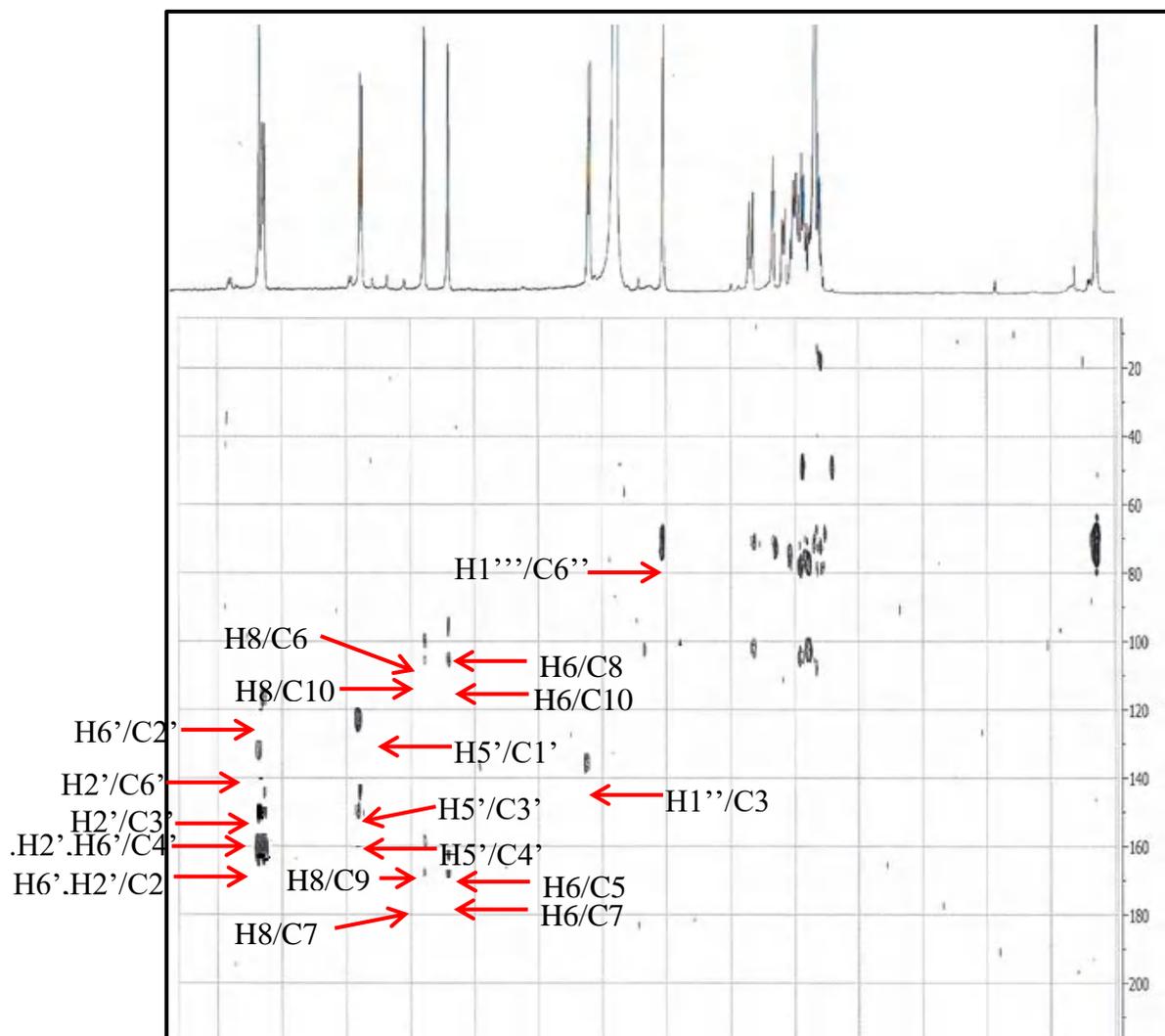
**Spectre n° III.36: Spectre HSQC du composé GE3.20**



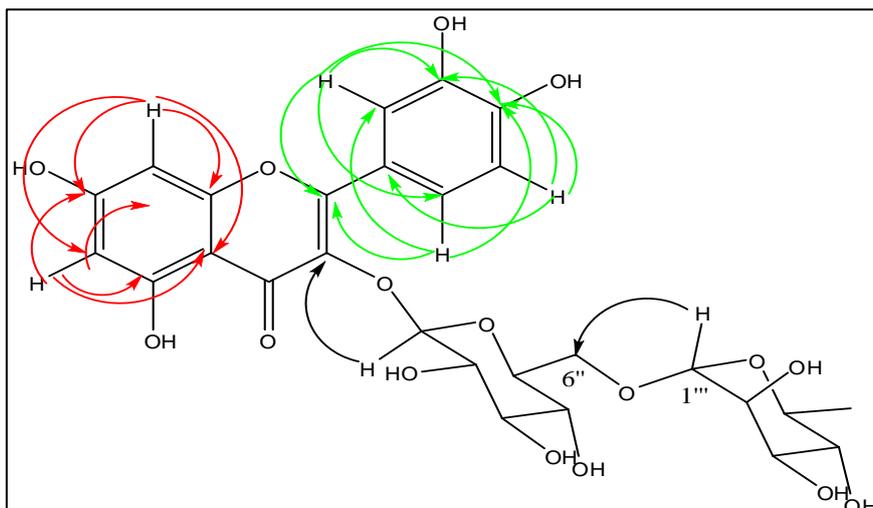
**Spectre n° III.36.1: Spectre HSQC la partie osidique du composé GE3.20**

Le spectre HMBC (spectre III.37) montre des corrélations H-C entre le proton H-6'' du glucose (Glc), et le carbone C-1''' du rhamnose (Rha) et inversement entre le carbone C-6'' du glucose (dont le déplacement chimique déblindé à  $\delta_C = 68,5$  ppm indique qu'il porte un

substituant OR) et le proton H-1'' du rhamnose (Rha) mettant en évidence la liaison :  $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ - glucopyranosyl (rutinose). Le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1'' du glucose.



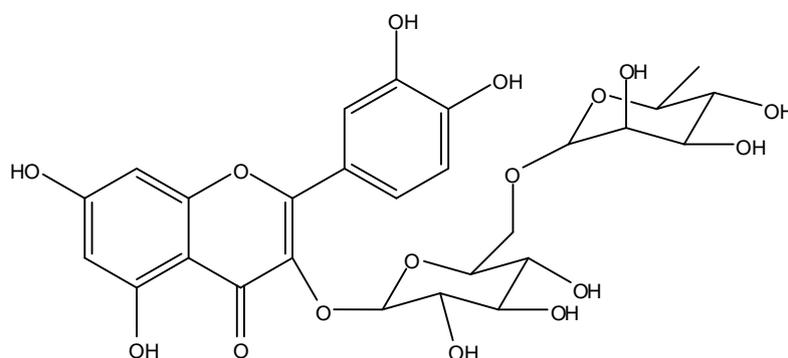
*Spectre n° III.37: Spectre HMBC du composé GE3.20*



*Figure n° III.8: montre les différentes corrélations HMBC*

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour ce flavonoïde [120], la structure suivante : quercétine 3-*O*-(6- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside.

Ce composé est connu sous le nom de **rutine** (quercétine-3-*O*-rutinoside).



*Figure n° III.9: la structure de la rutin*

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le **tableau III.8**.

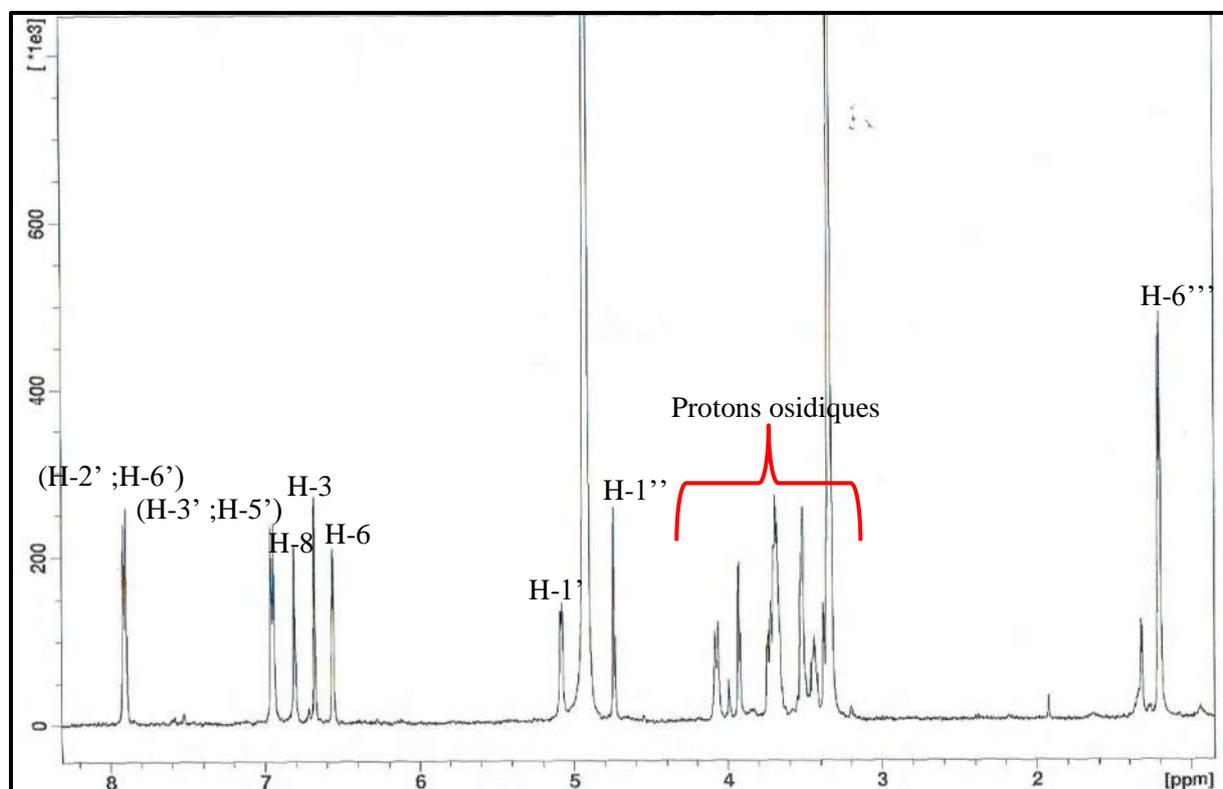
**Tableau III.8: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du composé GE3-20 dans MeOD**

Position	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm), (m, J (Hz))
2	159,7	-
3	136,8	-
4	179,6	-
5	162,3	-
6	100,8	6,25 (1H, d, J = 2,1 Hz)
7	165,3	-
8	95,9	6,40 (1H, d, J = 2,1 Hz)
9	158,7	-
10	106,8	-
1'	122,9	-
2'	116,6	7,74 (1H, d, J = 2,1 Hz)
3'	145,7	-
4'	150,0	-
5'	113,49	6,97 (1H, d, J = 8,5 Hz)
6'	123,5	7,65 (1H, dd, J = 8,5 ; 2,1 Hz)
1''	104,8	5,08 (d, J = 7,7 Hz)
2''	75,9	3,49
3''	78,0	3,4
4''	71,5	3,29
5''	77,4	3,30
6''-a	68,5	3,81-
6''-b		3,46
1'''	100,80	4,60 (d, J = 1,4 Hz)
2'''	71,0	3,70
3'''	71,0	3,70
4'''	73,6	3,28
5'''	69,9	3,60
6'''	16,3	1,28

### III-9- Identification du produit GE3-24

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre **III.38**) enregistré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 600 MHz de ce composé est totalement identique au spectre de la naringenin-7-O-neohesperidoside (GE3-13), seulement les protons du cycle C raisonnent sur ce spectre sous forme d'un singulier d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}= 6,65$  ppm attribuable à H-3, et la disparition de signales des protons H-3a et H-2.

- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}= 7,92$  ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}= 6,95$  ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz), attribués respectivement aux protons (H-2', H6') et (H-3', H5') du cycle B d'un flavonoïde substitué en C-4'
- Deux autre signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}= 6,55$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}=6,80$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7.
- Dans ce spectre on observe aussi la présence de deux protons anomériques dont le premier raisonne à  $\delta_{\text{H}}= 5,10$  ppm (1H,  $J = 7,2$  Hz) et le second à  $\delta_{\text{H}}= 4,87$  sous forme d'un singulet.



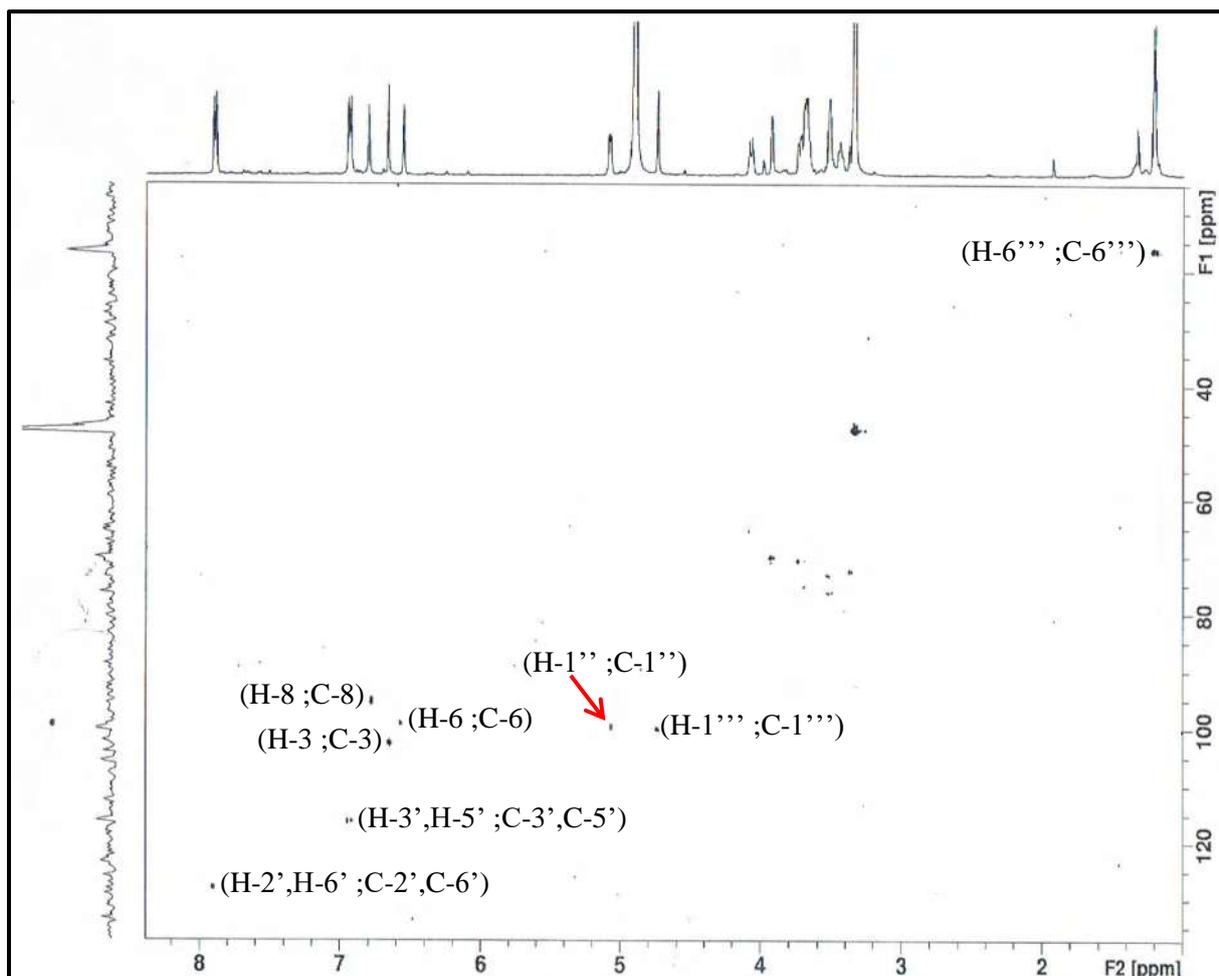
Spectre n° III.38: Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3-24**

L'examen du spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Spectre III.39) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et deux atomes de carbones à  $\delta_C = 127,0$  ppm et attribuables à C-2' et C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et deux atomes de carbones à  $\delta_C = 115,0$  ppm et attribuables à C-3' et C-5'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à  $\delta_C = 94,0$  ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_C = 98,0$  ppm qui est le C-6.
- Une taches de corrélation entre les protons H-3 à  $\delta_C = 102,0$  ppm qui est le C-3.
- Une tache de corrélation entre H-1'' et un atome de carbone à  $\delta_C = 99,0$  ppm qui est le C-1''.
- Une tache de corrélation entre H-1''' et un atome de carbone à  $\delta_C = 101,0$  ppm qui est le C-1'''.
- Une tache de corrélation entre H-6''' et un atome de carbone à  $\delta_C = 18,0$  ppm qui est le C-6'''.

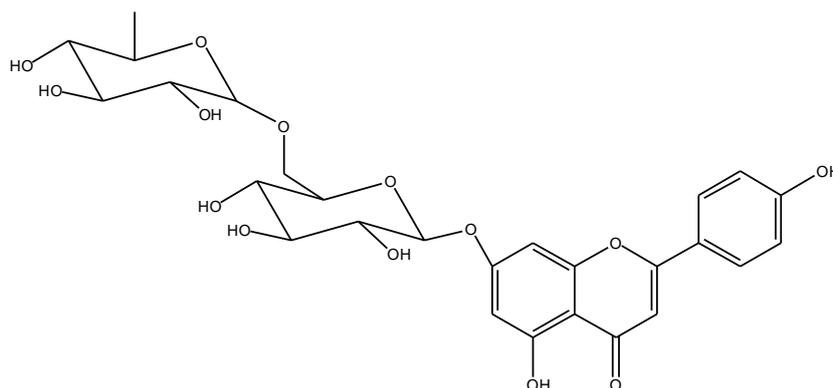
L'examen du spectre HSQC permet l'attribution des carbones porteurs des protons du groupement glycosylé  $\delta_C$  C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6''. en comparant ces données spectrales avec celles de la littérature [123]. On déduit que notre groupement glycosylé est un glucose.

L'unité osidique présente dans ce composé est clairement identifiée au  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside en raison, d'une part le déplacement des protons anomérique, et d'autre part le déplacement de méthyle du rhamnose.



**Spectre n° III.39:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz CD<sub>3</sub>OD du composé GE3-24

A partir de toutes ces données [121], la structure du composé GE3-24 a donc pu être établie comme étant : **apigenin-7-O-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside**.



**Figure n° III.10:** la structure de l'**apigenin-7-O-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside**

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-9

**Tableau n° III.9 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz**

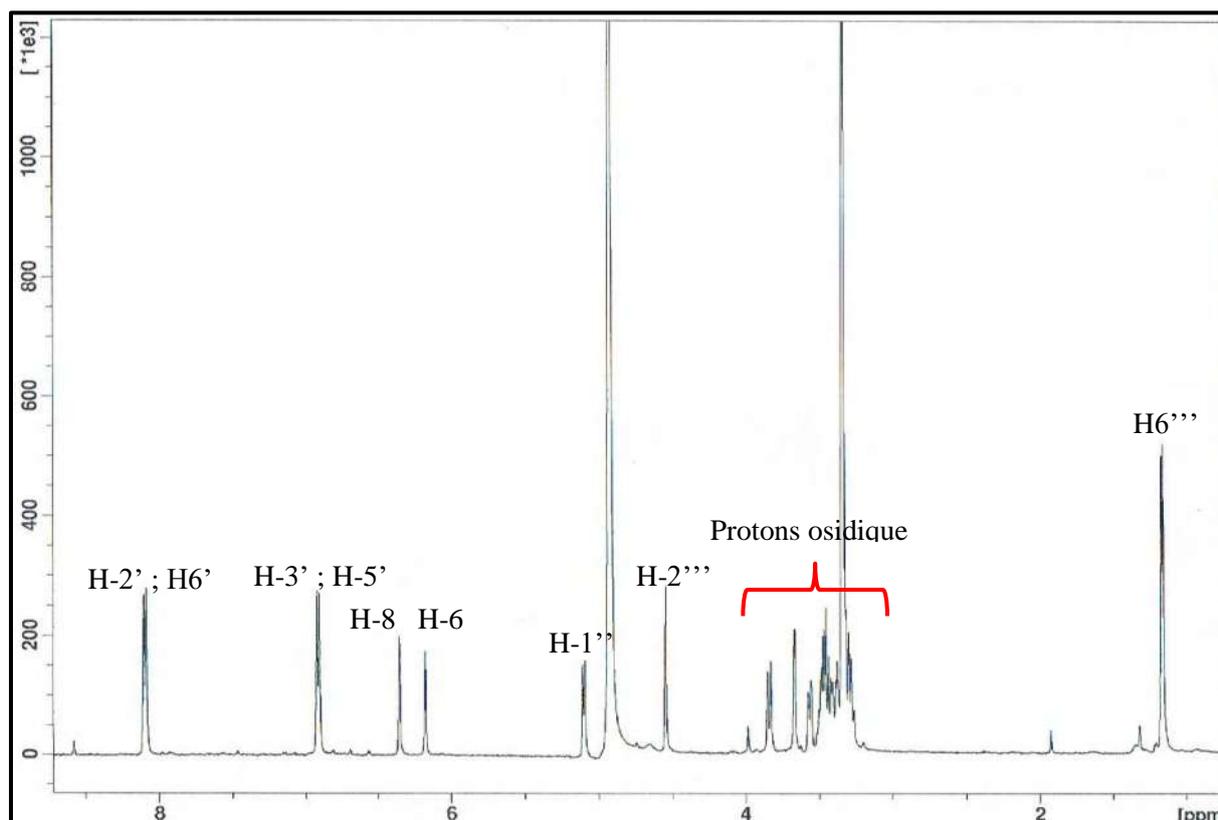
**RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE3-24**

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta$ H (ppm), (m, J (Hz))
1	-	-
2	-	-
3	102,0	6,65ppm (1H, <i>sl</i> .)
4	-	-
5	-	-
6	98,0	6,55(1H, <i>d</i> , J=2,1 Hz)
7	-	-
8	94,0	6,80(1H, <i>d</i> , J=2,1 Hz)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	128,0	7,92(1H, <i>d</i> , J=8,5 Hz)
3'	115,0	6,95(1H, <i>d</i> , J=8,5 Hz)
4'	-	-
5'	115,0	6,95(1H, <i>d</i> , J=8,5 Hz)
6'	128,0	7,92(1H, <i>d</i> , J=8,5 Hz)
1''	99,0	5,10(1H, <i>d</i> , J=7,0 Hz)
2''	76,3	3,42 (dd ; J=6,1 ; 7,2 Hz)
3''	76,5	3,47 (d, J=6,1 Hz)
4''	70,1	3,32 (m)
5''	75,8	3,37 (m)
6''	61,2	4,02 ( <i>d</i> ; 10,0) H-6"a 3,60 ( <i>dd</i> ; 10 ; 7,1) H-6"b
1'''	101,0	4,87 <i>s</i>
2'''	70,3	3,91 ( <i>d</i> ; J=4,5 Hz)
3'''	70,7	3,46 ( <i>dd</i> ; J= 8,2 ; 4,5 Hz)
4'''	72,0	3,75(m)
5'''	68,2	3,60(m)
6'''	18,0	1,23 (s)

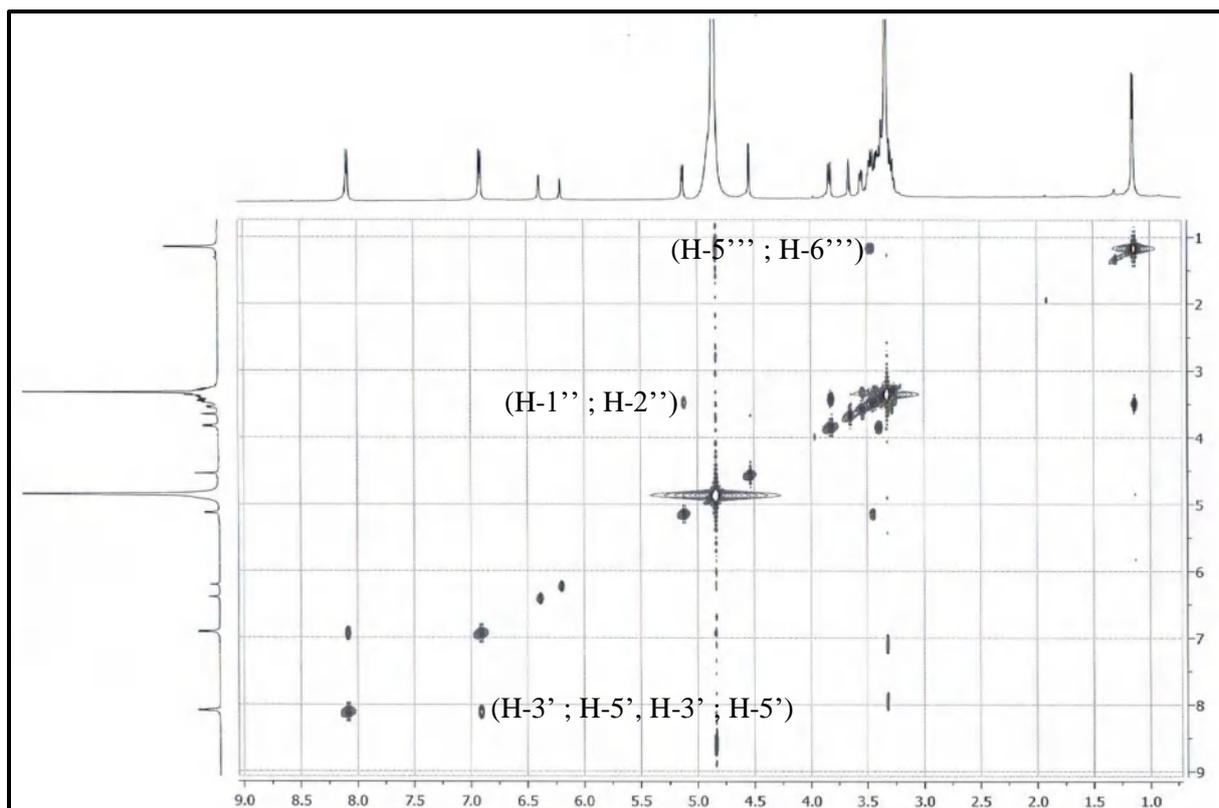
### III-10- Identification du produit GE3-27

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.30) du composé **GE 3.27** montre les six protons aromatiques caractéristiques de la kaempferol.

- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}} = 8,08$  ppm (2H, *d*,  $J = 7,9$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} = 6,98$  ppm (2H, *d*,  $J = 7,9$  Hz), attribués respectivement aux protons (H-2', H6') et (H-3', H5') du cycle B d'un flavonoïde substitué en C-4'. Ceci est confirmé par expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre III.41).
- Deux autres signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}} = 6,45$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} = 6,26$  ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), attribués respectivement aux protons H-8 et H-6 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (spectre III.41).
- Un signal à  $\delta_{\text{H}} = 5,19$  ppm (1H, *d*,  $J = 7,2$  Hz) attribuable au proton anomérique H-1'' du glucose d'une configuration  $\beta$ .
- Un signal à  $\delta_{\text{H}} = 4,53$  ppm (1H, *d*,  $J = 1,4$  Hz) attribuable au deuxième proton anomérique H-1''' du Rhamnose caractérisé par le méthyle sortant à  $\delta_{\text{H}} = 1,12$  ppm.



Spectre n° III.40: Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3-27**



**Spectre n° III.41:** Spectre COSY  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE3-27**)

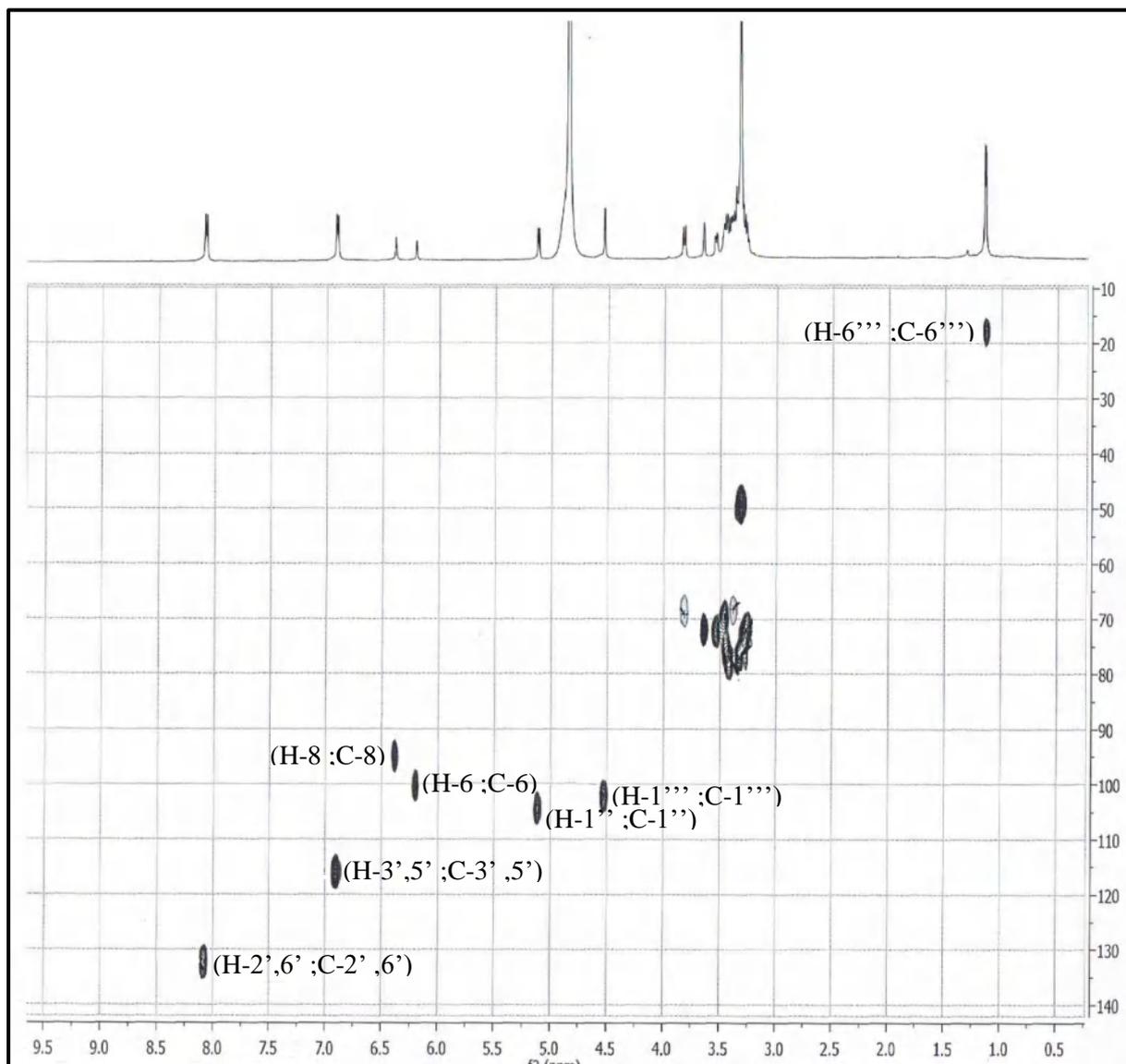
L'examen des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.41) permet l'attribution des protons voisins :

- Une tache de corrélation entre les protons (H-2' ; H-6')  $\delta_{\text{H}}$  8,08 ppm et autre protons à  $\delta_{\text{H}}$  6,98 qui ne peut être que les protons (H-3' ; H-5').
- Le proton anomérique H-1''  $\delta_{\text{H}}$  5,19 (d,  $J = 7,2$  Hz) corréle avec le proton H-2''  $\delta_{\text{H}}=3,39$  ppm.

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Spectre III.42) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et deux atomes de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 133,76$  ppm et attribuables à C-2' et C- 6'.
- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et deux atomes de carbones à  $\delta_{\text{C}}= 116,48$  ppm et attribuables à C-3' et C- 5'.
- Une tache de corrélation entre H-6et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}}= 98,21$  ppm qui est le C-6
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}}= 94,26$  ppm qui est le C-8.

- Une tache de corrélation entre H-1'' et un atome de carbone à  $\delta_C = 104,16$  ppm qui est le C-1''.
- Une tache de corrélation entre H-1''' et un atome de carbone à  $\delta_C = 102,23$  ppm qui est le C-1'''.
- Une tache de corrélation entre H-6''' et un atome de carbone à  $\delta_C = 20,30$  ppm qui est le C-6'''.



**Spectre n° III.42:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **GE3-27**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III.43) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :  
Le proton H-6 montre deux taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 96,40$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-8.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 106,84$  ppm.

Le proton H-8 montre quatre taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 98,21$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 104,84$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 159,83$  ppm attribuable à C-9.
- La quatrième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 166,0$  ppm attribuable à C-7.

Les protons H-3' et H-5' montre trois taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 116,23$  ppm confirme le C-3' et C-5'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 122,19$  ppm attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 161,31$  qui ne peut être que C-4'.

Les protons H-2' et H-6' montrent:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 133,76$  ppm attribuable à C-2' et C-6'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 161,31$  qui ne peut être que C-4'.

Le proton H-1'' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 135,61$  ppm qui ne peut être que le C-3.

Le proton H-1''' montre deux taches de corrélation:

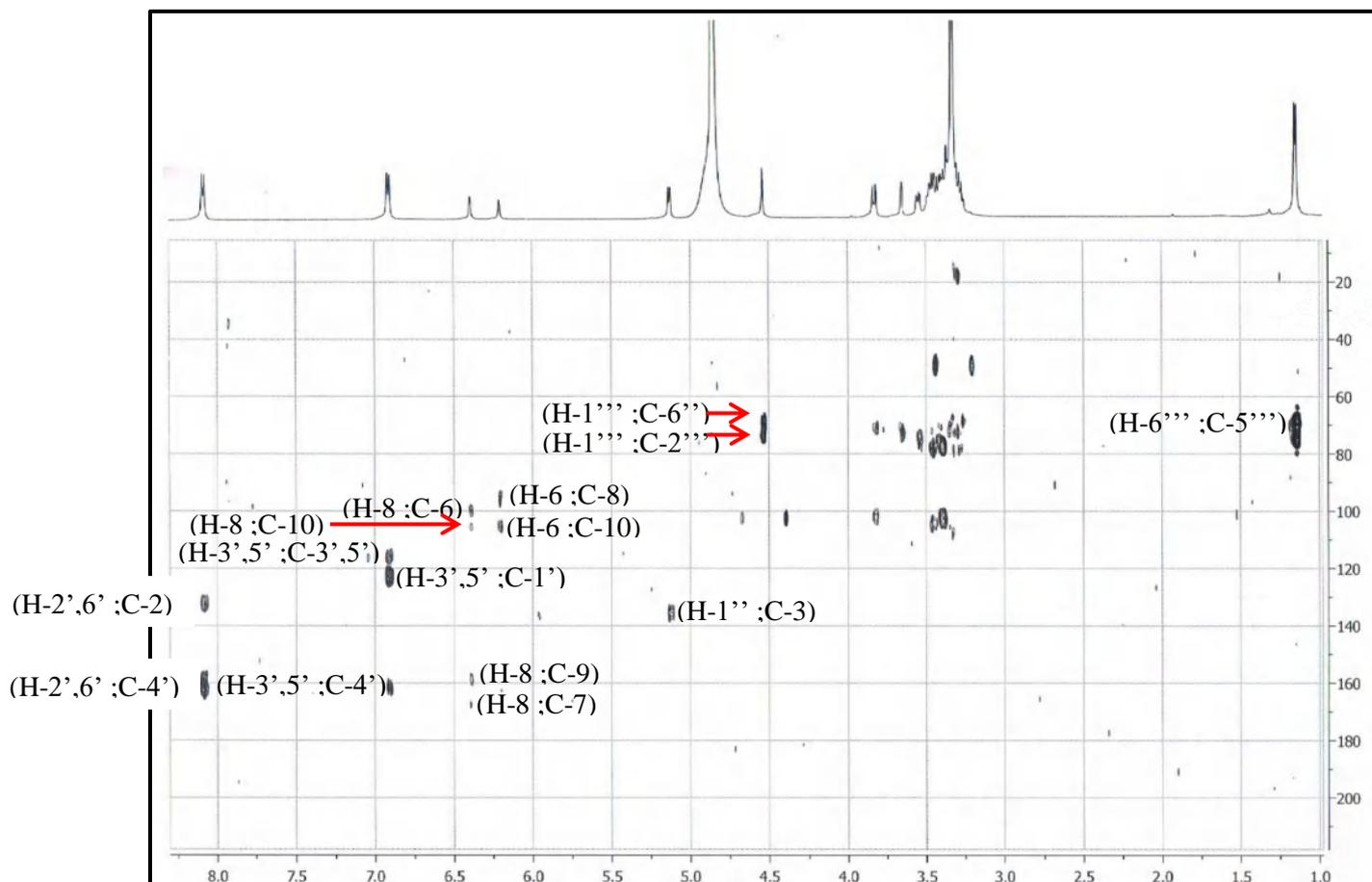
- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 69,15$  ppm confirme le C-6''.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 72,74$  ppm attribuable à C-2'''.

L'identification de la partie osidique est évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ . Partant du premier proton anomère nommé H-1'' [ $\delta_{\text{H}} = 5,19$  (*d*,  $J = 7,2$  Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les corrélations (Spectre n° III.41) : H-1''/H-2'' [ $\delta_{\text{H}} = 3,43$  (*m*)], H-2''/H-3'' [ $\delta_{\text{H}} = 3,42$  (*m*)], H-3''/H-4'' [ $\delta_{\text{H}} = 3,25$  (*m*)], H-4''/H-5'' [ $\delta_{\text{H}} = 3,34$  (*m*)] et H-5''/H-6'' [ $\delta_{\text{H}} = 3,38$  (*m*, H-6''a) /  $\delta_{\text{H}} = 3,80$  (*dd*,  $J = 11,6$  ;  $1,8$  Hz, H-6''b)].

Ces données sont typiques d'un glucopyranose de configuration  $\beta$  ( $J_{1''-2''} = 7,6$  Hz).

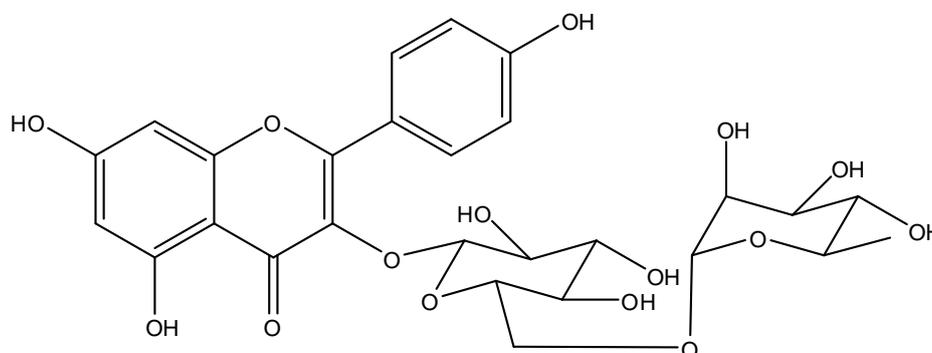
Partant du second proton anomère H-1''' [ $\delta_{\text{H}} = 4,51$  (*d*,  $J = 1,4$  Hz)], on identifie sur le spectre COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (spectre III.41) un autre système de spins à huit protons d'un déoxyhexose, et cela à travers les couplages H-1'''/H-2''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,63$ , *dd*,  $J = 3,2$ ;  $1,5$  Hz), H-2'''/H-3''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,53$ , *dd*,  $J = 9,5$ ;  $3,2$  Hz), H-3'''/H-4''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,29$ , *t*,  $J = 9,5$  Hz), H-4'''/H-5''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,46$ , *dq*,  $J = 9,5$ ;  $6,4$

Hz) et enfin H-5'''/ CH3-6''' ( $\delta_H = 1,12$ ,  $d$ ,  $J = 6,4$  Hz). Cette dernière corrélation en plus de la valeur de la constante de couplage  $J_{1'''-2'''} = 1,4$  Hz permettent d'identifier un  $\alpha$ -L-rhamnose. Selon les corrélations du HMBC le H-1''' (rhamnose)/C-6'' (glucose) et H-1'' (glucose)/C-3 (génine) montrent que ces deux unités osidiques forment en C-3 l'enchaînement [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranoside].



**Spectre n° III.43:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **GE3-27**

A partir de toutes ces données [120], la structure du composé GE3-27 a donc pu être établie comme étant :



**Figure n° III.11:** la structure du **kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside**

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-10

**Tableau n° III.10 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz**  
**RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE3-27**

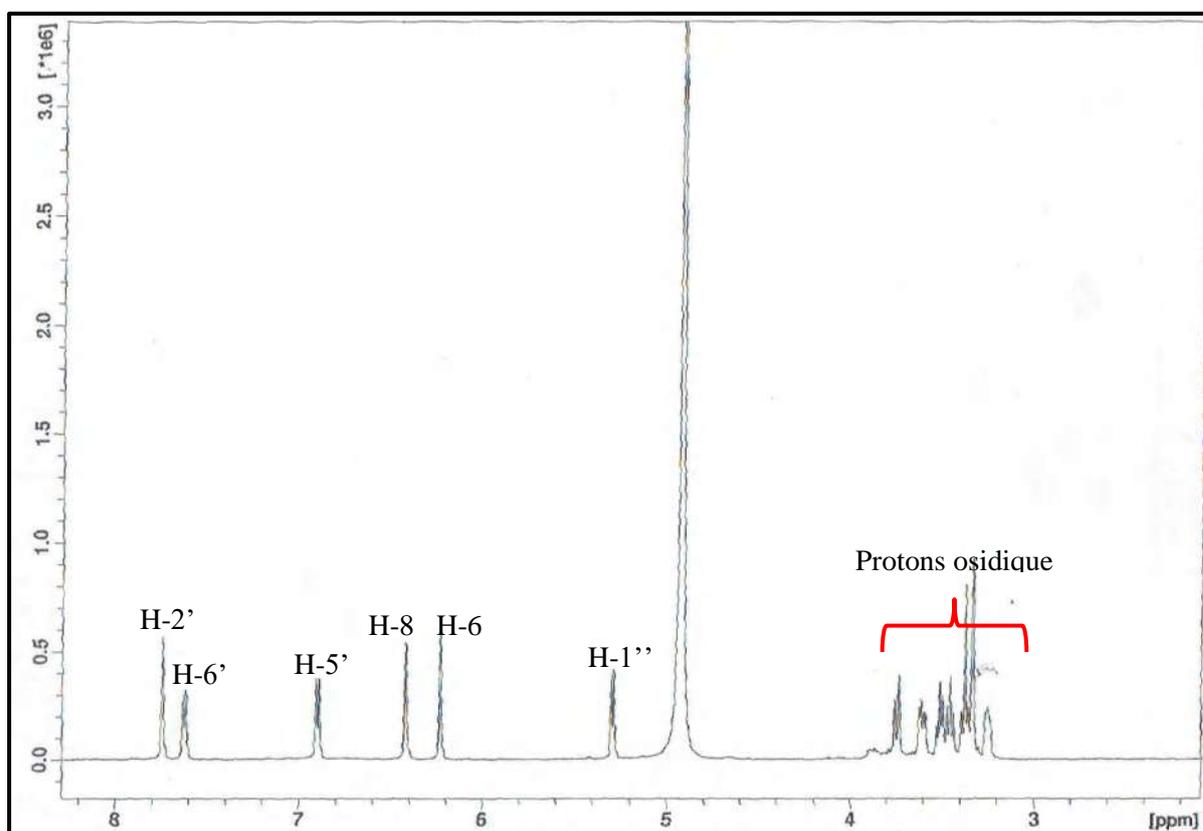
position	C δ (ppm)	δH (ppm), (m, J (Hz))
1	-	-
2	159,70	-
3	135,61	-
4	179,60	-
5	163,00	-
6	98,21	6,26(1H, d, J=2,1 Hz)
7	166,00	-
8	94,26	6,45(1H, d, J=2,1 Hz)
9	159,83	-
10	106,84	-
1'	122,19	-
2'	133,76	8,08(1H, d, J=7,9 Hz)
3'	116,48	6,98(1H, d, J=7,9 Hz)
4'	161,31	-
5'	116,48	6,98(1H, d, J=7,9 Hz)
6'	133,76	8,08(1H, d, J=7,9 Hz)
1''	104,16	5,19(1H, d, J=7,2 Hz)
2''	75,80	3,42 (m)
3''	76,50	3,47 (m)
4''	71,10	3,40 (m)
5''	75,80	3,37 (m)
6''	69,15	4,02 (d ; 10,0) H-6"a 3,60 (dd ; 10 ; 7,1) H-6"b
1'''	102,23	4,53(1H, d, J=1,4 Hz)
2'''	72,74	3,91 (d ; J=4,5 Hz)
3'''	72,70	3,46 (dd ; J= 8,2 ; 4,5 Hz)

<b>position</b>	<b>C <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta H</math> (ppm), (m, J (Hz))</b>
4'''	73,00	3,75(m)
5'''	69,48	3,60(m)
6'''	20,30	1,12 (d; J=6 Hz)

### III-11- Identification du produit GE4-9

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (spectre III.44) du composé **GE 4.9** montre les cinq protons aromatiques:

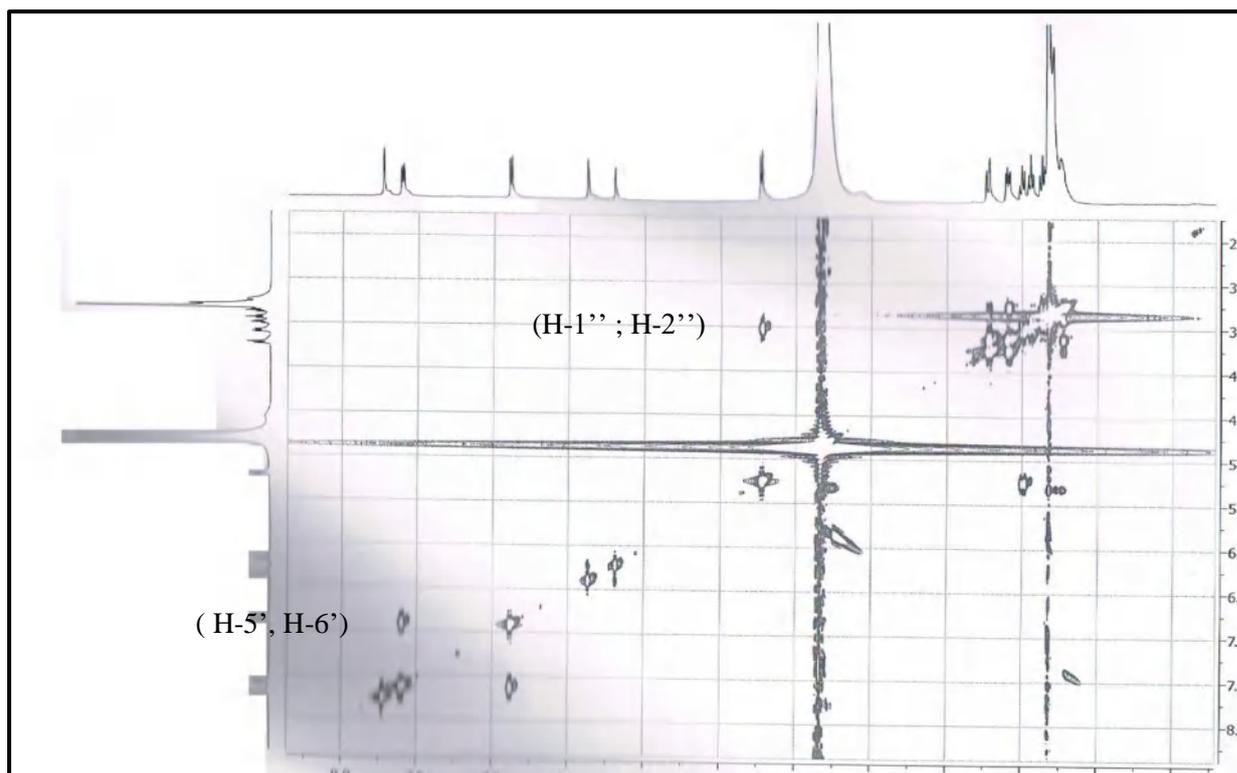
- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}=7,75$  ppm (1H, *d*,  $J=1,8$  Hz) et 6,90 ppm (1H, *d*,  $J=8,0$  Hz), attribués respectivement aux protons H-2' et H6'
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}=7,60$ ppm (1H, *dd*,  $J=8.0 ; 1.8$  Hz) attribuable au H-5'.
- Deux autre signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}=6,40$  ppm (1H, *d*,  $J=2,1$  Hz) et 6,22 ppm (1H, *d*,  $J=2,1$  Hz), attribués respectivement aux protons H-8 et H-6 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}=5,22$ ppm (1H, *d*,  $J=7,5$  Hz) attribuable au proton anomérique H-1'' du glucose d'une configuration  $\beta$ .



**Spectre n° III.44:** Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE4-9**

L'examen des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.45) montre:

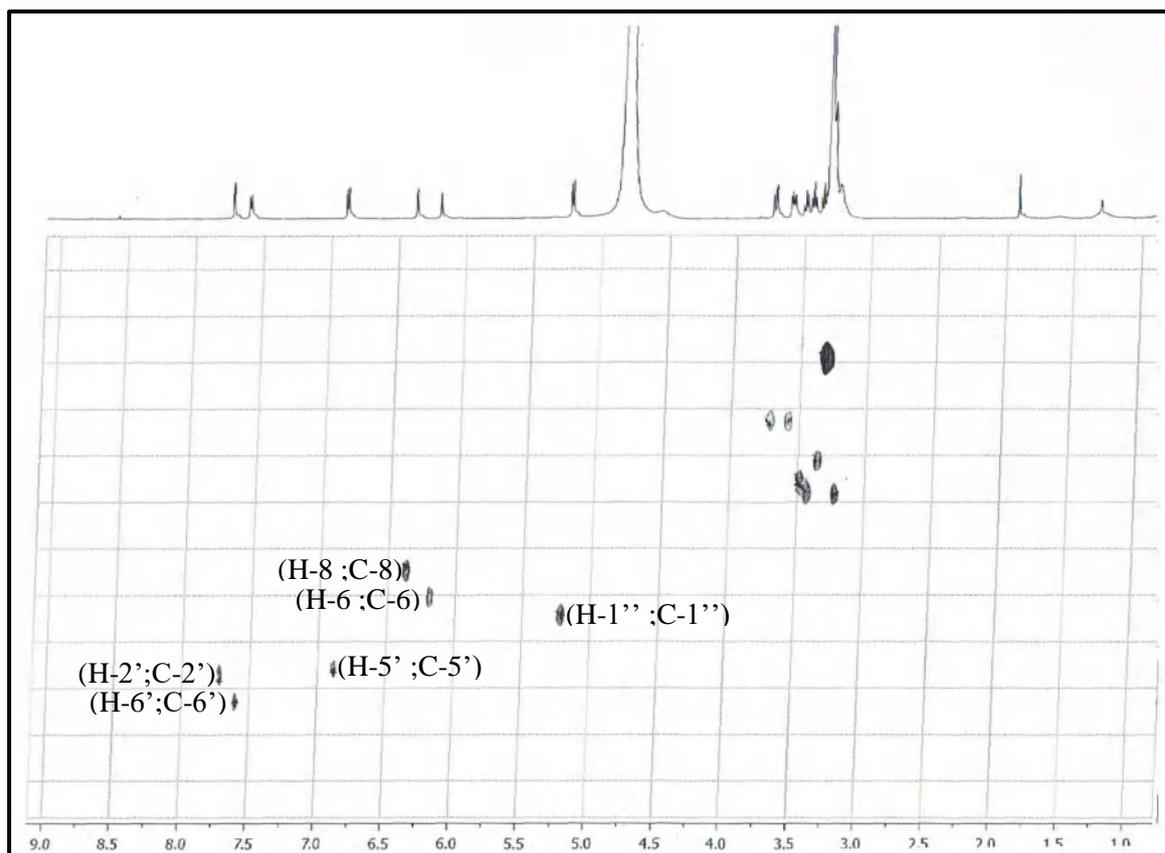
- Une tache de corrélation entre les protons H-2'  $\delta_{\text{H}}=7,60$  ppm et autre protons à  $\delta_{\text{H}}=6,90$  qui ne peut être que les protons H-6'.
- Le proton anomérique H-1''  $\delta_{\text{H}}=5,22$  corrèle avec le proton H-2'' à  $\delta_{\text{H}}=3,42$  ppm.



**Spectre n° III.45:** Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, MeOD du composé **GE4-9**)

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Spectre III.46) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-2'et un atome de carbone à  $\delta_c = 118,23$  ppm et attribuables à C-2'.
- Une tache de corrélation entre H-6'et un atome de carbone à  $\delta_c = 123,07$  ppm et attribuables à C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à  $\delta_c = 116,62$  ppm et attribuables à C- 5'.
- Une tache de corrélation entre H-6et un atome de carbone à  $\delta_c = 100,00$  ppm qui est le C-6
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_c = 93,96$  ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre H-1''et un atome de carbone à  $\delta_c = 104,20$  ppm qui est le C-1''.



**Spectre n° III.46:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz  $CD_3OD$  du composé **GE4-9**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III.47) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-6 montre trois taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 93,96$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-8.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 105,54$  ppm.
- La troisième confirme le carbone à  $\delta_C = 163,20$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-5

Le proton H-8 montre quatre taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 100,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 105,54$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 157,55$  ppm attribuable à C-9.
- La quatrième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 168,54$  ppm attribuable à C-7.

Le proton H-5' montre trois taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 123,18$  ppm confirme le C-6'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 143,57$  ppm attribuable à C-3'.

- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 150,21$  qui ne peut être que C-4'.

Le proton H-6' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 118,05$  ppm attribuable à C-2'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 150,21$  qui ne peut être que C-4'.

Le proton H-2' montre:

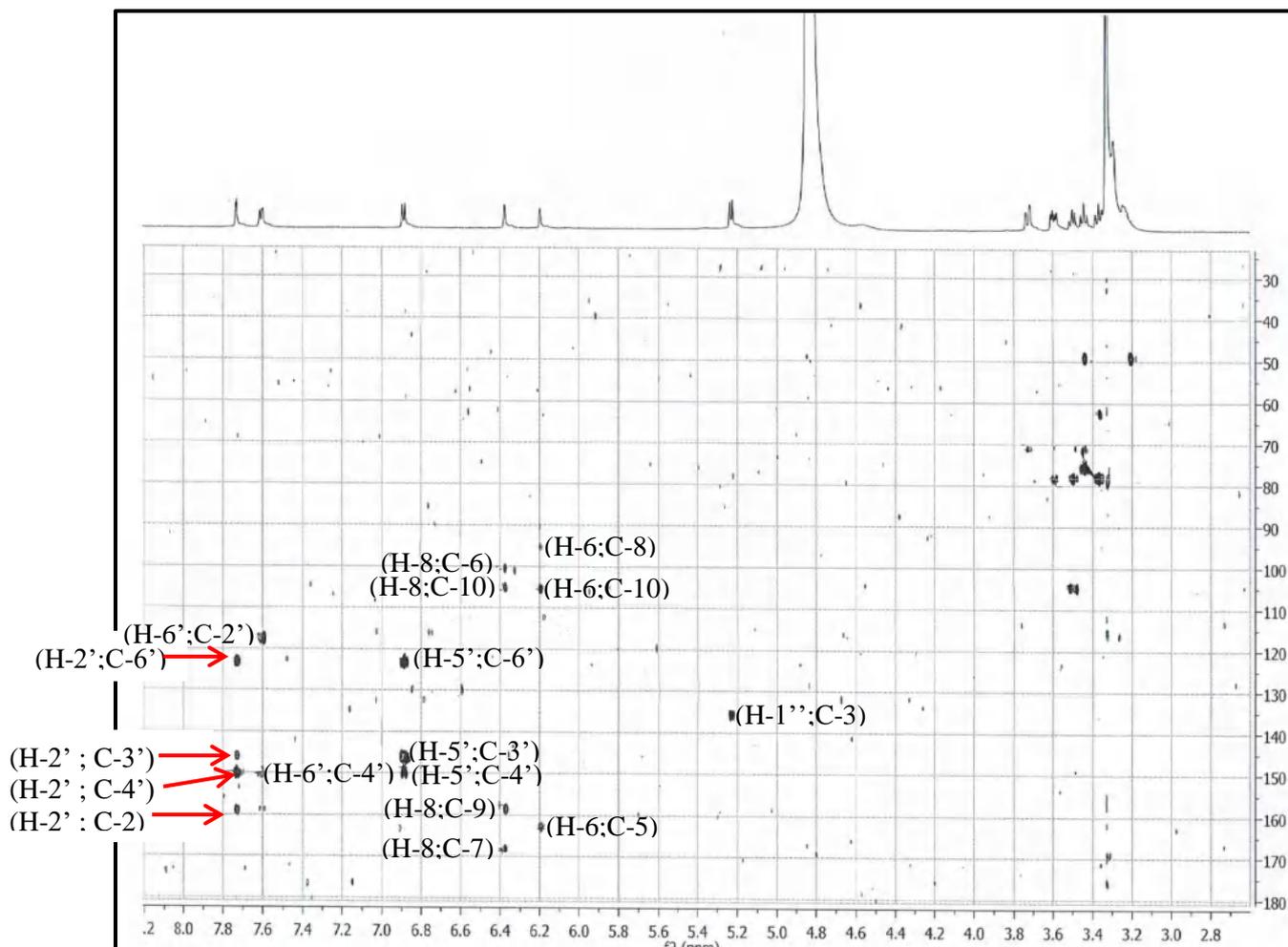
- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 123,21$  ppm attribuable à C-6'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 143,57$  qui ne peut être que C-3'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 150,21$  qui ne peut être que C-4'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 157,41$  qui ne peut être que C-2'.

Le proton H-1'' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 134,60$  ppm qui ne peut être que le C-3.

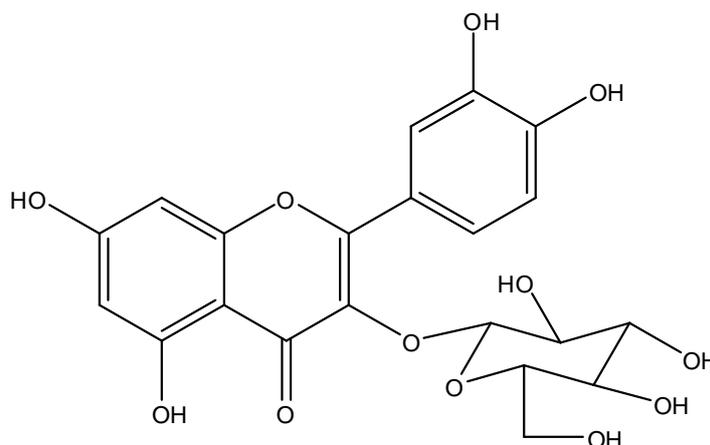
L'unité osidique présente dans ce composé est clairement identifiée au  $\beta$ -D-glucose en raison, d'une part, de la constante de couplage du proton anomérique qui est localisé à  $\delta_H = 5,22$  (*d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'') et d'autre part, des grandes valeurs des constantes de couplage ( $J > 7$  Hz) des protons constituant ce sucre. Ces valeurs indiquent des orientations axiales pour tous les protons. Ces derniers sont identifiés suite aux couplages qu'ils présentent sur le spectre cosy  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (spectre n° III.45) entre H-1'' ( $\delta_H = 5,22$ , *d*,  $J = 7,5$  Hz)/H-2'' ( $\delta_H = 3,43$ , *t*,  $J = 7,4$  Hz)/H-3'' ( $\delta_H = 3,49$ , *dd*,  $J = 9-7,6$  Hz)/H-4'' ( $\delta_H = 3,22$ , *t*,  $J = 9$  Hz)/H-5'' ( $\delta_H = 3,36$ , *ddd*,  $J = 9-5, 2-2,3$  Hz)/H-6''a ( $\delta_H = 3,72$ , *d*,  $J = 11,0$  Hz) et H-6''b ( $\delta_H = 3,58$ , *dd*,  $J = 11,0-5,2$  Hz).

Les carbones du  $\beta$ -D-glucose sont établis par l'analyse du spectre HSQC à C-1'' ( $\delta_C = 104,20$ ), C-2'' ( $\delta_C = 77,85$ ), C-3'' ( $\delta_C = 75,71$ ), C-4'' ( $\delta_C = 78,77$ ), C-5'' ( $\delta_C = 71,19$ ) et C-6'' ( $\delta_C = 63,41$ ).



**Spectre n° III.46:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé **GE3-27**

A partir de toutes ces données [122], la structure du composé **GE4-9** a donc pu être établie comme étant :



**Figure n° III.12:** la structure d'isoquercitrine

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-11

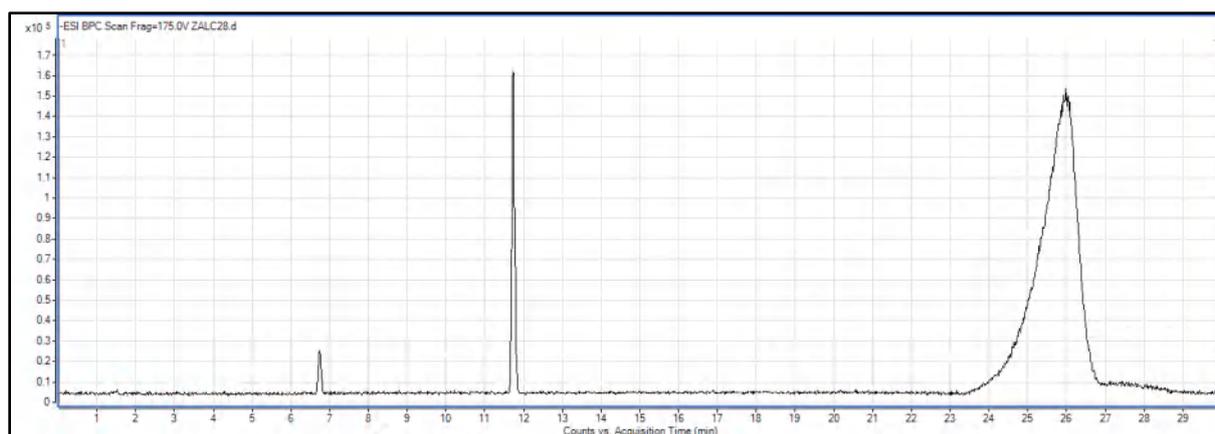
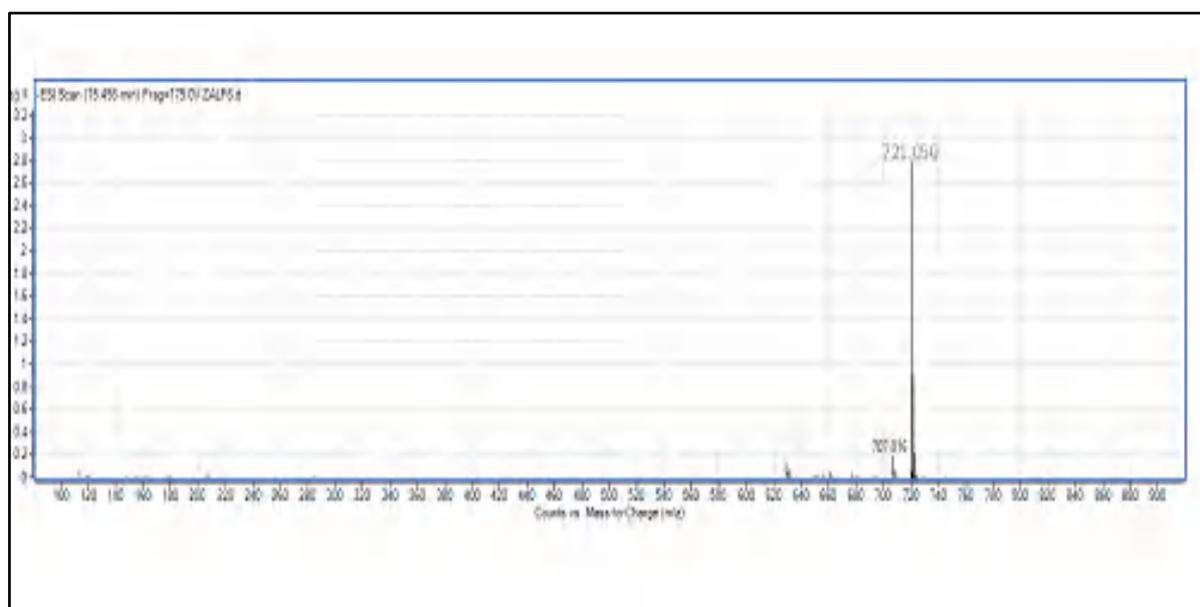
**Tableau n° III.11 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE4-9**

position	C δ (ppm)	δH (ppm), (m, J (Hz))
1	-	-
2	157,41	-
3	134,60	-
4	161,60	-
5	163,20	-
6	100,00	6,22(1H, d, J=2,1 Hz)
7	168,54	-
8	157,55	6,40(1H, d, J=2,1 Hz)
9	159,83	-
10	105,54	-
1'	121,30	-
2'	118,23	7,75(1H, d, J=1,8 Hz)
3'	143,57	-
4'	150,21	-
5'	116,62	6,90(1H, d, J=8,0 Hz)
6'	133,07	7,60(1H, d, J=8,0 Hz)
1''	104,20	5,22(1H, d, J=7,5 Hz)
2''	77,85	3,43 (1H, t, J = 7,4)
3''	75,71	3,49 (1H, dd, J = 9,0-7,4)
4''	78,77	3,22 (1H, t, J = 9,0)
5''	71,19	3,36 (1H, ddd, J = 9,0-5,2-2,3)
6''a	63,41	3,72 (1H, d ; 11,0)
6''b		3,58 (1H, dd ; 11,0 ; 5,1)

### III-12- Identification du produit GE5-8

Le produit **GE5-8** a été séparé sous forme d'une poudre amorphe blanche.

Le spectre de masse en mode ESI positif à haute résolution de ce composé (Spectre III-47), donne un pic quasi moléculaire de masse exacte  $m/z = 721$  Da correspondant à la formule brute  $[M+Na]^+ C_{32}H_{42}O_{17}Na^+$  (calculée 721,0). Ce résultat mène à une molécule de formule brute  $C_{32}H_{42}O_{17}$ , de masse 698 Da.



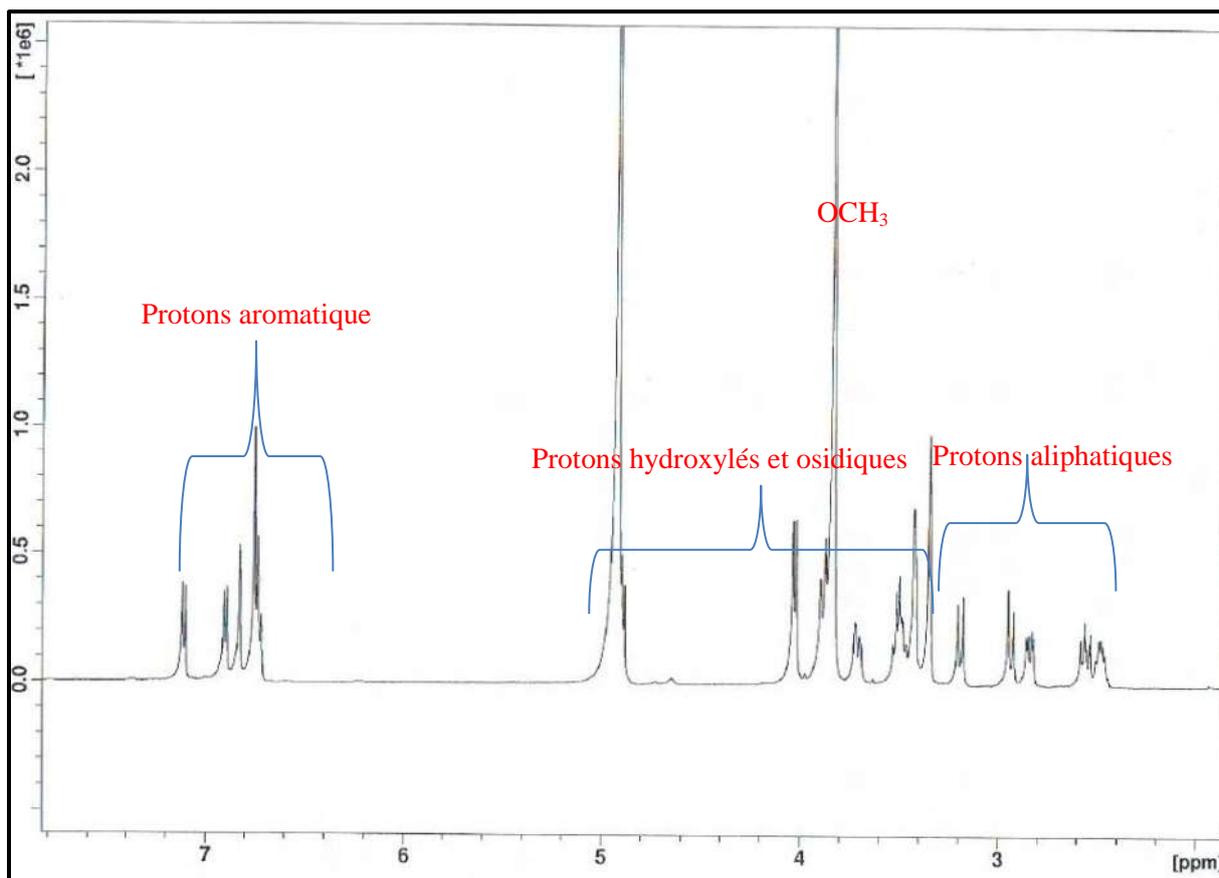
**Spectre n° III-47: Spectre SMHR (ESI)<sup>+</sup> du composé GE5-8.**

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (spectre III-48), enregistré dans MeOH-*d*<sub>4</sub>, montre les signaux suivants :

- Un massif de signaux de protons entre  $\delta_H = 2,48$  et  $\delta_H = 4,88$  ppm, est caractéristique des protons aliphatiques et osidiques.

- Un massif de signaux de protons entre  $\delta H=3,30$  et  $\delta H=4,88$ ppm, est caractéristique des protons hydroxylés et osidiques (présence au moins une unité osidique)
- Des signaux résonants dans le champ faible entre à  $\delta H= 6,71$  et à  $\delta H= 7,10$ ppm et s'intégrant pour six protons, caractéristiques des protons aromatiques.
- un singlet d'intensité six protons à  $\delta H= 3,82$  caractéristique de deux groupements méthoxyles.

Tous ces signaux orientent vers un squelette d'un composé phénolique.

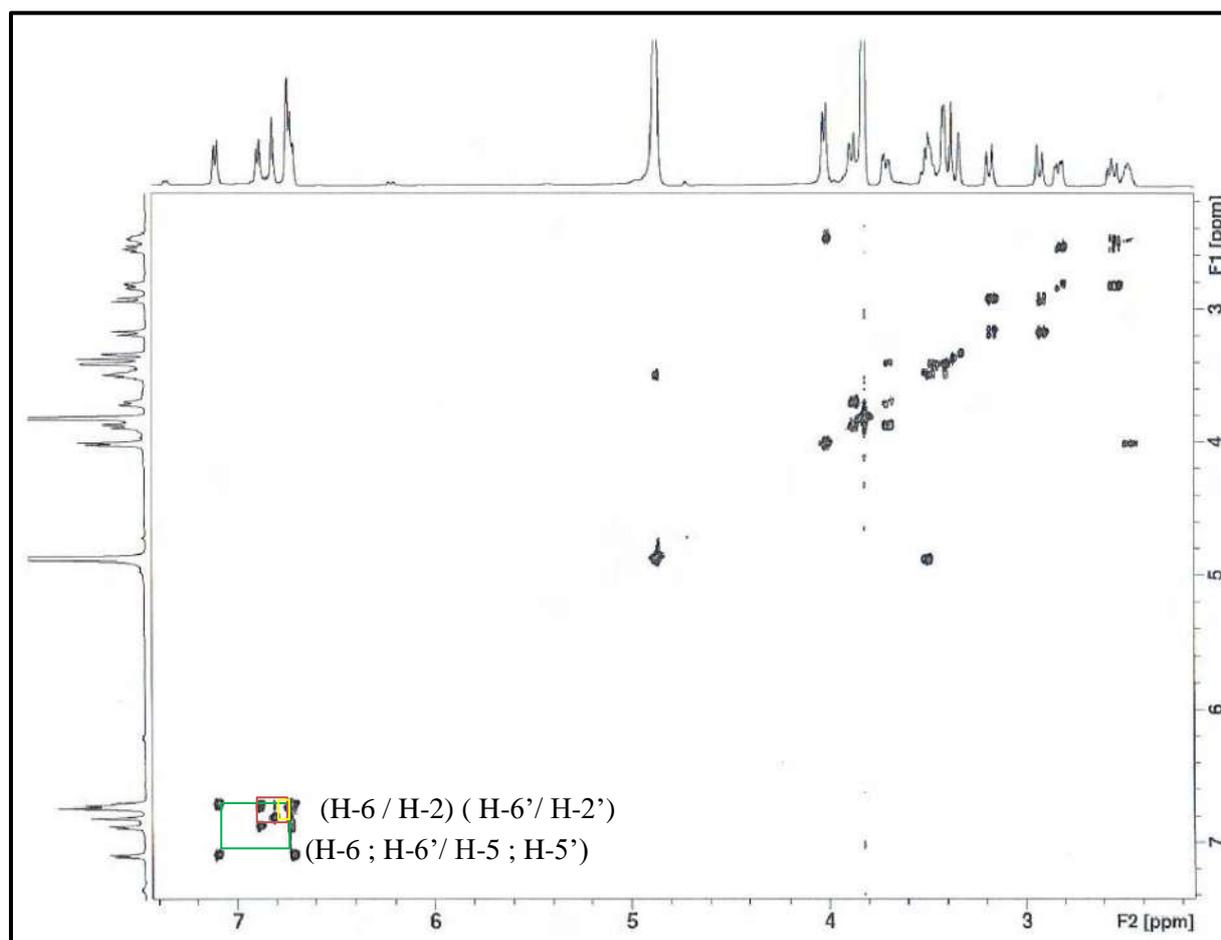
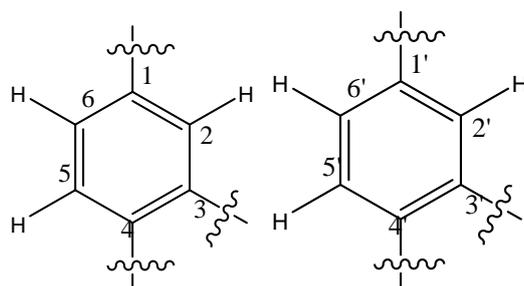


**Spectre n° III.48:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, MeOD) du composé **GE5-8**

L'analyse combinée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre III-48) et COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (spectre III-49) dans la région aromatique indique la présence de deux systèmes ABX. En effet, on observe:

- Trois signaux constituant le premier système à  $\delta H 6,71$ ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$ Hz), à  $\delta H 6,88$  ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz) et à  $\delta H 6,74$ ppm (1H, *s*), attribuables aux trois protons du premier noyau aromatiques H-6, H-5 et H-2 respectivement.
- Trois autre signaux constituant le deuxième système à  $\delta H 6,82$  ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$ Hz), à  $\delta H 7,10$ ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz) et à  $\delta H 6,73$ ppm (1H, *s*), attribuables aux trois protons du deuxième noyau aromatiques H-6', H-5' et H-2' respectivement.

Cette analyse permet d'identifier sans ambiguïté la présence de deux noyaux aromatiques 1, 3,4-trisubstitués.



**Spectre n° III.49:** Spectre COSY<sup>1</sup>H- <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOD du composé **GE5-8**)

Les valeurs des carbones porteur de ces six protons sont détectées par l'analyse de spectre HSQC (Figure III-51), comme suit : H-2/C-2 à  $\delta_H$  6,74/  $\delta_C$  112,2 ; H-5/C-5 à  $\delta_H$  6,88  $\delta_C$  111,9 ; H-6/C-6 à  $\delta_H$  6,71  $\delta_C$  121,4 ; H-2'/C-2' à  $\delta_H$  6,82/  $\delta_C$  114,0 ; H-5'/ C-5' à  $\delta_H$  7,10/  $\delta_C$  116,0 et H-6'/C-6' à  $\delta_H$  6,73/  $\delta_C$  120,0.

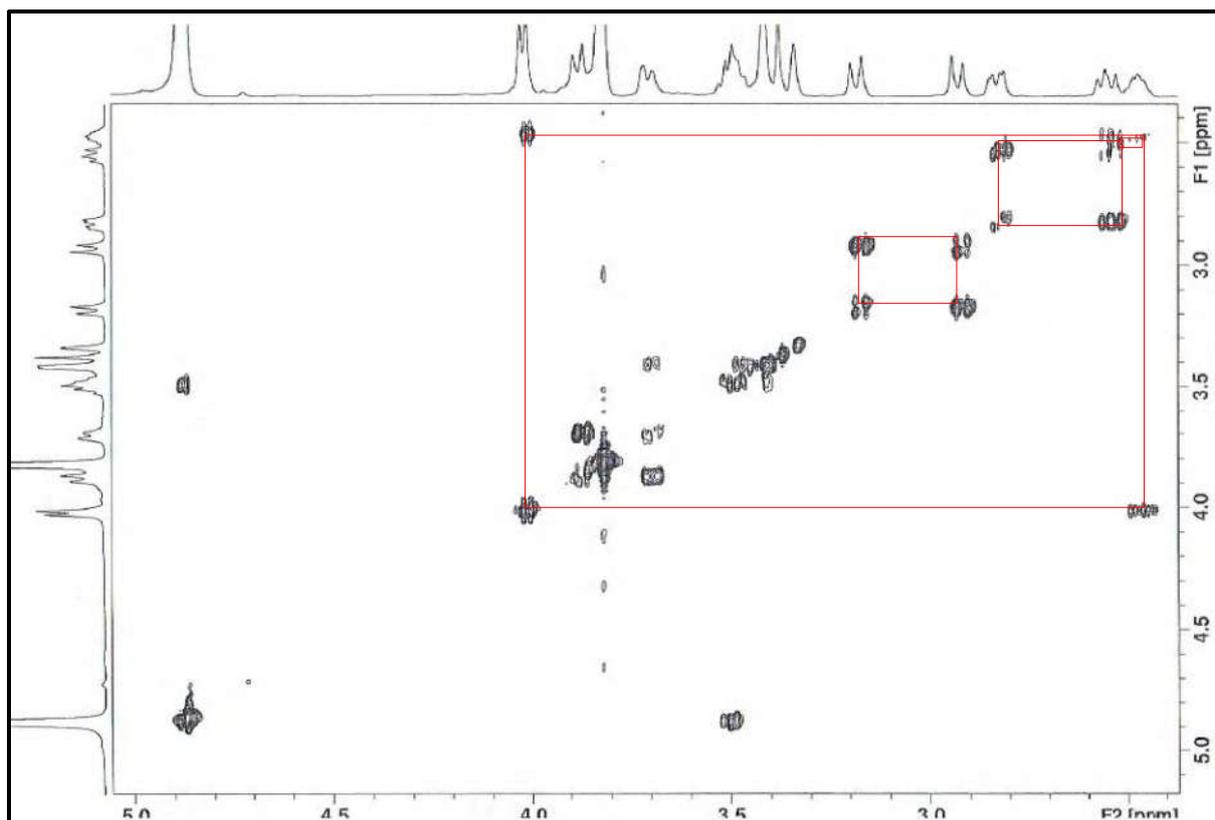
Dans la zone des protons aliphatiques, nous observons :

- Un signal s'intégrant pour un proton sous forme d'un multiplet à  $\delta_H$  2,47 (1H, *m*) correspondant à un proton H-8.

- Un signal sous forme de multiplet d'intégration 1H à  $\delta$ H 2,55ppm correspondant à H-7a.
- Un signal sous forme de doublet large d'intégration 1H à  $\delta$ H 2,82ppm correspondant au 2<sup>ème</sup> proton H-7b.
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 2H à  $\delta$ H 4,10ppm correspondant aux protons H-9 d'un CH<sub>2</sub> oxygéné (OCH<sub>2</sub>).
- . Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta$ H 2,92ppm correspondant à H-7'a.
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta$ H 3,18ppm correspondant au 2<sup>ème</sup> proton H-7'b.
- Un signal sous forme de singulier d'intégration 6H à  $\delta$ H 3,82ppm correspondant à deux méthoxyles (OCH<sub>3</sub>).

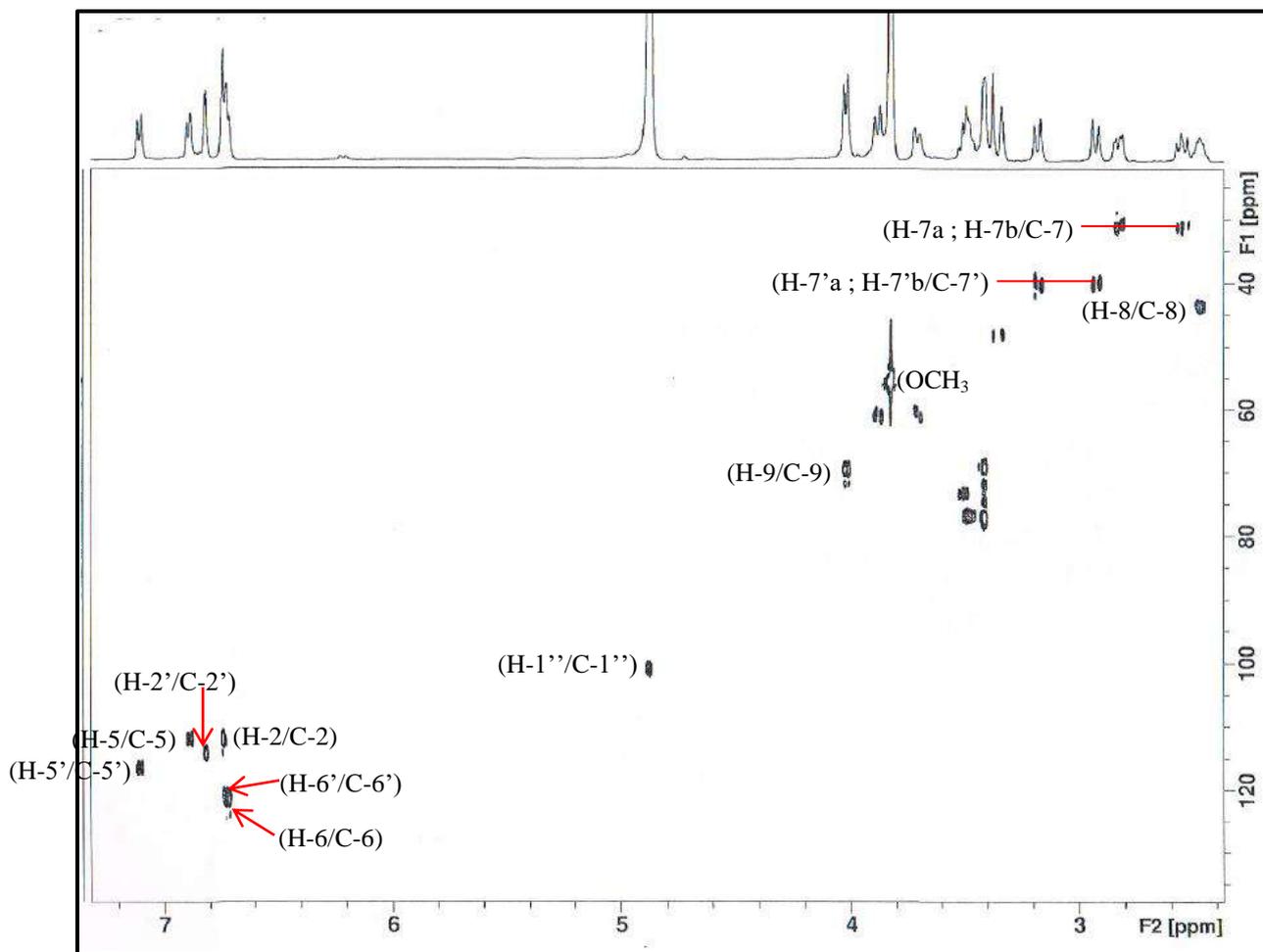
L'examen d'étalements du spectre cosy <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (spectre n° III.50) permet l'attribution des protons:

- Des taches de corrélation entre le proton H-8  $\delta$ H 2,47 ppm et trois autres protons à  $\delta$ H 2,55 ; 2,82 et 4,10ppm qui ne peut être que les protons H-7a, H-7b et H-9 respectivement.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7'a à  $\delta$ H 2,92 ppm et un autre proton à  $\delta$ H 3,18 ppm qu'il est le proton H-7'b.

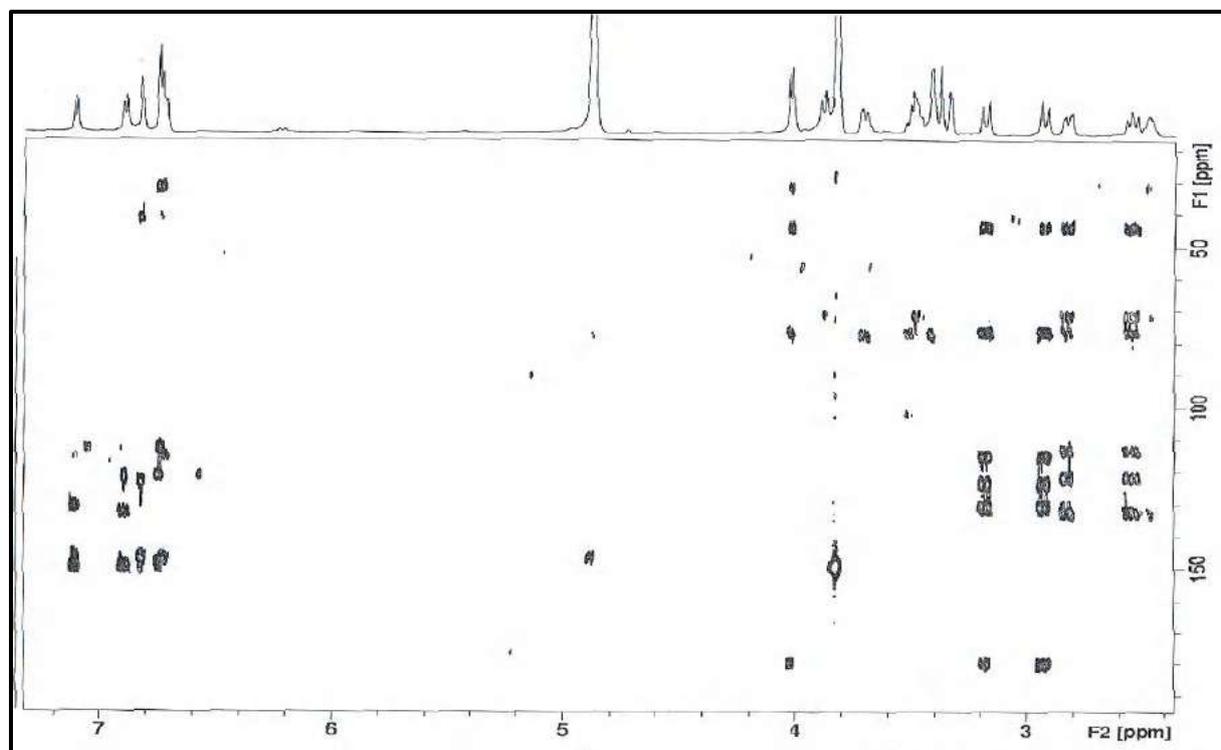


**Spectre n° III.50:** Etallement Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, MeOD) du composé **GE5-8**  
 L'examen des spectres HSQC (spectre n° III.51) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre le proton H-9 et l'atome de carbones C-9 à  $\delta = 70,0$  ppm confirme la jonction C-O.
- Une tache de corrélation entre le proton H-8 et l'atome de carbones C-8 à  $\delta_c = 43,4$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7a et l'atome de carbones C-7 à  $\delta_c = 31,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7b et l'atome de carbones C-7 à  $\delta_c = 31,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7'a et l'atome de carbones C-7' à  $\delta_c = 40,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7'b et l'atome de carbones C-7' à  $\delta_c = 40,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre les protons et le carbone de OCH<sub>3</sub> à  $\delta_c = 55,7$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1''' et l'atome de carbones C-1''' à  $\delta_c = 104,1$  ppm.



*Spectre n° III.51: Spectre HSQC(600 MHz, 150 MHz) MeOD du composé GE5-8*



*Spectre n° III.52: Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) MeOD du composé GE5-8*

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC dans la zone faible (spectre n° III-52) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Les protons H-6 ; H-6' montres quatre taches de corrélation :

- La première avec un atome de carbone à  $\delta_c = 147,0$  ppm attribuable à C-3 ; C-3'.
- La deuxième confirme le C-2 ; C-2' à  $\delta_c = 113,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_c = 41,3$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-7'.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 31,8$  ppm attribuable à C-7.

Le proton H-2 montre deux taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 150,0$  ppm attribuable à C-4.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 122,0$  ppm attribuable à C-6.

Le proton H-5 montres trois taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 150,0$  ppm attribuable à C-4.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 132,7$  ppm attribuable à C-1.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 122,0$  ppm attribuable à C-6.

Le proton H- 2' montres trois taches de corrélations :

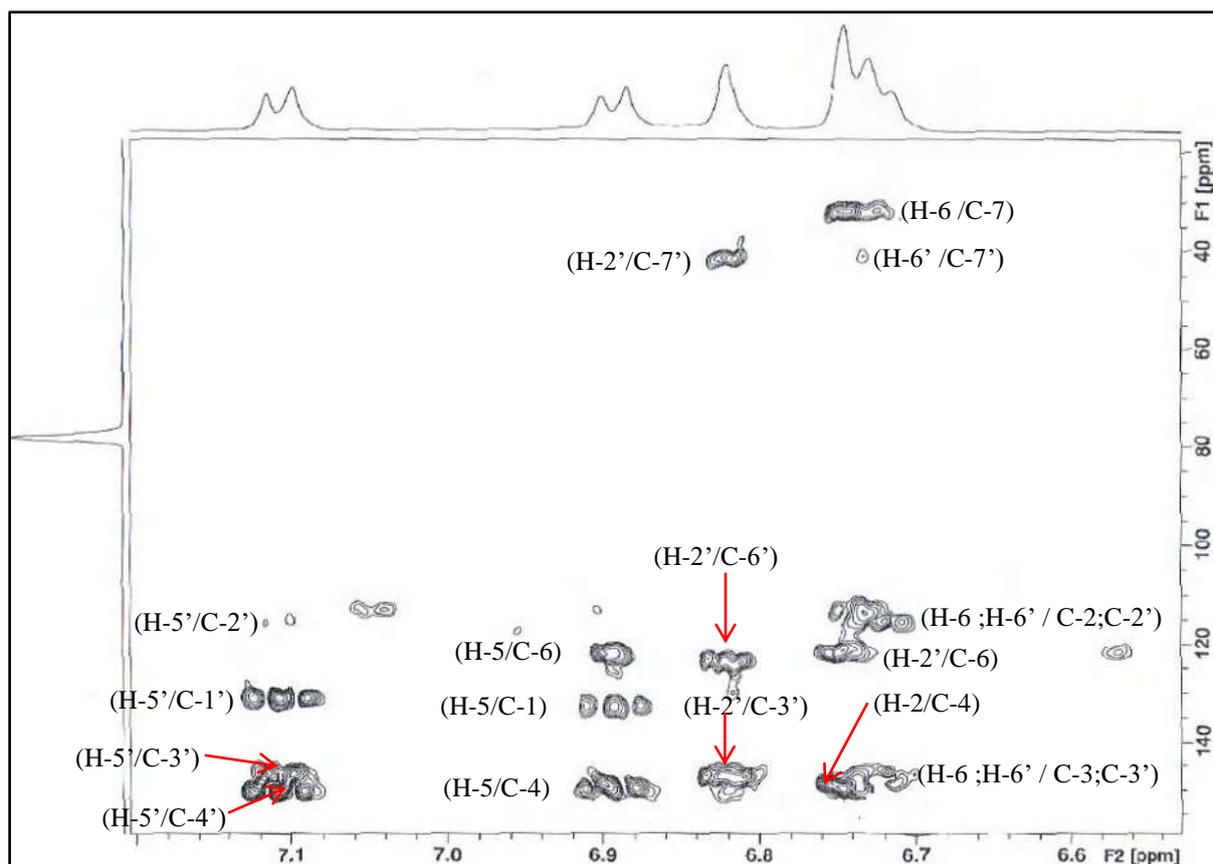
- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 147,1$  ppm attribuable à C-3 et C-3'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 123,8$  ppm attribuable à C-6'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 41,3$  ppm attribuable à C-7'.

Le proton H- 5' montres quatre taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 150,0$  ppm attribuable à C-4'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 147,0$  ppm attribuable à C-3'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 130,1$  ppm attribuable à C-1'.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 115,6$  ppm attribuable à C-2'.

Les protons de  $2\text{OCH}_3$  montrent une tache de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 149,2$  ppm attribuable à C-3.



**Spectre n° III.52-1: Etallement du Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) MeOD du composé *GE5-8***

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC dans la zone fort (spectre n° III-52-2), permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-9 montres quatre taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 180,0\text{ppm}$  attribuable à un carbonyle quaternaire C-9' dans un cycle furanique.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 77,0\text{ ppm}$  attribuable à un carbone quaternaire oxygéné C-8'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 43,5\text{ppm}$  attribuable à C-8.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 31,4\text{ ppm}$  attribuable à C-7.

Les protons H-7'a ; H-7'b montres six taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 180,0\text{ppm}$  attribuable à C-9'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 131,0\text{ ppm}$  attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 123,8\text{ppm}$  attribuable à C-6'.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 115,8\text{ ppm}$  attribuable à C-2'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 77,2\text{ ppm}$  attribuable à C-8'.

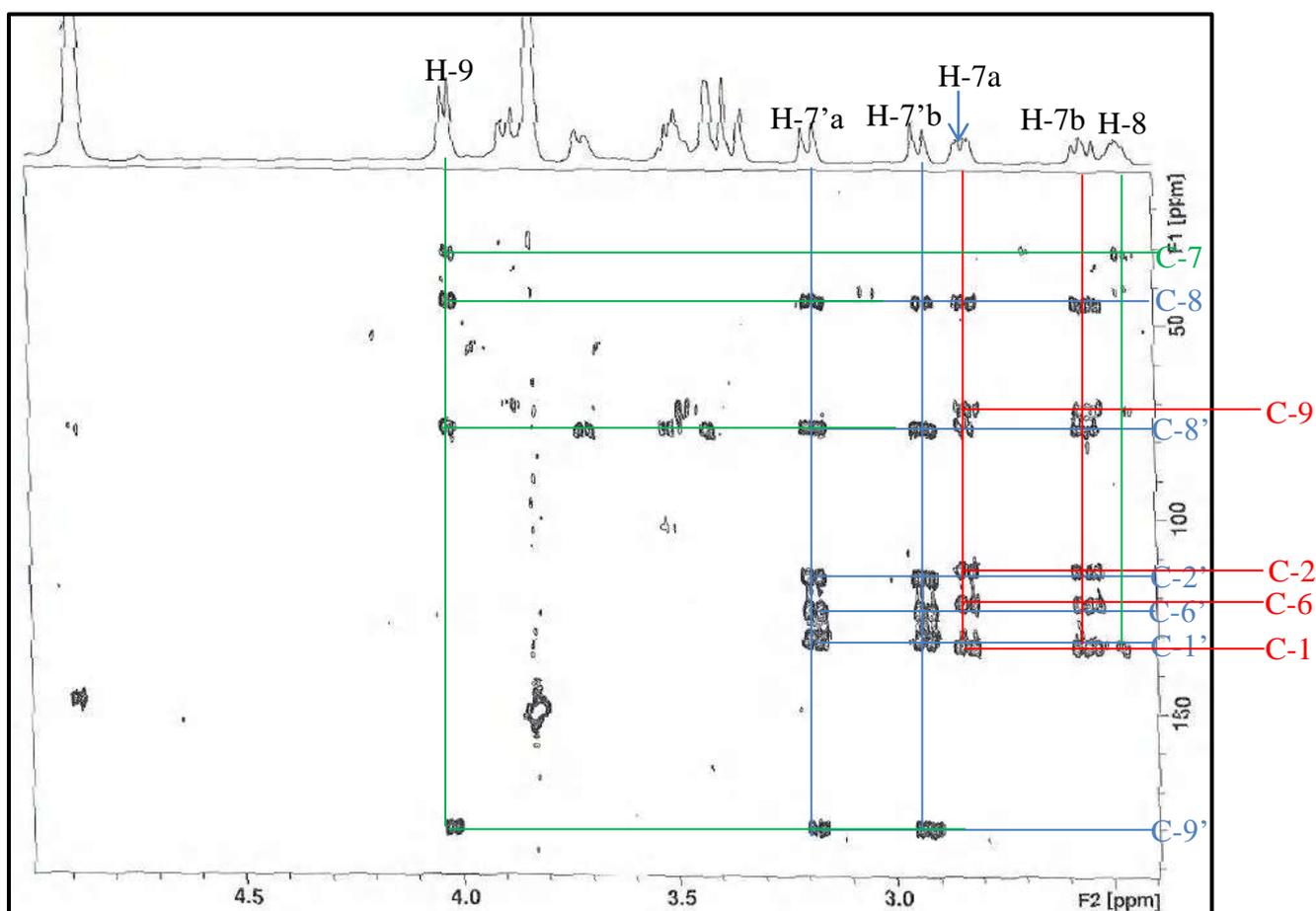
- La sixième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 44,8$  ppm attribuable à C-8

Les protons H-7a ; H-7b montres six taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 132,5$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 122,0$  ppm attribuable à C-6.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 114,0$  ppm attribuable à C-2.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 77,2$  ppm attribuable à C-8'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 71,3$  ppm attribuable à C-9.
- La sixième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 44,5$  ppm attribuable à C-8.

Le proton H-8 montre trois taches de corrélations :

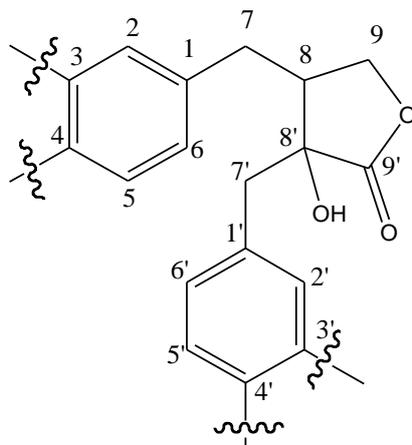
- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 132,5$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 77,3$  ppm attribuable à C-8'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 31,9$  ppm attribuable à C-7.



*Spectre n° III.52-2: Etalement du Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) MeOD du composé  
GE5-8*

L'analyse de ces spectres (RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC) de **GE5-8** a permis d'attribuer les signaux de la génine en comparaison avec ceux décrits dans la littérature et d'identifier le

squelette de lignane comme un diaryl monofuranique. Le lignane est, donc, identifiée comme étant :



**Figure n° III.13:** la structure du *nortrachelogenin*

L'examen du spectre RMN<sup>1</sup>H (*Spectre n° III.48*) montre un signal à  $\delta_H = 4,88\text{ppm}$  masquer par celui du solvant qui porté sur un carbone qu'il a un déplacement de  $\delta_C = 101,4\text{ppm}$  (*Spectre n° III.51*) caractéristique d'un proton anomérique.

L'examen du spectre *SMHR ESI* (*Spectre n° III.47*) mentre la presence de duex unité de sucre identique.

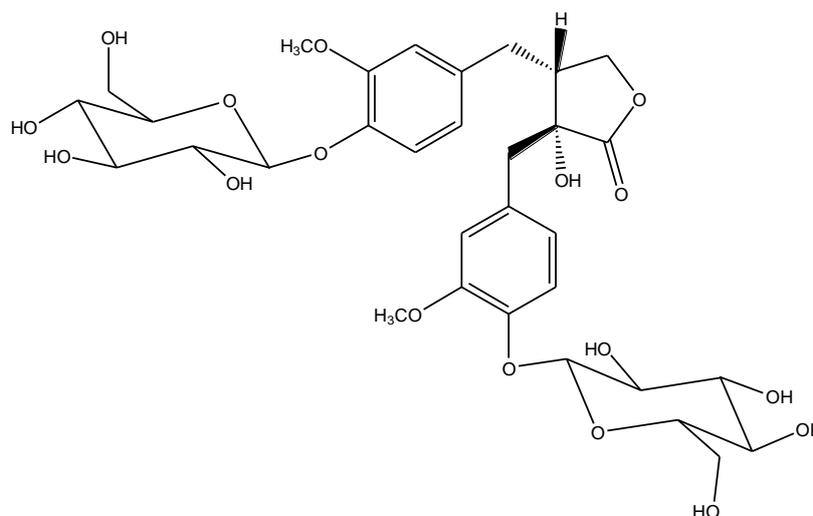
A partir de ces protons anomériques, l'interprétation des corrélations observées sur le spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (*Spectre n° III.50*) permet de repérer le proton (H-2'' ; H-2''') par la corrélation (H-1''/H-2'' ; H-1'''/H-2''') ) à  $\delta_H 3,50$  (2H, *m*), puis le proton (H-3'' ;H-3''') situé à  $\delta_H 3,52$  (2H, *d*) par la corrélation (H-2''/H-3'' ;H-2'''/ H-3'''), ensuite la corrélation (H-3''/H-4'' ;H-3'''/ H-4''') permet d'identifier ce dernier à  $\delta_H 3,40$  (2H, *t*), le proton (H-5'' ;H-5''') situé aussi à  $\delta_H 3,41$  (2H) présente deux corrélations avec deux protons géminés (H-6''<sup>a</sup> ; H-6'''<sup>a</sup>) à  $\delta_H 3,70$  (2H, *dd*,) et à  $\delta_H 3,87$  (2H, *m*), attribuables aux protons H-6''<sup>b</sup> ; H2-6'''<sup>b</sup>).

L'examen des spectres HSQC (*Spectre n° III.51*) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:  $\delta_C 73,2$ (C-2''/C-2'''),  $\delta_C 77,4$  (C-3''/ C-3'''),  $\delta_C 69,2$  (C-4''/ C-4'''),  $\delta_C 77,0$  (C-5''/ C-5''') et  $\delta_C 61,2$  (C-6''/ C-6'''). Une comparaison de ces données spectroscopiques avec celles de la littérature [3] a permis de caractériser ces deux sucres comme le  $\beta$ -glucopyranoside.

L'examen des spectres HMBC (*Spectre n° III.52*) montre :

- Une tache de corrélation des deux protons anomérique avec les carbones à  $\delta_C=147.0$  ppm attribuable aux C-4 et C-4'.
- Une tache de corrélation entre les protons des deux méthoxyle avec les carbones à  $\delta_C=149.2$  ppm attribuable aux C-3 et C-3'.

Donc le composé GE5-8 est identifié comme étant [116]:



**Figure n° III.14: nortrachelogenin-4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside**

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-12

**Tableau n° III.12 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (MeOD) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE3-26**

position	C δ (ppm)	δH (ppm), (m, J (Hz))
1	132,5	-
2	112,2	6,74(1H, s)
3	147,0	-
4	150,0	-
5	111,9	6,88(1H,d, J=8,0 Hz)
6	121,4	6,71(1H,d, J=8,0)
7a	31,1	2,55(1H, m)
7b		2,82 (1H,br d, J=10,0Hz)
8	43,4	2,47 (1H,m)
9	70,0	4,10(2H,br d, J=8,3Hz)
1'	130,1	-
2'	114,0	6,82(1H, s)
3'	147,0	-
4'	150,0	-
5'	116,0	7,10(1H,d, J=8,0 Hz)
6'	120,0	6,60(1H,d, J=8,0)

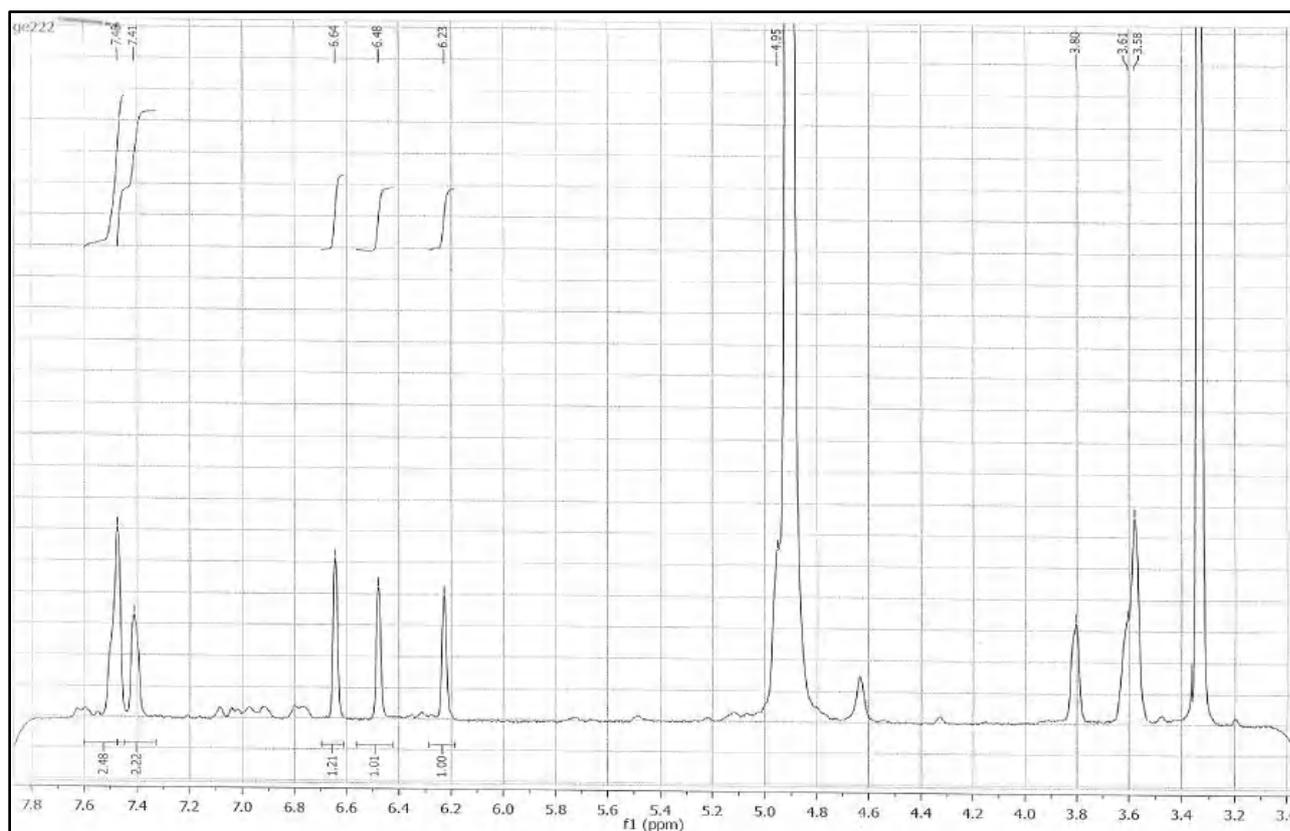
<b>position</b>	<b>C <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta H</math> (ppm), (m, J (Hz))</b>
7'a	40,1	2,92 (1H,d, J=13,5 Hz)
7'b		3,18(1H,d, J=13,5 Hz)
8'	77,2	-
9'	180,0	-
OCH <sub>3</sub>	55,7	3,82
1''	101,4	4,89 (d, J = 7,3)
2''	73,2	3,20 (t, J = 7,3)
3''	77,4	3,52 (t, J = 7,0)
4''	69,2	3,40 m
5''	77,0	3,41(dd, J = 7,9 -5,5)
6''a	61,2	3,70 (d, J = 11,8)
6''b		3,87 (dd, J = 11,8 -5,5)
1'''	101,4	4,89 (d, J = 7,3)
2'''	73,2	3,20 (t, J = 7,3)
3'''	77,4	3,52 (t, J = 7,0)
4'''	69,2	3,40 m
5'''	77,0	3,41(dd, J = 7,9 -5,5)
6'''a	61,2	3,70 (d, J = 11,8)
6'''b		3,87 (dd, J = 11,8 -5,5)

### III-13- Identification du produit GE6-10

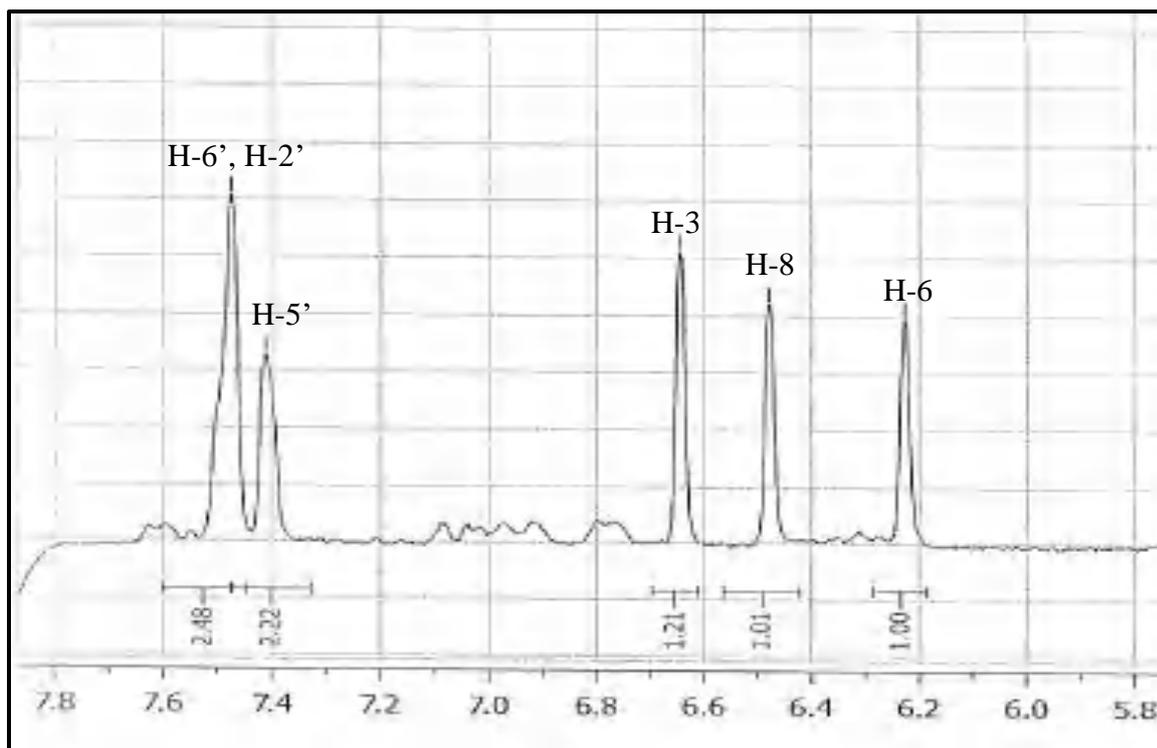
Le composé **GE6.10** se présente sous forme d'une poudre jaune,

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° III.53) du composé **GE 6.10** montre les six protons aromatiques caractéristiques de lutéoline.

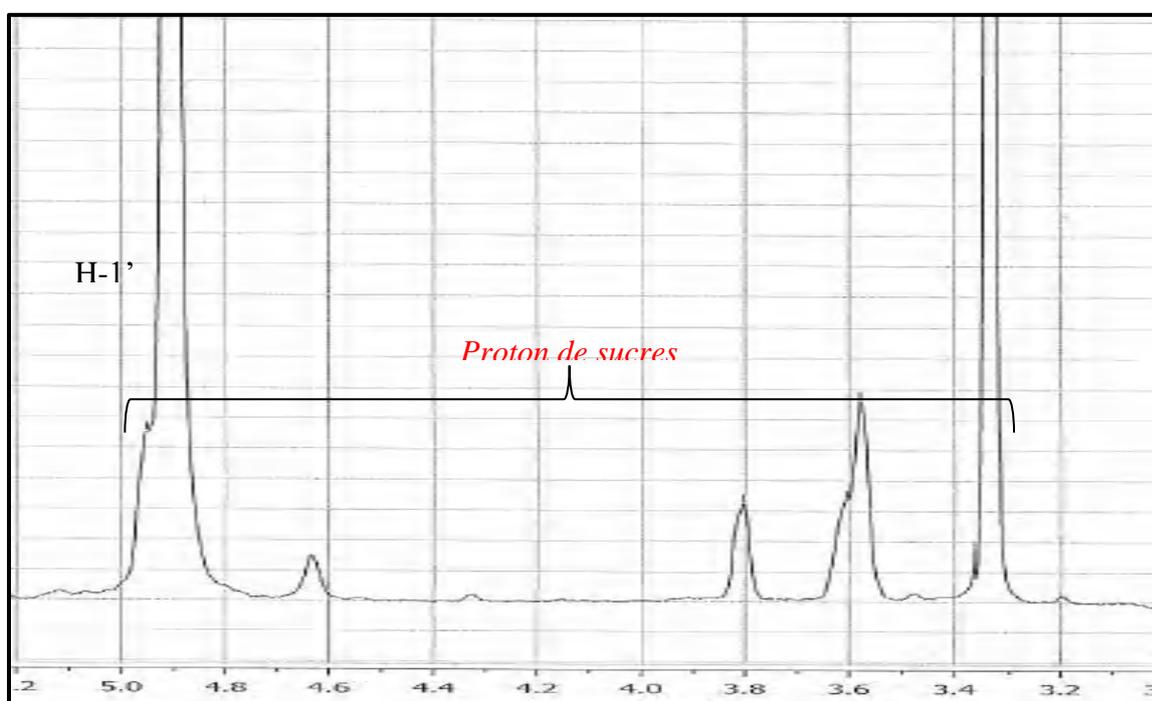
- Deux signaux de deux protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}=6,22$  ppm (1H, *sl*) et  $\delta_{\text{H}}= 6,50$  ppm (1H, *sl*) attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Ceci est confirmé par expérience COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (spectre n° III.54).
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}=6,64$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-3.
- trois signaux déblindés résonant à  $\delta_{\text{H}}= 7,54$  ppm (1H, *sl*),  $\delta_{\text{H}}= 7,49$  ppm (1H, *sl*) et  $\delta_{\text{H}}= 7,43$  ppm (1H *sl*), attribuables respectivement aux protons H-6', H-2' et H-5' du cycle B bisubstitué en positions 3' et 4' comme le montre également l'expérience COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (spectre n° III.54).



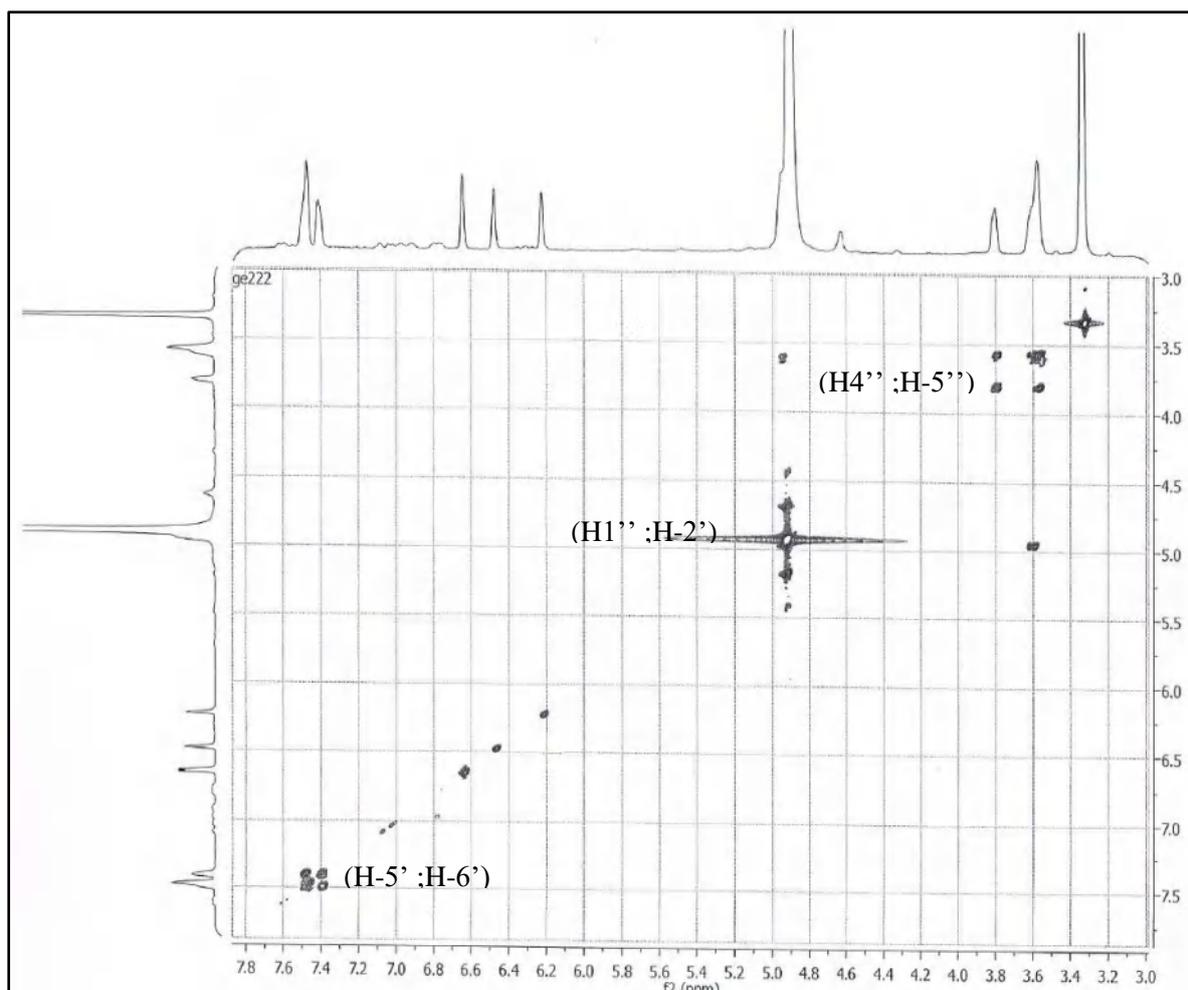
**Spectre n° III.53:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE6.10**



*Spectre n° III.53.1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE6.10  
Proton aromatique.*



*Spectre n° III.53.2: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE6.10  
Proton de sucres*



**Spectre n° III.54: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé GE6.10**

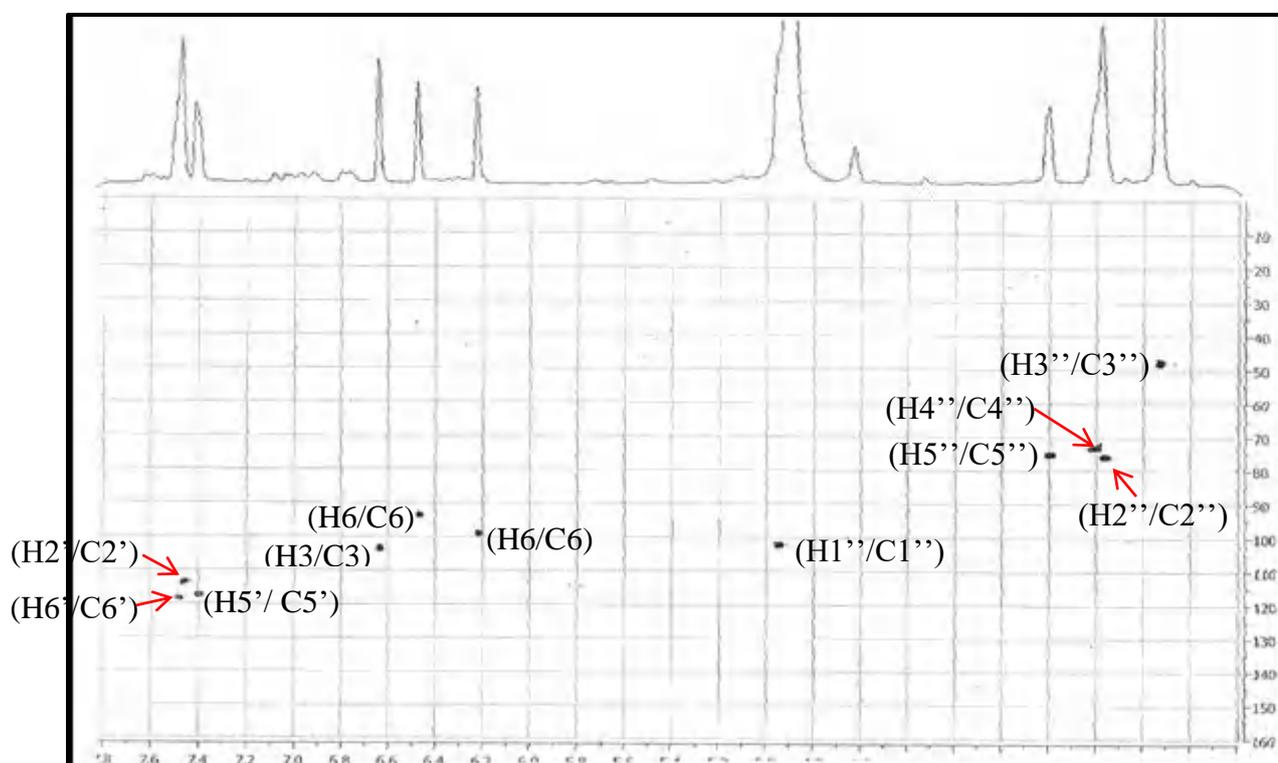
L'examen des spectres cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.54) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre le proton H-6'  $\delta_{\text{H}} = 7,54$  ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}} = 7,43$  ppm qui ne peut être que le proton H-5'.
- Le proton anomérique H-1''  $\delta_{\text{H}} = 4,95$  ppm corréle avec le proton H-2''  $\delta_{\text{H}} = 3,59$  ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton H-4''  $\delta_{\text{H}} = 3,57$  ppm et un autre proton à  $\delta_{\text{H}} = 3,79$  ppm qui ne peut être que les protons H-5''.

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (spectre n° III.55) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 113,51$  ppm et attribuable à C-2'.
- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbones à  $\delta_{\text{C}} = 118,28$  ppm et attribuable à C-6'.

- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbones à  $\delta_C = 116,97$  ppm et attribuables à C- 5'.
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_C = 93,25$  ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à  $\delta_C = 99,62$  ppm qui est le C-6.
- Une tache de corrélation entre H-3 et un atome de carbone à  $\delta_C = 102,43$  ppm qui est le C-3.
- Une tache de corrélation entre H-1'' ( $\delta H= 4,98$ ppm) et un atome de carbone à  $\delta_C=102,15$  ppm qui est le C-1''.
- Une tache de corrélation entre H-2'' ( $\delta H= 3,60$ ppm) et un atome de carbone à  $\delta_C=73,09$  ppm qui est le C-2''.
- Une tache de corrélation entre H-3'' ( $\delta H= 3,33$ ppm) et un atome de carbone à  $\delta_C=47,71$  ppm qui est le C-3''.
- Une tache de corrélation entre H-4'' ( $\delta H= 3,57$ ppm) et un atome de carbone à  $\delta_C=72,20$  ppm qui est le C-4''.
- Une tache de corrélation entre H-5'' ( $\delta H= 3,79$ ppm) et un atome de carbone à  $\delta_C=75,17$  ppm qui est le C-5''.



*Spectre n° III.55: Spectre HSQC du composé GE6.10*

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III.56), permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-6 montre quatre taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 93,07$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-8.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 105,04$  ppm.
- La troisième confirme le C-5 à  $\delta_C = 163,00$  ppm.
- La quatrième confirme le C-7 à  $\delta_C = 166,77$  ppm.

Le proton H-8 montre trois taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 166,77$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-7.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 105,04$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 158,00$  ppm attribuable à C-9.

Le proton H-3 montre quatre taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 127,40$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1'.
- La deuxième confirme le C-10 à  $\delta_C = 104,98$  ppm.
- La troisième confirme le C-2 à  $\delta_C = 165,39$  ppm.
- La quatrième confirme le C-4 à  $\delta_C = 185,73$  ppm.

Le proton H-5' montre deux taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 127,50$  ppm confirme le C-1'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 149,52$  ppm attribuable à C-3'.

Le proton H-2' montre:

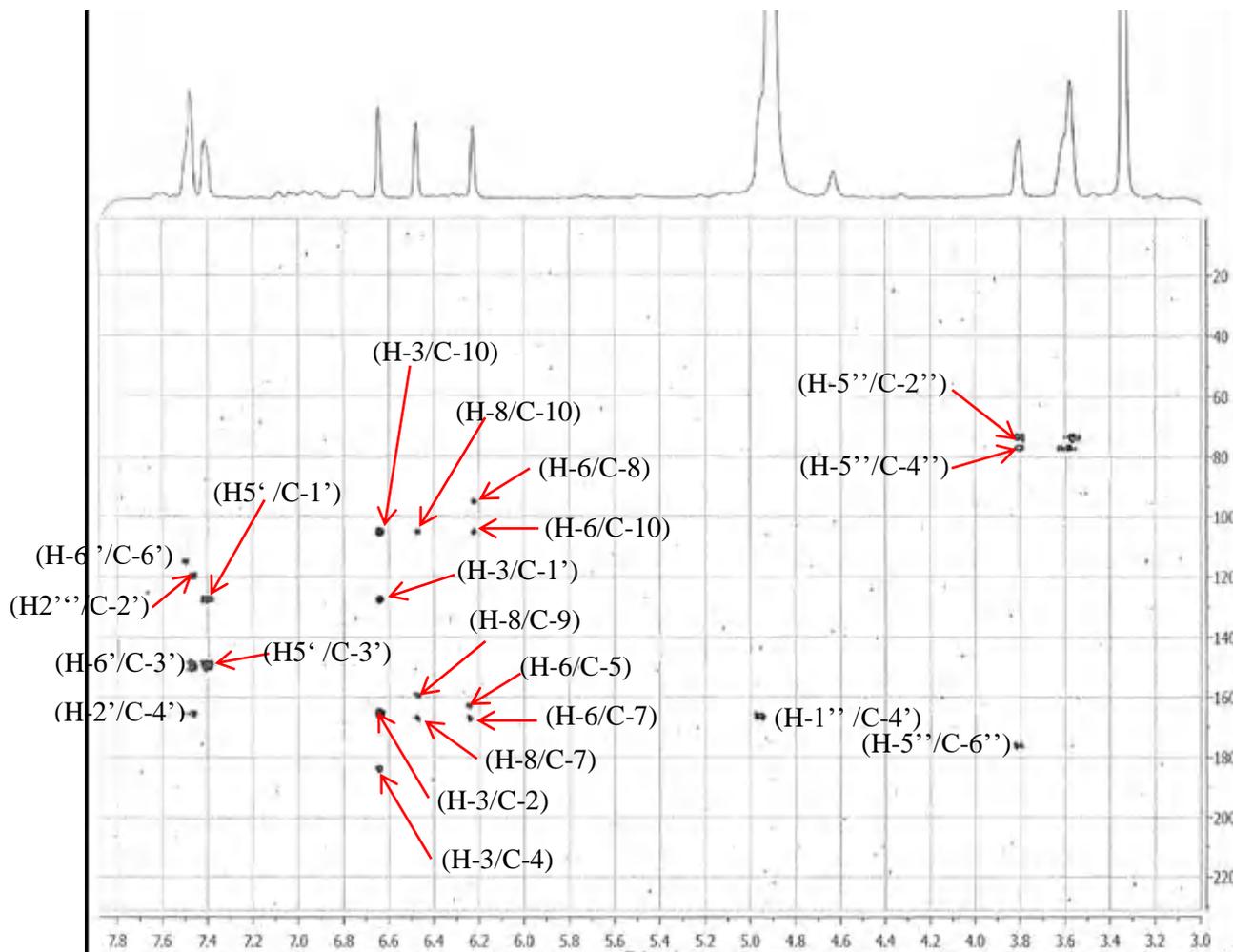
- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 118,28$  ppm attribuable à C-6'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 149,52$  qui ne peut être que C-3'.
- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 165,53$  ppm attribuable à C-4'.

Le proton H-6' montre:

- Une tache de corrélation avec un atome de carbone à  $\delta_C = 113,51$  ppm attribuable à C-2'.
- Une tache de corrélation avec le même atome de carbone à  $\delta_C = 149,52$  qui ne peut être que C-3'.

Les protons osidiques : montre:

- Une tache de corrélation entre le H- 1'' et un atome de carbone à  $\delta_C = 165,5\text{ppm}$  qui ne peut être que le C-3'.
- Le H-5'' avec les atomes de carbone à  $\delta_C = 175,77$ ;  $\delta_C = 76,96$ ;  $\delta_C = 70,58$  ppm confirme les carbones C-6''; C-4'' et C-2'' respectivement. Ce qui confirme la présence d'une fonction acide dans la position 6 du sucre.



*Spectre n° III.56: Spectre du composé GE6.10*

Ces données sont typiques d'un glucuronide de configuration  $\beta$  attaché avec la partie génine par la jonction C-O-C on position 4'.

A partir de toutes ces données [116], la structure du composé **GE6-10** a donc pu être établie comme étant *luteolin 4'-O- $\beta$ -D-glucuronide*.

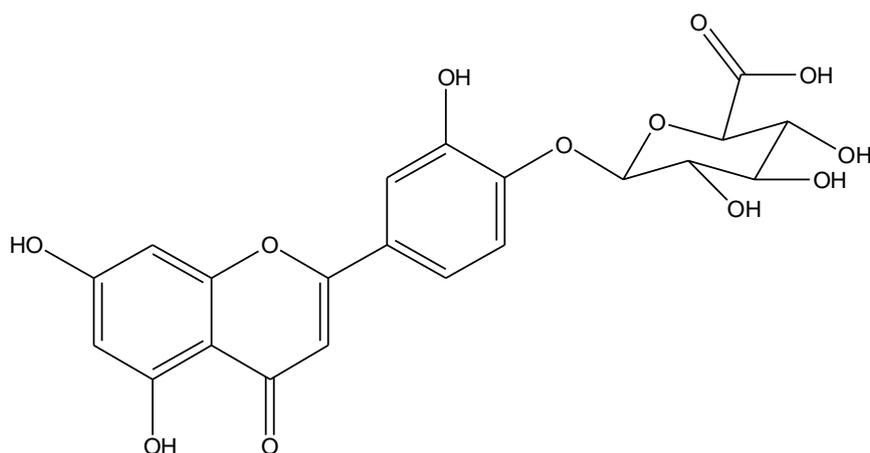


Figure n° III.15: la structure de luteolin 4'-O-β-D-glucuronide

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.13.

Tableau III.13: Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) du composé GE6-10 dans CD<sub>3</sub>OD

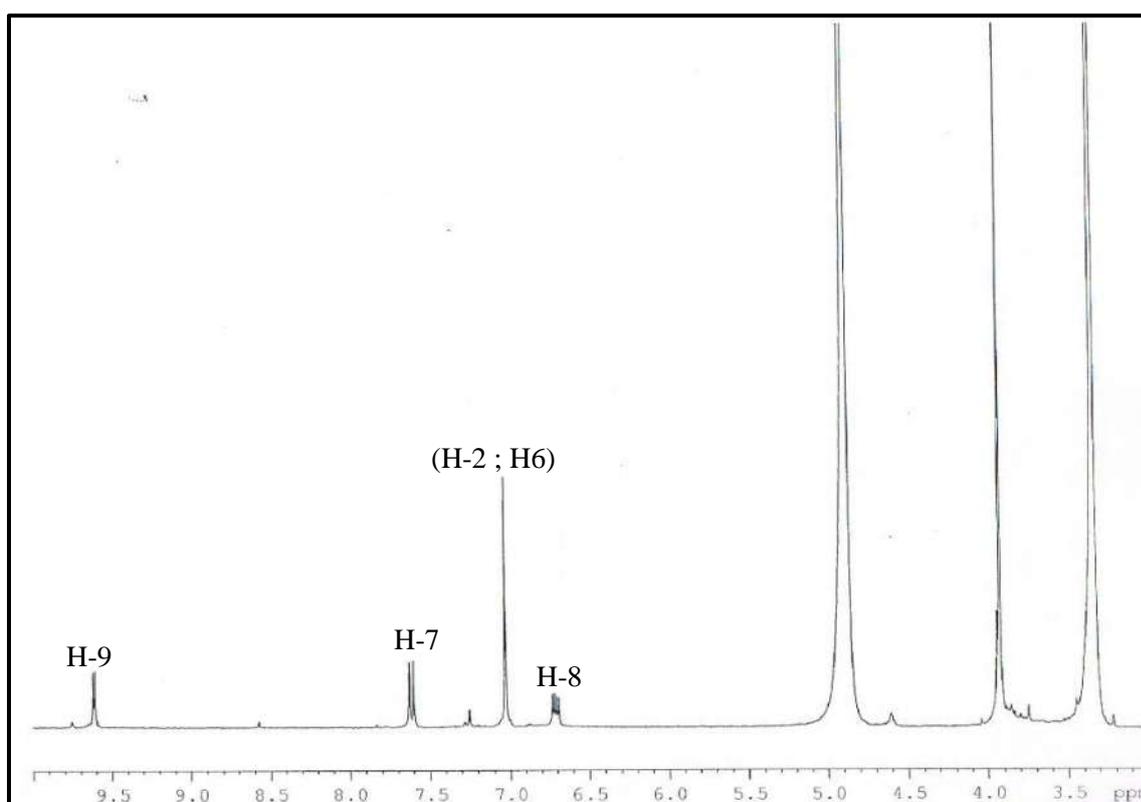
Position	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm), (m, J (Hz))
2	165,39	-
3	102,43	6,64(1H, <i>sl</i> )
4	185,73	-
5	163,00	-
6	99,62	6,22 (1H, <i>sl</i> )
7	166,77	-
8	93,25	6,50 (1H, <i>sl</i> )
9	158,00	-
10	105,04	-
1'	127,50	-
2'	113,50	$\delta H$ 7,49 (1H, <i>sl</i> )
3'	149,70	-
4'	165,53	-
5'	116,97	7,43 (1H, <i>sl</i> )
6'	118,28	7,54 (1H <i>sl</i> )
1''	102,15	4,98 (1H, <i>sl</i> )
2''	70,58	3,60

<b>position</b>	<b>C <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta H</math> (ppm), (m, J (Hz))</b>
3''	75.00	3,33
4''	76.96	3,57
5''	75.00	3,79
6''	175,77	-

### III-14- Identification du produit GE10-7

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé enregistré à 600 MHz dans MeOD (spectre III.57), indique la présence de :

- Un signal d'intégration 2H attribuables à un noyau aromatique tétrasubstitué résonne à  $\delta_{\text{H}} = 7.02\text{ppm}$  (2H, *s*,) attribuable aux protons H-2 et H-6.
- Deux signaux attribuables à une double liaison avec une géométrie *trans* résonant à  $\delta_{\text{H}} = 7,62\text{ppm}$  (1H, *d*,  $J=16,0$  Hz, H-7), 6,75 (1H, *dd*,  $J=16,0$  ; 8 Hz, H-8).
- Un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 9.60$  (1H, *d*,  $J=8.0$  Hz) attribuable à H-9 d'une fonction aldéhyde.
- Un singulier à  $\delta_{\text{H}} = 3.91\text{ppm}$  d'intégration 6H attribuable à deux méthoxyle.

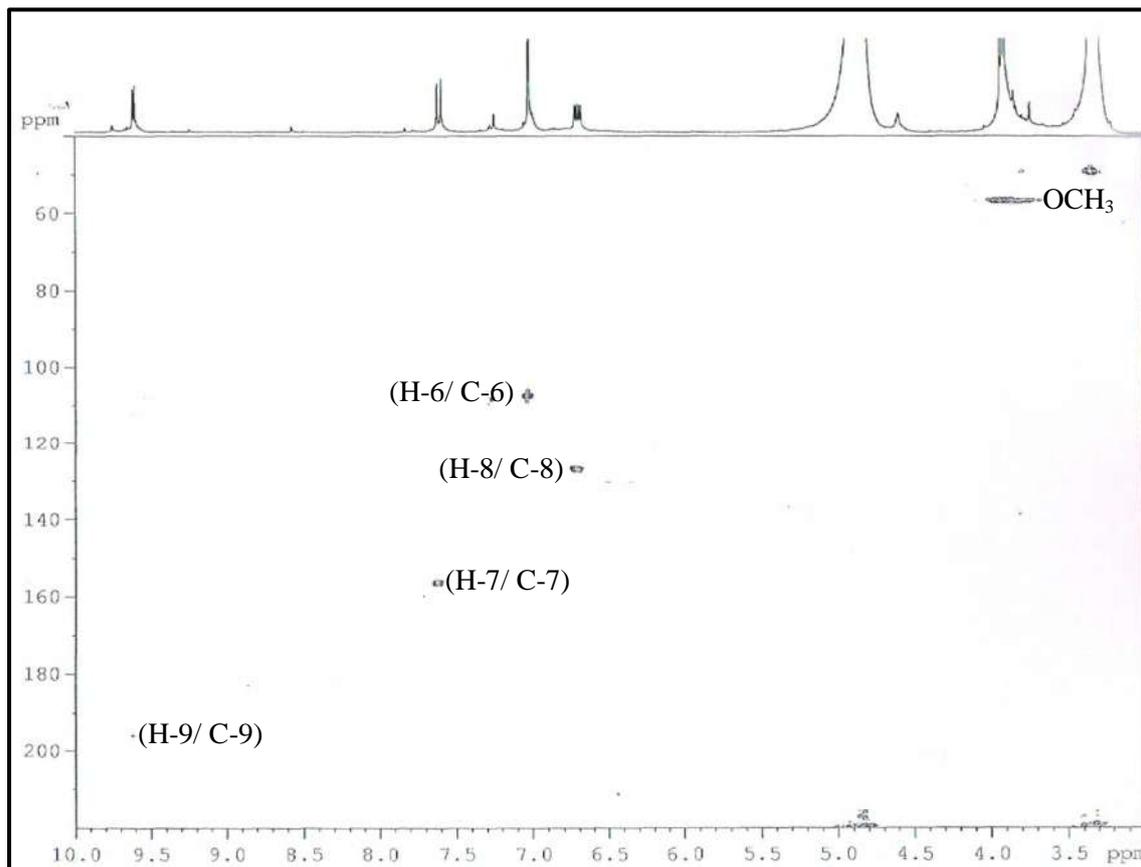


**Spectre n° III.57:** Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE10-7

L'examen des spectres HSQC (spectre n° III.58) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-9 et l'atome de carbones à C-9  $\delta_{\text{C}} = 195,5$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-8 et l'atome de carbones à C-8  $\delta_{\text{C}} = 155,7$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-7 et l'atome de carbones à C-7  $\delta_{\text{C}} = 155,7$  ppm.
- Une tache de corrélation entre (H-2; H-6) et l'atome de carbones à (C-2 ; C-6)  $\delta_{\text{C}} = 126,7$  ppm.

- Une tache de corrélation entre les protons des deux méthoxyle et l'atome de carbone à  $\delta_C = 56,5$  ppm.



**Spectre n° III.58:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz,  $CD_3OD$  du composé **GE10-7**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III-59) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-9 montre une tache de corrélation à  $\delta_C=126,7$  ppm attribuable à C-7.

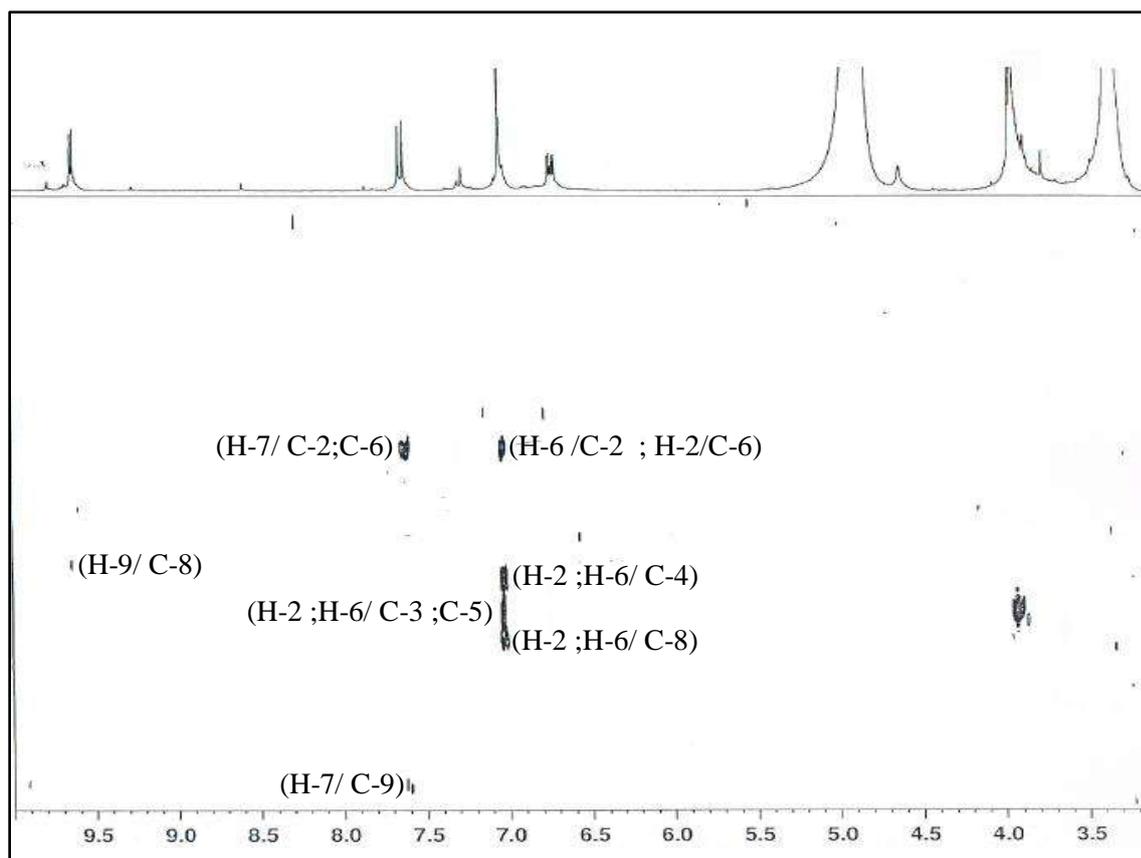
Le proton H-7 montre deux taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C= 195,5$ ppm attribuable à C-9.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C= 107,3$  ppm attribuable à C-2 et C-6.

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

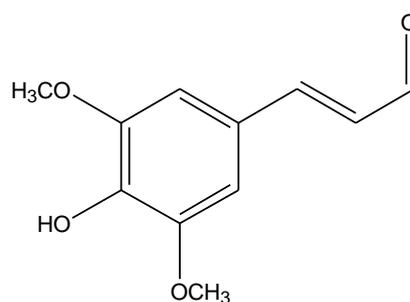
- La première confirme le carbone à  $\delta_C=154,0$  ppm attribuable à C-8.
- La deuxième confirme le C-3 et C-5 à  $\delta_C= 147,9$ ppm.
- La troisième confirme le C-4 à  $\delta_C= 139,6$  ppm.
- La quatrième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 106,8$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-6 et C-2.

Les protons de  $OCH_3$  montrent une tache de corrélation à  $\delta_C=147,9$  ppm attribuable à C-3 et C-5.



**Spectre n° III-59:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé **GE10-7**

A partir de toutes ces données en comparaison avec les données de la littérature [112], la structure du composé GE10-7 a donc pu être établie comme étant : **Sinapaldehyde**



**Figure n° III.16:** la structure de **Sinapaldehyde**

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le **tableau n° III-14**

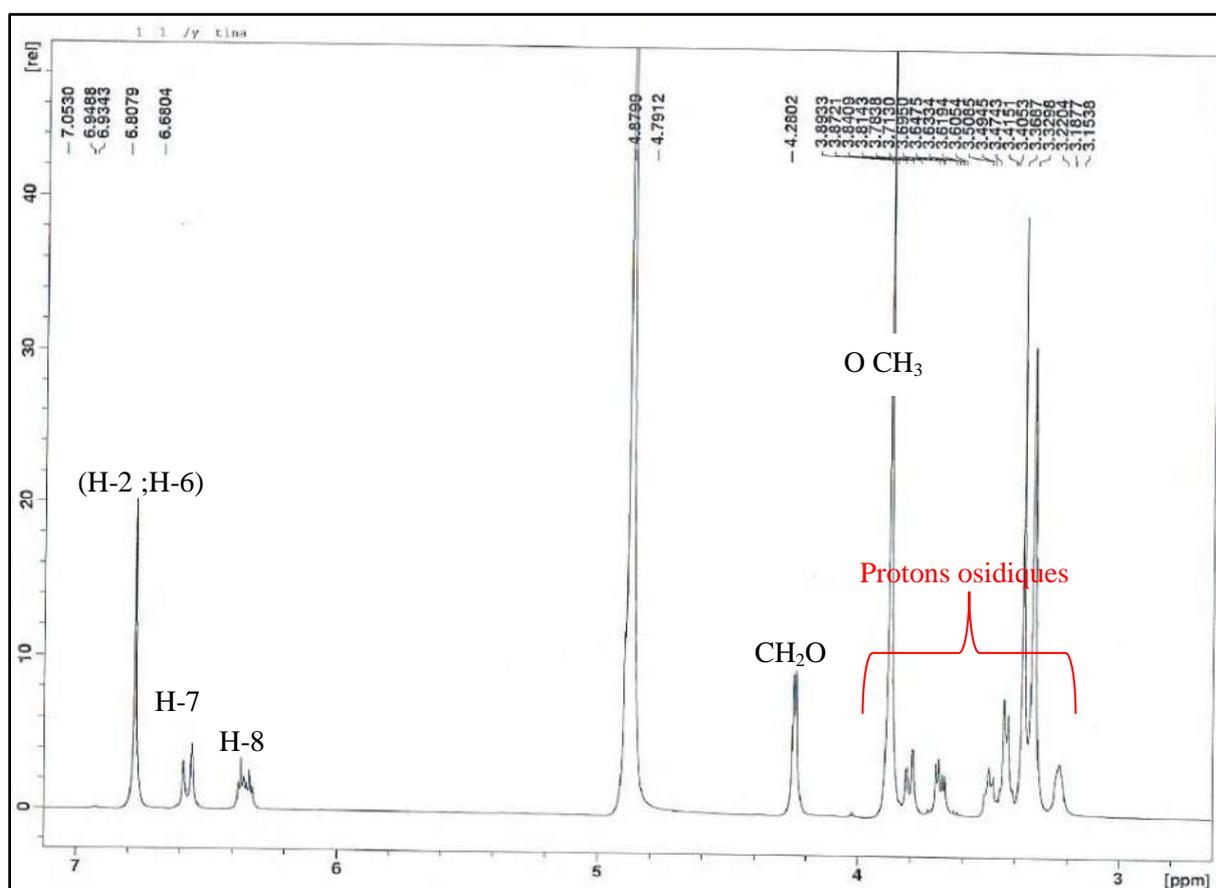
**Tableau n° III.14 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE3-27**

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta$ H (ppm), (m, J (Hz))
1	133,0	-
2	107,3	6,71s
3	147,3	-
4	150,0	-
5	147,3	-
6	127,3	7,01s
7	126,6	6,75(d, J=16Hz)
8	155,7	6,62 (dd, J=16,0; 8,0 Hz)
9	195,5	4,00(d, J=8,0Hz)
OCH <sub>3</sub>	56,5	3,91

### III-15- Identification du produit GE10-17

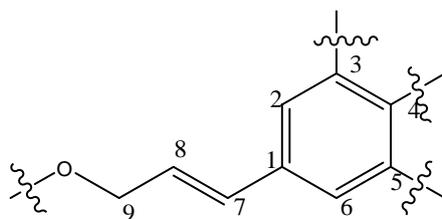
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé enregistré à 500 MHz dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  (spectre n° III.60), indique la présence de :

- Un signal d'intégration 2H attribuables à un noyau aromatique tétrasubstitué résonne à  $\delta_{\text{H}} = 6.76$  (2H, s,) attribuable aux protons H-2 et H-6.
- Deux signaux attribuables à une double liaison avec une géométrie *trans* résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6.32$  (1H, *d*,  $J = 16.0$  Hz, H-7),  $\delta_{\text{H}} = 6.55$  ppm (1H, *dd*,  $J = 16.0$ , H-8).
- Un signal d'intégration 2H sous forme d'un doublet repéré à  $\delta_{\text{H}} = 4.24$  ppm ( $J = 8$  Hz) correspondant aux protons oxyméthylènes ( $\text{CH}_2\text{-O}$ )
- Un singulier à  $\delta_{\text{H}} = 3.91$  ppm d'intégration 6H attribuable à deux méthoxyle.



Spectre n° III.60: Spectre NMR  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE10-17

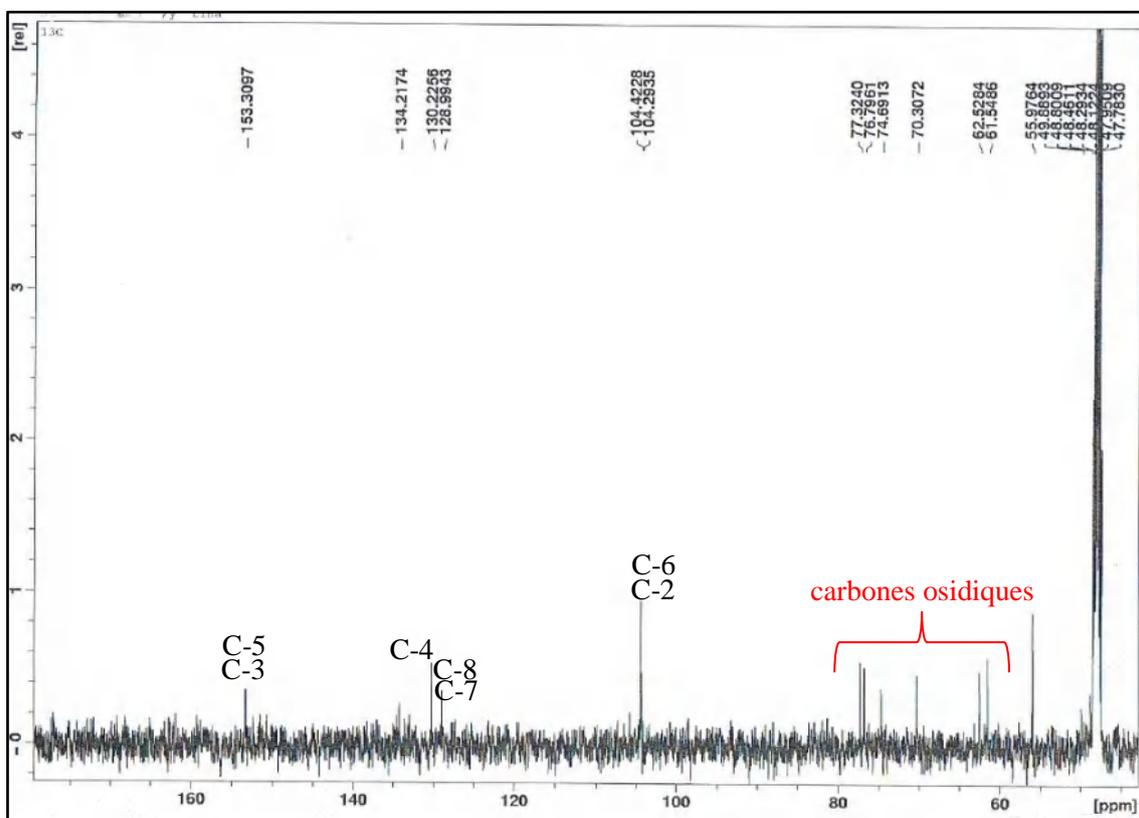
La présence de deux protons éthyléniques (H-7 et H-8), deux protons oxyméthylènes ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) et deux protons aromatiques (H-2 et H-6), révèle que cette molécule contient un squelette de type cinnamyle alcool substitué :



**Schéma n° III.17:** Structure d'un cinnamyle alcool

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre n° III.61), montre la présence de

- deux groupements méthines résonants à  $\delta_{\text{C}} = 104,42$  (C-2),  $104,49$  (C6)
- deux carbones tertiaire résonant à  $\delta_{\text{C}} = 129,0$  (C-7 ; C-8) .
- trois oxycarbones résonants à  $\delta_{\text{C}} = 135,0$  (C-4),  $\delta_{\text{C}} = 153,0$ (C-3 ; C-5).
- deux groupements méthoxy résonant à  $\delta_{\text{C}} = 56,5$  ppm.



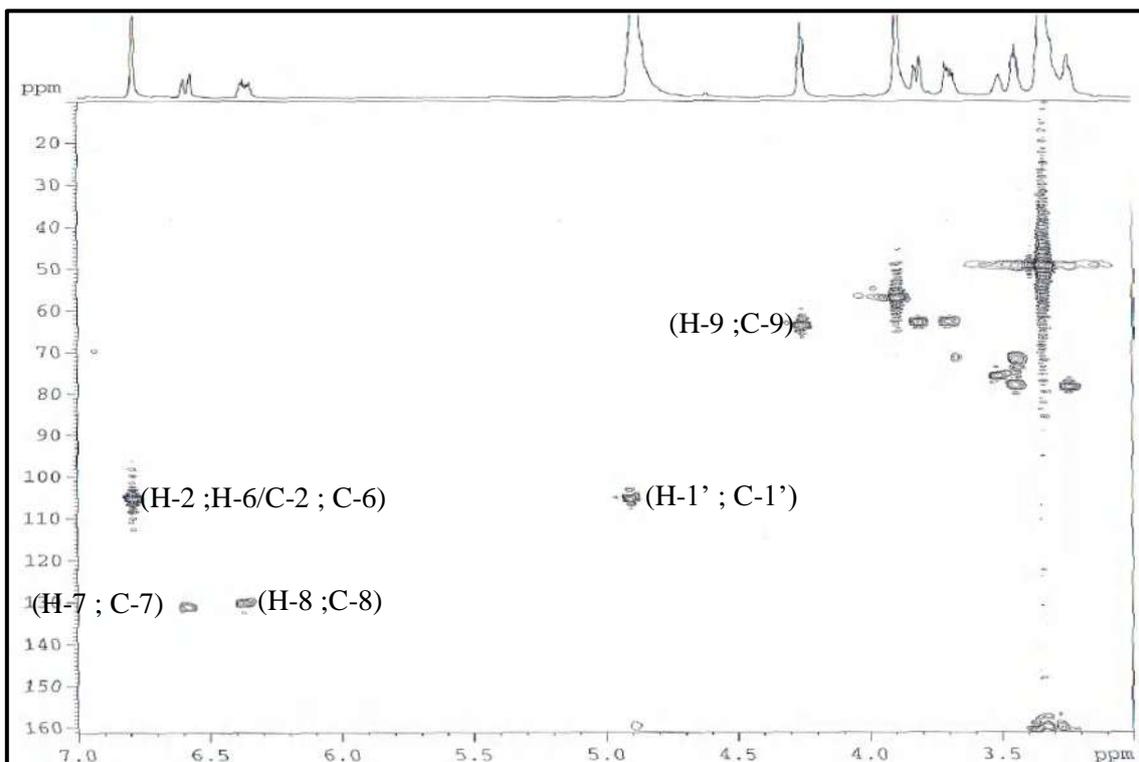
**Spectre n° III.61:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE10-17**

Ces spectres suggèrent aussi l'existence d'une unité osidique en raison du nombre de signaux résonant dans la zone (3,20 à 3,80 ppm).confirmé par le proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} = 4,87$ ppm.

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (spectre n° III.62),

Une tache de corrélation entre les protons (H-2, H-6) et les atomes de carbone (C-2, C-6) à  $\delta_c = 104,0$  ppm.

- Une tache de corrélation entre H-7 et l'atome de carbone C-7 à  $\delta_c = 129,7$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-8 et l'atome de carbone C-8 à  $\delta_c = 128,4$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-9 et l'atome de carbone C-9 à  $\delta_c = 62,0$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-1' et l'atome de carbone C-1' à  $\delta_c = 104,0$  ppm.



**Spectre n° III.62:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz  $CD_3OD$  du composé **GE10-17**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III-63) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

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

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 150,2$  ppm attribuable à C-3 et C-5.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 135,0$  ppm attribuable à C-4.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 128,0$  ppm attribuable à C-7.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_c = 104,8$  ppm qui ne peut être attribué qu'à C-2 et C-6.

Le proton H-7 montre trois taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_c = 131,1$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième confirme le C-2 et C-6 à  $\delta_c = 104,8$  ppm.

- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 62,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9.

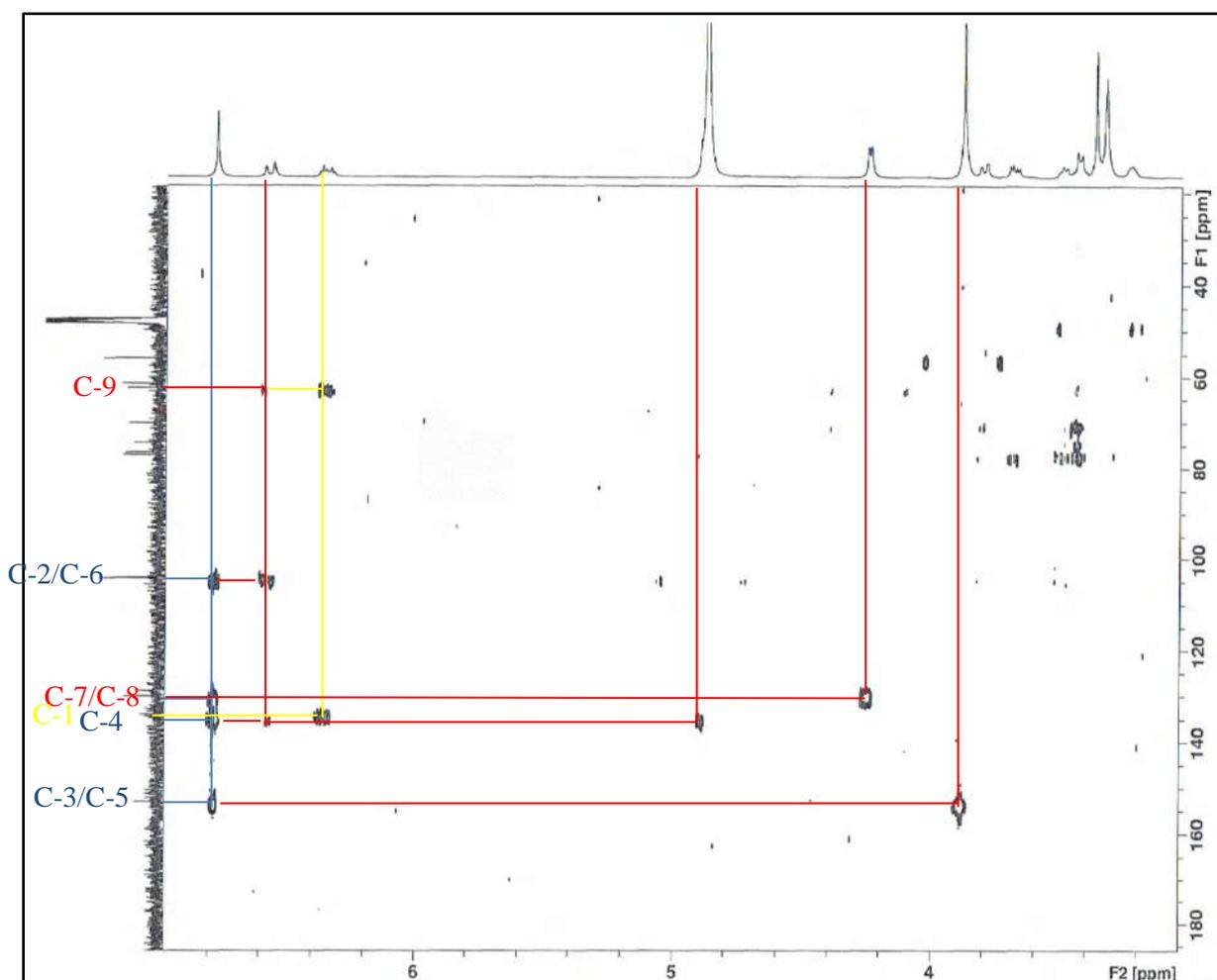
Le proton H-8 montre deux taches de corrélation :

- La première l'atome de carbone à  $\delta_C = 131,8$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième confirme le C-9 à  $\delta_C = 62,5$  ppm.

Le proton H-9 montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 129,0$  attribuable au C-8.

Les protons des deux méthoxyle montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 153,9$  attribuable au C-3 et C-5.

Le proton anomérique H-1' montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 135,3$  attribuable au C-4.



*Spectre n° III.63: Spectre HMBC (600 MHz, 150 MHz CD<sub>3</sub>OD du composé GE10-17*

L'unité osidique présente dans ce composé est clairement identifiée comme  $\beta$ -D-glucose, l'analyse [123] de ces spectres (RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC) de **GE10-17** a permis d'attribuer les signaux de de sucre (**tableauIII-15**).

A partir de toutes ces données, la structure du composé GE3-2 a donc pu être établie comme étant [113]: *la syringine*

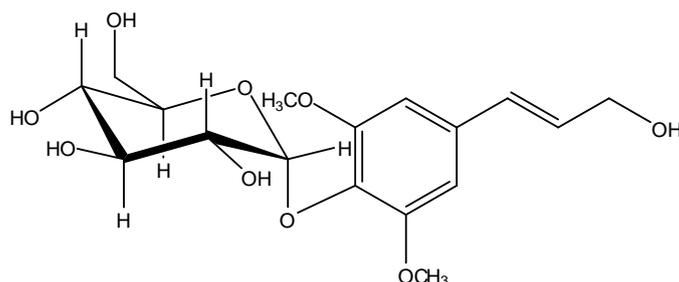


Figure n° III.18: la structure de la syringine

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le **tableau n° III-15**

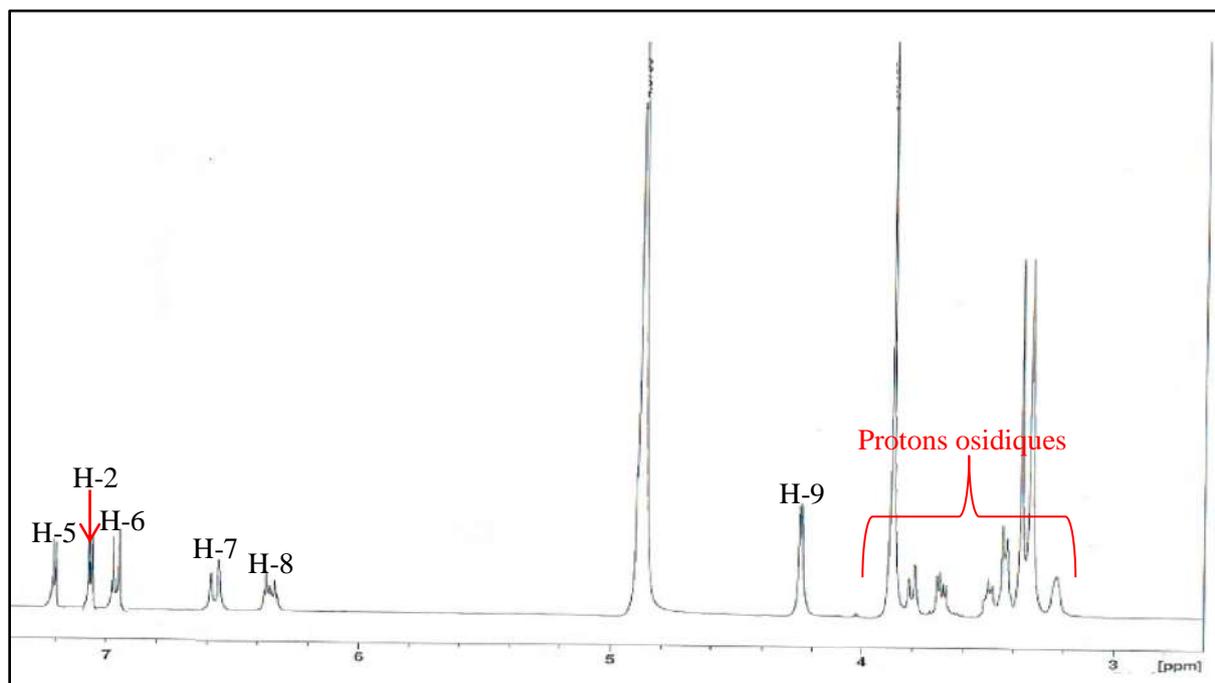
**Tableau n° III.15 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (DMSO) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD ; 150 MHz de GE3-27**

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta H$ (ppm), (m, J (Hz))
1	131,8	-
2	104,8	6,76 (s)
3	154,0	-
4	135,3	-
5	154,0	-
6	104,8	6,76 (s)
7	129,0	6,32 (1H, d, J=16,0 Hz)
8	128,5	6,55 (1H, dd, J=16,0 ; 8 Hz)
9	62,5	4,24 (2H, d, J = 8Hz)
1'	103,8	4,87 (1H, d, J=7,8 Hz)
2'	74,1	3,48 (dd, J=9,4 ; 8,1 Hz)
3'	76,0	3,22 (m)
4'	69,0	3,44 (m)
5'	76,0	3,41 (d, J=8,0 Hz)
6'a	61,0	3,78 (dd, J=11,5;2,0 Hz)
6'b		3,67(dd, J=11,5;5,0 Hz)
OMe	55,0	3,91(6H, s)

### III-16- Identification du produit GE10-18

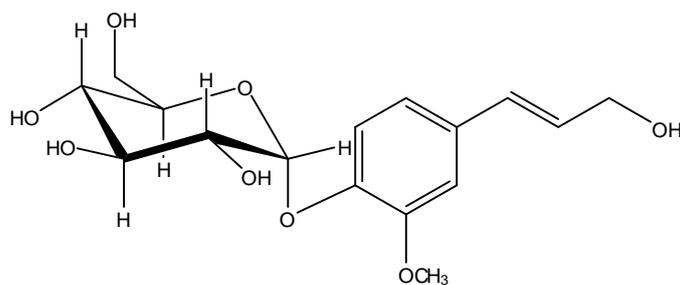
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé enregistré à 500 MHz dans MeOD (spectre n° III.64), indique la présence de un système ABX. En effet, on observe:

- Trois signaux constituant cette système à  $\delta_{\text{H}}=6,94$  (1H, *dd*,  $J=8,4$  ; 1,8 Hz), à  $\delta_{\text{H}}=7,10$  (1H, *d*,  $J=8,4$  Hz) et à  $\delta_{\text{H}}=7,06$  (1H, *d*,  $J=1,8$  Hz), attribuables aux trois protons d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitués, H-6, H-5 et H-2 respectivement.
- Deux signaux attribuables à une doubles liaisons avec une géométrie *trans* résonant à  $\delta_{\text{H}}=6,27$  (1H, *d*,  $J=15,7$  Hz, H-7),  $\delta_{\text{H}}=6,55$  ppm (1H, *dt*,  $J=15,7$  ; 5,8 Hz, H-8).
- Un signal d'intégration 2H sous forme d'un doublet repéré à  $\delta_{\text{H}}=4,21$  ( $J=5,8$ Hz) correspondant aux protons oxyméthylènes ( $\text{CH}_2\text{-O}$ )
- Un singulier à  $\delta_{\text{H}}=3,88$  ppm d'intégration 3H attribuable à un méthoxyle.



**Spectre n° III.64:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE10-18

En plus de ces données et par comparaison avec les données du composé précédent GE10-17 et avec les données de la littérature [113], on peut attribuer sans ambiguïté pour le composé, la structure suivante :



**Figure n° III.19:** la structure de l'abeitin

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le **tableau n° III-16**

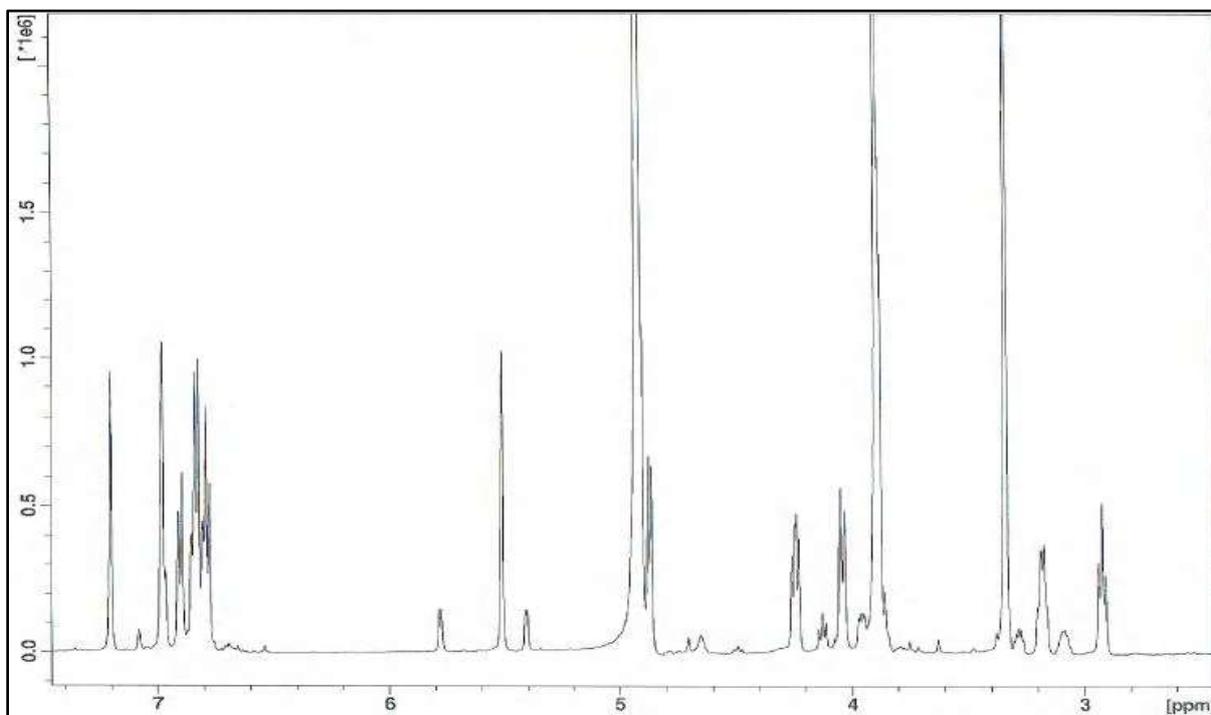
**Tableau n° III.16 :** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) ; 600 MHz  
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$  ; 150 MHz de GE3-27

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm), (m, J (Hz))
1	133,1	-
2	111,5	7,06 (1H, d, J=1,8 Hz)
3	150,9	-
4	147,7	-
5	118,0	7,10 (1H, d, J=8,4 Hz)
6	120,8	6,94 (1H, dd, J=8,4 ; 1,8 Hz)
7	131,3	6,27 (1H, d, J=15,7 Hz)
8	128,9	6,55 (1H, dt, J=15,7 ; 5,8 Hz)
9	63,8	4,21 (2H, d, J = 5,8Hz)
1'	102,8	4,88 (1H, d, J=7,33 Hz)
2'	74,9	3,48 (dd, J=9,4 ; 8,1 Hz)
3'	78,3	3,22 (m)
4'	71,4	3,44 (m)
5'	77,9	3,41 (d, J=8,0 Hz)
6'a	62,5	3,78 (dd, J=11,5;2,0 Hz)
6'b		3,67(dd, J=11,5;5,0 Hz)
OMe	56,7	3,88(3H, s)

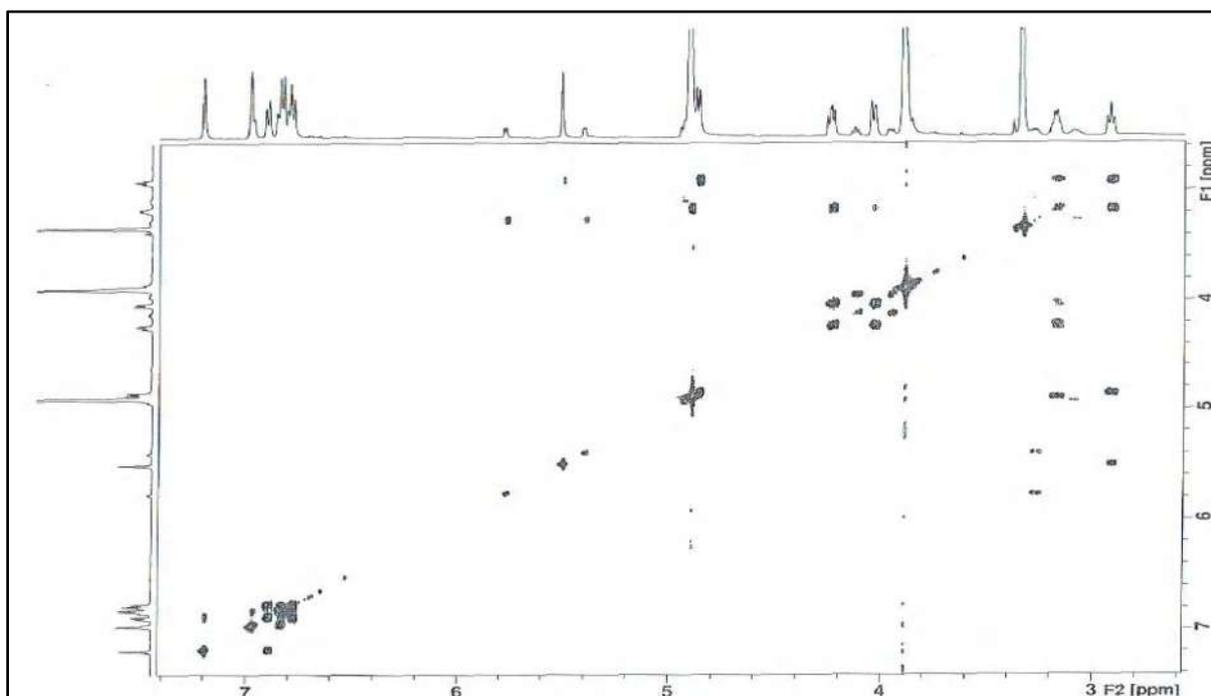
### III-17- Identification du produit GE12-7 :

Le composé **GE12-7** obtenu sous forme d'une huile incolore.

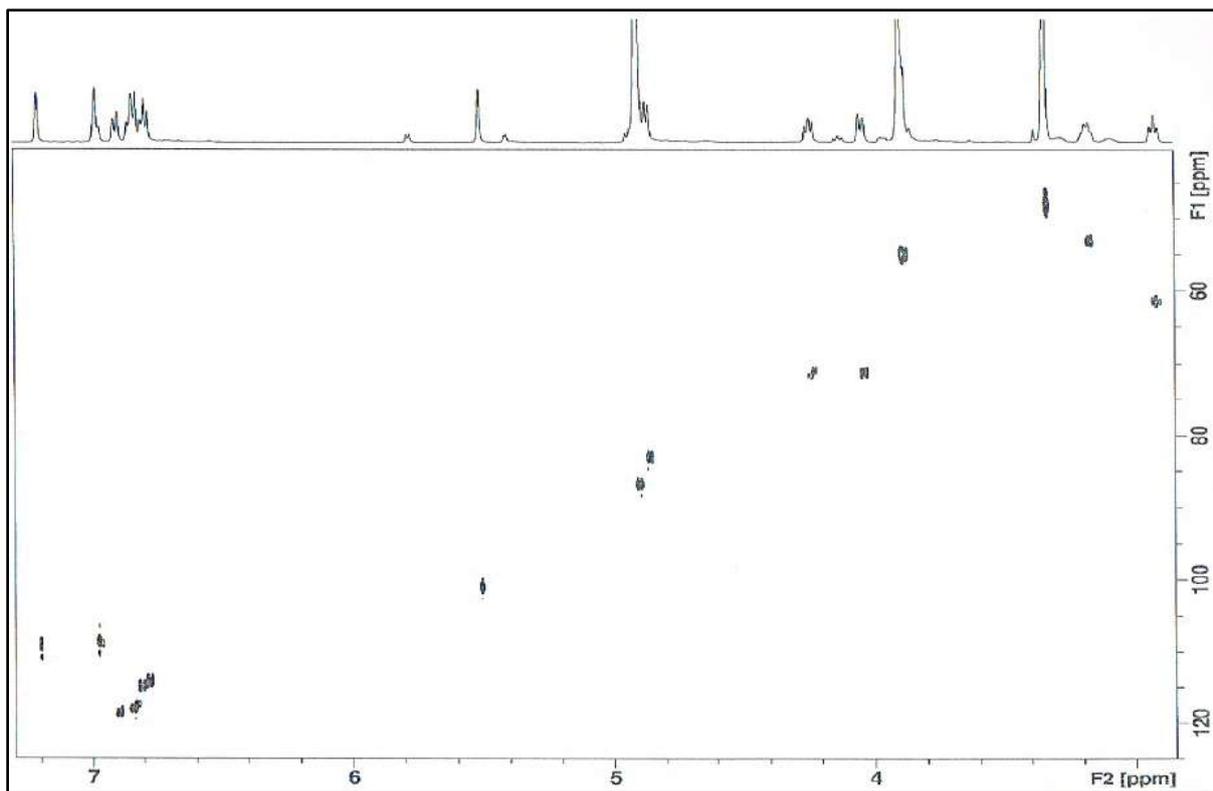
L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° III.65), COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (spectre n° III.66), et HSQC (spectre n° III.67), HMBC (spectre n° III.68), montre un spectre RMN  $^1\text{H}$  divisée en deux zones :



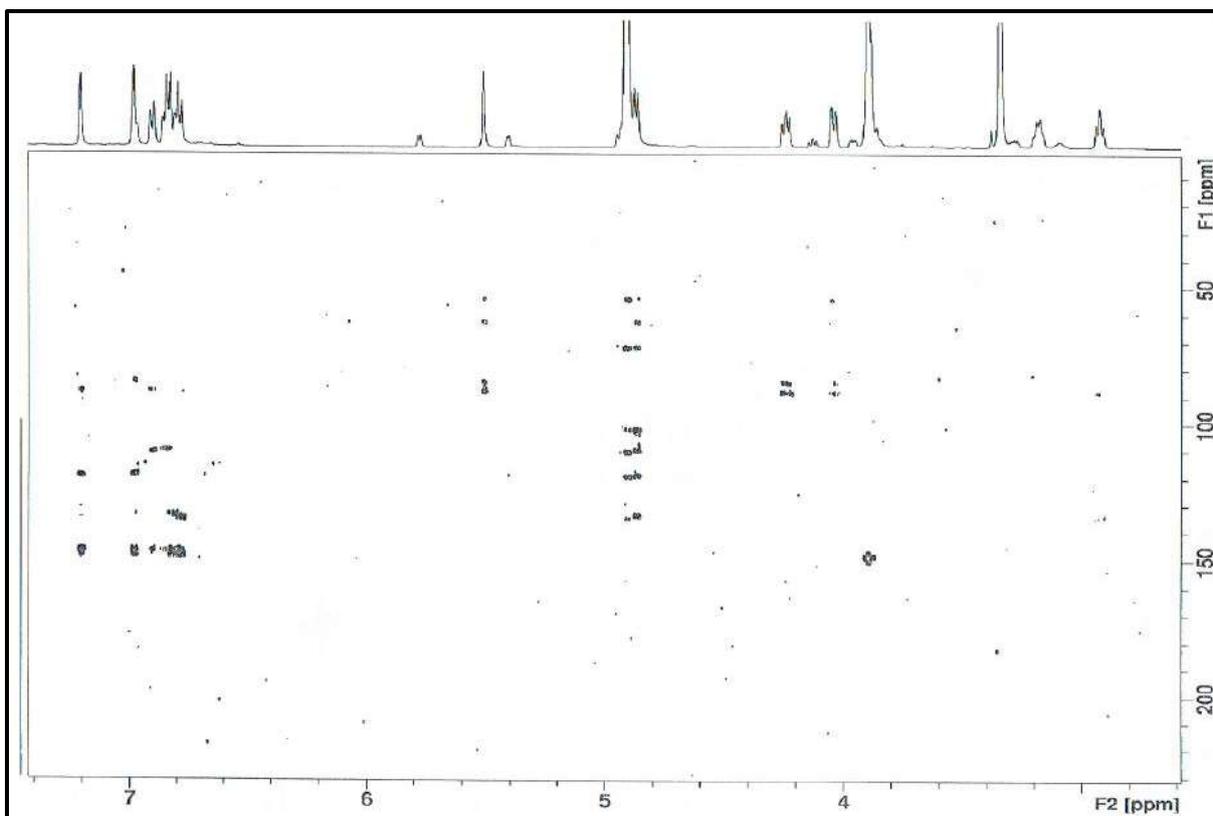
*Spectre n° III.65: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE12-7***



*Spectre n° III.66: Spectre COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE12-7***



*Spectre n° III.67: Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz CD<sub>3</sub>OD du composé GE12-7*

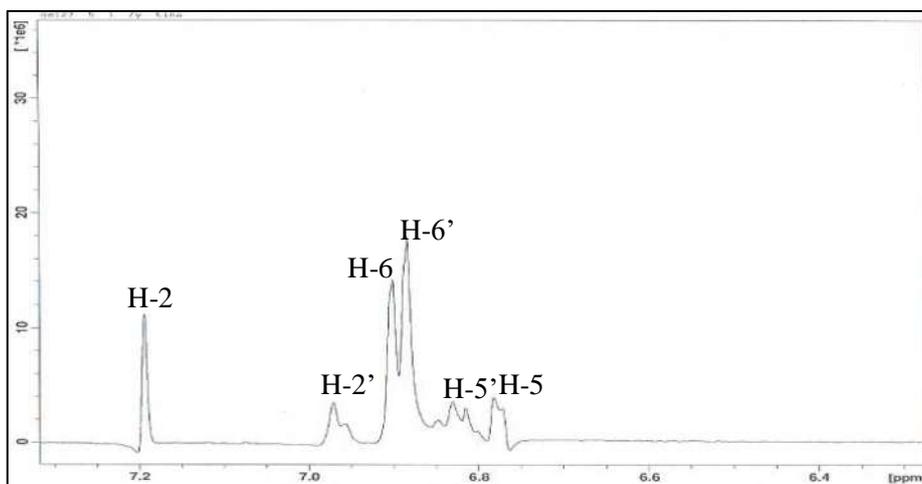


*Spectre n° III.68: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé GE12-7*

Zone aromatique :

Indique la présence de six protons aromatiques résonants entre  $\delta_H = 6,77$  et  $7,20$  ppm de deux noyaux aromatiques trisubstituée :

- Trois signaux constituant le premier système à  $\delta_H = 7,20$  (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz), à  $\delta_H = 6,89$  (1H, *dd*,  $J = 8,0 ; 2$  Hz) et à  $\delta_H = 6,77$  (1H, *d*,  $J = 8$  Hz), attribuables aux trois protons du premier noyau aromatiques H-2, H-6 et H-5 respectivement.
- Trois autre signaux constituant le deuxième système à  $\delta_H = 6,97$  (1H, *d*,  $J = 2$  Hz), à  $\delta_H = 6,84$  (1H, *dd*,  $J = 8,0 ; 2,0$  Hz) et à  $\delta_H = 6,82$  ppm (1H, *d*,  $J = 8$  Hz), attribuables aux trois protons du deuxième noyau aromatiques H-2', H-6' et H-5' respectivement.

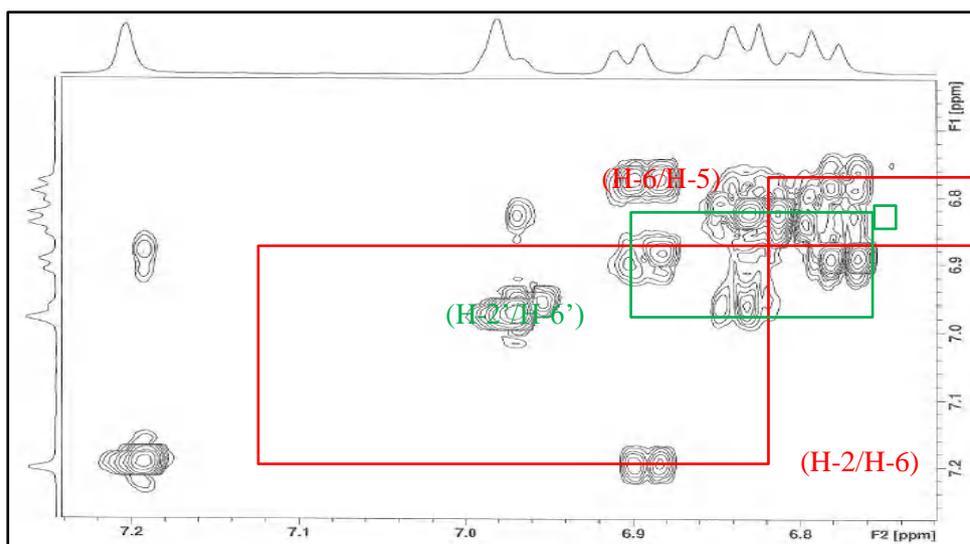


**Spectre n° III.65-1: Etallement Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE12-7**

Les déplacements chimique des carbones de ces six protons sont comme suit :  $\delta_{\text{C-2}} = 109,8$  ;  $\delta_{\text{C-5}} = 114,6$  ;  $\delta_{\text{C-6}} = 118,5$  ;  $\delta_{\text{C-2}'} = 108,9$  ;  $\delta_{\text{C-5}'} = 115,6$  ;  $\delta_{\text{C-6}'} = 118,0$ .

L'examen du spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et son étallement (spectres n° III.66 et III.66-1) montre des taches de corrélation suivantes :

- Une tache de corrélation entre le proton H-2 à  $\delta_H = 7,20$  ppm et un autre proton à  $\delta_H = 6,89$  qu'il est le proton H-6.
- Une tache de corrélation entre le proton H-6 à  $\delta_H = 6,89$  ppm et un autre proton à  $\delta_H = 6,77$  qu'il est le proton H-5.
- Une tache de corrélation entre le proton H-2' à  $\delta_H = 6,97$  ppm et un autre proton à  $\delta_H = 6,84$  qu'il est le proton H-6'.
- Une tache de corrélation entre le proton H-6' à  $\delta_H = 6,84$  ppm et un autre proton à  $\delta_H = 6,82$  qu'il est le proton H-5'.



**Spectre n° III.66-1: Étalement Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE12-7**

L'examen du spectre HMBC et son étalement (spectres n° III.68 et III.68-1) montre des taches de corrélation suivantes :

Le proton H-2 montre quatre taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 148,9$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4.
- La deuxième confirme le C-3 à  $\delta_C = 147,2$  ppm.
- La troisième confirme le C-6 à  $\delta_C = 119,9$  ppm.
- La quatrième confirme le C-7 à  $\delta_C = 86,5$  ppm

Le proton H-6 montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 147,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3.
- La deuxième confirme le C-2 à  $\delta_C = 111,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 86,0$  ppm attribuable à C-7.

Le proton H-5 montre deux taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 134,6$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1.
- La deuxième confirme le C-4 à  $\delta_C = 148,5$  ppm.

Le proton H-2' montre quatre taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 148,9$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4'.
- La deuxième confirme le C-3' à  $\delta_C = 147,0$  ppm.
- La troisième confirme le C-6' à  $\delta_C = 119,3$  ppm.
- La quatrième confirme le C-7' à  $\delta_C = 83,9$  ppm

Le proton H-6' montre trois taches de corrélation :

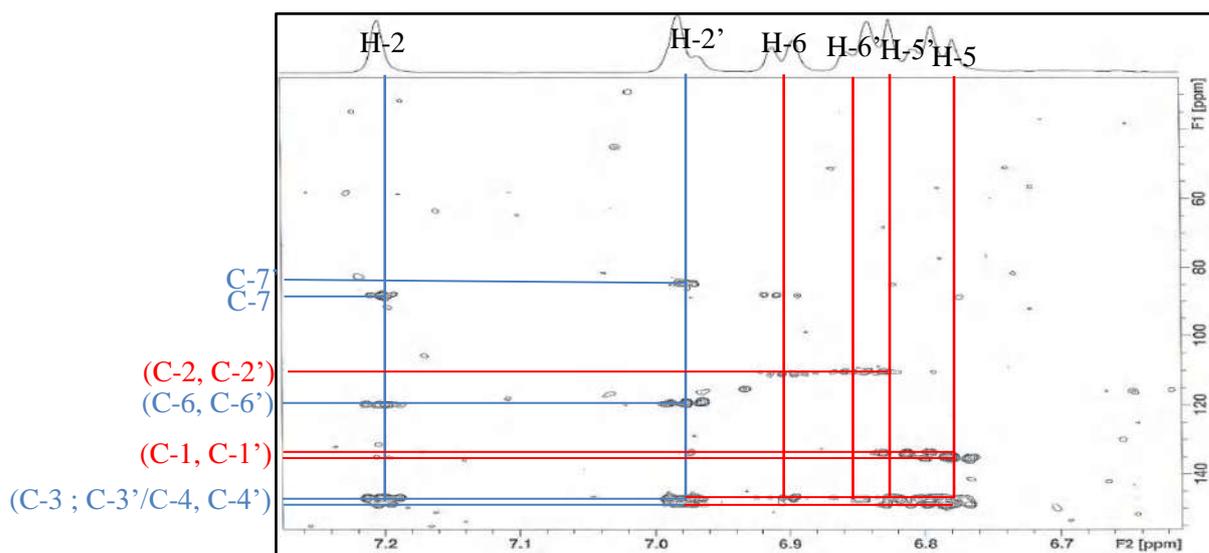
- La première avec le carbone à  $\delta_C = 146,9$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3'.
- La deuxième confirme le C-2' à  $\delta_C = 111,0$  ppm.

- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 84,0$  ppm attribuable à C-7'.

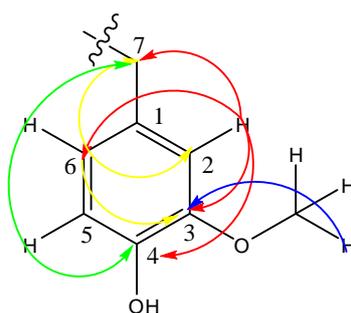
Le proton H-5' montre deux taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 135,4$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1'.
- La deuxième confirme le C-4' à  $\delta_C = 149,0$  ppm.

On observe une tache de corrélation entre un signal à  $\delta_H = 3,85$  ppm sous forme d'un singulier d'intégration 6H attribuer à 2OCH<sub>3</sub> avec un carbone à  $\delta_C = 147,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3 et C-3'.

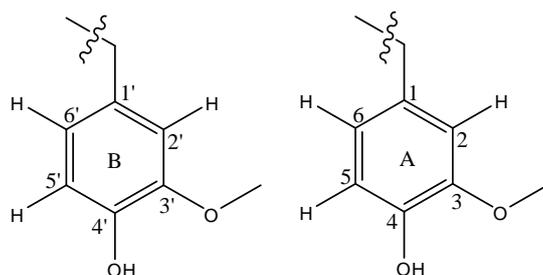


**Spectre n° III.68-1: Etallement Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé GE12-7**



**Figure n° III.20: Corrélations HMBC des protons aromatique du composé GE12-7**

A l'issue de ces résultats spectraux, les deux groupements aromatiques A et B

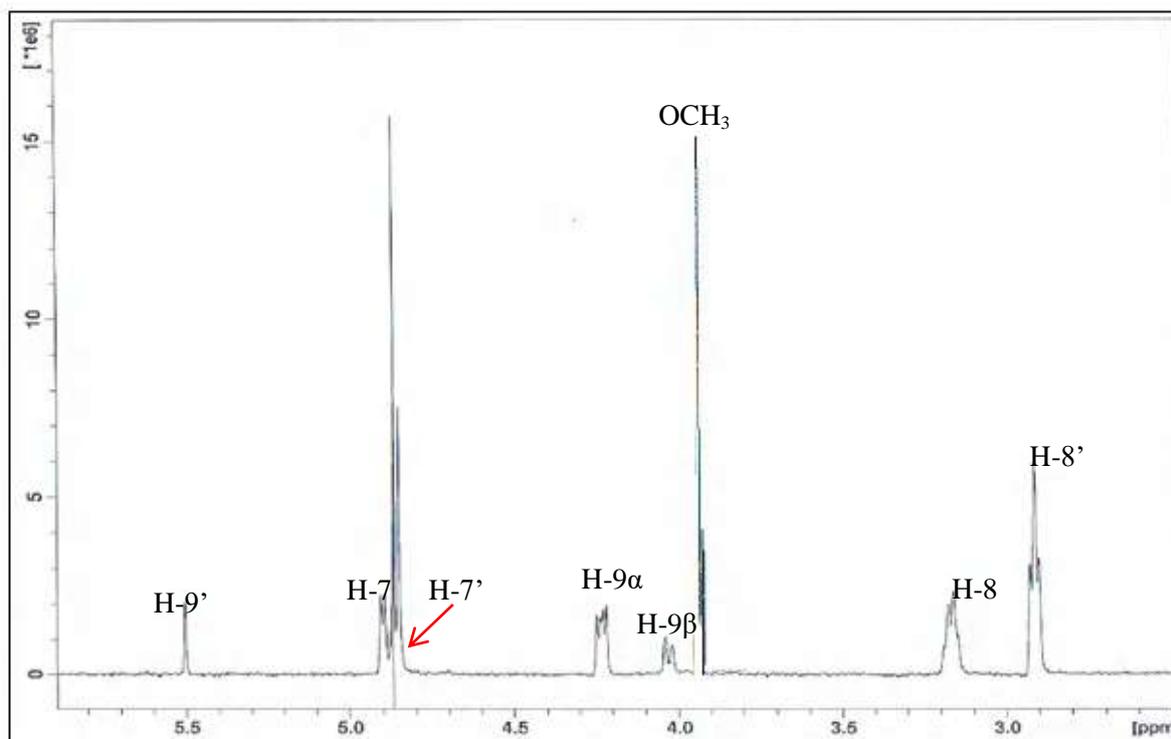


**Figure n° III.21:** Fragment 4-hydroxy-3-méthoxyphényle des cycles A et B du composé **GE12-7**

Zone aliphatique :

En plus des éléments structuraux identifiés précédemment, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° III.65), révèle la présence de huit signaux d'intégrant 1H pour chaque un.

- Trois sous forme de doublet sortant à  $\delta_{\text{H}}=5,52$  (IH, d,  $J = 1\text{Hz}$ ),  $\delta_{\text{H}}=4,90$  (IH, d,  $J = 6\text{ Hz}$ ) et  $\delta_{\text{H}}=4,84\text{ppm}$  (IH, d,  $J = 6\text{ Hz}$ ).
- Deux sous forme de doublet de doublet localisés à 4,03 (IH, *dd*,  $J = 9 ; 2\text{ Hz}$ ) et  $\delta_{\text{H}}=4,23\text{ ppm}$  (IH, *dd*,  $J = 9, 6\text{ Hz}$ ).
- Deux signaux sous forme multiple sortant à  $\delta_{\text{H}}=2,92\text{ ppm}$  et  $3,16\text{ ppm}$  (1H, m) pour chaque un.

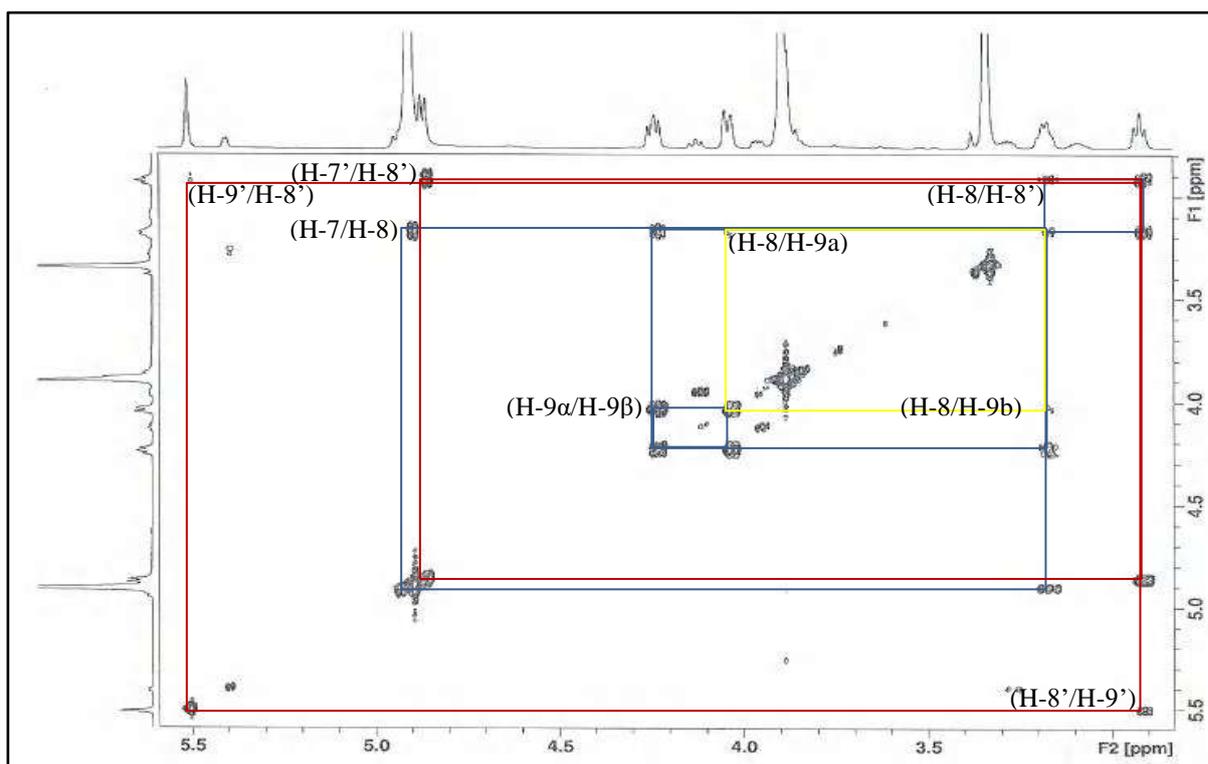


**Spectre n° III.65-2:** Etalement Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE12-7**

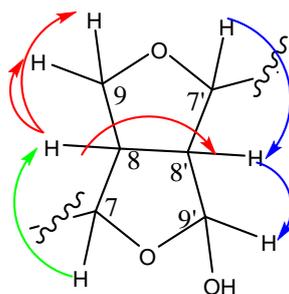
L'élucidation structurale de ce composé peut être débutée à partir des protons H-7 à  $\delta_{\text{H}}=4,90\text{ppm}$  et H-7' à  $\delta_{\text{H}}=4,84\text{ppm}$  qui sont portés sur les carbones C-7  $\delta_{\text{C}}=86,0$  et C-7'  $\delta_{\text{C}}=84,0\text{ppm}$ .

L'examen du spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (spectre n° III.66-2), montre :

- Une tache de corrélation entre le proton H-7 à  $\delta_{\text{H}}=4,90\text{ ppm}$  et autre proton à  $\delta_{\text{H}}=3,16$  qui ne peut être que le proton H-8.
- trois taches de corrélations entre le proton H-8 à  $\delta_{\text{H}}=3,16\text{ ppm}$  et trois autres protons (deux doublet de doublet et un triplé) à  $\delta_{\text{H}}=4,23, 4,03$  et  $\delta_{\text{H}}=2,92\text{ ppm}$  qui ne peut être que les protons H-9 $\alpha$ , H-9 $\beta$ , H-8' respectivement.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7' à  $\delta_{\text{H}}=4,84\text{ ppm}$  et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}=2,92$  qui ne peut être que le proton H-8'.
- Une tache de corrélation entre le proton H-8' à  $\delta_{\text{H}}=2,92\text{ ppm}$  et un autre proton à  $\delta_{\text{H}}=5,52$  qui ne peut être que le proton H-9'.



**Spectre n° III.66-2: Etallement Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE12-7**



**Figure n° III.22 :** Corrélations COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H des protons oxyméthines du composé GE12-7

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Spectre III.67) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_C = 53,16$  ppm et attribuables à C-8.
- Une tache de corrélation entre (H-9a, H-9b) et un atome de carbone à  $\delta_C = 71,0$  ppm attribuables à C-9.
- Une tache de corrélation entre H-8' et un atome de carbone à  $\delta_C = 61,5$  ppm et attribuables à C-8'.
- Une tache de corrélation entre H-9' et un atome de carbone à  $\delta_C = 101,2$  ppm qui est le C-9'.
- Une tache de corrélation entre les protons de méthoxyle et un atome de carbone à  $\delta_C = 55,0$  ppm et attribuables à OCH<sub>3</sub>.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° III.68-2) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H-7 montre six taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 135,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1.
- La deuxième confirme le C-6 à  $\delta_C = 119,6$  ppm.
- La troisième confirme le carbone à  $\delta_C = 111,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-2.
- La quatrième confirme le carbone à  $\delta_C = 102,1$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9'.
- La cinquième confirme le C-9 à  $\delta_C = 71,5$  ppm.
- La sixième confirme le carbone à  $\delta_C = 53,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-8.

Le proton H-9a et H-9b montrent deux taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 86,0$  ppm confirme le C-7.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 84,0$  ppm attribuable à C-7'.

Le proton H-7' montre six taches de corrélation :

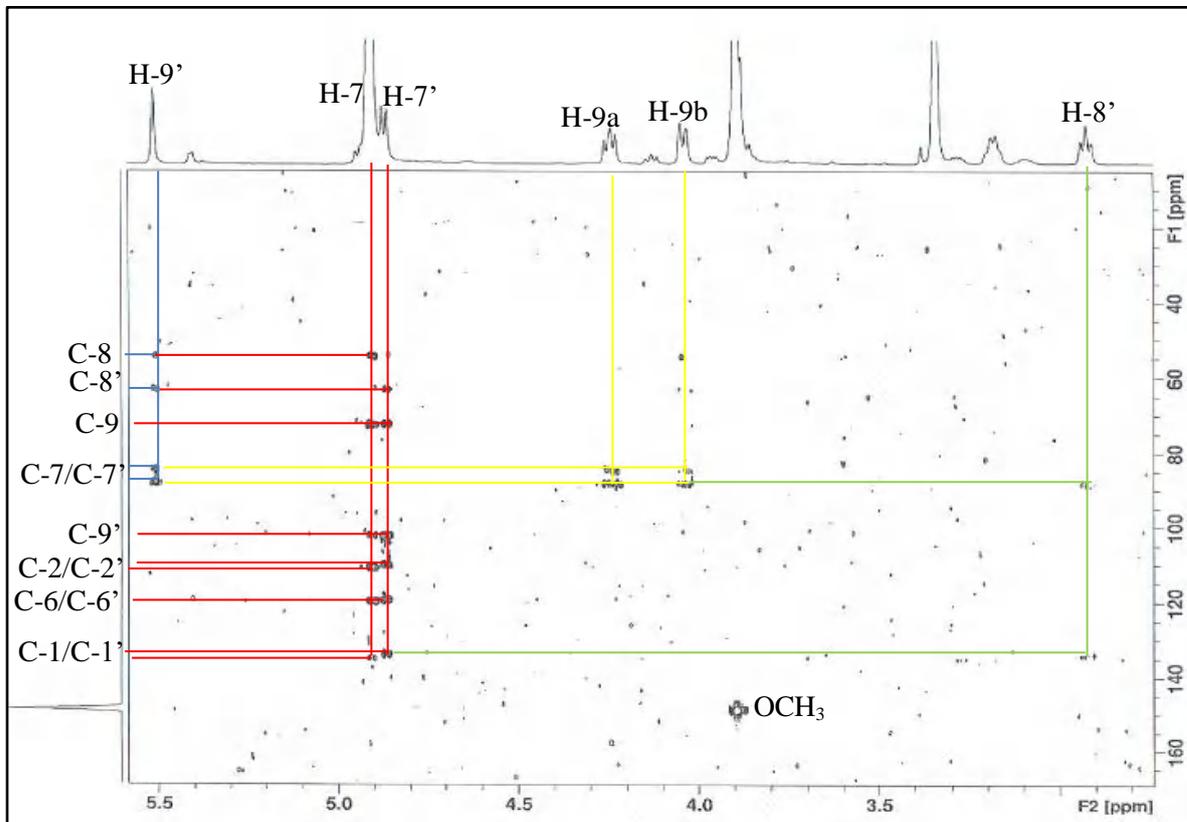
- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 134,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1'.
- La deuxième confirme le C-6' à  $\delta_C = 119,6$  ppm.
- La troisième confirme le carbone à  $\delta_C = 110,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-2'.
- La quatrième confirme le carbone à  $\delta_C = 102,1$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9'.
- La cinquième confirme le C-9 à  $\delta_C = 71,5$  ppm.
- La sixième confirme le carbone à  $\delta_C = 62,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-8'

Le proton H-8' montre deux taches de corrélation :

- La première confirme le carbone à  $\delta_C = 134,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1'.
- La deuxième confirme le C-8 à  $\delta_C = 86,0$  ppm.

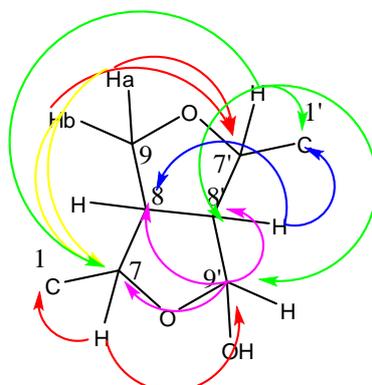
Le proton H-9' montre quatre taches de corrélation :

- la première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 86,0$  ppm confirme le C-7.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 84,0$  ppm attribuable à C-7'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 62,0$  qui ne peut être que C-8'.
- La quatrième confirme le C-8 à  $\delta_C = 53,0$  ppm.



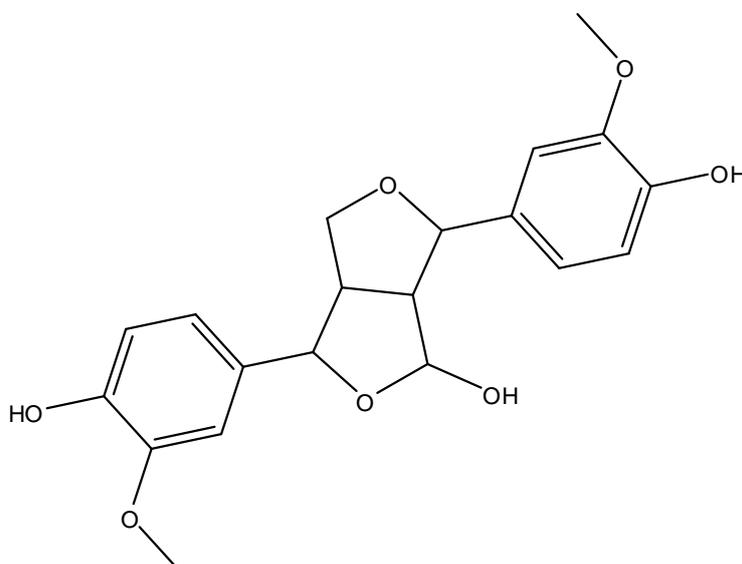
**Spectre n° III.68-2: Etallement Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) du composé GE12-7**

Le spectre HMBC montre des corrélations H/C en  $3J$  Schéma n° III.23 conduisant à la formation d'un squelette de type furofurane à travers les couplages des protons oxyméthines :



**Figure n° III.23 :** Corrélations HMBC des protons oxyméthines  
du composé GE12-7

L'analyse de ces spectres (RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC) a permis d'identifier le composé **GE12-7** comme étant [111] t *9 $\alpha$ -hydroxypinoresinol*



**Figure n° III.24:** la structure du *9 $\alpha$ -hydroxypinoresinol*

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le **tableau n° III-17**

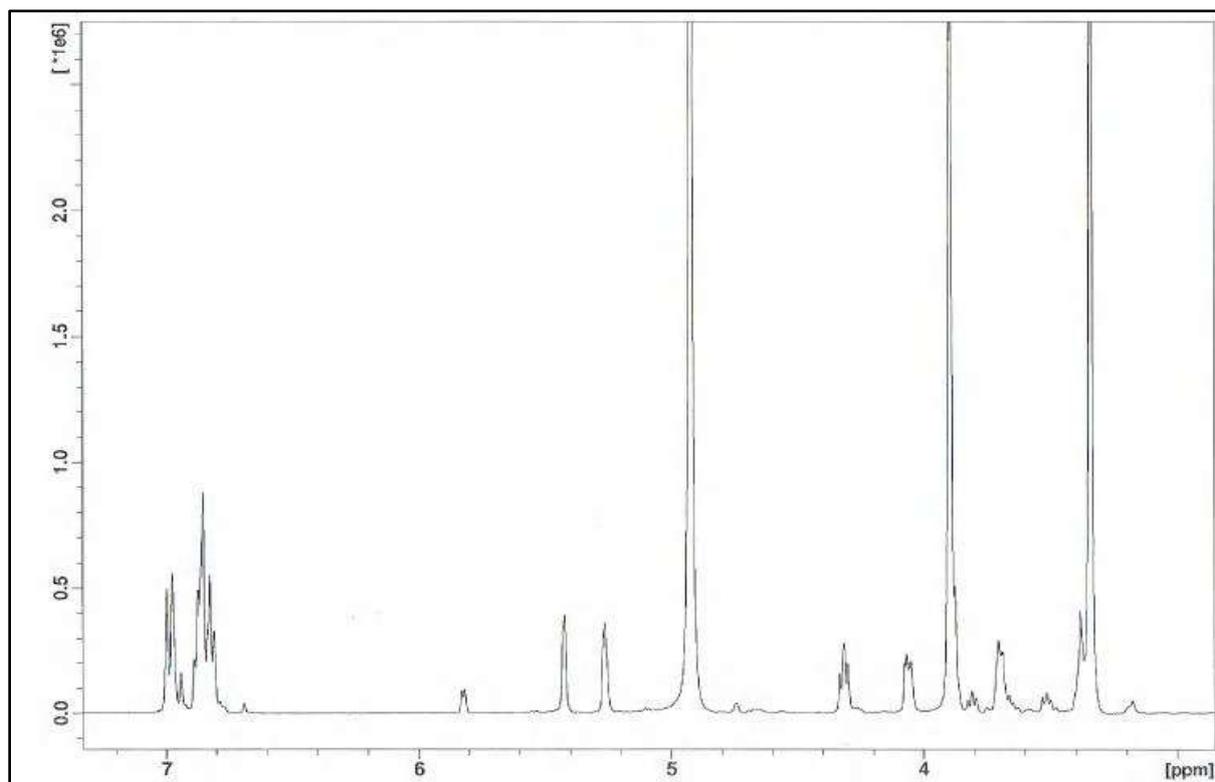
**Tableau n° III.17 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (MeOD) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE12-7**

<b>position</b>	<b>C <math>\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta</math>H (ppm), (m, J (Hz))</b>
1	135,0	-
2	109,8	7,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz),
3	147,0	-
4	149,0	-
5	114,6	6,77 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
6	118,5	6,89 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 ; 2 Hz)
7	86,0	4,90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)
8	53,2	3,16 (1H, <i>m</i> )
9a	71,0	4,23 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9, 6 Hz)
9b		4,03 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9, 2 Hz)
1'	134,5	-
2'	108,9	6,97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)
3'	147,0	-
4'	149,0	-
5'	115,6	6,82 ppm (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
6'	118,0	6,84 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 ; 2,0 Hz)
7'	84,0	4,84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)
8'	61,5	2,92 (1H, <i>m</i> )
9'	101,2	$\delta$ H 5,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1Hz)
OCH <sub>3</sub>	55,0	3,87 <i>s</i>

### III-18- Identification du produit GE13-10 :

L'analyse combinée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre n° III.69), de la région aromatique indique la présence d'un système ABX. En effet, on observe:

- Un massif de signaux résonants dans le champ faible entre à  $\delta_{\text{H}}= 6,81$  et à  $\delta_{\text{H}}= 6,98$  et s'intégrant pour six protons, caractéristiques des protons aromatiques des deux noyaux aromatique trisubstituer.  $\delta_{\text{H}}= 6,95$  (*d*;  $J = 1,5$  Hz; H-2'),  $\delta_{\text{H}}=6,98$  (*d*;  $J = 1,5$  Hz; H-2''),  $\delta_{\text{H}}=6,86$  (*dd*;  $J = 8,5$  et  $1,5$  Hz; H-6' et H-6'') et  $\delta_{\text{H}}=6,81$  (*d*;  $J = 8,5$  Hz; H-5' et H-5''). Leurs carbones sont déterminés par expérience HSQC à (spectre n° III.71),  $\delta_{\text{C}}$  108,5 (C-2 et C-2'), 114,9 (C-5 et C-5') et 119,6 (C-6 C-6').
- Deux signales sous forme d'un singulet large repéré à  $\delta_{\text{H}}= 5,42$  et  $\delta_{\text{H}}=5,26$  ppm correspondent à deux protons  $^2\text{HC-O}$  attribuable au H-7 et H-7'.
- Quatre signaux sont détecté à  $\delta_{\text{H}}=4,31$  (*dd*;  $J = 8,8$  et  $6,8$  Hz; H-9 $\alpha$ ),  $\delta_{\text{H}}= 4,04$  (*ddl*;  $J = 6,8$ ;  $4,5$  Hz; H-9 $\beta$ ),  $\delta_{\text{H}}=3,67$  (*dd*;  $J = 8,8$  Hz; H-5),  $\delta_{\text{H}}=3,37$  (*td* Hz; H-1),.
- Un signale sous forme d'un singulet repéré à  $\delta_{\text{H}}=3,89$  ppm d'intégration six protons correspond à deux groupements méthoxyle.



**Spectre n° III.69:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé GE13-10

L'examen du spectre HMBC (spectres n° III.72 et III.72-1) montre les taches de corrélation suivantes :

Le proton H-2' montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 147,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3'.
- La deuxième confirme le C- 6' à  $\delta_C = 119,3$  ppm.
- La troisième confirme le C-6 à  $\delta_C = 84,0$  ppm.

Le proton H-6' montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 148,3$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4'.
- La deuxième confirme le C-2' à  $\delta_C = 110,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 84,0$  ppm attribuable à C-6.

Le proton H-5' montre deux taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 132,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1'.
- La deuxième confirme le C-4' à  $\delta_C = 148,3$  ppm.

Le proton H-2'' montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 147,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3''.
- La deuxième confirme le C- 6'' à  $\delta_C = 119,3$  ppm.
- La troisième confirme le C-2 à  $\delta_C = 86,0$  ppm.

Le proton H-6'' montre trois taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 148,3$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4''.
- La deuxième confirme le C-2'' à  $\delta_C = 110,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 86,0$  ppm attribuable à C-2

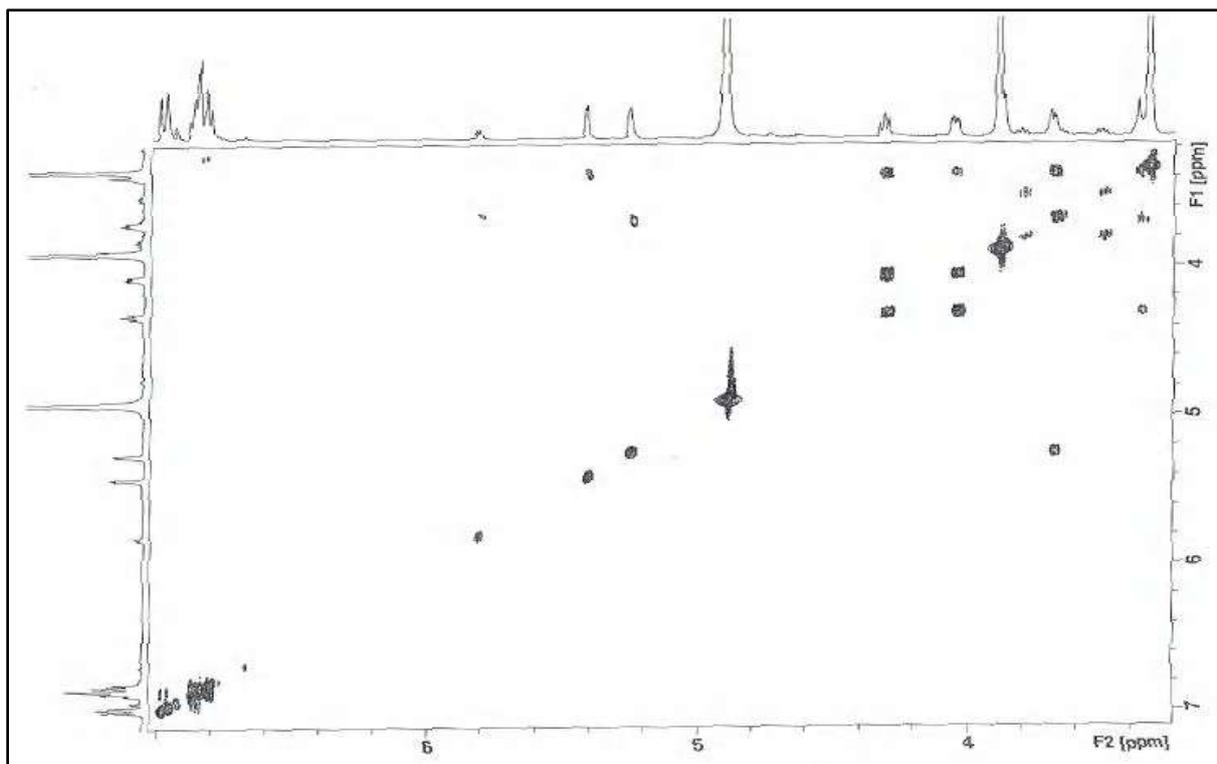
Le proton H-5'' montre deux taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 132,5$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-1''.
- La deuxième confirme le C-4'' à  $\delta_C = 148,3$  ppm.

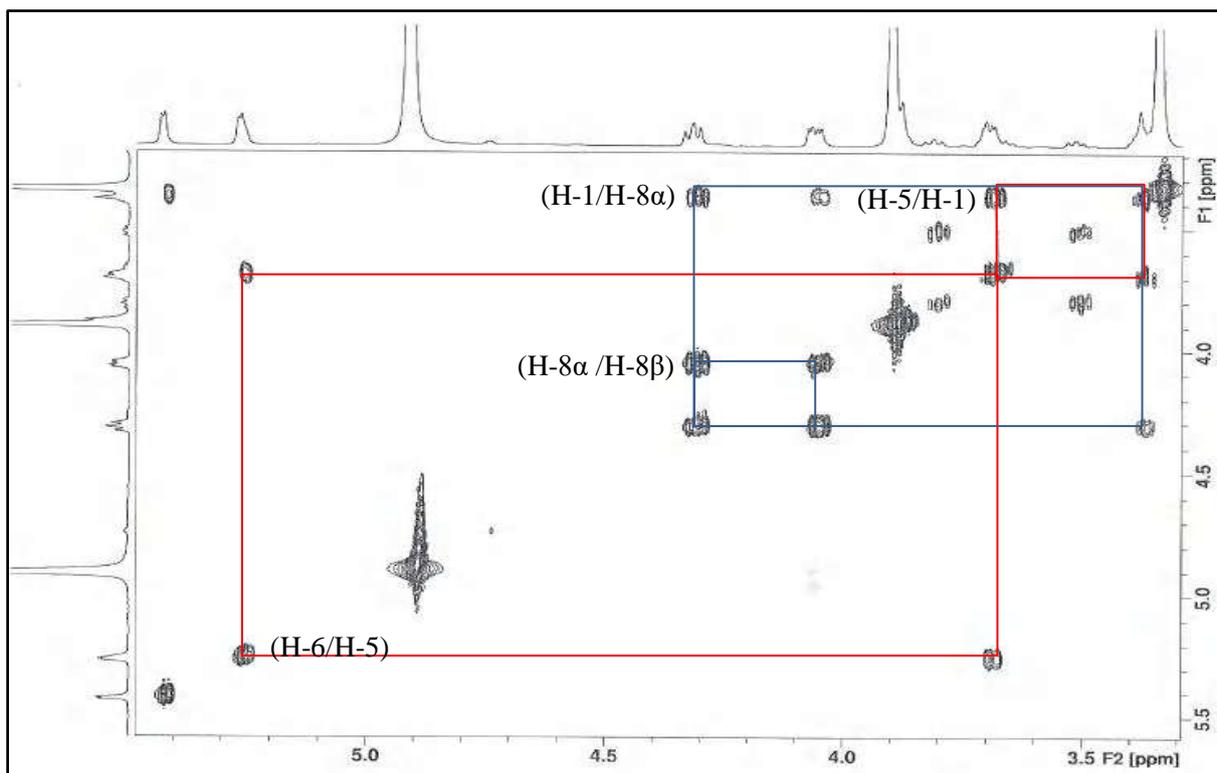
L'élucidation structurale de ce composé peut être débutée à partir des protons H-2 ( $\delta_H = 5,41$ ) et H-6 ( $\delta_H = 5,26$ ) qu'ils sont déjà déterminer à partir de leurs carbones porteurs C-2 ( $\delta_C = 86,0$  ppm) et C-6 ( $\delta_C = 84,0$  ppm), selon le spectre HSQC (spectre n° III.71).

L'examen du spectre COSY  $^1\text{H-H}$  et son étalement (spectres n° III.70 et III.70-1) montre des taches de corrélation suivantes :

- Une tache de corrélation entre le proton H-6 à  $\delta_H = 5,26$  ppm et un autre proton à  $\delta_H = 3,67$  qu'il est le proton H-5.
- Une tache de corrélation entre le proton H-5 à ppm et un autre proton à  $\delta_H = 3,37$  qu'il est le proton H-1.
- Une tache de corrélation entre le proton H-1 et un autre proton  $\delta_H = 4,31$  qu'il est le proton H-8 $\alpha$ .
- Une tache de corrélation entre le proton H-8 $\alpha$  et le proton H-8 $\beta$ .



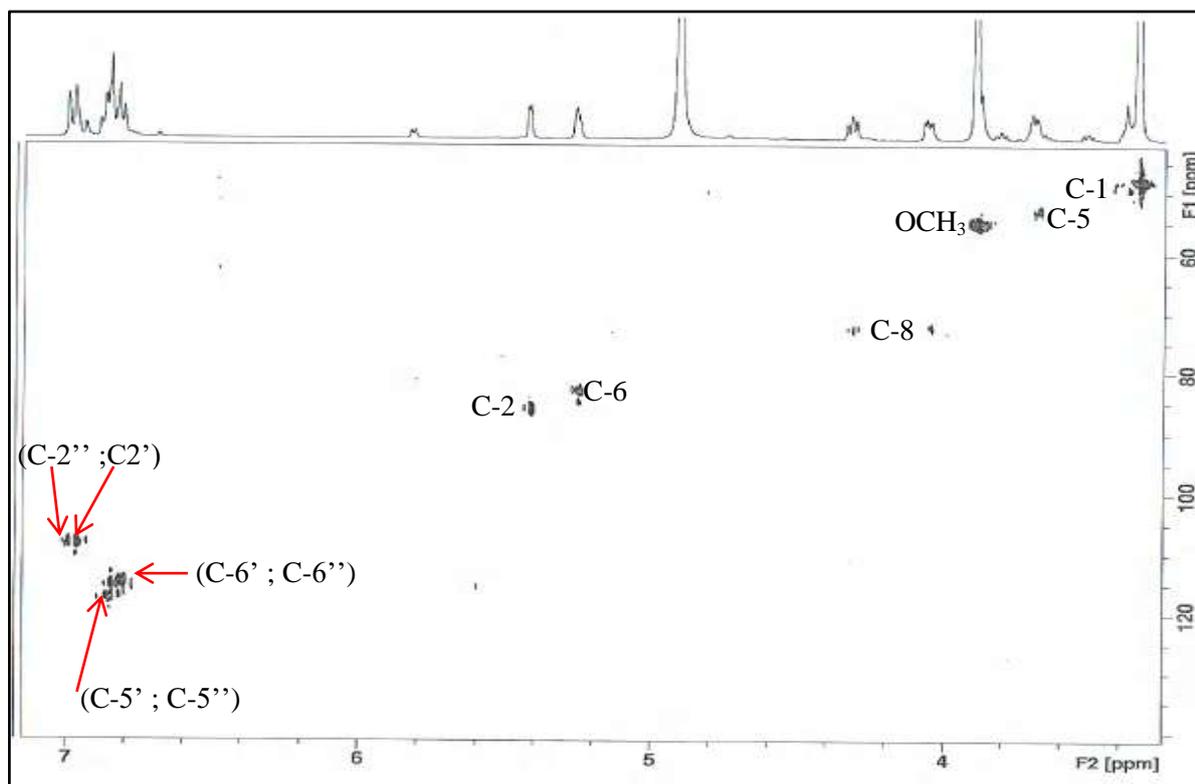
*Spectre n° III.70: Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE13-10*



*Spectre n° III.70-1: Etalement Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé GE13-10*

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (spectre III.71).

- Une tache de corrélation entre les protons (H-8 $\alpha$ , H-8 $\beta$ ) et l'atome de carbone C-8 à  $\delta_C = 72,2$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2 et l'atome de carbones C-2 à  $\delta_C = 86,0$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6 et l'atome de carbones C-6 à  $\delta_C = 84,0$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-5 et l'atome de carbones C-5 à  $\delta_C = 54,0$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-1 et l'atome de carbones C-1 à  $\delta_C = 50,5$  ppm.



**Spectre n° III.71:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz CD<sub>3</sub>OD du composé **GE3-27**

L'examen du spectre HMBC (spectres n° III.48 et III.48-1) montre également les taches de corrélation suivantes :

Le proton H-2 montre sept taches de corrélation :

- La première avec le carbone  $\delta_C = 178,9$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-4. qu'il est sous forme d'un carbonyle C=O.
- La deuxième confirme le C-1' à  $\delta_C = 132,9$  ppm.
- La troisième confirme le C-6' à  $\delta_C = 119,1$  ppm.
- La quatrième confirme le C-2' à  $\delta_C = 109,9$  ppm.
- La cinquième confirme le C-8 à  $\delta_C = 72,2$  ppm
- La sixième confirme le C-5 à  $\delta_C = 53,9$  ppm
- La septième confirme le C-1 à  $\delta_C = 50,5$  ppm

Le proton H-8 $\alpha$  montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 86,5\text{ppm}$  qui ne peut être attribué qu'au C-2.

Le proton H-8 $\beta$  montre quatre taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 86,5\text{ppm}$  qui ne peut être attribué qu'au C-2.
- La deuxième confirme le C-6 à  $\delta_C = 84,0\text{ ppm}$ .
- La troisième confirme le C-5 à  $\delta_C = 54,0\text{ ppm}$ .
- La quatrième confirme le C-1 à  $\delta_C = 50,0\text{ ppm}$

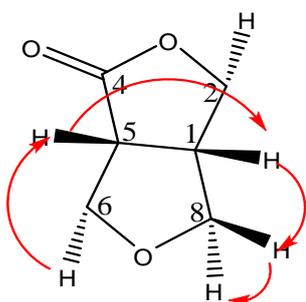
Le proton H-5 montre cinq taches de corrélation :

- La première avec le carbone à  $\delta_C = 178,9\text{ ppm}$  qui ne peut être attribué qu'au C-4.
- La deuxième confirme le C-1'' à  $\delta_C = 133,0\text{ ppm}$ .
- La troisième confirme le C-2 à  $\delta_C = 86,5\text{ ppm}$ .
- La quatrième confirme le C-6 à  $\delta_C = 84,0\text{ ppm}$ .
- La cinquième confirme le C-8 à  $\delta_C = 73,3\text{ ppm}$ .
- La sixième confirme le C-1 à  $\delta_C = 50,0\text{ ppm}$ .

Le proton H-6 montre six taches de corrélation :

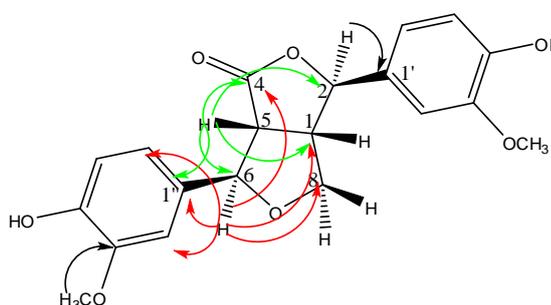
- La première avec le carbone à  $\delta_C = 178,9\text{ ppm}$  qui ne peut être attribué qu'au C-4.
- La deuxième confirme le C-1'' à  $\delta_C = 132,9\text{ ppm}$ .
- La troisième confirme le C-6'' à  $\delta_C = 119,1\text{ ppm}$ .
- La quatrième confirme le C-2'' à  $\delta_C = 109,9\text{ ppm}$ .
- La cinquième confirme le C-8 à  $\delta_C = 72,2\text{ ppm}$
- La sixième confirme le C-1 à  $\delta_C = 50,5\text{ ppm}$ .

Les protons des méthoxyles montrent une tache de corrélation avec les carbone à  $\delta_C=147,4\text{ppm}$  qui ne peut être attribué qu'au C-3' et C-3''.

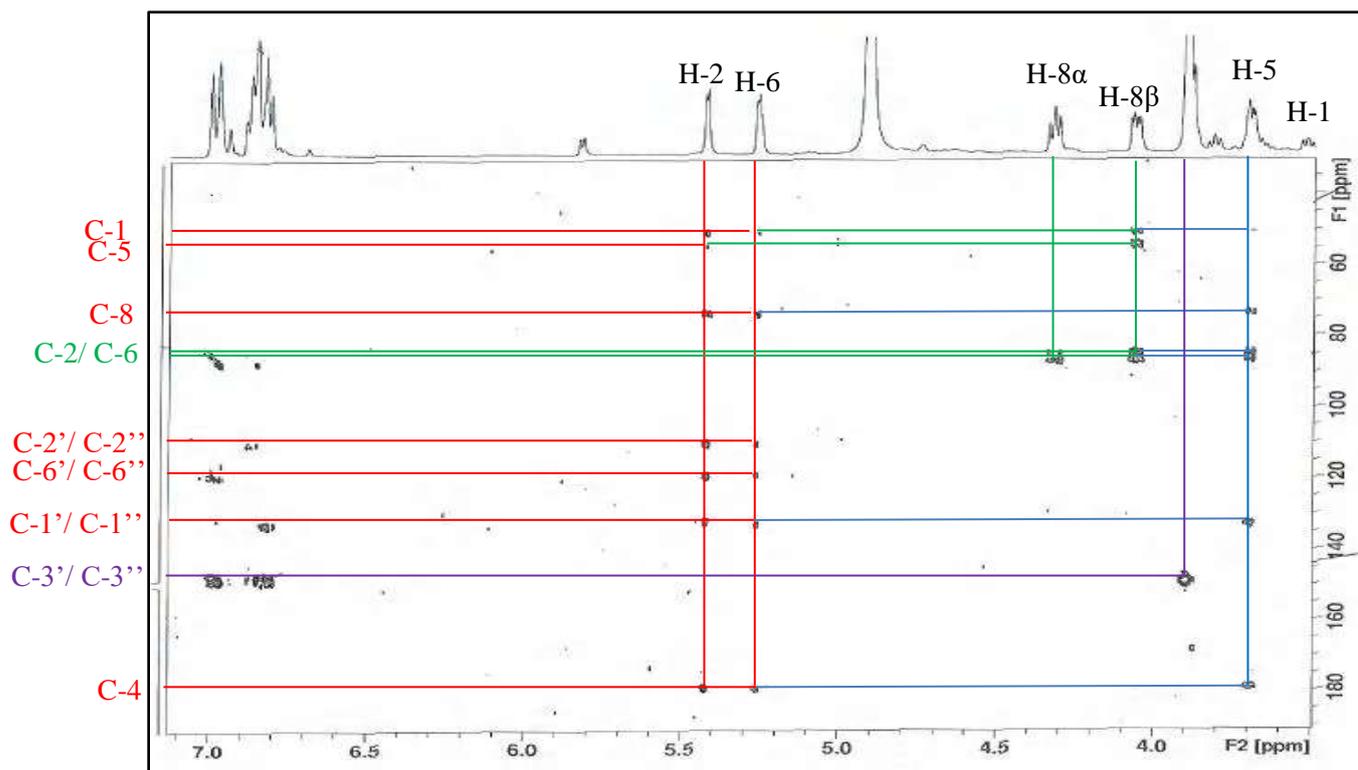


**Figure n° III.25: Principales  
corrélations COSY du composé**

**GE13-10**

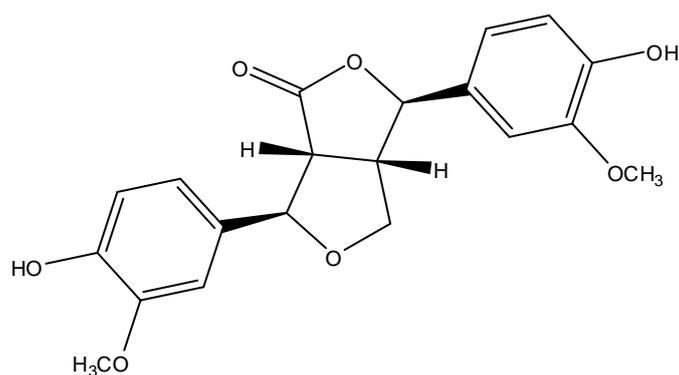


**Figure n° III.26: Principales corrélations HMBC du  
composé GE13-10**



*Spectre n° III-72: Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé GE13-10*

A partir de toutes ces données, la structure du composé GE13-10 a donc pu être établie comme étant [107] : **4-ketopinoresinol**



*Figure n° III.27: la structure du 4-ketopinoresinol*

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-18

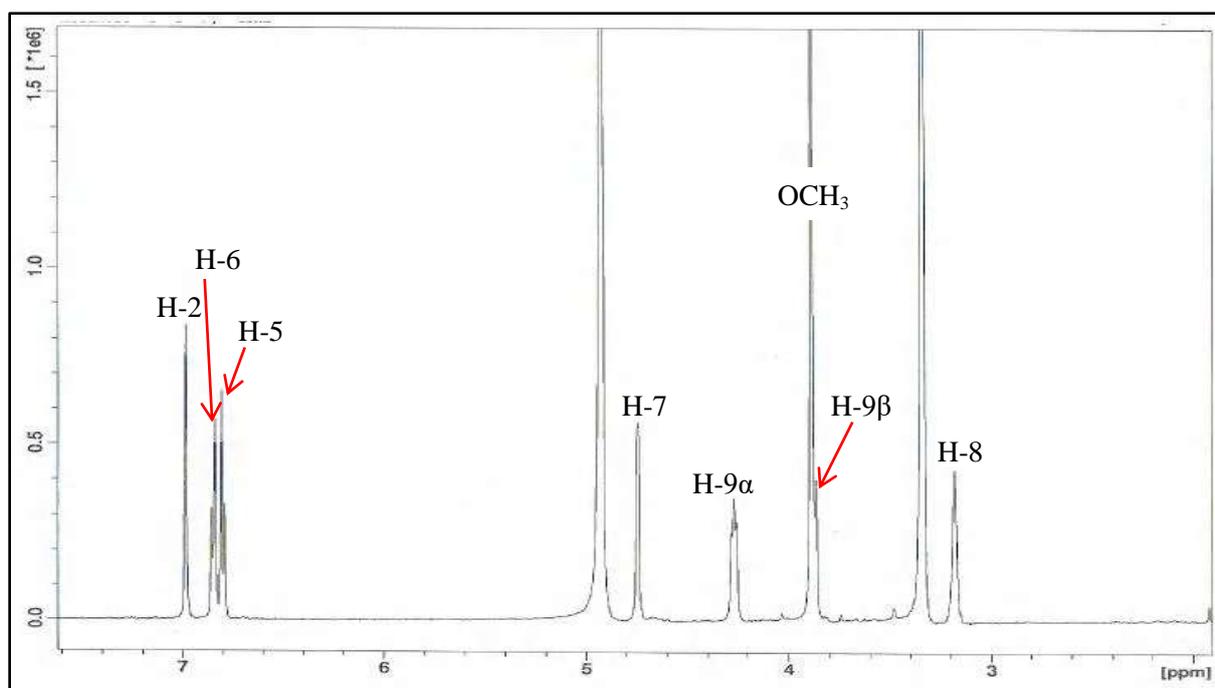
**Tableau n° III.18 : Données de la spectrométrie RMN <sup>1</sup>H (MeOD) ; 600 MHz  
RMN <sup>13</sup>C (MeOD ; 150 MHz de GE12-7**

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta$ H (ppm), (m, J (Hz))
1	50,5	3,16
2	86,0	5,42
3	-	-
4	178,9	-
5	54,0	3,67 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz)
6	84,0	5,26 (d, J = 4,5 Hz)
7	-	-
8 $\alpha$	72,9	4,31 (dd, J = 8,8 et 6,8 Hz)
8 $\beta$		4,04 (dd, J = 8,8; 3,3 Hz)
1'	133,3	-
2'	108,5	$\delta$ H 6,95 (d; J = 1,5 Hz; H-2')
3'	147,5	-
4'	148,0	-
5'	114,9	6,81 (d; J = 8,5 Hz)
6'	119,9	6,86 (dd; J = 8,5 et 1,5 Hz)
1''	133,3	-
2''	108,5	6,98 (d; J = 1,5 Hz)
3''	147,5	-
4''	148,3	-
5''	114,9	6,81 (d; J = 8,5 Hz)
6''	119,9	6,86 (dd; J = 8,5 et 1,5 Hz)
OCH <sub>3</sub>	55,0	3,89 s

### III-19- Identification du produit GE13-18 :

L'analyse combinée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre n III-73) de la région aromatique indique la présence de deux systèmes ABX comme le spectre de produit GE12-7 .En effet, on observe:

- Trois signaux résonant à  $\delta_{\text{H}}= 6,94$  (*d*;  $J = 1,5$  Hz; H-2),  $\delta_{\text{H}}=6,83$  (*dd*;  $J = 8,5$  et  $1,5$  Hz; H-6) et  $\delta_{\text{H}}=6,78$  (*d*;  $J = 8,5$  Hz; H-5) sont attribués aux protons aromatiques appartenant à un même système de spins. Leurs carbones sont déterminés par expérience HSQC (spectre n III-74) à  $\delta_{\text{C}} 110,3$  (C-2),  $115,6$  (C-5) et  $119,4$  (C-6).
- Quatre signaux sont détecté à  $\delta_{\text{H}}= 4,73$  (*d*;  $J = 4,5$  Hz; H-7),  $\delta_{\text{H}}=3,17$  (*ddl*;  $J = 6,8; 4,5$  Hz; H-8),  $\delta_{\text{H}}=4,27$  (*dd*;  $J = 8,8$  et  $6,8$  Hz; H-9 $\alpha$ ) et  $\delta_{\text{H}}=3,81$  (*dd*;  $J = 8,8; 3,3$  Hz; H-9 $\beta$ ).
- Deux signales sous forme d'un singulet repéré à  $3,88$  et  $3,81$ ppm correspondent à deux groupements méthoxyle.

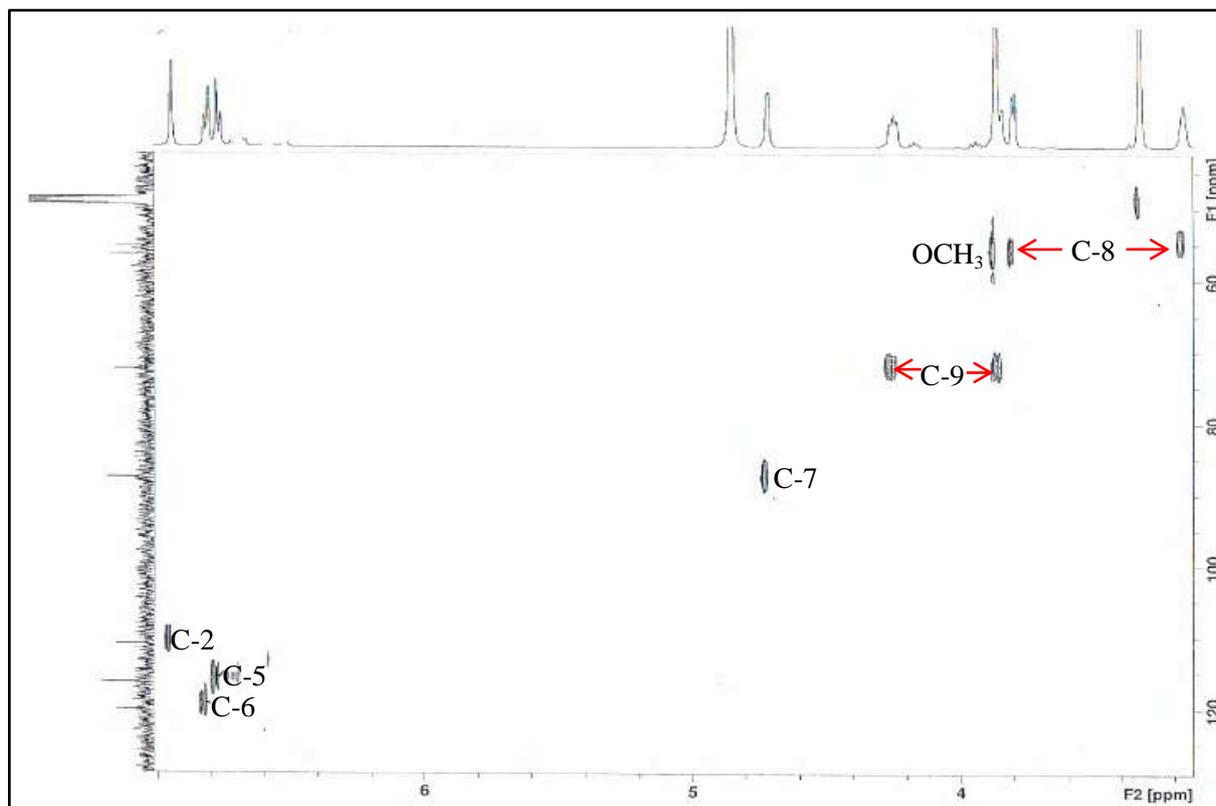


**Spectre n° III.23:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE13-18**

A travers le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (spectre n III-74) on a pu relier chacun des protons identifiés avec son carbone porteur :

- Une tache de corrélation entre H-7 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 87,6$  ppm attribuables à C-7.
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}} = 55,3$  ppm attribuables à C-8.
- Une tache de corrélation entre les protons (H-9 $\alpha$  et H-9 $\beta$ ) et un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}}=72,3$ ppm et attribuables à C-9.

- Une tache de corrélation entre les protons des méthoxyles et un atome de carbone à  $\delta_C = 56,0$  ppm et attribuables au carbone de méthoxyle.



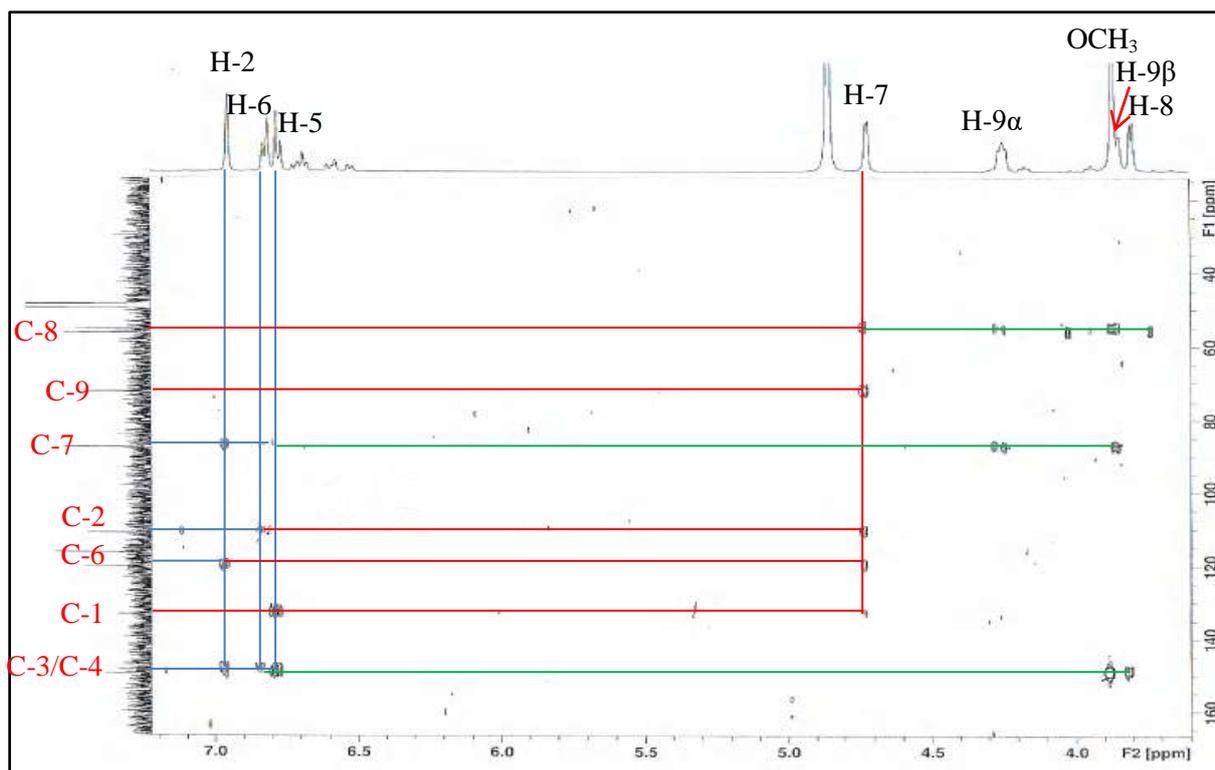
**Spectre n° III.74:** Spectre HSQC (600 MHz, 150 MHz  $CD_3OD$  du composé **GE13-18**

L'élucidation structurale de ce composé peut être débutée à partir du proton H-7 ( $\delta_H = 4,73$  ppm). Ce dernier montre des taches de corrélations sur le spectre HMBC (spectre n III-75) avec deux carbones aromatiques C-2 ( $\delta_C = 110,4$ ) et C-6 ( $\delta_C = 119,5$ ), ainsi qu'avec un carbone aromatique quaternaire résonant à  $\delta_C = 132,1$  ne pouvant être que le carbone C-1.

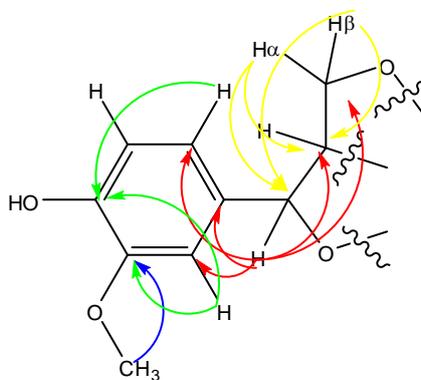
Le proton H-7 présente aussi des corrélations en HMBC avec les carbones C-8 ( $\delta_C = 53,3$  ppm; CH) et C-9 ( $\delta_C = 72,1$  ppm;  $CH_2-O$ ).

En plus de ces corrélations, les deux protons H-2 ( $\delta_H = 6,94$  ppm) et H-6 ( $\delta_H = 6,83$  ppm) corrélient en  $3J$  avec un carbone aromatique oxygéné détecté à  $\delta_C = 147,8$  attribuable au carbone C-4. Le proton H-2 montre également une tache de corrélation avec un carbone résonant à  $\delta_C = 148,3$  ppm correspondant au carbone C-3. Sa valeur déblindée indique qu'il est attaché à un atome d'oxygène.

La tache de corrélation observée en HMBC entre les protons du groupement méthoxyle ( $\delta_H = 3,88$  ppm) et le carbone C-3 montre clairement que ce groupement est attaché à ce carbone (*Schéma n° III.28*).

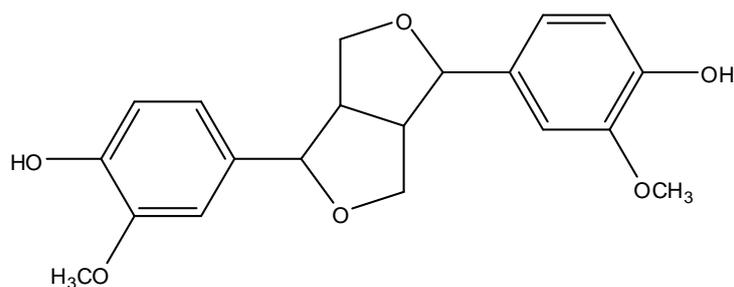


**Spectre n° III.75:** Spectre HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) du composé **GE13-18**



**Figure n° III.28:** Principales corrélations HMBC du composé **GE13-18**

Toutes ces données spectrales donnent une masse moléculaire égale à 195 uma correspondant à 4 insaturations, mais dans le cas de notre composé la masse moléculaire est 358 uma donc soit la double avec 10 degrés d'insaturation. Ceci implique la présence d'un squelette symétrique pour cette molécule (Figure III-29) correspondant au *pinorésino I* [10].



**Figure n° III.29:** la structure du pinoresinol

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° III-19

**Tableau n° III.19 :** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  (MeOD) ; 600 MHz  
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ; 150 MHz de GE12-7

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm), (m, J (Hz))
1	132,1	-
2	110,3	$\delta\text{H}$ 6,94 (d; J = 1,5 Hz)
3	147,0	-
4	149,0	-
5	115,6	6,78 (d, J = 8,5 Hz; H-5)
6	119,4	6,83 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz)
7	87,6	4,73 (d, J = 4,5 Hz)
8	55,3	3,17 (ddl, J = 6,8; 4,5 Hz)
9 $\alpha$	72,3	4,27 (dd, J = 8,8 et 6,8 Hz)
9 $\beta$		3,81 (dd, J = 8,8; 3,3 Hz)
1'	132,1	-
2'	110,3	$\delta\text{H}$ 6,94 (d; J = 1,5 Hz)
3'	147,0	-
4'	149,0	-
5'	115,6	6,78 (d, J = 8,5 Hz; H-5)
6'	119,4	6,83 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz)
7'	87,6	4,73 (d, J = 4,5 Hz)
8'	55,3	3,17 (ddl, J = 6,8; 4,5 Hz)
9' $\alpha$	72,3	4,27 (dd, J = 8,8 et 6,8 Hz)
9' $\beta$		3,81 (dd, J = 8,8; 3,3 Hz)
OCH <sub>3</sub>		3,88 s

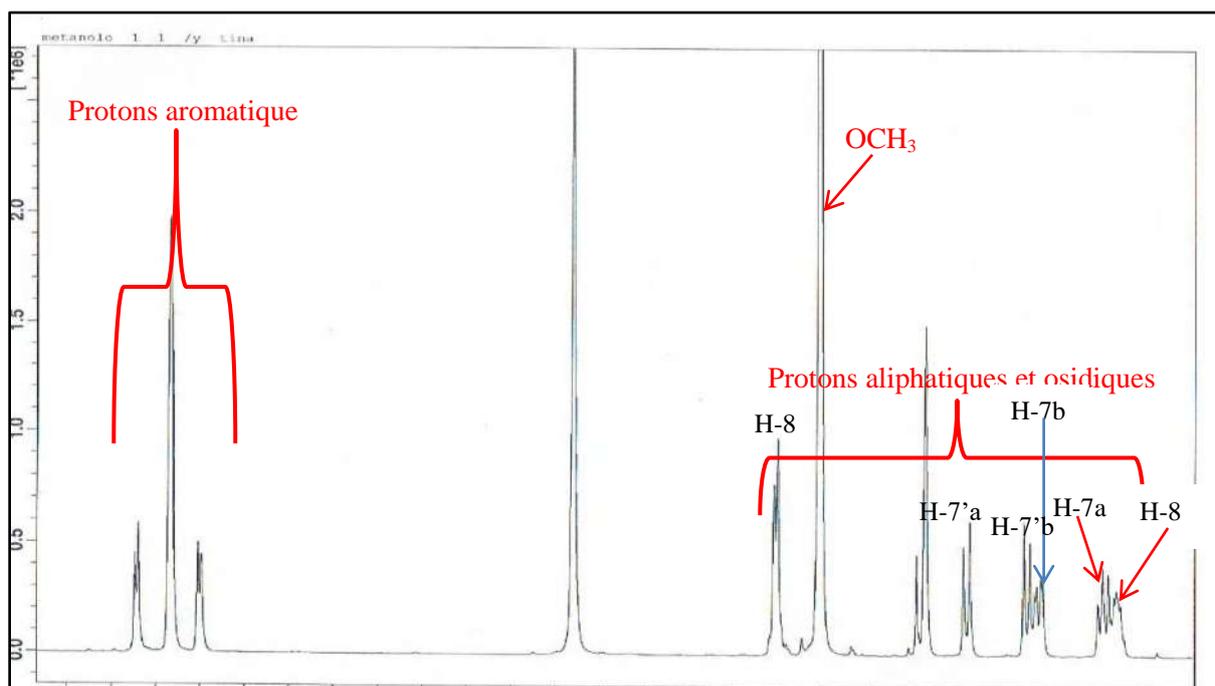
### III-20- Identification du produit GE13-26

Le composé **GE13.26** se présente sous forme d'une poudre blanche.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre III-76), enregistré dans  $\text{MeOH-}d_4$ , montre les signaux suivants :

- Des signaux de protons en forme de massif résonant dans le champ fort entre 2,40 et 3,20 ppm attribuables aux protons aliphatiques.
- Un massif de signaux de protons entre  $\delta_{\text{H}}=2,48$  et  $\delta_{\text{H}}=4,00$  ppm, est caractéristique des protons aliphatiques et osidiques.
- Des signaux résonants dans le champ faible entre à  $\delta_{\text{H}}=6,60$  et à  $\delta_{\text{H}}= 6,87$  et s'intégrant pour six protons, caractéristiques des protons aromatiques.
- un singlet d'intensité six protons à  $\delta_{\text{H}}=3,81$  caractéristique de deux groupements méthoxyles.

Tous ces signaux orientent vers un squelette d'un composé phénolique.

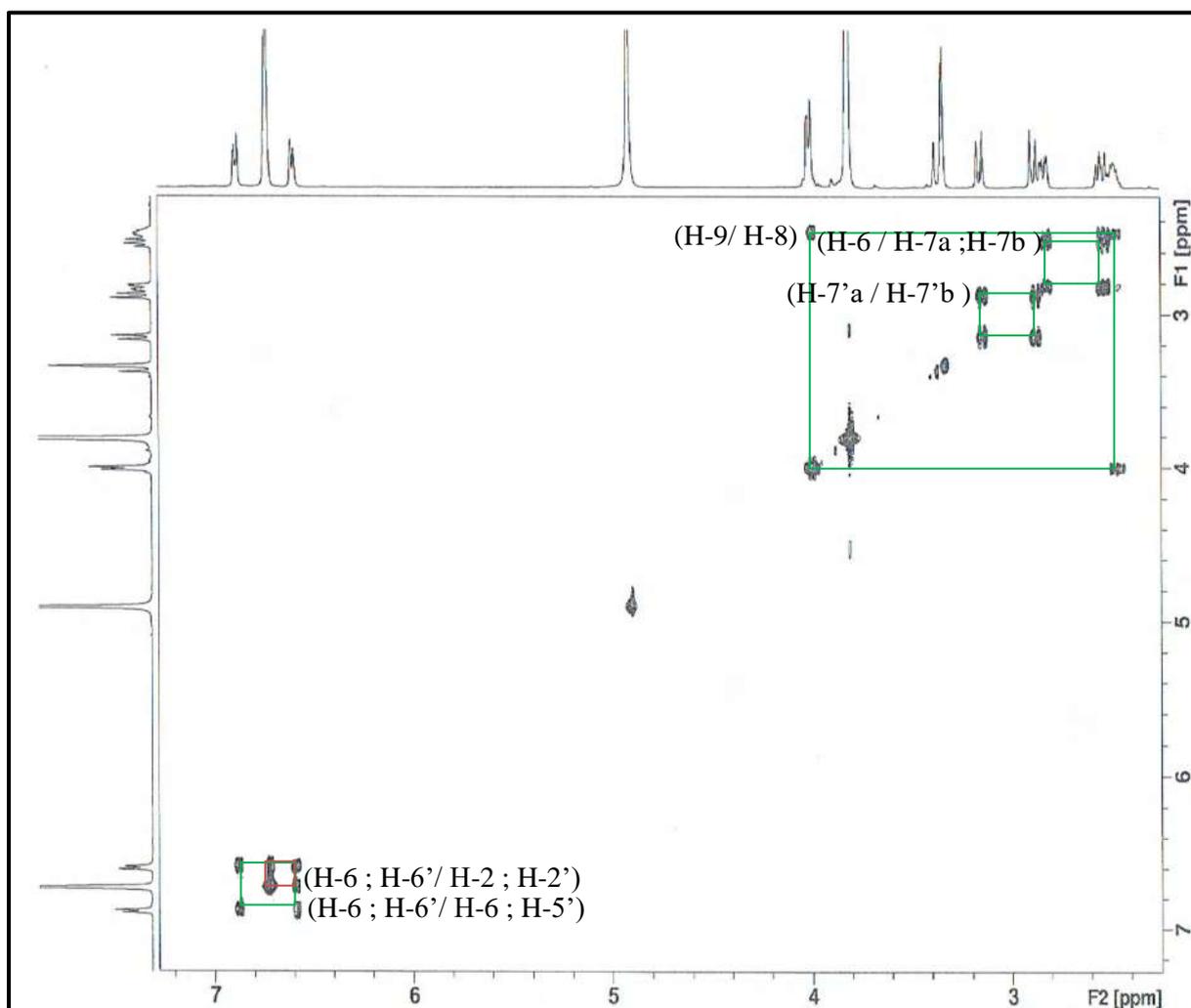
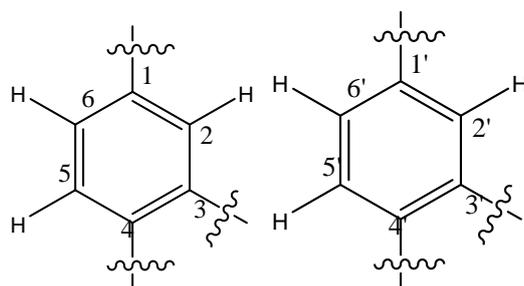


**Spectre n° III.76:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **GE13.26**

L'analyse combinée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre III-76), de la région aromatique indique la présence de deux systèmes ABX. En effet, on observe:

- Trois signaux constituant le premier système à  $\delta_{\text{H}}= 6,60$  (2H, *dd*,  $J = 8,3; 1,8$  Hz), à  $\delta_{\text{H}}= 6, 87$  (2H, *d*,  $J = 8,3$  Hz) et à  $\delta_{\text{H}}= 6,73$  (2H, *d*,  $J = 1,8$  Hz), attribuables aux six protons de deux noyaux aromatiques identiques (H-6 ;H-6'),(H-5 ;H-5') et (H-2 ;H-2'), respectivement.

Cette analyse permet d'identifier sans ambiguïté la présence de deux noyaux aromatiques 1,3,4-trisubstitués.



**Spectre n° III.77:** Spectre COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD du composé **GE13-26**)

Les valeurs des carbones de ces six protons sont détectées par l'analyse de spectre HSQC (spectre III-78), comme suit : H-2/C-2 à  $\delta_{\text{H}}=6,73/ \delta_{\text{C}}=112,1$ , H-5/C-5 à  $\delta_{\text{H}}=7,18$   $\delta_{\text{C}}=110,0$ , H-6/C-6 à  $\delta_{\text{H}}=6,90$   $\delta_{\text{C}}=121,0$ , H-2'/C-2' à  $\delta_{\text{H}}=6,91/ \delta_{\text{C}}=114,0$ , H-5'/C-5' à  $\delta_{\text{H}}=7,12/ \delta_{\text{C}}=110,0$  et H-6'/C-6' à  $\delta_{\text{H}}=6,78/ \delta_{\text{C}}=121,0$ .

A ce stade, tous les protons des deux cycles sont identifiés. Il nous reste à déterminer et positionner les trois substituants de chaque unité aromatique.

Dans la zone des protons aliphatiques, nous observons :

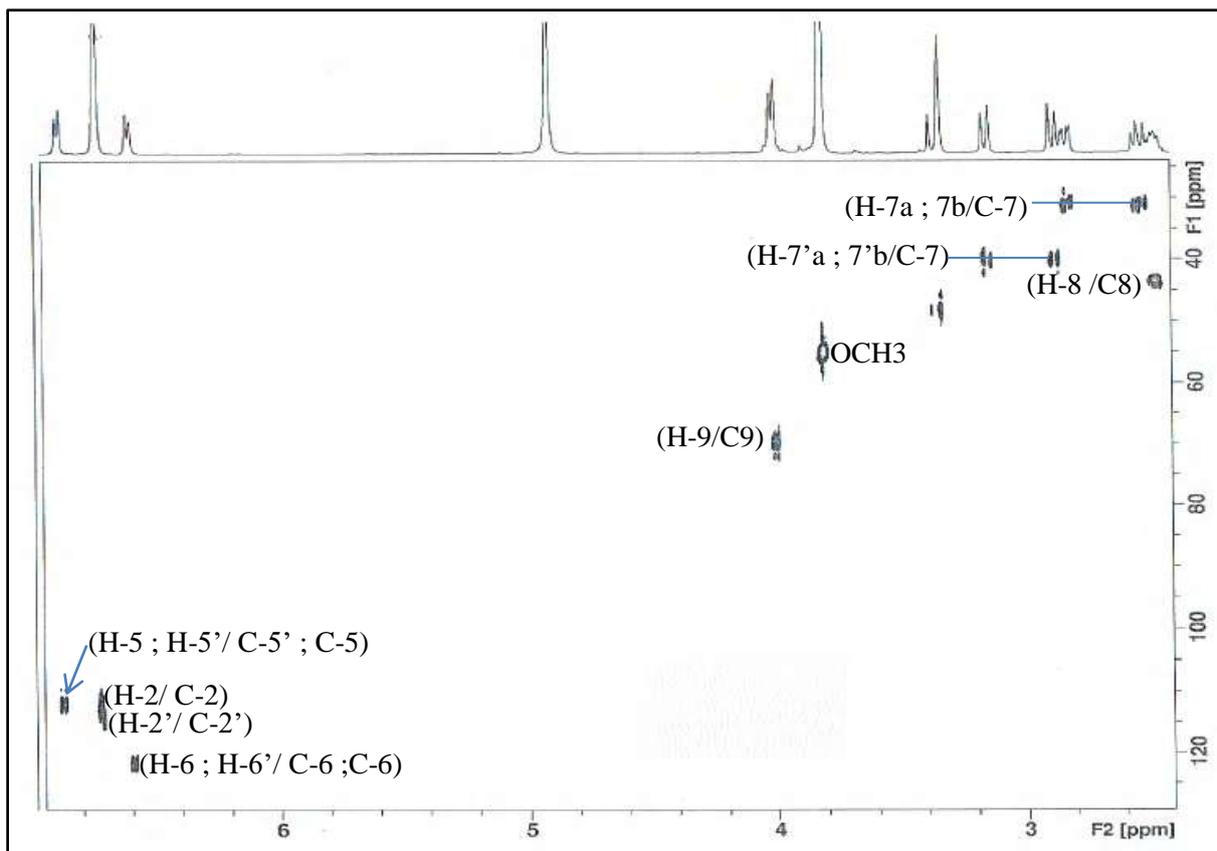
- Un signal s'intégrant pour un proton sous forme d'un multiplet à  $\delta_H=2,48$  (1H, *m*) correspondant à un proton H-8.
- Un signal sous forme de doublet de doublet d'intégration un proton à  $\delta_H= 2,53$ ppm correspondant à H-7a.
- Un signal sous forme de doublet de doublet d'intégration un proton à  $\delta_H= 2,83$ ppm correspondant au 2<sup>ème</sup> proton H-7b.
- Un signal sous forme de doublet d'intégration deux proton à  $\delta_H=4,00$ ppm correspondant aux protons H-9 d'un OCH<sub>2</sub>.
- . Un signal sous forme de doublet de doublet d'intégration un proton à  $\delta_H=2,88$ ppm correspondant à H-7'a.
- Un signal sous forme de doublet de doublet d'intégration un proton à  $\delta_H=3,15$ ppm correspondant au 2<sup>ème</sup> proton H-7'b.

L'examen des spectres cosy <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (spectre n° III.77) permet l'attribution des protons:

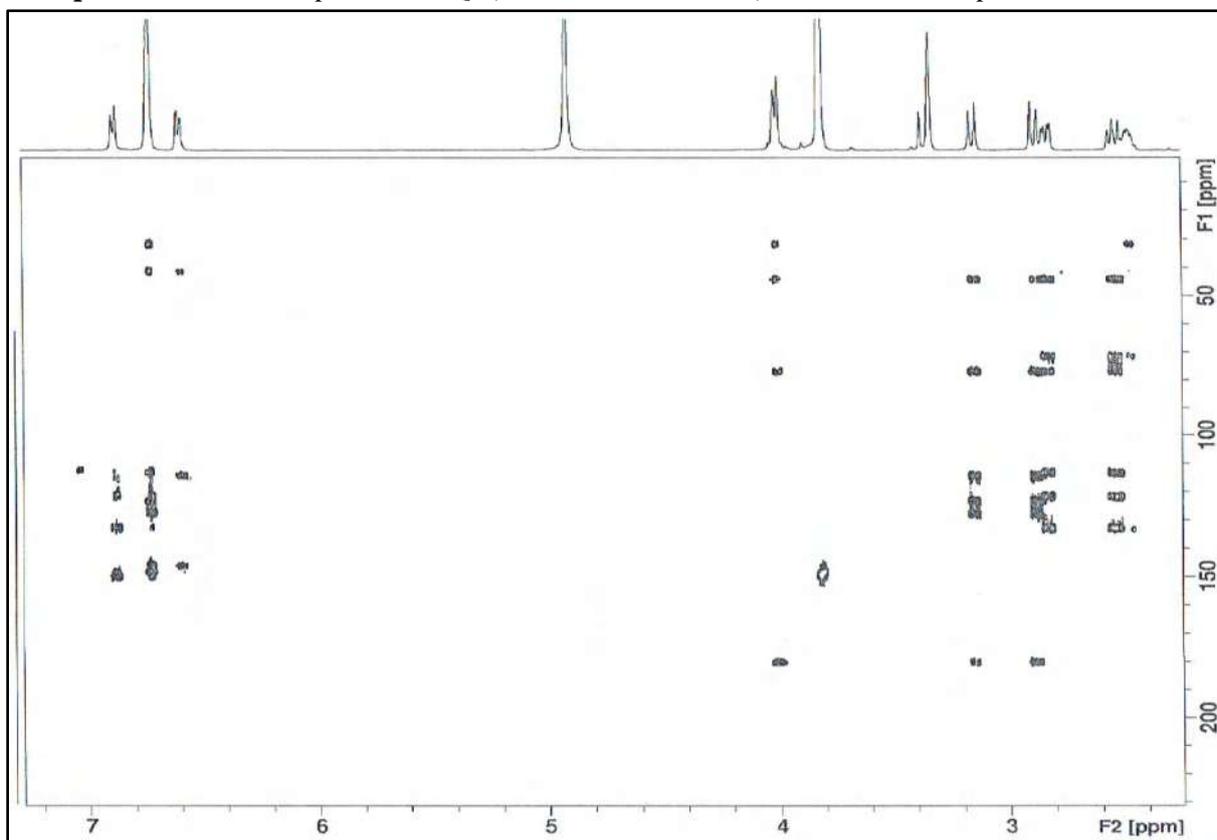
- Des taches de corrélation entre le proton H-8  $\delta_H=2,48$  ppm et trois autres protons à  $\delta_H=2,53$  ; 2,83 et  $\delta_H=4,00$ ppm qui ne peut être que les protons H-7a , H-7b et H-9 respectivement.
- Une tache de corrélation entre le proton H-7'a à  $\delta_H=2,88$  ppm et un autre proton à  $\delta_H=3,15$  qu'il est le proton H-7'b.

L'examen des spectres HSQC (spectre n° III.78) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-9 atomes de carbones à C-9  $\delta_C= 70,0$  ppm confirme la jonction C-O .
- Une tache de corrélation entre H-8 atomes de carbones à C-8  $\delta_C= 43,3$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-7a atomes de carbones à C-6'  $\delta_C = 31,3$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-7b atomes de carbones à C-5'  $\delta_C = 31,3$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-7'a atomes de carbones à C-8'  $\delta_C = 40,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-7'b atomes de carbones à C-5  $\delta_C= 40,1$  ppm.
- Une tache de corrélation entre les protons et le carbone de OCH<sub>3</sub> à  $\delta_C = 55,1$  ppm



*Spectre n° III.78: Spectre HSQC(600 MHz, 150 MHz) CD<sub>3</sub>OD du composé GE13-26*



*Spectre n° III.79: Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) CD<sub>3</sub>OD du composé GE13-26*

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC dans la zone faible (spectre n° III.79-1) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Les protons H-6 ; H-6' montres trois taches de corrélation :

- La première avec un atome de carbone à  $\delta_C = 146,6$  ppm attribuable à C-3 ; C-3'.
- La deuxième confirme le C-2 ; C-2' à  $\delta_C = 114,0$  ppm.
- La troisième avec un atome de carbone à  $\delta_C = 40,0$  ppm qui ne peut être attribué qu'au C-7'.

Les protons H-2 ; H-2' montres huit taches de corrélations :

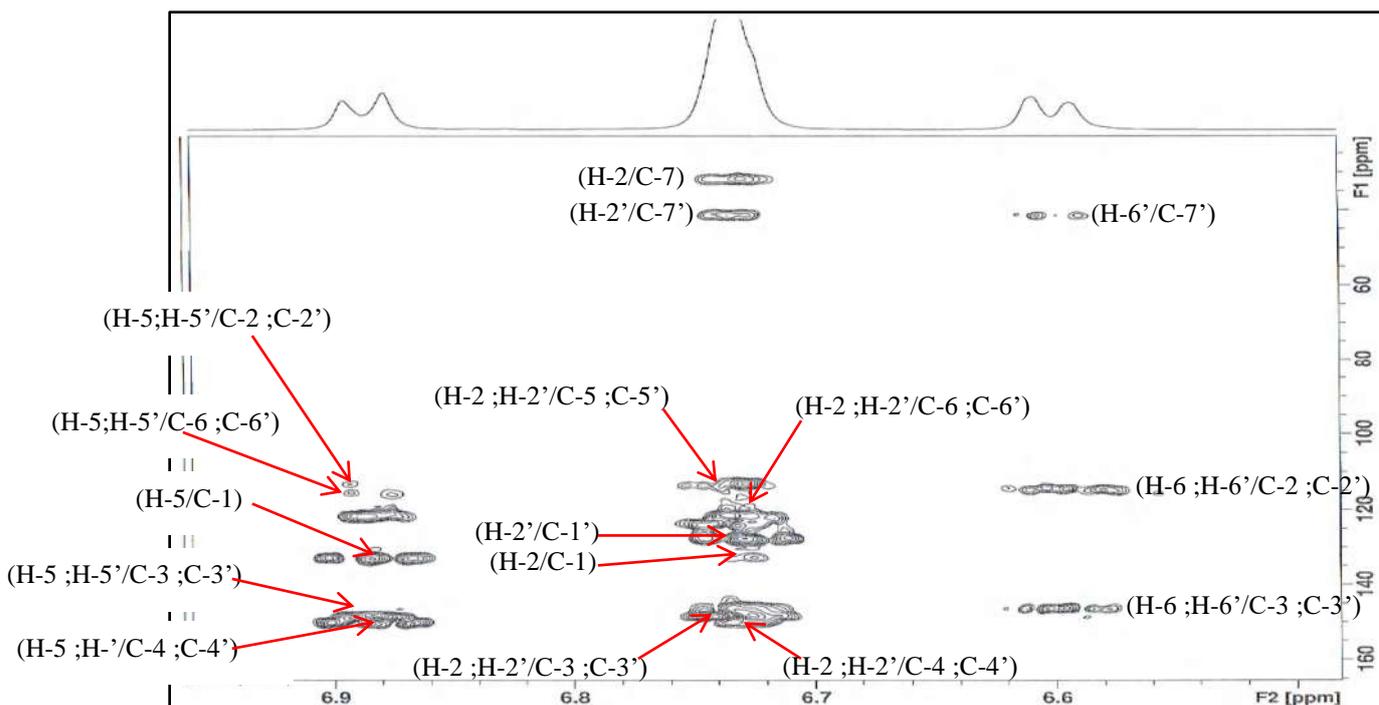
- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 149,0$  ppm attribuable à C-4 ; C-4'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 146,7$  ppm attribuable à C-3 ; C-3'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 131,0$  ppm attribuable à C-1.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 128,0$  ppm attribuable à C-1'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 123,7$  ppm attribuable à C-6 ; C6'.
- La sixième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 110,3$  ppm attribuable à C-5 ; C-5'.
- La septième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 41,3$  ppm attribuable à C-7'.
- La huitième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 31,8$  ppm attribuable à C-7.

Les protons H-5 ; H-5' montres cinq taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 150,0$  ppm attribuable à C-4 ; C-4'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 148,0$  ppm attribuable à C-3 ; C-3'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 133,0$  ppm attribuable à C-1.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 121,8$  ppm attribuable à C-6 ; C-6'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 113,0$  ppm attribuable à C-2 ; C2'.

Les protons de  $2\text{OCH}_3$  montrent deux taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 149,0$  ppm attribuable à C-3.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 148,0$  ppm attribuable à C-3'.



**Spectre n° III.79-1: Etallement Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) CD<sub>3</sub>OD  
du composé GE13-26**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC dans la zone fort (spectre n° III.79-2) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Les protons H-9 montres quatre taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 180,0$ ppm attribuable à un carbonyle C-9' dans un cycle furanique.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 77,4$  ppm attribuable à un carbone quaternaire C-8'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 43,5$ ppm attribuable à C-8.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 31,8$  ppm attribuable à C-7.

Les protons H-7'a ; H-7'b montres six taches de corrélations :

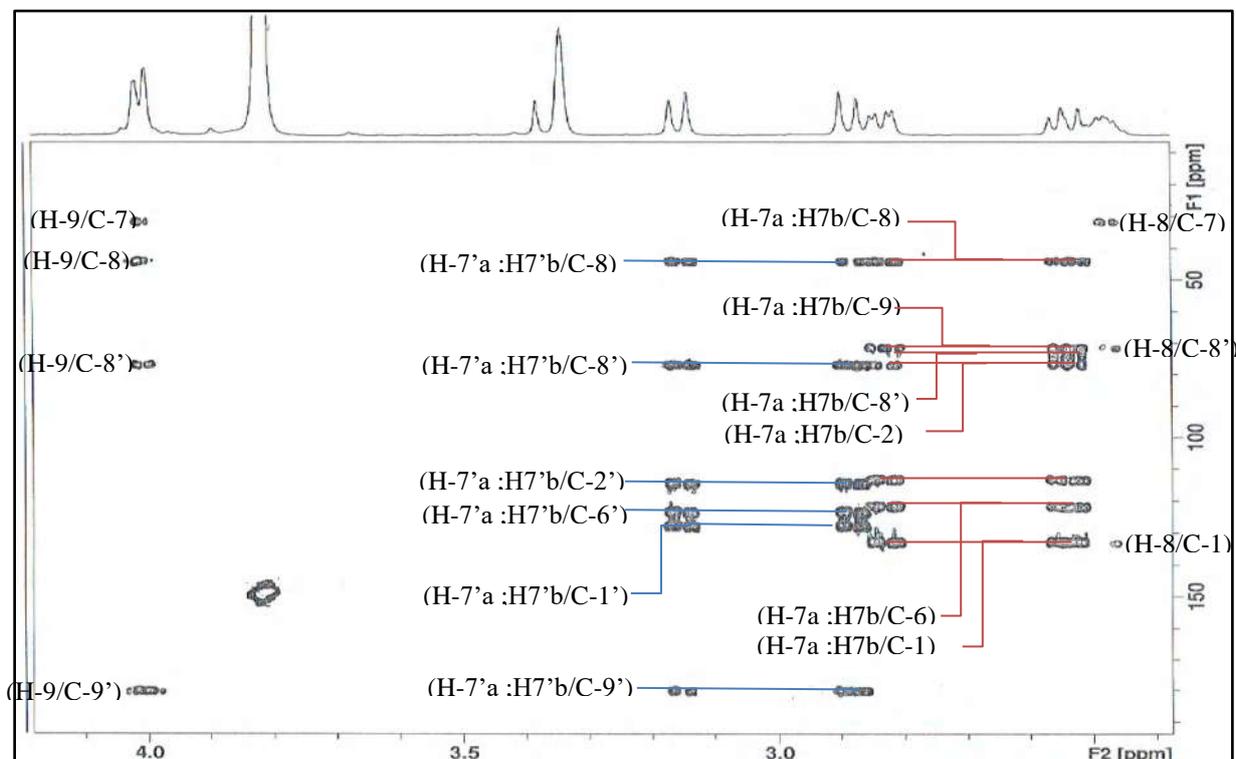
- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 180,0$ ppm attribuable à C-9'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 128,4$  ppm attribuable à C-1'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 121,6$ ppm attribuable à C-6'.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 114,5$  ppm attribuable à C-2'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 77,4$  ppm attribuable à C-8'.
- La sixième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 44,3$  ppm attribuable à C-8

Les protons H-7a ; H-7b montres six taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 133,0$ ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 121,9$  ppm attribuable à C-6.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 114,5$  ppm attribuable à C-2.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 77,4$  ppm attribuable à C-8'.
- La cinquième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 71,4$  ppm attribuable à C-9.
- La sixième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 44,3$  ppm attribuable à C-8.

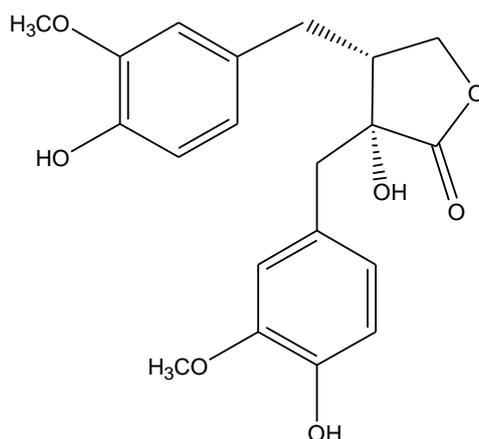
Les protons H-8 montre trois taches de corrélations :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 133,1$ ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 77,6$  ppm attribuable à C-8'.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta_C = 32,1$  ppm attribuable à C-7.



*Spectre n° III.79-2: Etallement Spectre HMBC(600 MHz, 150 MHz) CD<sub>3</sub>OD  
du composé **GE13-26***

L'analyse de ces spectres (RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC) de **GE13-26** a permis d'attribuer les signaux de la génine en comparaison avec ceux décrits dans la littérature et d'identifier le squelette de lignane comme un diaryl monofuranique. Le lignane est, donc, identifiée comme étant :



**Figure n° III.30:** la structure du *nortrachelogenin*

L'ensemble des spectres a permis de faire l'attribution de tous les noyaux, ainsi toutes les données sont rassemblées dans le **tableau n° III-20**

**Tableau n° III.20 :** Données de la spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ; 600 MHz  
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{MeOD}$  ; 150 MHz de GE3-27

Position	C $\delta$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm), (m, J (Hz))
1	133,0	-
2	114,0	6,71(d, , J=1,8 Hz)
3	148,0	-
4	150,0	-
5	110,0	6,87(d, J=8,0 Hz)
6	121,0	6,60(dd, J=8,0; 1,8 Hz)
7a	31,3	2,88(dd, J=13,0; 1,6 Hz)
7b		2,53(dd, J=13,0; 10,0 Hz)
8	43,3	2,48 m
9	70,0	4,00
1'	128,0	-
2'	112,8	6,71(d, , J=1,8 Hz)
3'	148,0	-
4'	150,0	-
5'	110,0	6,87(d, J=8,0 Hz)
6'	121,0	6,60(dd, J=8,0; 1,8 Hz)
7'a	40,1	3,15 (d, J=14,0 Hz)
7'b		3,88(d, J=14,0 Hz)
8'	77,0	-

position	C $\delta$ (ppm)	$\delta H$ (ppm), (m, J (Hz))
9'	180,0	-
OCH <sub>3</sub>	55,1	3,81

### III-21- Identification du produit GE13-9

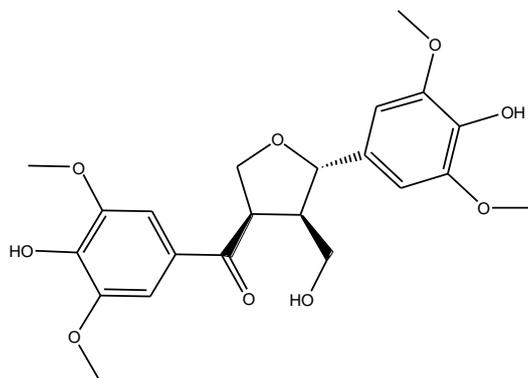


Figure n° III.31: la structure du *ciwujiatone*

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol

S'agit de **ciwujiatone**.

Les données spectrales RMN <sup>1</sup>H à 500 MHz, réalisées dans le CD<sub>3</sub>OD sont conformes à celles rapportées précédemment [106].

### III-22- Identification du produit GE11-5

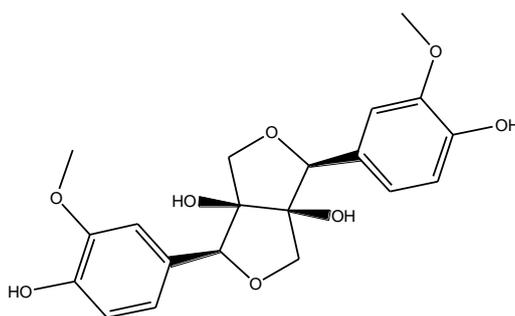


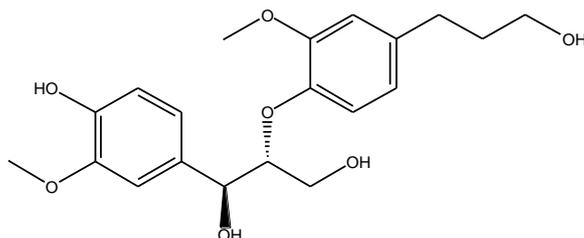
Figure n° III.32: la structure du **8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol**

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol.

Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254/366 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il s'agit d'un lignane appelée **8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol**.

Les données spectrales RMN  $^1\text{H}$  à 500 MHz, réalisées dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  sont conformes à celles rapportées précédemment [110].

### III-23- Identification du produit GE11-7



**Figure n° III.33:** la structure du erythro-guaiacylglycerol- $\beta$ - O-4'-dihydroconiferyl alcohol

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol.

S'agit d'un lignane appelée **erythro-guaiacylglycerol- $\beta$ - O-4'-dihydroconiferyl alcohol**.

Les données spectrales RMN  $^1\text{H}$  à 500 MHz, réalisées dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  sont conformes à celles rapportées précédemment [114].

### Conclusion

L'étude chimique des extrait *hydroalcoolique* des parties aériennes des espèces *Solanum rostratum*, plante appartenant à la famille SOLANACEAE et *Galactites elegans* plante appartenant à la famille ASTRACEAE a abouti à l'isolement et la caractérisation de vingt-trois produits

Les opérations de séparation, isolement et purification des métabolites secondaires que renferme les extraits de cette plantes sont basées principalement sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques (CCM et CC) utilisées dans notre laboratoire. et HPLC.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie de masse, la spectroscopie de résonance magnétique (RMN) et la comparaison avec les données de la littérature.

*Chapitre IV : Activité  
Biologique*

## **IV-1 Introduction :**

Le système de défense antioxydant correspond à l'ensemble des moyens mis en œuvre pour contrôler l'oxydation et ses effets négatifs. Il comprend plusieurs lignes de défenses qui visent à prévenir la formation des radicaux libres, les neutraliser quand ils sont déjà formés, réparer leur dégâts et/ou prévenir les conditions favorables à leur formation, comme par exemple, en bloquant/séquestrant les atomes de fer, qui agissent comme des catalyseurs dans la formation de radicaux libres (réaction de Fenton).

Diverses spécialités scientifiques sont impliquées et les travaux de recherche ont été développés pour l'extraction, l'identification, la quantification et la valorisation de la potentialité bioactive des substances naturelles et/ou les extraits qui les contiennent [123,124]. Les composés phénoliques, en possédant une structure chimique idéale pour des activités anti-radicalaires, se sont avérés être plus antioxydants in vitro que les vitamines E et C [125].

La variation du nombre de groupes hydroxyles phénoliques et leur position, conduisent, d'un côté, à des catégories de polyphénols très diversifiées telles que : les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc. et d'un autre, à une variation de leur capacité antioxydante.

Etant des constituants de nos aliments (légumes, fruits, herbes et épices) [126-127], les polyphénols pourraient contribuer de manière significative à l'effet protecteur in vivo [128].

## **IV.2 Évaluation de l'activité antioxydante :**

### **IV.2.1 Dosage spectrophotométrique (Estimation quantitative des polyphénols totaux) :**

#### **➤ Principe :**

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton et Milella [129,130] en utilisant l'acide gallique comme standard, avec quelques modifications[131].

Le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PMo_{12}O_4$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_3$ ), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre de 760 nm.

#### **➤ Mode opératoire :**

Les solutions des extraits ont été mélangées à 0,2 ml de réactif Folin-Ciocalteu à 50 % et laissée réagir pendant 3 minutes, puis 1 ml de solution aqueuse de  $Na_2CO_3$  à 2 % a été ajouté. À la fin de l'incubation de 45 minutes à température ambiante, l'absorbance de chaque mélange a été mesurée à 760 nm. La même procédure a également été appliquée aux solutions

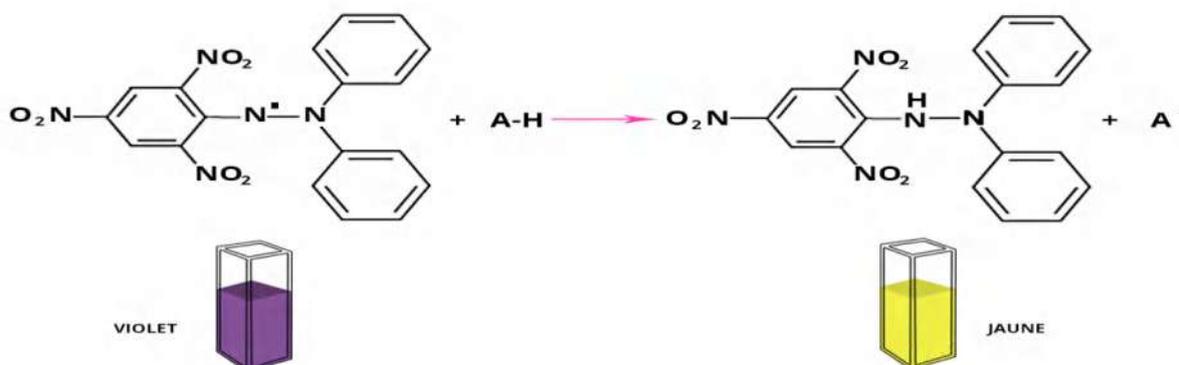
étalons d'acide gallique. Le contenu phénolique total a été exprimé en équivalents d'acide gallique  $\mu\text{g}$  par  $\text{mg}$  d'extrait.

#### **IV.2.2 Test de piégeage du radical libre DPPH:**

L'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait chloroformique de la plante *Solanum rostratum*, a été réalisée par la technique de : l'effet scavenger du radical DPPH. Par contre les extraits l'extrait chloroformique et l'extrait butanolique de la plante *Galactites elegans*, a été évaluée *in vitro* par l'utilisation de deux tests chimiques différents: le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH•), impliquant les transferts d'atome d'hydrogène et d'électron, et le test déterminant le pouvoir chélatant des métaux (Ferrozine).

##### ➤ **Principe :**

L'utilisation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est très répandue dans l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques [132-133]. Il est accessible, relativement stable à température ambiante comme il peut absorber à 517nm, L'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant se fait facilement en mesurant par un spectrophotomètre UV-Vis la diminution de la coloration violette, due à l'inhibition des radicaux DPPH•.



**Figure IV-1 : La réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant.**

##### ➤ **Protocole :**

L'activité le piégeage des radicaux libres a été déterminée par une méthode spectrophotométrique basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH selon la méthode de Blois (1958) [134], avec quelques modifications [135].

3 ml de solution méthanolique de DPPH 0.04 % sont ajoutés à 100  $\mu\text{l}$  de la solution d'extrait à différentes concentrations. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Le blanc est représenté par le méthanol. Le témoin négatif est composé de 3 ml de la solution méthanolique de DPPH et 3 ml de méthanol. Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un

antioxydant standard: l'acide ascorbique. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm.

La réduction du DPPH• en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivie à 517 nm. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• selon l'équation :

$$I\% = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance de la solution contenant le DPPH seul.

$A_{\text{Echantillon}}$  est l'absorbance de la solution contenant l'échantillon.

L'activité anti radicalaire de nos extraits a été exprimée en valeurs  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) à des fins de comparaison. La valeur de l'  $IC_{50}$  de chaque échantillon a été définie comme la concentration de l'échantillon nécessaire pour une diminution de 50 % de l'absorbance du blanc. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme témoins positifs.

### **IV.2.3 Pouvoir chélateur du Fer :**

#### **➤ Principe :**

Pour évaluer *in vitro* le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine [136]. En effet, la ferrozine forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel, un complexe [ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$ ] de couleur violette intense.

La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à piéger cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur de l'extrait est important.

La capacité des extraits à se lier avec  $\text{Fe}^{2+}$  en présence de la ferrozine, a été comparée à celle de l'EDTA, fort agent chélateur [137].

#### **➤ Protocole :**

Le pouvoir réducteur des extraits chloroformique et butanolique de la plante *Galactites elegans* est déterminé selon la méthode de Decker and Welch [138] avec quelques modifications [139, 140].

Une aliquote de 0.5mL de l'extrait est ajoutée à 0.05mL de  $\text{FeCl}_2$  (2 mM) et 2 mL de MeOH. Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 0,1 ml de ferrozine (5 mM) est ajouté . Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 562 nm contre le MeOH blanc (sans ferrozine). Dans le but de comparer les résultats, l'EDTA a été utilisé comme standard de référence.

Une absorbance faible indique une activité de chélation de fer élevée. Le pouvoir chélateur du fer est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle

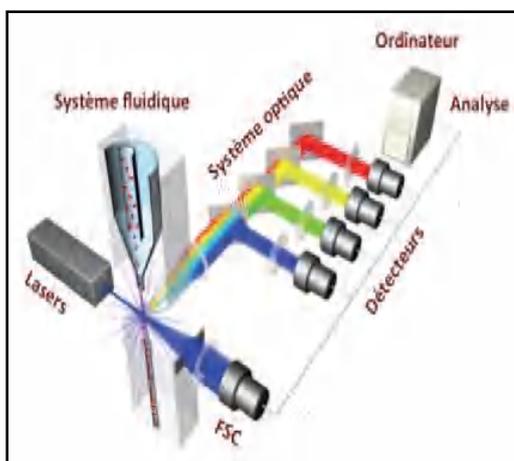
At: Absorbance du test

La concentration effective (IC50) qui chélate 50 % de Fe<sup>2+</sup> a été calculée. Tous les dosages des différents tests de l'activité antioxydante ont été réalisés en triplicata (3 répétitions pour chaque concentration).

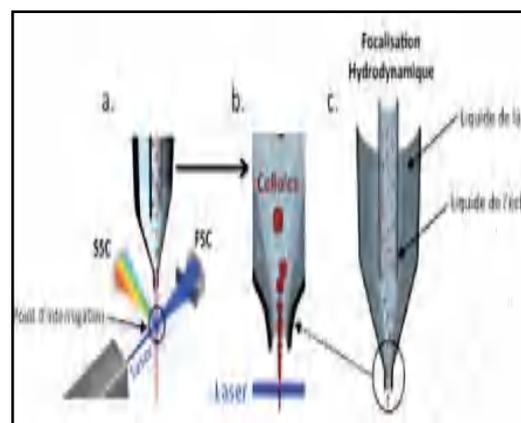
### **IV.2.3 Potentiel antioxydant des composés testés par cytofluorométrie :**

#### **➤ Principe :**

La cytométrie de flux, comme son nom l'indique est la mesure (-métrie) des propriétés d'une population cellulaire (cyto-) qui se déplace dans une gaine de liquide (flux). Les cellules analysées doivent donc être en suspension. En clinique, des échantillons tels que le sang, la moelle osseuse, les liquides biologiques et les cellules extraites de biopsies tissulaires ou osseuses sont analysées. Les cellules vont passer, une à une, à travers un faisceau lumineux « le laser » (**Figure IV-2**) et le cytomètre va alors détecter la capacité d'une cellule à diffracter la lumière incidente et à émettre une fluorescence. La lumière diffusée ainsi que la fluorescence émise par chaque cellule vont être captées par des détecteurs et transmises à un ordinateur (**Figure IV-3**). Les données récoltées seront analysées grâce à un logiciel pour les présenter sous forme d'histogrammes ou de graphiques [141].



**Figure IV-2:** Les composants d'un cytomètre de flux.



**Figure IV-3:** Le système fluidique et le principe de focalisation hydrodynamique.

### Cultures de cellules :

Des cellules de Jurkat (une lignée cellulaire de T-cell leucémie des cellules obtenue de la banque de cellules de GMP-IST, Gênes, Italie) ont été maintenues dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% (v/v) de FBS, 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques à 37°C en atmosphère humidifiée avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Pour assurer une croissance logarithmique, les cellules ont été sous-cultivées tous les trois jours. Stock Des solutions (50 mM) de composés polyphénoliques dans du DMSO ont été stockées à -20°C et diluées de manière appropriée dans le même solvant ou directement dans le milieu juste avant l'utilisation (DMSO ne dépassant jamais 0,5 %).

#### ➤ **Protocole :**

Activité d'appauvrissement en peroxyde des composés d'essai par cytofluorométrie :

L'évaluation de la concentration intracellulaire en peroxydes a été réalisée selon la méthode de Rothe [140] avec quelques modifications. En détail, des cellules de Jurkat ont été collectées par centrifugation et mises en suspension dans un RPMI contenant 5 % de FBS à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules/mL. La concentration de FBS a été abaissée à 2 % pour augmenter le taux d'absorption des flavonoïdes et des réactifs pendant la courte durée d'incubation (1 heure) choisie pour le test.

Les suspensions cellulaires ont été incubées avec des concentrations croissantes de chaque produit chimique ou véhicule uniquement sur le site 37°C. Pour chaque échantillon, des tubes à essai en double ont été préparés. Après 30 minutes d'incubation, on a ajouté de la BHP (concentration de 550  $\mu\text{M}$  final) ou un volume égal de véhicule. Cela nous a permis de surveiller l'effet des flavonoïdes sur l'élévation de la concentration en peroxydes induite par la BHP ou sur les niveaux basaux de peroxydes, respectivement. Au cours des 15 dernières minutes d'incubation, les cellules ont été chargées de DCFH-DA (8  $\mu\text{M}$  concentration finale). Les cellules en suspension ont ensuite été lavées et remises en suspension dans un volume égal de milieu et 10 000 événements ont été analysés pour la fluorescence DCF par cytofluorométrie (BDFACSCalibur\_instrument, BectonDickinson, San Jose, CA, USA). La fluorescence verte du DCF a été analysée dans le canal FL1 ( $\lambda_{\text{exc}}$  488 nm ; ( $\lambda_{\text{em}}$  535 nm). Avant l'analyse cytofluorométrique, une partie aliquote de chaque échantillon a été prélevée pour évaluer la viabilité des cellules par le test d'exclusion Trypan-bleu.

Analyse statistique. Toutes les expériences ont été réalisées en trois exemplaires et les

résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Pour l'activité DPPH, les différences entre les moyennes ont été faites par analyse de variance (ANOVA), et les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Duncan. Pour les autres tests, les différences entre les groupes de traitement ont été analysées par le test de l'étudiant. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $P < 0,05$ .

### **IV.3 Résultats et discussion :**

#### **IV.3.1 *Solanum rostratum* :**

Les activités de piégeage des radicaux DPPH de l'extrait de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et des agents synthétiques sont indiquées dans le tableau IV.1. Selon les valeurs d'IC<sub>50</sub>, les capacités de piégeage des radicaux DPPH parmi les échantillons étaient de l'ordre de BHA>BHT>CHCl<sub>3</sub> ( $p < 0,01$ ).

La valeur de l'IC<sub>50</sub> pour le piégeage des radicaux DPPH de l'extrait de chloroforme a été déterminée comme étant de  $0,066 \pm 0,001$  mg/ml. La **Figure IV-4** montre les courbes dose-réponse des activités de piégeage des radicaux DPPH de l'extrait brut de chloroforme de *S. rostratum* et des antioxydants synthétiques. D'autre part, la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait de chloroforme a été établie à  $88,45 \pm 0,34$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

**Tableau IV.1 Activités antioxydants de l'extrait chloroformique de *Solanum rostratum***

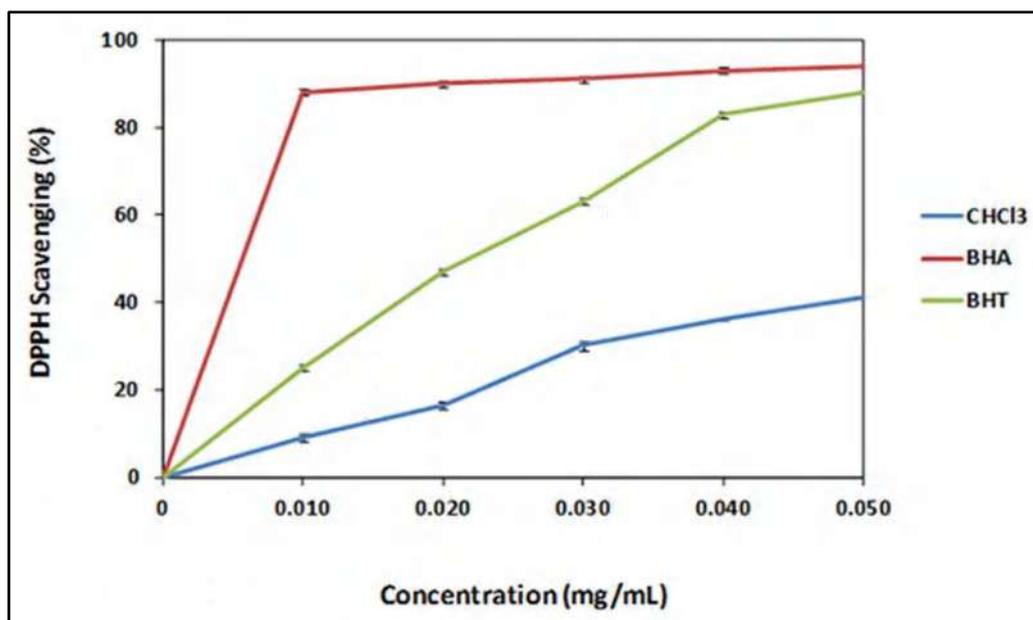
Composés	DPPH	Teneur totale en phénols
	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	( $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$ d'extrait)
L'extrait chloroformique	$0.066 \pm 0.001^c$	$88.45 \pm 0.34$
BHT	$0.023 \pm 0.001^b$	NS
BHA	$0.003 \pm 0.000^a$	NS

NS : Non étudié.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

BHT : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol.

BHA : hydroxyanisole butylé.



**Figure IV-4:** Activités de piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl des échantillons aux concentrations testées

Plusieurs études ont été rapportées sur les effets antioxydants de différentes espèces de *Solanum* [142,143]. Le composé (1) (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside) a été isolé de l'extrait de chloroforme qui a montré l'activité antioxydante importante. Comme pour notre étude, Hao et ses collègues [144] ont rapporté que les différentes fractions d'extraction (acétate d'éthyle, n-butanol, éther de pétrole et eau) de *S. rostratum* avaient de fortes activités antioxydantes. Dans une autre étude, les quatre extraits méthanoliques (racines, feuilles, fleurs et fruits) de cette espèce ont montré des inhibitions considérables contre le radical DPPH entre 86,76 et 90,24% [145]. Comme les composés phénoliques sont les groupes les plus importants de métabolites secondaires des plantes qui ont des fonctions biologiques diverses, notamment des effets antioxydants [146], le contenu phénolique total de l'extrait de *S. rostratum* a également été déterminé. Les résultats ont montré que l'extrait de chloroforme de *S. rostratum* avait une quantité élevée de contenu phénolique total.

### **IV.3.2 Galactites elegans:**

#### **IV.3.2.1 Activités antioxydantes des extraits et des composants de Galactites elegans :**

##### IV.3.2.1.1 Dosage des phénols totaux :

Les composés phénoliques sont caractérisés par le fait qu'ils possèdent au moins un cycle aromatique auquel sont attachés un ou plusieurs groupes hydroxyle qui contribuent directement aux propriétés antioxydantes [147]. Il est donc important d'évaluer la teneur totale

en composés phénoliques des extraits de *Galactites elegans*. La teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits, exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec, est indiquée dans le tableau IV.2.

#### IV.3.2.1.2 Activité de piégeage des radicaux libre DPPH :

Les activités de piégeage des radicaux DPPH des extraits et des agents de synthèse de référence sont indiquées dans le tableau IV.2. Selon ces valeurs de  $\text{IC}_{50}$ , les capacités de piégeage des radicaux DPPH des différents extraits étaient de l'ordre de  $\text{CHCl}_3 > n\text{-BuOH}$  ( $P < 0,05$ ). En outre, les capacités de piégeage des radicaux des composés purs sont indiquées dans le **tableau IV.3**. Une valeur d' $\text{IC}_{50}$  plus faible indique une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée.

#### IV.3.2.1.3 Pouvoir chélateur du Fer :

Les ions de fer catalysent la conversion d'espèces moins réactives telles que  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou les peroxydes de lipides en espèces plus réactives telles que les radicaux hydroxyles ou peroxydes / alcoxydes. Par conséquent, les extraits ayant une capacité de chélation du fer peuvent agir comme de puissants antioxydants [148]. La capacité de chélation des métaux des extraits a été étudiée par le dosage de la ferrozine. Le potentiel de chélation de l'extrait de  $n\text{-BuOH}$  a été déterminé comme étant de  $38,5 \pm 1,4 \%$ , ce qui est significativement inférieur ( $p < 0,01$ ) à l'agent de chélation synthétique EDTA ( $93,7 \pm 0,3 \%$ ) à la concentration de 2 mg/mL.

En revanche, l'extrait chloroformique n'était pas efficace pour les concentrations testées.

**Tableau IV.2 Activités antioxydantes des extraits de *Galactites elegans*.**

Composés	DPPH	Teneur totale en	Pouvoir chélateur
	$\text{IC}_{50}$ (mg/ml)	phénols ( $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$ d'extrait)	du Fer (%)
<b>Ex. <math>\text{CHCl}_3</math></b>	$41.2 \pm 1.3^{\text{d}}$	$116.5 \pm 0.7^{\text{b}}$	$\text{NA}^2$
<b>Ex. <i>n</i>-Butanol</b>	$52.1 \pm 1.1^{\text{c}}$	$94.4 \pm 0.6^{\text{a}}$	$38.5 \pm 1.4^{\text{b}}$
<b>BHT</b>	$22.3 \pm 0.8^{\text{b}}$	$\text{NS}^3$	$\text{NS}^3$
<b>BHA</b>	$19.1 \pm 0.4^{\text{a}}$	$\text{NS}^3$	$\text{NS}^3$
<b>EDTA</b>	$\text{NS}^3$	$\text{NS}^3$	$93.7 \pm 0.3^{\text{a}}$

NS : Non étudié.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

BHT : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol.

BHA : hydroxyanisole butylé.

NA : Non active.

EDTA : Ethylenediaminetetraacetate

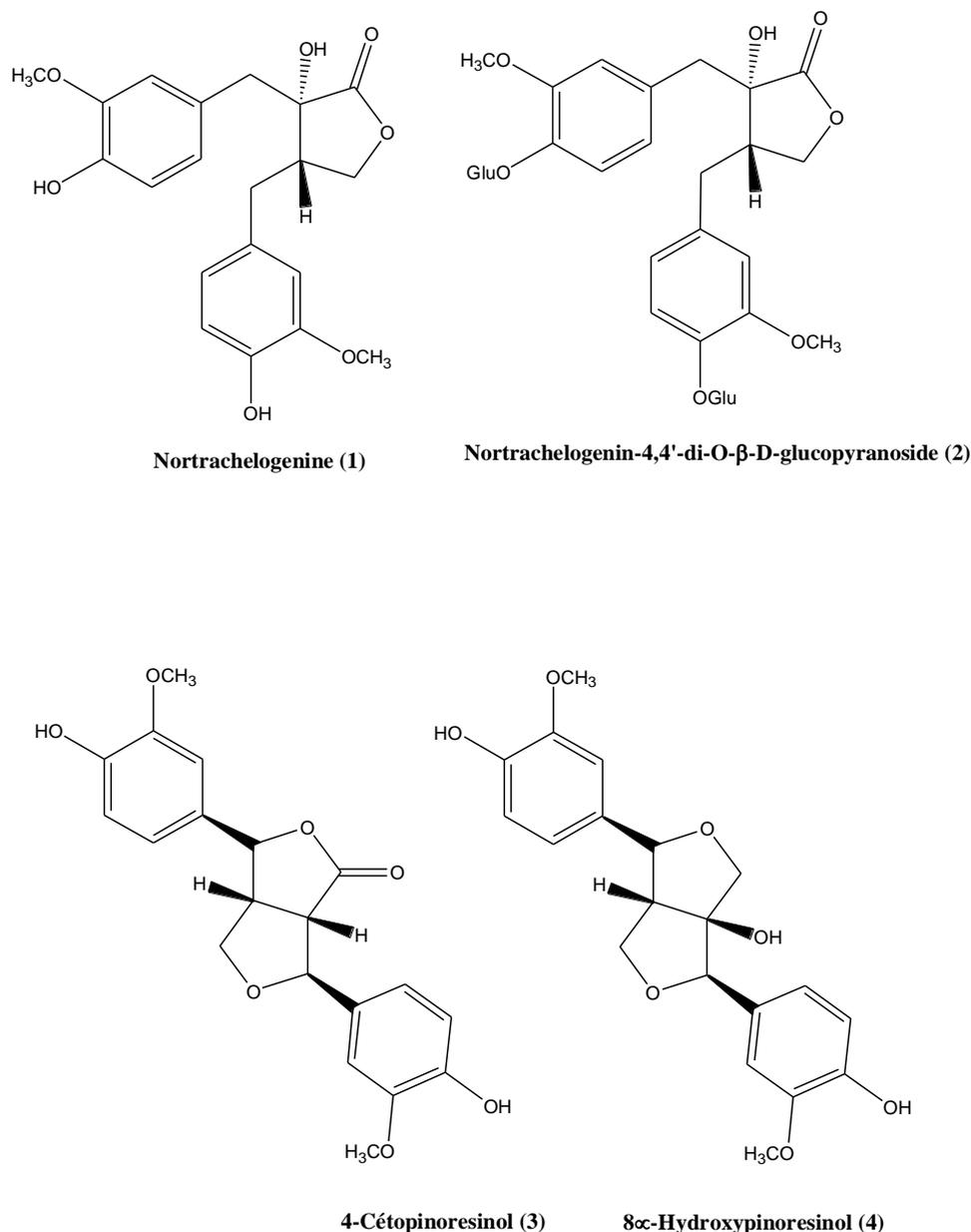
**Tableau IV.3: Valeurs IC<sub>50</sub> des polyphénols testés par rapport au radical DPPH.**

<b>Compound</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)<sup>1</sup></b>
<b>BHT (positive control)</b>	<b>98.8 ± 4.5</b>
<b>BHA (positive control)</b>	<b>105.4 ± 5.3</b>
<b>4-ketopinoresinol (3)</b>	<b>143.3 ± 13.1</b>
<b>8α-hydroxypinoresinol (4)</b>	<b>71.5 ± 5.9</b>
<b>9α-hydroxypinoresinol</b>	<b>84.0 ± 2.9</b>
<b>Abietin</b>	<b>&gt;500</b>
<b>apigenin-7-O-α-L-rhamnopyranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranoside (isorhoifolin)</b>	<b>&gt;500</b>
<b>chlorogenic acid</b>	<b>59.8 ± 4.9</b>
<b>Ciwujiatone</b>	<b>64.7 ± 5.3</b>
<b>erythro-guaiacylglycerol-β-O-4'- dihydroconiferyl alcohol</b>	<b>&gt;500</b>
<b>kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranoside (biorobin)</b>	<b>39.4 ± 2.8</b>
<b>luteolin 4'-O-glucuronide</b>	<b>38.9 ± 2.5</b>
<b>naringenin-7-O-neohesperidoside</b>	<b>116.0 ± 9.7</b>
<b>neochlorogenic acid</b>	<b>65.8 ± 4.8</b>
<b>nortrachelogenin (1)</b>	<b>38.6 ± 2.7</b>
<b>nortrachelogenin-4,4'-di-O-β-D- glucopyranoside (2)</b>	<b>34.4 ± 2.3</b>
<b>pinoresinol</b>	<b>50.8 ± 3.1</b>
<b>quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranoside (rutin)</b>	<b>63.0 ± 4.6</b>
<b>quercitrine</b>	<b>12.2 ± 1.0</b>
<b>sinapaldehyde</b>	

#### IV.3.2.1.4 Potentiel antioxydant des composés testés par cytofluorométrie :

Cette étude a été réalisée dans le but de découvrir des composés qui pourraient être utilisés comme ingrédients actifs pour améliorer la santé et/ou l'aspect physique de la peau ou comme conservateurs ou stabilisateurs pour d'autres ingrédients actifs ou des véhicules dans des

formulations d'actualité. Comme indiqué dans un récent travail de Korte [149], produits naturels qui montrent ce genre de la bioactivité sont les lignanes et les esters de lignanes. Pour ces raisons, les Parmi toutes les molécules testées, le pinoresinol et le des dérivés de la norrachelogénine ont été sélectionnés **Figure IV-5**.



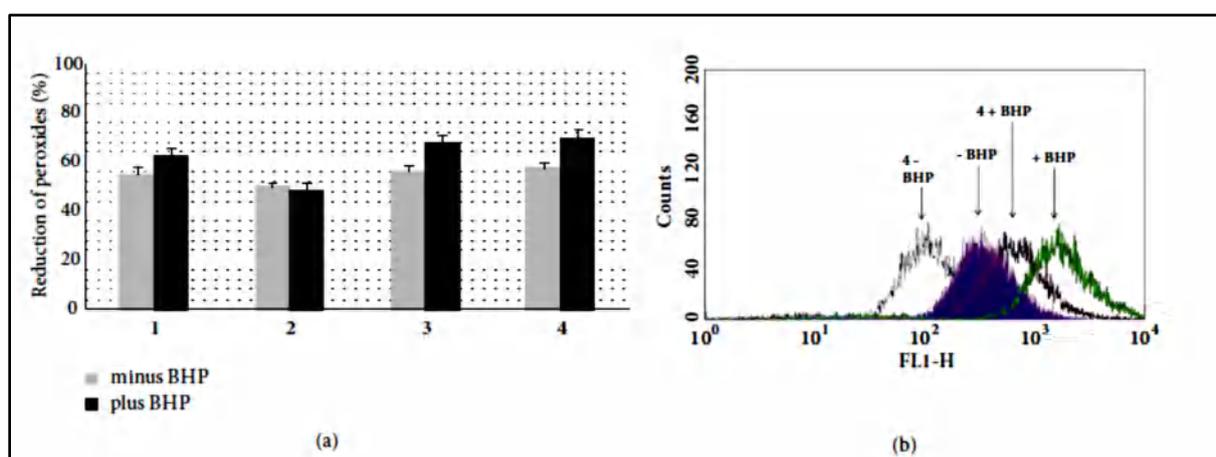
**Figure IV-5** : Structures des lignans testés.

En particulier, le potentiel antioxydant de la norrachelogenine (1), de la norrachelogenine-4,4'-di-O-β-Dglucopyranoside (2) et de 8α-hydroxypinoresinol (4) a été étudié.

Le 4-ketopinorésinol (3) a été utilisé comme témoin positif, comme indiqué dans le rapport de Chen [150], mais le pinorésinol n'a pas été testé en raison de sa cytotoxicité élevée, et le 9α-hydroxypinorésinol n'était pas actif [151]. La capacité des composés testés à réduire le niveau de

peroxydes dans les cellules de Jurkat témoins et traitées à la BHP a été mesurée par cytofluorométrie. Chaque produit chimique a été testé à 25  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  concentrations, cette dernière étant la dose maximale non cytotoxique. Elles ont permis de réduire le niveau basal de peroxydes dans les cellules de Jurkat ainsi que de contrecarrer l'augmentation de peroxydes induite par le traitement à la BHP.

Le potentiel antioxydant légèrement plus faible du 4,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de nortrachélogénine (2) pourrait être attribué à la présence d'une partie glucidique qui, si elle pouvait d'une part contribuer légèrement à l'activité antioxydante et d'autre part pourrait réduire la disponibilité du 4,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de nortrachélogénine pour les cellules de Jurkat. En outre, le composant sucrer semble être responsable du potentiel cytotoxique plus élevé de la nortrachélogénine 4,4-di-O $\beta$ -D-glucopyranoside, peut-être en raison d'une perturbation du plasma Figure IV-6.



**Figure IV-6 :** Potentiel antioxydant du pinoresinol et des dérivés de la northrachelogenine dans les cellules.

**a)** Non stimulés (barres blanches) et stimulés par la BHP (barres noires) Les cellules de Jurkat ont été incubées avec chacun des composés testés (50  $\mu\text{M}$ ) ou avec le véhicule seulement. Concentrations cellulaires de peroxydes (fluorescence DCF) ont été mesurées par cytofluorométrie. Les données présentées ont été obtenues en utilisant les valeurs moyennes de fluorescence et sont les valeurs moyennes valeurs  $\pm$  SD d'au moins trois expériences réalisées en double. Les valeurs de P étaient toujours  $<0,01$ .

**b)** Les histogrammes représentatifs obtenus avec 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol (4).

## *Conclusion générale*

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et un flore Paléo Tropicale, estimée à des milliers d'espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont une faible partie de leurs plantes a été caractérisée d'un point de vue phytochimique.

Dans le cadre de la recherche des principes actifs extraits des plantes, nous avons abordé cette étude pour compléter si nécessaire les données structurales qui sont rapportés dans la littérature concernant deux plantes algériennes, *Solanum rostratum*, et *Galactites elegans* appartenant aux familles Solanaceae et Astraceae, deux familles connues pour leurs richesses en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, tels que les flavonoïdes, les lignanes, les polyacétylènes, les polyphénols et les iridoïdes. Ces deux espèces sont très peu étudiées.

Cette étude réalisée sur les trois extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des parties aériennes des deux espèces *Solanum rostratum* et *Galactites elegans*, respectivement, a permis d'isoler vingt-trois composés naturels.

L'isolement de ces métabolites secondaires est réalisé par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice, la chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20, la chromatographie sur plaque CCM en phase normale et inverse et la chromatographie liquide à haute performance HPLC.

Les structures des composés isolés ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques impliquant la RMN1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC ...), la spectrométrie de masse ESI/MS et haute résolution HRMS/MS, la mesure du et la comparaison avec les données de la littérature.

Dans cette étude, quatre composés (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside, apigénine-7-O-glucoside, astragaline et isorhamnetine-3-O-glucoside) ont été isolés d'espèces de *S. rostratum* qui poussent en Algérie. Il s'agit du premier rapport sur l'isolement et l'élucidation de la structure du linalyl- $\beta$ -glucopyranoside et de l'apigénine-7-O-glucoside de cette plante. De plus, dans cette étude, l'extrait de chloroforme de cette plante a été évalué pour son effet antioxydant et les résultats ont montré que l'extrait de chloroforme était un capteur de radicaux remarquable.

Tous les isolats (à l'exception de l'acide chlorogénique) ont été signalés pour la première fois dans le genre *Galactites* et la majorité des composants phénoliques isolés ont montré un potentiel antioxydant *in vitro* (DPPH) significatif. Les cellules Jurkat ainsi que contre l'augmentation de peroxyde induite par le traitement BHP.

En particulier, le 8 $\alpha$ -hydroxypinorésinol (4) était le composé le plus actif présentant 70% d'inhibition du niveau de peroxyde. Le potentiel antioxydant légèrement inférieur de la nortrachelogénine 4,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2) (45% de l'inhibition du niveau de peroxyde) pourrait être attribué à la présence d'un groupement glucidique.

Ces résultats ont permis une meilleure connaissance des constituants phytochimiques des espèces *Solanum rostratum* et *Galactites elegans* et montrent aussi leur intérêt comme sources potentielles de métabolites secondaires, ainsi que leur diversité structurale.

En particulier, le potentiel antioxydant de la nortrachelogénine (1), de la nortrachelogénine-4,4'-di-O- $\beta$ -Dglucopyranoside (2) et de 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol (4) a été étudié.

Le 4-ketopinorésinol (3) a été utilisé comme témoin positif, comme indiqué dans le rapport de Chen [150], mais le pinorésinol n'a pas été testé en raison de sa cytotoxicité élevée, et le 9 $\alpha$ -hydropinorésinol n'était pas actif [151]. La capacité des composés testés à réduire le niveau de peroxydes dans les cellules de Jurkat

- [1] Cox P. A., Balick M. J., (1994), The ethnobotanical approach to drug discovery. *Journal of Science American* 270(6): 82-87.
- [2] Newman D. J., Cragg G. M., (2007), Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.
- [3] Quezel P., Santa S., (1962), *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I et Tome II, C. N. R. S. Paris.
- [4] Akkal S., Benayache F., Benayache S., Jay M., (1997), Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 25(4): 361-362.
- [5] Medjroubi K., Benayache F., Bermejo J., (2005), Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 76(7-8): 744-746.
- [6] P. Ozenda. *Flore et végétation du Sahara*. Edition CNRS, Paris, 1991.
- [7] Alfred S. Gubb, *la flore Algérienne naturelle acquise*, p3, 1913.
- [8] QUÉZEL, P et Medail. (1995). *La flore du Bassin méditerranéen : origine, mise en place, endémisme*. *Ecologia mediterranea*, XXI (1/2) : 19-39.
- [9] DOBIGNARD, A. & CHATELLIN, C. (2013). *Index synonymique de la Flore d'Afrique du nord*, Volume 5: Dicotyledonae, Oleaceae à Zygophyllaceae. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. 451 p.
- [10] <https://www.aquaportail.com/taxonomie-ordre-49-asterales.html>
- [11] Bremer K. (1994). *Asteraceae, Cladistics and Classification*. (Timber Press), pp. 752, Portland, Oregon.
- [12] Pottier G., *Artemisia herba-alba*. *Flore de la Tunisie: angiospermes–dicotylédones–gamopétales*, 1981 1012 p
- [13] Quezel, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris.
- [14]. Barkely, T.M., Brouillet, L., Strother, J.L. (2006). *Flora of North America- Asteraceae* 19, 3-69
- [15] Dupont F. Guignard J.L. (2012). *Abrégé de Botanique 15ème édition*. Editions Masson, Paris
- [16] *Herbier numérique Leucanthemum vulgare, Taraxacum officinale, Carduus nutans* [consulté le 22/07/2012]. Disponible à partir de : <http://www.herbier-a3v.org/herbiernum/familles.php>.
- [17] Usher, G. (1966). *A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics* constable & Co Ltd, London.

- [18] Gaussen, H., Leroy, F. (1982). Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2ème édition, 424- 426.
- [19] Floret CH., Pontannier R. R., L'aridité en Tunisie présaharienne, climat, sol, végétation et aménagement. Trav. Docum. 1982 ORSTOM n° 155, p. 544.
- [20] Saleh N., El-Nougoumy S., Abd-Allah M., Abou-Zaid M., Dellmonica G. ,Chopin J., Phytochemistry (1985) 24(01): 201- 203
- Saleh N., El-Nougoumy S., Abd-Allah M., Abou-Zaid M., Dellmonica G. ,Chopin J., Phytochemistry (1985) 24(01): 201- 203
- [21] Tropicos, consulté le 21 novembre 2014
- [22] Alfred S. Gubb, la flore Algérienne naturelle acquise, p201, 1913.
- [23] Botineau, 2010.
- [24] Hunziker AT, 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In: The Biology and taxonomy of the Solanaceae [ed. by Hawkes, J. G. \Lester, R. N. \Skelding, A. D.]. London, UK: Published for the Linnean Society of London by Academic Press, 49-85
- [25] Acevedo-Rodríguez P, 1996. Flora of St. John, U.S. Virgin Islands. Memoirs of the New York Botanical Garden, 78:1-581
- [26] Smith AW, 1971. A Gardener's Dictionary of Plant Names: A Handbook on the Origin and Meaning of Some Plant Names, revised and enlarged by William T. Stearn. London, UK: Cassell and Co., 391 pp
- [27] Whalen MD, 1979. Speciation in Solanum, section Androceras. In: Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution [ed. by Hawkes, J. G. \Lester, R. N. \Nee, M. \Estrada-R, N.]. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, Kew, 581-596
- [28] Hong-juan H, Tie-jun L, Hui-min W, Ao-cheng C, Chao-xian Z, Shou-hui W (2017): One new flavonoid from Solanum rostratum, Natural Product P 1831-1835.
- [29] Qian S, Lin C, Zhenya W, Yun W (2018) Separation of Four Flavonol Glycosides from Solanum rostratum Dunal Using Solvent Sublimation Followed by HSCCC and Low Column Temperature Preparative HPLC. Journal of Chromatographic Science, Volume 56, Issue 8, P695–701,
- [30] Ce L, Jinlong T, Tong A, Feinan L, Pengfei J, Mingjia Z, Zhixiang L, Yulong F (2020) Secondary Metabolites from Solanum rostratum and Their Antifeedant Defense Mechanisms against Helicoverpa armigera, J. Agric. Food Chem. P 88–96
- [31] Vallejo-Marín M; Manson JS; Thomson JD; Barrett SCH, 2009. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. Journal of Evolutionary Biology, 22(4):828-839. <http://www.blackwell-synergy.com/loi/jeb>

- [32] Tiré de Vallejo-Marin M, 2014. Species account: *Solanum rostratum*. Botanical Society of the British Isles website. <http://sppaccounts.bsbi.org.uk/content/solanum-rostratum-2>
- [33] Zhao JiaLi; Solís-Montero L; Lou AnRu; Vallejo-Marín M, 2013. Population structure and genetic diversity of native and invasive populations of *Solanum rostratum* (Solanaceae). PLoS ONE, 8(11):e79807. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0079807>
- [34] Randall RP, 2012. A Global Compendium of Weeds. Perth, Australia: Department of Agriculture and Food Western Australia, 1124 pp. <http://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2013/20133109119.pdf>
- [35] USDA-ARS, 2014. Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>
- [36] (Deb DB, 1979. Solanaceae in India. In: The Biology and taxonomy of the Solanaceae [ed. by Hawkes, J. G. \Lester, R. N. \Skelding, A. D.]. London, UK: Academic Press, 87-112.
- [37] Jaeger P-ML; Hepper FN, 1986. A review of the genus *Solanum* in Africa. In: D'Arcy WG, ed. Solanaceae: Biology and Systematics. New York, USA: Columbia University Press, 41-55.
- [38] Carlo I. G. Tuberoso†\*, Ersilia Bifulco, Lumichrome and Phenyllactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey, J. Agric. Food Chem. 59, 1, 364-369
- [39] Igor jerkovic, Marin Roje, Bioorganic Research of *Galactites tomentosa* Moench. Honey Extracts: Enantiomeric Purity of Chiral Marker 3-Phenyllactic Acid, chirality, Volume26, Issue8, August 2014, 405-410
- [40] Methyl Syringate: A Chemical Marker of Asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) Monofloral Honey, 2009 , Journal of Agricultural and Food Chemistry [IF: 3.15]
- [41] Dietrich Bäumer, Hans Georg Ruppel, Phenolic Constituents of *Galactites tomentosa* (Asteraceae), Z. Naturforsch. 51c, 623 -626 1996
- [42] Menichini, F., Statti, G., Delle Monache, F. (1994): Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Calabria, Arcavacata di Rende, Italy. Flavonoid glycosides from *Scorzonera columnae*. Fitoterapia 65(6), 555-6.
- [43] Oksuz, S., Goren, N.; Ulubelen, A. (1990): Terpenoids from *Scorzonera tomentosa*. Fitoterapia 61(1), 92-3.

- [44] Tolstikhina V. V., Semenov A. A. (1998): Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* L. Cell culture SO RAN, Irkutsk, Russia. *Rastitel'nye Resursy* 34(2), 77-80.
- [45] Bin W., Guo Q. Li., Pei J. Qiu., Hua Shi Guan. (2007): Two new olean-type triterpene fattyesters from *Scorzonera mongolica*. *Chinese Chemical Letters* 18, 708–710.
- [46] Ting-Fu J., Yuan-Hong W., Zhi-Hua L., and Mei E. (2007): Determination of kava lactones and flavonoid glycoside in *Scorzonera austriaca* by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 854–858.
- [47] défenses constitutives, site Internet :  
[Http://quasimodo.versailles.inra.fr/inapg/reactdef/const/index.htm](http://quasimodo.versailles.inra.fr/inapg/reactdef/const/index.htm).
- [48] Pichersky. E; Gang. D. R, 2000, *TIPS*, 5, 439-445
- [49] Dave-Oomah. B, 2003, *Bulletin IBP*, numéro 1, Canada.
- [50] Bruneton J. (1999) : *Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3ème édition, Ed. Tec et Doc Lavoisier, 1120 p., Paris.
- [51] Dey, P.M., Harborne, J.B. (1991): *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
- [52] Manitto, P. (1981): *Biosynthesis of natural products*. John willey et sons. New york.
- [53] P. Boiteau, B. Pasich, A. Rakoto ratsimamanga. *Les triterpènoïdes en physiologie végétale et animale*. Paris, 1964.
- [54] Alkins, P.W., Holher, J.S.E et A, K.H. (1987). *Secondary Metabolism*. Chapitre 3 (Biosynthesis of Triterpenoids (Pentacyclic) and Steroids, 2 nd edition.Clarendon Press. Oxford.
- [55] Goodwin, T.W. (1971). *Biosynthesis of Carotenoides and Plant Triterpenes*. *Biochem.J*, 123, 293-329
- [56] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales*, 3 ème Edition, Tec et Doc, Paris
- [57] Goodwin, T.W. (1971). *Biosynthesis of Carotenoides and Plant Triterpenes*. *Biochem.J*, 123, 293-329
- [58] Abe, I.M.R et Glenn, D.P. (1993). *Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes*. *Chem.Rev*, 93, 2189-2206.
- [59] Richter, G. (1933), *Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie*, 333
- [60] Bruneton, J. (1933), *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales*, Techniques et Documentation Lavoisier.

- [61] Kochs G. and Grisebach, H. (1986), *Eur. J. Biochem.*, 155, 311.
- [62] Stotz, G., Spribille, R. and Forkmann, G.J. (1984) *Plant Physiol.*, 116, 173.
- Harborne, J. B. (1975).
- [63] *Flavonoids in phytochemistry*, Vol. II, Edition Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Educational Publishing.
- [64] Iinuma, M. and Mizuno, M. (1989), *Phytochemistry*, 28, 681
- [65] Deluca, V. and Ibrahim R. K. (1985b) *Arch. Biochem. Biophysics*, p. 606.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1988), [66] *In the flavonoids advances in research since 1980.* ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- [67] Ebel, J. and Hahlbrock, K. (1982), *In the flavonoids advances in research* eds J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall, London, 641-659.
- [68] Harbone, J.B. and Williams, C.A.(1988), *The flavonoids advances in research since 1986.* ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall. Ltd. P.303.
- [69] Bruneton, J., (1999), *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 3ème édition. 3, lavoisier, Paris.
- [70] Chopin, J. (1966), *Actualité de phytochimie fondamentale*, IIème série, édition Masson, Paris, p.119.
- [71] Bronner, W.E.; Beecher, G.R. (1995), Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A.*, 705: 247-256.
- [72] Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, 57, 43-46.
- [73] Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. (1996), Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* 32 (1), 17-27.
- [74] Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S. (1997), Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatography A.*, 761, 315-321.
- [75] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol.Med.* 20, 933-956.
- [76] Hahida, F. and Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992), Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32 (1), pp. 67-103
- [77] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochem.Pharmacol.*, 56 (2), pp. 213-222.

- [78] Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1997), Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic.Biol. Med.*, 22 (5), pp. 749-760.
- [79] Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A., Capasso, F., (1999), Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci.*, 65:337-53.
- [80] Matsuda, H., Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. and Mizuno, M. (1991), Pharmacological Study on Citrus fruits unshiu Markovich (2) on Flavonoid Components, *Yakugata Zasshi.*, 111, 193-198.
- [81] Nakujima, T., Manishi, M.I., Yamamoto, K., Cyong, J.C. and Hirai, K. (2001), Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in Scutellaria Root, On Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts, *Planta Med.*, 67, pp. 132-135.
- [82] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994), Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of Citrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm.Pharmacol.*, 46, pp. 118-122.
- [83] Eibi, G., Wagner, H. (1991), A new method for the in Vivo Screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE), Using the chromophore Labeled Substrate Dansyltriglycine, *Planta Medica.* 57, pp. 137-141.
- [84] Kim, H.K., Jeon, W.K. and Ko, B.S. (2001), Flavanone Gglycoside from Citrus junos and their Anti-influenza Virus Activity, *Planta Med.*, 67, 548-549.
- [85] Elsohly, H.N., Joshi, A.S., Nimrod, A.C., Walker, L.A. and Clark, A.M., (2001), Antifungal Chalcones fom *Maclura tinctoria*, *Planta Med.*, 67, 87-89.
- [86] Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T.D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Azzam, S., Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Berghe, D.V. and Vlietinck, A.J. (2002). Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med.*, 68, 539-541.
- [87] Gordon, H.M. (1996), Dietary Antioxydants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, pp. 265-273.
- [88] Gutteridg, J.M.L., and Halliwell, B.(1994), *Antioxidants in nutrition, Health and Disease.* Oxford University Press. Oxford.
- [89] Colette, N., Bernier, J.L., Henichart, J.P.Catteau, J.P., Gaydou, E.M.Wallt, J.C. (1992). Scavanger and antioxydant properties of ten synthetic Flavones. *Free Radical Biology and Medecine.* 13, pp. 211-219.
- [90] Murakami, N., Mostaqul, H.M., Tamura, S., Itagak, S. and Horii, T. (2001), A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium* (*Hydrangea macrophylla*) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 2445-2447.

- [91] Chaudhry, P.S.; Cabrera, J.; Juliani, H.R.; Varma, S.D. (1983), Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Iochem Pharmacol.*, 32, 1995-1998
- [92] Ong, K.C.; Khoo, H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* (1997). 29, 121-126.
- [93] Ong, K.C.; Khoo, H.E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.*, 67, 1695-1705.
- [94] Chun C, Ming-Hong Y, Yen-Yin C, Cheng-hsung C et Tsumo N. 1991. *American Journal of Chinese Medicine*, 17: 265-274.].
- [95] Pan J-Y., Chen S-L., Yang M-H., Wu J., Sinkkonen J., Zou K., An update on lignans: natural products and synthesis, *Natural Product Reports* 26, 1251-1292, **2009**.
- [96] Umezawa T., Okunishi T., Shimada M., Stereochemical diversity in lignan biosynthesis, *Wood Research* 84, 62-75, **1997**.
- [97] : Gang DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander Mijnsbrugge K, Bauw G, Boerjan W, Van Montagu. M, Davin .L.B et Lewis .N.G, Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J. Biol. Chem*, 11, 7516-7527, 1999.
- [98] : Amadou .S.S, étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Cornbreturn glutinosum* Perr.ex DC (Combretaceae), Thèse doctorat (Pharmacie), Université de Bamako, 2005.
- [99] : Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN et Thompson LU, Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone, *Mol. Cell. Biochem.* 202(1-2): 91-100, 1999.
- [100] T: Décrit à partir de matériel cultivé à Montpellier, France; G, G-DC, MPU, P; n.v., fide W.G. D'Arcy, *Ann. Missouri Bot. Gard.* 61: 858 (1974).
- [101] JSTOR Plants [archive] : *Galactites tomentosa* [archive] (en) (consulté le 23 novembre 2014)
- [102] NCBI : *Galactites tomentosa* [archive] (en) (consulté le 23 novembre 2014)
- [103] The Plant List : *Galactites tomentosa* Moench [archive] (en) (Source: The Global Compositae archive]) (consulté le 23 novembre 2014)
- [104] uBio : *Galactites tomentosa* Moench [archive] (en) (consulté le 23 novembre 2014)
- G. tomentosus :

- [105] INPN : *Galactites tomentosus* Moench, 1794 (Syn. *Galactites elegans*) [archive] (+ statut [archive] + description [archive]) (fr) (consulté le 23 novembre 2014)
- Tela Botanica (France métro [archive]) : *Galactites tomentosus* Moench [archive] (fr)
- [106] Y. Deng, Y.-W. Chin, H. Chai, W. J. Keller, and A. D. Kinghorn, "Anthraquinones with quinone reductase-inducing activity and benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) roots," *Journal of Natural Products*, vol. 70, no. 12, pp. 2049–2052, 2007.
- [107] H.-H. Chen, Y.-T. Chen, Y.-W. Huang, H.-J. Tsai, and C.-C. Kuo, "4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 52, no. 6, pp. 1054–1066, 2012.
- [108] Y. Zhou, W. Wang, L. Tang et al., "Lignan and flavonoid glycosides from *Urtica laetevirens* Maxim.," *Journal of Natural Medicines*, vol. 63, no. 1, pp. 100–101, 2009.
- [109] P. C. Eklund, O. K. Långvik, J. P. Wärnå, T. O. Salmi, S. M. Willför, and R. E. Sjöholm, "Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans," *Organic*
- [110] R. Wangteeraprasert, V. Lipipun, M. Gunaratnam, S. Neidle, S. Gibbons, and K. Likhitwitayawuid, "Bioactive compounds from *Carissa spinarum*," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 10, pp. 1496–1499, 2012.
- [111] B. Steffan, W. Wätjen, G. Michels et al., "Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): Uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 57, no. 2, pp. 233–240, 2005.
- [112] M. V. Potapovich, V. P. Kurchenko, D. I. Metelitzka, and O. I. Shadyro, "Antioxidant activity of oxygen-containing aromatic compounds," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 47, no. 4, pp. 346–355, 2011.
- [113] D.-F. Gao, Y.-J. Zhang, C.-R. Yang, K.-K. Chen, and H.-J. Jiang, "Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7517–7521, 2008.
- [114] L. Li and N. P. Seeram, "Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 22, pp. 11673–11679, 2010.
- [115] H. M. Sayed, M. H. Mohamed, S. F. Farag, G. A. Mohamed, O. R. M. Omobuwajo, and P. Proksch, "Fructose-amino acid conjugate and other constituents from *Cyperus rotundus* L.," *Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)*, vol. 22, no. 17, pp. 1487–1497, 2008.

- [116] X.-T. Liu, Z.-X. Wang, Y. Yang et al., “Active components with inhibitory activities on IFN- $\gamma$ /STAT1 and IL-6/STAT3 signaling pathways from *Caulis Trachelospermi*,” *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 11560–11571, 2014.
- [117] Q. Liu, Y.-T. Zhang, C.-R. Yang, and M. Xu, “Phenolic antioxidants from green tea produced from *camellia crassicolumna* var. *multiplex*,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 2, pp. 586–590, 2009.
- [118] R. Aversano, F. Contaldi, M. G. Adelfi et al., “Comparative metabolite and genome analysis of tuber-bearing potato species,” *Phytochemistry*, vol. 137, pp. 42–51, 2017.
- [119] A. Brito, J. E. Ramirez, C. Areche, B. Sepúlveda, and M. J. Simirgiotis, “HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile,” *Molecules*, vol. 19, no. 11, pp. 17400–17421, 2014.
- [120] J.-T. Han, M.-H. Bang, O.-K. Chun, D.-O. Kim, C.-Y. Lee, and N.-I. Baek, “Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 27, no. 4, pp. 390–395, 2004.
- [121] L. Tao, J. Huang, Y. Zhao, and C. Li, “Chemical constituents in *Buddleja albiflora*,” *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, vol. 34, no. 23, pp. 3043–3046, 2009.
- [122] X. Dai, Y. Ding, Z. Zhang, X. Cai, and Y. Li, “Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F  $\beta$ -cells via the mitochondrial pathway and NF- $\kappa$ B signaling,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 31, no. 1, pp. 265–271, 2013.
- [123] T.J. Mabry, K.R. Markham and M.B. Thomas; (1970), the systematic identification of flavonoïds. Springer-Verlag New York, Heidelberg.254p.
- [124]. M. Siddiq, S. Roidoung, D. S. Sogi, K. D. Dolan., *Food Chem.* 136 (2), 803-806. 2013.
- [125]. D. Krishnaiah, R. sarbatly, R. Nithyanandam., , *Food Bioprod. Process.* 89 (3), 217-233. 2011.
- [126]. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Trends in plant science*, 2 (4), 152-159. 1997.
- [127]. N. Andarwulan, R. Batari, D. A. Sandrasari, B. Bolling, H. Wijaya, *Food Chem.*, 121,1231-1235. 2010.
- [128]. H. Boeing, A. Bechthold, A. Bub, S. Ellinger, D. Haller, A. Kroke, E. L-Bonnet, M. J. Muller, H. Oberritter, M. Schulze, P. Stehle, B. Watzl., , *Eur. J. Nutr.* 51, 637-663. 2012.
- [129]. A. H. Lo, Y. C. Liang, S. Y. Lin-Shiau, C. T. Ho, J. K. Lin, *Carcinogenesis*, 23 (6), 983- 991. 2002.
- [130].. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-58. 1965.

- [131] L. Milella, A. Bader, N. De Tommasi, D. Russo, and A. Braca, "Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species," *Food Chemistry*, vol. 160, pp. 298–304, 2014.
- [132] H. Yegenoglu, B. Aslim, and F. Oke, "Comparison of antioxidant capacities of *Anoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer by using different in vitro methods," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 5, pp. 512–516, 2011.
- [133]. N. Bounaga, S. A. Brac de la Perrière., « Ressources phytogénétiques du Sahara », *Ann. Ins. Agro. El-Harach, Alger*, 12(1), T. 1. 1988.
- [134]. W. Tadrent, A. Kabouche, R. Touzani et Z. Kabouche, *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (xxx) in press. 2014.
- [135]. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-200. 1958.
- [136]. Oke-Altuntas F, Aslim B, Duman H, Kartal M. Comparative evaluation of total phenolic/carotenoid contents, chlorogenic acid/rutin profiles, and antioxidant properties of two *Prangos* species (*P. uechtrizii* and *P. pabularia*). *Int J Pharm Pharm Sci* 8:284-8. 2016.
- [137] Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L. Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7277–7286. 2006.
- [138] Rainha N., Lima E., Baptista J., Rodrigues C., Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1930-1940. 2011.
- [139] E. A. Decker and B. Welch, "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, no. 3, pp. 674–677, 1990.
- [140] F. Oke and B. Aslim, "Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P. H. Davis," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 6, pp. 1728–1733, 2010.
- [141] G. Rothe and G. Valet, "Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 47, no. 5, pp. 440–448, 1990.
- [142]. R. Terra, N. Rodrigue, "La cytométrie de flux : un rôle majeur dans le diagnostic des néoplasies hématologiques", *le LABexpert*, vol.2, no. 4, p. 8, 2012.
- [143]. Taie H, Abd-Alla H, Ali S, Aly H. Chemical composition and biological activities of two *Solanum tuberosum* cultivars grown in Egypt. *Int J Pharm Pharm Sci* 7:311-20. 2015.

- [144]. Sudheesh S, Sandhya C, Koshy AS, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 13:393-6. 1999.
- [145]. Hao LJ, Wang S, An YW, Zhu JJ, Wang ZM, Wei SH, Chen JB. Antioxidative properties of different extraction fractions from *Solanum rostratum* [J]. *China J Exp Tradit Med Formulae* 20:113-6. 2014.
- [146]. Gutiérrez AD, Bah M, Garduño RM, Mendoza DS, Serrano CV. Antiinflammatory and antioxidant activities of methanol extracts and alkaloid fractions of four Mexican medicinal plants of Solanaceae. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11:259-67. 2014.
- [147]. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-56. 1996;
- [148] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, and P. Velasco, "Phenolic compounds in Brassica vegetables," *Molecules*, vol. 16, no. 1, pp. 251–280, 2011.
- [149] B. Halliwell, "The wanderings of a free radical," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 46, no. 5, pp. 531–542, 2009.
- [150] H. Korte, V.-M. Lehtola, M. Unkila, M. Hiilovaara-Teijo, and M. Ahotupa, Lignan formulations, Google Patents, 2009.
- [151] H.-H. Chen, Y.-T. Chen, Y.-W. Huang, H.-J. Tsai, and C.- C. Kuo, "4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 52, no. 6, pp. 1054–1066, 2012.
- [152] B. Steffan, W. W'atjen, G. Michels et al., "Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): Uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 57, no. 2, pp. 233–240, 2005.
- [153] <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Ffr.wikipedia.org%2Fwiki%2FSolanaceae&psig=AOvVaw0mY76p7cSQOhpLEdnMeeuh&ust=1654169615122000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwigvt2TIIz4AhVOZ8AKHZIXBtQQjRx6BAgAEAs>
- [154] [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Ffr.wikipedia.org%2Fwiki%2FPomme\\_de\\_terre&psig=AOvVaw2bfFXGjXHpIPDn4Zh1BQYA&ust=1654169793439000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCNCOru2UjPgCFQAAAAAdAAAAABAD](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Ffr.wikipedia.org%2Fwiki%2FPomme_de_terre&psig=AOvVaw2bfFXGjXHpIPDn4Zh1BQYA&ust=1654169793439000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCNCOru2UjPgCFQAAAAAdAAAAABAD)
- [155] [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Ffr.m.wikipedia.org%2Fwiki%2FFichier%3ASolanum\\_rostratum\\_\(Buffalo\\_bur\).jpg&psig=AOvVaw2kOlr9XTX5k1wCRbQ1mtmv&ust=1654170111249000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCNCxq5GWjPgCFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Ffr.m.wikipedia.org%2Fwiki%2FFichier%3ASolanum_rostratum_(Buffalo_bur).jpg&psig=AOvVaw2kOlr9XTX5k1wCRbQ1mtmv&ust=1654170111249000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCNCxq5GWjPgCFQAAAAAdAAAAABAE)
- [156] [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Fstringfixer.com%2Far%2FGalactites\\_tomentosa&psig=AOvVaw0jLSyYUSWUKM15s99TkCrn&ust=1654422167611000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCLCz44vBk\\_gCFQAAAAAdAAAAABAG](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2Fstringfixer.com%2Far%2FGalactites_tomentosa&psig=AOvVaw0jLSyYUSWUKM15s99TkCrn&ust=1654422167611000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCLCz44vBk_gCFQAAAAAdAAAAABAG)

## Research Article

# Antioxidant Potential of Herbal Preparations and Components from *Galactites elegans* (All.) Nyman ex Soldano

Omar Tebboub,<sup>1</sup> Roberta Cotugno,<sup>2</sup> Feyza Oke-Altuntas,<sup>3</sup> Mohamed Bouheroum,<sup>1</sup> Ibrahim Demirtas,<sup>4</sup> Massimiliano D'Ambola,<sup>2</sup> Nicola Malafrente,<sup>2</sup> and Antonio Vassallo<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Unité de Recherche de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physico-Chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculty of Exact Sciences, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Algeria

<sup>2</sup>Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, (SA), Italy

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Gazi University, Ankara 06500, Turkey

<sup>4</sup>Laboratory of Plant Research, Department of Chemistry, Faculty of Science, Cankiri Karatekin University, Cankiri, Turkey

<sup>5</sup>Dipartimento di Scienze, Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Italy

Correspondence should be addressed to Antonio Vassallo; [antonio.vassallo@unibas.it](mailto:antonio.vassallo@unibas.it)

Received 15 March 2018; Revised 14 September 2018; Accepted 2 October 2018; Published 16 October 2018

Academic Editor: Jae Youl Cho

Copyright © 2018 Omar Tebboub et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Galactites* is a genus of flowering plants belonging to Asteraceae family. This genus is mainly represented by the *Galactites elegans* (All.) Nyman ex Soldano, the milky thistle, a plant of Mediterranean origin. *Galactites elegans* is consumed as a monofloral boar thistle honey. Chromatography separation of CHCl<sub>3</sub> and *n*-BuOH extracts of aerial parts of *G. elegans* led to isolation of 18 pure compounds. Their structures were elucidated by 1D- and 2D-NMR spectroscopy and confirmed by mass spectrometry analysis. Sinapic aldehyde, abietin, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol, 9 $\alpha$ -hydroxypinoresinol, pinoresinol, 4-ketopinoresinol, nortrachelogenin, and erythro-guaiacylglycerol- $\beta$ -O-4'-dihydroconiferyl alcohol were isolated from CHCl<sub>3</sub> extract, while luteolin 4'-O-glucuronide, naringenin-7-O-neohesperidoside, kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, apigenin-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, ciwujiatone, and nortrachelogenin-4,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside were obtained from *n*-BuOH extract. The majority of isolated compounds displayed a significant antioxidant potential *in vitro* test (DPPH). The ability of compounds to reduce the level of peroxides in control and BHP-treated Jurkat cells was studied. The lignan derivatives were also able to reduce at 50  $\mu$ M the basal level of peroxides in Jurkat cells as well as counteract peroxide increase induced by BHP treatment. Particularly 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol was the most active showing 70% of peroxide level inhibition.

## 1. Introduction

*Galactites* is a genus of flowering plants belonging to Asteraceae Compositae (commonly referred to as the aster, daisy, composite, or sunflower family) which is a very large and widespread family of flowering plants (Angiospermae). Many members belonging to this family are herbaceous, but a significant number are also shrubs, vines, or trees. The family has a worldwide distribution most commonly in the arid and semiarid regions of subtropical and lower temperate latitudes [1]. Asteraceae is an economically important family, providing products such as cooking oils, lettuce, sunflower

seeds, artichokes, sweetening agents, coffee substitutes, and herbal teas. Plants in Asteraceae are medically important in areas that do not have access to Western medicine. They are also commonly featured in medical and phytochemical journals because the sesquiterpene lactone compounds contained within them are an important cause of allergic contact dermatitis [2].

This genus is mainly represented by the *Galactites elegans* (All.) Nyman ex Soldano, the milky thistle, a plant of Mediterranean origin (synonym: *Galactites tomentosa* Moench; common name: Scarlina). *Galactites elegans* is consumed as a monofloral boar thistle honey. This plant prefers sunny places

and usually grows on the uncultivated or barren grounds, waste places, well-drained soils, pastures, and roadsides [3–5].

In our systematic search for polyphenolic constituents from Algerian plants, we have investigated the aerial parts of *Galactites elegans* and report herein isolation and structural elucidation of 18 compounds and their antioxidant activities.

## 2. Material and Methods

**2.1. Chemicals and Reagents.** Anhydrous sodium carbonate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, and methanol (analytical reagent and HPLC gradient grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine), iron (II) chloride ( $\text{FeCl}_2$ ), gallic acid, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), and dimethylsulphoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). All other chemicals were analytical grade and obtained from either Sigma or Merck. RPMI-1640 medium was from BioWhittaker Lonza (NJ, USA). Fetal bovine serum (FBS) was from GIBCO (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), *tert*-butyl hydroperoxide (BHP), and all the other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

**2.2. General Experimental Procedures.** Briefly optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1 dm microcell. UV spectra were recorded on a Perkin-Elmer-Lambda spectrophotometer. NMR experiments were performed on a Bruker DRX-600 spectrometer at 300 K. HRES-IMS were acquired in positive ion mode on a Q-TOF premier spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Waters-Milford, MA, USA). Column chromatography was performed over Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences; Uppsala, Sweden). Silica gel 60 (0.040–0.063 mm; Carlo Erba; Milan, Italy) was used as column material. HPLC separation was conducted on a Shimadzu LC-8A series pumping system equipped with a Shimadzu RID-10A refractive index detector and Shimadzu injector on a  $\text{C}_{18}\mu\text{-Bondapak}$  column (30 cm x 7.8 mm, 10  $\mu\text{m}$  Waters, flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ). TLC was performed on precoated Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck; Darmstadt, Germany); compounds were detected by  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) solution; and reagent grade chemicals (Carlo Erba; Milan, Italy) were used throughout [6, 7].

**2.3. Plant Material.** The aerial parts of *Galactites elegans*, voucher specimen (Gae alg0312-2012), were collected in the end of March 2013 (flowering stage) in Hamma Bouziane, Constantine, Algeria. Fresh aerial parts were dried to constant weight at room temperature.

**2.4. Extraction and Isolation.** Dried and powdered aerial parts of *G. elegans* (966 g) were macerated with  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$

(8:2) at room temperature. The operation repeated 3 times. The hydromethanolic extract was concentrated to dryness (under low pressure). The residue was suspended in  $\text{H}_2\text{O}$  and successively partitioned with petroleum ether for 1 time then  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, and *n*-BuOH (3 mL x300 mL, each), respectively, affording a  $\text{CHCl}_3$  soluble fraction (2 g), an EtOAc-soluble fraction (5.5 g), and a *n*-BuOH soluble fraction (19 g).

A part of butanolic extract (2.79 g) was submitted to chromatographic separation on a Sephadex LH-20 column, using MeOH as mobile phase; fractions were collected, analyzed by TLC on silica 60 F254 gel-coated glass sheets using  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (80:18:2, v/v/v) and *n*-BuOH-AcOH- $\text{H}_2\text{O}$  (60:15:25, v/v/v) as eluent, and grouped to obtain 26 fractions.

The compound luteolin 4'-*O*-glucuronide [8] (7.3 mg) was obtained directly from the fraction 22. Fraction 6 was chromatographed using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (42:58, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compound nortrachelogenin 4,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (2) [9] (1.1 mg,  $t_R$  36 min). Fraction 8 was isolated using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (37:63, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compounds chlorogenic acid [10] (8.1 mg,  $t_R$  8 min), neochlorogenic acid [11] (3.0 mg,  $t_R$  9 min), naringenin-7-*O*-neohesperidoside [12] (19.2 mg,  $t_R$  27 min), quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside [13] (3.0 mg,  $t_R$  52 min), apigenin-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside [14] (1.4 mg,  $t_R$  62 min), and Kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside [13] (1.9 mg,  $t_R$  82 min). Fraction 9 was separated using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (35:65, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compound quercitrin [15] (24.7 mg,  $t_R$  23 min). Fraction 14 was chromatographed using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2:3, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compound quercitrin [15] (5.7 mg,  $t_R$  34 min).

A part of  $\text{CHCl}_3$  extract (1.87 g) was fractionated by column chromatography (CC) of Silica gel eluted with  $\text{CHCl}_3$  followed by increasing concentrations of MeOH in  $\text{CHCl}_3$  (between 1% and 100%), fractions were collected and monitored by TLC to obtain 20 fractions. Fraction 4 was chromatographed using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2:3, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compounds ciwujiatone [16] (0.7 mg,  $t_R$  10 min), 4-ketopinoresinol [17] (3) (1.9 mg,  $t_R$  40 min), pinoresinol [18] (1.2 mg,  $t_R$  48 min), and nortrachelogenin [19] (1) (2.1 mg,  $t_R$  57 min). Fraction 10 was chromatographed using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (35:65, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compound 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol [20] (4) (1.8 mg,  $t_R$  10 min). The Fraction 11 was separated using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2:3, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compound 9 $\alpha$ -hydroxypinoresinol [21] G4 (2.2 mg,  $t_R$  38 min). Fraction 12 was chromatographed using RP18 HPLC with  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (35:65, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) to yield pure compounds sinapic aldehyde [22] (0.7 mg,  $t_R$  16 min) and abietin [23] (1.1 mg,  $t_R$  17 min).

Fraction 15 was chromatographed using RP18 HPLC with MeOH/H<sub>2</sub>O (7:18, v/v) as mobile phase (flow rate 2.0 mL min<sup>-1</sup>) to yield pure compound *erythro*-guaiacylglycerol- $\beta$ -O-4'-dihydroconiferyl alcohol [24] (1.3 mg, t<sub>R</sub> 64 min).

The structure of each compound was determined by NMR (see Figures S1-S11 in the Supplementary Material for the <sup>1</sup>H NMR spectra of the tested lignans and glycosides).

## 2.5. Antioxidant Activity

**2.5.1. Determination of Total Phenolic Contents.** Total phenolic contents of the samples were analyzed using the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Milella [25] using gallic acid as standard, with some modifications [26]. The fraction solutions were mixed with 0.2 mL of 50% Folin-Ciocalteu reagent and allowed to react for 3 min and 1 mL aqueous solution of 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added. At the end of incubation for 45 min at room temperature, absorbance of each mixture was measured at 760 nm. The same procedure was also applied to the standard solutions of gallic acid. Total phenolic contents were expressed as  $\mu$ g gallic acid equivalents per mg of the fractions.

**2.6. DPPH Radical Scavenging Assay.** Radical scavenging activity was determined by a spectrophotometric method based on the reduction of a methanol solution of DPPH using the method of Blois [27]. The sample solutions were added to 0.004% methanol solution of DPPH. The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 517 nm against a blank by a spectrophotometer (Rayleigh, UV-2601). Scavenging of DPPH radical was calculated according to formula:

$$\text{Radical scavenging \%} = \left[ \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound) and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the test compound. DPPH scavenging activity was expressed as IC<sub>50</sub> values ( $\mu$ g/mL) for comparison. The IC<sub>50</sub> value of each sample was defined as the concentration of sample required for a 50% decrease in absorbance of the blank. BHT and BHA were used as positive controls.

**2.7. Metal Chelating Activity on Ferrous Ions (Fe<sup>2+</sup>).** Metal chelating activity was determined according to the method of Decker and Welch [28], with some modifications [29, 30]. Briefly, 0.5 mL of the samples was mixed with 0.05 mL 2 mM FeCl<sub>2</sub> and 0.1 mL 5 mM ferrozine. The mixture was diluted with methanol (2 mL) and left standing at room temperature for 10 minutes. The absorbance of the solution was measured spectrophotometrically at 562 nm. EDTA was used as a positive control.

**2.8. Cell Cultures.** Jurkat cells (a T-cell leukemia cell line obtained from Cell Bank in GMP-IST, Genova, Italy) were

maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. To ensure logarithmic growth, cells were subcultured every three days. Stock solutions (50 mM) of polyphenolic compounds in DMSO were stored at -20°C and appropriately diluted in the same solvent or directly in the medium just before use (DMSO never exceeding 0,5%).

**2.9. Peroxide Depletion Activity of Test Compounds by Cytofluorometry.** The evaluation of intracellular peroxides concentration was performed according to Rothe [30] with some modifications. In detail, Jurkat cells were collected by centrifugation and suspended in RPMI containing 5% FBS at a density of 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL. FBS concentration was lowered to 2% to increase the uptake rate of flavonoids and reagents in the short-incubation time (1 hr) chosen for the assay. Cell suspensions were incubated with increasing concentrations of each chemical or vehicle only at 37°C. For each sample duplicate test tubes were prepared. After 30 min of incubation, BHP (550  $\mu$ M final concentration) or an equal volume of vehicle was added. This allowed us to monitor the effect of flavonoids on BHP-induced peroxide elevation or the basal levels of peroxides, respectively. In the last 15 min of incubation cells were loaded with DCFH-DA (8  $\mu$ M final concentration). Test tubes were gently mixed several times along the incubation period (1 hr). Cells suspension were then washed and resuspended in an equal volume of medium and 10,000 events were analyzed for DCF-fluorescence by cytofluorometry (BD FACSCalibur™ instrument, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). DCF green fluorescence was analyzed in the FL1 channel ( $\lambda_{\text{exc}}$  488 nm; ( $\lambda_{\text{em}}$  535 nm). Before the cytofluorometric analysis an aliquot of each sample was withdrawn to evaluate cell viability by Trypan-blue exclusion test.

**2.10. Statistical Analysis.** All experiments were performed in triplicate and the results were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analyses were performed using the SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). For DPPH activity, differences among means were done by analysis of variance (ANOVA), and averages were compared using the Duncan test. For other tests, differences between treatment groups were analyzed by the student test. Differences were considered significant when P < 0.05.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Antioxidant Activities of Extracts and Components from *Galactites elegans*

**3.1.1. Total Phenolic Content.** Phenolic compounds are characterized by having at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups attached which directly contribute to the antioxidant properties [31]. Therefore, it is important to evaluate the total phenolic in the extracts from *Galactites elegans*. The contents of total phenolic compounds in the

TABLE 1: Antioxidant activities of the extracts from *Galactites elegans*<sup>1</sup>.

Material	DPPH IC <sub>50</sub> (μg/mL)	Total phenolic content (μgGAE/mg of material)	Metal chelating activity (%)
Ex. CHCl <sub>3</sub>	41.2 ± 1.3 <sup>d</sup>	116.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	NA <sup>2</sup>
Ex. <i>n</i> -Butanol	52.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	94.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	38.5 ± 1.4 <sup>b</sup>
BHT	22.3 ± 0.8 <sup>b</sup>	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>
BHA	19.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>
EDTA	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>	93.7 ± 0.3 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Values represent averages ± standard deviations for triplicate experiments. Values in the same column with different superscripts are significantly ( $p < 0.05$ ) different. <sup>2</sup>Not active. <sup>3</sup>Not studied.

TABLE 2: IC<sub>50</sub> values of polyphenols tested against the DPPH radical.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>
BHT (positive control)	98.8 ± 4.5
BHA (positive control)	105.4 ± 5.3
4-ketopinoresinol (3)	143.3 ± 13.1
8α-hydroxypinoresinol (4)	71.5 ± 5.9
9α-hydroxypinoresinol	84.0 ± 2.9
Abietin	>500
apigenin-7- <i>O</i> - <i>α</i> -L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (isorhoifolin)	>500
chlorogenic acid	59.8 ± 4.9
Ciwujiatone	64.7 ± 5.3
<i>erythro</i> -guaiacylglycerol-β- <i>O</i> -4'-dihydroconiferyl alcohol	>500
kaempferol-3- <i>O</i> - <i>α</i> -L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (biorobin)	39.4 ± 2.8
luteolin 4'- <i>O</i> -glucuronide	38.9 ± 2.5
naringenin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	116.0 ± 9.7
neochlorogenic acid	65.8 ± 4.8
nortrachelogenin (1)	38.6 ± 2.7
nortrachelogenin-4,4'-di- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (2)	34.4 ± 2.3
pinoresinol	50.8 ± 3.1
quercetin-3- <i>O</i> - <i>α</i> -L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (rutin)	63.0 ± 4.6
quercitrin	12.2 ± 1.0
sinapic aldehyde	53.4 ± 3.8

<sup>1</sup>Values represent averages ± standard deviations for triplicate experiments.

extracts, expressed as μg gallic acid equivalents per milligram of dry extract, are shown in Table 1.

**3.1.2. DPPH Radical Scavenging Activity.** DPPH radical scavenging activities of the extracts and the reference synthetic agents are given in Table 1. According to these IC<sub>50</sub> values, the DPPH radical scavenging abilities among the different extracts were in the order of CHCl<sub>3</sub> > *n*-BuOH ( $P < 0.05$ ). Furthermore, pure compounds radical scavenging abilities is reported in Table 2. Lower IC<sub>50</sub> value indicates higher free radical scavenging activity.

**3.1.3. Metal Chelating Activity.** Iron ions catalyse the conversion of less reactive species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or lipid peroxides into more reactive ones such as hydroxyl or peroxy/alkoxy radicals. Therefore, extracts with iron chelating ability can act as powerful antioxidants [32]. The metal chelating ability of the extracts was investigated by ferrozine assay. The chelating

potential of *n*-BuOH extract was determined as 38.5 ± 1.4 % that was significantly lower ( $p < 0.01$ ) than synthetic chelating agent EDTA (93.7 ± 0.3 %) at the concentration of 2 mg/mL. On the other hand, chloroformic extract was not effective at the tested concentration.

**3.2. Antioxidant Potential of Test Compounds by Cytofluorometry.** This study was carried out in order to discover natural compounds which could be used as active ingredients to improve the health and/or physical appearance of the skin or as preservatives or stabilizers for other active ingredients or vehicles in topical formulations. As reported in a recent work of Korte [33], natural products which show this kind of bioactivity are lignans and lignan esters. For these reasons, among all the tested molecules, pinoresinol and the nortrachelogenin derivatives have been selected (Figure 1; see Figures S1-S4 in the Supplementary Material for the <sup>1</sup>H NMR spectra of compounds).

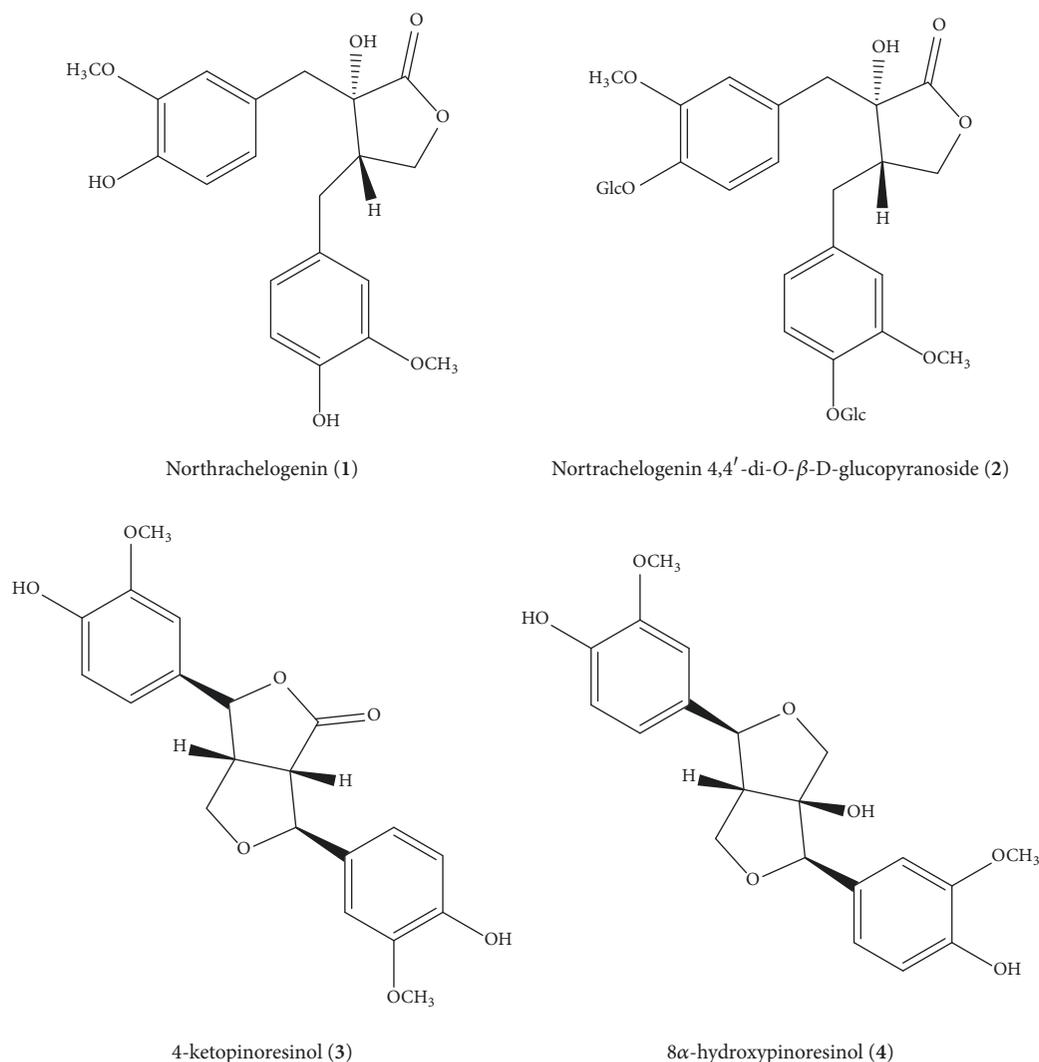


FIGURE 1: Structures of the tested lignans.

Particularly, the *in cell* antioxidant potential of nortrachelogenin (1), nortrachelogenin-4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside (2), and 8α-hydroxypinoresinol (4) have been investigated.

4-ketopinoresinol (3) was used as positive control as reported in Chen [17], however pinoresinol was not tested because of its high cytotoxicity, instead 9 hydroxypinoresinol was not active [21]. The ability of test compounds to reduce the level of peroxides in control and BHP-treated Jurkat cells was measured by cytofluorometry. Each chemical was tested at 25 μM and 50 μM concentrations, being the latter the maximum dose not cytotoxic. They were able to reduce the basal level of peroxides in *Jurkat cells* as well as counteract peroxide increase induced by BHP treatment. The slight lower antioxidant potential of nortrachelogenin 4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside (2) could be ascribed to the presence of a carbohydrate moiety which, if on one hand could slight contribute to the antioxidant activity and on the other hand might reduce nortrachelogenin 4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside availability for *Jurkat cells*. In

addition,— the sugar component seems to be responsible for the higher cytotoxic potential of nortrachelogenin 4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside, possibly due to perturbation of plasma membrane (Figure 2).

#### 4. Conclusion

All the isolates (except chlorogenic acid) were first reported from the genus *Galactites* and the majority of isolated phenolic components displayed a significant antioxidant potential *in vitro* assay (DPPH). The lignan derivatives were also able to reduce at 50 μM the basal level of peroxides in *Jurkat cells* as well as counteract peroxide increase induced by BHP treatment.

Particularly, 8α-hydroxypinoresinol (4) was the most active compound showing 70% of peroxide level inhibition. The slight lower antioxidant potential of nortrachelogenin 4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside (2) (45% of peroxide level inhibition) could be ascribed to the presence of a carbohydrate moiety.

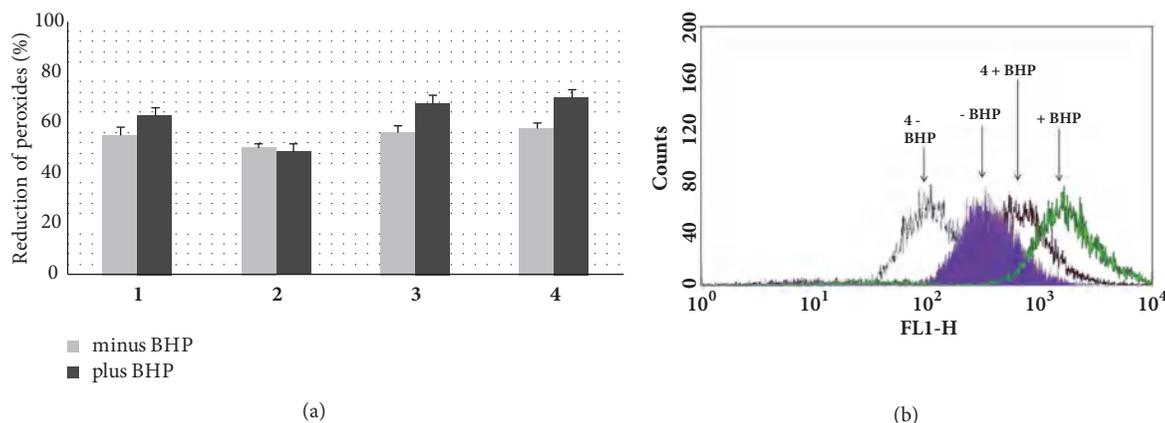


FIGURE 2: In-cells antioxidant potential of pinoresinol and the northrachelogenin derivatives. (a) Unstimulated (white bars) and BHP-stimulated (black bars) Jurkat cells were incubated with each tested compounds (50  $\mu$ M) or vehicle only. Cellular concentrations of peroxides (DCF fluorescence) were measured by cytofluorometry. Data shown were obtained using the mean fluorescence values and are the mean values  $\pm$  SD of at least three experiments performed in duplicate. P values were always <0.01. (b) Representative histograms obtained with 8 $\alpha$ -hydroxypinoresinol (4).

This result suggests that active fractions could be used as a source of antioxidant agent for pharmaceutical and cosmetic preparations.

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

### Conflicts of Interest

All authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

### Authors' Contributions

Omar Tebboub and Roberta Cotugno are equal contributing authors.

### Acknowledgments

This work was supported financially by University of Basilicata (Local Interest Funds 2015), Potenza, Italy.

### Supplementary Materials

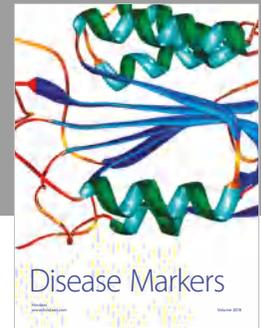
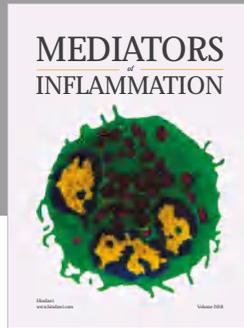
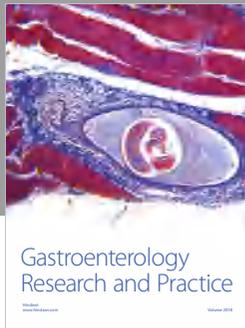
Figure S1: <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 1 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S2: <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 2 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S3: <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 3 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S4: <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 4 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S5: <sup>1</sup>H NMR spectrum of abietin (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S6: <sup>1</sup>H NMR spectrum of luteolin 4'-O-glucuronide (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S7: <sup>1</sup>H NMR spectrum of naringenin-7-O-neohesperidoside (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S8: <sup>1</sup>H NMR spectrum of kaempferol-3-

O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S9: <sup>1</sup>H NMR spectrum of apigenin-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S10: <sup>1</sup>H NMR spectrum of quercitrin (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). Figure S11: <sup>1</sup>H NMR spectrum of quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz). (Supplementary Materials)

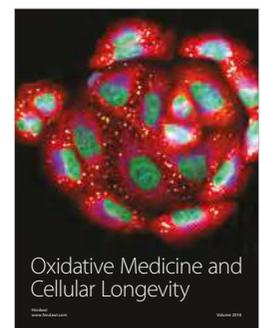
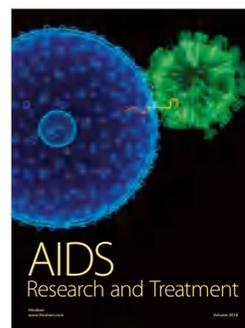
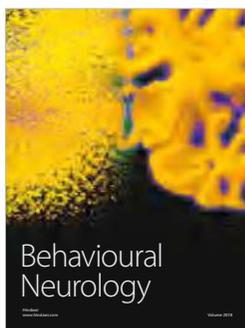
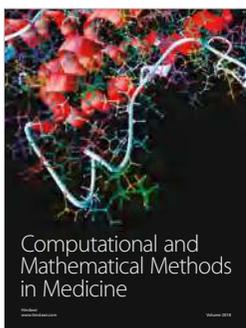
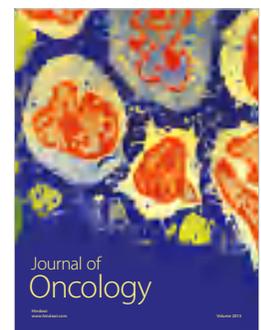
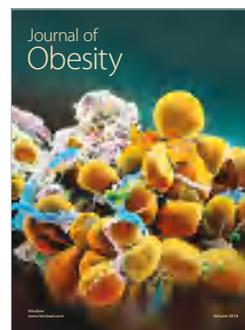
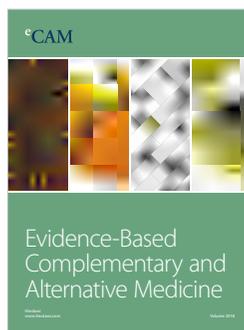
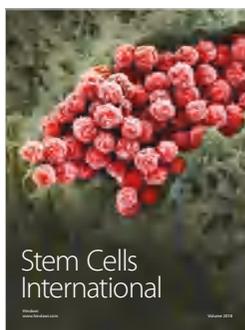
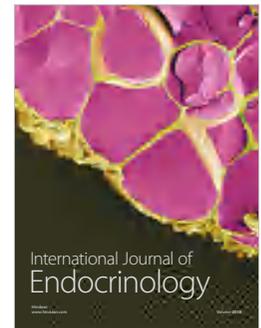
### References

- [1] T. Barkley, L. Brouillet, and J. Strother, *Flora of North America, Asteraceae, part 1*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2006.
- [2] M. Heinrich, M. Robles, J. E. West, B. R. Ortiz De Montellano, and E. Rodriguez, "Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae)," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 38, pp. 539–565, 1998.
- [3] C. Moench, *Methodus plantarum horti botanici et agri Marburgensis*, in officina nova libraria academiae, Marburgi Cattorum, 1794.
- [4] S. Pignatti, "Note critiche sulla flora d'Italia. VII. Supplemento," *Giornale Botanico Italiano*, vol. 116, no. 1-2, pp. 93–95, 2009.
- [5] I. Jerković, M. Roje, C. I. G. Tuberoso et al., "Bioorganic research of galactites tomentosa moench. Honey extracts: Enantiomeric purity of chiral marker 3-phenyllactic acid," *Chirality*, vol. 26, no. 8, pp. 405–410, 2014.
- [6] L. Milella, S. Milazzo, M. De Leo et al., " $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from *Arcytophyllum thymifolium*," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 8, pp. 2104–2112, 2016.
- [7] M. J. Gualtieri, N. Malafronte, A. Vassallo et al., "Bioactive limonoids from the leaves of *Azadirachta indica* (Neem)," *Journal of Natural Products*, vol. 77, no. 3, pp. 596–602, 2014.
- [8] H. M. Sayed, M. H. Mohamed, S. F. Farag, G. A. Mohamed, O. R. M. Omobuwajo, and P. Proksch, "Fructose-amino acid conjugate and other constituents from *Cyperus rotundus* L.," *Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)*, vol. 22, no. 17, pp. 1487–1497, 2008.

- [9] X.-T. Liu, Z.-X. Wang, Y. Yang et al., "Active components with inhibitory activities on IFN- $\gamma$ /STAT1 and IL-6/STAT3 signaling pathways from *Caulis Trachelospermi*," *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 11560–11571, 2014.
- [10] Q. Liu, Y.-T. Zhang, C.-R. Yang, and M. Xu, "Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia crassicolumna* var. *multiplex*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 2, pp. 586–590, 2009.
- [11] R. Aversano, F. Contaldi, M. G. Adelfi et al., "Comparative metabolite and genome analysis of tuber-bearing potato species," *Phytochemistry*, vol. 137, pp. 42–51, 2017.
- [12] A. Brito, J. E. Ramirez, C. Areche, B. Sepúlveda, and M. J. Simirgiotis, "HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile," *Molecules*, vol. 19, no. 11, pp. 17400–17421, 2014.
- [13] J.-T. Han, M.-H. Bang, O.-K. Chun, D.-O. Kim, C.-Y. Lee, and N.-I. Baek, "Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 27, no. 4, pp. 390–395, 2004.
- [14] L. Tao, J. Huang, Y. Zhao, and C. Li, "Chemical constituents in *Buddleja albiflora*," *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, vol. 34, no. 23, pp. 3043–3046, 2009.
- [15] X. Dai, Y. Ding, Z. Zhang, X. Cai, and Y. Li, "Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F  $\beta$ -cells via the mitochondrial pathway and NF- $\kappa$ B signaling," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 31, no. 1, pp. 265–271, 2013.
- [16] Y. Deng, Y.-W. Chin, H. Chai, W. J. Keller, and A. D. Kinghorn, "Anthraquinones with quinone reductase-inducing activity and benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) roots," *Journal of Natural Products*, vol. 70, no. 12, pp. 2049–2052, 2007.
- [17] H.-H. Chen, Y.-T. Chen, Y.-W. Huang, H.-J. Tsai, and C.-C. Kuo, "4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 52, no. 6, pp. 1054–1066, 2012.
- [18] Y. Zhou, W. Wang, L. Tang et al., "Lignan and flavonoid glycosides from *Urtica laetevirens* Maxim.," *Journal of Natural Medicines*, vol. 63, no. 1, pp. 100–101, 2009.
- [19] P. C. Eklund, O. K. Långvik, J. P. Wärnå, T. O. Salmi, S. M. Willför, and R. E. Sjöholm, "Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 3, no. 18, pp. 3336–3347, 2005.
- [20] R. Wangteeraprasert, V. Lipipun, M. Gunaratnam, S. Neidle, S. Gibbons, and K. Likhitwitayawuid, "Bioactive compounds from *Carissa spinarum*," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 10, pp. 1496–1499, 2012.
- [21] B. Steffan, W. Wätjen, G. Michels et al., "Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): Uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 57, no. 2, pp. 233–240, 2005.
- [22] M. V. Potapovich, V. P. Kurchenko, D. I. Metelitz, and O. I. Shadyro, "Antioxidant activity of oxygen-containing aromatic compounds," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 47, no. 4, pp. 346–355, 2011.
- [23] D.-F. Gao, Y.-J. Zhang, C.-R. Yang, K.-K. Chen, and H.-J. Jiang, "Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7517–7521, 2008.
- [24] L. Li and N. P. Seeram, "Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 22, pp. 11673–11679, 2010.
- [25] L. Milella, A. Bader, N. De Tommasi, D. Russo, and A. Braca, "Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species," *Food Chemistry*, vol. 160, pp. 298–304, 2014.
- [26] H. Yegenoglu, B. Aslim, and F. Oke, "Comparison of antioxidant capacities of *Ganoderma lucidum* (curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) bondartsev & singer by using different in vitro methods," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 5, pp. 512–516, 2011.
- [27] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958.
- [28] E. A. Decker and B. Welch, "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, no. 3, pp. 674–677, 1990.
- [29] F. Oke and B. Aslim, "Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 6, pp. 1728–1733, 2010.
- [30] G. Rothe and G. Valet, "Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 47, no. 5, pp. 440–448, 1990.
- [31] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, and P. Velasco, "Phenolic compounds in Brassica vegetables," *Molecules*, vol. 16, no. 1, pp. 251–280, 2011.
- [32] B. Halliwell, "The wanderings of a free radical," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 46, no. 5, pp. 531–542, 2009.
- [33] H. Korte, V.-M. Lehtola, M. Unkila, M. Hiilovaara-Teijo, and M. Ahotupa, *Lignan formulations*, Google Patents, 2009.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
[www.hindawi.com](http://www.hindawi.com)



## PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIOXIDANT EFFECT OF *SOLANUM ROSTRATUM* SPECIES FROM ALGERIA

TEBBOUB OMAR<sup>1</sup>, LABIB NOMAN<sup>2,4\*</sup>, BOUHROUME MOHAMED<sup>1</sup>, FEYZA OKE ALTUNTAS<sup>3</sup>, IBRAHIM DEMIRTAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université frères Mentouri, Constantine, Algérie. <sup>2</sup>Department of Chemistry, Laboratory of Plant Research, Faculty of Science, Cankiri Karatekin University, Cankiri, Turkey. <sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Gazi University, Ankara, Turkey, <sup>4</sup>Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Taiz University, Taiz, Yemen. Email: labibnomanali@gmail.com

Received: 25 January 2018, Revised and Accepted: 03 March 2018

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to isolate the constituents and evaluate the antioxidant activity of *Solanum rostratum* Dunal (Solanaceae) from Algeria.

**Methods:** In this study, phytochemical analyses of the chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts obtained from the aerial parts of *S. rostratum* were performed by column chromatography, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography techniques. The antioxidant activity was performed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging assay method.

**Results:** The identification and structure elucidation of the isolated compounds were compared with their nuclear magnetic resonance spectra and the literature led to identify one monoterpene glycoside (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside) (1) and three flavonoid glycosides: Apigenin-7-*O*-glucoside (2), astragalol (3) and (isorhamnetin-3-*O*-glucoside) (4).

**Conclusion:** This is the first report on the isolation and structure elucidation of compound (1) (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside) and compound (2) (apigenin-7-*O*-glucoside) from this species. In addition, antioxidant effect of the chloroform extract from *S. rostratum* was evaluated. The chloroform extract exhibited the remarkable radical scavenging ability ( $IC_{50}$ =0066 $\pm$ 0.001 mg/mL).

**Keywords:** *Solanum rostratum*, Monoterpene glycoside, Flavonoid glycosides, Antioxidant.

© 2018 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24951>

### INTRODUCTION

Solanaceae family has an economical and medicinal importance [1], it comprising about 2000 species and growing in the tropical and subtropical areas [1]. A phytochemical investigation in this family showed several types of chemical constituents and many traditional uses. *Solanum torvum* Swartz used in folk medicine as sedative, digestive, hemostatic, and diuretic in the southern areas of China [2]. The main isolated constituents were flavonoids and saponins from the aerial parts [3], along with antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *S. torvum* [4]. The methanolic extract from the fruit of *Solanum lycocarpum* was found to inhibit the increase of serum glucose levels in sucrose-loaded rats [5].

*Solanum rostratum* Dun is a harmful herb, it has widespread existence in North America [6] and has been classifying as quarantine weed for ecosystem and human health [7]. The previous isolation studies showed that *S. rostratum* had alkaloid components: Solasonine, solamargine [8], and methyl protodioscin [9], which cause the toxicity of this species [10]. In addition to exist the phenolic compounds which have various activities against antibacterial, cytotoxic and antioxidant [11,12].

In this study, we report the isolation and characterization of the constituents of *S. rostratum* and evaluation of antioxidant activity of the chloroform extract of this plant.

### METHODS

#### Plant material

The aerial parts of *S. rostratum* were collected at the end of April 2009 (flowering stage) in Constantine, Algeria. Fresh aerial parts were dried to constant weight at room temperature.

#### Chemicals

Anhydrous sodium carbonate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, and methanol (analytical reagent and high-performance liquid chromatography [HPLC] gradient grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), and dimethylsulphoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). All other chemicals were analytical grade and obtained from either Sigma or Merck.

#### General experimental procedure

Nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed on a Bruker Avance III spectrometer in DMSO- $d_6$  and  $CD_3OD$  ( $^1H$ : 600 MHz;  $^{13}C$ : 150 MHz). Chemical shifts were given in ppm with tetramethylsilane as an internal standard. HPLC separations were conducted on a Shimadzu LC-8A series pumping system equipped with a Shimadzu RID-10A refractive index detector and Shimadzu injector on a C18 I-Bondapak column (30 cm $\times$ 7.8 mm, 10  $\mu$ m waters, flow rate 2.0 ml min $\times$  1). The absorbance measurements for antioxidant activity were recorded using the ultraviolet and visible spectrophotometer Rayleigh ultraviolet (UV)-2601, BRAIC Co. Ltd., Beijing, China.

#### Extraction and isolation

The aerial parts of *S. rostratum* (1430 g) were crushed and macerated 3 times with 80% aqueous methanol, each for 72 h at room temperature, and the solvent was removed *in vacuo* to yield a crude extract (269.2 g). The crude extract was dissolved in 800 ml  $H_2O$  and extracted with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol, respectively. The chloroform extract (2.1g) was subjected to column chromatography on silica gel using a  $CHCl_3$ -MeOH (from 100:0 to 0:100, v/v) to provide 26 fractions, and the fraction 13 (84.1 mg) was purified on preparative C18

HPLC column with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) to yield compound (1) (3 mg). The ethyl acetate extract (5.44 g) was chromatographed on silica gel eluted with a gradient of petroleum ether-diethyl ether (from 100:0 to 0:100, v/v) to obtain 17 fractions, the fraction 9 (812 mg) performed on flash column eluted gradually with a CHCl<sub>3</sub>-MeOH (from 100:0 to 0:100, v/v) to afford 13 subfractions, and the precipitate from subfraction 7 (128 mg) was purified by thin-layer chromatography (TLC) eluted with aEtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (8:1:1, v/v/v) to yield compounds 2 (9 mg) and 3 (11 mg). Fractionation of the n-butanol extract (17 g) was carried out by column chromatography on silica gel, eluted with a gradient of EtOAc-MeOH (from 100:0 to 0:100, v/v) to yield 21 fractions, and the yellow precipitate from fraction 17 (193 mg) was purified by TLC eluted with a EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (8:1:1, v/v/v) to yield compound (4) (5 mg).

### Antioxidant activity

#### DPPH radical scavenging assay

Radical scavenging activity was determined by a spectrophotometric method based on the reduction of a methanol solution of DPPH using the method of Blois (1958) [13], with some modifications [14]. The sample solutions were added to 0.004% methanol solution of DPPH. The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 517 nm against a blank by a spectrophotometer (Rayleigh, UV-2601). Scavenging of DPPH radical was calculated according to the following formula:

$$\text{Radical scavenging \%} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the test compound. DPPH scavenging activity was expressed as IC<sub>50</sub> values (mg/ml) for comparison. The IC<sub>50</sub> value of each sample was defined as the concentration of sample required for a 50% decrease in absorbance of the blank. BHT and BHA were used as positive controls.

#### Determination of total phenolic contents

Total phenolic content of the chloroform extract was analyzed using the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Singleton and Rossi [15] using gallic acid as standard, with some modifications [16]. The extract solution was mixed with 0.2 ml of 50% Folin-Ciocalteu reagent and allowed to react for 3 min, and 1 ml aqueous solution of 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added. At the end of incubation for 45 min at room temperature, the absorbance of each mixture was measured at 760 nm. The same procedure was also applied to the standard solutions of gallic acid. Total phenolic content was expressed as µg gallic acid equivalents per mg of the extract.

#### Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. The results were expressed as means±standard deviations. Statistical analyses were performed using the SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Differences among means were done by analysis of variance, and averages were compared using the Tukey test. The level of statistical significance was taken at p<0.01.

### RESULTS

The four compounds isolated from *S. rostratum* species which grow in Algeria were identified as linalyl-β-glucopyranoside (1) [17], apigenin-7-O-glucoside (2) [18], astragalinal (3) [10], and isorhamnetin-3-O-glucoside (4) [19] (Fig. 1), by comparing their spectra data with those reported in the literature.

Compound 1 (Linalyl-β-glucopyranoside):

It is isolated as white viscous liquid. The <sup>1</sup>H NMR and heteronuclear single quantum correlation spectra of 1 (Figs. 2 and 3) exhibited signal attributed to one methyl at δ 1.39 (3H, s, H-10); two methyls at δ 1.61 (3H, s, H-8) and 1.69 (3H, s, H-9) which may connect with an olefinic carbon according to the downfield shift of the methyls; two olefinic methine signals with a proton at δ 5.99 (1H, dd, J = 17.5, 11.0 Hz, H-2) and 5.12 (1H, br t, J = 7.0 Hz, H-6); two olefinic methylene

signals with a proton at δ 5.22 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-1-a) and 5.27 (1H, d, J = 17.5 Hz, H-1-b); and two methylene groups with signals at δ 1.61 (2H, m, H-4) and 2.06 (2H, m, H-5). One anomeric proton signal at δ 4.36 (d, J = 7.5 Hz, H-1') corresponding to glucosyl moiety. One anomeric proton signal at δ 4.36 (d, J = 7.5 Hz, H-1'), and five protons at δ 3.18 (m, H-2'), 3.29 (m, H-3'), 3.39 (m, H-4'), 3.19 (m, H-5'), 3.65 (dd, J = 11.8, 5.4 Hz, H-6'-b), and 3.81 (dd, J = 11.8, 2.2 Hz, H-6'-a) corresponding to glucosyl moiety. The sugar linkage and methyl group in position 10 were determined on the basis of the HMBC correlations of the quaternary carbon at δ 88.8 (C-3) (Figs. 4 and 5). <sup>13</sup>C-NMR (MeOD, 150MHz): 16.0 (C-8), 21.9 (C-10), 22.7 (C-5), 24.0 (C-9), 40.0 (C-4), 61.4 (C-6'), 70.2 (C-4'), 73.0 (C-2'), 76.8 (C-5'), 77.0 (C-3'), 88.8 (C-3), 98.7 (C-1'), 114.4 (C-1), 124.4 (C-6), 130.6 (C-7), 142.5 (C-2).

Compound 2 (Apigenin-7-O-glucoside): yellow powder; C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (MeOD, 600MHz): 3.27~4.10 (6H, H-2''~H-6'', m), 5.78 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1''), 6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.94 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.91 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', H-6'); <sup>13</sup>C-NMR (MeOD, 150MHz): 61.65 (C-6''), 70.89 (C-4''), 74.34 (C-2''), 76.29 (C-3''), 77.90 (C-5''), 95.37 (C-8), 100.49 (C-6), 103.29 (C-3), 103.30 (C-1''), 109.22 (C-10), 116.22 (C-3', C-5'), 123.40 (C-1'), 128.20 (C-2', C-6'), 159.73 (C-4'), 160.25 (C-9), 162.10 (C-7), 163.85 (C-5), 164.20 (C-2), δ 181.53 (C-4).

Compound 3 (Astragalinal): yellow powder; C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz): 3.22~3.73 (6H, H-2''~H-6'', m), 5.42 (1H, d, J = 7.53 Hz, H-1''), 6.18 (1H, d, J = 2.01 Hz, H-6), 6.36 (1H, d, J = 2.01 Hz, H-8), 6.90 (2H, d, J = 8.78 Hz, H-5', H-3'), 7.08 (2H, dd, J = 8.78 Hz, H-6', H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150MHz): 61.32 (C-6''), 69.95 (C-4''), 74.33 (C-2''), 76.68 (C-3''), 77.01 (C-5''), 96.76 (C-8), 99.28 (C-6), 102.83 (C-1''), 103.42 (C-10), 114.78 (C-3', 5'), 121.44 (C-1'), 130.84 (C-2', 6'), 133.97 (C-3), 157.28 (C-2), 157.47 (C-9), 160.21 (C-4'), 163.35 (C-5), 165.89 (C-7), 178.03 (C-4).

Compound 4 (Isorhamnetin-3-O-glucoside): yellow powder; C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz): 3.68~3.09 (6H, H-2''~H-6'', m), 3.83 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 5.42 (1H, d, J = 7.53 Hz, H-1''), 5.90 (1H, d, J = 2.26 Hz, H-6), 6.00 (1H, d, J = 2.26 Hz, H-8), 6.87 (1H, d, J = 8.78 Hz, H-5'), 7.98 (1H, dd, J = 8.78-2.50 Hz, H-6'), 8.00 (1H, d, J = 2.50 Hz, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150MHz): 56.88 (4'-OCH<sub>3</sub>), 72.93 (C-2''), 73.70 (C-3''), 69.93 (C-4''), 77.81 (C-5''), 60.91 (C-6''), 95.60 (C-8), 99.68 (C-6), 101.35 (C-1''), 103.80 (C-10), 113.50 (C-2'), 115.55 (C-5'), 121.59 (C-1'), 131.16 (C-6'), 133.50 (C-3), 147.59 (C-4'), 149.99 (C-3'), 155.78 (C-2), 156.60 (C-9), 161.30 (C-5), 165.10 (C-7), 177.70 (C-4).

#### Antioxidant activity and total phenolic content

DPPH radical scavenging activities of the chloroform extract (CHCl<sub>3</sub>) and the synthetic agents are given in Table 1. According to these IC<sub>50</sub> values, the DPPH radical scavenging abilities among the samples were in the order of BHA>BHT>CHCl<sub>3</sub> (p<0.01). The IC<sub>50</sub> value for DPPH radical scavenging of the chloroform extract was determined as 0.066±0.001 mg/ml. Fig. 6 shows the dose-response curves of the DPPH radical scavenging activities of the crude chloroform extract from *S. rostratum* and the synthetic antioxidants. On the other hand, the content of total phenolic compounds in the chloroform extract was found as 88.45±0.34 µg/mg.

**Table 1: Antioxidant activities of chloroform extract from *Solanum rostratum*<sup>1</sup>**

Material	DPPH	Total phenolic content
	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	(µgGAE/mg of extract)
Chloroform extract	0.066±0.001 <sup>c</sup>	88.45±0.34
BHT	0.023±0.001 <sup>b</sup>	NS
BHA	0.003±0.000 <sup>a</sup>	NS

<sup>1</sup>Values represent averages±standard deviations for triplicate experiments. Values in the same column with different superscripts are significantly (p<0.01) different. NS: Not studied. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, BHT: 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol, BHA: Butylated hydroxyanisole

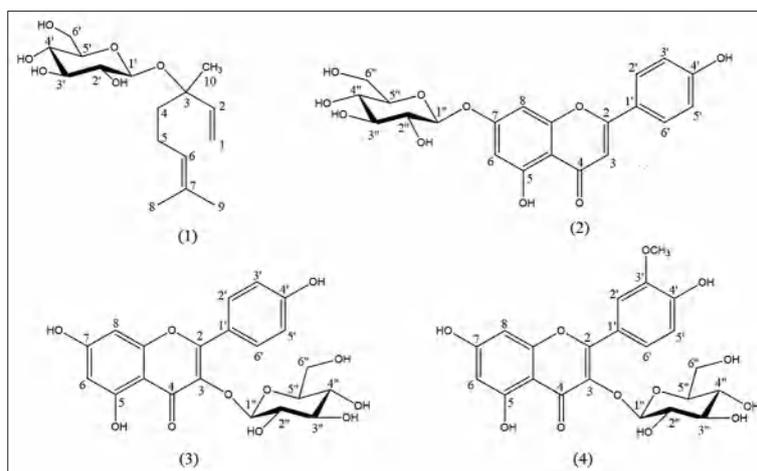


Fig. 1: Structures of the isolated compounds 1-4

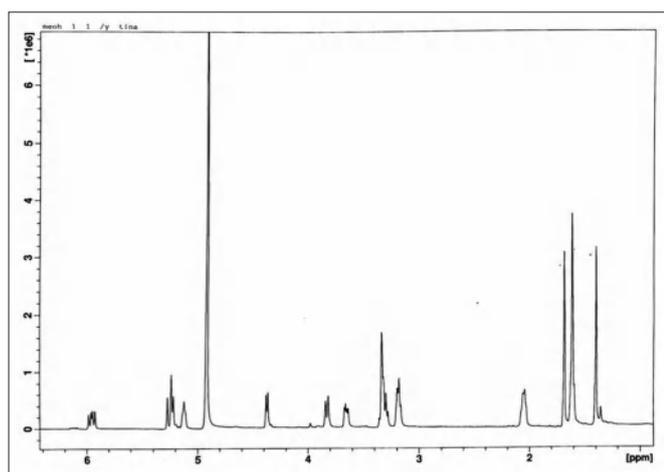
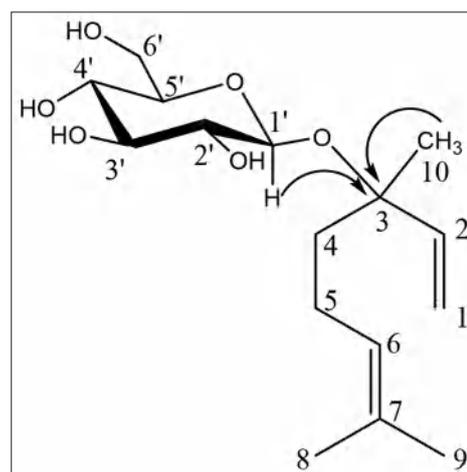
Fig. 2: <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectrum of compound 1

Fig. 4: Selected HMBC (→) correlations of compound (1)

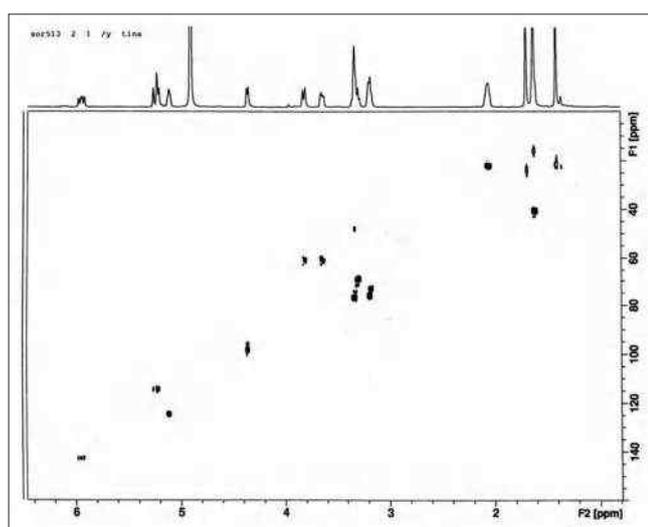


Fig. 3: Heteronuclear single quantum correlation spectrum of compound 1

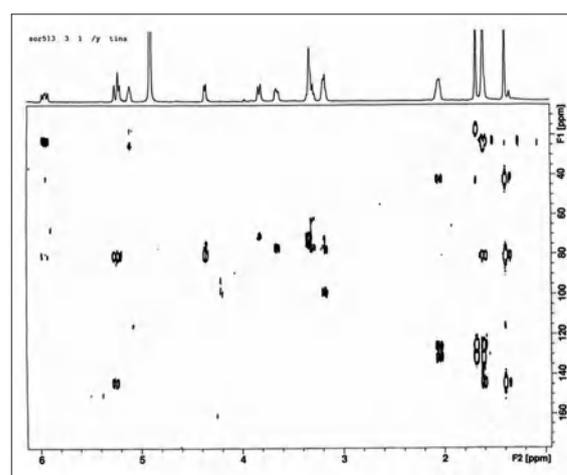


Fig. 5: HMBC Spectrum of Compound 1

## DISCUSSION

Phytochemical analyses of the chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts obtained from the aerial parts of *S. rostratum* led to the isolation of three flavonoid glycosides and monoterpene glycoside.

One of the aims of this study was to compare the constituents of *S. rostratum* species which grow in Algeria with the other species in different regions. Flavonoids and saponins are the most common isolated compounds which have been reported from the Chinese species *S. Rostratum* [20]. However, the phytochemical study of the Mexican medical plant *S. rostratum* Dun led to isolated one saponin (methyl protodioscin) [9]. *S. rostratum* species which grow in Azerbaïdhan

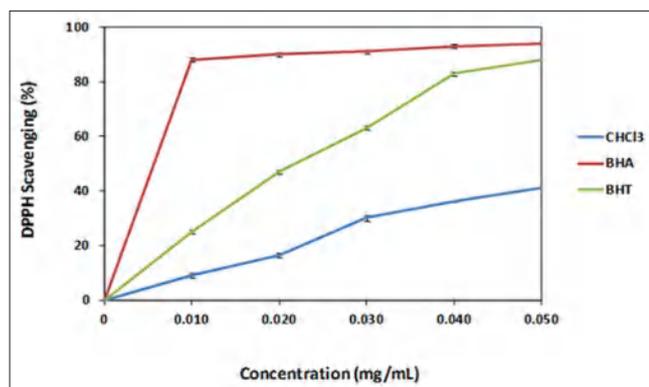


Fig. 6: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging activities of the samples at the tested concentrations

was collected in the Stepanakert region, and two glycosidic alkaloid compounds were obtained and identified as solasonine and solamargine.

In comparison to our results with the previous studies, it showed that the *S. rostratum* Dunal from China also produces compounds, isorhamnetin-3-*O*-glucoside and astragalinal [10,19]. While compound (1) (Linalyl- $\beta$ -glucopyranoside) is isolated for the first time from Algerian species *S. rostratum* and from the genus *Solanum*. In addition, this is the first report on the isolation and structure elucidation of compound (2) (Apigenin-7-*O*-glucoside) from this plant. The environmental factors are able to change or produce different secondary metabolites in the same plant species growing under different environmental conditions [21-27]. Thus, the difference of isolated compounds of *S. rostratum* species from different regions probably refers to the environment diversity, such as water availability, temperature, soil, and solar radiation [28-32].

Several studies have been reported on the antioxidant effects of different *Solanum* species [33,34]. Compound (1) (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside) was isolated from the chloroform extract which showed the significant antioxidant activity. Similar to our study, Hao et al. [35] reported that the different extraction fractions (ethyl acetate, n-butanol, petroleum ether, and water) of *S. rostratum* had strong antioxidant activities. In another study, the four methanolic extracts (roots, leaves, flowers, and fruits) from this species exhibited the significant inhibitions against the DPPH radical between 86.76 and 90.24% [36]. Since phenolic compounds are the most important groups of plant secondary metabolites that have diverse biological functions including antioxidant effects [37], the total phenolic content of the extract from *S. rostratum* was also determined. The results showed that chloroform extract of *S. rostratum* had a high amount of total phenolic content.

## CONCLUSION

In this study, four compounds (linalyl- $\beta$ -glucopyranoside, apigenin-7-*O*-glucoside, astragalinal, and isorhamnetin-3-*O*-glucoside) were isolated from *S. rostratum* species which grow in Algeria. This is the first report on the isolation and structure elucidation of linalyl- $\beta$ -glucopyranoside and apigenin-7-*O*-glucoside from this plant. Furthermore, in this study, the chloroform extract from this plant was evaluated for its antioxidant effect and the results showed that the chloroform extract was remarkable radical scavenger.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRES, Alger, Algeria), Turkish State Planning Organization (grant number DPT2010K120720), and Cankiri Karatekin University.

## AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

All the authors have contributed equally.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declared no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Yousafa Z, Wanga Y, Baydoun E. Phytochemistry and pharmacological studies on *Solanum torvum* Swartz. *J Appl Pharm Sci* 2013;3:152-60.
2. Zhu ZY, Gao L, Wang JK. Illustrated Handbook for Medicinal Materials from Nature in Yunnan [M]. Vol. 2. Kunming: Yunnan Science and Technology Press; 2003. p. 121.
3. Yuan-Yuan L, Jian-Guang L, Ling-Yi K. Chemical constituents from *Solanum torvum*. *Chinese J Nat Med* 2011;9:30-2.
4. Arthan D, Svasti J, Kittakoop P, Pittayakhachonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y, et al. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* 2002;59:459-63.
5. Nakamura S, Hongo M, Sugimoto S, Matsuda H, Yoshikawa M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, "fruta do lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). *Phytochemistry* 2008;69:1565-72.
6. Bassett I, Munro D. The biology of Canadian weeds. *Solanum carolinense* L. and *Solanum rostratum* Dunal. *Can J Plant Sci* 1986;66:977-91.
7. Guan GQ, Gao DC, Li WY, Ye J, Xin XG, Li SD. A quarantine weed: *Solanum rostratum*. *Plant Quar* 1984;4:25-8.
8. Novruzov E, Aslanov S, Ismailov N. Glycosidic alkaloids of *Solanum rostratum*. *Chem Nat Compd* 1973;9:659.
9. Bah M, Gutierrez DM, Escobedo C, Mendoza S, Rojas JI, Rojas A. Methylprotodioscin from the Mexican medical plant *Solanum rostratum* (*Solanaceae*). *Biochem Syst Ecol* 2004;32:197-202.
10. Huang HJ, Ling TJ, Wang HM, Cao AC, Zhang CX, Wei SH, et al. One new flavonoid from *Solanum rostratum*. *Nat Prod Res* 2017;31:1831-5.
11. Morais MG, da Costa GA, Aleixo AA, de Oliveira GT, Alves LF, Duarte-Almeida JM, et al. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of the ripe fruits of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (*Solanaceae*). *Nat Prod Res* 2015;29:480-3.
12. Ombra MN, Fratianni F, Granese T, Cardinale F, Cozzolino A, Nazzaro F, et al. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of purple potato extracts (*Solanum tuberosum* cv *viellotte noire*) following simulated gastro-intestinal digestion. *Nat Prod Res* 2015;29:1087-91.
13. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
14. Oke-Altuntas F, Aslim B, Duman H, Kartal M. Comparative evaluation of total phenolic/carotenoid contents, chlorogenic acid/rutin profiles, and antioxidant properties of two Prangos species (*P. uechtritzi* and *P. pabularia*). *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8:284-8.
15. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-58.
16. Yegenoglu H, Aslim B, Oke F. Comparison of antioxidant capacities of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev and Singer by using different *in vitro* methods. *J Med Food* 2011;14:512-6.
17. Al-Massarani SM, El Gamal AA, Abd El Halim MF, Al-Said MS. New acyclic secondary metabolites from the biologically active fraction of *Albizia lebbeck* flowers. *Saudi Pharm J* 2016;25:110-9.
18. Ibrahim TA, El-hela AA, Abd Elhady NM, Abo-Elftoh NM. Phytochemical composition, *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of seeds of *Convolvulus Arvensis* Linn. *Int J Pharm Biosci* 2016;7:107-16.
19. Chang L, Shao Q, Xi X, Chub Q, Wei Y. Separation of four flavonol glycosides from *Solanum rostratum* Dunal using aqueous two-phase flotation 2 followed by preparative high-performance liquid 3 chromatography. *J Sep Sci* 2016;40:804-12.
20. Hao LJ, Wang S, Zhu JJ, Wang ZM, Wei SH. Chemical constituents from *Solanum rostratum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2014;39:2034-8.
21. Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. *Sci Rep* 2016;6:29265.
22. Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim Feed Sci Technol* 2012;176:5-16.
23. Gutbrodt B, Dorn S, Unsicker SB, Mody K. Species-specific responses of herbivores to within-plant and environmentally mediated between-plant variability in plant chemistry. *Chemoecology* 2012;22:101-11.
24. Oh MM, Trick HN, Rajashekar CB. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress

- tolerance in lettuce. *J Plant Physiol* 2009;166:180-91.
25. Theis N, Lerda M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int J Plant Sci* 2003;164:S93-102.
  26. Bennett RN, Wallsgrave RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* 1994;127:617-33.
  27. Wink M. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* 1988;75:225-33.
  28. Ramakrishna A, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 2011;6:1720-31.
  29. Arbona V, Manzi M, Ollas CD, Gómez-Cadenas A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* 2013;14:4885-911.
  30. Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R. Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant* 2008;132:199-208.
  31. Graham D, Patterson BD. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: Proteins, metabolism, and acclimation. *Annu Rev Plant Physiol* 1982;33:347-72.
  32. Jakobsen H, Olsen C. Influence of climatic factors on emission of flower volatiles *in situ*. *Planta* 1994;192:365-71.
  33. Taie H, Abd-Alla H, Ali S, Aly H. Chemical composition and biological activities of two *Solanum tuberosum* cultivars grown in Egypt. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7:311-20.
  34. Sudheesh S, Sandhya C, Koshy AS, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 1999;13:393-6.
  35. Hao LJ, Wang S, An YW, Zhu JJ, Wang ZM, Wei SH, Chen JB. Antioxidative properties of different extraction fractions from *Solanum rostratum* [J]. *China J Exp Tradit Med Formulae* 2014;20:113-6.
  36. Gutiérrez AD, Bah M, Garduño RM, Mendoza DS, Serrano CV. Antiinflammatory and antioxidant activities of methanol extracts and alkaloid fractions of four Mexican medicinal plants of *Solanaceae*. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014;11:259-67.
  37. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56.

## المخلص

الهدف من عملنا هو دراسة المنتجات الأيضية الثانوية ، ولا سيما الفلافونيدات لبعض أنواع النباتات الجزائرية ، والتي لم تدرس من وجهة نظر التركيب الكيميائي.

على الرغم من أنهم جاءوا من اثنين من أشهر العائلات النباتية في العالم. منذ فترة طويلة معروفة الأسرة كمصدر للغذاء ومعروفة في الطب التقليدي لمضادات الالتهاب ومدر للبول ومضاد للالتهاب...

تم عزل أربعة مركبات من الأجزاء الهوائية من الأنواع النباتية *Rostratum* ينتمي إلى عائلة النباتات المعمرة، واستخرج اثنين من المركبات لأول مرة في هذا النوع. إضافة إلى تسعة عشر مركب آخر من *galactites elegans* تنتمي إلى العائلة *astraceae*. تم إدراج جميع المنتجات لأول مرة في هذه الفئة.

من أجل تحقيق هدفنا ، استخدمنا التقنيات المختلفة للاستخلاص والفصل والتنقية التي تعتمد بشكل رئيسي على تقنيات الكروماتوغرافي ، والتي سمحت لنا بفصل ثلاثة وعشرون مركب من الأجزاء الهوائية لهذه الأنواع.

وقد تم تحديدها مفصولة عن طرق المنتج من التحليل الطيفي ، والرنين المغناطيسي النووي ، وخاصة تسلسل لها (1 H-NMR ، 13C-NMR ، الساخنة ، HSQC و HMBC) ، الأشعة فوق البنفسجية المرئية وتحليل مطيافية الكتلة وأيضا التحليلات الكيميائية لبعض المنتجات.

أظهرت أغلبية المركبات المعزولة من مستخلصات الهيدروكحولية ل *S. rostratum* ، *G. elegans* قدرة كبيرة على مقاومة مضادات الأكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** *Solanum rostratum* ، *Astrassaa* ، *Solanaceae galactites elegans* ، *chromatography* ، *terpenes* ، *flavonoids* ، *spectroscopy* ، *1D and 2D NMR* ، ومضادات الأكسدة

## *Résumé :*

L'objectif de notre travail est l'étude des produits du métabolisme secondaire, et plus spécialement les flavonoïdes et lignane de certaines espèces de la flore Algérienne, laquelle n'a pas vu d'études du point de vue composition chimique.

Même s'il s'agit de deux familles parmi les plus connues du monde végétal. Cette famille est connue depuis longtemps comme source alimentaire et connue dans la médecine traditionnelle, pour ses propriétés anti-inflammatoire, diurétique et antispasmodique...

Quatre composés ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *solanum rostratum* appartient à la famille *SOLANACEAE*, deux produits ont été cités pour la première fois dans le genre, et dix-neuf autres de l'espèce *galactites elegans* appartient à la famille *ASTRACEAE*. Tous les produits ont été cités pour la première fois dans ce genre.

Pour aboutir à notre but, on a utilisé les différentes méthodes d'extraction, de séparation et de purification basées surtout sur les techniques chromatographiques, ce qui nous a permis de séparer vingt trois produits des parties aériennes de ces espèces.

Les produits séparés ont été identifiés par les méthodes spectrales d'analyse, spécialement la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et ses séquences (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, , COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC et HMBC), UV-Visible et la spectroscopie de masse et aussi les analyses chimiques pour certains produits.

La majorité des composés isolés de l'extrait hydrométhanolique des espèces *S. rostratum*, *G. elegans* ont montré une grande capacité du pouvoir antioxydant.

**Mots clés :** *solanum rostratum*, *Asteraceae*, *solanaceae galactites elegans*, Flavonoïdes, terpene, Chromatographie, RMN 1D et 2D et Spectrométrie de masse, activité anti-oxydante.

## ***Abstract:***

The objective of our work is the study of the products of the secondary metabolism, and more especially the flavonoids of some species of the Algerian flora, which did not see studies of the point of view chemical composition.

Even if they are two families among the most known of the plant world. This family has been known for a long time as a food source (parsley, celery, carrot, fennel, coriander ...) and known in traditional medicine, for its anti-inflammatory, diuretic and antispasmodic properties ...

Four compounds have been isolated from the aerial parts of the species *solanum rostratum* belongs to the solanaceae family; two products have been identified of which four are mentioned for the first time in the genus. And nineteen others of the species *galactites elegans* belong to the family *ASTRACEAE*. All products have been cited for the first time in the genre. To achieve our objectif, we used different extraction, separation and purification methods based mainly on chromatographic techniques, which allowed us to separate the twenty-three products from the aerial parts of these species.

The separated products were identified by spectral methods of analysis, especially nuclear magnetic resonance spectroscopy and its sequences (NMR-<sup>1</sup>H, NMR-<sup>13</sup>C,, COSY, HSQC and HMBC), UV-Visible and mass spectroscopy and also chemical analyzes for some products.

The majority of the compounds isolated from the hydromethanolic extract of the species *S. rostratum*, *G. elegans* showed a great capacity of the antioxidant power.

Key words: *Solanum rostratum*, Asteraceae, Solanaceae *Galactites elegans*, Flavonoids, Terpene, Chromatography, 1D and 2D NMR and Mass Spectrometry, Antioxidant Activity.