

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE BATNA I  
FACULTE DES SCIENCES DE LA MATIERE  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



THESE DE DOCTORAT LMD 3<sup>ème</sup> CYCLE

Filière

Chimie

Spécialité

Chimie Organique

Option

*Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique*

Présentée par

M<sup>me</sup> ALLAOUA ZINA

Thème

Etude phytochimique des espèces:  
*Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capitata*

*Soutenue publiquement*

*Devant le JURY :*

Hamada HABA	Prof.- Université de Batna 1	Président
Ammar DIBI	Prof.- Université de Batna 1	Rapporteur
Segni LADJAL	Prof.- Université d'Ouargla	Examineur
Mohammed BENKHALED	Prof.- Université de Batna 1	Examineur
M <sup>ed</sup> Cherif ABERKANE	M.C.A- Université de Batna 1	Examineur
Leila HAMBABA	Prof.- Université de Batna 2	Examinatrice

2017/2016



*FACULTE DES SCIENCES DE LA MATIERE*

*DEPARTEMENT DE CHIMIE*

**Etude phytochimique des espèces:**  
*Pteranthus dichotomus et Paronichia capitata*

*THESE DE DOCTORAT 3<sup>ème</sup> CYCLE*

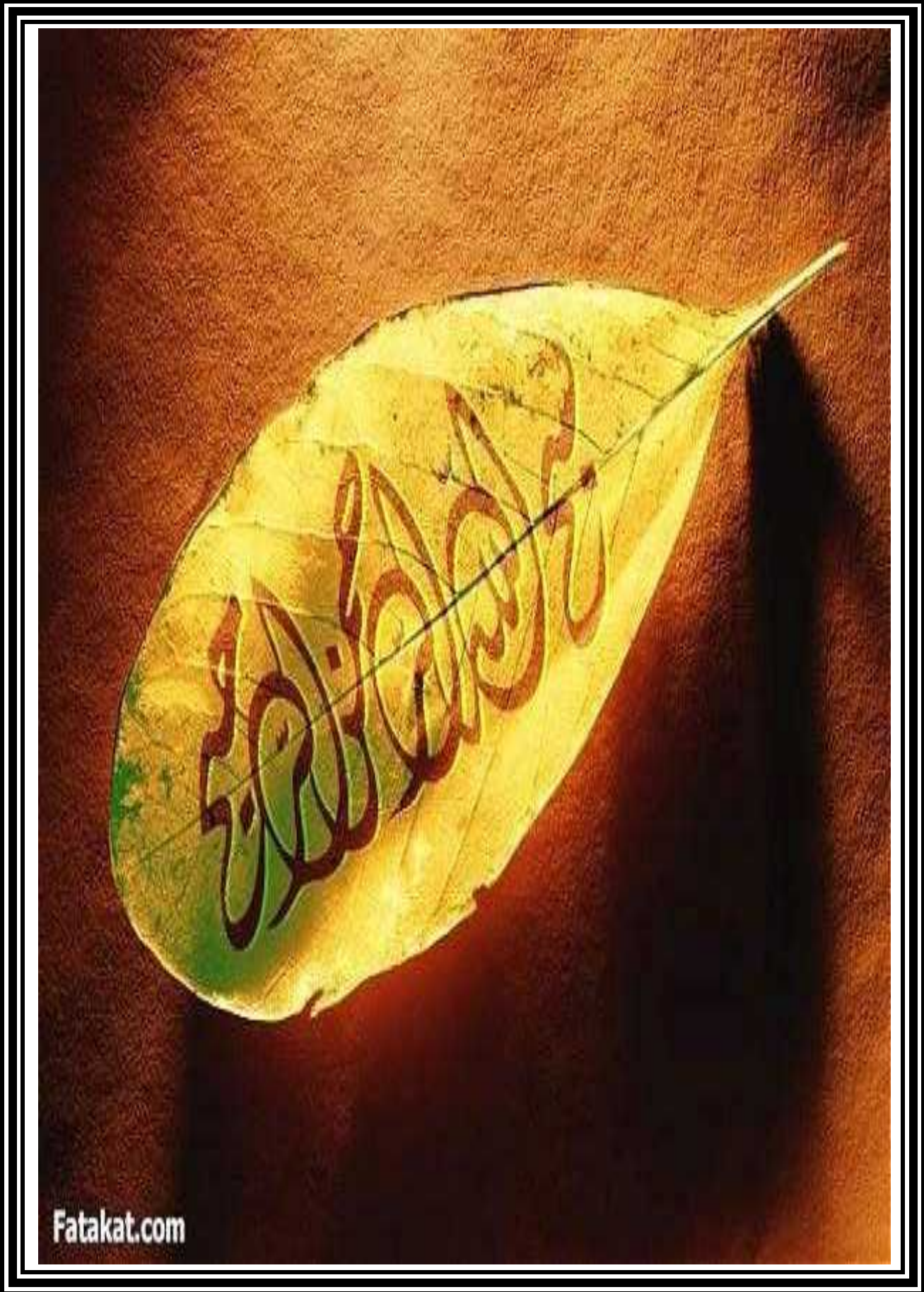
*Présentée par*

*ALLAOUA ZINA*

*JURY*

<b>Hamada HABA</b>	<b>Prof.- Université de Batna 1</b>	<b>Président</b>
<b>Ammar DIBI</b>	<b>Prof.- Université de Batna 1</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Segni LADJAL</b>	<b>Prof.- Université d'Ouargla</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mohammed BENKHALED</b>	<b>Prof.- Université de Batna 1</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>ed</sup> Cherif ABERKANE</b>	<b>M.C.A- Université de Batna 1</b>	<b>Examineur</b>
<b>Leila HAMBABA</b>	<b>Prof.- Université de Batna 2</b>	<b>Examinatrice</b>

*2015/2016*



# *Remerciements*



*J'adresse mes sincères remerciements :*





*.....Merci à Dieu.....*

*Avant toute chose, je tiens à remercier dieu le tout puissant, pour  
m'avoir donnée la force et la patience.*

Les travaux décrits dans cette thèse de doctorat LMD en chimie organique, option Chimie des substances naturelles d'intérêt biologique ont été réalisés au sein du groupe de phytochimie du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des Sciences de la matière Université de Batna 1, sous la direction du monsieur **DIBI Ammar** Professeur au département des sciences de la matière - filière chimie -.

Je tiens à lui remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et pour le soutien qui m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur **HABA Hamada**, Professeur à l'Université de Batna 1, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse et pour m'avoir également suivi, orienté dans l'accomplissement de ce travail et fait profiter de ses grandes compétences dans le domaine des substances naturelles.

Je tiens particulièrement à remercier, Monsieur **BENKHALED Mohammed**, Professeur et directeur du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) à l'Université de Batna 1; pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses orientations et sa gentillesse. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il a consentis et son dynamisme pour la recherche des produits naturels et qui ont été pour nous une source de motivation.

Je remercie aussi les membres de jury, les Professeurs Madame **HAMBABA Leila** de l'Université du Batna 2 et Monsieur **ABERKANE Mohammed Cherif** de

l'université de Batna 1 ainsi que Monsieur le Professeur **LADJAL Segni** à L'université d'Ouargla, qui m'ont honoré en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur **OUJJEH H Bachir** du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques à l'université de Batna 1 pour l'identification botanique des espèces étudiée dans le cadre de ce travail.

Un grand merci à Monsieur le professeur **KASSAH-LAOUAR Ahmed** du laboratoire de Bactériologie du CHU de Batna pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour la réalisation des tests de l'activité antibactérienne.

Je remercie vivement le Docteur **CHRISTOPHE Long**, du Centre de Recherche sur les Substance Naturelles (CNRS-Pierre Fabre) et à Monsieur le professeur **M.S. SILVA Artur** du laboratoire QOPNA a l'université de Aveiro (Portugal), pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

Je souhaite particulièrement remercier mes chères collègues et amies demoiselle **BOUZIDI Soumia**, Doctorante en biologie à l'université de Batna 1, pour m'avoir aidé et orienté dans la partie biologique et demoiselle **RAHMOUNI Naima** Doctorante en phytochimie à l'université de Constantine pour sa patience pendant mon travail sur les analyses spectroscopiques particulièrement la RMN 2D.

Je exprime également mes remerciements à mes collègues et amies pour leur amitié et gentillesse: **Imene, Wafa, Iftikhar, Salima, Farida, Wassila , Souad K., Mouna, Safaa et Hicham.....** Je tiens aussi à associer à ce travail tous mes collègues de promotion (**Leila, Hassina et Hassna** ) que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant la période de notre formation en Licence, Master et Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle.

Finalement, je remercie mes parents pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'apportent chaque jour, et je ne saurais oublier Mes sœurs, mes frères et mon cher mari qui ont cru à moi, m'avoir encouragé et donné la force d'aller jusqu'au bout de mes ambitions.

*Dédicaces*



*Je dédie ce travail*

✿ Avant tout c'est **Allah** ✿

*Je te remercie pour tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour finaliser cette thèse et obtenir le doctorat.*

*.....toujours je te dis « **hamd laka wahdak** ».....*

*Je dédie cette thèse aussi à :*

✿ A mes très **chers parents (Belgacem et Hedda)** ✿

*Pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.*

✿ À ma petite sœur **Asma** ✿

*Qui m'a toujours donné la sourire dans les moments difficiles, qui a toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais. Je voudrais simplement leur dire que je l'aime de tout mon cœur.*

✿ A mes frères : **Faik, Zouhir, Raid, Abdel-malek et Bahi** ✿

✿ A mes sœurs : **Hassina, Samira, Amel et Nahed** ✿

✿ A mes nièces : **Amani, Fedwa, Arwa, Ritadj, Alaa, Céline et Rihab** ✿

✿ A mes neveux : **Sami, Moncif et Rahim** ✿

*Qui par sa compréhension, sa tendresse et ses encouragements, a soutenu sans cesse mes efforts durant la réalisation de ce travail.*

✿ A moi tous simplement ✿

✿ A toute la famille ✿

✿ ..... **Zina** ..... ✿



## *Liste des abréviations*



<b>%</b>	Pourcentage
	déplacement chimique exprimé en ppm
<b>µg</b>	microgramme
<b>µl</b>	microlitre
<b>°C</b>	degrés Celsius
<b>[ ]<sub>D</sub></b>	pouvoir rotatoire
<b>(1), (2),...</b>	désignation des composés mentionnés dans la littérature
<b>(Pd<sub>1</sub>, Pd<sub>2</sub>...); (Pc<sub>1</sub>, Pc<sub>2</sub>...)</b>	désigne les composés naturels isolés dans ce travail
<b>AAR</b>	activité antioxydante relative
<b>AcOEt</b>	acétate d'éthyle.
<b>AH</b>	antioxydant donneur d'hydrogène
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluene
<b>BLSE</b>	Bêta-lactamases à spectre étendu
<b>C</b>	concentration
<b>CCE</b>	chromatographie sur couche épaisse
<b>CCM</b>	chromatographie sur couche mince
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	chloroforme deutéré
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	méthanol deutéré
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	chloroforme
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	dichlorométhane
<b>COSY H-H</b>	correlated spectroscopy
<b>Cq</b>	carbone quaternaire
<b>d</b>	doublet
<b>dd</b>	doublet de doublet
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde

<b>DPPH</b>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
<b>DEPT</b>	distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
<b>EtOH</b>	éthanol
<b>Ep</b>	éther de pétrole
<b>eq</b>	équivalent
<b>ESI</b>	spectrométrie de masse par electrospray
<b>Fr</b>	fraction
<b>g</b>	gramme
<b>Gal</b>	Galactose
<b>Glc</b>	Glucose
<b>Gluc</b>	acide glucuronique
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple bonding connectivity
<b>HR</b>	haute résolution
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum connectivity
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IR</b>	infra-rouge
<b><i>J</i></b>	constante de couplage exprimée en Hz
<b>Qui</b>	quinovose
<b><i>m</i></b>	multiplet
<b>Me</b>	méthyle
<b>MHz</b>	Mégahertz
<b>MeOH</b>	méthanol
<b>mg</b>	milligramme
<b><i>m/z</i></b>	masse/charge d'un ion
<b>MS/MS</b>	Mass Spectroscopy / Mass Spectroscopy
<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -butanol
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	sulfate de sodium
<b>NCCLS</b>	National committee for clinical laboratory standards.

<b>nm</b>	Nanomètre
<b>PCAC</b>	l'extrait acétate d'éthyle d'espèce <i>Paronychia capitata</i>
<b>PCBU</b>	l'extrait <i>n</i> -butanolique d'espèce <i>Paronychia capitata</i>
<b>PCEP</b>	l'extrait éther de pétrole d'espèce <i>Paronychia capitata</i>
<b>PDAC</b>	l'extrait acétate d'éthyle d'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i>
<b>PDBU</b>	l'extrait <i>n</i> -butanolique d'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i>
<b>PDEP</b>	l'extrait éther de pétrole d'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i>
<b>ppm</b>	partie par million
<b>R</b>	Radical
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>RP- 8</b>	silice greffée en C-8
<b>RP- 18</b>	silice greffée en C-18
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	résonance magnétique nucléaire du proton
<b>s</b>	singulet
<b>SD</b>	standard deviation
<b>SiO<sub>2</sub></b>	gel de silice normale
<b>SM</b>	spectrométrie de masse
<b>sl</b>	singulet large
<b>t</b>	Triplet
<b>tl</b>	triplet large
<b>uma</b>	Unité de masse atomique
<b>UV</b>	ultra-violet
<b>VLC</b>	chromatographie liquide sous vide
<b>Xyl</b>	Xylose



# *Liste des tableaux*



N°	Titre du Tableau	Page
<b>Tableau I-1:</b>	Flavonoïdes isolés de l'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> Forssk. ....	13
<b>Tableau I-2:</b>	Saponosides isolés du l'espèce <i>Paronychia anatolica</i> .....	14
<b>Tableau I-3:</b>	Saponosides isolés de l'espèce <i>Paronychia chionaea</i> .....	15
<b>Tableau I-4:</b>	Saponosides isolés du l'espèce <i>Paronychia argentea</i> .....	18
<b>Tableau III.1 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>1</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	52
<b>Tableau III.2 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>2</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	59
<b>Tableau III.3 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>3</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	71
<b>Tableau III.4 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>4</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	85
<b>Tableau III.5 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>5</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	89
<b>Tableau III.6 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>6</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	92
<b>Tableau III.7 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>7</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	96
<b>Tableau III.8 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>8</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	104
<b>Tableau III.9 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>9</sub></b> et <b>Pd<sub>10</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD...	110
<b>Tableau III.10 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>11</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	116
<b>Tableau III.11 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pd<sub>12</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	126
<b>Tableau III.12 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pc<sub>1</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	136
<b>Tableau III.13 :</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pc<sub>3</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	138
<b>Tableau III.14:</b>	Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de <b>Pc<sub>4</sub></b> dans CD <sub>3</sub> OD.....	142
<b>Tableau III.15 :</b>	Résultats du dosage des polyphénols totaux, dans les extraits des espèces Caryophyllaceae.....	145
<b>Tableau IV-1 :</b>	Résultats de l'antibiogramme (diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne).....	152
<b>Tableau IV-2:</b>	Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits <b>PDAC</b> et <b>PDBU</b> de l'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> .....	153
<b>Tableau IV-3 :</b>	Diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits <b>PCAC</b> et <b>PCBU</b> de l'espèce <i>Paronychia capitata</i> .....	154
<b>Tableau IV-4 :</b>	Valeurs des <b>IC<sub>50</sub></b> et <b>EC<sub>50</sub></b> des échantillons et témoin déterminées par le test au DPPH.....	164
<b>Tableau V-1:</b>	Rassemblement des différentes fractions de la VLC de l'extrait <b>PDAC</b> .....	174
<b>Tableau V-2:</b>	Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	177
<b>Tableau V-3:</b>	Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol <b>PCBU</b> .....	184
<b>Tableau V-4 :</b>	les Caractéristiques des souches microbiennes utilisées sont représenté dans le tableau ci-dessous.....	188

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>01</b>
---------------------------	-----------

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

<b>I-1- Caractéristiques des Caryophyllaceae</b> .....	<b>03</b>
<b>I-1-1- Aspects botaniques de la famille Caryophyllaceae</b> .....	<b>03</b>
<b>I-1-2- Répartition géographique</b> .....	<b>04</b>
<b>I-2- Présentation des genres <i>Pteranthus</i> et <i>Paronychia</i></b> .....	<b>04</b>
<b>I-2-1- Genre <i>Pteranthus</i></b> .....	<b>04</b>
<b>I-2-2- Genre <i>Paronychia</i></b> .....	<b>05</b>
<b>I-3- Présentation des espèces <i>Pteranthus dichotomus</i> Forssk. et <i>Paronychia capitata</i> (L.) Lam.</b> .....	<b>05</b>
<b>I-3-1- L'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> Forssk.</b> .....	<b>05</b>
<b>I-3-2- L'espèce <i>Paronychia capitata</i> (L.) Lam.</b> .....	<b>07</b>
<b>I-3-3- Classification systématique des espèces <i>Pteranthus dichotomus</i> et <i>Paronychia capitata</i></b> .....	<b>09</b>
<b>I-4- Propriétés biologiques et pharmacologiques des genres <i>Pteranthus</i> et <i>Paronychia</i></b> .....	<b>09</b>
<b>I-5- Etudes phytochimiques antérieures sur les genres <i>Pteranthus</i> et <i>Paronychia</i></b> .....	<b>12</b>
<b>I-5-1- Genre <i>Pteranthus</i></b> .....	<b>12</b>
<b>I-5-2- Genre <i>Paronychia</i></b> .....	<b>14</b>

## Chapitre II : Etude des composés glycolipidiques, triterpéniques et phénoliques.

<b>II-1- Généralités sur les glycolipides</b> .....	<b>23</b>
<b>II-1-1- Glycéroglycolipides</b> .....	<b>24</b>
<b>II-1-1-1- Biosynthèse des sulfoglycolipides</b> .....	<b>24</b>
<b>II-1-1-2- Rôles biologiques des glycéroglycolipides</b> .....	<b>26</b>
<b>II-1-2- Glycosphingolipides</b> .....	<b>26</b>
<b>II-1-2-1- Biosynthèse des glycosphingolipides</b> .....	<b>27</b>

II-1-2-2- Rôles biologiques des sphingolipides.....	28
II-2- Généralités sur les composés phénoliques.....	28
II-2-1-Flavonoïdes.....	29
II-2-1-1- Biosynthèse des flavonoïdes.....	30
II-2-1-2- Rôles biologiques des flavonoïdes.....	32
II-2-2- Lignanes.....	33
II-2-2-1- Biosynthèse des lignanes.....	34
II-2-2-2-Intérêts pharmacologiques des lignanes.....	36
-3-Généralité sur les triterpenoides et les phytostérols.....	36
-3-1- Triterpenoides.....	36
-3-2- Les phytostérols.....	37
-3-3- Biosynthèse des phytostérols et triterpenoides.....	38
II-3-4- Rôles et activités biologiques des triterpénoïdes et des stérols.....	40
II-3-4-1- Les triterpénoïdes.....	40
II-3-4-2- Les stérols.....	40

### Chapitre III : Etude phytochimique des espèces *Pteranthus dichotomus* Forssk.et

#### *Paronychia capitata* (L.) Lam.

#### Partie A- Etude phytochimique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.

III-A-1- Extraction.....	41
III-A-2- Séparation et purification.....	41
III-A-3- Identification structurale des composés isolés.....	43
III-A-3-1- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>1</sub> .....	44
III-A-3-2- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>2</sub> .....	53
III-A-3-3- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>3</sub> .....	60
III-A-3-4- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>4</sub> .....	72
III-A-3-5- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>5</sub> .....	86
III-A-3-6- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>6</sub> .....	90
III-A-3-7- Identification structurale du composé <i>Pd</i> <sub>7</sub> .....	93



III-A-3-8- Identification structurale du composé <i>Pd<sub>8</sub></i> .....	97
III-A-3-9- Identification structurale du composé <i>Pd<sub>9</sub></i> et <i>Pd<sub>10</sub></i> .....	105
III-A-3-10- Identification structurale du composé <i>Pd<sub>11</sub></i> .....	111
III-A-3-11- Identification structurale du composé <i>Pd<sub>12</sub></i> .....	118
<b>III-A-4- Conclusion.....</b>	<b>128</b>

### **Partie B- Etude phytochimique de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) Lam.**

III-B-1- Extraction.....	131
III-B-2- Séparation et purification.....	132
III-B-3- Identification structurale des composés isolés.....	132
III-B-3-1- Identification structurale du composé <i>Pc<sub>1</sub></i> .....	133
III-B-3-2- Identification structurale du composé <i>Pc<sub>2</sub></i> et <i>Pc<sub>3</sub></i> .....	137
III-B-3-3- Identification structurale du composé <i>Pc<sub>4</sub></i> .....	140
<b>III-B-4- Conclusion.....</b>	<b>143</b>

### **Partie C- Dosage des polyphénols des extraits des deux plantes *Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capitata***

III-C-1- Principe de dosage.....	145
III-C-2- Discussions des résultats.....	146

## **Chapitre IV : Tests des effets biologiques (Activité antibactérienne et antioxydant)**

IV-1- Généralité sur les activités antibactérienne et antioxydante.....	147
IV-1-1- Activité antibactérienne .....	147
IV-1-2- Activité antioxydante .....	150
IV-2- Tests biologiques.....	151
IV-2-1- Activité antibactérienne .....	151
IV-2-1-1- Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	151
IV-2-1-2- Résultats.....	152
IV-2-1-3- Discussions.....	156
IV-2-2- Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	157

IV-2-2-1- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	158
IV-2-2-2- Effet scavenger du radical DPPH.....	162
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>164</b>

## Chapitre V : La partie expérimentale

<b>V- 1- Matériels et méthodes.....</b>	<b>171</b>
V-1-1- Matériel végétal.....	171
V-1-1-1- Récolte de l'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> Forssk. ....	171
V-1-1-2- Récolte de l'espèce <i>Paronychia capitata</i> (L.) Lam. ....	171
V-1-2- Méthodes analytiques et préparatives.....	171
V-1-2-1- Chromatographie sur (CCM) et (CCE).....	171
V-1-2-2- Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	171
V-1-2-3- Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	172
V-1-3- Méthodes d'identification structurale.....	172
V-3-1- Pouvoir rotatoire.....	172
V-3-2- Spectrophotométrie Ultraviolet-visible.....	172
V-3-3- Spectrométrie Infra-rouge.....	172
V-3-4- Spectrométrie de masse (ESI) et (EI).....	172
V-4-5- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	172
<b>V- 2- Etude phytochimique des espèces <i>Pteranthus dichotomus</i> et <i>Paronychia capitata</i>.....</b>	<b>173</b>
V-2-1- Etude phytochimique de l'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> .....	173
V-2-1-1- Obtention des extraits.....	173
V-2-1-2- Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	173
V-2-1-3- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	174
V-2-1-4- Composés isolés de l'espèce <i>Pteranthus dichotomus</i> .....	178
V-2-2- Etude phytochimique de l'espèce <i>Paronychia capitata</i> .....	183
V-2-2-1- Obtention des extraits.....	183
V-2-2-2- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	184
V-2-2-3- Composés isolés de l'espèce <i>Paronychia capitata</i> .....	185
V-3-3- Dosage spectrophotométrique des polyphénols.....	187

V-3-3-1- Principe.....	187
V-3-3-2- Mode opératoire.....	187
<b>V- 3- Tests biologiques.....</b>	<b>188</b>
V-3-1- Test de l'activité antibactérienne.....	188
V-3-1-1- Caractéristiques des bactéries testées.....	188
V-3-1-2- Milieux de culture.....	188
V-3-1-3- Préparation des extraits.....	189
V-3-1-4- Préparation de l'inoculum.....	189
V-3-1-5- Ensemencement et dépôt des disques.....	189
V-3-1-6- Lecture des zones d'inhibition.....	190
V-3-2- Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	190
V-3-2-1- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	190
V-3-2-1-1- Principe.....	190
V-3-2-1-2- Mode opératoire.....	190
V-3-2-2- Test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl).....	191
V-3-2-2-1- Principe.....	191
V-3-2-3- Analyses statistiques.....	191
<b>Bibliographie.....</b>	<b>192</b>
<b><i>Publication internationale</i>.....</b>	<b>210</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>219</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>220</b>
.....	221

# *Introduction*





## *Introduction*

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne.

Le continent africain, par la richesse et la diversité de l'origine de sa flore, constitue un véritable réservoir phytogénétique, ce qui lui permet d'occuper une place privilégiée parmi les territoires méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales. Cependant, la flore médicinale Algérienne, avec ses espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique jusqu'à nos jours [1].

Le travail qui m'a été confié rentre pleinement dans la valorisation de la flore locale par la découverte éventuelle de principes actifs nouveaux, s'inscrit donc dans cette recherche de nouvelles biomolécules qui peuvent trouver un usage thérapeutique. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de deux plantes appartenant à la famille Caryophyllaceae. Cette famille cosmopolite est très riche en plantes médicinales fortement dosées en métabolites secondaires comme les saponosides, flavonoïdes et autres composés est présenter un grand intérêt biologique [2]. Les espèces de cette famille possèdent diverses activités biologiques intéressantes à savoir: anti-tumorale [3], anti-inflammatoire [4], antivirale [5], cytotoxique [6], analgésique [7] antipyrétique [8].....

Au niveau de cette thèse de doctorat, nous avons étudié les deux espèces *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lam. (Caryophyllaceae) en fixant comme principal objectif, l'extraction, la séparation et l'identification des métabolites secondaires des parties aériennes ainsi que les activités antibactérienne et antioxydante.

Notre travail de recherche sera exposé en cinq chapitres, organisés comme suit:

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique incluant la systématique de la famille Caryophyllaceae, la présentation des deux espèces *Pteranthus dichotomus* et

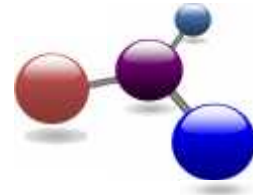
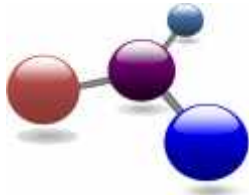
*Paronychia capitata* suivie par des propriétés biologiques et pharmacologiques des genres *Pteranthus* et *Paronychia* et enfin le passage en revue des principaux résultats phytochimiques antérieurs relatifs aux plantes appartenant aux mêmes genres.

Le deuxième chapitre concerne l'étude des composés glycolipidiques, triterpéniques et phénoliques, classes de métabolites secondaires isolés à partir des deux plantes étudiées. Dans ce chapitre, seront présentés des généralités, la biosynthèse ainsi que les intérêts biologiques de ces différentes classes de substances naturelles.

Le troisième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques personnels obtenus dans le cadre de cette étude chimique. Il est question dans ce chapitre de l'isolement, la purification, la caractérisation structurale de tous les métabolites isolés et du dosage des polyphénols réalisé sur les extraits de ces deux espèces locales.

Le quatrième chapitre concerne le screening biologique. Dans cette partie, le test de l'activité antibactérienne et antioxydante *in vitro* des échantillons bruts préparés à partir de ces plantes a été évalué.

Enfin le cinquième chapitre concerne la partie expérimentale incluant les différentes techniques chromatographiques et les méthodes d'analyse structurale utilisées. Il est réservé à la description des protocoles expérimentaux réalisés dans le cadre de l'investigation phytochimique et biologique des extraits des plantes étudiées.



# CHAPITRE I

*Aspects botaniques et  
études antérieures*



**I-1 Caractéristiques des Caryophyllaceae****I-1-1 Aspects botaniques de la famille Caryophyllaceae**

Les plantes Caryophyllaceae constituent une famille des dicotylédones [9]. Il s'agit d'herbes annuelles ou vivaces, rarement buissonnantes. Leur port se caractérise par des éléments foliacés opposés décussés, insérés sur des nœuds fortement renflés, d'où le nom de la famille (de **caryon** = nœud, et **phyllon** = feuille) [10]. Les caractéristiques morphologiques principaux des plantes relevant de cette famille sont les suivantes:

- 🌈 **les feuilles** opposées et entières, sont parfois réunies à la base de façon à former une gaine et ne sont pas toujours munies de stipules.
- 🌈 **les fleurs** sont pollinisées par divers insectes (mouches, papillons..) qui récoltent le nectar ; fleurs minuscules généralement à 5 sépales séparés les uns des autres 'libres' (Paronychioideae ou Alsinoideae) ou soudés en tube (Caryophylloideae).
- 🌈 **le fruit** sec, tantôt à une seule graine et tantôt, à graines multiples, généralement sphériques, entourées d'une aile membraneuse.

La famille Caryophyllaceae comprend trois sous-familles (Paronychioideae, Alsinoideae et Caryophylloideae) et 11 tribus, avec 86 genres et 2200 espèces cosmopolites [9,11].

- 🌈 La sous famille **Paronychioideae** avec 3 tribus (Paronychieae, Polycarpeae et Corrigioleae) et 33 genres (*Paronychia*, *Pteranthus*, *Gymnocarpus*, *Polycarpeae*,...) se caractérise par des plantes aux stipules présentes, généralement scarieuses et aux sépales libres ou connés.
- 🌈 La sous-famille **Caryophylloideae** (ou Silenoideae) se divise en 3 tribus (Caryophylleae, Drypideae et Sileneae) et 24 genres (*Silene*, *Dianthus*, *Gypsophila*, *Lychnis*...). Groupe des espèces à stipules absentes, aux sépales soudés et pétales articulés à onglet distinct.
- 🌈 La sous-famille **Alsinoideae** avec 5 tribus (Alsineae, Pycnophylleae, Scleranthaeae, Geocarpeae et Habrosieae) et 28 genres (*Arenaria*, *Honkenya*, *Stellaria*, *Sagina*, *Colobanthus*, *Lyallia*,...). Groupe des genres aux stipules absents et aux sépales libres.

### I-1-2- Répartition géographique

L'importante famille cosmopolite des Caryophyllaceae est largement répartie dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elle est particulièrement riche sur le pourtour méditerranéen et en Asie. Sous les tropiques, elle est limitée aux secteurs montagneux (Figure I-1) [12-13]. En Algérie, elle est particulièrement développée dans la région méditerranéenne. Au Sahara septentrional et central, 12 genres et une vingtaine d'espèces sont répertoriés [1].



Figure I-1: Répartition géographique des plantes Caryophyllaceae

### I-2-Présentation des genres *Pteranthus* et *Paronychia*

#### I-2-1 Genre *Pteranthus*

Le genre *Pteranthus* qui appartient à la famille Caryophyllaceae possède une inflorescence partielle en cymes bipares 3-flores entourées d'un involucre et portées sur un pédoncule fortement dilaté et aplati en raquettes [1]. Ce genre comporte une seule espèce *Pteranthus dichotomus*, distribuée dans les régions tempérées comme l'Afrique subtropicale et l'Asie tempérée et subtropicale [14-15].

**I-2-2-Genre *Paronychia***

Le genre *Paronychia* appartient à la famille Caryophyllaceae et comprend environ 109 espèces [9]. Il est le plus présent dans les zones tempérées des Amériques, d'Eurasie et aussi le plus fourni de toute la flore Africaine [16]. En Algérie, il y a environ 40 espèces distribués dans les régions tempérées et subtropicales. On rencontre principalement les espèces suivantes : *Paronychia argentea*, *P. kapela*, *P. arabica*, *P. echinata*, *P. capitata*, *P. chlorothursa*... [15].

Il s'agit de plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois suffrutescentes. Les feuilles opposées sont simples et entières, et munies de petites stipules connées. Les fleurs actinomorphes et bisexuées ou plus rarement unisexuées, sont groupées en cymes plus ou moins condensées, axillaires ou terminales et quelque fois, elles peuvent être solitaires. Apétales, elles se composent de 5 sépales soudés à la base de 5 étamines libres et d'un ovaire supère et uniloculaire. Les fruits sont des utricules ovoïdes à globuleuses [1].

**I-3-Présentation des espèces *Pteranthus dichotomus* Forsk. et *Paronychia capitata* (L.)**

**Lam.**

**I-3-1- L'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.**

*Pteranthus dichotomus* (Figures I-2, I-3) est une plante herbacée très épineuse et annuelle. Elle possède les caractères morphologiques suivants [15] :

- 🌈 Une taille 10 à 30 cm.
- 🌈 Feuilles charnues, sessiles, linéaires. Stipules membraneuses.
- 🌈 Fleurs sont groupées par trois au bout d'un pédoncule large et plat (en raquette).
- 🌈 La fleur centrale est fertile, les deux fleurs latérales stériles sont entourées de piquants. Fruit capsulaire, monosperme, indéhiscent et entouré par le calice.

*P. dichotomus* possède deux synonymes : *Pteranthus echinathus* Desf. et *Pteranthus trigynus* Caball. . En Algérie cette espèce est désignée sous le nom vernaculaire ***Derset el adjoura*** [1] et en Egypte sous le nom **Na'eema** [17]. Elle est distribué dans les régions tempérées comme l'Afrique subtropicale (Sahara, Afrique du nord), l'Asie tempérée et subtropicale (de Chypre et d'Arabie jusqu'au Pakistan). En Algérie on trouve aussi cette espèce dans le sud du pays (Biskra et Hoggar) [15].





Figures I-2 : Photos de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk. du la région Hoggar (Tamanrasset)

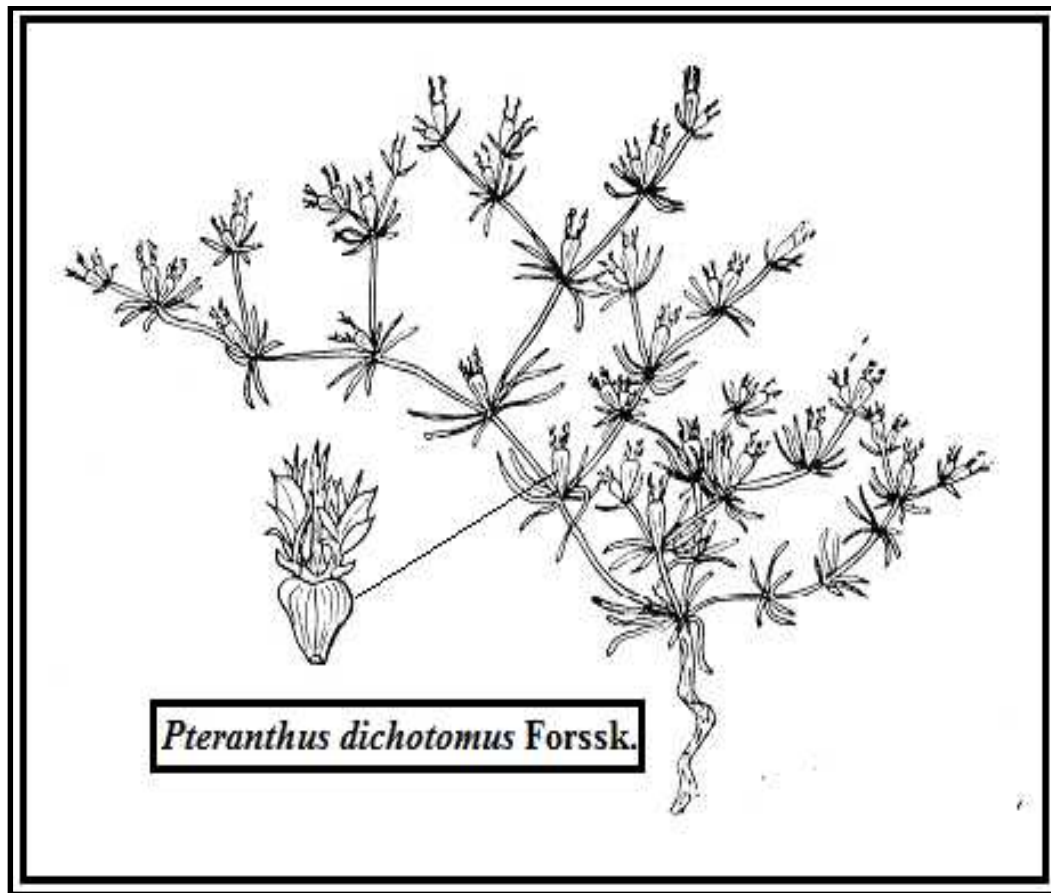


Figure I-3: *Pteranthus dichotomus* d'après Ozenda (1991)

### I-3-2- L'espèce *Paronychia capitata* (L.) Lam.

*Paronychia capitata* (Figures I-4, I-5) est une plante vivace formant des touffes denses [1], et possède les caractères suivants :

- Les fleurs blanchâtres sont regroupées en têtes terminales d'un calice long de 3,5-5 mm.
- Les sépales inégaux bien plus longs que la capsule, incurvés à l'apex.
- Les bractées ovales-aiguës.
- Les feuilles linéaires lancéolées-aiguës.

*P. capiata* possède trois synonymes : *Paronychia rigida* Moench ; *Paronychia nivea* DC. et *Illecebrum capitatum* L.. En Algérie, cette espèce est désignée sous le nom vernaculaire *Atai el Djebel*. Elle est distribuée dans la région Méditerranéenne et les Aurès à niveau des secteurs montagneux [1].





Figure I-4 : Photo de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) Lam.



Figures I-5 : Photos de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) Lam. de la région Merrkha  
(Hidoussa/ Merouana/ Batna)

I-3-3- Classification systématique des espèces *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lam.

Les espèces *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lam. sont classées sur le plan botanique suivant (Figure I-6) :

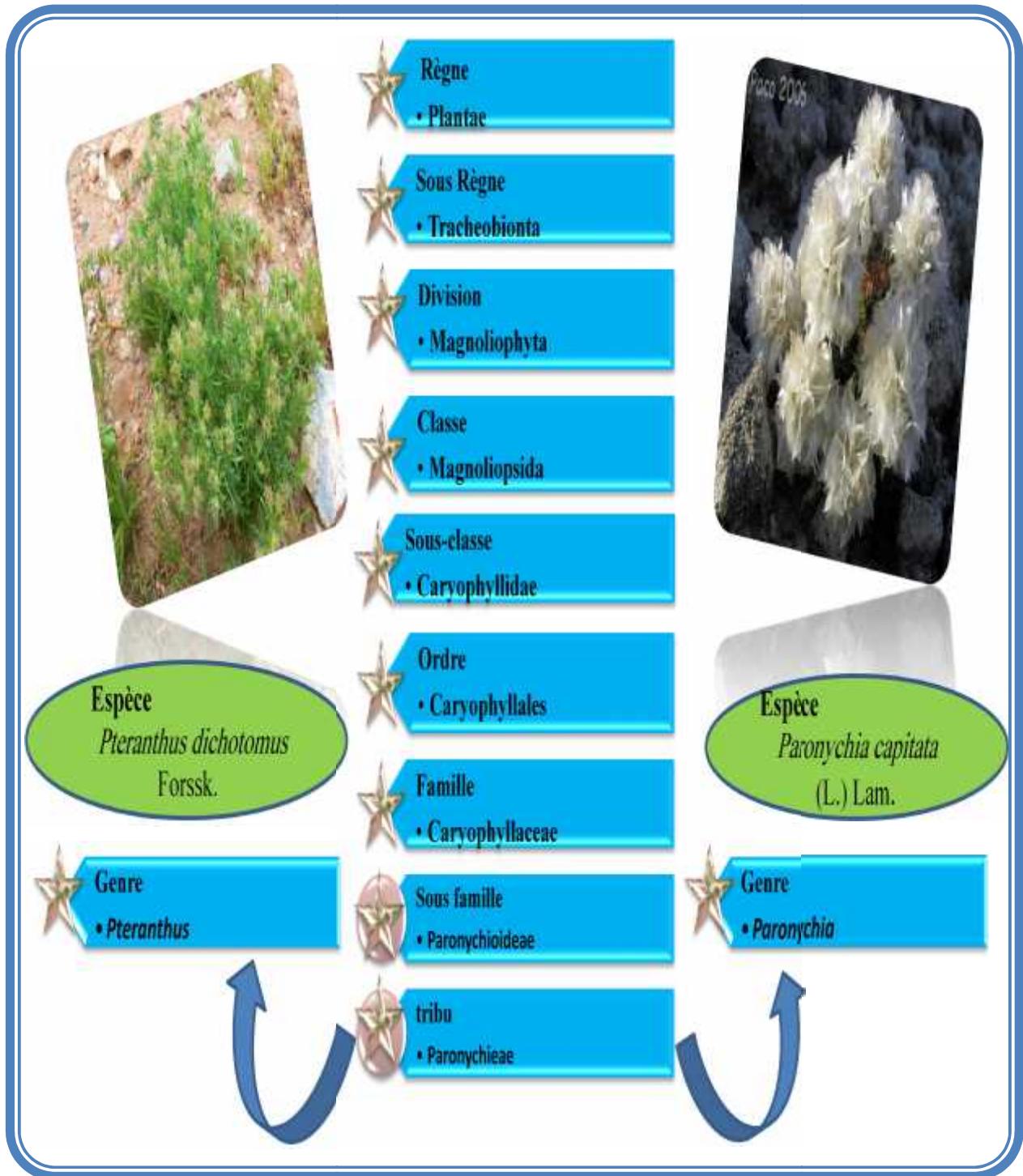


Figure I-6 : Classification systématique des espèces *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lam.

**I-4- Propriétés biologiques et pharmacologiques des genres *Pteranthus* et *Paronychia***

Les plantes Caryophyllaceae font l'objet de multiples usages thérapeutiques traditionnels. Diverses études biologiques ont été menées afin de déterminer les différentes activités biologiques susceptibles d'être exploitées ultérieurement à des fins thérapeutiques. La majorité d'entre elles concernent les effets anti-tumoraux [4], anti-inflammatoires [5], antiviral [6], cytotoxique [7], analgésique et antipyrétique [8].....

L'espèce *P. dichotomus* Forssk. mettant en évidence des activités variées dont on peut citer : analgésique, anti-inflammatoire, anti-tumorale [4]. Dans la médecine traditionnelle égyptienne, Les feuilles de l'espèce *Pteranthus dichotomus* sont utilisées comme un antiseptique oculaire [17].

Les plantes du genre *Paronychia* (les paronyques) sont utilisées généralement en infusion à la place du thé (infusion agréable) en plus de cela elles sont connues aussi pour leurs propriétés thérapeutiques et biologiques [18].

*Paronychia argentea* est une plante médicinale mondialement connue; elle est considérée dans les milieux populaires pour ses propriétés thérapeutiques et biologiques comme le thé arabe. La médecine populaire algérienne utilise la partie aérienne comme diurétique et pour le traitement des maladies rénales [19-20]. Au Portugal, *P. argentea* est utilisé comme analgésique, pour traiter l'ulcère de l'estomac, l'anorexie et la flatulence [24]. En Espagne, elle est utilisée pour traiter l'eczéma et aussi comme antipyrétique et digestif [25]. Elle possède aussi l'activité hypoglycémiant [21-22] et antimicrobienne [23]. Le mélange des espèces *P. anatolica* et *P. argentea* est utilisé pour le traitement du diabète [18].

L'étude réalisée sur les extraits aqueux et méthanolique de l'espèce *Paronychia mughlaii* par Sevil et al. montre bien une activité antioxydante et antimicrobienne très intéressante [26].

*P. chionaea* est utilisé dans la médecine traditionnelle palestinienne et jordanienne pour son activité hypoglycémique et traiter les troubles du système urinaire [27].

La médecine traditionnelle du Sud et de l'Ouest Europe (Espagne, Italie et la Croatie) utilise l'espèce *Paronychia kapela* [28]:

- 🌿 comme diurétique, hypotenseur, antirhumatismal, l'agent dépuratif.
- 🌿 dans le traitement des infections d'appareil respiratoire et urinaire.
- 🌿 Par la voie topique comme liniment pour les contusions, les plaies et les brûlures.

Finalement, les espèces *Paronychia arabica*, *P. cossoniana* et d'autres paronyques sont utilisées au sahara occidental comme stimulant et aphrodisiaque [18].

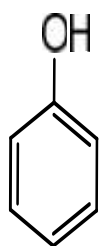


**I-5-Etudes phytochimiques antérieures sur les genres *Pteranthus* et *Paronychia***

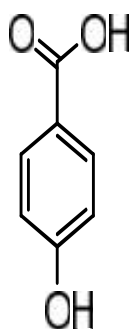
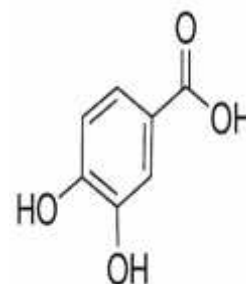
Les genres *Pteranthus* et *Paronychia* appartenant à la famille Caryophyllaceae ont fait l'objet, ces dernières années de plusieurs études phytochimiques à travers le monde. La recherche bibliographique effectuée a mentionné l'isolement et l'identification de plusieurs types de métabolites secondaires, constitués majoritairement de saponosides triterpéniques et de flavonoïdes. Les quelques exemples de structures que nous donnons ci-dessous montrent d'importantes activités biologiques de ces plantes.

**I-5-1-Genre *Pteranthus***

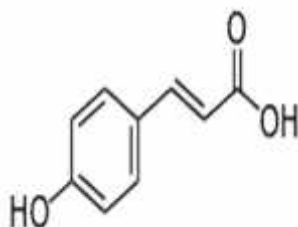
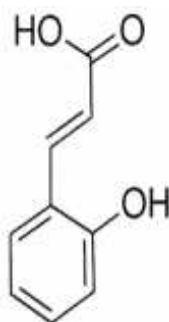
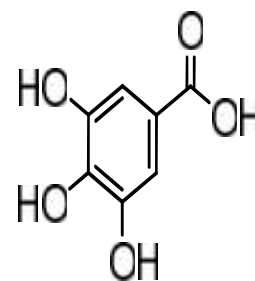
Une seule étude chimique à ce genre réalisée sur l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk. par Atta et al. a porté sur les parties aériennes. Elle a permis d'isoler et de caractériser six dérivés phénoliques (1-6) et neuf flavonoïdes (7-15). Le dernier flavonoïde (15) est nouveau. Il montré un effet antipyrétique et diurétique [4].



(1) Phenol

(2) Acide *p*-hydroxy benzoïque

(3) Acide protocatechoïque

(4) Acide *p*-coumarique(5) Acide *o*-coumarique

(6) acide gallique

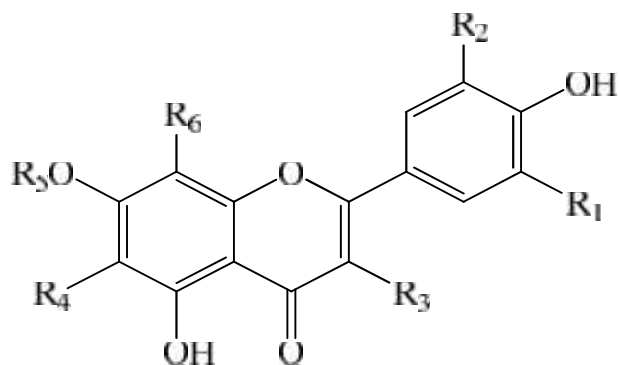
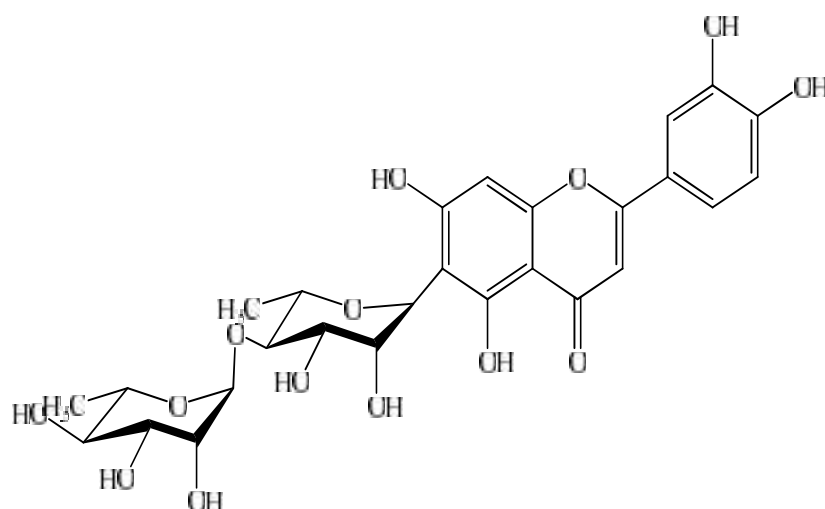


Tableau I-1: Flavonoïdes isolés de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.

(N°) Composés identifiés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
(7) Kaempferol	H	H	OH	H	H	H
(8) Quercetine	H	OH	OH	H	H	H
(9) Luteoline	H	OH	H	H	H	H
(10) 3-glucoside Myricetine	OH	OH	<i>O</i> -Glucose	H	H	H
(11) Isoorientine	OH	H	H	Glucose	H	H
(12) 7-methoxy Orientine	H	OH	OH	H	-CH <sub>3</sub>	Glucose
(13) 7-glucoside Quercetine	H	OH	OH	H	Glucose	H
(14) 3-rhamnoside -7- acide glucouronique Kaempferole	H	H	<i>O</i> -Rhamnose	H	Acide glucuronique	H



(15) Luteoline-6-dirhamnoside.

I-5-2- Genre *Paronychia*

Les travaux phytochimiques réalisés sur ce genre ont conduit à l'isolement des saponines (type acide gypsogénique et polygalactique), des flavonoïdes, des polyphénols et des acides gras.

I-5-2-1- *Paronychia anatolica*

Les travaux réalisés sur l'extrait méthanolique des racines de l'espèce *P. anatolica* ont permis d'isoler quatre nouvelles structures de saponosides (16-19) [29].

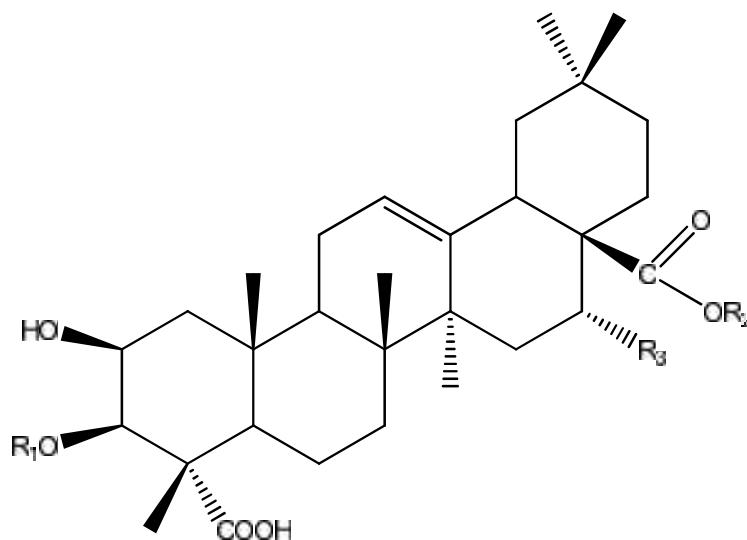
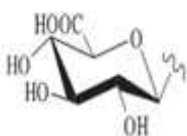
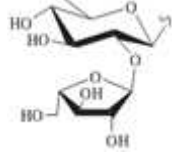
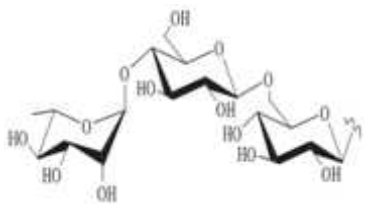


Tableau I-2 : Saponosides isolés de l'espèce *Paronychia anatolica*

(N°) Composés identifiés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(16) 3-O- -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ - L-rhamnopyranosyl-(1 2)- -D- quinovopyranoside] acide zahnique			OH
(17) 3-O- -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ - D-xylopyranosyl-(1 4)- -L- rhamnopyranosyl-(1 2)- -D- quinovopyranoside] acide zahnique			OH

<p>(18) 3-O- -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ - L-arabinofuranosyl-(1 2)- -D- quinovopyranoside] acide zahnique</p>			<p>OH</p>
<p>(19) 28-O-[ -L-rhamnopyranosyl-(1 4)- - D-glucopyranosyl-(1 6)- -D- glucopyranosyl]- acide medicagenique</p>	<p>H</p>		<p>H</p>

I-5-2-2- *Paronychia chionaea*

Les travaux de chimie effectués antérieurement sur l'espèce *Paronychia chionaea* ont porté sur les parties aériennes. Ils ont permis d'isoler et de caractériser quatre nouvelles saponines de type acide gypsogénique (20-23) [30].

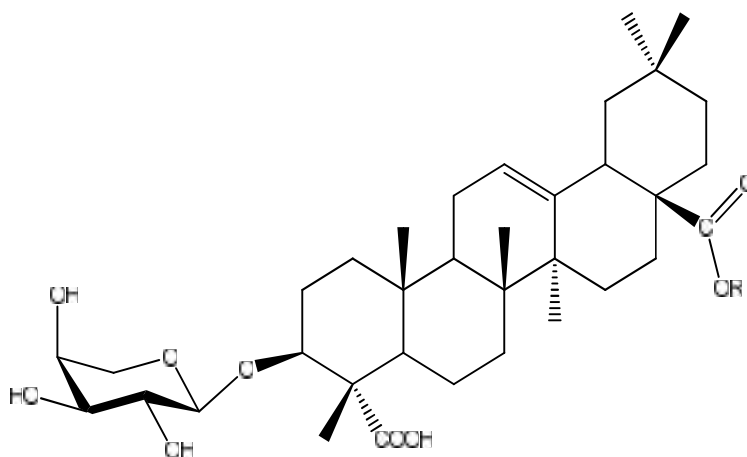
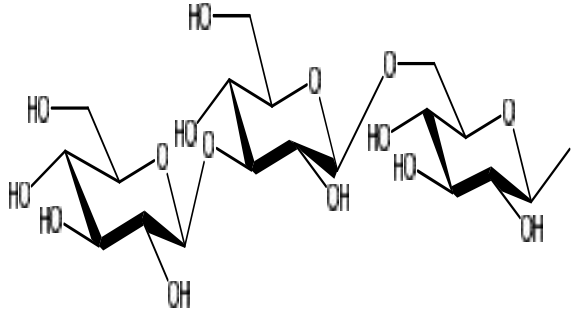
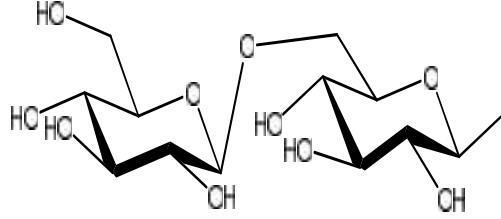
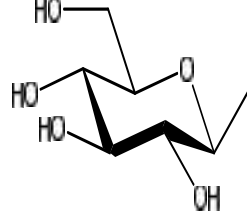


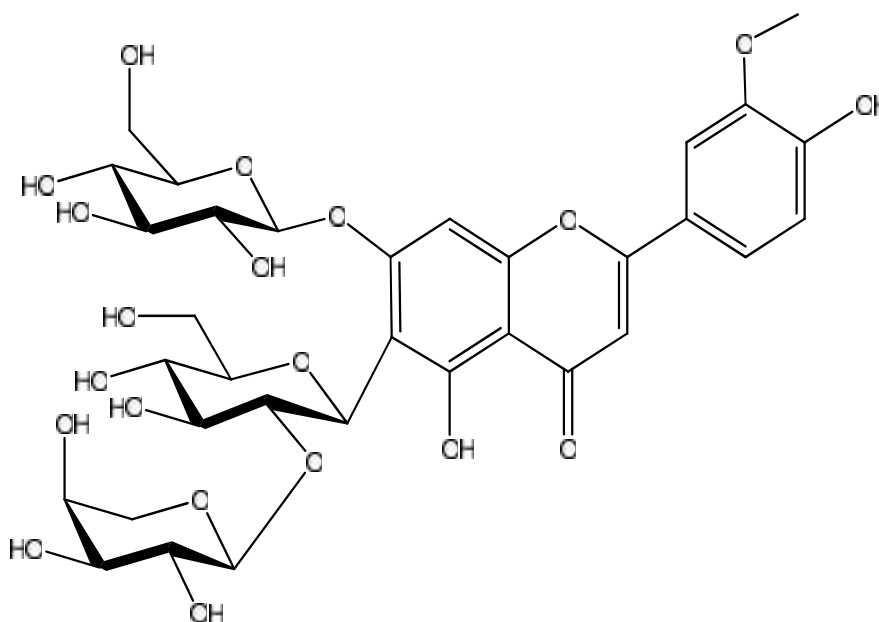
Tableau I-3: Saponides isolés de l'espèce *Paronychia chionaea*

(N°) Composés identifiés	R
<p>(20) 3-O- -L-arabinopyranosyl-28-O- -D- glucopyranosyl-(1 3)- -D-glucopyranosyl- (1 6)- -D-glucopyranoside acidegypsogénique</p>	

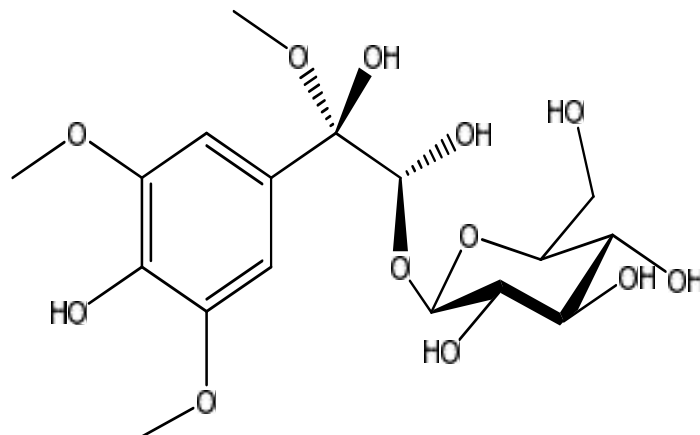


<p>(21) 3-O- -L-arabinopyranosyl-28-O- -D-glucopyranosyl-(1 6)- -D-glucopyranoside acide gypsogénique</p>	
<p>(22) 3-O- -L arabinopyranosyl-28-O- -D-glucopyranoside acide gypsogénique</p>	
<p>(23) 3-O- -L-arabinopyranosyl acide gypsogénique</p>	<p>H</p>

Une autre étude phytochimique a été réalisée sur l'extrait méthanolique des racine de la même espèce. Elle a permis d'isoler et de caractériser par les méthodes spectrales, principalement la RMN mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie de masse, un flavonoïde (24) et un polyphénol (25) [31].



(24) 6-C-[(1 2)- -D-glucopyranosyl]-7-O-[ -D-glucopyranosyl]-lutéoline 3'-methyl ether.



(25) 2-(methoxy)-2-(3,5-diméthoxy 4-hydroxyphenyl)-ethane-1,2-diol 1-O-β-D-glucopyranoside.

### I-5-2-3- *Paronychia argentea*

L'investigation chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes séchées et pulvérisées de *Paronychia argentea*, a permis l'identification de deux nouvelles saponines (26-27) et sept flavonoïdes glycosylés (28-34) dont (28) est un nouveau [32].

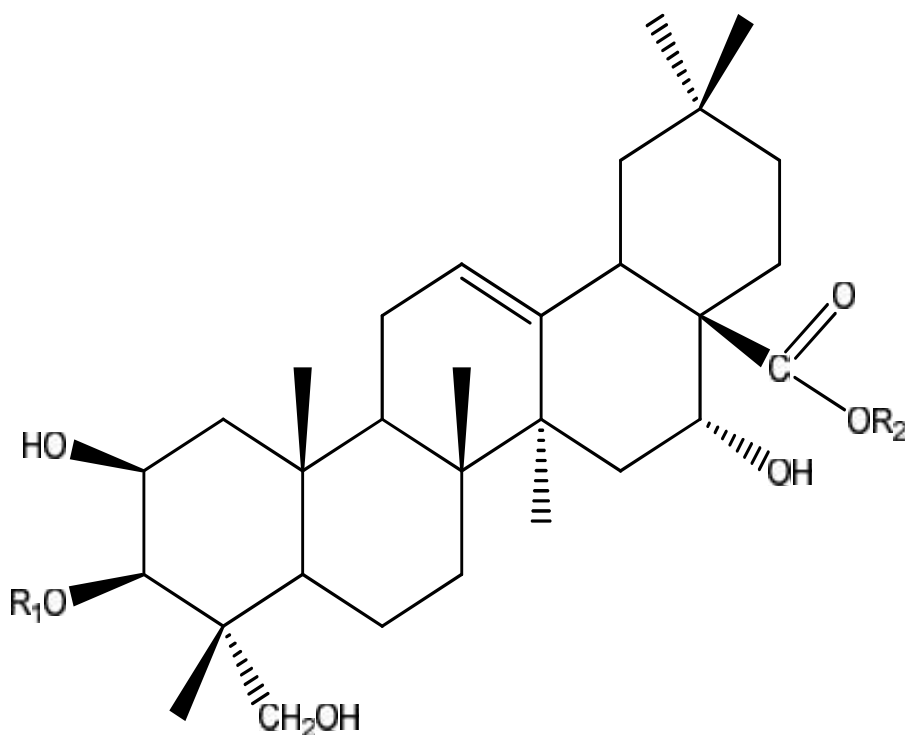
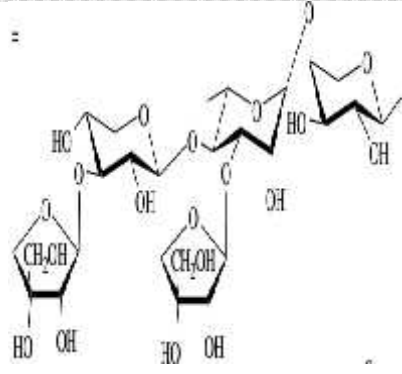
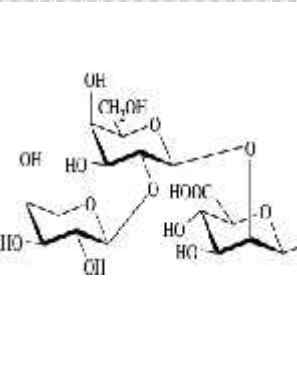
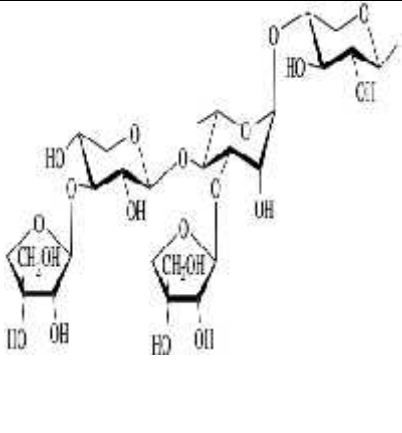
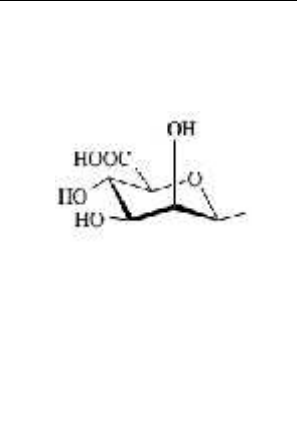
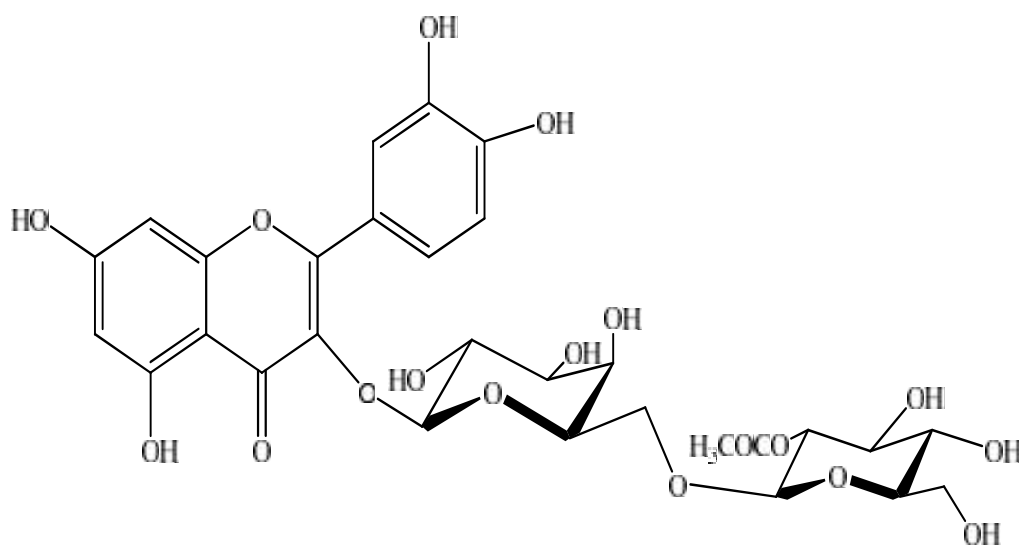
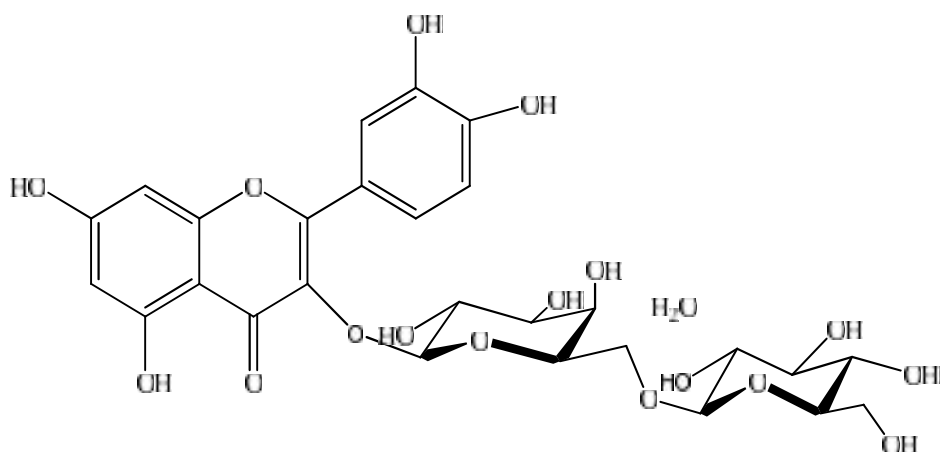


Tableau I-4: Saponosides isolés de l'espèce *Paronychia argentea*

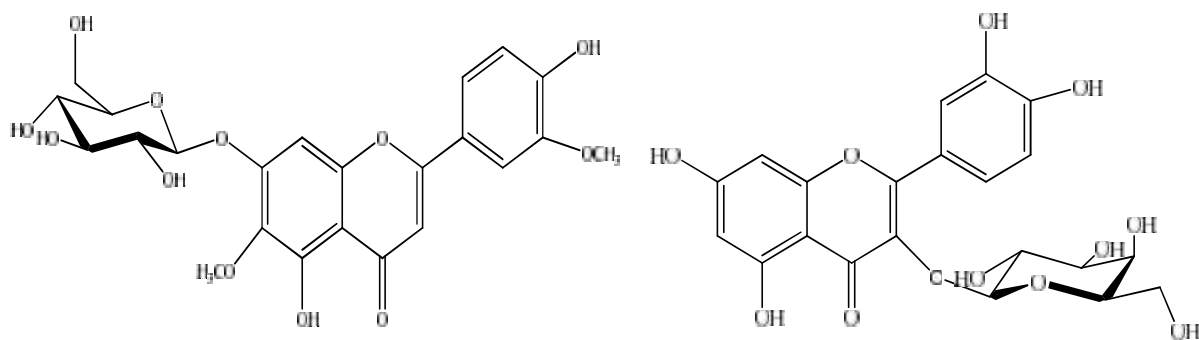
(N°) Composés identifiés.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<p>(26) 3-O-{ -D-apiofuranosyl-(1 3)- -D-xylopyranosyl-(1 4)-[ -D- apiofuranosyl-(1 3)]- -L- rhamnopyranosyl-(1 4)- -L- arabinopyranosyl} acide polygalacique.</p>		
<p>(27) 3-O-{ -D-apiofuranosyl-(1 3)- -D-xylopyranosyl-(1 4)-[ -D- apiofuranosyl-(1 3)]- -L- rhamnopyranosyl-(1 4)- -L- xylopyranosyl} acide polygalacique 28-O- - mannuronopyranosyl ester</p>		



(28) Quercetine 3-O-[(2''-acetyl)- -D-glucopyranosyl]-(1 6)- -D-galactopyranoside

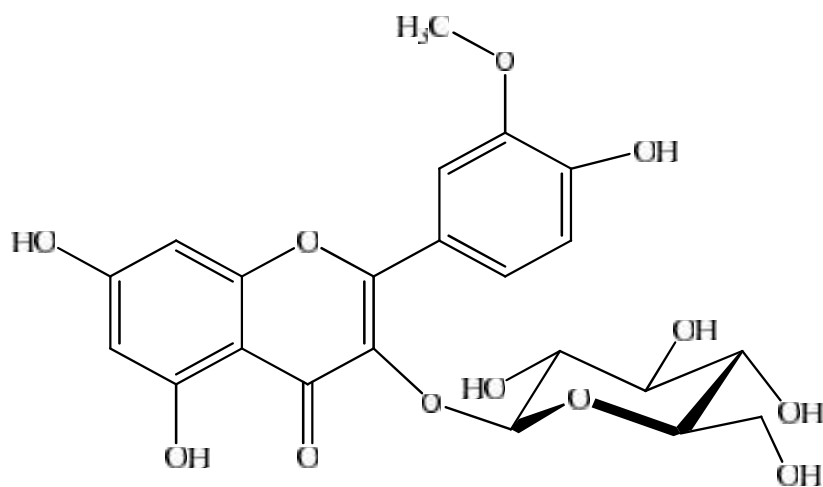


(29) Quercetine 3-O- -D-glucopyranosyl-(1 6)- -D-galactopyranoside

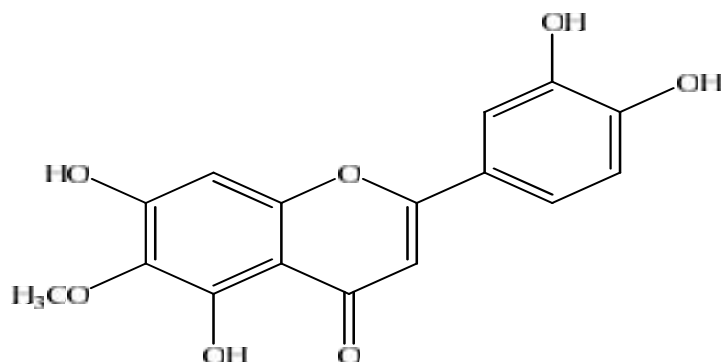


(30) Jaceoside

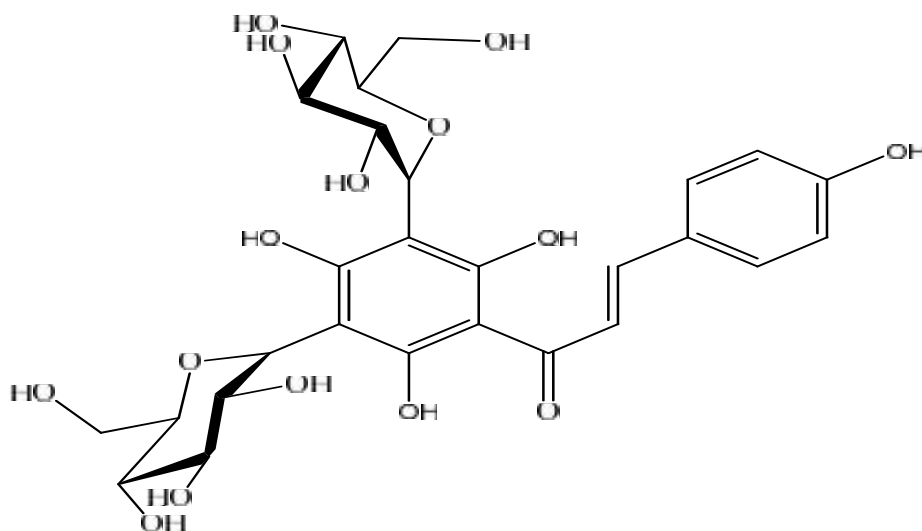
(31) Quercetine 3-O- -D-galactopyranoside



(32) Quercetine 3'-methoxy-3-O- -D-glucopyranoside



(33) 6-méthoxylutéoline

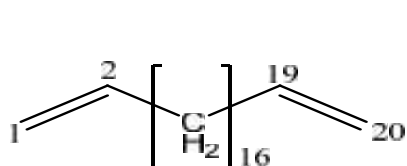


(34) 3',5'-di-C- -D-glucopyranosyl-phlorétine

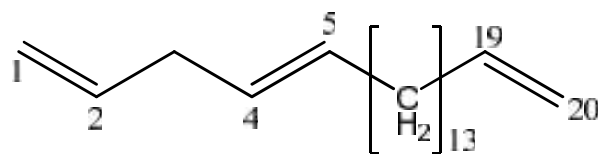
#### I-5-2-4- *Paronychia kapela*

S'il apparaît clairement au travers de cette étude consacrée aux travaux chimiques antérieurs dont a été soumis le genre *Paronychia* et qui montre la prépondérance des saponines triterpéniques et des flavonoïdes, il n'en demeure pas moins que les plantes constituant ce genre sont capables de biosynthétiser d'autres molécules issues du métabolisme secondaire, dont les acides gras et les polyphenols connus aussi pour leurs activités biologiques très importantes. En effet, Curini et ses collaborateurs rapportent dans une étude phytochimique sur l'espèce *P. kapela*, l'isolement et la caractérisation de 16 composés

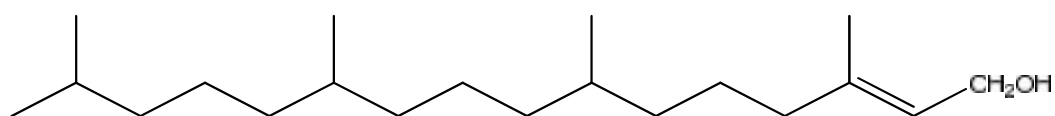
connus: sept long chaines hydrocarbures (35-41), trois polyphynoles (42-44) et six flavonoïdes (7;9;31;45-47) [28].



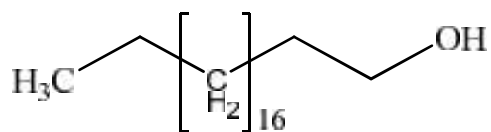
(35) 1,19-Eicosadiène



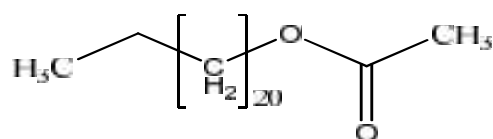
(36) 1,4-Eicosadiène



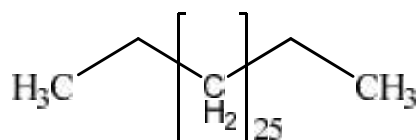
(37) Phytol



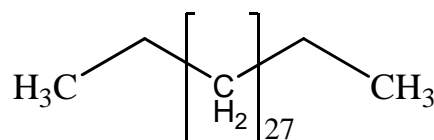
(38) Eicosanol



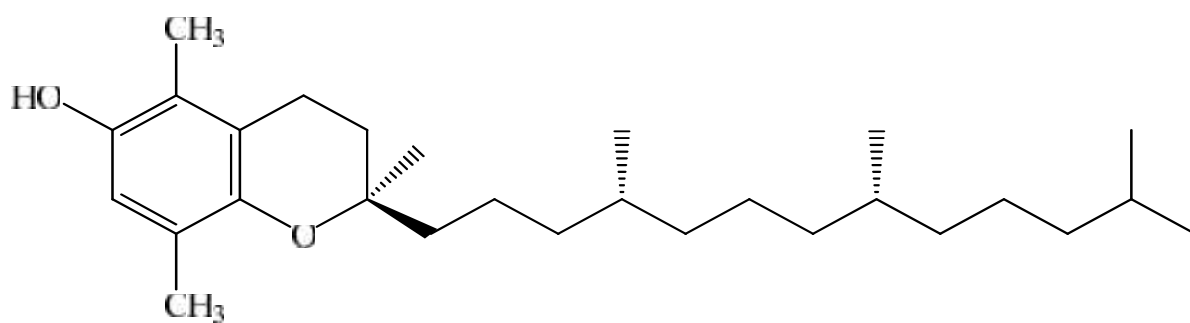
(39) 1-Docosanol acétate



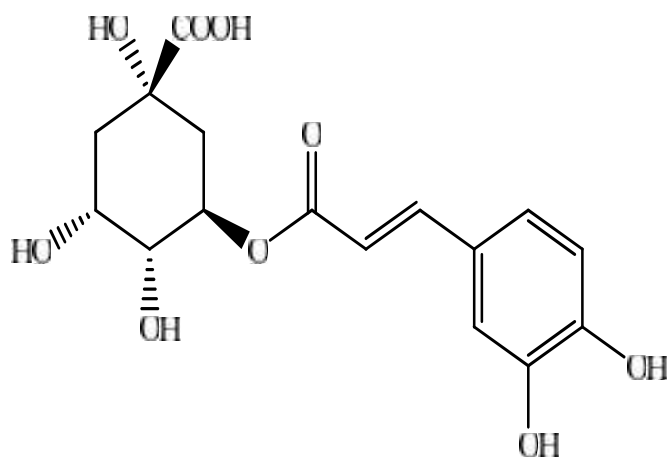
(40) Nonacosane



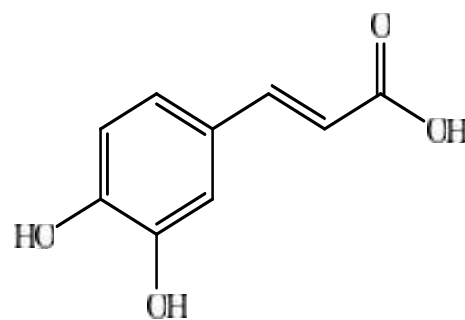
(41) Hentriacontane



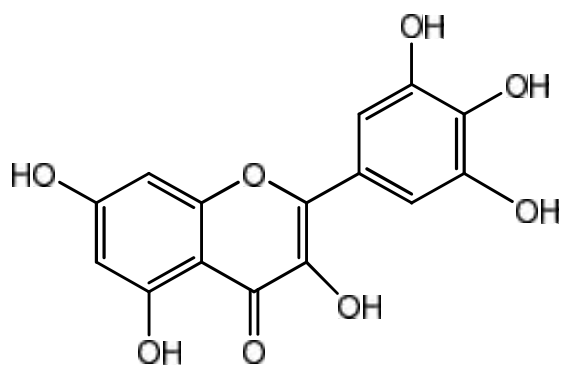
(42) Tocophérol



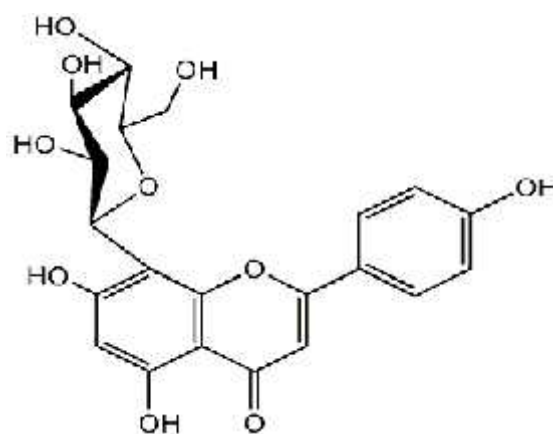
(43) Acide chlorogénique



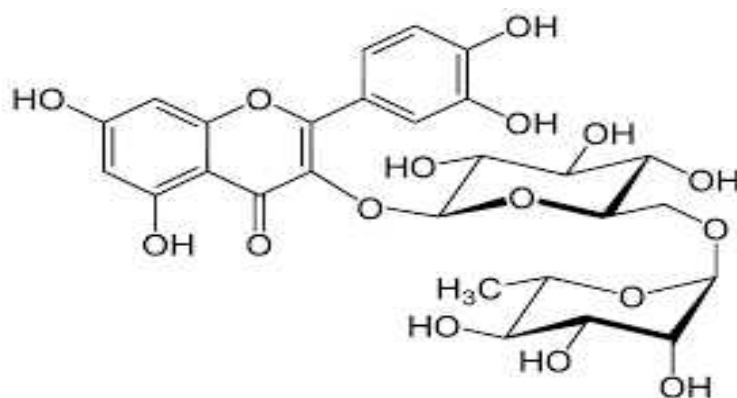
(44) Acide cafféique



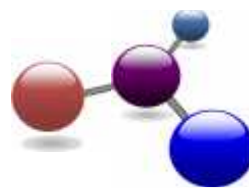
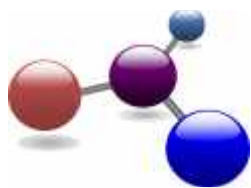
(45) Myricetine



(46) Vitexine



(47) Rutine



# CHAPITRE II

*Etude des composés  
glycolipidiques, phénoliques et  
triterpéniques.*





## II-1- Généralités sur les glycolipides

Le nom «glycolipide» décrit un lipide complexe composé d'une partie saccharidique liée à une chaîne aglycone hydrophobe [33]. Les glycolipides peuvent être divisés en deux classes :

1. Glycoglycérolipides (basés sur le glycérol « Figure II-1») sont abondants chez les bactéries et les plantes.

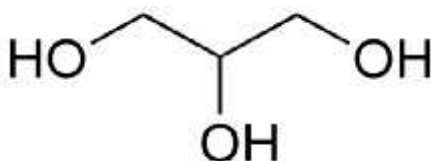


Figure II-1 : Glycérol

2. Glycosphingolipides (basés sur le sphingosine « Figure II-2») sont les glycolipides majeurs chez les animaux.

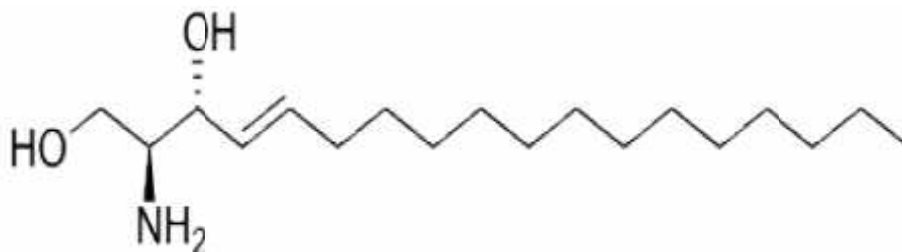


Figure II-2 : Sphingosine

Les glycolipides sont des composés polaires qui constituent les membranes des cellules animales et végétales. Ils jouent un rôle physiologique important (rôle protecteur, réserve glucidique, etc...) [34]. Ils se signalent par leur activité biologique; les plus prometteurs font l'objet de synthèse [35]. Les premiers glycolipides sont connus depuis plus d'un siècle [36]. Ce n'est qu'en 1973 que les premiers glycolipides marins ont été découverts dans les cyanobactéries [37].

## II-1-1- Glycéroglycolipides

Les glycéroglycolipides sont des lipides complexes polaires dont la structure de base est un glycérol, avec au moins une liaison osidique qui forme une tête polaire liée en position 3, les deux autres groupes hydroxyles en positions 1 et 2 du glycérol pouvant être acylés (monoacylé ou diacylé) par un acide gras ou alkylés par un résidu constitué d'une longue chaîne (Figure II-3) [38].

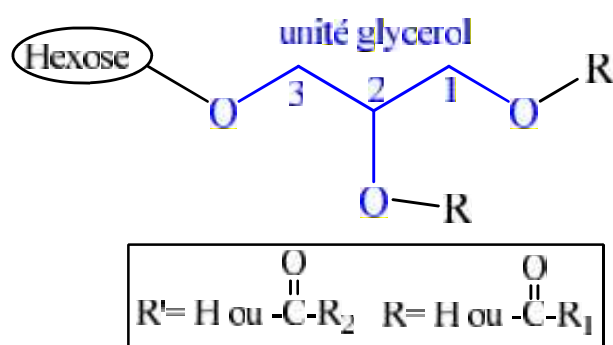


Figure II-3 : Glycéroglycolipide

Les glycolipides portent une tête polaire qui contient un ou plusieurs hexoses comme exemple le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) [39]. Parmi ces hexoses: le galactose [40], le glucose et ces isomères (soufré «6-désoxy-6-sulfo-D-glucose», azoté «6-amino-6-désoxy-D-glucose» [40-41].

Les sulfoquinovosyl monoacylglycérol (SQMG) et diacylglycérol (SQDG) possédant un groupement sulfate (6-désoxy-6-sulfo-D-glucose) sur la partie osidique sont appelés aussi sulfoglycolipides ou sulfolipides [42]. Il est important de noter que l'atome de soufre est contenu dans un résidu d'acide sulfonique lié par une liaison C-S très stable. Le groupe sulfate ester est très acide et la molécule formée de ce lien est très chargée *in vivo* ce qui la rend beaucoup moins stable. On le retrouve exclusivement chez les végétaux comme élément glucidique de base [42].

## II-1-1-1- Biosynthèse des glycolipides

Les glycolipides sont biologiquement synthétisés par des enzymes qui transfèrent les groupements porteurs des têtes polaires **UDP** sur une molécule de glycérol mono ou di acylé (GMA, GDA) (Figure II-4) [43-46].

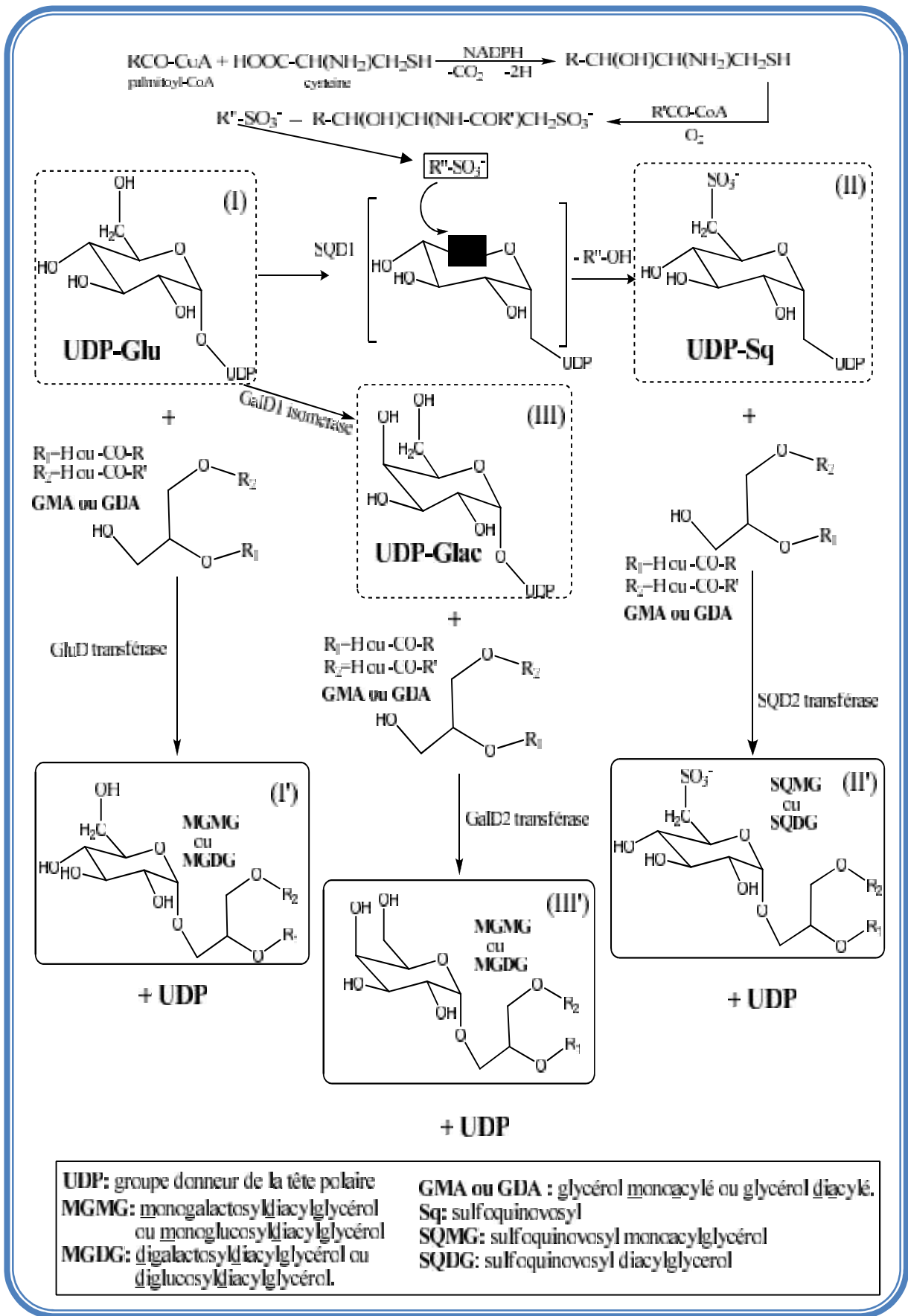


Figure II-4: Biosynthèse des glycolipides

### II-1-1-2- Rôles biologiques des glycosphingolipides

Les glycosphingolipides sont les lipides plus abondants de la membrane des thylacoïdes et semblent jouer un rôle crucial dans la photosynthèse [47].

Certains glycolipides isolés à partir de divers organismes des plantes supérieures possèdent une activité pharmacologique intéressante. Comme exemple les monogalactosylcéramides diacylglycérols MGDG sont des substances anti-inflammatoires [48] et les diacylglycérolsulfoquinovoses SQDG sont des composés actifs contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ses chaînes acyles transportant des électrons au cours de la photosynthèse sont impliquées dans la construction de chloroplastes [49].

D'après Naoki et al. [50], les glycolipides (MGDG et DGDG) peut être un inhibiteur de la prolifération des ADN polymérase du mammifère et de cellules de cancer humain. Elle a une activité anti-tumorale *in vivo* et sa force d'activité a été repérée au niveau de ses pairs acyles [51].

Un légume contenant une grande quantité de SQDG (un pourcentage élevé de SQDG dans la fraction de glycolipides) peut être une source importante d'agents anticancéreux [52].

### II-1-2- Les glycosphingolipides

Les sphingolipides sont une classe de lipides complexes dont l'acide gras est lié à une longue chaîne appelée base sphingosine, par une fonction amide. Le terme «sphingo» a été adopté par Thudichum en 1884 et le terme «sphingolipide» a été introduit par Carter et al. en 1947 [53]. Le glycosphingolipide comprend une partie amino-alcool à longue chaîne de base ou encore sphingosine. Cette dernière est liée à une chaîne acyle et l'ensemble porte le nom de cérebroside. La structure du glycosphingolipide (Figure II-5) résulte de la fixation d'une ou de plusieurs unités glucidiques sur la fonction alcool primaire de la céramide. Ils sont présents dans les végétaux surtout dans la membrane plasmique des cellules animales [54]. On les trouve aussi à l'état naturel dans de nombreuses sources alimentaires [55].

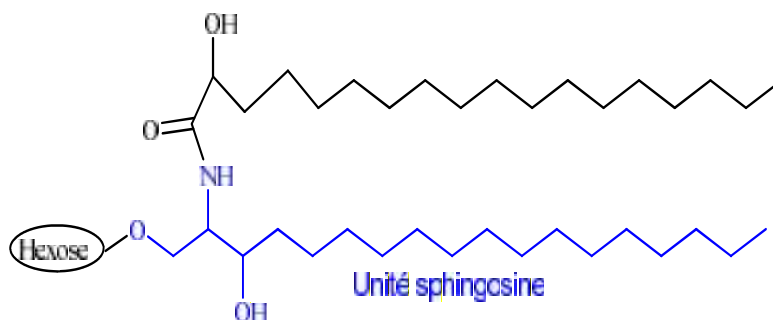
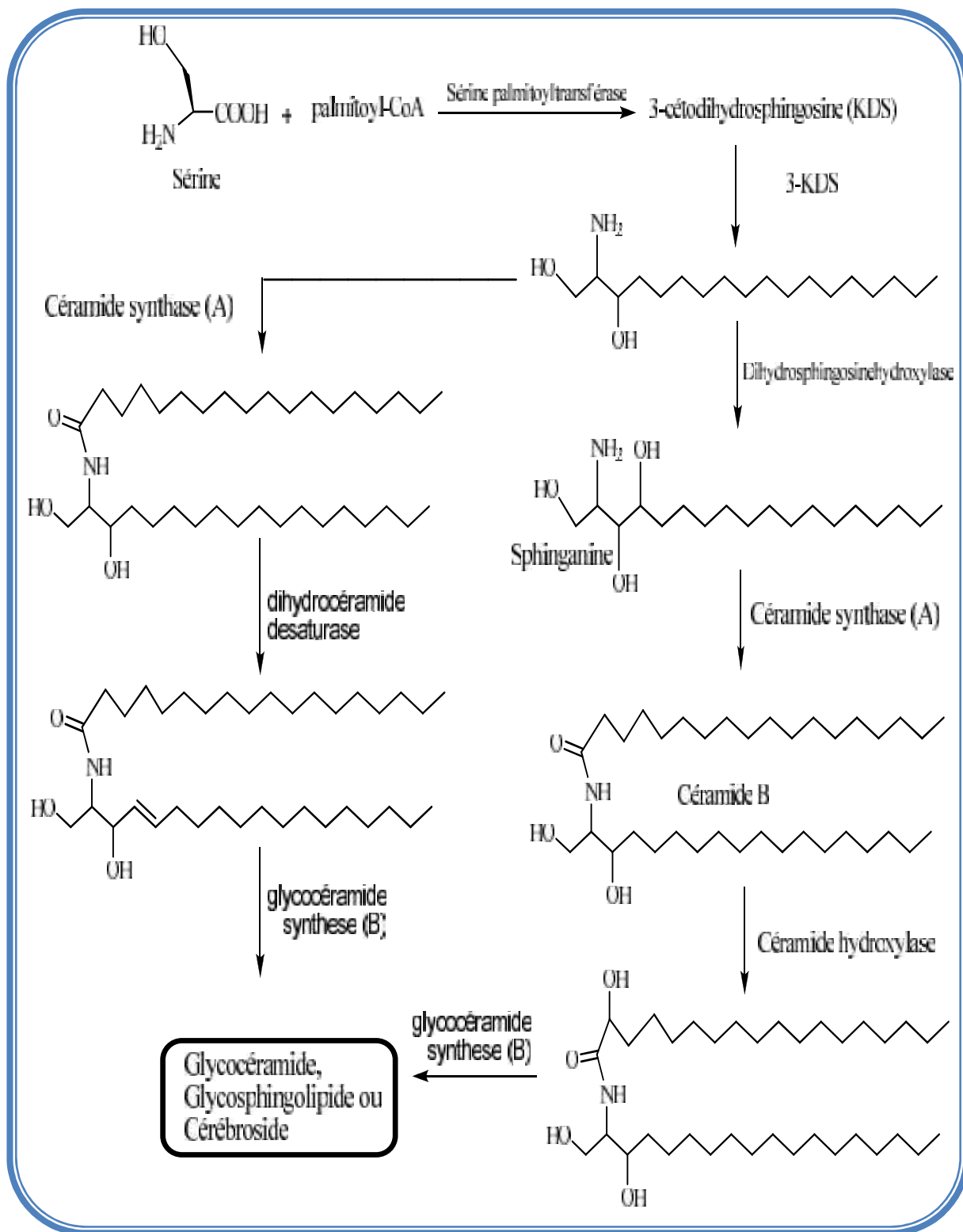


Figure II-5 : Le glycosphingolipide

**II-1-2-1- Biosynthèse des glycosphingolipides**

La biosynthèse des glycosphingolipides dont le point départ est la sérine et le palmitoyl-Coenzyme A, est illustrée par la figure ci-dessous (Figure II-6) [56-58].



**Figure II-6: Biosynthèse des glycosphingolipides**

**II-1-2-2- Rôle biologique des sphingolipides**

Des propriétés intéressantes leur ont été attribuées dans la prévention du cancer du colon ou de la peau [55]. Les sphingolipides interagissent également avec le cholestérol au niveau de l'intestin, ce qui limite son absorption. Cependant, les études cliniques évaluant ces propriétés chez l'homme sont rares et la quantité effective de sphingolipides apportée par l'alimentation reste méconnue [54].

Les céramides ont une grande fonction biologique dans les cellules vivantes. Elles seraient responsables du déclenchement de l'apoptose cellulaire et seraient aussi impliquées dans l'activation de la cascade de plusieurs protéines kinases. En effet, les céramides sont synthétisées dans les conditions de tout stress cellulaire [54].

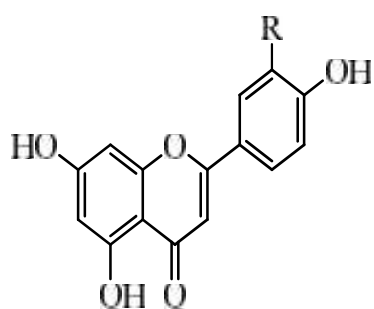
L'apoptose est le processus par lequel la cellule active son suicide, étape essentielle à son renouvellement. Ce processus est nécessaire pour l'homéostasie des tissus. L'arrêt de l'apoptose pourrait avoir de graves conséquences entraînant ainsi plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète, la neuropathie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose [59]. Il est possible que la fonction biologique des céramides soit liée à la double liaison C(4)=C(5) de la sphingosine. La configuration *trans* de cette dernière n'en paraît pas la raison car les céramides à liaison C(4)=C(5) *cis* induisent aussi l'apoptose cellulaire [53].

**II-2- Généralités sur les composés phénoliques**

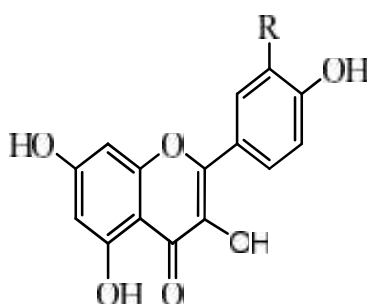
Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes comme les terpènes, les stéroïdes, les composés azotés dont les alcaloïdes et les composés phénoliques. Ces derniers possèdent une très large gamme d'activités biologiques [60-62]. Les composés phénoliques forment un ensemble de substances caractérisé par la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle [63]. Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus dans la littérature, on peut citer les flavonoïdes, les lignanes, les tanins et les coumarines [64-66]. Pour notre part nous nous sommes intéressés à étude des flavonoïdes et des lignanes.

II-2-1- Flavonoïdes

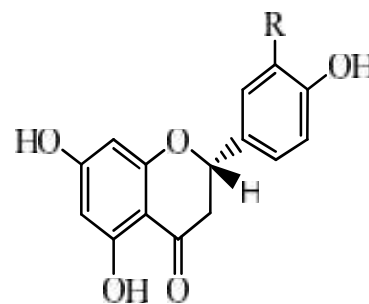
Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles; ils se trouvent dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans les divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits, bien qu'un type particulier de flavonoïdes ait en général une compartimentation définie (anthocyanes dans les fleurs) [67]. Ils se présentent souvent sous forme d'hétérosides, solubles dans la vacuole cellulaire ou solubles dans les solvants polaires [68]. Structurellement, les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavononols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aurones et anthocyanes (Figure II-7) [69]. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre ou sous la forme de glycosides et plus de 6500 d'entre elles ont été décrites jusqu'à maintenant [70].



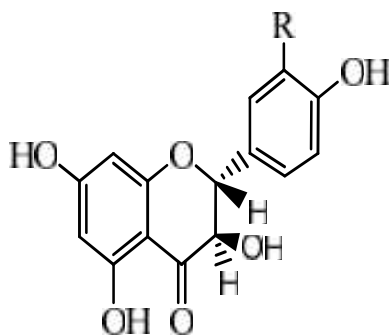
Flavones  
R=H Apigénine (51)  
R=OH Luteoline (52)



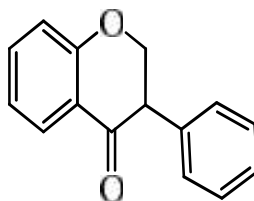
Flavonols  
R=H Kaempférol (53)  
R=OH Quercétine (54)



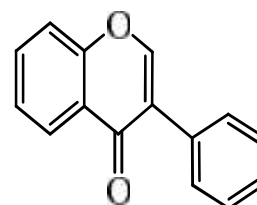
Flavanone  
R=H Naringénine (55)  
R=OH Eriodictyol (56)



Flavon-3-ols  
R=H dihydrokaempferol (57)  
R=OH dihydroQuercétine (58)



Isoflavone (59)



Isoflavonone (60)



Figure II-7: Structures de différentes classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4', 5' ou 6'. Les principaux groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Les flavonoïdes ou isoflavonoïdes peuvent être aussi présents sous forme *O*-glycosylés (arabinose, galactose, glucose, rhamnose et xylose) ou *C*-glycosylés comme Puerarine (66) et isovitexine (67).....etc (Figure II-8) [71].

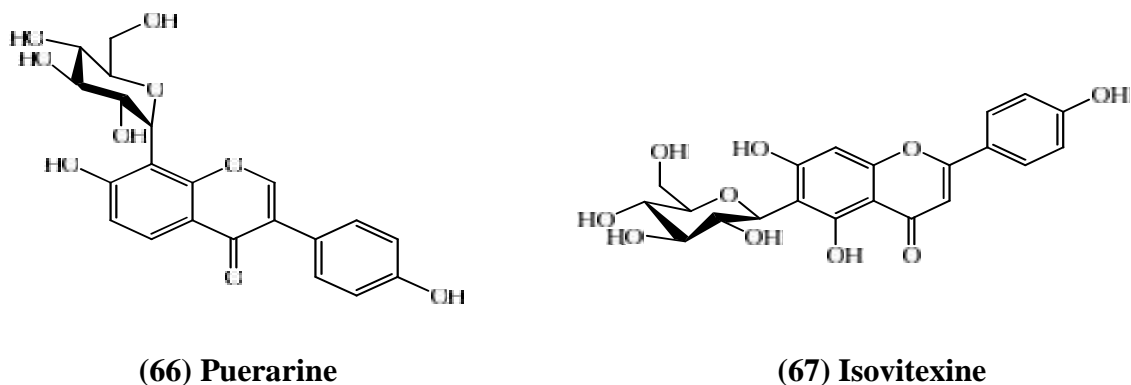


Figure II-8: Structures de flavonoïdes *C*-glycosylés

### II-2-1-1- Biosynthèse des Flavonoïdes

Robinson [72] remarqua que les différents systèmes d'hydroxylation des deux cycles aromatiques des flavonoïdes témoignent d'origines biogénétiques divergentes. Cependant, la principale voie de biosynthèse représentée ci-dessous (Figure II-9) de cette classe de composés a été correctement identifiée par Birch [73].



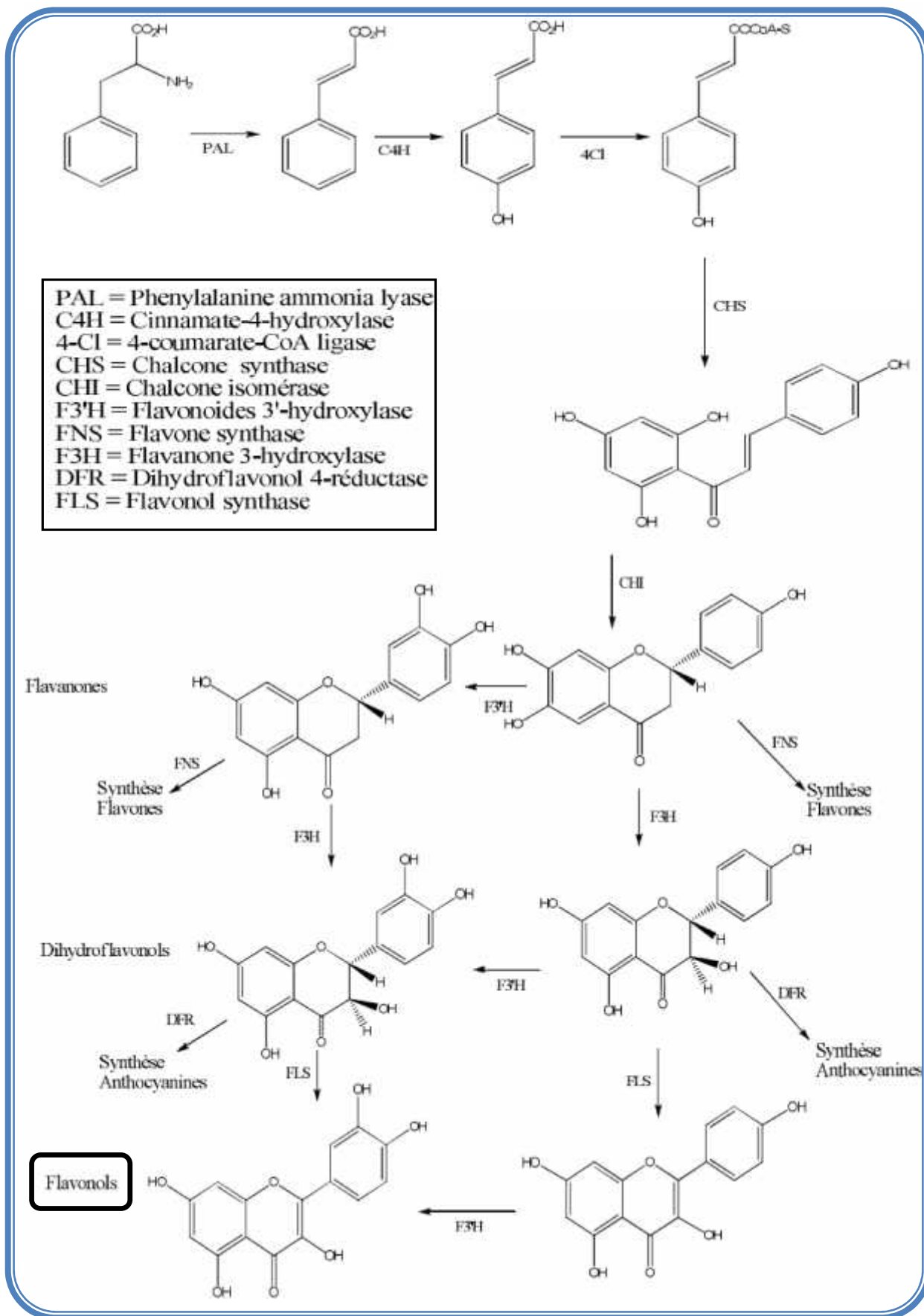


Figure II-9: Biosynthèse des flavonoïdes

**II-1-2- Rôles biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes, seuls ou associés, sont prescrits dans les indications suivantes : traitement de troubles en rapport avec une insuffisance veineuse : jambes lourdes, crampes, œdèmes, varices...etc.

- 📌 traitement de la crise hémorroïdaire
- 📌 en ophtalmologie lors de troubles liés à la circulation rétinienne
- 📌 métrorragies liées à la présence d'un dispositif intra-utérin
- 📌 traitement de la fragilité capillaire au niveau de la peau et des muqueuses [74]

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque de cancer, d'affections cardiovasculaires et d'autres maladies chroniques. Ces effets sont confirmés dans diverses études :

- 📌 En ce qui concerne le cancer, il est établi qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de cancer jusqu'à 50 % [75]
- 📌 En ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, les données relatives à l'influence des flavonoïdes restent fragmentaires [76], et les résultats ne sont pas concluants [77]
- 📌 Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires [78]

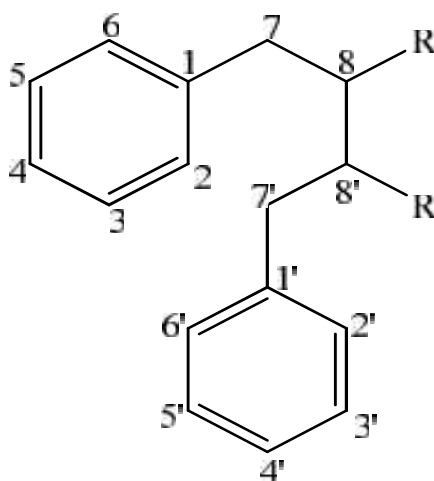
Des études épidémiologiques sur des femmes chinoises (400 personnes saines et 200 malades ayant le cancer du sein) ont montré qu'une alimentation riche en Soja diminue considérablement les risques d'attaque du cancer du sein [79]. Ces maladies, appelées aussi phyto-œstrogènes, ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche. En effet, des études épidémiologiques ont prouvé l'action de ce type de molécules sur les risques de certains cancers et maladies du cœur [80].

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée «vitaminique P».

À côté de cette action principale «vitamine P», les flavonoïdes présentent plusieurs activités: antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses [81] ainsi que d'autres activités particulières: diurétiques et antispasmodiques [82].

### II-2-2- Lignanes

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936 [83], désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8') (Figure II-10) [84].



**Figure II-10: Squelette de base des lignanes**

Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal. La distribution botanique des lignanes est large: Plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les gymnospermes, ils sont surtout rencontrés dans le bois alors que chez les angiospermes, ils ont été identifiés dans tous les tissus [85]. Ils ont été découverts dans toutes les parties des plantes: racines, feuilles, fruits et graines [83].

Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes ont été caractérisés chez différentes sont les suivantes: lignanes dibenzylbutanes, lignanes butyrolactones, lignanes monofuraniques, lignanes aryltéralines, lignanes furanofuraniques et lignanes dibenzocycloctanes (Figure II-11) [86].

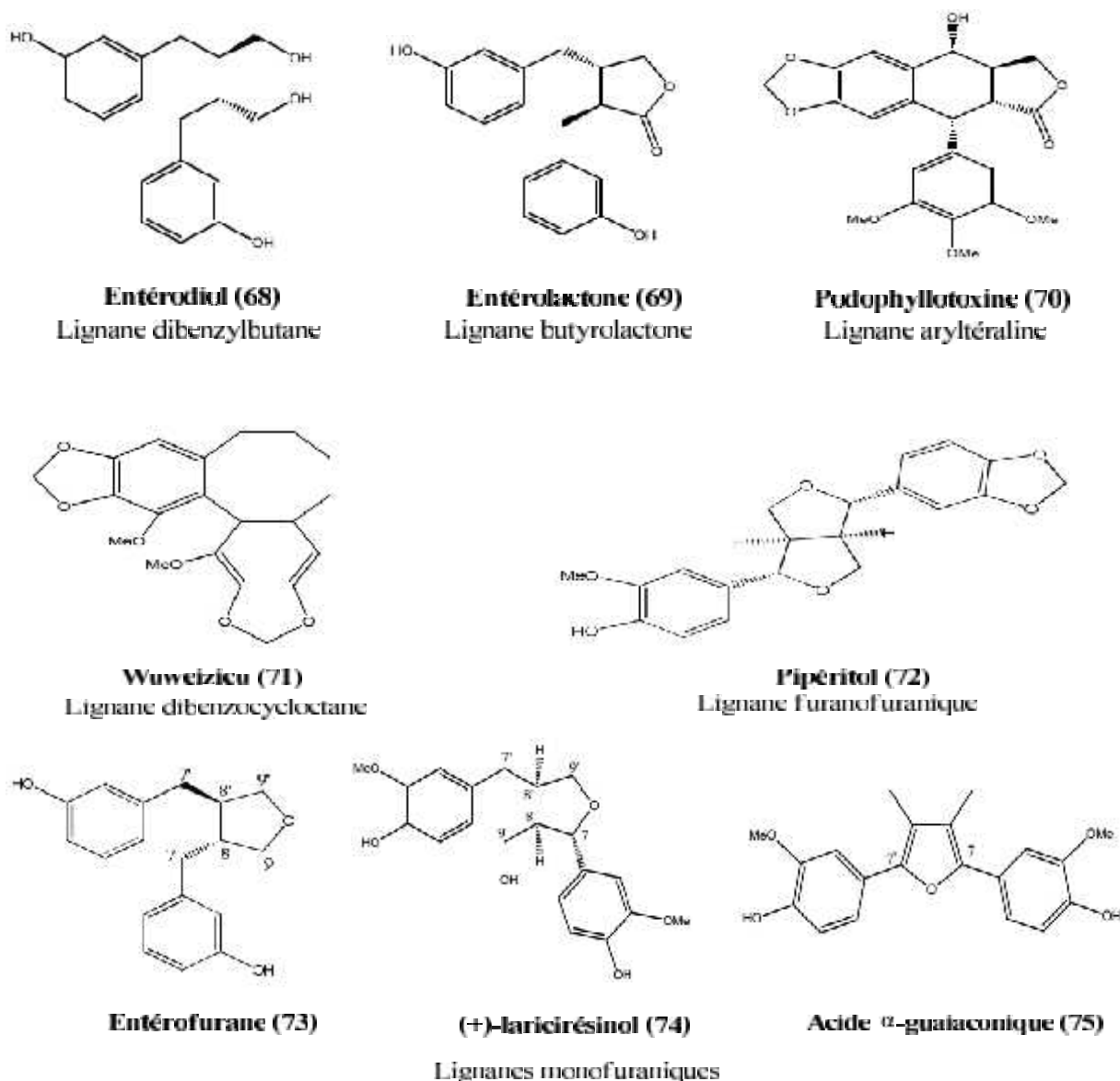


Figure II-11 : Différentes classes des lignanes

### II-2-2-1- Biosynthèse des lignanes

Les lignanes se trouvent dans les différentes parties des plantes: l'écorce, les racines, les fleurs et les graines. Biosynthétiquement, ils sont élaborés comme tous les dérivés des phénylpropanoïdes par la voie du schikimate via l'alcool coniférylique. La biosynthèse de ce dernier à partir de la phénylalanine n'est pas une voie simple et droite, mais une grille métabolique complexe (Figure II-12) [87,88]. L'alcool coniférylique est également précurseur des lignines.

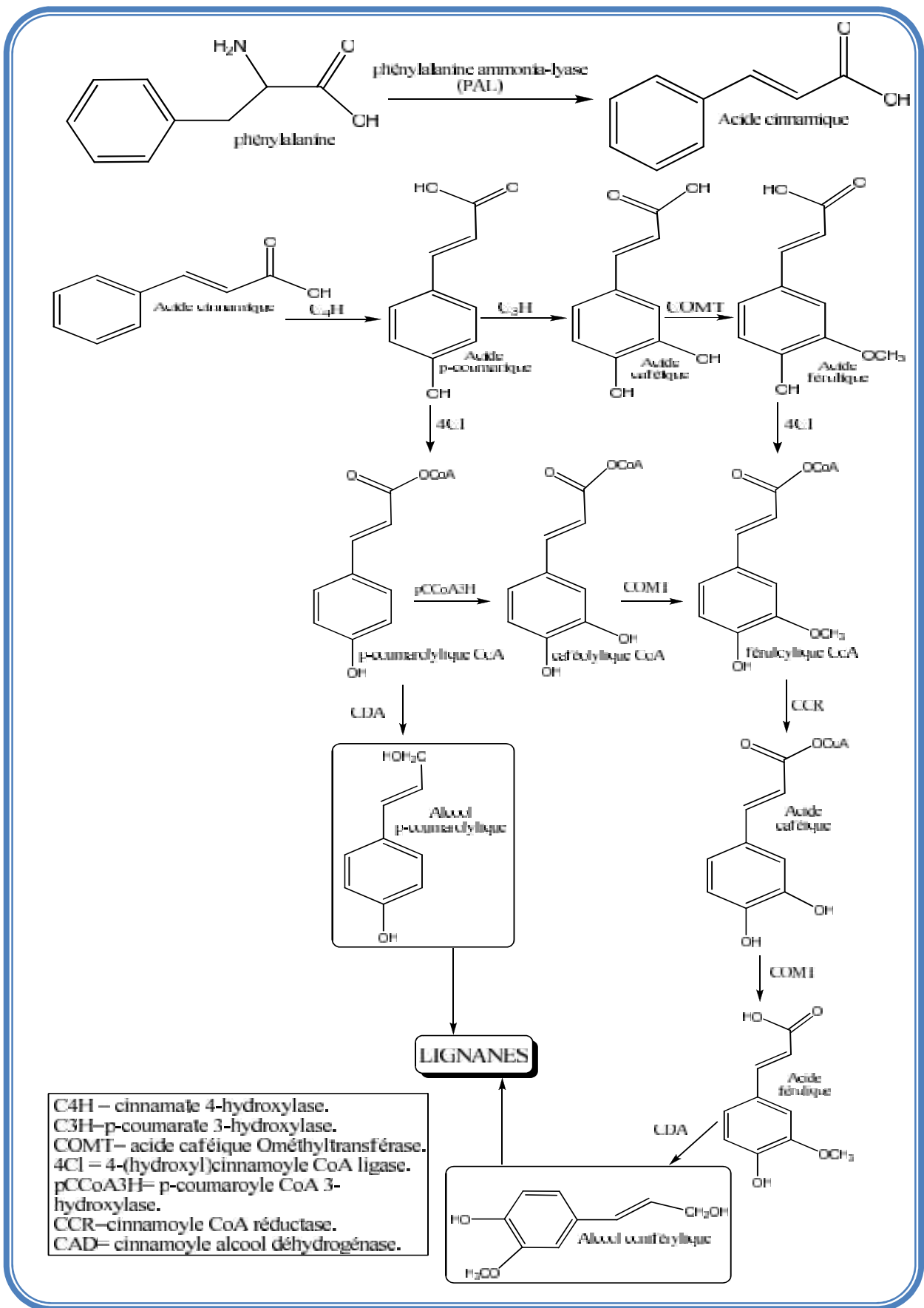


Figure II-12: Biosynthèse des lignanes

### II-2-2-2-Intérêts pharmacologiques des lignanes

Il a été établi que les plantes riches en lignanes sont utilisées pour traiter diverses maladies comme le cancer [89], l'arthrite, l'ulcère et les douleurs [90]. Ces composés possèdent une large gamme d'activités biologiques incluant: l'activité anti-tumorale, anti-oestrogénique, bactéricide, antifongique ainsi que anti-inflammatoire [96], cytotoxique [91], anti-nutritive [92], antivirale [93] et antimicrobienne [94]. Nombreuses recherches scientifiques ont aussi démontré que les lignanes sont transformés par les bactéries intestinales en composés qui protègent l'homme des maladies hormonales [90]. En plus, les lignanes sont des anti-oxydants spéciaux qui ont fait preuve de remarquables effets bénéfiques pour la santé humaine [95]. Ces composés agissent aussi contre les taux élevés de cholestérol, le lupus et le diabète [96].

### -3-Généralités sur les triterpenoides et les phytostérols

#### -3-1- Triterpenoides

C'est une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C<sub>30</sub>. C'est ainsi qu'il existe les triterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques et hexacycliques [97]. Ils sont produits à partir de deux molécules de farnésyl pyrophosphate (FPP) par une fusion de tête-à-tête. La majorité de triterpènes dans la nature est sous forme tétra ou pentacycliques, la forme acyclique est très rare. Parmi les triterpènes acycliques, on peut citer le squalène (Figure II-13). Ce dernier est le précurseur des autres triterpénoïdes [97-99]. La plupart des triterpènes sont des alcools sous forme libre ou glycoside (saponines) ou ester. Les triterpénoïdes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux [99].

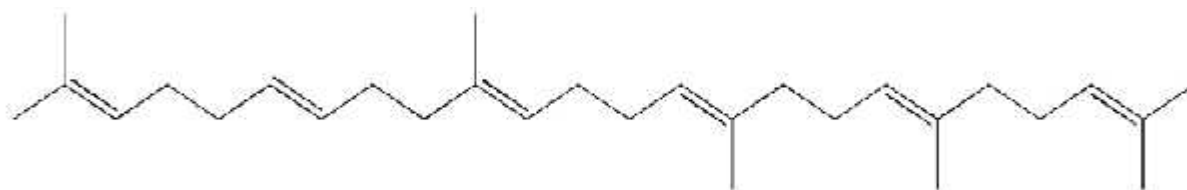
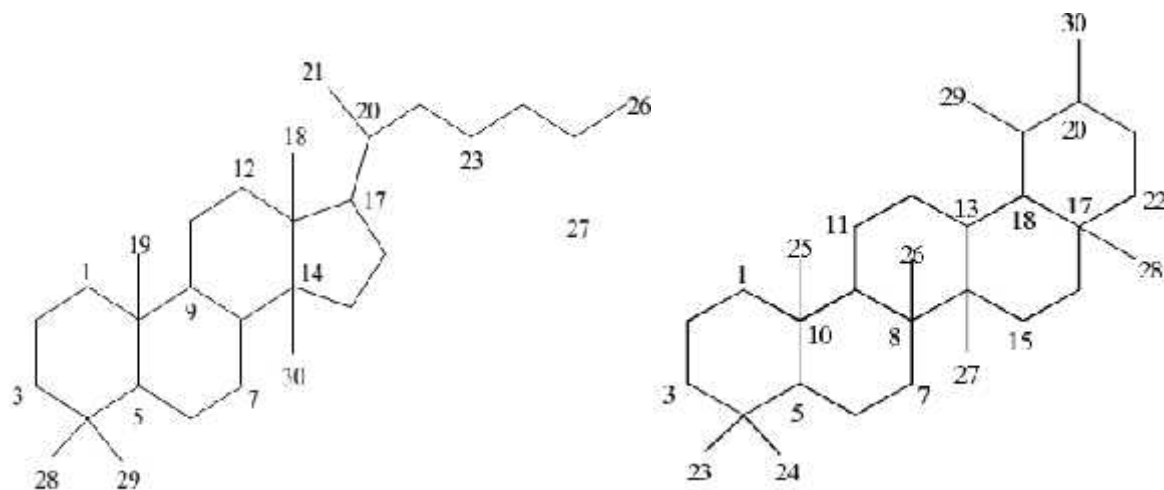


Figure II-13: Structure moléculaire de squalène

La numérotation des différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles [98], est représentée ci-dessous :



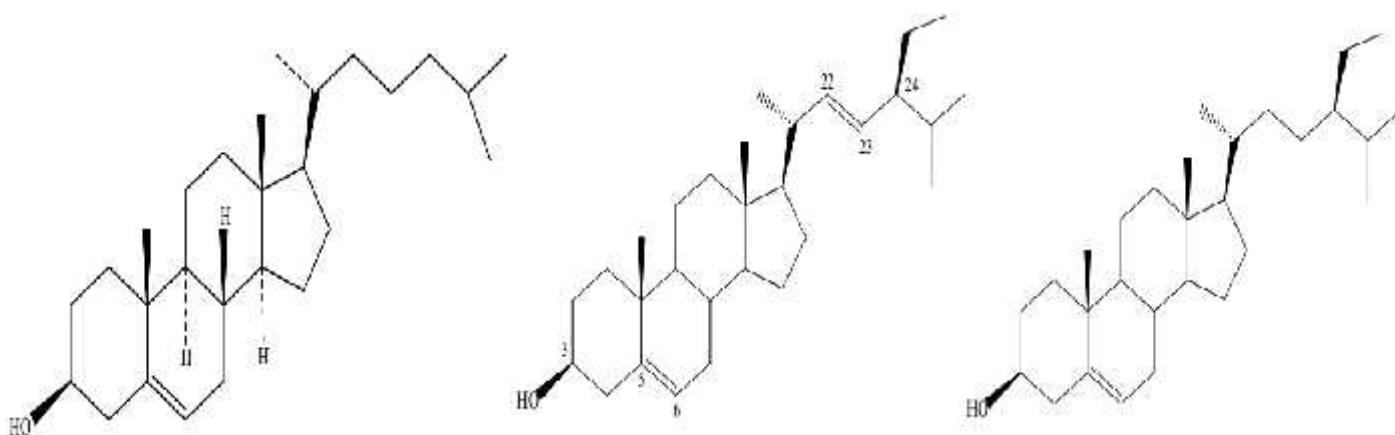
Triterpène tétracyclique

Triterpène pentacyclique

Figure II-13: Squelettes tétra- et pentacycliques

### -3-1-Phytostérols

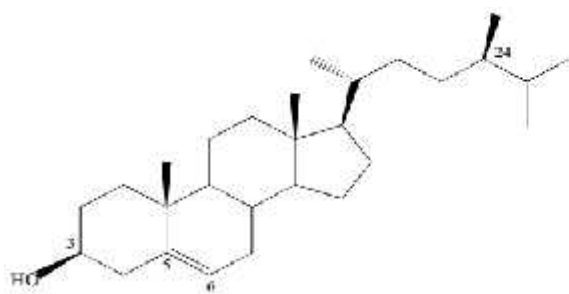
Les phytostérols (stérols végétaux) sont des composés naturellement présents dans la partie lipidique (grasse) des plantes [100-101]. Il existe plus que 100 différents phytostérols [102]. Ils s'apparaissent ainsi comme des graisses végétales identiques en structures au cholestérol (76) (graisse animale), peuvent différer également des stérols par l'alkylation supplémentaire de la chaîne latérale en C-24. Le stigmastérol (77), le -sitostérol (78), le campestérol (79) et le brassicastérol (80), en sont la meilleure illustration. On peut citer également l'isofucostérol (81) et le spinastérol (82) [102].



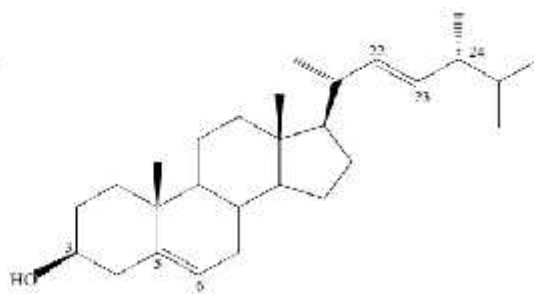
Cholestérol (76)

Stigmastérol (77)

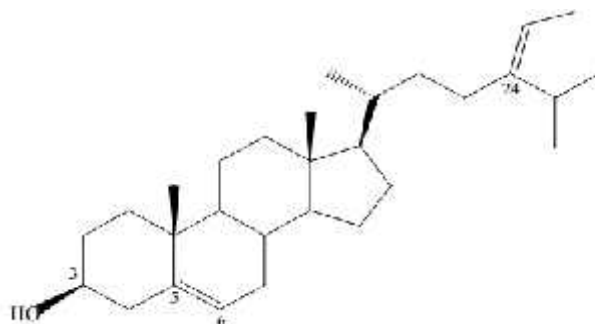
-Sitostérol (78)



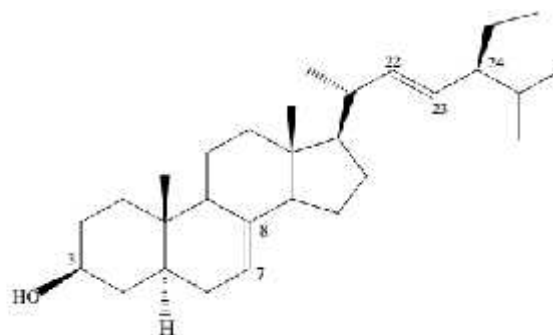
Campesterol (79)



Brassicasterol (80)



Isofucosterol (81)



Spinasterol (82)

Ils s'avèrent qu'ils possèdent tous un noyau cholestérol avec une chaîne latérale modifiée [103,104]. Ces composés, non synthétisés par l'homme et l'animal, ne peuvent être par conséquent apportés que par l'alimentation. Ils sont présents pratiquement chez toutes les plantes, mais leur concentration est cependant variable. On les trouve en concentration assez élevée dans les huiles de graines et de noix non transformées et dans une moindre mesure, dans les fruits et légumes [105].

Ce sont des solides cristallins à point de fusion élevé (de l'ordre de 100 °C), insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool à froid mais solubles à chaud. Ils se dissolvent dans le chloroforme, le benzène, la pyridine. Ils sont dotés de pouvoir rotatoire, en général lévogyres. Les phytostérols de même que les stérols donnent facilement des esters avec les acides. [103-104,106].

### -3-3- Biosynthèse des phytostérols et triterpénoïdes

Les phytostérols et les triterpénoïdes sont des classes de composés offrant une grande gamme de substances naturelles. Ceci est dû à leur origine biosynthétique (Figure II-14) [98, 107-108].



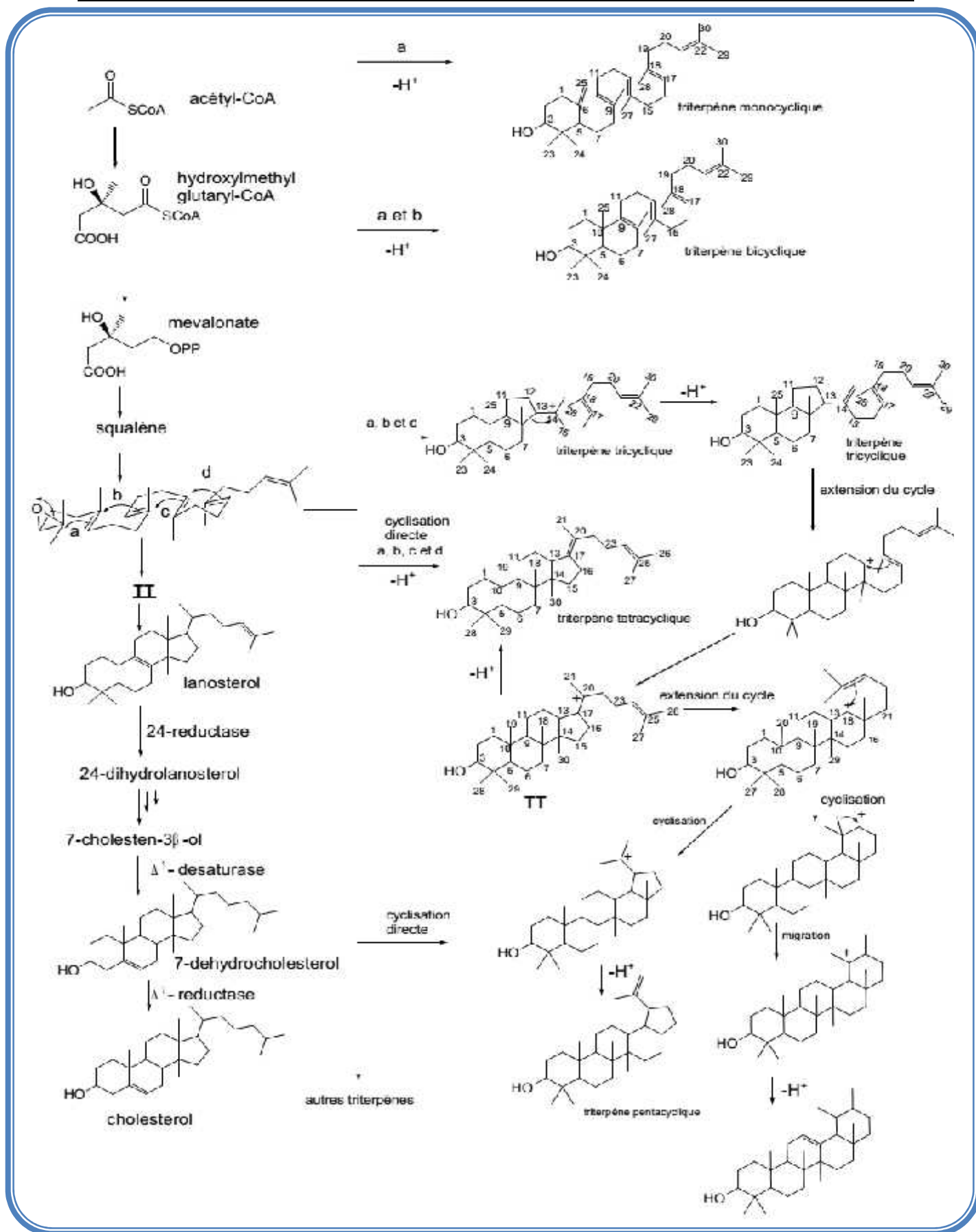


Figure II-14: Biosynthèse des stéroïdes et triterpénoïdes

**II-3-1- Rôles et activités biologiques des triterpénoïdes et des phytostérols****II-3-2- Les triterpénoïdes**

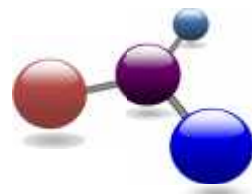
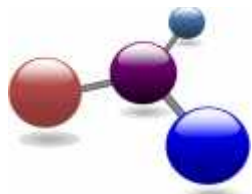
Les propriétés thérapeutiques de certains triterpènes découlent de la grande diversité structurale des métabolites secondaires triterpéniques conduisant à une grande diversité en termes d'activités biologiques [109]. Ces composés sont fréquemment utilisés dans des compositions pharmaceutiques comme matière première pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques dont on peut citer, entre autres : anti-inflammatoires, hépato protectrices, diurétiques, analgésiques, antimicrobiennes, inhibitrices d'activités enzymatiques, anti-tumorales, anti-néoplasmiques, cytotoxique... [98,110-112]. Les triterpénoïdes sont à la base de la synthèse de plusieurs contraceptifs et des médicaments anti-inflammatoires [98].

**II-3-2- Les phytostérols**

Les phytostérols sont des produits naturels avec un intérêt pharmacologique important, ils constituent les composés principaux dans un certain nombre de plantes médicinales. Ces derniers sont étudiés en raison de leur diversité structurale, de leurs activités pharmacologiques telles que : anti-cholestérolémique, anti-tumorale, anti-diabétique et anti-inflammatoire et également en raison de leur faible toxicité [113]. Certains stérols se sont montrés très actifs sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate [98,114].

Le stigmastérol a des effets anti-peroxidative et antidiabétique. Il est considéré comme inhibiteur de thyroïde [115]. Les stérols aminés 6-aminocholestanols et 25-aminocholestérols montrent successivement une activité antimicrobienne et une activité antifongique très élevée [116].

Les produits enrichis en phytostérols sont présentés comme aidant à la réduction du taux de cholestérol sanguin. L'excès de cholestérol qui touche près d'un adulte sur 5 est un des facteurs de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Grâce à leur structure proche de celle du cholestérol, les phytostérols entrent en compétition avec lui dans l'intestin et empêchent son absorption. Le sitostérol est prescrit comme drogue pour diminuer le cholestérol durant les années 1950, mais sa faible solubilité et biodisponibilité a fait rapidement diminuer son utilisation. Cependant, la solubilité des phytostérols a été améliorée par estérification. Ceci est remarqué dans le premier produit commercial des phytostérols contenant les margarines [117].



# CHAPITRE III

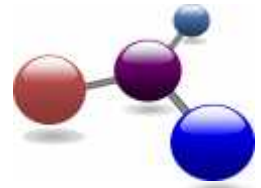
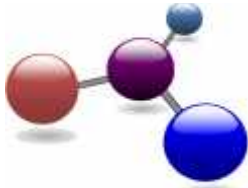
*Etude phytochimique des espèces*

*Pteranthus dichotomus et*

*Paronychia capitata*



## CHAPITRE III



# *Partie A*

*Etude phytochimique de  
l'espèce : *Pteranthus dichotomus*  
Forssk.*





### III-A- Etude phytochimique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.

#### III-A-1- Extraction

Les parties aériennes (600 g) de la plante *P. dichotomus*, séchées puis broyées finement, sont macérées dans 6 L d'une solution hydro-méthanolique 20% pendant 48 h (2 fois). Après filtration et concentration, 600 ml de l'extrait aqueux ont fait l'objet d'une extraction liquide-liquide en utilisant successivement les solvants suivants: étheropétrole puis acétate d'éthyle et à la fin le n-butanol, ce qui mène à l'obtention de 4.5 g d'extrait étheropétrolique (*PDEP*), 6.7 g d'extrait acétate d'éthyle (*PDAC*) et 15 g d'extrait n-butanolique (*PDBU*). Le protocole d'extraction est présenté dans la figure suivante (Figure III-1).

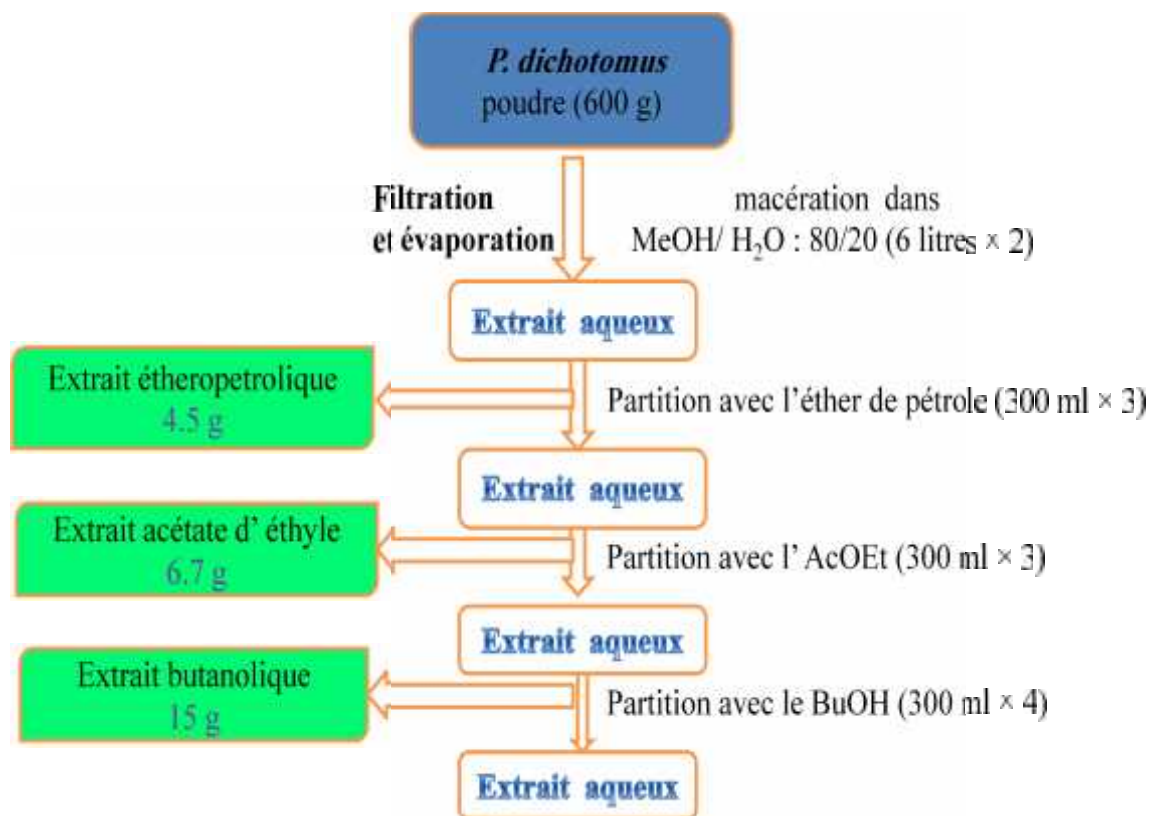


Figure III-1: Schéma d'extraction de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk

#### III-A-2- Séparation et purification

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique sont jugés intéressants au vu de leur profil CCM. Cette constatation nous a conduit à les choisir pour une investigation

chimique approfondie. Les séparations et purifications des composés contenus dans ces extraits ont nécessité l'utilisation de différentes techniques chromatographiques (VLC, CC, CCM et CCE) et l'usage de plusieurs phases stationnaires (gel de silice phase normale, RP-8, polyamide et Sephadex), ainsi qu'une vaste gamme de solvants.

### III-1-2-1- Extrait acétate d'éthyle (PDAC)

Un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle **PDAC** (6 g) a été effectué en utilisant la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC) aux conditions : gel de silice phase normale comme phase stationnaire et les mélanges Ep/AcOEt (100-0) à (0-100) puis AcOEt/MeOH (100-0) à (0-100) comme phases mobiles en permettant l'obtention de 8 fractions majoritaires (Fr<sub>1</sub> – Fr<sub>8</sub>). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparations et purifications chromatographiques (Figure III-2), conduisent à l'isolement de huit composés naturels purs.

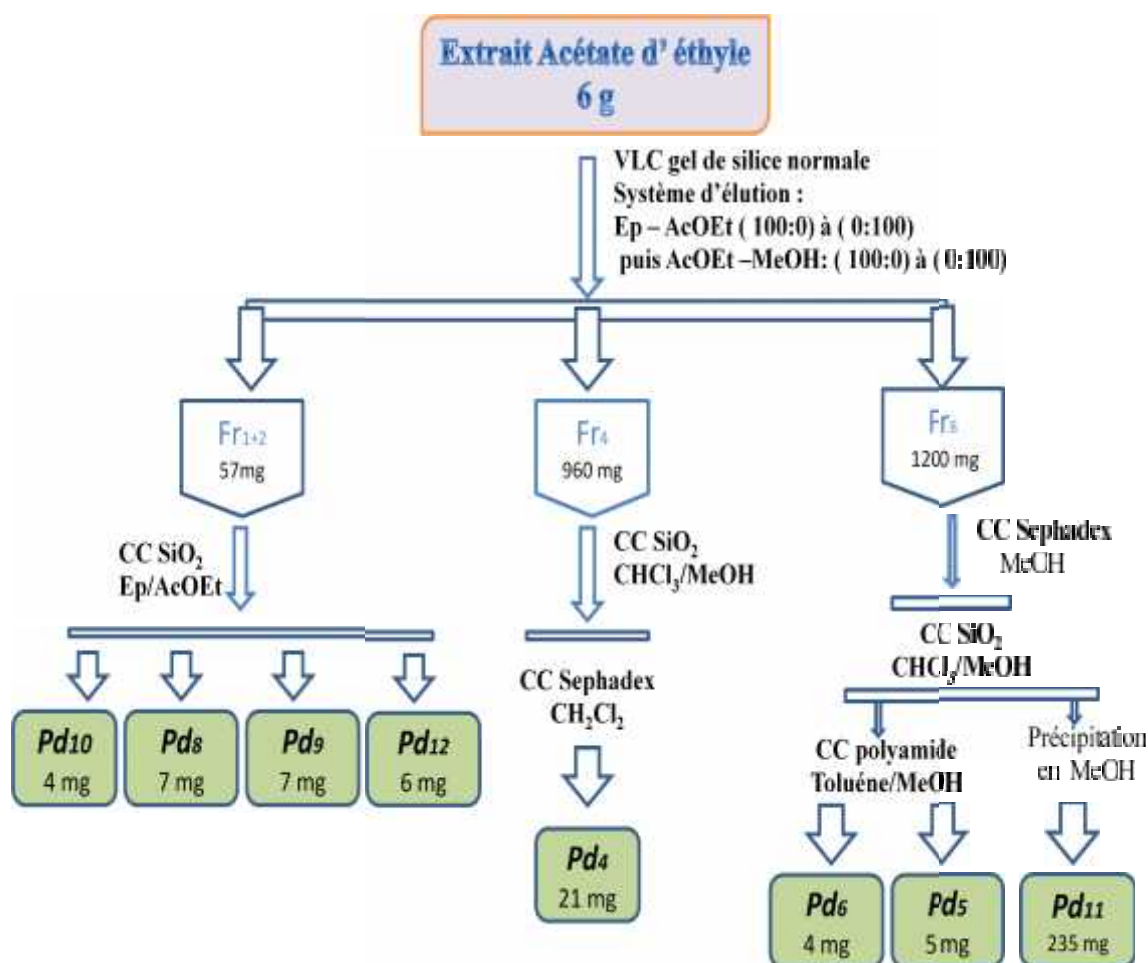


Figure III-2: Séparation et purification de l'extrait AcOEt (PDAC)

### III-1-2-2- Extrait *n*-butanolique (PDBU)

Le fractionnement primaire de l'extrait *n*-butanolique (7 g) a été réalisé par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice greffée C 8 comme phase stationnaire. L'élution a été menée par le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (80-20) à (0-100). Ceci a conduit à l'obtention de 6 fractions majoritaires (Fr<sub>1</sub> – Fr<sub>6</sub>). Quatre composés purs ont été isolés à partir des différentes fractions issues de cet extrait par l'emploi de divers procédés de séparation et purification (Figure III-3).

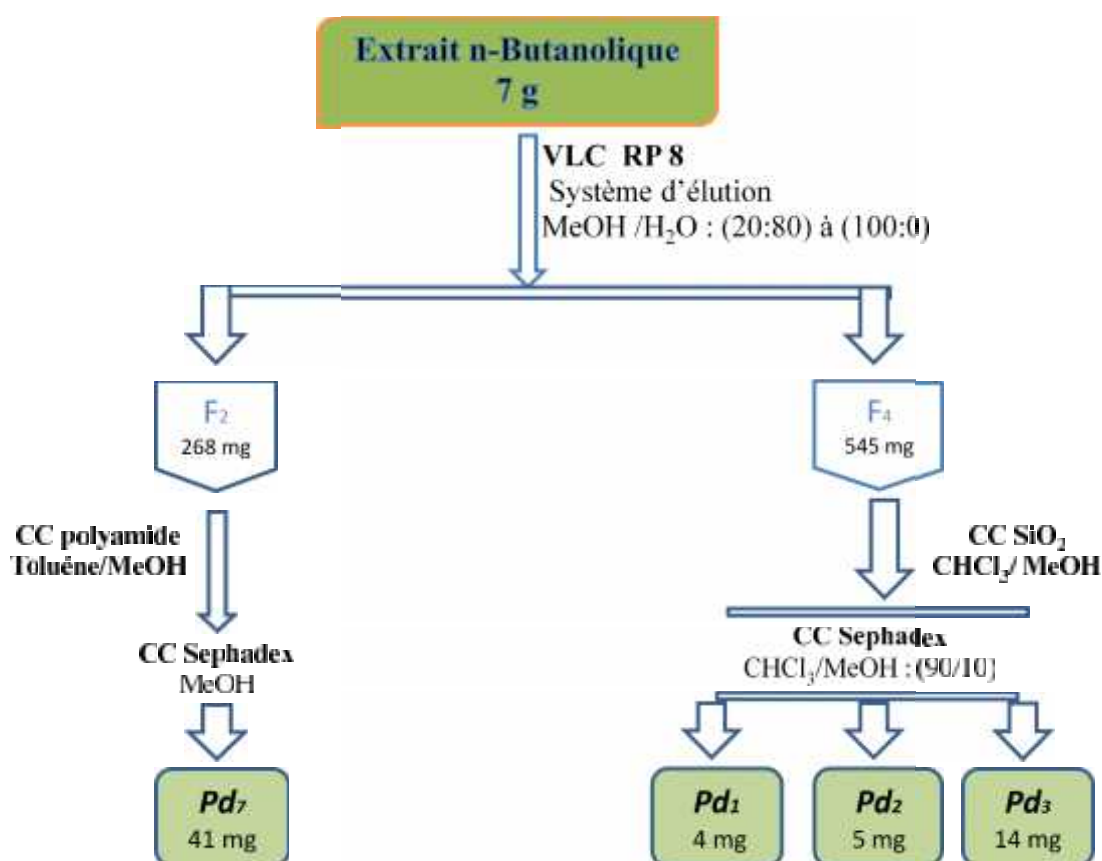
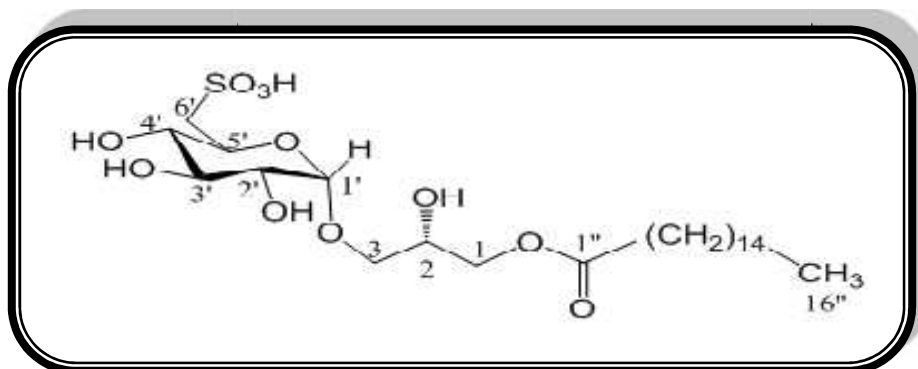


Figure III-3: Séparation et purification de l'extrait *n*-butanolique (PDBU)

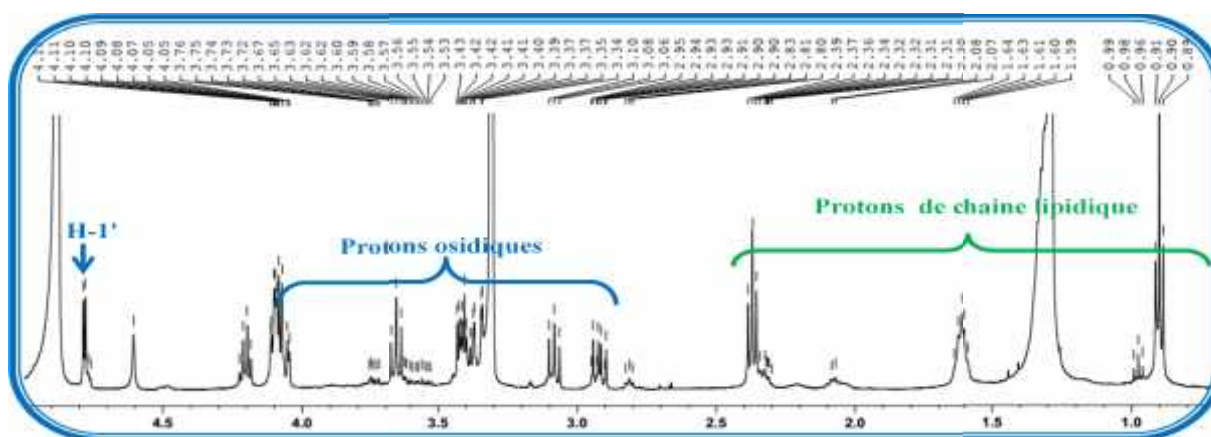
### III- 1-3- Identification structurale des composés isolés

L'identification structurale des composés isolés (Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>) a été réalisée en utilisant diverses méthodes d'analyse spectroscopiques : RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C DEPT, HSQC, COSY, HMBC, UV-VIS, IR, spectrométrie de masse ESI-MS et HR-ESI-MS, mesure du pouvoir rotatoire, ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

III-1-3-1- Identification structurale du composé  $Pd_1$  **$Pd_1$ : 1-O-palmitoyl-3-O-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol**

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche, invisible à la lumière UV (254 et 366 nm). Il se colore en rose-orange après révélation par solution d'acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-4) de ce composé, enregistré dans le méthanol deutéré ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), montre des signaux à 2.90-4 ppm caractéristiques de protons osidiques, un signal doublet à 4.78 ppm ( $J = 3.8$  Hz) d'un proton anomère ( $\text{H-1}'$ ) et plusieurs signaux résonant à champ fort entre 0.90-2.40 ppm caractéristiques des protons de chaîne aliphatique.



**Figure III-4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pd_1$**

Le spectre  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-5) montre des signaux entre 54-74 ppm des carbones osidiques, un signal à 100.1 ppm d'un carbone anomère. De plus, la présence d'autres carbones à :

- ✚ 14.6 ppm d'un carbone méthylique.
- ✚ [ 23.9-35.3 ] ppm de groupements méthylènes.



✚ 175.9 ppm d'un groupement carbonylé.

Cette observation de nombreux signaux également indique très bien la nature glycolipidique de notre composé.

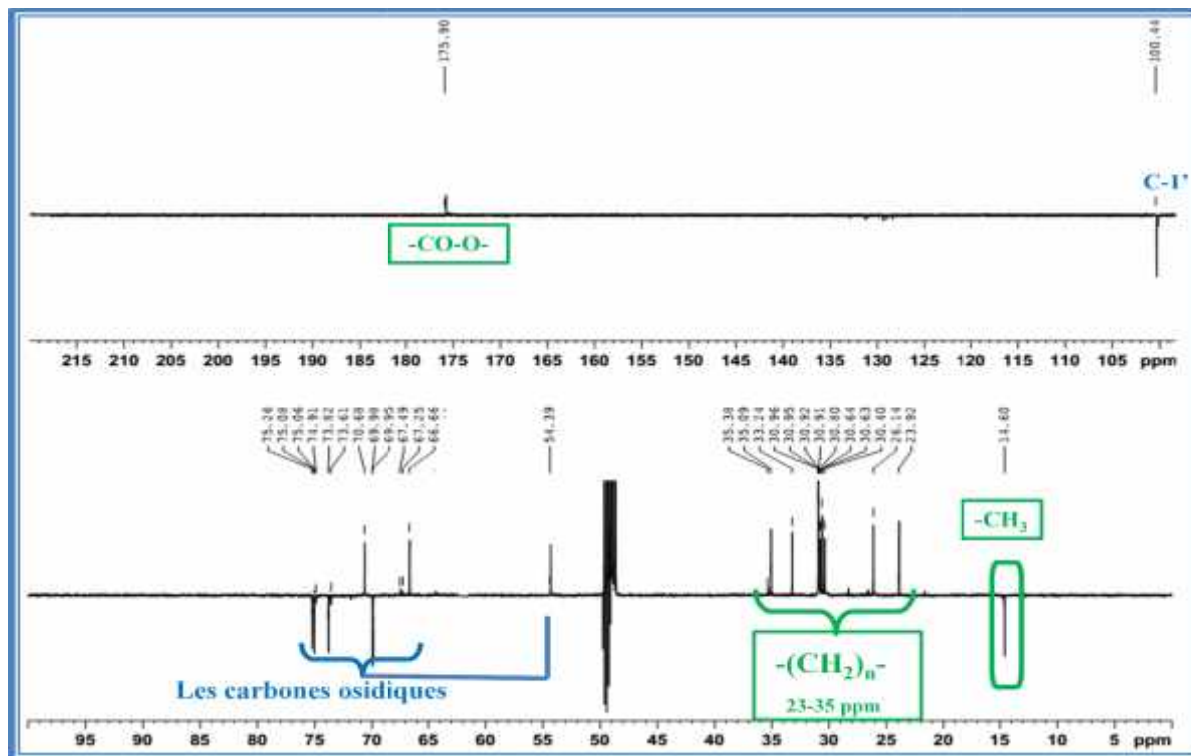


Figure III-5 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé  $Pd_1$

Partant du proton anomère H-1' résonant à 4.78 ppm ( $d$ ,  $J = 3.8$  Hz) cité précédemment, l'unité osidique est identifiée par analyse COSY H-H (Figure III-6). Il permet de caractériser un hexose et cela par l'observation des corrélations :

- ✚ H-1'/H-2' (H-2',  $\delta_{\text{H}} 3.48$ ,  $m$ ).
- ✚ H-2/H-3 (H-3,  $\delta_{\text{H}} 3.37$ ,  $t$ ,  $J = 8.9$  Hz).
- ✚ H-3/H-4 (H-4,  $\delta_{\text{H}} 3.08$ ,  $t$ ,  $J = 6.3$  Hz).
- ✚ H-4/H-5 (H-5,  $\delta_{\text{H}} 4.07$ ,  $m$ ).
- ✚ H-5/H-6 b (H-6 b,  $\delta_{\text{H}} 2.92$ ,  $dd$ ,  $J = 9.2; 13.9$  Hz).
- ✚ H-5/H-6 a (H-6 a,  $\delta_{\text{H}} 3.35$ ,  $dd$ ,  $J = 2.0; 13.0$  Hz).

Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un glucose de configuration  $\alpha$  au regard de la constante de couplage  $J_{\text{H1-H2}} = 3.8$  Hz.

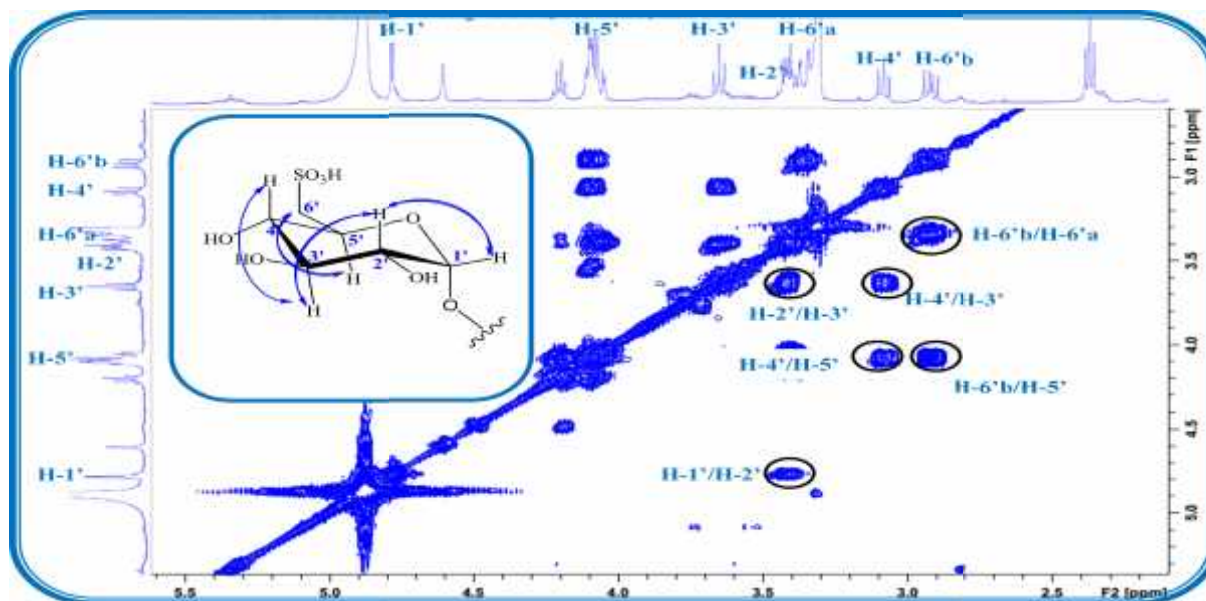


Figure III-6 : Corrélations COSY H-H de l'unité osidique

L'expérience HSQC (Figure III-7) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones osidiques : C-1' (100.4 ppm), C-2' (73.8 ppm), C-3' (75.3 ppm), C-4' (75.1 ppm), C-5' (69.9 ppm) et C-6' (54.3 ppm). La valeur de déplacement chimique de ce dernier est très caractéristique d'un groupement  $-\text{CH}_2-6'$  lié directement à un atome de soufre. De même que les déplacements chimiques et constantes de couplage de H-6 a ( $\delta_{\text{H}}$  3.35 ppm, *dd*,  $J = 2 ; 13.0$  Hz) et H-6 b ( $\delta_{\text{H}}$  2.92 ppm, *dd*,  $J = 9.2 ; 13.9$  Hz) confirment l'identité du groupement thiométhyle  $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  [119,120].

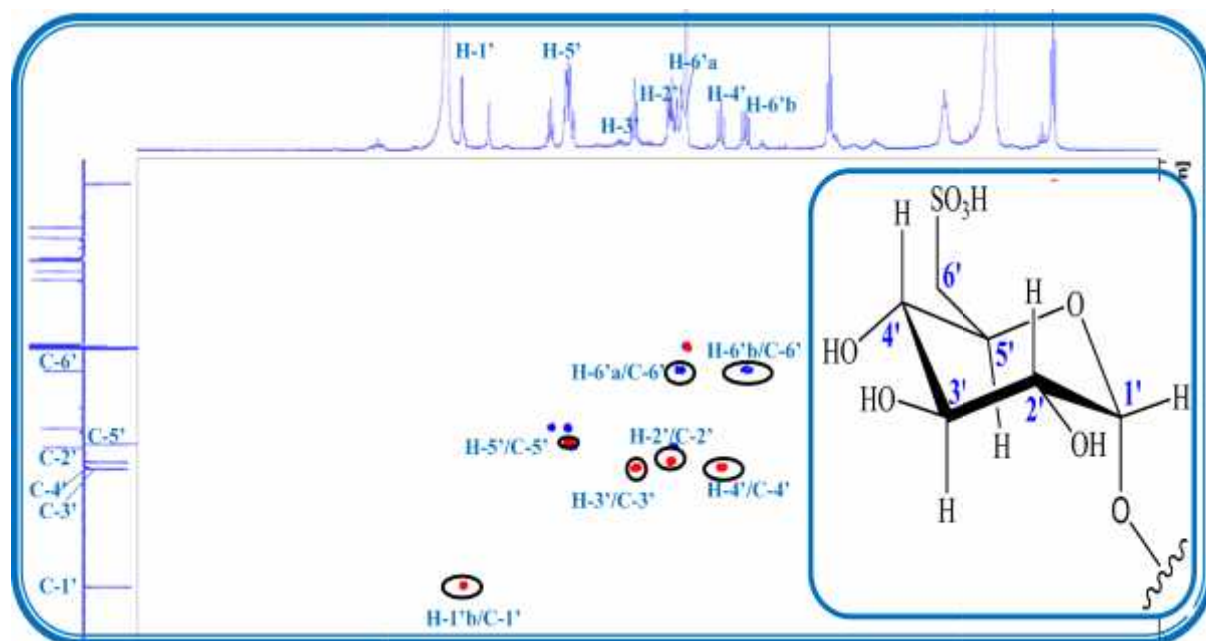


Figure III-7: Spectre HSQC de l'unité osidique

Le spectre HMBC (Figure III-8) montre deux corrélations entre le carbone anomérique C-1' (100.4 ppm) du glucose et 2 protons repérés à 3.39 (1H, *m*) et 4.05 ppm (1H, *dd*, 6.3 ; 12.8 Hz) d'un groupement oxyméthylène.

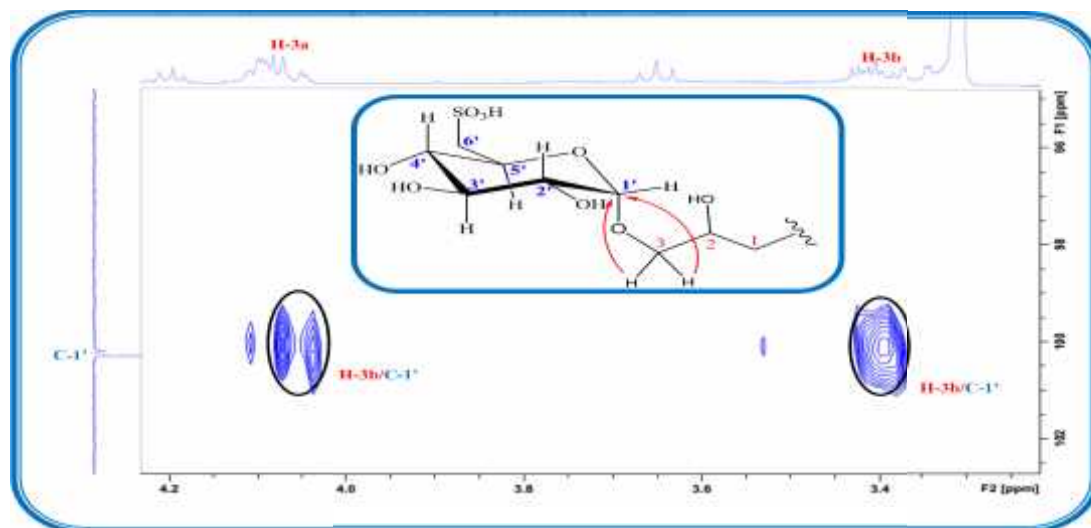


Figure III-8: Corrélations HMBC du l'unité osidique et un groupement oxyméthylène

Ces derniers montrent sur le spectre COSY H-H (Figure III-9) des corrélations avec un proton déblindé sortant à 4.07 ppm (*m*), lui-même corrélant avec deux signaux géminés d'intégration 1H chacun à  $^H$  4.10 ppm (*m*) et l'autre à  $^H$  4.20 ppm (*dd*,  $J= 5.9$  et 12.8 Hz) très caractéristique d'un groupement glycérol [118].

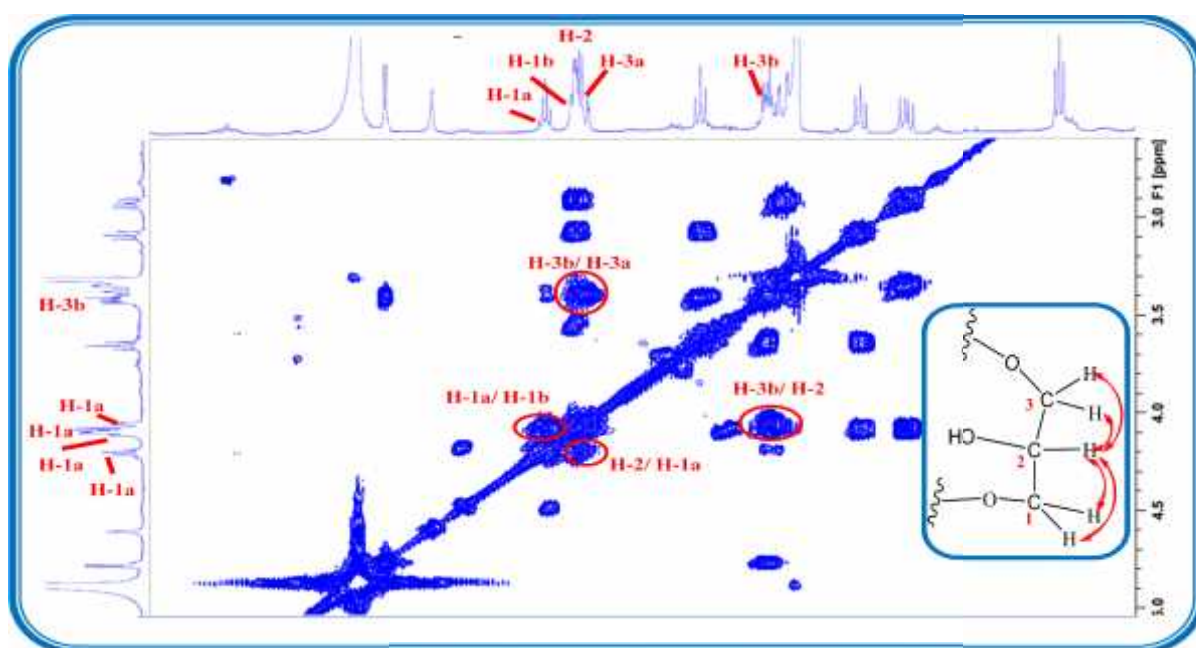


Figure III-9: Corrélations COSY H-H du groupement glycérol acylé

Le spectre HSQC (Figure III-10) permet d'identifier les carbones C-1 (66.6 ppm), C-2 (69.9 ppm) et C-3 (70.6 ppm) de l'unité glycérol dont la fixation du sucre est sur le carbone C-3 de cette dernière d'après l'expérience HMBC (Figure III-8). Le déplacement chimique important de C-2 traduit bien qu'il y a un -OH libre à ce niveau.

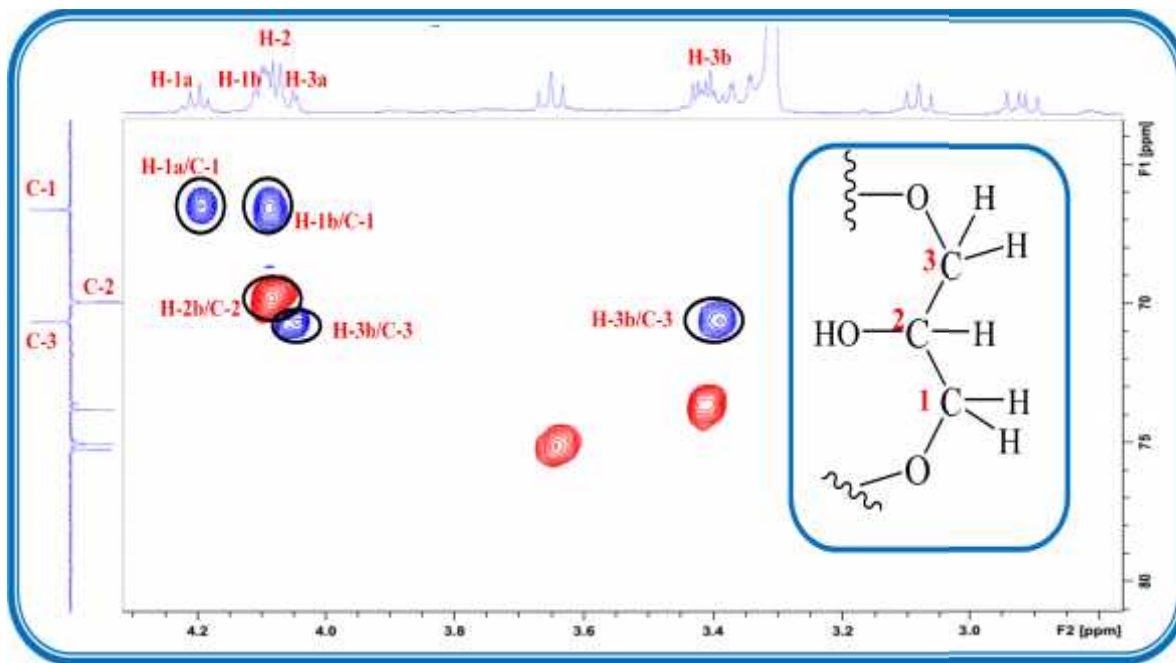


Figure III-10 : Spectre HSQC du l'unité glycérol du composé  $Pd_1$

Le déblindage important des deux protons oxyméthyléniques repérés à 4.10 et 4.20 ppm de carbone C-1 du l'unité glycérol suggérerait une oxydation par une acylation a ce niveau et sa est confirmer par expérience HMBC (Figure III-11) qui montre des corrélations entre ces deux derniers et un carbonyle à  $\delta_c$  175.9 (C-1'').

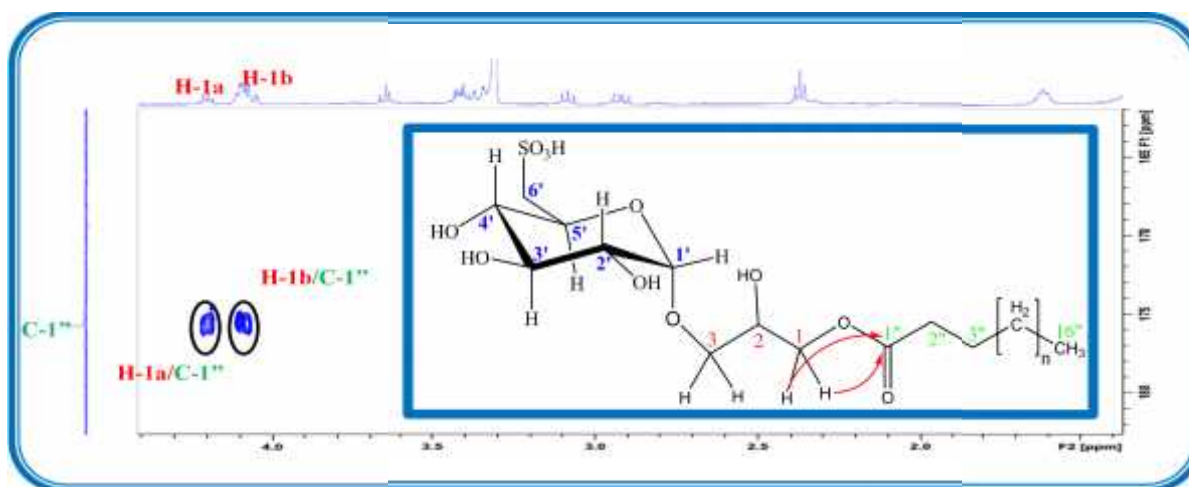
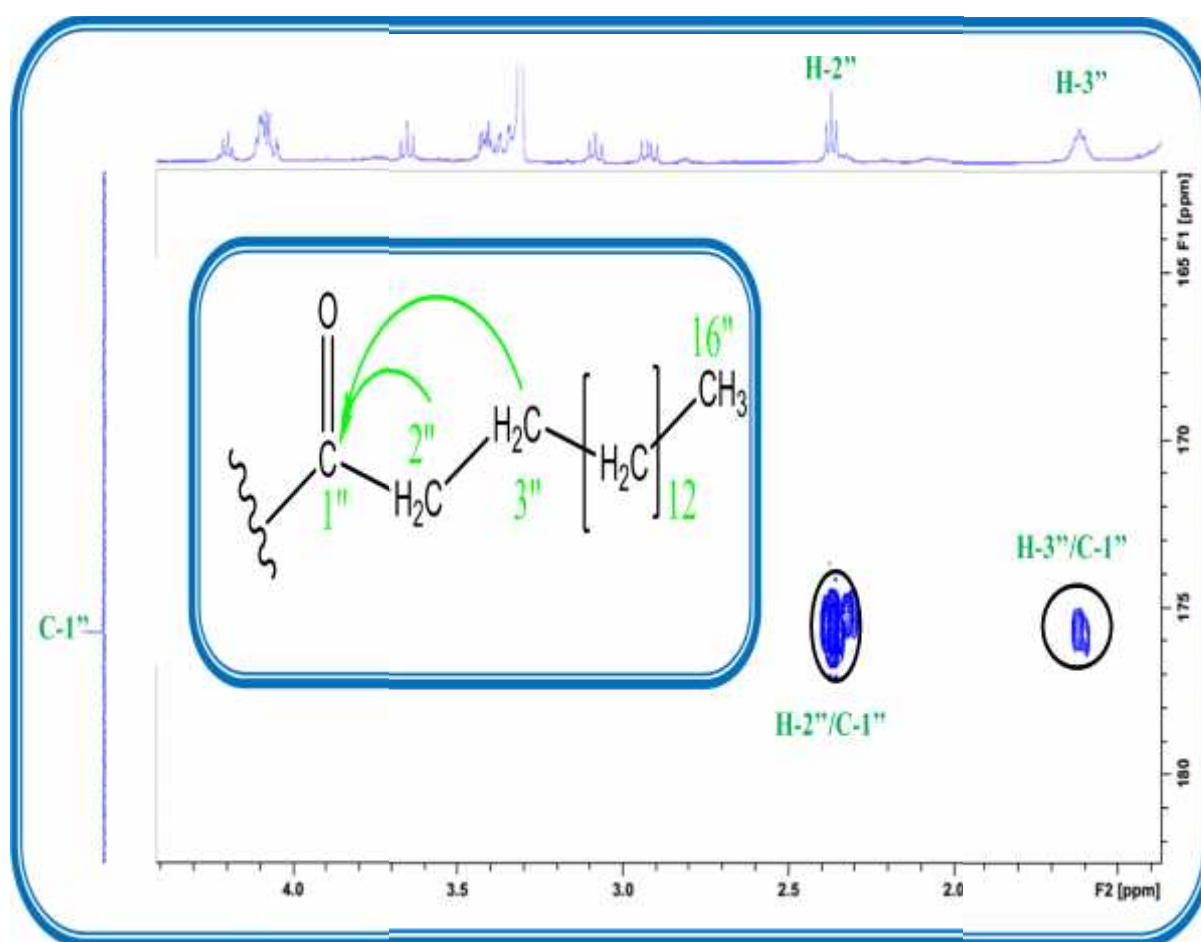


Figure III-11: Corrélations HMBC montre la position de la chaîne lipidique

Ces caractéristiques spectrales conformes aux données de la littérature [40,119], suggèrent que le composé **Pd<sub>1</sub>** est un glycoylcérolipide monoacylé par une longue chaîne d'acide gras saturée dont il reste à identifier la chaîne acylé et déterminer le nombre de CH<sub>2</sub> aliphatiques constituant cette dernière.

Le spectre HMBC (Figure III-12) montre des couplages hétéronucléaires à longue distance entre un carbonyle d'ester C-1'' (175.9 ppm) avec des protons équivalents repérés à 2.37 ppm (2H, *t*, *J*= 7.6 Hz) et 1.64 ppm (2H, *m*), correspondant à deux groupements méthyléniques, CH<sub>2</sub>-2'' et CH<sub>2</sub>-3'' démarrant la chaîne grasse.



**Figure III-12: Spectre HMBC de la chaîne lipidique**

Le spectre COSY H-H (Figure III-13) montre aussi les corrélations attendues entre les protons aliphatiques CH<sub>2</sub>-2'' et CH<sub>2</sub>-3''. Par ailleurs, les protons H-3'' montrent des corrélations avec un massif à 1.26-1.40 ppm de groupements (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, eux-mêmes corrélant avec le groupement -CH<sub>3</sub> terminant la chaîne grasse résonné à 0.90 ppm (3H, *t*, *J*= 6.7 Hz).



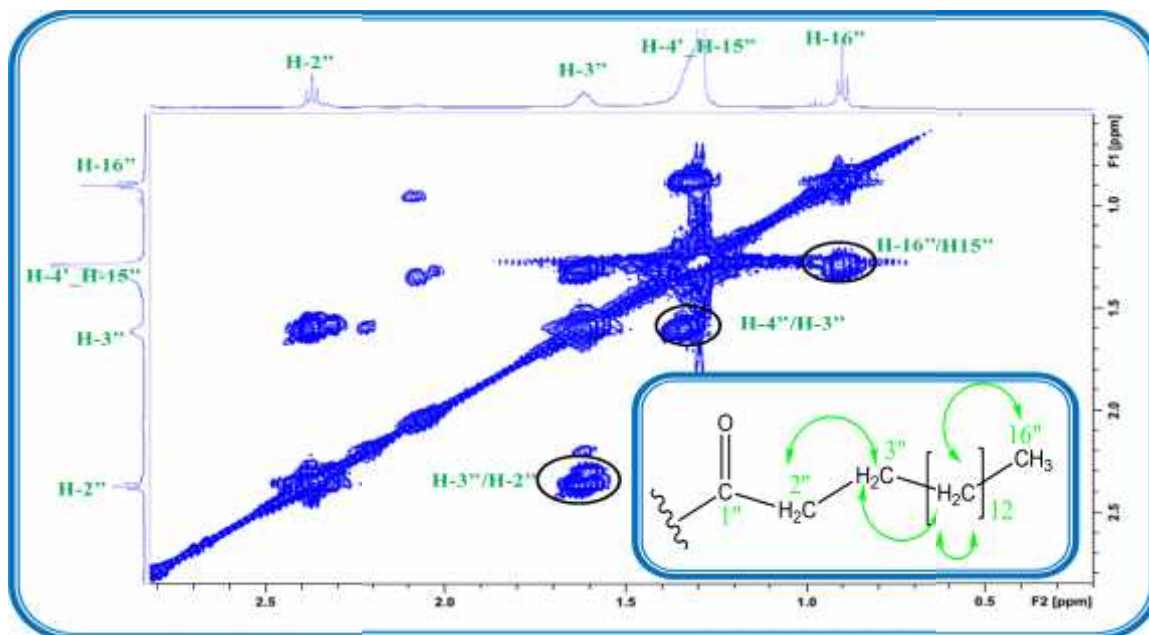


Figure III-13 : Corrélations COSY H-H du la chaine lipidique

Toutes ces attributions sont confirmées par analyse HMBC (Figure III-14). En effet, il est observé des corrélations entre le carbonyle C-1'' et les protons H-2'', H-3'' lui mêmes couplés avec un carbone méthylénique qui résonne à  $\delta$  33.2 nommé C-4''. Il montre aussi des corrélations entre Les protons de groupement -CH<sub>3</sub> terminal à 0.90 ppm et les signaux des carbones entre (23.9-33.4 ppm).

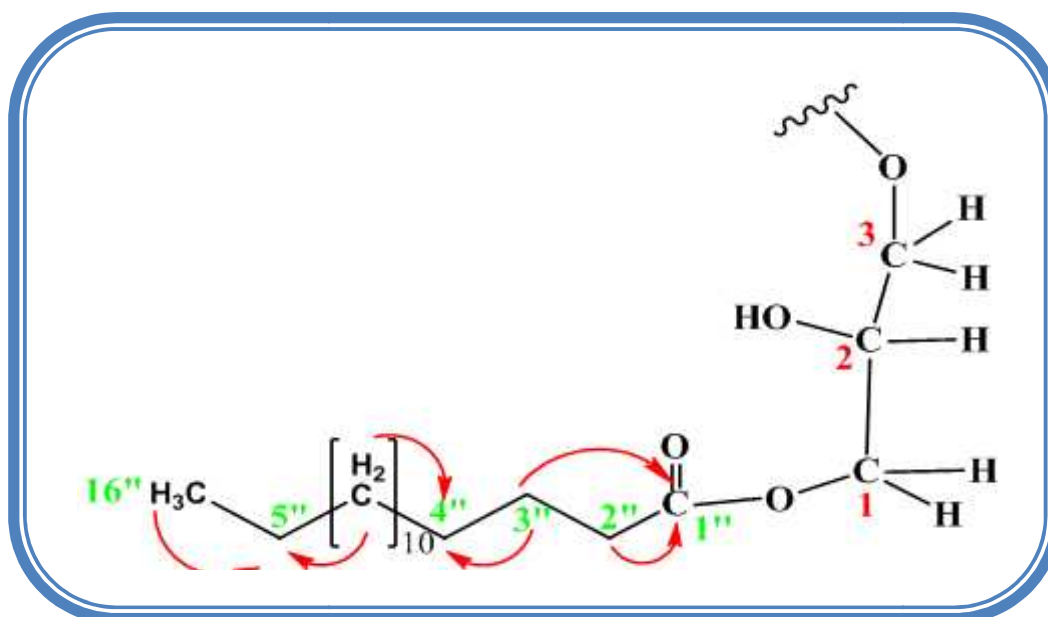


Figure III-14 : Corrélations HMBC importantes sur la chaine lipidique

L'expérience HSQC  $J$ -modulé (Figure III-15) a permis de caractériser tous les carbones la chaîne lipidique.

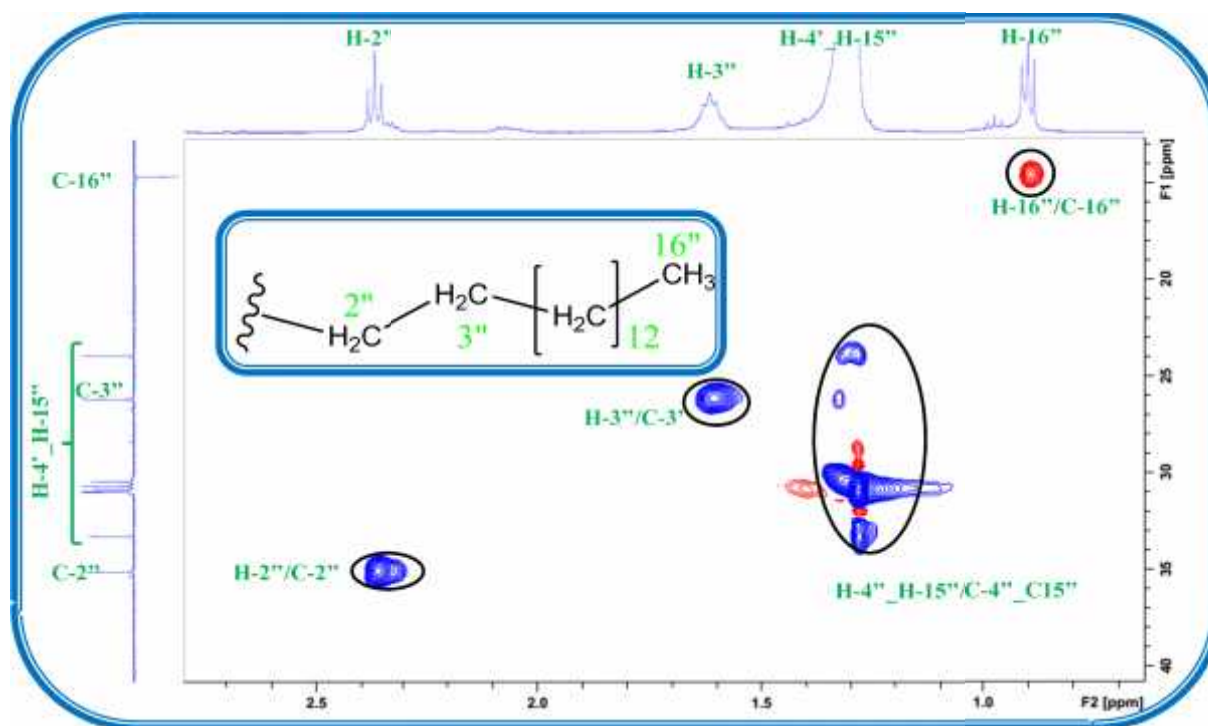


Figure III-15 : Spectre HSQC de la chaîne lipidique

Le spectre de masse ESI (figure III-16) du composé  $Pd_1$  enregistré en mode négatif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 555.3$   $[M-H]^-$  correspondant à une masse moléculaire de 556 uma et une formule brute en  $(C_{25}H_{48}O_{11}S)$ . La masse moléculaire de ce composé nous permet d'identifier sans ambiguïté la chaîne grasse saturée qui correspond à l'acide palmitique.

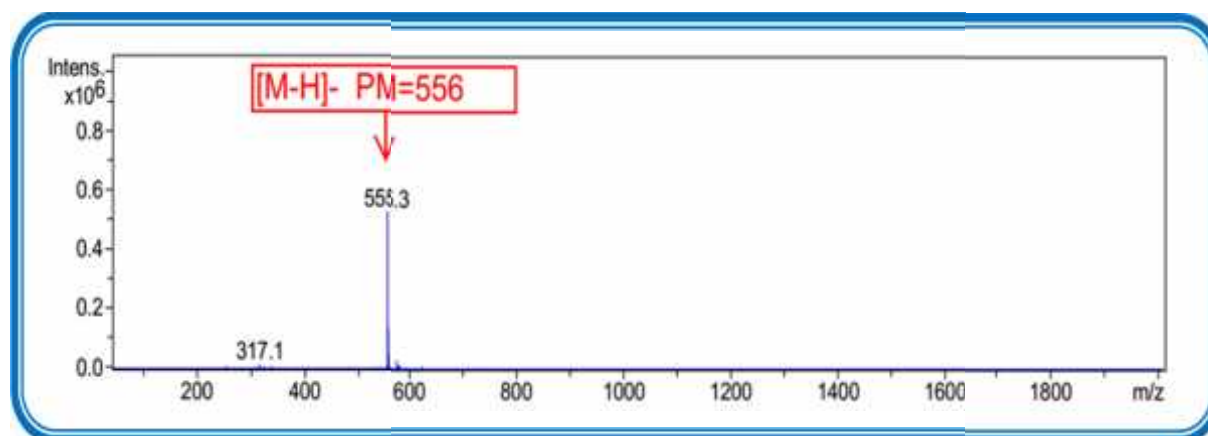
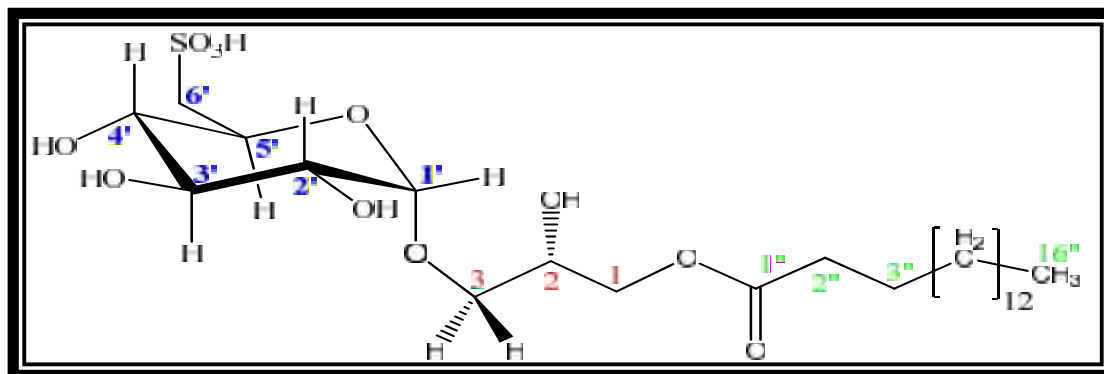


Figure III-16: Spectre de masse ESI MS du composé  $Pd_1$  (mode négatif)

La stéréochimie au niveau du carbone C-2 de l'unité glycérol est généralement déterminée pour ce type de composés sur la base des valeurs de constantes de couplage H-2/H-3a et H-2/H-3b [119]. Des valeurs de 6 Hz et 3.6 Hz plaident pour une stéréochimie (*R*). Des valeurs plus grandes de l'ordre de 6 et 11 Hz, comme c'est le cas de notre composé, plaident pour une stéréochimie (*S*).



Toute cette analyse ainsi que les données spectrales établies au moyen des spectres RMH  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY H-H, HSQC et HMBC et la valeur du pouvoir rotatoire mesuré dans le méthanol ( $[\alpha]_{\text{D}} = +47.1^\circ$ ,  $C = 0.035$ , MeOH) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé *Pd*<sub>1</sub> la structure suivante: **1-O-palmitoyl-3-O-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol**.

Ce composé est isolé précédemment à partir des algues marines *Caulacanthus ustulatus* et *Ulva pertusa* [40,119]. Il est décrit pour la première fois dans la famille Caryophyllaceae. Le tableau suivant (Tableau III.1) reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé *Pd*<sub>1</sub>.

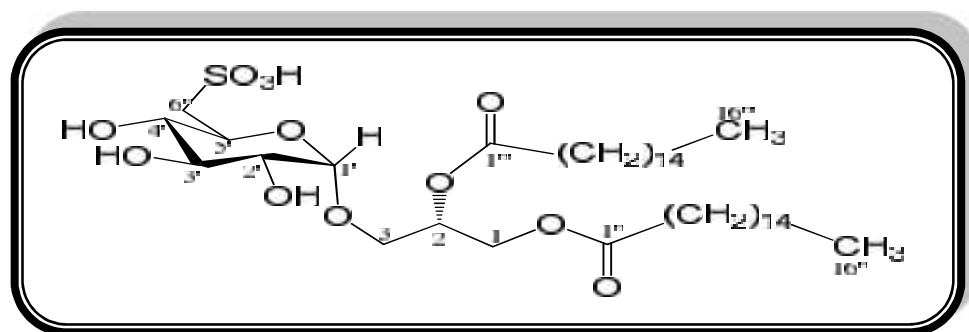
**Tableau III.1 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de *Pd*<sub>1</sub> dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

Position	c (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
<b>1</b>	66.6	4.10 ( <i>m</i> ) H-1b 4.20 ( <i>dd</i> , 5.9; 12.1) H-1a
<b>2</b>	69.9	4.07 ( <i>m</i> )
<b>3</b>	70.6	3.39 ( <i>m</i> ) H-3b 4.05 ( <i>dd</i> , 6.3; 12.8) H-3a
<b>3-O-(6'-sulfo- -D-quinovopyranosyl)</b>		
<b>1'</b>	100.4	4.78 ( <i>d</i> , 3.8)
<b>2'</b>	73.8	3.48 ( <i>m</i> )
<b>3'</b>	75.3	3.37 ( <i>t</i> , 8.9)



4'	75.1	3.08 (t, 6.3)
5'	69.9	4.07 (m)
6'	54.3	2.92 (dd, 9.2 ; 13.9) H-6''b 3.35 (dd, 2 ; 13) H-6''a
<b>1-O-CO-</b>		
1''	175.9	-
2''	35.1	2.37 (t, 7.6)
3''	26.1	1.61 (m)
4''-13''	30.4 - 30.9	
14''	33.2	1.26- 1.40
15''	23.9	
16''	14.6	0.90 (t, 6.7)

### III-1-3-2- Identification structurale du composé $Pd_2$



$Pd_2$ : 1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.

Le composé  $Pd_2$  à été isolé sous forme d'une poudre blanche, invisible à la lumière UV (254 et 366 nm) et donnant une coloration rose après révélation avec une solution d'acide sulfurique et le chauffage à 100°C.

Les spectres RMN  $^1H$  (Figures III-18) enregistrés dans  $CD_3OD$  montrent bien que le spectre de composé  $Pd_2$  sont très voisins de ceux du composé  $Pd_1$ . Il n'est pas à exclure que ce composé aussi est un sulfoglycoglycérolipide. Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III- 18) de ce composé  $Pd_2$ , montre des signaux à 3-4 ppm caractéristiques de protons osidiques, un signal doublet à 4.76 ppm ( $J = 3.6$  Hz) d'un proton anomère. L'observation également de nombreux signaux à champ fort entre 1.26-1.40 ppm renseigne sur la nature lipidique et sa confirme aussi par le spectre  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figure III-19) de même composé. La différence notable entre ces deux composés apparait clairement sur le spectre RMN  $^1H$  du composé  $Pd_2$  qui montre, un signal déblindés résonant à  $^1H$  5.31 (1H, m) caractéristique d'un groupement -CH acylé qui suggérerait la présence d'une chaîne lipidique à ce niveau [118].

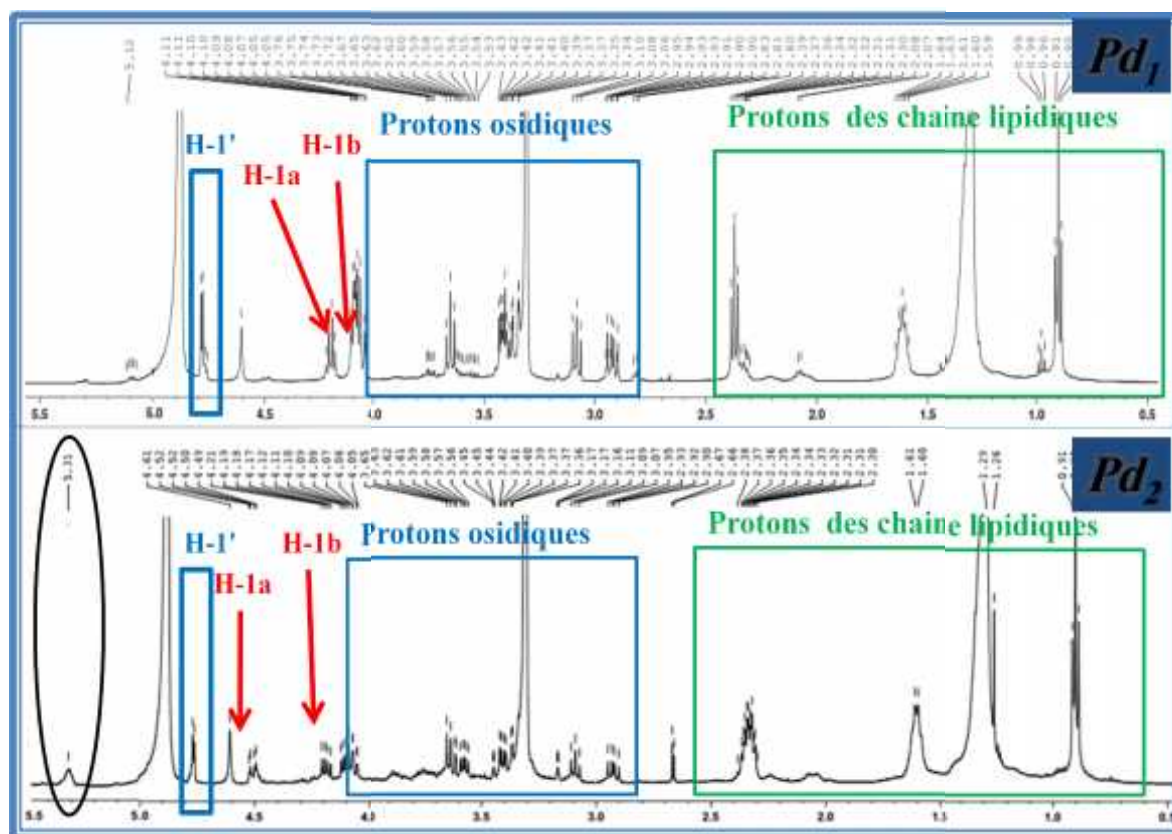


Figure III-17 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés  $Pd_1$  et  $Pd_2$

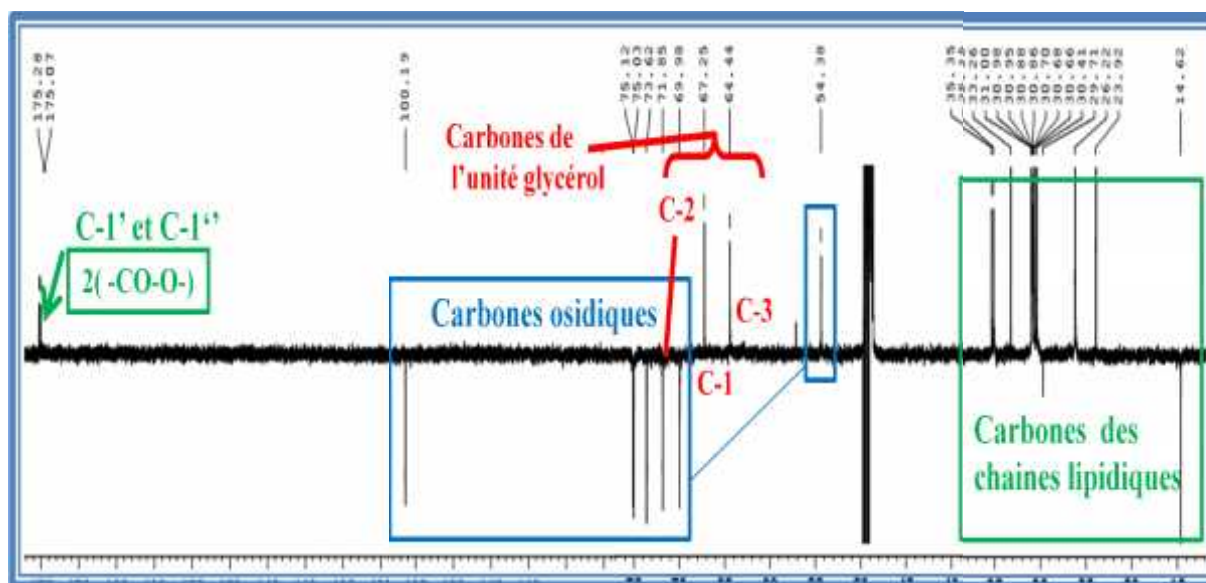


Figure III-18 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $Pd_2$

Ce dernier montre sur le spectre COSY H-H (Figure III-20) des corrélations avec deux couples des signaux des protons géminés le premier couple sortant à 4.12 ppm (H-1, *dd*,  $J = 7.1$  et  $12.1$  Hz) et 4,50 ppm (H-1, *dd*,  $J = 3.0$  et  $12.0$  Hz) et le deuxième couple sortant à H

4.10 (1H, *dd*,  $J = 6.4$  et  $11.0$  Hz) et  $^H$  4.20 (1H, *dd*,  $5.2$  et  $11.1$  Hz). Ces deux couples très caractéristiques de deux groupements oxyméthylène d'un glycérol acylé.

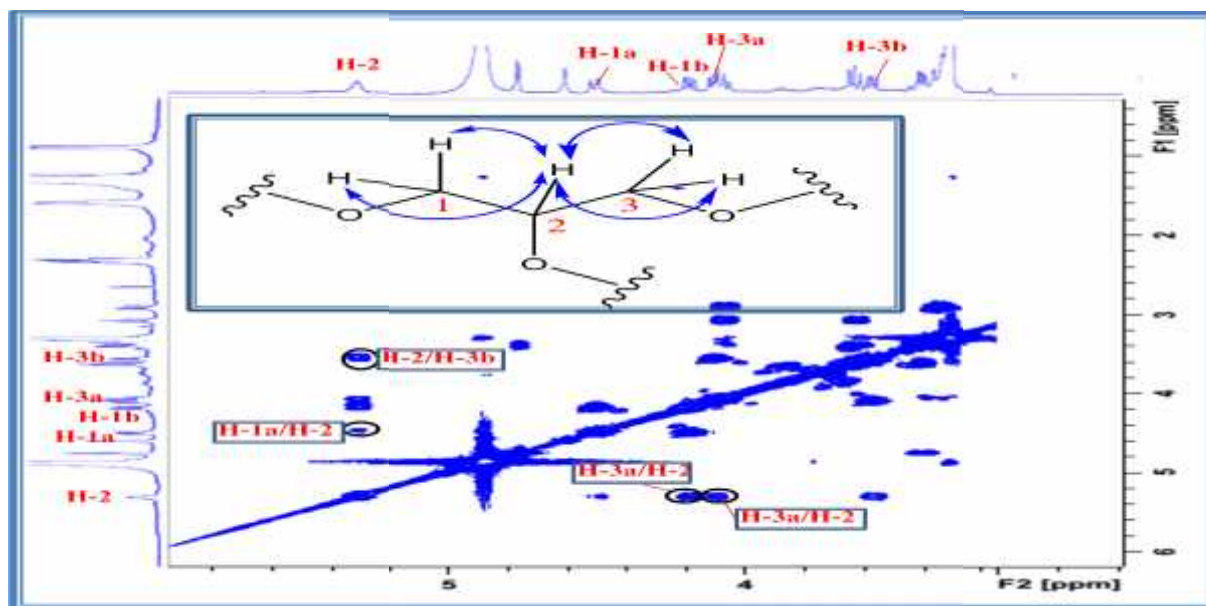


Figure III-19 : Corrélation COSY H-H du groupement glycérol acylé

Le spectre HSQC (Figure III-21) permet d'identifier les carbones C-1 (64.4 ppm), C-2 (71.8 ppm) et C-3 (67.2 ppm) de l'unité glycérol. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en  $J$ -modulé (Figure III-16) montre deux carbones quaternaires à 175.0 et 175.2 ppm, attribuable aux deux carbonyles d'ester. Ces caractéristiques spectrales conformes aux données de la littérature [118, 121], suggèrent que le composé  $Pd_2$  est un glycéroglycolipidique diacylé dont il reste à confirmer les structures des deux chaînes lipidiques et l'unité osidique qui le constitue.

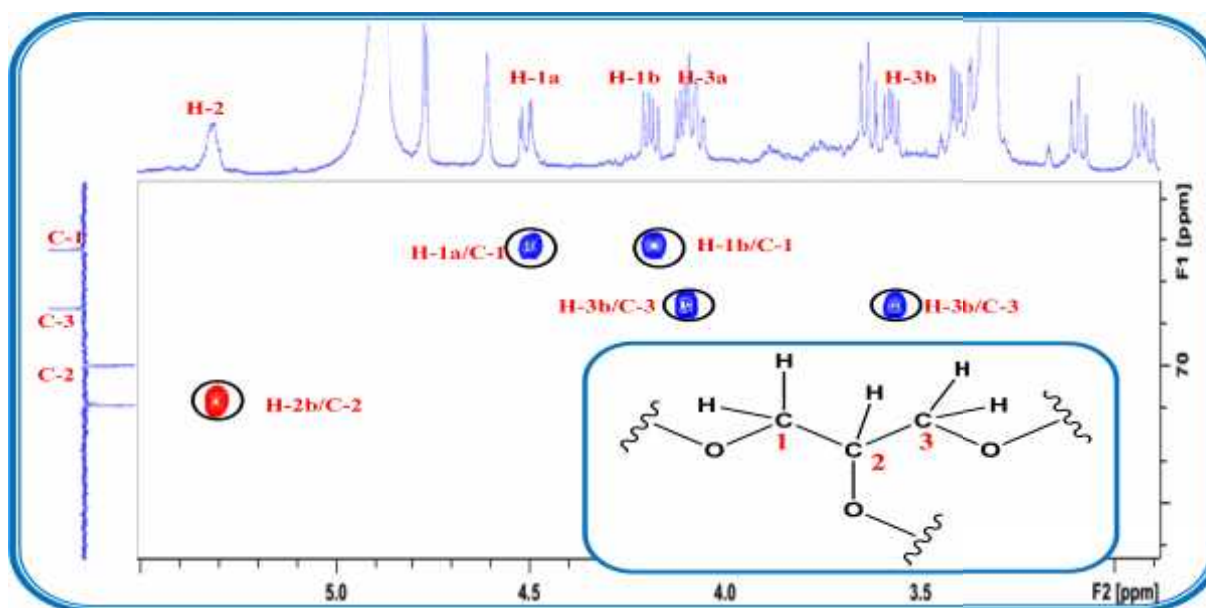
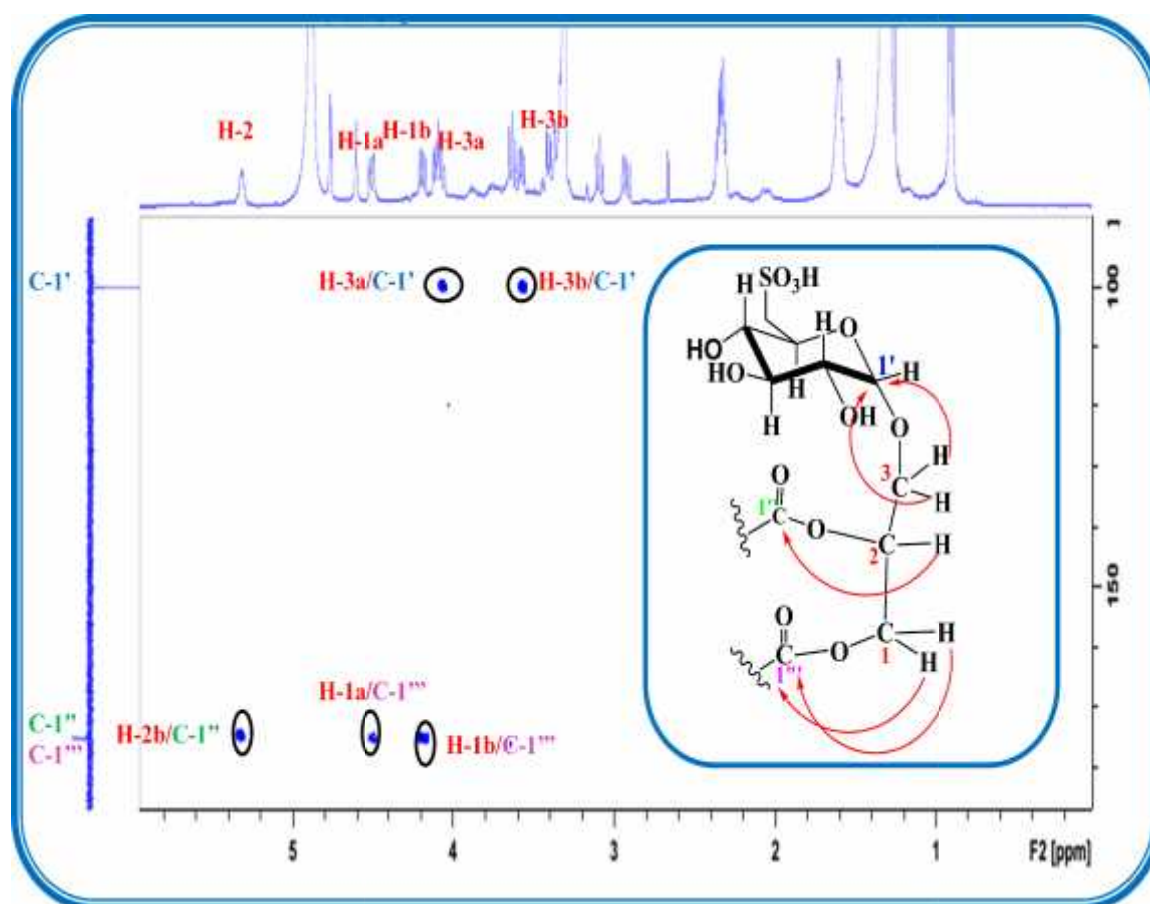


Figure III-20 : Spectre HSQC de l'unité glycérol du composé  $Pd_2$

La présence de deux chaînes lipidiques acylant l'unité glycérol est confirmée par expérience HMBC (Figure III-22) qui montre des corrélations  $^2J_{H-C}$  entre les protons oxyméthyléniques CH<sub>2</sub>-1 de l'unité glycérol repérés à 4.12 et 4.50 ppm et un carbonyle à  $\delta_c$  175.0 (C-1''') d'une part et le proton H-2  $\delta_H$  5.31 (m) de la même unité et un deuxième carbonyle sortant à 175.2 ppm (C-1'') d'autre part. La présence de deux longues chaînes lipidiques d'acide gras saturé liées aux carbones C-2 et C-1 de l'unité glycérol est donc parfaitement établie. Il montre aussi une corrélation entre le carbone anomère C-1' du glucose 6'-sulfo- -D-quinovose (100.1) et les protons H-3a ( $\delta_H$  4.20) et H-3b ( $\delta_H$  4.10) du glycérol.



**Figure III-21 : Spectre HMBC positionné les chaînes lipidiques et le sucre avec l'unité glycérol**

La partie osidique du ce composé est identique à celle du composé *Pd<sub>1</sub>* comme l'indique l'analyse des spectres COSY H-H, HSQC et  $^{13}C$  qui identifie un -D-quinovopyranosyl [H-1' ( $\delta_H$  4.78)/C-1' ( $\delta_c$  100.1)] lié directement en position 6 de sucre à un atome de soufre. Les attributions des protons et carbones osidiques (Tableau III-2) ont été assignées par expérience HSQC.

Le spectre HMBC montre des couplages hétéronucléaires à longue distance entre les deux carbonyles d'ester C-1'' (175.2 ppm) et C-1''' (175.0 ppm) avec des protons équivalents repérés à 2.34 ppm (4H, *m*) et 1.60 ppm (4H, *m*), correspondant à quatre groupements méthyléniques, CH<sub>2</sub>-2''-CH<sub>2</sub>-3'' démarrant la 1<sup>ère</sup> chaîne grasse et CH<sub>2</sub>-2'''-CH<sub>2</sub>-3''' démarrant la seconde (Figure III-23).

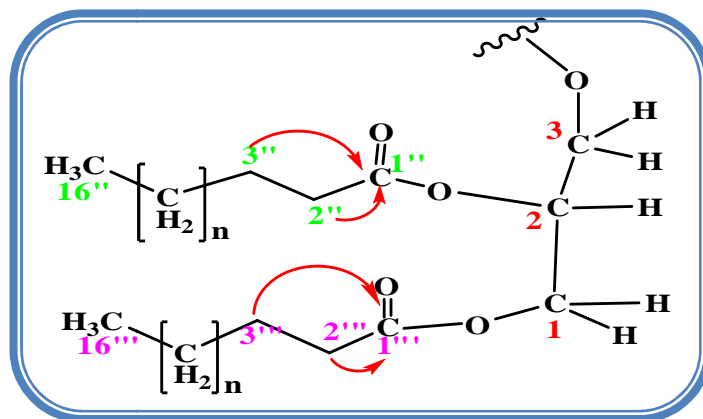


Figure III-22 : Corrélations HMBC importantes sur les chaînes lipidiques du *Pd*<sub>2</sub>

Le spectre COSY H-H (Figure III-24) montre les corrélations attendues CH<sub>2</sub>-2''/CH<sub>2</sub>-3'' et CH<sub>2</sub>-2'''/CH<sub>2</sub>-3'''. Par ailleurs, les protons H-3'' et H-3''' montrent des corrélations avec un massif à 1,26-1,40 ppm de groupements (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, eux-mêmes corrélant avec des protons repérés à 0.90 ppm (6H, *t*, *J*= 6.9 Hz) attribués au groupement méthyléniques -CH<sub>3</sub> terminaux des deux chaînes lipidiques.

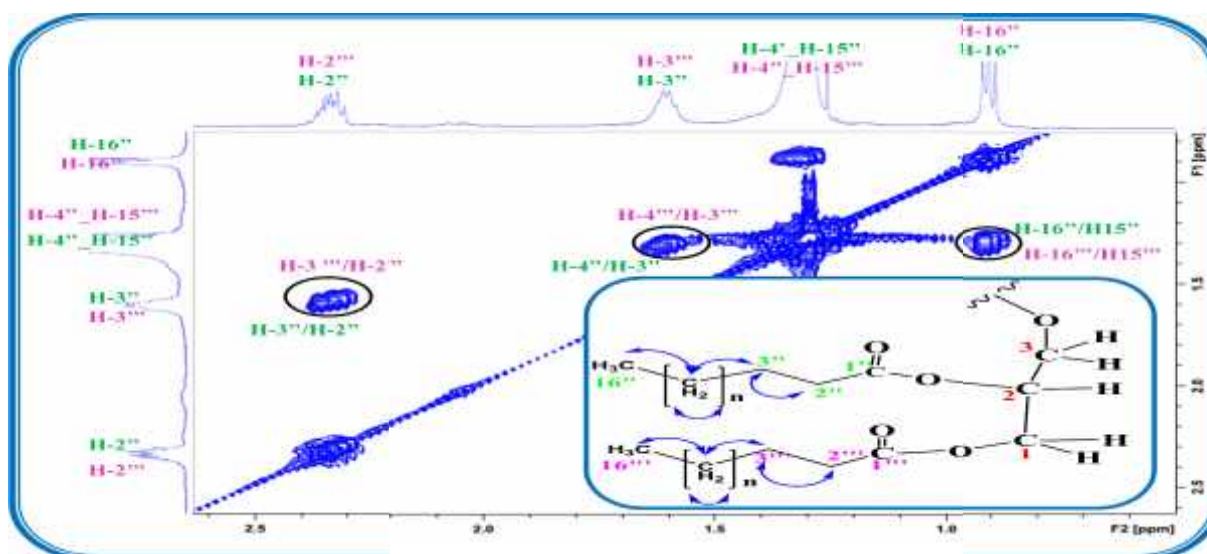
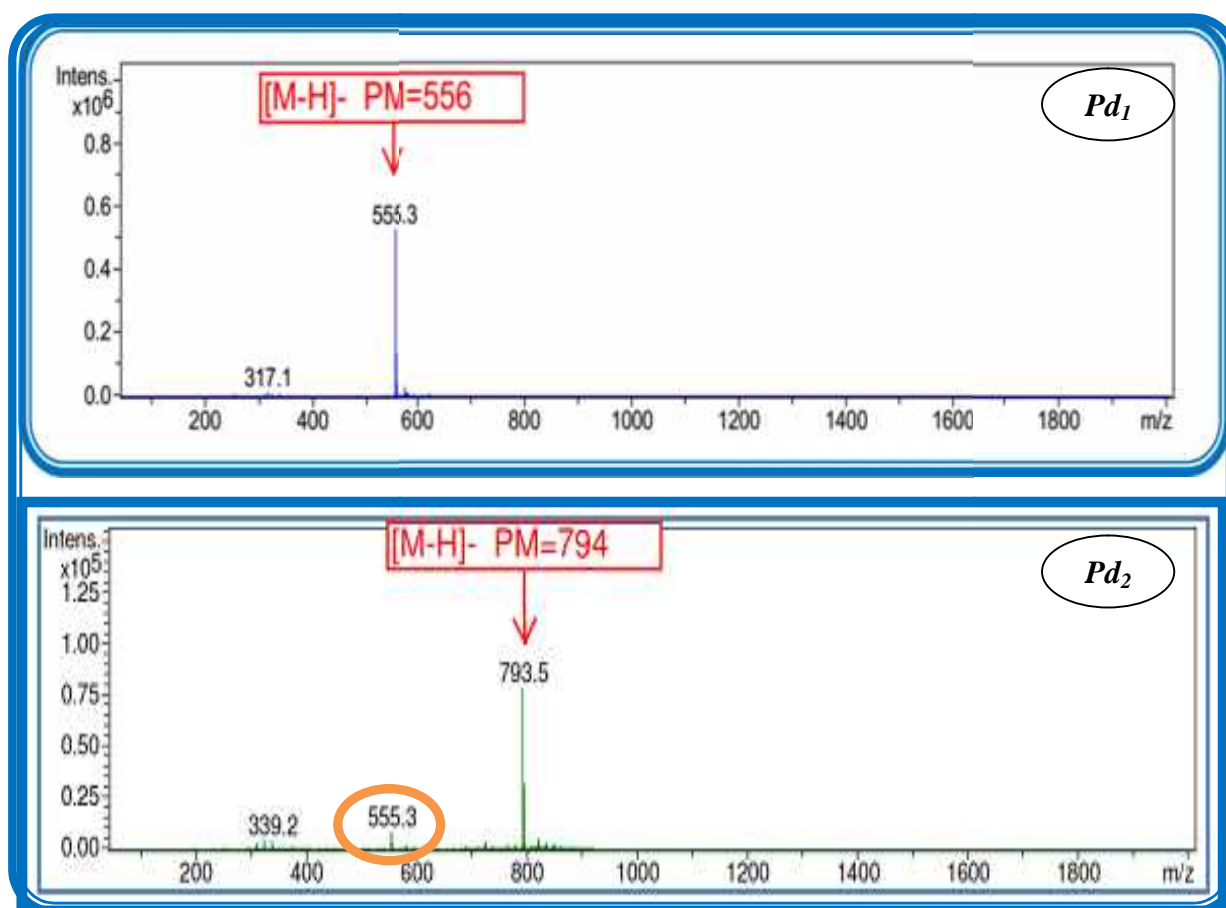


Figure III-23 : Corrélations COSY H-H des deux chaînes lipidiques



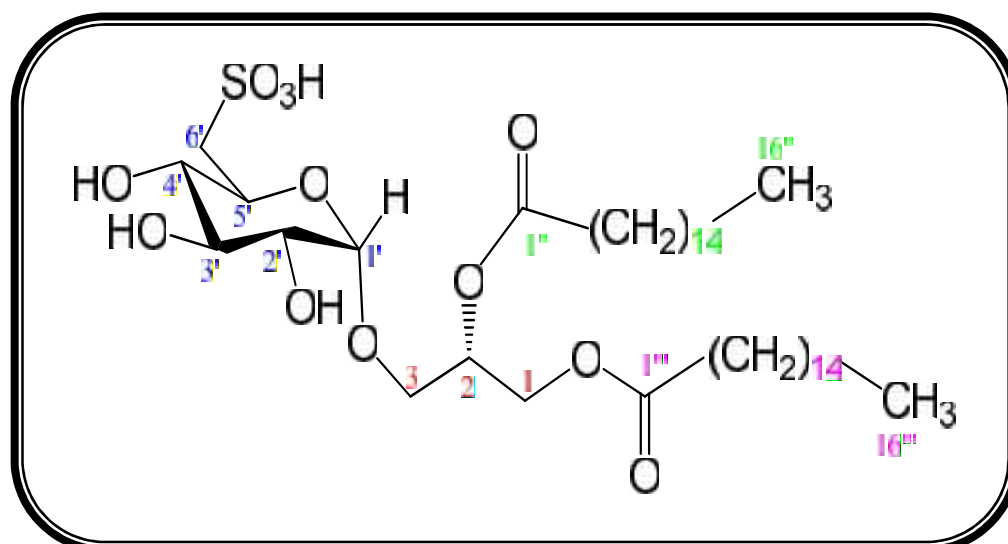
L'expérience HSQC *J*-modulé a permis de caractériser les carbones de deux chaînes lipidiques (tableau III-2).

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III-24) enregistré en mode négatif présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 793.5$   $[M-H]^-$ , soit une masse moléculaire égale à 794 uma, laissant suggérer une formule brute en  $C_{41}H_{79}O_{12}S$ . Par la comparaison entre les spectres de masses des composés  $Pd_1$  et  $Pd_2$ . Cette attribution a été dictée d'un glycolipide possédant des chaînes grasses totalement identiques et qui identifier les deux chaînes lipidiques de l'acide palmitique.



**Figure III-24: Spectre de masse ESI MS du composé  $Pd_1$  et  $Pd_2$  (mode négatif)**

La stéréochimie au niveau du carbone C-2 de l'unité glycérol est (*S*) car les valeurs de constantes de couplage à H-2/H-3a et H-2/H-3b plus grandes de l'ordre de 6 et 11 Hz [119]. L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III-2) permettent l'attribution au composé  $Pd_2$  la structure suivante : **1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.**



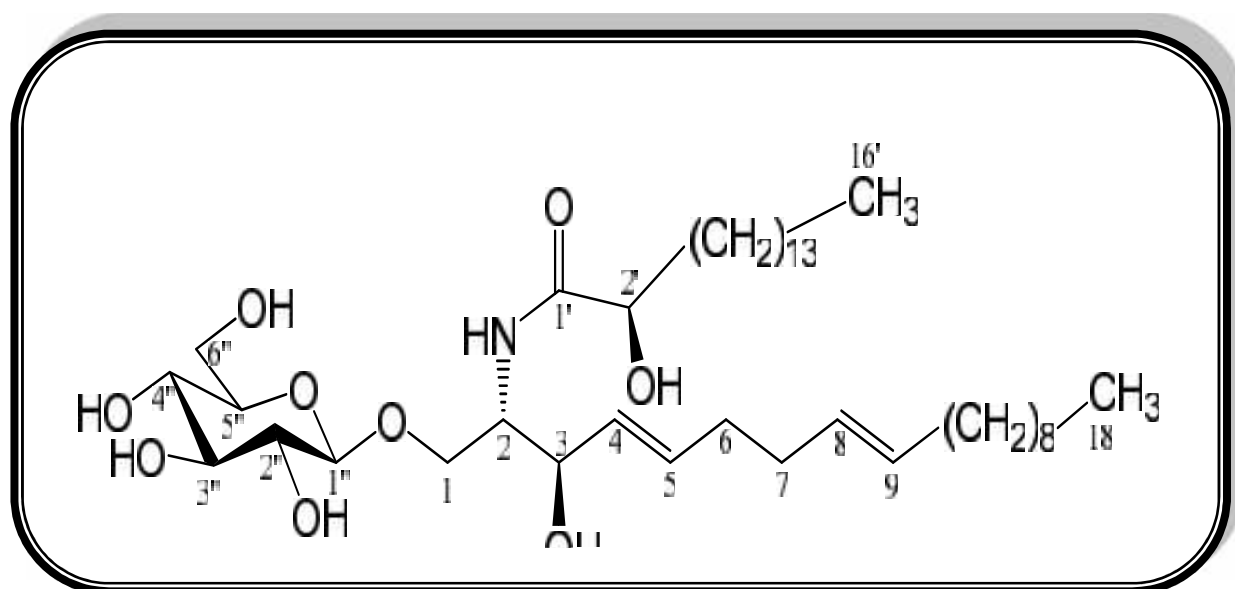
Ce glycolipide a été isolé pour la première fois non seulement du genre *Pteranthus*, mais aussi de la famille Caryophyllaceae. Par ailleurs, il a été identifié aussi dans les algues marines *Chlorella vulgaris* et *Sargassum vulgare* [118,121]. Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé *Pd*<sub>2</sub>.

Tableau III.2 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de *Pd*<sub>2</sub> dans CD<sub>3</sub>OD

Position	c (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
<b>1</b>	64.4	4.12 ( <i>dd</i> , 7.1; 12.1) H-1b 4.50 ( <i>dd</i> , 3.0; 12.0) H-1a
<b>2</b>	71.8	5.31 ( <i>m</i> )
<b>3</b>	67.2	4.10 ( <i>dd</i> , 6.4; 11.0) H-3b 4.20 ( <i>dd</i> , 5.2; 11.1) H-3a
<b>3-O-(6'-sulfo- -D-quinovopyranosyl)</b>		
<b>1'</b>	100.1	4.78 ( <i>d</i> , 3.6)
<b>2'</b>	73.6	4.48 ( <i>dd</i> , 3.5; 8.6)
<b>3'</b>	75.1	3.37 ( <i>dd</i> , 8.6; 2.3)
<b>4'</b>	75.0	3.08 ( <i>t</i> , 9.2)
<b>5'</b>	69.9	4.07 ( <i>dd</i> , 1.6; 8.6)
<b>6'</b>	54.3	2.93 ( <i>dd</i> , 9.3 ; 13.6) H-6''b 3.36 ( <i>m</i> ) H-6''a
<b>2-O-CO-</b>		
<b>1''</b>	175.2	-
<b>2''</b>	35.3	2.34 ( <i>m</i> )
<b>3''</b>	26.2	1.61 ( <i>m</i> )
<b>4''-13''</b>	30.4 – 31.0	1.26- 1.40
<b>14''</b>	33.2	
<b>15''</b>	26.2	

16''	14.6	0.90 (t, 6.6)
1-O-CO-		
1'''	175.0	-
2'''	35.1	2.34 (m)
3'''	26.2	1.61 (m)
4'''-13'''	30.4 - 31.0	
14'''	33.2	1.26- 1.40
15'''	26.2	
16'''	14.6	0.90 (t, 6.6)

### III-1-3-3- Identification structurale du composé $Pd_3$



**$Pd_3$ : 1-O-β-D-glucopyranosyl-2-N-2 S-hydroxy-palmitoyl-2S, 3R, 4(E), 8(E) octadécasphingadiénine (soyacerebroside I)**

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Invisible il donne une coloration rose après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

Les spectres de masse ESI (Figures III-25 ; III-26) de composé  $Pd_3$  enregistrés en modes négatif et positif montrent des pics d'ions pseudo-moléculaires à [M-H] 712,736 et [M+Na] 737 uma soit une masse moléculaire impaire égale à 713 uma, en accord avec une formule brute en  $C_{40}H_{75}NO_9$ .



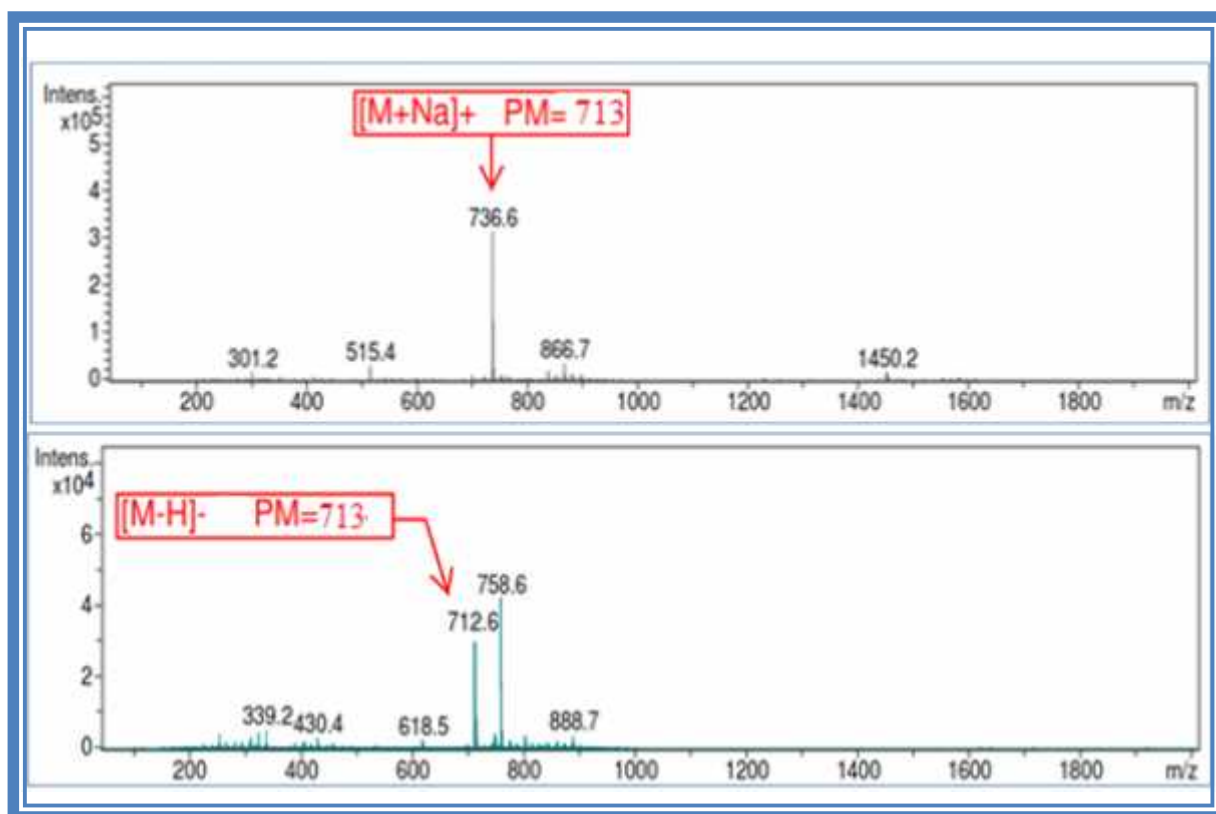


Figure III-25 : Spectre de masse ESI MS du composé  $Pd_3$  (modes négatif et positif)

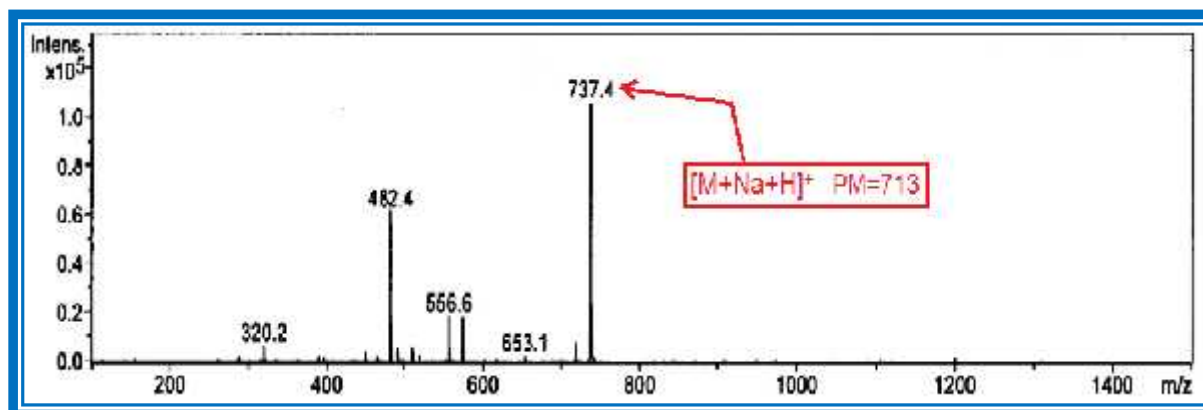


Figure III-26 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé  $Pd_3$

Le spectre RMN  $^1H$  (figure III-27) montre des signaux résonants à champ fort entre 0.93-2.10 ppm caractéristiques de protons des chaînes lipidiques. Plusieurs signaux entre 3-4 ppm caractéristiques des protons osidiques. Le signal doublet résonant à 4.27 ppm ( $J = 7.8$  Hz) est attribué au proton anomère H-1" du sucre. L'observation des quatre signaux à champ faible résonant entre 5.41 et 5.73 ppm correspondent aux protons oléfiniques.

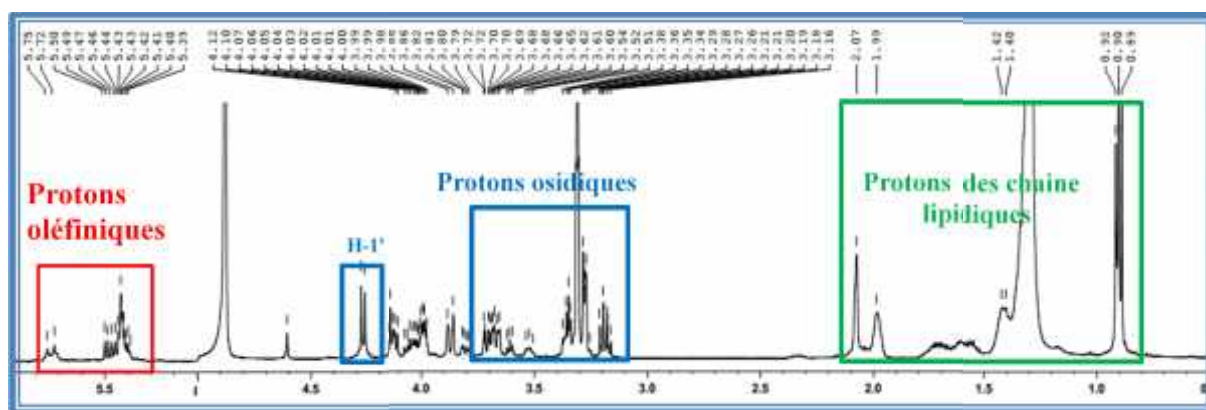


Figure III-27 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pd_3$

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -module (figure III-28) montre des signaux entre 60-74 ppm de carbones osidiques et un signal à 104.8 ppm d'un carbone anomère. De plus, la présence de carbones à:

- ✚ 14.6 ppm d'un carbone méthylique terminant la chaîne lipidique.
- ✚ 54.7 ppm caractéristique d'un carbone aliphatique substituant un atome d'azote [122].
- ✚ 23 et 36 ppm de groupements méthylènes.
- ✚ 177.3 ppm d'un carbonyle.

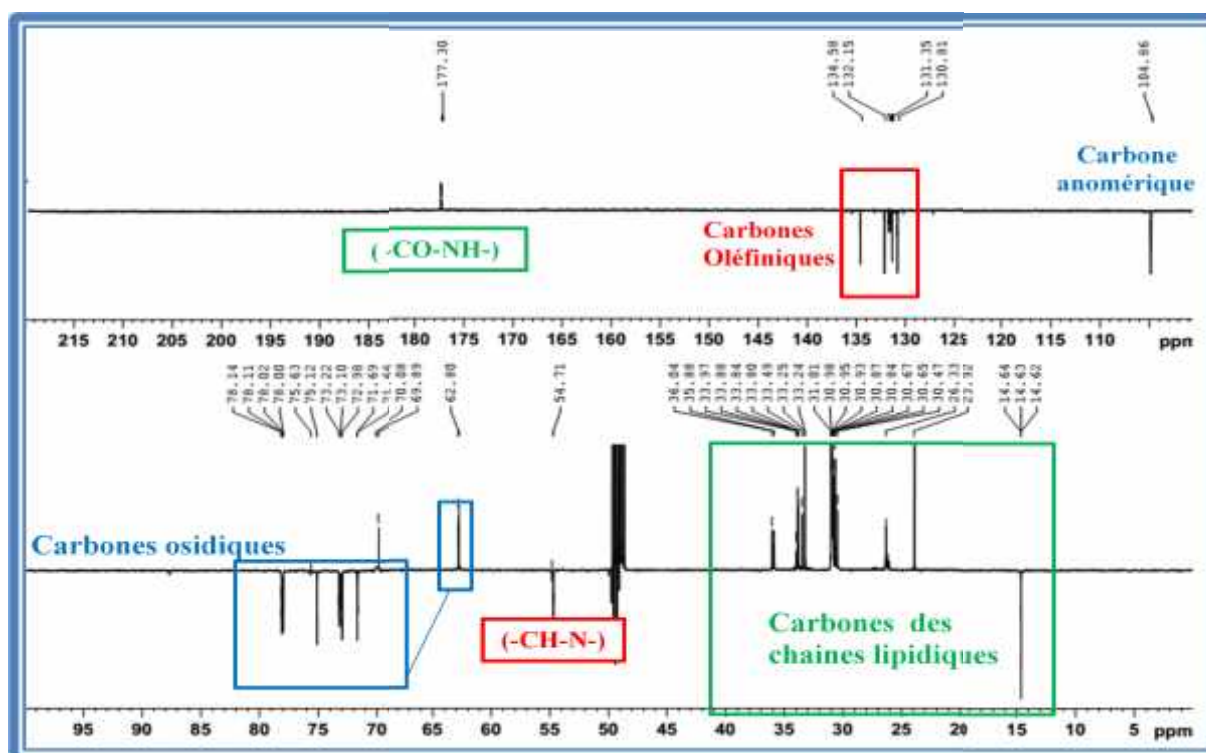


Figure III-28 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -module du composé  $Pd_3$

Les données obtenues à partir du spectre de masse (la présence d'atome d'azote) et l'observation des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé de ce composé (structure glucolipidique) indique que notre composé renferme un squelette céramidique liée à une unité osidique alors ces résultats nous aide de déduire que le composé **Pd<sub>3</sub>** est un glycoscéroside (Figure III-29). Ce type de squelette est rencontré au sein de la famille Caryophyllaceae [122].

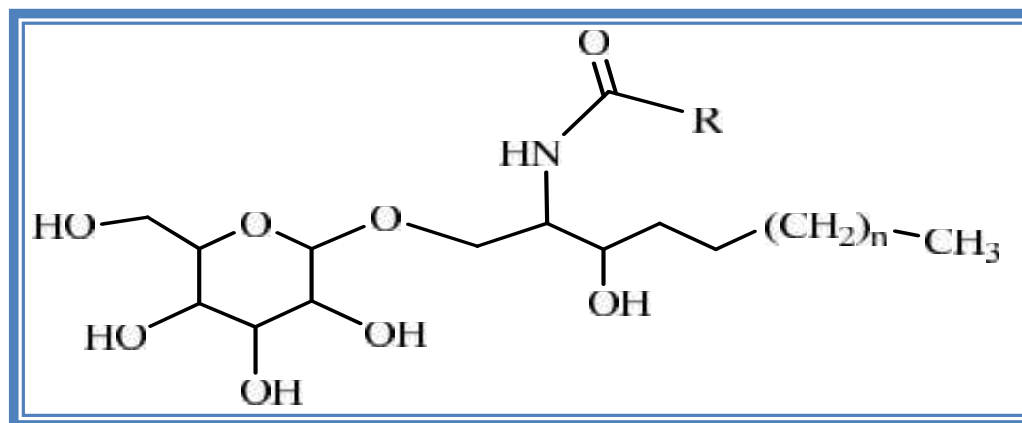


Figure III-29 : Squelette glycoscéroside

L'unité osidique est identifiée par l'analyse COSY H-H (Figure III-30) qui permet d'indiquer sept protons d'un hexose. En effet, partant du proton anomérique H-1, on relie à travers leurs taches de corrélations les protons comme suit :

- H-1'/H-2' (H-2',  $\delta_{\text{H}}$  3.18, *dd*,  $J = 9.3; 7.8$  Hz).
- H-2/H-3 (H-3,  $\delta_{\text{H}}$  3.35, *t*,  $J = 9.5$  Hz).
- H-3/H-4 (H-4,  $\delta_{\text{H}}$  3.26, *m*).
- H-4/H-5 (H-5,  $\delta_{\text{H}}$  4.28, *m*).
- H-5/H-6 b (H-6 b,  $\delta_{\text{H}}$  3.67, *dd*,  $J = 4.7; 12.6$  Hz) et H-6 a (H-6 a,  $\delta_{\text{H}}$  3.87, *m*).
- H-6 a/H-6 b.

Les grandes taches de corrélation impliquant de grandes valeurs de constantes de couplage ( $J_{1-2'} = 7.8$  Hz), indiquent que c'est un glucose de configuration  $\beta$ . L'expérience HSQC (Figure III-31) ont été assignées les attributions des carbones osidiques dans le tableau III-3. Il reste maintenant à identifier les chaînes lipidiques et son point de branchement sur l'unité osidique.

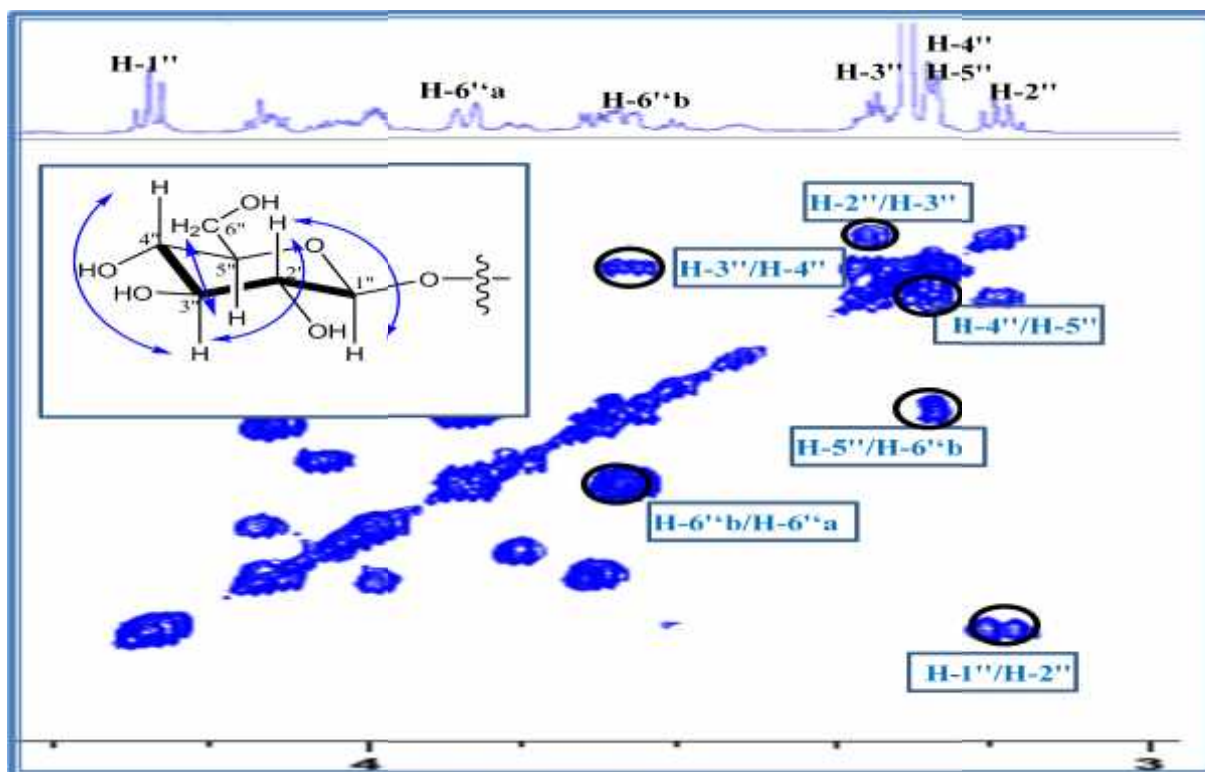


Figure III-30 : Spectre COSY H-H de l'unité osidique du composé  $Pd_3$

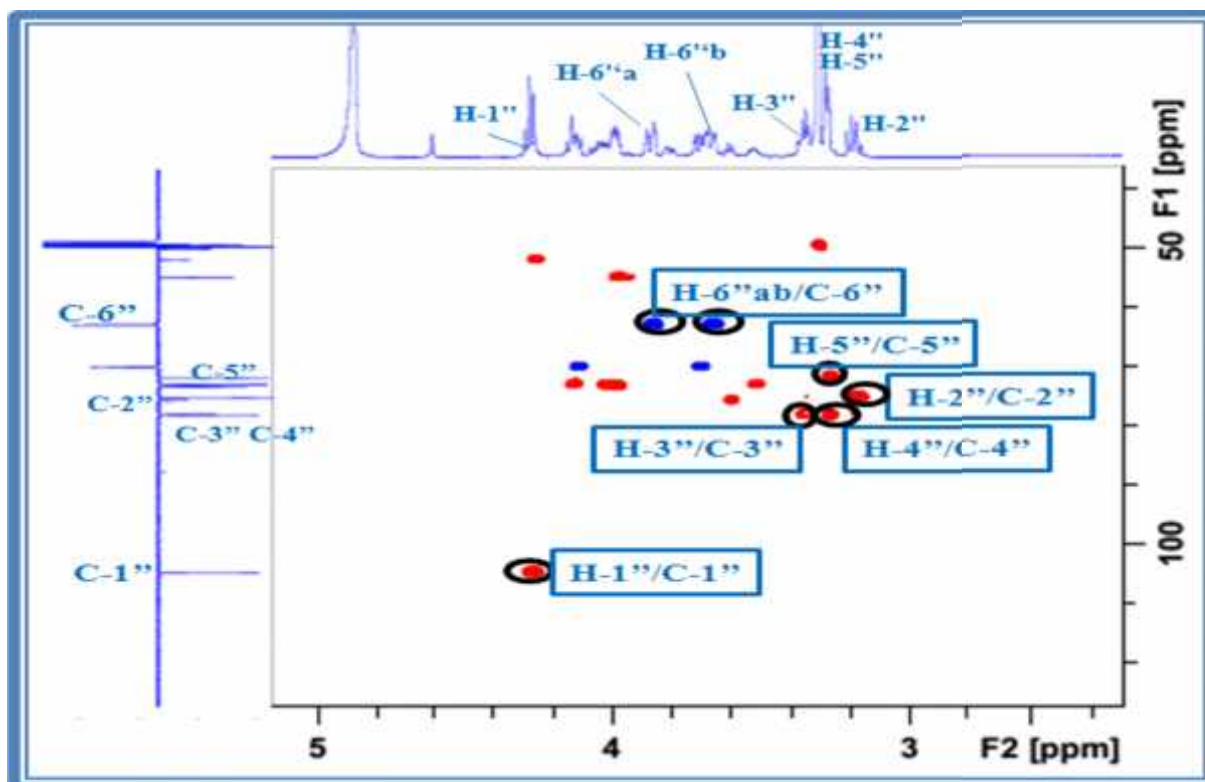
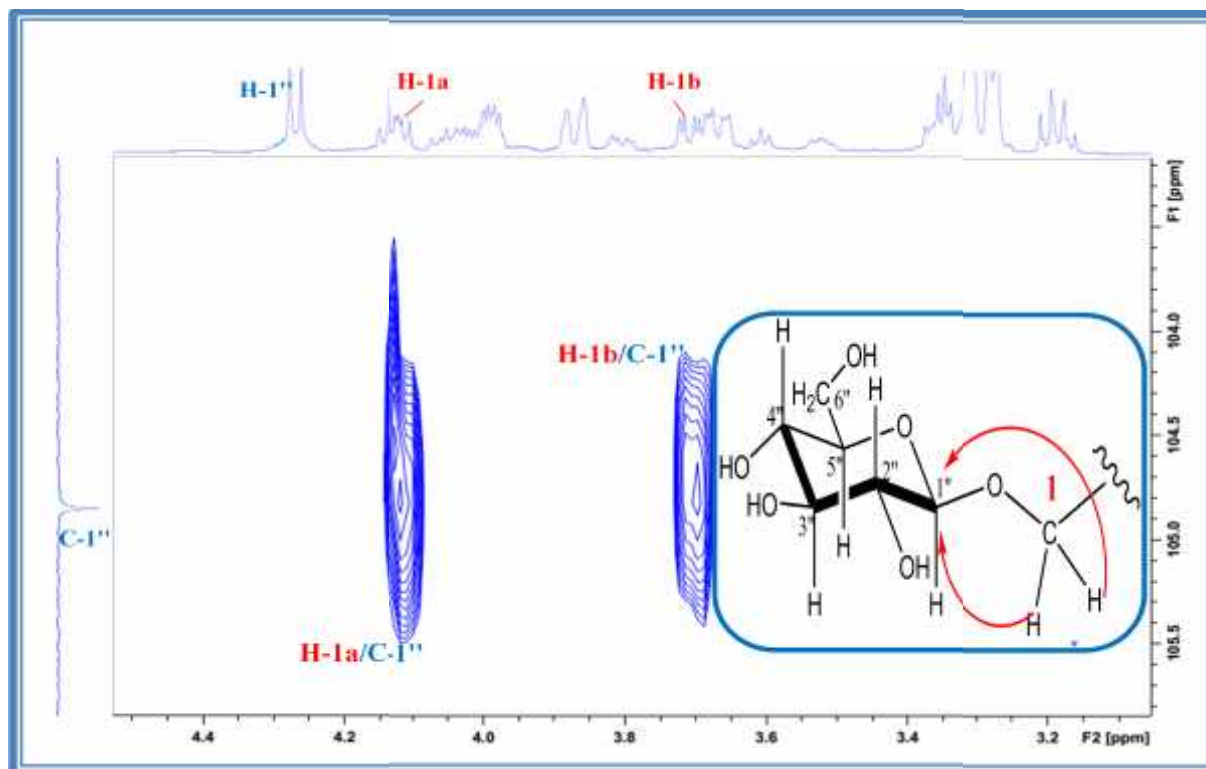


Figure III-31 : Spectre HQSC de l'unité osidique du composé  $Pd_3$

Le spectre HMBC (Figure III-32) montre une corrélation avec le carbone anomérique C-1'' et deux protons à 3.71 et 4.11 ppm d'un groupement oxyméthylène indique clairement que la chaîne lipidique est fixée en C-1 du glucose.



**Figure III-32 : Spectre HMBC montrant le point de branchement du sucre**

L'analyse COSY H-H (Figure III-33) a été déterminante. L'élucidation structurale proprement dite est initiée à partir des protons H-1 (3.71 ppm, *dd*,  $J = 1.7$  et  $3.4$  Hz, H-1b) et (4.11 ppm, *m*, H-1a) cités précédemment du groupement oxyméthylène qui corrélient avec un proton nommé H-2 résonant à  $\delta_{\text{H}} 3.97$  (1H, *m*) porté par un carbone repéré à 54.7 ppm par analyse HSQC (Figure III-34) qui est lié à un atome d'azote. Ce même proton H-2 corrélie avec un proton H-3 résonant à 4.13 ppm (1H, *m*). L'analyse HSQC (Figure III-34) montre que ce dernier est porté par un carbone dont la valeur de déplacement chimique est de l'ordre de 72.9 ppm, traduisant la présence d'un groupement oxyméthine CHOH en C-3. En effet, Ce dernier couple avec un proton éthylénique sortant à 5.48 ppm sous forme de doublet de doubles (1H, *dd*,  $J = 6.9, 16$  Hz) nommé H-4, lui-même corrélie avec un proton éthylénique H-5 résonant à 5.73 ppm (1H, *m*).



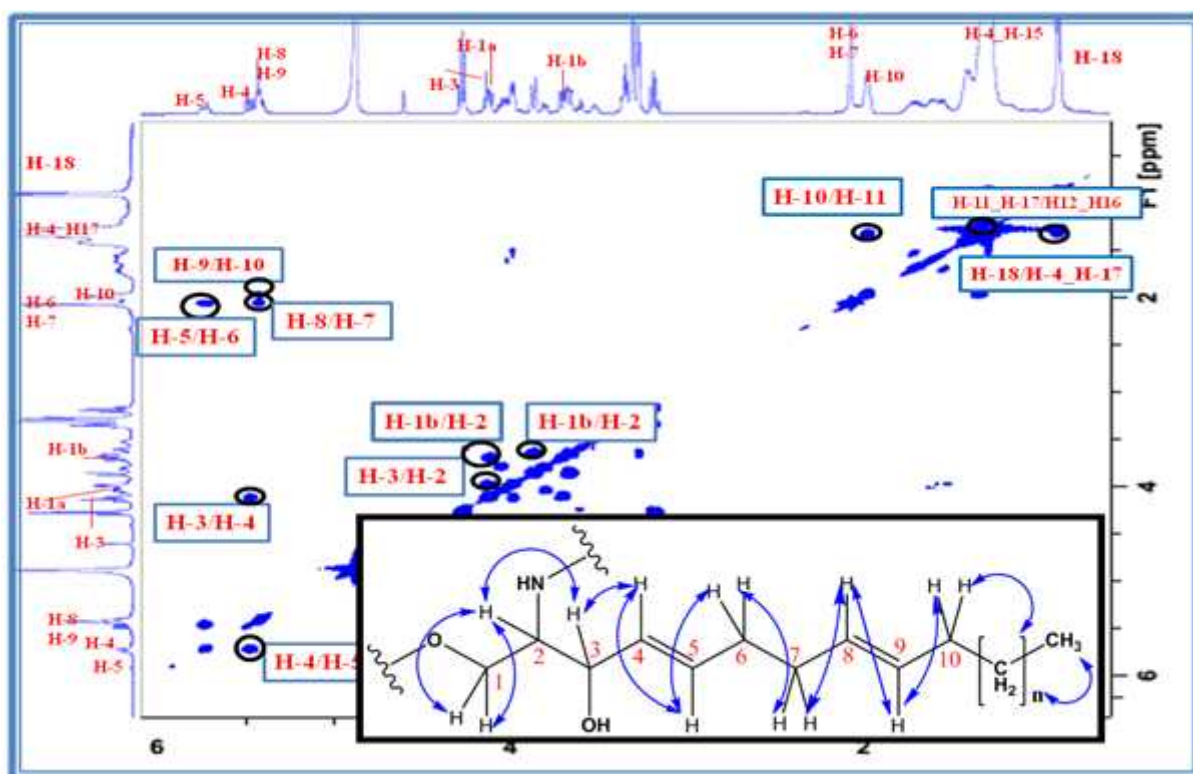


Figure III-33: Spectre COSY H-H de la partie lipidique (sphingosine) de *Pd*<sub>3</sub>.

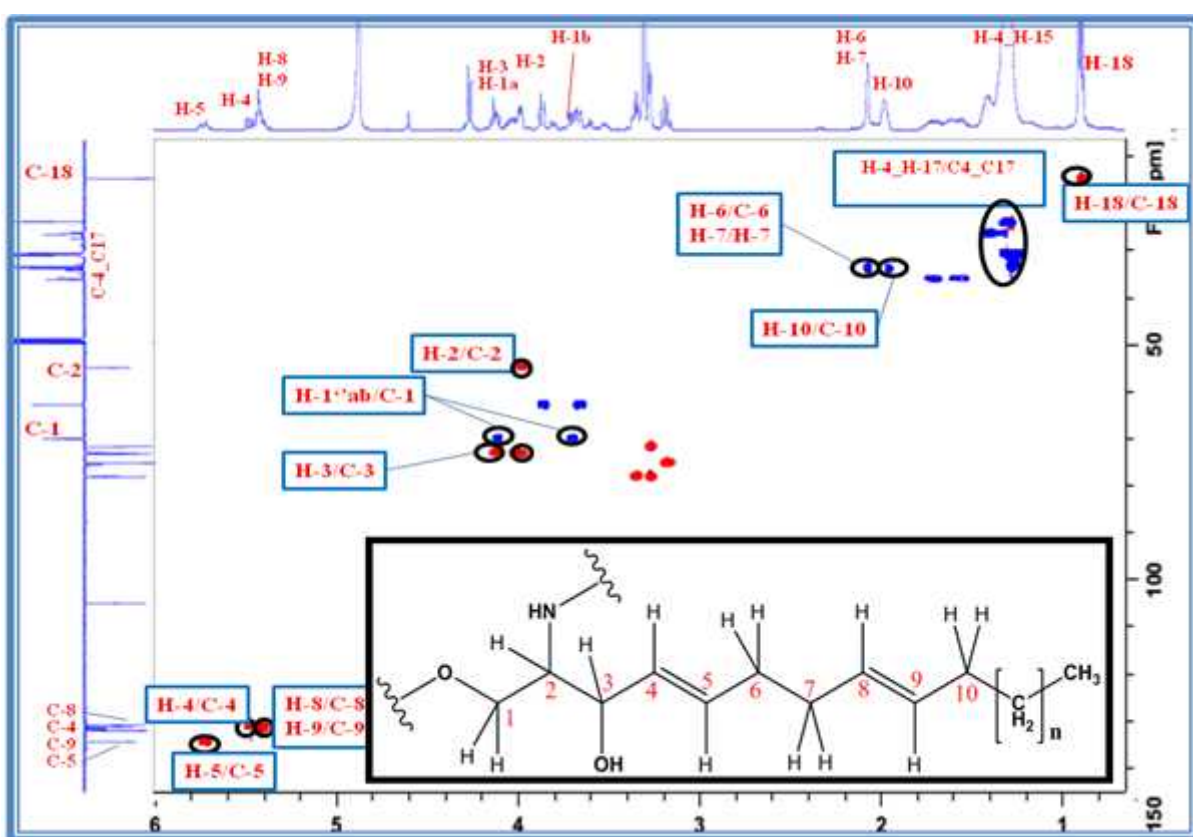
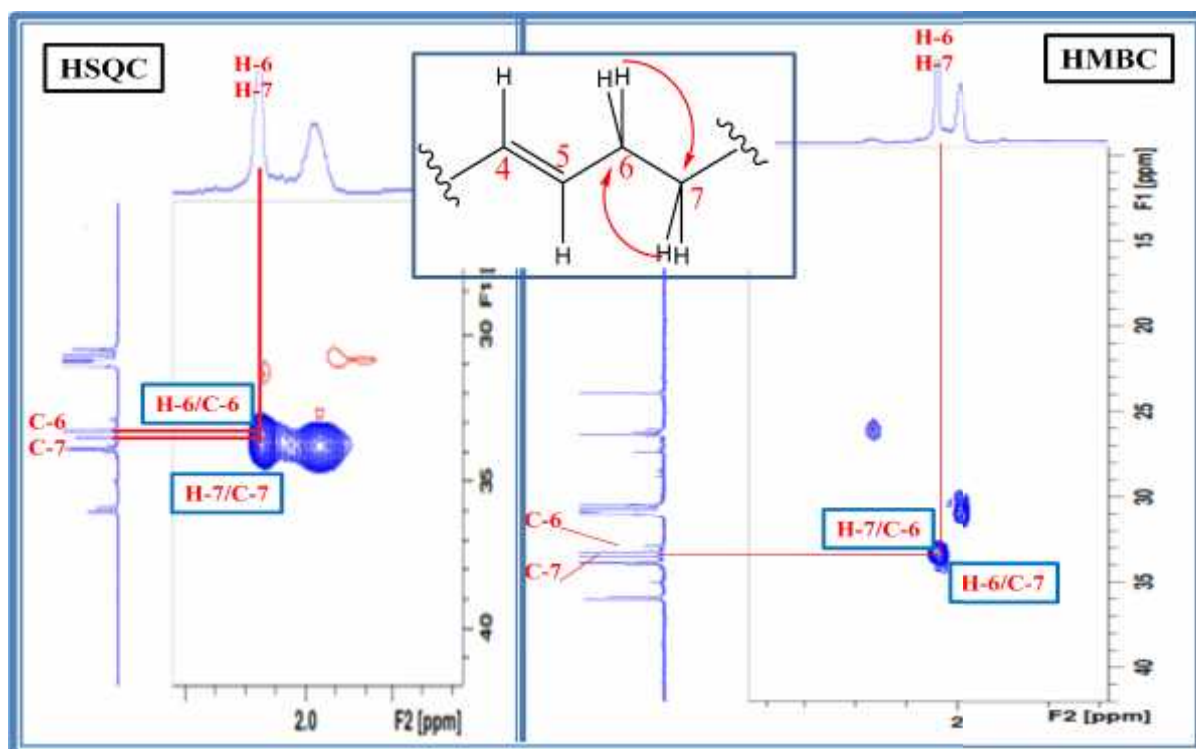


Figure III-34: Spectre HSQC de la partie lipidique (sphingosine) de *Pd*<sub>3</sub>.

Le spectre COSY H-H (Figure III-33) présente une tache de corrélation entre à H-5 et un signal singulet large (*sl*) à  $\delta$  2.06 ppm d'intégration 4H protons correspondants deux groupements méthylénique équivalents nommés H-6 et H-7 « confirmé aussi par les analyse HSQC et HMBC (Figure III-35) ». La corrélation avec ces 4 protons méthyléniques (4H, *sl*, 2.06 ppm) permet d'identifier un groupement allylique avec une configuration *trans* pour la fonction éthylénique au vu de la constante de couplage  $J_{4-5}$  égale à 16 Hz.



**Figure III-35 : Spectres HSQC et HMBC montre les deux groupements méthylénique CH<sub>2</sub> identique H<sub>2</sub>-6 et H<sub>2</sub>-7.**

De la même manière et toujours en se basant sur l'analyse COSY H-H (Figure III-33), les protons H-6 et H-7 de deux groupements méthyléniques CH<sub>2</sub> identique (4H, 2.06 ppm, *sl*), présentent une tache de corrélation avec les protons oléfiniques nommés H-8 et H-9 résonant à 5.42 ppm (2H, *t*,  $J = 4.8$  Hz). On identifie un autre groupement allylique avec une configuration *trans* pour la fonction éthylénique. Cette configuration a été établie du fait de la valeur de déplacement chimique du carbone CH<sub>2</sub> d'ordre 30 ppm de ce groupement allyle [123]. Partant de proton oléfinique H-9 qui corrèle avec un proton voisin multiplet H-10 repéré à 1.98 ppm, lui même montrant une tache de corrélation avec l'amas de protons entre 1.20-1.40 ppm de nature méthylénique attestée par le spectre HSQC (Figure III-34). Cet amas



corrèle avec un groupement méthyle (3H, *t*,  $J = 6.5$  Hz, H-18) résonnant à 0.90 ppm, terminant ainsi la première chaîne lipidique (l'unité sphingosine).

Le proton H-2 montre clairement sur le spectre HMBC (Figure III-36) une corrélation à longue distance avec un carbone résonnant à  $\delta_c$  177.3 caractéristique d'un groupement carbonyle mettant en évidence la présence d'une seconde chaîne amide d'acide gras saturé. Le carbonyle C-1' couple avec un proton nommé H-2 sortant à 3.99 ppm (1H, *m*) correspondant à un groupement oxyméthine CH-2' démarrnant la deuxième chaîne grasse; il est presque de même déplacement chimique avec le proton H-2 de la première chaîne.

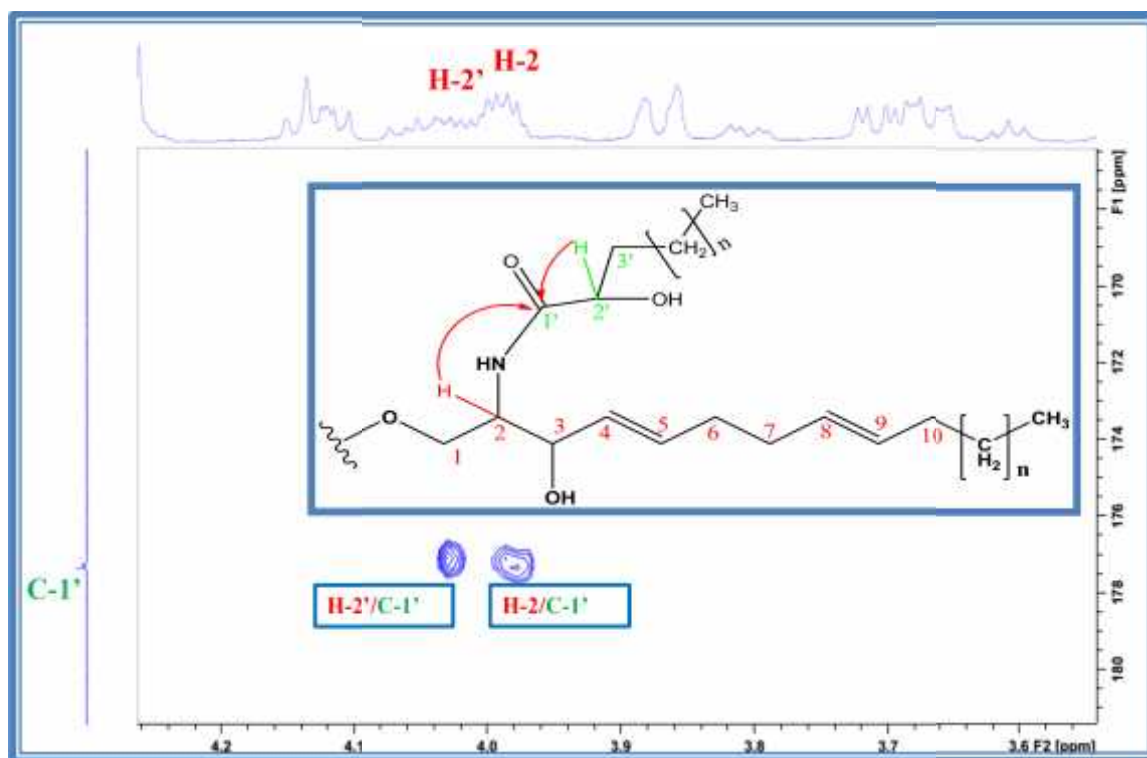


Figure III-36 : Spectre HMBC montre les points du branchement des chaînes lipidiques.

D'autre part, le spectre COSY H-H (Figure III-37) exhibe une corrélation entre le proton oxyméthine H-2 (1H, *m*) et 2 protons méthyléniques multiplets nommés H-3 a et H-3 b résonnant à 1.56 et 1.72 ppm respectivement lui aussi montrant une tache de corrélation avec l'amas des protons entre 1.20-1.40 ppm de nature méthylénique. Cet amas corrèle aussi avec un groupement méthyle (3H, *t*,  $J = 6.5$  Hz, H-16') résonnant à 0.90 ppm, terminant la deuxième chaîne lipidique et dont il faut cependant déterminer le nombre de CH<sub>2</sub> aliphatiques

constituant les deux chaînes lipidiques. L'analyse HSQC (Figure III-38) COSY permet d'assigner leurs déplacements chimiques.

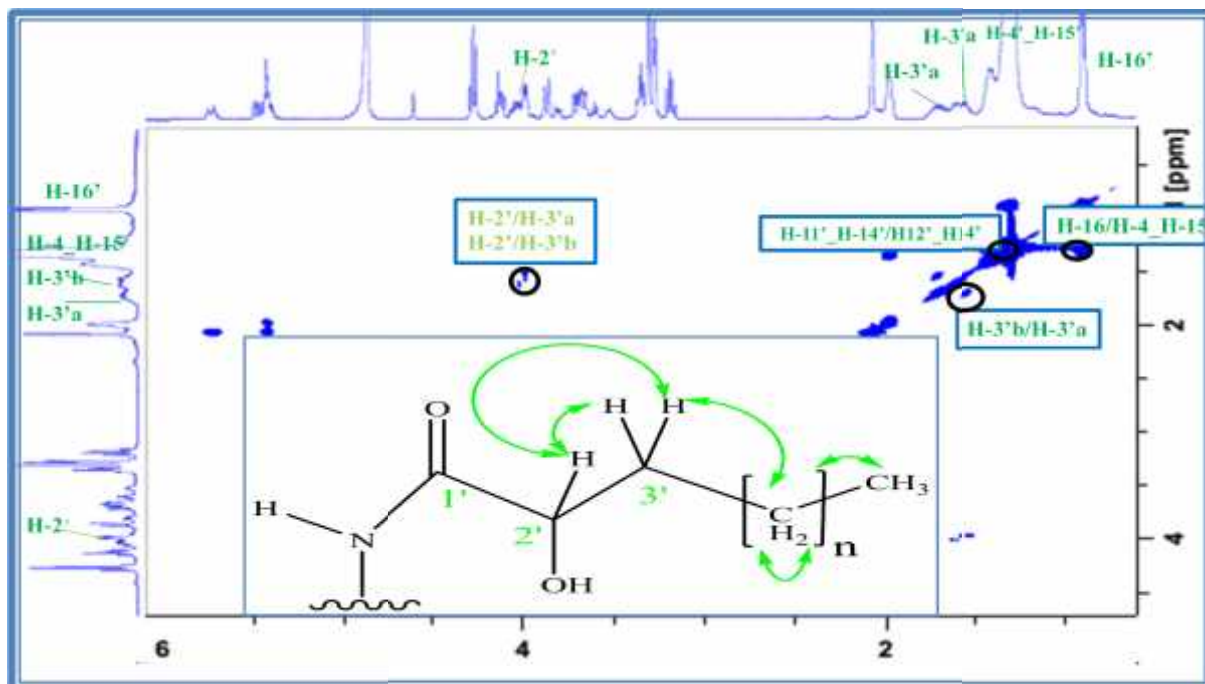


Figure III-37: Spectre COSY de deuxième chaîne lipidique du composé  $Pd_3$

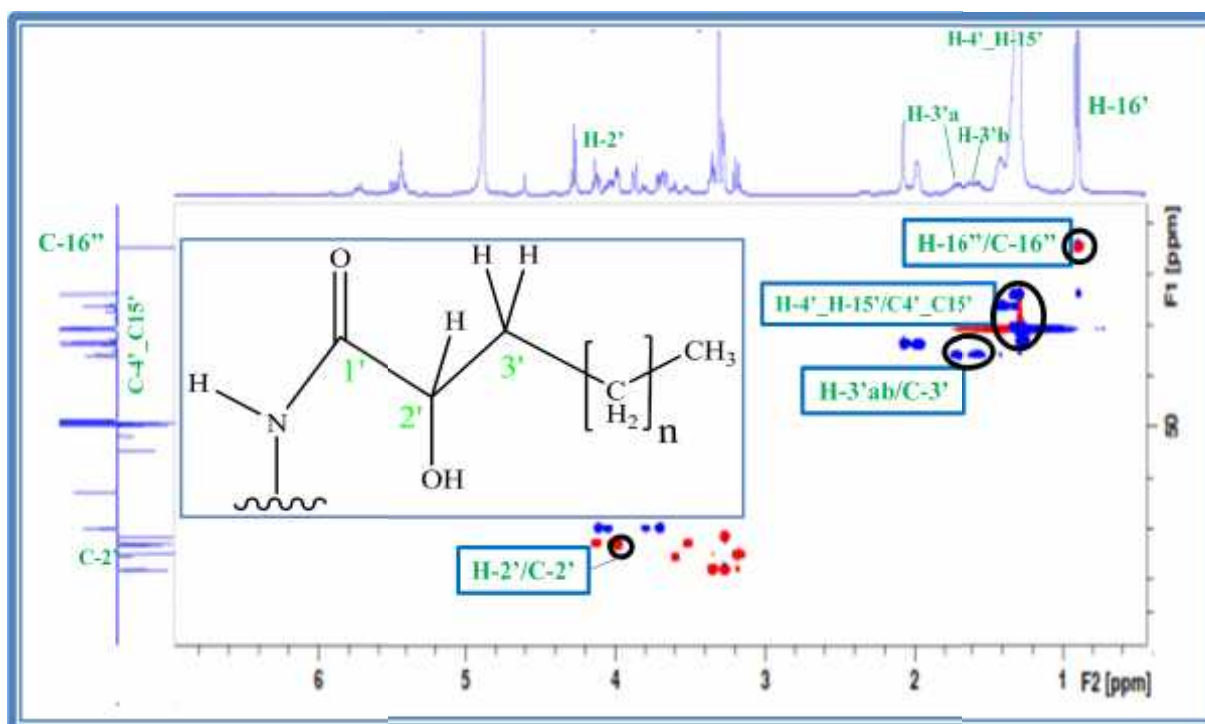


Figure III-38: Spectre HSQC de la deuxième chaîne lipidique composé  $Pd_3$

Le spectre de masse (Figure III-39) qui présente un pic de fragmentation de 482 uma [M-255], traduit ainsi la perte d'un fragment de 255 uma correspondant au groupement 2-hydroxy acide palmitique. Ceci nous permet d'identifier sans ambiguïté la longueur de la deuxième chaîne aliphatique constituée donc de 8 CH<sub>2</sub>. La configuration relative au niveau des carbones C-2(S), C-3(R) et C-2'(S) a été établie sur la base des données spectrales RMN <sup>13</sup>C en plein accord avec les données de la littérature [123].

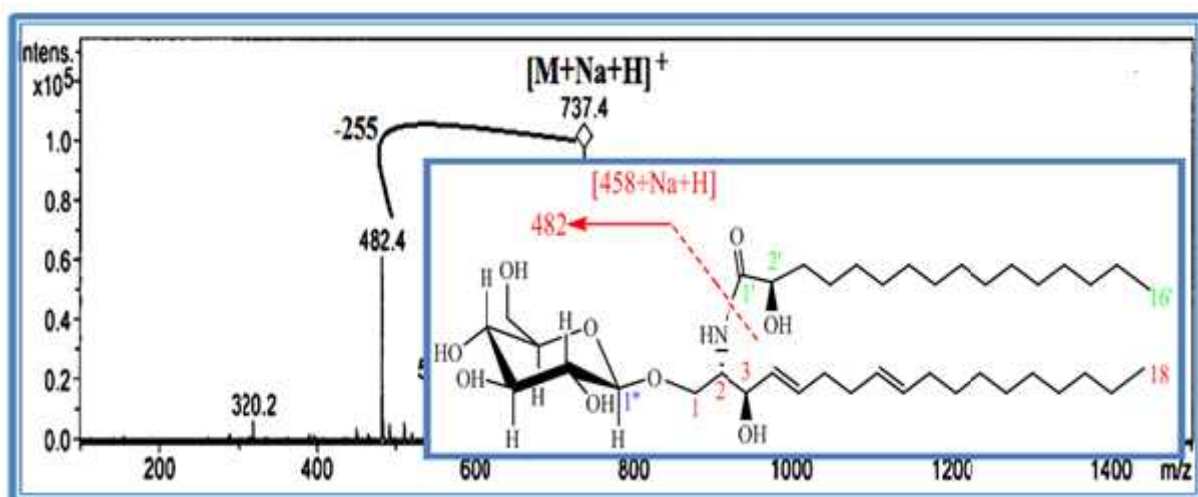


Figure III-39 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) montrent les pics de fragmentation du composé *Pd*<sub>3</sub>

Toute cette analyse ainsi que les données spectrales établies au moyen des spectres RMH <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC, la valeur du pouvoir rotatoire mesuré dans le mélange chloroforme/méthanol ( $[\alpha]_D = +5.1^\circ$ , C= 0,60 g/100 ml) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé *Pd*<sub>3</sub> la structure suivante : 1-*O*-*D*-glucopyranosyl-2-*N*-2'*S*-hydroxy-palmitoyl-2*S*,3*R*,4(*E*),8(*E*)-octadecasphingadiénine. Ce composé est connu sous le nom de Soyacerebroside I, isolé précédemment de *Dimocarpus fumatus* (Sapindaceae) [123] *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) [124] et *Euphorbia helioscopia* (Euphorbiaceae) [125].

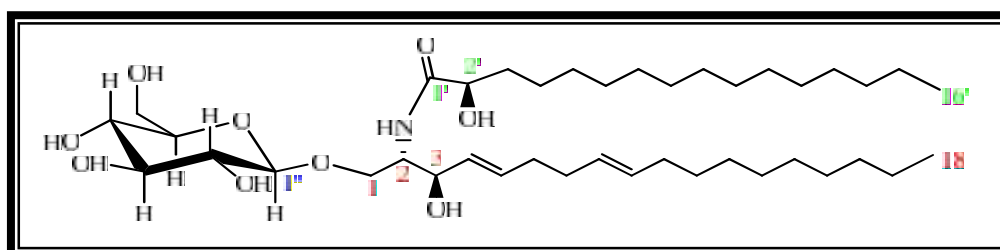
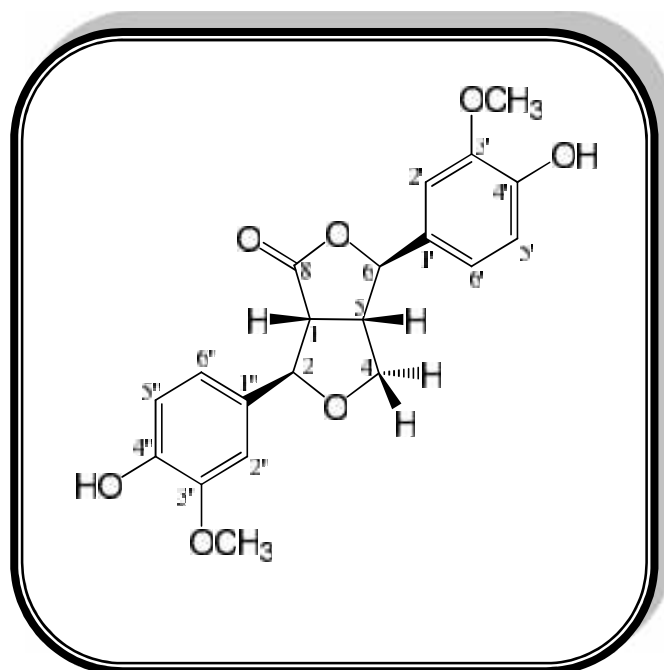


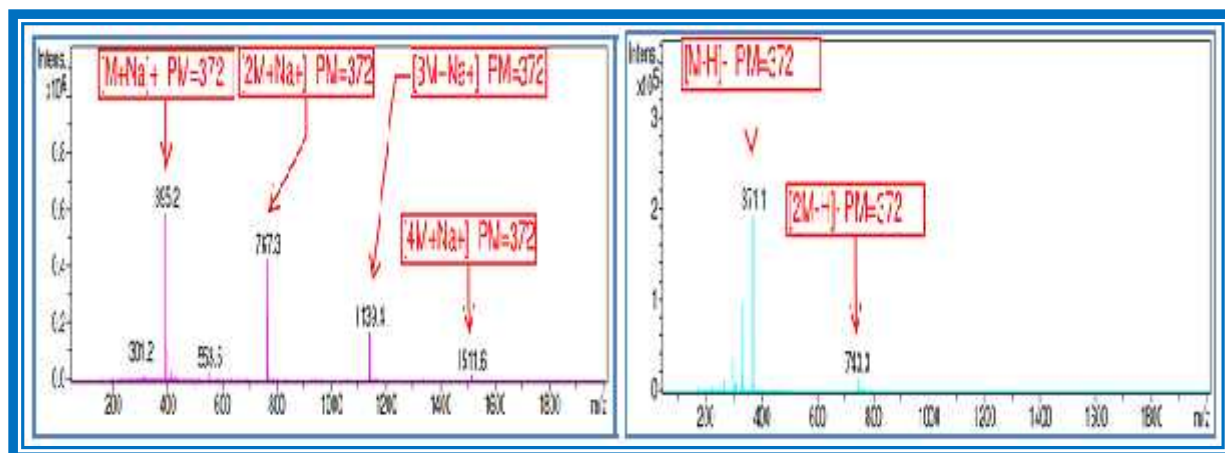
Tableau III-3 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de  $Pd_3$  dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	C (ppm)	H (ppm) (m, J en Hz)
1	69.8	3.71(dd, 1.7 ; 3.4) H-1b 4.11 (m) H-1a
2	54.7	3.97(m)
3	72.9	4.13(m)
4	131.3	5.48 (dd, 6.9 ; 16.0)
5	134.5	5.73 (m)
6	33.4	2.06 (sl)
7	33.8	2.08 (sl)
8	130.8	5.42(t, 4.8)
9	132.1	5.42 (t, 4.8)
10	33.84	1.98 (m)
11-15	30.3-31.0	1.20-1.40 (m)
16	33.2	1.20-1.40 (m)
17	23.9	1.20-1.40 (m)
18	14.6	0.90 (t, 6.5)
-NH-	-	-
<b>2-NH-CO-</b>		
1'	177.3	-
2'	73.2	3.99 (m)
3'	36.0	1.56 (m) H-3'b 1.72 (m) H-3'a
4'	26.3	1.41 (m)
5'-13'	30.3-31.0	1.20-1.40 (m)
14'	33.2	1.20-1.40 (m)
15'	23.9	1.20-1.40 (m)
16'	14.6	0.90 (t, 6.5)
<b>1-O-glu</b>		
1''	104.8	4.27 (d, 7.8)
2''	75.1	3.18 (dd, 9.3; 7.8)
3''	78.0	3.35 (t, 9.5)
4''	71.6	3.26 (m)
5''	78.1	3.28 (m)
6''	62.8	3.67 (dd, 4.7 ; 12.6) H-6''b 3.87 (m) H-6''a

III-1-3-4- Identification structurale du composé  $Pd_4$  **$Pd_4$  : 8-oxo-pinoresinol.**

Ce composé est obtenu sous forme d'une huile verte, visible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm). Il se colore en orange après révélation par une solution d'acide et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse obtenus par ionisation électrospray ESI-MS du composé en mode positif et négatif (Figure III-40) montrent des pics d'ions pseudo-moléculaires à 371, 395, 743, 767, 1139 et 1511 uma soit respectivement permettant d'attribuer à ce composé une masse moléculaire  $M = 372$  uma correspondant à une formule brute en  $C_{22}H_{22}O_7$ .

**Figure III-40 : Spectres de masse ESI-MS du composé  $Pd_4$  (en modes positif et négatif)**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-41) du composé  $Pd_4$  divisé en deux zones: aromatique et aliphatique, indique la présence de six protons aromatiques résonnant entre 6.80 et 6.93 ppm, et huit protons aliphatiques localisés à  $\delta_{\text{H}}$  3.27 (1H, *m*), 3.49 (1H, *dd*,  $J= 3.0 ; 7.9$  Hz), 3.92 (1H, *sl*), 4.07 (1H, *dd*,  $J= 4.5 ; 9.5$  Hz), 4.36 (1H, *dd*,  $J= 6.6 ; 9.5$  Hz), 5.35 (1H, *d*,  $J= 3.5$ , Hz) et 5.36 (*d*,  $J= 3.8$  Hz).

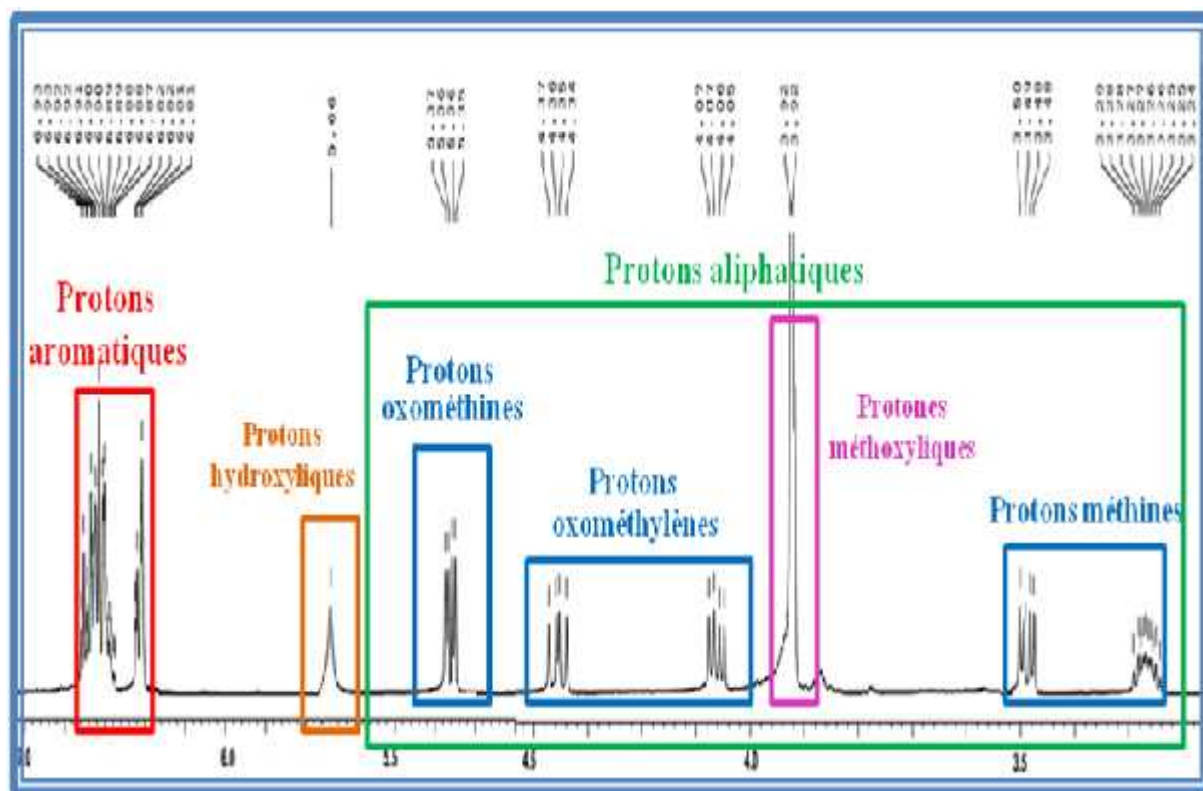


Figure III-41 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pd_4$

De même, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-42) montre la présence de 12 carbones aromatiques se répartissant en six groupements CH résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  107.9, 108.2, 114.6, 114.9, 118.2 et 118.6 ppm et six carbones quaternaires détectés à  $\delta_{\text{C}}$  131.2, 132.4, 145.5, 146.2, 146.9 et 147.1 ppm. Ainsi, il exhibe six carbones aliphatiques incluant :

- un oxométhylène résonnant à 72.8 ppm.
- deux méthines localisés à 50.7 et 53.5 ppm.
- deux oxométhines repérés à 83.5 et 84.8 ppm.
- deux carbones méthoxyliques résonnant à 56.2 et 56.3 ppm.
- un carbone quaternaire repéré à 177.2 ppm correspond à un carbonyle.



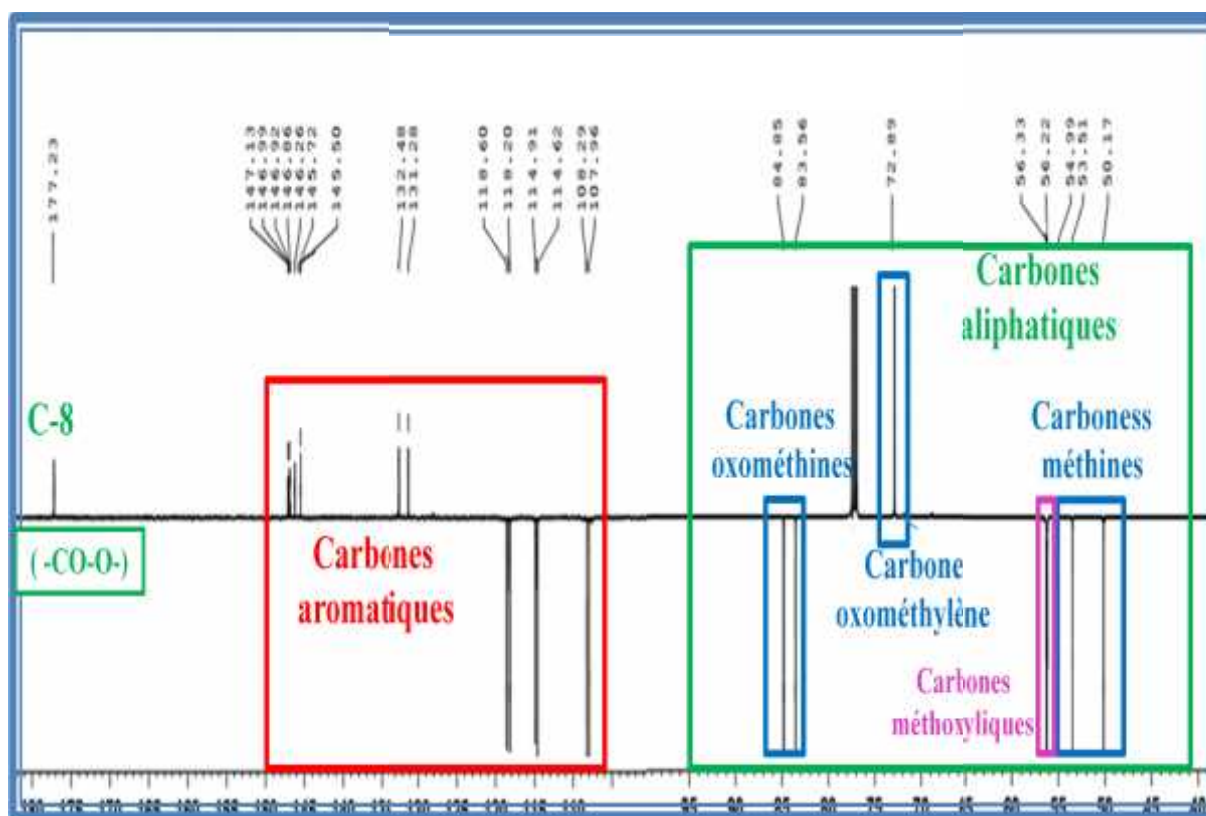


Figure III-42 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé  $Pd_4$

Cette répartition des carbones permet d'obtenir le nombre de groupements aromatiques constituant la structure de  $Pd_4$  qui est composée de deux cycles aromatiques notés A et B avec une présence de trois protons dans chaque cycle.

La multiplicité observée pour chaque proton aromatique sur le spectre RMN $^1\text{H}$  (Figure III-43) et la mesure des constantes de couplage ont permis d'obtenir les protons des deux noyaux aromatiques. En effet, le doublet à 6.81 ppm avec  $J= 2.0$  Hz correspond au proton H-2'. Ce dernier est couplé avec H-6' (6.82 ppm) qui est situé en position méta suite à sa multiplicité  $dd$  ( $J= 2.0 ; 6.8$  Hz). Cette dernière indique un autre couplage de H-6' avec un proton en position ortho qui est le proton H-5' ( $_{\text{H}} 6.91, d, J= 6.8$  Hz). De la même manière, l'attribution des protons du deuxième cycle aromatique B a été faite comme suit : H-2'' à 6.90 ppm ( $d, J = 1.9$  Hz), H-6'' à 6.88 ppm ( $d, J = 1.9 ; 6.4$  Hz) et H-5'' à 6.93 ppm ( $d, J= 6.4$  Hz). On constate que ces systèmes de spins résultant sont désignés par **ABX** pour les deux cycles A et B.



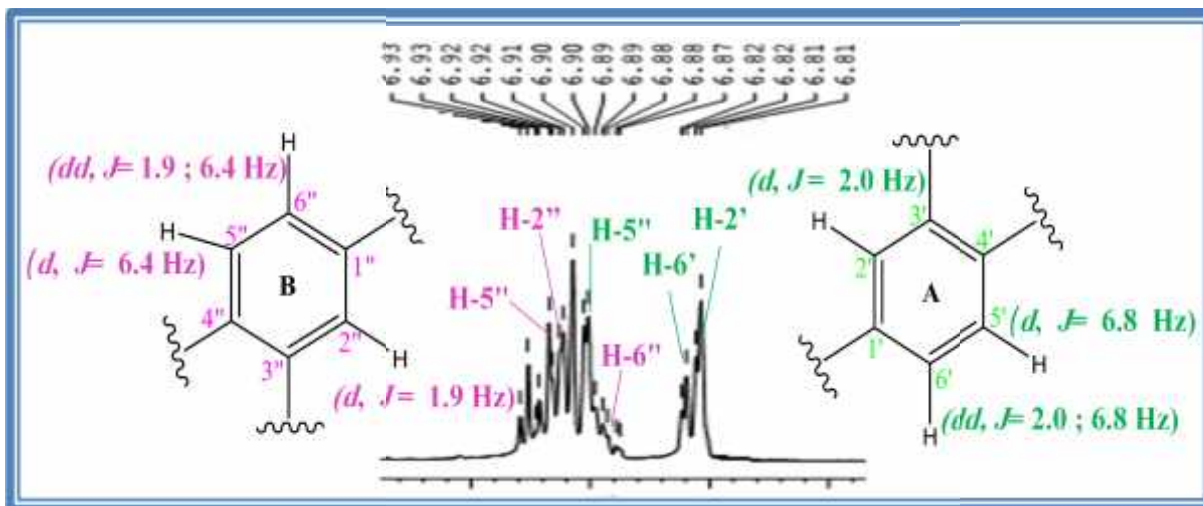


Figure III-43 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des protons aromatiques du composé  $Pd_4$

Le spectre COSY H-H (Figure III-44) confirme la position de ces protons par les corrélations qu'il révèle entre les protons couplés H-5'/H-6' et H-5''/H-6'' pour les deux cycles aromatiques A et B.

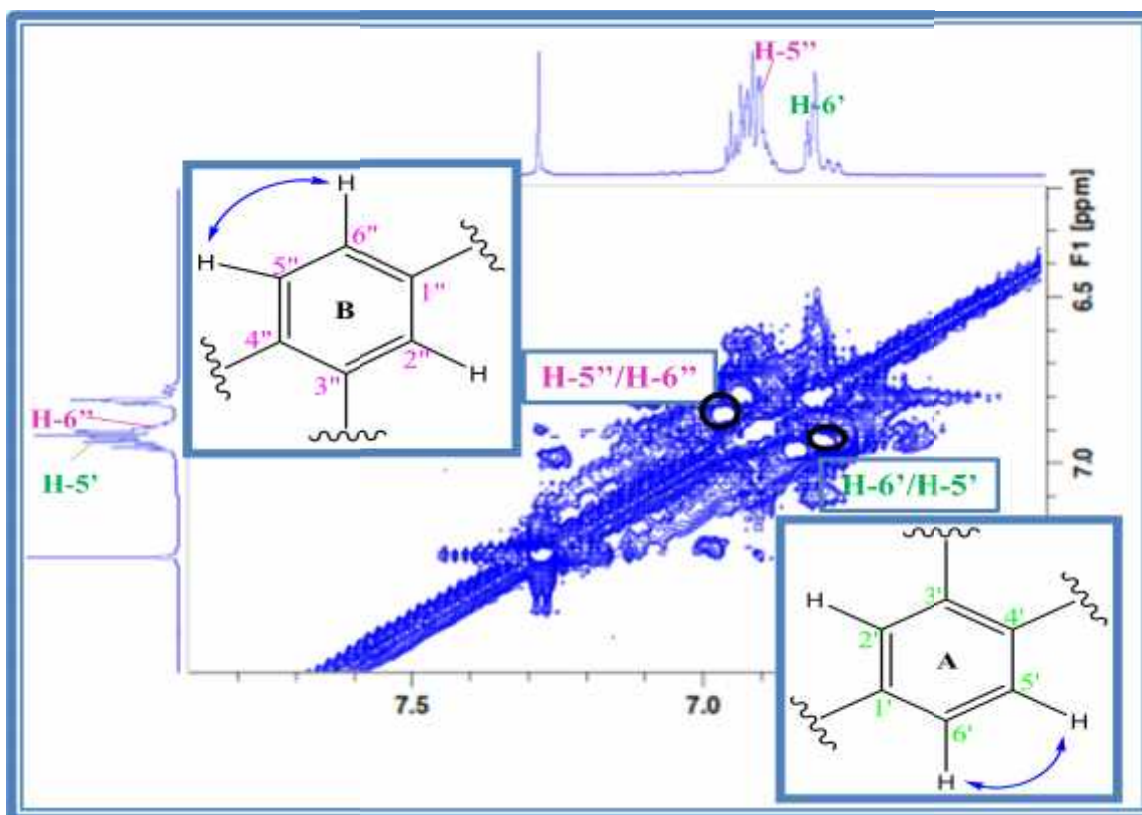


Figure III-44 : Spectre COSY H-H des protons aromatiques du composé  $Pd_4$

Partant de ces protons, l'expérience HSQC (Figure III-45) permet d'assigner aux déplacements chimiques comme suit :

- ✚ H-2'/C-2' à ( H 6.81/ C 107.9)
- ✚ H-5'/C-5' à ( H 6.91/ C 114.6)
- ✚ H-6'/C-6' à ( H 6.82/ C 118.3).
- ✚ H-2''/C-2'' à ( H 6.90/ C 108.2).
- ✚ H-5''/C-5'' à ( H 6.93/ C 114.9).
- ✚ H-6''/C-6'' à ( H 6.88/ C 118.6).

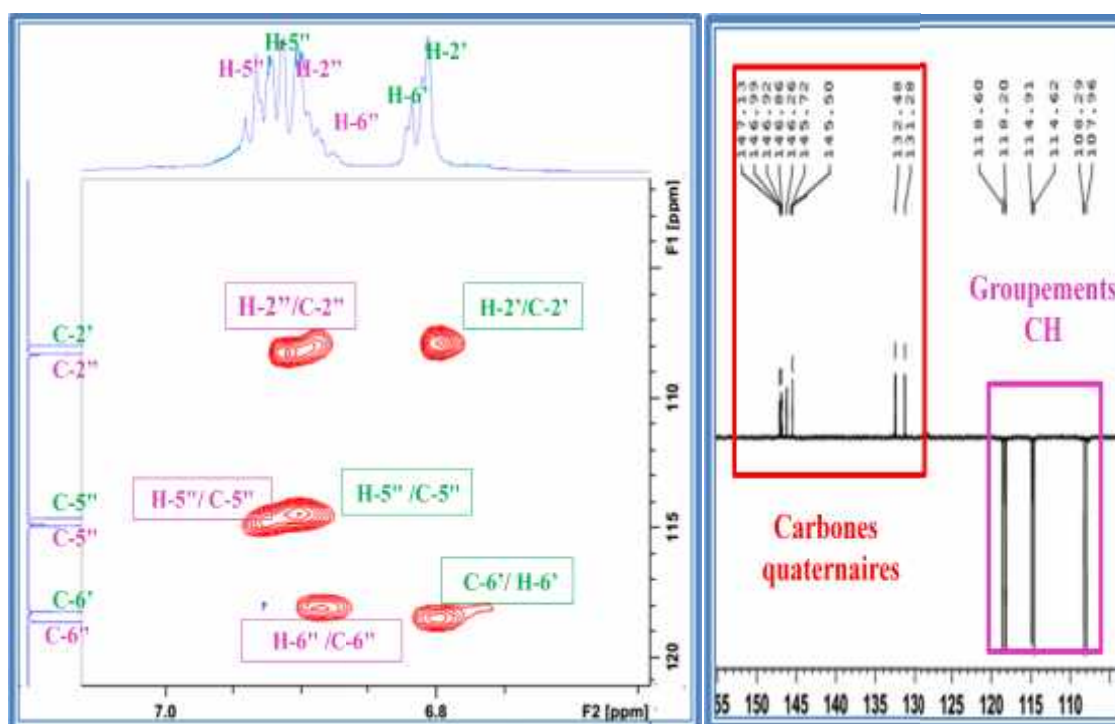


Figure III-45 : Spectres HSQC et RMN  $^{13}\text{C}$  de la partie aromatique du composé  $Pd_4$

A partir de ces données, l'analyse du spectre HMBC conduit à attribuer les carbones quaternaires des cycles A et B à travers les corrélations en  $^3J$  qu'ils présentent (Figure III-46) entre :

- Pour le cycle A :
  - ✚ Le proton H-2' et les carbones C-4' ( C 146.2) et C-6' déjà identifié.
  - ✚ Le proton H-5' et les carbones C-1' ( C 131.2) et C-3' ( C 146.9).
  - ✚ Le proton H-6' et les carbones C-2' et C-4' ( C 146.2).

➤ Pour le cycle B :

- ✚ Le proton H-2'' et les carbones C-4'' (  $\delta_c$  145.5) et C-6'' connu.
- ✚ Le proton H-5'' et les carbones C-1'' (  $\delta_c$  132.4) et C-3'' (  $\delta_c$  147.1).
- ✚ Le proton H-6'' et les carbones C-2'' (  $\delta_c$  108.2) et C-4'' (  $\delta_c$  145.5).

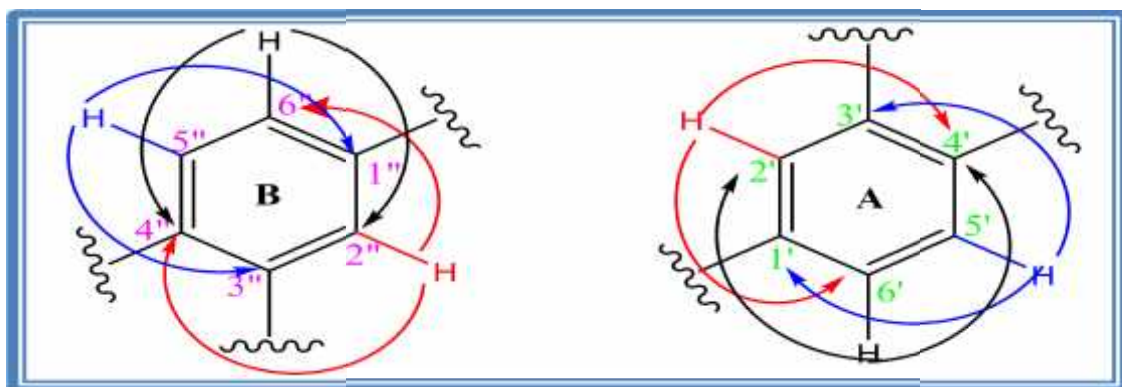


Figure III- 46 : Corrélations HMBC des protons aromatiques au niveau des cycles A et B du composé  $Pd_4$

Cette analyse nous a permis d'identifier les deux groupements aromatiques du composé comme étant le 1,3,4-trisubstitué phényle. L'identification de leurs substituants a débuté par l'interprétation du spectre RMN  $^{13}C$  (Figure III-47) qui montre un déblindage des carbones C-3' (  $\delta_c$  146.9), C-4' (  $\delta_c$  146.9), C-3'' (  $\delta_c$  147.1) et C-4'' (  $\delta_c$  145.5) en comparaison avec les valeurs des autres carbones de ces deux cycles. Ce qui indique la présence de substituants électro-négatifs.

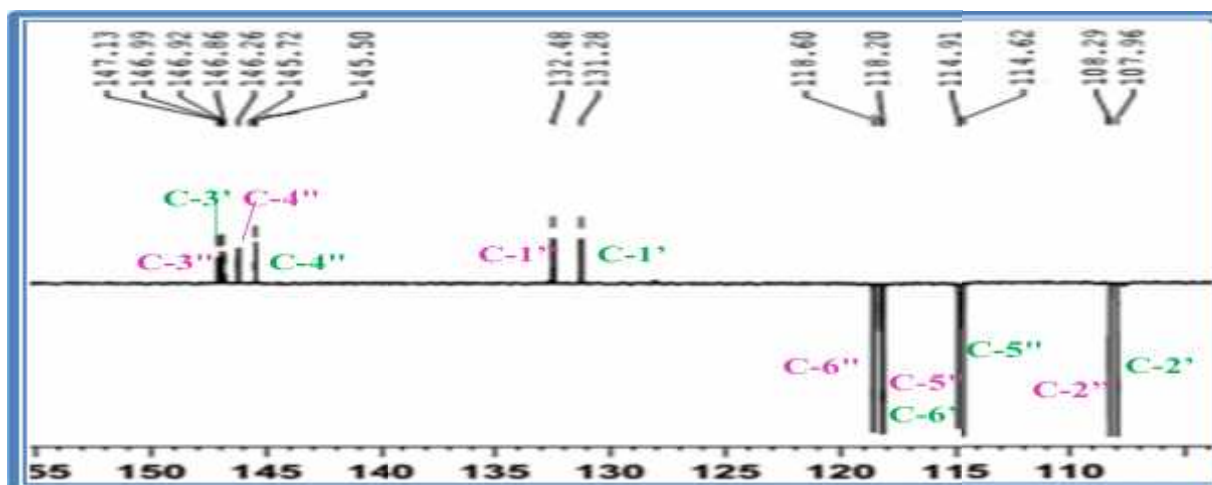


Figure III- 47 : Spectre RMN  $^{13}C$  J-modulé des cycles aromatiques du composé  $Pd_4$

Par ailleurs, un singulet d'intégration 6H, sortant à 3.92 ppm sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  et formant des taches de corrélation sur le spectre HSQC (Figure III-48) avec les carbones résonant à 56.2 et 56.3 ppm, sont attribués aux protons méthoxyliques.

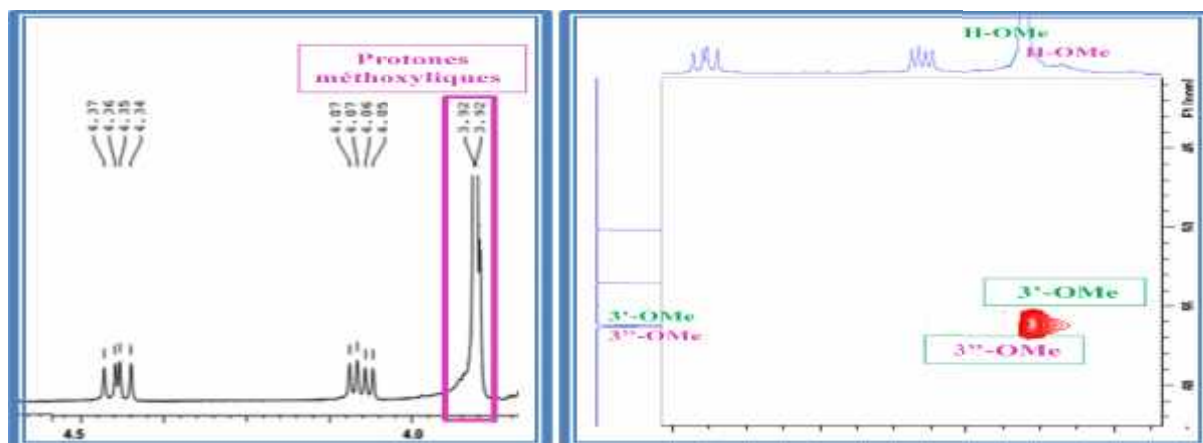


Figure III-48 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC exhibant des protons méthoxyliques du composé  $Pd_4$

Ces attributions sont supportées par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-49) avec les carbones quaternaires déblindés : C-3' ( $\text{C}$  146.9) et C-3'' ( $\text{C}$  147.1) pour les protons détectés à 3.92 ppm.

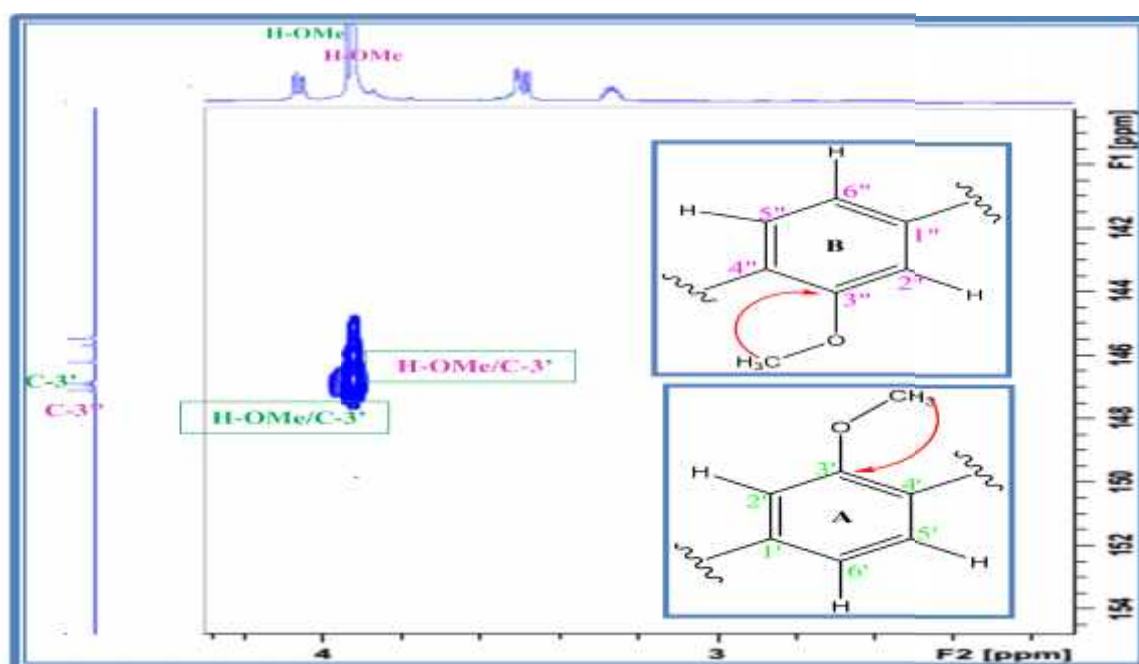


Figure III-49 : Spectre HMBC des protons méthoxyliques du composé  $Pd_4$ .

D'autre part, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-50) montrant un signal sous forme d'un singulet large résonant à 5.66 ppm et ne présentant aucune corrélation sur le spectre HSQC, est attribué à des protons hydroxyliques [126].

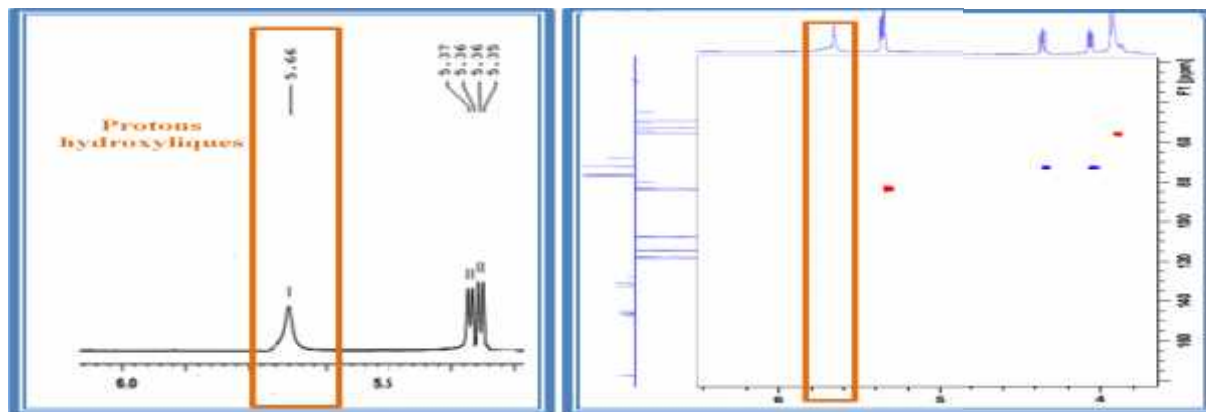


Figure III-50 : Spectres HSQC et RMN  $^1\text{H}$  montrant les hydroxyles du composé  $Pd_4$

Le proton hydroxyle qui résonne à 5.66 ppm montre des couplages sur le spectre HMBC (Figure III-51) avec le carbone du cycle A : C-5' et le carbone quaternaire C-4'. Ces corrélations indiquent l'attachement de ce groupe hydroxylique à ce dernier carbone (C-4'). La position en C-4'' de l'hydroxyle du cycle B est aussi clairement démontrée par les couplages en HMBC du deuxième proton hydroxylique résonnant aussi à 5.66 ppm avec les carbones C-4'' et C-5''.

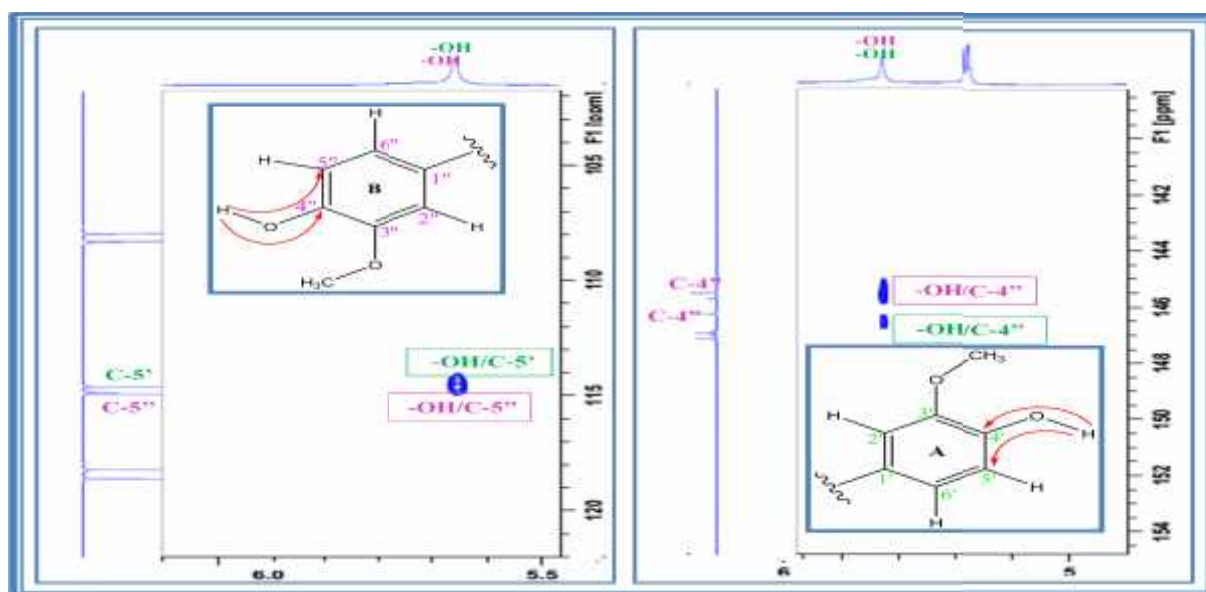


Figure III-51: Spectre HMBC des protons hydroxyliques du composé  $Pd_4$



A l'issue de ces résultats spectraux, les deux groupements aromatiques A et B (Figure III-52) du composé  $Pd_4$  sont identifiés au 4-hydroxy-3-méthoxyphényle.

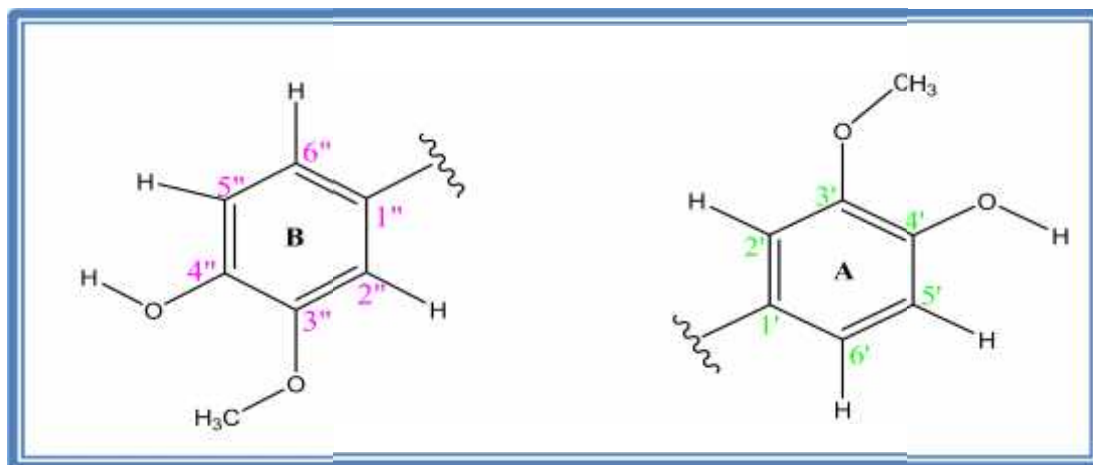


Figure III-52: Fragment 4-hydroxy-3-méthoxyphényle des cycles A et B du composé  $Pd_4$

En plus des éléments structuraux identifiés précédemment, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-53) révèle la présence de six signaux s'intégrant 1H chacun, deux sous forme de doublet sortant à  $\delta_{\text{H}}$  5.35 et 5.36 ppm, trois sous forme doublet de doubles localisés à 3.49, 4.07 et 4.36 ppm et un signal à 3.27 ppm sous forme d'un multiplet ( $m$ ). Ces valeurs de déplacements chimiques indiquent que ces protons sont engagés dans des environnements chimiques différents, ce qui se traduit par des absorptions relativement éloignées pour chaque proton sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ .

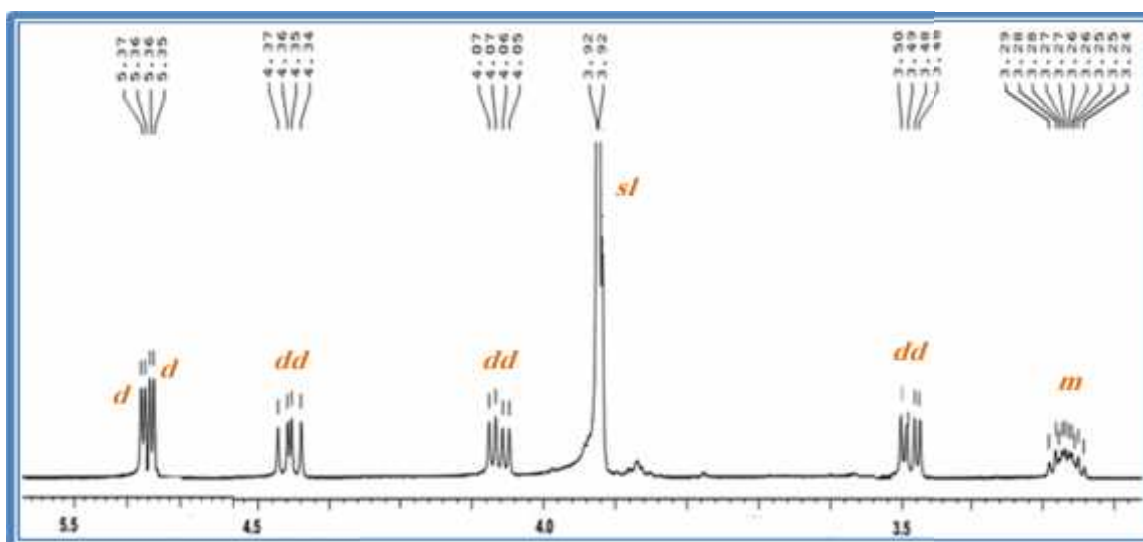


Figure III-53 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (3.20 à 5.40 ppm) du composé  $Pd_4$

L'attachement de ces protons à leurs carbones sur le spectre HSQC (Figure III-54) permet la formation de deux groupements méthines (  $^1\text{H}$  3.27/  $^{13}\text{C}$  50.1), (  $^1\text{H}$  3.49/  $^{13}\text{C}$  53.5), deux groupements oxométhines (  $^1\text{H}$  5,34/  $^{13}\text{C}$  84.8) et (  $^1\text{H}$  5.36/  $^{13}\text{C}$  83.5) et un oxométhylènes (  $^1\text{H}$  4.07 et 4.36,  $^{13}\text{C}$  72.8). Les déplacements chimiques de ces carbones et protons impliquent que ces groupements sont porteurs ou proches d'un atome d'oxygène.

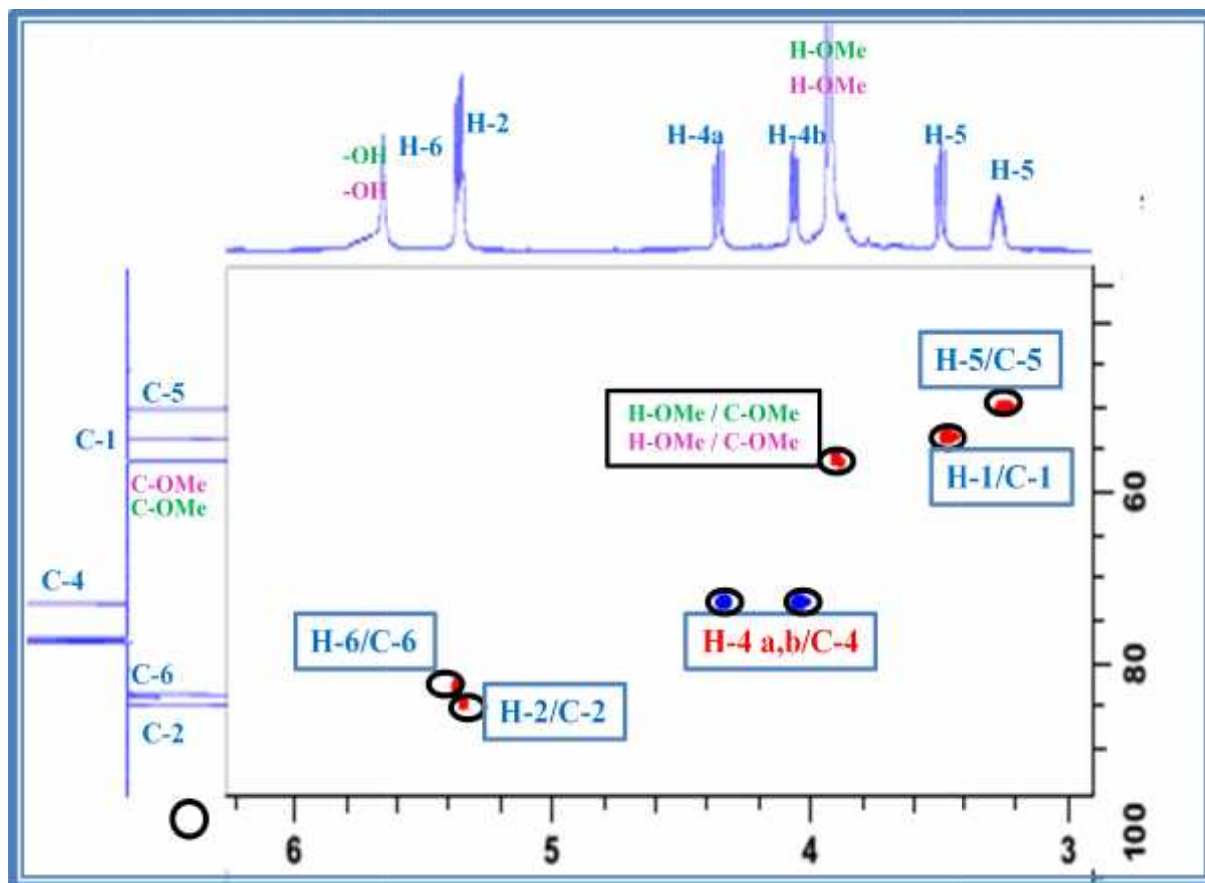


Figure III-54 : Spectre HSQC de la zone aliphatique du composé  $Pd_4$

Le spectre COSY H-H (Figure III-55) de la zone des aliphatique montre des taches de corrélations entre les protons :

- ✚ H-1 (  $^1\text{H}$  3.49, *dd*) avec les protons H-5 (  $^1\text{H}$  3.27, *m*) et H-2 (  $^1\text{H}$  5.33, *d*).
- ✚ H-5 (  $^1\text{H}$  3.27, *m*) avec les protons H-1 (  $^1\text{H}$  3.49, *dd*), H-4b (  $^1\text{H}$  4.07, *dd*), H-4a (  $^1\text{H}$  4.14, *dd*) et H-6 (  $^1\text{H}$  5.36, *d*).

Par ailleurs, il montre des corrélations attendues entre les protons géminés du groupement oxyméthylène H-4b (  $^1\text{H}$  4.07, *dd*) et H-4a (  $^1\text{H}$  4.12, *dd*).



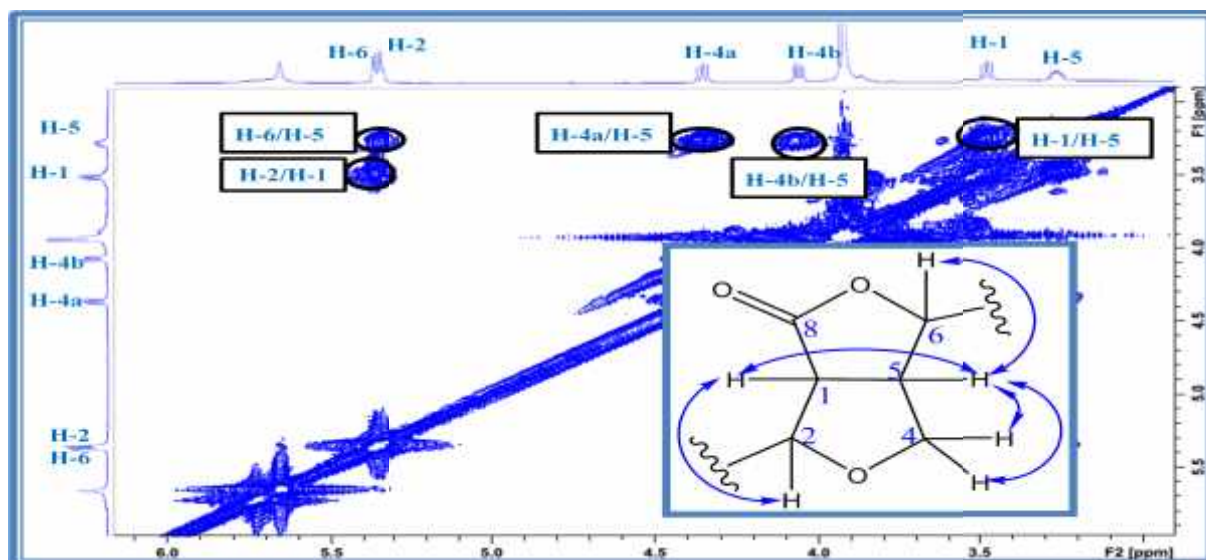


Figure III-55 : Spectre COSY entre 3.2 et 5.8 ppm du composé  $Pd_4$

Ces attributions cité précédemment sont confirmé par l'analyse HMBC qui montre des corrélations H/C en  $^2J$  et  $^3J$  (Figure III-56) en conduisant à la formation d'un squelette de type furofuranique à travers les couplages des protons:

- ✚ H-2 (  $\delta_H$  5.33, *d*) et les carbones C-4 (  $\delta_C$  72.8), C-5 (  $\delta_C$  50.1) et C-8 (  $\delta_C$  177.2).
- ✚ H-6 (  $\delta_H$  4.92, *d*) et les carbones C-1(  $\delta_C$  53.5), C-4 (  $\delta_C$  72.8) et C-8(  $\delta_C$  177.2).
- ✚ H-5 (  $\delta_H$  3.27, *dddd*) les carbones C-1(  $\delta_C$  53.5), C-4 (  $\delta_C$  72.8), C-8(  $\delta_C$  177.2).
- ✚ H-1 (  $\delta_H$  3.49, *dd*) et les carbones C-5(  $\delta_C$  50.1), C-4 (  $\delta_C$  72.8), C-8(  $\delta_C$  177.2).
- ✚ H-4b (  $\delta_H$  4.07, *dd*) et H-4a (  $\delta_H$  4.12, *dd*) avec les carbones C-1(  $\delta_C$  53.5), C-5(  $\delta_C$  50.1), C-2 (  $\delta_C$  83.5) et C-6(  $\delta_C$  84.8).

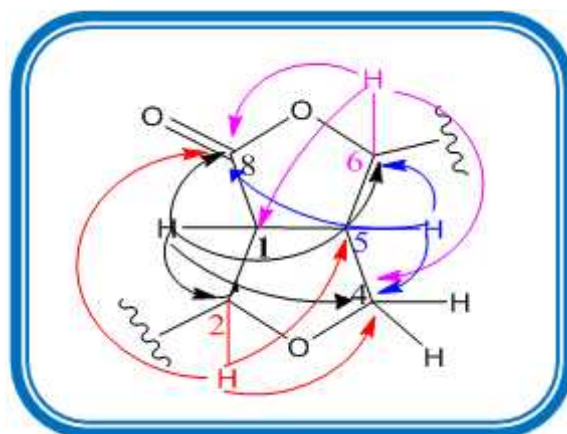


Figure III-56 : Corrélations HMBC des protons de squelette furofuranique du  $Pd_4$

A partir de toutes ces constatations, on a identifiée sans aucun doute comme étant la présence d'un dérivé du squelette furofuranique (Figure III-57).

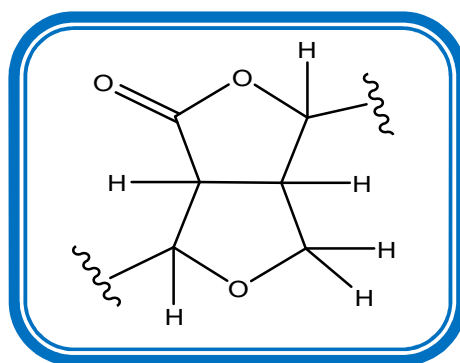


Figure III-57 : Squelette furofuranique du composé  $Pd_4$

A cette étape de l'élucidation structurale du composé  $Pd_4$ , il ne nous reste qu'à identifier les substituants attachés à ce squelette.

Le spectre HMBC (Figure III-58, III-59) montre bien la connectivité entre le cycle A (en position 1') et le carbone C-2 par la corrélation observée entre le proton oxyméthine H-2 et les carbones aromatiques C-1'', C-2'' et C-6''. De même pour le cycle B, il est visualisé également des couplages entre le deuxième proton oxyméthine H-6 et le carbone quaternaire C-1' et les carbones méthines C-2' et C-6'.

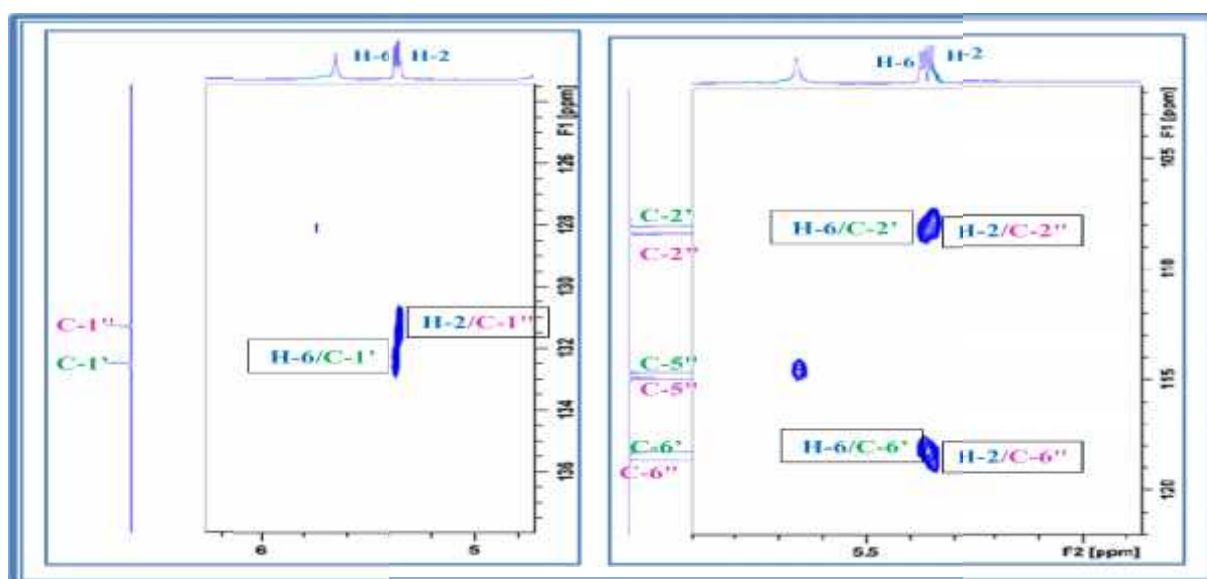
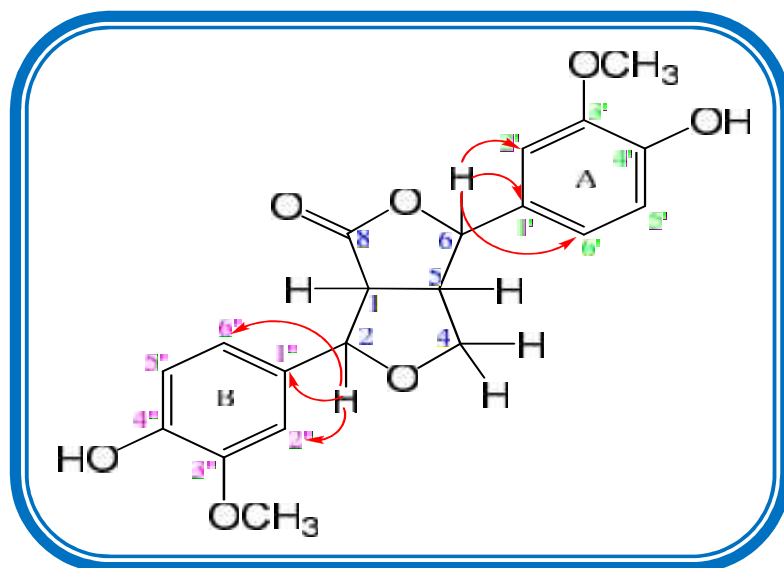
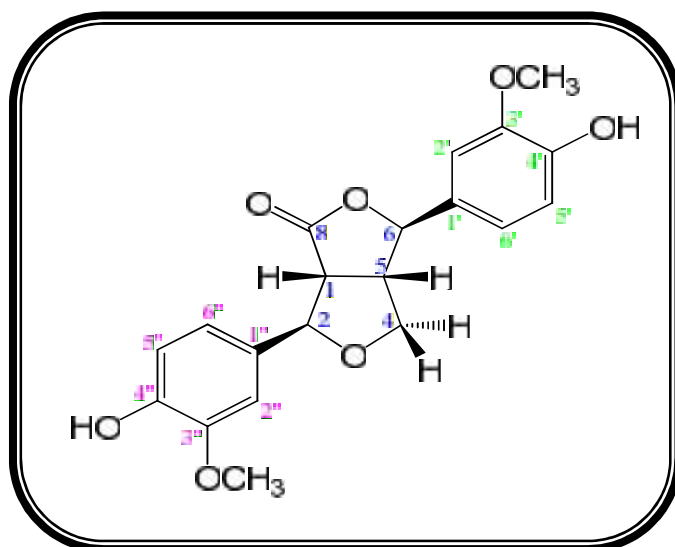


Figure III-58 : Spectre HMBC montrant les points de jonction des cycles A et B au squelette furofuranique du composé  $Pd_4$



**Figure III-59 : Corrélations HMBC montrant les points de jonction des cycles A et B du composé  $Pd_4$**

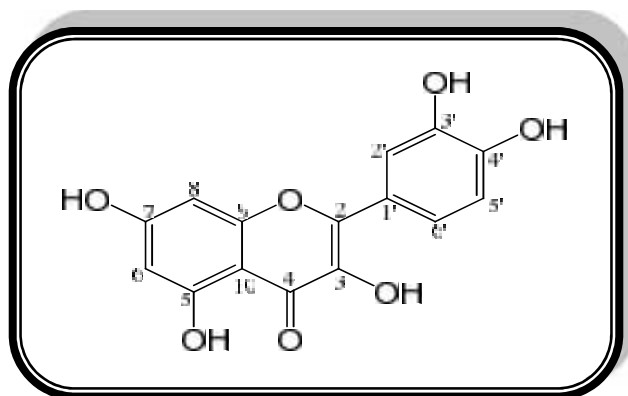
Ces données complètent les attributions déjà faites des carbones et protons du composé  $Pd_4$ . Il s'agit d'un dérivé pinoresinol. En conséquence, la configuration des quatre carbones asymétriques de ce composé est établie comme étant  $1S$ ,  $2R$ ,  $5S$  et  $6R$  par comparaison avec les données de la littérature [127]. L'ensemble des données spectrales accumulées, en plus de la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = -3.5$ ,  $c = 0.20$ , MeOH) permettent d'assigner pour le composé la structure suivante:  $1S$ ,  $5S$ ,  $2R$ ,  $6R$ -di(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7dioxabicyclo[3.3.0]octan-8-one nommé: 8-oxo-pinoresinol.



Il est à signaler que cette molécule est identifiée pour la première fois dans le genre *Pteranthus* et la famille Caryophyllaceae. Elle a été antérieurement isolée de l'espèce *Polygonum perfoliatum* L. de la famille Polygonaceae [128]. Le tableau (III-4) englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé *Pd<sub>4</sub>*.

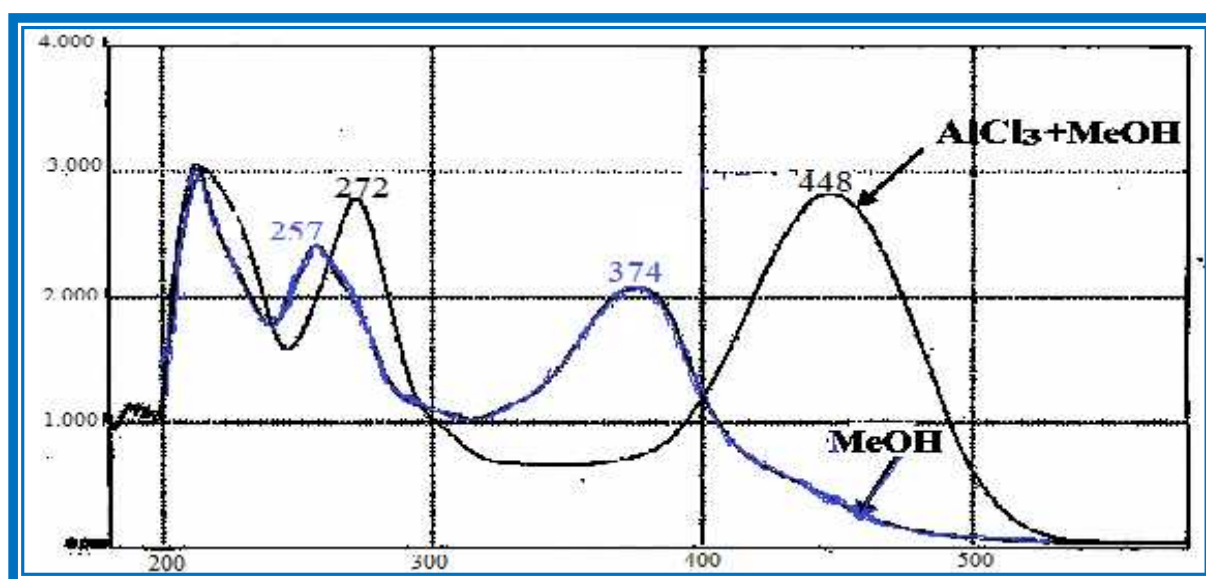
Tableau III.4 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de *Pd<sub>4</sub>* dans CDCl<sub>3</sub>

Position	C (ppm)	H (ppm) (m, J en Hz)
1	53.5	3.49 (dd, 3.0 ; 7.9)
2	83.5	5.36 (d, 3.8)
4	72.8	4.07 (dd, 4.5 ; 9.5) H-4b 4.36 (dd, 6.6 ; 9.5) H-4a
5	50.1	3.27 (m)
6	84.8	5.35 (d, 3.5)
8	177.2	-
1'	131.2	-
2'	107.9	6.81 (d, 2.0)
3'	147.1	-
4'	146.2	-
5'	114.9	6.91 (d, 6.3)
6'	118.6	6.82 (dd, 2.0; 6.3)
3'-OCH <sub>3</sub>	56.2	3.92 (s)
4 -OH	-	5.66 (sl)
1''	132.4	-
2''	108.2	6.90 (d, 1.9)
3''	146.9	-
4''	145.5	-
5''	114.6	6.93 (d, 6.4)
6''	118.2	6.88 (dd, 1.9 ; 6.4)
3''-OCH <sub>3</sub>	56.2	3.92 (s)
4''-OH	-	5.66 (sl)

III-1-3-5- Identification structurale du composé  $Pd_5$  $Pd_5$  : 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol (Quercétine)

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il donne une tache visible sur CCM à 254 et 366 nm et se colore en jaune après révélation par l'acide et chauffage à 100 °C.

L'examen du spectre UV du composé  $Pd_5$  (Figure III-60), enregistré dans MeOH permet d'observer deux bandes d'absorption à 257 nm (Bande II) et 374 nm (Bande I) indiquant la présence d'un squelette flavonique de type flavonol (OH libre en C-3). L'addition du réactif  $AlCl_3$ , conduit à l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 448 nm laissant suggérer la présence d'un flavonol avec au moins trois hydroxyles, dont deux sont *ortho* di-OH sur le cycle B et le troisième en C-5 (tableau III-5).

Figure III-60: Spectres UV du composé  $Pd_5$

L'analyse du spectre de masse effectué en ESI mode positif (Figure III-61), révèle pour le composé  $Pd_5$  les pics d'ions pseudo moléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  325 et  $[M+H]^+$  à  $m/z$  303. Ceci correspond à une masse moléculaire de 302 uma et une formule brute en  $C_{15}H_{10}O_7$ .

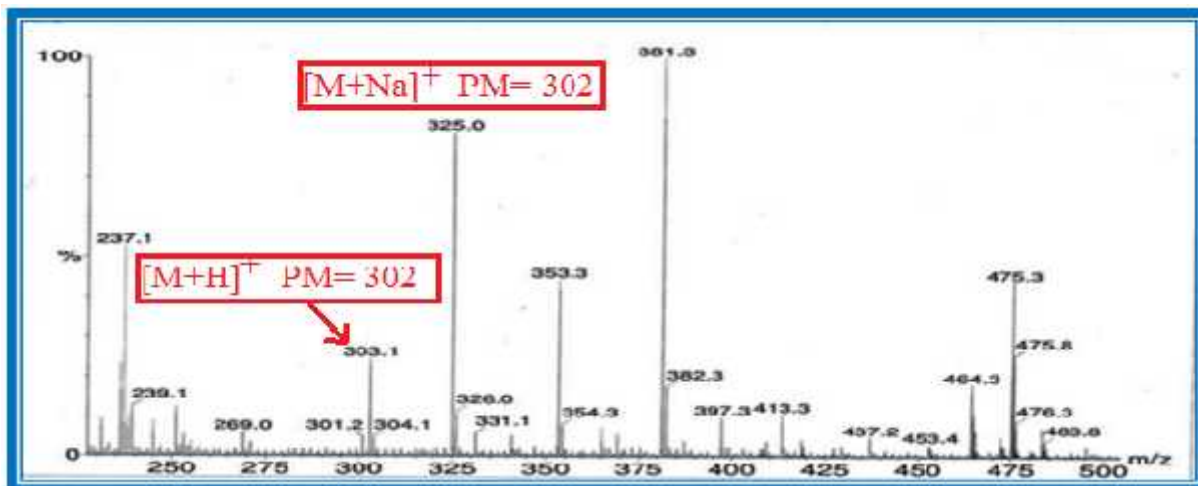


Figure III-61: Spectre de masse ESI-MS du composé  $Pd_5$

Le spectre IR (Figure III-62) du composé  $Pd_5$  montre des bandes d'absorption à  $3468\text{ cm}^{-1}$  (groupements hydroxyles),  $3144\text{ cm}^{-1}$  (CH du noyau aromatique),  $1644\text{ cm}^{-1}$  (carbonyle) et  $1614\text{ cm}^{-1}$ ,  $1512\text{ cm}^{-1}$  (cycle aromatique).

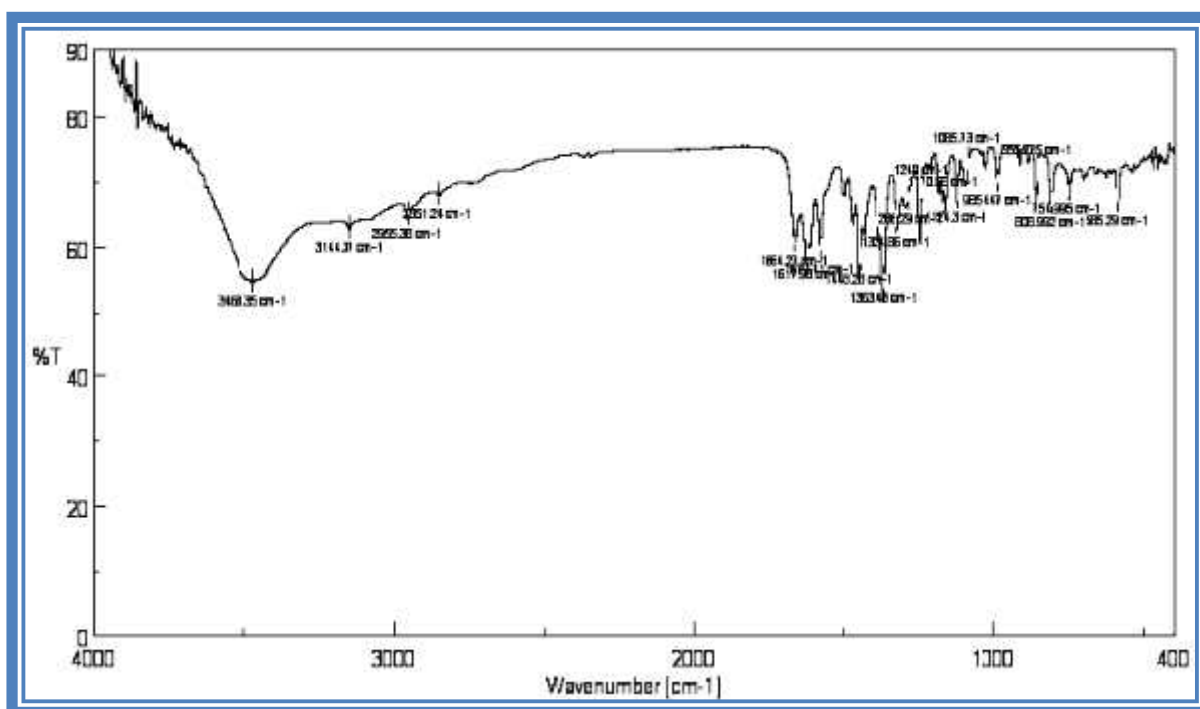


Figure III-62: Spectre de IR du composé  $Pd_5$

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-63) du composé  $Pd_5$ , il est observé :

- ▣ Deux protons aromatiques sous forme de deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  6.20 et  $\delta_{\text{H}}$  6.40 ( $J = 2$  Hz), typiques d'un couplage méta des protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde.
- ▣ Trois protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  7.75 ( $d$ ,  $J = 2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.65 ( $dd$ ,  $J = 8 ; 2$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6.9 ( $d$ ,  $J = 8$  Hz) dont les constantes de couplage indiquent qu'ils forment un système **ABX**. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5' du cycle B.

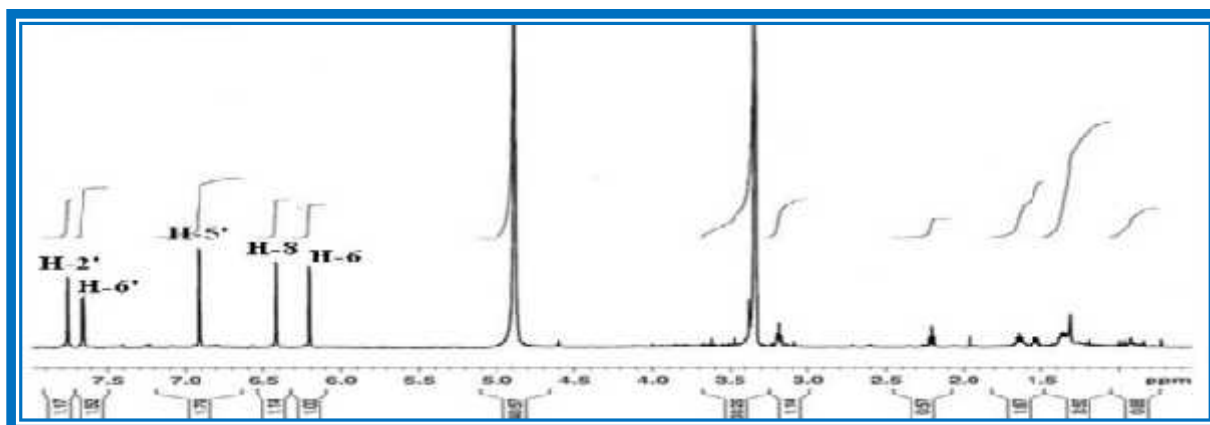


Figure III-63: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pd_5$

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $J$ -modulé du composé  $Pd_5$  (Figures III-64) présente quinze signaux distincts. Parmi ceux-ci, nous distinguons dix carbones quaternaires dont un groupement carbonyle ( $\delta_{\text{C}}$  177.5) et un carbone oxygéné C-3 caractéristique d'un flavonol ( $\delta_{\text{C}}$  137.3), et cinq CH aromatiques.

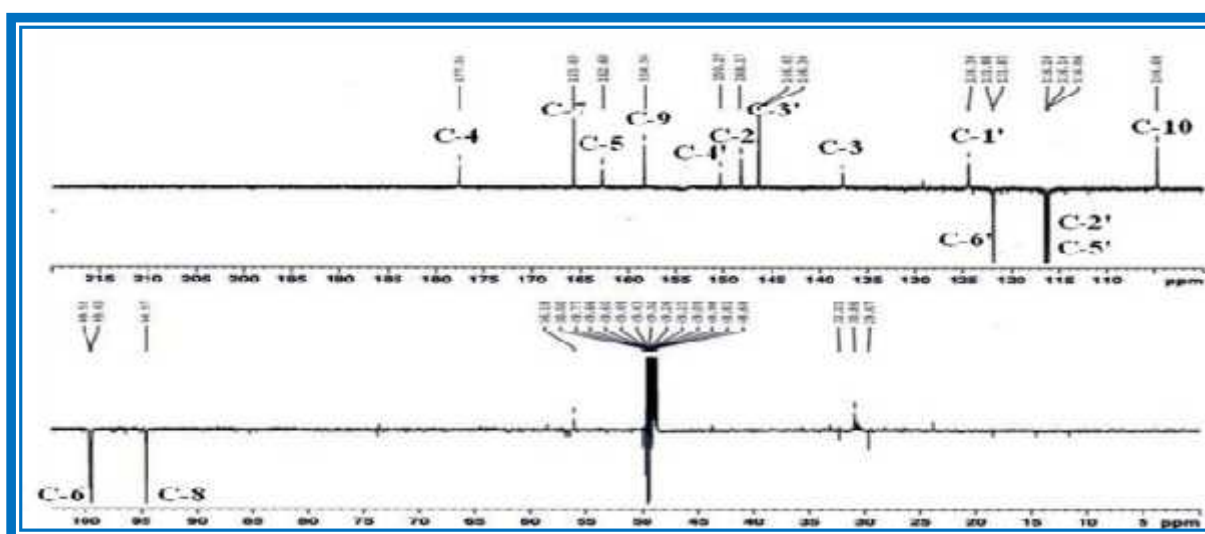
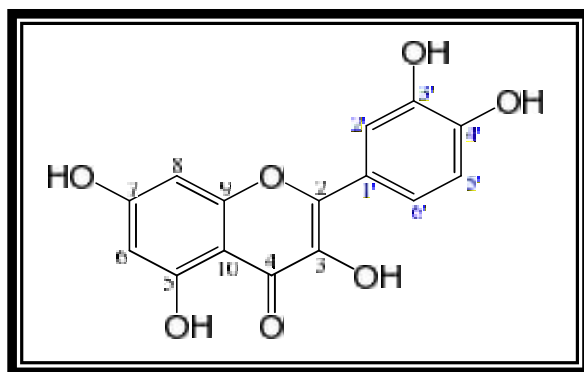


Figure III-64: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé  $Pd_5$



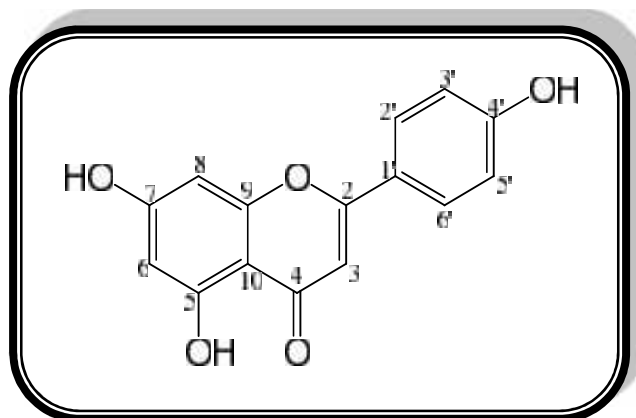
Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau III-5 ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [129] permettent d'identifier le composé  $Pd_5$  comme étant la 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol ou quercétine, isolé antérieurement de plusieurs espèces mais la première fois du genre *Pteranthus*



La quercétine est réputée pour être le plus actif des flavonoïdes. Elle possède des activités biologiques intéressantes comme anti-oxydantes [130], anti-inflammatoires [131] et anti-histaminiques [132]. Elle a aussi des effets positifs sur les capillaires et le système cardiovasculaire [133].

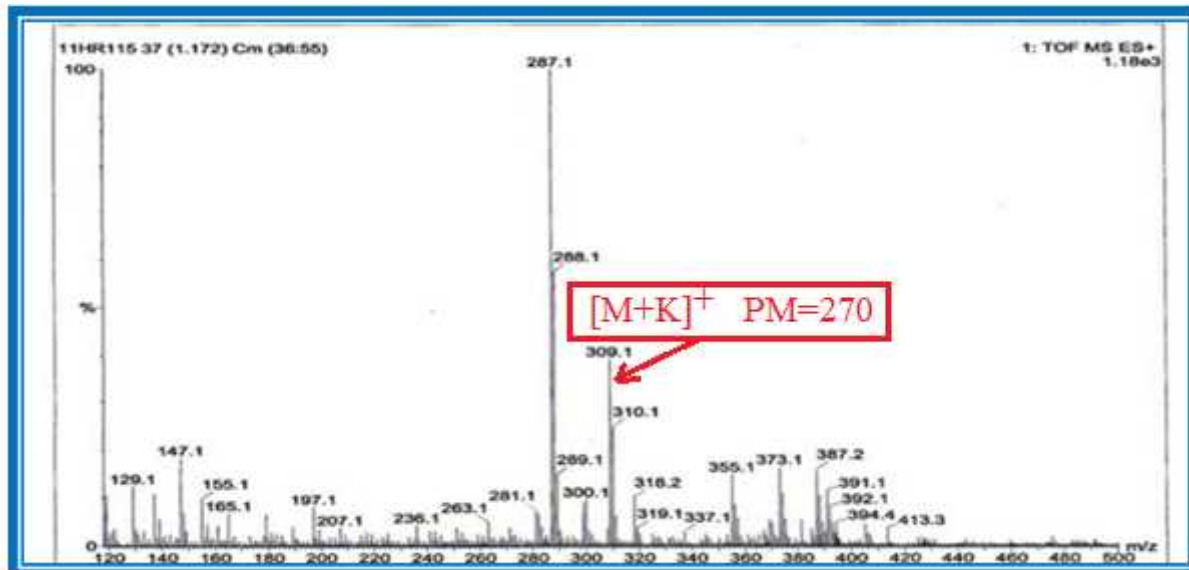
**Tableau III-5 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de  $Pd_5$  dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

Position	C (ppm)	H (ppm) (m, J en Hz)
2	148.2	-
3	137.2	-
4	177.5	-
5	162.6	-
6	99.4	6.18 (d, 2.0)
7	165.7	-
8	94.6	6.39 (d, 2.0)
9	158.4	-
10	104.7	-
1'	124.3	-
2'	116.1	7.74 (d, 2.1)
3'	146.3	-
4'	150.3	-
5'	116.1	6.88 (d, 8.3)
6'	121.8	7.62 (dd, 8.3 ; 2.1)

III-1-3-6- Identification structurale du composé  $Pd_6$  $Pd_6$  : 5,7,4'-trihydroxyflavone (Apigénine)

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, visible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en jaune après révélation par une solution d'acide et chauffage.

Le spectre de masse (Figure III-65) du composé donne un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  309  $[M+K]^+$ , correspondant à une formule brute en  $C_{15}H_{10}O_5$ .

Figure III-65 : Spectre de masse ESI-MS du composé  $Pd_6$ .

La détermination de la structure du composé  $Pd_6$  est basée principalement sur l'analyse des spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  et la comparaison avec les données de la littérature [134-135]. En effet l'analyse du spectre RMN  $^1H$  (Figure III-66) permet de visualiser:

- Deux signaux doublets s'intégrant pour deux protons chacun résonant à  $\delta_{\text{H}} 7.40$  ( $d, J = 8.8$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} 6.90$  ( $d, J = 8.8$  Hz) correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du noyau B d'un flavonoïde oxygéné en position 4'.
- Deux signaux singulets larges résonant à  $\delta_{\text{H}} 6.21$  et  $6.49$  sont attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A.
- Un signal singulet à  $\delta_{\text{H}} 6.59$  caractéristique d'un proton oléfinique H-3 d'une flavone.

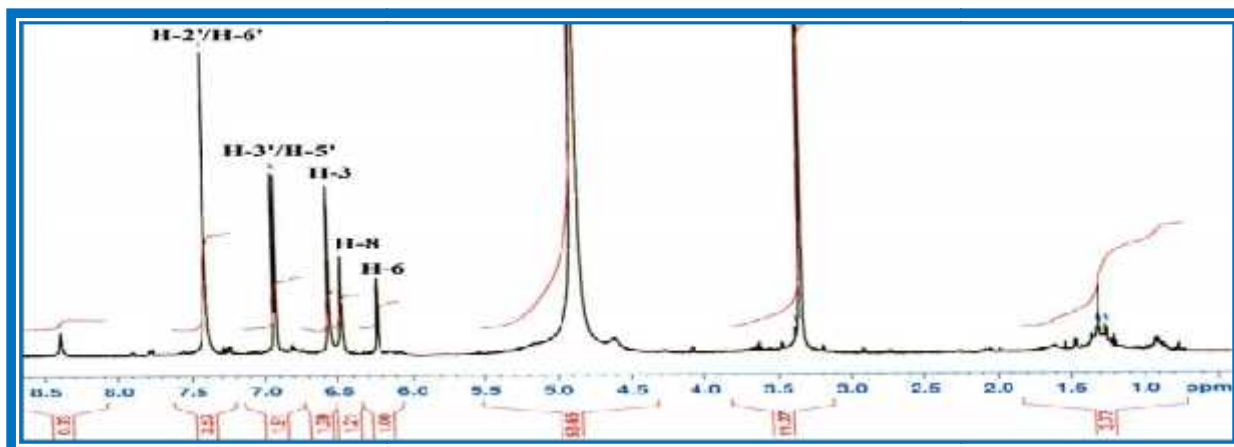


Figure III-66 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $\text{Pd}_6$

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figures III-67) montre la présence de 15 atomes de carbone incluant sept groupements CH résonant à  $\delta_{\text{C}} 102.4$  (C-3),  $98.7$  (C-6),  $93.5$  (C-8),  $127.5$  (C-2'/C-6') et  $115.3$  (C-3'/C-5'), huit carbones quaternaires résonant à  $\delta_{\text{C}} 164.6$  (C-2),  $182.48$  (C-4),  $161.81$  (C-5),  $164.9$  (C-7),  $149.5$  (C-9),  $103.9$  (C-10),  $122.3$  (C-1') et  $158$  (C-4').

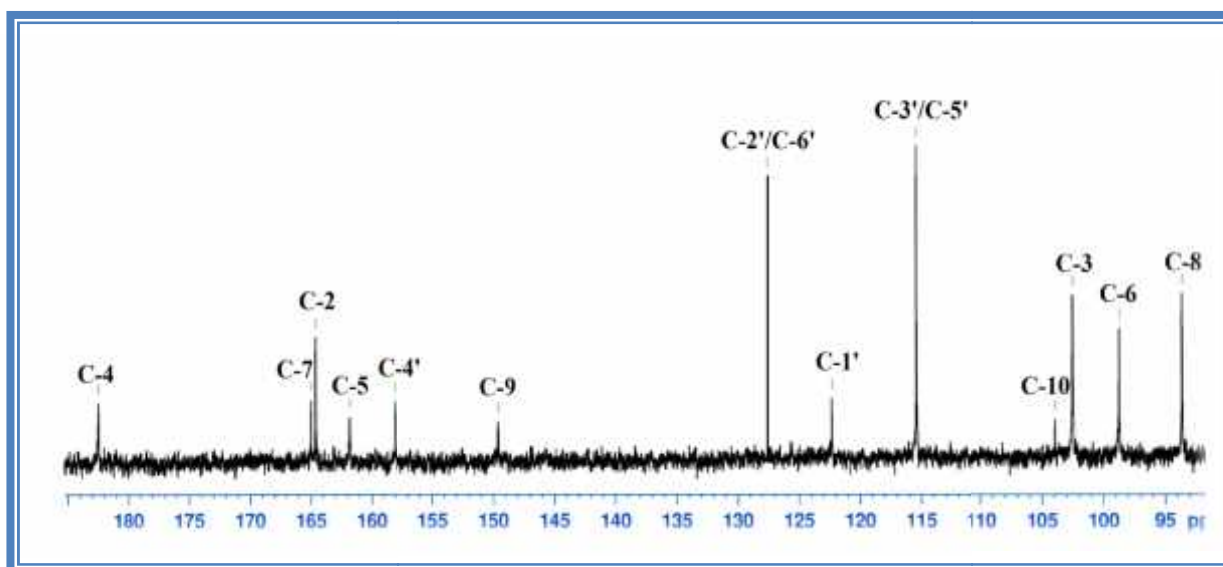
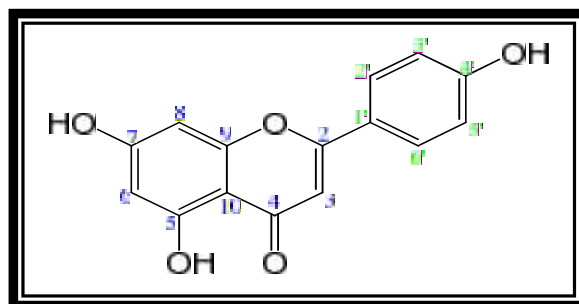


Figure III-67 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $\text{Pd}_6$

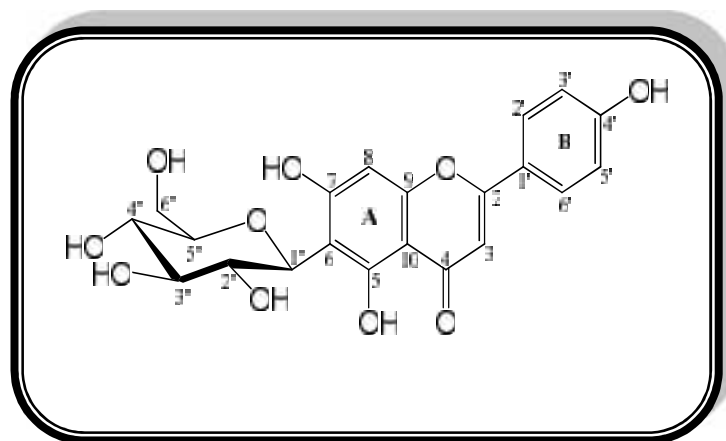
Toutes ces données spectrales, en plus de la comparaison avec la littérature [134-135] se sont avérées identiques à celles d'une flavone trihydroxylée connue sous le nom apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) Ce composé a déjà été isolé à partir de l'espèce *Dianthus versicolor* Fisch. (Caryophyllaceae) [136] et de l'espèce *Halophila johnsonii* (Hydrocharitaceae) [137]. Il a été détecté pour la première fois dans le genre *Pteranthus*.



Des études ont montré que l'apigénine agit de manière puissante dans la réduction des dommages génotoxiques induits par l'usage de médicaments anti-cancéreux, réduisant ainsi le développement de tumeurs secondaires pendant le traitement [138]. Elle possède des activités antiallergiques [139]. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé  $Pd_6$  sont représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III-3 : Déplacements chimiques en RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) du composé  $Pd_6$  dans  $CD_3OD$**

Position	C (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
2	164.6	-
3	102.4	6.59 ( <i>s</i> )
4	182.4	-
5	161.8	-
6	98.7	6.21 ( <i>sl</i> )
7	164.9	-
8	93.5	6.49 ( <i>sl</i> )
9	149.5	-
10	103.9	-
1'	122.3	-
2'	127.5	7.40 ( <i>d</i> , 8.8)
3'	115.3	6.90 ( <i>d</i> , 8.8)
4'	158.0	-
5'	115.3	6.90 ( <i>d</i> , 8.8)
6'	127.5	7.40 ( <i>d</i> , 8.8)

III-1-3-7- Identification structurale du composé  $Pd_7$ 

$Pd_7$ : 6-C- -D-glucopyranoside d'apigénine (Isovitexine)

Ce composé qui se présente sous forme d'une poudre jaune fluorescente à la lumière UV ( $\lambda = 365$  nm) et donnant une coloration jaune après révélation par une solution acide, traduit sa nature flavonoïdique.

Le spectre UV (Figure III-68) du composé  $Pd_7$  enregistré dans le méthanol montre deux maxima d'absorption : la bande I vers 332 nm correspondant au cycle B et la bande II vers 272 nm correspondant au cycle A. L'addition d' $AlCl_3$  provoque un déplacement bathochromique de 2 nm pour la bande II et de 18 nm pour la bande I. Ce déplacement traduit la présence d'une fonction -OH en C-5 du cycle A.

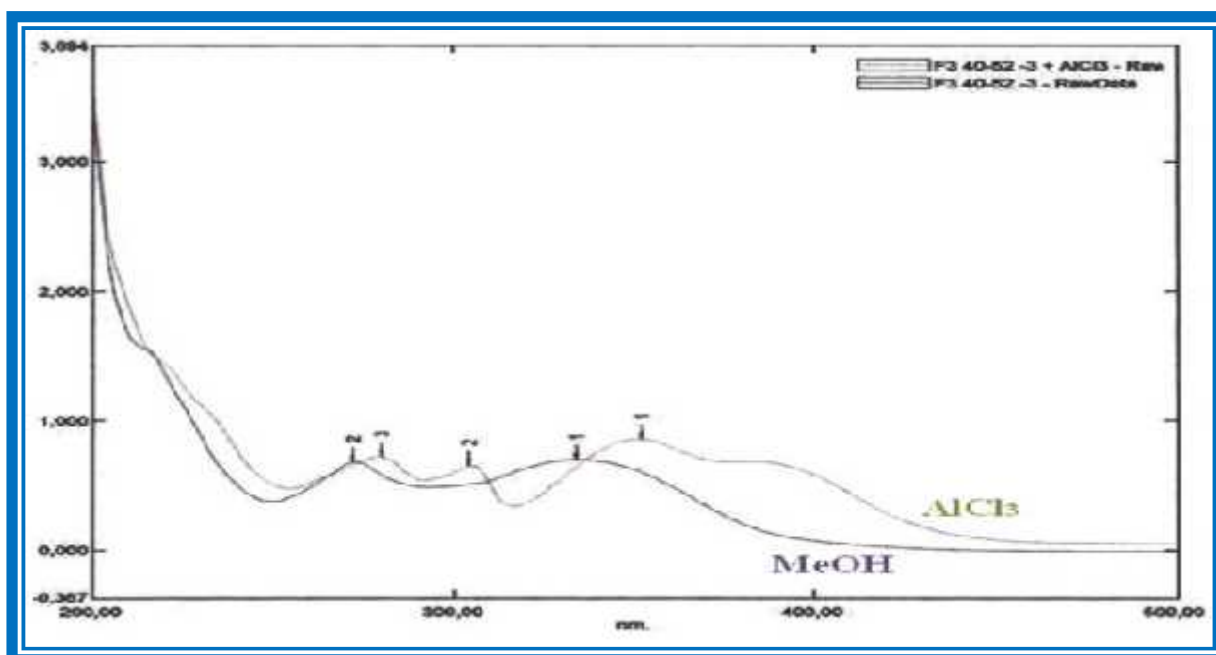
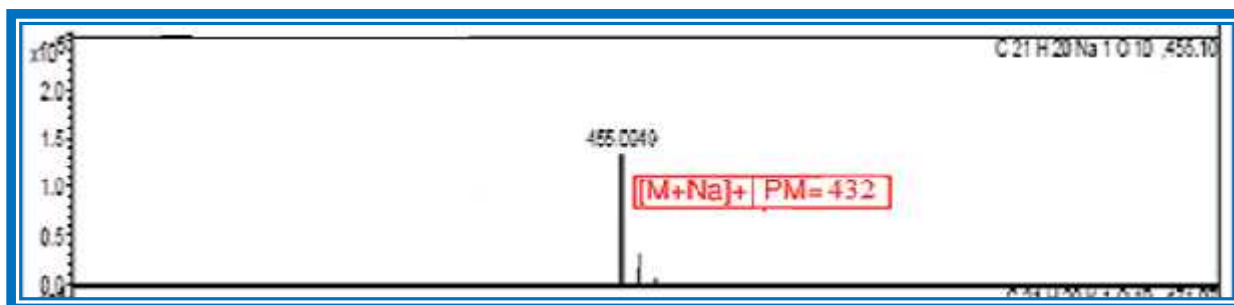


Figure III-68 : Spectre UV du composé  $Pd_7$

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III-69) de composé **Pd<sub>7</sub>** enregistré en mode positif montrent un pic d'ion pseudo-moléculaire à 455 uma  $[M+Na]^+$  soit une masse moléculaire égale à 432 uma en accord avec une formule brute en  $C_{21}H_{20}O_{10}$ .



**Figure III-69: Spectre de masse ESI-MS du composé Pd<sub>7</sub> (mode positif)**

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  *J*-modulé (Figures III- 70 et III-71) du composé **Pd<sub>7</sub>** sont très voisins de ceux du composé **Pd<sub>6</sub>**. En effet, on reconnaît tous les signaux caractéristiques des protons et carbones, à savoir:

- ✚ Deux signaux doublets s'intégrant pour deux protons chacun résonant à  $\delta_H$  7.81 (*d*,  $J = 8.5$  Hz) et  $\delta_H$  6.92 (*d*,  $J = 8.5$  Hz) correspondent aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du noyau B d'un flavonoïde oxygéné en position 4'.
- ✚ un signal singulet large (*sl*) résonant à  $\delta_H$  6.50 est attribué à proton H-8 du cycle A.
- ✚ Un signal singulet à  $\delta_H$  6.57 caractéristique d'un proton oléfinique H-3 d'une flavone.
- ✚ Sept signaux correspondant carbone des groupements CH résonant à  $\delta_C$  104.5 (C-3), 95.0 (C-8), 128.0 (C-2 /C-6) et  $\delta_C$  115.7 (C-3 /C-5),
- ✚ Neuf carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  164.7 (C-2), 182.8 (C-4), 161.5 (C-5), 164.7 (C-7), 157.5 (C-9), 103.0 (C-10), 121.5 (C-1), 110.0 (C-6) et  $\delta_C$  162.2 (C-4).

La différence notable entre les composés **Pd<sub>6</sub>** et **Pd<sub>7</sub>** apparaît clairement sur le spectre RMN  $^1H$  qui montre, pour le composé **Pd<sub>7</sub>**:

- ✚ Le signal du proton anomère H-1 d'un glucose résonant à  $\delta_H$  5.00 (*d*,  $J = 8.2$  Hz) de grande valeur de constante de couplage, indiquent qu'il est de configuration  $\beta$ . Ainsi que des signaux obtenus entre 3.10 ppm et 4.00 ppm correspondent aux protons osidiques. Tous ça est confirmé par l'analyse RMN  $^{13}C$  (Figure III-71) par la présence de six carbones osidiques sortant entre 63 et 84 ppm. On constate que la génine du composé **Pd<sub>7</sub>** correspond à l'apiginine lié par un glucose.
- ✚ On observe aussi sur le spectre RMN  $^1H$  (figure III-71) l'absence de signal qui indique le proton H-6. Le déblindage de la valeur de son carbone (+ 12 ppm) Par

comparaison avec la valeur RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $\text{Pd}_6$  confirme la substitution du glucose en position C-6 du cycle A. Le déplacement chimique des carbones anomériques C-1'' déterminé à  $\delta$  72.2 atteste que cette flavone est l'apigénine C-glycosylée en positions C-6 [135].

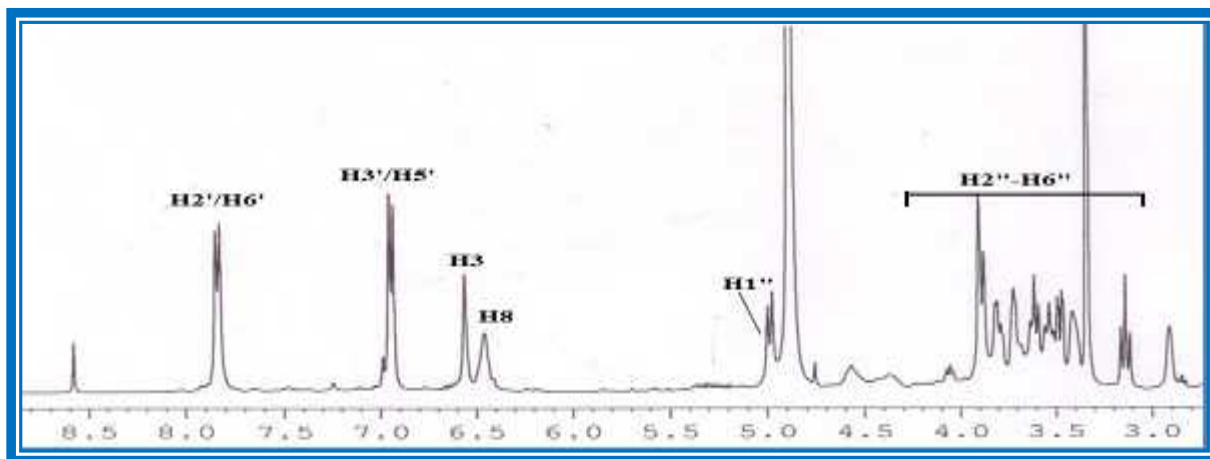


Figure III-70 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $\text{Pd}_7$

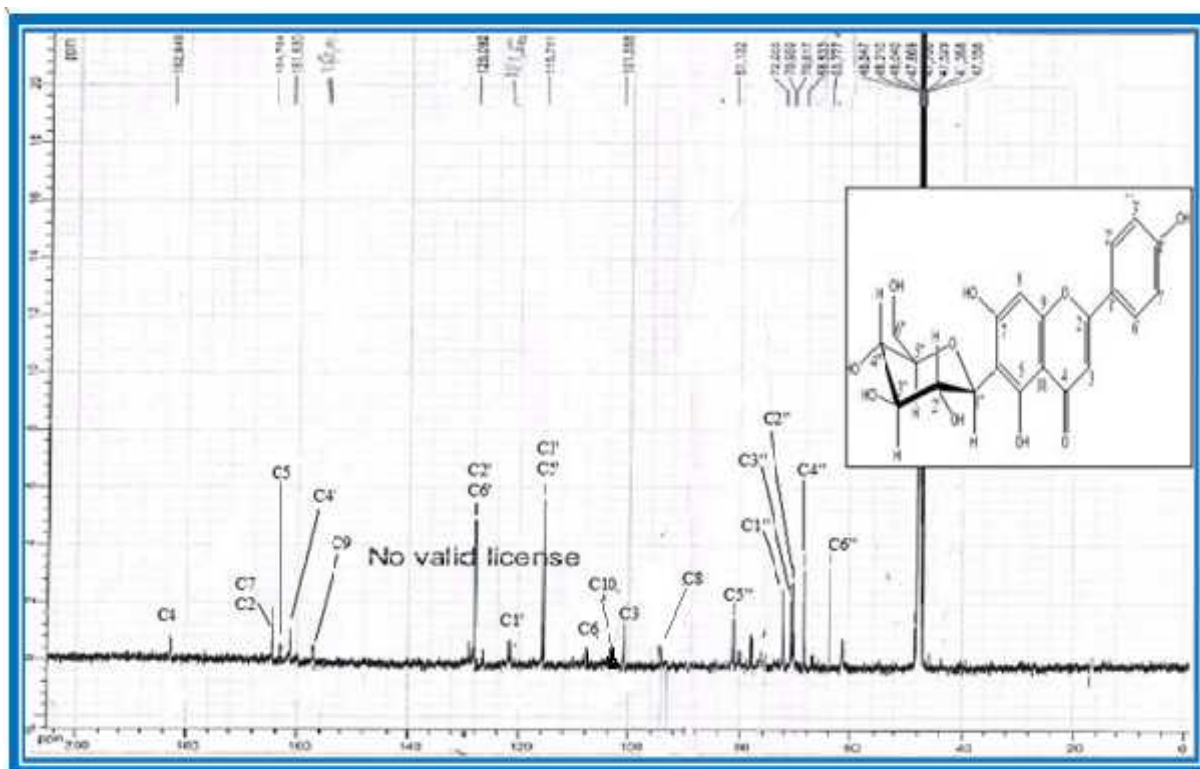
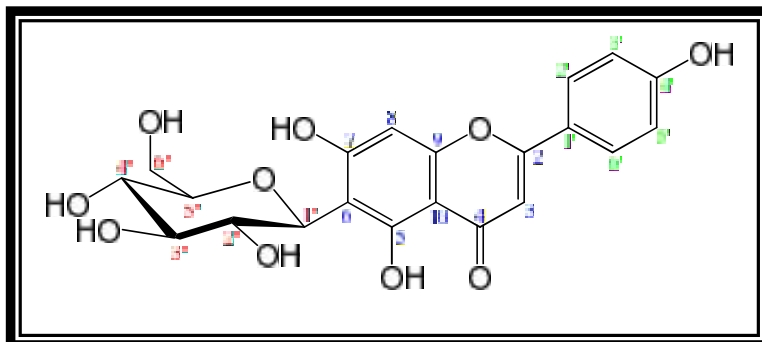


Figure III-71 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $\text{Pd}_7$

La détermination de structure du composé  $\text{Pd}_7$  est basée sur les données d'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , le spectre de masse ESI-MS et surtout sur la comparaison avec



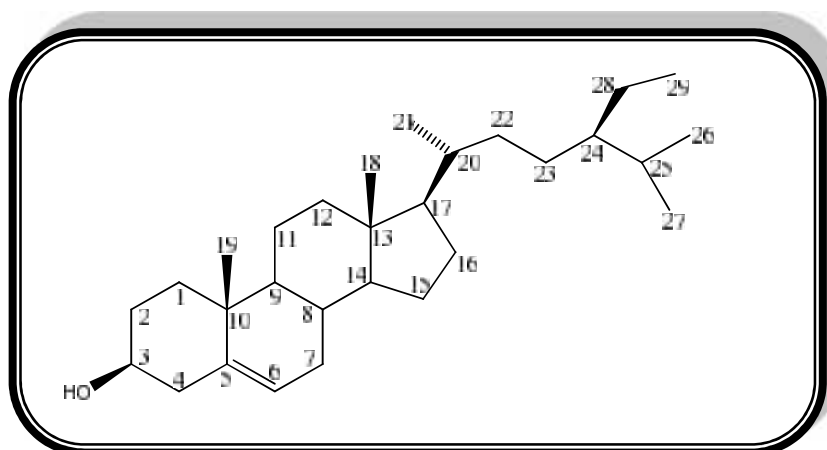
celles de la littérature [136,140] indique que ce composé correspond au 6-C- -D-glucopyranoside d'apigénine, encore appelé isovitexine.



Ce composé a été préalablement isolé de *Vitex lucens* et *Patrinia villosa* [140]. Il est isolé précédemment de la famille Caryophyllaceae de l'espèce *Dianthus versicolor* Fisch. [136] mais c'est la première fois pour le genre *Pteranthus*.

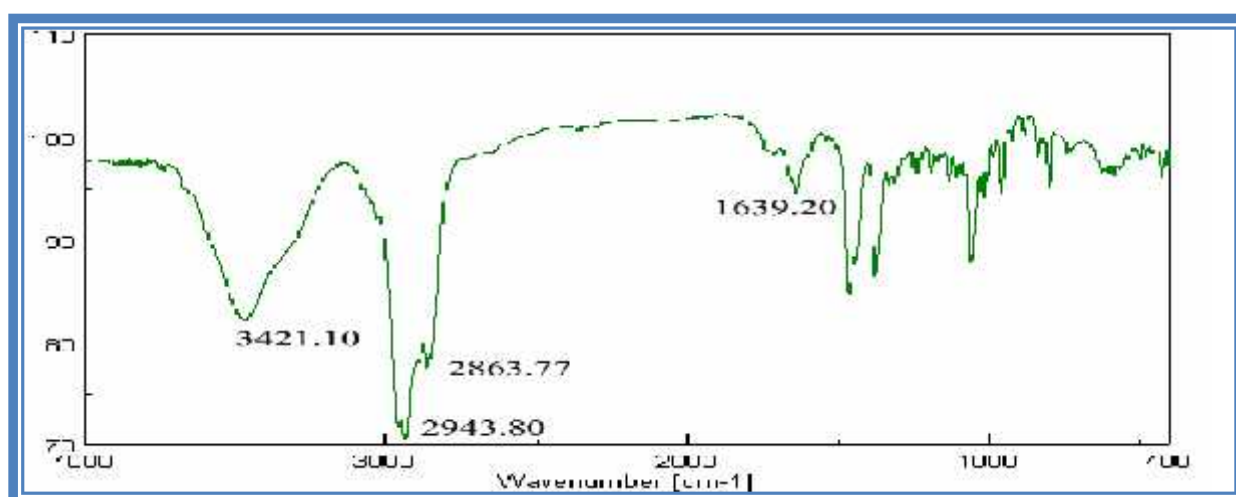
Tableau III-7: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (500 MHz) du composé  $Pd_7$  dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Position	C (ppm)	H (m, J en Hz)
2	164.7	-
3	101.5	6.57 (s)
4	182.8	-
5	161.5	-
6	110.0	-
7	164.7	-
8	95.0	6.50 (s)
9	157.5	-
10	103.0	-
1'	121.5	-
2'	128.0	7.81 (d, 8.5)
3'	115.7	6.92 (d, 8.5)
4'	162.0	-
5'	115.7	6.92 (d, 8.5)
6'	128.0	7.81 (d, 8.5)
<b>6-C-glu</b>		
1''	72.2	5.00 (d, 8.2)
2''	70.6	3.90 (t, 8.2)
3''	70.9	3.55 (t, 8.2)
4''	68.5	3.57 (t, 8.2)
5''	81.1	3.48 (m)
6''	63.7	3.84 (dd, 12.2 ; 3.7) H-6''b 3.90 (dd, 12.2 ; 2.4) H-6''a

III-1-3-8- Identification structurale du composé  $Pd_8$  $Pd_8$ : 24-éthylcholest-5-èn-3-ol ( -sitostérol).

Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. Il prend une coloration rose après révélation en CCM par l'acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre IR (Figure III-72) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyle ( $3421.10\text{ cm}^{-1}$ ), oléfinique ( $1639.20\text{ cm}^{-1}$ ) et des bandes d'absorption des liaisons C-H aliphatiques à  $2943.80$  et  $2863.77\text{ cm}^{-1}$ .

Figure III-72: Spectre IR du composé  $Pd_8$ 

Les spectres de masse du composé  $Pd_8$  obtenus en ionisation douce par ESI-MS (Electrospray) en mode positif (Figure III-73) à  $437\text{ uma } [M+Na]^+$  et en mode négatif (Figure III-73) à  $413\text{ uma } [M-H]^-$ , donnent une masse moléculaire égale à  $414\text{ uma}$  en accord avec une formule brute  $C_{29}H_{50}O$ .

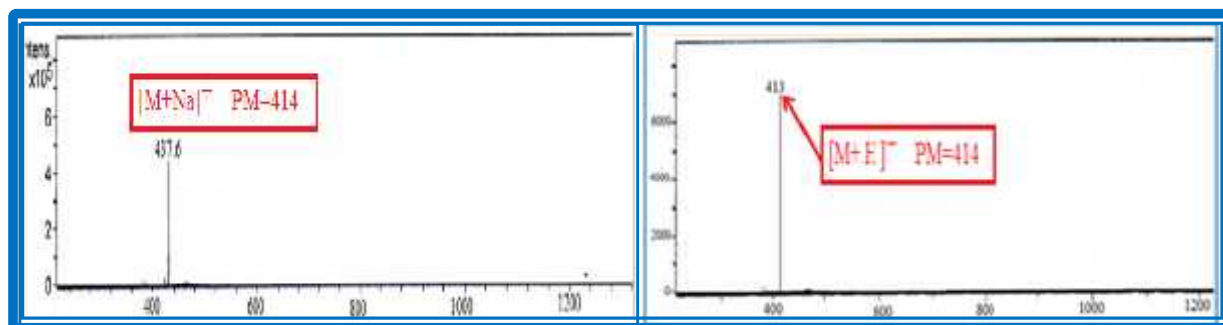


Figure III-73: Spectres de masse ESI-MS (modes positif et négatif) du composé  $Pd_8$

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III-74) du composé  $Pd_8$  montre la présence de :

- Six signaux à haut champ correspondant à six groupements méthyliques sous forme singulet, doublet et triplet repérés à : 0.74 (s, CH<sub>3</sub>-18), 1.06 (s, CH<sub>3</sub>-19), 0.97 (d,  $J = 6.5$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 0.86 (d,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-26), 0.86 (d,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-27), 0.90 (t,  $J = 7.6$  Hz, CH<sub>3</sub>-29).
- Un signal attribuable au proton H-3 à 3.6 ppm sous forme d'un triplet de triplets (tt,  $J = 11.3 ; 4.3$  Hz).
- Un signal de proton oléfinique à 5.41 (1H, dd,  $J = 5.2 ; 2.3$  Hz).

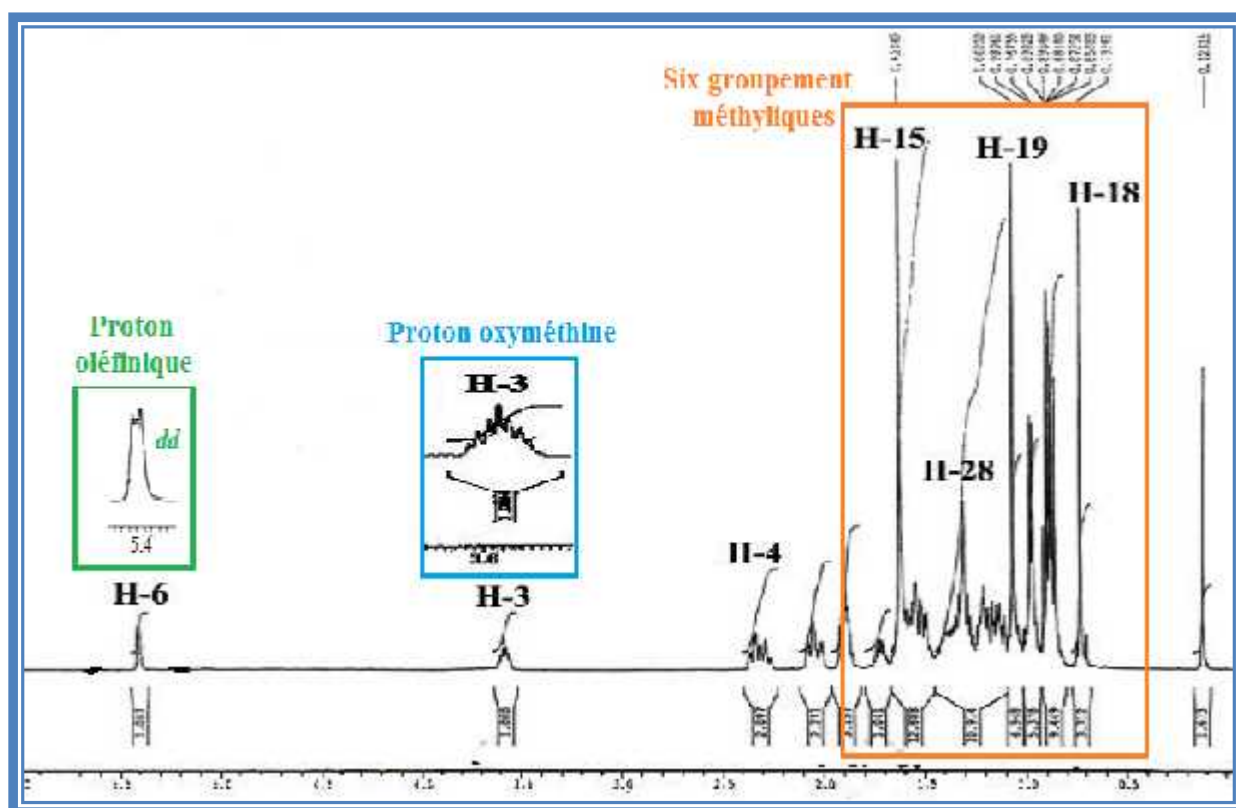


Figure III-74 : Spectre RMN  $^1H$  du composé  $Pd_8$

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-75) présente 27 signaux correspondant à 29 atomes de carbone confirmant ainsi la nature stéroïdique de ce composé avec :

- Six carbones méthyliques résonant à  $\delta$  11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 18.8 (C-21), 19.9 (C-26), 19.0 (C-27) et 12.0 (C-29).
- Un carbone oxyméthine à 71.7 ppm attribuable au carbone C-3.
- Deux carbones oléfiniques, l'un quaternaire sortant à 140.5 ppm et l'autre méthine CH ( $\text{sp}^2$ ) résonant à 121.7 ppm.

Tous les signaux des analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont caractéristiques d'un phytostérol.

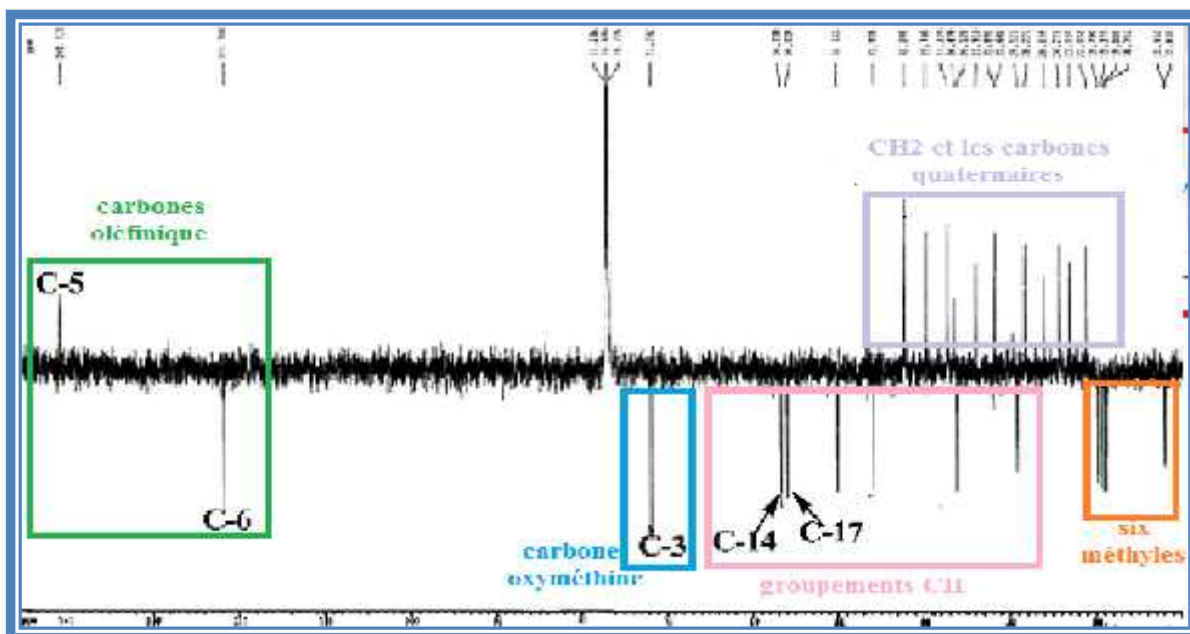


Figure III-75 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé  $Pd_8$

L'analyse du spectre COSY (Figure III-76) permet de visualiser les couplages entre :

- Le proton H-3 (3.6 ppm) et les protons H-2a (1.88 ppm) et H-2b (1.56 ppm) et les protons H<sub>2</sub>-4 (2.34, *m* ; 2.28, *m*).
- Le proton H-6 (5.41 ppm) et les protons H<sub>2</sub>-7 (2.03, *m* ; 1.57, *m*) et le proton H-4b (2.28, *m*).
- Les protons du groupement méthyle Me-21 (0.97, *d*,  $J = 6.5$  Hz) et le proton H-20 (1.4, *m*).
- Les protons des groupements méthyles Me-26 (0.87, *d*,  $J = 6.8$  Hz) et Me-27 (0.86, *d*,  $J = 6.8$  Hz) et le proton H-25 (1.72, *m*).

Les protons du groupement méthyle Me-29 (0.9, *t*,  $J = 7.6$  Hz) et le proton H-28 (1.30, *m*) (Figures III-76 et III-77).

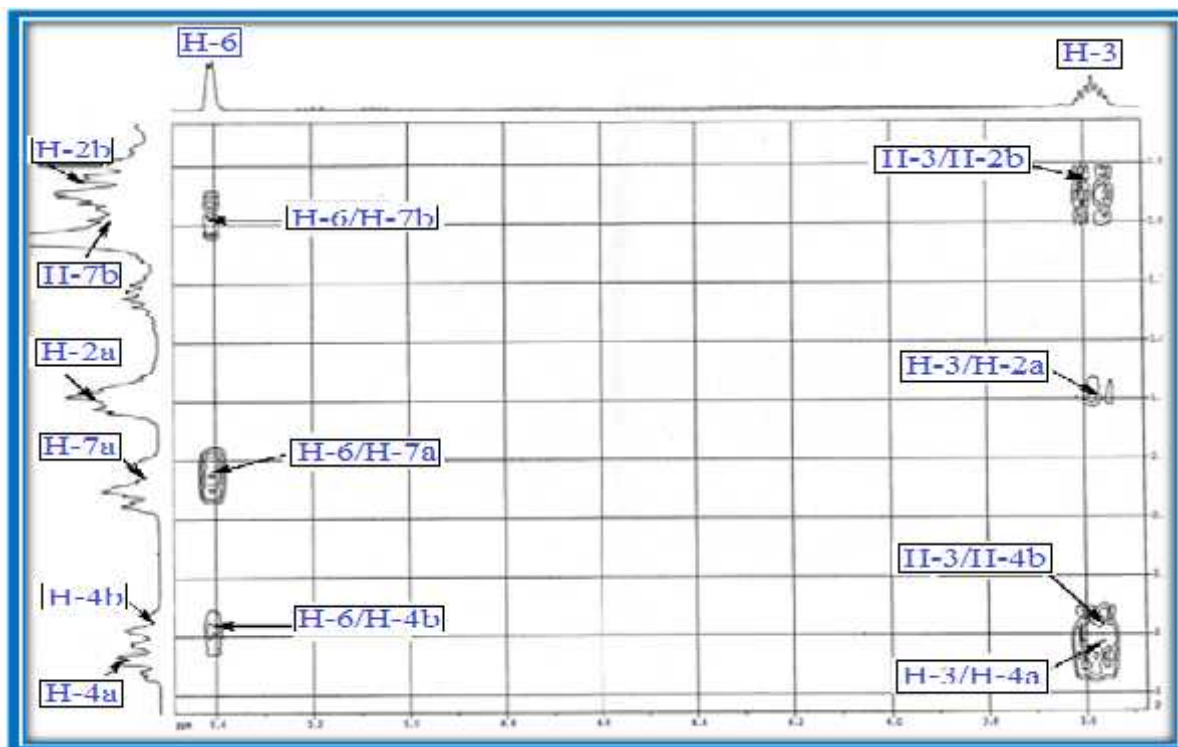


Figure III-76: Spectre COSY H-H du composé  $Pd_8$

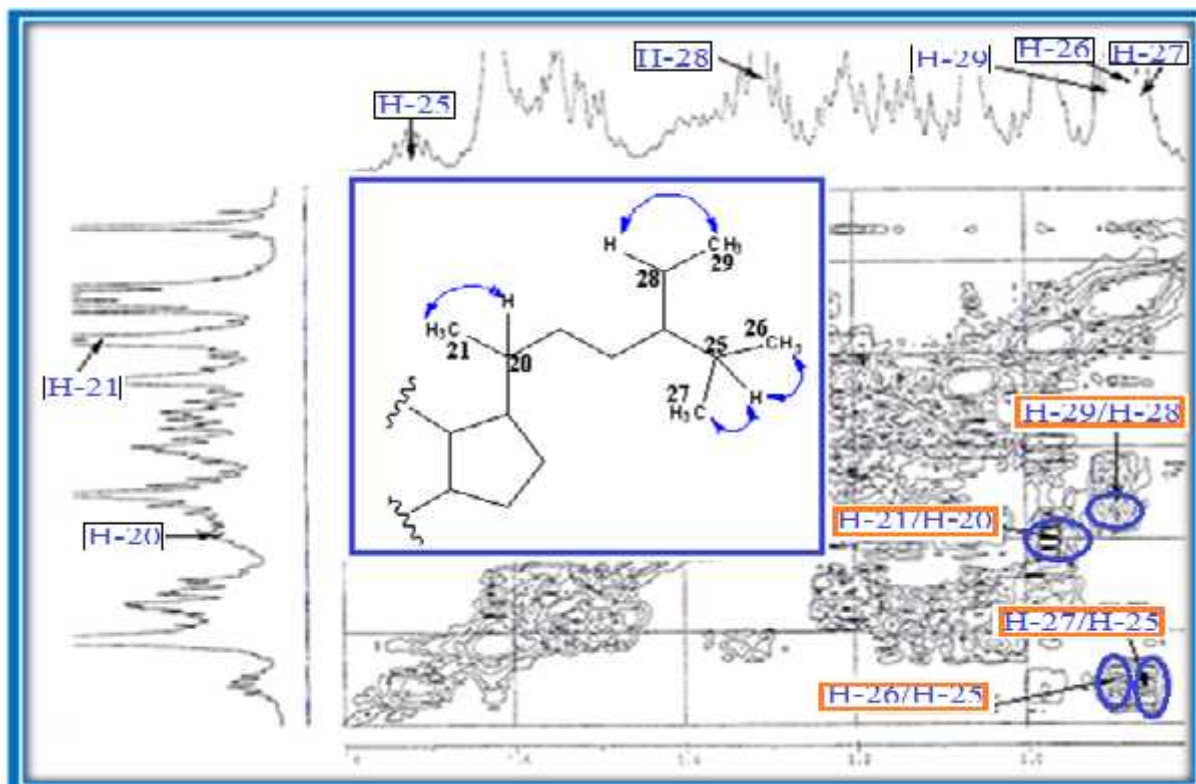


Figure III-77 : Corrélations COSY de la chaîne latérale

A partir des protons identifiés par expérience COSY H-H, l'expérience HSQC *J*-modulé permet l'identification directe des carbones qui les portent. Il est ainsi observé les différents couplages en  $^1J_{C-H}$  entre (Figures III-78):

- ▣ Les protons méthyliques H-21 et leur carbone C-21 (18.7 ppm).
- ▣ Les protons méthyliques H-27 et leur carbone C-27 (19.0 ppm).
- ▣ Les protons méthyliques H-26 et leur carbone C-26 (19.8 ppm).
- ▣ Les protons méthyliques H-29 et leur carbone C-29 (11.9 ppm).
- ▣ Le proton H-3 et son carbone C-3 (71.7 ppm).
- ▣ Le proton oléfinique H-6 et son carbone C-6 (121.7 ppm).

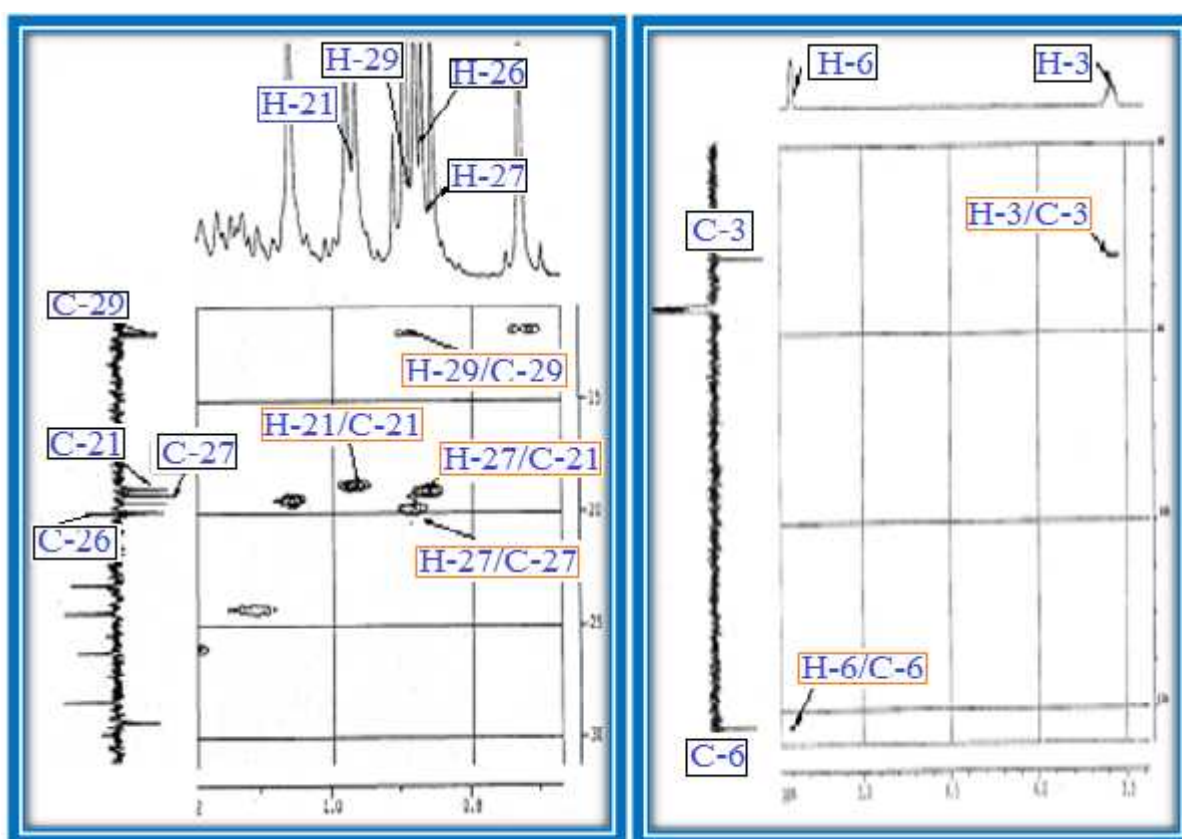


Figure III-78 : Spectres HSQC *J*-modulé du composé  $Pd_8$

L'expérience HMBC (Figure III-79) permet d'observer les corrélations à longue distance en  $^2J$  et  $^3J$  entre (Figure III-80) :

- ▣ Les protons du méthyle Me-19 et les carbones: C-10 (36.5 ppm), C-1 (37.2 ppm), C-9 (50.1 ppm) et le carbone oléfinique quaternaire C-5 résonant à 140.7 ppm.



- ✚ Les protons du méthyle Me-18 et les carbones: C-12 (39.7 ppm), C-13 (42.3 ppm) et C-14 (56.7 ppm).
- ✚ Les protons du méthyle Me-21 et les carbones: C-22 (33.9 ppm), C-20 (36.1 ppm) et C-17 (56.0 ppm).
- ✚ Les protons des groupements méthyles Me-26 et Me-27 et les carbones: C-25 (29.1 ppm) et C-24 (45.8 ppm).
- ✚ Le proton oléfinique H-6 et les carbones: C-7 (31.9 ppm), C-10 (36.5 ppm) et C-4 (42.3 ppm).
- ✚ Le proton H-4a et le carbone oléfinique quaternaire C-5 (140.7 ppm).

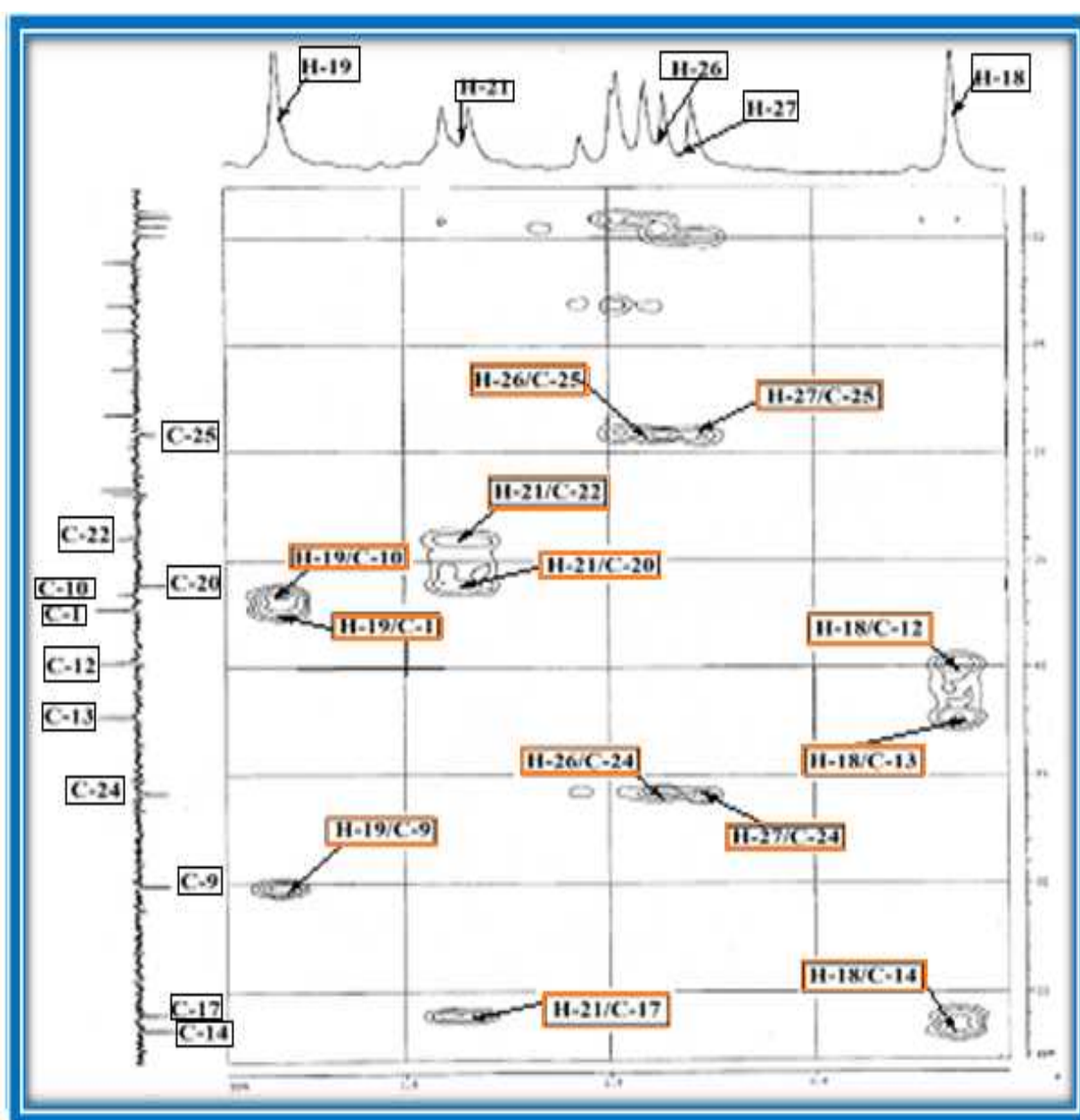


Figure III- 79 : Spectre des corrélations en HMBC du composé  $Pd_8$



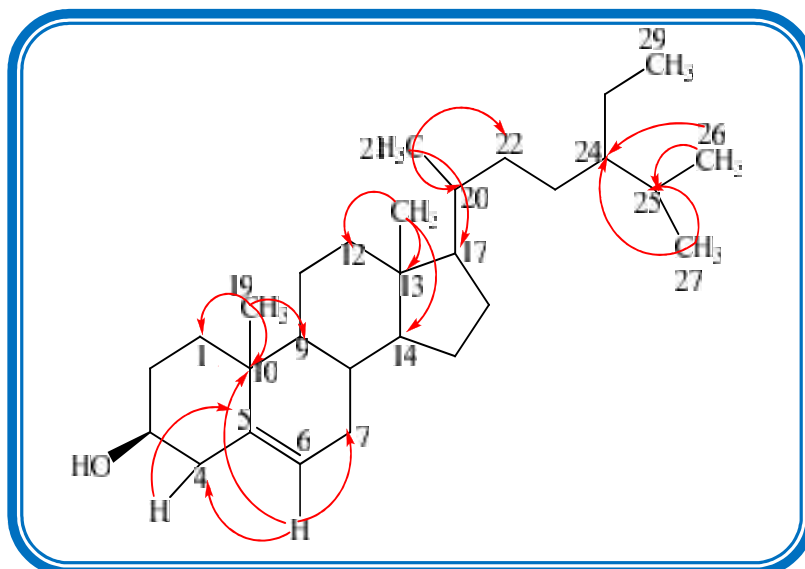
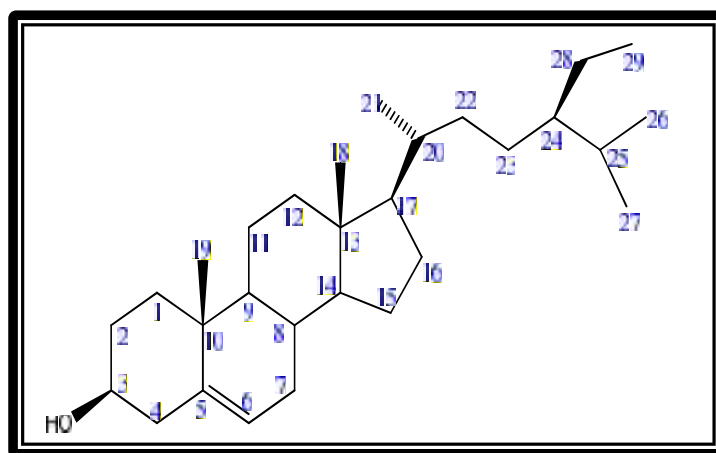


Figure III-80 : Corrélations en HMBC du composé  $Pd_8$

Toutes ces données spectrales (tableau III-8), la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -30^\circ$  (c 0,80 g/100 ml,  $CHCl_3$ ) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [141] permettent d'attribuer pour le composé  $Pd_8$  la structure du 24-éthylcholest-5-èn-3-ol et nommé aussi  $\beta$ -sitostérol.



Ce composé est considéré comme un métabolite secondaire commun dans toutes les plantes supérieures du règne végétal. Plusieurs études ont été réalisées sur l'intérêt pharmacologique du  $\beta$ -sitostérol, elles ont montré qu'il présente des propriétés très variées en citant: antinéoplasique, anti-inflammatoire et anti-pyrétique [142].

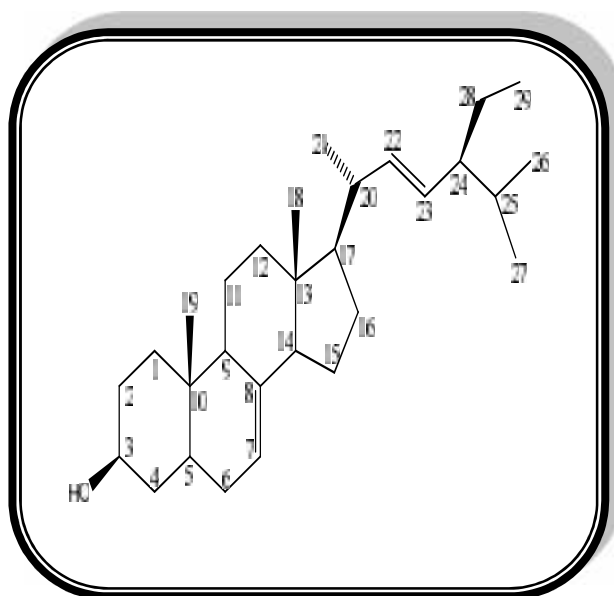
A l'issue de cette analyse tous les protons et carbones du composé  $Pd_8$  sont identifiés, leurs déplacements chimiques sont mentionnés dans le tableau III-10.

Tableau III-8 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de  $Pd_8$  dans  $\text{CDCl}_3$ 

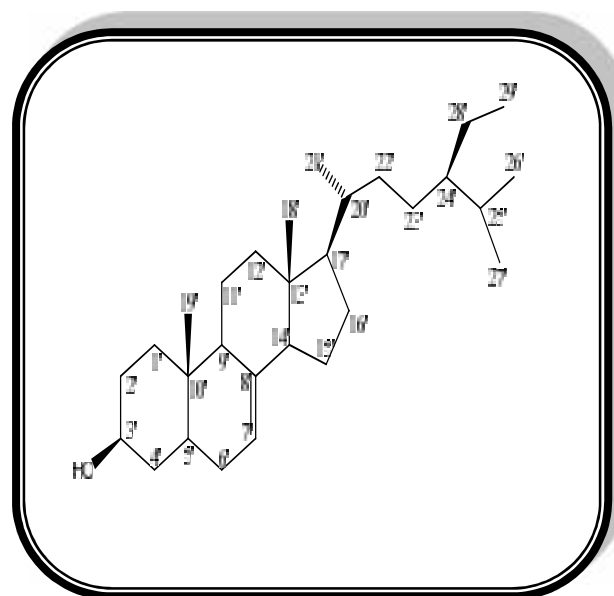
Position	c (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	37.2	1.91 ( <i>m</i> ) H-1a 1.13 ( <i>m</i> ) H-1b
2	31.6	1.88 ( <i>m</i> ) H-2a 1.56 ( <i>m</i> ) H-2b
3	71.7	3.6 ( <i>tt</i> , 11.3 ; 4.3)
4	42.3	2.34 ( <i>m</i> ) H-4a 2.28 ( <i>m</i> ) H-4b
5	140.7	-
6	121.7	5.41 ( <i>dd</i> , 5.2 ; 2.3)
7	31.9	2.03 ( <i>m</i> ) H-7a 1.57 ( <i>m</i> ) H-7b
8	31.9	1.51 ( <i>dd</i> , 11.2 ; 4.3)
9	50.1	0.96 ( <i>m</i> )
10	36.5	-
11	21.1	1.55 ( <i>m</i> ) H-11a 1.49 ( <i>m</i> ) H-11b
12	39.7	2.06 ( <i>dt</i> , 12.7 ; 3.6) H-12a 1.20 ( <i>m</i> ) H-12b
13	42.3	-
14	56.7	1.03 ( <i>m</i> ) H-14
15	24.3	1.63 ( <i>m</i> ) H-15a 1.12 ( <i>m</i> ) H-15b
16	28.2	1.90 ( <i>m</i> ) H-16a 1.30 ( <i>m</i> ) H-16b
17	56.0	1.14 ( <i>t</i> , 5.4)
18	11.8	0.74 ( <i>s</i> )
19	19.4	1.06 ( <i>s</i> )
20	36.1	1.40 ( <i>m</i> )
21	18.7	0.97 ( <i>d</i> , 6.5)
22	33.9	1.36 ( <i>m</i> ) H-22a 1.06 ( <i>m</i> ) H-22b

23	26.0	1.21 (m)
24	45.8	0.97 (m)
25	29.1	1.72(m)
26	19.8	0.87 (d, 6.8)
27	19.0	0.86 (d, 6.8)
28	23.0	1.30 (m)
29	11.9	0.9 (t, 7.6)

### III-1-3-9- Identification structurale des composés $Pd_9$ et $Pd_{10}$



$Pd_9$  : Spinasterol



$Pd_{10}$  : Stigmat-7-en-3-ol

Le mélange des composés  $Pd_9$  et  $Pd_{10}$ , a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme, invisible à la lumière UV à 254 et 366 nm. La CCM de ce composé donne une coloration marron après révélation par une solution d'acide et chauffage.

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS (figure III-81) montre un ion moléculaire à 412.3737 uma  $[M]^+$  qui correspondant à la formule brute  $C_{29}H_{48}O$  du composé majoritaire  $Pd_9$  et un autre ion moléculaire à  $m/z$  414.3870  $[M]^+$  correspondant à la formule brute en  $C_{29}H_{50}O$  du composé minoritaire  $Pd_{10}$ .

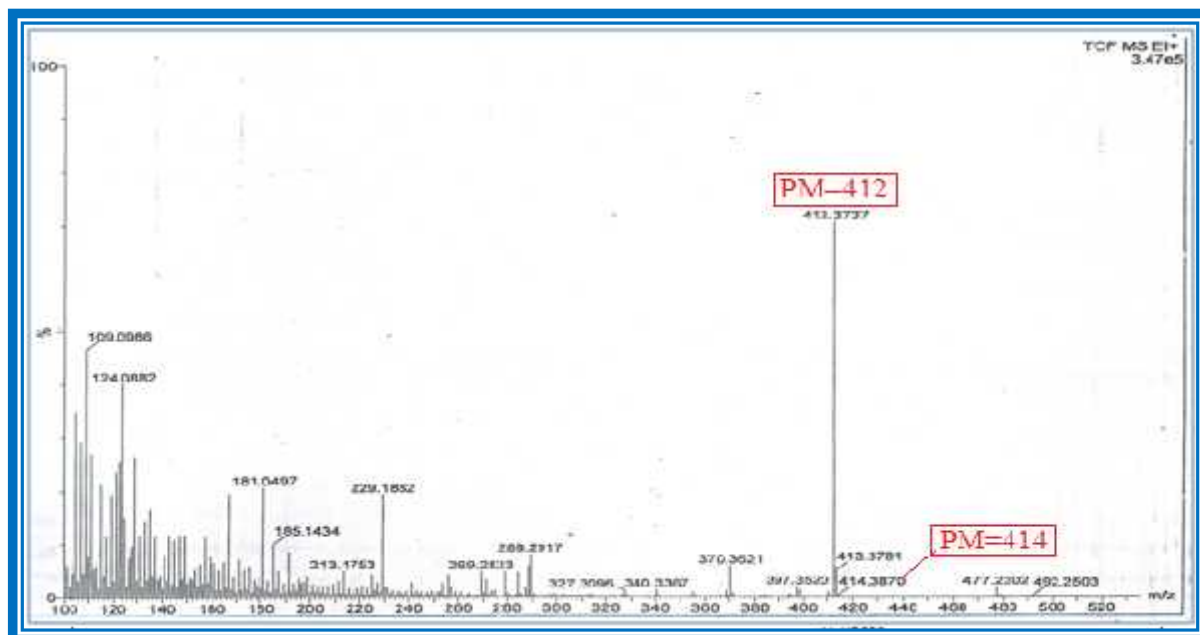


Figure III-81 : Spectre de masse HR-EI-MS deux composés  $Pd_9$  et  $Pd_{10}$

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-82) de deux composés indique un ensemble de signaux méthyliques qui oriente vers une structure de type stérol. Les différents protons de ces composés sont visualisés, on identifie :

- Deux signaux qui apparaissent sous forme de singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  0.47 et 0.73 assignable aux protons des méthyles Me-18 et Me-19 des phytostérols.
- Trois signaux de méthyles sous forme de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H,  $J = 6.6$  Hz) et 0.75 (6 H,  $J = 6.4$  Hz) attribuables respectivement aux méthyles Me-21 et Me-26, Me-27.
- Un signal triplet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  0.74 ( $J = 7$  Hz) correspondant au méthyle Me-29.

Par ailleurs, on observe également :

- Deux signaux sous forme de doublet dédoublés détectés à  $\delta_{\text{H}}$  5.08 (1H,  $J = 15.1 ; 8.5$  Hz) et 4.95 (1H,  $J = 15.1 ; 8.5$  Hz) caractéristiques des protons oléfiniques H-23 et H-22 respectivement. La valeur de la constante de couplage 15 Hz indique une géométrie trans de la double liaison C-22=C-23.
- Un signal sous forme de multiplet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  5.08 du proton oléfinique H-7.
- Un signal multiplet d'intégration 1H repéré à  $\delta_{\text{H}}$  3.52 caractéristique du proton oxyméthine H-3.

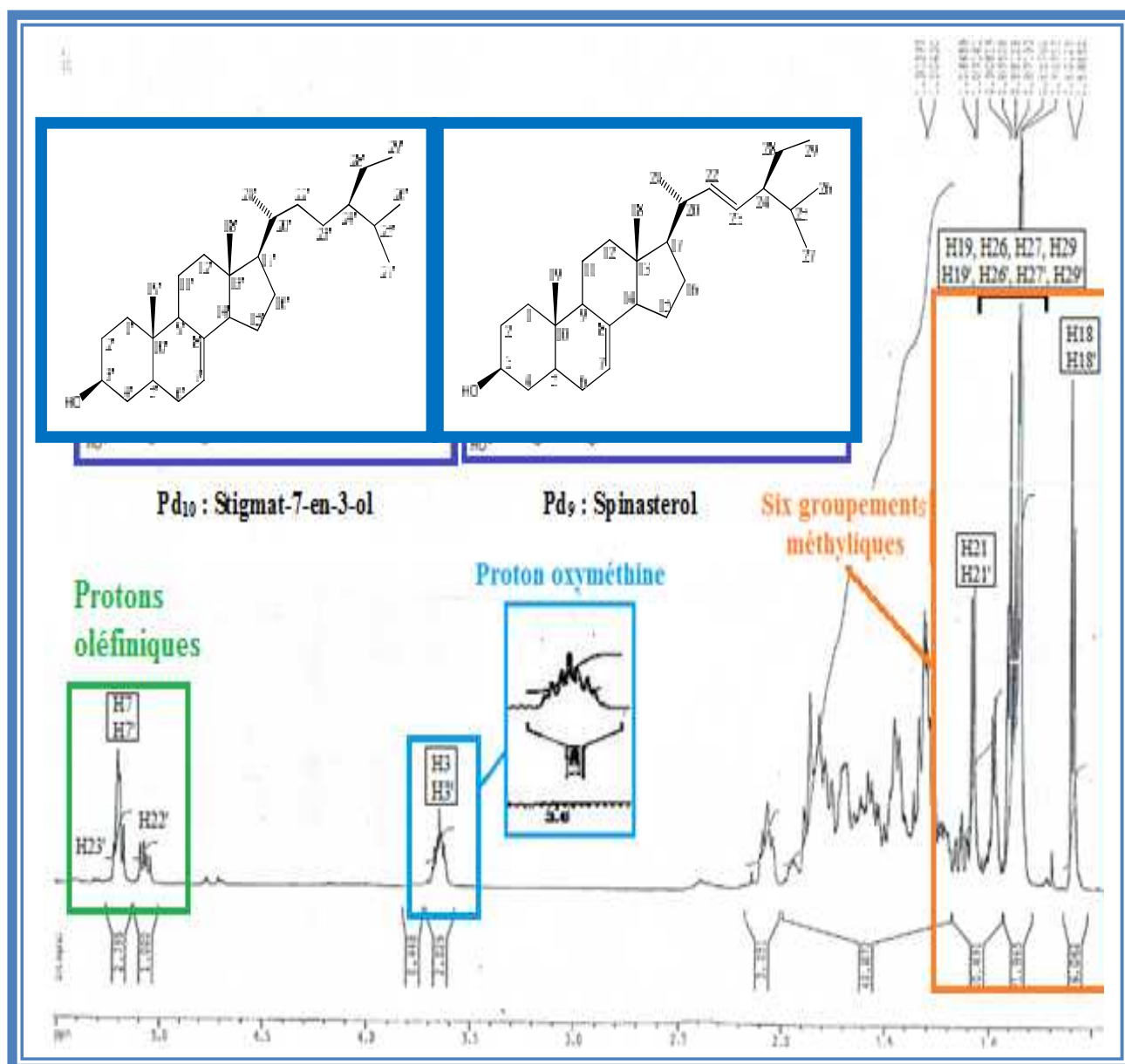


Figure III-82 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés  $Pd_9$  et  $Pd_{10}$

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-83, Figure III-84) confirme la présence de deux molécules en tenant compte du nombre de pics présents dans le spectre dépassant 40 atomes de carbone et donc l'existence de deux structures.

Le nombre de méthyles visualisés sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figures III-83, III-84) égale à 12 (6 pour chacune), localisé dans l'intervalle de 12 à 22 ppm confirme la nature stéroïdique du mélange. Il révèle l'existence de plus de 40 atomes de carbone suggérant la présence d'un mélange de deux structures stéroïdiques.

Pour le composé ***Pd*<sub>9</sub>**, la région des champs faibles de spectre RMN <sup>13</sup>C (Figure III-83) met en évidence la présence de 4 signaux correspondant à 4 atomes de carbone se répartissant en CH éthyléniques (sp<sup>2</sup>) résonnant à  $\delta$  117.3 ; 129.4 et 138.1 et un atome de carbone quaternaire (sp<sup>2</sup>) détecté à  $\delta$  139.8. Ceci indique l'existence de deux doubles liaisons dans le squelette de ce composé. Les carbones résonnant à  $\delta$  129.6 et 138.4 sont attribués à la double liaison de la chaîne latérale C-22 et C-23, tandis que la 2<sup>ème</sup> double liaison est localisée entre les carbones C-7 ( $\delta$  117.3) et C-8 ( $\delta$  139.5) par comparaison avec les données de la littérature. [144]

Pour le composé ***Pd*<sub>10</sub>** la région des champs fort sur le même spectre (Figure III-84) présente deux signaux correspondant à deux atomes de carbone méthylènes CH<sub>2</sub> résonnant à  $\delta$  33.8 et 26.1 sont attribués à une liaison simple entre C-22 et C-23 au niveau de la chaîne latérale tandis que il y a une seule double liaison qui localisée entre les carbones C-7 ( $\delta$  117.4) et C-8 ( $\delta$  139.5) par comparaison avec les données de la littérature[145].

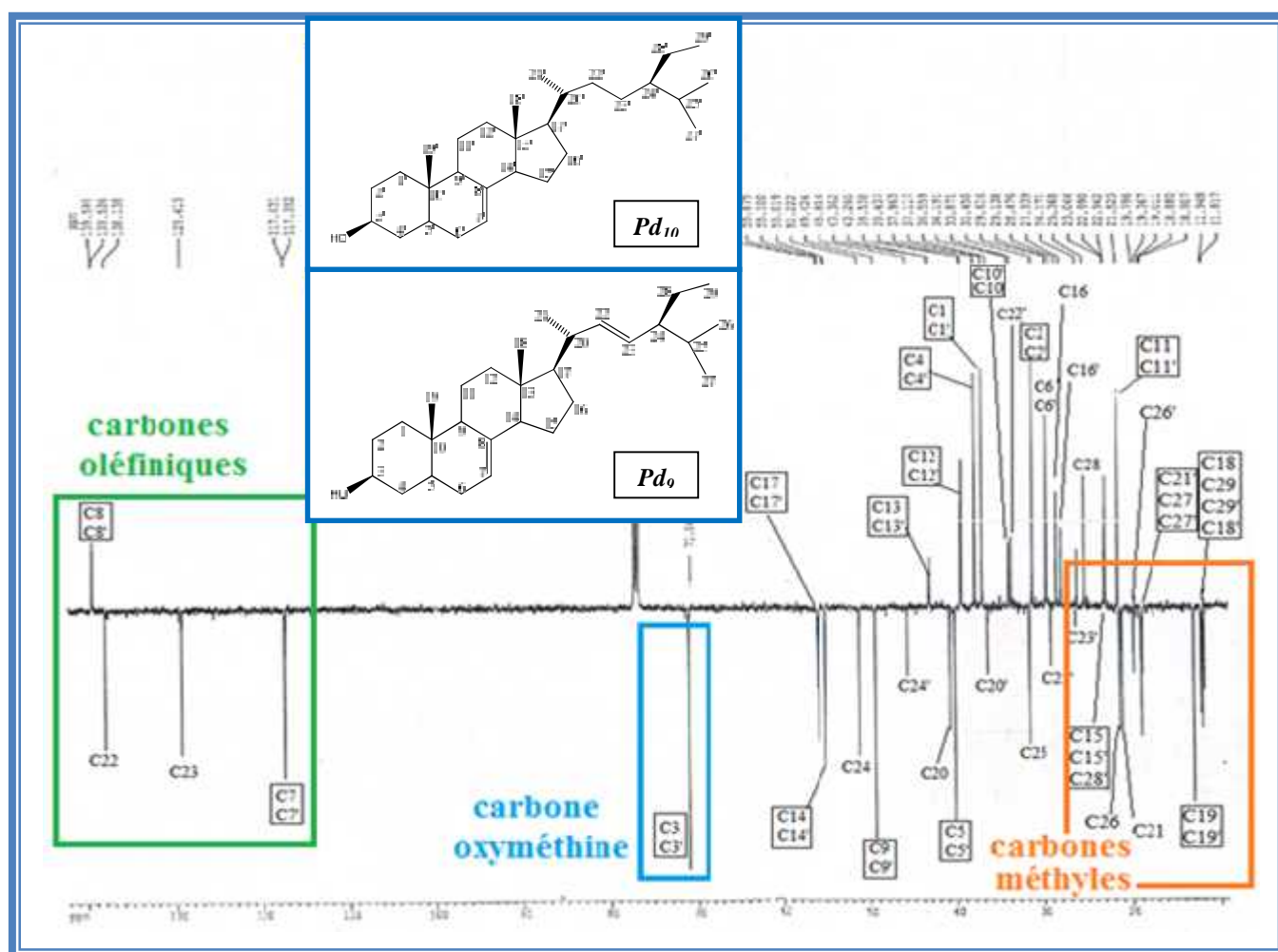


Figure III-83 : Spectre RMN <sup>13</sup>C des composés ***Pd*<sub>9</sub>** et ***Pd*<sub>10</sub>**

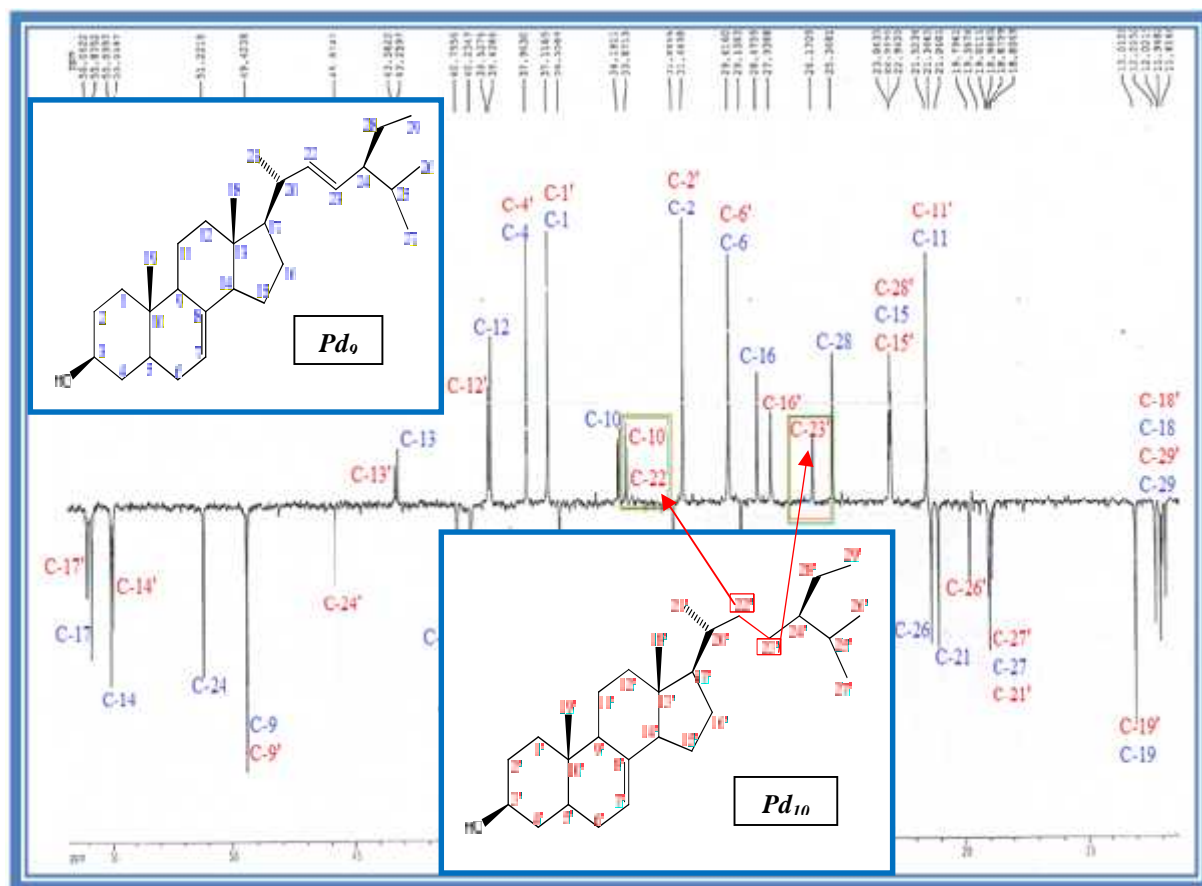
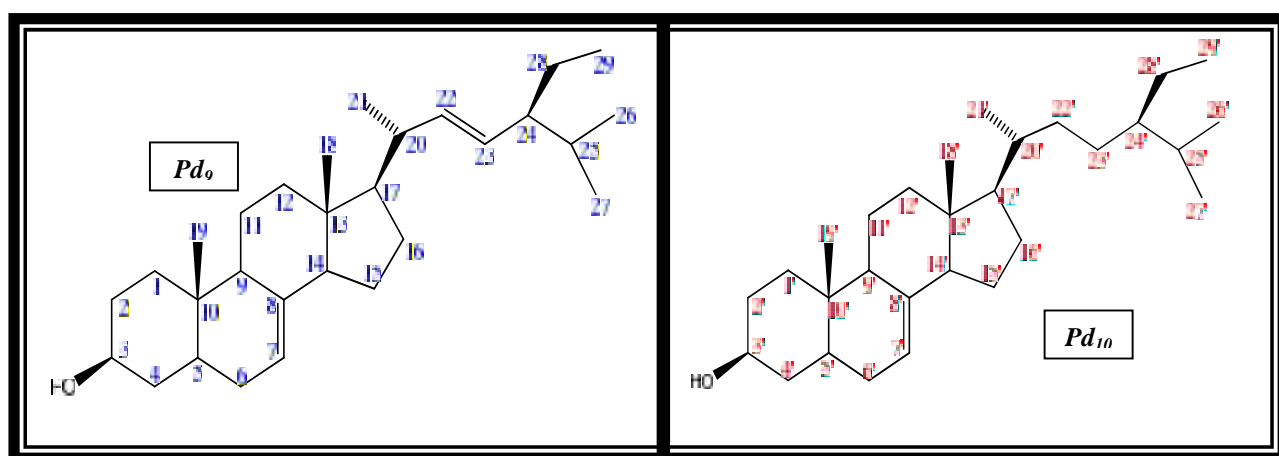


Figure III-84 : la zone [11-57 ppm] de Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des composés  $Pd_9$  et  $Pd_{10}$

La comparaison des données obtenues à travers l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ces deux composés avec celles de la littérature confirme l'identification du composé  $Pd_9$  au Spinastérol [144] et du composé  $Pd_{10}$  au Stigmat-7-en-3-ol [145].

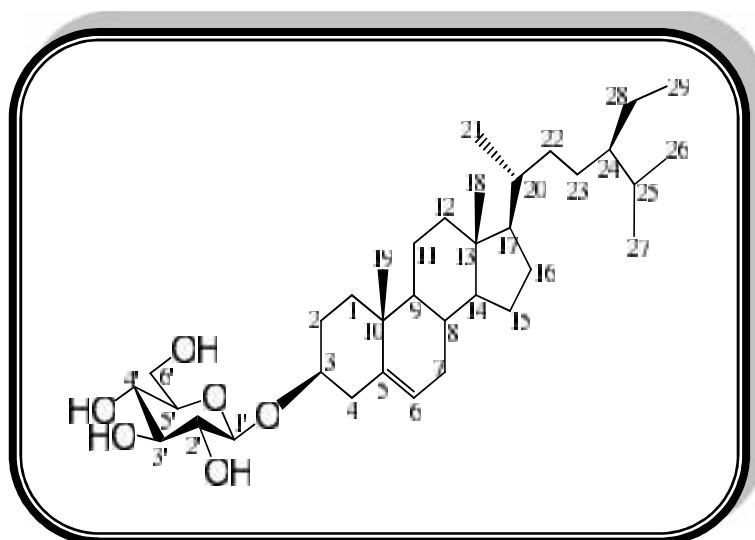


L'ensemble des résultats obtenus des deux composés sont présentés dans le tableau III-9.



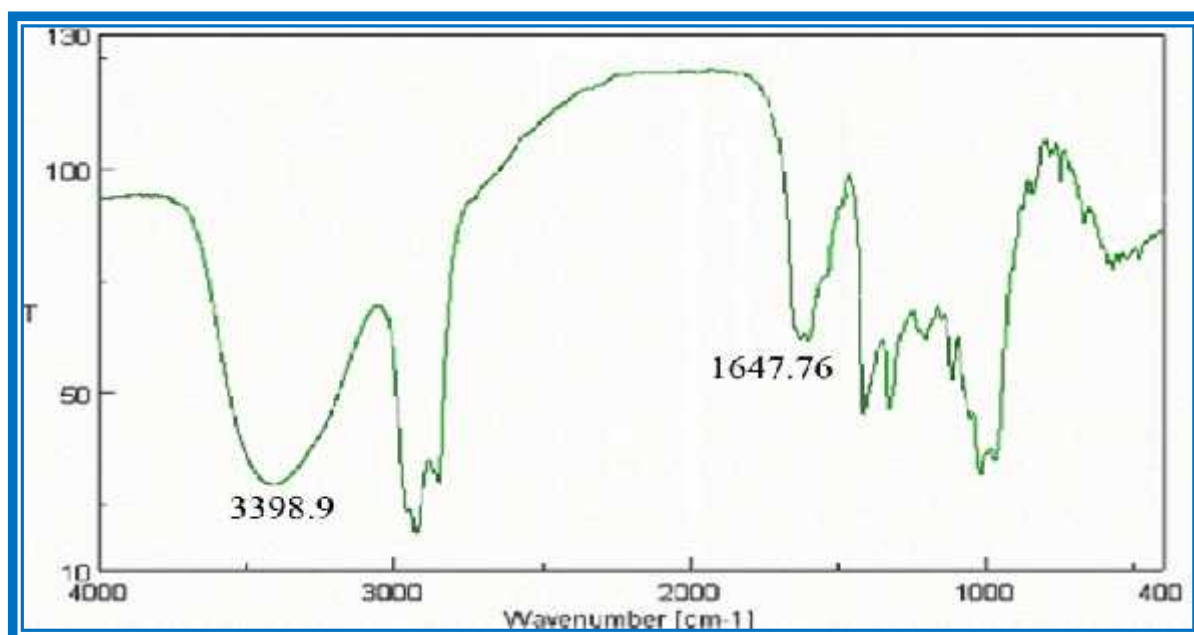
Tableau III-9 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de  $Pd_9$  et  $Pd_{10}$  dans  $\text{CDCl}_3$ 

Position	C (ppm)		H (m, J en Hz)	
	$Pd_9$	$Pd_{10}$	$Pd_9$	$Pd_{10}$
1	37.1	37.1	1.09(m) H-1b 1.82 (m) H-1a	1.09(m) H-1b 1.82 (m) H-1a
2	31.4	31.4	1.39(m) H-2b 1.77 (m) H-2a	1.39(m) H-2b 1.77 (m) H-2a
3	71.0	71.0	3.52 (m)	3.52 (m)
4	37.9	37.9	1.22 (m) H-4b 1.70 (m) H-4a	1.22 (m) H-4b 1.70 (m) H-4a
5	40.2	40.2	1.40 (m)	1.40 (m)
6	29.6	29.6	1.22 (m) H-6b 1.74 (m) H-6a	1.22 (m) H-6b 1.74 (m) H-6a
7	117.3	117.4	5.08 (m)	5.08 (m)
8	139.5	139.5	-	-
9	49.4	49.4	1.65 (m)	1.65 (m)
10	34.1	34.1	-	-
11	21.5	21.5	1.47 (m)	1.47 (m)
12	39.4	39.5	1.18 (m) H-12b 1.98 (m) H-12a	1.18 (m) H-12b 1.98 (m) H-12a
13	43.2	43.3	-	-
14	55.0	55.0	1.80 (m)	1.80 (m)
15	32.2	32.2	1.38(m) H-15b 1.50 (m) H-15a	1.38 (m) H-15b 1.50 (m) H-15a
16	28.4	27.9	1.23 (m) H-16b 1.80 (m) H-16a	1.23 (m) H-16b 1.80 (m) H-16a
17	55.8	56.0	1.25 (m)	1.25 (m)
18	12.0	11.8	0.47 (m)	0.47 (m)
19	13.0	13.0	0.73 (m)	0.73 (m)
20	40.7	36.5	1.95 (m)	1.95 (m)
21	21.0	18.8	0.97 (d, 6.6)	0.97 (d, 6.6)
22	138.1	33.8	4.95 (dd, 15.1 ; 8.5)	1.07(m) H-22b 1.36 (m) H-22a
23	129.4	26.1	5.08 (dd, 15.1 ; 8.5)	1.21 (m)
24	51.2	45.8	1.60 (m)	1.60 (m)
25	31.8	29.1	1.49 (m)	1.49 (m)
26	21.3	19.7	0.75 (m)	0.75 (m)
27	18.9	19.0	0.75 (m)	0.75 (m)
28	25.3	22.9	1.18 (m) H-28b 1.42 (m) H-28a	1.18 (m) H-28b 1.42 (m) H-28a
29	12.0	11.9	0.74 (t, 7.0)	0.74 (t, 7.0)

III-1-3-10- Identification structurale du composé  $Pd_{11}$  $Pd_{11}$ : 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol (Daucostérol)

Le composé  $Pd_{11}$  se présente sous forme d'une poudre amorphe blanche, soluble dans le mélange chloroforme/méthanol (50/50). Il est invisible à l'UV et se colore en mauve après révélation par une solution d'acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre IR (Figure III-85) de ce composé montre les bandes d'absorption à 1647.76  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique d'un groupement oléfinique et une bande d'absorption large centrée à 3398.9  $\text{cm}^{-1}$  correspondant au groupement hydroxyle.

Figure III-85 : Spectre IR du composé  $Pd_{11}$

Les spectres de masse du composé ***Pd*<sub>11</sub>** obtenus par ESI-MS en modes négatif et positif (Figure III-86), révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à 575.3 [M-H]<sup>-</sup> et 599.3 [M+Na]<sup>+</sup>, correspondant à une masse moléculaire M = 576 uma et une formule brute en C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>.

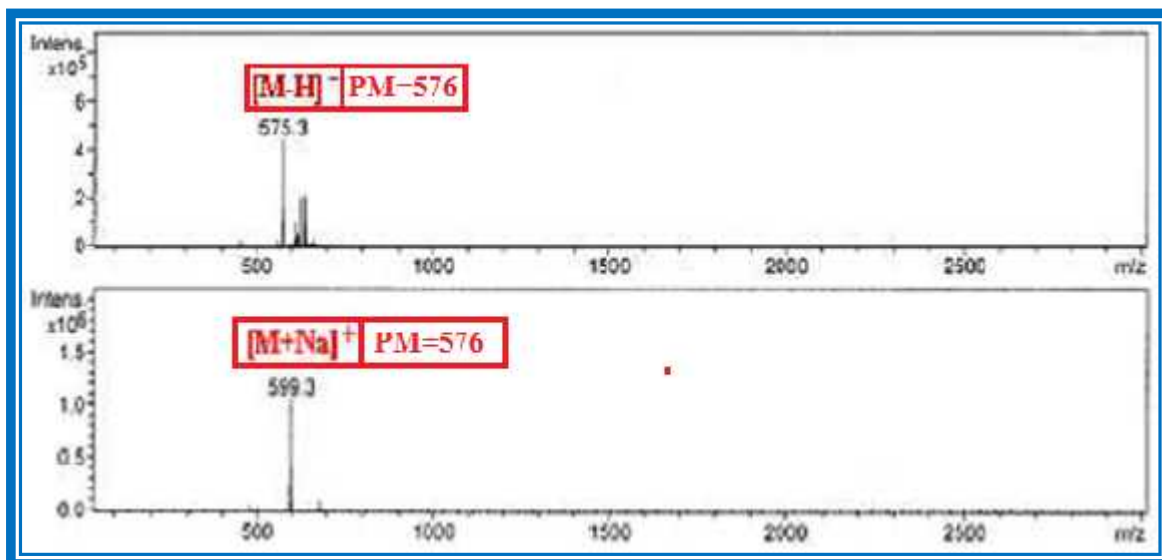


Figure III- 86 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif et positif) du composé ***Pd*<sub>11</sub>**

Les spectres RMN<sup>1</sup>H (Figures III-74 et III-87) des composés ***Pd*<sub>8</sub>** et ***Pd*<sub>11</sub>** présentent une grande similitude structurale. La différence réside dans la partie déblindée du spectre qui montre plusieurs signaux entre 3 et 4.5 ppm correspondant à une unité osidique en tenant compte des valeurs de leurs intégrations. Il s'agit donc d'un -sitostérol glucosylé.

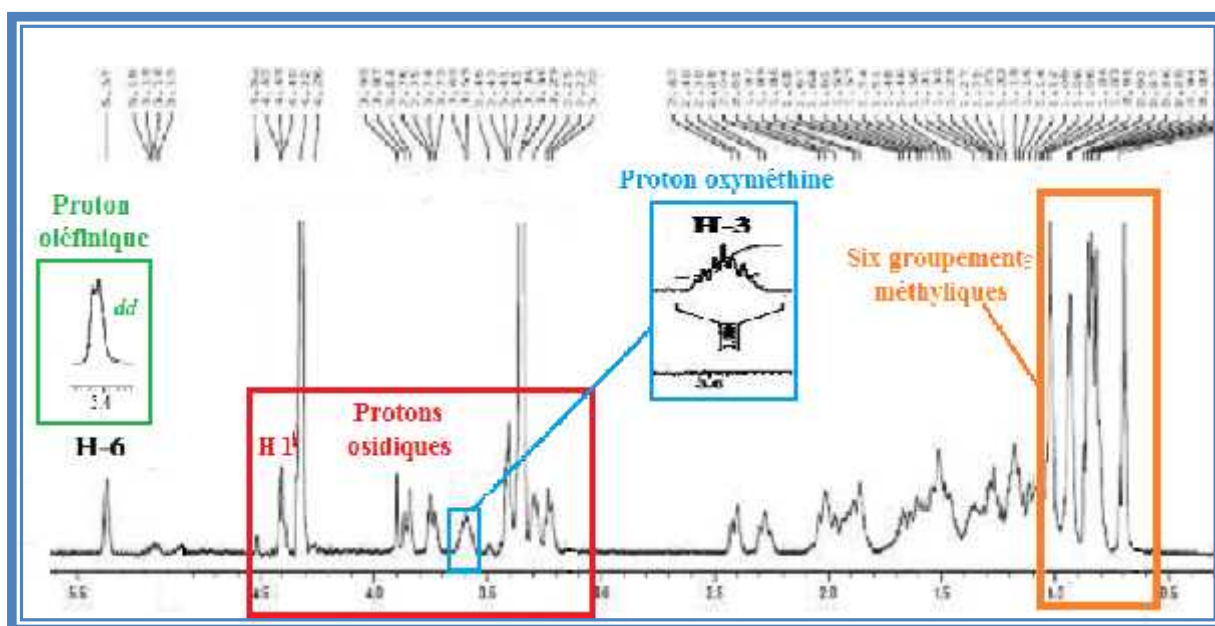


Figure III-87 : Spectre RMN <sup>1</sup>H des composés ***Pd*<sub>11</sub>**

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-88) permet de visualiser la présence des signaux concernant la même génine ( -sitosérol) et l'unité osidique. Alors il confirme bien nos hypothèses.

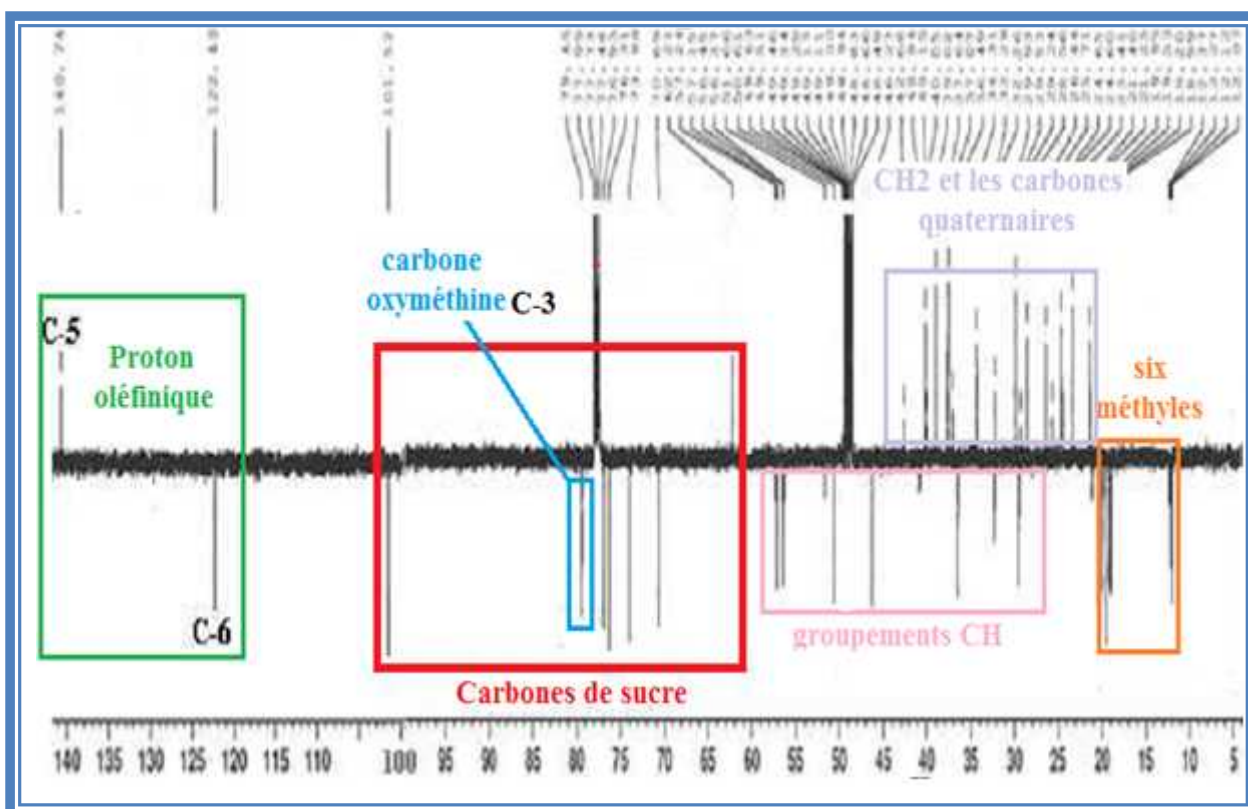


Figure III-88 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des composés  $Pd_{11}$

L'expérience COSY H-H (Figure III-89) permet l'identification de cette unité osidique par l'observation des corrélations entre les différents protons. Partant du proton anomère H-1' (  $\delta_{\text{H}} 4.35$ ,  $d$ ,  $J = 7.8$  Hz), les corrélations mises en évidence entre les protons sont :

- H-1' et H-2' (  $\delta_{\text{H}} 3.19$ ,  $t$ ,  $J = 7.8$  Hz).
- H-2' et H-3' (  $\delta_{\text{H}} 3.38$ ,  $t$ ,  $J = 7.9$  Hz).
- H-3' et H-4' (  $\delta_{\text{H}} 3.35$ ,  $t$ ,  $J = 7.7$  Hz).
- H-4' et H-5' (  $\delta_{\text{H}} 3.23$ ,  $m$ ).
- H-5' et les deux protons H-6'a (  $\delta_{\text{H}} 3.81$ ,  $dd$ ,  $J = 11.9, 2.9$  Hz) et H-6'b (  $\delta_{\text{H}} 3.70$ ,  $dd$ ,  $J = 11.9, 4.9$  Hz).

Permettent d'identifier un hexose. Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  au regard de la constante de couplage  $J_{1'-2'}$  égale à 7.8 Hz.

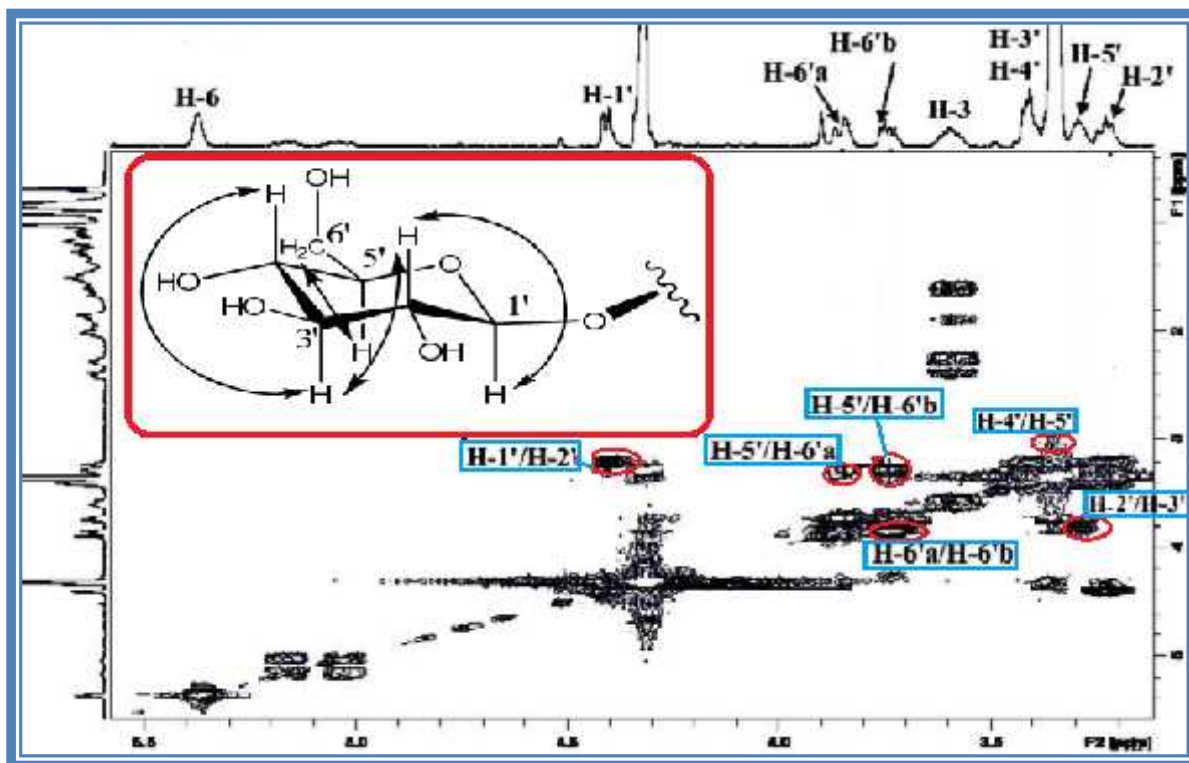


Figure III- 89: Spectre COSY H-H de la zone osidique du composé  $Pd_{11}$

Les carbones de ce sucre ont ensuite été caractérisés par expérience HSQC (Figures III-90) à :  $\delta_c$  101.3 (C-1'), 73.8 (C-2'), 76.7 (C-3'), 70.5 (C-4'), 76.1 (C-5') et 62.0 (C-6').

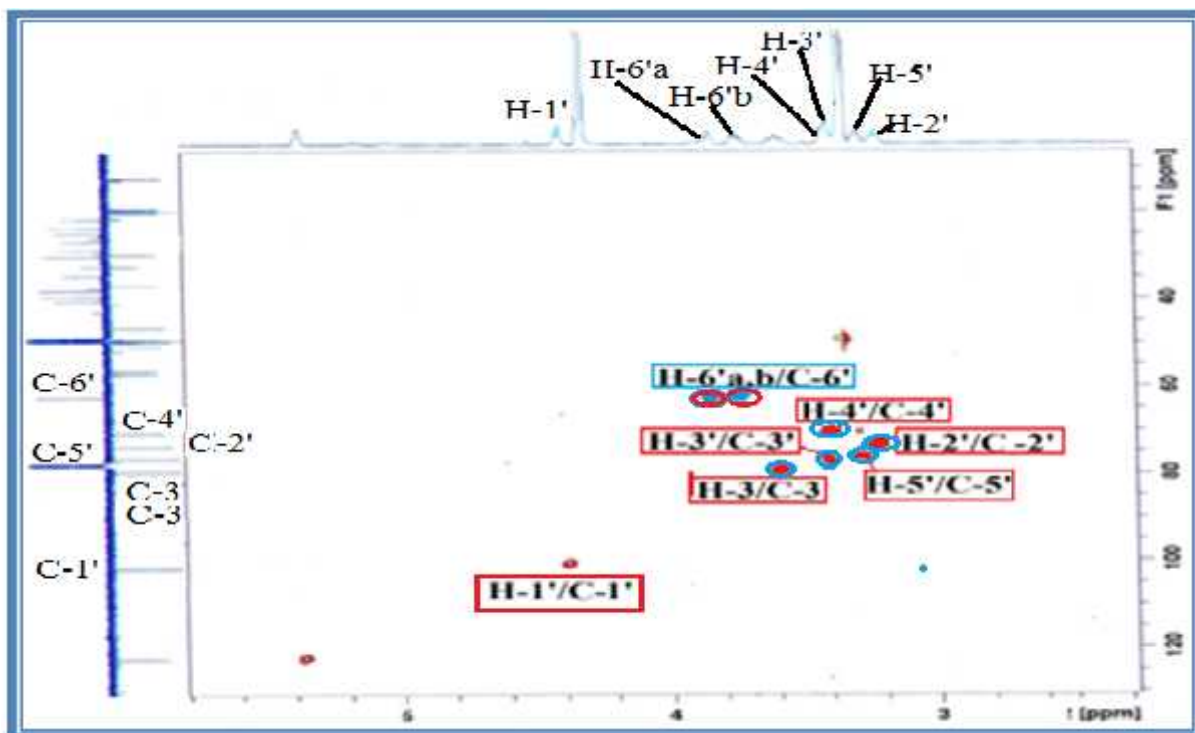


Figure III-90 : Spectre HSQC de la partie osidique



L'expérience de corrélation à longue distance HMBC (Figures III-91) permet d'identifier les corrélations H/C en  $^2J$  et  $^3J$ . Il présente une tache de corrélation en  $^3J$ , entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3. Cette corrélation confirme l'attachement de l'unité osidique en position C-3 de la génine. D'autres corrélations ont été observées entre:

- H-2' et le carbone C-3' (76.7 ppm).
- H-3' et les carbone C-4' (70.5 ppm) et C-5'(76.1 ppm).
- H-4' et le carbone C-2' (73.8 ppm).

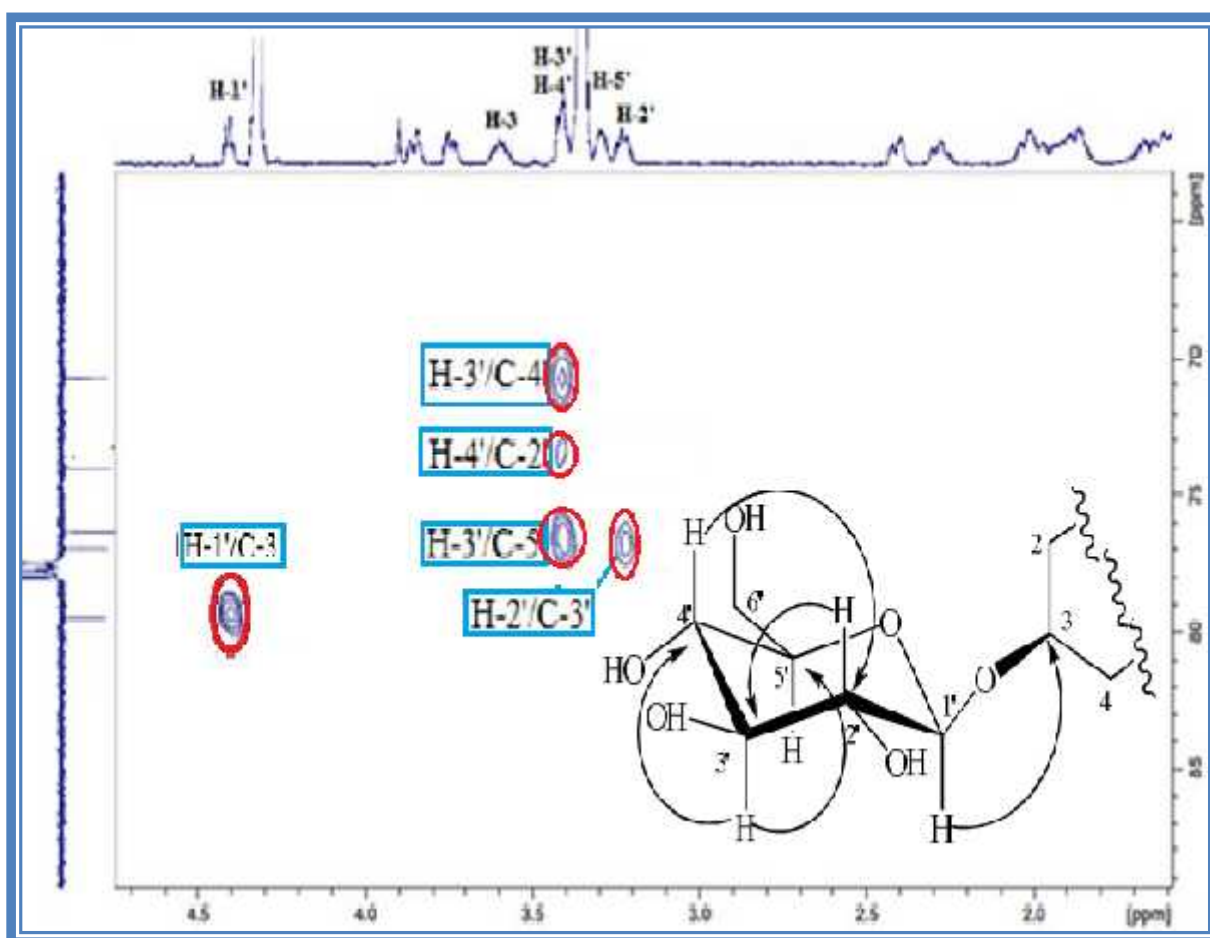
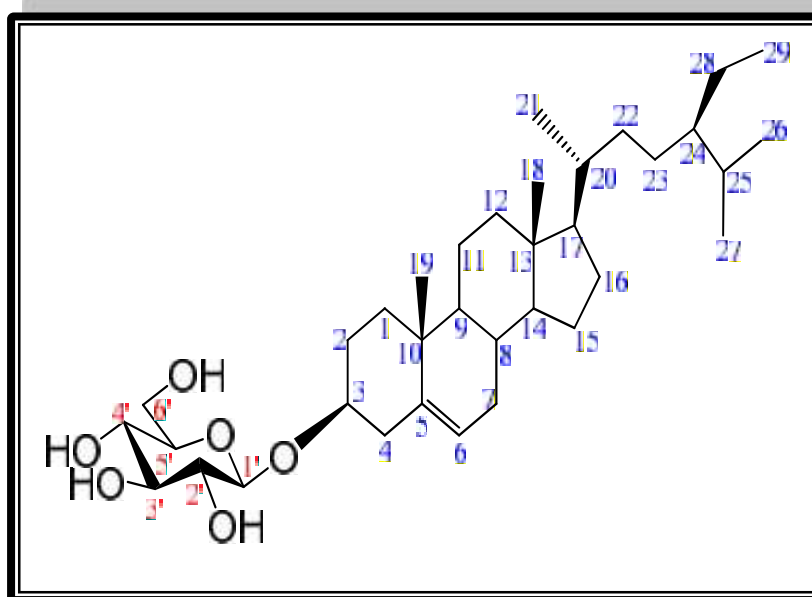


Figure III-91 : Spectre HMBC montrant des corrélations entre -glucose et la génine

L'exploitation des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques, à savoir la RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$  en  $J$ -modulé, COSY H-H, HSQC, HMBC, la spectrométrie de masse et IR ainsi que le pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -42.3^\circ$  ( $C = 0.5$ ,  $CHCl_3$ ) et la comparaison avec les données de la littérature [123,146] conduisent à attribuer sans ambiguïté la structure suivante pour le composé **Pd<sub>11</sub>** : 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol communément appelé Daucostérol. Il a été trouvé dans plusieurs espèces de la famille Caryophyllaceae.



Ce composé présente des propriétés anti-inflammatoire et anti-cholestérol [147]. Il est également utilisé dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate [148] et joue un rôle dans le renforcement du système immunitaire (tuberculose, VIH,....) [149].

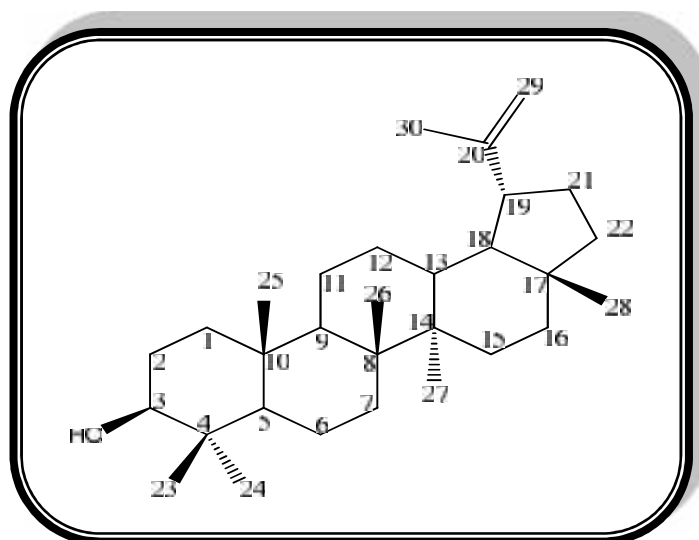
Le tableau (III-11) englobe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé.

**Tableau III-10: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de  $Pd_{11}$  dans  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$**

Position	c (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	37.5	1.86 ( <i>m</i> ) H-1a 1.09 ( <i>m</i> ) H-1b
2	29.8	1.91 ( <i>m</i> ) H-2a 1.36 ( <i>m</i> ) H-2b
3	79,3	3.53 ( <i>m</i> ) H-3
4	38.3	2.37 ( <i>dd</i> , 15, 5 H-4a 2.29 ( <i>t</i> , 10) H-4b
5	140.8	-
6	122.3	5.30 ( <i>dl</i> , 5.0)
7	32.1	1.96 ( <i>m</i> ) H-7a 1.56 ( <i>m</i> ) H-7b
8	32.1	1.45 ( <i>m</i> )
9	50.4	0.95 ( <i>m</i> ) H-9



10	36.9	-
11	21.2	1.53 (m) H-11a 1.48 (m) H-11b
12	40.0	2.1 (m) H-12a 1.17 (m) H-12b
13	42.5	-
14	57.0	1,01( m)
15	24.5	1.59 (m) H-15a 1.10 (m) H-15b
16	28.4	1.85 (m)
17	56.3	1.15 (m)
18	12.0	0.61 (s)
19	19.4	0.95 (s)
20	36.3	1.36 (m)
21	18.9	0.85 (d, 6.1)
22	34.1	1.35 (m) H-22a 1.04 (m) H-22b
23	26.3	1.12 (m)
24	46.1	0.98 (m)
25	29.3	1.67 (m)
26	19.1	0.75 (d, 6,7)
27	19.9	0.76 (d, 6,7)
28	23.2	1.28 (m) H-28a 1.23 (m) H-28b
<b>3-O-glu</b>		
1'	101.3	4.35 (d, 7.8)
2'	73.8	3.19 (t, 7.8)
3'	76.7	3.38(t, 7.9)
4'	70.5	3.35 (t, 7.7)
5'	76.1	3.23 (m)
6'	62.0	3.81 (dd, 11.9; 2.9) H-6'a 3.70 (dd, 11.9; 4.9) H-6'b

III-1-3-11- Identification structurale du composé  $Pd_{12}$ 

$Pd_{12}$ : lup-20(29)-èn-3-ol (Lupéol)

Le composé  $Pd_{12}$  est se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Ce composé prend une coloration marron-orange après révélation en CCM par l'acide et chauffage.

Le spectre de masse obtenu par électrospray ESI-MS (Figure III-92) permet d'observer en mode positif deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à 449.4 m/z et  $[2M+Na]^+$  à 875.3, soit une masse moléculaire égale à 426 uma correspondant à une formule brute en  $C_{30}H_{50}O$ .

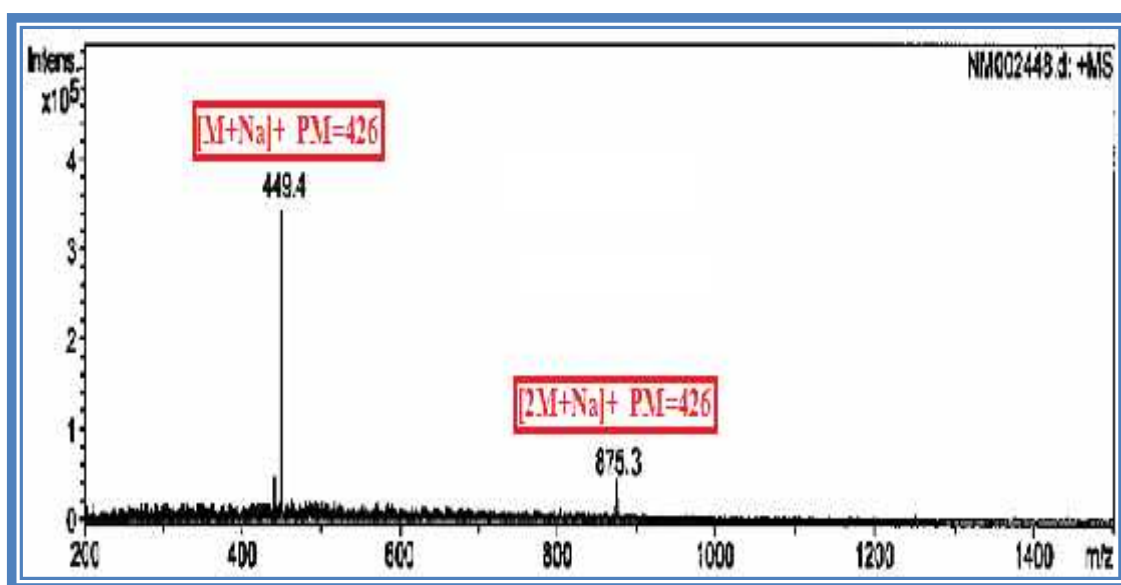


Figure III-92 : Spectre de masse du composé  $Pd_{12}$

- Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-93), enregistré dans le chloroforme deutéré, montre
- sept signaux singulets de protons de groupements méthyles résonant à 0.81, 0.84, 0.86, 1.00, 1.02, 1.07 et 1.54 ppm
  - un signal sous forme d'un doublet de doublet est visualisé à  $\delta_{\text{H}}$  3.20 attribuable à un groupement oxyméthine (COH-3).
  - deux signaux doublets d'intégration 1H chacun et résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4.66 ( $d, J = 2.3 \text{ Hz}$ ) et 4.54 ( $d, J = 2.3 \text{ Hz}$ ) ppm caractéristiques de protons oléfiniques.

Toutes ces données attestent que ce composé a une nature triterpénique.

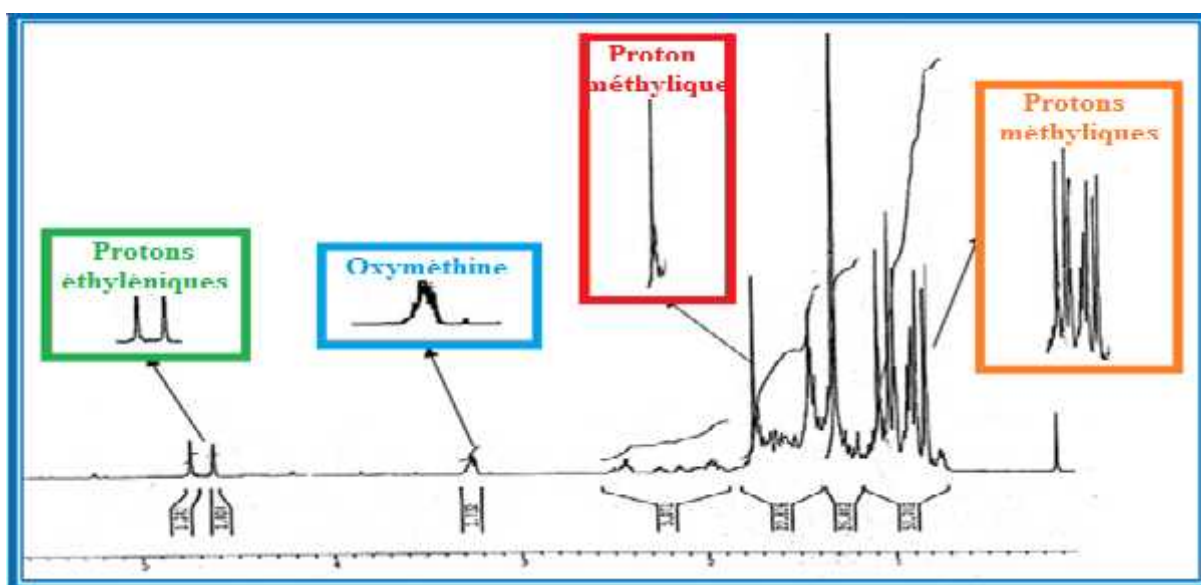


Figure III- 93 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pd_{12}$

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-94) prouve aussi la nature triterpénique de ce composé, et cela par l'observation des signaux suivants :

- Sept groupements méthyles résonant entre 14.5 et 27.9 ppm.
- Plus de 10 carbones  $\text{CH}_2$  et carbones quaternaire localisés dans l'intervalle de 20 à 40 ppm.
- Trois carbones méthines (CH) entre 45 et 55 ppm correspondant aux carbones des jonctions entre les différents cycles des triterpènes.
- Un carbone oxydé apparaissant à  $\delta_{\text{C}}$  79.2, suggérant la présence d'un groupement hydroxyle substituant le carbone en C-3 du triterpène.
- Deux carbones éthyléniques, l'un secondaire ( $\delta_{\text{C}}$  109.5) et l'autre quaternaire ( $\delta_{\text{C}}$  151.2).

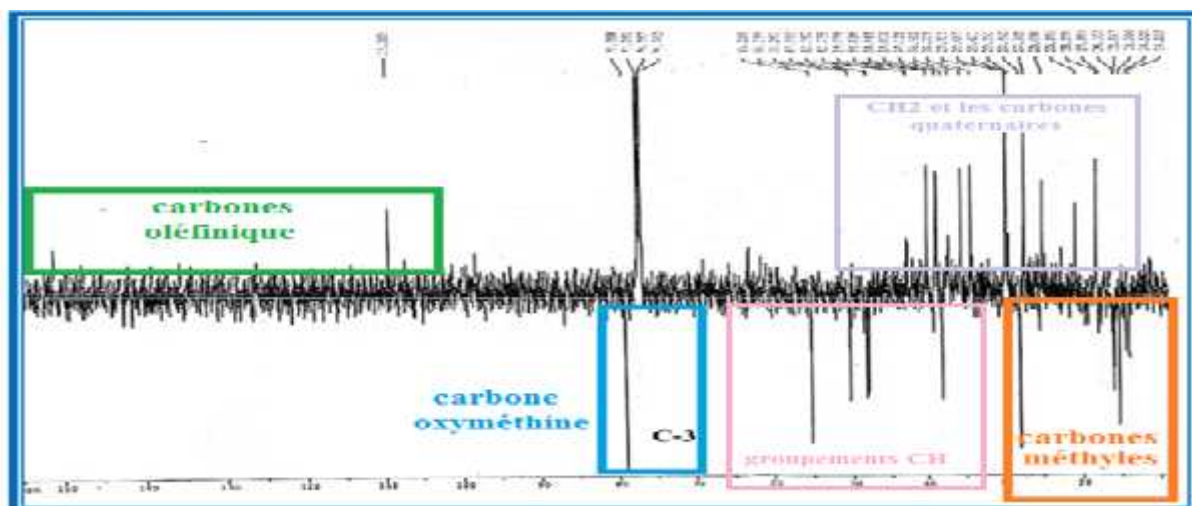


Figure III-94 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé  $Pd_{12}$

L'identification de la structure du composé  $Pd_{12}$  est basée principalement sur l'analyse combinée des spectres HMBC, COSY et HSQC  $J$ -modulé. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  indique la présence de deux protons déblindés sous forme de doublet chacun à  $\delta_{\text{H}} 4.66$  ( $J = 2.3$  Hz) et  $4.54$  ( $J = 2.3$  Hz) attribuables respectivement aux protons géminés exocycliques H-29a et H-29b. Ces derniers couplent sur le spectre HSQC (Figure III-95) avec un même carbone résonant à  $\delta_{\text{C}} 109.5$  (C-29). En effet l'expérience COSY H-H (Figure III-95) montre des corrélations entre ces protons  $\text{CH}_2$  oléfiniques et les protons du groupement  $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}} 1.72$ ). Ces résultats indiquent la présence d'un groupement isoprényle.

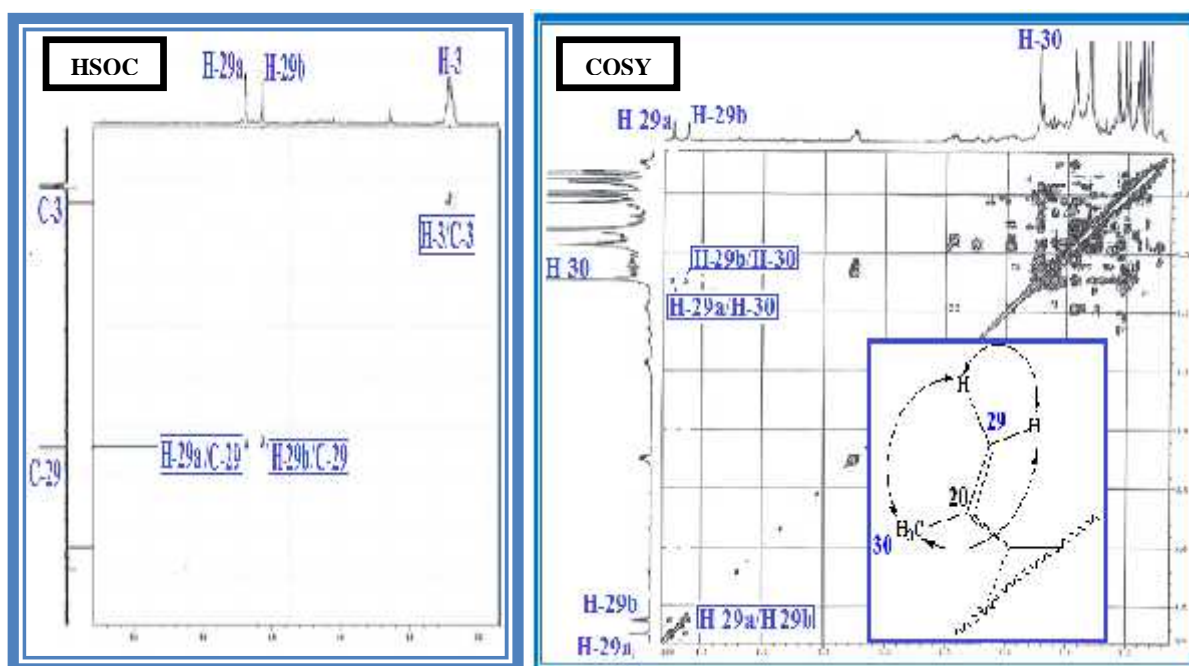
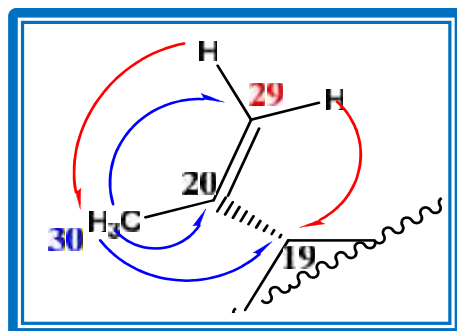


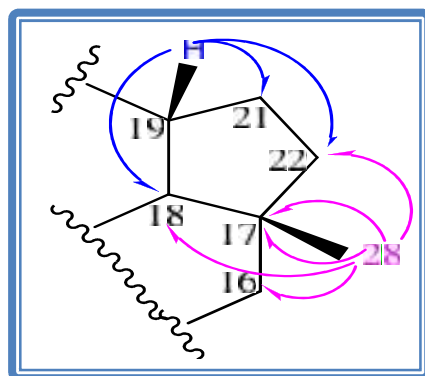
Figure III-95: Spectres HSQC et COSY du composé  $Pd_{12}$

Partant du groupement méthyle Me-30 du groupement isoprényle résonant à 1.72 ppm, l'expérience HMBC a aussi permis de mettre en évidence les corrélations entre les protons de ce groupement et le carbone secondaire oléfinique C-29, de même que le carbone quaternaire oléfinique C-20 sortant à 151.0 ppm. La dernière corrélation observée est due au carbone C-19 résonant à 47.9 ppm. La confirmation de la localisation des deux protons oléfiniques H-29a ( $\delta_{\text{H}} 4.66$ ,  $d$ ,  $J = 2.3$  Hz) et H-29b ( $\delta_{\text{H}} 4.54$ ,  $d$ ,  $J = 2.3$  Hz) est déduite des couplages qu'ils présentent avec les carbones C-19 et C-30 du groupement Me-30 ( $\delta_{\text{C}} 19.8$ ) (Figure III-96).



**Figure III-96 : Corrélations HMBC observées pour le groupement isoprényle**

A partir du proton H-19 identifié par expérience HMBC du fait de la corrélation C-H directe qu'il présente avec le carbone C-19 ( $\delta_{\text{C}} 47.9$ ), on caractérise le carbone C-18 ( $\delta_{\text{C}} 48.2$ ), les carbones C-21 ( $\delta_{\text{C}} 29.8$ ) et C-22 ( $\delta_{\text{C}} 39.9$ ). Ces attributions sont confirmées par les corrélations observées à partir des signaux correspondant aux trois protons du dernier groupement méthyle Me-28 résonant à 0.84 ppm et montrant par expérience HSQC un couplage direct avec leur carbone C-28 ( $\delta_{\text{C}} 17.9$ ). Ces protons méthyliques corrélient également avec le carbone quaternaire C-17 ( $\delta_{\text{C}} 42.9$ ), les carbones C-16 et C-22 sortant respectivement à 35.5 et 39.9 ppm (Figure III-97).



**Figure III- 97 : Corrélations HMBC observées pour le composé  $Pd_{12}$ .**

Sur le spectre COSY (Figure III-98), il est visualisé un système de spin à 7 protons

■ H<sub>2</sub>-21 (  $\delta$  1.97, 1.31) / H<sub>2</sub>-22 (  $\delta$  1.43, 1.25).

■ H<sub>2</sub>-21/H-19.

■ H-19/H-18 (  $\delta$  1.41).

■ H-18/H-13 (  $\delta$  1.70).

En plus les protons H<sub>2</sub>-16 identifiés précédemment par l'analyse HMBC résonant à  $\delta$  1.44 couplent en COSY avec deux protons géminés H<sub>2</sub>-15 détectés à  $\delta$  0.96 (H-15b) et 1.61 (H-15a) dont le carbone est localisé à 27.2 par l'expérience HSQC.

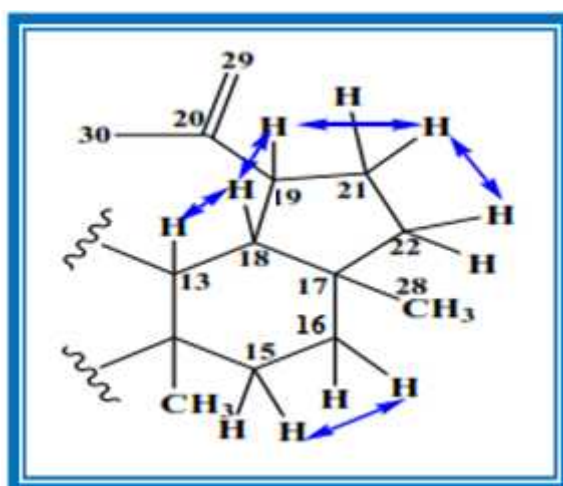


Figure III-98: Corrélations COSY observées pour le composé Pd<sub>12</sub>.

L'analyse COSY montre couplage important entre les protons H-18 et H-13 en plus le déplacement chimique du carbone C-13 (  $\delta$  38.5) selon l'analyse HSQC suggère que ce composé triterpinique à squelette lupane (Figure III-99) [150-151].

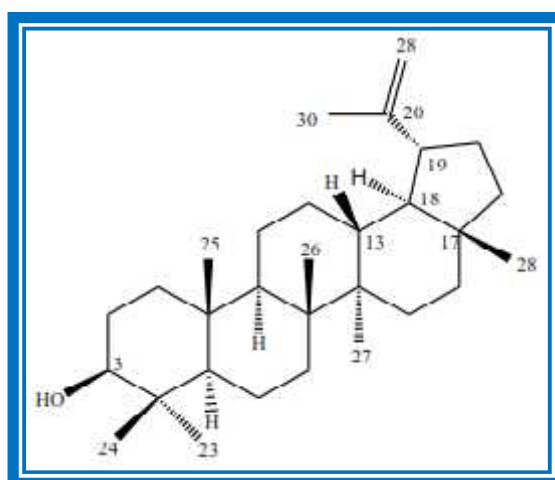


Figure III-99: Squelette lupane



Comme on le voit, l'analyse HMBC (Figure III-100) et particulièrement dans le cas des triterpènes, constitue une méthode de choix pour caractériser la majorité des carbones et donc de déterminer efficacement la structure du composé.

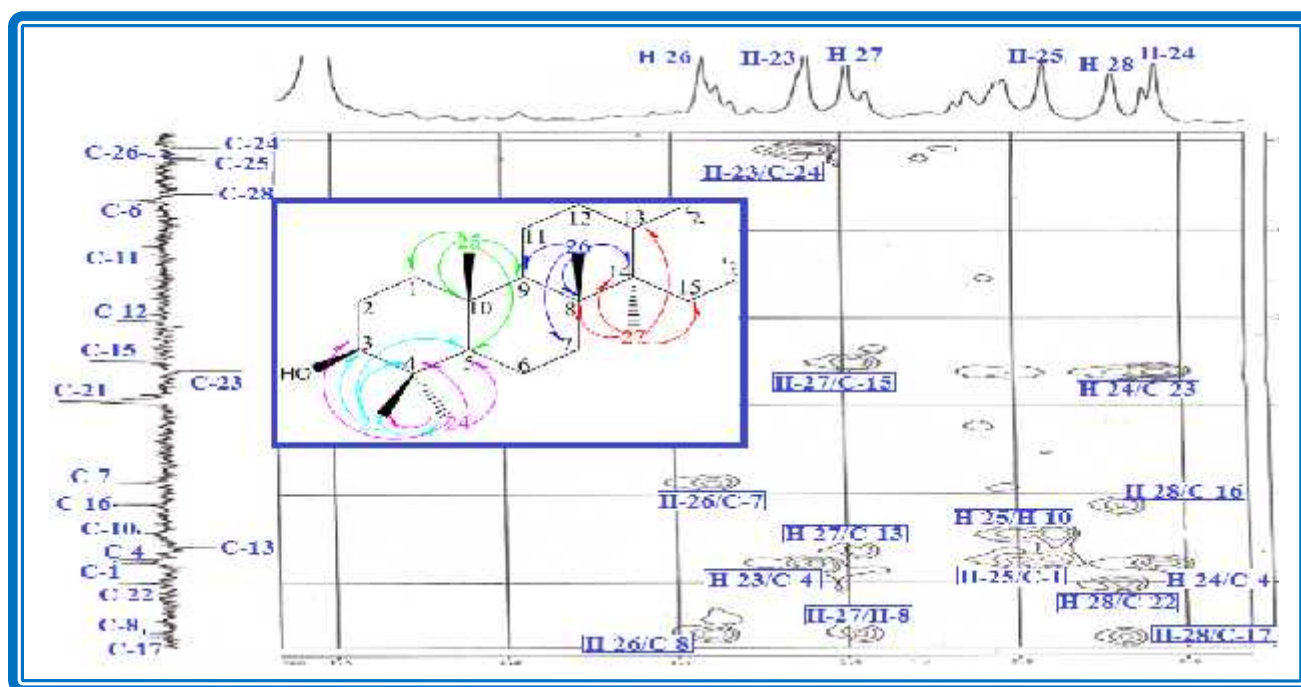


Figure III-100 : Corrélations HMBC observées pour le composé  $Pd_{12}$

L'expérience HSQC permet de caractériser chacun des carbones méthyliques (Figure III-101). Les attributions des protons et des carbones trouvés précédemment à partir de l'analyse HMBC (Tableau III-11) ont été assignées aussi par expérience HSQC.

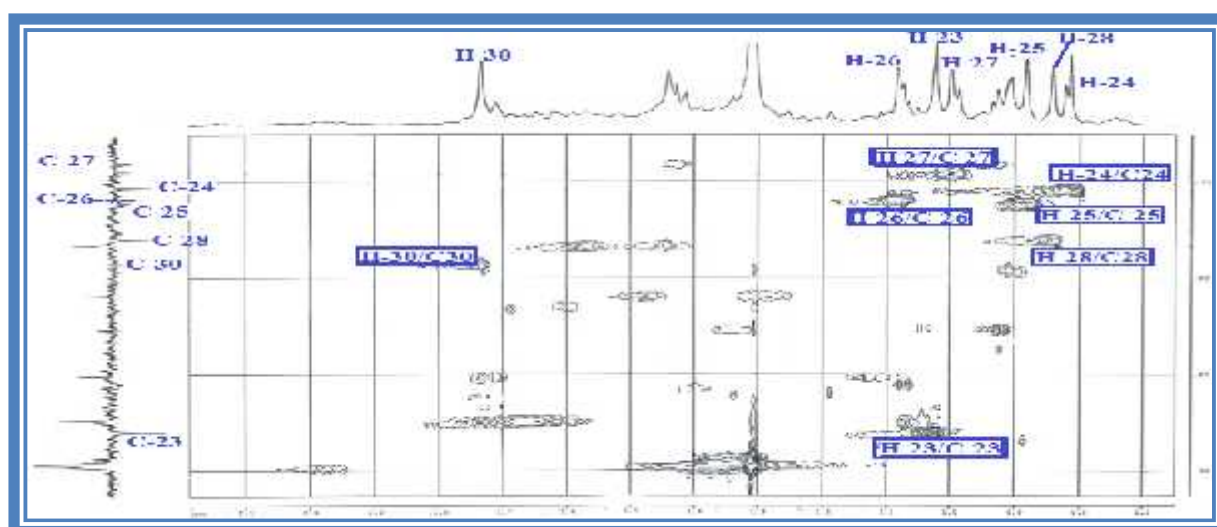


Figure III-101 : Spectre HSQC montre des carbones méthyliques du composé  $Pd_{12}$



Le spectre COSY (Figure III-102) montre aussi trois autres systèmes de spins nous aider de compléter la structure du ce composé. Ces trois systèmes sont :

■ H-13/H<sub>2</sub>-12 (  $\nu$  1.64), H<sub>2</sub>-12/H<sub>2</sub>-11 (  $\nu$  1.38) et H<sub>2</sub>-11/ H-9 (  $\nu$  1.35)

■ H-3/H<sub>2</sub>-2 (  $\nu$  1.61 et 1.06) et H-2/ H<sub>2</sub>-1 (  $\nu$  1.65 et 0.88).

■ H-5 (  $\nu$  0.73) / H<sub>2</sub>-6 (  $\nu$  1.45 et 1.55) et H<sub>2</sub>-6 / H<sub>2</sub>-7 (  $\nu$  1.43).

Les protons méthyléniques H-2 et H-12 ont été identifiés par expérience HSQC de fait du son couplage direct avec deux signaux résonant à 27.3 et 25.0 ppm attribuables aux deux carbones C-2 et C-12 respectivement.

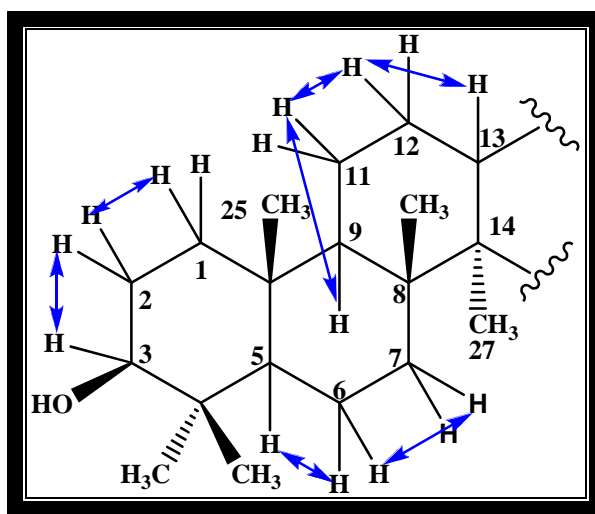


Figure III-103 : Spectre COSY du composé  $Pd_{12}$

Cette analyse complète axée principalement sur la RMN a permis d'assigner tous les déplacements chimiques des protons et carbones de notre composé à même d'identifier sans ambiguïté sa structure, nous oriente vers deux structures probables en fonction de la stéréochimie au niveau du carbone C-3, à savoir le lupéol ou l'épilupéol.

La stéréochimie du composé  $Pd_{12}$  est assignée en analysant les taches de corrélation observées sur le spectre NOESY (Figure III-104). Elle montre que le groupement hydroxyle (3-OH) en . Cette dernière nous oriente vers la structure lupéol (l'épilupéol 3-OH en ). Il permet aussi de vérifier la stéréochimie des 10 carbones asymétriques de ce composé sont : C-3 (H en ), C-5 (H en ), C-8 (CH<sub>3</sub>-26 en ), C-9 (H en ), C-10 (CH<sub>3</sub>-25 en ), C-13 (H en ), C-14 (CH<sub>3</sub>-27 en ), C-17 (CH<sub>3</sub>-28 en ), C-18 (H en ), C-19 (H en ) et le groupement isoprényle étant alors en position .

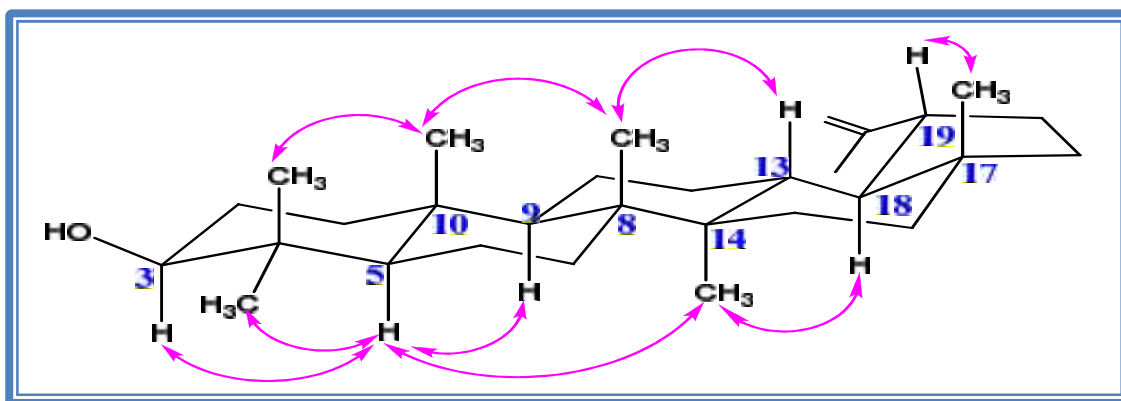
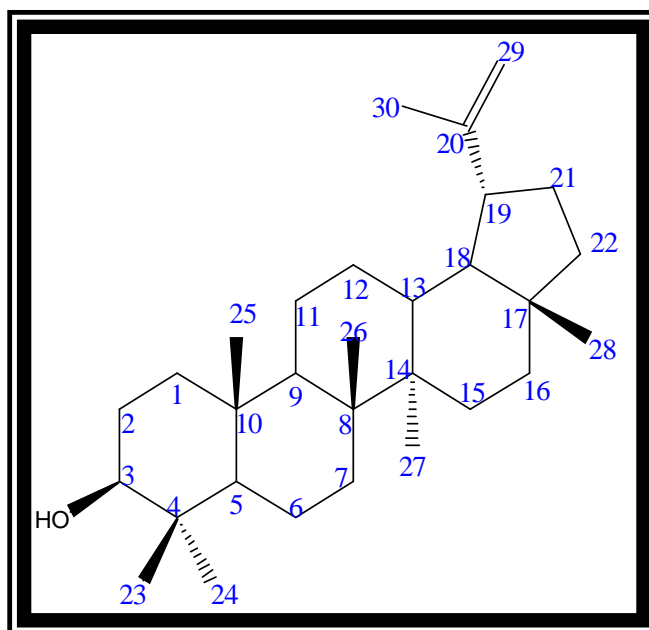


Figure III-104: Stéréochimie des carbones chiraux du composé  $Pd_{12}$

Toutes ces données spectroscopiques, la valeur du pouvoir rotatoire réalisée dans  $CHCl_3$  ( $[\alpha]_D = +26.2^\circ$ ,  $C = 0.83$ ) et la comparaison avec les données de la littérature [135], le composé  $Pd_{12}$  est identifié sans ambiguïté comme étant le (20) 29-lupèn-3-ol nommé aussi Lupéol.



Ce triterpène de la famille du lupane est le plus souvent rencontré dans le règne végétal. Il est connu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires et antiarthritiques [152-153]. D'autres analyses biologiques *in vitro* lui attribuent des activités anticancéreuses et antiangiogéniques [154].

Le tableau suivant (Tableau III-11) rassemble toutes les données spectrales du composé  $Pd_{12}$ .

Tableau III-11 : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé  $\text{Pd}_{12}$  dans  $\text{CDCl}_3$

Position	C (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	38.6	1.69 ( <i>m</i> ) H-1a 0.92 ( <i>m</i> ) H-1b
2	27.3	1.61 ( <i>m</i> ) H-2a 1.06 ( <i>m</i> ) H-2b
3	78.9	3.20 ( <i>m</i> )
4	38,8	-
5	55.2	0.73 ( <i>dd</i> , 10; 2.5)
6	18.2	1.55 ( <i>m</i> ) H-6a 1.45 ( <i>m</i> ) H-6b
7	34.2	1.43 ( <i>m</i> )
8	43.0	-
9	50.3	1.35 ( <i>m</i> )
10	37.1	-
11	20.8	1.48 ( <i>m</i> ) H-11a 1.25 ( <i>m</i> ) H-11b
12	25.0	1.72 ( <i>m</i> ) H-12a 1.12 ( <i>m</i> ) H-12b
13	38.0	1.70 ( <i>m</i> )
14	42.7	-
15	27.3	1.61 ( <i>m</i> ) H-15a 1.06 ( <i>m</i> ) H-15b
16	35.5	1.51 ( <i>m</i> )
17	42.9	-
18	48.2	1.41 ( <i>m</i> )
19	47.9	2.42 ( <i>td</i> , 10; 5)
20	151.2	-
21	29.8	1.97 ( <i>m</i> ) H-21a

		1.31 (m) H-21b
22	39.9	1.43 (m) H-22a 1.25 (m) H-22b
23	27.9	1.02 (s)
24	15.3	0.81 (s)
25	16.1	0.86 (s)
26	15.9	1.07 (s)
27	14.5	1.00 (s)
28	17.9	0.84 (s)
29	109.3	4.66 (d, 2.3) H-29a 4.54 (d, 2.3) H-29b
30	19.8	1.72 (s)

**III- 1-3- Conclusion**

Le présent travail décrit l'investigation chimique d'une plante saharienne appelée *Pteranthus dichotomus* Forssk. appartenant à la famille Caryophyllaceae. Cette étude effectuée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la plante entière a mené à l'identification de 12 composés. Les composés caractérisés appartiennent à cinq classes de métabolites secondaires se répartissant comme suit :

## ❖ Trois Glycolipides:

- 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.
- 1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.
- soyacerebroside I (1-*O*- -D-glucopyranosyl-2-*N*-2 *S*-hydroxy-palmitoyl-2*S*, 3*R*, 4(*E*), 8(*E*) octadécasphingadiénine).

## ❖ Un Lignane.

- 8-oxo-pinoresinol (1*S*, 5*S*, 2*R*, 6*R*-di(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7dioxabicyclo[3.3.0]octan-8-one)

## ❖ Trois Flavonoïdes:

- Quercetine.
- Apigénine.
- Isovitixine.

## ❖ Quater phytostérols:

- Sitosterol.
- Spinasterol.
- Stigmat-7-en-3-ol.
- 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol.

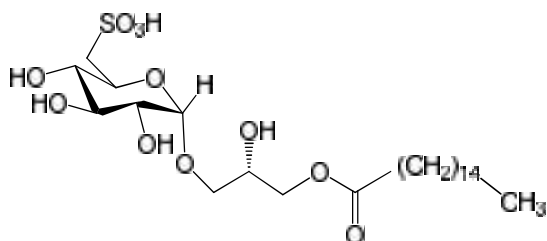
## ❖ Un triterpène :

- Lupéol = (20)29-lupèn-3 -ol.

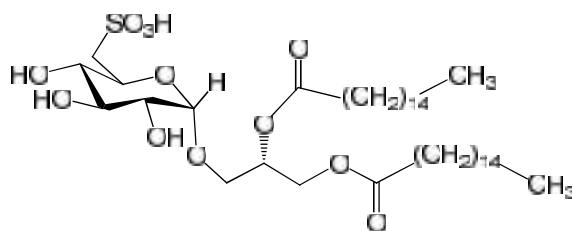
La méthodologie de séparation, isolement et purification de ces composés a été faite à l'aide de la combinaison de différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaque préparative de silice

normale, la chromatographie sur silice greffée en C8, la chromatographie sur polyamide SC6 et Séphadex LH-20.

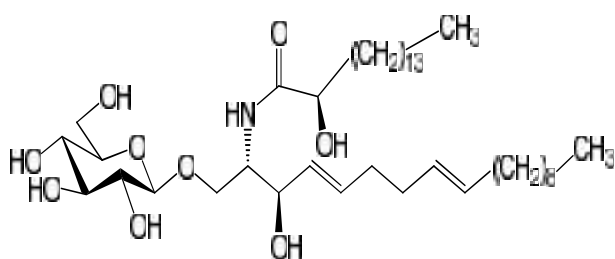
La détermination structurale des métabolites secondaires isolés (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) a été réalisée grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY) et la spectrométrie de masse, UV, IR, mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.



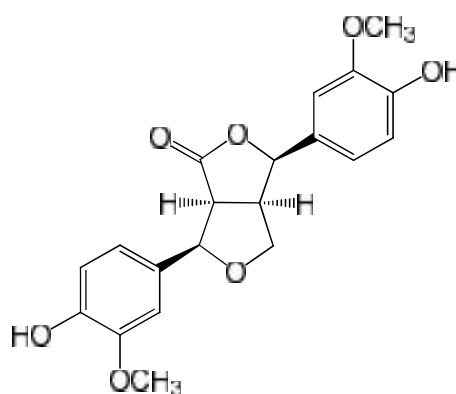
**Pd<sub>1</sub>**: 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo-*D*-quinovopyranosyl)-glycérol.



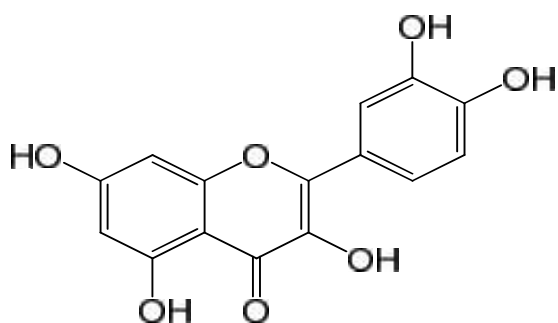
**Pd<sub>2</sub>**: 1,2-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo-*D*-quinovopyranosyl)-glycérol.



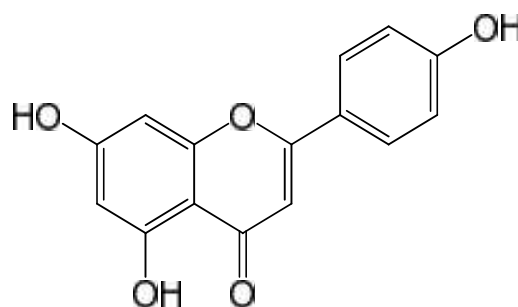
**Pd<sub>3</sub>**: soyacerebroside I.



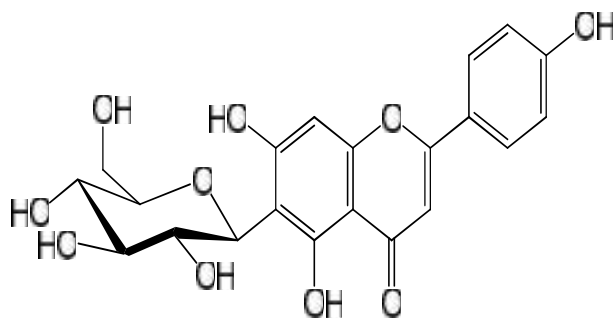
**Pd<sub>4</sub>**: 8-oxo-pinorésinol.



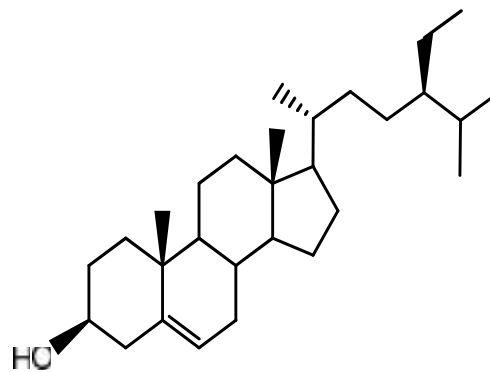
**Pd<sub>5</sub>**: Quercétine.



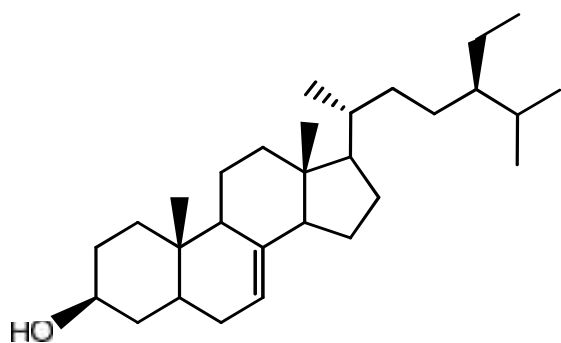
**Pd<sub>6</sub>**: Apigénine.



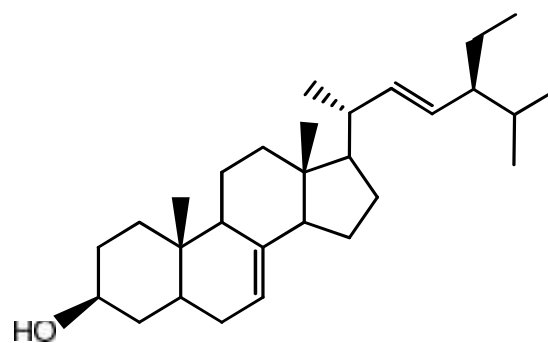
*Pd*<sub>7</sub>: Isovitixine.



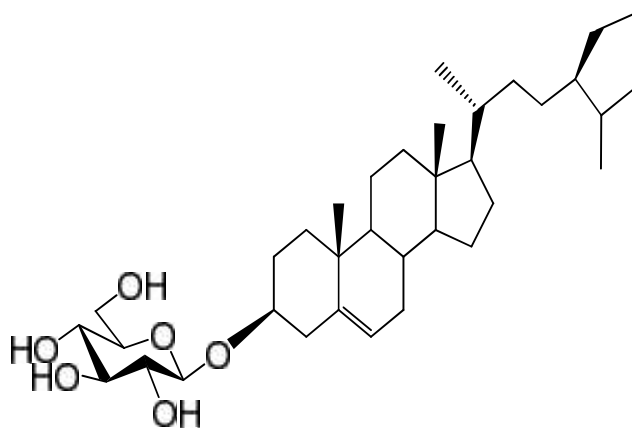
*Pd*<sub>8</sub>: -Sitostrol.



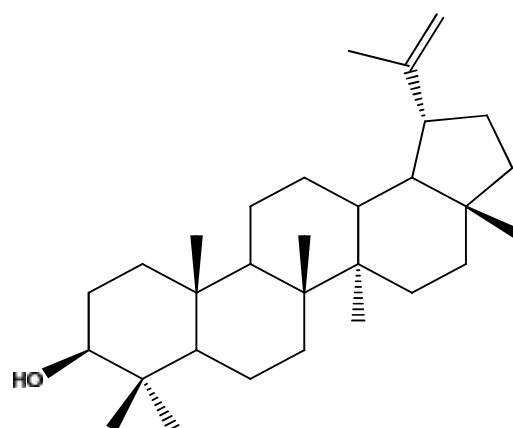
*Pd*<sub>10</sub>: Stigmat-7-en-3-ol.



*Pd*<sub>9</sub>: Spinasterol.



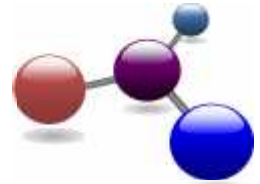
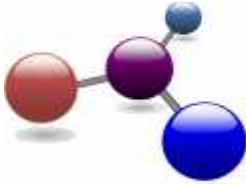
*Pd*<sub>11</sub>: 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol.



*Pd*<sub>12</sub>: Lupéol.



## CHAPITRE III



# *Partie B*

*Etude phytochimique de  
l'espèce *Paronychia capitata*.*



III-B- Etude phytochimique de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) lim.

## III-B-1- Extraction

La partie aérienne de *Paronychia capitata* séchée et broyée, d'un poids de 1 kg en poudre fine a été macérée dans un mélange éthanol-eau (70-30) deux fois pendant trois jours (72 h) à température ambiante. Après filtration et concentration de l'extrait, une solution aqueuse-alcoolique a été obtenue. Cette solution est soumise à une extraction liquide-liquide par les solvants suivants : éther de pétrole, acétate d'éthyle et enfin le butanol. Les trois phases organiques récupérées sont évaporées et concentrées à sec pour conduire les extraits suivants: éther de pétrole *PCEP* (3.7 g), acétate d'éthyle *PCAC* (7 g) et *n*-butanol *PCBU* (27 g). Le protocole d'extraction des racines de l'espèce *P. capitata* est présenté comme suit (Figure III-105):

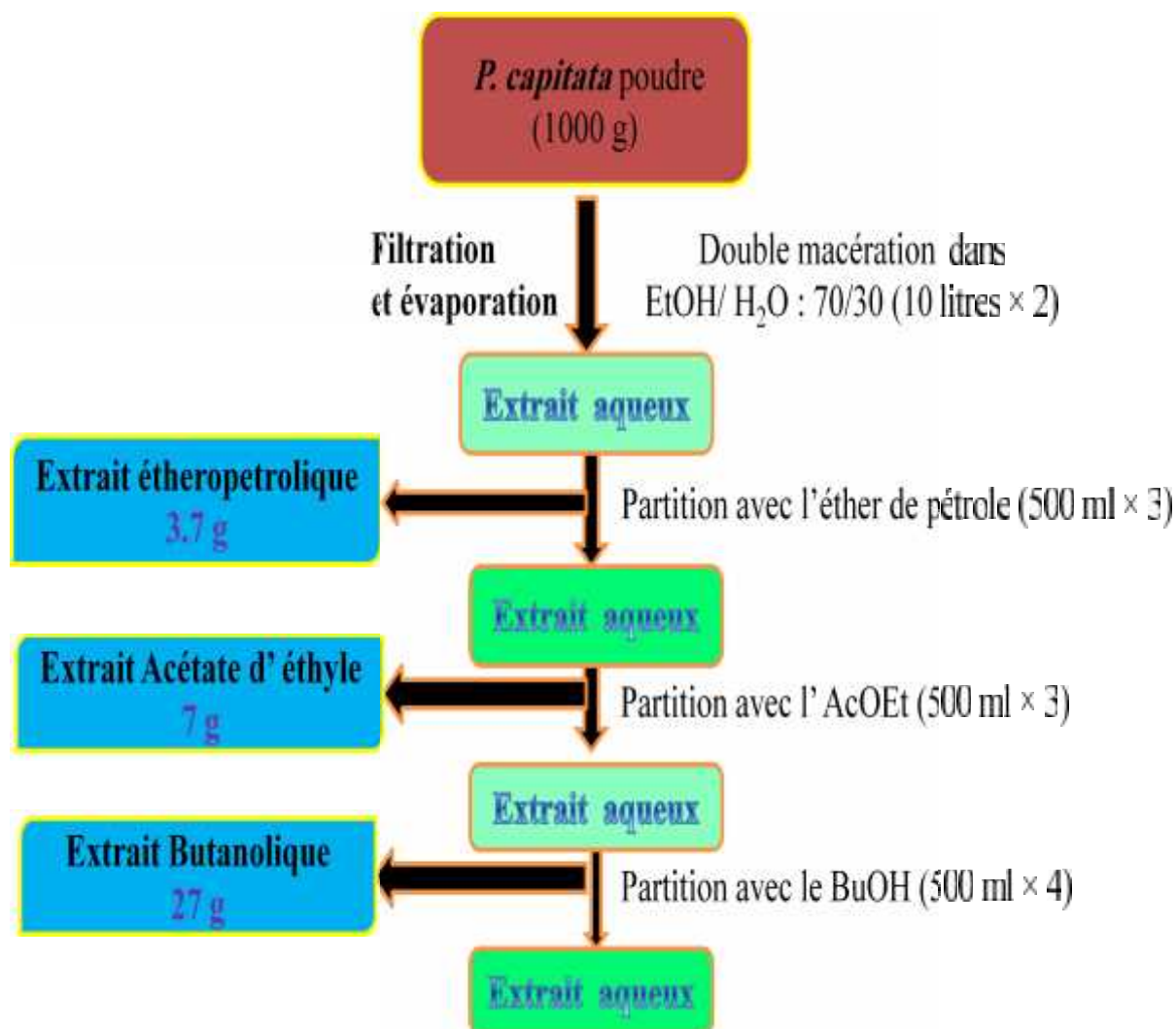


Figure III-105: Schéma d'extraction de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) lim.

Notre travail phytochimique sur l'espèce *P. capitata* a porté sur l'investigation de l'extrait *n*-butanolique en raison de son profil CCM révélant un nombre important de taches sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm).

### III-B-2- Séparation et purification de l'extrait *n*-butanolique (*PCBU*)

L'extrait *n*-butanolique *PCBU* (7 g) a été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice phase inverse RP-18 avec le gradient d'éluant H<sub>2</sub>O-MeOH 80:20 à 0:100. 6 fractions ont été recueillies. Trois composés naturels dont deux stéroïde glycosylé et un disaccharide ont été purifiés par les différentes méthodes chromatographiques sur colonne de gel de silice normale (CC) et sur Sephadex LH-20 et par précipitation (Figure III-106).

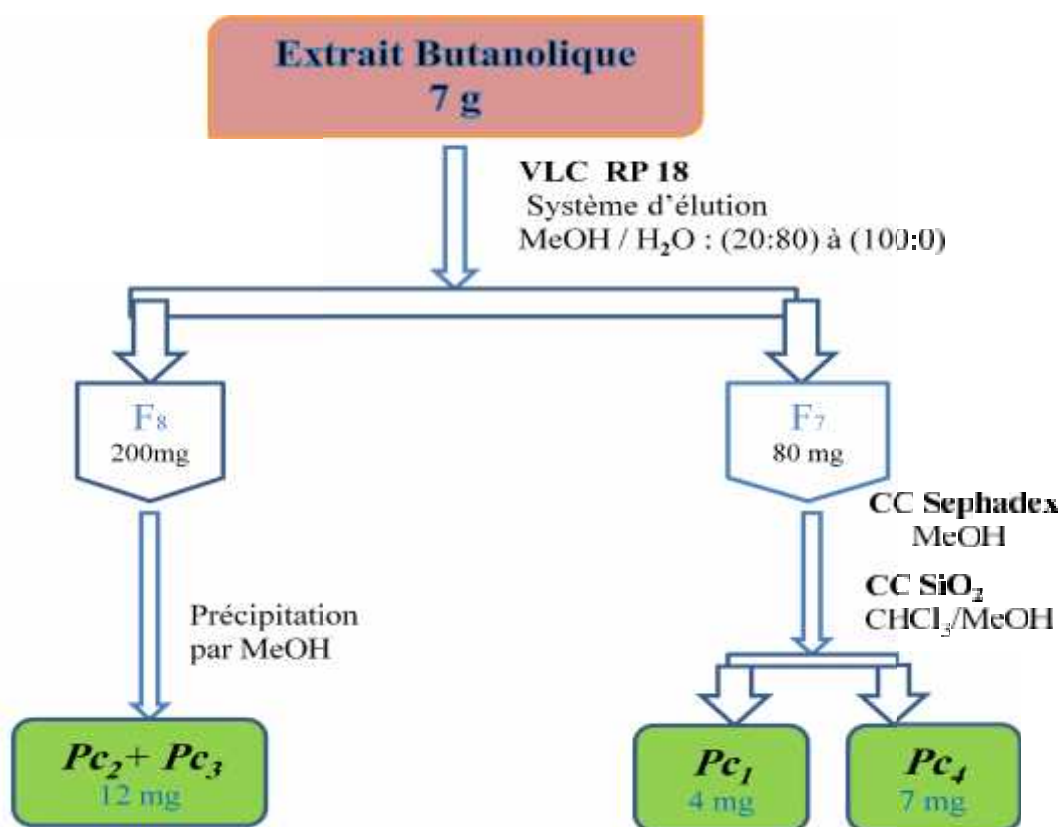
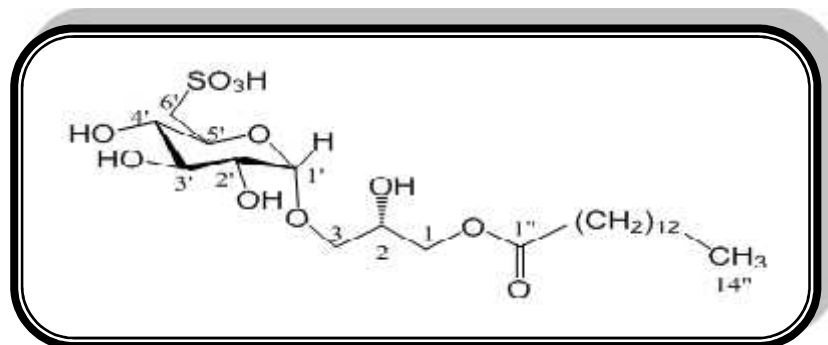


Figure III-106 : Séparation et purification de l'extrait *n*-butanolique (*PCBU*).

### III-B-3- Identification structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, la spectrométrie de masse et par comparaison avec les données de la littérature.

III-B-3-1- Identification structurale du composé  $Pc_1$ 

$Pc_1$ : 1-*O*-myristoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol.

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est invisible à l'UV et se colore en rose après révélation par l'acide et chauffage à 100 °C.

L'observation du spectre RMN du  $^1\text{H}$  du composé  $Pc_1$  (Figure III-107) enregistré dans le méthanol deutéré présente de grandes analogies avec le même spectre du composé  $Pd_1$  « 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol » (Figure III-4), ils sont identiques. Il n'est pas à exclure que ce composé aussi est un sulfoglycolipide. On note la présence de :

- Signaux à 3-4 ppm caractéristiques de protons osidiques.
- Si doublet à 4.78 ppm ( $J = 3.8$  Hz) d'un proton anomère (H-1').
- Plusieurs signaux résonant à champ fort entre 0.90-2.40 ppm caractéristiques des protons de chaîne lipidique.

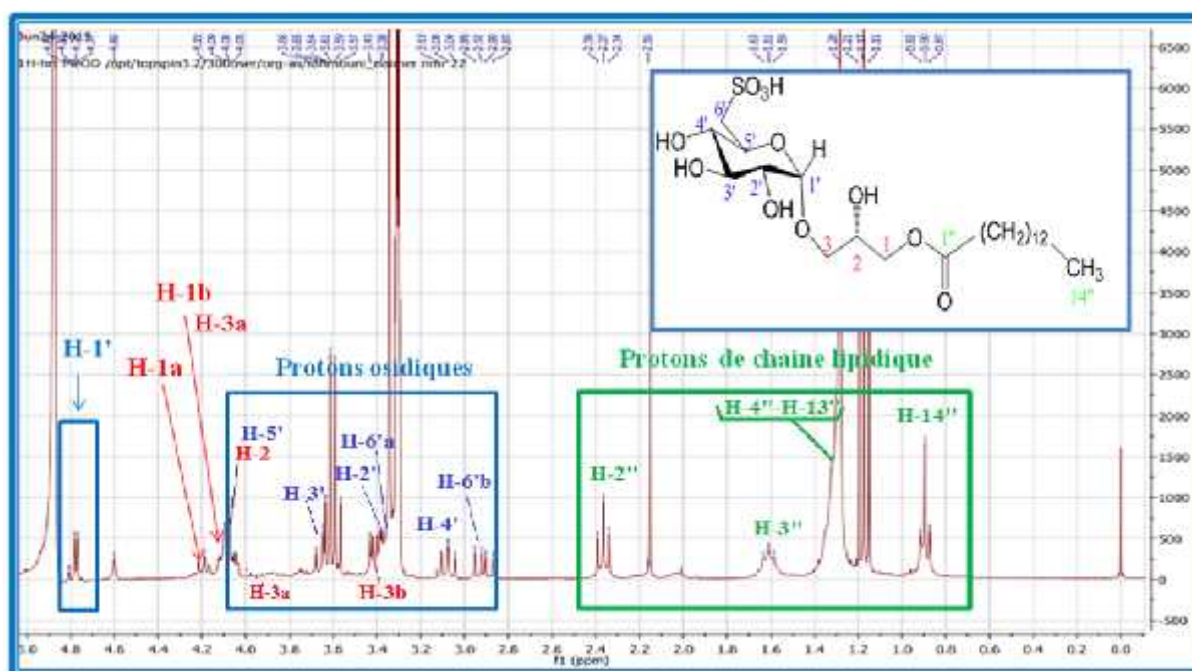


Figure III-107 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé  $Pc_1$

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III-108) en apporte la confirmation de la nature glycoylcérolipidique de ce composé. En effet, on observe la présence :

- Signal à 14.6 ppm d'un carbone méthylique terminant la chaîne lipidique.
- Signaux entre 23.7 et 33.2 ppm de groupements méthylènes.
- Signaux entre 54-75 ppm des carbones osidiques
- Signal à 100.0 ppm d'un carbone anomère.
- 175.7 ppm d'un groupement carbonylé.

Ces caractéristiques spectrales conformes aux données spectrales de composé  $Pd_1$ , suggèrent que ce composé  $Pc_1$  aussi est un glycoylcérolipide monoacylé en position 1 du glycérol.

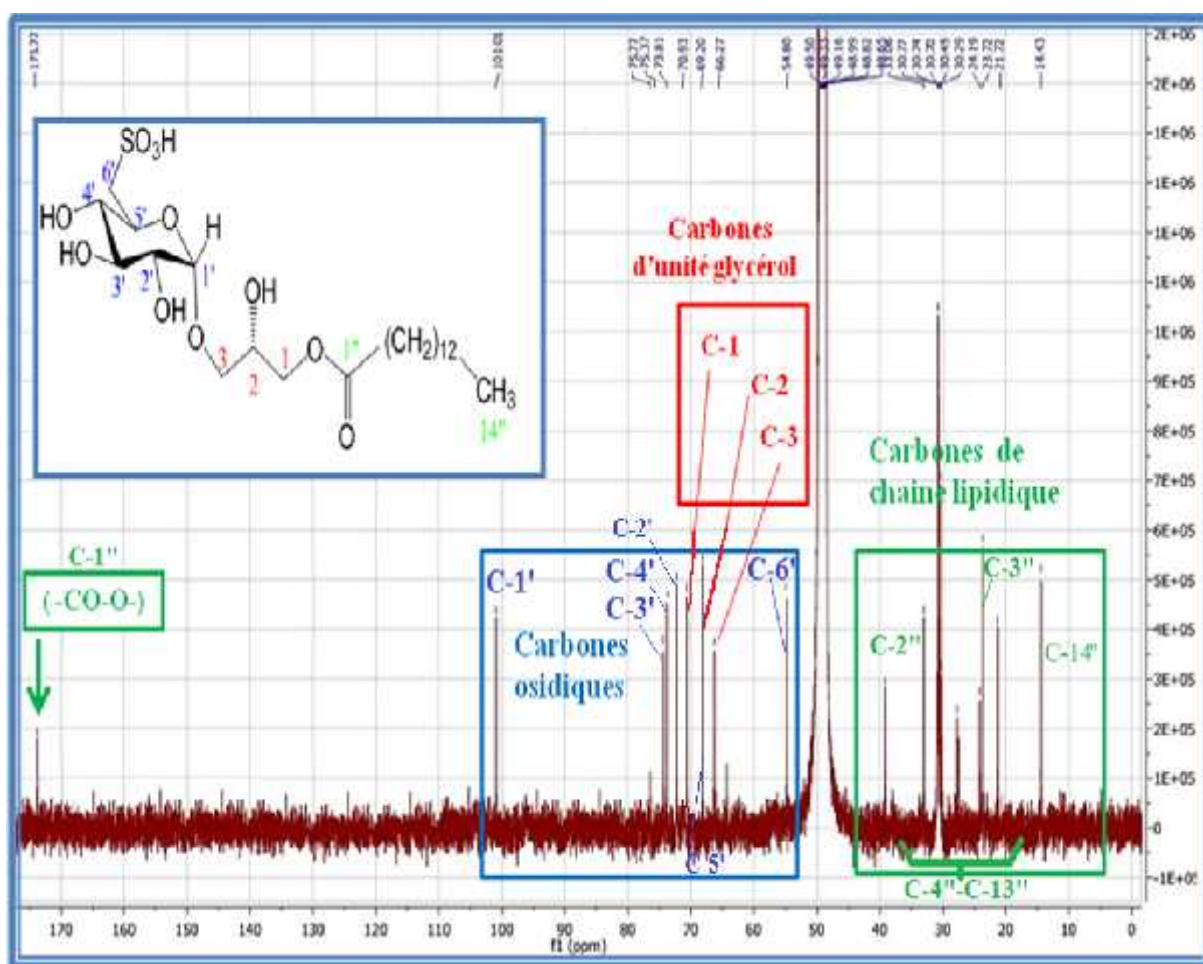


Figure III-108 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $Pc_1$ .

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III-109) du composé  $Pc_1$  obtenu en mode positif indique deux pics d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 551.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $1079.5$   $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  correspondant à une masse moléculaire égale à 528 uma et une formule brute en  $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_{11}\text{S}$ .



La masse moléculaire de ce composé nous permet d'identifier la chaîne grasse saturée qui correspondant au groupement d'acide myristique.

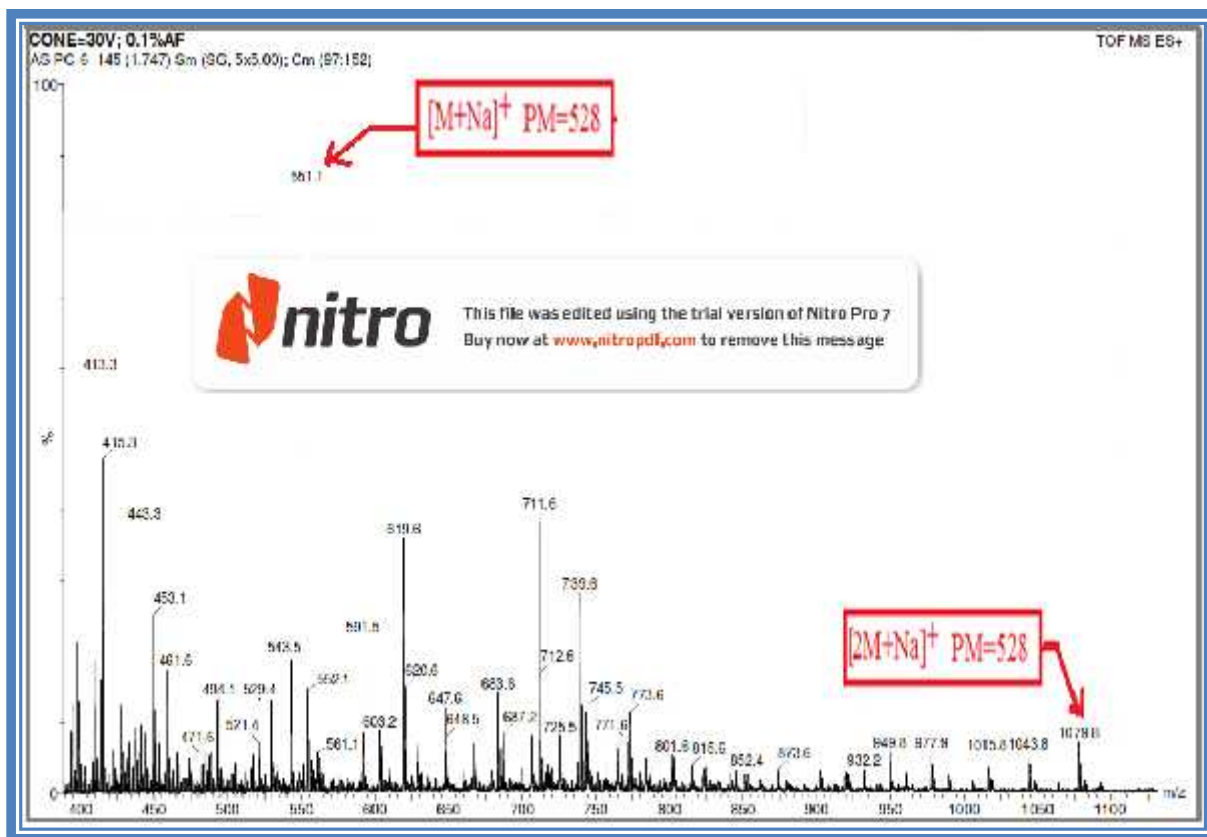
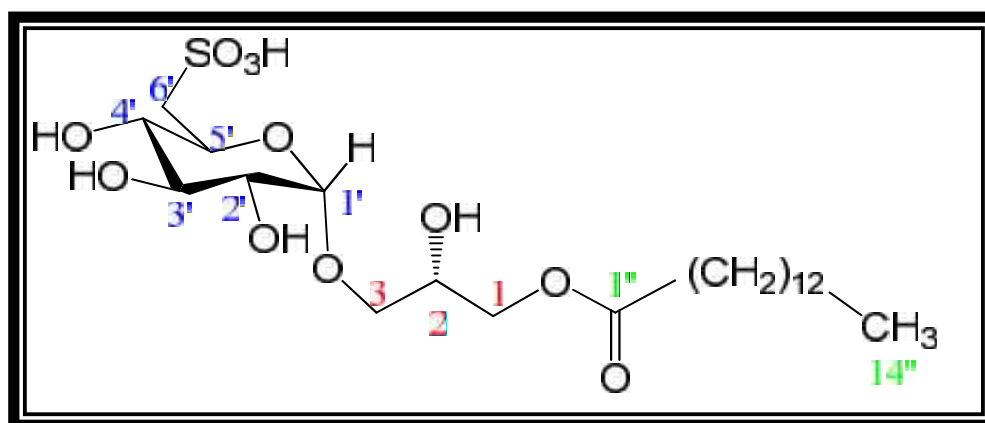


Figure III-109 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé  $Pc_1$

L'ensemble de ces données (Tableau III-12) comparées aux résultats de la littérature [154] suggèrent que ce composé  $Pc_1$  est un glycoylcérolipide monoacylé nommé: 1-*O*-myristoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol.

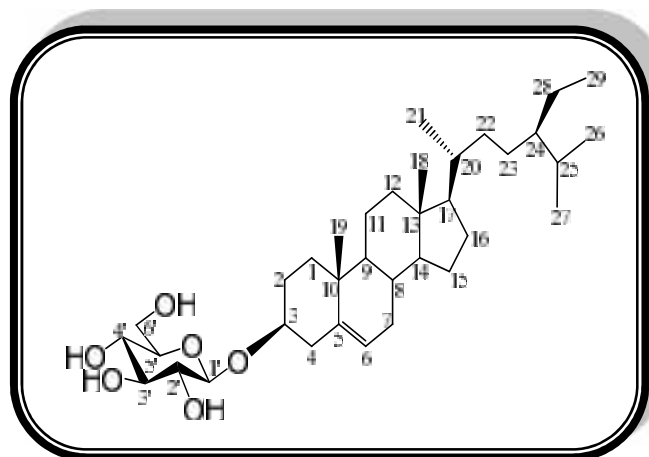
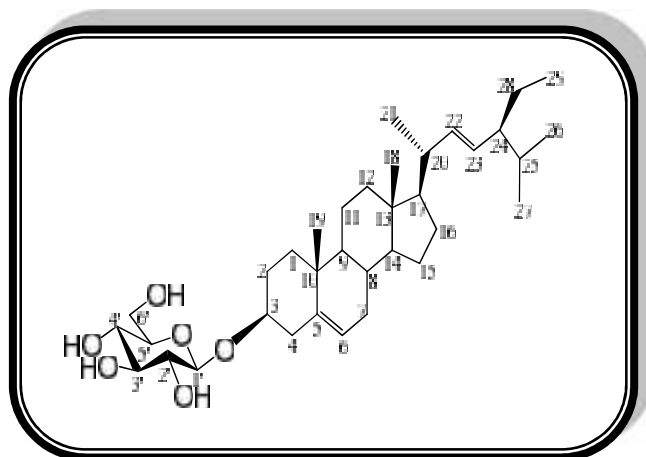


Ce composé est isolé précédemment à partir d'une algue marine *Sargassum fusiforme* [154]. Il a été identifié pour la première fois dans le genre *Paronychia* et la famille Cayophyllaceae.

Tableau III-12: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de  $Pc_I$  dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Position	C (ppm)	H (ppm) (m, J en Hz)
<b>1</b>	66.2	4.10 (m) H-1b 4.20 (dd, 5.9; 12.1) H-1a
<b>2</b>	69.2	4.07 (m)
<b>3</b>	70.9	3.39 (m) H-3b 4.05 (dd, 6.3; 12.8) H-3a
<b>3-O-(6'-sulfo- -D-quinovopyranosyl)</b>		
<b>1'</b>	101.0	4.78 (d, 3.8)
<b>2'</b>	73.8	3.48 (m)
<b>3'</b>	75.7	3.37 (t, 8.9)
<b>4'</b>	75.3	3.08 (t, 6.3)
<b>5'</b>	69.2	4.07 (m)
<b>6'</b>	54.8	2.92 (dd, 9.2 ; 13.9) H-6''b 3.35 (dd, 2 ; 13) H-6''a
<b>1-O-CO-</b>		
<b>1''</b>	175.7	-
<b>2''</b>	33.0	2.37 (t, 7.6)
<b>3''</b>	23.7	1.61 (t, 7.3)
<b>4''-11''</b>	30.2 - 30.9	
<b>12''</b>	33.2	1.26- 1.40
<b>13''</b>	21.7	
<b>14''</b>	14.4	0.90 (t, 6.7)



III-B-3-1- Identification structurale du composé  $Pc_2$  et  $Pc_3$ 

$Pc_3$  : 3-O- -D-glycopyranosyl stigmasterol.     $Pc_2$  : 3-O- -D-glycopyranosyl -sitostérol.

Ces composés se présentent un mélange sous forme d'une poudre blanche soluble dans un mélange chloroforme/méthanol. Il est invisible à l'UV et se colore en mauve après révélation à l'acide et chauffage à 100 °C.

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figures III-110 et III-111) et la comparaison avec les données de la littérature [135,155] permettent d'identifier deux phytostérols glycosylés, isolés en mélange constitué par 3-O- -D-glycopyranosyl Sitostérol  $Pc_2$  et stigmasterol glucosylé  $Pc_3$ .

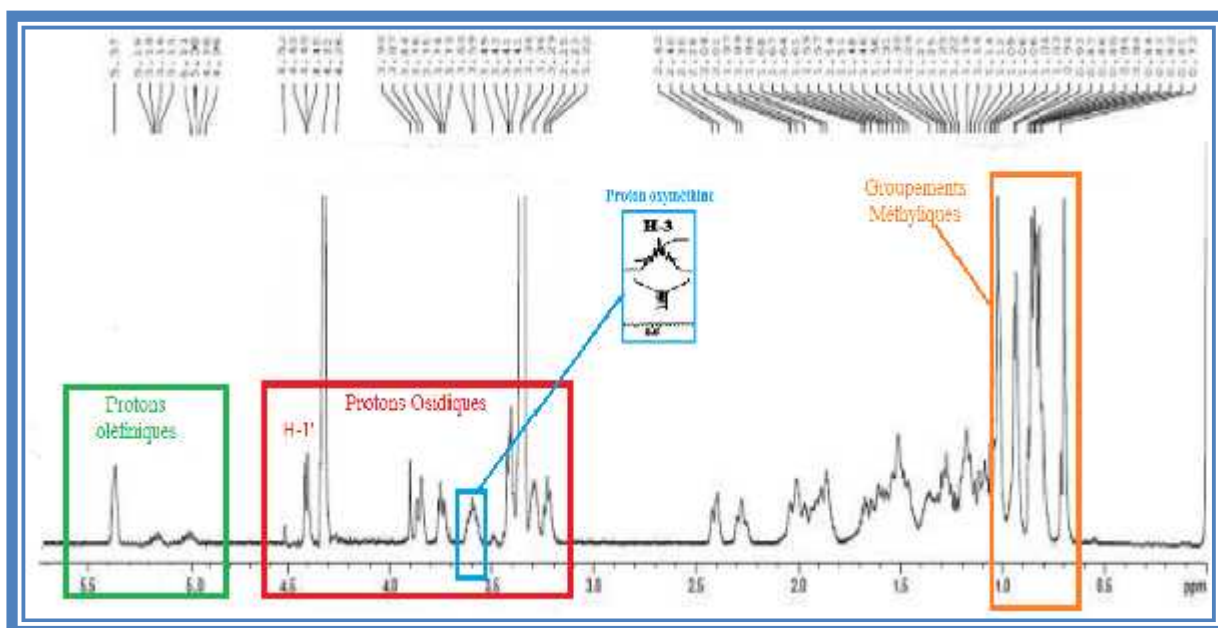


Figure III-110: Spectre RMN  $^1H$  du composé  $Pc_2$  et  $Pc_3$ .

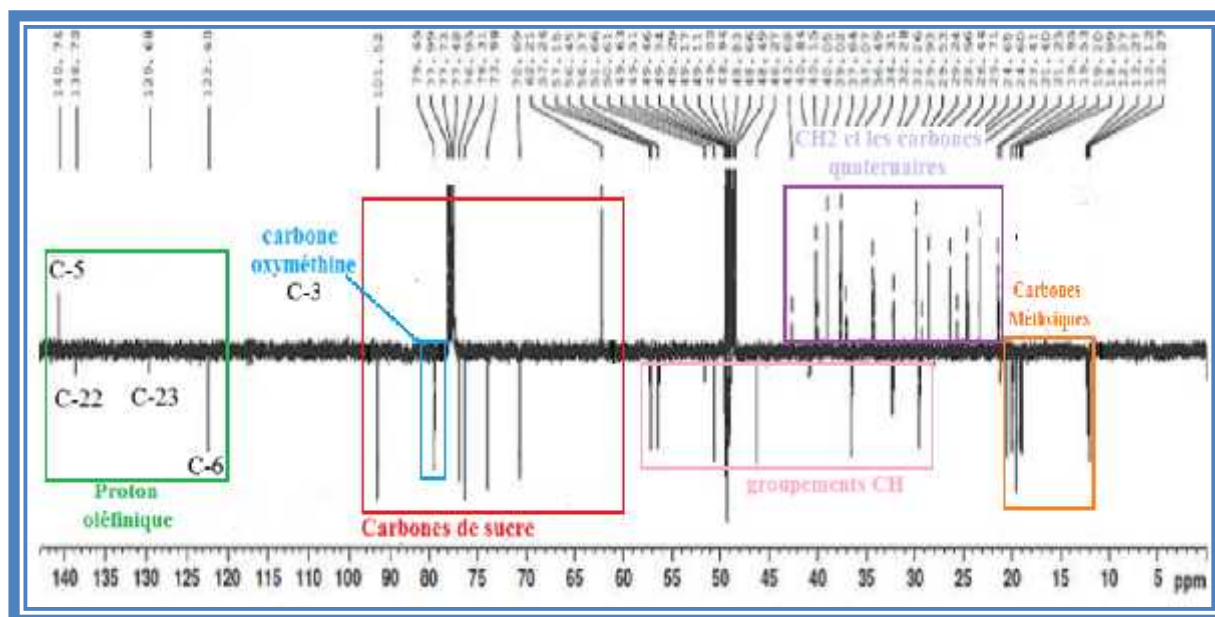


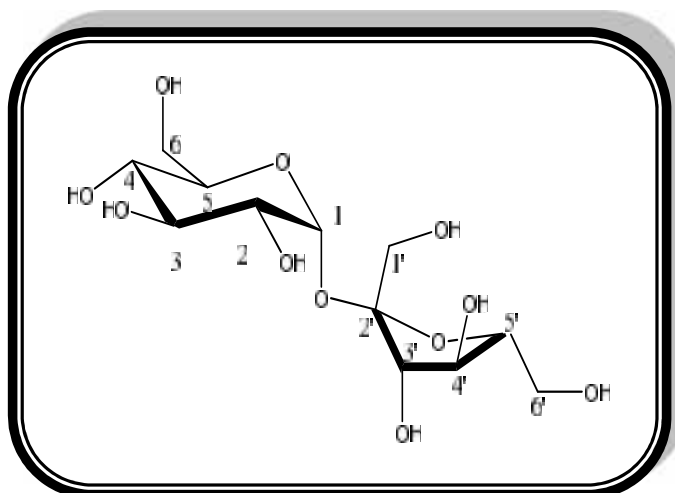
Figure III-111: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du composé  $Pc_2$  et  $Pc_3$ .

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones déterminés conjointement la comparaison avec les données de la littérature des composés  $Pc_2$  et  $Pc_3$  sont représentées dans les tableaux III-10 et III-13 respectivement. Le composé  $Pc_3$  en fait commun à toutes les plantes, a été isolé antérieurement de plusieurs espèces de la famille Caryophyllaceae. On citera pour l'exemple *Silene Conidea* Linn [155].

Tableau III-13: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de  $Pc_3$  dans  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ .

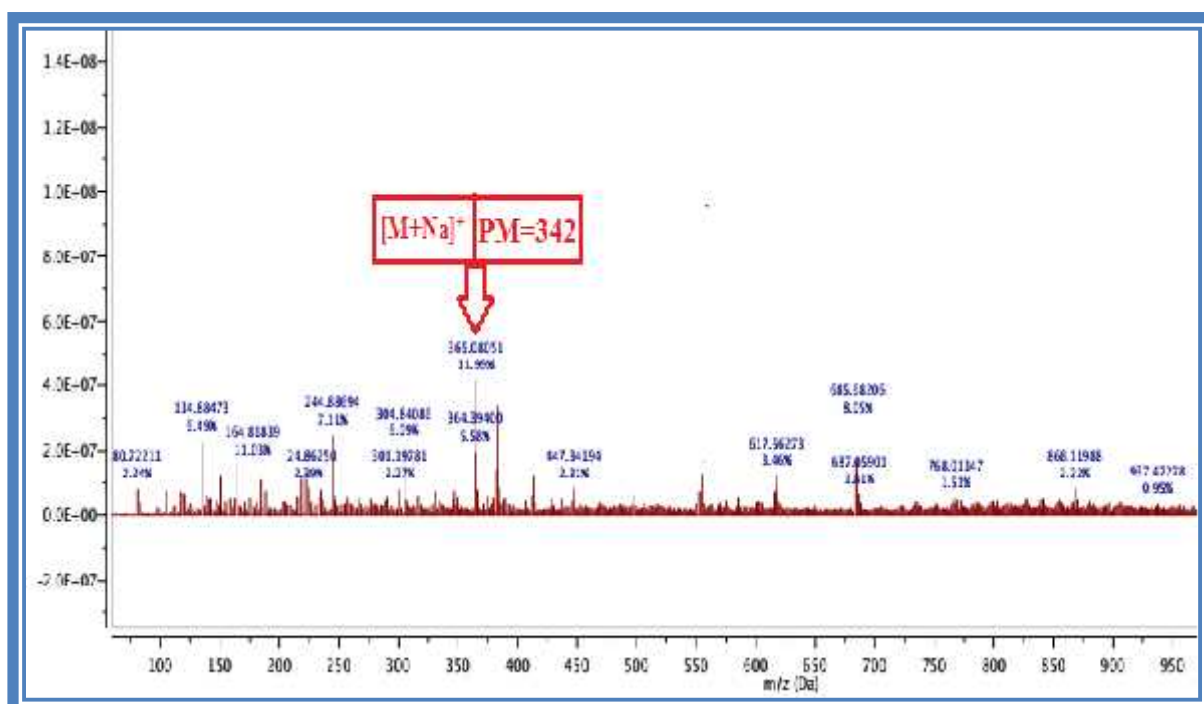
C	c	H (ppm) (m, J en Hz)
1	37.8	1.04 (m) H-1b 1.82 (m) H-1a
2	30.1	1.57 (m) H-2b 1.87 (m) H-2a
3	79.6	3,55 (m)
4	39.2	2,23 (m) H-4b 2,35 (m) H-4a
5	140.9	-
6	122.5	5.32 (dl; 5.2)
7	32.4	1.93 (m) H-7b

		1.96 (m) H-7a
8	32.4	1.48 (m)
9	50.8	0.90 (m)
10	37.2	-
11	21.6	1.46 (m)
12	40.2	1.44 (m) 1.97 (m)
13	42.7	-
14	57.4	0.98 m
15	26.6	1.11 m
16	29.4	1.23 (m) H-16b 1.88 (m) H-16a
17	56.5	1,13 (m)
19	19.7	0,99 (s)
20	41.0	2.02 (m)
21	21.4	0.93 (d, 6.1)
22	138.9	5.13 (dd; 15.0; 8.7)
23	129.8	4.96 (dd; 15.0; 8.5)
24	51.8	1.49 (m)
25	36.7	1.33 (m)
26	20.1	0.79(m)
27	19.3	0.77 (m)
28	24.8	1.03 (m) H-28b 1.54 (m) H-28a
29	12.5	0.73 (m)
<b>3-O-glu</b>		
1	101.7	4.36 (d, 7.7)
2	74.2	3.18 (t, 8.1)
3	77.1	3.37 (m)
4	70.8	3.36 (m)
5	76.5	3.25 (m)
6	62.3	3.70 (dd, 11.9; 4.8) H-6 b 3.81 (dd, 11.9; 2.4) H-6 a

III-B-3-3- Identification structurale du composé  $Pc_4$  $Pc_4$  : Saccharose.

Le composé  $Pc_4$  a été isolé sous forme d'une huile marron soluble dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache invisible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se colore en noir après révélation par solution d'acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif (Figure III-112) montre un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  365  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 342 uma correspondant à une formule brute en  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .

Figure III-112 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé  $Pc_4$ .

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-113) de ce composé permet d'observer des signaux dans la région moyenne des champs 3.00-5.20 ppm dont les signaux entre 3.00-4.80 correspondent les protons osidiques et un signal attribuable au proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} 5.13$  ( $d$ ;  $J = 3.7$  Hz; H-1). La valeur de la constante de couplage de ce proton traduit une configuration .

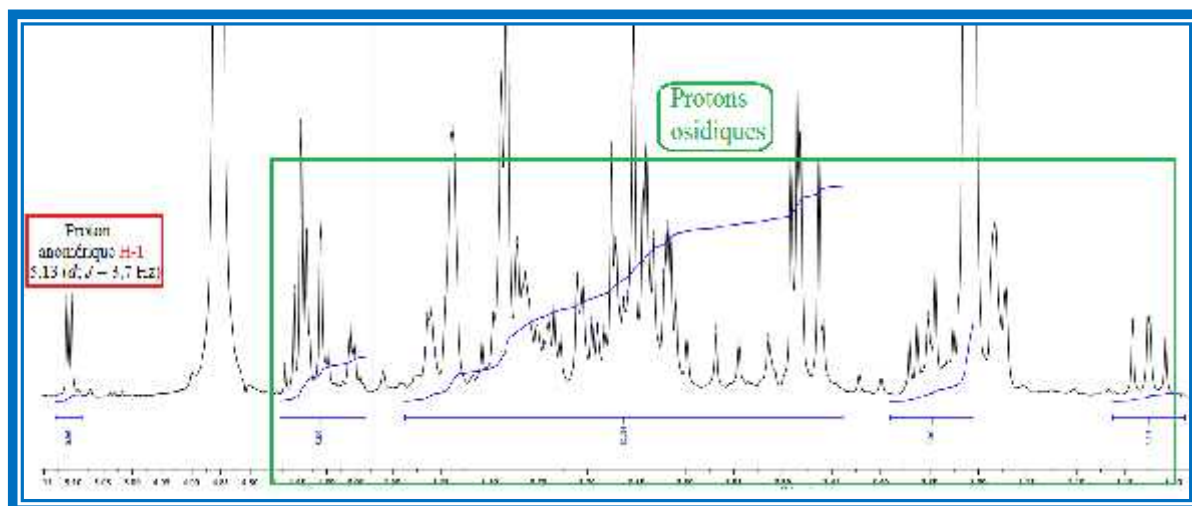


Figure III-113 : Spectre RMN $^1\text{H}$  du composé  $Pc_4$ .

D'autre part, son spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-114) montre 12 atomes de carbone se répartissant en huit oxyméthines dont un carbone anomère résonant à 93.2 ppm (C-1). Trois oxyméthylènes et un carbone quaternaire dioxycéné repéré à 103.7 ppm (C-2').

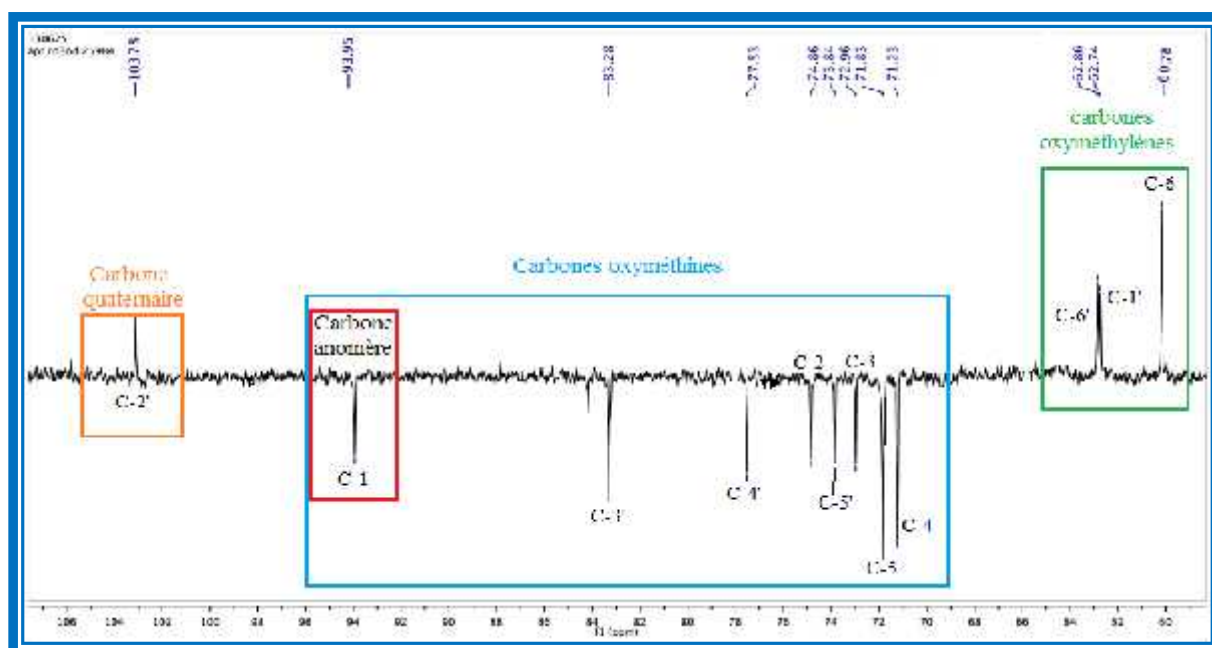


Figure III-114 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé  $Pc_4$ .

Ces observations des spectres RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C *J*-modulé et de masse ESI-MS en plus la comparaison avec les données de la littérature [156] indiquent que le composé *Pc*<sub>4</sub> est un disaccharide connu sous le nom du saccharose. Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé sont rassemblés dans le tableau (III-14).

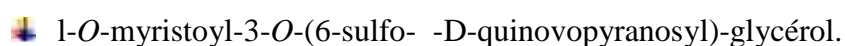
**Tableau III-14: Déplacements chimiques en RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN<sup>13</sup>C (125MHz) du composé *Pc*<sub>4</sub> dans CD<sub>3</sub>OD.**

Position	C (ppm)	H (ppm) ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	93.2	5.13 ( <i>d</i> , 3.7)
2	73.8	3.45 ( <i>t</i> , 3.7)
3	72.9	3.76 ( <i>m</i> )
4	71.2	3.80 ( <i>m</i> )
5	71.8	3.66 ( <i>m</i> )
6	60.7	3.83 ( <i>m</i> ) H-6a 3.81 ( <i>m</i> ) H-6b
1'	62.8	3.64 ( <i>m</i> ) H-1'a 3.62 ( <i>m</i> ) H-1'b
2'	103.7	-
3'	83.2	4.10 ( <i>d</i> , 2.5)
4'	77.5	3.97 ( <i>m</i> )
5'	74.8	3.78 ( <i>m</i> )
6'	62.7	3.77 ( <i>m</i> ) H-6'a 3.75 ( <i>m</i> ) H-6'b

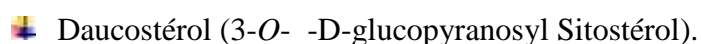
## III-B-3- Conclusion

L'étude chimique de l'extrait *n*-butanolique des parties aériennes de l'espèce *Paronychia capitata* (L) lim., plante appartenant à la famille Caryophyllaceae a abouti à l'isolement et la caractérisation de quatre produits naturels constitués de:

❖ Un glycolipide



❖ Deux phytostérols

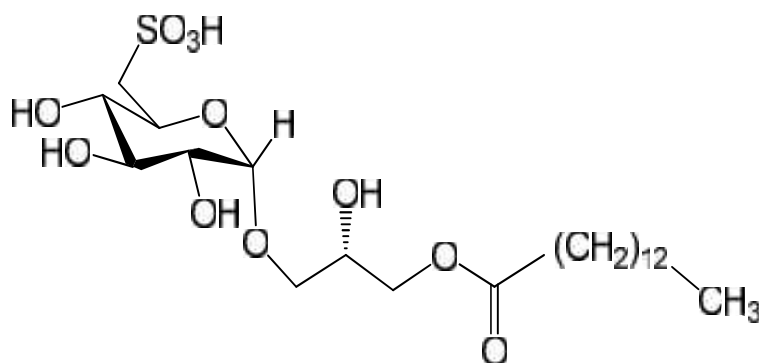


❖ Un disaccharide



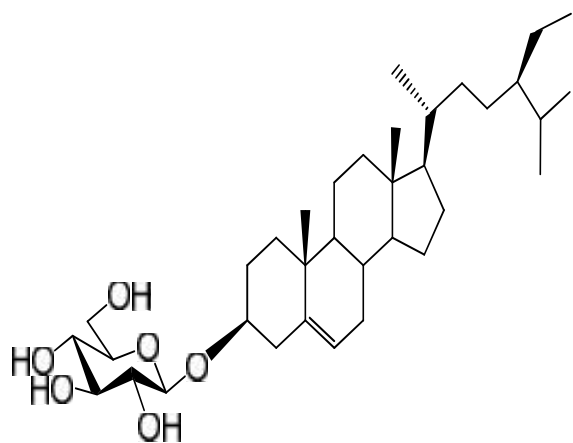
Les opérations de séparation, isolement et purification des métabolites secondaires que renferme l'extrait butanolique *PDBU* de cette plante sont basées principalement sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques (CCM et CC) utilisées dans notre laboratoire.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie de masse, la spectroscopie de résonance magnétique (RMN) et la comparaison avec les données de la littérature.

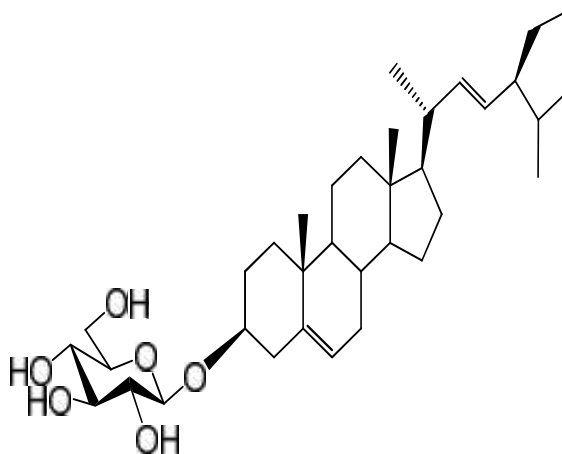


*Pc*<sub>1</sub>: 1-*O*- myristoyl -3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.

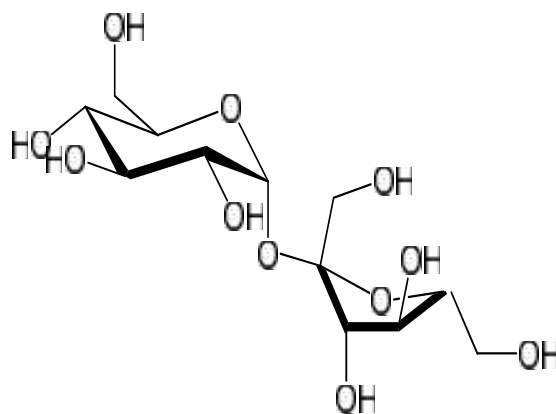




***Pc*<sub>2</sub>** : 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol.

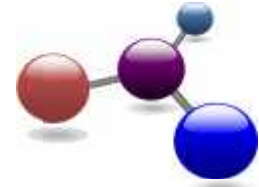
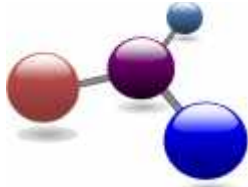


***Pc*<sub>3</sub>** : 3 -D-glucopyranosyl -stigmasterol.



***Pc*<sub>4</sub>** : Saccharose

## CHAPITRE III



# Partie C

*Dosage des polyphénols des espèces :*

*Pteranthus dichotomus Forssk.*

*et Paronychiacapitata (L) Lim.*



**III-C-Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux:**

Fin de identifier certaines métabolites dans les extraits préparés à partir les espèces *P. dichotomus* et *P. capitata*, un dosage des polyphénols totaux a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que ces composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives [157], ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires, antimicrobiens [158,159]. L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin- Ciocalteu [160], l'acide gallique a été utilisé comme standard.

**III-C-2- Résultats et discussion****III-C- 3- 1- Résultats**

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. Les résultats obtenus des extraits et le standard sont représentés dans une courbe d'étalonnage (Figure V-8 page 187). La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg}$  extrait sec).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux sont représentés dans le tableau III-15 ci-dessous.

**Tableau III-15 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, dans les extraits des espèces Caryophyllaceae**

	Extraits	Teneur en polyphénols ( $\mu\text{g EAG/mg}$ extrait)
<i>Pteranthus dichotomus</i>	<i>PDBU</i>	$7.007 \pm 0.155$
	<i>PDAC</i>	$27.140 \pm 1.836$
<i>Paronychia capitata</i>	<i>PCBU</i>	$5.140 \pm 1.131$
	<i>PCAC</i>	$32.237 \pm 1.403$

Les résultats montre que les extraits acétate d'éthyle (**PDAC**, **PCAC**) des deux espèces sont riches en polyphénols par rapport les extraits *n*-butanoliques (**PDBU**, **PCBU**).

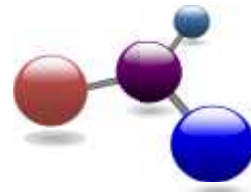
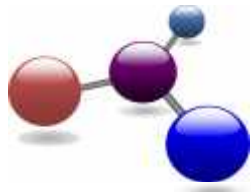
### III-C-2- Discussion des résultats

L'étude quantitative des extraits bruts des espèces *P. dichotomus* et *P. capitata*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués [159].

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [161]. En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleue, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm [162].

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que **PCAC** et **PDAC** représentent l'extrait le plus riches avec: 32 et 27 mg EAC/g d'extrait, suivi par les extraits **PDBU** et **PCBU** avec 7 et 5 mg EAC/g d'extrait représentent la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

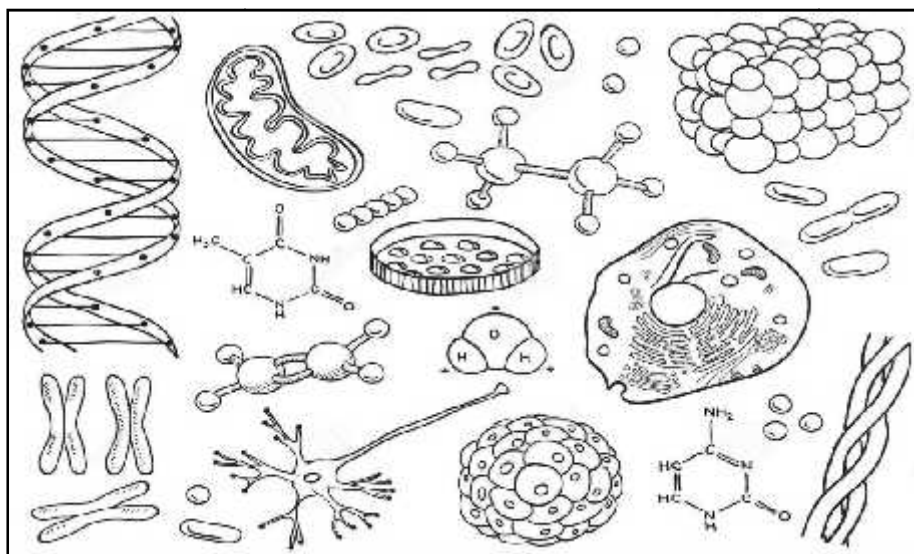
Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte des plantes ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales (polarité du solvant) [163].



# CHAPITRE IV

## *Tests biologiques*

*(Activités antibactérienne et antioxydant)*



## IV-1-Généralité sur l'activité antibactérienne et antioxydante

### IV-1-1- activité antibactérienne

#### IV-1-1-1-Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Elles sont responsables de diverses infections dans les organismes vivants. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes [164].

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [165]. D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [166].

#### IV-1-1-2- Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

##### IV-1-1-2-1- *Escherichia coli*

C'est une bactérie à GRAM négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal [167], de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1.1 à 1.5  $\mu\text{m}$  (Figure VI-1) [168].

*E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été diarrhée infantile et les intoxications alimentaires [167,169].



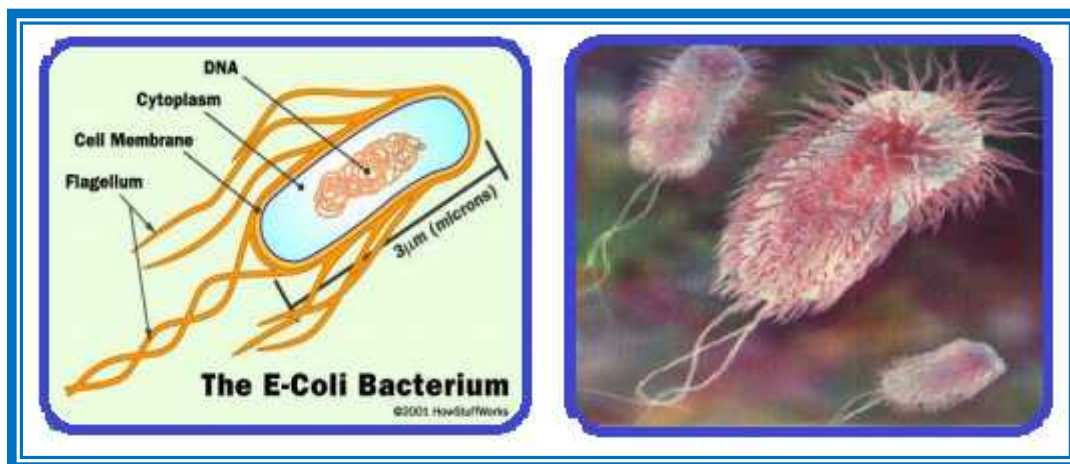


Figure IV-1 : Aspect morphologique d'*Escherichia Coli*.

#### IV-1-1-2-2- *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (Figure VI-2) sont des cocci à GRAM positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [169]. *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée [170].



Figure IV-2 : Aspect morphologique du *Staphylococcus aureus*.

#### IV-1-1-2-3- *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles à GRAM négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence des flagelles, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Figure VI-3) [169]. *P. aeruginosa* est responsable de 16% des cas de



pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales [172].



Figure IV-3 : Aspect morphologique du *Pseudomonas aeruginosa*.

#### IV-1-1-2-4- *Klebsiella pneumoniae*

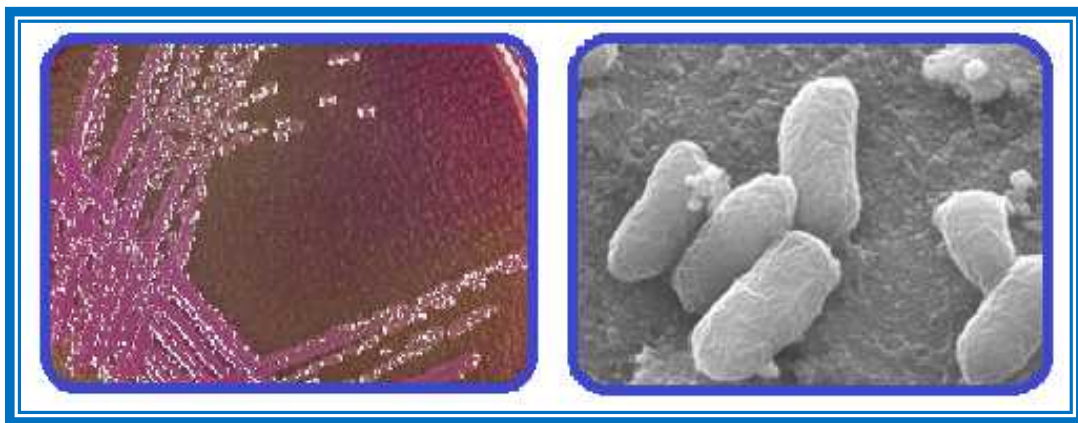
Bacille à GRAM négatif, immobile court et trapu, mesurant habituellement 2-3  $\mu\text{m}$  de long sur 0.6  $\mu\text{m}$  de large. Sur milieu gélosé cette bactérie donne des colonies de grande taille de type M ou muqueuses. *Klebsiella pneumoniae* (Figure IV-4) détermine des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), des infections intestinales et urinaires. Elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes et peut être responsable d'infections nosocomiales. Ces germes sont aussi responsables de proliférations sur de nombreuses plantes, feuilles, arbres, céréales, sols et eaux [173].



Figure IV-4 : Aspect morphologique du *Klebsiella pneumoniae*.

**IV-1-1-2-5- *Enterobacter sp***

Ce sont des bacilles à GRAM négatif, anaérobies facultatifs mesurant 0.6  $\mu\text{m}$  de diamètre et 1.2  $\mu\text{m}$  de longueur; ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche [174-175]; leur température optimale de croissance est de 30 °C [175]. Commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, pouvant être rencontré dans le sol et les eaux d'égouts. *Enterobacter sp* (Figure IV-5) est responsable d'infections nosocomiales et aussi elle est la pathogène les plus fréquents dans les septicémies néonatales avec des localisations secondaires comme les articulations ou le système nerveux central [176].



**Figure IV-5 : Aspect morphologique du *Enterobacter sp*.**

**IV-1-2- Activité antioxydante****IV-1-2- 1- Généralités**

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant [177]. Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer [178]. Ces radicaux provoquent des

lésions directes de molécules biologiques des cellules (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides) [179].

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète [180,181].

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [179,182]. La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que la réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les antioxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules [179]. Les antioxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre inoffensifs et donc rendre impossible leurs oxydations par les molécules biologiques des cellules [177].

Les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer, plusieurs substances naturels peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent: les composés phénoliques comme les flavonoïdes, les lignanes....etc, les caroténoïdes, et les vitamines C et E présents dans certains aliments comme les fruits et les légumes [183].

## IV-2- Tests biologiques

On a testé l'activité antibactérienne et antioxydante (test au DPPH, test de blanchissement du  $\beta$ -carotène) *in vitro* des extraits organiques préparés à partir des parties aériennes des deux espèces *Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capiata* (Caryophyllaceae).

### IV-2-1- l'activité antibactérienne

#### IV-2-1-1-Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits *PDAC*, *PDBU*, *PCAC* et *PCBU* des espèces *Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capiata*. Cette activité a été révélée sur trois souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), et deux souches bactériennes issues à partir des

prélèvements des malades (*Klebsiella pneumoniae* BLSE et *Enterobacter sp* BLSE). L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [184].

la méthode de diffusion en milieu gélosé (La méthode de disque) a permis de déterminer l'action des extraits des plantes dissouts dans le diméthyle sulfoxyde DMSO et diluée (0.5 g/ml, 0.25 g/ml, 0.125 g/ml et 0.062 g/ml) sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier (papier Wattman N°3) préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

La Gentamicine et l'Ampicilline (10µg/disque) ont été utilisées comme contrôle positif. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

#### IV-2-1-1- Résultats

Le test de diffusion sur disques nous a permis d'évaluer le pouvoir antimicrobien des extraits préparés. Le tableau IV-1 rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions de croissance bactérienne manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées.

**Tableau IV-1 : Résultats de l'antibiogramme (diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne).**

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	<i>Enterobacter sp</i> BLSE
<b>Ampicilline (10µg/disque)</b>	15 mm	20 mm	32 mm	-	-
<b>Gentamicine (10µg/disque)</b>	14 mm	19 mm	28 mm	14 mm	12 mm

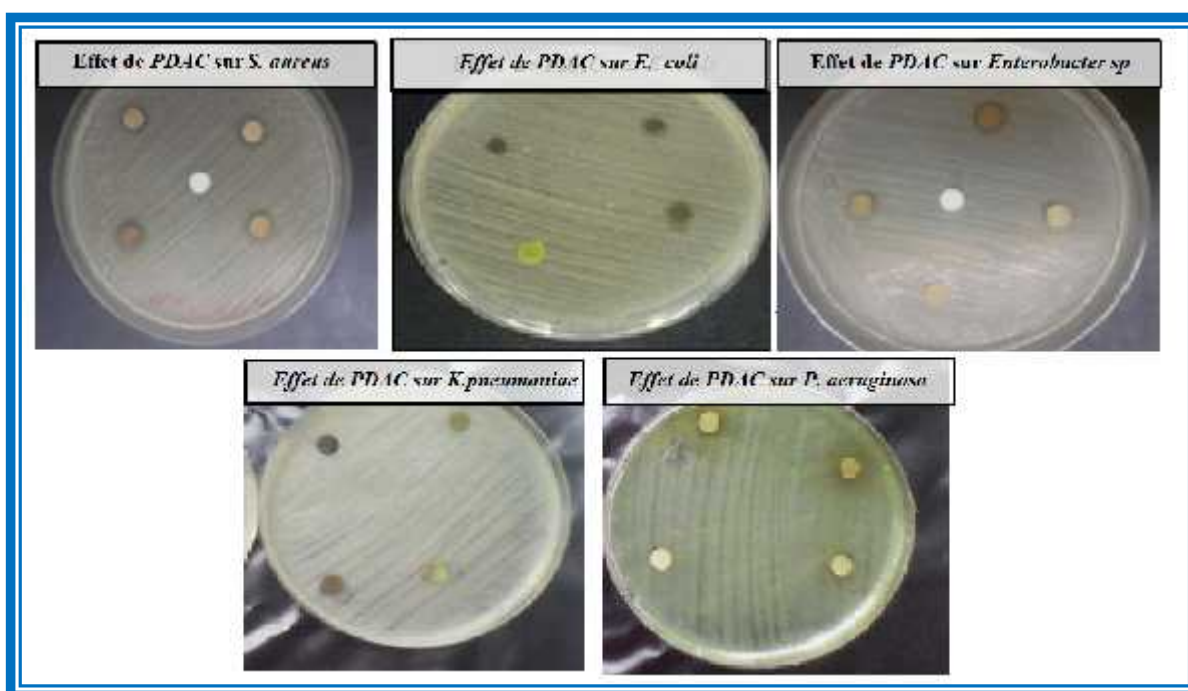
\* Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions. (-) : pas d'inhibition.

Les résultats du screening antibactérien des extraits *PDAC*, *PDBU*, *PCAC* et *PCBU* sont reportés dans les tableaux IV-2, IV-3 et les figures IV-6, IV-7, IV-8, IV-9.

**Tableau IV-2: Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits *PDAC* et *PDBU* de l'espèce *Pteranthus dichotomus*.**

		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	<i>Enterobacter sp</i> BLSE
<i>PDBU</i> (mg /mL)	500	10.0±2.828	-	-	13.5±0.707	-
	250	08.0±1.414	-	-	08.0±1.414	-
	125	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-
<i>PDAC</i> (mg /mL)	500	07.0±0.0	-	10.67±1.527	-	8.33±0.577
	250	-	-	10.0±1.732	-	07.0±0.0
	125	-	-	9.67±1.527	-	-
	65	-	-	8.33±0.577	-	-

\* Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus).  
Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.  
(-) : pas d'inhibition



**Figure IV-6: Effet de l'extrait *PDAC* sur la croissance microbienne.**



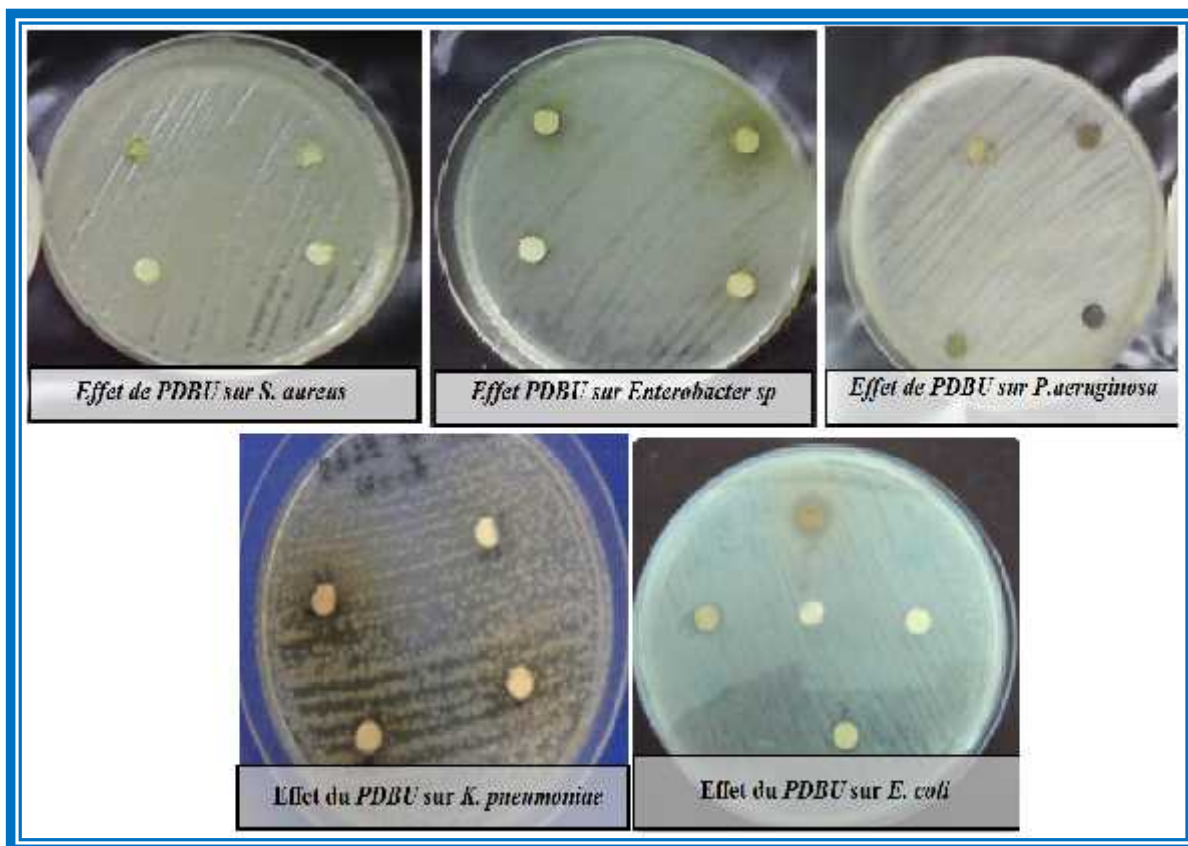


Figure IV-7 : Effet de l'extrait PDBU sur la croissance microbienne.

Tableau IV-3 : Diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne des extraits PCAC et PCBU de l'espèce Paronychia capitata.

		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE	<i>Enterobacter sp</i> BLSE
<b>PCBU</b> (mg /mL)	500	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-
	125	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-
<b>PCAC</b> (mg /mL)	500	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-
	125	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-

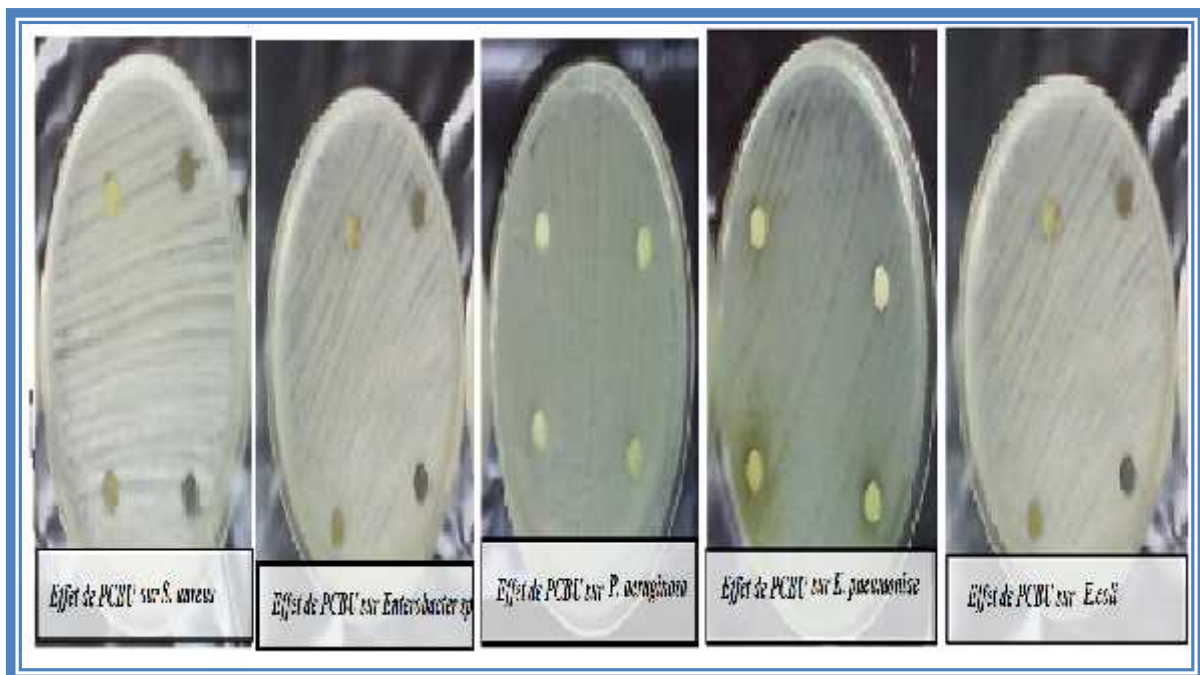


Figure IV-8 : Effet de l'extrait *PCBU* sur la croissance microbienne.

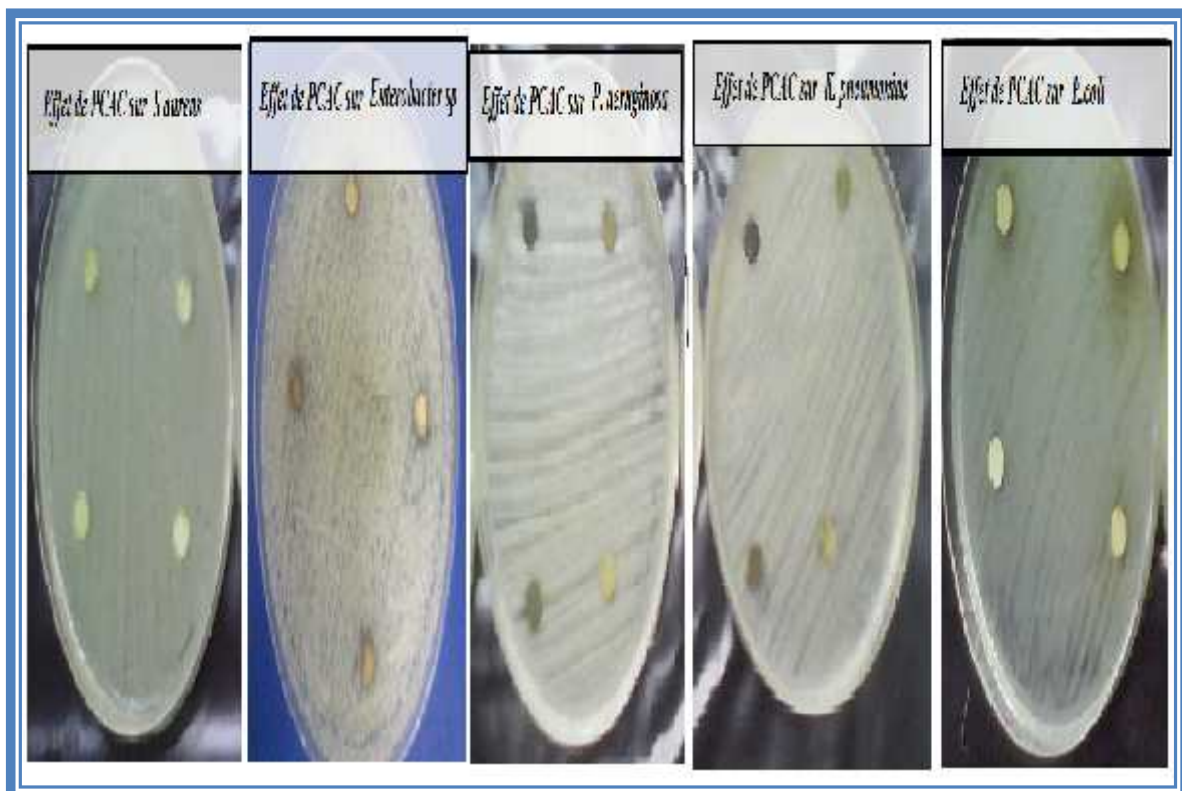


Figure IV-9 : Effet de l'extrait *PCAC* sur la croissance microbienne.



D'après les résultats obtenus, nous remarquons que:

- 🌈 Les extraits acétate d'éthyle et butanol *PDBU* et *PDAC* du *P. dichotomus* possèdent une activité antibactérienne modérée ;
  - ❖ L'extrait *PDBU* a inhibé la croissance des souches bactériennes *Escherichia coli* (10.76 mm à 500 mg/ml) et *Klebsiella pneumoniae* (13.5 mm à 500 mg/ml).
  - ❖ L'extrait *PDAC* est actif à l'égard des souches *Staphylococcus aureus* et *Enterobacter sp*, par contre il ne présente aucune activité antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.
  
- 🌈 Les extraits acétate d'éthyle et butanol *PCAC* et *PCBU* de l'espèce *P. capitata* sont inactif contre les cinq souches testées.

#### IV-2-1-2-Discussions

Le pouvoir antibactérien des extraits des plantes est tributaire de leurs compositions chimiques, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes [185,186]. Cette action se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre (structure de la paroi 'GRAM + ou GRAM-') et d'un extrait à un autre (classes des métabolites secondaires). D'après Athamna et al. [187] la méthode d'analyse et le volume influence sur l'activité antibactérienne.

D'autre part, les extraits de la plante *Paronychia capitata* sont avérées inactifs contre l'ensemble des souches testées, et cela, indépendamment de la dose. Selon Karaman et ses collaborateurs [188], certains extraits de plantes médicinales ne montrent aucun pouvoir antibactérien vis-à-vis les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

La paroi cellulaire est l'une des caractéristiques importantes des bactéries. Elle donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la pression osmotique du cytoplasme. En fonction de leur paroi cellulaire, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes: les Gram positifs (GRAM+) et les Gram négatifs (GRAM-) (Figure IV-10). Les différentes enveloppes bactériennes, parois et membranes ou autres structures représentent

une architecture essentielle pour s'adapter aux situations de l'environnement, température, osmose, pH; pour se fixer sur des supports (cellules), se nourrir, coloniser et infecter; pour résister aux substances antibactériennes [189].

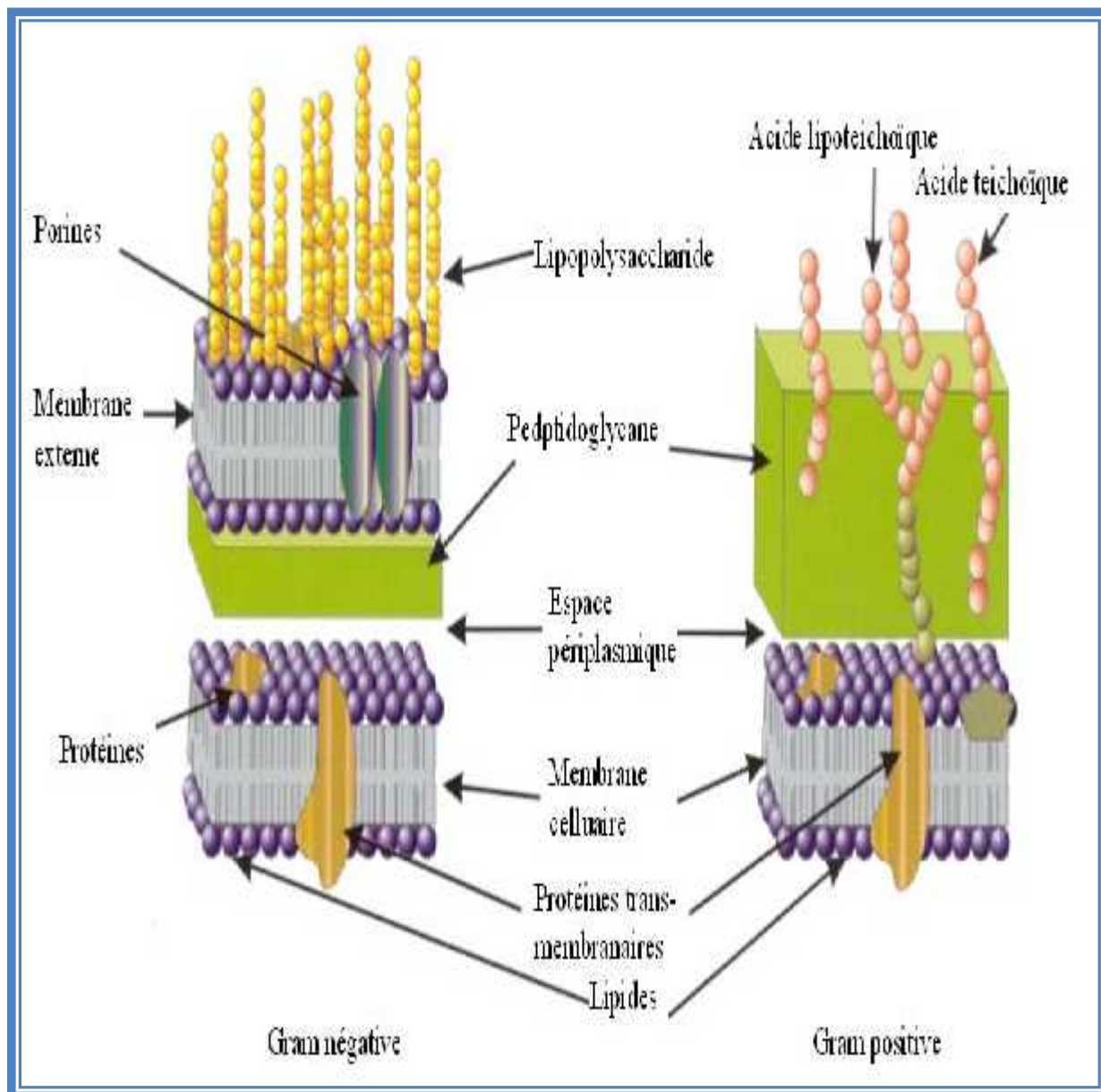


Figure IV-10: Structure de la paroi bactérienne GRAM+ et GRAM-.

#### IV-2-2- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

L'activité antioxydant des extraits a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes: la technique de décoloration du  $\beta$ -carotène et la méthode de piégeage de radical DPPH.

IV-2-2-1- Test du blanchissement du  $\beta$ -carotène

## IV-2-2-1-1- Principe :

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydroperoxydes diène conjugués [190]. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé (Figure IV-11) qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange, qui est suivi spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant puissant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène [191,192].

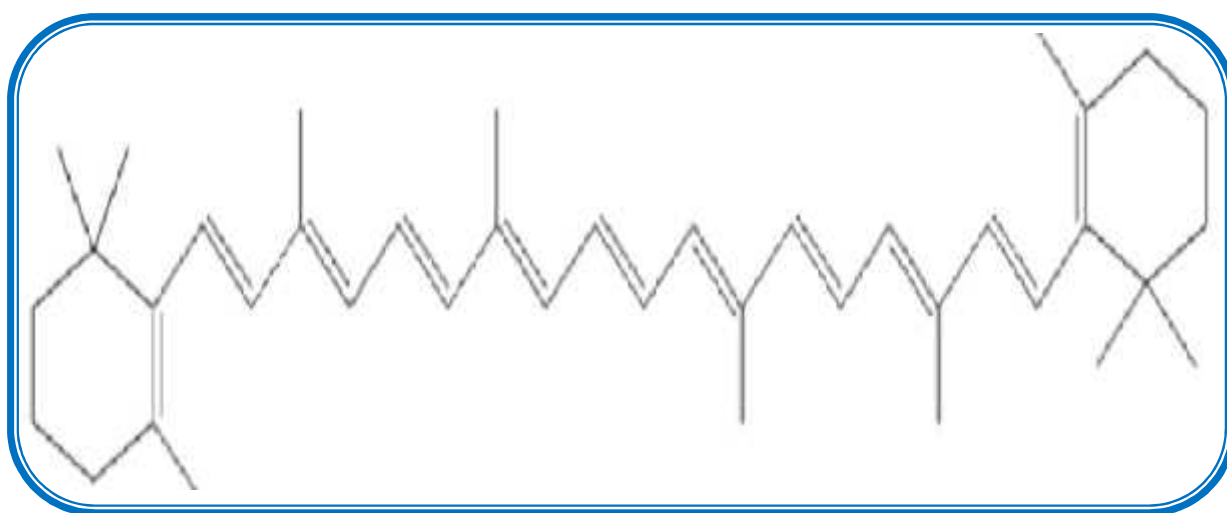


Figure IV-11 : Structure chimique de  $\beta$ -carotène [191].

## IV-2-2-1-2- Résultats et discussion

Pour évaluer cette activité, nous avons suivie la cinétique du blanchissement du  $\beta$ -carotène (réaction de l'oxydation) en présence des échantillons (*PDAC*, *PDBU*, *Pd<sub>7</sub>*, (*Fr<sub>(4+5)</sub>*)*PD*, *PCAC* et *PCBU*) des deux espèces *P. dichotomus* et *P. capitata*, du controle positif (BHT) et négatif (MeOH). L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs}_{t=48h}(\text{échantillon})}{\text{Abs}_{t=48h}(\text{BHT})} \times 100$$

La cinétique du blanchissement du  $\beta$ -carotène et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentées dans les Figures (IV-12, IV-13, IV-14 et IV-15).

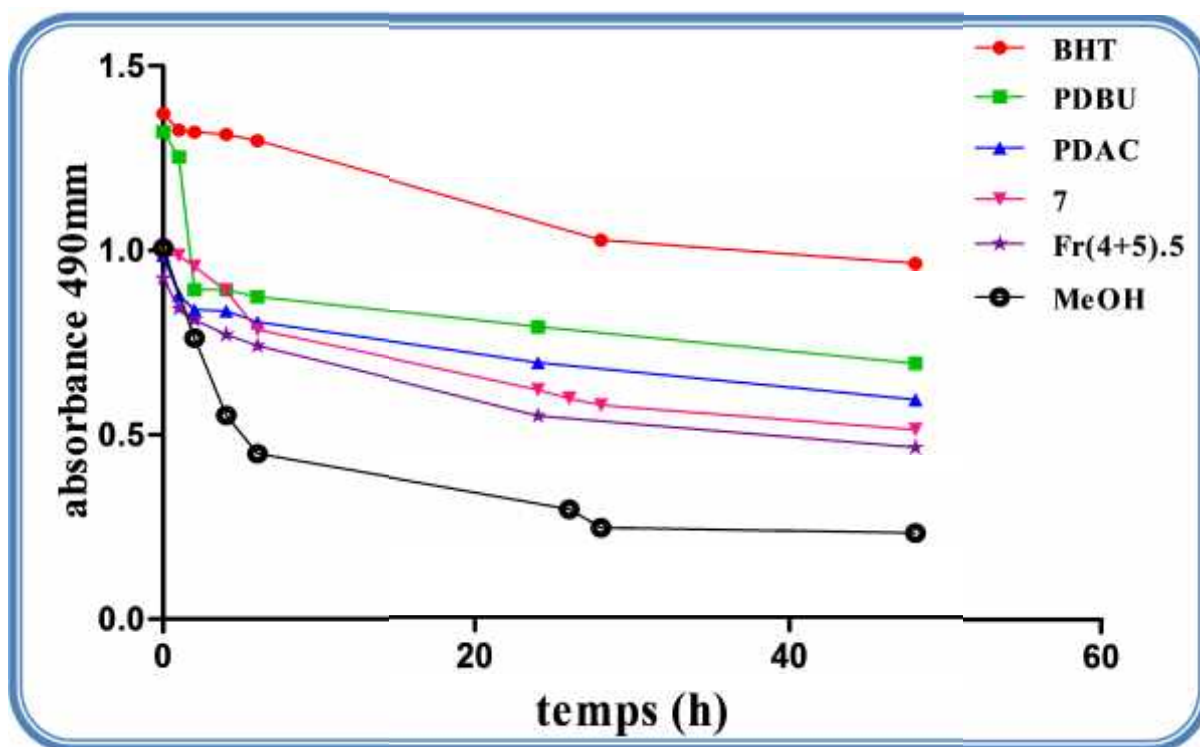


Figure IV-12 : La cinétique du blanchissement du  $\beta$ -carotène en absence et en présence des échantillons de l'espèce *Pteranthus dichotomus* du BHT (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

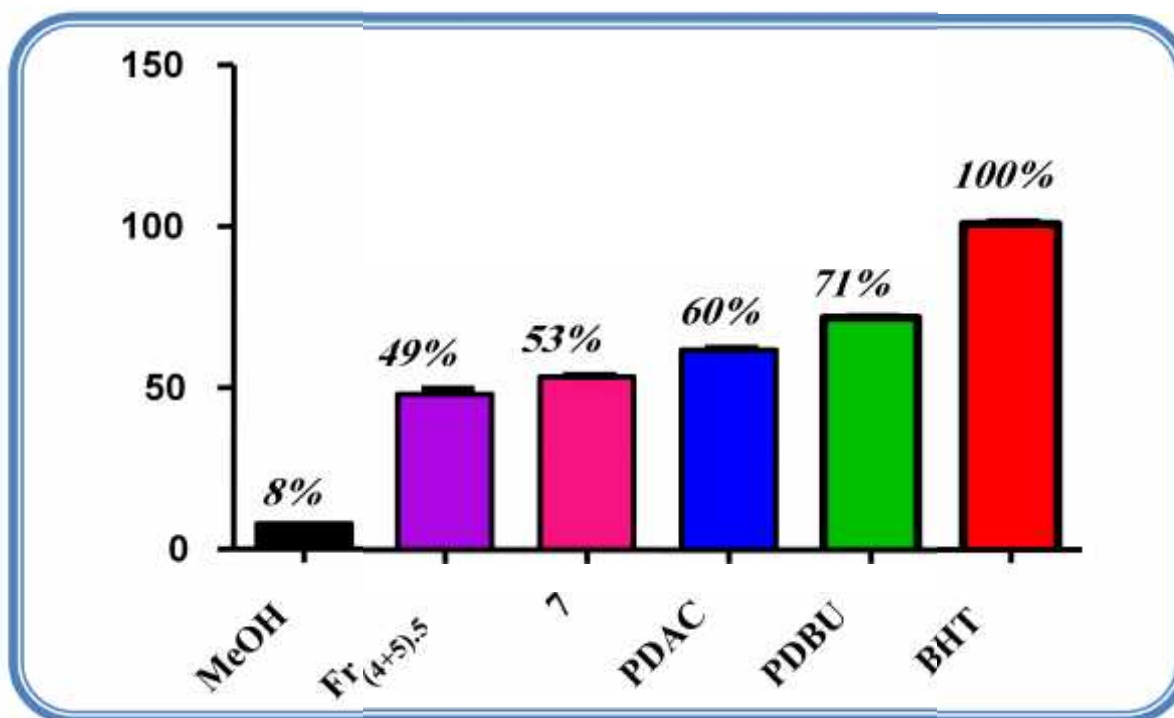


Figure IV-13 : Les activités antioxydants relatives (AAR) des échantillons de l'espèce *Pteranthus dichotomus*, Contrôle (-) MeOH et Contrôle (+) BHT.

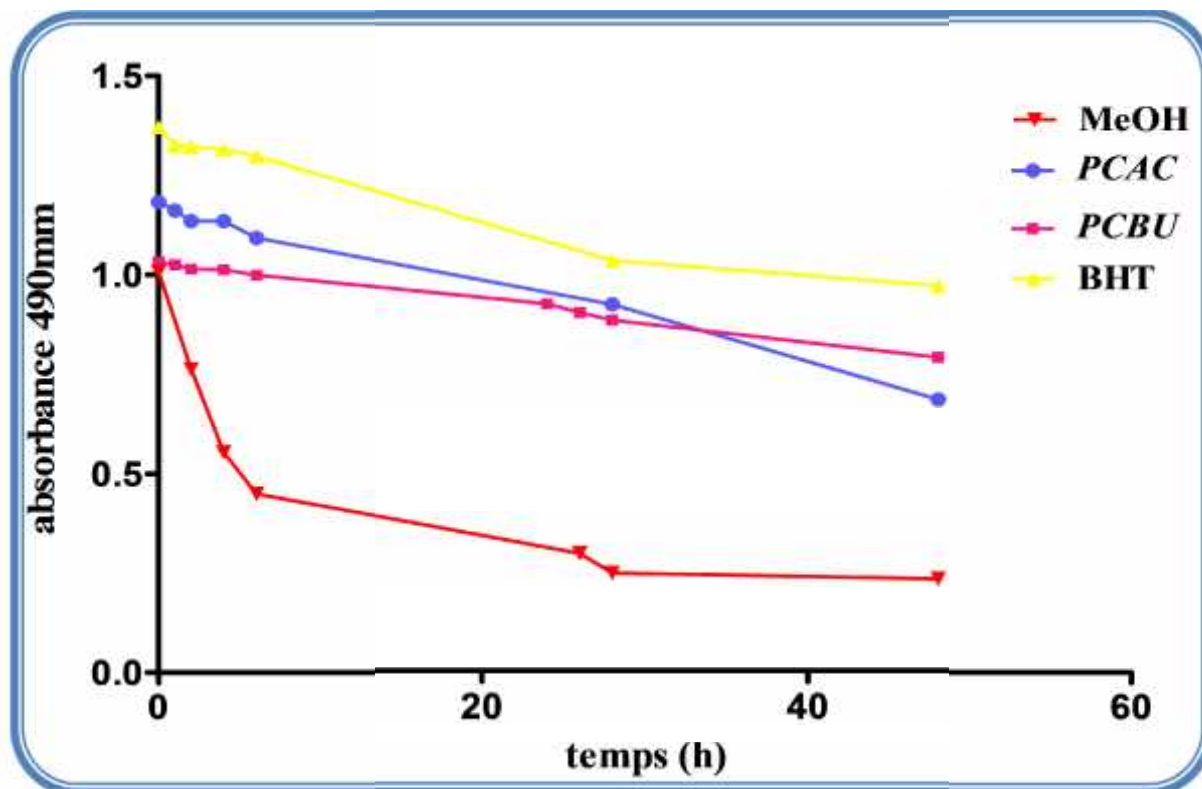


Figure IV-14 : La cinétique du blanchissement du  $\beta$ -carotène des extraits de l'espèce *Paronychia capitata*.

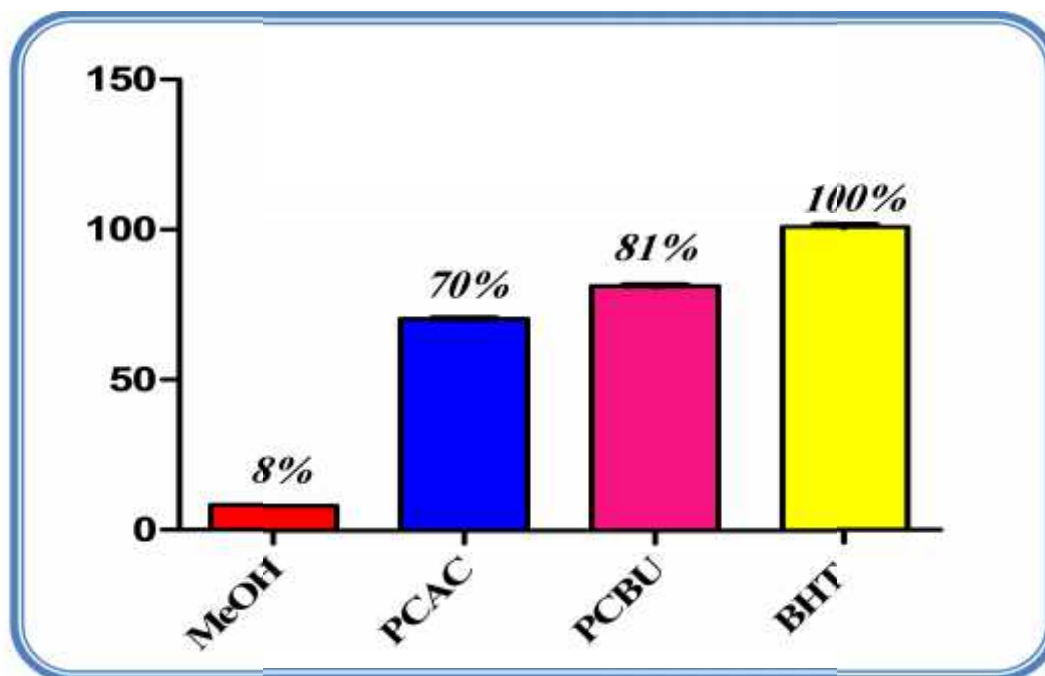


Figure IV-15 : Les activités antioxydants relatives (AAR) des extraits de l'espèce *Paronychia capitata*, Contrôle (-) MeOH et Contrôle (+) BHT.

On peut résumer l'ordre décroissant des extraits testés en termes d'activité antioxydante relative comme suit :

❖ *Pteranthus dichotomus*

*PDBU* (71%) > *PDAC* (60%) > *Pd<sub>7</sub>* (53%) > *Fr<sub>(4+5),5</sub>* (49%).

❖ *Paronychia capitata*

*PCBU* (81%) > *PCAC* (70%).

D'après ces résultats, il est évident que le BHT et les extraits inhibent d'une manière hautement significative (p 0.001) l'oxydation du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif.

En comparaison avec l'antioxydant de référence, *PDBU* de *Pteranthus dichotomus* et *PDBU* de *Paronychia capitata* sont 1.4 et 1.2 fois moins actifs que le BHT respectivement.

On observe d'une part que les extraits moyennement polaires *PDAC* et *PCAC* sont moins actifs que les extraits polaires *PDBU* et *PCBU*. D'autre part, les extraits *PDBU* et *PCBU* les moins riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs.

Cette étude n'a montré une relation inversée entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénolique pour les deux plantes. Notre observation est en accord avec celle d'Amarowicz et al. [193] qui ont indiqué que les graines de lin avec le contenu phénolique le plus bas, ont présenté l'activité antioxydante la plus élevée. En outre, l'activité antioxydante de noix de pécan et de noix de cajou [194] et le sarrasin [195] a été inversement corrélée avec le contenu phénolique. Une forte activité antioxydante pourrait aussi être due à d'autres composés en plus des composés phénoliques qui sont solubles dans l'eau, l'éthanol et aussi le synergisme entre les antioxydants [196,197].

Dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique, la polarité de l'extrait est un paramètre qui peut intervenir; ce système est similaire à un système d'émulsion huile-eau, et les variations dans l'activité pourraient être attribuées aux différences dans la proportion de composés hydrophobes et hydrophiles présents dans chaque extrait [198].

Selon Liyana-Pathirana et ses collaborateurs [199], un extrait qui retarde ou empêche le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un antioxydant primaire.



## IV-2-2-2- Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydant des différents échantillons vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm (Figure IV-16).

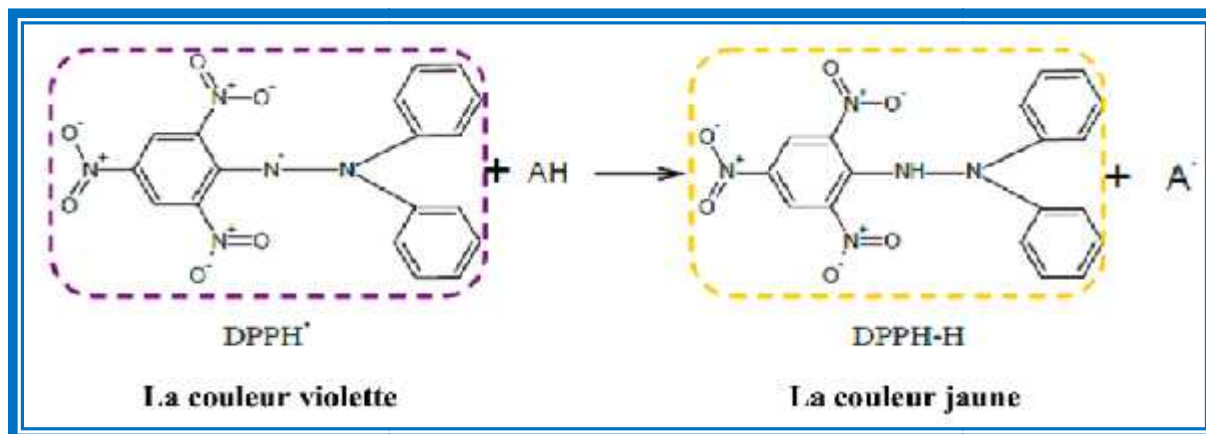


Figure VI-16 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH [200].

Le DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité antiradicalaire des antioxydants [201]. Il est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les composés actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités antiradicalaires des extraits végétaux [202].

## IV-2-2-2-1- résultats et discussion

Les résultats obtenus sont représentés dans (Figure IV-17, IV-18 et IV-19).

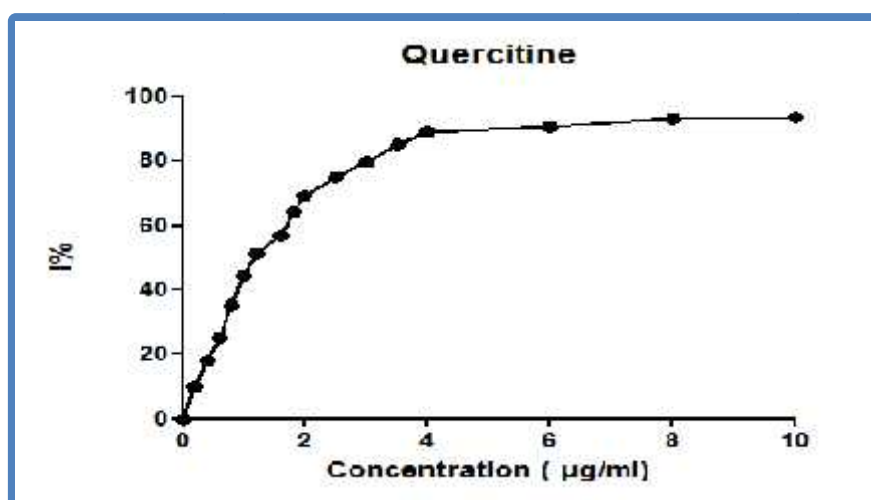


Figure IV-17 : Activité antioxydante du standard Quercitine.

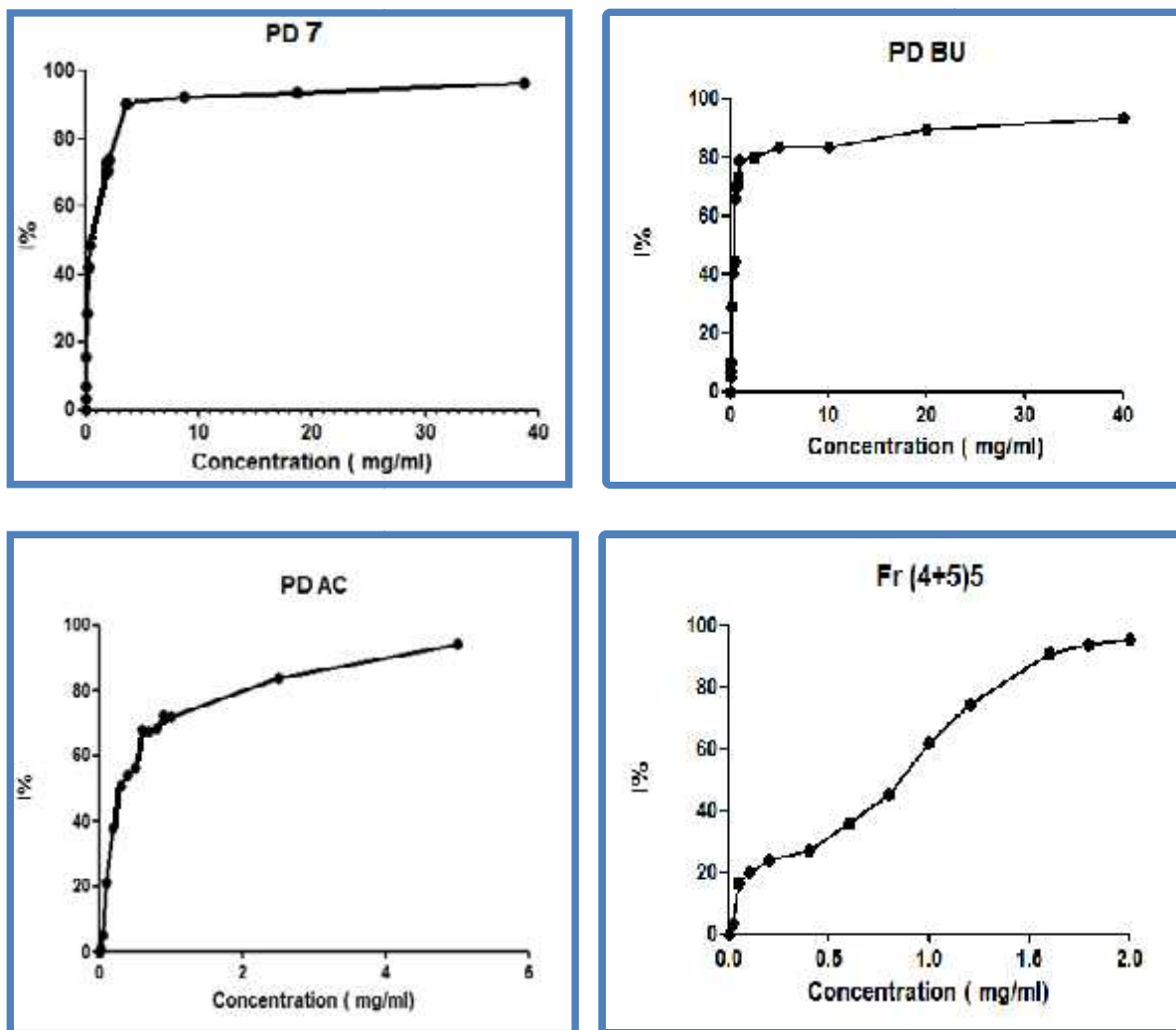


Figure VI-18: Activité antioxydante des échantillons d'espèce *Pteranthus dichotomus*.

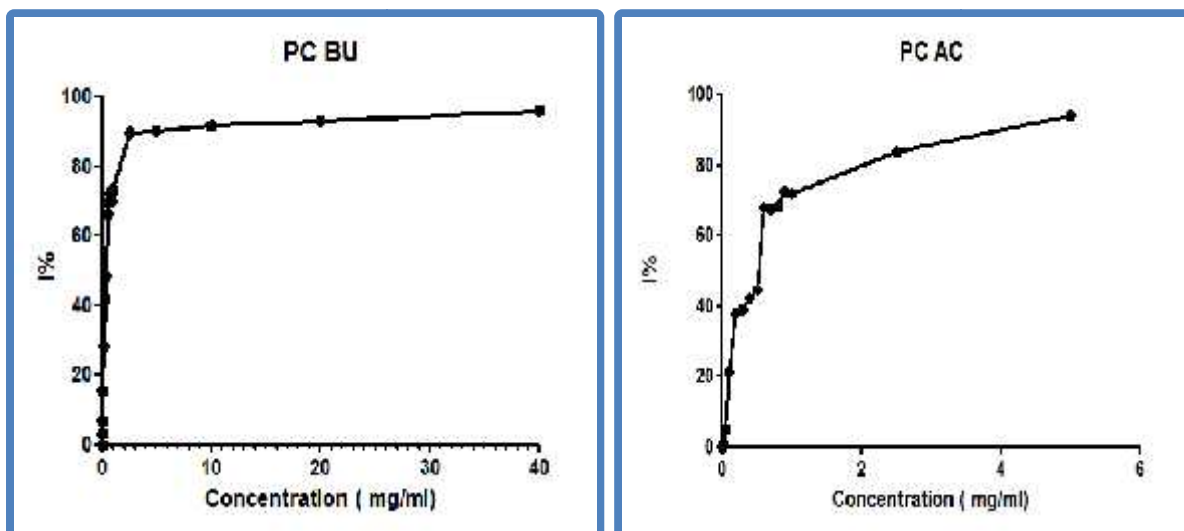


Figure VI-19: Activité antioxydant des extraits de l'espèce *Paronichia capitata*.

L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en IC<sub>50</sub>. De plus, à partir de valeur de IC<sub>50</sub> on a calculé l'EC<sub>50</sub> qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, EC<sub>50</sub>= (IC<sub>50</sub>/mg de DPPH/ml)] Comme figurant dans le tableau IV-4 ci-dessus.

**Tableau IV-4 : Valeurs des IC<sub>50</sub> et EC<sub>50</sub> des échantillons et témoin déterminées par le test au DPPH.**

	Les extraits	IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (mg/mg DPPH/ml)
<b>Standard</b>	<b>Quercitine</b>	1.149± 0.0004	0.491± 0.0001
<b><i>Pteranthus dichotomus</i></b>	<b><i>Pd</i><sub>7</sub></b>	358.888 ±11.213	15.337±0.479
	<b><i>PDBU</i></b>	375.514± 21.194	16.047± 0.903
	<b><i>PDAC</i></b>	691.333± 88.143	29.544± 3.766
	<b>Fr<sub>(4+5).5</sub></b>	912.667± 40.203	39.002± 1.718
<b><i>Paronychia capitata</i></b>	<b><i>PCBU</i></b>	359.213 ±28.766	15.350±1.229
	<b><i>PCAC</i></b>	428.219 ±97.2737	18.230±1.569

L'antioxydant standard Quercitine a montré une activité antioxydante très puissante avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 1.149  $\mu\text{g/ml}$ .

Suivant les valeurs d' $IC_{50}$  les échantillons sont classées comme suit :

✓ *Pteranthus dichotomus*

$Pd_7$  (358.8  $\mu\text{g/ml}$ ) >  $PDBU$  (375.5  $\mu\text{g/ml}$ ) >  $PDAC$  (691.333  $\mu\text{g/ml}$ ) >  $Fr_{(4+5),5}$  (912.6  $\mu\text{g/ml}$ ).

✓ *Paronychia capitata*

$PCBU$  (359.2  $\mu\text{g/ml}$ ) >  $PCAC$  (428.2  $\mu\text{g/ml}$ ).

Dans ce test, Tous les échantillons agissent d'une manière dose-dépendante; les résultats montrent que le flavonoïde  $Pd_7$  (Isovitexine) est le plus actif parmi des échantillons testés. Cependant, la sous fractions  $Fr_{(4+5),5}$  de l'extrait  $PDBU$  contenant les glycolipides comme composés principaux ont affiché une faible activité anti-radicalaire. En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs.

Une étude faite par Kang et al. [203] a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité anti-radicalaire.

Un grand nombre de plantes médicinales contiennent une large gamme de substances phytochimiques qui sont des sources d'antioxydants naturels tels -tocopherols, les acides phenoliques, les tanins [204]. Les flavonoïdes présentent des propriétés antioxydantes remarquables, ils sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle [205].

# *Conclusion Générale*



## **Conclusion générale**

Le présent travail porte sur l'investigation chimique et biologique de deux plantes locales: *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lamk. appartenant à la famille Caryophyllaceae. Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique tels que les saponosides et les flavonoïdes.

L'étude phytochimique réalisée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* et *n*-butanolique de la plante *Paronychia capitata* a permis d'isoler 16 composés naturels connus dont un composé commun aux deux plantes. Ces produits appartiennent à six classes des métabolites secondaires :

- ❖ quater Glycolipides comportant un glycoscéroside et trois sulfoglycolipides.
- ❖ un Lignane à squelette furofuranuïde.
- ❖ trois Flavonoïdes comportant deux aglycones et un C-glycosylés.
- ❖ six phytostérols.
- ❖ un triterpène.
- ❖ un disaccharide.

L'isolement et la purification de ces composés **1-16** a été essentiellement fondée sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques (VLC, CC, CCE et CCM) utilisant divers supports (silice normale, silice greffée en C8, silice greffée RP-18, polyamide et Sephadex LH-20).

La détermination des structures a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY), spectrométrie de masse, spectroscopies IR et UV, la mesure des pouvoirs rotatoires, par les transformations chimiques et par la comparaison avec les données de la littérature.



Selon les données de la littérature, tous les composés isolés (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) de l'espèce *Pteranthus dichotomus* sont trouvés pour le premier temps dans le genre *Pteranthus* et aussi le composé **Pc<sub>1</sub>** de la plante *Paronychia capitata* a été identifié pour la première fois dans le genre *Paronychia*. Par ailleurs, Les composés (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>4</sub>**) et (**Pc<sub>1</sub>**) ont été obtenus pour la première fois dans la famille Cayophyllaceae.

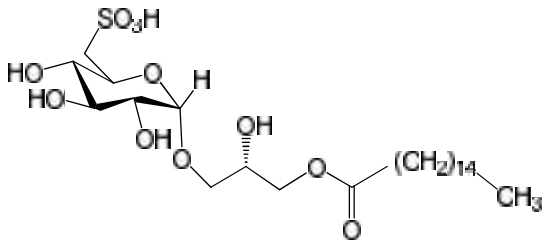
Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux dans les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique des espèces *Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capitata* en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu, révèle la présence de quantités moyennement importantes en polyphénols.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antibactériens et antioxydants *in vitro* sur les extraits et les fractions des espèces *Pteranthus dichotomus* et *Paronychia capitata*.

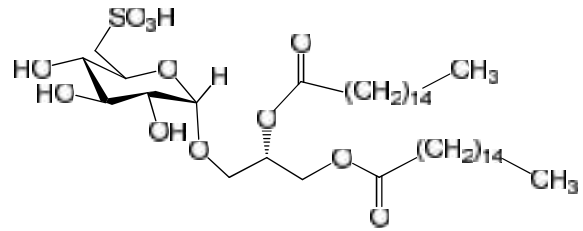
L'activité antibactérienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes, selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats indiquent que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol **PDAC** et **PDBU** de l'espèce *Pteranthus dichotomus* possèdent une activité antibactérienne modérée. Cette activité pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants de nature polyphénolique, notamment: les flavonoïdes et lignanes..... Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol **PCAC** et **PCBU** de *P. capitata* sont inactifs contre les cinq souches bactériennes testées.

L'activité antioxydante des différents échantillons des espèces *P. capitata* et *P. dichotomus* a été évaluée par deux méthodes: le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de réduction du radical libre DPPH. Pour le premier test, les résultats ont montré que l'oxydation du  $\beta$ -carotène est efficacement inhibée par les échantillons testés. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires. Pour le test de réduction du radical libre DPPH, les échantillons des deux espèces *P. capitata* et *P. dichotomus* possèdent une activité antioxydante modérée. La différence de pouvoir antioxydant des extraits ne dépend pas toujours de la richesse des extraits en polyphénols mais aussi de la distribution des substances à activité antioxydant entre eux.

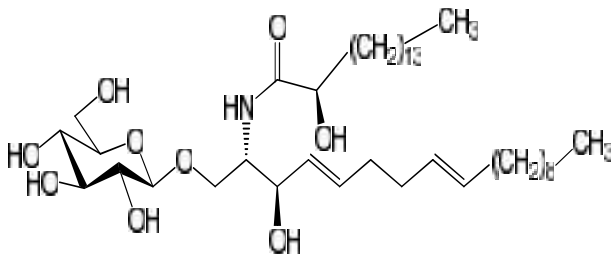
En fin, l'ensemble de ces résultats *in-vitro* obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.



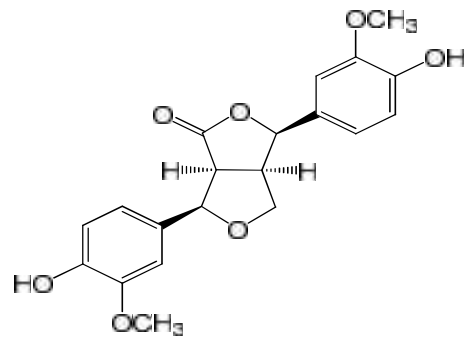
*Pd*<sub>1</sub> : 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo-*D*-quinovopyranosyl)-glycérol.



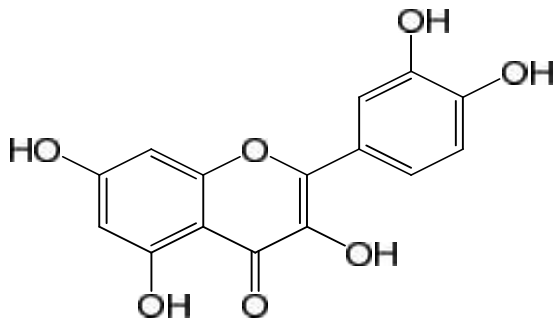
*Pd*<sub>2</sub> : 1,2-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo-*D*-quinovopyranosyl)-glycérol.



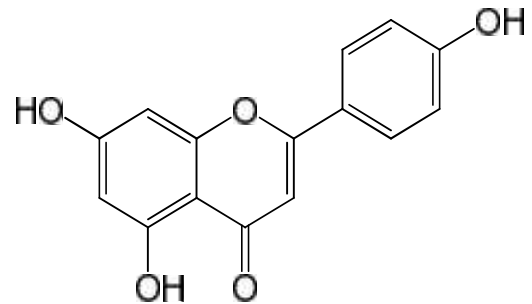
*Pd*<sub>3</sub> : soyacerebroside I.



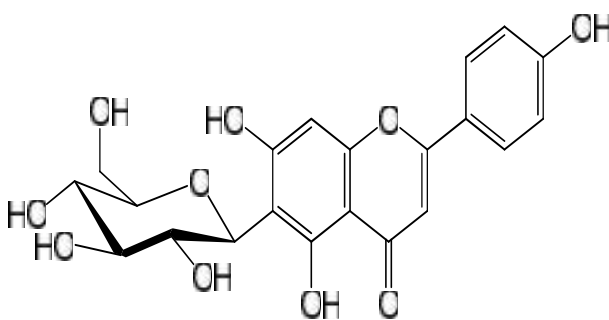
*Pd*<sub>4</sub> : 8-oxo-pinorésinol.



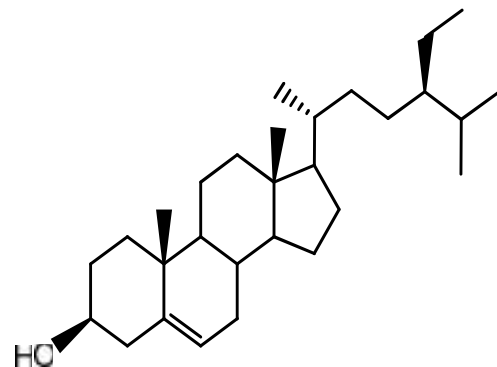
*Pd*<sub>5</sub> : Quercétine.



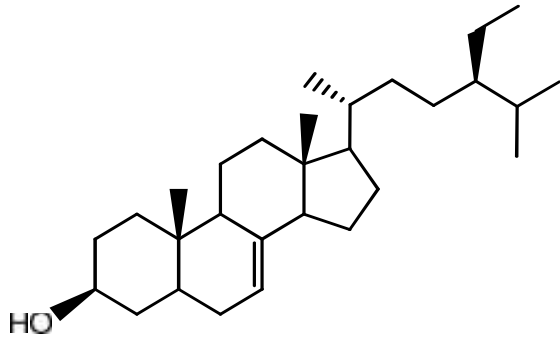
*Pd*<sub>6</sub> : Apigénine.



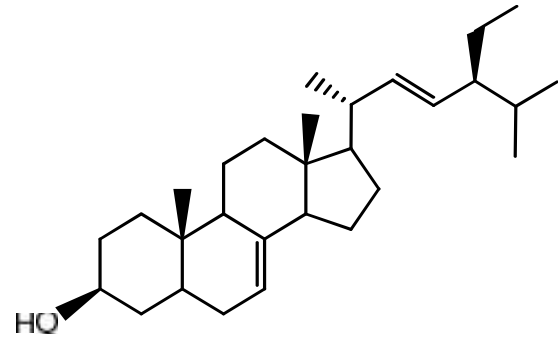
*Pd*<sub>7</sub> : Isovitixine.



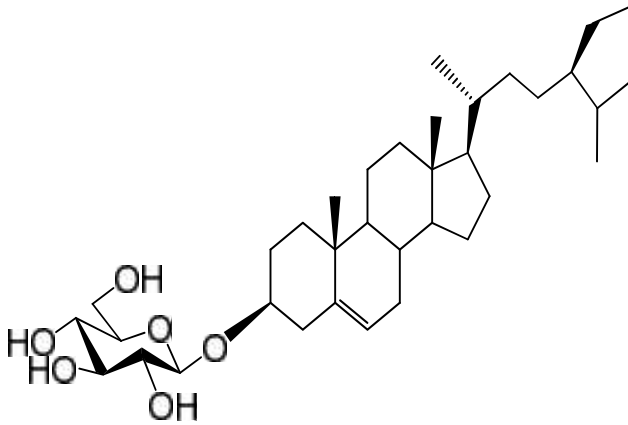
*Pd*<sub>8</sub> : -Sitostérol.



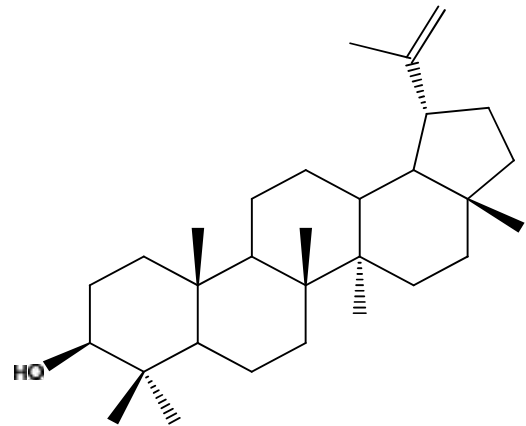
***Pd*<sub>10</sub>** : Stigmat-7-en-3-ol.



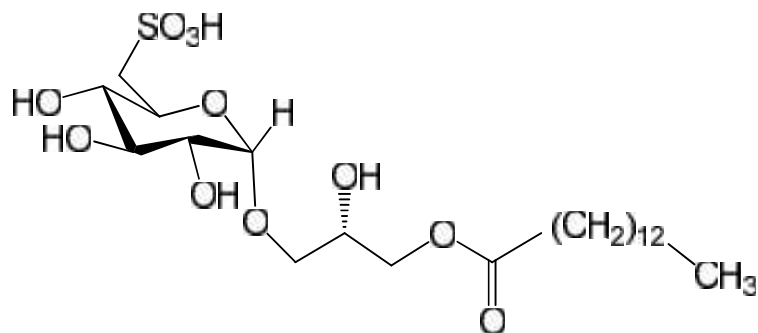
***Pd*<sub>9</sub>** : Spinastérol.



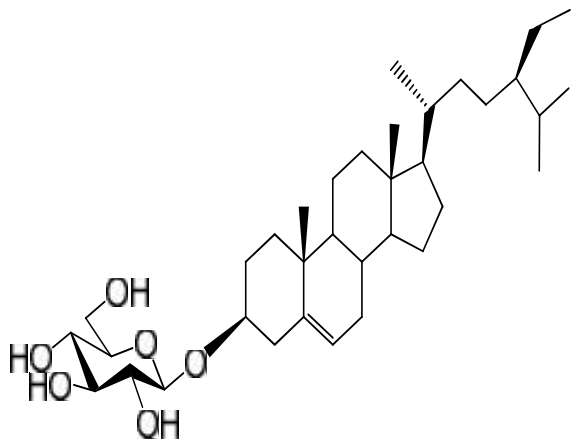
***Pd*<sub>11</sub>** : 3 -D-glucopyranosyl -sitostérol.



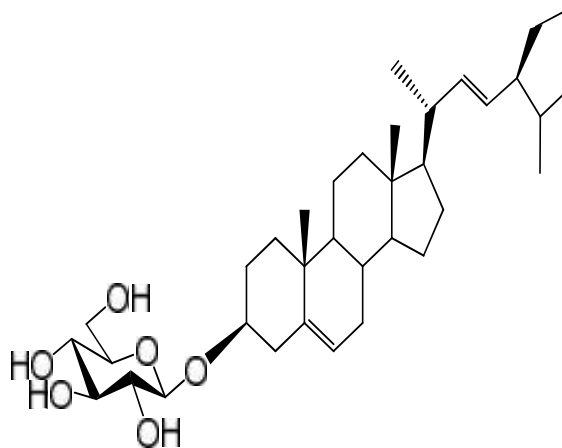
***Pd*<sub>12</sub>** : Lupéol.



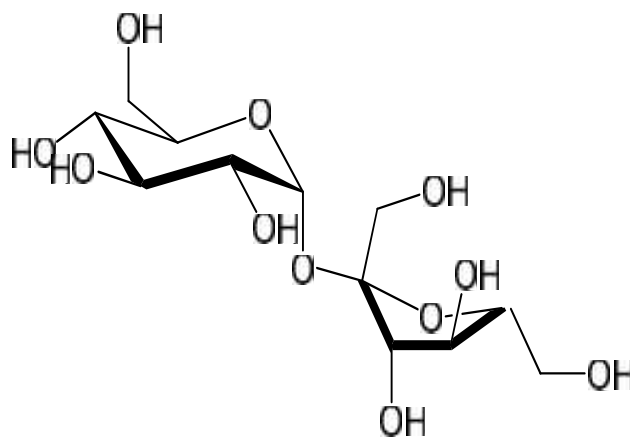
***Pc*<sub>1</sub>** : 1-*O*- myristoyl -3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycérol.



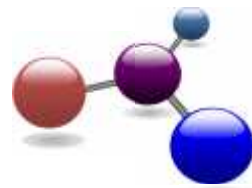
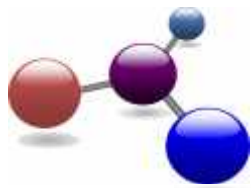
*Pc*<sub>2</sub>: 3 -D-glucopyranosyl -  
sitostérol.



*Pc*<sub>3</sub>: 3 -D-glucopyranosyl -  
stigmastérol.



*Pc*<sub>4</sub>: Saccharose



# CHAPITRE V

*La partie  
expérimentale*



## V-1- Matériels et méthodes

### V- 1-1-Matériel végétal

L'identification botanique des plantes étudiées a été réalisée par le professeur Bachir Oujehih, du Département d'agronomie, Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université de Batna. Pour chaque récolte, le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à la température ambiante.

#### V-1-1-1-Récolte de la plante *Pteranthus dichotomus* Forssk.

La plante *Pteranthus dichotomus* Forssk. a été récoltée au mois de Mai 2010 dans la région de Biskra. Après séchage, les parties aériennes de cette espèce broyées ont donné 600 g de poudre fine.

#### V-1-1-2-Récolte de la plante *Paronychia capitata* (L.) Lam.

La récolte de la plante *Paronychia capitata* (L.) Lam. a été effectuée dans la région de Omerkha à Hidoussa (alentours de Merouana-Batna) au mois de Mai 2012. Les différentes parties de la plante (aériennes et racines) ont été broyées pour donner 1.2 Kg de poudre fine.

## V-1-2-Méthodes analytiques et préparatives

### V-1-2-1-Chromatographie sur (CCM) et (CCE)

Pour les analyses sur couche mince (CCM) ou les purifications sur couche épaisse (CCE), nous utilisons dans notre laboratoire des plaques de gel de silice soit en phase normale [Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck<sup>®</sup> 250 µm (20 × 20 cm)], soit en phase inverse [RP-18 F<sub>254</sub>S, Merck<sup>®</sup> 200 µm (20 × 20 cm)] prêtes à l'emploi à support en aluminium pour les CCM et en verre pour les CCE.

Les plaques (CCM ou CCE) sont observées sous une lampe UV à 254 et 366 nm. Les révélateurs utilisés lors des expériences sont les vapeurs d'iode et/ou une solution acide (50% eau, 25% acide acétique et 25% acide sulfurique).

### V-1-2-2-Chromatographie liquide sur colonne (CC)

Les phases stationnaires utilisées dans cette étude pour la CC sont le gel de silice en phase normale (Kieselgel Merck<sup>®</sup> 70-230 mesh), polyamide SC6 et Sephadex LH-20. Le choix de la phase stationnaire, les dimensions de la colonne, les conditions d'élution, le débit, la pression et le volume des sous-fractions recueillies ont été établis sur la base d'analyse par CCM et la masse de l'échantillon à étudier.

### **V-1-2-3-Chromatographie liquide sous vide (VLC)**

Pour cette technique de fractionnement, on a utilisé des entonnoirs Büchner avec verre fritté N°4 dont les diamètres sont choisis selon la masse et la nature de la phase stationnaire utilisées. Selon la nature des extraits à étudier, les fractionnements sous vide ont été effectués sur plusieurs types de phase stationnaire à savoir gel de silice en phase normale (Kieselgel Merck® 70-230 mesh), gel de silice greffée (Lichroprep RP-18 Merck® 40-63 µm ou Lichroprep RP-8 Merck® 40-68 µm).

### **V-1-3-Méthodes d'identification structurale**

#### **V-1-3-1-Pouvoir rotatoire**

Les pouvoirs rotatoires ( $[\alpha]_D$ ) ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 équipée d'une lampe à sodium. Les échantillons solubilisés dans des solvants convenables sont introduits dans une cellule de 1 ml de volume et 10 cm de longueur sont traversés par un faisceau lumineux polarisé avec une longueur d'onde de la raie D du sodium = 589 nm à une température de 20 °C.

#### **V-1-3-2-Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible**

Les spectres UV-Vis réalisés dans cette étude sont enregistrés sur un spectrophotomètre UV KONTRON logiciel UV S900 Lite. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant un spectrophotomètre (Vis-7220G & UV-9200-UK) du laboratoire de Biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire, Faculté des Sciences naturelles et vie de l'université de Batna.

#### **V-1-2-3-Spectrophotométrie Infra-rouge IR**

Les spectres infrarouges ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr, sur un appareil à transformée de fourrier JASCO (FT/IR-4100), du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de l'université de Batna.

#### **V-1-2-4-Spectrométrie de masse (ESI-MS) et (EI)**

Les spectres de masse basse résolution ESI-MS et haute résolution HR-ESI-MS sont obtenus par électrospray (ESI) sur des spectromètres thermofinnigan MSQ et Micromasse QTOF respectivement en m/z.

#### **V-1-2-5-Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil BRUKER Avance DRX-500 du centre de recherche sur les substances naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France). Les Microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des



données (XWIN- NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les RMN spectres de RMN sont enregistrées à 500 et 125 MHz respectivement.

## V-2 -Etude phytochimique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.

### V-2-1-Obtention des extraits

600 g des parties aériennes de l'espèce *P. dichotomus* préalablement séchées et pulvérisées, sont mis en macération dans une solution hydro-alcoolique à base du méthanol à 80 % (6 litres, 2 fois) pendant 48 h à la température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et concentré. La phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide, d'abord par l'éther de pétrole (300 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (300 ml, 4 fois) et enfin le butanol (300 ml, 3 fois). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 4 g pour l'extrait étheropétrolique (*PDEP*), 6.5 g pour l'extrait AcOEt (*PDAC*) et 15 g pour l'extrait *n*-butanolique(*PDBU*). Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes d'élutions, mettent en relief la richesse des extraits acétate et butanol en métabolites secondaires (Figure V-1).

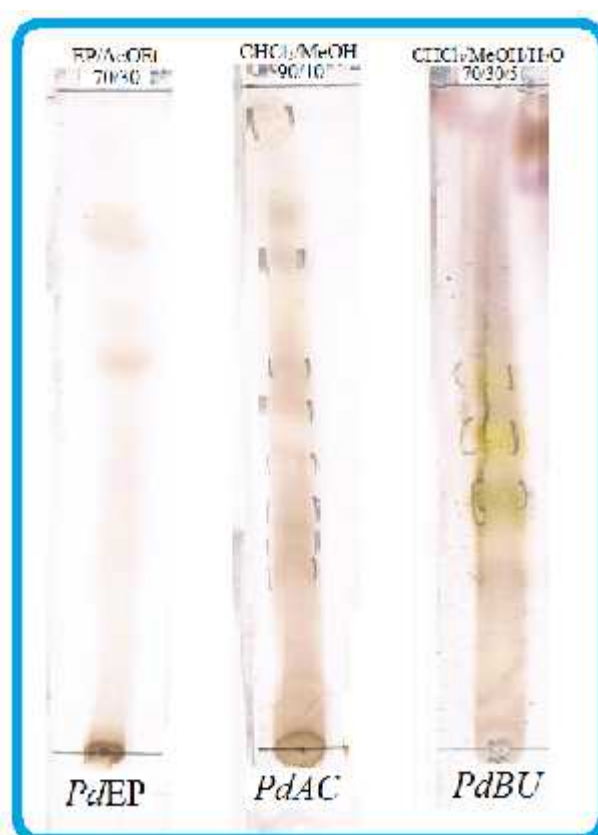


Figure V-1: CCM des extraits des parties aériennes de la plante *P. dichotomus*

**V-2-2-Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle (PDAC)**

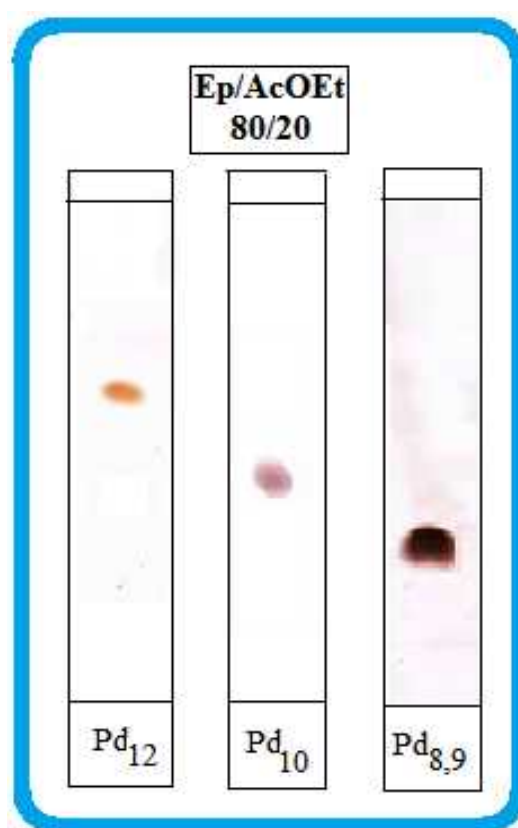
6 g d'extrait d'acétate d'éthyle (PDAC) ont été fractionné par chromatographie liquide sous vide VLC sur gel de silice en phase normale. L'élution a été effectuée avec un mélange de solvants (éther de pétrole- AcOEt) puis (AcOEt-MeOH). 23 fractions de 100 ml ont été collectées. L'examen en CCM des fractions a permis de rassembler les fractions obtenues en 17 fractions majoritaires Fr<sub>1</sub> à Fr<sub>10</sub> (Tableau V-1).

**Tableau V-1: Rassemblement des différentes fractions de la VLC de l'extrait PDAC**

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg	
Ep/AcOEt	100	/	CHCl <sub>3</sub> /MeOH : 95/5	/	
	99-1				
	97-3				
	93-7				
	90-10				
	80-20	Fr <sub>1</sub>		22.5 mg	
	70-30				
	60-40	Fr <sub>2</sub>		34.5mg	
	50-50	Fr <sub>3</sub>		425.4 mg	
	40-60				
	30-70				
	20-80	Fr <sub>4</sub>		966 mg	
	10-90	Fr <sub>5</sub>		CHCl <sub>3</sub> /MeOH : 90/10	534.9 mg
	100				
99-1	Fr <sub>6</sub>	587.3 mg			
97-3					
93-7	290.4 mg				
90-10	Fr <sub>7</sub>				
80-20	Fr <sub>8</sub>		1214.6 mg		

	70-30		et	
	60-40	<b>Fr<sub>9</sub></b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH : 80/20	380.8 mg
	50-50			
	40-60	<b>Fr<sub>10</sub></b>		50 mg

Le mélange des fractions Fr<sub>1</sub> et Fr<sub>2</sub> (57 mg) a été soumis à une Chromatographie sur colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant un mélange EP-EtOAc (100:0 à 60:40) pour donner 4 mg du composé **Pd<sub>10</sub>**, 6 mg du composé **Pd<sub>12</sub>** et 7 mg d'un mélange de deux composés **Pd<sub>8</sub>** et **Pd<sub>9</sub>** (Figure V-2).



**Figure V-2 : CCM en phase normale des composés **Pd<sub>8</sub>**, **Pd<sub>9</sub>**, **Pd<sub>10</sub>** et **Pd<sub>12</sub>****

La fraction Fr<sub>4</sub> (966 mg) a été purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice normale en utilisant un mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100: 0 à 70: 30) pour fournir 10 sous-fractions (Fr<sub>4.1</sub> à Fr<sub>4.10</sub>). La sous fraction Fr<sub>4.3</sub> (44 mg) est purifié par filtration sur Sephadex LH-20 en utilisant dichloro-méthane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) comme éluant, donnant ainsi 21,3 mg du composé **Pd<sub>4</sub>** (Figure V-3).

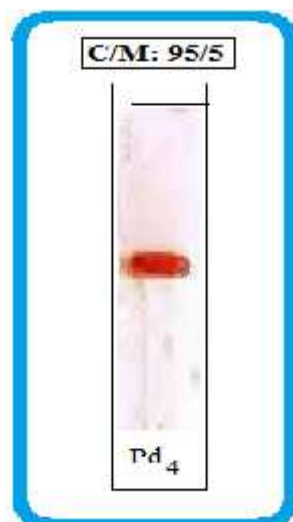


Figure V-3 : CCM en phase normale de composé *Pd*<sub>4</sub>

La fraction Fr<sub>8</sub> (1200 mg) a été filtrée sur Sephadex LH-20. Cette filtration a fourni quatre sous-fractions (Fr<sub>8,1</sub> à Fr<sub>8,4</sub>). La sous fraction Fr<sub>8,2</sub> (800 mg) a été soumise à une Chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100: 0 à 70: 30). Cette séparation a permis de recueillir 10 sous-fractions (Fr<sub>8,2,1</sub> à Fr<sub>8,2,10</sub>). Le composé *Pd*<sub>11</sub> (235 mg) a été obtenu par précipitation de la sous-fraction Fr<sub>8,2,5</sub> (400 mg) dans le MeOH (Figure V-4).

La sous fraction Fr<sub>8,2,10</sub> (70 mg) a été soumise à une Chromatographie sur colonne de polyamide en éluant avec du Toluène- MeOH (100: 0 à 80: 20). Cette purification a donné deux composés et *Pd*<sub>6</sub> (4 mg) et *Pd*<sub>5</sub> (3.2 mg) (Figure V-4).

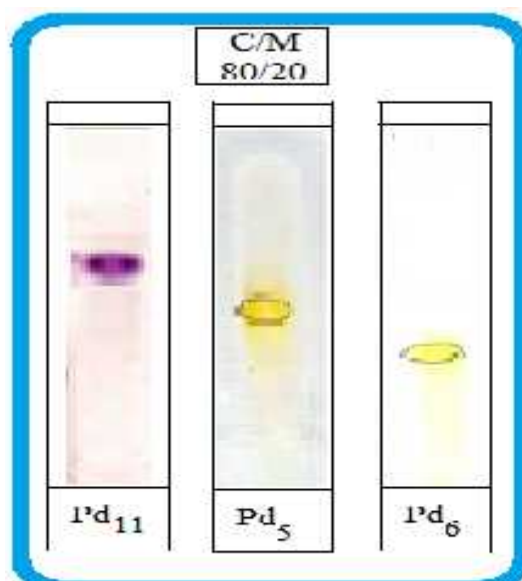


Figure V-4: CCM en phase normale des composés *Pd*<sub>5</sub>, *Pd*<sub>6</sub> et *Pd*<sub>11</sub>

### V-2-3- Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

L'extrait *n*-butanol *PDBU* (7.5 g) a été soumis à une Chromatographie sous vide liquide (VLC) sur RP-8 en utilisant comme éluant MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20 à 0:100) (Tableau V-2). A l'issue de ce fractionnement, 6 fractions ont été recueillies (Fr<sub>1</sub>-Fr<sub>6</sub>).

Tableau V-2: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
H <sub>2</sub> O/MeOH	20-80	Fr <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O 70/30/5	4.5 g
	20-80	Fr <sub>2</sub>		882 mg
	60-40	Fr <sub>3</sub>		228 mg
	60-40	Fr <sub>4</sub>		242 mg
	60-40			
	40-60			
	40-60	Fr <sub>5</sub>		238 mg
	40-60			
	20-80			
	MeOH	20-80		Fr <sub>6</sub>
100				
100				

La fraction Fr<sub>2</sub> (882 mg) est filtrée sur colonne du Sephadex LH-20 (méthanol), pour donner 41 mg du composé *Pd*<sub>7</sub> (Figure V-5).

Le mélange des fractions Fr<sub>4+5</sub> (480 mg) a été soumis à une Chromatographie sur colonne du gel de silice en phase normale, l'élution est réalisée par le mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100-0 à 80-20). Les fractions recueillies sont rassemblées selon leurs profil sur CCM en phase normale, donnant ainsi 8 sous fractions (Fr<sub>(4+5),1</sub> à Fr<sub>(4+5),8</sub>).

La sous fraction Fr<sub>(4+5).5</sub> (154 mg) a été purifiée sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0 à 80:20) et suivie d'une filtration sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant un mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (80/20) comme éluant pour donner trois composés **Pd<sub>3</sub>** (14 mg), **Pd<sub>2</sub>** (5 mg) et **Pd<sub>1</sub>** (4 mg) (Figure V-5).

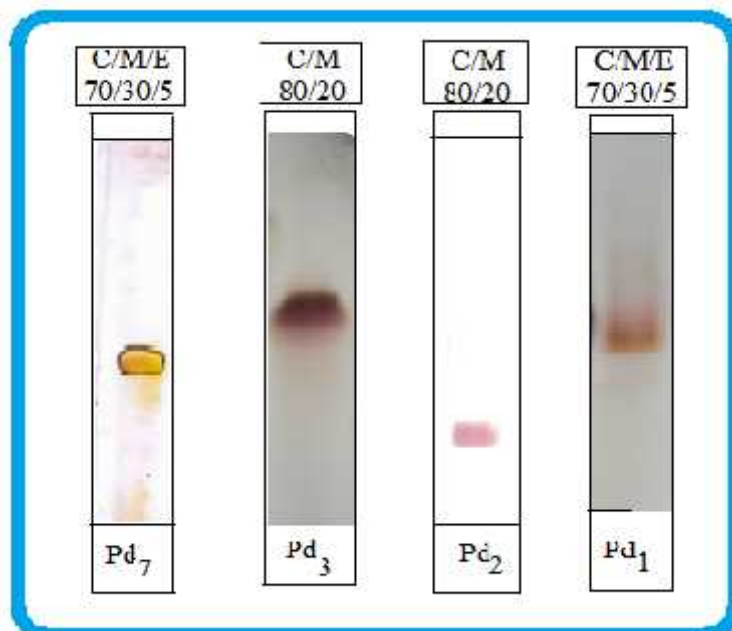


Figure V-5 : CCM en phase normale des composés **Pd<sub>1</sub>**, **Pd<sub>2</sub>**, **Pd<sub>3</sub>** et **Pd<sub>7</sub>**

#### V-2-4- Composés isolés de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk.

##### V-2-4-1- Composé **Pd<sub>1</sub>**

📌 **Nom** : 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.

📌 **Formule brute**: C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>11</sub>S.

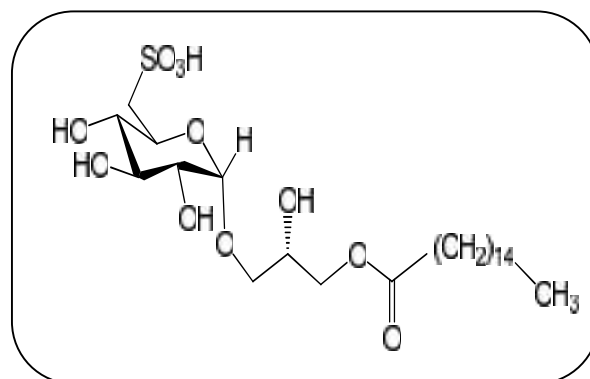
📌 **Masse moléculaire**: 556 uma.

📌  $[\alpha]_D^{25} +47.1^\circ$ ,  $C = 0.035$ , MeOH.

📌 **MS** : ESI (mode négatif)  $m/z$  : 555 [M+H]<sup>-</sup>.

📌 **RMN <sup>1</sup>H**: 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

📌 **RMN <sup>13</sup>C**: 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donner: III-1, page: 52)

V-2-4-2- Composé Pd<sub>2</sub>

📌 **Nom** : 1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- -D-quinovopyranosyl)-glycerol.

📌 **Formule brute**: C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>O<sub>12</sub>S.

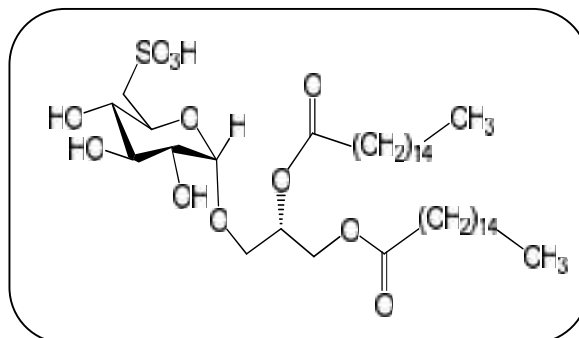
📌 **Masse moléculaire**: 794 uma.

📌 [α]<sub>D</sub> + 30,0; (C = 0,33, MeOH).

📌 **MS** : ESI (mode négatif) *m/z* : 793 [M+H]<sup>-</sup>.

📌 **RMN <sup>1</sup>H**: 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

📌 **RMN <sup>13</sup>C**: 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-2, page: 59)

V-2-4-3- Composé Pd<sub>3</sub>

📌 **Nom** : soyacerebroside.

📌 **Formule brute**: C<sub>40</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>9</sub>.

📌 **Masse moléculaire**: 786 uma.

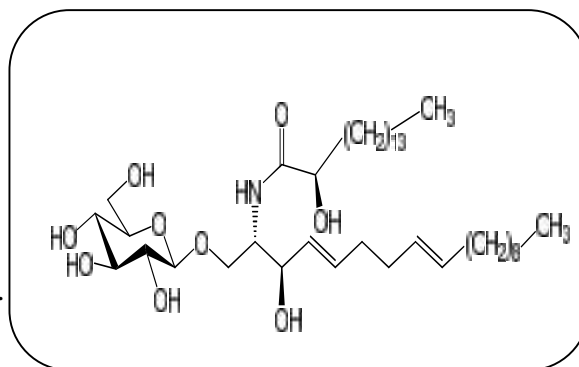
📌 [α]<sub>D</sub> + 5,1° (C = 0,60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH).

📌 **MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 736 [M+Na]<sup>+</sup>.

ESI (mode négatif) *m/z* : 712 [M+H]<sup>-</sup>.

📌 **RMN <sup>1</sup>H**: 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

📌 **RMN <sup>13</sup>C**: 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-3, page: 71)

V-2-4-4- Composé Pd<sub>4</sub>

📌 **Nom** : 8-oxo-pinoresinol.

📌 **Formule brute**: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>.

📌 **Masse moléculaire**: 372 uma.

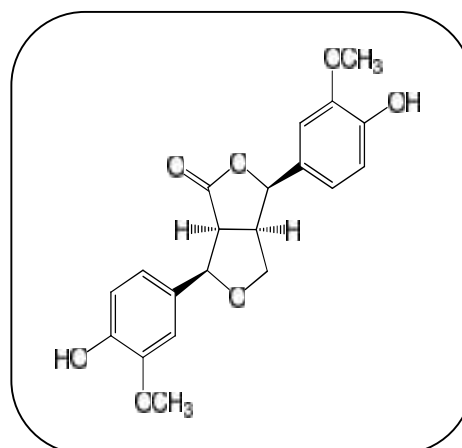
📌 [α]<sub>D</sub> - 3,5; (C = 0,2, MeOH).

📌 **MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 395 [M+Na]<sup>+</sup>.

ESI (mode négatif) *m/z* : 371 [M+H]<sup>-</sup>.

📌 **RMN <sup>1</sup>H**: 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

📌 **RMN <sup>13</sup>C**: 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

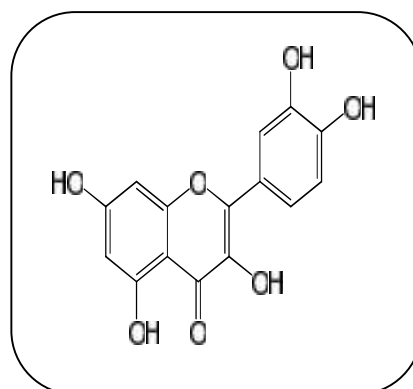


(Tableau des donneurs: III-XX, page : 85)



V-2-4-5- Composé Pd<sub>5</sub>

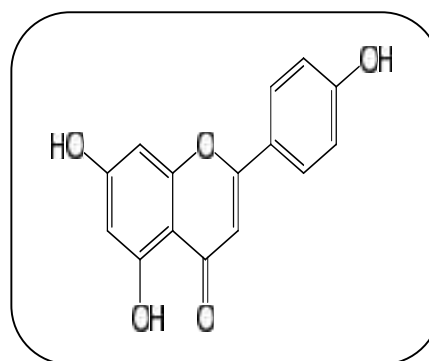
- 📌 **Nom :** Quercétine.
- 📌 **Formule brute:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>.
- 📌 **Masse moléculaire:** 302 uma.
- 📌 **Point de fusion :** 316.3 °C.
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 325 [M+Na]<sup>+</sup>.  
 $m/z$  : 303 [M+Na]<sup>-</sup>.
- 📌 **RMN <sup>1</sup>H:** 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.
- 📌 **RMN <sup>13</sup>C:** 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-5, page: 89)

V-2-4-6- Composé Pd<sub>6</sub>

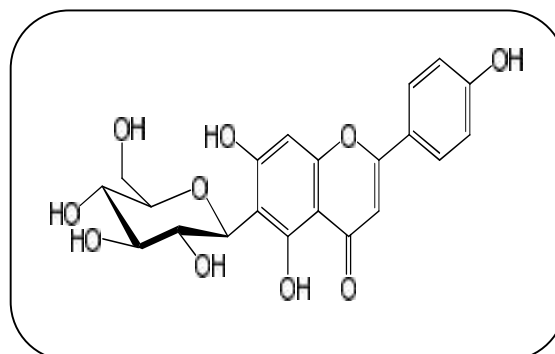
- 📌 **Nom :** Apigénine.
- 📌 **Formule brute:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>.
- 📌 **Masse moléculaire:** 270 uma.
- 📌 **Point de fusion :** 347.5 °C.
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 309 [M+K]<sup>+</sup>.
- 📌 **RMN <sup>1</sup>H:** 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.
- 📌 **RMN <sup>13</sup>C:** 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-6, pages : 93)

V-2-4-7- Composé Pd<sub>7</sub>

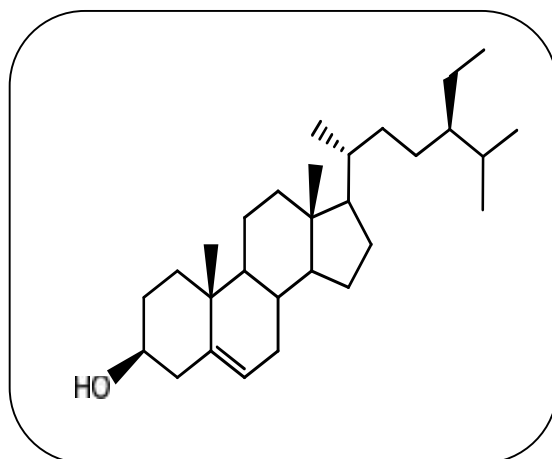
- 📌 **Nom :** Isovitexine.
- 📌 **Formule brute:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>.
- 📌 **Masse moléculaire:** 432 uma.
- 📌 **Point de fusion :** 286 °C.
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 455 [M+K]<sup>+</sup>.
- 📌 **RMN <sup>1</sup>H:** 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.
- 📌 **RMN <sup>13</sup>C:** 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-7, pages: 96)

V-2-4-8- Composé  $Pd_8$ 

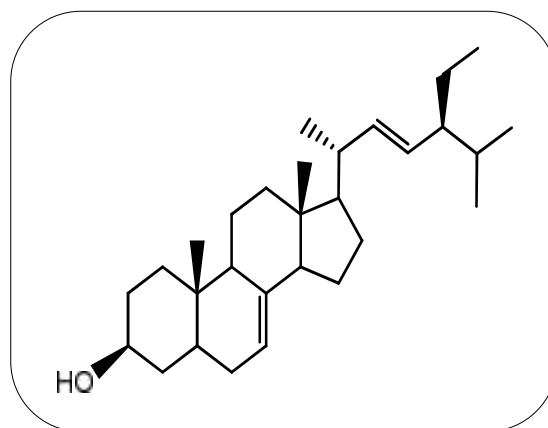
- 📌 **Nom :** -Sitosterol.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{29}H_{50}O$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 414 uma.
- 📌  $[\alpha]_D -30^\circ$  (C = 0.8,  $CHCl_3$ ).
- 📌 **Point de fusion :** 136.4 °C.
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 437  $[M+Na]^+$ .  
ESI (mode négatif)  $m/z$  : 413  $[M+Na]^-$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donnees: III-8, page : 104)

V-2-4-9- Composé  $Pd_9$ 

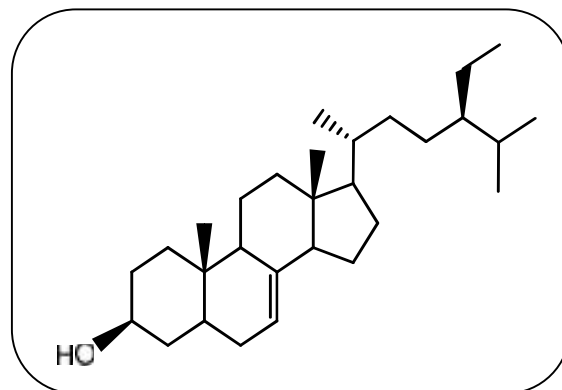
- 📌 **Nom :** Spinasterol.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{29}H_{48}O$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 412 uma.
- 📌 **MS :** EI-MS  $m/z$  412  $[M]^+$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donnees: III-9, page : 110)

V-2-4-10- Composé  $Pd_{10}$ 

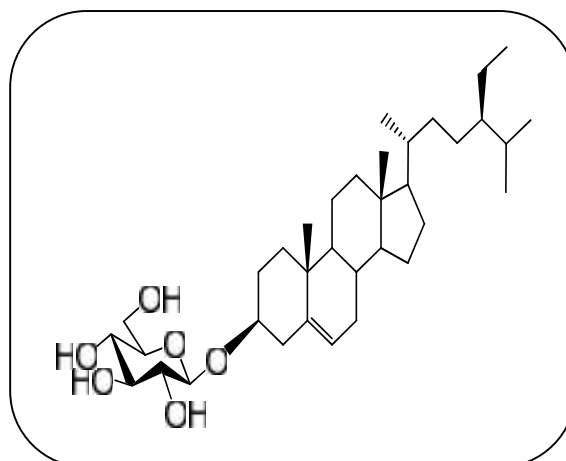
- 📌 **Nom :** Stigmat-7-en-3-ol.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{29}H_{50}O$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 414 uma.
- 📌 **MS :** EI-MS  $m/z$  414  $[M]^+$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donnees: III-9, page : 110)

V-2-4-11- Composé  $Pd_{11}$ 

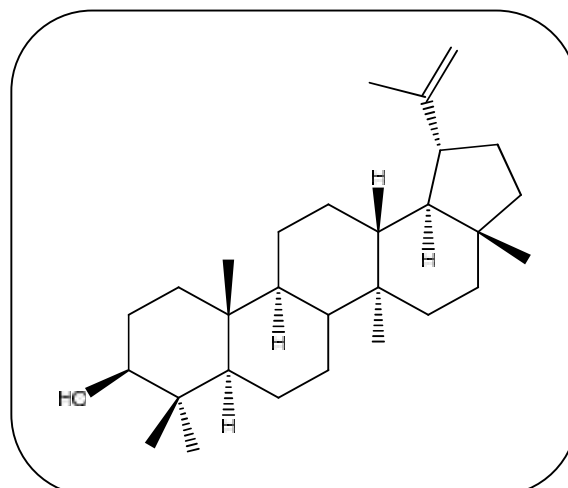
- 📌 **Nom :** -Sitosterol-3-O-glucoside.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{35}H_{60}O_6$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 576 uma.
- 📌  $[\alpha]_D$   $-41.5^\circ$  (C = 0.4, MeOH).
- 📌 **Point de fusion :** 285.2 °C
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 599  $[M+Na]^+$ .  
ESI (mode négatif)  $m/z$  : 575  $[M+H]^-$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donnees: III-10, page : 116).

V-2-4-12- Composé  $Pd_{12}$ 

- 📌 **Nom :** Lupéol.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{30}H_{50}O$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 426 uma.
- 📌  $[\alpha]_D$   $+26.4^\circ$  (C = 0.4,  $CHCl_3$ ).
- 📌 **Point de fusion:** 215-216 °C
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 449  $[M+Na]^+$ .  
 $m/z$  : 875  $[2M+Na]^+$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donnees: III-11, page: 126).

### V-3- Etude phytochimique de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) lim.

#### V-3-1-Obtention des extraits

Toutes les parties de la plante *Paronychia capitata* (L.) limk. (Tiges, feuilles, grains et racines) préalablement séchées et réduites en poudre (1 Kg) sont soumises à une double macération dans l'éthanol à 70 % (2 x 10 litres) pendant 48 h à la température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, la phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide, par l'éther de pétrole (500 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (500 ml, 3 fois) et enfin le butanol (500 ml, 3 fois). L'évaporation à sec des solutions organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 3 g pour l'extrait étheropétrolique (*PCEP*), 7 g pour l'extrait AcOEt (*PCAC*) et 28 g pour l'extrait *n*-butanolique (*PCBU*). Les CCM effectuées sur les deux extraits (*PCAC*, *PCBU*) dans plusieurs systèmes de solvants révèlent la richesse de l'extrait butanolique en produits (Figure V-6).

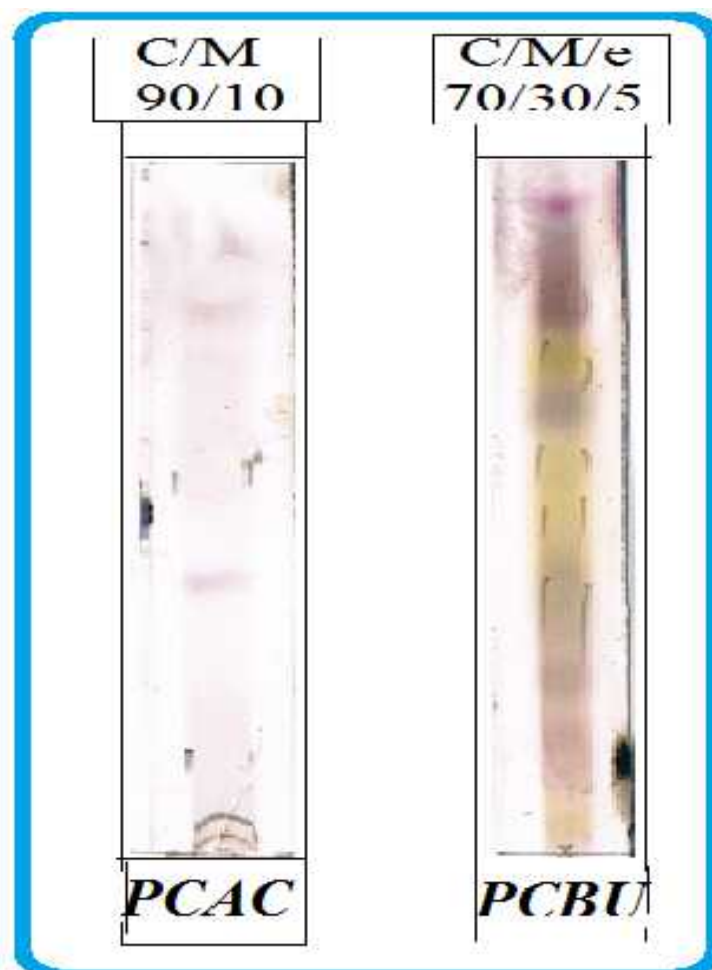


Figure V-6: CCM des extraits de Toutes les parties de la plante *Paronychia capitata* (L.) Lam.

### V-3-2- Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

L'extrait *n*-butanol *PCBU* (7.5 g) a été soumis à une Chromatographie sous vide liquide (VLC) sur RP-18 en utilisant comme éluant le mélange MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20 à 0: 100). A l'issue de ce fractionnement, 6 fractions ont été recueillies (Fr<sub>1</sub>-Fr<sub>7</sub>) (Tableau V-3).

**Tableau V-3: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol (*PCBU*)**

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
H <sub>2</sub> O/ MeOH	20-80	Fr <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O 70/30/5	4.66 g
	20-80			
	60-40	Fr <sub>2</sub>		470 mg
	60-40			
	60-40			
	40-60	Fr <sub>3</sub>		187 mg
	40-60			
	40-60	Fr <sub>4</sub>		400 mg
	20-80	Fr <sub>5</sub>		170 mg
	20-80	Fr <sub>6</sub>		140 mg
20-80	Fr <sub>7</sub>	80 mg		
MeOH	100	Fr <sub>8</sub>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH: 80/20	200 mg
	100			
	100			

La fraction Fr<sub>7</sub> (80 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'élution CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100-0 à 80-20), pour donner 6 fractions (Fr<sub>7.1</sub> à Fr<sub>7.6</sub>).

Les sous fractions Fr<sub>7.4</sub> (13 mg) Fr<sub>7.6</sub> (13 mg) sont filtrée sur le Sephadex LH-20 dans le mélange chloroforme/methanol, pour conduire aux composés *Pc*<sub>1</sub> (7 mg) et *Pc*<sub>4</sub> (7 mg).

La fraction Fr<sub>8</sub> (200 mg) a aussi subi une purification par précipitation dans le MeOH, ce qui a conduit à obtenir un mélange de deux composés *Pc*<sub>2</sub> et *Pc*<sub>3</sub> (12 mg) à l'état pur (Figure V-7).

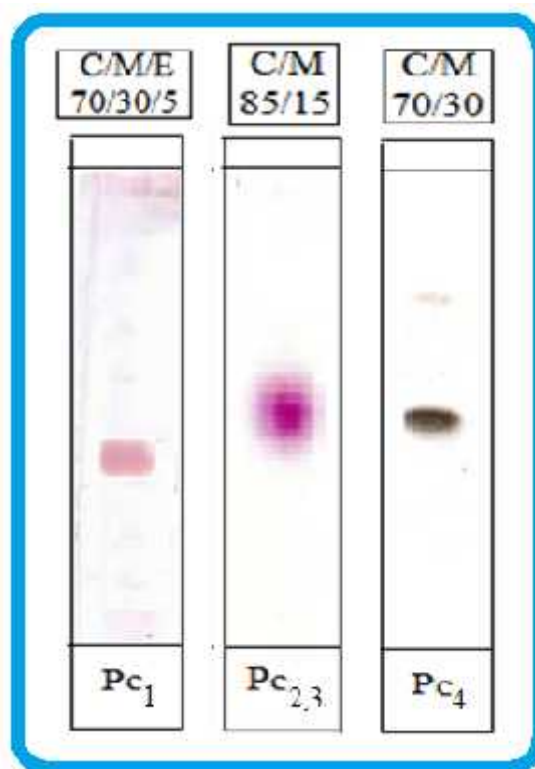
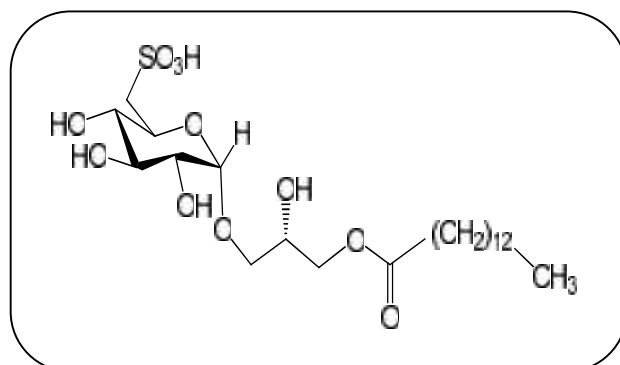


Figure V-7 : CCM en phase normale des composés *Pc*<sub>1</sub>, *Pc*<sub>2</sub>, *Pc*<sub>3</sub> et *Pc*<sub>4</sub>.

### V-3-3- Composés isolés de l'espèce *Paronychia capitata* (L.) Lamk.

#### V-3-3-1- Composé *Pc*<sub>1</sub>

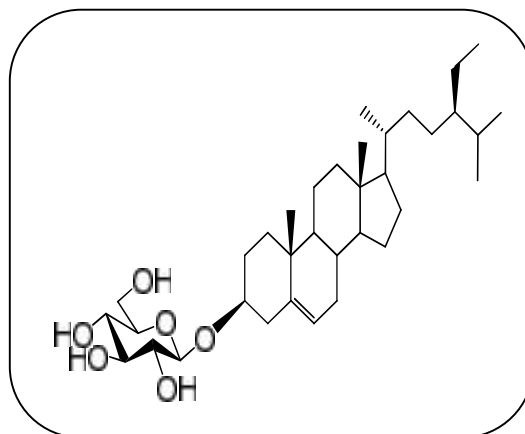
- 📌 **Nom** : 1-*O*-myristoyl-3-*O*-(6-sulfo-β-D-quinovopyranosyl)-glycerol.
- 📌 **Formule brute**: C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>O<sub>11</sub>S.
- 📌 **Masse moléculaire**: 528 uma.
- 📌 **MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 551 [M+Na]<sup>+</sup>.
- 📌 **RMN <sup>1</sup>H**: 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD.
- 📌 **RMN <sup>13</sup>C**: 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.



(Tableau des donneurs: III-12, page : 136)

V-2-3-2- Composé  $Pc_2$ 

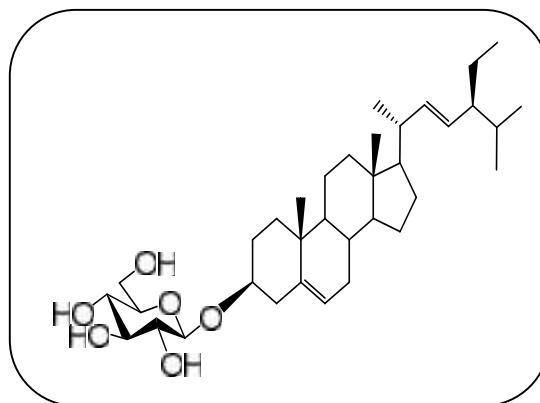
- 📌 **Nom :** -Sitosterol-3-O-glucoside.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{35}H_{60}O_6$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 576 uma.
- 📌  $[\alpha]_D -41.5^\circ$  (C = 0.4, MeOH).
- 📌 **Point de fusion :** 285.2 °C
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 599  $[M+Na]^+$ .  
ESI (mode négatif)  $m/z$  : 575  $[M+H]^-$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donneurs: III-10, page : 116).

V-2-3-2- Composé  $Pc_3$ 

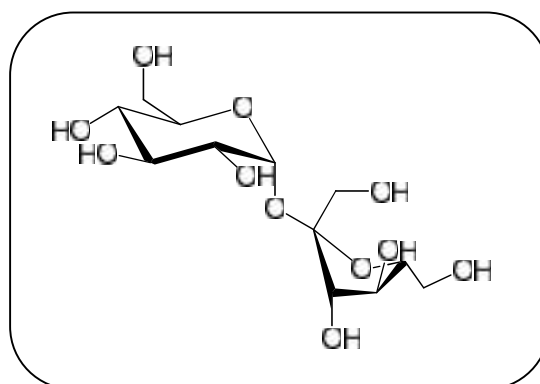
- 📌 **Nom:** 3-O- -D-glucopyranosyl Stigmastérol.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{35}H_{62}O_6$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 574 uma.
- 📌  $[\alpha]_D -6.5^\circ$  (C = 0.6 ;  $CHCl_3$ )
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 597  $[M+Na]^+$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donneurs: III-13, page : 139)

V-2-3-2- Composé  $Pc_4$ 

- 📌 **Nom :** Saccharose.
- 📌 **Formule brute:**  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .
- 📌 **Masse moléculaire:** 342 uma.
- 📌  $[\alpha]_D +30.0$ ; (C = 0.33, MeOH).
- 📌 **MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 365  $[M+Na]^+$ .
- 📌 **RMN  $^1H$ :** 500 MHz,  $CD_3OD$ .
- 📌 **RMN  $^{13}C$ :** 125 MHz,  $CD_3OD$ .



(Tableau des donneurs: III-14, page : 142)



**V-4- Dosage spectrophotométrique (Estimation quantitative des polyphénols totaux)****V- 4- 1- Principe**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu. [206]

**V- 4- 1- Mode opératoire**

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu ,Elle consiste à prendre un volume de 200 µl de l'extrait, un volume de 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué dix fois) était ajouté. Après 4 mn, un volume de 800 µl de Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (75 mg/ml % dans l'eau distillée) a été ajouté à la solution. Les tubes ont été placés à l'obscurité. Après les deux heures, les résultats étaient lus à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm [160]. La concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-200µg /ml) (Figure V-8). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

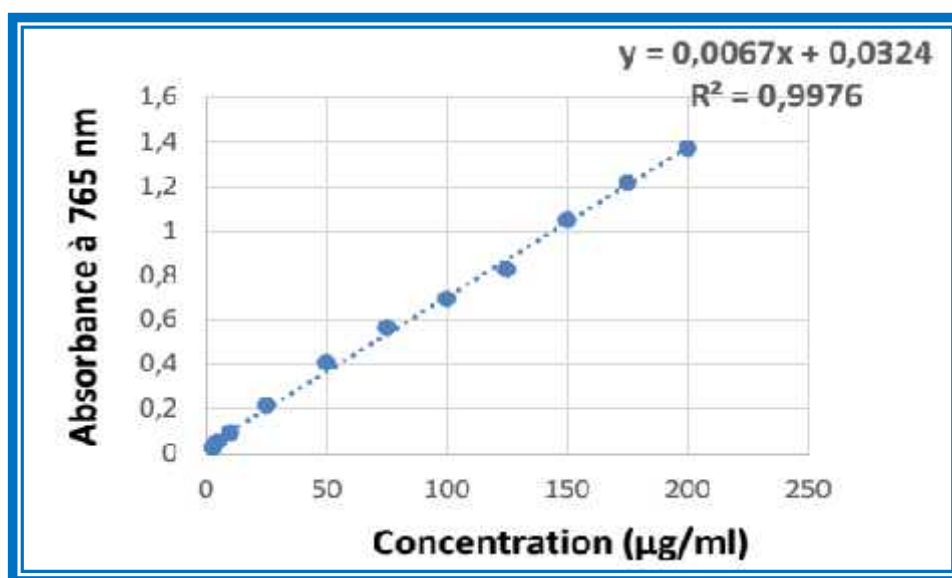


Figure V-8 : Droite d'étalonnages de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois essais)

## V-5- Tests biologiques :

### V- 5-1- Test de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Batna par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par (NCLLS) cité par [207,208].

**Tableau V-4 : les Caractéristiques des souches microbiennes utilisées sont représenté dans le tableau ci-dessous**

Bactéries testées	Caractéristiques des bactéries			
	Exigence	GRAM	La sensibilité vis-à-vis les antibiotiques	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	Bactéries non Exigeantes	GRAM-	Souches de références	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		GRAM+		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		GRAM-		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		GRAM-		BLSE
<i>Enterobacter sp.</i>		GRAM-		BLSE

#### V-5-1-1- Les caractéristiques des bactéries testées

#### V-5-1-2- Milieux de cultures

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits.

#### **V-5-1-2- Préparation des extraits**

Les extraits ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations :

- 0.15 g/ 300 $\mu$ l (0.5 g/ml).
- 0.075 g/ 300 $\mu$ l (0.25 g/ml).
- 0.037 g/ 300 $\mu$ l (0.12 g/ml).
- 0.018 g/ 300 $\mu$ l (0.06 g/ml).

#### **V-5-1-2- Préparation de l'inoculum**

On a ensemencées les souches bactériennes dans la gélose nutritive puis on a incubé nos souches dans une étuve à 37 °C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance, par la suite on a raclée à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. On a Déchargée l'anse dans 5 ml d'eau distillée stérile, et homogénéisée la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland à l'aide d'un densitomètre. On a fait l'ensemencement dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

#### **V-5-1-2- Ensemencement et dépôt des disques**

On a trouvé un écouvillon stérile dans le tube de la suspension bactérienne, puis on a déshydraté l'écouvillon sur la paroi interne du tube. On a frottée l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées et on a répété l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois et finalement on a passé l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. On a Rechargé l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. On a imprégné une petite quantité des extraits sur les disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre et on a déposé

les disques sur la surface de la gélose inoculée. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

### V-5-1-2- Lecture des zones d'inhibition

La lecture a été faite à l'aide d'un pied à coulisse. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

## V-5-2- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

### V-5-2-1- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

#### V-5-2-1-1- Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène [209].

#### V-5-2-1-2- Mode opératoire

Une solution du  $\beta$ -carotène (0.5 mg/1 ml de chloroforme) est introduite dans un ballon contenant 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été complètement évaporé, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène été ajouté au mélange précédant, l'émulsion précédente est rigoureusement agitée. Des solutions méthanoliques contenant 2 mg de chaque extrait et 2 mg d'un antioxydant standard, hydroxy toluène butylé (BHT) ont été ajoutés à une série de tubes contenant 350  $\mu$ l de l'émulsion préparée, juste après l'addition, l'absorbance de temps zéro ( $t=0$ ) à 490 a été enregistré pour l'antioxydant de référence (BHT). Les extraits ont été maintenus à l'obscurité et leurs valeurs d'absorbance ont été lues à des intervalles de temps réguliers pendant 48h. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \frac{\text{Absorbance}_{t=48h}(\text{échantillon})}{\text{absorbance}_{t=48h}(\text{BHT})} \times 100.$$

### V-5-2-2- Test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl)

#### V-5-2-2-1- Principe

La méthode du DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire DPPH-H. La réduction du DPPH• en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivie à 517 nm. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort. Figure IV-16' [210].

#### V-5-2-2-2- Mode opératoire

Un volume de 25µl de chaque extrait (reconstitué selon la concentration voulue) est mélangé avec 975 µl d'une solution méthanolique de DPPH (2.4mg/ 100 ml de méthanol). La solution est ensuite gardée à l'obscurité. Après 30 min d'incubation. Les absorbances ont été enregistrées à 517nm. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour la quercitrine pris comme antioxydant standard. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \text{ à } t=30 \text{ min}$$

- Abs contrôle : correspond à l'absorbance du blanc après 30 min
- Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon après 30 min

#### V-5-3- Analyses statistiques

L'étude statistique de l'activité antioxydante a été réalisée par le logiciel statistique GraphPad Prism, moyenne ± SD. Les résultats sont analysés par le test One-way ANOVA suivie du test Dunnett /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de (p < 0.05) sont considérées statistiquement significatives.

# *Bibliographie*



## Bibliographie

- [1]. Quezel P. et Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Ed C.N.R.S. Tome I. 565 p.
- [2]. Böttger S, Melzig MF. 2011. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phyto chem Lett.* 4: 59–68.
- [3]. Curini M, Epifano F, Menghini L, Pagiotti R. 2004. Flavonoids and tocopherols from *Paronychia kapela*. *Chem NatCompd.* 40: 190–191.
- [4]. Atta EM, Adel AN, Nawal MH, Ahmad RH. 2013. New flavonoid glycoside and pharmacological activities of *Pteranthus dichotomus* Forssk. *Rec Nat Prod.* 7: 69–79.
- [5]. Balamurugan K, Sakthidevi G, Mohan VR. 2012. Anti-inflammatory activity of whole plant of *Polycarpaea corymbosa* (L.) Lam (Caryophyllaceae). *Pharma Sci Monit.* 3: 3336–3341.
- [6]. Simões CMO, Amoros M, Girre L. 1999. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytother Res.* 13: 323–328.
- [7]. Sowemimo A, Van de Venter M, Baatjies L, Koekemoer T. 2009. Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 6: 526–528.
- [8]. Akindele A, Ibe I, Adeyemi O. 2012. Analgesic and antipyretic activities of *Drymaria cordata* (Linn.) Willd (Caryophyllaceae) extract. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 9: 25–35.
- [9]. Bittrich V. 1993. The Families and Genera of Vascular Plants Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. *Vol II. In: (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.*
- [10]. Botineau M. 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, *Tec & Doc* (Eds.), Lavoisier.
- [11]. Desfeux C, Maurice S, Henry JP, Lejeune B, Gouyon, PH. 1996. Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc R Soc B.* 263: 409–414.
- [12]. Ferreira A, Proenca C, Serralheiro MLM, Araujo MEM. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol.* 108: 31–37.



- [13]. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens P. 2002. *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Université s.a, 1 edition.
- [14]. Amer AM. 1991. Kuwaiti Plants Distribution, Traditional Medicine, Pytochemistry, Pharmacology and Economic Value Studies in Plant Science.
- [15]. Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3<sup>ème</sup> éd. Paris: CNRS.
- [16]. Hartman R L. 1974. Rocky Mountain species of *Paronychia* (Caryophyllaceae): A morphological, cytological, and chemical study. *Brittonia*. 26: 256-263.
- [17]. El-Seedi HR, Burman R, Mansour A, Turki Z, Boulos L, Gullbo J, Goransson U. 2013. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. *J Ethnopharmacol*. 145: 746–757.
- [18]. Bellakhdar J. 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, *Ibis Press*.
- [19]. Beloued A. 1998. Plantes médicinales d'Algérie. *OPU*, Alger. pp: 74–84.
- [20]. Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, Vlietinck A. 2007. Chloropyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian Journal of Pharmacology*. 39: 145–150.
- [21]. Afifi FU, Al-Khalidi B, Khalil E. 2005. Studies on the in vivo hypoglycemic activities of two medicinal plants used in the treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine following intranasal administration. *J Ethnopharmacol*. 100: 314–318.
- [22]. Carmona MD, Llorach R, Obon C, Rivera D. 2005. 'Zahraa', a Unani multicomponent herbal tea widely consumed in Syria: components of drug mixtures and alleged medicinal properties. *J Ethnopharmacol*. 102: 344–350.
- [23]. Al-Bakri AG, Affifi FU. 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*. 68: 19–25.
- [24]. Ferreira A, Proenc C, Serralheiro MLM, Araújo MEM. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*. 108: 31–37.

- [25]. De Santayana MP, Blanco E, Morales R. 2005. Plants known as té in Spain: an ethnopharmacobotanical review. *J Ethnopharmacol.* 98:1–19.
- [26]. Sevil A. & Ahmet A. 2010. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of *Paronychia mughlai* Chaudhri. *Acta Bot. Gallica.* 157: 411-418.
- [27]. Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z, Mahajna. 2000. Traditional knowledge of wild edible plants used in Palestine (Northern West Bank): A comparative study. *J. J. Ethnopharmacol.* 73: 221–232.
- [28]. Curini M, Epifano F, Menghini L, Pagiotti R. 2004. Flavonoids and tocopherols from *Paronychia kapela*. *Chem Nat Compd.* 40: 190–191.
- [29]. Derya G. Milena M. Özgen A. Sonia P. 2014. Oleanane type glycosides from *Paronychia anatolica* subsp. *balansae*. *Fitoterapia.* 92: 274–279.
- [30]. Avunduk S, Lacaille-Dubois M, Miyamoto T, Bedir E, enol SG, Alanku -Çalı kan Ö. 2007. Chionaeosides A–D, triterpene saponins from *Paronychia chionaea*. *J Nat Prod.* 70: 1830–1833.
- [31]. Avunduk S, Alanku -Çalı kan Ö, Miyamoto T, Tanaka C, Lacaille-Dubois M. 2011. Secondary metabolites from the roots of *Paronychia chionaea*. *Nat Prod Commun.* 6: 205–208.
- [32]. Braca A, Bader A, Siciliano T, De Tommasi N. 2008. Secondary metabolites From *Paronychia argentea*. *Magn Res Chem.* 46: 88–93.
- [33]. Kopitz J, Sinz K. 1997. "Partial characterization and enrichment of a membrane bound sialidase specific for gangliosides from human brain tissue". *Eur. J. Biochem.* 248: 527-534.
- [34]. Meng JK, Rosell G & Srivastava LM. 1987. Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforata*. *Carbohydrate. Res.* 161: 171–180.
- [35]. Morimoto T. Nagatsu A. Murakami N. Sakakibara J. 1995. Chemoenzymatic synthesis of a galactolipid. *Tetrahedron.* 51: 6443-6450.
- [36]. Kates M. 1990. Glycolipids of Higher Plants, Algae, Yeasts and Fungi, in: M. Kates (Ed.), *Handbook of Lipid Research*, Vol. 6, Plenum Press, New York, London. pp: 235.

- [37]. Lambein F, Wolk CP. 1973. Structural studies on the glycolipids from the envelope of the heterocyst of *Anabaena cylindrica*. *Biochemistry*. 12: 791-798.
- [38]. Hakomori S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*. 50: 733-764.
- [39]. De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, SCHELL J, Zambryski P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J*. 3: 1681-1689.
- [40]. Diop MS, Samb A. 2004. Identification de glycolipides isolés d'algues et de cnidaire de la côte Sénégalaise. *C. R. Chimie*. 7: 965-971.
- [41]. He ZD, Ma CY, Tan GT, Sydara K, Tamez P, Southavong B, Bouamanivong S, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HHS, Zhang H-J. 2006. Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochemistry*. 67: 1378-1384.
- [42]. Harwood JL. 1997. Plant lipid metabolism dans Plant biochemistry. Éditeurs : P. M. Dey et J. B. Harborne. Academic Press. San Diego. pp: 237-272.
- [43]. Sanda S, Leustek T, Theisen MJ, Garavito RM, and Benning C. 2001. Recombinant Arabidopsis SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose *in vitro*. *J Biol Chem*. 276: 3941-3946.
- [44]. Essigmann B, Hespeneide BM, Kuhn LA, Benning C. 1999. Prediction of the active-site structure and NAD (+) binding in SQD1, a protein essential for sulfolipid biosynthesis in Arabidopsis. *Arch Biochem Biophys*. 369: 30-41.
- [45]. Mulichak AM, Theisen MJ, Essigmann B, Benning C and Garavito RM. 1999. Crystal structure of SQD1, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant sulfolipid head group donor UDP-sulfoquinovose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 13097-13102.
- [46]. Yu B, Xu C and Benning C. 2002. Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 5732-5737.
- [47]. Harwood JL. 1980. "The Biochemistry of Plants" by P.K. Stumpf, E.E. Conn, Academic Press, New York. 4: 301-303.

- [48]. Kikuchi H, Tsukitani Y, Manda T, Fujii T, Nakanishi H, Kobayashi M, Kitagawa I. 1982. Marine natural products X. Pharmacologically active glycolipids from the Okinawan marine sponge *Phyllospongia foliascens*. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 3544–3547.
- [49]. Gustafson KR, Cardellina JH, Fuller RW, Weislow OS, Kiser RF, Snader K M. 1989. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 1254 – 1258.
- [50]. Naoki M, Seiji O. 2008. anti-tumor effect of orally administered spinach. *Journal of chemistry and science.* 43: 741-748.
- [51]. Shirahashi H, Murakami N, Watanabe M, Nagatsu A, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. 1993. Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem Pharm Bull.* 9: 1664-1666.
- [52]. Isoko K, Musumi K, Yonezawa Y, Takemura M, Maeda N, Iijima H. 2005. "Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation." *The Journal of nutritional biochemistry.* 10: 594-601.
- [53]. Sullards MC, Liu Y, Chen Y, Merrill AH, 2011. Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS), *Biochimica et Biophysica Acta.* 1811: 838-853.
- [54]. [www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk) «Sphingolipids: Introduction to sphingolipids and rafts» consulté le 13 mai 2008 à 9h30'.
- [55]. Vesper H, Schmelz EM, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill AH. 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nut.* 129: 1239-1250.
- [56]. Hanada K. 2005. Sphingolipids in Infectious Diseases. *Japan Journal of Infectious Diseases.* 58:131-148.
- [57]. Li Guan X, Wenk MR. 2006. Mass spectrometry-based profiling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23: 465-477.
- [58]. Beckmann C, Rattke J, Sperling P, Heinz E, Boland W. 2003. Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide 4-desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Organic and Biomolecular Chemistry.* 1: 2448-2454.

- [59]. Voet D, Voet J G. 2005. Biochimie, 2<sup>ème</sup> Edition. De Boeck, Bruxelles.
- [60]. Huang MT, Ferraw, T. 1992. Phenolic compound in food and cancer prevention. *Am. Chem. Soc, Washington, DC*. 8-34.
- [61]. Ali NAA, Julish WD, Kusunick C, Lindesquist U. 2001. Screening of yamanimedical plant for antibacterial and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.* 74: 173-179.
- [62]. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Tian Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of select edmicroalgae. *Food Chem.* 102: 771-776.
- [63]. Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. 1986. Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement). *Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India*.
- [64]. Hu SG, Li L, He XW. 2005. Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatography A.* 1062: 31-37.
- [65]. Beta T, Nam S, Pexter JE, Sapirstein HD. 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller milled fractions. *Cereal Chem.* 82: 390-393.
- [66]. Luthria DL, Mukahapadhyay S. 2006. Influence of sample preparation on Assay of phenolic acids from eggplant. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 41-47.
- [67]. Pietta P. 2000. Flavonoids as antioxydants. *J. Nat. Prod.* 63: 1053-1042.
- [68]. Pearce F L, Befus A D, Bienenstock J. 1984. Mucosal mast cells III, Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 819-823.
- [69]. Kone D. 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales extraction, identification d'alcaloides caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. *Thèse de doctorat*. Université de Paul Verlaine de Metz-UPVM, France.
- [70]. Harborne J B, Williams C A. 2000. « Advances in flavonoid research since 1992 ». *Phytochemistry.* 55: 481-504.

- [71]. Louis S. 2004. Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses. *Thèse de doctorat*. Lyon, France.
- [72]. Robinson R. 1955. *Structural relations of Natural Product* Oxford: Clarendon Press, England.
- [73]. Birch AJ. 1962. *The chemistry of flavonoids compounds* ed. Geissman TA, New York: Pergamon Press New York, 618, USA.
- [74]. Ghestem A, Seguin E, Paris M, Oricchioni A-M. 2001. *Le préparateur en pharmacie*, ed Tec et Doc Paris, France. 110.
- [75]. Faggioto A, Poli A, Catapano A. 1998. Anti-oxidants and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 9: 541-549.
- [76]. Van de Vijer LP, Kardinaal AF, Grobbee DE, Princen Hm, Vanden Poppel G. 1997. Lipoprotein oxidation, anti oxidants and cardiovascular risk : epidemiologic evidence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 57: 479-487.
- [77]. Fuchs J. 1998. Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR-alpha-tocophérol, l- ascorbic acid and - carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad Biol Med*. 25: 848-873.
- [78]. Weisburger J. 1998. Chemoprevention of cancer by tea. In: Prasad KN, Cole WC, editors. *Cancer and nutrition*. New York : *IOC Press*. pp: 167-171.
- [79]. Clarkson TB, Anthony M S, Hughes CL. 1995. Estrogenic soybean isoflavones and chronic -risks and benefits. *Trends Endocrin Met*. 6: 11-16.
- [80]. Hahida F, wanaundara P K G P D. 1998. Phenolic antioxydants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 32: 67-103.
- [81]. Middleton Jr E, Kardasami C. 1993. *The flavonoides advences in research since 1986*. ed. J. B. Harborn, Chapman and Hall. London. pp: 617-652.
- [82]. Hennebelle T, Sarpaz S, Bailleul F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

- [83]. Raffaeilli B A, Hoikkala A B, Wahala K. 2002. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Chromatography B*. 777: 29-43.
- [84]. Chun C, Ming-Hong Y, Yen-Yin C, Cheng-hsung C et Tsumo N. 1991. *American Journal of Chinese Medicine*, 17: 265-274.
- [85]. Hofmann, L. 2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. *Thèse de doctorat* .strasbourg, France.
- [86]. Bruneton J. 1998. Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales), 3<sup>ème</sup> Edition. Paris, France.
- [87]. Humphreys JM, Hemm MR, Chapple C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 10045-10050.
- [88]. Whetten RW, Mackay J J, Sederoff R R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant physol. Plant Mol. Biol.* 49: 585-609.
- [89]. Pelucchi C, Talamini R, Galeone C, Negri E, Franceschi S, Dal Maso L, Montella M, Conti E, La Vecchia C. 2004. Fibre intake and prostate cancer risk. *Int J. Cancer*. pp: 109-278.
- [90]. Chi Y. 2001. Atropisomerism and the synthesis of lignans, university of Manitoba Winipeg. Thesis Master of Science. Manitoba, Canada.
- [91]. Tandon S, Rastogi R P. 1976. Wikstromol, a new lignan from Wikstroemia viridiflora. *Phytochemistry*. 15: 1789-1791.
- [92]. Ayres D C, Loike J D. 1990. Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties (1). Cambridge University Press, Cambridge, England.
- [93]. Cos P, Maes L, Vlietinck A, Pieters LL. 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection-an update (1998 -2007). *Planta Med*. 74: 1323-1337.
- [94]. Saleem M, Kim H J, Ali M S, Lee Y S. 2005. An update on bioactive plant lignans. *Nat. Prod. Rep.* 22: 696-716.



- [95]. Abou-Gazar H, Bedir E, Takamatsu S, Ferreira D, Khan I A. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*. 65: 2499-2505.
- [96]. Raffaelli B, Hoikkala A, Leppälä E, Wähälä K. 2002. Enterolignans. *J. Chromatogr. B*. 777: 29-43.
- [97]. Dey P M, Harbone J B. 1991. *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids Academic press, France.
- [98]. Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales*. 3<sup>ème</sup> Edition. Techniques et documentations, Paris, France.
- [99] Manito P. 1981. *Biosynthesis of naturel products*. John willey et sons, New York, USA.
- [100]. Rahal S. 2004. *Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants*. Pp : 39-44.
- [101]. Khalik-uz-Zaman SM. 1999. *Studies on the chemical constituents of Asparagus species and synthesis of biotin analogues*, Karachi. Pp: 19-34.
- [102]. Gaignautl J C, Bidet D, Gaillard M, Perronnet J. 1997. *Stérols et stéroïdes*, Paris. Pp : 11-31.
- [103]. Grassé P P, Lavcolette P, Holland A, Nigon V, Wolf E. 1969. *Biologie général*, Paris. 193.
- [104]. Shoppee CW, Shopper E. 1953. *Steroids-Sterols and bile acids-Chemistry of carbon compounds*. *New York, Elsevier*. 17: 765-825,
- [105]. Bouic PJD. 2001. *Plant Sterols and Sterolins*. *Alternative Medicine Review*. 6: 203-206.
- [106]. Courtios JE, Perlés R. 1971. *Précis de chimie biologique*. 2<sup>ème</sup> édition, Masson et Cie, Paris. Pp: 424-437.
- [107]. Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed (3). Techniques et documentation, Paris.
- [107]. Dey PM, Harborne JB. 1991. *Methods inplant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.

- [108]. Manitto P. 1981. Biosynthesis of natural products. John Willey et sons. New York, USA.
- [109]. Rhourri-Frih B. 2009. Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse. Thèse de doctorat. Université d'Orléans, France.
- [110]. Aguirre MC, Delporte C, Backhouse N, Erazo S, Letelier ME, Cassels BK, Silva X, Alegria S, Negrete R. 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14: 5673-5677.
- [111]. Sharma ML, Kaul A, Khajuria A, Singh S, Singh GB. 1998. Immunomodulatory activity of Boswellic acids (pentacyclic triterpene acids) from *Boswellia serrata*. *Phytotherapy Research*. 10: 107-112.
- [112]. Laszczyk MU. 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane groups as tools in cancer therapy. *Planta Medica*. 75: 1549-1560.
- [113]. Corbiere C. 2003. Comparaison de l'effet anti-prolifératif de trois stéroïdes végétaux (diosgénine, hécogénine, tigogénine) sur la lignée 1547 d'ostéosarcome humain : implication de la mitochondrie et de la cyclooxygénase-2 dans l'apoptose induite par la diosgénine sur les lignées 1547, HEP-2 (laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome). *Thèse de doctorat*, Université de Limoges.
- [114]. Heller R. 1969. Biologie végétale II : Nutrition et metabolism. Paris.
- [115]. Panda S, Jafri M, Kar A, Meheta BK. 2009. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Bueta monosperma*. *Fitoterapia*. 80: 123-126.
- [116]. Beuchet P, Letourneux Y. 1998. Hemisynthèse de stéroïls marins polyhydroxyles sulfates ou amines à partir de stéroïdes naturels. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 137: 37-53.
- [117]. Neason A, Eskin M, Tamir S. 2006. Dictionary of nutraceuticals and functional foods, 345.

- [118]. Takashi M, Nobutoshi M, Akito N, Jinsaku S. 1993. Studies on Glycolipids (VII.i) Isolation of Two New Sulfoquinoyosyl Diacylglycerols from the Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* 41: 1545-1548.
- [119]. Fusetani N, Hashimoto Y. 1975. Structures of Two Water Soluble Hemolysins Isolated from the Green Alga *Ulva pertusa*. *Agr. Bioi. Chem.* 39: 2021-2025.
- [120]. Al-Fadhli A, Solimabi Wahidull S, D'Souza L. 2006. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Glycobiology.* 16: 902-915.
- [121]. Plouguerné E, De Souza LM, Sasaki GL, Cavalcanti JF, Villela Romanos MT, Da Gama BAP, Pereira RC, BarretoBergter E. 2013. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Mar Drugs.* 11: 4628– 4640.
- [122]. Jia AQ, Yang X, Wang W X, Jia Y X. 2010. Glycocerebroside bearing a novel long-chain base from *Sagina japonica* (Caryophyllaceae). *Fitoterapia.* 81: 540-545.
- [123]. Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Sevenet T, Hadi HA. 1999. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry.* 50: 63-69.
- [124]. Tang J, Meng X, Liu H, Zhao J, Zhou L, Qiu M, Zhang X, Yu ., Yang F. 2010. Antimicrobial Activity of Sphingolipids Isolated from the Stems of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Molecules.* 15: 9288-9297.
- [125]. Cateni F, Zilic J, Altieri T, Zacchigna M, Procida G, Gaggeri R, Rossi D, Collina S. 2014. Lipid metabolites with free-radical scavenging activity from *Euphorbia helioscopia* L. . *Chemistry and Physics of Lipids.* 181: 90-98.
- [126]. Luo YH, Zhou ZQ, Ma SC, Fu HZ. 2014. Three new antioxidant furofuran lignans from *Callicarpa nudiflora*. *Phytochemistry Letters,* 7: 194-197.
- [127]. Quideau S, Ralph J. 1993. Synthesis of 4,8-Bis( 4-hydroxy-3 methoxyphenyl ) -3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-2-one and Determination of their Relative Configuration via Long-range Proton Couplings. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2: 635-659.
- [128]. Kui-Wu W, Jun-Ru Z, Lian-Qing S. 2013. A new lignan with anti-tumour activity from *Polygonum perfoliatum*L. *Nat Prod Res.* 27: 568–573.

- [129]. Choi YH, Kim HK, Linthorst HJ, Hollander JG, Lefeber AWM, Erkelens C, Nuzillard JM, Verpoorte R. 2006. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J Nat Prod.* 69: 742–748.
- [130]. Mc Anlis GT, Mc Eneny J, Pearce J, Young IS. 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 : 92-96.
- [131]. Tarayre JP, Laressergues H. 1977. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid antiinflammatory agents. *Arzneimittel forschung.* 27: 1144-1149.
- [132]. Thornhill SM, Kelly AM. 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altern. Med. Rev.* 5: 448-454.
- [133]. Janssen K, Mensink R P, Cox FJ, Harryvan, JL, Hovenier R, Hollman P, Katan MB. 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 255-262.
- [134]. Ersöz T, Harput U , Saraco lu , Cali . 2002. Phenolic Compounds from *Scutellaria pontica*. *Turk. J. Chem.* 26: 581–588.
- [135]. Benabdelaziz I, Haba H, Lavaud C, Benkhalel M. 2014. Triterpenoids and flavonoid from *Scorzonera undulate* ssp *alexandrina*. *IJCBS.* 5: 1–5.
- [136]. Obmann A, Werner I, Presser A, Zehl M, Swoboda Z, Purevsuren S, Narantuya S, Kletter C, Glasl S. 2011. Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch. *Carbohydr Res.* 346: 1868–1875.
- [137]. Meng Y, Krzysiak AJ, Durako M J, Kunzelman J I, Wrigh J LC. 2008. Flavones and flavone glycosides from *Halophila johnsonii*. *Phytochemistry.* 69: 2603–2608.
- [138]. Siddique Y-H, Beg T, Afzal M. 2008. Antigenotoxic effect of Apigenin against anticancerous drugs. *Toxicol. in vitro.* 22: 625–631.
- [139]. Park J, Hyunkim S, Sungkim T. 2006. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via down-regulation of NF-AT DNA binding activity by Apigenin a flavonoid present in dietary plants. *Immunol. lett.* 103: 108–114.
- [140]. Peng J, Fan G, Hong Z, Chai Y, Wu Y. 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 1074: 111– 115.

- [141]. Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*. 68: 1255–1260.
- [142]. Dae-Sup P, Choi SZ, Ran KK, Mee LS, Ro LK, Suhkneung P. 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. *Journal of applied pharmacology*. 11: 1-4.
- [143]. Mahato SB, Kundu AP. 1994. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37: 1517–1575.
- [144]. Ragasa CY, Lim K. 2005. Sterols from *Cucurbita maxima*. *Philipp J Sci*. 134: 83–87.
- [145]. Smith AG, Goad LJ. 1975. The conversion of cholest-5-en-3b-ol into cholest-7-en-3b-ol by the echinoderms *Asterias rubens* and *Solaster papposus*. *Biochem J*. 146: 35–40.
- [146]. Burdi DK, Hasan M, Uddin V. 1991. Sterols and a glycoside from the flowers of *Inula grantioides*. *Pak J Pharm Sci*. 4: 131–136.
- [147]. Wang N. 2001. The beneficial effect of plant sterols on serum cholesterol. *Can. J Cardiol*. 17: 715-721.
- [148]. Awad AB, Gan Y, Fink CS. 2000. Effect of beta-sitosterol, a plant sterol, on growth, protein phosphatase 2A, and phospholipase D in LNCaP cells. *Fink. Nutr. Cancer*. 36: 74-78.
- [149]. Park E-H, Kahng J-H, Lee S-H, Shin K-H. 2001. An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia*. 72: 288-290.
- [150]. Mahato SB, Kundu AP, 1994. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37: 1517–1575.
- [151]. Geetha T, Varalakshmi P. 1998. Anti-Inflammatory Activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook). *Fitoterapia*, 69: 13-19.
- [152]. Nigam N, Prasad S, George J., Shukla Y. 2009. Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin. *Biochemical and Biophysical research communication*. 381: 253-258.
- [153]. Moriarity D-M, Hung J, Yancey C-A, Zhang P, Setzer W-N, Lawton R-O, Bates R-B, Caldera S. 1998. Lupeol is the cytotoxic principle in the extract *Dendro panax* cf. *querceti*. *Planta Med*. 64: 370-372.

- [154]. By Wang W, Hongyan L, Yanyan W, Xue X, Yoshihto O, Toru FO. 2008. Chemical constituents from brown alga *Sargassum fusiforme*. *Zhongcaoyao*. 39: 657-661.
- [155]. Ali Z, Ahmad VU, Ali MS, Iqbal F, Zahid M, Alam N. 1999. Two New C-Glycosylflavones From *Silene Conoidea*. *Nat Prod Res*. 13: 121-129.
- [156]. Torrance SJ, Hoffmann JJ, Cole JR, 1979. Wikstromol, antitumor lignan from *Wikstroemia foetida* var. oahuensis gray and *Wikstroemia uva-ursi* gray (Thymelaeaceae). *J. Pharm. Sci*. 68: 664-665.
- [157]. King A, Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*. 99: 213-218.
- [158]. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.
- [159]. Cetkovic G, Canadanovic-Brunet J, Djilas S, Savatovic S, Mandic A, Tumbas V. 2008. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem*. 109: 340-347.
- [160]. Bougandoura N, Bendimerad N. 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie*. 9: 15-19.
- [161]. Boizot N, Charpentier JP. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 6: 79-82
- [162]. Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem*. 53: 1841-1856.
- [163]. Trigui M, Ben Hsouna A, Tounsi S, Jaoua S. 2013. Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*. 41: 150– 157.
- [164]. Billing J, Sherman PW. 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *Q Rev Biol*. 73: 43-49.

- [165]. Jürgen R, Paul S, Ulrike S, and Reinhard S. 2009. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties—an Overview. *Forsch Komplementmed.* 16: 79–90.
- [166]. Huang G, Jiang J, Dai D. 2008. Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 9: 1335-1338.
- [167]. Patrick B, Jean L, Michel S. 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1<sup>er</sup> Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
- [168]. Steven P, Rachel C, Martha E, Paul H, Jane S, Peter WJ. 2004. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp 71-132.
- [169]. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheogenic *E. coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 42-201.
- [170]. Nauciel, C. 2000. Bactériologie médicale, Masson(Ed).Paris.
- [171]. Chambers HF. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 781–791.
- [172]. Van Delden C, Iglewski BH. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 4: 551-560.
- [173]. Abbott SL. 2007. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology Washington, USA: ASM Press. 9th ed.* Pp: 698-711.
- [174]. Pickering LK, Baker CJ, Freed GL, Gall SA, Grogg SE, Poland GA, Rodewald LE, Schaffner W, Stinchfield P, Tan L, Zimmerman RK, Orenstein WA. 2009. Immunization programs for infants, children, adolescents, and adults: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 49: 817-840.
- [175]. Hart MW, Keever CC, Dartnall AJ, Byrne M. 2006. Morphological and genetic variation indicate cryptic species within Lamarck's little sea star, *Parvulastra* (=Patiriella) *exigua*. *Biol Bull.* 2: 158-167.
- [176]. Jalaluddin S, Devaster J M, Scheen R, Gerard M and Butzler J P. 1998. Molecular Epidemiological Study of Nosocomial Enterobacter aerogenes Isolates in a Belgian Hospital. *Journal of Clinical Microbiology.* 7:1846-1852.



- [177]. Boyd B, Ford C, Koepke MC, Gary K, Horn E, McAnalley S, McAnalley B. 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 6: 4-7.
- [178]. Walker HG, Kohler GO, Garrett WN. 1982. Comparative feeding value of alfalfa press cake residues after mechanical extraction of protein. *J. Anim. Sci.* 3: 498-504.
- [179]. Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. pp: 108-115.
- [180]. Atawodi S. 2005. Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* 2: 128-133.
- [181]. Georgetti S, Casagrande R, Di Mambro V, Azzolini Ana ECS, Fonseca Maria J. 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* 5: 2-5.
- [182]. Dan Y. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant.* 44: 149-161.
- [183]. Kohen R, Nyska A. 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 30: 620-650.
- [184]. Bauer A, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- [185]. Huang G, Jiang J, Dai D. 2008. Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 9: 1335-1338.
- [186]. Billing J, Sherman P. 1998. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 43-49.
- [187]. Rios JL, Recio MC, Villar A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol.* 23: 127-149.
- [188]. Karaman , ahin F, Güllüce M, Ö ütçü H, engül M, Adigüzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol.* 85: 231-235.
- [189]. Nicholson W, Munakata N, Horneck G, Melosh H, Setlow P. 2000. Resistance of bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol.* 64: 548-572.

- [190]. Kaur C, Kapoor HC. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 153-161
- [191]. Yanishlieva NVI, Marinova EM. 1995. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chem*. 54: 377-382.
- [192]. Yang J, Guo J, Yuan J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT*. 41: 1060-1066.
- [193]. Amarowicz R, Wanasundara U, Wanasundara J & Shahidi F. 1993. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a b-carotene– linoleate model system. *Journal of Food Lipids*. 1: 111–117.
- [194]. Tsuda T, Makino Y, Kato H, Osawa T, Kawakishi S. 1993. Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 57: 1606–1608.
- [195]. Sun T, Ho C T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*. 90: 743–749.
- [196]. Rice-Evans C A, Sampson J, Bramley P M, Holloway D E. 1997. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? . *Free Radical Research*, 26: 381–398.
- [197]. Othman A, Ismail A, Abdul Ghani N, Adenan I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem*. 100: 1523–1530.
- [198]. Wijeratne SSK, Amarowicz R, Shahidi F. 2006. Antioxidant activity of almonds and their by-products in food model systems. *JAOCS*. 83: 223– 230.
- [199]. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. 2006. Antioxydant propreties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 477-485.
- [200]. Molineux P. 2004. The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J-Sci.Technol*. 26: 211-219.
- [201]. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- [202]. Yi Z, Yan Y, Liang Y, Zeng B. 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT*. 41: 597-603.
- [203]. Kang D-G, Yun C-K, Lee H-S. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 231-236.

- [204]. Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhiri , Khennouf S, Charef N, Harzallah D, Arrar L, Mosaad Attia A. 2010. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae*. 2: 128-136.
- [205]. Sokol-Letowska A, Oszmianski J, Wojdylo A. 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chem*. 103:853-859.
- [206]. Daels rakotoarison D. 1999. Extraits phénoliques d'aubépine, de cola et d'églantier. *Thèse de doctorat*. Université de Lille-II, France.
- [207]. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Mansredini S, Radice M, Bruni R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in food. *Food Chem*. 91: 621–632.
- [208]. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan F V, Ozek T, Baser KHC. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100: 553-559.
- [209]. Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem*. 100: 584–589.
- [210]. Mansouri A, Guendez E, Kokkalou E, kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date fruit (*phoenix dactylifera*). *Food Chem*. 89: 411-420.

*Publication*  
*International*





# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Pteranthus dichotomus* from Algerian Sahara

Zina Allaoua, Mohammed Benkhaled, Ammar Dibi, Christophe Long, Mohammed Cherif Aberkane, Soumia Bouzidi, Ahmed Kassah-Laouar & Hamada Haba


To cite this article: Zina Allaoua, Mohammed Benkhaled, Ammar Dibi, Christophe Long, Mohammed Cherif Aberkane, Soumia Bouzidi, Ahmed Kassah-Laouar & Hamada Haba (2016) Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Pteranthus dichotomus* from Algerian Sahara, *Natural Product Research*, 30:6, 700-704, DOI: [10.1080/14786419.2015.1038811](https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038811)



To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1038811>

 View supplementary material 

 Published online: 15 May 2015.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 142

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>

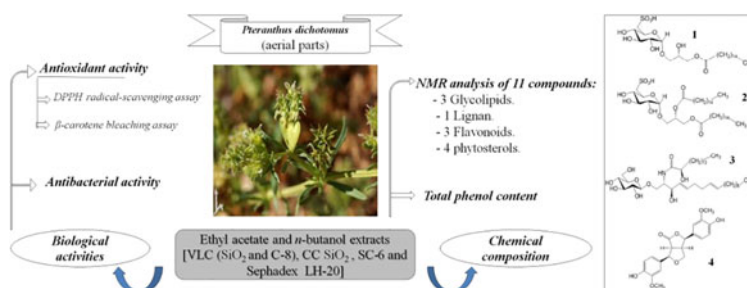
## SHORT COMMUNICATION

### Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Pteranthus dichotomus* from Algerian Sahara

Zina Allaoua<sup>a</sup>, Mohammed Benkhalel<sup>a</sup>, Ammar Dibi<sup>a</sup>, Christophe Long<sup>b</sup>, Mohammed Cherif Aberkane<sup>a</sup>, Soumia Bouzidi<sup>c</sup>, Ahmed Kassah-Laouai<sup>d</sup> and Hamada Haba<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna, Algérie; <sup>b</sup>USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, 3 Avenue Hubert Curien BP 13562, Toulouse 31035, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire, Département de biologie, Université de Batna, Batna, Algérie; <sup>d</sup>Laboratoire Central de Microbiologie CHU, Faculté de Médecine, Université de Batna, Batna, Algérie

(Received 9 February 2015; final version received 3 April 2015)



The phytochemical study of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Pteranthus dichotomus* Forssk. led to the isolation and identification of 11 compounds, including three glycolipids **1–3**, one lignan **4**, three flavonoids **5–7** and four phytosterols **8–11**. Structures of the isolated compounds have been elucidated by analysis of 1D and 2D NMR data, and mass spectrometry EI-MS and ESI-MS and by comparison with literature data. Furthermore, the ethyl acetate and *n*-butanol extracts were examined for their antioxidant and antibacterial activities. The results showed that both extracts (PDAC and PDBU) had a moderate antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 375.514 µg/mL and 691.333 µg/mL) respectively.

**Keywords:** Caryophyllaceae; *Pteranthus dichotomus*; glycolipids; flavonoids; NMR; ESI; antioxidant activity; antibacterial activity

## 1. Introduction

Caryophyllaceae family (pink family) contains 80 genera with more than 1800 species (Ozenda 1991). Previous phytochemical investigations on the species of this family indicated the presence of saponins (Böttger & Melzig 2011) and flavonoids (Curini et al. 2004). Caryophyllaceae species possess interesting pharmacological activities such as antitumour (Atta et al. 2013), anti-inflammatory (Balamurugan et al. 2012), antiviral (Simões et al. 1999), cytotoxic (Sowemimo et al. 2009), analgesic and antipyretic (Akindele et al. 2012).

\*Corresponding author. Email: [haba.hamada@yahoo.fr](mailto:haba.hamada@yahoo.fr)

*Pteranthus dichotomus* Forssk. belonging to Caryophyllaceae family is an herbaceous plant, which is also called as *P. echinatus* Desf. (Ozenda 1991). It is found in the northern Algerian Sahara and in the Hoggar region (Quezel & Santa 1963). In Egyptian traditional medicine, the leaves of *P. dichotomus* are used as an ocular antiseptic (El-Seedi et al. 2013). The aqueous extract of this species exhibited strong cytotoxicity (above 97%) against cultured melanoma cell lines (Sathiyamoorthy et al. 1999). Previous investigation on *P. dichotomus* has revealed the presence of flavonoids and polyphenols (Atta et al. 2013). This plant showed good anti-inflammatory and moderate antipyretic effects whereas its alcoholic extract has an antitumour activity (Atta et al. 2013).

In this investigation, we report the isolation and characterisation of 11 known compounds from ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *P. dichotomus*. Moreover, the antioxidant and antimicrobial activities of these extracts have been investigated.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemical compositions of *P. dichotomus*

This study allowed the isolation of 11 compounds from ethyl acetate (PDAC) and *n*-butanol (PDBU) extracts of *P. dichotomus*. Their structures were identified on the basis of spectral data and by comparing with those reported in the literature as 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl)-glycerol **1** (Diop & Samb 2004), 1,2-di-*O*-palmitoyl-3-*O*-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl)-glycerol **2** (Plouguerné et al. 2013), soyacerebroside I **3** (Voutquenne et al. 1999), 8-oxo-pinoresinol **4** (Kui-Wu et al. 2013), quercetin **5** (Choi et al. 2006), apigenin **6** (Benabdelaziz et al. 2014), isovitexin **7** (Peng et al. 2005; Obmann et al. 2011), stigmat-7-en-3-ol **8** (Smith & Goad 1975), spinasterol **9** (Ragasa & Lim 2005),  $\beta$ -sitosterol **10** (Haba et al. 2007) and  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside **11** (Burdi et al. 1991) (Figure 1). Among them, compounds **1–4** and

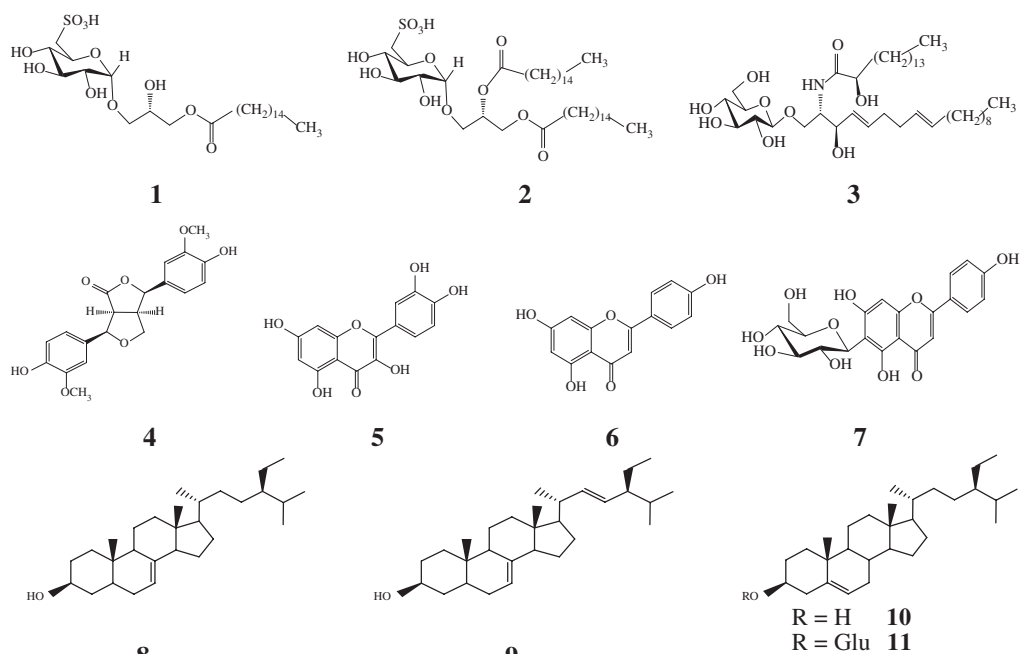


Figure 1. Structures of the isolated compounds **1–11** of *P. dichotomus*.



6–7 were reported from the genus *Pteranthus* for the first time and the compounds 1–4 were obtained for the first time from Caryophyllaceae family.

## 2.2. Total phenol content of *P. dichotomus*

The total phenolic contents of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *P. dichotomus* were calculated as  $\mu\text{g}$  gallic acid equivalent (GAE) (Folin-Ciocalteu method). The total phenolic content of PDAC extract ( $27.140 \pm 1.836 \mu\text{g}$  GAE/mg extract) was higher than that of PDBU ( $7.007 \pm 0.155 \mu\text{g}$  GAE/mg extract). This difference is mainly due to the presence of lignan 4 and flavonoids 5 and 6 in PDAC extract.

## 2.3. Antioxidant activity

### 2.3.1. Free radical scavenging ability by the use of a stable DPPH radical (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl)

Antiradical activity was evaluated by measuring the scavenging activity of *P. dichotomus* samples against DPPH free radical. Quercetin, used as reference, showed an antiradical activity value with IC<sub>50</sub> of 1.149  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The four *P. dichotomus* samples showed a significant ( $p < 0.05$ ) scavenging effect on the DPPH radical in a dose-dependent manner based on the calculated IC<sub>50</sub> values presented in Table S1, the samples are ordered for their scavenging activity as follows: compound (7) (358.888  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) > PDBU (375.514  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) > PDAC (691.333  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) > Fr<sub>(4+5),5</sub> (912.667  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The subfraction Fr<sub>(4+5),5</sub> of PDBU containing glycolipids as major compounds displayed a weak activity in comparison with the other extracts. However, the antioxidant capacities of glycolipids may be due to the composition and proportion of mono- and polyunsaturated fatty acids (Kitamoto et al. 2002; Alejandro et al. 2011).

### 2.3.2. $\beta$ -Carotene bleaching assay

Antioxidant activity of *P. dichotomus* samples was also estimated by bleaching of  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion system. Antioxidant activity of samples (PDBU, PDAC, 7 and Fr<sub>(4+5),5</sub>) is increased in the course of time. All samples have lower antioxidant activity than BHT used as standard. The highest antioxidant activity among the samples was observed for PDBU (71.48%) where Fr<sub>(4+5),5</sub> has the lowest antioxidant activity (47.99%) (Figures S1 and S2). This difference could be explained by the richness of PDBU with polyphenol compounds. The  $\beta$ -carotene–linoleate model is similar to an oil-in-water emulsion system, and variations in activities could be attributed to differences in the proportion of hydrophobic and hydrophilic compounds present in each extract (Wijeratne et al. 2006).

## 2.4. Antibacterial activity assay

Extracts of *P. dichotomus* were tested against five bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* BLSE and *Enterobacter* sp. BLSE). The results given in Table S2 showed that, in general, PDBU and PDAC extracts possessed a moderate antibacterial activity. *S. aureus* and *Enterobacter* sp. were the most sensitive microorganisms to the PDAC extract but it did not exhibit any antibacterial activity against *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The PDBU extract inhibited only the growth of Gram-negative bacteria strains *E. coli* and *K. pneumoniae* indicating zone of inhibition values of 10 and 13.5 mm at 0.5 g/mL and 8 mm at 0.25 g/mL, respectively.

### 3. Conclusion

According to literature data, all the isolated compounds **1–4** and **6–7** are found for the first time in the genus *Pteranthus*. To the best of our knowledge, compounds **1–4** were obtained from the family Caryophyllaceae for the first time. Further phytochemical studies should be carried out to investigate the fractions of *n*-butanol extract containing particularly flavonoids and lignans. From this study we can conclude that *P. dichotomus* showed moderate antibacterial and antioxidant activities.

### Supplementary material

General experimental methods, spectra and NMR data relating to this paper are available online, alongside Tables S1–S2 and Figures S1–S2.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

The authors wish to express thanks to the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant and USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, Toulouse, France for providing research facilities and technical support.

### References

- Akindele A, Ibe I, Adeyemi O. 2012. Analgesic and antipyretic activities of *Drymaria cordata* (Linn.) Willd (Caryophyllaceae) extract. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 9:25–35.
- Alejandro CS, Humberto HS, María JF. 2011. Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *Afr J Microbiol Res*. 5:2512–2523.
- Atta EM, Adel AN, Nawal MH, Ahmad RH. 2013. New flavonoid glycoside and pharmacological activities of *Pteranthus dichotomus* Forssk. *Rec Nat Prod*. 7:69–79.
- Balamurugan K, Sakthidevi G, Mohan VR. 2012. Anti-inflammatory activity of whole plant of *Polycarpha corymbosa* (L.) Lam (Caryophyllaceae). *Pharma Sci Monit*. 3:3336–3341.
- Benabdelaziz I, Haba H, Lavaud C, Benkhaled M. 2014. Triterpenoids and flavonoid from *Scorzonera undulata* ssp *alexandrina*. *IJCS*. 5:1–5.
- Böttger S, Melzig MF. 2011. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochem Lett*. 4:59–68.
- Burdi DK, Hasan M, Uddin V. 1991. Sterols and a glycoside from the flowers of *Inula grantioides*. *Pak J Pharm Sci*. 4:131–136.
- Choi YH, Kim HK, Linthorst HJ, Hollander JG, Lefeber AWM, Erkelens C, Nuzillard JM, Verpoorte R. 2006. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J Nat Prod*. 69:742–748.
- Curini M, Epifano F, Menghini L, Pagiotti R. 2004. Flavonoids and tocopherols from *Paronychia kapela*. *Chem Nat Compd*. 40:190–191.
- Diop MS, Samb A. 2004. Identification de glycolipides isolés d'algues et de cnidaire de la côte Sénégalaise [Identification of glycolipids isolated from red algae and cnidaria of the Senegalese coast]. *C R Chimie*. 7:965–971.
- El-Seedi HR, Burman R, Mansour A, Turki Z, Boulos L, Gullbo J, Goransson U. 2013. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. *J Ethnopharmacol*. 145:746–757.
- Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*. 68:1255–1260.
- Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid Biosurfactants-from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng*. 94:187–201.
- Kui-Wu W, Jun-Ru Z, Lian-Qing S. 2013. A new lignan with anti-tumour activity from *Polygonum perfoliatum* L. *Nat Prod Res*. 27:568–573.

- Obmann A, Werner I, Presser A, Zehl M, Swoboda Z, Purevsuren S, Narantuya S, Kletter C, Glasl S. 2011. Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch. Carbohydr Res. 346:1868–1875.
- Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3ème éd. Paris: CNRS.
- Peng J, Fan G, Hong Z, Chai Y, Wu Y. 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A. 1074:111–115.
- Plouguerné E, De Souza LM, Sasaki GL, Cavalcanti JF, Villela Romanos MT, Da Gama BAP, Pereira RC, Barreto-Bergter E. 2013. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. Mar Drugs. 11:4628–4640.
- Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales [New flora of Algeria and the southern desert regions]. Vol. 1–2. Paris: CNRS.
- Ragasa CY, Lim K. 2005. Sterols from *Cucurbita maxima*. Philipp J Sci. 134:83–87.
- Sathiyamoorthy P, Lugasi-Evgi H, Schlesinger P, Kedar I, Gopas J, Pollack Y, Golan-Goldhirsh A. 1999. Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products. Pharma Biol. 37:188–195.
- Simões CMO, Amoros M, Girre L. 1999. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. Phytother Res. 13:323–328.
- Smith AG, Goad LJ. 1975. The conversion of cholest-5-en-3 $\beta$ -ol into cholest-7-en-3 $\beta$ -ol by the echinoderms *Asterias rubens* and *Solaster papposus*. Biochem J. 146:35–40.
- Sowemimo A, Van de Venter M, Baatjies L, Koekemoer T. 2009. Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. Afr J Tradit Complement Altern Med. 6:526–528.
- Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Sevenet T, Hadi HA. 1999. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. Phytochemistry. 50:63–69.
- Wijeratne SSK, Amarowicz R, Shahidi F. 2006. Antioxidant activity of almonds and their by-products in food model systems. JAOCS. 83:223–230.

*Résumé*



*Abstract*



*Résumé*

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique des parties aériennes de deux plantes appartenant à la famille Caryophyllaceae: *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lamk.

L'étude phytochimique a permis l'isolement 16 métabolites secondaires connus par les méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE, CCM) et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse). Une teneur en polyphénols totaux des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de deux plantes a été effectuée.

Deux métabolites secondaires (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) ont été isolés des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk. Ils se répartissent en trois glycolipides, un lignane, trois flavonoïdes, quatre phytostérols et un triterpène. Selon les données de la littérature, tous ces composés isolés sont trouvés pour le premier temps dans le genre *Pteranthus* et les composés (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>4</sub>**) ont été obtenus pour la première fois dans la famille Caryophyllaceae.

Quatre autres composés (**Pc<sub>1</sub>-Pc<sub>4</sub>**) ont été isolés de l'extrait *n*-butanolique de la seconde plante : *Paronychia capitata* (L.) Lamk. dont un glycolipide, deux phytostérols et un disaccharide. D'après la littérature, le composé **Pc<sub>1</sub>** a été identifié pour la première fois dans le genre *Paronychia* et la famille Caryophyllaceae.

L'identification des métabolites secondaires isolés est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-MS), par la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'étude biologique présente l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydant par le biais de deux méthodes : la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de DPPH et de tester l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats de deux activités ont montré l'efficacité de certains échantillons.

**Mots clés :** Caryophyllaceae, *Pteranthus dichotomus*, *Paronychia Capitata*, glycolipides, Activité antibactérienne, Activité antioxydant, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse.

## *Abstract*

This work is concerning the phytochemical study of the aerial parts of two plants belonging to the family Caryophyllaceae: *Pteranthus dichotomus* Forssk. and *Paronychia capitata* (L.) Lamk. .

The phytochemical study led to the isolation of 16 secondary metabolites known by chromatographic methods (VLC, CC, CCE and CCM) and characterization by spectroscopic methods (NMR, Mass). A total polyphenol content of the extracts ethyl acetate and *n*-butanol of two plants was performed.

Twelve secondary metabolites (***Pd*<sub>1</sub>-*Pd*<sub>12</sub>**) were isolated from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of species *Pteranthus dichotomus* Forssk. . They are divided into three glycolipids, a lignan, three flavonoids, four phytosterols and a triterpene. According to data from the literature, all these isolated compounds are found for the first time in the genre *Pteranthus* and compounds (***Pd*<sub>1</sub>-*Pd*<sub>4</sub>**) were obtained for the first time in Cayophyllaceae family.

Four other compounds (***Pc*<sub>1</sub>-*Pc*<sub>4</sub>**) were isolated from the *n*-butanol extract of the aerial parts of the second plant *Paronychia capitata* (L.) Lamk. which glycolipid, two phytosterols and a disaccharide. According to the literature, the compounds ***Pc*<sub>1</sub>** was identified for the first time in the genus *Paronychia* and Cayophyllaceae family.

The identification of the isolated secondary metabolites is made possible through the combined of different spectroscopic methods especially 1D and 2D technics (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC and HMBC), mass spectrometry (ESI-MS, HR-MS), measurement of the optical rotations and by comparison with literature data.

The biological studies present evaluation *in vitro* of the antioxidant activity through two methods: the bleaching of  $\beta$ -carotene method and DPPH method and test the antibacterial activity by the agar diffusion method. The results of two activities have shown the effectiveness of some samples.

**Keywords:** Caryophyllaceae, *Pteranthus dichotomus*, *Paronychia capitata*, glycolipids, Antibacterial activity, antioxidant activity, 1D and 2D NMR, mass spectrometry.

هذا العمل قائم على الدراسة الفيتوكيميائية و البيولوجية و هوائي للنبتين من عائلة القرنفليات: *Paronychia capitata* (L.) Lamk. *Pteranthus dichotomus* Forssk.

الفيتوكيميائي 16 طبيعي  
الكروماتوغرافية (CCM, CCE, VLC, CC) تشخيها بواسطة التحليل الطيفي (RMN, مطيافية  
(. محتوي مركبات متعدد الفينول لمستخلصات AcOEt n-BuOH للنبتين قد تم

مركب طبيعي ( $Pd_1-Pd_{12}$ ) تم عزله من مستخلصات AcOEt n-BuOH  
*Pteranthus dichotomus* Forssk. 3 غليكوليبيدات, لينيان, 3 , 4 فيتوسرول  
تريتربان. انطلاقا من الدراسات الفيتوكيميائية السابقة فان كل هذه المركبات عزلت للمرة  
*Pteranthus* ( $Pd_1-Pd_4$ ) عائلة القرنفليات .

اخرى تم عزلها من مستخلص n-BuOH الثانية  
*Paronychia capitata* (L.) Lamk : غليكوليبيد , 2 فيتوستيرول وثنائي سكر.  
*Paronychia*  $Pc_1$  الدراسات الفيتوكيميائية القرنفليات.

تم تشخيص هذه باستعمال مختلف طرق التحليل الميطيافي مطيافية  
الرنين النووي المغناطيسي 1D 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY H-H, HSQC, HMBC) مطيافية  
(ESI-MS, HR-MS) قياس زاوية التدوير النوعي مقارنة مع الدراسات الفيتوكي يائية

الدراسة البيولوجية ت تقييم خارج العضوية ل بطريقتين : طريقة  
اختبار ابيضاض -carotene وطريقة DPPH وأيضا  
للبيكتيريا بواسطة طريقة الانتشار في الوسط الجيلوزي. النتائج المحصل عليها للنشطين بيد  
بعض العينات .

المفتاحية: قرنفل *Paronychia capitata* *Pteranthus dichotomus* غليكوليبيدات،  
للجراثيم، 1D 2D NMR مطياف .



## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique des parties aériennes de deux plantes appartenant à la famille Caryophyllaceae: *Pteranthus dichotomus* Forssk. et *Paronychia capitata* (L.) Lam.

L'étude phytochimique a permis l'isolement 16 métabolites secondaires connus par les méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE, CCM) et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse). Une teneur en polyphénols totaux des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de deux plantes a été effectuée.

Deuze métabolites secondaires (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) ont été isolés des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Pteranthus dichotomus* Forssk. Ils se répartissent en trois glycolipides, un lignane, trois flavonoïdes, quater phytostérols et un triterpène. Selon les données de la littérature, tous ces composés isolés sont trouvés pour le premier temps dans le genre *Pteranthus* et les composés (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>4</sub>**) ont été obtenus pour la première fois dans la famille Cayophyllaceae.

Quatre autres composés (**Pc<sub>1</sub>-Pc<sub>4</sub>**) ont été isolés de l'extrait butanolique de la seconde plante : *Paronychia capitata* (L.) Lam. dont un glycolipide, deux phytostérols et un disaccharide. D'après la littérature, le composé **Pc<sub>1</sub>** a été identifié pour la première fois dans le genre *Paronychia* et la famille Cayophyllaceae.

L'identification des métabolites secondaires isolés est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-MS), par la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'étude biologique présente l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydant par le biais de deux méthodes : la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de DPPH et de tester l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats de deux activités ont montré l'efficacité de certains échantillons.

**Mots clés :** Caryophyllaceae, *Pteranthus dichotomus*, *Paronychia Capitata*, glycolipides, Activité antibactérienne, Activité antioxydant, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse.

## Abstract

This work is concerning the phytochemical study of the aerial parts of two plants belonging to the family Caryophyllaceae: *Pteranthus dichotomus* Forssk. and *Paronychia capitata* (L.) Lam.

The phytochemical study led to the isolation of 16 secondary metabolites known by chromatographic methods (VLC, CC, CCE and CCM) and characterization by spectroscopic methods (NMR, Mass). A total polyphenol content of the extracts ethyl acetate and *n*-butanol of two plants was performed.

Twelve secondary metabolites (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) were isolated from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of species *Pteranthus dichotomus* Forssk. . They are divided into three glycolipids, a lignan, three flavonoids, four phytosterols and a triterpene. According to data from the literature, all these isolated compounds are found for the first time in the genus *Pteranthus* and compounds (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>4</sub>**) were obtained for the first time in Cayophyllaceae family.

Four other compounds (**Pc<sub>1</sub>-Pc<sub>4</sub>**) were isolated from the *n*-butanol extract of the aerial parts of the second plant *Paronychia capitata* (L.) Lamk. which glycolipid, two phytosterols and a disaccharide. According to the literature, the compound **Pc<sub>1</sub>** was identified for the first time in the genus *Paronychia* and Cayophyllaceae family.

The identification of the isolated secondary metabolites is made possible through the combined of different spectroscopic methods especially 1D and 2D technics (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC and HMBC), mass spectrometry (ESI-MS, HR-MS), measurement of the optical rotations and by comparison with literature data.

The biological studies present evaluation *in vitro* of the antioxidant activity through two methods: the bleaching of  $\beta$ -carotene method and DPPH method and test the antibacterial activity by the agar diffusion method. The results of two activities have shown the effectiveness of some samples.

**Keywords:** Caryophyllaceae, *Pteranthus dichotomus*, *Paronychia capitata*, glycolipids, Antibacterial activity, antioxidant activity, 1D and 2D NMR, mass spectrometry.

هذا العمل قائم على الدراسة الفيتوكيميائية و البيولوجية للقسم الهوائي للنبتين من عائلة القرنفليات: *Paronychia capitata* (L.) *Pteranthus dichotomus* Forssk. Lam.

الدراسة الفيتوكيميائية 16 مركب طبيعي معروف وذلك باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (VLC, CCE, CCM) وتشخيصها بواسطة التحليل الطيفي (RMN مطيافية الكتلة). إجمالي محتوى مركبات متعدد الفينول n-BuOH AcOEt للنبتين قد تم إجراءه.

اثنا عشر مركب طبيعي (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>12</sub>**) تم عزله من مستخلصات n-BuOH AcOEt *Pteranthus dichotomus* Forssk. 3 غليكوليبيدات، لينيان، 3 ، 4 فيتوسرول و تريترين. انطلاقا من الدراسات الفيتوكيميائية السابقة فان كل هذه المركبات عزلت للمرة الأولى في النوع *Pteranthus* (**Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>4</sub>**) للمرة الأولى في عائلة القرنفليات .

أخرى تم عزلها من مستخلص n-BuOH لنبته الثانية *Paronychia capitata* (L.) Lamk و *Paronychia* عائلة القرنفليات. **Pc<sub>1</sub>** وفقا للدراسات الفيتوكيميائية السابقة فان المركب *Paronychia* و عائلة القرنفليات.

تم تشخيص هذه المركبات باستعمال مختلف طرق التحليل الميطيافي و بالأخص مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (1D, 2D, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY H-H, HSQC, HMBC) مطيافية الكتلة (ESI-MS, HR-MS) قياس زاوية التدوير النوعي و المقارنة مع الدراسات الفيتوكيميائية سابقة.

الدراسة البيولوجية تتمثل في التقييم خارج العضوية للنشاط المضاد للأكسدة بطريقتين : طريقة اختبار ابيضاض  $\beta$ -carotene و طريقة إرجاع الجذر الحر DPPH وأيضا اختبارنا النشاط مضاد للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار في الوسط الجيلوزي. النتائج المحصل عليها للنشاطين بينت نجاعة بعض العينات .

المفتاحية: مطياف *Paronychia capitata* *Pteranthus dichotomus*. قرنفلي غليكوليبيدات