



Université El-Hadj Lakhdar - BATNA 1
Faculté des Sciences de la Matière
Département de Chimie



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité
Chimie Organique

Présentée par :
SMADI Abla

Thème :

Etude phytochimique des plantes *Cymodocea nodosa* et *Galium brunneum*

Soutenue le: 01/07/2018

Jury:

HABA Hamada	Professeur Université Batna-1	Président
BITAM Fatma	Maître de conférences A Université Batna-2	Rapporteur
BENKHALED Mohammed	Professeur Université Batna-1	Examineur
DIBI Ammar	Professeur Université Batna-1	Examineur
MEKKIOU Ratiba	Professeur Université Constantine-1	Examinatrice
AKKAL Salah	Professeur Université Constantine-1	Examineur

-2017/2018-

Dédicace

Je dédie spécialement cette thèse à

Ma mère qui m'a toujours donnée le sourire dans les moments difficiles, pour son soutien inébranlable et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, qui a toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.

Mon regretté père, AbdAllah, décédé. Cette thèse représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'il m'a prodigués tout au long de ma scolarité.

Puisse Dieu l'accueillir dans son Vaste Paradis.

A mes frères et sœurs et toute ma famille pour la patience et leur soutien surtout ma petite sœur Fahima surnommée Joujou.

A ma cousine Kafia O. pour son soutien, ses conseils et surtout l'espoir et la confiance qu'elle place en moi.

A mes amis proches: Fatima B., Habiba B., Habiba L., Fairouz A., Roufia M., Mabrouka B., Lynda G., Naouara Z. et Hanene S.

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de deux laboratoires, le laboratoire de Chimie et Chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des sciences de la matière de l'Université de Batna-1, sous la direction du Docteur **BITAM Fatma**, et le laboratoire de Chimie et Chimie Biomoléculaire (ICB) du Centre National de Recherche (CNR), Naples (Italie), sous la direction de Docteur **GAVAGNIN Margherita** et le Docteur **CIAVATTA Maria Letizia**.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, le Docteur **BITAM Fatma**, Maître de conférences A au département de pharmacie de l'université de Batna 2, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire LCCE, pour avoir encadré ce travail pendant ces ans, pour m'avoir accordée sa confiance, aussi pour son aide et sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail. Je la remercie de m'avoir encouragé tout en me laissant une grande liberté mais aussi pour son soutien, ses conseils, ses commentaires et aussi je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour les heures investies dans la correction du présent manuscrit. Je la remercie pour sa bienveillance et sa grande générosité.

Je remercie, particulièrement, Professeur **GAVAGNIN Margherita** de m'avoir accueillie dans son équipe, et de m'avoir donnée l'opportunité de me former en chimie des substances naturelles. En témoignage de ma respectueuse gratitude.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur **CIAVATTA Maria Letizia** pour avoir bien voulu encadrer une partie de ce travail, pour son soutien de tous les instants, sa confiance, ses conseils et son amitié. J'ai beaucoup appris avec elle sur les différentes méthodes de chimie extractive et structurale utilisées dans ce travail, et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions passionnantes sur les produits, qui a toujours su trouver du temps pour me montrer des trucs de paillasse.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **HABA HAMADA**, doyen de la faculté des sciences de la matière, Université de Batna 1 d'avoir accepté, et de me faire l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse. J'ai apprécié notre interaction et ses remarques avisées, son aide et pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à ce travail.

Mes remerciements vont également aux membres de jury:

- Le Professeur **BENKHALED Mohammed** de la Faculté des sciences de la matière, Université de Batna 1, pour avoir bien voulu faire part de ses observations à propos de ce travail et de participer à ce jury.
- Le Professeur **DIBI Ammar** de la Faculté des sciences de la matière, Université de Batna 1, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.
- Le Professeur **MEKKIOU Ratiba** de l'université de Constantine 1 pour avoir bien voulu examiner ce travail et participer à ce jury.
- Le Professeur **AKKAL Salah** de l'université de Constantine 1 pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **OUJJEH H Bachir**, professeur du département d'Agronomie de l'institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna 1 et Docteur **VILLANI Guido**, biologiste à l'Institut de Chimie Biomoléculaire (ICB), CNR de Naples, pour la détermination du matériel végétal concernant les deux plantes analysées dans ce travail.

J'adresse toute ma reconnaissance à l'équipe de l'Institut de Chimie Biomoléculaire ICB (CNR, Naples) notamment **CARBONE Marianna** et **MANZO Emiliano** pour les bons moments passés ensemble, de leur soutien durant toutes mes périodes de stage.

Je remercie vivement les personnes de l'équipe du service de RMN (CNR, Naples) pour la gentillesse de leur accueil et la confiance qui m'ont accordée lors de la réalisation des analyses spectroscopique, et particulièrement **Mme. MELCK D.**, **Mr. ESPOSITO A.** et **Mr. RICCIARDI D.** Un grand merci à **Mr. CUTIGNANO A.** et **Mr. ZAMPA M.** du service de masse pour leur aide chaleureuse et leur disponibilité dans la réalisation des spectres.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de chimie et Chimie de l'Environnement, et particulièrement son directeur, **BENDAIKHA Taher**, **ABERKANE Mohammed chérif**. Merci aussi à tous mes collègues et amis de paillasse avec lesquelles j'ai passé de très bons moments : **Fouzia**, **Nabila**, **Mouna** et **Amira**, pour leur collaboration et encouragement tout au long de ce travail. Merci aussi pour leur gentillesse et leur sympathie. Toutes ont permis de contribuer à une ambiance chaleureuse et agréable.

A ce titre, je tiens à remercier aussi tous mes collègues du département de chimie, Faculté des sciences de la matière et notamment **Noura B., Souhila B., Samira Z., Souad A., Amel A., Faiza B.,...** Et à tous ceux que j'aurais pu oublier, pour tous les moments passés ensembles.

À tous ceux qui, directement ou indirectement ont contribué à ce travail, j'adresse mes plus sincères remerciements.

Merci à tous.

Abréviations utilisées

1, 2, 3,.....	Désignation des composés mentionnés dans la partie bibliographique
CN	Désignation des composés naturels isolés de l'espèce <i>Cymodocea nodosa</i>
GB	Désignation des composés naturels identifiés dans l'espèce <i>Galium brunneum</i>
CDCl₃	Chloroforme deutéré
DMSO-<i>d</i>₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
MeOH-<i>d</i>₄	Méthanol deutéré
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
VLC	Chromatographie liquide sous vide
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
t_R	Temps de rétention
C18	Chromatographie en phase inverse
SiO₂	Silice
R_f	Rapport frontal
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
2D	Deux dimensions
ppm	Partie par million
δ_C	Déplacement chimique du carbone (en ppm)
δ_H	Déplacement chimique du proton (en ppm)
Hz	Hertz
J	Constante de couplage
d	doublet
m	multiplet
t	triplet
q	quadruplet
qt	quintuplet
s	singulet
COSY H-H	Corrélation spectroscopique ¹ H- ¹ H (COrrélation SpectroscopY)
NOESY	Spectroscopie nucléaire d'effet Overhauser (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY)
HSQC	Corrélation hétéronucléaire directe (Heteronuclear single Quantum Coherence)

HMBC	Corrélation hétéronucléaire à longue distance (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
PFG	gradient de champ pulsé (pulsed Field Gradient)
[α]_D	Pouvoir rotatoire
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
CD	Dichroïsme Circulaire
$\Delta\epsilon$	Dichroïsme circulaire molaire (ou absorptivité dichroïque molaire différentielle)
λ	Longueur d'onde
IR	InfraRouge
FT-IR	Infrarouge à transformée de Fourier
m/z	Rapport masse sur charge
SM	Spectrométrie de masse
ESI	Ionisation par électro nébulisation (Electro Spray Ionisation)
HR-MS	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Q-TOF	Spectromètre hybride quadripôles-temps de vol (Quadrupole-Time of flight)
Ara	Arabinose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
Gluc	Acide glucuronide
Prim	Primévéroside
Rha	Rhamnose
Rut	Rutinoside
Xyl	Xylose
DCC	N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide.
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMP	2,2-Diméthoxypropane
AMAA	Acide arylméthoxyacétique
MPA	Acide α -méthoxyphénylacétique
MTPA	Acide α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique
MTPA-Cl	Chlorure d'acide- α -méthoxy- α -trifluorométhyl- α -phénylacétique
1-NMA	Acide α -méthoxy- α -(naphthalèn-1-yl)acétique
2-NMA	Acide α -méthoxy- α -(naphthalèn-2-yl)acétique
9-AMA	Acide α -(anthracèn-9-yl)- α -méthoxyacétique
PPTS	<i>p</i> -Toluène sulfonate de pyridinium

IC₅₀	Concentration Inhibant 50% de l'activité biologique d'une cible
DPPH	2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyle
ABTS	2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
MIC	Concentration minimale inhibitrice
Réf.	Référence
GPP	Géranyl pyrophosphate
FPP	Farnésyl diphosphate

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I	5
1. Etude botanique	5
1.1. Plantes marines	5
1.1.1. Classification botanique	5
1.1.2. Ecologie	6
1.1.3. Intérêt économique	7
1.1.4. Famille Cymodoceaceae	8
1.1.4.1. Genre <i>Cymodocea</i>	8
1.1.4.1.1. Distribution géographique	8
1.1.4.2. Espèce <i>Cymodocea nodosa</i>	9
1.1.4.2.1. Caractéristiques morphologiques	10
1.2. Famille Rubiaceae	11
1.2.1. Genre <i>Galium</i>	12
1.2.2. Espèce <i>Galium brunneum</i>	13
1.2.2.1. Caractéristiques morphologiques	13
2. Travaux phytochimiques antérieurs	14
2.1. Polyphénols	14
2.1.1. Polyphénols chez les plantes marines	14
2.1.1.1. Phénols	14
2.1.1.2. Flavonoïdes	18
2.1.1.3. Lignanes	22
2.1.2. Polyphénols dans le genre <i>Galium</i>	23
2.1.2.1. Flavonoïdes	23
2.1.2.2. Lignanes	24
2.1.2.3. Antraquinones	25
2.2. Terpènes	28
2.2.1. Terpènes chez les plantes marines	28
2.2.1.1. Diterpènes	28
2.2.1.2. Stérols	30
2.2.2. Terpènes dans le genre <i>Galium</i>	33
2.2.2.1. Monoterpènes	33
2.2.2.2. Iridoides	33
2.2.2.3. Triterpènes	38
2.2.2.4. Saponines	39
2.3. Autres composés	39
2.3.2. Chez les plantes marines	39
2.3.2. Chez le genre <i>Galium</i>	40
2.4. Métabolites isolés à partir des espèces étudiées	41
2.4.1. <i>Cymodocea nodosa</i>	41
2.4.2. <i>Galium brunneum</i>	41
3. Propriétés biologiques	42
3.1. Propriétés biologiques des plantes marines	42
3.1.1. Utilisation en médecine traditionnelle	42

3.1.2. Activités biologiques	43
3.1.3. Activités biologiques de l'espèce <i>Cymodocea nodosa</i>	47
3.2. Propriétés biologiques du genre <i>Galium</i>	48
3.2.1. Utilisation en médecine traditionnelle	48
3.1.2. Activités biologiques	49
Chapitre II: Polyphénols et terpénoïdes	51
1. Introduction	51
2. Classification des métabolites secondaires	51
2.1. Polyphénols	51
2.1.1. Flavonoïdes	51
2.1.1.1. Classification des flavonoïdes	52
2.1.1.2. Substitution des flavonoïdes	54
2.1.2. Lignanes	55
2.1.2.1. Classification des lignanes	56
2.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes	57
2.1.4. Activités biologiques	60
2.2. Terpénoïdes	65
2.2.1. Classification des terpènes	65
2.2.1.1. Monoterpènes	65
2.2.1.1.1. Iridoïdes	65
2.2.1.1.2. Classification des iridoïdes	66
a. Iridoïdes simples	66
b. Iridoïdes glycosylés	66
c. Séco-iridoïdes	67
d. Bis-iridoïdes	67
2.2.1.2. Sesquiterpènes et diterpènes	68
2.2.1.3. Triterpènes	68
2.2.3. Biosynthèse des terpènes	70
2.2.4. Activités biologiques des terpènes	73
Chapitre III: Résultats et discussion	79
1. Détermination structurale des flavonoïdes	83
1.1. Composé CN-1	83
1.1.1. Identification de la partie aglycone	86
1.1.2. Identification de la partie osidique	91
1.1.3. La stéréochimie absolue du carbone C-2	95
1.2. Composé CN-2	98
1.2.1. Identification de la partie aglycone	100
1.2.2. Identification de la partie osidique	105
1.2.3. Conversion de la chalcone CN-2 en flavanone CN-1	107
1.3. Composé CN-3	109
1.3.1. Détermination de la configuration absolue au niveau des carbones C-2' et C-5' du composé CN-3	116
1.3.1.1. Principe de la réaction de Mosher	116
1.3.1.2. Détermination de la configuration absolue du carbone C-5'	120
1.3.1.2.1. Détermination structurale du composé acétonide CN-3'	121

1.3.1.2.2. Détermination de la configuration absolue du carbone C-5' du composé acétonide CN-3'	126
1.3.1.3. Détermination de la configuration absolue au niveau du C-2' du composé CN-3	131
1.4. Composé GB-1	134
1.5. Composé GB-2	141
1.6. Composé CN-4	147
1.7. Composé CN-5 (CN-5a et CN-5b)	153
1.8. Composé GB-3	162
1.9. Composé GB-4	164
1.10. Composé GB-5	165
2. Détermination structurale des lignanes	167
2.1. Composé GB-6	167
2.1.1. Identification de la partie aglycone	168
2.1.2. Identification de la partie osidique	173
2.2. Composé GB-7	176
2.3. Composé GB-8	179
2.4. Composé GB-9 (GB-9a et GB-9b)	181
2.5. Composé GB-10	186
3. Détermination structurale des terpènes	191
3.1. Monoterpène	191
3.1.1. Composé CN-6	191
3.1.1.1. Identification de la génine	192
3.1.1.2. Identification de la partie osidique	195
3.2. Les iridoïdes	197
3.2.1. Composé GB-11	197
3.2.2. Composé GB-12	204
3.2.3. Composé GB-13	206
3.2.4. Composé GB-14	208
3.2.5. Composé GB-15	214
3.2.6. Composé GB-16	215
3.3. Les saponines	217
3.3.1. Composé GB-17	217
3.3.1.1. Identification de l'aglycone	220
3.3.1.2. Identification de partie osidique	224
3.3.2. Composé GB-18	226
3.3.3. Composé GB-19	233
4. Composé GB-20	235
Conclusion et perspectives	242
Chapitre IV : Partie expérimentale	247
1. Matériels et appareillage	247
1.1. Matériel végétal	247
1.2. Méthodes chromatographiques préparatives	247
1.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	247
1.2.2. Chromatographie sur Couche Mince	247
1.2.3. Chromatographie sur Couche Epaisse (CCE)	248

1.2.4. Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)	248
1.2.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire Sephadex LH-20	248
1.2.6. Chromatographie sur cartouche (SPE)	249
1.2.7. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	249
1.3. Méthodes physico-chimiques	249
1.3.1. Pouvoir rotatoire	249
1.3.2. Spectrométrie Ultraviolet (UV-Vis)	249
1.3.3. Dichroïsme circulaire (DC)	249
1.3.4. Spectrométrie Infra-rouge (IR)	250
1.3.5. Spectrométrie de masse (MS)	250
1.3.6. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	250
2. Etude phytochimique de l'espèce <i>Cymodocea nodosa</i>	251
2.1. Extraction	251
2.2. Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait n-butanol de <i>C. nodosa</i>	252
a. La fraction F _(IV)	253
b. La fraction F _(V)	255
c. La fraction F _(VI)	256
d. La fraction F _(VII)	257
e. La fraction F _(X)	258
2.3. Détermination de la configuration absolue des centres chiraux du composé CN-3	258
2.3.1. Synthèse de l'acétonide CN-3'	258
2.3.2. Estérification de Mosher du composé CN-3'	259
2.3.3. Estérification de Mosher du composé CN-3	259
3. Etude phytochimique de l'espèce <i>Galium brunneum</i>	260
3.1. Extraction	260
3.2. Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait n-butanol de <i>G. brunneum</i>	261
a. La fraction F _{B4}	261
b. La fraction F _{B5}	262
c. La fraction F _{B9}	263
d. La fraction F _{B12}	264
3.3. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait AcOEt	266
a. La fraction F _{Ac3}	266
b. La fraction F _{Ac4}	267
c. La fraction F _{Ac5}	268
d. La fraction F _{Ac7}	269
4. Les composés isolés	270
4.1. Composés isolés de l'espèce <i>Cymodocea nodosa</i>	270
4.2. Composés isolés de l'espèce <i>Galium brunneum</i>	273
Résumé	276
Abstract	277
ملخص	278

Introduction

Les substances naturelles ont été traditionnellement la source la plus efficace pour la découverte de médicaments, et elles sont toujours à l'origine soit de molécules biologiquement actives, soit de modèles pour la conception de nouveaux agents thérapeutiques. Ainsi, encore aujourd'hui, plus de 60% des médicaments sont soit des substances naturelles, soit des dérivés ou des analogues, soit encore des molécules synthétisées sur le modèle de substances naturelles. Les médicaments à base de plantes ont été la principale source de soins dans de nombreux pays où près de 80% de la population mondiale dépend toujours des médicaments à base de plantes pour leurs soins¹. Comparaison de cette ressource des remèdes des extraits des plantes, un faible pourcentage (6%) a été étudié pour leurs activités biologiques².

Plus de 100 composés naturels ou dérivés étaient en phase clinique avancée et une centaine en phase préclinique. Les applications des substances naturelles en pharmacologie (comme antiparasitaires, antibiotiques, anticancéreux, immunosuppresseurs ...), en agronomie (comme herbicides, insecticides, pesticides) et en cosmétologie (comme actifs) sont innombrables³. Ceci est dû, pour une part, à leur utilisation directe comme molécules actives (taxol, morphine,...), mais aussi parce qu'elles ont été des sources de nouveaux archétypes structuraux). Toutes ces applications offertes sont dues sans doute à la diversité structurale naturelle incluant le nombre de centres chiraux, de groupes fonctionnels, de cycles aromatiques, et à la fréquence des hétéroatomes...

L'utilisation des produits naturels et/ou de leurs structures nouvelles, afin de découvrir et de développer l'unité du principe actif, est existé toujours et continue d'être grandement bénéfique. Par exemple, dans le domaine du cancer, au cours de la période allant des années 1940 à la fin de 2014, sur les 175 petites molécules approuvées, 131, ou 75%, sont autres que synthétiques, avec 85, ou 49%, étant en fait soit des produits naturels, soit directement des dérivés de ceux-ci⁴.

Les premières recherches sur les produits naturels d'origine terrestre sont intensivement réalisées plus d'un siècle, alors que les substances d'origine marine datent seulement de la fin des années 60. Dès lors, de nombreux organismes marins et plantes marines n'ont pas encore fait l'objet d'études chimiques et beaucoup de métabolites restent à découvrir dans ce

¹ Tiwari S., Plants: A rich source of herbal medicine, *Journal of Natural Products* 1, 27-35, **2008**.

² Verpoorte R., La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^{ème} congrès européen d'ethnopharmacologie IRD Edition, Paris, **2002**

³ Harvey A.L., Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 13(19-20), 894-901, **2008**.

⁴ Newman D.J., Cragg G.M., Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *Journal of Natural Products* 79, 629-661, **2016**.

domaine, considérant qu'environ 10% des espèces terrestres et 1% des organismes marins ont été étudiées pour leur composition chimique.

Cette biodiversité que l'on retrouve dans les mers et les océans se traduit naturellement par une chimio-diversité tout aussi importante. Celle-ci est d'ailleurs très spécifique en raison des particularités physico-chimiques du milieu marin. Néanmoins, sur près de 220 000 substances naturelles répertoriées, seules 10 % sont d'origine marine. Ceci peut s'expliquer par le fait que les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres et ce principalement à cause du manque de connaissance de ce milieu et des difficultés liées à la récolte des échantillons. Les scientifiques voient aujourd'hui dans les plantes marines un nouveau réservoir possible de substances médicinales.

Les connaissances actuelles sur les composés secondaires montrent que certaines familles de plantes sont particulièrement riches en substances actives. La sélection du matériel végétal est la première étape dans une étude phytochimique où l'étude chimio-taxonomique, ethno-pharmacologique et pharmacologique sont les critères qui peuvent guider le phytochimiste lors de la récolte d'une plante.

Au phytochimiste, l'approche chimio-taxonomique a une grande importance, car c'est de la variabilité structurale du métabolisme secondaire qu'il s'inspire principalement dans ses recherches. On rencontre les sesquiterpènes lactones dans la famille Asteraceae et les iridoïdes dans la famille Rubiaceae comme des marqueurs chimio-taxonomiques caractérisant les deux familles, respectivement.

Selon une estimation conservatrice récente, plus de 400 000 espèces sont décrites, dont la grande majorité (369 000 espèces) sont des angiospermes et qui sont réparties en 416 familles parmi lesquelles, la famille Rubiaceae représente la plus vaste famille des angiospermes terrestres⁵. Les herbiers marins font partie aussi de ces angiospermes avec environ de 70 espèces appartenant à quatre familles (Hydrocharitaceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae et Zosteraceae), elles possèdent un système végétatif semblable à celui des plantes terrestres et elles représentent moins de 0,02 % des angiospermes.

L'Algérie plus grand pays africain et méditerranéen, présente une grande diversité climatique et taxonomique, ce qui lui donne une grande diversité de milieux terrestres et aquatiques. La flore Algérienne est estimée à plus de 3152 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Parmi ces espèces, un nombre non négligeable (15 %) sont des espèces

⁵ Willis K.J., Royal Botanic Gardens, Kew, *State of the World's Plants Report*, 1-100, 2017.

endémiques^{6,7}. En Algérie, les médicaments à base de plantes occupent dernièrement une place importante dans le marché pharmaceutique. Des critères législatifs ont été précisés, visant à améliorer le développement industriel des médicaments à base de plantes et à faciliter leur mise sur le marché pharmaceutique⁸.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration de recherche développée entre le Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement de l'université Batna 1, et l'Institut de Chimie Biomoléculaire du Centre National de Recherche de Naples (Italie) (ICB, CNR).

C'est dans ce contexte, que le laboratoire LCCE de l'Université de Batna 1 apporte sa continuation à la recherche de métabolites secondaires biologiquement actives à partir de diverses familles végétales marines ou terrestres. La stratégie de recherche consiste à sélectionner des familles de plantes connues pour leur richesse en métabolites secondaires.

L'extraction, le fractionnement, l'isolement, la purification et la détermination structurale de molécules d'origine végétale sont autant d'étapes nécessaires à la découverte de nouvelles substances bioactives

Cette thèse est le fruit d'une étude phytochimique d'une espèce marine de la famille des Cymodoceaceae, *Cymodocea nodosa*, et d'une espèce terrestre de la famille des Rubiaceae, *Galium brunneum*.

L'investigation chimique de la première plante choisie *Cymodocea nodosa*, est réalisée à l'Institut de Chimie Biomoléculaire (ICB, CNR, Naples). Le choix de cette plante entre dans le cadre d'une suite de recherches sur des métabolites secondaires contenus dans quelques espèces appartenant à la famille des Hydrocharitacées de la mer Méditerranée. Les études effectuées sur deux espèces *Posidonia oceanica* et *Halophila stipulacea* présentent une originalité des structures par l'isolement des flavonoïdes malonylés à partir de l'espèce *Halophila stipulacea* et des néolignanes de l'espèce *Posidonia oceanica*, ces métabolites sont décrits pour la première fois dans la flore marine^{9,10}.

⁶ Rapport National-Algérie, 5^{ème} Rapport national sur la mise en œuvre de la convention sur la diversité biologique au niveau national MATE/PNUD, Décembre 2014.

⁷ Quezel P., Santa S., Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition CNRS, Paris Tome 2, 1963.

⁸ Bouzabata A., Les médicaments à base de plantes en Algérie: Réglementation et enregistrement (Herbal Drugs in Algeria: Regulation and Registration), *Phytothérapie* 15, 401-408, 2017.

⁹ Bitam F., Ciavatta M.L., Carbone M., Manzo E., Mollo E., Gavagnin M., Chemical analysis of flavonoid constituents of the seagrass *Halophila stipulacea*: First finding of malonylated derivatives in marine phanerogams, *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 686-690, 2010.

¹⁰ Bitam F., Ciavatta M.L., Manzo E., Villani G., Gavagnin M., The first record of neolignans from the marine phanerogam *Posidonia oceanica*, *Phytochemistry Letters* 5, 696-699, 2012.

L'étude phytochimique de *Galium brunneum*, une Rubiacée endémique de la flore algérienne, est réalisée au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE). Alors que le genre est relativement bien référencé, l'espèce *G. brunneum* n'a pas fait l'objet d'aucune étude phytochimique et biologique. Les molécules liées au genre *Galium* sont principalement des iridoïdes, une classe particulière de monoterpènes, et qui sont des chimio-marqueurs de la famille des Rubiacées.

Nos travaux effectués sur la plante marine *Cymodocea nodosa* et de la plante terrestre *Galium brunneum* ont pour but d'apporter une meilleure compréhension chimique et chimio-taxonomique de deux espèces, et ceux-ci grâce à l'exploitation des différentes méthodes analytiques de séparation et de purification ainsi que les méthodes d'analyse spectroscopiques et en particulier, la RMN mono et bidimensionnelle.

Ce présent travail s'articule en quatre grandes parties:

- Une première partie consacre à une synthèse bibliographique relative aux familles et genres des plantes étudiées à savoir l'étude botanique, les travaux phytochimiques antérieurs et l'activité biologique. Nous décrivons d'abord *Cymodocea nodosa* appartenant à la famille des Cymodoceaceae puis *Galium brunneum* de la famille des Rubiaceae.
- Une seconde partie concerne l'étude chimique et biologique des métabolites secondaires relatifs aux familles Rubiaceae et Cymodoceaceae. Les polyphénols, en particulier, les flavonoïdes et les lignanes, les terpènes, en particulier, les iridoïdes et les triterpènes seront discutés. La classification, la biosynthèse et les activités biologiques de ces métabolites seront entamées.
- Une troisième partie correspond à l'étude chimique personnelle. Cette partie concerne, en effet, la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de l'étude phytochimique des deux espèces considérées.
- Le dernier volet consacre à la présentation des techniques chromatographiques et spectroscopiques ayant permis à l'isolement et la caractérisation structurale des composés obtenus.

Chapitre I

Etude bibliographique

1. Etude botanique

1.1. Plantes marines

Les Angiospermes ou phanérogames sont des plantes à fleurs qui se sont adaptées au milieu marin. Ils occupent une très grande diversité d'habitats et sont présents dans toutes les régions du monde et la grande majorité de ces plantes sont terrestres mais aussi aquatiques. Les angiospermes marins sont d'origine terrestre, ils ne représentent pas le lien entre les algues marines et les plantes supérieures terrestres, ils sont considérés entre eux¹¹ et représentent moins de 0,02 % d'angiospermes^{12,13}. Ces plantes constituent des groupements appelés herbiers (seagrass en Anglais), parce qu'elles poussent souvent sous la forme de grandes prairies qui ressemblent à des pâturages. Ce sont des plantes à fleurs, leurs feuilles sont longues et étroites, vertes la plupart du temps, portées par des tiges ou rhizomes.

1.1.1. Classification botanique

Les herbiers marins dits aussi magnoliophytes marines sont polyphylétiques, et selon le système de classification, ces plantes appartiennent à la classe des monocotylédones, superordre des Alismatiflorae, soit à l'ordre des Alismatales, Najadales ou des Hydrocharitales. Ces plantes appartiennent à l'une des quatre familles suivantes : Zosteraceae, Posidoniaceae, Cymodoceaceae et Hydrocharitaceae, et regroupent environ 70 espèces marines réparties en 12 genres (Tableau I-1). Bien que la taxonomie de ce groupe de plantes soit encore discutée. Récemment, deux autres familles, Ruppiaceae (*Ruppia* sp) et Zannichelliaceae (*Lepilaena marina*) ont été ajoutées aux angiospermes marins¹¹.

Tableau I-1: Liste des espèces de phanérogames marines dans le monde

Familles	Genres	Espèces
Hydrocharitaceae	<i>Enhalus</i>	<i>E. acoroïdes</i> .
	<i>Thalassia</i>	<i>T. hemprichii</i> , <i>T. testudinum</i> .
	<i>Halophila</i>	<i>H. capricorni</i> , <i>H. decipiens</i> , <i>H. minor</i> , <i>H. tricostata</i> , <i>H. ovalis</i> , <i>H. spinulosa</i> , <i>H. australis</i> , <i>H. hawaiiiana</i> , <i>H. johnsonii</i> , <i>H. stipulacea</i> , <i>H. madagascariensis</i> , <i>H. beccarii</i> , <i>H. engelmanni</i> , <i>H. baillonis</i> .
Zosteraceae	<i>Zostera</i>	<i>Z. marina</i> , <i>Z. capricorni</i> , <i>Z. caespitosa</i> , <i>Z. noltii</i> , <i>Z. caulescens</i> , <i>Z. asiatica</i> , <i>Z. japonica</i> , <i>Z. capensis</i> , <i>Z. muelleri</i> , <i>Z. mucronata</i> , <i>Z. novazelandica</i> .

¹¹ Larkum A. D., Orth R. J., Duarte C. M., Seagrasses: biology, ecology and conservation, Berlin Springer, 2006.

¹² Papebrock J., Highlights in seagrasses' phylogeny, physiology and metabolism: what makes them special?, review article, International Scholarly Research Network ISRN Botany, 1-15, 2012.

¹³ Short F., Carruthers T., Dennison W., Waycott M., Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350, 3-20, 2007.

	<i>Heterozostera</i>	<i>H. tasmanica</i> , <i>H. polychlamis</i> , <i>H. nigricaulis</i> , <i>H. chilensis</i> .
	<i>Phyllospadix</i>	<i>P. scouleri</i> , <i>P. torreyi</i> , <i>P. serrulatus</i> , <i>P. iwatensis</i> , <i>P. japonicus</i> , <i>P. juzepczukii</i> .
Cymodoceae	<i>Cymodocea</i>	<i>C. rotundata</i> , <i>C. serrulata</i> , <i>C. nodosa</i> , <i>C. angustata</i>
	<i>Amphibolis</i>	<i>A. antarctica</i> , <i>A. griffithii</i> .
	<i>Halodule</i>	<i>H. pinifolia</i> , <i>H. uninervis</i> , <i>H. beaudettei</i> , <i>H. wrightii</i> , <i>H. bermudensis</i> , <i>H. ciliata</i> , <i>H. emarginata</i> .
	<i>Syringodium</i>	<i>S. isoetifolium</i> , <i>S. filiforme</i> .
	<i>Thalassodendron</i>	<i>T. pachyrhizum</i> , <i>T. ciliatum</i> .
Posidoniaceae	<i>Posidonia</i>	<i>P. oceanica</i> , <i>P. australis</i> , <i>P. sinuosa</i> , <i>P. kirkmanii</i> <i>P. angustifolia</i> , <i>P. ostenfeldii</i> , <i>P. robertsoniae</i> , <i>P. coriacea</i> , <i>P. denhartogii</i> .

1.1.2. Ecologie

Les herbiers marins sont présents dans tous les océans et mers du globe sauf en Antarctique suite à la présence de la glace. Elles forment des herbiers denses dans toutes les eaux côtières protégées et peu profondes (entre zéro et une cinquantaine de mètres), enracinées dans le sable ou la vase, parfois sur substrats rocheux. Short et al¹³ ont réparti ces plantes en six biorégions globales (Figure I-1), quatre tempérées (Nord d'Atlantique (Région 1), Nord du Pacifique (Région 4), Océans du sud (Région 6) et Méditerranée (Région 3)) et deux tropicales (Atlantique (Région 2) et Indo-pacifique (Région 5)). En Méditerranée, on dénombre neuf espèces : *Posidonia oceanica*, *Zostera marina*, *Z. noltii*, *Cymodocea nodosa*, *Halophila stipulacea*, *H. decipiens*, *Halodule wrightii*, *Ruppia cirrhosa* et *R. maritima*.

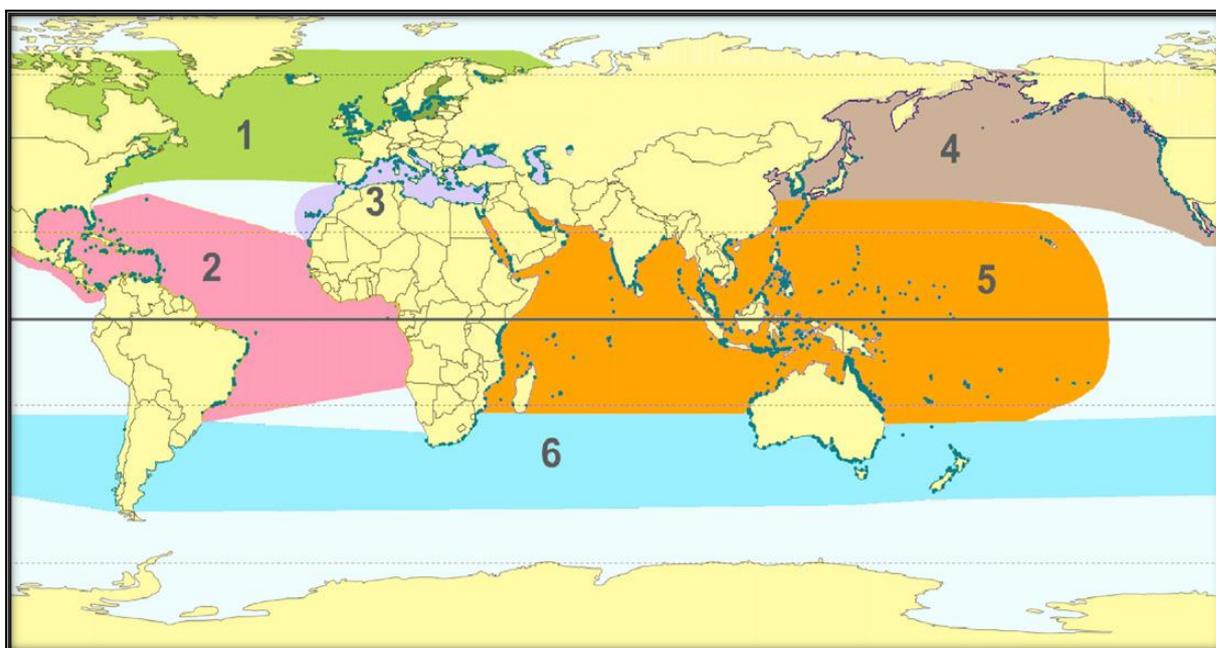


Figure I-1: Répartition mondiale et bio-régions des phanérogames marines

1.1.3. Intérêt économique

Les premières utilisations des herbiers par les hommes sont anciennes jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle, ils servaient pour l'agriculture, dans l'alimentation animale comme litières ou comme engrais. Les herbiers jouent un rôle économique important dans le monde^{11,14,15}. Les principaux rôles de ces phanérogames sont :

- Elles sont avant tout d'importants producteurs primaires, et nourrissent de nombreux herbivores, notamment, des espèces charismatiques (animaux) comme les tortues marines, certains mammifères marins et les poissons.
- Elles produisent une quantité importante d'oxygène par photosynthèse et offrent abri et source importante de nourriture pour la faune.
- Elles stabilisent le sédiment et protègent les côtes contre l'érosion.
- Elles peuvent stocker de grandes quantités de carbone, pour des périodes relativement longues. Elles représentent une production nette annuelle de $0,6 \cdot 10^9$ tonnes de carbone soit 12 % du carbone total stocké dans les océans.
- Elles sont récoltées comme engrais pour améliorer les sols sablonneux.
- Elles permettent la réalisation d'une pollinisation en milieu marin.
- De plus, elles sont utilisées comme un indicateur biologique permettant d'évaluer la contamination marine par des matières polluantes telles que les éléments-traces métalliques, elles sont capables d'accumuler et de stocker ces matières polluantes et elles ont un rôle d'épuration.

Malgré l'importance de ces herbiers dans le monde et l'augmentation des mesures de protection et de gestion, une régression annuelle de 2 à 5 % de leur surface est rapportée au niveau planétaire. Ces pertes ont différentes causes, aussi bien anthropiques que naturelles. De plus, des phénomènes géologiques et météorologiques sont susceptibles de modifier fortement ces habitats^{16,17}. Enfin, les grandes catastrophes induisant des pollutions marines accidentelles peuvent toucher les herbiers, tant par leur effet toxique, l'engluement et l'étouffement, que

¹⁴ Orth R. J., Carruthers T. J., Dennison W. C., Duarte C. M., Fourqurean J. W., Heck Jr. K. L., Hughes A. R., Kendrick G. A., Kenworthy W. J., Olyarnik S., Short F., Waycott M., Williams S. L., A Global crisis for seagrass ecosystems, *BioScience* 56(12) 987-996, **2006**.

¹⁵ Mani A.E., Bharathi V., Patterson J., Antibacterial activity and preliminary phytochemical analysis of seagrass *Cymodocea rotundata*, *International Journal of Microbiological Research* 3(2), 99-103, **2012**.

¹⁶ Pergent G., Bazairi H., Bianchi C. N., Boudouresque C.-F., Buia M.-C., Calvo S., Clabaut P., Harmelin-Vivien M., Angel Mateo, Montefalcone M., Morri C., Orfanidis S., Pergent-Martini C., Semroud R., Serrano O., Thibaut T., Tomasello A. M., Verlaque M., Climate change and Mediterranean seagrass meadows: A synopsis for environmental Managers, *Mediterranean Marine Science* 15(2), 462-473, **2014**.

¹⁷ Boudouresque C.F., Bernard G., Pergent G., Shili A., Verlaque M., Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: a critical review, *Botanica Marina* 52(5), 395-418, **2009**.

par la dépollution qui induit un piétinement important de l'estran pour une meilleure conservation des herbiers.

1.1.4. Famille Cymodoceaceae

La famille Cymodoceaceae est l'une des quatre familles de plantes marines. Elle regroupe environ 15 espèces réparties en cinq genres: *Halodule*, *Cymodocea*, *Syringodium*, *Thalassodendron* et *Amphibolis*. Ce sont des herbes submergées, vivaces par des rhizomes aux longues feuilles, les fleurs sont unisexuées, femelles ayant quatre carpelles et le fruit est un akène¹⁸.

1.1.4.1. Genre *Cymodocea*

Le genre *Cymodocea* est représenté par quatre espèces: *C. angustata*, *C. nodosa*, *C. rotundata* et *C. serrulata*.

1.1.4.1.1. Distribution géographique

Le genre *Cymodocea* a une affinité tropicale et sub-tropicale, il est localisé dans l'ouest de l'Afrique, en Méditerranée, sur la côte Est de l'Afrique (mer Rouge et Madagascar), sur les côtes Sud Asiatiques (Sud Malaisie et Indonésie) et sur les côtes Nord et Nord-Est de l'Australie²⁰ (Figure I-2).

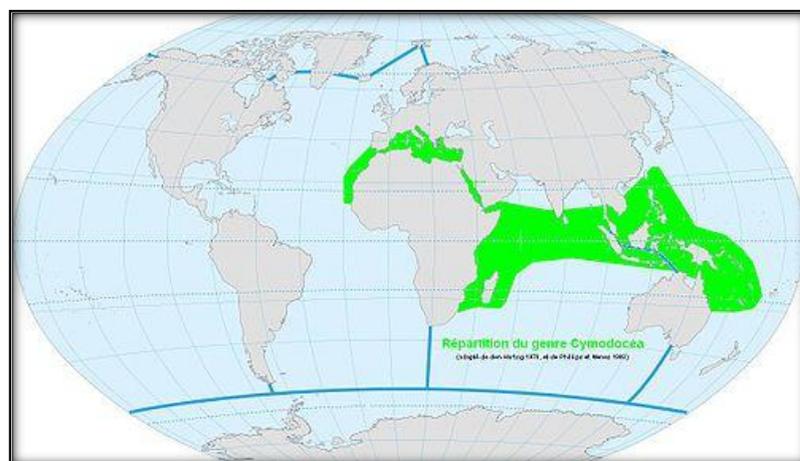


Figure I-2: Répartition du genre *Cymodocea*

¹⁸ Botineau M., Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Edition Tec & Doc, Lavoisier, 2010.

Le genre *Cymodocea* est classé comme suit (Tableau I-2):

Tableau I-2: Position systématique du genre *Cymodocea*

Classification du genre <i>Cymodocea</i>	
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Liliopsida (Monocotylédones)
Sous-classe	Alismatidae
Ordre	Najadales
Famille	Cymodoceaceae
Genre	<i>Cymodocea</i>

1.1.4.2. Espèce *Cymodocea nodosa*

L'espèce *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch. fut décrite en détail par Borter en 1864 sous le nom *Phucagrostis major* Cavolini^{19,20}. C'est une espèce de la Méditerranée, il s'agit de la seconde espèce, après *Posidonia oceanica* en terme de surface occupée en Méditerranée. Elle est présentée aussi en Atlantique (îles des Canaries et de Madère), Afrique de l'Ouest, Italie, Sud de l'Espagne et du Portugal²⁰ (Figure I-3).

Le nom botanique *Cymodocea* dérive du grec Cymodocé = Néréides, qui selon la mythologie grecque, est une nymphe marine et le mot *nodosa* du latin nodosus signifie noueux.

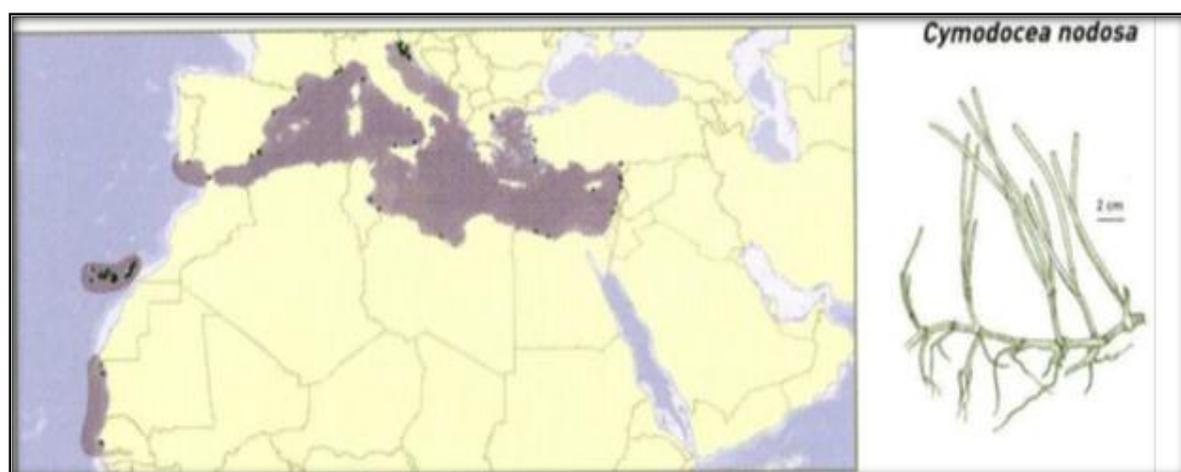


Figure I-3: Répartition de *Cymodocea nodosa* en Méditerranée

¹⁹ Caye G., Meinesz A., Observations on the vegetative development, flowering and seeding of *cymodocea nodosa* (ucria) ascherson on the mediterranean coasts of France, *Aquatic botany* 22, 277-289, **1985**.

²⁰ Reyes J., Sansdn M., Afonso-Carrillo J., Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary Islands, *Aquatic Botany* 50, 171-180, **1995**.

1.1.4.2.1. Caractéristiques morphologiques

Cymodocea nodosa est une espèce herbacée et vivace, elle forme des plaques larges et denses avec des feuilles vertes et fleurs submergées. La floraison a lieu entre les mois de Mars et Juillet, elle peut perdre ses feuilles en hiver et persiste par son rhizome. Elle se rencontre sur les fonds sableux et vaseux photophiles, en mer ouverte et dans des lagunes littorales, souvent observée dans la surface de 10-30 mètres de profondeur. Elle est souvent associée avec d'autres habitats formant des phanérogames (*Zostera noltii* et *Zostera marina*) sur les sables boueux riches en nutriments organiques.

Les caractères typiques de *Cymodocea nodosa* sont les suivants (Figure I-4):

- Tige rampante portant des feuilles à chaque nœud du rhizome.
- Les faisceaux foliaires sont constitués de deux à cinq feuilles rubanées.
- Feuilles vertes claires, étroites (10 à 30 cm de hauteur, de 2 à 4 mm de largeur), allongées à fines nervures longitudinales parallèles, à bords dentelés et dont l'extrémité du limbe porte de petites dents visibles à la loupe.
- Rhizomes rampants, de couleur rougeâtre, minces et annelés à intervalles réguliers à croissance horizontale, ils portent des racines et des feuilles alternes et étroites formant des touffes.
- Fleurs dioïques, nues, renfermées dans la gaine des feuilles des rameaux. Elles à périanthes, mâles et femelles sont séparées, portées par des pieds différents (plante dioïque). Les fleurs femelles se trouvent à la base des feuilles, protégées par une gaine cylindrique et les fleurs mâles sont de couleur rouge.
- Fruit sec, ovale, comprimé, droit, brièvement pédonculé, formé de 2 carpelles libres subsessiles, il est membraneux et ne s'ouvre pas. La dispersion du pollen et des graines se fait par l'eau.



Figure I-4: l'espèce *Cymodocea nodosa*

1.2. Famille Rubiaceae

La famille des Rubiacées est la plus vaste parmi les plantes terrestres à fleurs de famille dicotylédones, avec plus de 670 genres qui regroupent près de 13 000-14 000 espèces^{21,22,23}, et c'est la 4^{ème} plus grande famille du monde végétal en termes de nombres d'espèces parmi les Angiospermes^{21,22,24}. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, ou des sous-arbrisseaux à tige ligneuse inférieurement, herbacée et annuelle dans sa partie supérieure. Les Rubiacées se trouvent surtout dans les régions tropicales et subtropicales²¹⁻²³, mais on les rencontre aussi dans les régions méditerranéennes et tempérées où elles se présentent plutôt sous forme d'herbes qui, dans certains cas, deviennent particulièrement gênantes, telles que le Gaillet (*Galium*). Dans les régions tropicales, cette famille comporte quelques genres qui ont une importance économique, comme le quinquina (*Cinchona*), le caféier (*Coffea*) et gardénia (*Gardenia*). Dans la région tempérée, les Rubiacées sont surtout représentées par le *Galium*, le *Rubia*, le *Polemonia* et l'*Asperula*. Cette famille de plantes angiospermes comprend 43 tribus regroupées en quatre sous-familles (Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae et Ixoroideae)²⁴.

La famille des Rubiacées a été décrite en 1789 par le botaniste français Antoine-Laurent de Jussieu. Elle tire son nom de *Rubia*, rouge en latin, car les pigments (les anthraquinones) qui se trouvent surtout dans les racines de cette famille sont responsables de leur teinture rouge²⁵. Depuis plusieurs siècles, les extraits de racines de la garance (*Rubia tinctorum*) ont été utilisés pour la teinture de tissus²⁶.

Les Rubiacées sont probablement peu utilisées en rapport à leur diversité, mais sont d'un ordre économique majeur au niveau mondial. En effet, c'est la famille du caféier (*Coffea* L.), plantes alimentaires d'intérêt économique les plus fructueux issus du monde végétal, après les céréales. Autre représentant phare des Rubiaceae, le quinquina (*Cinchona* L.), plante médicinale source de la quinine (première molécule anti-malarique qui a été isolée en 1820 par Pelletier et Caventou). Jusqu'à aujourd'hui, cette plante est utilisée sous forme d'extrait pharmaceutique de quinine comme traitement contre la malaria. Un autre genre de cette famille utilisé médicalement depuis des siècles est *Psychotria* qui est une source des

²¹ Mouly A., Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray (Rubiaceae): phylogénie, biogéographie et taxinomie, *Acta Botanica Gallica*, 155(3), 457-464, **2008**.

²² Birgitta B., Torsten E., Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes, *International Journal of Plant Sciences*, 170(6), 766-793, **2009**.

²³ Martins D., Nunez C. V., Secondary metabolites from Rubiaceae species, *Molecules* 20, 13422-13495, **2015**.

²⁴ Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Bessoule J-J., Chemotaxonomy of Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition, *Phytochemistry* 66, 549-559, **2005**.

²⁵ Petroviciu I., Cretu I., Berghe IV., Wouters J., Medvedovici A., Albu F., Creanga D., A discussion on the red anthraquinone dyes detected in historic textiles from Romanian collections, *e-Preservation Science (e-PS)* 9,90-96, **2012**.

²⁶ Schulte U., El-Shagi H., Zenk M.H., Optimization of 19 Rubiaceae species in cell culture for the production of anthraquinones, *Plant Cell Reports* 3, 51-54, **1984**.

alcaloïdes et qu'est utilisé comme sédatif du système nerveux central^{21,23}. Certains genres de Rubiaceae fournissent des colorants, comme *Uncaria*, *Galium* et *Rubia*, alors d'autres Rubiaceae sont cultivées comme des plantes ornementales (*Gardenia*, *Hamelia*, *Pentas*, *Randia*, *Rondeletia*).

1.2.1. Genre *Galium*

Le genre *Galium* ou les gaillets appartient à la sous famille Rubioideae et fait partie de la tribu de Rubieae^{22,27}, il est constitué de 1300 espèces représentent 1/10 des Rubiacées, comprenant. Dans la flore algérienne, ce genre est représenté par 20 espèces dont six sont endémiques⁷. Plusieurs espèces du genre *Galium* possèdent sur les tiges, les feuilles et parfois, sur les fruits, des poils en crochet qui permettent à la plante de s'accrocher aux autres végétaux. La corolle rotacée à préfloraison valvaire ou tordue, rarement quinconciale, constitue un tube parfois court.

Le nom *Galium*, du grec *gala*, signifie lait en allusion aux propriétés de certaines espèces à faire cailler le lait. Cette propriété aurait donné son nom au genre *Galium* "caille-lait" connu (Yogurt herb). Elle est attribuée notamment à la présence des enzymes permettant de faire cailler le lait.

La classification botanique de ce genre peut être résumée sous forme d'arbre phylogénique ci-dessous (Tableau I-3).

Tableau I-3: Taxonomie du genre *Galium*

Classification du genre <i>Galium</i>	
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Rubiales
Famille	Rubiaceae
Sous-famille	Rubioideae
Tribu	Rubieae
Genre	<i>Galium</i>

²⁷ Bolivar P., Cruz-Paredes C., Hernández L.R., Juárez Z.N., Sánchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*, *J. of Ethnopharmacology*, 137, 141-147, **2011**.

1.2.2. Espèce *Galium brunneum*

1.2.2.1. Caractéristiques morphologiques

Galium brunneum est une plante endémique d'Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) (Figure I-5). Très peu d'études sur la description botanique de *G. brunneum* sont révélées dans la littérature. La première description de cette plante est faite en 1847 par Munby lors de ses prospections de la flore Algérienne. Cette espèce est désignée dans la littérature sous le synonyme *Galium clausonis* Pomel (1874)²⁸.

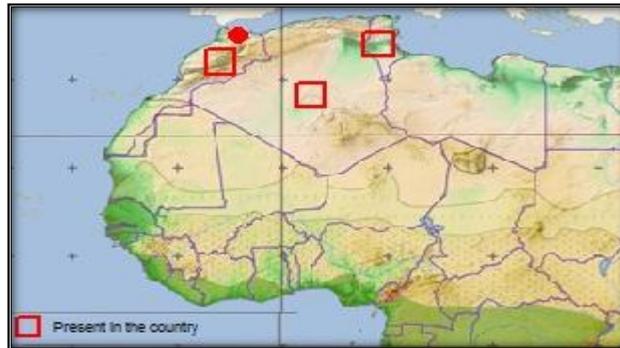


Figure I-5: Répartition géographique de l'espèce *Galium brunneum*

Les caractères botaniques spécifiques de l'espèce *G. brunneum* Munby sont les suivants (Figure I-6):

- La tige est rameuse, de forme quadrangulaire, dressée ou diffuse pouvant atteindre une longueur de 2 à 3 dm, lisse et parfois hérissée dans le haut.
- Les feuilles sont lancéolées-acuminées, un peu épaisses, verticillées par 6 et luisantes.
- Les fleurs sont petites, à divisions cuspidées, à pointe infléchie, pédicelles plus longues que le fruit.
- Le fruit glabre, luisant et rugueux.



Figure I-6: L'espèce *Galium brunneum*

²⁸ Battaudier J. A., Trabut L., Flore d'Algérie, Paris, Librairie F. Savy, 1951.

2. Travaux phytochimiques antérieurs

Les études phytochimiques des plantes marines sont limitées. Cependant, quelques-unes ont été entamées faisant un certain nombre de publications. Les constituants les plus rencontrés sont des composés phénoliques, flavonoïdes, stéroïdes et acide gras^{29,30}.

En revanche, les métabolites secondaires des plantes appartenant à la famille des Rubiacées sont très nombreux et très variés. Cette famille semble riche en composés polyphénoliques (flavonoïdes et anthraquinones), alcaloïdes indoliques, terpènes (iridoïdes) et en huiles essentielles. La plupart des produits naturels reportés dans le genre *Galium* appartient à la classe des composés phénoliques et terpéniques et plus précisément, les anthraquinones et les iridoïdes qui sont des marqueurs chimio-taxonomiques. Nous nous limiterons dans ce qui suit, aux études phytochimiques antérieures effectuées sur les herbiers marins et les plantes du genre *Galium*.

2.1. Polyphénols

Les composés phénoliques constituent un des plus grands groupes de produits naturels, et comprennent essentiellement les phénols simples, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les lignanes et les xanthones.

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques qui se divisent en différents types: flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanes, chalcones, anthocyanidines et aurones. Ils sont tous des produits résultant de la même voie biosynthétique par l'intermédiaire de la chalcone.

2.1.1. Polyphénols chez les plantes marines

2.1.1.1. Phénols

De nombreux métabolites phénoliques ont été identifiés dans les différentes espèces de plantes marines³¹. Plusieurs études ont été effectuées sur l'espèce *Posidonia oceanica* pour son profil phénolique. Ces études ont permis d'isoler plus de 20 composés phénoliques simples classés en trois groupes: les dérivés du phénol **1-4**, les dérivés du phényléthane **5-7** et les dérivés du phénylméthane **8-19**^{32,33,34,35}.

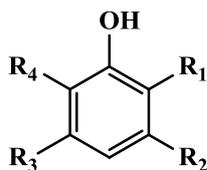
²⁹ Zidorn C., Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae): chemical diversity, bioactivity, and ecological function, *Phytochemistry* 124, 5-28, **2016**.

³⁰ Subhashini P., Dilipan E., Thangaradjou T., Papenbrock J., Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions, *Natural Products and Bioprospecting* 3, 129-136, **2013**.

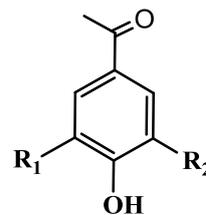
³¹ Zapata O., Memillan C., Phenolic acids in seagrasses, *Aquatic Botany* 7, 307-317, **1979**.

³² Agostini S., Desjobert J.-M., Pergent G., Distribution of phenolic compounds in the seagrass, *Posidonia Oceanica*, *Phytochemistry* 48(4), 611-617, **1998**.

³³ Heglmeier A., Zidorn C., Secondary metabolites of *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 964-970, **2010**.



- 1 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
- 2 $R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$
- 3 $R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$
- 4 $R_1 = R_4 = OH, R_2 = R_3 = H$



- 5 $R_1 = R_2 = H$
- 6 $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
- 7 $R_1 = R_2 = OCH_3$

Le Tableau (I-4) ci-dessous regroupe la majorité des composés phénoliques dérivés du phénylméthane **8-19** décrits dans l'espèce *Posidonia oceanica*.

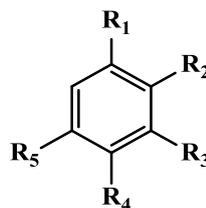


Tableau I-4: Distribution des composés phénylméthane dans l'espèce *P. oceanica*

N	Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
8	4-hydroxybenzaldéhyde	CHO	H	H	OH	H
9	3,4-dihydroxybenzaldéhyde	CHO	H	OH	OH	H
10	Vanilline	CHO	H	OCH ₃	OH	H
11	Syringaldéhyde	CHO	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
12	Acide benzoïque	COOH	H	H	H	H
13	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	COOH	H	H	OH	H
14	Acide <i>p</i> -anisique	COOH	H	H	OCH ₃	H
15	Acide protocatéchuique	COOH	H	OH	OH	H
16	Acide vanillique	COOH	H	OCH ₃	OH	H
17	Acide gallique	COOH	H	OH	OH	OH
18	Acide syringique	COOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
19	Acide géntisique	COOH	OH	H	H	OH

Les dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large dans le règne végétal, ils sont présents aussi dans les plantes marines. Le plus répandu est l'acide caféique qui est isolé à partir des espèces *Cymodocea nodosa*, *Posidonia oceanica*, *Thalassia hemprichii* et *Zostera marina*³⁴⁻³⁸.

³⁴ Cariello L., Zanetti L., De Stefano S., *Posidonia* ecosystem-V. Phenolic compounds from marine phanerogames, *Cymodocea nodosa* and *Posidonia oceanica*, *Comparative Biochemistry and Physiology* 62B, 159-161, **1979**.

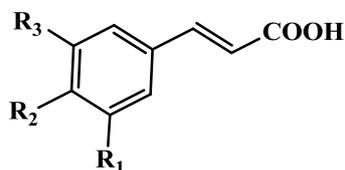
³⁵ Haznedaroglu M. Z., Zeybek U., HPLC Determination of chicoric acid in leaves of *Posidonia oceanica*, *Pharmaceutical Biology* 45(10), 745-748, **2007**.

L'acide cinnamique (**20**) et ses dérivés comme l'acide *p*-coumarique (**21**), l'acide férulique (**22**) et l'acide sinapique (**23**) ont été identifiés dans l'espèce *P. oceanica* par une analyse sur CLHP^{34,35}.

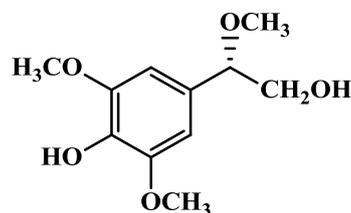
Une étude quantitative de l'espèce *Zostera marina* L. par CLHP a permis d'identifier six acides phénoliques dont quatre dérivés sont de phénylméthane: l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**13**), l'acide protocatéchique (**15**), l'acide vanillique (**16**), et l'acide gallique (**17**) et deux dérivés de l'acide cinnamique: l'acide férulique (**22**) et l'acide caféique (**24**)³⁶.

L'acide zostérique (**25**) est un dérivé de l'acide cinnamique isolé pour la première fois à partir de *Zostera marina*, il a un potentiel anti-fouling très prometteur contre plusieurs organismes (*Acinetobacter* et *Pseudomonas putida*) micro-fouling et macro-fouling³⁷.

Le genre *Thalassia* a été examiné aussi pour son profil phénolique. Un dérivé phénylthane **27** ((*S*)-4-(2-hydroxy-1-méthoxyéthyl)-2,6-diméthoxyphénol) et quatre acides phénoliques **13**, **17**, **24** et **26** sont répertoriés au niveau de l'espèce *T. hemprichii*³⁸, par contre un dérivé phénylméthane **13** et trois acides phénoliques **15**, **16** et **19** sont détectés dans l'espèce *T. testudinum*³⁹.



- 20** $R_1 = R_2 = R_3 = H$
21 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$
22 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$
23 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$
24 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$
25 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OSO_3H$
26 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OCH_3$

**27**

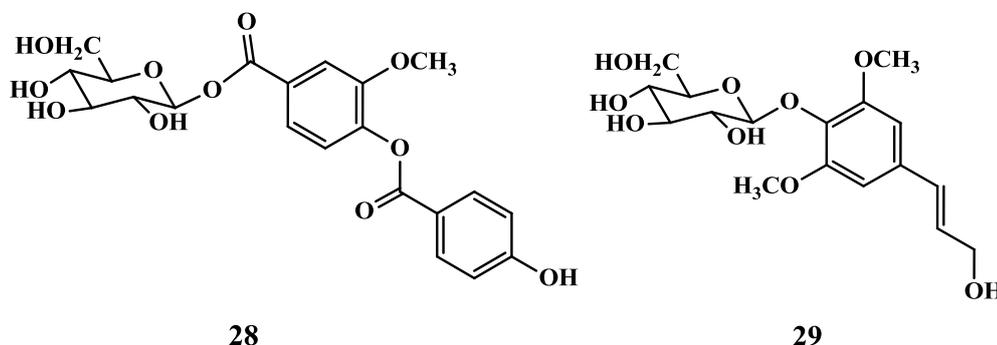
³⁶ Quackenbush R.C., Bunn D., Lingren W., HPLC determination of phenolic acids in the water-soluble extract of *Zostera marina* L. (eelgrass), *Aquatic Botany* 24, 83-89, **1986**.

³⁷ Todd J.S., Zimmermann R.C., Crews P., Alberte R.S., The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate esters, *Phytochemistry* 34, 401-404, **1993**.

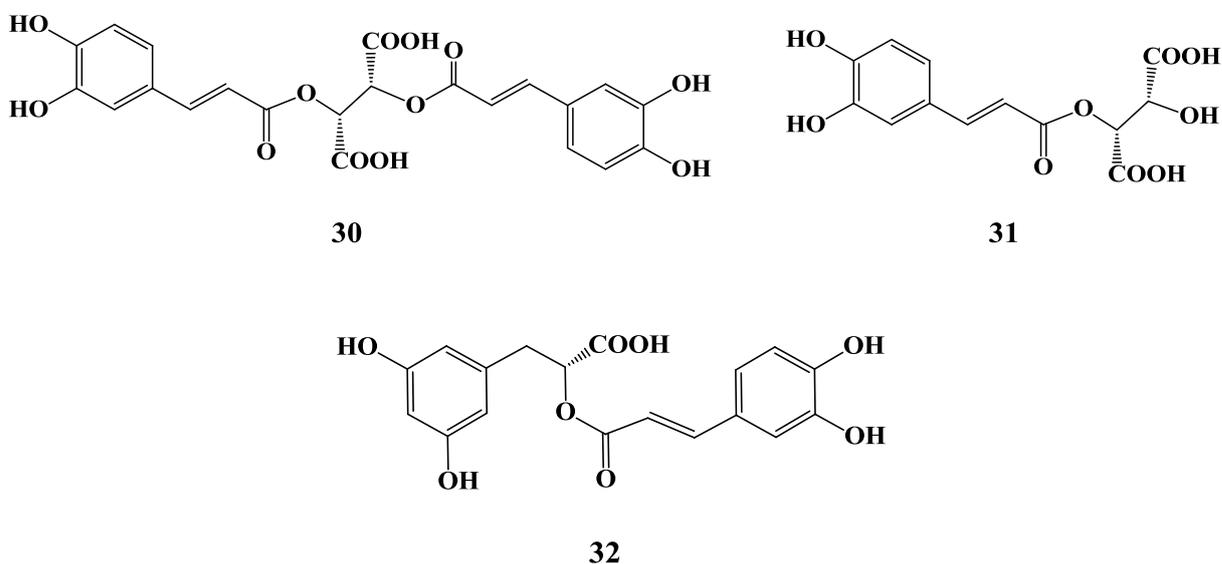
³⁸ Qi S-H., Huang L-S., He F., Zhang S., Dong J-D., Phytochemical and chemotaxonomic investigation of seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers (Hydrocharitaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 128-131, **2012**.

³⁹ Trevathan-Tackett S.M., Lane A.L., Bishop N., Ross C., Metabolites derived from the tropical seagrass *Thalassia testudinum* are bioactive against pathogenic *Labyrinthula* sp, *Aquatic Botany* 122, 1-8, **2015**.

On rencontre également des phénols glucosylés comme la none (**28**) (ester glucopyranoside de l'acide-4-*O*-*p*-hydroxybenzoylvanillique) isolé à partir de l'espèce *P. oceanica*³⁴ et la syringine (**29**) détectée dans l'espèce *T. hemprichii*³⁸.



L'acide chicorique (**30**) est un polyphénol, le plus fréquent dans les herbiers. Il a été isolé à partir des espèces *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Syringodium filiforme* et *Talasia hemprichii*^{34,35,38,40,41}. On peut également citer d'autres dérivés comme l'acide caftarique (**31**) qui a été détecté dans les espèces *Cymodocea nodosa* et *Syringodium filiforme*^{40,41}. Les espèces *Zostera noltii* et *Z. marina* sont des sources de l'acide rosmarinique⁴² (**32**).

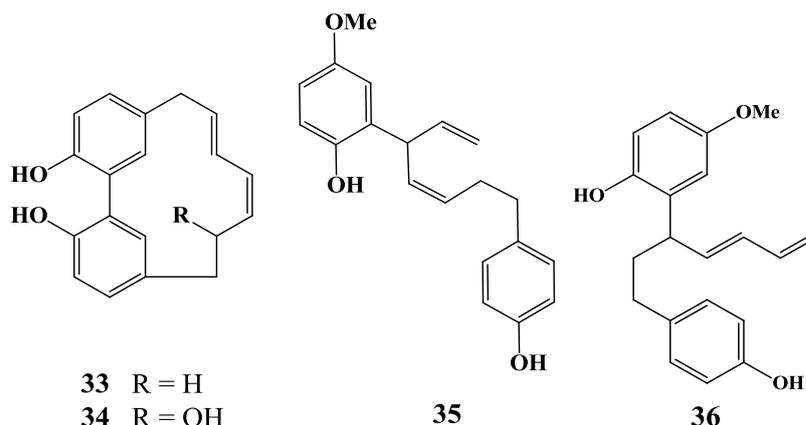


⁴⁰ Grignon-Dubois M., Rezzonico B., The economic potential of beach-cast seagrass- *Cymodocea nodosa*: a promising renewable source of chicoric acid, *Botanica Marina* 56(4), 303-311, **2013**.

⁴¹ Nuissier G., Rezzonico B., Grignon-Dubois M., Chicoric acid from *Syringodium filiforme*, *Food Chemistry* 120, 783-788, **2010**.

⁴² Achamlale S., Rezzonico B., Grignon-Dubois M., Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon, *Food Chemistry* 113, 878-883, **2009**.

En plus de ces dérivés phénoliques, les biphénols comme les diarylhéptanoïdes **33-36** ont été détectés plus tard et uniquement dans l'espèce *Cymodocea nodosa*^{43,44}.

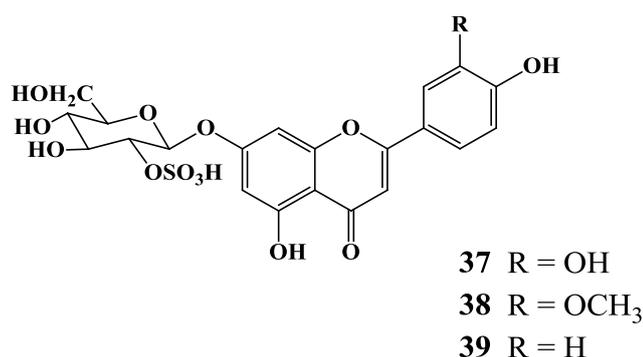


2.1.1.2. Flavonoïdes

Divers travaux ont montré la présence des flavonoïdes et leurs dérivés sulfatés dans les herbiers. Ces dérivés sont souvent associés à ces plantes marines surtout dans la famille Hydrocharitaceae⁴⁵. Les différentes études réalisées jusqu'à présent sur la phytochimie de différentes espèces marines ont mis en évidence la présence caractéristique des squelettes de type flavone. On retrouve dans ces squelettes flavoniques, plusieurs positions de sulfatation, soit au niveau de la génine ou au niveau du sucre.

Certains de ces composés sont sulfatés au niveau de sucre tels que :

- Les thalassiolines A-C (**37-39**) isolés à partir de l'espèce *Thalassia testudinum* possédant une activité antibiotique et anti-labyrinthite (bioactive contre l'agent pathogène *Labyrinthula* sp)^{39,46}.



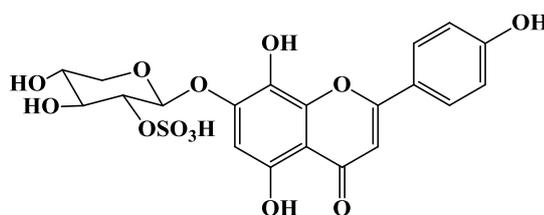
⁴³ Kontiza I., Vagias C., Jakupovic J., Moreau D., Roussakis C., Roussis V., Cymodienol and cymodiene: new cytotoxic diarylheptanoids from the sea grass *Cymodocea nodosa*, *Tetrahedron Letters* 46, 2845-2847, **2005**.

⁴⁴ Kontiza I., Stavri M., Zloh M., Vagias C., Gibbons S., Roussis V., New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*, *Tetrahedron* 64, 1696-1702, **2008**.

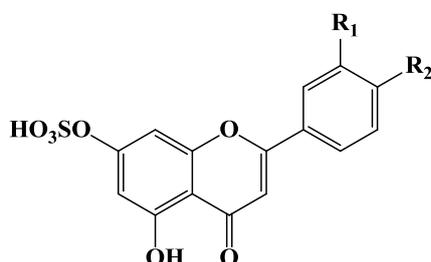
⁴⁵ Mcmillan C., Zapata O., Escobar L., Sulphated phenolic compounds in seagrasses, *Aquatic Botany* 8, 267-278, **1980**.

⁴⁶ Jensen P.R., Jenkins K.M., Porter D., Fenical W., Evidence that a new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoospore fungi, *Applied and Environmental Microbiology* 64(4), 1490-1496, **1998**.

- L'isoscutellaréine 7-O- β -xyloside-2''-O-sulfate (**40**) avec les composés **37** et **38** isolés à partir du *Thalassia hemprichii*^{38,47}. Le composé **40** avec deux autres flavonoïdes, isoscutellaréine et isoscutellaréine 7-O- β -xyloside (**67-68**), montrent une activité antibactérienne contre quatre bactéries (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), en utilisant la méthode de diffusion sur plaque d'Agar où le composé **40** était le plus actif⁴⁷.

**40**

L'investigation chimique des espèces du genre *Zostera* (*Z. marina* et *Z. noltii*) a donné les flavones sulfoniques **41-46** possédant un ou plusieurs groupements sulfoniques, généralement, au niveau de carbone C-7 ou C-3'^{48,49,50}.



- 41** R₁ = H, R₂ = OH
42 R₁ = R₂ = OH
43 R₁ = OH, R₂ = OCH₃
44 R₁ = OCH₃, R₂ = OH
45 R₁ = OSO₃H, R₂ = OH
46 R₁ = OSO₃H, R₂ = OCH₃

⁴⁷ Hawas UW., A new 8-hydroxy flavone O-xyloside sulfate and antibacterial activity from the Egyptian seagrass *Thalassia hemprichii*, *Chemistry of Natural Compounds* 50, 629-632, **2014**.

⁴⁸ Buchsbaum R.N., Short F.T., Cheney D.P., Phenolic-nitrogen interactions in eelgrass, *Zostera marina* L.: possible implications for diseases resistance, *Aquatic Botany* 37, 291-297, **1990**.

⁴⁹ Grignon-Dubois M., Rezzonico B., First phytochemical evidence of chemotypes for the seagrass *Zostera noltii*, *Plants* 1, 27-38, **2012**.

⁵⁰ Enerstvedt K.H., Jordheim M., Andersen Ø.M., Isolation and Identification of Flavonoids Found in *Zostera marina* Collected in Norwegian Coastal Waters, *American Journal of Plant Sciences* 7, 1163-1172, **2016**.

D'autres espèces comme *Enhalus acoroides*, *Halophila stipulacea*, *Halophila johnsonii* et *Thalassia testudinum*^{9,51,52} sont révélées riches en flavones et flavones glycosylés.

Le tableau I-5 illustre les structures isolées à partir de ces espèces.

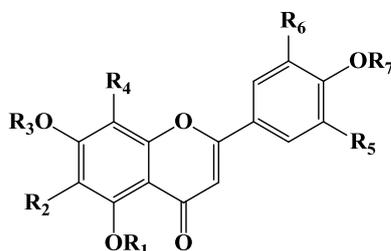


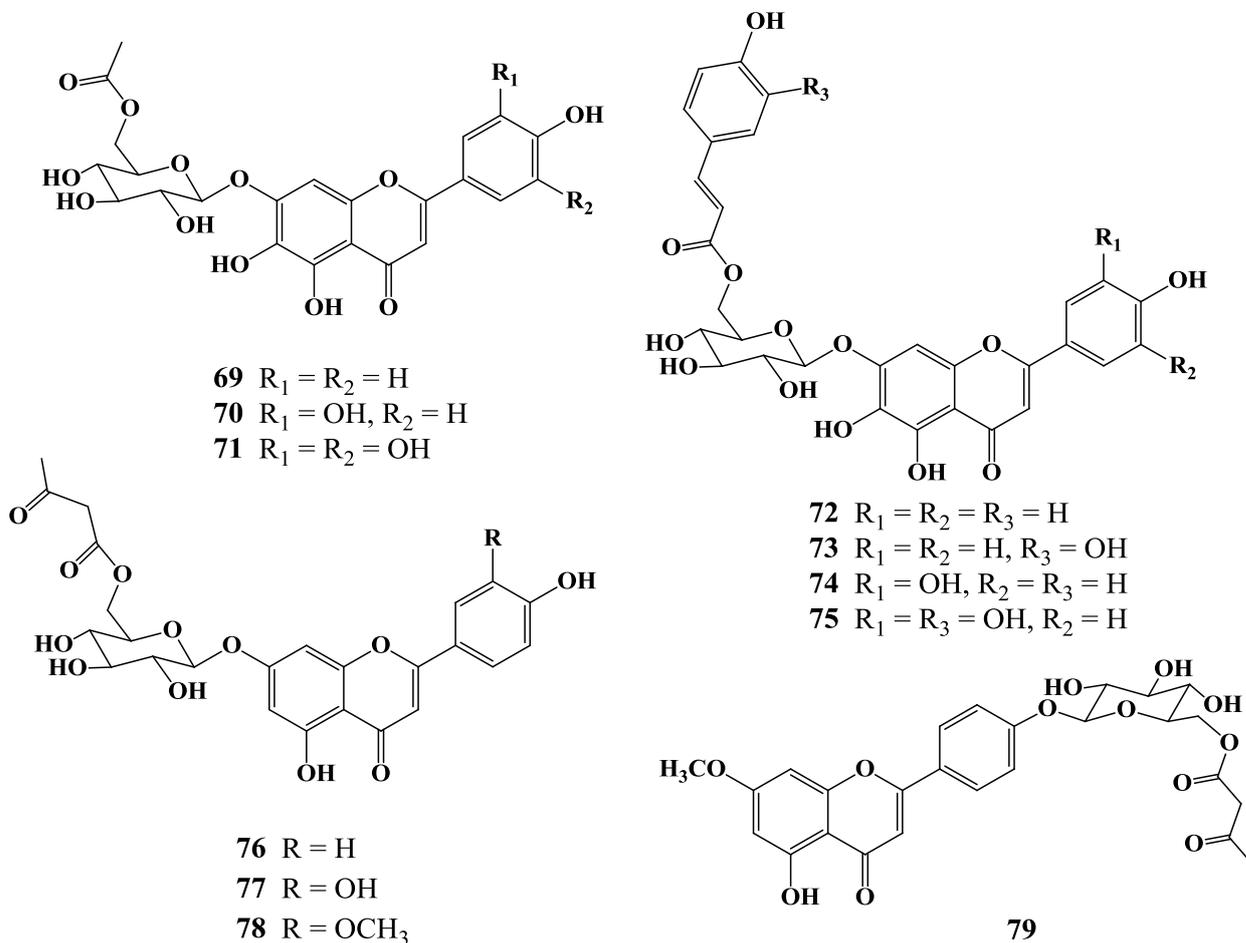
Tableau I-5: Flavones et flavones glycosylées isolées de quelques espèces marines

N°	Espèce	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Réf.
47	<i>E. acoroides</i>	H	H	H	H	H	H	H	51
48	<i>Z. marina</i> , <i>E. acoroides</i> , <i>H. johnsonii</i>	H	H	H	H	H	OH	H	50 51 52
49	<i>Z. marina</i>	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	50
50	<i>E. acoroides</i>	H	H	H	H	H	OH	Gluc	51
51		H	H	H	H	H	Ogluc	H	
52	<i>H. stipulacea</i> , <i>Z. marina</i>	H	H	Glc	H	H	H	H	9 50
53	<i>Z. marina</i>	H	H	Glc	H	H	OH	H	50
54	<i>H. stipulacea</i>	H	H	Glc	H	H	OCH ₃	H	9
55		H	H	H	H	H	H	Glc	
56		H	H	H	H	H	OCH ₃	Glc	
57		H	H	CH ₃	H	H	H	Glc	
58	<i>H. johnsonii</i>	H	H	H	H	H	H	H	52
59		H	OH	H	H	OH	OH	H	
60		H	OH	CH ₃	H	H	H	H	
61		H	OH	CH ₃	H	OH	H	H	
62		H	OH	Glc	H	H	H	H	
63		H	OH	Glc	H	OH	H	H	
64		H	OH	Glc	H	OH	OH	H	
65	<i>T. hemprichii</i>	H	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	H	38 47
66		CH ₃	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	CH ₃	
67		H	H	H	OH	H	H	H	
68		H	H	Xyl	OH	H	H	H	

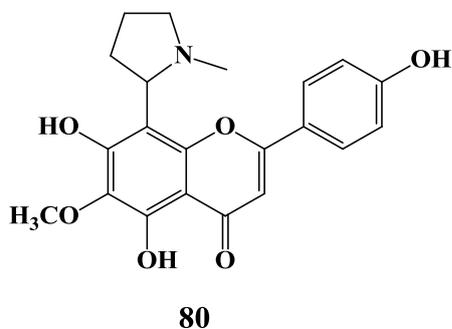
⁵¹ Qi S-H., Zhang S., Qian P-Y., Wang B-G., Antifeedant, antibacterial, and antilarval compounds from the South China Sea seagrass *Enhalus acoroides*, *Botanica Marina* 51(5), 441-447, 2008.

⁵² Meng Y., Krzysiak A.J., Durako M.J., Kunzelman J.I., Wright J.L.C., Flavones and flavone glycosides from *Halophila johnsonii*, *Phytochemistry* 69, 2603-2608, 2008.

Certaines flavones glucosylées identifiées dans les genres *Halophila* et *Zostera* ont une acétylation au niveau du carbone C-6'' du glucose, soit par un groupement acétyle **69-71**, acide *p*-coumaroyle, cafféoyle **72-75** (*H. johnsonii*)⁵² ou malonyle **76-79** (*H. stipulacea* (**76, 79**)⁹ et *Z. marina* (**77-78**))⁵⁰.

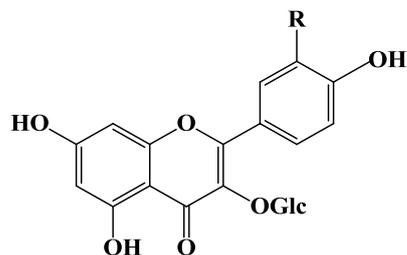


Enfin une flavone alcaloïde, la phyllospadine (**80**) a été isolée à partir de l'espèce *Phyllospadix iwatensis*⁵³.



⁵³ Takagi M., Funahashi S., Ohta K., Nakabayashi T., Phyllospadine, a new flavonoidal alkaloid from the sea grass *Phyllospadix iwatensis*, *Agricultural and Biological Chemistry* 44(12), 3019-3020, **1980**.

On remarque aussi la présence de flavonols comme la quercétine-monoglucoside (**81**) et l'isorhamnétine-monoglucoside (**82**) qui ont été isolés de l'espèce *Cymodocea nodosa*³⁴.

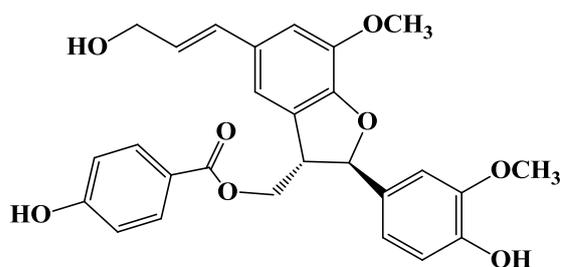


81 R = OH

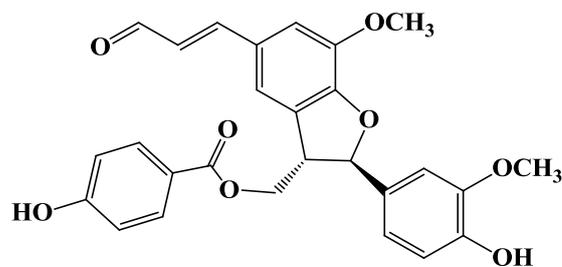
82 R = OCH₃

2.1.1.3. Lignanes

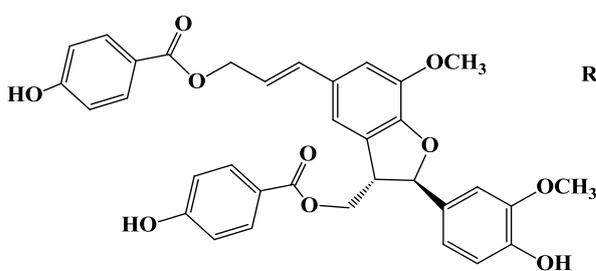
Bitam et collaborateurs¹⁰ ont récemment étudié le contenu chimique des phanérogames marines en lignanes, et précisément, chez l'espèce *Posidonia oceanica*. Six néo-lignanes **83-88** ont été isolés de cette espèce dont les composés **83** et **86** sont nouveaux.



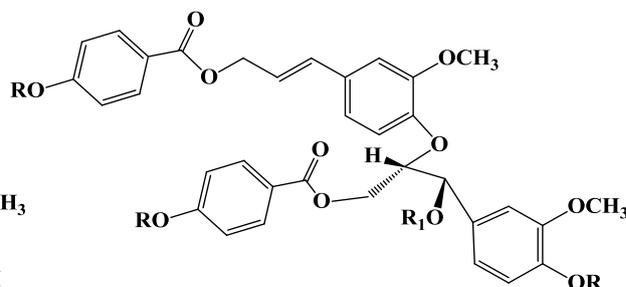
83



84



85



86 R=R₁=H

87 R=H, R₁=Et

88 R=R₁=Ac

2.1.2. Polyphénols dans le genre *Galium*

2.1.2.1. Flavonoïdes

Divers travaux ont montré la présence de flavones et de flavonols dans différentes espèces du genre *Galium*. Ils sont en fait tous des dérivés de la quercétine, du kaempférol, de l'apigénine et de l'isorhamnétine. Ce sont surtout des dérivés *O*-glycosylés et très rarement acétylés tandis que les *C*-glycosylés sont absents dans ce genre.

Le tableau suivant (Tableau I-6) présente quelques exemples de flavonoïdes isolés dans diverses espèces du genre *Galium*.

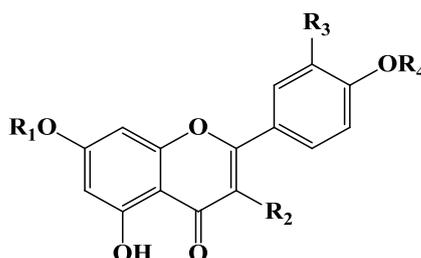


Tableau I-6: Flavonoïdes identifiés dans le genre *Galium*

N	Composés	Espèce	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Réf.
89	Apigénine 4'- <i>O</i> -β-rhamnoside	<i>G. verum</i>	H	H	H	Rha	54
90	Apigénine 7- <i>O</i> -β-glucoside	<i>G. ruthenicum</i> <i>G. fagetorum</i>	Glc	H	H	H	55 56
91	Apigénine 7- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -acétyl)-α-rhamnosyl-(1→6)-β-glucoside	<i>G. verum</i>	R	H	H	H	57
92	Apigénine 7- <i>O</i> -α-rhamnosyl-(1→6)-β-glucoside	<i>G. ruthenicum</i>	Rha-Glc	H	H	H	55
48	Lutéoline	<i>G. fagetorum</i>	H	H	OH	H	58
93	Lutéoline 7- <i>O</i> -β-glucoside (Cynaroside)	<i>G. ruthenicum</i>	Glc	H	OH	H	55 56
94	Diosmétine 7- <i>O</i> -β-glucoside	<i>G. fagetorum</i>	Glc	H	OH	Me	58
95	Diosmétine 7- <i>O</i> -α-arabinosyl-(1→6)-β-glucoside	<i>G. ruthenicum</i>	Ara-Glc	H	OH	Me	55
96	Kaempférol 3- <i>O</i> -β-glucoside (Astragaline)	<i>G. verum</i> sp <i>verum</i>	H	OGlc	H	H	59

⁵⁴ Shafaghat A., Salimi F., Aslaniyan N., Shoaie Z., Flavonoids and an ester derivative isolated from *Galium verum* L., *World Applied Sciences Journal* 11(4), 473-477, **2010**.

⁵⁵ Borisov M.I., Flavonoids of *Galium ruthenicum*, *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 5, 662-663, **1974**.

⁵⁶ Bogaezskii K. A., Borisov M.I., Flavonoids of *Galium fagetorum*, *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 6(3), 367-368, **1970**.

⁵⁷ Zhao C-C., Shao J-H., Zhao C-J., Li X., A new flavonoid glycoside from *Galium verum*, *Chemistry of Natural Compounds* 47(4), 545-546, **2011**.

⁵⁸ Bogaevskii K.A., Borisov M.I., Flavonoids of *Galium fagetorum*, *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 5, 626-627, **1970**.

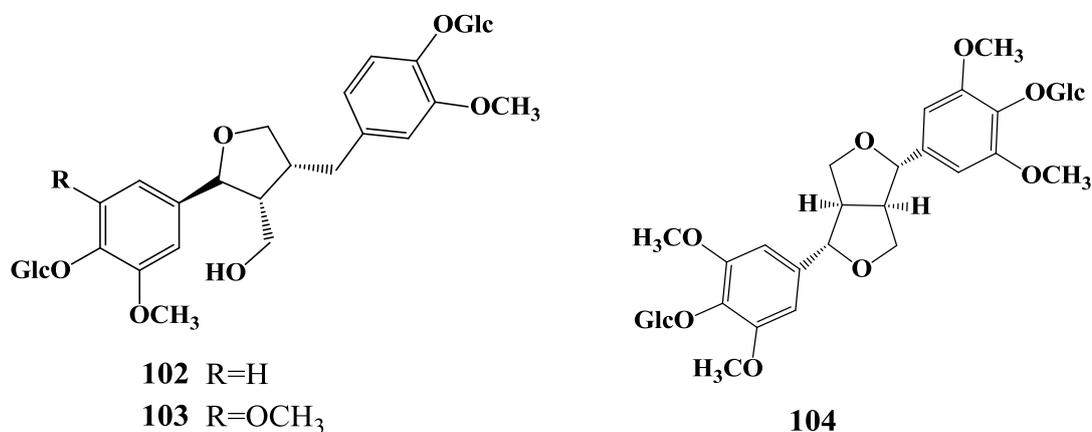
⁵⁹ Demirezer L.O., Gurbuz F., Guvenalp Z., Stoch K., Zeeck A., Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*, *Turkish Journal of Chemistry* 30(4), 525-534, **2006**.

97	Kaempférol 3- <i>O</i> -β-rhamnoside	<i>G. spurium</i>	H	ORha	H	H	60
98	Kaempférol 3- <i>O</i> -β-rutinoside	<i>G. ruthenicum</i>	H	ORut	H	H	55
		<i>G. spurium</i>					60
		<i>G. uliginosum</i>					61
99	Quercétine	<i>G. spurium</i>	H	OH	OH	H	60
100	Quercétine 3- <i>O</i> -β-rutinoside (Rutine)	<i>G. verum</i> sp <i>verum</i>	H	ORut	OH	H	59
		<i>G. spurium</i>					60
		<i>G. uliginosum</i>					61
		<i>G. tortumense</i>					62
101	Quercétine 3- <i>O</i> -α-rhamnoside	<i>G. spurium</i>	H	ORha	OH	H	60
82	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -β-glucoside		H	OGlc	OMe	H	

R = (3,4-di-*O*-acétyl)-α-rhamnosyl-(1→6)-β-glucoside

2.1.2.2. Lignanes

Trois lignanes, seulement, ont été répertoriés dans le genre *Galium* et exactement chez l'espèce *Galium sinaicum*, dont deux sont des bis-glucosides de laricirésinol: (7*S*,8*R*,8'*R*)-(-)-laricirésinol 4,4'-bis-*O*-β-glucoside (**102**) et 7*S*,8*R*,8'*R*)-(-)-5-méthoxylaricirésinol 4,4'-bis-*O*-β-glucoside (**103**) et un est un bis-glucoside de syringarésinol: ((-)-syringarésinol 4,4'-bis-*O*-β-glucoside (**104**))⁶³.



⁶⁰ Seokwon Y., Saerom P., Dalrae A., Jae Heon Y., Dae Keun K., Antioxidative constituents of the aerial parts of *Galium spurium*, *Biomolecules & Therapeutics* 19(3), 336-341, **2011**.

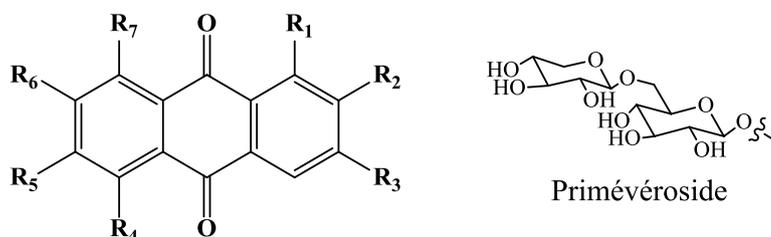
⁶¹ Borisov M.I., Boguslavskaya L.I., Batyuk V.S., Lisovaya L.I., Flavonoids of *Galium uliginosum*, *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 6(2), 271-272, **1970**.

⁶² Guvenalp Z., Kilic N., Kazaz C., Kaya Y., Demirezer L.O., Chemical Constituents of *Galium tortumense*, *Turkish Journal of Chemistry* 30, 515-523, **2006**.

⁶³ El-Gamal A.A., Takeya K., Itokawa H., Halim A.F., Amer M.M., Saad, H.-E.A., Lignan bis-glucosides from *Galium sinaicum*, *Phytochemistry* 45(3), 597-600, **1997**.

2.1.2.3. Anthraquinones

Les anthraquinones sont largement répandues dans le genre *Galium*. On peut distinguer, des anthraquinones simples, des anthraquinones glycosylées et dimères. Le tableau I-7 présente une liste d'anthraquinones simples et glycosylées caractérisées dans les différentes espèces du genre *Galium*.

Tableau I-7: Anthraquinones identifiées dans le genre *Galium*

N	Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Espèces	R.
105	1-méthoxy alizarine	OMe	OH	OH	H	H	H	H	<i>G. sinaicum</i>	64
									<i>G. verum</i>	65
									<i>G. spurium</i>	66
106	1,3-diméthoxy-2-hydroxy anthraquinone	OMe	OH	OMe	H	H	H	H	<i>G. sinaicum</i>	64
									<i>G. verum</i>	66
										67
107	1,3-diméthoxy-6-hydroxy anthragallol	OMe	OH	OMe	H	OH	H	H	<i>G. sinaicum</i>	64
									<i>G. sinaicum</i>	68
108	Rubiadine	OH	Me	OH	H	H	H	H	<i>G. spurium</i>	65
									<i>G. verum</i>	66
109	Rubiadine 3- <i>O</i> -β-primévéroside	OH	Me	OPrim	H	H	H	H	<i>G. humifusum</i>	69
110	1-méthyléther rubiadine 3- <i>O</i> -β-primévéroside	OMe	Me	OPrim	H	H	H	H		
111	ω-méthoxy lucidine 3- <i>O</i> -β-primévéroside	OH	CH ₂ OMe	OPrim	H	H	H	H		
112	2,8-dihydroxy-1,3-diméthoxy-7-méthyl anthraquinone	OMe	OH	OMe	H	H	Me	OH	<i>G. spurium</i>	65
113	1-hydroxy-2-méthyl anthraquinone	OH	Me	H	H	H	H	H		

⁶⁴ Halim A.F., AbdEl-Fattah H., El-Gamal A.A., Thomson R.H., Anthraquinones from *Galium sinaicum*, *Phytochemistry* 31(1), 355-356, 1992.

⁶⁵ Koyama J., Ogura T., Tagahara K., Anthraquinones of *Galium spurium*, *Phytochemistry* 33(6), 1540-1542, 1993.

⁶⁶ Banthorpe D.V., White J.J., Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*, *Phytochemistry* 38(1), 107-111, 1995.

⁶⁷ Zhao C-C., Shao J-H., Li Xian X.J., Wang J-H., A new anthraquinone from *Galium verum* L., *Natural Product Research* 20(11), 981-984, 2006.

⁶⁸ El-Gamal A.A., Takeya K., Itokawa H., Halim A.F., Amer M. M., Saad H.-E.A., Awad S.A., Anthraquinones from the polar fractions of *Galium sinaicum*, *Phytochemistry* 42(4), 1149-1155, 1996.

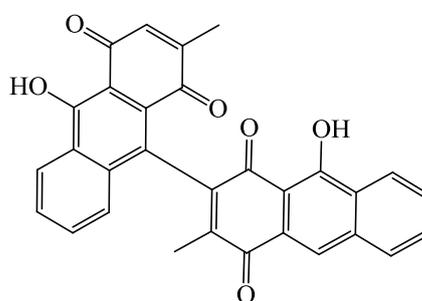
⁶⁹ Guvenalp Z., Kazaz C., Kaya Y., Demirezer L.O., Phytochemical investigation on *Galium humifusum* growing in Turkey, *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 894-896, 2006.

114	ω-méthyl éther lucidine	OH	CH ₂ OMe	OH	H	H	H	H	<i>G. spurium</i>	65
115	1,3,5-trihydroxy-2-méthoxy-6-méthyl anthraquinone	OH	OMe	OH	OH	Me	H	H		
116	6-méthyl alizarine	OH	OH	H	H	Me	H	H		
117	Xanthopurpurine	OH	H	OH	H	H	H	H		
118	1,3-dihydroxy-2-méthoxy méthyl anthraquinone	OH	CH ₂ OMe	OH	H	H	H	H	<i>G. verum</i>	66 67
119	1,3-dihydroxy-2-acétoxy anthraquinone	OH	OAc	OH	H	H	H	H		
120	1-hydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone	OH	CH ₂ OH	H	H	H	H	H		
121	1,3-dihydroxy-2-méthyl anthraquinone	OH	Me	OH	H	H	H	H		
122	1,3-dihydroxy-2-hydroxyméthyl-6-méthoxy anthraquinone	OH	CH ₂ OH	OH	H	OMe	H	H		
123	1,6-dihydroxy-2-méthyl anthraquinone	OH	CH ₃	H	H	OH	H	H	<i>G. verum</i> <i>G. sinaicum</i>	67 68
124	Physcione	OH	H	OMe	H	CH ₃	H	OH	<i>G. verum</i>	67
125	2,5-dihydroxy-1,3-diméthoxy anthraquinone	OMe	OH	OMe	OH	H	H	H		
126	7-hydroxyméthyl-1,3-diméthoxy anthragallol	OMe	OH	OMe	H	H	CH ₂ OH	H		
127	6,7-diméthoxy xanthopurpurine	OH	H	OH	H	OMe	OMe	H	<i>G. sinaicum</i>	68 70
128	6-hydroxy-7-méthoxy rubiadine	OH	Me	OH	H	OH	OMe	H		
129	5-hydroxy-6-hydroxyméthyl-1,3-diméthoxy anthragallol	OMe	OH	OMe	OH	CH ₂ OH	H	H		
130	7-carboxy-1,3-diméthoxy anthragallol	OMe	OH	OMe	H	H	COOH	H		
131	1-méthoxy anthragallol 3-O-β-glucoside	OMe	OH	OGlc	H	H	H	H		
132	Anthragallol 3-O-β-rutinoside	OH	OH	ORut	H	H	H	H		
133	1-méthoxy anthragallol 3-O-β-rutinoside	OMe	OH	ORut	H	H	H	H		
134	1-méthoxy alizarine 2-O-β-primévéroside	OMe	OPrim	H	H	H	H	H		
135	1,3-diméthoxy-7-méthyl anthragallol	OMe	OH	OMe	H	H	Me	H		
136	2-méthoxy-7-méthyl anthragallol	H	OMe	H	H	H	Me	H		
137	6-méthyl-3-méthoxy anthragallol	H	OH	OMe	H	Me	H	H		

⁷⁰ El-Gamal A.A., Takeya K., Itokawa H., Halim A.F., Amer M.M., Saad, H.-E.A., Awad S.A., Anthraquinones from *Galium sinaicum*, *Phytochemistry* 40(1), 245-51, 1995.

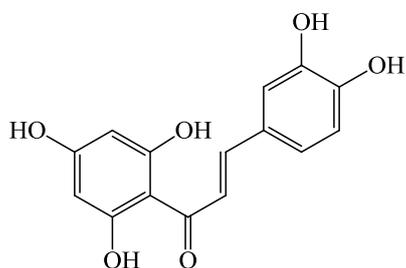
138	8-hydroxy-2,3-diméthoxy anthragallol	H	OMe	OMe	H	H	H	OH	<i>G. sinaicum</i>
139	1,3-diméthoxy-7-formyl anthragallol	OMe	OH	OMe	H	H	CHO	OH	
140	5,7-diméthoxy coparéolatine	OH	OH	OH	OMe	CH ₃	OMe	H	
141	6,7-diméthoxy coparéolatine	OH	OH	OH	OH	OMe	OMe	H	
142	ω -éthyl éther lucidine	OH	CH ₂ OEt	OH	H	H	H	H	
143	6-méthoxy- ω -éthyl éther lucidine	OH	CH ₂ OEt	OH	H	OMe	H	H	
144	6-hydroxy xanthopurpurine	OH	H	OH	H	OH	H	H	
145	1,3-dihydroxy-2-méthoxy-7-méthyl anthraquinone	OH	OMe	OH	H	H	CH ₃	H	

Le composé **146** (10,2'-bis(9-hydroxy-3-méthyl-1,4-anthraquinone)) est une anthraquinone dimère isolée à partir de l'espèce *G. sinaicum*⁷⁰.

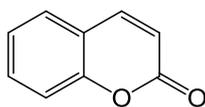


146

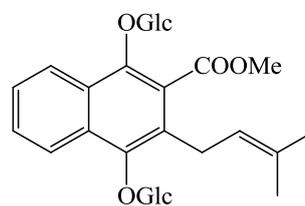
On note aussi la présence de la chalcone **147** dans l'espèce *G. verum* L.⁵⁷, de la coumarine **148** isolée à partir de *G. corsicum*⁷¹, d'une quinone glucosylée **149** (2-carbométhoxy-3-prényl-1,4-naphthohydroquinone 1,4-di-*O*- β -glucoside), isolée à partir de l'extrait n-butanol du *G. humifusum*⁶⁹, et des phénols simples tels que l'acide caféique (**24**) (*G. spurium*)⁶⁰ et l'arbutine (**150**) de la plante *G. album* Mill.⁷²



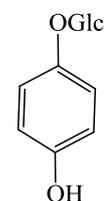
147



148



149



150

⁷¹ Serrilli A. M., Ramunno A., Amicucci F., Chicarella V., Santoni S., Ballero M., Serafini M., Bianco A., Iridoidic pattern in endemic Sardinian plants: the case of *Galium* species, *Natural Product Research* 22(7), 618-622, **2008**.

⁷² Bock K., Rosendal J.S., Nielsen B.J., Secogalioside, an iridoid glucoside from *Galium album* Mill. and carbon-13 NMR spectra of some seco-iridoid glucosides, *Acta Chemica Scandinavica* B30, 743-748, **1976**.

2.2. Terpènes

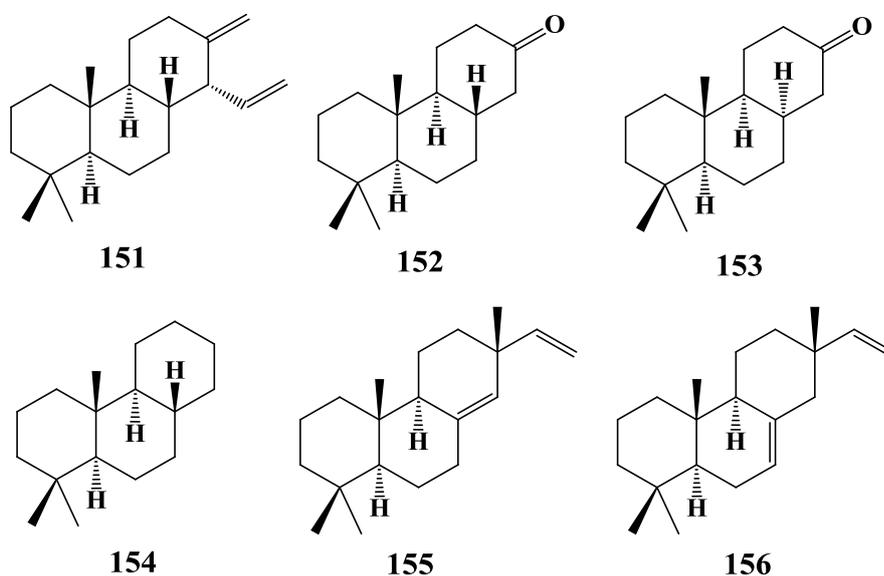
Les terpénoïdes sont une classe importante de métabolites secondaires. Chaque classe de terpène est issue du couplage « tête-à-queue » d'unités isopréniques.

2.2.1. Terpènes chez les plantes marines

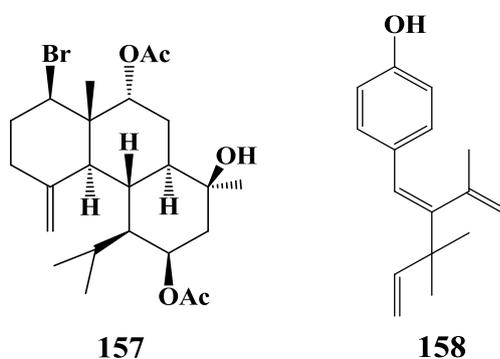
Plusieurs espèces marines ont été examinées pour leur profil terpénique. Les diterpènes sont la classe la plus commune des terpènes avec les stéroïdes, par contre les triterpènes sont très rares dans ces plantes marines⁷³.

2.2.1.1. Diterpènes

Six diterpènes **151-156** ont été identifiés à partir des feuilles de l'espèce *Amphibolis antarctica* par GC-MS⁷⁴.



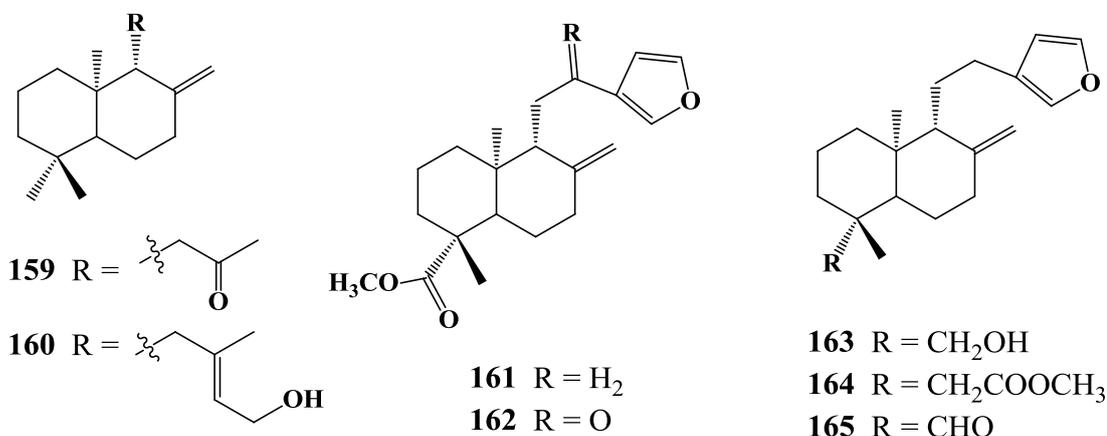
A partir de *Cymodocea nodosa*⁴⁴, deux diterpènes, un dérivé bromé de briarane **157** et un méroterpénoïde nodosol (**158**) ont été isolés.



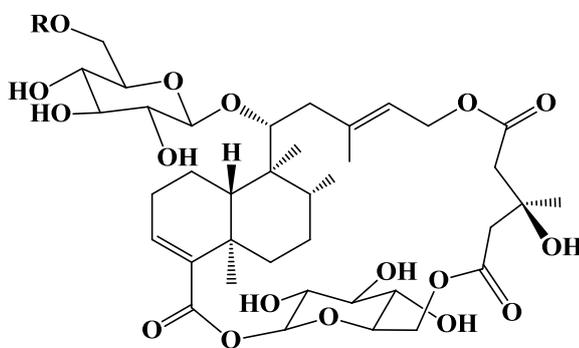
⁷³ Killops S.D., Frewin N.L., Triterpenoid diagenesis and cuticular preservation, *Organic Geochemistry* 21(12), 1193-1209, **1994**.

⁷⁴ Dunlop R.W., Diterpenoid hydrocarbons in the seagrass *Amphibolis antarctica*, *Phytochemistry* 24(5), 977-979, **1985**.

L'investigation phytochimique de l'espèce *Ruppia maritima* a montré la présence caractéristique de sept diterpènes **159-165** de type *ent*-labdanes. La phytotoxicité de ces diterpènes a été évaluée en utilisant l'algue verte unicellulaire *Raphidocelis subcapitata* utilisée comme bioindicateur. Les composés **162-164** ont prouvé une toxicité plus élevée⁷⁵.



Des glucoterpènes comme le syphonoside (**166**) et son dérivé acétylé (**167**), ont été isolés de l'espèce *Halophila stipulacea*^{76,77}. Le syphonoside n'a montré aucune cytotoxicité *in vitro* même avec des concentrations élevées (400 µM), mais au contraire, il inhibe l'apoptose dans certaines lignées cellulaires⁷⁷.



166 R = H

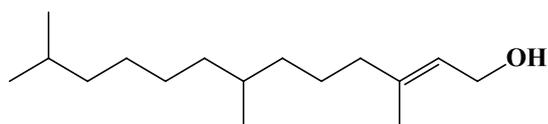
167 R = Ac

⁷⁵ DellaGreca M., Fiorentino A., Isidori M., Monaco P., Zarrelli A., Antialgal entlabdane diterpenes from *Ruppia maritima*, *Phytochemistry* 55, 909-913, **2000**.

⁷⁶ Carbone M., Gavagnin M., Mollo E., Bidello M., Roussis V., Cimino G., Further syphonosides from the sea hare *Syphonata geographica* and the sea-grass *Halophila stipulacea*, *Tetrahedron* 64, 191-196, **2008**.

⁷⁷ Gavagnin, M., Carbone, M., Amodeo, P., Mollo, E., Vitale, M.R., Roussis, V., Cimino, G., Structure and absolute stereochemistry of syphonoside, a unique Macrocyclic glycoterpenoid from marine organisms, *Journal of Organic Chemistry* 72, 5625-5630, **2007**.

Enfin, un hydrocarbure linéaire a également été trouvé comme un dérivé sesquiterpénique nommé posidzidol (**168**). Il a été isolé à partir de l'extrait chloroformique des feuilles de *Posidonia oceanica*⁷⁸.

**168**

2.2.1.2. Stérols

Les travaux antérieurs relatifs à la phytochimie des plantes marines ont permis de caractériser de nombreux stérols à travers les genres *Posidonia*, *Cymodocea*, *Thalassia*, *Enhalus* et *Ruppia*⁷⁸⁻⁸³.

Différents travaux ont montré que les dérivés de 5 α -choléstane, cholést-5-ène et 3-cétostérols étaient les phytostérols les plus abondants dans ces plantes⁷⁹. Ces stérols diffèrent entre eux par la structure de la chaîne latérale R (Figure I-7). Cette famille de plantes marines demeure l'une des sources de stérols la plus importante.

Le tableau suivant (Tableau I-8) donne une idée sur la distribution de ces dérivés stéroïdiques dans les différentes espèces marines.

Tableau I-8: Stérols isolés de différentes espèces marines

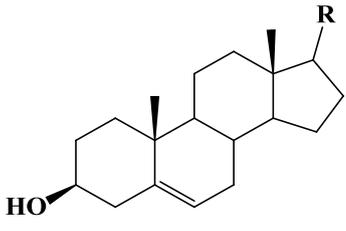
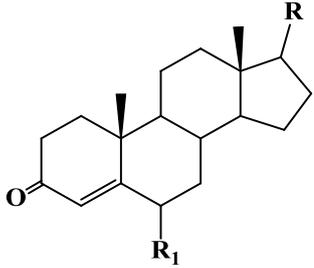
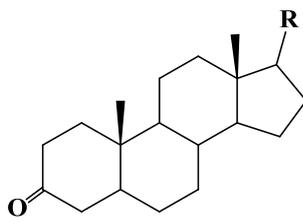
N	Noms	Squelette de base	R	Espèces	Réf		
169	5 α -Cholestan-3-ol		a	<i>P. oceanica</i> <i>C. nodosa</i>	33 78 80		
170	5 α -Cholèst-22E-èn-3-ol		b				
171	5 α -Ergostanol		d				
172	5 α -Campestanol		e				
173	5 α -24-méthylcholést-24(28)-èn-3-ol		h				
174	5 α -Stigmastérol		i				
175	5 α - β -Sitostanol		j				
176	5 α -Isofucostanol		k				
177	Cholestérol		a			<i>P. oceanica</i> <i>C. nodosa</i> <i>T. hemprichii</i>	33 80 81
178	Cholesta-5,22-dièn-3 β -ol		b				

⁷⁸ Hammami S., Ben Salema A., Ashour M. L., Cheriaa J., Graziano G., Mighri Z., A novel methylated sesquiterpene from seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Natural Product Research iFirst*, 1-6, **2012**.

⁷⁹ Gillan F.T., Hogg R.W., Drew E.A., The sterol and fatty acid compositions of seven tropical seagrasses from north Queensland, Australia, *Phytochemistry* 23(12), 2817-2821, **1984**.

⁸⁰ Sica D., Piccialli V., Masullo A., Configuration at C-24 of sterols from the marine phanerogams *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*, *Phytochemistry* 23, 2609-2611, **1984**.

⁸¹ Nichols P. D., Johns R. B., Lipids of the tropical seagrass *Thalassia hemprichii*, *Phytochemistry*, 24(1), 81-84, **1985**.

179	Désmostérol		c	<i>P. oceanica</i> <i>R. maritima</i> <i>C. nodosa</i>	33 75 80	
180	Campestérol		f	<i>P. oceanica</i> <i>C. nodosa</i>	33 80	
181	Dihydrobrassicastérol		d			
182	Epibrassicastérol		g			
183	Brassicastérol		e			
184	24-méthylènecholestérol		h			
185	β -Sitostérol		j	<i>P. oceanica</i> <i>R. maritima</i> <i>C. nodosa</i>	33 75 82	
186	Isofucostérol		k	<i>P. oceanica</i> <i>T. hemprichii</i>	33 81	
187	Stigmastérol	i	<i>P. oceanica</i> <i>R. maritima</i> <i>C. nodosa</i> <i>T. hemprichii</i>	33 75 81 82		
188	(20 <i>R</i>)-22 <i>E</i> -24-éthylcholesta-4,22-dièn-3-one.		R ₁	R		
189	(20 <i>R</i>)-24-éthylcholest-4-èn-3-one		H ₂	i	<i>C. nodosa</i> <i>R. maritima</i>	83 75
190	(24 <i>R</i>)-ergost-4-èn-3-one		H ₂	j	<i>C. nodosa</i>	83
191	(20 <i>R</i>)-22 <i>E</i> -6- β -hydroxy-24-éthylcholesta-4,22-dièn-3-one		H ₂	d	<i>R. maritima</i>	75
192	6- β -hydroxy-(20 <i>R</i>)-24-éthylcholest-4-èn-3-one		β OH	i	<i>C. nodosa</i> <i>E. acoroides</i>	83 51
193	(20 <i>R</i>)-24-éthylcholesta-4,22-dièn-3,6-dione		β OH	j	<i>C. nodosa</i>	83
194	(24 <i>R</i>)-ergost-4-èn-3,6-dione		=O	i	<i>E. acoroides</i> <i>R. maritima</i>	51 75
195	Stigmast-22-èn-3-one		=O	d	<i>R. maritima</i>	75
195	Stigmast-22-èn-3-one		i	<i>E. acoroides</i>	51	

⁸² Latrides M. C., Artaud J., Vicente N., Composition en stérols de végétaux marins méditerranéens, *Oceanologica Acta* 6(1), 73-77, 1983.

⁸³ Kontiza I., Abatis D., Malakate K., Vagias C., Roussis V., 3-Keto steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*, *Steroids* 71, 177-181, 2006.

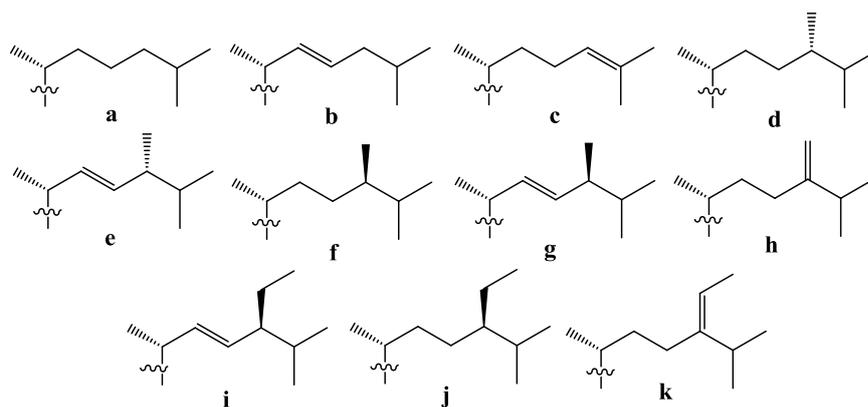
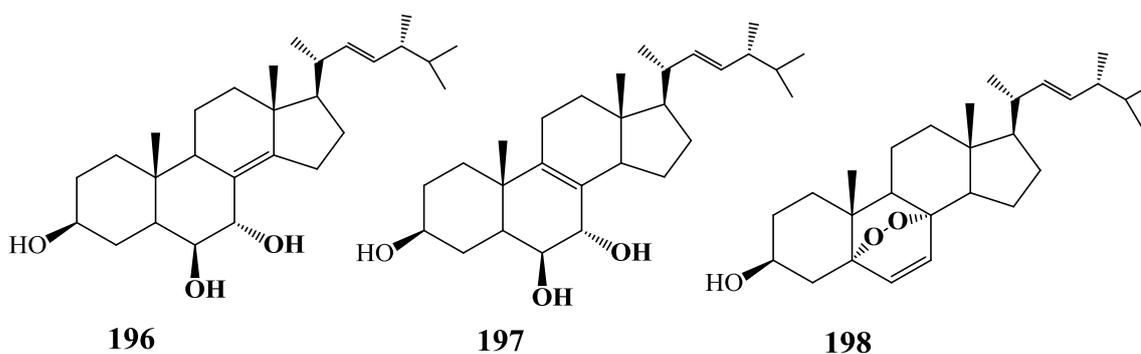
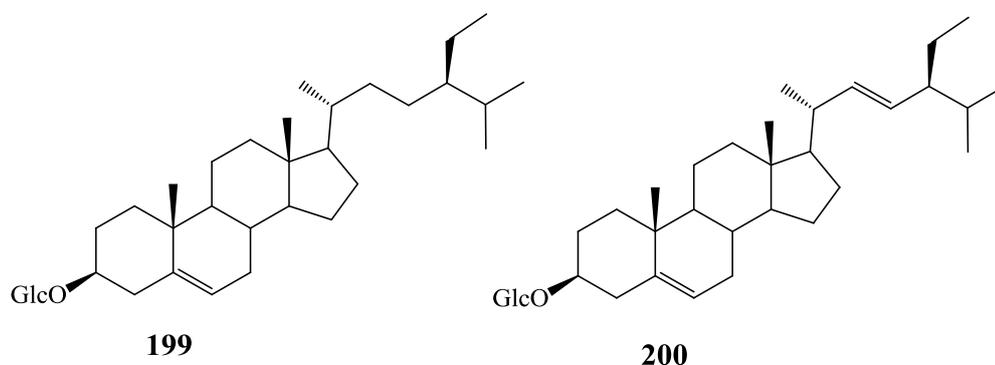


Figure I-7 : Structures de différentes chaînes latérales R

En plus, on note la présence des stérols polyhydroxylés comme le (24*R*)-ergosta-8(14)22-dièn-3 β ,6 β ,7 α -triol (**196**), (24*R*)-ergosta-8,22-dièn-3 β ,6 β ,7 α -triol (**197**) et (22*E*,24*R*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dièn-3 β -ol (**198**) qui ont été isolés de l'espèce *Ruppia maritima*⁸⁴.



Les saponines sont des métabolites typiques des plantes supérieures, elles sont présentes aussi dans les herbiers marins, le daucostérol (**199**) et la stigmastérol 3-*O*- β -glucoside (**200**) sont deux phytostérols glucosylés, elles ont été isolées à partir de l'extrait éthanol de la partie aérienne de *Enhalus acoroides*⁵¹.

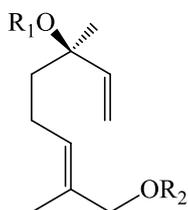


⁸⁴ Dellagrecia M., Fiorentino A., Monaco P., Zarrelli A., Two new polyhydroxylated sterols from *Ruppia maritima*, *Natural Product Letters* 15, 111-118, 2001.

2.2.2. Terpènes issus du genre *Galium*

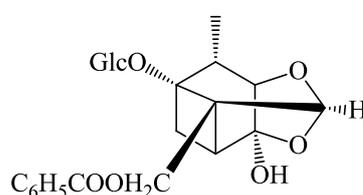
2.2.2.1. Monoterpènes

De nombreux travaux ont pu démontrer la richesse en terpènes et surtout en monoterpènes, généralement glucosylés à partir du genre *Galium*. La plupart des composés monoterpéniques cités dans le genre *Galium* appartiennent aux iridoïdes, mais on peut rencontrer aussi des monoterpènes glycosylés tels que le bétulalbuside (**201**) et son isomère le (2E)-2,6-diméthyl-2,7-octadiène-1,6-diol 6-O-β-glucopyranoside (**202**) qui ont été isolés de l'espèce *G. verum* sp. *verum*⁵⁹, et le paéoniflorine (**203**), isolé de la partie aérienne de *G. aegeum*⁸⁵.



201 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}$

202 $R_1 = \text{Glc}, R_2 = \text{H}$



203

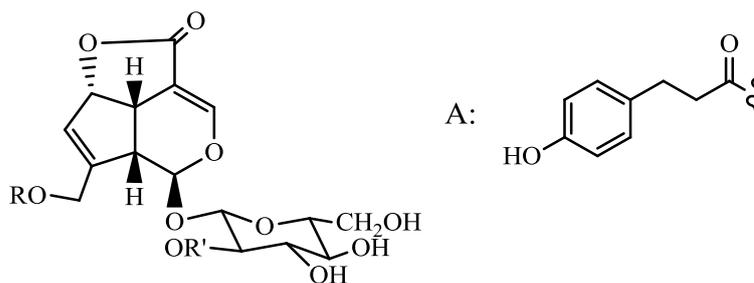
2.2.2.2. Iridoides

Les iridoïdes sont des monoterpènes irréguliers, largement répandus dans le genre *Galium*. Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de ce genre. Les iridoïdes de type iridiane sont les principaux métabolites secondaires rencontrés chez les espèces *Galium*, les plus souvent sont des dérivés de l'aspéruloside (la présence d'une lactone intracyclique supplémentaire) (Tableau I-9), l'acide aspérulosidique (Tableau I-10), la géniposide (Tableau I-11) et la loganine (Tableau I-12). On note que l'aspéruloside, l'acide deacétylaspérulosidique (ou galium glucoside) et la monotropéine faisant l'exception, ils sont les plus communs dans la majorité des espèces et constituent des marqueurs chimiotaxonomiques forts et quasi- exclusifs de la famille toute entière⁸⁶.

⁸⁵ Mitova, M., Passov, S., Handjieva, N., Paéoniflorin from *Galium aegeum*, *Fitoterapia* 70(1), 109-110, **1999**.

⁸⁶ Skovgaard R. L., Christian R., Rosendal J. S., Transfer of iridoid glucosides from host plant *Galium verum* to hemiparasitic *Euphrasia stricta*, *Biochemical Systematics and Ecology* 34(10), 763-765, **2006**.

i. Dérivés de l'aspéruloside

Tableau I-9: Iridoïdes dérivés de l'aspéruloside identifiés dans le genre *Galium*

N	Composés	R	R'	Espèces	Réf.
204	Aspéruloside	Ac	H	<i>G. verum</i> sp. <i>Verum</i> , <i>G. spurium</i> ,	59
				<i>G. corsicum</i> , <i>G. schmidii</i> ,	71
				<i>G. glaucophyllum</i> , <i>G. album</i> ,	72
				<i>G. verum</i> var. <i>asiaticum</i>	87
				<i>G. verum</i> , <i>G. mollugo</i> ,	88
				<i>G. album</i> sp <i>album</i> ,	89
				<i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> ,	90
				<i>G. lovicense</i> , <i>G. humifusum</i>	91
					92
205	Deacétyl aspéruloside	H	H	<i>G. verum</i> var. <i>asiaticum</i> , <i>G. glaucophyllum</i> , <i>G. humifusum</i>	71 88
206	10- <i>p</i> -dihydrocoumaroyl deacétyl aspéruloside (Iridoïde V ₁)	A	H	<i>G. verum</i> var. <i>asiaticum</i> , <i>G. verum</i> <i>G. humifusum</i>	88
					92
					93
207	Iridoïde V ₂	Ac	A	<i>G. verum</i> , <i>G. humifusum</i>	92
					93

L'iridoïde V₃ (**208**), est un dérivé de l'aspéruloside où la double liaison en 3-4 est saturée et la position 3 est substituée par un groupement méthoxyle. Ce composé a été isolé de nombreuses espèces du *Galium* (*G. album* ssp *album*, *G. album* ssp *pychnotrichum*, *G. lovicense*, *G. verum* et *G. humifusum*)^{90,91}.

⁸⁷ Desmond C., Timoney Richard F., Donnelly Dervilla M.X., Iridoids and alkanes in twelve species of *Galium* and *Asperula*, *Phytochemistry* 17(7), 1131-1133, 1978.

⁸⁸ Lee T.G., Kim D.K., Iridoid Compounds from the Whole Plant of *Galium verum* var. *asiaticum*, *Natural Product Sciences* 19(3), 227-230, 2013.

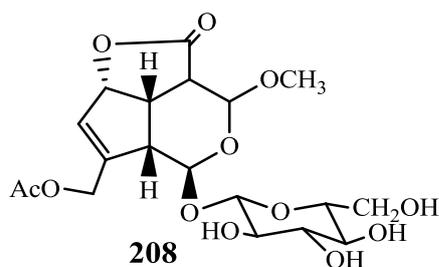
⁸⁹ Boejthe-Horvath K., Hetenyi F., Kocsis A., Szabo L., Varga-Balazs M., Mathe I. Jr., Tetenyi P., Iridoid glycosides from *Galium verum*, *Phytochemistry* 21(12), 2917-2919, 1982.

⁹⁰ Uesato S., Ueda M., Inouye H., Kuwajima H., Yatsuzuka M., Takaishi K., Iridoids from *Galium mollugo*, *Phytochemistry* 23(11), 2535-3527, 1984.

⁹¹ Handjieva N., Mitova M., Anchev M., Popov S., Iridoid glucosides from *Galium album* and *G. lovicense*, *Phytochemistry* 43(3), 625-628, 1996.

⁹² Mitova M., Handjieva N., Anchev M., Popov S., Iridoid glucosides from *Galium humifusum*, *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 54(7/8), 488-491, 1999.

⁹³ Bojthe-Horvath K., Kocsis A., Parkanyi L., Simon K., A new iridoid glycoside from *Galium verum* L. First x-ray analysis of a tricyclic iridoid glycoside, *Tetrahedron Letters*, 23(9), 965-966, 1982.



ii. Dérivés de l'acide aspérulosidique

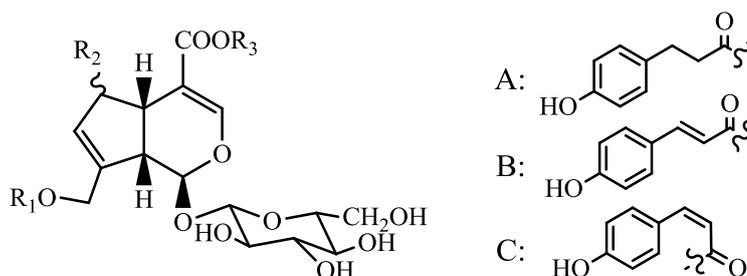


Tableau I-10: Iridoïdes dérivés de l'acide aspérulosidique identifiés dans le genre *Galium*

N	Composés	Espèces	R ₁	R ₂	R ₃	Réf.
209	Acide aspérulosidique	<i>G. verum</i> var <i>asiaticum</i>	Ac	αOH	H	59
		<i>G. verum</i> sp <i>verum</i> , <i>G. mollugo</i>				71
		<i>G. corsicum</i> , <i>G. glaucophyllum</i> ,				87
		<i>G. album</i> sp <i>album</i> ., <i>G. album</i> sp				90
		<i>pychnotrichum</i> , <i>G. lovcense</i> , <i>G.</i>				91
		<i>humifusum</i> , <i>G. rivale</i> ,				92
<i>G. melanantherum</i> , <i>G spurium</i>	94					
210	Acide déacétyl aspérulosidique (Galium glucoside)	<i>G. album</i> sp <i>album</i> , <i>G. tortumense</i> , <i>G. album</i> , <i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> , <i>G. lovcense</i> , <i>G. humifusum</i> , <i>G. rivale</i> , <i>G. melanantherum</i> , <i>G. spurium</i>	H	αOH	H	59 62 72 91 92 94 95 96
211	Ester méthyl scandoside	<i>G. tortumense</i> , <i>G. humifusum</i>	H	βOH	Me	62 92
212	Daphyloside	<i>G. album</i> sp <i>album</i> , <i>G.</i>	Ac	αOH	Me	59
		<i>tortumense</i> , <i>G. verum</i>				62
		<i>G. verum</i> var. <i>asiaticum</i> ,				69
		<i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> ,				88
		<i>G. lovcense</i> , <i>G. humifusum</i>				91
213	Déacétyl daphylloside	<i>G. album</i> sp <i>album</i> , <i>G. melanantherum</i>	H	αOH	Me	59 95

⁹⁴ De Rosa S., Iodice C., Mitova M., Handjieva N., Popov S., Anchev M., Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium rivale*, *Phytochemistry* 54(8), 751-756, **2000**.

⁹⁵ Tzakou O., Mylonas P., Vagias C., Petrakis P.V., Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*, *Z. Naturforsch* 62c, 597-602, **2007**.

⁹⁶ Ahn D., Kim D.K., Iridoid Glycosides from the aerial parts of *Galium spurium* L., *Natural Product Sciences* 18(3), 195-199, **2012**

214	Scandoside	<i>G. corsicum</i> , <i>G. humifusum</i> , <i>G. verum</i> var <i>asiaticum</i> <i>G. album</i> sp <i>album</i> , <i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> , <i>G. lovcense</i> , <i>G. rivale</i> , <i>G. melanantherum</i> , <i>G. spurium</i>	H	β OH	H	71 88 91 92 94 95 96
215	10- <i>O</i> - <i>trans-p</i> -coumaroyl scandoside	<i>G. spurium</i>	B	β OH	Me	96
216	10- <i>O</i> - <i>cis-p</i> -coumaroyl scandoside		C	β OH	Me	
217	10- <i>O</i> - <i>trans-p</i> -coumaroyl déacétyl daphylloside		B	α OH	Me	
218	10- <i>O</i> - <i>cis-p</i> -coumaroyl-déacétyl daphylloside		C	α OH	Me	
219	10- <i>p</i> -dihydrocoumaroyl-6- α -hydroxygéniposide	<i>G. verum</i> var. <i>asiaticum</i>	A	α OH	Me	88
220	Humifusine A	<i>G. humifusum</i>	A	β OH	H	92
221	Humifusine B		Ac	β OH	H	

iii. Dérivés de la géniposide

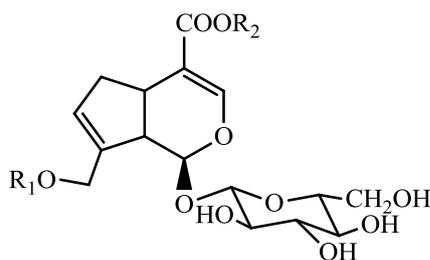
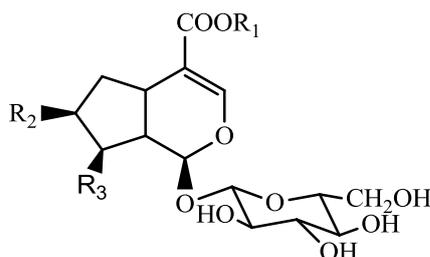


Tableau I-11: Iridoïdes dérivés de la géniposide identifiés dans le genre *Galium*

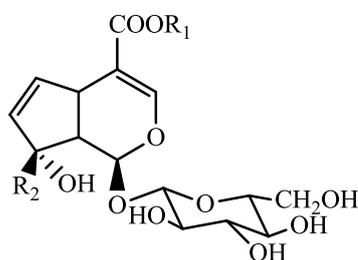
N	Composés	R ₁	R ₂	Espèces	Réf.
222	Acide géniposidique	H	H	<i>G. tortumense</i> , <i>G. schmidii</i> , <i>G. glaucophyllum</i> , <i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> , <i>G. lovcense</i> , <i>G. humifusum</i> , <i>G. rivale</i> , <i>G. melanantherum</i>	62 71 91 92 94 95
223	Géniposide	H	Me	<i>G. tortumense</i>	62

iv. Dérivés de la loganine

Tableau I-12: Iridoïdes dérivés de la loganine identifiés dans le genre *Galium*

N	Composés	R ₁	R ₂	R ₃	Espèces	Réf.
224	Loganine	Me	OH	Me	<i>G. tortumense</i> , <i>G. schmidii</i> , <i>G. glaucophyllum</i>	62 71
225	Acide loganique	H	OH	Me	<i>G. tortumense</i> , <i>G. corsicum</i> , <i>G. glaucophyllum</i>	
226	10-hydroxyloganine	Me	OH	CH ₂ OH	<i>G. album</i> sp <i>album</i> , <i>G. album</i> sp <i>pychnotrichum</i> , <i>G. lovcense</i> <i>G. schmidii</i> , <i>G. melanantherum</i>	71 91 95
227	7- <i>O</i> -acétyl-10-acétoxyloganine	Me	OAc	CH ₂ OAc	<i>G. lovcense</i>	91
228	7-β-hydroxy-11-méthylforsythide	Me	OH	COOH	<i>G. lovcense</i>	
229	7-cétologanine	Me	=O	Me	<i>G. tortumense</i>	62

La monotropéine (**230**) a été extraite de nombreuses espèces de *Galium* telles que *G. verum* spp *verum*, *G. tortumense*, *G. mollugo*, *G. glaucum*, *G. album* sp *album*, *G. album* sp *pychnotrichum*, *G. album* Mill., *G. lovcense*, *G. humifusum* Bieb. *G. melanantherum* et *G. rivale*.^{59,62,72,90-97} Deux dérivés de la monotropéine, le galioside (**231**) et le mollugoside (**232**) ont été caractérisés dans l'espèce *G. mollugo*^{90,97}.



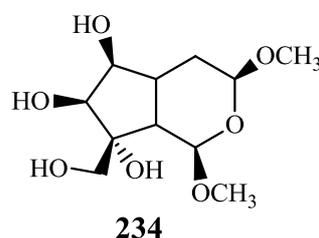
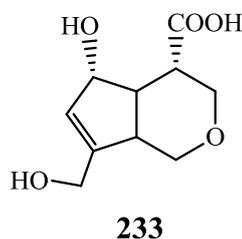
230 R₁ = H, R₂ = CH₂OH

231 R₁ = Me, R₂ = CH₂OH

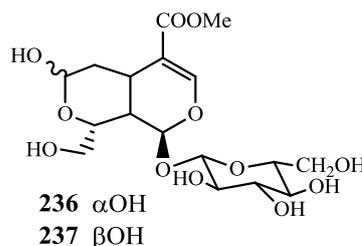
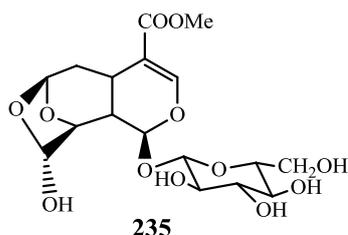
232 R₁ = Me, R₂ = COOH

⁹⁷ Iavarone C., Sen A., Trogolo C., Villa S., Mollugoside, an iridoid glucoside from *Galium mollugo*, *Phytochemistry* 22(1), 175-178, 1983.

On peut distinguer aussi, la présence des iridoïdes simples non glycosylés tels que le macédonine (**233**) et l'écchrémocarpol B (**234**) isolés par Mitova et collaborateurs⁹⁸ à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de l'espèce *G. macedonicum*.



Les séco-iridoïdes glycosylés sont caractérisés aussi dans ce genre avec la présence du sécogalioside (**235**) (*G. album*, *G. album* sp *album*, *G. album* sp *pychnotrichum*, *G. lovcense* et *G. mollugo*)^{72,90,91} et les deux isomères de configuration 7 α et 7 β de 10-hydroxy morroniside **236** et **237** (*G. album* sp *album*, *G. album* sp *pychnotrichum*, *G. lovcense* et *G. mollugo*)^{90,91}.

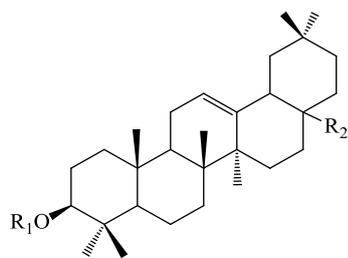


2.2.2.3 Triterpènes

L'aglycone triterpénique la plus répandue dans le genre *Galium* est l'acide oléanolique (**238**) et ses dérivés, l'acide 3-acétoxyoléanolique (**239**), 3-acétoxyoléan-12-èn-28-al (**240**). On peut citer aussi la présence de l'acide ursolique (**241**) isolé de *G. tortumense*⁶². Des aglycones de type stéroïdique ont également été rencontrés dans le genre *Galium*. Une étude effectuée sur quelques espèces a montré que le campestérol (**180**) et le β -sitostérol (**185**) sont les phytostérols les plus abondants dans ce genre⁹⁹.

⁹⁸ Mitova M., Handjieva N., Spassov S., Popov S., Macedonine, a non-glycosidic iridoid from *Galium macedonicum*, *Phytochemistry* 42(4), 1227-1229, **1996**.

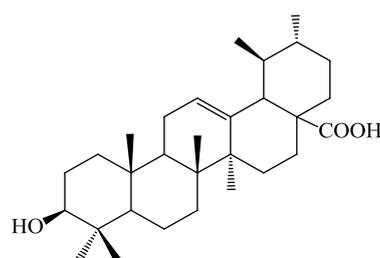
⁹⁹ Mocan A., Crişan G., Vlase L., Ivănescu B., Bădărău A.S., Arsene A.L., Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania, *Farmacia* 64, 95-99, **2016**.



238 $R_1 = H, R_2 = COOH.$

239 $R_1 = Ac, R_2 = COOH.$

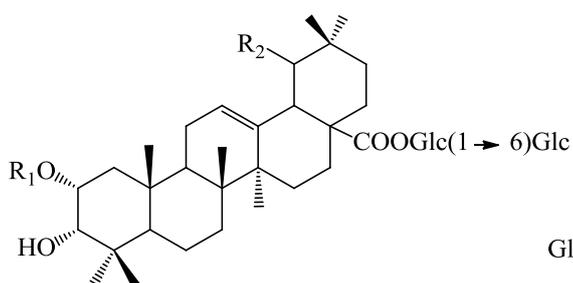
240 $R_1 = Ac, R_2 = COH$



241

2.2.2.4. Saponines

Des tests chimiques réalisés sur plus de 20 espèces de *Galium* par Salvatore De Rosa et ses collaborateurs^{94,100}, ont mis en évidence l'absence de saponines triterpéniques dans ces espèces. D'autre part, une étude approfondie sur la partie aérienne de l'espèce *G. rivale* réalisée par la même équipe, a permis d'isoler six saponines à squelette oléanane **242-247** dont les rivalosides A-E (**242-246**) sont considérés comme nouveaux. Cette étude a permis de les classer comme des agents chimio-taxonomiques de l'espèce *G. rivale*¹⁰⁰.

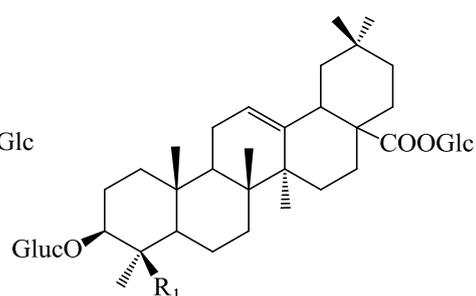


242 $R_1 = Ac, R_2 = O$

243 $R_1 = H, R_2 = O$

244 $R_1 = Ac, R_2 = \alpha OH$

245 $R_1 = H, R_2 = \alpha OH$



246 $R_1 = CH_2OH$

247 $R_1 = CH_3$

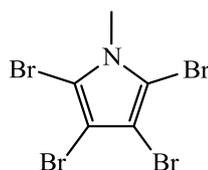
2.3. Autres composés

2.3.1. Chez les plantes marines

Diverses autres classes de composés ont été caractérisées et quantifiées dans les herbiers marins tels que les lipides^{78,79,81,101}, les polysaccharides^{102,103} et un dérivé azoté, le 2,3,4,5-tétrabromo-1-méthylpyrrole (**248**) détecté dans l'espèce *Halophila ovalis*¹⁰⁴.

¹⁰⁰ De Rosa S., Mitova M., Handjieva N., Popov S., Anchev M., Rivalosides A and B, two 19-oxo triterpenoid saponins from *Galium rivale*, *Journal of Natural Products* 63(7), 1012-1014, **2000**.

¹⁰¹ Khotimchenko S.V., Fatty acids and polar lipids of seagrasses from the Sea of Japan, *Phytochemistry* 33(2), 369-372, **1993**.



248

2.3.2. Chez le genre *Galium*

D'autres métabolites ont été déterminés et quantifiés dans le genre *Galium* comme les alcaloïdes¹⁰⁵, les huiles essentielles¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ et les acides gras²⁴.

Le genre *Galium* est connu par sa richesse en huiles essentielles. Baser et collaborateurs¹⁰⁶ ont déterminé la teneur en huiles essentielles dans deux espèces Turques *G. aparine* et *G. odoratum*, le thymol (30,6 %) et l'isothymol (22,8 %) sont les composés majeurs de *G. odoratum*, par contre l'acide hexadécanoïque (22,3 %) représente l'huile majeure dans l'espèce *G. aparine*. Une série des travaux de Il'ina et collaborateurs^{107,108,109} sur les fractions lipophiliques et les fleurs des espèces *G. verum*, *G. hercynicum*, *G. humifusum* et *G. salicifolium* ont permis d'identifier la composition générale de ces huiles. Les terpènes, les hydrocarbures et les dérivés phénylpropanoïdes, sont les plus détectés, le α -terpinène et le squalène sont les plus abondants dans ces espèces.

Une autre étude a été effectuée par Ramdani et collaborateurs¹¹⁰ sur deux espèces algériennes *G. tunetanum* Poiret et *G. mollugo* L. Elle a permis de montrer que les parties aériennes contiennent d'abondantes quantités d'huiles essentielles dont l'acide palmitique, le tétradécanal et le linoléate d'éthyle représentent les constituants principaux.

¹⁰² Lv Y, Shan X., Zhao X., Cai C., Zhao X., Lang Y., Zhu H., Yu G., Extraction, Isolation, Structural Characterization and Anti-Tumor Properties of an Apigalacturonan-Rich Polysaccharide from the Sea Grass *Zostera caespitosa* Miki, *Marine Drugs* 13, 3710-3731, **2015**.

¹⁰³ Torbatinejad N.M., Annison G., Rutherford-Markwick K., Sabine JR., Structural constituents of the seagrass *Posidonia australis*, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55(10), 4021-4026, **2007**.

¹⁰⁴ Gaul S., Bendig, P., Olbrich D., Rosenfelder N., Ruff P., Gaus C., Mueller J.F., Vetter W., Identification of the natural product 2,3,4,5-tetrabromo-1-methylpyrrole in Pacific biota, passive samplers and seagrass from Queensland, *Australia Marine Pollution Bulletin* 62, 2463-2468, **2011**.

¹⁰⁵ Hultin E., Torssell K., Alkaloid screening of Swedish plants, *Phytochemistry* 4, 425-433, **1965**.

¹⁰⁶ Baser K.H.C., Özek T., Kırimer N., Composition of the Essential Oils of *Galium aparine* L. and *Galium odoratum* (L.) Scop. from Turkey, *Journal of Essential Oil Research*, 16, 305-307, **2004**.

¹⁰⁷ Il'ina T.V., Kovaleva A. M., Goryachaya O. V., Aleksandrov A. N., Essential oil from *Galium verum* flowers, *Chemistry of Natural Compounds* 45(4), 587-588, **2009**.

¹⁰⁸ Il'ina T.V., Kovaleva A. M., Goryachaya O. V., Komissarenko A. N., Terpenoids and aromatic compounds in essential oils of the herbs *Galium hercynicum* and *G. humifusum*, *Chemistry of Natural Compounds* 47(1), 130-131, **2011**.

¹⁰⁹ Il'ina T.V., Kovaleva A. M., Goryachaya O. V., Vinogradov B. A., Essential oil of *Galium salicifolium* flowers and herb, *Chemistry of Natural Compounds* 48(1), 151-152, **2012**.

¹¹⁰ Ramdani M., Lograda T., Chalard P. and Figueredo G., Chemical composition of essential oils of *Galium tunetanum* Poiret and *Galium mollugo* L. in Algeria, *International Journal Medicine Aromatic Plants* 3(3), 362-365, **2013**.

2.4. Métabolites isolés à partir des espèces étudiées

2.4.1. *Cymodocea nodosa*

L'espèce marine *Cymodocea nodosa* a fait l'objet d'un nombre des études phytochimiques. Le premier travail phytochimique a été effectué en 1978 par Cariello et al³⁴. Cette étude révèle la présence des composés phénoliques tels que la quercétine mono-glucose (**81**), l'isorhamnétine mono-glucoside (**82**) et l'acide caféïque (**24**) à partir des feuilles de cette plante.

Mechiline et Berdinette⁴⁰ ont isolé de la fraction hexanique des racines de *C. nodosa* deux acides phénols, l'acide chicorique (**30**) et l'acide caftarique (**31**).

En 2005, Vassilios et collaborateurs ont étudié cette plante. Ils ont identifié pour la première fois les diaryles: le cymodiéanol (**34**) et le cymodiène (**36**). Ces composés sont cytotoxiques sur les lignées cellulaires cancéreuses NSCLC-N6 et A-549⁴³. Trois ans plus tard, la même équipe a isolé d'autres composés de même type: deoxycymodiéanol (**33**) et isocymodiène (**35**) et deux diterpènes (**157-158**)⁴⁴.

Les études phytochimiques concernant les stérols de l'espèce *Cymodocea nodosa* mettent en évidence la présence des stérols à squelettes 5 α -choléstane (**169-170** et **173-176**) et cholést-5-ène (**177-179** et **182-187**)^{80,82}. Une autre étude réalisée sur cette plante confirme la présence des stérols qui sont à squelette 3-cétostérols (**188-189** et **191-192**)⁸³.

Récemment¹¹¹, un polysaccharide sulfaté a été isolé à partir de *Cymodocea nodosa*. Ce polysaccharide a également montré une activité anti-hypertensive importante (IC₅₀ = 0,43 mg/mL). Les résultats de cette étude indiquent que *Cymodocea nodosa* a des propriétés chimiques, fonctionnelles et biologiques qui peuvent être considérées comme un additif alimentaire pour les préparations cosmétiques et pharmaceutiques.

2.4.2. *Galium brunneum*

L'espèce *Galium brunneum* Munby connue sous le nom *Galium clausonis* Pomel n'a pas été étudiée chimiquement et biologiquement, au regard de la recherche bibliographique exhaustive réalisée.

¹¹¹ Kolsi RBA, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Blecker C., Allouche N., Belghith H, Belghith K. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharide, *Carbohydrate Polymers* 151, 511-522, 2016.

3. Propriétés biologiques

3.1. Propriétés biologiques des plantes marines

3.1.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Certains herbiers sont utilisés traditionnellement pour leurs diverses propriétés médicinales comme le traitement de maladies de peau, des plaies, de varices, des douleurs musculaires, pour le traitement de la fièvre, des problèmes d'estomac, comme remède contre les piqûres de différents types de rayons et tranquillisants pour les bébés^{112,113,116}. En Inde, les herbiers marins sont utilisés comme médicaments (maladies cardiaques et mal de mer), comme nourriture (graines nutritives), et comme engrais (biomasse riche en nutriments) et aliments de bétail (chèvres et moutons)^{113,114}.

Les herbiers marins sont de nature nutraceutique et donc importants en tant que compléments alimentaires¹¹⁵.

La plupart des espèces du genre *Cymodocea* sont utilisées comme tranquillisants pour les bébés, comme une aide apaisante pendant la grossesse et contre la toux et le paludisme^{15,116}.

Les racines de l'espèce *Enhalus acoroides* sont utilisées comme remède contre les piqûres de différentes sortes des rayons et de scorpion^{116,117}. Leurs graines ont des propriétés aphrodisiaques et contraceptives.

Les espèces du genre *Halophila* sont consommées en tant que médicaments puissants contre le paludisme et les maladies de peau et se révèlent très efficaces aux premiers stades de la lèpre¹¹⁷.

¹¹² Kannan Raja R.R., Arumugam R., Thangaradjou T., Anantharaman P., Phytochemical constituents, antioxidant properties and p-coumaric acid analysis in some seagrasses, *Food Research International* 54 1229-1236, **2013**.

¹¹³ Kannan Raja R.R., Arumugam R., Anantharaman P., Perumal A., Chemical composition and antibacterial activity of Indian seagrasses against urinary tract pathogens, *Food Chemistry* 135, 2470-2473, **2012**.

¹¹⁴ Kannan Raja R.R., Arumugam R., Iyapparaj P., Thangaradjou T., Anantharaman P., In vitro antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrasses from the Gulf of Mannar, South India, *Food Chemistry* 136, 1484-1489, **2013**.

¹¹⁵ Yuvaraj N., Kanmani P., Satishkumar R., Paari A., Pattukumar V., Arul V., Seagrass as a potential source of natural antioxidant and anti-inflammatory agents, *Pharmaceutical Biology* 50, 458-467, **2012**.

¹¹⁶ Nanthakumar R., Karthikeyan R., Chitra K., Seethalakshmi S., Phytochemical analysis, HPLC finger printing, in vitro antioxidant and cytotoxic activity of *Cymodocea serrulata*, *Pharmacognosy Journal* 5, 238-241, **2013**.

¹¹⁷ Kannan Raja R.R., Arumugam R., Anantharaman P., Antibacterial potential of three seagrasses against human pathogens, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 890-893, **2010**.

3.1.2. Activités biologiques

Récemment, les espèces marines intéressent les scientifiques malgré que les premières espèces sont décrites en 1779 (*Zostera marina* et *Posidonia oceanica*). Les travaux biologiques sur les phanérogames marines ou sur les composés purs isolés ont largement été étudiés ces dernières années.

Une étude chimique et biologique de l'espèce *Enhalus acoroides* a mis en évidence la présence de quatre flavonoïdes et de cinq stérols, dont les trois flavonoïdes lutéoline (**47**), apigénine (**48**) et lutéoline 4'-glucuronide (**50**) possèdent une activité anti-nutritive contre les larves de deuxième stade de *Spodoptera litura*, les deux flavonoïdes **47** et **50** ont une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries marines, et le flavonoïde **50** a montré une forte activité anti-larvaire contre les larves de *Bugula neritina*⁵¹.

D'autre part, une autre étude phytochimique et biologique a été réalisée sur l'extrait méthanolique d'*Halophila ovalis*. Elle a mis en évidence la présence de triacylglycérol et la richesse en phénols suite à une analyse quantitative par GC-MS. Cet extrait s'avère être actif suite à des activités antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire *in vitro*. L'activité antibactérienne est réalisée surtout contre les bactéries à Gram négatif (CMI 75 µg/mL), à l'exception de *Vibrio vulnificus* et Gram positif, *Bacillus cereus* (CMI 50 µg/mL). Cet extrait a montré une forte activité de piégeage des radicaux DPPH (CI₅₀ 0,13 mg/mL) et superoxyde (CI₅₀ 0,65 mg/mL) et une activité anti-inflammatoire remarquable (CI₅₀ 78,72 µg/mL)¹¹⁵.

- **Activité cytotoxique**

Les travaux sur la cytotoxicité des espèces Indiennes: *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia*, *Syringodium isoetifolium*, *Cymodocea serrulata* et *C. rotundata* contre l'artémie (*nauplii* d'*Artemia salina*) ont révélé que l'espèce *C. rotundata* a une cytotoxicité maximale avec une valeur de CL₅₀ de 132,469 µg/ml suivi de *T. hemprichii* (154,081 µg/ml), *H. pinifolia* (175,021 µg/ml) et *C. serrulata* (392,124 µg/ml). *E. acoroides* et *S. isoetifolium* ont une cytotoxicité faible avec des valeurs de CL₅₀ 479,575 et 699,096 µg/ml, respectivement. La plupart des herbiers sélectionnés n'ont pas encore été évalués pour leur cytotoxicité *in vitro* sauf les espèces *E. acoroides* et *S. isoetifolium* qui ont montré des propriétés cytotoxiques¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Iyapparaj Palanisamy et collaborateurs¹¹⁸ ont étudié les propriétés antisalissures et toxiques des espèces *Cymodocea serrulata* et *Syringodium isoetifolium*. Parmi les trois

¹¹⁸ Iyapparaj P., Revathi P., Ramasubburayan R., Prakash S., Palavesam A., Immanuel G., Anantharaman P., Sautreau A., Hellio C., Antifouling and toxic properties of the bioactive metabolites from the seagrasses *Syringodium isoetifolium* and *Cymodocea serrulata*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 103, 54-60, 2014.

extraits obtenus, les activités anti-encrassement et anti-macroulage ont été démontrées pour les extraits méthanoliques de ces deux herbiers avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) entre 1,0 et 10 mg/ml contre les bactéries du film biologique et les micro-algues. De même, une inhibition de l'encrassement à 100% de la *Patelle vulgaire* (*Patella*) a été trouvée à 6,0 mg/ml pour les deux plantes marines.

L'extrait brut de *Thalassodendron ciliatum* présente une activité cytotoxique contre certaines lignées cellulaires cancéreuses (HCT-116, HEPG, MCF-7 et HeLa), et une certaine activité *in vitro* contre les virus de l'hépatite A (VHA) et l'herpès simplex (HSV-1)¹¹⁹.

- **Activité antibactérienne**

Plusieurs études ont été effectuées par Kannan Raja et collaborateurs^{113,114,117} sur les extraits hydroalcooliques de six espèces marines récoltées dans la région du golf de Mannar au Sud de l'Inde (*Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia*, *Syringodium isoetifolium*, *Cymodocea serrulata* et *C. rotundata*) pour leurs activités antibactériennes, anti-oxydantes, cytotoxiques et hémolytiques.

Plus d'un vingtain de composés actifs (acides gras, hexoses et huiles essentielles) a été identifié par GC-MS à partir de ces espèces Indiennes (*E. acoroides*, *T. hemprichii*, *H. pinifolia*, *S. isoetifolium*, *C. serrulata* et *C. rotundata*). Cette étude a déterminé les concentrations minimales inhibitrices CMI ainsi que l'activité inhibitrice contre tous les agents pathogènes bactériens humains. Les herbiers *H. pinifolia* et *C. rotundata* ont une activité antibactérienne la plus élevée. Les extraits hydroalcooliques de ces plantes ont été efficaces contre les infections de voies urinaires (UTI)¹¹³.

Une autre recherche a été faite par la même équipe¹¹⁷ sur les espèces *Halophila stipulacea*, *Cymodocea serrulata* et *Halodule pinifolia* contre cinq pathogènes bactériens humains, par la méthode de diffusion du disque et la concentration minimale inhibitrice (MIC). Les résultats montrent que les espèces *H. pinifolia* et *H. stipulacea* sont plus actives que *C. serrulata* contre les pathogènes humains.

Trois extraits bruts de *P. oceanica* avec les 13 fractions de l'extrait chloroformique ont été testés pour leur activité antibactérienne contre les microorganismes *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* par les méthodes de dilution et de la diffusion du disque. Pour tous les

¹¹⁹ Hamdy A.-H.A., Mettwally W.S.A., El Fotouh M.A., Rodriguez B., El-Dewany A.I., El-Toumy S.A.A., Hussein M.A.A., Bioactive phenolic compounds from the Egyptian Red Sea seagrass *Thalassodendron ciliatum*, *Z. Naturforsch. C.* 67, 291-296. 2012.

extraits et les fractions testées, l'activité antibactérienne est plus intéressante contre *P. aeruginosa* en comparaison avec *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis*⁷⁸.

Les extraits méthanoliques et acétates d'éthyles de trois espèces marines indiennes, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* et *Zostera capensis*, possèdent une activité antibactérienne contre un groupe de pathogènes humains (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*) en utilisant la méthode de diffusion sur l'Agar¹²⁰.

L'espèce *Cymodocea rotundata* a une activité antibactérienne contre dix pathogènes humains¹⁵. Une étude récente de l'extrait dichlorométhane de cette plante a permis la détermination structurale de quatre composés (Trois stérols et la chlorophylle A). Ces composés ont présenté une activité antibactérienne et qui sont peut être responsable de la propriété antimicrobienne déjà signalée dans cette espèce¹²¹.

Un screening a été fait par Devi et collaborateurs¹²² sur l'activité anti-microbienne de seize organes marins dont trois sont des herbiers marins (*Halodule pinifolia*, *Halophila ovalis* et *Syringodium isoetifolium*) contre 15 souches de bactéries. Cette étude montre que *H. pinifolia* ne présente aucune activité biologique contre les bactéries testées, *H. pinifolia* montre une faible inhibition contre une seule souche (*Anterobacteriaceae*) alors que *S. isoetifolium* prouve une faible inhibition contre les cinq souches (*Anterobacteriaceae*, *Alkalegenes*, *Arthrobacterium*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*).

- **Activité antifongique**

Cinq espèces marines de Floride (*Halodule wrightii*, *Halophila decipiens*, *Ruppia maritima*, *Syringodium filiforme* et *Thalassia testudinum*) ont été examinées pour leurs activités antifongiques contre six champignons. Tous les extraits bruts de ces espèces marines testées sauf *S. filiforme* ont inhibé la croissance d'une souche fongique au moins de 35%¹²³.

- **Activité anti-oxydante**

L'activité anti-oxydante des plantes marines n'est pas encore absolument étudiée. Dernièrement, des études ont révélé que les herbiers sont une source riche en composés antioxydants. Kannan Raja et collaborateurs¹¹² ont focalisé leurs travaux sur l'estimation

¹²⁰ Kumar C.S., Sarada D.V.L., Gideon T.P., Rengasamy R., Antibacterial activity of three South Indian seagrasses, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera capensis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1989-1992, **2008**.

¹²¹ Perez J., Shen C.C., Ragasa C., Chemical Constituents of *Cymodocea rotundata* Asch. and Schweinf, *Pharmacognosy Journal* 10(4):620-621, **2018**.

¹²² Devi P., Solimabi W., D'Souza L., Sonak, S. Kamat S.Y., Singbal S.Y.S., Screening of some marine plants for activity against marine fouling bacteria, *Botanica Marina* 40, 87-91, **1997**.

¹²³ Ross C., Puglisi M.P., Paul V.J., Antifungal defenses of seagrasses from the Indian River Lagoon. Florida, *Aquatic Botany* 88, 134-141, **2008**.

quantitative des flavonoïdes et des phénols totaux dans les extraits hydro-alcooliques des feuilles fraîches des espèces indiennes (*Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia*, *Syringodium isoetifolium*, *Cymodocea serrulata* et *C. rotundata*). L'analyse par HPLC de ces extraits a confirmé la présence d'acide *p*-coumarique dans les espèces *H. pinifolia* et *C. rotundata*. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisée par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH et OH. Cette étude a indiqué que les extraits méthanoliques de *H. pinifolia*, *E. acoroides* et *C. rotundata* ont montré une efficacité antioxydante supérieure à celle enregistrée de l'acide ascorbique, alors que *C. rotundata* a révélé le capteur de radicaux DPPH le plus puissant (70,30%). L'inhibition est supérieure pour les espèces *C. rotundata* (53,74%) et *H. pinifolia* (51,05%) pour piéger les radicaux OH. Les résultats de ce travail ont démontré que les molécules responsables de cette activité sont les phénols.

De la même façon, l'équipe de Santoso et collaborateurs¹²⁴ a travaillé sur des feuilles fraîches de quatre espèces indonésiennes (*Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides* et *Syringodium isoetifolium*). La teneur totale en phénols de chaque extrait a été déterminée par spectrophotomètre et le réactif de Follin-Ciocalteu, et l'activité antioxydante a été mesurée en présence de réactif DPPH. Il ressort de cette étude que ces espèces sont riches en teneur phénols et sont douées des activités les plus élevées sur le radical DPPH.

Des études antérieures sur l'activité biologique sur le genre *Cymodocea* ont révélé des niveaux modérés d'activité anti-oxydante. L'espèce *C. serrulata* a montré une activité anti-oxydante où le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique de cette espèce a été déterminé par dosage des radicaux DPPH, le pouvoir de l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'évaluation de l'acide ascorbique¹¹⁵.

¹²⁴ Santoso J., Anwariyah S., Rumiantin R.O., Aristi Pramadita Putri, Ukhty N., Yoshie-Stark Y., Phenol content, antioxidant activity and fibers profile of four tropical seagrasses from Indonesia, *J. of Coastal Development* 15(2), 189-196, 2012.

3.1.3. Activités biologiques de l'espèce *Cymodocea nodosa*

Des études ont été faites sur l'espèce *Cymodocea nodosa* pour leur activité biologique.

- **Activité cytotoxique**

Les diarylhéptanoïdes identifiés par Kontiva et collaborateurs^{43,44} sont cytotoxiques et la relation structure activité de ces molécules a démontré que la présence de ces métabolites est essentielle à l'observation de la cytotoxicité. La cytotoxicité du cymodiénol (**34**) et du cymodiène (**36**) a été testée contre les lignées cellulaires de cancer du poumon NSCL-N6 et A549. Le cymodiénol a montré une forte cytotoxicité ($IC_{50} = 84,0$ et $114,6 \mu M$) contre les cellules NSCL-N6 et A549, alors que le cymodiène n'a montré que des niveaux modérés d'activité. Par contre les 3-cétostéroïdes, **188-189** et **191-192**, isolés à partir cette espèce, n'ont montré aucune cytotoxicité *in vitro* contre ces lignées cellulaires⁸³.

- **Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne des métabolites (les diarylhéptanoïdes et le méroterpénoïde) isolés de *C. nodosa* a été testée contre les souches multi-résistantes (MDR) et méthicillino-résistantes de *Staphylococcus aureus* (SARM), ainsi que sur les mycobactéries à croissance rapide, notamment *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis* et *M. fortuitum*, qui sont usuellement utilisés dans la lutte contre la tuberculose. L'activité antimycobactérienne des composés phénoliques a fait l'objet d'un grand nombre d'études par contre les diarylhéptanoïdes représentent le premier rapport de cette activité. Cette étude a avait montré que le desoxycymodiénol (**33**), l'isocymodiène (**35**) et surtout le diterpène nodosol (**158**) sont très actifs contre les souches MDR que contre la souche standard de *S. aureus* ATCC 25923^{43,44}.

Les tests d'inhibition de concentration minimale (MIC) ont été réalisés sur ces métabolites, le nodosol (**158**) présente l'activité la plus puissante avec une valeur de CMI de 16 mg/ml contre *M. fortuitum*, *M. phlei* et *M. smegmatis*. Le cymodiénol (**34**) diffère du desoxycymodiénol (**33**) par un hydroxyle supplémentaire et n'a montré aucune activité contre *M. fortuitum*, en comparaison avec la CMI (64 mg/ml) contre la même souche. Contrairement à *M. phlei*, le desoxycymodiénol (**33**) présente une CMI quatre fois plus élevée que le cymodiénol (**34**). L'isocymodiène (**35**) a montré une activité modérée contre *M. fortuitum* et *M. phlei* avec une valeur de CMI de 32 mg/ml^{43,44}.

3.2. Propriétés biologiques du genre *Galium*

3.2.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les gaillets sont des plantes très communes, qui offrent de nombreuses propriétés médicinales. Elles sont utilisées en usage interne qu'en usage externe.

Les gaillets sont des plantes connues et utilisées depuis longtemps pour ses vertus médicinales et alimentaires. Plusieurs espèces du genre *Galium*, sont utilisées depuis des siècles dans la cuisine, comme colorant naturel et additif alimentaire pour coaguler le lait^{54,57,62,96,106}.

En France, les gaillets peuvent entrer dans la composition de phytomédicaments traditionnellement utilisés dans le traitement symptomatique des états neurotoniques soit pour les adultes ou les enfants, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil¹²⁵.

Les espèces du genre *Galium* sont largement utilisées traditionnellement en tant que remèdes diététiques, cholérétiques, contre la diarrhée et certains maux d'estomac^{55,59,69,99}. Elles possèdent des capacités thérapeutiques antispasmodiques, vulnéraires mais aussi cicatrisantes des plaies cancéreuses⁹⁵.

Les parties aériennes de *G. spurium* ont longtemps été utilisées en médecine populaire pour traiter les maladies des os, la douleur des nerfs, l'hématurie et le cancer⁹⁶.

L'espèce *G. aparine* est utilisée pour le psoriasis, dans la médecine traditionnelle arabe^{110,126}.

L'espèce *G. verum* est utilisée comme diurétique, sédatif, spasmolytique, dans le traitement des calculs rénaux, pour les blessures et les dommages cutanés comme la cicatrisation des plaies et le traitement du psoriasis et les rhumatismes¹²⁶. En médecine traditionnelle chinoise, elle est impliquée dans le traitement d'hépatites et de la phlébopathie⁵⁷.

Galium mollugo L. est une espèce diurétique, sédatif, spasmolytique, et elle est utilisée aussi pour traiter des maladies de la peau et de rhumatismes¹²⁷.

¹²⁵ Bruneton J., Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales, Edition Tec &Doc, 3^{ème} édition, 609, **1999**.

¹²⁶ Tamas M., Doina Stana, Simina Timis, Comparative phytochemical research of *Galium verum* L. and *G. mollugo* L., *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 34, 18-2, **2006**.

¹²⁷ Milic P.S., Stanojevic L.P., Rajkovic K.M., Milic S.M., Nikolic V.D., Nikolic L.B., Veljkovic V.B., Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques, *Hemijaska Industrija* 67(1), 89-94, **2013**.

3.2.2. Activité biologique

- **Activité antioxydante**

Certaines espèces telles que *G. verum* L., *G. mollugo* L., *G. aparine* et *G. spurium* sont connues surtout pour leurs propriétés antioxydantes^{54,60,127,128}, les molécules liées à cette activité sont principalement des flavonoïdes.

Quatre espèces de *Galium* (*G. verum* L., *G. mollugo* L., *G. aparine* L. et *G. odoratum* L.) ont été analysées pour leur teneur en polyphénols par HPLC-MS/MS. Les extraits éthanoliques bruts obtenus de ces espèces ont fait l'objet de plusieurs mesures d'activité antioxydante. Tous les extraits sont actifs, et l'extrait de l'espèce *G. verum* possède la meilleure activité anti-oxydante (DPPH)¹²⁹.

- **Activité antibactérienne**

Les extraits éthanoliques des espèces *Galium verum* L., *G. mollugo* L., *G. aparine* L. et *G. odoratum* ont été testés aussi contre quatre bactéries (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*) et un champignon (*Candida albicans*), en utilisant la méthode de diffusimétrie. Les résultats montrent une activité antibactérienne importante surtout contre les bactéries à Gram positif (*L. monocytogenes* et *S. aureus*) et une faible activité antifongique contre *C. albicans* où l'extrait de *G. mollugo* est inactif sur cette souche fongique¹²⁹.

D'autres espèces du genre *Galium* (*G. verum*, *G. salicifolium*, *G. dasypodum*, *G. aparine*, *G. carpaticum* et *G. pseudomollugo*) sont aussi connues pour leur activité antimicrobienne. Une étude a été réalisée sur les extraits lipophiles de ces espèces par la méthode de diffusion en milieu gélose en utilisant des souches standard de micro-organismes pour évaluer cette activité *in vitro*. Les résultats ont révélé que les extraits étudiés sont très actifs contre la souche *Staphylococcus aureus*, par contre ces espèces ne sont pas actives contre les souches *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*. *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* ont montré une sensibilité modérée. Ces résultats ont montré aussi un effet inhibiteur très important des espèces *G. aparine*, *G. dasypodum* et *G. pseudomollugo* contre le champignon *Candida albicans*¹³⁰.

¹²⁸ Bokhari Ja., Khan M.R., Shabbir M., Umbreen R., Shumaila J., Zai J. A., Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*, *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 102, 24-29, **2013**.

¹²⁹ Vlase L., Mocan A., Hanganu D., Benedec D., Gheldiu A., G. Crişan, Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae), *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(3), 1085-1094, **2014**.

¹³⁰ Ilyina T.V., Goryachaya O.V., Toryanik E.L., Kulish I.A., Kovaleva A.M., Antimicrobial Activity of the Genus *Galium* L., *Pharmacognosy Communications* 6(1) 42-47, **2016**.

- **Cytotoxicité**

Il existe plusieurs études sur l'effet antiprolifératif des espèces de *Galium* sur divers types de cancer. Amirghofran et collaborateurs¹³¹ ont rapporté que l'extrait de *G. mite* a présenté des effets cytotoxiques contre les cellules de la leucémie humaine. Dans une autre étude, l'effet anti-cancer de l'extrait aqueux de *G. verum* a été étudié sur le carcinome laryngé. Cet extrait était cytotoxique contre tous les lignées cellulaires de carcinome laryngé testé¹³². Une étude récente effectuée sur l'effet de l'extrait MeOH de *G. aparine* sur les lignées cellulaires de cancer du sein humain. De plus, l'extrait méthanolique a été caractérisé par des analyses par LC/Q-TOF/MS et par GC-MS. Au total 14 composés chimiques majeurs ont été identifiés par LC/Q-TOF/MS et 34 composés volatils ont été déterminés par GC-MS. Cet extrait possède un effet anticancéreux potentiel contre les cellules cancéreuses du sein sans changer les cellules épithéliales mammaires normales. La viabilité cellulaire et la distribution du cycle cellulaire ont été étudiées par un test XTT (sel de tétrazolium) et une coloration IP (iodure de propidium) par cytométrie en flux, respectivement¹³³.

- **Autres activités**

L'espèce *G. spurium* présente de bons potentiels des effets neuroprotecteurs et anticonvulsivants. Ces activités ont été déterminées par des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, et elles ont été induites par des substances chimiques et d'électrochoc maximal¹³⁴.

L'espèce *G. verum* possède une activité anti-appétante, elle est utilisée contre l'épilepsie et l'hystérie⁵⁷.

L'espèce *G. mexicanum* Kunth possède une activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-parasitique et une activité cytotoxique. Ces activités confortent les usages traditionnels de *G. mexicanum* au Mexique²⁷.

¹³¹ Amirghofran Z., Bahmani M., Azadmehr A., Javidnia K., Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines, *Neoplasma* 53(5), 428-433, **2006**.

¹³² Schmidt M., Scholz C.J., Gavril G.L., Otto C., Polednik C., Roller J., Hagen R., Effect of *Galium verum* aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and resistant laryngeal carcinoma cell lines, *Journal of Oncology* 44, 745-760, **2014**.

¹³³ Atmaca H., Bozkurt E., Cittan M., Dilek Tepe H., Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines, *Journal of Ethnopharmacology* 186, 305-310, **2016**.

¹³⁴ Orhan N., Orhan D.D., Aslan M., Ukuroglu M.S., Orhan I.E., UPLC-TOF-MS analysis of *Galium spurium* towards its neuroprotective and anticonvulsant activities, *Journal of Ethnopharmacology* 141, 220-227, **2012**.

Chapitre II
Polyphénols et terpénoïdes
(Produits naturels des plantes)

1. Introduction

Chez les végétaux, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories. Elles sont, soit des métabolites primaires (les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres), ou des métabolites secondaires classés en trois grands groupes: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. Les métabolites secondaires marquent de manière originale, une espèce, un genre ou une famille de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Plusieurs techniques spectrales telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) mono- et bi-dimensions, la spectroscopie de masse (SM), la spectroscopie UV-Visible, et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) permettent d'identifier et de quantifier un grand nombre de composés naturels dont ils se répartissent dans tous les organes (fleurs, feuilles, rhizomes, racines, écorces, graines et fruits). Ils sont très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, et drogues...etc.

2. Classification des métabolites secondaires

Chez les plantes, il existe trois grandes classes des métabolites secondaires:

- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques
- Les alcaloïdes et les composés azotés

2.1. Polyphénols

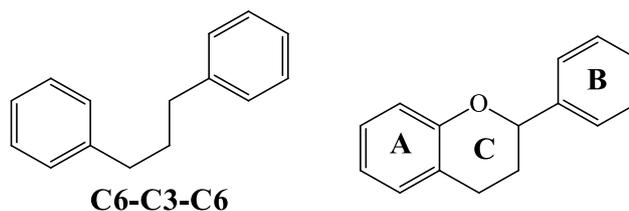
La famille des polyphénols rassemble une très large gamme de métabolites secondaires, ce sont des molécules aromatiques polysubstituées, leurs structures sont souvent hydroxylées et peuvent également être acétylées, prénylées, glycosylées et parfois sulfatées. Il existe de nombreuses classes de polyphénols avec une grande variété de structures, nous en citerons les principaux: les phénols, les flavonoïdes, les quinones, les lignanes, les coumarines et les tanins.

2.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) regroupent un vaste ensemble de composés polyphénoliques ubiquistes des plantes, plus de 7 000 flavonoïdes naturels ont été décrits¹³⁵. Ces métabolites possèdent une origine biosynthétique commune, la structure de base est représentée par un squelette 1,3-diphénylpropane (Ar-C3-Ar), elle est constituée de

¹³⁵ Thilakarathna S.H., Rupasinghe V.H.P., Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement, *Nutrients* 5, 3367-3387, 2013.

deux noyaux aromatiques (cycle A et B) reliés par un chaînon propyle qui peut être complété par une fonction éther (cycle C).



2.1.1.1. Classification de flavonoïdes

Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, on peut regrouper ces composés en neuf classes distinctes : chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols, flavane-3,4-diols et anthocyanes^{136,137,138,139,140,142}. Ces différentes classes des composés sont regroupées dans la figure suivante (**Figure II-1**).

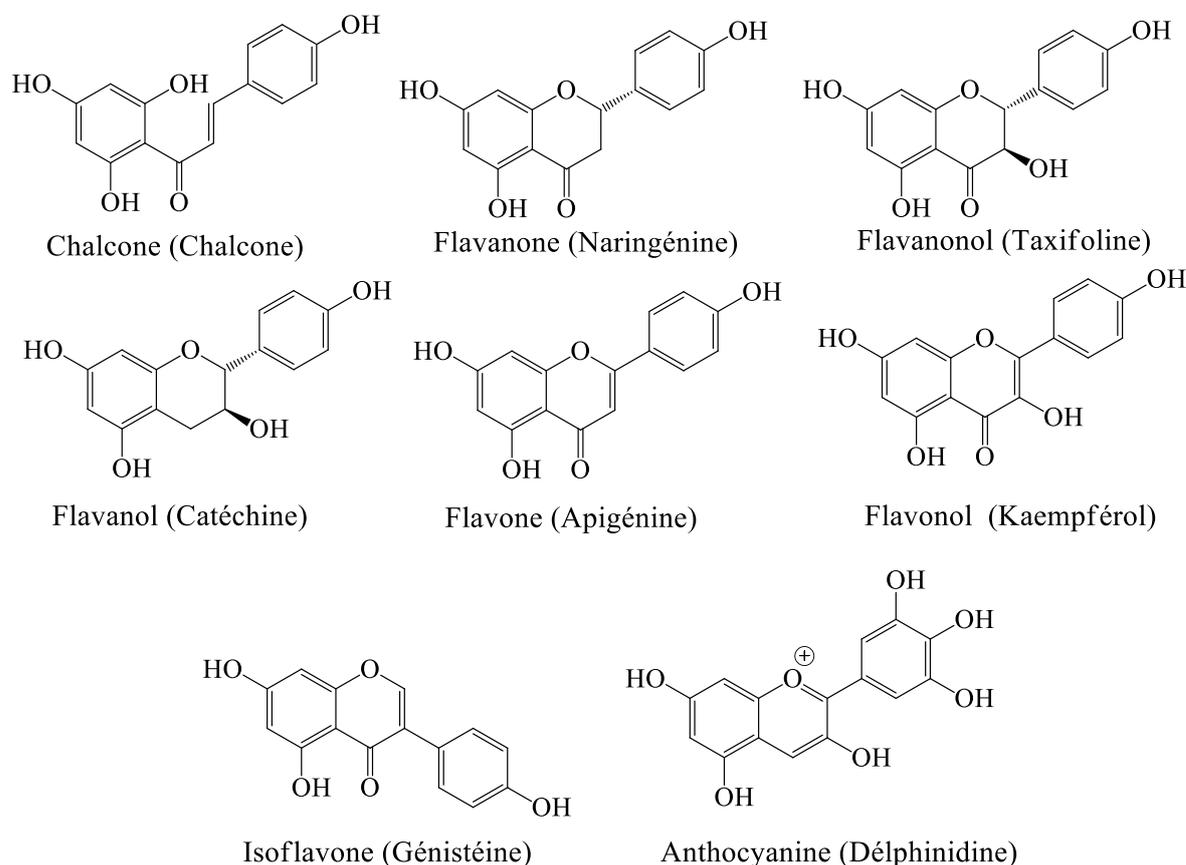


Figure II-1: Principales sous classes de flavonoïdes

¹³⁶ Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A., Brielmann H. L., Natural Products from Plants, 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, **2006**.

¹³⁷ Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H., Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, **2006**.

¹³⁸ Ho C.-T., Phenolic Compounds in Food. An Overview, Phenolic compounds in food and their effects on health I, ACS Symposium Series 506, Chapter 1, 2-7, **1992**.

- **Les chalcones** représentent un précurseur de la voie de synthèse des flavonoïdes. Elles résultent de la condensation de 3-malonyl-CoA et d'un acide cinnamique. De ce fait, les chalcones sont les seuls flavonoïdes qui ne comportent pas du noyau C, car la fermeture de ce cycle intervient plus tard dans la voie de synthèse. On distingue les chalcones qui ont une insaturation et les dihydrochalcones dont la chaîne est saturée. Du fait de l'insaturation sur la chaîne des chalcones, on différencie encore les formes *trans* et *cis*, respectivement, appelées chalcones et rétrochalcones.
- **Les flavanones** sont des isomères de 2'-hydroxychalcones, issues de la transformation du motif linéaire en motif cyclique (cycle C). Elles sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre asymétrique en position C-2, grâce à la stéréospécificité de cette transformation enzymatique, la grande majorité des flavanones sont de configuration (2*S*)-flavanones^{125,139-140}.
- Par rapport aux flavanones, **les flavones** et **les flavanols** possèdent en plus une double liaison entre les carbones C-2 et C-3 du cycle C. La différence essentielle entre les flavones et flavanols se traduit par la présence d'un hydroxyle en position 3 dans les flavanols.
- **Les dihydroflavonols (flavanonol)** se caractérisent par un groupement hydroxylé en position 3 sur l'hétérocycle, créant ainsi un centre asymétrique supplémentaire par rapport aux flavanones.
- **Les flavanes** (flavanols ou flavan-3-ols) possèdent un groupement hydroxyle en position 3 du cycle C. Ils se différencient des flavanols qui possèdent un groupement cétone sur le cycle C en position 4. Les flavanes comprennent les catéchines qui sont des flavan-3-ols monomériques ainsi que les procyanidines qui sont des flavan-3-ols polymériques. Contrairement aux autres composés phénoliques, les flavan-3-ols ne sont pas présents sous la forme glycosylée ou estérifiée.
La catéchine existe en fait sous forme de quatre énantiomères provenant de deux carbones asymétriques. Dans la nature, les isomères les plus fréquents sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine¹³⁹.
- Le cas extrême d'oxydation d'hétérocycle central correspond aux **anthocyanines**, toujours présentes en milieu acide sous forme d'un cation flavylum.

¹³⁹ Grotebold E., The Science of Flavonoids, Spring Street, New York, 2006.

¹⁴⁰ Dewick P. M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd, 2009.

2.1.1.2. Substitution des flavonoïdes

Dans chaque classe de flavonoïdes, la diversification des molécules se fait par réactions d'hydroxylation, d'alkylation, de sulfatations et de glycosylation.

- **Glycosylation**

Les flavonoides sont très souvent liés avec des sucres, la liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. Plusieurs sites de O-glycosylation sont possibles où la majorité de ces substituants se situent au niveau des carbones 3, 7 ou 4'. La substitution de position 5 est rare à cause de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle en position 4.

- **Prénylation**

La prénylation est une fixation d'une chaîne latérale d'une unité isoprène (diméthylallyle (C5), géranyle (C10) farnesyle (C15) et géranylgéranyle (C20)). La plupart des composés phénoliques présentent, généralement, une C-prénylation mais on peut rencontrer également une O-prénylation¹⁴¹.

La prénylation des flavonoïdes se situe en général sur le cycle A (position 6 ou 8), plus rarement sur le cycle B (position 3' ou 5'), et en position 3 dans le cas des flavones. Cette prénylation se trouve soit sous forme linéaire ou cyclique de types furano et pyrano (DMP, 2,2-diméthyl-pyrano)¹⁴² qui proviennent de la cyclisation d'une unité isopentényle avec un hydroxyle vicinal.

Les métabolites prénylés sont présents chez les plantes, les champignons et les bactéries. L'occurrence de flavonoïdes prénylés est taxonomiquement limitée dans certaines familles de plantes terrestres, essentiellement, chez les Leguminosae, Rutaceae, Clusiaceae, Umbelliferae, Euphorbiaceae, Moraceae, Cannabaceae et Asteraceae, ils n'ont jamais été détectés dans les plantes marines^{141,143}. Les flavonoïdes prénylés caractérisent les squelettes chalcones, flavanones, flavones, flavonols et isoflavones. Dans la famille des Legumineuses, les chalcones et les flavanones viennent largement en tête, suivies des Moraceae et des Asteraceae¹⁴⁴.

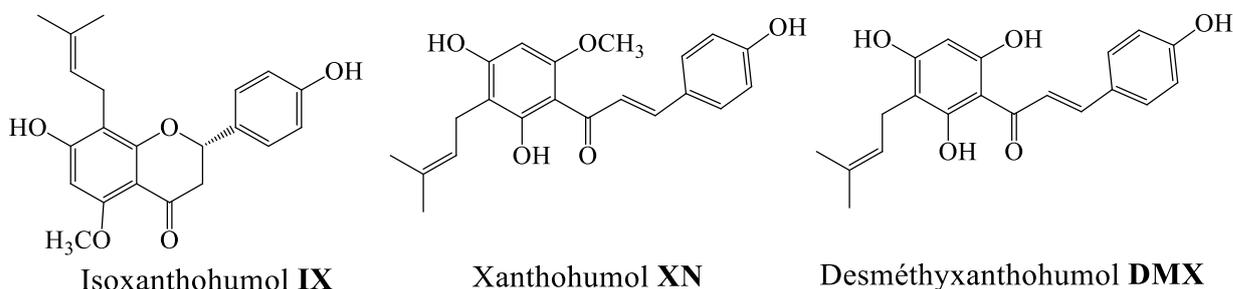
¹⁴¹ Alhassan A.M., Abdullahi M. I., Uba A., Umar A., Prenylation of Aromatic Secondary Metabolites: A New Frontier for Development of Novel Drugs, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13(2), 307-314, **2014**.

¹⁴² Veitch N.C., Grayer R.J., Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins, *Natural Product Reports* 28, 1626-1695, **2011**.

¹⁴³ Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites, *Phytochemistry* 70, 1739-1745, **2009**.

¹⁴⁴ Barron D., Ibrahim R.K., Isoprenylated flavonoids-a survey, *Phytochemistry* 43, 921-982, **1996**.

Le houblon (*Humulus lupulus* L.) est une source de nombreuses flavanones prénylées: 8-prénylnaringénine, 6-prénylnaringénine, desméthylxanthohumol DXN, isoxanthohumol IX et xanthohumol XN¹⁴⁵.

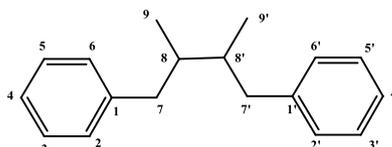


2.1.2. Lignanes

Les lignanes et les néolignanes constituent un vaste groupe de substances naturelles de nature polyphénolique, ils sont très répandus chez les végétaux supérieurs. Les lignines sont des polymères de l'unité phénylpropane C₆-C₃ et constituent le troisième type de polymères présents dans les végétaux après la cellulose et les hémicelluloses¹⁴⁶. Le lignane est un dimère formé à partir de deux unités monolignols (dérivé de l'alcool cinnamique) où ce dernier est un dérivé de l'acide cinnamique et sert comme un précurseur pour les composés de type phénylpropanoïde tels que les lignanes et les lignines^{125,147}.

Le terme lignane, à l'origine présenté par Haworth en 1936, est un dimère formé à partir d'un couplage oxydatif de deux unités phénylpropane C₆-C₃ qui sont liées par leurs carbones C-8 et C-8'.

Le terme néolignane est défini par Gottlieb, en 1972, pour définir tous les autres types de liaison entre les deux unités phénylpropane C₆-C₃. Lorsque ces dernières sont liées par un hétéroatome comme l'oxygène, le composé résultant est un oxynéolignane¹⁴⁸. Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes (ayant trois unités de C₆-C₃) et les dinéolignanes (contenant quatre unités de C₆-C₃).



Structure de base de lignane

¹⁴⁵ Stevens J.F., Ivancic M., Hsu V., Deinzer M.L., Prenylflavonoids from *humulus lupulus*, *Phytochemistry* 44(8), 1575-1585, **1997**.

¹⁴⁶ Lamblin F., Hano C., Lainé E., Fliniaux O., Mesnard F., Fliniaux M.A., Interest of lignans in prevention and treatment of cancers, *Medecine/Sciences* 24, 511-519, **2008**.

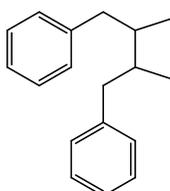
¹⁴⁷ Umezawa T., Diversity in lignan biosynthesis, *Phytochemistry Reviews* 2, 371-390, **2003**.

¹⁴⁸ Moss G.P., Nomenclature of lignans and neolignans, *Pure and Applied Chemistry* 72(8), 1493-1523, **2000**.

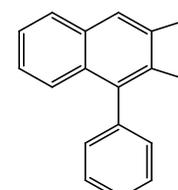
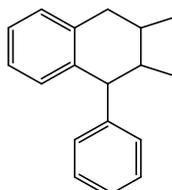
2.1.2.1. Classification des lignanes et néolignanes

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 II-2), alors que les néolignanes sont classés en plusieurs groupes et aucun nom spécial est attribué (Figure II-3)^{149,150}.

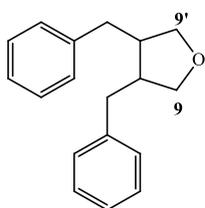
◆ Les lignanes dibenzylbutane



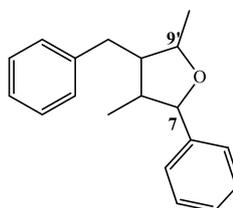
◆ Les aryltétralines et les arylnaphtalènes



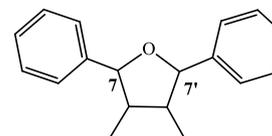
◆ Les lignanes monofuraniques (trois types)



Liaison 9-O-9'

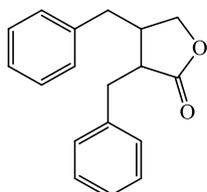


Liaison 7-O-9'

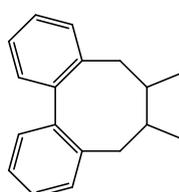


Liaison 7-O-7'

◆ Les lignanes butyrolactones



◆ Les dibenzocyclooctanes



◆ Les lignanes furanofuraniques

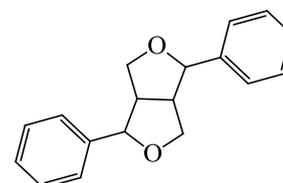


Figure II-2: Principaux types des lignanes

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 racémique¹⁵¹.

¹⁴⁹ 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.

¹⁵⁰ Teponno R.B., Kusari S., Spiteller M., Recent advances in research on lignans and neolignans, *Natural Product Reports* 33, 1044-1092, 2016.

¹⁵¹ Umezawa T., Okunishi T., Shimada M., Stereochemical diversity in lignan biosynthesis, *Wood Research* 84, 62-75, 1997.

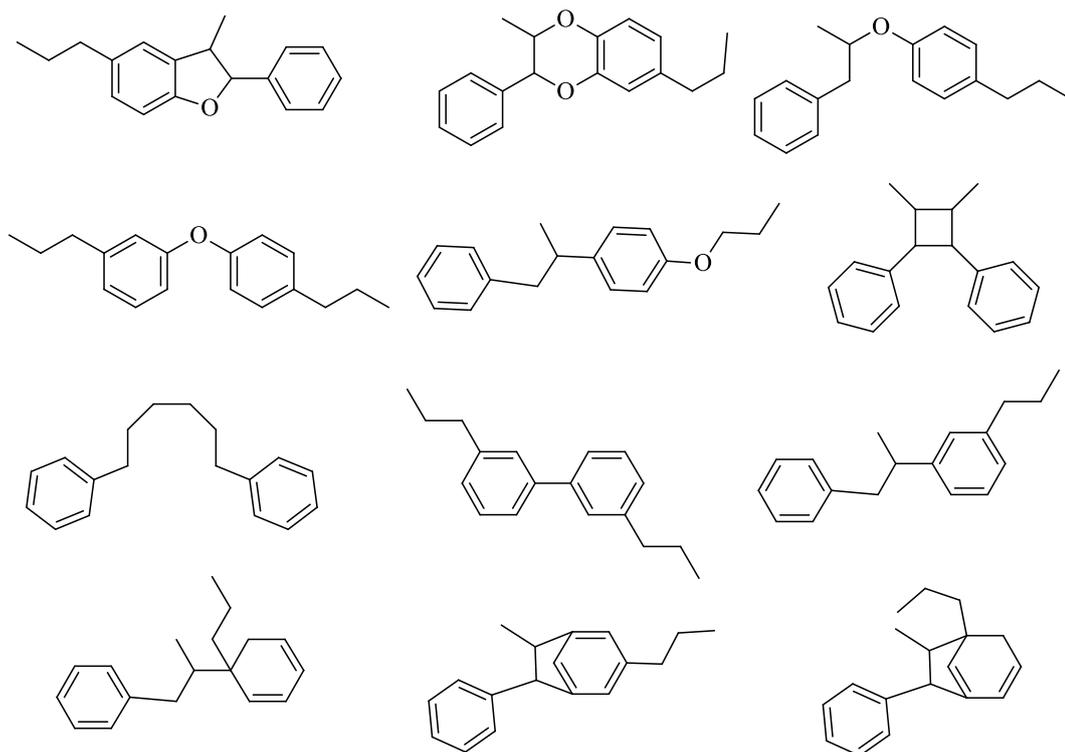


Figure II-3: Principaux types de néolignanes

2.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse d'un flavonoïde peut être décrite soit par la voie du shikimate (acide shikimique), soit par celle de l'acétate. Par ailleurs, la voie des polyacétates intervient chez les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates^{125,139-140,152}.

Le noyau aromatique B est produit par la voie de l'acide shikimique, tandis que l'anneau aromatique A est formé par la voie de l'acide malonique.

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune, la chalcone.

Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose.

Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate. Le 3-déhydroshikimate, formé à partir de la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate, est réduit en shikimate puis il conduit à la formation du chorismate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figure II-4).

¹⁵² Wink M., Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition, Blackwell Publishing Ltd., 2010.

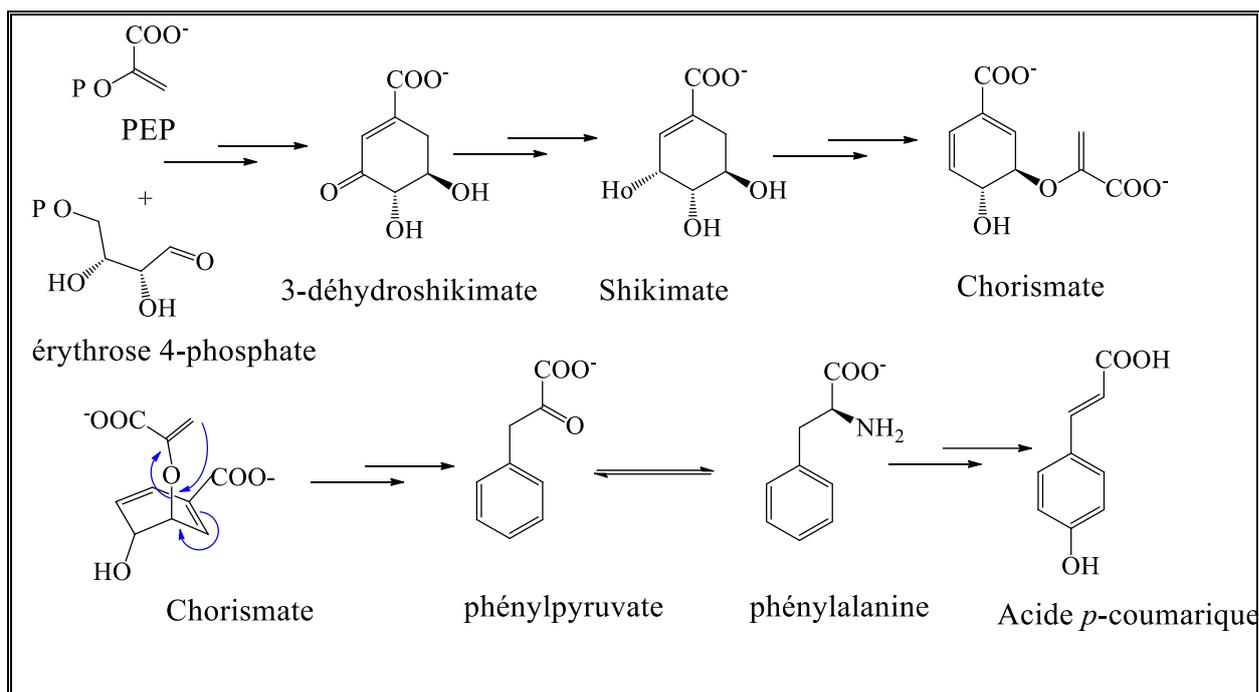


Figure II-4: Formation de l'acide *p*-coumarique

La chalcone résulte en une seule étape enzymatique par condensation de *p*-coumaroyl-CoA et les trois malonyls-CoA. Une transformation stéréospécifique de la chalcone catalysée par une chalconeisomérase (CHI) qui induit une fermeture du cycle, dirigeant à une seule 2(*S*)-flavanone (la naringénine)^{125,136,137}. Cette dernière s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses (Figure II-5).

Les phénylpropanes, tels que l'acide cinnamique, sont des métabolites du shikimate susceptibles de se cycliser et d'aboutir à la formation des coumarines. Les lignanes et les néolignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques¹⁵².

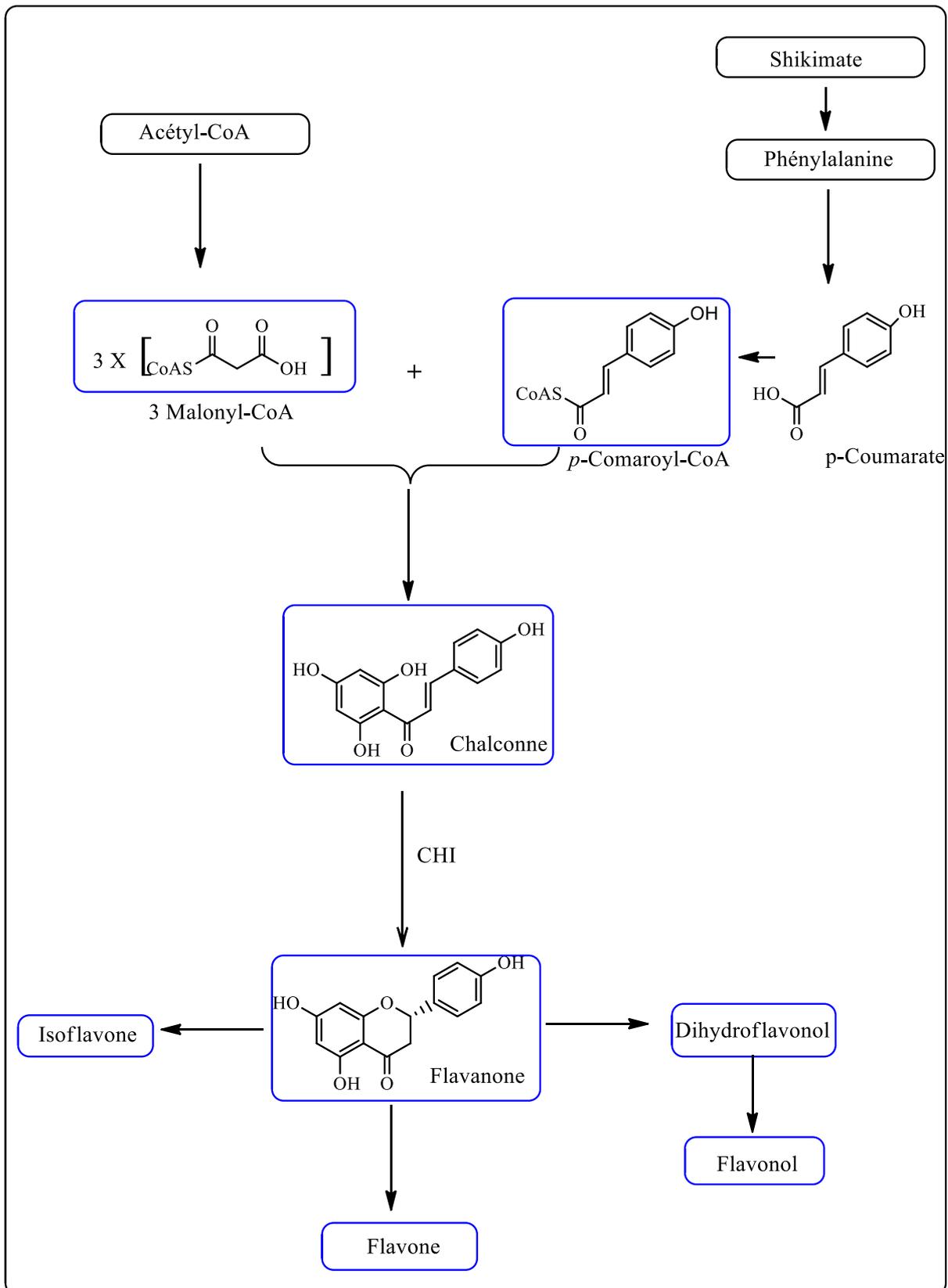


Figure II-5: Biosynthèse des flavonoïdes

2.1.4. Activités biologiques

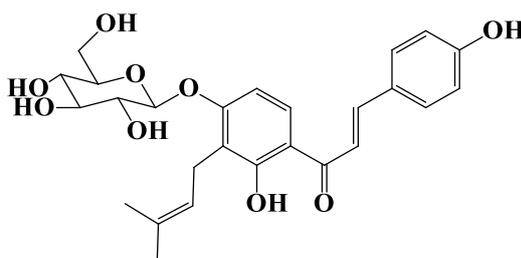
- Flavonoïdes

Les composés phénoliques prennent une importante croissance, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les flavonoïdes interviennent dans la pigmentation des fleurs, la protection des plantes contre les radiations UV, ils représentent un système de défense contre les herbivores et les attaques microbiennes.

L'activité anti-oxydante de polyphénols, et spécifiquement de flavonoïdes, dépend généralement de leur structure chimique et de la distribution des groupements hydroxyles présents.

Le xanthohumol XN est capable de piéger les espèces réactives de l'oxygène, y compris les radicaux hydroxyles et peroxydes, et d'inhiber la production de radicaux anioniques superoxydes et d'oxyde nitrique. Il présente des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de l'activité cyclo-oxygénase-1 (COX-1) et cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et anti-œstrogénique sans posséder de potentiel œstrogénique intrinsèque¹⁵³.

L'activité anti-oxydante de 3'-prényl-4,2'-dihydrochalcone 4'-O-β-glucopyranoside, chalcone prénylée glucosylée a été isolé à partir de l'espèce *Maclura tinctoria* L., a été déterminée en mesurant les effets de piégeage des radicaux libres, en utilisant deux dosages différents, à savoir le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) et l'oxydation couplée du β-carotène et de l'acide linoléique (auto-oxydation)¹⁵⁴.



De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes et des activités antifongiques, (le plus grand nombre) sont actives contre des souches standards comme

¹⁵³ Gerhauser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.-R., Frank N., Bartsch H., Becker H., Cancer Chemopreventive Activity of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hop, *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 959-969, **2002**.

¹⁵⁴ Cioffi G., Escobar L.M., Braca A., De Tommasi N., Antioxidant Chalcone Glycosides and Flavanones from *Maclura (Chlorophora)*, *Journal of Natural Product* 66, 1061-1064, **2003**.

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus*¹⁵⁵.

Les dérivés prénylés constituent un ensemble particulier des flavonoïdes qui suscitent actuellement un intérêt scientifique croissant. Les activités biologiques relatives à ce type de flavonoïdes sont relativement diversifiées^{141,143,156}. Elles forment un groupe de produits naturels qui convient d'explorer pour des propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ils sont capables d'inhiber les transferts électroniques et de découpler les phosphorylations mitochondriales¹⁵⁷.

Le xanthohumol est une chalcone prénylée possédant des propriétés anticancérigènes avec un large spectre de mécanismes inhibiteurs exceptionnels au stade de l'initiation, de la promotion et de la progression de la carcinogenèse. La naringénine possède un effet anti-ostrogénique par inhibition compétitive de la fixation aux récepteurs oestrogéniques. Une prénylation de la naringénine en position C-8 augmente l'effet oestrogénique alors que des dérivés de la naringénine prénylés en position C-6 ne possèdent pas cette activité à l'exception de la 6-(1,1-diméthylallyl)-naringénine¹⁵⁸.

Les mécanismes anti-prolifération de xanthohumol XN impliquant la prévention de la cancérogénicité dans la phase de progression, comprennent l'inhibition de la synthèse de l'ADN et l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Le xanthohumol XN empêche les lésions préneoplasiques induites par les cancérogènes dans la culture des organes de la glande mammaire de souris à des concentrations nanomolaires. En plus de son activité antiproliférative remarquable contre différentes lignées cellulaires cancéreuses, le xanthohumol présente également une activité apoptotique et des effets chimiopréventifs. De plus, plusieurs études *in vitro* ont corroboré les effets sur les enzymes et les facteurs de transcription impliqués dans la genèse du cancer. Très récemment, l'inhibition de la croissance *in vivo* d'une tumeur vasculaire a été signalée¹⁵³.

L'influence du profil d'hydroxylation du cycle A sur l'activité cytotoxique des chalcones prénylées a été étudiée dans une lignée cellulaire HeLa. Une comparaison de l'activité cytotoxique du xanthohumol et du 3-hydroxyxanthohumol avec les analogues non

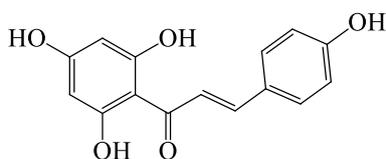
¹⁵⁵ Orhan D.D., Ozcelik B., Ozgen S., Ergun F., Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids, *Microbiological Research* 165, 496-504, **2010**.

¹⁵⁶ Sasaki K., Mito K., Ohara K., Yamamoto H., Yazaki K., Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*, *Plant Physiology* 146, 1075-1084, **2008**.

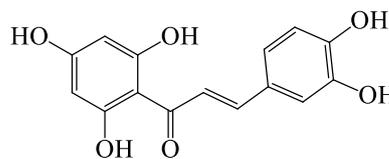
¹⁵⁷ Barron D., Balland C., Possety F., Ravanel P., Desfougere A., Flavonoides prénylés et perméabilité membranaire, *Acta botanica Gallica*, 143 (6), 509-520, **1996**.

¹⁵⁸ Kretzschmar G., Zierau O., Wober J., Tischer S., Metz P., Vollmer G., Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 118, 1-6, **2010**.

prénylés, hélichrysétine et 3-hydroxyhélichrysétine, a montré que le prényl lié à C-3' a une influence sur la cytotoxicité contre les cellules HeLa seulement pour le dérivé dihydroxylé¹⁵⁹.



Hélichrysétine



3-hydroxyhélichrysétine

Le xanthohumol **XN** et l'isoxanthohumol **IX** ont été testés pour leurs activités antiprolifératives sur les lignées cellulaires du cancer du côlon, HT-29 et SW620, et sur une lignée cellulaire non cancéreuse IEC-6. Il a été confirmé que le xanthohumol et l'isoxanthohumol inhibaient la prolifération cellulaire, même à des concentrations micromolaires. Pour la lignée cellulaire HT-29, la CI_{50} était de $1,2 \pm 0,9$ et de $16,9 \pm 0,9$ μmol pour le xanthohumol et l'isoxanthohumol, respectivement. Des valeurs similaires ont été obtenues pour les cellules SW620 ($2,5 \pm 0,2$ et $37,3 \pm 3,2$ μmol). Aucun des prénylflavonoïdes purs testés n'a affecté la prolifération de la lignée cellulaire non cancéreuse IEC-6¹⁶⁰.

Des études *in vitro* ont été effectuées sur des flavonoïdes prénylés du houblon (*Humulus lupulus* L.) pour leurs effets anti-tumorigènes, du cancer de la prostate et de l'hyperplasie bénigne de la prostate. Les lignées cellulaires BPH-1 et PC3 ont été utilisées dans cette étude pour représenter à la fois l'hyperplasie non tumorigène et le cancer de la prostate malin. Dans les deux cellules BPH-1 et PC3, XN et son produit d'oxydation XAL ont diminué la viabilité cellulaire de manière en fonction de la dose ($2,5$ - 20 μM) déterminée par le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et ont provoqué une augmentation de la formation de cellules apoptotiques précoces et tardives déterminées par la coloration de l'annexine V et des dosages multicaspases. XN et son dérivé oxygéné ont également induit des changements de cycle cellulaire dans les deux lignées, observés dans un pic sub-G1 élevé après 48 h de traitement. Une analyse par la méthode de Western blot a été réalisée pour confirmer l'activation des protéines pro-apoptiques¹⁶¹.

¹⁵⁹ Vogel S., Ohmayer S., Brunner G., Heilmann J., Natural and non-natural prenylated chalcones: Synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 4286–4293, **2008**.

¹⁶⁰ Hudcová T., Bryndová J., Fialová K., Fiala J., Karabín M., Jelínek L., Dostálek P., Antiproliferative effects of prenylflavonoids from hops on human colon cancer cell lines, *Institute of Brewing & Distilling* 120, 225-230, **2014**.

¹⁶¹ Colgate E.C., Miranda C.L., Stevens J. F., Bray T.M., Ho E., Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells, *Cancer Letters* 246, 201-209, **2007**.

Le xanthohumol XN et son dérivé ont provoqué une diminution de l'activation de NF-κB (Nuclear Kappa B). Il a été suggère que le xanthohumol et son produit d'oxydation, XAL, pourraient être potentiellement utiles en tant qu'agent chimiopréventif pendant l'hyperplasie de la prostate et la carcinogenèse de la prostate, en agissant par induction de l'apoptose et la régulation négative de l'activation de NF-κB dans les cellules BPH-1¹⁶¹.

Certains chalcones et flavanones possèdent une activité inhibitrice de la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) et bloquent le transfert du cholestérol des HDL vers les particules VLDL et LDL. Parmi ces composés, le xanthohumol présente la plus forte inhibition contre la CETP par le criblage de produits naturels dans diverses plantes. La naringénine a montré une faible inhibition de la CETP par rapport au xanthohumol. En outre, l'isoxanthohumol et la naringénine ont radicalement diminué l'activité inhibitrice. Ces résultats suggèrent que le groupe prényle et la structure chalcone du xanthohumol sont responsables de l'activité inhibitrice de la CETP¹⁶².

- **Lignanes**

Les lignanes sont des composés phénoliques antifongiques, antibactériens, antioxydants, antinutritifs, potentiellement et anticancéreux.

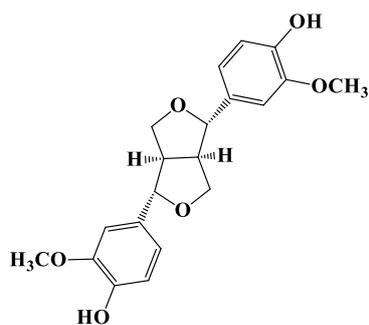
Dix-Huit dihydrobenzofurane néolignanes ont été isolés à partir de *Crataegus pinnatifida* et ont été testés pour leurs activités cytotoxiques contre les lignées cellulaires cancéreuses humaines, parmi eux : la balanophonine, qui est le plus intéressant, et il a révélé une cytotoxicité préférée sur la lignée cellulaire HT-1080 et une activité inhibitrice beaucoup plus forte ($IC_{50} = 8,86 \mu M$) que le témoin positif. Ces néolignanes présentent une activité antioxydante puissante à l'aide de tests de DPPH et ABTS¹⁶³.

La fraction d'acétate d'éthyle de *Manihot esculenta* Crantz a été soumise à une chromatographie sur colonne, pour donner dix composés phénoliques dont deux sont des lignanes (pinorésinol et balanophonine), ces composés possèdent des activités antioxydantes significatives et montrent plus d'activités de piégeage DPPH et ABTS¹⁶⁴.

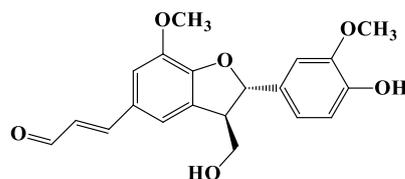
¹⁶² Hirata H., Takazumi K., Segawa S., Okada Y., Kobayashi N., Shigyo T., Chiba H., Xanthohumol, a prenylated chalcone from *Humulus lupulus* L., inhibits cholesteryl ester transfer protein, *Food Chemistry* 134, 1432-1437, **2012**.

¹⁶³ Huang X-X., Zhou C-C., Li L-Z., Peng Y., Lou L-L., Liu S., Li D-M., Ikejima T., Song S-J, Cytotoxic and antioxidant dihydrobenzofuran neolignans from the seeds of *Crataegus pinnatifida*, *Fitoterapia* 91 217-223, **2013**.

¹⁶⁴ Bo Y., Lifei H., Wenli M., Kaibing Z., Hui W., Ying L., Xiaoyi W., Haofu D., Antioxidant phenolic compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan, *Molecules* 16, 10157-10167, **2010**.



Pinorésinol

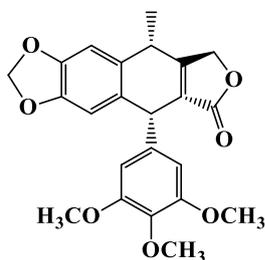


Balanophonine

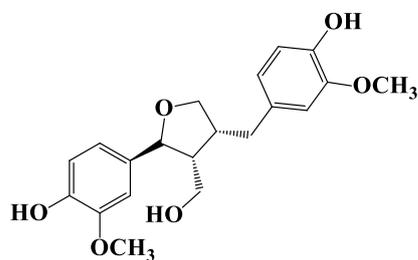
Beaucoup de lignanes et de néolignanes ont servi de composés principaux pour le développement de nouveaux médicaments. L'exemple le plus connu est la podophyllotoxine, un composé antimitotique (médicament utilisé pour sa propriété anticancéreuse) qui se lie à la tubuline. Les dérivés de la podophyllotoxine sont des agents antitumorals, des agents antiviraux et possèdent des propriétés hypolipidémiques et antirhumatismaux et antifongiques¹⁶⁵. L'étoposide, un dérivé hémisynthétique de la podophyllotoxine a des propriétés cytotoxiques utilisées en chimiothérapie anti-cancéreuse¹⁴⁶.

Les lignanes du lin (*Linum usitatissimum* L.) sont des phyto-œstrogènes. Plusieurs études ont révélé l'action protectrice et préventive de ces molécules vis-à-vis de certains cancers, notamment les cancers hormono-dépendants (sein, prostate). Outre les propriétés phyto-oestrogènes des entérolignanes, des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques ont également été rapportés¹⁴⁶.

Le laricirésinol présente des propriétés antifongiques puissantes contre plusieurs souches fongiques pathogènes humaines sans effets hémolytiques sur les érythrocytes humains. Par conséquent, le laricirésinol possède des activités fongicides en perturbant la membrane plasmique fongique et le potentiel thérapeutique comme un nouvel agent antifongique pour le traitement des maladies infectieuses fongiques chez l'homme¹⁶⁶.



Podophyllotoxine



Laricirésinol

¹⁶⁵ Apers S., Vlietinck A., Pieters L., Lignans and neolignans as lead compounds, *Phytochemistry Reviews* 2, 201-217, **2003**.

¹⁶⁶ Hwang B., Cho J., Hwang I-S., Jin H-G., Woo E-R., Lee D.G., Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410, 489-493, **2011**.

2.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes font une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique. Le terme terpène est l'origine de la turpentine (*Balsamum terebinthinae*), car les premiers membres du groupe ont été isolés de la térébenthine (terpentine). Tous les composés terpéniques construits à partir d'unités isopréniques sont nommés terpènes. Ils sont formés de l'assemblage « tête-à-queue » d'un nombre entier d'unités isopréniques.

2.2.1. Classification des terpènes

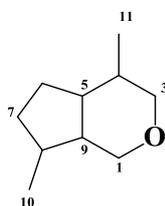
Selon le nombre entier d'unités isopréniques (2-méthylbutadiène), on peut définir les différentes classes de terpènes : monoterpènes (C₁₀, 2 unités), sesquiterpènes (C₁₅, 3 unités), diterpènes (C₂₀, 4 unités), sesterterpènes (C₂₅, 5 unités), triterpènes (C₃₀, 6 unités) et tétraterpènes (C₄₀, 8 unités)^{125,140,151}.

2.2.1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes constituent les composants principaux d'un très grand nombre d'huiles essentielles¹⁶⁷, on les trouve dans toutes les parties de la plante. Ils se trouvent sous forme acycliques et cycliques (mono et bicycliques). Parmi les monoterpènes bicycliques, les iridoïdes représentent un groupe de cyclopenta-[c]-pyrane.

2.2.1.1.1. Iridoïdes

Les iridoïdes constituent un groupe de composés naturels appartenant à la classe des monoterpènes, le plus souvent, bicycliques fusionnés *cis*. Ils sont caractérisés par un squelette cyclopenta-[c]-pyrane, parfois nommé iridane (*cis*-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonane). Ils ont une fonction énol-éther très caractéristique qui s'ouvre facilement s'il n'y a pas de sucre lié.



Iridane

Les iridoïdes tirent leur nom en 1956, des fourmis Australienne; *Iridomyrmex detectus* qui synthétisent ces molécules dans leurs mécanismes de défense des insectes. Ce sont des dérivés de l'iridodial, c'est le premier iridoïde à être isolé. En 1963, Briggs et collaborateurs

¹⁶⁷ Grayson D.H., Monoterpenoids, *Natural Product Reports* 14, 439-475, 1998.

proposent de les appeler Iridoides et en 1969, ce nom a été définitivement admis par Bobbit et Segebarth¹⁶⁸.

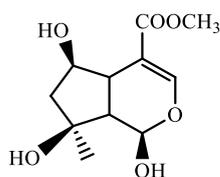
Les iridoïdes sont très répandus dans le règne végétal, ils sont présents chez les angiospermes dicotylédones en particulier chez les Dipsacaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Oleaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae et Bignoniaceae¹⁶⁹. Ils sont considérés chez, elles comme, des marqueurs chimiotaxonomiques intéressants. Ces métabolites sont rares chez les insectes bien qu'ils aient été premièrement isolés chez les fourmis et n'avaient encore jamais été décrits dans les plantes marines.

2.2.1.1.2. Classification des iridoïdes

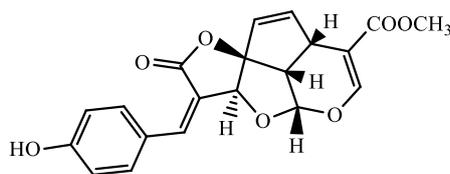
Selon la nature des substituants, de degrés d'oxydation et de l'insaturations, les iridoïdes pourraient être classés en quatre groupes principaux :

a. Iridoïdes simples

Ce groupe des iridoïdes est caractérisé par l'absence d'une unité osidique (scyphiphine C), ils peuvent être alcaloïdiques où l'atome d'azote remplace l'oxygène ou polycycliques (prismatomérine).



Scyphiphine C



Prismatomérine

b. Iridoïdes glycosylés

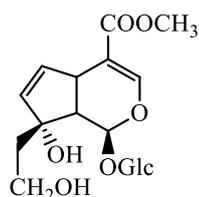
Ils présentent une classe des monoterpènes à 10 atomes de carbones où la position 4 est substituée parfois par un COOH, plus souvent un COOCH₃, rarement un CH₃ (lamiol) et un CH₂OH estérifié ou glycosylé. Tous ces composés ont une double liaison en position 3-4, des fois une autre double liaison en 6-7 ou en 7-8 (le cas du galioside et l'acide géniposidique)¹⁷⁰.

La liaison hétérosidique s'établit avec l'hydroxyle en C-1 ou en C-6 de la génine (catalpol-6-O-rhamnoside et sinuatole). L'unité osidique est généralement constituée du glucose, Plus rarement le sucre peut être un rhamnose, un arabinose ou un oligosaccharide (williamsoside C).

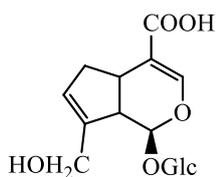
¹⁶⁸ Plouvier V., Favre-Bonvin J., Les iridoïdes et séco-iridoïdes: Répartition, Structure, Propriétés, Biosynthèse, *Phytochemistry* 10, 1697-1722, **1971**.

¹⁶⁹ Rosendal Jensen S., Franzky H., Wallander E., Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers, *Phytochemistry* 60, 213-231, **2002**.

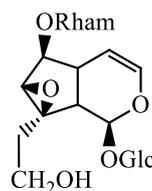
¹⁷⁰ Saisty D., Bailleul F., Delaveau P., Alpighiacées : nouvelle famille à iridoïdes étude du *Stigmaphyllon sagittatum*, *Journal of Natural Products* 44(5), 576-578, **1981**.



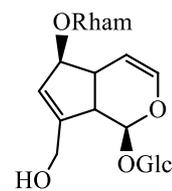
Galioside



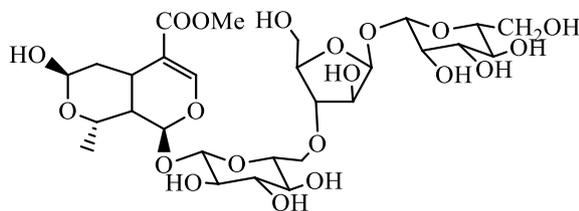
Acide géniposidique



Catapol-6-O-rhamnoside



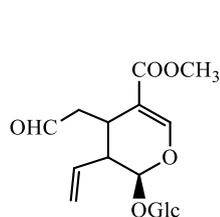
Sinuatole



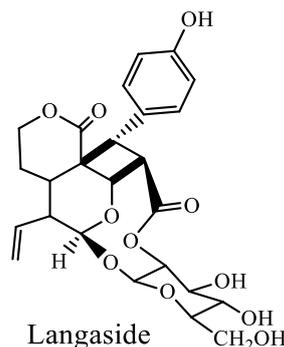
Williamsoside C

c. Séco-iridoïdes

Les séco-iridoïdes dérivent biogénétiquement des iridoïdes par ouverture oxydante de la liaison C7-C8 de la génine (sécologanine, langaside). Majoritairement, ils sont sous forme d'hétérosides.



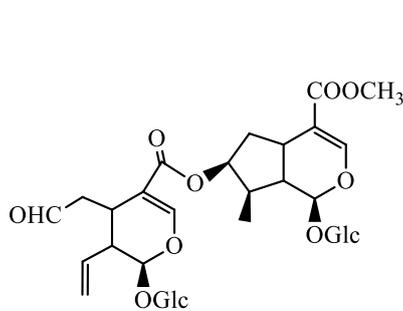
Sécologanine



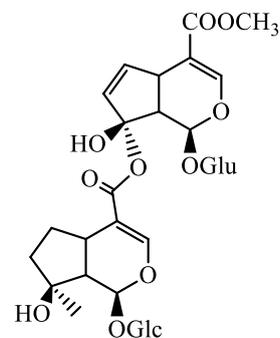
Langaside

d. Bis-iridoïdes

Ce sont des molécules issues de la condensation de deux iridoïdes. Les deux squelettes peuvent être liés, directement, entre eux (canthéyoside et randinoside) ou par un squelette intermédiaire.



Canthéyoside



Randinoside

2.2.1.2. Sesquiterpènes et diterpènes

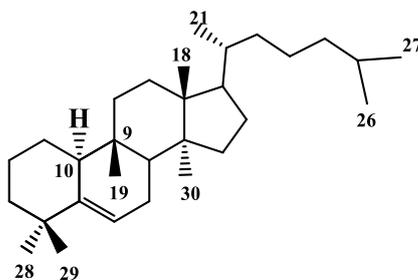
Ils sont issus du couplage de trois unités isopréniques pour les sesquiterpènes et quatre unités pour les diterpènes.

- Les sesquiterpènes se rencontrent dans les huiles essentielles, on les retrouve sous les formes acyclique, monocyclique et bicyclique.
- Les diterpènes sont particulièrement abondants chez les Lamiaceae et les Astéraceae. Ils peuvent être acycliques, bicyclique ou tricycliques. Ils sont largement distribués chez les végétaux supérieurs.

2.2.1.3. Triterpènes

Les triterpènes sont des composés en C₃₀, ils sont à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique, ils peuvent être des composés acycliques (le squalène) ou cycliques. Les triterpènes cycliques sont les plus abondants, ils sont divisés en squelettes tétracycliques (dammarane, cucurbitane, lanostane et stéroïdes), et pentacycliques (oléanane, ursane, lupane, friedélane, hopane et holostane)^{171,172}.

Les cucurbitacines sont des triterpènes tétracycliques, polyfonctionnalisés et insaturés¹⁷³, initialement identifiés chez les cucurbitaceae^{174,175,176}, ce sont des molécules toxiques et amères dont le potentiel toxique a été décrit pour la première fois en 1932, elles sont généralement caractérisées de nombreuses familles végétales comme les cucurbitaceae, Cruciferae, Scrophulariaceae, Begoniaceae, Primulaceae et Rosaceae^{177,178,179}.



Structure de base de la Cucurbitacine (Cucurbitane)

¹⁷¹ Vincken J-P., Heng L., Groot A., Gruppen H., Review: Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry* 68, 275-297, **2007**.

¹⁷² Hill R. A., Connolly J.D., Triterpenoids, *Natural Product Reports* 29, 780-818, **2012**.

¹⁷³ Velde V. V., Lavie D., ¹³C NMR spectroscopy of cucurbitacins, *Tetrahedron* 39(2), 317-321, **1983**.

¹⁷⁴ Sparg S.G., Light M.E., Staden J. van, Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219-243, **2004**.

¹⁷⁵ Lavie D., Benjaminov B. S., The constituents of *Ecballium elaterwm* L-XX structural transformations in rings A and B in the Cucurbitacins, *Tetrahedron* 20, 2665-2670, **1964**.

¹⁷⁶ Lavie D., Shvo Y., Gottlieb O. R., Glotter E., Constitution of the cucurbitacins, *Tetrahedron Letters* 18, 615-623, **1961**.

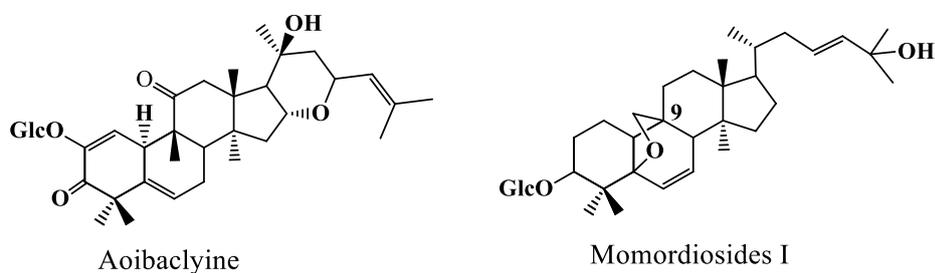
¹⁷⁷ Curtis P. J., Meade P. M., Cucurbitacins from the Cruciferae, *Phytochemistry* 10, 3081-3083, **1971**.

¹⁷⁸ Gry J., Sjøborg I., Andersson C. H., Cucurbitacins in plant food, *Tema Nord* **2006**.

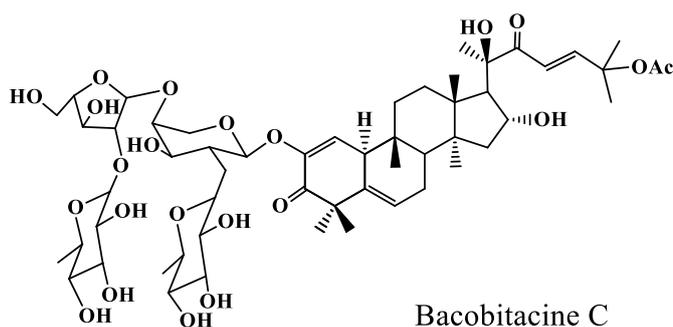
¹⁷⁹ Shibuya M., Adachi S., Ebizuka Y., Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis, *Tetrahedron* 60, 6995-7003, **2004**.

Leur squelette de base est le cucurbitane, isomère du lanostane, qui en diffère par la position d'un méthyle CH₃-19 sur le carbone C-9 et non pas sur le C-10^{176,180,181,182}.

Lorsque le cucurbitane est modifié par la présence de nombreuses fonctions oxygénées et des doubles liaisons, d'autres formes de cucurbitacines sont également produites suite à des réactions de déshydrogénation, d'hydroxylation et d'isomérisation. Certaines cucurbitacines sont des composés pentacycliques, dans lesquels une cyclisation entre le carbone C-23 (ou C-24) et l'oxygène lié au carbone C-16 fournit un cycle supplémentaire comme dans le cas d'aoibacliyne, un produit isolé à partir du fruit de *Gymnopetalum integrifolium*¹⁸³. Les momordicosides constituent un groupe spécial de cucurbitacines, très répandu dans l'espèce *Momordica charantia*. La caractéristique commune des momordicosides est que le carbone C19 est oxydé.



Les cucurbitanes sont rencontrées aussi sous forme des composés, généralement mono-osidiques, où l'unité osidiques étant le D-glucose ou le L-rhamnose, liés souvent au carbone C-2 ou au carbone C-3. Les cucurbitacines polyosidiques ont été aussi identifiés, telle que la bacobitacine C, isolée à partir de l'espèce *Bacopa monnieri* (Scrophulariaceae)¹⁸⁴.



¹⁸⁰ Tessier A.M., Bouquet A., Paris R.R., Sur quelques Euphorbiacées toxiques Africaines, *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, Tome IX N°3, 238-249, **1975**.

¹⁸¹ Lang K.L., Silva I.T., Zimmermann L.A., Machado V.R., Teixeira M.R., Lapuh M.I., Galetti M.A., Palermo J.A., Cabrera G.M., Bernardes L.S.C., Simões C.M.O., Schenkel E.P., Balparada M.S.C., Durán F.J., Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 3016-3030, **2012**.

¹⁸² He C-T., Ang X., Phoebe C. H., Inghorn D., Farnsworth N.R., High-field ¹H-NMR spectral analysis of some Cucurbitacins, *Journal of Natural Products* 48(3), 429-434, **1985**.

¹⁸³ Sekine T., Kurihara H., Waku M., Ikegami F., Ruangrunsi N., A new pentacyclic cucurbitane glucoside and a new triterpene from the fruits of *Gymnopetalum integrifolium*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50(5), 645-648, **2002**.

¹⁸⁴ Bhandari P., Kumar N., Singh B., Kaul V.K., Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*, *Phytochemistry* 68, 1248-1254, **2007**.

2.2.3. Biosynthèse des terpènes

La condensation de trois molécules d'acétyl-CoA forme le β -hydroxy β -méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), ensuite la réduction de ce dernier donne l'acide mévalonique (MVA) qui est par la suite activé par une enzyme spécifique.

Le MVA est converti en isopentényl pyrophosphate (IPP) ou isoprène actif, une unité isoprénique d'enchaînement, et il s'isomérise en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). La première étape de la biosynthèse des terpènes commence toujours par une condensation de l'isopentényl pyrophosphate IPP et le diméthylallyl pyrophosphate DMAPP. Cette condensation conduit au géraniol pyrophosphate (GPP), le précurseur des monoterpènes réguliers et monoterpènes irréguliers (iridoïdes). Le couplage de géraniol (GPP) avec une nouvelle molécule (IPP), conduit au (FPP) précurseur des sesquiterpènes en C-15 qui peut agir avec une autre molécule de (IPP) pour former le (GGP), le précurseur des diterpènes en C-20. D'autre part, le couplage queue à queue réductif de deux unités (FPP) donne le squalène en C-30, le précurseur des triterpènes (Figure II-6).

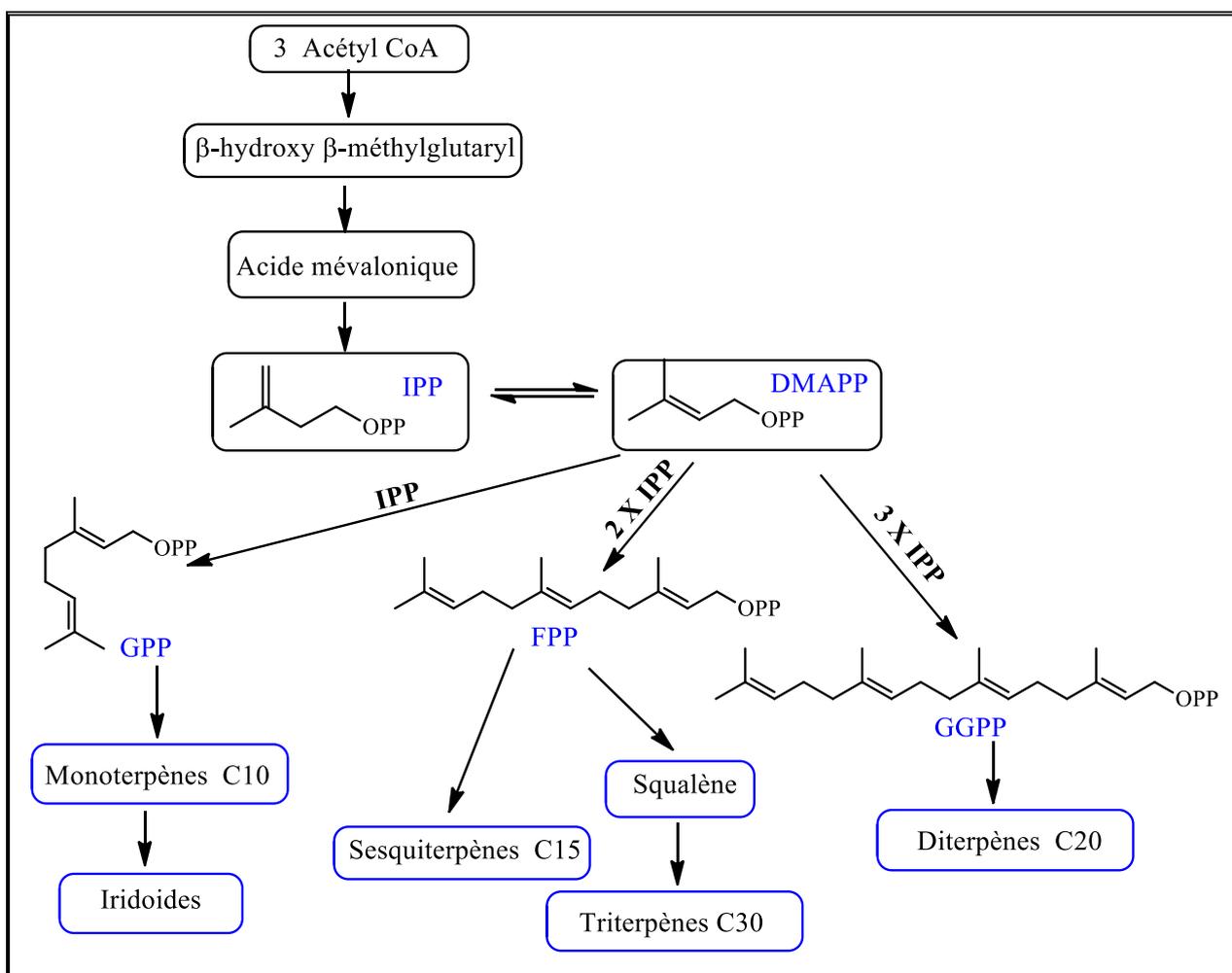


Figure II-6: Biosynthèse des terpènes

Les iridoïdes, un groupe bien particulier de monoterpènes irréguliers. La biosynthèse de ces derniers est issue d'un couplage entre les deux unités isopréniques (IPP et DMAPP) pour donner le diphosphate de géranyle (GPP) dont l'hydrolyse donne le géraniol qui est hydroxylé en C-10. Les deux hydroxyles s'oxydent en aldéhydes, puis une cyclisation s'opère au niveau des carbones insaturés pour former l'iridodial qui s'oxyde en iridotrial. La cyclisation de ce dernier conduit au méthylcyclopentane qui subit après, une oxydation, une glycosylation et une estérification pour se transformer en iridoïdes^{125,140} (Figure III-7).

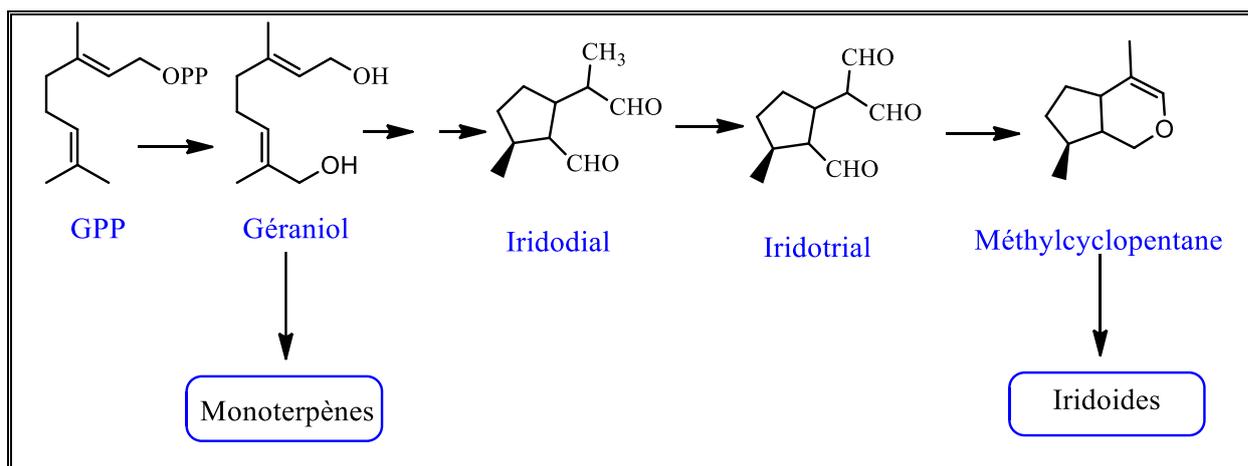


Figure II-7: Biosynthèse des iridoïdes

Les triterpènes sont synthétisés à partir du squalène, précurseur de toutes les structures tétracycliques et pentacycliques. Il subit une époxydation suivie d'une cyclisation qui aboutit soit aux prostatanes soit aux dammaranes. En effet, si l'époxysqualène est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostéryl précurseur des triterpènes tétracycliques (cucurbitacines, lanostanes, cycloartanes et des stéroïdes). Par contre, si l'époxysqualène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un cation appelé dammarényl qui est le plus souvent réarrangé en formant un cycle supplémentaire donnant naissance aux triterpènes pentacycliques de type oléane, ursane, dammarane, tirucallane, lupane, hopane et taraxastérane (Figure II-8)^{125,140,151,170}.

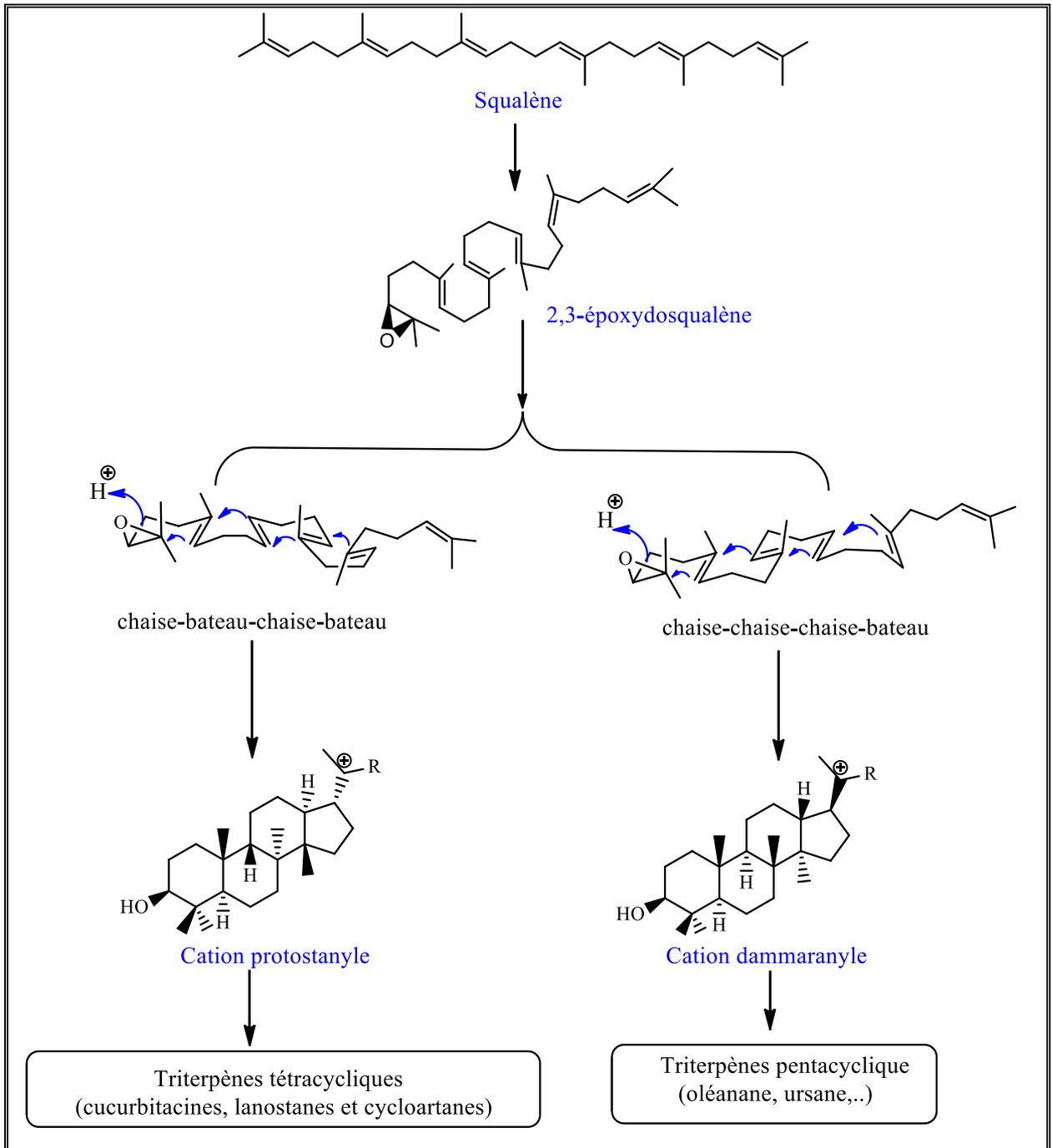


Figure II-8: Biosynthèse des triterpènes

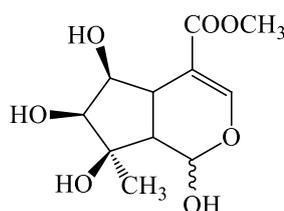
2.2.4. Activités biologiques des terpènes

- Iridoïdes

Les iridoïdes ont montré une large gamme d'activités biologiques, telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-insecticides, anti-inflammatoires, anti-oxydantes, hépatoprotectrices, cardioprotectrices, antitumorales et antiprotozoaires.

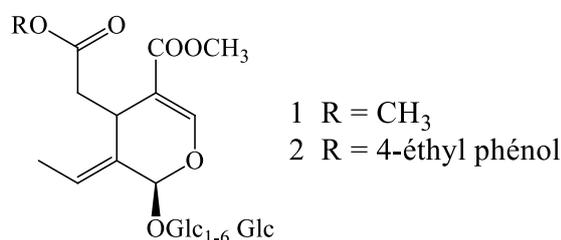
Parmi les iridoïdes isolés, l'acide loganique était le composé dominant de la plante *honeysuckle berries* (baies de chèvrefeuille), et il représentait entre 22% et 73% de la quantité totale d'iridoïdes quantifiés. Une très forte corrélation a été observée entre le potentiel antioxydant et la quantité des iridoïdes présente dans l'espèce¹⁸⁵.

Deux isomères lamiridosines A et B (*Lamium album*) inhibent significativement le virus de l'hépatite C (IC₅₀ 2,31 µM) *in vitro*. Des études de quatorze iridoïdes analogues ont montré que les iridoïdes glucosides parents ne présentaient aucune activité anti-VHC, mais que les aglycones de l'ester méthylique du shanzhiside, de la loganine, de l'acide loganique, du géniposide, d'eurostoside et de la picroside présentaient une importante activité anti-VHC et anti-infectiosité¹⁸⁶.



Lamiridosines

Deux sécoiridoïdes glucosylés, excelsides A (1) et B (2) (*Fraxinus excelsior*) inhibent la différenciation des adipocytes dans les cellules 3T3-L1¹⁸⁷.

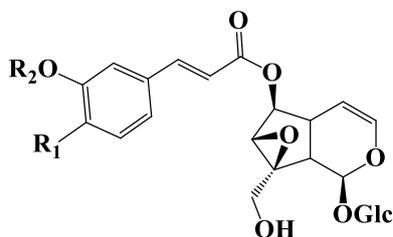


¹⁸⁵ Kucharska A.Z., Sokół-Letowska A., Oszmianski J., Piórecki N., Fecka I., Iridoids, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.), *Molecules* 22, 405-427, 2017.

¹⁸⁶ Zhang HJ., Rothwang K, Mesecar AD., Sabahi A., Rong LJ., Fong HHS., Lamiridosins, hepatitis C Virus entry inhibitors from *Lamium album*, *Journal of Natural Products* 72(12), 2158-2162, 2009.

¹⁸⁷ Bai NS., HK, Ibarra A, Bily A, Roller M, Chen XZ, Rühl R. Iridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPAR α activation activity, *Journal of Natural Products* 73, 2-6, 2010.

Trois iridoïdes, le spécioside, le verminoside et le minécocide (*Kigelia pinnata*) ont été testés contre la souche HK-9 d'*Entamoeba histolytica* pour leur évaluation anti-amibienne *in vitro* et le métronidazole a été utilisé comme médicament de référence. Le verminoside avait une activité anti-amibienne deux fois supérieure à celle du médicament standard, tandis que le spécioside présentait une activité comparable à celle du métronidazole¹⁸⁸.

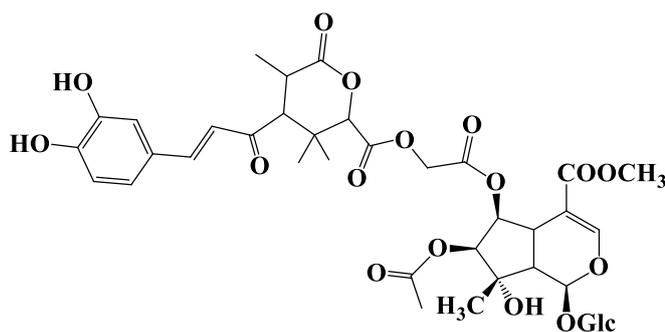


Spécioside $R_1 = H, R_2 = H$

Verminoside $R_1 = OH, R_2 = H$

Minécocide $R_1 = OH, R_2 = CH_3$

Mussaenda 'dona aurora' (Rubiaceae) a été étudiée pour ses activités antioxydantes et hépatoprotectrices *in vitro*. L'activité la plus élevée a été observée dans la fraction acétate d'éthyle contenant des iridoïdes, le sanshiside-D et le lamalbide. Le sanshiside-D a présenté une activité hépatoprotectrice supérieure à celle de la silimarine. Le sanshiside-D présente aussi une activité antioxydante puissante dans l'ABTS, une inhibition de la peroxydation lipidique et des radicaux nitriques¹⁸⁹. Cet iridoïde a un effet négatif sur la croissance des lignées cellulaires Vero, alors que les dérivés ester méthyliques de cet iridoïde et le lamalbide sont inactifs vers ces lignées cellulaires¹⁹⁰.



Sanshiside-D

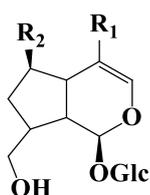
¹⁸⁸ Bharti N., Singh S., Naqvi F., Azam A., Isolation and *in vitro* anti-amoebic activity of iridoids isolated from *Kigelia pinnata*, *ARKIVOC* 2006 part (x), 69-76, **2006**.

¹⁸⁹ Vidyalakshmi K. S., Nagarajan S., Vasanthi H. R., Rajamanickam G.V., Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Two Iridoids from *Mussaenda 'dona aurora'*, *Z. Naturforsch* 64C, 329-334, **2009**.

¹⁹⁰ Vidyalakshmi K. S., Rajamanickam G.V., An iridoid with anticancer activity from the sepals of *Mussaenda 'dona aurora'*, *Indian Journal of Chemistry* 48B, 1019-1022, **2009**.

L'activité insecticide de l'espèce endémique *Galium mélanantherum* a été évaluée contre les fourmis *Crematogaster scutellaris* et les termites *Kaloterme flavicollis*. Les principaux composants isolés sont les iridoïdes non-acétylés: l'acide géniposidique, l'hydroxyloganine, le deacétyldaphylloside, la monotropéine, le scandinoside, l'acide asperulosidique et l'acide desacétylasperulosidique. Des essais biologiques ont révélé des niveaux significatifs de toxicité pour ces iridoïdes contre les termites *Kaloterme flavicollis* et les fourmis *Crematogaster scutellaris*⁹⁴.

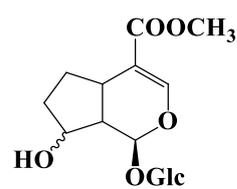
Les fractions éthanoliques des parties aériennes de *Castilleja tenuiflora* ont été étudiées sur des œdèmes induits par le 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Les iridoïdes représentent les principaux constituants de cette fraction (acide géniposidique, aucubine, bartioside, 8-*épi*-loganine et mussaenoside). L'iridoïde le plus actif était l'acide géniposidique, plus actif que le témoin (indométacine), et l'iridoïde le moins actif était le mussaenoside, alors que la 8-*épi*-loganine, et mussaenoside n'ont pas été entièrement rapportés pour être des composés anti-inflammatoires¹⁹¹.



Acide géniposidique $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{H}$

Aucubine $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$

Bartsioside $R_1 = R_2 = \text{H}$



8-*épi* loganine $\alpha \text{ OH}$

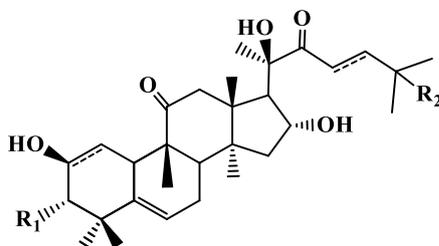
Messaenoside $\beta \text{ OH}$

• Cucurbitacines

Les cucurbitacines possèdent une forte activité cytotoxique *in vitro* et antitumorale *in vivo*. Elles sont des triterpénoïdes tétracycliques fortement oxydées qui sont largement présentes dans les médicaments traditionnels chinois (famille des Cucurbitacées) et elles possèdent une forte activité anticancéreuse. Les huit composants de la cucurbitacine les plus actifs contre le cancer sont la cucurbitacine B, D, E, I, IIa, L glucoside, Q et R. Leurs mécanismes d'action comprennent l'antiprolifération, l'inhibition de la migration et de l'invasion, la proapoptose et la promotion du blocage du cycle cellulaire. Les cucurbitacines sont également des inhibiteurs des voies de signalisation JAK-STAT3, Wnt, PI3K/Akt et MAPK, qui jouent un rôle important dans l'apoptose et la survie des cellules cancéreuses. Récemment, de nouvelles études ont découvert des effets anticancéreux synergiques en

¹⁹¹ Carrillo-Ocampo D., Bazaldúa-Gómez S., Bonilla-Barbosa J.R., Aburto-Amar R., Rodríguez-López V., Anti-Inflammatory Activity of Iridoids and Verbascoside Isolated from *Castilleja tenuiflora*, *Molecules* 18, 12109-12118, 2013.

utilisant des cucurbitacines en association avec des médicaments chimiothérapeutiques cliniquement approuvés, tels que le docétaxel et le méthotrexate. Par conséquent, les cucurbitacines sont une classe de médicaments anticancéreux prometteurs qui peuvent être utilisés seuls ou être utilisés dans les chimiothérapies et les radiothérapies actuelles pour traiter de nombreux types de cancers¹⁹².

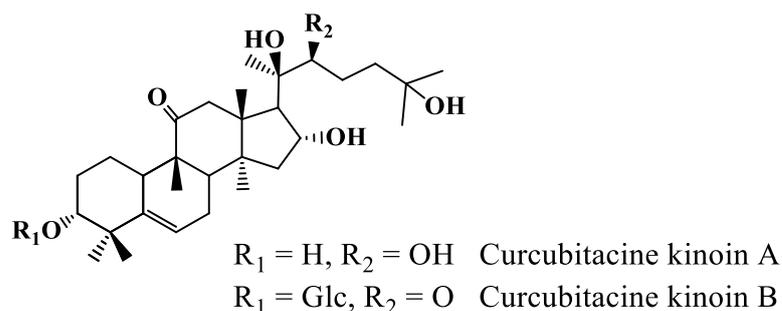


Composés	R ₁	R ₂	Δ^{1-2}	Δ^{23-24}
Cucurbitacine B	=O	Ac	-	+
Cucurbitacine D	=O	H	-	+
Cucurbitacine E	=O	Ac	+	+
Cucurbitacine I	=O	H	+	+
Cucurbitacine IIa	OH	Ac	-	-
Cucurbitacine L	=O	H	-	+
Cucurbitacine Q	OH	Ac	-	+
Cucurbitacine R	=O	H	-	-

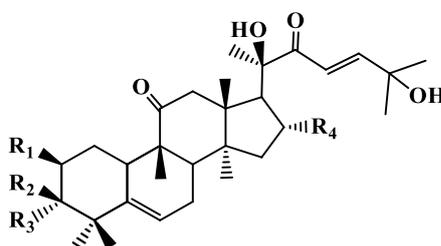
La saponine de type cucurbitacine kinoin B était capable d'inhiber la croissance des lignées de cellules cancéreuses HeLa, M12A^K.C3F6, A549 et RAW 264.7 avec une CI₅₀ de 18,0, 31,4, 40,2 et 61,5 μ M, respectivement. La lignée cellulaire L-929 utilisée comme témoin était plus résistante qu'un dérivé aglycone (cucurbitacine kinoin A) de ce composé. L'induction de l'apoptose a été analysée par cytométrie en flux de l'Annexine V / iodure propidium (PI), et il a été observé que le traitement des cellules HeLa avec l'aglycone provoquait la mort cellulaire par apoptose¹⁹³.

¹⁹² Cai Y., Fang X., He C., Li P., Xiao F., Wang Y., Chen M., Cucurbitacins: A systematic Review of the phytochemistry and anticancer activity, *The American Journal of Chinese Medicine* 43(7), 1-20, **2015**.

¹⁹³ Torres-Moreno H., Velázquez C.A., Garibay-Escobara A., Massimo Curini, Marcotullio M.C., Robles-Zepeda R.E., Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*, *Industrial Crops and Products* 77, 895-900, **2015**.



La plante antipaludique (antimalarique), traditionnellement utilisée, *Datisca glomerata* (C. Presl) Baill, a été soumise à un fractionnement guidé par un essai antiplasmodiale. Cela a conduit à l'isolement de neuf cucurbitacines glycosides, les datiscosides A-B et I-O. Les valeurs de CI_{50} antiplasmodiales ont été déterminées pour tous les composés isolés contre une souche de *Plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine (D10), qui ont également été évalués *in vitro* pour leur activité antileishmanienne contre *Leishmania tarentolae*. La cytotoxicité a été évaluée par rapport aux cellules musculaires squelettiques de rat (L6) et aux cellules de hamster de l'ovaire chinois (CHO). L'activité antiplasmodiale des composés était modérée et variait de 7,7 à 33,3 μM . Aucun des composés n'a montré d'activité antileishmanienne appréciable¹⁹⁴.



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
Datiscoside A	H	=O		X ₂	<p> X₁ R = H X₂ R = OH Y₁ R = H Y₂ R = Ac </p>
Datiscoside B	H			X ₁	
Datiscoside I	OH	H	OH	X ₂	
Datiscoside J	OH	H	OH	Y ₁	
Datiscoside K	OH	H	OH	Y ₂	
Datiscoside L	OH	H	OH		
Datiscoside M	OH	H	OH		
Datiscoside N	H	OH	H		
Datiscoside O	H	H	OH		

¹⁹⁴ Graziose R., Grace M.H., Rathinasabapathy T., Rojas-Silva P., Dekock C., Poulev A., Lila M.A., Smith P., Raskin I., Antiplasmodial activity of cucurbitacin glycosides from *Datisca glomerata* (C. Presl) Baill, *Phytochemistry* 87, 78-85, 2013.

Un bio-essai guidé de l'écorce d'*Elaeocarpus mastersii* à l'aide de cellules KB (carcinome épidermoïde oral humain) a permis d'isoler deux cucurbitacines, la cucurbitacine D et la cucurbitacine F, comme principes cytotoxiques. Ces composés ont été évalués contre un panel de lignées cellulaires tumorales humaines¹⁹⁵.

La purification bio-essai de fruits de *Cucurbita andreana* a donné des cucurbitacines B, D, E et I. Ces cucurbitacines ont été évaluées pour leurs effets inhibiteurs sur la croissance des lignées cellulaires cancéreuses du côlon humain (HCT-116), du sein (MCF-7), du poumon (NCI-H460) et du système nerveux central SNC (SF-268), les enzymes cyclooxygénase-1 (COX-1) et cyclooxygénase-2 (COX-2) et sur la peroxydation lipidique. Les activités inhibitrices des cucurbitacines B, D, E et I, respectivement, étaient de 81,5, 80,4, 77 et 65% à 0,4 µM 87 de côlon, 78, 66,5, et 12% à 0,4 µM des seins, 96, 43, 37 et 2% à 0,1 µM de poumon 92, 25, 24 et 4% à 0,05 µM de CNS. L'adriamycine (doxorubicine) a été utilisée comme témoin positif, qui a montré une inhibition de 64, 47, 45 et 71% de HCT-116 (côlon), MCF-7 (sein), NCI-H460 (poumon) et SF-268 (SNC). Ces composés ont inhibés l'enzyme COX-2 de 32, 29, 35 et 27%, respectivement, à 100 mg / ml. Cependant, ces composés n'inhibent pas l'enzyme COX-1 à cette concentration. L'ibuprofène, le naproxène et le vioxx sont des anti-inflammatoires commerciaux, ont été testés comme témoins pour l'inhibition des enzymes COX-1 et COX-2 à des concentrations de 2,1, 2,5 et 1,67 µg / ml, respectivement. L'ibuprofène et le naproxène présentaient des activités inhibitrices du COX-1 de 59 et 95% et du COX-2 de 53 et 79%, respectivement. Vioxx a montré une inhibition spécifique du COX-2 de 71%. De même, les cucurbitacines B et I ont inhibés la peroxydation lipidique de 59 et 23%, respectivement, à 100 µg /ml¹⁹⁶.

¹⁹⁵ Ito A., Chai H-B., Lee D., Kardono L.B.S., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins from *Elaeocarpus mastersii*, *Phytochemistry* 61, 171-174, **2002**.

¹⁹⁶ Jayaprakasam B., Seeram N.P., Nair M.G., Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*, *Cancer Letters* 189, 11-16, **2003**.

Chapitre III
Résultats et discussion

Les différents extraits obtenus soit de la plante marine *Cymodocea nodosa* ou de l'espèce terrestre *Galium brunneum* ont été analysés par CCM. Un fractionnement a été ensuite effectué par chromatographie sur colonne de gel de silice ou gel de Sephadex LH-20 sur les extraits choisis pour étudier. Pour certaines fractions obtenues, un fractionnement préalable est réalisé, par CC phase normale ou phase inverse, en fonction de leurs profils chromatographiques (CCM) et spectroscopiques (RMN ¹H) obtenus. A partir des sous fractions obtenues, plusieurs techniques chromatographiques de séparation ont été appliquées (colonnes sur gel de silice ou gel de Séphadex LH-20, CLHP, cartouche sur gel de silice RP₁₈ et les plaques préparatives (CCE). Les protocoles de séparation et de purification de différents extraits étudiés sont résumés dans les schémas ci-dessous (Figures III-1, III-2 et III-3).

Le détail expérimental d'extractions, de séparations et de purifications réalisées sur les deux espèces *Cymodocea nodosa* et *Galium brunneum* est exposé dans le chapitre IV.

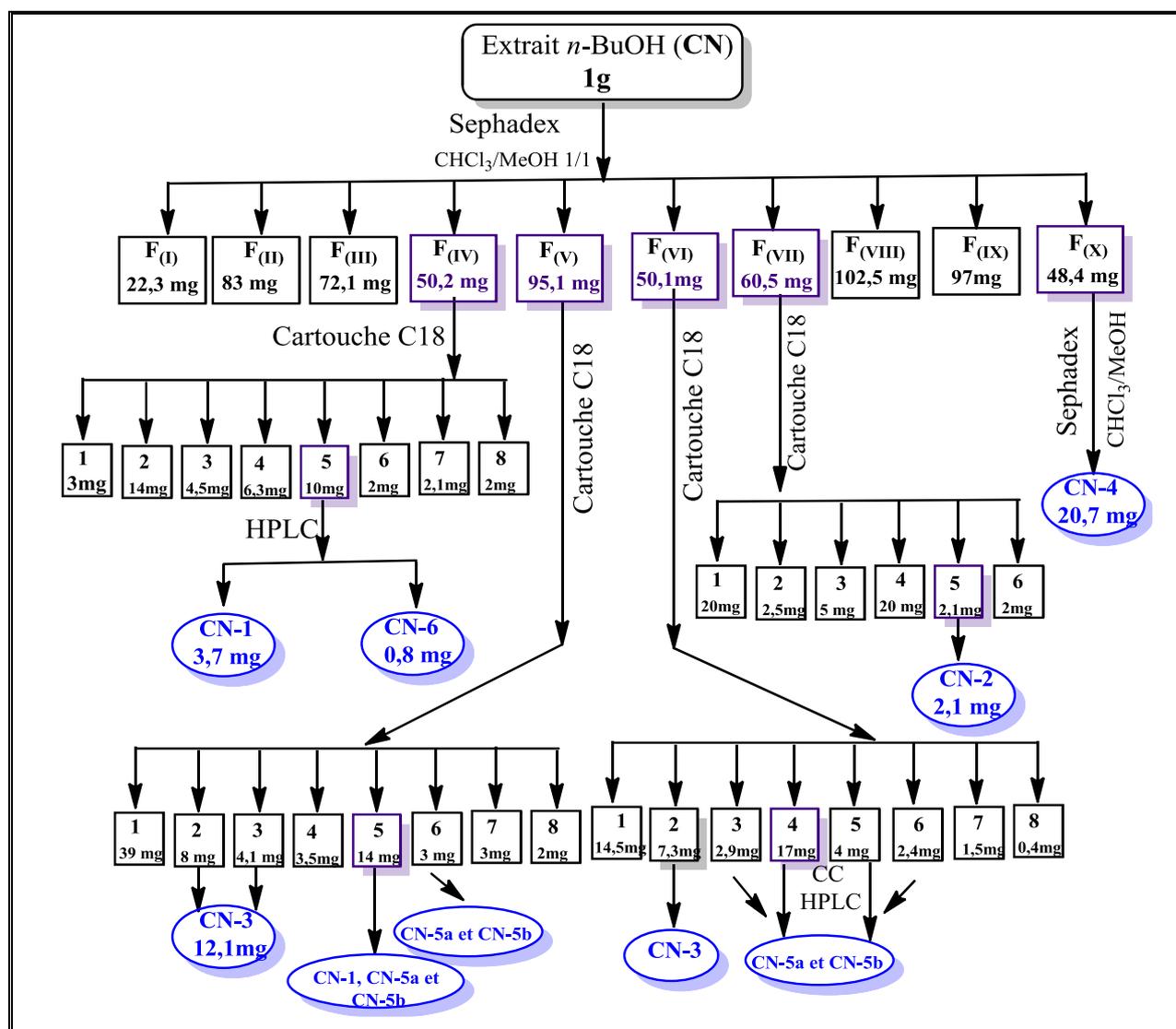


Figure III-1: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH de *Cymodocea nodosa*

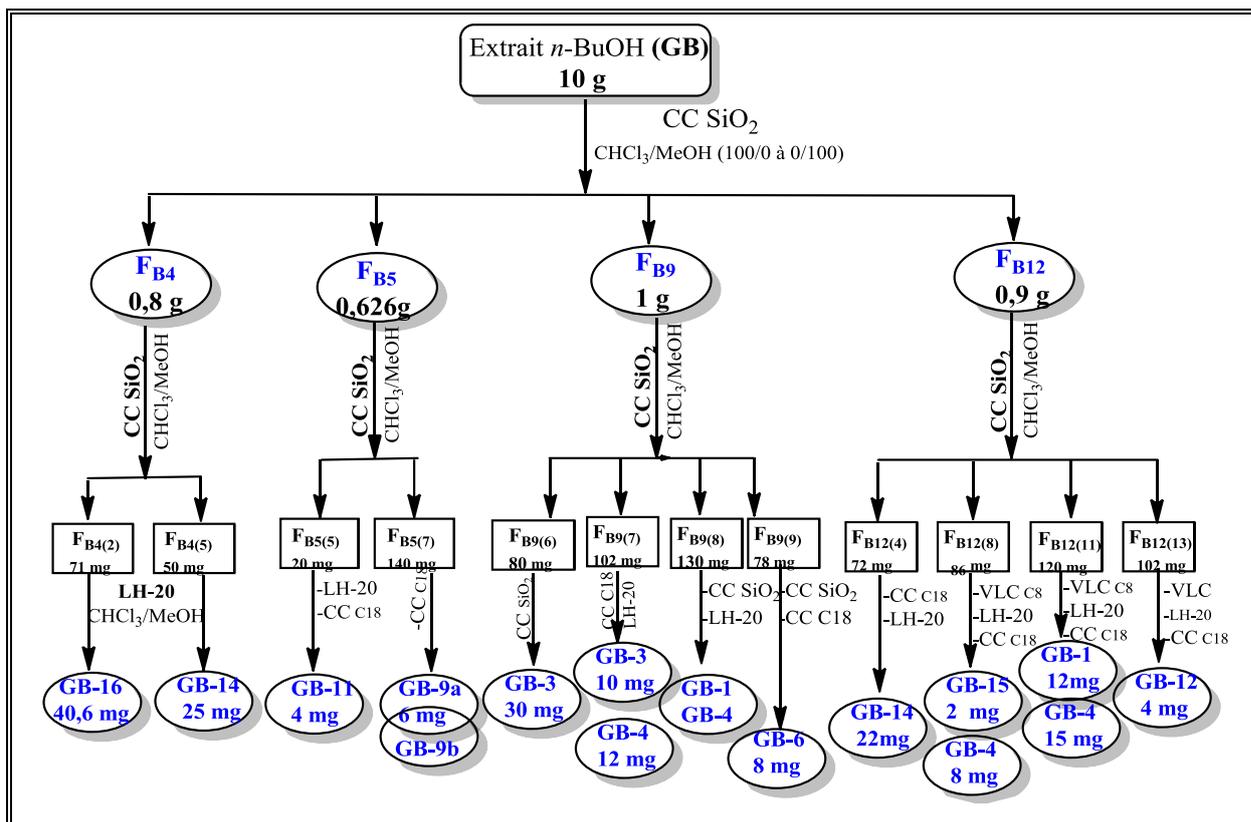


Figure III-2: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH de *Galium brunneum*

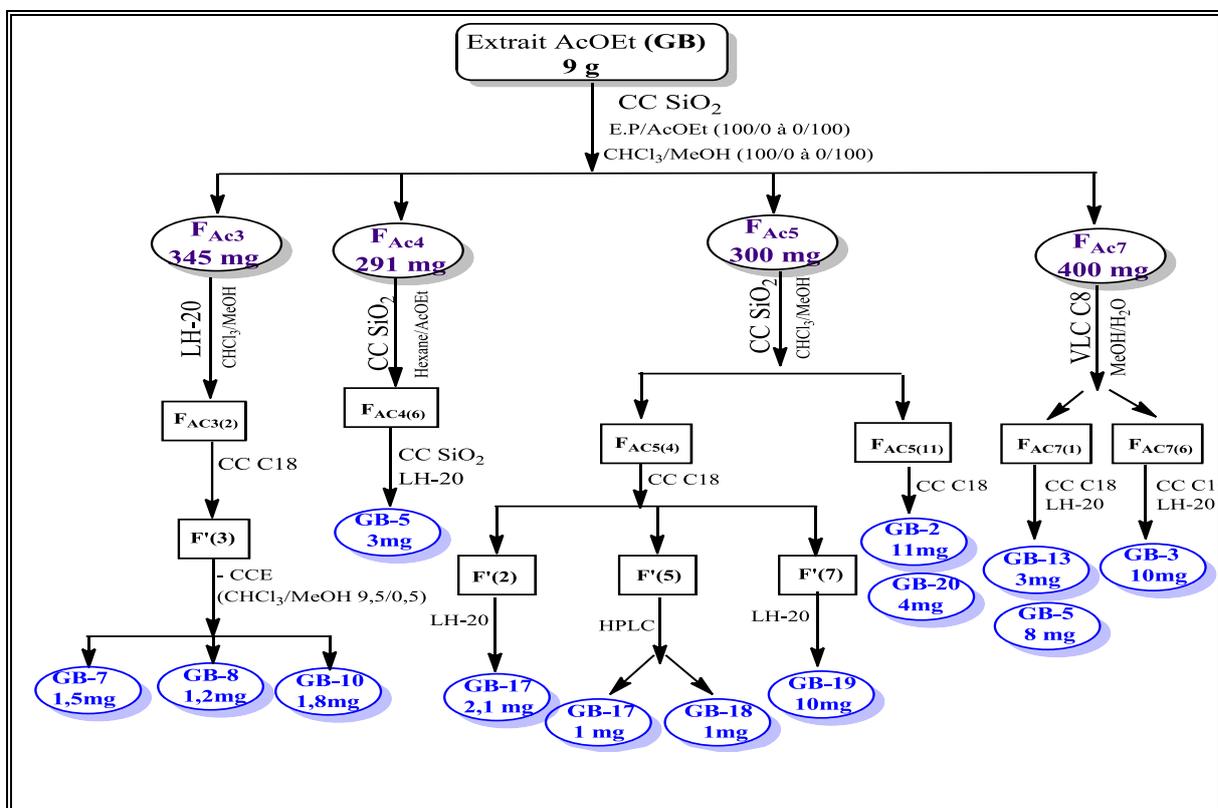


Figure III-3: Schéma de purification des produits de l'extrait AcOEt de *Galium brunneum*

Au total, sept composés ont été isolés de l'extrait butanolique de la plante marine *Cymodocea nodosa* (Figure III-4). De la plante terrestre *Galium brunneum*, vingt-un composés ont été isolés, dont onze composés proviennent de l'extrait butanolique et dix composés résultent de l'extrait acétate d'éthyle (Figure III-5).

L'élucidation structurale des composés isolés est basée sur les données spectroscopiques telles que: l'ultraviolet (UV), l'infra-rouge (IR), la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle et bidimensionnelle (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-ESI-MS) et le dichroïsme circulaire (CD) ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et par la comparaison avec les données de la littérature. L'application de la réaction de Moscher a permis d'établir la configuration absolue des centres chiraux pour certains composés isolés.

Pour faciliter les explications concernant la détermination structurale de ces composés, nous présenterons, successivement, l'identification des molécules de type polyphénolique (flavanone, flavonols, chalcones et lignanes) puis les terpènes (monoterpène, iridoides et saponines). On utilisera les symboles **CN** pour les composés isolés de la plante marine *Cymodocea nodosa* et le symbole **GB** pour les produits isolés de l'espèce terrestre *Galium brunneum*.

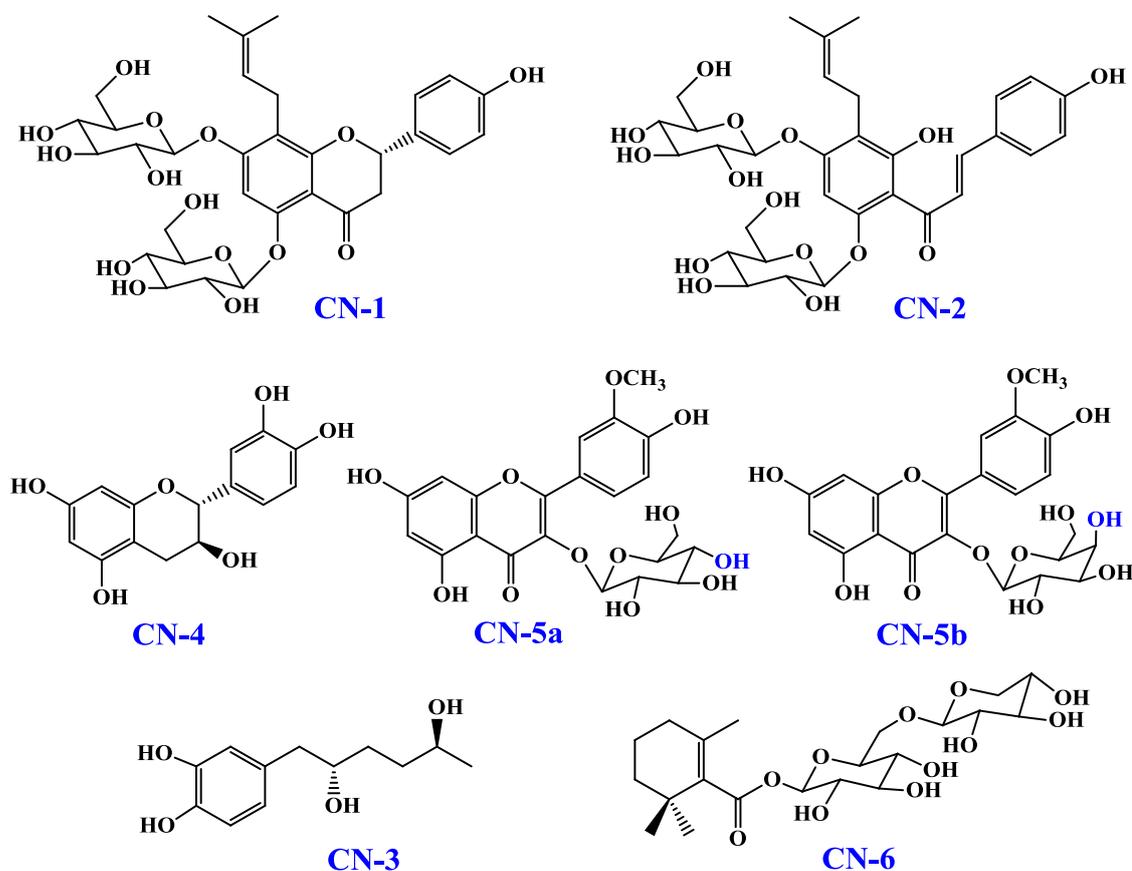


Figure III-4: Composés isolés à partir de l'espèce *Cymodocea nodosa*

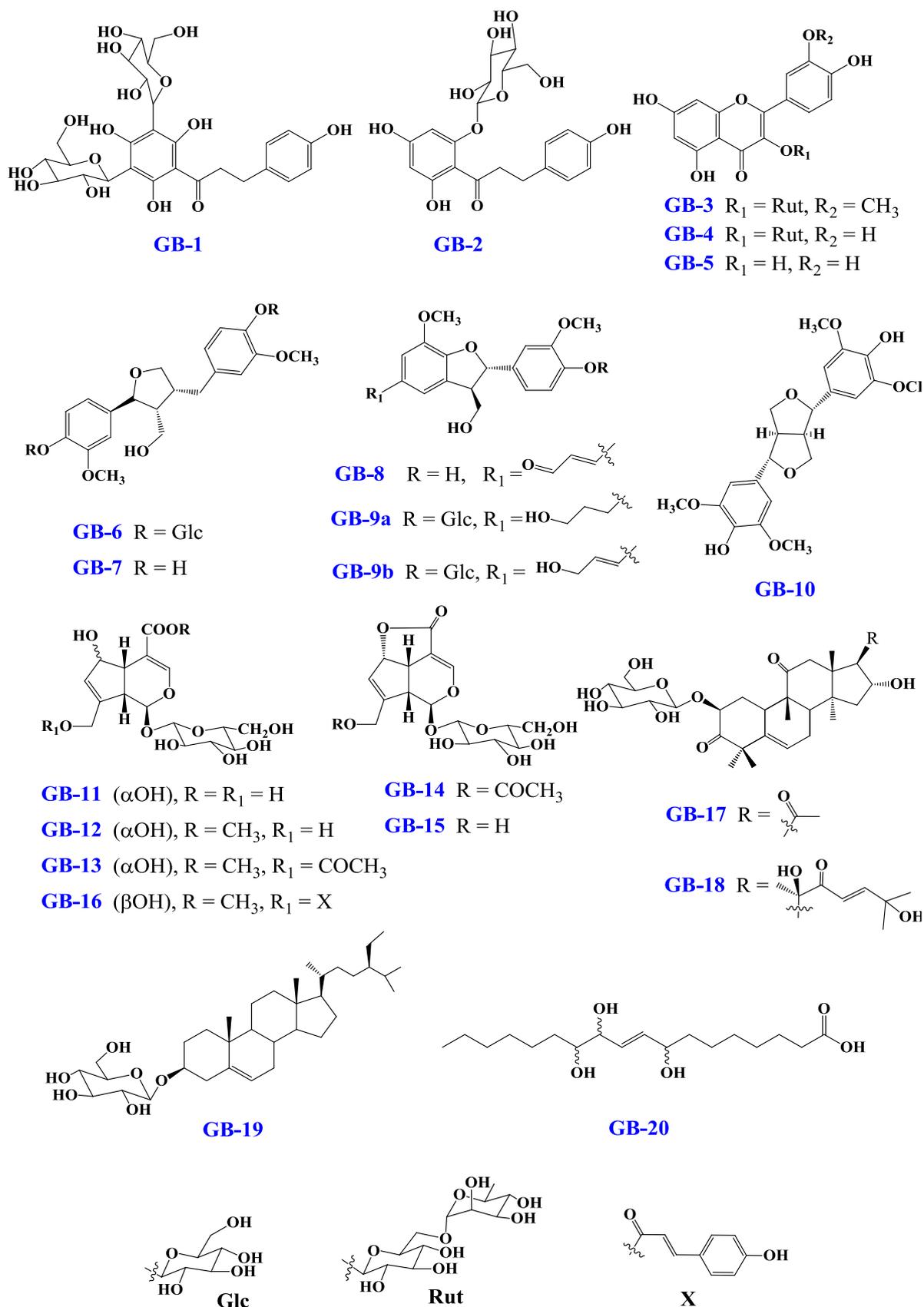
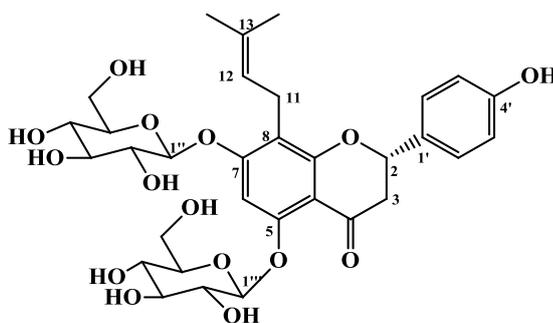


Figure III-5: Composés isolés à partir de l'espèce *Galium brunneum*

1. Détermination structurale des flavonoïdes

1.1. Composé CN-1

Le composé **CN-1** est une poudre jaune, isolé de l'extrait n-butanol et purifié par CLHP ($t_R = 9,4$ min, dans les conditions d'expérience). Il est visible sur la CCM à 254 nm et donne une tâche jaune après révélation par une solution de sulfate de cérium et chauffage.



Sur le spectre UV-Visible de ce composé enregistré dans le méthanol, les trois maxima d'absorption observés à 348,0, 283,0 et 225,0 nm sont caractéristiques d'un squelette flavonoïdique de type flavanone ou dihydroflavonol¹⁹⁷. La valeur 283,0 nm est typique d'une flavanone^{198,199,200}.

Son spectre IR montre des bandes d'absorption à 3405 cm^{-1} (hydroxyle), 1645 cm^{-1} (γ -pyrone, C-4) et à 1597 cm^{-1} (système aromatique).

Sur les spectres de masse en source ESI, enregistrés en modes positif et négatif (Figures III-6a et III-6b), deux pics d'ions pseudomoléculaires sont observés à $m/z = 687,194$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $m/z = 663,393$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 664 uma et une formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$. Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS (mode positif) (Figure III-6c) montre un pic à m/z 687,2260 (calc. 687,2265, $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{15}\text{Na}$), confirmant ainsi la formule chimique du composé **CN-1** avec un nombre d'insaturations égale à 13.

¹⁹⁷ Markham K. R., Techniques of flavonoid identification, Academic press, **1982**.

¹⁹⁸ Gomez-Garibay F., Quijano L., Rios T., Flavanones from *Tephrosia leiocarpa*, *Phytochemistry* 30, 3832-3834, **1991**.

¹⁹⁹ Li N., Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Li X., Yoshikawa M., New flavanone oligoglycosides, theaflavanosides i, ii, iii, and iv with hepatoprotective activity from the seeds of tea plant (*Camellia sinensis*), *Heterocycles* 71, 1193-1201, **2007**.

²⁰⁰ Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C., Flavonoid composition of *Citrus* Juices, *Molecules* 12, 1641-1673, **2007**.

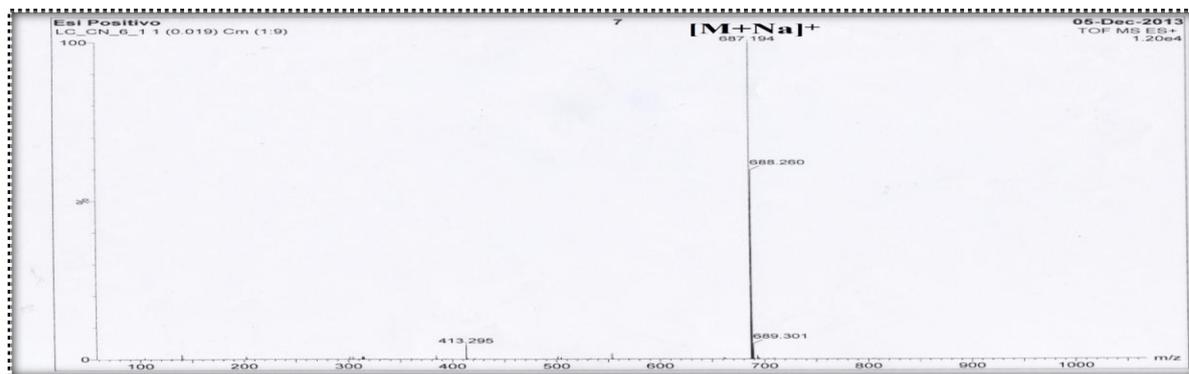


Figure III-6a: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé CN-1

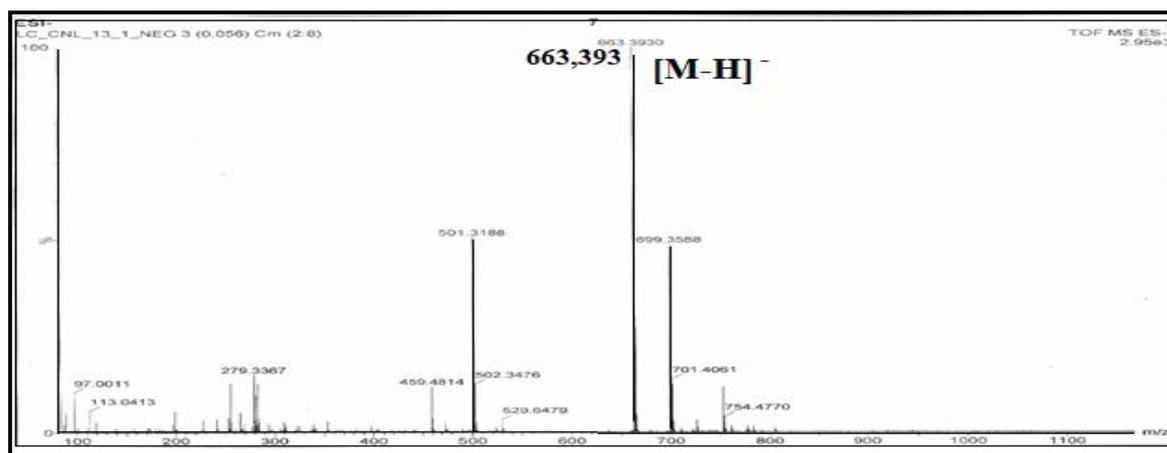


Figure III-6b: Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé CN-1

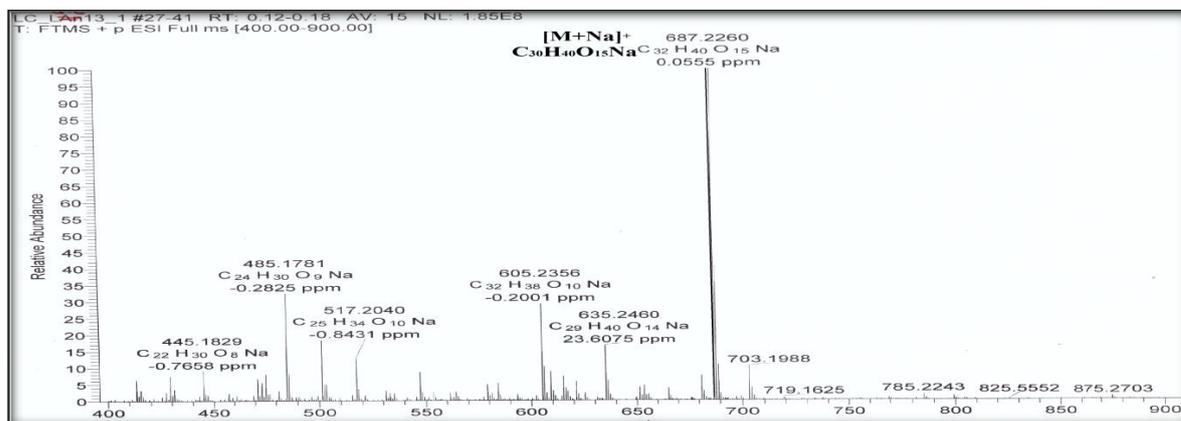


Figure III-6c: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé CN-1

Sur le spectre RMN ^1H du composé CN-1, enregistré dans $\text{MeOH-}d_4$ (Figure III-7), nous observons :

- Trois signaux des protons aromatiques.
- Une série de signaux entre 3,30 et 5,20 ppm, relatifs aux protons osidiques.
- Deux singulets typiques de deux méthyles vinyliques.

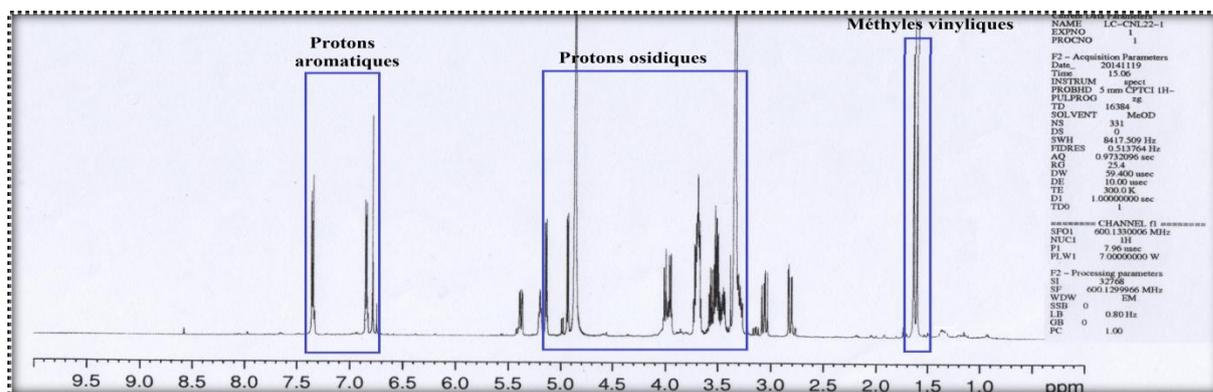


Figure III-7: Spectre RMN ^1H du composé CN-1

Parallèlement, le spectre RMN ^{13}C (Figure III-8), montre la présence des signaux des carbones aromatiques et osidiques. Les signaux à 98,3, 108,5, 114,5, 116,3, 129,0, 131,1, 159,0 159,6 162,5 et 162,8 ppm, sont typiques des atomes de carbones aromatiques. On observe aussi la présence de raies de résonances entre 62,9 et 104,5 ppm caractéristiques des carbones osidiques.

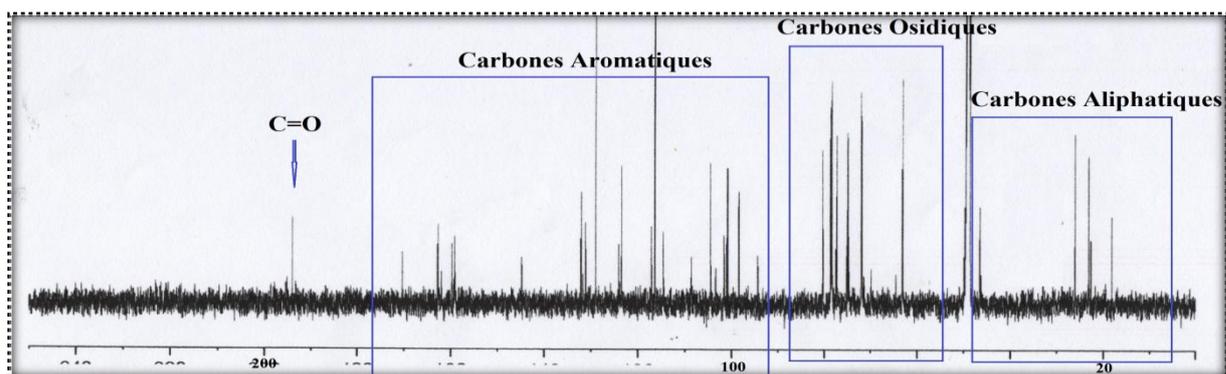


Figure III-8: Spectre RMN ^{13}C du composé CN-1

La présence de deux unités osidiques est supportée par l'analyse de spectre ESI-MS/MS enregistré en mode négatif (Figure III-6d). En effet, le spectre visualise deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 501,2538$ $[(\text{M}-\text{H})-162]^-$ et $m/z = 339,192$ $[(\text{M}-\text{H})-324]^-$ caractérisant la perte de deux unités osidiques (162 uma pour chacune).

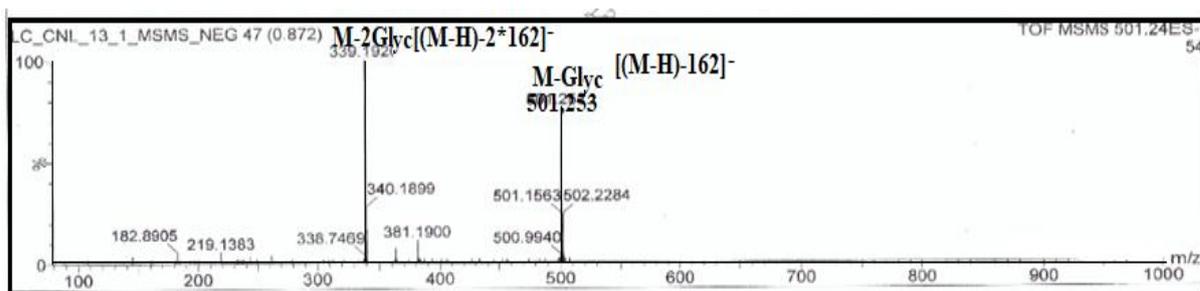


Figure III-6d: Spectre de masse ESI-MS/MS (mode négatif) du composé CN-1

On note, sur le spectre RMN ^{13}C (Figure III-8), la présence d'un signal à δ_{C} 194,0, assigné à une fonction cétone. La valeur déblindée de ce dernier renforce l'hypothèse d'une flavanone¹⁹⁷.

Cette première lecture spectroscopique des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et masse, nous oriente vers une structure de type flavanone glycosylée du composé CN-1.

1.1.1. Identification de la partie aglycone

Le spectre de corrélation homonucléaire COSY H-H (Figure III-9), permet d'identifier les signaux observés sur le spectre RMN ^1H . En effet, deux signaux appartenant à un système AA'BB' sous forme de doublet à δ_{H} 7,35 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) et 6,85 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) qui ne peuvent être positionnés que sur le cycle B de cette flavanone. Les deux protons H-2' et H-6' sont déblindés à δ_{H} 7,35, tandis que les protons H-3' et H-5' sont blindés à δ_{H} 6,85.

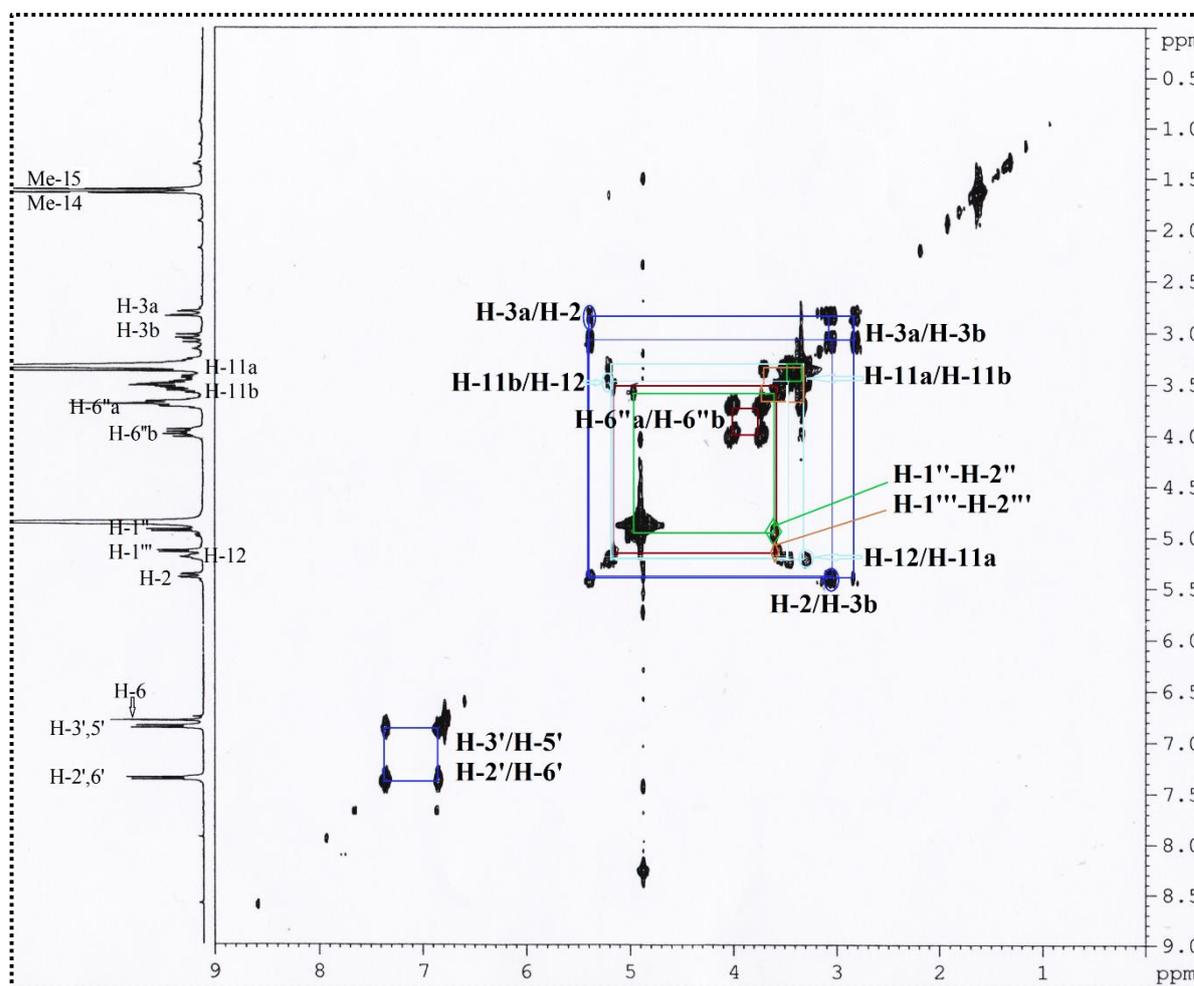


Figure III-9: Spectre COSY H-H du composé CN-1

A partir de ces protons déjà identifiés par RMN ^1H et COSY H-H, l'expérience HSQC (Figure III-10) permet de déterminer les déplacements chimiques de leurs carbones à δ_{C} 129,0 (C-2' et C-6') et à δ_{C} 116,3 pour C-3' et C-5'.

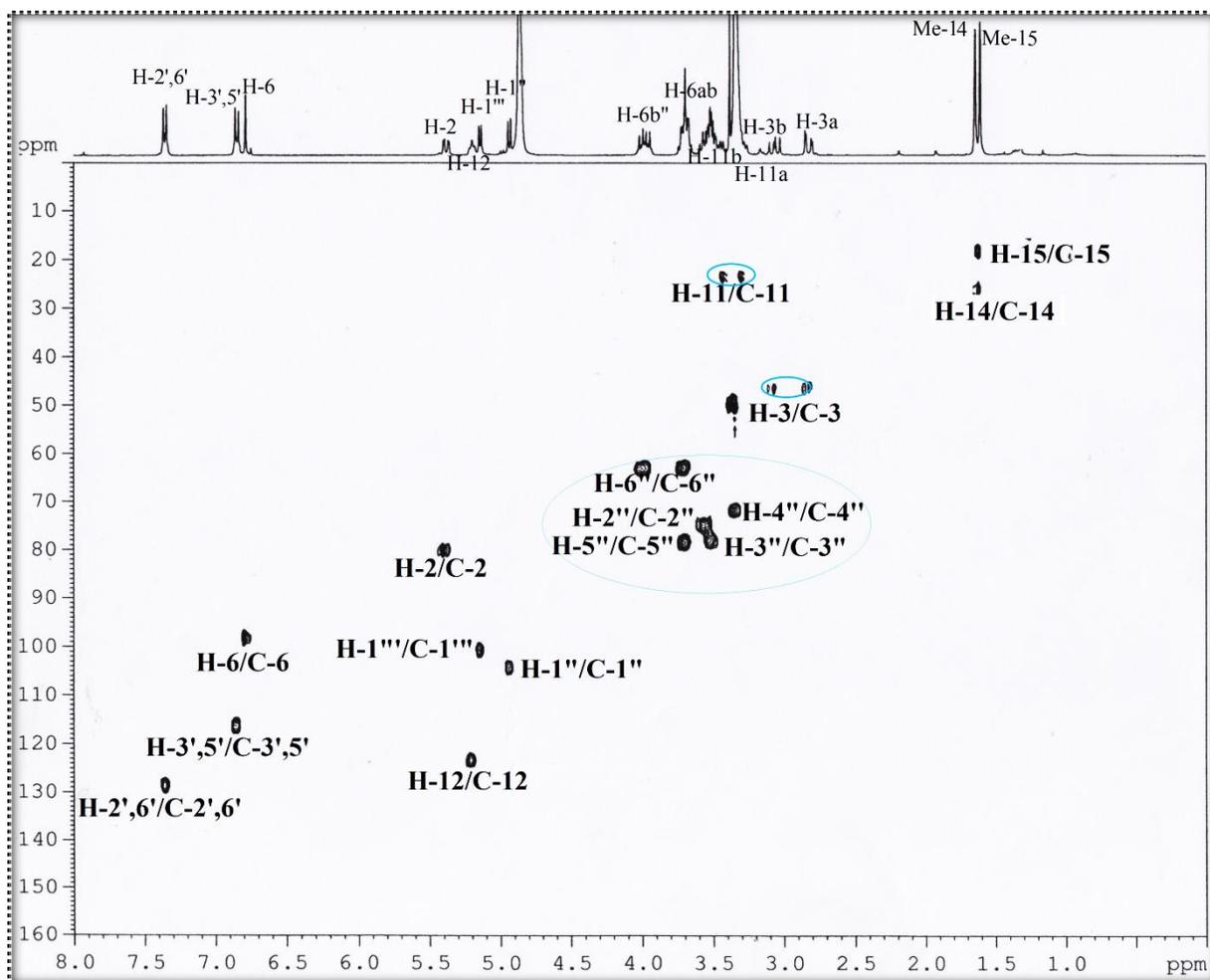


Figure III-10: Spectre HSQC du composé CN-1

L'expérience HMBC (Figures III-11 et III-11a) permet de repérer les carbones quaternaires C-1' et C-4' du cycle B comme suit:

- Le doublet à δ_H 6,85 (H-3'/H-5') présente une tâche de corrélation avec les deux carbones aromatiques quaternaires à δ_C 131,1 (C-1') et à δ_C 159,0 (C-4').
- Le deuxième doublet à δ_H 7,35 ppm (H-2'/H-6') présente une corrélation avec les mêmes carbones aromatiques C-1' et C-4' et avec un carbone oxygéné à 80,3 ppm.

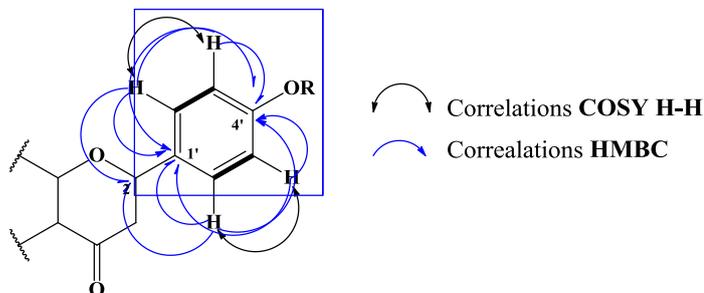


Figure III-11a: Corrélations COSY H-H et HMBC du cycle B du composé CN-1

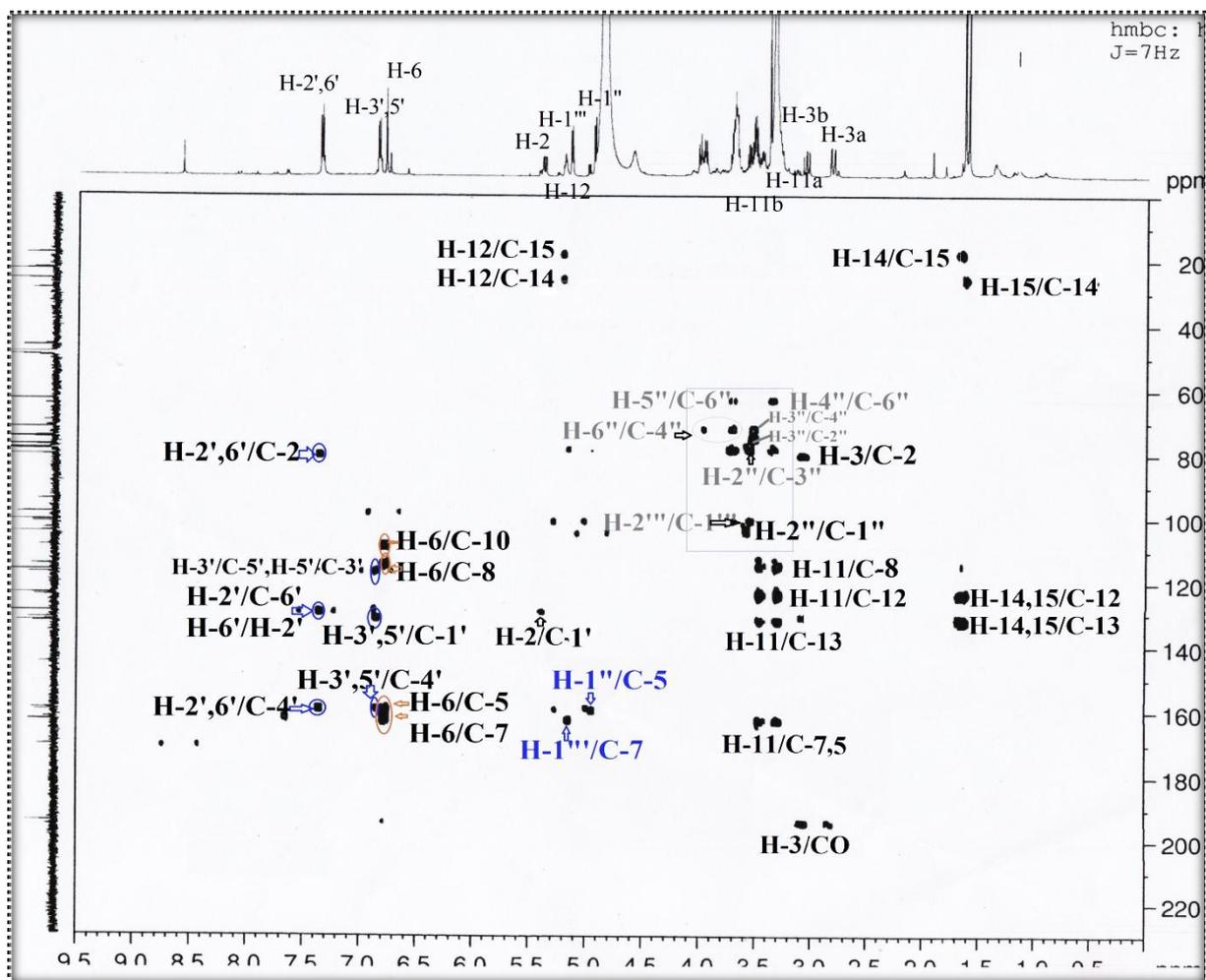


Figure III-11: Spectre HMBC du composé CN-1

Une analyse approfondie des spectres RMN ^1H et COSY H-H, décrit un système ABX de trois protons: un proton sous forme de doublet dédoublé dont le signal résonne à δ_{H} 5,38 (1H, *dd*, $J = 12,7; 2,9$ Hz), présente une corrélation sur le spectre COSY H-H avec deux protons non équivalents d'un groupement méthylène à δ_{H} 3,06 (1H, *dd*, $J = 17,0; 12,7$ Hz) et 2,82 (1H, *dd*, $J = 17,0; 2,9$ Hz). Ces signaux sont attribuables aux protons d'un motif dihydropyrone du cycle C d'une flavanone^{201,202} (Figure III-9a).

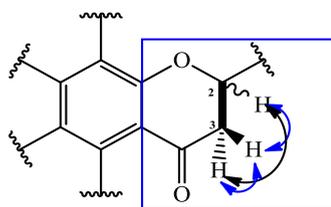


Figure III-9a: Corrélations COSY H-H du cycle C du composé CN-1

²⁰¹ Morikawa T., Wang L-B, Nakamura S., Ninomiya K., Yokoyama E., Matsuda H., Muraoka O., Wu L-J., Yoshikawa M., New flavanone and chalcone glycosides, Arenariumosides I, II, III, and IV, and tumor necrosis factor- α inhibitors from everlasting, flowers of *Helichrysum arenarium*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57, 361-367, 2009.

²⁰² Wang L-B., Hui-Yuan G., Morikawa T., Sun B-H., Huang J., Yoshikawa M., Wu L-J., Flavonones from *Helichrysum flos syn*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(5), 357-360, 2009.

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à courte distance ^1H - ^{13}C permet de fixer les carbones C-2 et C-3 du motif dihydropyrone à 80,3 et 46,4 ppm, respectivement. Cela est confirmé par l'observation de corrélations dans le spectre HMBC (Figures III-11 et III-11b) entre :

- Le carbone aromatique C-1' et le proton H-2, dont le carbone C-2 corrèle avec les protons aromatiques H-2' et H-6'.
- Les deux protons méthylènes CH_2 -3 et le carbonyle C-4.

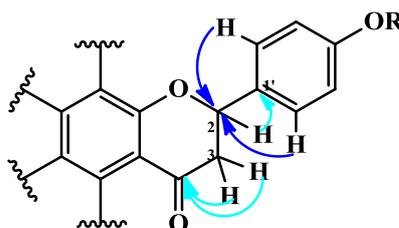


Figure III-11b: Corrélations HMBC des cycles B et C

A ce stade, tous les protons et les carbones de deux cycles B et C sont déterminés. Par conséquent, les carbones repérés à 98,3, 108,5, 114,5, 159,6, 162,5 et 162,8 ppm sont attribués aux carbones du cycle A.

L'analyse du reste du spectre RMN ^1H (Figure III-7a), permet de mettre en évidence la présence d'un signal aromatique à δ_{H} 6,78 sous forme d'un singulet s'intégrant pour un proton correspondant soit au proton H-6 ou au proton H-8 du cycle A. Son carbone résonne à δ_{C} 98,3 sur le spectre HSQC (Figure III-10).

Ces données spectroscopiques nous orientent vers une aglycone de type naringénine substituée, très répandue dans le règne végétal, en particulier. Notant que cette aglycone est détectée ici pour la 1^{ère} fois dans une espèce marine.

La nature de la substitution est déterminée par l'analyse approfondie des spectres RMN ^1H (Figure III-7a), RMN ^{13}C (Figure III-8b et III-8c) et 2D (HSQC, HMBC et NOESY). En effet, le signal sortant à δ_{H} 5,20 sous forme d'un triplet (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz) est attribué à un proton oléfinique. Le spectre COSY H-H (Figure III-9) montre la présence d'un couplage entre ce proton et les deux protons formant un système AB d'un groupement méthylène à δ_{H} 3,45 (1H, *m*) et à δ_{H} 3,29 (1H, *m*). Les deux singulets à δ_{H} 1,61 et à δ_{H} 1,64, intégrant chacun pour 3H, indiquent la présence de deux méthyles vinyliques.

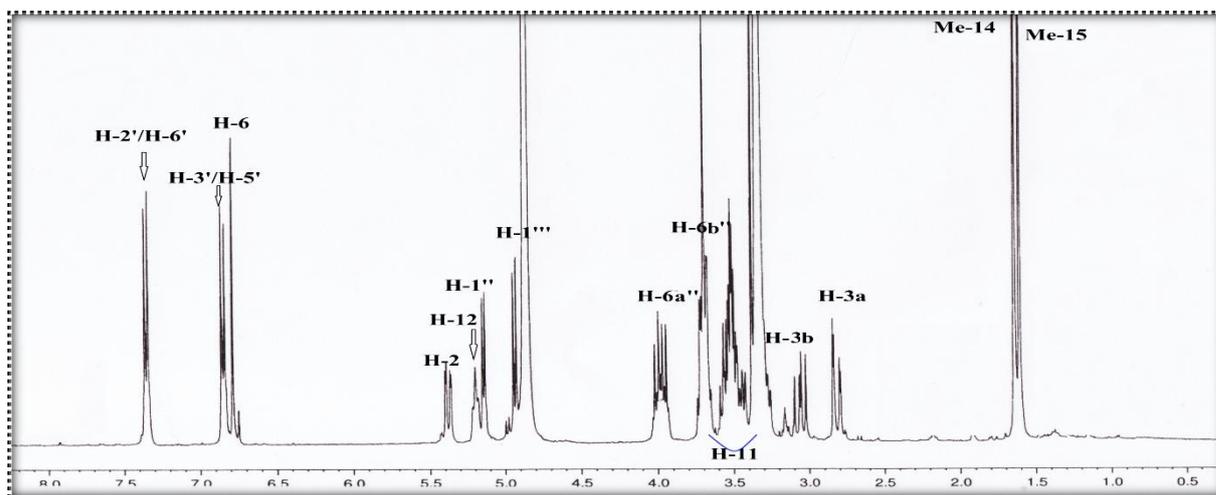


Figure III-7a: Spectre RMN ^1H du composé CN-1

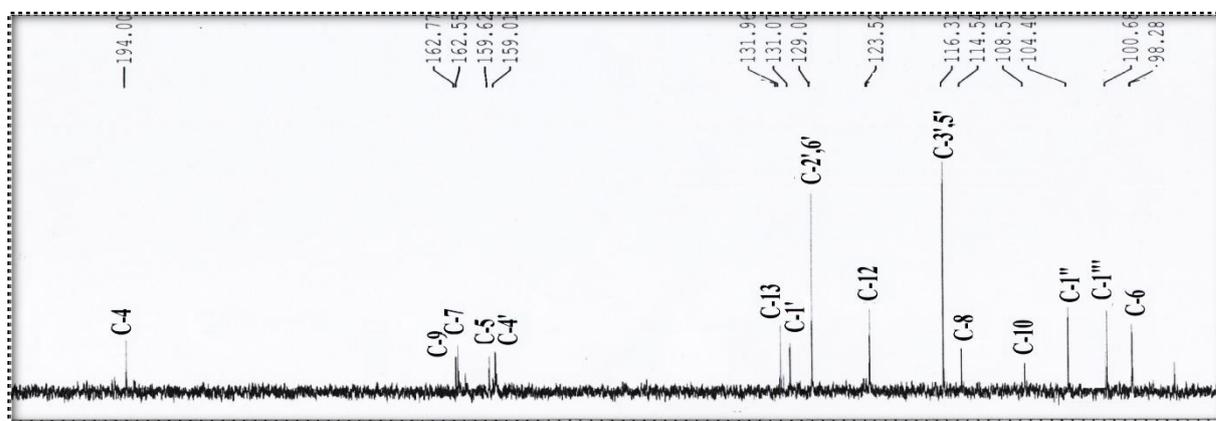


Figure III-8-a: Spectre ^{13}C du composé CN-1 (partie aromatique)

Tous les carbones correspondant aux protons oléfiniques, méthylènes et méthyles vinyliques, cités précédemment, résonnent à δ_{C} 123,5, 23,0, 18,1 et 25,9, respectivement, d'après le spectre HSQC (Figure III-10). L'ensemble de ces informations suggère la présence d'une unité prénylée (3-méthylbut-2-ène).

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-11) renforcent bien la présence de cette unité et permettent de visualiser tous les couplages $^2J_{\text{H-C}}$, $^3J_{\text{H-C}}$ et $^4J_{\text{H-C}}$ de cette unité comme suit:

- Les protons de méthyles vinyliques corréleront avec les signaux à δ_{C} 132,0, 123,5 et 23,0 correspondant aux carbones C-13 et C-12, respectivement.
- Les deux protons du groupement méthylène corréleront aussi avec les deux carbones oléfiniques C-13 et C-12.
- Le proton oléfinique H-12 corrélera avec les carbones de deux groupements méthyles.

Toujours au moyen de spectre HMBC, on observe que les protons du groupement méthylène corrélient avec les carbones suivants à δ_C 114,5, 162,5 et 162,8, ce qui suggère que cette unité prénylée est attachée au cycle A, et sa position est attribuée soit aux carbones C-6 ou C-8 (Figures III-11 et III-11c).

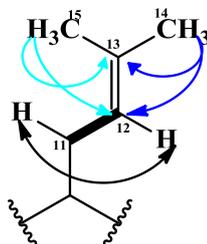


Figure III-11c: Corrélations COSY H-H et HMBC du groupement prényle du composé **CN-1**

1.1.2. Identification de la partie osidique

L'analyse de la partie osidique est débutée par l'examen des signaux observés dans l'intervalle 3,30 et 5,20 ppm sur le spectre RMN ^1H (Figure III-7a).

En effet, les deux signaux résonnant à δ_H 5,14 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz) et à δ_H 4,94 (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz), sont attribués aux protons anomériques de deux unités osidiques. Leurs carbones apparaissent à δ_C 100,7 et δ_C 104,4, respectivement, sur le spectre HSQC. La constante de couplage de ces deux protons ($J = 7,5$ Hz et $J = 7,7$ Hz) est significative d'une conformation β pour chaque unité. A partir de ces protons anomériques, le spectre COSY H-H (Figure III-9) permet d'identifier deux systèmes de spins presque identiques à sept protons. Leurs signaux résonnent respectivement à δ_H 3,57/3,56 (2H, *m*, H-2''/ H-2'''), δ_H 3,51 (2H, *m*, H-3''/ H-3'''), δ_H 3,33 (2H, *m*, H-4''/ H-4'''), δ_H 3,69 (2H, *m*, H-5''/ H-5'''), δ_H 3,69 (2H, *m*, H-6a''/ H-6a''') et δ_H 3,96 (2H, *m*, H-6b''/H-6b'''). Leurs carbones sont déterminés par l'expérience HSQC (Figure III-10) à δ_C 74,7 (C-2''), δ_C 77,2 (C-3''), δ_C 71,7 (C-4''), δ_C 78,3 (C-5''), δ_C 63,0 (C-6'') à δ_C 74,8 (C-2'''), δ_C 77,2 (C-3'''), δ_C 71,9 (C-4'''), δ_C 78,3 (C-5''') et δ_C 62,9 (C-6''').

Les déplacements chimiques de protons et carbones de ces deux unités osidiques, sont en faveur avec l'unité β -glucopyranosyle.

La connectivité de ces deux glucoses à la naringénine a été déduite par l'analyse du spectre HMBC (Figure III-11). En effet, deux tâches de corrélation sont observées, entre le premier proton anomère H-1'' à 4,94 ppm et le carbone quaternaire à 159,6 ppm, et le deuxième proton anomère H-1''' (δ_H 5,14) et le carbone résonant à 162,5 ppm, suggérant que les deux unités glucoses sont attachées au cycle A. Cette hypothèse est confirmée en enregistrant le spectre RMN ^1H du produit **CN-1** dans le DMSO- d_6 (Figure III-7b). En effet, le spectre montre un singulet large supplémentaire à δ_H 9,65, caractéristique de la présence

d'un groupement hydroxyle libre localisé sur le carbone 4' ²⁰³, ce qui confirme bien l'attachement de deux unités glucoses au cycle A.

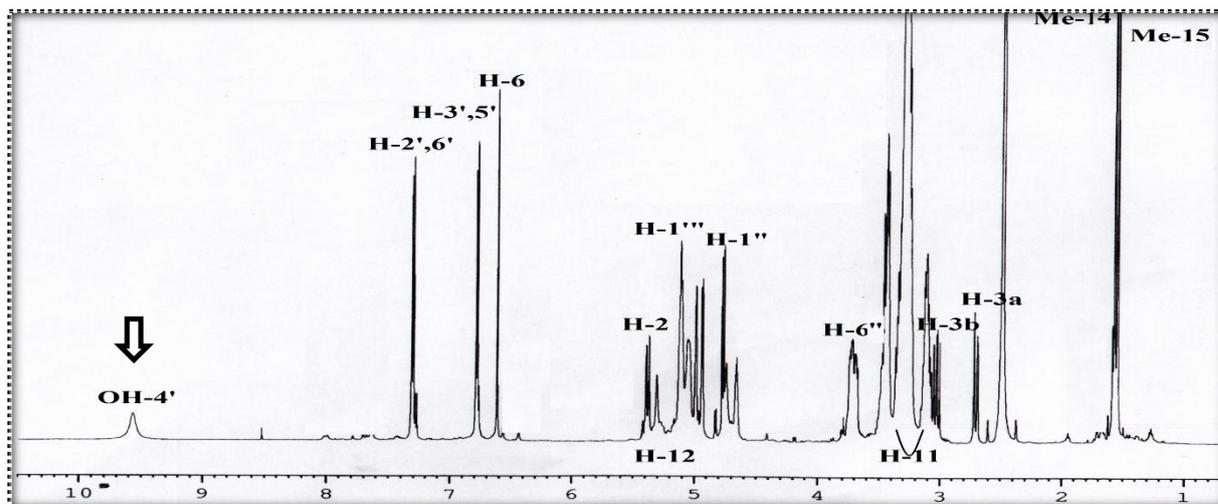
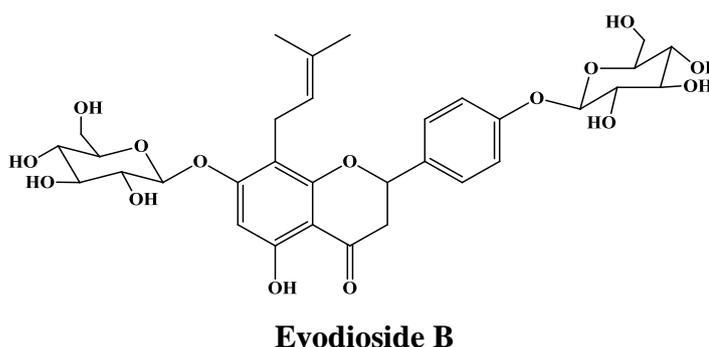


Figure III-7b: Spectre RMN ^1H du composé CN-1

A l'issue de cette analyse spectroscopique, le composé CN-1 est une naringénine substituée par un groupement prényle et deux unités β -glucopyranosydes. Une bibliographie exhaustive effectuée sur les flavanones prénylées trouvées dans les espèces terrestres, en particulier, l'evodioside B (8-prénylnaringénine 4',7-O- β -diglucopyranoside), isolé pour la 1^{ère} fois à partir de deux espèces *Evodia daniellii* et *Evodia rutacarpa* ^{204,205}, présente une grande ressemblance structurale avec le composé CN-1. Cependant, le déplacement chimique du proton du cycle A apparaissant à δ_{H} 6,78 sur le spectre RMN ^1H du composé CN-1 se trouve blindé à δ_{H} 6,27 pour l'evodioside B, cela laisse suggérer un environnement chimique différent du proton H-6 ou H-8 du composé CN-1.



²⁰³ Stevens J.F., Taylor A.W., Clawson J.E., Deinzer M.L., Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from Hops to Beer, *J. of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2421-2428, **1999**.

²⁰⁴ Arisawa M., Horiuchi T., Hayashi T., Tezuka Y., Kikuchi T., Morita N., Studies on Constituents of *Evodia rutacarpa* (Rutaceae). I. Constituents of the Leaves. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 41, 1472-1474, **1993**.

²⁰⁵ Yoo S.W., Kim J.S., Kang S.S., Son K.H., Chang H.W., Kim H.P., Bae B., Lee C-O., Constituents of the Fruits and Leaves of *Euodia daniellii*, *Archives of Pharmacal Research* 25(6), 824-830, **2002**.

Les données RMN précédentes permettent de proposer deux structures possibles pour le composé **CN-1** (Figure III-12), l'une de ces deux devra être confirmée par RMN-bidimensionnelle NOESY et HMBC.

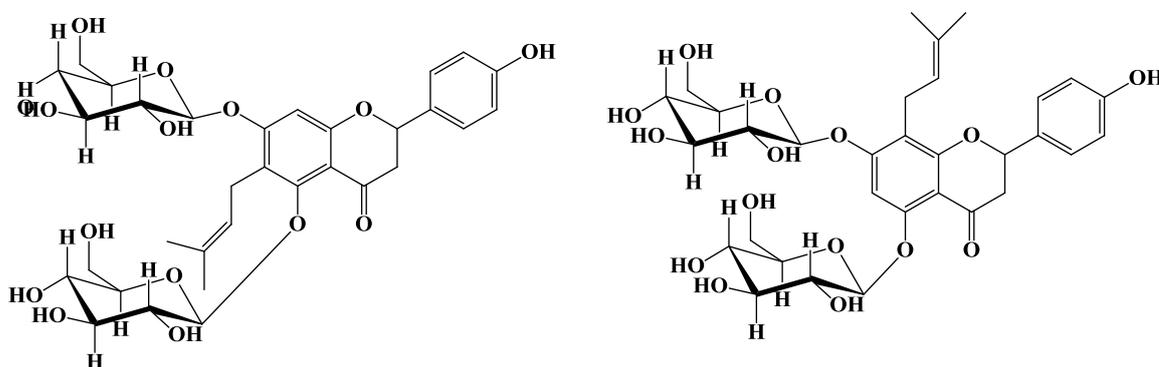


Figure III-12: Structures proposées du composé **CN-1**

La situation est éclaircie en analysant, soigneusement, le spectre HMBC (Figures III-11 et III-11d). En effet, le signal du proton en question à δ_H 6,78 présente deux corrélations avec les deux carbones quaternaires à δ_C 159,6 et δ_C 162,5, qui sont joints directement aux deux unités osidiques (Glc-1 et Glc-2). Ces carbones quaternaires sont respectivement C-5 et C-7, et par conséquent, le proton en question est en position C-6 de la naringénine.

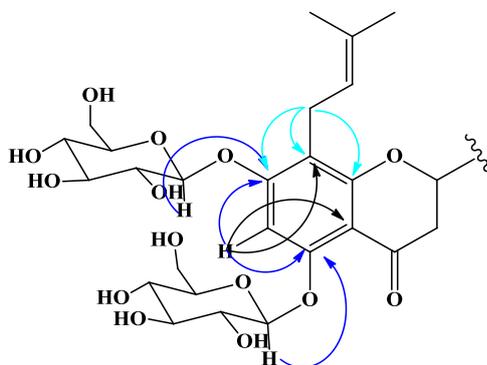


Figure III-11d: Corrélations HMBC de la partie osidique et du cycle A du composé **CN-1**

Le spectre de corrélation homonucléaire NOESY (Figures III-13 et III-13a) confirme le point d'attachement de l'unité prénylée au cycle A à travers la corrélation observée entre le proton H-6 et les deux protons anomériques H-1'' et H-1'''. Le groupement prényle est donc fixé sans doute en position C-8 du cycle A.

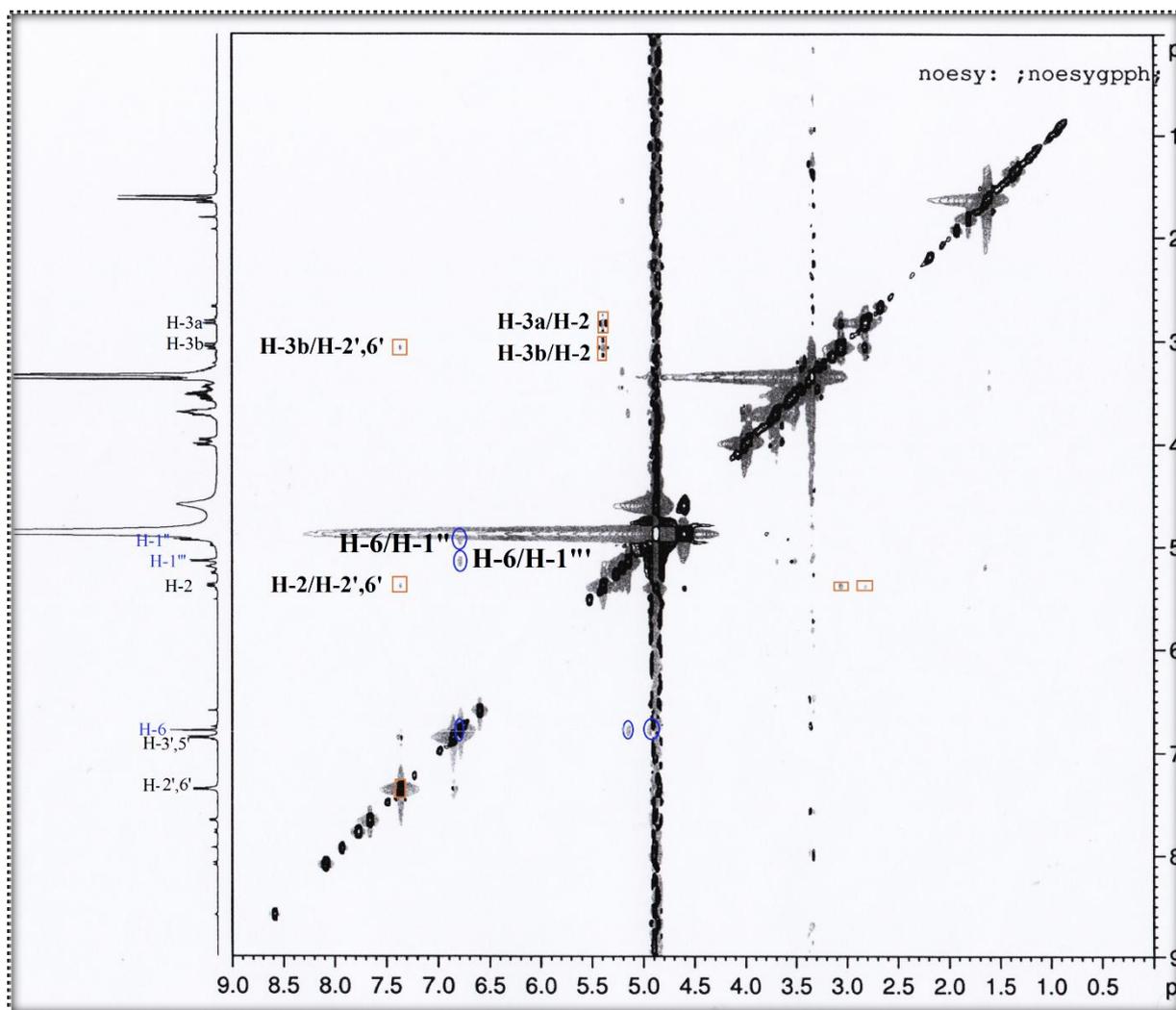


Figure III-13: Spectre NOESY du composé CN-1

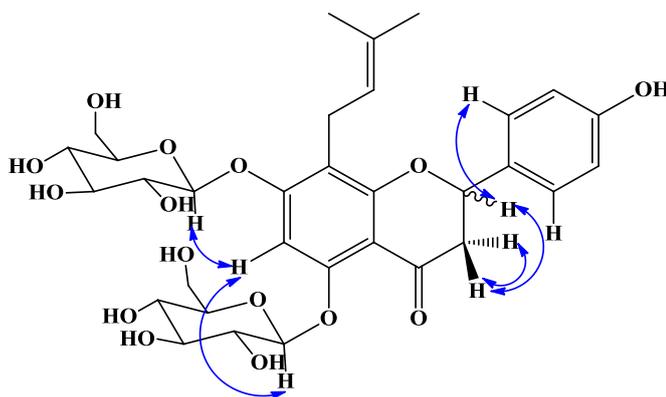
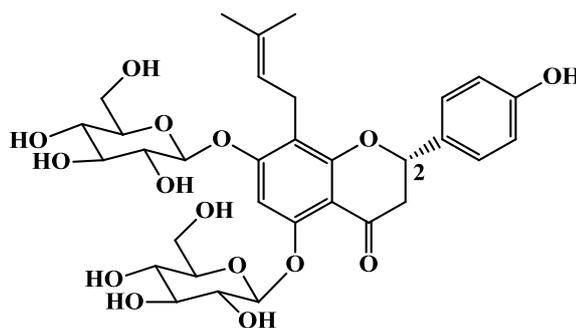


Figure III-13a: Corrélations NOESY du composé CN-1

L'ensemble de toutes les données précédentes nous a permis ainsi d'établir la structure du composé **CN-1** comme étant la 8-prénylnaringénine 5,7- β -*O*-D-diglycopyranoside, nommé cymodioside A, un composé naturel nouveau.

1.1.3. La stéréochimie absolue du carbone C-2



La biosynthèse de nombreux flavonoïdes procède par la conversion enzymatique de la tétrahydroxychalcone en une flavanone, (2*S*)-naringénine, par l'action de la chalcone isomérase (CHI). Cette isomérisation se produit également d'une façon non enzymatique pour donner un mélange de deux énantiomères (2*R*) et (2*S*).

La stéréochimie absolue du carbone C-2 du cycle C peut être déterminée également par plusieurs techniques. Le dichroïsme circulaire (CD) est la plus utilisée. D'après les travaux de Gaffield et collaborateurs^{206,207}, on peut connaître la configuration absolue de l'hétérocycle C d'un flavonoïde (flavanone ou 3-hydroxyflavanone) par les spectres de dichroïsme circulaire (CD). Les spectres obtenus représentent le CD molaire ($\Delta\epsilon$), comme une fonction de la longueur d'onde. Leurs positions sur le spectre dépendent du type de transition électronique impliquée dans l'effet ($n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$).

Gaffield et collaborateurs^{206,207} ont énoncé les règles suivantes pour les flavanones:

- Les flavanones de configuration 2*S* dont tous les substituants sont en position équatoriale, montrent un effet Cotton positif dû à la transition $n \rightarrow \pi^*$ (~330 nm) et un effet Cotton négatif dans la région $\pi \rightarrow \pi^*$ (~280-290 nm).
- Les flavanones glycosylées possédant des aglycones chiraux montrent des effets Cotton similaires à leurs aglycones optiquement actifs, alors que les flavanones glycosylées ayant des aglycones racémiques ne montrent que des effets Cotton faibles à 250-350 nm.
- L'effet Cotton $\pi \rightarrow \pi^*$ est plus approprié pour déterminer la chiralité de l'aglycone.

Le spectre CD enregistré dans le méthanol (Figure III-14) du composé **CN-1** montre des effets Cotton positifs et négatifs dans les régions $n \rightarrow \pi^*$ (~ 330 nm) et $\pi \rightarrow \pi^*$ (~ 280-290 nm),

²⁰⁶ William G., Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides, Determination of aglycone chirality in flavanone glycosides, *Tetrahedron* 26, 4093-4101, **1970**.

²⁰⁷ William G., Lundin Robert E., Gentili B., Horowitz Robert M., C-2 Stereochemistry of naringin and its relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit, *Big organic Chemistry* 4, 259-269, **1975**.

respectivement, avec des amplitudes d'absorption considérablement réduites comparaison à des dérivés de 2*S*-naringénine, optiquement purs.

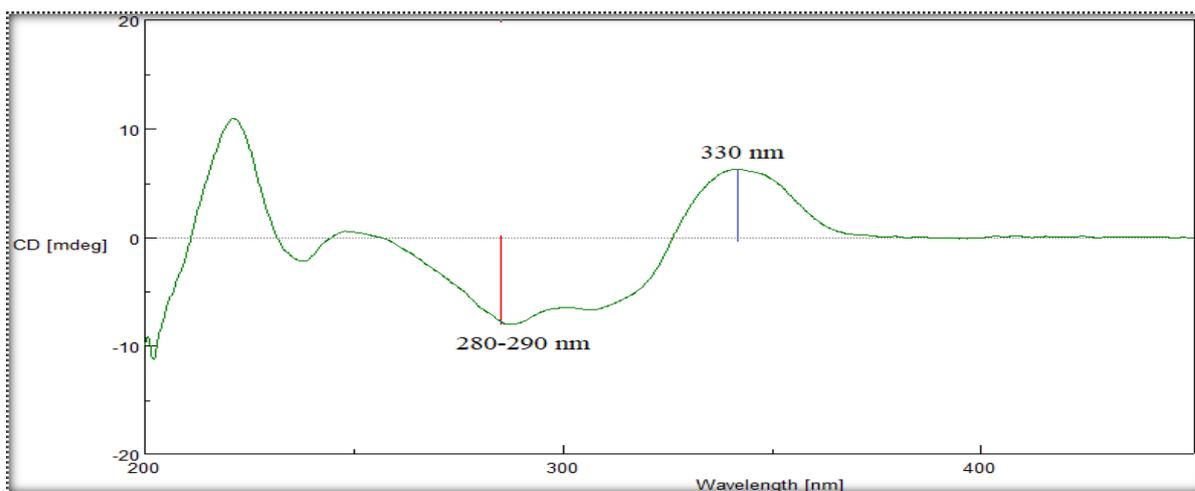


Figure III-14 : Spectre CD du composé CN-1

Une isomérisation spontanée du composé CN-1 avec la chalcone correspondante (CN-2) pourra expliquer l'allure de spectre CD du composé CN-1. En effet, le composé CN-1 subit une ouverture dans les solvants deutérés pendant les analyses spectroscopiques, la cyclisation de la chalcone peut redonner le composé CN-1 d'une façon non stéréospécifique, on obtient donc les deux stéréoisomères 2*S* et 2*R* avec une prédominance du stéréoisomère 2*S*.

Ce phénomène d'isomérisation a été observé, également lors de la purification du composé CN-1 par CLHP. En effet, le chromatogramme (Figure III-15) montre deux pics adjacents avec des temps de rétention très proches et une intensité très réduite pour le 2^{ème} pic ($t_{R1} = 9,4$ pour CN-1 et $t_{R2} = 9,6$ pour CN-1').

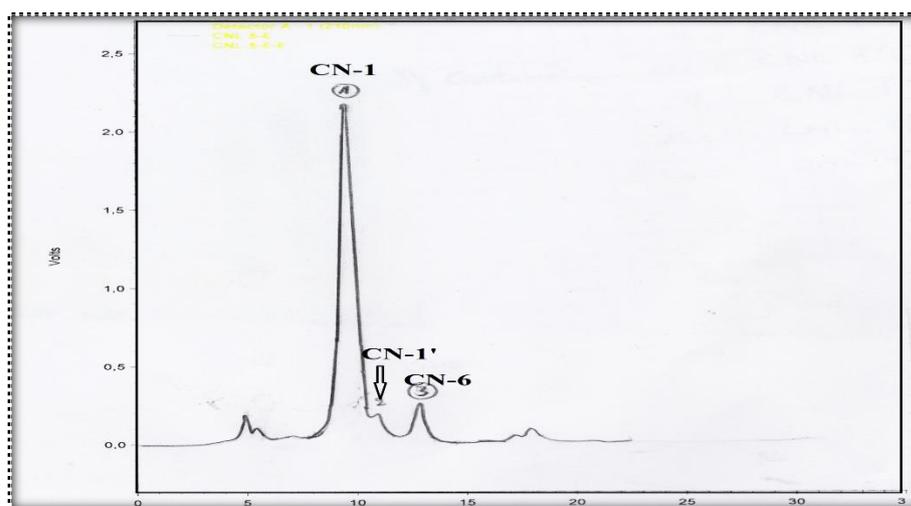


Figure III-15 : Chromatogramme des composés CN-1 et CN-1'

Le spectre RMN ^1H (Figure III-16) du 2^{ème} pic (composé **CN-1'**) est identique avec celui du composé **CN-1**. Cependant, une légère différence du niveau des déplacements chimiques des protons H-2 (δ_{H} 5,41, *dd*, $J = 12,3; 2,9$ Hz), H-3_a (δ_{H} 2,78, *dd*, $J = 16,6; 2,9$ Hz) et H-3_b (δ_{H} 3,14, *dd*, $J = 11,9; 16,6$ Hz) est observés ce qui explique effectivement la présence des deux stéréoisomères en quantité non équivalente (le **CN-1** (2*S*) prédominant).

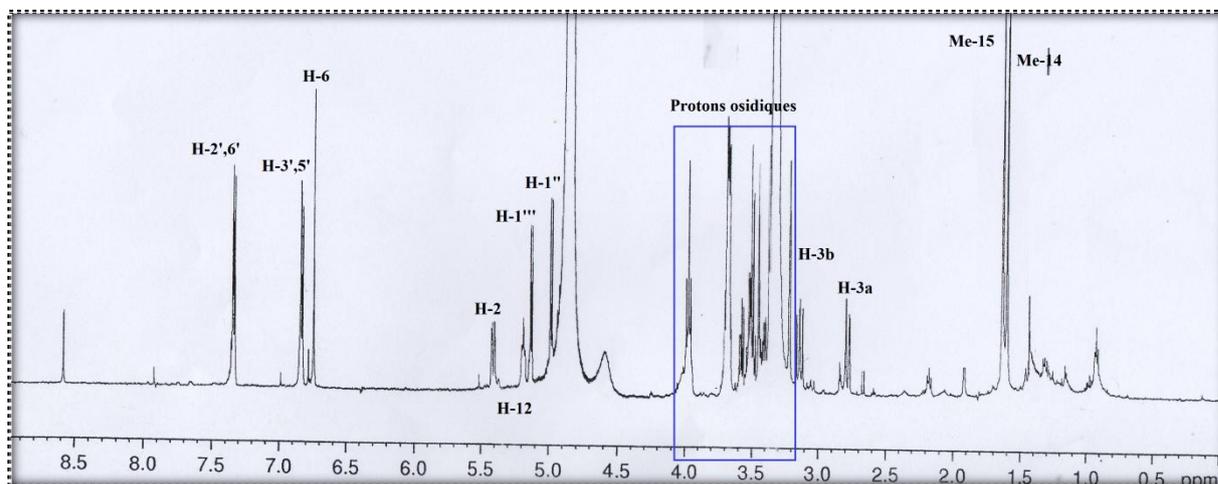
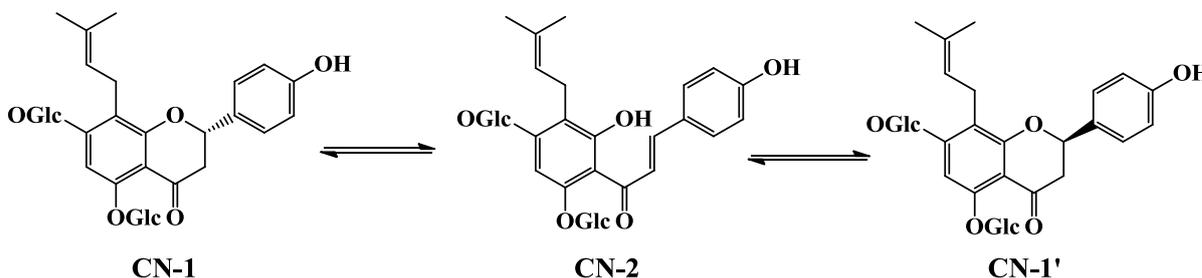


Figure III-16: Spectre RMN ^1H du composé **CN-1'**



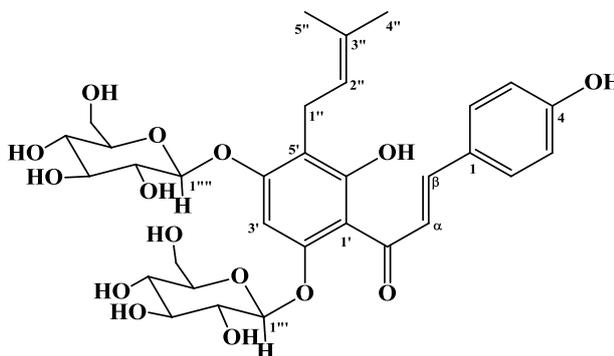
Tous les déplacements chimiques du composé **CN-1** sont rassemblés dans le tableau suivant:

Tableau III-1: les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **CN-1**

Position	δ_{H} <i>m</i> (J en Hz)	δ_{C}
Aglycone		
1	-	-
2	5,38 <i>dd</i> (12,7; 2,9)	80,3
3	3,06 <i>dd</i> (12,7; 17,0)	46,4
	2,82 <i>dd</i> (17,0; 2,9)	
4	-	194,0
5	-	159,6
6	6,78 <i>s</i>	98,3
7	-	162,5
8	-	114,5
9	-	162,8
10	-	108,5
11	3,45 <i>m</i>	23,0
	3,29 <i>m</i>	

12	5,20 app <i>t</i> (7,2)	123,5
13	-	132,0
14	1,64 <i>s</i>	25,9
15	1,61 <i>s</i>	18,1
1'	-	131,1
2', 6'	7,35 <i>d</i> (8,5)	129,0
3', 5'	6,85 <i>d</i> (8,5)	116,3
4'	-	159,0
Glucoses	4,94 <i>d</i> (7,7)	104,4
1''	3,57 <i>m</i>	74,7
2''	3,51 <i>m</i>	77,2
3''	3,33 <i>m</i>	71,7
4''	3,69 <i>m</i>	78,3
5''	3,96 <i>m</i>	63,0
6''	3,69 <i>m</i>	
1'''	5,14 <i>d</i> (7,5)	100,7
2'''	3,56 <i>m</i>	74,8
3'''	3,51 <i>m</i>	77,2
4'''	3,33 <i>m</i>	71,9
5'''	3,69 <i>m</i>	78,3
6'''	3,96 <i>m</i>	63,0
	3,69 <i>m</i>	

1.2 Composé CN-2



Ce composé a été isolé sous forme d'une poudre jaunâtre, visible sous la lumière UV à 254 nm et donne une tache jaune sur la CCM après révélation par une solution de sulfate de cérium et chauffage.

Le spectre de masse ESI (Figure III-17), en mode positif, est identique à celui du composé CN-1. On observe un pic de masse à $m/z = 687,245 [M+Na]^+$, en accord avec la formule brute en $C_{32}H_{40}O_{15}$, et une masse molaire de 664 uma, soit un nombre d'insaturations 13.

Ces données sont confirmées par le spectre de masse réalisé à haute résolution HR-ESI-MS en mode positif à $m/z 687,2258 [M+Na]^+$ (calc. 687,2265, $C_{32}H_{40}O_{15}Na$).

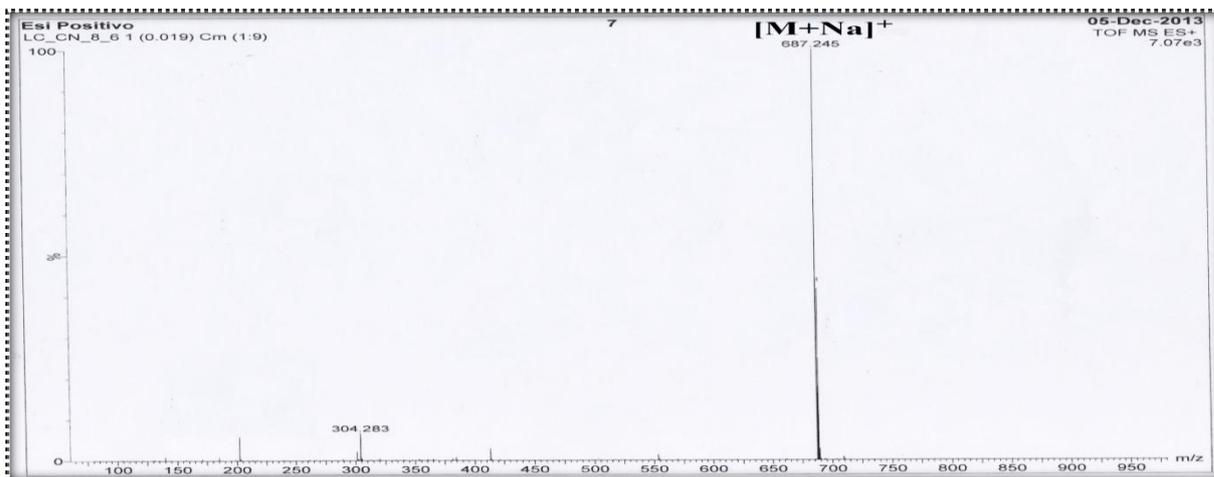


Figure III-17: Spectre de masse du composé CN-2

Les données de la spectroscopie UV-Visible de ce composé sont en accord avec le caractère d'une chalcone par la présence de deux bandes d'absorption à 369 nm (bande large), et une bande à 285 nm¹⁹⁷.

Le spectre RMN ¹H enregistré dans MeOH-*d*₄ (Figure III-18), présente des similitudes des signaux en comparaison avec le composé CN-1, au niveau de la présence du groupement prényle, des protons aromatiques des cycles A et B et de la partie osidique, avec cependant, deux différences majeures :

- L'absence de signaux correspondant au système ABX du motif dihydropyrone de la naringénine.
- L'apparition de deux signaux à δ_H 7,76 (1H, *d*, *J* = 16,0 Hz) et 8,08 (1H, *d*, *J* = 16,0 Hz), correspondent aux deux protons oléfiniques.

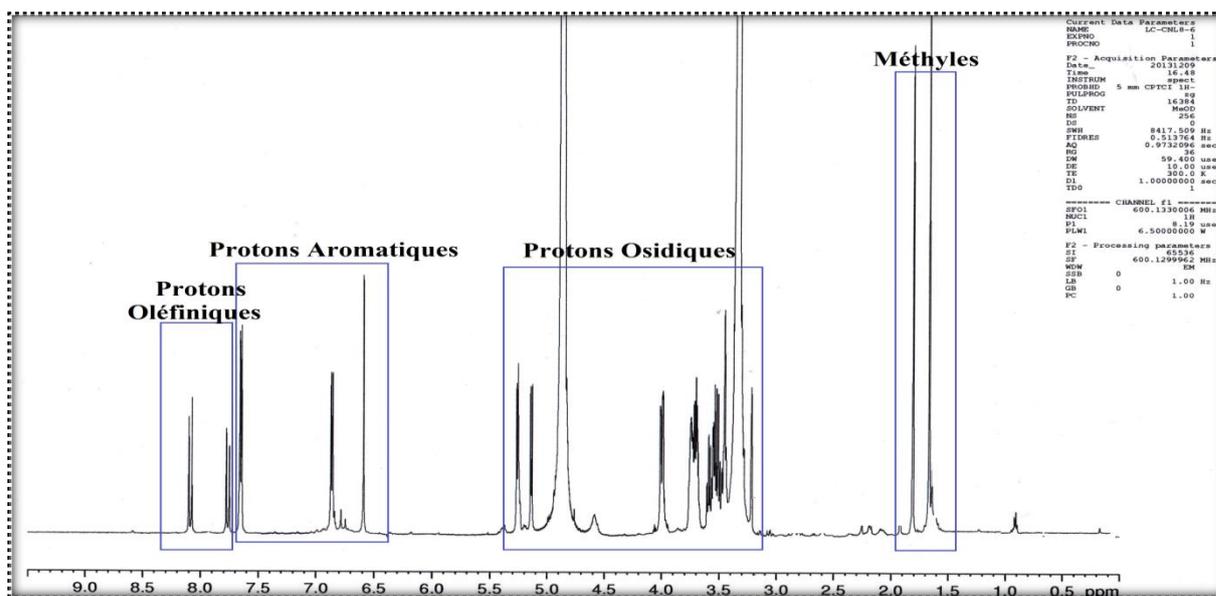


Figure III-18: Spectre RMN ¹H du composé CN-2

Cette analyse est confirmée aussi par le spectre du RMN ^{13}C (Figure III-19) du composé CN-2, où on note la disparition des signaux attribuables aux carbones C-2 et C-3 de la partie dihydropyrone et l'apparition de deux carbones oléfiniques à 125,6 et 144,8 ppm. Ces premières observations laissent supposer que l'unité $-\text{CH}-\text{CH}_2-$ du motif dihydropyrone est remplacée par une double liaison $-\text{CH}=\text{CH}-$. Nous sommes, donc, en présence d'une forme ouverte de la naringénine, qui ne peut être que la forme chalcone.

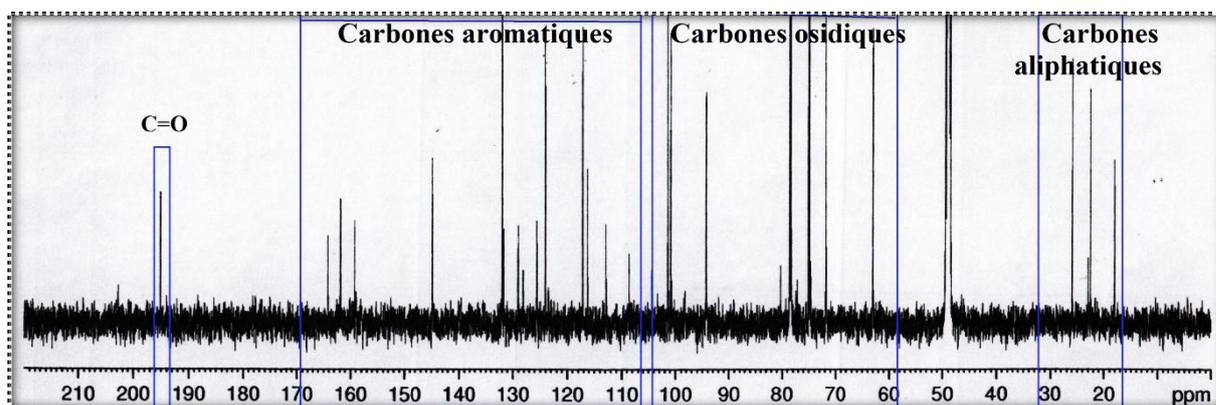


Figure III-19: Spectre RMN ^{13}C du composé CN-2

1.2.1. Identification de la partie aglycone

Le spectre RMN ^1H (Figure 18) combiné avec ceux du COSY H-H et HSQC (Figures III-20 et III-21) confirme bien cette hypothèse.

Le spectre COSY H-H (Figures III-20 et III-20a) montre que le premier proton oléfinique à δ_{H} 8,08 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz, H- α) présente une tâche de corrélation avec le deuxième proton oléfinique à δ_{H} 7,76 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz, H- β). La grande valeur de la constante de couplage entre ces deux protons oléfiniques qui est de 16,0 Hz, indique une configuration *trans*.

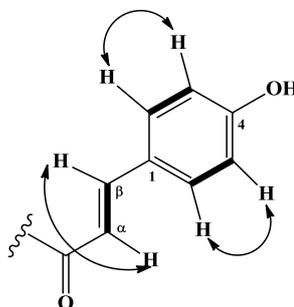


Figure III-20a: Corrélations COSY H-H de la partie génine du composé CN-2

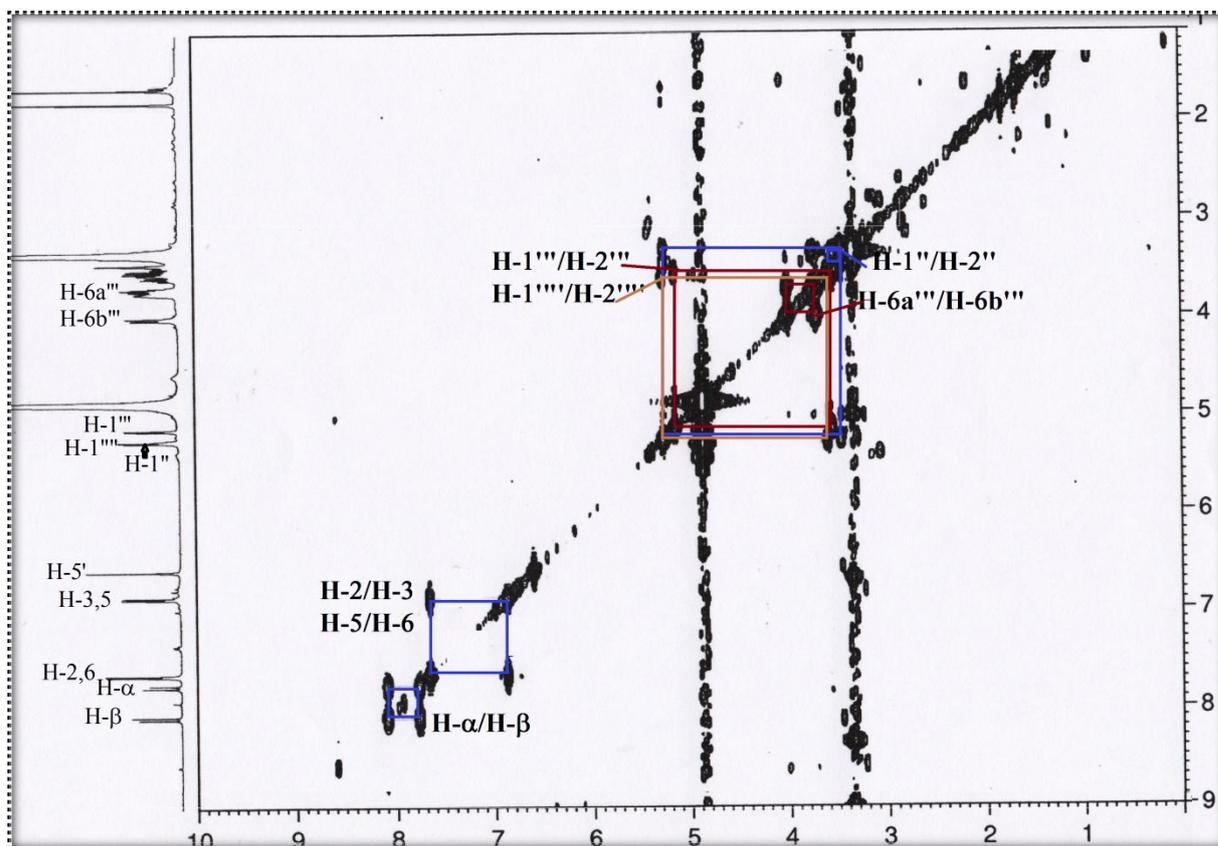


Figure III-20: Spectre COSY H-H du composé CN-2

Les carbones C- α et C- β sont repérés à 125,6 ppm et à 144,8 ppm, respectivement, d'après le spectre HSQC (Figure III-21).

Par analogie avec le composé CN-1, l'analyse conjuguée des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY H-H et HSQC ont permis de marquer tous les signaux caractéristiques des protons aromatiques des cycles A et B:

- Deux signaux des protons aromatiques à δ_{H} 6,86 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3/H-5) et à δ_{H} 7,65 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2/H-6). Sur le spectre COSY H-H (Figure III-20), ces protons couplent entre eux, faisant un système AA'BB' du cycle B. Leurs carbones résonnent à δ_{C} 117,1 (C-3/C-5) et à δ_{C} 132,0 (C-2/C-6), respectivement d'après le spectre HSQC.
- Un signal d'un proton aromatique à δ_{H} 6,59 (1H, *s*) attribuable soit au proton H-3' ou H-5' du cycle A. Le signal du carbone correspondant est repéré à δ_{C} 94,3, d'après le spectre HSQC.

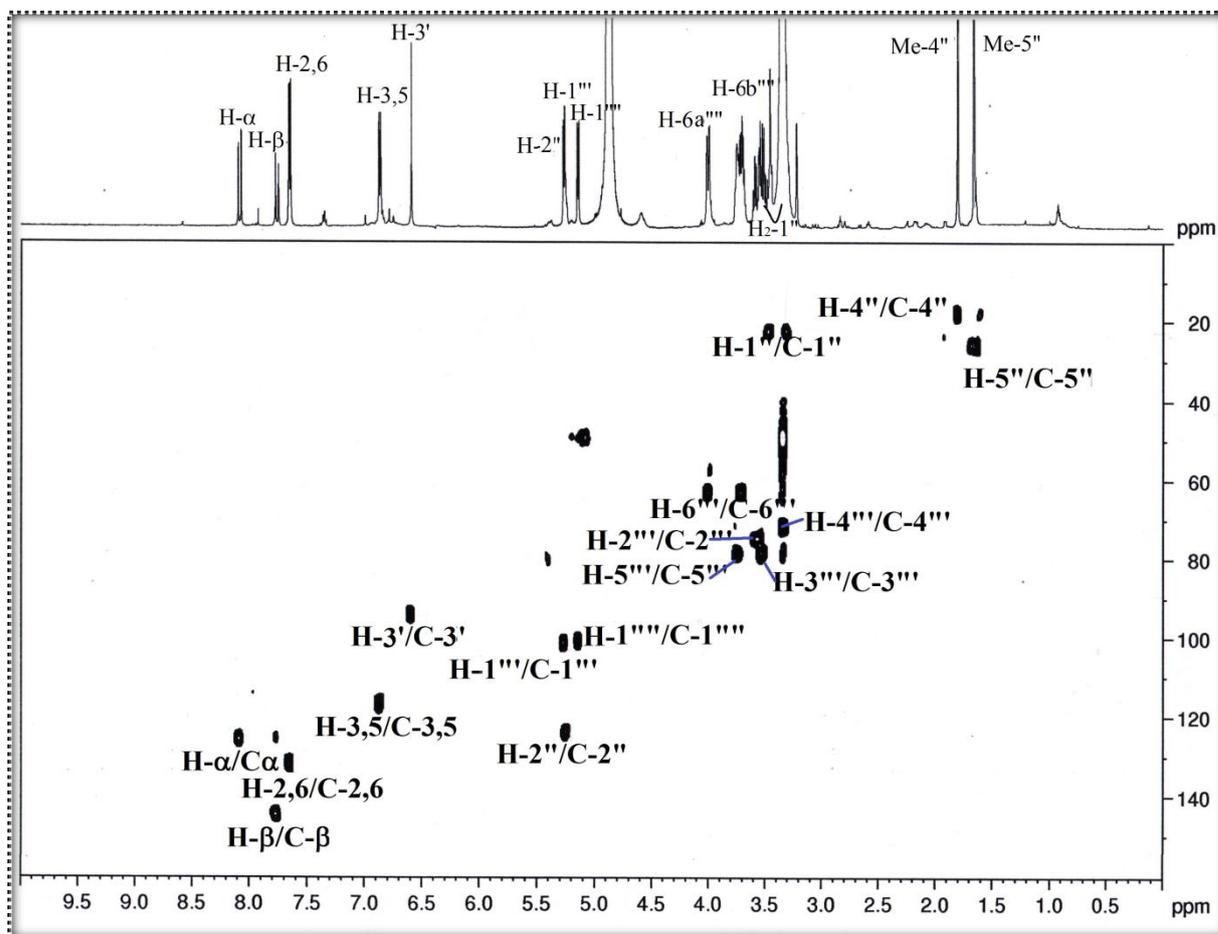


Figure III-21: Spectre HSQC du composé CN-2

L'expérience HMBC permet d'identifier les carbones C-1, C-4 et C-9 à partir des tâches de corrélations suivantes (Figures III-22 et III-22a):

- Entre les deux protons oléfiniques H-β (H-7) et H-α (H-8) et le carbonyle à 195,1 ppm, correspondant au carbone C-9.
- Entre le proton oléfinique à δ_H 7,76 (H-β) et un carbone aromatique quaternaire à 130,6 ppm, attribué au carbone C-1.
- Entre les protons aromatiques H-2 et H-6 et les carbones C-1, C-β et un carbone à 161,8 ppm, assigné au carbone C-4.

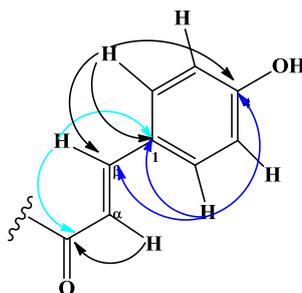


Figure III-22a: Corrélations HMBC du cycle B du composé CN-2

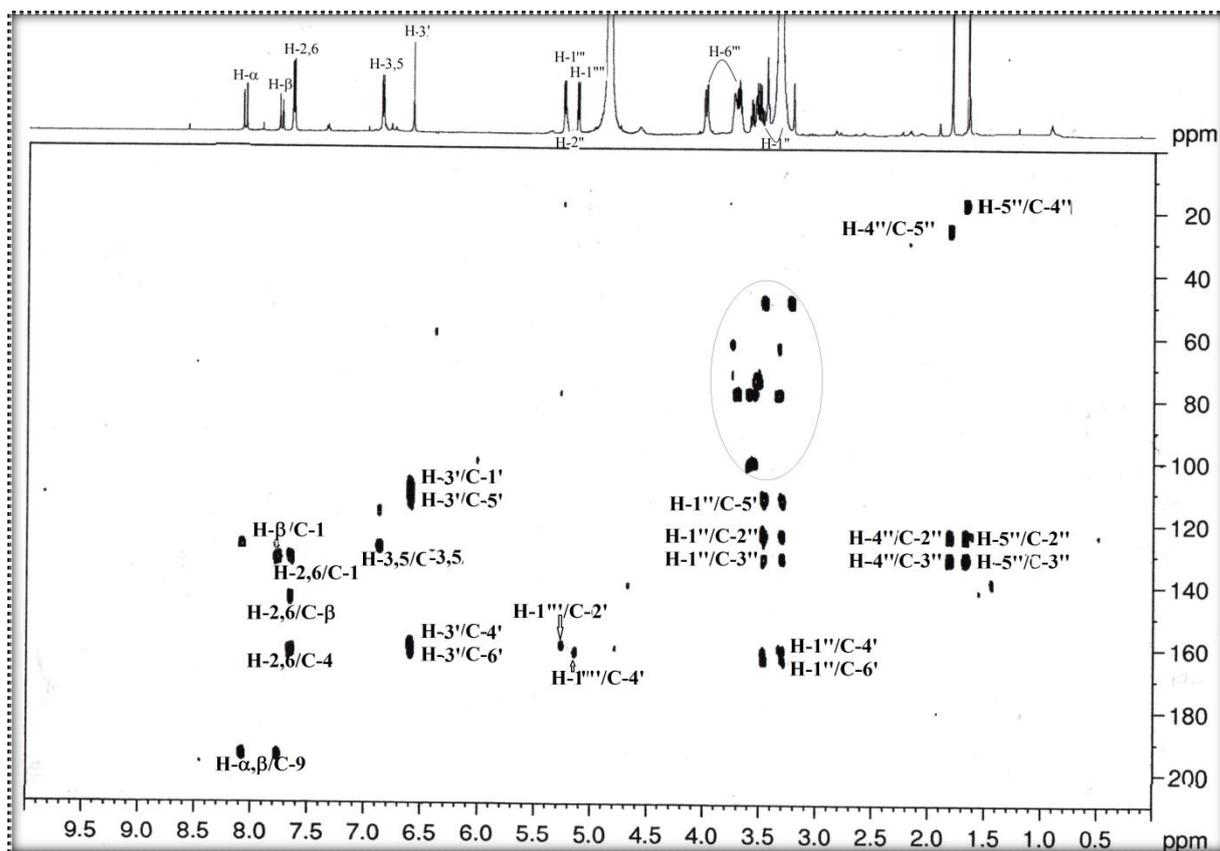


Figure III-22: Spectre HMBC du composé CN-2

Le spectre RMN ^1H (Figure III-18a) montre aussi la présence des signaux caractéristiques de l'unité prényle comme suit:

Le proton oléfinique à δ_{H} 5,25 (1H, *m*) et les deux signaux des groupements méthyles vinyliques à δ_{H} 1,67 (3H, *s*) et à δ_{H} 1,82 (3H, *s*).

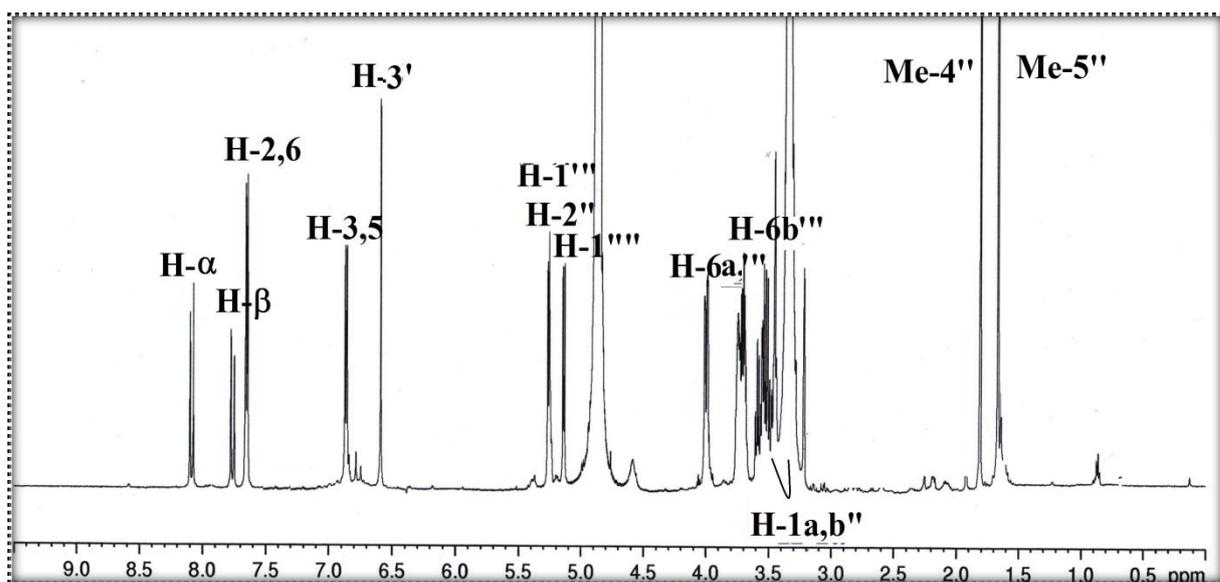


Figure III-18a: Spectre RMN ^1H du composé CN-2

Les spectres RMN ^{13}C (Figure III-19a) et HSQC (Figure III-21) confirment la présence de l'unité prényle par l'existence des signaux de deux groupements méthyles résonant à δ_{C} 18,0 et 25,9, d'une double liaison dont les carbones sortent à δ_{C} 131,7 et 124,0. Un carbone d'un groupement méthylène à δ_{C} 22,5, ses protons figurent à δ_{H} 3,45 (1H, *m*, H-1''a) et 3,30 (1H, *m*, H-1''b), d'après le spectre HSQC.

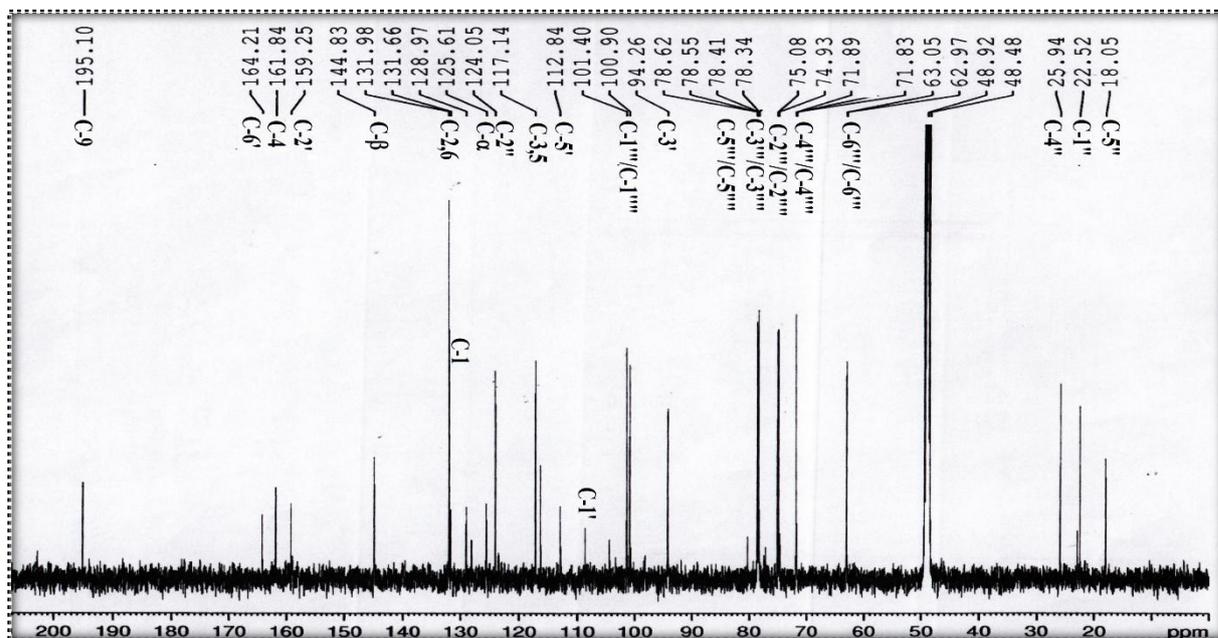


Figure III-19a: Spectre de RMN ^{13}C du composé CN-2

En plus, sur le spectre HMBC (Figures III-22b et III-22c), les deux protons H-1'' montrent des corrélations avec le carbone oléfinique à δ_{C} 124,0 (C-2'') et trois carbones aromatiques quaternaires à δ_{C} 112,8, 164,2 et 161,8. En plus, d'autres tâches de corrélations entre les protons de deux groupements méthyles (δ_{H} 1,67 et δ_{H} 1,82) et les deux carbones de la double liaison à δ_{C} 131,7 (C-3'') et 124,0 (C-2'') sont observées.

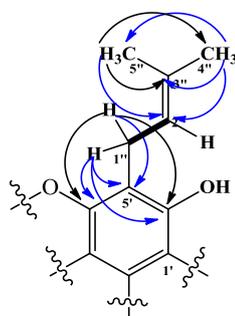


Figure III-22c: Corrélations HMBC du groupement prényle du composé CN-2

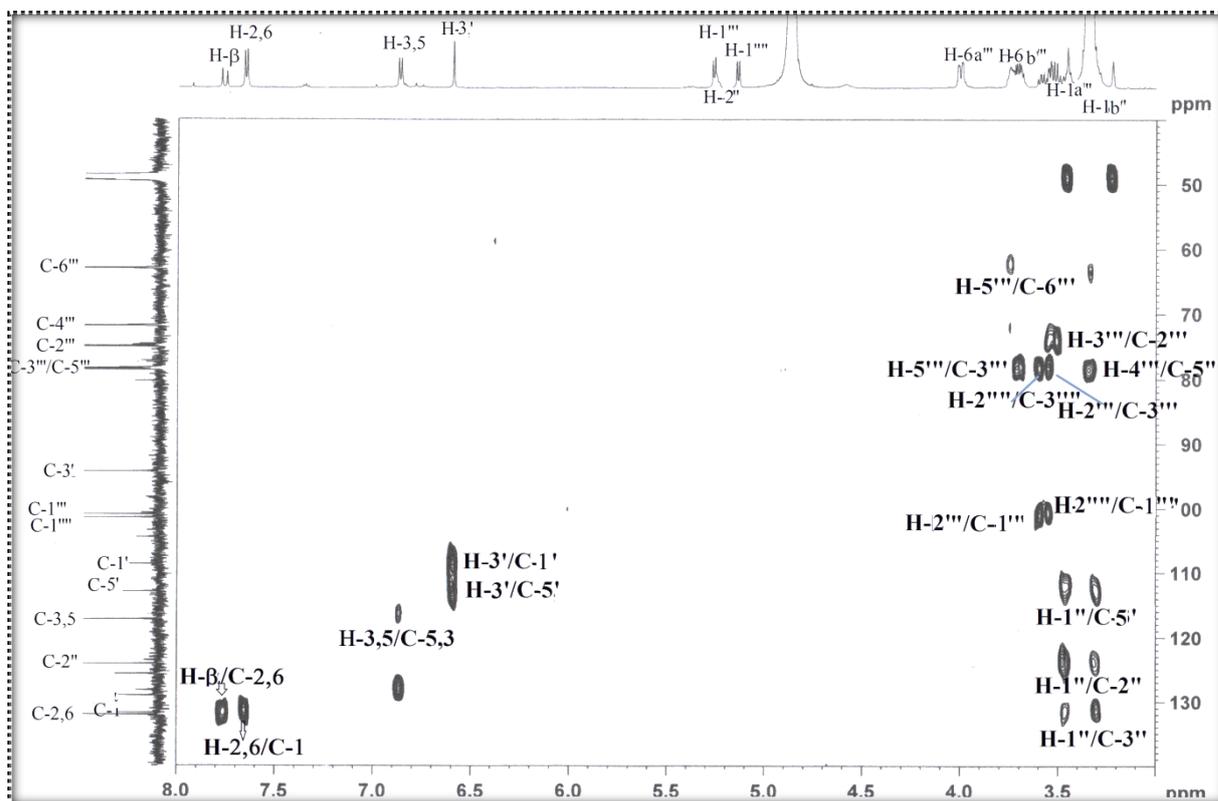


Figure III-22b: Spectre HMBC du composé CN-2

1.2.2. Identification de la partie osidique

En comparaison avec le produit CN-1, le composé CN-2 comporte pratiquement les mêmes sucres, par l'analyse suivante : à partir des protons anomériques à δ_H 5,14 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz, H-1''') et 5,27 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-1''), la nature des deux systèmes de spins a été déterminée grâce au spectre COSY H-H (Figure III-20), en suivant la même analyse faite pour le composé CN-1. Les spectres HSQC (Figure III-21) et HMBC (Figure III-22b) ont permis de déterminer les déplacements chimiques des protons et carbones de deux unités sucres et de les caractériser comme étant des β -glucopyranoside.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figures III-22b et III-22d) entre le premier proton anomère à δ_H 5,27 (*d*, $J = 7,6$ Hz, Glc-I) et le carbone à δ_C 159,3, et entre le deuxième proton anomère à δ_H 5,14 (*d*, $J = 7,4$ Hz, Glc-II), et le carbone à δ_C 161,8, indique que le Glc-I et le Glc-II sont liés au cycle A, et que les carbones cités, précédemment, sont les carbones C-2' et C-4', respectivement. Une corrélation HMBC observée entre le proton à δ_H 6,59 (1H, *s*) et les deux carbones C-2' et C-4', permet de déduire la position de ce proton au carbone C-3'. Cette localisation est confirmée bien par les deux autres corrélations observées entre ce proton et les carbones à 112,8 et 108,6 ppm, qui ne peuvent être que les carbones C-5' et C-1', respectivement.

Par conséquent le groupement prényle est attaché au carbone C-5', et la valeur de carbone C-6' à δ_C 164,2 est déduite par la corrélation entre celui-ci et les deux protons H₂-1''.

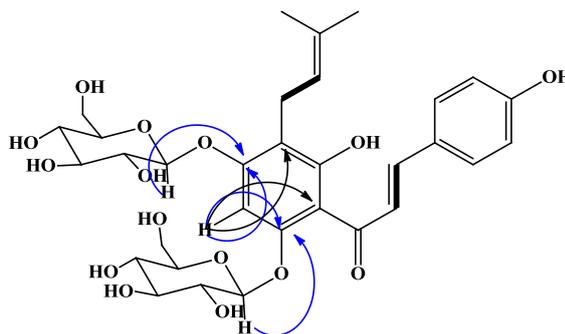


Figure III-20d: Corrélations HMBC du composé CN-2

De ce qui précède, le composé **CN-2** est identifié à la 5'-prénylchalconenaringénine 2',4'- β -O-diglucoopyranoside, nommé cymodioside B, un produit naturel nouveau. Comme pour la naréngénine précédente, celle-ci n'avait jamais été isolée des plantes marines. Ces chalcones prénylées se trouvent dans un nombre limité de familles terrestres telles que Moraceae, Cannabinaceae, Leguminosae et Asteraceae^{141,143}. Le houblon (*Humulus lupulus* L.) est une source très riche de chalcones prénylées, telles que desméthylxanthohumol DXN, xanthohumol XN¹⁴⁵, un dérivé glycosylé tel que le 3'-prényl-4,2'-dihydrochalcone 4'-O- β -glucopyranoside a été isolé à partir de l'espèce *Maclura tinctoria* L.¹⁵⁴. Une transformation microbienne par *Penicillium chrysogenum* du xanthohumol peut produire des chalcones prénylées mono-glucoside (xanthohumol 4'-O- β -glucoside) et bi-glucosides (xanthohumol 4,4'-O- β -diglucosides)²⁰⁸.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones (MeOH-*d*₄) sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau III-2: Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **CN-2**

Position	δ_H m (J en Hz)	δ_C
1	-	130,4
2, 6	7,65 d (8,5)	132,0
3, 5	6,86 d (8,5)	117,1
4	-	161,8
7 (α)	8,08 d (16,0)	125,6
8 (β)	7,76 d (16,0)	144,8
9	-	195,1
1'	-	108,6
2'	-	159,3
3'	6,59 s	94,3
4'	-	161,8
5'	-	112,8
6'	-	164,2

²⁰⁸ Kim H. J., Ik-Soo Lee, Microbial Metabolism of the prenylated chalcone xanthohumol, *Journal of Natural Products* 69, 1522-1524, 2006.

1"	3,45 m	22,5
	3,30 m	
2"	5,25 m	124,0
3"	-	131,7
4"	1,67 s	18,0
5"	1,82 s	25,9
Glucoses		
1'''	5,27 d (7,6)	101,4
2'''	3,62 m	75,0
3'''	3,51 m	78,3
4'''	3,33 m	71,8
5'''	3,75 m	78,6
6'''	4,02 m	63,0
	3,70 m	
1''''	5,14 d (7,4)	100,9
2''''	3,56 m	75,1
3''''	3,51 m	78,4
4''''	3,33 m	71,9
5''''	3,75 m	78,6
6''''	4,00 m	63,0
	3,71 m	

1.2.3. Conversion de la chalcone CN-2 en flavanone CN-1

Comme pour le composé CN-1, la chalcone CN-2 subit une cyclisation en solution, en présence d'un solvant polaire et aprotique comme le DMSO, ou polaire et protique comme le MeOH.

L'isomérisation de ces deux composés est renforcée durant un stockage prolongé de CN-1 et CN-2 dans les solvants. Cependant, l'ouverture de la flavanone est lente et nécessite parfois plusieurs jours pour obtenir une conversion.

Ce phénomène de transformation chalcone-flavanone a été décrit dans la littérature^{145,203,209,210,211,212}, pour les chalcones prénylées isolées de l'espèce *Humulus lupulus* (houblon, Cannabaceae). Il a été constaté que la plupart des chalcones contiennent un groupement 2'-hydroxy libre peuvent donc s'isomériser en leurs flavanones correspondantes²¹². La plupart, sinon la totalité, de la 8-prénylnaringénine des extraits de houblon provient du précurseur de desméthylxanthohumol DXN par isomérisation spontanée ou thermique dans des solvants aqueux pendant le processus d'extraction, et donc la prénylnaringénine devrait être présente dans les extraits de houblon en tant que mélange d'énantiomères.

²⁰⁹ Hänsel R. and Schulz J., Desmethyloxanthohumol: Isolierung aus Hopfen und Cyclisierung zu Flavanonen, *Archiv der Pharmazie* 321(1), 37-40, **1988**.

²¹⁰ Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatography A* 832, 97-107, **1999**.

²¹¹ Stevens J.F., Taylor A.W., Nickerson G.B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M.L., Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol, *Phytochemistry* 53, 759-775, **2000**.

²¹² Stevens J.F., Page J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health, *Phytochemistry* 65, 1317-1330, **2004**.

L'équilibre chalcone-flavanone varié avec la nature des substituants, du solvant utilisé et le domaine d'absorption de ces flavonoïdes.

Matsushima et al.²¹³⁻²¹⁵ ont étudié l'influence du solvant et de la longueur d'onde sur la réactivité, la vitesse de réaction et le rendement de la photocyclisation d'une série d'hydroxychalcones aux flavanones correspondantes. L'étude de la transformation chalcone en flavanone a montré des résultats attendus.

- Lorsque le solvant est polaire aprotique, la cyclisation des chalcones en flavanones est favorisée. Néanmoins, la réaction peut être inhibée par la présence d'un solvant peu polaire et un solvant hydroxyle.
- L'importance de la substitution sur la cyclisation permet de comprendre certains phénomènes de stabilisation ainsi que des mécanismes d'inhibition de la réaction d'hydratation.
- La lumière d'une longueur d'onde plus courte a donné des vitesses de réaction plus lentes et plus de réactions secondaires. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des longueurs d'ondes supérieures à 365 nm.

Cette équipe^{213,214,215} a étudié aussi le mécanisme de la photocyclisation des 2'-hydroxychalcones et a confirmé les résultats précédents, par une photolyse d'une série de dérivés monosubstitués de cycle B. Le mécanisme proposé est illustré dans le schéma suivant (Figure III-23):

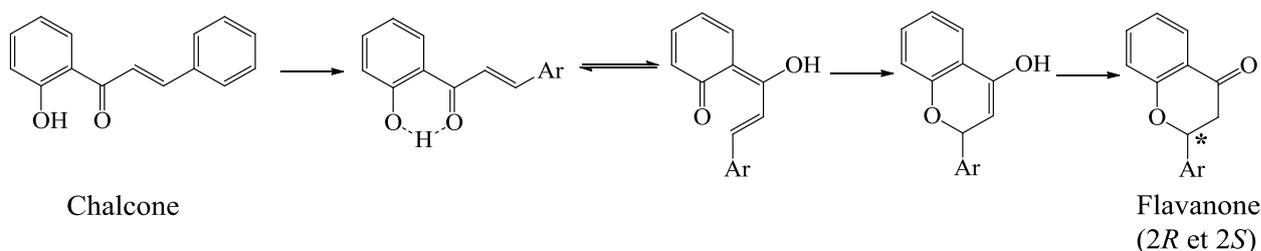


Figure III-23: Formation d'une flavanone par cyclisation de la chalcone

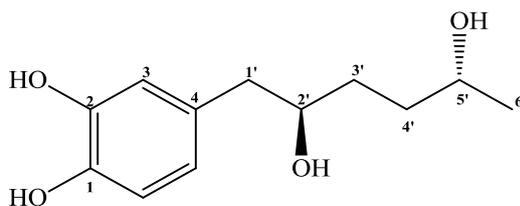
La relation structurelle entre les cymodiosides A et B a été définitivement confirmée par l'interconversion chimique des composés CN-1 et CN-2 qui a été observée pendant le traitement dans certaines conditions expérimentales, y compris un stockage prolongé dans des solvants organiques.

²¹³ Matsushima R., Hirao I., Photocyclization of 2'-Hydroxychalcones to 4-Flavanones, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 53(2), 518-522, **1980**.

²¹⁴ Matsushima R., Kishimoto T., Suzuki M., Morioka M., Mizuno H., Photoreactions of Flavanones, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 53(10), 2938-2942, **1980**.

²¹⁵ Matsushima R., Kageyama H., Photochemical cyclization of 2'-hydroxychalcones, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2(6), 743-748, **1985**.

1.3 Composé CN-3



Ce composé a été obtenu à l'état huileux, il est invisible sous la lumière UV et présente une coloration noire après révélation au réactif de sulfate de cérium et chauffage.

Sur le spectre IR (Figure III-24), on distingue des bandes caractéristiques à 3380 et 1587 cm^{-1} indiquant, respectivement, la présence des fonctions hydroxyles et d'un noyau aromatique.

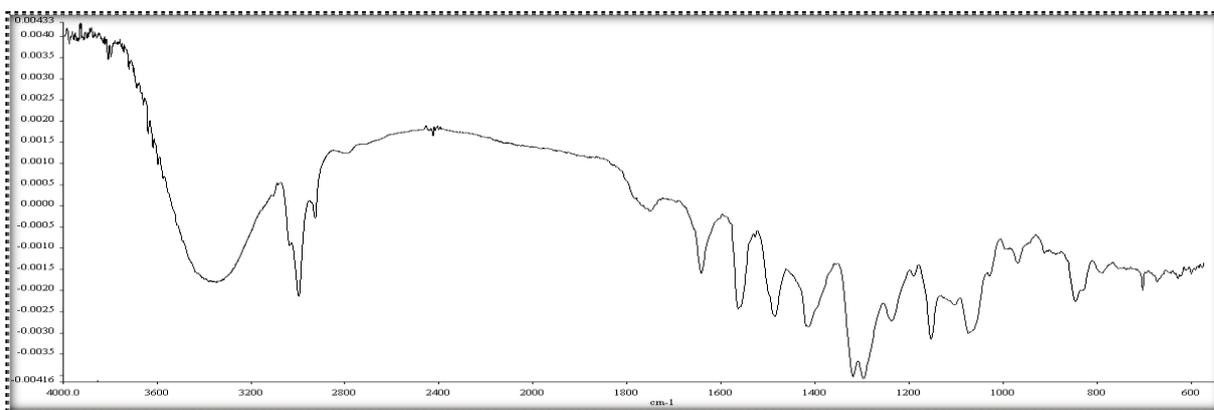


Figure III-24: Spectre IR du composé CN-3

Sur son spectre de masse en source ESI (Figure III-25), enregistré en mode positif, un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 249,1102 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ est détecté, correspondant à une masse moléculaire de 226 uma, suggérant une formule brute en $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4$ avec 4 degrés d'insaturation.

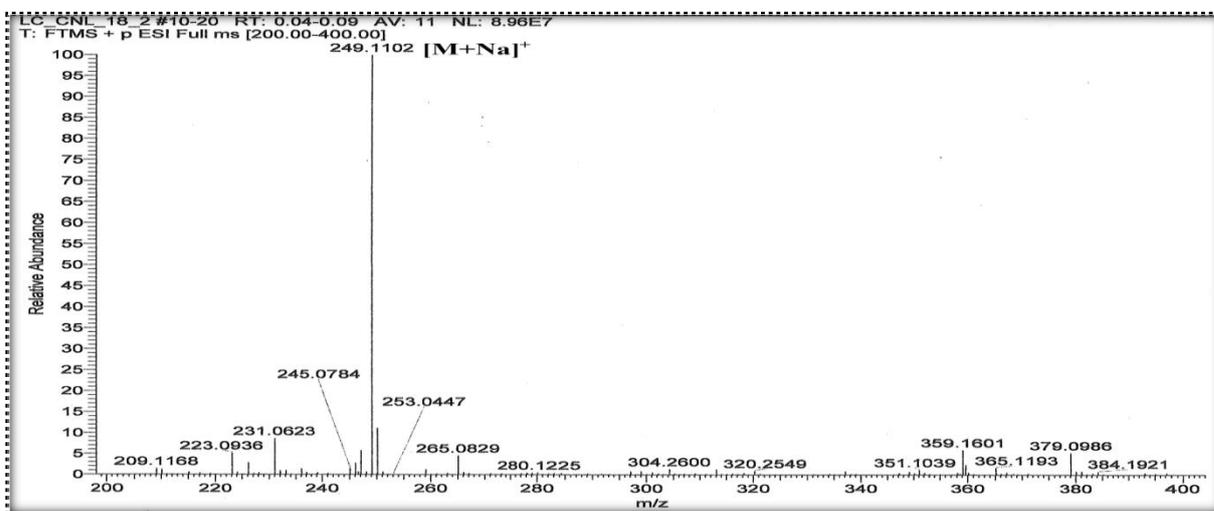


Figure III-25: Spectre de masse ESI du composé CN-3

Le spectre RMN ^1H enregistré dans $\text{MeOH-}d_4$ (Figure III-26), met en évidence la présence de deux sous-structures, l'une aromatique et l'autre aliphatique.

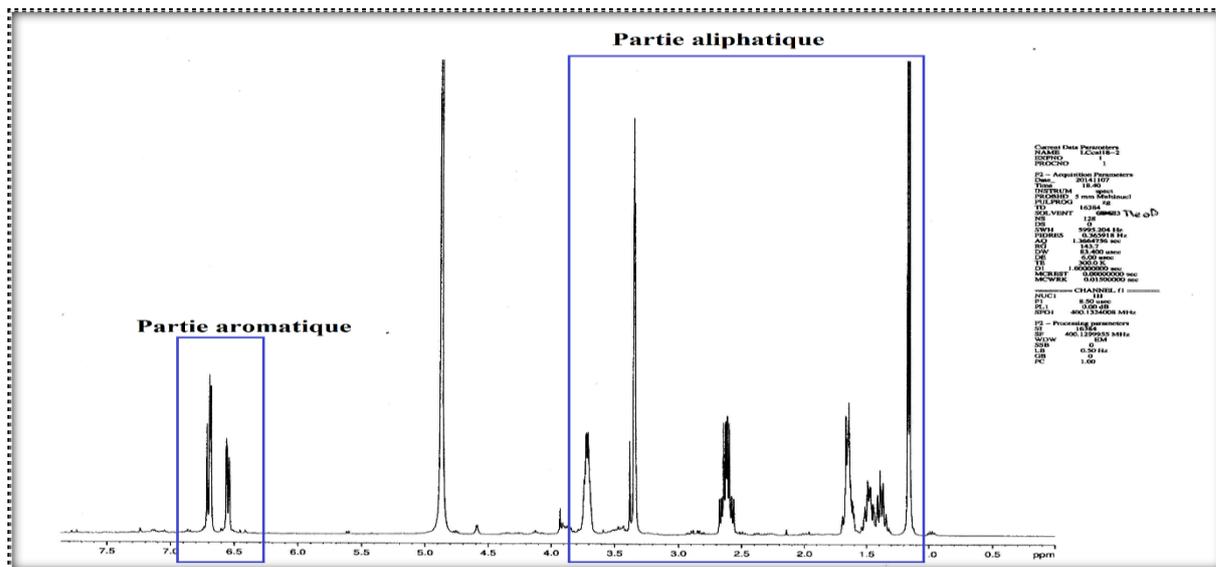
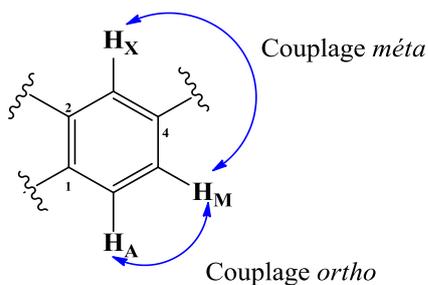


Figure III-26: Spectre RMN ^1H du composé CN-3

En effet, l'analyse de la partie déblindée, des signaux observés sur le spectre RMN ^1H , permet d'identifier trois protons aromatiques :

- Un signal résonant à δ_{H} 6,68 sous forme d'un doublet avec une constante de couplage faible ($J = 1,0$ Hz) attribuable à un proton aromatique *mé*ta couplé.
- Un autre signal sous forme d'un doublet à δ_{H} 6,69 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) est attribué au 2^{ème} proton aromatique, *ortho* couplé.
- En fin, un signal qui apparaît à δ_{H} 6,55 (1H, *dd*, $J = 8,0; 1,0$ Hz), sous forme doublet dédoublé, correspond à un proton aromatique *ortho* et *mé*ta couplé.

Le spectre COSY H-H (Figure III-27) monte bien la corrélation attendue entre les trois protons aromatiques d'un système ABX et qui sont attribuables aux protons aromatiques H-3 (δ_{H} 6,68), H-5 (δ_{H} 6,55) et H-6 (δ_{H} 6,69). Cette analyse (RMN ^1H et COSY H-H) permet d'identifier sans ambiguïté un noyau aromatique 1,2,4-trisubstitué.



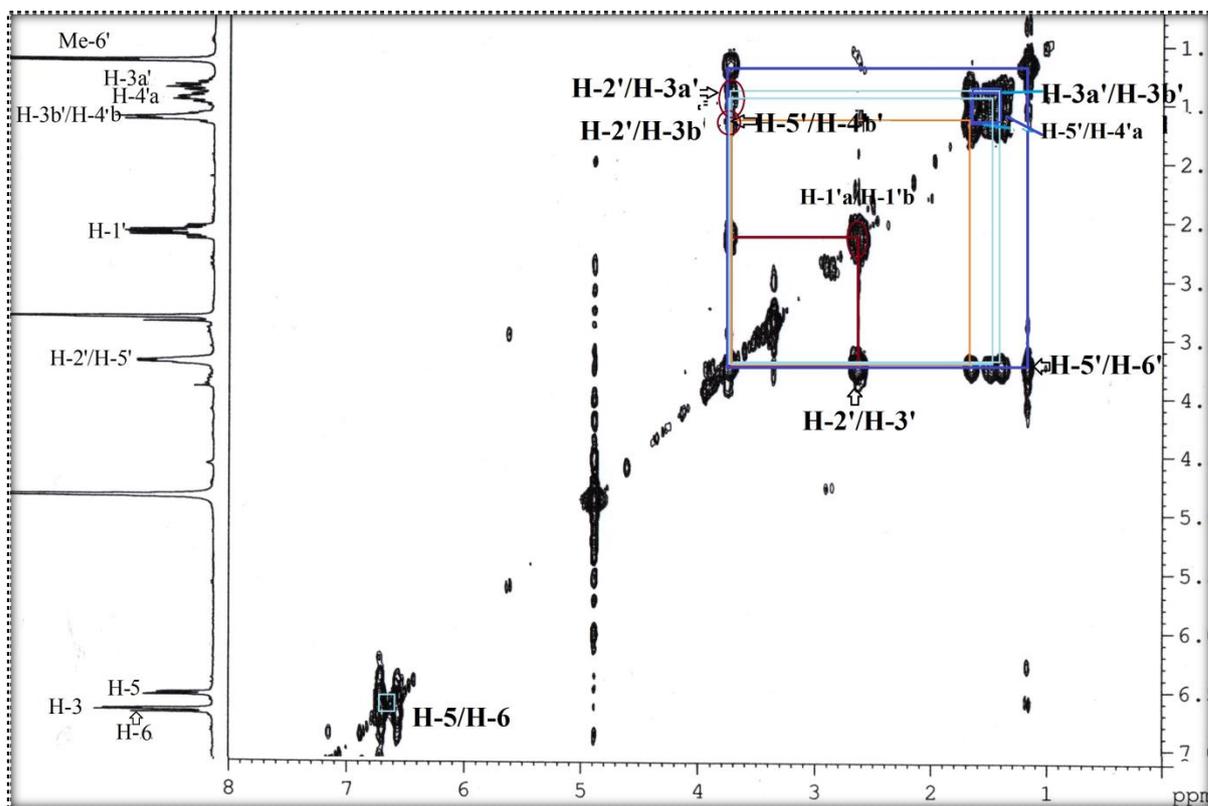


Figure III-27: Spectre de COSY H-H du composé CN-3

L'expérience HSQC (Figure III-28) montre des couplages directs entre ces trois protons et leurs carbones à δ_c 117,3 (C-3), δ_c 121,6 (C-5) et δ_c 116,0 (C-6).

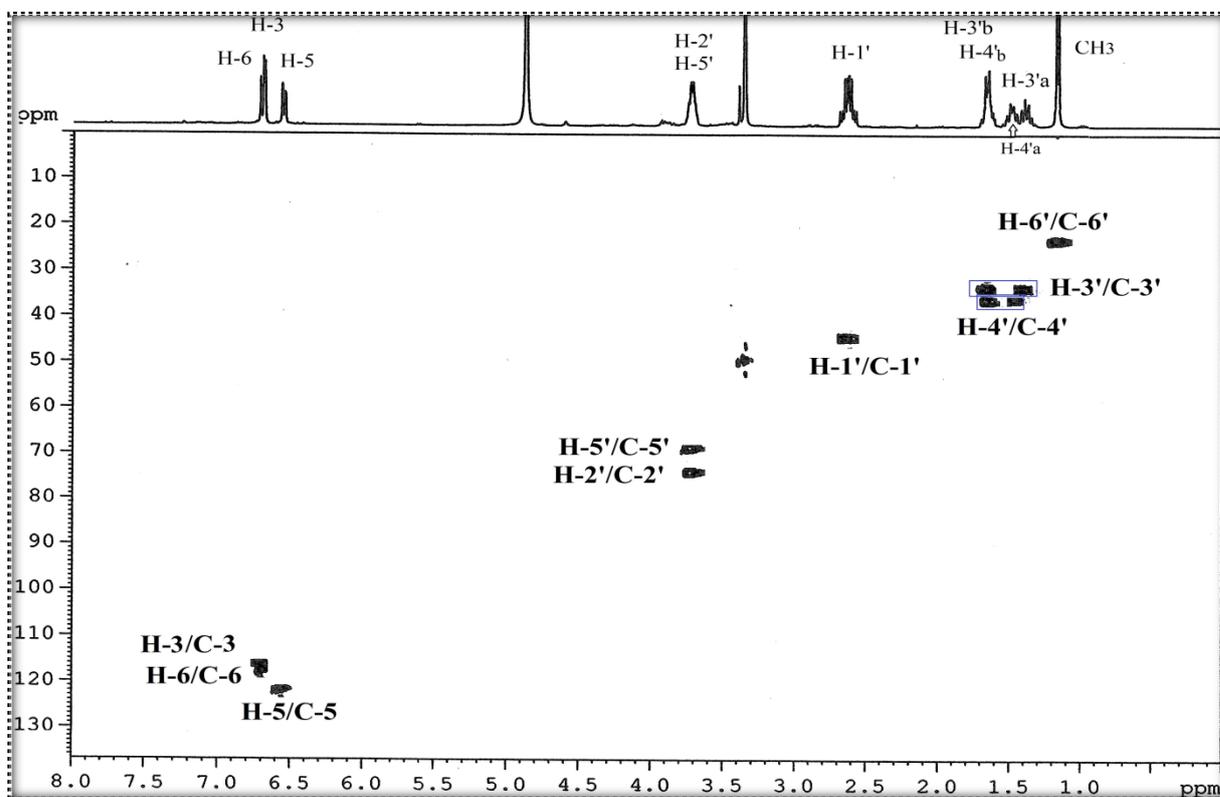


Figure III-28: Spectre HSQC du composé CN-3

L'analyse du spectre HMBC (Figures III-29 et III-29a) permet de déduire les carbones quaternaires C-1, C-2 et C-4 à partir des corrélations suivantes:

- Entre le proton H-5 et le carbone à 117,3 ppm (C-3) déjà identifié, et un carbone quaternaire à 144,2 ppm qui est attribué, sans doute, au carbone C-1.
- Entre le proton H-6 à δ_H 6,69 et les carbones quaternaires à δ_C 132,0 et δ_C 145,2 qui ne peuvent être que les carbones C-4 et C-2.
- Entre le proton H-3 et les carbones C-5 à δ_C 121,6 et C-1 à δ_C 144,2.

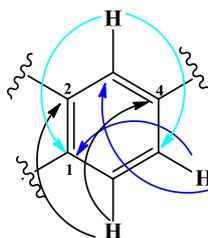


Figure III-29a: Corrélations HMBC du noyau aromatique du composé CN-3

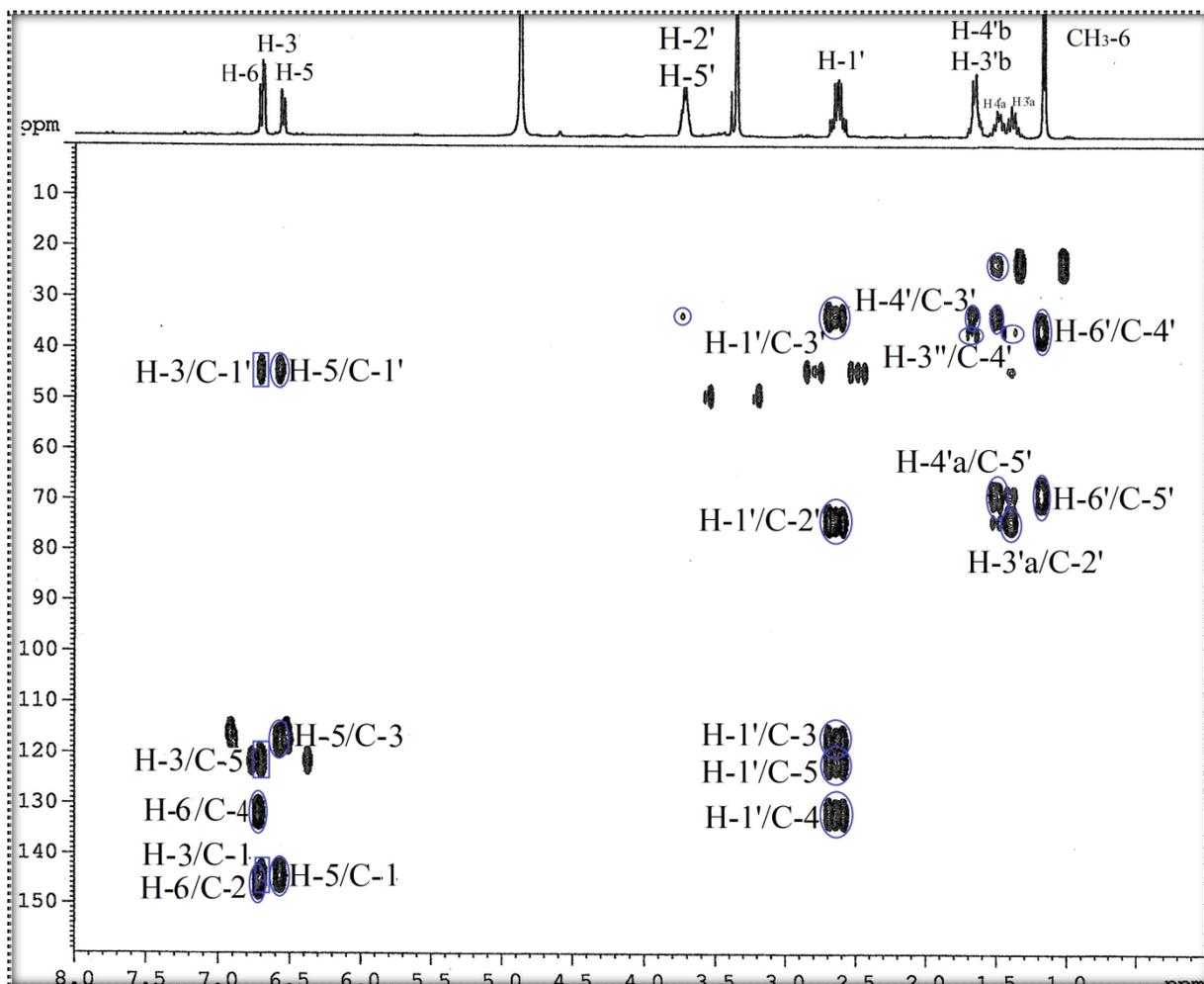
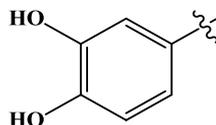


Figure III-29: Spectre HMBC du composé CN-3

Le déblindage des carbones C-1 et C-2 indique qu'ils sont attachés à des groupements hydroxyles, tandis que la valeur blindée de C-4 suggère qu'il est lié à une chaîne alkyle. Toutes ces informations, nous ont permis d'identifier la partie aromatique comme étant le 1, 2-dihydroxyphényle (catéchol) substitué par trois unités : deux groupements hydroxyles et une chaîne alkyle.



La partie aliphatique est déduite à partir des signaux observés sur les spectres RMN ^1H et HSQC (MeOH- d_4) comme suit (Figure III-26a):

- Trois protons d'un groupement méthyle dont le signal résonant à δ_{H} 1,15 sous forme d'un doublet (3H, d , $J = 6,4$ Hz) correspondant au groupement méthyle terminal.
- Quatre signaux résonnant entre 1,38 et 2,65 ppm, s'intégrant pour six protons, sont attribuables aux protons aliphatiques de type CH_2 et CH .
- Le signal déblindé à 3,72 ppm s'intégrant pour deux protons suggère la présence de deux protons oxyméthines.

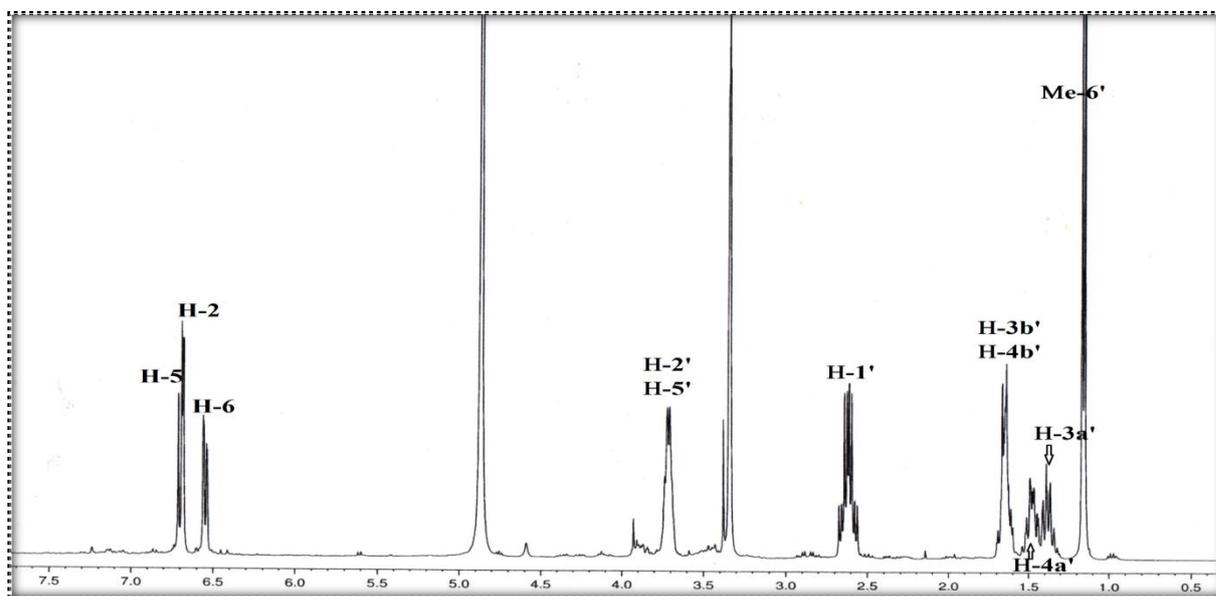


Figure III-26a: Spectre RMN ^1H du composé CN 3

Sur le spectre de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à courte distance HSQC (Figure III-28), on peut compter la présence de trois groupements méthylènes et deux oxyméthines :

- Le premier groupement méthylène est constitué de deux protons sortant à δ_{H} 1,65 (1H, m , H-3'a) et à δ_{H} 1,38 (1H, ddl , $J = 18,6 ; 8,4$ H-3'b), leur carbone est repéré à δ_{C} 33,4.

- Le deuxième groupement méthylène est formé par les protons à δ_H 1,65 (1H, *m*) et à δ_H 1,48 (1H, *m*), leur carbone sort à δ_C 36,0.
- Le troisième méthylène est présenté par les deux protons à δ_H 2,65 (1H, *dd*, $J = 13,6$; 6,9 H-1'a) et à δ_H 2,58 (1H, *dd*, $J = 13,6$; 6,4 H-1'b), dont le carbone est détecté à δ_C 44,3.
- Le multiplet à δ_H 3,72 représente les deux protons oxyméthines. Sur le spectre HSQC, les deux carbones correspondant sont à δ_C 68,4 et 74,0.

L'enchaînement des différents protons cités précédemment (CH₃-, -CHO- et -CH₂-) est basé sur la combinaison des spectres COSY H-H et HMBC (Figures III-27 et III-29).

Sur le spectre COSY H-H (Figures III-27 et III-27a), l'un des deux protons oxyméthines à 3,72 ppm présente une tache de corrélation avec le groupement méthylène à 2,65/2,58 ppm.

Le deuxième oxyméthine présente lui aussi une tache de corrélation avec les protons du méthyle terminal à 1,15 ppm.

En outre, les deux protons oxyméthines présentent d'autres corrélations avec les deux autres groupements méthylènes à δ_H 1,38/1,65 et à δ_H 1,48/1,65 comme il est illustré dans la figure III-27a.

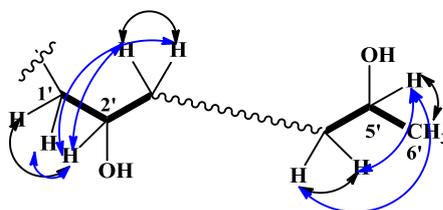


Figure III-27a: Corrélations COSY de la partie aliphatique

A l'issue de cette analyse, la chaîne alkyle est constituée de six carbones dont deux sont oxyméthines, trois de type méthylènes et un groupement méthyle terminal.

Le spectre HMBC (Figure III-29) nous a permis de brancher la partie aromatique de la molécule à sa partie aliphatique. En effet, sur ce spectre on observe des corrélations entre les deux protons à δ_H 2,65/2,58, notés H₂-1' avec les atomes de carbone aromatiques C-3, C-4 et C-5. Ces corrélations nous permettent de fixer la chaîne aliphatique en position C-1 du noyau aromatique (Figure III-29b).

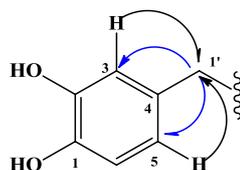


Figure III-29b: Corrélations HMBC de la chaîne alkyle et du noyau aromatique

Au niveau des protons H₂-1', deux corrélations sont observées dont une avec le carbone oxygéné le plus déblindé détecté à δ_C 74,0, attribuable au carbone C-2', et l'autre est avec le carbone aliphatique situé à δ_C 33,4, attribué au carbone du groupement méthylène C-3'.

A son tour, le carbone C-3' présente une tache de corrélation avec les deux protons du groupement méthylène à δ_H 1,48 et à δ_H 1,65 qui ne pourra être que le carbone C-4' (δ_C 36,0).

Le méthyle terminal avec le carbone porteur du deuxième groupe hydroxyle à δ_C 68,4, indiquent la localisation d'une 2^{ème} fonction alcool, attribuable au carbone C-5'. De même le méthyle corréle avec le carbone du méthylène à δ_C 36,0 (C-4').

D'autres tâches de corrélations sont observées sur le spectre HMBC (Figure III-29c) confirmant bien la séquence aliphatique C-1' à C-6'.

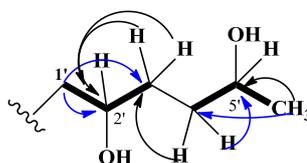


Figure III-29c: Corrélations HMBC de la partie aliphatique du composé CN-3

Toutes ces données obtenues précédemment, nous ont permis d'identifier le composé **CN-3** comme le 4-(2,5-dihydroxyhexyl)benzène-1,2-diol. A notre connaissance, ce composé est un nouveau produit naturel. Il a été isolé récemment durant la fermentation anaérobie microbienne du thé vert²¹⁶.

Tableau III-3: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé CN-3 (MeOH-*d*₄)

Position	δ_H <i>m</i> (<i>J</i> en Hz)	δ_C
1	-	144,2
2	-	145,2
3	6,68 <i>d</i> (1,0)	117,3
4	-	132,0
5	6,55 <i>dd</i> (8,0; 1,0)	121,6
6	6,69 <i>d</i> (8,0)	116,0
1'	2,65 <i>dd</i> (13,5; 6,9)	44,3
	2,58 <i>dd</i> (13,5; 6,4)	
2'	3,72 <i>m</i>	74,0
3'	1,38 <i>ddl</i> (18,6; 8,4)	33,4
	1,65 <i>m</i>	
4'	1,48 <i>m</i> , 1,65 <i>m</i>	36,0
5'	3,72 <i>m</i>	68,4
6'	1,15 <i>d</i> (6,4)	23,2

²¹⁶ Shii T., Asada C., Matsuo Y., Saito Y., Tanaka T., Polyphenols in lahpert-so and two new catechin metabolites produced by anaerobic microbial fermentation of green tea, *Journal of Natural Medicines* 68, 459-464, 2014.

1.3.1. Détermination de la configuration absolue au niveau des carbones C-2' et C-5' du composé CN-3

La valeur négative du pouvoir rotatoire de ce composé ($[\alpha]_D = -7,5$) est en accord avec celle trouvée par Shii et son collaborateur²¹⁶. La stéréochimie de deux centres chiraux n'a pas été déterminée par cette équipe, ils ont conclu que la stéréochimie au niveau du carbone C-2' pourra être *R* par voie biogénèse. Ils ont supposé que ce composé est un dérivé d'une dégradation de (-)-épi-catéchine, et par conséquent, la configuration du carbone C-2' est la même que la (-)-épi-catéchine. Cependant, la configuration du carbone C-5' est restée indéterminée. Par analogie à la littérature, le composé CN-3 de *Cymodocea nodosa* pourrait dériver de (-)-catéchine (CN-6), isolé aussi de cette espèce, et par conséquent, la configuration *R* de C-2' est identique à la (-)-catéchine (CN-6), et devrait également être suggérée dans ce cas.

Dans le but de confirmer la configuration absolue du C-2' et d'établir la configuration absolue du carbone C-5', on a décidé d'appliquer la méthode de Mosher après avoir protégé la fonction 2'-OH par formation d'un acétonide crée, par une cyclisation intramoléculaire selon le mécanisme d'Oxa-Pictet-Spengler. Ainsi, la méthode de Mosher modifiée par Riguera et collaborateur a toutefois été utilisée pour le composé CN-3 afin de déterminer la configuration absolue du centre stéréogène C-5' non affecté.

Avant de détailler les étapes qui nous ont permis de déterminer la configuration absolue de phénol CN-3, nous détaillerons dans la section suivante les principes généraux de la réaction de Mosher et ses applications.

1.3.1.1. Principe de la réaction de Mosher

La détermination de la configuration absolue par RMN des composés chiraux monofonctionnels a été initiée et appliquée par Mosher²¹⁷, fondamentalement, aux alcools secondaires et aux amines primaires. L'application de cette procédure de RMN aux substrats polyfonctionnels nécessite une analyse beaucoup plus minutieuse que pour les composés monofonctionnels. Riguera et collaborateurs^{218,219,220} proposent une nouvelle approche en utilisant des agents de dérivatisation chiraux (ADC) pour déterminer la configuration absolue d'un système 1,n-diols secondaires.

²¹⁷ Dale J.A., Dull DL., Mosher H.S., α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines, *Journal of Organic Chemistry* 34(9), 2543-2549, **1969**.

²¹⁸ Seco JM., Quiñoá E., Riguera R., The assignments of absolute configuration by NMR, *Chemical Rev.* 104, 17-117, **2004**.

²¹⁹ Freire F., Seco JM., Quiñoá E., Riguera R., Determining the absolute stereochemistry of secondary/secondary diols by ¹H NMR: basis and applications, *Journal of Organic Chemistry* 70, 3778-3790, **2005**.

²²⁰ Seco JM., Quiñoá E., Riguera R., Assignment of the absolute configuration of polyfunctional compounds by NMR using chiral derivatizing agents, *Chemical Rev.* 112, 4603-4641, **2012**.

La configuration absolue d'un centre chiral se détermine par la méthode de Mosher, en effectuant une réaction d'estérification de l'alcool secondaire avec les agents chiraux de dérivation. Le plus connu et efficace de ces réactifs est l'acide de Mosher (acide- α -méthoxy- α -trifluorophénylacétique (MTPA)) ou son chlorure d'acyle dont les deux énantiomères sont commerciaux. L'efficacité de ce réactif est due à la présence d'un groupement aromatique et d'un groupement électro-attracteur. Ces réactifs fournissent des diastéréo-isomères qui sont en général faciles à distinguer par RMN ^1H .

Le schéma ci-dessous (Figure III-30) représente la conformation favorisée par Mosher à cause d'une diminution des interactions stériques.

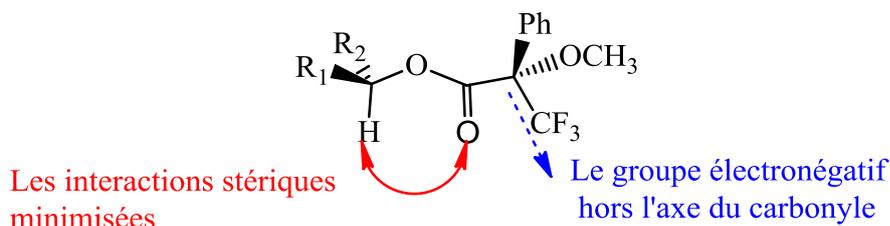


Figure III-30: Conformation préférée de Mosher

Le protocole de Mosher comporte deux étapes importantes (Figure III-31):

- La préparation de chacun des esters diastéréomères (*S*)-ester et (*R*)-ester.
- Une analyse comparative des données spectrales de RMN ^1H de ces deux esters. En analysant le signe de la différence dans les déplacements chimiques ($\Delta\delta_{SR} = \delta_S - \delta_R$), la configuration absolue du stéréocentre original du carbinol (ou amino) est distinguée.

Le groupe (*S*)-MTPA de Mosher modifie les déplacements chimiques de L_1 (groupement le plus encombré) et L_2 (groupement le moins encombré) de manière prévisible, même chose pour le (*R*)-MTPA qui a un effet opposé sur ces déplacements chimiques. Le principe du protocole est schématisé ci-dessous :

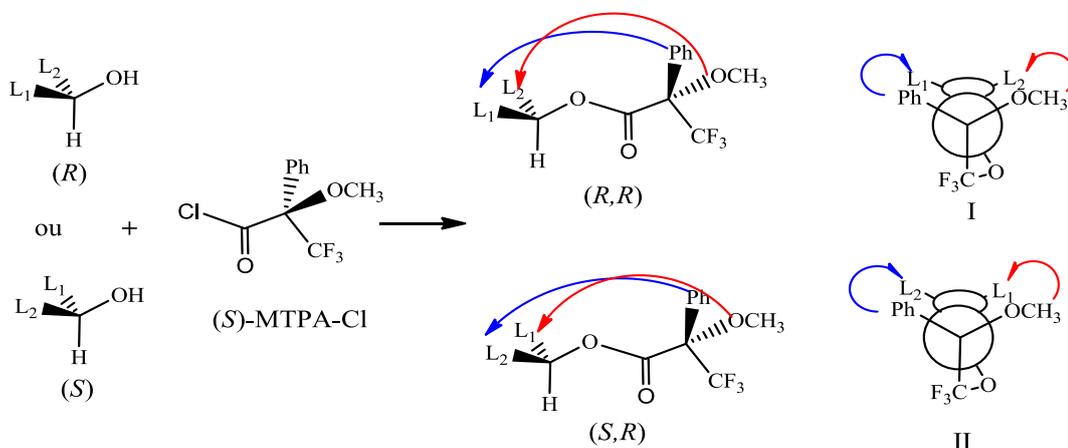


Figure III-31: Protocole de la réaction de Mosher

L'assignation de la configuration absolue des esters de Mosher par RMN ^1H dépend de la détection de la position relative des substituants de chaque côté de l'ester par rapport au groupement phényle. Le substituant proche du groupement phényle subit un blindage alors que celui placé près du méthoxyle subit un déblindage (Figure III-32).

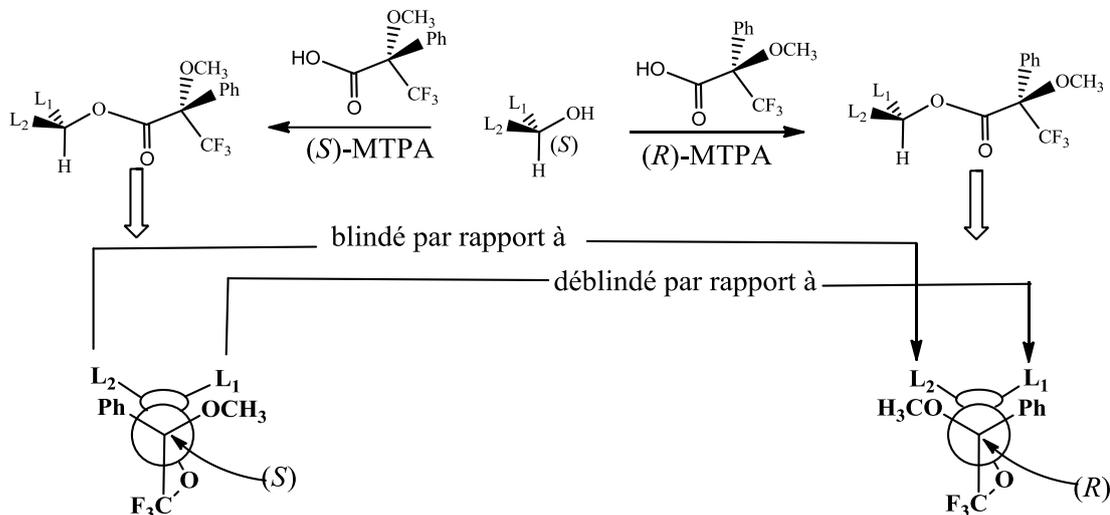
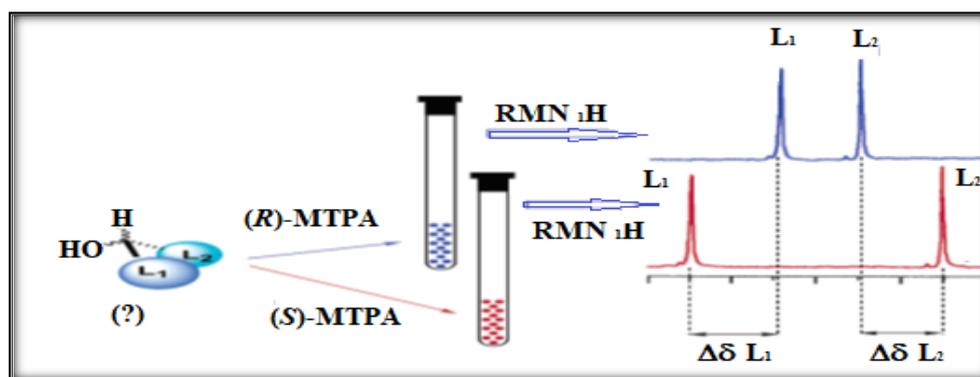


Figure III-32: Conformations supposées prépondérantes dans les esters de Mosher

Quand on utilise le (R) -MTPA de Mosher, si la configuration du second centre stéréogène est S , alors L_1 donnera des signaux à plus haut champ que pour le diastéréoisomère dont la configuration du second centre stéréogène est R , L_2 donnera donc des signaux à champs plus bas.



Les modèles développés sur les monoalcools ne sont pas directement applicables aux polyalcools. Une autre technique largement employée est l'utilisation d'agents chiraux de dérivatisation (ACD). Ces composés sont énantiomériquement purs, ils réagissent avec les diols à analyser pour former des esters correspondants. L'ACD le plus classique et le plus courant est le réactif de Mosher (MTPA), bien qu'il existe d'autres auxiliaires chiraux comme MPA, AMAA, MPA, 1-NMA, 2-NMA et 9-AMA.

Pour un système 1,n-diols contenant deux centre chiraux, on peut prévoir au maximum quatre stéréoisomères [*Anti*-1,n-diols et *Syn*-1,n-diols].



Le procédé de la réaction implique l'estérification parallèle de tous les groupements OH du substrat avec les auxiliaires (*R*) et (*S*) où il en résulte quatre diastéréoisomères, et la configuration absolue est attribuée après par l'interprétation des valeurs $\Delta\delta_{RS}$. Il a été démontré qu'il existe une corrélation entre la configuration absolue d'un diol contenant deux centres chiraux et les spectres RMN des dérivés bis-esters de réactifs auxiliaires choisis. De cette manière, aucune opération de protection-déprotection est nécessaire car les deux groupes hydroxyles du diol sont estérifiés en même temps. Les valeurs expérimentales $\Delta\delta_{RS}$ résultent de la contribution des effets de blindage/déblindage produits par les deux unités ACD qui se combinent selon la stéréochimie réelle du diol.

Le protocole CDA d'un 1, n-diols nécessite les étapes suivantes:

- Préparation séparément des dérivés bis-(*R*)- et bis-(*S*)-ester du "diol inconnu" avec les énantiomères (*R*) et (*S*) du réactif auxiliaire choisi.
- Comparaison les spectres RMN ^1H de ces deux bis-esters et mesurer les différences $\Delta\delta_{RS}$ des substituants [H (1), H (n), et/ou R_1 , R_2].
- Comparaison les signes du $\Delta\delta_{RS}$ observés avec ceux montrés par Riguera.

Les données de la littérature publiées pour les bis-esters (MPA) de la série de diols sont montrées sur la figure III-33 et le tableau III-4.

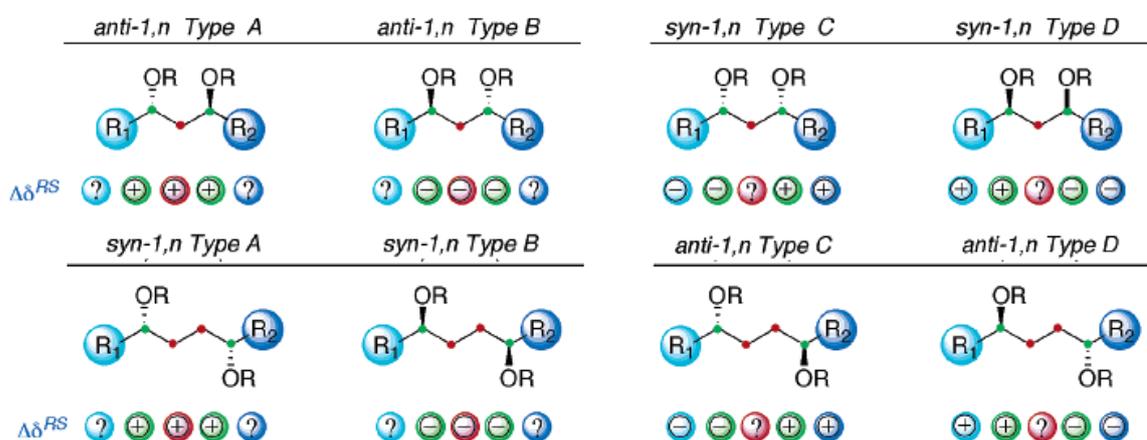


Figure III-33: Les signes du $\Delta\delta_{RS}$ observés pour les quatre diastéréoisomères

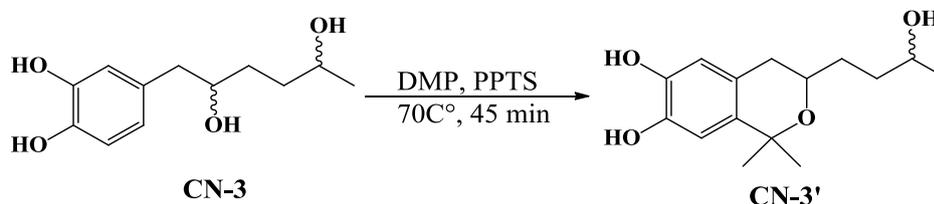
Tableau III-4: Distribution des signes $\Delta\delta_{RS}$ pour les esters bis-MPA des quatre possibilités d'un 1,n-diol.

	<i>syn</i> -1,n-diols Type C (n impair)		<i>syn</i> -1,n-diols Type D (n impair)		<i>anti</i> -1,n-diols Type A (n impair)		<i>anti</i> -1,n-diols Type B (n impair)	
$\Delta\delta_{RS}$	-	+	+	-	+	+	-	-
	<i>syn</i> -1,n-diols Type A (n pair)		<i>syn</i> -1,n-diols Type B (n pair)		<i>anti</i> -1,n-diols Type C (n pair)		<i>anti</i> -1,n-diols Type D (n pair)	
$\Delta\delta_{RS}$	+	+	-	-	-	+	+	-

La simplicité et l'utilité de cette procédure sont démontrées par le fait que deux spectres RMN sont suffisants pour obtenir en une seule opération la configuration absolue des deux carbones asymétriques de 1,n-diols.

1.3.1.2. Détermination de la configuration absolue du carbone C-5' du composé CN-3

Le composé **CN-3** contient deux alcools secondaires. Pour déterminer la configuration absolue de centres chiraux correspondants, on a essayé de déterminer, séparément, la configuration de chaque centre chiral. Pour cela, on a réalisé, en première étape, une réaction de Mosher sur le carbone C-5', en protégeant la fonction alcool en position C-2'. La réaction de protection de la fonction alcool C-2' suit la cyclisation d'Oxa-Pictet-Spengler^{221,222,223}, en utilisant le réactif 2,2-diméthoxypropane (DMP) et le *p*-toluène sulfonate de pyridinium (PPTS) comme catalyseur pour former le composé acétone **CN-3'** (Figure III-34).

**Figure III-34:** Schéma de la réaction de protection du composé **CN-3**

Cette réaction comporte un mécanisme en trois étapes, schématisée dans la figure III-35.

²²¹ Wunsch B., Zott M., Chirale 2-Benzopyran-3-Carbonsäure-Derivate durch Oxa-Pictet-Spengler Reaktion von (S)-3-Phenylmilchsäure-Derivaten. *Liebigs Annalen der Chemie*, 39-45, **1992**.

²²² Larghi EL., Kaufman TS., The Oxa-Pictet-Spengler cyclization: Synthesis of isochromans and related pyran-type heterocycles, *Synthesis* 2006(2), 187-220, **2006**.

²²³ Larghi EL., Kaufman TS., Synthesis of oxacycles employing the Oxa-Pictet-Spengler reaction: recent developments and new prospects, *European Journal of Organic Chemistry* 27, 5195-5231, **2011**.

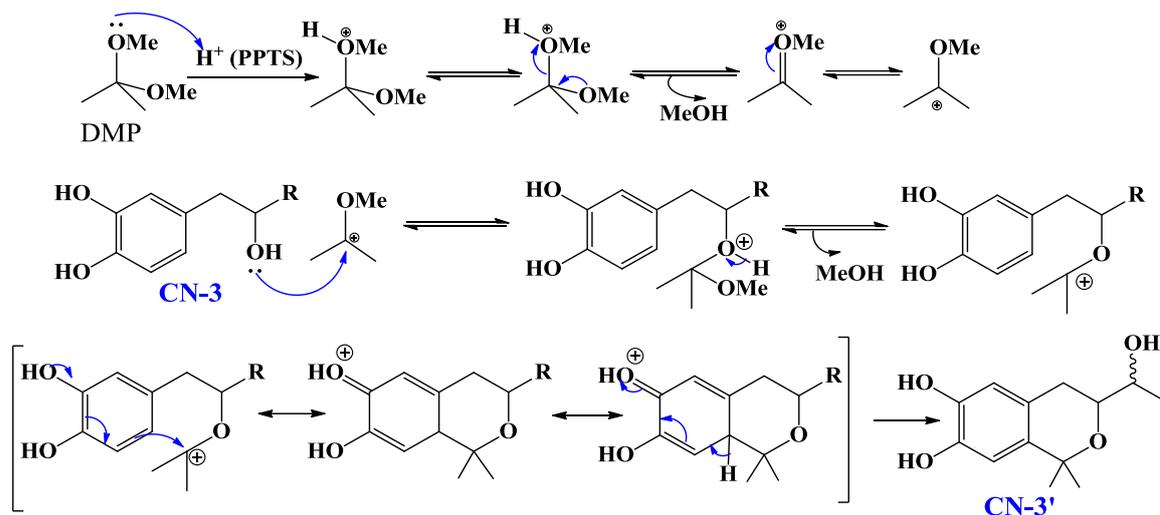
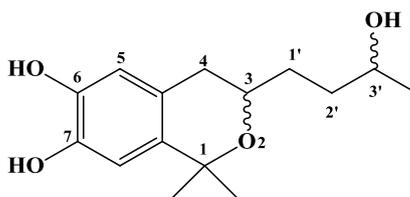


Figure III-35: Mécanisme de la condensation de type Oxa-Pictet-Spengler du CN-3 en CN-3'

La deuxième étape consiste à réagir la 2^{ème} fonction alcool (C-5') avec le réactif de Mosher

1.3.1.2.1. Détermination structurale du composé acétone CN-3'



Le spectre de masse du produit acétone **CN-3'** donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 289,71 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 266 uma, en accord avec une formule brute $C_{15}H_{22}O_4$ et un degré d'insaturation de 5 (Figure III-36).

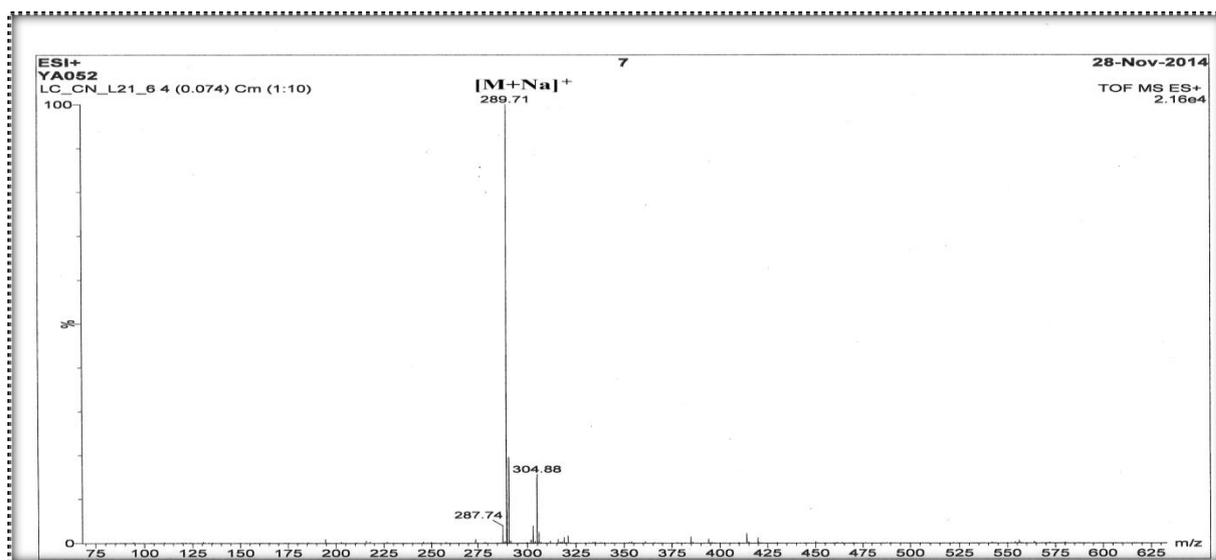
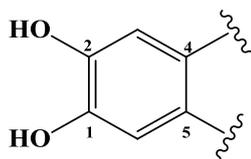


Figure III-36: Spectre de masse ESI du composé CN-3'

L'analyse spectrale combinée des spectres RMN ^1H , COSY H-H, HSQC (Figures III-37, III-38 et III-39) et une comparaison des données spectrales avec celles du composé **CN-3**, nous a permis de faire les remarques suivantes :

- On note l'apparition de deux signaux presque superposés à δ_{H} 1,46 (6H, *s*) attribuables aux deux groupements méthyles supplémentaires, leurs carbones apparaissent à δ_{C} 28,6 et δ_{C} 31,0 sur le spectre HSQC (Figure III-39).
- La présence seulement de deux protons aromatiques résonant à δ_{H} 6,53 (1H, *s*) et δ_{H} 6,59 (1H, *s*) et qui donnent des corrélations sur le spectre HSQC avec leurs carbones à δ_{C} 114,9 et δ_{C} 111,9 respectivement, indique ainsi une autre substitution sur le noyau aromatique du composé **CN-3**. Ceci, nous a permis de proposer une substitution en position C-5 du noyau aromatique du composé **CN-3** par l'absence d'aucune corrélation entre les deux protons aromatiques mis en jeu sur le spectre COSY H-H (Figure III-38).



En parallèle, la disparition du 3^{ème} signal du proton aromatique dans le spectre du proton du composé **CN-3'**, confirme bien la présence d'une substitution à ce niveau.

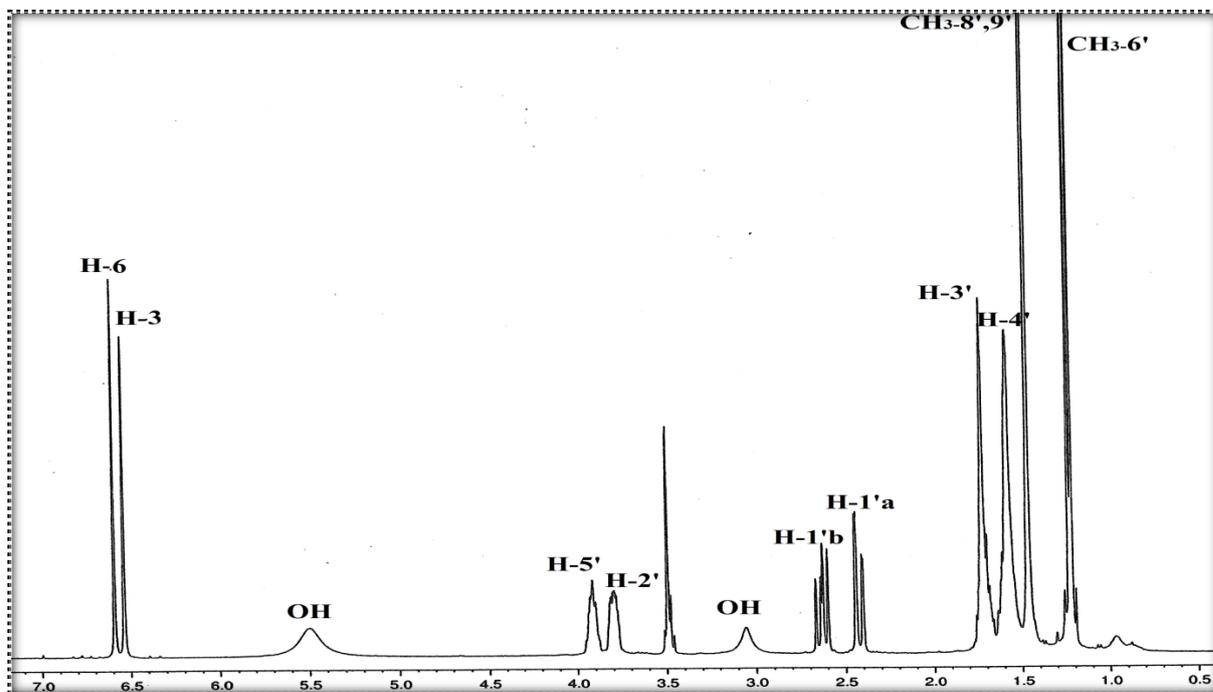


Figure III-37: Spectre RMN ^1H du composé **CN-3'**

L'analyse de la partie aliphatique du ce composé (RMN ^1H , COSY H-H) permet de mettre en évidence la présence de deux oxyméthines à δ_{H} 3,79 (1H, *m*) et à δ_{H} 3,91 (1H, *m*), les groupements méthylènes $\text{CH}_2\text{-1}'$ à δ_{H} 2,63 (*dd*, $J = 15,5; 11,3$ Hz, H-1'a) / 2,42 (*dd*, $J = 15,5; 2,5$ Hz, H-1'b), $\text{CH}_2\text{-3}'$ à δ_{H} 1,72 et $\text{CH}_2\text{-4}'$ à δ_{H} 1,70 / 1,58 et le doublet à δ_{H} 1,22 (3H, *d*, $J = 6,3$ Hz) correspondant au méthyle terminal $\text{CH}_3\text{-6}'$.

L'analyse de spectre COSY H-H (Figure III-38) permet d'identifier les deux systèmes de spins suivants :

- Le proton de l'oxyméthine le plus déblindé à 3,91 ppm (OCH-5') couple avec les protons du méthyle terminal et avec les deux protons méthylène $\text{CH}_2\text{-4}'$ à 1,58 ppm
- Le proton de l'oxyméthine (OCH-2') à 3,79 ppm couple avec les protons des deux méthylènes à δ_{H} 2,63 (H-1'b) et δ_{H} 1,72 (H-2-3').

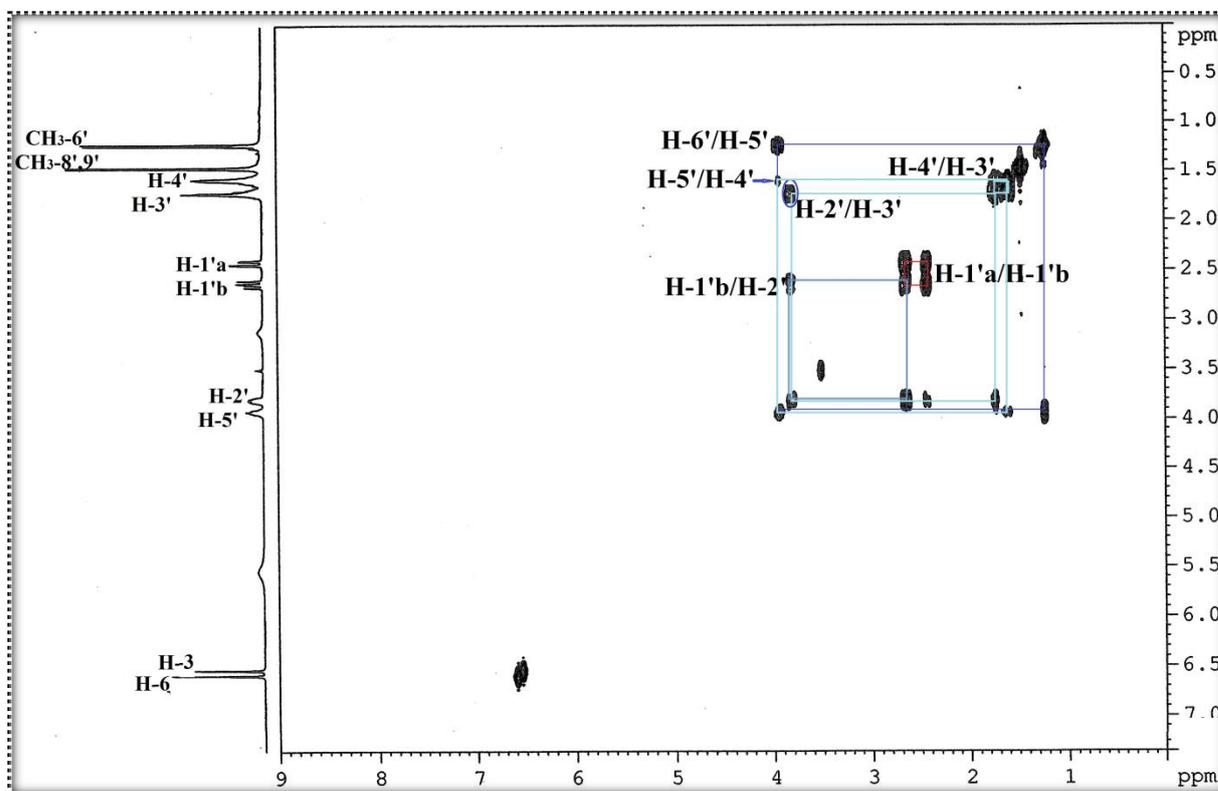


Figure III-38: Spectre COSY H-H du composé **CN-3'**

L'expérience HSQC permet d'assigner leurs déplacements chimiques comme suit :

- Les méthylènes $\text{CH}_2\text{-1}'$, $\text{CH}_2\text{-3}'$ et $\text{CH}_2\text{-4}'$ avec les signaux à δ_{C} 34,6, 31,9 et 35,2, respectivement.
- Les méthines oxygénés $\text{CH-2}'$ et $\text{CH-5}'$ avec leurs signaux à δ_{C} 69,1 et δ_{C} 67,5, respectivement.
- Le méthyle terminal CH_3 et son carbone à 23,0 ppm.

Le blindage des carbones C-1' à δ_c 34,6 et C-2' à δ_c 69,1 ppm en comparaison avec C-1' (δ_c 44,3) et C-2' (δ_c 74,0) du composé **CN-3**, suggère que la protection était faite au niveau de carbone C-2'.

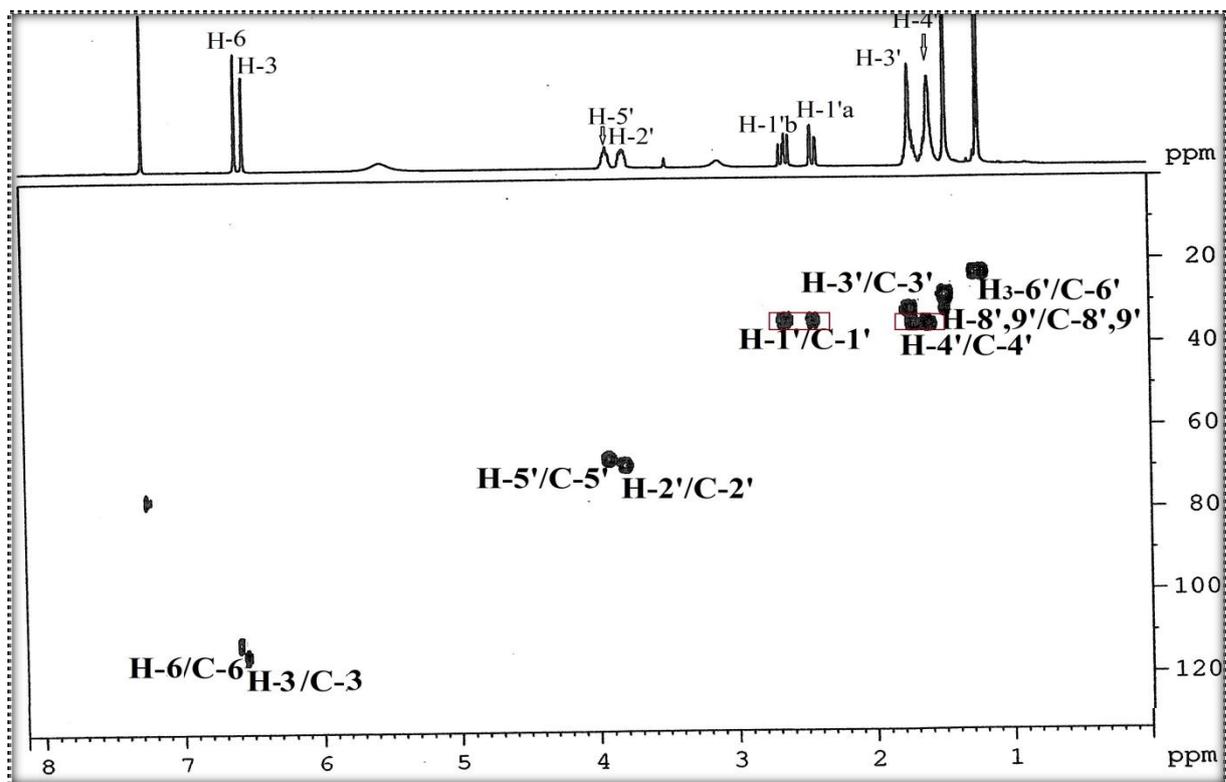


Figure III-39: Spectre HSQC du composé **CN-3'**

Le spectre HMBC (Figure III-40) permet, en outre, de confirmer ce résultat. En effet, sur ce spectre, on observe des corrélations entre le proton aromatique à δ_H 6,53 (H-3) et le carbone C-1', le carbone aromatique à δ_c 142,4 (C-1) et un carbone quaternaire aromatique à δ_c 135,4. Les protons de groupement méthylène (CH₂-2') ont une corrélation avec l'atome de carbone à δ_c 125,4 (C-4). L'un de ces deux protons à δ_H 2,42 a une corrélation avec le carbone à δ_c 114,9 (C-3).

Le deuxième proton aromatique à δ_H 6,59 (H-6) corrèle avec les atomes de carbone à δ_c 125,4 (C-4), δ_c 142,0 (C-2), et un carbone quaternaire oxygéné à δ_c 75,5 (C-7'). Ce dernier corrèle à son tour avec les protons de deux groupements méthyles à δ_H 1,46 (CH₃-8'/CH₃-9'). La valeur du déplacement chimique à 135,4 ppm est assignée au carbone quaternaire C-5, par la corrélation observée entre ce carbone et les deux groupements méthyles (Figure III-40a).

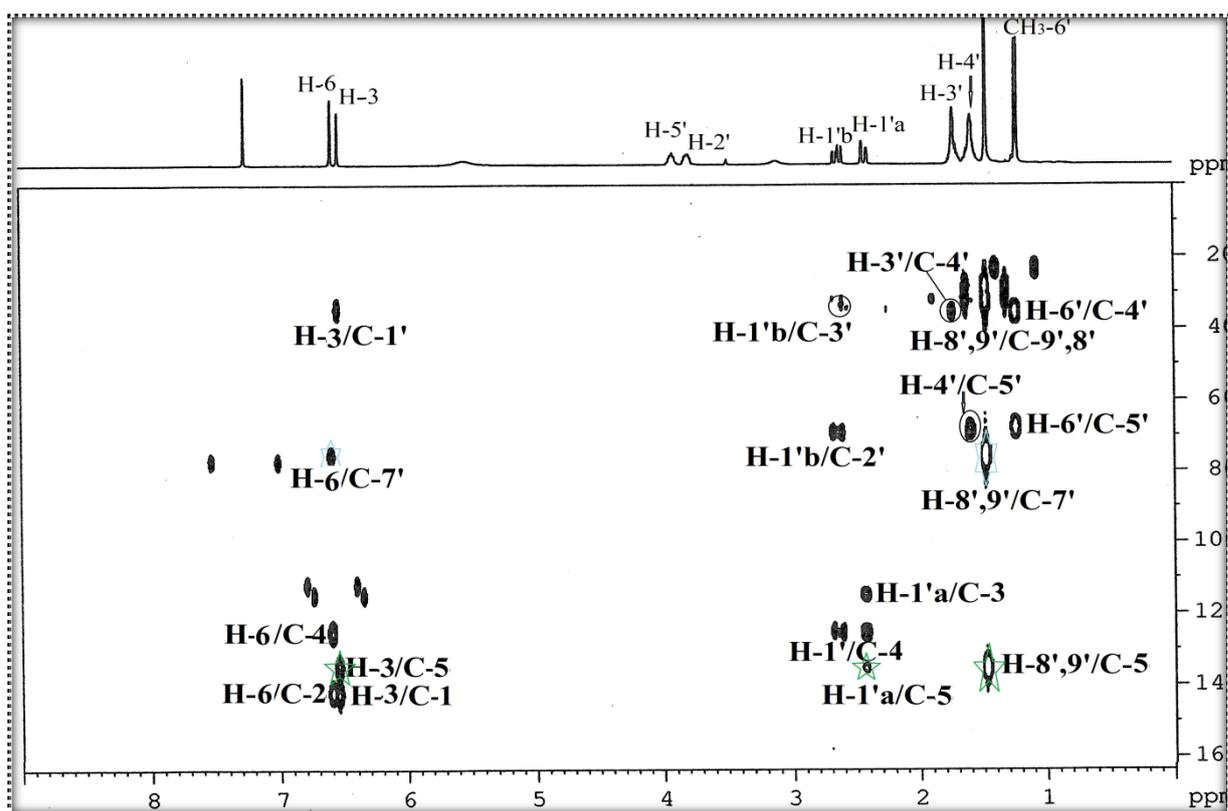


Figure III-40: Spectre HMBC du composé CN-3'

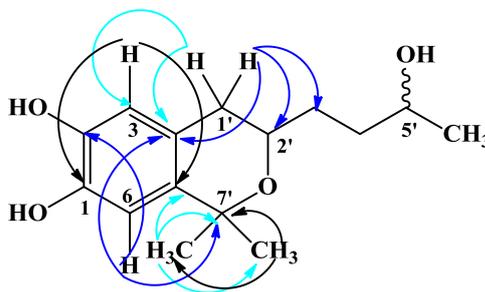
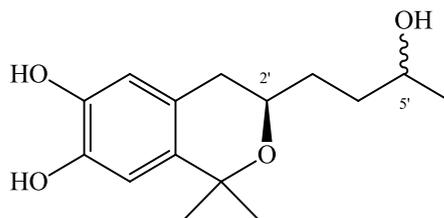


Figure III-40a: Corrélations HMBC du composé CN-3'

A l'issue de cette analyse, l'enchaînement de deux groupements méthyles doit faire partie d'une unité cyclique à six atomes de carbones, accolée au noyau aromatique sous forme de *gem*-diméthyl-dihydropyrane, et la structure de ce composé CN-3' est établie comme étant le 3-(3-hydroxybutyl)-1,1-diméthylisochroman-6,7-diol.

Ce composé contient deux centres chiraux C-2' et C-5' dont C-2' est protégé sous forme d'un éther cyclique et le centre chiral C-5' reste sous forme d'un alcool secondaire. Au niveau de ce dernier centre C-5', la réaction de Mosher sera appliquée pour déterminer sa configuration absolue.

1.3.1.2.2. Détermination de la configuration absolue du carbone C-5' du composé acétonide CN-3'



La configuration absolue du carbone C-5' a été déterminée par la méthode de Mosher, en réalisant une réaction d'estérification du composé **CN-3'** avec les deux dérivés de chlorures d'acides de Mosher *R*-MTPA-Cl [*(R)*-(-)-chlorure d'acide- α -méthoxy- α -trifluorométhyl- α -phénylacétique] et le *(S)*-MTPA-Cl [*(S)*-(+)-Chlorure d'acide- α -méthoxy- α -trifluorométhyl- α -phénylacétique], comme le montre la figure (Figure III-41). Cette réaction fournit deux diastéréo-isomères **CN-3'A** et **CN-3'B**.

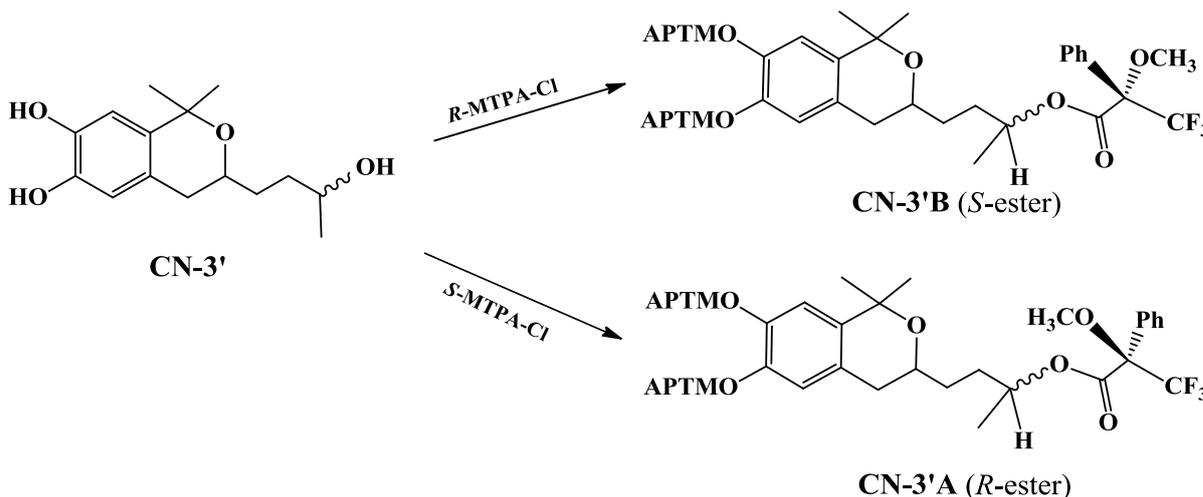


Figure III-41: Réactions de Mosher sur le composé **CN-3'**

Détermination structurale des composés **CN-3'A** et **CN-3'B**

Le spectre de masse à haute résolution (HRESI-MS) des produits estérifiés (Figure III-42) donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 937,2601 $[M+Na]^+$ (calc. 937,2601 $C_{45}H_{43}O_{10}F_9Na$), cette valeur est en accord avec la formule brute $C_{45}H_{43}O_{10}F_9$ et une masse moléculaire de 914 uma.

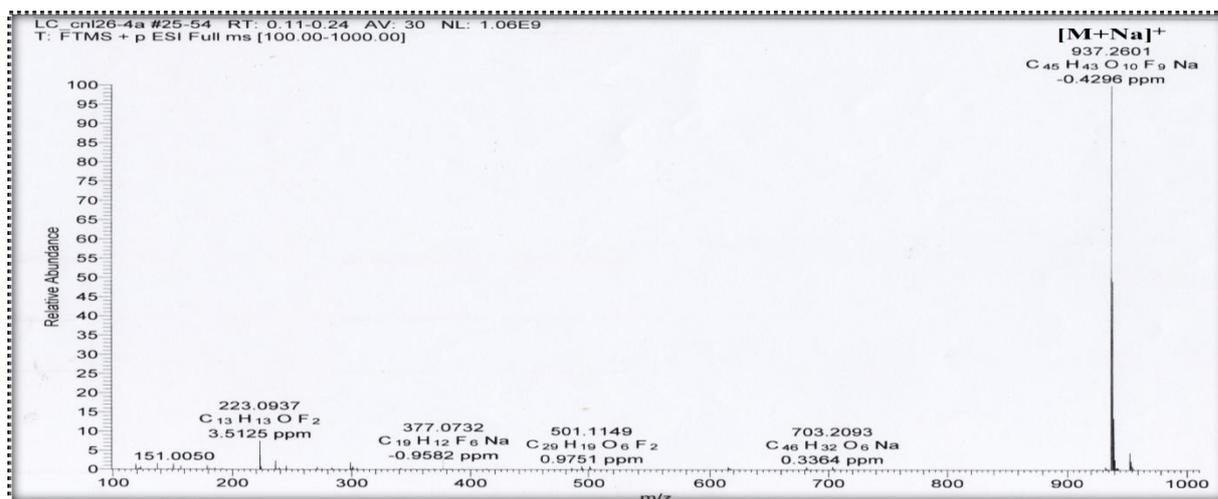


Figure III-42: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé CN-3'A (CN-3'B)

L'analyse des spectres RMN mono- et bidimensionnelles des composés CN-3'A et CN-3'B présente des similitudes très semblables à ceux du produit d'origine (CN-3').

Le spectre RMN ^1H (Figure III-43a/III-43b) met en évidence la présence de tous les protons aromatiques. En effet, les deux signaux apparaissant à 6,92 (6,92) et 6,94 (6,97) ppm sous forme des singulets sont assignés aux protons H-3 et H-6 du noyau aromatique. Le multiplet d'intensité de quinze protons entre 7,30 et 7,60 ppm est attribué aux protons des trois noyaux aromatiques de réactif de Mosher. Les singulets supplémentaires qui apparaissent entre 3,40 et 3,60 ppm sont attribués aux groupements méthoxyles du même réactif.

On observe, également, que le signal du proton H-5' se trouve déblindé dans les deux dérivés de Mosher (δ_{H} 5,22 (*S*-ester) et δ_{H} 5,23 (*R*-ester)) ce qui confirme que la fonction hydroxyle est estérifiée au niveau du carbone C-5'.

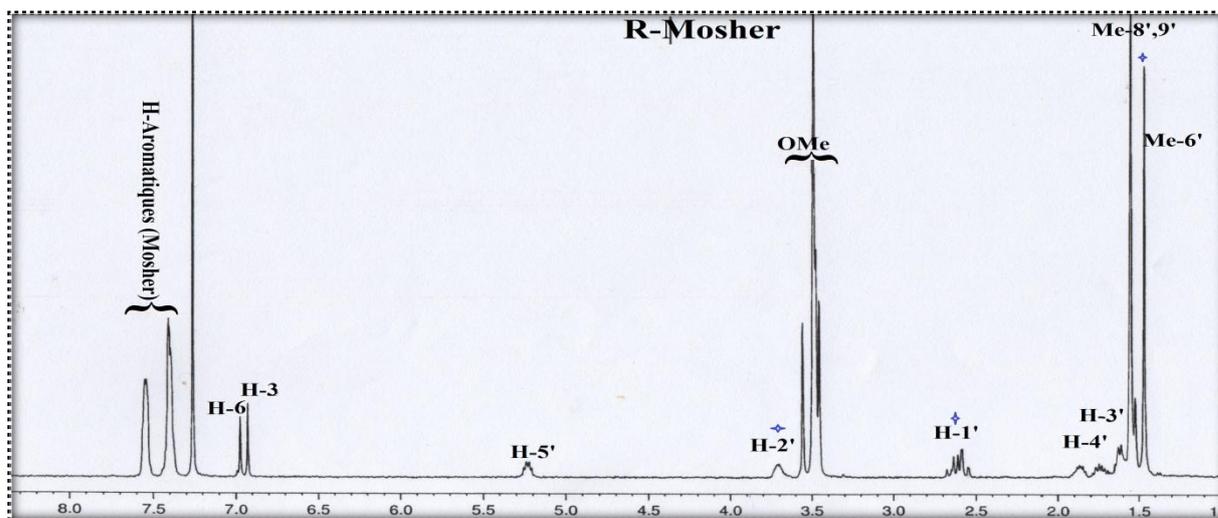


Figure III-43a: Spectre RMN ^1H du composé CN-3'A

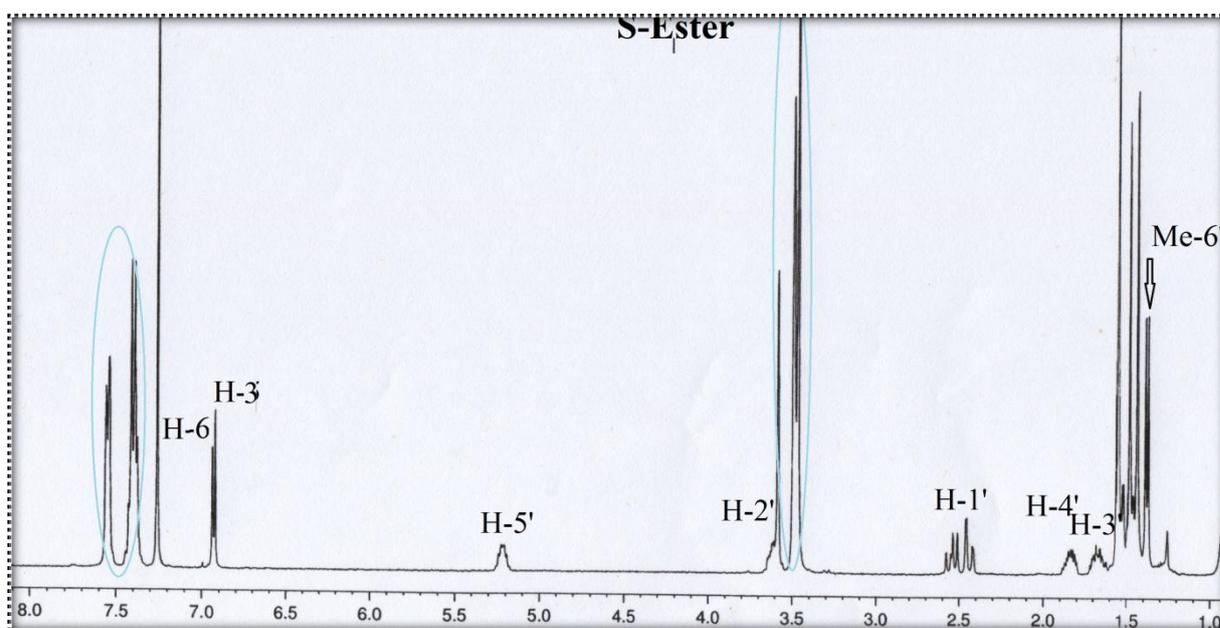


Figure III-43b: Spectre RMN ^1H du composé CN-3'B

Le spectre COSY H-H (Figures III-44a et III-44b) montre le couplage entre les protons du méthyle terminal et le proton H-5', ce dernier couple avec le méthylène adjacent CH_2 -4'. A partir des protons de l'oxyméthine H₂-2', le spectre COSY H-H permet d'identifier les protons H-1' et H-3'.

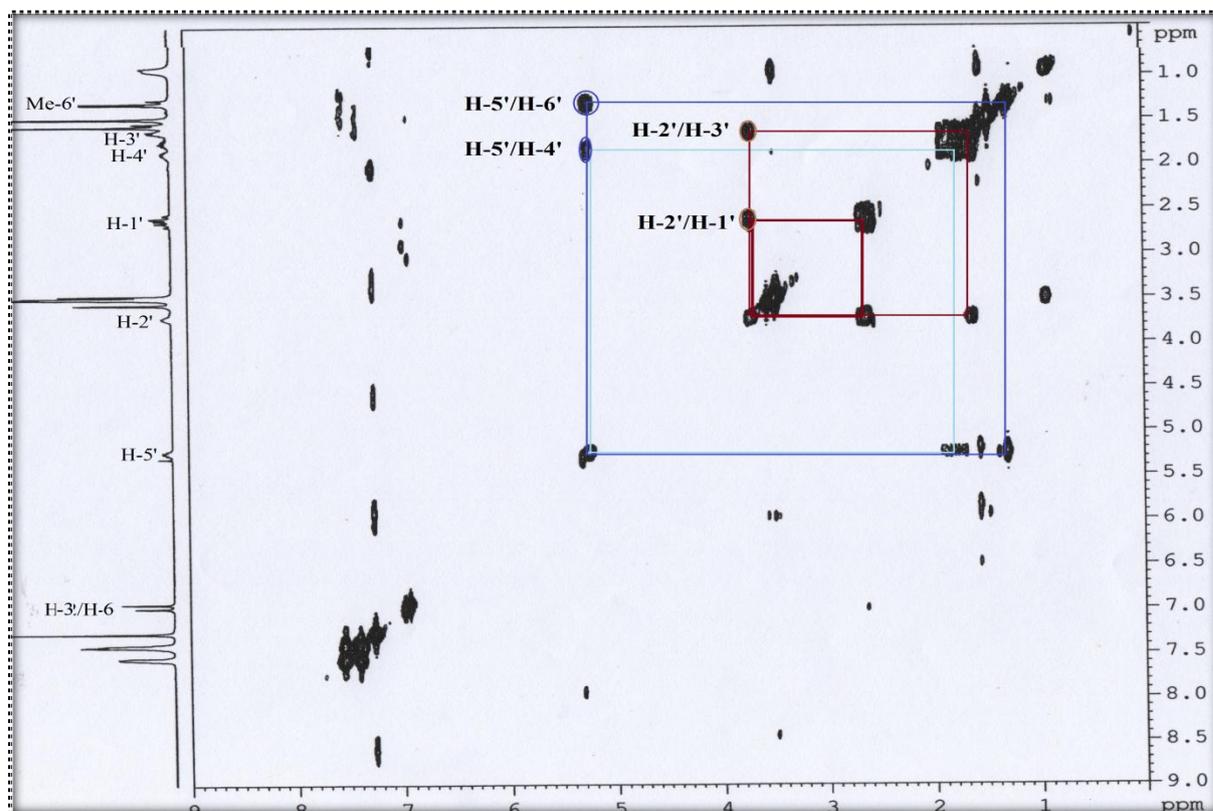


Figure III-44a: Spectre COSY H-H du composé CN-3'A

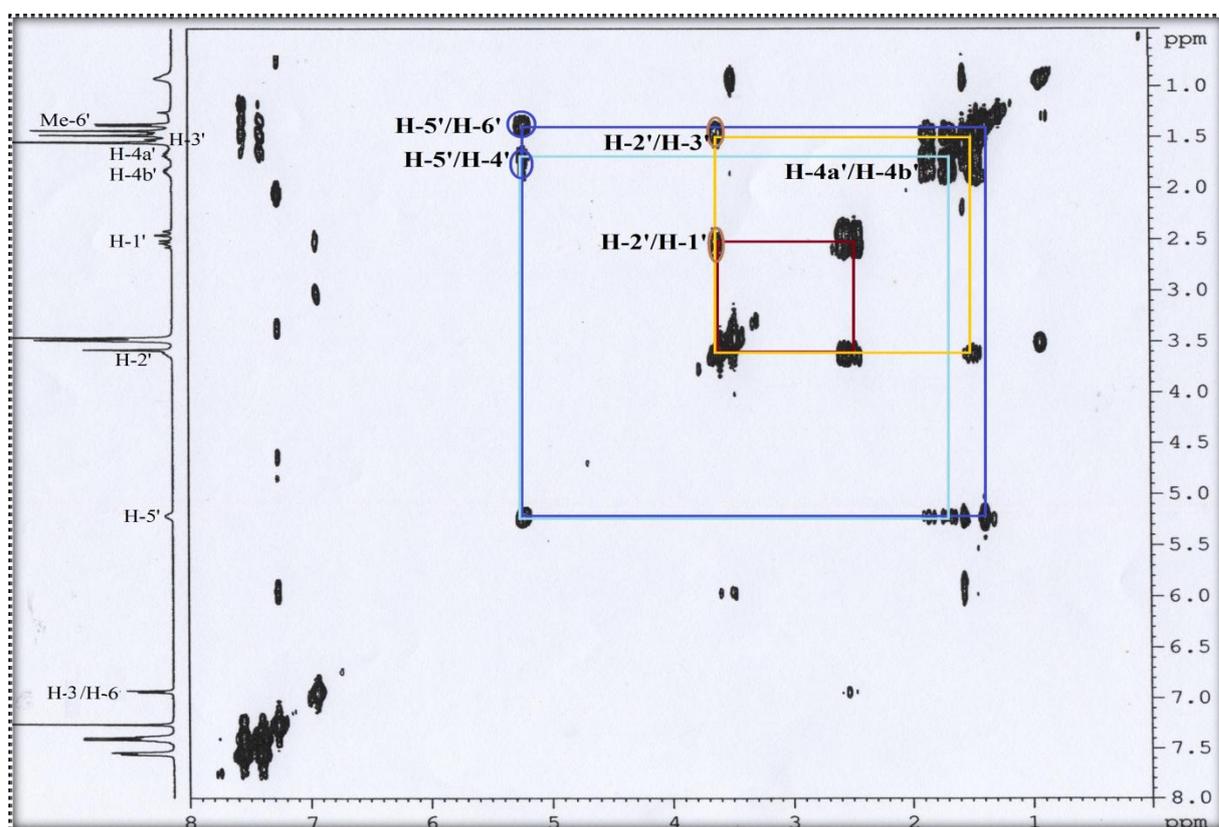


Figure III-44b: Spectre COSY H-H du composé CN-3'B

Des expériences de corrélations hétéronucléaires à courte et à longue distance, HSQC et HMBC, (Figures III-45a, III-45b, III-46a et III-46b) ont permis l'attribution complète des signaux appartenant à chaque diastéréoisomère.

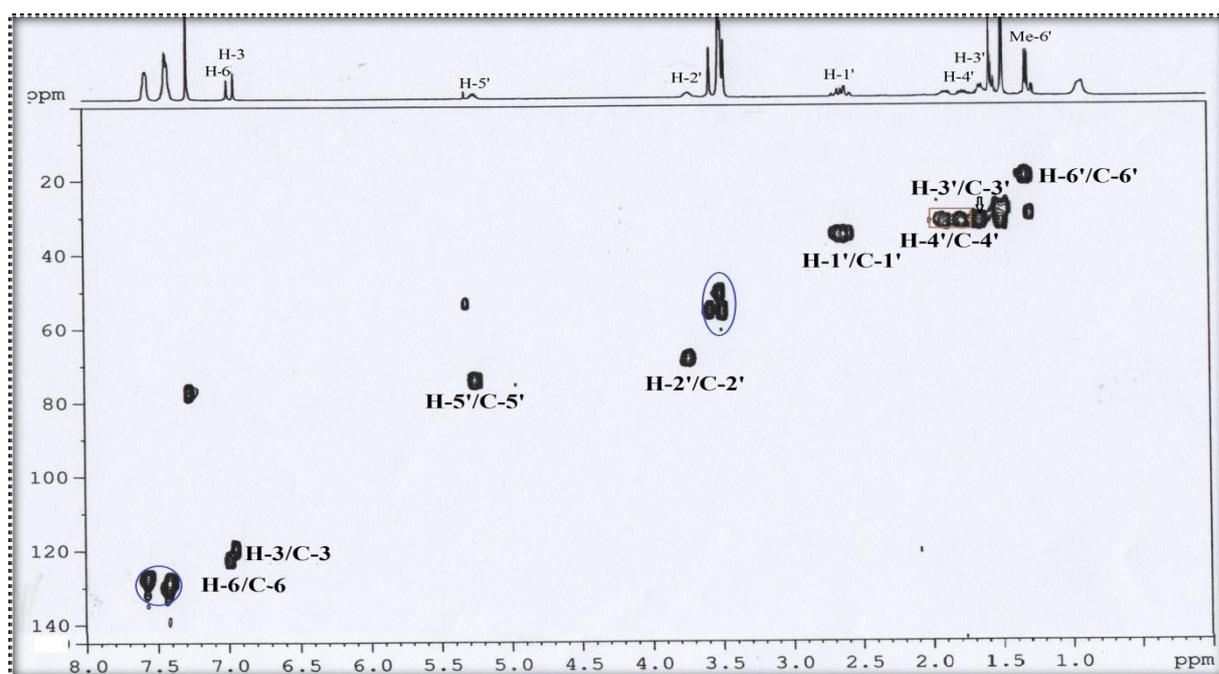


Figure III-45a: Spectre HSQC du composé CN-3'A

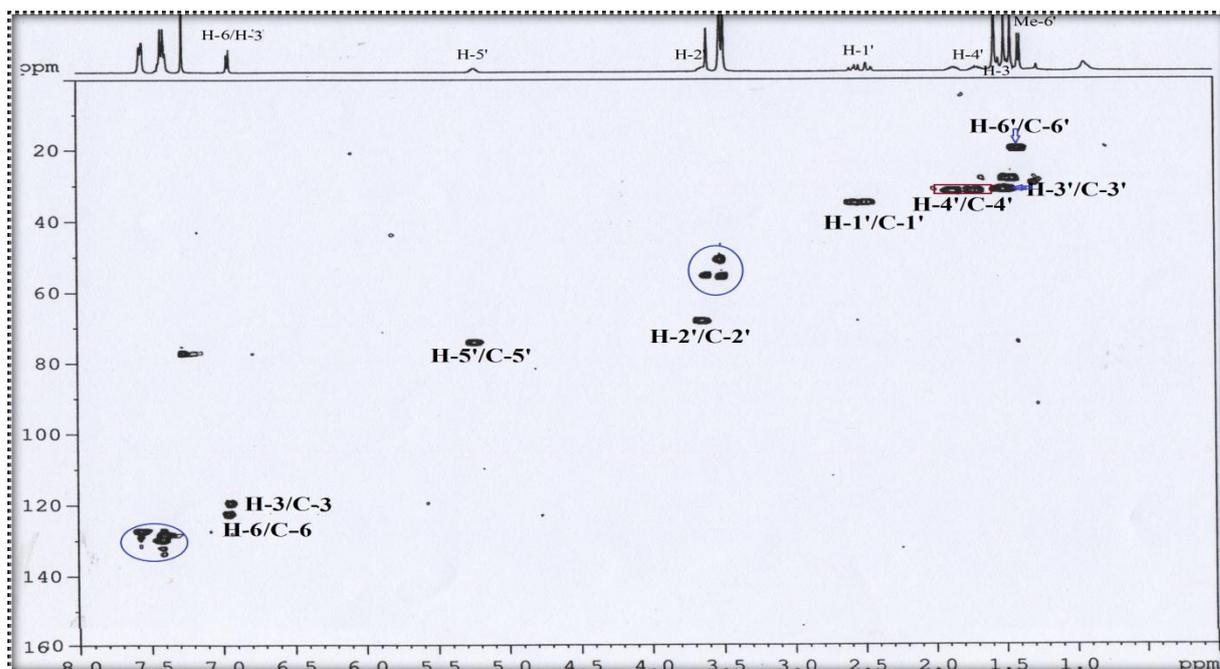


Figure III-45b: Spectre HSQC du composé CN-3'B

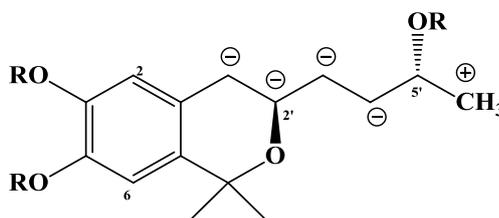
L'analyse des spectres RMN ^1H , COSY H-H et HSQC de deux diastéréoisomères CN-3'A et CN-3'B montre une différence des déplacements chimiques des protons adjacents à l'oxyméthine H-5'. Cette différence est mesurée par la relation suivante:

$$\Delta\delta_{SR} = \delta_S \text{ ester} - \delta_R \text{ ester}$$

Les valeurs obtenues expérimentalement sont présentées dans le tableau III-5 suivant :

Tableau III-5: Les déplacements chimiques des protons des isomères CN-3'A et CN-3'B

Les protons	$\delta_{\text{H}} S\text{-ester}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}} R\text{-ester}$ (ppm)	$\Delta\delta_{SR}$
3	6,940	6,977	- 0,037
6	6,920	6,929	- 0,009
1'	2,544 / 2,437	2,646 / 2,567	- 0,102/- 0,130
2'	3,602	3,708	- 0,106
4'	1,835 / 1,672	1,862 / 1,738	- 0,027/-0,056
6' Me	1,379	1,296	+ 0,083



Selon le modèle de Mosher, la différence de déplacements chimiques du proton H-6' pour les deux dérivés **CN-3'B** et **CN-3'A** devrait être positive ($\Delta\delta_{SR}>0$), tandis que cette différence pour les protons H₂-1' à H₂-4', devrait être négative ($\Delta\delta_{SR}<0$). En se basant sur les valeurs expérimentales obtenues et celles prévues par le modèle de Mosher, la configuration absolue au niveau du carbone C-5' est déduite *R*.

1.3.1.3. Détermination de la configuration absolue au niveau du C-2' du composé CN-3

Pour confirmer la configuration absolue du carbinol secondaire C-2', on a effectué la réaction d'estérification directement sur le composé d'origine CN-3. Dans cette expérience, on a utilisé les deux agents chiraux de dérivatisation (*R*)-MPA (acide méthoxyphényl acétique) et (*S*)-MPA (acide méthoxyphényl acétique). La réaction d'estérification est catalysée avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de quantités catalytiques de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), pour fournir les deux bis-esters diastéréoisomères **CN-3A** et **CN-3B** (Figure III-46).

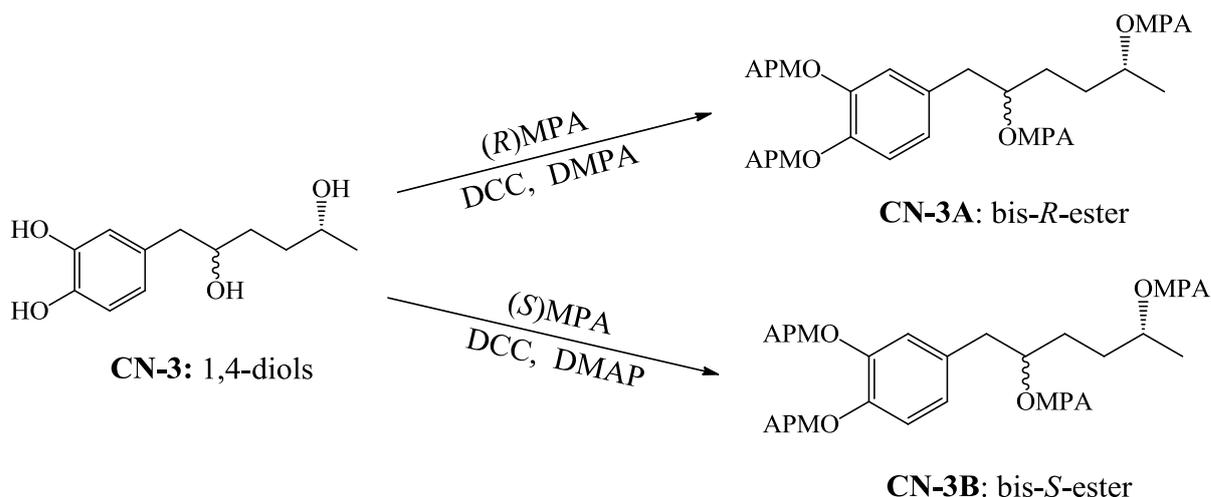


Figure III-46: Réaction de Mosher sur le composé **CN-3**

Détermination structurale des esters **CN-3A** et **CN-3B**

L'analyse des spectres de masse en source ESI⁺ de **CN-3A** et **CN-3B** permet d'observer un ion quasi-moléculaire à $m/z = 840,43$ $[M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 818 uma, en accord avec la formule C₄₈H₅₀O₁₂ (Figure III-47).

A partir des protons du méthyle H₃-6' et les protons H₂-1', les spectres RMN ¹H et COSY H-H (Figures III-48 et III-49) de chaque ester ont permis d'identifier les deux protons H-2' et H-5'.

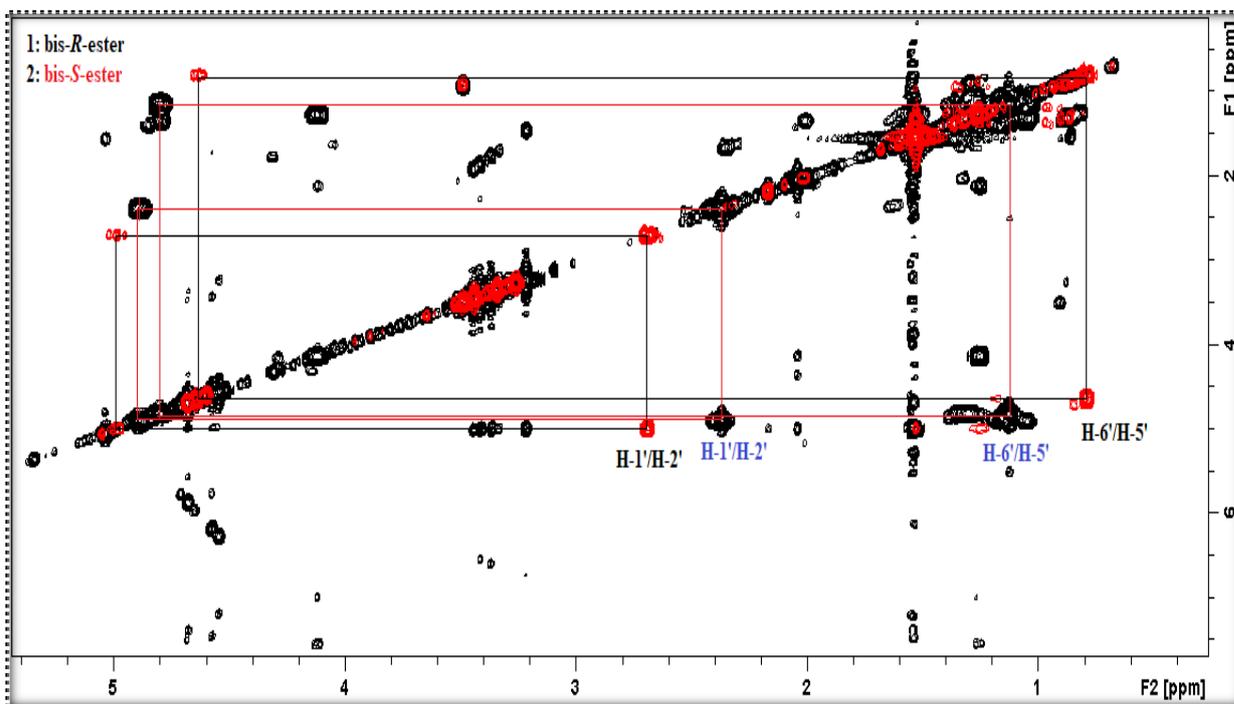
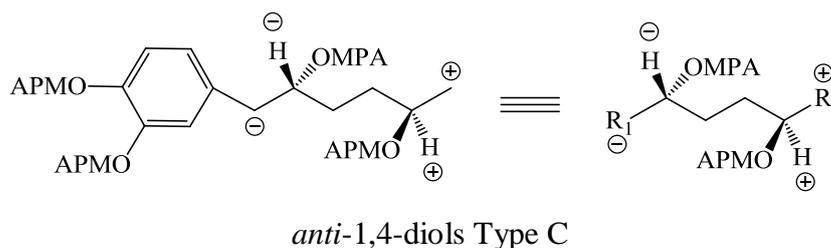


Figure III-49: Spectres COSY H-H des composés CN-3A et CN-3B

Les valeurs obtenues expérimentalement à partir des spectres RMN ¹H et COSY H-H pour chaque ester sont présentées dans le tableau suivant :

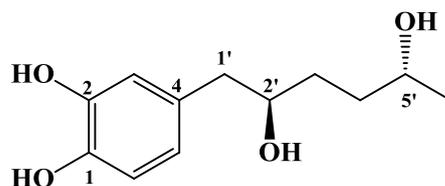
Tableau III-6: Les déplacements chimiques des protons des isomères CN-3A et CN-3B

Les protons	$\delta_{\text{H } R\text{-ester}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H } S\text{-ester}}$ (ppm)	$\Delta\delta_{RS}$
1'	2,36	2,70	-0,34
2'	4,89	4,99	-0,10
5'	4,78	4,61	+0,17
6' Me	1,14	0,78	+0,36



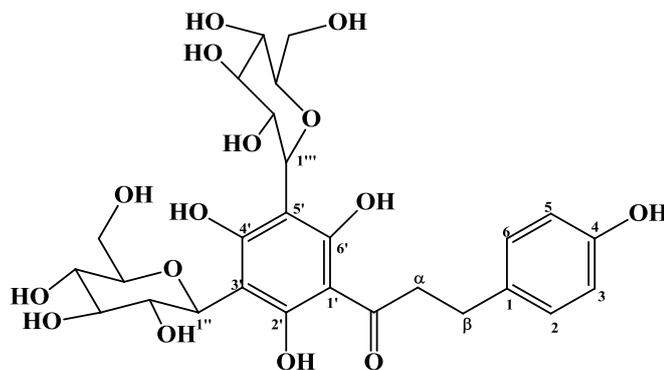
A l'issue de cette analyse chimique et selon le modèle de Mosher utilisant ACD, la différence de déplacements chimiques des protons H-6' (R₂) et H-5' (H_{αn}) pour les dérivés **CN-3A** et **CN-3B** devrait être positive ($\Delta\delta_{RS}>0$) tandis que cette différence pour les protons H₂-1' (R₁) et H-2' (H_{α1}) devrait être négative ($\Delta\delta_{RS}<0$), et par conséquent le composé **CN-3** (1,4-diol) est *anti* de type C et la configuration absolue au niveau des carbones C-2' et C-5' sont *R*. L'attribution de la configuration absolue (*R*) aux centres stéréogéniques C-2' et C-5' est en accord avec les résultats déjà obtenus.

A partir de tout ce qui précède, le composé **CN-3** est identifié comme étant le 4-(2*R*,5*R*-dihydroxyhexyl) benzène-1,2-diol.



1.4. Composé GB-1

Le composé **GB-1** est obtenu sous forme d'une poudre jaune, il est visible à la lumière UV à 254 nm et présente une couleur jaunâtre après révélation avec le sulfate de cérium et chauffage.



L'analyse du spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-1** (Figure III-50) fait apparaître un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 621,72 [M+Na]⁺, attestant une masse moléculaire de 598 uma en accord avec la formule C₂₇H₃₄O₁₅.

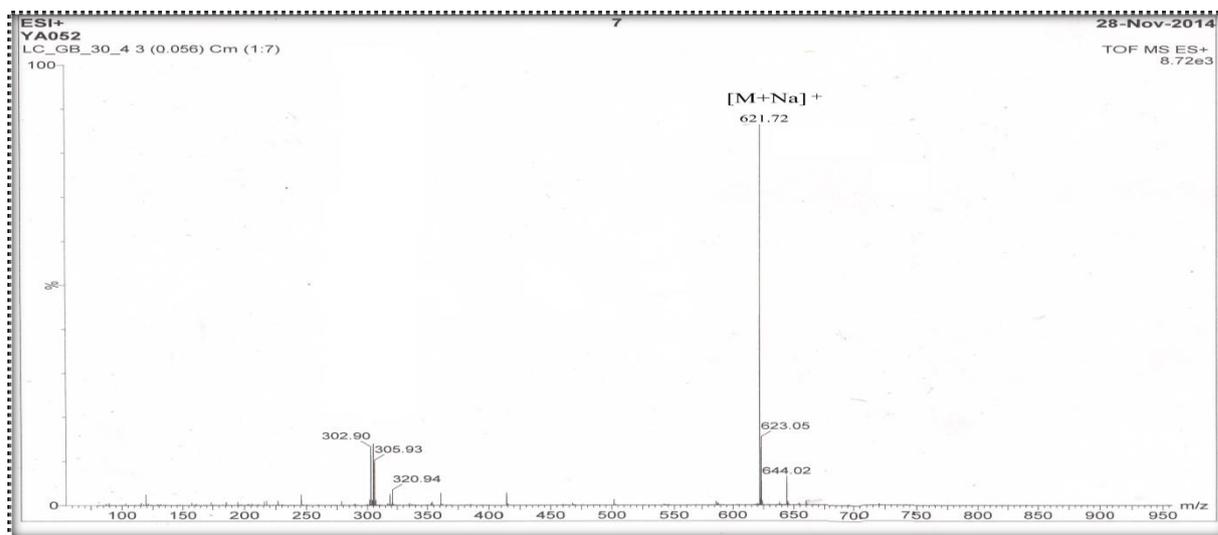


Figure III-50: Spectre de masse ESI⁺ du composé GB-1

L'analyse du spectre RMN ¹H réalisé dans MeOH-*d*₄ (Figure III-51) indique la présence de :

- Deux doublets à δ_H 7,06 (*d*, $J = 8,3$ Hz) et à δ_H 6,70 (*d*, $J = 8,3$ Hz), s'intégrant chacun pour deux protons assignables aux protons aromatiques d'un noyau *para* substitué.
- Un massif compris entre 3,30 et 5,00 ppm correspond aux signaux caractéristiques de protons osidiques dont le signal à δ_H 4,97 (2H, *d*, $J = 10$ Hz), intégrant pour deux protons, est attribuable aux deux protons anomériques identiques.
- En fin, un signal aliphatique à δ_H 2,89 sous forme de triplet, s'intégrant pour deux protons, attribuable aux protons méthylènes d'un groupement benzyle (CH₂).

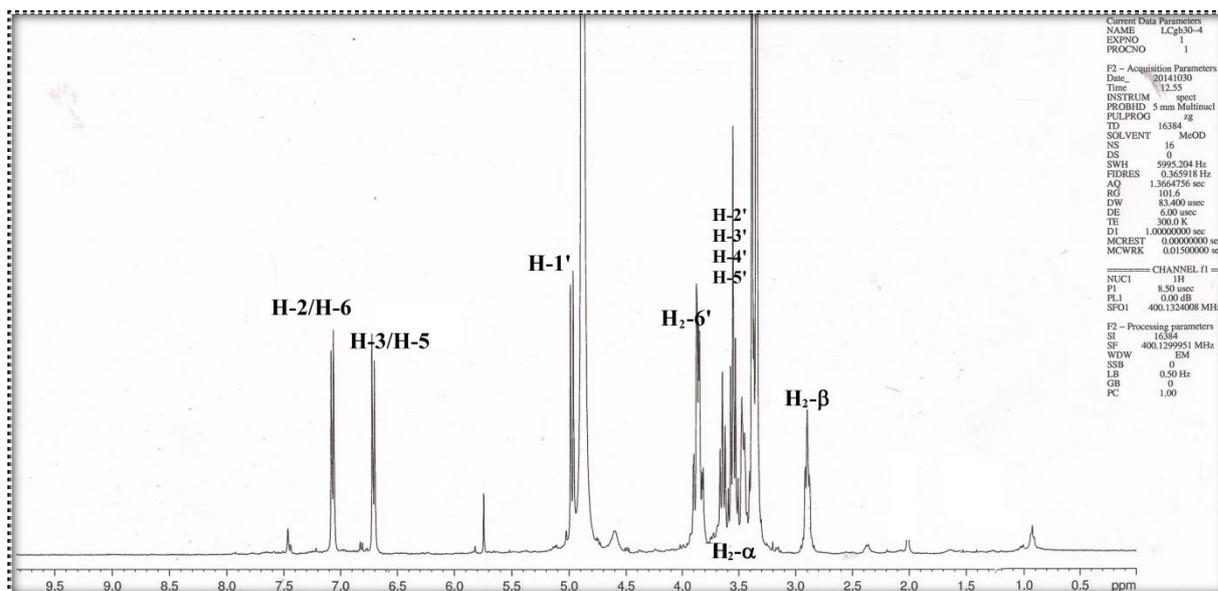


Figure III-51: Spectre RMN ¹H du composé GB-1

La simplicité du spectre RMN ^1H de ce composé, en faveur avec la masse moléculaire relativement élevée, laisse supposer que le squelette de ce composé est un dérivé phénolique substitué par deux unités osidiques et comportant au moins deux noyaux aromatiques.

La détermination de la structure du composé **GB-1** est initiée par le spectre COSY H-H (Figures III-52 et III-52a), où on observe un couplage entre les quatre protons aromatiques constituant un système A_2B_2 d'un cycle aromatique (H-2/H-3 et H-5/H-6). Egalement, le spectre fait apparaître un couplage entre les protons méthylènes du groupement benzyle à 2,89 ppm (2H, $t J = 7,4$ Hz) avec deux autres protons dont le signal résonant à δ_{H} 3,37 (2H, m). Il est à signaler que le déblindage relatif du signal de ces deux derniers protons laisse suggérer qu'ils sont attachés à un groupement attracteur.

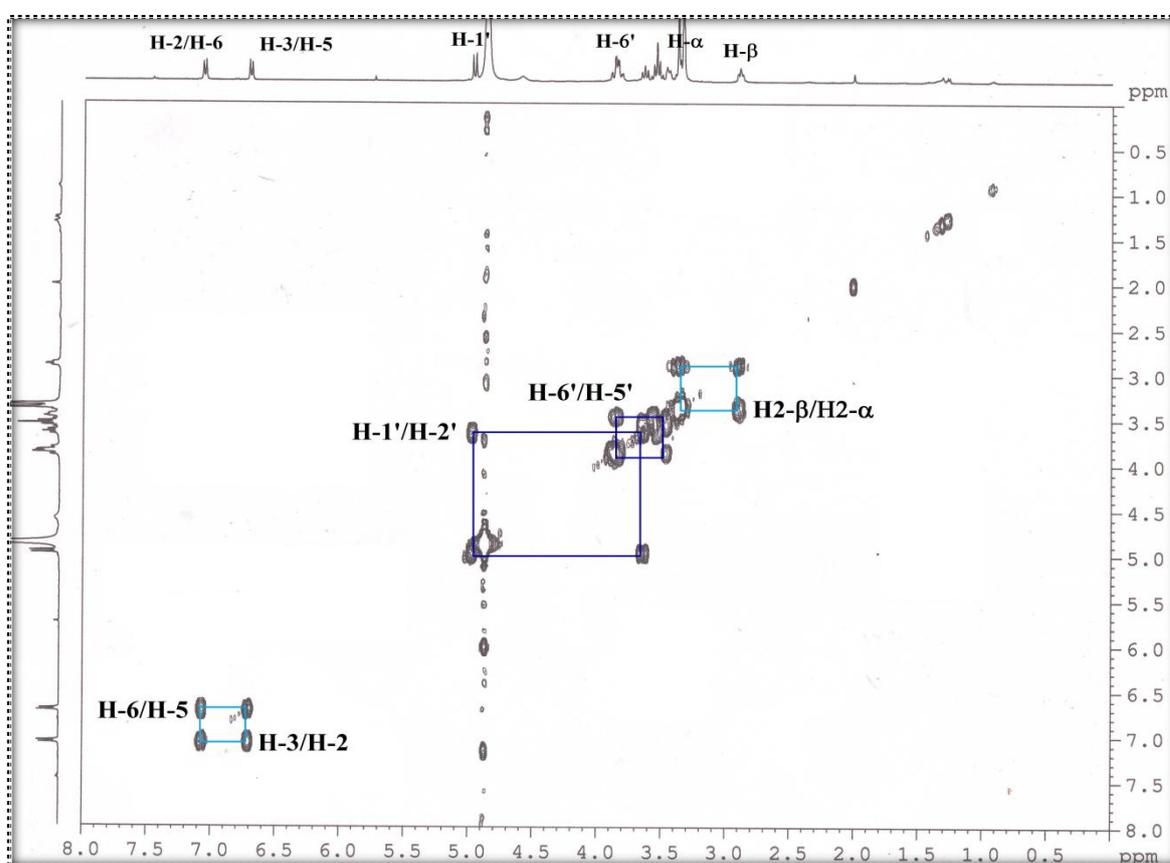


Figure III-52: Spectre COSY H-H du composé **GB-1**

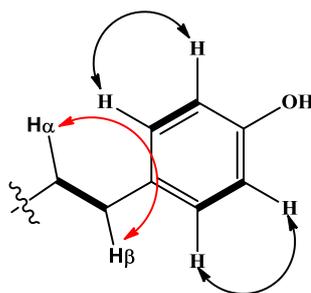


Figure III-52a: Corrélations COSY H-H d'une partie du composé **GB-1**

Le spectre HSQC (Figure III-53), montre les carbones des protons détectés précédemment, comme suit:

- Les protons aromatiques à δ_H 7,06 (H-2/H-6) et 6,70 (H-3/H-5), et leurs carbones à δ_C 130,2 (C-2/C-6) et à δ_C 116,0 (C-3/C-5), respectivement.
- Les protons aliphatiques H₂- α à δ_H 2,89, H₂- β à δ_H 3,37, et leurs carbones à δ_C 30,9 et à δ_C 47,8, respectivement.

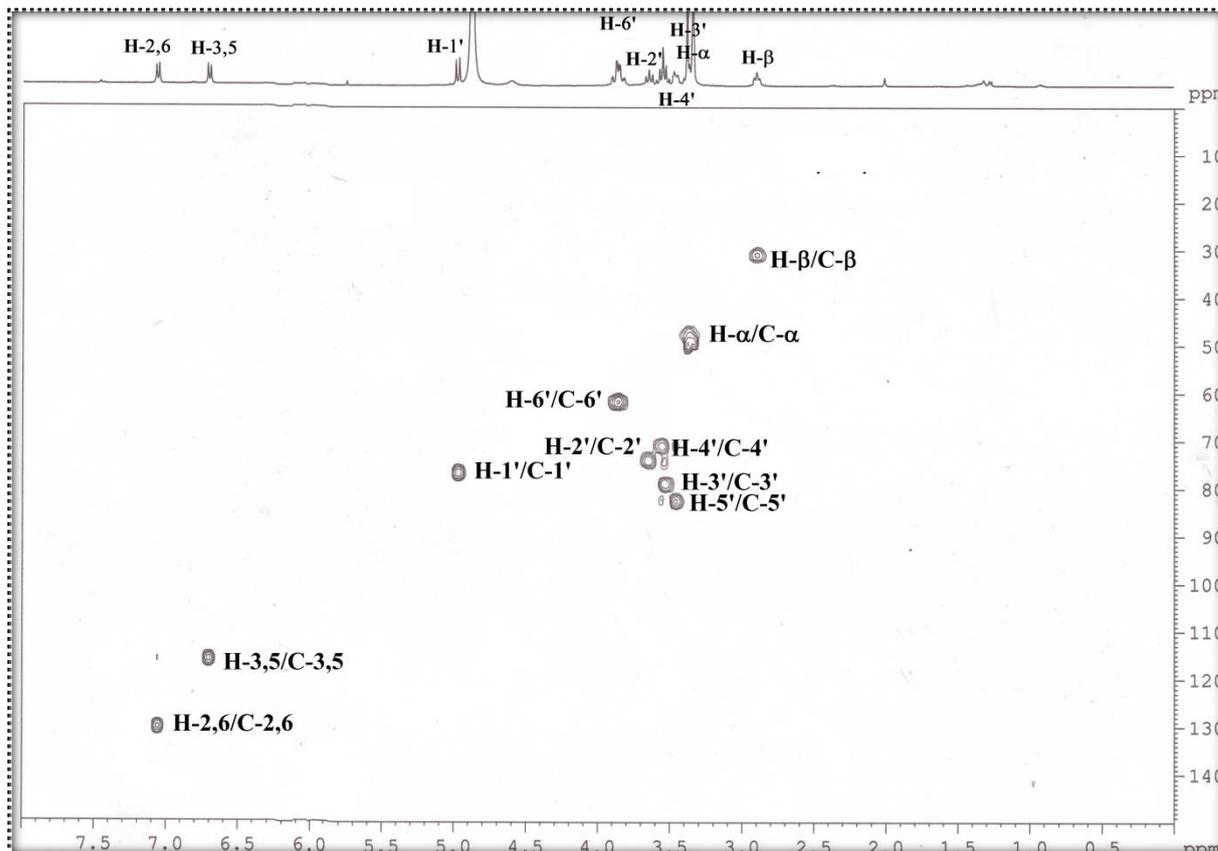


Figure III-53: Spectre HSQC du composé **GB-1**

Le spectre HMBC (Figure III-54), montre toutes les corrélations observées pour le composé **GB-1**. En particulier, on repère sur ce spectre des taches de corrélations entre les quatre protons aliphatiques (H₂- β et H₂- α) avec le carbonyle dont le signal est détecté à δ_C 207,0. Ces protons corréleront aussi avec un carbone quaternaire à δ_C 133,5, attribuable au carbone C-1 du premier cycle aromatique. En revanche, les protons benzyles H₂- β corréleront bien avec le carbone C- α et les carbones aromatiques C-2 et C-6. Tous les protons aromatiques H-2, H-3, H-5 et H-6 présentent des corrélations avec un carbone aromatique quaternaire oxygéné à 156,3 ppm, attribuable au carbone C-4.

L'analyse précédente est en accord avec le fragment ph-CH₂-CH₂-CO- (dihydrocoumaryle) (Figure III-54a).

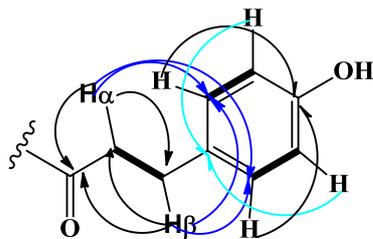


Figure III-54a: Corrélations HMBC de la partie dihydrocoumaroyle du composé **GB-1**

A ce stade d'analyse, tous les protons observés sur les spectres COSY H-H et HSQC sont identifiés, bien que le spectre HMBC (Figure III-54), d'autres carbones quaternaires aromatiques non attribuables, ceci nous a orienté à supposer que le composé **GB-1** est une dihydrochalcone, où le noyau A est totalement substitué.

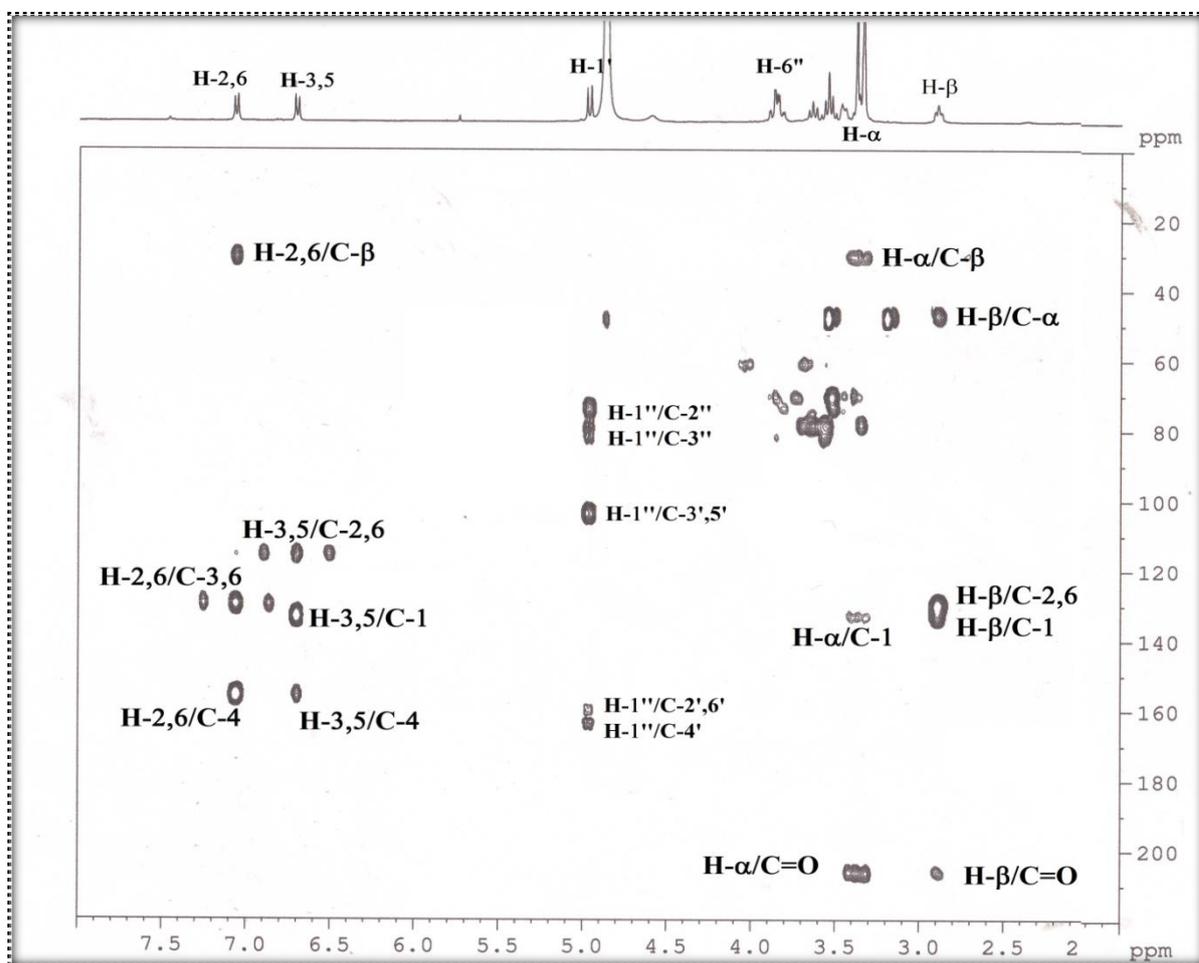


Figure III-54: Spectre HMBC du composé **GB-1**

Pour identifier le reste du squelette du composé GB-1 y compris la partie aromatique et sucre, on commence par l'analyse de la partie osidique.

Le spectre RMN ^1H (Figure III-51) montre un doublet à δ_{H} 4,97 (2H, *d*, $J = 10,0$ Hz), caractéristique des deux protons anomériques de configuration β . Le spectre de corrélation

hétéronucléaire HSQC (Figure III-53) montre que ces deux protons anomères sont liés aux deux carbones superposés à δ_C 76,6, une valeur très typique d'un β -C-glycose¹⁹⁷.

A partir des protons anomériques, l'analyse des spectres RMN ^1H et COSY H-H (Figures III-52), permet de déterminer la nature de deux systèmes de spins identiques. En effet, on observe clairement sur le spectre COSY H-H, les couplages entre les protons anomères H-1''/H-1''' (2H, *d*, $J = 10,0$ Hz) et les protons H-2''/ H-2''' à δ_H 3,62 (2H, *dd*, $J = 9,2$ Hz), ces derniers corrént avec les protons H-3''/ H-3''' sous forme de triplet à δ_H 3,55 (2H, *t*, $J = 9,2$ Hz). A leurs tour, les protons H-3''/H-3''' corrént eux aussi avec les protons H-4''/ H-4''' à δ_H 3,57 (2H, *t*, $J = 9,2$ Hz), ces derniers corrént avec les protons H-5''/ H-5''' à 3,41 ppm (2H, *m*) sous forme de multiplet. De même les protons H-5''/H-5''' couplent avec deux autres protons H₂-6''/ H₂-6''' à 3,82 ppm (2H, *dd*, $J = 12,5, 4,9$ Hz, H-6a''/ H-6a''') et à 3,86 ppm (2H, *dd*, $J = 12,5, 2,1$ Hz, H-6b''/ H-6b''').

Les déplacements chimiques des carbones osidiques de chaque unité sont attribués à l'aide de l'expérience HSQC à δ_C 74,2 (C-2''/ C-2'''), δ_C 79,1 (C-3''/C-3'''), δ_C 71,1 (C-4''/C-4'''), δ_C 82,7 (C-5''/C-5''') et δ_C 61,8 (C-6''/C-6'''). En comparaison de ces données spectroscopiques avec celles décrites dans la littérature, les deux unités sucres sont identifiées comme le β -glucose.

La connectivité de deux unités osidiques à la molécule a été faite en analysant rigoureusement le spectre HMBC (Figure III-54). En effet, chaque proton anomère présente trois corrélations avec les carbones aromatiques quaternaires à δ_C 104,5 δ_C 162,1 et à δ_C 163,1. La valeur à 104,5 ppm justifie la liaison C-C entre l'unité osidique et le noyau aromatique, tandis que les deux valeurs à 162,1 et 163,1, sont typiques des carbones aromatiques hydroxylés et par conséquent, ces trois valeurs sont assignées aux carbones C-3'/C-5' (104,5 ppm), C-2'/C-4' (163,1 ppm) et C-6' (162,1 ppm) (Figure III-54b).

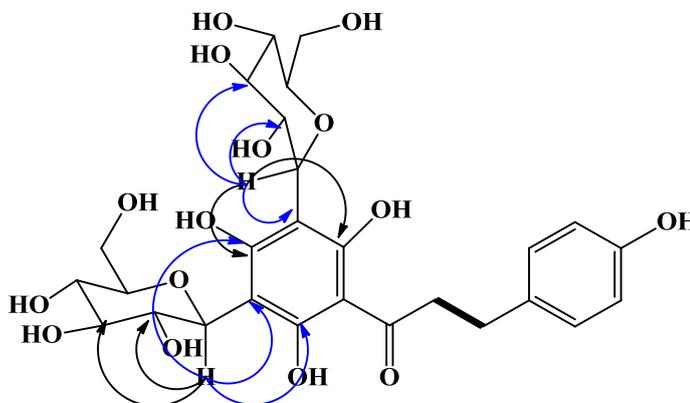


Figure III-54b: Corrélations HMBC de la partie osidique et du cycle A du composé **GB-1**

Ces données spectroscopiques permettent l'attribution au composé **GB-1** la structure suivante: 2',4,4',6'-tétrahydroxydihydrochalcone 3',5'-di-C- β -D-glucoside (phlorétine 3',5'-di-C- β -D-glucoside). Ce composé naturel di-C-glucoside est relativement rare²²⁴. Il n'a été isolé que de quelques genres de la famille Rutaceae tels que les genres *Fortunella* (*F. crassifolia*, *F. japonica*, *F. margarita* et *F. hindisii*), le *Citrus* (*C. madurensis* et *C. halimii*) et le *Cyclopia* (*C. subternata*, *C. intermedia* et *C. sessiliflora*)^{225,226}. Il n'avait jamais été caractérisé chez les Rubiaceae. Comme les autres dérivés phénoliques, et en particulier les dihydrochalcones, ce composé possède une propriété anti-oxydante et des effets hypotensives et radio protective^{227,228,229}.

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **GB-1** sont représentés dans le tableau III-7 suivant :

Tableau III-7: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé **GB-1** dans MeOH-*d*₄

Position	δ_H m J(Hz)	δ_C
1	-	133,5
2	7,06 d (8,3)	130,2
3	6,70 d (8,3)	116,0
4	-	156,3
5	6,70 d (8,3)	116,0
6	7,06 d (8,3)	130,2
α	3,30 m	47,8
β	2,89 t (7,4)	30,9
1'	-	nd
2'	-	163,1
3'	-	104,5
4'	-	163,1
5'	-	104,5
6'	-	162,1
Glucose		
1" (1''')	4,97 d (10,0)	76,6
2" (2''')	3,62 dd (9,2)	74,2
3" (3''')	3,55 t (9,2)	79,1
4" (4''')	3,57 t (9,2)	71,1
5" (5''')	3,41 m	82,7
6" (6''')	3,82 dd (12,5; 5,9)	61,8
	3,86 dd (12,5; 2,1)	
C=O	-	207,0

²²⁴ Sato S., Akiya T., Nishizawa H., Suzuki T., Total synthesis of three naturally occurring 6,8-di-C-glycosylflavonoids: phloretin, naringenin, and apigenin bis-C- β -D-glucosides, *Carbohydrate Research* 341, 964-970, **2006**.

²²⁵ Ogawaa K., Kawasakib A., Omurab M., Yoshidab T., Ikomab Y., Masamichi Y., 3',5'-Di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*, *Phytochemistry* 57, 737-742, **2001**.

²²⁶ Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., Sowinski P., Glod D., Gorynski K., Bucinski A., Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and in vitro cultures, *Food Chemistry* 133, 1373-1382, **2012**.

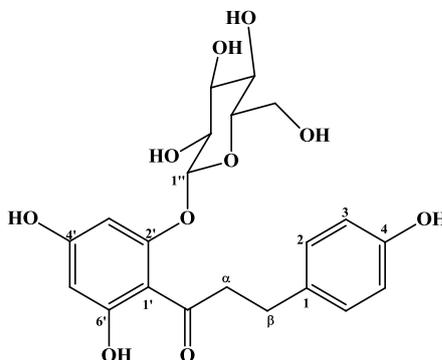
²²⁷ Rezk B.M., Haenen G. R.M.M., Vijgh W. J.F. van der, Basta A., The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 9-13, **2002**.

²²⁸ Lou S-N., Hsu Y-S., Ho C-T., Flavonoid compositions and antioxidant activity of *Calamondin* extracts prepared using different solvents, *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 290-295, **2014**.

²²⁹ Yu M-W., Lou S-N., Chiu E-M., Ho C-T., Antioxidant activity and effective compounds of *Immature calamondin* peel, *Food Chemistry* 136, 1130-1135, **2013**.

1.5. Composé GB-2

Le produit **GB-2** est une poudre jaune claire dont la CCM montre une tache jaune UV-visible et donne après révélation et chauffage une tache marron.



Le spectre de masse en source ESI, enregistré en mode positif (Figure III-55), a permis la détermination de sa masse moléculaire de 436 uma, grâce aux deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 459,0508 $[M+Na]^+$ et m/z 894,8355 $[2M+Na]^+$, soit une formule brute $C_{21}H_{16}O_{10}$.

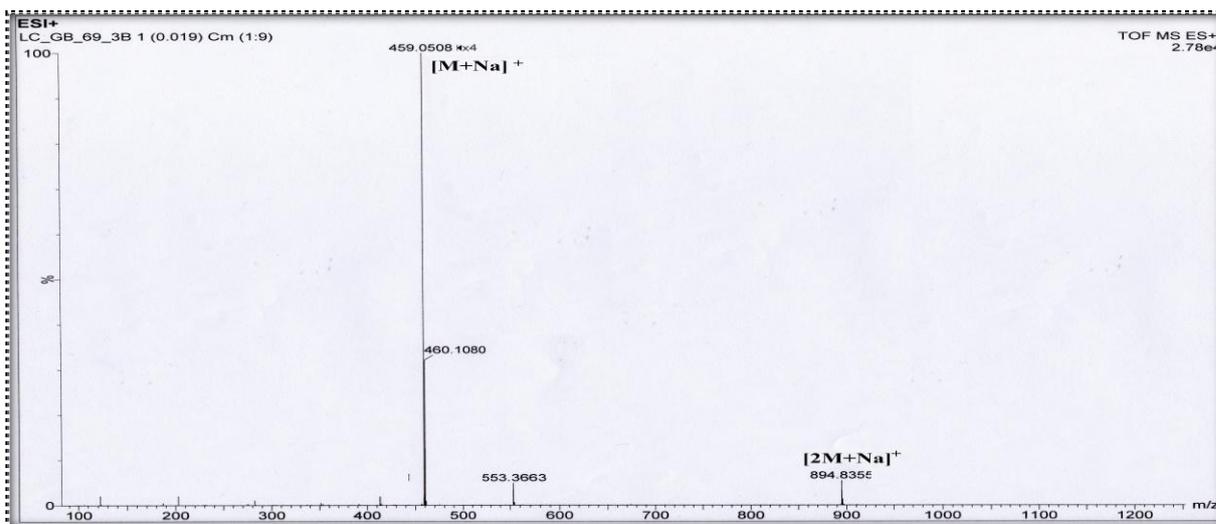


Figure III-55: Spectre de masse ESI du composé **GB-2**

Le spectre RMN 1H , réalisé dans $MeOH-d_4$ (Figure III-56), fait apparaître des signaux similaires à ceux du composé **GB-1**, concernant la présence d'une partie aromatique et d'une partie osidique. Toutefois, deux signaux supplémentaires dans la région aromatique sont observés. En premier lieu, le noyau aromatique B *para*-substitué, est présent avec les deux doublets à δ_H 7,05 (2H, d, $J = 9,0$ Hz) et δ_H 6,77 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), correspondent aux quatre protons aromatiques (H-2/H-6 et H-3/H-5), organisés en système A_2B_2 du ce cycle.

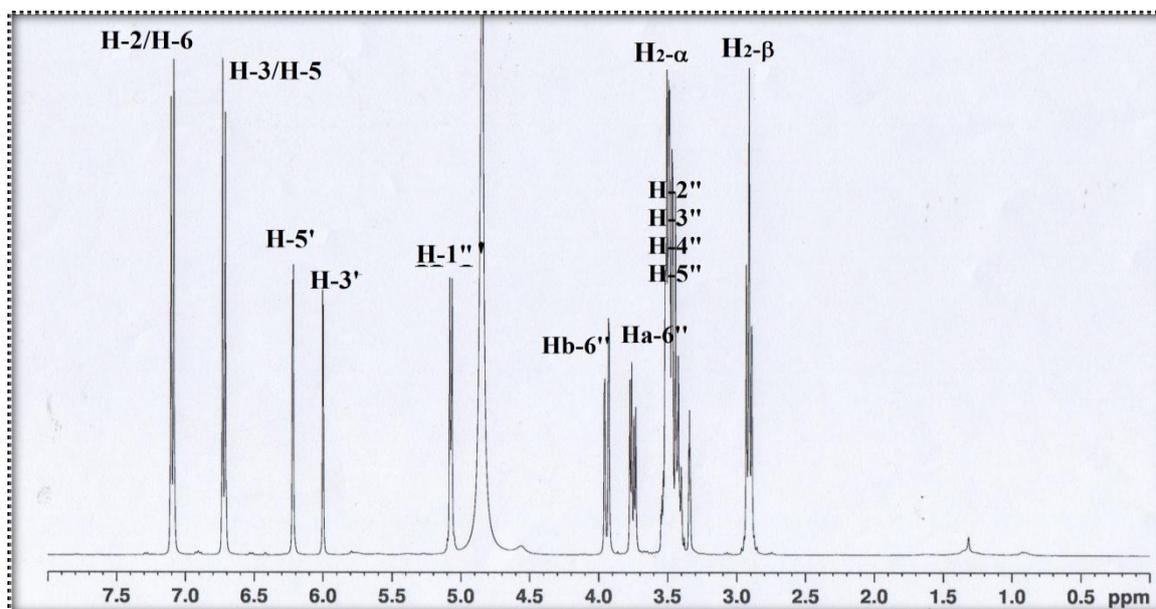


Figure III-56: Spectre RMN ^1H du composé **GB-2**

En deuxième lieu, les deux signaux supplémentaires sous forme de doublet à δ_{H} 5,98 ($J = 2,0$ Hz) et 6,19 ($J = 2,0$ Hz), s'intégrant chacun pour un proton sont attribués aux protons aromatiques H-3' et H-5' du cycle A *mé*ta couplé.

Les spectres HSQC et HMBC montrent également toutes les corrélations H-C directes et indirectes du cycle B (Figures III-57 et III-59).

- Des corrélations directes entre les protons H-2/H-6 et leurs carbones à 129,9 ppm, et les protons H-3/H-5 et leurs carbones à 115,8 ppm.
- Des corrélations indirectes entre les protons cités précédemment et un carbone aromatique quaternaire C-1 à 133,8 ppm, et un autre oxygéné C-4 à 156,0 ppm.

Le signal sous forme d'un triplet à δ_{H} 2,96 (2H, *t*, $J = 7,2$ Hz) correspondant aux protons méthylènes du groupement benzyle $\text{CH}_2\text{-}\beta$ et qui corrélient dans le spectre COSY H-H (Figures III-58 et III-58a) avec les protons $\text{H}_2\text{-}\alpha$ à δ_{H} 3,49 (2H, *m*).

Leurs carbones correspondants d'après le spectre HSQC (Figure III-57), sont repérés à δ_{C} 30,0 et à δ_{C} 46,8, respectivement. De plus, la corrélation HMBC (Figure III-59) entre les deux méthylènes et un carbonyle à δ_{C} 206,5 est détectée. Ce spectre permet d'observer aussi des corrélations entre les signaux des protons aromatiques H-2 et H-6 avec le carbone C- β . Les carbones aromatiques C-1, C-2, C6 et le carbone C- α , présentent des taches de corrélations avec les protons $\text{H}_2\text{-}\beta$. De même que le composé **GB-1**, le composé **GB-2**, présente une unité dihydrocoumaroylé ($\text{ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$) caractéristique d'une dihydrochalcone.

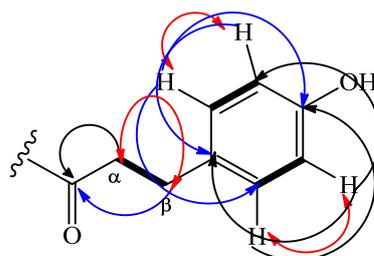


Figure III-58a: Corrélations COSY et HMBC de l'unité dihydrocoumaroyle du composé **GB-2**

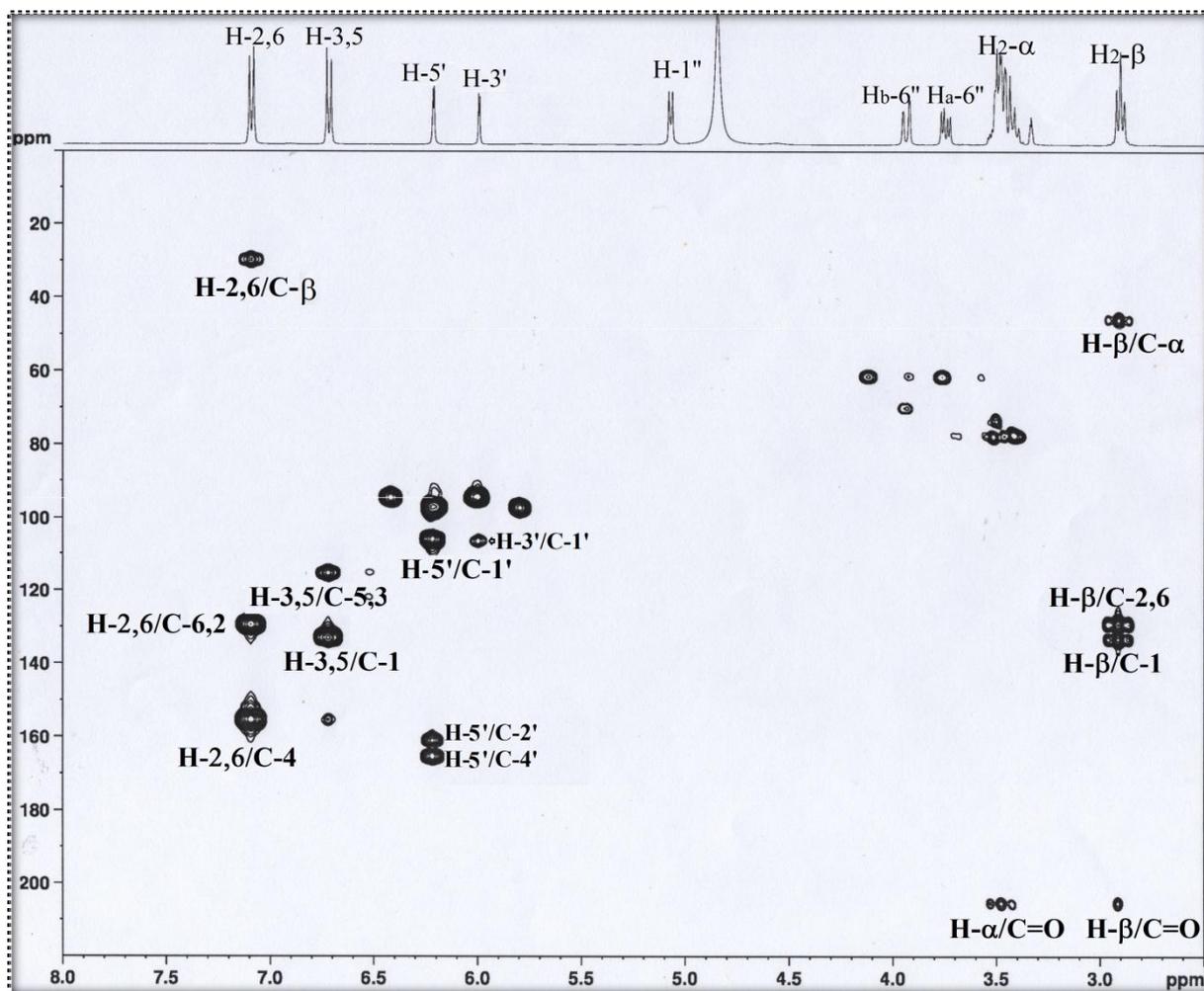


Figure III-59: Spectre HMBC du composé **GB-2**

Concernant la partie osidique, le spectre RMN ^1H (Figure III-56) montre également, un doublet à δ_{H} 5,02 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz), typique d'un proton anomérique d'une unité β -glycose. Une corrélation hétéronucléaire HSQC (Figure III-57) permet de définir le carbone porteur de ce proton avec un signal à δ_{C} 101,8, un déplacement chimique rencontré dans les *O*-glycosides. L'interprétation des corrélations observées sur le spectre COSY H-H (Figure III-58) à partir du proton anomérique fait marquer les autres protons H-2'' à δ_{H} 3,51 (1H, *t*, $J = 9,1$ Hz), H-3'' à δ_{H} 3,53 (1H, *m*), H-4'' à δ_{H} 3,42 (1H, *t*, $J = 9,0$ Hz), H-5'' à δ_{H} 3,46 (1H, *m*) et H₂-

6" à δ_H 3,72 (1H, *dd*, $J = 12,0$ et $5,3$ Hz, H-6a") et à δ_H 3,92 (1H, *dd*, $J = 12,0$ et $2,1$ Hz, H-6b"). Les valeurs élevées des constantes de couplage indiquent que tous les protons sont *trans* diaxiaux, suggérant qu'il s'agit d'un β -D-glucopyranose. A ce stade, tous les fragments de la molécule sont définis, il nous reste à déterminer le carbone d'attachement de l'unité glucose. En effet, comme la position C-2' est hydroxylée, les seules positions possibles de lier ce glucose, sont soit en C-6' (ou C-2') (phlorizine) ou en C-4' (trilobatine) (Figure III-60).

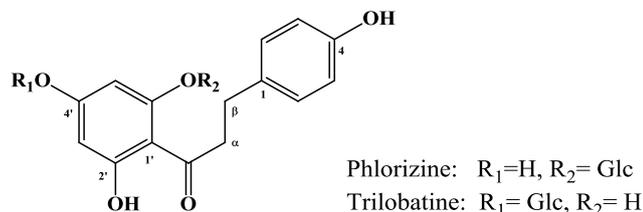


Figure III-60: Structures proposées pour le composé **GB-2**

Le spectre HMBC (Figures III-59) présente des tâches de corrélations entre le proton aromatique H-5' et le carbone quaternaire C-1' à δ_C 106,9, et avec d'autres carbones quaternaires oxygénés à δ_C 162,0 et à δ_C 167,1. Par ailleurs, sur le même spectre, aucune tâche de corrélation n'a été observée pour le proton anomérique. Avec ces données spectrales, il est difficile, donc, de déterminer la position d'attachement du glucose. Sa position en C-6' a été révélée grâce à une comparaison avec les données de la littérature^{230,231,232,233}. Dans le cas de la trilobatine, les valeurs de déplacement chimique des protons H-3' et H-5', sont identiques à δ_H 6,12, leur carbone (C-3'/C-5') est à δ_C 96,3, et les carbones C-2' et C-4' sont à δ_C 164,9. Contrairement à la phlorizine, les déplacements chimiques qui sont presque identiques à ceux du composé GB-2 se situent à $\delta_{H-3'}$ 5,98/ $\delta_{C-3'}$ 98,3, $\delta_{H-5'}$ 6,19/ $\delta_{C-5'}$ 95,2, $\delta_{C-4'}$ 162,0 et $\delta_{C-6'}$ 165,4.

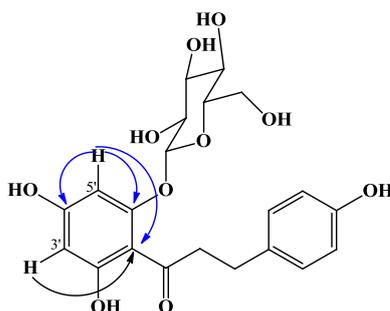


Figure III-79a: Corrélations HMBC du cycle A du composé **GB-2**

²³⁰ Rui-Lin N., Tanaka T., Zhou J., Tanaka O., Phlorizin and trilobatin, sweet dihydrochalcone-glucosides from leaves of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Rehd. (Fagaceae), *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (7), 1933-1934, **1982**.

²³¹ Tanaka T., Tanaka O., Kohda H., Chou W-H., Chen F-H., Isolation of trilobatin, a sweet dihydrochalcone-glucoside from Leaves of *Vitis piasezkii* Maxim. and *V. saccharifera* Makino, *Agricultural and Biological Chemistry* 47 (10), 2403-2404, **1983**.

²³² Qin X-D., Liu J-K., A new sweet dihydrochalcone glucoside from leaves of *Lithocarpus pachyphyllus* (Kurz) Rehd. (Fagaceae), *Z Naturforsch C* 58, 759-761, **2003**.

²³³ Tanaka T., Uehara R., Nishida K., Kouno I., Galloyl, caffeoyl and hexahydroxydiphenoyl esters of dihydrochalcone glucosides from *Balanophora tobiracola*, *Phytochemistry* 66, 675-681, **2005**.

Le composé **GB-2** est, par conséquent, a été identifié comme étant la dihydrochalcone 2'-O- β -glucoside, nommée phlorizine ou phloridzine, rencontrée dans plusieurs espèces de Rosaceae (pommier, poirier) et d'Ericaceae. Il a été isolé en 1966 dans l'écorce du pommier (*Malus demestica*)²³⁴. La phlorizine et ses analogues possèdent une saveur sucrée et jouent un rôle important dans la physiologie des feuilles de Rosaceae, infectées par les champignons. Ils possèdent des activités biologiques (anti-oxydantes) et pharmacologiques très importantes (traitement de diabète, obésité et le stress hyperglycémie)^{235,236}.

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont réunis dans le tableau III-8 suivant :

Tableau III-8: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé **GB-2** dans MeOH-*d*₄

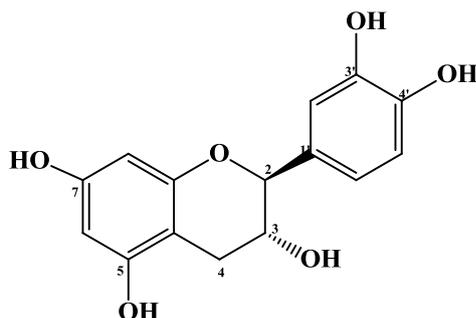
Position	δ_H <i>m J</i> (Hz)	δ_C
1	-	133,8
2	7,05 <i>d</i> (9,0)	129,9
3	6,77 <i>d</i> (9,0)	115,8
4	-	156,0
5	6,77 <i>d</i> (9,0)	115,8
6	7,05 <i>d</i> (9,0)	129,9
1'	-	106,9
2'	-	nd
3'	5,98 <i>d</i> (2,0)	98,3
4'	-	162,0
5'	6,19 <i>d</i> (2,0)	95,2
6'	-	165,4
α	3,49 <i>m</i>	46,5
β	2,96 <i>d</i> (7,2)	30,6
1''	5,02 <i>d</i> (8,0)	101,8
2''	3,51 <i>d</i> (9,1)	74,3
3''	3,53 <i>m</i>	78,1
4''	3,42 <i>t</i> (9,1)	71,1
5''	3,46 <i>m</i>	78,4
6''	3,73 <i>dd</i> (12,0; 5,3)	62,2
	3,92 <i>dd</i> (12,0; 2,1)	
C=O	-	206,5

²³⁴ Gosch C., Halbwirth H., Stich K., Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants, *Phytochemistry* 71, 838-843, **2010**.

²³⁵ Huang H-Y., Ko H-H., Jin Y-J., Yang S-Z., Shih Y-A., Chen I-S., dihydrochalcone glucosides and antioxidant activity from the roots of *Anneslea fragrans* var. lanceolate, *Phytochemistry* 78 120–125, **2012**.

²³⁶ Ehrenkranz JR., Lewis NG., Kahn CR., Roth J., Phlorizin: a review, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 21(1), 31-38, **2005**.

1.6. Composé CN-4



Le composé **CN-4** a été isolé, majoritairement, à partir de deux extraits éther diéthylique et butanolique. Ce composé est une poudre jaune, sa tâche sur CCM est visible sous la lumière UV à 254 nm. Il réagit aussi avec le réactif du sulfate de cérium et donne une tâche jaune après chauffage.

Le spectre de masse de composé **CN-4**, obtenu en mode positif (Figure III-61) montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 313,038 $[M+Na]^+$ et à m/z 603,173 $[2M+Na]^+$, donnant une masse moléculaire de 290 uma et une formule brute $C_{15}H_{14}O_6$.

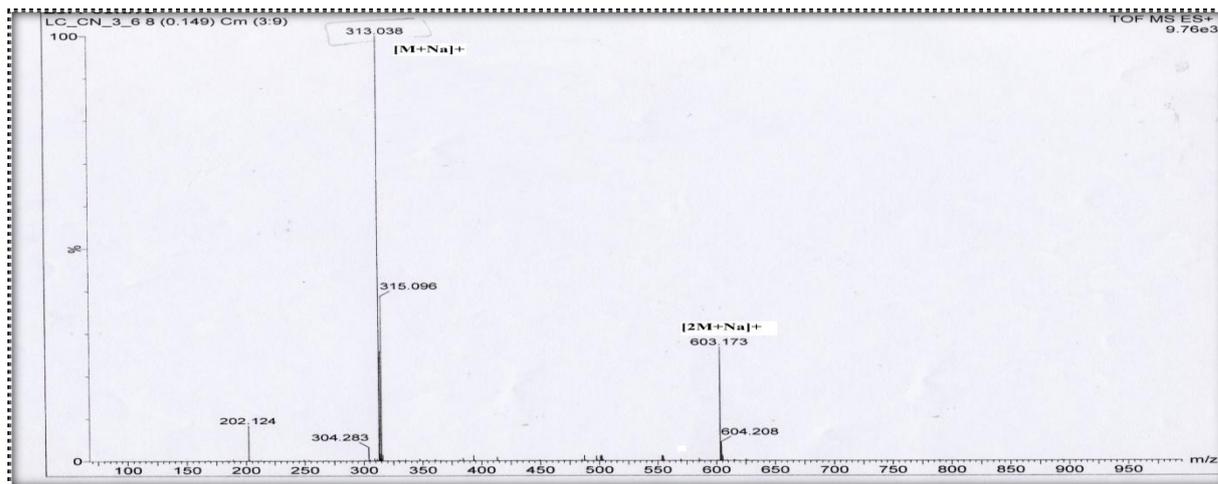


Figure III-61: Spectre de masse ESI⁺ du composé **CN-4**

La structure de **CN-4** a été établie grâce à son spectre RMN ¹H (Figure III-62) réalisé dans le méthanol deutéré. La 1^{ère} analyse effectuée suggère un squelette flavonoïdique où la région aromatique est représentée par cinq signaux allant du 5,85 à 7,00 ppm.

- Les deux signaux blindés résonant à δ_H 5,88 et δ_H 5,95, sous forme d'un doublet, s'intégrant chacun pour 1H, avec une constante de couplage $J = 2,1$ Hz, sont assignés aux deux protons aromatiques positionnés en *mé*ta l'un par rapport à l'autre ce sont les deux protons typiques H-8 et H-6 du cycle A.

- Les trois signaux aromatiques résonant à δ_H 6,86 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), δ_H 6,78 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) et δ_H 6,74 (1H, *dd*, $J = 8,0, 1,8$ Hz) sont attribuables aux protons H-2', H-5', et H-6', respectivement, du cycle B.

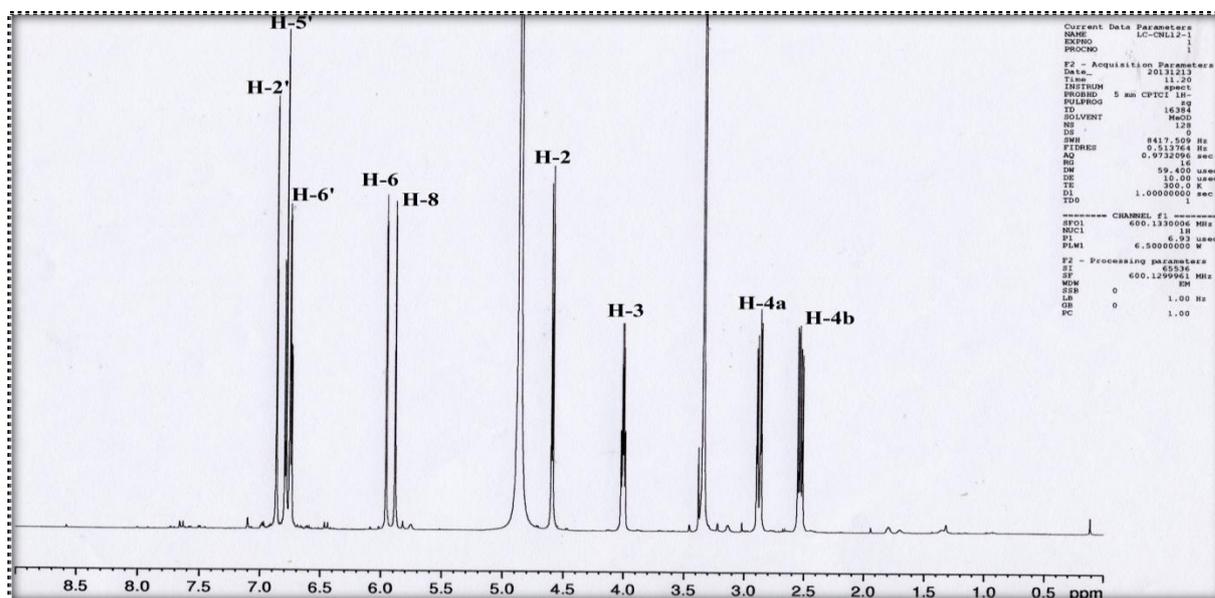


Figure III-62: Spectre de RMN ^1H du composé CN-4

L'analyse de spectre HSQC (Figure III-63), nous a permis de compter les cinq carbones aromatiques des cycles A et B de ce composé. L'attribution de chaque proton aromatique à son carbone porteur est comme suit: H-6/C-6 à δ_H 5,95/ δ_C 95,9, H-8/C-8 à δ_H 5,88/ δ_C 95,1, H-2'/C-2' à δ_H 6,86/ δ_C 114,9, H-5'/C-5' à δ_H 6,78/ δ_C 115,8, et H-6'/C-6' à δ_H 6,74/ δ_C 119,5). L'absence des autres signaux (osidiques et de groupements méthoxyles), indique que les noyaux A et B sont substitués en positions 5, 7, 3' et 4' par des groupements hydroxyles.

L'analyse du spectre RMN ^1H de la partie aliphatique (Figure III-82) montre la présence de deux signaux de deux protons géminés non équivalents d'un groupement méthylène, ces signaux apparaissent sous forme de doublet de doublets à δ_H 2,53 (1H, *dd*, $J = 16,0; 8,0$ Hz) et à δ_H 2,87 (1H, *dd*, $J = 16,0; 5,6$ Hz). On observe également sur ce spectre un signal à δ_H 4,00 (1H, *ddd*, $J = 8,0; 7,4; 5,4$ Hz) et un autre le plus déblindé à δ_H 4,59 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz) sous forme de doublet.

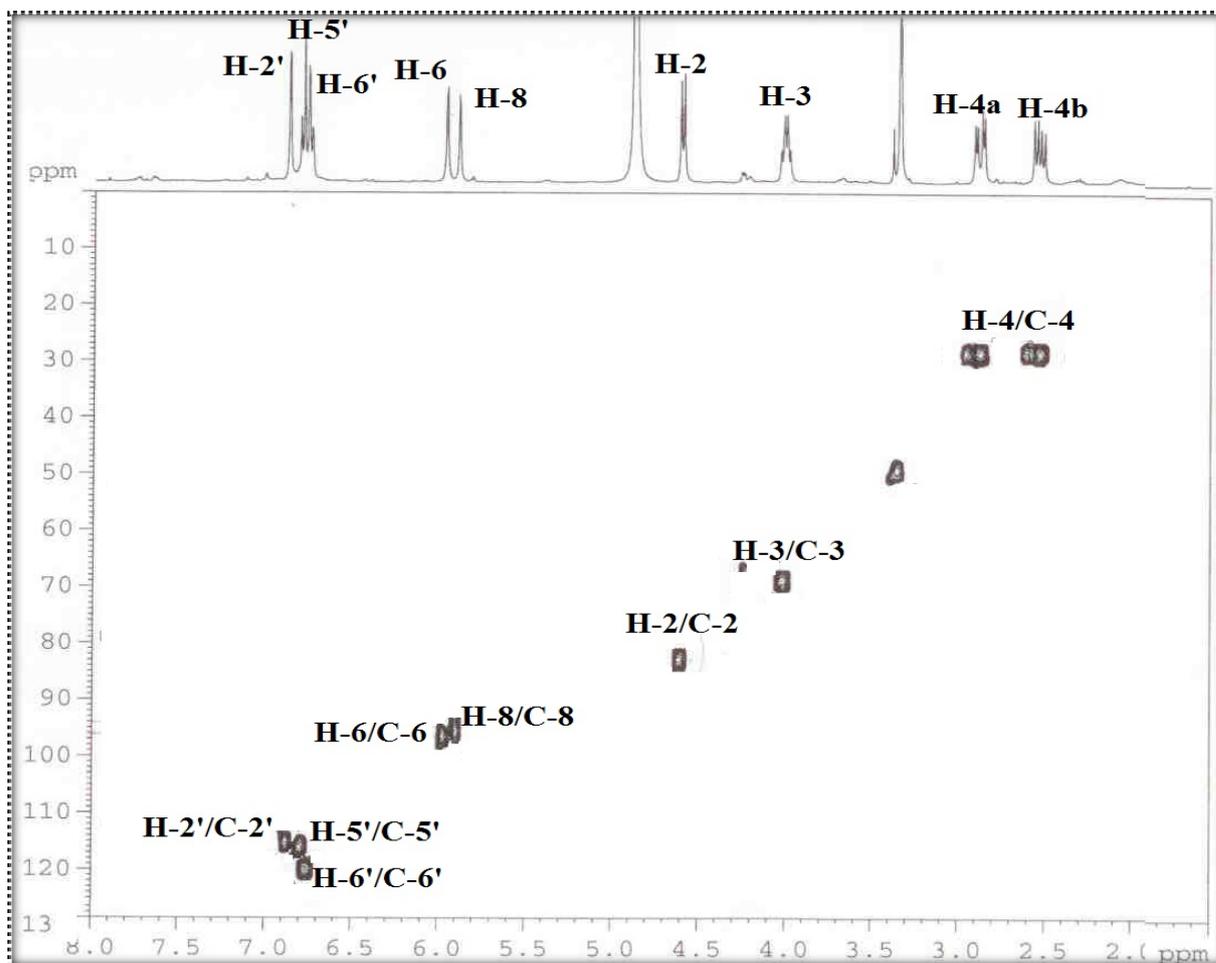


Figure III-63: Spectre HSQC du composé CN-4

Sur le spectre COSY H-H (Figure III-64), et à partir du signal du proton situé à 4,00 ppm, trois corrélations sont observées dont l'une est avec le proton résonant à 4,59 (*d*, $J = 7,4$ Hz) et les deux autres sont avec les deux protons géminés (2,53 et 2,87 ppm) présentant aussi des corrélations entre eux. Ces quatre signaux sont attribués respectivement aux protons H-3, H-2, H-4a et H-4b (Figure III-64a).

Les données obtenues sur le spectre HSQC (Figure III-63) permettent d'attribuer leurs carbones à δ_C 68,0 (C-3), δ_C 82,1 (C-2) et δ_C 28,2 (C-4), et l'ensemble de toutes ces valeurs est typique d'un fragment $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OR})-$ d'un flavanol.

Ce système de spin, à quatre protons du cycle C, contient deux centres chiraux au niveau des carbones C-2 et C-3. La grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-2 et H-3 ($J = 7,4$ Hz) indique une position *trans*-diaxiale.

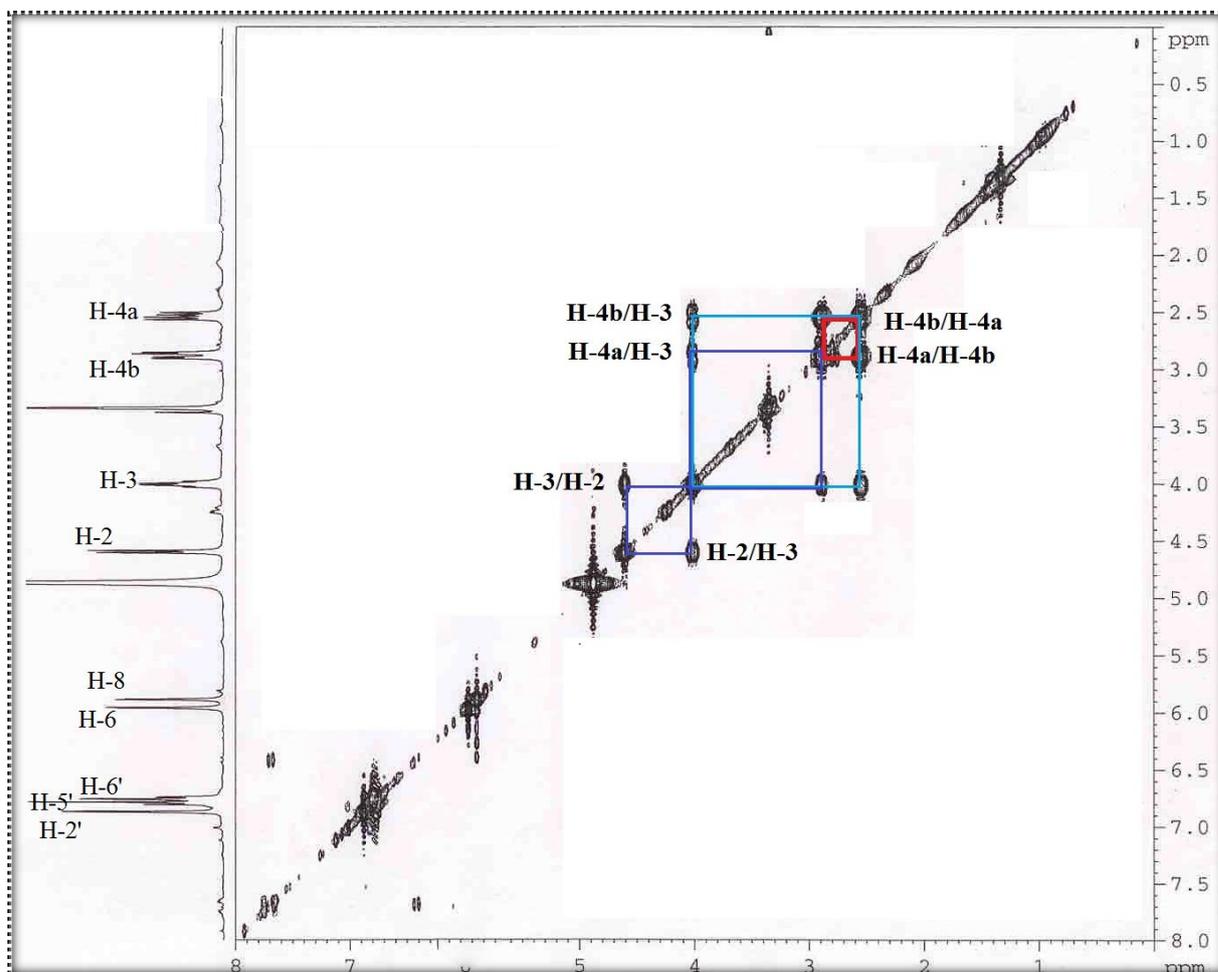


Figure III-64: Spectre COSY H-H du composé CN-4

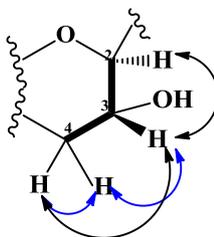


Figure III-64a: Corrélations COSY H-H du cycle C du composé CN-4

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-65) montrent que les protons géminés H-4a/H-4b corrélient avec les deux carbones oxygénés à δ_C 82,1 et à δ_C 68,0, et avec deux carbones autres quaternaires aromatiques à δ_C 101,2 et à δ_C 156,7. Ces observations permettent d'attribuer les carbones oxygénés aux carbones C-2 et C-3 déterminés, précédemment, et les deux carbones aromatiques sont assignés, respectivement, aux carbones C-10 et C-9. D'autres tâches de corrélations sont observées entre les protons H-6 et H-8 et le carbone C-10, et entre l'oxyméthine H-2 et les carbones aromatiques C-6' (δ_C 114,9), C-2' (δ_C 115,8), C-1' (δ_C 114,8) et C-9 (δ_C 156,7).

De plus, les corrélations HMBC entre le proton aromatique H-5' et un carbone quaternaire à δ_C 132,0 permet d'identifier le carbone C-1' du cycle B, et les carbones quaternaires C-3' (δ_C 145,8) et C-4' (δ_C 146,0) sont assignés par les corrélations avec les protons H-2', H5' et H-6'.

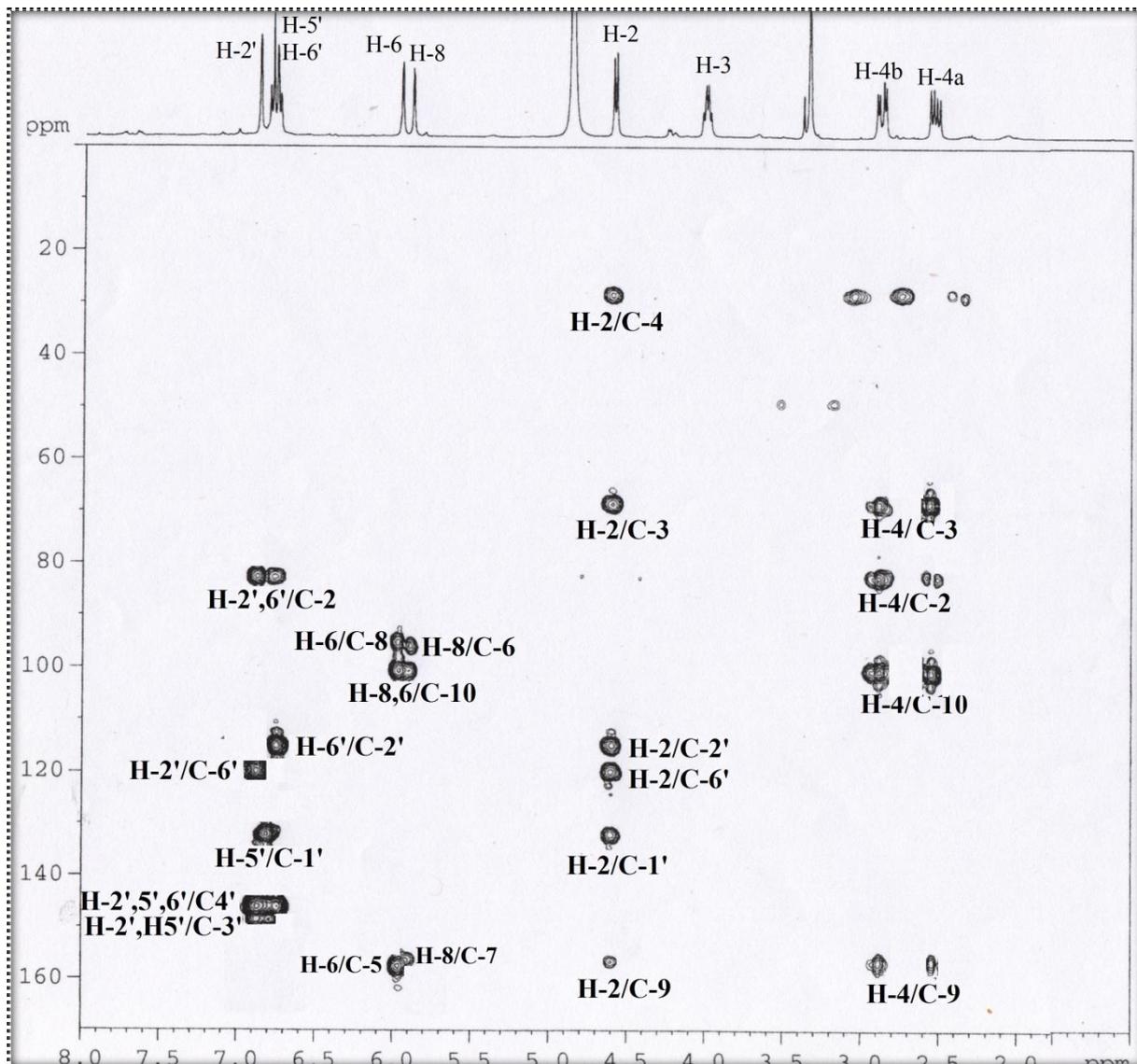


Figure III-65: Spectre HMBC du composé CN-4

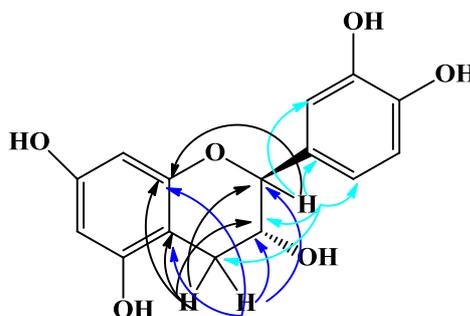


Figure III-65a: corrélations HMBC du cycle C du composé CN-4

Toutes ces données spectroscopiques qui correspondent à celles de la littérature^{237,238,239}, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire $-2,73^\circ$ (c 2,5 mg/ml, MeOH), permettent d'identifier le composé **CN-4** comme la (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-dihydroxyphényl) chromane-3,5,7-triole, nommée (-)-catéchine.

Ce composé a été déjà isolé, antérieurement, de plusieurs espèces terrestres. Initialement, elle a été découverte dans les fruits de l'*Acacia catechu*, mais elle est rarement détectée dans la flore marine. La (-)-catéchine, comme ses isomères, ont un effet antioxydant et anti-inflammatoire¹³⁸.

Les déplacements chimiques des protons et de carbones du composé **CN-4** sont donnés dans le tableau suivant:

Tableau III-9: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **CN-4** dans $\text{MeOH-}d_4$

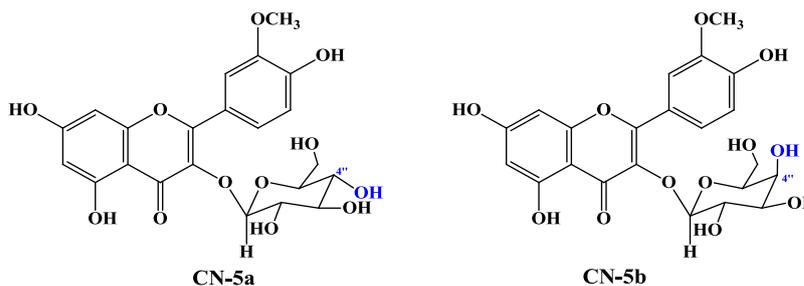
Position	$\delta_{\text{H}} m J$ (Hz)	δ_{C}
2	4,59 <i>d</i> (7,4)	82,1
3	4,00 <i>ddd</i> (8,0; 7,4; 5,4)	68,0
4	2,53 <i>dd</i> (16,0; 8,0) 2,87 <i>dd</i> (16,0; 5,6)	28,2
5	-	156,9
6	5,95 <i>d</i> (2,1)	95,9
7	-	157,0
8	5,88 <i>d</i> (2,1)	95,1
9	-	156,7
10	-	101,2
1'	-	132,0
2'	6,74 <i>d</i> (1,8)	114,9
3'	-	145,8
4'	-	146,0
5'	6,78 <i>d</i> (8,0)	115,8
6'	6,86 <i>dd</i> (8,0; 1,8)	119,5

²³⁷ Freudenberg K K., Steinbrunn G., Umwandlung der, Anthocyanidine und Catechine. *Liebigs Ann Chem* 518, 37-61, **1935**.

²³⁸ Nahrstedt A, Proksch P, Conn EE. Dhurrin, (-)-catechin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*. *Phytochemistry* 26, 1546-1547, **1987**.

²³⁹ Qi S-H., Wu D-G., Ma Y-B., Luo X-D.. A novel flavane from *Carapa guianensis*, *Acta Botanica Sinica* 45(9), 1129-1133, **2003**.

1.7. Le composé CN-5 (CN-5a et CN-5b)



Le composé **CN-5** (**CN-5a** et **CN-5b**) se présente sous forme d'une poudre amorphe jaune, il donne une seule tâche visible sur CCM qui se révèle avec le sulfate de cérium en jaune après chauffage. Bien que ce composé semble être pur sur la CCM, certains signaux observés sur les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont dédoublés (Figures III-67 et III-68), suggérant ainsi que le composé **CN-5** est un mélange de deux composés. Malheureusement, après plusieurs tentatives pour séparer ce mélange, en utilisant différentes techniques chromatographiques (CC et CLHP), nous n'avons pas pu obtenir aucun produit pur.

L'analyse du spectre de masse en source ESI en mode positif permet d'observer (Figure III-66) un seul pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 501,0938 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, indiquant une masse de 478 uma, en accord avec la formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$.

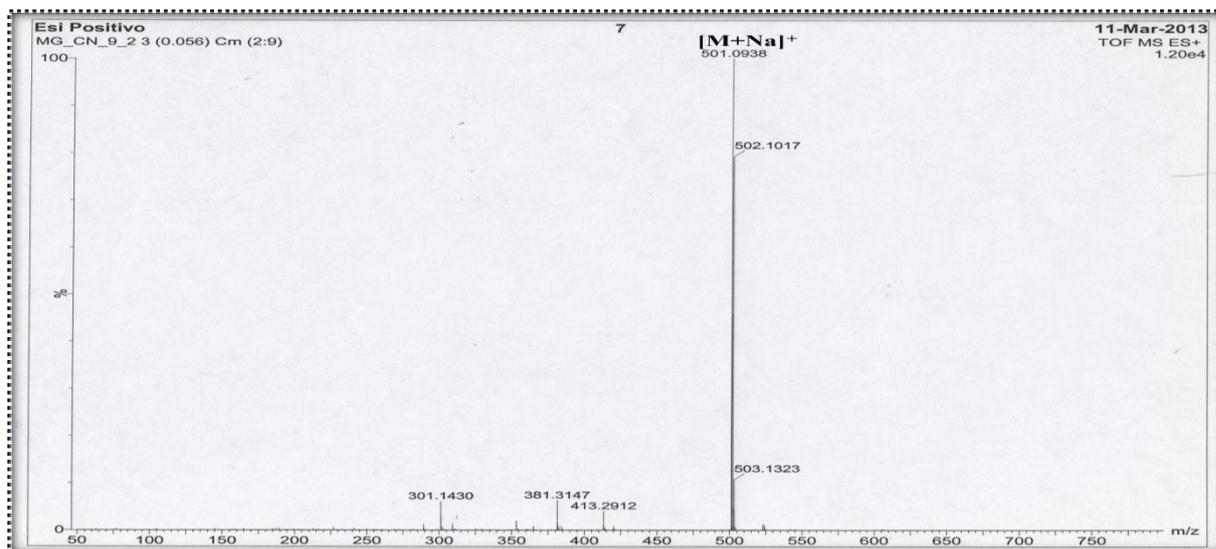


Figure III-66: Spectre de masse ESI du composé **CN-5**

L'analyse judicieuse des spectres RMN ^1H (Figure III-67) et RMN ^{13}C (Figure III-68) de ce composé, montre clairement qu'il s'agit d'un flavonoïde glycosylé, par la présence des signaux des protons et des carbones aromatiques, et ceux des protons osidiques. La présence de deux signaux de protons anomériques laisse suggérer que ce composé est un flavonoïde bi-

osidiques. Cependant, la masse de 478 uma, relativement bas du composé CN-5, nous oriente vers un flavonoïde mono-osidique.

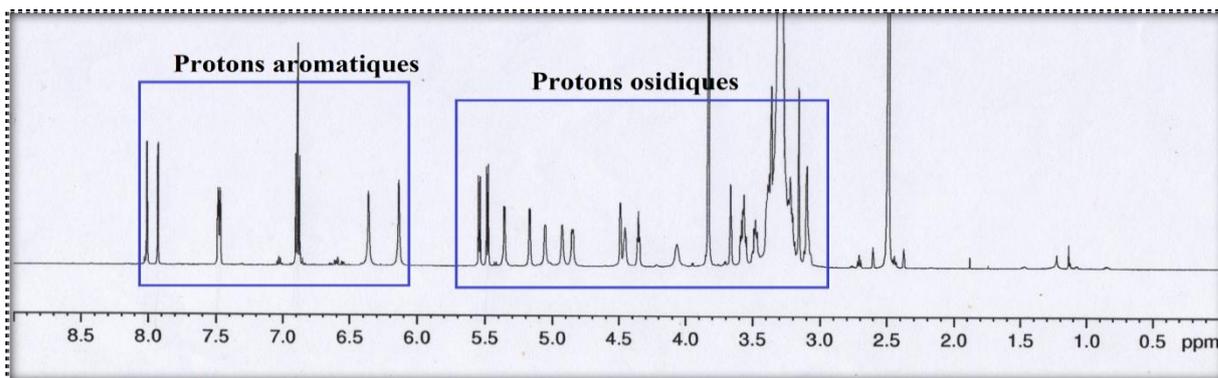


Figure III-67: Spectre RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) du mélange CN-5

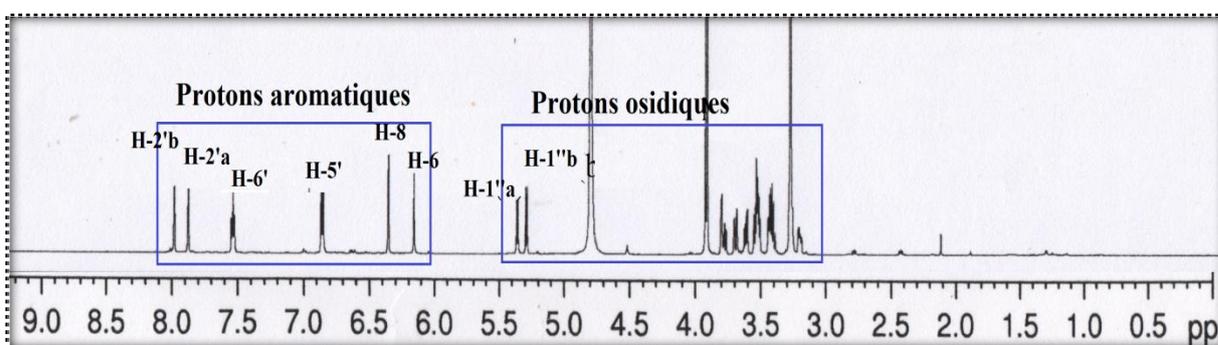


Figure III-67': Spectre RMN ^1H ($\text{MeOH-}d_4$) du mélange CN-5

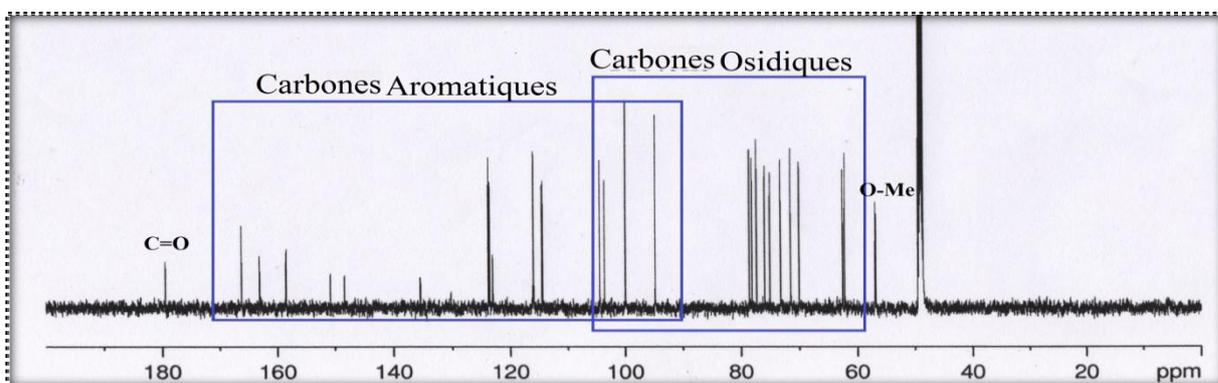


Figure III-68: Spectre RMN ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$) du mélange CN-5

On note que le dédoublement des pics sur les spectres RMN (Figure III-67) est remarquable surtout au niveau des signaux de la partie osidique (Figure III-68), ce qui postule que, probablement, les deux structures se diffèrent par la nature de sucre attaché.

L'élucidation structurale est basée premièrement sur les signaux de la partie aromatique. En effet, le spectre RMN ^1H (Figure III-67, $\text{MeOH-}d_4$) permet d'identifier l'aglycone à partir des signaux des protons suivants :

- Deux doublets repérés à δ_H 6,40 (2H, $J = 2,0$ Hz) et à δ_H 6,20 (2H, $J = 2,0$ Hz), correspondent, respectivement, aux deux protons aromatiques H-8 et H-6 situés sur le cycle A.
- Un doublet de doublets à δ_H 7,61 (2H, dd , $J = 8,2$ et $1,8$ Hz) et un autre doublet à δ_H 6,95 (2H, d , $J = 8,2$ Hz), positionnés en *ortho*. Deux singulets s'intègrent chacun pour 1H à δ_H 7,92 (1H, $J = 1,8$ Hz) et à δ_H 8,01 (1H, d , $J = 1,8$ Hz) sont attribués aux protons H-2' du cycle B. Ces protons sont assignés aux protons aromatiques H-6', H-5' et H-2' d'un cycle B tri-substitué.
- Deux singulets repérés à δ_H 3,82 et 3,83, s'intégrant chacun pour trois protons, sont assignés aux deux groupements méthoxyles.
- Enfin, deux signaux résonant à δ_H 5,54 (1H, d , $J = 7,3$ Hz) et 5,48 (1H, d , $J = 7,6$ Hz), sont attribués aux deux protons anomériques de chaque unité osidique.

A travers cette première analyse, l'aglycone du composé CN-5 est un flavonol glycosylé.

Le spectre COSY H-H (Figure III-69) nous permet d'observer la corrélation entre les protons H-5' et H-6'.

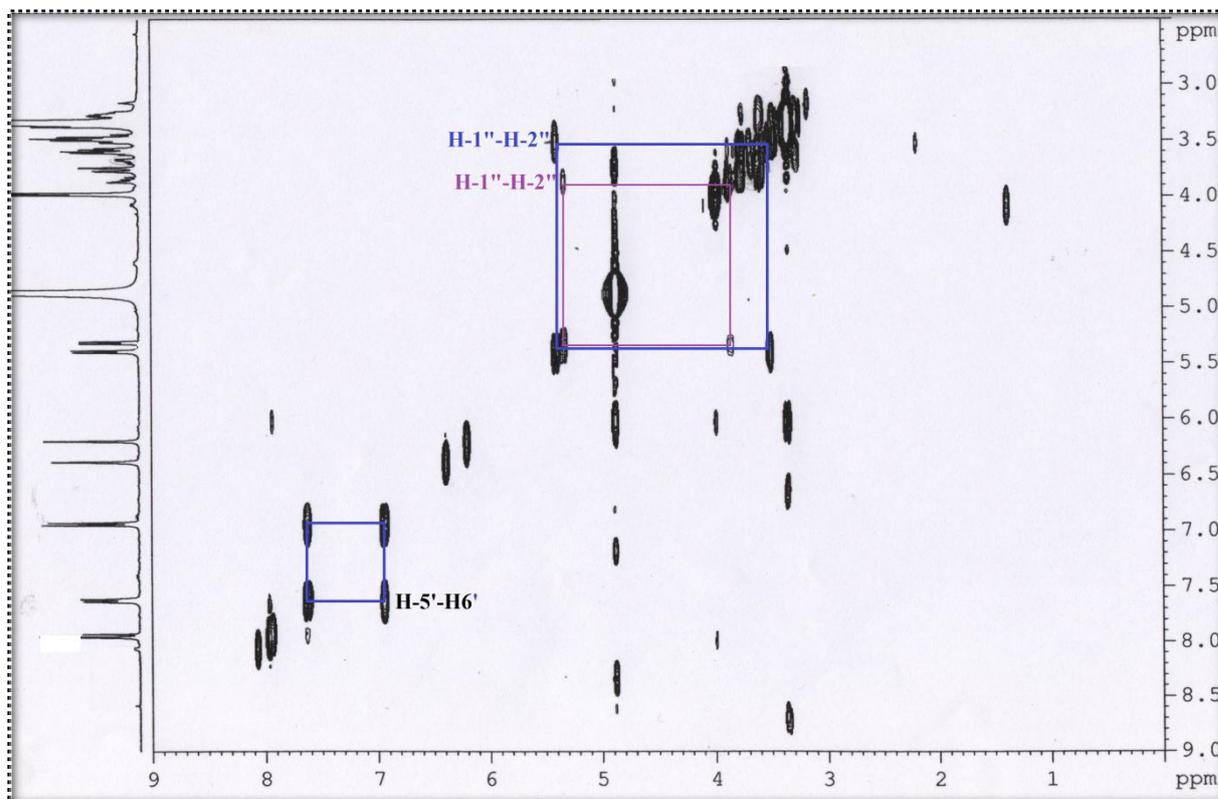


Figure III-69: Spectre COSY H-H du composé CN-5

L'analyse conjuguée du spectre RMN ^{13}C , HSQC (Figures III-68a et III-70) permet d'établir tous les carbones de tous les protons cités précédemment.

- Les protons H-6 et H-8 et leurs carbones à δ_{C} 99,9 (C-6) et δ_{C} 94,8 (C-8), respectivement.
- Les protons H-6' avec les carbones à δ_{C} 123,6 et à δ_{C} 123,8.
- Les protons H-5' et les carbones à δ_{C} 116,0 et à δ_{C} 116,1.
- Les protons H-2' et leurs carbones à δ_{C} 114,4 et à δ_{C} 114,6.
- Les méthoxyles et leurs carbones à δ_{C} 56,8 et à δ_{C} 56,9.
- Les protons anomériques à δ_{H} 5,54 et δ_{H} 5,48 et leurs carbones à δ_{C} 103,6 et δ_{C} 104,4, respectivement.
- Les signaux à δ_{C} 179,4 et à δ_{C} 179,5 correspondent aux carbonyles de la fonction cétone (C-4).

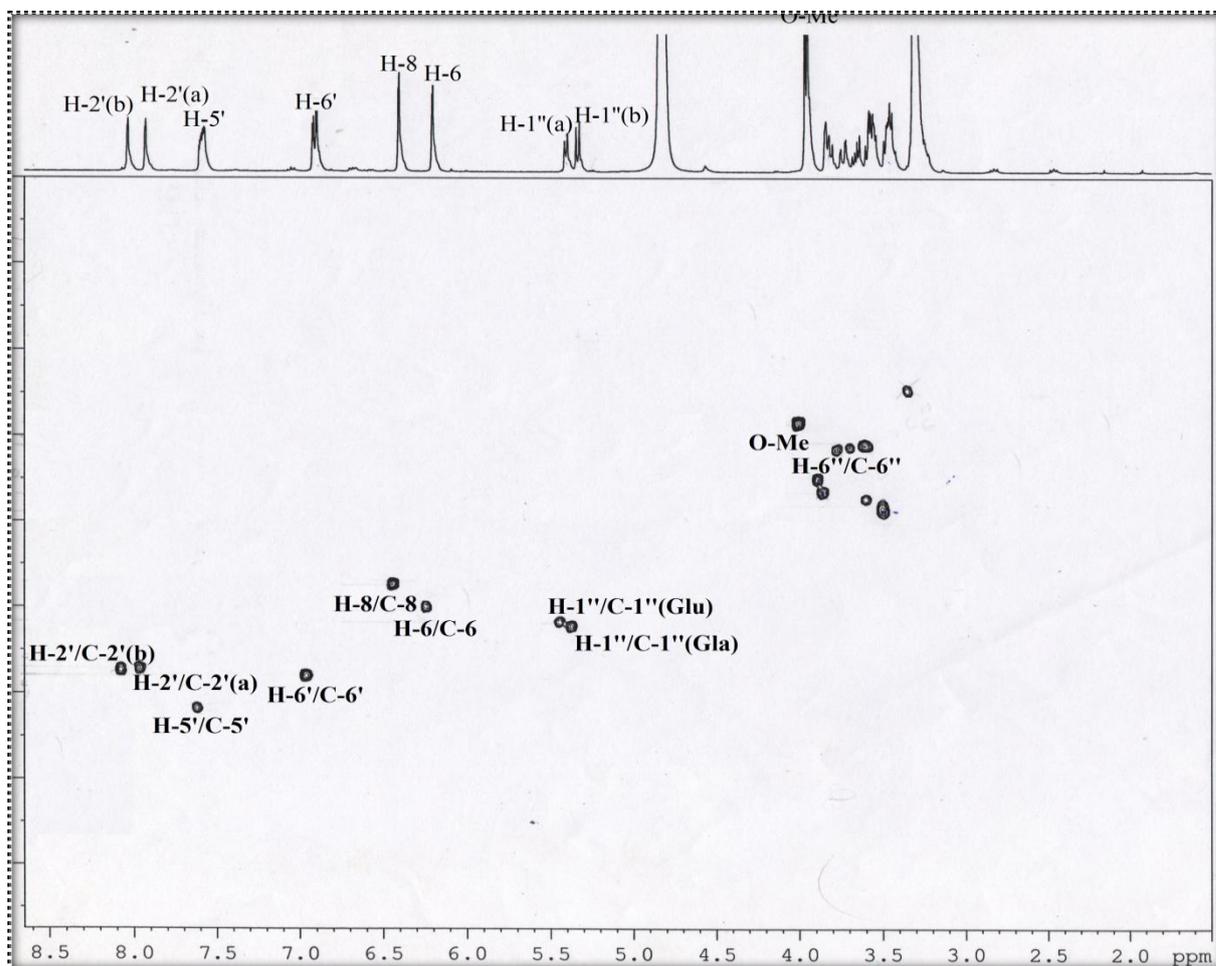


Figure III-70: Spectre HSQC du composé CN-5

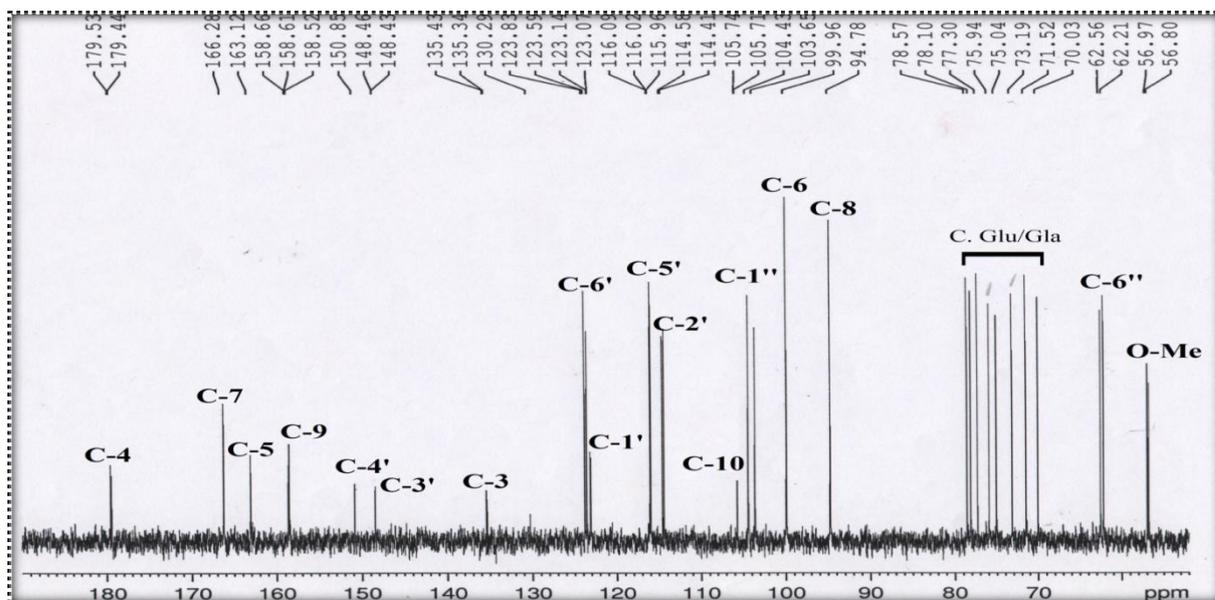
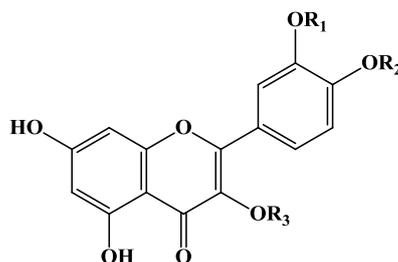


Figure III-68a: Spectre RMN ¹³C (MeOD) du composé CN-5

L'expérience de corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC (Figure III-71) a permis l'attribution complète des signaux du cycle A. En effet, on observe les tâches de corrélations suivantes:

- Entre les protons H-6 et H-8 et le carbone quaternaire oxygéné à δ_C 166,3 (C-7), et le carbone quaternaire à δ_C 105,7 (C-10).
- Entre le proton H-8 et le carbone quaternaire à δ_C 158,6 (C-9).
- Entre le proton H-6 et le carbone quaternaire à δ_C 163,1 (C-5).

D'après ce qui précède, le composé CN-5 est un mélange de deux isomères où la partie aglycone est un flavonol substitué par un groupement méthoxyle et un hexose.



L'absence du signal du proton H-3 laisse supposer que le carbone C-3 est substitué par un hydroxyle ou un hexose. La substitution est déterminée en analysant, rigoureusement, le spectre HMBC. Partant des protons anomères, une corrélation a été observée avec un carbone quaternaire à δ_C 135,3 (135,4) caractéristique du carbone C-3, substitué par une unité osidique. Deux structures sont envisagées, l'isorhamnétine et la tamaraxitine (Figure III-72).

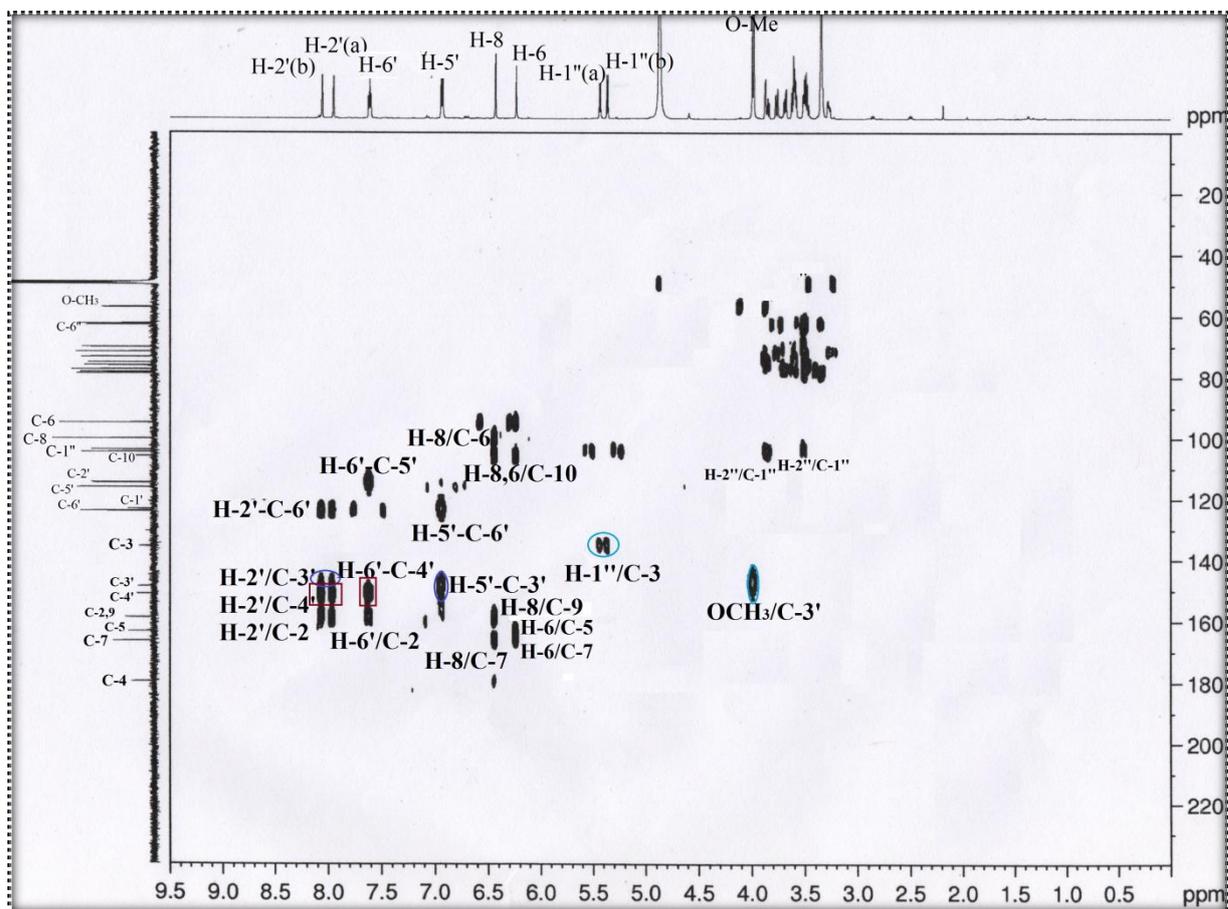
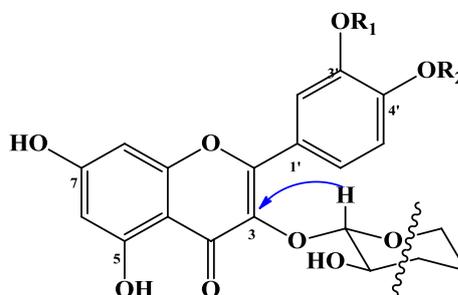


Figure III-71: Spectre HMBC du composé CN-5



Isorhamnétine ($R_1 = \text{OCH}_3$ et $R_2 = \text{H}$)

Tamaraxitine ($R_1 = \text{H}$ et $R_2 = \text{OCH}_3$)

Figure III-72: Structures proposées de la partie aglycone du composé CN-5

Une analyse rigoureuse du spectre HMBC, montre des corrélations entre les protons des méthoxyles et le carbone à 148,4 ppm (148,5 ppm), qui à son tour, présente des tâches de corrélations avec les protons H-5' et H-2' (Figures III-71 et III-71a). L'absence d'une corrélation entre H-6' et le carbone porteur du groupement méthoxyle, indique que ce groupement est en position C-3', et par suite la position C-4' est donc libre. De même, des corrélations, entre les protons H-2' et H-6' et les signaux à δ_c 158,5 (C-2), δ_c 150,85 (C-4') et

à δ_C 123,1 (C-1'), entre les protons H-5' et H-6' et le carbone à 150,8 ppm (C-4') ont été observées. En comparant les résultats avec ceux de la littérature, nous avons pu identifier l'aglycone comme étant l'isorhamnétine pour le composé **CN-5**.

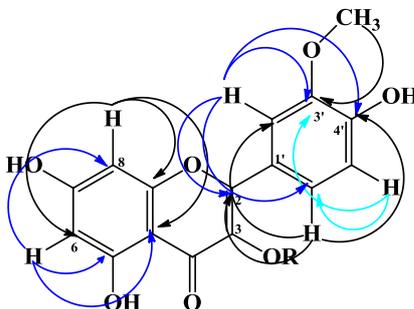


Figure III-71a: Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé **CN-5** (CN-5a et CN-5b)

L'analyse détaillée du reste du spectre RMN ^1H de mélange **CN-5** met en évidence la présence de deux protons anomériques à δ_H 5,54 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz) et à δ_H 5,48 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz). La grande valeur de constante de couplage ($J = 7,3$ Hz et $J = 7,6$ Hz), indique une conformation β de ces deux sucres.

Le spectre COSY H-H (Figure III-69), nous a permis de déterminer uniquement les deux déplacements chimiques des protons H-2''/H-2''' à δ_H 3,59 (1H, *t*, $J = 9,1$ Hz)/ δ_H 3,88 (1H, *t*, $J = 9,1$ Hz), à partir de leur tâches de corrélations avec les deux protons anomères. Malheureusement, les autres protons osidiques n'ont pas été déterminés à cause de l'interférence de leurs signaux dans la région 3,3-3,9 ppm.

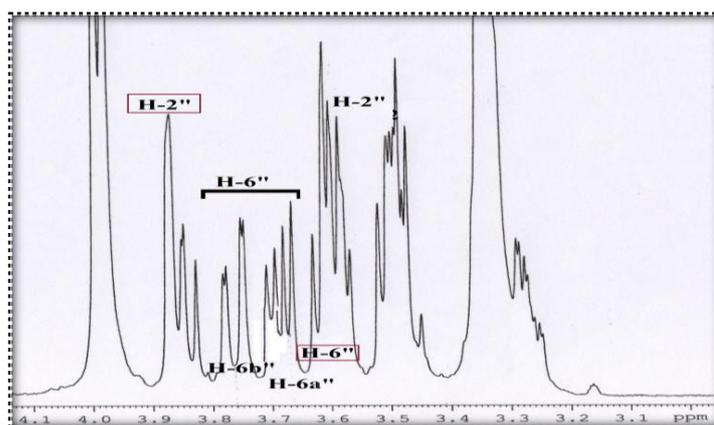


Figure III-67a: Spectre RMN ^1H (MeOD) de la partie osidique

Par conséquent, l'identification de la nature de deux sucres est reposée essentiellement sur le spectre RMN ^{13}C . On enregistrant le spectre dans le DMSO, il apparait clairement les 12 signaux des atomes de carbone de deux unités hexoses.

L'attribution judicieuse des déplacements chimiques est faite avec une comparaison avec les données de la littérature^{240, 241,242,243} qui suggère que les deux unités hexoses ne peuvent être qu'un glucose et un galactose.

- Les signaux de carbones caractéristiques du β -D-glucose sont δ_C 74,3 (C-2''), δ_C 76,4 (C-3''), δ_C 69,8 (C-4''), δ_C 77,4 (C-5'') et à δ_C 60,2 (C-6'').
- Les signaux de carbones caractéristiques du β -D-galactose sont : δ_C 71,2 (C-2''), δ_C 73,1 (C-3''), δ_C 67,9 (C-4''), δ_C 75,9 (C-5''), et à δ_C 60,2 (C-6'').

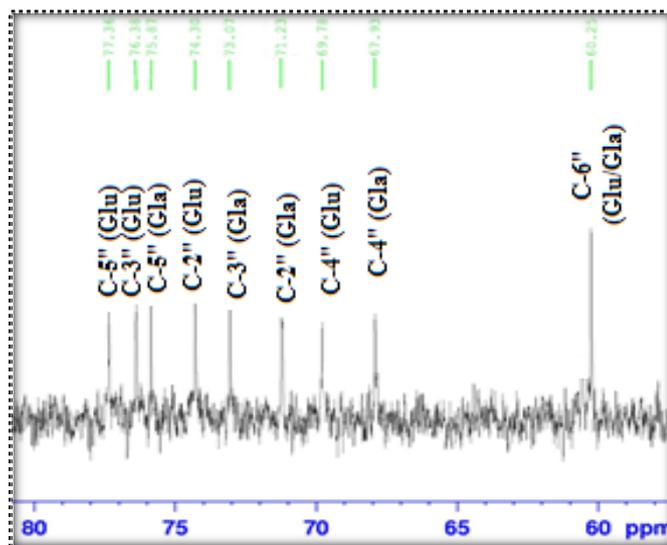


Figure III-68b: Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6) de la partie osidique

Les analyses des données spectrales obtenues pour le mélange **CN-5** nous permettent d'identifier le premier isomère **CN-5a**, comme étant l'isorhamnétine 3-O- β -D-glucopyranoside et le second isomère **CN-5b** comme l'isorhamnétine 3-O- β -D-galactopyranoside. Le premier isomère a déjà été détecté dans cette espèce marine *Cymodocea nodosa* en 1978 par Cariello et al.³⁴, et il a été isolé dans plusieurs espèces terrestres telles que: *Barbarea vulgaris*, *Sorbus torminalis* et *Salicornia herbacea*^{243,244,245}.

²⁴⁰ Rahman W., Ilyas M., Flavanoïdes des fleurs d'*Argemone mexicana*, *Comptes Rendus* 252, 1974-1975, **1961**.

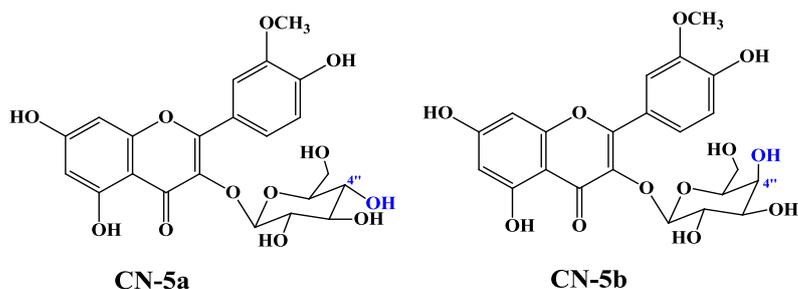
²⁴¹ Horhammer L., Wagner H., Arndt HG., Farkas L., Isolierung Synthese zweier Flavonol-Glycoside von *Cereus grandiflorus* Mill, *Chem Ber* 99, 1384-1387, **1966**.

²⁴² Wang D-M., Pu W-J., Wang Y-H., Zhang Y-J., Wang S-S., A New Isorhamnetin Glycoside and Other Phenolic Compounds from *Callianthemum taipaicum*, *Molecules* 17, 4595-4603, **2012**.

²⁴³ Olszewska MA., Roj JM., Phenolic constituents of the inflorescences of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz, *Phytochemistry Letters* 4, 151-157, **2011**.

²⁴⁴ Kong C-S., Lee J-I., Kim Y.A., Kim J-A., Bak S.S., Hong J.W., Park H.Y., Yea S.S., Seo Y., Evaluation on anti-adipogenic activity of flavonoid glucopyranosides from *Salicornia herbacea*, *Process Biochemistry* 47, 1073-1078, **2012**.

²⁴⁵ Senatore F., D'Agostino M., Dini I., Flavonoids glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2659-2662, **2000**.



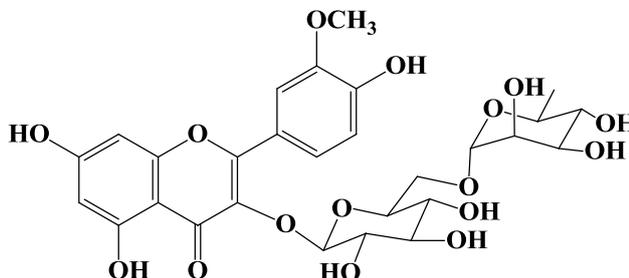
Le tableau suivant représente tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CN-5a (CN-5b).

Tableau III-10: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C (MeOH- d_4) du composé CN-5 (CN-5a/CN-5b).

Position	$\delta_{\text{H}} m J$ (Hz)	δ_{C}
Aglycone		
2	-	158,5
3	-	135,3 / 135,4
4	-	179,4 / 179,5
5	-	163,1
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	99,9
7	-	166,3
8	6,40 <i>d</i> (2,0)	94,8
9	-	158,6/158,7
10	-	105,7
1'	-	123,1
2'	7,92 / 8,01 <i>d</i> (1,8)	114,4 / 114,6
3'	-	148,4 / 148,6
4'	-	150,9
5'	6,95 <i>d</i> (8,2)	116,1
6'	7,61 <i>dd</i> (8,2; 1,8)	123,6
OCH ₃	3,82 <i>s</i> / 3,83 <i>s</i>	56,8 / 56,9
Glucose/Glactose		
1''	5,54 <i>d</i> (7,3) / 5,48 <i>d</i> (7,6)	103,6 / 104,4
2''	3,59 <i>t</i> (8,9) / 3,88 <i>t</i> (9,3)	75,9 / 71,5
3''	3,33-3,65 <i>m</i>	78,5 / 75,0
4''	3,33-3,65 <i>m</i>	73,2 / 70,0
5''	3,33-3,65 <i>m</i>	78,1 / 77,3
6''a	3,69 <i>dd</i> (11,2; 5,8) / 3,55-3,65 <i>m</i>	62,2 / 62,7
6''b	3,77 <i>dd</i> (11,2; 2,3) / 3,55-3,65 <i>m</i>	

1.8. Composé GB-3

Le composé **GB-3** a été obtenu sous forme de poudre jaune amorphe, soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV et donne une coloration jaune après révélation par sulfate de cérium et chauffage.



L'analyse du spectre de masse en mode positif du composé **GB-3** (Figure III-73) permet d'observer des pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 647,23 $[M+Na]^+$ et m/z 1271,69 $[2M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 624 uma, en accord avec la formule $C_{28}H_{32}O_{16}$.

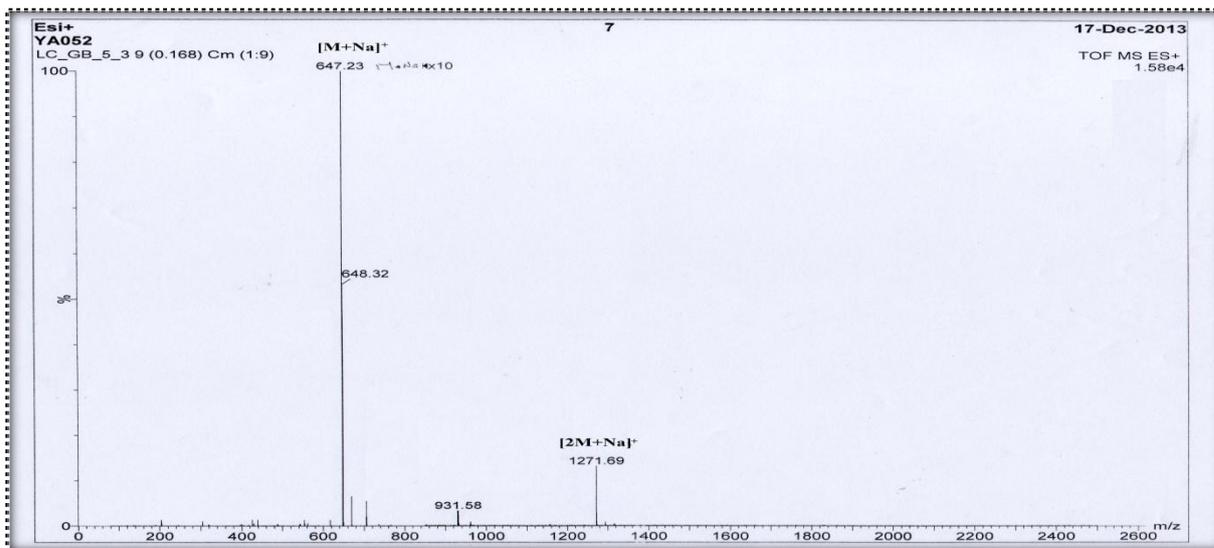


Figure III-73: Spectre de masse ESI du composé **GB-3**

Le spectre RMN 1H de ce composé enregistré dans le méthanol deutéré (Figure III-74) révèle une grande similitude des signaux avec ceux du composé **CN-5**, en particulier les signaux aromatiques du squelette isorhamnétine.

- Le système ABX est détecté par les trois signaux à δ_H 7,98 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-2'), à δ_H 6,98 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5') et à δ_H 7,68 (1H, *dd*, $J = 8,0, 1,8$ Hz, H-6'), assignés aux trois protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B.

- Les signaux à δ_H 6,20 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz) et à δ_H 6,40 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz) sont caractéristiques aux deux protons aromatiques H-6 et H-8 *mé*ta couplés du cycle A.
- Le signal intense sous forme d'un singulet à δ_H 3,82 ppm, intégrant pour trois protons est caractérisé d'un groupe méthoxyle.

La différence majeure entre les deux spectres RMN 1H des composés **CN-5** et **GB-3** concerne la région des protons osidiques, où on observe l'apparition d'un signal résonnant à δ_H 4,52 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) attribuable au proton anomère d'une unité osidique, et un autre signal intense, intégrant pour trois protons à δ_H 1,14 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz), attribuable à un groupement méthyle.

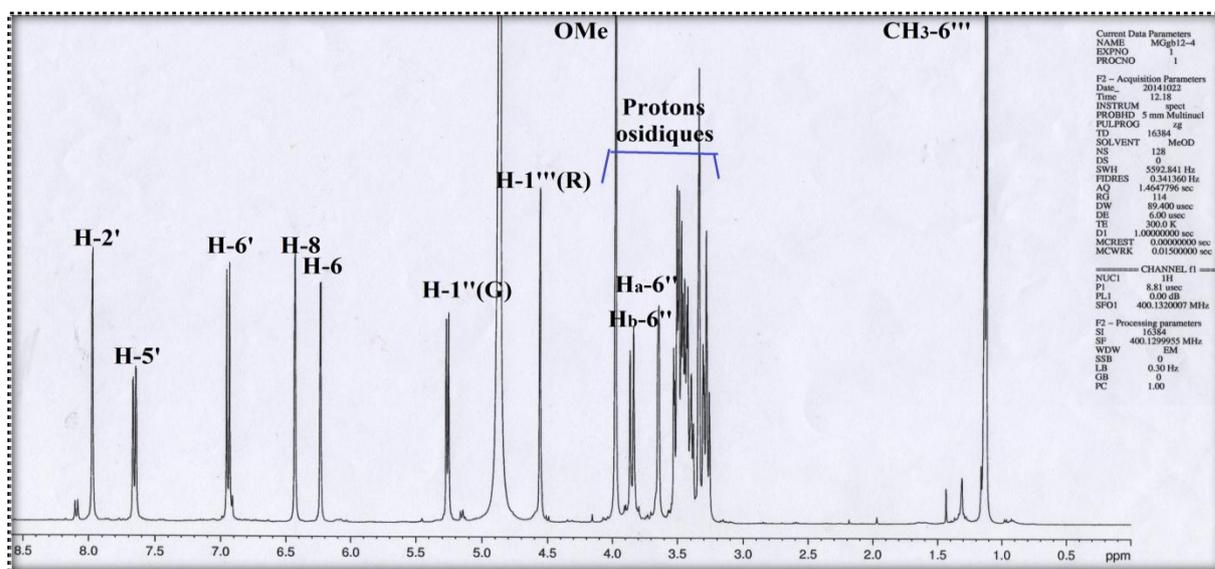


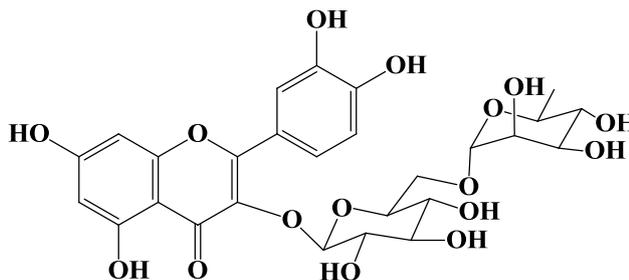
Figure III-74: Spectre RMN 1H du composé **GB-3**

De ce fait, le composé **GB-3** est une isorhamnétine substituée par deux unités osidiques dont :

- Le signal à δ_H 5,25 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz) est caractéristique du proton anomérique du β -glucose.
- Le signal à δ_H 4,52 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), ainsi que le doublet à δ_H 1,14 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz) sont caractéristiques du α -rhamnose.

La comparaison des données recueillies du ce composé, et en comparaison avec celles de littérature²⁴⁵, et en particulier, avec les squelettes de base d'isorhamnétine diglycosylés, indique qu'elles sont en faveur avec la rutinoside, et par conséquent, le composé **GB-3** est élucidé comme étant l'isorhamnétine 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranoside (isorhamnétine-3-*O*- β -rutinoside), un dérivé isolé antérieurement, de l'espèce *Galium spurium*⁶⁰.

1.9. Composé GB-4



L'analyse du spectre de masse en mode positif ESI de ce composé (Figure III-75) révèle un pic intense d'ion pseudomoléculaire à m/z 633,96 $[M+Na]^+$, et un autre pic à m/z 1244,40 $[2M+Na]^+$, ce qui est en accord avec une masse moléculaire de 610 uma, et une formule moléculaire $C_{27}H_{30}O_{16}$. La comparaison de cette masse avec celle du composé précédemment décrit (**GB-3**), indique une différence de 14 uma, suggérant la perte d'un fragment méthyle.

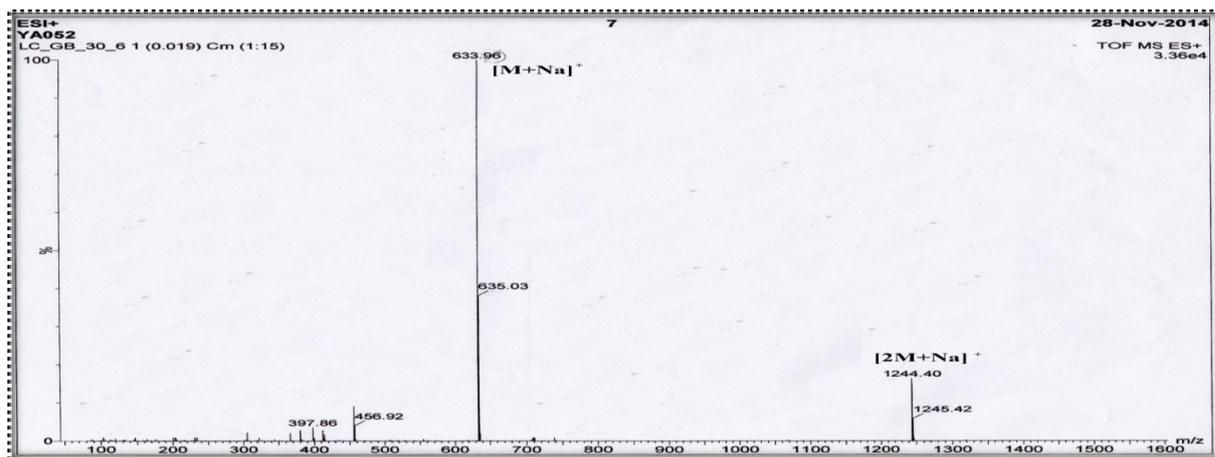


Figure III-75: Spectre de masse du composé **GB-4**

Le spectre RMN 1H réalisé, dans le $MeOH-d_4$, (Figure III-76) présente lui aussi cinq signaux aromatiques:

- Deux doublets à δ_H 6,38 et à δ_H 6,19 avec une constante de couplage $J_{méta} = 2,0$ Hz, attribuables aux protons H-8 et H-6 du cycle A.
- Trois signaux assignés aux protons H-2' (δ_H 7,70, *d*, $J = 1,8$ Hz), H-5' (δ_H 6,86, *d*, $J = 8,0$ Hz) et H-6' (δ_H 7,62, *dd*, $J = 8,0$ et $1,8$ Hz) d'un système ABX du cycle B.
- La disparition du signal du groupement méthoxyle certifie que l'aglycone résultante est une quercétine et non pas isorhamnétine.

Le blindage du proton H-2' du cycle B à δ_H 7,70, en comparaison avec celui du composé **GB-3** (δ_H 7,98), confirme ainsi que le carbone en C-3' est porteur d'un hydroxyle libre.

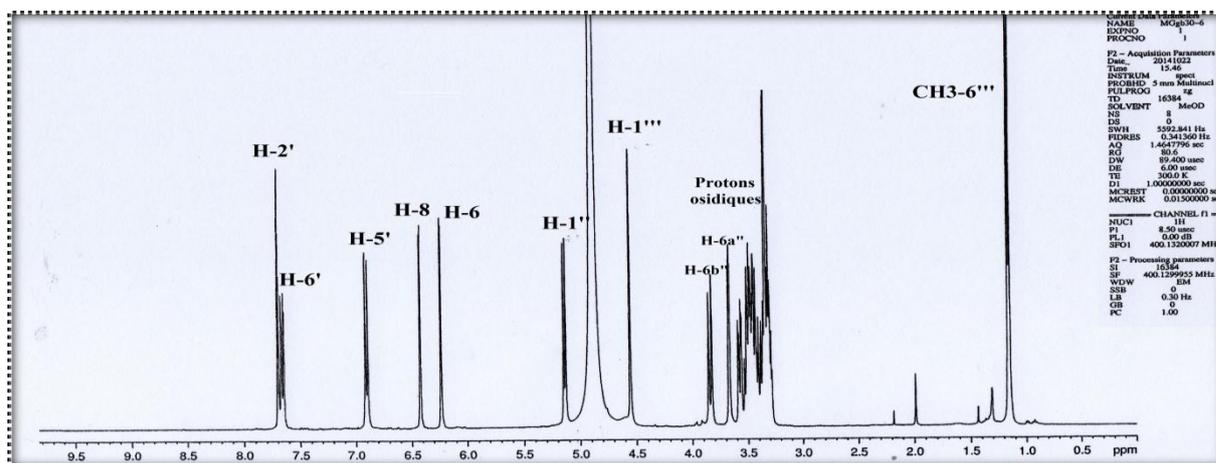


Figure III-76: Spectre RMN ^1H du composé **GB-4**

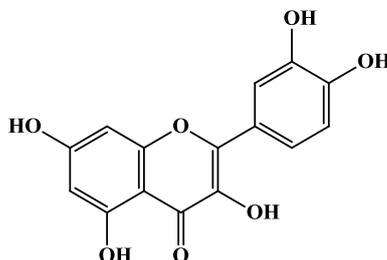
Les déplacements chimiques des protons osidiques sont identiques à ceux de **GB-3** ce qui indique la présence d'une unité rutinoside.

Les signaux à δ_{H} 5,25 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz) et à δ_{H} 4,52 (1H, *s*), correspondent aux protons anomériques du β -glucose et du α -rhamnose, respectivement. Les protons oxyméthines de glucose et du rhamnose sont dans l'intervalle 3,0-4,0 ppm.

La comparaison de ces données spectrales avec celles trouvées dans la littérature^{59-62,245}, atteste la structure finale de **GB-4**, comme étant la quercétine 3- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- α -L-rhamnopyranoside (quercétine 3-*O*- β -rutinoside), appelée la rutine ou la rutoside, un flavonoïde très fréquent dans le règne végétal, isolé de plusieurs espèces de *Galium* telles que *G. spurium*, *G. uliginosum*, *G. tortumense* et *G. verum* sp *verum*⁵⁹⁻⁶².

1.10. Composé GB-5

Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux jaunes (aiguilles). Il est visible en CCM et prend une couleur jaune avant et après la révélation.



Le spectre de masse ESI, en mode positif (Figure III-77) montre les pics d'ions moléculaires à m/z 325,1087 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et à m/z 626,966 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, soit une masse de 302 uma et une formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

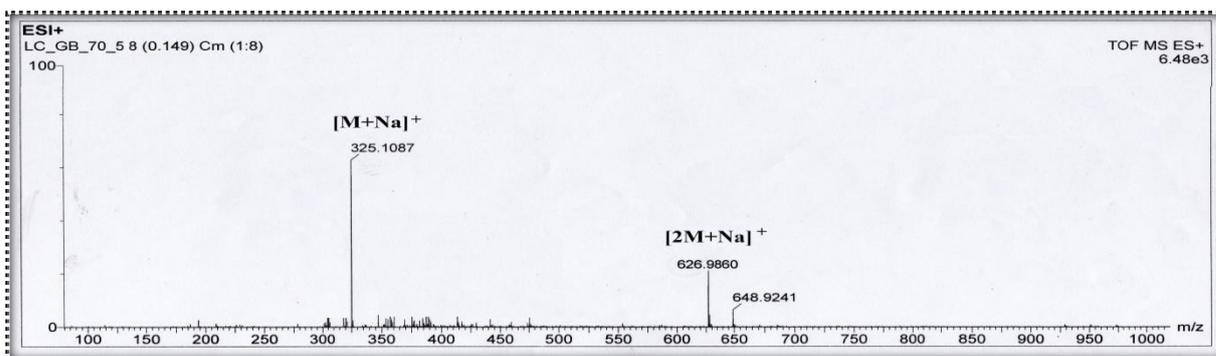


Figure III-77: Spectre de masse du composé **GB-5**

Le spectre RMN ^1H du composé **GB-5** (Figure III-78), présente la même allure que les spectres de deux composés précédemment **GB-3** et **GB-4**. Une comparaison entre ces spectres montre que ce composé possède la même aglycone comme celle du composé **GB-4**, qui est la quercétine. On note juste la disparition des signaux dus à l'unité osidique, indiquant que le composé **GB-5** est l'aglycone du composé **GB-4**. Cette constatation est jugée par la différence de masse calculée entre le composé **GB-5** (302 uma), et le précédent **GB-4** (610 uma) qui est 308 uma (162+146), correspondant aux unités osidiques glucose et rhamnose, respectivement.

Le spectre RMN ^1H est caractérisé par les signaux suivants :

- Les deux signaux résonant à δ_{H} 6,18 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et à δ_{H} 6,38 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), sont attribuables aux protons H-6 et H-8 du cycle A, respectivement.
- Les signaux de résonance à δ_{H} 6,88 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), à δ_{H} 7,59 (1H, *dd*, $J = 2,2$ et 8,5 Hz) et à δ_{H} 7,76 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), sont caractéristiques des protons H-5', H-6' et H-2' du cycle B.

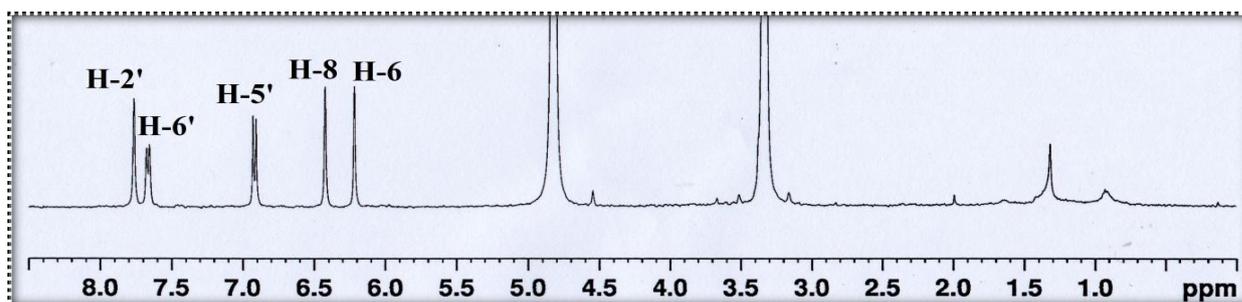


Figure III-78: Spectre RMN ^1H du composé **GB-5**

L'ensemble de ces informations spectroscopiques et celles des données de la littérature^{246,247}, nous permettent d'identifier le composé **GB-5** comme étant la quercétine, isolée antérieurement des parties aériennes de *G. spurium*⁶⁰.

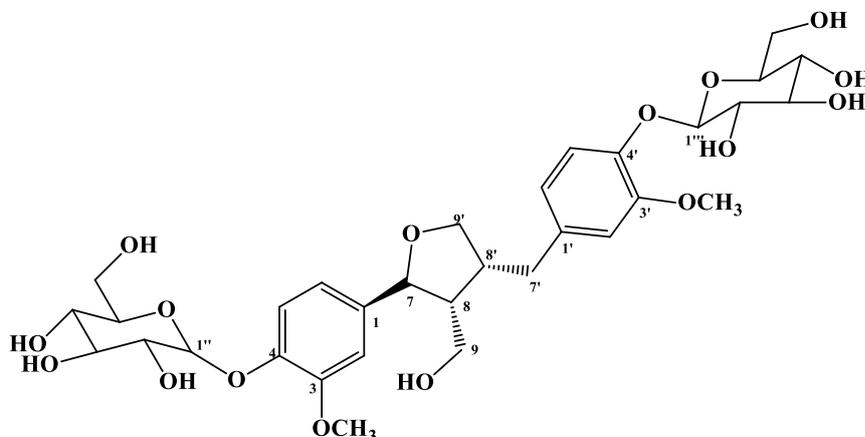
²⁴⁶ Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970.

²⁴⁷ Uddin S., Alnsour L., Segun P., Servi H., Celik S., Göktürk R. S., Al-Groshi A., Al-Majmaie S., Guetchueng S.T., Nahar L., Dempster N.M., Ismail F. M.D., Ritchie K.J., Sarker S.D., Flavonoids from two Turkish *Centaurea* species and their chemotaxonomic implications, *Trends Phytochemical Research* 1(4) 243-248, 2017.

2. Détermination structurale des lignanes

2.1. Composé GB-6

Le composé **GB-6** a été isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche, soluble dans MeOH, et sa tache sur la CCM est visible à 254 nm. Il réagit avec le réactif de sulfate de cérium pour donner une coloration grise après chauffage.



On observe sur son spectre de masse ESI enregistré en mode positif un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 708,324 $[M+Na]^+$ (Figure III-79), suggérant une masse molaire de 684 uma, correspond à une formule brute de $C_{32}H_{44}O_{16}$. Le composé présente 11 insaturations, ce qui laisse supposer la présence au moins deux noyaux aromatiques.

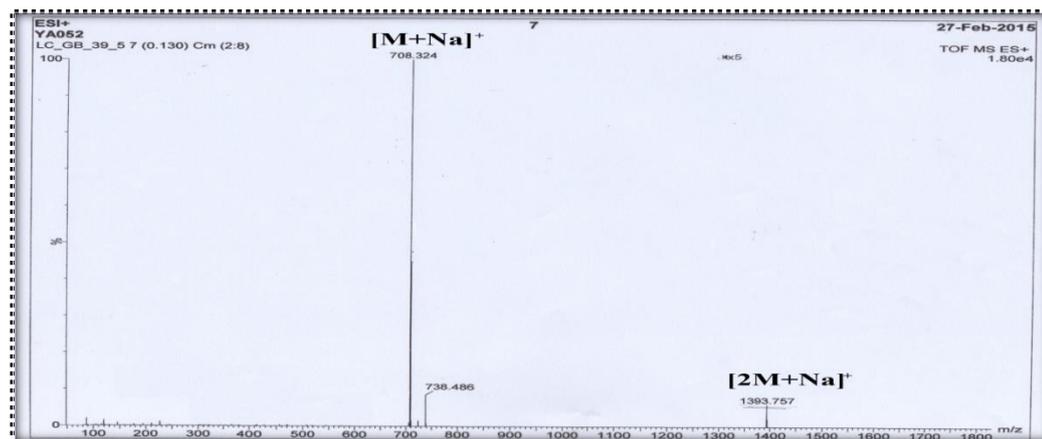


Figure III-79: Spectre de masse ESI⁺ du composé GB-6

Le spectre RMN ¹H (Figure III-80), enregistré dans MeOH-*d*₄, montre les signaux suivants :

- Des signaux de protons en forme de massif résonant dans un champ fort entre 2,40 et 3,20 ppm attribuables aux protons aliphatiques.

- Un massif de signaux de protons entre 3,30 et 5,00 ppm, est caractéristique des protons hydroxylés et osidiques.
- Des signaux résonant dans un champ faible entre à δ_H 6,70 et à δ_H 7,25 et s'intégrant pour six protons, caractéristiques des protons aromatiques.
- Deux singlets chacun d'intensité trois protons à δ_H 3,88 et à δ_H 3,89 caractéristique de deux groupements méthoxyles.

Tous ces signaux sont en faveur d'un squelette d'un composé phénolique glycosylé.

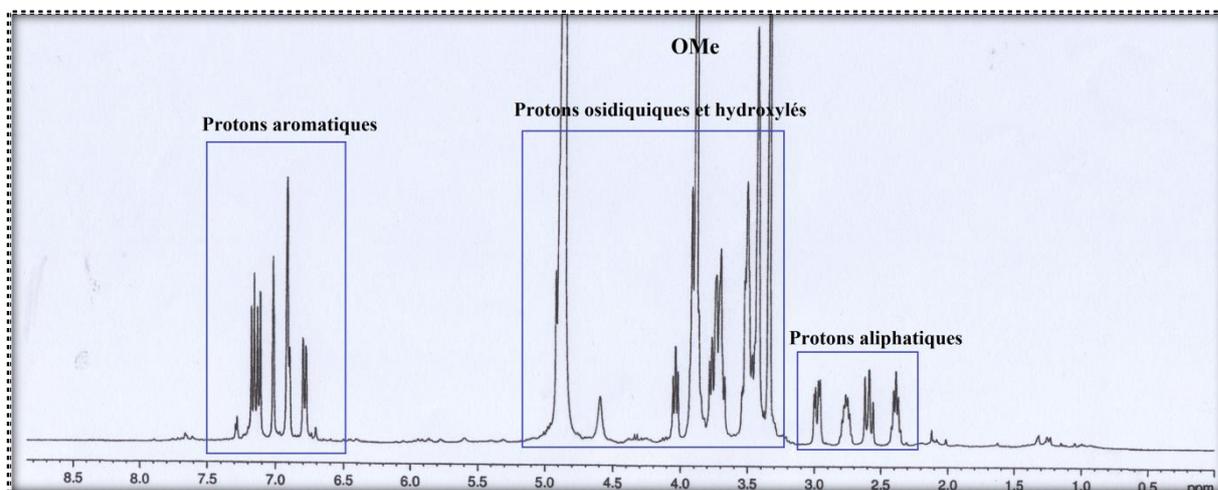


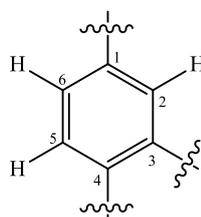
Figure III-80: Spectre RMN ^1H du composé GB-6

2.1.1. Identification de la partie aglycone

L'analyse combinée du spectre RMN ^1H (Figure III-80a) de la région aromatique indique la présence de deux systèmes ABX. En effet, on observe:

- Trois signaux constituant le premier système à δ_H 6,90 (1H, *dd*, $J = 8,3; 1,8$ Hz), à δ_H 7,18 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz) et à δ_H 7,02 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), attribuables aux trois protons d'un noyau aromatique H-6, H-5 et H-2, respectivement.
- Trois autres signaux à δ_H 6,78 (1H, *dd*, $J = 8,2$ et $1,6$ Hz), δ_H 7,12 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) et à δ_H 6,91 (1H, $J = 1,6$ Hz), attribuables aux protons H-6', H-5' et H-2' du deuxième système ABX.

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



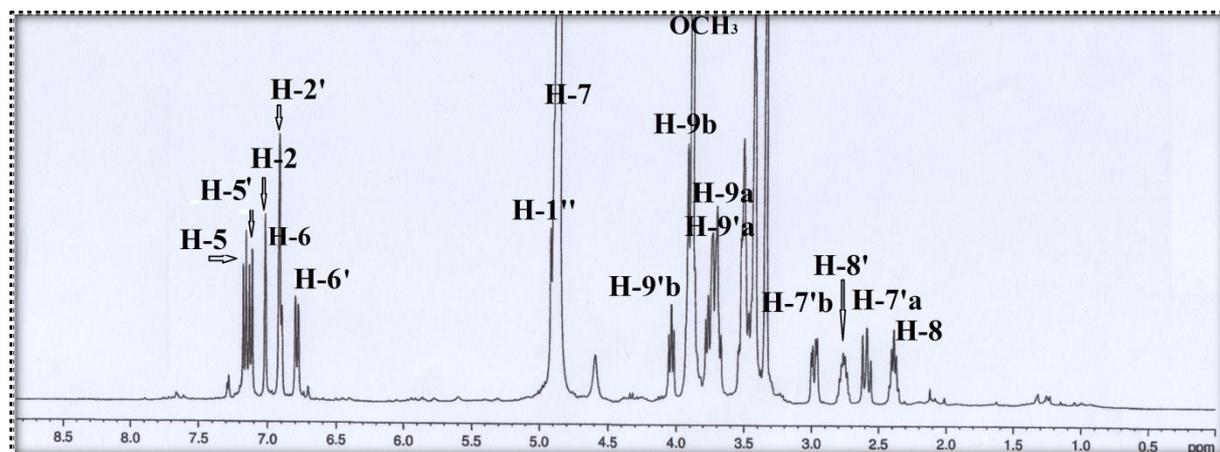


Figure III-80a: Spectre RMN ^1H du composé **GB-6**

Le spectre COSY H-H (Figure III-81) met en évidence les corrélations entre les protons H-5/H-6 et H-5'/H-6'.

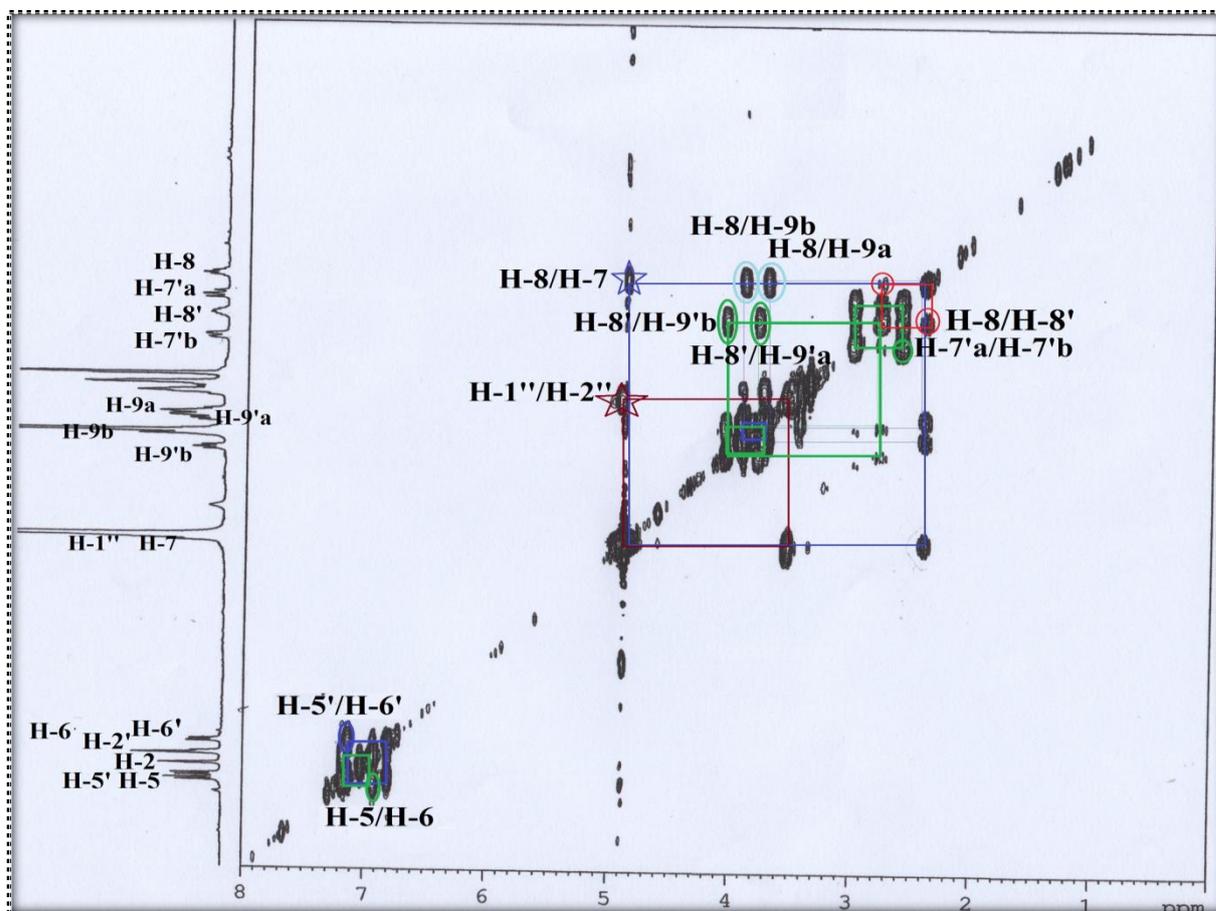


Figure III-81: Spectre COSY H-H du composé **GB-6**

Les valeurs des carbones de ces six protons sont détectées par l'analyse de spectre HSQC (Figure III-82), comme suit : H-2/C-2 à δ_{H} 7,02/ δ_{C} 111,1, H-5/C-5 à δ_{H} 7,18/ δ_{C} 117,9,

H-6/C-6 à δ_H 6,90/ δ_C 119,3, H-2'/C-2' à δ_H 6,91/ δ_C 114,0, H-5'/C-5' à δ_H 7,12/ δ_C 118,1 et H-6'/C-6' à δ_H 6,78/ δ_C 121,8.

A ce stade, tous les protons 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 quintuplet à δ_H 2,40 (1H, *quint*, $J = 6,0$ Hz) correspondant à un proton méthine.
- Un signal sous forme de multiplet intégrant pour un proton à δ_H 2,76 correspondant à 2^{ème} proton méthine.
- Deux signaux intégrant chacun pour un proton sous forme de doublet de doublets à δ_H 2,61 (1H, *dd*, $J = 13,6; 10,6$ Hz) et à δ_H 2,98 (1H, *dd*, $J = 13,5; 1,6$ Hz), respectivement, attribuable aux protons d'un groupement méthylène.

On observe sur le spectre COSY H-H (Figures III-81 et III-81a) une corrélation entre les deux protons méthylènes (δ_H 2,61/2,98) et le proton méthine dont le signal résonnant à δ_H 2,76 (1H, *m*), ce dernier présente lui aussi une corrélation avec deux protons oxyméthylènes à δ_H 4,05 (1H, *t*, $J = 7,9$ Hz) et à δ_H 3,78 (1H, *m*). Cette analyse permet d'identifier le premier système de spin à cinq protons et trois carbones.

En outre, le proton méthine à δ_H 2,40 (δ_C 54,2), et à partir de celui-ci, le spectre COSY H-H montre qu'il corrèle avec un proton oxyméthine dont le signal apparaît à δ_H 4,91 (1H, *m*) et avec deux protons géminés à δ_H 3,71 (1H, *m*) et δ_H 3,90 (1H, *dd*, $J = 8,1; 6,0$ Hz), ce qui nous ramène à identifier le deuxième système de spin à quatre protons et trois carbones.

La figure suivante (Figure III-81a) montre les deux systèmes mise en jeu :

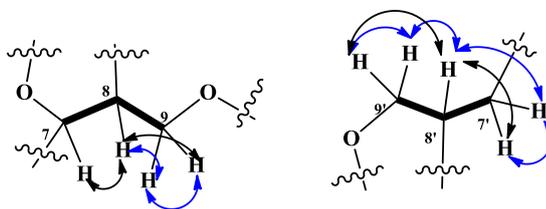


Figure III-81a: Corrélations COSY H-H de la partie aliphatique du composé **GB-6**

Les corrélations directes observées sur le spectre HSQC (Figure III-82) permettent en plus, d'attribuer pour chaque système de spin les carbones correspondants:

- Le méthine à δ_H 2,40 et l'oxyméthine à δ_H 4,91 avec leurs carbones à 54,2 ppm et à 83,7 ppm, respectivement, et l'oxyméthylène à δ_H 3,71/3,90 avec son carbone à δ_H 59,8.

- Le méthine à δ_H 2,76 et son carbone à 43,9 ppm, le méthylène à δ_H 2,61/2,98 et l'oxyméthylène à δ_H 3,78/4,05 avec leurs carbones à 34,0 ppm et à 73,8 ppm respectivement.

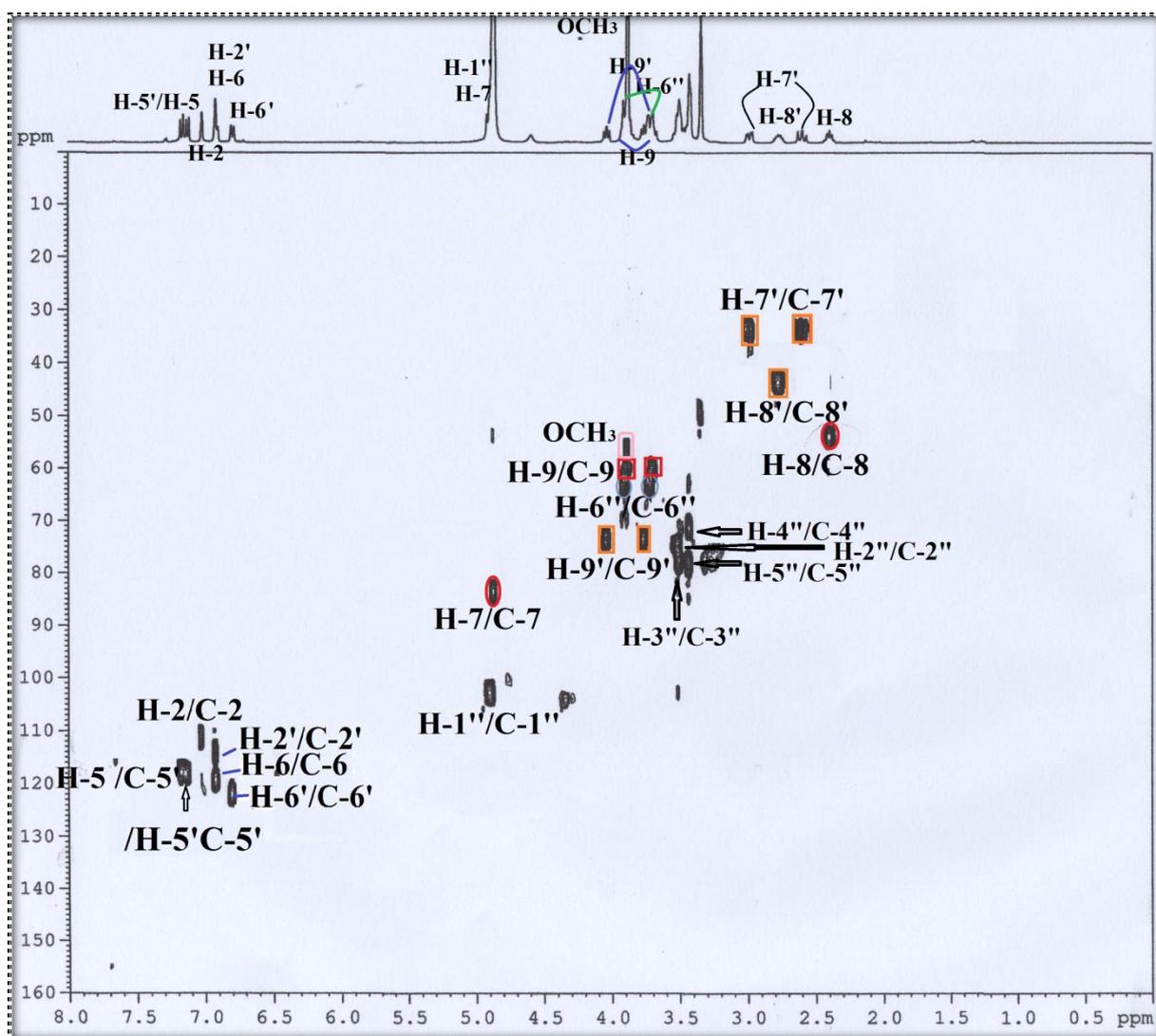
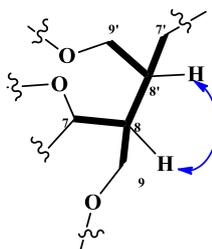


Figure III-82: Spectre HSQC du composé GB-6

Toujours au moyen du spectre COSY H-H, les deux fragments précédents sont connectés à travers une tache de corrélation repérée entre les deux protons méthines à δ_H 2,40 et à δ_H 2,76, d'où la présence du fragment suivant:



L'étude du spectre HMBC (Figure III-83) montre que les deux systèmes de spin sont branchés à travers une corrélation entre le carbone oxyméthine à δ_C 83,7 (C-7) du deuxième système avec les protons oxyméthylènes (CH₂-9') à δ_H 3,78 et δ_H 4,05 du premier système à travers un pont oxygéné. Cet ensemblement est en faveur d'une unité furanique présente dans le composé **GB-6**. A l'issue de cette première analyse qui est la présence d'un cycle furane et deux noyaux aromatiques laisse supposer que notre composé est un lignane dont les six carbones du fragment furane constituant les deux unités C₃ du squelette lignane : C-7, C-8, C-9 et C-7', C-8' et C-9'. En faite, le spectre HMBC (Figures III-83 et III-83a) montre des corrélations caractéristique de cette unité furanique, on observe une corrélation entre les protons méthylène CH₂-7' déjà identifié et le carbone à δ_C 43,9 (C-8'), et une corrélation entre le carbone à δ_C 73,8 (C-9') et les protons CH₂-7'. D'autre part, le spectre montre aussi des corrélations attendues, entre les protons méthylène CH₂-9 et le carbone oxyméthine C-7 (δ_C 83,7), et les protons H-7 et H-8 avec le carbone C-9.

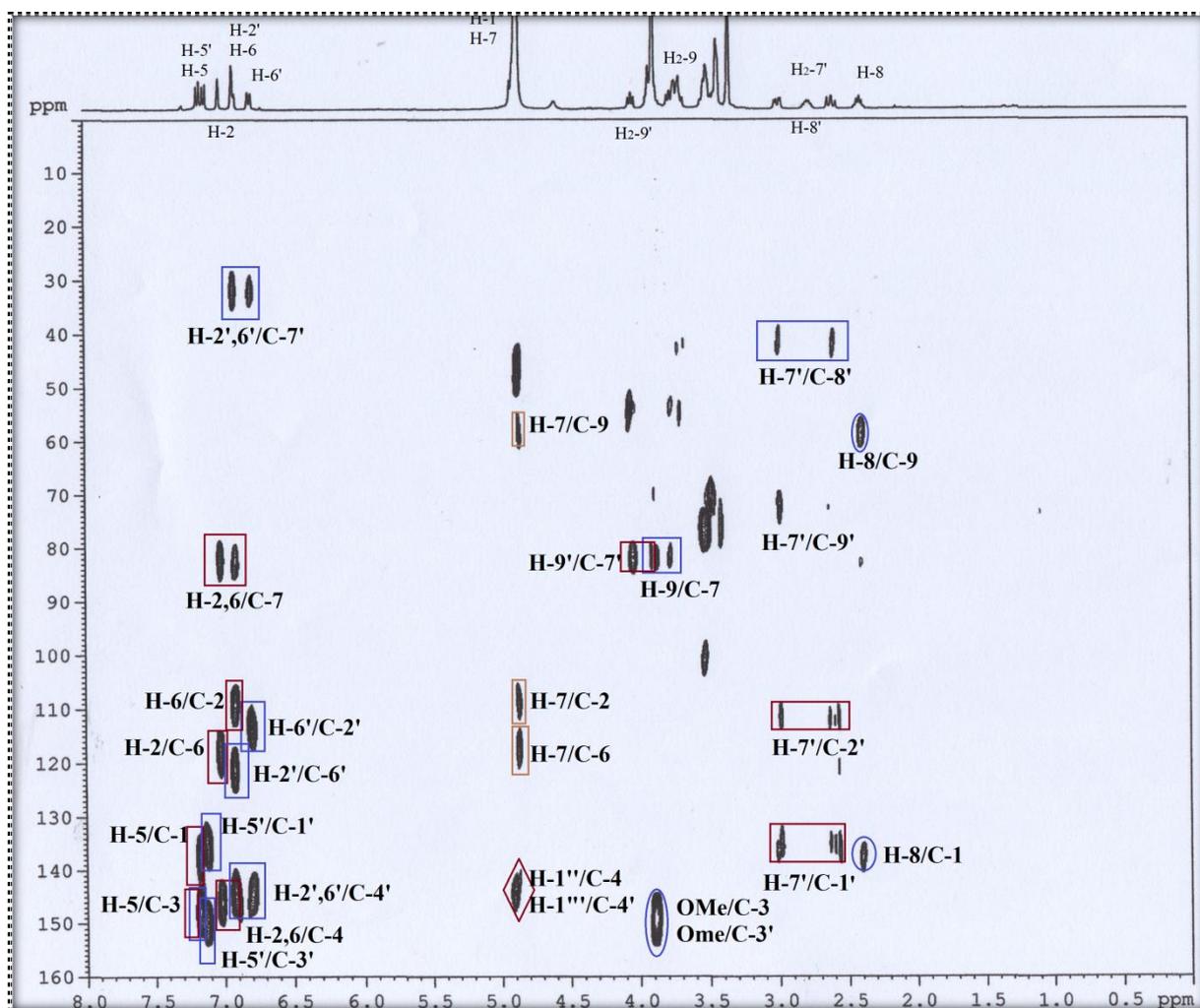


Figure III-83: Spectre HMBC du composé **GB-6**

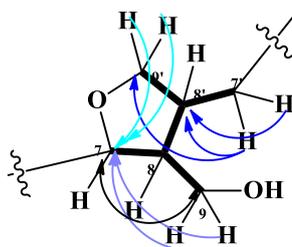


Figure III-83a: Corrélations HMBC du cycle furane du composé **GB-6**

Le spectre HMBC (Figure III-83) permet aussi de connecter le cycle furane à la partie aromatique à travers la corrélation observée entre le carbone C-7 à δ_C 34,0 avec les deux protons aromatiques H-2 et H-6. La localisation du carbone C-7 au premier noyau aromatique a été confirmée par la corrélation HMBC détectée entre son proton (H-7) et les carbones C-2 (δ_C 111,1) et C-6 (δ_C 119,3). Cette analyse HMBC (Figure III-83b) fait apparaître que les protons H-2' (δ_H 6,91) et H-6' (δ_H 6,78) corrélient avec le carbone méthylénique à δ_C 34,0 (C-7'). De plus, les corrélations des protons H₂-7' et le carbone C-2' et un carbone aromatique quaternaire à 135,8 ppm attribué au C-1', ont été observées. Le carbone correspondant du 2^{ème} cycle aromatique est relié directement par une liaison C-C au cycle furane.

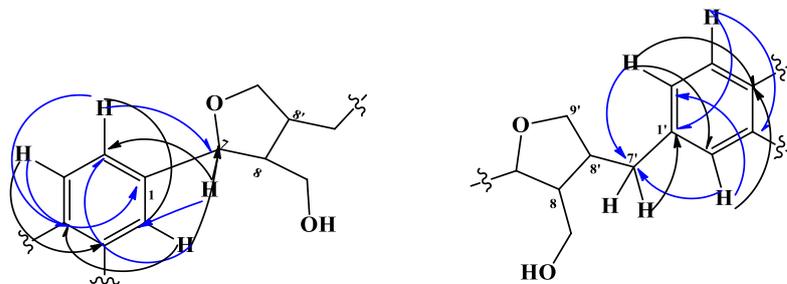


Figure III-83b: Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé **GB-6**

L'analyse de ces spectres (RMN 1H , HSQC et HMBC) de **GB-6** 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 monofurannique²⁴⁸. La génine est, donc, identifiée comme étant laricirésinol comportant deux glycoses, ce qui est en accord avec les informations apportées par le spectre de masse.

2.1.2. Identification de la partie osidique

L'identification de cette partie est initiée par analyse du spectre RMN 1H (Figure III-80a) qui montre un signal masqué par celui du solvant à δ_H 4,92. Ce dernier est caractéristique

²⁴⁸ Ida Y., Satoh Y., Ohtwka M., Nagasao M., Shoji J., Phenolic constituents of *Phellodendron Amurense* Bark, *Phytochemistry*, 35(1), 209-215, 1994.

d'un proton anomérique d'un sucre. Le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Figure III-82) repère le carbone anomère à δ_C 103,3. En étudiant le spectre RMN ^1H réalisé dans le DMSO- d_6 (Figure III-80b), on observe un signal de résonance à δ_H 4,83 sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 7,5$ Hz indique une configuration β , son intégration de deux protons indique la présence de deux glycoses.

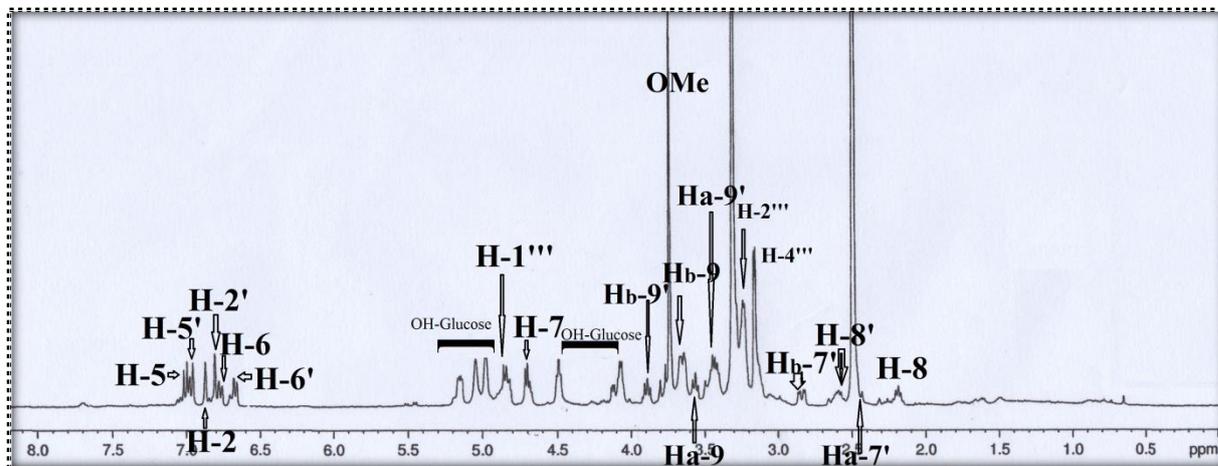


Figure III-80b: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6) du composé GB-6

A partir de ces protons anomériques, l'interprétation des corrélations observées sur le spectre COSY (Figure III-81) permet de repérer le proton H-2'' (H-2''') par la corrélation H-1'''/H-2'' à δ_H 3,52 (2H, t , $J = 9,0$ Hz), puis le proton H-3'' (H-3''') situé à δ_H 3,51 (2H, d , $J = 9,1$ Hz) 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 δ_H 3,45 (2H, t , $J = 8,6$ Hz), le proton H-5'' (H-5''') situé aussi à δ_H 3,42 (2H, t , $J = 8,6$ Hz) présente deux corrélations avec deux protons géminés à δ_H 3,74 (2H, dd , $J = 11,5, 2,2$ Hz) et à δ_H 3,92 (2H, m), attribuables aux protons H₂-6'' (H₂-6''').

Les déplacements chimiques de leurs carbones sont attribués à l'aide de l'expérience HSQC comme suit : δ_C 75,1 (C-2''/C-2'''), δ_C 78,1 (C-3''/ C-3'''), δ_C 71,6 (C-4''/ C-4'''), δ_C 78,5 (C-5''/ C-5''') et δ_C 63,5 (C-6''/ C-6'''). Une comparaison de ces données spectroscopiques avec celles de la littérature a permis de caractériser ces deux sucres comme le β -glucopyranoside.

Le site de glucosylation sur l'aglycone laricirésinol a été finalement déterminé grâce au spectre HMBC. Les deux protons anomères, et les quatre protons aromatiques H-2/H-6 et H-2'/H-6' présentent des taches de corrélations avec deux carbones aromatique quaternaires à δ_C 145,9 et à δ_C 144,1, qui ne peuvent être que les carbones C-4 et C-4', respectivement, de deux noyaux aromatiques de l'aglycone. Par conséquent, chaque anomère doit être lié séparément au carbone C-4 et C-4' de chaque unité aromatique. Il nous reste à positionner les deux groupements méthoxyles à l'unité aromatique, ils sont attachés aux carbones C-3 et C-3' par

les corrélations observées entre les signaux de leurs protons à δ_H 3,88 et à δ_H 3,89 et les carbones à δ_C 147,8 (C-3) et à δ_C 149,6 (C-3'), respectivement. De plus, ces carbones corrélerent avec les protons H-5 et H-5', respectivement (Figure III-83c).

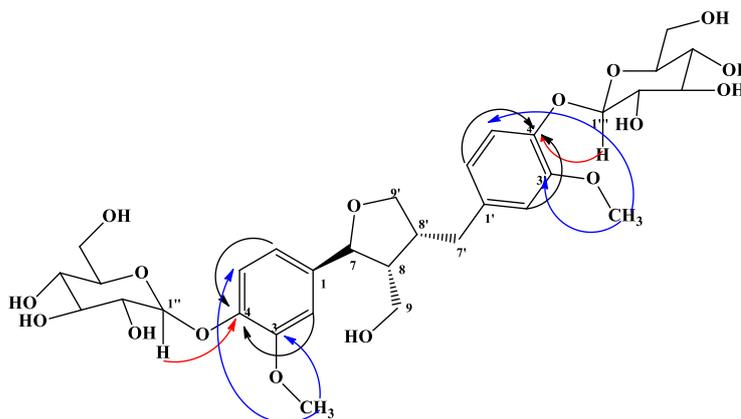


Figure III-80c: corrélations HMBC du composé **GB-6**

L'ensemble de ces données spectrales nous a permis d'établir la structure du composé **GB-6** comme étant le (7*S*,8*R*,8'*R*)-(-)-laricirésinol 4-4'-bis-*O*-D-glucoside^{63, 249}. Ce composé a été isolé pour la première fois des racines de l'extrait n-butanolique de *Galium sinaicum* et a été soumis à un essai biologique de cytotoxicité contre la lignée cellulaire de leucémie P388, il présente une faible activité cytotoxique *in vitro* avec une valeur de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de IC_{50} .

Le tableau III-11 contient tous les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **GB-6**.

Tableau III-11: Déplacement chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **GB-6** ($\text{MeOH-}d_4$)

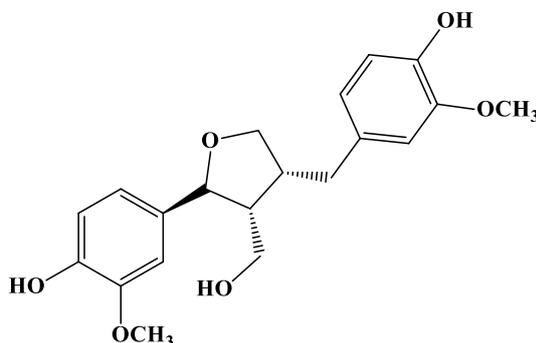
Position	δ_H <i>m</i> J(Hz)	δ_C
1	-	137,5
2	7,02 <i>d</i> (1,8)	111,1
3	-	147,8
4	-	145,9
5	7,18 <i>d</i> (8,3)	117,9
6	6,90 <i>dd</i> (8,3; 1,8)	119,3
7	4,91 <i>d</i> (6,0)	83,7
8	2,40 <i>quint</i> (6,0)	54,2
9	3,71 <i>m</i>	59,8
	3,90 <i>dd</i> (6,0; 10,4)	
1'	-	135,8
2'	6,91 <i>d</i> (1,6)	114,0
3'	-	149,6
4'	-	144,1
5'	7,12 <i>d</i> (8,2)	118,1
6'	7,06 <i>dd</i> (8,2; 1,6)	121,8

²⁴⁹ Kurkin V. A., Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity, *Chemistry of Natural Compounds*, 39(2), 123-153, 2003.

7'	2,98 <i>dd</i> (13,6; 1,6) 2,61 <i>dd</i> (13,6; 10,6)	34,0
8'	2,76 <i>m</i>	43,9
9'	3,78 <i>m</i> 4,05 <i>t</i> (8,9)	73,8
Glucose		
1'' (1''')	4,92 <i>d</i> (7,5)	103,0
2'' (2''')	3,52 <i>t</i> (9,0)	75,1
3'' (3''')	3,51 <i>t</i> (9,1)	78,1
4'' (4''')	3,45 <i>d</i> (8,6)	71,6
5'' (5''')	3,42 <i>t</i> (8,6)	78,5
6'' (6''')	3,74 <i>dd</i> (11,2; 2,2) 3,92 <i>m</i>	63,5

2.2. Composé GB-7

Le composé **GB-7** se présente sous forme d'une poudre amorphe, blanche, soluble dans le chloroforme, il donne une fluorescence sous la lumière UV (254 nm) et une coloration grise après pulvérisation sur sa plaque CCM par sulfate de cérium et chauffage.



Le spectre de masse obtenu en ESI, en mode positif (Figure III-84), donne deux ions pseudomoléculaires à m/z 383,133 $[M+Na]^+$ et à m/z 742,927 $[2M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 360 uma avec une formule brute de $C_{24}H_{30}O_6$.

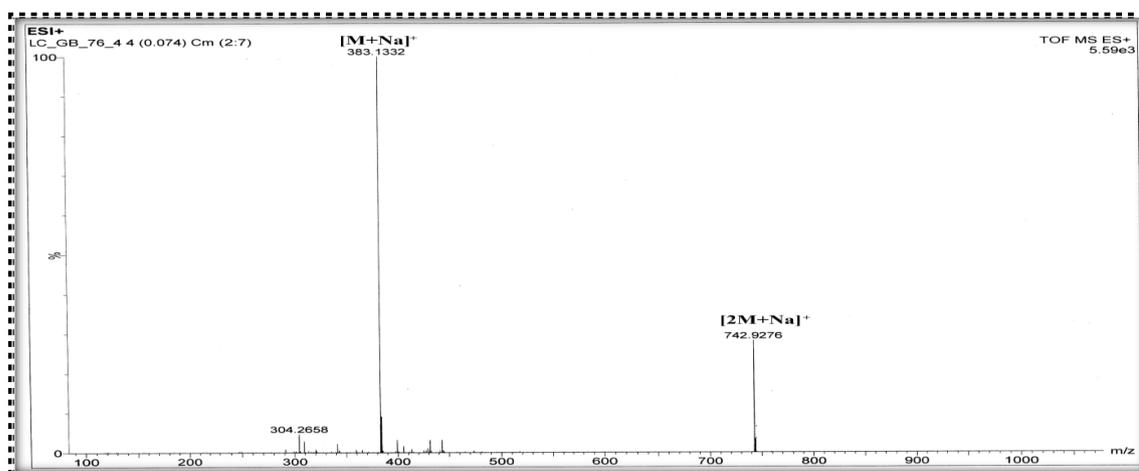


Figure III-84: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-7**

L'étude du spectre de RMN ^1H (Figures III-85) révèle une ressemblance avec celui de **GB-6** (Figure III-80), la différence principale concerne l'absence des signaux osidiques. Cette analyse permet d'attribuer tous les signaux de la génine, en comparaison avec ceux décrits dans le composé **GB-6** dans la littérature et d'identifier celle-ci à la laricirésinol²⁵⁰. Ceci est confirmé par le spectre de masse de **GB-7** qui présente une masse moléculaire de 360 uma, soit une différence de masse de 324 (2×162) uma en comparaison avec celle du composé **GB-6**, suggérant ainsi la perte de deux fragments glucoses.

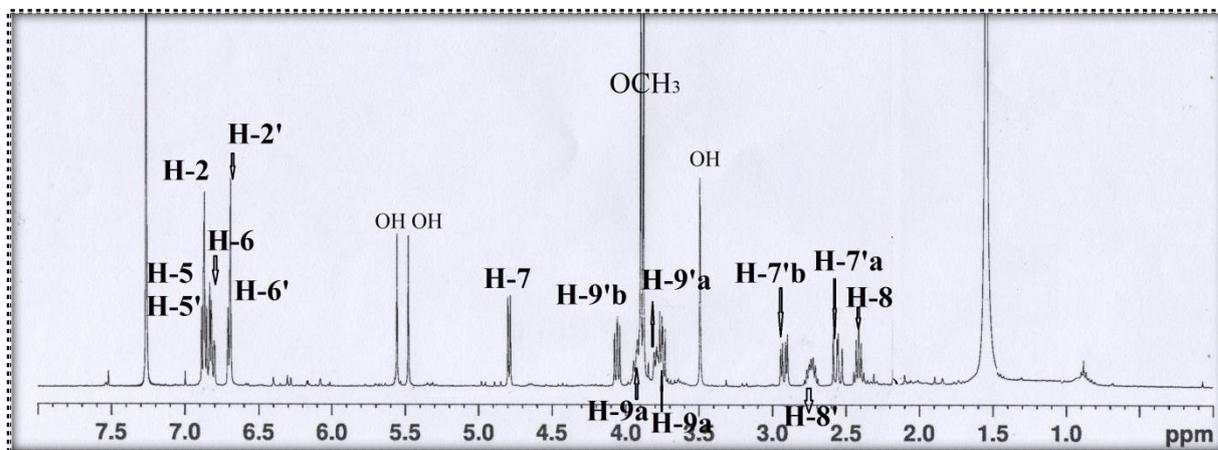


Figure III-85: Spectre RMN ^1H du composé **GB-7**

Sur le spectre RMN ^1H , réalisé dans le CDCl_3 , on confirme la présence de tous les signaux caractéristiques de laricirésinol.

- Les résonances des signaux entre δ_{H} 6,65 et à δ_{H} 6,90 repèrent les protons H-6 à δ_{H} 6,82 (1H, *dd*, $J = 8,2; 1,6$ Hz) et H-5 à δ_{H} 6,87 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) *ortho* couplés, le proton H-2 à δ_{H} 6,88 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz) *métra* couplé. Ces protons correspondent à un système ABX d'un cycle aromatique substitué en positions 3 et 4. Un autre système ABX constitué des protons H-6' à δ_{H} 6,70 (1H, *dd*, $J = 8,3, 1,7$ Hz), H-5' à δ_{H} 6,89 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz) *ortho* positionnés l'un par rapport à l'autre, et H-2' à δ_{H} 6,69 (1H, *d*, $J = 1,7$ Hz) *métra* couplé.
- Les résonances des signaux entre 2,40 et 4,80 ppm sont en accord avec le fragment de cycle furane. En effet, on observe:
 - ✓ Un doublet déblindé à δ_{H} 4,49 (1H, *d*, $J = 6,4$ Hz), assigné au proton oxyméthine H-7.
 - ✓ Un signal sous forme de quintuplet à δ_{H} 2,41 ($J = 6,1$ Hz) intégrant pour un proton, caractéristique du proton H-8.

²⁵⁰ Wang Q-H., Peng K., Tan L-H., Dai H-F., Aquilarin A, a new benzenoid derivative from the Fresh Stem of *Aquilaria sinensis*, *Molecules* 15, 4011-4016, 2010.

- ✓ Le méthylène CH₂-9 est déterminé par les deux signaux à δ_H 3,76 (1H, *m*) et à δ_H 3,91 (1H, *m*), tandis que les deux signaux à δ_H 4,07 (1H, *dd*, $J = 8,6; 6,6$ Hz) et à δ_H 3,79 (1H, *m*) constituent le groupement méthylène CH₂-9'.
- ✓ Deux signaux intégrant chacun pour 1H résonnant à δ_H 2,92 (*dd*, $J = 13,4; 5,2$ Hz) et à δ_H 2,57 (*dd*, $J = 13,4; 10,2$ Hz), sont attribués aux protons du groupement méthylène CH₂-7'.
- ✓ Le multiplet à δ_H 2,75 est attribué au proton H-8'.
- Deux signaux intégrant chacun pour trois protons à δ_H 3,87 et δ_H 3,89 caractéristiques de deux groupements méthoxyles.
- Les trois singlets restant correspondent aux protons hydroxyles résonnant à δ_H 3,49, δ_H 4,98 et δ_H 5,08.

Toutes ces données spectrales sont accord avec la structure finale du composé **GB-7** comme étant laricirésinol, isolé antérieurement des espèces *Aquilaria sinensis* et *Sambucus williamsii*^{250,251}. Ce composé a été détecté pour la première fois dans la famille des Rubiacées à partir d'une espèce *Plocama pendula*²⁵², bien que son bis-glucoside, a été obtenu à partir de *Galium sinaicum*⁶³.

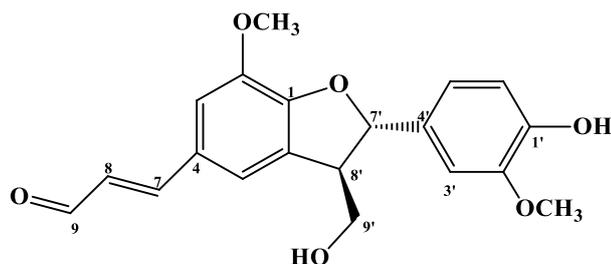
Une étude réalisée sur le laricirésinol isolé de *Sambucus williamsii* montre qu'il présente des propriétés antifongiques contre plusieurs pathogènes sans effets hémolytiques sur les érythrocytes humains. Cette étude suggère que le laricirésinol a un potentiel thérapeutique en tant que un nouvel agent antifongique pour le traitement de maladies infectieuses chez l'homme²⁵¹. D'autre étude montre que ce composé présente une cytotoxicité vis-à-vis des cellulaires SGC-7901 et SMMC-7721. Il est considéré comme un agent chimio-préventif potentiel de différentes formes de cancer^{250,253}.

²⁵¹ Hwang B., Cho J., Hwang I.-S., Jin H.-G., Woo E.-R., Lee D.G., Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410, 489-493, **2011**.

²⁵² Fraga B.M., Díaz C.E., Quintana N., Naphthohydroquinones and lignans from the roots of *Plocama pendula*, a Canary Island paleoendemism, *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 784-788, **2010**.

²⁵³ Eklund P., Sillanpaa R., Sjöholm R., Synthetic transformation of hydroxymatairesinol from norway spruce (*Picea abies*) to 7-hydroxysecoisolariciresinol, (+)-lariciresinol and (+)-cycloalariciresinol, *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1906-1910, **2002**.

2.3. Composé GB-8



Le composé **GB-8** se présente sous forme d'une poudre amorphe jaune pâle, soluble dans le chloroforme, visible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm) et se révèle avec le sulfate de cérium en coloration grise après chauffage, il présente le même profil chromatographique comme le composé précédent (**GB-7**).

On observe sur le spectre de masse en source ESI⁺ de ce composé (Figure III-86), un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 379,1568 [M+Na]⁺ correspondant à une masse moléculaire M = 356 uma, soit une formule brute en C₂₀H₂₀O₆ avec 11 insaturations, suggérant la présence au moins de deux groupements aromatiques.



Figure III-86: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-8**

Le spectre RMN ¹H de **GB-8**, réalisé dans le MeOH-*d*₄ (Figure III-87a), est analogue à celui de **GB-7**, il comporte une zone aliphatique et une autre aromatique. En plus, un signal est observé dans la zone des champs faibles.

Dans la zone aromatique, le spectre RMN ¹H montre cinq signaux dont l'intégration représente cinq protons, comme suit:

- Deux signaux sous formes de doublets résonnant à δ_H 7,26 (1H, *d*, $J = 1,4$ Hz) et à δ_H 7,32 (1H, *d*, $J = 1,4$ Hz) sont caractéristiques aux protons H-3 et H-5 *mé*ta couplés, d'un noyau aromatique tétra-substitué.

- Trois signaux à δ_H 6,81 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz) et à δ_H 6,86 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz) et à δ_H 6,98 (1H, *d*, $J = 1,2$ Hz). Ces signaux attribuables aux protons H-6', H-5' et H-2' du 2^{ème} cycle aromatique tri-substitué.

Toujours dans la zone des protons aromatiques (Figure III-87a), on observe l'apparition des protons à δ_H 7,64 (1H, *d*, $J = 15,4$ Hz) et δ_H 6,71 (1H, *dd*, $J = 7,7; 15,4$ Hz), attribuables aux deux protons oléfiniques d'une double liaison avec une configuration *trans*. La présence d'un doublet à δ_H 9,61 (*d*, $J = 7,7$ Hz) dans une zone de champs très faible est caractéristique d'un proton d'une fonction aldéhyde. La constante de couplage commune entre le signal du proton aldéhyde et le signal de la double liaison à δ_H 6,71 ($J = 7,7$ Hz), indique la présence d'un fragment CH=CH-CHO. Ce dernier de trois atomes de carbone, fait partie de l'unité cinnamaldéhyde (phénylpropénal) très répandu dans les lignanes.

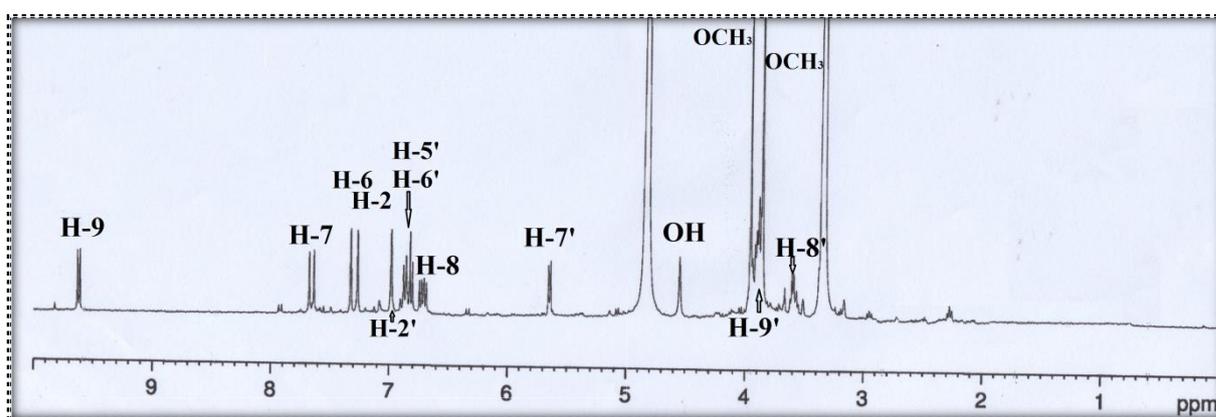


Figure III-87a: Spectre RMN ^1H (MeOD) du composé **GB-8**

L'analyse de spectre RMN ^1H , enregistré dans le CDCl_3 (Figure III-87b), permet d'observer les protons aliphatiques suivants:

- Un signal sous forme de doublet à δ_H 5,62 (1H, *d*, $J = 7,1$ Hz), attribuable à un oxyméthine (H-7').
- Un signal de deux protons géminés résonant à δ_H 3,91, sous forme d'un multiplet (2H, *m*), attribué à un groupement méthylène (H₂-9').
- Un autre signal à δ_H 3,69 (1H, *dd*, $J = 7,1; 8,0$ Hz), intégrant pour un proton, attribuable à un proton méthine (H-8').
- Deux singulets à δ_H 3,86 et δ_H 3,92 attribuables aux protons de deux groupements méthoxyles.

Toutes ces données nous oriente à proposer une structure d'un néolignane pour le composé **GB-8**.

La comparaison des déplacements chimiques de ce composé avec ceux décrits dans la littérature, nous permet d'identifier ce composé comme étant la balanophonine ^{250,254}.

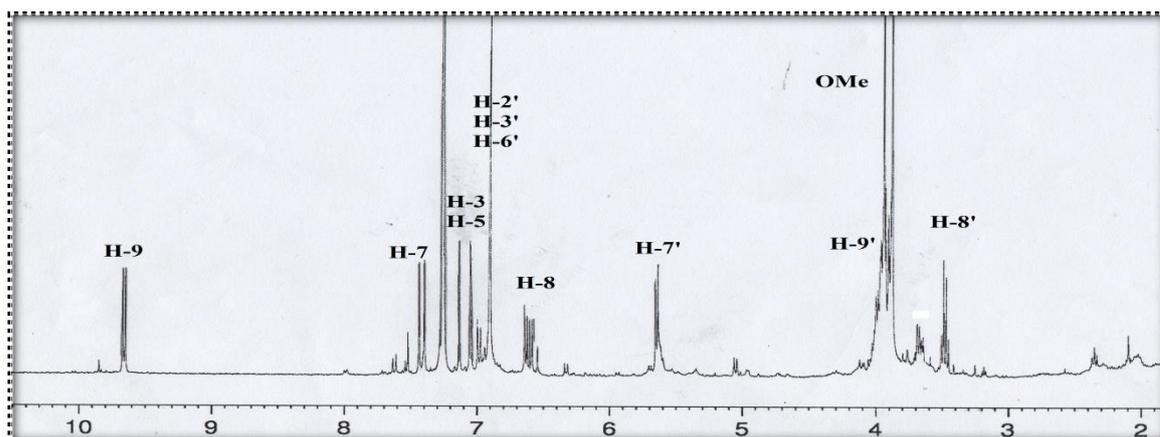
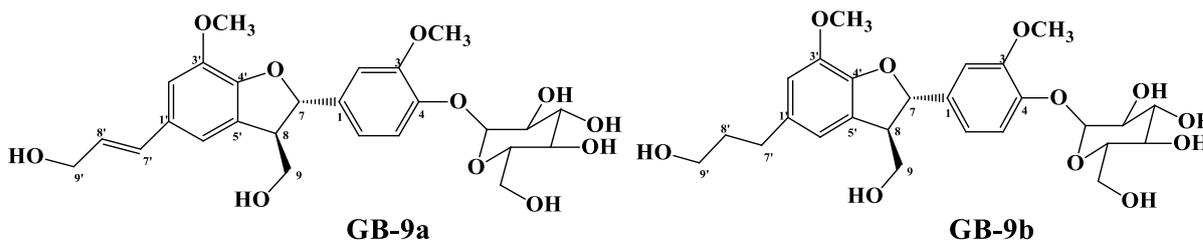


Figure III-87b: Spectre RMN ¹H (CDCl₃) du composé **GB-8**

Le balanophonine est un néolignan isolé pour la première fois de l'espèce *Balanophora japonica*²⁵⁴, elle a été détectée dans plusieurs espèces des Rubiaceae telles que *Morinda citrifolia* L et *Tarenna attenuata*. Ce composé est connu par ses propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et une activité d'agrégation antiplaquettaire *in vitro*²⁵⁵.

2.4. Composé GB-9 (GB-9a et GB-9b)



Le composé **GB-9** présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol. La plaque CCM le visualise sous forme d'une monotâche visible sous la lampe UV et se révèle avec le sulfate de cérium en coloration violette après chauffage.

L'ionisation électrospray ESI de ce composé, en mode positif (Figure III-88), a produit quatre ions à m/z 543,709 [M_a+Na]⁺, m/z 545,708 [M_b+Na]⁺, m/z 1064,491 [$2M_a+Na$]⁺ et m/z 1066,497 [$2M_b+Na$]⁺, attribuables aux masses moléculaires $M_a = 520$ et $M_b = 522$ uma respectivement. Ainsi deux formules brutes avec une différence de deux uma sont suggérées: $C_{26}H_{32}O_{11}$ et $C_{26}H_{34}O_{11}$, par conséquent le composé **GB-9** est un mélange de deux composés

²⁵⁴ Haruna M., Koube T., Ito K., Murata H., Balanophonin, a new neo-lignan from *Balanophora japonica* Makino, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 30 (4), 1525-1527, **1982**.

²⁵⁵ Xie Y., Ma G., Wei H., Yuan J., Wu H., Zhou X., Yang J., Xu X., Three New Phenolics and other constituents from the seeds of *Lithocarpus pachylepis*, *Molecules* 18, 10397-10403, **2013**.

GB-9a et **GB-9b**, qu'ils sont différents par une insaturation. Des essais de séparation par les méthodes chromatographiques classiques (CC en phase normale et en phase inverse, CCE,...), se sont révélés inefficaces.

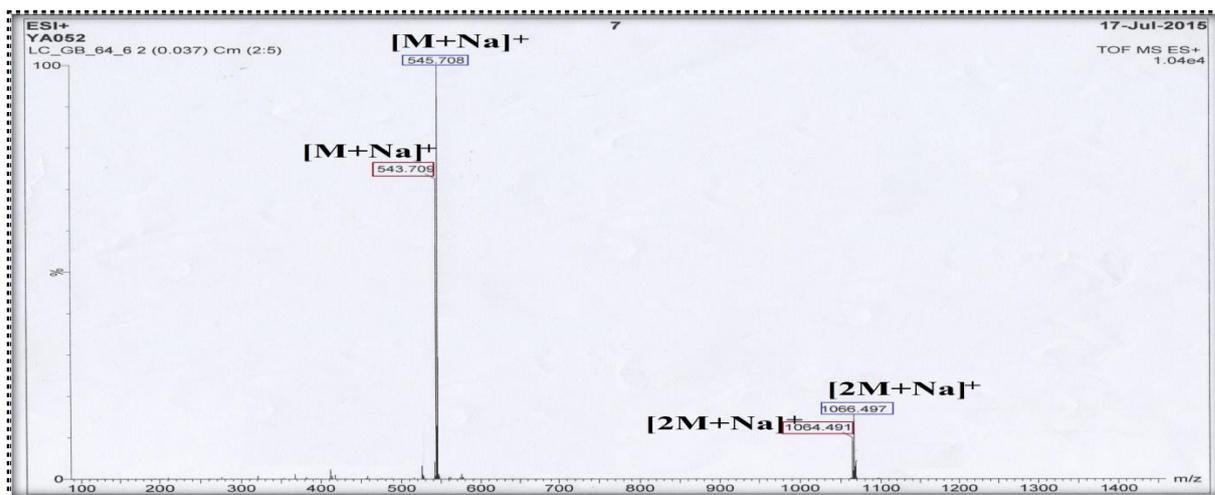


Figure III-88: Spectre de masse ESI du composé **GB-9** (**GB-9a** et **GB-9b**)

En comparant les signaux du spectre RMN ^1H de ce mélange avec ceux de **GB-6**, **GB-7** et en particulier avec le composé **GB-8**, nous constatons une grande ressemblance, ce qui suggère que le composé **GB-9** est un mélange de deux néolignanes. En effet, sur le spectre RMN ^1H réalisé dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure III-89), on observe la présence de trois grandes zones:

- La première, inclure dix protons aromatiques
- La seconde, la zone centrale du spectre, comporte les protons des groupements méthoxyles, des protons osidiques et des protons oxyméthines.
- La dernière zone, celle de champ fort (de 1,80 à 2,25 ppm), renferme des protons aliphatiques.

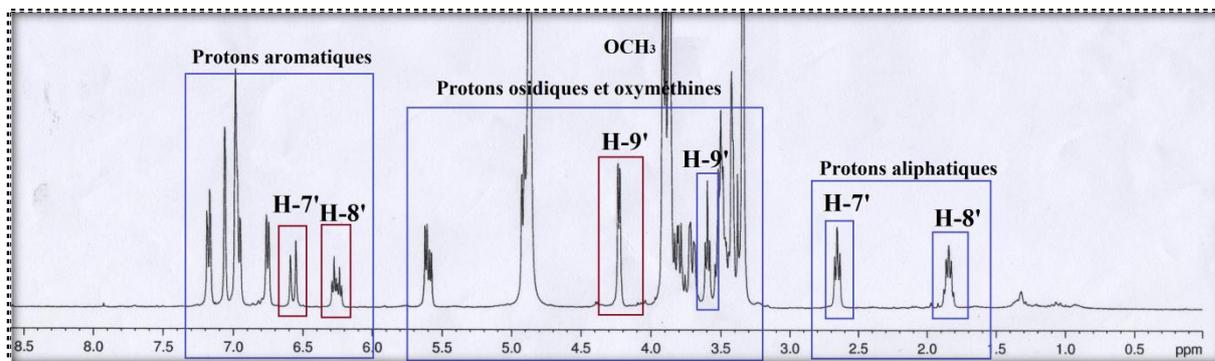


Figure III-89: Spectre RMN ^1H du composé **GB-9** (**GB-9a** et **GB-9b**)

D'après cette première analyse, le composé **GB-9** est un mélange de deux composés de même squelette de base.

En effet, l'analyse de la partie aromatique (Figure III-89a) met en évidence la présence de deux systèmes ABX, comme suit:

- Deux signaux superposés à δ_H 7,17 (1H, H_a-5) et à δ_H 7,16 (1H, H_b-5) apparaissent sous forme d'un doublet avec des constantes de couplage $J = 8,2$ Hz indiquant leur couplage *ortho*.
- Le signal à δ_H 6,96 (2H, H_a-6/H_b-6) est également sous forme de doublet de doublet (*dd*) avec des constantes de couplage $J = 8,2$ et 1,8 Hz, correspondant respectivement à un couplage *ortho* et *mé*ta, le doublet à δ_H 7,06 (2H, H_a-2/H_b-2) avec de constante de couplage $J = 1,8$ Hz.

Ces protons sont respectivement attribués aux protons H_a-5/H_b-5, H_a-6/H_b-6 et H_a-2/H_b-2 de deux cycles aromatiques trisubstitués.

La suite de l'analyse de cette partie permet d'identifier deux autres noyaux aromatiques dont:

- Les deux singlets à δ_H 6,73 (1H, *s*) et δ_H 6,75 (1H, *s*) sont attribués aux protons aromatiques du cycle tétra-substitué pour l'un de composés **GB-9a** (**GB-9b**).
- Le singlet intense à δ_H 6,99, intègre pour 2H, correspondent aux deux protons aromatiques du 2^{ème} cycle tétra-substitué pour l'un de composés **GB-9a** (**GB-9b**).

De ce qui précède, on permet de noter la présence pour chaque composé deux noyaux aromatique, un est tri-substitué et l'autre est tétra-substitué.

Les signaux à δ_H 3,83 (6H, *s*), δ_H 3,88 (3H, *s*) et δ_H 3,93 (3H, *s*) sont liés à la présence de quatre groupements méthoxyles.

L'identification de l'unité dihydrobenzofurane peut être commencée par les deux signaux de protons oxyméthines, observés à δ_H 5,58 (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz) et δ_H 5,61 (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz), caractéristiques du proton H-7 de chaque composé. Les deux protons non équivalents du groupement méthylène CH₂-9 et le proton du groupement méthine H-8 sont masqués par les signaux de l'unité osidique. D'après cette analyse primaire, le mélange **GB-9** est un mélange de deux néolignanes **GB-9a/GB-9b** où la différence majeur résulte dans la chaîne latérale constitué de trois carbones du fragment phényl propyle.

Effectivement, cette idée est renforcée par l'analyse de reste des signaux observés sur le spectre RMN ¹H (Figure III-89a). En effet, le spectre fait apparaître d'autres signaux déblindés à δ_H 6,56 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz) et δ_H 6,22 (1H, *dt*, $J = 15,9, 5,8$ Hz), intégrant chacun pour 1 proton, confirmant la présence d'une double liaison de configuration *Trans*. Les deux protons éthyléniques font partie d'une unité de trois atomes de carbones d'un fragment -CH=CH-CH₂OH, d'après le signal apparaissant à δ_H 4,21 (2H, *dd*, $J = 5,8, 1,2$ Hz),

attribuable aux protons hydroxyméthylènes (CH_2OH). Ces trois signaux sont attribués respectivement aux protons H-7', H-8' et H-9'.

Par suite, les deux signaux résonnent dans la zone blindée à δ_{H} 1,83 (2H, *quint*, $J = 6,5$ Hz, H-8') et à δ_{H} 2,66 (2H, *t*, $J = 7,3$ Hz, H-7') respectivement, sont attribuables aux deux protons aliphatiques, ce qui suggère que la double liaison pour le composé **GB-9b** est saturée. La multiplicité observée pour ces protons avec le signal sous forme de triplet à δ_{H} 3,59 (2H, *t*, $J = 6,5$ Hz, H-9') et la valeur des constantes de couplage liés entre eux, ont permis de déterminer le fragment $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

De ce qui précède, les structure des composés **GB-9a** et **GB-9b** ne présentent, qu'une seule différence structurale concernant l'unité coniféryle alcool ce qui nous oriente vers deux néolignanes de types benzofurane.

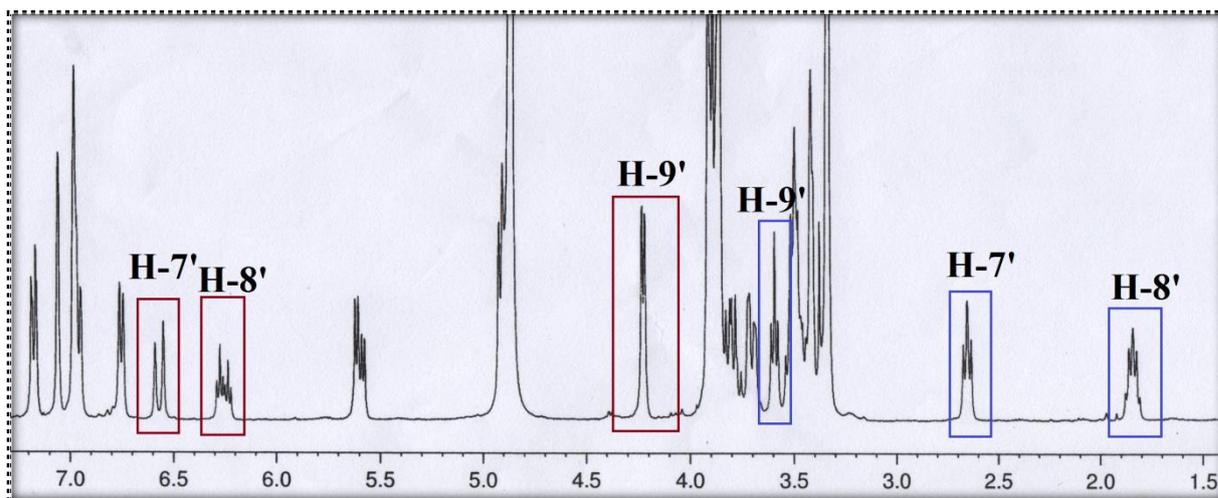


Figure III-89b: Spectre RMN ^1H du composé **GB-9** (**GB-9a** et **GB-9b**)

Concernant la partie osidique, on observe sur le même spectre RMN ^1H (Figure III-89b), le doublet du proton anomère à δ_{H} 4,91 avec une constante de couplage $J = 7,7$ Hz indiquant une configuration β d'un hexose. Les signaux osidiques compris entre 3,30 et 4,00 ppm suggèrent la présence de deux unités glucoses.

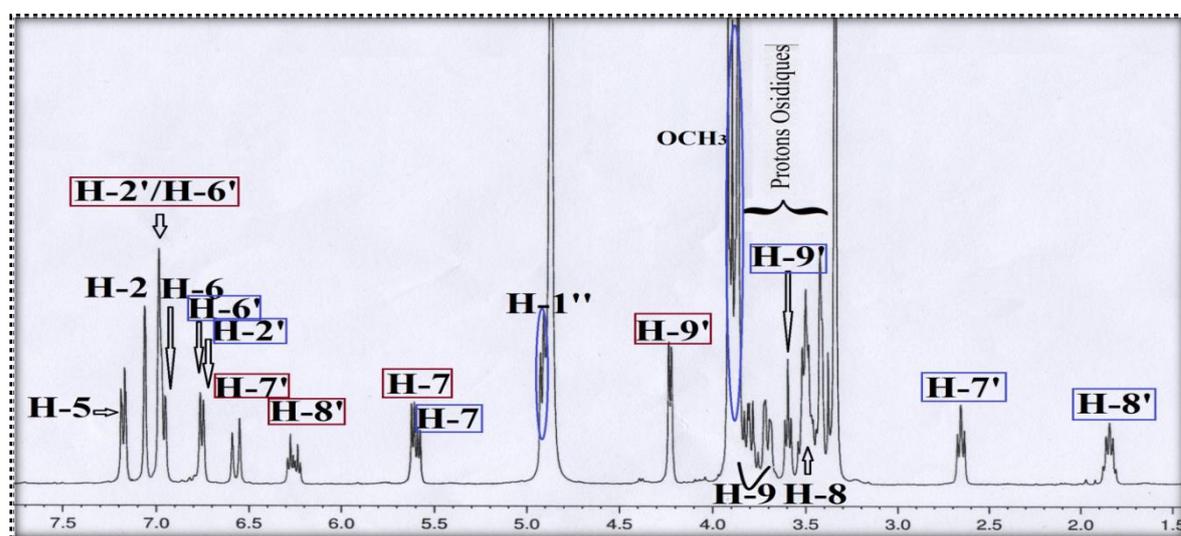
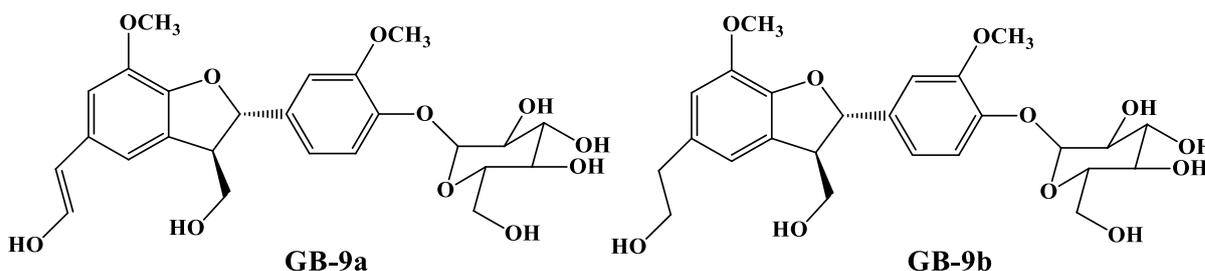


Figure III-89a: Spectre RMN ^1H du composé **GB-9** (**GB-9a**/**GB-9b**)

Une recherche bibliographique exhaustive réalisée sur les néolignanes comportant les unités coniféryle alcool, et la comparaison des données spectrales avec celles décrites par ces composés, nous a ramené à proposer les deux structures de ces deux composés: le dehydrodiconiféryl alcool 4-*O*- β -glucopyranoside (**GB-9a**) et le dihydrodehydrodiconiféryl alcool 4-*O*- β -glucopyranoside (**GB-9b**)^{256,257,258,259}.

Le dehydrodiconiféryl alcool 4-*O*- β -glucopyranoside est décrit pour la première fois dans une plante appartenant à la famille des Scophulariaceae, *Euphrasia rostkoviana*²⁵⁶. Ces deux composés sont isolés dans les espèces *pedicularis torta* et *Sambucus williamsii*^{257,260}.



²⁵⁶ Salama O., Chaudhuri R.K., Sticher O., A lignan glucoside from *Euphrasia rostkoviana*, *Phytochemistry* 20(11), 2603-2604, **1981**.

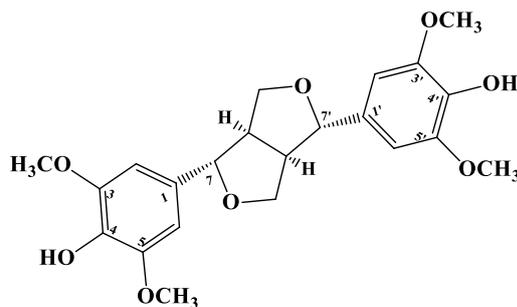
²⁵⁷ Changzeng W., Zhongjian J., Lignan, phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis torta*, *Phytochemistry* 45 (1), 159-166, **1997**.

²⁵⁸ Saracoglu I., Varel M., Calis I., Neolignan, flavonoid, phenylethanoid and iridoid glycosides from *Phlomis integrifolia*, *Turkish Journal of Chemistry* 27, 739-747, **2003**.

²⁵⁹ Machida K., Sakamoto S., Kikuchi M., Two new neolignan glycosides from leaves of *Osmanthus heterophyllus*, *Journal of Natural Medicines* 63, 227-231, **2009**.

²⁶⁰ Ouyang F., Liu Y., Li R., Li L., Wang N-L., Yao X-S., Five Lignans and an Iridoid from *Sambucus williamsii*, *Chinese Journal of Natural Medicines* 9(1), 26-29, **2011**.

2.5. Composé GB-10



Le composé **GB-10** se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Sa CCM présente une grande semblable à celles des produits **GB-7** et **GB-8**.

L'analyse du spectre de masse de **GB-10** en source ESI, en mode positif, (Figure III-90) permet d'observer un ion pseudo-moléculaire à m/z 441,0413 $[M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 418 uma, en accord avec la formule brute $C_{22}H_{26}O_8$. Un autre fragment est observé à m/z 859,7861 $[2M+Na]^+$ correspondant au dimère de ce composé.

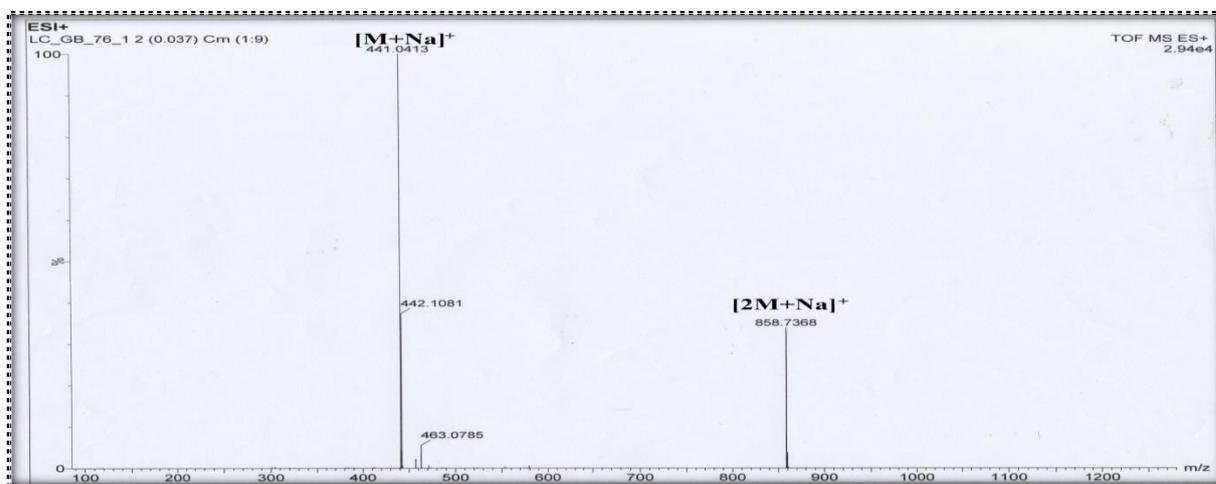


Figure III-90: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-10**

L'analyse du spectre RMN ¹H (Figure III-91), met en évidence la présence d'un nombre limité des signaux. On note l'apparition de:

- Un seul signal à δ_H 6,70 (4H) assigné aux protons aromatiques.
- Un doublet à δ_H 4,71 (2H) et un doublet dédoublé à δ_H 4,28 (2H), attribuables aux protons oxyméthines.
- Un singlet large et intense à δ_H 3,88 (12H) caractérisant les protons des groupements méthoxyles.
- Un signal à δ_H 3,12 (2H) sous forme d'un multiplet attribué à un proton méthine.

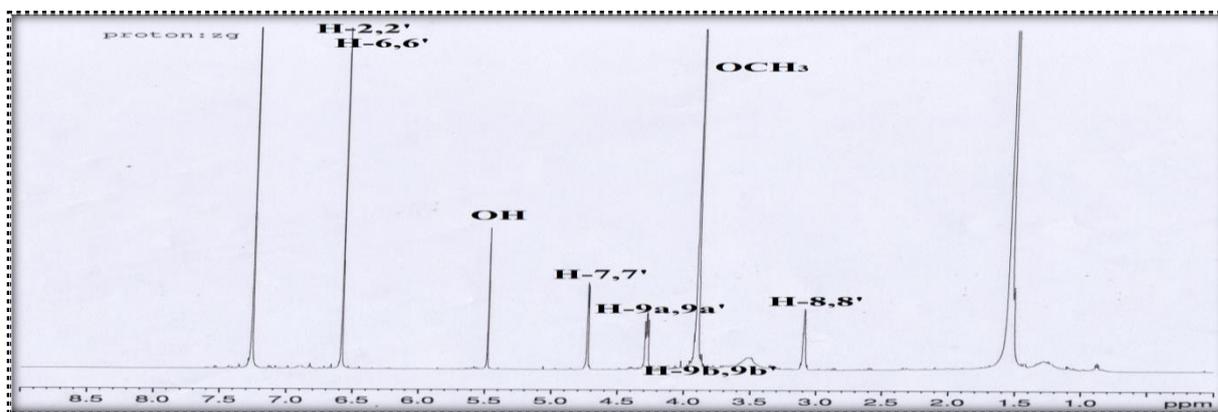


Figure III-91: Spectre RMN ^1H du composé GB-10

Les déplacements chimiques des carbones correspondant sont déterminés grâce à l'expérience HSQC (Figure III-92), par les couplages directs suivants:

- Le singlet à δ_{H} 6,70 avec le carbone aromatique à δ_{C} 100,2.
- Le doublet à δ_{H} 4,71 avec le carbone à δ_{C} 84,2.
- Le quintuplet à δ_{H} 3,12 et le carbone à δ_{C} 53,8.
- Le signal des groupements méthoxyles à δ_{H} 3,88 et le carbone à δ_{C} 54,9.

D'après le spectre HSQC (Figure III-92), deux protons d'une unité méthylène sont repérés à δ_{H} 3,88 et à δ_{H} 4,28, leur carbone à δ_{C} 70,1.

Le signal à δ_{H} 5,48 qui ne présente aucune corrélation sur le spectre HSQC, est attribué aux protons hydroxyliques.

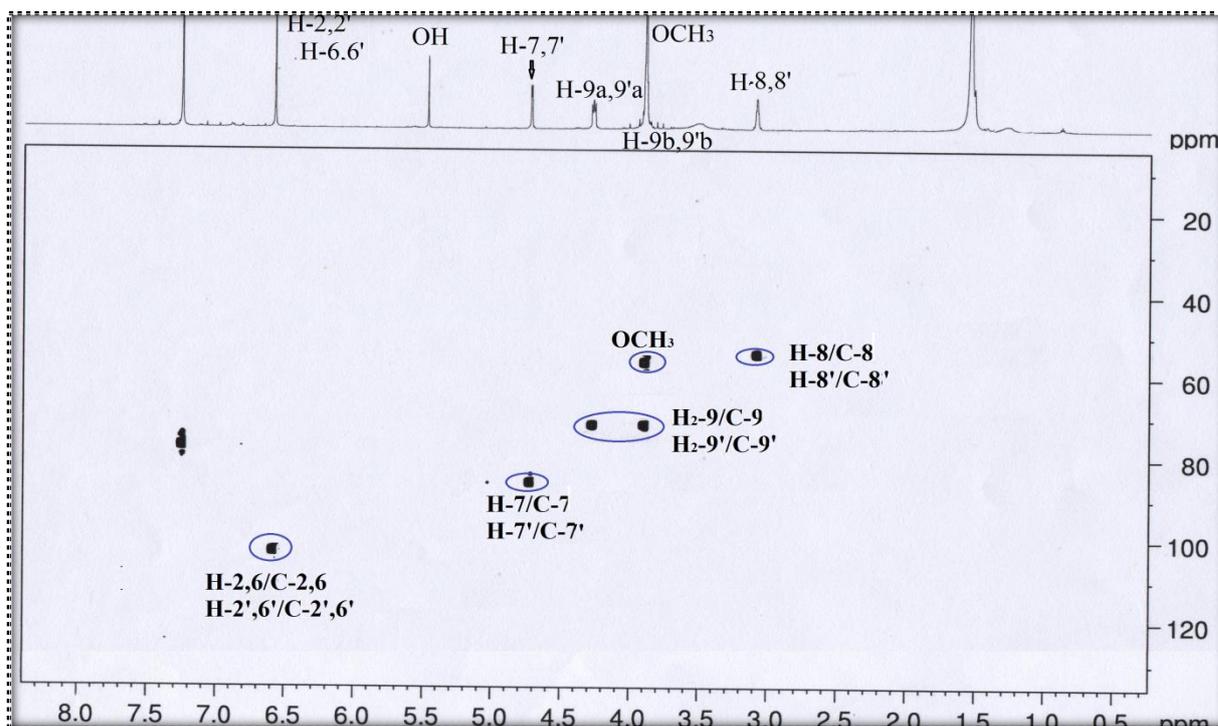


Figure III-92: Spectre HSQC du composé GB-10

Les corrélations présentées sur le spectre COSY H-H (Figure III-93), entre les protons de groupement méthylène (H_2-9/H_2-9') et le proton à δ_H 3,18 ($H-8/H-8'$), qui à son tour corrèle avec l'oxyméthine à δ_H 4,71 ($H-7/H-7'$), confirme la présence d'un fragment de type $-OCH_2-CH-CHO-$. Le dédoublement de chaque signal observé sur le spectre RMN 1H laisse suggérer que le composé **GB-10** est un lignane avec une structure symétrique de type furofurannique.

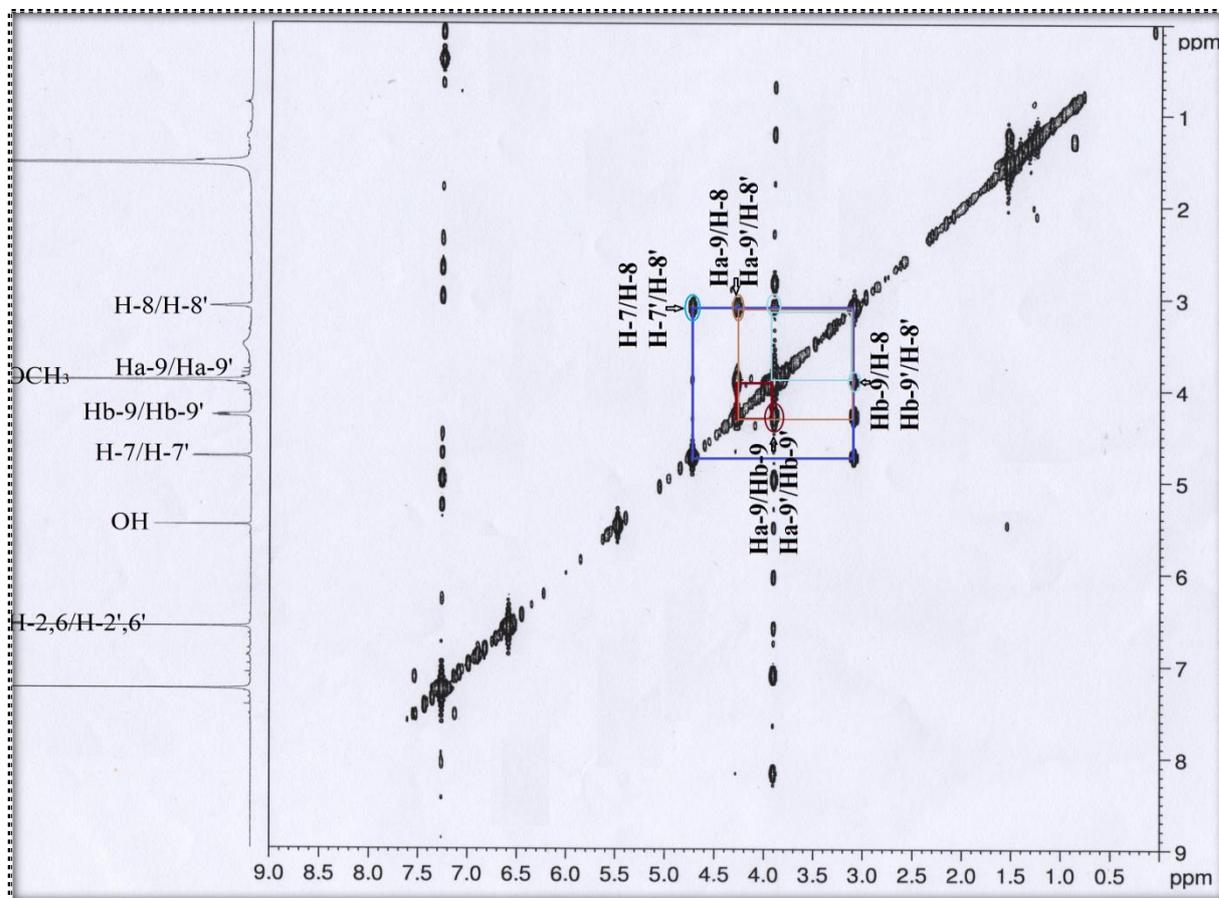


Figure III-93: Spectre COSY H-H du composé **GB-10**

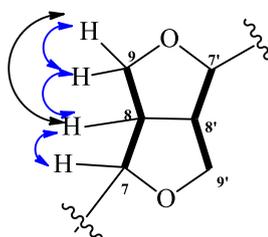


Figure III-93a: Corrélations COSY H-H du cycle furofurannique du composé **GB-10**

Le spectre HMBC (Figures III-94 et III-94a) permet d'observer des corrélations attendues entre le signal de proton $H-7/H-7'$ et les carbones à δ_C à 53,8 ($C-8/C8'$) et à δ_C 70,1 ($C-9/C-9'$ et $C-9'/C-9$), en plus des corrélations entre les protons du groupement CH_2 ($H-9/H-9'$) et le carbone $C-7/C-7'$ confirmant l'hypothèse précédente.

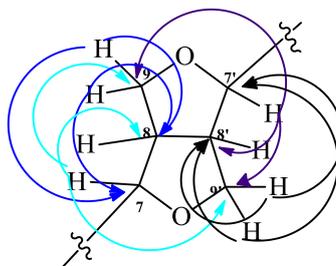


Figure III-94a: Corrélations HMBC du cycle furofurannique du composé **GB-10**

L'attachement de l'unité furofurannique aux deux noyaux aromatiques est confirmé par l'analyse des corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-94). En effet, les protons H-7/H-7' corrèlent avec les carbones aromatiques (C-2/C-6, C-2'/C-6') à δ_C 100,2 et réciproquement indiquant que les deux noyaux aromatiques sont liés aux carbones C-7 et C-7'. Les autres positions des cycles aromatiques (C-3/C-3', C-4/C-4' et C-5/C-5') sont substituées par un hydroxyle et deux méthoxyles selon la masse et la symétrie de cette molécule.

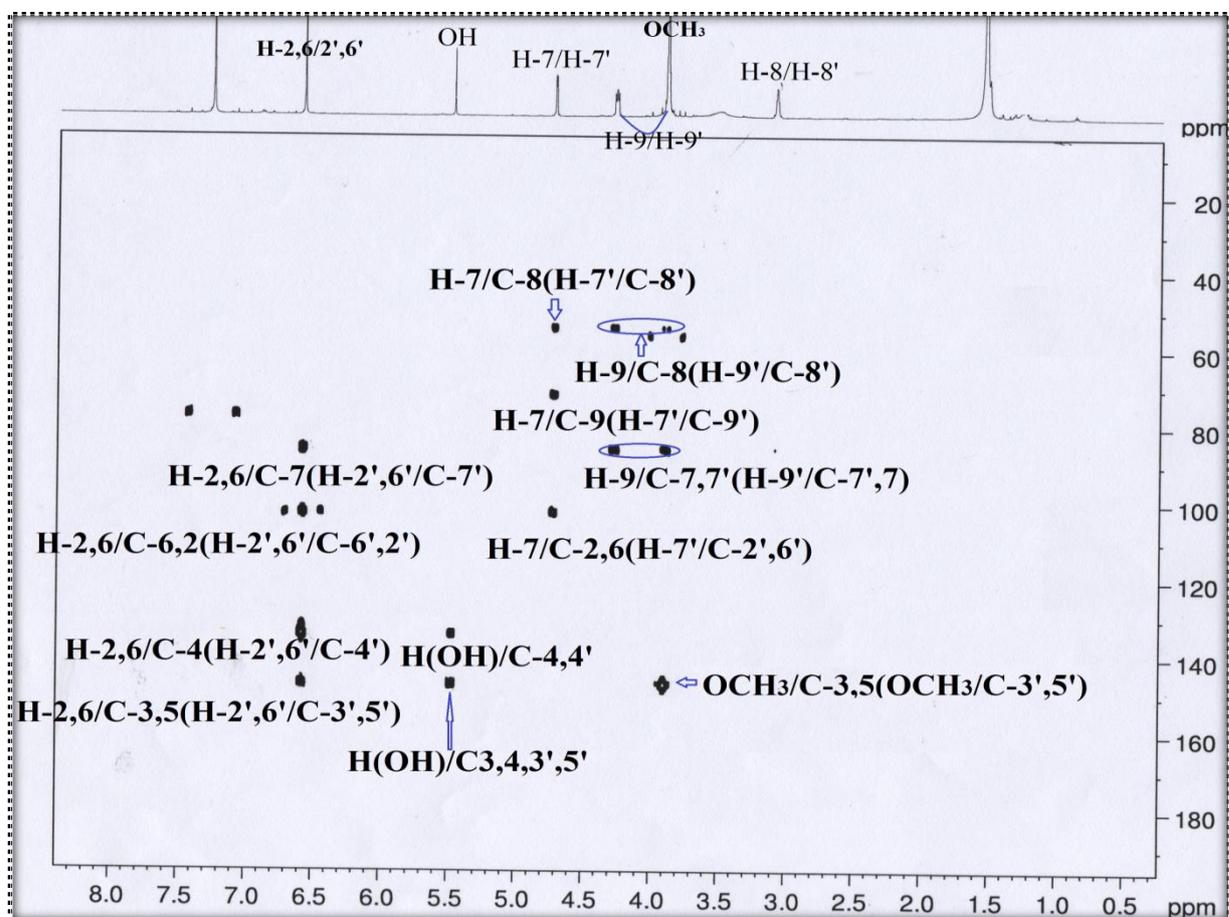


Figure III-94: Spectre HMBC du composé **GB-10**

Toujours au moyen de spectre HMBC (Figure III-94b), les corrélations entre les protons du groupement méthoxyle à δ_H 3,98 et le carbone à δ_C 148,1, le proton du groupement

hydroxyle et les carbones quaternaires à δ_C 148,1 et à δ_C 133,0 permettent de définir la position des groupements méthoxyles en C-3, C-5 (C-3', C-5'), et le groupement hydroxyle en C-4 (C-4').

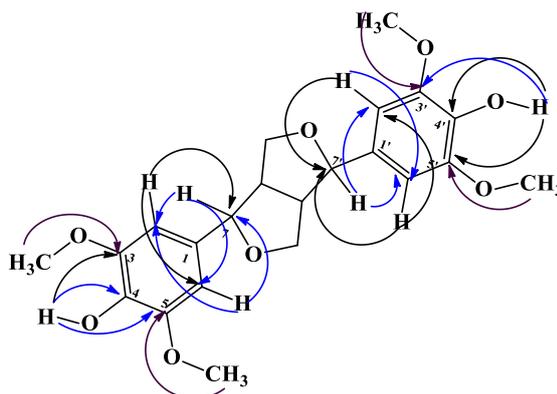


Figure III-94b: Corrélations HMBC du composé **GB-10**

L'ensemble de ces données spectroscopique et la comparaison avec les données de la littérature^{261,262,263}, nous a orienté vers la structure de **GB-10**, qui est le syringarésinol, un composé naturel isolé, auparavant, du genre *Ixora* (*I. brevifolia* et *I. philippinensis* Merr) de la famille Rubiaceae^{263,264}. Un dérivé glucosylé ((-)-syringarésinol 4,4'-bis-*O*- β -D-glucopyranoside) a été isolé dans l'espèce *Galium sinaicum*⁶³.

Tous les déplacements chimiques du composé **GB-10** sont illustrés dans les tableaux suivants:

Tableau III-12: Déplacements chimiques RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé **GB-10** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} <i>m</i> J(Hz)	δ_{C}
1(1')	-	130,5
2(2')	6,70 <i>s</i>	100,2
3(3')	-	148,1
4(4')	-	133,0
5(5')	-	148,1
6(6')	6,70 <i>s</i>	100,2
7(7')	4,71 <i>d</i> 4,5	84,2
8(8')	3,12 <i>m</i>	53,8
9(9')	4,28 <i>dd</i> (9,0; 7,0)	70,1
	3,88 <i>m</i>	
OCH ₃	3,88 <i>s</i>	54,9

²⁶¹ Park H.B., Lee K.H., Kim K.H., Lee I.K., Noh H.J., Choi S.U., Lee K.R., Lignans from the Roots of *Berberis amurensis*, *Natural Product Sciences* 15(1), 17-21, **2009**.

²⁶² Shahata A.A., Abdel-Azimb N.S., Pietersa L., Vlietinck A.J., Isolation and NMR spectra of syringaresinol- β -D-glucoside from *Cressa cretica*, *Fitoterapia*, 75, 771-773, **2004**.

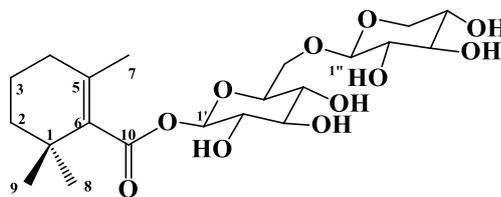
²⁶³ Ragasa C.Y., Tan M.C.S., Fortin D.R., Shen C.-C., Chemical Constituents of *Ixora philippinensis* Merr., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (09), 62-67, **2015**.

²⁶⁴ Medina R.P., Schuquel I.T.A., Pomini A.M., Silva C.C., Oliveira C.M.A., Kato Lucília N.C.V., Santin S.M.O., Ixorine, a new cyclopeptide alkaloid from the branches of *Ixora brevifolia*, *Journal of Brazilian Chemical Society* 27(4), 753-758, **2016**.

3. Les terpènes

3.1. Monoterpène

3.1.1. Composé CN-6



Le composé **CN-6** a été obtenu sous forme d'une poudre amorphe blanche, soluble dans le méthanol.

L'analyse du spectre de masse ESI de ce composé en mode positif (Figure III-95), montre deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 485,58 $[M+Na]^+$ et à m/z 947,77 $[2M+Na]^+$, soit une masse molaire de 462 correspondant à la formule brute $C_{21}O_{11}H_{34}$.



Figure III-95: Spectre de masse ESI⁺ du composé CN-6

Sur le spectre RMN 1H (Figure III-96), on note la présence de :

- Deux singulets attribuables aux trois méthyles dont un résonne à δ_H 1,75 intégrant pour 3H, et l'autre présente deux signaux superposés résonnants à δ_H 1,16, et intégrant pour 6H.
- Un ensemble des signaux résonnant à δ_H 1,49, δ_H 1,72 et à δ_H 2,05 sont attribuables aux protons aliphatiques.
- Un ensemble des signaux entre 3,10 à 4,20 ppm, caractéristiques des protons osidiques dont les deux doublets résonnants à δ_H 4,36 et δ_H 5,56 sont attribuables aux deux protons anomériques.

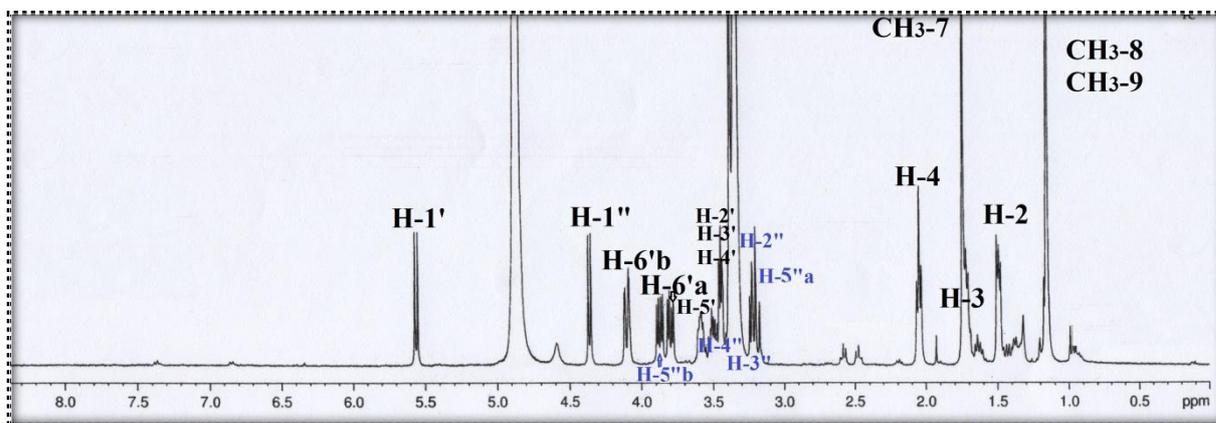


Figure III-96: Spectre RMN ^1H du composé CN-6

3.1.1.1. Identification de la génine

L'analyse des corrélations sur le spectre COSY H-H (Figures III-97 et III-97a) du composé CN-6 nous permet d'identifier un système de spin à six protons : à partir des protons à δ_{H} 2,05 (2H, *t*, $J = 6,3$ Hz), une tâche de corrélation est observée avec deux autres protons à δ_{H} 1,72 (2H, *m*) constituant une unité méthylène qui à son tour corrèle avec deux autres protons à δ_{H} 1,49 (2H, *m*) constituant une 2^{ème} paire d'unité méthylène. A partir de ce système de spin, la présence d'un fragment propyle ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) est suggérée.

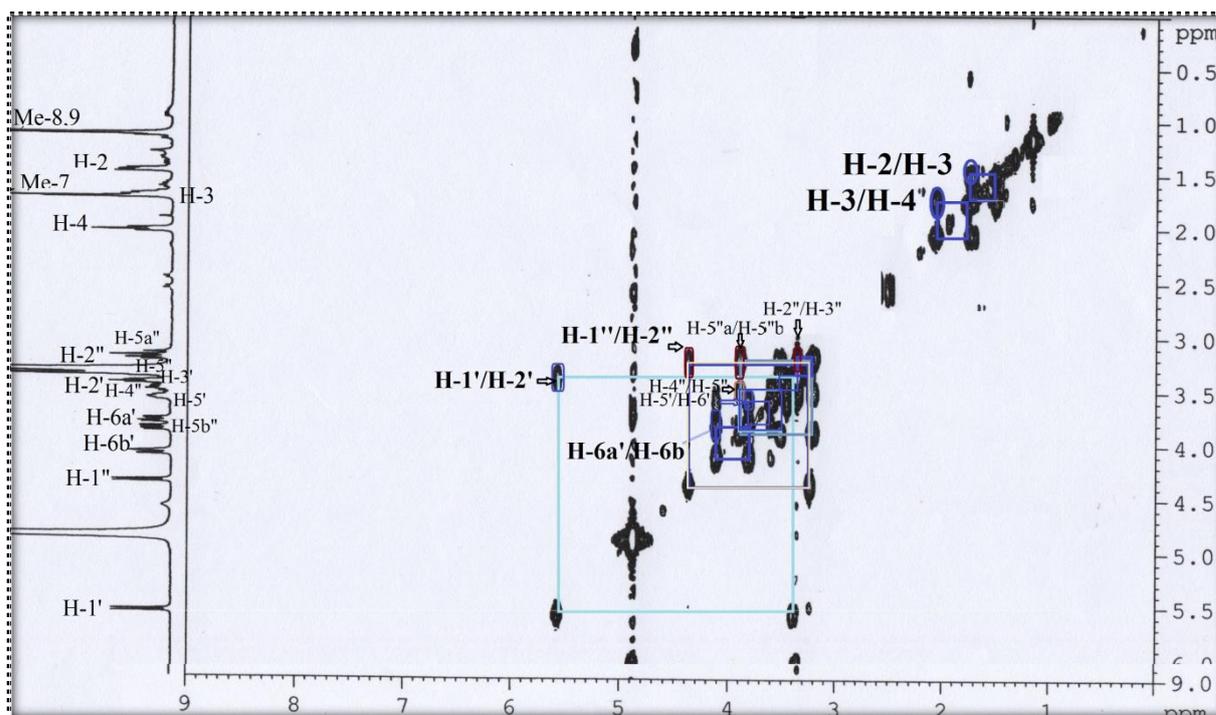


Figure III-97: Spectre COSY H-H du composé CN-6

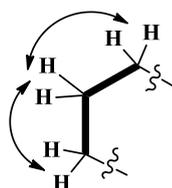


Figure III-97a: Corrélations COSY H-H de la partie génine du composé CN-6

Les données obtenues sur le spectre HSQC (Figure III-98), permettent d'attribuer les carbones de ces trois méthylènes à δ_C 39,5 (δ_H 1,49), δ_C 19,7 (δ_H 1,72) et δ_C 31,9 (δ_H 2,05) et les carbones correspondants aux groupements méthyles à δ_C 28,6 (δ_H 1,16) et δ_C 20,9 (δ_H 1,75). Les deux carbones anomériques à δ_C 95,6 (δ_H 5,56) et δ_C 105,3 (δ_H 4,36) sont aussi attribués au moyen du spectre HSQC.

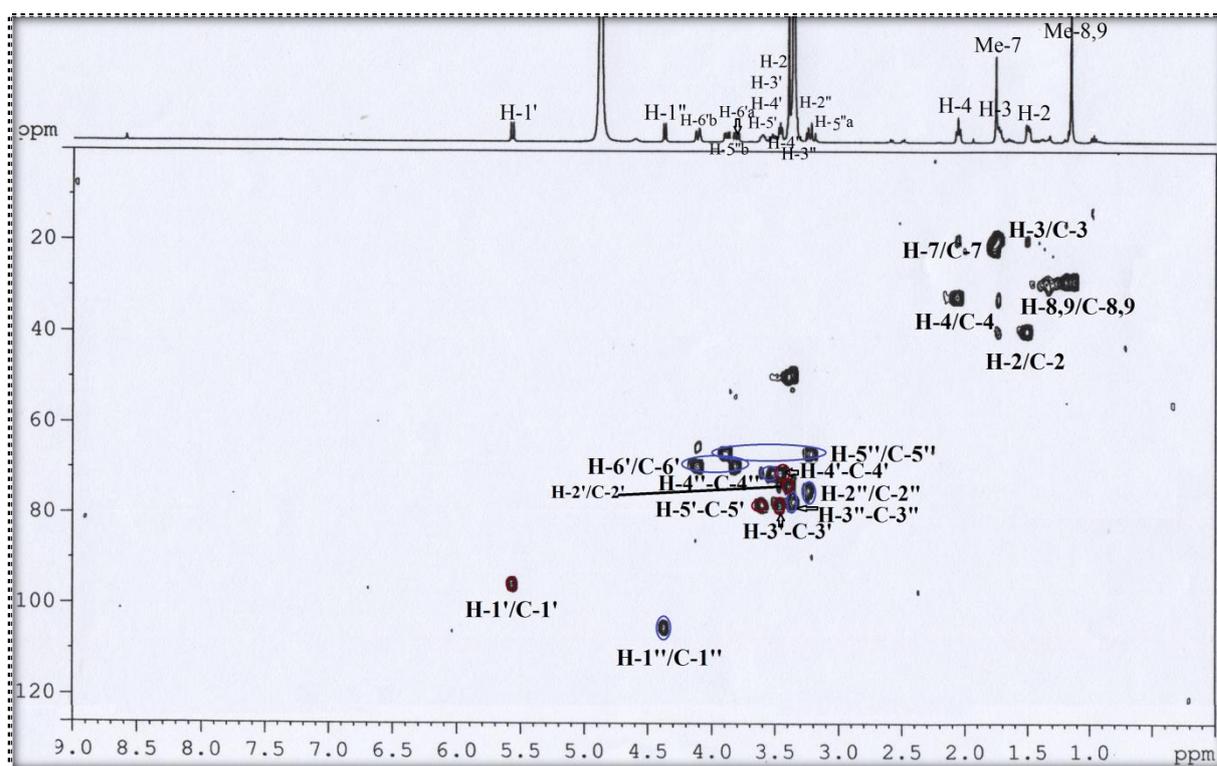


Figure III-98: Spectre HSQC du composé CN-6

L'expérience HMBC (Figures III-99 et III-99a) localise le méthyle à δ_H 1,75 sur une double liaison à partir d'une corrélation entre ses protons et les deux carbones quaternaires oléfiniques à δ_C 136,1 et δ_C 134,5. De même le carbone de ce méthyle à 20,9 ppm (δ_H 1,75) corréle avec les deux protons méthylènes à 2,05 ppm (δ_C 31,9), qui à leur tour corréle avec les deux carbones oléfiniques.

Toujours au moyen de l'expérience HMBC (Figures III-99 et III-99a), la corrélation entre les protons de deux méthyles superposés à δ_H 1,16 et un carbone quaternaire à δ_C 34,1,

indique bien leur emplacement à ce carbone. D'autres taches de corrélations sont aussi observées pour ces méthyles, d'un côté avec le carbone oléfinique à δ_C 134,3 et d'autre coté avec le carbone de méthylène à δ_C 39,5.

A l'issue de cette analyse, la double liaison est liée à la fois au fragment propyle et à la fois au carbone quaternaire porteur de deux groupements méthyles, ce qui nous permet de former un cycle à six chaînons, comme le montre la suite de corrélations observées entre les protons méthylènes (CH_2 -2) à δ_H 1,49 et les carbones à δ_C 34,1 (C-1) et à δ_C 19,7 (C-3), et entre les protons méthylènes à δ_H 2,05 (CH_2 -4) et le carbone à δ_C 39,5 (C-2).

Ce fragment formé par neuf carbones laisse suggérer un squelette monoterpénique avec deux unités isoprènes caractérisant d'un fragment géranyle dont le dixième carbone est oxydé. Effectivement, sur le spectre HMBC, on note la présence d'un carbonyle à 171,7 ppm.

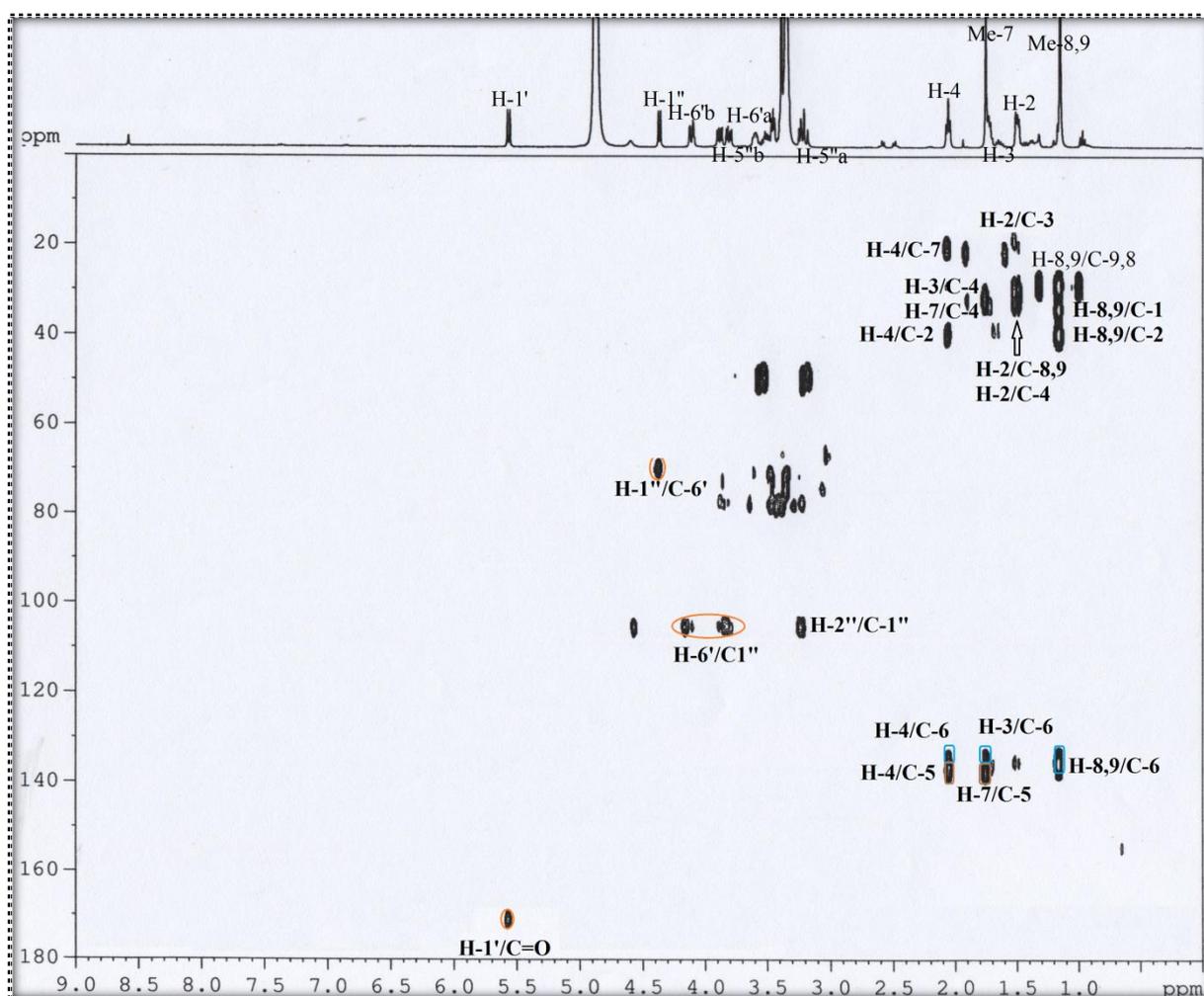


Figure III-99: Spectre HMBC du composé CN-6

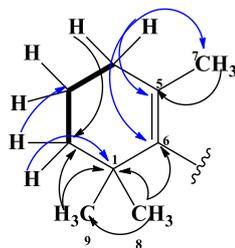


Figure III-99a: Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé **CN-6**

3.1.1.2. Identification de la partie osidique

A partir de proton anomérique du premier sucre dont le signal résonne à δ_H 5,56 (*d*, $J = 8,0$ Hz), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-97), permet d'attribuer les sept protons du premier hexose. Les valeurs des constantes de couplage obtenues sur le spectre de RMN 1H indiquent une position *trans* diaxiale de tous les protons H-1' à δ_H 5,56 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz), H-2' à δ_H 3,37 (1H, *m*), H-3' à δ_H 3,45 (1H, *t*, $J = 8,3$ Hz), H-4' à δ_H 3,44 (1H, *t*, $J = 8,3$ Hz), H-5' à δ_H 3,59 (1H, *t*, $J = 8,1$ Hz) et H₂-6' à δ_H 4,10 (1H, *dd*, $J = 12,1$ et 2,0 Hz)/ δ_H 3,80 (1H, *dd*, $J = 12,1$ et 5,3 Hz), suggérant ainsi la présence d'un β -D-glucopyranose. Le déblindage de deux signaux des protons H₂-6' (δ_H 4,10/3,80) ainsi que celui du carbone C-6' (δ_C 69,3) est significatif d'une substitution en cette position par le second sucre. Les corrélations observées sur le spectre COSY H-H entre les protons : H-1''/H-2'' à δ_H 3,22 (*t*, $J = 8,3$), H-2''/H-3'' à δ_H 3,35 (*m*), H-3''/H-4'' à δ_H 3,49 (*t*, $J = 8,1$ Hz) et H-4''/H₂-5'' à δ_H 3,20 (*d*, $J = 11,5$) et à δ_H 3,87 (*dd*, $J = 11,5$ et 5,4 Hz) permettent d'identifier ce sucre comme β -D-xylopyranose à travers les constantes de couplages élevées, indiquant que ces protons sont *trans*-diaxiale. Les déplacements chimiques des carbones, attribués par l'analyse du spectre HSQC, sont en accord avec un β -D-xylose terminal.

L'enchaînement de ces deux sucres ainsi que le point de fixation de cette unité osidique sur la génine sont élucidés grâce à l'analyse du spectre HMBC (Figures III-99 et III-99b). Ce dernier présente des corrélations entre H-1''/C-6' et H₂-6'/C-1'' confirmant que le β -D-xylose est attaché en C-6' du glucose. D'autre part, une tache de corrélation entre l'anomère H-1' du glucose et le carbonyle δ_C 171,7 est observée, ce qui confirme le branchement de la partie osidique à la génine. De ce qui précède, le composé **CN-6** est un dérivé monoterpénique substitué en position C-10 par une unité osidique.

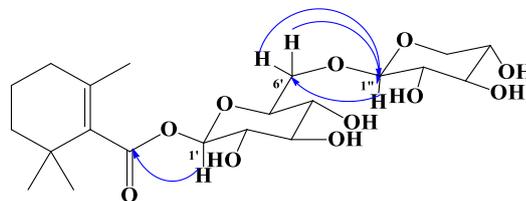


Figure III-99b: Corrélations HMBC entre la partie osidique et la génine du composé **CN-6**

L'ensemble de ces données nous permet d'identifier le composé **CN-6** au β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-èn-1-carboxylate, connu par le nom jasminoside M. Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Gardenia jasminoside*^{265,266,267}, il est isolé ici pour la première fois dans la flore marine.

Le tableau III-13 rassemble les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **CN-6**:

Tableau III-13: Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **CN-6** dans MeOH-*d*₄

Position	$\delta_{\text{H}} m J$ (Hz)	δ_{C}
1	-	34,1
2	1,49 <i>m</i>	39,5
3	1,72 <i>m</i>	19,7
4	2,05 <i>t</i> (6,3)	31,9
5	-	136,4
6	-	134,3
7	1,75 <i>s</i>	20,9
8	1,16 <i>s</i>	28,6
9	1,16 <i>s</i>	28,6
10	-	171,7
Glucose		
1'	5,56 <i>d</i> (8,0)	95,6
2'	3,37 <i>m</i>	73,6
3'	3,45 <i>t</i> (8,3)	77,9
4'	3,44 <i>t</i> (8,3)	70,8
5'	3,59 <i>t</i> (8,1)	77,8
6'	4,10 <i>dd</i> (12,1; 2,0)	69,3
	3,80 <i>dd</i> (12,1; 5,3)	
Xylose		
1''	4,36 <i>d</i> (7,4)	105,3
2''	3,22 <i>t</i> (8,3)	74,6
3''	3,35 <i>m</i>	77,1
4''	3,49 <i>t</i> (8,1)	70,8
5''	3,87 <i>dd</i> (11,5; 5,4)	66,5
	3,20 <i>d</i> (11,5)	

²⁶⁵ Yu Y., Gao H., Dai Y., Wang Y., Chen H-R., Yao X-S., Monoterpenoids from the Fruit of *Gardenia jasminoides*, *Helvetica Chimica Acta* 93, 763-771, **2010**.

²⁶⁶ Peng K., Yang L., Zhao S., Chen L., Zhao F., Qiu F., Chemical constituents from the fruit of *Gardenia jasminoides* and their inhibitory effects on nitric oxide production, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 1127-1131, **2013**.

²⁶⁷ Yu S-F., Huang X-J., Fu S-N., Wu C., Ye W-C., Zhou G-X., New Monoterpenoids from Fruits of *Gardenia jasminoides* var. *radicans*, *Helvetica Chimica Acta* 98, 1267-1272, **2015**.

3.2. Les iridoïdes

Les composés **GB-11**, **GB-12**, **GB-13**, **GB-14**, **GB-15** et **GB-16** présentent sur la plaque CCM un comportement chromatographique similaire. Ils sont à la fois invisibles ou peu absorbants sous la lumière UV à 254 nm. Ils présentent les mêmes aspects visuels après pulvérisation au sulfate de cérium, et donnent en fin une couleur bleu après chauffage. Ces composés ont été obtenus soit sous forme d'une poudre blanche amorphe ou de cristaux blancs (aiguilles), et ils sont solubles dans le méthanol.

L'analyse structurale de ces composés a été réalisée en utilisant la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire RMN (1D et 2D). Cette analyse permet de déterminer la nature de l'aglycone et le sucre.

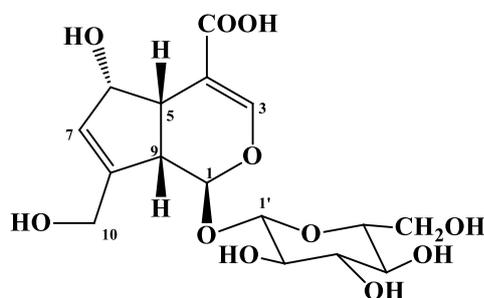
En effet, On observe sur la plupart des spectres RMN ^1H de ces composés la présence de:

- Deux protons oléfiniques dont l'un est plus déblindé.
- Un ensemble des signaux entre 3,20 et 6,00 ppm attribués aux protons oxyméthines et aux protons osidiques. L'élucidation structurale de ces composés est initiée à partir du signal le plus blindé, typique d'un proton du groupement acétal.

Ces observations combinées avec une recherche extensive, effectuée sur le genre *Galium*, orientent vers une structure terpénique et spécifiquement un squelette iridoïdique. Ces derniers se présentent dans le genre *Galium* comme des marqueurs chimio-taxonomiques très répandus.

L'iridoïde constituant le groupe majeur des terpènes dans le genre *Galium*, est constitué d'un squelette représenté par un noyau cyclopentane accolé à un noyau α -pyrone par une jonction *cis*.

3.2.1. Composé GB-11



Sur son spectre de masse en source ESI, enregistré en mode positif (Figure III-100), nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 413,792 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 390 uma, suggérant une formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.

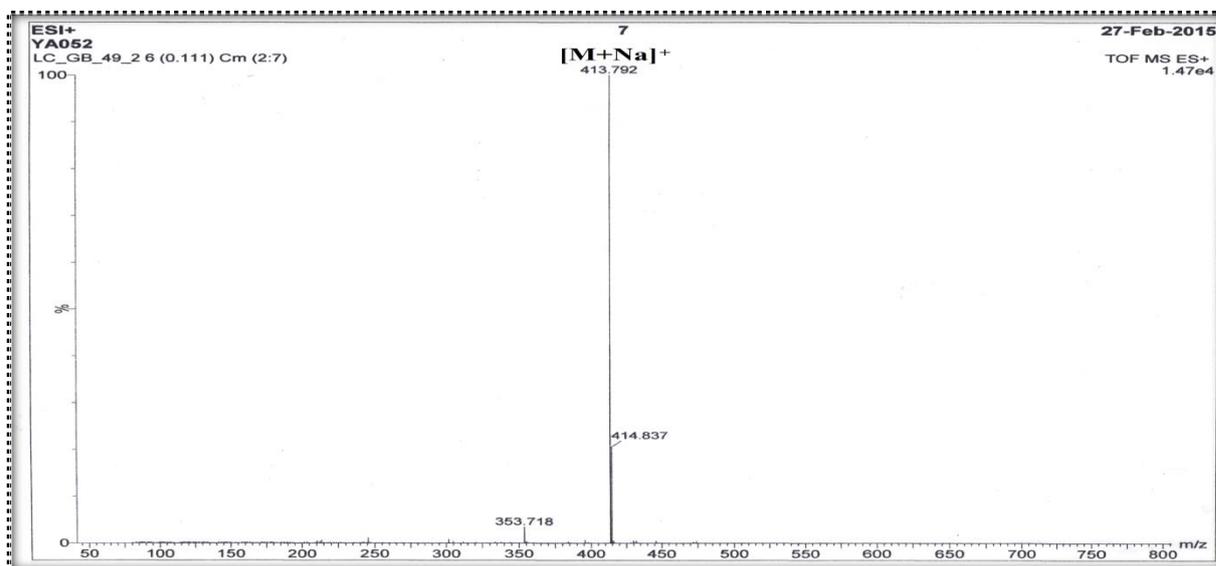


Figure III-100: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-11**

Sur le spectre RMN ¹H, enregistré dans le MeOH-*d*₄ (Figure III-101), on observe la présence de :

- Deux signaux des protons oléfiniques, l'un sous forme de singulet à δ_H 7,58 (1H, s) et l'autre sous forme de doublet à δ_H 6,08 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz).
- Trois signaux, s'intégrant pour 1H chacun, l'un sous forme de doublet à δ_H 5,08 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz), l'autre sous forme de doublet de doublet à δ_H 4,45 (1H, $J = 15,2$ et $1,2$ Hz), et le dernier sous forme de doublet à δ_H 4,21 (1H, $J = 15,2$ Hz) caractéristiques des protons oxygénés.
- Deux triplets à δ_H 2,54 (1H, *t*, $J = 7,3$ Hz) et à δ_H 3,01 (1H, *t*, $J = 7,3$ Hz) intégrant chacun pour 1H, assignés à deux protons aliphatiques.
- Un massif de protons osidiques entre 3,20 et 4,80 ppm avec un doublet à δ_H 4,75 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz), caractéristique du proton anomère H-1' d'une configuration β .

On note le déblindage important du proton oxygéné à δ_H 5,08 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz), son carbone apparait à δ_C 101,3 d'après le spectre HSQC, ces valeurs sont typiques d'un proton hémiacétal d'un squelette iridoïdique.

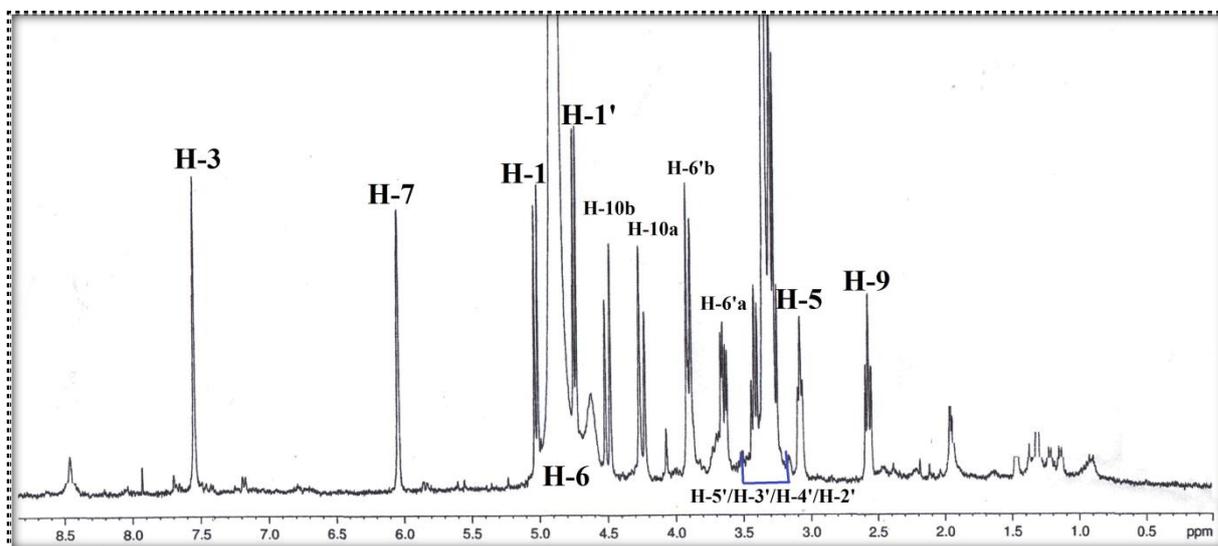


Figure III-101: Spectre RMN ^1H du composé **GB-11**

Sur le spectre de COSY H-H (Figures III-102 III-102a), on repère les systèmes de spins suivants :

- A partir du proton hémiacétalique (H-1) à δ_{H} 5,08 (*d*, $J = 9,0$ Hz), on compte un système de spins à cinq protons : avec le proton méthine à δ_{H} 2,54 (*t*, $J = 8,4$ Hz), qui couple à son tour avec un autre proton méthine repéré à δ_{H} 3,01 (*t*, $J = 6,3$ Hz). De même, ce dernier présente un couplage avec un proton dont le signal est masqué par celui du solvant à δ_{H} 4,82 (*m*), celui-ci est assigné à un proton oxyméthine, lui aussi couple avec un proton oléfinique à δ_{H} 6,08 ($J = 1,6$ Hz).
- A partir du proton oléfinique cité précédemment à δ_{H} 6,08, on observe un couplage allylique avec deux protons non équivalents d'un groupement oxyméthylène à δ_{H} 4,21 (1H, *d*, $J = 15,2$ Hz) et à δ_{H} 4,45 (1H, *dd*, $J = 15,2$ et $1,2$ Hz), le spectre HSQC (Figure III-103) permet d'attribuer leur carbone à δ_{C} 61,8 par une corrélation directe.
- Le 2^{ème} proton oléfinique à δ_{H} 7,58 présente aussi un couplage allylique avec le proton à δ_{H} 3,01 déjà identifié.

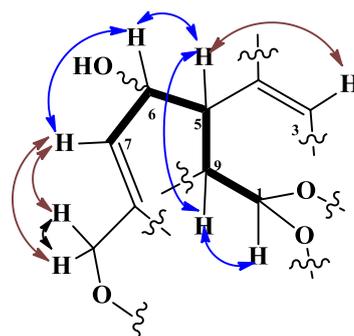


Figure III-102a: Corrélations COSY H-H de la partie génine du composé **GB-11**

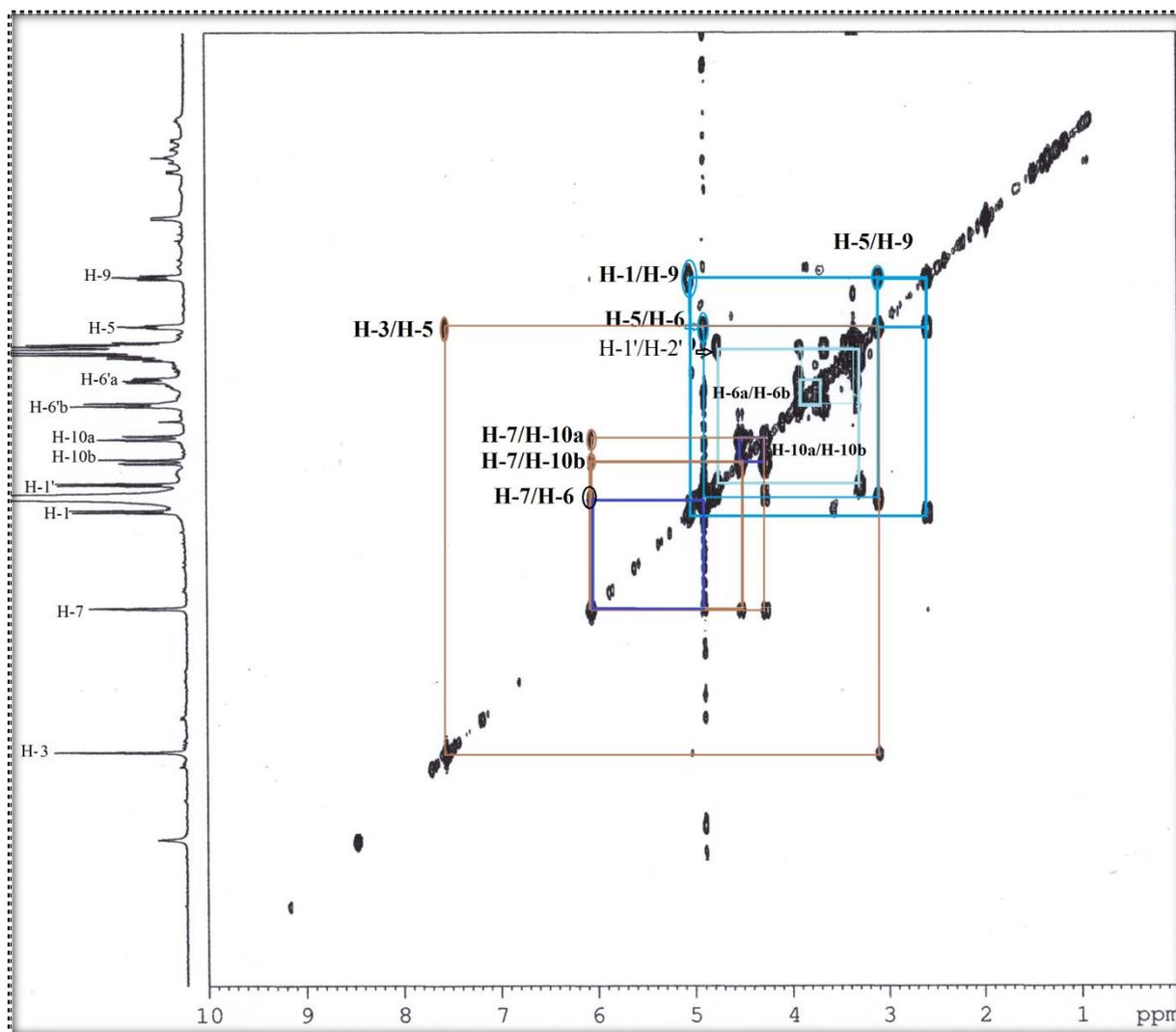


Figure III-102: Spectre COSY H-H du composé **GB-11**

Les carbones méthines sont localisés par l'expérience HSQC (Figure III-103) à δ_C 101,3 (δ_H 5,08), δ_C 46,1 (δ_H 2,54), δ_C 43,2 (δ_H 3,01) et à δ_C 75,6 (δ_H 4,82), et les carbones à δ_C 154,2 et δ_C 129,8 sont assignés aux carbones oléfiniques, suite à leurs taches repérées avec les protons à δ_H 7,58 et à δ_H 6,08, respectivement.

L'expérience HMBC (Figure III-104) permet de relier tous les fragments cités précédemment, et d'identifier le squelette iridoïdique du composé **GB-11**. Les corrélations observées sur ce spectre montrent que le carbone acétal à δ_C 101,3 présente des taches de corrélations avec le proton oléfinique à δ_H 7,58, et avec les deux protons méthines à δ_H 2,54 et à δ_H 3,01. Un cycle à six chaînons est alors formé entre le carbone du groupement acétal (-O-CH-O-), les carbones de la première double liaison (-CH=CH-), et les deux carbones méthines.

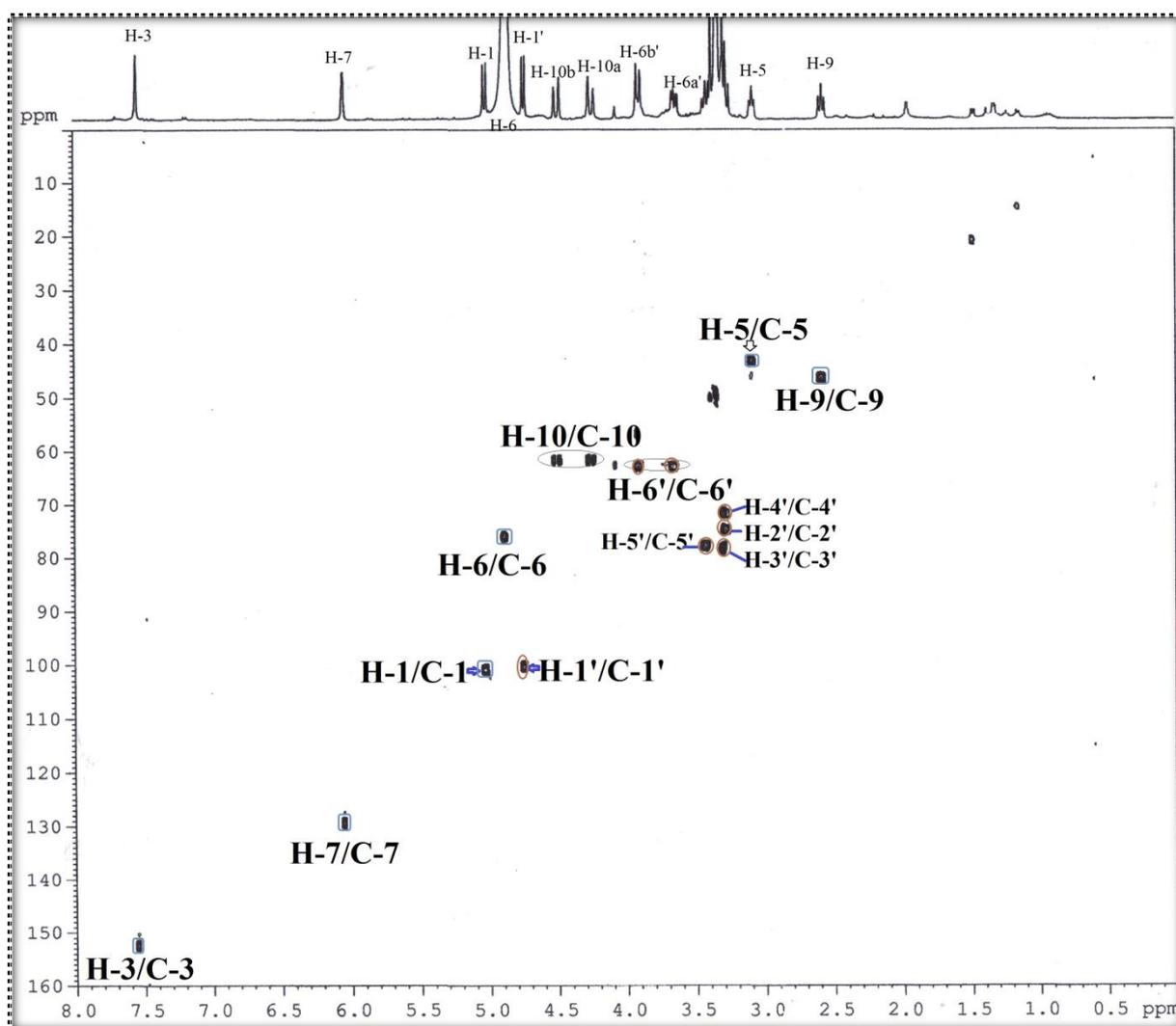


Figure III-103: Spectre HSQC du composé GB-11

De la même façon, et sur le spectre HMBC (Figure III-104), le proton méthine à δ_H 2,54, présente des taches de corrélations avec le carbone acétal C-1 à δ_C 101,3, le carbone oxyméthine à δ_C 75,6, et les deux carbones éthyléniques à δ_C 129,8 et à δ_C 151,5. De cette étude, un cycle à cinq chaînons est formé entre les deux carbones méthines, cités précédemment, le carbone oxyméthine à δ_C 75,6 et les carbones de la deuxième double liaison, et par suite, les protons oléfiniques à δ_H 7,58 (δ_C 154,2) et à δ_H 6,08 (δ_C 129,8), sont attribués aux protons H-3 et H-7, respectivement. Les méthines à δ_H 2,54 (δ_C 46,1) et δ_H 2,54 (δ_C 46,1), sont les CH-9 et CH-5, respectivement, et l'oxyméthine à δ_H 4,82 (δ_C 75,6) est attribué au CH-6.

Toujours au moyen de l'expérience HMBC (Figures III-104 et III-104a), deux corrélations sont observées entre les carbones oléfiniques C-7 et C-8, et les deux protons de groupement oxyméthylène CH₂OH, suggérant que l'hydroxyle est en position C-10.

Une autre corrélation est observée dans ce spectre, entre le proton oléfinique à δ_H 7,58 et un carbonyle à δ_C 174,1 qui correspond au groupement acide C-11.

Ces corrélations confirment les attributions déjà établies par l'analyse du spectre COSY H-H et permettent de connecter tous les fragments de l'aglycone à travers le pont oxygéné résultant (H-3/C-1), pour former un cycle dihydropyrane accolé au cyclopentène.

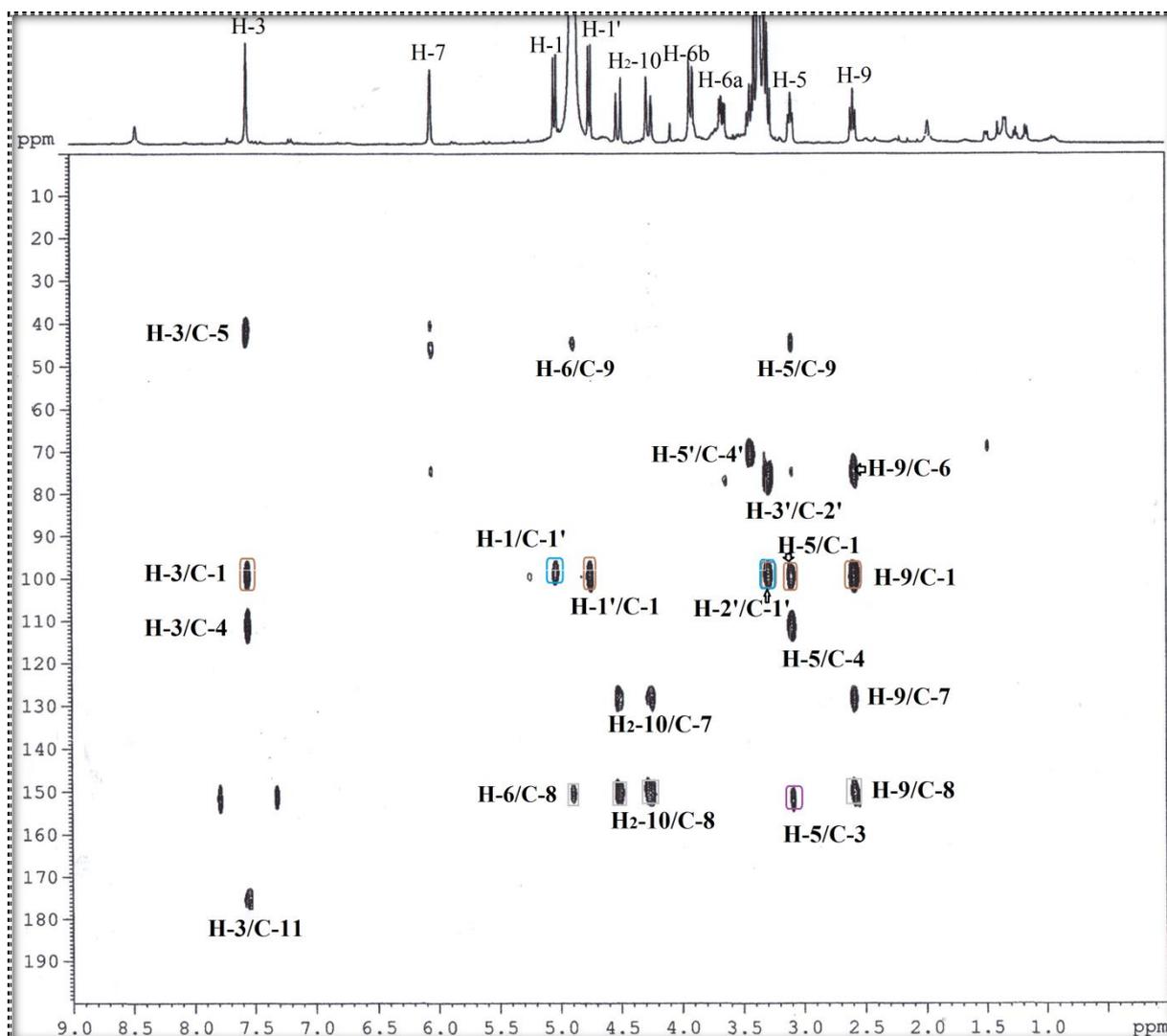


Figure III-104: Spectre HMBC du composé GB-11

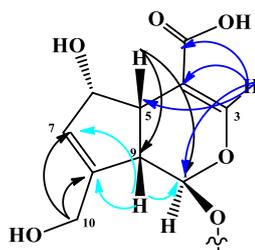


Figure III-104a: Corrélations HMBC de la partie aglycone du composé GB-11

La stéréochimie relative de carbones C-5 et C-9, est établie par le calcul des valeurs de constantes de couplage de leurs protons. La grande valeur ($J_{H-5/H-9} \geq 7$ Hz), indique une orientation β et une jonction cis entre les deux cycles. La stéréochimie de l'hydroxyle en position C-6, est déterminée d'être α , par comparaison des déplacements chimiques du carbone C-6 avec ceux de la littérature, elle est de valeur 75,3 (δ_H 4,84), dans le stéréoisomère α , une valeur compatible avec celle du composé **GB-11**, et elle est de valeur 82,4 (δ_H 4,53) dans le cas de stéréoisomère β ^{95,96,268,269}.

L'unité osidique est identifiée à partir de son proton anomérique à δ_H 4,75. La valeur de la constante de couplage d'ordre de 7,9 Hz montre qu'il s'agit d'un β -glycose, où les sept protons de cet hexose sont attribués à l'aide des spectres COSY H-H (Figure III-102) [(H-1'/H-2' à 3,33(*m*)) et H₂-6'a à 3,71 (*dd*, $J = 11,9; 5,3$ Hz)/H₂-6'b à 3,92 (*dd*, $J = 11,9; 1,9$ Hz)], et HMBC (Figure III-104) [H-2'/C-1', H-3'/C-4' et H-5'/C-4']. Les déplacements chimiques des carbones correspondants sont attribués par analyse du spectre HSQC (Figure III-103) [(3,33/74,8, C-2'), (3,35/78,0, C-3'), (3,34/71,2, C-4'), (3,45/77,8, C-5') et (3,71, 3,92/62,2, C-6)]. Ces valeurs attestent de la présence d'un β -D-glucopyranose.

La position de sucre est déduite en C-1 par les corrélations observées, sur le spectre HMBC (Figures III-104 et III-104b) entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-1 (101,3 ppm), le proton de ce dernier H-1 et le carbone anomérique C-1'.

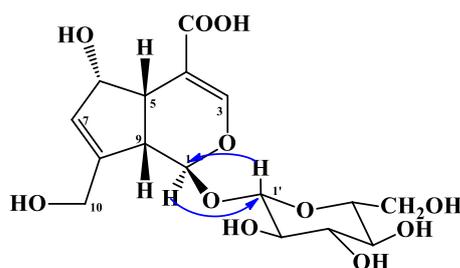


Figure III-104b: Corrélations HMBC du composé **GB-11**

L'ensemble des données spectrales précédentes, comparées avec celle de la littérature^{62,91,92,95,96,267-270}, permet d'établir la structure du composé **GB-11** comme étant l'acide deacétylaspérulosidique, connu sous le nom de galium glucoside. Ce composé a été isolé de diverses espèces de la famille Rubiaceae, et du genre *Galium*, en particulier. Les espèces *G.*

²⁶⁸ Otsuka H., Yoshimura K., Yamasaki K., Cantoria M.C., Isolation of 10-*O*-acetyl iridoid glucosides from a Philippine medicinal plant, *Oldenlandia corymbosa* L. (Rubiaceae), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39 (8), 2049-2052, **1991**.

²⁶⁹ Leticia J. El-Naggar, Jack L. Beal, Iridoids, A review, *Journal of Natural Products* 43 (6), 649-707, **1980**.

²⁷⁰ Sainty D., Bailleul F., Delaveau P., Jacquemin H., Iridoids of *Borreria verticillata*, *Planta Medica* 42, 260-264, **1981**.

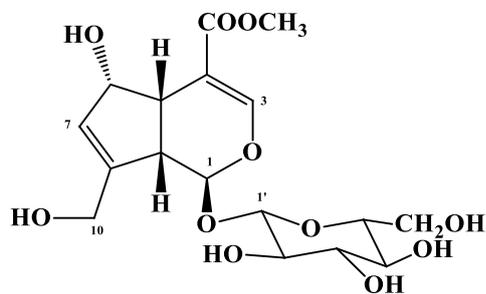
tortumense, *G. album* Mill, *G. album* ssp *album*, *G. album* ssp *pychnotrichum*, *G. lovcense*, *G. humifusum* Bieb, *G. rivale* et *G. spurium* L. ^{62,72,91,92,94-96}.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **GB-11** sont rassemblés dans le tableau suivant:

Tableau III-14: Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **GB-11** dans MeOH-*d*₄

Position	δ_H <i>m J</i> (Hz)	δ_C
1	5,08 <i>d</i> (9,0)	101,3
2	-	-
3	7,58 <i>s</i>	154,2
4	-	110,3
5	3,01 <i>t</i> (7,3)	43,2
6	4,82 <i>m</i>	75,6
7	6,08 <i>d</i> (1,6)	129,8
8	-	151,5
9	2,54 <i>t</i> (8,4)	46,1
10	4,21 <i>d</i> (15,2)	61,8
	4,45 <i>dd</i> (15,2; 1,2)	
11	-	174,1
Glucose		
1'	4,75 <i>d</i> (7,9)	100,4
2'	3,33 <i>m</i>	74,8
3'	3,35 <i>m</i>	78,0
4'	3,34 <i>m</i>	71,2
5'	3,45 <i>m</i>	77,8
6'	3,71 <i>dd</i> (11,9, 5,3)	62,2
	3,92 <i>dd</i> (11,9, 1,9)	

3.2.2. Composé GB-12



Le spectre de masse enregistré en ESI (Figure III-105) indique un pic d'ion pseudomoléculaire en mode positif à m/z 427,1593, soit une masse de 404 uma, en accord avec la formule brute C₁₇H₂₄O₁₁.

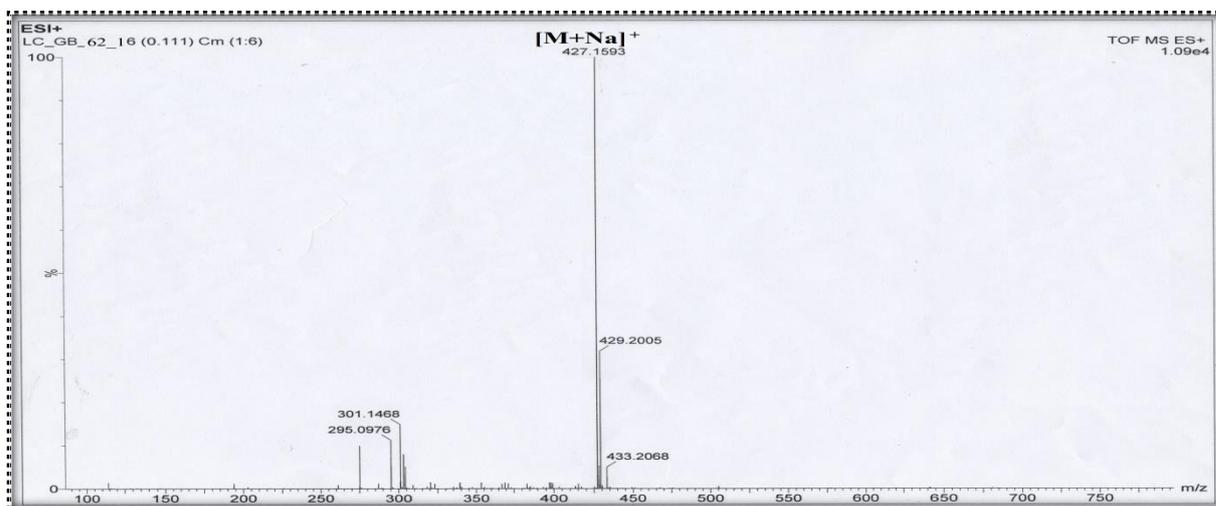


Figure III-105: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-12**

Les données de spectre RMN ¹H du composé **GB-12** (Figure III-106), sont très proches de celles du composé **GB-11** (Figures III-101), à l'exception d'un signal supplémentaire intense à δ_H 3,74, intégrant pour trois protons, attribuable au groupement méthoxyle. La différence de masse calculée entre les deux composés **GB-11** et **GB-12** est de 14 uma, confirmant ainsi l'existence d'un groupement méthyle supplémentaire.

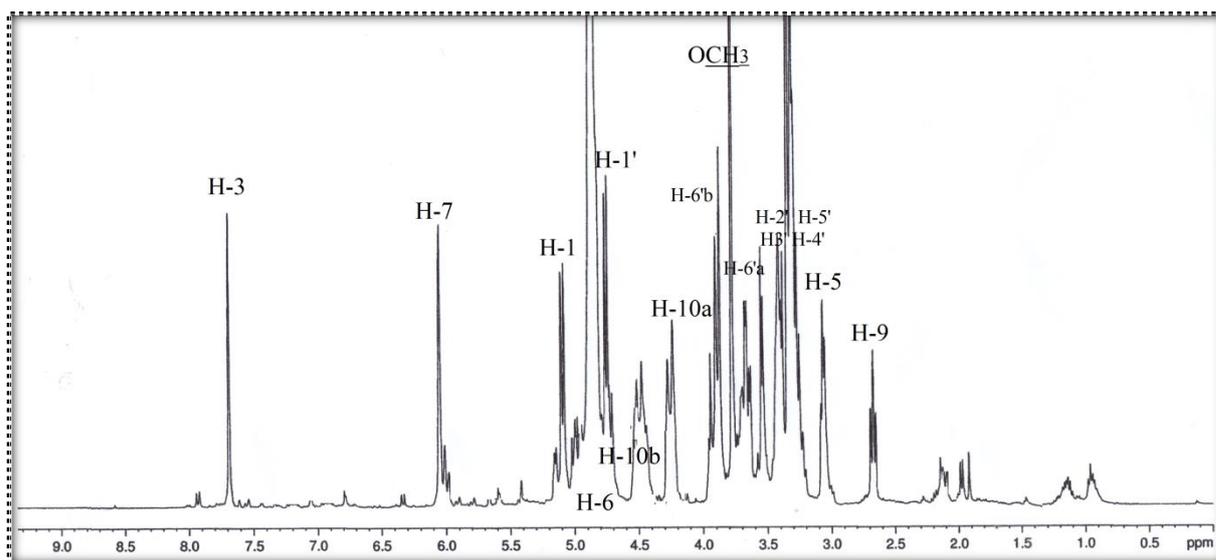


Figure III-106: Spectre RMN ¹H du composé **GB-12**

Son spectre RMN ¹H, réalisé dans le MeOH-*d*₄ (Figure III-106), présente pratiquement les mêmes déplacements chimiques en comparaison avec le composé **GB-11**:

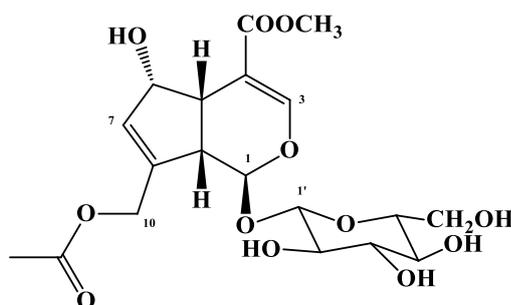
- Les protons oléfiniques à δ_H 7,68 (*d*, *J* = Hz, H-3) et à δ_H 6,07 (*d*, *J* = Hz, H-7).

- Les protons apparaissant sous forme d'un triplet à δ_H 2,64 et à δ_H 3,05 sont caractéristiques de deux groupes méthines CH-9 et CH-5, respectivement, et ceux sous forme d'un doublet à δ_H 4,21 (1H, *d*, $J = 15,4$ Hz) et δ_H 4,47 (1H, *d*, $J = 15,4$ Hz), sont attribués au groupement oxyméthylène CH₂-10.
- Le signal sous forme d'un doublet à δ_H 5,10 est attribué au proton hémiacétale CH-1.
- Les autres signaux entre 3,40 et 4,00 ppm, sont ceux d'un glucose dont le proton anomérique apparaît à δ_H 4,72 (*d*, $J = 7,8$ Hz).

L'étude de spectre RMN ¹H, et ainsi que la comparaison avec les données de la littérature^{95,268-270} confirmant qu'il s'agit d'un dérivé d'acide deacétylaspérulosidique, substitué au niveau du C-11 par un méthoxyle.

De ce qui précède, le composé **GB-12**, est identifié comme étant la deacétyldaphylloside, isolé antérieurement à partir de l'espèce *G. melanatherum*⁹⁵.

3.2.3. Composé GB-13



Le spectre de masse ESI, obtenu en mode positif (Figure III-107), donne deux ions à m/z 469,904 [M+Na]⁺ et m/z 916,741[2M+Na]⁺, qui correspondent à une masse de 446 uma et une formule brute C₁₉H₂₆O₁₂, soit une différence de 42 uma, par rapport au composé **GB-12**.



Figure III-107: Spectre de masse ESI⁺ du composé GB-13

Le spectre RMN ¹H (Figure III-108), montre des signaux très similaires à ceux des composés précédents (GB-11 et GB-12), à l'exception de la présence d'un groupement acétyle, suggéré par le signal supplémentaire à δ_H 2,08 (3H, s). On observe également les signaux suivants:

- Deux singulets: un à δ_H 7,68 (s) attribué au proton H-3, et l'autre à δ_H 6,05 (s) attribué au proton H-7.
- Un signal sous forme de doublet à δ_H 5,09 ($J = 8,3$ Hz), caractéristique du proton acétal H-1.
- Deux signaux, sous forme de triplet, le premier à δ_H 2,67 (1H, t , $J = 8,1$ Hz) et le second à δ_H 3,03 (1H, t , $J = 6,7$ Hz), attribués aux groupements méthines CH-9 et CH-5, respectivement.
- Un singulet intégrant pour 3H à δ_H 3,78, attribué à un groupement méthoxyle.
- Les signaux entre 3,20 et 4,80 ppm, correspondent aux protons de l'unité glucose avec le proton β -anomérique H-1' qui apparait à δ_H 4,75 (d , $J = 7,9$ Hz).
- Les deux protons du groupement oxyméthylène CH₂-10, se trouvent déblindés à δ_H 4,95 ($J = 14,9$ Hz) et à δ_H 4,82 (m), en comparaison avec ceux du composé GB-12 à δ_H 4,21 et à δ_H 4,47, ce qui indique une estérification en C-10.

La différence de 42 uma, calculée entre les masses des composés GB-12 et GB-13, justifie cette estérification par le fragment acétyle CH₃C=O.

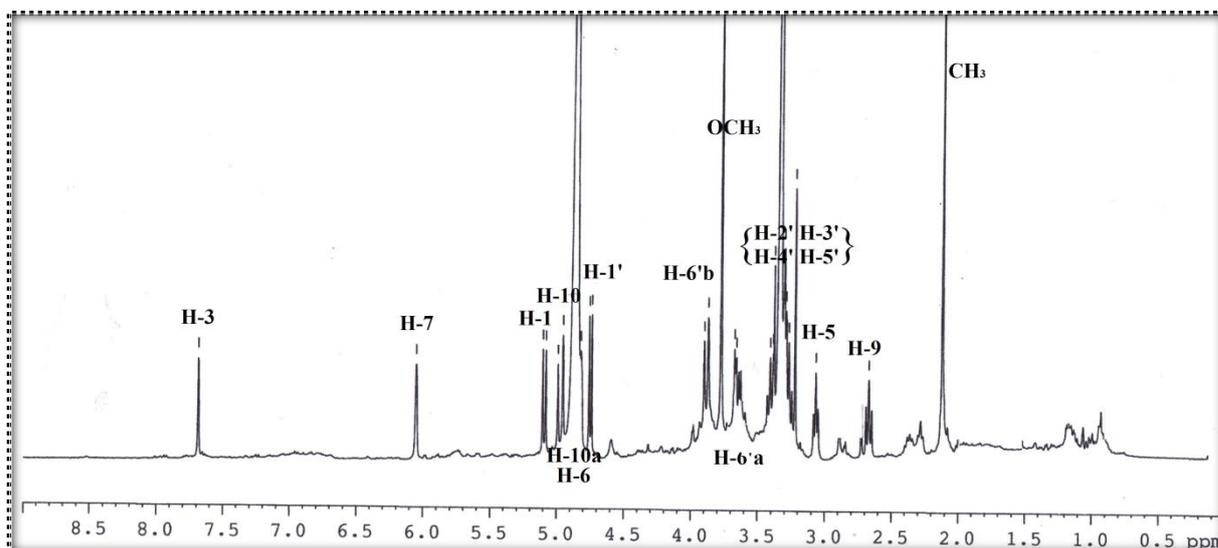
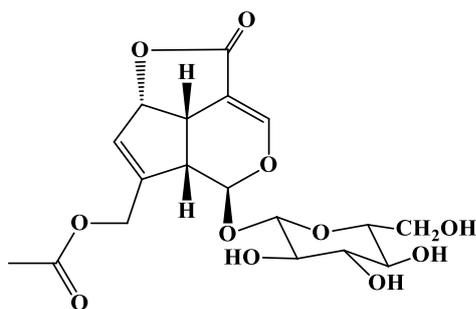


Figure III-108: Spectre RMN ^1H du composé **GB-13**

De ce fait, ce composé est un iridoïde nommé daphylloside, c'est l'ester méthylique de l'acide aspérulosidique²⁷⁰. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans l'espèce *Daphniphyllum macropodium*¹⁶⁸, sa présence a été relevée dans un certain nombre d'espèces du genre *Galium* telles que : *G. verum* sp. *verum*, *G. tortumense*, *G. verum* var *asiaticum*, *G. humifusum* et *G. spurium* L.^{59,62,88,92,96}.

3.2.4. Composé GB-14



Sur le spectre de masse en source ESI (Figure III-109), enregistré en mode positif, deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 437,55 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et à m/z 851,64 sont observés, correspondant à une masse moléculaire de 414 uma, suggérant une formule brute de $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.

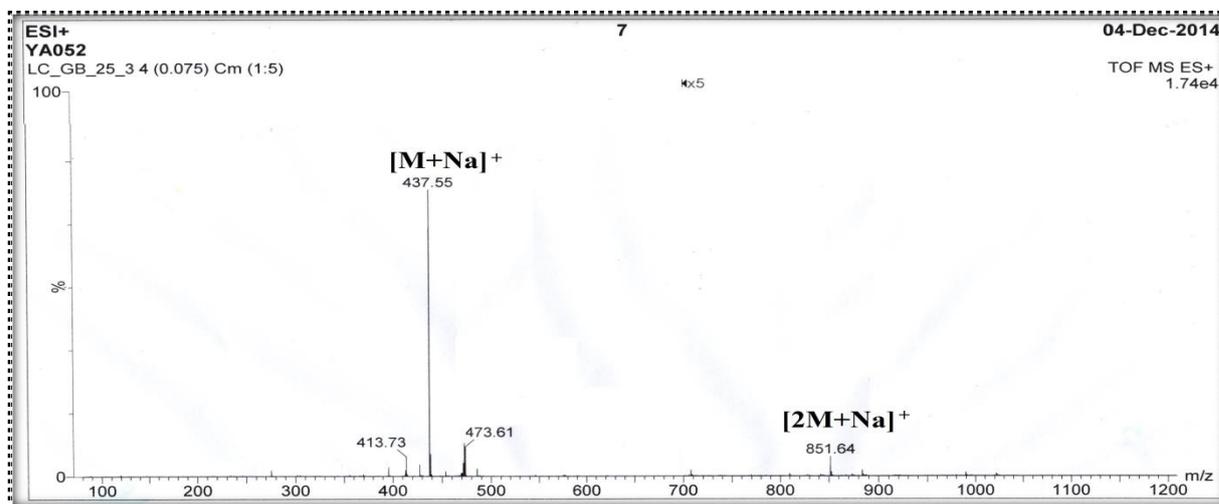


Figure III-109: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-14**

Le spectre RMN ¹H (Figure III-110) montre des signaux comparables à ceux des composés **GB-12** et **GB-13**, (Figures III-106 et III-108), à l'exception de l'absence d'un groupe méthyl-ester, traduit par la disparition du signal du au groupement méthoxyle, et des modifications sur les déplacements chimiques des protons H-6, H-5, H-9 et H-1. Cette différence suggère un environnement électronique différent pour le composé **GB-14**.

Dans le spectre RMN ¹H (Figure III-110), on observe:

- Les deux protons oléfiniques H-3 et H-7 à δ_H 7,30 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz) et à δ_H 5,72 (1H, *s*), respectivement.
- Les trois protons à δ 2,07 (*s*) d'un groupement acétyle.
- Le massif entre 3,10 et 4,70 ppm, de l'unité osidique, avec le proton anomérique H-1' à δ 4,67 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz)

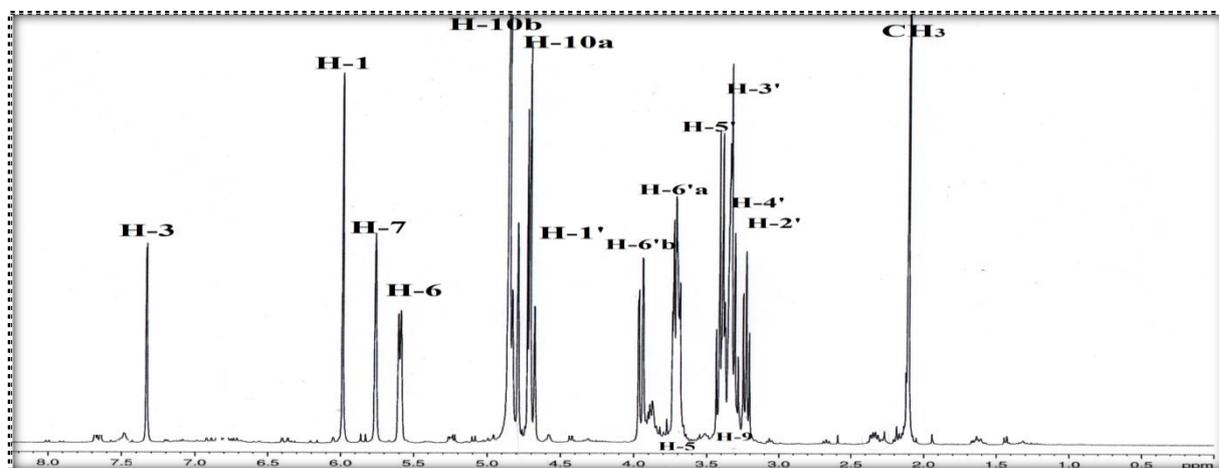


Figure III-110: Spectre RMN ¹H du composé **GB-14**

Le spectre COSY H-H (Figure III-111 et III-111a), montre les corrélations identiques à celles observées dans le composé **GB-11**. À partir du proton acétal H-1, on repère un système de spins à quatre protons : H-1 à δ_H 5,95 (*d*, $J = 1,5$ Hz) / H-9 à δ_H 3,29 (*m*) / H-5 à δ_H 3,71 (*m*) et H-6 à δ_H 5,56 (*d*, $J = 6,4$ Hz), constituant l'enchaînement carboné $-C_6H-C_5H-C_9H-C_1H-$.

Les deux protons oléfiniques H-3 et H-7 permettent d'identifier le reste du squelette iridane par les deux systèmes de spins allyliques suivants:

- Le proton H-3 qui couple avec le proton H-5 déjà identifié.
- Le proton H-7 qui couple avec les protons du groupement oxyméthylène H₂-10 à δ_H 4,66 (*dd*, $J = 14,2; 1,0$ Hz) et à δ_H 4,77 (*dd*, $J = 14,2; 1,0$ Hz).
- De même, le H-7 couple avec le proton H-9.

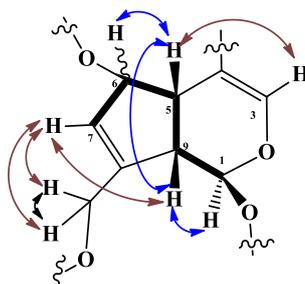


Figure III-111a: Corrélations COSY H-H de la partie aglycone du composé **GB-14**

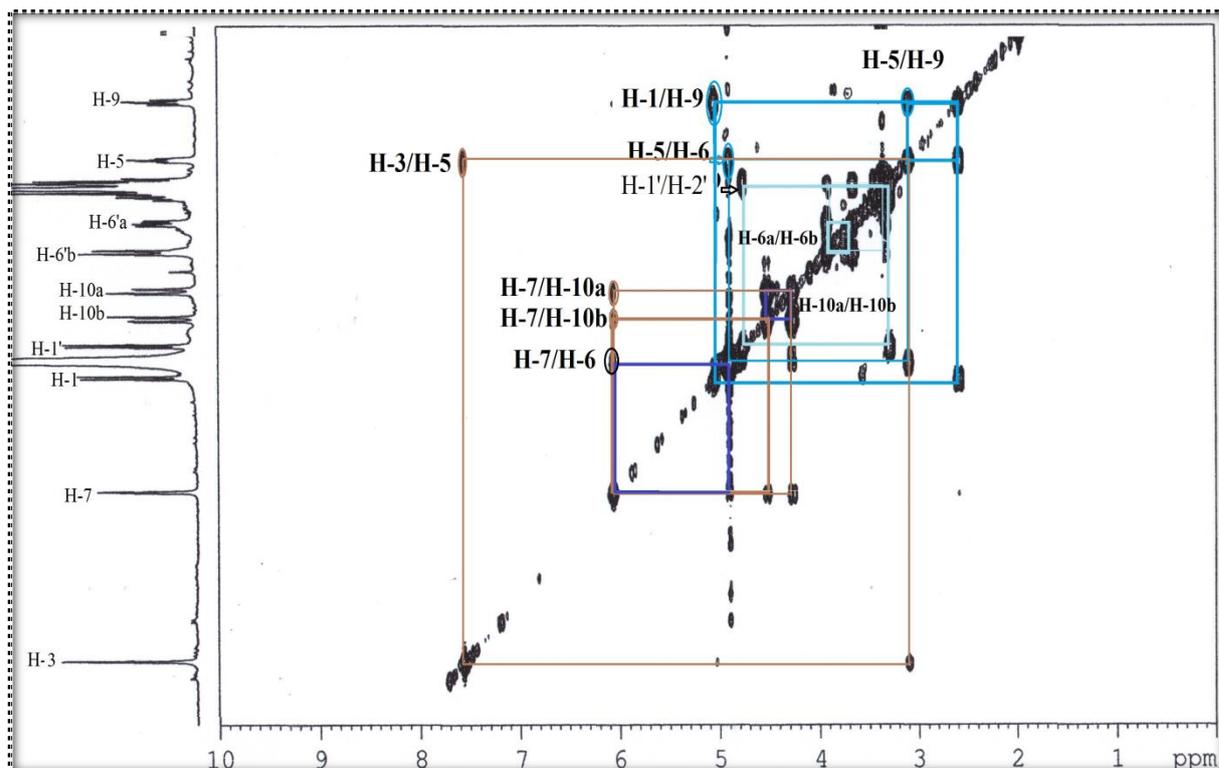


Figure III-111: Spectre COSY H-H du composé **GB-14**

L'étude de spectre HSQC (Figure III-112), permet d'observer les corrélations directes suivantes:

- Les deux protons méthines à δ_H 3,71 (*m*) et à δ_H 3,29 (*m*) avec leurs carbones à 37,5 (C-5) et 45,3 (C-9) ppm, respectivement.
- Les protons oxyméthines à δ_H 5,95 et 5,56, et l'oxyméthylène à δ_H 4,77/4,66 avec leurs carbones situés à δ_C 93,3, 86,3 et 61,6, respectivement. Ces carbones sont assignés aux carbones C-1, C-6 et C-10.
- Les protons oléfiniques à δ_H 5,75 (H-7) et δ_H 7,30 (H-3) avec leurs carbones à δ_C 128,9 et δ_C 150,3, respectivement.

La différence du déplacement chimique observée pour le carbone C-6 (δ_C 86,3), en comparaison avec celui du composé **GB-11** (δ_C 75,6), laisse supposer que la fonction OH est estérifiée. Comme le composé **GB-14** est un dérivé ester de l'acide **GB-11**, et en se basant sur la masse de ce composé, on déduit aisément que l'estérification est faite ainsi au niveau du carbone C-6 et C-11 via un cycle lactone.

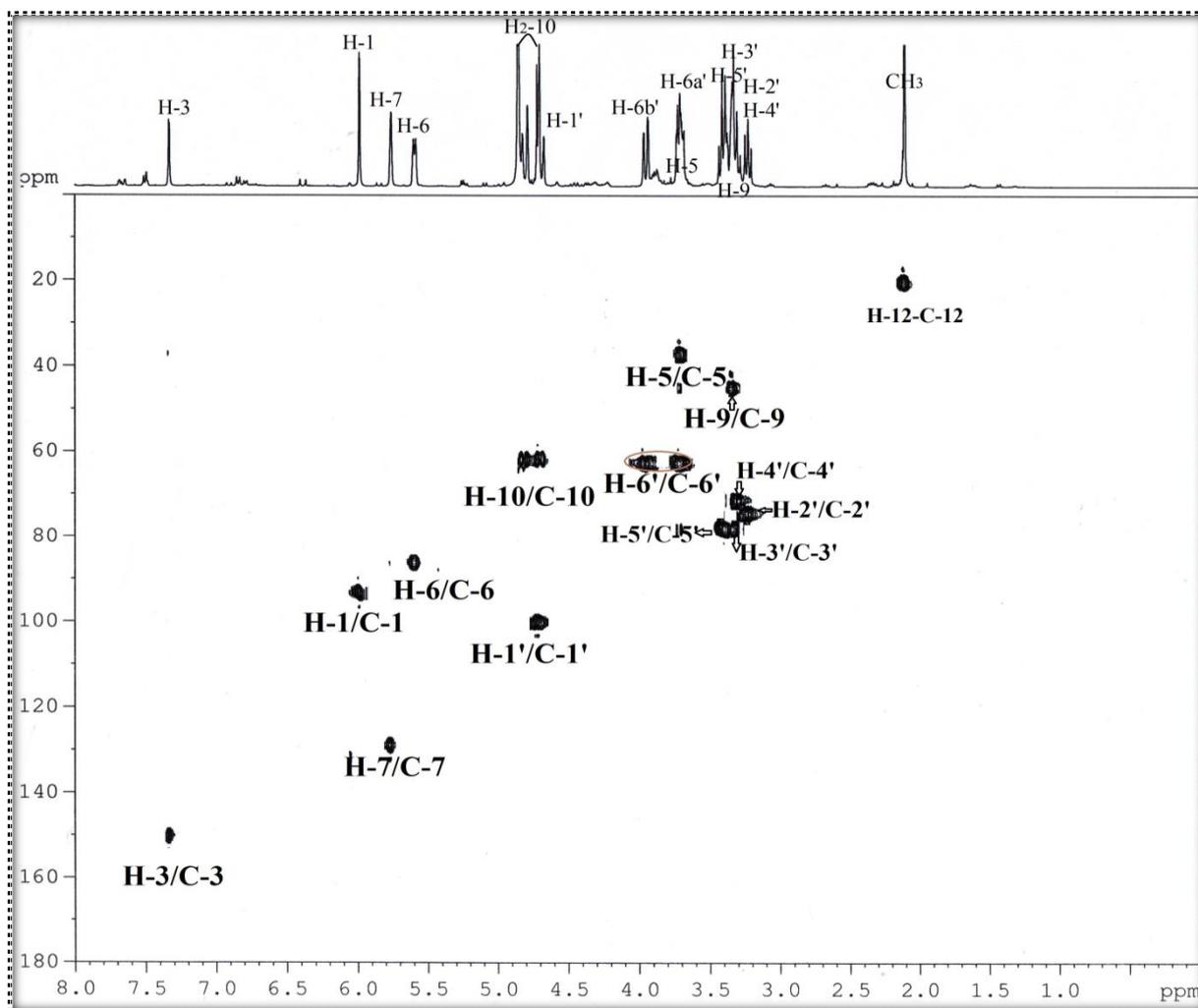


Figure III-112: Spectre HSQC du composé **GB-14**

L'analyse du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^1H - ^{13}C (HMBC), (Figure III-113), permet d'observer les corrélations suivantes confirmant bien le squelette iridoïdique du composé **GB-14**:

- Entre le proton oléfinique à δ_{H} 7,30 (H-3) et les carbones à δ_{C} 106,2 (C-4), 93,3 (C-1), 37,5 (C-5), et le carbonyle C-11 à 172,2 ppm.
- Entre le second proton oléfinique à δ_{H} 5,72 (H-7) et les atomes de carbone C-5, C-6, C-1 et un carbone oléfinique quaternaire à 144,3, attribué au carbone C-9.
- Entre les protons du méthylène H₂-10 (δ_{H} 4,66/4,77) et les carbones C-7, C-8, C-9 et le carbonyle à δ_{C} 172,6, attribué au carbonyle du groupement acétyle.

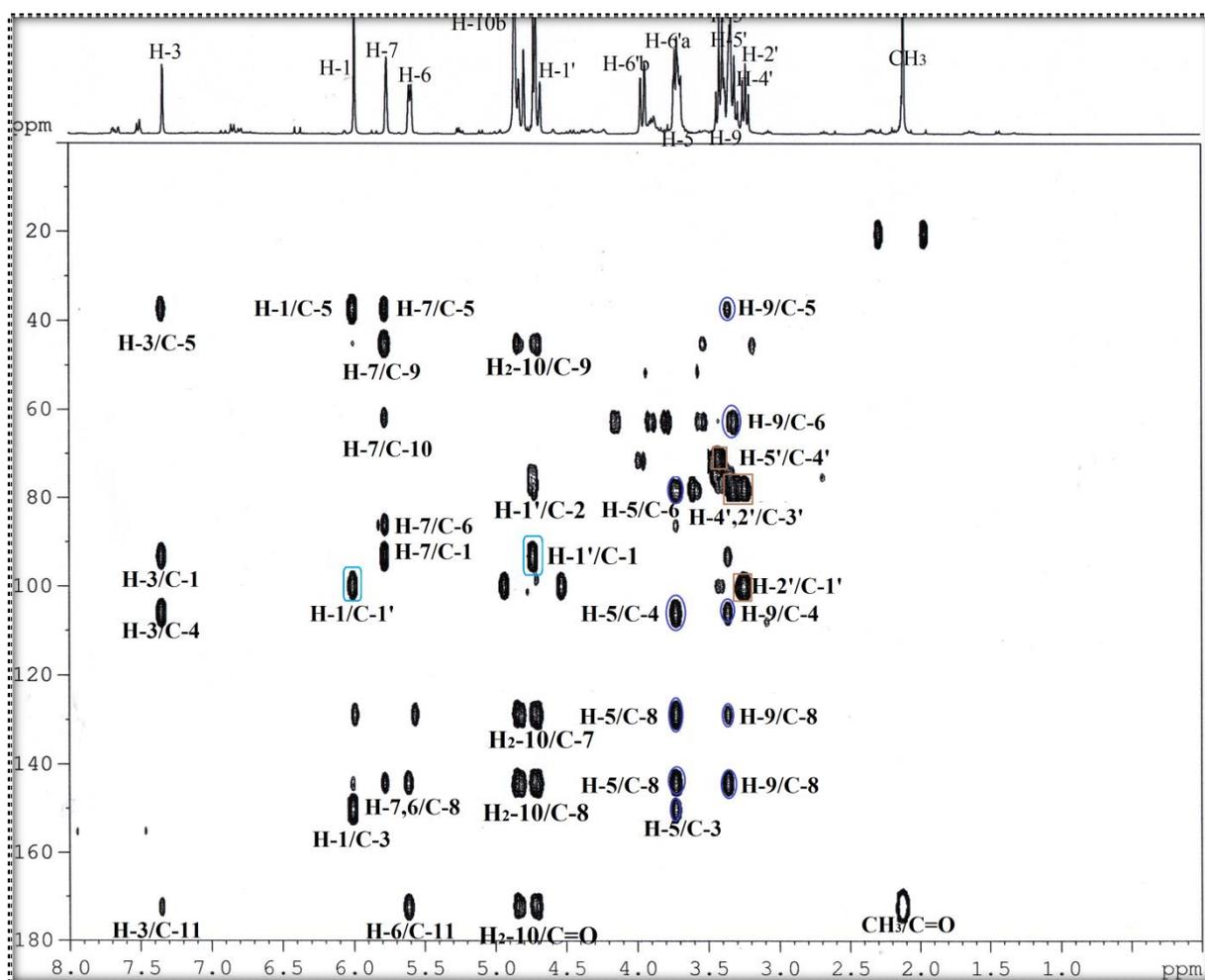


Figure III-113: Spectre HMBC du composé **GB-14**

Le spectre HMBC (Figure III-113), montre également des corrélations entre le proton anomère H-1' et le carbone à δ_{C} 93,3 (C-1), et entre le proton H-1 et le carbone anomère C-1' indiquant la position du sucre sur l'aglycone en C-1.

La présence d'un β -D-glucopyranose, est confirmée par le déplacement chimique et la constante de couplage de son proton anomérique H-1' (4,18, *d*, $J = 7,8$ Hz), ainsi que par les corrélations observées sur les spectres COSY H-H [H-1'/H-2', H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-4'/H-5' et H-5'/H₂-6'] et HSQC.

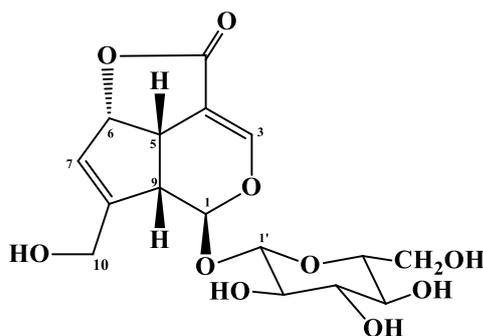
L'analyse des spectres RMN 1D et 2D, et en comparant ces données spectrales avec celles de la littérature^{59,270}, nous a permis d'identifier le composé **GB-14** à l'aspéruloside isolé, ultérieurement, des espèces du *Galium* telles que: *G. verum* subsp. *verum*, *G. corsicum*, *G. schmidii*, *G. glaucophyllum*, , *G. verum* var. *asiaticum*, *G. verum* L, *G. album*, *G. album* ssp *album*, *G. album* ssp *pychnotrichum*, *G. lovcense*, *G. humifusum* et *G. spurium* L ^{59,71,88,91,92,96}.

Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone sont rassemblés dans le tableau (III-15) ci-dessous.

Tableau III-15: Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **GB-14** dans MeOH-*d*₄

Position	δ_H <i>mJ</i> (Hz)	δ_C
1	5,95 <i>d</i> (1,5)	93,3
2	-	-
3	7,30 <i>d</i> (1,6)	150,3
4	-	106,2
5	3,71 <i>m</i>	37,5
6	5,56 <i>d</i> (6,4)	86,3
7	5,72 <i>s</i>	128,9
8	-	144,3
9	3,29 <i>m</i>	45,3
10	4,77 <i>dd</i> (14,2; 1,0) 4,66 <i>dd</i> (14,2; 1,0)	61,6
11	-	172,2
<u>COCH₃</u>	-	172,6
<u>COCH₃</u>	2,07 <i>s</i>	20,6
Glucose		
1'	4,67 <i>d</i> (7,9)	100,0
2'	3,26 <i>m</i>	74,9
3'	3,35 <i>m</i>	78,1
4'	3,31 <i>m</i>	71,2
5'	3,41 <i>m</i>	77,9
6'	3,72 <i>dd</i> (11,9, 5,3) 3,94 <i>dd</i> (11,9, 1,9)	62,7

3.2.5. Composé GB-15



L'analyse du spectre de masse en source ESI (mode positif) du composé **GB-15** (Figure III-114) permet d'observer deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 395,166 $[M+Na]^+$ et m/z 766,975 $[2M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 372 uma et une formule brute $C_{16}H_{20}O_{10}$.

Le spectre RMN 1H (Figure III-115) de ce composé est similaire à celui de **GB-14**, la seule différence entre les deux spectres est l'absence d'un singulet à 2,02 ppm, attribuable à un groupement acétyle. Le blindage des protons H₂-10 à δ_H 4,22 (2H, *s*), par rapport aux H₂-10 du dérivé acétylé, traduit une desacétylation en cette position.

Une différence de masse de 42 uma entre les masses moléculaires de ce composé (372 uma) et le composé **GB-14** (414 uma) confirme la perte du groupement acétyle.

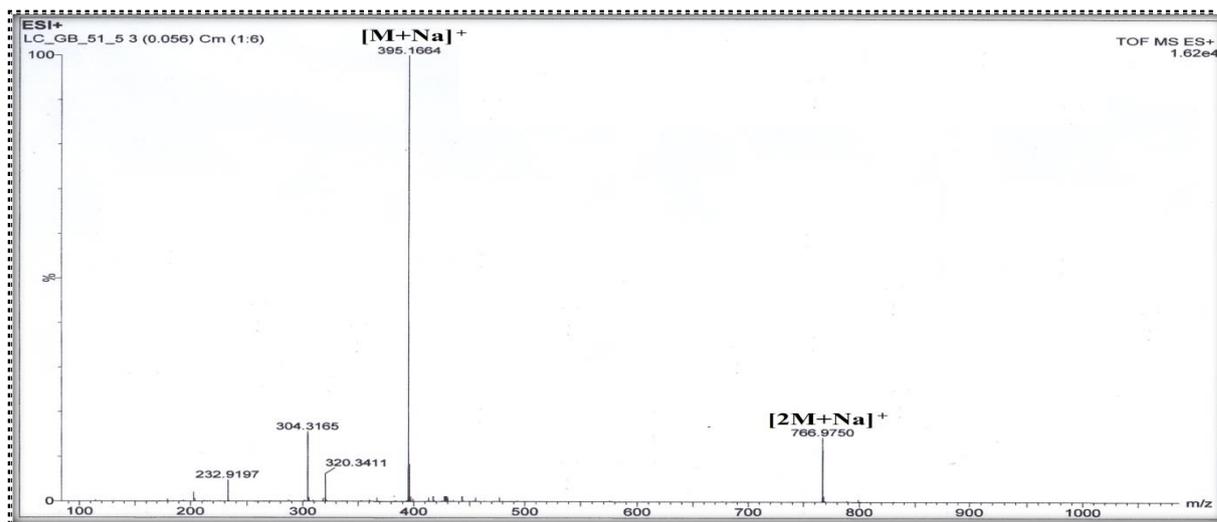


Figure III-114: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-15**

La détermination structurale du composé **GB-15** a permis d'identifier tous les signaux caractéristiques, d'après l'analyse du spectre RMN 1H (MeOH-*d*₄).

- Les deux protons oléfiniques sous forme de singulet à δ_H 7,31 (H-3) et δ_H 5,67 (H-7).
- Le proton acétal H-1 à δ_H 5,98 (1H, *d*, $J = 1,4$ Hz).

- Les résonances entre 3,20 et 4,00 ppm, montrent les protons osidiques et les deux protons méthines H-9 et H-5. Le signal de proton anomérique est repéré à δ_H 4,70 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz).
- Le proton H-6 apparait sous forme d'un doublet à δ_H 5,59 (1H, *d*, $J = 6,4$ Hz)

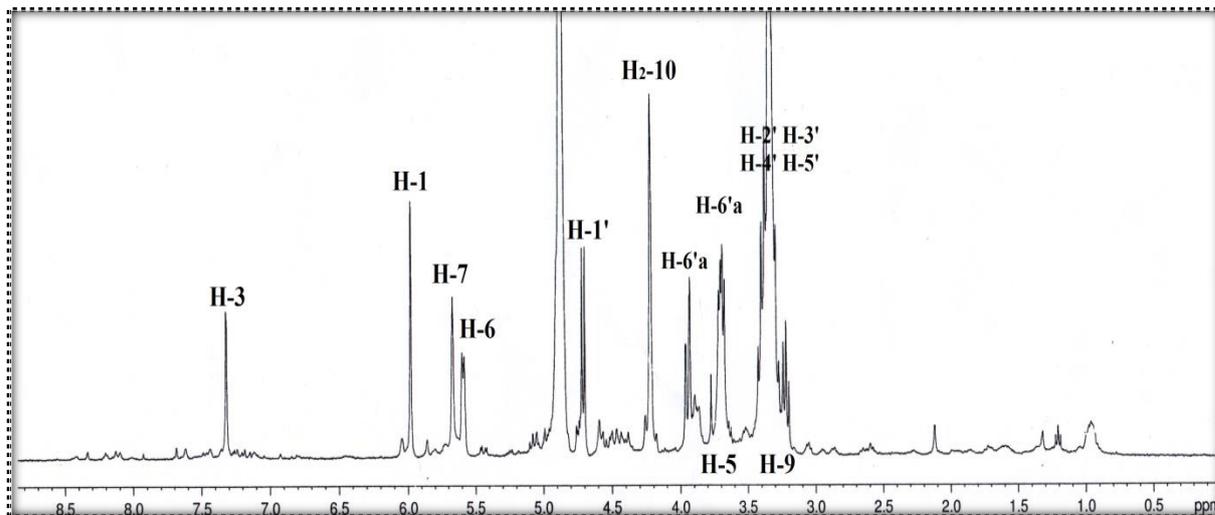
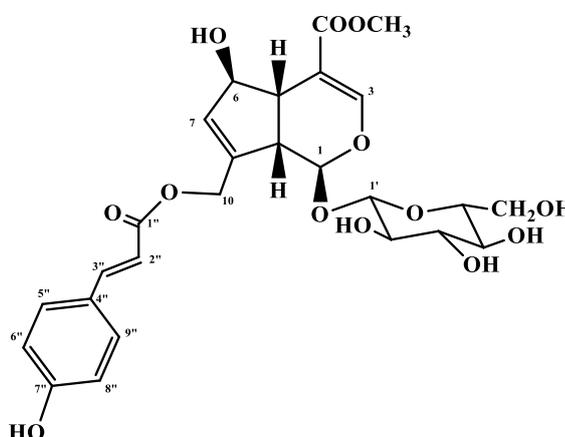


Figure III-115: Spectre RMN ^1H du composé **GB-15**

L'analyse de toutes ces données avec une comparaison avec celles de la littérature^{88,268}, est en faveur avec la structure deacétylaspéruloside du composé **GB-15**, il est déjà isolé dans d'autres espèces du *Galium* telles que : *G. glaucophyllum*, *G. verum* var. *asiaticum* et *G. humifusum*^{71,88,92}.

3.2.6. Composé GB-16



Le spectre de masse ESI, obtenu en positif (Figure III-116), présente deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 573,58 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et m/z 1123,67 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, suggérant une masse atomique de 550 uma, soit une formule brute $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 12.

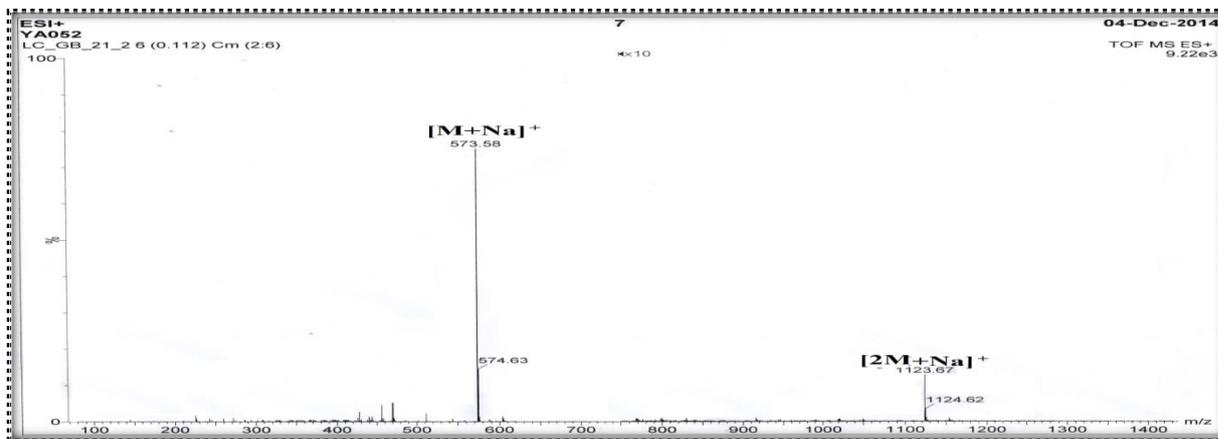


Figure III-116: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-16**

La comparaison du spectre RMN ¹H du composé **GB-16** (Figure III-117) avec les précédents iridoïdes (**GB-12** et **GB-13**), permet de noter que ce composé possède une structure très proche. Cependant quelques différences concernant la présence des protons supplémentaires, dans la région des protons aromatiques entre 6,40 et 7,70 ppm, sont observées. En effet, on observe (Figure III-117):

- Deux doublets à δ_H 7,48 et à δ_H 6,82, intégrant chacun pour 2H et avec une constante de couplage de 8,3 Hz, correspondent à quatre protons aromatiques positionnés symétriquement sur un cycle aromatique *para* substitué.
- Deux doublets apparaissent à δ_H 7,68 (1H, $J = 15,9$ Hz) et à δ_H 6,40 (1H, $J = 15,9$ Hz), intégrant chacun pour 1H, sont attribuables aux deux protons oléfiniques d'une double liaison de configuration *trans*.

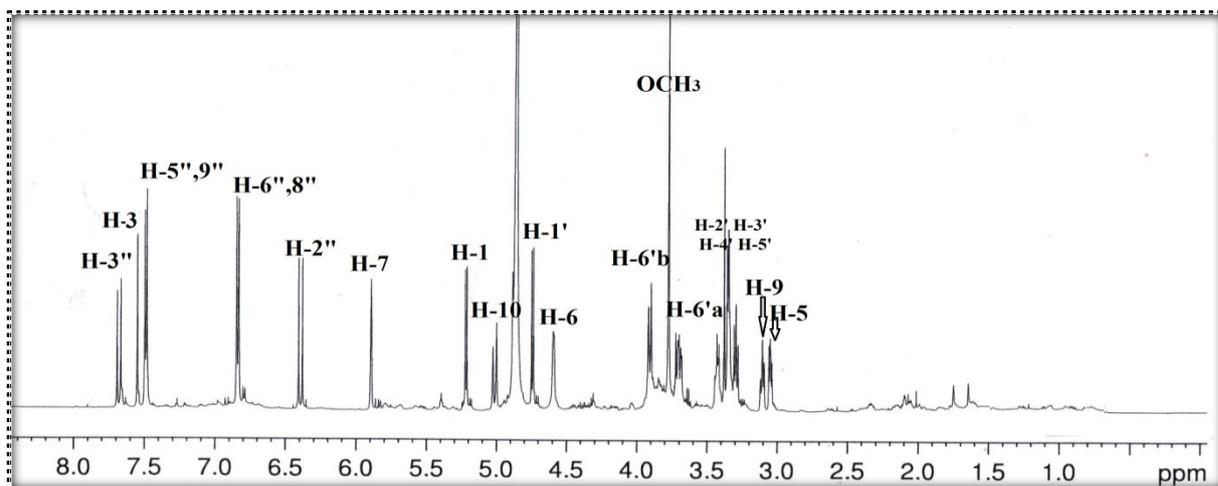


Figure III-117: Spectre RMN ¹H du composé **GB-16**

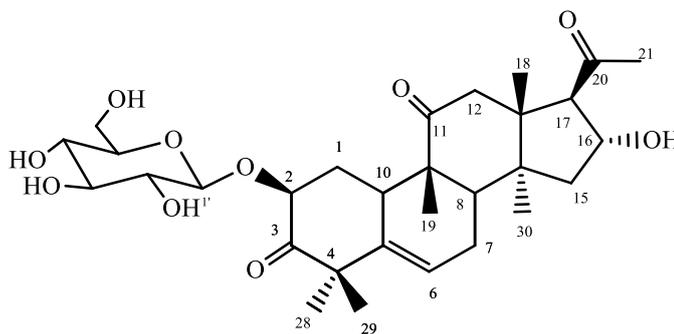
En plus, le spectre RMN ^1H (MeOH- d_4), montre les signaux suivants, caractéristiques d'un squelette iridoïdique:

- Les deux singulets d'intensité un proton à δ_{H} 7,53 (1H, *s*) et à δ_{H} 5,90 (1H, *s*), sont attribués aux protons H-3 et H-7, respectivement.
- Les deux signaux à δ_{H} 3,05 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz) et à δ_{H} 3,10 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz), sont attribués aux protons des groupements méthines H-5 et H-9 respectivement.
- Le signal du proton hémiacétal H-1 à δ_{H} 5,21 (1H, *d*, $J = 6,3$ Hz)
- Le signal du proton du groupement oxyméthine H-6 à δ_{H} 4,60 (1H, *sl*)
- Un singulet d'intensité 3H à δ_{H} 3,75 caractéristique d'un groupement méthoxyle.
- Les signaux entre 3,30 et 4,80 ppm sont attribuables au β -D-glucose dont le doublet à δ_{H} 4,72 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz) est caractéristique du proton anomérique (H-1').

De ce qui précède, le composé **GB-16** est un iridoïde substitué par un groupement coumaroyle et un méthoxyle. L'étude comparative avec les données de la littérature permet de positionner les différents substituants sur le squelette iridoïdique. Il s'agit donc du 10-*O-trans*-*p*-coumaroylscandoside, isolé originalement dans la plante *Oldenlandia orymbosa*²⁶⁸ (Rubiaceae) et il est aussi présent dans le genre *Galium*, et en particulier dans l'espèce *G. spurium* L⁹⁶.

3.3. Les saponines

3.3.1. Composé GB-17



Le composé **GB-17** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le méthanol. Sur la CCM, sa tâche est invisible à la lumière UV (254 et 366 nm), il réagit avec le réactif de sulfate de cérium pour donner une coloration grise après chauffage.

Le spectre de masse ESI en mode positif du composé **GB-17** (Figure III-118) montre deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 587,1097 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et à m/z 1151,3162 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 564 uma et une formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$, soit un nombre d'insaturation égale à 9.

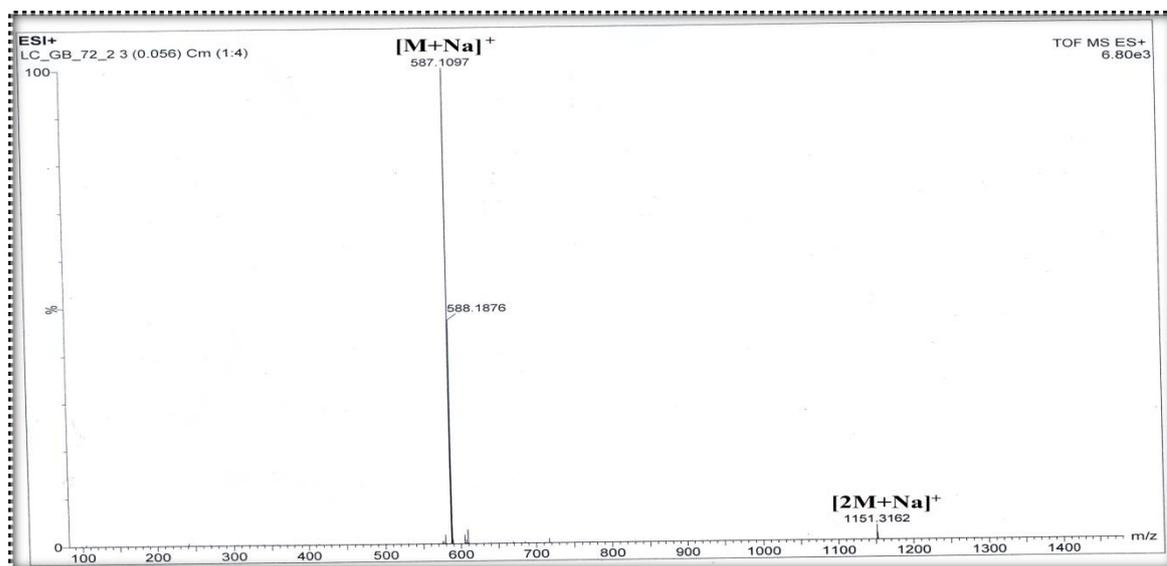


Figure III-118: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-17**

L'analyse de son spectre RMN ¹H enregistré dans le méthanol-*d*₄ (Figure III-119), permet de fixer les signaux suivants:

- Six singulets dans la région des champs forts, intégrant chacun pour 3H correspondant à six groupes méthyles dont un est déblindé vers 2,20 ppm, et correspond à méthyle d'un groupement acyle.
- Un signal résonnant à 5,85 (1H, *sl*) ppm est attribué à un proton oléfinique.
- Un massif entre 3,20 et 5,00 ppm est caractéristique des protons osidiques et oxyméthines

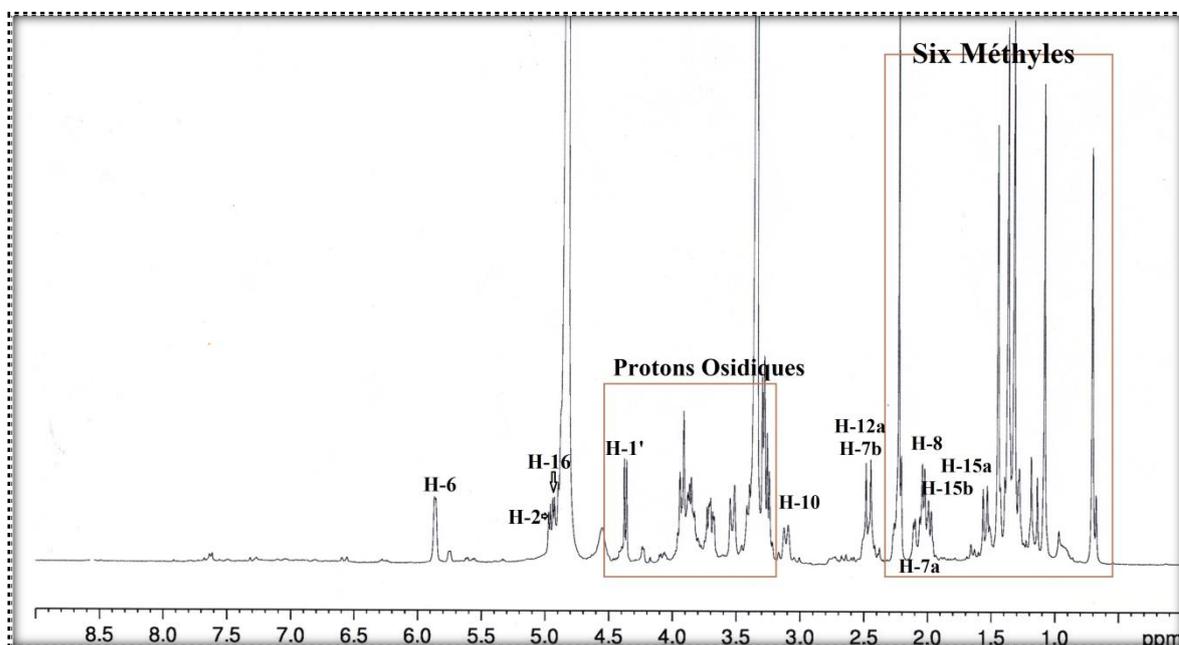


Figure III-119: Spectre RMN ¹H du composé **GB-17**

Sur le spectre HSQC edited (ge-2D) du composé **GB-17** (Figure III-120), on dénombre :

- Six groupements méthyles à δ_H 0,70/ δ_C 20,0, δ_H 1,09/ δ_C 19,5, δ_H 1,30/ δ_C 22,0, δ_H 1,36/ δ_C 29,5, δ_H 1,42/ δ_C 19,5 et δ_H 2,20/ δ_C 32,0.
- Quatre groupements méthylènes à δ_H 1,35 et 2,20/ δ_C 36,0, δ_H 1,55 et 2,00/ δ_C 46,0, δ_H 2,05 et 2,50/ δ_C 25,0 et δ_H 2,45 et 3,50/ δ_C 48,0.
- Trois groupements méthines à δ_H 3,25/ δ_C 67,0, δ_H 3,10/ δ_C 34,0 et δ_H 2,02/ δ_C 44,0.
- Deux groupements oxyméthines à δ_H 4,88/ δ_C 72,1 et δ_H 4,94/ δ_C 80,0.
- Un groupement éthylénique à δ_H 5,85/ δ_C 120,1.
- Cinq groupements oxyméthines à δ_H 4,38/ δ_C 102,9, δ_H 3,27/ δ_C 75,1, δ_H 3,29/ δ_C 78,5, δ_H 3,30/ δ_C 71,6, δ_H 3,40/ δ_C 78,1 et un oxyméthylène à δ_H 3,69 et 3,92/ δ_C 63,5 sont caractéristiques d'une unité osidique.

L'ensemble de ces données spectrales nous oriente vers une saponine mono-osidique.

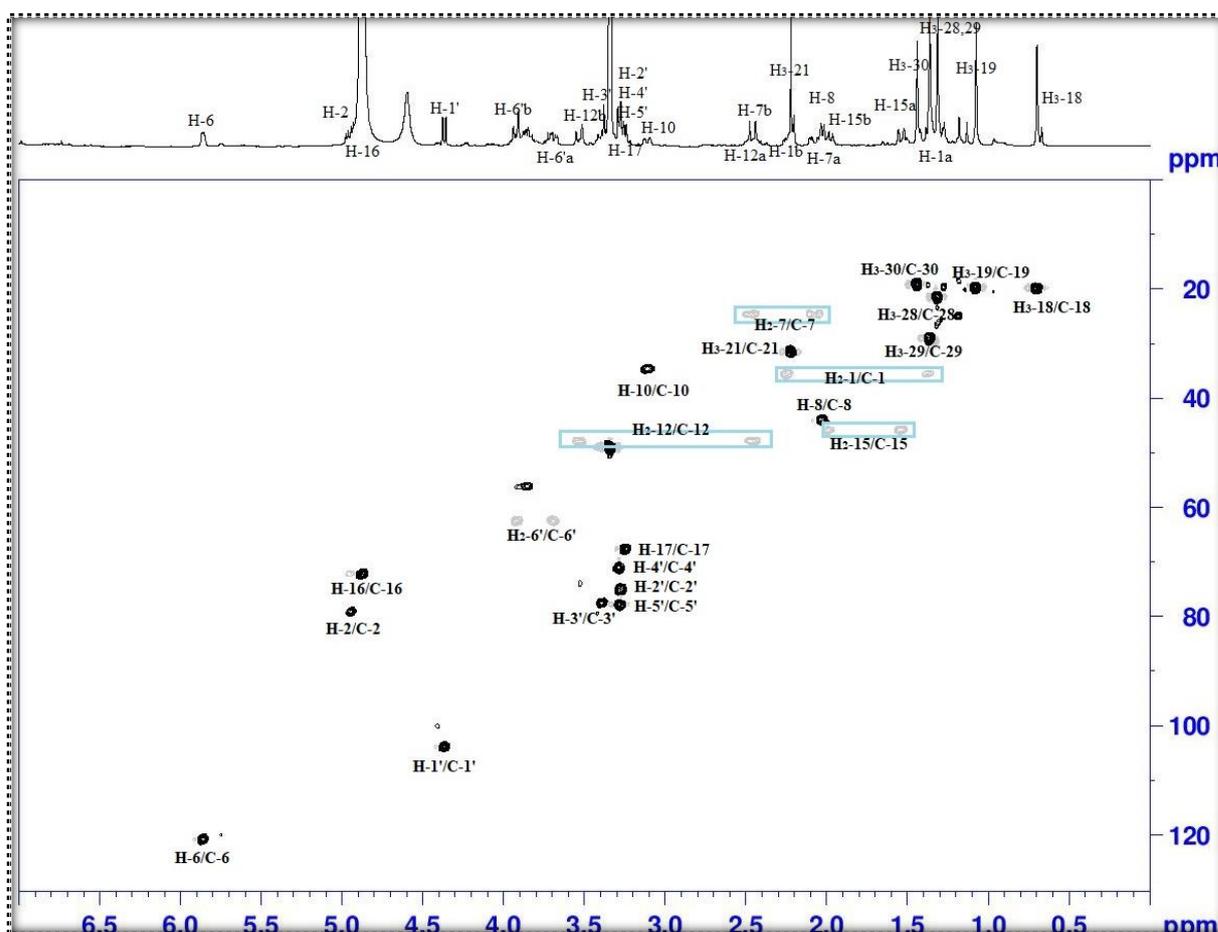


Figure III-120: Spectre HSQC du composé **GB-17**

3.3.1.1. Identification de l'aglycone

L'analyse du spectre COSY H-H (Figures III-121 et III-121a) permet d'identifier et repérer trois systèmes de spin à partir des corrélations spectroscopiques suivantes:

- Le proton oléfinique à δ_H 5,85 corrèle avec les protons du premier groupement méthylène à 2,05/2,50 ppm. Ce système de spin à trois protons indique que la double liaison est liée à un groupement méthylène.
- Le proton du groupement oxyméthine à δ_H 4,94 (*dd*, $J = 13,0; 7,5$ Hz) corrèle avec deux protons non équivalents d'un 2^{ème} groupement méthylène à 1,35/2,20 ppm. L'un de ces protons (δ_H 1,35) corrèle, à son tour, avec un proton d'un groupement méthine repéré à δ_H 3,10 (*d*, $J = 12,0$ Hz).
- Le deuxième proton oxyméthine situé à δ_H 4,88 (*d*, $J = 7,7$ Hz) corrèle avec deux protons géminés à δ_H 2,00 (*m*) et δ_H 1,55 (*dd*, $J = 8,0$ et 3,2 Hz) et un proton à 3,25 ppm (*d*, $J = 7,5$ Hz).

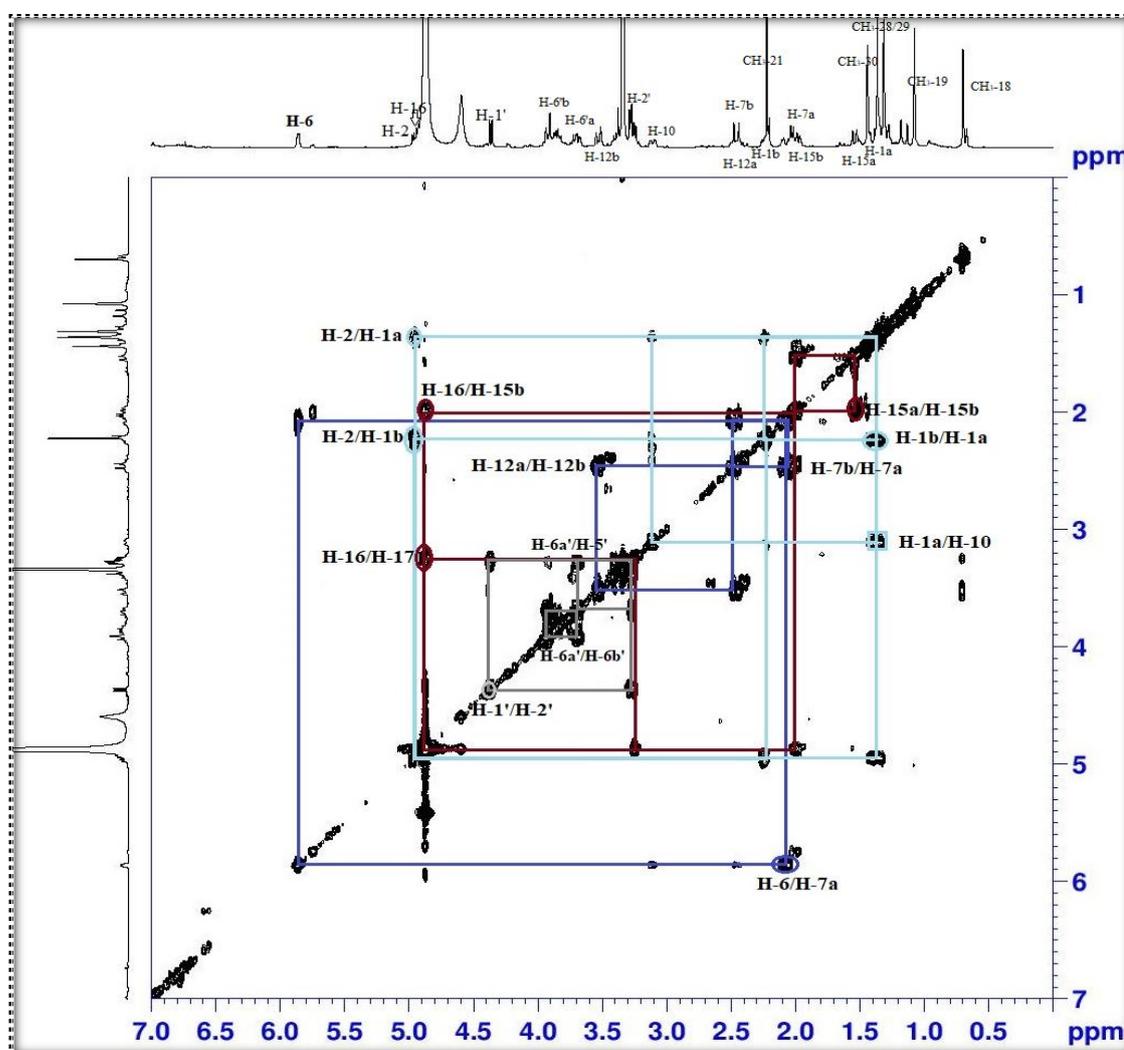


Figure III-121: Spectre COSY H-H du composé GB-17

Par suite de cette analyse, trois fragments structuraux sont identifiés :

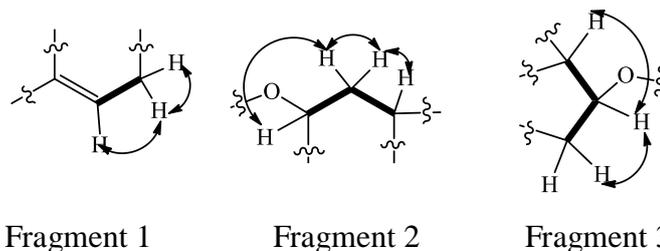


Figure III-121a: Corrélations COSY H-H de la partie aglycone du composé **GB-17**

La suite de l'analyse structurale est basée sur le spectre HMBC (Figure III-122), où les couplages $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ sont visualisés. Sur ce spectre, et au niveau des protons des groupements méthyles, on note que:

- Les protons de deux groupements méthyles à δ_H 1,30 et à δ_H 1,36 présentent les mêmes corrélations, avec un carbone quaternaire oléfinique à δ_C 140,9, un carbonyle à 212,0, ppm et un carbone quaternaire à 51,1 ppm, et par conséquent les deux méthyles sont localisés entre le carbonyle et une double liaison. En plus, l'un de ces méthyles (1,36 ppm) corrèle avec le carbone de l'oxyméthine à δ_C 80,0.

Ces corrélations nous apporte des informations sur le cycle A d'un squelette triterpénique et permettent de lier entre les deux fragments 1 et 2 identifiés, précédemment, par l'analyse effectuée du spectre COSY H-H.

Les valeurs des déplacements chimiques à δ_H 1,30/ δ_C 22,0 et δ_H 1,36/ δ_C 29,5 sont attribuables aux méthyles CH₃-28 et CH₃-29 du cycle A. De même, le carbone C-3 est à δ_C 212,0, le carbone C-4 est à δ_C 51,1, le carbone C-2 est à δ_C 80 et le carbone C-1 à δ_C 36,0. Les valeurs à δ_C 140,1 et à δ_C 120,5 sont attribuables aux carbones C-5 et C-6 de la double liaison, respectivement. La valeur du carbone C-10 est assignée à δ_C 34,0 par la corrélation observée entre ce dernier et le proton oléfinique H-6 (δ_H 5,85). A ce stade, tous les protons et carbones du cycle A sont déterminés.

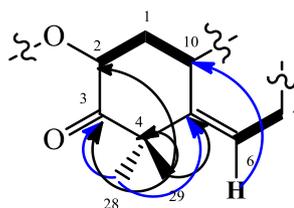


Figure III-122a: Corrélations HMBC du cycle A du composé **GB-17**

Le cycle B est initié par le carbone oléfinique C-6, son proton présente des tâches de corrélations avec les carbones C-10 (δ_C 34,0) et C-4 (δ_C 51,1) déjà identifiés, et un carbone méthine à δ_C 45,0 qui ne pourrait être que le carbone C-8 (Figure III-122a).

Le carbone C-9 du cycle B est identifié au moyen des tâches de corrélations détectées entre le méthyle repéré à δ_H 1,09. En effet, ce méthyle corrèle avec le carbone C-10 et un carbone méthine à δ_C 50,0 qui est assigné sans doute au carbone C-9 (Figure III-122b).

On note que le carbone C-10 dans cette structure n'est pas porteur d'un groupement méthyle, comme il est prévu pour les triterpènes fréquents. Par conséquent, le C-9 (δ_H 1,09 / δ_C 19,5) est porteur d'un groupement méthyle numéroté le C-19. Cette situation est connue dans les triterpènes tétracycliques^{176,180-182}.

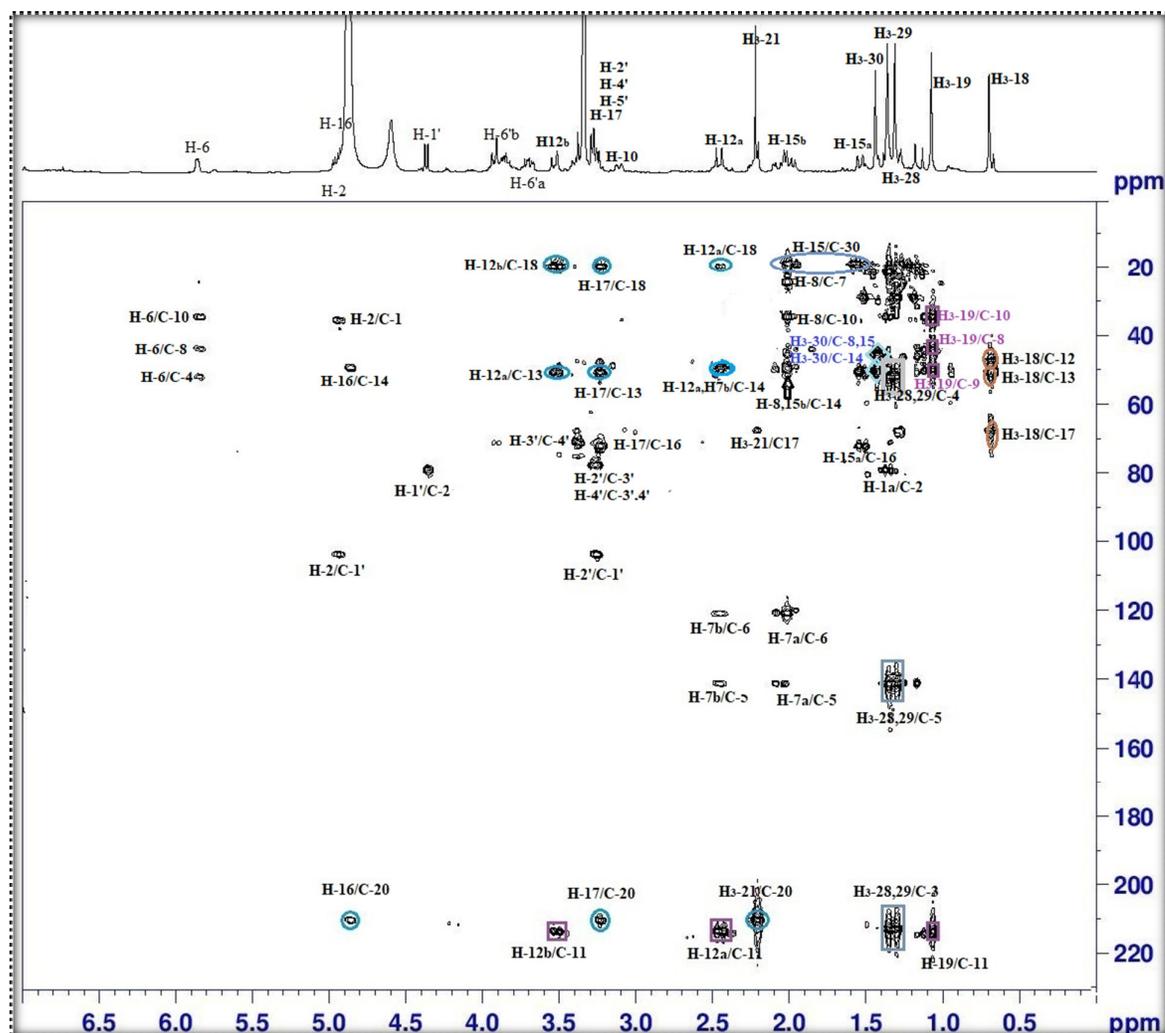


Figure III-122: Spectre HMBC du composé GB-17

La suite de corrélations détectées entre le méthyle CH₃-19 (δ_H 1,09) et d'autres carbones facilite l'identification des carbones du cycle C (Figure III-122b). Le carbone C-11 est à δ_C 212,8, et le carbone C-12 est à δ_C 48,0 dont les protons sont assignés à δ_H 2,45/3,50 au moyen de l'expérience HSQC (Figure III-120).

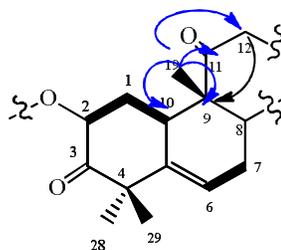


Figure III-122b: Corrélations HMBC des cycles B/C du composé **GB-17**

Les carbones C-13 et C-14 sont identifiés par les tâches de corrélations observées sur le spectre HMBC (Figures III-122 et III-122c) entre les deux groupements méthyles à δ_H 0,70 et à δ_H 1,42. Le méthyle à δ_H 1,42 corrèle avec le carbone C-8 du cycle B et un carbone quaternaire à δ_C 50,0, tandis que le méthyle à δ_H 0,70 corrèle bien avec le 2^{ème} carbone quaternaire à δ_C 50,1, ce dernier présente des corrélations avec les protons H-12 du cycle B. Par cette analyse le carbone C-13 est fixé à δ_C 50,1, le carbone C-14 à δ_C 50,0, le carbone C-18 (δ_H 0,70) à δ_C 20,0 et le carbone C-30 (δ_H 1,42) à δ_C 19,5.

Toujours au moyen de l'expérience HMBC (Figures III-122 et III-122c), et en reliant le fragment 3 identifié précédemment, nous pouvons déterminer le cycle D du composé **GB-17**. En effet, le proton oxyméthine à δ_H 4,88 corrèle avec le carbone C-13 (δ_C 50,1), d'autre part le carbone C-14 (δ_C 50,0) présente une tâche de corrélation avec l'unité méthylène à δ_H 2,00/1,55 et par conséquent un cycle à cinq chaînons est formé avec le cycle C, d'où le squelette suivant:

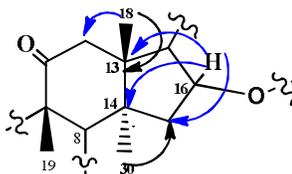


Figure III-122c: Corrélations HMBC des cycles C/D du composé **GB-17**

Les protons du groupement acyle à 2,20 ppm présentent une seule corrélation avec son carbonyle correspondant à 210,0 ppm. Au niveau de ce carbonyle, nous observons deux corrélations dont une est avec le proton de groupement méthine oxygéné C-16 (4,88 ppm) et l'autre avec le proton de méthine C-17 (3,25 ppm). Cette analyse permet d'assigner le carbonyle au carbone C-20 et le méthyle acyle au carbone CH₃-21.

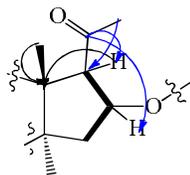
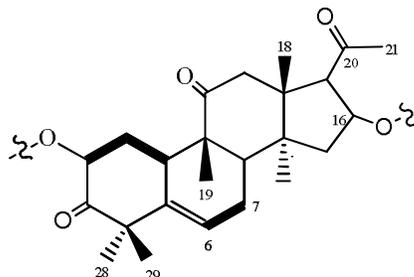


Figure III-122d: Corrélations HMBC de la chaîne latérale du composé **GB-17**

L'analyse des spectres COSY H-H, conjointement avec les spectres HSQC et HMBC du composé **GB-17** permettent de caractériser cette aglycone comme un squelette tétracyclique renfermant six méthyles angulaires, une double liaison et trois carbonyle. De plus, la masse de ce composé et la comparaison avec les données rapportées dans la littérature, permettent de conclure que la structure de la génine est la cucurbitacine^{173,182}.



3.3.1.1. Identification de la partie osidique

L'identification structurale de l'unité osidique est basée sur le spectre COSY H-H, débutant par son proton anomérique à δ_H 4,38 (d , $J = 7,5$), où ce dernier présente un système de spin à sept protons : H-1'/H-2' à δ_H 3,27 (t , $J = 8,7$ Hz), H-2'/H-3' à δ_H 3,40 (m), H-3'/H-4' à δ_H 3,30 (t , $J = 9,0$ Hz) et H-4'/H-5' à δ_H 3,29 (t , $J = 8,6$ Hz). Les protons du méthylène CH₂-6' forment avec H-5' un système ABX à δ_H 3,69 (dd , 11,8; 6,9 Hz) et à δ_H 3,92 (dd , 11,8; 2,1 Hz).

L'expérience HSQC permet de lier les protons à leurs carbones osidiques respectifs: le carbone anomérique CH-1' à δ_C 102,9, CH-2' à δ_C 75,1, CH-3' à δ_C 78,1, CH-4' à δ_C 71,6, CH-5' à δ_C 78,5 et CH₂-6' à δ_C 63,5. Ces valeurs sont celles retrouvées habituellement pour un β -D-glucose terminal.

Une corrélation hétéronucléaire HMBC (Figure III-122) entre le proton anomérique de l'unité β -glucose et le carbone C-2 du cycle A et entre le proton H-2 et le carbone anomérique a permis de confirmer sans ambiguïté la position d'attachement du sucre en C-2.

L'ensemble des données spectrales nous permet d'identifier le composé **GB-17** comme hexanor cucurbitacine D 2-O- β -D-glucopyranoside, isolé de la plante *Cucumis melo*²⁷¹. Ce type de saponines à génine cucurbitacine ont été isolées, antérieurement, à partir des espèces de Rubiaceae telles que: *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora*, *Exostema caribaeum* et *Phaseolus vulgaris*^{272,273}, mais elle est identifiée ici pour la première fois dans le genre *Galium*.

²⁷¹ Chen C., Qiang S., Lou L., Zhao W., Cucurbitane-Type Triterpenoids from the Stems of *Cucumis melo*, *Journal of Natural Products* 72, 824-829, 2009.

²⁷² Guerrero-Analco J., Medina-Campos O., Brindis F., Bye R., Pedraza-Chaverri J., Navarrete A., Mata R., Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family, *Phytochemistry* 68(15), 2087-2095, 2007.

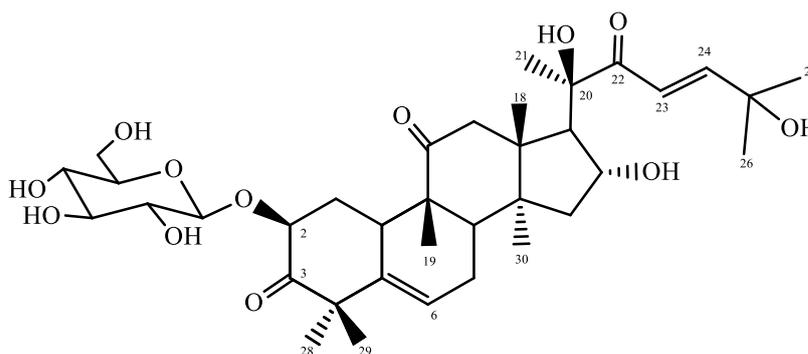
²⁷³ Déciga-Campos M., Guerrero-Analco J. A., Quijano L., Mata R., Antinociceptive activity of 3-O- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae), *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 83(2), 342-348, 2006.

Les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **GB-17** sont rassemblés dans le tableau III-16.

Tableau III-16: Déplacements chimiques RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **GB-17** enregistrés dans $\text{MeOH-}d_4$.

Position	δ_{H} <i>m J</i> (Hz)	δ_{C}
1	1,35 <i>m</i>	36,0
	2,20 <i>m</i>	
2	4,94 <i>dd</i> (13,0; 7,5)	80,0
3	-	212,0
4	-	51,1
5	-	140,1
6	5,85 <i>sl</i>	120,5
7	2,02 <i>m</i>	25,0
	2,50 <i>d</i> (15,1)	
8	2,01 <i>d</i> (15,6)	45,0
9	-	50,0
10	3,10 <i>d</i> (12,0)	34,0
11	-	212,8
12	2,45 <i>d</i> (15,0)	48,0
	3,50 <i>d</i> (15,6)	
13	-	50,1
14	-	50,0
15	1,55 <i>d</i> (13,2)	46
	2,00 <i>d</i> (8,2)	
16	4,88 <i>t</i> (7,7)	72,1
17	3,25 <i>d</i> (7,6)	67,0
18	0,70 <i>s</i>	20,0
19	1,09 <i>s</i>	19,5
20	-	210,0
21	2,20 <i>s</i>	32,0
28	1,30 <i>s</i>	22,0
29	1,36 <i>s</i>	29,5
30	1,42 <i>s</i>	19,5
Glucose		
1'	4,38 <i>d</i> (7,5)	102,9
2'	3,27 <i>t</i> (8,7)	75,1
3'	3,40 <i>m</i>	78,1
4'	3,30 <i>t</i> (8,9)	71,6
5'	3,29 <i>t</i> (8,6)	78,5
6'	3,69 <i>dd</i> (11,2, 6,9)	63,5
	3,92 <i>dd</i> (11,2, 2,1)	

3.3.2. Composé GB-18



Le composé **GB-18** a été obtenu à l'état solide (poudre blanche amorphe), il est soluble dans le méthanol, invisible à la lumière UV (254 et 366 nm) et réagit avec le réactif de sulfate de cérium pour donner une coloration grise après chauffage.

Sur le spectre de masse en source ESI (Figure III-123), enregistré en mode positif, un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 701,6310 $[M+Na]^+$ est observé, correspondant à une masse moléculaire de 678 uma, suggérant une formule brute de $C_{36}H_{54}O_{12}$.

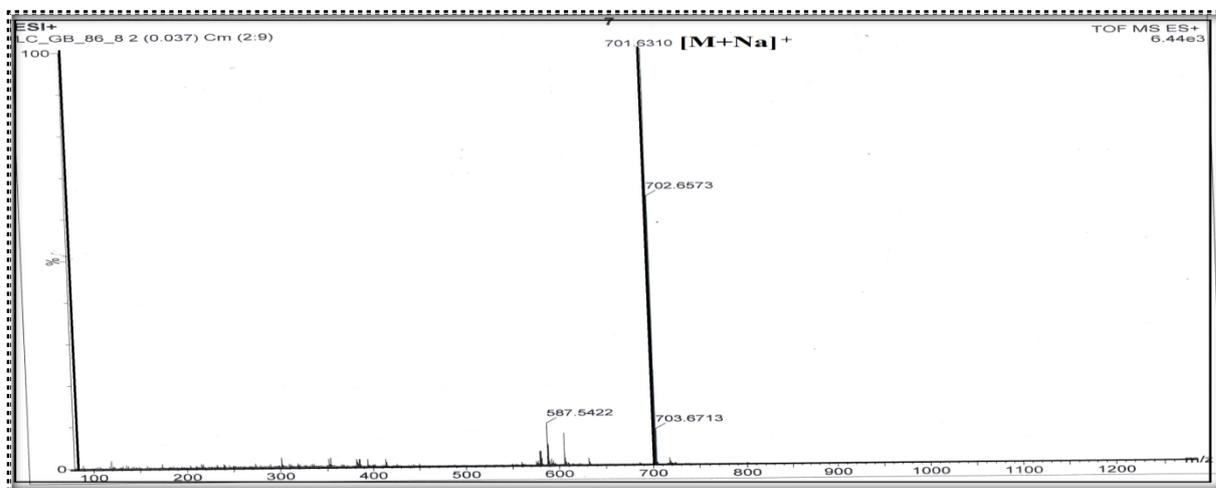


Figure III-123: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-18**

La comparaison des spectres RMN 1D et 2D de ce composé avec la saponine précédente, permet de noter que ces composés possèdent des structures très proches avec quelques différences.

On note sur le spectre RMN ¹H (Figure III-124) la disparition de signal de méthyle du groupement acétyle (CH₃-21) et l'apparition de trois groupements méthyles supplémentaires.

En plus du proton éthylénique H-6 (δ_H 6,85), le spectre RMN ¹H montre deux autres signaux oléfiniques, sous forme d'un doublet à δ_H 6,87 et à δ_H 7,00 avec une constante de couplage $J = 16,0$ Hz, indiquant la présence d'une deuxième double liaison avec une configuration *trans*.

Les données obtenues à partir des spectres RMN ^1H suggèrent une modification au niveau de la chaîne alkyle portée sur le cycle D. en effet, la différence de 114 uma calculée par rapport au composé précédent (**GB-17**), renforce la présence d'une chaîne latérale.

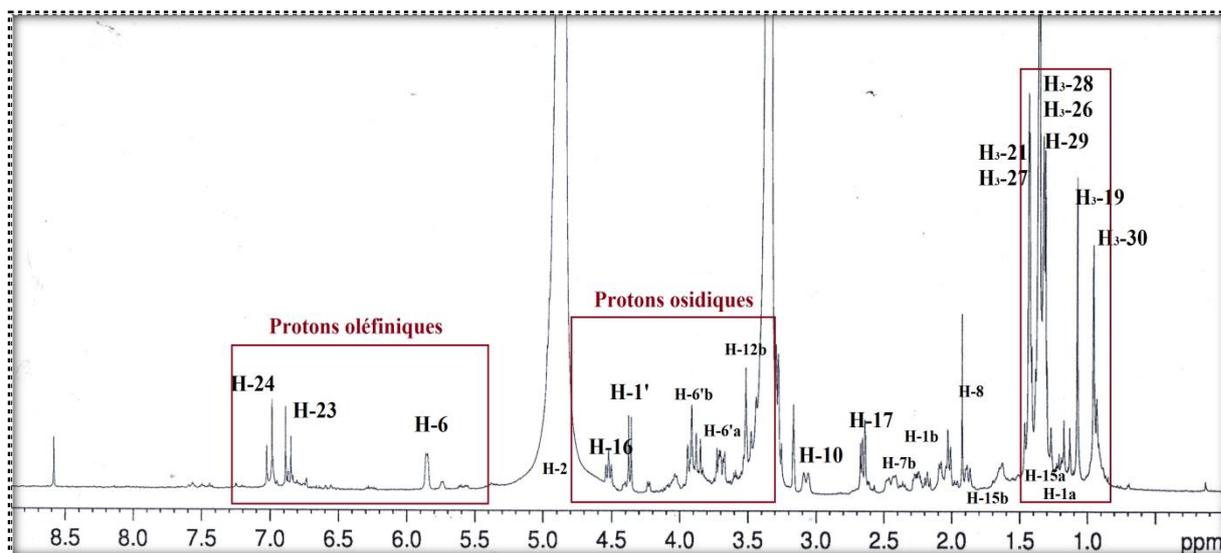


Figure III-124: Spectre RMN ^1H du composé **GB-18**

De même, le spectre de RMN ^1H montre les protons de l'unité glucosidique avec un doublet anomérique à δ_{H} 4,36 (d , $J = 7,9$ Hz) et un massif entre δ_{H} 3,30 et 3,95 pour les autres protons osidiques.

L'analyse du spectre HSQC (Figure III-125), permet de distinguer pour l'aglycone:

- Huit méthyles à δ_{H} 0,95 (δ_{C} 20,1), à δ_{H} 1,07 (δ_{C} 20,0), à δ_{H} 1,31 (δ_{C} 20,2), à δ_{H} 1,34 (δ_{C} 32,0), à δ_{H} 1,35 (δ_{C} 20,1), à δ_{H} 1,35 (δ_{C} 29,7), à δ_{H} 1,42 (δ_{C} 19,9) et à δ_{H} 1,42 (δ_{C} 25,9).
- Trois groupements éthyléniques à δ_{H} 5,85 (δ_{C} 121,4), à δ_{H} 6,87 (δ_{C} 119,5) et à δ_{H} 7,00 (δ_{C} 154,4),
- Trois méthines à δ_{H} 2,01 (δ_{C} 43,9), à δ_{H} 3,07 (δ_{C} 34,4) et à δ_{H} 2,65 (δ_{C} 59,2).
- Deux oxyméthines à δ_{H} 4,52 (δ_{C} 70,8) et à δ_{H} 4,94 (δ_{C} 80,0).
- Quatre méthylènes à δ_{H} 1,44/1,89 (δ_{C} 46,2), à δ_{H} 1,35/2,25 (δ_{C} 35,6), à δ_{H} 2,07/2,45 (δ_{C} 24,5) et à δ_{H} 2,66/3,33 (δ_{C} 49,0),

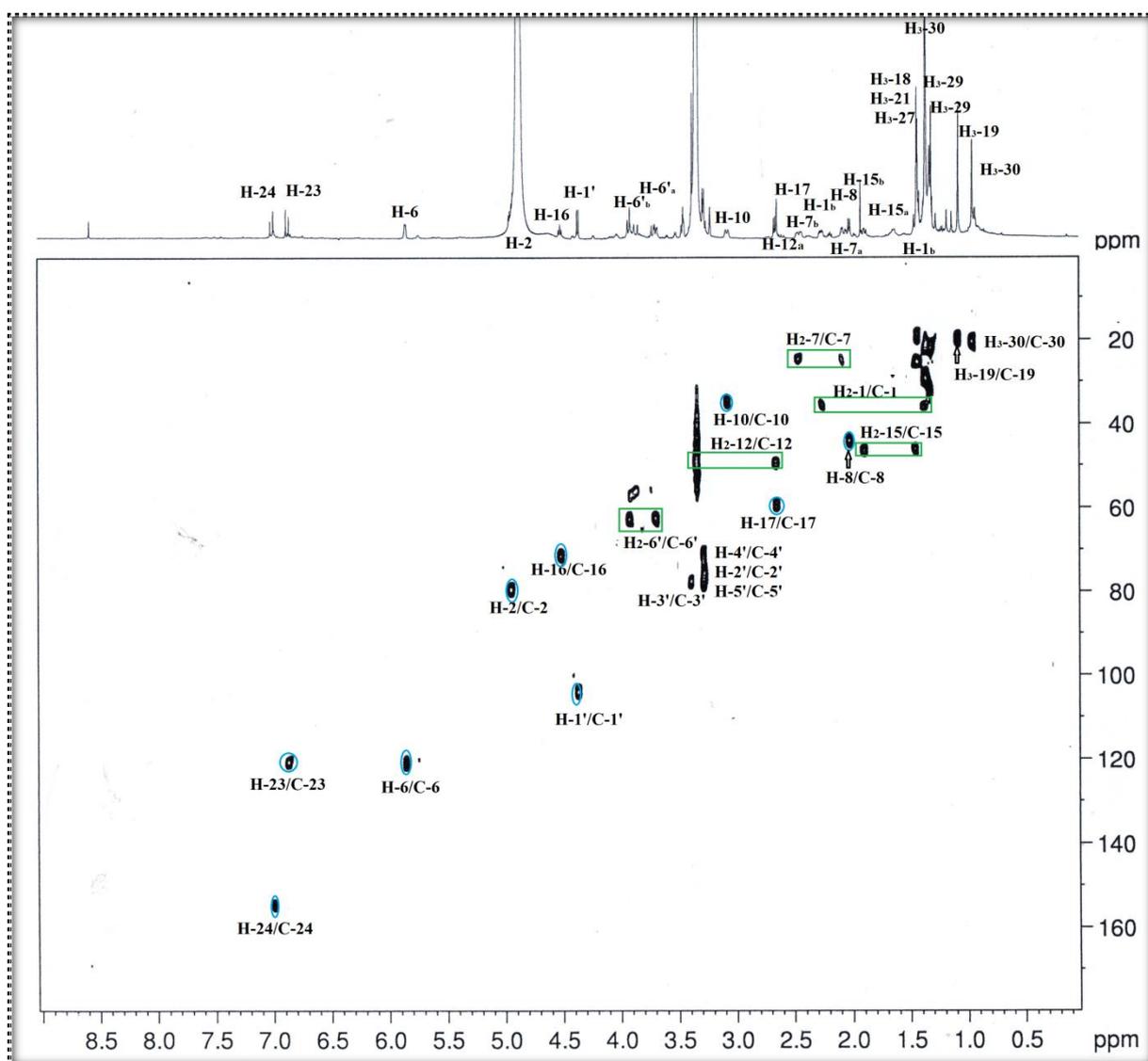


Figure III-125: Spectre HSQC du composé **GB-18**

L'analyse du spectre COSY H-H (Figures III-126 et III-126a) montre la présence de trois enchainements qui sont globalement similaires à ceux de la saponine **GB-17**. En effet, on identifie aisément :

- Le méthylène CH₂-7 à δ_H 2,07/2,45 à partir du proton oléfinique CH-6 (δ_H 6,85).
- Le méthylène CH₂-1 à δ_H 1,37/2,25 et le méthine CH-10 à δ_H 3,07 à partir de l'oxyméthine CH-2 à δ_H 4,94.
- L'oxyméthine CH-16 à δ_H 4,52 permet d'identifier le méthylène CH₂-15 à δ_H 1,44/1,89 et le méthine CH-17 à δ_H 2,65.

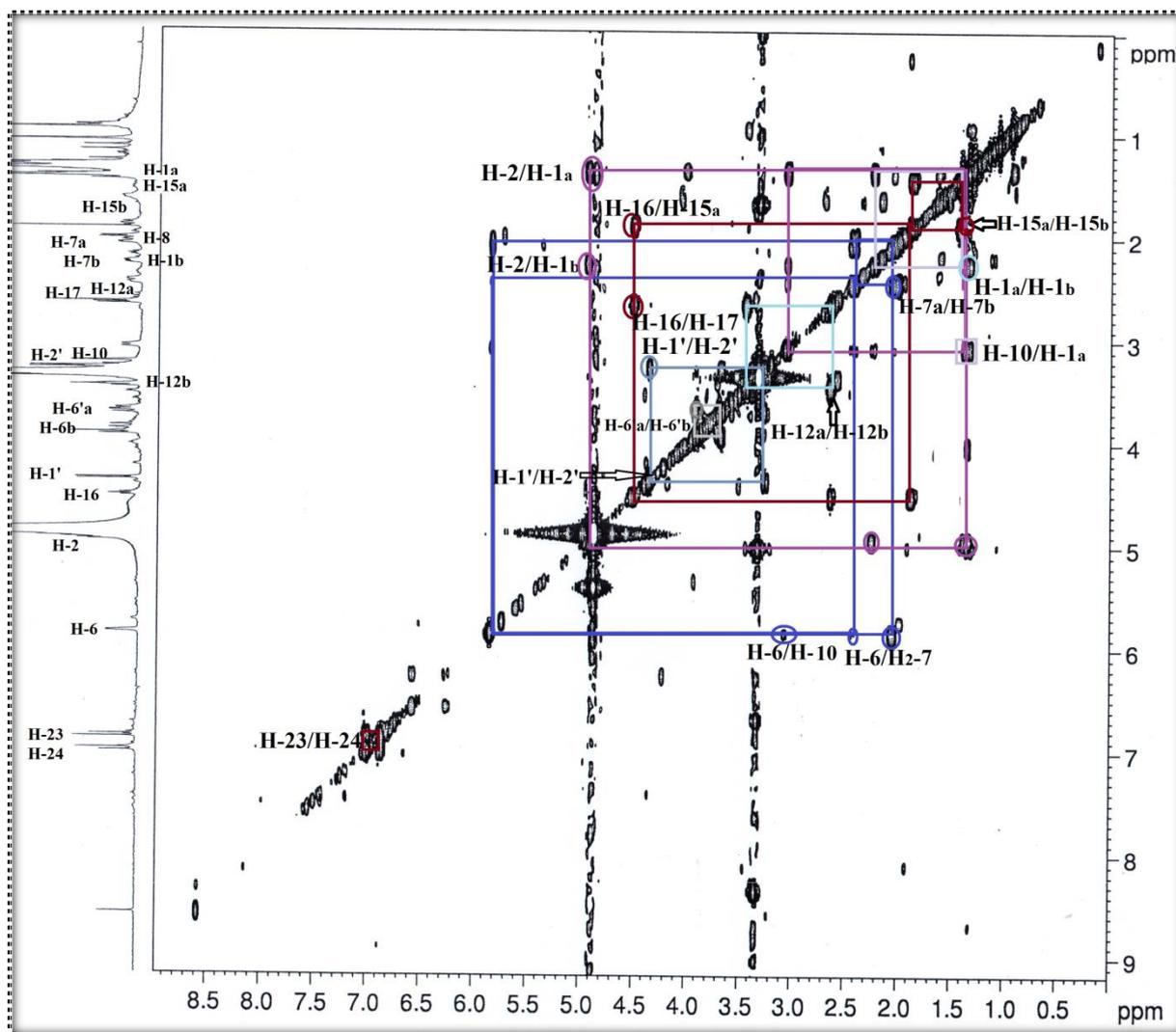


Figure III-126: Spectre COSY HH du composé GB-18

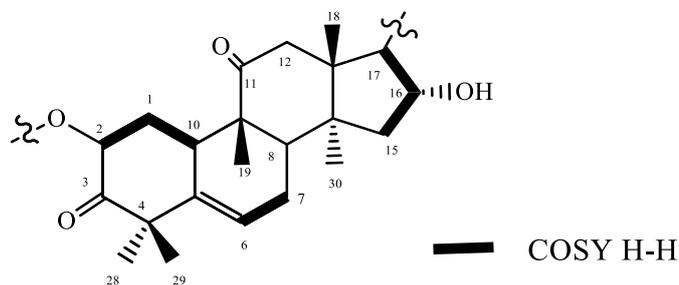


Figure III-126a: Corrélations COSY H-H de la partie aglycone du composé GB-18

Sur le spectre HMBC (Figures III-127 et III-127a), les protons des méthyles à δ_H 1,31 et δ_H 1,34 sont attribués aux méthyles CH_3 -28 et CH_3 -29, à partir de leurs corrélations avec :

- Un carbone oxygéné à 80,0 ppm, qui est le carbone C-2.
- Un carbonyle à 213,0 ppm, assigné au carbonyle C-3.
- Un carbone quaternaire à 51,0 attribué au carbone C-4.
- Un carbone quaternaire éthylénique à δ_C 142,0, attribué au C-5.

Le méthyle CH₃-19 à δ_H 1,07 et le méthylène CH₂-12 (δ_H 2,66/3,33, δ_C 49,0) sont déterminés par deux corrélations HMBC communes avec le deuxième carbonyle à 200,0 ppm attribué au C-11, et un carbone quaternaire à δ_C 49,0 attribué au C-9.

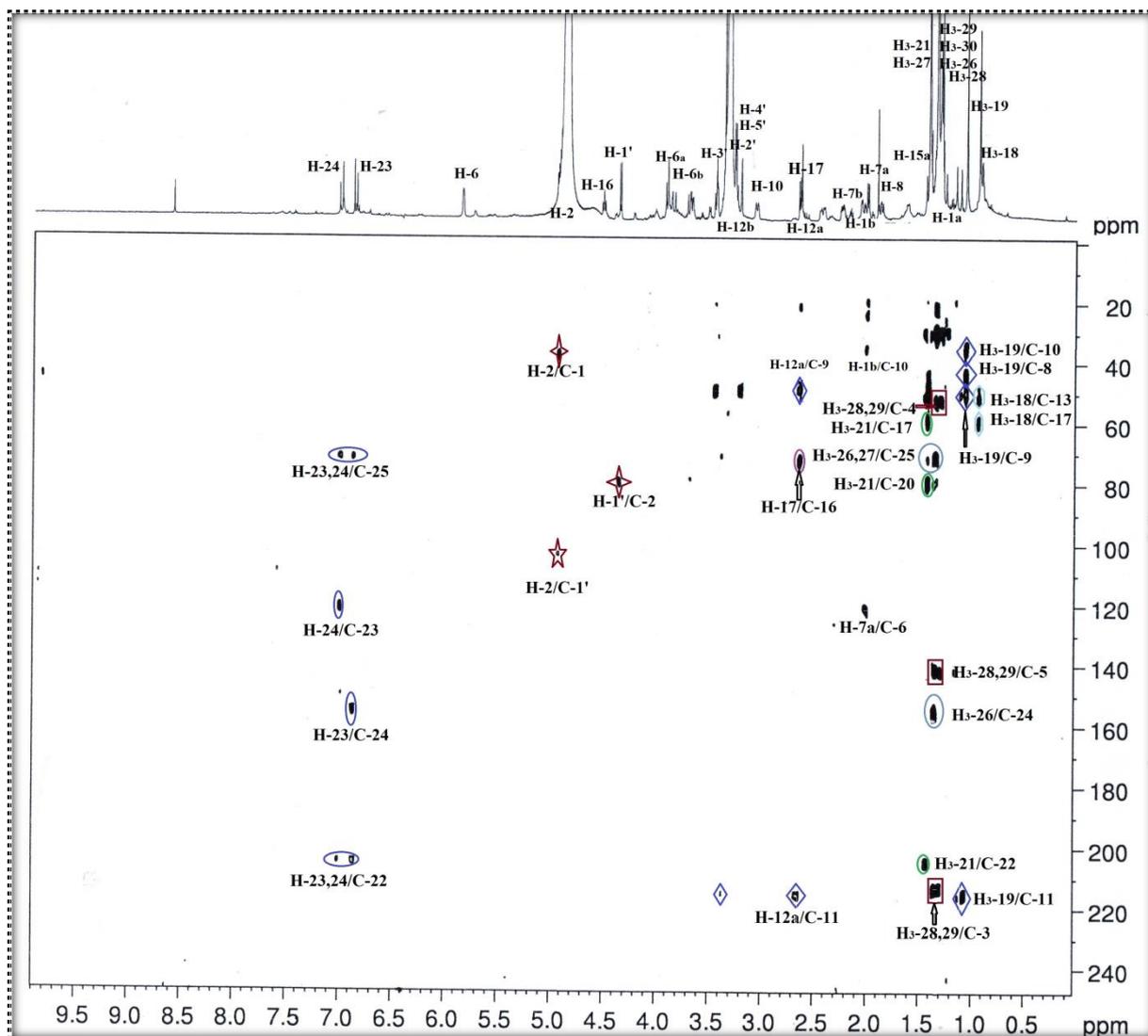


Figure III-127: Spectre HMBC du composé GB-18

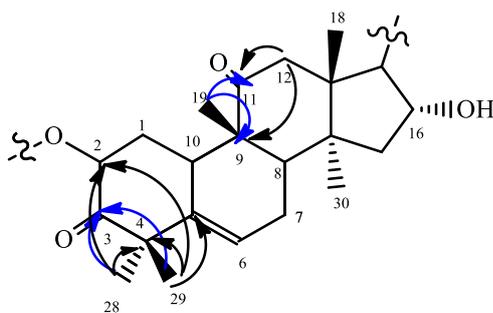


Figure III-127a: Corrélations HMBC du composé GB-17

Les signaux correspondant aux deux protons oléfiniques à δ_H 6,87 et à δ_H 7,00 ont des corrélations HMBC avec un carbone quaternaire oxygéné à δ_C 69,9 et un carbonyle à δ_C 204,6, ce qui permet de positionner la deuxième double liaison entre ces carbones (carbonyle et carbinol).

Le signal du groupement méthyle à δ_H 1,42 présente des corrélations HMBC avec le même carbonyle cité précédemment, un carbone quaternaire oxygéné à δ_C 79,3 et le carbone C-17 (δ_C 59,2).

Les deux méthyles restant à δ_H 1,35 et δ_H 1,42 montrent des corrélations HMBC identiques avec le carbone oxygéné à δ_C 69,9, les protons de l'un de ces deux méthyles corrélerent avec le carbone oléfinique à 154,4 ppm. Ces corrélations permettent de déterminer la chaîne alkyle de l'aglycone comme suit (Figure III-127b):

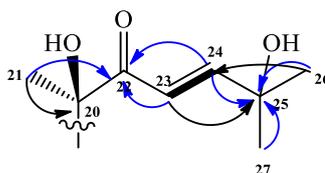


Figure III-127b: Corrélations HMBC de la chaîne alkyle du composé **GB-18**

A ce stade structural, la génine du composé **GB-18** est déterminée comme étant la cucurbitacine D, elle est connue comme un produit cytotoxique principal¹⁹⁵.

La partie osidique de ce composé est identique à la saponine précédente (**GB-17**), il s'agit le β -D-glucose, il est identifié par l'analyse des corrélations COSY H-H observées à partir de son doublet anomérique à δ_H 4,36 (*d*, $J = 7,9$ Hz), ainsi les protons H-2' δ_H 3,29 (*d*, $J = 9,1$ Hz), H-3' à δ_H 3,43 (*t*, $J = 8,6$ Hz), H-4' à δ_H 3,32 (*m*), H-5' à δ_H 3,30 (*m*) et H₂-6' à δ_H 3,71 (*dd*, $J = 11,2; 5,2$ Hz, H-6'a) et à δ_H 3,93 (*dd*, $J = 11,1; 2,2$ Hz, H-6'b) sont identifiés. Leurs carbones correspondants sont également localisés grâce à l'analyse du spectre HSQC: H-1' à δ_C 101,3, H-2' à δ_C 75,4, H-3' à δ_C 77,6, H-4' à δ_C 71,2, H-5' à δ_C 78,0 et H₂-6' à δ_C 62,3.

Enfin, par comparaison avec les données de la littérature le composé **GB-18** est identifié comme étant la cucurbitacine D 2-*O*- β -glucopyranoside nommée Arvenine III^{274,275,276}.

Les déplacements chimiques des protons et carbones constituant cette molécule, sont présentés dans le tableau suivant:

²⁷⁴ Yamada Y., Hagiwara K., Iguchi K., Suzuki S., Structures of arvenin I and II, bitter principles from *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae), New cucurbitacin glucosides, *Tetrahedron Letters* 24, 2099-2102, **1977**.

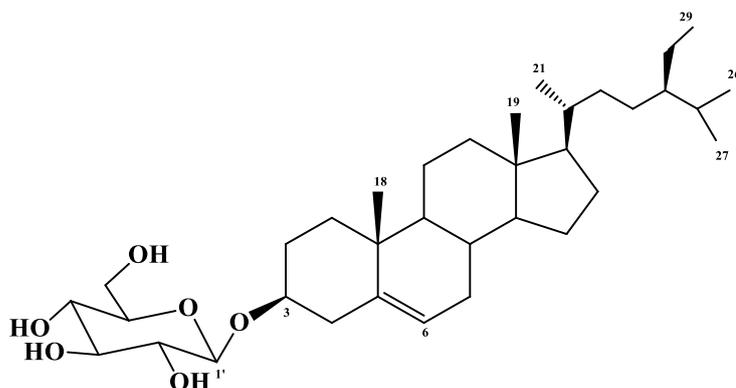
²⁷⁵ Stuppner H., Seligmann O., Wagner H., Minor cucurbitacin glycosides from *Picrorhiza kurrooa*, *Phytochemistry* 29(5), 1633-1637, **1990**.

²⁷⁶ Yamada Y., Hagiwara K., Iguchi K., Suzuki S., Hsu H., Isolation and structures of arvenins from *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae), New cucurbitacin glucosides, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26(10), 3107-3112, **1978**.

Tableau III-17: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **GB-18** dans MeOH-*d*₄

Position	δ_H <i>m J</i> (Hz)	δ_C
1	2,25 <i>m</i> 1,35 <i>m</i>	35,6
2	4,94 <i>m</i>	80,0
3	-	213,0
4	-	51,0
5	-	142,0
6	5,85 <i>sl</i>	121,4
7	2,07 <i>m</i>	24,6
	2,45 <i>dd</i> (20,0; 6,0)	
8	2,01 <i>d</i> (7,6)	43,9
9	-	49,0
10	3,07 <i>d</i> (11,8)	34,4
11	-	215,0
12	2,66 <i>m</i> 3,33 <i>m</i>	49,0
13	-	50,1
14	-	50,0
15	1,44 <i>m</i> 1,89 <i>m</i>	46,2
16	4,52 <i>t</i> (7,3)	70,8
17	2,65 <i>d</i> (7,1)	59,2
18	0,95 <i>s</i>	20,1
19	1,07 <i>s</i>	20,0
20	-	79,3
21	1,42 <i>s</i>	19,9
22	-	204,6
23	6,87 <i>d</i> (16,0)	119,5
24	7,00 <i>d</i> (16,0)	154,4
25	-	69,9
26	1,35 <i>s</i>	29,7
27	1,42 <i>s</i>	25,9
28	1,31 <i>s</i>	20,2
29	1,34 <i>s</i>	32,0
30	1,35 <i>s</i>	20,1
Glucose		
1'	4,36 <i>d</i> (7,9)	101,3
2'	3,29 <i>d</i> (9,1)	75,4
3'	3,43 <i>t</i> (8,9)	77,6
4'	3,32 <i>m</i>	71,2
5'	3,30 <i>m</i>	78,0
6'	3,71 <i>dd</i> (11,2; 5,2) 3,93 <i>dd</i> (11,1; 2,2)	62,3

3.3.3. Composé GB-19



Le composé **GB-19** est soluble dans un mélange de chloroforme/méthanol (1/1), il est invisible sur la CCM à la lumière UV (254 et 365 nm) et se colore en bleu-violet après la révélation par le sulfate de cérium et chauffage.

Son spectre de masse ESI obtenu en mode positif (Figure III-128) présente deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 599,234 $[M+Na]^+$ et à m/z 1175,493 $[2M+Na]^+$, soit une masse de 576 uma, correspondant à la formule brute $C_{35}H_{60}O_6$.

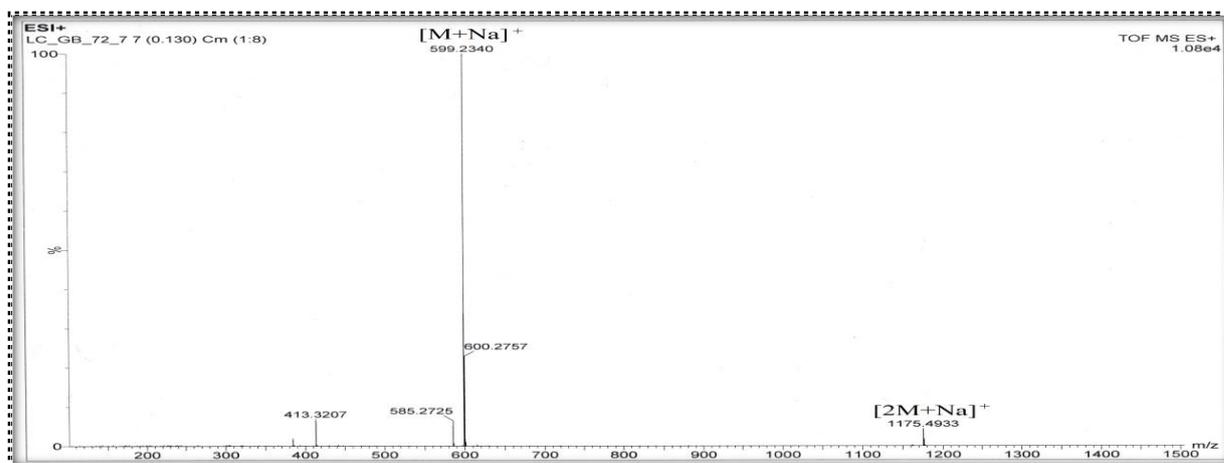


Figure III-128: Spectre de masse ESI⁺ du composé **GB-19**

Le spectre de RMN ¹H enregistré dans la pyridine-*d*₅ (Figure III-129) indique la présence des signaux typiques d'un stérol glycosylé. Sur ce spectre, on observe :

- Un ensemble de signaux méthyliques à champ fort entre 0,65 et 1,00 ppm.
- Des raies de résonances entre 3,90 et 5,20 ppm, caractéristiques d'un glucose dont le doublet à 5,04 ppm est attribuable au proton anomérique.
- Un signal plus déblindé à 5,36 ppm (1H, *sl*) correspond à un proton oléfinique.

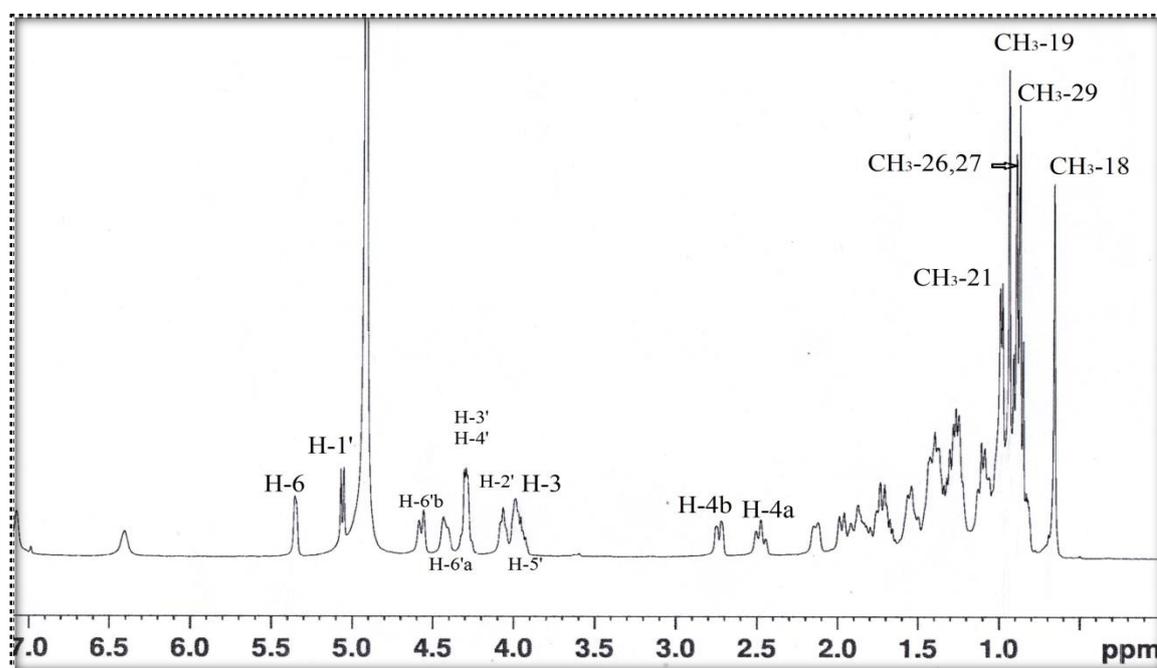


Figure III-129: Spectre RMN ^1H du composé GB-19

L'analyse de l'intervalle de 0,60 à 1,00 ppm, nous a permis de distinguer un squelette stéroïdique à travers les protons méthyliques suivants :

- Les deux singulets d'intensité 3H correspondant aux deux méthyles $\text{CH}_3\text{-18}$ et $\text{CH}_3\text{-19}$ à δ_{H} 0,67 et à δ_{H} 0,93, respectivement.
- Les deux signaux sous forme de doublet à δ_{H} 1,00 (d , $J = 6,5$ Hz, 3H) et à δ_{H} 0,87 (d , $J = 7,0$ Hz, 6H), sont caractéristiques aux groupements méthyles $\text{CH}_3\text{-21}$, $\text{CH}_3\text{-26}$ et $\text{CH}_3\text{-27}$, respectivement.
- Enfin, le triplet apparaissant à δ_{H} 0,86 (t , $J = 7,5$ Hz) est attribué au méthyle $\text{CH}_3\text{-29}$.

En plus de ces groupements méthyles, le spectre de RMN ^1H permet d'identifier

- Le proton oléfinique H-6 dont le signal apparaît à δ_{H} 5,36 (1H, sl).
- Le proton H-3 dont le signal résonne à δ_{H} 3,95 (1H, m) sous forme d'un multiplet.
- Le massif de protons dans la zone blindée est attribué aux protons des groupements méthylènes et méthines. La génine est donc identifiée comme étant le β -sitostérol, par comparaison de ces données avec celles de la littérature^{277,278}.

La partie osidique est caractérisée par son proton anomérique situé à 5,04 ppm (d , $J = 7,7$ Hz), la valeur élevée de la constante de couplage indique une configuration β . Le spectre RMN ^1H montre aussi les cinq protons osidiques à δ_{H} 3,97 (1H, m , H-5'), 4,07 (1H, t , $J = 7,7$ Hz, H-

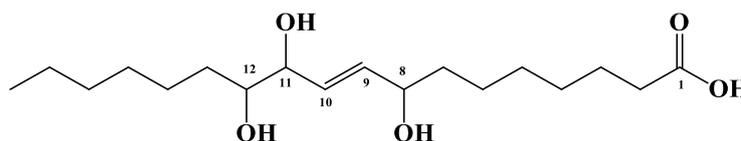
²⁷⁷ Rai N. P., Adhikari B. B., Arjun Paudel., K. Masuda, R. D. Mckelvey and M. D. Manandhar, Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin, *Journal of Nepal Chemical Society* 21, 1-7, 2006.

²⁷⁸ Kojima H., Sato N., Hatano A., Ogura H., Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry* 29, 2351-2355, 1990.

2'), 4,31 (2H, *m*, H-3' et H-4'), 4,45 (1H : *m*, H-6'a) et 4,59 (1H : *dd*, $J = 11,5, 2,5$ Hz, H-6'b). La comparaison de ces données avec celles de la littérature indique qu'il s'agit d'un β -D-glucopyranose.

L'ensemble de ces analyses et la comparaison avec les données rapportées dans la littérature^{279,280}, attestent que la structure de ce stérol est β -sitostérol 3- β -O-D-glucoside ou daucostérol.

4. Composé GB-20



Le composé **GB-20** a été isolé sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol, invisible à la lumière UV (254 nm), et se colore en mauve claire après révélation par une solution d'acide de sulfate de cérium et chauffage.

L'analyse du spectre de masse en source ESI (mode positif) de ce composé (Figure III-130) permet d'observer deux pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 353,2855$ $[M+Na]^+$ et à $m/z = 683,6467$ $[2M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 330 uma, en accord avec la formule $C_{18}H_{34}O_5$, soit un nombre d'insaturation égal à 2.

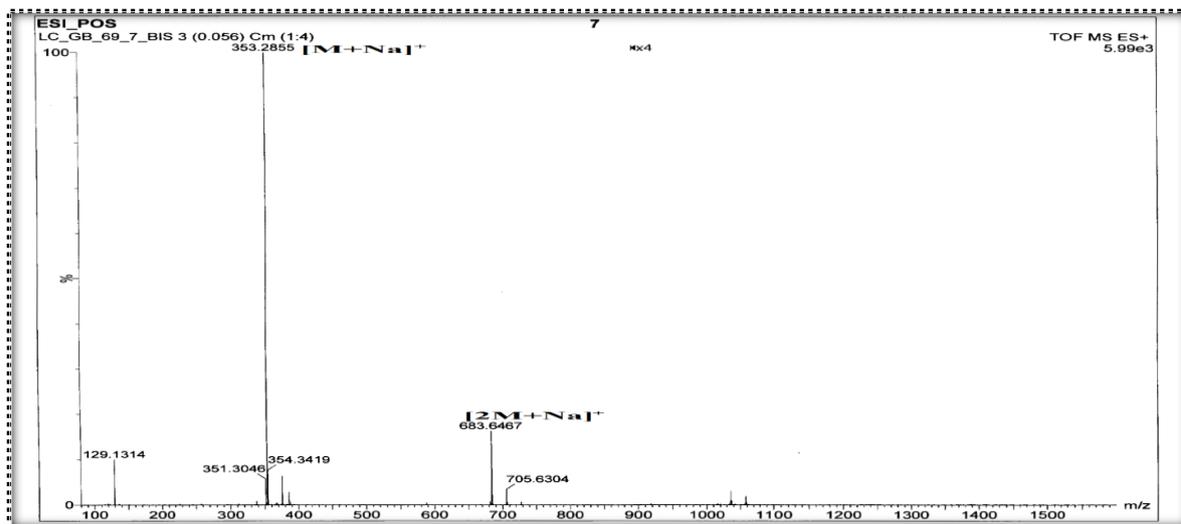


Figure III-130: Spectre de Masse ESI du composé **GB-20**

²⁷⁹ Wang Y., Lai D., Zhang Y., Kang A., Cao Y., Sun W., Study of steroidal saponins in *Dioscorea Zingiberensis* C.H.W right, *Journal of Natural Products* 2, 123-132, 2009.

²⁸⁰ Li J., Kadoda S., Kawata Y., Hattori M., Xu G-J., Namba T., Constituents of the roots of *Cynanchum bungei* Decne, Isolation and structures of four new glucosides, bungeiside-A, B, C and D, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40(12), 3133-3137, 1992.

Le spectre RMN ^1H (Figure III-131) de ce composé, enregistré dans le $\text{MeOH-}d_4$, montre la présence de l'ensemble des signaux suivants :

- Deux signaux à δ_{H} 5,75 (1H, *dd*, $J = 15,5; 5,9$ Hz) et à δ_{H} 5,70 (1H, *dd*, $J = 15,0; 5,9$ Hz) sont attribués aux protons oléfiniques d'une double liaison de configuration *trans*.
- Trois signaux à δ_{H} 3,44 (1H, *m*), à δ_{H} 3,93 (1H, *t*, $J = 5,9$ Hz) et à δ_{H} 4,09 (1H, *dd*, $J = 6,0; 5,4$ Hz), relatifs aux trois groupements oxyméthines.
- Un signal sous forme d'un triplet à δ_{H} 2,29 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz) d'intégration de deux protons attribuable, au groupement méthylène.
- Un signal élargi à δ_{H} 1,37 (*m*) correspondant à une longue chaîne aliphatique $-(\text{CH}_2)_n-$.
- En fin, un signal sous forme d'un triplet d'intégration de trois proton à δ_{H} 0,94 (3H, *t*, $J = 7,4$ Hz), attribué au méthyle terminal.

Ces données montrent un profil typique d'un acide gras pour le composé **GB-20**.

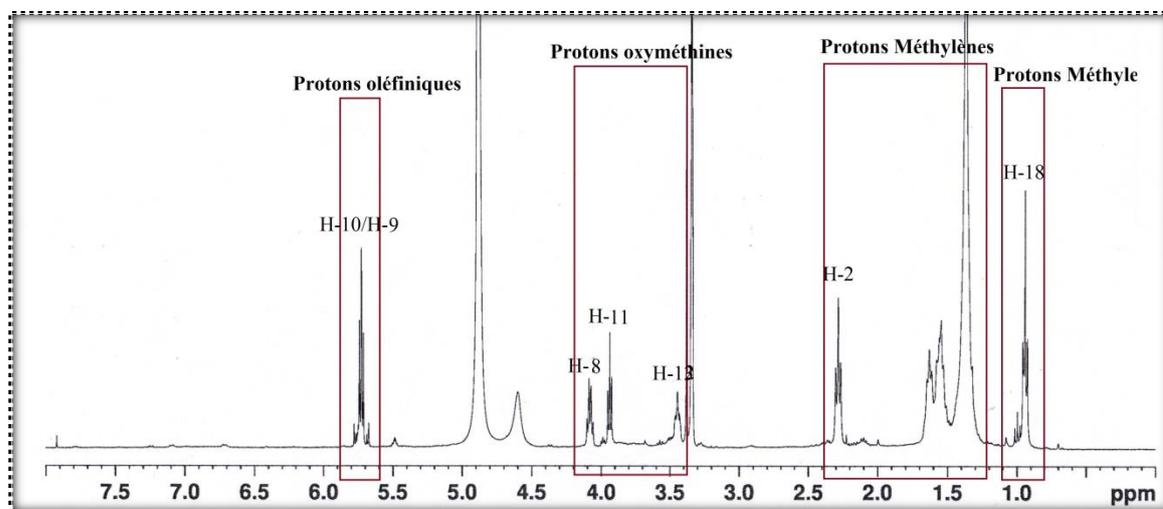


Figure III-131: Spectre RMN ^1H du composé **GB-20**

L'analyse du spectre COSY H-H (Figures III-132 et III-132a) permet de distinguer les systèmes de spins suivants:

- Le premier proton oléfinique à δ_{H} 5,75 couple avec le proton oxyméthine le plus déblindé (δ_{H} 4,09), ce dernier présente une corrélation avec les protons d'un groupement méthylène à δ_{H} 1,54 (2H, *m*).
- Le deuxième proton oléfinique à δ_{H} 5,70 présente une corrélation avec l'oxyméthine à δ_{H} 3,93, qui à son tour couple avec le troisième oxyméthine le plus blindé à δ_{H} 3,44. Ce proton oxyméthine présente un couplage avec les protons non équivalents d'un groupement méthylène à δ_{H} 1,37 et à δ_{H} 1,54.

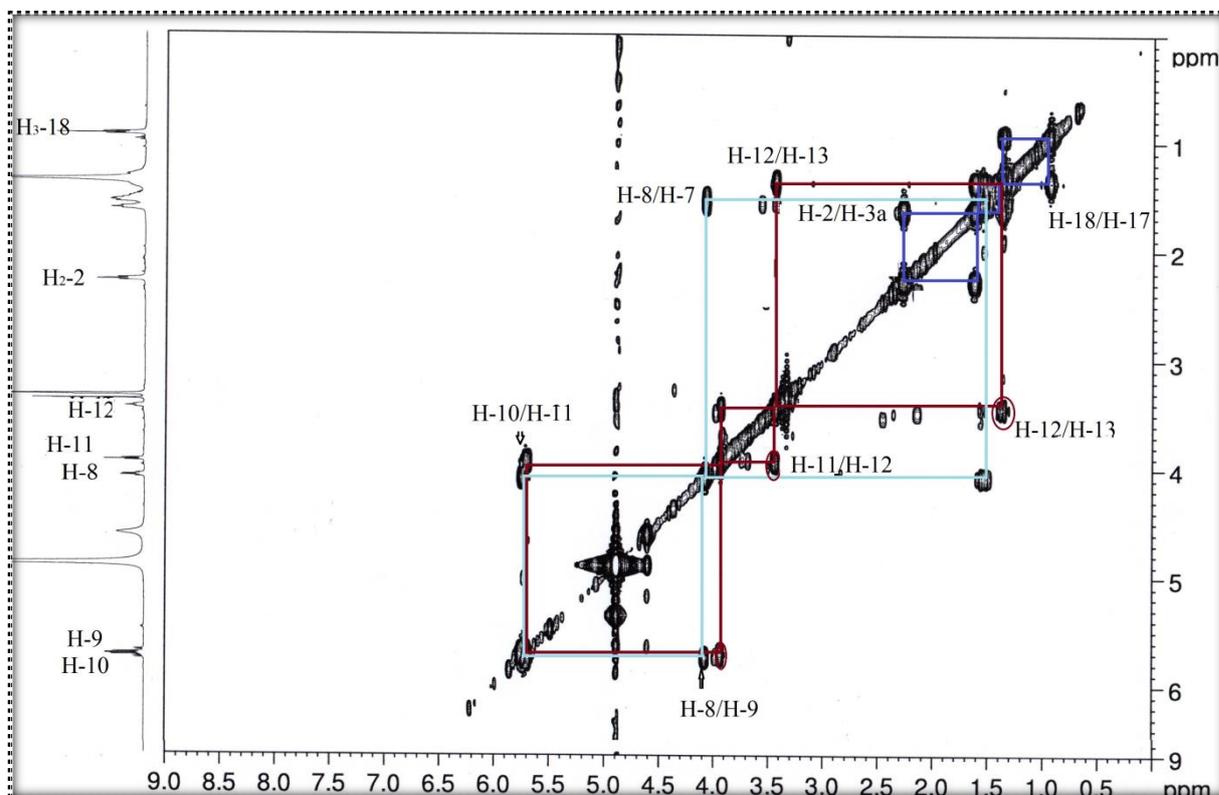


Figure III-132: Spectre COSY H-H du composé **GB-20**

Ces corrélations (Figure III-132a) indiquent que ce composé est un acide gras acyclique en C-18 et contient au moins une double liaison sur sa chaîne aliphatique.

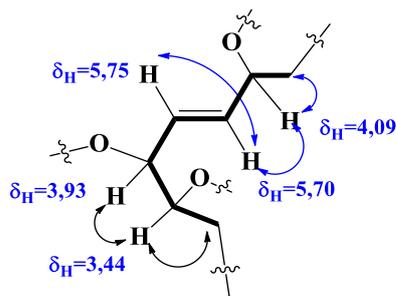


Figure III-132a: Corrélations COSY H-H du composé **GB-20**

Le spectre HSQC (Figure III-133) permet de lier tous les protons identifiés précédemment à leurs carbones :

- Les deux protons oléfiniques à δ_H 5,75 et δ_H 5,70 avec leurs carbones à δ_C 135,0 et δ_C 129,6, respectivement.
- Les trois protons oxyméthines à δ_H 4,09, δ_H 3,93 et δ_H 3,44 avec leurs carbones à δ_H 71,9, δ_H 75,1 et δ_H 74,6, respectivement.
- Les trois protons d'un groupement méthyle à δ_H 0,94 et leur carbone à δ_C 13,6.
- Les deux protons d'un groupement méthylène à δ_H 2,29 et leur carbone à δ_C 36,2.

- Les protons aliphatiques à δ_H 1,37 et leurs carbones à δ_C 26,0-28,0.
- Les protons méthylènes non équivalents à δ_H 1,37 et à δ_H 1,54 et leur carbone à δ_C 32,1.

L'expérience HMBC (Figure III-134) permet de confirmer la présence des fragments identifiés, précédemment, par les corrélations suivantes :

- Entre le proton éthylénique à δ_H 5,75 et les deux carbinols à 71,9 ppm et 75,1 ppm.
- Entre le 2^{ème} proton éthylénique à δ_H 5,70 et les trois carbinols (δ_C 71,5, 74,6 et 75,1)
- Le proton oxyméthine à δ_H 3,93 et le carbinol à δ_H 74,6.

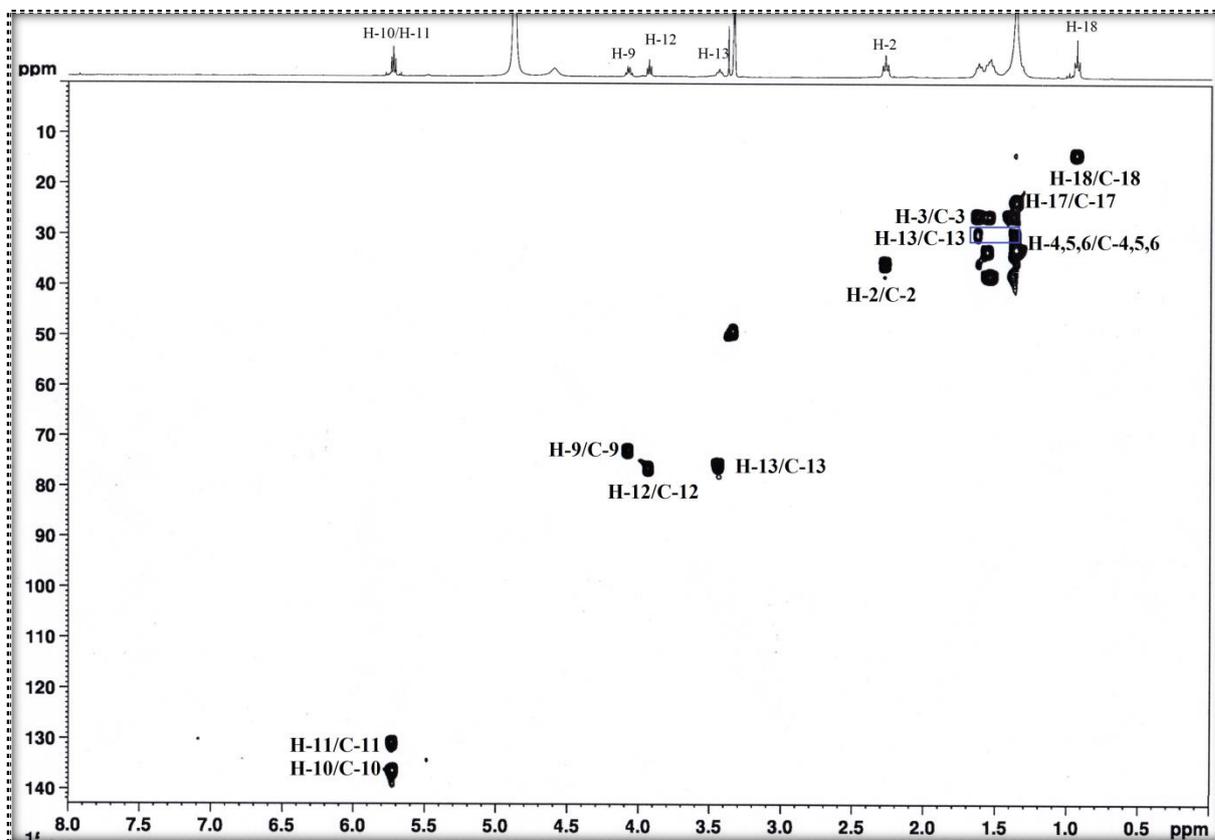


Figure III-133: Spectre HSQC du composé **GB-20**

A partir des protons du méthyle terminal CH_3 -18, le spectre HMBC a permis de déterminer les déplacements chimiques des deux carbones adjacents à δ_C 22,5 (δ_H 1,37) et à δ_C 32,1 (δ_H 1,37), ces derniers attribués à CH_2 -17 et CH_2 -16, respectivement.

Les protons de deux groupements méthylènes à δ_H 2,29 (δ_C 36,2) et à δ_H 1,62 (δ_C 26,0) corréleront en HMBC (Figures III-134 et III-134a) avec un carbonyle à 177,8 ppm, valeur caractéristique d'une fonction acide. Ces corrélations permettent d'identifier les carbones C-1, C-2 et C-3 à δ_C 177,8, à δ_C 36,2 et à δ_C 26,0, respectivement.

- Le proton oxyméthine à δ_H 4,09 révèle des corrélations en HMBC avec les deux carbones méthylènes à δ_C 36,6 et à δ_C 23,9.

- Le proton oxyméthine à δ_H 3,93 corrèle sur le spectre HMBC ($^3J_{H-C}$) avec le carbone méthylène à δ_C 32,0.
- De la même façon, le proton oxyméthine à 3,40 ppm présente une corrélation ($^3J_{H-C}$) avec le carbone méthylène à 24,9 ppm.

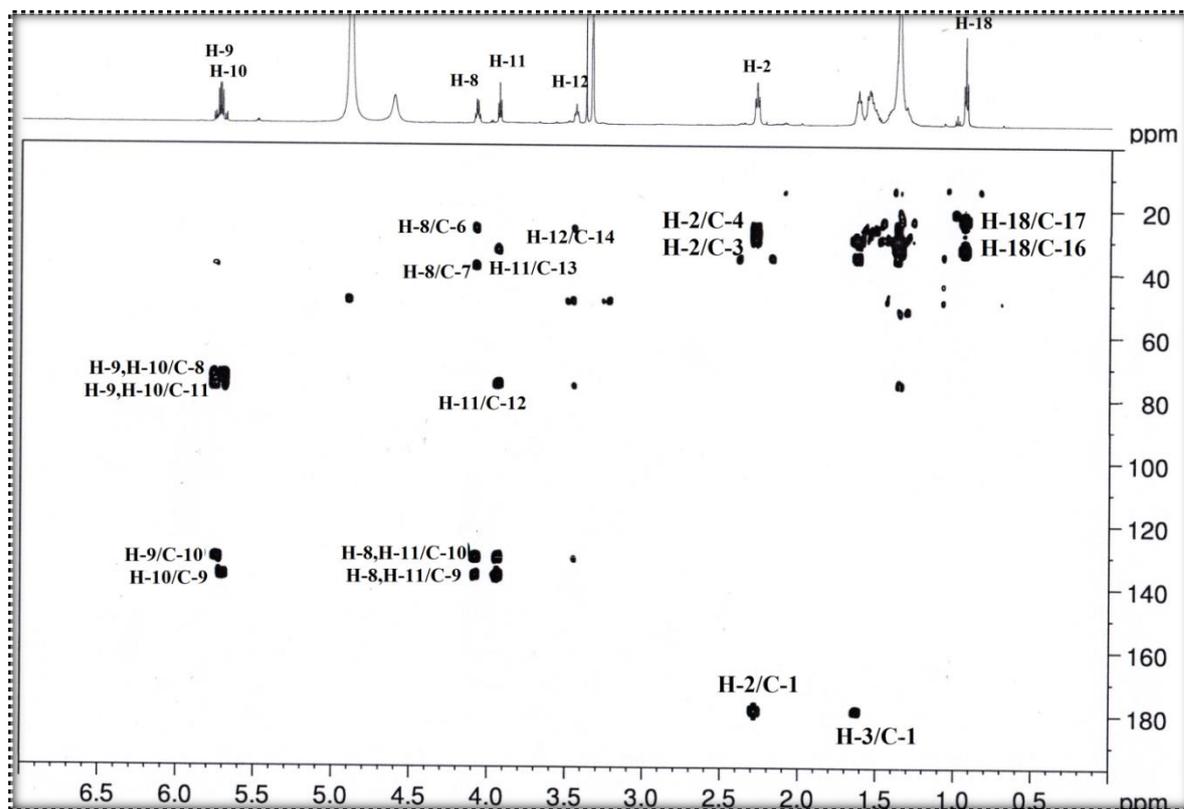


Figure III-134: Spectre HMBC du composé GB-20

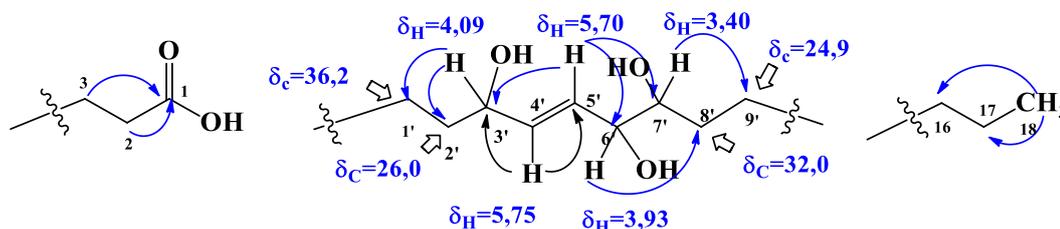
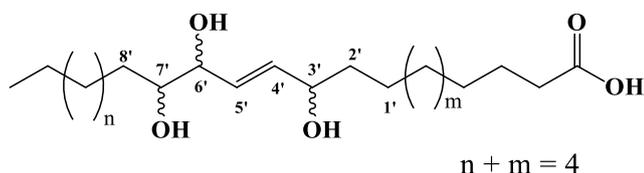


Figure III-134a: Corrélations HMBC du composé GB-20

Toutes ces informations spectroscopiques permettent d'identifier le composé **GB-20** comme étant un oxylipine avec trois fonctions hydroxyles et une double liaison^{281,282}.

²⁸¹ Fiorentino A., D'Abrosca B., DellaGreca M., Izzo A., Natale A., Pascarella M.T., Pacifico S., Zarrelli A., Monaco P., Chemical characterization of new oxylipins from *Cestrum parqui*, and their effects on seed germination and early seedling growth, *Chemistry & Biodiversity* 5, 1780-1790, 2008.

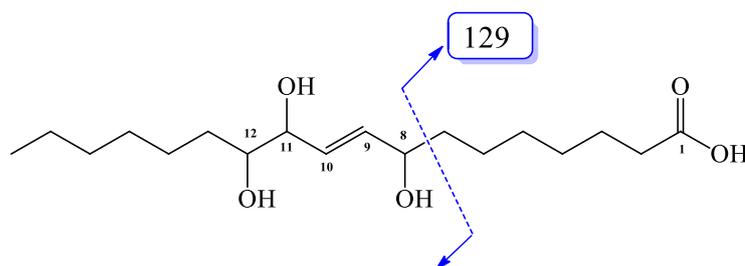
²⁸² Toshiaki Sunazuka, Tatsuya Shirahata, Kiminari Yoshida, Daisuke Yamamoto, Yoshihiro Harigaya, Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Haruki Yamada, Isao Kuwajima, Satoshi Omura, Total synthesis of pinelllic acid, a potent oral adjuvant for nasal influenza vaccine, Determination of the relative and absolute configuration, *Tetrahedron Letters* 43, 1265-1268, 2002.



L'enchaînement des fragments identifiés (Figure III-134a) ainsi la position de la double liaison suggérés par la comparaison avec les données de la littérature.

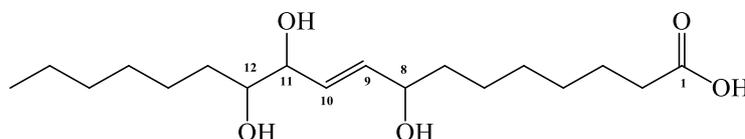
La recherche bibliographique sur les oxylipines connus en C-18, nous oriente vers deux structures probables où la double liaison est en position C-9 (acide tianshique) ou C-10 (acide pinéllique).

Le pic de fragmentation à $m/z = 129,1314 [(M+Na) - 224]^+$ apparait sur le spectre de masse (Figure III-135) pourra attribuer à la perte du fragment $(CH_2)_6COOH$, et par conséquence la double liaison est portée sur le carbone C-9.



La comparaison des données spectroscopiques entre les structures visées révèle que la position probable est celle en C-9.

L'ensemble de ces données nous permet ainsi d'établir la structure de **GB-20** comme étant l'acide (9E)-8,11,12-trihydroxyoctadecénoïque, nommé acide tianshique^{281-283,284}.



Le composé **GB-20** a déjà été identifié, antérieurement, dans plusieurs espèces telles que *Sambucus williamsii* (Caprifoliaceae), *Chromolaena odorata* (Asteraceae), *Boehmeria nivea* (Urtiaceae) et *Allium fistulosum* L. (Liliaceae)^{283,285,286,287}. Il est détecté ici pour la première fois dans le genre *Galium*.

²⁸³ Yang X., Wong M., Wang N., Chan A.S-C., Yao X., A New Eudesmane Derivative and a New Fatty Acid Ester from *Sambucus williamsii*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 54(5), 676-678, **2006**.

²⁸⁴ Al-Qudah M. A., Abu Zarga M. H., Chemical constituents of *Sisymbrium irio* L. from Jordan, *Natural Product Research* 24(5), 448-456, **2010**.

²⁸⁵ Sang S., Lao A., Wang Y., Chin C-K., Rosen R.T., Ho C-T., Antifungal constituents from the seeds of *Allium fistulosum* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22), 6318-6321, **2002**.

²⁸⁶ Zhang M-L., Irwin D., Li X-N., Sauriol F., Shi X-W., Wang Y-F., Huo C-H., Li L-G., Gu Y-C., Shi Q-W., PPAR γ Agonist from *Chromolaena odorata*, *Journal of Natural Products* 75(12), 2076-2081, **2012**.

²⁸⁷ Xu Q-M., Liu Y-L., Li X-R., Li X., Yang S-L., Three new fatty acids from the roots of *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich and their antifungal activities, *Natural Product Research* 25(6), 640-647, **2011**.

Les déplacements chimiques de ses protons et carbones sont présentes dans le tableau III-18 suivant:

Tableau III-18: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **GB-20** dans CD_3OD

Position	δ_{H} <i>m J(Hz)</i>	δ_{C}
1	-	177,8
2	2,29 <i>t</i> (7,2)	36,2
3	1,62 <i>m</i>	26,0
4	1,37 <i>m</i>	nd
5	1,37 <i>m</i>	nd
6	1,37 <i>m</i>	23,9
7	1,54 <i>m</i>	36,6
8	4,09 <i>dd</i> (6,0; 5,4)	71,9
9	5,75 <i>dd</i> (15,5; 5,9)	135,0
10	5,70 <i>dd</i> (15,0; 5,9)	129,6
11	3,93 <i>t</i> (5,9)	75,1
12	3,40 <i>m</i>	74,6
13	1,37 <i>m</i> 1,54 <i>m</i>	32,0
14	1,37 <i>m</i>	24,9
15	1,37 <i>m</i>	nd
16	1,37 <i>m</i>	32,1
17	1,37 <i>m</i>	22,5
18	0,94 <i>t</i> (7,4)	13,6

Conclusion et perspectives

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une actualité brûlante malgré son ancienneté. Les sujets dans ce domaine ne manquent donc pas, et chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacochimiques originales à valoriser.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche des Laboratoire de LCCE et ICB dont les objectifs sont de découvrir de nouveaux métabolites à partir d'espèces végétales terrestres et marines, de développer des techniques analytiques destinées à optimiser la recherche sur les plantes, et de la mise en évidence de différents traceurs spécifiques et chimio-taxonomiques caractérisant chaque espèce.

Notre étude phytochimique a été réalisée sur deux plantes : *Galium brunneum*, espèce terrestre endémique de la région des Aurès, et *Cymodocea nodosa*, espèce marine de la Méditerranée.

Une étude bibliographique approfondie sur l'espèce *Cymodocea nodosa* a montré que les données phytochimiques disponibles se limitaient aux parties aériennes et c'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'explorer les rhizomes de cette plante. La majorité des composés reportés dans cette espèce sont des stérols et des composés phénoliques.

Notre étude phytochimique a conduit à la séparation, à la purification, et à l'élucidation de sept composés correspondant, principalement, à un terpène, à un phénol et cinq flavonoïdes. Parmi ces composés, cinq sont isolés pour la première fois dans la flore marine dont deux sont des flavonoïdes prénylés nouveaux : cymodioside A et cymodioside B. Les flavonoïdes glycosylés peuvent être considérés comme des critères de chimiotaxonomie pour la plupart de plantes terrestres et de nombreuses plantes marines, cependant, les flavonoïdes prénylés qui n'ont auparavant été mis en évidence que dans quelques familles terrestres sont présentés ici dans le règne marin, ils pourraient en faire des marqueurs chimiotaxonomiques de valeur. La configuration absolue de cymodioside A a été déduite par des spectres de dichroïsme circulaire d'une part, et grâce à des considérations biosynthétiques d'autre part. L'utilisation du modèle de Moscher a permis de déterminer la configuration absolue du composé phénolique, isolé ici pour la fois comme un dérivé naturel.

L'étude phytochimique du *Galium brunneum*, une espèce endémique non étudiée, appartenant à la famille des Rubiacées, a permis d'isoler à partir de deux extraits AcOEt et BuOH de la partie aérienne vingt-et-un composés naturels dont dix n'ont été jamais décrits dans le genre *Galium*.

Les composés isolés appartiennent à cinq classes de métabolites secondaires : flavonoïdes (cinq composés), lignanes (six composés), iridoïdes (six composés), saponines (trois composés), et un lipide.

La présence majoritaire d'iridoïdes glucosylés confirme qu'ils sont bien de marqueurs chimio-taxonomiques des Rubiacées et du *Galium* en particulier. Les six composés identifiés (**GB-11** à **GB-16**) sont des glucosides de l'iridane. Les différences structurales de ces iridoïdes résident dans les substituants estérifiant les positions 10 et 11 de la génine iridane.

Les flavonoïdes étant aussi identifiés majoritairement dans cette espèce, leur présence n'est pas surprenante dans la mesure où ces composés sont fréquemment isolés dans d'autres espèces, les flavonoïdes *O*-glucosylés (**GB-3** et **GB-4**) sont très répandus dans les Rubiaceae. Contrairement, le dérivé *C*-glucosylé (**GB-1**) est rare dans cette famille et il y est isolé ici pour la première fois.

Trois saponosides ont été identifiés dont deux composés **GB-17** et **GB-18** à squelette cucurbitacine, le hexanorcucurbitacine D 2-*O*- β -glucopyranoside et le cucurbitacine D 2-*O*- β -glucopyranoside, sont décrits pour la première fois dans la famille Rubiaceae.

La méthodologie de purification de ces deux espèces a été, essentiellement, fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports chromatographiques (couche mince (CCM), colonne de silice, cartouche (SPE), exclusion moléculaire Sephadex LH-20, liquide sous vide (VLC) et liquide de haute performance (CLHP)).

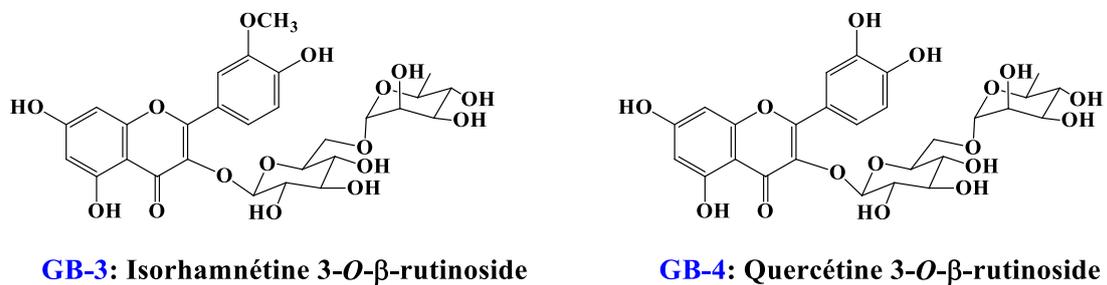
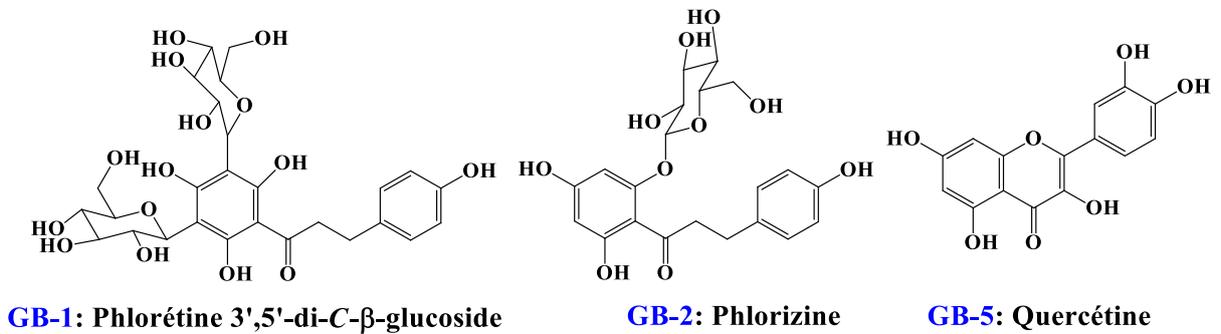
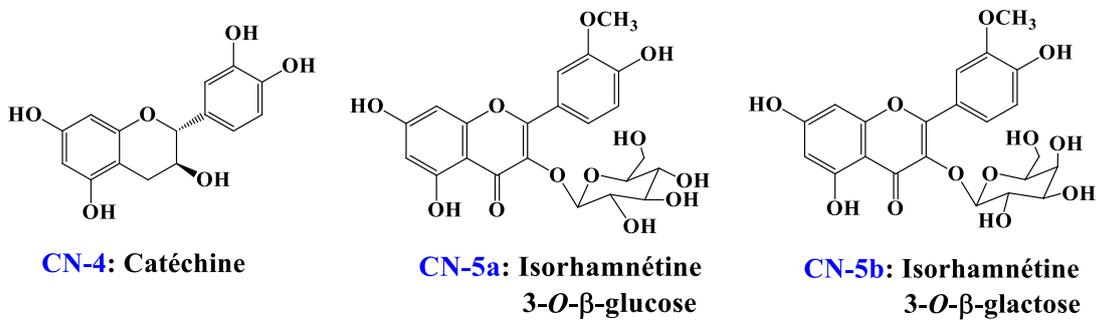
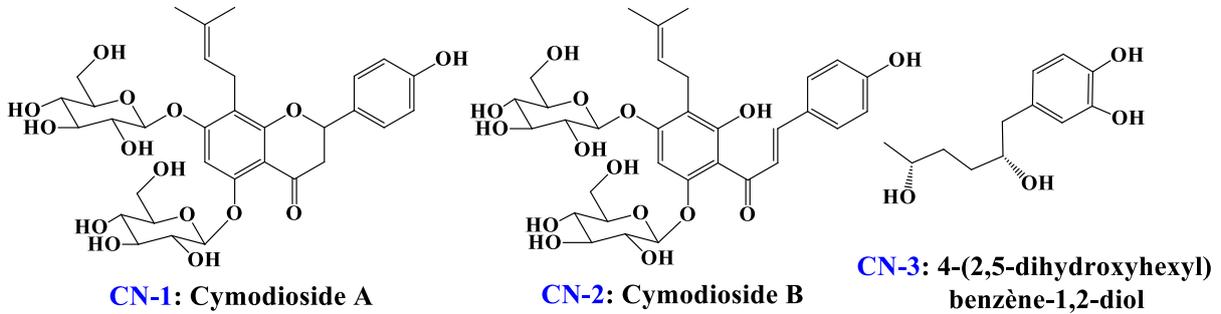
La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie infrarouge (IR), la spectroscopie de masse (SM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

L'étude phytochimique est loin d'être complète, et nous pouvons penser que d'autres analogues triterpéniques sont présents dans la plante terrestre *Galium brunneum* dont certains sont potentiellement originaux.

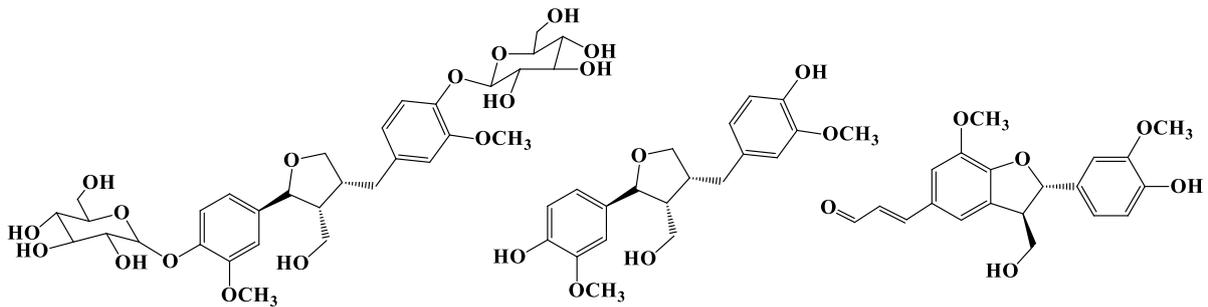
Malgré les résultats des études phytochimiques antérieures sur l'espèce *Galium breunnum* attestant de la présence d'anthraquinones dans de nombreuses espèces du *Galium*, aucun composé de cette classe n'a été détecté ou isolé lors de ce travail. Il aurait été utile d'étudier les racines de cette plante.

Les différents composés isolés des deux espèces étudiées:

1. Flavonoïdes



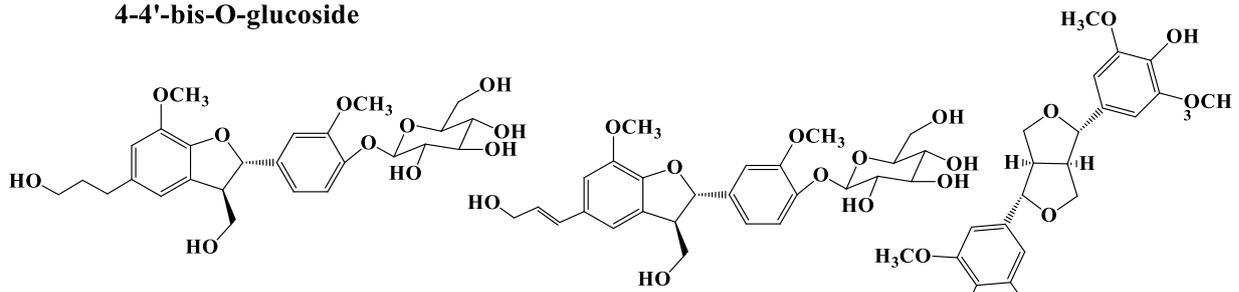
2. Lignanes



GB-6: (7*S*,8*R*,8'*R*)-(-)-Laricirésinol
4-4'-bis-O-glucoside

GB-7: Laricirésinol

GB-8: Balanophonine

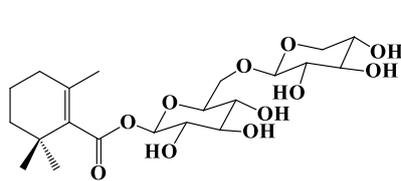


GB-9a: Dihydrodehydrodiconiféryl
alcool 4-O-glucoside

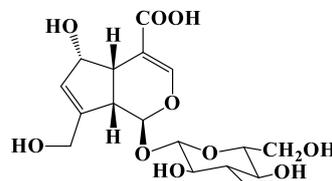
GB-9b: Dehydrodiconiféryl
alcool 4-O-glucoside

GB-10: Syringarésinol

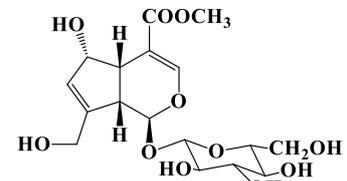
3. Monoterpènes



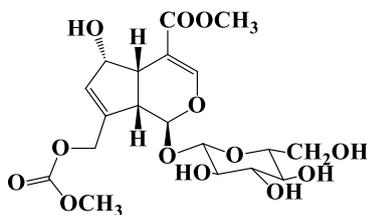
CN-6: Jasminoside M



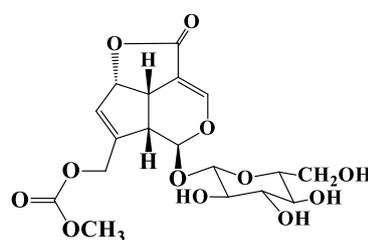
GB-11 Acide désacétyl
aspérulosidique



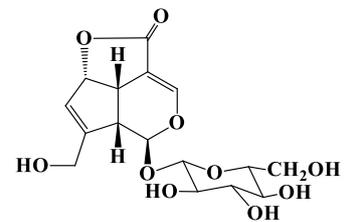
GB-12 Désacétyldaphylloside



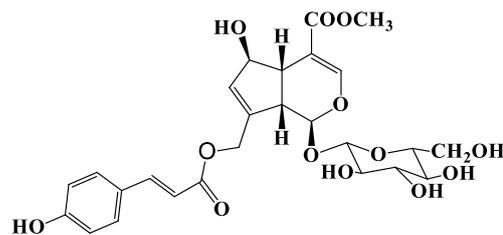
GB-13: Daphylloside



GB-14: Aspéruloside

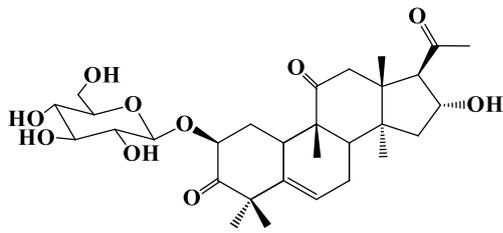


GB-15: Désacétylaspéruloside

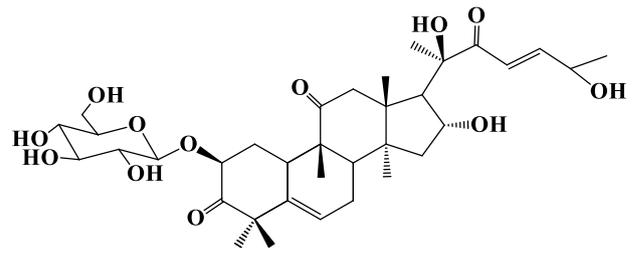


GB-16: 10-*O*-*trans* *p*-coumaroylscandoside

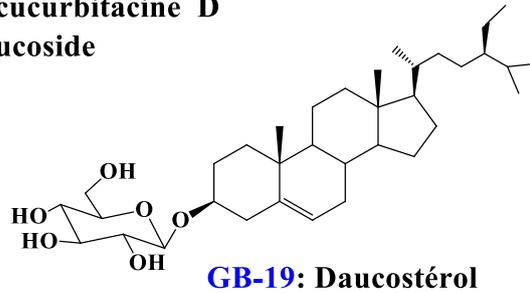
4. Saponines



**GB-17: Hexanorcucurbitacine D
2-O-β-glucoside**

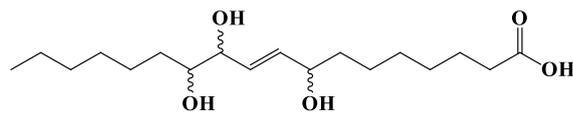


GB-18: Arvénine III



GB-19: Daucostérol

5. Oxylipine



GB-20: Acide (9E)-8,11,12-trihydroxyoctadécénique

L'ensemble de ces résultats obtenus sur ces deux plantes associées à la recherche bibliographique démontrent l'intérêt de ces études et permettent de dégager quelques perspectives:

- Poursuivre la purification et l'identification d'autres métabolites secondaires des espèces contenus dans les extraits des plantes étudiées.
- Etudier les activités biologiques des extraits mis en jeu ainsi que les produits purs isolés.
- Poursuivre la collaboration avec le laboratoire de Chimie et Chimie Biomoléculaire ICB (CNR, Naples) afin de valoriser le potentiel chimique d'autres plantes marines de la Méditerranée.

Chapitre IV

Partie expérimentale

1. Matériels et appareillage

Le détail sur le protocole d'extraction, de séparation et de purification pour les deux espèces *Cymodocea nodosa* et *Galium brunneum* sera montré, respectivement, dans ce chapitre. Les extraits organiques obtenus ont été fractionnés sur des colonnes ouvertes (gel de silice phase normale et inverse, Sephadex LH-20) et par CLHP. Les constituants chimiques ont été isolés et leurs structures ont été déterminées par des méthodes spectroscopiques, en particulier l'RMN (1D, 2D) et la spectrométrie de masse MS. Vingt-huit produits ont été isolés à partir de deux espèces étudiés, parmi lesquels deux sont nouveaux. Ces molécules sont regroupées en quatre squelettes: les flavonoïdes, les lignanes, les iridoïdes et les saponines.

1.1. Matériel végétal

Cymodocea nodosa a été étudiée au sein de l'Institut de Chimie Biomoléculaire (ICB) du Centre National de Recherche CNR, Naples. Cette espèce a été identifiée et recueillie dans le golfe de Pozzuoli (Naples, Italie) en octobre 2014 par Guido Villani. Les rhizomes frais sont nettoyés et séparés des feuilles et immédiatement soumis à la procédure d'extraction.

L'espèce *Galium brunneum* a été étudiée au Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnementale (LCCE) de l'Université de Batna 1. Cette plante a été récoltée dans la région d'Ain-Touta en Mai 2012 au moment de la floraison. Son identification a été faite par le Professeur Bachir Oudjehih de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques, université de Batna1. Après séchage à l'ombre, les parties aériennes ont été réduites en poudre afin d'effectuer une extraction hydro-alcoolique.

1.2. Méthodes chromatographiques préparatives

Dans notre étude, nous avons utilisé les méthodes de séparation suivantes:

1.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies d'adsorption sur colonnes ouvertes en verre, la taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon étudié.

Les chromatographies ont été faites avec une poudre de gel de silice Merck Kieselgel 60 (70-230 Mesh).

1.2.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les chromatographies par CCM analytique ont été effectuées sur des plaques en verre (5 x 10, 10 x 20 ou 20 x 20 cm) ou en aluminium (20 x 20 cm) recouvertes de silice, en utilisant des plaques en phase normale Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck (CCM) et en phase inverse

RP-18 F_{254S} (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

Les plaques CCM sont observées sous lampe UV à 254 et 366 nm avant la révélation et chauffage.

a. Les révélateurs

- Le sulfate de cérium: on prépare une solution composée de 380 ml eau, 120 ml H₂SO₄ (96%) et une petite cuillère de sulfate de cérium tétrahydraté.
- Solution diluée d'H₂SO₄ à 10%.

b. Les solvants d'élutions

Pour la migration des composés, nous avons utilisé divers systèmes de solvants qui sont les suivants :

- MeOH/H₂O: 1/1, 6/4, 7/3, 8/2 et 9/1, pour les éluions en phase inverse.
- CHCl₃/MeOH/H₂O: 7,0/3,0/0,5.
- CHCl₃/MeOH: 10/0, 9,5/0,5, 9,0/1,0, 8,5/1,5, 8,0/2,0, 7,0/3,0 et 0/10.
- Hexane/AcOEt: 10/0, 9,5/0,5, 9,0/1,0, 8,5/1,5, 8,0/2,0, 7,0/3,0, 6/4, 1/1 et 0/10.

1.2.3. Chromatographie sur Couche Epaisse (CCE)

La purification par CCE préparative a été réalisée sur des plaques en verre. La phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

1.2.4. Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)

Cette technique est réalisée en verre fritté, avec un vide, permettant d'accélérer le débit d'élution. C'est une méthode de fractionnement des extraits ou des fractions mères qui permet d'éliminer les sucres et les tanins contenus dans les extraits. Dans notre étude nous avons utilisé le filtre en verre fritté N° 3. La phase stationnaire est le gel de silice en phase inverse RP-8 (Lichroprep RP-8 Merck (40-63 µm). L'élution est réalisée avec le système MeOH/H₂O en gradient de polarité (0/1, 1/9, 2/8, 3/7, 1/1 et 1/0).

1.2.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire Sephadex LH-20

La chromatographie d'exclusion repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure spatiale. Les chromatographies d'exclusion sont réalisées sur gel de Sephadex[®] LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech) où les systèmes de solvants employés durant notre travail expérimental sont: le MeOH pur ou le mélange binaire CH₃Cl/MeOH (1:1).

1.2.6. Chromatographie sur cartouche (SPE)

L'extraction en phase solide SPE est une technique très utilisée en raison de sa rapidité et son efficacité où la phase stationnaire se trouve dans une cartouche sous forme de seringue. Le choix du solvant d'éluion et la phase stationnaire dépendent de la fraction à purifier. Dans notre étude, on a utilisé des cartouches de silice RP-18 de type Chromabond® C18 et Chromabond® C18 Hydra (Macherey-Nagel).

1.2.7. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les purifications réalisées ont été effectuées à l'aide d'une chaîne CLHP Shimadzu munie d'une pompe Shimadzu LC-10AD et d'un détecteur UV/Vis SPD-10A. Les solvants utilisés sont de qualité CLHP. Les différents types de colonnes à CLHP utilisées ainsi que les conditions analytiques de l'injection de l'échantillon sont illustrés dans le tableau suivant.

Tableau IV-1: Colonnes et conditions d'éluion en CLHP analytique

	Colonne 1	Colonne 2	Colonne 3
Type de colonne	Aventis-Supelco RP-18 (5 µm, 250 x 10 mm)	Kinetex 5 µm Phenyl-Hexyl 100 Å (Phenomenex, 250 × 4,6 mm)	Kinetex PFP 2,6 µm 100 Å, (LC 50 x 3 mm)
Mode	Gradient	Isocratique	Gradient
Système de solvants	MeOH/H ₂ O (45% à 60%)	MeOH-H ₂ O 7:3	MeOH/H ₂ O (50% à 100%)
Débit	0,8 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Détection	λ = 210 et 254 nm.	λ = 210 et 254 nm.	λ = 210 et 254 nm.

1.3. Méthodes physico-chimiques

1.3.1. Pouvoir rotatoire ([α]_D)

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre numérique de type Jasco P2000 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ = 589 nm).

1.3.2. Spectrométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Les spectres ultraviolets des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type Jasco V-650, double faisceau avec un détecteur à tube photomultiplicateur.

1.3.3. Spectromètre dichroïsme circulaire (CD)

Le spectre de dichroïsme circulaire CD a été enregistré sur un spectropolarimètre Jasco J-815. Le dichroïsme circulaire (CD) est la propriété que possèdent les substances

optiquement actives d'absorber différemment la lumière polarisée circulaire gauche et la lumière polarisée circulaire droite à une longueur d'onde donnée. Les pics et les vallées observées sur le tracé sont appelés « effets Cotton » et peuvent être positifs (pics) ou négatifs (vallées). Leur position sur le spectre dépend du type de transition électronique impliquée dans l'effet ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$).

Les composés sont solubilisés dans le méthanol dans une cuve en quartz de 1 cm et à température ambiante.

1.3.4. Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres infra-rouge IR des molécules ont été pris à partir d'un spectrophotomètre Jasco 4100 FT-IR. Les échantillons analysés ont été dissous dans le MeOH puis déposés sous film des pastilles de KBr.

1.3.5. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en ionisation par électrospray (ESI-MS) en mode positif et négatif, respectivement, sur un spectromètre de type Micro-mass Q-TOF Micro, couplé à une HPLC Waters Alliance 2695.

Les spectres de masse haute résolution (HR-ESI-MS) ont été enregistrés sur un spectromètre Thermo Q-Exactive couplé avec un UHPLC Agilent Infinity 1290 et en ESI sur un appareil IT-TOF (Shimadzu).

1.3.6. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN 1D et 2D ont été acquis sur des appareils de type Bruker Avance 400 (fréquences de 400 (^1H) et 125 MHz (^{13}C)) et Bruker DRX-600 (fréquences de 600 MHz (^1H) et 150 MHz (^{13}C)). Le logiciel TopSpin et le microprogramme Bruker sont utilisés pour l'analyse de données RMN et le traitement des spectres.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$ et pyridine- d_5 dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne (CD_3OD : ^1H δ_{H} 3,34, ^{13}C 49,0 ppm; $\text{DMSO-}d_6$: ^1H δ_{H} 2,50, ^{13}C 40,0 ppm et CDCl_3 : ^1H δ_{H} 7,26, ^{13}C 77,0 ppm). Les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

a. Corrélations homonucléaires

- **COSY H-H** (COrrélation SpectroscopY)

Ce spectre fournit des informations sur les couplages homonucléaires entre les protons géminaux 2J et vicinaux 3J d'un même système de spins, et permettent donc de retrouver l'enchaînement des protons voisins sur le squelette de la molécule.

- **NOESY H-H** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

b. Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence $^1J_{H-C}$)

Cette technique permet d'observer les couplages directs $^1J_{C-H}$ entre carbones et protons liés entre eux. L'expérience HSQC ge-2D (HSQC edited) est la version améliorée en gradient de l'expérience HSQC 2D classique dans laquelle la sélection de cohérence est réalisée au moyen de PFG (gradient de champ pulsé / pulsed Field Gradient).

- **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Coherence $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$)

Cette technique permet de détecter des couplages hétéronucléaires à longue distance $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire. Grâce à cette expérience, on peut attribuer pratiquement la totalité des carbones d'un composé.

2. Etude phytochimique de l'espèce *Cymodocea nodosa*

2.1. Extraction

Les rhizomes frais de l'espèce *Cymodocea nodosa* (1 kg humide, 300 g après extraction et séchage) ont été coupés en petits fragments et broyés. Le broyat frais obtenu est soumis à une macération dans l'acétone (0,6 L x 4) en utilisant des ultrasons. La solution extractive obtenue est concentrée par évaporation et le résidu aqueux obtenu est soumis à des extractions successives avec l'éther di-éthylique (500 mL x 4) et le n-butanol (500 mL x 4). Après évaporation sous vide du solvant organique, on a obtenu deux extraits: l'éther di-éthylique (**0,5 g**) et le n-butanol (**1,5 g**). Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes de l'extraction (Figure IV-1).

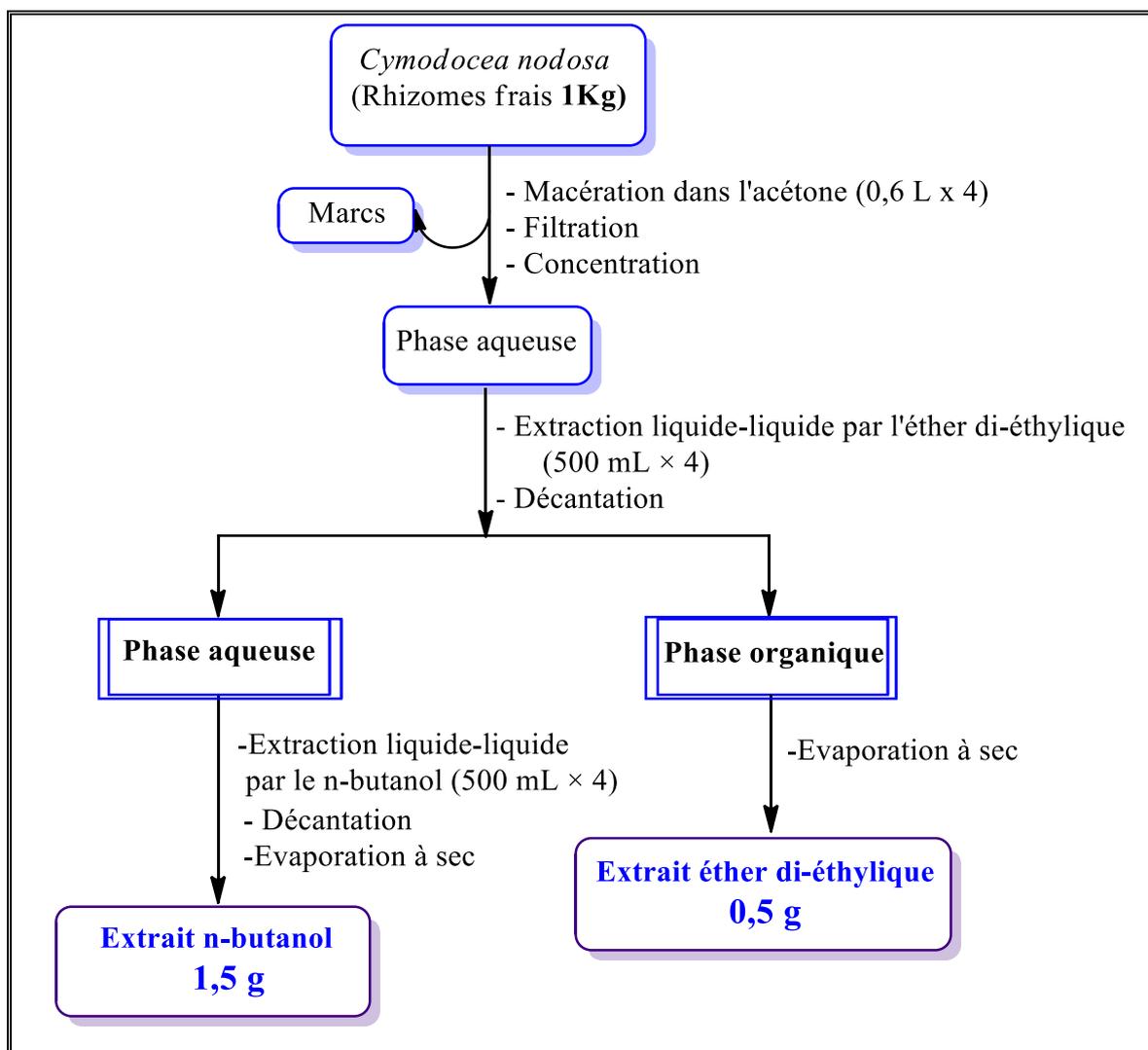


Figure IV-1: Schéma d'extraction de l'espèce *Cymodocea nodosa*

2.2. Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait n-butanol de *C. nodosa*

Une masse de **1,0 g** de l'extrait n-butanol a été fractionnée par chromatographie de partage sur une colonne de Sephadex LH-20 (3 cm de diamètre et 120 cm de hauteur, 300 g de Sephadex), en utilisant un éluant isocratique ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 1/1). Cinquante-deux tubes, chacun avec un volume de 20 ml, ont été obtenus. L'examen CCM de ces tubes a permis de les rassembler en dix fractions ($F_{(1)}-F_{(x)}$) (Figure IV-2 et Tableau IV-2). L'analyse de ces fractions par la chromatographie CCM et par RMN ^1H révèle principalement la présence des composés de types phénoliques. La figure IV-2 et le tableau IV-2 résument ce fractionnement.

Tableau IV-2: Fractionnement de l'extrait n-butanol de *Cymodocea nodosa*

Regroupement		Masse (mg)	CCM
1-8	F _(I)	22,3	Mélange
9-18	F _(II)	83,0	Trainé
19-23	F _(III)	72,1	Mélange
24-27	F_(IV)	50,2	Mélange
28-31	F_(V)	95,1	Mélange
32-36	F_(VI)	100,6	Mélange
37-41	F_(VII)	60,5	Mélange
42-46	F _(VIII)	102,5	Mélange
47-49	F _(IX)	97,0	Mélange
50-52	F_(X)	48,4	Tache + trainé



Figure IV-2: Profil CCM en phase inverse des fractions issues de l'extrait n-BuOH.

a. La fraction F_(IV)

La purification de la fraction F_(IV) (50,2 mg) est réalisée par chromatographie sur cartouche d'extraction en phase solide C18 (SPE) avec un gradient MeOH/H₂O (0/100 à 100/0). Des fractions de cinq mL sont recueillies, analysées et réunies en fonction de leurs profils en CCM et huit fractions (F_{IV-1} à F_{IV-8}) ont été obtenues. La sous fraction F_{IV-5} a été purifiée par CLHP sur colonne de C18 (Colonne 1: Supelco-Ascentis 1,0×25 cm) et éluée par un gradient de solvants H₂O/MeOH (45/55 à 60/40). Deux produits purs ont été obtenus, le

composé **CN-1** ($m = 3,7$ mg, $t_R = 9,4$ min) et le composé **CN-6** ($m = 0,8$ mg, $t_R = 12,8$ min) (Figure IV-3).

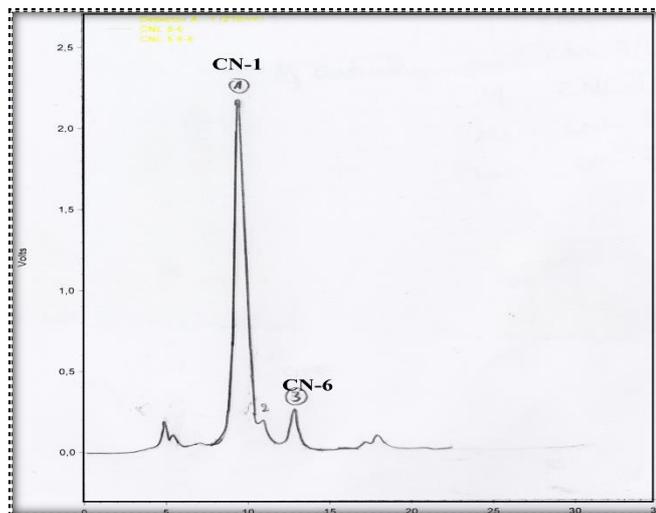


Figure IV-3: Chromatogramme de la sous fraction F_{IV-5}

Le tableau IV-3 et la figure IV-4 résument cette purification.

Tableau IV-3 : Traitement de la fraction $F_{(IV)}$

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F_{IV-1}	3,0	Tache marron	Sucre
F_{IV-2}	14,0	Tache marron	Sucre
F_{IV-3}	4,5	Mélange	/
F_{IV-4}	6,3	Mélange	/
F_{IV-5}	10,0	Mélange	CN-1 et CN-6
F_{IV-6}	2,0	Trainé	/
F_{IV-7}	2,1	Mélange	/
F_{IV-8}	2,0	Rien	/

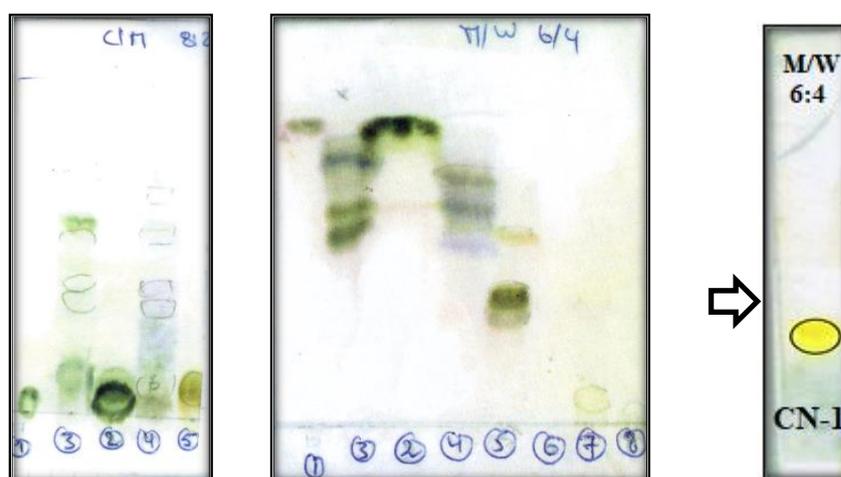


Figure IV-4 : Profil CCM de la fraction $F_{(IV)}$ et du composé CN-1

b. La fraction $F_{(V)}$

La fraction $F_{(V)}$ (95,1 mg) a été encore soumise à purifier sur cartouche SPE C18 avec un gradient MeOH/H₂O (0/100 à 100/0) pour donner huit fractions [F_{V-1} à F_{V-8}]. Les fractions F_{V-2} (8,0 mg) et F_{V-3} (4,1 mg) éluées avec MeOH/H₂O (9/1) contiennent le composé CN-3 pur (12,2 mg), tandis que la fraction F_{V-5} (14,3 mg) est un mélange des composés CN-1 et CN-5 (CN-5a et CN-5b) (CCM: RP-18, MeOH/H₂O: 6/4).

Les étapes de la purification sont résumées dans le tableau (Tableau IV-4) et la figure (Figure IV-5) suivants.

Tableau IV-4: Fractionnement de la fraction $F_{(V)}$

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F_{V-1}	39,0	Tache marron	Sucres
F_{V-2}	8,0	Tache maj.	CN-3
F_{V-3}	4,1	Tache maj.	CN-3
F_{V-4}	3,5	Mélange	/
F_{V-5}	14,3	Mélange	CN-1, CN-5
F_{V-6}	3,0	Mélange	CN-5
F_{V-7}	3,0	Rien	/
F_{V-8}	2,0	Rien	/

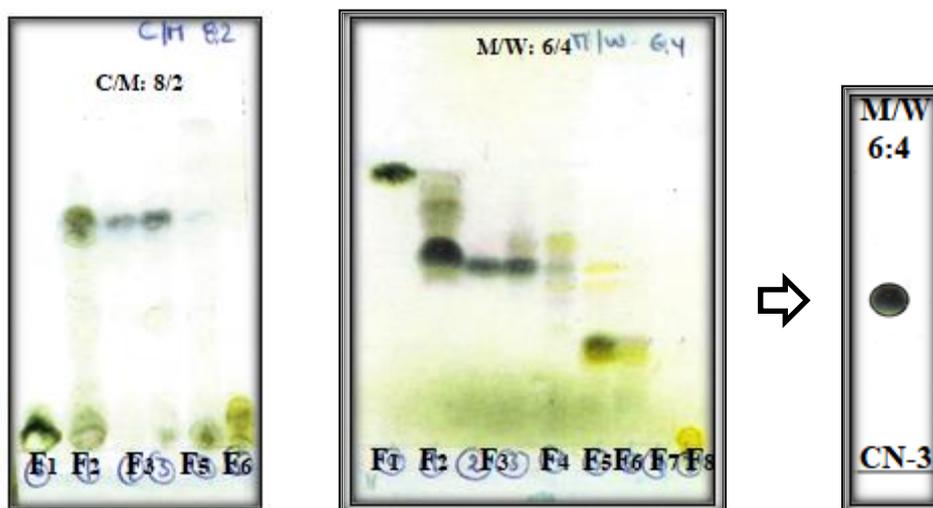


Figure IV-5: Profil CCM de la fraction $F_{(v)}$ et du composé **CN-3**

c. La fraction $F_{(VI)}$

De même, la moitié de la fraction $F_{(VI)}$ (50,1 mg) est purifiée par cartouche SPE avec le système MeOH/H₂O (0/100 à 100/0) pour donner sept sous fractions. La sous fraction F_{VI-2} fournit le composé **CN-3** (CCM RP-18, MeOH-H₂O : 9/1). La sous-fraction F_{VI-4} est repurifiée par des colonnes et CLHP pour obtenir le composé **CN-5** (réellement **CN-5a** et **CN-5b** (mélange 1:1)), ce dernier montre une seule tâche sur la CCM en phase inverse RP-18 (éluant: MeOH/H₂O: 7/3).

Le tableau (Tableau IV-5) et la figure (Figure IV-6) illustrent le protocole de cette purification.

Tableau IV-5: Traitement de la fraction $F_{(VI)}$

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F_{VI-1}	14,5	Tache marron	Sucre
F_{VI-2}	7,3	Mélange	CN-3
F_{VI-3}	2,9	Trainé	CN-5 (CN-5a et CN-5b)
F_{VI-4}	17,0	Mélange	CN-5 (CN-5a et CN-5b)
F_{VI-5}	4,0	Mélange	CN-5 (CN-5a et CN-5b)
F_{VI-6}	2,4	Mélange	CN-5 (CN-5a et CN-5b)
F_{VI-7}	1,5	Rien	/
F_{VI-8}	0,4	Rien	/

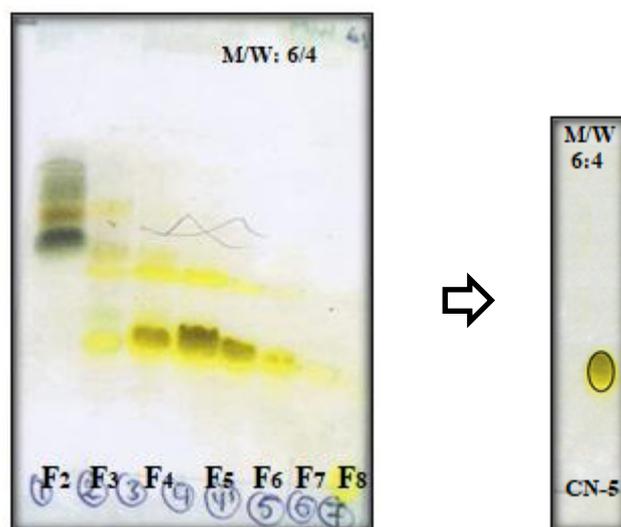


Figure IV-6: Profil CCM de la fraction $F_{(VI)}$ et du composé CN-5 (CN-5a et CN-5b)

d. La fraction $F_{(VII)}$

La fraction $F_{(VII)}$ (60,5 mg) a également été chromatographiée sur cartouche SPF C18 comme les fractions précédentes, avec le gradient d'éluion MeOH/H₂O (0/100 à 100/0), cinq sous fractions ont été obtenues dont la sous fraction F_{VII-5} contient le composé CN-2 pur (2,1 mg).

Tableau IV-6: Traitement de la fraction $F_{(VII)}$

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F_{VII-1}	20,0	Tache marron	Sucre
F_{VII-2}	2,5	Trace	/
F_{VII-3}	5,0	Mélange	/
F_{VII-4}	20,5	Tache maj	CN-5 (CN-5a et CN-5b)
F_{VII-5}	2,1	Tache	CN-2
F_{VII-6}	2,0	Rien	/

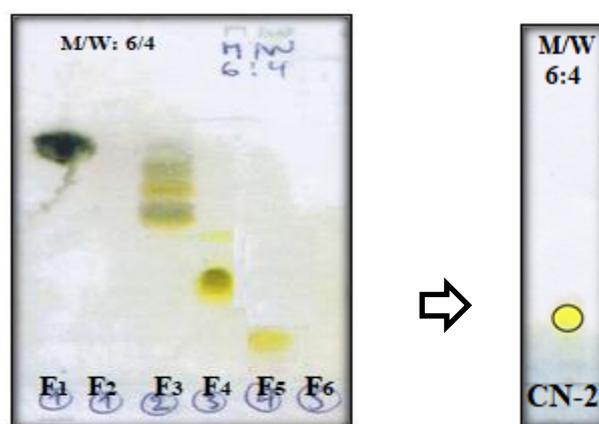


Figure IV-7: Profil CCM de la fraction $F_{(VII)}$ et du composé CN-2

e. La fraction F_(X)

La fraction F_(X) (48,4 mg) contient un seul composé, elle est repurifiée par une seconde chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 (1 cm de diamètre et 60 cm de hauteur, 20 g de Sephadex) pour aboutir à l'isolement du composé **CN-4** (20,7 mg) (Figure IV-8).



Figure IV-8: Profil CCM du composé **CN-4**

2.3. Détermination de la configuration absolue des centres chiraux du composé **CN-3**

La détermination de la configuration absolue de composé **CN-3** (centres chiraux C-2' et C-5') est réalisée en effectuant une réaction d'acétonide de ce composé afin d'obtenir son dérivé nommé **CN-3'**.

2.3.1. Synthèse de l'acétonide **CN-3'**

Une quantité de 8 mg du composé **CN-3** a été dissoute dans 1,0 mL de diméthoxy propane DMP dans un petit ballon de 25 mL, une quantité de 1 mg de PPTS (p-toluène sulfonate de pyridium) a été ajoutée à la solution comme catalyseur. Le mélange a été chauffé à 70°C et agité pendant 45 minutes, et ensuite dilué avec 5,0 mL de l'eau puis extrait trois fois avec l'éther di-éthylique (5 mL x 3). Les phases organiques récupérées ont été concentrées et le résidu obtenu (11 mg) a été purifié par chromatographie phase normale (1-5% méthanol dans le chloroforme) pour donner trois fractions. La fraction la plus polaire est une huile incolore qui contient seulement le composé acétonide **CN-3'** (4,6 mg).



Figure IV-9: Profil CCM de la réaction d'acétonide et du composé **CN-3'**

2.3.2. Estérification de Mosher du composé CN-3' (Synthèse des esters de Mosher CN-3'A et CN-3'B)

Une quantité de l'acétonide **CN-3'** (1 mg) dans 0,5 mL de dichlorométhane anhydre a été ajoutée à une solution contenant (*S*)-MTPA-Cl (10 µL) et catalysée par DMAP (4-diméthyl amino pyridine). Le mélange a été agité vigoureusement pendant trois heures à la température du laboratoire et puis concentré et purifié par chromatographie sur colonne phase normale (0% à 2% méthanol dans le chloroforme) pour obtenir le composé **CN-3'A** ((*R*)-ester). La même réaction d'estérification dans les mêmes conditions, décrit précédemment, a été réalisée sur 1 mg du composé **CN-3'** avec le 2^{ème} réactif de Mosher (*R*)-MTPA-Cl pour obtenir le dérivé (*S*)-ester nommé **CN-3'B**.

2.3.3. Estérification de Mosher du composé CN-3 (Synthèse des bis-esters de Mosher CN-3A et CN-3B)

La réaction d'estérification du composé **CN-3** a été réalisée dans deux différents ballons de 10,0 mL:

Dans le premier ballon, une masse de 2 mg de **CN-3** a été solubilisée dans 500 µL de dichlorométhane, une quantité de (*R*)-MPA (6 mg) et de DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) (4,5 mg) ont été ajoutées au mélange. Ce mélange a été catalysé par DMAP et agité à la température ambiante pendant 24 heures.

De même, dans le 2^{ème} ballon: 2 mg de **CN-3**, (*S*)-MPA, CH₂Cl₂ anhydre, DCC ont été mélangés et catalysés par le DMPA. Le mélange a été agité pendant 24 heures à température ambiante.

Le mélange réactionnel obtenu dans chaque ballon de réaction a été filtré puis concentré.

La purification séparée de chaque mélange a été effectuée sur une CC SiO₂ (pipette pasteur), en éluant avec l'acétate d'éthyle dans le n-hexane (1/9, 1,5/8,5 et 2/8) pour aboutir aux trois fractions pour chaque mélange.

L'analyse de ces trois fractions par CCM, RMN ¹H et spectrométrie de masse indique que la 3^{ème} fraction, la plus polaire, de chaque mélange contient le diastéréoisomère à rechercher. Chacune de ces deux fractions a été purifiée par CLHP (colonne 2: Phenyl-Hexyl 5 µm, 250 × 4,6 mm) avec un système isocratique (MeOH/H₂O: 7/3). Ces purifications ont permis d'obtenir les deux produits d'estérification de Mosher CN-3A (ester (*R*)-MPA: poudre blanche, m = 1 mg, *t_R*=25 min) et CN-3B (ester (*S*)-MPA: poudre blanche, m = 0,9 mg, *t_R*=27 min).

3. Etude phytochimique de l'espèce *Galium brunneum*

3.1. Extraction

Les parties aériennes de cette espèce séchées et broyées (1Kg) ont été extraites par macération dans un mélange hydro-alcoolique 80 % (MeOH/H₂O), cette opération a été répétée deux fois avec renouvellement de solvant, après filtration et évaporation du méthanol, la phase aqueuse résultante (500 mL) est soumise à une extraction liquide-liquide, successivement, avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol pour conduire après concentration à sec du solvant à **7**, **10** et **35** g d'extrait à l'hexane, acétate d'éthyle et n-butanol, respectivement. Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes de l'extraction (Figure IV-10).

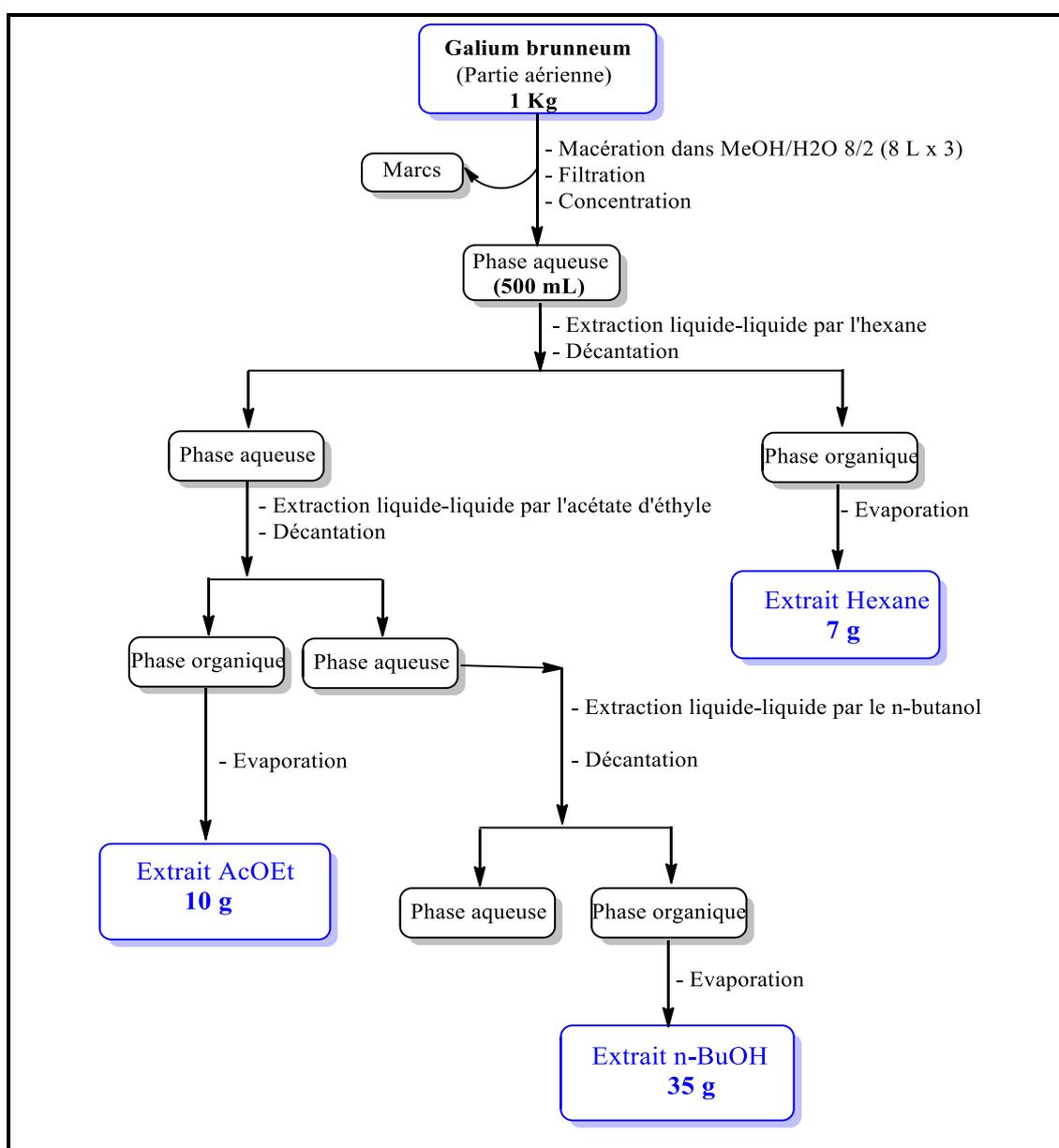


Figure IV-10: Schéma d'extraction de l'espèce *Galium brunneum*

3.2. Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait n-butanol du *G. brunneum*

Un premier fractionnement de l'extrait butanolique du *G. brunneum* (10 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice, l'élution est effectuée avec un gradient de méthanol dans le chloroforme (0/100 à 100/0). Des fractions de 30 mL ont été recueillies. Après analyse de leurs profils sur chromatographie sur couche mince CCM, treize fractions sont obtenues (F_{B1}-F_{B13}) (Figure IV-11).

Tableau IV-7: Fractionnement de l'extrait n-butanol de l'espèce *Galium brunneum*

Eluant	Regroupement	Masse (mg)	Eluant	Regroupement	Masse (mg)
CHCl ₃ /MeOH	F _{B1}	42,0	70/30	F _{B7}	500
100/0 à 95/5			60/40	F _{B8}	938
90/10	F _{B2}	33,0	60/40	F_{B9}	1000
85/15	F _{B3}	50,0	50/50	F _{B10}	500
80/20	F_{B4}	800	50/50	F _{B11}	1000
70/30	F_{B5}	626	30/70	F_{B12}	900
70/30	F _{B6}	700	100	F _{B13}	1600

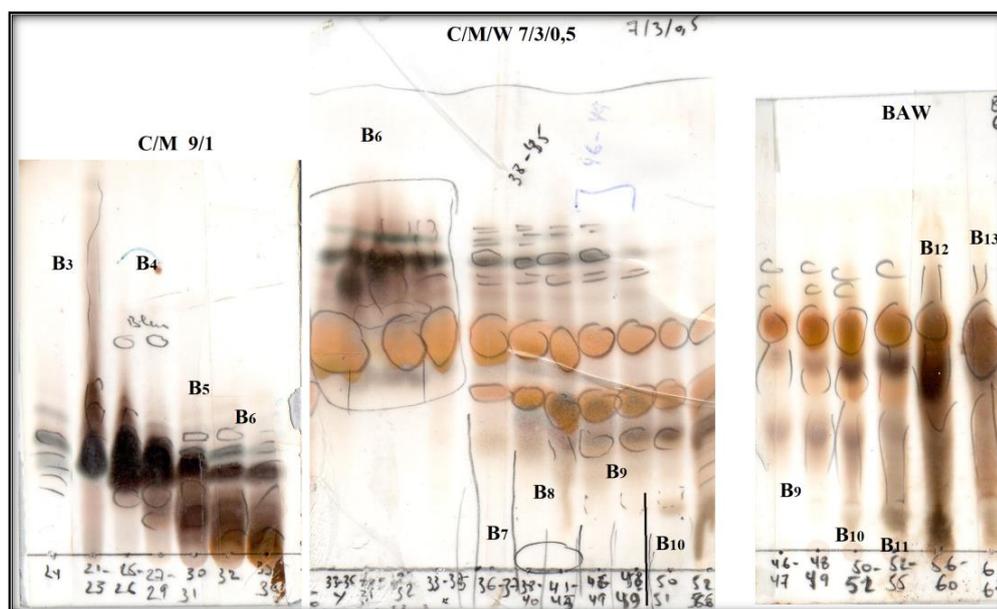


Figure IV-11: CCM en phase normale des fractions de l'extrait n-BuOH

a. La fraction F_{B4}

La fraction F_{B4} est appliquée sur une colonne de silice normale, en utilisant comme éluant un mélange de CHCl₃/MeOH (de 100% CHCl₃ à 100 % MeOH), et sept fractions sont obtenues (F_{B4(1)}- F_{B4(7)}). Deux composés purs ont été isolés, **GB-16** et **GB-14**, après avoir réalisé successivement deux purifications sur deux sous fractions F_{B4(2)} et F_{B4(5)} sur une

colonne de Sephadex LH-20 éluée par un mélange isocratique MeOH/CHCl₃ (1/1). Le tableau IV-8 résume l'ensemble de ces étapes chromatographiques.

Tableau IV-8: Traitement de la fraction F_{B4}

Fractions	Masse	CCM	Observation
F _{B4(1)}	82	Trainé	/
F_{B4(2)}	71	Tache Maj.	GB-16
F _{B4(3)}	121	Mélange	GB-16 et GB-14
F _{B4(4)}	91	Mélange	GB-16 et GB-14
F_{B4(5)}	50	Tache Maj.	GB-14
F _{B4(6)}	160	Mélange	GB-14
F _{B4(7)}	126	Trainé	/

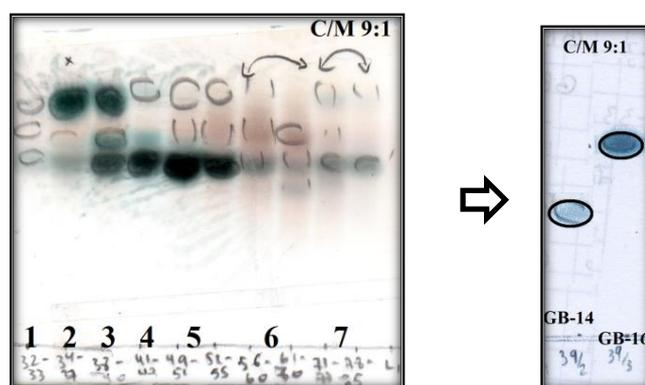


Figure IV-12: Profil CCM de la fraction F_{B4} et des composés **GB-14** et **GB-16**

b. La fraction F_{B5}

La fraction F_{B5} a été purifiée sur une colonne de gel de silice pour donner huit sous fractions. Le produit **GB-11** (4 mg) a été ainsi isolé de la sous fraction F_{B5(3)} grâce à une colonne de Sephadex (C/M 1/1), suivie d'une purification par chromatographie sur cartouche en C18. La sous fraction F_{B5(7)} est purifiée par une cartouche en C18 éluée par H₂O/MeOH (100/0 à 0/100) pour conduire à l'isolement du composé **GB-9** (6 mg). La procédure de purification est résumée dans le tableau IV-9 et la figure IV-13.

Tableau IV-9: traitement de la fraction F_{B5}

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F _{B5(1)}	31	Mélange	iridoïdes
F _{B5(2)}	81	Mélange	//
F_{B5(3)}	46	Mélange	GB-11

F _{B5(4)}	73	Mélange	GB-11 et GB-9
F_{B5(5)}	20	Mélange	//
F _{B5(6)}	60	Mélange	GB-9
F_{B5(7)}	140	Mélange	GB-9
F _{B5(8)}	150	Trainé	/

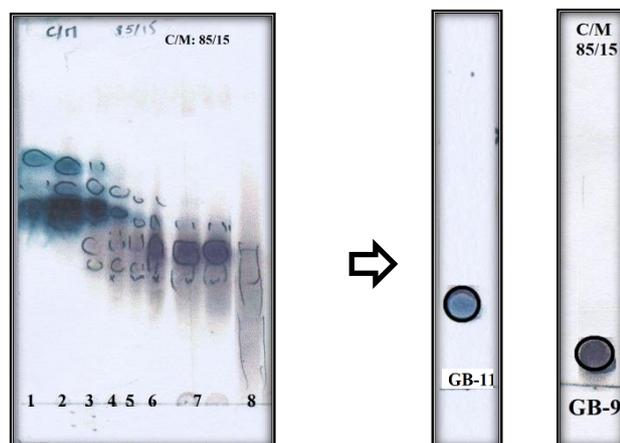


Figure IV-13: Profil CCM de la fraction F_{B5} et des composés **GB-9** et **GB-11**

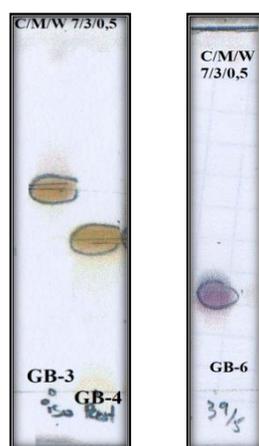
c. La fraction F_{B9}

La fraction F_{B9} a également été chromatographiée sur colonne de gel de silice SiO₂ avec un gradient CHCl₃-MeOH (1% MeOH à 100% MeOH). Selon le profil des CCM, dix fractions ont été rassemblés (F_{B9(1)}-F_{B9(10)}).

- Les sous fractions F_{B9(6)} et F_{B9(7)} ont été analysées, successivement, sur une deuxième colonne de gel de silice et par une chromatographie de partage sur Sephadex LH-20 (isocratique, CHCl₃/MeOH) pour aboutir à l'isolement des produits **GB-3** et **GB-4**.
- Les composés **GB-1** et **GB-4** sont isolés de la fraction F_{B9(8)} suite à une purification sur cartouche RP-18 en utilisant comme éluant H₂O/MeOH (100/0 à 0/100) suivie d'une filtration sur colonne Sephadex LH-20 (CHCl₃/MeOH).
- La sous fraction F_{B9(9)} est fractionnée par une chromatographie sur colonne (CC). Après analyse du profil CCM des fractions récupérées, cinq regroupements sont obtenus (F'₁-F'₅). Le composé **GB-6** (8 mg) a été obtenu de la sous fraction F'₂ après purification sur une CC cartouche C18 avec un gradient d'éluant MeOH/H₂O (10/90 à 100/0).

Tableau IV-10: Traitement de la fraction **F_{B9}**

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F_{B9(1)}	21	Mélange	Iridoïdes
F_{B9(2)}	59	Mélange	/
F_{B9(3)}	120	Mélange	/
F_{B9(4)}	37	Mélange	GB-3
F_{B9(5)}	156	Mélange	GB-3 et GB-4
F_{B9(6)}	80	Mélange	GB-3 et GB-4
F_{B9(7)}	102	Mélange	GB-3 et GB-4
F_{B9(8)}	130	Mélange	GB-1 et GB-4
F_{B9(9)}	78	Mélange	GB-6
F_{B9(10)}	180	Mélange	/

Figure IV-14: Profil CCM des composés **GB-3**, **GB-4** et **GB-6**

d. La fraction **F_{B12}**

La fraction **F_{B12}** est soumise à une colonne SiO₂ éluée par CHCl₃/MeOH (100/0 % à 0/100 %), treize fractions ont été obtenus selon leurs profils en CCM (**F_{B12(1)}**-**F_{B12(13)}**).

La sous fraction **F_{B12(4)}** a subi une série de purification sur cartouche RP-18 (H₂O/MeOH: 100/0 à 0/100) puis sur une colonne de Sephadex LH-20 (MeOH) pour conduire au composé **GB-14** (22 mg).

Les sous fractions **F_{B12(8)}**, **F_{B12(11)}** et **F_{B12(12)}** sont menées, successivement, à des purifications, sur une chromatographie VLC suivie par une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et en fin par CC cartouche C18 pour aboutir les composés purs: **GB-1**, **GB-3**, **GB-4**, **GB-6** et **GB-15**.

- Le composé **GB-4** (8 mg) a été isolé à partir de la sous fraction F₁ de F_{B12(8)}, par chromatographie de partage sur une colonne de Sephadex (C/M: 1/1). La sous fraction F₂ a fait l'objet d'une 2^{ème} purification par chromatographie sur cartouche C18 pour donner le composé **GB-15** (2 mg).
- Les composés **GB-1** (12 mg) et **GB-4** (15 mg) ont été ensuite isolés par chromatographie sur cartouche en phase inverse C18 à partir de la sous fraction F₃ de F_{B12(11)}.
- Le composé **GB-12** (4 mg) a été obtenu de la sous fraction F₃ de F_{B12(12)} après une filtration sur une colonne de Sephadex LH-20 (MeOH).

Tableau IV-11: Traitement de la fraction F_{B12}

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
F _{B12(1)}	33	Mélange	/
F _{B12(2)}	30	Mélange	/
F _{B12(3)}	48	Mélange	Iridoïdes
F_{B12(4)}	72	Mélange	GB-14
F ₁₂₍₅₎	24	Mélange	GB-14
F _{B12(6)}	47	Mélange	/
F _{B12(7)}	80	Mélange	/
F_{B12(8)}	86	Mélange	GB-4 et GB-15
F _{B12(9)}	71	Mélange	/
F _{B12(10)}	83	Mélange	GB-4
F_{B12(11)}	120	Mélange	GB-1 et GB-4
F_{B12(12)}	102	Mélange	GB-12
F _{B12(13)}	94	Trainé	Sucre

Figure IV-15: Profil CCM des composés **GB-1** et **GB-4**

3.3. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait AcOEt

Sept grammes de l'extrait AcOEt ont été fractionnés sur une colonne ouverte de silice (CC, m = 250g), en suivant un gradient de polarité croissante hexane/AcOEt, et puis un gradient du MeOH dans le chloroforme (30/70 à 100/0). Douze fractions (F_{Ac1} - F_{Ac10}) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leurs profils en chromatographie sur couche mince (Figure IV-16).

Tableau IV-12: Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Galium brunneum*

Eluant	Regroupement	Masse (mg)	Eluant	Regroupement	Masse (mg)
Hexane/AcOEt			$CHCl_3/MeOH$		
100/0 à 80/20	F_{Ac1}	1094	30/70	F_{Ac7}	400
80/20 à 70/30	F_{Ac2}	960	30/70	F_{Ac8}	900
70/30 à 50/50	F_{Ac3}	345	40/60	F_{Ac9}	700
40/60 à 20/80	F_{Ac4}	291	50/50	F_{Ac10}	870
10/90	F_{Ac5}	300	60/40	F_{Ac11}	350
0/100	F_{Ac6}	300	70/30 à 100/0	F_{B12}	1600

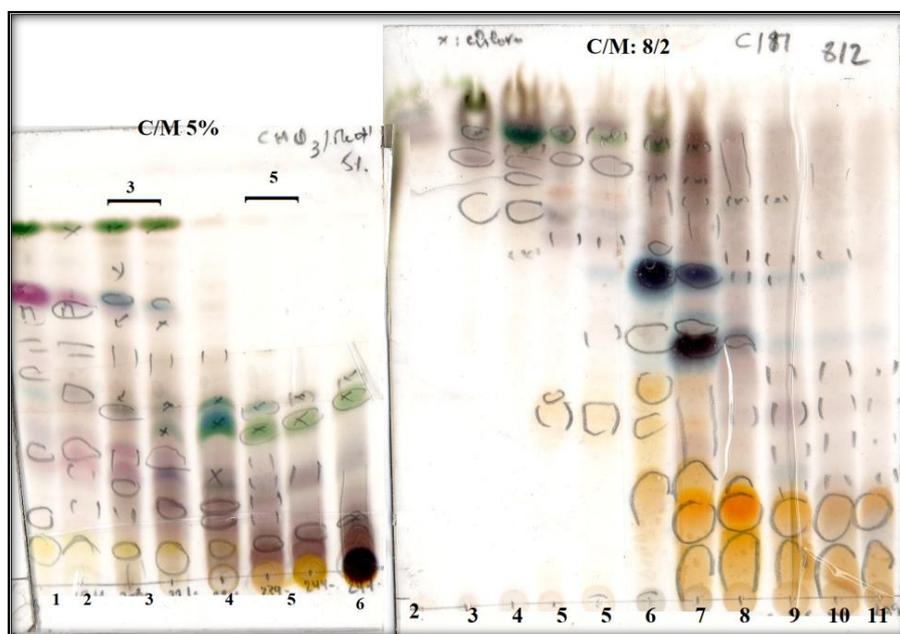


Figure IV-16: Profil CCM du fractionnement de l'extrait AcOEt du *Galium brunneum*

a. La fraction F_{Ac3}

La fraction F_{Ac3} (345 mg) a été filtrée sur une colonne de Séphadex LH-20 pour donner trois sous fractions ($F_{Ac3(1)}$ - $F_{Ac3(3)}$). La sous fraction $F_{Ac3(2)}$ a été purifiée sur une cartouche SPE C18 avec un gradient H_2O -MeOH (100/0 à 0/100) pour aboutir à la sous fraction F'_3 avec

un aspect solide jaune-pâle. Cette dernière est mise à séparer sur une chromatographie sur couche épaisse CCE avec le système d'éluion $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9,5/0,5. Les composés **GB-7** (1,5 mg), **GB-8** (1,2 mg) et **GB-10** (1,8 mg) ont été obtenus. Le tableau IV-13 et la figure IV-17 résumant le mode de purification.

Tableau IV-13: Traitement de la fraction F_{Ac3}

Fractions	Masse	CCM	Observation
$F_{Ac3(1)}$	16	Trainé	/
$F_{Ac3(2)}$	14	Mélange	GB-7, GB-8 et GB-10
$F_{Ac3(3)}$	25	Mélange	/

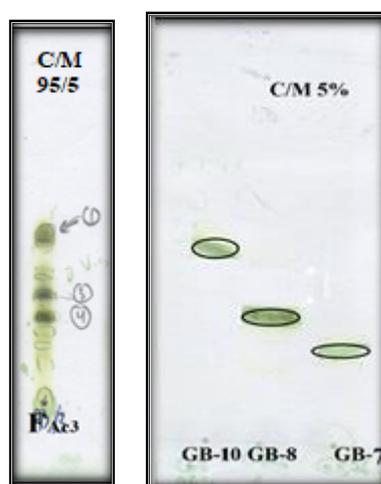


Figure IV-17: Profil CCM de la sous fraction $F_{Ac3(2)}$ et des composés **GB-7**, **GB-8** et **GB-10**

b. La fraction F_{Ac4}

La fraction F_{Ac4} (291 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient Hexane-AcOEt (80/20 à 50/50). Le produit **GB-5** a été isolé de la sous fraction $F_{Ac4(4)}$ grâce à une chromatographie sur colonne phase normale suivie d'une filtration sur CC Sephadex LH-20 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 1/1).

Tableau IV-14: Traitement de la fraction F_{Ac4}

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
$F_{Ac4(1)}$	25	Trainé	/
$F_{Ac4(2)}$	29	Mélange	/
$F_{Ac4(3)}$	60	Mélange	/
$F_{Ac4(4)}$	50	Mélange	GB-5
$F_{Ac4(5)}$	50	Mélange	/
$F_{Ac4(6)}$	39	Mélange	GB-9



Figure IV-18: Profil CCM du composé **GB-5**

c. La fraction F_{Ac5}

La fraction F_{Ac5} (300 mg) a subi une séparation sur une colonne de gel de silice éluée avec un gradient de polarité croissante de $CHCl_3/MeOH$ (100/0 à 90/10) Selon le profil des CCM, onze fractions ont été obtenues après rassemblement des fractions similaires.

- ✓ La sous fraction $F_{Ac5(4)}$ a été ensuite purifiée sur une cartouche C18 pour donner sept sous fractions ($F'_1-F'_7$).
- Les composés **GB-17** et **GB-18** ont été isolés directement de la fraction F'_5 par CLHP (Colonne 3: Kinetex PFP 2,6 μm 100 Å, 50 x 3 mm).
- Les sous fractions F'_2 et F'_7 sont purifiées par chromatographie d'exclusion, en utilisant le Sephadex LH-20 ($CHCl_3/MeOH$: 1/1). Cette purification a conduit à l'isolement des composés **GB-17** et **GB-19**, respectivement.
- ✓ Une purification de la dernière sous fraction (F'_{11}) sur cartouche C18 éluée par un mélange $MeOH/H_2O$ (0/100 à 100/0) a permis d'isoler les composés **GB-2** et **GB-20**.

Toutes les étapes de purification de la fraction F_{Ac5} sont figurées dans le tableau IV-15.

Tableau IV-15 : Traitement de la fraction F_{Ac5}

Fractions	Masse (mg)	CCM	Observation
$F_{Ac5(1)}$	131	Mélange	/
$F_{Ac5(2)}$	34,5	Mélange	/
$F_{Ac5(3)}$	18,5	Mélange	/
$F_{Ac5(4)}$	24	Mélange	GB-19, GB17 et GB-20
$F_{Ac5(5)}$	10	Mélange	GB-19
$F_{Ac5(6)}$	22	Mélange	/
$F_{Ac5(7)}$	23	Mélange	/
$F_{Ac5(8)}$	15	Mélange	/

F _{Ac5(9)}	21	Mélange	/
F _{Ac5(10)}	19	Mélange	GB-2
F_{Ac5(11)}	50,5	Mélange	GB-2 et GB-20

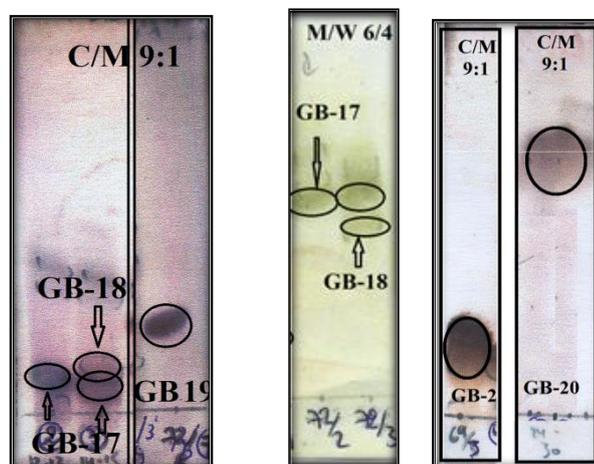


Figure IV-19: Profil CCM des composés **GB-2**, **GB-17**, **GB-18**, **GB-19** et **GB-20**

d. La fraction F_{Ac7}

La fraction F_{Ac7} a été soumise à une chromatographie VLC en phase inverse C8 pour obtenir sept sous fractions. Après avoir réalisé, successivement, deux purifications des sous fractions F_{Ac7(1)} et F_{Ac7(6)}, sur cartouche C18 et Séphadex LH-20 (CHCl₃/MeOH (1/1)), les composés **GB-13** et **GB-5** ont été obtenus à l'état pur à partir de la sous fraction F_{Ac7(1)}.

Le tableau IV-16 rassemble la procédure de la purification de la fraction F_{Ac7}.

Tableau IV-16: Traitement de la fraction F_{Ac7}

Fractions	Masse	CCM	Observation
F_{Ac7(1)}	35	Trainé	GB-13 et GB-5
F _{Ac7(2)}	24,5	Mélange	/
F _{Ac7(3)}	51	Mélange	/
F _{Ac7(4)}	43	Mélange	/
F _{Ac7(5)}	32	Mélange	/
F_{Ac7(6)}	58	Tache Maj.	GB-3
F _{Ac7(7)}	110	Mélange	Flavonoïdes



Figure IV-20: Profil CCM du composé GB-13

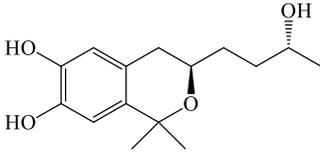
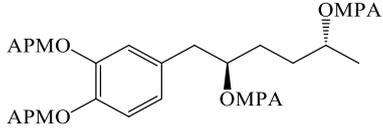
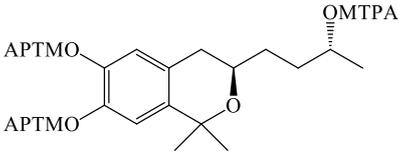
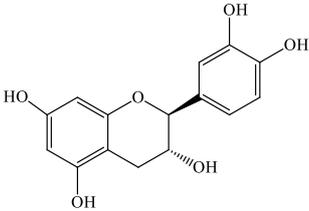
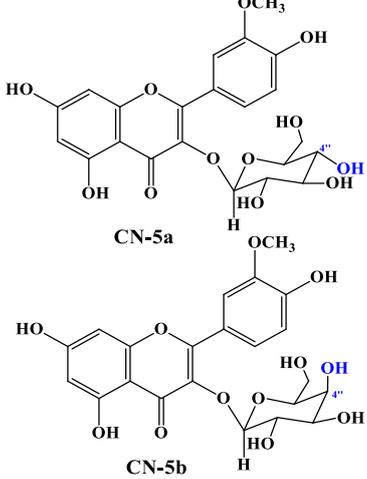
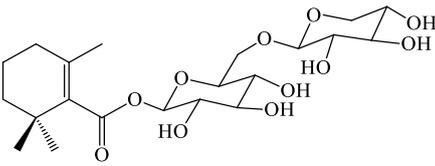
4. Les composés isolés

4.1. Composés isolés de l'espèce *Cymodocea nodosa*

Tableau IV-17: Composés isolés de l'espèce *Cymodocea nodosa*

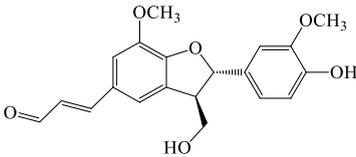
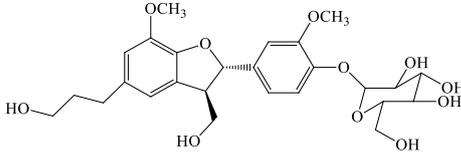
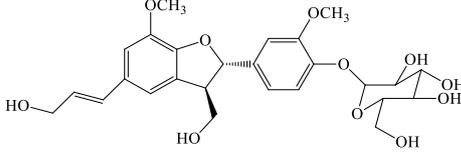
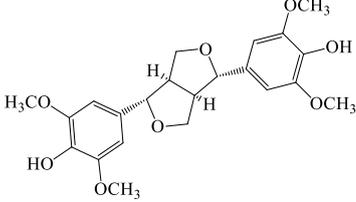
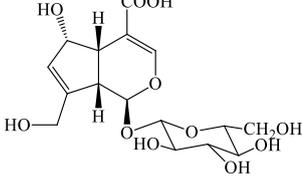
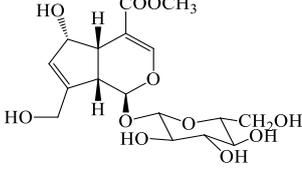
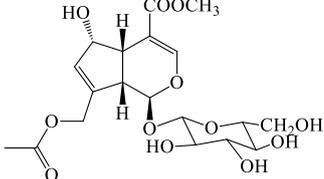
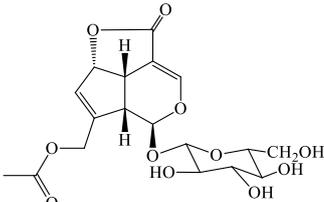
Propriétés	Structure
<p>Composé CN-1 : Cymodioside A (8-prénylnaringénine 5,7-<i>O</i>-β-D-diglucoopyranoside)</p> <p>Formule brute : C₃₂H₄₀O₁₅</p> <p>$[\alpha]_D^{25}$ -1,7 (C 0,05, MeOH)</p> <p>R_f = 0,38 (MeOH/H₂O :6/4)</p> <p>MS: ESI⁺ <i>m/z</i> 687 [M+Na]⁺, ESI⁻ <i>m/z</i> 663[M-H]⁻, HR-ESI-MS⁺ <i>m/z</i> : 687,2260 [M+Na]⁺ (Calc. 687,2265)</p> <p>UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 348 (7,67), 283 (8,36), 225 (9,11)</p> <p>CD (MeOH) Δε 342 (+1,70), Δε 288(-1,48), Δε 237(-0,03)</p> <p>IR (KBr) ν_{max} 3405, 2924, 1645, 1597 et 1076 cm⁻¹</p> <p>RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans CD₃OD (Tableau III-1, page 102)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): δ_H 7,30 (1H, <i>d</i>, <i>J</i> = 8,5Hz, H-2/H-6'), 6,78 (2H, <i>d</i>, <i>J</i> = 8,5Hz, H-3'/H-5'), 6,61 (1H, <i>s</i>, H-6), 5,38(1H, <i>dd</i>, <i>J</i> = 13,0, 2,7 Hz, H-2), 5,16 (1H, <i>m</i>, H-12), 3,35 (1H, <i>m</i>, H-11a), 3,11 (1H, <i>m</i>, H-11b), 3,03 (1H,<i>dd</i>, <i>J</i> = 13,0, 17,4 Hz, H-3ax), 2,70 (1H, <i>dd</i>, <i>J</i> = 2,7, 17,4Hz, H- 3eq), 1,57 (3H, <i>s</i>, H₃-15), 1,55 (3H, <i>s</i>, H₃-14), 5,12 (1H, H-1''), 3,12–3,49 (8H, H-2'', H-2''', H-3'', H-3''', H-4'', H- 4''', H-5'', H-5'''), 3,45 (2H, H-6''a/H-6'''a), 3,74 (2H, H-6''b/H-6'''b).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 150 MHz): δ_C 190,7 (C-4), 162,6 (C-9), 160,5 (C-7), 157,7 (C-4'/C-5), 131,2 (C-1'), 130,5 (C-13), 127,9 (C-2'/C 6'),122,7 (C12),116,6 (C-3'/C-5'), 110,1 (C-8), 106,2 (C-10), 103,0</p>	

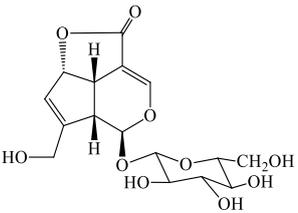
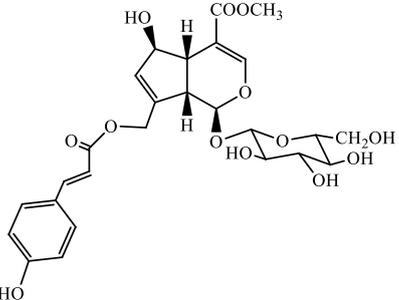
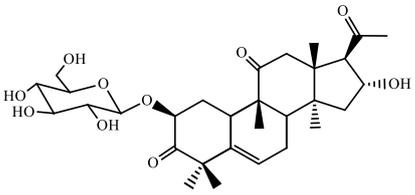
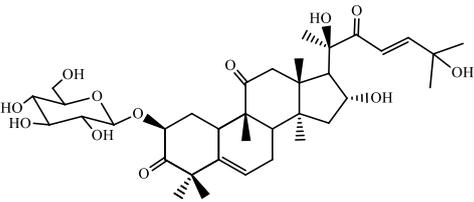
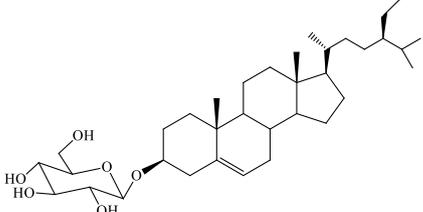
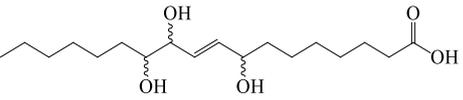
<p>(C-1''), 99,0 (C-1'''), 96,5 (C-6), 77,8 (C-2), 77,2-69,9 (C-2'',C-5'',C-2''' et C-5'''), 60,9 (C-6''/C-6'''), 44,6 (C-3), 25,5 (C-14), 21,2 (C- 11), 17,7 (C-15).</p>	
<p>Composé CN-2 : Cymodioside B (5'-prénylchalcononaringénine 2',4'-β-O-D-diglucosides)</p> <p>Formule brute: C₃₂H₄₀O₁₅</p> <p>[α]_D²⁵ -3,2 (C 0,1, MeOH)</p> <p>R_f = 0,20 (MeOH/H₂O: 6/4)</p> <p>MS: ESI⁺ m/z 687 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS⁺ m/z : 687,2258 [M+Na]⁺ (Calc. 687,2265)</p> <p>UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 369 (9,25), 285 (8,69)</p> <p>IR (KBr) ν_{max} 3369, 2923, 1598, 1076 et 839 cm⁻¹</p> <p>RMN ¹H (600 MHz, CD₃OD) et RMN ¹³C (150 MHz, CD₃OD) (Tableau III-2, page 111)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ_H 8,00 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-β), 7,68 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-α), 7,63 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2/ H-6), 6,78 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3/ H-5), 6,43 (1H, s, H-3'), 5,16 (1H, m, H-2''), 3,34 (1H, m, H-1''a), 3,12 (1H, m, H-1''b), 1,70 (3H, s, H3-5''), 1,58 (3H, s, H3-4''), 5,12 (1H, H-1'''), 4,97 (1H, d, J = 7,3Hz, H-1'''), 3,12-3,49 (8H, H-2''', H-2''', H-3''', H-3''', H-4''', H-4''', H-5''', H-5'''), 3,45 (2H, m, H-6''a/ H-6''a), 3,74 (2H, m, H-6''b/ H-6''b).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆,150 MHz): δ_C 192,9 (C=O), 162,7 (C-6'), 160,4 (C-4/C-4'), 157,7 (C-2'), 144,0 (C-β), 131,2 (C-2/C-6), 130,2 (C-1/C-3''), 122,8 (C-α/C-2''), 115,2 (C-3/C-5), 110,3 (C-5'), 106,3 (C-1'), 99,9 (CH, C-1''), 99,5 (C-1'''), 93,2 (C-3'), 77,3-70,0 (C-2'', C-5'' , C-2''', C-5'''), 61,0-60,9 (C-6''/C-6'''), 25,6 (C-4''), 21,3 (C-1''), 17,8(C-5'').</p>	
<p>Composé CN-3 : 4-(2<i>R</i>,5<i>R</i>-dihydroxyhexyl)-benzène-1,2-diol</p> <p>Formule brute: C₁₂H₁₈O₄</p> <p>[α]_D²⁵ -7,5 (C 0,4, MeOH)</p> <p>R_f = 0,38 (MeOH/H₂O: 6/4)</p> <p>MS : ESI⁺ m/z 249 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS⁺ m/z : 249,1102 [M+Na]⁺ (Calc. 249,1103, C₁₂H₁₈O₄Na)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans le CD₃OD (Tableau III-3, page 120)</p>	

<p>Composé CN-3' : 3<i>R</i>-(3<i>R</i>-hydroxybutyl)-1,1-diméthyl isochroman-6,7-diol</p> <p>Formule brute : C₁₄H₂₂O₄</p> <p>MS: ESI⁺ <i>m/z</i> 289 [M + Na]⁺, HR-ESI-MS <i>m/z</i> 289,1409 [M + Na]⁺ (calc. 289,1416, C₁₅H₂₂O₄Na)</p>	
<p>Composé CN-3A/CN-3B: Ester MPA</p> <p>Formule brute: C₄₈H₅₀O₁₂</p> <p>MS: HR-ESI⁺ <i>m/z</i> 841,3195 [M + Na]⁺ (calc. 841,3199, C₄₈H₅₀O₁₂Na)</p>	
<p>Composé CN-3'A/CN-3'B: Ester MTPA</p> <p>Formule brute: C₄₅H₄₃O₁₀F₉</p> <p>MS: HR-ESI-MS⁺ <i>m/z</i> 937,2604 [M + Na]⁺ (calc. 937,2610, C₄₅H₄₃O₁₀F₉Na)</p>	
<p>Composé CN-4: (-)-Catéchine</p> <p>Formule brute: C₁₅H₁₄O₆</p> <p>$[\alpha]_D^{25}$ -2,73 (C 2,5, MeOH)</p> <p>MS: <i>m/z</i> 313,038 [M+Na]⁺ et à <i>m/z</i> 603,173 [2M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans le CD₃OD (Tableau III-9, page 157)</p>	
<p>Composé CN-5a: Isorhamnétine 3-<i>O</i>-β-D-glucoside</p> <p>Composé CN-5b : Isorhamnétine-3-<i>O</i>-β-D-galactoside</p> <p>Formule brute: C₂₂H₂₂O₁₂</p> <p>MS: <i>m/z</i> 501,0938 [M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans le CD₃OD (Tableau III-10, page 166)</p>	
<p>Composé CN-6 : Jasminoside M</p> <p>Formule brute: C₂₁O₁₁H₃₄</p> <p>MS: <i>m/z</i> 485,58 [M+Na]⁺ et <i>m/z</i> 947,77 [2M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans le CD₃OD (Tableau III-13, page 201)</p>	

4.2. Composés isolés de l'espèce *Galium brunneum*Tableau IV-18: Composés isolés de l'espèce *Galium brunneum*

Propriétés	Structure
<p>Composé GB-1 : Phlorétine 3',5'-di-C-β-D-glucosides</p> <p>Formule brute : C₂₇H₃₄O₁₅</p> <p>MS : <i>m/z</i> 621,72 [M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans CD₃OD (Tableau III-7, page 145)</p>	
<p>Composé GB-2 : Phlorizine (phloridzine)</p> <p>Formule brute : C₂₁H₁₆O₁₀</p> <p>MS : <i>m/z</i> 459,0508 [M+Na]⁺ et <i>m/z</i> 894,8355 [2M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans CD₃OD (Tableau III-8, page 151)</p>	
<p>Composé GB-3 : Isorhamnétine 3-O-β-rutinoside</p> <p>Formule brute : C₂₈H₃₂O₁₆</p> <p>MS : <i>m/z</i> 647,23 [M+Na]⁺ et <i>m/z</i> 1271,69 [2M+Na]⁺</p>	
<p>Composé GB-4 : Quercétine 3-O-β-rutinoside</p> <p>Formule brute : C₂₇H₃₀O₁₆</p> <p>MS : <i>m/z</i> 633,96 [M+Na]⁺ et <i>m/z</i> 1244,40 [2M+Na]⁺</p>	
<p>Composé GB-5 : Quercétine</p> <p>Formule brute : C₁₅H₁₀O₇</p> <p>MS : <i>m/z</i> 325,1087 [M+Na]⁺ et <i>m/z</i> 626,966 [2M+Na]⁺</p>	
<p>Composé GB-6 : (7<i>S</i>,8<i>R</i>,8'<i>R</i>)-(-)-Laricirésinol 4-4'-bis-O-D-glucosides</p> <p>Formule brute : C₃₂H₄₄O₁₆</p> <p>MS : <i>m/z</i> 708,324 [M+Na]⁺</p> <p>RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) (Tableau III-11, page 180)</p>	
<p>Composé GB-7: Laricirésinol</p> <p>Formule brute : C₂₀H₃₀O₆.</p> <p>MS : <i>m/z</i> 383,133 [M+Na]⁺ et à <i>m/z</i> 742,927 [2M+Na]⁺</p>	

<p>Composé GB-8: Balanophonine</p> <p>Formule brute : $C_{20}H_{20}O_6$</p> <p>MS : m/z 379,1568 $[M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-9a: Dihydrodehydrodiconiférylalcool 4-<i>O</i>-D-glucoside</p> <p>Formule brute : $C_{26}H_{34}O_{11}$</p> <p>MS: m/z 545,708 $[M+Na]^+$ et m/z 1066,497 $[2M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-9b: Dehydrodiconiférylalcool 4-<i>O</i>-D-glucoside</p> <p>Formule brute : $C_{26}H_{32}O_{11}$</p> <p>MS: m/z 543,709 $[M+Na]^+$ et m/z 1064,491 $[2M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-10: Syringarésinol</p> <p>Formule brute : $C_{22}H_{26}O_8$</p> <p>MS: m/z 441,0413 $[M+Na]^+$ et m/z 859,7861 $[2M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) (Tableau III-12, page 195)</p>	
<p>Composé GB-11: Acide deacétyl aspérulosidique</p> <p>Formule brute : $C_{16}H_{22}O_{11}$</p> <p>MS: m/z 413,792 $[M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) (Tableau III-14, page 209)</p>	
<p>Composé GB-12: Deacétyldaphylloside</p> <p>Formule brute : $C_{17}H_{24}O_{11}$</p> <p>MS: m/z 427,1593 $[M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-13: Daphylloside</p> <p>Formule brute : $C_{19}H_{26}O_{12}$</p> <p>MS: m/z 469,904 $[M+Na]^+$ et m/z 916,741 $[2M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-14: Aspéruloside</p> <p>Formule brute : $C_{18}H_{22}O_{11}$</p> <p>MS: m/z 437,55 $[M+Na]^+$ et m/z 851,64 $[2M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) (Tableau III-15, page 218)</p>	

<p>Composé GB-15: Deacétylaspéruloside</p> <p>Formule brute : $C_{16}H_{20}O_{10}$</p> <p>MS: m/z 395,166 $[M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-16: 10-<i>O-trans</i> <i>p</i>-coumaroylscandoside</p> <p>Formule brute: $C_{26}H_{30}O_{13}$</p> <p>MS: m/z 573,58 $[M+Na]^+$ et m/z 1123,67 $[2M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-17: Hexanorcucurbitacine D 2-<i>O</i>-β-D-glucoside</p> <p>Formule brute : $C_{30}H_{44}O_{10}$</p> <p>MS: m/z 587,1097 $[M+Na]^+$ et m/z 1151,3162 $[2M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) (Tableau III-16, page 230)</p>	
<p>Composé GB-18: Cucurbitacine D 2-<i>O</i>-β-D-glucoside (Arvénine III)</p> <p>Formule brute : $C_{36}H_{54}O_{12}$</p> <p>MS: m/z 701,631 $[M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) (Tableau III-17, page 237)</p>	
<p>Composé GB-19: β-Sitostérol-3-β-<i>O</i>-D-glucoside (Daucostérol)</p> <p>Formule brute: $C_{35}H_{60}O_6$</p> <p>MS: m/z 599,234 $[M+Na]^+$ et à m/z 1175,493 $[2M+Na]^+$</p>	
<p>Composé GB-20: Acide (<i>E</i>)-8,11,12-trihydroxyoctadec-9-énoïque</p> <p>Formule brute : $C_{18}H_{34}O_5$</p> <p>MS: m/z 353,2855 $[M+Na]^+$ et à m/z 683,6467 $[2M+Na]^+$</p> <p>RMN 1H (400 MHz) RMN ^{13}C (150 MHz) (Tableau III-18, page 246)</p>	

Résumés

Résumé

Ce travail phytochimique a comme but principal d'étudier deux espèces végétales, de déterminer leur composition métabolique ainsi que d'établir la stéréochimie des centres chiraux de nouvelles molécules isolées.

Le travail est divisé en deux parties distinctes, chacune portant sur une plante différente, *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae), une plante marine et *Galium brunneum* (Rubiaceae), une plante terrestre. Pour améliorer les connaissances phytochimiques de deux plantes, nous avons présenté dans cette thèse les résultats des travaux phytochimiques réalisés sur ces espèces.

La partie 1 présente l'étude phytochimique de l'extrait butanolique des rhizomes frais de l'espèce marine *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae). Cette étude a permis l'isolement d'un phénol, d'un terpène, et cinq composés appartenant à la famille des flavonoïdes dont deux sont originaux. Ces métabolites n'ont jamais été décrits dans les plantes marines. L'identification structurale a été générée par l'analyse des données spectrales obtenues par les méthodes spectroscopiques RMN mono et bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), par la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-ESI-MS), UV et IR, et par la mesure du pouvoir rotatoire. Pour certains composés, les configurations des carbones asymétriques ont été déterminées par l'analyse des spectres de dichroïsme circulaire CD et par l'application de la réaction de Mosher.

La partie 2 porte sur l'étude phytochimique des parties aériennes de *Galium brunneum* (Rubiaceae), une espèce qui n'a jamais été étudiée au point de vue phytochimique et biologique. Un criblage des métabolites présents a été réalisé en montrant la présence prépondérante de composés de la famille des iridoïdes et des flavonoïdes. Le fractionnement des extraits acétate d'éthyle et n-butanol a abouti à l'isolement et l'identification de vingt-un métabolites appartenant à différentes classes : cinq flavonoïdes, six lignanes, six iridoïdes, trois saponines et un oxylipine. Leurs structures ont été déterminées à l'aide des techniques spectroscopiques RMN 1D et 2D, par la spectrométrie de masse ESI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.

Mots-clés :

Cymodocea nodosa, *Galium brunneum*, Flavonoïdes, Lignanes, Iridoïdes, Saponines, Mosher, RMN.

Abstract

The main purpose of this phytochemical work is to study some plant species, to determine their metabolic composition and to establish the stereochemistry of the chiral centers of new isolated molecules.

The work is divided into two distinct parts, each covering a different plant, *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae), a marine species and *Galium brunneum* (Rubiaceae), a terrestrial plant. To improve the phytochemical knowledge of these plants, we presented in this thesis the results of the phytochemical study carried out on these two species.

Part **1** presents the phytochemical study of the butanolic extract of the fresh rhizomes of the marine species, *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae). This study allowed the isolation of one phenol, one terpene, and five compounds belonging to the flavonoid family, two of which are original. These metabolites have never been described in marine plants. The structural identification was generated by the analysis of spectral data obtained by the mono and bidimensional NMR spectroscopic methods (COSY, HSQC, HMBC and NOESY), mass (ESI-MS and HR-ESI-MS), UV, IR and by the measurement of optical rotary. For some compounds, asymmetric carbon configurations were determined by the analysis of the circular dichroism spectra and by the application of the modified Mosher reaction.

Part **2** deals with the phytochemical study of the aerial parts of *Galium brunneum* (Rubiaceae), a species that has never been studied in phytochemical and biological point of view. Screening of the metabolites present was carried out, showing the predominant presence of compounds of the family iridoids and flavonoids. The fractionation of the ethyl acetate and butanolic extracts resulted in the isolation and identification of twenty one metabolites belonging to the different classes: five flavonoids, six lignans, six iridoids, three saponins, and one oxylipin. Their structures were determined using 1D and 2D NMR spectroscopic techniques, ESI-MS mass spectrometry, and comparison with the literature data.

Key words

Cymodocea nodosa, *Galium brunneum*, Flavonoids, Lignans, Iridoids, Saponins, Mosher, NMR.

ملخص

الهدف من هذا العمل الكيميائي هو دراسة نوعين من النباتات، لفصل مركباتها الأيضية وتحديد البنية الفراغية للمراكز الكيرالية للجزيئات المعزولة الجديدة.

ينقسم العمل إلى قسمين منفصلين، على نبتتين مختلفتين، *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae)، وهي من النباتات الأرضية. و *Galium brunneum* (Rubiaceae)، وهي من النباتات البحرية.

قدمنا في هذه الأطروحة نتائج العمل الكيميائي النباتي التي أجريت على هاتين النبتتين وذلك لتحسين المعارف الكيميائية. يظهر الجزء 1 الدراسة الكيميائية النباتية للمستخلص البيوتانولي للجذور الطازجة للنبتة البحرية، *Cymodocea nodosa*. هذه الدراسة مكنت من عزل 7 مركبات: مركب فينولي، مركب تربيني وخمس مركبات تنتمي الى عائلة الفلافونويدات، اثنان منها تم عزلهما لأول مره في النباتات البحرية. هذه المركبات تم عزلها ثم معالجتها وتحديد البنية الفراغية من خلال تحليل البيانات الطيفية التي حصل عليها عن طريق مطيافيه الرنين المغناطيسي احاديه وثنائيه الابعاد، مطيافيه الكتلة، الأشعة فوق البنفسجية، الأشعة تحت الحمراء وحساب زاويه التدوير النوعي. بالنسبة لبعض المركبات تم تحديد الفراغية الكيميائية من خلال تطبيق تفاعل موشر.

يغطي الجزء 2 الدراسة الكيميائية النباتية للأجزاء الهوائية لنبات *Galium brunneum*، وهي من الأنواع التي لم يتم دراستها من الناحية الكيميائية والبيولوجية. تم إجراء الفحص الكيميائي للأبيض الثانوي والذي تبين وجود غالب المركبات من عائلة الايردويدات و الفلافونويدات. أدى فصل المستخلصين العضويين إيثيل اسيتات و بيوتانولي الى عزل 21 مركب كيميائي من فئات مختلفة: خمسة فلافونيدات ، ستة لينينات، ستة ايردويدات، ثلاثة صابونين و حمض دهني . تم تحديد هيكلها باستخدام تقنيات طيفية الرنين المغناطيسي احاديه وثنائيه الابعاد، مطيافية الكتلة والمقارنة مع البيانات المكتبية .

كلمات البحث:

Cymodocea nodosa، *Galium brunneum*، فلافونويدات، لينينات، ايردويدات، صابونين، مطيافيه الرنين المغناطيسي، تفاعل موشر.

Prenylated Flavonoids and Phenolic Compounds from the Rhizomes of Marine Phanerogam *Cymodocea nodosa*

Authors

Abla Smadi¹, Maria Letizia Ciavatta², Fatma Bitam³, Marianna Carbone², Guido Villani², Margherita Gavagnin²

Affiliations

- 1 Université de Batna 1, Faculté des Sciences de la matière, Département de Chimie, Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE), Batna, Algérie
- 2 Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Chimica Chimica Biomolecolare (ICB), Pozzuoli (Na), Italy
- 3 Université de Batna 2, Faculté de Médecine, Département de Pharmacie, Batna, Algérie

Key words

seagrass, *Cymodocea nodosa*, Cymodoceaceae, prenylflavonoids, NMR

received August 7, 2017

revised November 3, 2017

accepted November 8, 2017

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-122747>

Published online | Planta Med © Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York | ISSN 0032-0943

Correspondence

Dr. Maria Letizia Ciavatta

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Chimica Biomolecolare

Via Campi Flegrei, 34-80078 Pozzuoli (Naples), Italy

Phone: + 39 08 18 67 52 43, Fax: + 39 08 18 04 17 70

lciaavatta@icb.cnr.it



Supporting information available online at
<http://www.thieme-connect.de/products>

ABSTRACT

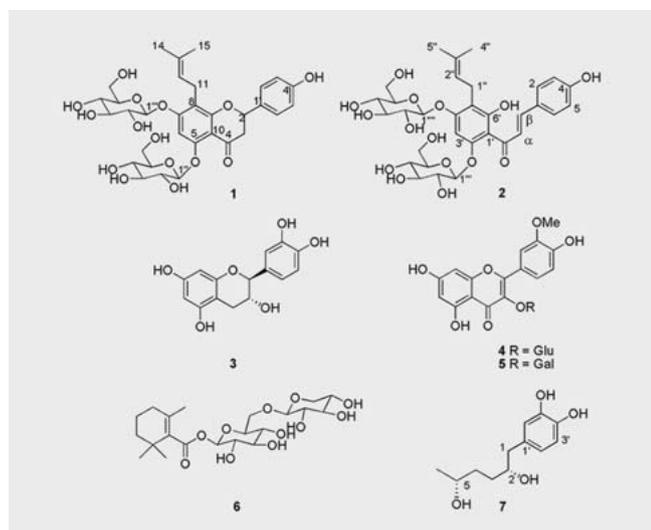
Chemical investigation of the rhizomes of the marine phanerogam *Cymodocea nodosa* resulted in the isolation of two new prenylated flavon-di-*O*-glycosides, cymodioside A (**1**) and B (**2**), along with known phenolic compounds **3–7**, some of which never reported from seagrasses to date. The structures of compounds **1** and **2** were established by extensive nuclear magnetic resonance analysis. In addition, the absolute configuration of 4-(2,5-dihydroxyhexyl) benzene-1,2-diol (**7**), which was not previously reported in the literature, has been now determined.

Introduction

Marine phanerogams are flowering plants that inhabit the oceans worldwide and play a significant role in coastal ecosystems [1]. Because of their great ecological importance, a number of studies have been dedicated to seagrasses and their ecology [2–4]. On the other side, the chemistry of these plants has not been equally well investigated even though the studies conducted to date report the presence of a wide array of natural products including phenols, flavonoids, sterols, and few terpenoids [5, 6]. *Cymodocea nodosa* (Ucria) (Ascherson) is a seagrass distributed across the Mediterranean Sea and adjacent eastern Atlantic coasts. It belongs to one of the four families of higher plants exclusively marine (Cymodoceaceae, Hydrocharitaceae, Posidoniaceae, and Zosteraceae) encompassing a total of 15 species in five genera [7]. *C. nodosa* holds a significant relevance in various ecosystems as evidenced by numerous ecological investigations [8, 9] whereas a limited number of studies concern with the chemical aspects. To date, the compounds characterized from this species include caffeic acid, quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside and isorhamnetin 3-*O*-

β -glucopyranoside [10], sterols and 3-keto steroids [11, 12], and a sulfated polysaccharide [13], all of which are isolated from the aerial parts. Quite recently, four diarylheptanoids, a meroterpenoid, and brominated briarane diterpenes were reported from the whole plant [14, 15], and lastly, chicoric acid was found in high concentration in leaves and rhizomes [16].

In the course of our ongoing studies on marine organisms including seagrasses [17, 18], we have analyzed the chemical content of the rhizomes of *C. nodosa*. In particular, our attention has been focused towards the *n*-butanol-soluble portion of the acetone extract containing polyhydroxy aromatic components. This study led us to isolate several phenolic metabolites including two new prenylated flavonoids, cymodioside A (**1**) and B (**2**), and a series of known metabolites (compounds **3–7**), some of them never reported from *C. nodosa* (► **Fig. 1**). The structure elucidation of **1** and **2** and the assignment of the absolute configuration of 4-(2,5-dihydroxyhexyl) benzene-1,2-diol (**7**) that was not previously determined are here described.



► Fig. 1 Structures of the isolated compounds from *C. nodosa*.

Results and Discussion

Fresh plants of *C. nodosa* collected in the Gulf of Pozzuoli (Naples) in October 2014 were carefully separated into leaves and rhizomes. Rhizomes were exhaustively extracted with acetone, and after removal of the organic solvent, the aqueous residue was subsequently partitioned with diethyl ether and *n*-butanol. The TLC chromatographic screening of both extracts revealed a complex metabolite pattern in the *n*-butanol part. Several brownish and yellowish spots were observed by developing TLC plates with cerium sulphate. A portion of this extract (1 g) was fractionated on a Sephadex LH-20 column to give 10 fractions (Fr. I–X), all of which were analyzed by NMR. The proton spectra revealed the presence of phenolic components in almost all the fractions that were subsequently submitted to further purification steps including SPE (solid phase extraction) reversed-phase chromatography and HPLC (see “Material and Methods” for details). Two new minor compounds, named cymodiosides A and B, were isolated from two distinct fractions and characterized as 8-prenylnaringenin 5,7-*O*- β -diglucopyranoside (1) and 5'-prenylchalconaringenin 2',4'-*O*- β -diglucopyranoside (2), respectively. In addition, main (-)-catechin (3) [19–21], which is a quite rarely occurring metabolite, isorhamnetin-3-*O*-glucopyranoside (4) [22,23] and isorhamnetin-3-*O*-galactopyranoside (5) [24,25] (1 : 1 mixture), jasminoside M (6) [26], and 4-(2,5-dihydroxyhexyl) benzene-1,2-diol (7) [27] (► Fig. 1) were also isolated and identified by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.

Cymodioside A (1) was obtained as a pale-yellow oil. The molecular formula $C_{32}H_{40}O_{15}$ was deduced by the sodium adduct ion at m/z 687.2260 in the HR-ESI-MS spectrum (positive mode) accounting for 13 indices of hydrogen deficiency. Analysis of the 1H NMR spectrum in CD_3OD (► Table 1) immediately revealed the presence of a glycosyl 4',5,7-trihydroxy flavanone framework (naringenin) bearing a prenyl moiety. In particular, the spectrum contained multiplets due to an ABX system at δ 3.06 (1H, dd, $J = 17.0, 12.7$ Hz, H-3a), 2.82 (1H, dd, $J = 17.0, 2.9$ Hz, H-3b), and

► Table 1 NMR data^a in ppm for compound 1 in CD_3OD .

C	δ_H , m (J in Hz)	δ_C , m	HMBC ^b
2	5.38, dd (12.7, 2.9)	80.3, CH	C-1'
3	3.06, dd (17.0, 12.7) 2.82, dd (17.0, 2.9)	46.4, CH ₂	C-2, C-4
4		194.0, C	
5		159.6, C	
6	6.78, s	98.3, CH	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10
7		162.5, C	
8		114.5, C	
9		162.8, C	
10		108.5, C	
11	3.45, m 3.29, m	23.0, CH ₂	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13
12	5.20, app t (7.2)	123.5, CH	C-13
13		132.0, C	
14	1.64, s	25.9, CH ₃	C-12, C-13, C-15
15	1.61, s	18.1, CH ₃	C-12, C-13, C-14
1'		131.1, C	
2', 6'	7.35, d (8.5)	129.0, CH	C-2,
3', 5'	6.85, d (8.5)	116.3, CH	C-1', C-2', C-4'
4'		159.0, C	
1''	4.94, d (7.7)	104.4, CH	C-5
2''	3.57, m	74.73, CH	
3''	3.51, m	77.18, CH	
4''	3.33, m	71.76, CH	
5''	3.69, m	78.26, CH	
6''	3.96, m 3.69, m	62.95, CH ₂	
1'''	5.14, d (7.5)	100.7, CH	C-7
2'''	3.56, m	74.85, CH	
3'''	3.51, m	77.18, CH	
4'''	3.33, m	71.86, CH	
5'''	3.69, m	78.32, CH	
6'''	3.96, m 3.69, m	62.95, CH ₂	

^a Assignments aided by HSQC and HMBC ($J = 7$ Hz) experiments; ^b HMBC correlations are from protons stated to the indicated carbons.

5.38 (1H, dd, $J = 12.7, 2.9$ Hz, H-2), two sets of aromatic doublets at δ 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2',6') and 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3',5') attributed to a *p*-disubstituted benzene ring, a singlet at δ 6.78 (1H, s) assigned to an isolated proton on an aromatic pentasubstituted ring, and a series of signals at δ 3.29 (1H, m, H-11a), 3.45 (1H, m, H-11b), 5.20 (1H, app t, $J = 7.2$ Hz, H-12), 1.64 (3H, s, H-14), and 1.61 (3H, s, H-15) that were attributed to the protons of a prenyl chain. The structure of 1 included two sugar moieties as suggested by analysis of ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (see Fig. S44, Supporting Information) showing a typical fragmenta-

tion pattern with m/z 501 ($M - C_6H_{12}O_6$)⁻, and m/z 339 ($M - 2 \times C_6H_{12}O_6$)⁻ ion peaks as well as ¹H and ¹³C NMR spectra displaying two anomeric glycosyl signals (► **Table 1**). Comparison of NMR data of **1** with the literature suggested that both sugar moieties were glucopyranose. Analysis of the coupling constant values of the two anomeric protons at δ 4.94 (H-1^{''}, $J_{H-H} = 7.7$ Hz) and 5.14 (H-1^{'''}, $J_{H-H} = 7.5$ Hz) indicated that the two sugars had the β -configuration. The prenyl chain was located at C-8 of naringenin skeleton, whereas the glucosyl units were positioned at 5-OH and 7-OH groups according to the following evidence. Diagnostic cross-peaks were observed in the HMBC experiment between C-5 (δ 159.6) and both H-1^{''} (δ 4.94) and H-6 (δ 6.78), as well as between C-7 (δ 162.5) and H-1^{'''} (δ 5.14), H-6, and H₂-11 (δ 3.45 and 3.29). Furthermore, significant NOESY correlations were observed between H-6 and both H-1^{''} and H-1^{'''} anomeric protons, confirming the proposed assignment. Thus, the structure of cymodioside A (**1**) was determined as 8-prenylnaringenin-5,7-*O*- β -diglucopyranoside. Compound **1** was closely related to evodioside B, which has been isolated from the two terrestrial plants *Evodia rutaecarpa* and *Evodia daniellii* [28, 29]. NMR spectra of **1** were also recorded in DMSO-*d*₆ (see “Materials and Methods”) and compared with those reported in the literature for evodioside B [28, 29] supporting the structure assignment.

Cymodioside B (**2**) was isomeric with **1** with the same molecular formula C₃₂H₄₀O₁₅ as deduced by the sodium adduct ion at m/z 687.2258 in the HR-ESI-MS spectrum. The ¹H NMR spectrum of **2** recorded in both CD₃OD (► **Table 2**) and DMSO-*d*₆ (“Materials and Methods”) revealed the presence of two phenol rings bearing two glycosyl residues and a prenyl moiety the same as **1**. The main difference resides in the presence in **2** of an olefinic AB system at δ 8.08 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H- α) and 7.76 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H- β) (► **Table 2**) attributable to a *trans* double bond replacing the aliphatic CH₂-CH moiety of the flavanone framework in **1**.

These features suggested that cymodioside B (**2**) was the corresponding chalcone form of cymodioside A (**1**). Analysis of 2D NMR experiments confirmed this assumption. Particularly diagnostic were the HMBC spectra revealing correlations between H- β and C=O, C-2, and C-6 as well as between H- α and both C-1 and C=O. Additional HMBC correlations were observed between H-3' and C-1', C-2', C-4' and C-5', and H-1^{''} with C-4', C-5' and C-6' according to the substitution pattern with the two glucose moieties attached to 2',4' positions and the prenyl group linked to C-5' of the chalcone skeleton. Comparison of spectroscopic data of **2** with those reported in the literature for plant chalcones revealed that it was the di-*O*-glucoside of desmethyl xanthohumol, previously reported from hops of *Humulus lupulus* L [30–32].

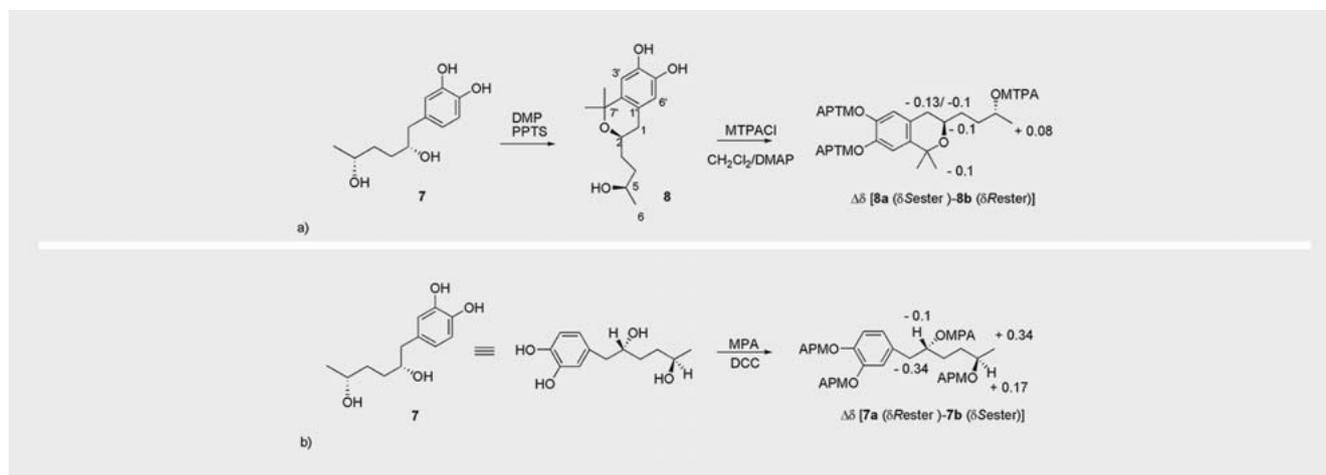
The structural relationship between cymodiosides was definitively confirmed by the chemical interconversion of compounds **1** and **2** that was observed to occur during workup in some experimental conditions including a prolonged storage in organic solvents [32, 33]. Due to this, compound **1** was a scalemic mixture with a predominance of 2S stereoisomer [34]. In fact, the CD profile of **1** showed very weak positive and negative Cotton effects in the $n \rightarrow \pi^*$ (~ 330 nm) and $\pi \rightarrow \pi^*$ (~ 290–280 nm) regions, respectively, with absorption magnitudes greatly reduced with respect to optically pure 2S-naringin derivatives [34, 35].

► **Table 2** NMR data^a in ppm for compound **2** in CD₃OD.

C	δ_H , m (J in Hz)	δ_C , m	HMBC ^b
β	7.76, d (16.0)	144.8, CH	C=O, C-2, C-6
α	8.08, d (16.0)	125.6, CH	C=O, C-1
C=O	–	195.1, C	
1	–	130.4, C	
2	7.65, d (8.5)	132.0, CH	α , C-4
3	6.86, d (8.5)	117.1 CH	C-1
4	–	161.8, C	
5	6.86, d (8.5)	117.1 CH	C-1
6	7.65, d (8.5)	132.0, CH	α , C-4
1'	–	108.6, C	
2'	–	159.3, C	
3'	6.59, s	94.3, CH	C-1', C-2', C-3', C-4'
4'	–	161.8, C	
5'	–	112.8, C	
6'	–	164.2, C	
1''	3.45, m 3.30, m	22.5, CH ₂	C-4', C-5', C-6', C-2'', C-3''
2''	5.25, m	124.0, CH	
3''	–	131.7, C	
4''	1.82, s	25.9, CH ₃	C-2'', C-3''
5''	1.67, s	18.0, CH ₃	C-2'', C-3''
1'''	5.27, d (7.6)	101.4, CH	C-2'
2'''	3.62, m	74.93, CH	C-1'''
3'''	3.51, m	78.34, CH	
4'''	3.33, m	71.83, CH	
5'''	3.75, m	78.55, CH	
6'''	4.00, m 3.71, m	63.05, CH ₂	
1''''	5.14, d (7.4)	100.9, CH	C-4'
2''''	3.56, m	75.10, CH	C-1''''
3''''	3.51, m	78.42, CH	
4''''	3.33, m	71.90, CH	
5''''	3.75, m	78.63, CH	
6''''	4.00, m 3.71, m	62.97, CH ₂	

^a Assignments aided by HSQC and HMBC ($J = 8$ Hz) experiments; ^b HMBC correlations are from protons stated to the indicated carbons.

Along with the chemical characterization of the prenylated pair flavanone (**1**) – chalcone (**2**), the absolute configuration of two carbinolic stereogenic centers of 4-(2,5-dihydroxyhexyl) benzene-1,2-diol (**7**) has been also determined. Analysis of NMR spectra of **7** evidenced that carbon and proton resonances were almost identical with those of the compound recently isolated by anaerobic microbial fermentation of green tea [27]. In particular, the multiplicities of H₂-1 and H-3a signals were identical in the two compounds, suggesting that **7** had the same relative configuration at two stereogenic centers as the literature compound



► **Fig. 2** **a** Reaction of **7** with DMP to give compound **8**. Reaction of **8** with MTPA chlorides and $\Delta\delta$ values calculated for the *tri*-MTPA esters **8a** and **8b**. **b** Reaction of **7** with *R*- and *S*-MPA and $\Delta\delta$ values calculated for the *tetra*-MPA esters **7a** and **7b**.

[27]. In that paper, compound **7** was assumed to derive by degradation of co-occurring (*-*)-*epi*-catechin and, consequently, the 2- (*R*) configuration, the same as (*-*)-*epi*-catechin, was assigned whereas the configuration at C-5 remained undetermined [27]. Analogous with the literature, in *C. nodosa* compound **7** could derive from co-occurring (*-*)-catechin (**3**) and thus the 2- (*R*) absolute configuration, the same as (*-*)-catechin (**3**), should be suggested also in this case. With the aim at establishing the C-5 absolute configuration as well as at securing the C-2 absolute configuration, it was decided to apply the modified Mosher method after protecting phenolic 3'-OH and 4'-OH by formation of the corresponding acetonide. The protection reaction was conducted by using dimethoxypropane (DMP) and catalytic amount of pyridinium *p*-toluenesulfonate, but under the reaction conditions, **7** underwent an intramolecular cyclization following the Oxa-Pictet-Spengler mechanism [36, 37] and gave the main isochromane **8** rather than the expected acetonide derivative. Thus, the modified Mosher method was nevertheless used on derivative **8** to determine the absolute configuration of the unaffected C-5 stereogenic center. The reaction of **8** with *R* and *S* MTPA chlorides gave the corresponding *S* and *R* *tri*-MTPA ester derivatives **8a** and **8b**. The evaluation of $\Delta\delta$ values ($\delta_S - \delta_R$) of protons close to H-5 indicated the 5- (*R*) absolute configuration (► **Fig. 2a**). The 1D and 2D of cymodioside A (**1**) and B (**2**), compound **7** and its MPA esters **7a–7b**, compound **8**, and MTPA esters **8a–8b** are available as Supporting Information.

However, with the aim at definitively proving the absolute configuration of C-2, the CDA (chiral derivatization agents) approach proposed by Riguera's group for secondary 1,*n*-diols was followed by using MPA as chiral derivatizing reagent [38–40]. The reaction of **7** with *R* and *S* MPA reagents gave the corresponding *R* and *S* *tetra*-MPA ester derivatives **7a** and **7b**. It was assumed that MPA substituents esterifying the *ortho*-hydroxyl groups in the aromatic ring did not alter for each derivative the representative conformation as it relates to NMR [38–40]. According to the CDA method [38–40], comparison of ^1H -NMR spectra of **7a** and **7b** allowed to calculate the signs of $\Delta\delta$ values ($\delta_R - \delta_S$) of C-1/C-6 fragment

(► **Fig. 2b**). The sign distribution of $\Delta\delta$ was homogeneous and consistent with the *anti*-1,4 disposition [39], implying the assignment of the (*R*) absolute configuration at both C-2 and C-5 stereogenic centers, in agreement with the already obtained results.

In conclusion, this study added new insights to the chemistry of marine plants by characterization of two new phenolic metabolites, cymodioside A (**1**) and cymodioside B (**2**), as well as the isolation of known compounds **3–7**. In particular, (*-*)-catechin (**3**), jasminoside M (**6**), and 4-(2,5-dihydroxyhexyl) benzene-1,2-diol (**7**) have never been described from seagrasses. Phenolic compounds are widely distributed in marine plants and a number of biological functions have been attributed to them [5, 6]. They include flavones and flavonols [10, 17, 41–44] whereas flavanone components have not been reported till now. Thus, this study represents the first finding of flavanones as well as of prenylated flavonoids in seagrasses.

Materials and Methods

General experimental procedures

Optical rotations were obtained with a Jasco P2000 digital polarimeter (Jasco). UV spectra were acquired on a Jasco V-650 spectrophotometer. ECD (electronic circular dichroism) curves were acquired on a Jasco J-815 spectropolarimeter. IR (infrared) were recorded on a Jasco FTIR 4100. NMR experiments were recorded at the Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB) NMR Service Centre. Chemical shifts values are reported in ppm and referenced to the internal signals of residual protons (CD_3OD , ^1H δ 3.34, ^{13}C 49.0 ppm; $\text{DMSO}-d_6$, ^1H δ 2.50, ^{13}C 40.0 ppm; CDCl_3 , ^1H δ 7.26, ^{13}C 77.0 ppm). The 1D and 2D NMR spectra were acquired on a Bruker Avance-400 operating at 400 MHz using an inverse probe fitted with a gradient along the z-axis and a Bruker DRX-600 operating at 600 MHz using an inverse TCI CryoProbe fitted with a gradient along the z-axis. ESI-MS and ESI-MS/MS spectra were measured in positive and negative mode, respectively, on a Micromass Q-TOF Micro spectrometer coupled with an HPLC Waters Alliance

2695. HR-ESI-MS spectra were recorded on a Thermo Q-Exactive spectrometer coupled with a UHPLC Agilent Infinity 1290 and on a Shimadzu IT-TOF spectrometer equipped with an ESI interface. HPLC separation was performed on a Shimadzu HPLC system using a Shimadzu liquid chromatograph LC-10AD equipped with an UV SPD-10A wavelength detector with a reversed-phase (RP) column (10 × 250 mm, Aventis-Supelco). Silica gel chromatography was performed using precoated KieselGel 60 F254 plates (TLC) and Kieselgel 60 powder (70–230 mesh) from Merck. The spots on TLC were visualized under UV light (254 nm) and then sprayed with 10% H₂SO₄ in water followed by heating. Sephadex LH-20 was from Amersham Pharmacia Biotech. RP-18 cartridge (SPE) were purchased from Macherey-Nagel.

Biological material

The seagrass *C. nodosa* was collected in the Gulf of Pozzuoli (Naples, Italy) by scuba diving in October 2014. The plant has been identified by one of us (G.V.). Fresh rhizomes were accurately cleaned from the leaves and immediately submitted to the extraction procedure. A frozen voucher specimen of rhizomes is stored at ICB (code CNL).

Extraction and isolation

Fresh rhizomes (1 kg wet, 300 g after extraction) were cut and exhaustively extracted with acetone (0.6 L × 4) by using ultrasounds. After filtration and evaporation *in vacuo* of the organic solvent, the aqueous residue was partitioned first with diethyl ether (500 mL × 4) and subsequently with *n*-BuOH (500 mL × 4) to obtain two extracts of 0.5 g and 1.5 g, respectively. Chromatographic screening of both extracts revealed a more complex metabolite pattern in the *n*-BuOH extract, a portion of which (1.0 g) was fractionated by Sephadex LH-20 (column diameter: 3 cm diameter, 120 cm height, 300 g Sephadex) and eluted in isocratic mode with CHCl₃/MeOH 1:1. The collected eluates (52 tubes, each with a volume of 20 mL) were combined to obtain 10 fractions (I–X). NMR analysis of all fractions revealed that some of them contained mainly phenolic and several UV-absorbing compounds. Fraction IV (50.2 mg) was subjected to C18 cartridge (SPE, Macherey-Nagel) and eluted with a gradient of MeOH in H₂O (0–100%) to give eight fractions [IV(1) to IV(8)]. Subfraction IV(5), 10.0 mg, eluted with MeOH/H₂O 3:7, was further purified by HPLC (Supelco, Ascentis C18 column, 1.0 × 25 cm) with a 30-min eluent gradient starting from 45 to 60% MeOH in H₂O (flow rate 0.8 mL/min) to yield pure compounds **1** (3.7 mg) and **6** (0.8 mg). Fraction V (95.1 mg) was further fractionated on C18 cartridge (SPE, Macherey-Nagel) with a gradient of MeOH in H₂O (0–100%) to give eight fractions [V(1) to V(8)]. Fractions V(1) (8.0 mg) and V(2) (4.1 mg), eluted with MeOH/H₂O 1:9, contained pure compound **7** (12.2 mg), whereas fraction V(5) (14.3 mg), eluted with MeOH/H₂O 6:4, was a mixture containing compounds **1**, **4**, and **5**. Half of fraction VI (50.1 mg) was additionally purified on C18 cartridge (SPE, Macherey-Nagel) with a gradient of MeOH in H₂O (0–100%) to give subfraction VI(1) eluted with MeOH/H₂O 1:9 containing compound **7** (7.3 mg) and subfraction VI(4) (MeOH/H₂O 3:7) containing compounds **4** and **5** (mixture 1:1, 17.0 mg). Fraction VII (60.5 mg) was subjected to C18 cartridge (SPE, Macherey-Nagel) with a gradient of MeOH in

H₂O (0–100%) to yield a subfraction VII(4) (2.1 mg) eluted with MeOH/H₂O 4:6 containing compound **2**. Finally, fraction X (48.4 mg) from the first purification column was further submitted to a Sephadex LH-20 column (column diameter: 1 cm diameter, 60 cm height, 20 g Sephadex) eluted with CHCl₃/MeOH 1:1 to give (–)-catechin (**3**, 20.7 mg).

Cymodioside A (**1**): pale-yellow oil; R_f 0.38 RP-18 F₂₅₄ MeOH/H₂O (6:4); [α]_D²⁵ – 1.7 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 348 (7.67), 283 (8.36), 225 (9.11); CD (MeOH) Δε₃₄₂ + 1.70, Δε₂₈₈ – 1.48, Δε₂₃₇ – 0.03; IR (KBr) ν_{max} 3405, 2924, 1645, 1597, 1076 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (MeOD) see ▶ **Table 1**; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.30 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2' and H-6'), 6.78 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.61, (1H, s, H-6), 5.38 (1H, dd, *J* = 13.0, 2.7 Hz, H-2), 5.16 (1H, m, H-12), 3.35 (1H, m overlapped, H-11a), 3.11 (1H, m, overlapped, H-11b), 3.03 (1H, dd, *J* = 13.0, 17.4 Hz, H-3ax), 2.70 (1H, dd, *J* = 2.7, 17.4 Hz, H-3eq), 1.57 (3H, s, H₃-15), 1.55 (3H, s, H₃-14), 5.12 (1H, overlap, H-1''), 3.12–3.49 (8H, overlap, H-2'', H-2''', H-3'', H-3''', H-4'', H-4''', H-5'', H-5'''), 3.45 (2H, overlap, H-6''a and H-6'''a), 3.74 (2H, overlap, H-6''b and H-6'''b); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 190.7 (C, C-4), 162.6 (C, C-9), 160.5 (C, C-7), 157.7 (C, C-4' and C-5), 131.2 (C, C-1'), 130.5 (C, C-13), 127.9 (CH, C-2' and C-6'), 122.7 (CH, C-12), 116.6 (CH, C-3' and C-5'), 110.1 (C, C-8), 106.2 (C, C-10), 103.0 (CH, C-1''), 99.0 (CH, C-1'''), 96.5 (CH, C-6), 77.8 (CH, C-2), 77.2–69.9 (CH, C-2''–C-5'' and C-2'''–C-5'''), 60.9 (CH₂, C-6'' and C-6'''), 44.6 (CH₂, C-3), 25.5 (CH₃, C-14), 21.2 (CH₂, C-11), 17.7 (CH₃, C-15); ESI-MS (pos. ion mode) *m/z* 687 [M + Na]⁺; ESI-MS (neg. ion mode) *m/z* 663 [M – H][–]; HR-ESI-MS *m/z* 687.2260 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₂H₄₀O₁₅Na 687.2265).

Cymodioside B (**2**): yellow oil; R_f 0.20 RP-18 F₂₅₄ MeOH/H₂O (6:4); [α]_D²⁵ – 3.2 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 369 (9.25), 285 (8.69); IR (KBr) ν_{max} 3369, 2923, 1598, 1076, 839 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.00 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-β), 7.68 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-α), 7.63 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2 and H-6), 6.78 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3 and H-5), 6.43, (1H, s, H-3'), 5.16 (1H, m, overlap, H-2''), 3.34 (1H, m overlapped, H-1''a), 3.12 (1H, m, overlapped, H-1''b), 1.70 (3H, s, H₃-5''), 1.58 (3H, s, H₃-4''), 5.12 (1H, overlap, H-1'''), 4.97 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1'''), 3.12–3.49 (8H, overlap, H-2''', H-2''''', H-3''', H-3''''', H-4''', H-4''''', H-5''', H-5'''''), 3.45 (2H, m, H-6''a and H-6''''a), 3.74 (2H, m, H-6''b and H-6''''b); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 192.9 (C, C=O), 162.7 (C, C-6'), 160.4 (C, C-4, C-4'), 157.7 (C, C-2'), 144.0 (CH, C-β), 131.2 (CH, C-2 and C-6), 130.2 (C, C-1 and C-3'), 122.8 (CH, C-α and C-2''), 115.2 (CH, C-3 and C-5), 110.3 (C, C-5'), 106.3 (C, C-1'), 99.9 (CH, C-1'''), 99.5 (CH, C-1'''''), 93.2 (CH, C-3'), 77.3–70.0 (CH, C-2'''–C-5''' and C-2''''–C-5'''''), 61.0–60.9 (CH₂, C-6''' and C-6'''''), 25.6 (CH₃, C-4''), 21.3 (CH₂, C-1''), 17.8 (CH₃, C-5''); ESI-MS (pos. ion mode) *m/z* 687 [M + Na]⁺; HR-ESI-MS *m/z* 687.2258 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₂H₄₀O₁₅Na 687.2265).

4-(2,5-dihydroxyhexyl)-benzene-1,2-diol (**7**): white powder, [α]_D²⁵ – 7.5 (c 0.4, MeOH); [α]_D²⁵ lit. – 4.1 (c 0.1, MeOH) [27]; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 6.69 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 6.68, (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-6'), 6.55, (1H, dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, H-2'), 3.72, (2H, m, H-2 and H-5), 2.65 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.9 Hz, H-1a), 2.58 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, H-1b), 1.65 (3H, m, H-3a and H₂-4), 1.38 (1H, bdd, *J* = 18.6, 8.4, H-3b), 1.15 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H₃-6); ¹³C

NMR (MeOD, 400 MHz, indirect detection from 2D heteronuclear experiments) δ 145.3 (C, C-5'), 144.2 (C, C-4'), 132.0 (C, C-1'), 121.6 (CH, C-2'), 117.3 (CH, C-6'), 116.0 (CH, C-3'), 74.0 (CH, C-2), 68.4 (CH, C-5), 44.3 (CH₂, C-1), 36.0 (CH₂, C-4), 33.4 (CH₂, C-3), 23.2 (CH₃, C-6); HR-ESI-MS m/z 249.1102 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₁H₁₈NaO₄ 249.1103).

Reaction of compound 7 with DMP

An aliquot of compound 7 (8.0 mg) was allowed to react with DMP (1 mL) and a catalytic amount of pyridinium *p*-toluenesulfonate at 70 °C for 45 min. The reaction was then quenched with H₂O (5 mL) and extracted with Et₂O (5 mL × 3). All the organic layers were combined and evaporated, and the crude reaction mixture (11 mg) was purified on a silica-gel pipette Pasteur packed in CHCl₃ and eluted with a gradient of MeOH in CHCl₃ (1–5%). Fractions (50 tubes) of 2 mL were collected and checked by TLC chromatography (CHCl₃/MeOH, 9:1). Fractions (34–49) eluted with 5% MeOH were combined to yield compound 8 (4.6 mg).

3R-(3R-hydroxybutyl)-1,1-dimethylisochroman-6,7-diol (8): ¹H NMR values in ppm (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.59 (1H, s, H-3'), 6.53 (1H, s, H-6'), 3.91 (1H, m, H-5), 3.79 (1H, m, H-2), 2.63 (1H, dd, J = 15.5, 11.3 Hz, H-1ax), 2.42 (1H, dd, J = 15.5, 2.5 Hz, H-1eq), 1.72 (2H, m, H₂-3), 1.70 (1H, m, H-4a), 1.58 (1H, m, H-4b), 1.46 (6H, s, H₃-8' and H₃-9'), 1.22 (3H, d, J = 6.3 Hz, H₃-6); ¹³C NMR (CDCl₃, indirect detection from HSCQ and HMBC) δ 142.4 (C × 2, C-4' and C-5'), 135.4 (C, C-2'), 125.4 (C, C-1'), 114.9 (CH, C-6'), 111.9 (CH, C-3'), 75.5 (C, C-7'), 69.1 (CH, C-2), 67.5 (CH, C-5), 35.2 (CH₂, C-4), 34.6 (CH₂, C-1), 31.9 (CH₂, C-3), 31.0 (CH₃, C-8'), 28.6 (CH₃, C-9') 23.0 (CH₃, C-6); ESI-MS (pos. ion mode) m/z 289 [M + Na]⁺. HR-ESI-MS m/z 289.1409 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₂O₄Na 289.1416).

Preparation of MTPA esters of compound 8: (R)- and (S)-MTPA-Cl (α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl chloride) (10 μ L) and a catalytic amount of DMAP (N,N-dimethylaminopyridine) were separately added to two different aliquots of compound 8 (1.0 mg each) in dry CH₂Cl₂ (0.5 mL). The resulting mixtures were allowed to stir at room temperature for 3 h. After evaporation of the solvent, each mixture was purified on a SiO₂ pipette Pasteur eluting with CHCl₃ to afford pure (S)- and (R)-MTPA esters **8a** and **8b**, respectively.

(S)-MTPA ester (8a): selected ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.94 (1H, s, H-6'), 6.92 (1H, s, H-3'), 5.218 (1H, m, H-5), 3.60 (1H, m, H-2), 2.545 (1H, dd, J = 15.5, 11.3 Hz, H-1ax), 2.437 (1H, dd, J = 15.5, 2.5 Hz, H-1eq), 1.836 (1H, m, H-4a), 1.672 (1H, m, H-4b), 1.379 (3H, d, J = 6.3 Hz, H₃-6); HR-ESI-MS m/z 937.2604 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₅H₄₃O₁₀F₉Na 937.2610).

(R)-MTPA ester (8b): selected ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.98 (1H, s, H-6'), 6.93 (1H, s, H-3'), 5.232 (1H, m, H-5), 3.708 (1H, m, H-2), 2.646 (1H, dd, J = 15.5, 11.3 Hz, H-1ax), 2.567 (1H, dd, J = 15.5, 2.5 Hz, H-1eq), 1.862 (1H, m, H-4a), 1.738 (1H, m, H-4b), 1.296 (3H, d, J = 6.3 Hz, H₃-6); HR-ESI-MS m/z 937.2601 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₅H₄₃O₁₀F₉Na 937.2610).

Preparation of MPA esters of compound 7

R-(MPA) and S-(MPA) (α -Methoxyphenylacetic acid) (6 mg each), DCC (dicyclohexylcarbodiimide) (4.5 mg), and a catalytic amount

of DMAP were added to distinct aliquot of compound 7 (2 mg each) in dry CH₂Cl₂ and left stirring overnight. The reaction mixtures were first purified on distinct Pasteur pipettes eluting with an ethyl acetate gradient in *n*-hexane, and the fractions obtained from *n*-hexane/EtOAc 8:2 were further purified by HPLC on a Kinetex 5 μ m Phenyl-Hexyl 100 Å column (Phenomenex, 250 × 4.6 mm), eluting with MeOH/H₂O (7:3 isocratic mode, flow 1 mL/min) to give R-(MPA)-(7a) (R_t 25 min) and S-(MPA)-(7b) (R_t 27 min) esters, respectively.

R-(MPA)-ester (7a): selected ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.64 (1H, s, H-3'), 6.62 (1H, br s, H-6'), 6.47 (1H, s, H-2'), 4.89 (1H, m, H-2), 4.80 (1H, m, H-5), 2.37 (2H, app d, J = 6.0 Hz, H₂-1); HR-ESI-MS m/z 841.3198 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₈H₅₀O₁₂Na 841.3199).

S-(MPA)-ester (7b): selected ¹H NMR values (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.75 (1H, s, H-3'), 6.69 (1H, br s, H-6'), 6.55 (1H, s, H-2'), 4.99 (1H, m, H-2), 4.63 (1H, m, H-5), 2.71 (2H, app d, J = 6.0 Hz, H₂-1); HR-ESI-MS m/z 841.3195 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₈H₅₀O₁₂Na 841.3199).

Supporting information

The 1D and 2D of cymodioside A (1) and B (2), compound 7 and its MPA esters **7a–7b**, compound 8, and MTPA esters **8a–8b** are available as Supporting Information.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. D. Melck and Mr. A. Esposito of ICB NMR service and Mrs. D. Ricciardi for technical assistance. ICB MS service provided by Dr. A. Cutignano and Mr. M. Zampa is gratefully acknowledged. This research work was granted by MIUR-ITALY PRIN2015 "Top-down and bottom-up approach in the development of new bioactive chemical entities inspired on natural products scaffolds" (Project No. 2015M5CKCE_003). FB is grateful to Faculté de Médecine, Université de Batna (Algeria) for partial financial support. AS is grateful to Universities of Batna 1 and Batna 2 for their fellowships.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Gillanders BM. Seagrasses, Fish, and Fisheries. In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM, eds. Seagrasses: Biology, Ecology, and Conservation. Berlin: Springer; 2006: 503–536
- [2] Ruiz JM, Boudouresque CF, Enriquez S. Mediterranean seagrasses. Bot Mar 2009; 52: 369–381
- [3] Repolho T, Duarte B, Dionísio G, Paula JR, Lopes AR, Rosa IC, Grilo TF, Caçador I, Calado R, Rosa R. Seagrass ecophysiological performance under ocean warming and acidification. Sci Rep 2016; 7: e41443
- [4] Boudouresque CF, Bernard G, Pergent G, Shili A, Verlaquel M. Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: a critical review. Bot Mar 2009; 52: 395–418
- [5] Subhashini P, Dilipan E, Thangaradjou T, Papenbrock J. Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. Nat Prod Bioprospect 2013; 3: 129–136

- [6] Zidorn C. Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae): chemical diversity, bioactivity, and ecological function. *Phytochemistry* 2016; 124: 5–28
- [7] Mabberley DJ. *Mabberley's Plant-Book: a portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2008
- [8] Agostini S, Pergent G, Marchand B. Growth and primary production of *Cymodocea nodosa* in a coastal lagoon. *Aquat Bot* 2003; 76: 185–193
- [9] Mateo MA. Beach-cast *Cymodocea nodosa* along the shore of a semi-enclosed bay: sampling and elements to assess its ecological implications. *J Coastal Res* 2010; 26: 283–291
- [10] Cariello L, Zanetti L, De Stefano S. Phenolic compounds from marine phanerogams, *Cymodocea nodosa* and *Posidonia oceanica*. *Comp Biochem Physiol* 1979; 62B: 159–161
- [11] Sica D, Piccialli V, Masullo A. Configuration at C-24 of sterols from the marine phanerogams, *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. *Phytochemistry* 1984; 23: 2609–2611
- [12] Kontiza I, Abatis D, Malakate K, Vagias C, Roussis V. 3-Keto steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*. *Steroids* 2006; 71: 177–181
- [13] Kolsi RBA, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Blecker C, Allouche N, Belghith H, Belghith K. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharide. *Carbohydr Polym* 2016; 151: 511–522
- [14] Kontiza I, Vagias C, Jakupovic J, Moreau D, Roussakis C, Roussis V. Cymodienol and cymodiene: new cytotoxic diarylheptanoids from the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron Lett* 2005; 46: 2845–2847
- [15] Kontiza I, Stavri M, Zloh M, Vagias C, Gibbons S, Roussis V. New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron* 2008; 64: 1696–1702
- [16] Grignon-Dubois M, Rezzonico B. The economical potential of beach-cast seagrass – *Cymodocea nodosa*: a promising renewable source of chiroic acid. *Bot Mar* 2013; 56: 303–311
- [17] Bitam F, Ciavatta ML, Carbone M, Manzo E, Mollo E, Gavagnin M. Chemical analysis of flavonoid constituents of the seagrass *Halophila stipulacea*: first finding of malonylated derivatives in marine phanerogams. *Biochem Systematics Ecol* 2010; 38: 686–690
- [18] Bitam F, Ciavatta ML, Villani G, Mollo E, Gavagnin M. The first record of neolignans from the marine phanerogam *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry Lett* 2012; 5: 696–699
- [19] Freudenberg K, Karimullah, Steinbrunn G. Umwandlung der Anthocyanidine und Catechine. *Liebigs Ann Chem* 1935; 518: 37–61
- [20] Nahrstedt A, Proksch P, Conn EE. Dhurrin, (–)-catechin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*. *Phytochemistry* 1987; 26: 1546–1547
- [21] Qi SH, Wu DG, Ma YB, Luo XD. A novel flavane from *Carapa guianensis*. *Acta Bot Sin* 2003; 45: 1129–1133
- [22] Rahman W, Ilyas M. Flavonoides des fleurs d'*Argemone mexicana*. *Compt Rend* 1961; 252: 1974–1975
- [23] Senatore F, D'Agostino M, Dini I. Flavonoids glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae). *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2659–2662
- [24] Horhammer L, Wagner H, Arndt HG, Farkas L. Isolierung und Synthese zweier Flavonol-Glycoside von *Cereus grandiflorus* Mill. *Chem Ber* 1966; 99: 1384–1387
- [25] Olszewska MA, Roj JM. Phenolic constituents of the inflorescences of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Phytochemistry Lett* 2011; 4: 151–157
- [26] Yu Y, Gao H, Dai Y, Wang Y, Chen HR, Yao XS. Monoterpenoids from the fruit of *Gardenia jasminoides*. *Helv Chim Acta* 2010; 93: 763–771
- [27] Shii T, Asada C, Matsuo Y, Saito Y, Tanaka T. Polyphenols in lahpets and two new catechin metabolites produced by anaerobic microbial fermentation of green tea. *J Nat Med* 2014; 68: 459–464
- [28] Arisawa M, Horiuchi T, Hayashi T, Tezuka Y, Kikuchi T, Morita N. Studies on constituents of *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae). I. Constituents of the leaves. *Chem Pharm Bull* 1993; 41: 1472–1474
- [29] Yoo SW, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP, Bae B, Lee C. Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 824–830
- [30] Hänsel R, Schulz J. Desmethylxanthohumol: Isolierung aus Hopfen und Cyclisierung zu Flavononen. *Arch Pharm (Weinheim)* 1988; 321: 37–40
- [31] Stevens JF, Ivancic M, Hsu VL, Deinzer ML. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 1997; 44: 1575–1585
- [32] Stevens JF, Taylor AW, Nickerson GB, Ivancic M, Henning J, Haunold A, Deinzer ML. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* 2000; 53: 759–775
- [33] Dewick PM. The shikimate Pathway: aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids. In: *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2009: 137–186
- [34] Gaffield W. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. Determination of aglycone chirality in flavanone glycosides. *Tetrahedron* 1970; 26: 4093–4101
- [35] Caccamese S, Manna L, Scivoli G. Chiral HPLC separation and CD spectra of the C-2 diastereomers of naringin in grapefruit during maturation. *Chirality* 2003; 15: 661–667
- [36] Wünsch B, Zott M. Chirale 2-Benzopyran-3-Carbonsäure-Derivate durch Oxa-Pictet-Spengler Reaktion von (S)-3-Phenylmilchsäure-Derivaten. *Liebigs Ann Chem* 1992: 39–45
- [37] Larghi EL, Kaufman TS. Synthesis of oxacycles employing the Oxa-Pictet-Spengler reaction: recent developments and new prospects. *Eur J Org Chem* 2011: 5195–5231
- [38] Freire F, Seco JM, Quiñoá E, Riguera R. Determining the absolute stereochemistry of secondary/secondary diols by ¹H NMR: basis and applications. *J Org Chem* 2005; 70: 3778–3790
- [39] Seco JM, Quiñoá E, Riguera R. The assignments of absolute configuration by NMR. *Chem Rev* 2004; 104: 17–117
- [40] Seco JM, Quiñoá E, Riguera R. Assignment of the absolute configuration of polyfunctional compounds by NMR using chiral derivatizing agents. *Chem Rev* 2012; 112: 4603–4641
- [41] Enerstvedt KH, Lundberg A, Sjøtun IK, Fadnes P, Jordheim M. Characterization and seasonal variation of individual flavonoids in *Zostera marina* and *Zostera noltii* from Norwegian coastal waters. *Biochem Systematics Ecol* 2017; 74: 42–50
- [42] Meng Y, Krzysiak AJ, Durako MJ, Kunzelman JI, Wright JLC. Flavones and flavone glycosides from *Halophila johnsonii*. *Phytochemistry* 2008; 69: 2603–2608
- [43] Hawas UW. A new 8-hydroxy flavone O-xyloside sulfate and antibacterial activity from the Egyptian seagrass *Thalassia hemprichii*. *Chem Nat Comp* 2014; 50: 629–632
- [44] Qi SH, Zhang S, Qian PH, Wang BG. Antifeedant, antibacterial, and anti-larval compounds from the South China seagrass *Enhalus acoroides*. *Bot Mar* 2008; 51: 441–447