



Etude de la composition chimique d'extraits d'*Ilex aquifolium* Linné et de *Calicotome villosa* (Poiret) Link de Corse par RMN du carbone-13

Doreen Palu

► To cite this version:

Doreen Palu. Etude de la composition chimique d'extraits d'*Ilex aquifolium* Linné et de *Calicotome villosa* (Poiret) Link de Corse par RMN du carbone-13. Autre. Université Pascal Paoli, 2022. Français. NNT : 2022CORT0018 . tel-04048666

HAL Id: tel-04048666

<https://theses.hal.science/tel-04048666>

Submitted on 28 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE
Mention : CHIMIE ANALYTIQUE

Soutenue publiquement par
Doreen Stacy PALU

le 02 décembre 2022

**Etude de la composition chimique d'extraits d'*Ilex aquifolium* Linné et de
Calicotome villosa (Poiret) Link de Corse par RMN du carbone-13**

Directeurs :

M. Ange BIGHELLI, Professeur, Université de Corse
M. Mathieu PAOLI, Docteur, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Nicolas BALDOVINI, Docteur-HDR, Université de Côte d'Azur
M. Jean-Brice BOTI, Professeur, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, Côte d'Ivoire

Jury

M. Jean-Brice BOTI, Professeur, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, Côte d'Ivoire
M. Nicolas BALDOVINI, Docteur-HDR, Université de Côte d'Azur
M. Toussaint BARBONI, Docteur-HDR, Université de Corse
M. Félix TOMI, Professeur, Université de Corse

DÉDICACES

À ma mère, Miguèle Catherine PALU,

Tchimbé rèd pa moli, ou sé poto mitan fanmi nou ! Mèsi anchay sé ou ki fè si mwen rivé jis-la.

À ma sœur, Cynthia Olivia PALU,

Délè sé an lanmen douvan an lanmen dèyè mè fok pa fè bagay a la séré sewvyèt !

À mon père, Pierre Roland PALU,

Pa kité lanmen bondié !

À toute la famille DUPUY,

Plis fô, ki bondié béni gran é bèl fanmi nou !

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, (UMR-CNRS 6134 « Sciences pour l'Environnement »), sous la direction de Messieurs Ange BIGHELLI (Professeur à l'Université de Corse) et Mathieu PAOLI (Ingénieur de Recherche à l'Université de Corse). Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance pour leurs conseils avisés, leur disponibilité et leur expérience.

J'adresse mes remerciements au Pr. Félix TOMI (Directeur adjoint de l'UMR-CNRS 6134 et Professeur à l'Université de Corse) pour son accueil au sein du laboratoire, son professionnalisme et pour avoir accepté de juger ce travail en tant que Président du jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Jean-Brice BOTI (Professeur à l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY) et Monsieur Nicolas BALDOVINI (Docteur-HDR à l'Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Université Côte d'Azur) en acceptant de juger ce travail et de me faire bénéficier de leurs recommandations. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance. Je remercie également Monsieur Toussaint BARBONI (Docteur-HDR) d'avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.

Je tiens également à remercier Monsieur Joseph CASANOVA (Professeur Émérite à l'Université de Corse) pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail mais également pour sa disponibilité, son expérience et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement Madame Vannina LORENZI (Maître de Conférences à l'Université de Corse), Madame Elodie GUINOISEAU (Maître de Conférences à l'Université de Corse), Madame Élisabeth HARDY (Doctorante en biochimie), Madame Sonia AGHZAF (Doctorante en biochimie), Monsieur Jean-Pierre POLI (Doctorant en biochimie à l'Université de Corse, 2018) et Madame Camille DE SOUSA (étudiante stagiaire en Génie biologique à l'IUT de l'Université de Corse, 2018), membres de l'équipe « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal ». Je leur suis extrêmement reconnaissante pour leur collaboration sans laquelle l'étude microbiologique de mes échantillons n'aurait pas eu lieu.

Mes sincères remerciements à Monsieur Pierre TOMI (MCF) pour son aide lors de la préparation et de l'encadrement des TDs et TP, pour la traduction du résumé en langue Corse sans oublier la lecture de l'actualité.

Un grand merci aux membres des équipes « Chimie et Biomasse », « Energies renouvelables » : Marc GIBERNAU (CR-HDR à l'Université de Corse), Monsieur Gilles NOTTON (MCF-HDR à l'Université de Corse), David OUVRARD (ASI CNRS), Guillaume PIGELET (IGE), Ghjuvan-Antone FAGGIANELLI (MCF), Jean-Laurent DUCHAUD (MCF), Fabien BOUISSET (doctorant en physique) pour leur bonne humeur et leurs encouragements au quotidien.

Je tiens à remercier Monsieur Alain LOUCHE (Professeur Émérite à l'Université de Corse), pour sa précieuse aide à la relecture et à la correction de ce manuscrit de thèse.

Merci également aux membres du personnel du laboratoire Jennifer GALTIE et Jean André Albertini qui s'assure que tout se déroule dans les meilleures conditions. Je n'oublie pas Yves THIBAUDAT pour les moments de partage et les mâchons, merci à toi !

Je remercie mes camarades des équipes « Chimie et Biomasse » et « Energies renouvelables » : Thomas MAROSELLI, Albert KAMBIRÉ, Vincent FERRER, Oksana SIMEONI, Clémentine BACCATI, Tchougoune Mamadou MOUSTAPHA MAI TANIMOUNE, Sarah OUEDRAOGO, Maude CHIN CHOI et Laurent PLUME pour leur sympathie et mon intégration au laboratoire.

J'adresse également mes remerciements aux membres de Stepsol : Didier PIERRAT-AGOSTINI, Tina LE MAO, Nathan GUIGNARD et Damien CASANOVA pour les moments conviviaux et leur grande sympathie.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée quand j'ai rencontré des soucis de transport.

Mes remerciements vont également à ma famille et en particulier à ma mère, Miguèle PALU, à ma sœur, Cynthia PALU, et à mon père Pierre PALU pour leur soutien moral et pour avoir supporté mes périodes de stress. Je remercie également ma mère pour son aide à la relecture et à la correction du manuscrit de thèse. Mèsi anchay pas' zot ka soutienn' mwen dépi nanni nannan.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	23
CHAPITRE I. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN EXTRAIT	27
I.1. VOIE A : ANALYSE PAR COUPLAGE « EN LIGNE »	29
I.1.1. LES COUPLAGES CLHP-SM ET CLHP-SM/SM.....	30
I.1.2. LE COUPLAGE CLHP-RMN ¹ H.....	30
I.1.3. LE COUPLAGE CLHP-RMN ¹ H-SM	31
I.2. VOIE B : IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES SEPARATION.....	32
I.3. VOIE C : IDENTIFICATION PAR RMN ¹³C SANS SEPARATION PREALABLE	33
I.3.1. INTERET DE LA RMN ¹³ C	34
I.3.2. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS EN MELANGE	35
<i>I.3.2.1. Observation et individualisation des signaux</i>	<i>35</i>
<i>I.3.2.2. Attribution des signaux</i>	<i>35</i>
<i>I.3.2.3. Exemples d'analyse en mélange par RMN ¹³C</i>	<i>36</i>
I.3.3. LA METHODE D'ANALYSE DEVELOPPEE AU LABORATOIRE	36
CHAPITRE II. ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FEUILLES ET DE BAIES D'<i>ILEX AQUIFOLIUM</i> PAR RMN ¹³C	40
II.1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : <i>ILEX AQUIFOLIUM</i>	41

II.1.1. LE GENRE <i>Ilex</i>	41
II.1.2. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES D' <i>Ilex aquifolium</i>	41
II.1.3. USAGES THERAPEUTIQUES TRADITIONNELS ET TOXICITE.....	43
II.1.4. COMPOSITION CHIMIQUE.....	43
II.2. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FEUILLES D'<i>Ilex aquifolium</i> DE CORSE.....	47
II.2.1. EXTRAIT A L'HEXANE DE FEUILLES DE HOUX.....	48
<i>II.2.1.1. Chromatographie sur colonne de silice de type « flash » de l'extrait à l'hexane.....</i>	49
<i>II.2.1.2. Chromatographie sur colonne de silice de type « fine » de la fraction H₆</i>	54
II.2.2. EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FEUILLES DE HOUX.....	57
<i>II.2.2.1. Analyse qualitative de l'extrait</i>	58
<i>II.2.2.2. Analyse quantitative de l'extrait</i>	62
II.2.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES.....	69
II.3. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE BAIES D'<i>Ilex aquifolium</i> DE CORSE.....	74
II.3.1. EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE BAIES DE HOUX.....	74
<i>II.3.1.1. Chromatographie sur colonne de silice de type « flash » de l'extrait de baies au dichlorométhane.....</i>	75
<i>II.3.1.2. Chromatographie sur colonne de type « fine » de la fraction à l'oxyde de diéthyle.....</i>	82
II.3.2. EXTRAIT DE BAIES DE HOUX AVEC UN MELANGE DICHLOROMETHANE/ACETATE D'ETHYLE (50/50).....	87
CHAPITRE III. ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FLEURS ET DE RACINES DE <i>Calicotome villosa</i> PAR RMN ¹³C.....	95
III.1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : <i>Calicotome villosa</i>	96
III.1.1. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES DE <i>Calicotome villosa</i>	96
III.1.2. COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES THERAPEUTIQUES DES EXTRAITS.....	98

III.2. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FLEURS DE <i>CALICOTOME VILLOSA</i> DE CORSE	103
III.2.1. COMPOSITION DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FLEURS DE <i>C. VILLOSA</i>	103
III.2.2. COMPOSITION DE L'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE DE FLEURS DE <i>C. VILLOSA</i>	109
III.3. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'UN EXTRAIT DE RACINES DE <i>CALICOTOME VILLOSA</i> DE CORSE	122
III.3.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION AU DICHLOROMETHANE	123
III.3.2. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION A L'ACETATE D'ETHYLE	130
III.3.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES	158
CONCLUSION	162
PARTIE EXPERIMENTALE	167
I. MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTIONS SUCCESSIVES AUX SOLVANTS	168
I.1. <i>ILEX AQUIFOLIUM</i> LINNE	168
I.2. <i>CALICOTOME VILLOSA</i> (POIRET) LINK.	168
II. CHROMATOGRAPHIES SUR COLONNE OUVERTE DE SILICE (CC)	169
II.1. CC DE L'EXTRAIT A L'HEXANE DE FEUILLES D' <i>I. AQUIFOLIUM</i>	169
II.2. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FEUILLES D' <i>I. AQUIFOLIUM</i>	170
II.3. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE BAIES D' <i>I. AQUIFOLIUM</i>	172
II.4. CC DE L'EXTRAIT AU MELANGE DICHLOROMETHANE/ACETATE D'ETHYLE (50/50, v/v) DE BAIES D' <i>I. AQUIFOLIUM</i>	172
II.5. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FLEURS DE <i>C. VILLOSA</i>	174
II.6. CC DE L'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE DE FLEURS DE <i>C. VILLOSA</i>	174
II.7. CC DE L'EXTRAIT AU METHANOL DE RACINES DE <i>C. VILLOSA</i>	177
III. HYDROLYSE DES ESTERS D'AMYRINES ET DES TRIGLYCERIDES PREPARATION DES ESTERS METHYLIQUES	180
IV. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)	181
V. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG-SM)	181

VI. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (CLHP-SM/SM)	182
VII. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	183
VIII. IDENTIFICATION DES COMPOSES	185
IX. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES.....	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187
ANNEXES	209
RESUMES	268
RESUME VULGARISE.....	269
RIASSUNTU.....	270
ABSTRACT	271
RESUME.....	272

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Méthodes d'analyse d'un extrait au solvant.....	29
Figure 2. Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN ¹³ C	37
Figure 3. Feuilles et baies d' <i>Ilex aquifolium</i>	42
Figure 4. Fleurs d' <i>Ilex aquifolium</i>	42
Figure 5. Exemples de molécules identifiées dans des extraits d' <i>Ilex aquifolium</i>	46
Figure 6. Molécules identifiées par RMN dans l'extrait brut à l'hexane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	49
Figure 7. Schéma de l'extraction et du fractionnement de l'extrait à l'hexane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	50
Figure 8. Esters d'amyrones identifiés dans l'extrait à l'hexane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	52
Figure 9. Exemples de molécules identifiées après fractionnement de l'extrait à l'hexane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	53
Figure 10. Schéma de la chromatographie de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	57
Figure 11. Structure de l'acide oléanolique	58
Figure 12. Linéarité de la méthode de quantification de l'acide ursolique par RMN ¹ H. 65	
Figure 13. Spectre RMN ¹ H de l'extrait de feuilles d' <i>Ilex aquifolium</i> au dichlorométhane	68
Figure 14. Squelettes de triterpènes : relation structure-activité.....	73
Figure 15. Schéma de l'extraction et du fractionnement de l'extrait de baies d' <i>Ilex aquifolium</i>	76
Figure 16. Spectre RMN ¹³ C de la fraction obtenue au dichlorométhane	81
Figure 17. Schéma du fractionnement de l'extrait de baies d' <i>Ilex aquifolium</i> obtenu au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle	88
Figure 18. Exemples de dérivés phénoliques et de monosaccharides identifiés dans l'extrait brut dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50)	90
Figure 19. Spectre de la fraction DE ₆	93
Figure 20. Fleurs, feuilles et épines de <i>Calicotome villosa</i>	97

Figure 21. Gousses et feuilles de <i>Calicotome villosa</i>	97
Figure 22. Fleurs, feuilles, épines et gousses de <i>Calicotome villosa</i> ssp. <i>intermedia</i>	97
Figure 23. Exemples de molécules identifiées dans les extraits de <i>Calicotome villosa</i>	100
Figure 24. Schéma de l'extraction des fleurs de <i>C. villosa</i>	104
Figure 25. Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane de fleurs de <i>C. villosa</i>	106
Figure 26. Schéma de la chromatographie de la fraction D' ₄	107
Figure 27. Schéma de l'extraction des fleurs de <i>C. villosa</i>	109
Figure 28. Schéma du fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle de fleurs de <i>C. villosa</i>	111
Figure 29. Schéma de la chromatographie des fractions E' ₇ et E' ₈	112
Figure 30. Schéma de la chromatographie de la fraction E' ₁₀	114
Figure 31. Schéma de la chromatographie de la fraction E' ₁₃	118
Figure 32. Schéma de la chromatographie de la fraction F ₂	124
Figure 33. Spectre RMN ¹ H de la sous-fraction F _{2.5}	127
Figure 34. Spectre RMN ¹³ C de la sous-fraction F _{2.5}	128
Figure 35. Spectre RMN 2D INADEQUATE et structure du 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane avec les principales corrélations.	129
Figure 36. Schéma de l'extraction et du fractionnement des racines de <i>Calicotome villosa</i>	130
Figure 37. Structure du squelette ptérocarpane	132
Figure 38. Schéma de la chromatographie des sous-fractions F _{3.5} à F _{3.7}	134
Figure 39. Schéma de la chromatographie des sous-fractions F _{3.A.8} à F _{3.A.11}	139
Figure 40. Schéma de la chromatographie de la sous-fraction F _{3.9}	146
Figure 41. Schéma de la chromatographie de la sous-fraction F _{3.11}	151
Figure 42. Workflow de l'extraction et du fractionnement des extraits de feuilles d' <i>I. aquifolium</i>	171
Figure 43. Workflow de l'extraction et du fractionnement des extraits de baies d' <i>I. aquifolium</i>	173
Figure 44. Workflow de l'extraction et du fractionnement des fleurs de <i>C. villosa</i>	176
Figure 45. Workflow de l'extraction et du fractionnement des racines de <i>C. villosa</i>	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Structure et déplacements chimiques de l'ursolaldéhyde (UAL) et de l'oléanaldéhyde (OAL)	56
Tableau 2. Structure et déplacements chimiques de l'acide ursolique (UA).....	61
Tableau 3. Justesse des mesures d'acide ursolique (UA) par RMN	65
Tableau 4. Précision des mesures d'acide ursolique (UA) par RMN.....	66
Tableau 5. Quantification de l'acide ursolique et de l'acide oléanolique dans l'extrait de feuilles au dichlorométhane	67
Tableau 6. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en mg.L ⁻¹ des douze échantillons sélectionnés sur des bactéries à Gram+ et à Gram-	71
Tableau 7. Structure et déplacements chimiques de la ménisdaurilide.....	78
Tableau 8. Structure et déplacements chimiques de l'aquilégiolide	80
Tableau 9. Structure et déplacements chimiques du p-hydroxybenzaldéhyde et du (p-hydroxyphényl)acétonitrile	86
Tableau 10. Structure et déplacements chimiques de la 7-épi-griffonilide	91
Tableau 11. Structure et déplacements chimiques de la dasycarponilide	92
Tableau 12. Structure et données RMN ¹³ C de la 4''-O-acétyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine.....	105
Tableau 13. Structure et données RMN ¹³ C de la 6''-O-acétyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine (Fraction D'4.1).....	108
Tableau 14. Structure et données RMN ¹³ C de la 7-O-β-D-glucopyranosylchrysine.....	110
Tableau 15. Structure et données RMN ¹³ C de l'acide cis-p-coumarique et de l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique	113
Tableau 16. Structure et données RMN ¹³ C de l'acide caféique.....	115
Tableau 17. Structure et données RMN ¹³ C de la 4''-O-acétyl-6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine	117
Tableau 18. Structure et données RMN ¹³ C du D-pinnitol.....	119
Tableau 19. Structure et données RMN ¹³ C de la 6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine.....	120

Tableau 20. Structure et données RMN du 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane avec les principales corrélations HMBC et COSY	126
Tableau 21. Structure et données RMN de la maackiaine	133
Tableau 22. Structure et données RMN ¹³ C de l'isonéorauténol.....	136
Tableau 23. Structure et données RMN ¹³ C du 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane	137
Tableau 24. Structure et données RMN ¹³ C de l'homoédudiol.....	138
Tableau 25. Structure (stéréochimie relative) et données RMN du 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane avec les principales corrélations HMBC et COSY	142
Tableau 26. Structure (stéréochimie relative) et données RMN du 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane avec les principales corrélations HMBC et COSY	145
Tableau 27. Structure et données RMN ¹³ C de la formononétine.....	147
Tableau 28. Structure et données RMN du bidwillon B.....	150
Tableau 29. Structure et données RMN ¹³ C de la génistéine, de la calycosine de la daidzéine et de l'isoprunétine	153
Tableau 30. Structure et données RMN ¹³ C de la liquiritigénine	154
Tableau 31. Structure et données RMN ¹³ C du trans-resvératrol (F _{3.11.6})	155
Tableau 32. Structure et données RMN ¹³ C de la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine (F _{3.11.12})	156
Tableau 33. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en mg.L ⁻¹ des vingt-et-un échantillons sélectionnés sur des bactéries à Gram+ et à Gram-.....	159
Tableau 34. Solvants utilisés pour l'enregistrement des spectres de RMN (extraits et fractions de chromatographie)	184

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait à l'hexane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i> dans le CDCl_3	210
Annexe 2. Spectre RMN ^{13}C de la fraction H_2	211
Annexe 3. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i> dans le CDCl_3	212
Annexe 4. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d' <i>I. aquifolium</i> dans le $\text{DMSO}-d_6$	213
Annexe 5. Spectre RMN ^1H de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)	214
Annexe 6. Spectre DEPT 135 de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)	215
Annexe 7. Spectre HSQC de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)	216
Annexe 8. Spectre HMBC de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)	217
Annexe 9. Spectre COSY de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx).	218
Annexe 10. Spectre NOESY de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)	219
Annexe 11. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction E_6	220
Annexe 12. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction E_6	221
Annexe 13. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction E_6	222
Annexe 14. Spectre HSQC de la sous-fraction E_6	223
Annexe 15. Spectre HMBC de la sous-fraction E_6	224
Annexe 16. Spectre COSY de la sous-fraction E_6	225
Annexe 17. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	226
Annexe 18. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	227
Annexe 19. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	228
Annexe 20. Spectre HSQC de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	229
Annexe 21. Spectre HMBC de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	230
Annexe 22. Spectre COSY de la sous-fraction $\text{E}'_{10,9}$	231

Annexe 23. Spectre NOESY de la sous-fraction E'10.9	232
Annexe 24. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F2.5	233
Annexe 25. Spectre HSQC de la sous-fraction F2.5	234
Annexe 26. Spectre HMBC de la sous-fraction F2.5.....	235
Annexe 27. Spectre COSY de la sous-fraction F2.5.....	236
Annexe 28. Spectre NOESY de la sous-fraction F2.5	237
Annexe 29. Spectre SM/SM de la sous-fraction F2.5.....	238
Annexe 30. Spectre RMN ¹ H de la sous-fraction F3.4	239
Annexe 31. Spectre RMN ¹³ C de la sous-fraction F3.4.....	240
Annexe 32. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F3.4.....	241
Annexe 33. Spectre HSQC de la sous-fraction F3.4.....	242
Annexe 34. Spectre HMBC de la sous-fraction F3.4.....	243
Annexe 35. Spectre COSY de la sous-fraction F3.4.....	244
Annexe 36. Spectre NOESY de la sous-fraction F3.4	245
Annexe 37. Spectre RMN ¹ H de la sous-fraction F3.B.3.....	246
Annexe 38. Spectre RMN ¹³ C de la sous-fraction F3.B.3.....	247
Annexe 39. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F3.B.3	248
Annexe 40. Spectre HSQC de la sous-fraction F3.B.3	249
Annexe 41. Spectre HMBC de la sous-fraction F3.B.3	250
Annexe 42. Spectre COSY de la sous-fraction F3.B.3.....	251
Annexe 43. Spectre NOESY de la sous-fraction F3.B.3.....	252
Annexe 44. Spectre SM/SM de la sous-fraction F3.B.3 et voies de clivages possible du 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane	253
Annexe 45. Spectre RMN ¹ H de la sous-fraction F3.B.7.....	254
Annexe 46. Spectre RMN ¹³ C de la sous-fraction F3.B.7.....	255
Annexe 47. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F3.B.7.....	256
Annexe 48. Spectre HSQC de la sous-fraction F3.B.7	257
Annexe 49. Spectre HMBC de la sous-fraction F3.B.7	258
Annexe 50. Spectre COSY de la sous-fraction F3.B.7	259

Annexe 51. Spectre NOESY de la sous-fraction F _{3.B.7}	260
Annexe 52. Spectre SM/SM de la sous-fraction F _{3.B.7} et voies de clivages possible du du 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane.....	261
Annexe 53. Spectre RMN ¹ H de la sous-fraction F _{3.9.6}	262
Annexe 54. Spectre RMN ¹³ C de la sous-fraction F _{3.9.6}	263
Annexe 55. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F _{3.9.6}	264
Annexe 56. Spectre HSQC de la sous-fraction F _{3.9.6}	265
Annexe 57. Spectre HMBC de la sous-fraction F _{3.9.6}	266
Annexe 58. Spectre COSY de la sous-fraction F _{3.9.6}	267

LISTE DES ABREVIATIONS

Å : angström

δ : déplacement chimique

Δδ : variation de déplacement chimique

δ_{c^{litt}} : déplacement chimique du spectre RMN ¹³C issu de la littérature

μm : micromètre

BHA : hydroxyanisol butylé

BHT : butylhydroxytoluène

C : carbone quaternaire

CC : Chromatographie sur Colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CCMHP : Chromatographie sur Couche Mince de Haute Performance

CH : méthine

CH₂ : méthylène

CH₃ : méthyle

CLHP : Chromatographie Liquide de Haute Performance

CLHP-RMN ¹H : Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée à la Résonance Magnétique Nucléaire du proton

CLHP-RMN ¹H-SM : Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée respectivement à la Résonance Magnétique Nucléaire du proton et à la Spectrométrie de Masse

CLHP-SM : Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse

CLHP-SM/SM : Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COSY : COrrélation SpectroscopY (Spectroscopie de corrélation)

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG(Ir) : Chromatographie en Phase Gazeuse associée aux Indices de rétention

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de Masse

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Amélioration sans distorsion par transfert de polarisation)

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EPS : Extraction en Phase Solide

ER : Erreur Relative

ESI-MS : ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse avec Ionisation par ElectroSpray)

HMBC : Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (Corrélation Hétéronucléaire à Multiple Liaisons)

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation (Corrélation Hétéronucléaire à Une Liaison)

i.e. : *id est* (c'est-à-dire)

Hz : Hertz

IC₅₀ : 50 % inhibitory concentration (Concentration Inhibitrice médiane)

INADEQUATE : Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment (Incroyable Expérience de Transfert Double QUAntum en Abondance Naturelle)

IR : Infra-Rouge

IRTF : spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

³J : couplage vicinal

⁴J : le couplage longue distance

J : constante de couplage

K : Kelvin

LMH : largeur à mi-hauteur

LOD : Limit Of Detection (limite de détection)

LOQ : Limit Of Quantification (limite de quantification)

m/m : pourcentage masse par masse

m/z : rapport masse/charge

MHz : Mégahertz

nd : non déterminé

NIST : National Institute of Standards and Technology (Intitut National des Normes et de Technologie)

NOE : Nuclear Overhauser Effect (effet Overhauser nucléaire)

NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (Spectroscopie Nucléaire à Effet Overhauser)

OA : Acide Oléanolique

OH : fonction hydroxyle

pH : Potentiel Hydrogène

ppm : Partie Par Million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13

RMN 1D : Résonance Magnétique Nucléaire monodimensionnelle

RMN 2D : Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

S/B : rapport Signal sur Bruit

SM : Spectrométrie de Masse

ssp. : subspecie (sous-espèce)

T : Tesla

T₁ : temps de relaxation longitudinale

T₂ : temps de relaxation transversale

UA : Acide Ursolique

UV : Ultraviolet

v/v : pourcentage volume par volume

vs. : versus

INTRODUCTION

Cette thèse est adossée au projet « Ressources Naturelles » de l'UMR 6134 « Sciences Pour l'Environnement » dont l'un des axes concerne la caractérisation et la valorisation des ressources naturelles issues de la biomasse végétale. Elle s'inscrit dans une démarche globale de valorisation du patrimoine naturel de la Corse. En effet, depuis de nombreuses années, la biomasse suscite un grand intérêt, aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, du fait de son utilisation : elle peut être utilisée comme vecteur énergétique (biocombustibles et biocarburants) ou encore comme source de produits industriels à forte valeur ajoutée (extraits de végétaux, résines et huiles essentielles). De plus, les produits naturels issus de la biomasse connaissent aujourd'hui un réel succès dans des secteurs tels que la parfumerie, la cosmétique, la pharmacie, l'aromathérapie ou bien encore l'agro-alimentaire.

Un produit naturel est en général un mélange complexe parfois constitué de plusieurs centaines de molécules dans des proportions variables appartenant ou non à une même famille chimique. La valorisation de ces produits naturels nécessite généralement une connaissance précise de leur composition chimique dans le but de les caractériser, d'en contrôler la qualité ou bien encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Dans le cas de produits naturels originaires d'une région insulaire comme la Corse, l'accent doit être mis beaucoup plus sur la qualité du produit et/ou sur l'existence d'un particularisme, ce qui peut constituer un atout en vue d'une éventuelle commercialisation, que sur la production en grande quantité. La caractérisation de ces mélanges complexes nécessite donc une étape préalable d'analyse pour identifier et quantifier leurs différents constituants.

Dans ce cadre, de nombreuses techniques analytiques sont aujourd'hui utilisées, chacune d'elles devant être fiable et adaptée aux produits considérés tout en répondant au mieux aux objectifs de l'analyste. Schématiquement, l'identification des constituants d'un mélange naturel peut s'effectuer selon deux voies en fonction de l'objectif fixé (analyse de routine ou étude approfondie), de la complexité du mélange et de la nature des constituants :

- la première consiste à utiliser un couplage « en ligne » qui associe une ou plusieurs techniques chromatographiques, permettant d'individualiser les constituants, avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques, dans le but

d'identifier ces constituants par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans des bibliothèques de spectres. Le couplage de la chromatographie en phase liquide à haute performance avec la spectrométrie de masse (CLHP-SM) est le plus utilisé pour l'analyse des extraits constitués principalement de molécules non volatiles. Cependant, afin d'obtenir d'avantage d'informations sur les structures des composés et garantir leur identification, il est souvent nécessaire de combiner les techniques d'analyse ;

- la seconde voie, privilégiée dans le cas de mélanges beaucoup plus complexes ou pour décrire des molécules nouvelles, consiste à purifier les constituants par différentes techniques chromatographiques en vue de les identifier avec des méthodes spectroscopiques. Cette méthode, plus longue, présente l'avantage d'être plus fiable grâce à l'utilisation de la RMN (^1H et ^{13}C) qui apporte notamment des informations extrêmement précieuses sur les structures des molécules.

Dans ce contexte, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point et développé depuis une trentaine d'années une méthode d'identification originale des constituants des mélanges complexes naturels par RMN ^{13}C sans séparation préalable. Elle a pour principe de comparer, grâce à un logiciel d'aide à l'identification, les raies de résonance du spectre d'un mélange avec celles de composés identifiés au laboratoire ou commerciaux contenus dans des bibliothèques de spectres de référence. Bien que moins sensible que d'autres techniques spectroscopiques, la RMN permet de prendre en compte des informations intrinsèques du squelette carboné des molécules (déplacement chimique des carbones). Cette technique est donc complémentaire des méthodes conventionnelles et permet l'identification sans ambiguïté des molécules, incluant les composés thermosensibles et les stéréoisomères difficilement différenciables par les techniques usuelles. La méthode d'analyse développée au laboratoire a été appliquée avec succès à divers produits naturels comme les huiles essentielles, les extraits de végétaux, les liquides de pyrolyse de la biomasse ou bien encore les huiles végétales.

A cet égard, l'objectif de cette thèse de doctorat était double : d'un point de vue académique, il s'agissait de contribuer au développement des méthodes d'analyse qualitative et quantitative par RMN ^1H et ^{13}C des constituants d'extraits de végétaux. D'un

point de vue appliqué, nous nous sommes attachés à déterminer la composition chimique d'extraits de plantes médicinales ou toxiques de Corse encore peu ou pas étudiées et susceptibles d'avoir des activités thérapeutiques valorisables. Ainsi, nous avons choisi d'étudier la composition chimique d'extraits de feuilles et de baies d'*Ilex aquifolium* Linné (houx commun) ainsi que de fleurs et de racines de *Calicotome villosa* (Poir.) Link, en mettant en œuvre la méthodologie d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire. Ce travail visait à identifier les constituants majoritaires contenus dans ces extraits, en les isolant pour les soumettre à des analyses structurales approfondies si nécessaire, et à contribuer à l'enrichissement des bibliothèques de spectres du laboratoire.

Ainsi, dans un premier chapitre, nous présenterons les principales techniques conventionnelles utilisées pour l'analyse des extraits. Nous présenterons également la méthode d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire, en soulignant son rôle pour l'identification de composés contenus dans les mélanges naturels.

Dans le deuxième chapitre, nous nous consacrerons à l'étude de la composition chimique d'extraits de feuilles et de baies d'*I. aquifolium* L., certains de ces produits pouvant avoir des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes. Nous décrirons ainsi les fractionnements et l'analyse détaillée par RMN ^{13}C des extraits bruts et des fractions de chromatographie qui en sont issues. Nous présenterons également la mise au point et la validation d'une méthode de quantification de deux triterpènes acides d'intérêt, l'acide ursolique et l'acide oléanolique. Nous évaluerons aussi les activités antibactériennes des extraits et des fractions de chromatographie obtenus.

Enfin, le troisième et dernier chapitre concernera l'étude de la composition chimique d'extraits de fleurs et de racines de *C. villosa* (Poir.) Link. Les propriétés diurétiques, cytotoxiques et antioxydantes d'extraits des parties aériennes de cette plante ont été reportées. Comme précédemment, dans ce chapitre nous étudierons la composition chimique des extraits bruts ainsi que des fractions de chromatographie puis, nous mettrons en évidence leurs activités antibactériennes.

CHAPITRE I

IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN EXTRAIT

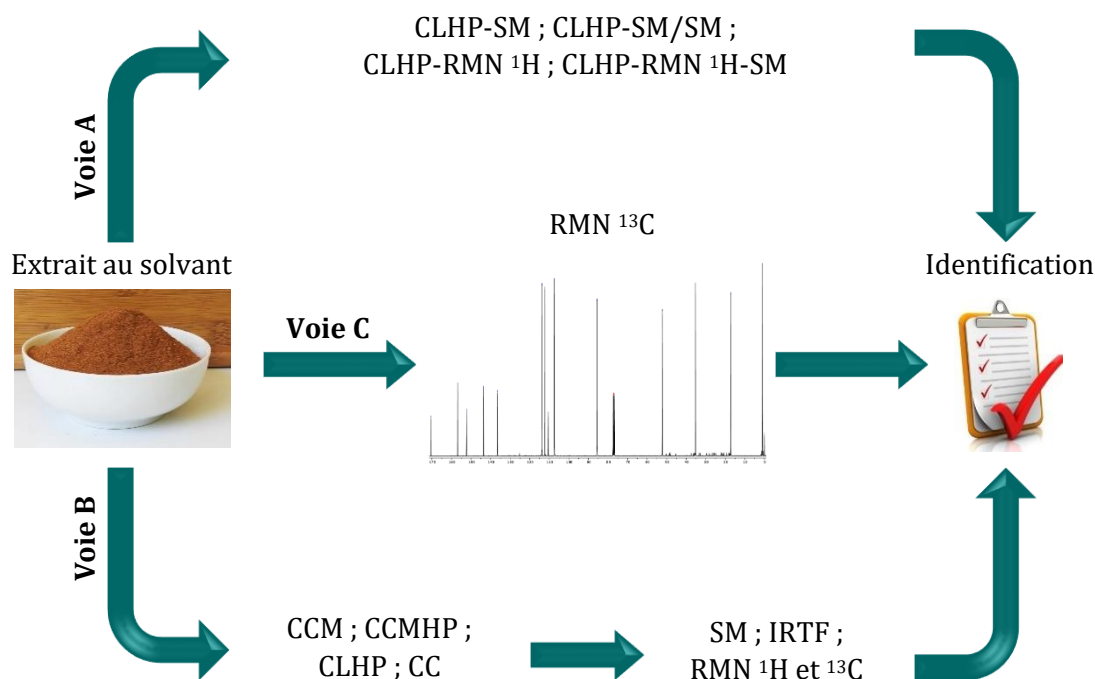


Les produits naturels d'origine végétale (huiles essentielles, extraits aux solvants, résines, etc.) sont généralement des mélanges complexes (volatils ou non volatils) parfois constitués de plusieurs centaines de molécules dans des proportions différentes. Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation et les essences obtenues par expression à froid sont principalement composées de monoterpènes, de sesquiterpènes, parfois de diterpènes et de phénylpropanoïdes. Les extraits aux solvants peuvent être constitués, quant à eux, en plus des familles chimiques précédemment citées, de triterpènes, de flavonoïdes, de glycérides, de phytostérols, d'alcaloïdes ainsi que de molécules appartenant à d'autres familles chimiques moins courantes. Selon leur composition chimique, certains produits naturels trouveront un intérêt dans les domaines de la cosmétique, de la parfumerie, de la pharmacutique ou encore de l'agro-alimentaire.

La valorisation des mélanges naturels nécessite qu'ils soient caractérisés chimiquement par le biais d'une évaluation qualitative (identification des constituants) et quantitative (proportion des divers constituants). Les techniques et méthodes analytiques utilisées afin de déterminer la composition chimique d'un extrait et quantifier ses constituants diffèrent en fonction de sa complexité (nature et nombre des constituants) et doivent avant tout être fiables et rapides. Classiquement, l'identification des constituants d'un extrait peut s'effectuer selon deux voies :

- l'analyse par couplages « en ligne » dont les principales techniques utilisées sont la CLHP-SM et la CLHP-RMN ^1H (voie A);
- l'analyse après purification des constituants qui comprend des techniques chromatographiques (CC, CCM, CCMHP et CLHP préparative) et des techniques spectroscopiques (SM, IR, UV, RMN 1D et 2D) (voie B).

Toutefois, l'analyse d'un mélange naturel peut également être menée selon une troisième voie plus originale, qui met en œuvre la RMN ^{13}C en mélange sans séparation préalable des constituants ou avec un nombre réduit d'étapes de fractionnement (voie C) (**Figure 1**).

Figure 1. Méthodes d'analyse d'un extrait au solvant

Notes: CLHP, Chromatographie Liquide à Haute Performance ; RMN, Résonance Magnétique Nucléaire ; SM, Spectrométrie de Masse ; IRTF, Infra-Rouge à Transformée de Fourier ; CCM, Chromatographie sur Couche Mince ; CCMHP, Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance ; CC, Chromatographie sur Colonne.

I.1. VOIE A : ANALYSE PAR COUPLAGE « EN LIGNE »

L'analyse des constituants par couplage « en ligne » consiste à associer une ou plusieurs techniques chromatographiques (individualisation et quantification des constituants) avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques (identification des constituants par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence). Cette méthode convient à l'analyse des extraits aux solvants dont les constituants ne présentent pas de difficulté d'identification ou de séparation.

I.1.1. LES COUPLAGES CLHP-SM ET CLHP-SM/SM

La CLHP permet de séparer les composés d'un mélange complexe en fonction de leurs diverses propriétés physico-chimiques (la taille, la charge électrique, le degré d'hydrophobicité, etc.). Un détecteur (UV, fluorescence, etc.) couplé à un enregistreur (permettant d'obtenir le chromatogramme, où le signal est fonction de la concentration de l'analyte) est placé à la sortie de la colonne. Ainsi, le temps de rétention, correspondant au temps d'élution et de détection d'un composé, permet la caractérisation qualitative d'une molécule. Cependant, l'identification des composés contenus dans un extrait sur la seule base de leur séparation chromatographique, n'est pas suffisante car la présence d'autres molécules possédant des propriétés physico-chimiques proches peuvent induire des erreurs. Le couplage CLHP-SM permet d'obtenir la masse de chaque composé ainsi séparé et fournit une information supplémentaire conduisant à une identification plus fiable. Le couplage CLHP-SM/SM quant à lui, a pour principe de fragmenter les ions parents et de séparer les ions fils pour leur identification. Les fragments caractéristiques de chaque ion parent sont identifiés par comparaison avec ceux de composés de référence contenus dans des bases de données.

A titre d'exemple, l'application du couplage CLHP-SM a permis d'identifier des alcaloïdes tels que la lycopsamine, la symviridine, l'échimidine et la lasiocarpine, dans des extraits de *Symphytum officinale* (Liu et al., 2009). Concernant le couplage CLHP-SM/SM, son utilisation a permis d'identifier des flavonoïdes et des polyphénols contenus dans trois types de thés différents : la gallocatéchine, la catéchine et la théaflavine, notamment (Tao et al., 2016). L'emploi de ce couplage a également permis l'identification de composés phénoliques comme le pyrogallol, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide férulique contenus dans des extraits à l'eau et à l'éthanol de *Zingiber officinale* (Tohma et al., 2017).

I.1.2. LE COUPLAGE CLHP-RMN ^1H

Bien que la RMN soit une technique spectroscopique moins sensible que l'IR ou encore que la SM, elle présente l'avantage de donner des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules. Cette technique nécessite toutefois que l'extrait

analysé soit relativement peu complexe. Le couplage CLHP-RMN ^1H apparaît vers la fin des années 70 et permet d'effectuer les analyses selon deux modes différents (Marston et Hostettmann, 2009) :

- le « flux continu » (continuous-flow) selon lequel l'acquisition des données est effectuée simultanément au passage du flux chromatographique. Toutefois, le temps de séjour limité de l'analyte dans la sonde RMN ^1H , conduit à une quantité de composé détectable faible ;
- le « flux stoppé » (stopped-flow) selon lequel l'élution est arrêtée lorsqu'un constituant est présent dans la sonde du spectromètre. Ce mode présente l'avantage de réaliser des spectres RMN 2D (^1H - ^1H) car le temps de séjour de l'analyte est prolongé dans la sonde (Schefer et al., 2006).

A titre d'exemple, l'utilisation du couplage CLHP-RMN ^1H s'est révélée efficace pour l'identification des stéréoisomères Z et E de la lutéine et du β -carotène (caroténoïdes) dans les épinards (Glaser et al., 2003). Ce couplage a également permis d'identifier les produits de dégradation du PRASUGREL, un antiplaquettaire (Singh et al., 2015) ainsi que 9 dérivés glucosylés de la delphinidine et de la cyanidine (anthocyanes) issus d'extraits de fruits de *Pistacia lentiscus* (Aissat et al., 2022).

I.1.3. LE COUPLAGE CLHP-RMN ^1H -SM

Le couplage CLHP-RMN ^1H -SM a été utilisé pour la détection et l'identification de composés présents dans des échantillons biologiques complexes ou encore dans des extraits de plantes (Corcoran et Spraul, 2003 ; Yang, 2006). Même si le couplage présente quelques inconvénients (utilisation de solvants deutérés comme D_2O , CD_3CN , CD_3OD par exemple), l'utilisation conjointe des deux techniques spectroscopiques permet une identification sans ambiguïté des composés. A titre d'exemple, Wilson et al. (1999) ont identifié des phytoecdystéroïdes, qui participent à la défense des plantes contre les insectes, dans un extrait de *Silene otites*. Le couplage CLHP-RMN ^1H -SM a également permis d'identifier deux dérivés de lignanes glucosylés diastéréoisomères, contenus dans un extrait de graines de *Linum usitatissimum* (Fritsche et al., 2002).

L'utilisation des couplages précédemment cités est efficace pour l'identification de composés contenus dans des extraits, aussi bien pour des analyses de routine que pour des analyses fines. Cependant, devant la complexité de certains mélanges, il est nécessaire d'utiliser une méthode d'analyse en deux étapes, basée sur la purification des constituants avant leur identification.

I.2. VOIE B : IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES SEPARATION

La méthode d'analyse selon la voie B s'apparente à celle mise en œuvre lors de l'identification de nouvelles molécules et se décompose en deux étapes. Elle consiste, dans un premier temps, à individualiser les constituants du mélange complexe puis, dans un second temps, à les identifier. L'isolation des composés est effectuée par différentes techniques chromatographiques telles que la CC, la CCM ou la CLHP préparative. Cette étape peut, dans certains cas, être précédée d'une partition acido-basique ou d'une cristallisation. Les différents constituants isolés ou présents dans des fractions enrichies, sont ensuite analysés avec des techniques spectroscopiques (SM, IR, UV, RMN 1D et RMN 2D) puis identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de composés de référence.

Cette méthode est fiable et adaptée à l'étude de la composition chimique des mélanges complexes. Elle a notamment été utilisée pour l'analyse de divers extraits de végétaux. A titre d'exemple, [Barrero et al. \(2004\)](#) ont réalisé une partition acido-basique d'un extrait de feuilles de *Juniperus phoenicea* et de *Juniperus thurifera* var. *africana*, puis des fractionnements successifs et une cristallisation pour identifier trente-huit composés par RMN, dont huit nouveaux.

Après avoir fractionné par CC et CCM un extrait de feuilles de *Desmodium adscendens*, [Muanda et al. \(2011\)](#) ont purifié par CLHP puis identifié par SM et RMN : deux dérivés phénoliques (les acides caféique et p-coumarique), deux flavonoïdes (la quercétine et l'épicatéchine) et un dérivé glucosylé de flavonoïde (la rutine).

Nous pouvons également citer les travaux récents de [Zhou et al. \(2018\)](#) menés sur un extrait à l'éthanol de graines de *Cannabis sativa*. Cet extrait a subi des fractionnements successifs et dix-huit composés ont été isolés et identifiés par SM et RMN, parmi lesquels un nouveau lignanamide et un nouveau dérivé glucosylé de coumaroylamine.

Un extrait au méthanol de feuilles de *Persea americana* a été soumis à des partitions dans trois solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle). Après fractionnements successifs sur colonne de silice et CLHP puis analyse par SM et RMN 1D et 2D, les auteurs ont identifié seize composés connus (dix flavonoïdes, quatre mégastigmanes et deux lignanes) et un nouveau composé, le 3-O- β -D-fucopyranosylkaempférol (flavonol glucosylé) ([Park et al., 2020](#)).

Plusieurs constituants d'un extrait au méthanol de feuilles de *Morus alba* ont été prépurifiés par extraction en phase solide (EPS) puis isolés par CCM préparative avant d'être identifiés par SM et RMN. Il s'agit d'un polyphénol (l'acide ellagique) et de flavonoïdes (la rutine, la lutéoline et ses dérivés glucosylés, la quercétine et le kaempférol) ([Arraki et al., 2020](#)).

I.3. VOIE C : IDENTIFICATION PAR RMN ^{13}C SANS SEPARATION PREALABLE

La méthode d'analyse selon la voie C garantit l'identification et accessoirement la quantification des composés. Cette méthode a été développée avec pour objectif de tirer profit des informations fournies par la RMN ^{13}C en évitant, ou tout du moins en limitant, les fastidieuses étapes de séparation et de purification des constituants, favorisant ainsi un gain de temps considérable.

Ainsi, [Formácek et Kubeczka \(1982, 1984, 1988\)](#) ont réalisé des travaux précurseurs relatifs à l'utilisation de la RMN ^{13}C en tant qu'outil analytique des mélanges naturels. Les auteurs ont utilisé la RMN ^{13}C dans le but de confirmer l'identification de composés suggérés par une autre technique analytique (généralement le couplage CPG-SM). Dès le début des années 90, l'objectif de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse était d'utiliser la RMN ^{13}C comme outil d'analyse des mélanges

naturels et d'en faire une véritable méthode analytique pour identifier (et éventuellement quantifier) directement les constituants et non plus pour confirmer la présence de ces constituants préalablement identifiés par une autre technique (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996 ; Bighelli et Casanova, 2009).

I.3.1. INTERET DE LA RMN ^{13}C

Malgré une abondance isotopique faible (environ 1,1 %) et un moment gyromagnétique environ 5700 fois moins sensible que le noyau ^1H (Günther, 1994), le noyau ^{13}C est souvent privilégié, pour les raisons suivantes :

- le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques. En général, le spectre de RMN ^{13}C présente autant de raies de résonance que de carbones dans la molécule. De plus, les carbones ayant une fréquence de résonance très sensible aux environnements électronique et stérique, la moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes des déplacements chimiques des carbones de la molécule, permettant l'identification de molécules structuralement proches ;
- les spectres de RMN ^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation totale des noyaux d'hydrogène (on observe une seule raie de résonance par carbone) ;
- le temps de relaxation transversal T_2 est plus important pour le carbone que pour le proton. Il en résulte des pics plus fins et mieux résolus (la largeur du signal de résonance à mi-hauteur étant inversement proportionnelle à T_2) ;
- la largeur spectrale du carbone est plus importante que celle du proton (250 ppm vs. 12 ppm), ce qui diminue le nombre de superpositions des signaux ;
- les spectres peuvent être enregistrés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;
- la RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour être éventuellement soumis à d'autres analyses.

I.3.2. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS EN MELANGE

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des carbones relevés sur le spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Pour identifier un composé au sein d'un mélange complexe, il faut que ses signaux soient observables, individualisés et que les déplacements chimiques correspondant soient attribués. Afin de permettre une reproductibilité des résultats obtenus, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées.

I.3.2.1. Observation et individualisation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dépend de la quantité de produit, de sa viscosité, de sa solubilité dans le solvant choisi, de la sensibilité du spectromètre (rapport signal/bruit (S/B)). Le manque de produit ou de sensibilité peut être pallié par :

- l'augmentation du nombre d'acquisitions car le rapport S/B est proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions ;
- l'utilisation d'une cryosonde qui permet de réduire considérablement le temps d'analyse et multiplier par 4 la sensibilité ;
- l'utilisation d'aimants supraconducteurs à haut champ (jusqu'à 28,2 Tesla) ;

Par ailleurs, l'individualisation des signaux dépend du spectromètre lui-même et donc, de la puissance de l'aimant et des caractéristiques du système informatique permettant l'acquisition du signal. La résolution digitale peut aussi être améliorée par l'utilisation de fenêtres spectrales réduites qui permettent d'enregistrer le spectre sur une largeur correspondant uniquement à la zone d'intérêt ou en plusieurs portions.

I.3.2.2. Attribution des signaux

Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structures différentes présentent des spectres de RMN

^{13}C superposables, chaque molécule étant définie par une série de déplacements chimiques qui lui est propre et qui constitue son spectre. Les valeurs des déplacements chimiques étant indépendantes de l'intensité du champ magnétique B_0 du spectromètre utilisé, des séquences impulsionnelles, des paramètres d'acquisition des spectres et de traitement du signal, l'utilisation des spectres issus de la littérature comme données de référence pour l'identification des composés en mélange apparaît donc possible. Néanmoins, afin d'obtenir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, il est primordial que les conditions d'analyse (dilution et nature du solvant, essentiellement) soient rigoureusement identiques.

1.3.2.3. Exemples d'analyse en mélange par RMN ^{13}C

La RMN ^{13}C a été mise en œuvre pour l'identification des constituants de différents mélanges par la reconnaissance de leurs déplacements chimiques. Concernant les extraits de végétaux, nous pouvons mentionner à titre d'exemple l'identification de deux triterpènes (l'acide oléanolique et le β -sitostérol) dans un extrait de feuilles de *Cybistax antisiphilitica* (Ramos et al., 2005). Lors d'une étude menée sur un extrait aqueux de café Wei et al. (2010) ont identifié différents composés en mélange, notamment la caféine, la trigonelline (alcaloïdes), l'acide quinique, des isomères de l'acide chlorogénique (dérivés phénoliques) et le saccharose (disaccharide).

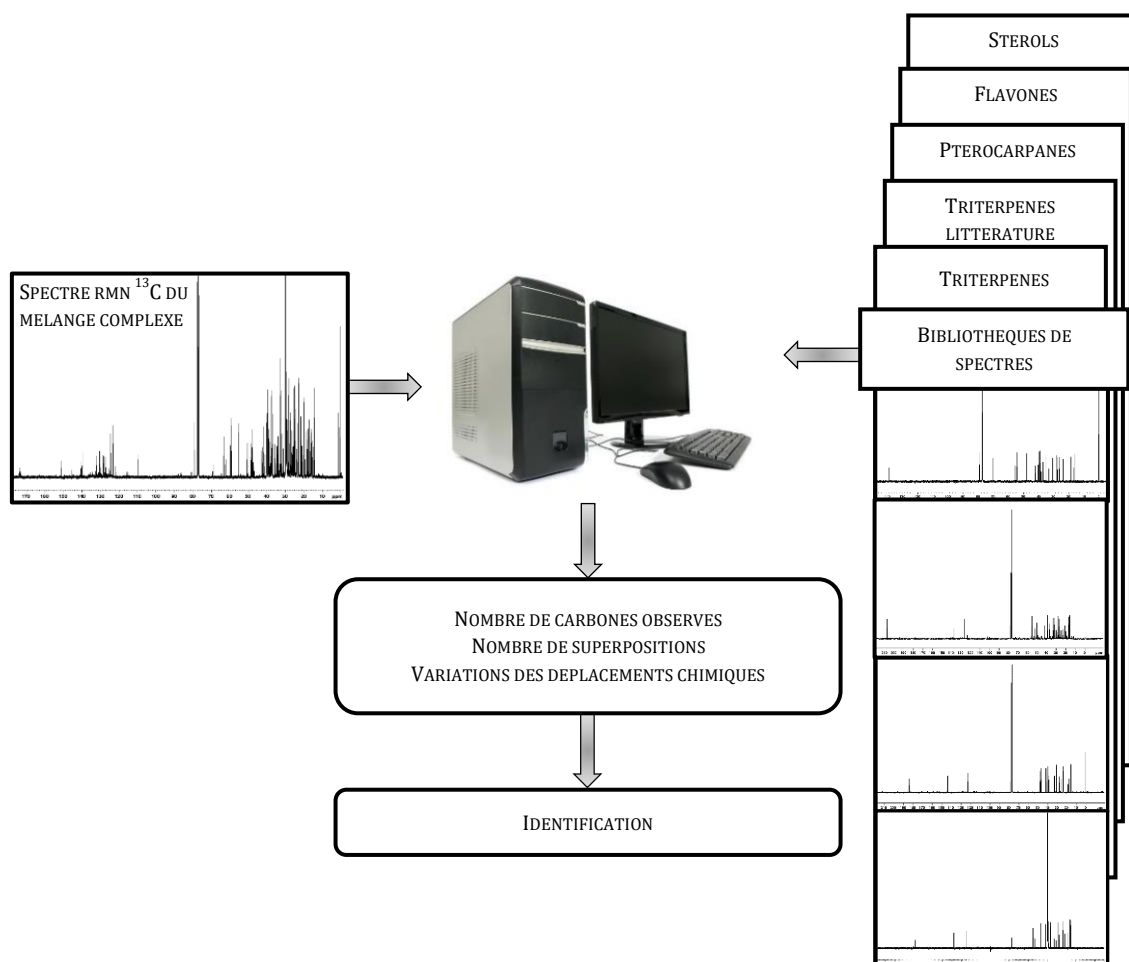
I.3.3. LA METHODE D'ANALYSE DEVELOPPEE AU LABORATOIRE

Au début des années 90, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point puis développé une méthode d'analyse des mélanges complexes naturels par RMN ^{13}C sans séparation préalable des constituants. La particularité de cette méthode réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Ce logiciel compare les déplacements chimiques de chacun des carbones du spectre du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans les bibliothèques de spectres (Figure 2).

L'identification des composés présents dans le mélange est rendue possible par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux qui peuvent se produire quand les différents effets stériques et/ou électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique ou quand les composés présents ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;
- les variations des déplacements chimiques des carbones du spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$).

Figure 2. Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN ^{13}C



Parallèlement, différentes bibliothèques de spectres de composés de référence ont été élaborées et sont constamment enrichies avec des données RMN ^{13}C de composés isolés au laboratoire à partir de mélanges naturels ou encore de composés commerciaux. De plus, pour chaque famille de composés, une deuxième bibliothèque contenant les données spectrales publiées dans la littérature récente est disponible. Par ailleurs, le protocole expérimental (choix du solvant, dilution) est adapté et optimisé en fonction de la famille chimique analysée. Quand il s'agit de composés volatils, cette méthode est associée à une analyse par CPG-SM et CPG(Ir) permettant de confirmer leur identification et de les quantifier.

Après une trentaine d'années d'utilisation de cette méthode pour l'analyse de différents mélanges naturels (huiles essentielles, extraits de végétaux, résines), le bilan suivant peut être établi :

- la teneur minimale des composés identifiables avec le spectromètre disponible au laboratoire (9,4 T) est de l'ordre de 0,3 % - 0,4 % ;
- en général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires appartenant aux composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions est généralement limité et n'empêche pas l'identification d'un composé ;
- les variations des déplacements chimiques entre les signaux des carbones des composés du mélange et ceux des composés de référence ($\Delta\delta$) sont inférieures à 0,05 ppm dans la très grande majorité des cas. Toutefois, il demeure quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques ou les composés carbonylés α,β -insaturés dont certains carbones sp^2 présentent des variations de déplacements chimiques plus importantes selon la polarité, la dilution, la présence d'autres constituants dans le mélange ou d'éventuelles liaisons hydrogènes.

La méthode d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire a été appliquée avec succès pour déterminer la composition chimique de nombreuses huiles essentielles. A titre d'exemple, nous pouvons citer parmi les travaux récents, l'étude sur les huiles essentielles de *Citrus paradisi* (Paoli et al., 2016), de *Pinus halepensis* (Nam et al., 2016), d'*Origanum elongatum* (Bakha et al., 2019), d'*Elionurus tristis* (Garcia et al., 2019),

d'*Isolona dewevrei* (Kambiré et al., 2020), de différentes espèces d'*Helichrysum* (Rabehaja et al., 2020), de *Cladanthus eriolepis* (El Hafidi et al., 2021), de *Neuropeltis acuminata* (Kambiré et al., 2022), de *Keteleeria evelyniana* (Thai et al., 2022a) et d'*Illigera trifoliata* ssp. *cucullata* (Thai et al., 2022b).

Cette méthode a également été appliquée à l'identification des composés peu volatils présents dans différents mélanges naturels, comme :

- les triterpènes contenus dans des extraits de liège (Castola et al., 1999, 2002, 2005), un extrait de *Santolina corsica* (Ferrari et al., 2005a) ou encore un extrait industriel de feuilles d'olivier (Duquesnoy et al., 2007) ;
- les diterpènes acides et neutres présents dans les résines de pin laricio (Rezzi et al., 2002, 2005 ; Cannac et al., 2009 ; et de pin maritime (Ottavioli et al., 2019) ;
- les sucres dans des miels de Corse (Mazzoni et al., 1997) et des extraits de pin laricio et de sapin (Duquesnoy et al., 2008) ;
- les lactones sesquiterpéniques présentes dans l'huile végétale de *Laurus novacanariensis* de Madère (Ferrari et al., 2005b) ;
- les taxanes dans des extraits de feuilles de *Taxus baccata* (Duquesnoy et al., 2009) ;
- les stérols et les diterpènes dans un extrait d'algue verte *Chaetomorpha linum* (Sutour et al., 2015)
- les sesquiterpènes halogénés dans un extrait à l'acétate d'éthyle de l'algue rouge *Laurencia obtusa* (Esselin et al., 2017).

CHAPITRE II

ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FEUILLES ET DE BAIES D'*ILEX AQUIFOLIUM* PAR RMN ^{13}C



II.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : *ILEX AQUIFOLIUM*

II.1.1. LE GENRE *ILEX*

Le genre *Ilex* (Aquifoliaceae) comprend plus de 500 espèces d'arbres et arbustes dioïques distribuées à travers le monde dans les régions tropicales et tempérées. Les principales zones de répartition et de diversification sont les régions d'Asie de l'Est, d'Afrique, méditerranéennes, ainsi que l'Amérique, l'Allemagne, le Royaume-Uni et l'Autriche (Choi et al., 2005 ; Nahar et al., 2005). Les espèces les plus connues du genre *Ilex* sont : *I. cornuta* (houx Chinois, provenant de Corée du Sud et de Chine), *I. pubescens* (présent également en Chine), *I. crenata* (houx Japonais, originaire d'Extrême Orient), *I. paraguariensis* (Maté ou thé des Jésuites, cultivé au Paraguay et au Brésil notamment), *I. opaca* (houx Américain, natif du centre et de l'Est des Etats-Unis) et *I. aquifolium* (houx commun, houx anglais ou européen très répandu en Europe) (Alikaridis, 1987). Seules quatre espèces persistent en Europe : le houx commun (*I. aquifolium*) répandu à travers tout le continent, le houx de la Mer Noire (*I. colchica*) retrouvé à la frontière entre l'Europe et l'Asie et deux espèces endémiques des îles de Macaronésie (*I. perado* et *I. canariensis*).

II.1.2. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES D'*ILEX AQUIFOLIUM*

Le houx commun (*Ilex aquifolium* appellation signifiant « feuilles épineuses ») sert traditionnellement d'ornement pour les fêtes de Noël. Il s'agit d'un arbre mesurant jusqu'à 20 mètres de haut. Son feuillage est persistant et rigide, à bords piquants et ondulés, d'un magnifique vert foncé et luisant (Figure 3). Les fleurs de cet arbuste sont petites, blanches ou roses, odorantes, situées à la base des feuilles et apparaissent d'Avril à Juillet (Figure 4). Les baies du houx sont rouge vif et sphériques, d'environ 8 mm de diamètre et sont visibles d'Août à Décembre (Jaeger, 2012).



Figure 3. Feuilles et baies d'*Ilex aquifolium*



Figure 4. Fleurs d'*Ilex aquifolium*

II.1.3. USAGES THERAPEUTIQUES TRADITIONNELS ET TOXICITE

Les feuilles d'*I. aquifolium* sont utilisées en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques pour leurs propriétés antipyrétiques, astringentes et diurétiques, pour soigner les fièvres intermittentes et les rhumatismes ou encore comme agents expectorants (Alikaridis, 1987 ; Erdemoglu et al., 2009). Les feuilles et les fruits d'*I. aquifolium* sont employés pour traiter les cancers du foie, de l'estomac et des intestins mais aussi pour soigner l'hydropisie, la jaunisse ou encore le paludisme, la goutte et les œdèmes (Nahar et al., 2005 ; Jalali et al., 2009).

I. aquifolium est également connu pour sa toxicité. A titre d'exemple, beaucoup d'enfants ont été empoisonnés suite à l'ingestion de fruits de houx. Les symptômes associés aux divers empoisonnements sont des désordres gastro-intestinaux, des vomissements et des diarrhées (Habermehl et Fliegner, 1998). Ils sont causés par la présence d'un glucoside cyanogénique (le 2-β-D-glucopyranosyloxy-p-hydroxy-6,7-dihydromandelonitrile) à l'origine du caractère toxique de la plante, ce composé étant présent aussi bien dans les baies que dans les feuilles et les tiges du houx commun (Willems, 1988).

II.1.4. COMPOSITION CHIMIQUE

Du fait de ses propriétés thérapeutiques et toxiques, de nombreuses études ont été menées sur la composition chimique et/ou la détermination des molécules responsables des activités des extraits d'*I. aquifolium*. Ces travaux ont porté sur la détermination de la composition chimique de chaque organe de la plante, sur la variation de la composition chimique en fonction du type du pied (mâle ou femelle), du type de feuillage (albinos ou vert), de l'âge du pied et des saisons (Nichols, 1965 ; Knights et Smith, 1977 ; Catalano et al., 1978 ; Niemann et Baas, 1985a ; Niemann et Baas, 1985b ; Alikaridis, 1987 ; Willems, 1988 ; Van Genderen et Jaarsma, 1990 ; Nahar et al., 2005). D'une manière générale, les principales familles chimiques reportées dans la plante sont :

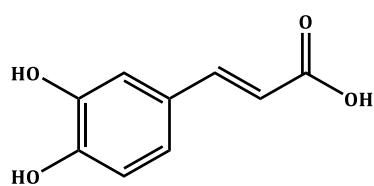
- **Des composés phénoliques** : des acides phénylacétiques (comme l'acide 2,4-dihydroxyphénylacétique et son ester méthylique) peuvent être contenus dans les

graines du houx commun (Nahar et al., 2005 ; Hao et al., 2013). Par ailleurs, l'acide vanillique et l'acide p-hydroxybenzoïque ont été isolés dans les fruits d'*I. aquifolium* alors que l'acide caféique a été identifié dans les feuilles (Alikaridis, 1987). Les composés phénoliques sont reconnus pour diverses propriétés parmi lesquelles leur activité antioxydante. Ainsi, Nahar et al. en 2005, ont montré que l'acide 2,4-dihydroxyphénylacétique et son ester méthylique, isolés dans les graines du houx commun, possèdent une activité antioxydante modérée ($1,50 \times 10^{-3}$ et $2,55 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹, respectivement) par rapport à la quercétine ($2,88 \times 10^{-5}$ mg.mL⁻¹) utilisée comme référence dans l'étude ;

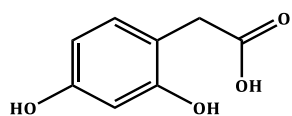
- **Des flavonoïdes** : plusieurs études renseignent sur les caractères antioxydant, anti-tumoral, antidiabétique, antimicrobien, cardio-protecteur et neuro-protecteur des flavonoïdes (Amer 2018). Parmi les plus connus, le kaempférol, la quercétine et la rutine ont été identifiés dans les feuilles d'*I. aquifolium* (Schindler et Herb, 1955 ; Bate-Smith, 1962) ;
- **Des acides aminés** : l'acide aspartique, la cystéine, l'acide glutamique, la sérine, le tryptophane et la valine ont notamment été isolés à partir des feuilles du houx commun (Alikaridis, 1987) ;
- La théobromine (**un alcaloïde**), dont la structure s'apparente à celle de la caféine, a par exemple été identifiée dans *I. aquifolium* (partie du végétal non spécifiée) (Alikaridis, 1987). Cette molécule agit comme un relaxant musculaire, diurétique, hypotenseur, protecteur cardiovasculaire et réducteur de risque de maladie coronarienne (Septianti et al., 2020) ;
- **Des acides gras saturés** (l'acide palmitique [C16:0], l'acide stéarique [C18:0]), et **des acides gras insaturés** (l'acide oléique [C18:1], l'acide linoléique [C18:2] et l'acide linolénique [C18:3]) ont été identifiés dans les feuilles du houx commun et reportés par Catalano et al. (1978) et Alikaridis (1987). Dans d'une étude menée par Zafaryab et al. en 2019, l'acide palmitique (présent à 55,4 % dans les feuilles de houx selon Catalano et al. (1978)) a montré sa capacité à sensibiliser les cellules cancéreuses du sein ;
- **Des sucres** : Les monosaccharides (molécules non précisées) et le sucrose sont prédominants dans les jeunes feuilles d'*I. aquifolium* alors que la teneur en maltose a tendance à diminuer avec l'âge des feuilles (Alikaridis, 1987) ;

- **Des pigments** : des caroténoïdes (40 carbones) comme les isomères α - et β -carotène ont été identifiés dans les fruits d'*I. aquifolium* (Alikaridis, 1987). D'autres travaux ont montré que la couleur rouge des épicarpes des baies d'*I. aquifolium* provenant du Japon était attribuable à la présence d'anthocyanes comme le pélargonidine 3-xylosylglucoside (couleur orange) et le cyanidine 3-xylosylglucoside (couleur rouge violacé) (Ishikura, 1971). Outre le fait de conférer aux baies de houx leur couleur, ces anthocyanes présentent entre autres des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales et vermifuges (Lazalde-Cruz et al., 2021) ;
- **Des stérols** : selon Knights et Smith (1977), le β -sitostérol était contenu dans les fleurs mâles et femelles mais aussi dans les feuilles du houx commun. A ce jour, diverses propriétés ont été mises en évidence pour le β -sitostérol. On peut citer par exemple ses activités antimicrobienne, immunomodulatrice, antidiabétique anti-inflammatoire et anticancéreuse (Rashed, 2020) ;
- **Un nor-monoterpène** : l'ilex lactone, une molécule bicyclique, a été identifiée dans les fruits d'*I. aquifolium* (Alikaridis, 1987).
- **Des triterpènes** : l' α -amyrine est le premier triterpène à avoir été isolé à partir des écorces d'*I. aquifolium* et a été retrouvé par la suite dans les feuilles et les fruits du végétal (Alikaridis, 1987). D'autres triterpènes ont été identifiés dans diverses parties du houx commun comme la β -amyrine (feuilles), l'acide oléanolique (feuilles), le baurénol (feuilles), l'érythrodiol (feuilles), l'acide ursolique (feuilles et fruits) l'uvaol (feuilles et fruits), l'acide 27-p-coumaroxyursolique (fruits) (Fischer et Linser, 1930 ; Schindler et Herb, 1955 ; Alikaridis, 1987). Plusieurs études ont mis en évidence les bienfaits thérapeutiques et les mécanismes d'action des triterpènes. Par exemple, Cháirez-Ramírez et al. (2016) ont démontré les bénéfices des lupanes tels que la bétuline, l'acide bétulinique et le lupéol dans la prévention et le traitement des tumeurs malignes les plus communes à savoir les cancers des poumons, du foie, de l'estomac, colorectal et du sein. Les triterpènes de type oléanane (acide oléanolique et isomères) et ursane (acide ursolique et isomères) possèdent également des propriétés pharmacologiques (Salvador et al., 2012) parmi lesquelles, les activités hépatoprotectrice, anti-inflammatoire et antiulcéreuse.

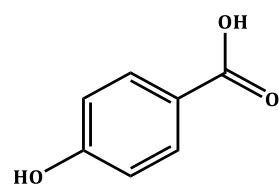
Figure 5. Exemples de molécules identifiées dans des extraits d'*Ilex aquifolium*



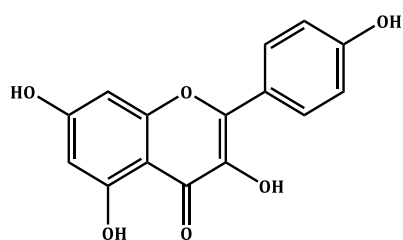
acide caféique



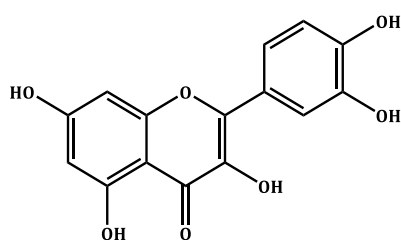
acide
2,4-dihydroxyphénylacétique



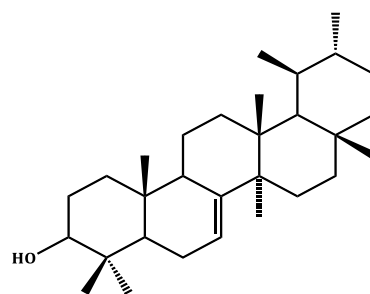
acide
p-hydroxybenzoïque



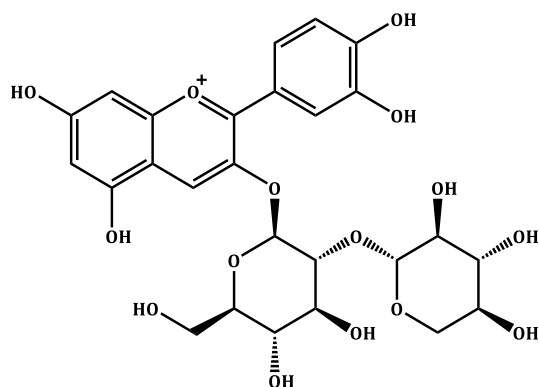
kaempférol



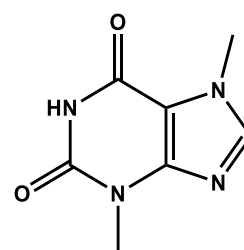
quercétine



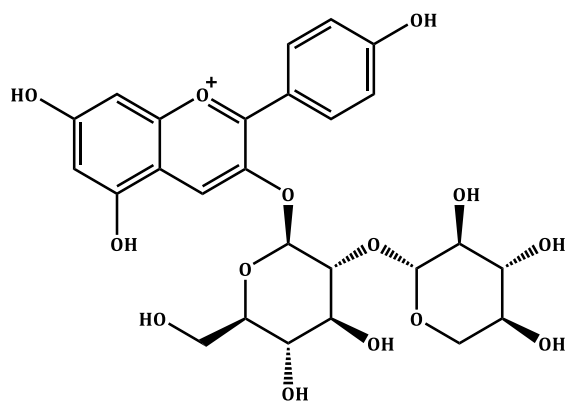
baurénol



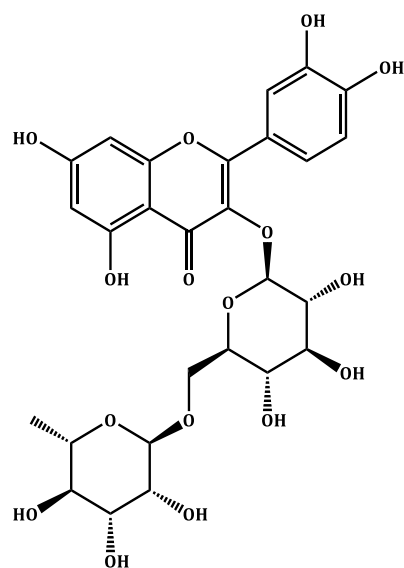
cyanidine 3-xylosylglucoside



théobromine



pélargonidine 3-xylosylglucoside



rutine

En outre, les propriétés antibactériennes et antifongiques des extraits de feuilles de houx ont été décrites dans la littérature. En effet, dans l'étude menée par [Erdemoglu et al. \(2009\)](#), quatre extraits aux solvants (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol) de feuilles d'*I. aquifolium*, ont notamment été testés sur des souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*), à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*) et sur une levure (*Candida albicans*). Tous les extraits sauf celui à l'hexane ont présenté une activité antibactérienne et antifongique modérée (Concentration Minimale Inhibitrice comprise entre 62,5 et 250 µg.mL⁻¹) par rapport aux standards utilisés pour l'étude (Concentration Minimale Inhibitrice comprise entre 3,9 et 62,5 µg.mL⁻¹).

Il ressort de cette étude bibliographique que les extraits de feuilles d'*I. aquifolium* présentent un intérêt thérapeutique valorisable notamment dans les domaines de la microbiologie, de la cosmétique et de l'oncologie. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans notre étude, à la composition chimique d'extraits de feuilles et de baies de houx commun ainsi qu'à l'activité antimicrobienne de certaines molécules.

II.2. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FEUILLES D'*ILEX AQUIFOLIUM* DE CORSE

Les feuilles de houx commun (*Ilex aquifolium* L.) utilisées dans cette étude ont été récoltées en décembre 2017 dans la forêt communale d'Isolacciu di Fium'Orbu puis stockées à -60°C. Dans la suite de notre travail, nous avons choisi d'étudier la composition chimique d'un extrait à l'hexane et d'un extrait au dichlorométhane.

II.2.1. EXTRAIT A L'HEXANE DE FEUILLES DE HOUX

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé une extraction à chaud (Soxhlet) de feuilles d'*I. aquifolium* (98 g) en utilisant l'hexane comme solvant (600 mL, 17 h). Le matériel végétal a préalablement été broyé après refroidissement dans l'azote liquide. Ce cryobroyage permet de diminuer la granulométrie du broyat ainsi que d'augmenter le rendement d'extraction. Après évaporation de la solution hexanique (évaporateur rotatif), 1,836 g d'extract brut a été obtenu, soit un rendement de 1,9 % par rapport à la masse sèche de végétal.

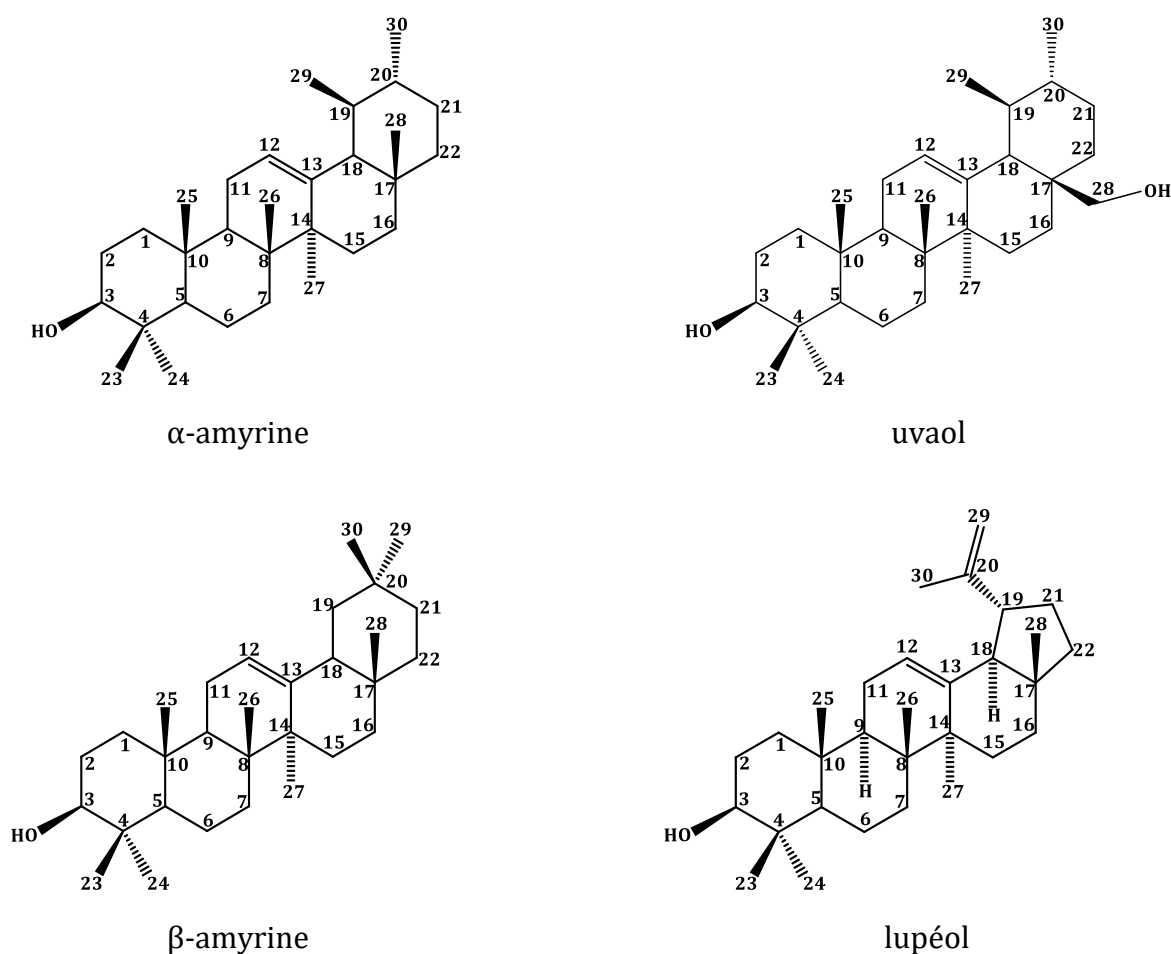
L'extract brut à l'hexane ainsi obtenu a été soumis dans un premier temps à une analyse par RMN ^{13}C ([Annexe 1](#)), selon la méthode développée au laboratoire. L'interrogation des bibliothèques de spectres propres au laboratoire nous a permis d'identifier directement 4 triterpènes possédant une ou deux fonction(s) hydroxyle(s) : l' α -amyrine, la β -amyrine, le lupéol et l'uvaol ([Figure 6](#)). Malgré la similitude de structure de ces molécules, leur identification a été réalisée sans ambiguïté puisque, pour chacune d'entre elles, plus des deux-tiers des signaux en propre ont été observés. La plupart de ces composés triterpéniques avaient déjà été identifiés dans des feuilles d'*I. aquifolium* provenant d'Italie ([Catalano et al., 1978](#)) hormis le lupéol qui n'est présent, à notre connaissance, que dans les feuilles de houx commun de Corse.

Par ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C de l'extract hexanique, plusieurs des raies de résonance ayant des intensités importantes sont restées non attribuées : i) deux signaux à 173,73 ppm et 173,68 ppm, ii) une série de signaux compris entre 128,02 ppm et 131,93 ppm, iii) deux signaux à 80,61 ppm et 80,82 ppm ainsi que iv) une série de signaux classiques des chaînes linéaires (14,11 ppm ; 22,69 ppm ; 29,70 ppm ; 31,92 ppm).

L'ensemble de ces déplacements chimiques correspond manifestement à des chaînes grasses saturées et/ou insaturées. Ces données, associées à l'identification des triterpènes cités précédemment, indiquent que nous sommes vraisemblablement en présence, dans des proportions majoritaires, de dérivés d' α - et de β -amyrine présentant une fonction ester au niveau du carbone C3 ([Figure 8](#)). Par ailleurs, parmi les composés non identifiés, nous pouvons noter la présence d'un déplacement chimique non encore attribué à 207,48 ppm. L'enregistrement de la séquence DEPT de l'extract à l'hexane nous oriente vers un composé possédant une fonction aldéhyde et présent en plus faible

proportion. Afin d'aller plus avant dans la détermination de la composition chimique de l'extrait à l'hexane, nous avons soumis ce dernier à deux chromatographies successives sur colonne ouverte de silice de granulométries différentes.

Figure 6. Molécules identifiées par RMN dans l'extrait brut à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium*

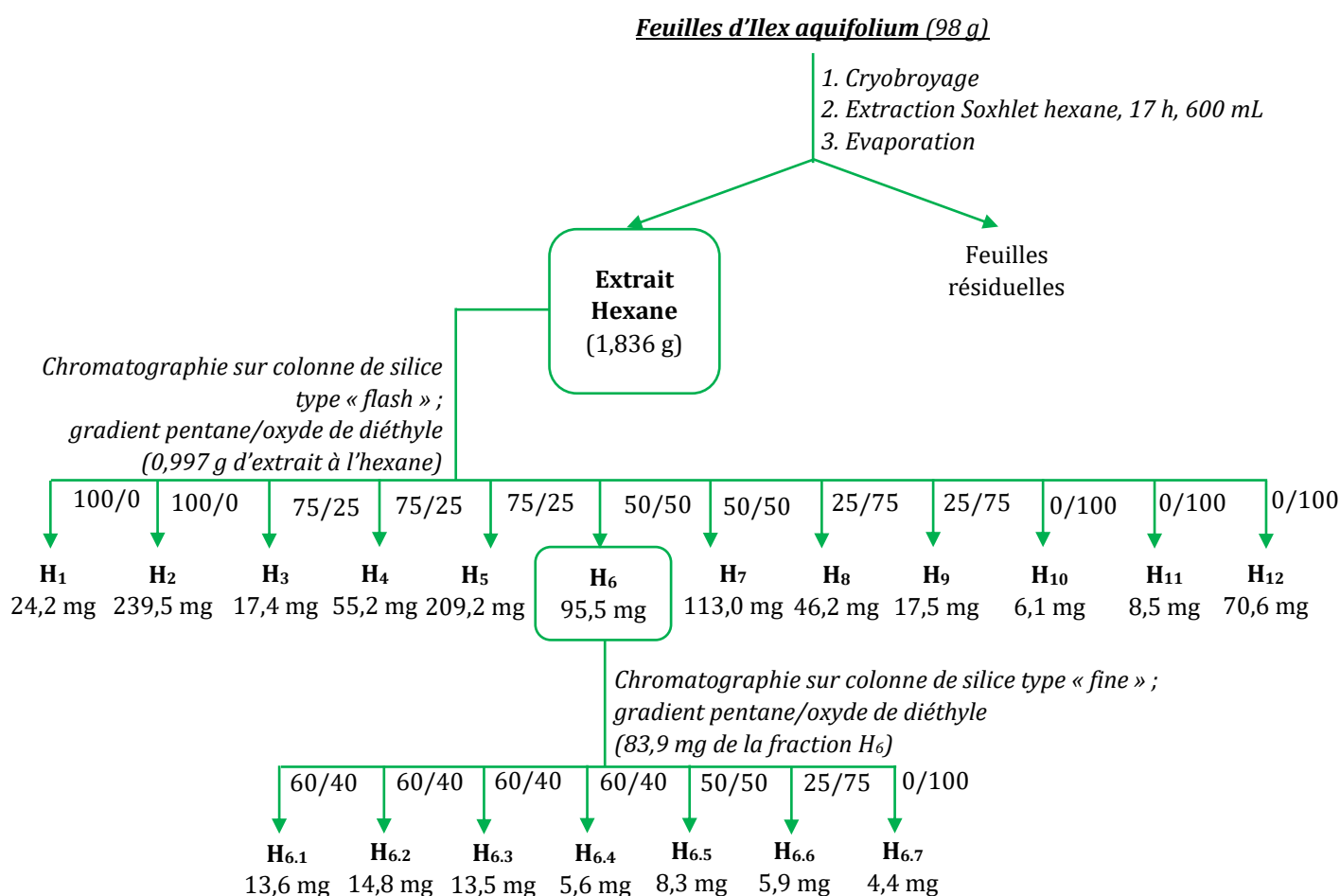


II.2.1.1. Chromatographie sur colonne de silice de type « flash » de l'extrait à l'hexane

Un échantillon de 0,997 g d'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (63 - 200 μm ; 60 $\text{\AA}$; 25 g). A l'issue de cette chromatographie, douze fractions ont été obtenues (H_1 à H_{12}), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (**Figure 7**). Dans la suite du manuscrit, nous décrirons plus

particulièrement les fractions de chromatographie apportant de nouvelles informations et dont les signaux des spectres ont été en majeure partie attribués, c'est-à-dire pour lesquels les raies de résonance restantes sont d'intensités négligeables.

Figure 7. Schéma de l'extraction et du fractionnement de l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium*



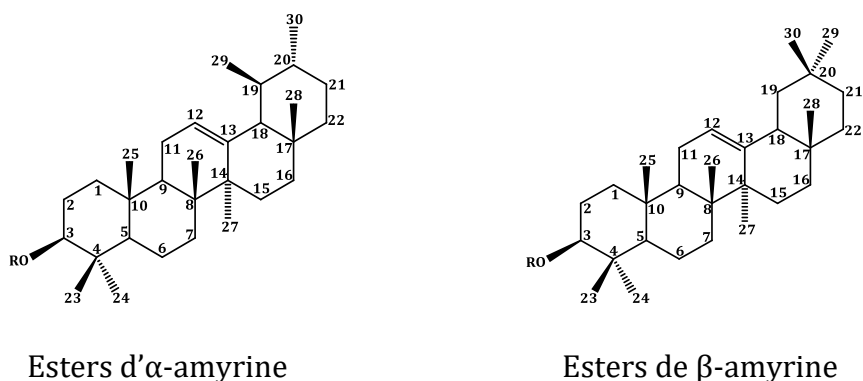
Les résultats obtenus à l'issue de ce fractionnement confirment les propositions d'identification réalisées à partir de l'extrait brut. En effet, sur le spectre de RMN ^{13}C des fractions H₂, H₃ et H₄, nous relevons : i) des signaux correspondant aux squelettes de l' α -amyrine et de la β -amyrine à l'exception du signal du C3 ([Annexe 2](#)), ii) deux signaux à 173,73 ppm et 173,68 ppm associés à iii) deux signaux de résonance intenses à 80,61 et

80,82 ppm, iv) une série de signaux caractéristiques des chaînes linéaires (14,11 ppm ; 22,69 ppm ; 29,70 ppm ; 31,92 ppm) ainsi que v) des signaux entre 128,01 ppm et 131,95 ppm appartenant manifestement à des chaînes grasses saturées et insaturées constituant la chaîne carbonée de la fonction « ester » liée aux amyrines sur le C3 (R-(CO)-O-C3).

Les fractions H₂ à H₄ contiennent donc des esters de l'α-amyrine et de la β-amyrine. Afin d'identifier et de quantifier les chaînes grasses de ces esters, nous avons décidé de soumettre la fraction H₂ (dont le pourcentage relatif en esters d'amyrynes est le plus important) à une analyse par CPG et CPG-SM après une étape classique d'hydrolyse de l'ester suivie d'une étape de méthylation de la fonction acide ainsi obtenue (Metcalf et al., 1966). Cette étape permet d'atteindre un triple objectif :

- i) Eviter l'agression de la colonne analytique de CPG par des acides gras,
- ii) Détecter un maximum de composés semi-volatils grâce à la diminution de leur point d'ébullition et
- iii) Améliorer la sensibilité du détecteur.

Ainsi, l'analyse par CPG (associée à l'utilisation des indices de rétention) et par CPG-SM (bibliothèques de spectres de masse propres au laboratoire et commerciales), après hydrolyse et dérivatisation, nous a permis d'identifier cinq esters méthyliques d'acides gras : l'acide palmitique (C16:0 ; 54,1 %), l'acide linoléique (C18:2 ; 10,0 %), l'acide oléique (C18:1 ; 11,3 %), l'acide linoléique (C18:2 ; 10,0 %), et l'acide stéarique (C18:0 ; 3,0 %). Nous pouvons donc conclure que, au sein de la fraction H₂, nous sommes en présence d'esters d'α-amyrine et de β-amyrine possédant les chaînes grasses saturées ou insaturées dans les proportions sus-citées. Niemann et Baas (1985a), avaient déjà reporté la présence d'esters d'amyrynes dans *I. aquifolium* et avaient identifié 3 chaînes grasses, l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide linoléique.

Figure 8. Esters d'amyrynes identifiés dans l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium*

R =	
C16:0	Palmitate d'amyryne
C18:3	Linolénate d'amyryne
C18:2	Linoléate d'amyryne
C18:1	Oléate d'amyryne
C18:0	Stéarate d'amyryne

Concernant les autres fractions de chromatographie, l'interrogation de la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier :

- sur le spectre de RMN ^{13}C de la fraction H₅, le pseudotaraxastérol, présent en faible teneur dans la fraction, à côté du lupéol, de l' α -amyryne et de la β -amyryne préalablement identifiés dans l'extrait brut ;

- la bétuline, l'érythrodiol et l'uvaol dans la fraction H₇ (**Figure 9**);

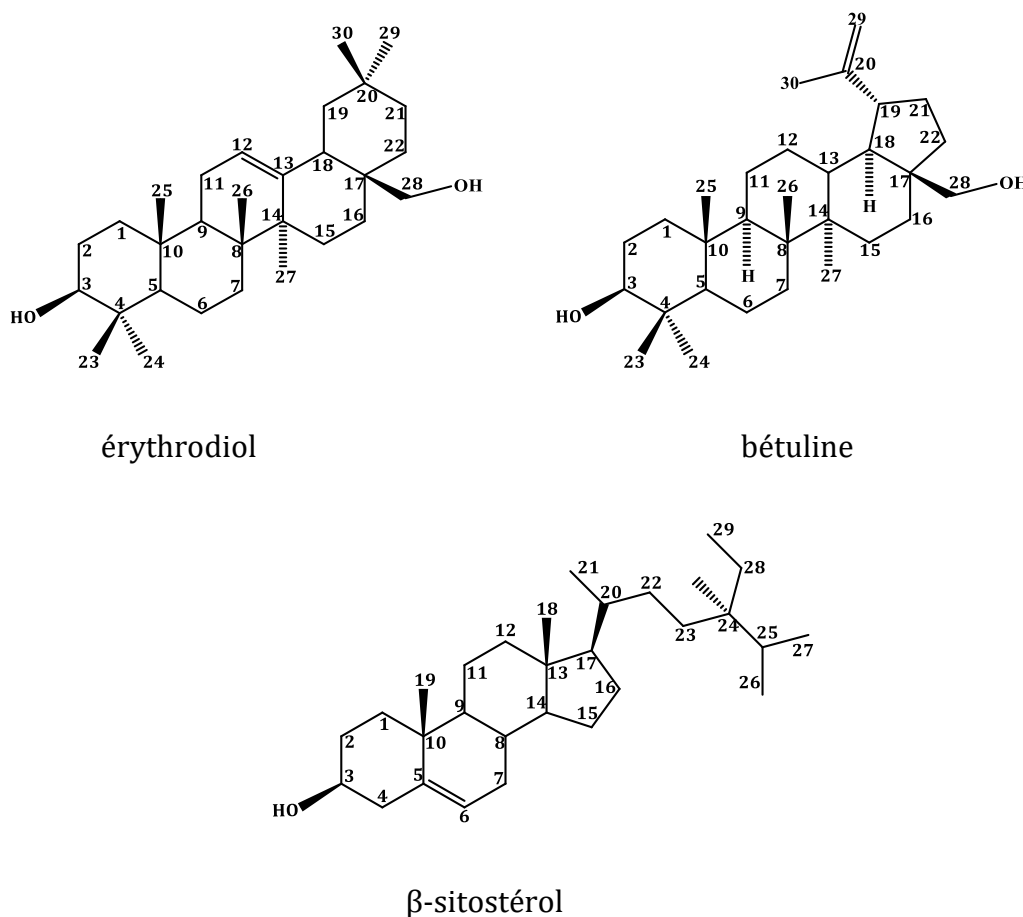
- l'uvaol ultra-majoritaire au sein de la fraction H₈ qui avait précédemment été identifié dans l'extrait.

Sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction H₆, l' α -amyryne, la β -amyryne et le lupéol ainsi que le β -sitostérol ont été identifiés après interrogation des banques spectrales du laboratoire. Cependant, une série de raies de résonance d'intensités homogènes et importantes restait non attribuée. Le déplacement chimique relevé à 207,50 ppm indique que nous sommes en présence d'un aldéhyde triterpénique préalablement suspecté

minoritaire dans l'extrait brut. La fraction H₆ a donc fait l'objet d'une chromatographie sur colonne ouverte dite « fine ».

Le β -sitostérol avait déjà été identifié dans des extraits de feuilles de houx du Royaume-Uni (Knights et Smith, 1977). L'érythrodiol et le β -sitostérol ont déjà été tous les deux identifiés dans des extraits de feuilles récoltées en Italie (Catalano et al., 1978) et aux Pays-Bas (Van Genderen et Jaarsman, 1990). En revanche, le pseudotaraxastérol et la bétuline ne sont identifiés, à notre connaissance, que dans les feuilles du houx de Corse.

Figure 9. Exemples de molécules identifiées après fractionnement de l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium*



II.2.1.2. Chromatographie sur colonne de silice de type « fine » de la fraction H₆

La fraction H₆ (83,9 mg) a été chromatographiée sur colonne de silice (4,0 g) de granulométrie fine (35 - 70 μm). A l'issue de cette séparation, nous avons obtenu 7 sous-fractions avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle. Ces sous-fractions ont toutes été analysées par RMN ^{13}C . L'analyse par RMN ^{13}C des fractions H_{6.1} à H_{6.4} nous a permis de confirmer l'identification de l' α -amyrine, de la β -amyrine, du lupéol, et du β -sitostérol. Sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction H_{6.3}, sur lequel seul le β -sitostérol a été identifié dans des proportions minoritaires, nous repérons une série de 30 signaux d'intensités très importantes restant non attribuée. Cette série comprend notamment un signal déblindé à 207,49 ppm correspondant selon le spectre DEPT à une fonction aldéhyde déjà mentionnée avant chromatographie « fine ». Par ailleurs, la grande majorité des signaux de la molécule recherchée nous oriente vers un triterpène présentant globalement le squelette de l' α -amyrine ($\delta_{\text{C}13} = 137,80$ ppm ; $\delta_{\text{C}12} = 126,21$ ppm ; $\delta_{\text{C}3} = 79,03$ ppm ; $\delta_{\text{C}5} = 55,22$ ppm) et possédant une fonction aldéhyde. L'interrogation des bibliothèques de spectres issues de la littérature à notre disposition n'ayant donné aucun résultat, nous avons donc recherché dans la littérature un composé ayant le squelette de l' α -amyrine avec une fonction aldéhyde. Ainsi, nous avons identifié l'ursolaldéhyde (diffère de l' α -amyrine par une fonction aldéhyde à la place du méthyle en position C28) comme étant la molécule majoritaire dans la sous-fraction H_{6.3} (**Tableau 1**). Pour ce composé :

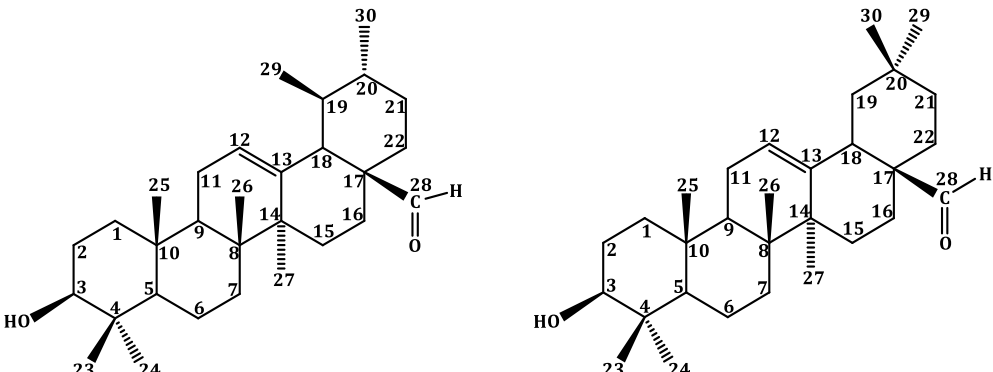
- Tous les signaux attendus ont été observés ;
- Les variations de déplacement chimique ($\Delta\delta$) entre le spectre du mélange et celui du composé de référence (Kim et al., 2005) sont acceptables puisqu'elles sont toutes inférieures à 0,12 ppm. Seule une variation de déplacement chimique plus importante est observée pour le carbone de la fonction aldéhyde (*i.e.* 0,19 ppm). Cela n'est pas surprenant puisque ce type de groupement, tout comme le groupement hydroxyle, est susceptible d'établir des liaisons hydrogènes à l'origine de variations de déplacement chimique plus importantes.

L'examen du spectre de RMN ^{13}C de la sous fraction H_{6.2} nous a permis de confirmer l'identification de l' α -amyrine, du lupéol et de l'ursolaldéhyde. Sur ce spectre, nous observons une nouvelle série de trente raies de résonance non encore identifiée (voisine

de celle de l'ursolaldéhyde). Suite à de nouvelles recherches bibliographiques, nous identifions un isomère de l'ursolaldéhyde, à savoir l'oléanaldéhyde (**Tableau 1**). Pour cette molécule :

- Tous les signaux attendus ont été observés ;
- Les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence ([Zhang et al., 2004](#)) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,09 ppm pour les deux-tiers des signaux et comprises entre 0,11 et 0,21 ppm pour le tiers restant. Il s'agit notamment des carbones C2 et C17 qui sont en position α de la fonction hydroxyle et en position α de la fonction aldéhyde respectivement. Comme énoncé précédemment, ces variations ne sont pas surprenantes ;
- Seules quatre superpositions de signaux ont été relevées entre l'ursolaldéhyde et l'oléanaldéhyde malgré la similitude de structure entre les deux isomères. L'identification par RMN ^{13}C à partir des données de la littérature est donc effectuée sans aucune ambiguïté.

L'extraction à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium* poussant en Corse suivie de deux chromatographies sur colonne ouverte de silice successives a donc permis d'identifier plusieurs triterpènes dont deux supplémentaires à partir des données spectrales issues de la littérature. Il s'agit d'esters d' α -amyrine, d'esters de β -amyrine, de l' α -amyrine, de la β -amyrine, du lupéol, du β -sitostérol, de la bétuline, de l'érythrodiol, de l'uvaol, de l'ursolaldéhyde et de l'oléanaldéhyde. Les déplacements chimiques de ces deux dernières molécules en mélange, enregistrés sur notre appareil, ont été référencés dans la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire contribuant ainsi à son enrichissement. La présence de ces deux aldéhydes triterpéniques dans des extraits de feuilles d'*I. aquifolium* avait déjà été reportée dans des feuilles de houx commun provenant des Pays-Bas ([Van Genderen et Jaarsma, 1990](#)).

Tableau 1. Structure et déplacements chimiques de l'ursolaldéhyde (UAL) et de l'oléanaldéhyde (OAL)


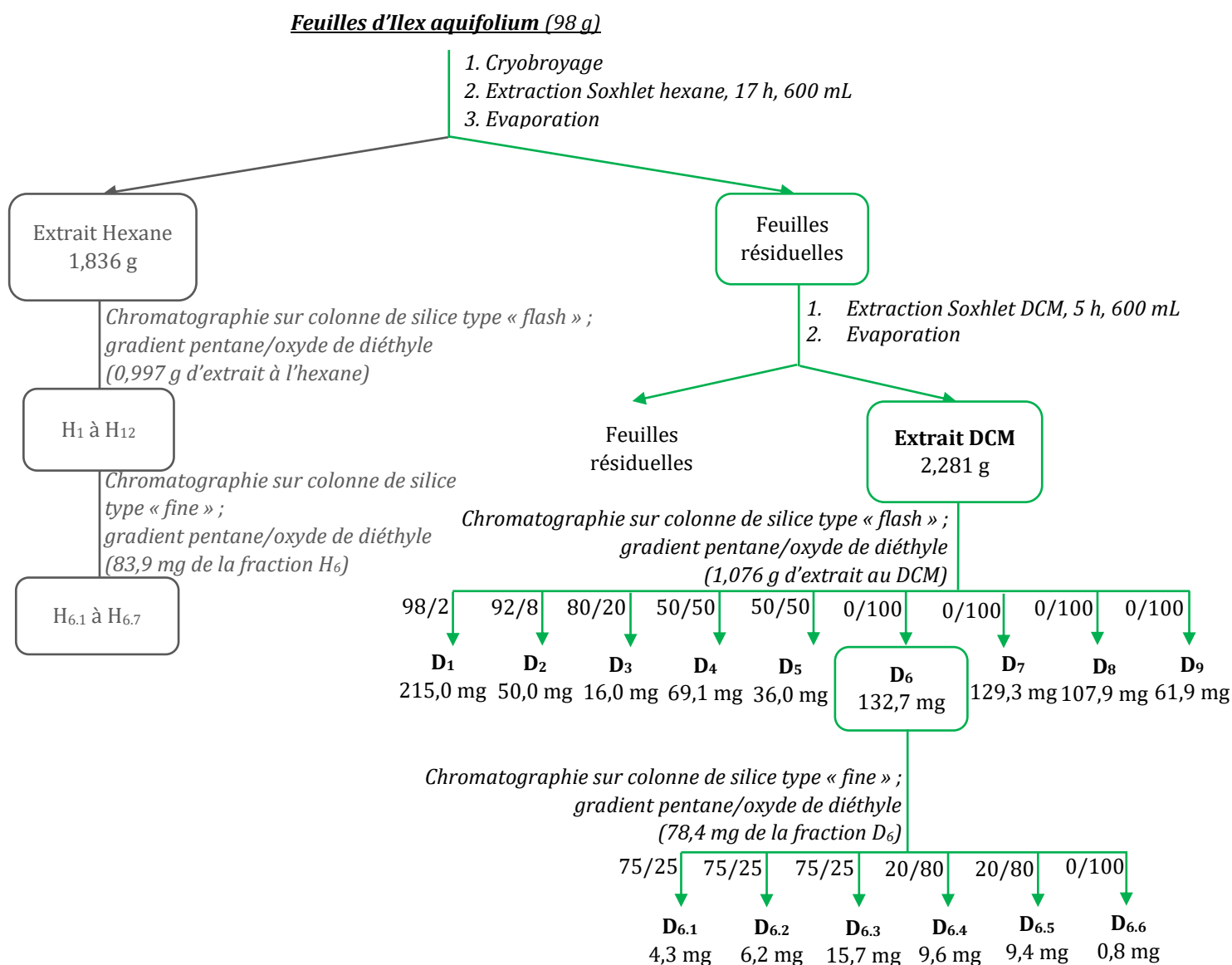
	Ursolaldéhyde (UAL)			Oléanaldéhyde (OAL)		
	δ UAl (ppm)	δ^{litt} UAl (ppm)	$ \Delta\delta $	δ OAl (ppm)	δ^{litt} OAl (ppm)	$ \Delta\delta $
C1	38,70	38,7	0,00	39,39	39,4	0,01
C2	27,23	27,3	0,07	26,89	27,1	0,21
C3	79,03	79,0	0,03	79,03	79,0	0,03
C4	38,75	38,8	0,05	38,70	38,7	0,00
C5	55,22	55,2	0,02	55,22	55,1	0,12
C6	18,28	18,4	0,12	18,28	18,2	0,08
C7	31,88	32,0	0,12	33,17	33,1	0,07
C8	39,82	39,9	0,08	40,42	40,3	0,12
C9	47,57	47,6	0,03	49,10	49,1	0,00
C10	36,95	37,0	0,05	37,01	36,9	0,11
C11	23,24	23,3	0,06	23,43	23,4	0,03
C12	126,21	126,1	0,11	123,26	123,2	0,06
C13	137,80	137,7	0,10	142,99	142,9	0,09
C14	42,17	42,2	0,03	41,71	41,6	0,11
C15	28,15	28,2	0,05	27,75	27,7	0,05
C16	23,31	23,4	0,09	22,12	22,0	0,12
C17	50,16	50,2	0,04	47,57	47,4	0,17
C18	52,63	52,6	0,03	45,61	45,5	0,11
C19	39,00	39,0	0,00	45,85	46,0	0,15
C20	38,82	38,9	0,08	30,65	30,6	0,05
C21	30,19	30,2	0,01	33,12	33,1	0,02
C22	33,11	33,2	0,09	28,10	28,1	0,00
C23	29,71	29,8	0,09	32,76	32,7	0,06
C24	15,63	15,7	0,07	16,93	17,0	0,07
C25	15,52	15,6	0,08	15,35	15,3	0,05
C26	17,22	17,3	0,08	17,03	17,2	0,17
C27	23,24	23,3	0,06	26,75	26,7	0,05
C28	207,49	207,3	0,19	207,56	207,7	0,14
C29	16,67	16,7	0,03	32,78	32,7	0,08
C30	21,08	21,2	0,12	23,55	23,6	0,05

Notes: δ UAl et δ OAl, déplacements chimiques observés respectivement pour l'ursolaldéhyde sur le spectre de la sous-fraction H_{6.3} et pour l'oléanaldéhyde sur le spectre de la sous-fraction H_{6.2} ; δ^{litt} UAl et δ^{litt} OAl, déplacements chimiques décrits dans la littérature respectivement pour l'ursolaldéhyde (Kim et al., 2005) et l'oléanaldéhyde (Zhang et al., 2004). Nous avons comparé les chiffres au dixième de ppm près et au centième de ppm bien que ce ne soit pas mathématiquement correct pour donner un ordre de grandeur.

II.2.2. EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FEUILLES DE HOUX

Les feuilles résiduelles ont été extraites à nouveau à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL de dichlorométhane pendant 5 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 2,281 g a été obtenu (rendement de 2,3 % par rapport à la masse sèche initiale de végétal).

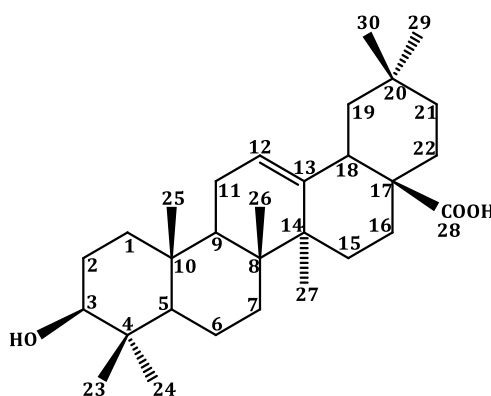
Figure 10. Schéma de la chromatographie de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium*



II.2.2.1. Analyse qualitative de l'extrait

Dans un premier temps, nous avons enregistré le spectre de RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane dans le CDCl_3 ([Annexe 3](#)). L'interrogation de la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire a permis d'identifier les esters d'amyrynes (isomères α et β) et l'acide oléanolique ([Figure 11](#)). Malgré la similitude de structure entre ces molécules, le nombre de superpositions de signaux sur le spectre RMN ^{13}C de l'extrait reste limité et permet donc une identification sans ambiguïté.

Figure 11. Structure de l'acide oléanolique



Acide oléanolique

Cependant, le CDCl_3 ne permettant pas de dissoudre la totalité de l'extrait au dichlorométhane, nous avons donc enregistré le spectre de RMN ^{13}C de ce même extrait en utilisant un solvant plus polaire : le diméthylsulfoxyde deutéré ($\text{DMSO}-d_6$) ([Annexe 4](#)). Afin de confirmer l'identification de l'acide oléanolique dans le $\text{DMSO}-d_6$, nous nous sommes procurés un échantillon commercial de ce composé et nous avons enregistré son spectre dans le même solvant. Les données spectrales du produit pur et celles relevées sur le spectre de l'extrait coïncident parfaitement, confirmant ainsi l'identification de cette molécule. Les déplacements chimiques de l'acide oléanolique dans le $\text{DMSO}-d_6$ enregistrés sur notre spectromètre ont alors été référencés dans la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire.

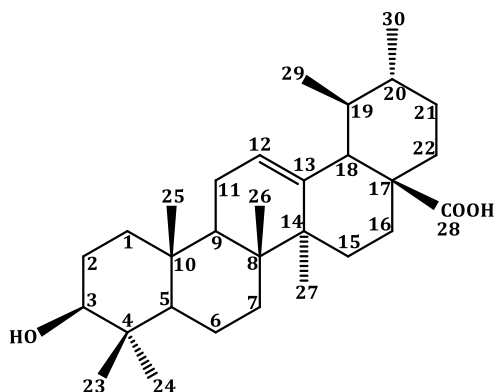
Parallèlement, sur le spectre de RMN ^{13}C de l'extrait dichlorométhanique enregistré dans le DMSO- d_6 , nous observons une série de 30 raies de résonance de fortes intensités (nettement supérieures à celles de l'acide oléanolique) qui n'avait pas été repérée sur le spectre obtenu dans le CDCl_3 . Il s'agit du composé majoritaire de l'extrait. Ce dernier est absent des bibliothèques de spectres issues de la littérature et propres au laboratoire. Cependant, un tiers de ses signaux sont superposés à ceux de l'acide oléanolique. Cette observation, associée à l'examen du spectre de la séquence DEPT, nous oriente vers un triterpène présentant une fonction acide (178,11 ppm) et de structure similaire à celle de l' α -amyrine (raies de résonance caractéristiques : C, 139,62 ppm / CH, 124,46 ppm / CH, 79,08 ppm / CH, 59,11 ppm / CH, 55,23 ppm / CH_3 , 21,41 ppm / CH_3 , 17,49 ppm).

Afin d'identifier cette molécule, nous avons cherché à la concentrer, voire à la purifier. Nous avons donc mis en œuvre une chromatographie sur colonne ouverte de silice de type « flash » (silice 63 - 200 μm ; 60 Å ; 25 g) à partir de 1,076 g d'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium*. Neuf fractions ont été éluées (D_1 à D_9), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (**Figure 10**). L'examen des spectres RMN ^{13}C (enregistrés dans le CDCl_3) des fractions les moins polaires D_1 à D_3 , nous a permis de confirmer l'identification des esters d' α - et β -amyrine précédemment décrits. Par ailleurs, au sein des fractions D_4 et D_5 , l'interrogation de la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire nous a permis d'identifier, à côté de l'acide oléanolique, le β -sitostérol, dont les signaux n'avaient pas été repérés sur le spectre de l'extrait brut.

Les quatre fractions suivantes (*i.e.* D_6 - D_9) n'étant pas solubles dans le CDCl_3 , nous avons utilisé une nouvelle fois le DMSO- d_6 pour l'enregistrement des spectres RMN ^{13}C respectifs. Ainsi, sur les spectres des fractions D_6 et D_7 , nous repérons tous les signaux de l'acide oléanolique à côté de ceux du second triterpène acide, les deux composés étant manifestement présents dans des proportions voisines. L'examen des spectres des fractions D_8 et D_9 , dans lesquels les signaux de l'acide oléanolique sont soit absents soit très peu intenses, nous permet d'identifier le second triterpène acide à partir notamment des données spectrales issues de la littérature enregistrées dans le DMSO- d_6 (Silva *et al.*, 2008). Il s'agit d'un isomère de l'acide oléanolique : l'acide ursolique (**Tableau 2**). Pour ce dernier, qui a donc été quasiment purifié, tous les signaux attendus ont été observés. Les variations des déplacements chimiques entre le spectre du mélange et celui du

composé de référence issu de la littérature sont acceptables puisqu'elles sont globalement comprises entre 0,07 et 0,18 ppm. Des variations de déplacements chimiques plus importantes sont observées uniquement pour les carbones C7 et C9 bien que ces derniers ne soient pas proches d'une fonction (groupement hydroxyle ou acide). Ainsi, afin de lever toute ambiguïté et de repérer avec certitude l'ensemble des déplacements chimiques de l'acide ursolique dans le DMSO-*d*₆, nous nous sommes procurés un échantillon commercial de ce composé et nous avons enregistré son spectre RMN ¹³C. Les valeurs des déplacements chimiques du produit pur correspondent parfaitement à celles observées dans la fraction D₉ (**Tableau 2**). L'identification de l'acide ursolique et de l'acide oléanolique dans des extraits de feuilles de houx (*I. aquifolium*) avait déjà été préalablement reportée dans la littérature ([Schindler et Herb, 1955](#) ; [Catalano et al., 1978](#); [Alikaridis, 1987](#) ; [Van Genderen et Jaarsma, 1990](#)).

L'acide ursolique et l'acide oléanolique font partie des triterpènes les plus fréquemment rencontrés dans les plantes et ont fait l'objet de nombreux travaux. Des études réalisées sur l'acide oléanolique ont mis en évidence ses activités antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-hépatotoxique, antibactérienne, antifongique, hépatoprotectrice, antitumorale et anti-hyperglycémiant ([Liu, 1995](#) ; [Ikeda et al., 2008](#) ; [Fontanay et al., 2008](#)).

Tableau 2. Structure et déplacements chimiques de l'acide ursolique (UA)

	δ UA (ppm)	δ UA ^c (ppm)	$\Delta\delta$
C1	38,10	38,11	0,01
C2	26,86	26,86	0,00
C3	76,70	76,70	0,00
C4	38,25	38,24	0,01
C5	54,64	54,65	0,01
C6	17,87	17,87	0,00
C7	30,05	30,06	0,01
C8	39,01	38,97	0,04
C9	46,70	46,69	0,01
C10	36,40	36,39	0,01
C11	23,67	23,68	0,01
C12	124,45	124,44	0,01
C13	138,07	138,05	0,02
C14	41,52	41,51	0,01
C15	32,57	32,57	0,00
C16	22,72	22,72	0,00
C17	46,88	46,89	0,01
C18	52,25	52,24	0,01
C19	38,37	38,37	0,00
C20	38,30	38,31	0,01
C21	27,41	27,41	0,00
C22	36,19	36,18	0,01
C23	28,13	28,13	0,00
C24	16,80	16,78	0,02
C25	15,96	15,94	0,02
C26	15,10	15,09	0,01
C27	23,14	23,14	0,00
C28	178,16	178,14	0,02
C29	16,89	16,88	0,01
C30	20,95	20,94	0,01

Notes: δ UA, déplacements chimiques de l'acide ursolique observés dans la sous-fraction D₉ (DMSO-d₆); δ UA^c, déplacements chimiques de l'acide ursolique dans l'échantillon commercial.

L'acide ursolique, pour sa part, est connu pour présenter des propriétés intéressantes et tout à fait valorisables dans des domaines variés et notamment ceux de l'oncologie, de la microbiologie et de la cosmétique. Par exemple, ce composé possède une activité antirides similaire aux rétinoïdes (Both et al., 2002). Il possède également des activités anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-tumorale, hépatoprotectrice, anticancéreuse, antileucémique, antimutagène, antioxydante, antipyrétique, antidiabétique, anti-hypertension et antivirale (Liu, 1995 ; Shen et al., 2003 ; Fontanay et al., 2008 ; Ikeda et al., 2008 ; Sultana, 2011 ; Checker et al., 2012). Ainsi, compte-tenu du large spectre d'activités biologiques de l'acide ursolique, plusieurs méthodes de quantification de cet acide dans diverses matrices végétales ont été décrites dans la littérature. A titre d'exemple, l'acide ursolique peut être quantifié en utilisant des techniques analytiques souvent coûteuses en temps : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse, CLHP couplée à la spectrométrie de masse, CPG-SM après dérivation (Sultana, 2011). Nous nous sommes donc proposés de mettre au point une séquence de quantification très rapide et fiable de l'acide ursolique en mélange par RMN ^1H , cette méthode étant également extrapolable à l'acide oléanolique.

II.2.2.2. Analyse quantitative de l'extrait

D'une manière générale, quelle que soit la technique utilisée, la quantification d'un composé au sein d'un mélange nécessite la comparaison des signaux de ce composé avec ceux d'une référence interne (étalonnage interne) ou l'utilisation de droites d'étalonnage (étalonnage externe). L'utilisation de la méthode par étalonnage interne par RMN nécessite d'obtenir une réponse homogène des noyaux des composés et de la référence interne. Il est alors possible de quantifier chacun des constituants identifiés dans un mélange par intégration de leurs signaux, puisque la valeur de l'aire est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent (Günther, 1994). Deux facteurs sont responsables de la réponse (uniforme ou non) des noyaux. Il s'agit des temps de relaxation longitudinale (T_1) des carbones ou protons et des variations d'Effet Overhauser Nucléaire (effet NOE) entre les carbones ou protons des composés à doser et ceux de la référence interne. Diverses méthodes ont été développées pour quantifier les constituants de mélanges par RMN :

- Un angle d'impulsion de 90° combiné à un délai d'attente entre deux impulsions successives d'au moins cinq fois le T_1 le plus long permet d'obtenir un rapport Signal/Bruit (S/B) maximum et la relaxation totale de tous les noyaux. L'application simultanée de ces paramètres est reconnue comme étant la séquence standard de quantification par RMN (Günther, 1994) ;
- La quantification par RMN peut également être réalisée en mettant en œuvre une série rapide d'impulsions courtes dans la mesure où la diminution de l'angle d'impulsion diminue les différences d'aimantation restaurée entre des noyaux dont les T_1 sont différents (Kalinowski et al., 1991). L'utilisation de petits angles d'impulsion présente l'avantage de pouvoir diminuer le délai entre deux impulsions successives et donc le temps d'analyse. Cependant, la diminution de l'angle d'impulsion s'accompagne systématiquement d'une baisse du rapport S/B ;
- L'utilisation d'une méthode intermédiaire aux deux précédentes, constitue une bonne approche de l'analyse quantitative d'un mélange complexe contenant des noyaux de T_1 différents (Brekke et Kvalheim, 1996). Cette approche a été privilégiée au sein du laboratoire de l'équipe « Chimie et Biomasse » depuis plusieurs années, notamment pour le dosage par RMN ^{13}C des diterpènes (Rezzi et al., 2002), des triterpènes (Nam et al., 2017) et des taxanes (Paoli et al., 2013). Cette méthodologie a également été utilisée en RMN ^1H pour quantifier des mono et sesquiterpènes d'intérêt dans des huiles essentielles (Paoli, 2011).

Afin de quantifier de la manière la plus rapide et la plus juste possible l'acide ursolique et l'acide oléanolique dans l'extrait dichlorométhanique de feuilles d'*I. aquifolium*, nous avons privilégié la troisième approche en utilisant la RMN ^1H et en utilisant l'acide ursolique comme molécule modèle et le DMSO- d_6 comme solvant. Dans le but de déterminer les paramètres de la séquence impulsionnelle, lors de l'enregistrement d'un spectre RMN ^1H , nous avons d'abord mesuré les valeurs de T_1 des protons de l'acide ursolique (produit commercial) par la technique d'inversion-récupération. Nous avons sélectionné le proton éthylénique porté par le carbone C12 (triplet, $\delta = 5,12$ ppm, $T_1 = 0,1$ s) (Figure 13). Comme nous l'avons expliqué précédemment, la quantification nécessite en général l'utilisation d'une référence interne. Nous avons choisi l'anisole

(méthoxybenzène) car le signal des protons de la fonction méthoxy notamment (singulet à 3,73 ppm) et ceux des protons aromatiques (6,87 ppm ; 6,91 ppm ; 7,27 ppm), ne présentent pas de superpositions ni de chevauchements avec les triplets du proton éthylénique des deux acides. De plus, la valeur du T₁ des protons de l'anisole (0,7 s dans le DMSO-*d*₆), est comparable à celle du proton éthylénique de l'acide ursolique. Cette référence interne avait déjà été utilisée au laboratoire dans les travaux de doctorat de [Paoli \(2011\)](#). Ainsi, nous avons mis au point une séquence classique de quantification dont l'angle d'impulsion α était 30°, un délai de relaxation d'1,0 s et un temps d'acquisition de 2,56 s (32 K).

Afin de valider la méthode, nous avons d'abord testé la justesse de notre procédure quantitative (**Tableau 3**) en comparant les quantités pesées d'acide ursolique pur, dilué dans 0,5 mL de DMSO-*d*₆, de (1,4 à 30,9 mg) avec celles déterminées par RMN ¹H (m_C). Pour réaliser le calcul quantitatif (**formule [1]**), nous avons pris en compte l'aire du signal correspondant au proton sélectionné (A_C, triplet δ = 5,12 ppm), non superposé et parfaitement résolu et l'aire du signal (A_A ; singulet ; 3,73 ppm) des trois protons de la fonction méthoxy de l'anisole. Les erreurs relatives entre les masses pesées et les masses calculées sont comprises entre -1,0 % et 1,7 % indiquant une très bonne justesse des mesures.

$$m_C = \frac{3 \times A_C \times M_C \times m_A \times P_A}{n \times A_A \times M_A \times P_C} \quad \text{formule [1]}$$

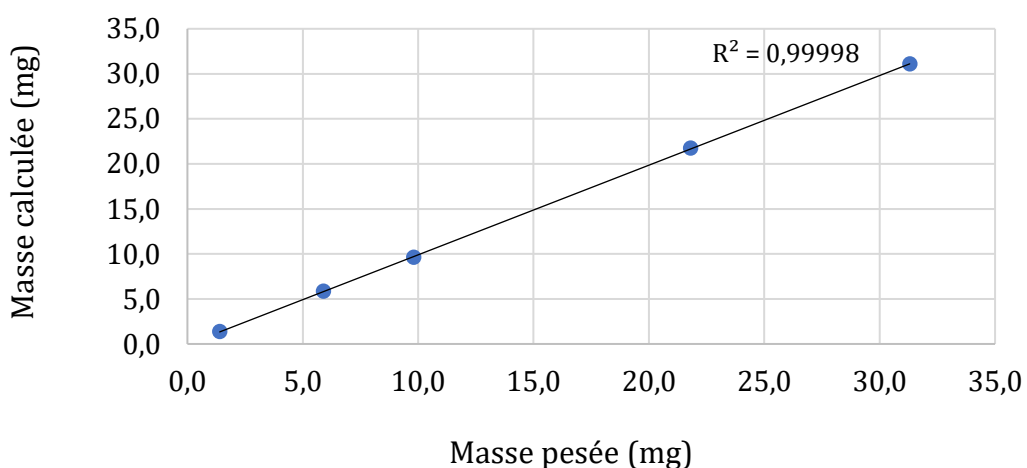
Notes : L'aire du signal de l'anisole (A_A) est fixée et égale à 1,0000 dans toutes les expériences ; le facteur 3 est dû à l'intégration des 3 protons de la fonction méthoxy de l'anisole nécessaire pour quantifier le composé sélectionné ; m_C : masse calculée (en mg) ; A_C : aire du signal correspondant au proton sélectionné ; M_C : masse molaire (en g.mol⁻¹) du composé sélectionné ; m_A : quantité d'anisole soit 11,0 mg ; n : nombre de proton(s) intégré(s) du composé sélectionné ; M_A : masse molaire de l'anisole (108 g.mol⁻¹) ; P_A et P_C : pureté de l'anisole (0,99) et du composé (0,95 pour l'UA).

Tableau 3. Justesse des mesures d'acide ursolique (UA) par RMN

Essai	Aire UA	Masse pesée (mg)	Masse calculée (mg)	ER %
1	0,0857	1,4	1,4	0,0
2	0,3782	5,9	6,0	1,7
3	0,6187	9,8	9,8	0,0
4	1,3006	20,8	20,6	-1,0
5	1,9297	30,9	30,6	-1,0

Notes : L'aire du signal de l'anisole (A_A) est fixée et égale à 1,0000 ; masse d'anisole (m_A) = 1,2 mg ; Aire UA : Aire du signal sélectionné de l'UA à 5,12 ppm ; masse calculée, selon la Formule (1) ; ER : erreur relative dans toutes les expériences.

Nous avons ensuite tracé la droite d'étalonnage de l'acide ursolique (**Figure 12**) en exprimant la masse calculée (m_C) en fonction de la quantité pesée. Nous avons observé une très bonne linéarité des mesures puisque $R^2 = 0,99998$.

Figure 12. Linéarité de la méthode de quantification de l'acide ursolique par RMN ^1H 

Enfin, dans le but de déterminer la précision de la méthode, nous avons enregistré 3 fois le spectre de l'échantillon contenant 20,8 mg de produit et calculé la répétabilité. Nous avons ensuite calculé les erreurs relatives entre les masses calculées et la quantité pesée. Une moyenne de 20,7 mg associée à un écart-type de 0,1 mg (soit 0,5 %) atteste d'une bonne précision des mesures (**Tableau 4**).

Tableau 4. Précision des mesures d'acide ursolique (UA) par RMN

	Test 1	Test 2	Test 3
Masse d'UA pesée (mg)	20,8	20,8	20,8
Aire UA	1,3006	1,3151	1,3077
Masse calculée d'UA (mg)	20,6	20,8	20,7
ER (%)	-1,0	0,0	-0,5

Notes : Aire UA, l'aire du signal du proton éthylénique de l'UA par rapport à celle des protons méthoxy de l'anisole fixée à 1,0000 dans tous les essais ; ER, erreur relative.

La méthode de quantification directe par RMN ¹H décrite précédemment étant validée, nous avons calculé, au sein des spectres enregistrés, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ). Les valeurs mesurées (*i.e.* LOD = 0,14 mg ; LOQ = 2,37 mg) nous permettent d'appliquer notre séquence de quantification pour doser l'acide ursolique et l'acide oléanolique au sein de l'extrait non fractionné au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium*. Sur le spectre RMN ¹H de l'extrait enregistré dans les conditions quantitatives, les signaux correspondant aux protons éthyléniques respectifs des deux molécules sont parfaitement résolus et ne sont pas superposés malgré la similitude des structures (**Figure 13**).

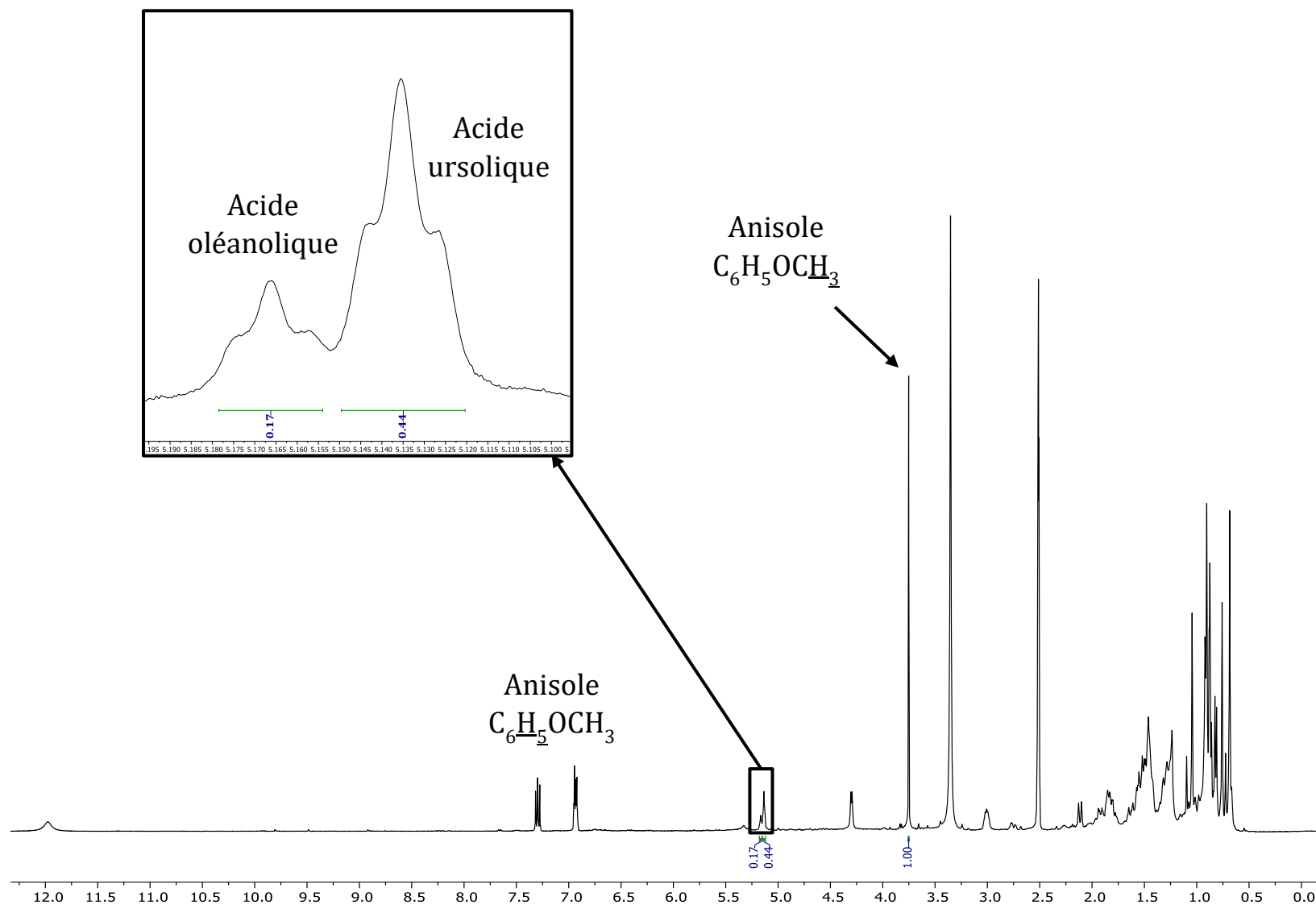
L'acide ursolique est le composé largement majoritaire de l'extrait (55,3 %) suivi de l'acide oléanolique (20,8 %) (**Tableau 5**). Par extrapolation, les feuilles de houx étudiées sont composées notamment de 1,3 % d'acide ursolique et de 0,5 % d'acide oléanolique.

Tableau 5. Quantification de l'acide ursolique et de l'acide oléanolique dans l'extrait de feuilles au dichlorométhane

Acide ursolique		Acide oléanolique		Anisole	
A _{UA}	0,4380	A _{OA}	0,1658	A _A	1,0000
m _{UA} (mg)	8,7	m _{OA} (mg)	3,3	m _A (mg)	1,5
M _{UA} (g.mol ⁻¹)	456	M _{OA} (g.mol ⁻¹)	456	M _A (g.mol ⁻¹)	108
Teneur UA (%)	55,3	Teneur OA (%)	20,8	-	-

Notes : Masse de l'extrait= 15,9 mg ; A_A : aire du signal du groupe méthoxy de l'anisole ; m_A : masse d'anisole ; pureté de l'anisole : 0,99 ; M_{UA} : masse moléculaire de l'UA et de l'OA, respectivement ; M_A : masse moléculaire de l'anisole ; A_{UA} et A_{OA} : aire du signal appartenant au groupe éthylénique de l'UA (5,12 ppm) et de l'OA (5,15 ppm), respectivement ; m_{UA} et m_{OA} : masse calculée (mg) d'UA et OA, respectivement, selon la formule (1).

Figure 13. Spectre RMN ^1H de l'extrait de feuilles d'*Ilex aquifolium* au dichlorométhane



A titre de comparaison, l'acide ursolique est notamment présent jusqu'à 0,11 % dans les cranberries (Kondo, 2006), 0,19 % dans les baies sèches d'argousier (Grey et al., 2010), 0,26 % dans les fleurs sèches du néflier du Japon (Zhou et al., 2007), de 0,15 % à 0,70 % dans les pelures de pommes (équivalent à 0,01 % à 0,02 % environ dans le fruit) (Ma et al., 2005a ; He et Liu, 2007 ; Yamaguchi et al., 2008 ; Frighetto et al., 2008), 0,26 % dans les feuilles d'*I. paraguariensis* (Gnoatto et al., 2008). L'acide ursolique avait déjà été quantifié dans les feuilles d'*I. aquifolium* à des teneurs de 3,34 % mais il s'agit d'une quantification relative réalisée par chromatographie en phase gazeuse et dont le protocole est peu détaillé par les auteurs (Catalano et al., 1978). Nous pouvons donc conclure que, les feuilles de houx de Corse sont une source importante d'acide ursolique.

Cette étude portant sur l'identification et la quantification des constituants des extraits à l'hexane et au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium* a fait l'objet d'une publication en 2019 parue dans le journal *Molecules* (Palu et al., 2019).

L'extraction au Soxhlet, au dichlorométhane, de feuilles d'*I. aquifolium*, suivie d'une chromatographie sur colonne ouverte de silice, nous a permis d'identifier l'acide ursolique à partir des données spectrales de la littérature et l'acide oléanolique grâce aux données du laboratoire. Au vu des applications potentielles de ces deux acides triterpéniques, nous avons mis au point et validé une méthode de quantification par RMN ¹H en mélange très rapide et fiable. Cette méthode a été appliquée avec succès à l'extrait au dichlorométhane de feuilles de houx.

Compte-tenu des données de la littérature (paragraphe II.I), certains des triterpènes présents dans les extraits de feuilles du houx commun étudié présentent un potentiel valorisable dans le domaine de la microbiologie. Nous avons déterminé l'activité antibactérienne des extraits et de leurs composés majoritaires.

II.2.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

La partie suivante de notre travail avait pour but d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*I. aquifolium*, de produits purifiés (fractions de chromatographie) et celle de composés purs commerciaux afin d'évaluer une éventuelle

relation structure-activité. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal » de l'Université de Corse.

En plus des deux extraits à l'hexane et au dichlorométhane (échantillons 1 et 2 respectivement), nous avons sélectionné six fractions de chromatographie (échantillons 3 à 8), en fonction de leur composition chimique, afin de mesurer une éventuelle activité antibactérienne (**Figure 42**). Nous avons également testé 4 triterpènes purs commerciaux (échantillons 10 à 12) préalablement identifiés dans les extraits et fractions (**Tableau 6**). Parallèlement, nous avons mis en œuvre une chromatographie sur colonne ouverte de silice (5 g de granulométrie 35 – 70 µm) dite « fine » en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle sur la fraction de chromatographie D₆ (**Figure 10**). Cette séparation a notamment permis la purification de l'acide ursolique dans la fraction D_{6.3} qui constitue l'échantillon 8 dans les tests réalisés.

Nous avons alors déterminé le potentiel de ces 12 échantillons à inhiber des souches bactériennes. Pour y parvenir, nous avons sélectionné trois bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*) ainsi que trois bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus cereus*). Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux mesurés avec un antibiotique de référence (chloramphénicol). Afin de mesurer le potentiel d'inhibition des 12 échantillons sélectionnés, nous avons procédé à des tests de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur la sélection des souches bactériennes citées ci-dessus (**Tableau 6**). Ces tests ont été réalisés par la technique de micro-dilution.

Tableau 6. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en mg.L⁻¹ des douze échantillons sélectionnés sur des bactéries à Gram+ et à Gram-

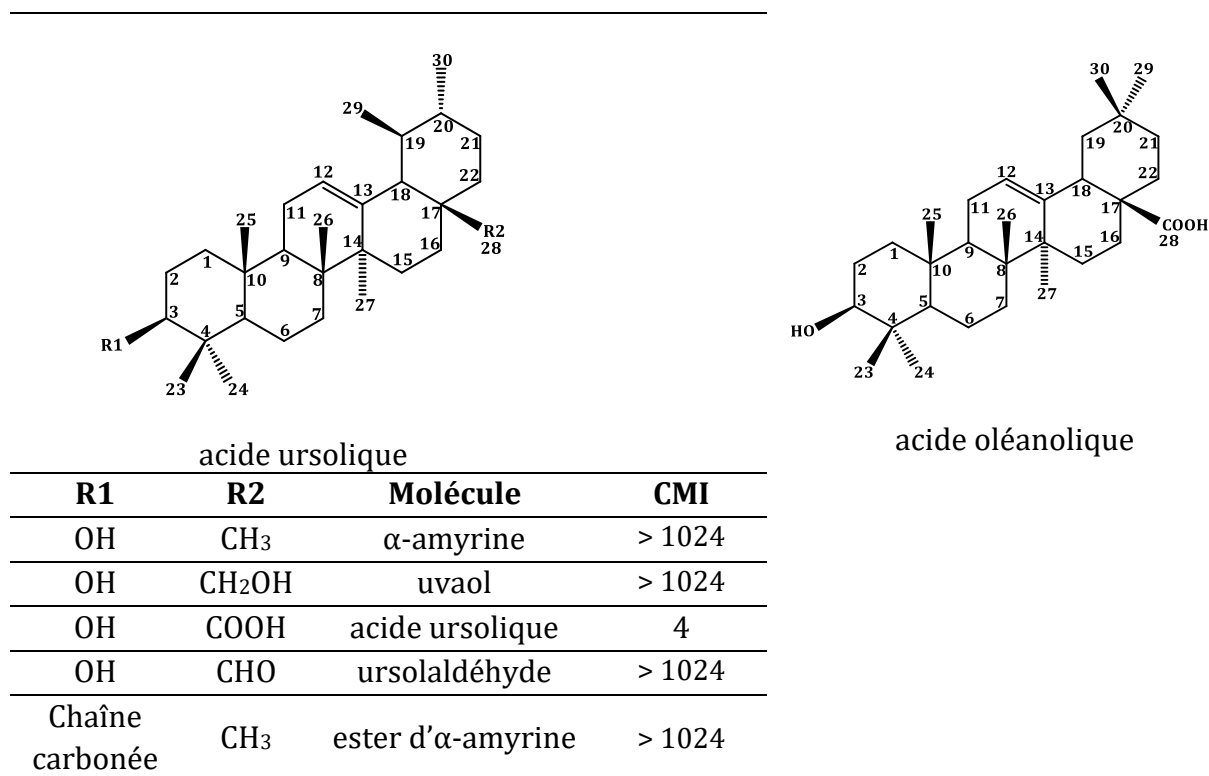
	Gram négatif			Gram positif		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>
1	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
2	> 1024	> 1024	> 1024	8	32	4
3	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
4	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	1024
5	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	256
6	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
7	> 1024	> 1024	> 1024	32	32	32
8	> 1024	> 1024	> 1024	32	32	32
9	> 1024	> 1024	> 1024	4	4	4
10	> 1024	> 1024	> 1024	8	8	4
11	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
12	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
Chloramphénicol	0,25	64	2	4	2	2

Notes : Correspondance des échantillons, 1=extrait de feuilles d'*I. aquifolium* à l'hexane ; 2= extrait de feuilles d'*I. aquifolium* au dichlorométhane ; 3=Fraction H₄ ; 4=Fraction H₅ ; 5= Fraction H₇ ; 6=Sous-fraction H_{6.3} ; 7=Fraction D₈ ; 8=Sous-fraction D_{6.3} ; 9=Acide ursolique commercial ; 10=Acide oléanolique commercial ; 11=α-amyrine commercial ; 12=Uvaol commercial.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries à Gram négatif ne sont pas sensibles aux divers échantillons testés (extraits, fractions de chromatographie et molécules pures). En effet, les CMI calculées pour l'ensemble des douze échantillons sont toutes supérieures à 1024 mg.L⁻¹. Ce type de bactéries est connu pour être relativement peu sensible aux produits toxiques naturels à cause de la structure de leur paroi constituée d'une double membrane plus difficile à traverser que celle des bactéries à Gram positif qui ne possèdent qu'une seule membrane biologique (bicouche lipidique) entourée par un peptidoglycane épais.

En ce qui concerne les tests réalisés sur les bactéries à Gram positif, sept échantillons sur douze n'ont montré aucune activité (CMI supérieures ou égales à 1024 mg.L⁻¹) (**Tableau 6**). Il s'agit des échantillons 1 (extrait à l'hexane), 3, 4, 6 (fraction de chromatographie H₄, H₅, H_{6.3} respectivement), 11 et 12 (produits purs : α-amyrine et uvaol). On note toutefois une activité modérée de l'échantillon 5 (H₇) vis-à-vis de la

bactérie *B. cereus* (256 mg.L^{-1}). En revanche, une activité antibactérienne a été mesurée pour les échantillons 2 et 7 à 10 concernant les trois bactéries à Gram positif ($4 - 32 \text{ mg.L}^{-1}$). La souche la plus sensible, c'est-à-dire celle sur laquelle les produits présentent la CMI la plus faible, est *B. cereus*. En effet, sur les 5 échantillons, trois CMI sont égales à 4 mg.L^{-1} et deux à 32 mg.L^{-1} . Quant à la souche la plus résistante, *S. epidermidis*, trois CMI sont égales à 32 mg.L^{-1} , une à 8 mg.L^{-1} et une à 4 mg.L^{-1} . Nous avons vu précédemment ([paragraphe II.2.2.2.](#)) que les composés majoritaires de l'extrait au dichlorométhane (échantillon 2) étaient l'acide ursolique (55,3 %) et l'acide oléanolique (20,8 %). Les fractions de chromatographie D_8 (échantillon 7, acide ursolique / acide oléanolique 50/50) et $\text{D}_{6.3}$ (échantillon 8, acide ursolique quasiment pur) montrent une activité similaire à celle de l'extrait au dichlorométhane (échantillon 2). Nous pouvons donc conclure que ces deux triterpènes acides sont responsables de l'activité antimicrobienne de l'extrait, ceci étant confirmé par les résultats positifs obtenus pour les échantillons 9 et 10 (tests réalisés sur les molécules commerciales pures). Les échantillons 9 et 10 ont une activité semblable à celle du chloramphénicol. La structure chimique d'une molécule est connue pour avoir un impact sur son activité biologique de par les interactions qu'elle peut générer avec sa cible d'action. Dans le but de mettre en évidence une éventuelle relation structure-activité, nous avons donc comparé, en utilisant les mêmes bactéries que précédemment, les activités de l'acide ursolique (échantillon 9), de l'acide oléanolique (échantillon 10) et de trois molécules structuralement proches : ursolaldéhyde, α -amyrine et uvaol, (échantillons 6, 11 et 12) ([Figure 14](#)).

Figure 14. Squelettes de triterpènes : relation structure-activité

Pour commencer, nous constatons que l'acide ursolique (échantillon 9) et l'acide oléanolique (échantillon 10) ont des activités antimicrobiennes semblables, ce qui indique que la position des méthyles en C29 et C30 (respectivement portés par deux carbones voisins ou géminés) (**Figure 14** ; **Tableau 6**) n'a pas d'influence. En revanche, pour l' α -amyrine (échantillon 11), l'uvaol (échantillon 12) et l'ursolaldéhyde (échantillon 6), nous notons une perte d'activité. En conséquence, le remplacement de la fonction acide en position C28 (acides ursolique et oléanolique) respectivement par un groupement méthyle, un alcool primaire ($-\text{CH}_2\text{-OH}$) ou encore un aldéhyde est responsable de la perte d'activité.

Ainsi, il ressort de ces résultats que les amyrines et leurs esters d'acides gras présents dans l'extrait brut à l'hexane et les fractions H₄, H₅ et H₇, ne sont pas actifs sur les souches bactériennes. Ce résultat est en accord avec ceux reportés par [Diaz-Ruiz et al.](#)

(2012), selon lesquels, les molécules sus-citées ne sont pas actives sur *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* et *S. oralis* (CMI > 1 g/L). Par ailleurs, les acides ursolique et oléanolique sont les deux triterpènes responsables de l'activité antibactérienne sur les 3 bactéries à Gram positif sélectionnées. Ces résultats vont dans le même sens que ceux décrits dans la littérature. En effet, à titre d'exemple, selon Catteau et al. (2017), les acides ursolique et oléanolique sont actifs sur la souche *S. aureus* (résistante à la méthicilline) à des CMI de 8 - 16 mg.L⁻¹ et 32 - 128 mg.L⁻¹ respectivement.

Parallèlement, la composition chimique des baies d'*I. aquifolium* de Corse a fait l'objet d'une étude détaillée dans la partie suivante de ce chapitre (paragraphe II.3.).

II.3. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE BAIES D'*ILEX AQUIFOLIUM* DE CORSE

II.3.1. EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE BAIES DE HOUX

Les baies d'*Ilex aquifolium* ont été récoltées en novembre 2017 dans la forêt communale d'Isolacciu di Fium'Orbu et stockées à -60 °C. Le végétal (734 g) a été broyé dans l'azote liquide. Dans le but d'éliminer d'éventuels composés à chaînes grasses, les fruits ont été, dans un premier temps, extraits à chaud à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'hexane pendant 48 h. Après évaporation de la solution hexanique, 2,018 g d'extrait ont été obtenus, soit un rendement de 0,3 % par rapport à la masse sèche de végétal.

Le marc a été extrait suivant le même procédé avec 600 mL de dichlorométhane pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 1,078 g a été obtenu (rendement de 0,15 % par rapport à la masse sèche de végétal). L'extrait brut au dichlorométhane ainsi obtenu a été soumis à une analyse par RMN ¹³C (spectre enregistré dans le CDCl₃ puis dans le DMSO-*d*₆). L'interrogation des bibliothèques de spectres propres au laboratoire nous a permis d'identifier l'α-amyrine, l'acide oléanolique et l'acide

ursolique (également présents dans les feuilles). L' α -amyrine et l'acide ursolique avaient déjà été identifiés dans les baies d'*Ilex aquifolium* d'Allemagne (Thomas et Budzikiewicz, 1980). En revanche, à notre connaissance, l'acide oléanolique n'est donc décrit que dans les baies de houx commun de Corse.

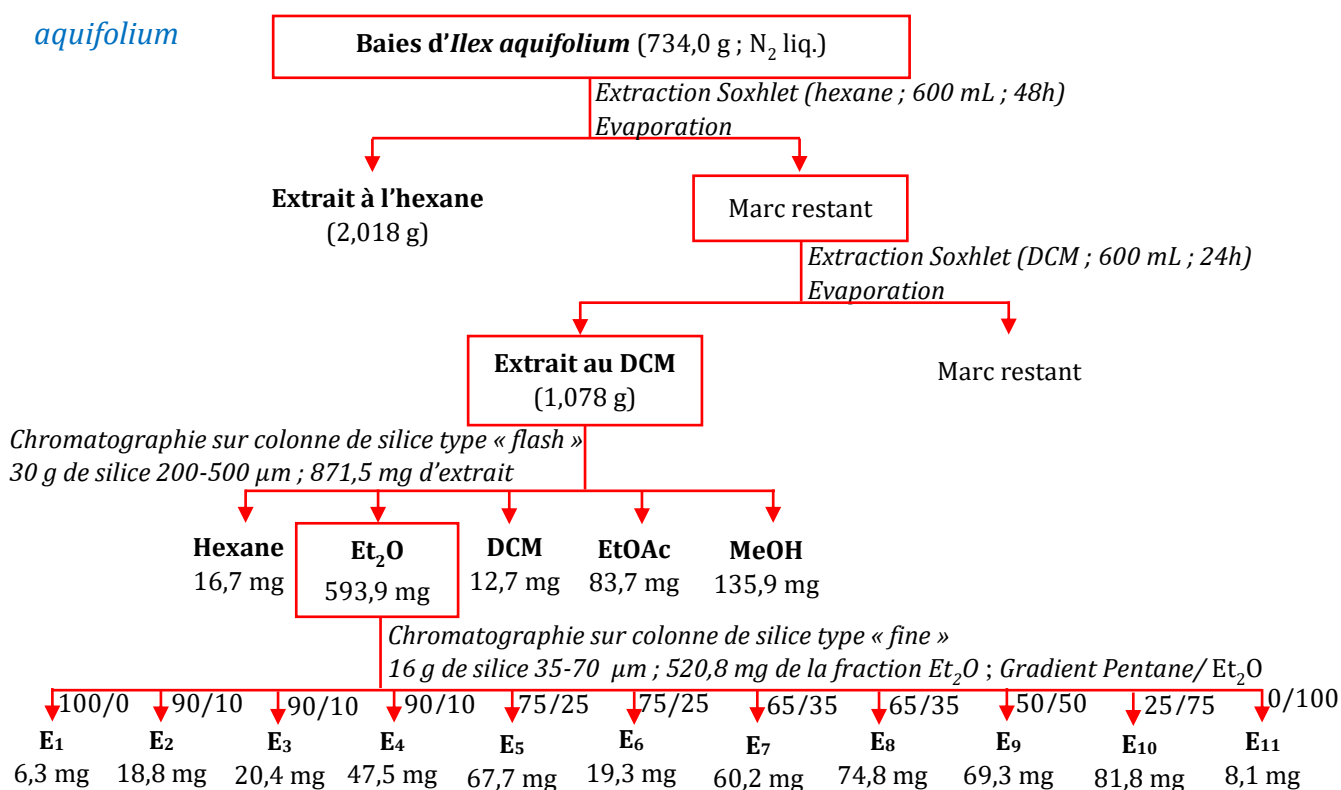
Par ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane, deux séries de raies de résonance ayant des intensités relativement importantes et des valeurs voisines sont restées non attribuées. La première série correspondant à la molécule majoritaire comprends les signaux suivants : 39,97 ppm, 66,79 ppm, 78,02 ppm, 111,60 ppm, 120,03 ppm, 143,42 ppm, 162,84 ppm et un signal à 173,34 ppm indiquant la présence d'une fonction ester. La seconde série comprend les signaux : 37,24 ppm, 64,46 ppm, 76,29 ppm, 112,66 ppm, 122,12 ppm, 137,24 ppm, 162,59 ppm et 173,38 ppm.

L'ensemble de ces déplacements chimiques correspond manifestement à deux molécules isomères possédant une fonction ester. Afin d'aller plus avant dans la détermination de la composition chimique de l'extrait au dichlorométhane, nous avons soumis ce dernier à une chromatographie sur colonne ouverte de silice.

Dans la suite de ce travail, nous décrirons uniquement les fractions de chromatographie qui ont permis l'identification de molécules supplémentaires.

II.3.1.1. Chromatographie sur colonne de silice de type « flash » de l'extrait de baies au dichlorométhane

Un échantillon de 871,5 mg d'extrait au dichlorométhane de baies d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200-500 μm ; 60 Å ; 30 g) à l'aide de cinq solvants de polarité croissante (hexane, oxyde de diéthyle, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). A l'issue de cette chromatographie, cinq fractions ont été obtenues (Figure 15).

Figure 15. Schéma de l'extraction et du fractionnement de l'extrait de baies d'*Ilex aquifolium*

Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol ; Et₂O, oxyde de diéthyle.

Le spectre RMN ¹³C de la fraction obtenue au dichlorométhane (**Figure 16**), comporte essentiellement deux séries de huit signaux homogènes entre eux (proportions 2:1) appartenant manifestement aux deux molécules isomères recherchées. Les signaux de la molécule majoritaire ont été différenciés à partir de la séquence DEPT135 (**Annexe 6**) comme suit :

- deux carbones sp² quaternaires suggérant une fonction ester ($\delta_c = 162,77$ ppm et $\delta_c = 173,28$ ppm) ;
- trois groupes méthines dont les carbones sont hybridés sp² ($\delta_c = 143,34$ ppm, $\delta_c = 120,07$ ppm, et $\delta_c = 111,65$ ppm) ;
- Deux groupes méthines reliés à un oxygène ($\delta_c = 66,82$ ppm et $\delta_c = 77,97$ ppm) ;
- un méthylène ($\delta_c = 40,01$ ppm).

L'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire et de la littérature n'ayant fourni aucun résultat, la fraction au dichlorométhane a, par conséquent, été

soumise à une série d'analyses supplémentaires par RMN 1D (^1H), RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY) (**Annexes 5-10**) et CPG-SM (**Figure 16** ; **Tableau 7**). Les données obtenues en SM (masse molaire : 152 g.mol^{-1}) associées aux données RMN précédentes indiquent que la formule brute de la molécule recherchée est $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. Ce composé contient donc cinq centres d'insaturation.

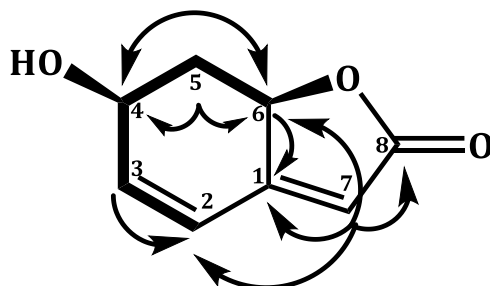
La corrélation relevée sur le spectre COSY entre le doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,32 \text{ ppm}$ ($^3J_{\text{cis}} = 9,8 \text{ Hz}$; $\delta_{\text{C}} = 143,34 \text{ ppm}$; C3) et le doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 6,58 \text{ ppm}$ ($^3J_{\text{cis}} = 9,8 \text{ Hz}$ et $^4J = 2,4 \text{ Hz}$; $\delta_{\text{C}} = 120,07 \text{ ppm}$; C2) indique la présence d'un système éthylénique (**Tableau 7**). De plus, les valeurs des déplacements chimiques associées aux corrélations HMBC entre le singulet à $\delta_{\text{H}} = 5,83 \text{ ppm}$ ($\delta_{\text{C}} = 111,65 \text{ ppm}$; C7) et le signal du carbone quaternaire C1 ($\delta_{\text{C}} = 162,77 \text{ ppm}$) indiquent la présence d'un second système éthylénique, (trisubstitué) et vraisemblablement conjugué au groupe ester. Sur les cinq centres d'insaturation que possède le composé, trois correspondent à des doubles liaisons (deux liaisons C=C et une C=O), les deux restants se rapportent, par conséquent, à deux cycles. Ces données suggèrent donc la présence d'un ester bicyclique de type γ -lactone α,β -insaturée. La structure partielle γ -lactone est confirmée par les corrélations HMBC entre le signal du proton à $\delta_{\text{H}} = 5,83 \text{ ppm}$ ($\delta_{\text{C}} = 111,65 \text{ ppm}$; C7) et ceux des carbones C8 ($\delta_{\text{C}} = 173,28 \text{ ppm}$) et C1 ($\delta_{\text{C}} = 162,77 \text{ ppm}$) ainsi que la corrélation HMBC entre le signal du proton à $\delta_{\text{H}} = 4,88 \text{ ppm}$ ($\delta_{\text{C}} = 77,97 \text{ ppm}$; C6) et celui du carbone C1 ($\delta_{\text{C}} = 162,77 \text{ ppm}$).

Les corrélations observées sur le spectre COSY (**Annexe 9**) entre les protons portés par les carbones à $\delta_{\text{C}2} = 120,07 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}3} = 143,34 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}4} = 66,82 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}5} = 40,01 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}6} = 77,97 \text{ ppm}$ indiquent l'enchaînement $-\text{HC}=\text{HC}-(\text{HO})\text{HC}-\text{H}_2\text{C}-\text{HC}-$ qui forme un cycle cyclohexénique relié au cycle γ -lactone par les carbones C1 et C6 (**Tableau 7**). Cette sous structure est d'ailleurs confirmée par les corrélations observées sur le spectre HMBC (**Annexe 8**) entre les protons du méthylène (H5) et les carbones C4 et C6, et entre le signal du proton H7 et celui du carbone C2.

L'ensemble des données spectrales décrites précédemment conduisent à une molécule possédant un cycle γ -lactone α,β -insaturée et un second cycle à six carbones comportant une fonction alcool en position β d'une double liaison conjuguée à celle du premier cycle. Des recherches bibliographiques nous conduisent à l'identification de la ménisdaurilide, dont les valeurs en RMN ^{13}C reportées par Otsuka et al.

(1993), correspondent globalement à celles relevées sur le spectre de la fraction au dichlorométhane (**Tableau 7**). D'après les auteurs, cette molécule possède une stéréochimie *cis* entre le groupement alcool et l'oxygène sp^3 de la fonction ester du cycle lactone, ce qui est confirmé dans nos analyses RMN 2D par la corrélation entre les protons H4 et H6 sur le spectre NOESY (**Annexe 10**).

Tableau 7. Structure et déplacements chimiques de la ménisdaurilide



Ménisdaurilide

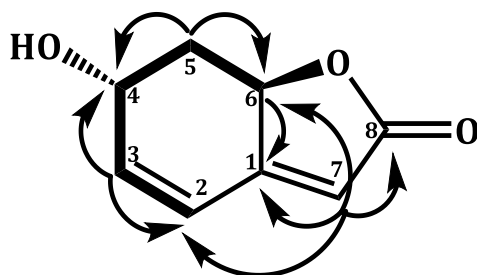
n°C	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$ (ppm)	δ_{H} (multiplicité ; J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	162,77	163,3	-	-	-	-
2	120,07	119,8	6,58 (dd ; 9,8 ; 2,4)	4 ; 6	3 ; 4	3 ; 4 ; 6 ; 7
3	143,34	144,0	6,32 (large d ; 9,8)	1 ; 2 ; 5	2 ; 4 ; 5	2 ; 4 ; 5
4	66,82	66,7	4,65 (large m)	2	2 ; 3 ; 5	2 ; 3 ; 5 ; 6
5	40,01	39,9	2,95 (large dt ; 10,9 ; 5,1)	1 ; 3 ; 4 ; 6	3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7	3 ; 4 ; 5 ; 6
			1,68 (dt ; 13,2 ; 10,9)	4 ; 6	4 ; 5 ; 6	3 ; 4 ; 5 ; 6
6	77,97	78,3	4,88 (ddd ; 13,2 ; 5,1 ; 1,6)	1 ; 5	5 ; 7	2 ; 4 ; 5 ; 7
7	111,65	111,3	5,83 (large s)	1 ; 2 ; 6 ; 8	-	2 ; 6
8	173,28	173,7	-	-	-	-

Notes : δ_{C} , déplacements chimiques expérimentaux ; $\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$, numérotation des carbones et déplacements chimiques selon *Otsuka et al. (1993)* ; s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; m, multiplet ; — = principales corrélations COSY ; = principales corrélations HMBC ; = principale corrélation NOESY.

Par ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction de chromatographie au dichlorométhane, nous observons une seconde série de huit signaux d'intensités homogènes :

- deux carbones quaternaires suggérant une fonction ester ($\delta_{\text{C}} = 162,54$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 173,34$ ppm) ;
- trois groupes méthines dont les carbones sont hybridés sp^2 ($\delta_{\text{C}} = 137,19$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 122,17$ ppm, et $\delta_{\text{C}} = 112,71$ ppm) ;
- deux groupes méthines reliés à un oxygène ($\delta_{\text{C}} = 64,50$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 76,24$ ppm);
- un méthylène ($\delta_{\text{C}} = 37,26$ ppm).

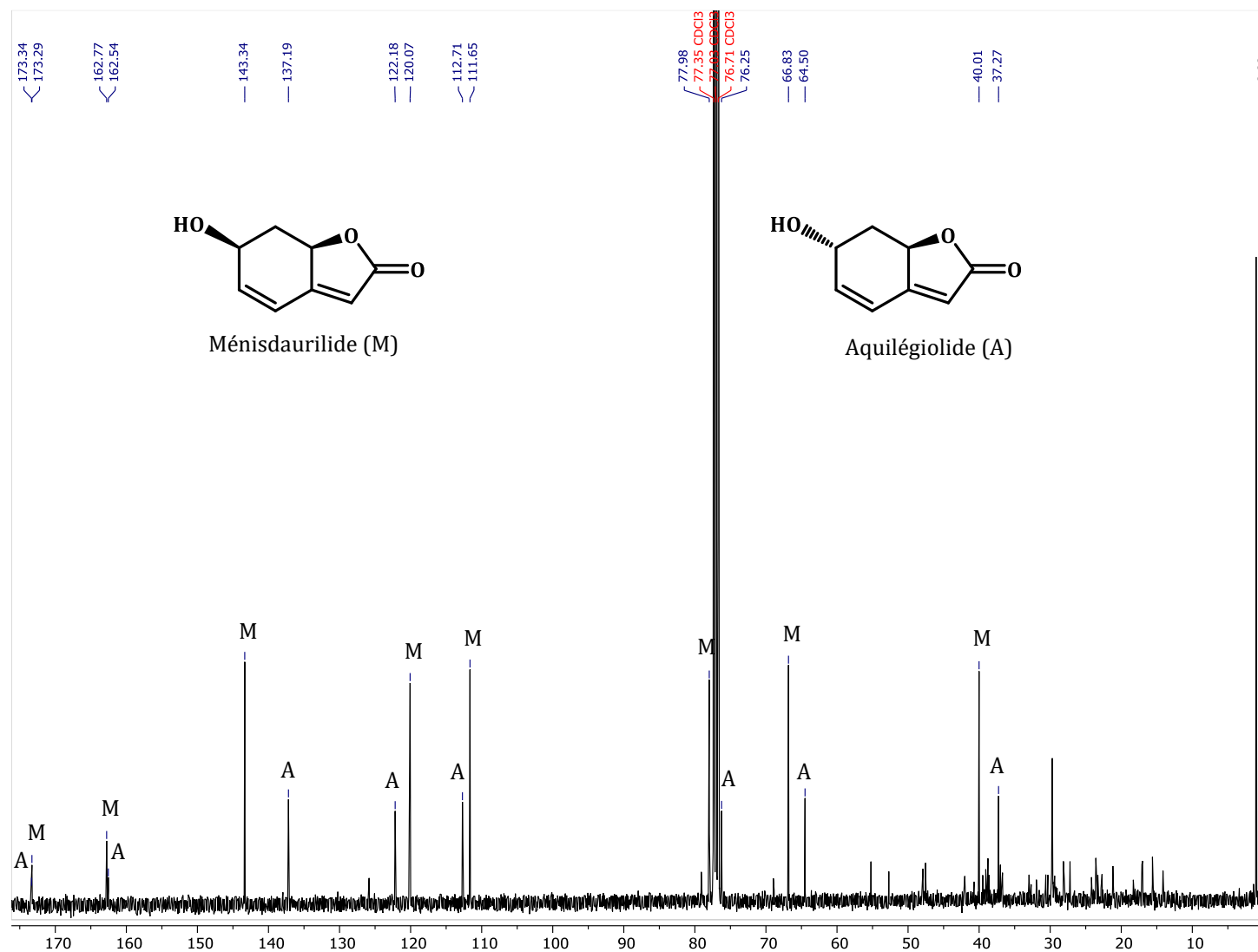
Les données issues des spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) et de la SM (masse molaire : 152 g.mol^{-1}), nous orientent une nouvelle fois vers un composé de formule brute $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ vraisemblablement diastéréoisomère de la ménisdaurilide. Les informations relevées sur les spectres RMN 2D (**Annexes 7-10**) permettant de confirmer la structure du composé. En effet, la structure partielle γ -lactone α,β -insaturée est attestée par les corrélations HMBC entre le signal du proton H7 et ceux des carbones C8 et C1 ainsi que par la corrélation entre le signal du proton H6 et celui du carbone C1 (**Tableau 8**). Le motif cyclohexénique est quant à lui confirmé par les corrélations observées sur le spectre COSY (**Annexe 9**) entre les protons portés par les carbones C2, C3, C4, C5 et C6. Des recherches bibliographiques nous permettent d'identifier l'aquilégiolide, diastéréoisomère de la ménisdaurilide (stéréochimie *trans* vs. *cis*), dont les valeurs RMN ^{13}C décrites par **Audran et Mori (1998)**, sont en accord avec celles du spectre de la fraction étudiée (**Tableau 8 ; Figure 16**).

Tableau 8. Structure et déplacements chimiques de l'aquilégolide**Aquilégolide**

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	δ_H (ppm) (multiplicité ; J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	162,54	163,1	-	-	-	-
2	122,17	121,7	6,62 (d ; 9,7)	1 ; 4 ; 7 ; 6	3	3 ; 4 ; 6 ; 7
3	137,19	137,8	6,32 (nd)	4 ; 5	2 ; 4	4 ; 5
4	64,50	64,2	4,66 (m)	-	3 ; 5	2 ; 3 ; 5
5	37,26	37,1	2,64 (large dd ; 12,8 ; 5,1)	1 ; 3 ; 4 ; 6	4 ; 5 ; 6	3 ; 4 ; 5 ; 6
			1,81 (td ; 12,8 ; 4,12)	1 ; 6	4 ; 5 ; 6	3 ; 4 ; 5 ; 6
6	76,24	76,5	5,30 (ddd ; 12,6 ; 5,1 ; 1,7)	1	5	2 ; 5 ; 5 ; 7
7	112,71	112,1	5,83 (large s)	1 ; 2 ; 6 ; 8	5 ; 6	2 ; 6
8	173,34	173,8	-	-	-	-

Notes : numérotation des carbones selon [Otsuka et al. \(1993\)](#) ; δ_c , déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt} , déplacements chimiques selon [Audran et Mori \(1998\)](#) ; s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; m, multiplet ; nd, non déterminé. — = principales corrélations COSY ; — = principales corrélations HMBC.

Figure 16. Spectre RMN ^{13}C de la fraction obtenue au dichlorométhane



Les déplacements chimiques de la ménisdaurilide et de l'aquilégiolide enregistrés sur notre spectromètre ont alors été référencés dans la bibliothèque de spectres « Lactones » du laboratoire.

La ménisdaurilide et l'aquilégiolide ont été identifiées pour la première fois, il y a près de 40 ans, dans des racines d'*Aquilegia atrata* (Guerriero et Pietra, 1984). Par la suite, ces composés ont été isolés dans plusieurs végétaux des genres *Phyllanthus* et *Securinega* (Bardají et al., 2008). Ils ont été récemment identifiés pour la première fois dans le genre *Ilex* dans un extrait de feuilles d'*I. kaushue* (Kakumu et al., 2022). Cependant, aucune étude ne fait mention de ces lactones dans des extraits aux solvants d'*Ilex aquifolium*. Concernant les activités biologiques, Yi et al. (2015) ont montré que la ménisdaurilide possédait une activité anti-hépatite B modérée (80,7 $\mu\text{g/mL}$) par rapport à la lamivudine (0,1 $\mu\text{g/mL}$) utilisée comme référence dans l'étude. De plus, ces deux lactones ont la capacité d'induire l'apoptose des cellules tumorales humaines (McNulty et al., 2007).

Par ailleurs, en dehors de l'étude de la fraction obtenue au dichlorométhane, l'étude de la fraction obtenue à l'oxyde de diéthyle (de masse plus importante *i.e.* 593,9 mg), a permis l'identification de l' α -amyrine, l'acide oléanolique et l'acide ursolique à l'aide de la bibliothèque de spectres « Triterpènes » du laboratoire. Néanmoins, sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction, plusieurs séries de signaux restaient non attribuées. Afin d'aller plus avant dans la détermination de la composition chimique de cette fraction, nous avons mis en œuvre une nouvelle chromatographie sur colonne ouverte de silice de type plus « fine ».

II.3.1.2. Chromatographie sur colonne de type « fine » de la fraction à l'oxyde de diéthyle

La fraction à l'oxyde de diéthyle (520,8 mg) a été re-chromatographiée sur colonne de silice (16,0 g) de granulométrie fine (35-70 μm). A l'issue de cette séparation, onze sous-fractions (E₁ à E₁₁) ont été obtenues avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (Figure 15). Ces fractions ont toutes été analysées par RMN ^1H , ^{13}C et DEPT135.

L'interrogation des différentes bibliothèques de spectres propres au laboratoire a permis d'identifier :

- Des triglycérides, dans la sous-fraction E₄ ;
- l'α-amyrine, la β-amyrine, l'ursolaldéhyde, l'oléanaldéhyde ainsi que le lupéol et le pseudotaraxastérol présents en faibles teneur, dans la sous-fraction E₅ ;
- l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'uvaol, dans la sous-fraction E₇ ;
- l'acide oléanolique et l'acide ursolique, dans les sous-fractions E₈ et E₉ ;
- la ménisdaurilide et l'aquilégilolide, dans les sous-fractions E₁₀ et E₁₁.

Les sous-fractions E₂ et E₃ contiennent des esters d'α-amyrine et de β-amyrine. Afin d'identifier et de quantifier les chaînes grasses de ces esters, nous avons décidé de rassembler ces deux sous-fractions et de soumettre le mélange à une analyse par CPG (associée à l'utilisation des indices de rétention) et CPG-SM (bibliothèques de spectres de masse propres au laboratoire et commerciales) après une étape classique d'hydrolyse de l'ester suivie d'une étape de méthylation de la fonction acide ainsi obtenue ([Metcalf et al., 1966](#)). L'ensemble des résultats nous a permis d'identifier cinq esters méthyliques d'acides gras également présents dans les feuilles de houx : l'acide palmitique (C16:0 ; 43,3 %), l'acide linoléique (C18:2 ; 17,14 %), l'acide oléique (C18:1 ; 15,7 %), l'acide stéarique (C18:0 ; 7,2 %) et l'acide linoléinique (C18:3 ; 3,6 %).

Sur le spectre de la sous-fraction E₆ nous relevons deux séries de signaux homogènes entre eux. L'interrogation des bibliothèques de spectres propres au laboratoire et issues de la littérature ne nous permettent pas d'identifier ces deux composés. La première série compte cinq signaux différenciés comme suit à partir de la séquence DEPT135 :

- un méthine ($\delta_c = 191,32$ ppm : fonction aldéhyde) ;
- deux autres méthines d'intensité double ($\delta_c = 132,51$ ppm et $\delta_c = 116,03$ ppm) ;
- deux carbones quaternaires ($\delta_c = 162,04$ ppm et $\delta_c = 129,56$ ppm).

Le spectre RMN ¹H indique la présence de quatre protons aromatiques ($\delta_H = 6,95$ ppm et deux à $\delta_H = 7,79$ ppm), d'un proton d'une fonction aldéhyde ($\delta_H = 9,84$ ppm) et d'un dernier proton appartenant vraisemblablement à une fonction alcool. Ces données RMN ¹H et ¹³C nous orientent vers un composé aromatique symétrique comportant un alcool et un aldéhyde : le p-hydroxybenzaldéhyde, un aldéhyde phénolique. Le

déplacement chimique du méthine le plus blindé ($\delta_{\text{C}} = 116,03$ ppm) est caractéristique de la position β dans les dérivés phénoliques, le carbone quaternaire déblindé à $\delta_{\text{C}} = 162,04$ ppm étant lié à l'alcool du phénol. L'analyse par CPG-SM de la fraction E_6 nous permet de confirmer l'identification du p-hydroxybenzaldéhyde par interrogation de bibliothèques de masse commerciales à notre disposition (notamment NIST). Enfin, une recherche bibliographique en RMN ^{13}C certifie également l'identification du p-hydroxybenzaldéhyde, par comparaison des valeurs des déplacements chimiques (**Tableau 9**). En effet, pour ce composé :

- tous les signaux attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de la sous-fraction E_6 et celui du composé de référence ([Jang et al., 2004](#)) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,12 ppm pour les carbones aldéhydique, C2, C3, C5 et C6. Des variations de déplacements chimiques plus importantes sont observées pour les carbones C1 (0,34 ppm) et C4 (0,44 ppm) situés en position α de la fonction aldéhyde et en position α de la fonction hydroxyle, respectivement. Ces variations ne sont pas surprenantes car ce type de groupements est susceptible d'établir des liaisons hydrogènes à l'origine de variations de déplacements chimiques plus importantes.

Les signaux de la seconde molécule encore non identifiée (six raies de résonance) relevés sur le spectre de la sous-fraction E_6 ont également été différenciés comme suit à partir de la séquence DEPT135 (**Annexes 12, 13**):

- Deux méthines d'intensité double ($\delta_{\text{C}} = 129,26$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 116,06$ ppm) ;
- Trois carbones quaternaires ($\delta_{\text{C}} = 155,73$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 121,54$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 118,28$ ppm) ;
- Un méthylène ($\delta_{\text{C}} = 22,83$ ppm).

Comme précédemment, la présence de déplacements chimiques de carbones sp^2 (dont deux méthines d'intensité double ; **Annexe 11**) et de protons aromatiques (deux à $\delta_{\text{H}} = 6,84$ ppm et deux autres à $\delta_{\text{H}} = 7,17$ ppm) nous oriente vers un dérivé phénolique symétrique (molécule à huit carbones). Le carbone quaternaire déblindé à $\delta_{\text{C}} = 155,73$ ppm est lié à l'alcool du phénol ainsi qu'au méthine le plus blindé ($\delta_{\text{C}} = 116,06$ ppm, en position β du groupe -OH). Afin d'élucider complètement la structure de cette molécule dans la sous-fraction E_6 , cette dernière a été soumise à un ensemble d'analyses par RMN

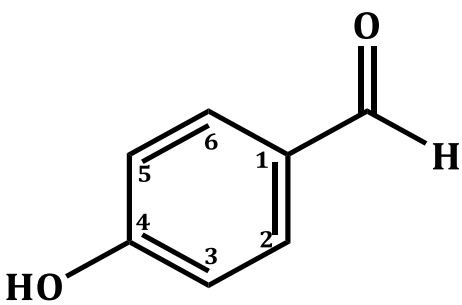
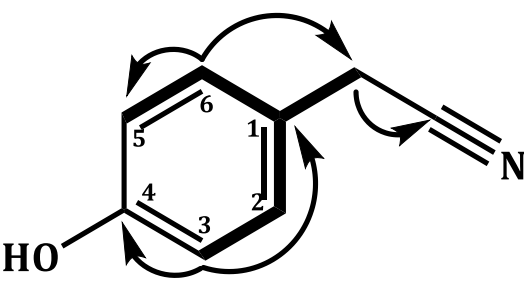
2D (HSQC, HMBC et COSY). Les corrélations HSQC, HMBC et COSY (**Annexes 14-16**) confirment la structure partielle phénol. Par ailleurs, les corrélations HMBC indiquent également que le méthylène ($\delta_H = 3,67$ ppm ; $\delta_C = 22,83$ ppm) est situé entre les carbones quaternaires qui résonnent à $\delta_C = 121,54$ ppm (position para du phénol) et à $\delta_C = 118,28$ ppm qui est manifestement relié à un azote par une triple liaison (enchaînement C-CH₂-C $\equiv$ N). Nous en concluons que la molécule recherchée est le (p-hydroxyphényl)acétonitrile. De nouveau, l'analyse par CPG-SM de la fraction E₆ nous permet de confirmer l'identification de ce composé à l'aide des bibliothèques commerciales à notre disposition. Par ailleurs, les données RMN relevées dans la bibliographie pour cette molécule sont en accord avec celles que nous décrivons (**Tableau 9** ; AIST, 1999). Les déplacements chimiques du p-hydroxybenzaldéhyde et du p-(hydroxyphényl)acétonitrile enregistrés sur notre spectromètre et dans nos conditions opératoires, ont alors été référencés dans la bibliothèque de spectres « Phénols » du laboratoire.

Le p-hydroxybenzaldéhyde a déjà été identifié dans le genre *Ilex*, notamment dans les feuilles du houx d'Amérique *Ilex opaca* (Hedges et Parker, 1976). Ce composé possède une activité anti-inflammatoire modérée (IC₅₀ = 62,4 μ M) par rapport à la référence utilisée (IC₅₀ = 44,5 μ M) (Quang et al., 2021). Une autre étude a mis en évidence les propriétés anti-angiogénique et anti-nociceptive du p-hydroxybenzaldéhyde suggérant ainsi sa possible utilisation dans le traitement de maladies cancéreuses et inflammatoires (Lim et al., 2008).

Pour sa part, le (p-hydroxyphényl)acétonitrile a été identifié au préalable dans divers extraits : racines et graines torréfiées de *Moringa oleifera* (Hafizur et al., 2018 ; Villasenor, 1989), bois de *Drypetes gossweileri* (Ata et al., 2011), dans un extrait du tourteau de colza (Nagatsu et al., 2004), fleurs d'*Angelica furcijuga* (Matsuda et al., 2005) ou encore dans l'huile essentielle de graines de *Brassica hirta* (Miyazawa et Kawata, 2006). Concernant les activités biologiques, ce composé a montré une meilleure activité antioxydante que la vitamine E et une activité comparable à l'antioxydant de synthèse, le BHA (4-*tert*-butyl-3-hydroxyanisole), pris comme références dans l'étude (Nagatsu et al., 2004). Par ailleurs, Ata et al. (2011) ont mis en évidence les propriétés antimicrobienne et antifongique modérées du (p-hydroxyphényl)acétonitrile (CMI = 48 μ M et 16 μ M, respectivement) par rapport aux références utilisées dans ce travail (CMI = 0,6 μ M et

<8 μ M, respectivement). Une autre étude menée par et [Hafizur al. \(2018\)](#), a mis en évidence le potentiel du (p-hydroxyphényl)acétonitrile à inhiber le taux de glucose sanguin chez le rat et donc sa capacité à traiter le diabète de type-2.

Tableau 9. Structure et déplacements chimiques du p-hydroxybenzaldéhyde et du (p-hydroxyphényl)acétonitrile

 p-hydroxybenzaldéhyde			 (p-hydroxyphényl)acétonitrile				
n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	δ_H (ppm) (multiplicité ; J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY
1	129,56	129,9	121,54	121,37	-	-	-
2 et 6	132,51	132,5	129,26	129,28	7,17 (large d)	2; 3; 4; 5; 6; CH ₂	3; 5; CH ₂
3 et 5	116,03	116,0	116,06	116,19	6,84 (large d)	1; 2; 3; 4; 5; 6	2; 6
4	162,04	161,6	155,73	155,83	-	-	-
CHO	191,32	191,2	-	-	-	-	-
CH ₂	-	-	22,83	22,69	3,67 (s)	1; 2; 4; 6; C≡N	2; 6
C≡N	-	-	118,28	118,56	-	-	-

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; J, constantes de couplage; n°C, δ_c^{litt} , numérotation des carbones et déplacements chimiques du p-hydroxybenzaldéhyde selon [Jang et al. \(2004\)](#); déplacements chimiques du (p-hydroxyphényl)acétonitrile selon le [National Institute of Advanced Industrial Science and Technology \(AIST\), 1999](#).

L'extraction au dichlorométhane de baies d'*I. aquifolium* poussant en Corse suivi de deux chromatographies sur colonne ouverte de silice successives a donc permis d'identifier plusieurs triterpènes préalablement identifiés dans les feuilles, à partir des données spectrales RMN ^{13}C du laboratoire. Il s'agit d'esters d' α - et de β -amyrine, de l' α -amyrine, de la β -amyrine, de l'acide oléanolique, de l'acide ursolique, de l'ursolaldéhyde, de l'oléanalaldéhyde, du pseudotaraxastérol, du lupéol et de l'uvaol. De plus, deux lactones, la ménisdaurilide, l'aquilégolide, et deux dérivés phénoliques, le p-hydroxybenzaldéhyde et le (p-hydroxyphényl)acétonitrile ont été identifiés à l'aide des données spectrales issues de la littérature.

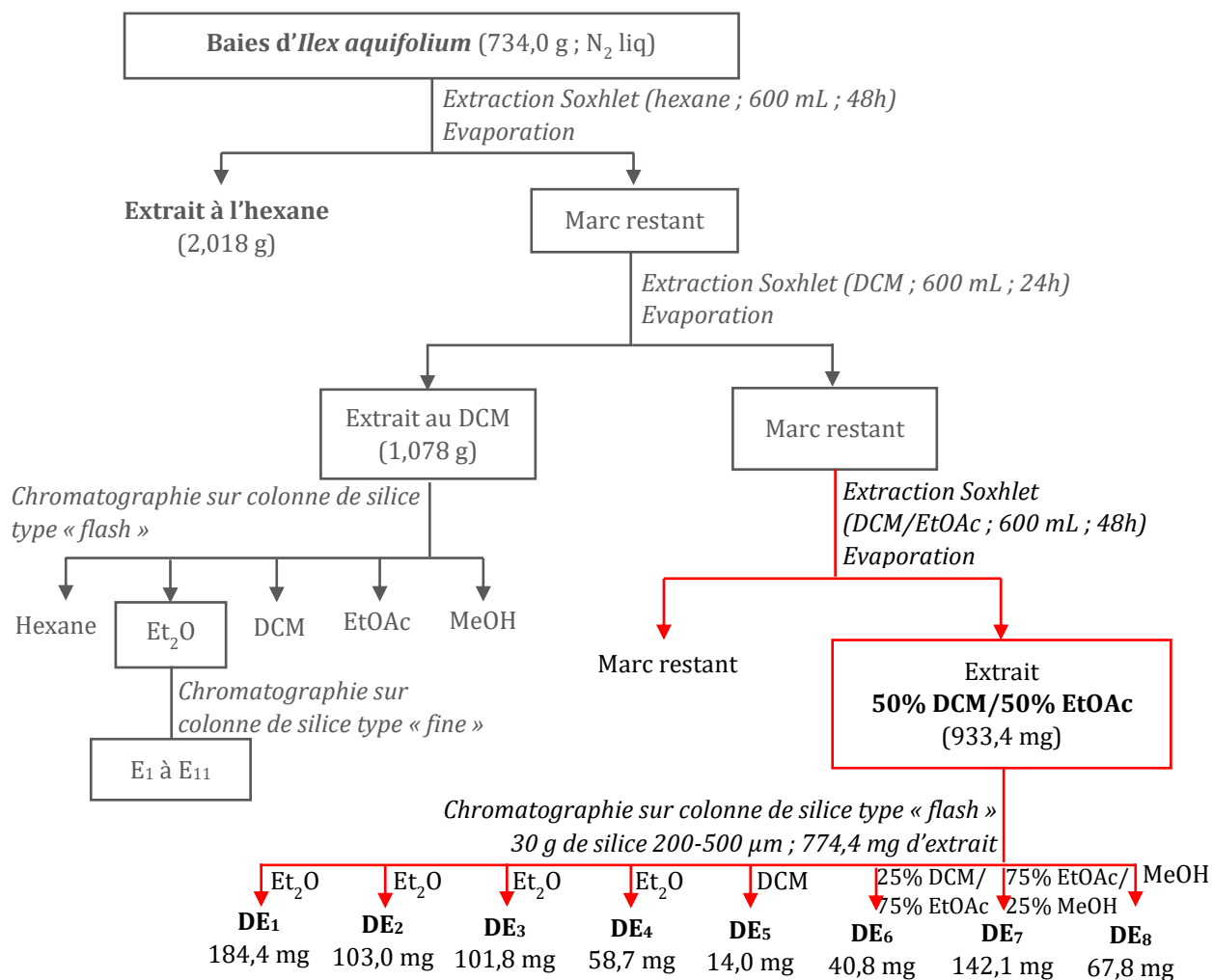
II.3.2. EXTRAIT DE BAIES DE HOUX AVEC UN MELANGE DICHLOROMETHANE/ACETATE D'ETHYLE (50/50)

Le marc de baies restant a été extrait à nouveau avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50, v/v) pendant 48h. Après évaporation du solvant, 933,4 mg d'extrait ont été obtenus, soit un rendement de 0,14 % par rapport à la masse sèche de végétal.

L'extrait brut a été soumis, en premier lieu, à une analyse par RMN ^{13}C . L'interrogation des bibliothèques de spectres propres au laboratoire nous a permis d'identifier à nouveau l'acide oléanolique, l'acide ursolique, la ménisdaurilide et l'aquilégolide ([paragraphe II.3.1.1](#)). Par ailleurs, un monosaccharide, le β -D-fructopyranose, a été identifié avec la bibliothèque « Sucres » du laboratoire. Cependant, sur le spectre RMN ^{13}C de l'extrait brut, plusieurs raies de résonance sont restées non attribuées. Afin d'identifier ces molécules, l'extrait brut a été soumis à une chromatographie sur colonne ouverte de silice.

Un échantillon de 774,4 mg d'extrait a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200-500 μm ; 60 Å ; 30 g) à l'aide de quatre solvants de polarité croissante (oxyde de diéthyle, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). A l'issue de cette chromatographie, huit fractions (DE₁ à DE₈) ont été obtenues ([Figure 17](#)). Ces fractions ont toutes été analysées par RMN ^{13}C .

Figure 17. Schéma du fractionnement de l'extrait de baies d'*Ilex aquifolium* obtenu au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle



Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol ; Et₂O, oxyde de diéthyle

Les diverses bibliothèques de spectres du laboratoire ont permis d'identifier à nouveau:

- l'acide oléanolique et l'acide ursolique aux côtés de l' α -amyrine et de la β -amyrine en faibles quantités, dans la fraction DE₂ ;
- l'acide oléanolique et l'acide ursolique, dans la fraction DE₃ ;
- la ménisdaurilide et l'aquilégiolide, dans les fractions DE₄, DE₅ et DE₆.

Par ailleurs, à l'aide des données spectrales du laboratoire, nous identifions trois dérivés phénoliques : l'acide vanillique et l'acide p-hydroxybenzoïque dans la fraction DE₂

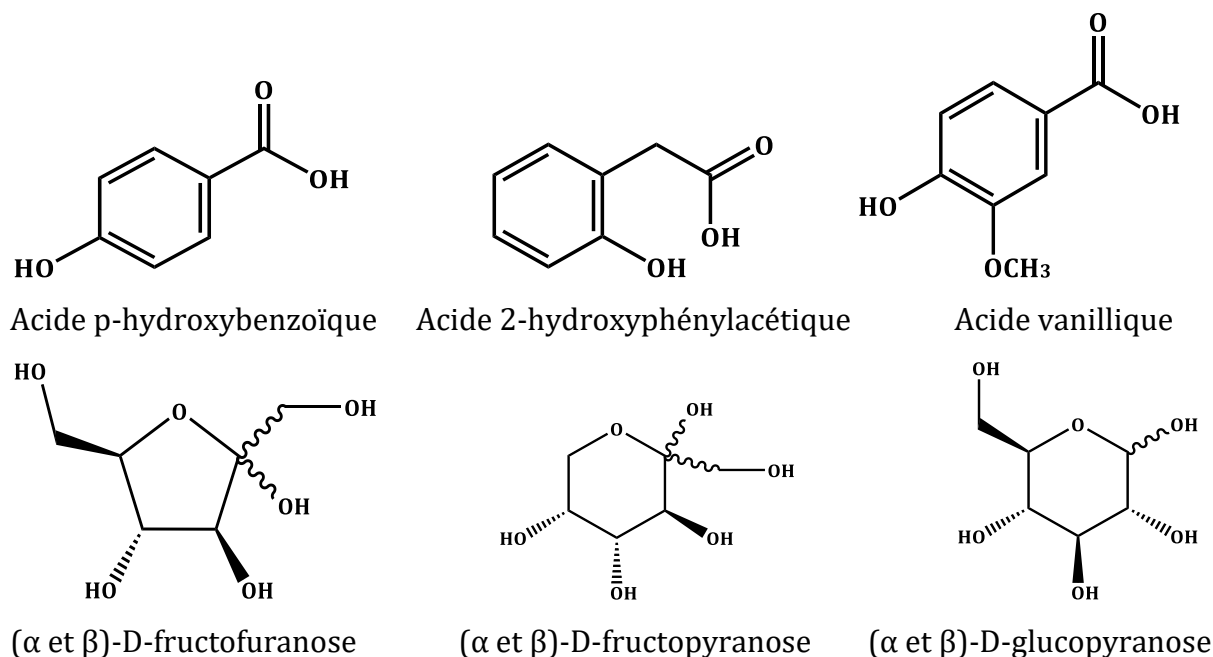
ainsi que l'acide 2-hydroxyphénylacétique dans la fraction DE₃ (**Figure 18**). De plus, quatre monosaccharides ont été identifiés dans les fractions DE₇ et DE₈ à l'aide de la bibliothèque « Sucres » du laboratoire. Il s'agit de l' α -D-glucopyranose, du β -D-glucopyranose, de l' α -D-fructopyranose et du β -D-fructopyranose identifié précédemment dans l'extrait brut (**Figure 18**). Deux autres monosaccharides, l' α -D-fructofuranose et le β -D-fructofuranose, ont été identifiés à l'aide des données issues de la littérature. En 1980, Thomas et Budzikiewicz avaient déjà décrit la présence, dans des extraits de baies d'*I. aquifolium*, du glucose et du fructose (anomères non précisés) ainsi que de l'acide vanillique et de l'acide p-hydroxybenzoïque. Ce dernier possède des propriétés antioxydantes (Velika et Kron, 2012) et antimicrobiennes (Cho et al., 1998). Pour sa part, l'acide vanillique présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, immunostimulantes, neuroprotectrices, hépato-protectrices, cardioprotectrices et anti-apoptotiques (Sharma et al., 2020).

Le spectre de la fraction DE₁ présente des déplacements chimiques caractéristiques des triglycérides :

- 172,85 ppm, 173,26 ppm et 173,30 ppm (carbones des fonctions esters) ;
- compris entre 127,92 ppm et 130,24 ppm (carbones éthyléniques) ;
- 62,13 ppm, 65,07 ppm, 68,44 ppm et 68,92 ppm (carbones du glycérol) ;
- compris entre 14,08 ppm et 34,21 ppm (carbones aliphatiques).

Afin d'identifier et de quantifier les chaînes grasses de ces triglycérides, la fraction DE₁ a été soumise à une analyse par CPG (associée à l'utilisation des indices de rétention) et CPG-SM (bibliothèques de spectres de masse propres au laboratoire et commerciales) après une étape d'hydrolyse suivie d'une étape de méthylation de la fonction acide ainsi obtenue (Metcalf et al., 1966). L'ensemble des résultats nous a permis d'identifier quatre esters méthyliques d'acides gras : l'acide linoléique (C18:2 ; 37,3 %), l'acide oléique (C18:1 ; 30,0%), l'acide palmitique (C16:0 ; 9,5%), l'acide stéarique (C18:0 ; 2,9%).

Figure 18. Exemples de dérivés phénoliques et de monosaccharides identifiés dans l'extrait brut dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50)



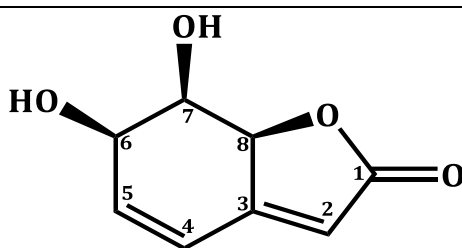
Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C de la fraction DE₆ comporte deux séries de huit raies de résonance d'intensités importantes qui restent non attribuées (**Figure 19**). D'après les valeurs des déplacements chimiques, ces deux molécules possèdent manifestement une structure semblable à la ménisdaurilide et à l'aquilégiolide, les deux lactones bicycliques identifiées précédemment dans l'extrait au dichlorométhane (**paragraphe II.3.1.1**). Selon le spectre DEPT, la molécule majoritaire de la fraction DE₆ possède :

- un carbone quaternaire dont le déplacement chimique suggère une fonction ester ($\delta_{\text{C}} = 176,68$ ppm) et un second carbone quaternaire hybridé sp^2 ($\delta_{\text{C}} = 163,28$ ppm) ;
- trois groupes méthines dont les carbones sont hybridés sp^2 ($\delta_{\text{C}} = 143,02$ ppm ; 121,00 ppm et 113,26 ppm) ;
- trois groupes méthines liés à un oxygène ($\delta_{\text{C}} = 83,47$ ppm, 72,74 ppm et 70,06 ppm).

Comparativement à la ménisdaurilide, nous notons l'absence d'un groupe méthylène, qui est ici remplacé par un groupe méthine CH-OH ($\delta_{\text{C}} = 72,74$ ppm ; C7)

(**Tableau 10**). L'enregistrement du spectre de masse de la fraction DE₆ ne permet pas l'identification de la molécule recherchée. Cependant, les données obtenues confirment la présence d'un second groupe hydroxyle (masse molaire : 168 g.mol⁻¹ vs. 152 g.mol⁻¹ pour la ménisdaurilide). Par conséquent, la molécule recherchée possède la structure de la ménisdaurilide avec un groupe hydroxyle supplémentaire lié au carbone C7. Des recherches bibliographiques nous orientent vers la 7-épi-griffonilide décrite par [De Almeida et al. \(2017\)](#) et dont les valeurs en RMN ^{13}C concordent avec celles relevées sur le spectre de la fraction DE₆ (**Tableau 10**).

Tableau 10. Structure et déplacements chimiques de la 7-épi-griffonilide



7-épi-griffonilide

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)
1	176,68	176,7
2	113,26	113,3
3	163,28	163,3
4	121,00	121,0
5	143,02	143,0
6	70,06	70,1
7	72,74	72,8
8	83,47	83,5

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , Numérotation et déplacements chimiques selon [De Almeida et al. \(2017\)](#).

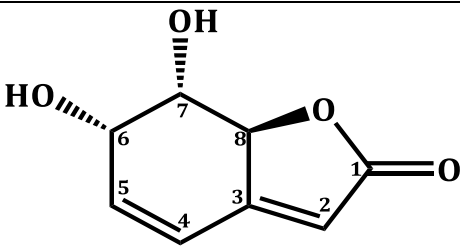
Pour la seconde molécule (minoritaire) contenue dans la fraction DE₆, l'ensemble des données RMN (^{13}C et DEPT) indique qu'il s'agit vraisemblablement d'un diastéréoisomère de la 7-épi-griffonilide (**Figure 19**). En effet, cette molécule possède :

- un carbone quaternaire dont le déplacement chimique suggère une fonction ester ($\delta_c = 176,11$ ppm) et un second carbone quaternaire hybridé sp^2 ($\delta_c = 164,45$ ppm) ;

- trois groupes méthines dont les carbones sont hybridés sp^2 ($\delta_{\text{C}} = 139,75$ ppm ; 123,37 ppm et 113,40 ppm) ;
- trois groupes méthines liés à un oxygène ($\delta_{\text{C}} = 83,45$ ppm, 74,46 ppm et 68,71 ppm).

Des recherches bibliographiques conduisent à l'identification de la dasycarponilide, diastéréoisomère de la 7-épi-griffonilide, dont les données RMN ^{13}C reportées dans la littérature par [De Almeida et al. \(2017\)](#), concordent avec celles relevées sur le spectre de la fraction DE₆ (**Tableau 11**).

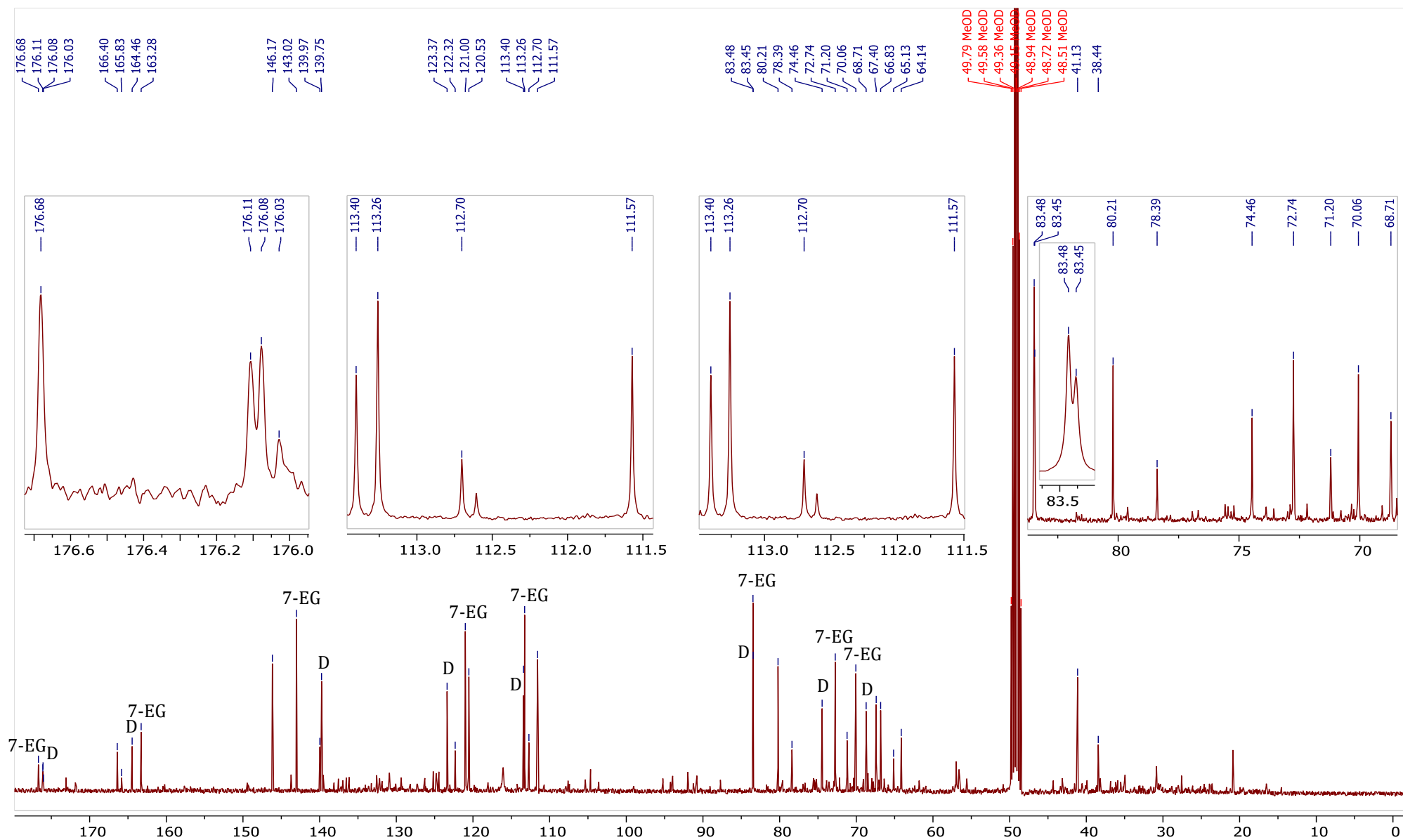
Tableau 11. Structure et déplacements chimiques de la dasycarponilide

 Dasycarponilide		
n°C	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$ (ppm)
1	176,11	176,7
2	113,40	113,4
3	164,45	164,5
4	123,37	123,4
5	139,75	139,8
6	68,71	68,7
7	74,46	74,5
8	83,45	83,5

Notes: δ_{C} , déplacements chimiques expérimentaux; $\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$, Numérotation et déplacements chimiques selon [De Almeida et al. \(2017\)](#).

Les déplacements chimiques de la 7-épi-griffonilide et de la dasycarponilide enregistrés sur notre spectromètre ont alors été référencés dans la bibliothèque de spectres « Lactones » du laboratoire. La 7-épi-griffonilide et la dasycarponilide ont été identifiées ensemble dans les feuilles de *Bauhinia pentandra* ([De Almeida et al., 2017](#)) cependant, aucune étude ne fait mention de ces lactones dans des extraits de végétaux du genre *Ilex*.

Figure 19. Spectre de la fraction DE₆



Notes : 7-EG , raies de résonance de la 7-épi-griffonilide ; D , raies de résonance de la dasycarponilide.

L'extraction avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50) de baies d'*I. aquifolium* poussant en Corse suivie d'une chromatographie sur colonne ouverte de silice a donc permis d'identifier :

- quatre triterpènes déjà identifiés dans les travaux menés sur les extraits de feuilles d'*I. aquifolium* : l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine et la β -amyrine ;
- trois phénols : l'acide vanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide 2-phénylacétique (identifications réalisées à l'aide de la bibliothèque « Phénols » du laboratoire ;
- six monosaccharides : l' α -D-glucopyranose, le β -D-glucopyranose, l' α -D-fructopyranose et le β -D-fructopyranose à l'aide de la bibliothèque « Sucres » du laboratoire ainsi que l' α -D-fructofuranose et le β -D-fructofuranose, à partir des données de la littérature.
- deux lactones bicycliques, la 7-épi-griffonilide et la dasycarponilide, pour la première fois dans le genre *Ilex*, avec les données spectrales issues de la littérature.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FLEURS ET DE RACINES DE *CALICOTOME VILLOSA* PAR RMN ^{13}C



III.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : *CALICOTOME VILLOSA*

III.1.1. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES DE *CALICOTOME VILLOSA*

Le genre *Calicotome* (ou *Calycotome*) appartient à la famille des Fabaceae. Parmi les espèces appartenant à ce genre, cinq sont distribuées dans le bassin Méditerranéen : *C. villosa* (Poir.) Link, *C. spinosa* (L.) Link, *C. infesta* (*C. Presl*) Guss., *C. rigida* (Viv.) Rothm. et *C. fontanesii* Rothm. (Alhage et al., 2018). Le mot *Calicotome* vient du grec ancien « calyx » et signifie « qui a le calice coupé » en référence au calice qui se fend en deux à la floraison. Le terme *villosa* provient du mot latin « villosus » qui signifie « velu » (Servais et Seba, 2018).

Calicotome villosa (Poiret) Link [synonyme : *Cytisus laniger* (Desf.) DC.], est un arbuste épineux qui pousse dans les lieux pierreux où les températures sont relativement douces (Pistelli et al., 2003). Très répandu en Méditerranée, il peut mesurer jusqu'à 2 m de haut (Alhage et al., 2018 ; Loy et al., 2001). Ses branches anguleuses et pubescentes sont vertes quand elles sont jeunes et grisâtres quand elles sont âgées. Ses feuilles alternes sont allongées, ovales, trifoliées et couvertes de duvet. Ses fleurs jaunes, groupées et papilionacées, sont visibles au printemps et possèdent un calice en forme de cloche (Figure 20). Ses gousses subquadrangulaires sont densément duveteuses, épaisses, roussâtres lorsqu'elles sont mûres (Figure 21) et renferment des graines olivacées sombres et rondes (Loy et al., 2001).

Il existe une sous-espèce considérée comme intermédiaire entre *C. villosa* et *C. spinosa* (*C. villosa* ssp. *intermedia*), qui pousse au Maroc, en Algérie et en Espagne (Alhage et al., 2018). Elle diffère de *C. villosa* par ses gousses plates (non subquadrangulaires) à villosité apprimée et une suture ventrale épaissie (faiblement ailée) (Figure 22) (Maire, 1987 ; Guaâdaoui et al., 2016). Toutefois, cette sous-espèce n'est pas présente en Corse. En revanche, des travaux de chimiotaaxonomie montrent des similitudes de composition chimique entre *C. villosa* et *C. villosa* ssp. *intermedia* (Guaâdaoui et al., 2016).



Figure 20. Fleurs, feuilles et épines de *Calicotome villosa*



Figure 21. Gousses et feuilles de *Calicotome villosa*



Figure 22. Fleurs, feuilles, épines et gousses de *Calicotome villosa* ssp. *intermedia*

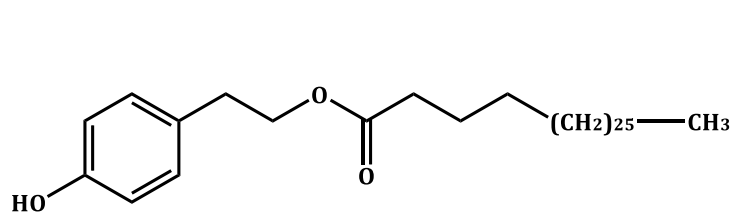
III.1.2. COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES THERAPEUTIQUES DES EXTRAITS

Plusieurs études ont été réalisées dans le but de déterminer la composition chimique d'extraits aux solvants de *C. villosa*, et plus ponctuellement de son huile essentielle. Parallèlement, des travaux ont cherché à mettre en évidence les propriétés thérapeutiques de ces extraits bruts et molécules isolées. Les principales familles chimiques reportées sont :

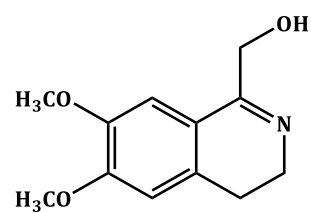
- **Des flavones** telles que la chrysine, l'apigénine, la lutéoline et la 6,8-diméthoxylutéoline qui ont été identifiées dans des extraits au méthanol de parties aériennes (Dessì et al., 2001 ; Pistelli et al., 2003 ; Loy et al., 2001) ;
- **Des isoflavones** parmi lesquelles, la génistéine, retrouvée dans la fraction phénolique d'un extrait au méthanol de feuilles (Dessì et al., 2001 ; Loy et al., 2001) ainsi que la calycosine et la 6,8-diisoprényl-3',4',5,7-tétrahydroxyisoflavone dans les parties aériennes (Pistelli et al., 2003). La daidzéine et l'isoprunétine ont, quant à elles, été identifiées dans un extrait aqueux de feuilles (Guaâdaoui et al., 2016) ;
- **Des dérivés glucosylés de flavones et d'isoflavones** comme la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (Alhage et al., 2018), la 7-O- β -D-glucopyranosylgénistéine, la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosyllutéoline et l'orientine (Pistelli et al., 2003) ont été identifiées dans un extrait au méthanol des parties aériennes. Par ailleurs, la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine et la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine ont également été identifiées dans un extrait au méthanol des parties aériennes de *C. villosa* ssp. *intermedia* (El Antri et al., 2004a ; Cherkaoui-Tangi et al., 2008). La 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine favorise la prolifération cellulaire, possède un potentiel antidiabétique (Alhage et al., 2018) et des propriétés vasodilatatrices, diurétiques et hypotensives (Cherkaoui-Tangi et al., 2008) ;
- **Une flavanone**, l'ériodyctiol, a été identifiée dans les parties aériennes (Pistelli et al., 2003) ;
- **Deux flavonols** (i.e. la 3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone et la 3,5,7,4'-tétrahydroxy-8-méthoxyflavone) ont été identifiés dans un extrait au méthanol de graines de *C. villosa* ssp. *intermedia* (El Antri et al., 2010) et le kaempférol a

- été identifié dans les parties aériennes de *C. villosa* (Pistelli et al., 2003). Parallèlement, l'activité vasodilatatrice de la 3,5,7,4'-tétrahydroxy-8-méthoxyflavone a été démontrée sur le rat (El Antri et al., 2010) ;
- **Des chalcones** telles que la butéine, la calythropsine et la 2'-méthoxyisoliquiritigénine ont été isolées des parties aériennes (Pistelli et al., 2003 ; Alhage et al., 2018). L'étude de Alhage et al. (2018) a démontré les propriétés cytotoxiques et antidiabétiques de la calythropsine ;
 - **Des anthraquinones** comme la 1,8-diacétyloxy-3-méthyl-9,10-anthracènedione et la 1,8-dihydroxy-3-méthylène-(O-glucopyranosyl)-9,10-anthracènedione par exemple, ont été identifiées dans l'extrait au méthanol de feuilles (Loy et al., 2001) ;
 - **Des dérivés phénoliques** comme le 4-hydroxybenzoate ou le basaléthanoïde ont été retrouvés dans des extraits au méthanol et à l'acétate d'éthyle de graines et de cosses de *C. villosa* ssp. *intermedia* (Elkhamlichi et al., 2017a) ainsi que dans un extrait au dichlorométhane de tiges de *C. villosa*. Parallèlement, le basaléthanoïde présente une activité cytotoxique (Alhage et al., 2018) ;
 - **Des terpènes** : des monoterpènes et des sesquiterpènes comme le 1,8-cinéole, le camphre, l'eugénol et le β -eudesmol ont été identifiés dans l'huile essentielle des parties aériennes (Loy et al., 2001 ; Dessì et al., 2001). **Un triterpène**, le lupéol, a été isolé des parties aériennes (Pistelli et al., 2003).
 - **Des stéroïdes**, comme le β -sitostérol et le stigmastérol, ont été retrouvés dans un extrait au dichlorométhane de tiges (Alhage et al., 2018). Cette étude a également mis en évidence le caractère cytotoxique du β -sitostérol ;
 - **Un alcool gras**, le faltarinol, a été identifié dans l'extrait au méthanol de feuilles et l'huile essentielle. Cette molécule possède également des propriétés cytotoxiques (Loy et al., 2001) ;
 - **Des alcaloïdes** parmi lesquels la lupinine, la calycotomine et la spartéine ont été isolés à partir d'un extrait au méthanol de feuilles (Loy et al., 2001 ; Dessì et al., 2001). D'autres alcaloïdes comme la 1-hydroxyméthyl-6,7-diméthoxy-3,4-dihydroisoquinoline ont été identifiés dans les graines de *C. villosa* ssp. *intermedia* (Elkhamlichi et al., 2017 a ; El Antri et al., 2004 b, c).

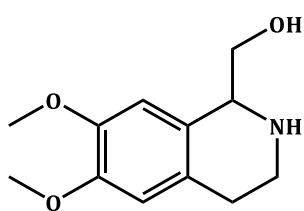
Figure 23. Exemples de molécules identifiées dans les extraits de *Calicotome villosa*



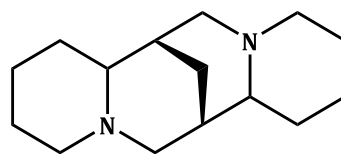
basaléthanoïde



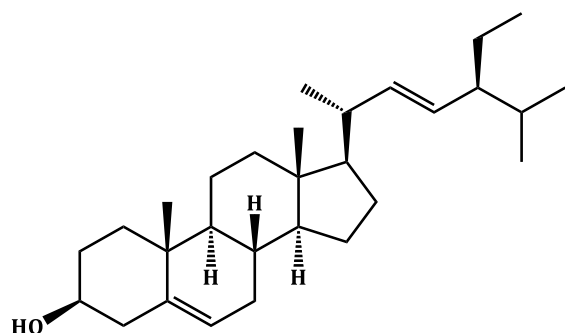
1-hydroxyméthyl-6,7-diméthoxy-3,4-dihydroisoquinoline



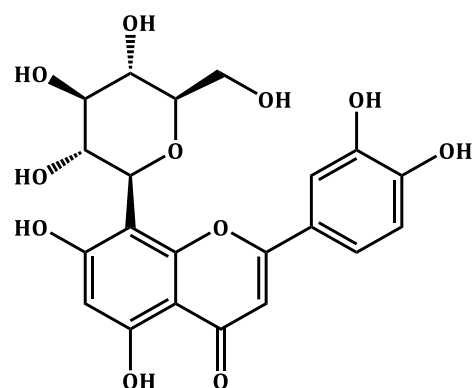
calycotomine



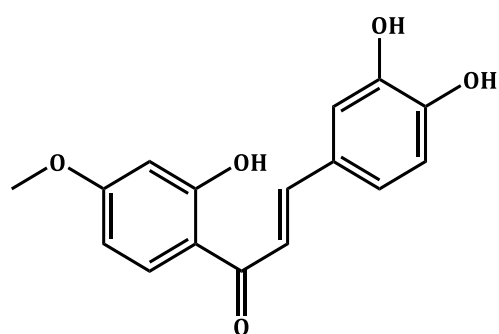
spartéine



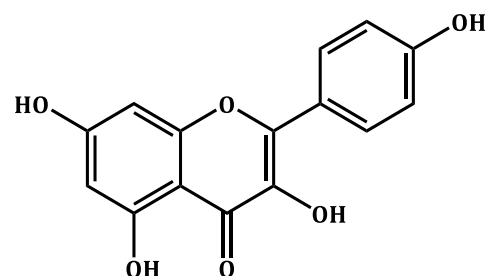
β-stigmastérol



orientine



calythropsine



kaempférol

Calicotome villosa est utilisé en médecine traditionnelle Sicilienne pour traiter les furoncles, les abcès cutanés et les engelures (Pistelli et al., 2003). En Palestine, les infusions de fleurs aident à soigner les hémodilutions, les problèmes cardiovasculaires et nerveux (Said et al., 2002). Les racines sont employées pour soigner les cors aux pieds (Loi et al., 2004). Enfin, les infusions de *C. villosa* ssp. *intermedia* sont utilisées au Maroc pour soigner diverses maladies, les rhumatismes et les cicatrices (Lyoussi et al., 2018). Ainsi, malgré le nombre relativement important d'études décrivant les constituants des parties aériennes de *C. villosa*, aucune ne concerne la composition des racines. Parallèlement, les extraits aux solvants et/ou huiles essentielles de *C. villosa* et de *C. villosa* ssp. *intermedia* ont fait l'objet d'études mettant en évidence diverses propriétés thérapeutiques ou biologiques.

L'huile essentielle issue des parties aériennes de *C. villosa* possède des propriétés antioxydantes (protège l'acide linoléique des attaques des radicaux libres) (Dessi et al., 2001). Les auteurs ont également montré qu'un extrait de feuilles au méthanol, contenant de la chrysine et de la génistéine, présente une activité antioxydante modérée par rapport au BHT mais comparable à l'EDTA et au tocophérol (antioxydants de référence) dans les proportions 1 : 20 et 1 : 10 (extrait : acide linoléique). Une activité antioxydante a également été mise en évidence pour un extrait à l'acétate d'éthyle (IC₅₀ = 0,20 mg/mL) et un extrait au méthanol (IC₅₀ = 0,34 mg/mL) de graines de *C. villosa* ssp. *intermedia*, comparable au BHT (IC₅₀ = 0,19 mg/mL) pris comme référence (Elkhamlichi et al., 2017b). Un extrait à l'éthanol des parties aériennes de *C. villosa* ssp. *intermedia* et un extrait au méthanol de tiges de *C. villosa* ont montré une activité antioxydante comparable à la vitamine C (0,20 mg/mL) (Chikhi et al., 2014 ; Alhage et al., 2018). Ce caractère antioxydant est dû à la composition riche en flavonoïdes et en composés phénoliques de ces extraits et notamment à la présence de la calythropsine isolée des tiges de *C. villosa* et dont l'activité antioxydante était totale (100 % des radicaux libres DPPH piégés) pour une concentration de 0,1 mg/mL (Alhage et al., 2018).

Par ailleurs, l'extrait au méthanol de feuilles de *C. villosa* présente une forte cytotoxicité (Dose Toxique Minimale (DTM) = 0,04 µl/mL) attribuable au falcarinol (Loy et al., 2001). De même, les travaux réalisés par Alhage et al. (2018) ont mis en évidence le caractère cytotoxique d'un extrait au dichlorométhane de tiges de *C. villosa* (inhibition totale à 2 mg/mL).

Par ailleurs, un extrait au méthanol de tiges de *C. villosa* inhibe la croissance de *C. albicans* de manière comparable à la nystatine (antifongique pris pour référence) (Alhage et al., 2018). L'activité antimicrobienne modérée (diamètre d'inhibition compris entre 8 et 11 mm ; CMI = 500 µg/mL) d'un extrait au méthanol de feuilles de *C. villosa* a été démontrée sur des souches bactériennes à Gram-positif (*S. aureus*, *Bacillus lentus*) et des souches bactériennes à Gram-négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Providencia rettgeri* et *Morganella morganii*) (Dessi et al., 2001 ; Loy et al., 2001). L'huile essentielle des parties aériennes possède une activité antifongique modérée (500 µg/mL) sur *Cryptococcus neoformans*. L'activité antibactérienne modérée d'un extrait éthanolique des parties aériennes de *C. villosa* ssp. *intermedia* (CMI comprises entre 21,2 et 42,5 mg/mL) a été mise en évidence sur *S. aureus* et *Enterococcus faecalis* (bactéries à Gram-positif) et *Klebsiella pneumoniae* et *S. typhimurium* (bactéries à Gram-négatif) (Chikhi et al., 2014). Des extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol réalisés sur les cosses et les graines de *C. villosa* ssp. *intermedia* ont totalement inhibé la croissance de *E. coli* (Elkhamlichi et al., 2017b).

Bien que les fleurs et les racines de *C. villosa* présentent un intérêt thérapeutique valorisable, peu d'études décrivent la composition chimique de leurs extraits. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans ce travail, à la composition chimique d'extraits de fleurs et de racines de *C. villosa* ainsi qu'à l'activité antimicrobienne d'extraits et de fractions de chromatographie.

III.2. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'EXTRAITS DE FLEURS DE *CALICOTOME VILLOSA* DE CORSE

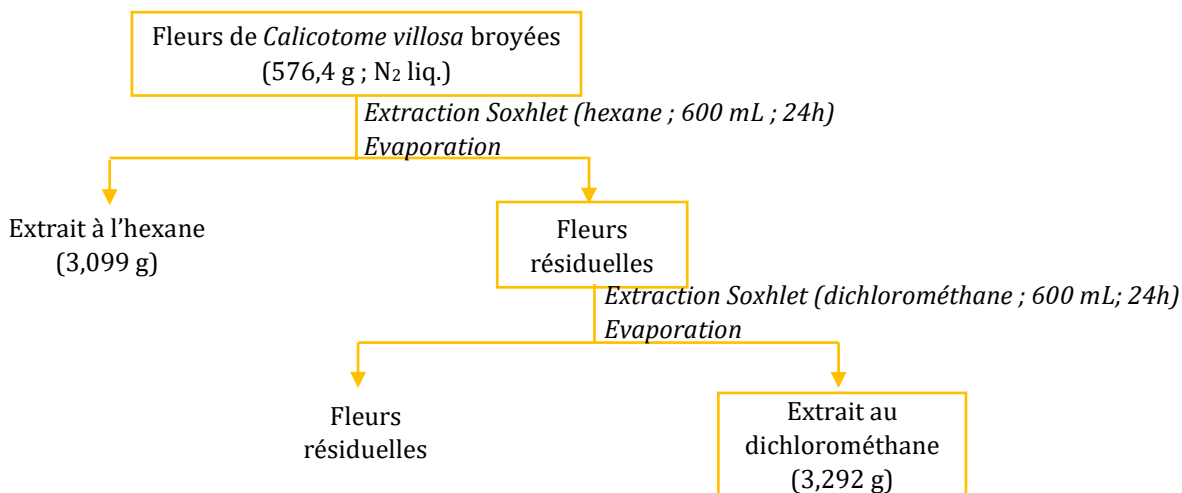
Les fleurs de *Calicotome villosa* utilisées dans cette étude ont été récoltées en avril 2019 au lieu-dit Vignola sur la commune d'Ajaccio (41°54'45.0"N 8°39'11.2"E) puis stockées à -60°C. Dans la suite de notre travail, nous avons choisi d'étudier en particulier la composition chimique d'un extrait au dichlorométhane et d'un extrait à l'acétate d'éthyle.

III.2.1. COMPOSITION DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FLEURS DE *C. VILLOSA*

Dans la première partie de ce travail, les fleurs ont été broyées (azote liquide) puis la poudre obtenue (576,4 g) a été extraite à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'hexane pendant 24 h, dans le but d'éliminer d'éventuels composés à chaînes grasses. Après évaporation de la solution hexanique, 3,099 g d'extrait ont été obtenus, soit un rendement de 0,54 % par rapport à la masse sèche de végétal. Sur le spectre RMN ^{13}C de cet extrait, nous observons les raies de résonance caractéristiques de triglycérides et de chaînes grasses saturées et insaturées : des carbones de fonctions esters ($\delta_{\text{C}} = 173,33$ et $172,87\text{ppm}$) ; des carbones éthyléniques (entre $\delta_{\text{C}} = 131,97$ et $127,78\text{ ppm}$) ; des carbones du glycérol ($\delta_{\text{C}} = 68,91\text{ ppm}$, $68,17\text{ ppm}$ et $63,12\text{ ppm}$) et des carbones aliphatiques (entre $\delta_{\text{C}} = 31,95$ et $14,12\text{ ppm}$).

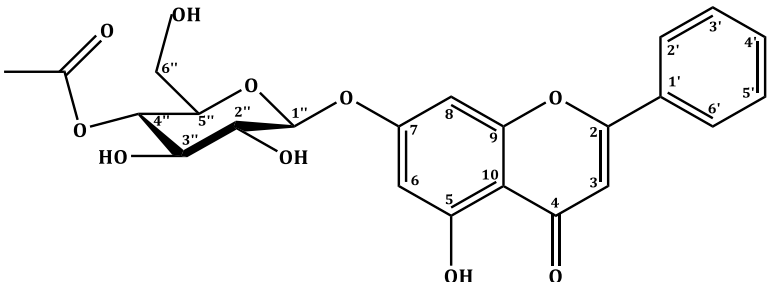
Les fleurs résiduelles ont été extraites suivant le même procédé avec 600 mL de dichlorométhane pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 3,292 g a été obtenu (rendement de 0,57 % par rapport à la masse sèche de végétal) ([Figure 24](#)).

Figure 24. Schéma de l'extraction des fleurs de *C. villosa*



L'extrait brut au dichlorométhane ainsi obtenu a été soumis dans un premier temps à une analyse par RMN ^{13}C . Après interrogation des diverses bibliothèques de spectres nous identifions deux flavones : la chrysine (bibliothèque « Flavones » du laboratoire) et un dérivé glucosylé de la chrysine, la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (bibliothèque « Flavones » de la littérature). Pour cette dernière molécule :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence (Pistelli et al., 2003) sont globalement faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,16 ppm pour la plupart des signaux. Pour les trois valeurs restantes, les variations ($\Delta\delta$) sont comprises entre 0,23 et 0,35 ppm (Tableau 12).

Tableau 12.Structure et données RMN ¹³C de la 4''-O-acétyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine


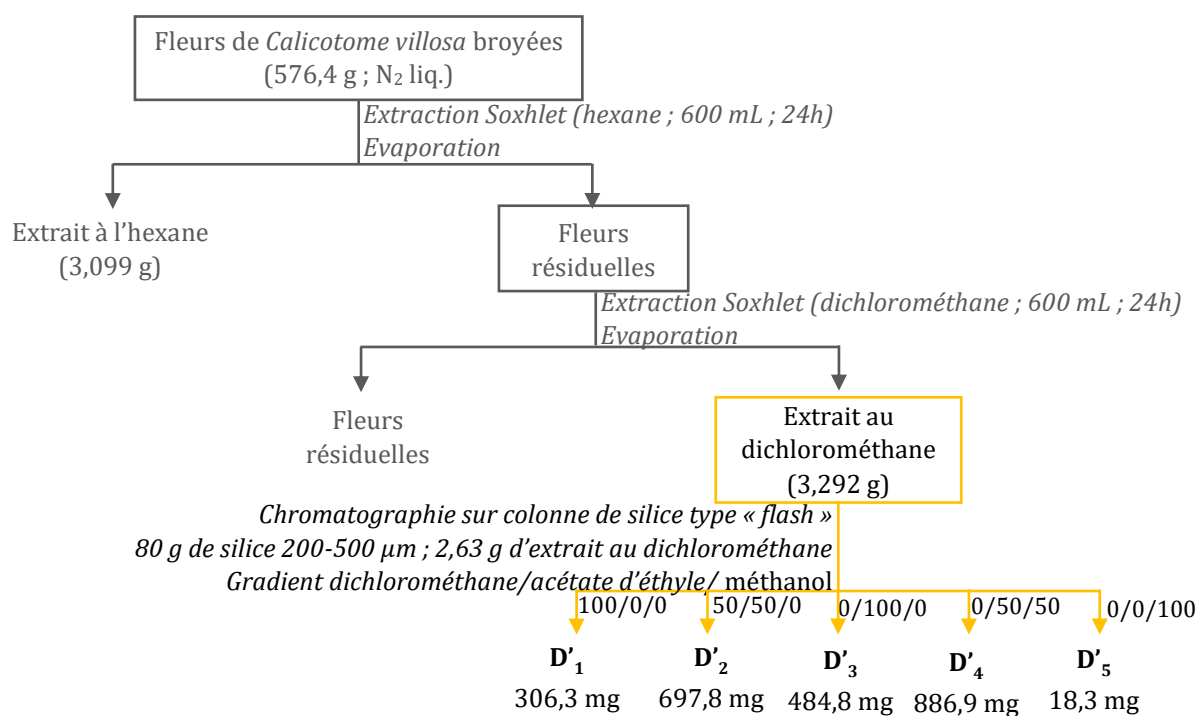
n°C	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	Δδ
2	162,90	163,0	0,10
3	105,38	105,5	0,12
4	182,09	182,1	0,01
5	161,05	161,4	0,35
6	99,53	99,5	0,03
7	163,61	163,6	0,01
8	94,96	94,8	0,16
9	156,96	157,1	0,14
10	105,57	105,8	0,23
1'	130,46	130,6	0,14
2' et 6'	126,38	126,4	0,02
3' et 5'	129,06	129,2	0,14
4'	132,12	132,2	0,08
1''	99,43	99,7	0,27
2''	72,95	73,1	0,15
3''	74,36	74,5	0,14
4''	70,81	70,9	0,09
5''	73,57	73,7	0,13
6''	60,20	60,3	0,10
COO	169,44	169,5	0,06
CH ₃	20,81	20,9	0,09

Notes : δ_c, déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt}, numérotation des carbones et déplacements chimiques selon Pistelli et al. (2003).

Par ailleurs, plusieurs raies de résonance restent non attribuées sur le spectre RMN ¹³C de l'extrait au dichlorométhane. Un échantillon (2,63 g) a donc été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 – 500 μm ; 60 Å ; 80 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). A l'issue de cette chromatographie, cinq fractions ont été obtenues (D'₁ à D'₅) (**Figure 25**). Dans la suite de ce travail, nous décrirons uniquement les fractions de

chromatographie apportant de nouvelles informations et dont les signaux des spectres ont été en majeure partie attribués, c'est-à-dire pour lesquels les raies de résonance restantes sont d'intensités négligeables.

Figure 25. Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane de fleurs de *C. villosa*

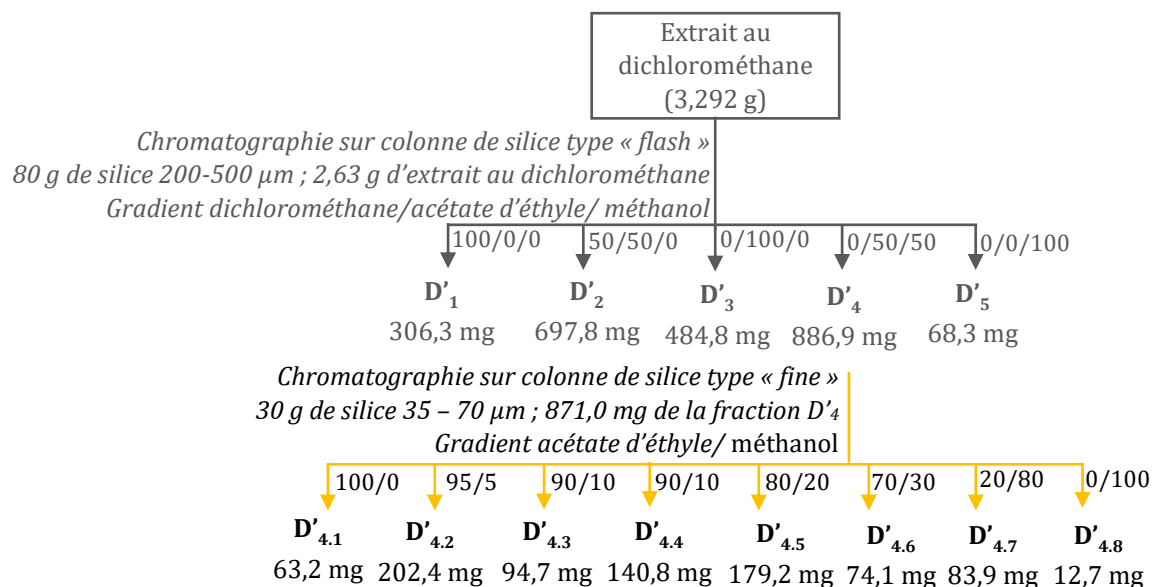


Le spectre de la fraction D'₁ (306,3 mg) présente des déplacements chimiques caractéristiques de triglycérides : δ_{C} = 172,85, 173,26 et 173,31 ppm (carbones des fonctions esters) ; entre δ_{C} = 127,12 et 131,97 ppm (carbones éthyléniques) ; δ_{C} = 62,10 et 68,90 ppm (carbones du glycérol) ; entre δ_{C} = 14,08 et 34,21 ppm (carbones aliphatiques). Dans les deux fractions suivantes, nous identifions à nouveau la chrysine (D'₂ ; 697,8 mg) et la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (D'₃ ; 484,8 mg), présentes dans des proportions très majoritaires.

Dans la fraction D'₄ (886,9 mg), nous identifions la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine. Par ailleurs, des raies de résonance restent non attribuées sur le spectre de la fraction D'₄. Ainsi, cette fraction a donc été chromatographiée sur colonne de silice plus fine (35 – 70 μm ; 60 Å ; 30 g) avec un gradient de solvants de polarité

croissante acétate d'éthyle/méthanol (100:0 à 0:100). A l'issue de cette chromatographie, huit sous-fractions ont été obtenues ($D'_{4.1}$ à $D'_{4.8}$) (**Figure 26**).

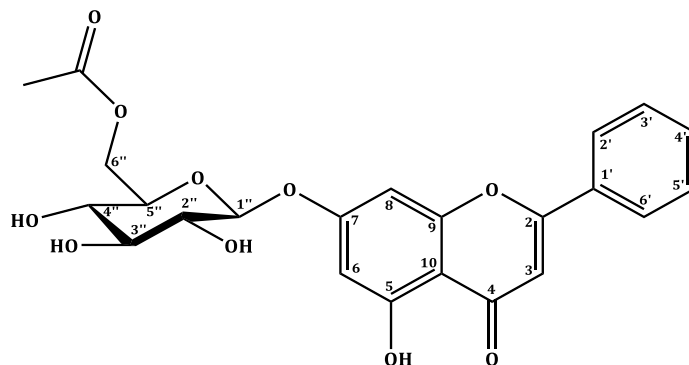
Figure 26. Schéma de la chromatographie de la fraction D'_4



L'interrogation des diverses bibliothèques de spectres du laboratoire nous a permis d'identifier à nouveau la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine dans les sous-fractions $D'_{4.1}$ à $D'_{4.5}$ et parallèlement, dans les sous-fractions $D'_{4.1}$ et $D'_{4.2}$, un autre dérivé de la chrysine, proche du précédent, la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, avec la bibliothèque « Flavones » de la littérature (**Tableau 13**).

Pour cette molécule :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence (*Pistelli et al., 2003*) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,13 ppm pour la majorité des signaux, les trois valeurs restantes étant comprises entre 0,20 et 0,36 ppm (**Tableau 13**) ;
- seules trois superpositions de signaux ont été relevées avec la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine. Ainsi, malgré la similitude des structures, l'identification par RMN ^{13}C à partir des données de la littérature est effectuée sans aucune ambiguïté.

Tableau 13. Structure et données RMN ^{13}C de la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (Fraction D'4.1)

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
2	162,83	162,9	0,07
3	105,39	105,5	0,11
4	182,11	182,2	0,09
5	161,01	161,1	0,09
6	99,50	99,4	0,10
7	163,62	163,7	0,08
8	94,87	95,0	0,13
9	156,99	157,1	0,11
10	105,58	105,6	0,02
1'	130,48	130,6	0,12
2' et 6'	126,40	126,5	0,10
3' et 5'	129,09	129,2	0,11
4'	132,19	132,2	0,01
1''	99,61	99,6	0,01
2''	72,90	73,2	0,30
3''	76,10	76,3	0,20
4''	69,70	69,8	0,10
5''	73,79	73,9	0,11
6''	63,27	63,4	0,13
COO	170,10	170,2	0,10
CH ₃	20,46	20,1	0,36

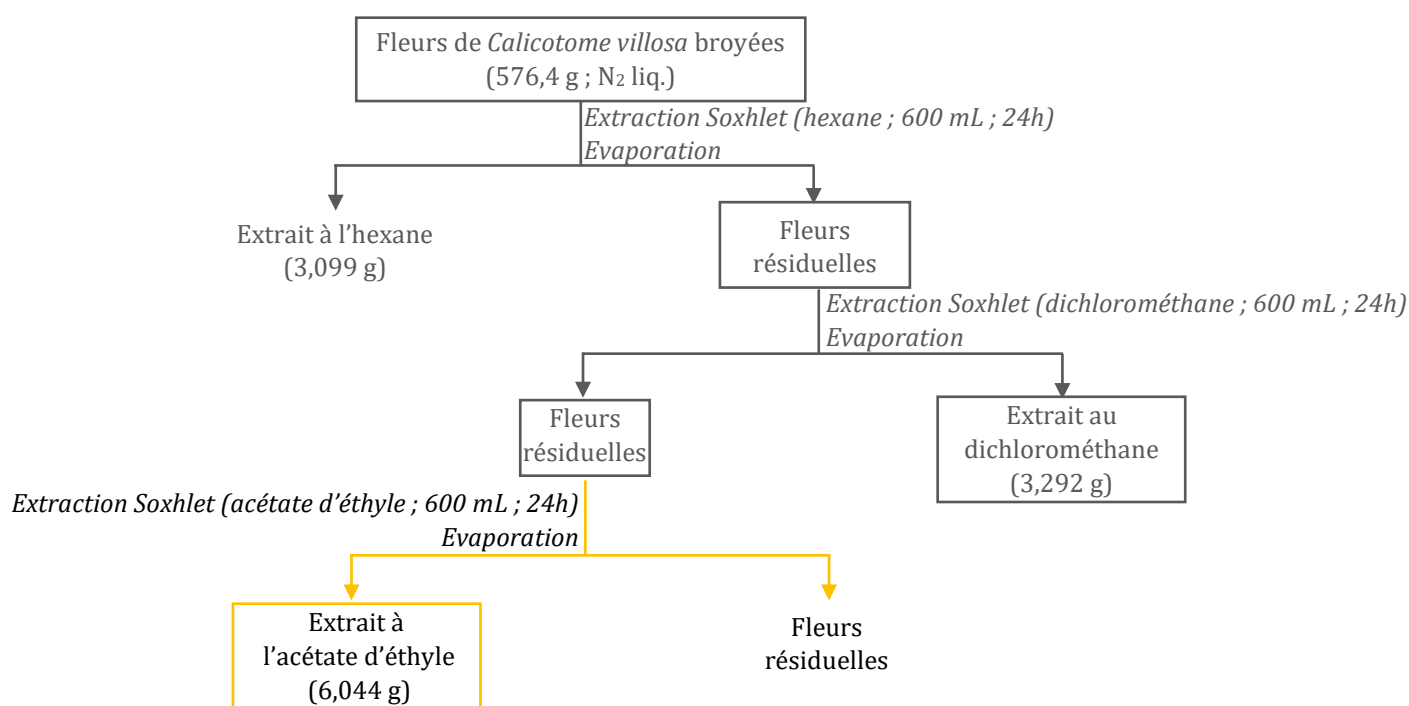
Notes : δ_c : déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt} , numérotation des carbones et déplacements chimiques selon [Pistelli et al. \(2003\)](#).

L'analyse par RMN ^{13}C de l'extrait brut au dichlorométhane et des différentes fractions de chromatographies a permis d'identifier trois composés, la chrysine et deux de ses dérivés glucosylés. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés à la composition chimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle.

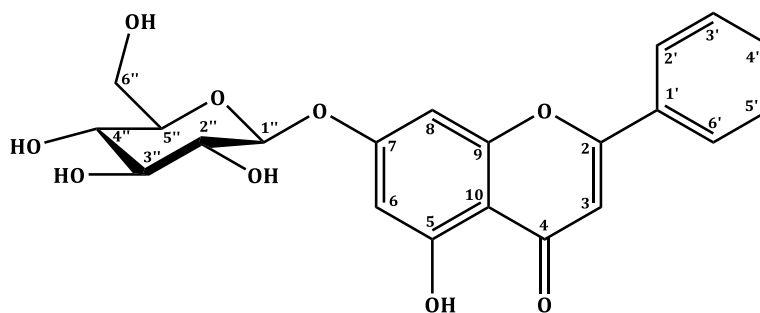
III.2.2. COMPOSITION DE L'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE DE FLEURS DE *C. VILLOSA*

Les fleurs résiduelles ont été extraites à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'acétate d'éthyle pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 6,044 g a été obtenu (rendement de 1,05 % par rapport à la masse sèche initiale de végétal) (**Figure 27**). Après analyse par RMN ^{13}C de l'extrait, l'interrogation de la bibliothèque « Flavones » du laboratoire a permis d'identifier à nouveau la chrysine et la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine.

Figure 27. Schéma de l'extraction des fleurs de *C. villosa*



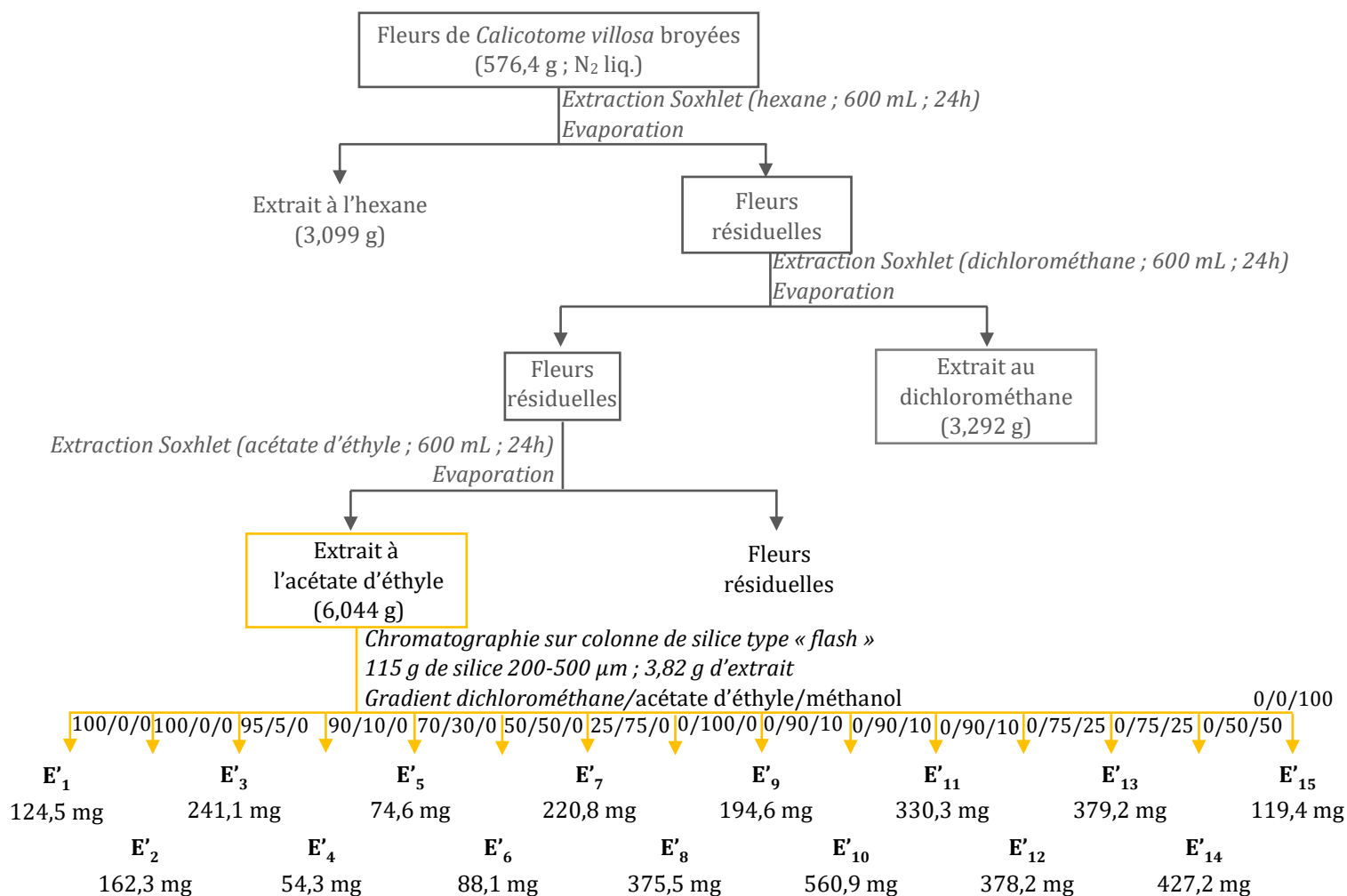
Par ailleurs, la bibliothèque « Flavones » de la littérature a permis d'identifier un dérivé glucosylé supplémentaire de la chrysine présent dans des proportions majoritaires, la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, par comparaison avec les données RMN ^{13}C décrites par El Antri et al. (2004 a) ($\Delta\delta < 0,13$ ppm pour 95 % des signaux) (**Tableau 14**).

Tableau 14. Structure et données RMN ^{13}C de la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysrine

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
2	163,59	163,7	0,11
3	105,35	105,6	0,25
4	182,09	182,2	0,11
5	161,01	161,1	0,09
6	99,59	99,7	0,11
7	163,09	163,2	0,11
8	94,88	95,0	0,12
9	157,00	157,1	0,10
10	105,49	105,5	0,01
1'	130,48	130,6	0,12
2' et 6'	126,40	126,5	0,10
3' et 5'	129,07	129,2	0,13
4'	132,13	132,2	0,07
1''	99,77	99,9	0,13
2''	72,98	73,0	0,02
3''	76,31	76,4	0,09
4''	69,42	69,5	0,08
5''	77,07	77,2	0,13
6''	60,48	60,6	0,12

Notes : δ_c , déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt} numérotation des carbones et déplacements chimiques selon *El Antri et al. (2004 a)*.

Parallèlement, sur le spectre RMN ^{13}C de l'extrait à l'acétate d'éthyle, des raies de résonance restent non attribuées. Un échantillon de cet extrait (3,82 g) a donc été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 – 500 μm ; 60 Å ; 115 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol (100: 0: 0 à 0: 0: 100). A l'issue de cette chromatographie, quinze fractions ont été obtenues (E'1 à E'15) (**Figure 28**).

Figure 28. Schéma du fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle de fleurs de *C. villosa*

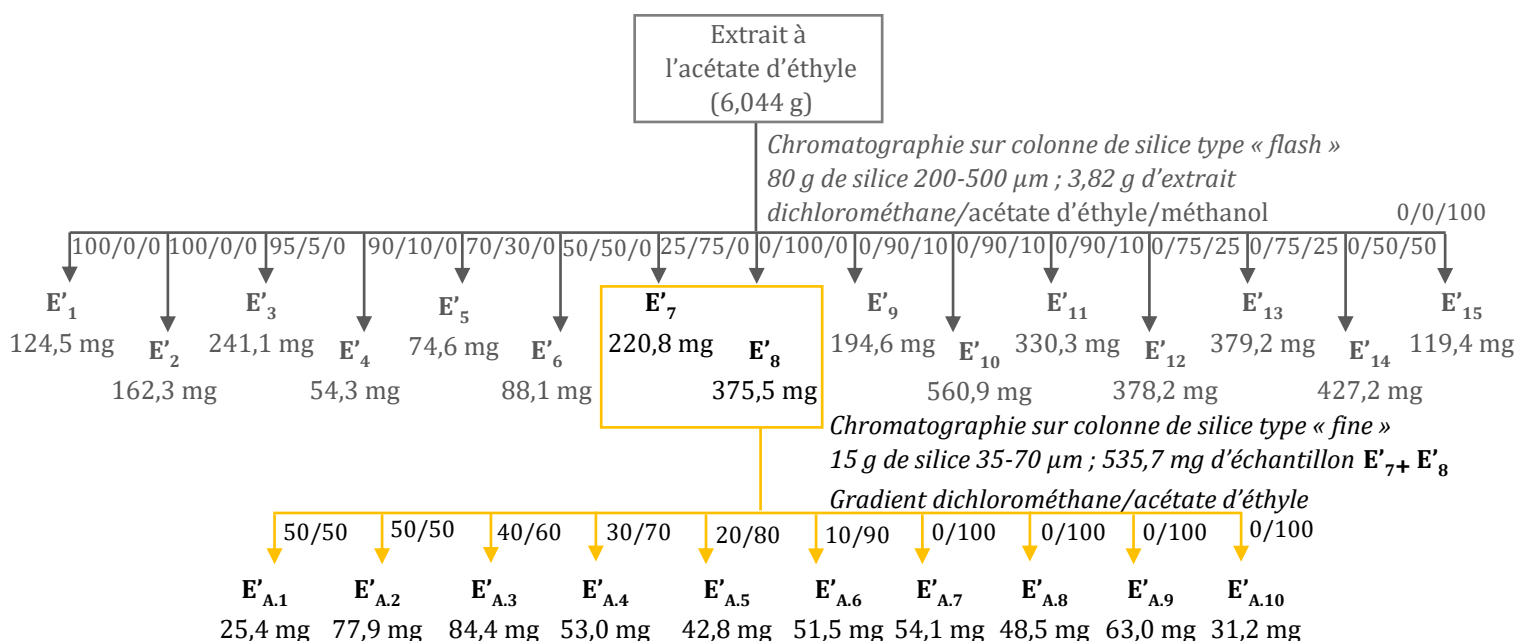
Sur le spectre de la fraction E'₁, nous relevons des raies de résonance caractéristiques de triglycérides : des carbones de fonctions esters ($\delta_c = 172,85, 173,26$ et $173,30$ ppm) ; des carbones éthyléniques (compris entre $\delta_c = 127,13$ et $131,97$ ppm) ; des carbones du glycérol ($\delta_c = 62,11$ et $68,91$ ppm) et des carbones aliphatiques ($\delta_c = 14,08$ et $34,21$ ppm). L'interrogation des diverses bibliothèques de spectres du laboratoire a permis, entre autres, l'identification des flavonoïdes déjà présents dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle et dans les fractions de chromatographie de l'extrait au dichlorométhane ainsi que des monosaccharides :

- la chrysine, dans les fractions E'₂ à E'₅ ;
- l'apigénine dans les fractions E'₄ à E'₆ ;

- la lutéoline dans la fraction E'₅ ;
- la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, dans les fractions E'₉ à E'₁₅ ;
- la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine et la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, dans les fractions E'₇ à E'₉ ;
- le β -D-fructopyranose, dans les fractions E'₁₁ à E'₁₅ ;
- l' α -D-fructofuranose, le β -D-fructofuranose, l' α -D-glucose et le β -D-glucose, dans les fractions E'₁₂ à E'₁₅.

Par ailleurs, des raies de résonance restent non attribuées sur les spectres RMN ^{13}C des fractions E'₇ et E'₈. Ces deux fractions présentant des profils spectraux similaires, ont donc été rassemblées pour former la fraction E'_A (535,7 mg), puis soumises à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 Å ; 15 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (50 :50 à 0 :100) permettant l'obtention de dix sous-fractions (E'_{A.1} à E'_{A.10}) (**Figure 29**).

Figure 29. Schéma de la chromatographie des fractions E'₇ et E'₈



L'examen des spectres RMN ^{13}C des diverses sous-fractions associé à l'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire a permis d'identifier à nouveau les trois dérivés glucosylés de la chrysine précédemment cités, dans les sous-

fractions E'_{A.4} à E'_{A.10} dans des proportions majoritaires. Parallèlement, la bibliothèque de spectres « Phénols » du laboratoire a permis l'identification de l'acide trans-p-coumarique dans les sous-fractions E'_{A.1} et E'_{A.2}. De plus, la bibliothèque « Phénols » issue de la littérature a permis d'identifier l'acide cis-p-coumarique, dans les sous-fractions E'_{A.1} à E'_{A.3} ainsi que l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique dans la sous-fraction E'_{A.2}. Pour ces deux acides, les données RMN ^{13}C relevées sur les spectres des sous-fractions concordent parfaitement avec celles décrites dans la littérature ([Salum et al., 2010](#) ; [Zhao et al., 2012](#)) (**Tableau 15**). En effet, pour ces deux molécules les écarts entre les valeurs des déplacements chimiques reportées dans la littérature et celles relevées sur les spectres des sous-fractions sont tous inférieurs ou égaux à 0,07 ppm.

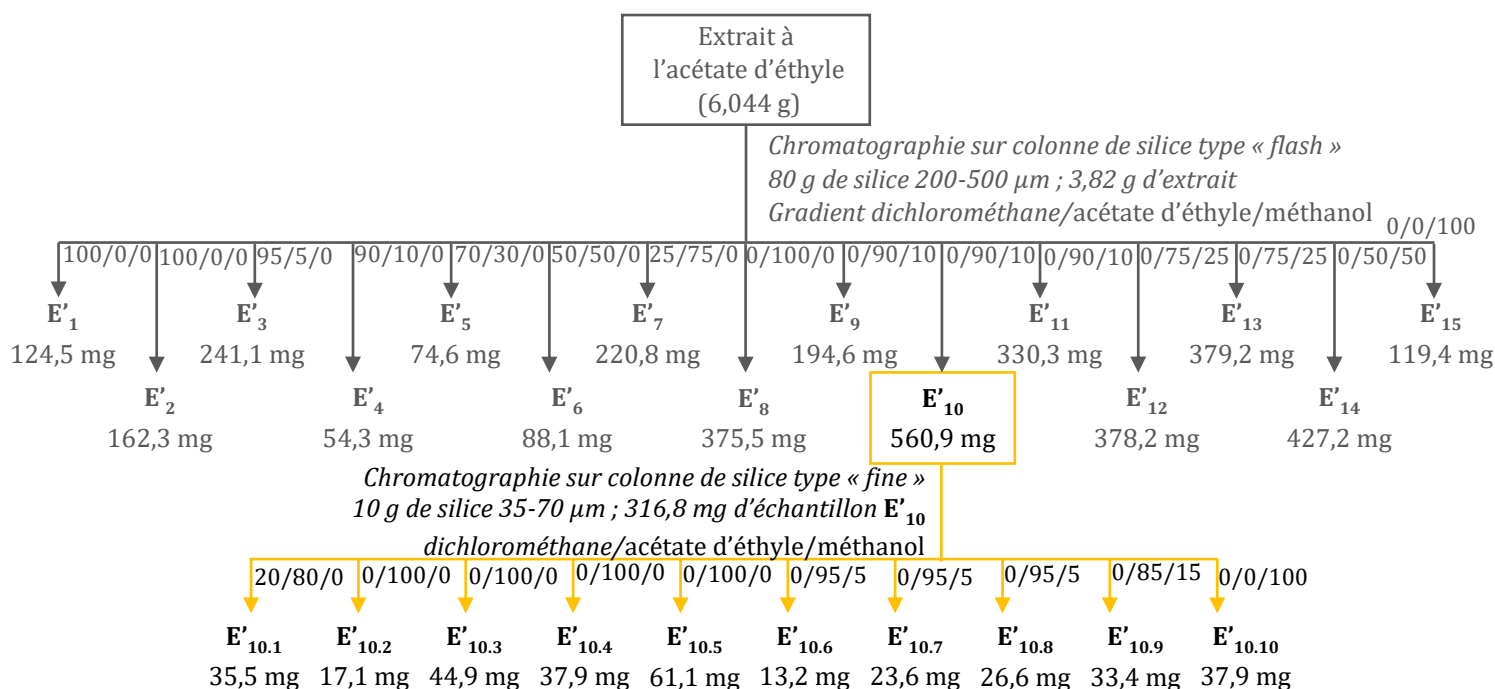
Tableau 15. Structure et données RMN ^{13}C de l'acide cis-p-coumarique et de l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique

Acide cis-p-coumarique				Acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique			
n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$	n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	125,73	125,76	0,03	1	113,00	113,0	0,00
2 et 6	132,29	132,32	0,03	2	150,66	150,7	0,04
3 et 5	114,84	114,87	0,03	3	103,83	103,8	0,03
4	158,48	158,52	0,04	4	144,73	144,8	0,07
-	-	-	-	5	152,18	152,2	0,02
-	-	-	-	6	113,23	113,2	0,03
α	116,92	116,95	0,03	α	112,68	112,7	0,02
β	141,62	141,66	0,04	β	146,26	146,3	0,04
COOH	167,64	167,66	0,02	COOH	164,50	164,5	0,00

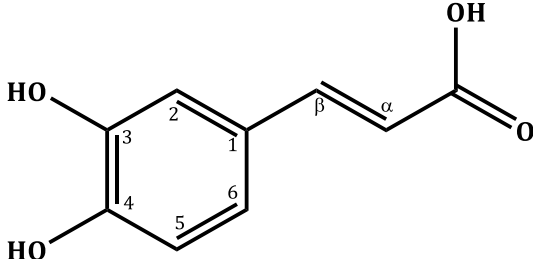
Notes : δ_c , déplacements chimiques expérimentaux ; numérotation des carbones selon [Salum et al. \(2010\)](#) ; δ_c^{litt} : déplacements chimiques de l'acide cis-p-coumarique selon [Salum et al. \(2010\)](#) ; déplacements chimiques de l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique selon [Zhao et al. \(2012\)](#).

La fraction E'_{10} dans laquelle seule la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine a été préalablement identifiée dans des proportions majoritaires, a été soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 Å ; 10 g) avec un gradient dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol (20: 80: 0 à 0: 0: 100). A l'issue de cette chromatographie, dix sous-fractions ont été éluées ($\text{E}'_{10.1}$ à $\text{E}'_{10.10}$) (**Figure 30**).

Figure 30. Schéma de la chromatographie de la fraction E'_{10}



Après l'analyse RMN ^{13}C des différentes sous-fractions, l'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire a permis d'identifier à nouveau les trois dérivés glucosylés de la chrysine précédemment cités dans les sous-fractions $\text{E}'_{10.1}$ et $\text{E}'_{10.2}$. Nous identifions également les acides trans-p-coumarique, cis-p-coumarique et cis-2,4,5-trihydroxycinnamique, dans la sous-fraction $\text{E}'_{10.1}$. Par ailleurs, la bibliothèque de spectres « Phénols » de la littérature a permis l'identification de l'acide caféique pour lequel les données RMN ^{13}C issues de la littérature ([Świsłocka, 2013](#)) concordent avec celles de la sous-fraction $\text{E}'_{10.1}$ ($\Delta\delta < 0,08$ ppm). Seule une superposition a été observée entre l'acide caféique et l'acide trans-p-coumarique (**Tableau 16**).

Tableau 16. Structure et données RMN ^{13}C de l'acide caféique


n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	125,67	125,71	0,04
2	115,73	115,76	0,03
3	144,58	144,59	0,01
4	148,12	148,14	0,02
5	114,57	114,65	0,08
6	121,16	121,16	0,00
α	115,08	115,13	0,05
β	145,53	145,57	0,04
COOH	167,90	167,91	0,01

Notes : δ_c , déplacements chimiques expérimentaux ; numérotation des carbones selon [Salum et al. \(2010\)](#) ; δ_c^{litt} , déplacements chimiques selon [Świśtowska \(2013\)](#).

Parallèlement, sur le spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction E'10.9, des raies de résonance restent non attribuées ([Annexe 18](#)). D'après les valeurs des déplacements chimiques et les données observées sur le spectre DEPT, la molécule recherchée présente des similitudes structurales avec la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, précédemment identifiée ([Annexe 19](#)). En effet, nous relevons les signaux de :

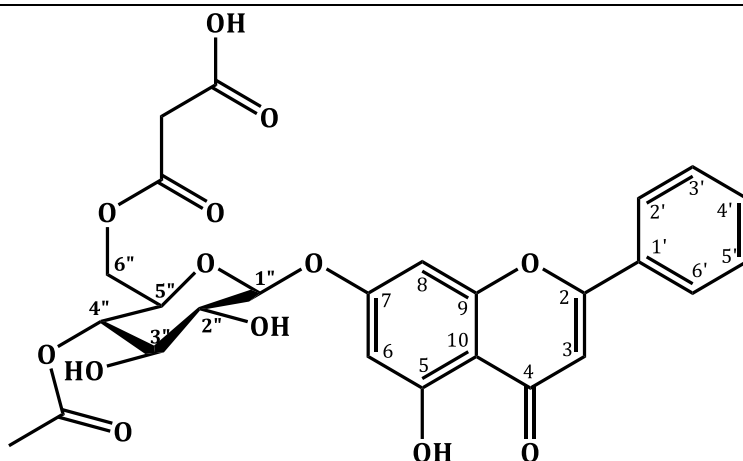
- sept carbones quaternaires (δ_c = 182,02 ppm ; 163,64 ppm ; 162,64 ppm ; 161,11 ppm ; 157,08 ppm ; 130,48 ppm) dont un appartient au groupement acétate (δ_c = 169,71 ppm) ;
- onze méthines (δ_c = 132,12 ppm ; 105,46 ppm ; 99,61 ppm ; 94,84 ppm) dont deux ayant une double intensité (δ_c = 129,11 ppm ; 126,41 ppm) et cinq appartenant au monosaccharide (δ_c = 99,21 ppm ; 73,31 ppm ; 72,92 ppm ; 71,20 ppm ; 70,55 ppm) ;
- un méthylène (δ_c = 62,74 ppm) ;
- un méthyle (δ_c = 20,76 ppm).

Comparativement à la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, nous relevons en plus les déplacements chimiques d'un groupement malonyl : δ_c = 168,18 ppm (C=O) ;

167,31 ppm (C=O); 42,38 ppm (CH₂). Nous procédons donc à une série d'analyses RMN 1D et 2D (**Annexes 17, 20-23**). Les informations relevées sur les spectres RMN 2D permettent de confirmer la structure partielle 5,7- dihydroxyflavone (chrysine) (**Tableau 17 ; Annexes 20-23**).

Les corrélations observées sur le spectre NOESY entre les protons dont les signaux sont situés à $\delta_{\text{H}} = 5,25$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 99,21$ ppm ; C1''), $\delta_{\text{H}} = 3,59$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 73,31$ ppm ; C3'') et $\delta_{\text{H}} = 4,08$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 71,20$ ppm ; C5'') d'une part, et $\delta_{\text{H}} = 3,41$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 72,92$ ppm ; C2''), $\delta_{\text{H}} = 4,68$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 70,55$ ppm ; C4'') d'autre part indiquent que le monosaccharide lié au squelette flavone est le β -glucose. La corrélation relevée sur le spectre HMBC entre le proton $\delta_{\text{H}} = 5,25$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 99,21$ ppm ; C1'') et le carbone quaternaire C7 ($\delta_{\text{C}} = 162,64$ ppm) confirme la liaison entre le dérivé glucosylé et le carbone C7 du squelette flavone. Par ailleurs, la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton H4'' (C4'' ; $\delta_{\text{C}} = 70,55$ ppm) et le carbone quaternaire du groupement acétate ($\delta_{\text{C}} = 169,71$ ppm) indique que ce dernier est lié au carbone C4''. De plus, la corrélation entre le proton H6'' (C6'' ; $\delta_{\text{C}} = 62,74$ ppm) et le carbone de la fonction ester ($\delta_{\text{C}} = 167,31$ ppm) indique que le groupement malonyl est lié au carbone C6''. La flavone recherchée est donc la 4''-O-acétyl-6''-O-malonyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (**Tableau 17 ; Annexes 17-23**).

Des recherches bibliographiques d'après le nom et la structure de la molécule n'ayant donné aucun résultat, il s'agit probablement d'une molécule nouvelle.

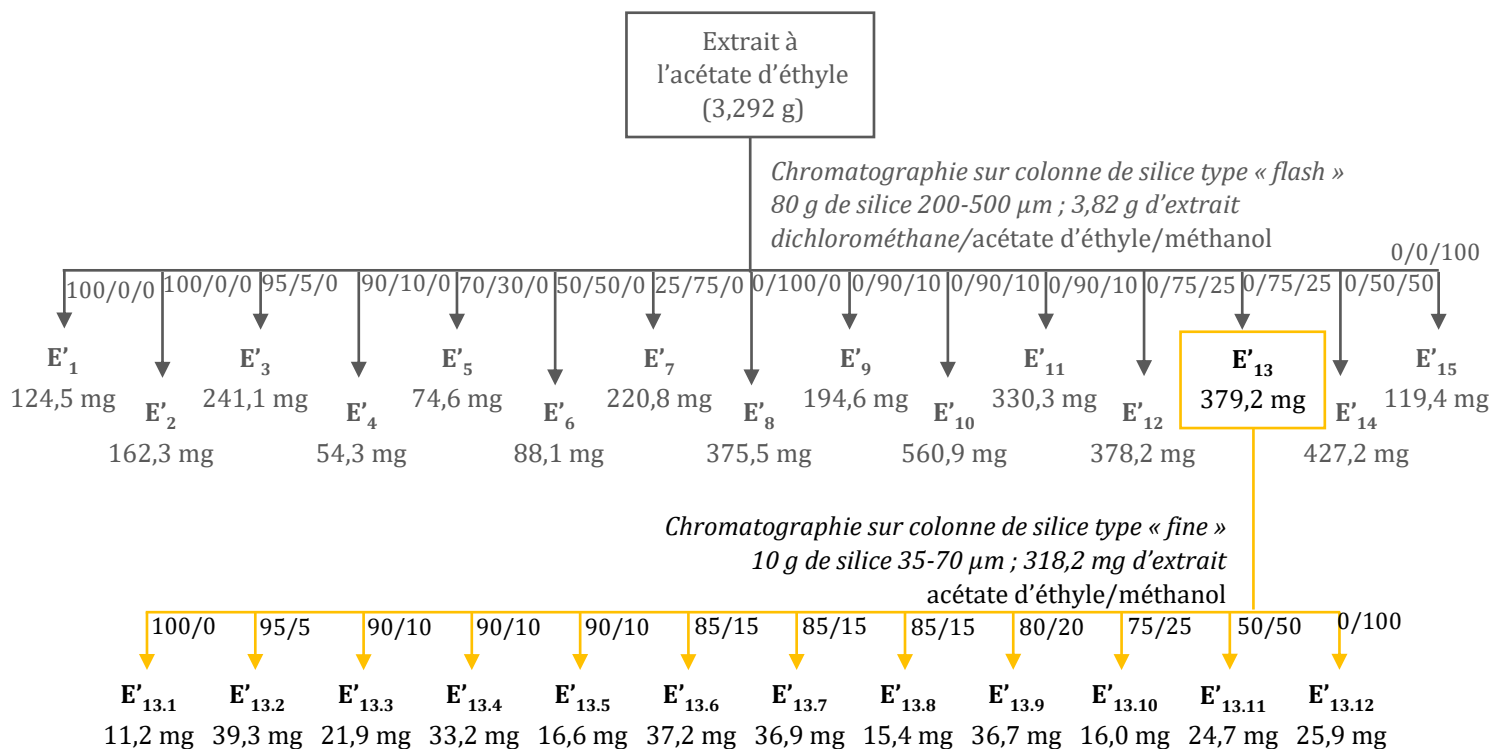
Tableau 17. Structure et données RMN ¹³C de la 4''-O-acétyl-6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine

n°C	δ _c (ppm)	δ _H (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	HMBC	COSY	NOESY
2	163,64	-	-	-	-	-
3	105,46	7,05	s	2 ; 4 ; 5 ; 10	-	2' ; 6'
4	182,02	-	-	-	-	-
5	161,11	-	-	-	-	-
6	99,61	6,51	s	5 ; 7 ; 8 ; 10	8	1''
7	162,64	-	-	-	-	-
8	94,84	6,87	s	6 ; 7 ; 9 ; 10	6	1''
9	157,08	-	-	-	-	-
10	105,78	-	-	-	-	-
1'	130,48	-	-	-	-	-
2' et 6'	126,41	8,10	d large	2 ; 4'	3' ; 5' ; 4'	3 ; 3' ; 5' ; 4'
3' et 5'	129,11	7,60	m	1' ; 2' ; 6'	2' ; 6'	2' ; 6'
4'	132,12	7,62	m	1' ; 2' ; 6' ; 3' ; 5'	2' ; 6'	2' ; 6'
1''	99,21	5,25	d (7,64)	7	2''	3'' ; 5'' ; 6 ; 8
2''	72,92	3,41	m	3''	1'' ; 3''	4''
3''	73,31	3,59	m	2'' ; 4''	2'' ; 4''	1'' ; 5''
4''	70,55	4,68	t (9,2)	5'' ; 6'' ; CH ₃ C=O	3'' ; 5''	2''
5''	71,20	4,08	m	6''	4''	1'' ; 3''
6''	62,74	4,09	m	C=O	-	-
CH ₃ C=O	169,71	-	-	-	-	-
CH ₃ COO	20,76	2,08	s	4'' ; CH ₃ C=O	-	-
C=O	167,31	-	-	-	-	-
CH ₂	42,38	3,25	s	C=O ; COOH	-	-
COOH	168,18	-	-	-	-	-

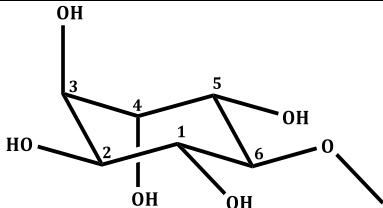
Notes : numérotation des carbones selon *El Antri et al. (2004 a)*. s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; m, multiplet.

Par ailleurs, un échantillon de la fraction E'_{13} (318,2 mg) a été chromatographié sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 Å ; 10 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante acétate d'éthyle/méthanol (100: 0 à 0: 100). A l'issue de cette chromatographie, douze sous-fractions ont été obtenues ($\text{E}'_{13.1}$ à $\text{E}'_{13.12}$) (**Figure 31**).

Figure 31. Schéma de la chromatographie des fractions E'_{13}



Après l'analyse RMN ^{13}C des différentes sous-fractions, l'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire a permis d'identifier à nouveau la 4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine dans la sous-fraction $\text{E}'_{13.1}$ et la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine dans les sous-fractions $\text{E}'_{13.1}$ à $\text{E}'_{13.11}$. Dans la sous-fraction $\text{E}'_{13.2}$, nous identifions une nouvelle fois l' α -D-fructofuranose et le β -D-fructofuranose avec la bibliothèque de spectres « Sucres » du laboratoire. Parallèlement, dans cette sous-fraction, la bibliothèque « Sucres » de la littérature a permis d'identifier un polyol supplémentaire : le D-pinnitol, dont les données RMN ^{13}C concordent avec celles de la sous-fraction $\text{E}'_{13.2}$ ($\Delta\delta \leq 0,09$ ppm) (**Tableau 18**).

Tableau 18. Structure et données RMN ^{13}C du D-pinnitol


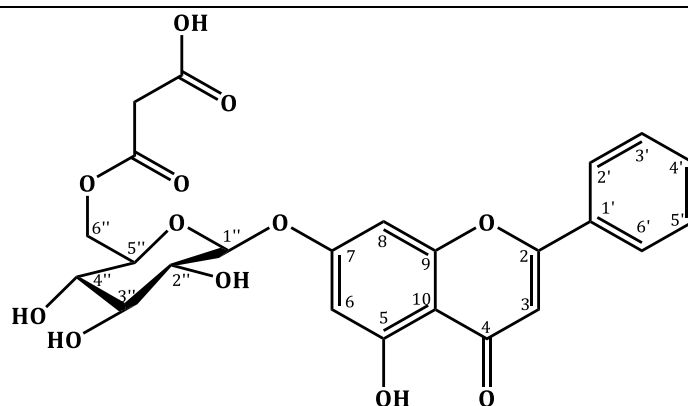
n°C	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$ (ppm)	$\Delta\delta$
1	70,89	70,8	0,09
2	72,42	72,4	0,02
3	70,07	70,0	0,07
4	72,59	72,6	0,01
5	71,97	71,9	0,07
6	83,81	83,8	0,01
-O-CH ₃	59,64	59,6	0,04

δ_{C} : déplacements chimiques expérimentaux ; $\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$, déplacements chimiques et numérotation des carbones selon [Usmanova et Botirov \(2013\)](#).

Par ailleurs, sur les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions E'13.8 à E'13.10, une série de raies de résonance reste non attribuée. Les différents signaux de la molécule recherchée ont été différenciés à partir de la séquence DEPT comme suit :

- neuf carbones quaternaires (δ_{C} = 181,95 ppm ; 168,41 ppm ; 167,76 ppm ; 163,54 ppm ; 162,85 ppm ; 161,12 ppm ; 157,14 ppm ; 130,54 ppm ; 105,77 ppm) ;
- dix méthines (δ_{C} = 132,11 ppm ; 105,55 ppm ; 94,80 ppm) dont trois d'intensité double (δ_{C} = 129,14 ppm ; 126,43 ppm ; 99,64 ppm) et quatre liés à un oxygène (δ_{C} = 76,11 ppm ; 73,90 ppm ; 72,97 ppm ; 69,61 ppm) ;
- deux méthylènes (63,70 ppm ; 42,92 ppm).

D'après les valeurs des déplacements chimiques, la molécule recherchée présente une structure similaire à la 4''-O-acétyl-6''-O-malonyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine identifiée précédemment. Comparativement à cette dernière, nous observons une absence de la fonction acétate liée au carbone C4'' qui se traduit par des variations notables des déplacements chimiques des carbones C3'' (δ_{C} = 76,11 ppm) et C5'' (δ_{C} = 73,90 ppm). Des recherches bibliographiques conduisent à l'identification de la 6''-O-malonyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, dont les valeurs en RMN ^{13}C reportées par [Park et al. \(1995\)](#), correspondent globalement à celles relevées sur les spectres des sous-fractions E'13.8 à E'13.10 (**Tableau 19**).

Tableau 19.Structure et données RMN ¹³C de la 6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine

n°C	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	δ _c [#] (ppm)
2	163,54	163,7	163,64
3	105,55	105,1	105,46
4	181,95	182,1	182,02
5	161,12	161,3	161,11
6	99,64	99,9	99,61
7	162,85	163,1	162,64
8	94,80	95,0	94,84
9	157,14	157,3	157,08
10	105,77	105,7	105,78
1'	130,54	130,8	130,48
2' et 6'	126,43	126,6	126,41
3' et 5'	129,14	129,3	129,11
4'	132,11	132,2	132,12
1''	99,64	99,9	99,21
2''	72,97	73,2	72,92
3''	76,11	76,4	73,31
4''	69,61	69,8	70,55
5''	73,90	74,1	71,20
6''	63,70	63,9	62,74
CH ₃ C=O	-	-	169,71
C=O	-	-	20,76
C=O	167,76	167,7	167,31
C=CH ₂	42,92	42,8	42,38
C=OOH	168,41	168,2	168,18

Notes : δ_c, déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt}, déplacements chimiques selon [Park et al. \(1995\)](#) ; δ_c[#], déplacements chimiques de la 4''-O-acétyl-6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine ; numérotation des carbones selon [El Antri et al. \(2004 a\)](#).

L'extraction des fleurs de *C. villosa* au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle suivie de chromatographies successives, a permis l'identification de trois flavones (la chrysine, l'apigénine et la lutéoline), de cinq monosaccharides (l' α -fructofuranose, le β -fructofuranose, l' α -glucose, le β -glucose et le β -fructopyranose) et d'un phénol (l'acide trans-p-coumarique) avec les diverses bibliothèques de spectres du laboratoire. Par ailleurs, l'interrogation des bibliothèques de spectres de la littérature a permis d'identifier quatre dérivés glucosylés de la chrysine qui ne diffèrent que par la position des différents substituants au niveau du sucre (4''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine, la 6''-O-acétyl-7-O- β -D-glucopyranosylchrysine et la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine), trois phénols (l'acide caféique, l'acide cis-p-coumarique et l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique) et un polyol (le D-pinnitol) conduisant à l'enrichissement des bibliothèques de spectres du laboratoire. La chrysine, l'apigénine, la lutéoline ainsi que les trois dérivés glucosylés de la chrysine avaient déjà été identifiés dans des extraits de parties aériennes de *C. villosa* (Dessì et al., 2001 ; Loy et al., 2001 ; Alhage et al., 2018).

Concernant les activités biologiques, le D-pinnitol est connu dans la littérature pour ses propriétés antidiabétiques, anti-inflammatoires et antioxydantes (Sánchez-Hidalgo et al., 2021). La chrysine, l'apigénine et la lutéoline présentent entre autres des propriétés antivirales, neuroprotectrices et anticancéreuses (Imran et al., 2020 ; Nabavi et al., 2015 ; Zhou et al., 2017 ; Salehi et al., 2019 ; Mani et Natesan, 2018 ; Naz et al., 2019). Les acides caféique et p-coumarique possèdent entre autres des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et cardioprotectrices (Pei et al., 2016 ; Espíndola et al., 2019). Les activités biologiques relevées dans la littérature confèrent donc un potentiel certain aux extraits aux solvants de fleurs de *C. villosa* étudiés.

Afin d'aller plus avant dans l'étude de la composition chimique d'extraits aux solvants de *C. villosa* de Corse, dans la suite de ce travail nous nous sommes intéressés aux racines de cet arbuste (paragraphe III.3.).

III.3. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'UN EXTRAIT DE RACINES DE *CALICOTOME VILLOSA* DE CORSE

Les racines utilisées dans cette étude ont été récoltées en septembre 2018 au lieu-dit Vignola sur la commune d'Ajaccio (41°54'45.0"N 8°39'11.2"E). Les racines nettoyées ont été stockées puis broyées. Les copeaux (192,6 g) ont été extraits pendant 24 h avec 600 mL de méthanol à l'aide d'un appareil de Soxhlet. La solution méthanolique résultante a été évaporée (évaporateur rotatif) donnant lieu à un extrait de 9,18 g, soit un rendement de 4,7 % (m/m) par rapport à la masse sèche de végétal. Le spectre RMN ^{13}C de l'extrait brut a été enregistré dans le DMSO- d_6 . L'interrogation des diverses bibliothèques de données spectrales issues du laboratoire ou de la littérature n'ayant permis d'identifier aucune molécule, l'extrait a été soumis à un premier fractionnement. Un échantillon de 9,11 g d'extrait au méthanol a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 - 500 μm ; 60 Å ; 300 g) à l'aide de quatre solvants de polarité croissante (pentane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). A l'issue de cette chromatographie, quatre fractions ont été obtenues (F₁ à F₄) (**Figure 32**).

La première fraction F₁, éluée au pentane, ne représente que 8 mg et renferme manifestement des composés à chaînes grasses saturées et insaturées. En effet, sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction, nous relevons plusieurs signaux compris entre δ_{C} = 130,88 ppm et 128,81 ppm et entre 31,94 ppm et 14,06 ppm. Par ailleurs, les spectres RMN ^{13}C et DEPT de la fraction F₄ obtenue avec du méthanol (4,17 g) présentent essentiellement des signaux appartenant manifestement à des sucres, compris entre i) δ_{C} = 103,98 ppm et 83,73 ppm (carbones anomériques) ; ii) δ_{C} = 77,26 ppm et 69,60 ppm (alcools secondaires) ainsi que iii) δ_{C} = 63,80 ppm et 60,41 ppm (alcools primaires). Bien que la fraction F₄ représente 45,7 % de l'extrait brut, nous n'avons pas poursuivi son étude plus avant. Dans la suite de notre travail, nous avons choisi d'étudier la composition chimique des fractions au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle.

III.3.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION AU DICHLOROMETHANE

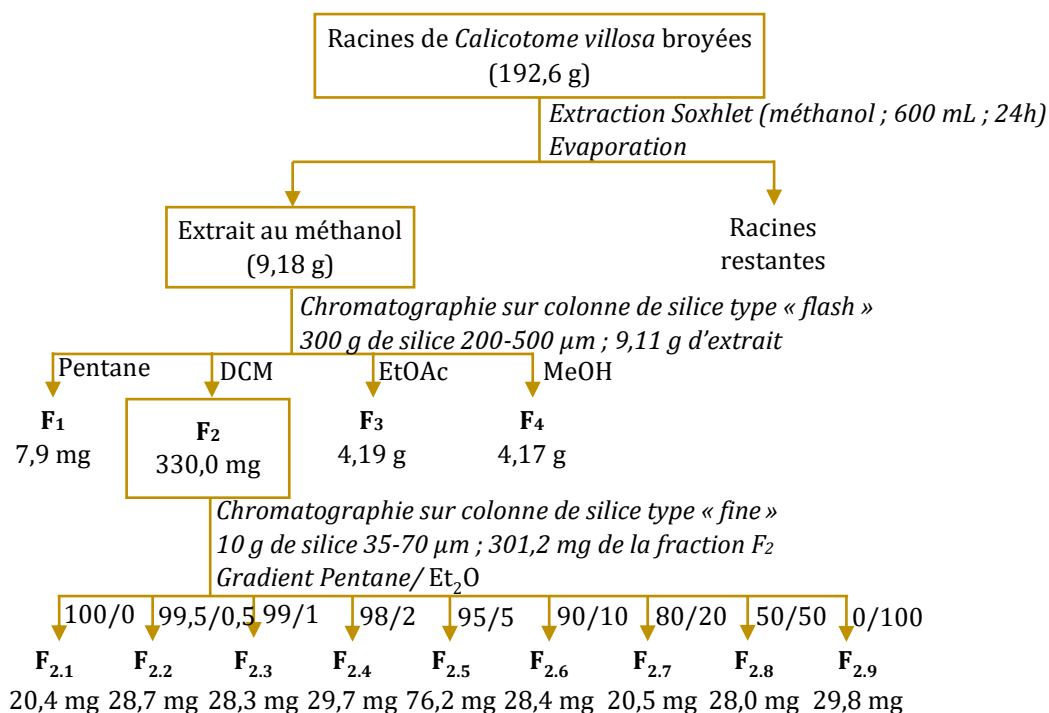
Sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction F₂ (330,0 mg), nous observons les raies de résonance caractéristiques de triglycérides et de chaînes grasses saturées et insaturées :

- à $\delta_{\text{C}} = 173,66$ et $173,32$ ppm (carbones des fonctions esters) ;
- compris entre $\delta_{\text{C}} = 130,22$ et $127,93$ ppm (carbones éthyléniques) ;
- à $\delta_{\text{C}} = 68,90$ ppm, $68,17$ ppm, $63,12$ ppm et $62,11$ ppm (carbones du glycérol) ;
- compris entre $\delta_{\text{C}} = 31,94$ et $14,06$ ppm (carbones aliphatiques).

Parallèlement, nous relevons une série de treize signaux correspondant au composé majoritaire de la fraction. L'interrogation des différentes bibliothèques de spectres du laboratoire et issues de la littérature ne permet pas l'identification de ce composé. Selon les données relevées sur le spectre de la séquence DEPT, nous dénombrons :

- six carbones quaternaires ($\delta_{\text{C}} = 170,63$ ppm ; $156,86$ ppm ; $152,34$ ppm ; $143,67$ ppm ; $136,55$ ppm ; $110,48$ ppm) ;
- trois méthines ($\delta_{\text{C}} = 113,79$ ppm ; $107,40$ ppm ; $85,52$ ppm) ;
- deux méthylènes ($\delta_{\text{C}} = 112,23$ ppm ; $35,27$ ppm) ;
- deux méthyles ($\delta_{\text{C}} = 52,21$ ppm ; $17,17$ ppm).

Afin de purifier cette molécule, la fraction F₂ a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » ($35 - 70 \mu\text{m}$; $60 \text{ \AA}$; 10 g). Neuf sous-fractions (F_{2.1} - F_{2.9}) ont été éluées avec un gradient de solvants pentane/oxyde de diéthyle ($100:0$ à $0:100$) (**Figure 32**).

Figure 32. Schéma de la chromatographie de la fraction F_2 

Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol ; Et_2O , oxyde de diéthyle

Les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions $\text{F}_{2.2}$ à $\text{F}_{2.8}$ présentent les signaux de résonance de la molécule recherchée (dans des proportions majoritaires) et ceux de composés à chaînes grasses. La fraction $\text{F}_{2.5}$ (76,2 mg ; 95:5 pentane/oxyde de diéthyle) contenant la molécule recherchée sous forme quasiment pure, a été soumise à une série d'analyses RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT135) et 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) (Figure 33, 34 ; Annexes 24-28). Le degré de pureté de la molécule nous a également permis d'enregistrer un spectre RMN 2D INADEQUATE (corrélations homonucléaires $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$).

Parallèlement, la masse exacte obtenue à partir de l'analyse SM/SM ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}^+$, masse expérimentale = 257,0783 g.mol $^{-1}$, masse théorique = 257,0789 g.mol $^{-1}$) indique que la formule brute de la molécule recherchée est $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (masse monoisotopique neutre = 234,0892 g.mol $^{-1}$) (Annexe 29). Cette dernière est en accord avec les données relevées sur les spectres RMN ^{13}C et DEPT (Tableau 20 ; Figure 34 ; Annexe 24). Cette molécule possède donc sept degrés d'insaturation.

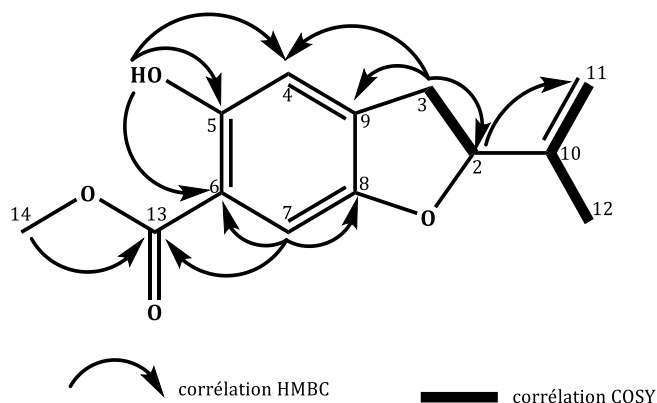
Les huit signaux entre $\delta_{\text{C}} = 107,40$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 156,86$ ppm correspondent à des carbones de quatre doubles liaisons dont une comprend un groupe méthylidène ($=\text{CH}_2$; $\delta_{\text{C}} = 112,23$ ppm). Les deux singulets à $\delta_{\text{H}} = 6,80$ ppm (lié au $\delta_{\text{C}} = 113,79$ ppm) et $\delta_{\text{H}} = 7,16$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 107,40$ ppm) suggèrent un fragment phényle tétrasubstitué, les hydrogènes étant en position *para* (**Figure 33**). Les signaux à $\delta_{\text{C}} = 170,63$ ppm (carbone quaternaire) et à $\delta_{\text{C}} = 52,21$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm ; 3H) indiquent la présence d'un groupe carbométhoxy. La corrélation relevée sur le spectre HMBC entre le signal du proton à $\delta_{\text{H}} = 7,16$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 107,40$ ppm ; C7) et le carbone C13 ($\delta_{\text{C}} = 170,63$ ppm) indique que le groupe carbométhoxy est lié au carbone C6 (C ; $\delta_{\text{C}} = 110,48$ ppm). Les corrélations entre le proton (signal à $\delta_{\text{H}} = 10,55$ ppm ; singulet ; – OH) et les carbones C4 (CH ; $\delta_{\text{C}} = 113,79$ ppm), C5 (C ; $\delta_{\text{C}} = 156,86$ ppm) et C6 (C ; $\delta_{\text{C}} = 110,48$ ppm) indiquent qu'un groupe hydroxyle est lié au carbone C5. Ainsi, étant donné que la molécule recherchée possède sept centres d'insaturation, nous supposons que le dernier degré d'insaturation correspond à un cycle dihydrofurane ($\delta_{\text{C}} = 85,52$ ppm, C2 ; 35,27 ppm, C3 ; 136,55 ppm, C9 ; 152,34 ppm, C8) lié au cycle aromatique par les carbones C8 et C9. Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le signal des protons du méthyle à $\delta_{\text{H}} = 1,75$ ppm (singulet) et les carbones C2, C10 et C11, indiquent la présence de la sous-structure $-\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ formant un système isopropylène (méthyléthényle) lié au carbone C2 (**Figure 34** ; **Annexe 26** ; **Tableau 20**).

Par ailleurs, les corrélations carbone-carbone relevées sur le spectre RMN 2D INADEQUATE confirment la structure de la molécule recherchée (**Figure 35** ; **Tableau 20**). Par exemple, la corrélation entre le signal du carbone du méthine à $\delta_{\text{C}} = 85,52$ ppm (C2) et celui du carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 143,67$ ppm (C10) indique que le groupement isopropylène est lié au carbone C2 du squelette dihydrobenzofurane. Parallèlement, les corrélations observées entre les signaux des carbones C2 et C3 ; C3 et C9 ainsi que C9 et C4, indiquent l'enchaînement $-\text{O}-\text{C}2-\text{C}3-\text{C}9-\text{C}4-$.

Le composé recherché est donc une molécule nouvelle, le 2-(1-méthyléthényle)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane (**Tableau 20** ; **Figures 33-35** ; **Annexes 24-29**). Il s'agit d'un isomère du tubaiate de méthyle (2-(1-méthyléthényle)-4-hydroxy-5-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane), les deux composés étant notamment différenciés par leurs données RMN ^1H . En effet, les signaux des deux protons aromatiques du tubaiate de méthyle correspondent à deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 7,69$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,37$ ppm

($J = 9 \text{ Hz}$) (Obara *et al.*, 1976) tandis que ceux des protons aromatiques du 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane correspondent à deux singulets à $\delta_{\text{H}} = 6,80 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{H}} = 7,16 \text{ ppm}$.

Tableau 20. Structure et données RMN du 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane avec les principales corrélations HMBC et COSY



n°C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
2	85,52	CH	5,13	t (8,0)	11	3a;3b	3a;3b;12
3	35,27	CH ₂	3,02 (a) 3,33 (b)	ddd (16,7;8,0;1,2) ddd (16,7;8,0;1,2)	2;4;5;8;9;10	2;3b;4 2;3a;4	2;4;12 2;4;12
4	113,79	CH	6,80	large s	3;5;6;7;8;9;13	3a;3b	3a;3b;5-OH
5	156,86	C	-	-	-	-	-
6	110,48	C	-	-	-	-	-
7	107,40	CH	7,16	s	4;5;6;8;9;13	-	-
8	152,34	C	-	-	-	-	-
9	136,55	C	-	-	-	-	-
10	143,67	C	-	-	-	-	-
11	112,23	CH ₂	4,91(a) 5,07(b)	m m	2;10;12 2;3;10;12	12	11b;12 11a;12
12	17,17	CH ₃	1,75	large s	2;10;11	11a;11b	2;3a;3b;11a;11b
13	170,63	C	-	-	-	-	-
14	52,21	CH ₃	3,91	s	13	-	-
5-OH	-	-	10,55	s	4;5;6;9	-	4

Notes: s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet; les hydrogènes H3a/H3b et H11a/H11b ne pouvaient pas être différenciés; numérotation des carbones selon Obara *et al.* (1976).

Figure 33. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction F2.5

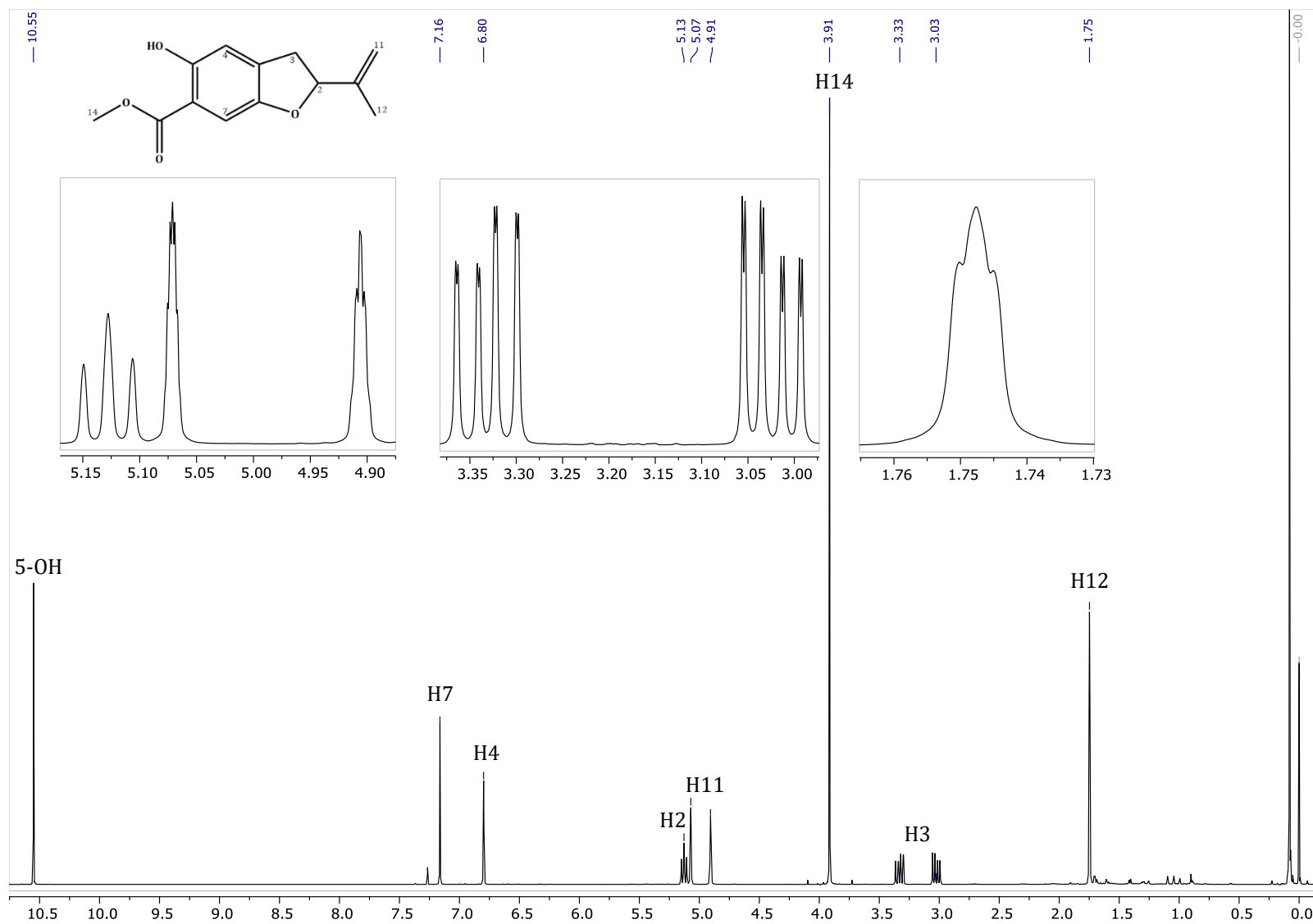


Figure 34. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction F_{2.5}

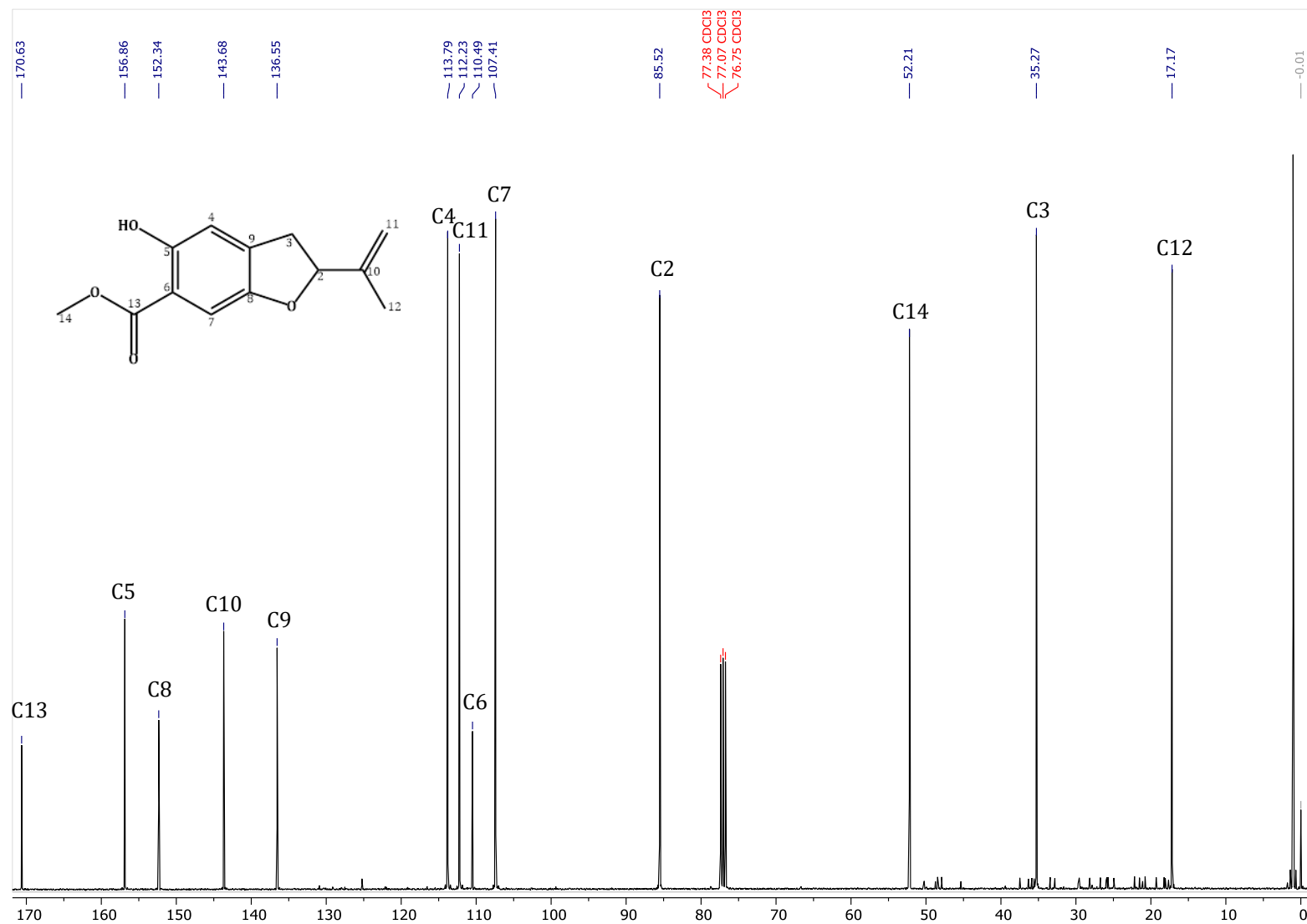
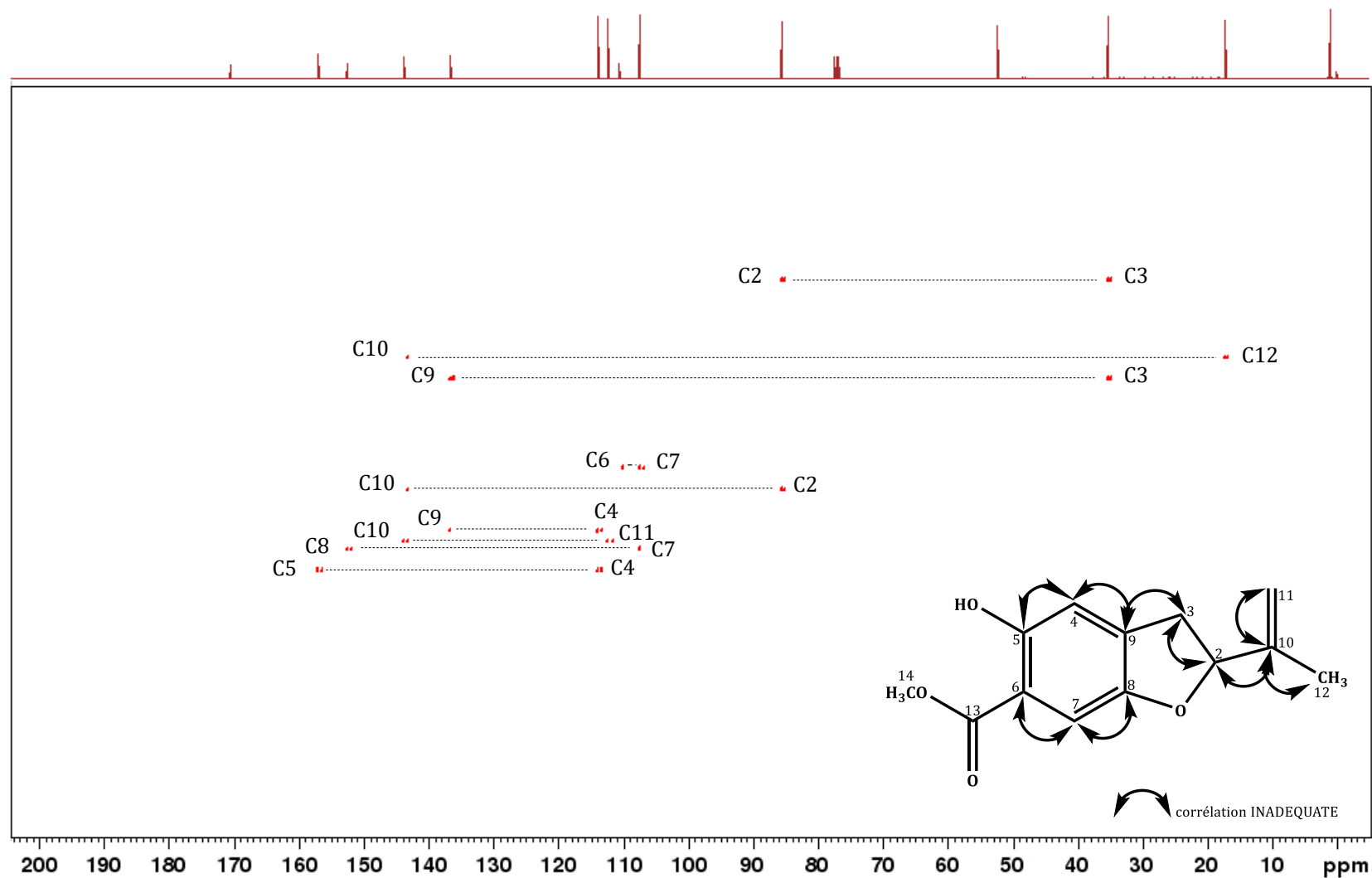


Figure 35. Spectre RMN 2D INADEQUATE et structure du 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane avec les principales corrélations

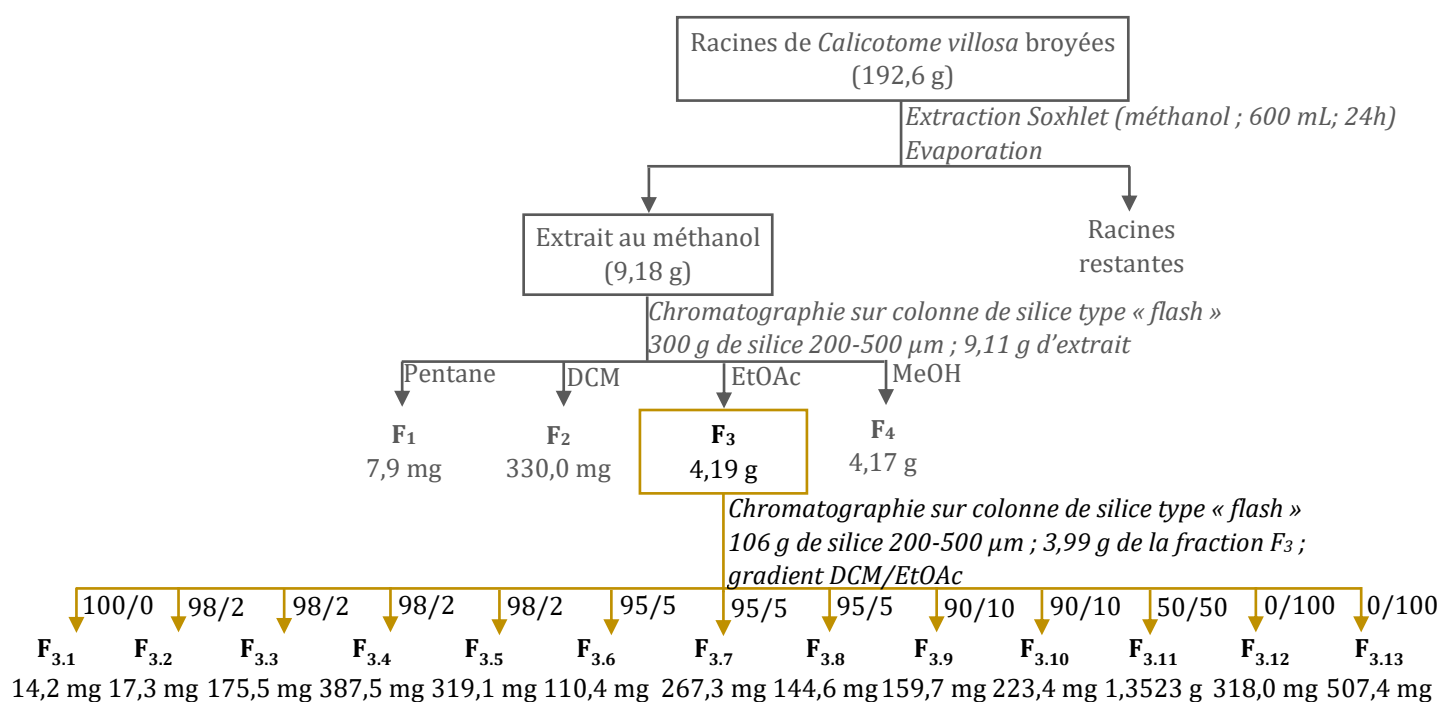


Les données RMN ^{13}C de cette nouvelle molécule ont été enregistrées dans la bibliothèque de spectres « Coumarines » du laboratoire. Afin d'aller plus avant dans la détermination de la composition chimique de l'extrait au méthanol de racines de *C. villosa*, nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la fraction à l'acétate d'éthyle.

III.3.2. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION A L'ACETATE D'ETHYLE

Sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction F_3 (4,19 g) éluée à l'acétate d'éthyle, nous relevons plusieurs séries de raies de résonance appartenant à des molécules majoritaires. L'interrogation des bibliothèques de spectres issues du laboratoire et de la littérature ne nous permettant pas d'identifier ces composés, la fraction F_3 a été soumise à une chromatographie de type « flash » (Figure 36). Un échantillon de la fraction F_3 (3,99 g) a été fractionné sur colonne de silice (200 – 500 μm ; 60 Å ; 106 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100:0 à 0:100), et treize sous-fractions ont été obtenues ($\text{F}_{3.1}$ – $\text{F}_{3.13}$).

Figure 36. Schéma de l'extraction et du fractionnement des racines de *Calicotome villosa*



Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol.

L'interrogation des diverses bibliothèques de spectres du laboratoire nous a permis d'identifier le 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane (molécule nouvelle préalablement identifiée dans la fraction F_2), dans la sous-première fraction $\text{F}_{3.1}$, ainsi que le β -sitostérol et le stigmastérol dans la sous-fraction $\text{F}_{3.2}$. Par la suite, sur les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions $\text{F}_{3.3}$ et $\text{F}_{3.4}$, nous relevons la même série de seize raies de résonance d'intensités importantes et homogènes qui reste non attribuée (**Annexe 31**). Les différents signaux de la molécule recherchée ont été différenciés à partir de la séquence DEPT comme suit (**Annexe 32**):

- sept carbones quaternaires ($\delta_{\text{C}} = 157,38 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 156,55 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 154,14 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 148,07 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 141,71 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 117,96 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 112,32 \text{ ppm}$);
- sept méthines ($\delta_{\text{C}} = 132,07 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 109,92 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 104,76 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 103,66 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 93,83 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 40,14 \text{ ppm}$) dont un lié à un oxygène -CH-O- ($\delta_{\text{C}} = 78,56 \text{ ppm}$) ;
- deux méthylènes : le premier lié à un oxygène -CH₂-O- ($\delta_{\text{C}} = 66,43 \text{ ppm}$) et le second lié à deux oxygènes -O-CH₂-O- ($\delta_{\text{C}} = 101,28 \text{ ppm}$).

Afin d'identifier cette molécule, la sous-fraction $\text{F}_{3.4}$, a été soumise à une séquence d'analyses RMN 1D et 2D (**Annexe 30, 33-36**). Sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C enregistrés, nous relevons une série de signaux de résonance indiquant la présence d'une sous-structure « pyrano-furano » (**Tableau 21**) :

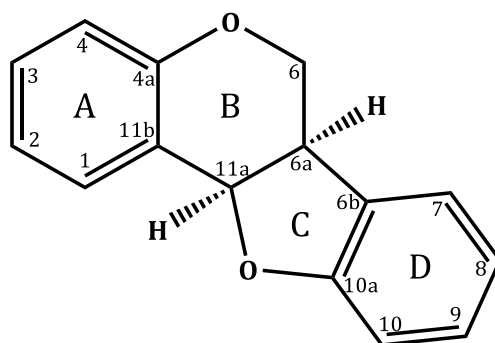
- un méthylène : $\delta_{\text{C}} = 66,43 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 4,20 \text{ ppm}$ (dd) et $\delta_{\text{H}} = 3,63 \text{ ppm}$ (t) ;
- un méthine à $\delta_{\text{C}} = 40,14 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 3,45 \text{ ppm}$ (m) ;
- un méthine à $\delta_{\text{C}} = 78,56 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 5,46 \text{ ppm}$ (d).

Diverses corrélations observées sur le spectre HMBC confirment cette sous-structure (**Annexe 34**) :

- les protons du méthylène ($\delta_{\text{H}} = 4,20 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 3,63 \text{ ppm}$) avec les carbones à $\delta_{\text{C}} = 156,55 \text{ ppm}$, $40,14 \text{ ppm}$, $117,96 \text{ ppm}$ et $78,56 \text{ ppm}$;
- le proton à $\delta_{\text{H}} = 3,45 \text{ ppm}$ avec les carbones à $\delta_{\text{C}} = 66,43 \text{ ppm}$, $117,96 \text{ ppm}$ et $154,14 \text{ ppm}$;
- le proton à $\delta_{\text{H}} = 5,46 \text{ ppm}$ avec les carbones à $156,55 \text{ ppm}$, $66,43 \text{ ppm}$, $40,14 \text{ ppm}$ et $112,32 \text{ ppm}$.

L'ensemble des données spectrales observées sur les spectres RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY, [Annexes 33-35](#)) associé aux valeurs des déplacements chimiques relevées sur les spectres RMN ^1H ($\delta_{\text{H}} = 7,33 \text{ ppm}$; $6,53 \text{ ppm}$; $6,40 \text{ ppm}$; $6,70 \text{ ppm}$; $6,42 \text{ ppm}$) et ^{13}C ($\delta_{\text{C}} = 132,07 \text{ ppm}$; $109,92 \text{ ppm}$; $157,38 \text{ ppm}$; $103,66 \text{ ppm}$; $156,55 \text{ ppm}$; $112,32 \text{ ppm}$; $117,96 \text{ ppm}$; $104,76 \text{ ppm}$; $141,71 \text{ ppm}$; $148,07 \text{ ppm}$; $93,83 \text{ ppm}$; $154,14 \text{ ppm}$) indique que la molécule recherchée possède deux cycles aromatiques situés de part et d'autre du motif pyrano-furano ([Tableau 21](#)), formant ainsi un squelette ptérocarpane (*i.e.* cis-6a,11a-dihydro-6H-benzofuro(3,2-c)benzopyrane) ([Figure 37](#) ; [Fotso et al., 2015](#)).

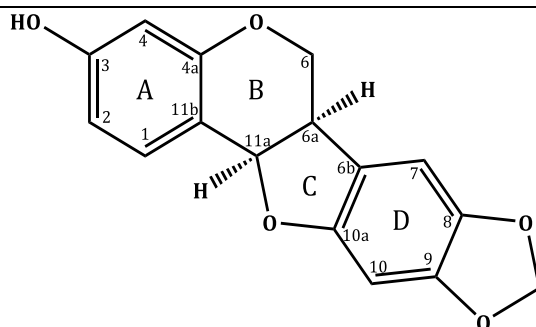
Figure 37. Structure du squelette ptérocarpane



De plus, la valeur de la constante de couplage entre les protons H6a (lié au carbone C6a ; $\delta_{\text{C}} = 40,14 \text{ ppm}$) et H11a (lié au C11a ; $\delta_{\text{C}} = 78,56 \text{ ppm}$) étant égale à $6,8 \text{ Hz}$ (³) confirme la jonction *cis* des deux cycles constituant la sous-structure pyrano-furano ([Yoon et al., 2004](#) ; [Tableau 21](#)). Enfin, le signal du carbone restant ($\delta_{\text{C}} = 101,27 \text{ ppm}$) est caractéristique d'un groupe méthylènedioxy $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$, suggérant un cycle dioxolane lié au cycle aromatique D du ptérocarpane par les carbones C8 et C9 (corrélations HMBC).

Des recherches bibliographiques ont permis d'identifier la maackiaine, dont les données RMN ^{13}C décrites par [Chaudhuri et al. \(1995\)](#) concordent avec celles relevées sur le spectre de la sous-fraction F_{3.4} ([Tableau 21](#)). En effet, pour cette molécule :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence (Chaudhuri et al., 1995) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,06 ppm pour plus de 80 % des signaux. Seules trois variations de déplacements chimiques plus importantes ont été observées pour les carbones C2, C3 et C11b situés en position α ou β d'un oxygène.

Tableau 21. Structure et données RMN de la maackiaine

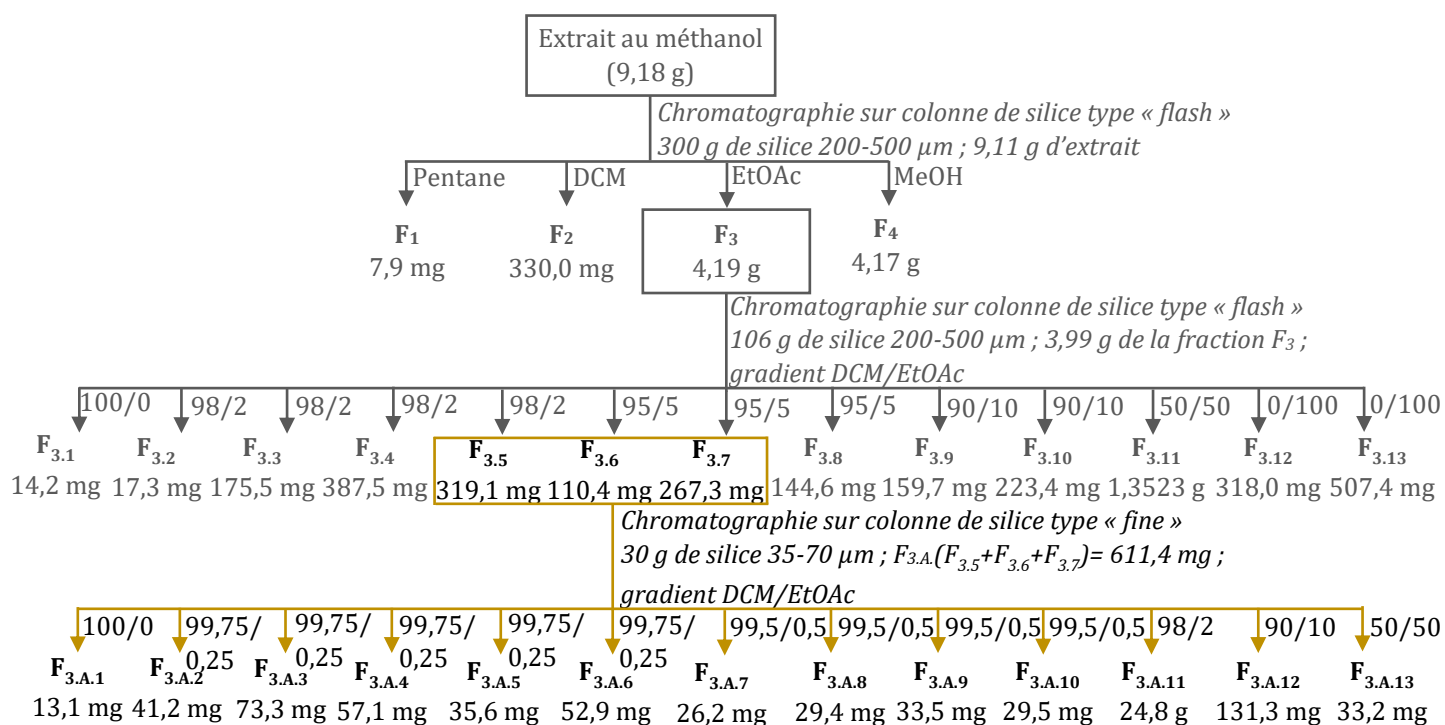
n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$	DEPT	δ^1H (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	132,07	132,1	0,03	CH	7,33	d (8,3)	3;4;4a;11a	2	2;11a
2	109,92	109,8	0,12	CH	6,53	dd (2,5;8,3)	-	1	1;11a
3	157,38	157,1	0,28	C	-	-	-	-	-
4	103,66	103,6	0,06	CH	6,40	d (2,5)	2;4a;11a;11b	-	-
4a	156,55	156,6	0,05	C	-	-	-	-	-
6	66,43	66,4	0,03	CH ₂	4,20 (x) 3,63 (y)	dd (11,0;5,0) t (11,0)	4a;6a;6b;11a	6y;6a 6x;6a	6y;6a 6x;6a
6a	40,14	40,1	0,04	CH	3,45	m	6;6b;7;10a	11a;6x;6y	6x;6y 7;11a
6b	117,96	117,9	0,06	C	-	-	-	-	-
7	104,76	104,7	0,06	CH	6,70	s	6a;6b;8;9;10; 10a	-	6a
8	141,71	141,7	0,01	C	-	-	-	-	-
9	148,07	148,1	0,03	C	-	-	-	-	-
10	93,83	93,8	0,03	CH	6,42	s	6b;7;8;9;10a	-	-
10a	154,14	154,2	0,06	C	-	-	-	-	-
11a	78,56	78,5	0,06	CH	5,46	d (6,8)	1;4a;6;6a;11b	6a	1;2;6a
11b	112,32	112,5	0,18	C	-	-	-	-	-
OCH ₂ O	101,28	101,3	0,02	CH ₂	5,88 (x) 5,89 (y)	d (11,9) d (11,9)	8;9	-	-
3-OH	-	-	-	-	6,15	s large	-	-	-

Notes: s = singulet, t = triplet, d=doublet, m = multiplet; δ_c : déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} : déplacements chimiques et numérotation des carbones selon Chaudhuri et al. (1995).

Suite à l'identification de la maackiaine, nous avons constitué une bibliothèque de spectres de référence de ptérocarpanes décrits en RMN ^{13}C dans la littérature. Nous avons ainsi référencé plus de 200 molécules identifiées dans des extraits de diverses espèces végétales.

Dans les sous-fractions $F_{3.5}$ à $F_{3.7}$, nous identifions à nouveau la maackiaine cependant, plusieurs séries de raies de résonance d'intensités importantes restent non attribuées. Ces trois sous-fractions ayant des profils spectraux similaires, ont été rassemblées, formant ainsi la fraction $F_{3.A}$ (611,4 mg). Cette dernière a été soumise à nouveau à une chromatographie sur colonne de silice de type fine (35 - 70 μm ; 60 Å ; 30 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100:0 à 50:50) pour donner treize sous-fractions ($F_{3.A.1}$ – $F_{3.A.13}$) (**Figure 38**).

Figure 38. Schéma de la chromatographie des sous-fractions $F_{3.5}$ à $F_{3.7}$

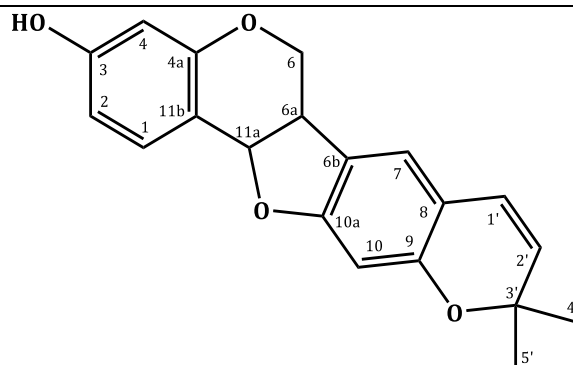


Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol.

Dans la sous-fraction F_{3.A.1}, nous identifions à nouveau le β -sitostérol et le stigmastérol ainsi que la maackiaine, cette dernière étant également retrouvée dans les sous-fractions F_{3.A.2} à F_{3.A.6} (bibliothèques de spectres du laboratoire). Dans la suite de ce travail, nous décrivons uniquement les fractions de chromatographie apportant de nouvelles informations et dont les signaux des spectres ont été en majeure partie attribués, c'est-à-dire pour lesquels les raies de résonance restantes sont d'intensités négligeables.

Parallèlement, l'interrogation de la bibliothèque de spectres « Ptérocarpanes » issue de la littérature, a permis l'identification de l'isonéorauténol présent dans des proportions majoritaire, dans la sous-fraction F_{3.A.2} (**Tableau 22**). Pour cette molécule :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence ([Nkengfack et al., 1995](#)) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,09 ppm pour la très grande majorité des signaux ;
- seules deux superpositions de signaux ont été relevées entre l'isonéorauténol et la maackiaine. Ainsi, malgré la similitude structurale entre ces deux molécules, l'identification par RMN ^{13}C à partir des données de la littérature est effectuée sans aucune ambiguïté.

Tableau 22. Structure et données RMN ^{13}C de l'isonéorauténol

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	132,22	132,2	0,02
2	109,89	109,8	0,09
3	160,14	160,2	0,06
4	103,64	103,7	0,06
4a	157,26	157,2	0,06
6	66,50	66,5	0,00
6a	39,39	39,4	0,01
6b	119,09	119,4	0,31
7	122,01	122,0	0,01
8	114,88	114,9	0,02
9	156,55	156,6	0,05
10	99,38	99,4	0,02
10a	154,40	154,4	0,00
11a	78,44	78,4	0,04
11b	112,35	112,4	0,05
1'	122,10	122,1	0,00
2'	127,61	127,6	0,01
3'	76,55	76,5	0,05
4'	27,95	26,9	1,05
5'	27,81	26,9	0,91

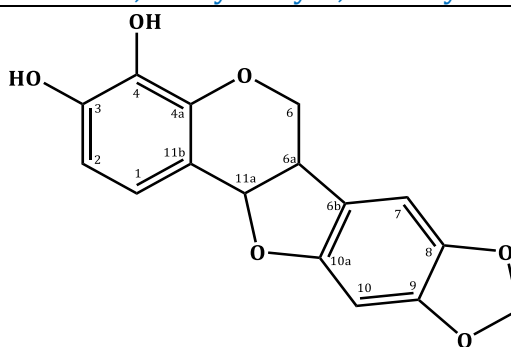
Notes: δ_c : déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , déplacements chimiques selon *Nkengfack et al. (1995)*; numérotation des carbones selon *Chaudhuri et al. (1995)*.

Dans les sous-fractions F_{3.A.5} à F_{3.A.7}, nous identifions le 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane, à l'aide de la bibliothèque « Ptérocarpanes » issue de la littérature (**Tableau 23**). Une nouvelle fois, pour ce composé :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon et celui du composé de référence ([Chaudhuri et al., 1995](#)) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,11 ppm pour tous les signaux.

Tableau 23.

Structure et données RMN ^{13}C du 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane



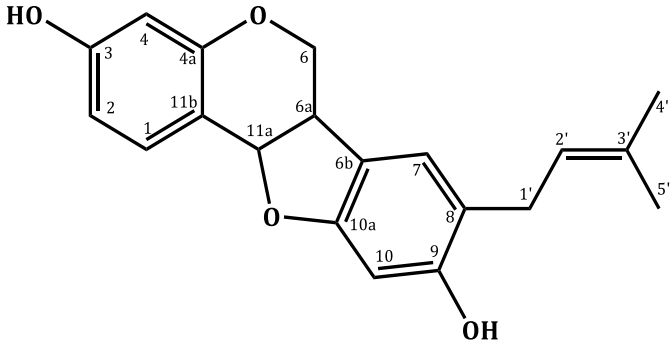
n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	121,74	121,7	0,04
2	109,58	109,5	0,08
3	144,44	144,4	0,04
4	131,59	131,5	0,09
4a	143,11	143,0	0,11
6	66,93	66,9	0,03
6a	40,29	40,3	0,01
6b	117,49	117,4	0,09
7	104,67	104,7	0,03
8	141,77	141,8	0,03
9	148,21	148,2	0,01
10	93,93	93,9	0,03
10a	154,23	154,2	0,03
11a	78,32	78,3	0,02
11b	112,53	112,5	0,03
O-CH ₂ -O	101,32	101,3	0,02

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux ; δ_c^{litt} , déplacements chimiques et numérotation des carbones selon [Chaudhuri et al. \(1995\)](#).

Nous identifions également l'homoédudiol avec la bibliothèque « Ptérocarpanes » de la littérature, dans les sous-fractions F_{3.A.11} à F_{3.A.13}, pour lequel :

- tous les déplacements chimiques attendus ont été observés ;
- les variations des déplacements chimiques entre le spectre de l'échantillon (**Tableau 24**) et celui du composé de référence (Kippsy, 2013) sont faibles puisqu'elles sont inférieures ou égales à 0,15 ppm pour la plupart des signaux, les valeurs restantes étant comprises entre 0,21 et 0,39 ppm.

Tableau 24. Structure et données RMN ^{13}C de l'homoédudiol

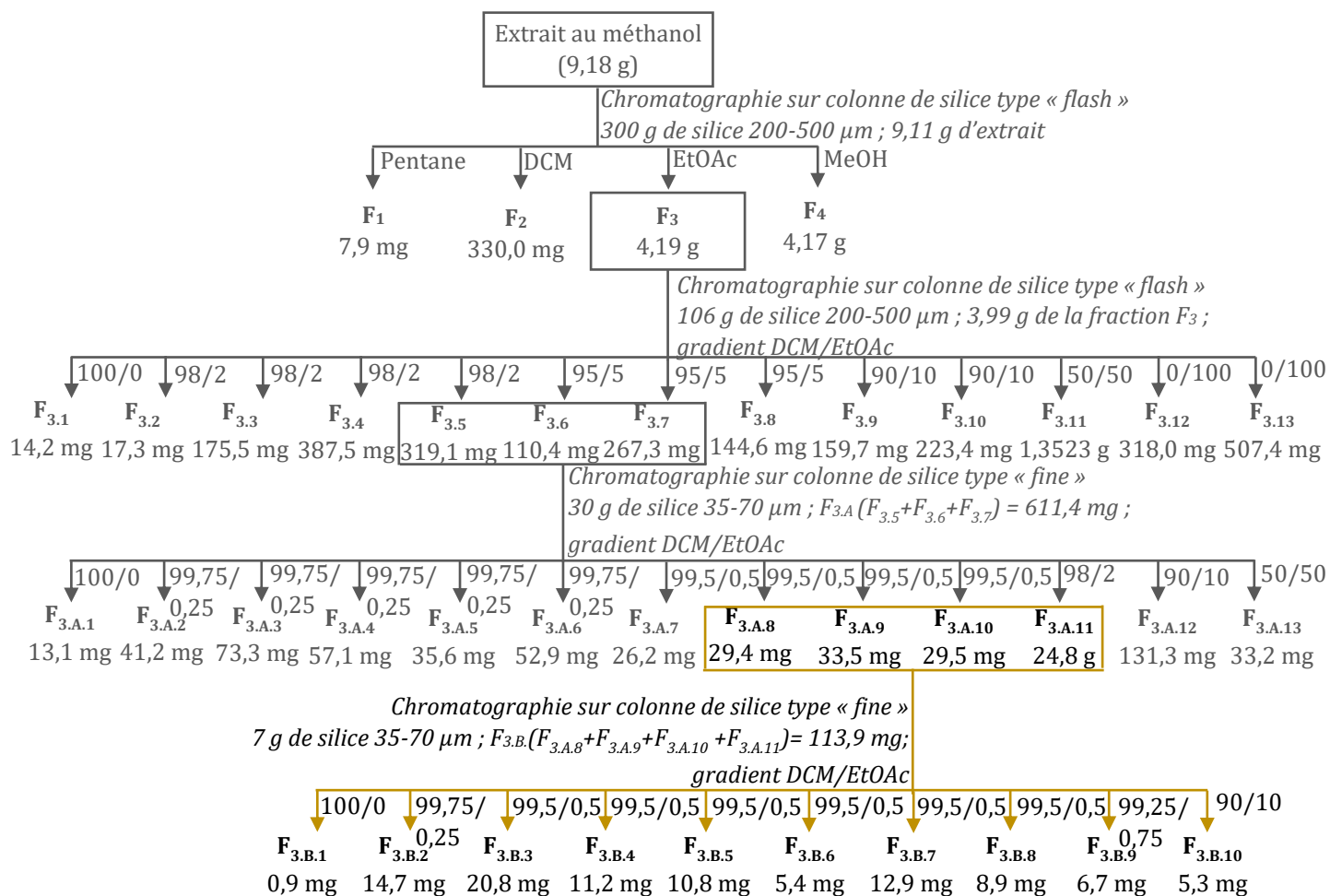


n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	132,20	132,2	0,00
2	109,95	109,8	0,15
3	157,21	157,1	0,11
4	103,66	103,7	0,04
4a	156,46	156,6	0,14
6	66,57	66,6	0,03
6a	39,59	39,6	0,01
6b	118,83	118,9	0,07
7	125,28	125,3	0,02
8	119,49	119,1	0,39
9	158,57	158,9	0,33
10	98,54	98,6	0,06
10a	154,97	155,2	0,23
11a	78,49	78,4	0,09
11b	112,39	112,6	0,21
1'	29,13	29,4	0,27
2'	122,23	122,2	0,03
3'	134,29	134,6	0,31
4'	25,79	25,8	0,01
5'	17,82	17,9	0,08

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , déplacements chimiques et numérotation des carbones selon Kippsy (2013).

Par ailleurs, les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions $F_{3.A.8}$ à $F_{3.A.11}$ présentent deux séries de raies de résonance d'intensités importantes qui restent non attribuées. Afin d'identifier ces molécules, ces quatre sous-fractions présentant des profils spectraux voisins ont été rassemblées. L'échantillon obtenu ($F_{3.B}$; 113,9 mg) a été soumis à une chromatographie sur colonne de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 $\text{\AA}$; 7 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100 : 0 à 90 : 10) pour donner dix sous-fractions ($F_{3.B.1}$ – $F_{3.B.10}$) (**Figure 39**). Sur les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions $F_{3.B.3}$ à $F_{3.B.7}$, nous relevons principalement les raies de résonance des deux molécules recherchées dans des proportions relatives variables (3 : 1 à 1 : 4). Bien que ces deux molécules n'aient pas pu être purifiées, nous avons enregistré des séquences d'analyses RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) et 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) ayant permis leur identification structurale sans ambiguïté (**Annexes 37-43** ; **45-51**).

Figure 39. Schéma de la chromatographie des sous-fractions $F_{3.A.8}$ à $F_{3.A.11}$



Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol.

Dans la sous-fraction F_{3.B.3}, l'une des deux molécules recherchées est présente dans des proportions majoritaires (3 : 1) selon le spectre RMN ^{13}C qui comporte une série de vingt-et-une raies de résonance principales. D'après le spectre DEPT, cette molécule possède :

- neuf carbones quaternaires (δ_{C} = 160,70 ppm ; 157,02 ppm ; 145,52 ppm ; 142,01 ppm ; 137,72 ppm ; 132,46 ppm ; 128,72 ppm ; 118,99 ppm et 115,52 ppm) ;
- sept méthines (δ_{C} = 125,01 ppm ; 122,81 ppm ; 121,00 ppm ; 107,75 ppm ; 98,48 ppm ; 78,44 ppm et 39,70 ppm) ;
- deux méthylènes (δ_{C} = 67,04 ppm et 28,15 ppm) ;
- trois méthyles (δ_{C} = 60,62 ppm ; 25,83 ppm et 17,85 ppm).

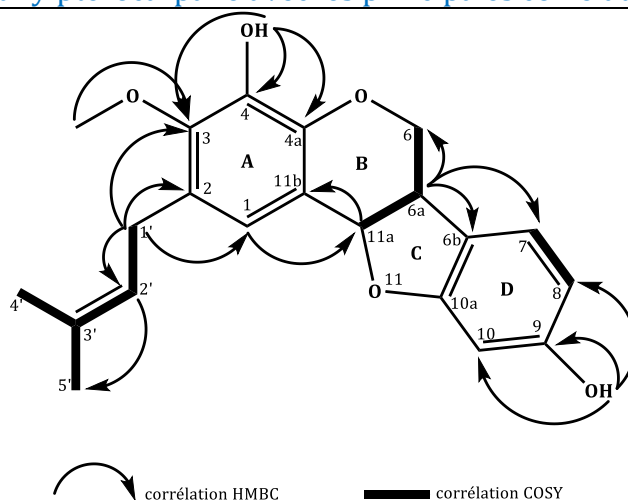
Nous sommes de nouveau en présence d'un squelette ptérocarpane. En effet, sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C (**Annexes 37, 38**), nous relevons, comme pour les molécules précédentes, les déplacements chimiques de l'enchaînement -O-CH₂-CH-CH-O- caractérisant la sous-structure « pyrano-furano » : δ_{C} = 67,04 ppm (δ_{H} = 4,32 ppm, dd ; δ_{H} = 3,62 ppm, t), δ_{C} = 39,70 ppm (δ_{H} = 3,57 ppm, m), et δ_{C} = 78,44 ppm (δ_{H} = 5,50 ppm, d) (**Tableau 25**). De plus, la valeur de la constante de couplage entre les protons H6a et H11a (3J = 6,6 Hz) confirme la jonction *cis* des deux cycles B et C (**Yoon et al., 2004**). Douze carbones aromatiques (δ_{C} = 121,00 ppm ; 128,72 ppm ; 145,52 ppm ; 137,72 ppm ; 142,01 ppm ; 115,52 ppm ; 118,99 ppm ; 125,01 ppm ; 107,75 ppm ; 157,02 ppm ; 98,48 ppm ; 160,70 ppm) constituent les deux derniers cycles A et D du squelette ptérocarpane (**Tableau 25**).

Parallèlement, nous avons soumis la fraction F_{3.B.3} à une analyse SM/SM ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, C₂₁H₂₂O₅Na⁺, masse expérimentale = 377,1347 g.mol⁻¹, masse théorique = 377,1359 g.mol⁻¹) indiquant que la formule brute de la molécule recherchée est C₂₁H₂₂O₅ (masse monoisotopique neutre = 354,1467 g.mol⁻¹) (cf. **partie expérimentale ; Annexe 44**). Cette molécule possède donc onze degrés d'insaturation. Le squelette ptérocarpane représentant à lui seul dix degrés d'insaturation, le dernier correspond donc à une double liaison formée par les deux derniers carbones hybridés sp².

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C mettent en évidence la présence d'un groupe méthoxy -O-CH₃ (δ_{H} = 3,86 ppm, s ; δ_{C} = 60,62 ppm), lié au carbone quaternaire C3 (δ_{C} = 145,52 ppm)

(corrélations HMBC) (**Tableau 25** ; **Annexe 41**). Nous observons également la présence de deux fonctions hydroxyles -OH ($\delta_{\text{H}} = 4,95$ ppm, singulet et $\delta_{\text{H}} = 5,47$ ppm, singulet). Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton qui résonne à $\delta_{\text{H}} = 4,95$ ppm et les carbones aromatiques C8, C9 et C10 d'une part et entre le proton qui résonne à $\delta_{\text{H}} = 5,47$ ppm et les carbones aromatiques C3, C4 et C4a d'autre part indiquent que les deux fonctions hydroxyles sont liées aux carbones C9 et C4, respectivement (**Tableau 25** ; **Annexe 41**). Les cinq signaux restants ($\delta_{\text{C}} = 28,15$ ppm, CH_2 ; $\delta_{\text{C}} = 122,81$ ppm, CH ; $\delta_{\text{C}} = 132,46$ ppm, C ; $\delta_{\text{C}} = 25,83$ ppm, CH_3 et $17,85$ ppm, CH_3) sont caractéristiques de la sous-structure γ,γ' -diméthylallyle, motif renfermant le dernier centre d'insaturation ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$). Ces déplacements chimiques sont d'ailleurs similaires à ceux de la chaîne γ,γ' -diméthylallyle de l'homoédudiol, identifié précédemment. Les corrélations observées sur le spectre HMBC (**Annexe 41**) entre les protons H1' ($\delta_{\text{H}} = 3,33$ ppm) liés au carbone C1' ($\delta_{\text{C}} = 28,15$ ppm) et les carbones C1, C2 et C3 indiquent que la chaîne carbonée est liée au carbone C2 du cycle A du ptérocarpane.

Ainsi la première molécule recherchée est un nouveau ptérocarpane nommé 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane dont les données RMN complètes sont présentées dans le **Tableau 25** et les **Annexes 37 à 44** (spectres RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, et NOESY).

Tableau 25. Structure (stéréochimie relative) et données RMN du 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane avec les principales corrélations HMBC et COSY

n°C	δ_c (ppm)	DEPT	δ_H (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	121,00	CH	6,89	large s	1';3;4;4a;11a	-	1';11a
2	128,72	C	-	-	-	-	-
3	145,52	C	-	-	-	-	-
4	137,72	C	-	-	-	-	-
4a	142,01	C	-	-	-	-	-
6	67,04	CH ₂	4,32 (x) 3,62 (y)	dd (10,9;4,8) t (10,9)	4a;6a;6b;11a	6y;6a 6x;	6y 6x
6a	39,70	CH	3,57	m	6;6b;7;10a	11a;6x	7;11a
6b	118,99	C	-	-	-	-	-
7	125,01	CH	7,08	d (8,6)	6a;9;10;10a	8	6a;8
8	107,75	CH	6,37	m	10;10a	7	7
9	157,02	C	-	-	-	-	-
10	98,48	CH	6,39	s	6b;8;9	-	9-OH
10a	160,70	C	-	-	-	-	-
11a	78,44	CH	5,50	d (6,6)	1;4a;6;6a;11b	6a	1;6a
11b	115,52	C	-	-	-	-	-
1'	28,15	CH ₂	3,33	m	1;2;2';3;3'	2';4';5'	1;2';-OCH ₃
2'	122,81	CH	5,29	m	4';5'	1';4';5'	1'
3'	132,46	C	-	-	-	-	-
4'	17,85	CH ₃	1,74	large s	2';3';5'	1';2'	-
5'	25,83	CH ₃	1,74	large s	2';3';4'	1';2'	-
-OCH ₃	60,62	-	3,86	s	3	-	1'
4-OH	-	-	5,47	s	3;4;4a	-	-
9-OH	-	-	4,95	s	8; 9;10	-	10

Notes: s = singulet, t = triplet, d=doublet, m = multiplet; numérotation des carbones selon Chaudhuri et al. (1995).

Par ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C (**Annexe 46**) de la sous-fraction F_{3.B.7}, nous relevons une série de vingt signaux de résonance intenses appartenant à la seconde molécule recherchée qui est présente dans des proportions majoritaires par rapport à la molécule identifiée précédemment (4 : 1). Les signaux ont été différenciés selon le spectre DEPT comme suit (**Annexe 47**) :

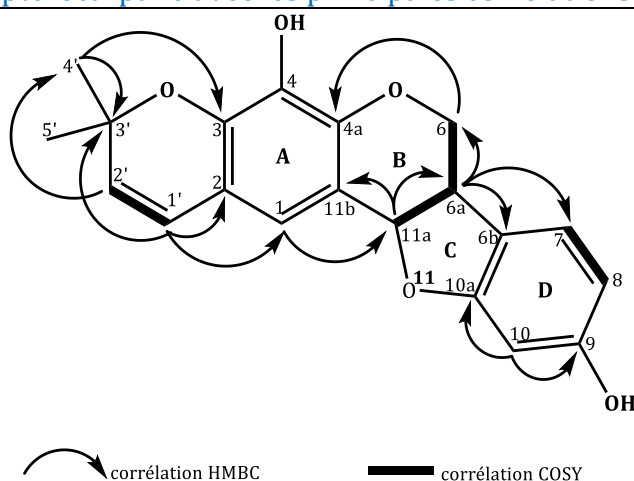
- neuf carbones quaternaires (δ_{C} = 160,63 ppm ; 157,07 ppm ; 143,73 ppm ; 140,30 ppm ; 133,01 ppm ; 119,00 ppm ; 116,12 ppm ; 112,65 ppm et 77,31 ppm) ;
- huit méthines (δ_{C} = 129,39 ppm ; 125,04 ppm ; 121,79 ppm ; 118,41 ppm ; 107,77 ppm ; 98,44 ppm ; 78,57 ppm et 39,53 ppm ;
- un méthylène (δ_{C} = 66,92 ppm) ;
- deux méthyles (δ_{C} = 28,16 ppm et 27,90 ppm).

Comme précédemment, les spectres RMN ^1H et ^{13}C (**Annexes 45, 46**) mettent en évidence la présence du squelette ptérocarpane et notamment la sous-structure pyrano-furano, à travers l'enchaînement -O-CH₂-CH-CH-O- : δ_{C} = 66,92 ppm (δ_{H} = 4,34 ppm, dd ; δ_{H} = 3,63 ppm, t), δ_{C} = 39,53 ppm (δ_{H} = 3,53 ppm, m) et δ_{C} = 78,57 ppm (δ_{H} = 5,48 ppm, d) (**Tableau 26**). Une fois de plus, la valeur de la constante de couplage entre les protons H6a et H11a (3J = 6,5 Hz) confirme la jonction *cis* des deux cycles aliphatiques (Yoon *et al.*, 2004). Par ailleurs, les valeurs des déplacements chimiques, les multiplicités des signaux, les valeurs des constantes de couplage ainsi que les douze carbones sp² appartenant aux deux cycles phényles, sont caractéristiques du squelette ptérocarpane (**Tableau 26** ; Fotso *et al.*, 2015).

Par ailleurs, la masse exacte obtenue à partir des analyses SM/SM ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, C₂₀H₁₈O₅Na⁺, masse expérimentale = 361,1050 g.mol⁻¹, masse théorique = 361,1046 g.mol⁻¹) indique que la formule brute de la molécule recherchée est C₂₀H₁₈O₅ (masse monoisotopique neutre = 338,1154 g.mol⁻¹). Ces données sont en accord avec les spectres RMN ^{13}C et DEPT (**Tableau 26** ; **Annexe 52**). Cette molécule possède donc douze degrés d'insaturation, dont dix appartiennent au squelette ptérocarpane. D'après les valeurs des déplacements chimiques (cinq signaux restants non attribués), les deux derniers degrés d'insaturation correspondent à une double liaison d'une part (CH = CH ; δ_{C} = 129,39 ppm et δ_{C} = 121,79 ppm), et à un cinquième cycle d'autre part (δ_{C} = 116,12 ppm ; 129,39 ppm ; 121,79 ppm ; 77,31 ppm ; 140,30 ppm). Cette molécule

possédant un cycle D identique à celui du ptérocarpane identifié précédemment (**Tableau 25** ; **Tableau 26**), le cinquième cycle est par conséquent lié au cycle aromatique A. Ce cycle comprend un atome d'oxygène lié à un carbone quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 77,31$ ppm) portant deux méthyles ($\delta_{\text{C}} = 27,90$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 28,16$ ppm) puis à la double liaison, décrivant ainsi une sous-structure pyrane (ou benzopyrane si le cycle A est inclus dans la sous-structure) (**Annexe 49**). D'après les corrélations observées sur le spectre HMBC, le proton qui résonne à $\delta_{\text{H}} = 6,31$ ppm (doublet, lié au carbone C1', $\delta_{\text{C}} = 121,79$ ppm) corrèle avec les carbones dont les signaux sont situés à $\delta_{\text{C}} = 118,41$ ppm (méthine), $\delta_{\text{C}} = 116,12$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 140,30$ ppm (carbones quaternaires). Ces données indiquent que le cycle pyrano est lié au cycle A par les carbones C2 et C3 (**Annexes 48, 49**).

Ainsi, la seconde molécule recherchée est également un nouveau ptérocarpane, nommé 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane (4-hydroxynéorauténol). Les données RMN 1D et 2D complètes sont rapportées dans le **Tableau 26** et les **Annexes 45-52**.

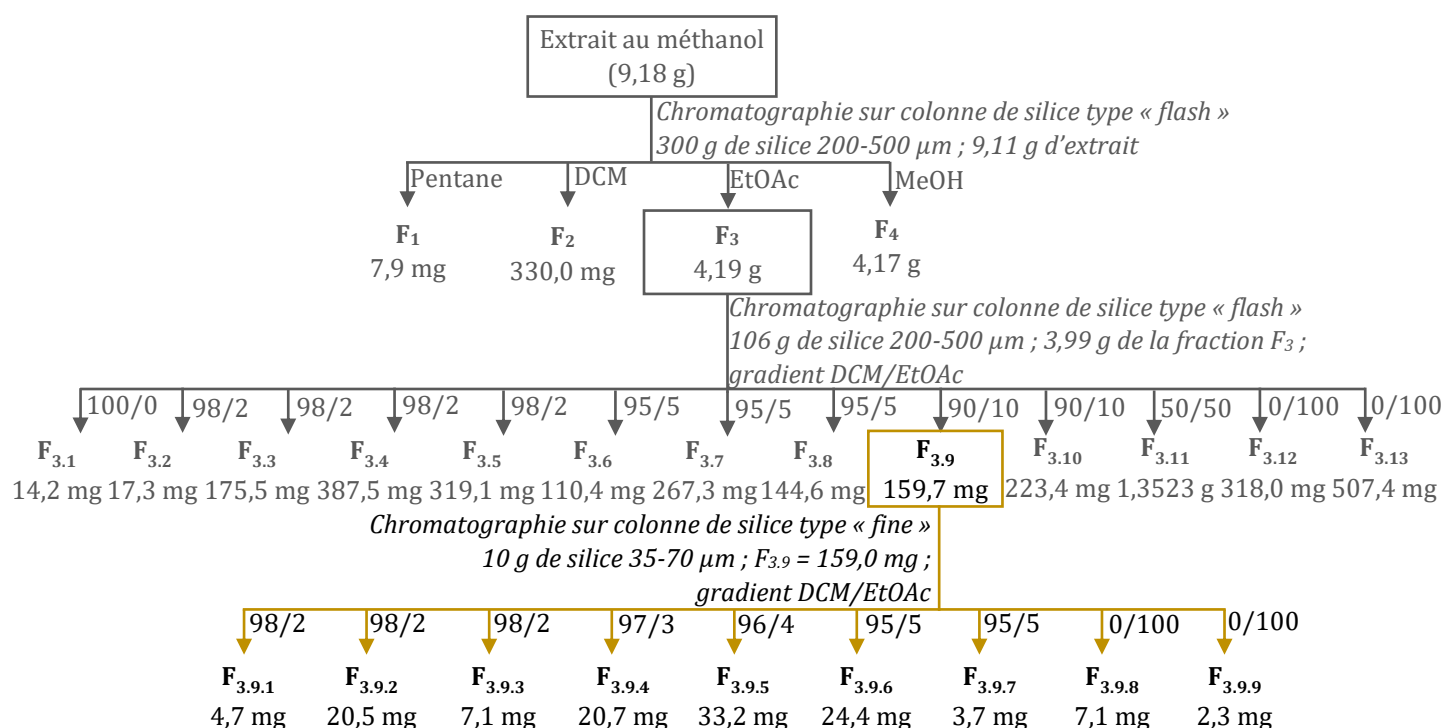
Tableau 26. Structure (stéréochimie relative) et données RMN du 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane avec les principales corrélations HMBC et COSY

n°C	δ _c (ppm)	DEPT	δ _H (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	118,41	CH	6,77	s	1';2;3;4;4a;11a	-	1';11a
2	116,12	C	-	-	-	-	-
3	140,30	C	-	-	-	-	-
4	133,01	C	-	-	-	-	-
4a	143,73	C	-	-	-	-	-
6	66,92	CH ₂	4,34 (x) 3,63 (y)	dd (10,8; 5,0) t (10,8)	4a;6a;6b;11a	6y;6a 6x	6y;6a 6x;
6a	39,53	CH	3,53	m	6;6b;7;10a;11a	11a;6x	6x;11a
6b	119,00	C	-	-	-	-	-
7	125,04	CH	7,08	d (8,3)	6;6a;6b;9;10;10a	8	8
8	107,77	CH	6,37	m	6b	7	7
9	157,07	C	-	-	-	-	-
10	98,44	CH	6,38	s	6b;8;9;10a	-	-
10a	160,63	C	-	-	-	-	-
11a	78,57	CH	5,48	d (6,5)	1;2;4a;6;6a;11b	6a	1;6a
11b	112,65	C	-	-	-	-	-
1'	121,79	CH	6,31	d (9,8)	1;2;3;3';4;5'	2'	1;2'
2'	129,39	CH	5,57	d (9,8)	2;3;3';4'	1'	1';4';5'
3'	77,31	C	-	-	-	-	-
4'	28,16*	CH ₃	1,48	s	1';2';3;3';5'	-	2'
5'	27,90*	CH ₃	1,44	s	1';2';3';4'	-	2'
4-OH	-	-	5,38#,\$	s	-	-	-
9-OH	-	-	5,28#,\$	m	-	-	-

Notes: s = singulet, d = doublet, m = multiplet; *#: les signaux peuvent être intervertis; \$: corrélation non observée sur le spectre RMN HMBC; numérotation des carbones selon [Chaudhuri et al. \(1995\)](#).

La sous-fraction $\text{F}_{3.9}$ a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type fine (35 - 70 μm ; 60 Å ; 10 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (98 : 2 à 0 : 100) pour donner neuf sous-fractions ($\text{F}_{3.9.1}$ – $\text{F}_{3.9.9}$) (**Figure 40**).

Figure 40. Schéma de la chromatographie de la sous-fraction $\text{F}_{3.9}$

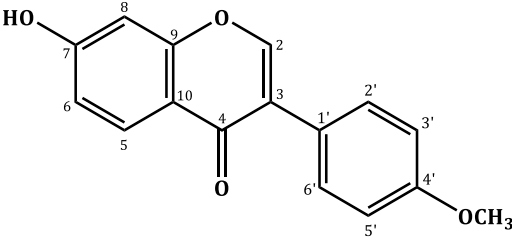


Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol.

Après l'analyse RMN ^{13}C des diverses sous-fractions et l'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire, la maackiaine a été de nouveau identifiée dans les sous-fractions $\text{F}_{3.9.2}$ et $\text{F}_{3.9.3}$ ainsi que l'homoédudiol, dans la sous-fraction $\text{F}_{3.9.4}$.

Dans la sous-fraction F_{3,9,5}, nous identifions une isoflavone, la formononétine, à l'aide de la bibliothèque « Flavones » de la littérature (**Tableau 27**). Tous les déplacements chimiques de cette molécule ont été relevés sur le spectre de cette sous-fraction et les variations des déplacements chimiques sont toutes inférieures ou égales à 0,11 ppm par rapport aux données de référence (**Brad et al., 2017**).

Tableau 27. Structure et données RMN ^{13}C de la formononétine



n°C	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$ (ppm)	$\Delta\delta$
2	153,09	153,2	0,11
3	123,13	123,2	0,07
4	174,57	174,6	0,03
5	127,26	127,3	0,04
6	115,17	115,2	0,03
7	162,59	162,6	0,01
8	102,09	102,1	0,01
9	157,43	157,5	0,07
10	116,56	116,6	0,04
1'	124,22	124,2	0,02
2' et 6'	130,03	130,1	0,07
3' et 5'	113,57	113,6	0,03
4'	158,93	159	0,07
-O- <u>C</u> H ₃	55,11	55,1	0,01

Notes: δ_{C} , déplacements chimiques expérimentaux; $\delta_{\text{C}}^{\text{litt}}$, numérotation des carbones et déplacements chimiques selon **Brad et al. (2017)**.

Sur les spectres RMN ^{13}C des sous-fractions F_{3,9,5} et F_{3,9,6}, nous relevons une série de vingt-cinq raies de résonance appartenant à une molécule absente des bibliothèques de spectres du laboratoire. Le spectre DEPT de la sous-fraction F_{3,9,6}, dans laquelle cette molécule est présente dans des proportions très majoritaires, permet de différencier les signaux comme suit :

- onze carbones quaternaires : δ_{C} = 193,87 ppm (carbonyle) ; δ_{C} = 158,55 ppm ; 156,86 ppm ; 156,76 ppm ; 156,17 ppm (liés directement à un oxygène) ; δ_{C} =

132,64 ppm ; 124,41 ppm ; 114,78 ppm ; 112,48 ppm ; 108,87 ppm et 77,81 ppm ;

- huit méthines : $\delta_{\text{C}} = 128,67 \text{ ppm}$; $128,53 \text{ ppm}$; $127,99 \text{ ppm}$; $121,88 \text{ ppm}$; $115,87 \text{ ppm}$; $108,24 \text{ ppm}$; $104,77 \text{ ppm}$ et $46,05 \text{ ppm}$;
- deux méthylènes : $\delta_{\text{C}} = 70,23 \text{ ppm}$ (lié à un oxygène) et $25,77 \text{ ppm}$;
- quatre méthyles : $\delta_{\text{C}} = 28,37 \text{ ppm}$; $28,27 \text{ ppm}$; $27,80 \text{ ppm}$ et $17,84 \text{ ppm}$.

Afin d'identifier cette molécule, la sous-fraction F_{3.9.6}, a été soumise à une série d'analyses RMN 1D et 2D (**Annexes 53-58**). Les corrélations relevées sur les spectres HSQC, HMBC et COSY permettent de mettre en évidence :

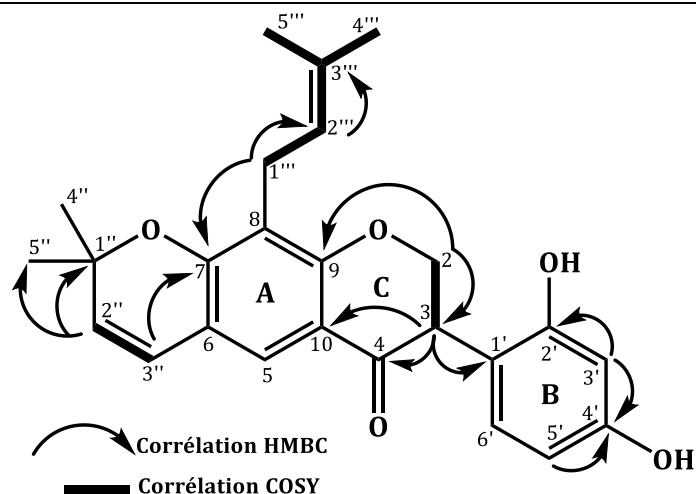
- un premier cycle aromatique (cycle A) regroupant cinq carbones quaternaires *i.e.* $\delta_{\text{C}} = 108,87 \text{ ppm}$ (C8), $112,48 \text{ ppm}$ (C10), $124,41 \text{ ppm}$ (C6) , $156,86 \text{ ppm}$ (C9), $158,55 \text{ ppm}$ (C7) et un méthine $\delta_{\text{C}} = 127,99 \text{ ppm}$ (C5 lié au proton H5 $\delta_{\text{H}} = 7,57 \text{ ppm}$, s) ;
- un second cycle aromatique (cycle B) possédant trois carbones quaternaires *i.e.* $\delta_{\text{C}} = 114,78 \text{ ppm}$ (C1') ; $156,17 \text{ ppm}$ (C2' portant une fonction hydroxyle) ; $156,76 \text{ ppm}$ (C4' portant également une fonction hydroxyle) ainsi que trois méthines à $\delta_{\text{C}} = 104,77 \text{ ppm}$ (C3' ; H3' ; $\delta_{\text{H}} = 6,35 \text{ ppm}$, d), $\delta_{\text{C}} = 108,24 \text{ ppm}$ (C5' ; H5' ; $\delta_{\text{H}} = 6,33 \text{ ppm}$, dd) et $\delta_{\text{C}} = 128,67 \text{ ppm}$ (C6' ; H6' ; $\delta_{\text{H}} = 7,18 \text{ ppm}$, d) ;
- un cycle « 2,3-dihydropyran-4-one » (cycle C) constitué du méthylène C2 ($\delta_{\text{C}} = 70,23 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 4,67 \text{ ppm}$, dd et $4,85 \text{ ppm}$, dd), du méthine C3 ($\delta_{\text{C}} = 46,05 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} = 3,96 \text{ ppm}$, dd) et des carbones quaternaires C4 (carbonyle, $\delta_{\text{C}} = 193,87 \text{ ppm}$), C9 et C10.

Les cycles A et C sont donc reliés au niveau des carbones C9 et C10 (corrélations HMBC entre les protons H₂ et H₃ et les carbones C9 et C10, respectivement) (**Tableau 28** ; **Annexes 56-57**). Par ailleurs, les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton H3 et les carbones C1', C2' et C6' indiquent que le cycle B est relié au cycle C par la liaison C3-C1'. La molécule recherchée possède donc un squelette isoflavanone.

Les valeurs des déplacements chimiques, les multiplicités et les constantes de couplage relevées sur le spectre RMN ^1H pour les signaux à $\delta_{\text{H}} = 7,18 \text{ ppm}$ (H6' ; d ; 8,1 Hz ; $\delta_{\text{C}} = 128,67 \text{ ppm}$), $\delta_{\text{H}} = 6,33 \text{ ppm}$ (H5' ; dd ; 2,3 Hz et 8,1 Hz ; $\delta_{\text{C}} = 108,24 \text{ ppm}$) et $\delta_{\text{H}} = 6,35 \text{ ppm}$ (H3' ; d ; 2,3 Hz ; $\delta_{\text{C}} = 104,77 \text{ ppm}$) indiquent que les deux fonctions hydroxyles du cycle B sont situées en ortho et en para par rapport au carbone C1'. Par

ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction F_{3.9.6}, nous repérons également les déplacements chimiques caractéristiques d'une chaîne γ,γ' -diméthylallyle (cf. [homoédudiol](#) et [4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane](#)) : $\delta_{\text{C}} = 27,80$ ppm, CH_2 ; $\delta_{\text{C}} = 121,88$ ppm, CH ; $\delta_{\text{C}} = 132,64$ ppm, C ; $\delta_{\text{C}} = 25,77$ ppm, CH_3 et $\delta_{\text{C}} = 17,84$ ppm, CH_3 . Les corrélations relevées sur le spectre HMBC entre les protons H1''' et le carbone C7 et entre les protons H1''' et le carbone C8, indiquent que la chaîne carbonée est liée au carbone C8 ($\delta_{\text{C}} = 108,87$ ppm, C) du cycle A.

Enfin, les signaux restants sont caractéristiques d'un cycle « diméthylpyrano » comme dans le cas du 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane précédemment décrit ([paragraphe III.3.2.](#)) : $\delta_{\text{C}} = 158,55$ ppm, C ; $124,41$ ppm, C ; $115,87$ ppm, CH ; $128,53$ ppm, CH ; $77,81$ ppm, C ; $28,37$ ppm, CH_3 et $28,27$ ppm, CH_3 . Ce dernier cycle est lié au cycle A par les carbones C6 et C7. L'ensemble de ces données nous conduit à l'identification d'une isoflavanone, le bidwillon B, décrite par [Sato et al. \(2004\)](#) en RMN ^1H uniquement ([Tableau 28](#)) et dont les données spectrales ainsi que les multiplicités des signaux, concordent avec celles relevées sur le spectre de la sous-fraction F_{3.9.6}. Nous reportons, à notre connaissance, pour la première fois les données RMN ^{13}C de cette molécule ([Tableau 28](#) ; [Annexes 53-58](#)).

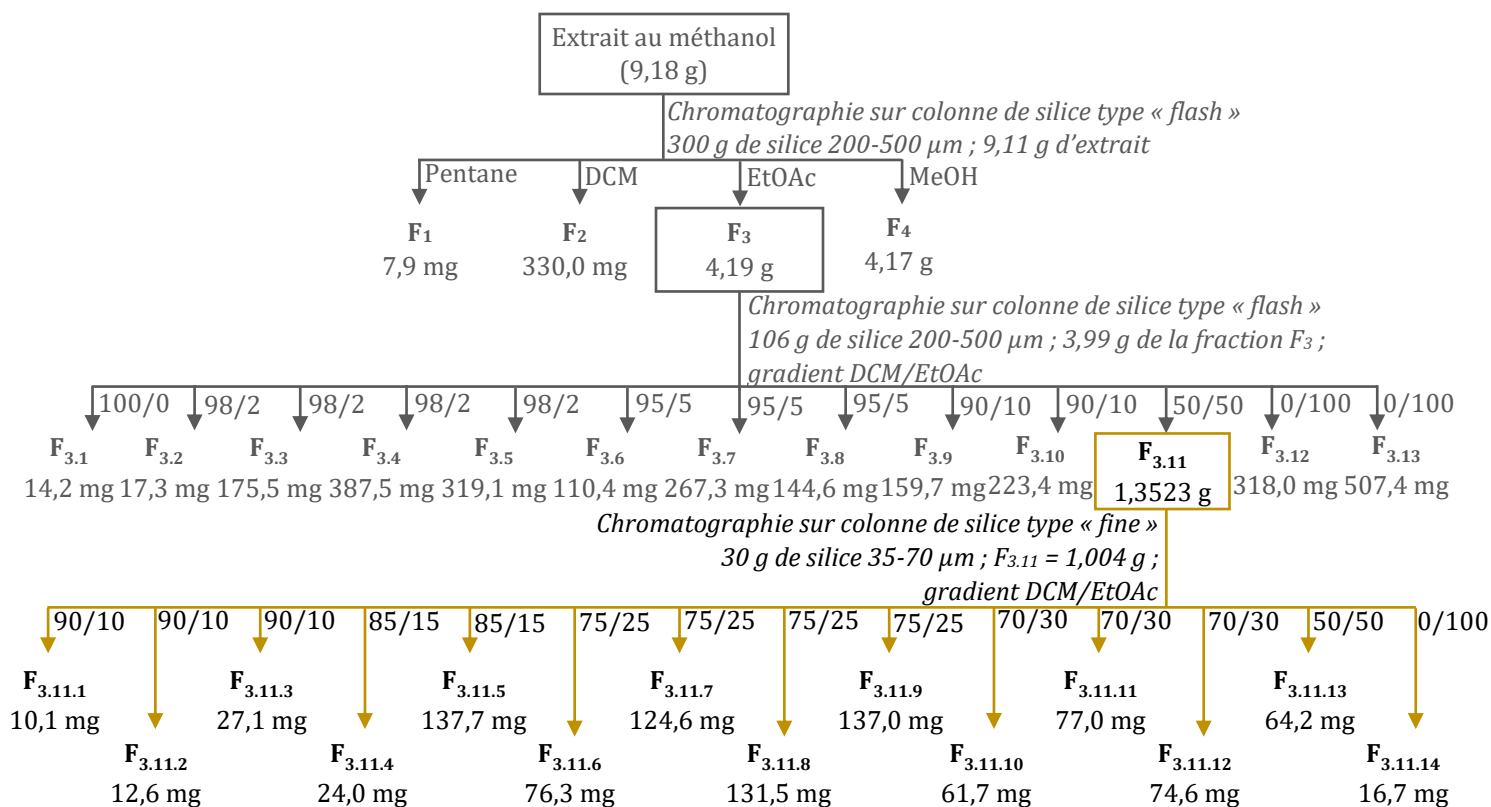
Tableau 28. Structure et données RMN du bidwillon B

n°C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplicité (J (Hz))	δ_H^{litt} (ppm) multiplicité	HMBC	COSY
2	70,23	4,67 4,85	dd (4,8;11,6) dd (5,7;11,6)	4,60 dd 4,70 dd	3; 4; 8; 9; 1'	3
3	46,05	3,96	dd (4,8;5,7)	4,14 dd	2; 4; 10; 1'; 2'; 6'	2
4	193,87	-	-	-		
5	127,99	7,57	s	7,46 s	7; 8; 9; 4	
6	124,41	-	-	-		
7	158,55	-	-	-		
8	108,87	-	-	-		
9	156,86	-	-	-		
10	112,48	-	-	-		
1'	114,78	-	-	-		
2'	156,17	-	-	-		
3'	104,77	6,35	d (2,3)	6,43 d	1'; 2'; 4'; 5'	
4'	156,76	-	-	-		
5'	108,24	6,33	dd (2,3;8,1)	6,32 dd	1'; 2'; 3'; 4'	
6'	128,67	7,18	d (8,1)	6,96 d	2'; 3'; 4'	
1''	77,81	-	-	-		
2''	128,53	5,59	d (10,1)	5,74 d	8; 1''; 4''; 5''	3''
3''	115,87	6,63	d (10,1)	6,44 d	7; 8; 1''; 4''; 5''	2''
4''	28,37	1,46	s	1,46 s	1''; 2''; 5''	
5''	28,27	1,45	s	1,45 s	1''; 2''; 4''	
1'''	27,80	3,17	d (7,4)	3,31 d	5; 6; 7; 8; 2''; 3''	2'''
2'''	121,88	5,19	m (7,4)	5,21 t	1''; 4''; 5''	1''; 4''; 5''
3'''	132,64	-	-	-		
4'''	17,84	1,68	s	1,66 s	2''; 3''	2'''
5'''	25,77	1,68	s	1,79 s	2''; 3''	2'''

Notes: δ_C , δ_H , déplacements chimiques expérimentaux du spectre du carbone et du proton, respectivement; δ_H^{litt} , déplacements chimiques selon [Sato et al. \(2004\)](#).

Par ailleurs, la sous-fraction $\text{F}_{3.11}$ a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type fine (35 - 70 μm ; 60 Å ; 30 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (90 : 10 à 0 : 100) pour donner quatorze sous-fractions ($\text{F}_{3.11.1}$ – $\text{F}_{3.11.14}$) qui ont toutes été analysées par RMN ^{13}C (**Figure 41**).

Figure 41. Schéma de la chromatographie de la sous-fraction $\text{F}_{3.11}$



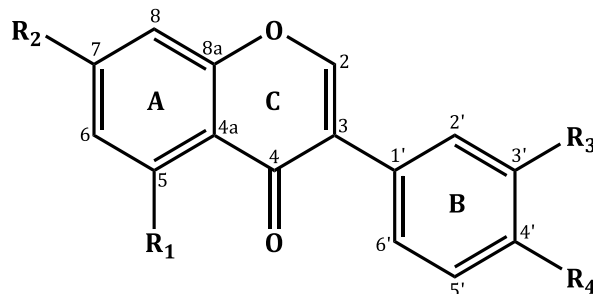
Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol.

Après interrogation des diverses bibliothèques de spectres du laboratoire, la maakiaïne a été identifiée à nouveau dans les sous-fractions $\text{F}_{3.11.1}$ et $\text{F}_{3.11.2}$ ainsi que l'homoédudiol et le 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane, dans la sous-fraction $\text{F}_{3.11.2}$.

Par ailleurs, quatre isoflavones ont été identifiées après interrogation des bibliothèques de spectres issues de la littérature (**Tableau 29**) :

- la génistéine, dans la sous-fraction F_{3.11.3} ;
- la calycosine, dans les sous-fractions F_{3.11.5} à F_{3.11.10} ;
- la daidzéine, dans les sous-fractions F_{3.11.5} à F_{3.11.10} ;
- l'isoprunétine, dans les sous-fractions F_{3.11.12} à F_{3.11.14}.

Pour ces quatre molécules, tous les déplacements chimiques attendus ont été observés et les variations des déplacements chimiques sont inférieures ou égales à 0,10 ppm par rapport aux données de référence, pour la majorité des signaux.

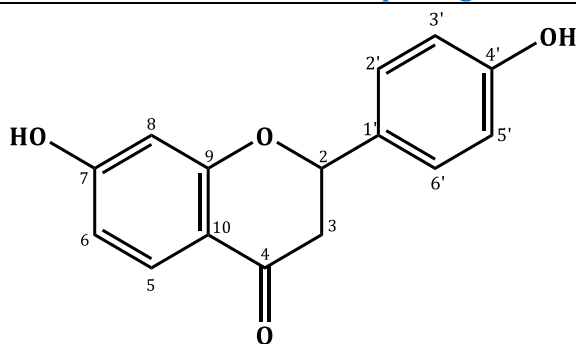
Tableau 29. Structure et données RMN ¹³C de la génistéine, de la calycosine de la daidzéine et de l'isoprunéine

	Génistéine (F_{3.11.3}) R ₁ = OH ; R ₂ = OH R ₃ = H ; R ₄ = OH			Calycosine (F_{3.11.8}) R ₁ = H ; R ₂ = OH R ₃ = OH ; R ₄ = OCH ₃			Daidzéine (F_{3.11.10}) R ₁ = H ; R ₂ = OH R ₃ = H ; R ₄ = OH			Isoprunéine (F_{3.11.13}) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = OH R ₃ = H ; R ₄ = OH		
n°C	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	Δδ	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	Δδ	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	Δδ	δ _c (ppm)	δ _c ^{litt} (ppm)	Δδ
2	153,83	153,9	0,07	152,91	153,0	0,09	152,66	152,7	0,04	152,85	152,9	0,05
3	122,17	122,2	0,03	123,27	123,3	0,03	123,40	123,4	0,00	127,31	127,4	0,09
4	180,10	180,1	0,00	174,48	174,5	0,02	174,60	174,6	0,00	178,12	175,8	2,32
4a	104,36	104,3	0,06	116,55	116,2	0,15	116,51	116,5	0,01	109,68	109,7	0,02
5	161,89	161,9	0,01	127,19	127,3	0,11	127,21	127,2	0,01	163,36	163,5	0,14
6	98,85	98,9	0,05	115,03	115,1	0,07	115,04	115,1	0,06	96,50	96,5	0,00
7	164,15	164,3	0,15	162,41	162,5	0,09	162,41	162,5	0,09	165,10	165,2	0,10
8	93,54	93,6	0,06	101,99	102,2	0,21	102,01	102,2	0,19	97,82	97,8	0,02
8a	157,30	157,3	0,00	157,28	157,3	0,02	157,28	157,1	0,18	161,81	161,9	0,09
1'	121,09	121,1	0,01	124,60	124,7	0,10	122,45	122,4	0,05	124,86	125,0	0,14
2'	130,03	130,1	0,07	116,35	116,4	0,15	129,98	130,0	0,02	131,93	132,0	0,07
3'	114,94	114,9	0,04	145,93	146,0	0,07	114,86	114,8	0,06	116,40	116,5	0,10
4'	157,47	157,5	0,03	147,40	147,5	0,10	157,01	157,1	0,09	158,87	159,0	0,13
5'	-	-	-	111,85	111,9	0,05	-	-	-	-	-	-
6'	-	-	-	119,59	119,7	0,11	-	-	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	-	55,55	55,6	0,05	-	-	-	56,79	56,8	0,01

Notes : δ_c : déplacements chimiques expérimentaux ; numérotation des carbones selon Kamnaing et al. (1999) ; δ_c^{litt}, déplacements chimiques selon Yasuda et al. (1996), Kamnaing et al. (1999), Yasuda et al. (1994), Fokialakis et al. (2019).

De plus, une flavanone, la liquiritigénine, a été identifiée dans les sous-fractions F_{3.11.3} et F_{3.11.4} par comparaison avec les données RMN ^{13}C reportées dans la littérature (Ma et al., 2005b). Une fois de plus, tous les déplacements chimiques attendus ont été observés avec des variations de déplacements chimiques inférieures ou égales à 0,12 ppm par rapport aux données de référence, pour la majorité des signaux (**Tableau 30**).

Tableau 30. Structure et données RMN ^{13}C de la liquiritigénine

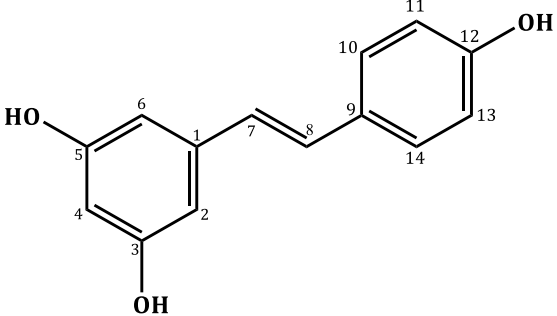


n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
2	78,85	79,0	0,15
3	43,05	43,1	0,05
4	189,98	190,1	0,12
5	128,28	128,4	0,12
6	110,37	110,5	0,13
7	164,49	164,6	0,11
8	102,44	102,5	0,06
9	163,05	163,2	0,15
10	113,42	113,5	0,08
1'	129,20	129,3	0,10
2' et 6'	128,13	128,2	0,07
3' et 5'	115,01	115,1	0,09
4'	157,50	157,6	0,10

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , numérotation des carbones et déplacements chimiques selon Ma et al. (2005b).

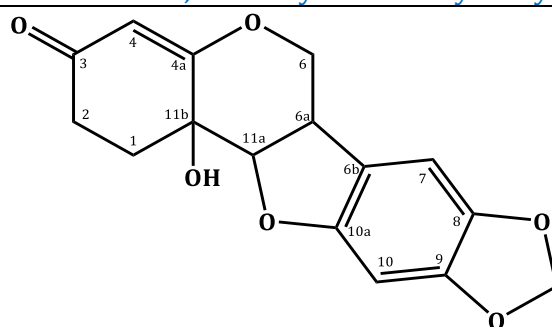
Parallèlement, un polyphénol, le trans-resvératrol a été identifié dans les sous-fractions F_{3.11.3} à F_{3.11.8} après interrogation des bibliothèques de spectres issues de la littérature (**Tableau 31**). Tous les déplacements chimiques de cette molécule ont été relevés (sous-fraction F_{3.11.6}) avec des variations ($\Delta\delta$) inférieures ou égales à 0,11 ppm par rapport aux données de référence pour la plupart des signaux (*Sivakumar et al.*, 2013).

Tableau 31. Structure et données RMN ^{13}C du trans-resvératrol (F_{3.11.6})

			
n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	128,06	128,1	0,04
2 et 6	104,29	104,4	0,11
3 et 5	158,49	158,6	0,11
4	101,76	101,9	0,14
7	125,64	125,7	0,06
8	127,86	127,9	0,04
9	139,25	139,4	0,15
10 et 14	127,83	127,9	0,07
11 et 13	115,50	115,6	0,10
12	157,20	157,3	0,10

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , numérotation des carbones et déplacements chimiques du trans-resvératrol selon *Sivakumar et al.* (2013).

Un ptérocarpane, la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine, a également été identifié dans les sous-fractions F_{3.11.10} à F_{3.11.12}, avec les données issues de la littérature (**Tableau 32**). Tous les déplacements chimiques attendus ont été relevés avec des variations de déplacements chimiques inférieures ou égales à 0,13 ppm par rapport aux données de référence pour la majorité des signaux.

Tableau 32.Structure et données RMN ^{13}C de la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine (F_{3.11.12})

n°C	δ_c (ppm)	δ_c^{litt} (ppm)	$\Delta\delta$
1	31,88	31,8	0,08
2	31,94	31,9	0,04
3	197,11	196,9	0,21
4	107,93	107,9	0,03
4a	171,59	171,4	0,19
6	67,33	67,2	0,13
6a	40,58	40,5	0,08
6b	119,05	119,0	0,05
7	104,53	104,4	0,13
8	141,21	141,0	0,21
9	148,18	148,1	0,08
10	92,23	92,1	0,13
10a	153,86	153,8	0,06
11a	83,04	83,0	0,04
11b	67,09	67,0	0,09
O-CH ₂ -O	101,38	101,3	0,08

Notes: δ_c , déplacements chimiques expérimentaux; δ_c^{litt} , déplacements chimiques et numérotation des carbones selon [Barrero et al. \(1998\)](#).

L'extraction au Soxhlet au méthanol de racines de *C. villosa*, suivie de chromatographies sur colonne successives, a permis l'identification de seize composés :

- un nouveau dérivé benzofuranique, le 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane, dans la fraction au dichlorométhane ;
- sept ptérocarpanes dont deux nouveaux (le 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane et le 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane), dans la fraction à l'acétate d'éthyle et cinq à partir des bibliothèques de spectres de la littérature (la maackiaine, l'isonéorauténol, l'homoédudiol, le 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane et la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine) ;
- sept flavonoïdes (l'isoprunétine, la génistéine, la calycosine, la daidzéine, la formononétine, le bidwillon B et la liquiritigénine) ;
- un polyphénol (le trans-resvératrol).

Les déplacements chimiques de ces diverses molécules enregistrés sur notre appareil, ont été référencés dans les bibliothèques de spectres du laboratoire contribuant ainsi à son enrichissement.

Plusieurs molécules identifiées dans l'extrait au méthanol de racines de *C. villosa* présentent des activités biologiques. En effet, la maackiaine possède entre autres propriétés un potentiel anti-allergique ([Mizuguchi et al., 2015](#)), une activité larvicide ([Bezerra-Silva et al., 2015](#)) et antitumorale ([Liu et al., 2020](#)). Par ailleurs, l'étude menée par [Kuate et al. \(2014\)](#) met en évidence le potentiel anticancéreux de l'isonéorauténol. L'isoprunétine, la daidzéine et la génistéine présentent des propriétés antimicrobiennes ([Quach et al., 2021](#)), antioxydantes, anti-inflammatoires et antidiabétiques ([Sun et al., 2016](#) ; [Rajput et al., 2017](#)) alors que la calycosine et la formononétine sont connues pour leurs propriétés anticancéreuse et neuroprotectrice ([Deng et al., 2021](#) ; [Dutra et al., 2021](#)). La liquiritigénine et le trans-resvératrol sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes et anti-inflammatoires ([Ramalingam et al., 2018](#) ; [Fiod Riccio et al., 2020](#)). Enfin, le bidwillon B possède des propriétés antimicrobiennes ([Sato et al., 2004](#) ; [Iinuma et al., 1992](#)).

Nous avons donc, dans la suite de ce travail, cherché à évaluer les activités antibactériennes des extraits de fleurs et de racines de *C. villosa* ainsi que de produits purifiés (fractions de chromatographie). De nouveau, les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de « Biochimie et de Biologie Moléculaire du Végétal » de l'Université de Corse.

III.3.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

Les extraits bruts de fleurs à l'hexane, au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle (échantillons 1 à 3 respectivement) ont été testés afin de mesurer une éventuelle activité antibactérienne (**Figure 44**). Parallèlement, nous avons également testé l'extrait brut au méthanol de racines (échantillon 4) ainsi que 17 fractions de chromatographie qui en sont issues (échantillons 5 à 21), en fonction de leur composition chimique (**Tableau 33** ; **Figure 45**).

Dans le but de déterminer le potentiel de ces 21 échantillons à inhiber la croissance des souches bactériennes, nous avons sélectionné quatre bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter aerogenes* EA289 (multi-résistante) ainsi que trois bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus cereus*) sur lesquelles nous avons procédé à des tests de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la technique de micro-dilution (**Tableau 33**). Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux mesurés pour un antibiotique de référence : le chloramphénicol qui appartient à la famille des phénicolés.

Tableau 33. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en mg.L⁻¹ des vingt-et-un échantillons sélectionnés sur des bactéries à Gram+ et à Gram-

Echantillons	Correspondance des échantillons	Composés majoritaires	Gram positif			Gram négatif			
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i> (BMR)	<i>E. aerogenes</i>
Fleurs	1	Extrait de fleurs à l'hexane	Triglycérides	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
	2	Extrait de fleurs au DCM	Chrysine	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
	3	Extrait de fleurs à l'EtOAc	4''-O-acétyl-7-O-β-D-glucopyranosylchrysine	> 1024	> 1024	1024	> 1024	> 1024	> 1024
Racines	4	Extrait de racines au MeOH	Maackiaine/2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane/1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine/isonéorauténol	16	32	16	1024	> 1024	1024
	5	Fraction F ₂ DCM	2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
	6	Fraction F ₃ EtOAc	Maackiaine/1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine/isonéorauténol	1024	8	8	512	> 1024	> 1024
	7	Fraction F ₄ MeOH	Sucres	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
	8	Fraction F _{3.11}	Maackiaine/1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine/isoprunitine/Daidzéine/calycosine	32	32	32	1024	1024	512
	9	Fraction F _{3.9.2}	Maackiaine	16	32	16	1024	> 1024	256
	10	Fraction F _{3.A.3}	Maackiaine	32	32	32	> 1024	> 1024	256
	11	Fraction F _{3.A.2}	Isonéorauténol/maackiaine (2/1)	32	64	32	> 1024	> 1024	> 1024
	12	Fraction F _{3.11.11}	1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine	> 1024	> 1024	1024	> 1024	> 1024	> 1024
	13	Fraction F _{3.A.12}	Homoédudiol	8	16	8	512	512	32
	14	Fraction F _{3.9.4}	Homoédudiol/4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane /4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane (2/1/1)	16	32	16	1024	1024	> 1024
	15	Fraction F _{3.B.4}	4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane /4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane (1/1)	16	> 1024	8	> 1024	> 1024	1024
	16	Fraction F _{3.9.6}	Bidwillon B	4	4	4	512	> 1024	> 1024
	17	Fraction F _{3.11.8}	Calycosine	32	32	16	512	> 512	512
	18	Fraction F _{3.11.9}	Daidzéine/Calycosine (2/1)	128	128	64	1024	1024	1024
	19	Fraction F _{3.11.10}	Daidzéine	16	16	16	512	> 512	> 512
	20	Fraction F _{3.11.13}	Isoprunitine	1024	512	1024	1024	512	> 1024
	21	Fraction F _{3.11.3}	Trans-resvératrol	32	32	16	512	> 512	512
Antibiotiques	Chloramphénicol			4	2	2	0,25	64	1024

Notes : DCM, dichlorométhane ; EtOAc, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol ; BMR, bactérie multirésistante aux antibiotiques.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries à Gram négatif et positif ne sont pas sensibles aux divers extraits de fleurs (échantillons 1 à 3) (**Tableau 33** ; **Figure 44**). En effet, les CMI calculées pour ces trois échantillons sont toutes supérieures ou égales à 1024 mg.L⁻¹.

L'extrait au méthanol de racines (échantillon 4) possédant la maackiaine, l'isonéorauténol, le 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane et la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine comme molécules majoritaires, présente quant à lui une activité appréciable sur les trois bactéries à Gram positif utilisées dans cette étude (CMI ≤ 32 mg.L⁻¹). Concernant les fractions de chromatographie issues de cet extrait (échantillons 5 à 7), seule la fraction F₃ éluée à l'acétate d'éthyle (échantillon 6) présente une activité importante sur *S. epidermidis* et *B. cereus* (CMI = 8 mg.L⁻¹). Nous avons donc testé 14 sous-fractions de chromatographie issues de la fraction F₃ afin de déterminer les molécules responsables de cette activité antimicrobienne.

Parmi ces sous-fractions, 12 ont montré une activité valorisable (CMI globalement inférieures ou égales à 64 mg.L⁻¹) sur les trois bactéries à Gram positif (**Tableau 33**). Il s'agit des échantillons 8 à 11 (fractions de chromatographie F_{3.11}, F_{3.9.2}, F_{3.A.3}, F_{3.A.2}, respectivement), 13 à 19 (F_{3.A.12}, F_{3.9.4}, F_{3.B.4}, F_{3.9.6}, F_{3.11.8}, F_{3.11.9}, F_{3.11.10}, respectivement) et 21 (F_{3.11.3}) (**Figure 45**). Parmi les ptéocarpanes majoritaires de la fraction F₃ (échantillon 6), la maackiaine présente une activité importante sur les trois bactéries à Gram positif (CMI = 16 et 32 mg.L⁻¹, échantillons 9 et 10) ainsi que l'isonéorauténol en mélange avec la maackiaine dans les proportions 2/1 (CMI = 32 et 64 mg.L⁻¹; échantillon 11). La 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine n'est active sur aucune bactérie (CMI = 1024 mg.L⁻¹; échantillon 12) et n'est, par conséquent, pas responsable de l'activité antibactérienne de la fraction F₃. Concernant l'activité des autres ptéocarpanes issus de la fraction F₃, les échantillons contenant l'homoédudiol dans des proportions majoritaires (échantillons 13 et 14) présentent une activité notable (CMI = 8, 16 et 32 mg.L⁻¹). Les deux nouveaux ptéocarpanes en mélange dans des proportions égales (4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptéocarpane/4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptéocarpane) possèdent également une activité antibactérienne importante et comparable au chloramphénicol (CMI = 8, 16 et 32 mg.L⁻¹; échantillons 14 et 15) sur les bactéries *S. aureus* (CMI = 16 mg.L⁻¹) et *B. cereus* (CMI = 8 mg.L⁻¹).

Parmi les échantillons renfermant des isoflavonoïdes comme composés majoritaires, l'échantillon 16 enrichi en bidwillon B, présente l'activité antibactérienne la plus remarquable (CMI = 4 mg.L⁻¹) comparable au chloramphénicol. Les échantillons 17 et 19 riches en calycosine et en daidzéine présentent des activités similaires sur les 3 bactéries à Gram positif (CMI = 16 et 32 mg.L⁻¹). Le trans-resvératrol, un polyphénol (échantillon 21), est également actif sur les souches à Gram positif (CMI = 16 à 32 mg.L⁻¹).

Enfin, seul l'homoédudiol (échantillon 13) présente une activité notable sur la bactérie *E. aerogenes* multirésistante (Gram négatif) (CMI = 32 mg.L⁻¹). Ce résultat est remarquable car, comme énoncé précédemment ([Chapitre II partie 2.3.](#)), les bactéries à Gram négatif sont connues pour être relativement peu sensibles aux produits toxiques naturels. Cette propriété est certainement due à la structure de leur paroi constituée d'une double membrane lipidique plus difficile à traverser que celle des bactéries à Gram positif qui ne possèdent qu'une seule membrane biologique (bicouche lipidique) entourée par un peptidoglycane épais.

De manière générale, les échantillons possédant l'homoédudiol, le bidwillon B, le 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane et le 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane, sont également ceux ayant les CMI les plus basses. En effet, ces composés possèdent un ou plusieurs groupements phénols connus pour être les plus actifs sur les bactéries ([Kalemba et Kunika, 2003](#)). De plus, la présence d'une chaîne prényle augmente leur lipophilie et par conséquent leur propriété antibactérienne à travers de probables interactions avec les membranes des bactéries permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à l'intérieur de la cellule ([Barron et Ibrahim, 1996](#) ; [Araya-Cloutier et al., 2018](#)).

Ainsi, au vu des résultats obtenus, plusieurs extraits et fractions de chromatographie montrent un potentiel tout à fait valorisable d'un point de vue microbiologique, notamment le bidwillon B qui possède des CMI de l'ordre de celles du chloramphénicol (antibiotique de référence).

CONCLUSION

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse Pasquale Paoli (UMR CNRS 6134 « Sciences Pour l'Environnement », projet « Ressources Naturelles ») et s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel de la Corse. Les produits naturels issus de la biomasse se présentent généralement sous forme de mélanges complexes, leur valorisation nécessite donc une étape préalable d'analyse afin d'identifier et de quantifier leurs différents constituants.

Conventionnellement, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel peut s'effectuer selon deux approches :

- la première consiste à utiliser le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques pour individualiser les constituants du mélange avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques qui permettent de les identifier, par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres ;
- la seconde démarche est similaire à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule. Elle consiste à purifier les constituants d'un mélange complexe avant de les identifier par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence.

Dans ce contexte, l'équipe « Chimie et Biomasse » a mis au point et développé, depuis une trentaine d'années, une technique d'analyse originale des mélanges complexes naturels. Elle est basée sur l'utilisation de la RMN ^{13}C comme outil d'identification des constituants, sans séparation préalable ou avec des étapes de fractionnement réduites. Un logiciel informatique, conçu et développé au laboratoire, permet de comparer les déplacements chimiques du spectre du mélange avec ceux de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres construites au laboratoire ou avec des données récentes issues de la littérature. Cette méthode a été initialement utilisée pour l'analyse de composés volatils contenus dans des huiles essentielles, puis a été appliquée à l'identification de composés non volatils contenus dans des extraits de végétaux, des résines, des miels, des matières grasses d'origine animale ou végétale (diterpènes, triterpènes, sucres, lipides, etc.). L'ensemble de ces méthodes d'analyse (conventionnelles ou développées au laboratoire) a été décrit dans un premier chapitre.

L'objectif de cette thèse de doctorat était, d'un point de vue académique, de contribuer au développement des méthodes d'analyse qualitative et quantitative par RMN ^1H et ^{13}C des différents constituants d'extraits de végétaux. D'un point de vue appliqué, il s'agissait de déterminer la composition chimique d'extraits de plantes de Corse encore peu ou pas étudiées et susceptibles d'avoir des activités biologiques valorisables.

Ainsi, dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, nous avons étudié la composition chimique et les activités antibactériennes d'extraits de feuilles et de baies d'*I. aquifolium*. Pour cela, dans un premier temps, deux extraits de feuilles, à l'hexane et au dichlorométhane, ont subi chacun deux fractionnements successifs par chromatographie sur colonne. Les analyses par RMN ^{13}C (et dans certains cas par CPG(Ir) et CPG-SM) ont permis l'identification de plusieurs triterpènes : l' α - et la β -amyrine et leurs esters, le β -sitostérol, le lupéol, la bétuline, l'érythrodiol, le pseudotaraxastérol, l'uvaol, l'ursolaldéhyde, l'oléanaldéhyde, l'acide oléanolique et l'acide ursolique. Ces deux derniers composés sont des produits d'intérêt onéreux, connus pour posséder un large spectre d'activités biologiques. Ainsi, nous avons quantifié ces triterpènes acides par RMN ^1H dans l'extrait brut au dichlorométhane, via une méthode rapide mise au point et validée (justesse, linéarité et précision des mesures). Ces derniers représentent respectivement 55,3 % et 20,8 % de l'extrait (soit 1,3 % et 0,5 % des feuilles de houx). Ensuite, nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal » de l'Université de Corse, des tests antimicrobiens. Les deux triterpènes acides ont montré une activité antimicrobienne comparable à celle du chloramphénicol (antibiotique de référence) vis-à-vis de 3 bactéries à Gram positif *i.e.* *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* (CMI = 4 - 8 mg.L $^{-1}$ vs. 2 - 4 mg.L $^{-1}$ pour le chloramphénicol). Dans ce chapitre, nous avons également décrit la composition chimique de deux extraits de baies d'*I. aquifolium* (dichlorométhane et dichlorométhane/acétate d'éthyle). L'extrait au dichlorométhane a subi deux fractionnements successifs et l'examen des spectres RMN ^{13}C des diverses fractions obtenues nous a permis d'identifier : plusieurs triterpènes précédemment identifiés dans les extraits de feuilles (l' α - et la β -amyrine, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'ursolaldéhyde, l'oléanaldéhyde, le pseudotaraxastérol, le lupéol et l'uvaol), deux dérivés phénoliques (le p-hydroxybenzaldéhyde et le (p-hydroxyphényl)acétonitrile) ainsi que deux lactones jamais répertoriées dans des extraits de houx commun (la ménisdaurilide

et l'aquilégiolide). Parallèlement, l'extrait de baies obtenu avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle a été soumis à une chromatographie sur colonne et l'analyse des spectres RMN ^{13}C des différentes fractions obtenues a permis d'identifier plusieurs molécules précédemment citées : quatre triterpènes (l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α - et la β -amyrine) ainsi que deux lactones (la ménisdaurilide et l'aquilégiolide). Nous avons également identifié trois phénols (l'acide vanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide 2-hydroxyphénylacétique), six monosaccharides (l' α - et le β -D-glucopyranose, l' α - et le β -D-fructopyranose et l' α - et le β -D-fructofuranose) et deux lactones décrites pour la première fois dans le genre *Ilex* (la 7-épi-griffonilide et la dasycarponilide).

Dans un troisième et dernier chapitre, nous avons étudié la composition chimique d'extraits de racines et de fleurs de *C. villosa*. L'extrait au dichlorométhane de fleurs a subi deux fractionnements successifs et l'étude des spectres RMN ^{13}C des diverses fractions obtenues a permis d'identifier les composés majoritaires suivants : une flavone (la chrysine) et cinq de ses dérivés glucosylés. L'extrait de fleurs obtenu à l'acétate d'éthyle a été soumis à cinq fractionnements successifs et l'étude des spectres RMN ^{13}C des fractions obtenues a permis l'identification de deux autres flavones (l'apigénine et la lutéoline) et de quatre dérivés phénoliques (l'acide caféique, l'acide cis-2,4,5-trihydroxycinnamique, les acides trans- et cis-p-coumarique). Les acides phénoliques de configuration *cis*-précédemment cités sont peu fréquents à l'état naturel et, à notre connaissance, sont décrits pour la première fois dans les fleurs de *C. villosa*. Dans ce chapitre, nous nous sommes également intéressés à la composition chimique de l'extrait au méthanol de racines de *C. villosa* qui a été soumis à un fractionnement. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à décrire la composition chimique des fractions obtenues au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle. La première fraction contient un composé majoritaire absent de nos bibliothèques de spectres. Ce composé a été purifié et l'utilisation de la complémentarité des techniques d'analyse (RMN 1D, 2D et SM/SM) a permis l'identification d'une molécule nouvelle, le 2-(1-méthyléthényle)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane. La fraction à l'acétate d'éthyle a subi six fractionnements successifs et l'étude des spectres RMN ^{13}C des diverses fractions obtenues nous a permis d'identifier quatorze composés de familles chimiques diverses : deux stérols (le β -sitostérol et le stigmastérol), cinq flavonoïdes (la daidzéine,

l'isoprunétine, la liquiritigénine, la calycosine et le bidwillon B), un polyphénol (le trans-resvératrol) et cinq ptérocarpanes (la maackiaine, l'isonéorauténol, l'homoédudiol, le 3,4-dihydroxy-8,9-méthylènedioxyptérocarpane et la 1,11b-dihydro-11b-hydroxymaackiaine). Par ailleurs, deux nouveaux ptérocarpanes (*i.e.* le 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane et le 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane) ont été identifiés dans l'une des fractions de chromatographie, en mettant de nouveau en œuvre la RMN 1D, 2D et la SM/SM. Enfin, nous avons évalué l'activité antimicrobienne des molécules préalablement identifiées. La maackiaine, l'isonéorauténol, l'homoédudiol, la daidzéine, la calycosine, le trans-resvératrol et la liquiritigénine ont inhibé la croissance de trois bactéries à Gram-positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*) avec des CMI comprises entre 64 mg.L⁻¹ et 8 mg.L⁻¹. L'inhibition la plus remarquable revient au bidwillon B dont la CMI (4 mg.L⁻¹) pour les souches *S. aureus* et *B. cereus* est comparable à celles du chloramphénicol pour les mêmes souches (4 mg.L⁻¹ et 2 mg.L⁻¹ respectivement). Les deux nouveaux ptérocarpanes possèdent quant à eux une activité comparable au chloramphénicol vis-à-vis des souches bactériennes *S. aureus* et *B. cereus* (CMI = 16 mg.L⁻¹ et 8 mg.L⁻¹).

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse contribuent à l'enrichissement des bibliothèques de spectres du laboratoire ainsi qu'au développement de la méthode d'analyse développée par l'équipe « Chimie et Biomasse ». Ils confirment que la RMN (¹H et ¹³C) est un outil d'identification et de quantification fiable et performant des différents constituants contenus dans des extraits de végétaux, quelle que soit leur famille chimique ou leur fonctionnalisation. Enfin, la RMN ¹H s'est avérée particulièrement intéressante pour quantifier les acides ursolique et oléanolique (acides triterpéniques) contenus dans l'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium*, contribuant ainsi au développement de la RMN comme technique d'analyse quantitative des mélanges complexes naturels.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTIONS SUCCESSIVES AUX SOLVANTS

I.1. *ILEX AQUIFOLIUM* LINNE

Les feuilles et les baies de houx (*Ilex aquifolium* L.) ont été récoltées en décembre 2017 dans la forêt communale d'Isolacciu di Fium'Orbu (42°01'04.9"N 9°15'34.0"E ; Haute-Corse) puis stockées à -60 °C. Les feuilles (98 g) ont été broyées dans l'azote liquide (cryobroyage), puis extraites à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'hexane pendant 17 h. Après évaporation de la solution hexanique (évaporateur rotatif), 1,836 g d'extrait a été obtenu, soit un rendement de 1,9 % par rapport à la masse sèche de végétal. Les feuilles résiduelles ont été extraites suivant le même procédé avec 600 mL de dichlorométhane pendant 5 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 2,281 g a été obtenu (rendement de 2,3 % par rapport à la masse sèche de végétal).

Les baies (734,0 g) ont également été broyées dans l'azote liquide, puis extraites à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'hexane pendant 48 h. Après évaporation de la solution hexanique, 2,018 g d'extrait ont été obtenus, soit un rendement de 0,3 % par rapport à la masse sèche de végétal. Les baies résiduelles ont été extraites suivant le même procédé avec 600 mL de dichlorométhane pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 1,078 g a été obtenu (rendement de 0,15 % par rapport à la masse sèche de végétal). Les baies résiduelles ont été ensuite extraites avec 600 mL d'un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50, v/v) pendant 48 h et après évaporation du solvant, un extrait de 933,4 mg a été obtenu (rendement de 0,14 % par rapport à la masse sèche de végétal).

I.2. *CALICOTOME VILLOSA* (POIRET) LINK

Les fleurs de *Calicotome villosa* (Poir.) Link ont été récoltées en avril 2019 au lieu-dit Vignola sur la commune d'Ajaccio (41°54'45.0"N 8°39'11.2"E) puis stockées à -60°C. Le végétal a été broyé (azote liquide) puis la poudre obtenue (576,4 g) a été extraite à l'aide d'un appareil de Soxhlet avec 600 mL d'hexane pendant 24 h. Après évaporation de

la solution hexanique, 3,099 g d'extrait ont été obtenus, soit un rendement de 0,54 % par rapport à la masse sèche de végétal. Les fleurs résiduelles ont été extraites suivant le même procédé avec 600 mL de dichlorométhane pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 3,292 g a été obtenu (rendement de 0,57 % par rapport à la masse sèche de végétal). Les fleurs résiduelles ont ensuite été extraites à l'aide d'un appareil Soxhlet avec 600 mL d'acétate d'éthyle pendant 24 h. Suite à l'évaporation du solvant, un extrait de 6,044 g a été obtenu (rendement de 1,05 % par rapport à la masse sèche initiale de végétal).

Les racines utilisées dans cette étude ont été récoltées en septembre 2018 sur la même station. Les racines nettoyées ont été stockées puis broyées. Les copeaux (192,6 g) ont été extraits pendant 24 h avec 600 mL de méthanol à l'aide d'un appareil de Soxhlet. La solution méthanolique résultante a été évaporée donnant lieu à un extrait de 9,18 g, soit un rendement de 4,7 % par rapport à la masse sèche de végétal.

II. CHROMATOGRAPHIES SUR COLONNE OUVERTE DE SILICE (CC)

II.1. CC DE L'EXTRAIT A L'HEXANE DE FEUILLES D'*I. AQUIFOLIUM*

Un échantillon (0,997 g) de l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash ». Cette chromatographie a été réalisée avec 25 g de silice de granulométrie 63-200 μm , 60 Å. A l'issue de cette séparation, douze fractions ont été obtenues (H_1 à H_{12}), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle: H_1 (100/0 ; 24,2 mg), H_2 (100/0 ; 239,5 mg), H_3 (75/25 ; 17,4 mg), H_4 (75/25 ; 55,2 mg), H_5 (75/25 ; 209,2 mg), H_6 (50/50 ; 95,5 mg), H_7 (50/50 ; 113,0 mg), H_8 (25/75 ; 46,2 mg), H_9 (25/75 ; 17,5 mg), H_{10} (0/100 ; 6,1 mg), H_{11} (0/100 ; 8,5 mg), H_{12} (0/100 ; 70,6 mg).

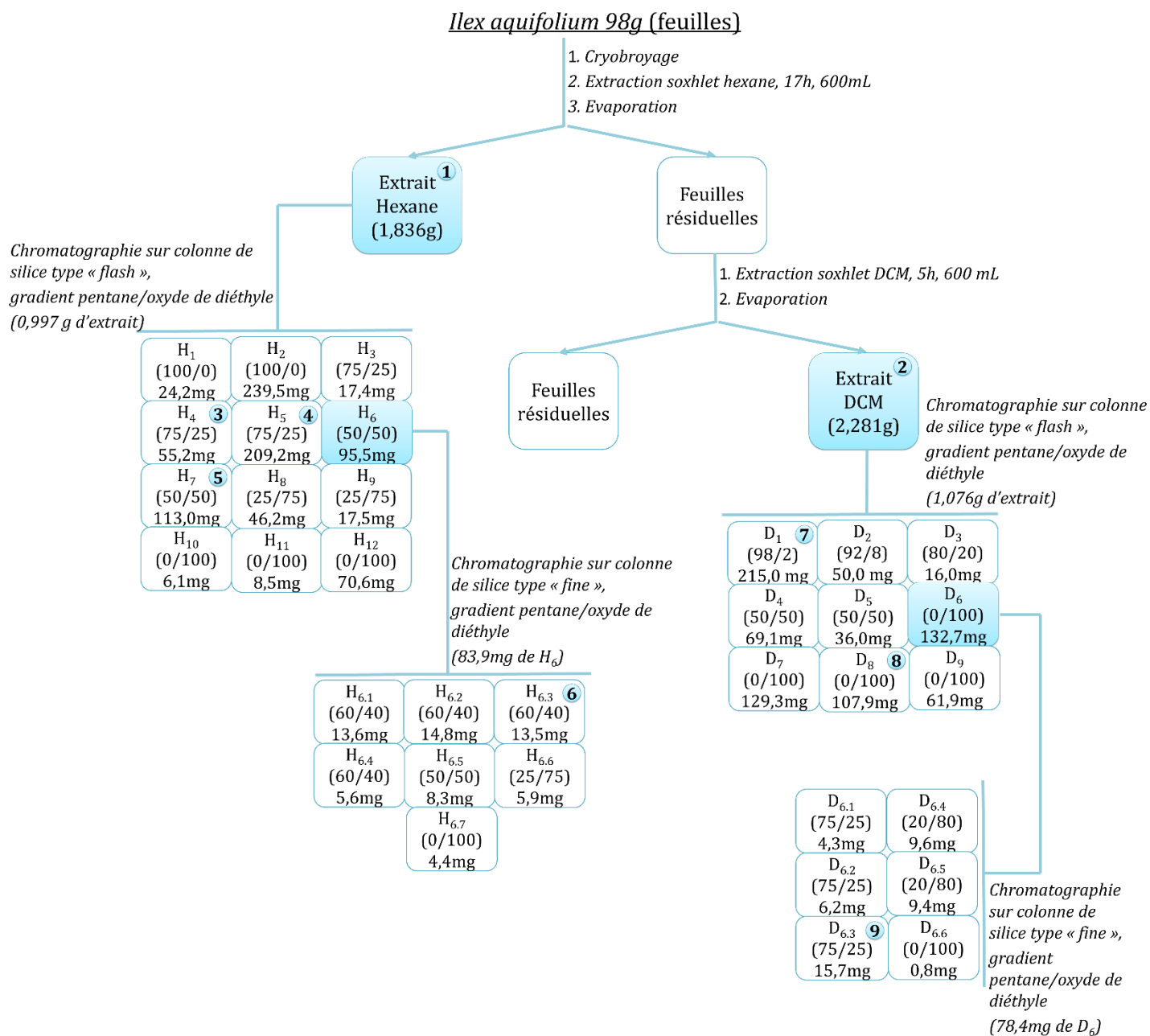
La fraction H_6 (83,9 mg) a été re-chromatographiée sur colonne de silice « fine » de granulométrie 35 – 70 μm (4,0 g ; 60 Å). Sept nouvelles fractions ont été obtenues ($H_{6.1}$ à $H_{6.7}$), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle : $H_{6.1}$ (60/40 ; 13,6 mg), $H_{6.2}$ (60/40 ; 14,8 mg), $H_{6.3}$ (60/40 ; 13,5 mg), $H_{6.4}$ (60/40 ; 5,6 mg), $H_{6.5}$ (50/50 ; 8,3 mg), $H_{6.6}$ (25/75 ; 5,9 mg), $H_{6.7}$ (0/100 ; 4,4 mg).

II.2. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FEUILLES D'*I. AQUIFOLIUM*

Un échantillon (1,076 g) de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash ». Ce fractionnement a été réalisé avec 25 g de silice de granulométrie 63 - 200 μm , 60 Å. A l'issue de cette chromatographie, neuf fractions ont été éluées (D₁ à D₉), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle : D₁ (98/2 ; 215,0 mg), D₂ (92/8 ; 50,0 mg), D₃ (80/20 ; 16,0 mg), D₄ (50/50 ; 69,1 mg), D₅ (50/50 ; 36,0 mg), D₆ (0/100 ; 132,7 mg), D₇ (0/100 ; 129,3 mg), D₈ (0/100 ; 107,9 mg), D₉ (0/100 ; 61,9 mg) (**Figure 42**).

La fraction D₆ (78,4 mg) a été re-chromatographiée sur colonne de silice « fine » de granulométrie 35 - 70 μm (60 Å ; 5 g) (**Figure 42**). Six nouvelles fractions ont été éluées (D_{6.1} à D_{6.6}), avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle : D_{6.1} (75/25 ; 4,3 mg), D_{6.2} (75/25 ; 6,2 mg), D_{6.3} (75/25 ; 15,7 mg), D_{6.4} (20/80 ; 9,6 mg), D_{6.5} (20/80 ; 9,4 mg), D_{6.6} (0/100 ; 0,8 mg).

Figure 42. Workflow de l'extraction et du fractionnement des extraits de feuilles d'*I. aquifolium*



① Echantillons ayant fait l'objet de tests microbiologiques

II.3. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE BAIES D'*I. AQUIFOLIUM*

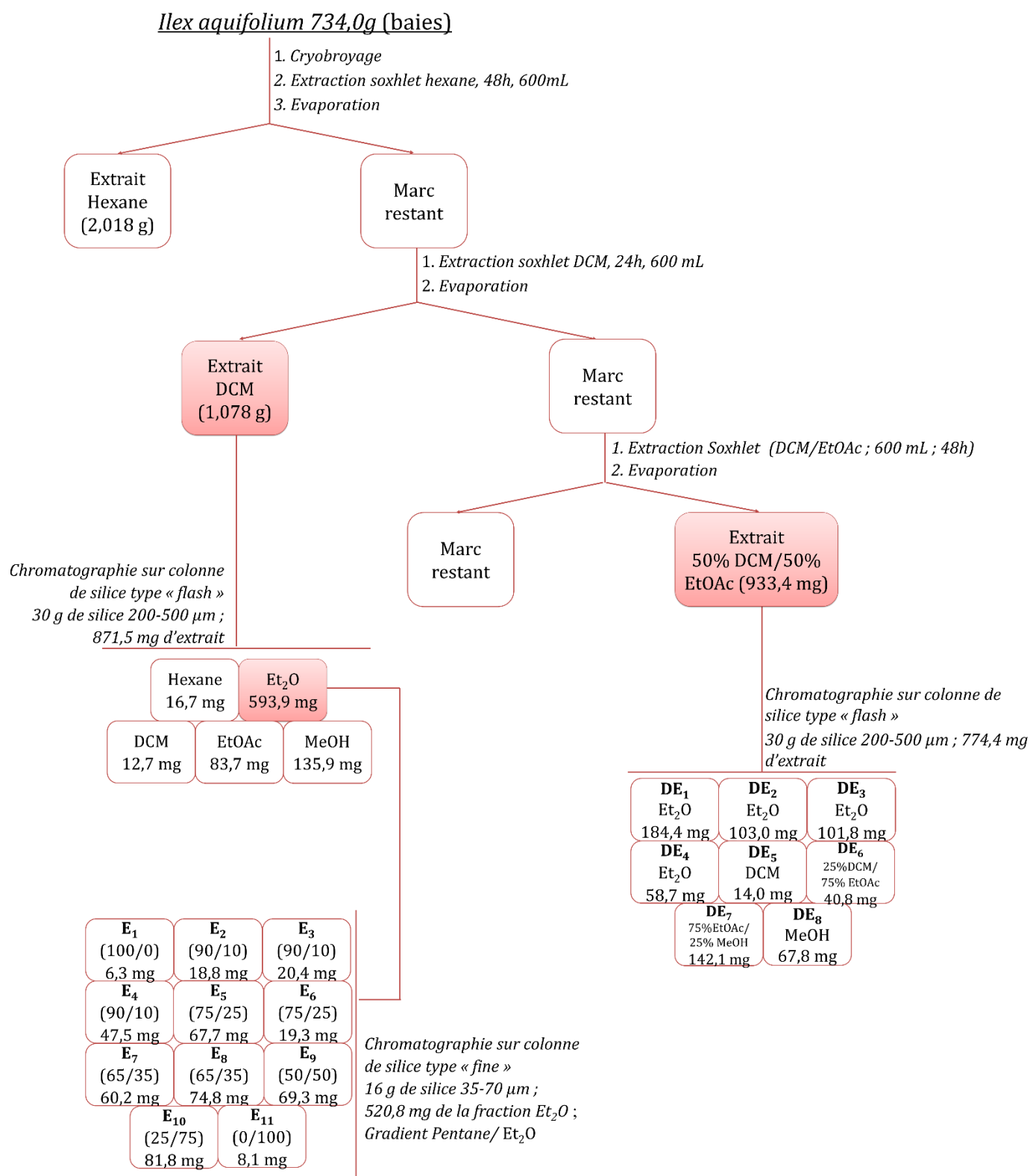
Un échantillon (871,5 mg) de l'extrait au dichlorométhane de baies d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 - 500 μm ; 60 Å ; 30 g) (**Figure 43**). A l'issue de cette chromatographie, cinq fractions ont été éluées avec cinq solvants de polarité croissante : hexane (16,7 mg), oxyde de diéthyle (593,9 mg), dichlorométhane (12,7 mg), acétate d'éthyle (83,7 mg) et méthanol (135,9 mg).

La fraction à l'oxyde de diéthyle (520,8 mg) a été re-chromatographiée sur colonne de silice de granulométrie fine (35 - 70 μm , 60 Å ; 16,0 g). A l'issue de cette séparation, onze sous-fractions ont été obtenues avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle : E₁ (100/0 ; 6,3 mg), E₂ (90/10 ; 18,8 mg), E₃ (90/10 ; 20,4 mg), E₄ (90/10 ; 47,5 mg), E₅ (75/25 ; 67,7 mg), E₆ (75/25 ; 19,3 mg), E₇ (65/35 ; 60,2 mg), E₈ (65/35 ; 74,8 mg), E₉ (50/50 ; 69,3 mg), E₁₀ (25/75 ; 81,8 mg) et E₁₁ (0/100 ; 8,1 mg) (**Figure 43**).

II.4. CC DE L'EXTRAIT AU MELANGE DICHLOROMETHANE/ACETATE D'ETHYLE (50/50, V/V) DE BAIES D'*I. AQUIFOLIUM*

L'extrait au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (774,4 mg) de baies d'*I. aquifolium* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 - 500 μm ; 60 Å ; 30 g) à l'aide de quatre solvants de polarité croissante (oxyde de diéthyle, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). A l'issue de cette chromatographie, huit fractions ont été obtenues : DE₁ (100/0/0/0 ; 184,4 mg), DE₂ (100/0/0/0 ; 103,0 mg), DE₃ (100/0/0/0 ; 101,8 mg), DE₄ (100/0/0/0 ; 58,7 mg), DE₅ (0/100/0/0 ; 14,0 mg), DE₆ (0/25/75/0 ; 40,8 mg), DE₇ (0/0/75/25 ; 142,1 mg) et DE₈ (0/0/0/100 ; 67,8 mg) (**Figure 43**).

Figure 43. Workflow de l'extraction et du fractionnement des extraits de baies d'*I. aquifolium*



II.5. CC DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE DE FLEURS DE *C. VILLOSA*

Un échantillon (2,63 g) d'extrait de fleurs de *C. villosa* a été chromatographié sur une colonne de silice de type « flash » (200 – 500 μm ; 60 Å ; 80 g) à l'aide de trois solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). Cinq fractions ont été obtenues à l'issue de cette chromatographie : D'₁ (100/0/0 ; 306,3 mg), D'₂ (50/50/0 ; 697,8 mg), D'₃ (0/100/0 ; 484,8 mg), D'₄ (0/50/50 ; 886,9 mg) et D'₅ (0/0/100 ; 18,3 mg) (**Figure 44**).

La fraction D'₄ (871,0 mg) a été chromatographiée sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 Å ; 30 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante acétate d'éthyle/méthanol (100 : 0 à 0 : 100). Suite à cette chromatographie, huit sous-fractions ont été obtenues : D'_{4.1} (100/0 ; 63,2 mg), D'_{4.2} (95/5 ; 202,4 mg), D'_{4.3} (90/10 ; 94,7 mg), D'_{4.4} (90/10 ; 140,8 mg), D'_{4.5} (80/20 ; 179,2 mg), D'_{4.6} (70/30 ; 74,1 mg), D'_{4.7} (20/80 ; 83,9 mg) et D'_{4.8} (0/100 ; 12,7 mg) (**Figure 44**).

II.6. CC DE L'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE DE FLEURS DE *C. VILLOSA*

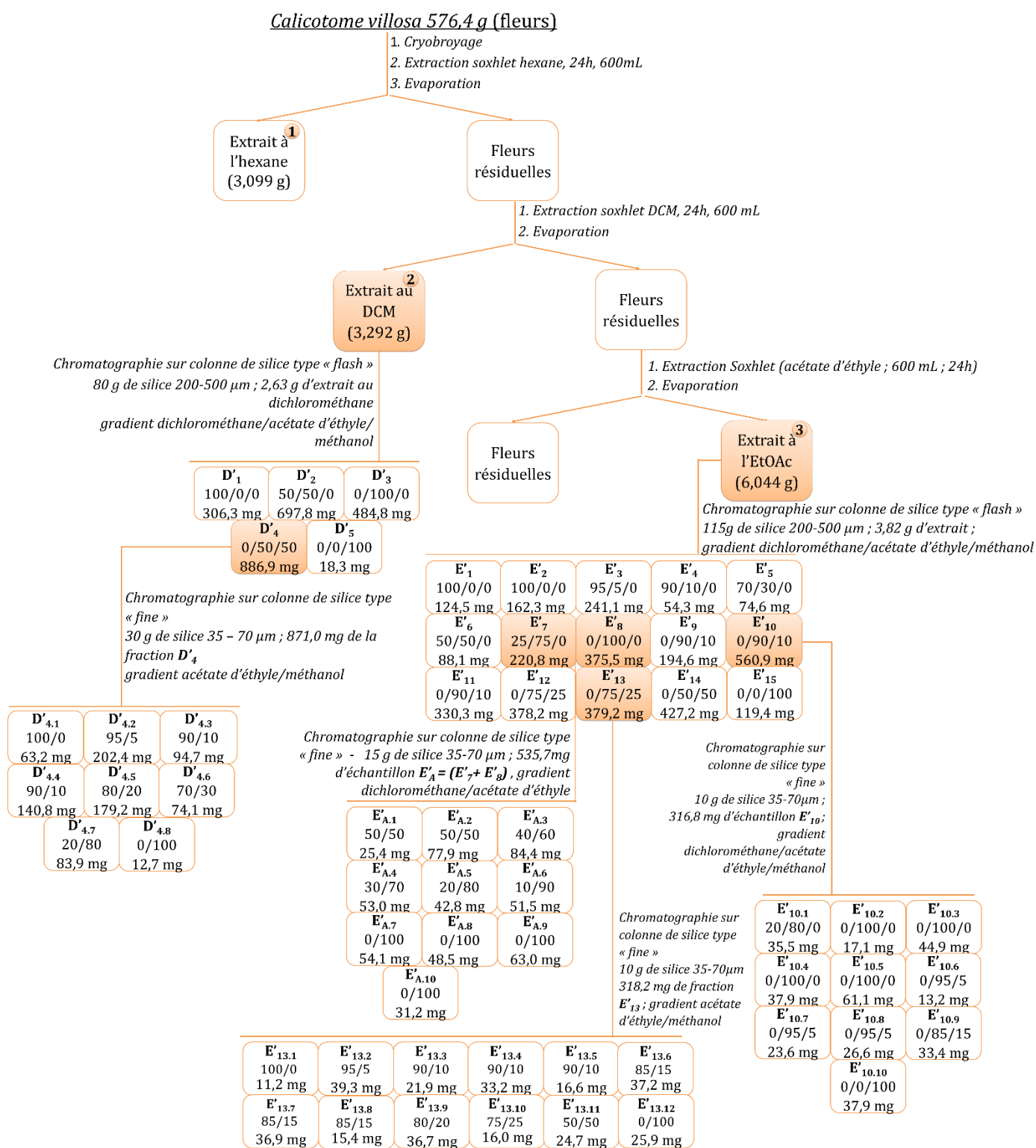
Un échantillon (3,82 g) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de fleurs de *C. villosa* a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 – 500 μm ; 60 Å ; 115 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol (100: 0: 0 à 0: 0: 100) (**Figure 44**). Quinze fractions ont été éluées : E'₁ (100/0/0 ; 124,5 mg), E'₂ (100/0/0 ; 162,3 mg), E'₃ (95/5/0 ; 241,1 mg), E'₄ (90/10/0 ; 54,3 mg), E'₅ (70/30/0 ; 74,6 mg), E'₆ (50/50/0 ; 88,1 mg), E'₇ (25/75/0 ; 220,8 mg), E'₈ (0/100/0 ; 375,5 mg), E'₉ (0/90/10 ; 194,6 mg), E'₁₀ (0/90/10 ; 560,9 mg), E'₁₁ (0/90/10 ; 330,3 mg), E'₁₂ (0/75/25 ; 378,2 mg), E'₁₃ (0/75/25 ; 379,2 mg), E'₁₄ (0/50/50 ; 427,2 mg) et E'₁₅ (0/0/100 ; 119,4 mg).

Les fractions E'₇ et E'₈ ont donc été rassemblées pour former la fraction E'_A (535,7 mg), puis soumises à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 μm ; 60 Å ; 15 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (50 : 50 à 0 : 100) permettant l'obtention de dix sous-fractions : E'_{A.1} (50/50 ; 25,4 mg), E'_{A.2} (50/50 ; 77,9 mg), E'_{A.3} (40/60 ; 84,4 mg), E'_{A.4} (30/70 ; 53,0 mg), E'_{A.5} (20/80 ;

42,8 mg), E'_{A.6} (10/90 ; 51,5 mg), E'_{A.7} (0/100 ; 54,1 mg), E'_{A.8} (0/100 ; 48,5 mg), E'_{A.9} (0/100 ; 63,0 mg) et E'_{A.10} (0/100 ; 31,2 mg) (**Figure 44**).

La fraction E'₁₀ (316,8 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 µm ; 60 Å ; 10 g) avec un gradient dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol (80: 20: 0 à 0: 0: 100). A l'issue de cette chromatographie, dix sous-fractions ont été éluées : E'_{10.1} (80/20/0 ; 35,5 mg), E'_{10.2} (0/100/0 ; 17,1 mg), E'_{10.3} (0/100/0 ; 44,9 mg), E'_{10.4} (0/100/0 ; 37,9 mg), E'_{10.5} (0/100/0 ; 61,1 mg), E'_{10.6} (0/95/5 ; 13,2 mg), E'_{10.7} (0/95/5 ; 23,6 mg), E'_{10.8} (0/95/5 ; 26,6 mg), E'_{10.9} (0/85/15 ; 33,4 mg) et E'_{10.10} (0/0/100 ; 37,9 mg) (**Figure 44**).

Un échantillon de la fraction E'₁₃ (318,2 mg) a été chromatographié sur colonne de silice de type « fine » (35 – 70 µm ; 60 Å ; 10 g) avec un gradient de solvants de polarité croissante acétate d'éthyle/méthanol (100: 0 à 0: 100) (**Figure 44**). Douze sous-fractions ont été éluées : E'_{13.1} (100/0 ; 11,2 mg), E'_{13.2} (95/5 ; 39,3 mg), E'_{13.3} (90/10 ; 21,9 mg), E'_{13.4} (90/10 ; 33,2 mg), E'_{13.5} (90/10 ; 16,6 mg), E'_{13.6} (85/15 ; 37,2 mg), E'_{13.7} (85/15 ; 36,9 mg), E'_{13.8} (85/15 ; 15,4 mg), E'_{13.9} (80/20 ; 36,7 mg), E'_{13.10} (75/25 ; 16,0 mg), E'_{13.11} (50/50 ; 24,7 mg) et E'_{13.12} (0/100 ; 25,9 mg).

Figure 44. Workflow de l'extraction et du fractionnement des fleurs de *C. villosa*

n°

Echantillons ayant fait l'objet de tests microbiologiques

II.7. CC DE L'EXTRAIT AU METHANOL DE RACINES DE *C. VILLOSA*

Un échantillon de 9,11 g d'extrait au méthanol a été chromatographié sur colonne de silice de type « flash » (200 - 500 μm ; 60 Å ; 300 g) à l'aide de quatre solvants de polarité croissante (pentane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol) (**Figure 45**). A l'issue de cette chromatographie, quatre fractions ont été obtenues : F₁ (100/0/0/0 ; 7,9 mg), F₂ (0/100/0/0 ; 330,0 mg), F₃ (0/0/100/0 ; 4,19 g) et F₄ (0/0/0/100 ; 4,17 g).

La fraction F₂ (échantillon de 301,2 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 - 70 μm ; 60 Å ; 10 g) (**Figure 45**). Neuf sous-fractions ont été éluées avec un gradient de solvants pentane/oxyde de diéthyle (100:0 à 0:100) : F_{2.1} (100/0 ; 20,4 mg), F_{2.2} (99,5/0,5 ; 28,7 mg), F_{2.3} (99/1 ; 28,3 mg), F_{2.4} (98/2 ; 29,7 mg), F_{2.5} (95/5 ; 76,2 mg), F_{2.6} (90/10 ; 28,4 mg), F_{2.7} (80/20 ; 20,5 mg), F_{2.8} (50/50 ; 28,0 mg), F_{2.9} (0/100 ; 29,8 mg).

Un échantillon de la fraction F₃ (3,99 g) a été fractionné sur colonne de silice (200 - 500 μm ; 60 Å ; 106 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100:0 à 0:100), et treize sous-fractions ont été obtenues : F_{3.1} (100/0 ; 14,2 mg), F_{3.2} (98/2 ; 17,3 mg), F_{3.3} (98/2 ; 175,5 mg), F_{3.4} (98/2 ; 387,5 mg), F_{3.5} (98/2 ; 319,1 mg), F_{3.6} (95/5 ; 110,4 mg), F_{3.7} (95/5 ; 267,3 mg), F_{3.8} (95/5 ; 144,6 mg), F_{3.9} (90/10 ; 159,7 mg), F_{3.10} (90/10 ; 223,4 mg), F_{3.11} (50/50 ; 1,35 g), F_{3.12} (0/100 ; 318,0 mg), F_{3.13} (0/100 ; 507,4 mg) (**Figure 45**).

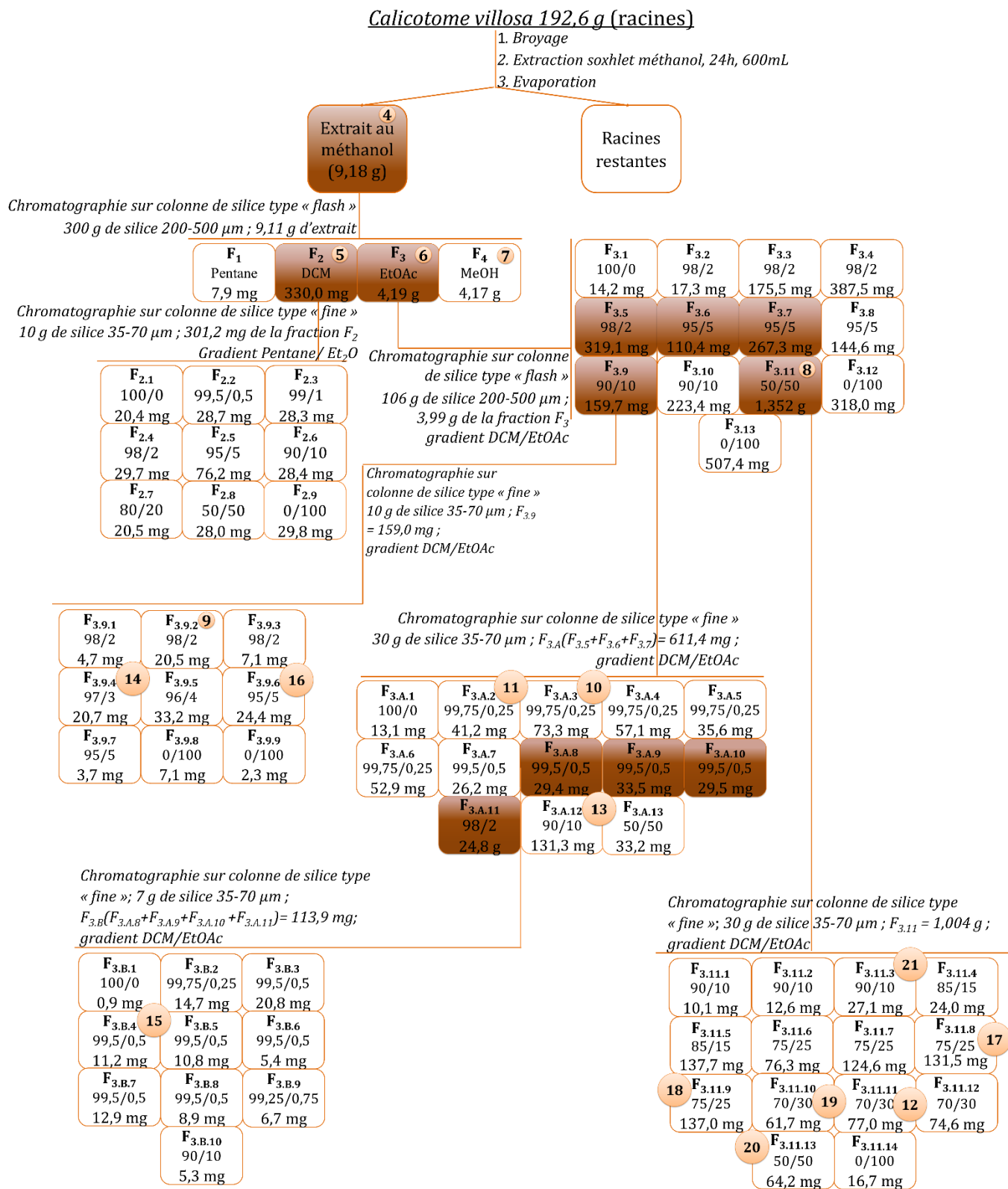
Les sous-fractions F_{3.5} à F_{3.7}, ont été rassemblées, formant ainsi la fraction F_{3.A} (611,4 mg). Cette dernière a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 - 70 μm ; 60 Å ; 30 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100:0 à 50:50) pour donner treize sous-fractions : F_{3.A.1} (100/0 ; 13,1 mg), F_{3.A.2} (99,75/0,25 ; 41,2 mg), F_{3.A.3} (99,75/0,25 ; 73,3 mg), F_{3.A.4} (99,75/0,25 ; 57,1 mg), F_{3.A.5} (99,75/0,25 ; 35,6 mg), F_{3.A.6} (99,75/0,25 ; 52,9 mg), F_{3.A.7} (99,5/0,5 ; 26,2 mg), F_{3.A.8} (99,5/0,5 ; 29,4 mg), F_{3.A.9} (99,5/0,5 ; 33,5 mg), F_{3.A.10} (99,5/0,5 ; 29,5 mg), F_{3.A.11} (98/2 ; 24,8 mg), F_{3.A.12} (90/10 ; 131,1 mg), F_{3.A.13} (50/50 ; 33,2 mg) (**Figure 45**).

Les sous-fractions F_{3.A.8} à F_{3.A.11} ont été rassemblées. L'échantillon obtenu (F_{3.B} ; 113,9 mg) a été soumis à une chromatographie sur colonne de type « fine »

(35 – 70 μm ; 60 $\text{\AA}$; 7 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (100 : 0 à 90 : 10) pour donner dix sous-fractions : F_{3.B.1} (100/0 ; 0,9 mg), F_{3.B.2} (99,75/0,25 ; 14,7 mg), F_{3.B.3} (99,5/0,5 ; 20,8 mg), F_{3.B.4} (99,5/0,5 ; 11,2 mg), F_{3.B.5} (99,5/0,5 ; 10,8 mg), F_{3.B.6} (99,5/0,5 ; 5,4 mg), F_{3.B.7} (99,5/0,5 ; 12,9 mg), F_{3.B.8} (99,5/0,5 ; 8,9 mg), F_{3.B.9} (99,25/0,75 ; 6,7 mg), F_{3.B.10} (90/10 ; 5,3 mg) (**Figure 45**).

La sous-fraction F_{3.9} (159,0 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 - 70 μm ; 60 $\text{\AA}$; 10 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (98 : 2 à 0 : 100) pour donner neuf sous-fractions : F_{3.9.1} (98/2 ; 4,7 mg), F_{3.9.2} (98/2 ; 20,5 mg), F_{3.9.3} (98/2 ; 7,1 mg), F_{3.9.4} (97/3 ; 20,7 mg), F_{3.9.5} (96/4 ; 33,2 mg), F_{3.9.6} (95/5 ; 24,4 mg), F_{3.9.7} (95/5 ; 3,7 mg), F_{3.9.8} (0/100 ; 7,1 mg), F_{3.9.9} (0/100 ; 2,3 mg) (**Figure 45**).

La sous-fraction F_{3.11} (1,004 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de silice de type « fine » (35 - 70 μm ; 60 $\text{\AA}$; 30 g) avec un gradient de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (90 : 10 à 0 : 100) pour donner quatorze sous-fractions : F_{3.11.1} (90/10 ; 10,1 mg), F_{3.11.2} (90/10 ; 12,6 mg), F_{3.11.3} (90/10 ; 27,1 mg), F_{3.11.4} (85/15 ; 24,0 mg), F_{3.11.5} (85/15 ; 137,7 mg), F_{3.11.6} (75/25 ; 76,3 mg), F_{3.11.7} (75/25 ; 124,6 mg), F_{3.11.8} (75/25 ; 131,5 mg), F_{3.11.9} (75/25 ; 137,0 mg), F_{3.11.10} (70/30 ; 61,7 mg), F_{3.11.11} (70/30 ; 77,0 mg), F_{3.11.12} (70/30 ; 74,6 mg), F_{3.11.13} (50/50 ; 64,2 mg), F_{3.11.14} (0/100 ; 16,7 mg) (**Figure 45**).

Figure 45. Workflow de l'extraction et du fractionnement des racines de *C. villosa*

n°

Echantillons ayant fait l'objet de tests microbiologiques

III. HYDROLYSE DES ESTERS D'AMYRINES ET DES TRIGLYCERIDES

PREPARATION DES ESTERS METHYLIQUES

Un échantillon (103,5 mg) de la fraction H₂ issue de l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium*, a été placé dans un ballon de 10 mL auquel ont été ajoutés 5 mL d'une solution de potasse éthanolique (KOH : 99,8 mg ; éthanol : 2 mL). Le mélange a été porté à reflux sous agitation pendant 1h30. La solution obtenue après chauffage a été placée dans une ampoule à décanter avec 10 mL de pentane et 6 mL d'eau salée. Une fois récupérée, la phase aqueuse a été extraite une seconde fois avec 10 mL de pentane. La phase aqueuse résiduelle a été acidifiée jusqu'à pH 1 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique puis extraite avec 2 fois 10 mL de pentane. La phase organique ainsi obtenue (pentane) a été séchée sur MgSO₄, filtrée, puis le solvant a été évaporé. Pour obtenir 41,4 mg d'extrait.

Ce dernier a été placé dans un ballon avec 5 mL d'une solution de BF₃/méthanol. Le mélange a été chauffé pendant 5 min jusqu'à dissolution des acides gras. Le contenu du ballon a été alors introduit dans une ampoule à décanter contenant 3 mL d'hexane et 20 mL d'eau salée. Après extraction liquide-liquide, la phase aqueuse a été éliminée. Après 3 lavages avec 10 mL de pentane, la phase organique a été séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le mélange ainsi obtenu (35,6 mg) a été analysé par CPG et CPG-SM.

Les fractions E₂ et E₃ issues de l'extrait au dichlorométhane de baies d'*I. aquifolium* et contenant des esters d'amyrones, ont été rassemblées (39,2 mg). Le mélange obtenu a subi le procédé décrit précédemment. L'hydrolyse des esters (KOH : 100,9 mg ; éthanol : 2 mL) a permis l'obtention d'un extrait de 7,4 mg. Ce mélange a été soumis à une seconde étape de méthylation (5 mL d'une solution de BF₃/méthanol). 4,7 mg d'extrait ont été obtenus puis analysés par CPG et CPG-SM.

Les triglycérides contenus dans la fraction DE₁ (184,4 mg) issue de l'extrait au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle de baies de houx, ont été également soumis à une hydrolyse (KOH : 605,2 mg ; éthanol : 10 mL), suivant le même procédé. Un extrait de 150,4 mg a été obtenu puis soumis à une méthylation (10 mL d'une solution de

BF₃/méthanol). L'extrait obtenu (121,5 mg) a été analysé par CPG et CPG-SM (voir paragraphes IV et V, ci-après).

IV. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Clarus 500*, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, polydiméthylsiloxane) et de détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : le gaz vecteur est l'hydrogène, la pression en tête de colonne est de 20 psi, le débit est de 1 mL/min, la température de l'injecteur est de 250 °C et la température des détecteurs est de 250 °C. La programmation de température est de 60 à 220 °C à 2 °C/min suivi d'un palier de 20 min à 220 °C. L'injection se fait par mode diviseur avec un rapport de 1/60. Les chromatogrammes ont été enregistrés en dissolvant entre 4 et 50 mg d'extrait dans 0,5 mL de CHCl₃.

V. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG-SM)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Auto System XL*, doté de deux injecteurs automatiques et de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) couplées à un détecteur de masse *Perkin Elmer Turbo Mass*. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation par un faisceau électronique de 70 eV. La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. Le gaz vecteur est l'hélium et la pression en tête de colonne est de 43 psi. Le débit est de 0,8 mL/min. Le

programme utilisé consiste dans une augmentation de température de 60 à 220 °C par élévation de 2 °C par minute avec un palier à 220 °C pendant 20 minutes. L'injection se fait par mode diviseur avec un rapport de division de 1/75. Pour l'enregistrement des spectres, une masse de 4 à 50 mg d'extrait a été dissoute dans 0,5 mL de CHCl₃.

VI. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (CLHP-SM/SM)

Les analyses SM/SM ont été obtenues avec un spectromètre Bruker Daltonics Maxis Plus, Data analysis 4.3, basé sur l'infusion directe par ESI-MS et une confirmation par SM/SM à l'aide d'une liste sélective de masses (rapports m/z). Une solution d'agrégat de formiate et d'acétate de sodium 10mM été utilisée pour l'étalonnage. Les analyses ont été réalisées sur une gamme de masse de 50-1000 Daltons avec une fréquence de balayage de 1Hz. La résolution de l'appareil a été estimée à 21,244 (LMH) pour m/z = 415,211. Les produits ont été dissous dans du méthanol pour une introction directe. Pour le 2-(1-méthyléthényle)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane m/z (%): 257,0783 ([M + Na]⁺ 100); 256,0718 (36,3); 225,0522 (27,9); 62,9816 (26,8). Pour le 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpane m/z (%): 377,1347 ([M+Na]⁺ 9,4); 308,0651 (29); 293,0407 (24,4); 164,9189 (30,1); 149,0592 (35,1); 105,0333 (17,6); 90,9757 (39,8); 69,0684 (8,3); 62,9804 (100); 56,0480 (49,5). Enfin pour le 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane m/z (%): 361,1050 ([M + Na]⁺ 46,3); 313,2039 (10,8); 164,9197 (26,4); 104,9923 (6,2); 91,0541 (5,0); 62,9803 (100) (les motifs de fragmentation observés sur les spectres de mass sont similaires à ceux reportés par [Simons et al. \(2011\)](#) pour d'autres ptérocarpanes.

VII. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Les spectres de RMN ont été enregistrés avec un spectromètre *Bruker 400 AVANCE*, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton (^1H) et à 100,623 MHz pour le carbone-13 (^{13}C). Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Les solvants utilisés pour dissoudre les échantillons sont le CDCl_3 , le $\text{DMSO-}d_6$ et le CD_3OD ([Tableau 34](#)). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne pour les échantillons au CDCl_3 et CD_3OD . Pour les échantillons analysés dans le $\text{DMSO-}d_6$, les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant (septuplet à 39,39 ppm). Les spectres de RMN ^{13}C ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 45° ; temps d'acquisition = 2,7 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 24 000 Hz (environ 240 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Pour l'enregistrement des spectres, une masse de 40 à 50 mg d'extrait et de 4 à 70 mg de fraction de chromatographie est dissoute dans 0,5 mL de solvant (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ ou CD_3OD). Le nombre d'accumulations est compris entre 2000 et 5000 pour chaque enregistrement. Les données du signal (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle ($\text{LB} = 1,0 \text{ Hz}$). Les spectres DEPT (Distortionless Enhanced Polarization Transfert) ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les spectres de RMN ^{13}C avec un angle d'impulsion à 135° .

Les paramètres utilisés pour la quantification par RMN ^1H sont les suivants : angle d'impulsion 30° ; délai de relaxation = 1,0 s ; temps d'acquisition = 2,56 s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 6410 Hz (16 ppm). Aucun traitement mathématique du signal de précession libre (FID) n'est appliqué avant la transformée de Fourier.

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées expérimentalement en utilisant la rapport Signal sur Bruit (S :N). Selon [Cerceanu et al. \(2016\)](#) les concentrations pour S :N = 10 et S :N = 150 ont été définies comme LOD et LOQ, respectivement. Les spectres RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY et INADEQUATE) ont été enregistrés suivant les séquences d'analyse standards contenues dans la bibliothèque Bruker.

Tableau 34. Solvants utilisés pour l'enregistrement des spectres de RMN (extraits et fractions de chromatographie)

<i>I. aquifolium</i>		<i>C. villosa</i>	
Solvant	Feuilles Baies	Fleurs	Racines
CDCl ₃	extrait à l'hexane ; H ₁ à H ₁₂ ; H _{6.1} à H _{6.7} ; extrait au dichlorométhane ; D ₁ à D ₄ extrait à l'hexane ; extrait au dichlorométhane ; fraction hexane ; fraction oxyde de diéthyle ; fraction dichlorométhane ; E ₁ à E ₇ ; extrait au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle DE ₁ à DE ₆	extrait à l'hexane ; D' ₁ ; E' ₁ ; E' ₂	F ₁ ; F ₂ ; F _{2.1} à F _{2.9} ; F _{3.1} à F _{3.10} ; F _{3.A.1} à F _{3.A.12} ; F _{3.B.1} à F _{3.B.10} ; F _{3.9.1} à F _{3.9.6} ; F _{3.11.1} ; F _{3.11.2}
DMSO- <i>d</i> ₆	extrait au dichlorométhane ; D ₅ à D ₉ ; D _{6.1} à D _{6.6} extrait au dichlorométhane ; fraction oxyde de diéthyle ; fraction dichlorométhane ; fraction acétate d'éthyle, fraction méthanol ; E ₇ à E ₁₁ ; extrait au mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle ; DE ₂ ; DE ₃ ; DE ₅ ; DE ₇ ; DE ₈	extrait au dichlorométhane ; extrait à l'acétate d'éthyle ; D' ₂ à D' ₅ ; E' _{A.1} à E' _{A.10} ; D' _{4.1} à D' _{4.8} ; E' ₃ à E' ₁₅ ; E' _{10.1} à E' _{10.10} ; E' _{13.1} à E' _{13.12}	extrait au méthanol ; F ₃ ; F ₄ ; F _{3.11} à F _{3.13} ; F _{3.A.12} ; F _{3.A.13} ; F _{3.9.5} à F _{3.9.9} ; F _{3.11.3} à F _{3.11.14} ; F _{3.10}
CD ₃ OD	- DE ₆	E' _{A.1} à E' _{A.3}	F _{3.11.13}
(CD ₃) ₂ CO	- -	-	F _{3.9.6}

VIII. IDENTIFICATION DES COMPOSES

L'ensemble des extraits et des fractions de chromatographie qui en sont issues, a été analysé par RMN ^{13}C en utilisant la méthodologie du laboratoire par comparaison des signaux relevés sur les spectres RMN ^{13}C enregistrés avec des spectres de référence compilés dans les bibliothèques de spectres RMN ^{13}C propres au laboratoire et celles issues de la littérature (Tomi et al., 1995 ; Tomi et Casanova, 2006).

Dans le cas des fractions de chromatographie H₂, E₂+E₃, et DE₁ issues des extraits de feuilles et baies d'*I. aquifolium*, l'identification des composés est basée sur la complémentarité des techniques analytiques à notre disposition : (CPG(Ir), CPG-SM, RMN) :

- Comparaison des indices de rétention (Ir) calculés par CPG au laboratoire et/ou issus de la littérature sur des colonnes polaires et apolaires de même type que celles utilisées au laboratoire ;
- Comparaison des spectres de masse des composés obtenus avec ceux contenus dans des bibliothèques de spectres commerciales et issues de la littérature ;
- RMN ^{13}C selon la méthode citée ci-dessus.

IX. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

Six souches bactériennes provenant de la collection de l'Institut Pasteur ont été utilisées : 3 souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* CIP 53.156, *Staphylococcus epidermidis* CIP 53.124 et *Bacillus cereus* CIP 78.3) et 3 souches à Gram négatif (*Escherichia coli* CIP 54.8 T, *Enterobacter aerogenes* CIP 60.86 T et *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467). La souche multi-résistante *Enterobacter aerogenes* EA289, fournie par le laboratoire « Membranes et Cibles Thérapeutiques » d'Aix-Marseille

Université, est un dérivé sensible à la kanamycine de l'isolat clinique EA27. Ces souches bactériennes ont été cultivées en routine à 37 °C, pendant 18 à 24 h sur milieu solide Mueller-Hinton Agar (MHA) et sur milieu liquide Mueller-Hinton Broth (MHB). Un antibiotique appartenant à la classe des phénicolés a été pris pour référence : le chloramphénicol.

L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la plus faible concentration de produit suffisante pour inhiber, *in vitro*, 90 % de la croissance bactérienne. La CMI a été déterminée par la technique de micro-dilution en milieu liquide. Tous les échantillons ont été dilués dans le solvant adéquat, de manière à générer une dilution de base 2, en partant de 1024 µg.mL⁻¹. Par la suite, 2 µL de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une microplaque de 96 puits. Les *inocula* bactériens sont ensuite préparés à une densité équivalente au standard 0,5 Mac Farland (10⁸ Unités Formant Colonies (UFC). mL⁻¹) avant d'être dilués au 1/100^{ème} dans le milieu liquide MHB et inoculés (200 µL) dans chaque puit. Le milieu MHB seul en présence de bactéries permet ici de contrôler positivement la croissance bactérienne.

La lecture a ensuite lieu après 18 à 24 h d'incubation à 37° C sous agitation. Pour révéler ou non la présence de bactéries, 50 µL de chlorure d'iodonitrotétrazolum sont ajoutés (présence de bactéries vivantes : coloration du puit en rose). La CMI est déduite au niveau du premier puit qui est dépourvu de croissance bactérienne. Tous les tests sont réalisés trois fois sur chaque microplaque, au cours de trois expériences avec des *inocula* différents.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aissat, A. K., Chaher-Bazizi, N., Richard, T., Kilani-Atmani, D., Pedrot, E., Renouf, E., Atmani, D., Fonayet, J. V., **2022**. Analysis of individual anthocyanins, flavanols, flavonols and other polyphenols in *Pistacia lentiscus* L. fruits during ripening. *J. Food Compos. Anal.* 106, 104286.
- Alhage, J., Elbitar, H., Taha, S., Guegan, J. P., Dassouki, Z., Vives, T., Benvegna, T., **2018**. Isolation of bioactive compounds from *Calicotome villosa* stems. *Molecules* 23(4), 851.
- Alikaridis, F., **1987**. Natural constituents of *Ilex* species. *J. Ethnopharmacol.* 20, 121-144.
- Amer, A., **2018**. Biotechnology approaches for in vitro production of flavonoids. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 7(5), 457-468.
- Araya-Cloutier, C., Vincken, J. P., Van Ederen, R., Den Besten, H. M. W., Gruppen, H., **2018**. Rapid membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* induced by antibacterial prenylated phenolic compounds from legumes. *Food Chem.* 240, 147-155.
- Arraki, K., Totoson, P., Attia, R., Zedet, A., Pudlo, M., Messaoud, C., Demougeot, C., Girard, C., **2020**. Arginase inhibitory properties of flavonoid compounds from the leaves of Mulberry (*Morus alba*, Moraceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 72(9), 1269-1277.
- Ata, A., Tan, D. S., Matochko, W. L., Adesanwo, J. K., **2011**. Chemical constituents of *Drypetes gossweileri* and their enzyme inhibitory and anti-fungal activities. *Phytochem. Lett.* 4(1), 34-37.
- Audran, G., Mori, K., **1998**. Synthesis of Phyllanthurinolactone, the Leaf-Closing Factor of *Phyllanthus urinaria* L., and its three stereoisomers. *Eur. J. Org. Chem.* 57-62.
- Bakha, M., Gibernau, M., Tomi, F., Machon, N., Khiraoui, A., Aboukhalid, K., El Mtili, N., Al Faiz, C., **2019**. Chemical diversity of essential oil of the Moroccan endemic *Origanum grosii* in natural populations and after transplantation. *S. Afr. J. Bot.* 124, 151-159.
- Bardají, G. G., Cantó, M., Alibés, R., Bayón, P., Busqué, F., De March, P., Figueredo, M., Font, J., **2008**. Diastereoselective synthesis of allosecurinine and viroallosecurinine from menisdaurilide. *J. Org. Chem.* 73(19), 7657-7662.

Barrero, A. F., Cabrera, E., Garcia, I. R., **1998**. Pterocarpanes from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* 48(1), 187-190.

Barrero, A. F., del Moral, J. F. Q., Herrador, M. M., Akssira, M., Bennamara, A., Akkad, S., Aitigri, M., **2004**. Oxygenated diterpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *africana*. *Phytochemistry* 65(17), 2507-2515.

Barron, D., Ibrahim, R. K., **1996**. Isoprenylated flavonoids—a survey. *Phytochemistry* 43(5), 921-982.

Bate-Smith, E. C., **1962**. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. (Bot.)* 58(371), 95-173.

Bezerra-Silva, P. C., Santos, J. C., Santos, G. K. N., Dutra, K. A., Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., Nascimento, M. S., Navarro, D. M. A. F., Bieber, L. W., **2015**. Extract of *Bowdichia virgilioides* and maackiain as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. *Exp. Parasitol.* 153, 160-164.

Bighelli, A., Casanova, J., **2009**. Analytical methods for Cymbopogon oils. In Akhila, A. (Ed.), *Essential oil-bearing grasses : the genus Cymbopogon* (v. 46, Chap. 8, p. 195-221). Taylor & Francis : London.

Both, D. M., Goodtzova, K., Yarosh, D. B., Brown, D. A., **2002**. Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 569-575.

Brad, K., Zhang, Y., Gao, J., **2017**. Extraction and purification of formononetin from *Trifolium pratense* L. : Physicochemical properties of its complex with lecithin. *Trop. J. Pharm. Res.* 16(8), 1757-1763.

Bradesi, P., Bighelli, A., Tomi, F., Casanova, J., **1996**. L'analyse des mélanges complexes par RMN du ¹³C. *Can. J. Appl. Spectrosc.* Partie 1 : 41, 15-24 ; Partie 2 : 41, 41-50.

Brekke, T., Kvalheim, O. M., **1996**. Analysis of Nuclear Magnetic Resonance spectra of mixtures using multivariate techniques. In Rutledge, D. N. (Ed.), *Signal treatment and signal analysis in NMR* (v. 18, Chap. 20, p. 422 - 451). Elsevier : Amsterdam.

Cannac, M., Barboni, T., Ferrat, L., Bighelli, A., Castola, V., Costa, J., Trecul, D., Morandini, F., Pasqualini, V., **2009**. Oleoresin flow and chemical composition of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp. *laricio*) in response to prescribed burnings. *For. Ecol. Manage.* 257, 1247-1254.

Castola, V., Bighelli, A., Casanova, J., **1999**. Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using ^{13}C NMR spectroscopy exemplified by dichloromethanic extracts of cork. *Appl. Spectrosc.* 53, 344-350.

Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J. M., Casanova, J., **2002**. Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork. *Ind. Crops Prod.* 15, 15-22.

Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., Lai, A., Casanova, J., **2005**. Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO_2 extracts. *Ind. Crops Prod.* 21, 65-69.

Catalano, S., Marsili, A., Morelli, I., Pistelli, L., Scartoni, V., **1978**. Constituents of the leaves of *Ilex aquifolium* L. *Planta Med.* 33, 416-417.

Catteau, L., Reichmann, N. T., Olson, J., Pinho, M. G., Nizet, V., Van Bambeke, F., Quetin-Leclercq, J., **2017**. Synergy between ursolic and oleanolic acids from *Vitellaria paradoxa* leaf extract and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo activity and underlying mechanisms. *Molecules* 22(12), 2245.

Cerceau, C.I., Barbosa, L.C.A., Alvarenga, E.S., Ferreira, A.G., Thomasi, S.S. A, **2016**. Validated ^1H -NMR method for quantitative analysis of α -bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus*. *Talanta* 161, 71-79.

Cháirez-Ramírez, M. H., Moreno-Jiménez, M. R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., **2016**. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI J.* 15, 758-771.

Chaudhuri, S. K., Huang, L., Fullas, F., Brown, D. M., Wani, M. C., Wall, M. E., Tucker, J. C., Beecher, C. W. W., Kinghorn, A. D., **1995**. Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. *J. Nat. Prod.* 58(12), 1966-1969.

- Checker, R., Sandur, S. K., Sharma, D., Patwardhan, R. S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B. B., Sainis, K. B., **2012**. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxydant, is mediated through suppression of NF-kB, AP-1 and NF-AT. *PLoS One* 7(2), e31318.
- Cherkaoui-Tangi, K., Lachkar, M., Wibio, M., Morel, N., Gilani, A. H., Lyoussi, B., **2008**. Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin glucoside from *Calycotome villosa* in rats. *Phytother. Res.* 22, 356–361.
- Chikhi, I., Allali, H., Bechlaghem, K., Fekih, N., Muselli, A., Djabou, N., El Amine Dib, M., Tabti, B., Halla, N., Costa, J., **2014**. Assessment of in vitro antimicrobial potency and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* growing in Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4(5), 356-362.
- Cho, J. Y., Moon, J. H., Seong, K. Y., Park, K. H., **1998**. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(11), 2273-2276.
- Choi, Y. H., Sertic, S., Kim, H. K., Wilson, E. G., Michopoulos, F., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Kricun, S. D. P., Verpoorte, R., **2005**. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using Nuclear Magnetic Resonance and multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.* 53(4), 1237-1245.
- Corcoran, O., Spraul, M., **2003**. LC-NMR-MS in drug discovery. *Drug Discov. Today* 8(14), 624-631.
- De Almeida, M. C. S., Souza, L. G. S., Ferreira, D. A., Pinto, F. C. L., De Oliveira, D. R., Santiago, G. M. P., Monte, F. J. Q., Braz-Filho, R., De Lemos, T. L. G., **2017**. 7-epi-griffonilide, a new lactone from *Bauhinia pentandra*: complete ¹H and ¹³C chemical shift assignments. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89(1), 65-71.
- Deng, M., Chen, H., Long, J., Song, J., Xie, L., Li, X., **2021**. Calycosin: a review of its pharmacological effects and application prospects. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 19(7), 911-925.

- Dessí, M. A., Deiana, M., Rosa, A., Piredda, M., Cottiglia, F., Bonsignore, L., Deidda, D., Pompei, R., Corongiu, F. P., **2001**. Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Phytother. Res.* 15, 511–518.
- Díaz-Ruiz, G., Hernández-Vázquez, L., Luna, H., Wachter-Rodarte, M. D. C, Navarro-Ocaña, A., **2012**. Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by α -amyrin esters. *Molecules* 17, 12603-12611.
- Duquesnoy, E., Castola, V., Casanova, J., **2007**. Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europaea* L. using ^{13}C NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 18, 347-353.
- Duquesnoy, E., Castola, V., Casanova, J., **2008**. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 343, 893-902.
- Duquesnoy, E., Paoli, M., Castola, V., Bighelli, A., Casanova, J., **2009**. Identification of taxanes in extracts from leaves of *Taxus baccata* L. using ^{13}C -NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 20, 246-252.
- Dutra, J. M., Espitia, P. J. P., Batista, R. A., **2021**. Formononetin: Biological effects and uses—A review. *Food Chem.* 359, 129975.
- El Antri, A., Messouri, I., Tlemçani, R. C., Bouktaib, M., El Alami, R., El Bali, B., Lachkar, M., **2004** (a). Flavone glycosides from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Molecules* 9(7), 568-573.
- El Antri, A., Messouri, I., Bouktaib, M., El Alami, R., Bolte, M., El Bali, B., Lachkar, M., **2004** (b). Isolation and X-ray crystal structure of a new isoquinoline-N-oxide alkaloid from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Fitoterapia* 75(7-8), 774-778.
- El Antri, A., Messouri, I., Bouktaib, M., El Alami, R., Bolte, M., El Bali, B., Lachkar, M., **2004** (c). Isolation and X-ray crystal structure of tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Molecules* 9(8), 650-657.
- El Antri, A., Lachkar, N., El Hajjaji, H., Gaamoussi, F., Lyoussi, B., El Bali, B., Morel, N., Allouchi, H., Lachkar, M., **2010**. Structure elucidation and vasodilator activity of methoxy flavonols from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arab. J. Chem.* 3(3), 173-178.

- El Hafidi, S., Bakhy, K., Ouhssine, M., Casanova, J., Tomi, F., Paoli, M., **2021**. Essential oil composition of *Cladanthus eriolepis* (Coss. ex Maire) Oberpr. & Vogt, an endemic species to Morocco. *J. Essent. Oil Res.* 33, 369-375.
- Elkhamlichi, A., El Antri, A., El Hajaji, H., El Bali, B., Oulyadi, H., Lachkar, M., **2017** (a). Phytochemical constituents from the seeds of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arab. J. Chem.* 10(suppl. 2), S3580-S3583.
- Elkhamlichi, A., El Hajaji, H., Faraj, H., Alami, A., El Bali, B., Lachkar, M., **2017** (b). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of seeds and pods extracts of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *J. Appl. Pharm. Sci.* 7 (4), 192-198.
- Erdemoglu, N., Iscan, G., Sener, B., Palittapongarnpim, P., **2009**. Antibacterial, antifungal, and antimycobacterial activity of *Ilex aquifolium* leaves. *Pharm. Biol.* 47 (8), 697-700.
- Espíndola, K. M. M., Ferreira, R. G., Narvaez, L. E. M., Silva Rosario, A. C. R., Da Silva, A. H. M., Silva, A. G. B., Vieira, A. P. O., Monteiro, M. C., **2019**. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Front. Oncol.* 9 (541).
- Esselin, H., Sutour, S., Liberal, J., Cruz, M. T., Salgueiro, L., Siegler, B., Freuze, I., Castola, V., Paoli, M., Bighelli, A., Tomi, F., **2017**. Chemical composition of *Laurencia obtusa* extract and isolation of a new C15-acetogenin. *Molecules* 22(5), 779.
- Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J., **2005** (a). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 445-449.
- Ferrari, B., Castilho, P., Tomi, F., Rodrigues, A. I., do Ceu Costa, M., Casanova, J., **2005** (b). Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostuslactone in *Laurus novocanariensis* fixed oil using ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* 16, 104-107.
- Fiod Riccio, B. V., Fonseca-Santos, B., Ferrari, P. C., Chorilli, M., **2020**. Characteristics, biological properties and analytical methods of *trans*-resveratrol: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 50, 339-358.

Fischer, R., Linser, E., **1930**. Der mikrochemische Nachweis geringer Mengen von Arbutin und Urson in Pflanzen. *Arch. Pharm.* 185-190.

Fokialakis, N., Alexi, X., Aligiannis, N., Boulaka, A., Meligova, A. K., Lambrinidis, G., Kalpoutzakis, E., Pratsinis, H., Cheilari, A., Mitsiou, D. J., Mitakou, S., Alexis, M. N., **2019**. Biological evaluation of isoflavonoids from *Genista halacsyi* using estrogen-target cells: Activities of glucosides compared to aglycones. *PLoS One* 14(1), e0210247.

Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, R. E., **2008**. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* 120, 272–276.

Formáček, V., Kubeczka, K. H., **1982**. Analysis and composition : ¹³C NMR analysis of essential oils. In Margaris, N., Koedam, A., Vokou, D. (Eds.), *Aromatic plants : basic and applied aspects* (v. 7, Chap. 4, p. 177-181). Martinus Nijhoff Publishers: La Haye.

Formáček, V., Kubeczka, K. H., Schultze, W., Herres, W., **1988**. New developments in essential oils analysis by Fourier-transform spectroscopy. In Lawrence, B.M., Mookherjee, B.D., Willis B.J. (Eds.), *Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors*, 16-20 Nov 1986 (p. 931-950). Elsevier Science : Washington.

Fotso, G. W., Maher, F. A., Ngnintedo, D., Ango, P. Y., Kapche, D. G. F. W., Ngameni, B., Ngwenya, B., Yeboah, S. O., Ngadjui, B. T., Andrae-Marobela, K., **2015**. Three new isoflavonoids with antioxidant properties from *Ptycholobium contortum* (N. E. Br.) Brummitt (Leguminosae). *Phytochem. Lett.* 14, 254-259.

Frighetto, R. T. S., Welendorf, R. M., Nigro, E. N., Frighetto, N., Siani, A. C., **2008**. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chem.* 106, 767-771.

Fritsche, J., Angoelal, R., Dachtler, M., **2002**. On-line liquid-chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–mass spectrometry coupling for the separation and characterization of secoisolariciresinol diglucoside isomers in flaxseed. *J. Chromatogr. A* 972(2), 195-203.

Garcia, G. P., Sutour, S., Rabehaja, D., Tissandié, L., Filippi, J. J., Tomi, F., **2019**. Essential oil of the malagasy grass *Elionurus tristis* Hack. contains several undescribed sesquiterpenoids. *Phytochemistry* 162, 29-38.

Glaser, T., Lienau, A., Zeeb, D., Krucker, M., Dachtler, M., Albert, K., **2003**. Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling. *Chromatographia* 57(1), S19-S25.

Gnoatto, S. C., Dassonville-Klimpt, A., Da Nascimento, S., Galéra, P., Boumediene, K., Gosmann, G., Sonnet, P., Moslemi, S., **2008**. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* 43(9), 1865-1877.

Grey, C., Widén, C., Adlercreutz, P., Rumpunen, K., Duan, R. D., **2010**. Antiproliferative effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) extracts on human colon and liver cancer cell lines. *Food Chem.* 120(4), 1004–1010.

Guaâdaoui, A., El-Alami, I., Abid, M., Boukhatem, N., Lechkar, M., Hamal, A., **2016**. Contribution to botanical, phyto-ecological and phytochemical studies of *Calicotome villosa* (Poiret) Link subsp. *intermedia* (C. Presl): A phylogenetic approach from Moroccan species. *IJGHC* 5(2), 93-111.

Guerriero, A., Pietra, F., **1984**. A butenolide atypical of the Ranunculaceae: aquilegiolide from *Aquilegia atrata* (var. *Atroviolacea*). *Phytochemistry* 23(10), 2394-2396.

Günther, H., **1994**. *La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie*. Masson: Paris.

Habermehl, G. G., Fliegner, W., **1998**. Terpenes and their Biological Relevance. *Studies in Natural Products Chemistry: Structure and Chemistry (Part F)*, 3.

Hafizur, R. M., Maryam, K., Hameed, A., Zaheer, L., Bano, S., Sumbul, S., Sana, A., Saleem, R., Naz, S., Waraich, R. S., Ul-Haq, Z., Faizi, S., **2018**. Insulin releasing effect of some pure compounds from *Moringa oleifera* on mice islets. *Med. Chem. Res.* 27, 1408-1418.

- Hao, D., Gu, X., Xiao, P., Liang, Z., Xu, L., Peng, Y., **2013**. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharmacol. Sin.* 3(1), 8-19.
- He, X., Liu, R. H., **2007**. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.* 55(11), 4366-4370.
- Hedges, J. I., Parker, P. L., **1976**. Land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 1019-1029.
- Iinuma, M., Tanaka, T., Mizuno, M., Yamamoto, H., Kobayashi, Y., Yonemori, S., **1992**. Phenolic constituents in *Erythrina x bidwilli* and their activity against oral microbial organisms. *Chem. Pharm. Bull.* 40(10), 2749-2752.
- Ikeda, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., **2008**. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 26-42.
- Imran, M., Gondal, T. A., Atif, M., Shahbaz, M., Qaisarani, T. B., Mughal, M. H., Salehi, B., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., **2020**. Apigenin as an anticancer agent. *Phytother. Res.* 34, 1812-1828.
- Ishikura, N., **1971**. Paper chromatographic analysis of anthocyanins in the red epicarp of *Ilex aquifolium*. *Bot. Mag. Tokyo* 84, 113-117.
- Jaeger, A., 2012. *Ilex aquifolium* L. *Management*, 10, 2.
- Jalali, H., Mozaffari Nejad, A. S., Ebadi, A. G., Laey, G., **2009**. Ethnobotany and folk pharmaceutical properties of major trees or shrubs in Northeast of Iran. *Asian J. Chem.* 21 (7), 5632-5638.
- Jang, D. S., Han, A. R., Park, G., Jhon, G. J., Seo, E. K., **2004**. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. *Arch. Pharm. Res.* 27(4), 386-389.
- Kakumu, Y., Nguyen, T. M. T., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., **2022**. New benzoic acid and caffeoyl derivatives with anti-inflammatory activities isolated from leaves of *Ilex kaushue*. *Nat. Prod. Res.* 36(12), 3013-3021.

Kalemba, D., Kunicka, A., **2003**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829.

Kalinowski, H. O., Berger, S., Braun, S., **1991**. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. John Wiley & Sons: Chichester.

Kambiré, D. A., Boti, J. B., Yapi, T. A., Ouattara, Z. A., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., **2020**. New natural oxygenated sesquiterpenes and chemical composition of leaf essential oil from Ivoirian *Isolona dewevrei* (De Wild. & T. Durand) Engl. & Diels. *Molecules* 25(23), 5613.

Kambiré, D. A., Kablan, A. C. L., Yapi, T. A., Vincenti, S., Maury, J., Baldovini, N., Tomi, P., Paoli, M., Boti, J. B., Tomi, F., **2022**. *Neuropeltis acuminata* (P. Beauv.): Investigation of the chemical variability and in vitro anti-inflammatory activity of the leaf essential oil from the Ivorian species. *Molecules* 27(12), 3759.

Kamnaing, P., Fanzo Free, S.N.Y., Nkengfack, A. E., Folefoc, G., Tanee Fomum, Z., **1999**. An isoflavan-quinone and a flavonol from *Millettia laurentii*. *Phytochemistry* 51(6), 829-832.

Kim, D. H., Han, K. M., Chung, I. S., Kim, D. K., Kim, S. H., Kwon, B. M., Jeong, T. S., Park, M. H., Ahn, E. M., Baek, N. I., **2005**. Triterpenoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as human Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* 28 (5), 550-556.

Kippsy, T. S., **2013**. Phytochemical and antimicrobial screening of *Crotalaria quartiniana* A. Rich and *Erythrina melanacantha* Harms : mémoire de master en chimie, Université de Kenyatta.

Knights, B. A., Smith, A. R., **1977**. Sterols and triterpenes of *Ilex aquifolium*. *Phytochemistry* 16, 140-141.

Kondo, M., **2006**. Phytochemical studies of extracts from cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) with anticancer, antifungal and cardioprotective properties: a Doctoral dissertation in chemistry, University of Massachusetts Dartmouth.

- Kubeczka, K. H., Formáček, V., **1984**. Application of direct carbon-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. In Schreier P. (Ed.), *Analysis of volatiles : methods-applications* (p. 219-230). Walter de Gruyter & Co. : Berlin.
- Kuete, V., Sandjo, L. P., Kwamou, G. M. N., Wiench, B., Nkengfack, A. E., Efferth, T., **2014**. Activity of three cytotoxic isoflavonoids from *Erythrina excelsa* and *Erythrina senegalensis* (neobavaisoflavone, sigmoidin H and isoneorautenol) toward multi-factorial drug resistant cancer cells. *Phytomedicine* 21(5), 682-688.
- Lazalde-Cruz, R., Tirado-González, D. N., Mendoza-Martínez, G. D., Lara-Bueno, A., Carrillo-Díaz, M. I., Tirado-Estrada, G., Miranda-Romero, L. A., **2021**. Potential effects of delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-sambubioside of *Hibiscus sabdariffa* L. in ruminant meat and milk production and quality. *Animals* 11(10), 2827.
- Lim, E. J., Kang, H. J., Jung, H. J., Kim, K., Lim, C. J., Park, E. H., **2008**. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of 4-hydroxybenzaldehyde. *Biomol. Ther.* 16(3), 231-236.
- Liu, J., **1995**. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57-68.
- Liu, F., Wan, S. Y., Jiang, Z., Li, S. F. Y., Ong, E. S., Osorio, J. C. C., **2009**. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 80(2), 916-923.
- Liu, Y., Zeng, W., Ma, C., Wang, Z., Wang, C., Li, S., Wei, H., Zhang, Q., Xu, J., Zhou, C., **2020**. Maackiain dampens osteoclastogenesis via attenuating RANKL-stimulated NF-κB signalling pathway and NFATc1 activity. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 12308-12317.
- Loi, M. C., Poli, F., Sacchetti, G., Selenu, M. B., Ballero, M., **2004**. Ethnopharmacology of ogliastra (villagrande strisaili, sardinia, Italy). *Fitoterapia* 75(3-4), 277-295.
- Loy, G., Cottiglia, F., Garau, D., Deidda, D., Pompei, R., Bonsignore, L., **2001**. Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves. *Il Farmaco* 56(5-7), 433-436.

- Lyoussi, B., Cherkaoui-Tangi, K., Morel, N., Haddad, M., Quetin-Leclercq, J., **2018**. Evaluation of cytotoxic effects and acute and chronic toxicity of aqueous extract of the seeds of *Calycotome villosa* (Poiret) Link (subsp. *intermedia*) in rodents. *Avicenna J. Phytomed.* 8(2), 122-135.
- Ma, C. M., Cai, S. Q., Cui, J. R., Wang, R. Q., Tu, P. F., Hattori, M., Daneshtalab, M., **2005** (a). The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 582–589.
- Ma, C. J., Li, G. S., Zhang, D. L., Liu, K., Fan, X., **2005** (b). One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1078(1-2), 188-192.
- Maire, R., 1987. *Flore de l'Afrique du Nord*. In Quezel, P. (Ed.), *Dicots. Leguminosae* (Vol. 16 p. 211-217). Lechevalier S.A.R.L. : Paris.
- Mani, R., Natesan, V., **2018**. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* 145, 187-196.
- Marston A., Hostettmann K., **2009**. Natural product analysis over the last decades. *Planta Med.* 75, 672–682.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ohgushi, T., Ishiwada, T., Nishida, N., Yoshikawa, M., **2005**. Inhibitors of nitric oxide production from the flowers of *Angelica furcijuga*: structures of hyuganosides IV and V. *Chem. Pharm. Bull.* 53(4), 387—392
- Mazzoni, V., Bradesi, P., Tomi, F., Casanova, J., **1997**. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using ¹³C NMR spectroscopy: application to honeys. *Magn. Reson. Chem.* 35, 81-90.
- McNulty, J., Poloczek, J., Larichev, V., Werstiuk, N. H., Griffin, C., Pandey, S., **2007**. Discovery of the apoptosis-inducing activity and high accumulation of the butenolides, menisdaurilide and aquilegiolide, in *Dicentra spectabilis*. *Planta med.* 73(15), 1543-1547.
- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R., **1966**. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38 (3), 514-515.

- Miyazawa, M., Kawata, J., **2006**. Identification of the main aroma compounds in dried seeds of *Brassica hirta*. *J. Nat. Med.* 60, 89-92.
- Mizuguchi, H., Nariai, Y., Kato, S., Nakano, T., Kanayama, T., Kashiwada, Y., Nemoto, H., Kawazoe, K., Takaishi, Y., Kitamura, Y., Takeda, N., Fukui, H., **2015**. Maackiain is a novel antiallergic compound that suppresses transcriptional upregulation of the histamine H₁ receptor and interleukin-4 genes. *Pharmacol. Res. Perspect.* 3(5), e00166.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Dicko, A., **2011**. Study on biological activities and chemical composition of extracts from *Desmodium adscendens* leaves. *J. Nat. Prod.* 4, 100-107.
- Nabavi, S. F., Braid, N., Habtemariam, S., Orhan, I. E., Daglia, M., Manayi, A., Gortzi, O., Nabavi, S. M., **2015**. Neuroprotective effects of chrysin: from chemistry to medicine. *Neurochem. Int.* 90, 224-231.
- Nagatsu, A., Sugitani, T., Mori, Y., Okuyama, H., Sakakibara, J., Mizukami, H., **2004**. Antioxidants from rape (*Brassica campestris* var. *Japonica hara*) oil cake. *Nat. Prod. Res.* 18(3), 231-239.
- Nahar, L., Russell, W. R., Middleton, M., Shoeb, M., Sarker, S. D., **2005**. Antioxidant phenylacetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium*. *Acta Pharm.* 55(2), 187-193.
- Nam, A. M., Tomi, F., Gibernau, M., Casanova, J., Bighelli, A., **2016**. Composition and chemical variability of the needle oil from *Pinus halepensis* growing in Corsica. *Chem. Biodivers.* 13, 380-386.
- Nam, A. M., Bighelli, A., Tomi, F., Casanova, J., Paoli, M., **2017**. Quantification of squalene in olive oil using ¹³C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Magnetochemistry.* 3, 34.
- National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), **1999**. ¹³C NMR spectrum of (p-hydroxyphenyl)acetonitrile : <https://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/landingpage?sdbno=18483> (dernière visite, le 23/09/2022)
- Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Shahbaz, M., Ul-Haq, I., Yasmin, I., Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Shah, Z. A., Plygun, S., Heydari, M., **2019**. Chrysin: pharmacological and therapeutic properties. *Life Sci.* 235, 116797.

- Nichols, B.W., **1965**. The lipids of a moss (*Hypnum cupressiforme*) and of the leaves of green holly (*Ilex aquifolium*). *Phytochemistry* 4, 769-772.
- Niemann, G. J., Baas, W. J., **1985** (a). The composition of the lipid globules of *Ilex aquifolium* leaves and its variability with the age of the leaf and with season. *Physiol. Plant.* 64, 371-376.
- Niemann, G. J., Baas, W. J., **1985** (b). The composition of the lipid constituents of *Ilex aquifolium* L. (Aquifoliaceae) in relation to the age of the leaf. I. The leaf wax. *J. Plant Physiol.* 118, 219-226.
- Nkengfack, A. E., Vardamides, J. C., Fomum, Z. T., Meyer, M., **1995**. Prenylated isoflavanone from *Erythrina eriotricha*. *Phytochemistry* 40(6), 1803-1808.
- Obara, Y., Matsubara, H., Munakata, K., **1976**. Isolation and identification of tubaic acid and β -tubaic acid from Derris roots. *Agr. Biol. Chem.* 40(6), 1245-1246.
- Otsuka, H., Ito, A., Fujioka, N., Kawamata, K. I., Kasai, R., Yamasaki, K., Satoh, T., **1993**. Butenolides from *Sinomenium acutum*. *Phytochemistry* 33(2), 389-392.
- Ottavioli, J., Paoli, M., Casanova, J., Tomi, F., Bighelli, A., **2019**. Identification and quantitative determination of resin acids from Corsican *Pinus pinaster* Aiton oleoresin using ^{13}C -NMR spectroscopy. *Chem. Biodivers.* 16, e1800482.
- Palu, D., Bighelli, A., Casanova, J., Paoli, M., **2019**. Identification and quantitation of ursolic and oleanolic acids in *Ilex aquifolium* L. leaf extracts using ^{13}C and ^1H -NMR spectroscopy. *Molecules* 24(23), 4413.
- Paoli, M., **2011**. Analyse par RMN ^1H et ^{13}C d'huiles essentielles et d'extraits (*Cedrus atlantica* G. Manetti et *Taxus baccata* Linné) : thèse de doctorat en chimie organique et analytique, Université de Corse.
- Paoli, M., Bighelli, A., Castola, V., Tomi, F., Casanova, J., **2013**. Quantification of taxanes in a leaf and twig extract from *Taxus baccata* L. using ^{13}C NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 51, 756-761.

- Paoli, M., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Luro, F., Bighelli, A., **2016**. Chemical composition of the leaf essential oil of grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) in relation with the genetic origin. *J. Essent. Oil Res.* 28(4), 265-271.
- Park, H. H., Hakamatsuka, T., Sankawa, U., Ebizuka, Y., **1995**. Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 38(2), 373-380.
- Park, S., Nam, Y. H., Rodriguez, I., Park, J. H., Kwak, H. J., Oh, Y., Oh, M., Park, M. S., Lee, K. W., Lee, J. S., Kim, D. H., Park, Y. H., Moon, I. S., Choung, S. Y., Jeong, K. W., Hong, B. N., Kang, T. H., Kim, S. H., **2020**. Chemical constituents of leaves of *Persea americana* (avocado) and their protective effects against neomycin-induced hair cell damage. *Rev. Bras. Farmacogn.* 29, 739-743.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., Ou, S., **2016**. *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2952-2962.
- Pistelli, L., Fiumi, C., Morelli, I., Giachi, I., **2003**. Flavonoids from *Calicotome villosa*. *Fitoterapia* 74(4), 417-419.
- Quach, N. T., Nguyen, Q. H., Vu, T. H. N., Le, T. T. H., Ta, T. T. T., Nguyen, T. D., Doan, T. V., Nguyen, T. V., Dang, T. T., Nguyen, X. C., Chu, H. H., Phi, Q. T., **2021**. Plant-derived bioactive compounds produced by *Streptomyces variabilis* LCP18 associated with *Litsea cubeba* (Lour.) Pers as potential target to combat human pathogenic bacteria and human cancer cell lines. *Braz. J. Microbiol.* 52, 1215-1224.
- Quang, T. H., Vien, L. T., Anh, L. N., Ngan, N. T. T., Hanh, T. T. H., Cuong, N. X., Nam, N. H., Van Minh, C., **2021**. Anti-inflammatory metabolites from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. IMBC-FP2. 05. *Vietnam J. Chem.* 59(1), 52-56.
- Rabehaja, D. J., Bezert, G., Rakotonandrasana, S. R., Ramanoelina, P. A., Andrianjara, C., Bighelli, A., Tomi, F., Paoli, M., **2020**. Chemical composition of aerial parts essential oils from six endemic Malagasy *Helichrysum* species. *Plants* 9(2), 265.
- Rajput, M. S., Sarkar, P. D., Nirmal, N. P., **2017**. Inhibition of DPP-4 activity and neuronal atrophy with genistein attenuates neurological deficits induced by transient global

cerebral ischemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic mice. *Inflammation* 40, 623-635.

Ramalingam, M., Kim, H., Lee, Y., Lee, Y. I., **2018**. Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and isoliquiritigenin from radix glycyrrhizae in human health and disease models. *Front. Aging Neurosci.* 10, 348.

Ramos, M. P. P., Ferreira, M. J., Lopes, L., Emerenciano, V. P., **2005**. Computer-aided identification of chemical constituents isolated from *Cybistax antisiphilitica*. *Internet Electron. J. Mol. Des.* 4 (2), 173–180.

Rashed, K., **2020**. Beta-sitosterol medicinal properties: a review article. *IJSIT* 9 (4), 208-212.

Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V., Casanova, J., **2002**. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ^{13}C NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl. Spectrosc.* 56, 312-317.

Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V., Casanova, J., **2005**. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica. *Ind. Crops Prod.* 21, 65-69.

Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H., **2002**. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *J. Ethnopharmacol.* 83(3), 251-265.

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., Martins, N., **2019**. The therapeutic potential of apigenin. *Int. J. Mol. Sci.* 20(6), 1305.

Salum, M. L., Robles, C. J., Erra-Balsells, R., **2010**. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: one-pot synthesis–isolation of Z-cinnamic acids. *Org. Lett.* 12(21), 4808–4811.

Salvador, J. A. R., Moreira, V. M., Gonçalves, B. M. F., Leal, A. S., Jing, Y., **2012**. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1463-1479.

- Sánchez-Hidalgo, M., León-González, A. J., Gálvez-Peralta, M., González-Mauraza, N. H., Martín-Cordero, C., **2021**. D-Pinitol: A cyclitol with versatile biological and pharmacological activities. *Phytochem. Rev.* 20, 211-224.
- Sato, M., Tanaka, H., Yamaguchi, R., Kato, K., Etoh, H., **2004**. Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24(3), 43-48.
- Schefer, A. B., Braumann, U., Tseng, L. H., Spraul, M., Soares, M. G., Fernandes, J. B., da Silva, M. F. G. F., Vieira, P. C., Ferreira, A. G., **2006**. Application of high-performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling to the identification of limonoids from mahogany tree (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) by stopped-flow 1D and 2D NMR spectroscopy. *J. Chromatogr. A* 1128(1-2), 152-163.
- Schindler, H., Herb, M., **1955**. Chemistry of *Ilex aquifolium* L. I. Isolation of ursolic acid and rutin from leaves. *Arch. Pharm.* 288 (8-9), 372-377.
- Septianti, E., Salengke, Langkong, J., **2020**. Profile of bioactive compounds, antioxidant and aromatic component from several clones of cocoa beans during fermentation. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 575, 012009.
- Servais, P., Seba, P., **2018**. Tilo Botanica : Flore de Tilos et du Dodécanèse. *Calicotome villosa* (Poir.) Link, Fam.: Fabaceae : <https://www.tilo-botanica.eu/espece-c-d/calicotome-villosa.html> (dernière visite, le 30/06/2022).
- Sharma, N., Tiwari, N., Vyas, M., Khurana, N., Muthuraman, A., Utreja, P., **2020**. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. *Plant Arch.* 20(Suppl. 2), 3053-3059.
- Shen, Y. C., Prakash, C. V. S., Wang, L. T., Chien, C. T., Hung, M. C., **2003**. New triterpenoid fatty acid esters from the small twigs of *Viburnum odoratissimum*. *J. Chin. Chem. Soc.* 50 (2), 297-302.
- Silva, M. G. V., Vieira, Í.G. P., Mendes, F. N. P., Albuquerque, I. L., dos Santos, R. N., Silva, F. O., Morais, S. M., **2008**. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from Northeastern Brazil. *Molecules* 13, 2482-2487.

- Simons, R., Vincken, J.P., Bohin, M.C., Kuijpers, T.F.M., Verbruggen, M.A., Gruppen, H., **2011**. Identification of prenylated pterocarpanes and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 55–65.
- Singh, D. K., Sahu, A., Handa, T., Narayanam, M., Singh, S., **2015**. Study of the forced degradation behavior of prasugrel hydrochloride by liquid chromatography with mass spectrometry and liquid chromatography with NMR detection and prediction of the toxicity of the characterized degradation products. *J. Sep. Sci.* 38, 2995–3005.
- Sivakumar, B., Murugan, R., Baskaran, A., Khadangale, B. P., Murugan, S., Senthilkumar, U. P., **2013**. Identification and characterization of process-related impurities of trans-veratrol. *Sci. Pharm.* 81(3), 683-695.
- Sultana, N., **2011**. Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26(5), 616–642.
- Sun, M. Y., Ye, Y., Xiao, L., Rahman, K., Xia, W., Zhang, H., **2016**. Daidzein: A review of pharmacological effects. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 13(3), 117-132.
- Sutour, S., Tao, X. U., Casabianca, H., Paoli, M., de Rocca-Serra, D., Tomi, F., Garrido, M., Pasqualini, V., Aiello, A., Castola, V., Bighelli, A., **2015**. Chemical composition of extracts from *Chaetomorpha linum* (Miller) Kütz. A potential use in the cosmetic industry. *Int. J. Phytocos. Nat. Ingred.* 2(1), 5.
- Świsłocka, R., **2013**. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ^1H and ^{13}C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 100, 21-30.
- Tao, W., Zhou, Z., Zhao, B., Wei, T., **2016**. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC–MS–MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131, 140–145.
- Thai, T. H., Hien, N. T., Cuong, N. T., Casanova, J., Tomi, F., Paoli, M., **2022** (a). Chemical composition of essential oils isolated from leaves, twigs, roots and cones of Vietnamese *Keteleeria evelyniana* Mast. *J. Essent. Oil Res.* 34(2), 148-154.

- Thai, T. H., Hien, N. T., Hung, N. Q., Casanova, J., Paoli, M., Tomi, F., **2022** (b). Integrated analysis of Vietnamese *Illigera trifoliata* ssp. *cucullata* (Merr.) Kubitzki, leaf and stem essential oils by GC-FID/GC-MS and ^{13}C NMR. *Rec. Nat. Prod.* 16(6), 657-662.
- Thomas, H., Budzikiewicz, H., **1980**. Inhaltsstoffe der fröchte von *Ilex aquifolium* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 271-276.
- Tohma, H., Gülçin, İ., Bursal, E., Gören, A. C., Alwasel, S. H., Köksal, E., **2017**. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *J. Food Meas. Charact.* 11(2), 556-566.
- Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J., **1995**. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* 1, 25-34.
- Tomi, F., Casanova, J., **2006**. ^{13}C -NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. *Acta Hort.* 723, 185-192.
- Usmanova, G. A., Botirov, E. Kh., **2013**. Glucoside of taxifolin and (+)-pinitol from *Pinus sylvestris*. *Chem. Nat. Compd.* 49(2), 345-346.
- Van Genderen, H. H., Jaarsma, J., **1990**. Triterpenes and alkanes in developing variegated and albino leaves of *Ilex aquifolium* L. (Aquifoliaceae). *Plant Sci.* 72, 165-172.
- Velika, B., Kron, I., **2012**. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radic. Antioxid.* 2(4), 62-67.
- Villasenor, I. M., Lim-Sylianco, C. Y., Dayrit, F., **1989**. Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 224(2), 209-212.
- Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., Tanokura, M., **2010**. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 48, 857-865.
- Willems, M., **1988**. A cyanogenic glucoside from *Ilex aquifolium*. *Phytochemistry* 27(6), 1852-1853.

Wilson, I. D., Morgan, E. D., Lafont, R., Shockcor, J. P., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Wright, B., **1999**. High performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry applied to plant products: Identification of ecdysteroids from *Silene otites*. *Chromatographia* 49(7), 374-378.

Yamaguchi, H., Noshita, T., Kidachi, Y., Umetsu, H., Hayashi, M., Komiyama, K., Funayama, S., Ryoyama, K., **2008**. Isolation of ursolic acid from apple peels and its specific efficacy as a potent antitumor agent. *J. Health Sci.* 54(6), 654-660.

Yang, Z., **2006**. Online hyphenated liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40(3), 516-527.

Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K. I., Ohsawa, K., **1994**. Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 17(10), 1369-1374.

Yasuda, T., Mizunuma, S., Kano, Y., Saito, K. I., Ohsawa, K., **1996**. Urinary and biliary metabolites of genistein in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19(3), 413-417.

Yi, X. X., Deng, J. G., Gao, C. H., Hou, X. T., Li, F., Wang, Z. P., Hao, E. W., Xie, Y., Du, Z. C., Huang, H. X., Huang, R. M., **2015**. Four new cyclohexylideneacetonitrile derivatives from the hypocotyl of mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*). *Molecules* 20(8), 14565-14575.

Yoon, J. S., Sung, S. H., Park, J. H., Kim, Y. C., **2004**. Flavonoids from *Spatholobus suberectus*. *Arch. Pharm. Res.* 27(6), 589-592.

Zafaryab, M., Fakhri, K. U., Khan, M. A., Hajela, K., Rizvi, M. M. A., **2019**. In vitro assessment of cytotoxic and apoptotic potential of palmitic acid for breast cancer treatment. *Int. J. Life Sci. Res.* 7(1), 166-174.

Zhang, Y., Jayaprakasam, B., Seeram, N. P., Olson, L. K., DeWitt, D., Nair, M. G., **2004**. Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by Cabernet Sauvignon grape skin compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 228-233.

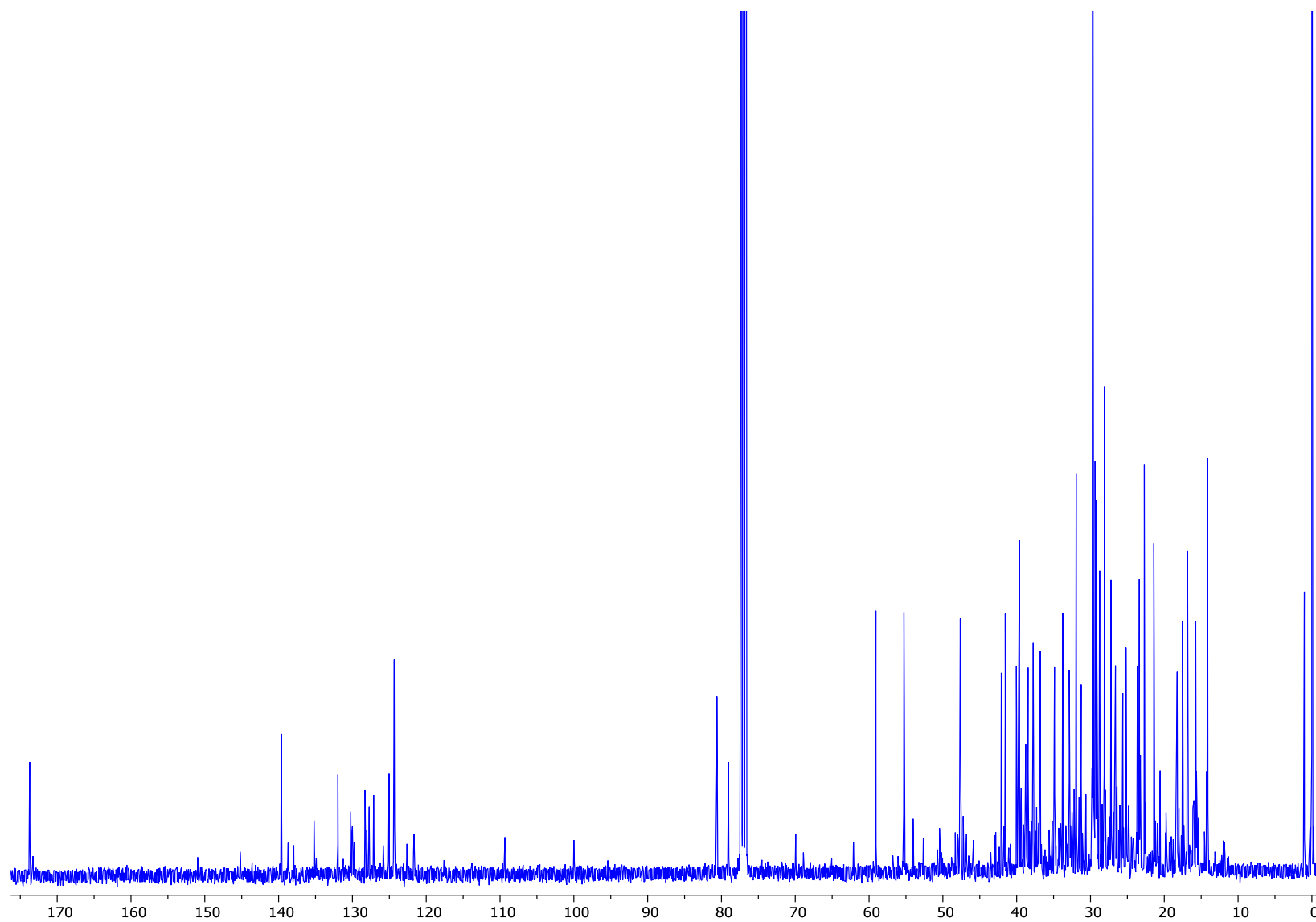
Zhao, M., Chen, J. Y., Xu, L. J., Goedecke, T., Zhang, X. Q., Duan, J. A., Che, C. T., **2012**. Cis-aconitic anhydride ethyl ester and phenolic compounds from the seeds of *Alisma orientale*. *Nat. Prod. Commun.* 7(6), 785-787.

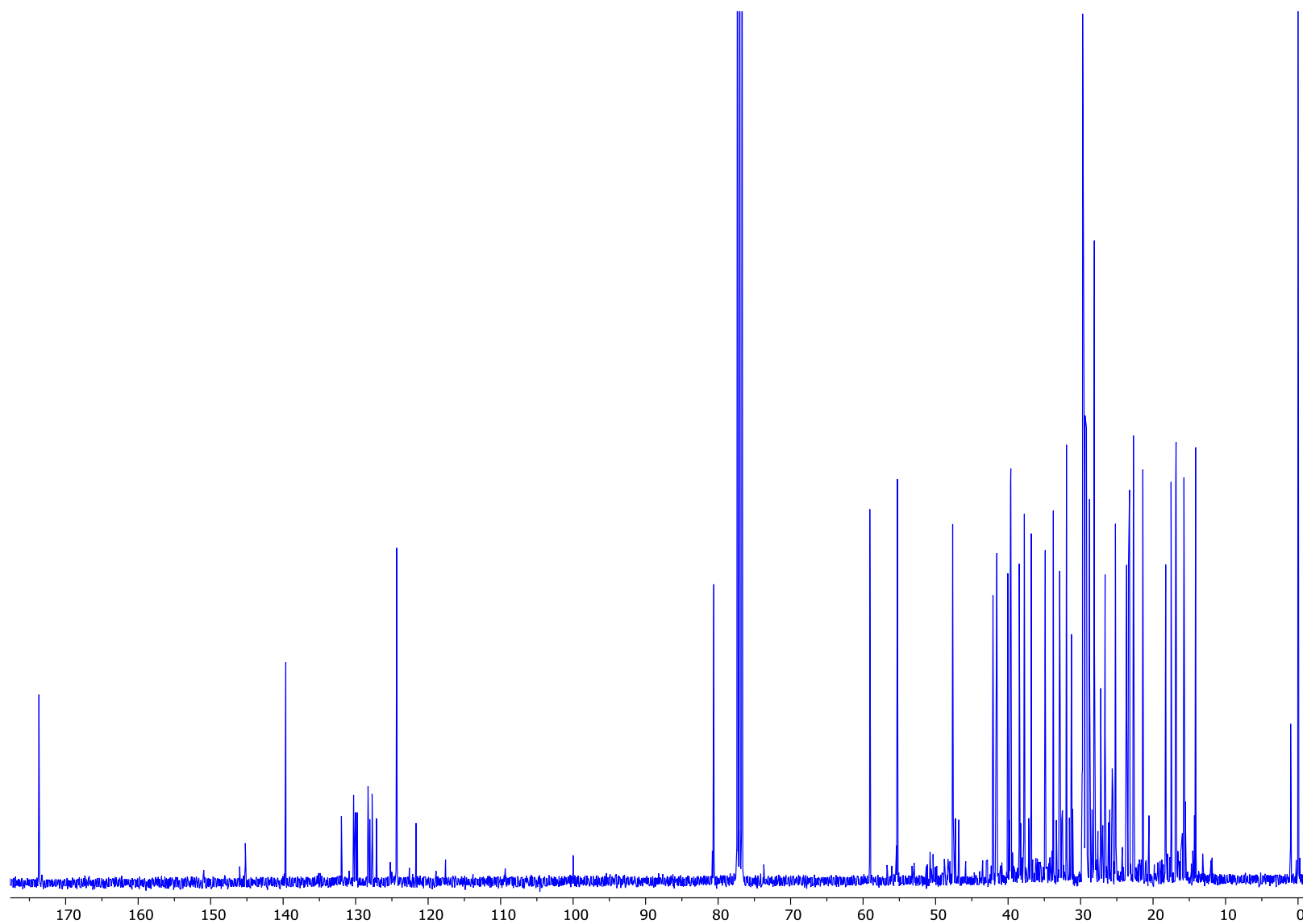
Zhou, C., Chen, K., Sun, C., Chen, Q., Zhang, W., Li, X., **2007**. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 21, 755–761.

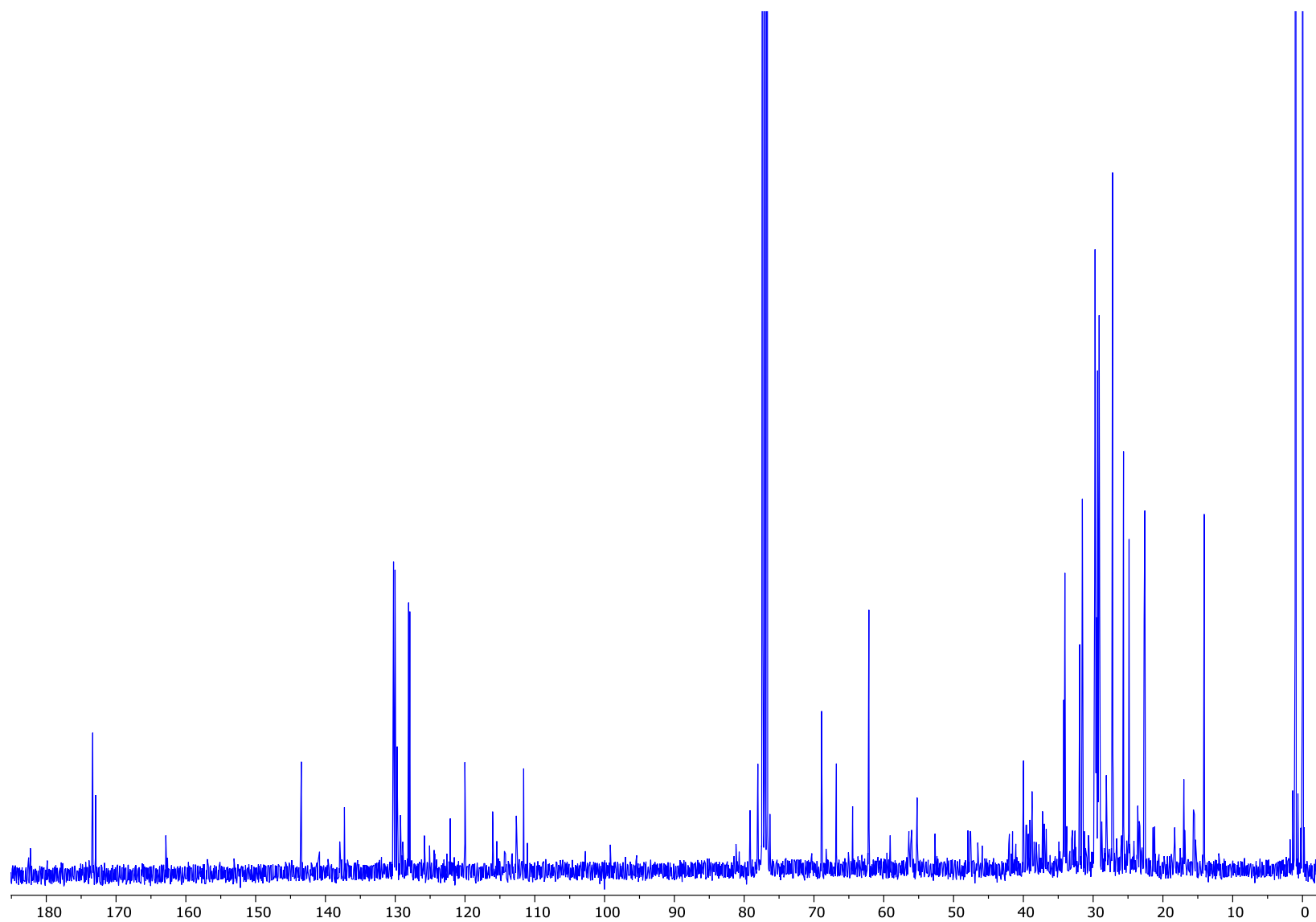
Zhou, X., Wang, F., Zhou, R., Song, X., Xie, M., **2017**. Apigenin: a current review on its beneficial biological activities. *J. Food Biochem.* 41, e12376.

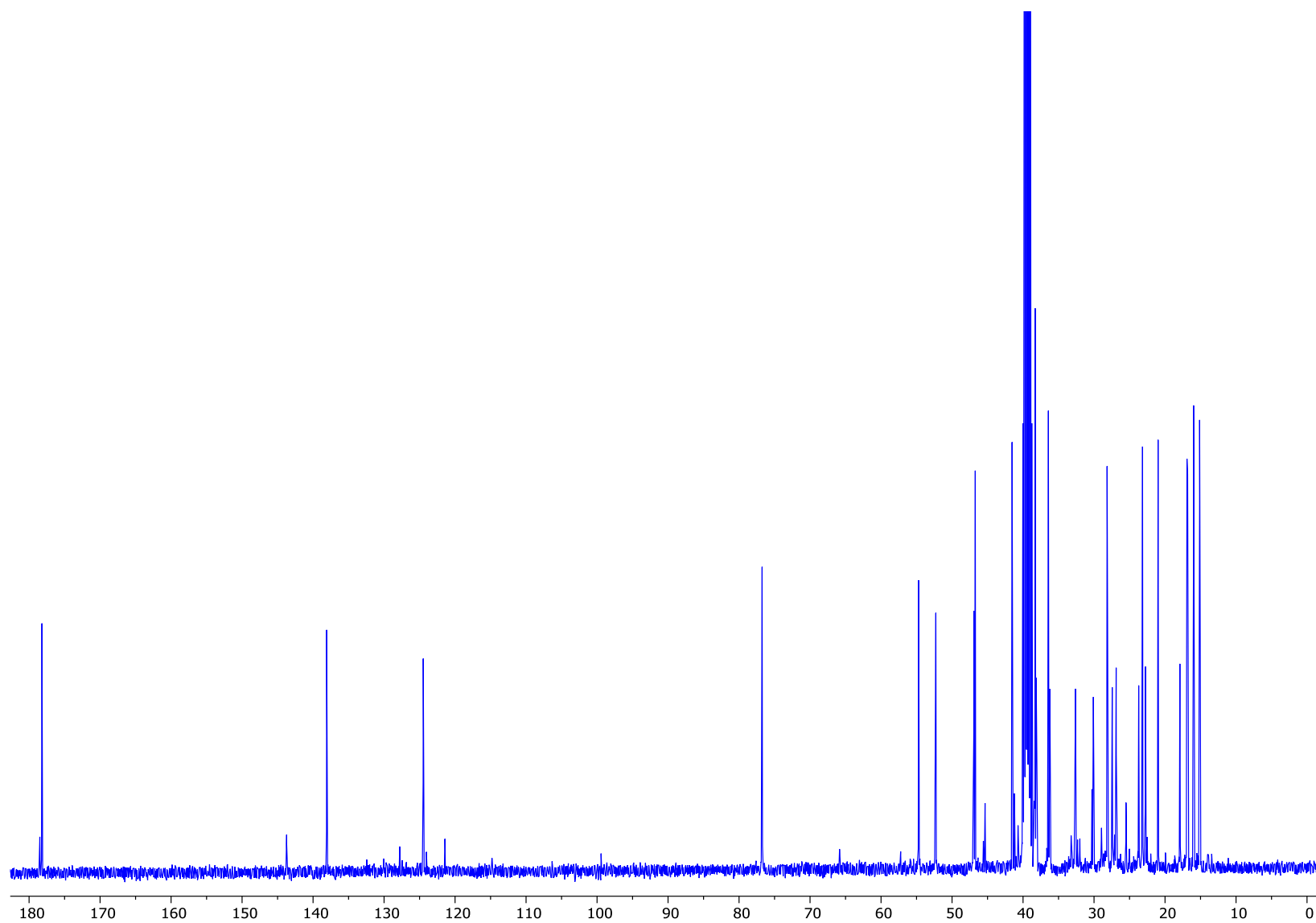
Zhou, Y., Wang, S., Lou, H., Fan, P., **2018**. Chemical constituents of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity. *Phytochem. Lett.* 23, 57-61.

ANNEXES

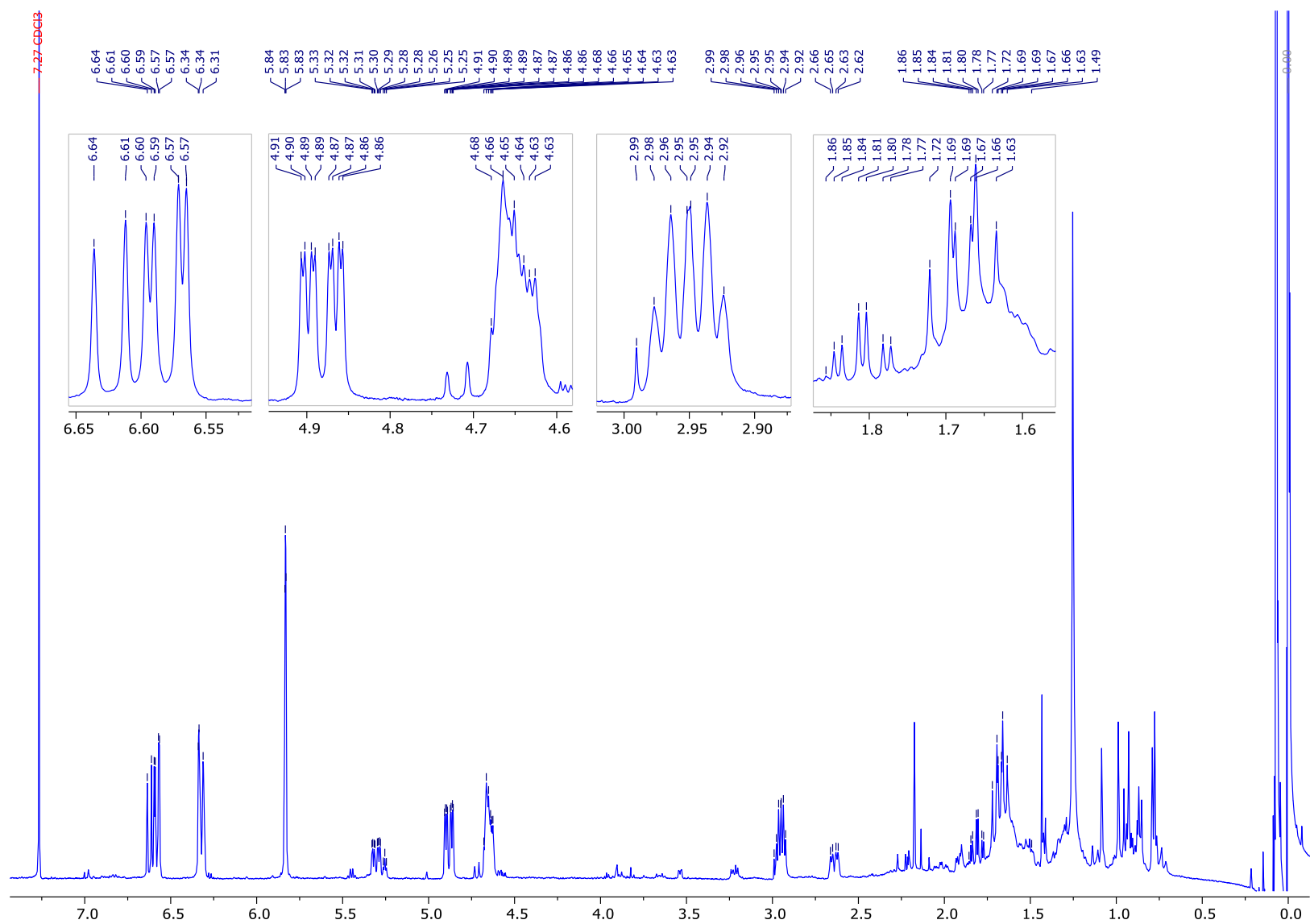
Annexe 1. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait à l'hexane de feuilles d'*I. aquifolium* dans le CDCl_3 

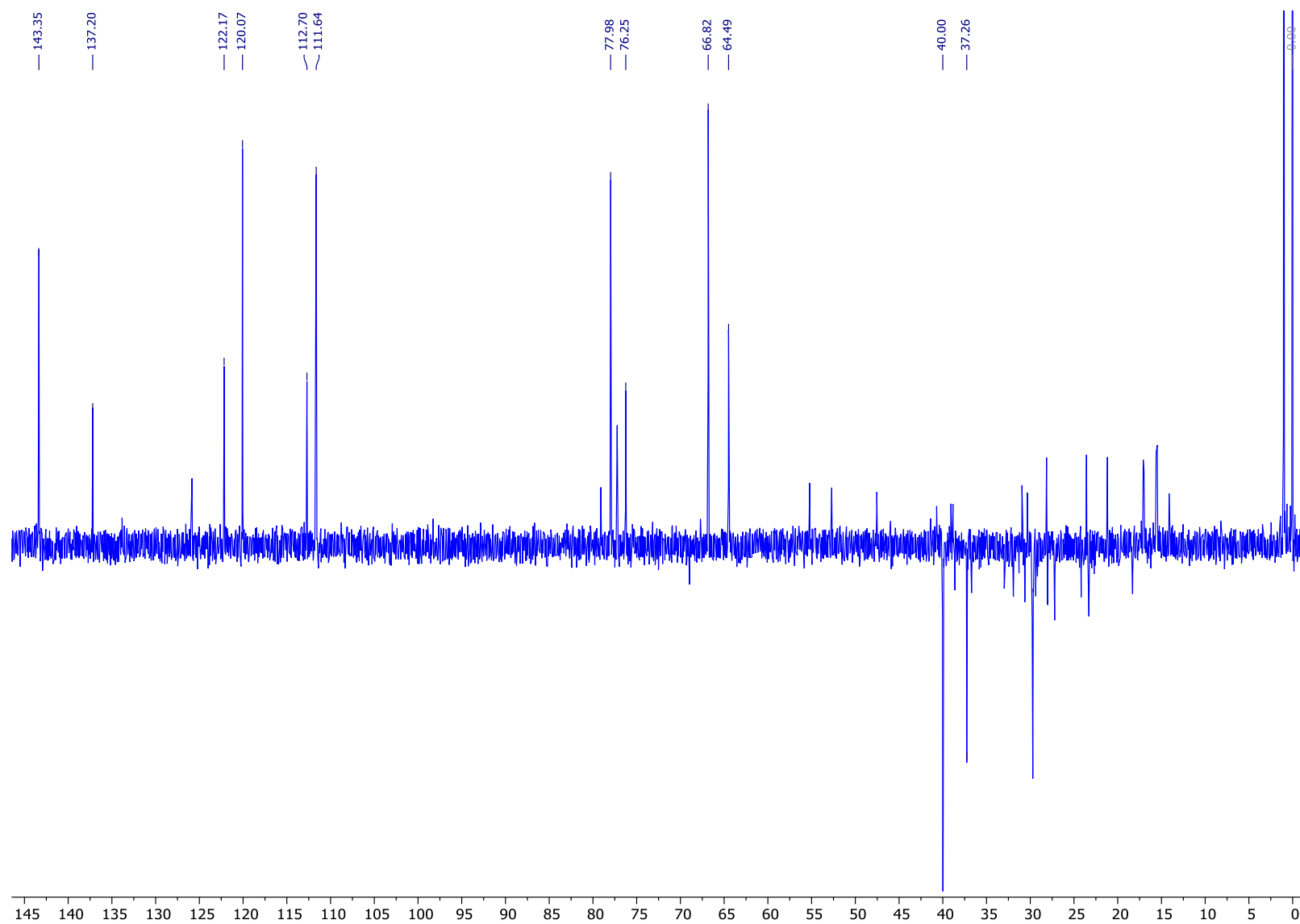
Annexe 2. Spectre RMN ^{13}C de la fraction H_2 

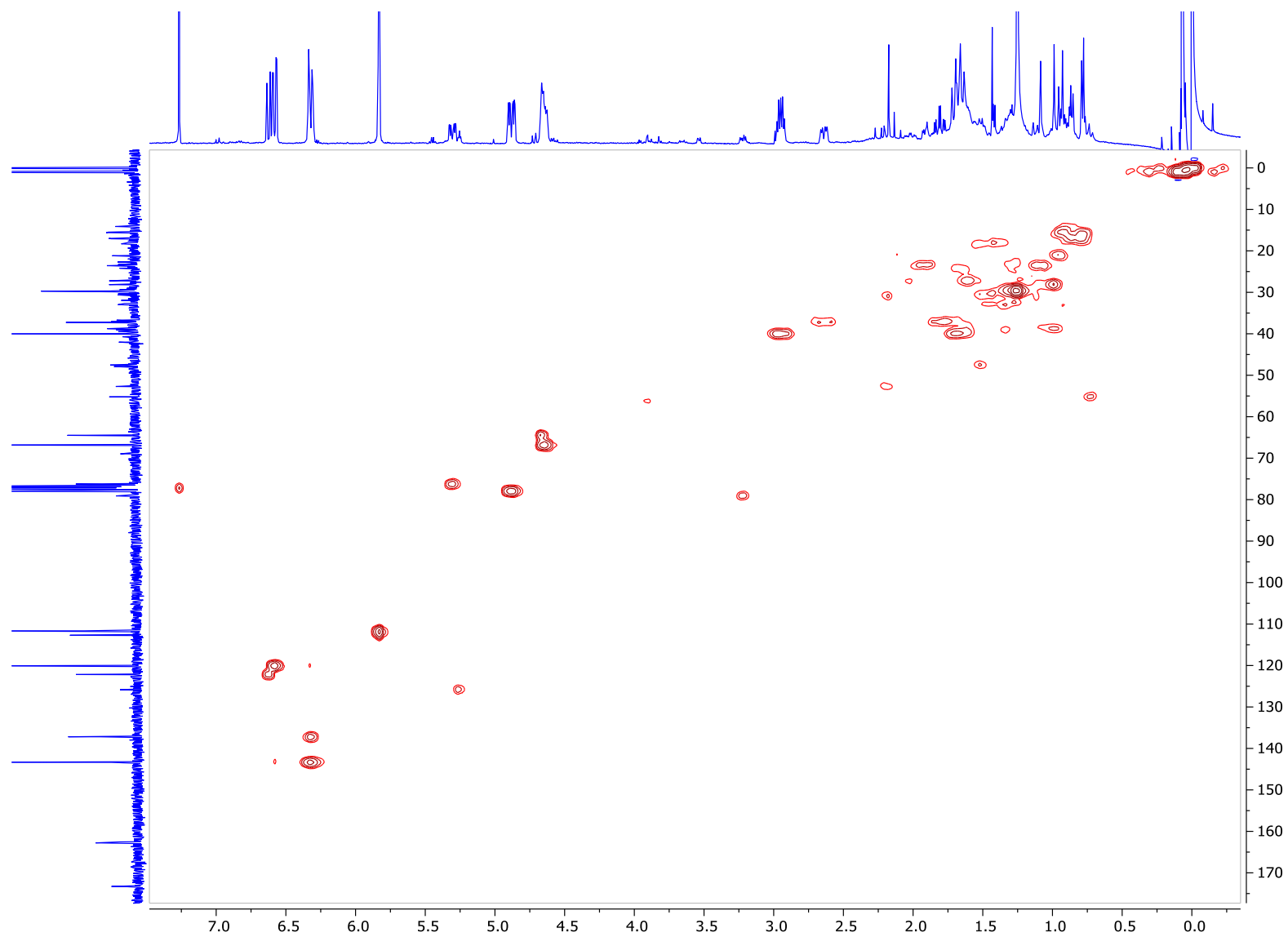
Annexe 3. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium* dans le CDCl_3 

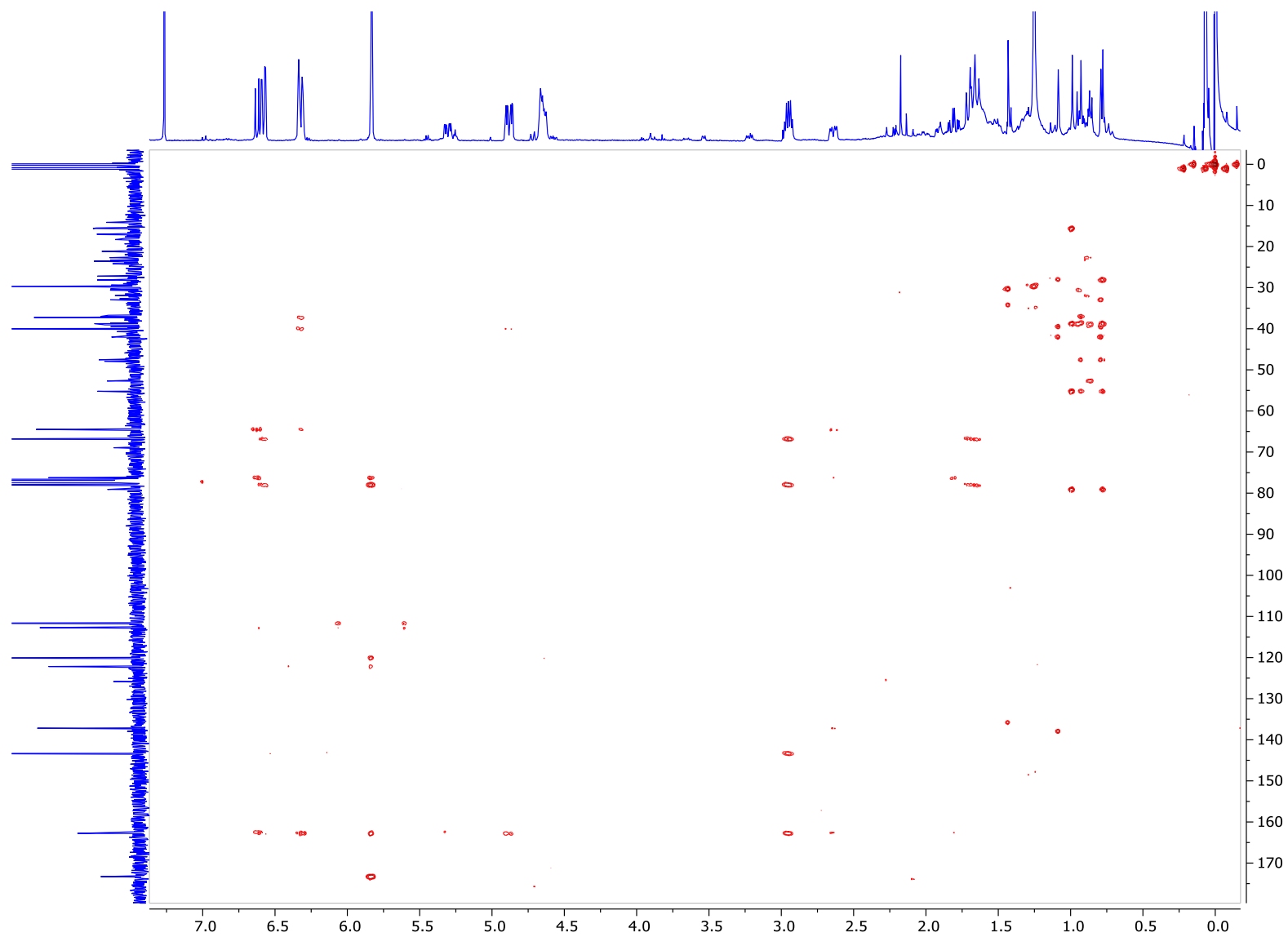
Annexe 4. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait au dichlorométhane de feuilles d'*I. aquifolium* dans le DMSO- d_6 

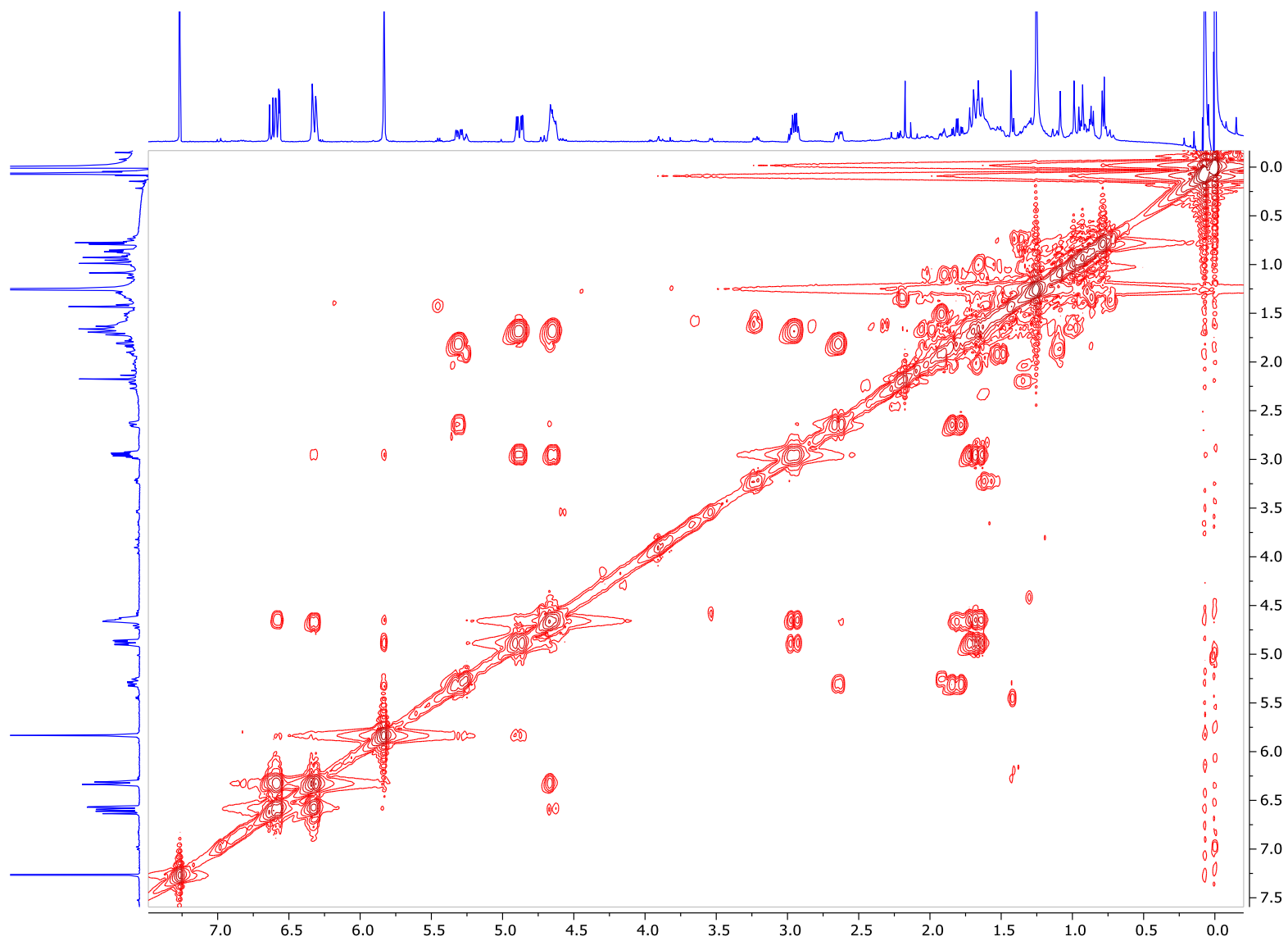
Annexe 5. Spectre RMN ^1H de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

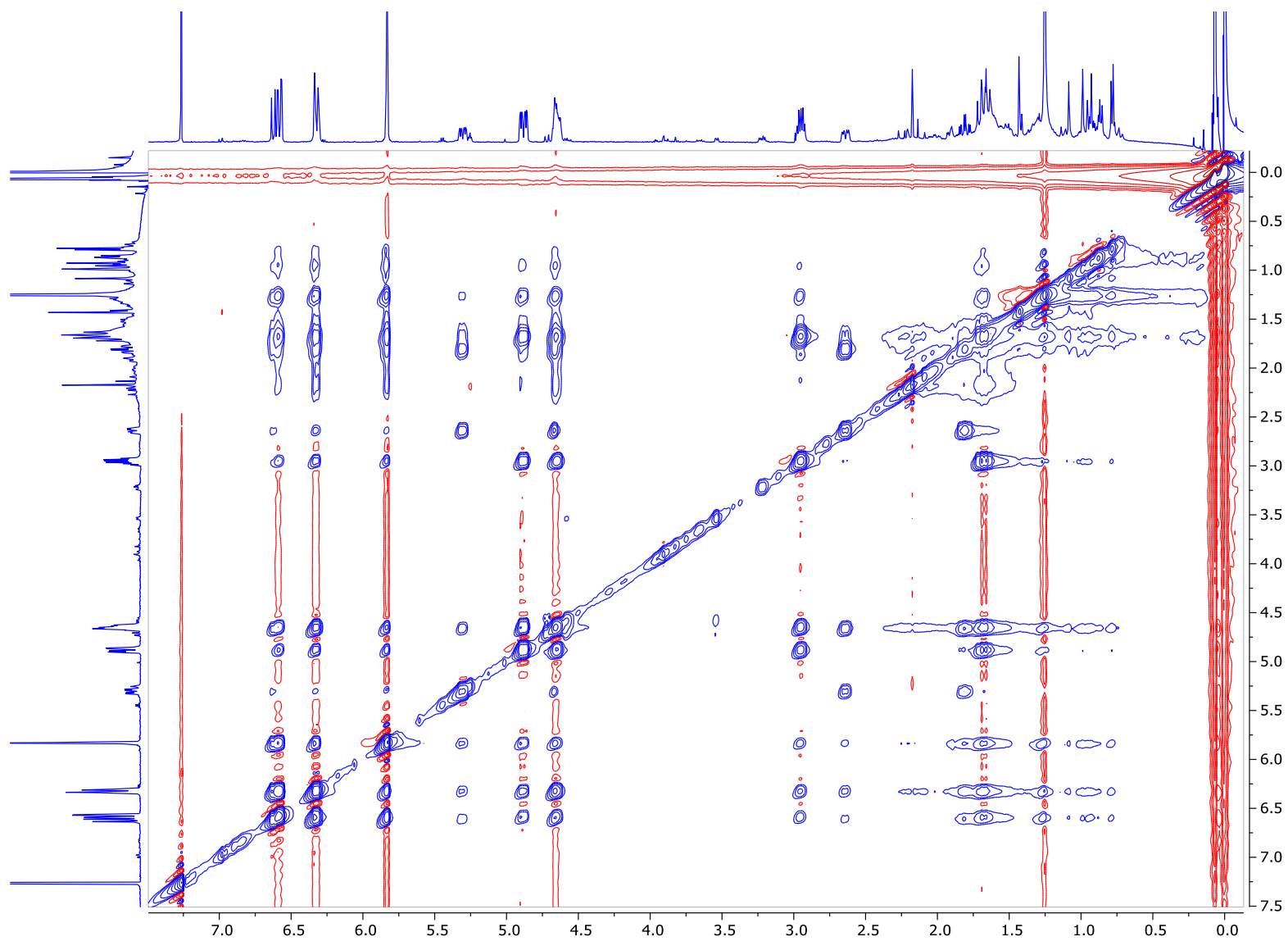


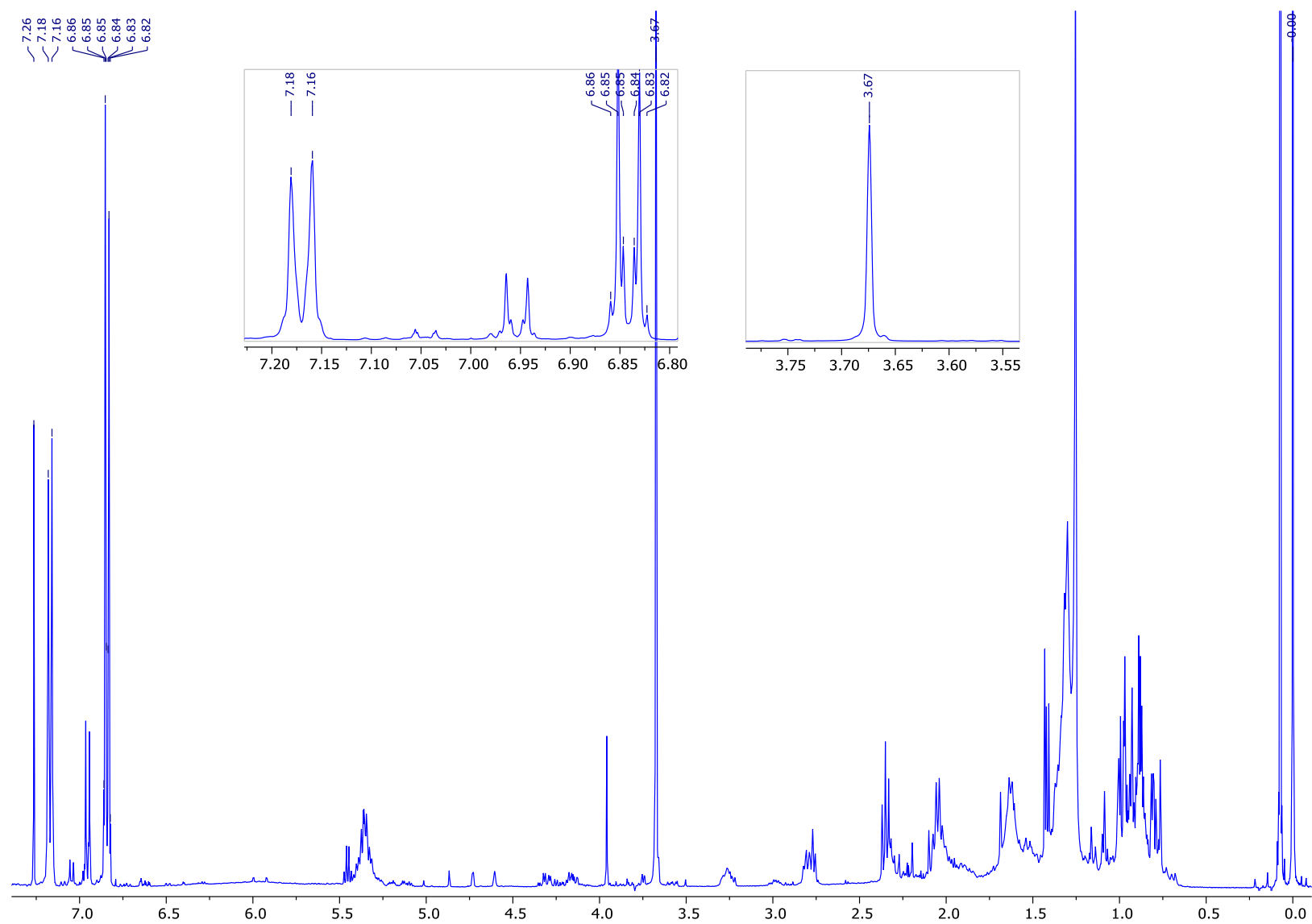
Annexe 6. Spectre DEPT 135 de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

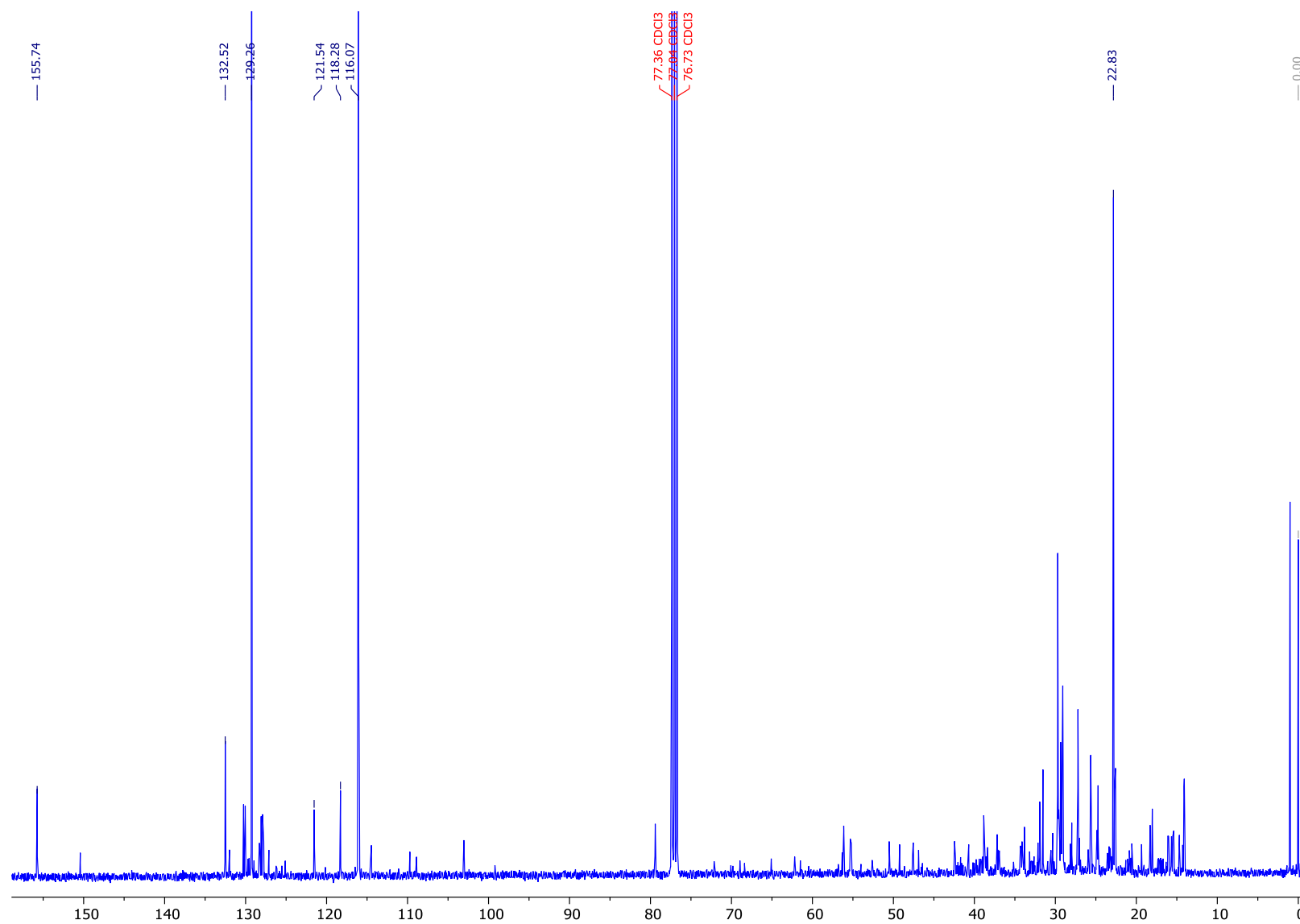
Annexe 7. Spectre HSQC de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

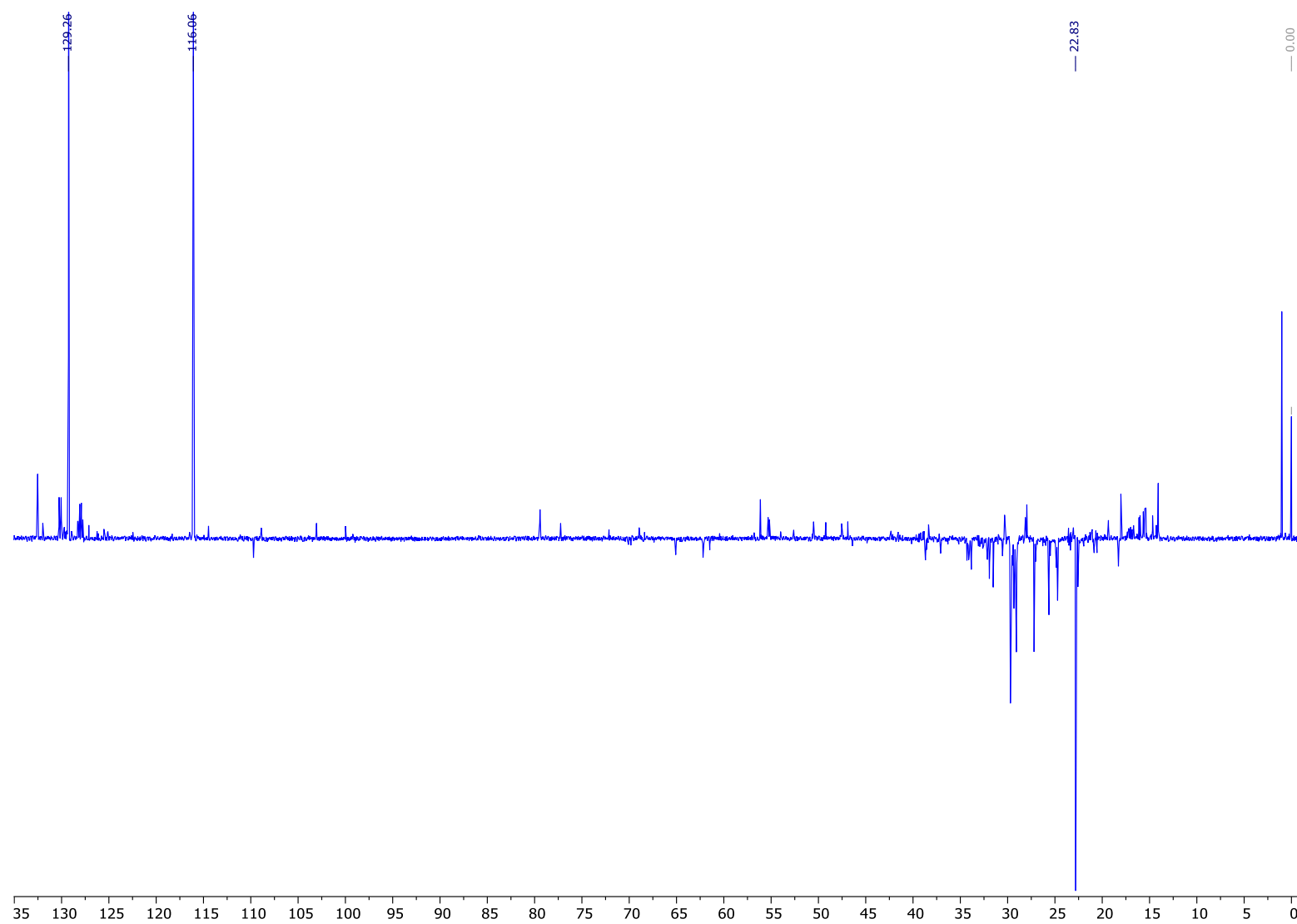
Annexe 8. Spectre HMBC de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

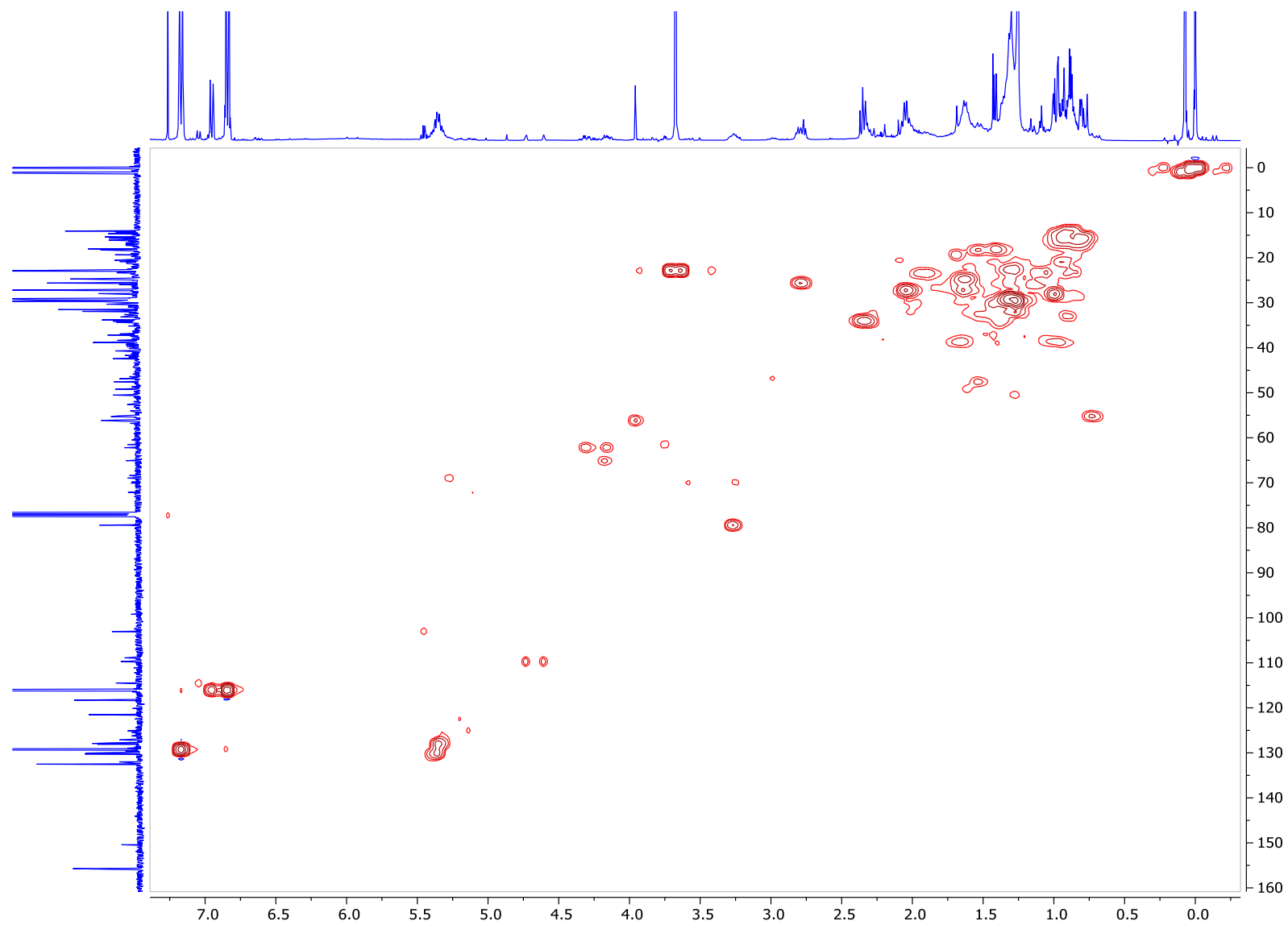
Annexe 9. Spectre COSY de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

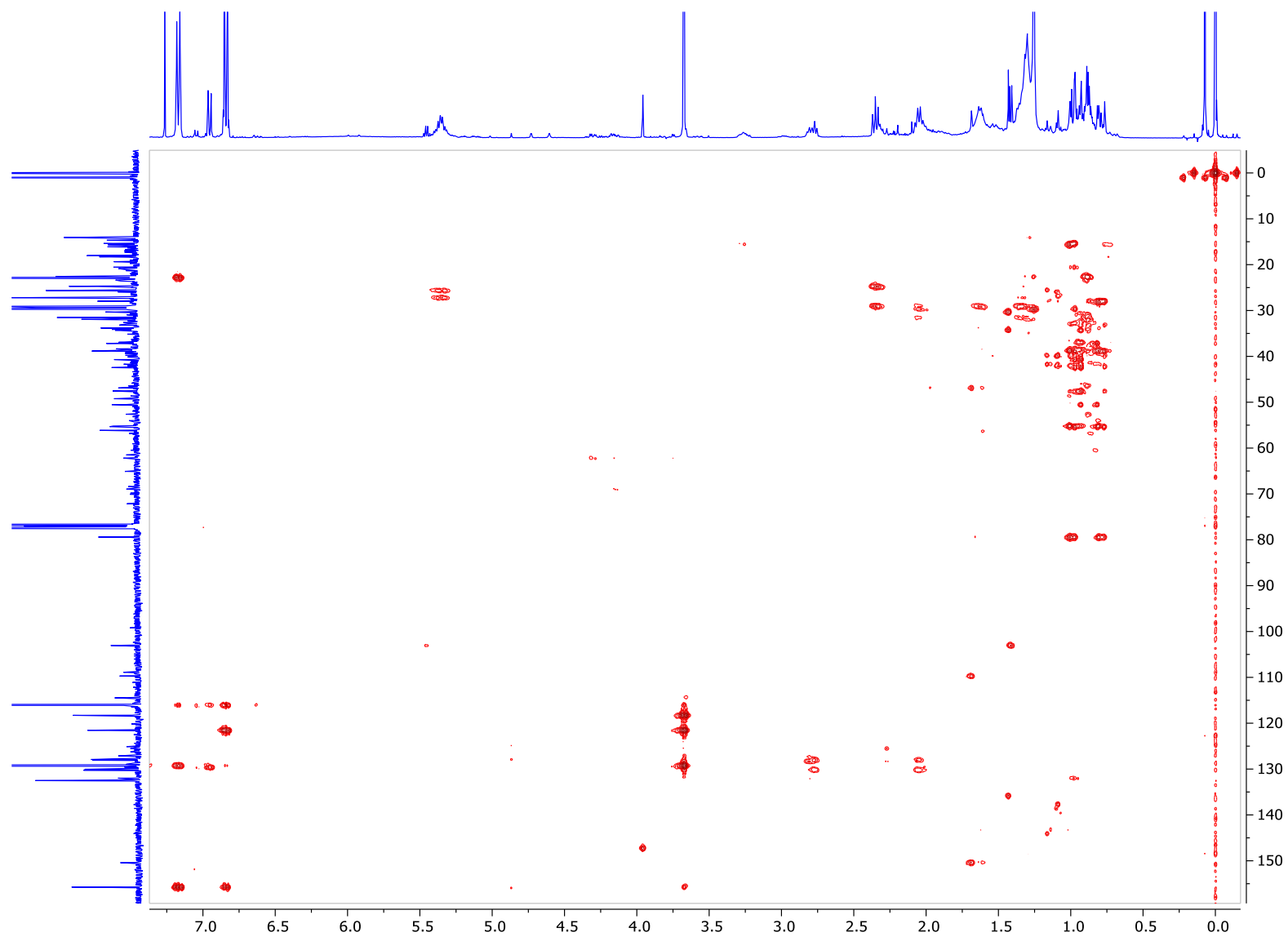
Annexe 10. Spectre NOESY de la fraction obtenue au dichlorométhane (baies de houx)

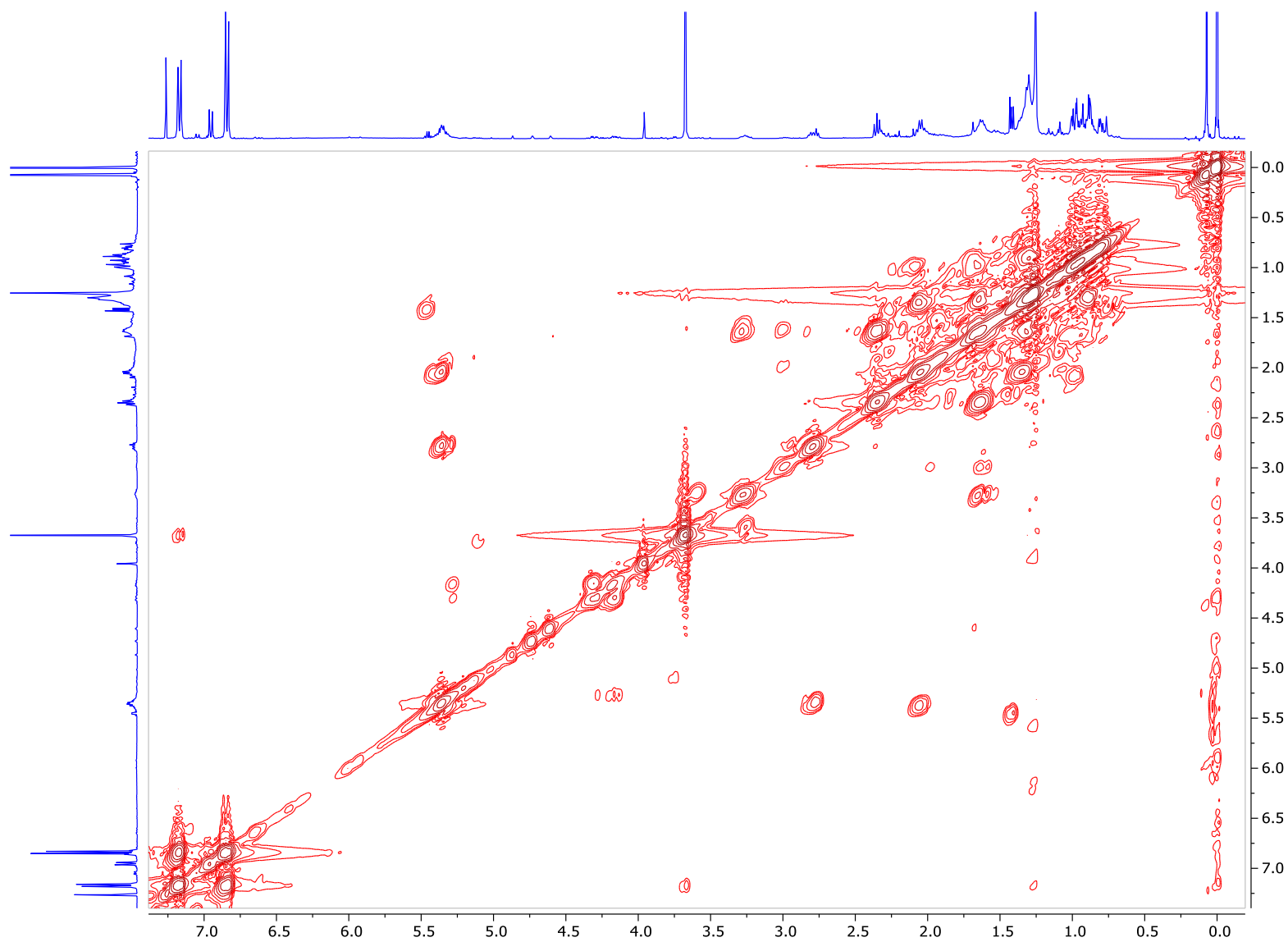
Annexe 11. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction E₆

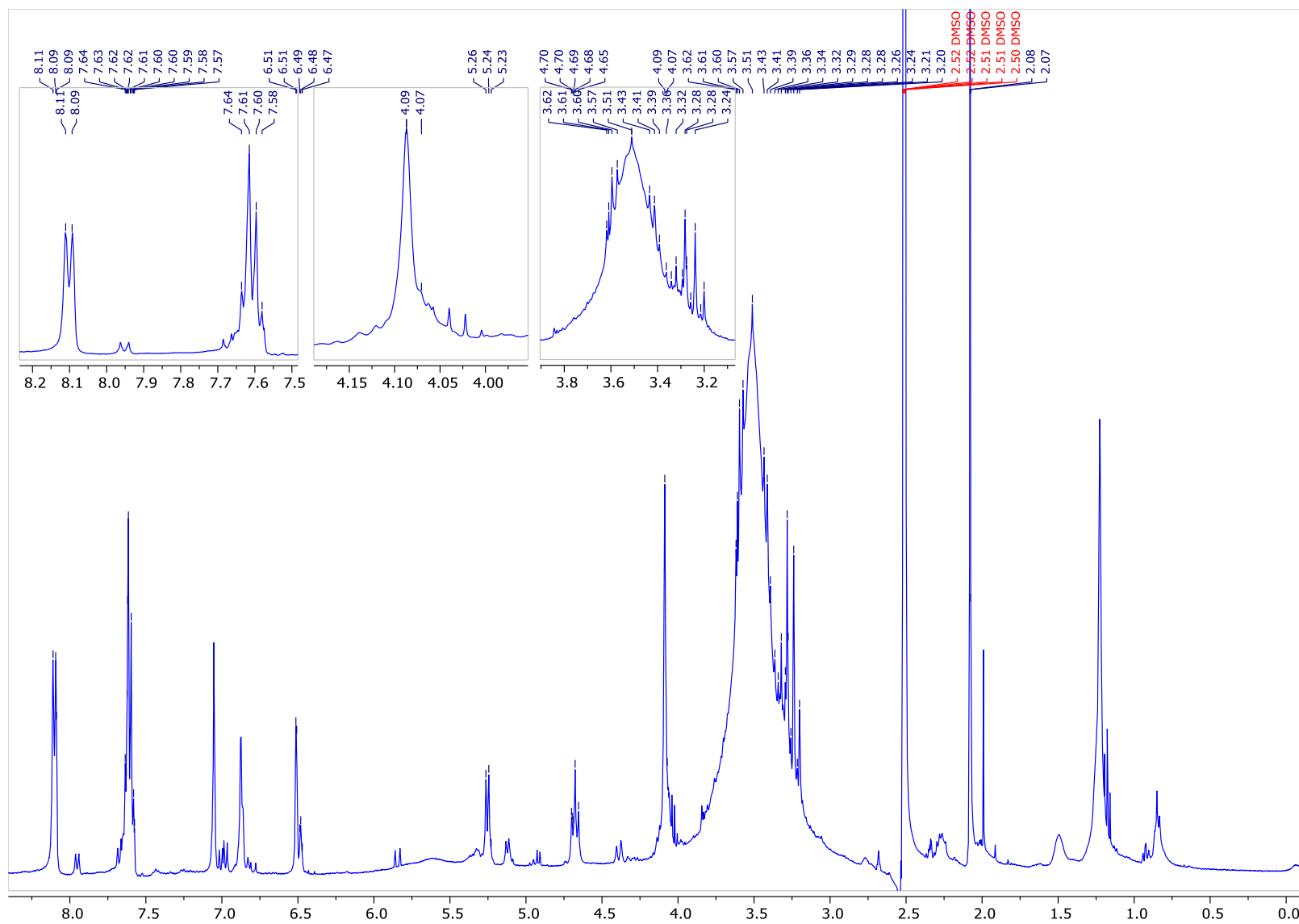
Annexe 12. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction E₆

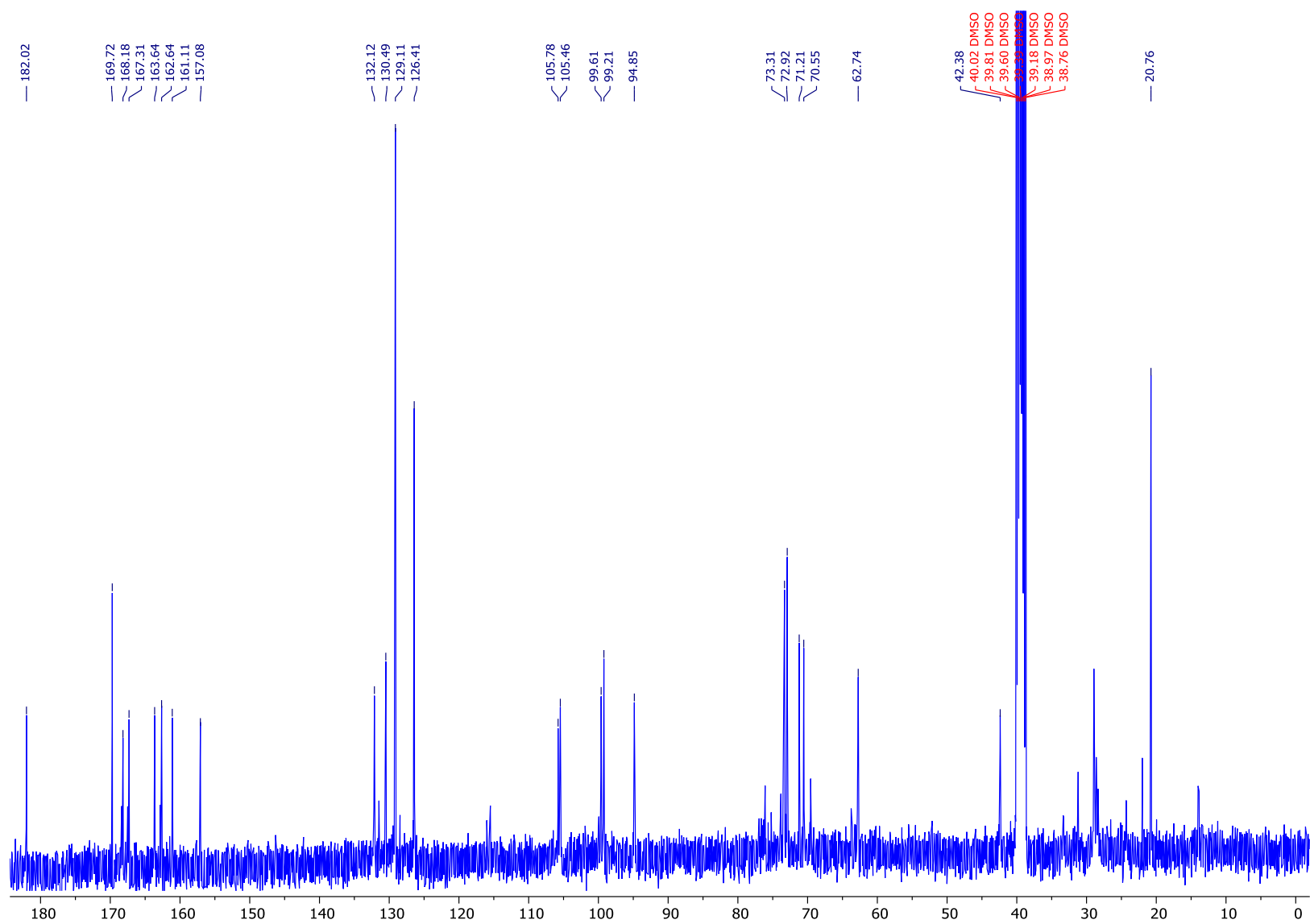
Annexe 13. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction E₆

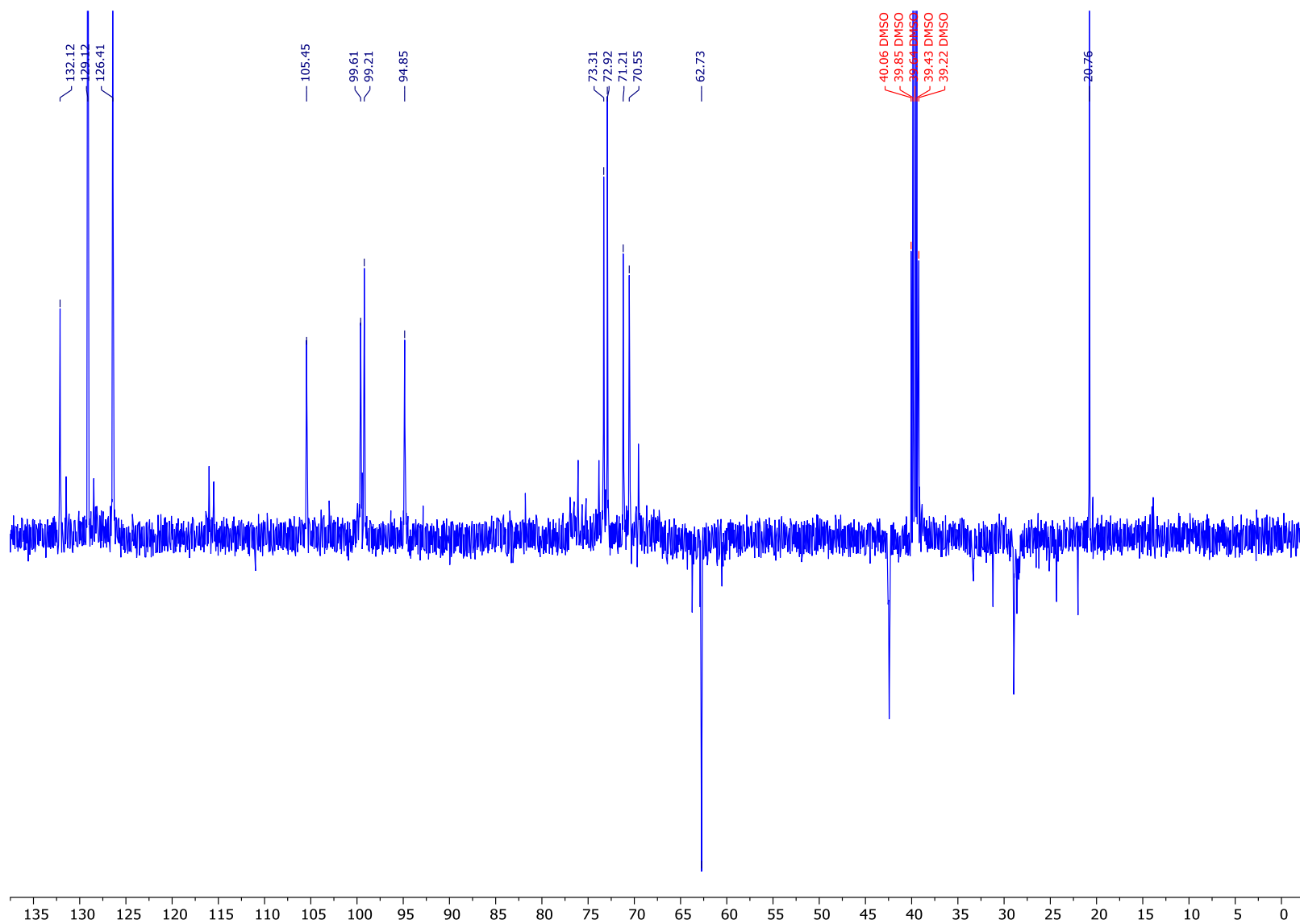
Annexe 14. Spectre HSQC de la sous-fraction E₆

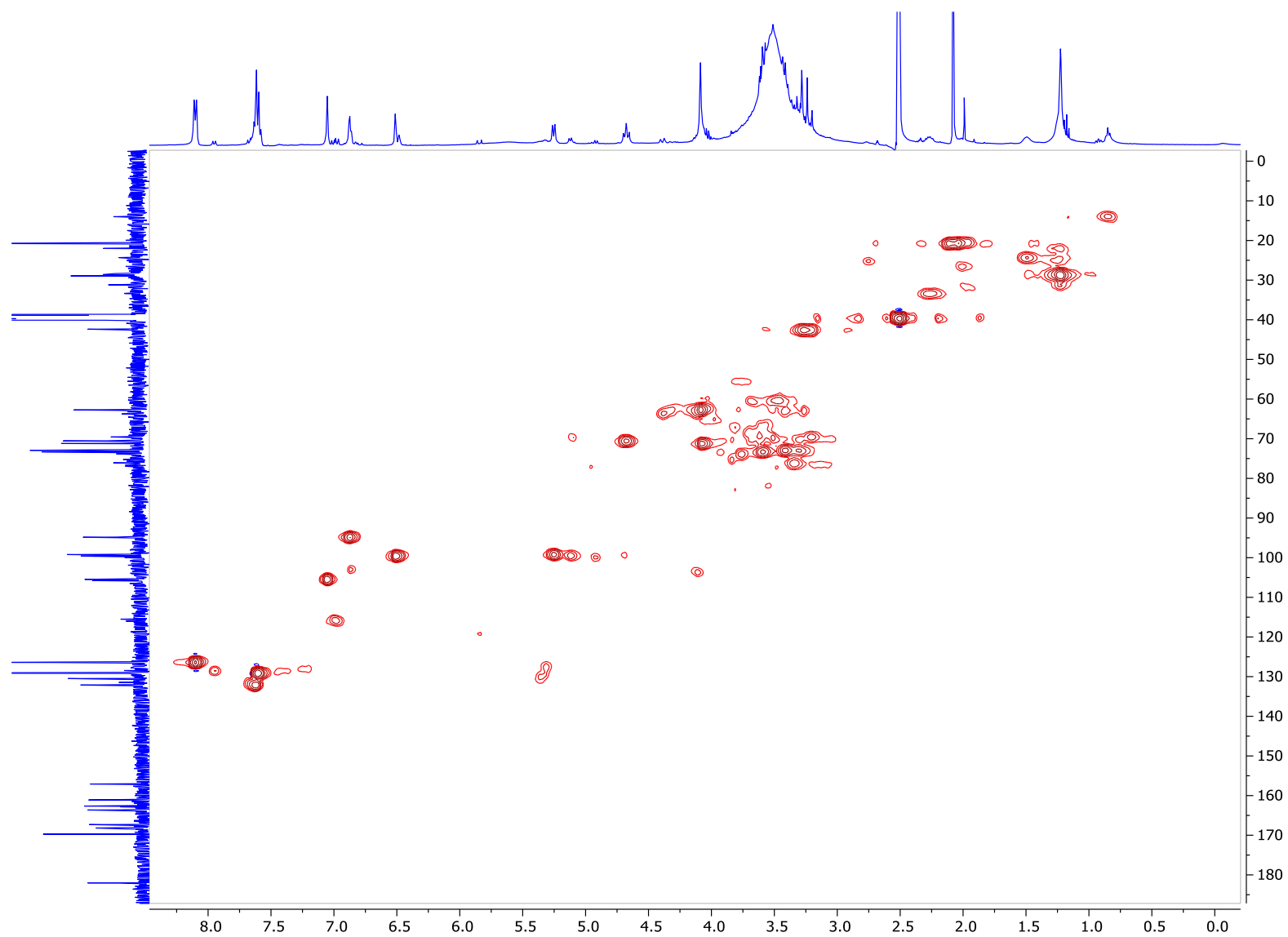
Annexe 15. Spectre HMBC de la sous-fraction E₆

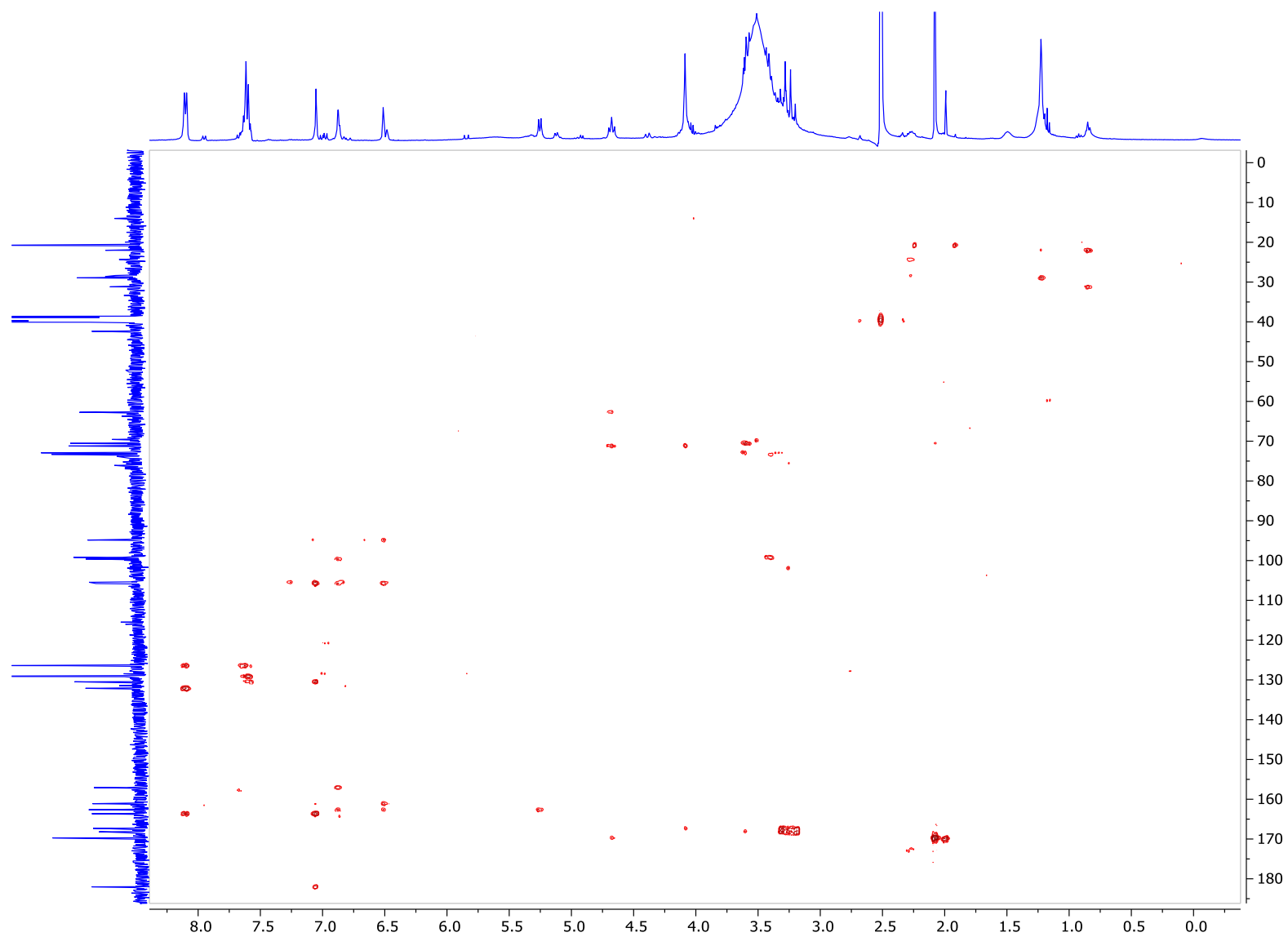
Annexe 16. Spectre COSY de la sous-fraction E₆

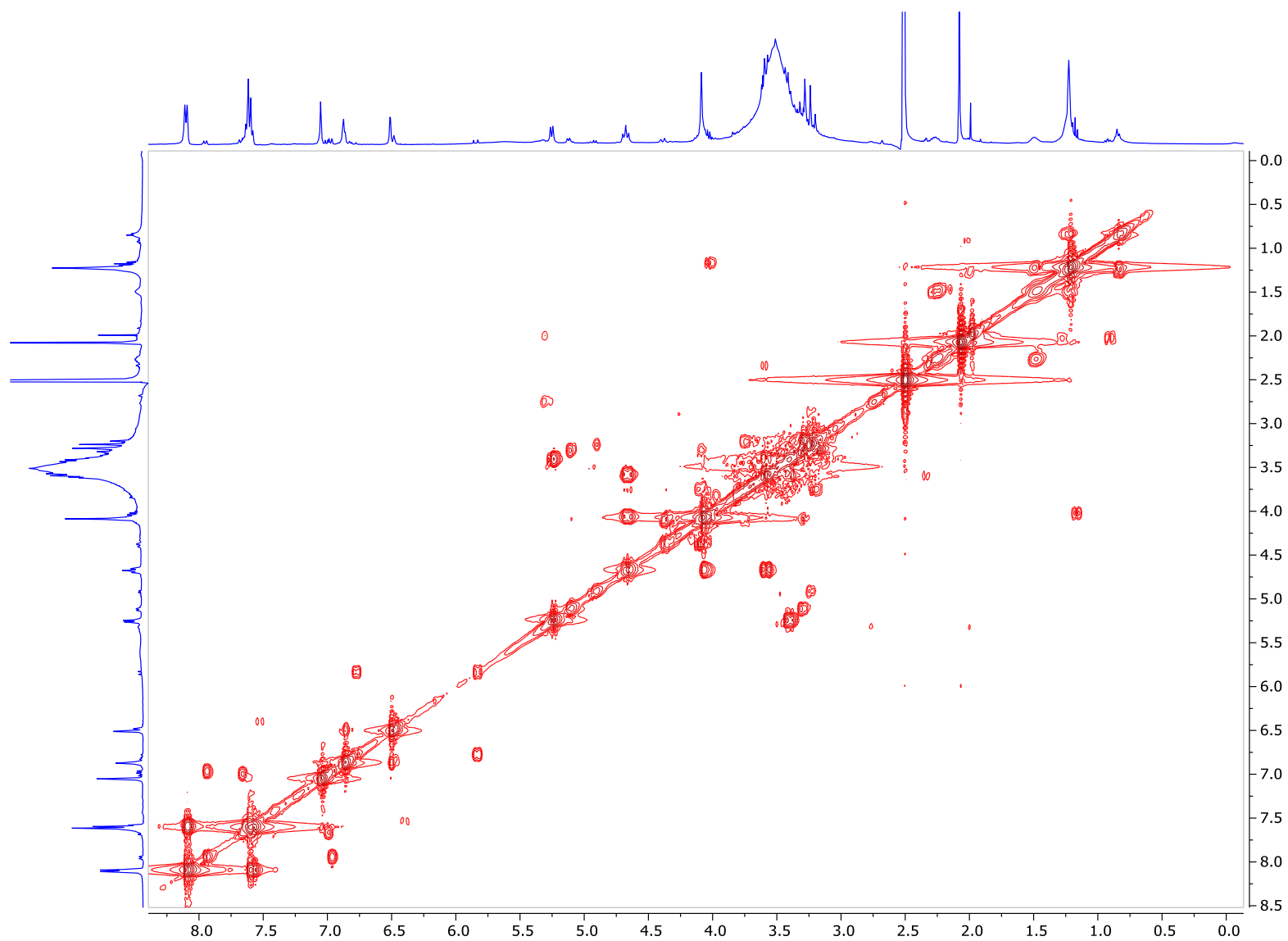
Annexe 17. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction E'_{10.9}

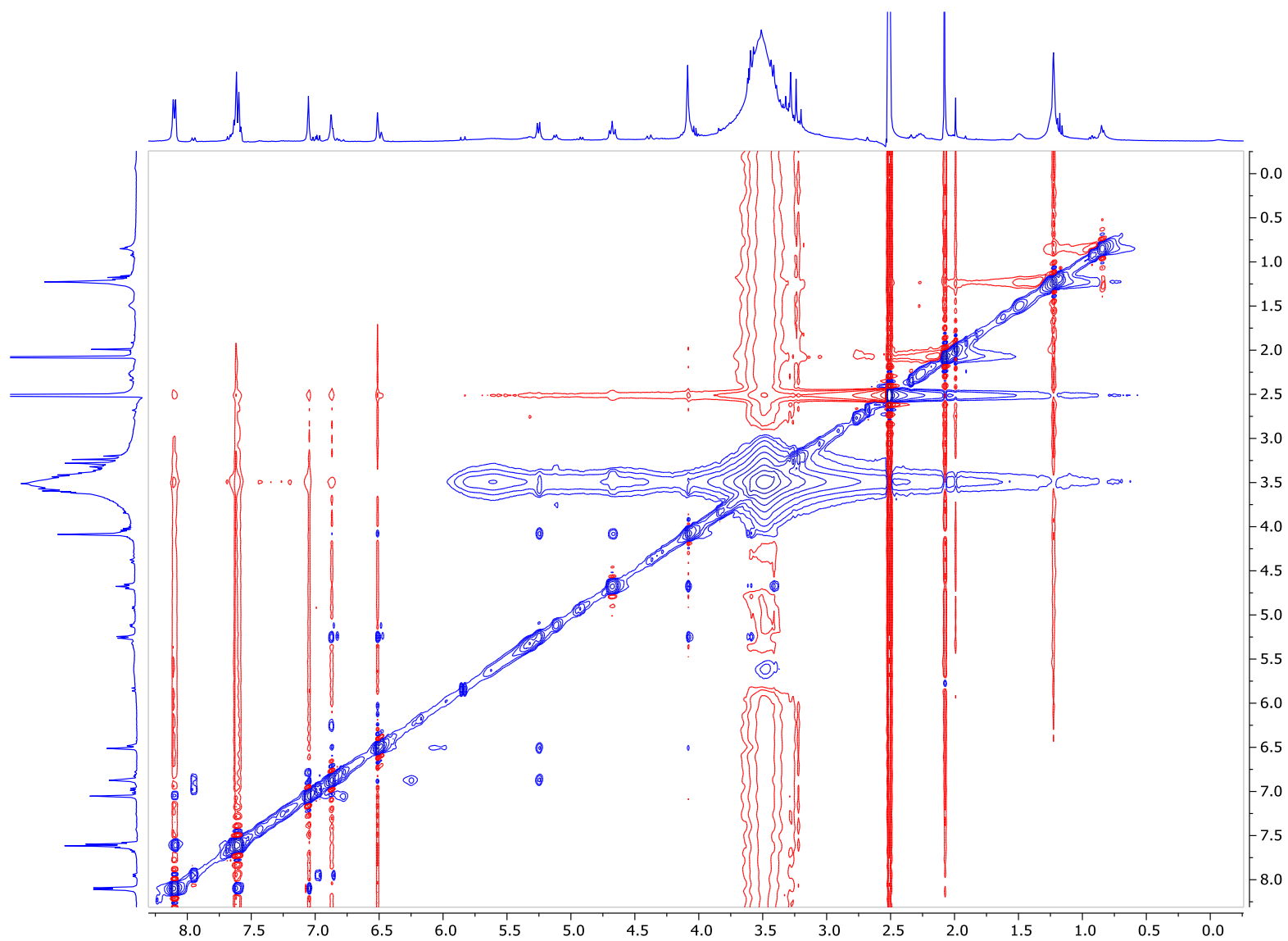
Annexe 18. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction E'_{10.9}

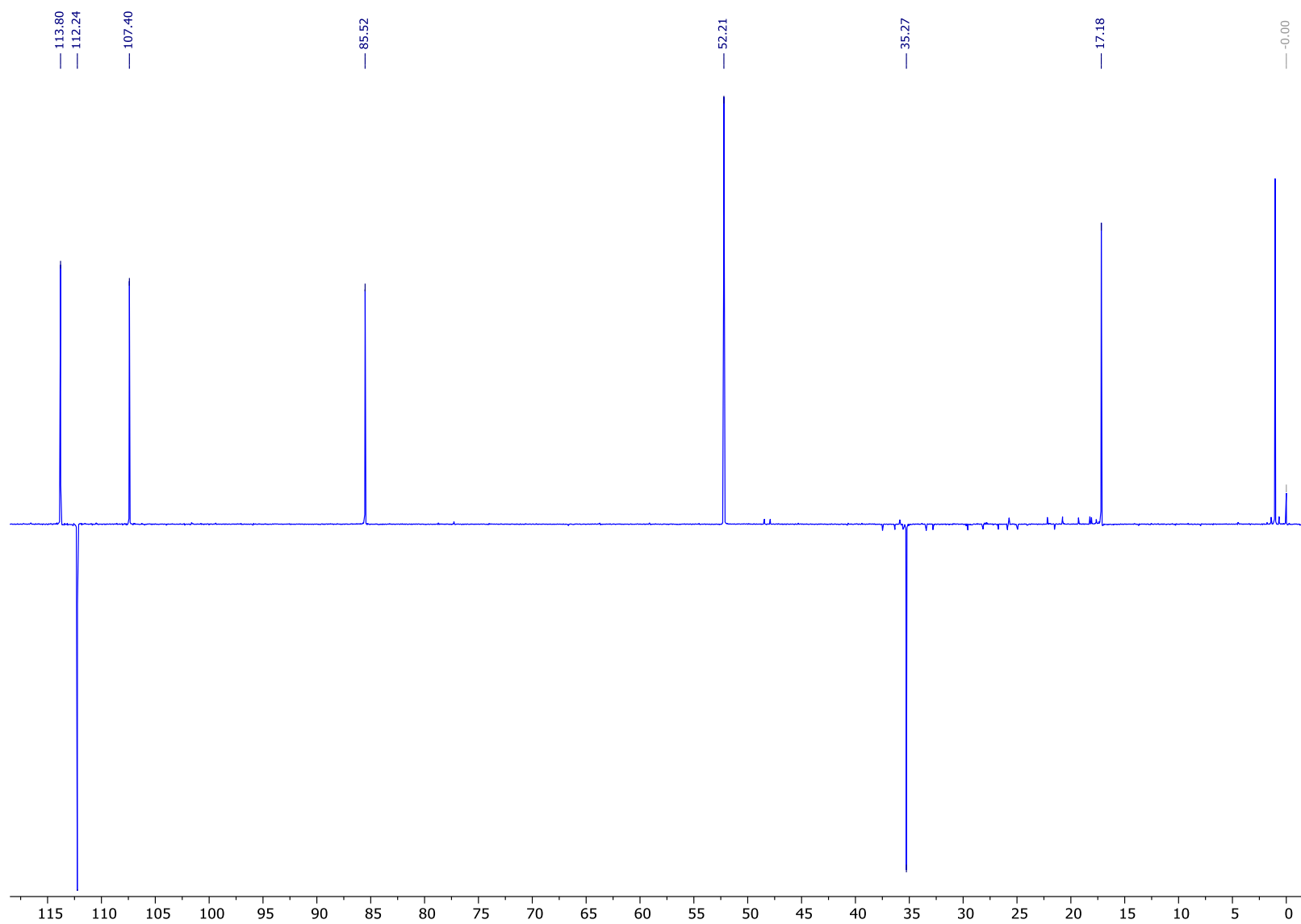
Annexe 19. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction E'_{10.9}

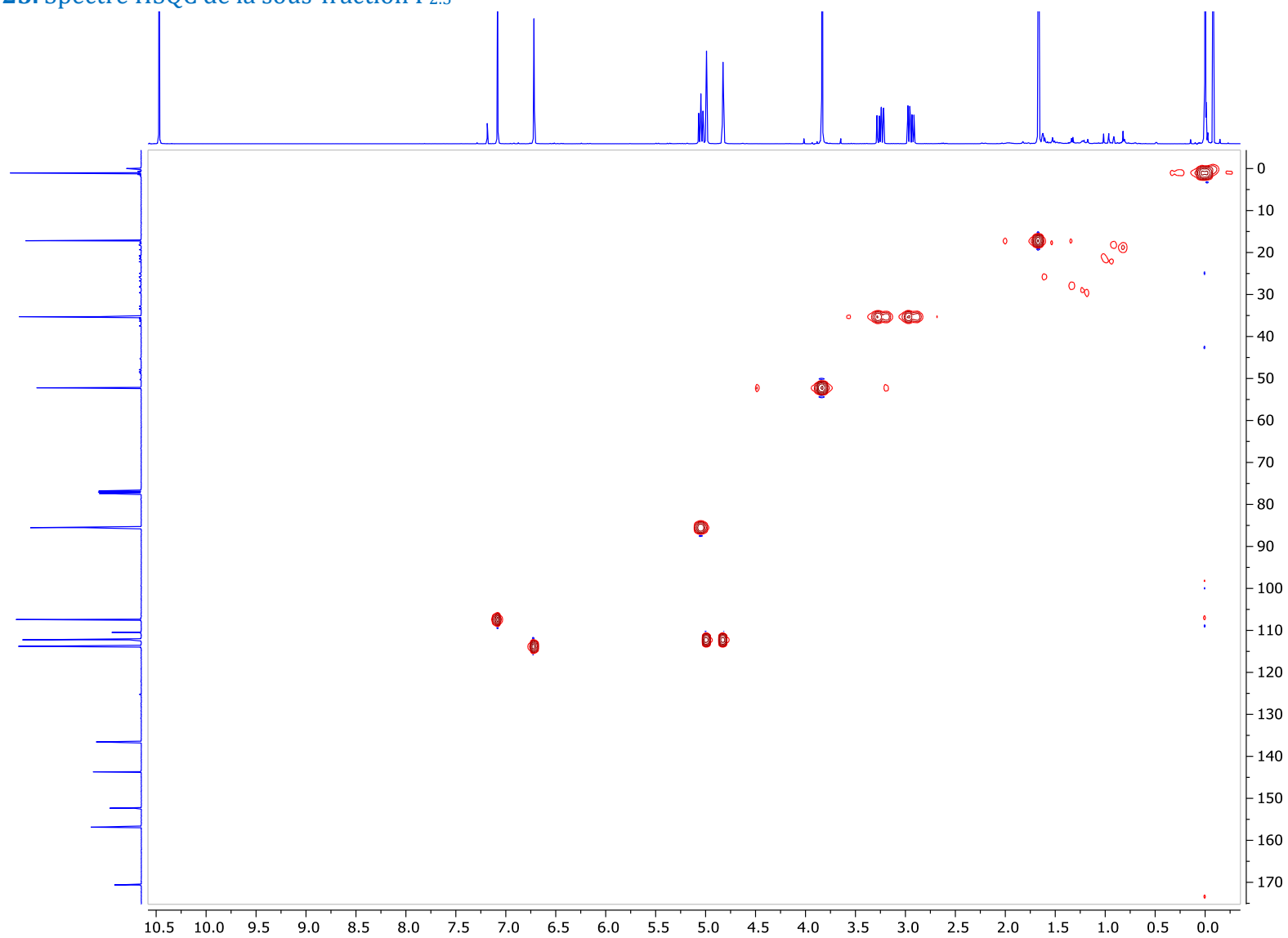
Annexe 20. Spectre HSQC de la sous-fraction E'_{10.9}

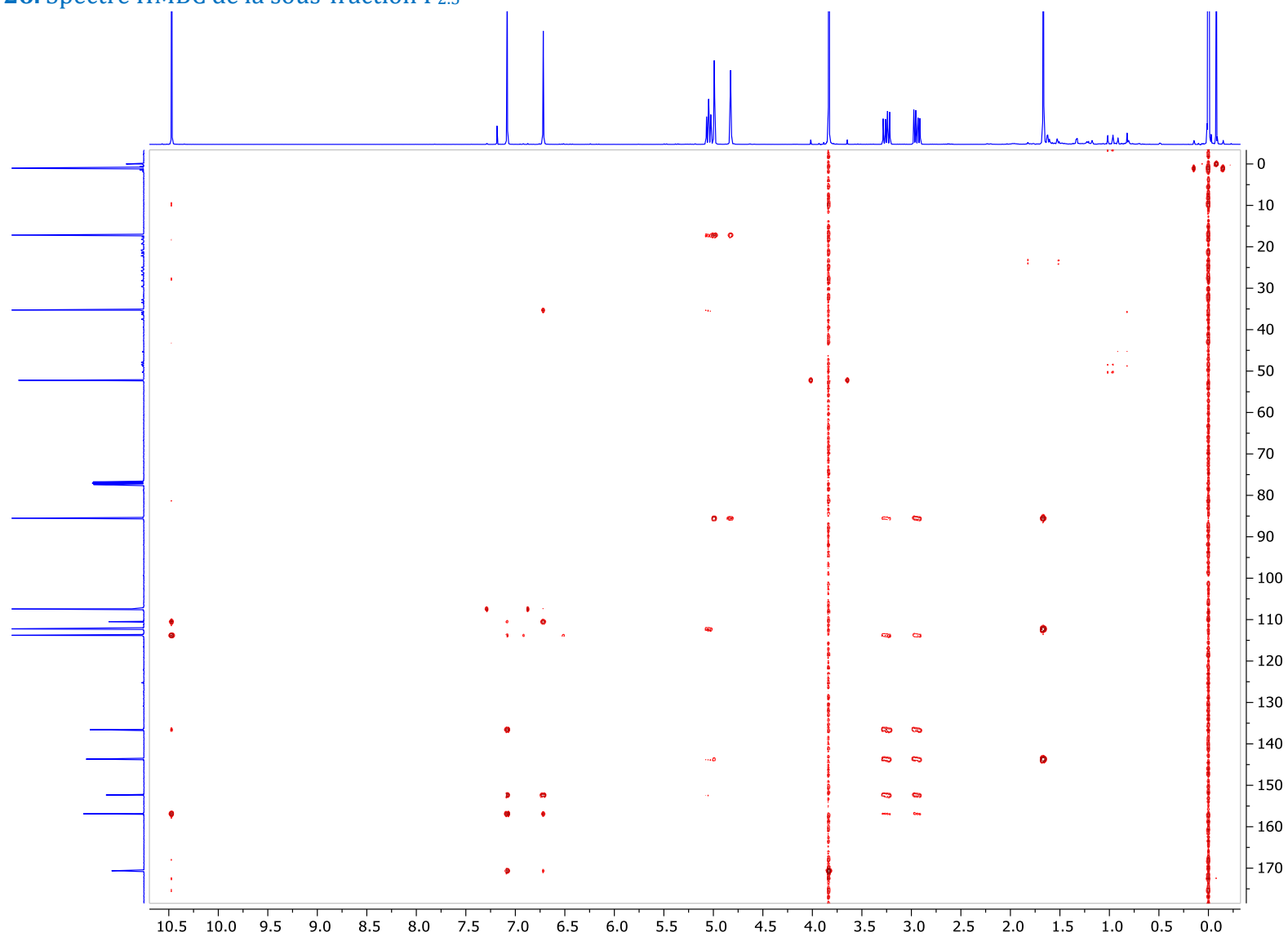
Annexe 21. Spectre HMBC de la sous-fraction E'_{10.9}

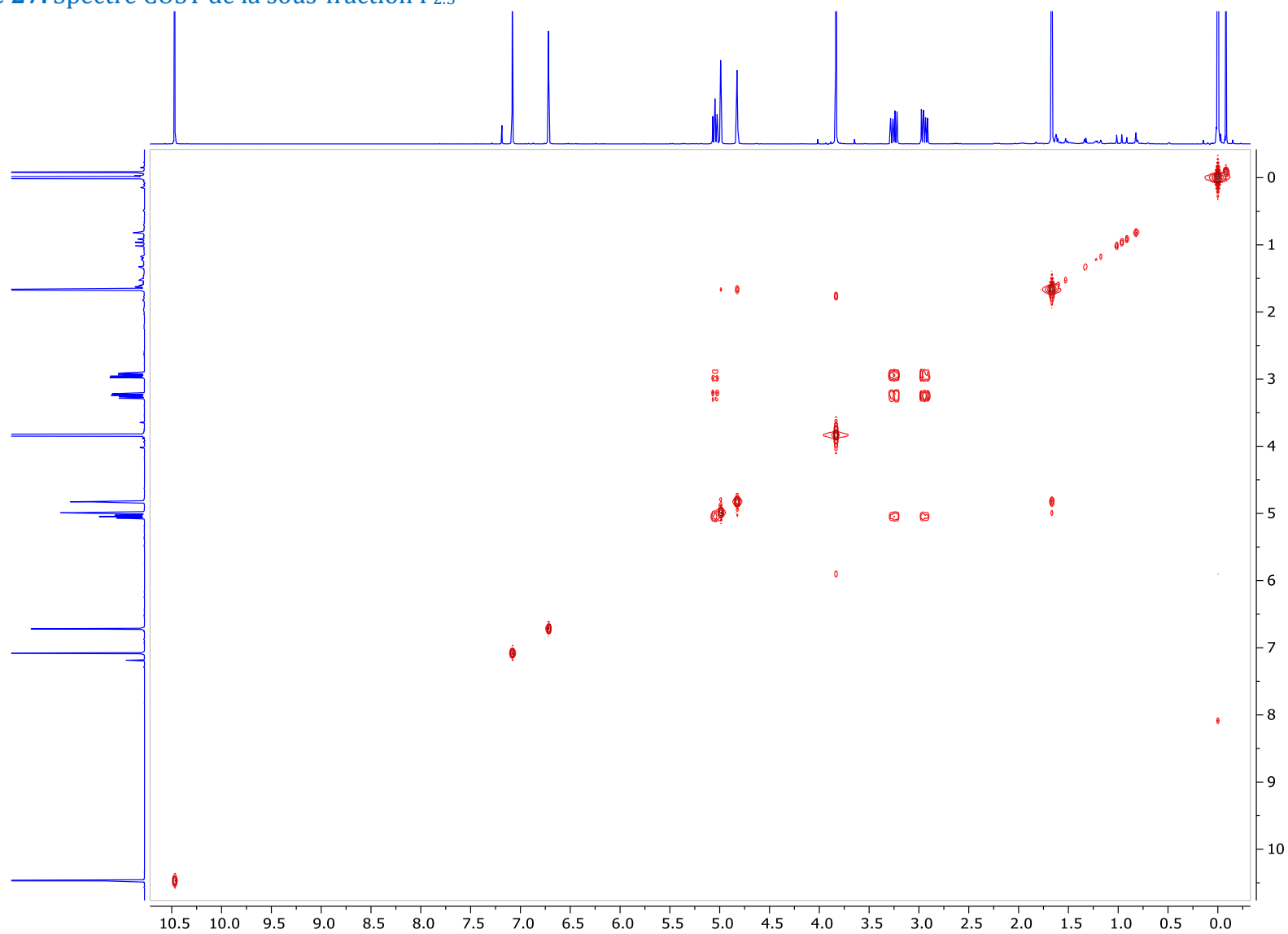
Annexe 22. Spectre COSY de la sous-fraction E'10.9

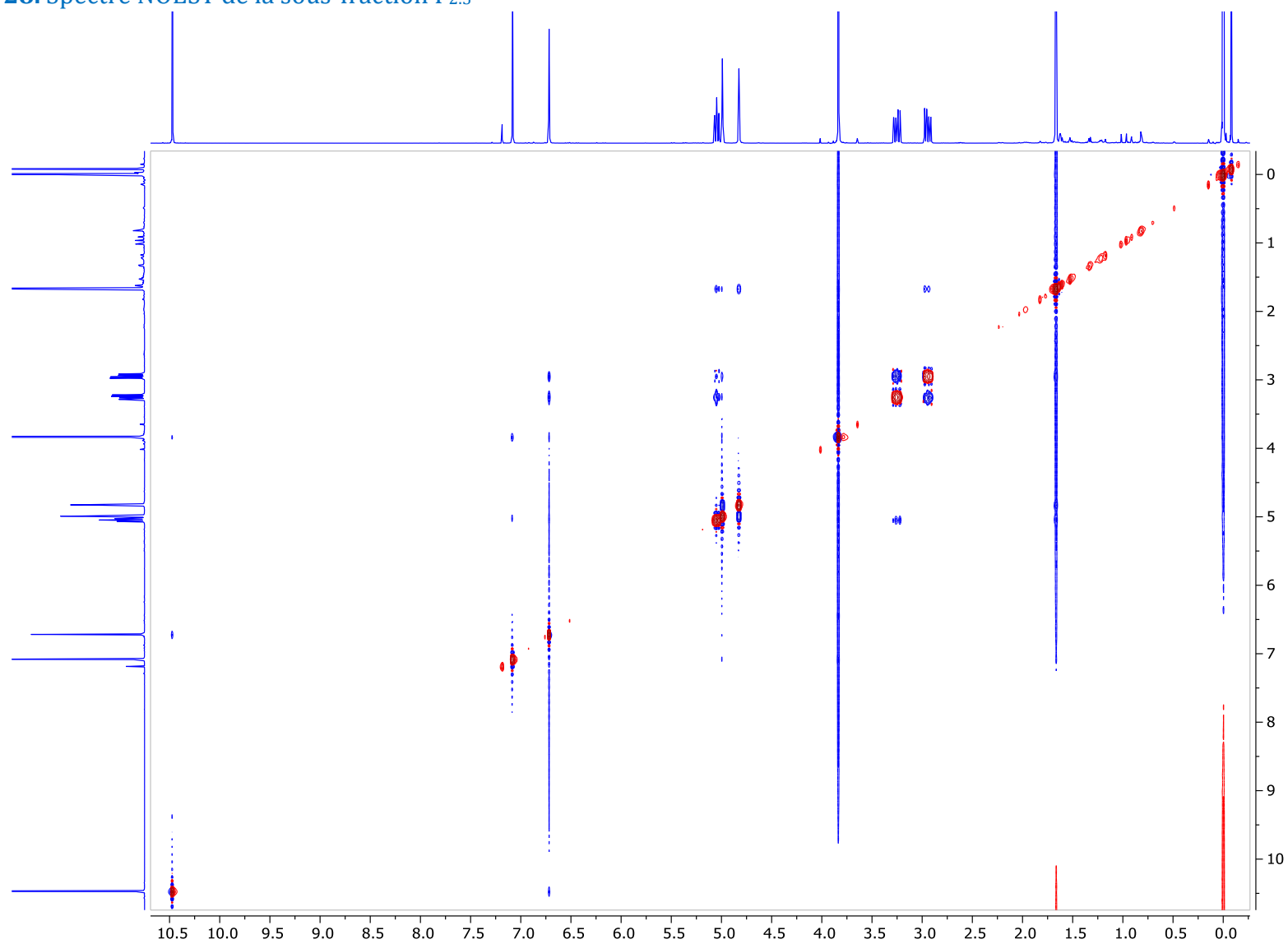
Annexe 23. Spectre NOESY de la sous-fraction E'10.9

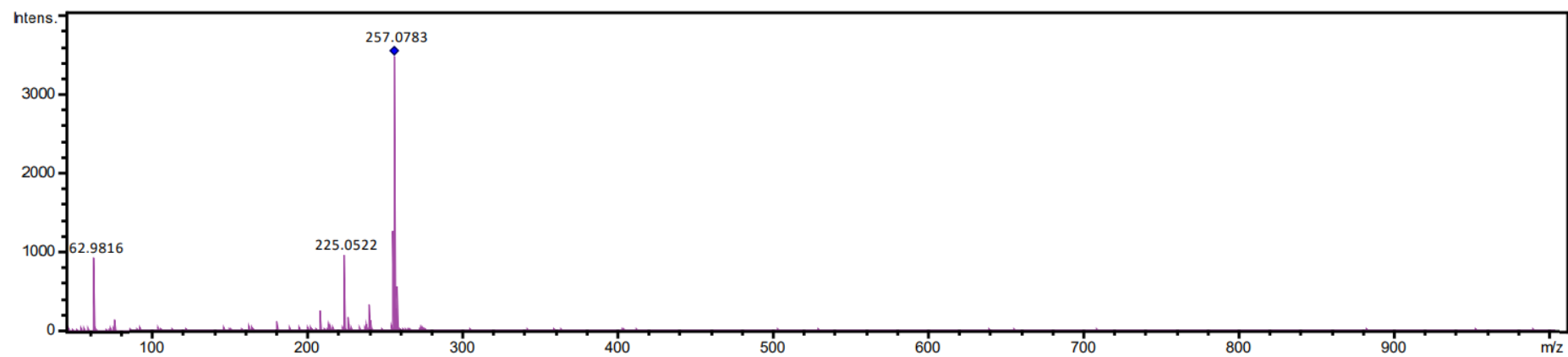
Annexe 24. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F_{2.5}

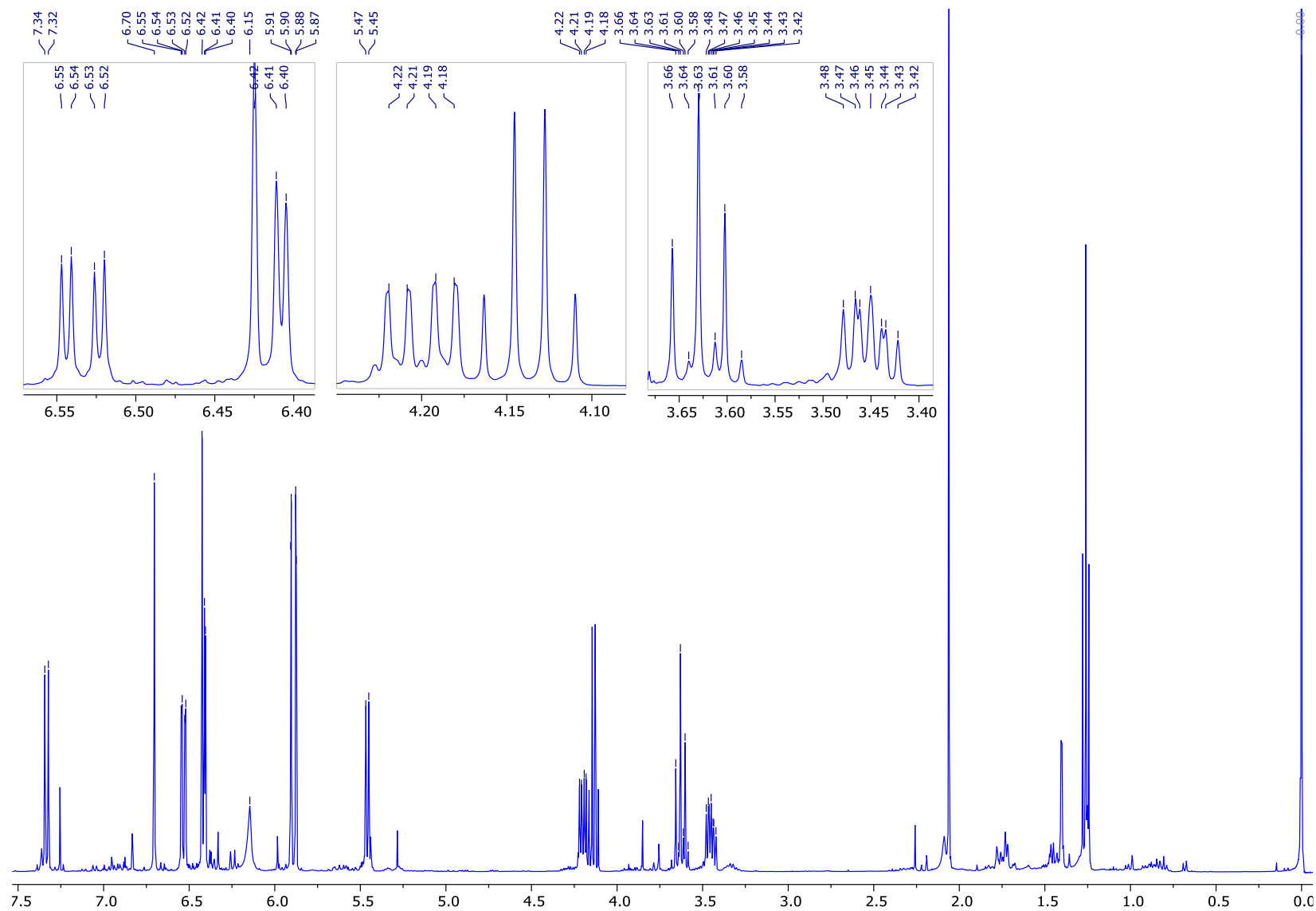
Annexe 25. Spectre HSQC de la sous-fraction F_{2.5}

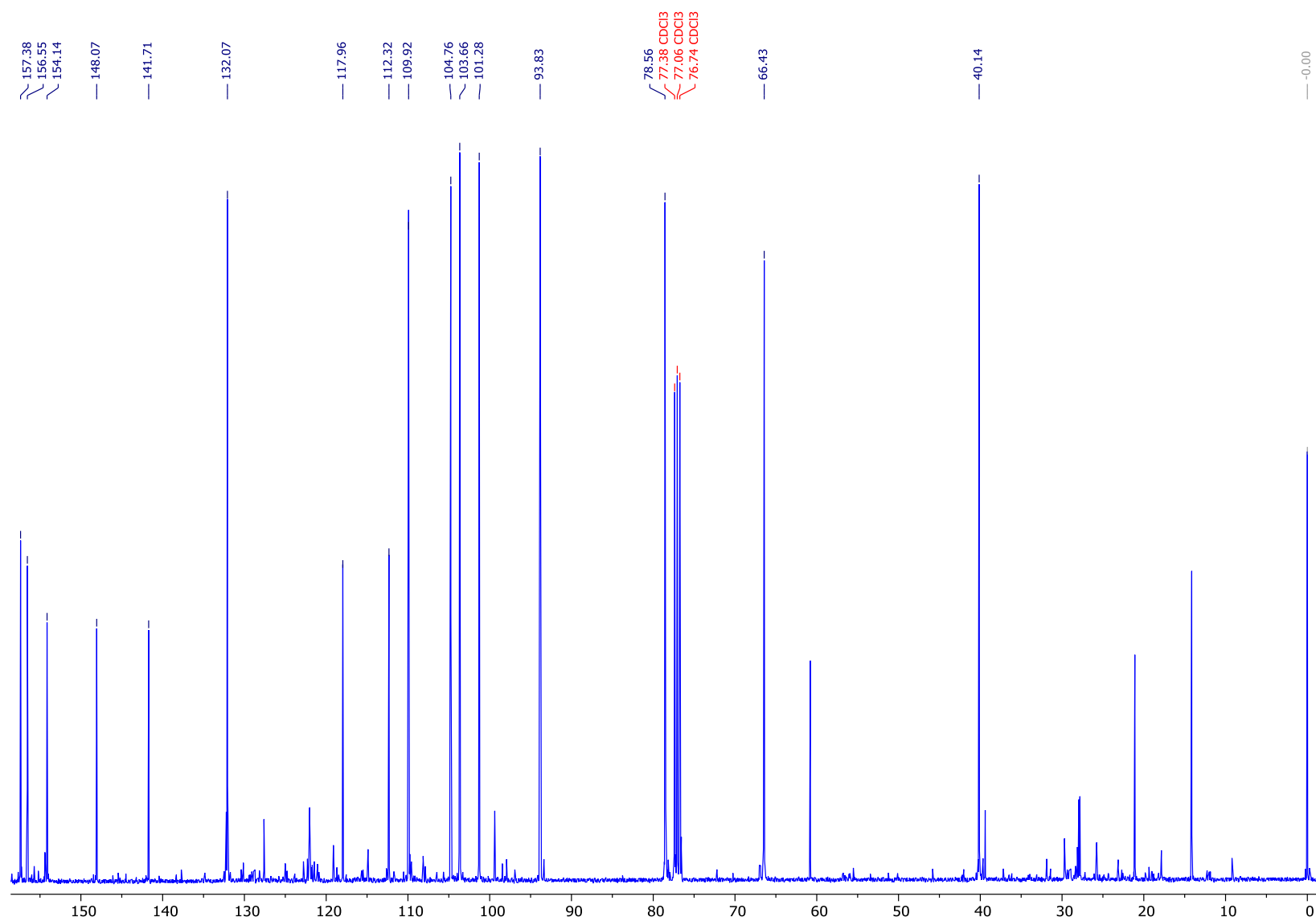
Annexe 26. Spectre HMBC de la sous-fraction F_{2.5}

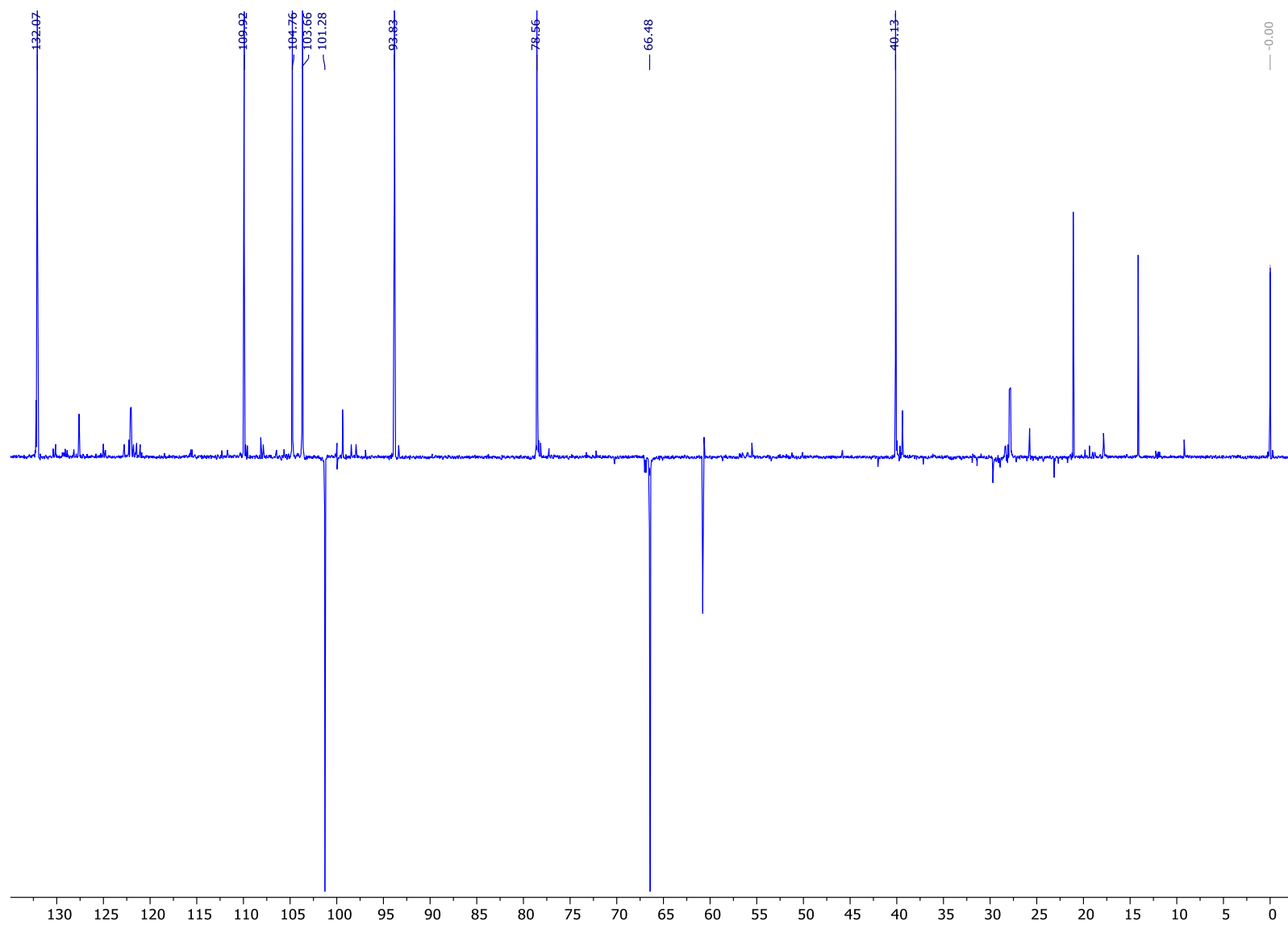
Annexe 27. Spectre COSY de la sous-fraction F_{2.5}

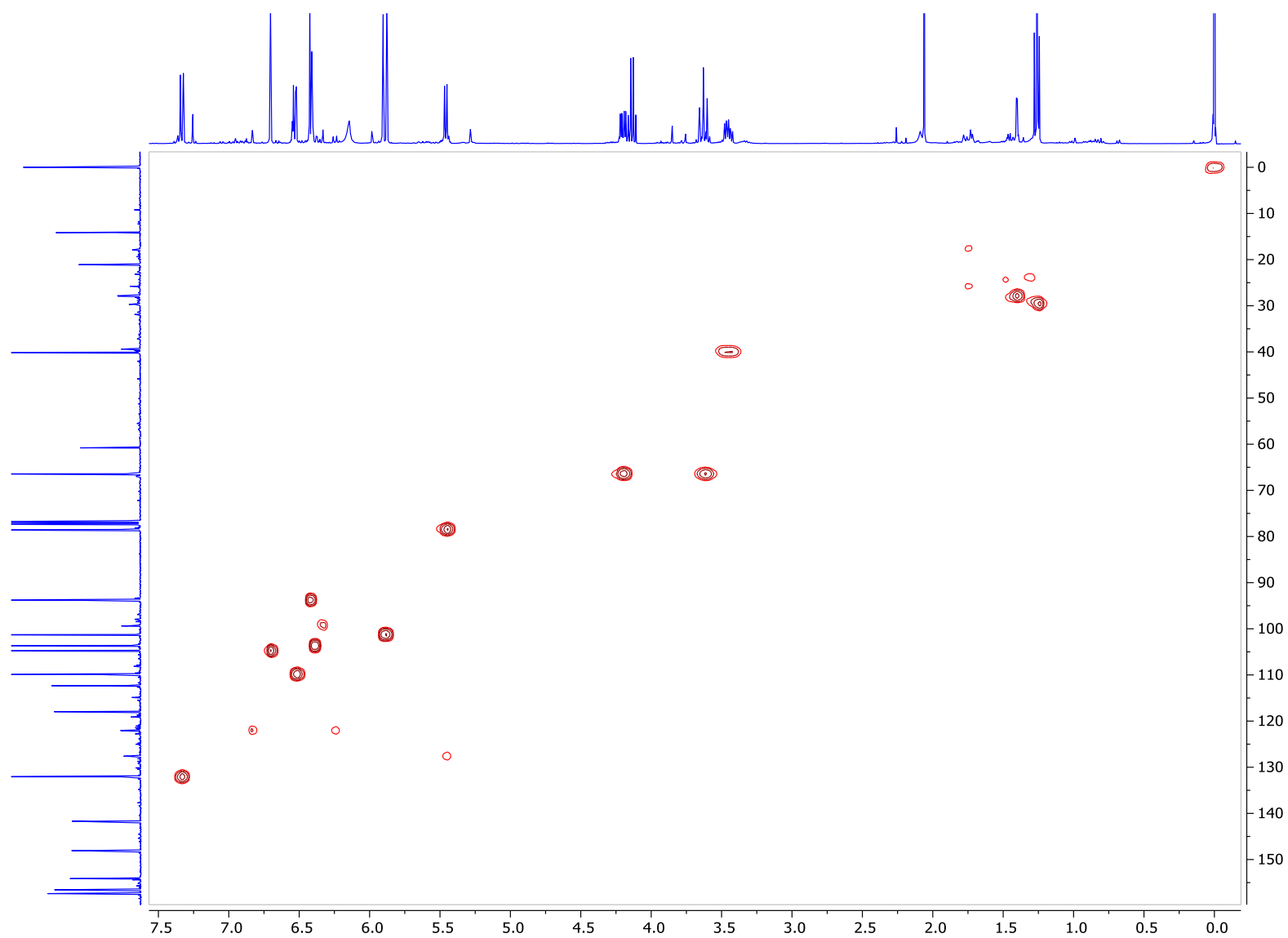
Annexe 28. Spectre NOESY de la sous-fraction F2.5

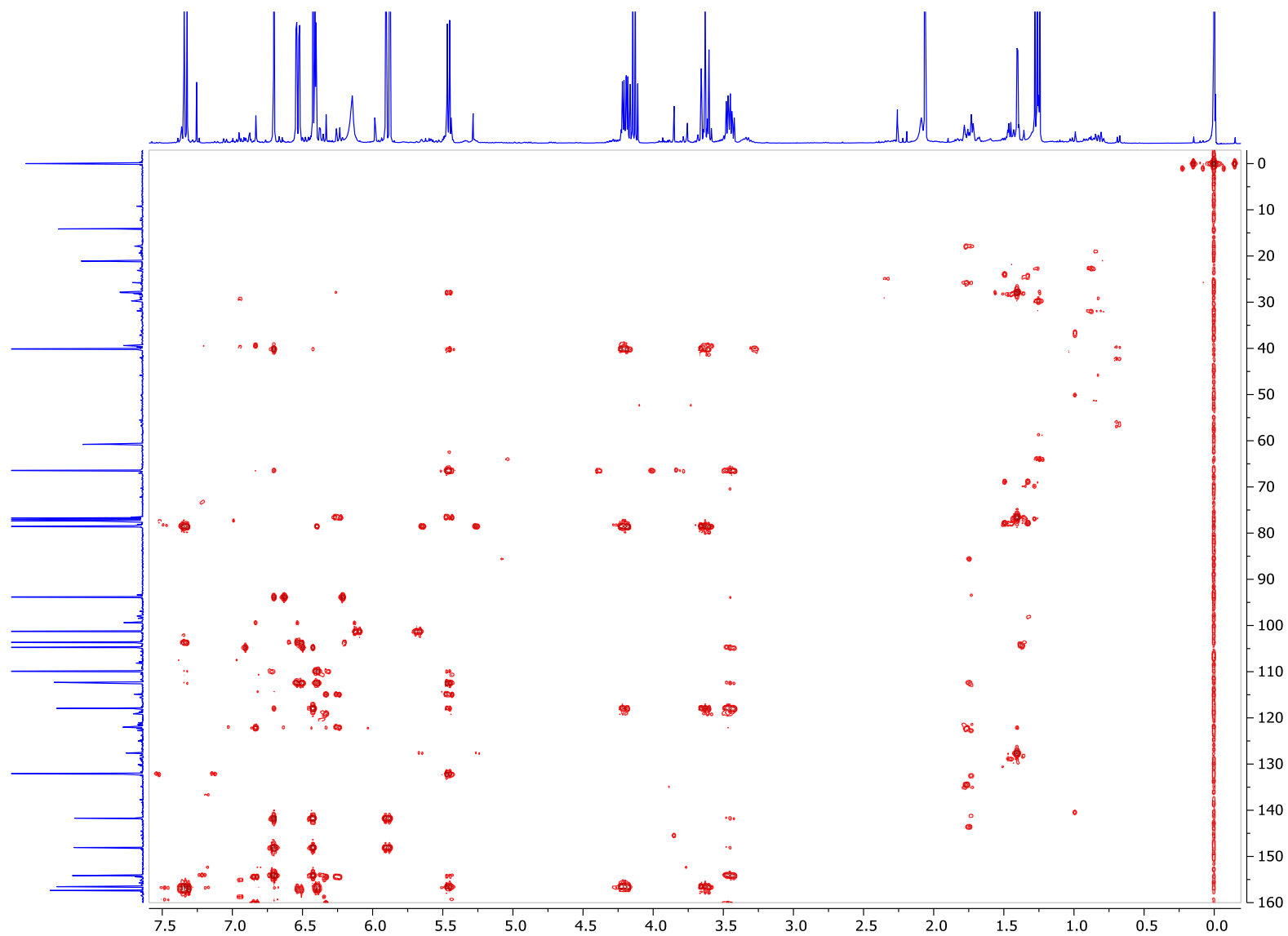
Annexe 29.Spectre SM/SM de la sous-fraction F_{2.5}

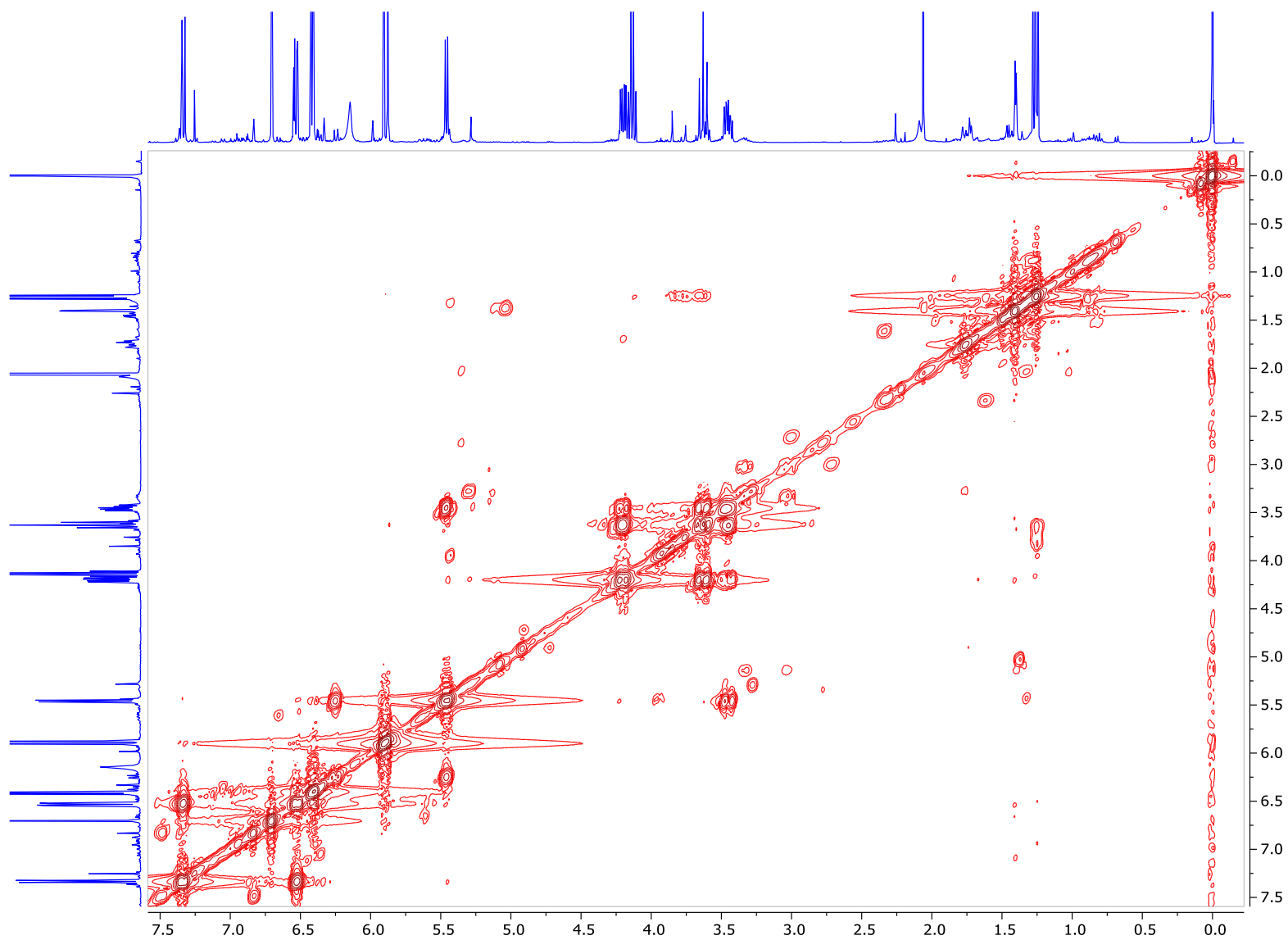
Annexe 30. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction F_{3,4}

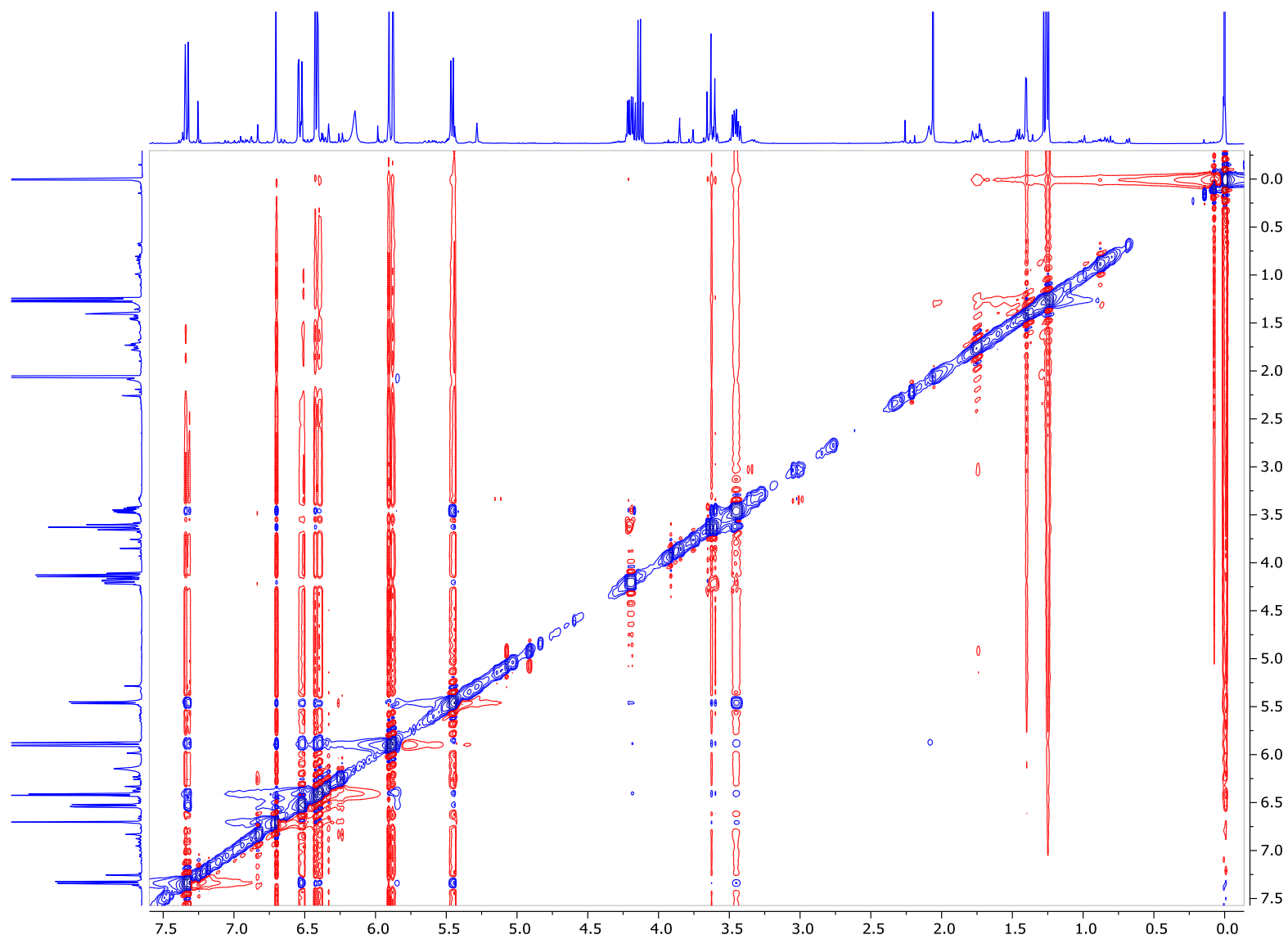
Annexe 31. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction F_{3,4}

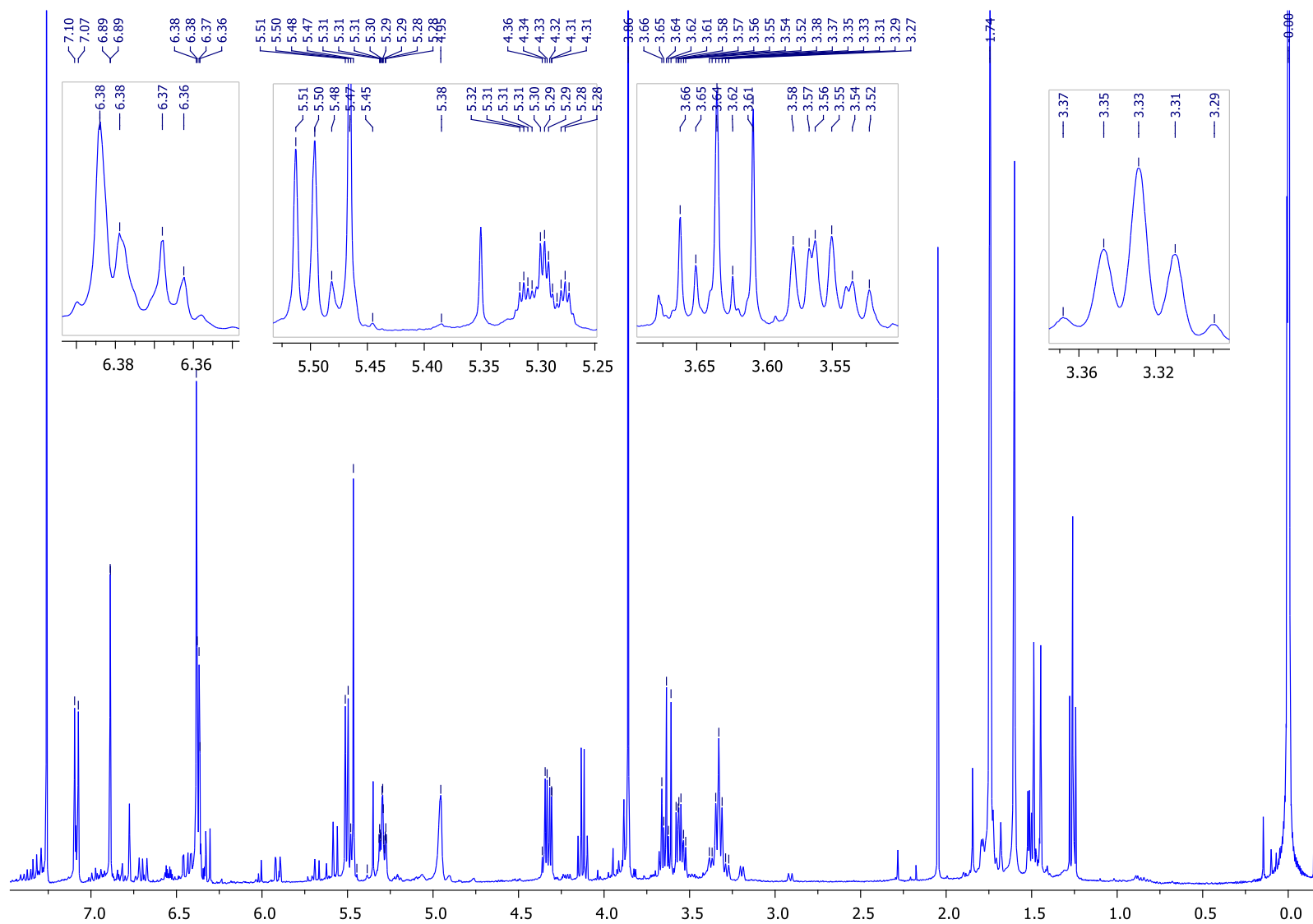
Annexe 32. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F_{3.4}

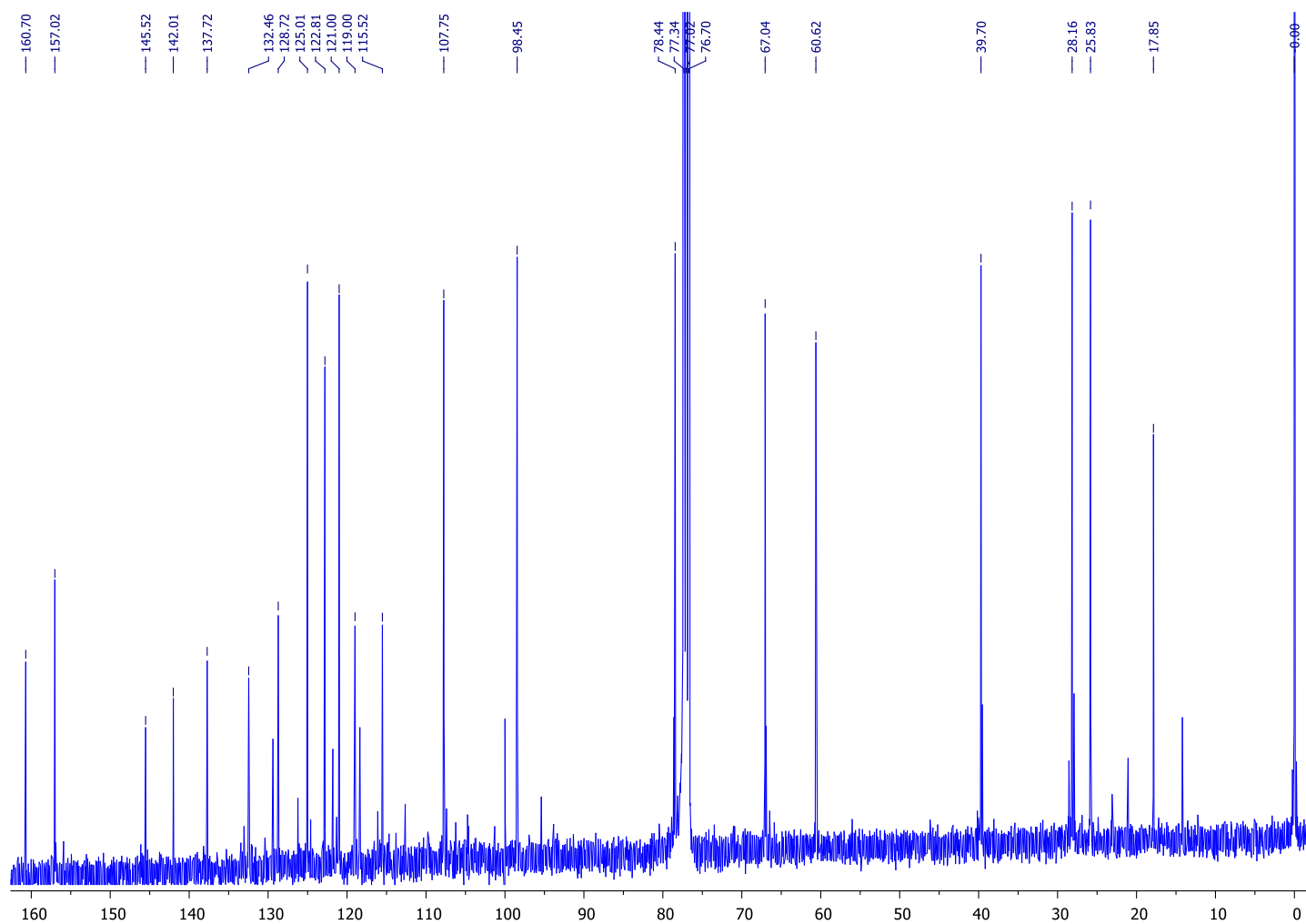
Annexe 33. Spectre HSQC de la sous-fraction F_{3,4}

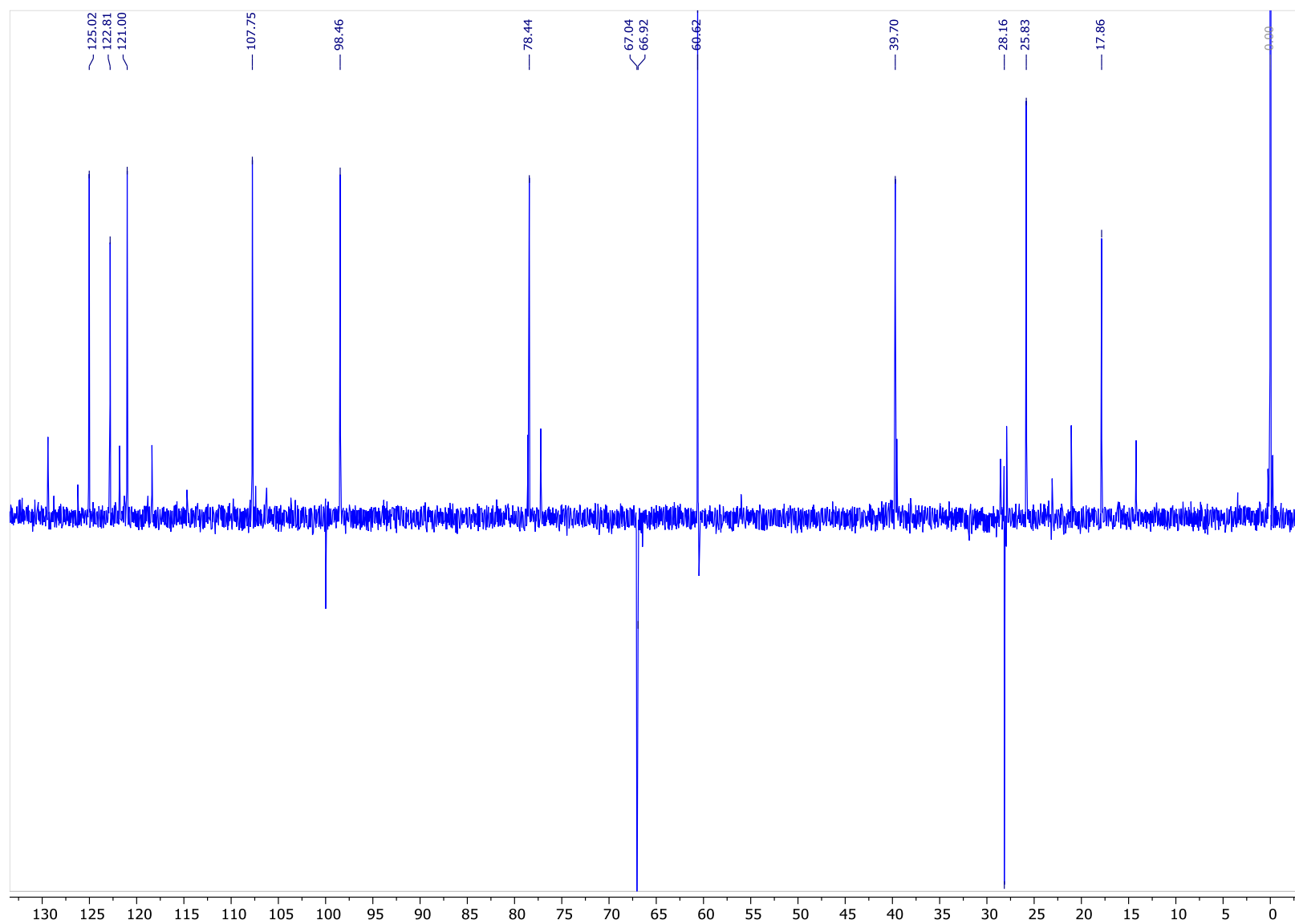
Annexe 34. Spectre HMBC de la sous-fraction F_{3.4}

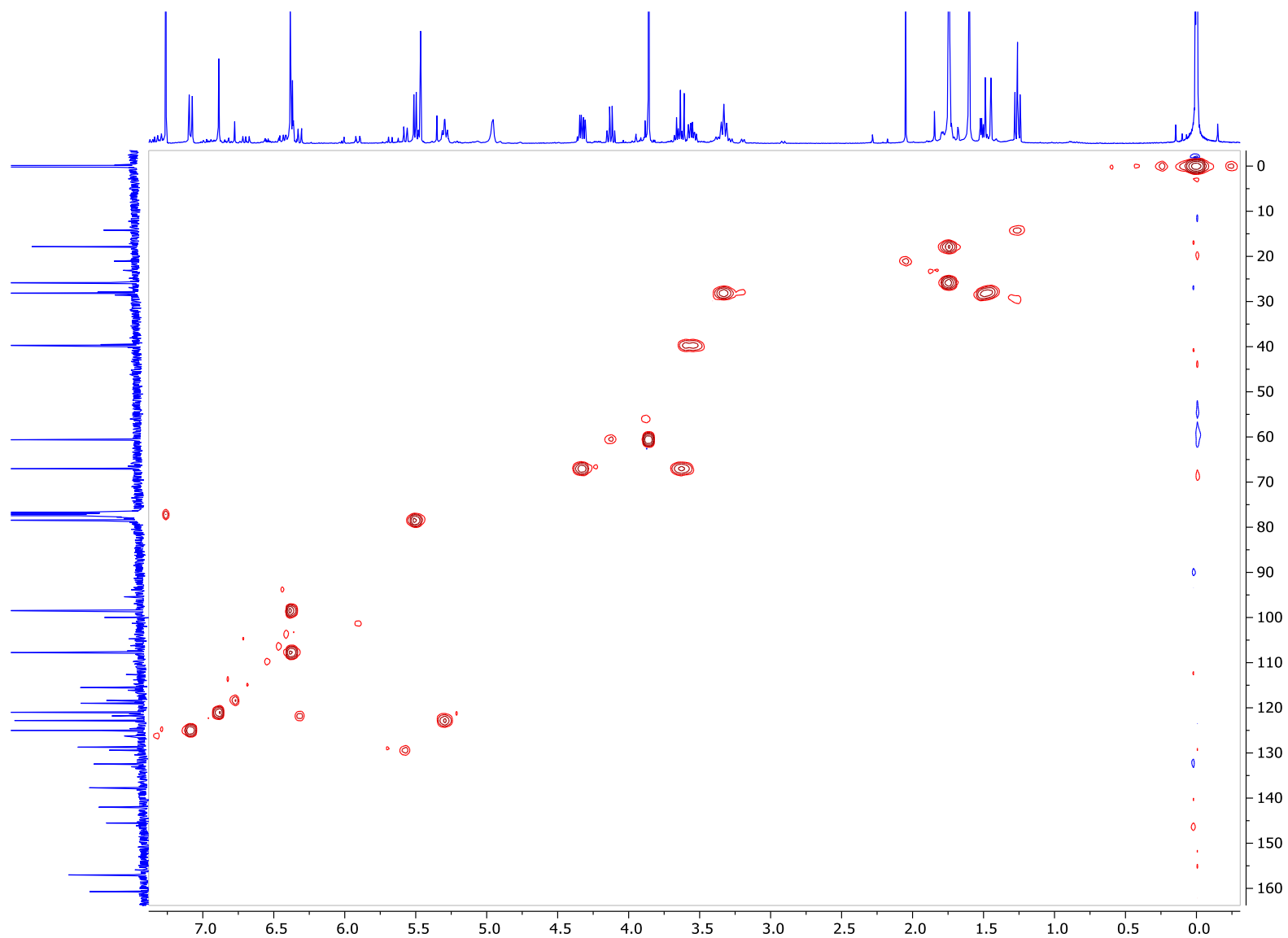
Annexe 35. Spectre COSY de la sous-fraction F_{3.4}

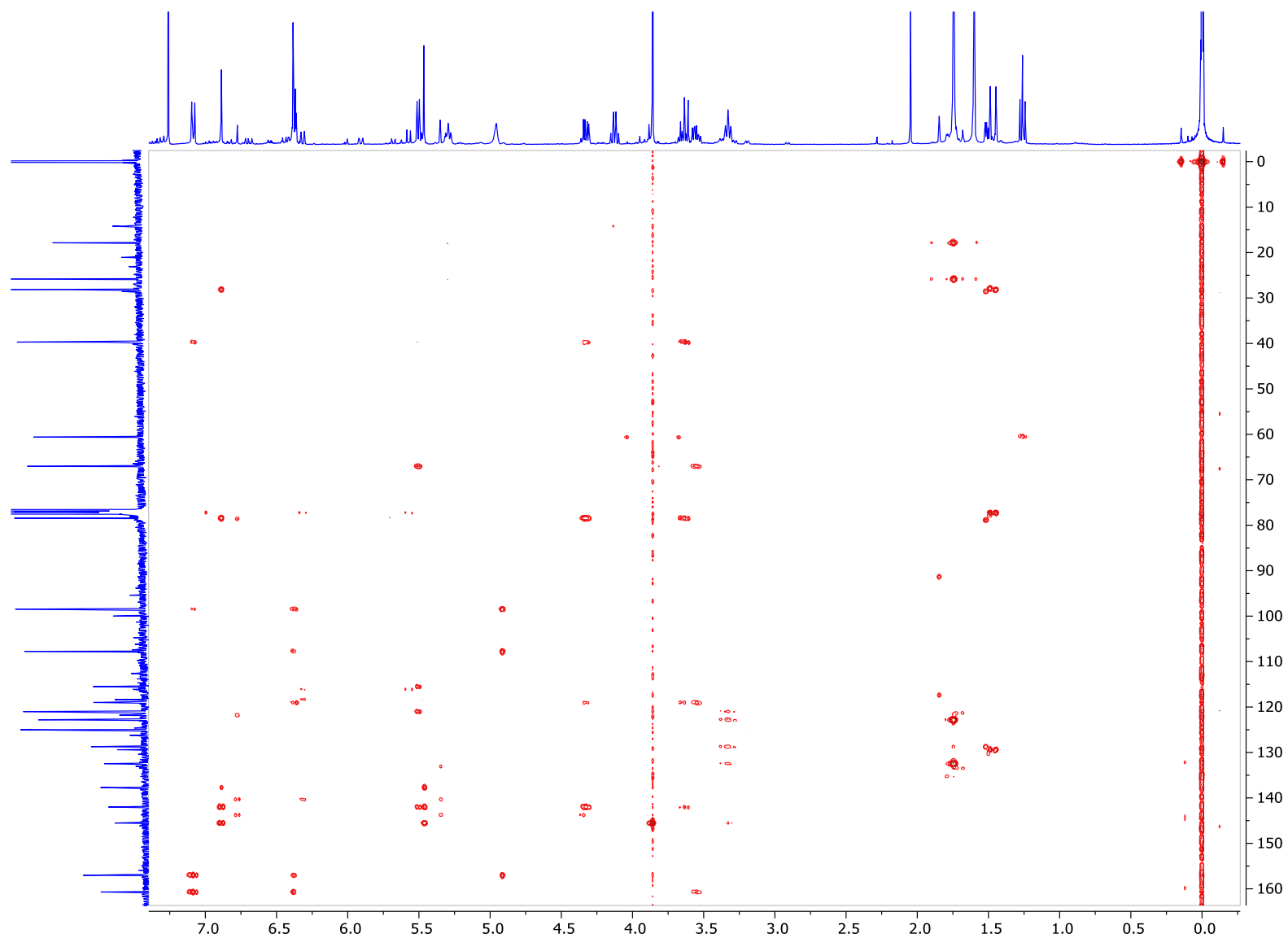
Annexe 36. Spectre NOESY de la sous-fraction F_{3.4}

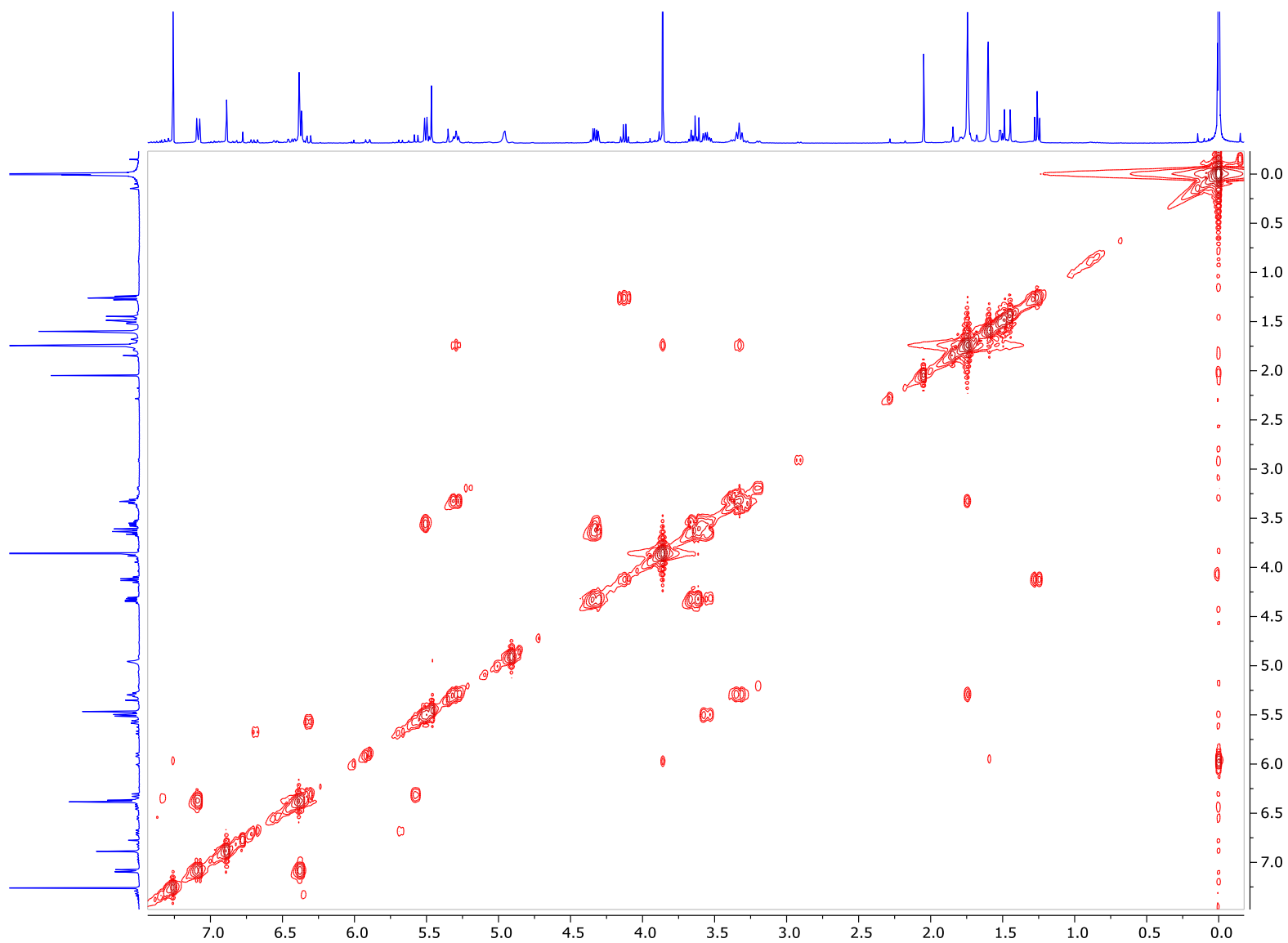
Annexe 37. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction F_{3.B.3}

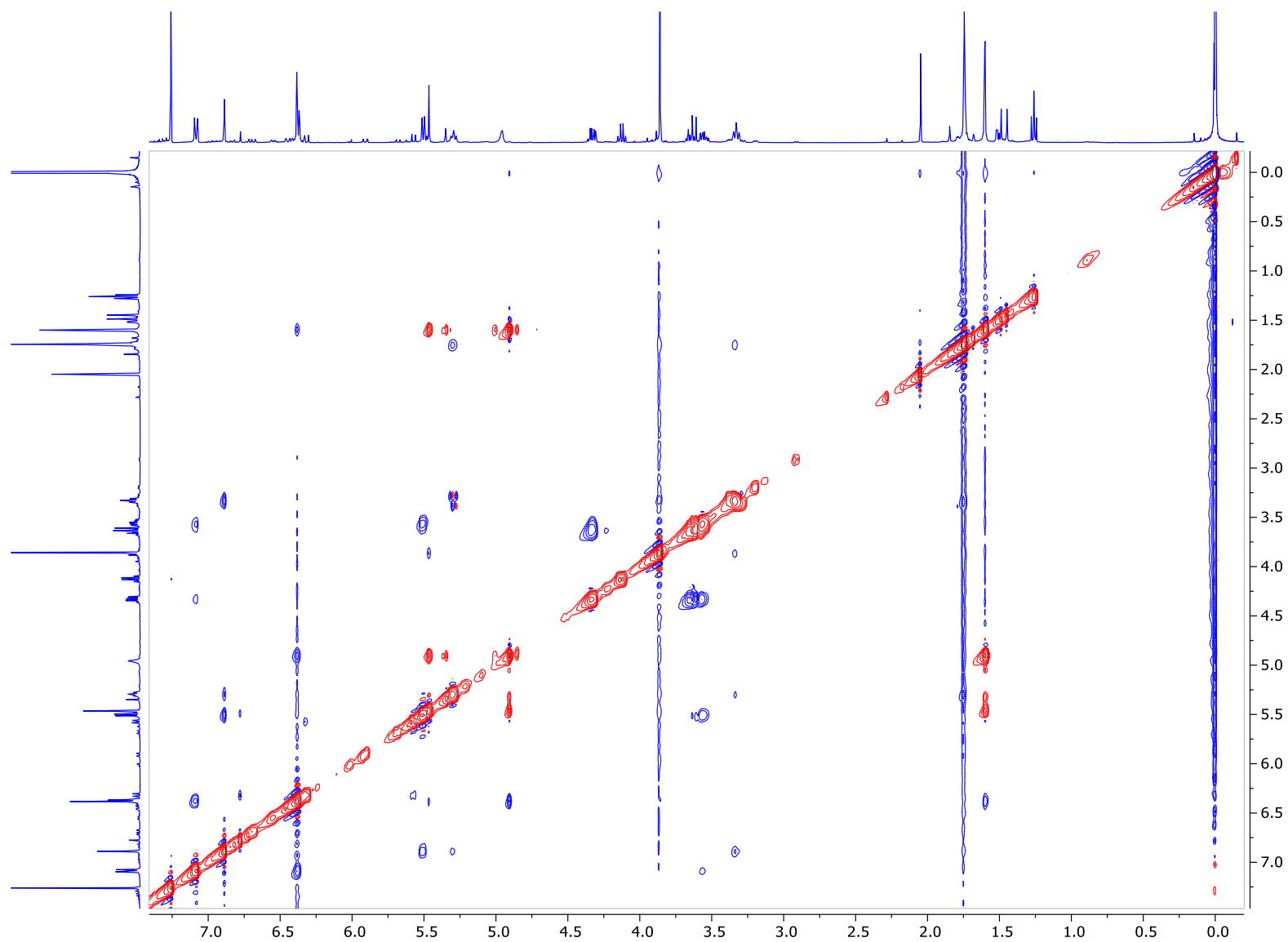
Annexe 38. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction F_{3,B,3}

Annexe 39. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F_{3.B.3}

Annexe 40. Spectre HSQC de la sous-fraction F_{3.B.3}

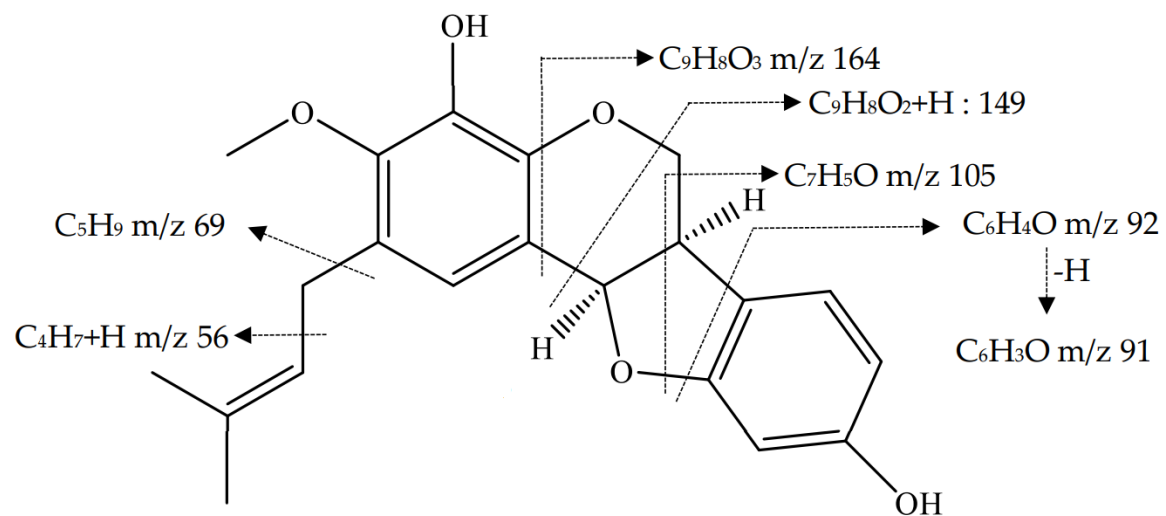
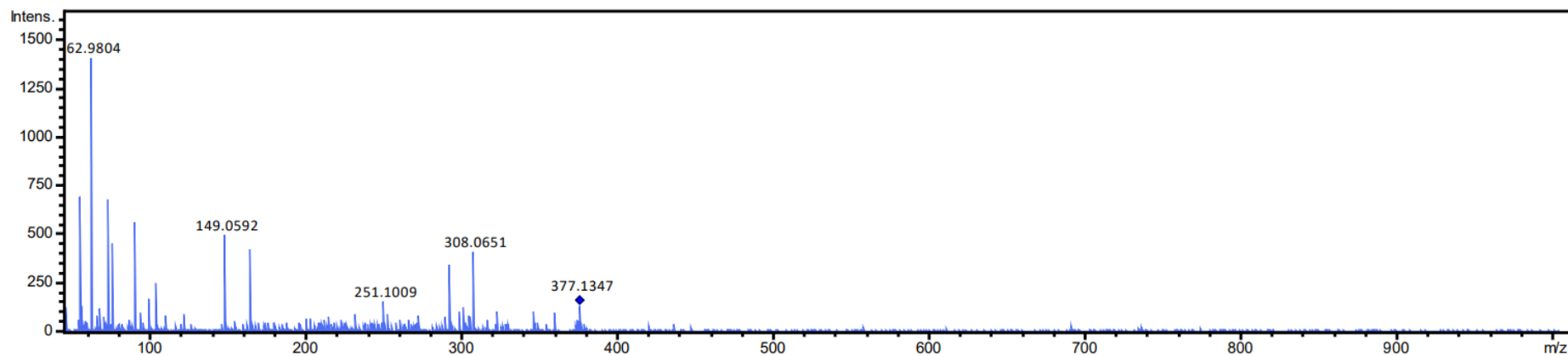
Annexe 41. Spectre HMBC de la sous-fraction F_{3.B.3}

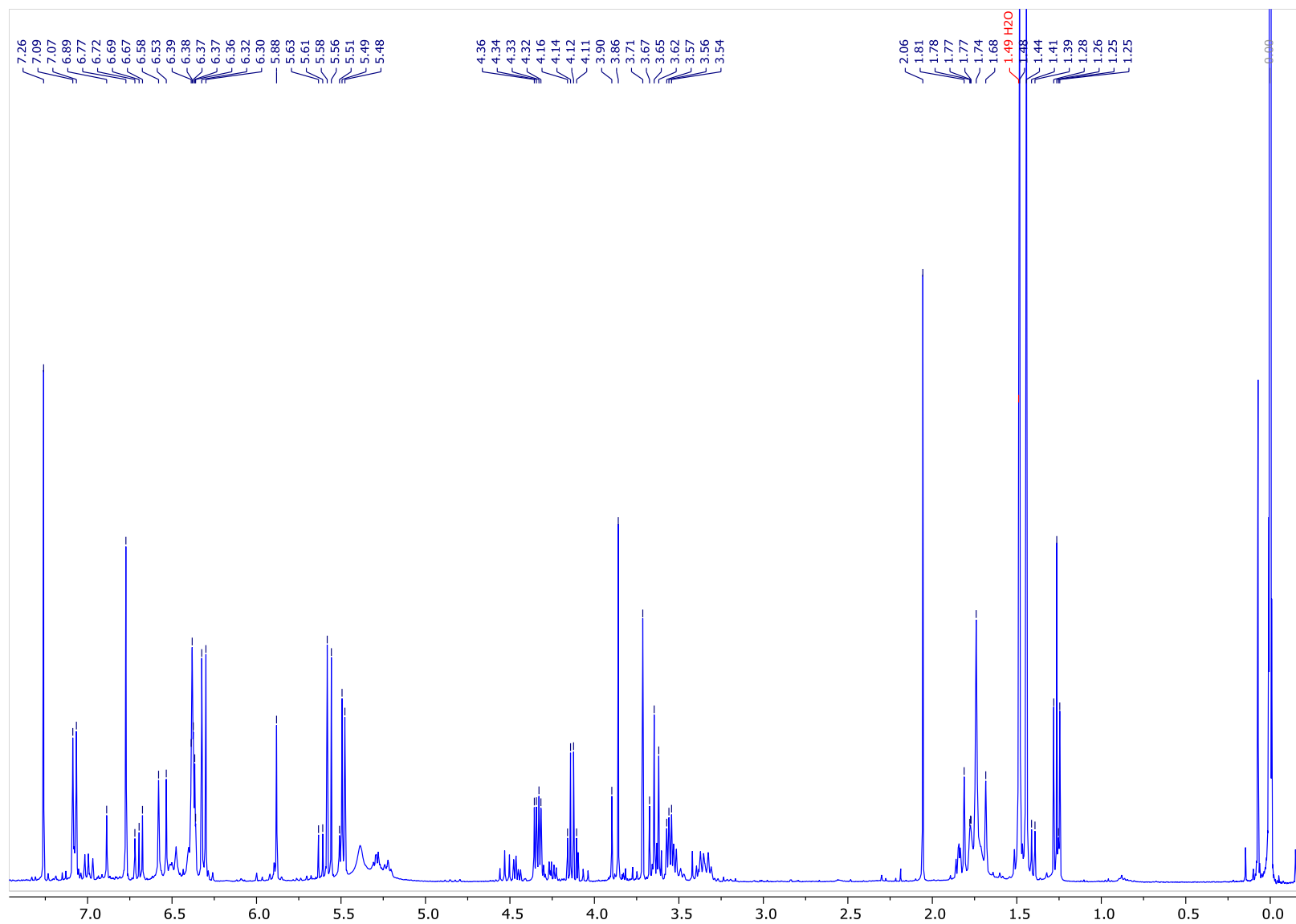
Annexe 42. Spectre COSY de la sous-fraction F_{3.B.3}

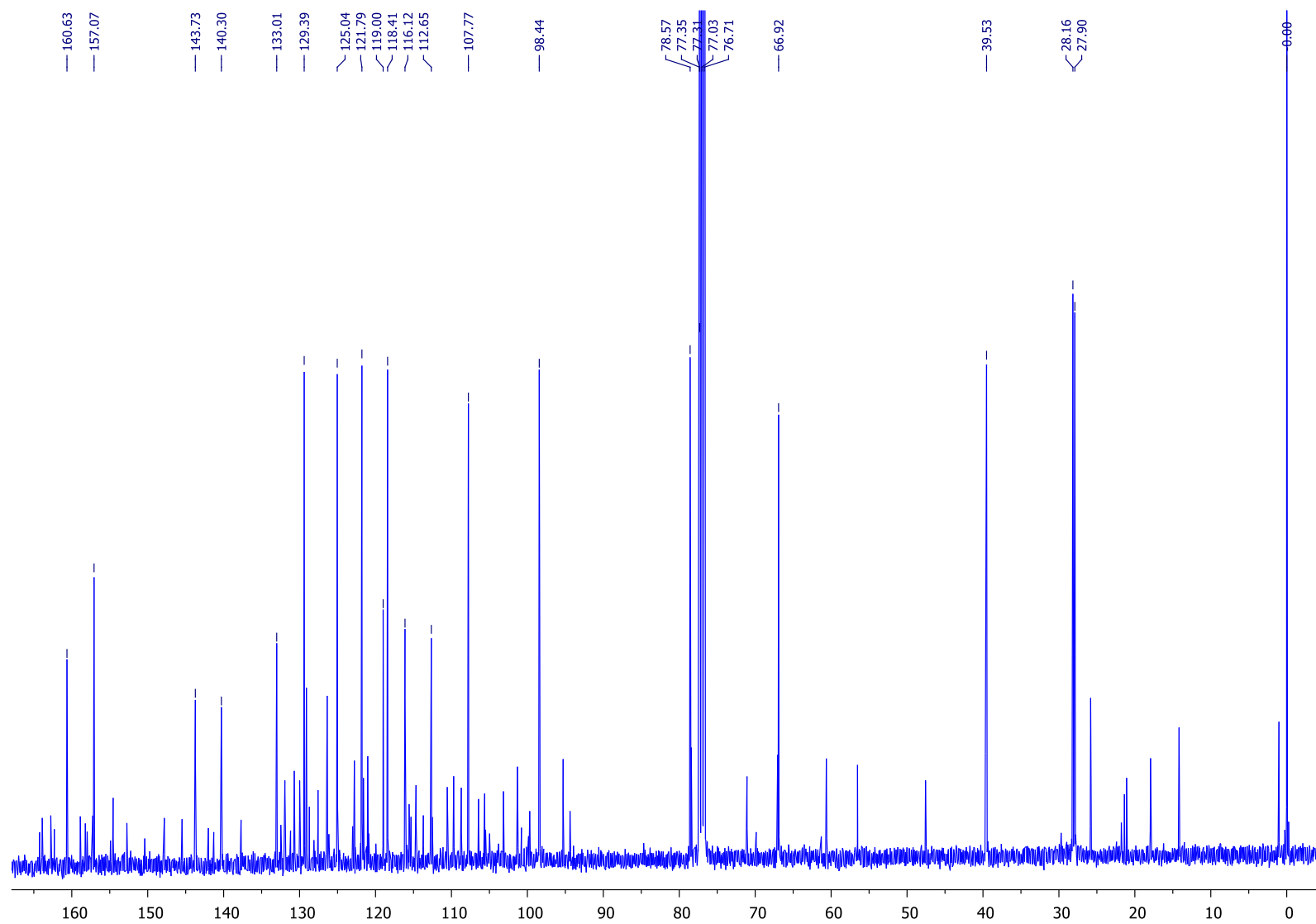
Annexe 43. Spectre NOESY de la sous-fraction F_{3.B.3}

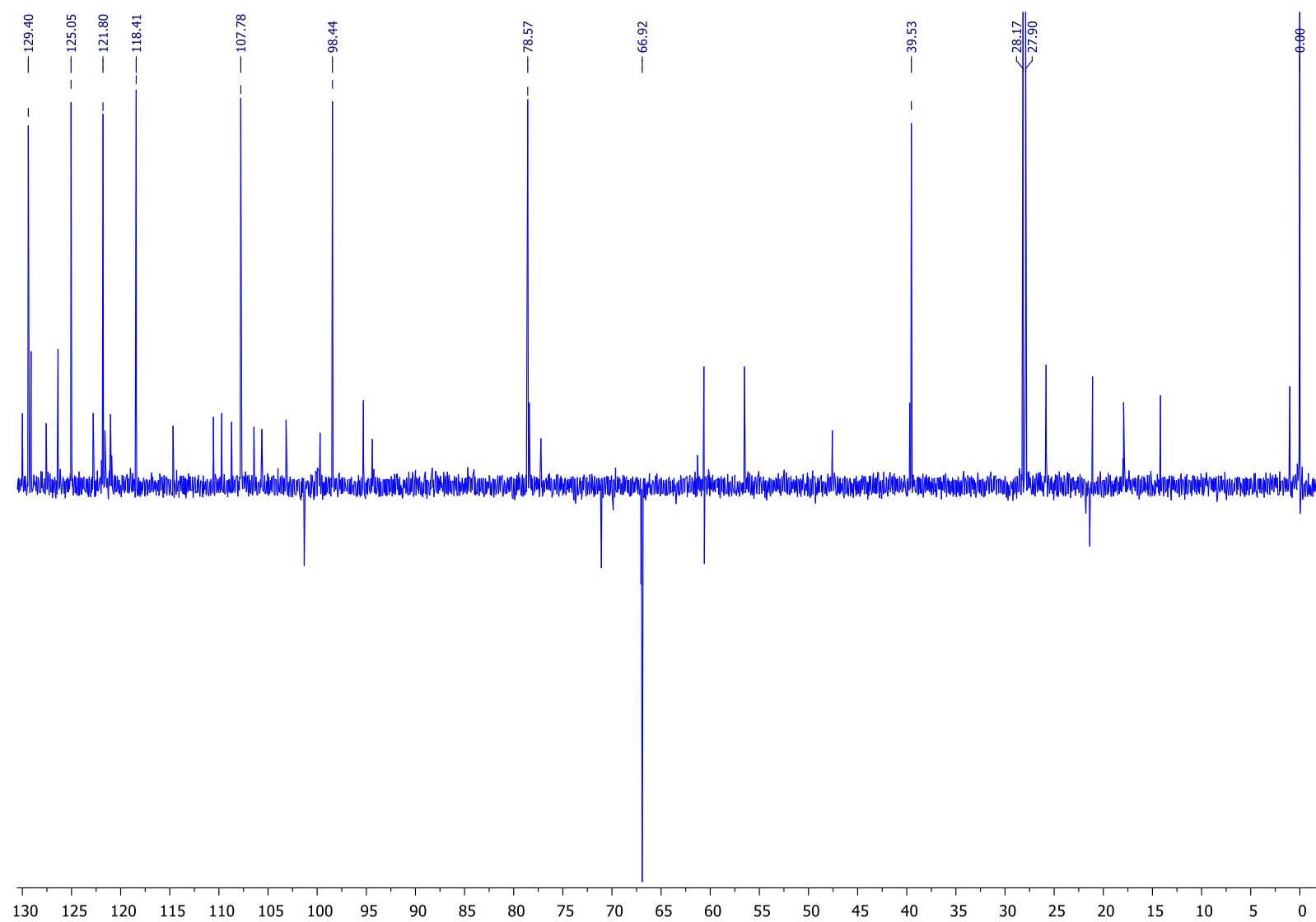
Annexe 44.

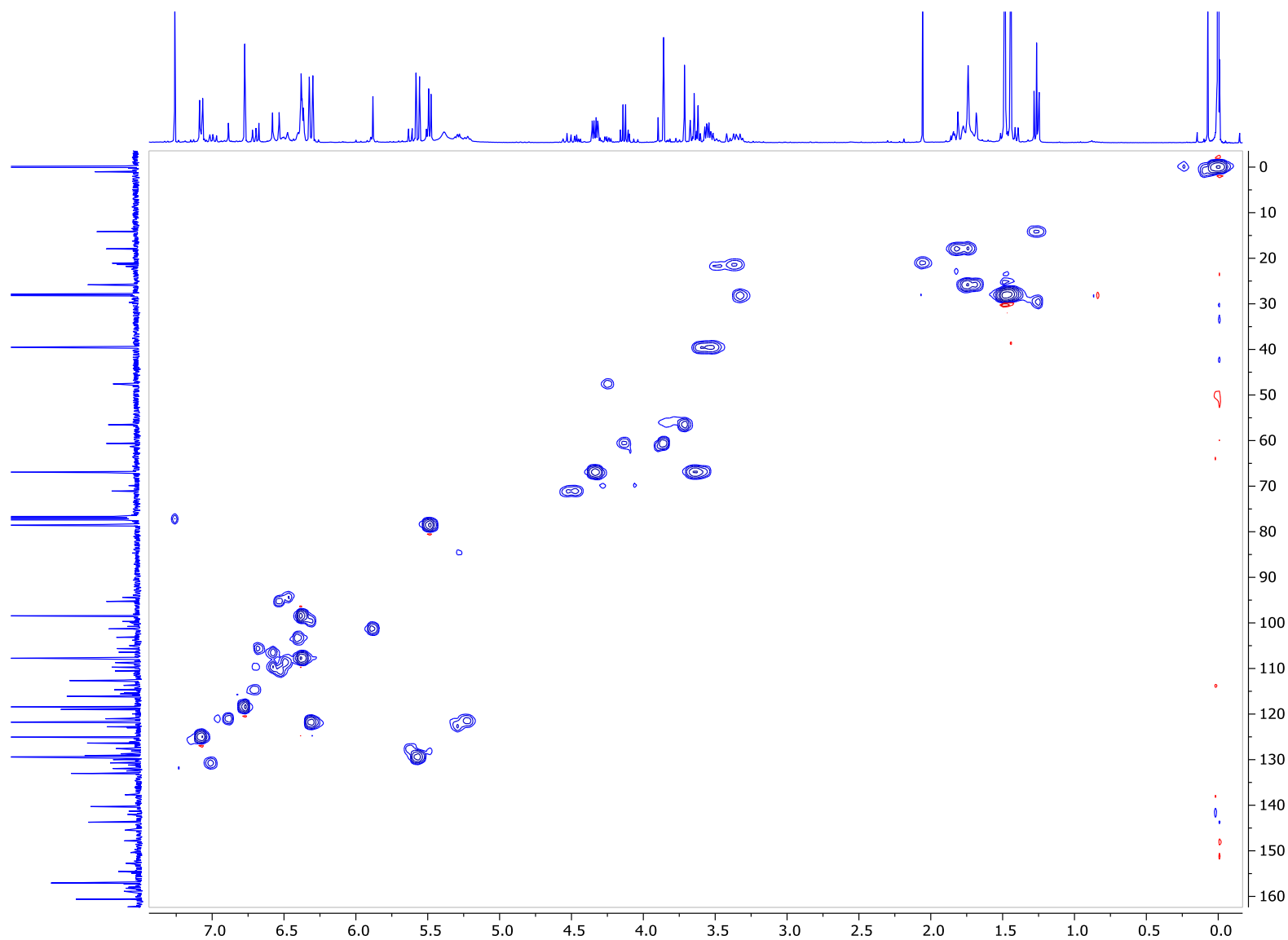
Spectre SM/SM de la sous-fraction F_{3.B.3} et voies de clivages possible du 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptérocarpène

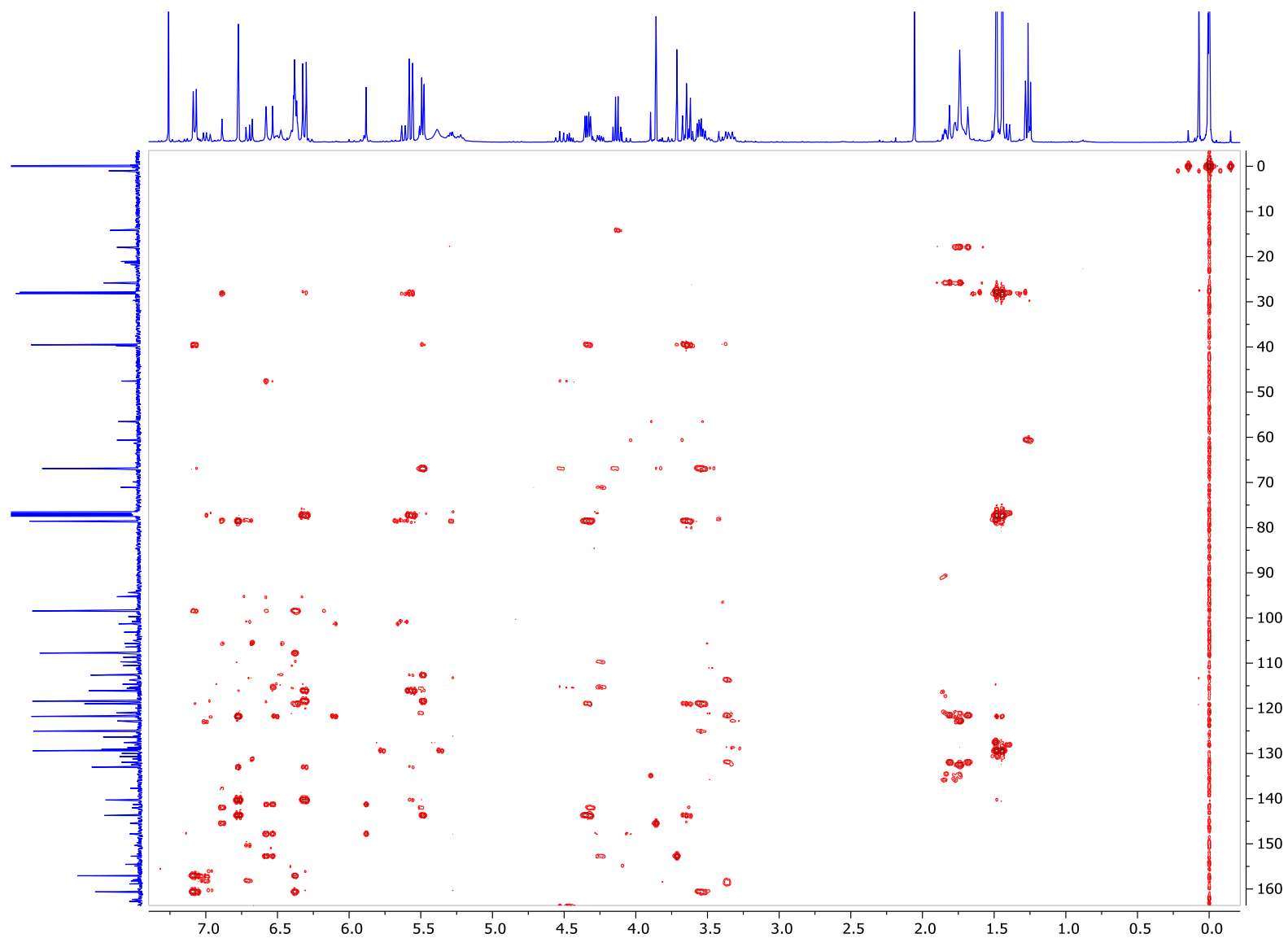


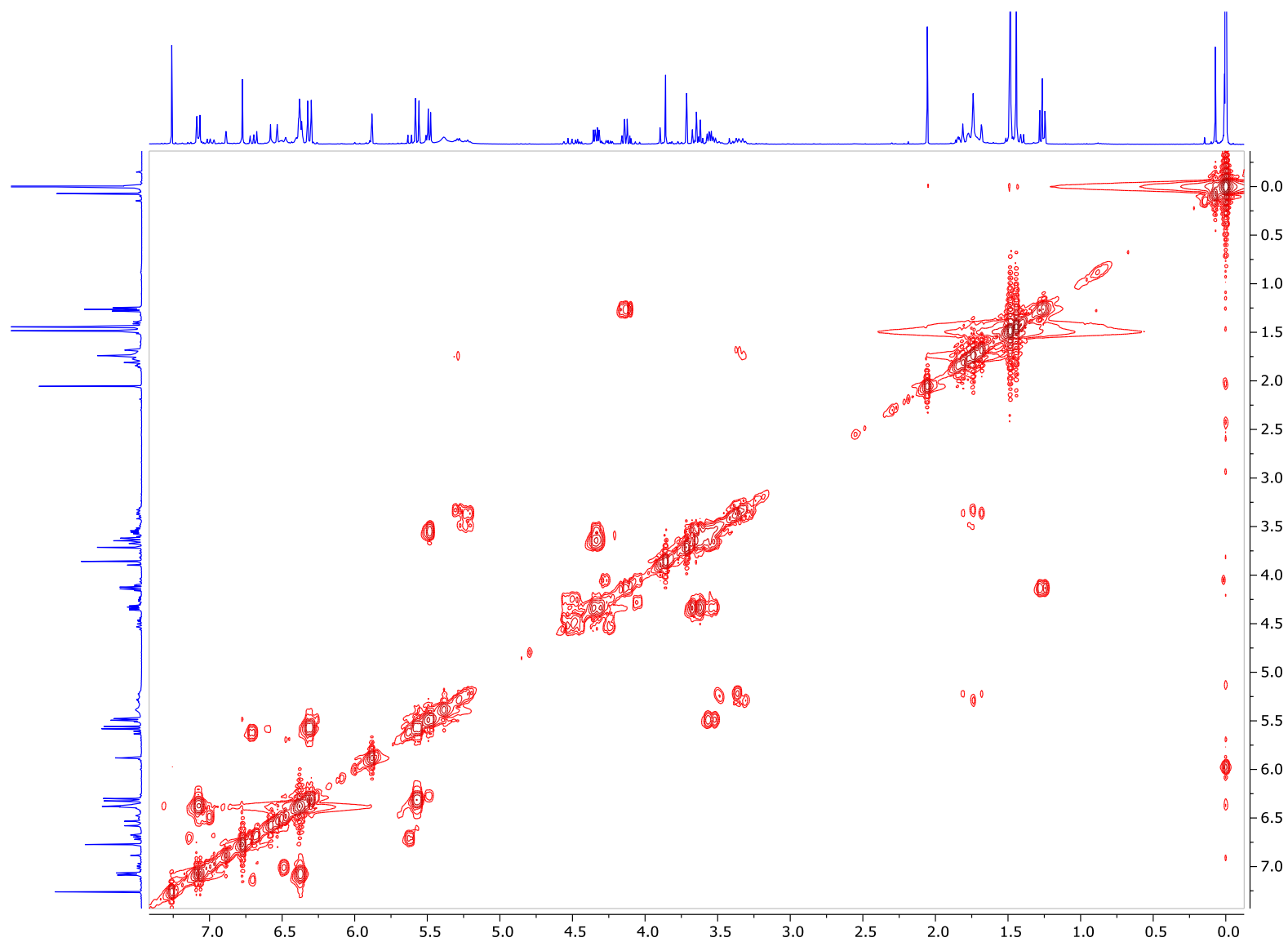
Annexe 45. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction F_{3.B.7}

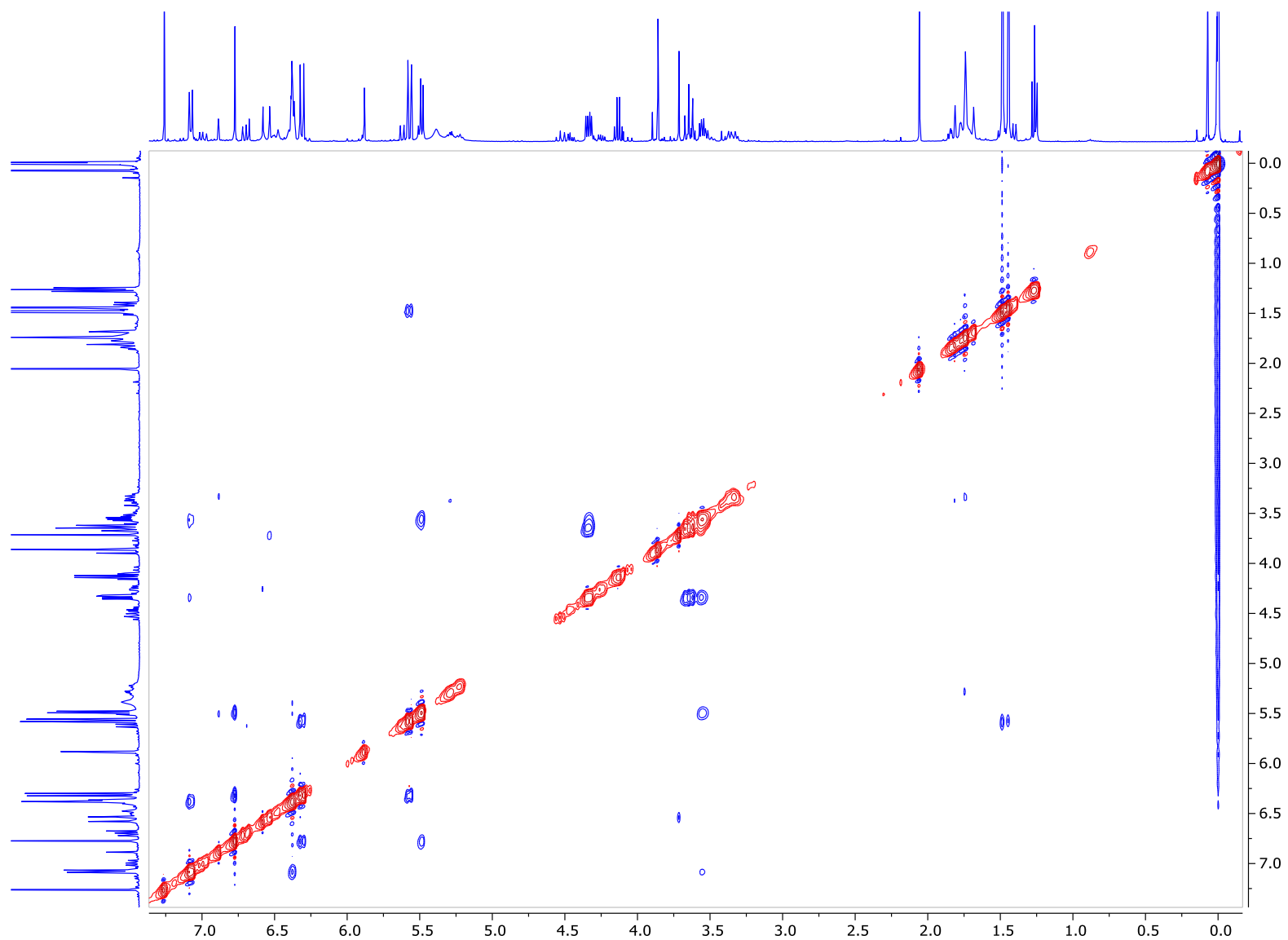
Annexe 46. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction F_{3,B.7}

Annexe 47. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F_{3.B.7}

Annexe 48. Spectre HSQC de la sous-fraction F_{3.B.7}

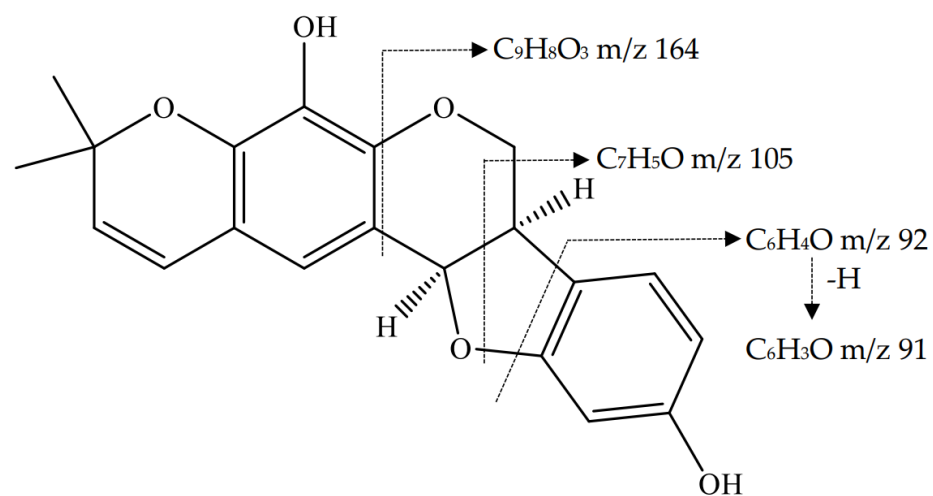
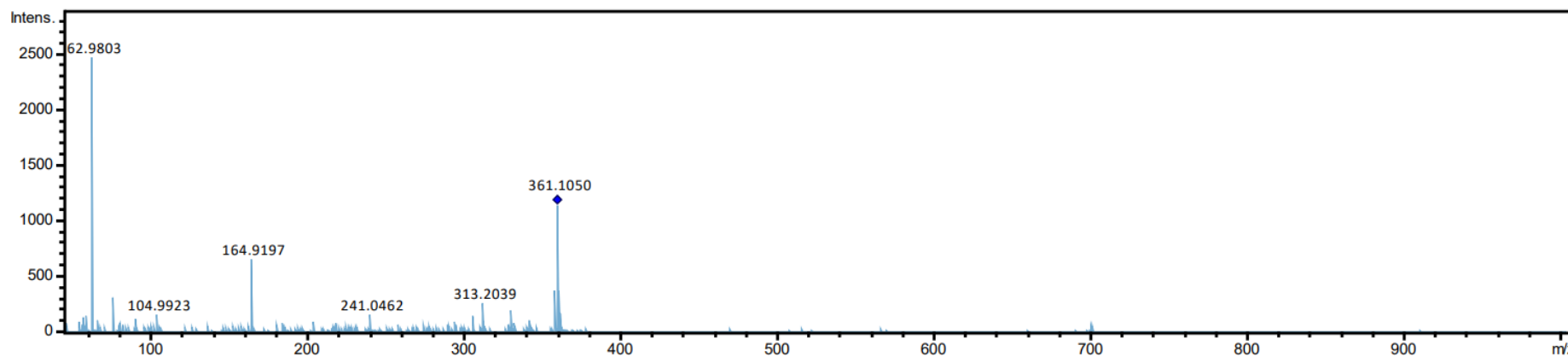
Annexe 49 Spectre HMBC de la sous-fraction F_{3.B.7}

Annexe 50. Spectre COSY de la sous-fraction F_{3.B.7}

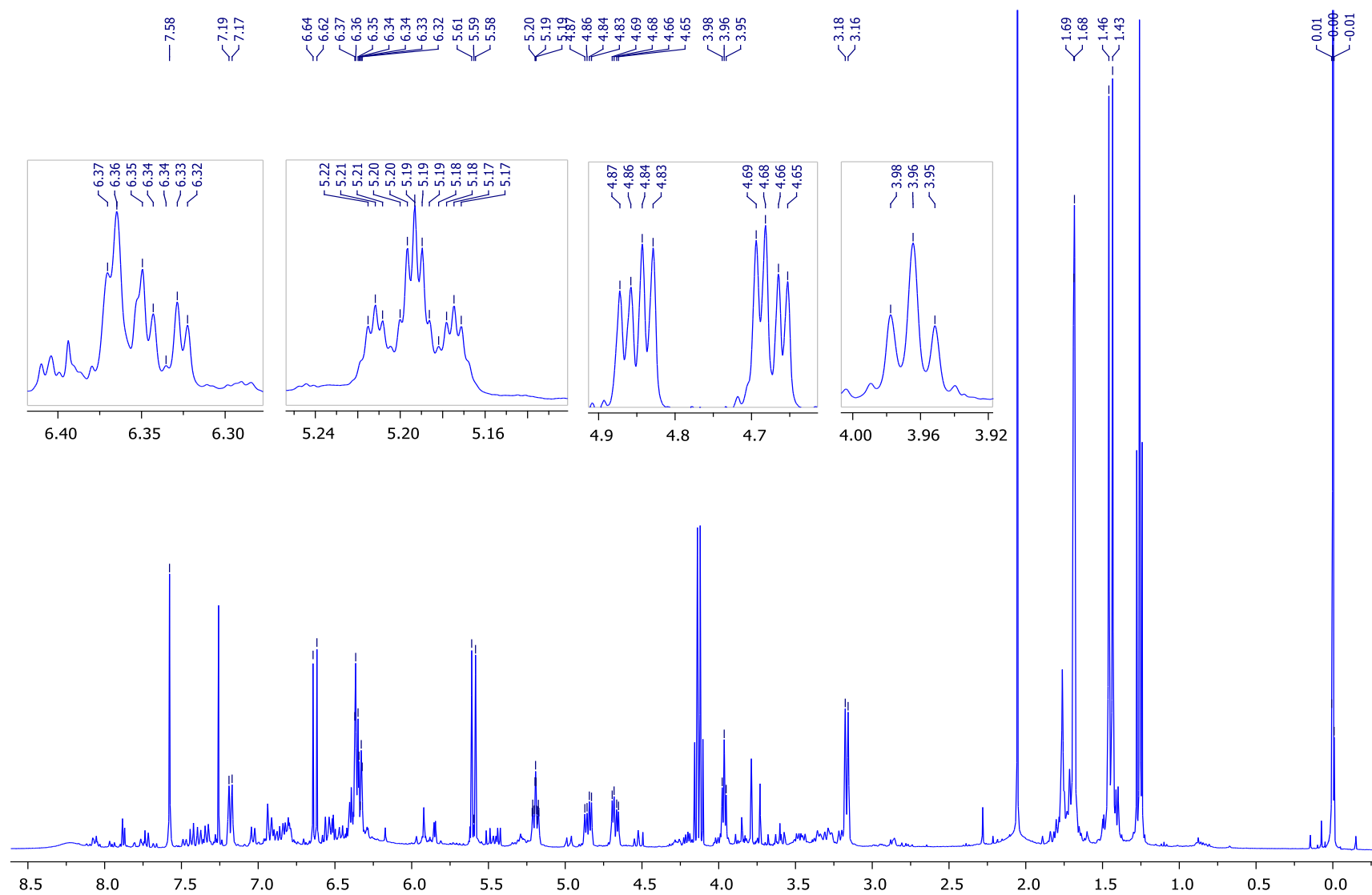
Annexe 51. Spectre NOESY de la sous-fraction F_{3.B.7}

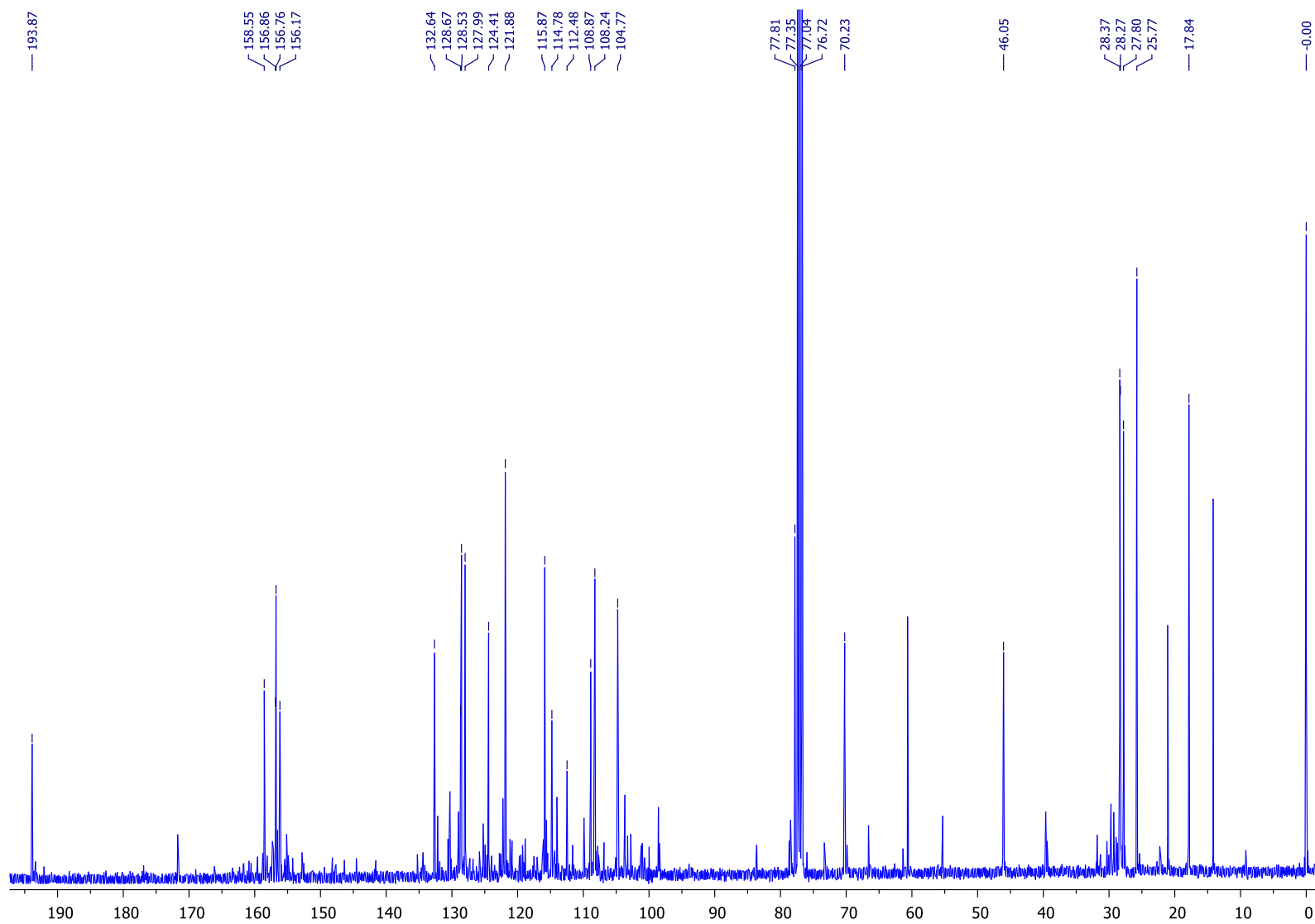
Annexe 52.

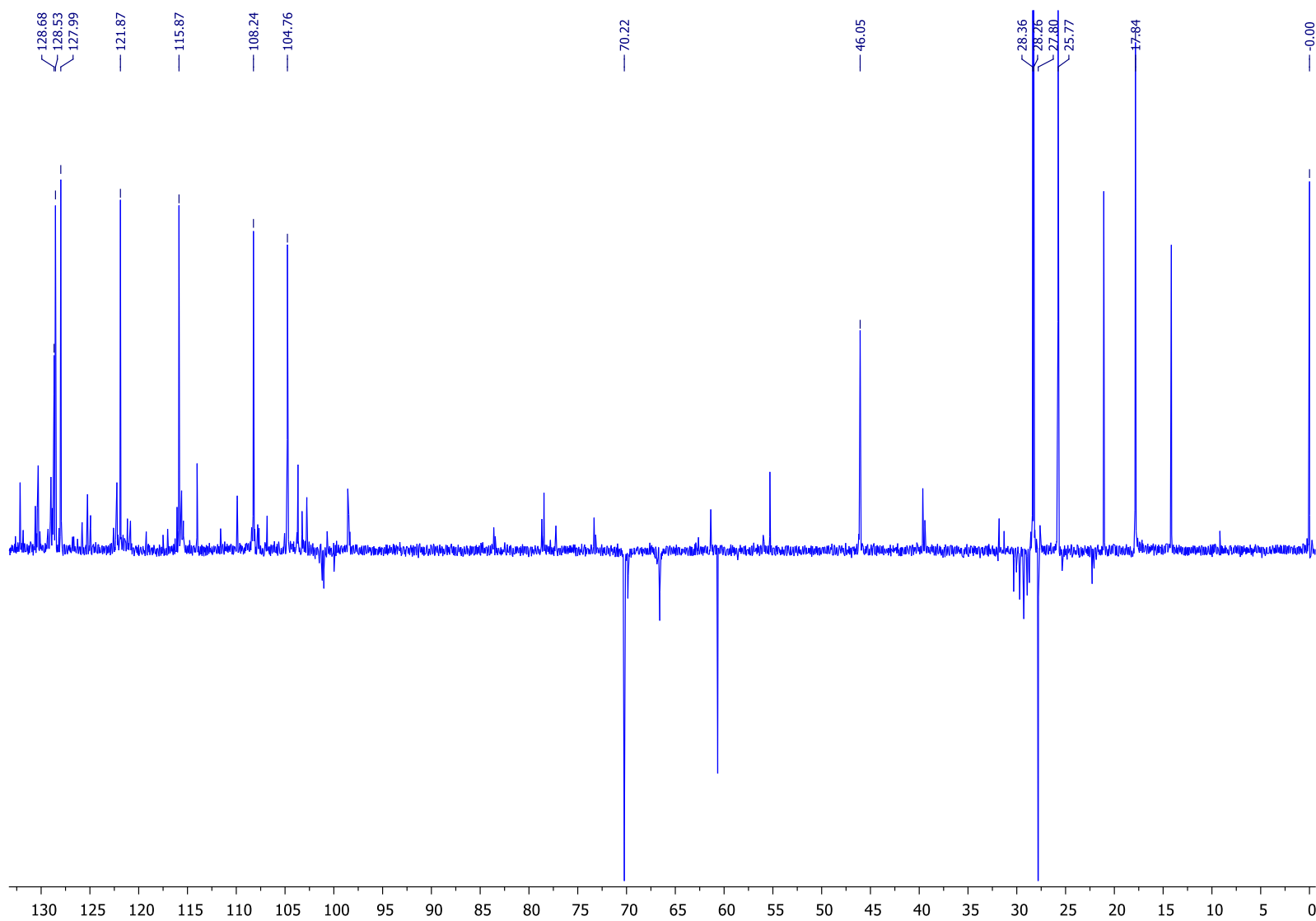
Spectre SM/SM de la sous-fraction F_{3.B.7} et voies de clivages possible du du 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptérocarpane

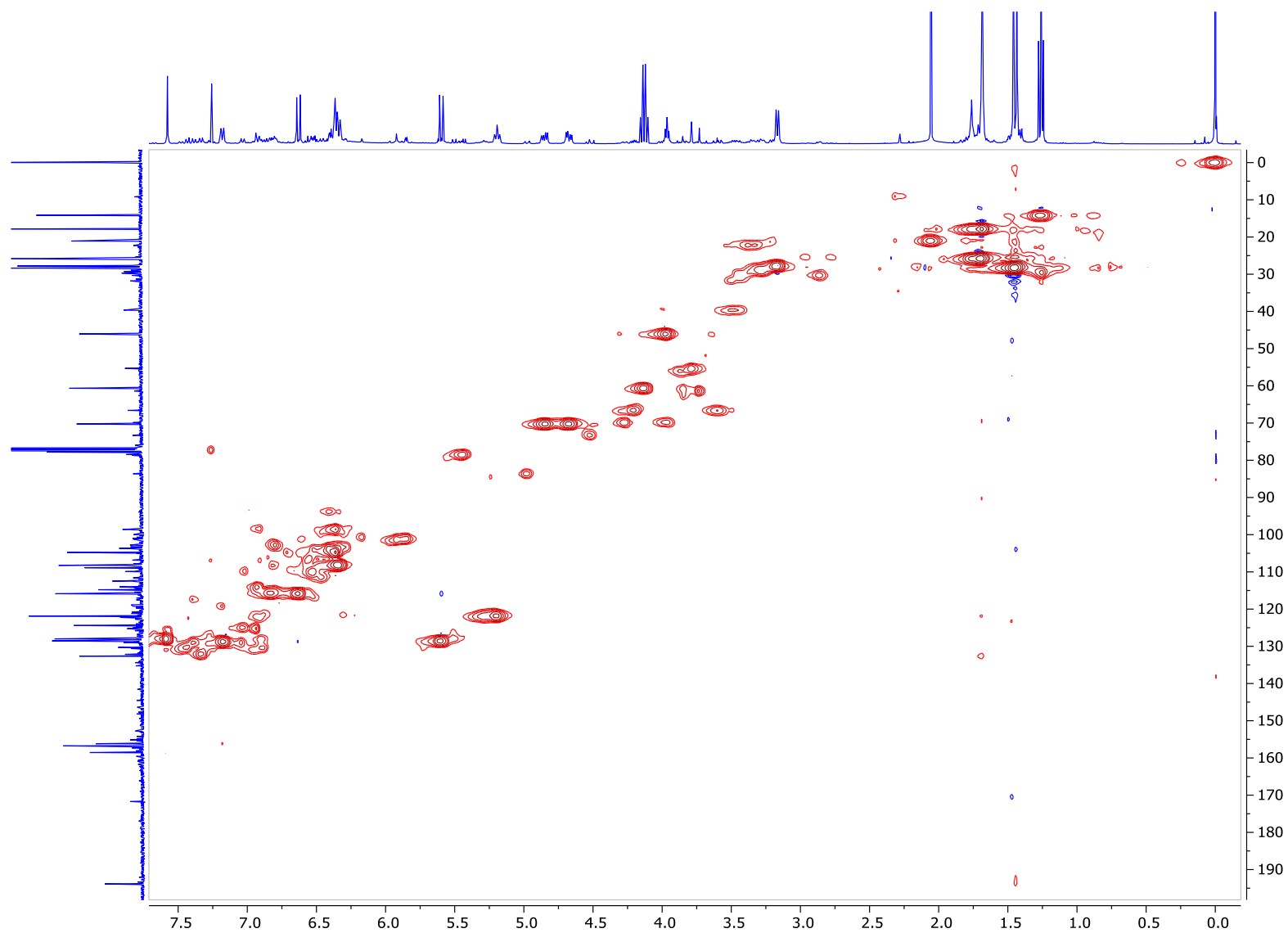


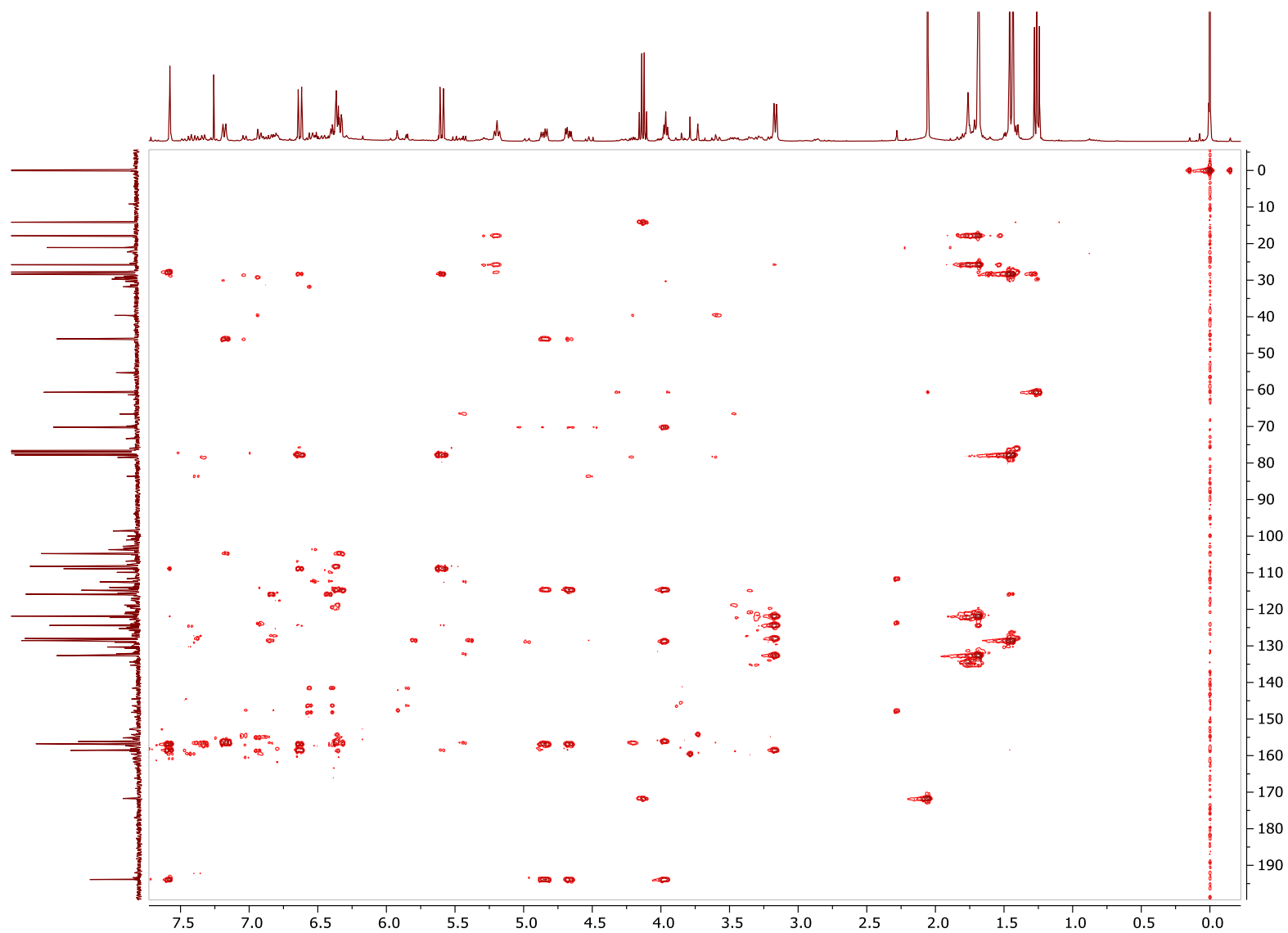
Annexe 53. Spectre RMN ^1H de la sous-fraction $\text{F}_{3.9,6}$

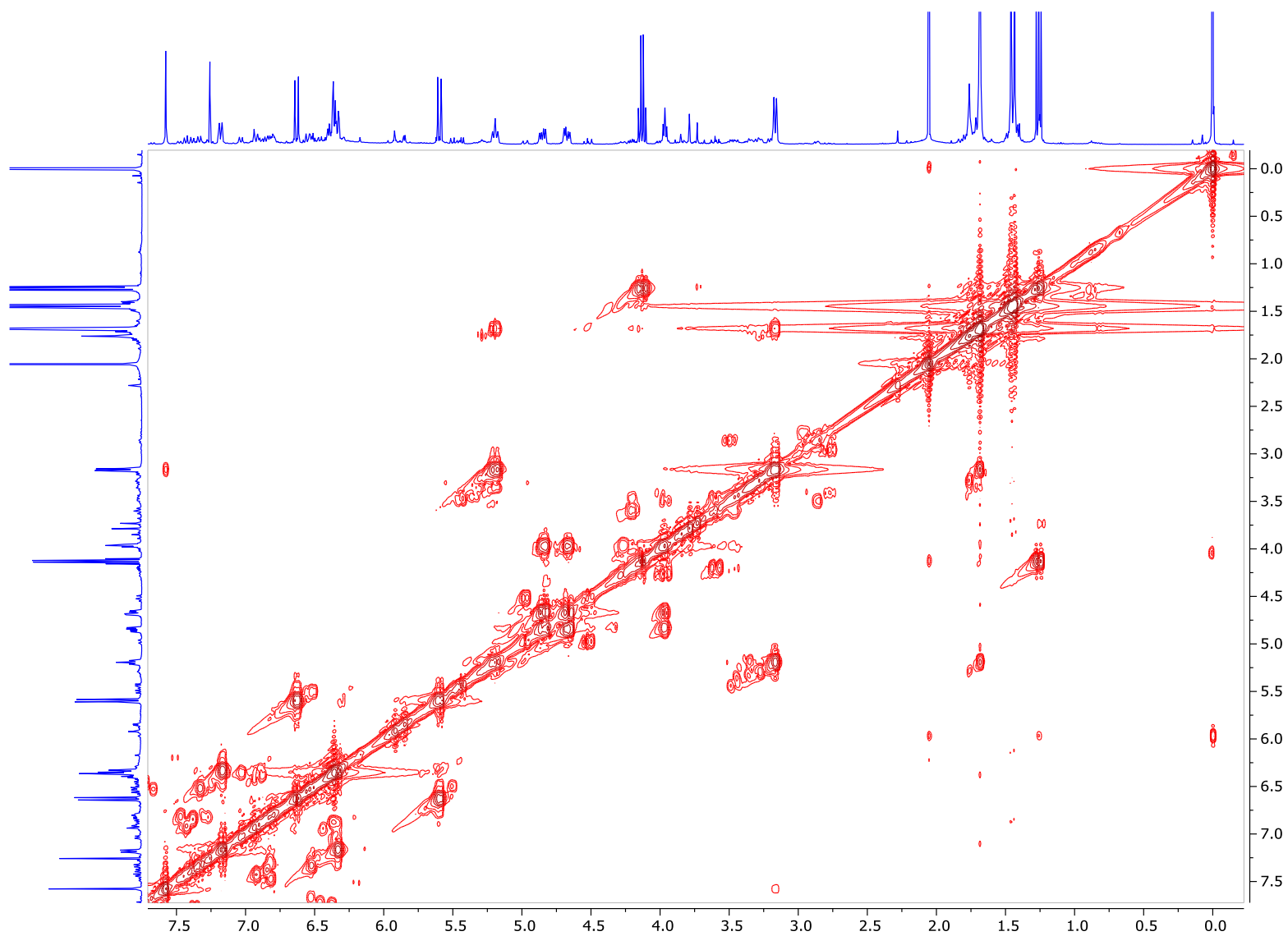


Annexe 54. Spectre RMN ^{13}C de la sous-fraction $\text{F}_{3.9.6}$ 

Annexe 55. Spectre DEPT 135 de la sous-fraction F_{3.9.6}

Annexe 56. Spectre HSQC de la sous-fraction F_{3.9,6}

Annexe 57. Spectre HMBC de la sous-fraction F_{3.9.6}

Annexe 58. Spectre COSY de la sous-fraction F_{3.9,6}

RESUMES

RESUME VULGARISE

L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer la composition chimique d'extraits de plantes de Corse encore peu ou pas étudiées et susceptibles d'avoir des activités biologiques valorisables. Cette étude a été menée en mettant en œuvre la méthodologie d'analyse des mélanges complexes par RMN ^{13}C , développée depuis une trentaine d'années par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'UMR CNRS 6134 Sciences pour l'Environnement de l'université de Corse.

Dans une première partie, nous avons étudié la composition chimique d'extraits de feuilles et de baies de houx commun (*Ilex aquifolium* L.). L'analyse par RMN ^{13}C (CPG(Ir) et CPG-SM dans certains cas) des extraits bruts ainsi que des différentes fractions issues de ces extraits a permis d'identifier des composés appartenant à différentes familles chimiques : onze triterpènes, cinq dérivés phénoliques, six monosaccharides ainsi que quatre lactones jamais répertoriées dans des extraits de houx commun. Parmi les composés identifiés, nous avons quantifié, dans l'extrait brut au dichlorométhane, l'acide ursolique et l'acide oléanolique, deux acides triterpéniques connus pour leurs propriétés thérapeutiques, via une méthode rapide par RMN ^1H que nous avons mise au point, validée et appliquée. Nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal » de l'université de Corse, des tests antimicrobiens. Les deux acides triterpéniques quantifiés précédemment ont montré une activité antimicrobienne comparable à celle de l'antibiotique de référence utilisé dans notre étude (chloramphénicol).

Dans une seconde partie, nous avons étudié la composition chimique d'extraits de fleurs et de racine de *Calicotome villosa* (Poir.) Link. Les extraits bruts obtenus ainsi que les fractions qui en sont issues ont été analysés par RMN 1D (RMN 2D et SM/SM dans certains cas) permettant l'identification de : deux stérols, dix flavonoïdes, cinq dérivés glucosylés de flavonoïdes, quatre phénylpropanoïdes, un polyphénol et cinq ptérocarpanes. Par ailleurs, trois nouveaux composés ont été identifiés dans l'extrait au méthanol de racine, il s'agit de deux ptérocarpanes et un dérivé benzofuranique. Enfin, sept de ces composés ont inhibé la croissance de bactéries à Gram positif, parmi lesquels figurent les deux nouveaux ptérocarpanes avec une activité antibactérienne comparable à celle du chloramphénicol.

Mots-clefs : *Ilex aquifolium* L., *Calicotome villosa* (Poir.) Link, extraits aux solvants, identification par RMN ^{13}C , quantification par RMN ^1H .

RIASSUNTU

U scopu di stu travagliu di tesi era di determinà a cumpusizione chimica di l'estratti di piante di Corsica ancora pocu o micca studiati è capaci d'avè un'attività biologica chì pò esse valutata. Stu studiu hè statu compiu mettendu in ballu a metodulugia d'analisi per ^{13}C RMN di mischii cumplessi, sviluppata dipoi una trentina d'anni da a squadra "Chimica è Biomassa" di l'UMR CNRS 6134 Scienze per l'Ambiente di l'Università di Corsica.

In una prima parte, avemu studiatu a cumpusizione chimica di l'estratti di foglie è di frutti di u caracutu cumunu (*Ilex aquifolium* L.). L'analisi per ^{13}C RMN (incu GC(Ir) è GC-MS in certi casi) di i primi estratti è di e diverse frazzioni di questi estratti hà permessu di identificà composti di diverse famiglie chimiche : undici triterpeni, cinque derivati fenolici, sei monosaccaridi è quattru lattone mai registrati in estratti di caracuti cumuni. Trà i cumposti identificati, avemu quantificatu, in u primu estrattu di diclorometanu, l'acidu ursolicu è l'acidu oleanolicu, dui acidi triterpenici cunnisciuti per e so pruprietà terapeutiche, via un metudu rapidu per ^1H RMN chì avemu sviluppatu, validatu è applicatu. In cullaburazione cù a squadra «Biochimica è Biulugia Molecularia di e Piante» di l'Università di Corsica, avemu fattu prove antimicrobiane. I dui acidi triterpenici quantificati prima dimustravanu un'attività antimicrobiana paragonabile à quella di l'antibioticu di riferimentu in u nostru studiu (chloramfenicolu).

In una siconda parte, avemu studiatu a cumpusizione chimica di l'estratti di fiori è di radiche di *Calicotome villosa* (Poir.) Link. I primi estratti ottenuti è e frazioni chì ne risultanu sò stati studiati via l'analisi 1D NMR (2D NMR è MS/MS in certi casi) chì ha permessu l'identificazione di dui steroli, dece flavonoidi, cinque derivati glucosilati di flavonoidi, quattru fenilpropanoidi, un polifenolu è cinque pterocarpani. Inoltre, trè novi cumposti sò stati identificati in l'estrattu di metanolu di a radica : questi sò dui pterocarpani è un derivatu di benzofuranu. Infine, sette di sti cumposti hannu inibitu a crescita di bacterie Gram-positive, trà i quali sò i dui novi pterocarpani chì sviluppanu un'attività antimicrobiana paragonabile à quella di u chloramfenicolu.

Parolle puntelle: *Ilex aquifolium* L., *Calicotome villosa* (Poir.) Link, estratti di solventi, identificazione per ^{13}C RMN, quantificazione per ^1H RMN.

Abstract : Chemical composition of Corsican *Ilex aquifolium* Linné and *Calicotome villosa* (Poirét) Link extracts using carbon-13 NMR

The aim of this work was to determine chemical composition of wild growing corsican understudied plant species, with potential biological activities. This study was realized using the computerized NMR method developed over the past thirty years by the University of Corsica “Chimie et Biomasse” group, UMR CNRS “Sciences Pour l’environnement”. Identified secondary metabolites were then undertaken to evaluate their antimicrobial properties.

As part of this study, we selected on the first place commun holly (*Ilex aquifolium* L.). After two successive column chromatography, hexane and dichloromethane leaves crude extracts and all chromatography fractions were analyzed by ^{13}C NMR (GC(RI) and GC-MS sometimes) to allow the identification of eleven triterpens and α - and β -amyrin esters. Among identified compounds, ursolic acid and oleanolic acid were also quantified by ^1H NMR in the dichloromethane crude extract using a reliable method developed and validated (accuracy, linearity precision of measurements). Ursolic acid accounted for 55.3% of the extract, followed by oleanolic acid, 20.8%. Evaluation of previous identified compounds antimicrobial activities has been performed in collaboration with « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal » group (University of Corsica). Triterpen acids and chloramphenicol (reference antibiotic) displayed similar antibacterial activities against three Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus cereus* (MIC = 4 and 8 mg.L^{-1} vs. 2 and 4 mg.L^{-1}). Moreover, dichloromethane and dichloromethane/ethyl acetate (50/50, v/v) berries extracts were submitted to successive column chromatography. Crude extracts and chromatography fractions ^{13}C NMR spectra revealed presence of nine triterpens previously identified, five phenolics derivatives, six monosaccharides and four lactones (menisdaurilide, aquilegiolide, dasycarponilide and 7-epi-griffonilide) were first time identified in berries holly extracts.

On the second place, we determined chemical compositions of *Calicotome villosa* (Poir.) Link flowers and root extracts. ^{13}C NMR analysis of dichloromethane and ethyl acetate flowers extracts and their chromatography fractions, allowed the identification of three flavonoids, five glycosyl flavonoids and four phenylpropanoids. We also studied chemical composition of a methanol root extract which has never been submitted to any chemical composition study. After successive column chromatography, eighteen compounds were identified by ^{13}C NMR including sterols, flavonoids, a polyphenol and pterocarpan. Among identified compounds, two new pterocarpan (4,9-dihydroxy-3-methoxy-2-dimethylallylpterocarpan and 4,9-dihydroxy-3',3'-dimethyl-2,3-pyranopterocarpan) and a new dihydrobenzofuran derivative were identified using a combination of 1D, 2D NMR and MS/MS. The MIC was measured to evaluate the antibacterial activities of previous identified compounds. Seven of them displayed antibacterial activities against Gram-positive bacteria. New pterocarpan and chloramphenicol displayed similar antibacterial activities against *S. aureus* et *B. cereus* (MIC = 8 and 16 mg.L^{-1} vs. 2 and 4 mg.L^{-1}).

Mots-clefs : *Ilex aquifolium* L., *Calicotome villosa* (Poir.) Link, solvents extracts, ^{13}C NMR identification, ^1H NMR quantification.

RESUME

L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer la composition chimique d'extraits de plantes de Corse encore peu ou pas étudiées et susceptibles d'avoir des activités biologiques valorisables. Cette étude a été menée en mettant en œuvre la méthodologie d'analyse des mélanges complexes par RMN ^{13}C , développée depuis une trentaine d'années par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'UMR CNRS 6134 Sciences pour l'Environnement de l'université de Corse.

Dans une première partie, nous avons étudié la composition chimique d'extraits de houx commun (*Ilex aquifolium* L.). Deux extraits de feuilles (obtenus à l'hexane et au dichlorométhane) ont chacun subi deux fractionnements successifs par chromatographie sur colonne ouverte de silice. L'analyse par RMN ^{13}C (CPG(Ir) et CPG-SM également dans certains cas) des extraits bruts et des fractions de chromatographie a permis l'identification de onze triterpènes dont l' α -amyrine et la β -amyrine et certains de leurs esters. Parallèlement, deux acides triterpéniques d'intérêt (acide ursolique et acide oléanolique) ont été quantifiés par RMN ^1H au sein de l'extrait brut au dichlorométhane via une méthode rapide mise au point et validée (justesse, linéarité, précision des mesures). Ces deux composés représentent respectivement 55,3% et 20,8% de l'extrait. Nous avons également réalisé, en collaboration avec l'équipe « Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal » de l'université de Corse, des tests antimicrobiens sur les extraits et certaines fractions de chromatographie. Les deux acides triterpéniques précédemment cités ont montré une activité antimicrobienne comparable à celle du chloramphénicol (antibiotique de référence) vis-à-vis de trois bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus cereus* (CMI = 4 et 8 mg.L $^{-1}$ vs. 2 et 4 mg.L $^{-1}$). Par ailleurs, nous avons préparé des extraits de baies de houx en utilisant différents solvants : hexane, dichlorométhane, dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50, v/v). Les deux derniers extraits (dichlorométhane et dichlorométhane/acétate d'éthyle) ont subi des fractionnements successifs et l'étude des spectres RMN ^{13}C des extraits bruts et des fractions de chromatographie a permis d'identifier neuf triterpènes (précédemment identifiés), cinq dérivés phénoliques, six monosaccharides ainsi que quatre lactones (la ménisdaurilide, l'aquilégolide, la 7-épi-griffonilide et la dasycarponilide) non encore répertoriées dans le houx commun.

Dans une seconde partie, nous avons étudié la composition chimique d'extraits de fleurs et de racine de *Calicotome villosa* (Poir.) Link. Les extraits de fleurs obtenus au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle ont été soumis à des chromatographies successives. L'analyse par RMN ^{13}C des extraits bruts et des fractions de chromatographie a permis l'identification de trois flavonoïdes, cinq dérivés glucosylés de flavonoïdes et quatre phénylpropanoïdes. Dans cette partie, nous nous sommes également intéressés à la composition chimique d'un extrait méthanolique de racine de *C. villosa* qui n'a fait l'objet d'aucune étude de ce type au préalable. Cet extrait a été soumis à plusieurs fractionnements successifs et dix-huit composés, notamment des stérols, des flavonoïdes, un polyphénol et des ptéocarpanes ont été identifiés par RMN ^{13}C . Parmi ceux-ci, deux nouveaux ptéocarpanes (le 4,9-dihydroxy-3-méthoxy-2-diméthylallylptéocarpane et le 4,9-dihydroxy-3',3'-diméthyl-2,3-pyranoptéocarpane) et un nouveau dérivé benzofuranique (le 2-(1-méthyléthényl)-5-hydroxy-6-carbométhoxy-2,3-dihydrobenzofurane), ont été identifiés en mettant en œuvre la RMN 1D, 2D et la SM/SM. Enfin, nous avons mesuré l'activité antimicrobienne de molécules sélectionnées préalablement identifiées et purifiées. Sept de ces composés ont inhibé la croissance de trois souches bactériennes à Gram positif. Certains composés dont les deux nouveaux ptéocarpanes, présentent une activité comparable à celle du chloramphénicol vis-à-vis des souches bactériennes *S. aureus* et *B. cereus* (CMI = 8 et 16 mg.L $^{-1}$ vs. 2 et 4 mg.L $^{-1}$).

Mots-clefs : *Ilex aquifolium* L., *Calicotome villosa* (Poir.) Link, extraits aux solvants, identification par RMN ^{13}C , quantification par RMN ^1H .