République Algérienne Démocratique Et Populaire

MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

en Chimie

Présenté par :

Mr. CHEBAKI Rachid

THEME

ETUDE DES COMPOSES CHIMIQUES DE SCROPHULARIA SAHARAE (*deserti* Coss.)

Devant la commission d'examen :

➢ *A. DIBI*	*Prof, Université de Batna*	*Président*
➢ *M. BENKHALED*	*Prof, Université de Batna*	*Rapporteur*
➢ *F. BENAYACHE*	*Prof, Université de Constantine*	*Examinatrice*
➢ *K. LAAMARA*	*Prof, Centre Universitaire d'Oum El Bouaghi*	*Examinateur*
➢ *M. LAABASSI*	*Prof, Université de Batna*	*Examinateur*

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

ETUDE DES COMPOSES CHIMIQUES DE SCROPHULARIA SAHARAE Batt. (*deserti* Coss.)

MEMOIRE DE MAGISTER

Présentée à la

Faculté des Sciences de l'Université de Batna

Par

Mr. CHEBAKI Rachid

Jury

Prof, A. DIBI, Université de Batna, Président

prof, M. BENKHALED, Université de Batna, Rapporteur

Prof, F. BENAYACHE, Université de Constantine, Examinatrice

Prof, K. LAAMARA, Centre Universitaire d'Oum El Bouaghi, Examinateur

Prof, M. LAABASSI, Université de Batna, Examinateur

En hommage à mon père
A ma mère et à son courage
A mes frères et ma sœur naama
A tous les membres de ma famille

REMERCIEMENTS

Ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Synthèse Organique et Phytochimie du Département de chimie, de la faculté des Sciences de l'Université de Batna sous la direction de Monsieur **Mohammed BENKHALED**.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de travail, Monsieur **Mohammed BENKHALED**, Professeur à l'Université de Batna, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses orientations, ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et surtout sa confiance tout au long de ce travail. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il a consentis sans cesse durant la rédaction de ce mémoire, sa disponibilité et son dynamisme pour la recherche des produits naturels et qui ont été pour moi une source de motivation.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Ammar DIBI**, de l'Université de Batna, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements à Madame le Professeur **Fadila BENAYACHE**, de l'Université de Constantine, Monsieur le Professeur **Kaddour LAAMARA**, de l'Université d'Oum El Bouaghi et Monsieur le Professeur **LAABASSI Mohammed**, de l'Université de Batna, pour avoir aimablement accepté de juger ce modeste travail.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Hamada HABA et Hassina HARKAT pour leur disponibilité, leur gentillesse ainsi que leurs conseils tout le long de mon travail de mémoire.

Je tiens également à remercier le Professeur Tahar BENDAIKHA, de l'Université de Batna, pour la réalisation des spectres infra-rouge.

Je remercie également le Docteur Georges MASSIOT, Directeur du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour son aide inestimable. Je remercie le docteur Catherine LAVAUD, Professeur à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, pour la réalisation des spectres RMN, Christophe Long, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour la réalisation des spectres de masse.

Un merci collectif à tous les membres du Laboratoire de Synthèse Organique et Phytochimie, et de Chimie Analytique de l'Université de Batna, en particulier Younes, Yacine et Lynda.

Je remercie mes collègues, professionnels ou non, pour leurs encouragements quant à la réalisation de ce mémoire.

Je ne saurais oublier toute ma famille, particulièrement mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans cette longue et pénible épreuve que représente ce mémoire et mes frères Mohammed, Karim, Walid et Sofiane.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

°C	Degré Celsius
δ	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde
(1), (**2**), (**3**)….	Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature
1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
A, **B**, **C**…	Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude
AcOEt	Acétate d'éthyle
APG	Angiosperm Phylogeny Group
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	Chloroforme Duteré
$CHCl_3$	Chloroforme
Cinn	Cinnamoyle
cm	centimètre
COSY	Spectroscopie de corrélation
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer
épi	épimère
ESI	ElectroSpray Ionization
FAB	Fast Atomic Bombardment
Fab I	Fatty acid biosynthesis I
Glc	Glucose
g	gramme
H_2O	Eau
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IR	Infra-Rouge

J	Constante de couplage (RMN)
m	multiplet
m/z	masse / charge électrique
n.d.	non détermine
Me	Méthyle
CD_3OD	Méthanol Duteré
MeOH	Méthanol
mg	milligramme
MHz	mégahertz
ml	millilitre
MS	Mass Spectrometry
nm	nanomètre
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p	Para
Ph	Phényle
ppm	Partie par million
rdt	Rendement
Rf	Retention Factor (CCM)
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser effect spectroscopy
RP-18	Reversed Phase Silica with C-18 functional groups
s	Singulet
sl	Singulet large
t	Triplet
TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultra-violet

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 11

1 TRAVAUX ANTERIEURS 14

1.1 DESCRIPTION BOTANIQUE 15

1.1.1 Introduction 15

1.1.2 Classification 15

1.1.3 Aspects botaniques et répartition géographique du genre *Scrophularia* 17

1.1.4 Caractéristiques botaniques de l'espèce *saharae* 18

1.2 PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DU GENRE SCROPHULARIA 19

1.2.1 Introduction 19

1.2.2 Utilisation en médecine traditionnelle 19

1.2.3 Activités biologiques 20

1.3 ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES 20

1.3.1 Sur le genre 20

1.3.2 Sur l'espèce 30

2 ETUDE DES IRIDOIDES 31

2.1 Structure des iridoïdes 32

2.2 Classification des iridoïdes 34

2.2.1 Iridoïdes simples 34

2.2.2 Glucosides d'iridoïdes 35

2.2.3 Séco-iridoïdes 36

2.2.4 Bisiridoïdes 37

2.3 Activités biologiques des iridoïdes 38

2.4 Biosynthèse des iridoïdes 40

3 SEPARATION DES COMPOSES ET DETERMINATION DE LEURS STRUCTURES 45

3.1 EXTRACTION 46

3.1.1 Racines 46

3.1.1.1 *Fractionnement de l'extrait chloroformique des racines et isolement des composés* **A - E** 47

3.1.2 Parties aériennes **49**

3.1.2.1 *Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes et isolement des composés* **F** *et* **G** **50**

3.2 Détermination de structures des composés A-E isolés de l'extrait chloroformique des racines **51**

3.2.1 Détermination de structure du composé **A** **51**

3.2.2 Détermination de structure du composé **B** **68**

3.2.3 Détermination de structure du composé **C** **78**

3.2.4 Détermination de structure du composé **D** **84**

3.2.5 Détermination de structure du composé **E** **96**

3.3 Détermination de structures des composés F et G isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes **105**

3.3.1 Détermination de structure du composé **F** **105**

3.3.2 Détermination de structure du composé **G** **112**

CONCLUSION **120**

BIBLIOGRAPHIE **124**

4 PARTIE EXPERIMENTALE **130**

4.1 Matériel et méthodes **131**

4.1.1 Méthodes chromatographiques analytiques **131**

4.1.1.1 *Chromatographie sur couche mince (CCM)* **131**

4.1.2 Méthodes chromatographiques préparatives **131**

4.1.2.2 *Chromatographie sur colonne ouverte (CC)* **131**

a. *Chromatographie d'adsorption* **131**

b. *Chromatographie d'exclusion* **131**

4.1.2.3 *Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC)* **131**

4.1.2.4 *Chromatographie préparative sur couche épaisse (C.C.E)* **132**

4.1.3 Méthodes physico-chimiques **132**

4.1.3.3 *Spectres ultraviolets (UV)* **132**

4.1.3.4 *Spectres de masse (MS)* **132**

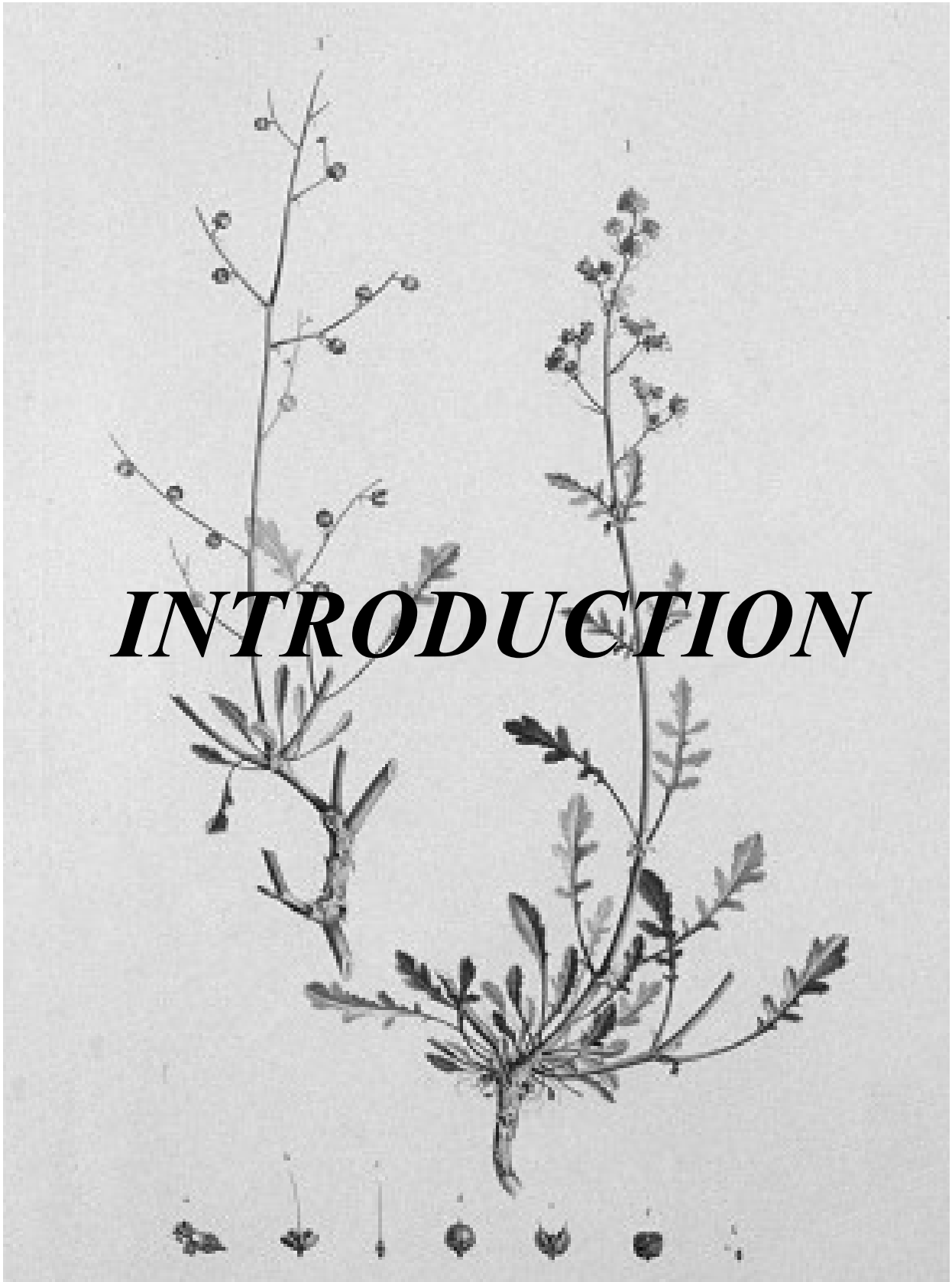
4.1.3.5 *Spectres infra-rouge (IR)* **132**

4.1.3.6 *Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)* **132**

4.2 EXTRACTION **132**

4.3 CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS **133**
4.3.1 RACINES **133**
4.3.2 PARTIES AERRIENNES **133**
4.4 SEPARATION ET PURIFICATION **133**
4.4.1 RACINES **133**
4.4.1.1 *Extrait chloroformique* **133**
a. *Etude du lot 22* **136**
b. *Etude du lot 25* **139**
c . *Etude du lot 29* **140**
4.4.2 PARTIE AERIENNE **142**
4.4.2.1 *Extrait méthanolique* **142**
a. Etude de lot 1 **144**
a.1 *Etude des lots 9 et 10* **145**
a.2 *Etude du lot 11* **147**
4.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés **150**
4.5.1 Composé **A** **150**
4.5.2 Composé **B** **152**
4.5.2 Composé **C** **154**
4.5.2 Composé **D** **155**
4.5.2 Composé **E** **157**
4.5.2 Composé **F** **158**
4.5.2 Composé **G** **159**
RESUME **161**
ملخص **163**

INTRODUCTION



Scrophularia sahara

NTRODUCTION

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne s'inspire encore largement de métabolites secondaires végétaux, à la recherche de principes actifs nouveaux. L'avènement du Taxol en est un exemple éclatant.

Dans certains pays d'Afrique noire, les plantes médicinales représentent l'unique source thérapeutique pour près de 90% de la population. Le savoir-faire des guérisseurs traditionnels, d'une valeur inestimable, constitue un point de départ pour l'investigation pharmacologique et phytochimique de ces médicaments naturels.

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale et dans la continuité de notre travail relatif à l'étude chimique systématique des plantes Scrophulariaceae sahariennes, nous avons entrepris l'investigation chimique de *Scrophularia saharae* Batt. (Scrophulariaceae), plante commune dans tout le Sahara septentrionnal.

Si la pharmacopée traditionnelle nord-africaine ne fait pas mention d'une éventuelle utilisation thérapeutique pour *Scrophularia saharae* (deserti Coss., non Del.), l'espèce *Sc. deserti* Del. poussant en Arabie Saoudite, est utilisée en médecine traditionnelle locale comme antipyrétique, hypoglycémiant, contre les troubles rénaux et l'inflammation de la bouche notamment. Une étude pharmacologique réalisée sur la dite espèce, a révélé que deux composés à squelette iridoïde isolés et caractérisés, présentent des activités anti-inflammatoires et antidiabétiques jugées intéressantes.

Notre intérêt porté à l'étude de *Scrophularia saharae* Batt. s'explique également par le fait que l'espèce en question n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique, au regard de la recherche bibliographique exhaustive réalisée.

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- Une première partie appelée travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques du genre *Scrophularia* ainsi qu'aux études chimiques antérieures réalisées sur le genre et l'espèce.
- Une seconde partie consacrée à une étude impliquant la structure, classification, activité biologique et biosynthèse des iridoïdes.
- Une troisième partie décrivant nos travaux personnels allant de la séparation à la détermination de structures des produits isolés.
- Une quatrième partie constituant la partie expérimentale.
- En dernier, une conclusion générale résumant les résultats obtenus.

Chapitre 1

Travaux antérieurs

1.1 DESCRIPTION BOTANIQUE

1.1.1 Introduction

La grande famille des Scrophulariaceae comprend près de deux cents genres, dont le genre *Scrophularia*, et environ trois milles espèces répandues dans les milieux les plus variés des régions tempérées ou froides des deux hémisphères [1,2].

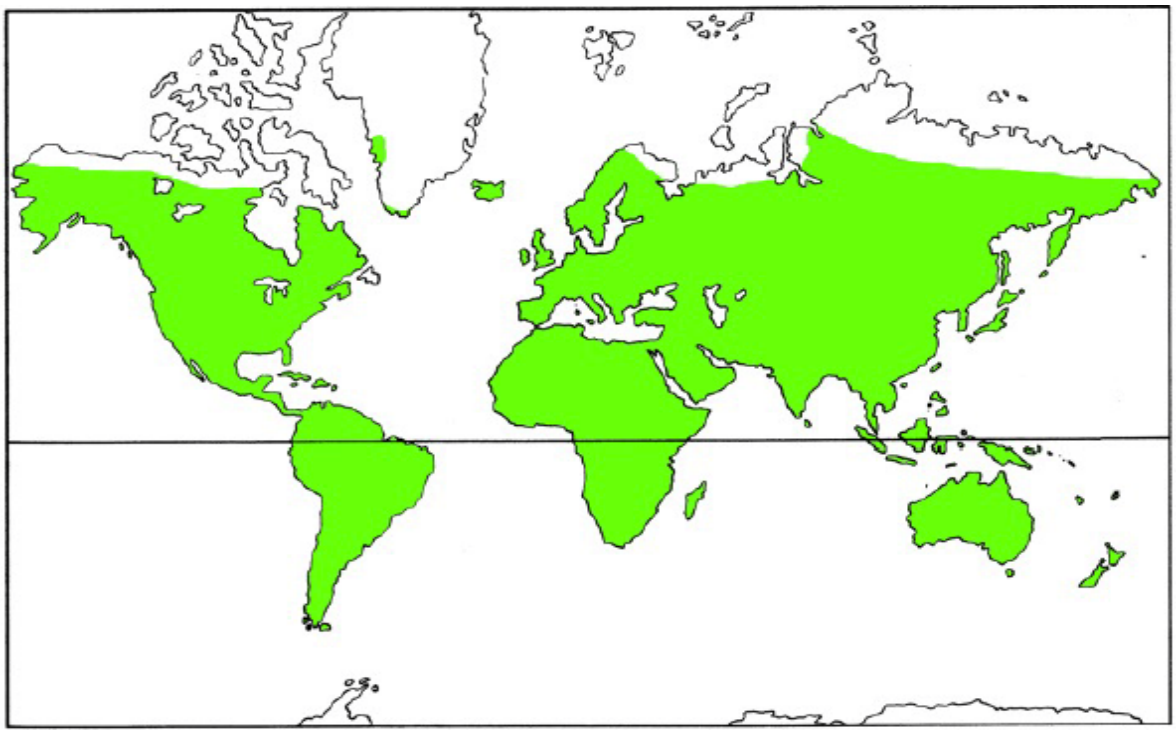


Figure 1.1 : Distribution géographique des Scrophulariaceae

1.1.2 Classification

La classification de Valdés (1987) pour cette famille, est très bien représentée avec 99 taxons (à l'exclusion des hybrides) appartenant à 19 genres. Elle est subdivisée en trois sous-familles : Verbascoideae, Scrophularioideae et Rhinanthoideae (Tableau 1.1), qui sont habituellement différenciées par l'estivation des pétales et la disposition des feuilles [3].

sous-familles	tribu	genre
Verbascoideae	Verbasceae	*Verbascum*
Scrophularioideae	Scrophularieae	***Scrophularia***
	Antirrhineae	*Anarrhinum* *Antirrhinum*
Chaenorrhinum		
		Cymbalaria *Kickxia* *Linaria* *Misopates*
	Gratioleae	*Gratiola*
Rhinanthoideae	Sibthorpieae	*Sibthorpia*
	Digitaleae	*Digitalis*
	Veroniceae	*Veronica*
	Rhinantheae	*Bartisia* *Ballardia* *Odontites* *Parentucellia* *Pedicularis*

Tableau 1.1 : classification de la famille scrophulariaceae d'après valdés (1987)

Récemment, un groupe de chercheurs (Angiosperm Phylogeny Group 1998) publiait une nouvelle classification de plantes à fleurs, fondée sur leurs relations phylogénétiques telles que mises en lumière par la génétique [4]. Cette classification attribue 23 tribus à la famille des Scrophulariaceae [5]. La position systématique des Scrophulariaceae se trouve ainsi représentée par le schéma 1.1.

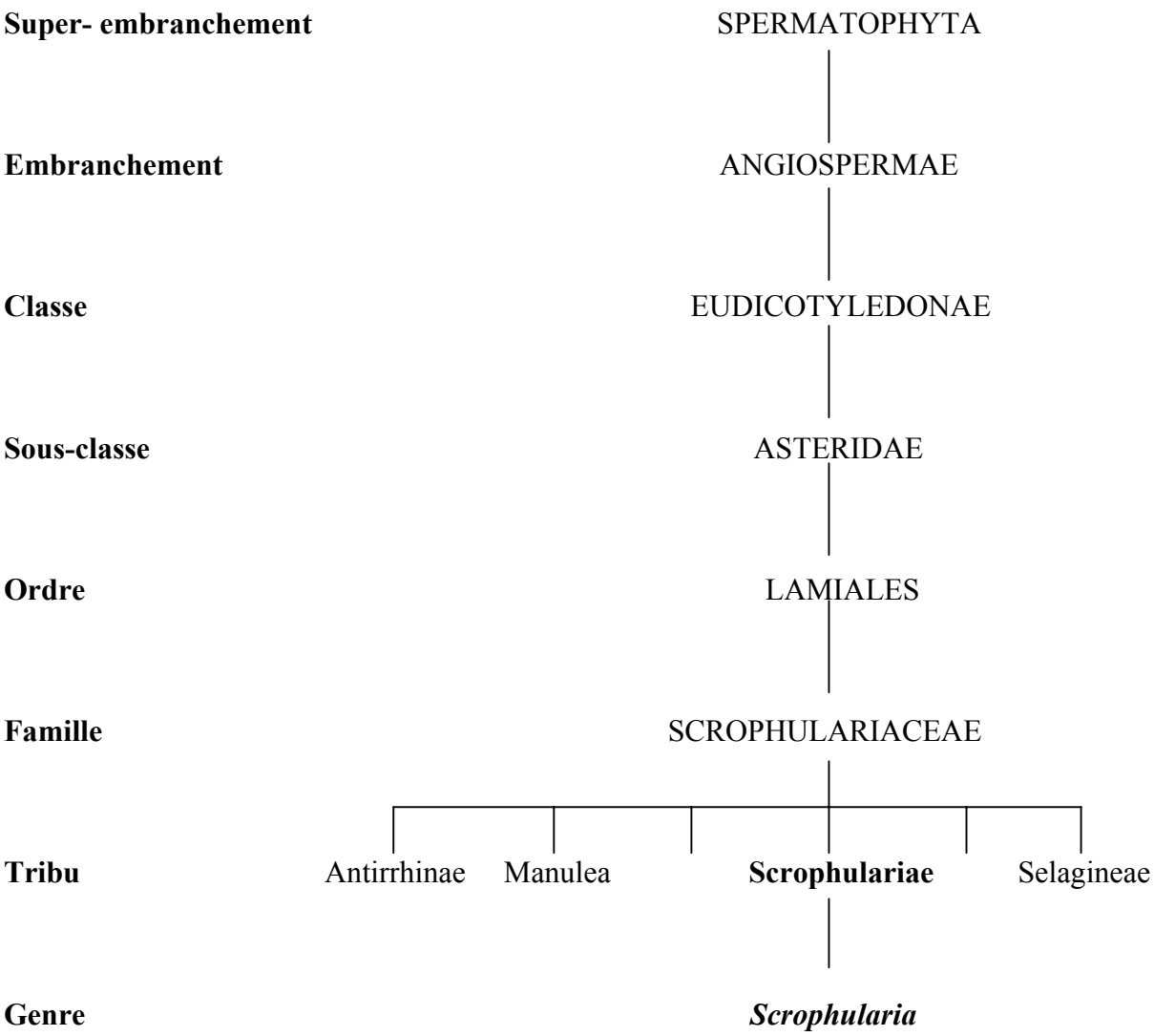


Schéma 1.1 : Position systématique des Scrophulariaceae d'après APG (1998) et Hilliard (1994)

1.1.3 Aspects botaniques et répartition géographique du genre *Scrophularia*

Les plantes du genre *Scrophularia* sont herbacées ou constituées tout simplement en buissons. Elles présentent des tiges anguleuses, à feuilles opposées (divisées) [6]. Elles sont constituées de fleurs à corolle tubuleuse nettement labiée, globuleuse de moins de 8 mm, non bossue, ni éperonnée à la base et légèrement dépassée par les étamines [7].

Le Sahara algérien est représenté par deux espèces : *Scrophularia saharae* Batt. et Trab., espèce commune dans tout le Sahara septentrional et *Scrophularia arguta* Solander, espèce présente dans le Sahara central (Hoggar, Tassili des Ajjer) [7].

1.1.4 Caractéristiques botaniques de l'espèce *saharae*

Selon Battandier [8], l'espèce *saharae* Batt. également appelée *Sc. hypericifolia* Wudl. [6] et *Sc. deserti* Coss. [7], est une plante très rameuse, sous frutescente à la base, à feuilles minuscules, ovées ou lancéolées, entières ou dentées, cartilagineuses aux bords, atténuées en pétiole très court ou nul. Les fleurs sont petites et tigrées. Elle est commune dans toute la région désertique [8].

Figure 1.1 : Photographie de *Scrophularia deserti* Coss.

Figure 2.2 : *Scrophularia saharae* (Batt.) d'après Ozenda (1991)

1.2 PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DU GENRE SCROPHULARIA

1.2.1 Introduction

Depuis l'Antiquité, dans de nombreuses civilisations, les plantes ont joué un rôle capital dans l'art de guérir. Il y a environ 500 000 plantes sur terre ; 10 000 d'entre elles environ, possèdent des propriétés médicinales [9]. La plupart de ces plantes sont bien connues et traditionnellement utilisées dans le monde entier [9]. Les plantes Scrophulariaceae ne sont pas en reste et ont fait l'objet d'une utilisation appréciable en médecine traditionnelle [10]. Le nom de la famille et du genre de cette plante dérive de l'usage que l'on faisait pour guérir la scrofule. Cette maladie est un ensemble de manifestations par lesquelles se révèle une infection tuberculaire chez les enfants sujets aux diathèses essudatives de la peau et des muqueuses, et qui souffrent souvent d'inflammation des premières voies respiratoires, de végétations adénoïdes et d'enflement des glandes du cou, des aisselles et de l'aisne [11].

1.2.2 Utilisation en médecine traditionnelle

La plante *Scrophularia vernalis*, plus communément appelée Scrofulaire jaune, est utilisée pour guérir justement la maladie décrite précédemment. Pour l'usage interne, l'infusion de sommités fleuries sert de purge et de diurétique, ainsi qu'à limiter les tremblements dus au mal de basedow. Par voie externe, les extraits des sommités ou mieux encore des racines, sont employés contre les enflures précitées, ainsi qu'en compresses et lavage contre les dermatoses (eczémas, démangeaisons,… etc) [11].

Scrophularia sambucifolia L., espèce poussant en Afrique du nord et dans la péninsule ibérique [11], est utilisée par les bergers comme savon pour le linge. Usage laissant suggérer une présence accrue de saponosides, composés très présents au sein de la famille[12].

Scrophularia nodosa, appelée plus communément Scrofulaire noueuse en raison de ses nodosités [9], est utilisée pour soigner les scrofules citées précédemment. Elle était aussi autrefois utilisée comme remède contre les plaies, blessures, hémorroïdes et les ulcères [9]. Les parties aériennes de cette plante sont utilisées comme infusion pour éliminer les accumulations de toxines [13].

En chine, *Scrophularia ningpoensis* est utilisée pour ses propriétés antiseptiques et purgatives [9]. Ses racines sont utilisées contre les problèmes de gorge, les abcès profonds et les engorgements lymphatiques [13].

Scrophularia auriculata, plante voisine de *Scrophularia nodosa*, poussant en bord des rivières, dans les lieux humides et les marécages, est employée dans la médecine traditionnelle chinoise, pour le traitement des inflammations [14].

L'espèce *deserti* Del., généralement connue sous le nom de afinah en Arabie Saoudite [15], est utilisée en médecine traditionnelle locale comme antipyrétique, hypoglycémiant, contre les troubles rénaux et l'inflammation de la bouche notamment [15].

1.2.3 Activités biologiques

La plupart des espèces du genre *Scrophularia* est utilisée en médecine traditionnelle pour leurs effets anti-inflammatoires[16]. Des études biologiques ont confirmé que l'espèce *deserti* Del. présente effectivement des activités anti-inflammatoires et antidiabétiques [15].

Scrophularia scorodonia avait été évaluée comme un inhibiteur potentiel de quelques fonctions macrophages impliquées dans les processus inflammatoires [17].

Les racines de l'espéce *lipidota* présente une activité antimalariale et des propriétés inhibitrices de l'enzyme plasmodiale enoyl-ACP (FabI), enzyme principale de la biosynthèse des acides gras [18].

Les travaux de So Ra Kim et So Young Kang ont montré lors d'essais biologiques effectués sur des souris [19], que l'acide *E-p*-méthoxycinnamique de *Scrophularia buergeriana* allège certains affaiblissements de mémoire observés lors de cas de démence [18].

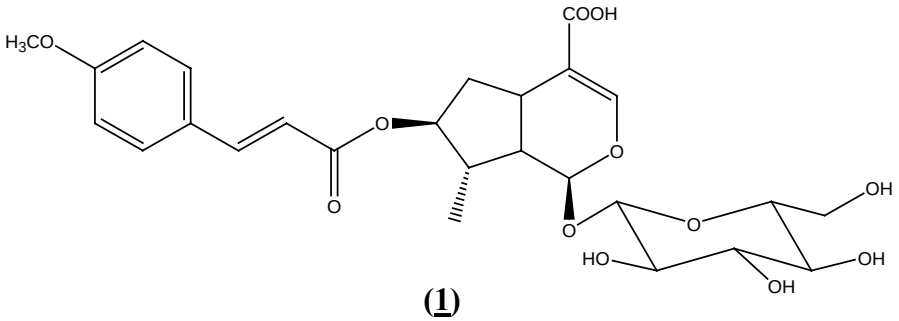
1.3 ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

1.3.1 *Sur le genre*

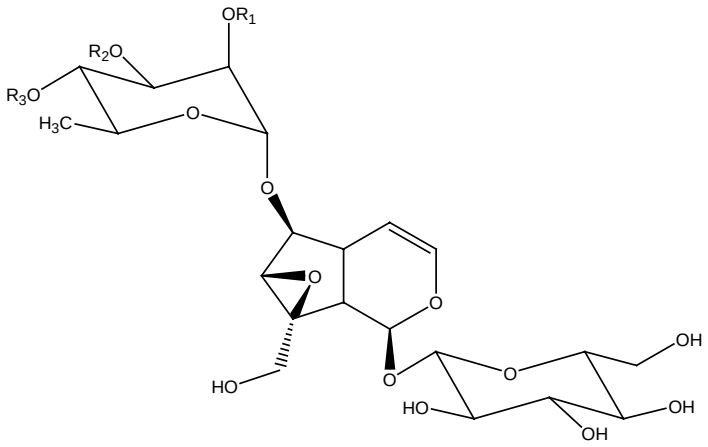
La recherche bibliographique effectuée sur le genre *Scrophularia* soutenue par le dictionnaire des produits naturels (version 2005), ont révélé que ce genre a été peu

investi chimiquement. La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de 37 composés constitués essentiellement de saponines et iridoïdes. Ces substances sont connues pour leurs diverses activités biologiques.

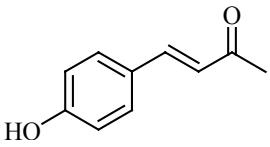
Miyase et collaborateurs [20] ont particulièrement étudié l'espèce *Scrophularia nodosa* L. Cette étude effectuée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes, a permis d'isoler un iridoïde monoglycosilé nommé scrophuloside A_1**(1)** , ainsi que sept iridoïdes diglycosilés appelés respectivement scrophuloside A_2 **(2)**, A_3 **(3)** , A_4 **(4)**, A_5 **(5)**, A_6 **(6)** , A_7 **(7)** et A_8 **(8)**.



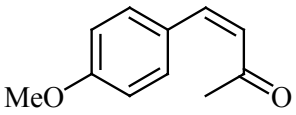
(1)



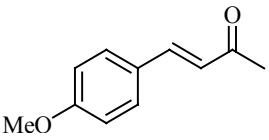
	R_1	R_2	R_3
(2)	acétyle	H	*p*- coumaroyle
(3)	H	acétyle	*p*- coumaroyle
(4)	acétyle	*p*- méthoxycinnamoyle	*p*- méthoxycinnamoyle
(5)	acétyle	cis - *p*- méthoxycinnamoyle	H
(6)	acétyle	cis - *p*- méthoxycinnamoyle	acétyle
(7)	acétyle	acétyle	cis- *p*- méthoxycinnamoyle
(8)	acétyle	acétyle	isoferuloyle



***p*- coumaroyle**

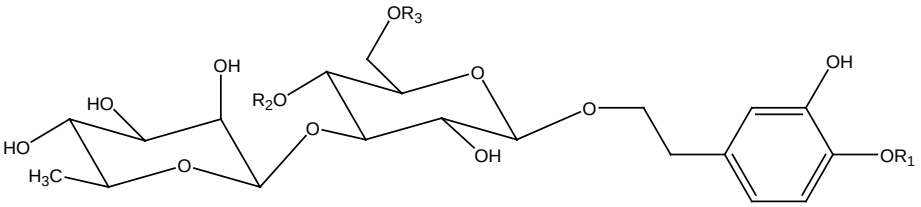


cis - *p*- méthoxycinnamoyle



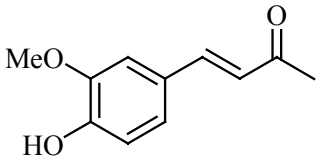
***p*- méthoxycinnamoyle**

Cette même étude a révélé également la présence de deux phényléthanoïdes glycosilés : scrophuloside B_1 **(9)** et B_2 **(10)**.

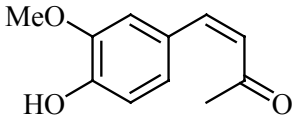


	R_1	R_2	R_3
(9)	H	feruloyle	arabinosyle
(10)	H	cis- feruloyle	arabinosyle

.



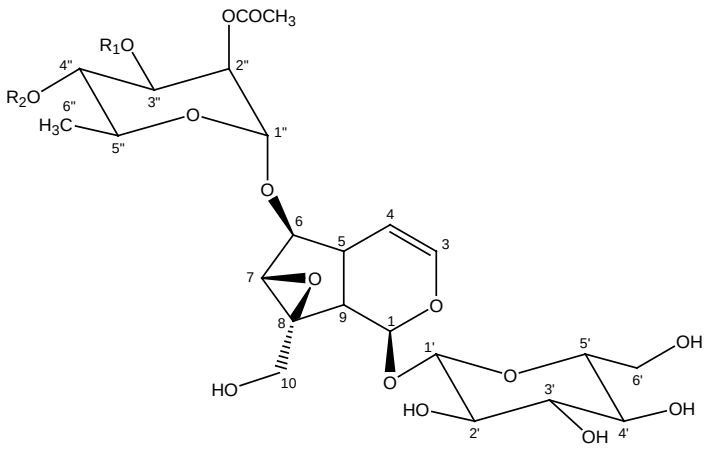
feruloyle



cis- feruloyle

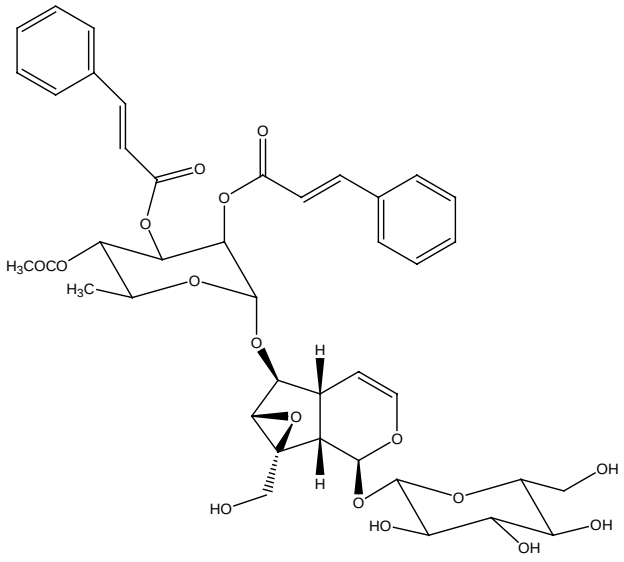
Les structures de ces composés ont été déterminées par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D, 2D et spectrométre de masse en mode FAB.

D'autres études phytochimiques [21] réalisées sur le même extrait, ont permis de séparer par HPLC et d'identifier par les méthodes spectroscopiques, deux iridoïdes glycosilés acylés. Il s'agit de (*E*)-6-*O*-(2″,4″-diacétyl-3″-*O*-*p*-méthoxycinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl catalpol (scropolioside A) **(11)**, (*E*)-6-*O*-(2″, 3″-diacétyl-4″-*O*- *p* - méthoxycinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl catalpol (scrovalentinoside) **(12)**.

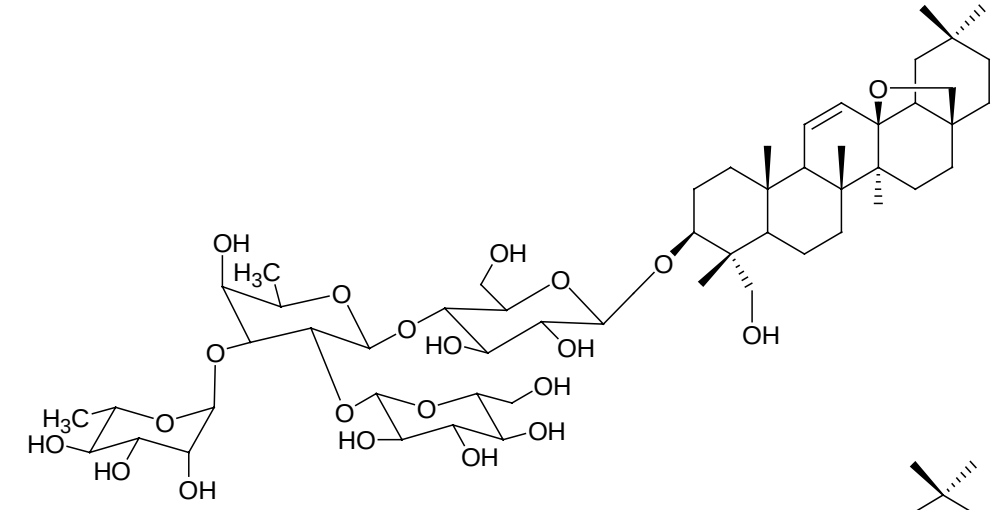


	R_1	R_2
(11)	*p*- méthoxycinnamoyle	$COCH_3$
(12)	$COCH_3$	*p*- méthoxycinnamoyle

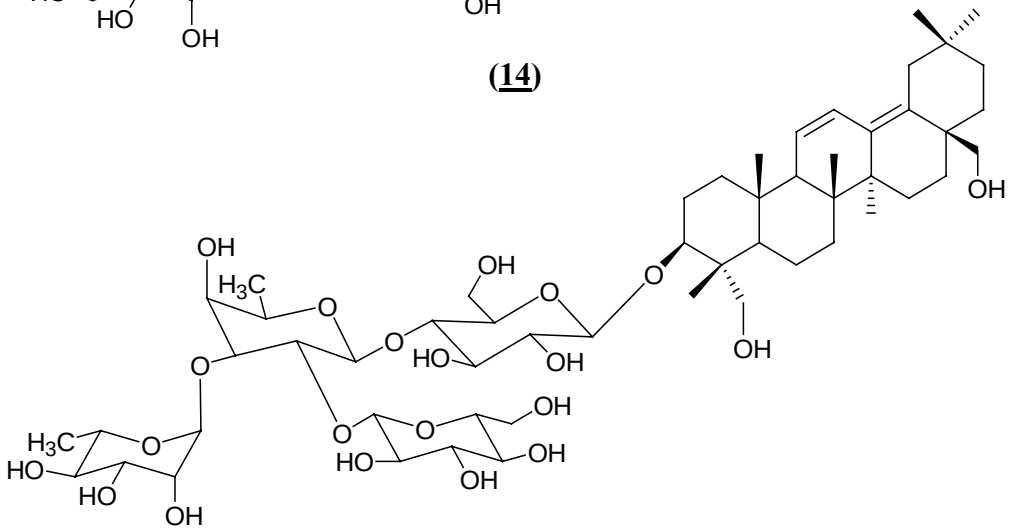
Trois études réalisées sur l'extrait chloroformique du *Scrophularia koellzii* L., par Bhandari et collaborateurs, ont abouti à l'isolement d'un iridoïde diglycosilé [22] nommé koelzioside **(13)** et de deux saponines triterpéniques à squelette oléanane [23,24] nommées respectivement scrokoelziside A **(14)** et B **(15)**.



(13)

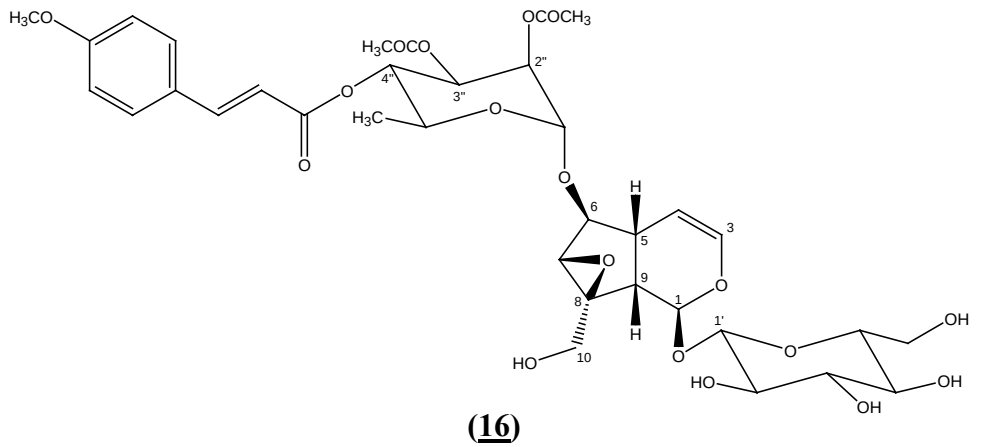


(<u>14</u>)



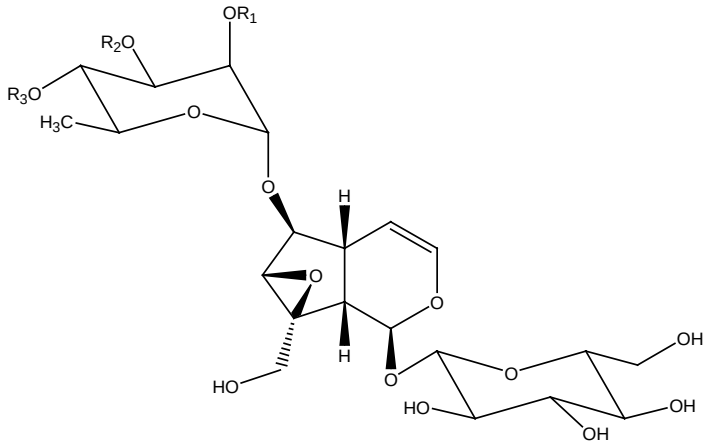
(<u>15</u>)

L'investigation chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Scrophularia auriculata ssp. auriculata*[14], a permis d'isoler et d'identifier un iridoïde nouveau appelé scrovalentinoside : 6-*O*-(2″, 3″-di-*O*-acétyl-4″-*O*- *p*-méthoxycinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl catalpol **(<u>16</u>)**.



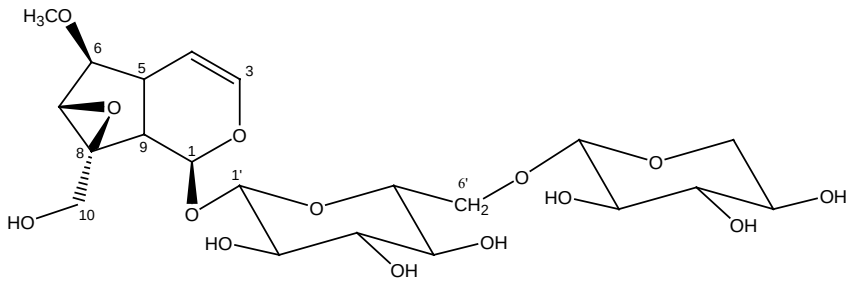
(<u>16</u>)

Deux nouveaux iridoïdes glycosilés triacyclés [25] nommés respectivement scropolioside A **(17)** et B **(18)** , ont été isolés des racines de *Scrophularia scopolli* var *scopolii* . Ces deux composés ont été séparés par chromatographie sur colonne de polyamide et caractérisés par des méthodes d'analyse spectroscopique (RMN 1D et 2D, FAB-MS, UV, IR) et dégradation chimique.

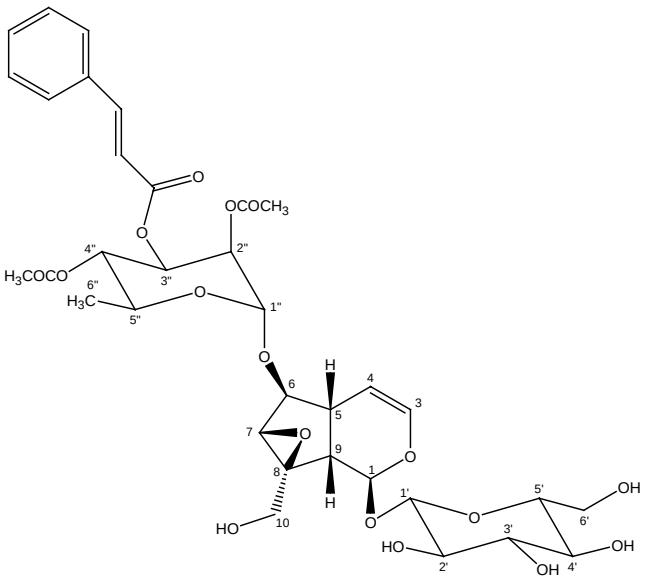


	R_1	R_2	R_3
(17)	$COCH_3$	*p*- méthoxycinnamoyle	$COCH_3$
(18)	$COCH_3$	cinnamoyle	cinnamoyle

Une autre étude chimique réalisée par Calis et collaborateurs sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Scrophularia ilwensis* C. KOCH. [26], a révélé la présence de deux iridoïdes glycosilés : 6'-*O*-(β-D-xylopyranosyl)-méthylcatalpol **(19)** et 6-*O*-[(2″,4″-di-*O*-acétyl-3″-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol **(20)** nommés respectivement karsoside et scropolioside D.

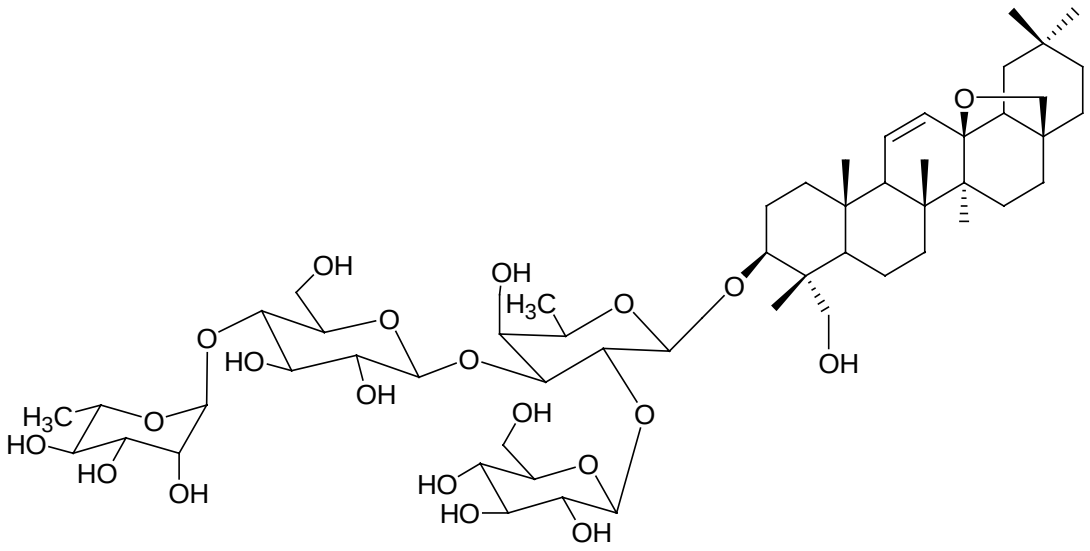


(19)

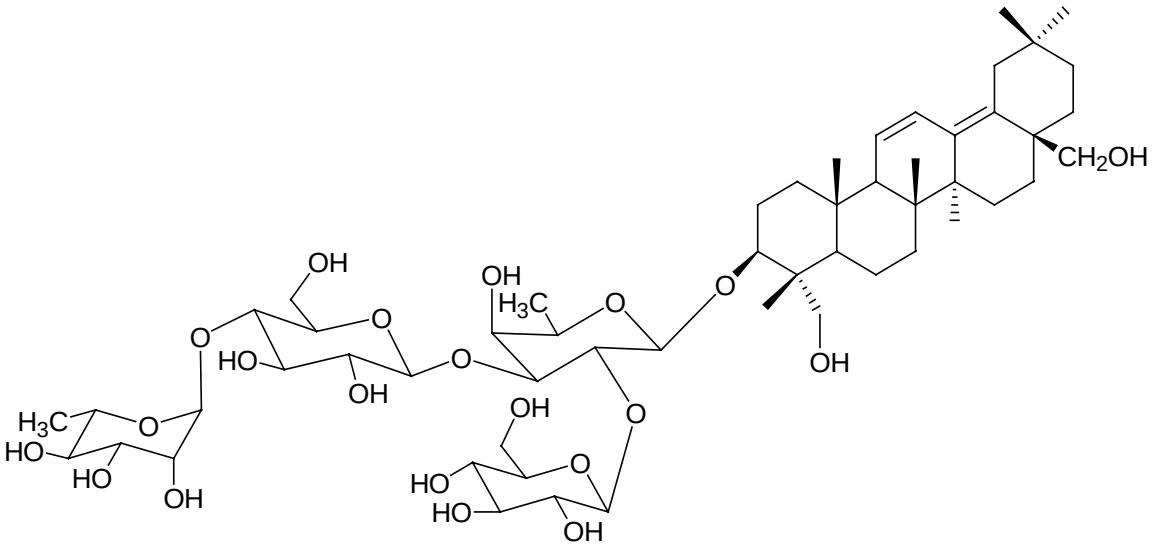


(<u>20</u>)

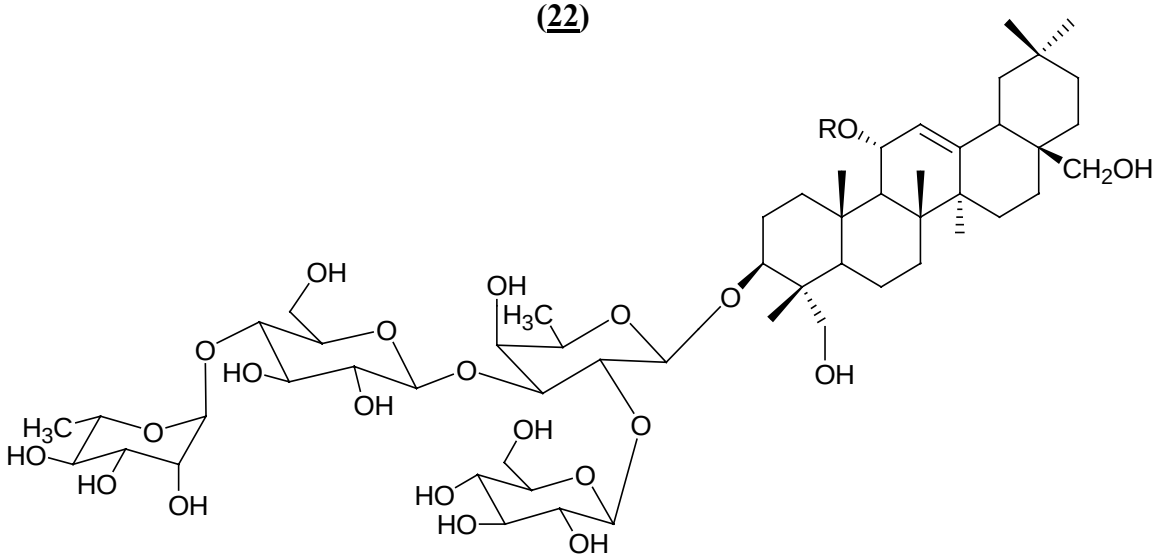
D'autres études phytochimiques [27] menées par les mêmes chercheurs sur les parties aériennes de *Scrophularia ilwensis* C. KOCH., ont permis d'isoler quatre saponines triterpéniques **(<u>21</u>)**, **(<u>22</u>)**, **(<u>23</u>)** et **(<u>24</u>)** appelées respectivement Ilwensisaponin A, B, C et D.



(<u>21</u>)



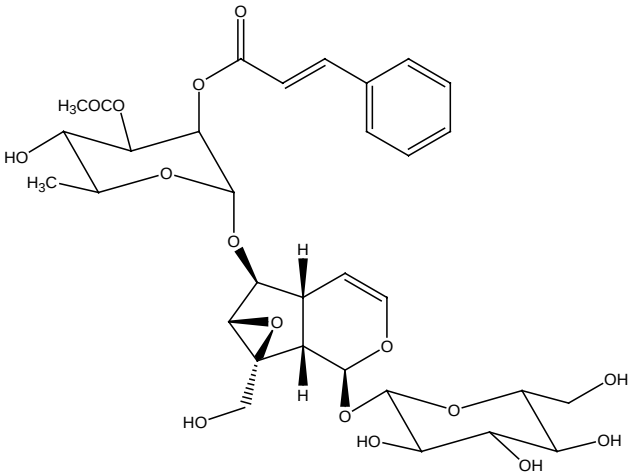
(<u>22</u>)



(<u>23</u>) **R** = Me

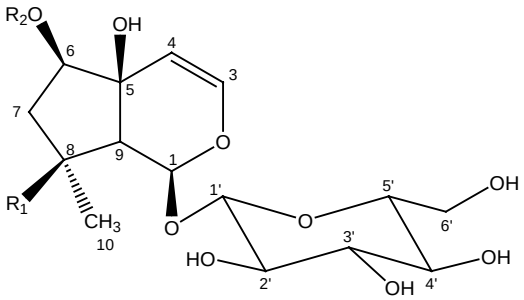
(<u>24</u>) **R** = H

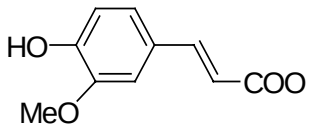
L'étude chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de l'espèce *Scrophularia scorodonia* L., plante répandue dans le sud-est de l'Espagne et dans le nord-ouest de l'Afrique [28], a permis d'isoler un iridoïde glycosilé nouveau appelé scorodioside **(<u>25</u>)**.

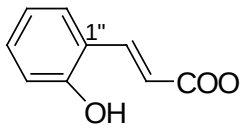


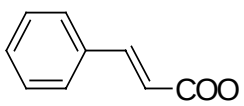
(25)

Trois iridoïdes nouveaux appelés scropolioside A **(26)**, ningpogosides A **(27)** et B **(28)**, ont été isolés de l'extrait méthanolique des racines de l'espèce *Scrophularia ningpoensis* Hemsl [29]. Il s'agit respectivement de 8-*O*-feruloylharpagide, 8-*O*-(2"-hydroxy-cinnamoyl) harpagide et 6-*O*-α-D-galactopyranosylharpagoside.

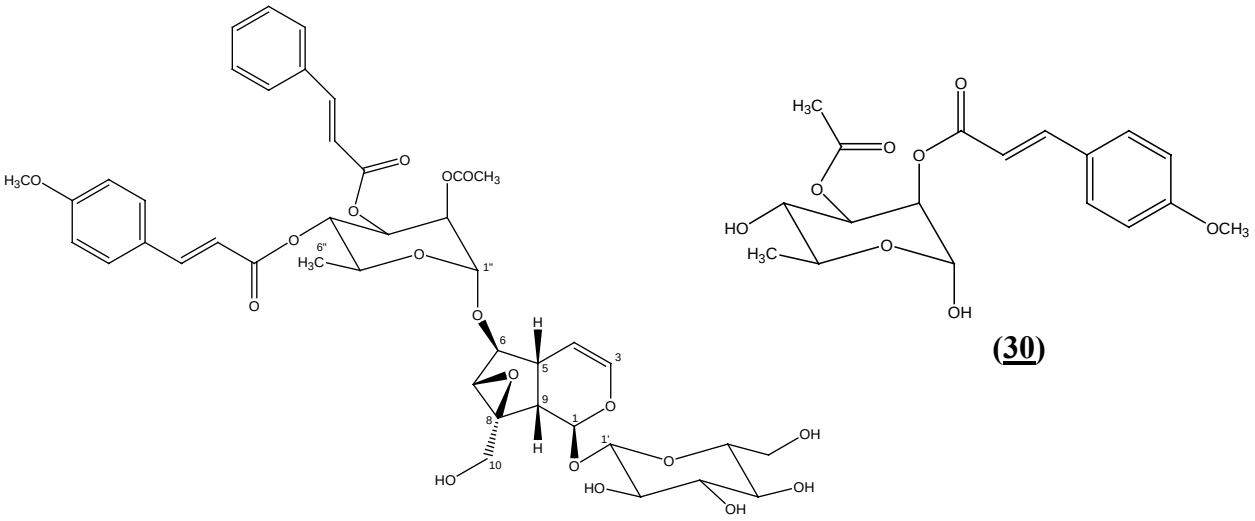


(26) **R_1** =  **R_2** = H

(27) **R_1** =  **R_2** = H

(28) **R_1** =  **R_2** = Galactosyl

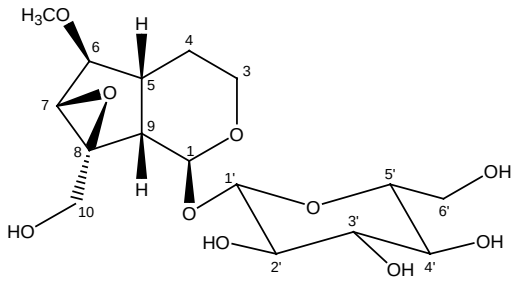
Récemment, Anh-Tho Nguyen et collaborateurs, ont isolé et identifié à partir de la même espèce, un iridoïde glycosilé **(29)** et un sucre ester **(30)** [30]. Ces deux nouveaux composés ont été nommés respectivement scrophuloside B_4 et ningposide D.



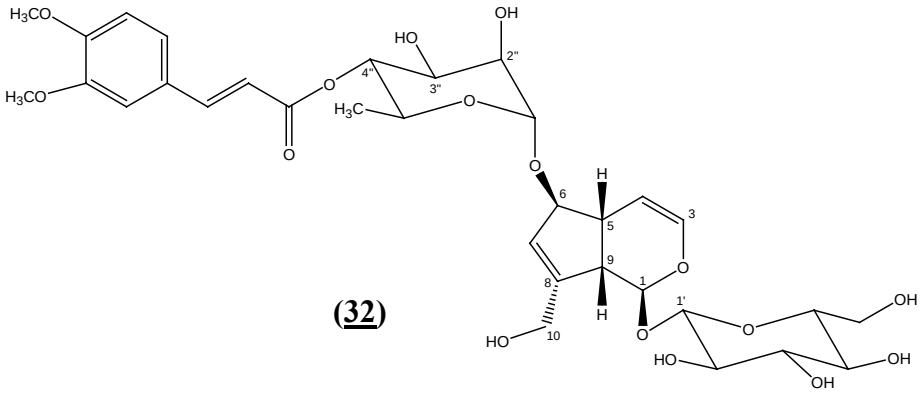
(30)

(29)

Des travaux effectués sur les racines de l'espèce *lepidota* ont permis d'isoler et d'identifier deux iridoïdes glycosilés nouveaux [18]. Il s'agit de 3,4-dihydro-méthylcatalpol **(31)** et 6-*O*-[4"-*O*-trans-(3,4-diméthoxycinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl] aucubine (scrolepidoside) **(32)**. Ces composés ont montré une activité contre le parasite *Leishmania donovani* [18].

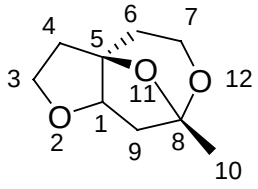


(31)

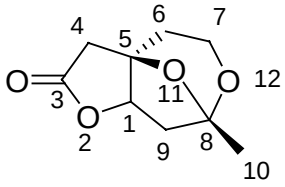


(32)

Da - Yuan Zhu et collaborateurs, dans leurs études phytochimiques systématiques du genre *Scrophularia*, ont également étudié l'espèce *buergeriana* Miq [31]. Cette étude réalisée sur les racines, a permis d'isoler deux iridoïdes appelés buergerinin F **(33)** et G **(34)**.



(33)



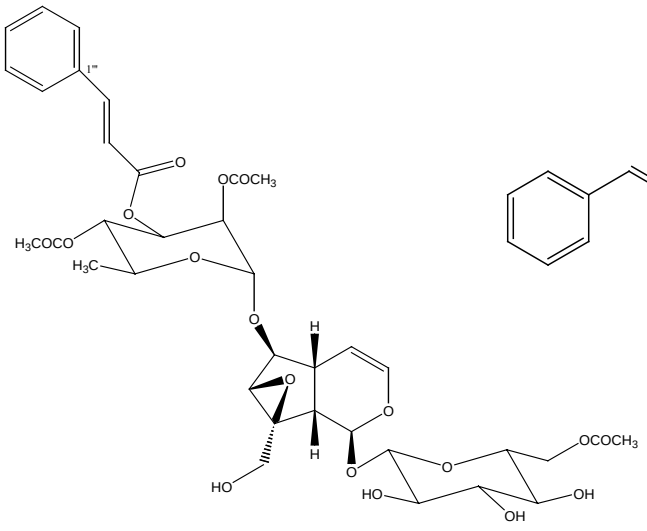
(34)

Ces structures ont été déterminées par RMN 1D, 2D et Rayons X.

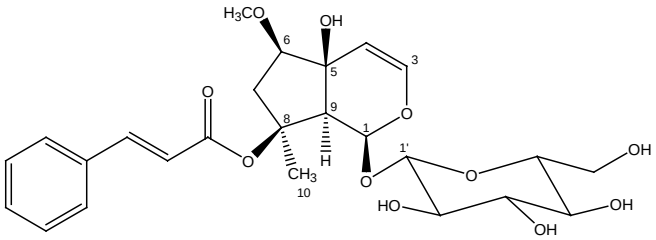
3.1.2 *Sur l'espèce*

Une recherche bibliographique exhaustive a montré que l'espèce *saharae* Batt. n'a pratiquement pas été étudiée chimiquement. La seule étude phytochimique mentionnée a porté sur *Scrophularia deserti* Del. [15], plante signalée comme différente de l'espèce *saharae* Batt. (*deserti* Coss.) [8], objet de notre travail.

Cette étude réalisée par Ahmed et collaborateurs [15], sur l'extrait méthanolique des parties aériennes, a abouti à la mise en évidence de deux iridoïdes nouveaux appelés scropolioside-D_2 **(35)** et harpagoside-B **(36)**.



(35)



(36)

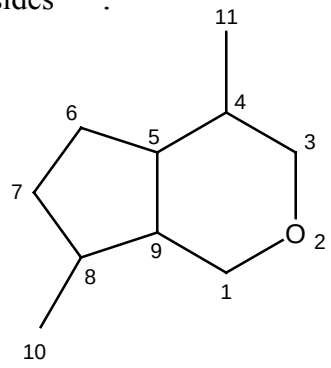
Leurs structures ont été déterminées également par les méthodes d'analyse spectroscopiques (UV, IR, RMN 1D, 2D et spectrométrie de masse).

Chapitre 2

Etude des iridoïdes

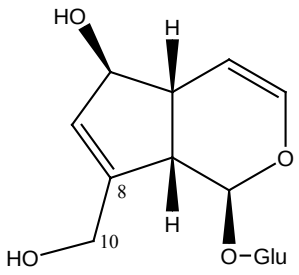
2.1 Structure des iridoïdes

Les iridoïdes sont une grande classe de composés naturels avec plus de 300 membres dans la famille [32]. Ces composés sont caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyranique, parfois désigné par le terme d'iridane (cis-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonane) **(37)**. Ils se présentent principalement sous forme de glycosides [33].

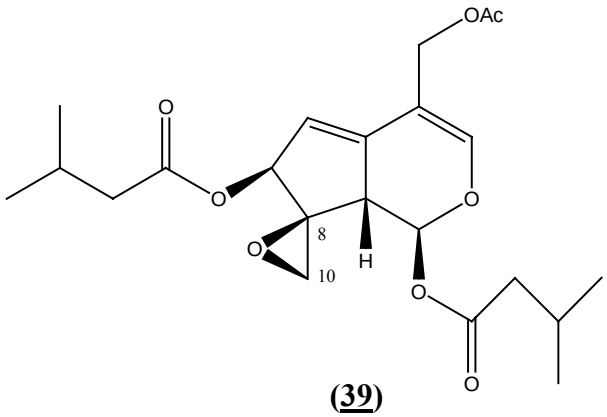


(37)

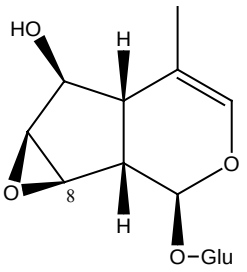
Le groupement méthyle (C-10) généralement porté par le carbone C-8, peut être plus ou moins oxydé [33] : hydroxy méthyle (aucuboside) **(38)**, époxyde (valtrate) **(39)**. Rarement, il est carrément absent comme dans le cas du deutzioside **(40)** [33].



(38)

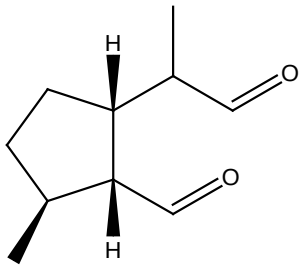


(39)

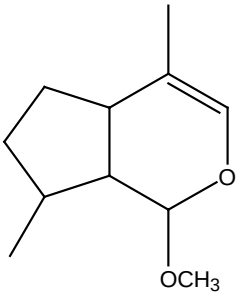


(40)

Les iridoïdes tirent leur nom de celui de fourmis du genre *Iridomirmex* à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense propres à ces insectes, à savoir iridodial **(41)**, iridomyrmécine **(42)** et composés apparentés [33].

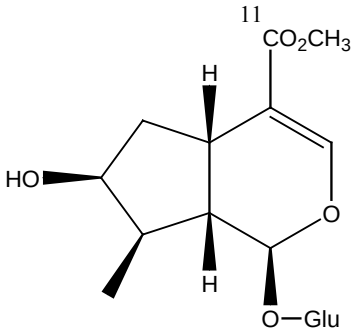


(41)

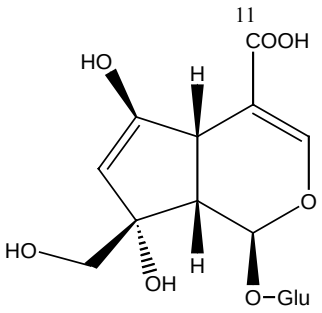


(42)

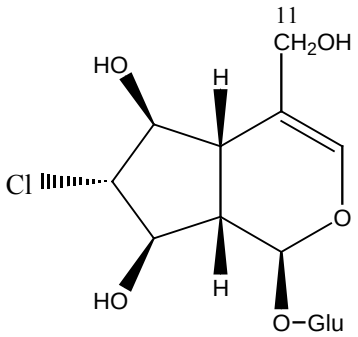
Les iridoïdes ont généralement dix atomes de carbone [33]. Le carbone C-11 est habituellement inclus dans un groupe carbométhoxyle comme dans le cas du loganoside **(43)** ou carboxylique comme dans le cas du monotropéoside **(44)**. Plus rarement, ce dernier groupe est remplacé par un hydroxyméthyle comme il est constaté au niveau de la structure du mentzifoliol **(45)**. Dans un certain nombre de cas, le carbone C-11 est absent comme dans le cas du catalpol **(46)** [33].



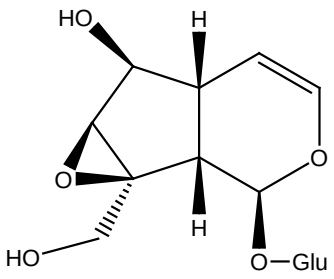
(43)



(44)



(45)



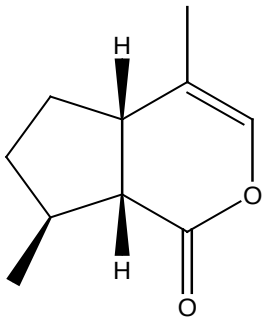
(46)

2.2 Classification des iridoïdes

Il y a quatre groupes principaux d'iridoïdes : iridoïdes simples non hétérosidiques et se résumant donc uniquement à la partie génine ou aglycone, iridoïdes glycosides ou glycosilés les plus abondants, séco-iridoïdes et bisirioïdes [34].

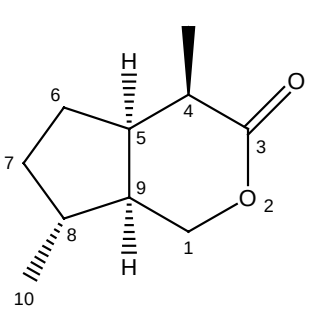
2.2.1 Iridoïdes simples

Les iridoïdes simples peuvent être alcaloïdiques, polycycliques, esters et éthers internes [33]. Les structures les plus simples ont été identifiées dans les plantes. On peut citer l'iridoïde simple appelé népétalactone **(47)**, constituant odorant majeur d'une plante labiée *Nepeta cataria* L., nommée également herbe à chat en raison de son effet attractif pour les chats [35].

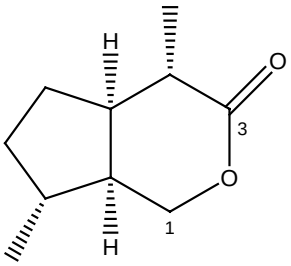


(47)

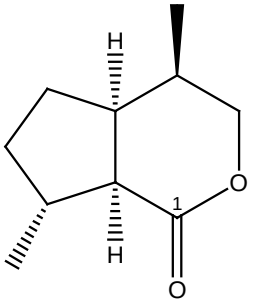
Les iridoïdes lactoniques peuvent être subdivisés en deux groupes de types I et II, selon l'orientation régiochimique de la lactone par rapport au noyau cyclopentanique fonctionnalisé [36]. Dans le cas des iridoïdes de types I représentés par l'iridomyrmecine **(48)** et l'isoiridomyrmecine **(49)** isolés respectivement de *Iridomyrmex humilis* Mayr. et *Iridomyrmex nitidus* Mayr. [37,38], le groupement carbonyle de la lactone est en position C-3. Dans le cas des iridoïdes de type II comme les composés dihydronepetalactone **(50)** et isodihydronepetalactone **(51)**, ce dernier est en position C-l [36].



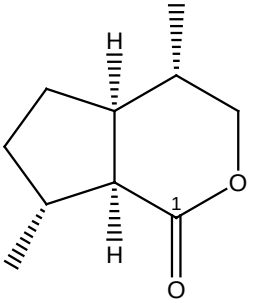
(48)



(49)



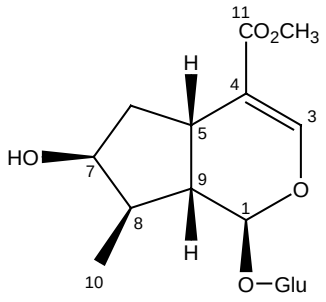
(50)



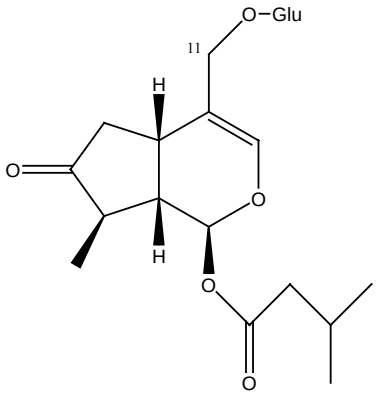
(51)

2.2.2 Iridoïdes glycosides

La majorité des glycosides d'iridoïdes sont des glucosides, la liaison hétérosidique s'établissant entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose et l'hydroxyle en C-1 de la génine, comme dans le loganoside **(52)**, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes [33]. Cependant mais rarement, la liaison hétérosidique s'établit avec l'hydroxyle en C-11, comme dans le cas de l'ébuloside **(53)**, iridoïde isolé de la famille Caprifoliaceae [33].

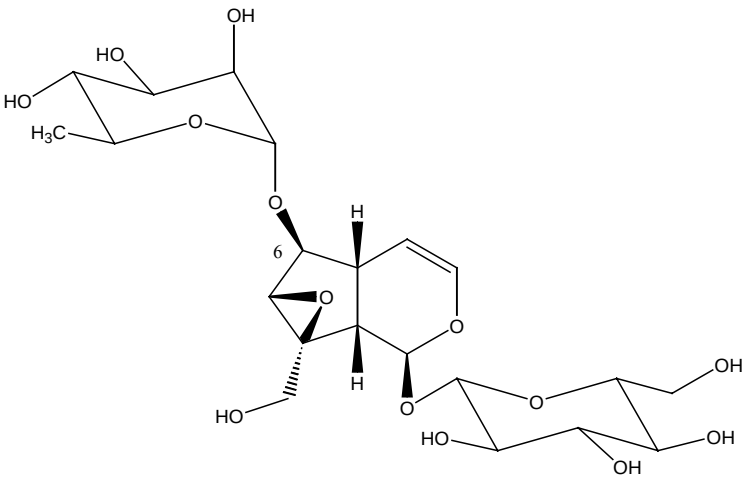


(52)



(53)

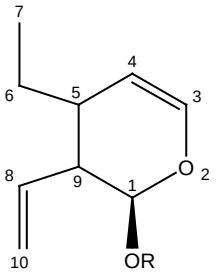
Le type de sucre et sa complexité peuvent également varier. Pour l'exemple, le catalpol **(46)** peut avoir un rhamnopyranosyl porté par le carbone C-6 conduisant au 6-*O* -α -L-rhamnopyranosylcatalpol **(54)**, isolé de S*crophularia nodosa* [21].



(54)

2.2.3 Séco-iridoïdes

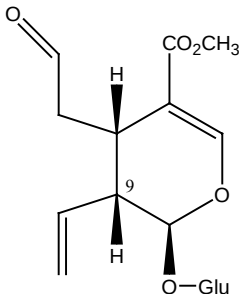
Les séco-iridoïdes **(55)** sont issus de la rupture de la liaison 7-8 du noyau cyclopentanique [39].



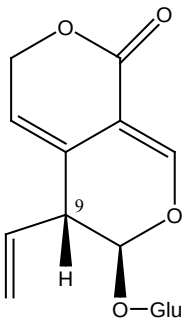
(55)

On constate ainsi l'existence de plusieurs types de génines séco-iridoïdiques [33] :

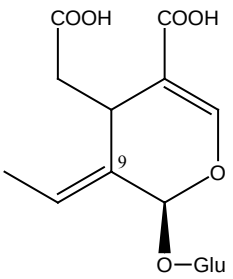
- Génines comme le sécologanoside **(56)**, ayant un groupe vinyle en C-9. La polyfonctionnalisation du système engendre des lactonisations. A titre d'exemple, on citera le gentiopicroside **(57)**.
- Génines comme l'oléoside **(58)**, ayant un groupe éthylidène ou hydroxyéthylidène en C-9. Le carboxyle peut être estérifié comme dans le cas de l'oleuropéoside **(59)**.
- Génines aminées. On citera l'ipecoside **(60)**.



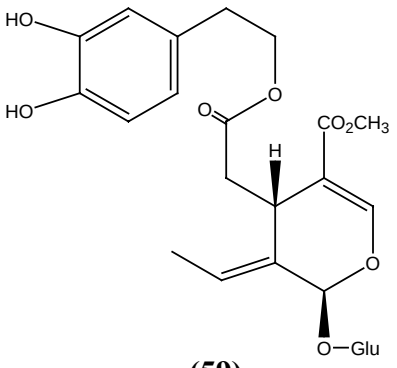
(56)



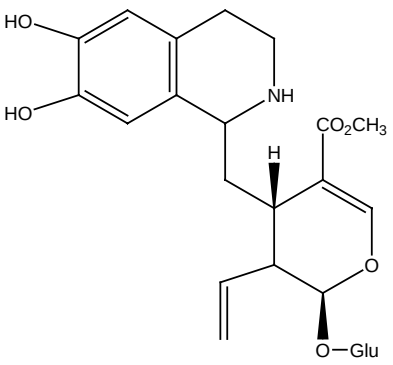
(57)



(58)



(59)

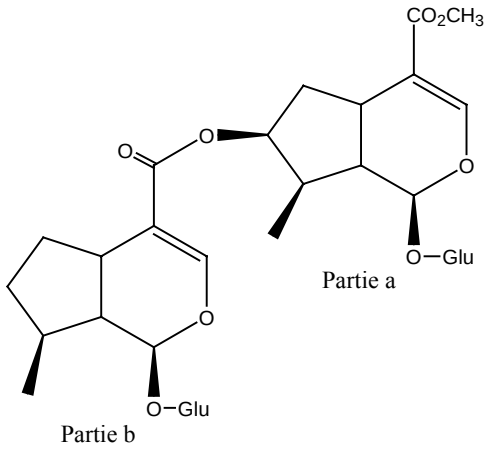


(60)

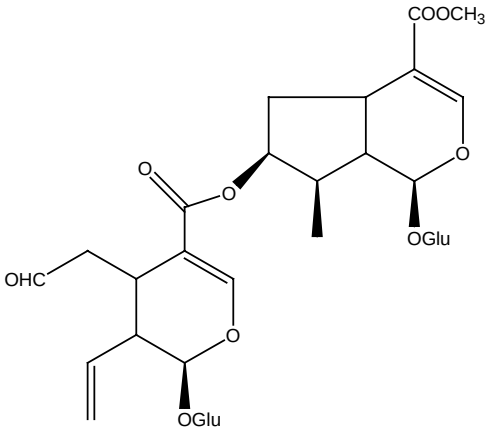
Les séco-iridoïdes non hétérosidiques sont exceptionnels [33].

2.24 Bisiridoïdes

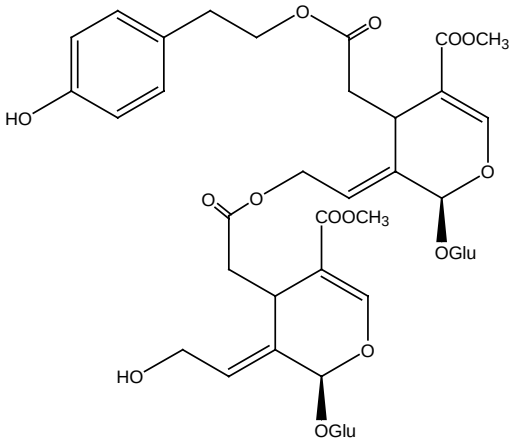
La forme bisiridoïdique résulte de la dimérisation des iridoïdes et des séco-iridoïdes [40]. Le composé nommé picconioside I **(61)**, bisiridoïde isolé de *Picconia excelsa* [41], est constitué d'une partie loganine (partie a) estérifiée par la deoxyloganine (partie b). Le cantleyoside **(62)** isolé de *Pterocephalus perennis* résulte d'une dimérisation de la loganine et d'un séco-iridoïde (sécologanine) [42]. Il peut y avoir également dimérisation de deux séco-iridoides comme constatée dans le cas du jasamplexoside A **(63)**, isolé du genre *Jasminum* [43].



(61)



(62)

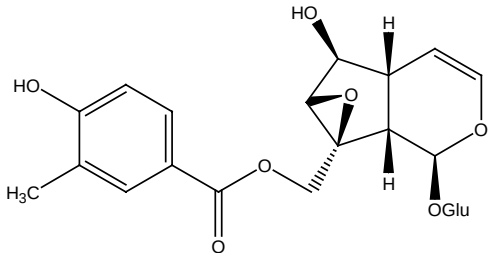


(63)

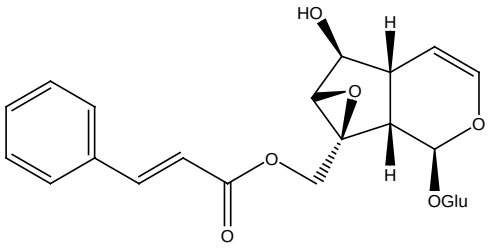
2.3 Activités biologiques des iridoïdes

L'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle a constitué la base de ce que nous appelons aujourd'hui, médecine moderne. Les investigations phytochimiques réalisées sur les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, ont abouti à la découverte de beaucoup de composés actifs utilisés à juste titre comme médicaments. Les iridoïdes, constituants principaux de beaucoup de familles de plantes, couvrent un large domaine d'activités biologiques [44]. On citera les activités cardiovasculaire, antihepatotoxique, cholérétique, hypoglycémique, hypolipidémique, antispasmodique, antitumorale, antivirale, purgative, antioxydante, leishmanicide et immunomodulatrice [45]. Cependant, ces composés sont surtout connus et réputés pour leurs activités anti-inflammatoires.

Plusieurs études réalisées sur une mixture dénommée Picroliv extraite des parties souterraines de *Picrorhiza kurroa* Royle et constituée de kuktoside **(64)**, picroside I **(65)** ainsi que de dérivés 10-ester catalpol, lui reconnaissent des propriétés antihepatotoxique, cholérétique, hypolipidémique et antivirale [45].

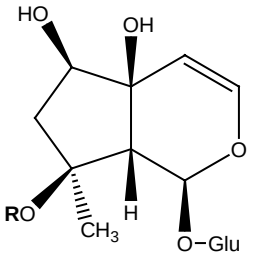


(64)

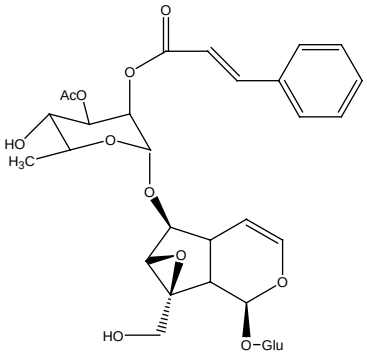


(65)

D'autres iridoïdes montrent également une activité antivirale. Ainsi l'harpagoside **(66)** additionné au 8-*O*-acétylharpagide **(67)** et au scorodioside isolé de *Scrophularia scorodonia*, présentent une activité antivirale contre le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Le composé **(67)** testé chez les souris, a montré une forte activité à l'égard des tumeurs cutanées et hépatiques. Le scorodioside **(68)** isolé de *Scrophularia scorodonia* a montré une activité antivirale modérée contre le virus herpes simplex de type-1 (HSV-1) [46,47].

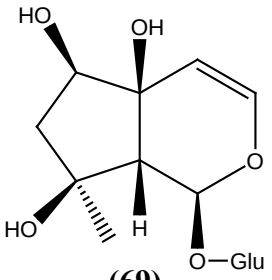


(66) R = cinnamoyle
(67) R = acétate



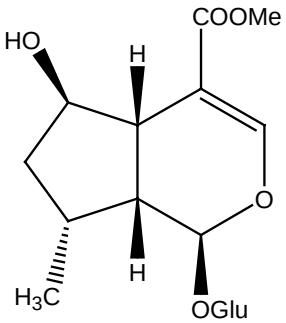
(68)

Harpagophytum procumbens (pedaliaceae, sous famille des Scrophulariaceae), communément appelé harpagophyton [33], est utilisé en pharmacopée européenne pour traiter les désordres digestifs, la fièvre et soulager les douleurs des parturientes. Les iridoïdes sont considérés comme responsables de ces activités [33]. Le constituant majoritaire de l'extrait des racines de cette espèce est l'harpagoside **(66),** isolé pour la première fois en même temps que l'harpagide **(69)**, de cette plante en 1962 [48].



(69)

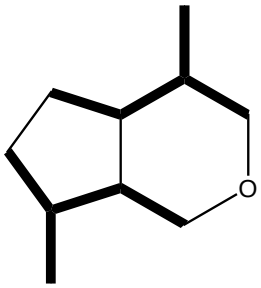
Les peracétates de l'aucubine **(38)**, du catalpol **(46)** et du penstemonoside **(70)** isolé de *Parentucillia latifolia* L., ont montré des activités inhibitrices vis à vis des contractions musculaires utérines induites par l'acétylcholine, de manière semblable à la papavérine [49].



(70)

2.4 Biosynthèse des iridoïdes

Les éléments de base des terpénoïdes sont les unités de l'isoprène en C_5, sous forme d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et de dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Les Iridoïdes sont des monoterpènes en C_{10} et dérivent du géraniol [50]. Les unités isopréniques peuvent être identifiées dans la plupart des terpénoïdes avec une relative facilité. Le squelette iridane **(37)** en est l'illustration.



(37)

La plupart des iridoïdes carboxyliques dérive de la 8-β-loganine **(52)**. La conversion du géraniol en loganine (Schéma 2.1) passe par différentes étapes, impliquant les intermédiaires suivants : 10-oxogeranial, iridodial, iridotrial et l'acide deoxyloganique [51].

Dans la première étape, le géraniol est converti en 10-oxogéranial par une série de réactions d'hydroxylations et d'oxydations. La cyclisation de ce dialdéhyde conduit à l'iridodial. L'oxydation de ce dernier aboutit à la formation de l'iridotrial présent sous deux formes à l'équilibre, cétonique et hémiacétalique [51]. La cyclisation de l'iridotrial (forme cétonique) permet la formation de l'iridotrial hémiacétalique, correspondant au squelette iridoïde. La glucosylation puis l'oxydation de l'iridotrial, donnent l'acide deoxyloganique. L'estérification et l'hydroxylation en C-7 de ce dernier, conduisent à la loganine, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes.

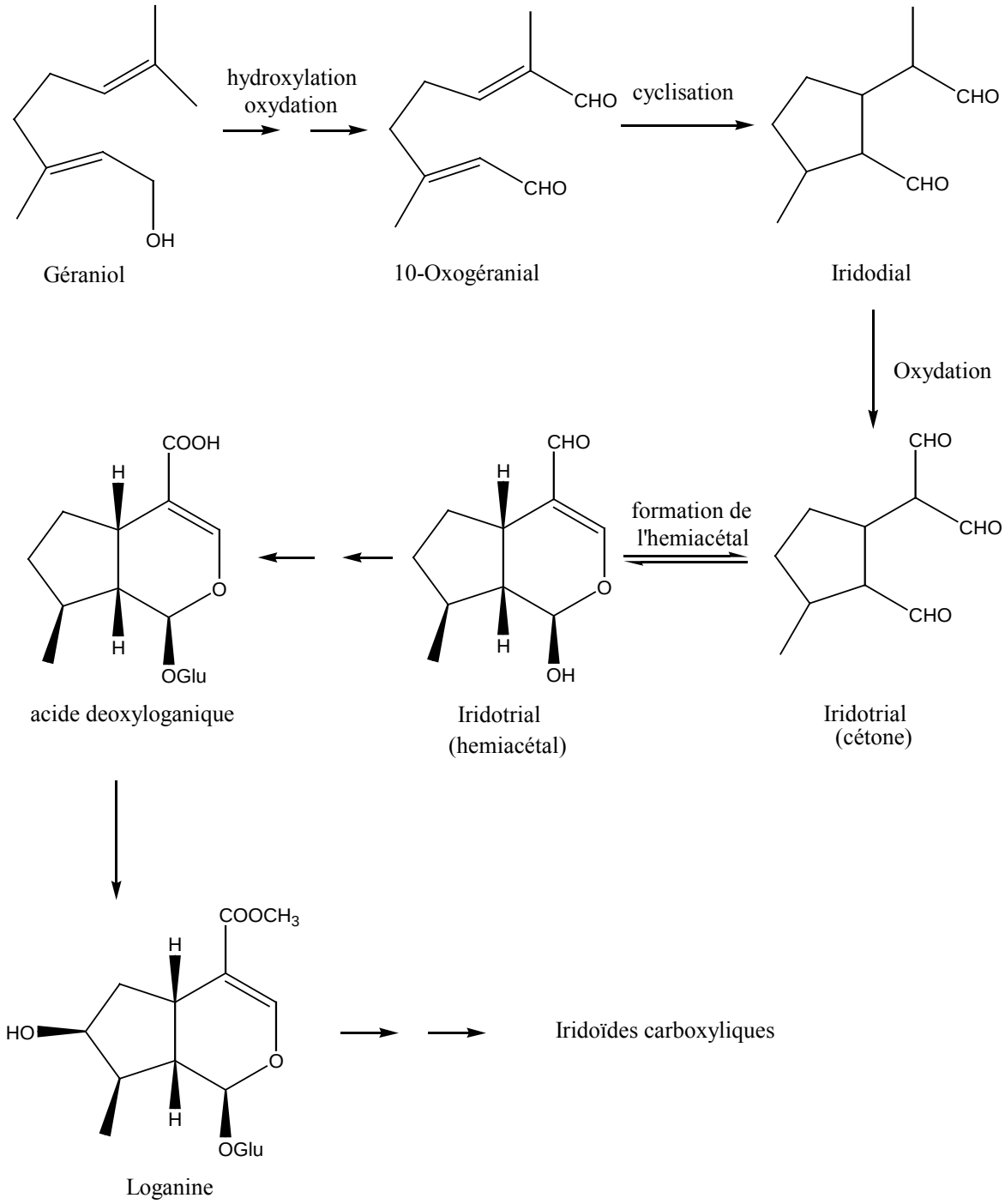
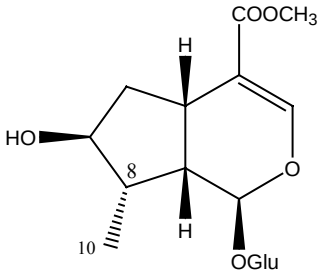


Schéma 2.1 : ***Biosynthèse de la loganine***

Les iridoïdes non carboxyliques tels que l'aucubine ou l'harpagide, sont formés de la même manière que les iridoïdes carboxyliques à partir du 8-épi-loganine **(76)** [51] via les intermédiaires suivants : 8-epi-iridodial, 8-épi-iridotrial et l'acide 8-épi-deoxyloganique. La décarboxylation de ce dernier aboutit à l'iridoïde intermédiaire non carboxylé. Ceci est

soutenu par le fait que dans la plupart des iridoides décarboxylés, le C-8 a une épiconfiguration [33].



(76)

Certains iridoïdes perdent le groupement méthyle C-10 par hydroxylation puis décarboxylation. Des études récentes ont permis d'établir la biosynthèse de ces structures [52] (Schéma 2.2).

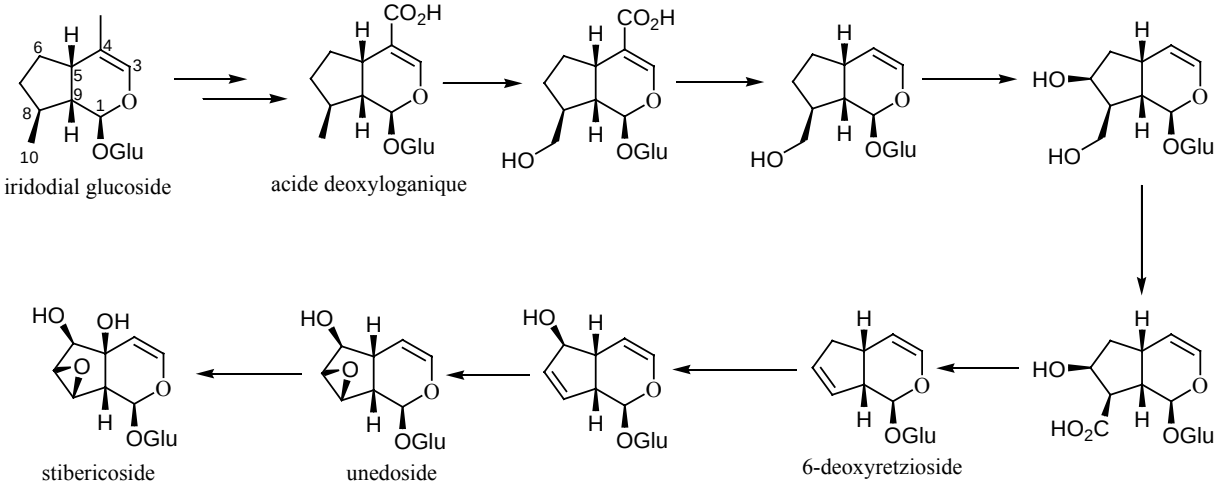


Schéma 2.2 : ***Biosynthèse des iridoïdes***

La conversion de la loganine en sécologanine (Schéma 2.3) par une réaction d'ouverture oxydante du cycle pentanique, constitue une étape biosynthétique importante du fait que la sécologanine est un précurseur pour beaucoup d'alcaloïdes, particulièrement les alcaloïdes indoliques [53].

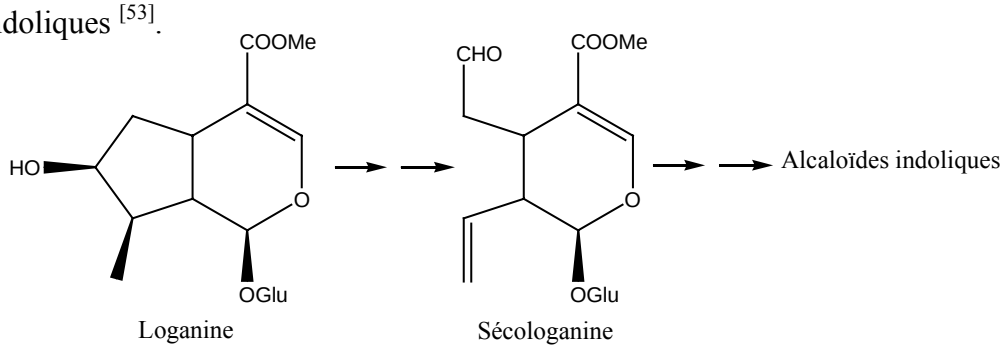


Schéma 2.3 : ***Conversion de la loganine en sécologanine***

Le mécanisme proposé pour la conversion de la loganine en sécologanine est basé sur la formation d'un radical en C-10, suivie d'une rupture de la liaison C_7-C_8. Le radical en C-7 résultant est transformé en aldéhyde par hydroxylation. Parallèlement à ce mécanisme radicalaire, il y'a lieu de signaler que le départ du radical hydrogène et d'un électron conduit à la formation d'un carbocation. La rupture de la liaison C_7-C_8 se ferait dans ce cas précis, selon un mécanisme ionique [54].

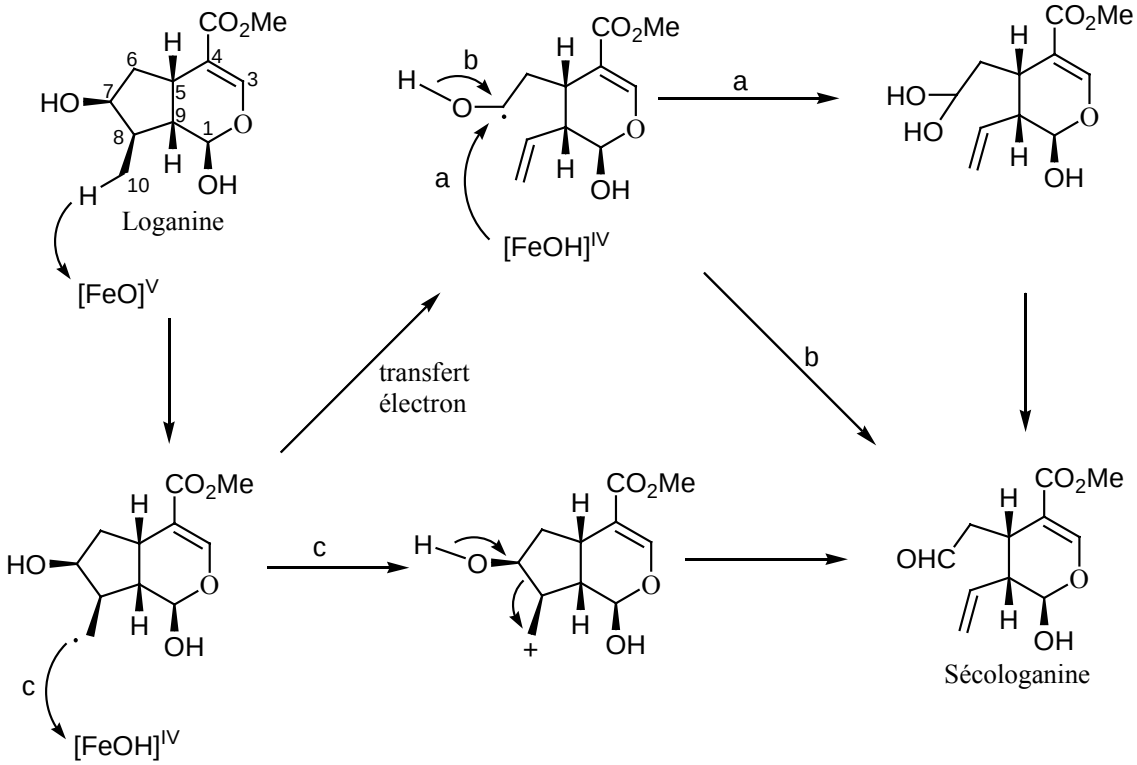


Schéma 2.4 : ***Mécanisme enzymatique de la sécolo*****ganine**

La biosynthèse des séco-iridoïdes a été étudiée au niveau des plantes Oleaceae [55]. Ces composés se répartissent en trois types : oleoside **(79)**, 10-hydroxyoleoside **(80)** et ligustalolide **(81)**. Initialement, le marquage isotopique de la sécologanine dans l'espèce *Ligustrum japonicum* a montré que celle-ci est le précurseur du ligustaloside B **(85)**. Les stéréoisomères en C-8 des composés 8,10-époxysécologanine **(77)** et 8,10-époxysécoxyloganine **(78)** ont été marqués isotopiquement et d'une manière séparée dans les plantes *Olea europaea*, *Osmanthus fragrans* et *Ligustrum japonicum*. Il s'est avéré, à l'issue de ce marquage, que le (8S) - 8,10-époxysécologanine est le meilleur précurseur comparé à l'isomère (8R) de l'oleuropine **(82)** dans *Olea europaea*, du 10-acétoxyoleuropine **(83)** dans *Osmanthus fragrans* ainsi que des ligustaloside A **(84)** et ligustaloside B **(85)** dans *Ligustrum*

japonicum. Il en résulte que le composé (8S)-8,10-époxysécologanine est le précurseur des trois types de séco-iridoïdes. Les mécanismes biosynthétiques proposés sont représentés dans le schéma 2.5 suivant.

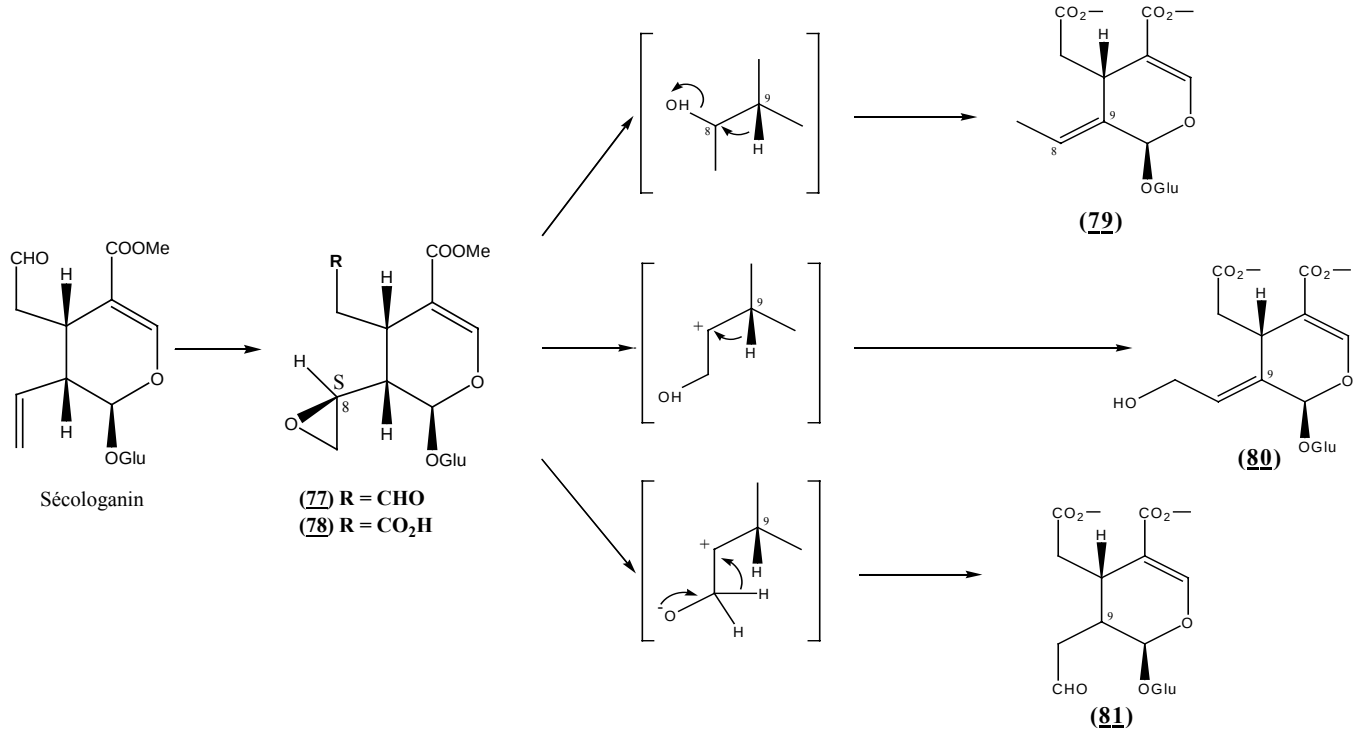
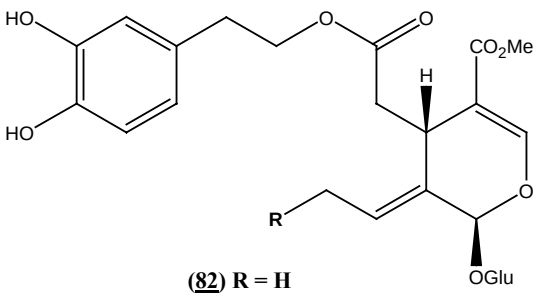


Schéma 2.5 : ***Biosynthèse des séco-iridoïdes***



Chapitre 3

Séparation des composés et détermination de leurs structures

Scrophularia sahara

3.1 EXTRACTION

3.1.1 Racines

Les racines (200 g) de *Scrophularia saharae* préalablement séchées et réduites en poudre, sont mises à macérer dans le cyclohexane pendant deux jours. Après filtration et élimination du solvant, 380 mg (rdt 0,19 %) de l'extrait cyclohexanique ont été obtenus. Les marcs sont de nouveau mis à macérer dans le chloroforme pendant deux jours. La filtration du mélange et l'évaporation totale du solvant ont donné 4,50 g (rdt 2,25 %) de l'extrait chloroformique. Enfin, la macération des marcs récupérés dans le méthanol pendant deux jours, la filtration puis l'évaporation du solvant, ont permis d'obtenir 17 g (rdt 8,5 %) de l'extrait méthanolique. L'ensemble de ces opérations d'extraction est résumé dans le schéma 3.1.

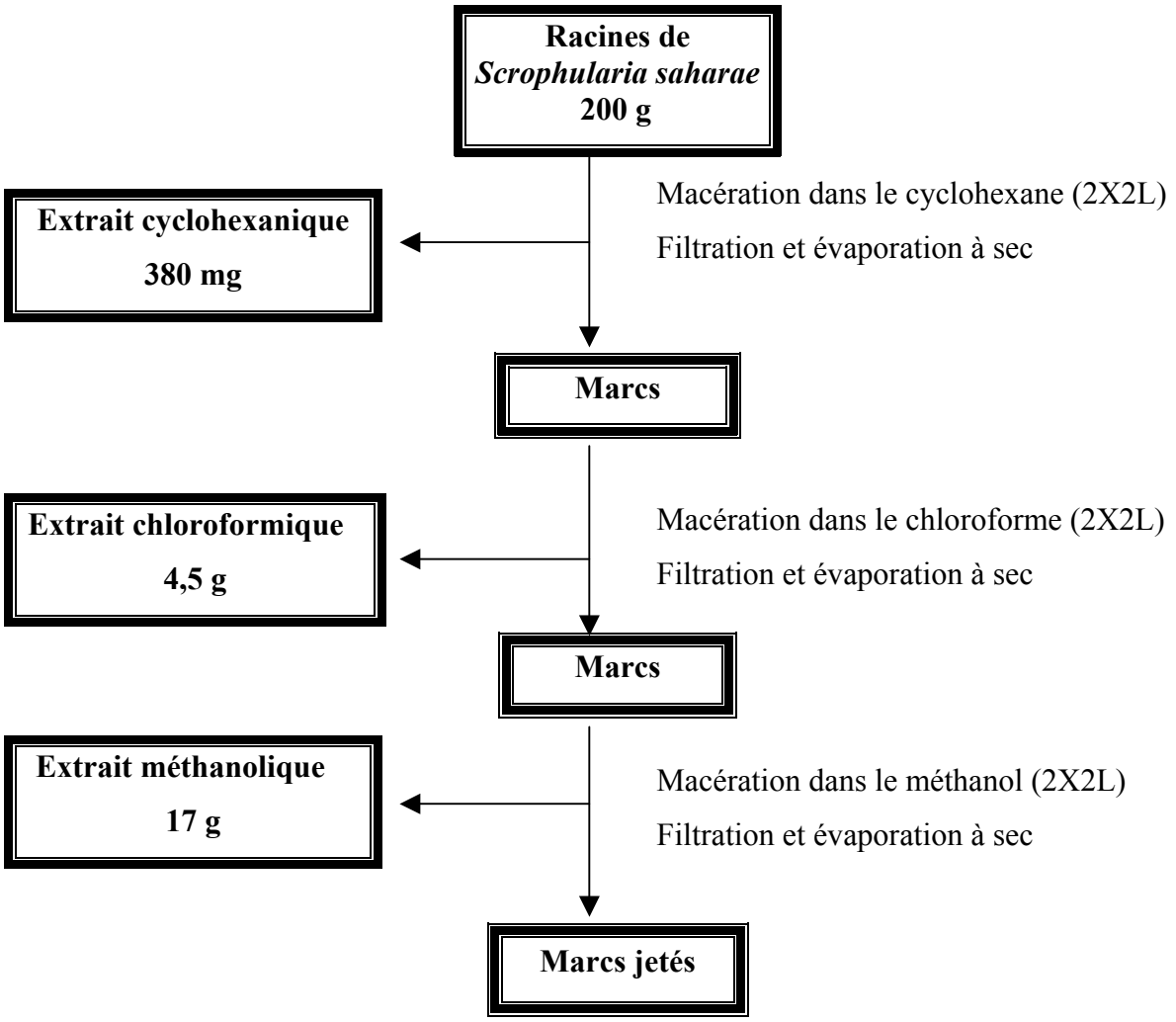


Schéma 3.1 : ***Extraction des racines de Scrophularia saharae***

3.1.1.1 *Fractionnement de l'extrait chloroformique des racines et isolement des composés* **A – E**

Un premier fractionnement de l'extrait chloroformique des racines (4 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice pour donner 384 fractions. L'analyse sur C.C.M de ces fractions, après révélation à la lumière UV (254 nm) et à la vanilline sulfurique, a permis de les rassembler en 30 lots. Le lot 22 présentant en C.C.M (éluant : chloroforme/méthanol 80/20) des taches de couleur marron caractéristiques à première vue de composés iridoïdes très présents dans le genre et la famille, a été à son tour fractionné sur une colonne de gel de silice, donnant ainsi 308 fractions.

Les fractions 221-229 de ce lot rassemblées car présentant des similitudes, montrent en C.C.M (éluant : chloroforme/méthanol 80/20) après révélation à la lumière UV (254 nm) et pulvérisation à la vanilline sulfurique, une tache marron majoritaire correspondant à première vue à un produit. L'examen de cette tache en CCM RP-18 et après révélation à la lumière UV atteste à priori de la présence de deux produits donnant une coloration marron foncée après révélation à la vanilline sulfurique. Une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 (éluant : méthanol/eau 70/30) a permis d'isoler les deux produits correspondant aux deux taches. Si le premier produit nommé **C** est obtenu à l'état pur après filtration sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, l'autre s'est avéré après examen en RMN ^{1}H, être un mélange de deux produits. D'où la difficulté, voire l'impossibilité des les séparer et isoler à l'état pur par les méthodes chromatographiques classiques. Il apparaît ainsi qu'une séparation par chromatographie liquide haute performance sur silice RP-18 est indispensable. L'examen HPLC analytique montre en effet et indiscutablement la présence de deux produits à temps de rétention très voisins comme le montre le chromatogramme illustré par la figure 3.1. Une chromatographie préparative HPLC sur colonne Lichrospher 100 RP-18 a permis d'isoler les deux produits **A** et **B**.

Le lot 25 montrant en C.C.M outre les composés cités précédemment, un composé majoritaire visible en UV et donnant une coloration rose après révélation à la vanilline sulfurique, est soumis lui aussi à une chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice. L'élution réalisée par un mélange hexane/acétate d'éthyle et se terminant par l'acétate d'éthyle pur, a permis de séparer le composé **D** pas totalement pur. Ce qui a

nécessité une autre purification par chromatographie sur couche épaisse (C.C.E), suivie d'une filtration sur Sephadex LH-20 dans le méthanol.

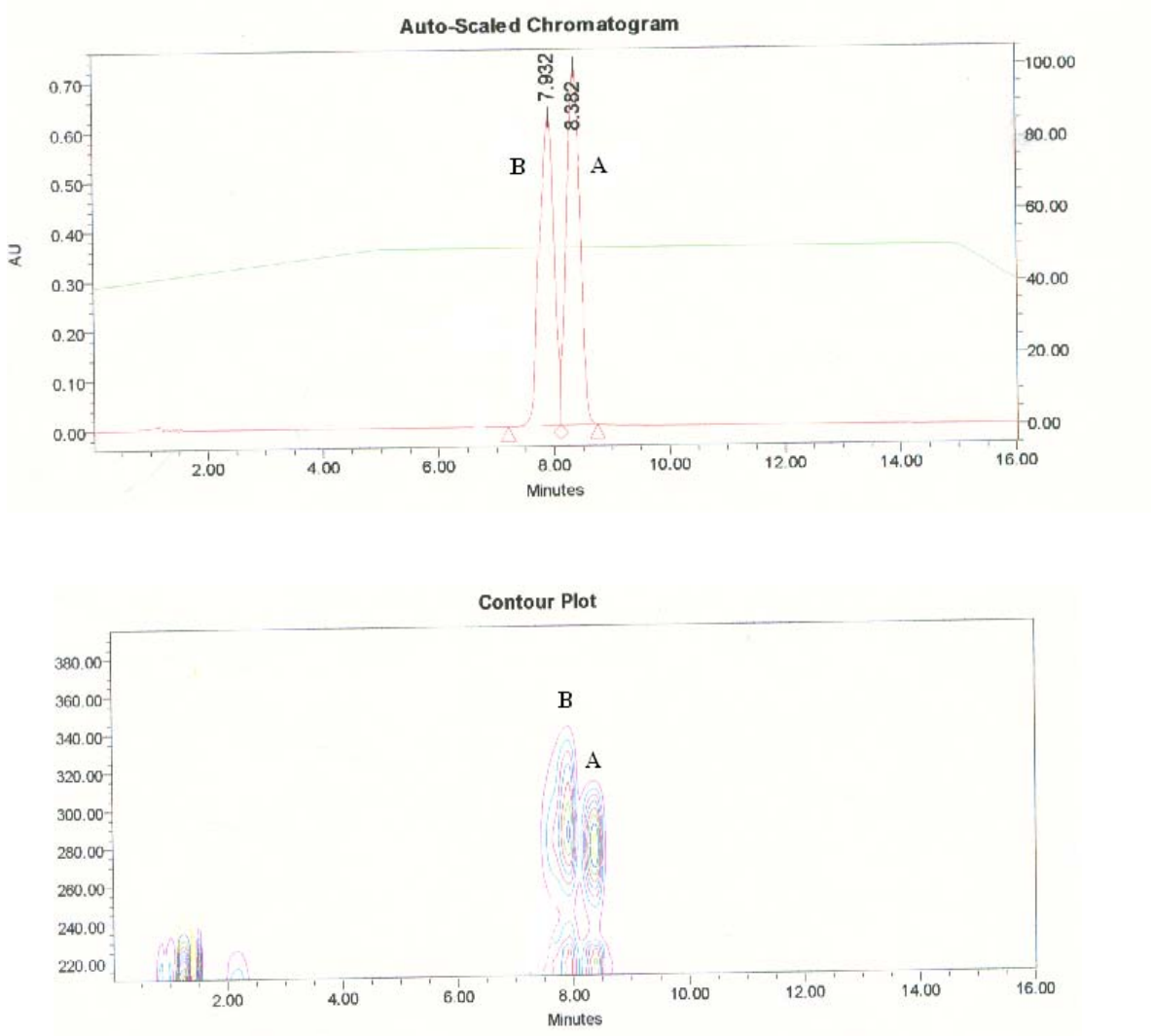


Figure 3.1 : ***Chromatogramme des produits*** **A** ***et*** **B**

Le lot 29 montre en C.C.M et après révélation à la vanilline sulfurique, une tache rose attestant de la présence d'un produit invisible en UV. Une chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant un mélange de solvants : hexane/acétate d'éthyle 50/50, acétate d'éthyle pur, puis un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle, a permis d'isoler le composé **E**. Une ultime purification a été réalisée sur colonne de Sephadex LH-20 en présence de méthanol comme solvant d'élution.

3.1.2 Parties aériennes

Les parties aériennes séchées et pulvérisées sont mises à macérer dans le cyclohexane pendant deux jours. Le mélange est ensuite filtré et concentré à sec, donnant ainsi 4 g (rdt 0,57 %) d'extrait cyclohexanique. Les marcs sont ensuite extraits successivement par l'acétate d'éthyle et le méthanol suivant le même protocole décrit précédemment, donnant 14,57 g (rdt 2,08 %) d'extrait acétate d'éthyle et 100 g (rdt 14,28 %) d'extrait méthanolique. L'ensemble de ces opérations d'extraction est résumé dans le schéma 3.2.

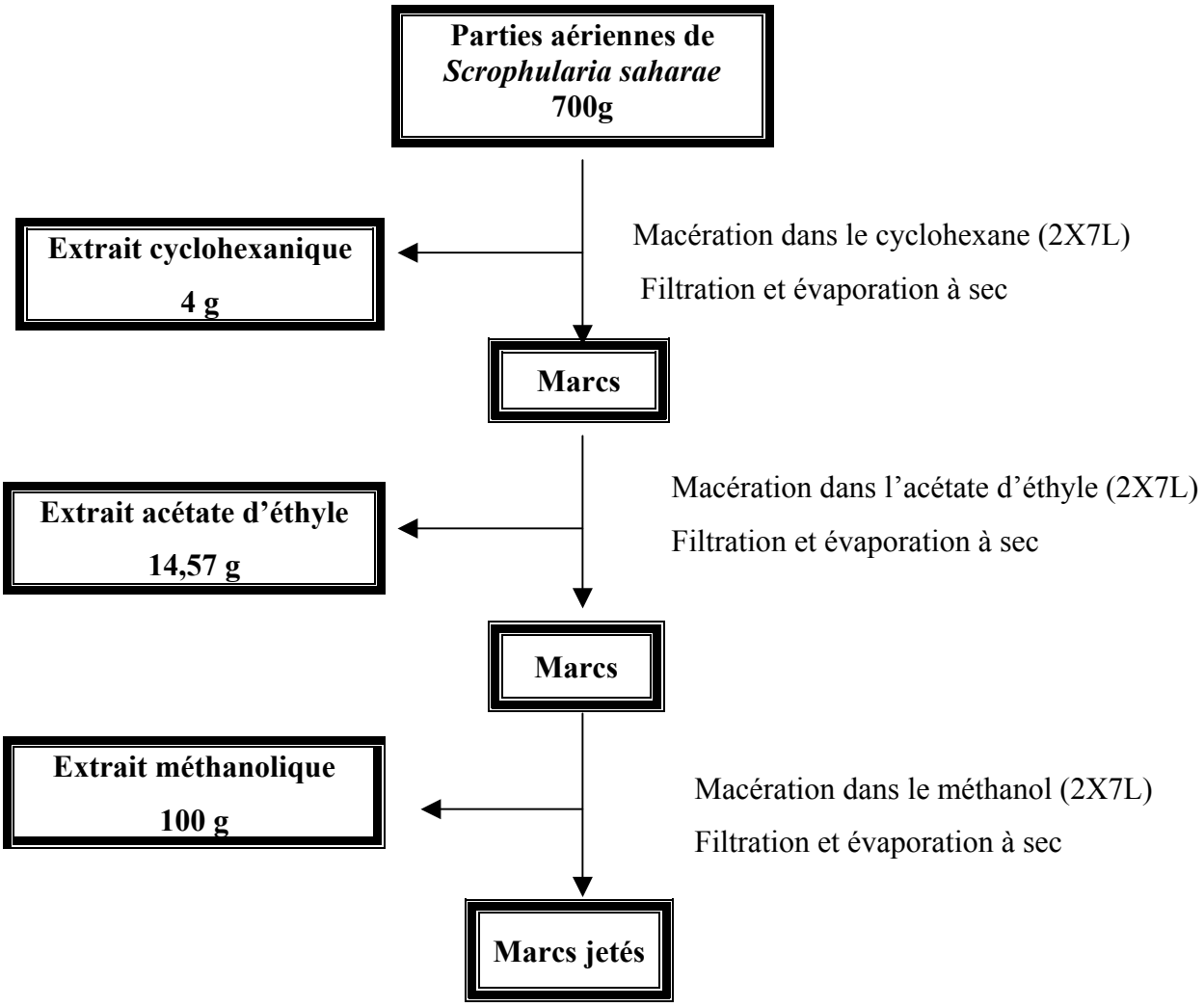


Schéma 3.2 : ***Extraction des parties aériennes de Scrophularia saharae***

3.1.2.1 *Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes et isolement des composés* **F** *et* **G**

L'extrait méthanolique (15 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie sur une colonne de polyamide SC6, en utilisant un gradient eau/méthanol (10/00 à 20/80). Ceci a permis de collecter cinq fractions allant de F_1 à F_5.

La fraction F_1 d'un poids de 1 g est mise à chromatographier sur colonne de gel de silice en phase et pression normales. L'élution a été réalisée par le chloroforme pur puis un gradient de solvants chloroforme/méthanol/eau, permettant d'obtenir 14 lots.

Les lots 9 et 10 réunis montrent en C.C.M une tache invisible à l'UV et se colorant en rose après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage. L'examen de cette tache en CCM RP-18 après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage, met en évidence la présence de trois produits dont deux **E** et **F** largement prédominants. Leur fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice au moyen du mélange : chloroforme/méthanol/eau (90/10/1), a permis de récolter 6 sous-lots. Le sous-lot 4 jugé intéressant soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 dans le mélange méthanol/eau 60/40 a permis d'isoler les deux composés **E** et **F.** Ces derniers sont soumis séparément à une ultime purification sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol.

Le lot 11 montre en C.C.M RP-18 deux taches dont une très minoritaire, invisibles en UV et se révélant en rose à la vanilline sulfurique. Ce lot soumis successivement à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le système de solvants chloroforme/méthanol/eau à différents gradients, puis une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 dans le mélange méthanol/eau 60/40, et enfin une filtration sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a permis d'obtenir le composé **G** à l'état pur.

3.2 Détermination de structures des composés A-E isolés de l'extrait chloroformique des racines

3.2.1 Détermination de structure du composé A

Le composé **A** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme, dichlorométhane, méthanol. Le spectre d'absorption UV (Figure 3.2) montre des bandes d'absorption maximales à 201, 217 et 277 nm caractéristiques d'un système éther-énol d'un iridoïde et d'un chromophore cinnamoyle [25].

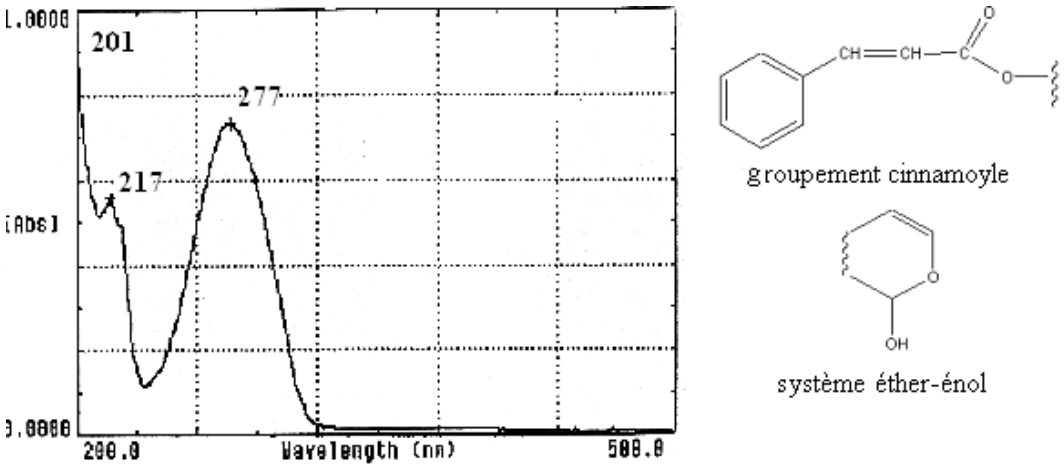


Figure 3.2 : Spectre UV du composé A

Les spectres de masse ESI enregistrés en modes positif et négatif (Figure 3.3), présentent respectivement des pics d'ions moléculaires à m/z = 833 $[M+Na]^+$ et m/z = 809 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 810 et correspondant à une formule brute en $C_{41}H_{46}O_{17}$. Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif, montre un ion de fragmentation à *m/z* = 685 $[(M+Na)-148]^+$ correspondant à la perte d'un groupement cinnamoyle et un autre fragment à *m/z* = 495 $[(M+Na)-148-60]^+$ correspondant à la perte d'un groupement acétate.

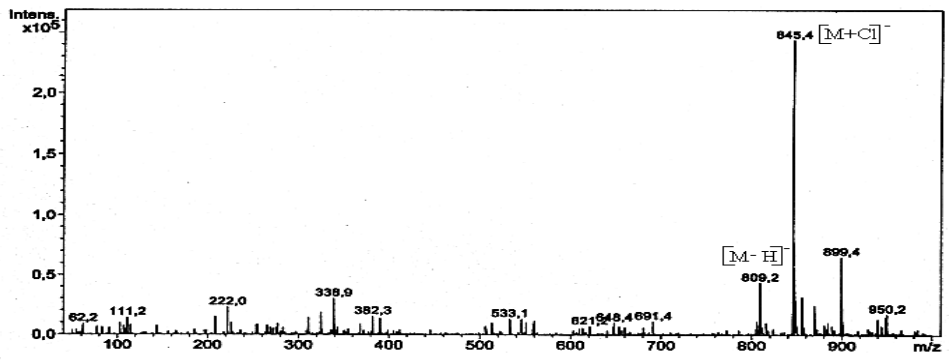


Figure 3.3 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé A

Le spectre infra-rouge (Figure 3.4) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyle (3400 cm^{-1}), carbonyle (1700 cm^{-1}) et oléfinique (1630 cm^{-1}).

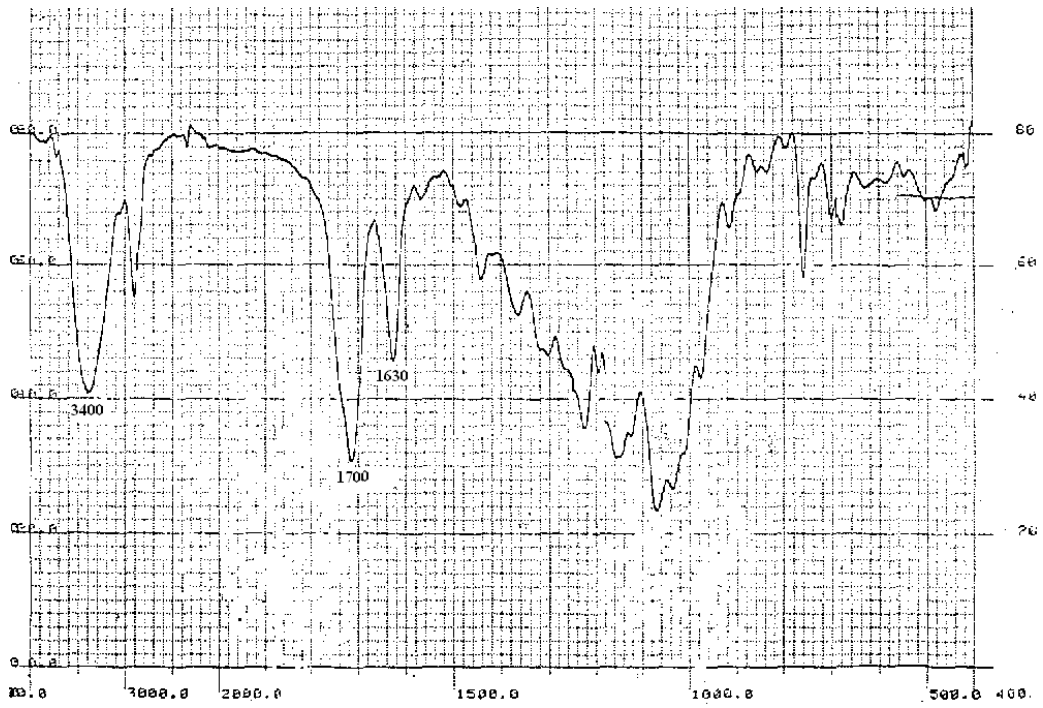
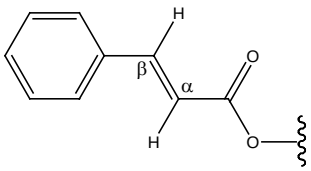


Figure 3.4 : Spectre IR du composé A

Le RMN ^1H du composé **A** enregistré à 500 MHz (Figures 3.5 et 3.6) permet d'observer :

- Des signaux à champ faible allant de 7,53 à 7,37 ppm, s'intégrant pour dix protons caractéristiques de protons aromatiques.
- Quatre doublets (*d*, J = 16 Hz) s'intégrant chacun pour un proton à δ = 7,71, 7,62, 6,44 et 6,36 ppm (H- β', H-β, H- α' et H-α) caractéristiques de protons oléfiniques couplant deux à deux. La valeur de la constante de couplage indique qu'ils sont en position trans.

La présence de ces quatre protons oléfiniques et des dix protons aromatiques nous permet de suggérer la présence de deux groupements trans-cinnamoyles.



trans-cinnamoyle

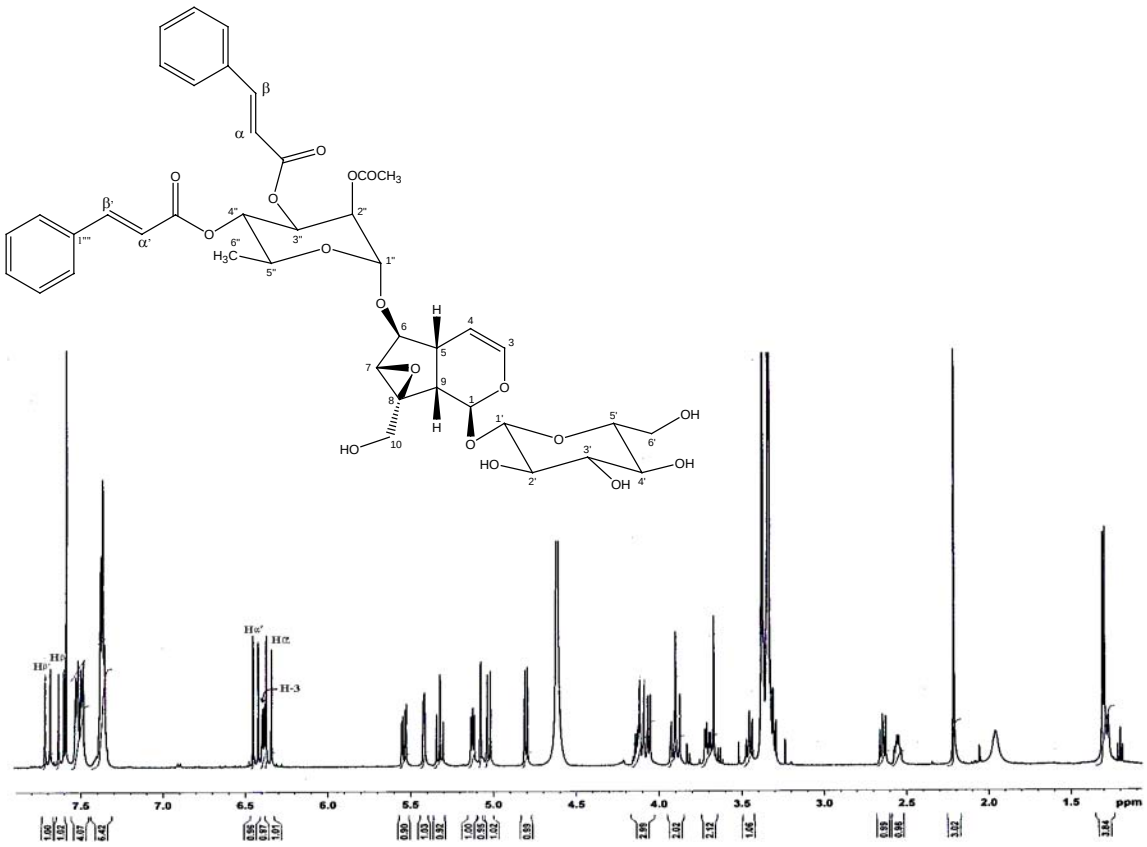


Figure 3.5: Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé A

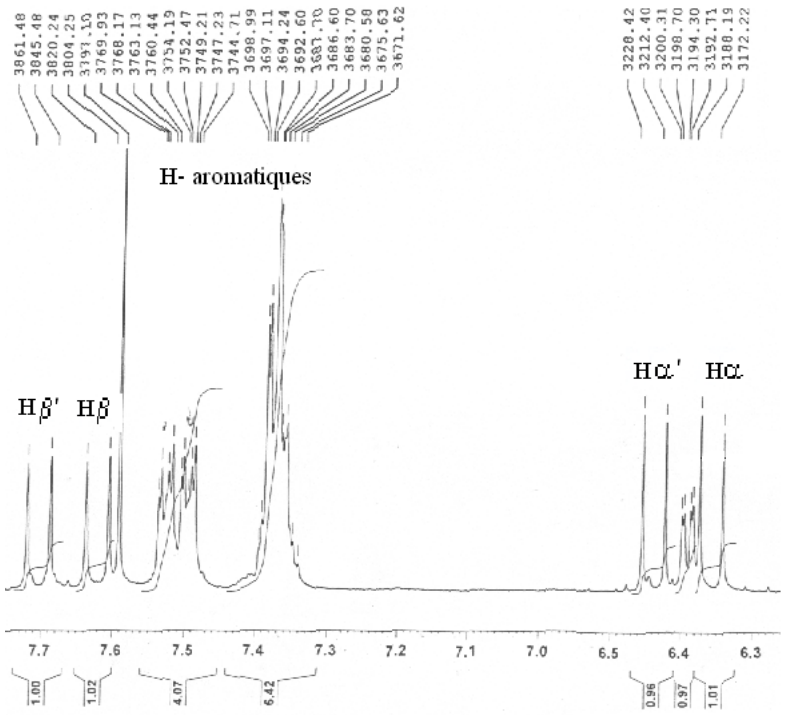


Figure 3.6: Spectre RMN ^{1}H étalé (région 6,3-7,7 ppm) du composé A

En plus de ces signaux, le spectre RMN ^{1}H (Figure 3.7) montre également :

- Un signal doublet (J = 7,9 Hz) résonant à δ = 4,81 ppm, caractéristique d'un proton anomère de sucre (H-1').
- Un signal sous forme de doublet de doublet (J = 6 et 1,6 Hz) résonant à δ = 6,39 ppm, caractéristique d'un proton oléfinique (H-3).

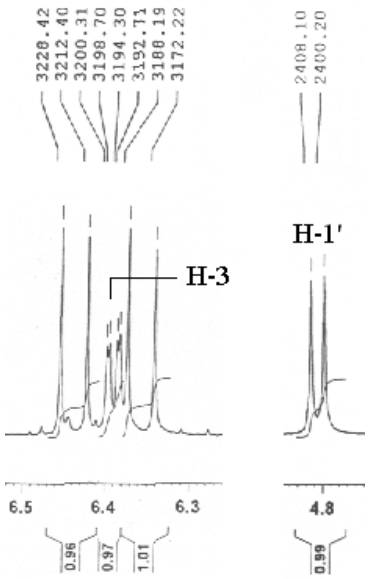


Figure 3.7: Spectre RMN ^{1}H étalé (région 4,8 ; 6,3-6,5 ppm) du composé A

L'expérience COSY H-H (Figure 3.8) montre des couplages entre :

- Le proton H-α et le proton H-β.
- Le proton H-α' et le proton H-β'.
- Le proton oléfinique H-3 et un autre proton oléfinique H-4 résonant à δ = 5,13 ppm.
- Le proton H-4 et le proton H-5 résonant à δ = 2,55 ppm.
- Le proton H-5 et les protons H-6 et H-9 résonant respectivement à δ = 4,06 et 2,65 ppm.
- Le proton H-6 et le proton H-7 résonant à δ = 3,57 ppm.
- Le proton H-9 et le proton H-1 résonant à δ = 5,03 ppm.
- Deux protons fortement couplés au regard de la grande tache de corrélation, résonant sous forme de deux doublets propres à un système AB, résonant respectivement à δ = 4,11 ppm (H-10a) et résonant à δ = 3,89 ppm (H-10b).

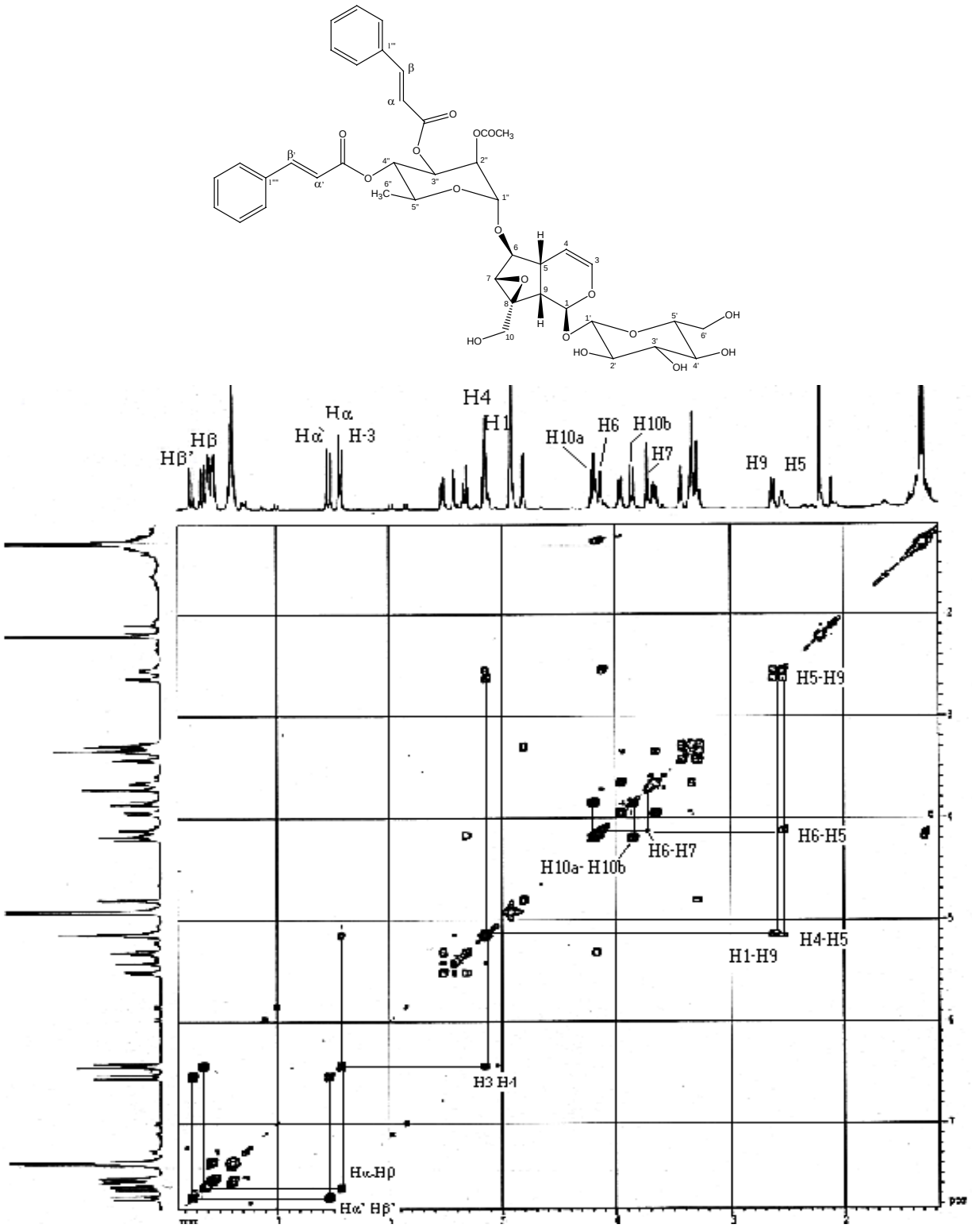
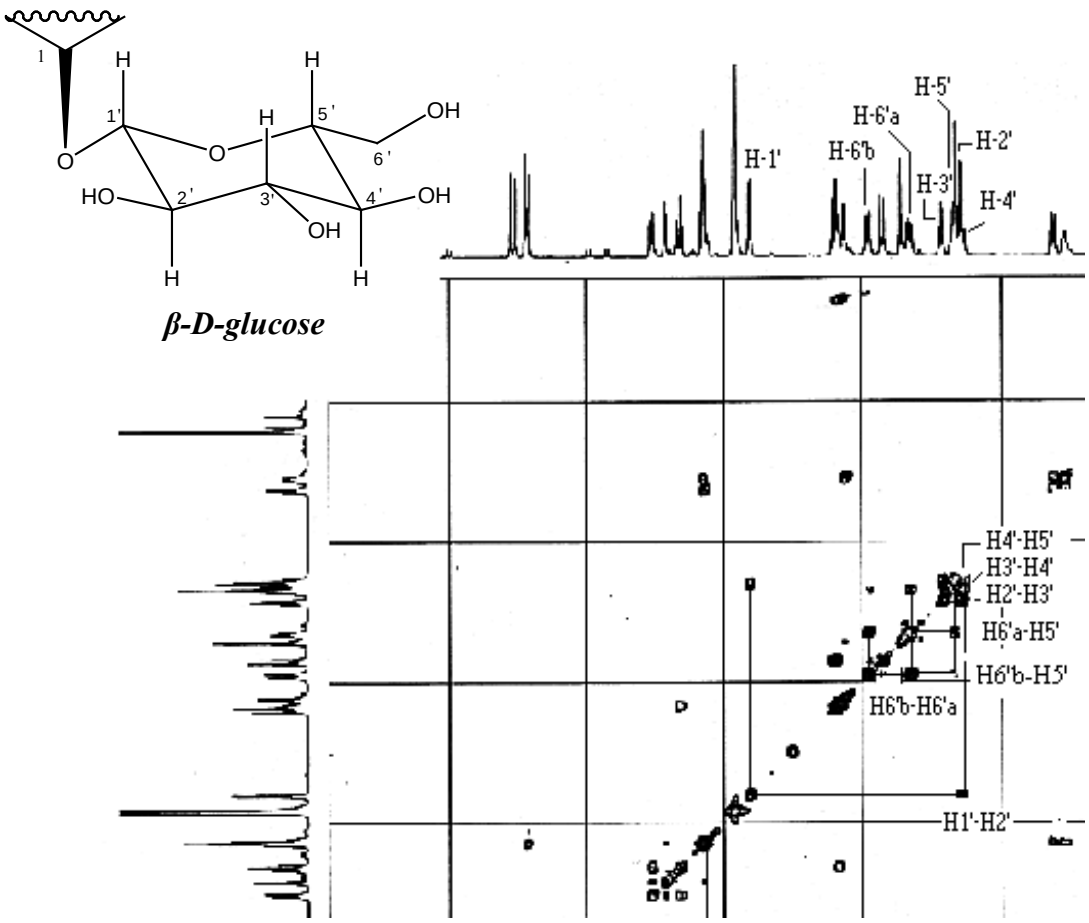


Figure 3.8 : Spectre COSYH-H du composé A

Partant du proton anomère de sucre cité précédemment et résonant à δ = 4,81 ppm, l'expérience COSY H-H (Figure 3.9) permet d'identifier un hexose. En effet, il est observé les corrélations entre :

- Le proton anomère H-1' et le proton H-2' résonant à δ = 3,33 ppm sous forme de doublet de doublet (*J* = 7,9 et 9 Hz).
- Le proton H-2' et le proton H-3' résonant sous forme de triplet à δ = 3,46 ppm (*J* = 9 Hz), lui-même corrélant avec un signal triplet à δ = 3,31 ppm (*J* = 9Hz) correspondant au proton H-4'. Ce dernier donnant une tâche de corrélation avec le proton H-5' résonant sous forme de multiplet à δ = 3,35 ppm.
- Le proton H-5' et deux protons résonant sous forme de doublet de doublet chacun à 3,71 ppm (*J* = 12,1 et 5,4 Hz) et 3,92 ppm (*J* = 12,1 et 1,3 Hz) correspondant respectivement aux protons H-6'a et H-6'b. Ces deux protons constituant la partie AB d'un système ABX d'un hexose.

Les grandes tâches de corrélation traduisant de grandes valeurs de constantes de couplage, indiquent que tous les protons caractérisant l'hexose sont axiaux. Il s'agit donc d'un D-glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{1'-2'}$ = 7,9 Hz.



β-D-glucose

Figure 3.9 : Spectre COSY H-H du glucose

L'expérience de corrélation directe carbone–proton ou HSQC (Figure 3.10) montre les couplages entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à δ = 93,7 ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à δ = 141,1 ppm.
- Le proton H-4 et son carbone C-4 résonant à δ = 101,8 ppm.
- Le proton H-5 et son carbone C-5 résonant à δ = 35,7 ppm.
- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à δ = 83,5 ppm.
- Le proton H-7 et son carbone C-7 résonant à δ = 58 ppm.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ = 41,8 ppm.
- Les deux protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ = 60 ppm.

Toutes ces données spectrales nous orientent vers un squelette d'un iridoïde très présent au sein de la famille des Scrophulariaceae en général et le genre *Scrophularia* en particulier [22] : le catalpol.

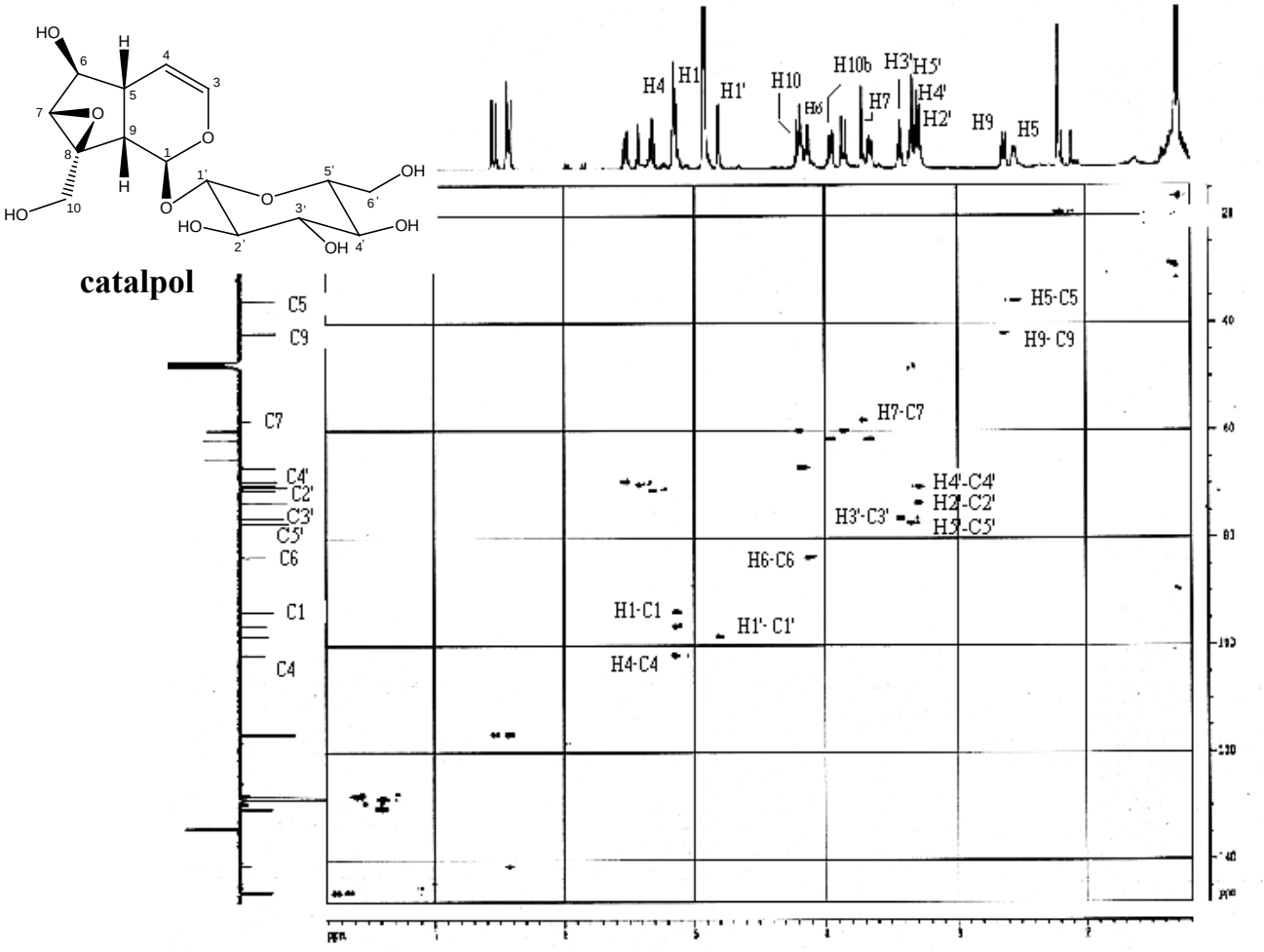


Figure 3.10 : Spectre HSQC du catalpol

L'expérience HMBC (Figure 3.11) montre les couplages C-H longue distance entre :

- Le proton H-1 et des carbones résonant à δ = 35,7 , 41,8 , 65,1 , 141,1 et 98,2 ppm, correspondant respectivement aux carbones C-5, C-9, C-8, C-3 et C-1'.
- Le proton H-6 et les carbones résonant à δ = 35,7 , 58 et 101,8 ppm, correspondant respectivement aux carbones C-5, C-7, C-4 ainsi qu'un carbone résonant à δ = 96,3 ppm, caractéristique d'un carbone anomère indiquant ainsi une substitution en C-6 du noyau catalpol par un sucre.

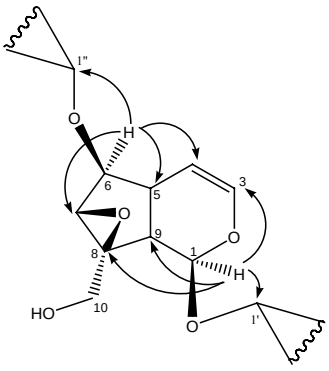


Schéma 3.3 : ***Corrélations C-H en ^{2}J et ^{3}J mettant en évidence la position des substituants au niveau du squelette catalpol***

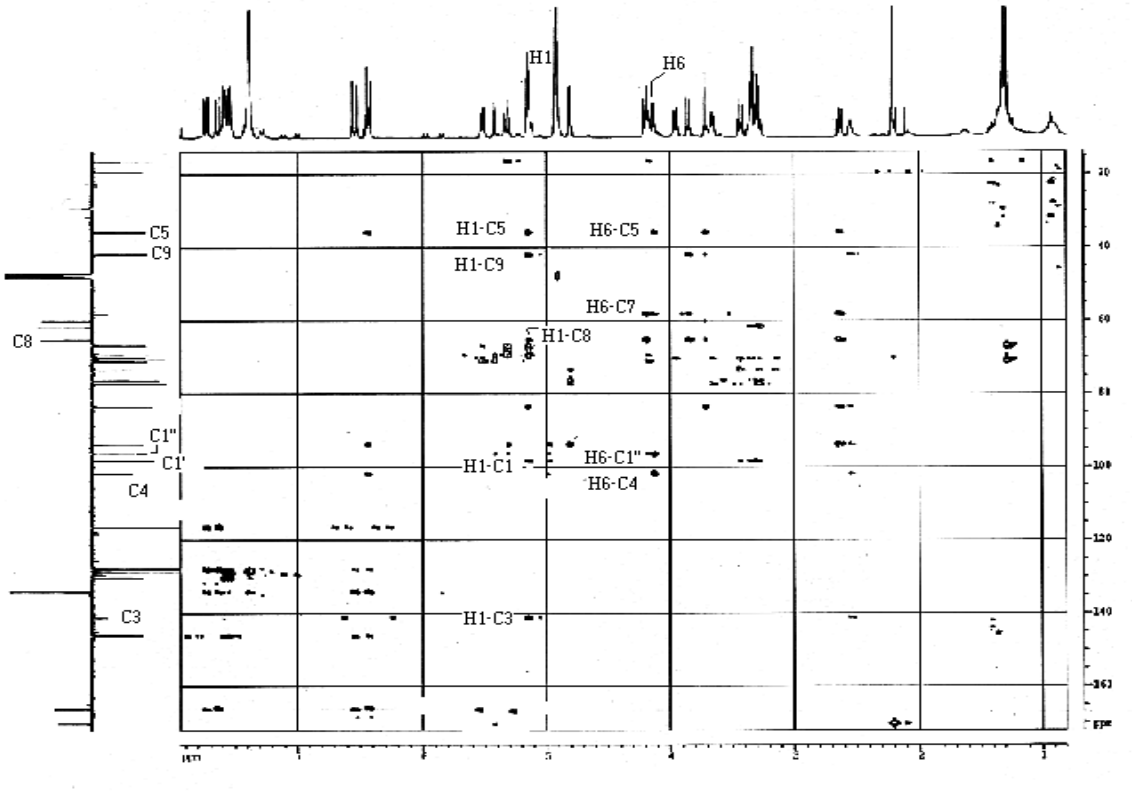


Figure 3.11 : Spectre HMBC mettant en évidence la position des substituants au niveau du squelette catalpol

La présence d'un sucre, voire d'un deoxyhexose, est attestée également par l'observation en RMN ^{1}H (Figure 3.12) d'un signal doublet résonant à champ fort (δ = 1,3 ppm) correspondant à un méthyle (3H, *d*, *J* = 6,2 Hz). Ce sucre substitue comme il a été déjà cité, le catalpol en C-6.

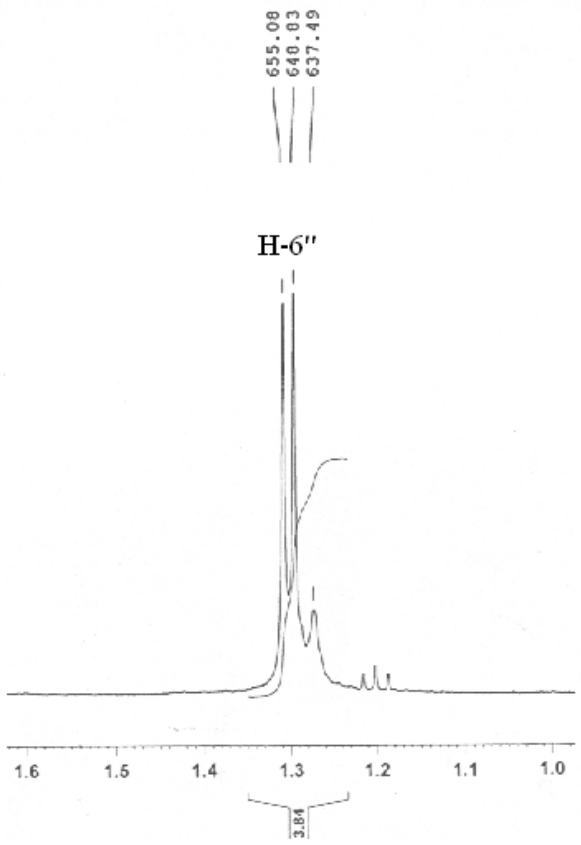
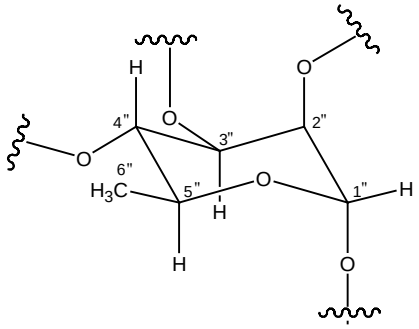


Figure 3.12 : Spectre RMN ^{1}H étalé (région 1-1,6 ppm) du composé A

Partant de ces protons méthyliques (H-6"), l'expérience COSY H-H (Figure 3.13) met en évidence les corrélations entre :

- Ces derniers et le proton H-5" résonant à δ = 4,13 ppm.
- Le proton H-5" et un proton résonant sous forme de triplet à δ = 5,33 ppm (*t*, *J* = 10,3 Hz) correspondant au proton H-4".
- Le proton H-4" et un proton résonant sous forme de doublet de doublet à δ = 5,54 ppm (*dd*, *J* = 10,3 et 3,5 Hz) correspondant au proton H-3".
- Le proton H-3" et un proton résonant sous forme de doublet de doublet à δ = 5,42 ppm (*dd*, *J* = 3,5 et 1,7 Hz) correspondant au proton H-2".
- Le proton H-2" et un proton résonant sous forme de doublet à δ = 5,08 ppm (*d*, *J* = 1,7 Hz) correspondant au proton anomère H-1".

Ces corrélations confirment donc la présence d'un deoxyhexose. La valeur de la constante de couplage de l'ordre de 10,3 Hz entre les protons H-3" et H-4", H-4" et H-5" montre qu'ils sont tous axiaux. Ce sucre est donc un rhamnose de configuration α au regard de la constante de couplage $J_{1"-2"}$ = 1,7 Hz [56].



α -rhamnose

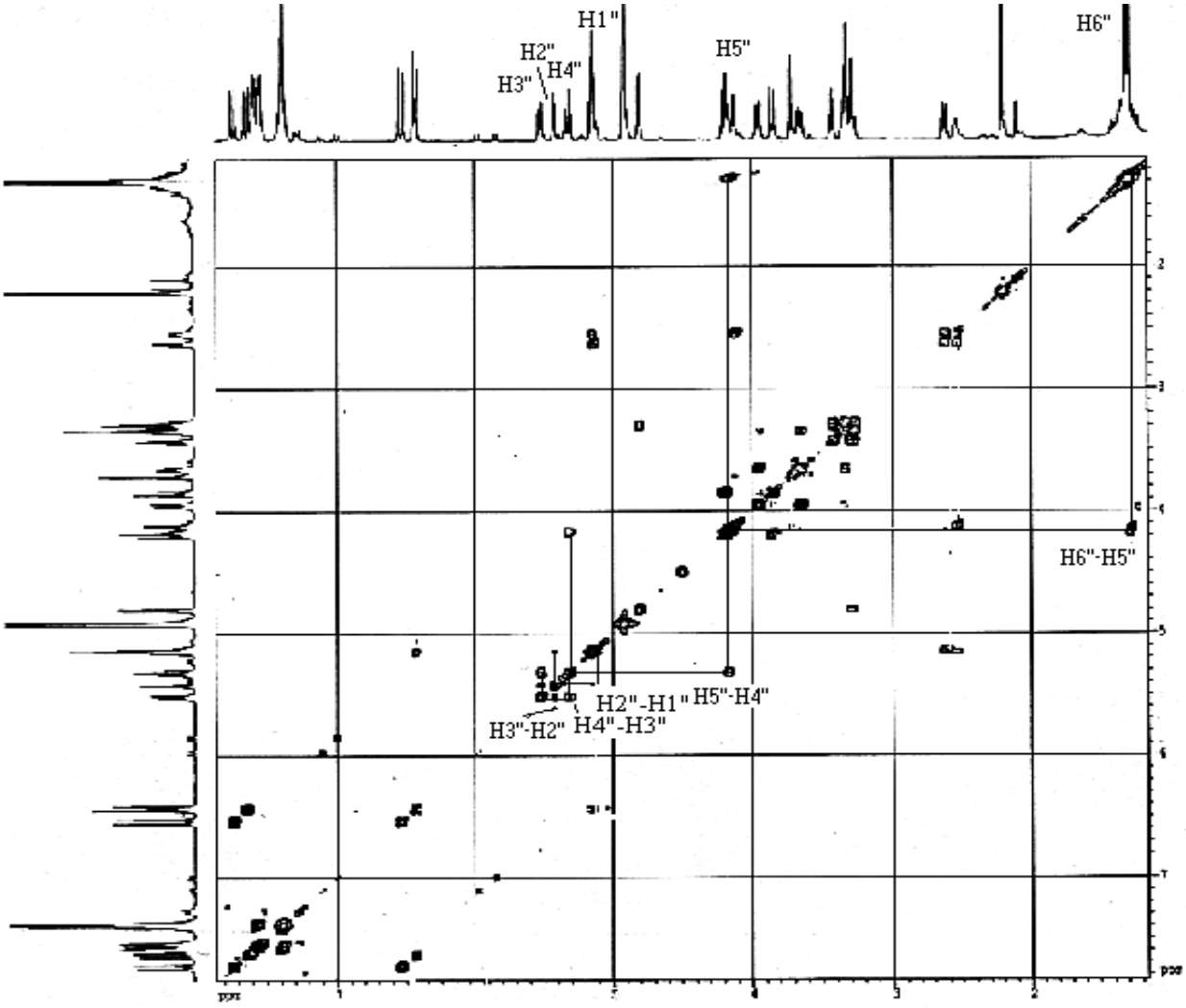


Figure 3.13 : Spectre COSY H-H du rhamnose

Les carbones du rhamnose sont caractérisés par expérience de corrélation carbone – proton ou HSQC qui montre les couplages directs entre :

- Les protons méthyliques H-6" et leur carbone C-6" résonant à δ = 16,4 ppm.
- Le proton anomère H-1" et son carbone C-1" résonant à δ = 96,3 ppm.
- Les protons H-2", H-3" et H-4" et leurs carbones résonant respectivement à 70,3 , 70 et 71 ppm.

Le spectre HSQC suivant (Figure 3.14) illustre les attributions des protons et carbones du composé **A**.

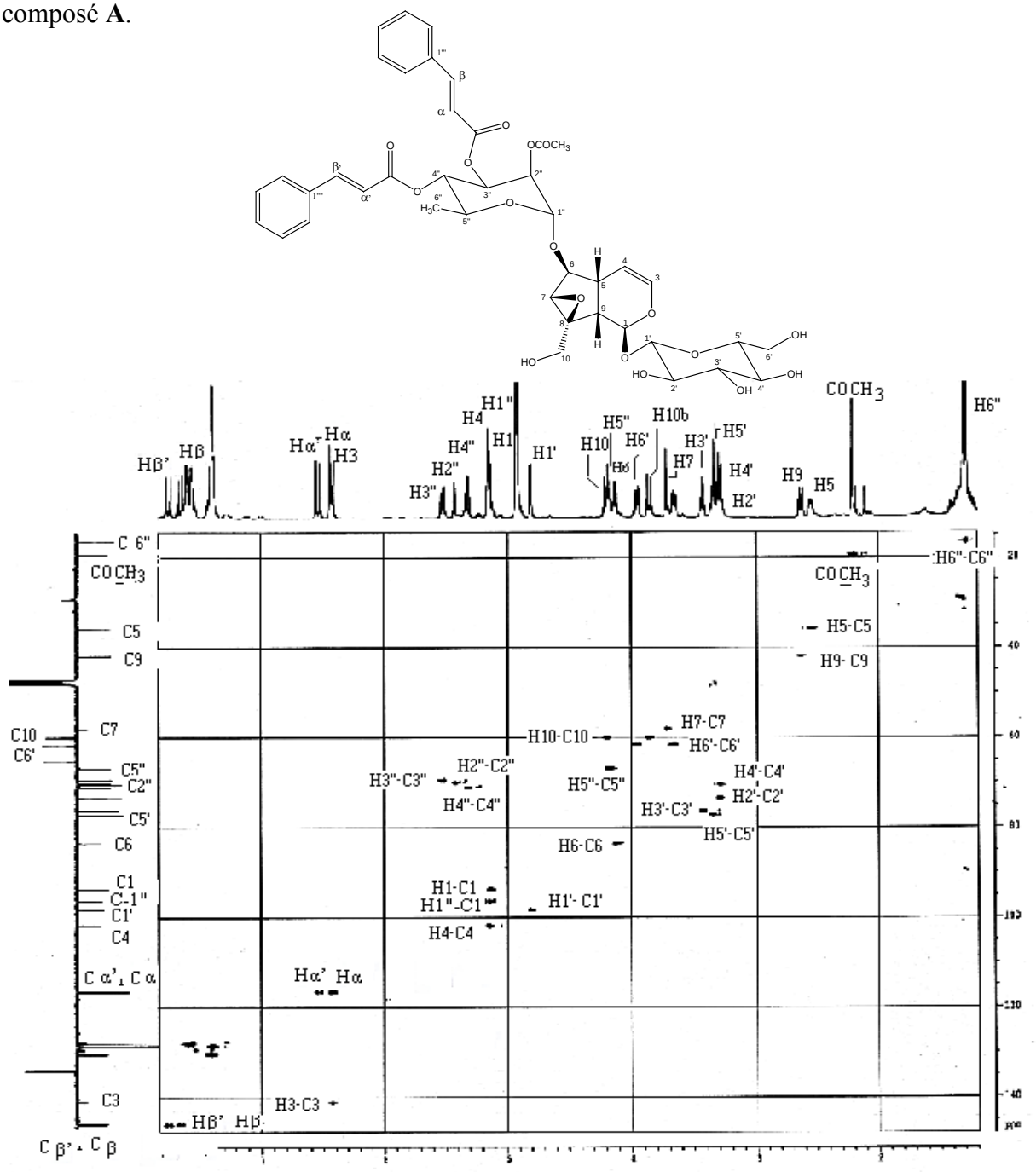


Figure 3.14 : Spectre HSQC du composé A

En plus des protons déjà identifiés, le spectre RMN ^1H (Figure 3.5) montre trois protons résonant sous forme d'un singulet à δ = 2,22 ppm, correspondant aux protons méthyliques d'un groupement acyle $COCH_3$.

A l'issue de cette analyse, il apparaît ainsi que le compose A est constitué :

- D'un squelette catalpol.
- D'un deoxyhexose, α-rhamnose en l'occurrence, porté par le carbone C-6 du catalpol.
- D'un groupement acyle $COCH_3$ et deux groupements trans-cinnamoyles.

Les valeurs déblindées des déplacements chimiques (> 5 ppm) des protons H-2", H-3" et H-4" du rhamnose, permettent d'ores et déjà de suggérer que les trois groupements acyles substituent les positions 2",3"et 4" du rhamnose.

L'expérience HMBC (Figure 3.15) constitue un outil de choix pour déterminer ou plutôt confirme sans ambiguïté les positions précises de ces trois groupements acyles. En effet, on observe des corrélations entre :

- Les protons méthyliques du groupement $COCH_3$ et deux carbones résonant à δ = 70,3 et 170,2 ppm, correspondant respectivement au carbone C-2" et celui du carbonyle, indiquant ainsi que le groupement acétoxy $OCOCH_3$ est branché en position C-2" du rhamnose.
- Le proton H-3" du rhamnose et le carbonyle résonant à δ = 165,8 ppm, confirmant ainsi la substitution du rhamnose en C-3" par un groupement cinnamoyle.
- Le proton H-4" du rhamnose et le carbonyle résonant à δ = 166,2 ppm, attestant ainsi que le second groupement cinnamoyle substitue le rhamnose en C-4".

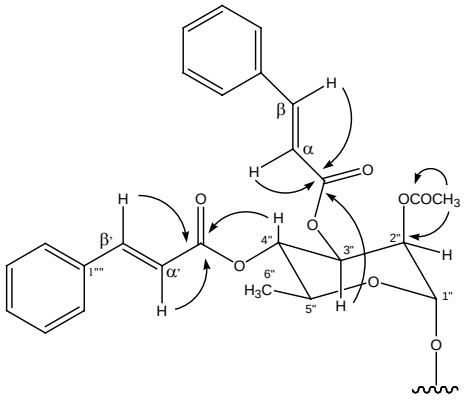


Schéma 3.4 : ***Corrélations C- H en ^2J et ^3J mettant en évidence la position des substituants au niveau du rhamnose***

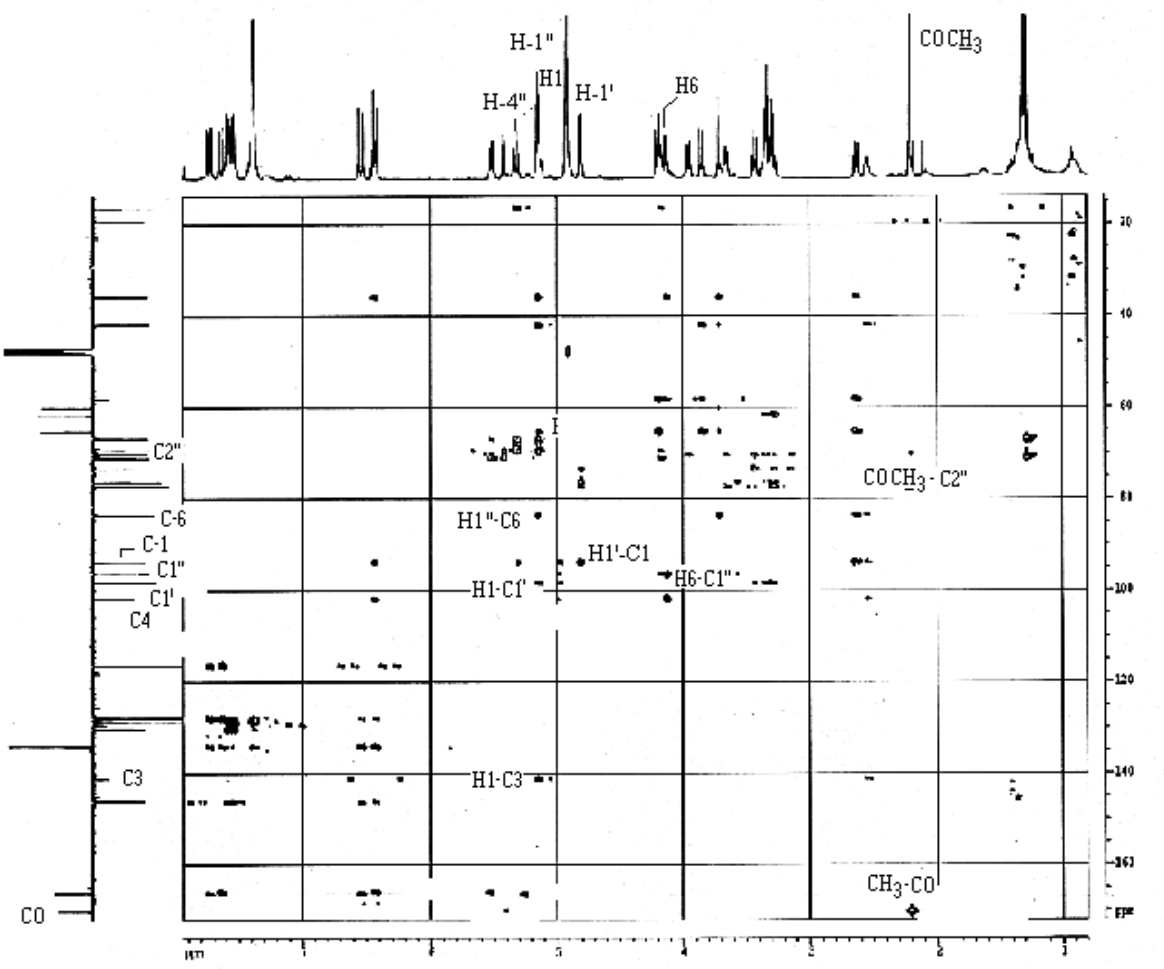


Figure 3.15 : Spectre HMBC mettant en évidence les positions des groupements acyles

L'expérience ROESY (Figure 3.16) , technique permettant d'observer les effets Overhauser entre protons dans l'espace, permet d'assigner la stéréochimie particulièrement au niveau du catalpol, plus précisément au niveau des carbones C-5, C-9, C-1 et C-10.

Cette expérience montre les corrélations entre :

- Le proton anomère H-1' du glucose de configuration α et le proton H-1 de la génine, attestant ainsi que ce dernier est également de configuration α.
- Ce proton H-1α de la génine et les protons H-10, indiquant ainsi que le groupement CH_2OH substituant le carbone en C-8 est également de configuration α.

L'absence de corrélation entre les protons H-10α et H-9, confirme la configuration β du proton H-9.

D’autres corrélations sont également mises en évidence entre :

- Le proton H-9 β et le proton H-5 également donc de configuration β.
- Le proton H-10α et le proton H-7α.
- Le proton H-7α et le proton H-6 confirmant ainsi sa configuration α.

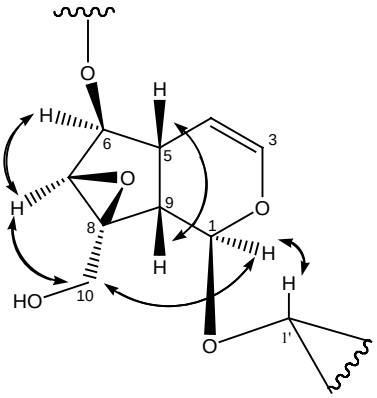


Schéma 3.5 :*Corrélations H-H ROESY au niveau du squelette catalpol*

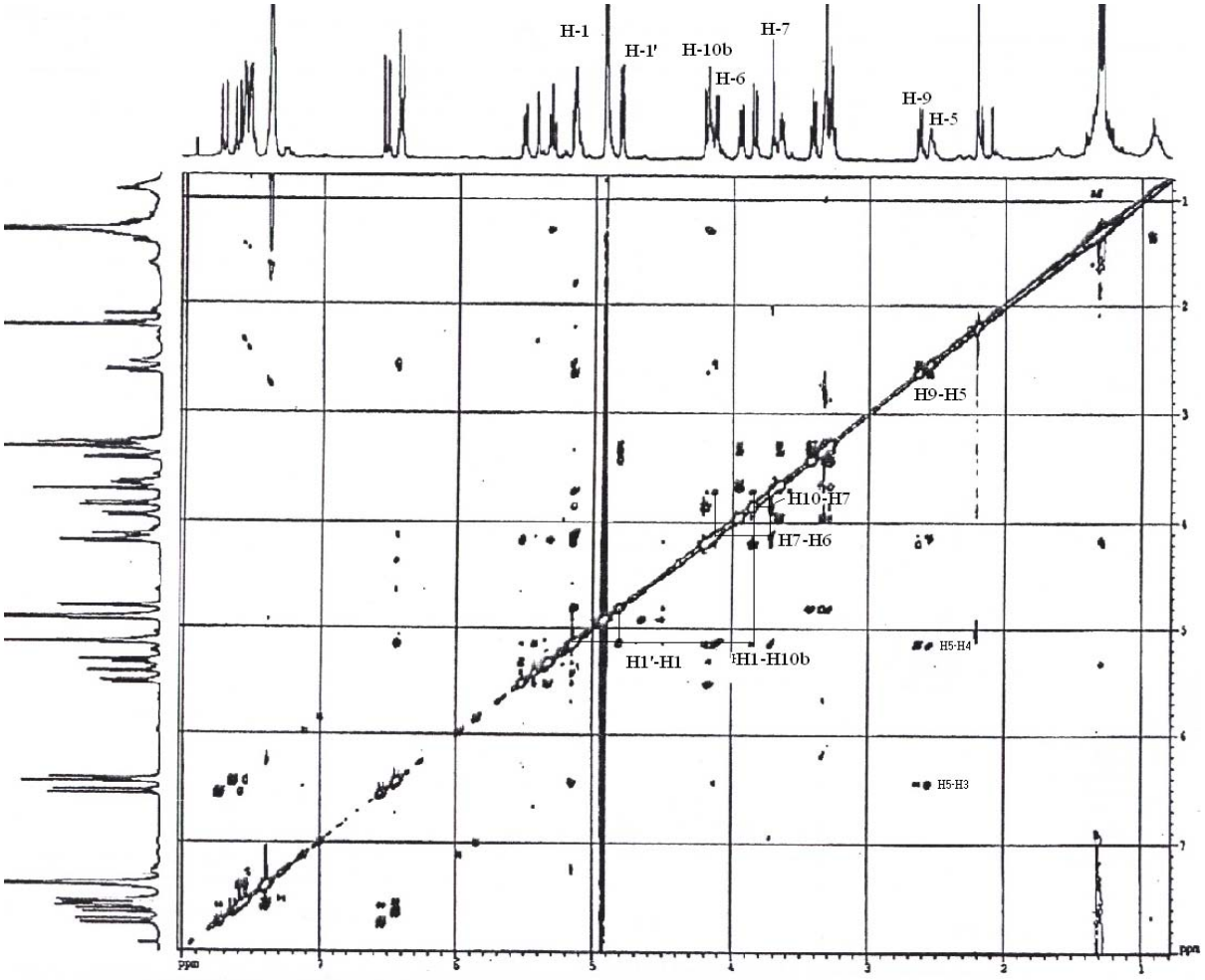


Figure 3.16 : Spectre ROESY du squelette catalpol

Cette analyse spectrale s'appuyant particulièrement sur les techniques de RMN bidimensionnelle, permet d'attribuer sans équivoque tous les signaux de résonance des protons et carbones au niveau des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C (Figure 3.17 et 3.18).

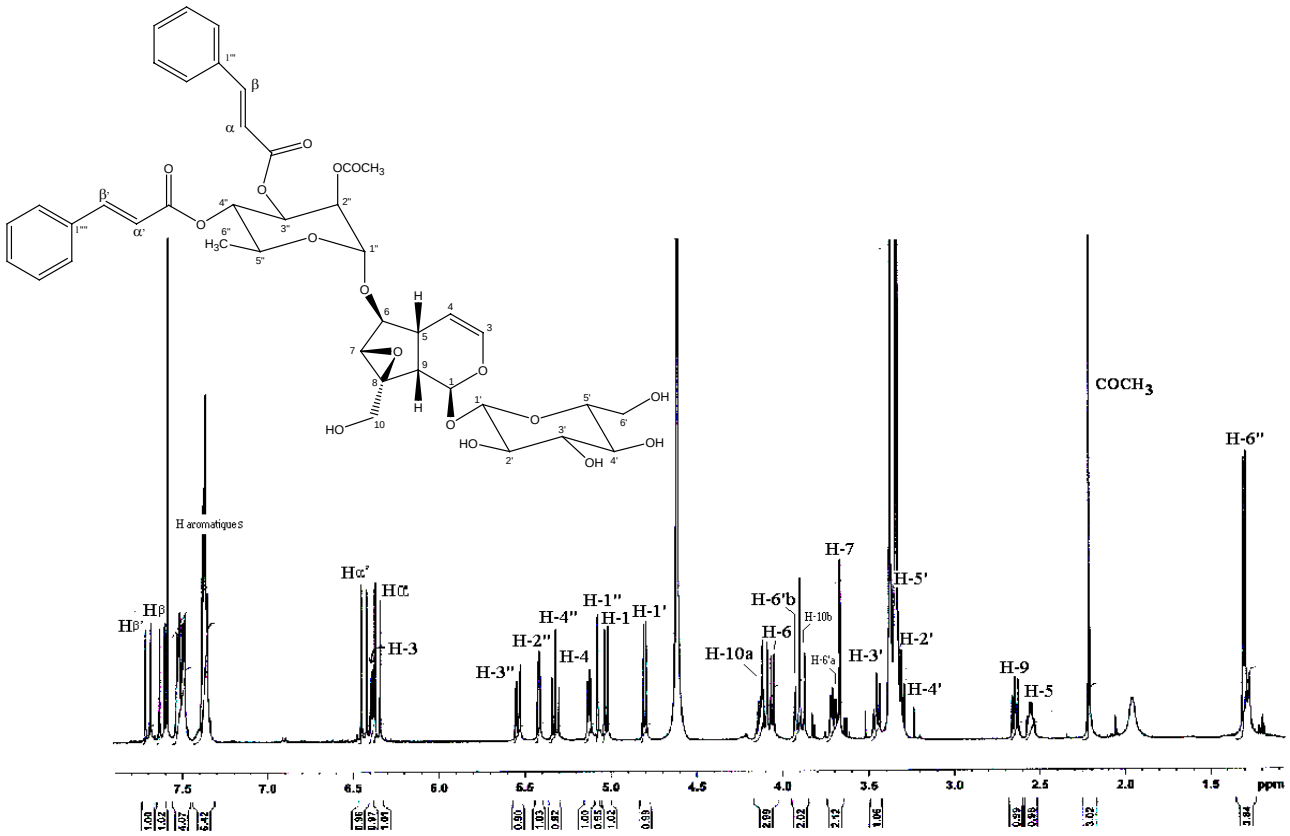


Figure 3.17 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé A

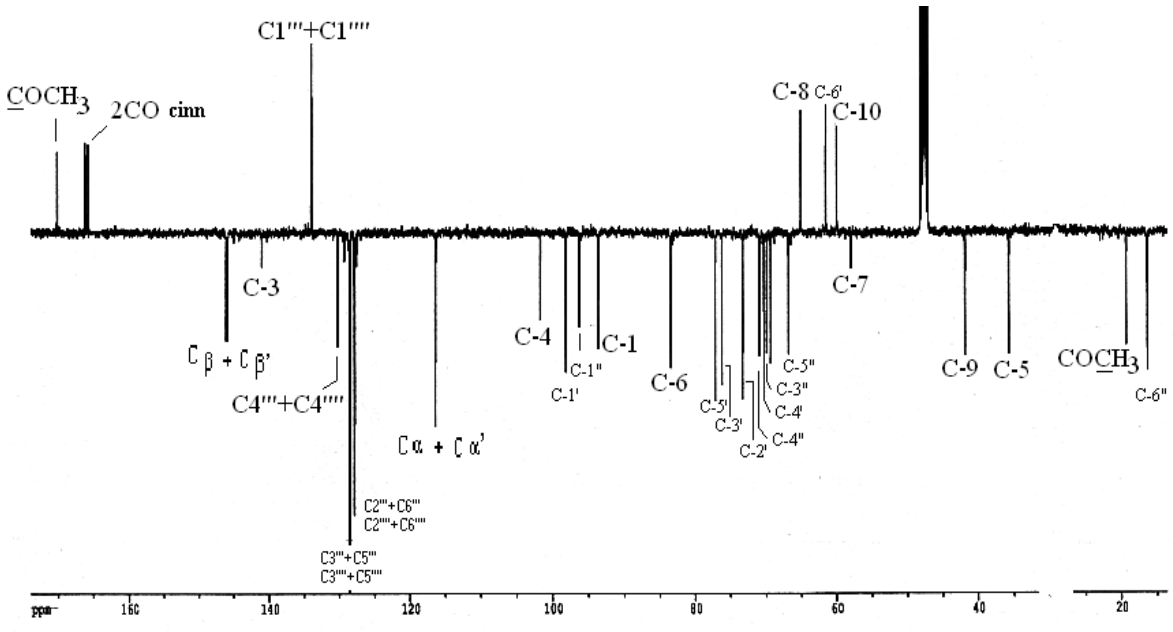


Figure 3.18 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé A

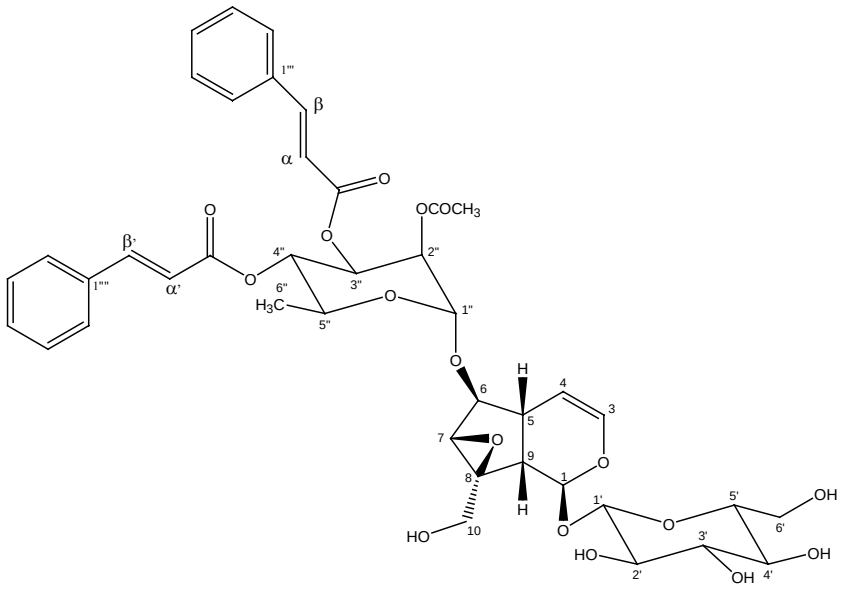
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **A** sont représentées dans le tableau suivant :

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1 (CH)	93,7	5,03 *d*	9,7
3 (CH)	141,1	6,39 *dd*	6 – 1,6
4 (CH)	101,8	5,13 *dd*	6 – 4,7
5 (CH)	35,7	2,55 *m*	-
6 (CH)	83,5	4,06 *d*	8,1
7 (CH)	58	3,57 *sl*	-
8 (C)	65,1	-	-
9 (CH)	41,8	2,65 *dd*	9,7 – 7,6
10 (CH_2)	60	4,11 *d* (H-10a)	13,2
		3,89 *d* (H-10b)	13,2
Glucose			
1'(CH)	98,2	4,81 *d*	7,9
2'(CH)	73,4	3,33 *dd*	7,9-9
3'(CH)	76,2	3,46 *t*	9
4'(CH)	70,6	3,31 *t*	9,5
5'(CH)	77,2	3,35 m	-
6'(CH_2)	61,5	3,71 *dd* (H-6'a)	12,1 – 5,4
		3,92 *dd* (H-6'b)	12,1 – 1,3
Rhamnose			
1"(CH)	96,3	5,08 *d*	1,7
2"(CH)	70,3	5,42 *dd*	3,5 – 1,7
3"(CH)	70	5,54 *dd*	10,3 – 3,5
4"(CH)	71	5,33 *t*	10,3
5"(CH)	66,8	4,13 *m*	-
6"(CH_3)	16,4	1,30 *d*	6,2
Cinnamoyle I			
1'"(C)	134	-	-
2'", 6'"(CH)	127,9	7,50 *m*	-
3'", 5'"(CH)	128,6	7,37 *m*	-
4'"(CH)	130,3	7,37 *m*	-

α (CH)	116,4	6,36 *d*	16
β (CH)	146	7,62 *d*	16
CO	165,8	-	-
Cinnamoyle II			
1""(C)	134	-	-
2"" 6""(CH)	127,9	7,53 *m*	-
3"", 5""(CH)	128,6	7,37 *m*	-
4""(CH)	130,3	7,37 *m*	-
α'(CH)	116,1	6,44 *d*	16
β'(CH)	146,2	7,71 *d*	16
CO	166,2	-	-
$CO\underline{C}H_3$	19,3	2,22 *s*	-
$\underline{C}OCH_3$	170,2	-	-

Tableau 3.1 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé A

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé **A** : 6-*O*-[(2"-*O*-acetyl-3",4"-di-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]- catalpol.



Composé A

Les attributions des spectres RMN ^{1}H et RMN ^{13}C (DEPT) se sont avérées en concordance avec les déplacements chimiques des protons et carbones d'un composé de structure analogue donc, appelé scropolioside B isolé de *Scrophularia scopolii* [25]. Il été isolé également de *Scrophularia koelzii* [22], des feuilles de *Gmelina arborea* [57] et très récemment des parties aériennes de *Scrophularia deserti* [15]. Il a été également isolé dans notre laboratoire à partir des parties aériennes de *Verbascum ballii* (Scrophulariaceae) [58].

3.2.2 Détermination de structure du composé B

Le composé **B** obtenu également sous forme de poudre blanche, présente une formule moléculaire en $C_{42}H_{48}O_{18}$. Formule déterminée grâce aux spectres de masse ESI (Figure 3.19) enregistrés en modes négatif et positif, présentant respectivement des pics d'ions moléculaires à *m/z* = 875 $[M+Cl]^-$ et *m/z* = 863 $[M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire égale à 840.

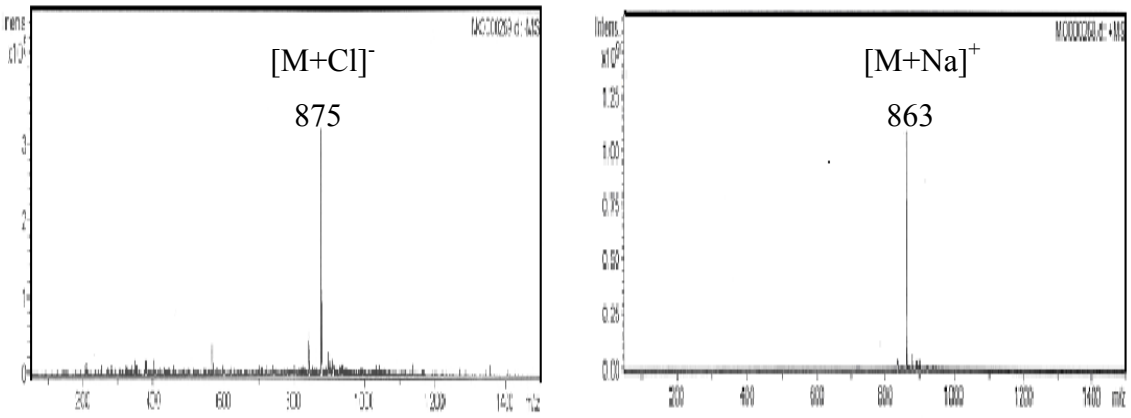


Figure 3.19 : Spectres de masse ESI du composé B

Les diverses techniques spectroscopiques mises en oeuvre pour établir la structure du composé **B**, montrent une similitude structurale avec le composé **A** décrit précédemment.

Le spectre UV de ce composé montre les mêmes bandes d'absorption à 203, 216 et 278 nm, suggérant la présence d'un système éther-énol et d'un chromophore cinnamoyle [25].

Le spectre RMN ^1H (Figure 3.19) est très voisin de celui de composé **A**. Il permet de reconnaître entre autres :

- Les protons H-5 (δ = 2,55 ppm), H-9 (δ = 2,64 ppm), H-1 (δ = 5,02 ppm), H-3 (δ = 6,39 ppm) et enfin le proton anomère H-1' du glucose, indiquant la présence du noyau catalpol.
- Les protons méthyliques H-6" à δ = 1,31 ppm (*d*, *J* = 6,2 Hz) et le proton anomère H-1" à δ = 5,07 ppm *(d*, *J* = 1,7 Hz) du rhamnose.
- Les deux systèmes AX résonant à δ = 6,36 et 7,62 ppm (J_{AX} = 16 Hz), δ = 6,29 et 7,71 ppm (J_{AX} = 16 Hz) correspondant aux deux groupements cinnamoyles.

Les différences majeures par rapport au composé **A**, résident en la présence :

- D'un groupement méthoxy OCH_3 à δ = 3,83 ppm sous forme de singulet.
- De deux signaux doublets de protons aromatiques d'intégration 2H chacun et résonant à δ = 6,90 et 7,48 ppm (*d*, *J* = 8,9 Hz), très caractéristiques d'un groupement *p*-méthoxy-trans-cinnamoyle [20]. La substitution d'un radical cinnamoyle par le groupement méthoxy s'explique aussi par l'intégration 9H au lieu de 10 pour le composé **A**, des protons aromatiques.

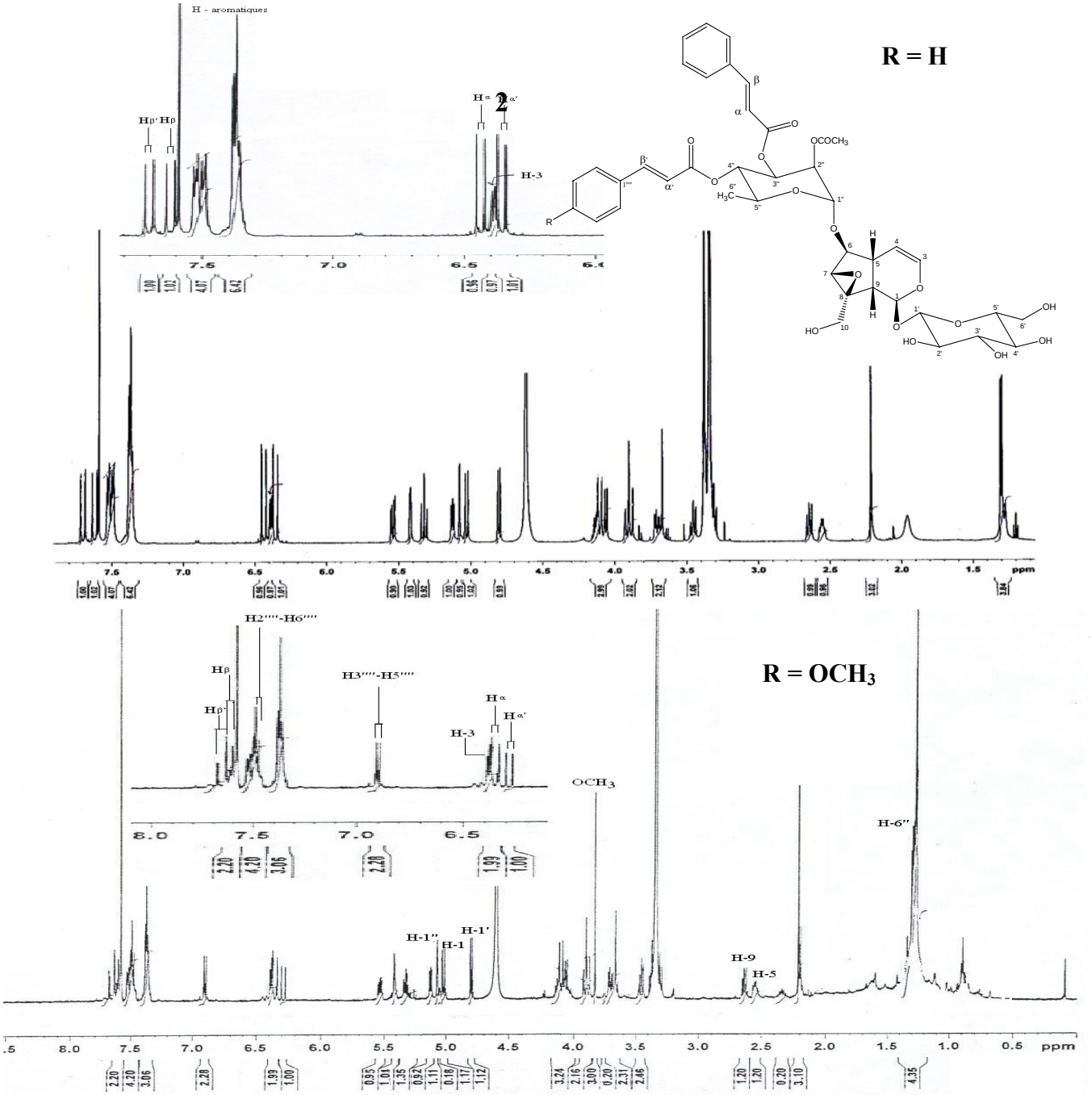


Figure 3.19 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés A (haut) et B (bas)

Le spectre RMN ^{13}C (DEPT) illustré par la figure 3.20, révèle comparativement à celui du composé A, la présence d'un carbone quaternaire à δ = 161,8 ppm confirmant ainsi que le groupement méthoxy substitue l'un des deux groupements cinnamoyles en C-4. Ce dernier se trouve déplacé de plus 30 ppm par rapport au même carbone (δ = 130,3 ppm) du composé **A**.

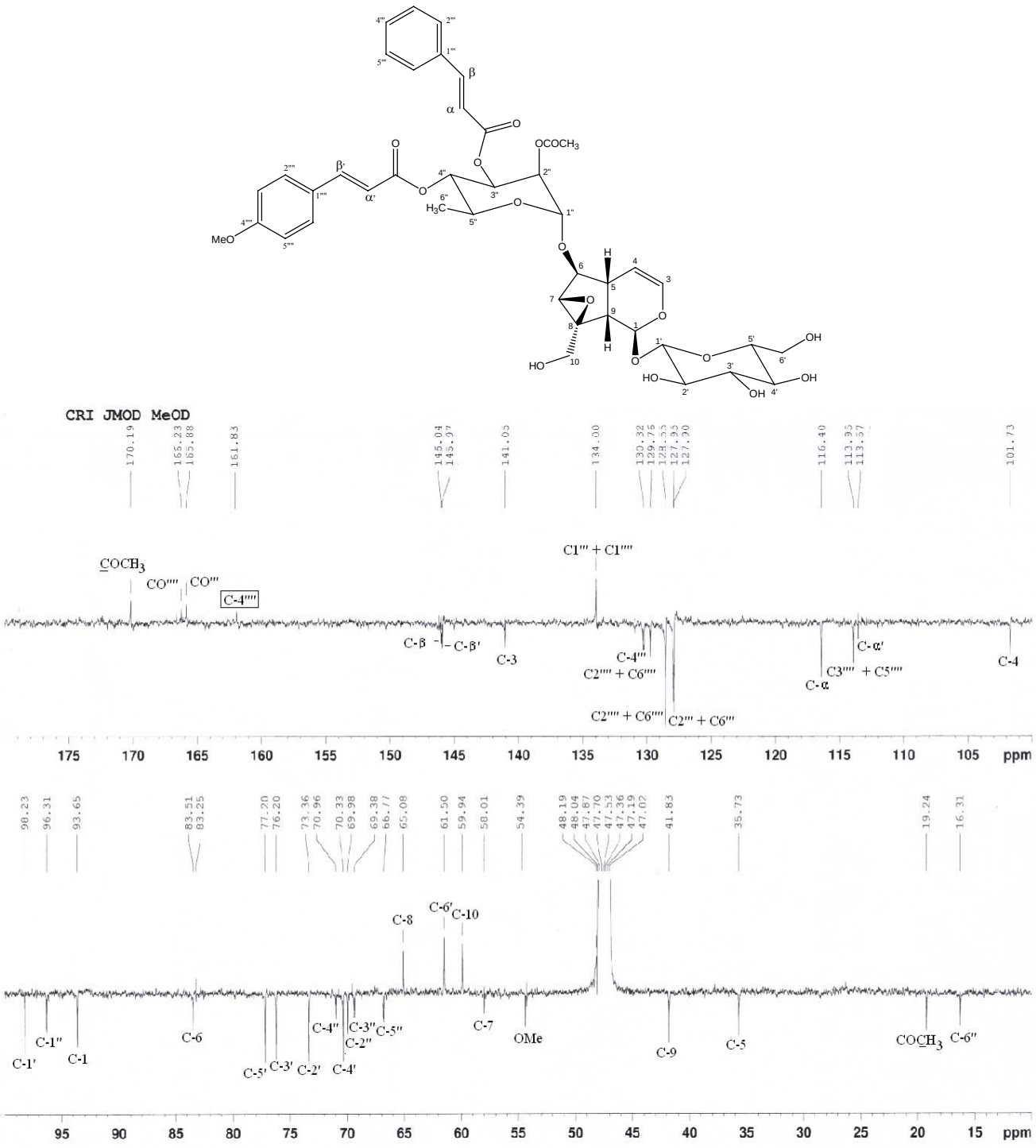


Figure 3.20 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé B

L'expérience COSY H-H (Figure 3.21) met en évidence les corrélations attendues entre les quatre protons aromatiques constituant le système *p*-méthoxy-trans-cinnamoyle, apparaissant sous forme de deux doublets à δ = 6,9 ppm (2H, *J* = 8,9 Hz) et 7,48 ppm (2H, *J* = 8,9 Hz).

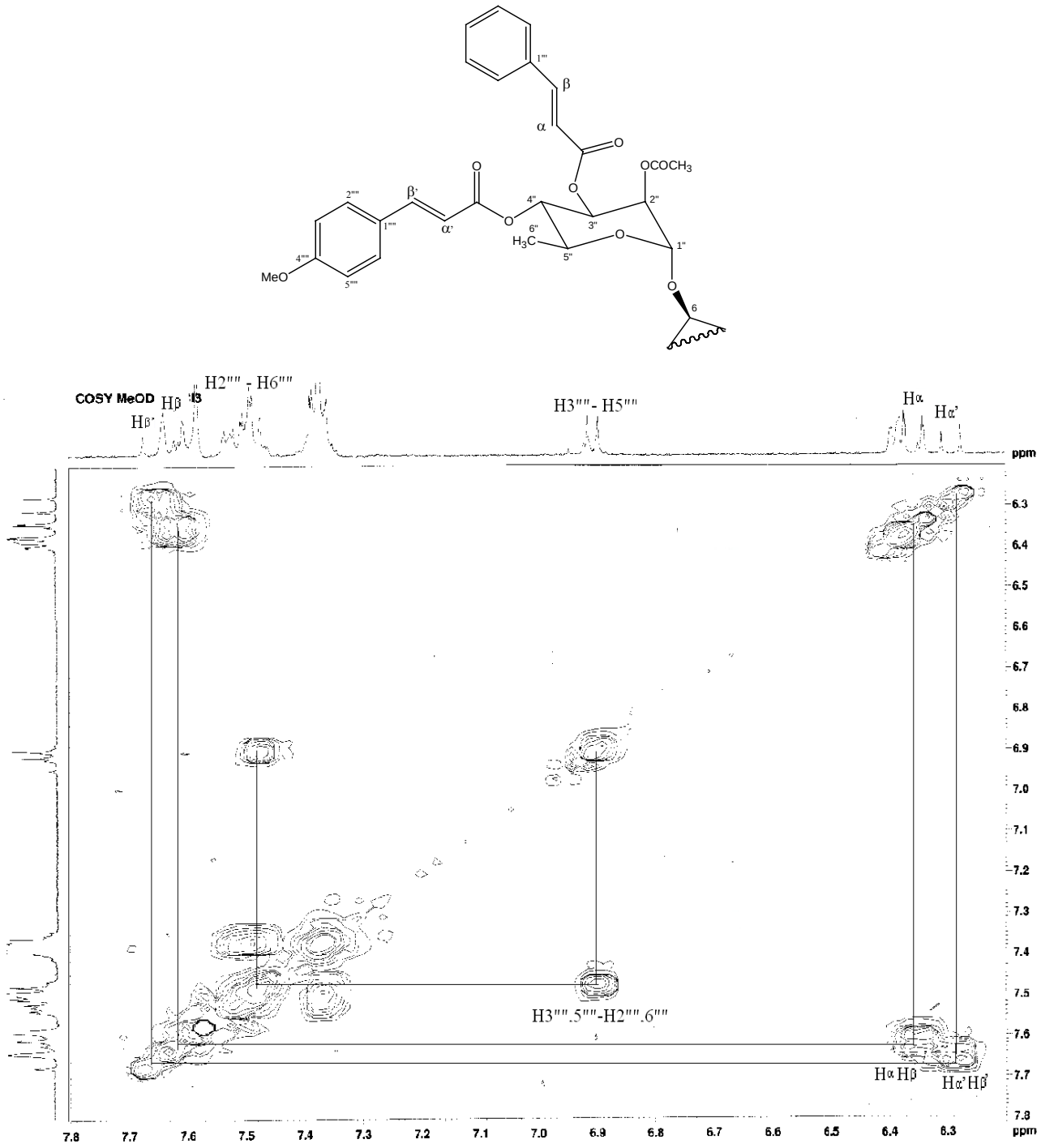


Figure 3.21 : Spectre COSY H-H mettant en évidence le groupement p-méthoxy-trans-cinnamoyle

L'expérience COSY H-H du composé **B** (Figure 3.22) permet aussi de retrouver comme pour le composé **A**, toutes les corrélations permettant de caractériser le rhamnose, le glucose ainsi que la partie aglycone.

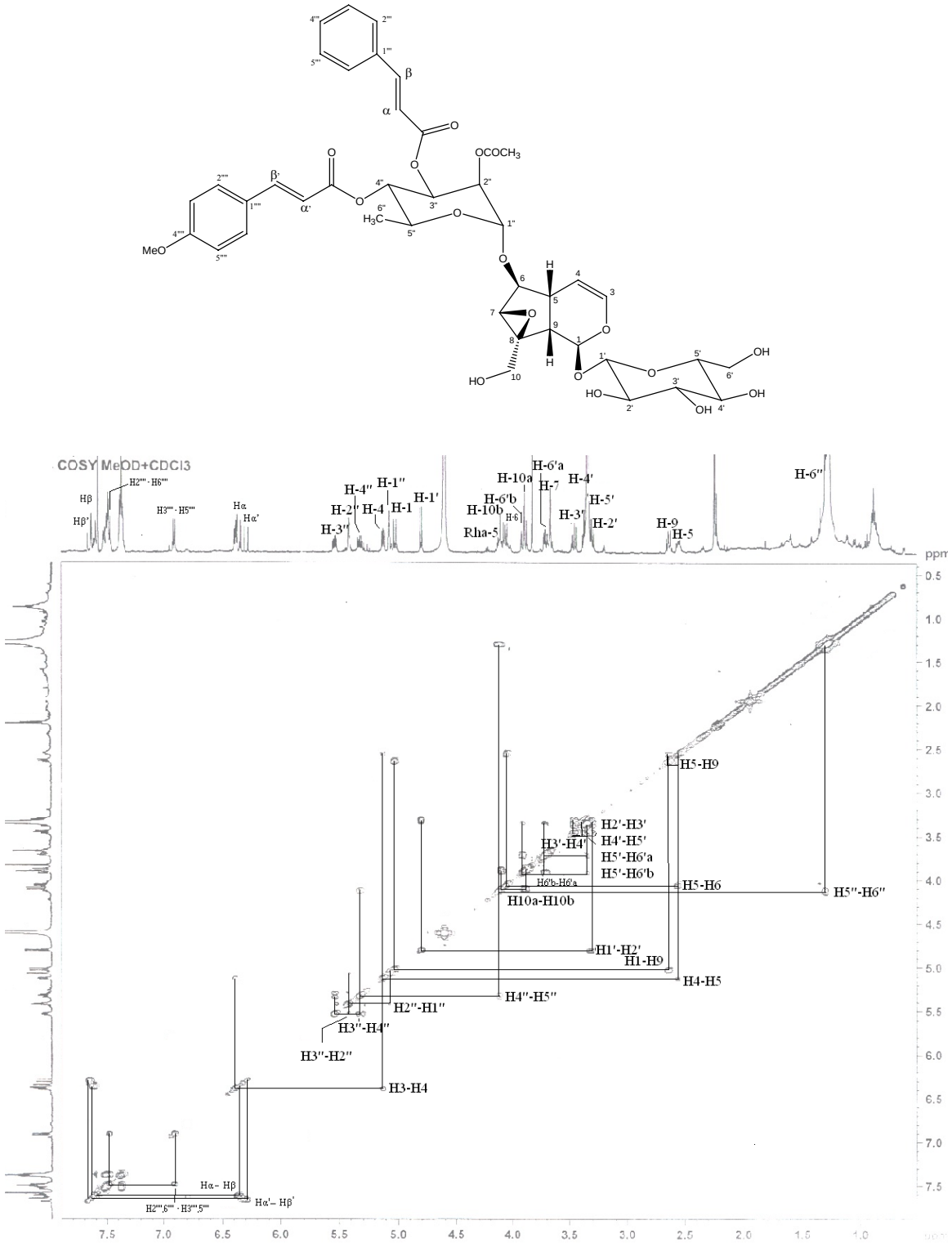


Figure 3.22 : Spectre COSY H-H du composé B

L'expérience HSQC (Figures 3.23 et 3.24) permet de mettre en évidence les corrélations directes C-H du composé **B**. Celle-ci montre bien les corrélations entre les protons aromatiques en positions 3"" et 5"" (δ = 6,9 ppm), 2"" et 6"" (δ = 7,48 ppm) et leurs carbones respectifs résonant à δ = 113,9 et 129,8 ppm.

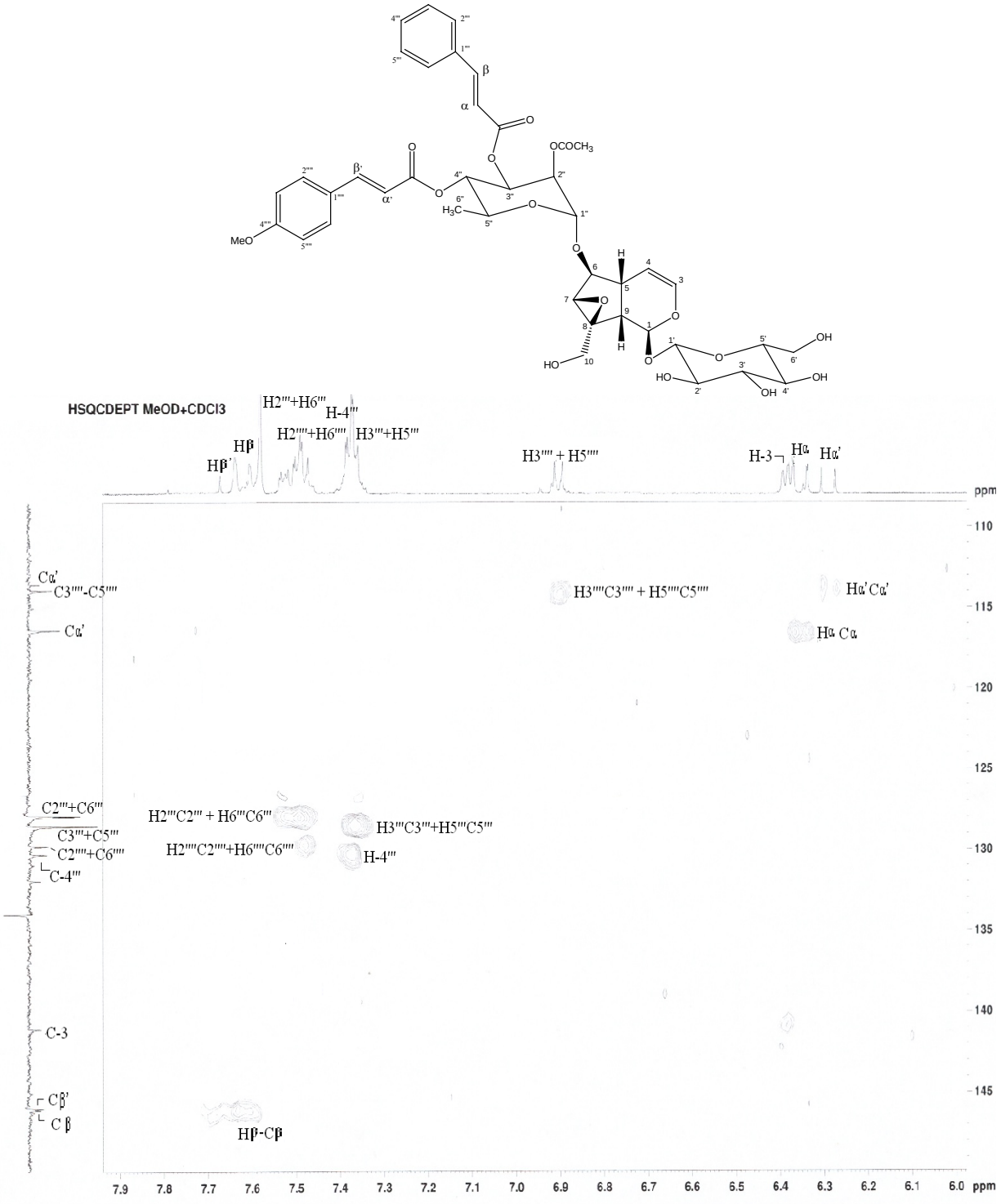


Figure 3.23 : Spectre HSQC de la partie aromatique

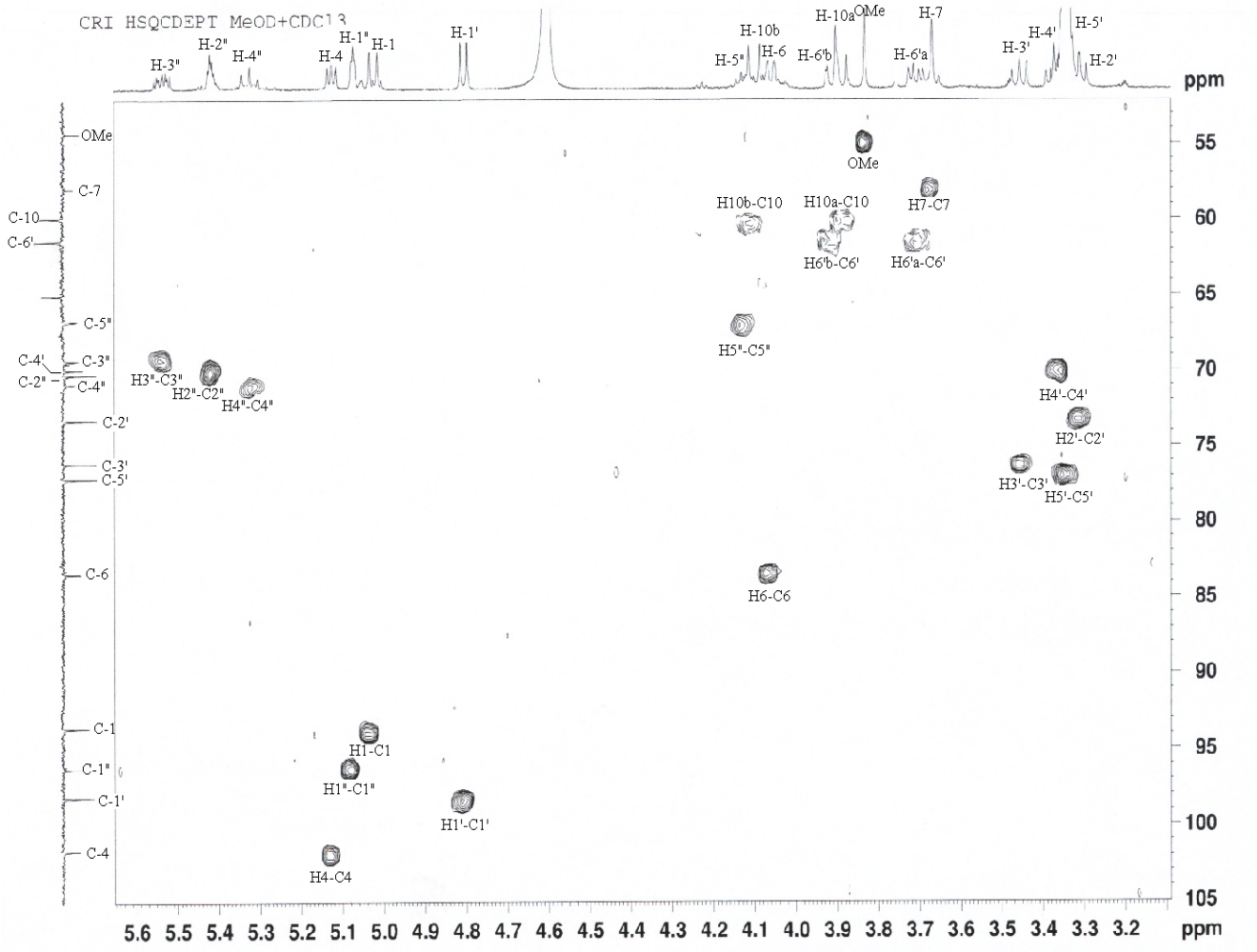


Figure 3.24 : Spectre HSQC des parties catalpol et rhamnose

Le problème et non le moindre, consiste à déterminer le point de branchement du groupement *p*-méthoxy-trans-cinnamoyle sur le rhamnose. L'expérience HMBC (Figure 3.25) s'avère un outil idéal puisqu'elle nous a permis d'établir sans ambiguïté que ce groupement substitue le carbone C-4″ du rhamnopyranose (δ = 70,8 ppm). En effet, le proton H-4" de ce dernier déterminé par expériences COSY H-H et HSQC et résonant à δ = 5,33 ppm, corrèle avec le carbonyle résonant à δ = 166,2 ppm, lui-même corrélant avec les protons oléfiniques H-α′ et H-β′ résonant respectivement à δ = 6,29 et 7,71 ppm. Le carbone C-β′ (δ = 145,9 ppm) identifié par HSQC, corrèle avec deux protons résonant à δ = 7,48 ppm. Ces deux protons H-2‴″ et H-6‴″ font partie du noyau aromatique constituant le groupement *p*-méthoxy-trans-cinnamoyle. Ils présentent une corrélation avec le carbone C-4‴″ (δ = 161,8 ppm) porteur du groupement méthoxy OCH_3 comme le montre le schéma 3.6.

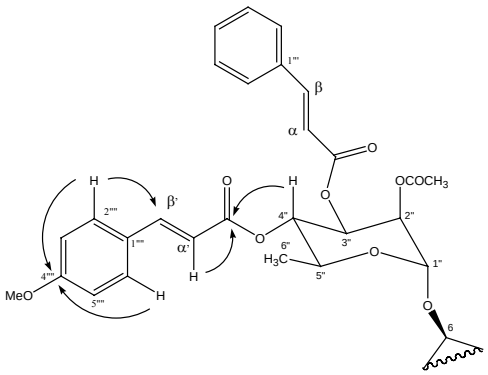


Schéma 3.6 : ***Corrélations C- H en ^{2}J et ^{3}J mettant en évidence la position du p-méthoxy-trans-cinnamoyle au niveau du rhamnose***

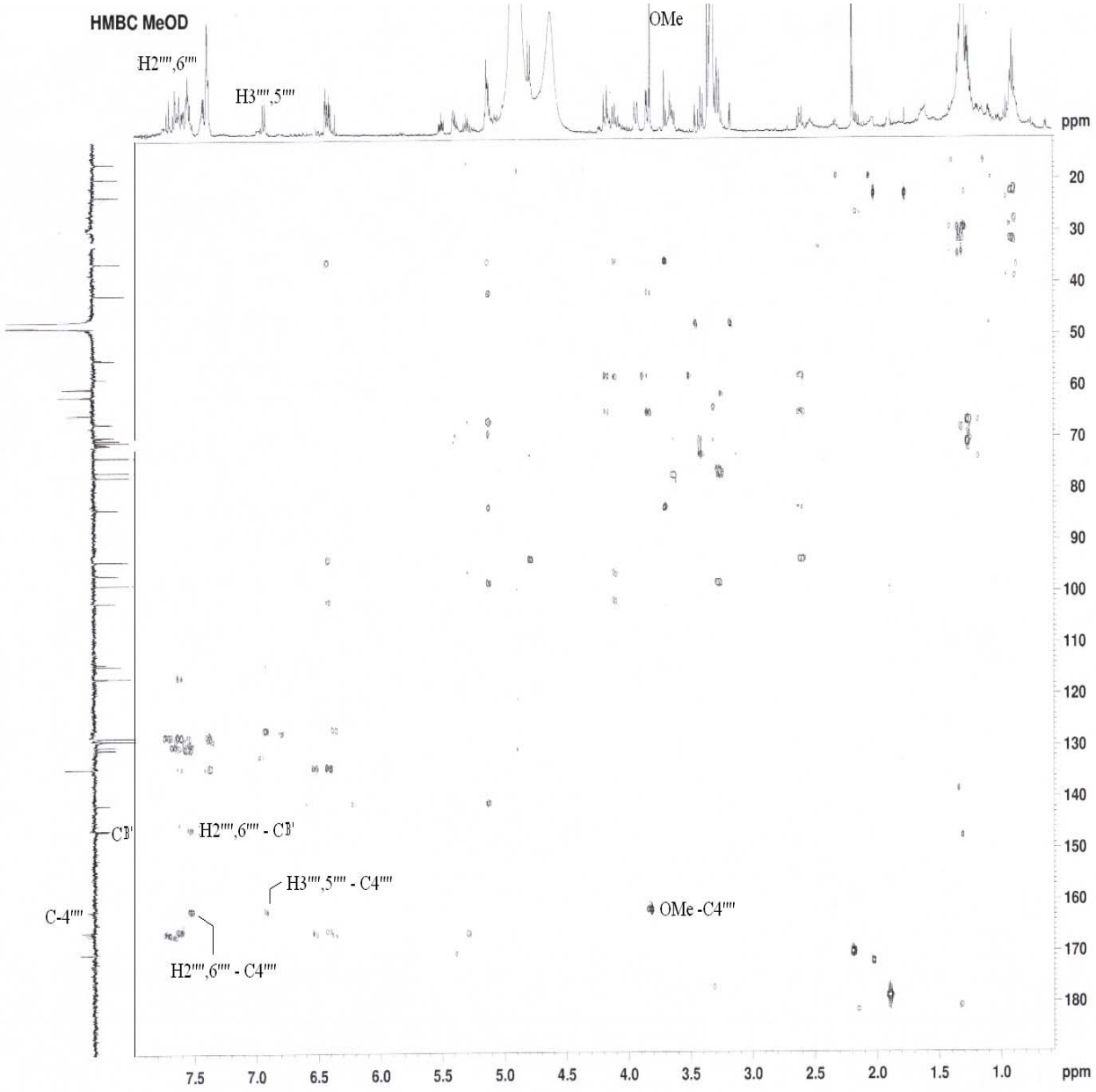


Figure 3.25 : Spectre HMBC déterminant la position du *p*-méthoxy-trans-cinnamoyle

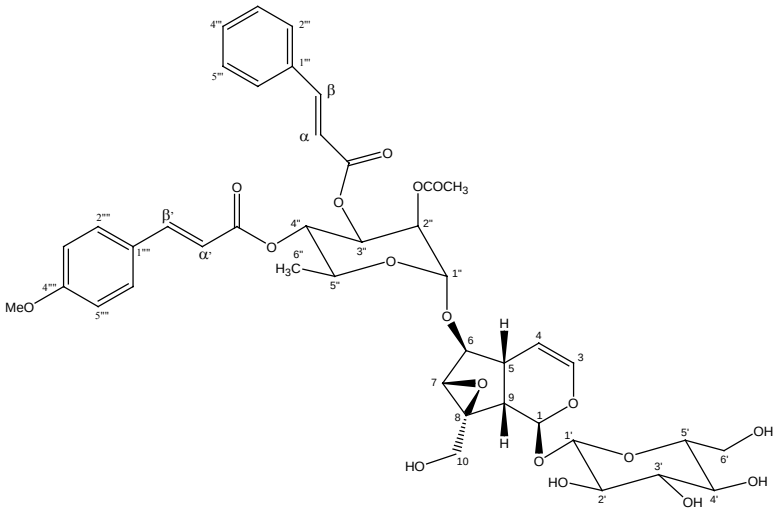
Le tableau suivant reproduit les déplacements chimiques de tous les carbones et les protons du composé **B**.

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1 (CH)	93,7	5,02 *d*	9,7
3 (CH)	141,1	6,39 *dd*	6,1 – 1,6
4 (CH)	101,7	5,13 *dd*	6,1 – 4,8
5 (CH)	35,7	2,55 *m*	-
6 (CH)	83,3	4,06 *d*	7,9
7 (CH)	58	3,67 *sl*	-
8 (C)	65,1	-	-
9 (CH)	41, 8	2,64 *dd*	9,7 – 7,6
10 (CH_2)	59,9	4,11 *d* (H-10a)	13,1
		3,89 *d* (H-10b)	13,1
Glucose			
1'(CH)	98,2	4,80 *d*	7,9
2'(CH)	73,4	3,31 *dd*	8,7 – 9,7
3'(CH)	76,2	3,45 *t*	8,7
4'(CH)	70,3	3,37 *t*	8,7
5'(CH)	77,2	3,34 *m*	-
6'(CH_2)	61,5	3,71 *dd* (H-6'a)	12 – 5,3
		3,92 *dd* (H-6'b)	12– 2
Rhamnose			
1" (CH)	96,3	5,07 *d*	1,7
2" (CH)	70	5,42 *dd*	3,5 – 1,7
3" (CH)	69,4	5,54 *dd*	10 – 3,5
4" (CH)	70,8	5,33 *t*	10
5" (CH)	66,8	4,13 *m*	-
6"(CH_3)	16,3	1,31 *d*	6,2
Cinnamoyle I			
1'"(C)	134	-	-
2'", 6'"(CH)	127,9	7,51 *m*	-
3'", 5'"(CH)	128,5	7,36 *m*	-
4'"(CH)	130,3	7,37 *m*	-

α (CH)	116,4	6.36 *d*	16
β (CH)	146	7,62 *d*	16
CO	165,9		
Cinnamoyle II			
1""(C)	134	-	-
2"", 6""(CH)	129,8	7,48 *d*	8,9
3"", 5""(CH)	113,9	6,90 *d*	8,9
4""	161,8	-	-
α'(CH)	113,6	6,29 *d*	16
β'(CH)	145,9	7,71 *d*	16
CO	166,2	-	-
OCH_3	54,4	3,83 *s*	
$CO\underline{C}H_3$	19,2	2,1 *s*	
$\underline{C}OCH_3$	170,2	-	

Tableau 3.2 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé B

En vertu de cette analyse, il a été établi la structure suivante pour le composé **B** :



Composé B

Il s'agit du 6-*O*-[(2″-*O*-acétyl-3″-*O*-trans-cinnamoyl-4″-*O*-*p*-méthoxy-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol. Ce composé a été très récemment isolé des racines d'une plante Scrophulariaceae asiatique, *Scrophularia ningpoensis* [30].

3.2.3 Détermination de structure du composé C

Les spectres de masse (Figure 3.26) du composé **C** obtenu également sous forme de poudre planche, enregistrés en modes positif et négatif, présentent respectivement des pics d'ions moléculaires à m/z = 745 $[M+Na]^+$ et m/z = 721 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 722 correspondant à une formule brute en $C_{34}H_{42}O_{17}$.

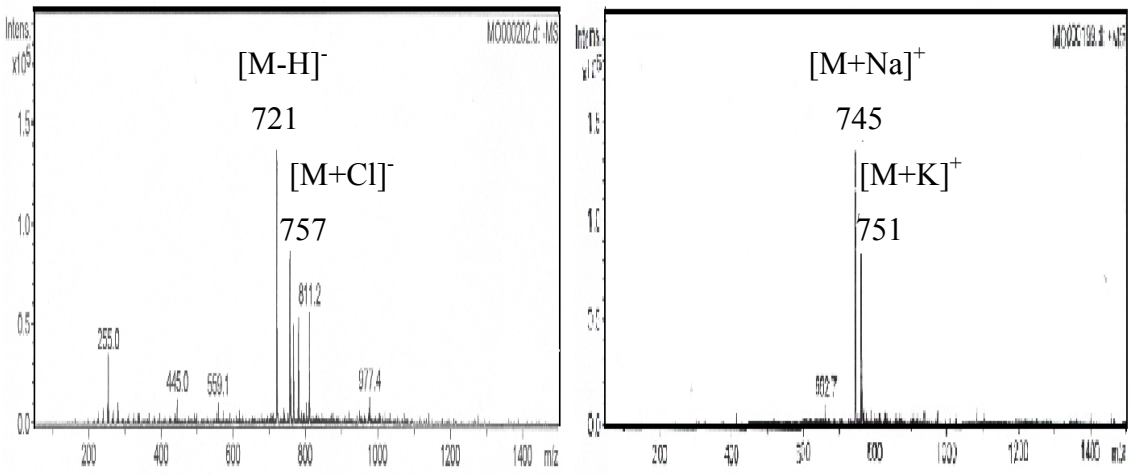


Figure 3.26 : Spectres de masse ESI du composé C

Le spectre d'absorption UV (Figure 3.27) montre les mêmes bandes d'absorption à 206, 216 et 278 nm caractéristiques d'un système éther-énol propre d'un iridoïde et d'un chromophore cinnamoyle [25].

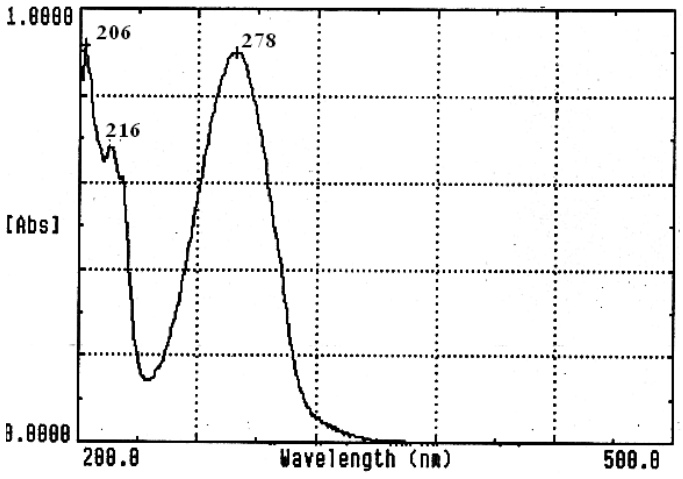


Figure 3.27 : Spectre UV du composé C

Le spectre infra-rouge (Figure 3.28) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyle (3400 cm^{-1}), carbonyle (1720 cm^{-1}) et oléfinique (1640 cm^{-1}).

Figure 3.28 : Spectre IR du composé C

Le spectre RMN ^1H du composé **C** (Figure 3.29) présente de grandes similitudes avec celui du composé **A.** Il permet de reconnaître entre autres :

- Les protons H-5 (δ = 2,52 ppm), H-9 (δ = 2,63 ppm), H-1 (δ = 5,02 ppm), H-3 (δ = 6,39 ppm) et enfin le proton anomère H-1' (δ = 4,8 ppm) du glucose, mettant en évidence la présence du noyau catalpol.
- Les protons méthyliques H-6" à δ = 1,26 ppm (*d*, *J* = 6,3 Hz) et le proton anomère H-1" à δ = 5,05 ppm (*d*, *J* = 1,6 Hz) du rhamnose.

Il permet également d'identifier la présence d'un seul système AX résonant à δ = 6,39 et 7,66 ppm (J_{AX} = 16 Hz), suggérant ainsi la présence d'un seul groupement trans-cinnamoyle. Ceci est confirmé par l'observation de protons aromatiques d'intégration 5H.

La différence de taille par rapport au composé **A**, réside donc en la disparition d'un groupement trans-cinnamoyle et l'apparition d'un second signal singulet à δ = 2,06 ppm confirmant la présence d'un second groupement acétoxy. On peut en déduire d'emblée que le composé **C** a la structure du composé **A** mais où le groupement $OCOCH_3$ a remplacé un groupement trans-cinnamoyle.

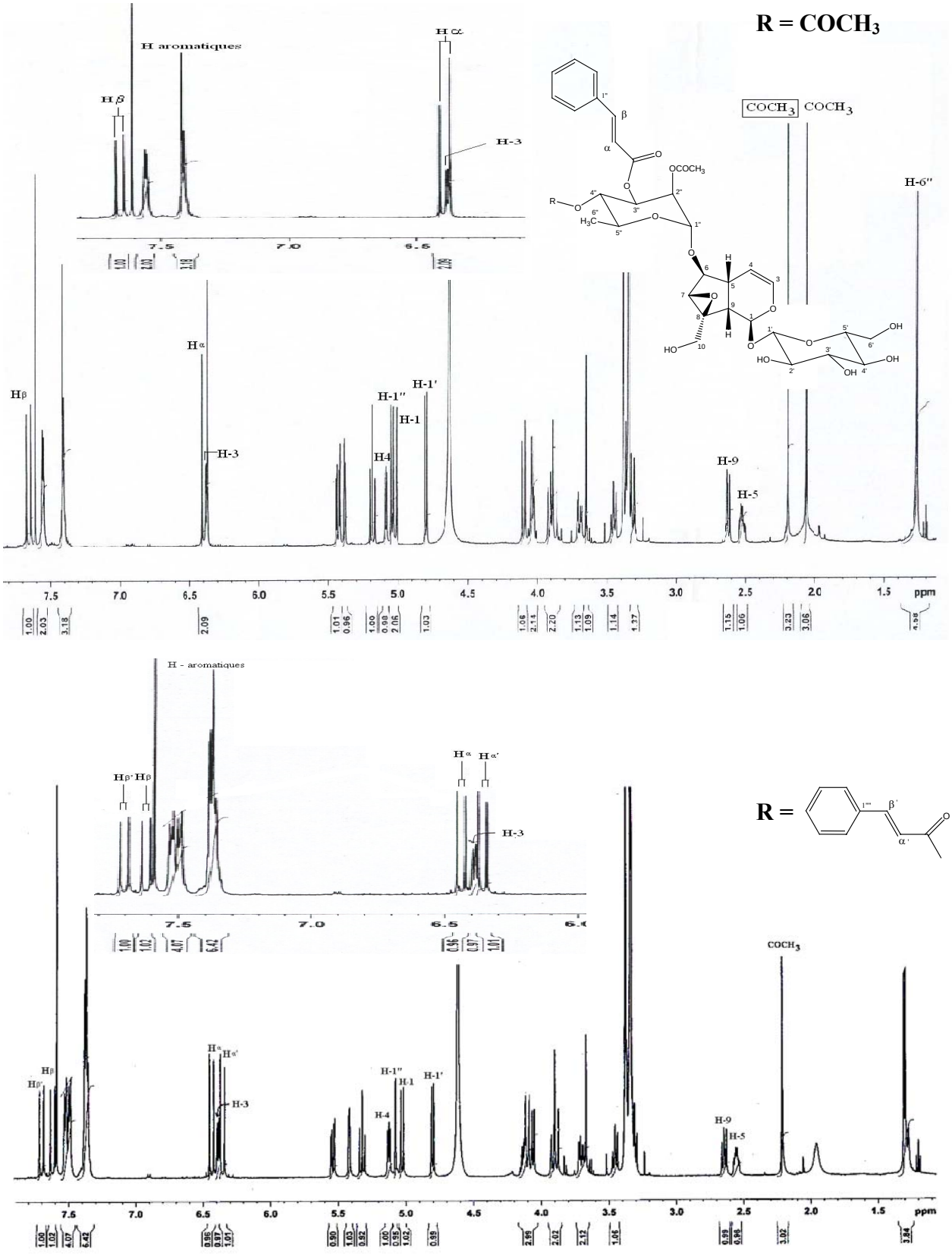


Figure 3.29 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés C (haut) et A (bas)

Le spectre RMN ^{13}C (DEPT) du composé **C** illustré par la figure 3.30, révèle comparativement à celui du composé **A,** outre la disparition de six carbones aromatiques et deux oléfiniques, la présence de deux signaux résonant à δ = 170,4 et 19,4 ppm permettant d'identifier ainsi un groupement $COCH_3$.

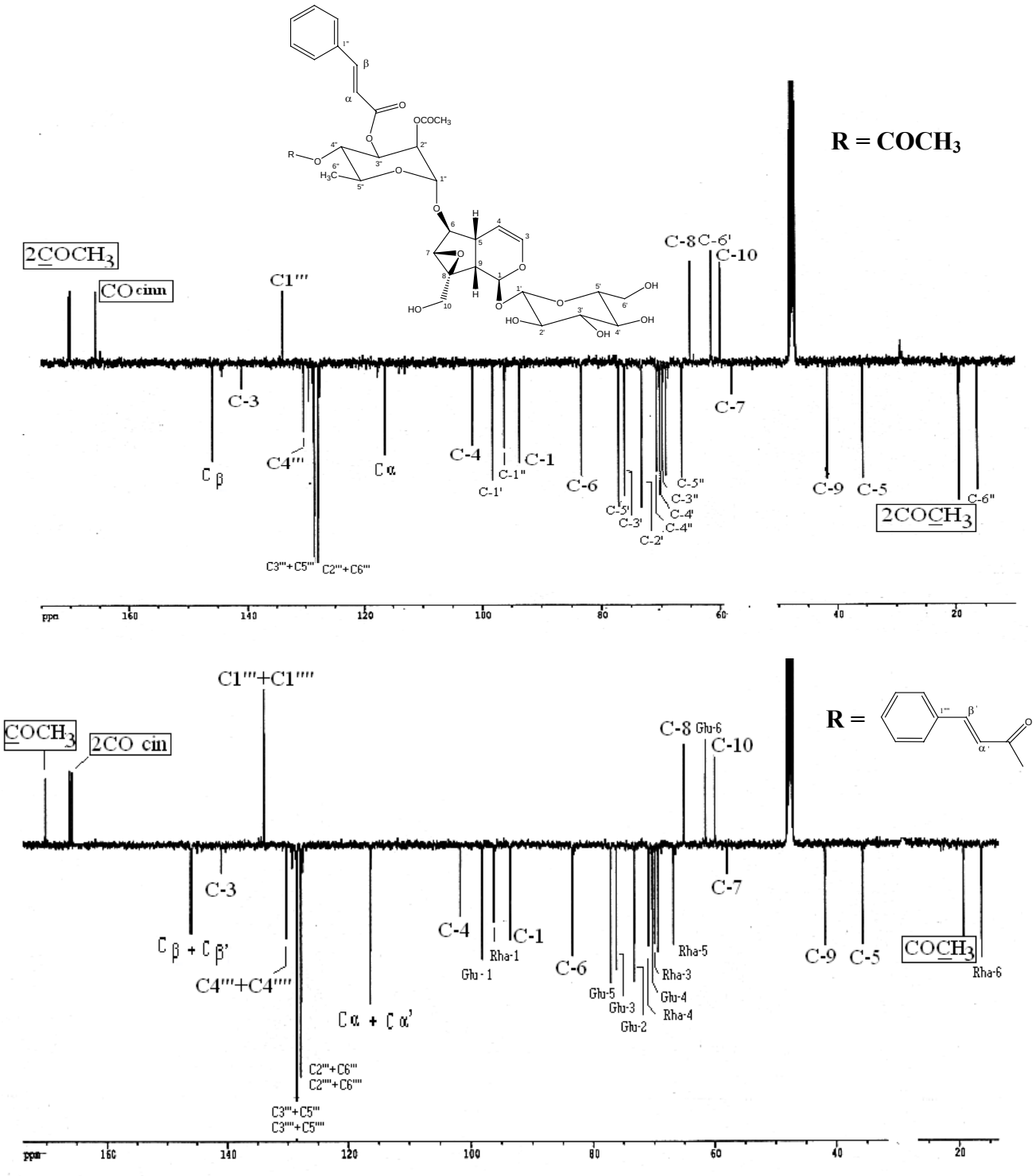


Figure 3.30 : Spectres RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés C (haut) et A (bas)

Les attributions des signaux et déplacements chimiques des protons et carbones ont été établies conjointement par expériences COSY H-H, HSQC et HMBC.

Il reste maintenant à identifier la position du second groupement acétoxy en C-3" ou C-4" du rhamnopyranose. L'ambiguïté est levée au moyen de l'expérience HMBC (Figure 3.31) qui montre indiscutablement une corrélation entre le proton H-4" à δ = 5,18 ppm (*t*, *J* = 10,2 Hz) du rhamnopyranose et le carbonyle résonant à δ = 170,4 ppm du second groupement acétoxy. Elle montre également une corrélation entre le proton H-3" à δ = 5,43 ppm (*dd*, *J* = 3,7 et 10,2 Hz) et le carbonyle du groupement cinnamoyle situé à 165,8 ppm, suggérant la position de ce dernier en C-3" du rhamnose.

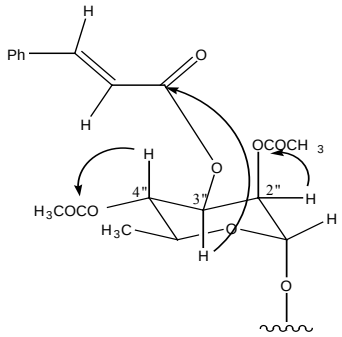


Schéma 3.7 : Corrélations HMBC mettant en évidence la position des groupements acyles

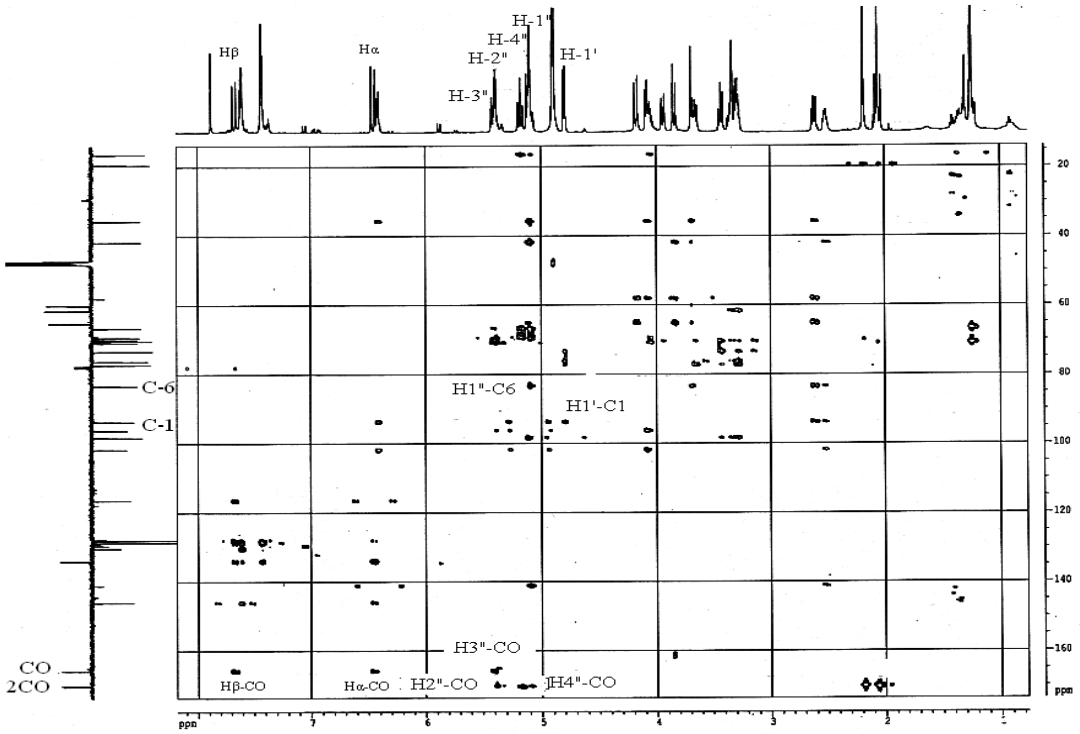


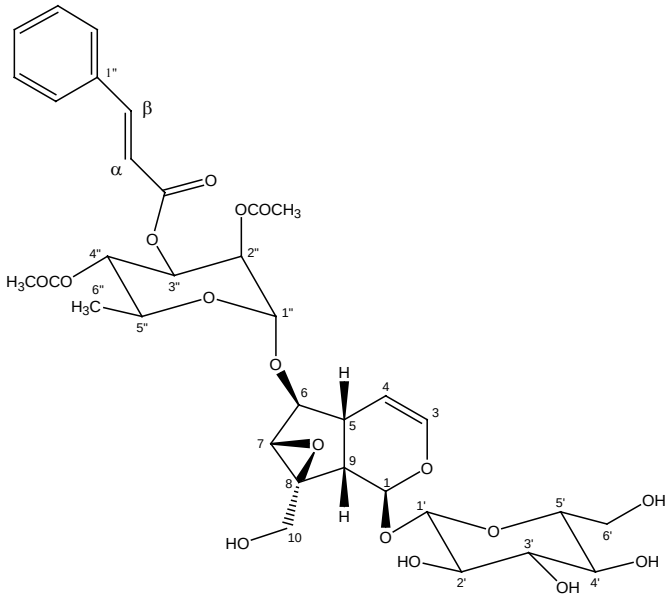
Figure 3.31 : Spectre HMBC mettant en évidence la position des groupements acyles

Le tableau suivant reproduit les déplacements chimiques de tous les carbones et les protons du composé **C**.

N°	δc (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1 (CH)	93,7	5,02 *d*	9,7
3 (CH)	141,9	6,39 *dd*	6,2 – 1,2
4 (CH)	101,7	5,09 *dd*	6,2 – 4,7
5 (CH)	35,7	2,52 *m*	-
6 (CH)	83,3	4,04 *dd*	0,7 – 8,3
7 (CH)	57,9	3,65 *sl*	-
8 (C)	65,1	-	-
9 (CH)	41,8	2,63 *dd*	7,8 – 9,7
10 (CH_2)	60	4,10 *d* (H-10a)	13,2
		3,88 *d* (H-10a)	13,2
Glucose			
	98,2	4,8 *d*	7,9
1' (CH)	73,3	3,31 *dd*	9,3 – 8,1
2' (CH)	76,2	3,45 *t*	8,8
3' (CH)	70,3	3,28 *t*	8,8
4' (CH)	77,1	3,34 *m*	-
5' (CH)	61,5	3,70 *dd* (H-6'a)	5,4 – 12,2
6' (CH_2)	-	3,91 *dd* (H-6'b)	1,4 – 12,2
-			
Rhamnose			
1" (CH)	96,2	5,05 *d*	1,6
2" (CH)	69,7	5,38 *dd*	3,7 – 1,6
3" (CH)	69,3	5,43 *dd*	10,2 – 3,7
4" (CH)	71,8	5,18 *t*	10,2
5" (CH)	66,6	4,04 *m*	-
6" (CH_3)	16,4	1,26 *d*	6,3
Cinnamoyle			
1'" (C)	134	-	-
2'",6'" (CH)	128	7,56 *m*	-
3'",5'" (CH)	128,6	7,41 *m*	-
4'" (CH)	130,4	7.41 *m*	-
α (CH)	116,4	6,39 *d*	16
β (CH)	146	7,66 *d*	16
CO	165,8	-	-
$CO\underline{C}H_3$	19,4	2,19 *s*	-
$CO\underline{C}H_3$	19,4	2,06 *s*	-
$\underline{C}OCH_3$	170,4	-	-
$\underline{C}OCH_3$	170,4	-	-

Tableau 3.3 *:* Déplacements chimiques des protons et carbones du composé C

Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante pour le composé **C** : 6-*O*-[(2",4"-di-*O*-acétyl-3"-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]- catalpol.



Composé C

Cet iridoïde s'est avéré identique au scrospioside A, isolé par Zhang des racines de *Scrophularia spicata* [59]. Ce composé a été isolé par Calis de *Scrophularia ilwensis* sous le nom scropolioside D [26] et par Pachaly de *Scrophularia korainensis* sous le nom de scropheanoside III [60]. Il a été également isolé dans notre laboratoire à partir des parties aériennes de *Verbascum ballii* (Scrophulariaceae) [58].

3.2.4 Détermination de structure du composé D

Le composé **D** se présente également sous forme d'une poudre blanche. Son spectre d'absorption UV (Figure 3.32) montre des bandes d'absorption maximales à 202 et 279 nm caractéristiques d'un système éther-énol d'un iridoïde et d'un chromophore cinnamoyle [24]. Ceci nous indique d'emblée que le composé **D** comme tous les produits décrits précédemment, est à squelette iridoïde porteur d'au moins un groupement cinnamoyle.

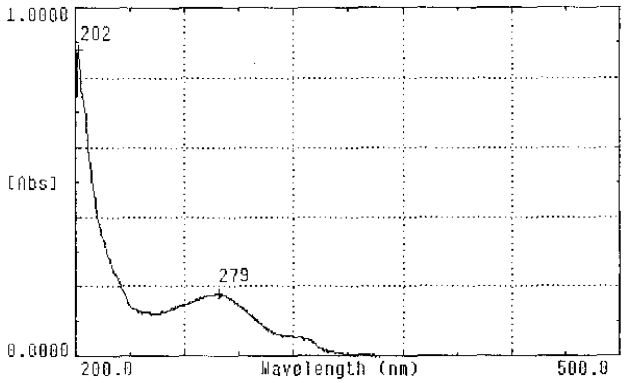


Figure 3.32 : Spectre UV du composé D

Les spectres de masse ESI enregistrés en modes positif et négatif (Figure 3.33), présentent respectivement des pics d'ions moléculaires à *m/z* = 517 $[M+Na]^+$ et *m/z* = 493 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 494 et correspondant à une formule brute en $C_{24}H_{30}O_{11}$. Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif, montre un ion de fragmentation à m/z = 345 $[(M+Na)-H-148]^+$ correspondant à la perte de l'acide cinnamique [25].

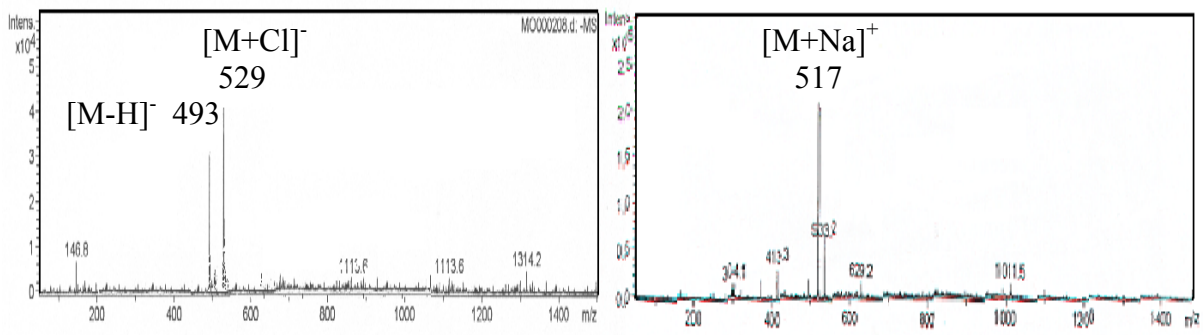


Figure 3.33 Spectres de masse ESI du composé D

Le spectre infra-rouge (Figure 3.34) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyle (3399 cm^{-1}), carbonyle conjugué (1697 cm^{-1}) et oléfinique (1635 cm^{-1}).

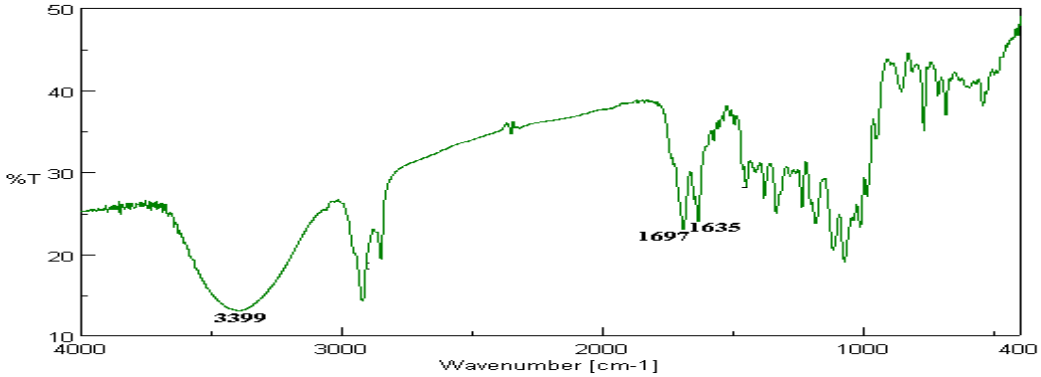


Figure 3.34 : Spectre IR du composé D

Le RMN ^{1}H enregistré à 500 MHz du composé **D** (Figures 3.35 et 3.36) montre :

- Des signaux résonant à champ faible allant de δ = 7,51 à 7,31 ppm d'intégration 5H, caractéristiques de protons aromatiques.
- Deux doublets s'intégrant chacun pour un proton à δ = 6,41 et 7,61 ppm correspondant respectivement aux protons oléfiniques H-α et H-β, de géométrie trans au regard de la constante de couplage (*J* = 16 Hz).

La présence de ces deux protons oléfiniques et des cinq protons aromatiques nous permet de suggérer la présence d'un groupement trans-cinnamoyle.

Le spectre RMN ^{1}H montre également des signaux de résonance propres à un noyau iridoïde. En effet, on observe :

- Un signal (1H, *d, J* = 7,9 Hz) résonant à δ = 4,63 ppm, caractéristique d'un proton anomère de sucre H-1'.
- Un signal doublet (*J* = 6,4 Hz) d'intégration 1H résonant à δ = 6,38 ppm, caractéristique d'un proton oléfinique H-3.
- Un signal sous forme de doublet de doublet (*J* = 6,4 et 1,4 Hz) à δ = 4,87 ppm, caractéristique d'un proton oléfinique H-4.

La multiplicité de ces deux derniers protons indiquant l'absence du proton en position C-5, montre que le composé **D** n'est pas à noyau catalpol. Ceci est confirmé par la présence d'un signal singulet d'un groupement méthyle (H-10) à δ = 1,49 ppm.

- Un proton sous forme de doublet (*J* = 4,2 Hz) à δ = 3,8 ppm, correspondant au proton H-6 porteur d'un groupement OH.

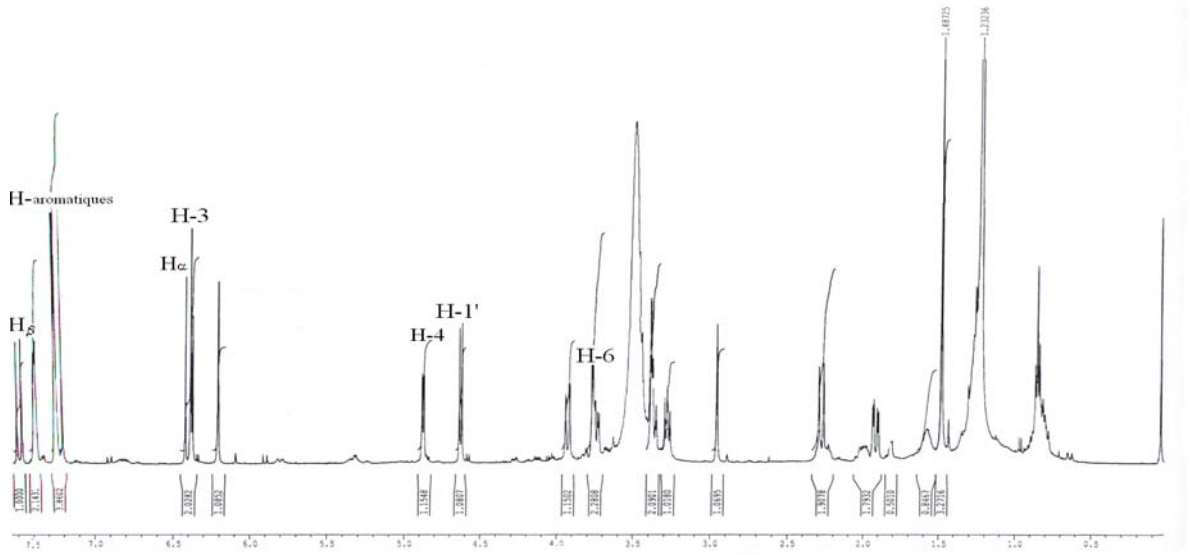


Figure 3.35 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé D

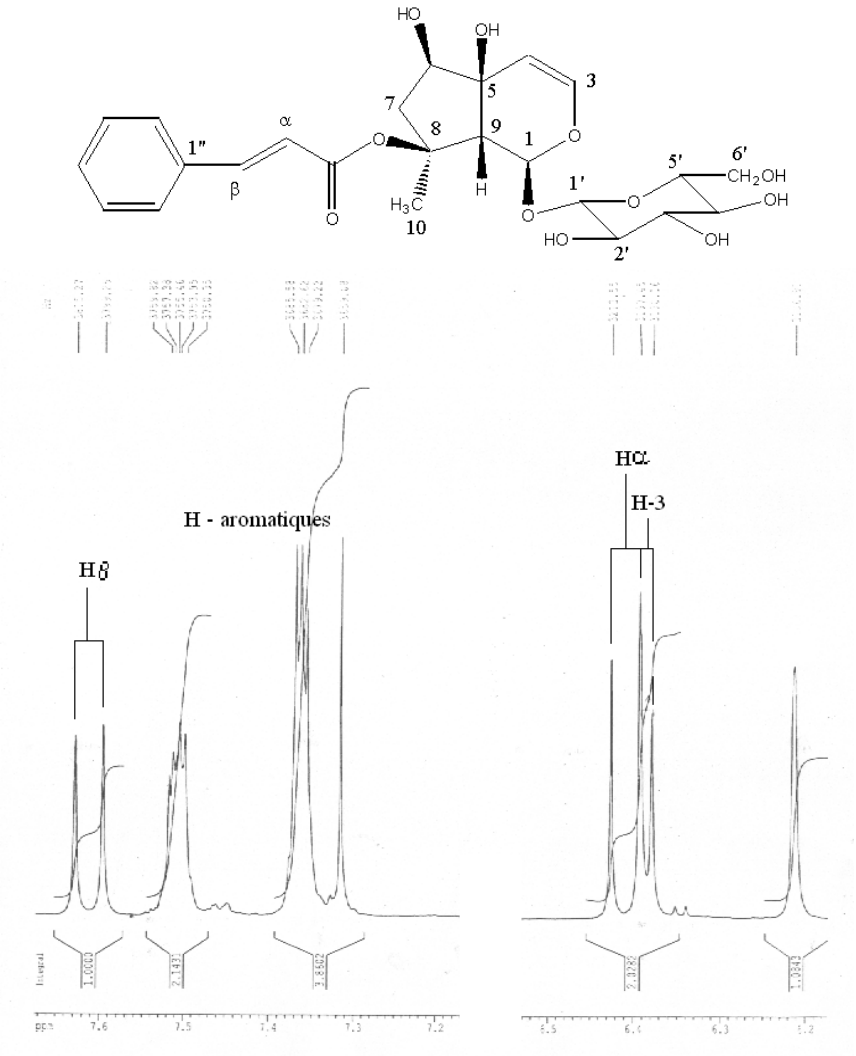
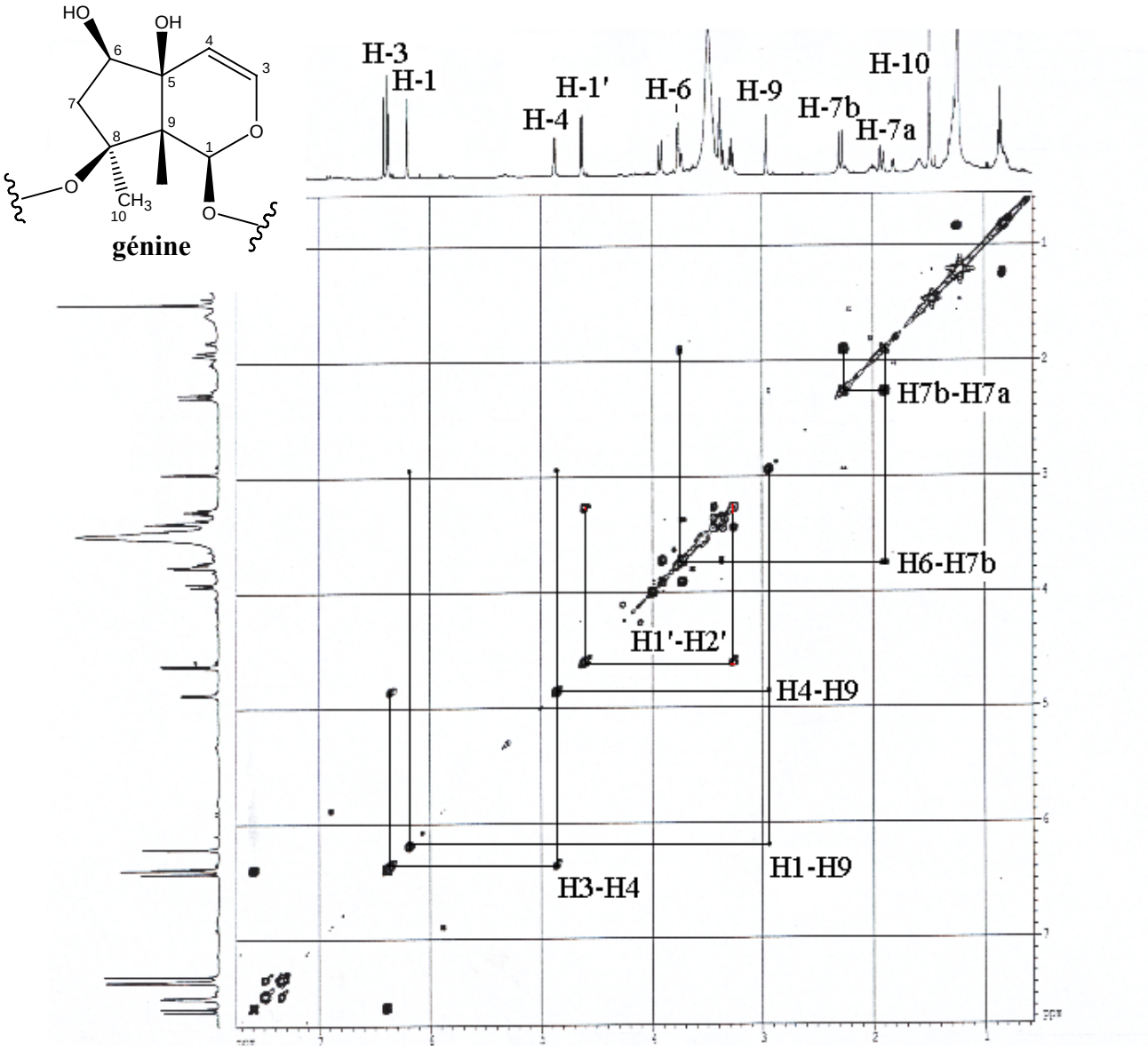


Figure 3.36 : Spectre RMN ^{1}H étalé (région 6,2-7,7 ppm) du composé D

L'expérience COSY H-H (Figure 3.37) permet également d'observer les corrélations entre :

- Les deux protons oléfiniques H-3 et H-4.
- Le proton H-4 et le proton H-9 résonant à δ = 2,96 ppm, lui même corrélant avec un proton résonant sous forme d'un large singulet à δ = 6,21 ppm, attribué proton H-1.
- Le proton H-6 et un proton résonant sous forme de doublet de doublet à δ = 1,92 ppm (*J* = 15,7 et 4,2 Hz) correspondant au proton H-7a.
- Le proton H-7a et le proton H-7b résonant sous forme de doublet (*J* = 17,5 Hz) à δ = 2,28 ppm.



génine

Figure 3.37 : Spectre COSY H-H de la génine

Partant du proton anomère de sucre cité précédemment et résonant δ = 4,63 ppm, l'expérience COSY H-H (Figure 3.38) permet d'identifier un hexose. En effet, il est observé les corrélations entre :

- Le proton anomère H-1' et le proton H-2' résonant à δ = 3,28 ppm sous forme de doublet de doublet.
- Le proton H-2' et le proton H-3' résonant à δ = 3,46 ppm.
- Le proton H-3' et le proton H-4' résonant à δ = 3,35 ppm.
- Le proton H-4' et le proton H-5' résonant à δ = 3,39 ppm.

- Le proton H-5' et les protons H-6'a et H-6'b résonant respectivement à δ = 3,73 et 3,93 ppm sous forme de doublet de doublet.
- Les deux protons H-6'a et H-6'b.

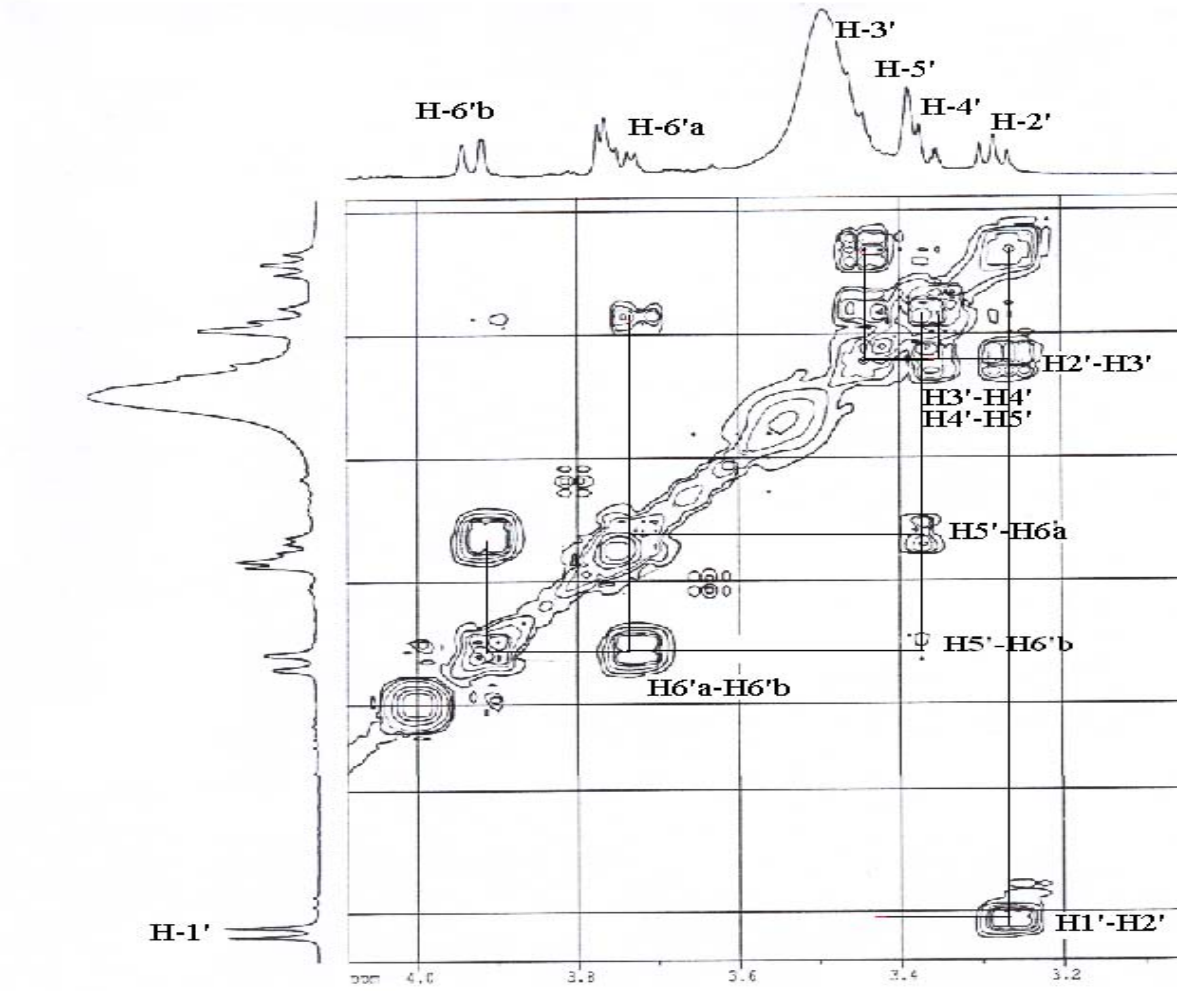


Figure 3.38 : Spectre COSY H-H de l'hexose

Les grandes tâches de corrélation traduisant de grandes constantes de couplage, indiquent que l'hexose en question est un glucose de configuration β ($J_{1'-2'}$ = 7,9 Hz).

L'expérience HSQC (Figure 3.39) montre les couplages directs entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à δ = 93,7 ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à δ = 143,1 ppm.
- Le proton H-4 et son carbone C-4 résonant à δ = 104,7 ppm.

- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à δ = 76,2 ppm. Valeur qui confirme bien que ce dernier est porteur d'un groupement OH libre.
- Les deux protons H-7 et leur carbone C-7 résonant à δ = 45 ppm.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ = 53,8 ppm.
- Les protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ = 22,2 ppm.

Toutes ces données spectrales nous orientent vers un squelette d'un iridoïde autre que le catalpol et également très présent au sein de la famille des Scrophulariaceae en général et le genre *Scrophularia* en particulier [21] : l'harpagide.

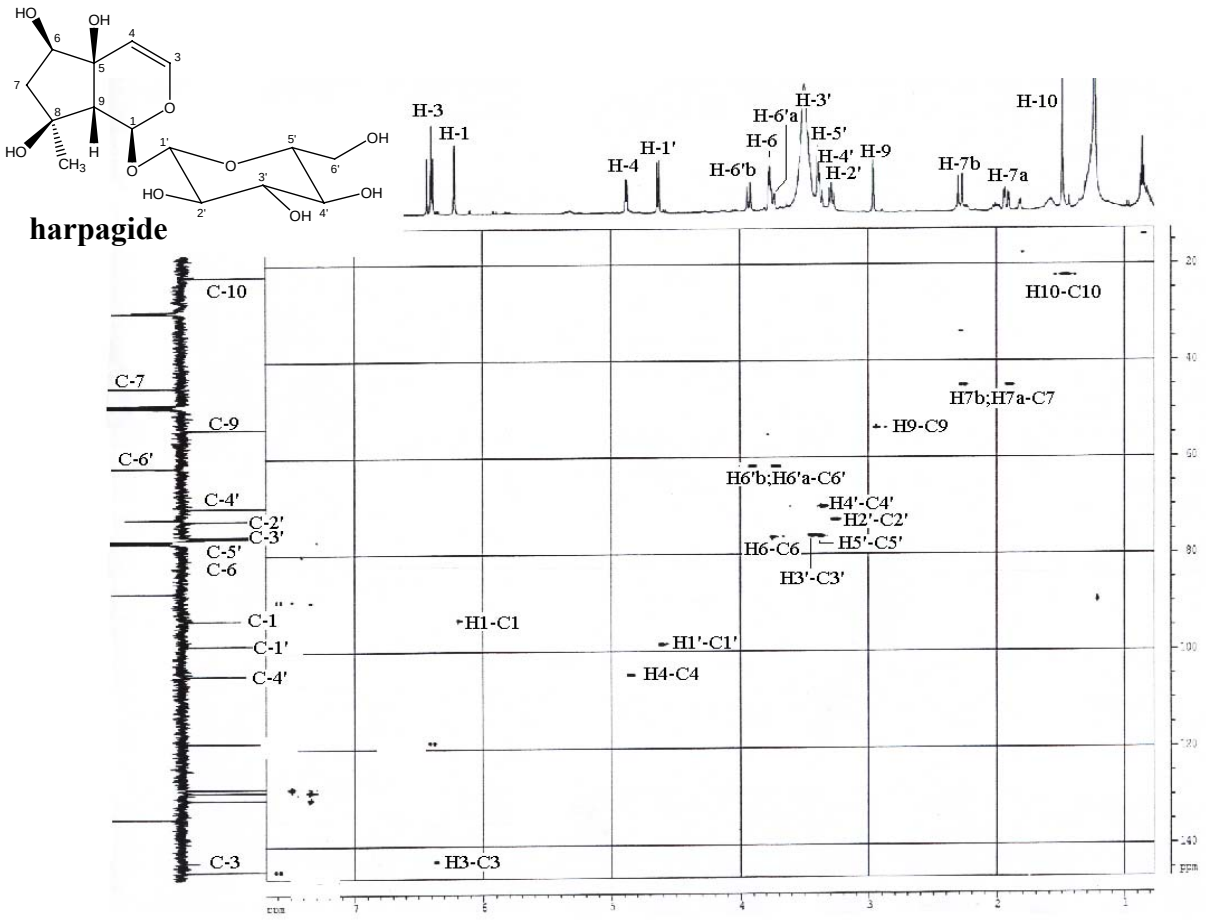


Figure 3.39 : Spectre HSQC mettant en évidence le noyau harpagide

Les carbones quaternaires du noyau harpagide, en l'occurrence les carbones C-5 et C-8, sont identifiés par expérience HMBC. En effet, le spectre (Figure 3.40) montre les couplage entre :

- Le proton H-3 et les carbones C-1 (δ = 93,7 ppm), C-4 (δ = 104,7 ppm) et un carbone résonant à δ = 72,4 ppm ne pouvant correspondre qu'au carbone C-5.

- Les protons méthyliques H-10 et les carbones C-7 (δ = 45 ppm), C-9 (δ = 53,8 ppm) et un carbone résonant à δ = 87,7 ppm attribuable au carbone C-8.

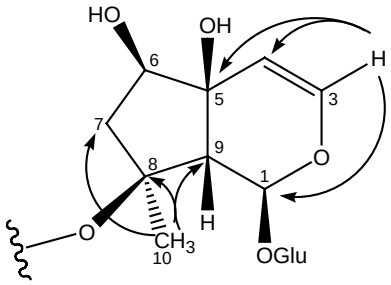


Schéma 3.8 : ***Corrélations C- H en ^{2}J et ^{3}J du noyau harpagide***

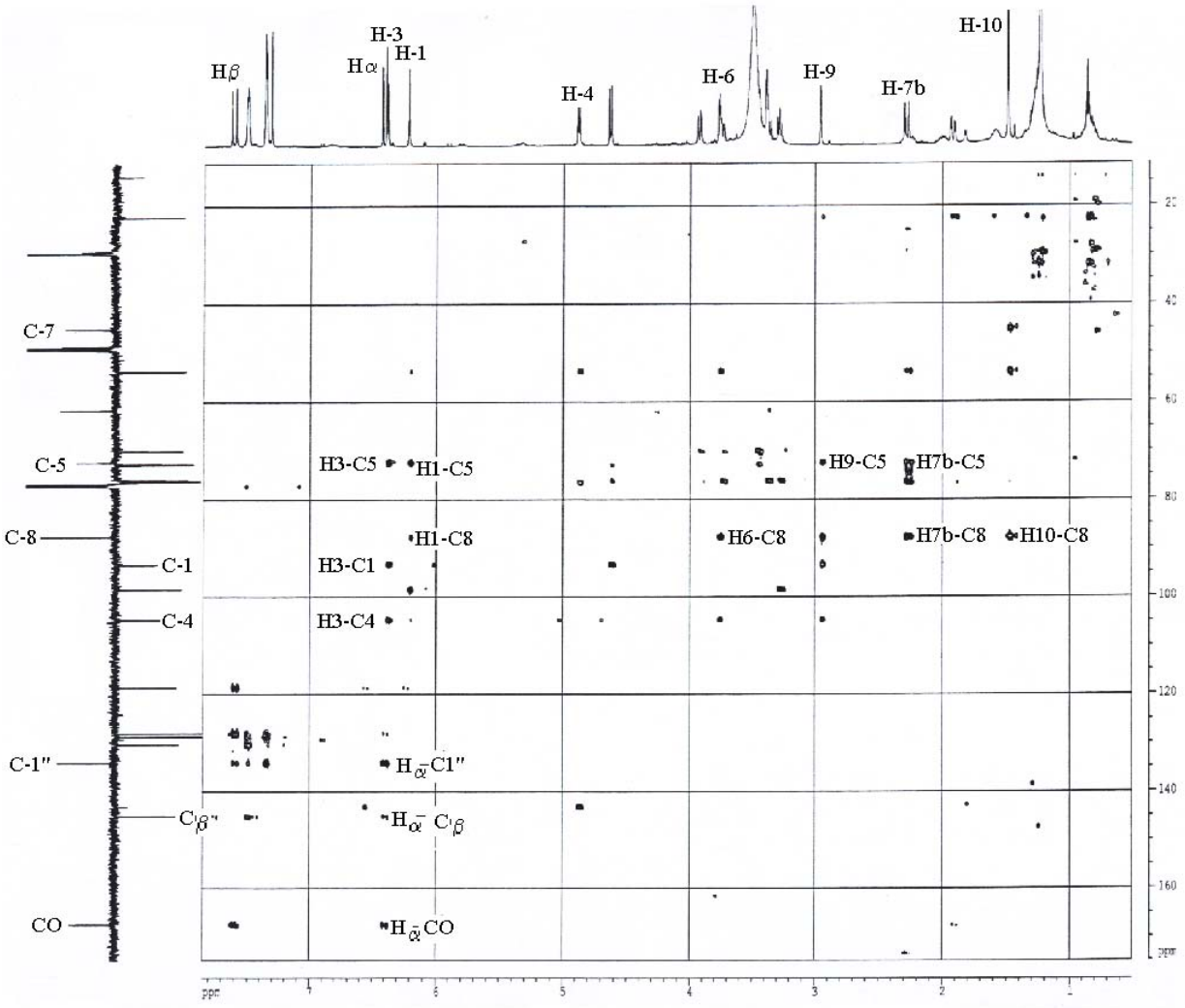


Figure 3.40 : Spectre HMBC du composé D

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'assigner tous les signaux des protons et carbones de la molécule (Figures 3.41 et 3.42).

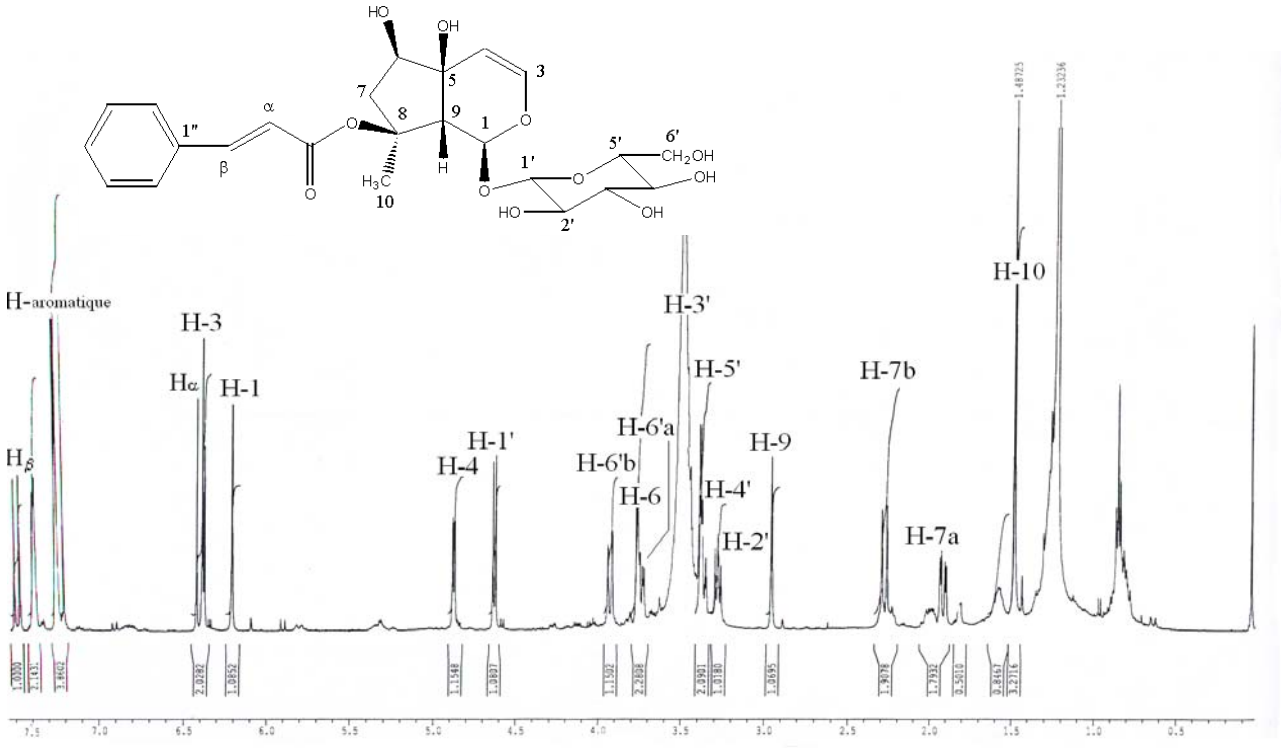


Figure 3.41 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé D

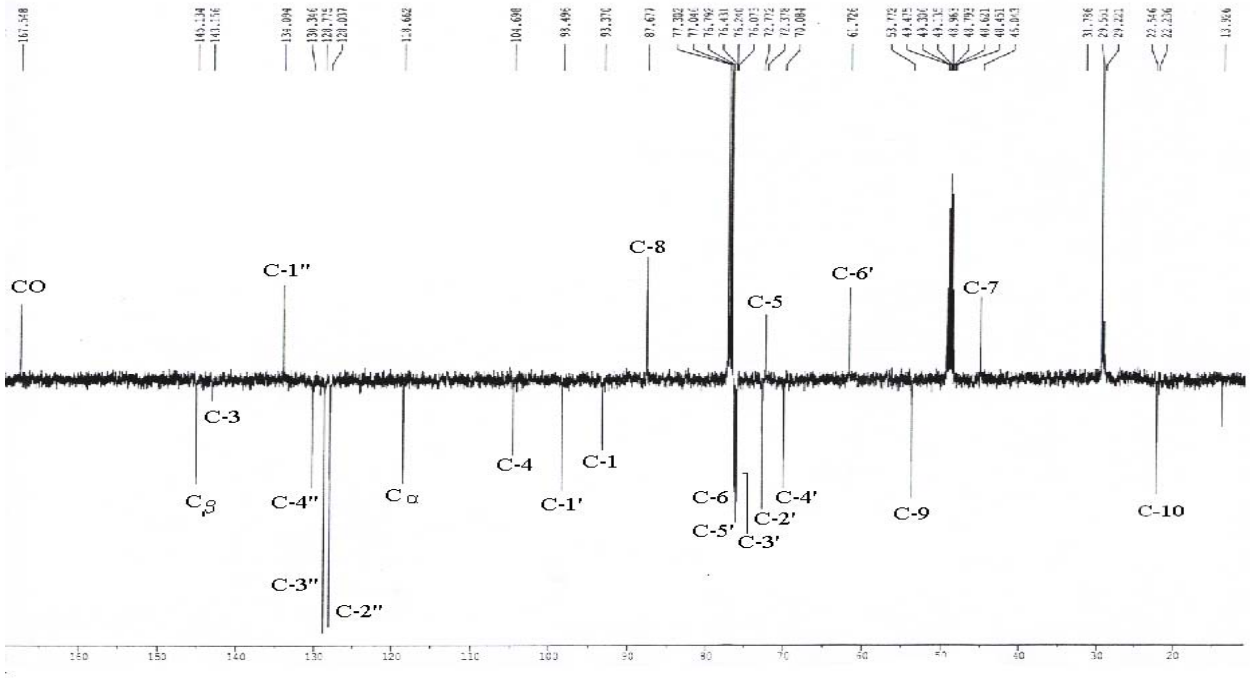


Figure 3.42 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé D

L'expérience HMBC (Figure 3.43) montre clairement la position du glucose et le groupement cinnamoyle sur la génine. En effet, on observe les corrélations entre :

- Le proton H-1 (δ = 6,21 ppm) de la génine et le carbone anomère C-1' (δ = 98,5 ppm) du glucose.
- Le proton H-7a de la génine résonant à δ = 1,92 ppm et le carbonyle du groupement trans-cinnamoyle, montrant ainsi que ce dernier substitue l'harpagide en C-8.

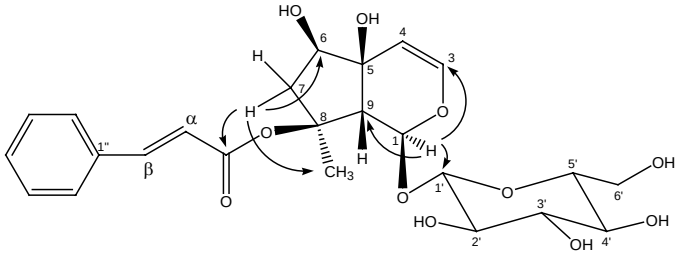


Schéma 3.9 : ***Corrélations C- H en ^2J et ^3J mettant en évidence la position des substituants***

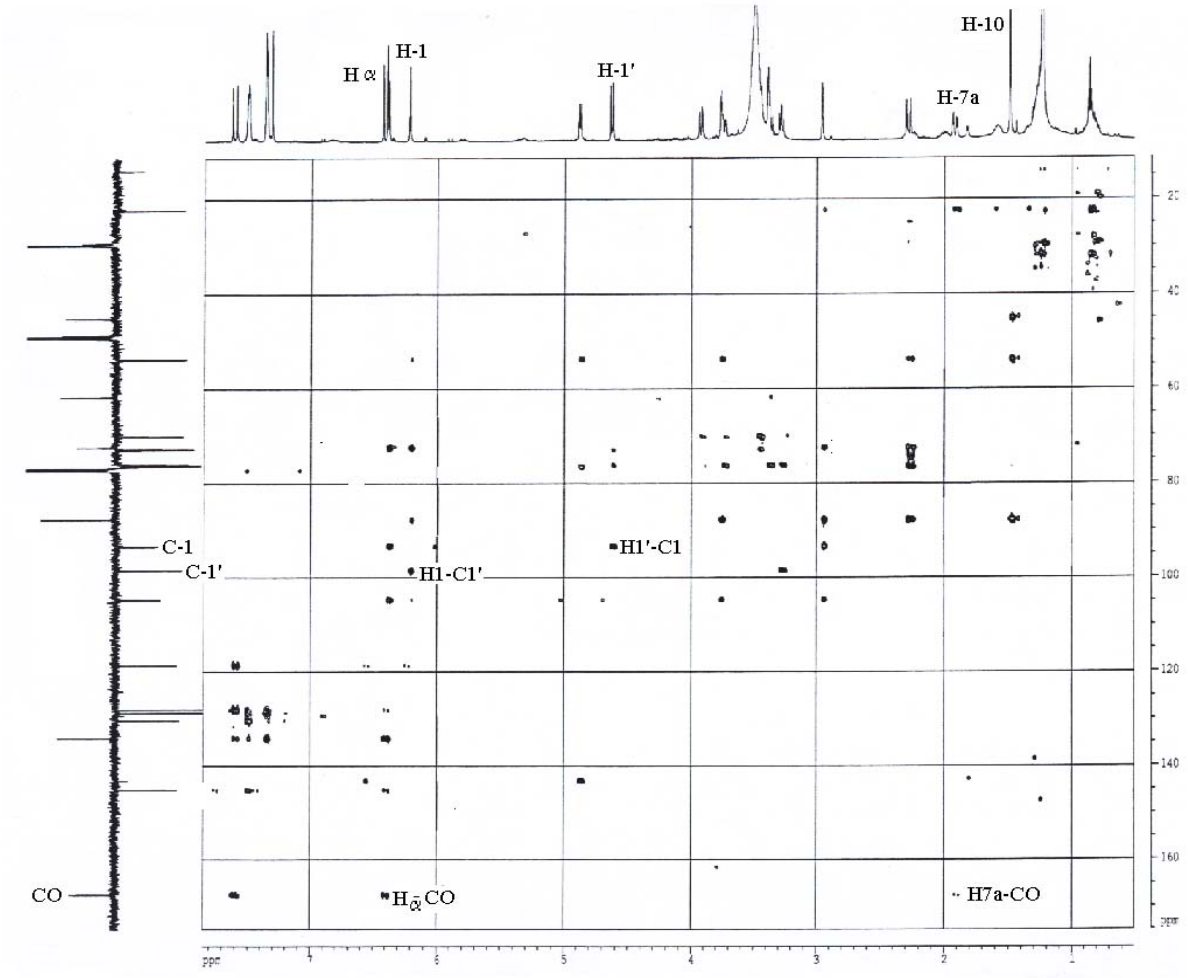


Figure 3.43 : Spectre HMBC mettant en évidence la position des substituants

Le problème qui se pose maintenant est celui de résoudre la stéréochimie de la molécule au niveau de la génine, plus précisément la stéréochimie au niveau du carbone C-9. En effet, il est établi désormais qu'il existe deux types d'harpagide : H-9α harpagide [15] et H-9β harpagide le plus fréquemment rencontré [61]. Les constantes de couplage $J_{1\text{-}9}$ de l'ordre de 1 Hz dans les deux cas, ne permet aucunement d'assigner la stéréochimie en ce point. L'expérience NOESY consistant à mesurer les effets Overhauser entre protons dans l'espace, s'est avéré pour cela l'outil approprié. En effet, on observe des corrélations entre :

- Le proton anomère H-1' du glucose de configuration α et le proton H-1 de la génine, attestant ainsi que ce dernier est également de configuration α.
- Le proton H-1α de la génine et les protons méthyliques H-10, indiquant ainsi que le groupement méthyle substituant le carbone en C-8 est aussi de configuration α.
- L'absence de corrélation entre les protons H-10α et H-9, confirme la configuration β du proton H-9.

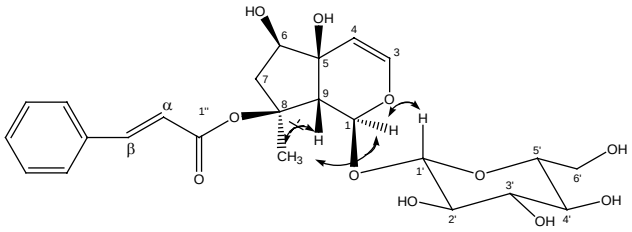


Schéma 3.10 : ***Corrélations proton- proton observées en NOESY (composé*** **D*)***

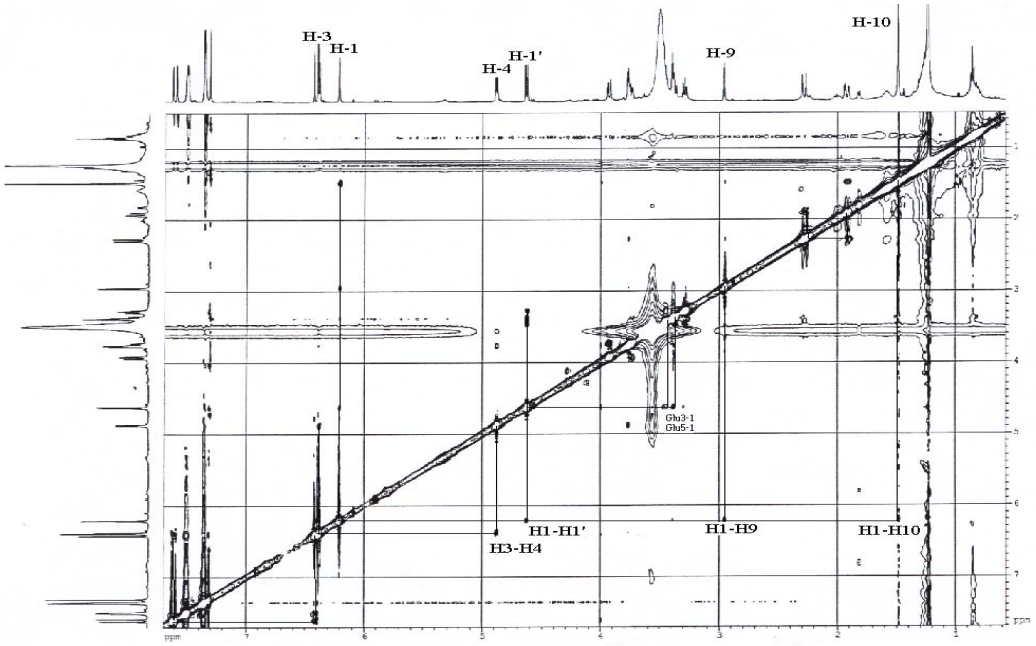


Figure 3.44 *:* Spectre NOESY du composé D

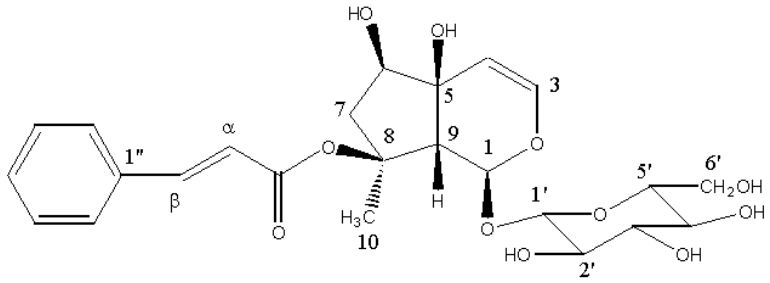
L'observation en NOESY d'une corrélation entre les protons méthyliques H-10 et le proton H-9 a permis à Ahmed et collaborateurs, d'assigner une configuration α pour le proton H-9 et d'identifier un H-9α harpagide original [15].

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau suivant :

N°	δc (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1(CH)	93,7	6,21 *s*	-
3 (CH)	143,1	6,38 *d*	6,4
4 (CH)	104,7	4,87 *dd*	1,4 – 6,4
5 (C)	72,4	-	-
6 (CH)	76,2	3,80 *d*	4,2
7 (CH_2)	45	1,92 *dd* (H-7a)	15,5 – 4,2
	-	2,28 *d* (H-7b)	15,5
8 (C)	87,7	-	-
9 (CH)	53,8	2,96 *s*	-
10 (CH_3)	22,2	1,49 *s*	-
Glucose			
1' (CH)	98,5	4,63 *d*	7,9
2' (CH)	72,8	3,28 *dd*	7,9 – 8,8
3' (CH)	76,1	3,46 *nd*	-
4' (CH)	70,1	3,35 *nd*	-
5' (CH)	76,4	3,39 *m*	-
6' (CH_2)	61,7	3,73 *dd* (H-6'a)	5,3 – 12,3
	-	3,93 *dd* (H-6'b)	1,7 – 12,3
Cinnamoyle			
1" (C)	134,1	-	-
2" (CH)	128	7,51 *m*	-
3" (CH)	128,8	7,36 *m*	-
4" (CH)	130,1	7,31 *m*	-
5" (CH)	128,8	7,36 *m*	-
6" (CH)	128	7,51 *m*	-
α (CH)	118,6	6,41 *d*	16
β (CH)	145,1	7,61 *d*	16
CO	167,5	-	-

Tableau 3.4 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé D

L'analyse spectrale réalisée permet de proposer la structure suivante pour le composé **D**.



Composé D

Il s'agit de : 8-*O*-trans-cinnamoylharpagide. Ce composé a été antérieurement isolé des parties aériennes de *Rogeria adenophylla* [62], de *Oxera morieri* [63] et récemment des racines de *Verbascum lasianthum* [64].

3.3.1 Détermination de structure du composé E

Le composé **E** obtenu également sous forme de poudre blanche, présente une formule moléculaire en $C_{17}H_{26}O_{11}$. Formule déterminée grâce au spectre de masse ESI (Figure 3.45) enregistré en mode positif. Ce dernier présente un pic d'ion moléculaire *m/z* = 429 $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire égale à 406.

Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif, montre un ion de fragmentation à m/z = 369 $[(M+Na)-60]^+$ correspondant à la perte d'un groupement acétate.

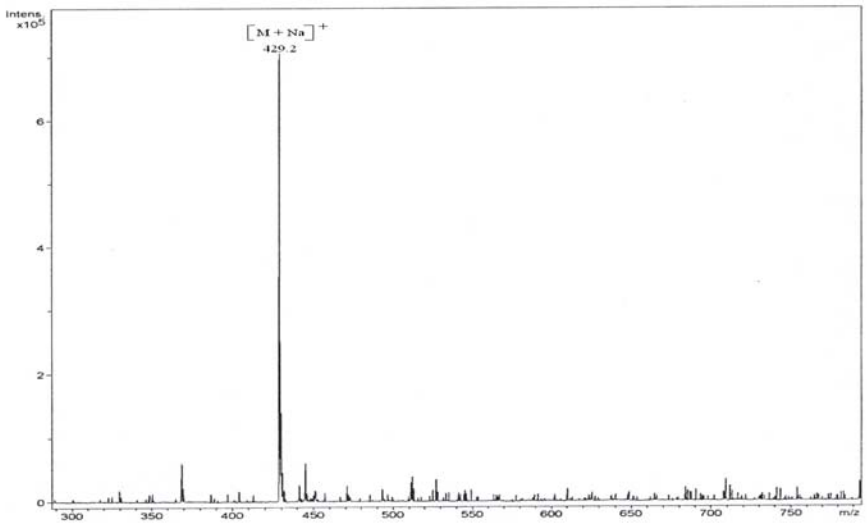


Figure 3.45 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé E

Le spectre infra-rouge (Figure 3.46) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyle (3391 cm^{-1}), carbonyle (1718 cm^{-1}) et oléfinique (1652 cm^{-1}).

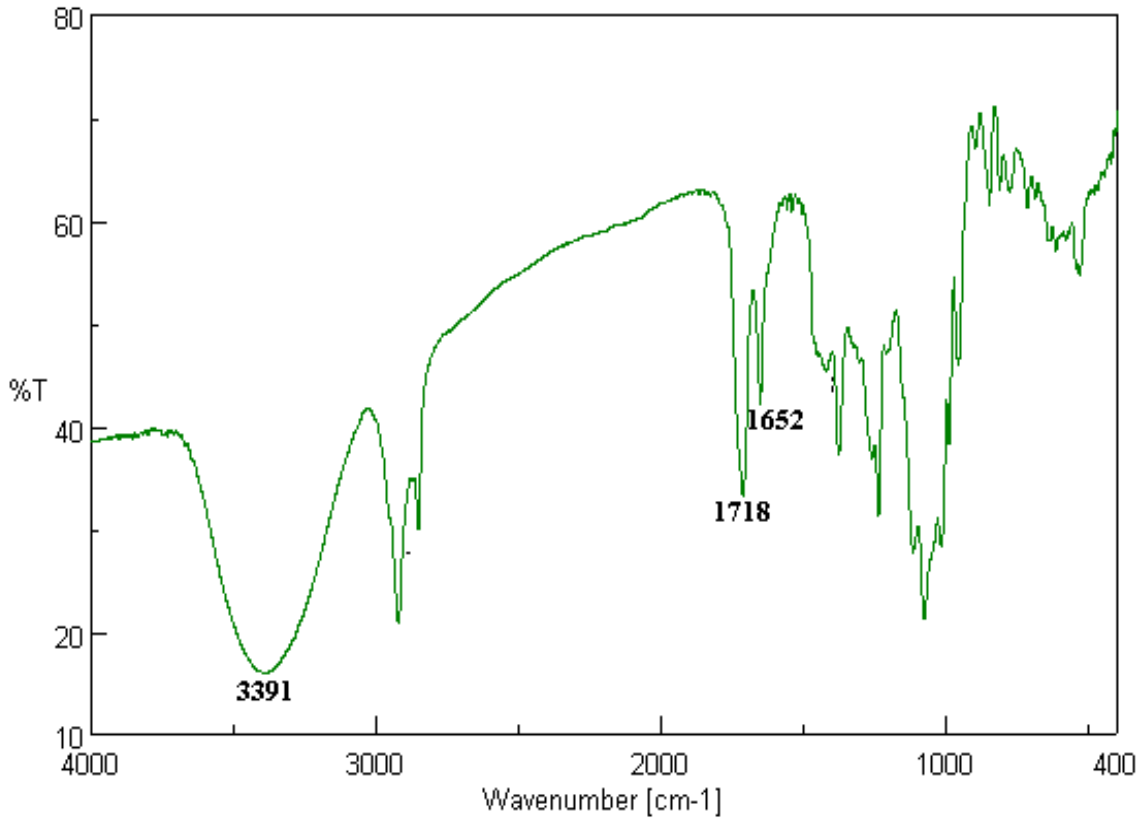


Figure 3.46 : Spectre IR du composé E

Le spectre RMN ^1H du composé **E** présente de grandes ressemblances avec celui du composé **D** (Figure 3.47). On reconnaît les protons caractéristiques du noyau harpagide, à savoir : les protons H-3 (δ = 6,35 ppm), H-1 (δ = 6,1 ppm), H-4 (δ = 4,85 ppm), H-9 (δ = 2,84 ppm), H-7 (2H, δ = 2,17 et 1,88 ppm), H-10 (δ = 1,41 ppm) et enfin le proton anomère H-1' (δ = 4,58 ppm) du β-glucose ($J_{1'-2'}$ = 7,9 Hz).

La différence se résume à la disparition des protons aromatiques et oléfiniques constituant le groupement trans-cinnamoyle et l'apparition d'un signal singulet à δ = 2,0 ppm attestant de la présence d'un groupement acétoxy. Ceci nous permet de suggérer que ce dernier substitue le carbone en C-8 en lieu et place du groupement trans-cinnamoyle.

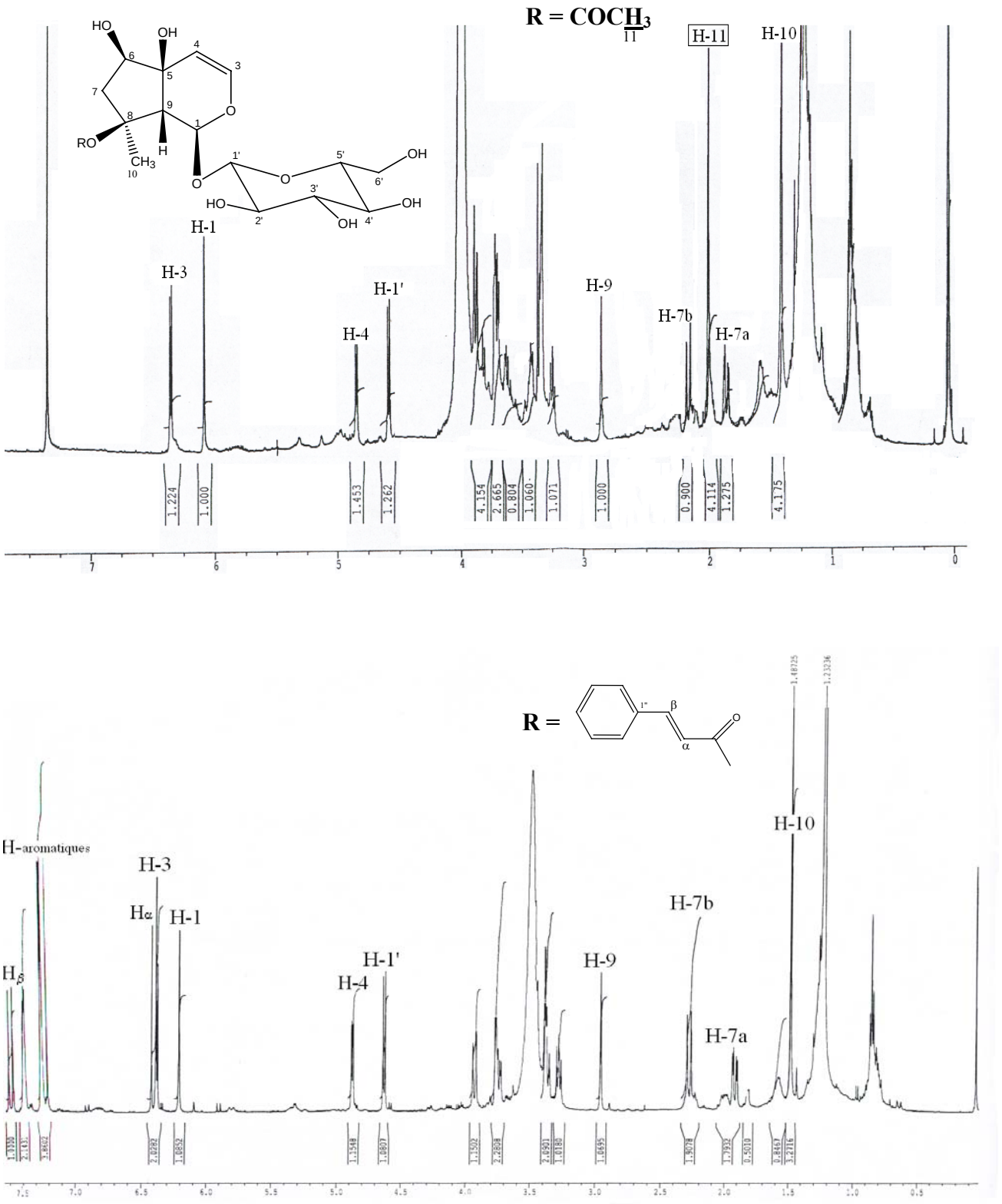


Figure 3.47 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés E (haut) et D (bas)

Le spectre RMN ^{13}C (DEPT) du composé **E** illustré par la figure 3.48, révèle comparativement à celui du composé **D,** outre la disparition des six carbones aromatiques et deux oléfiniques, la présence de deux signaux résonant à δ = 172,2 et 21,8 ppm permettant d'identifier deux carbones d'un groupement $COCH_3$.

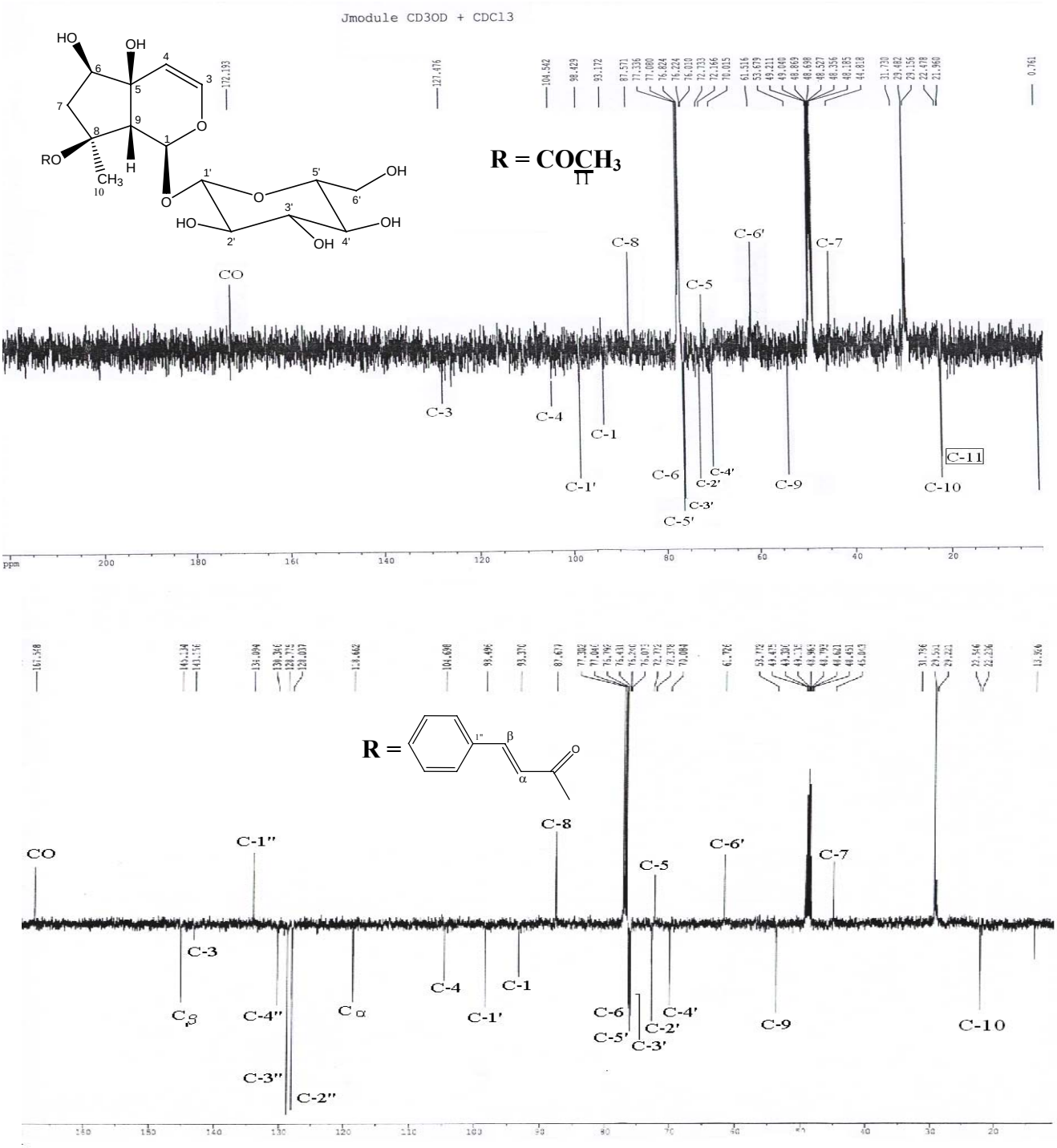


Figure 3.48 : Spectres RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés E (haut) et D (bas)

L'expérience COSY H-H (Figure 3.49) permet de retrouver toutes les corrélations ayant permis de caractériser le glucose et la génine.

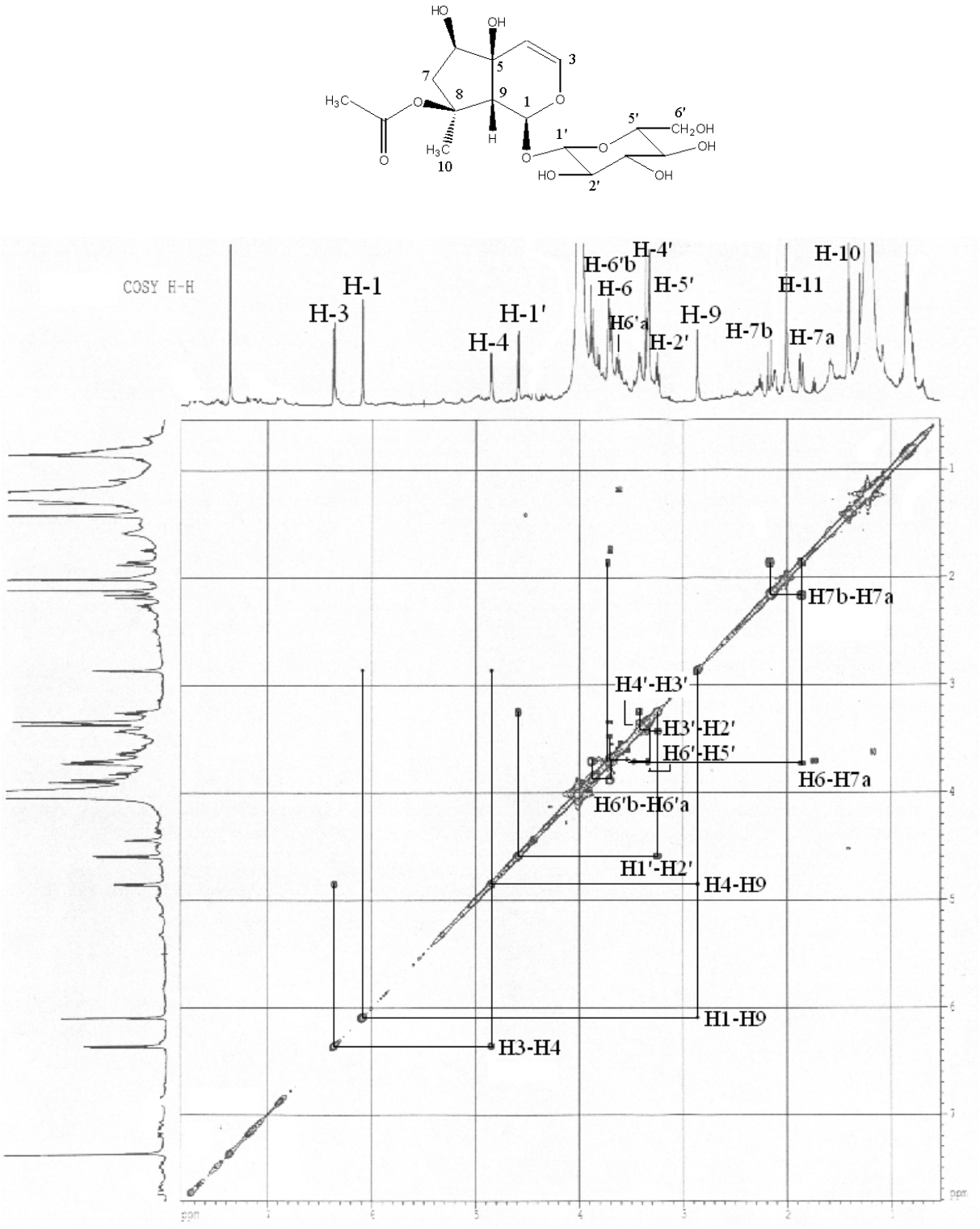


Figure 3.49 : Spectre COSY H-H du composé E

L'expérience HSQC (Figure 3.50) permet de mettre en évidence les corrélations directes proton-carbone du composé **E**. Elle montre bien les corrélations entre les protons méthyliques H-11 (δ = 2,0 ppm) et le carbone C-11 (δ = 21,8 ppm).

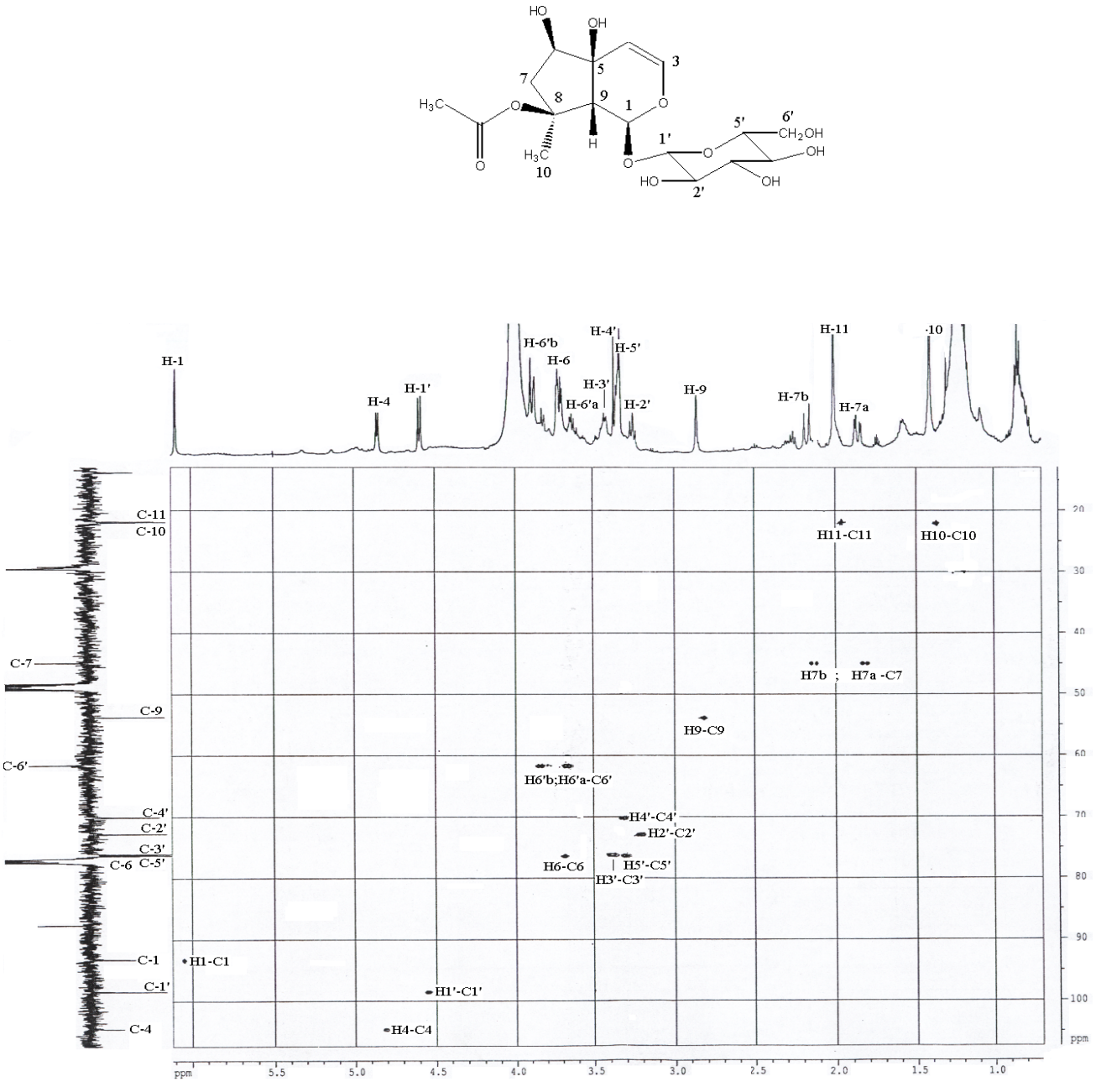


Figure 3.50 : Spectre HSQC du composé E

L'expérience HMBC montre clairement la position du sucre et le groupement acétoxy sur la génine. En effet, le spectre HMBC (Figure 3.51) met en évidence les corrélations entre :

- Le proton H-1 (δ = 6,1 ppm) de la génine et le carbone C-1' (δ = 98,4 ppm) du glucose.
- Le proton H-7b (δ = 2,17 ppm) et le carbonyle (δ = 172,2 ppm) du groupement acetoxy confirmant sa position sur le carbone C-8 (δ = 87,6 ppm).

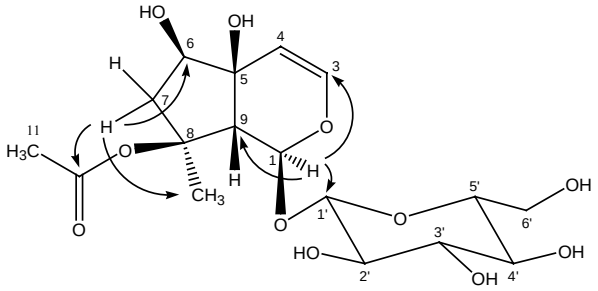


Schéma 3.9 : ***Corrélations C- H en ^{2}J et ^{3}J mettant en évidence la position des substituants***

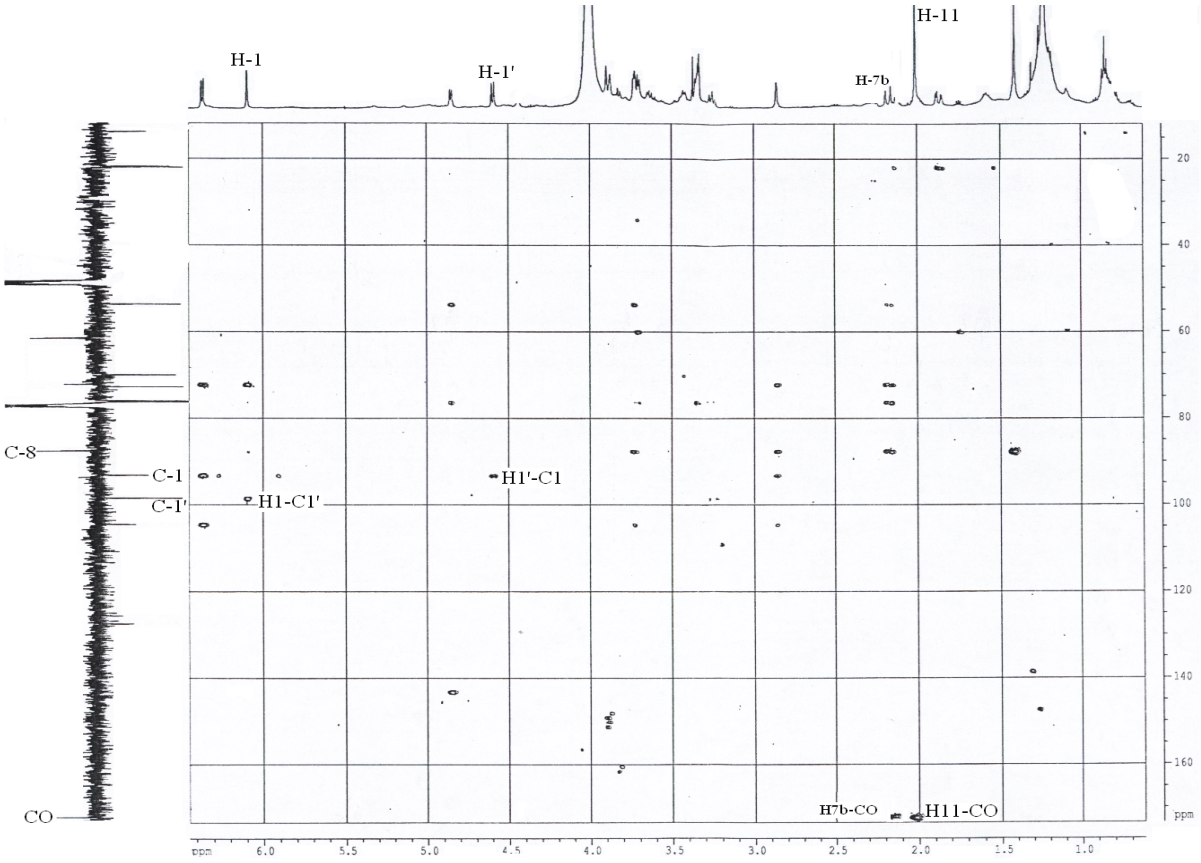


Figure 3.51 : Spectre HMBC mettant en évidence la position des substituants

L'expériences ROESY (Figure 3.52) montre pour le composé **E**, une stéréochimie identique à celle du composé **D** (H-10 α, H-1 α et H-9 β).

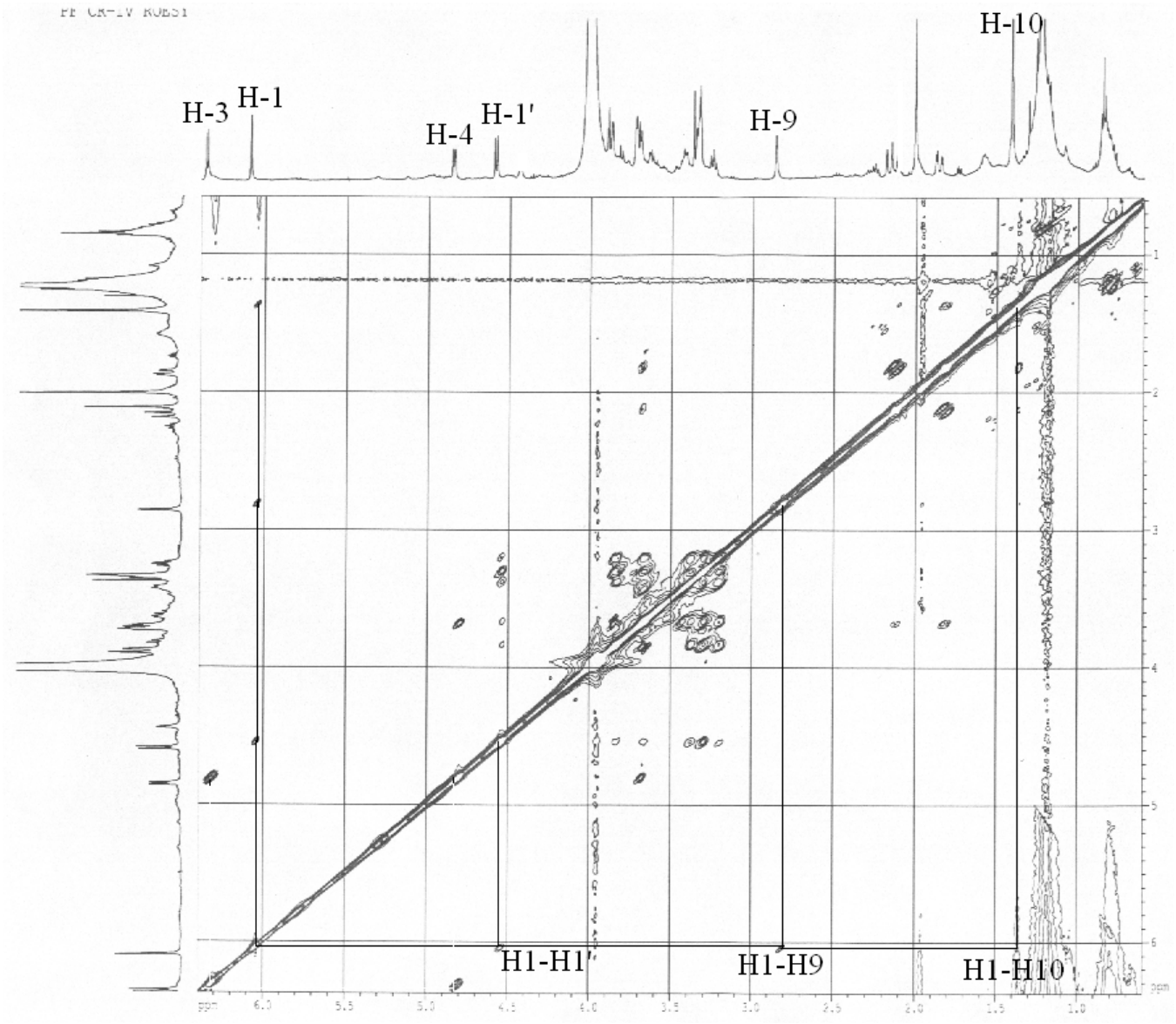


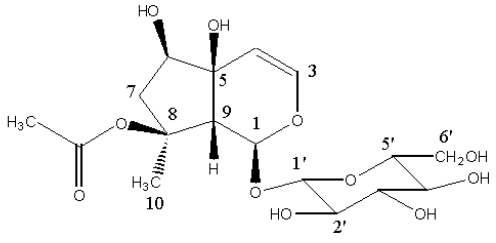
Figure 3.52 : Spectre ROESY du composé E

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau suivant :

N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1(CH)	93,2	6,10 *s*	-
3(CH)	142,2	6,35 *d*	6,4
4(CH)	104,5	4,85 *dd*	6,4 – 1,5
5(C)	72,2	-	-
6(CH)	76,2	3,71 *d*	4,2
7(CH_2)	44,8	1,88 *dd* (H-7a)	15,3 – 4,2
		2,17 *d* (H-7b)	15,3
8(C)	87,6	-	-
9(CH)	53,7	2,84 *sl*	-
10(CH_3)	21,9	1,41 *s*	-
Glucose			
1'(CH)	98,4	4,58 *d*	7,9
2'(CH)	72,7	3,22 *dd*	9 – 7,9
3'(CH)	76,1	3,40 *t*	9
4'(CH)	70	3,33 *nd*	-
5'(CH)	76,2	3,31 *m*	-
6'(CH_2)	61,5	3,68 *dd* (H-6'a)	5,6 – 12,2
		3,88 *dd* (H-6'b)	12,2 – 1,6
$CO\underline{C}H_3$	21,8	2,0 *s*	-
$\underline{C}OCH_3$	172,2	-	-

Tableau 3.4 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé E

Ceci permet de proposer la structure suivante pour le composé **E** : 8-*O*-acétylharpagide



Composé E

Ce composé a été aussi identifié dans les parties aériennes de *Scrophularia deserti* Del. [15], de *Oxera morieri* [63] et récemment des racines de *Verbascum lasianthum* [64].

3.3 Détermination de structures des composés F et G isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes

3.3.1 Détermination de structure du composé F

Le composé **F** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme, méthanol….. Le spectre de masse ESI enregistré en mode positif (Figure 3.53), présente un pic d'ion moléculaire à *m/z* = 399 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 376 et correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{24}O_{10}$.

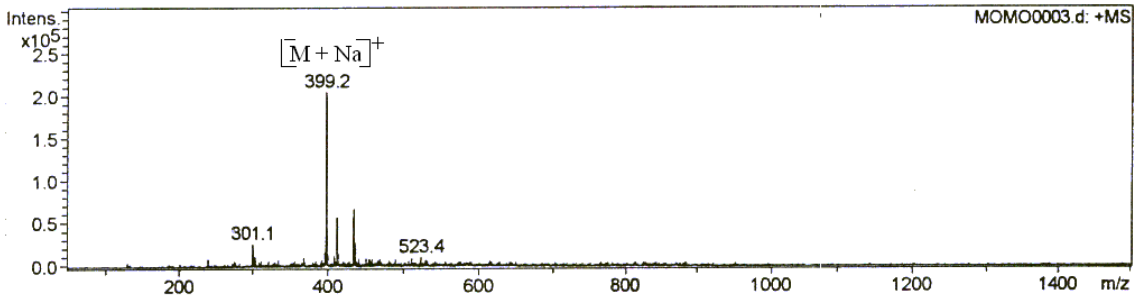


Figure 3.53 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé F

Le spectre RMN ^1H du composé **F** (Figure 3.54) montre un profil relativement simple et permet de mettre en évidence la présence des protons caractéristiques du noyau catalpol. En effet, on observe :

- Un signal résonant sous forme de doublet de doublet (*J* = 6 et 1,7 Hz) à δ = 6,27 ppm, caractéristique du proton oléfinique H-3.
- Un signal doublet (*J* = 9,7 Hz) à δ = 4,88 ppm, correspondant au proton H-1.
- Un signal résonant sous forme de doublet de doublet (*J* = 6 et 4,7 Hz) à δ = 4,99 ppm, attribuable au proton oléfinique H-4.
- Un signal doublet (*J* = 7,9 Hz) à δ = 4,74 ppm, correspondant proton anomère H-1' du glucose.
- Un signal résonant sous forme de doublet de doublet (*J* = 7,8 et 9,7 Hz) à δ = 2,53 ppm, correspondant au proton H-9.
- Un signal multiplet résonant à δ = 2,35 ppm, correspondant au proton H-5.
- Enfin, un signal singulet à δ = 3,45 ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxy OCH_3, substituant probablement le carbone en C-6 du catalpol.

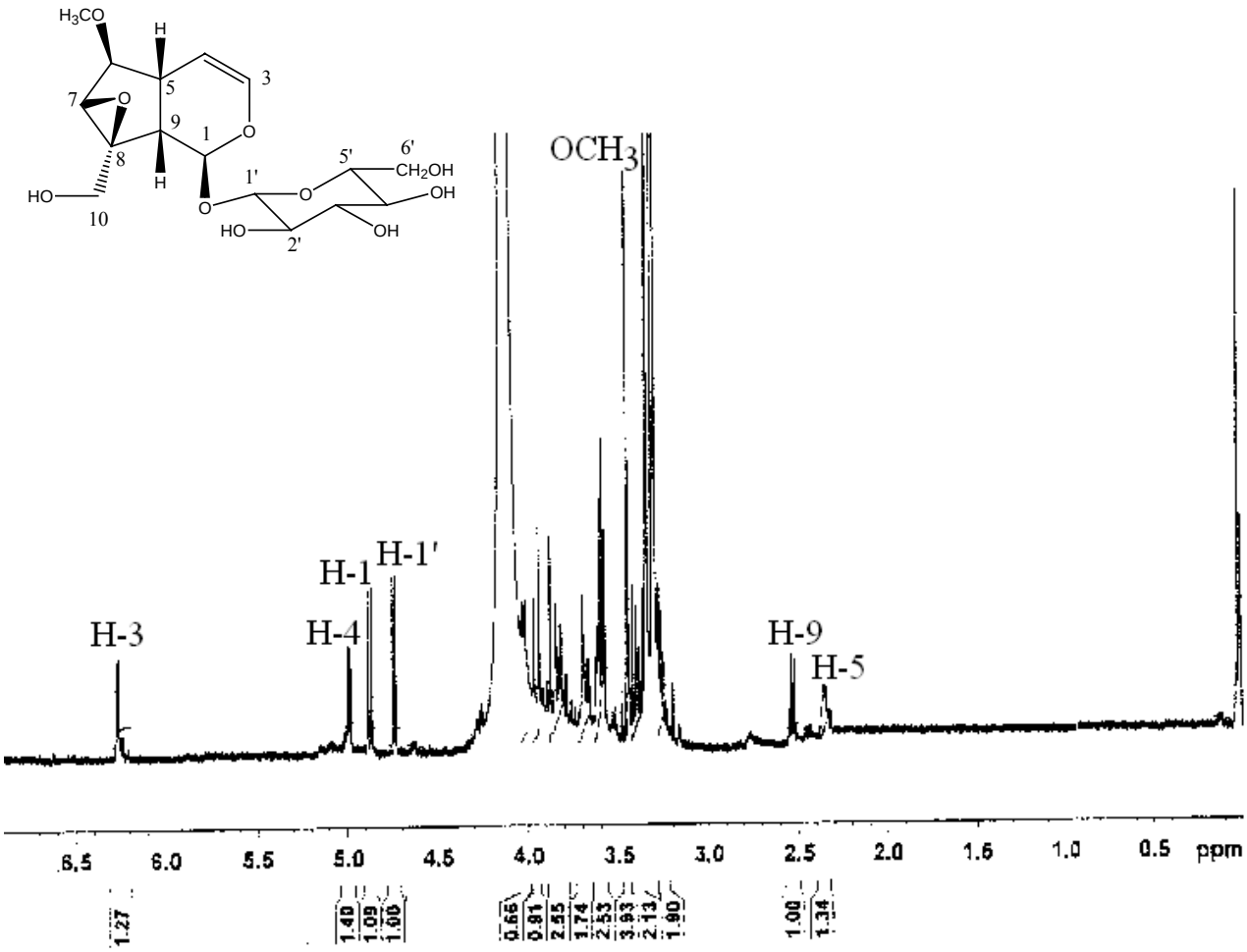


Figure 3.54 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé F

L'expérience COSY H-H (Figure 3.55) montre des couplages entre :

- Les deux protons oléfiniques H-3 et H-4.
- Le proton H-4 et le proton H-5.
- Le proton H-5 et les protons H-6 et H-9.
- Le proton H-9 et le proton H-1.
- Le proton H-10a (δ = 3,86 ppm) et H-10b (δ = 3,97 ppm)

A partir du proton anomère de sucre, on identifie par leurs taches de corrélation, tous les protons du β-glucose (Figure 3.55).

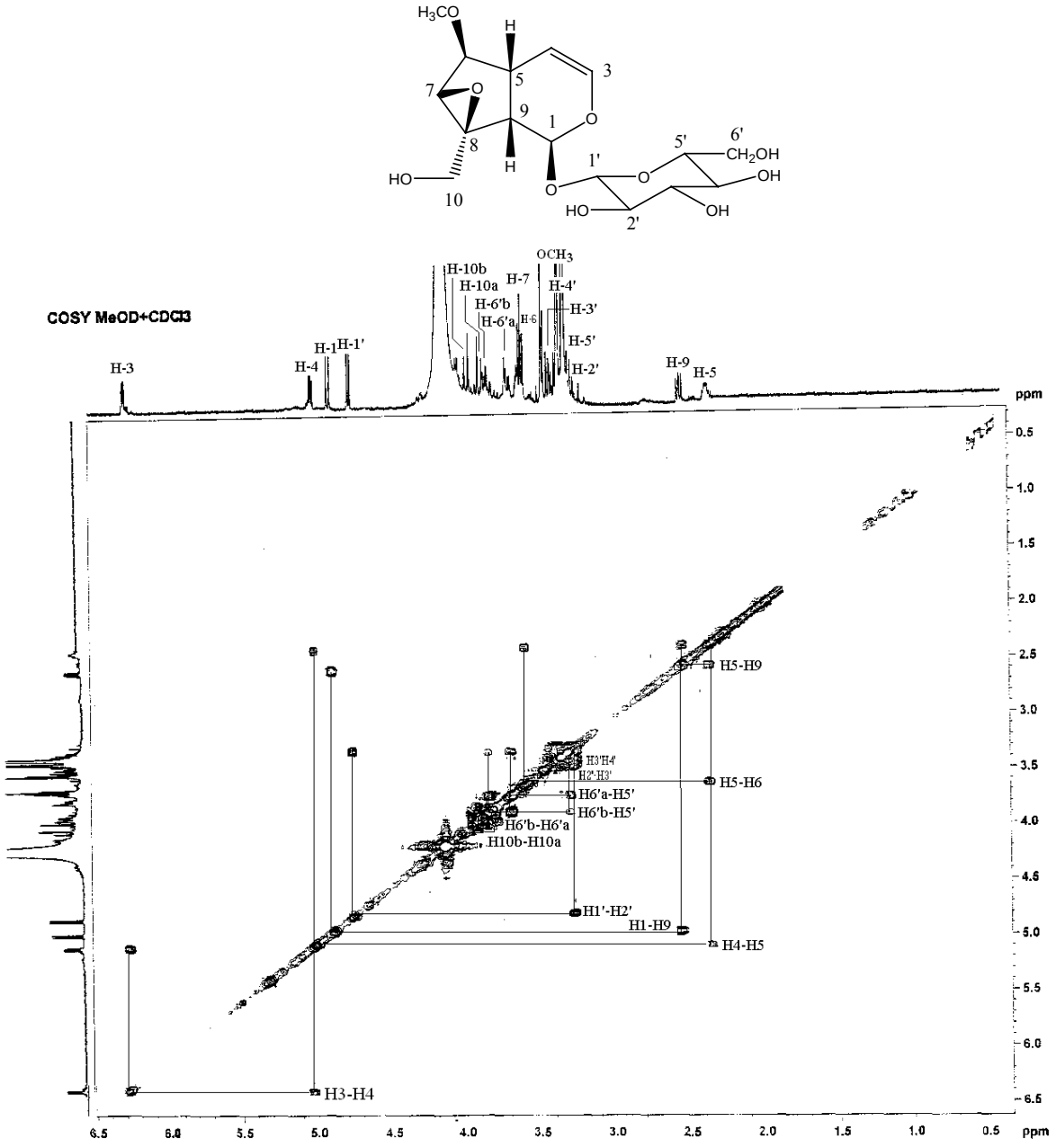


Figure 3.55 : Spectre COSY H-H du composé F

L'expérience de corrélation carbone-proton ou HSQC (Figure 3.56) montre les couplages directs entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à $\delta = 94,7$ ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à $\delta = 142,4$ ppm.
- Le proton H-4 et son carbone C-4 résonant à $\delta = 103,4$ ppm.
- Le proton H-5 et son carbone C-5 résonant à $\delta = 36,3$ ppm.

- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à δ = 87,3 ppm.
- Le proton H-7 et son carbone C-7 résonant à δ = 58,1 ppm.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ = 42,4 ppm.
- Les deux protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ = 61 ppm.

Le spectre montre également les corrélations entre les protons osidiques et leurs carbones.

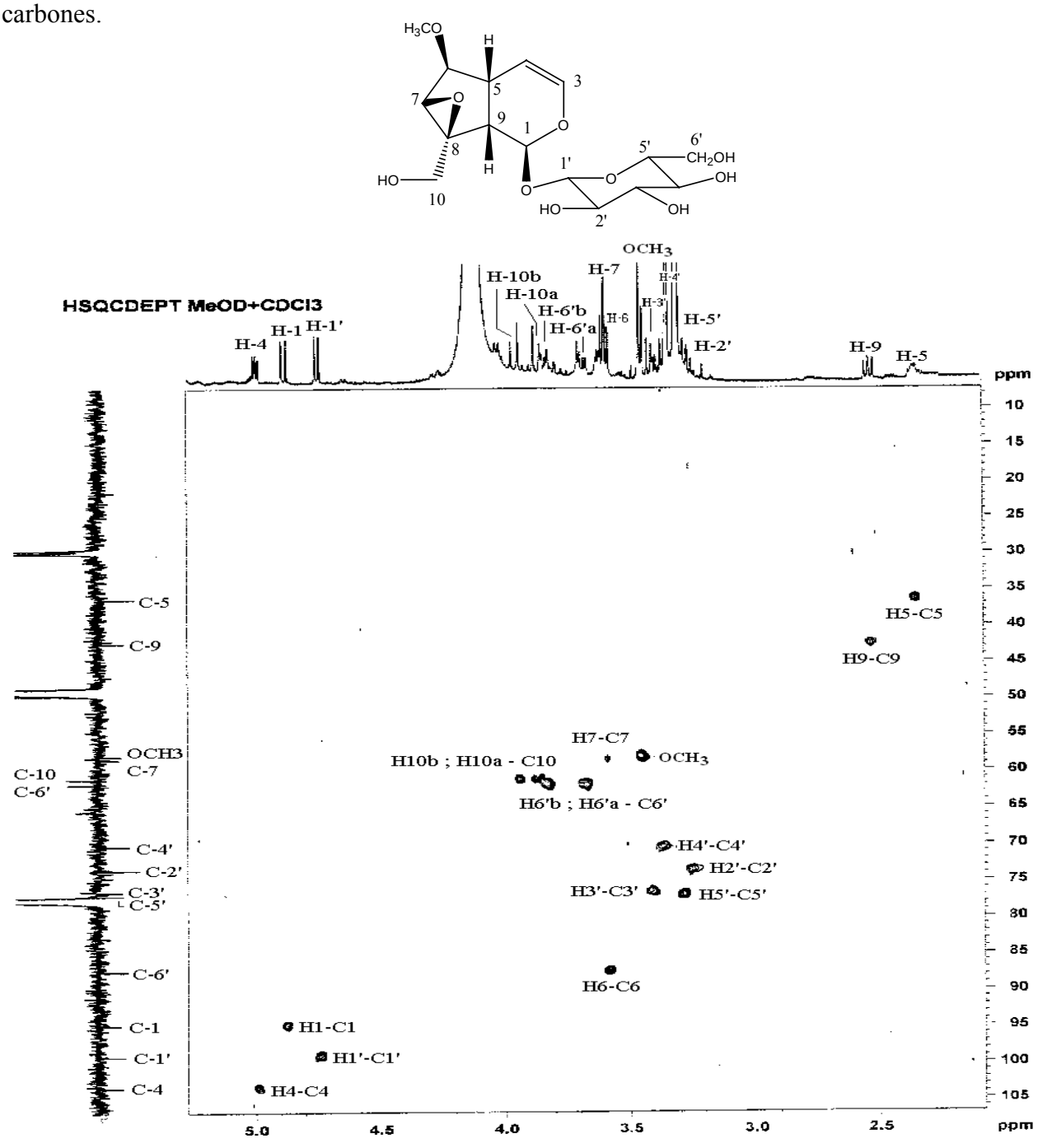


Figure 3.56 : Spectre HSQC du composé F

Cette analyse spectrale s'appuyant particulièrement sur les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'attribuer tous les signaux de résonance des protons et carbones de la molécule (Figure 3.57).

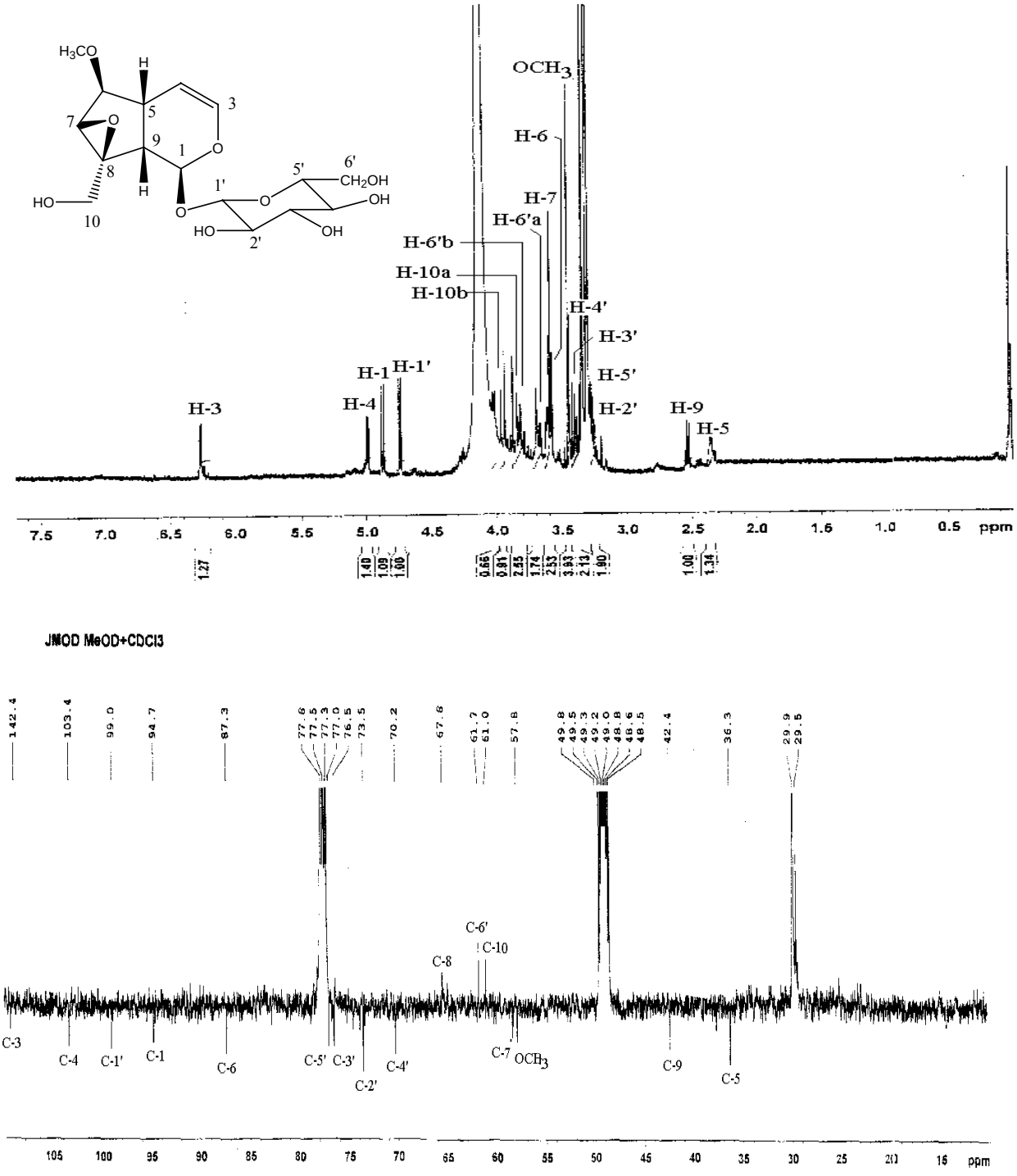


Figure 3.57 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé F

L'expérience HMBC (Figure 3.58) permet de confirmer la position du glucose sur la génine, par l'observation d'une corrélation entre le proton anomère du glucose H-1' (δ = 4,74 ppm) et le carbone C-1 (δ = 94,7) ppm de la génine. Il est également observé un couplage longue distance entre les protons du groupement méthoxyle à δ = 3,45 ppm et le carbone C-6 (δ = 87,3 ppm), confirmant ainsi la position de groupement OCH_3 sur le carbone C-6.

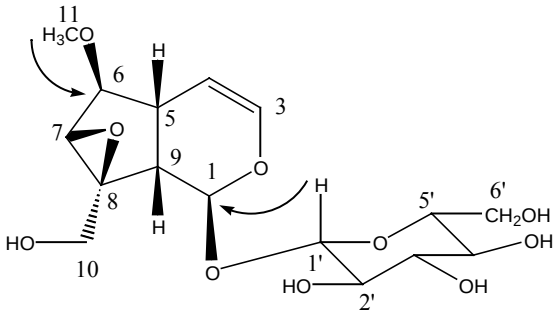


Schéma 3.10 : ***Corrélations C- H en ^2J et ^3J mettant en évidence la position des substituants***

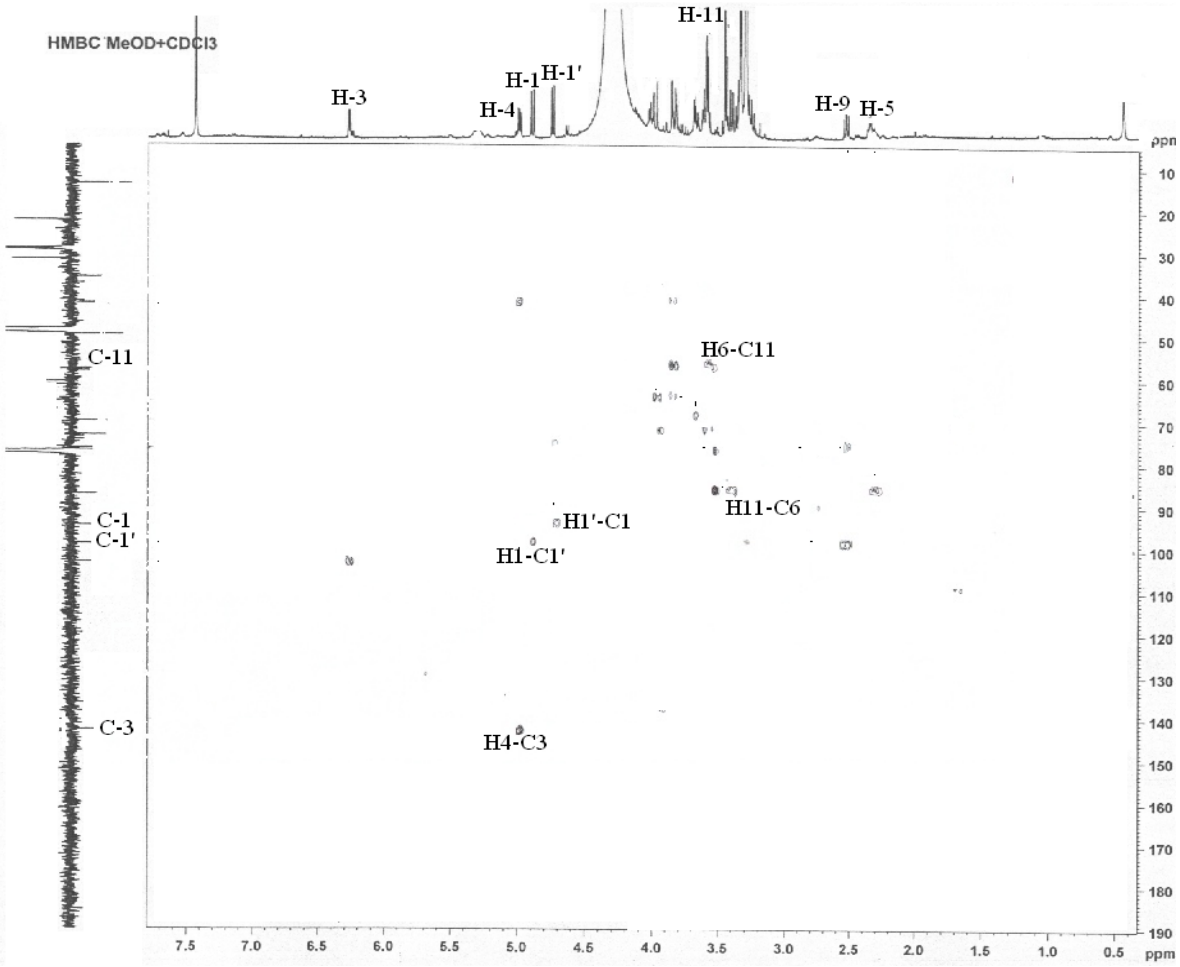


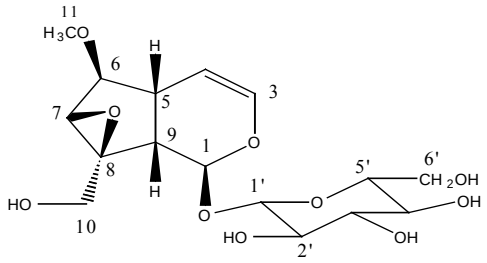
Figure 3.58 : Spectre HMBC mettant en évidence la position des substituants

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans le tableau suivant :

N°	δ_C(ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1(CH)	94,7	4,88 *d*	9,7
3(CH)	142,4	6,27 *dd*	1,7 – 6
4(CH)	103,4	4,99 *dd*	6 – 4,7
5(CH)	36,3	2,35 *m*	-
6(CH)	87,3	3,58 *sl*	-
7(CH)	58,1	3,59 *sl*	-
8(C)	67,7	-	-
9(CH)	42,4	2,53 *dd*	7,8 – 9,7
10(CH_2)	61	3,86 *d* (H-10a)	13,2
		3,97 *d* (H-10a)	13,2
11(CH_3)	57,8	3,45 *s*	-
Glucose			
1'(CH)	99	4,74 *d*	7,9
2'(CH)	73,5	3,27 *dd*	7,9 – 9,1
3'(CH)	76,5	3,39 *nd*	-
4'(CH)	70,2	3,33 *t*	8,7
5'(CH)	77	3,25 *m*	-
6'(CH_2)	61,7	3,68 *dd* (H-6'a)	5,4 – 12,2
		3,83 *dd* (H-6'a)	12,2 – 2,5

Tableau 3.6 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé F

Ainsi, le composé **F** a pour structure : 6-*O*-Méthylcatalpol



Composé F

Récemment, ce composé très commun de la famille Scrophulariaceae, a été isolé des racines de *Scrophularia lepidota* [18].

3.3.2 Détermination de structure du composé G

Les spectres de masse (Figure 3.59) du composé **G** isolé sous forme d'une poudre blanche, enregistrés en modes positif et négatif, présentent respectivement des pics d'ions moléculaires *m/z* = 369 $[M+Na]^+$ et *m/z* = 399 $[M+Cl]^-$, soit une masse moléculaire égale à 346 correspondant à une formule brute en $C_{15}H_{22}O_9$.

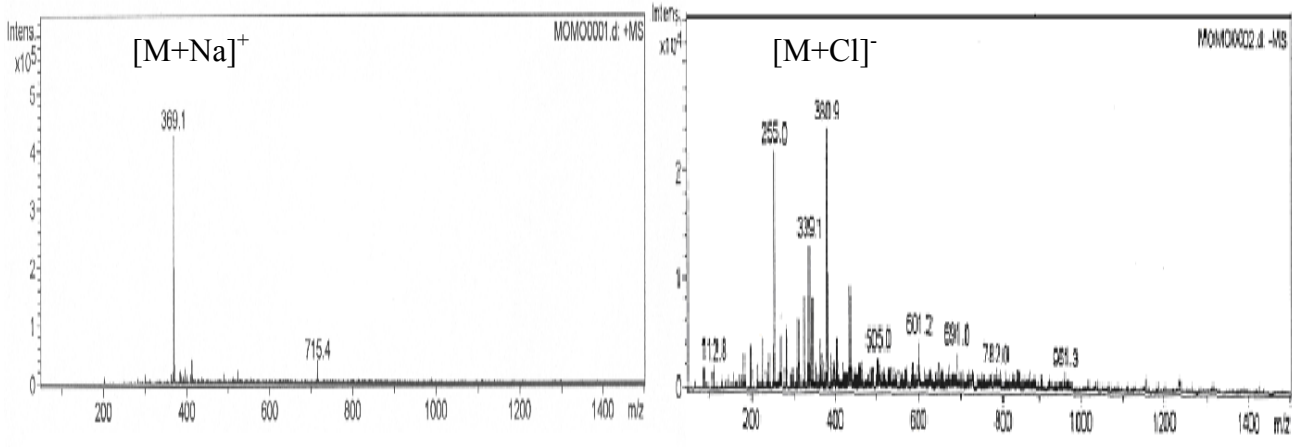


Figure 3. 59 : Spectres de masse ESI du composé G

Le spectre RMN ^1H (Figure 3.60) montre des signaux propres d'un noyau catalpol à l'exception de celui du proton H-7 qui apparaît sous forme d'un large singulet à δ = 5,73 ppm au lieu de δ = 3,59 ppm dans le cas du catalpol (composé **F**), caractéristique d'un proton oléfinique. Ceci permet de déduire la présence d'une double liaison à ce niveau.

Les autres signaux sont identifiables à ceux du catalpol. En effet, on reconnaît :

- Les deux protons résonant à δ = 6,24 et 5,05 ppm, correspondant respectivement aux protons oléfiniques H-3 et H-4.
- Le proton résonant à δ = 4,8 ppm, correspondant au proton H-1.
- Le proton à δ = 4,62 ppm, caractéristique du proton anomère H-1'.
- Le proton résonant sous forme de triplet à δ = 2,86 ppm, correspondant au proton H-9.
- Le proton à δ = 2,61 ppm, attribuable au proton H-5.

Les signaux des protons H-10 sont difficilement identifiables car enveloppés par le pic de l'eau.

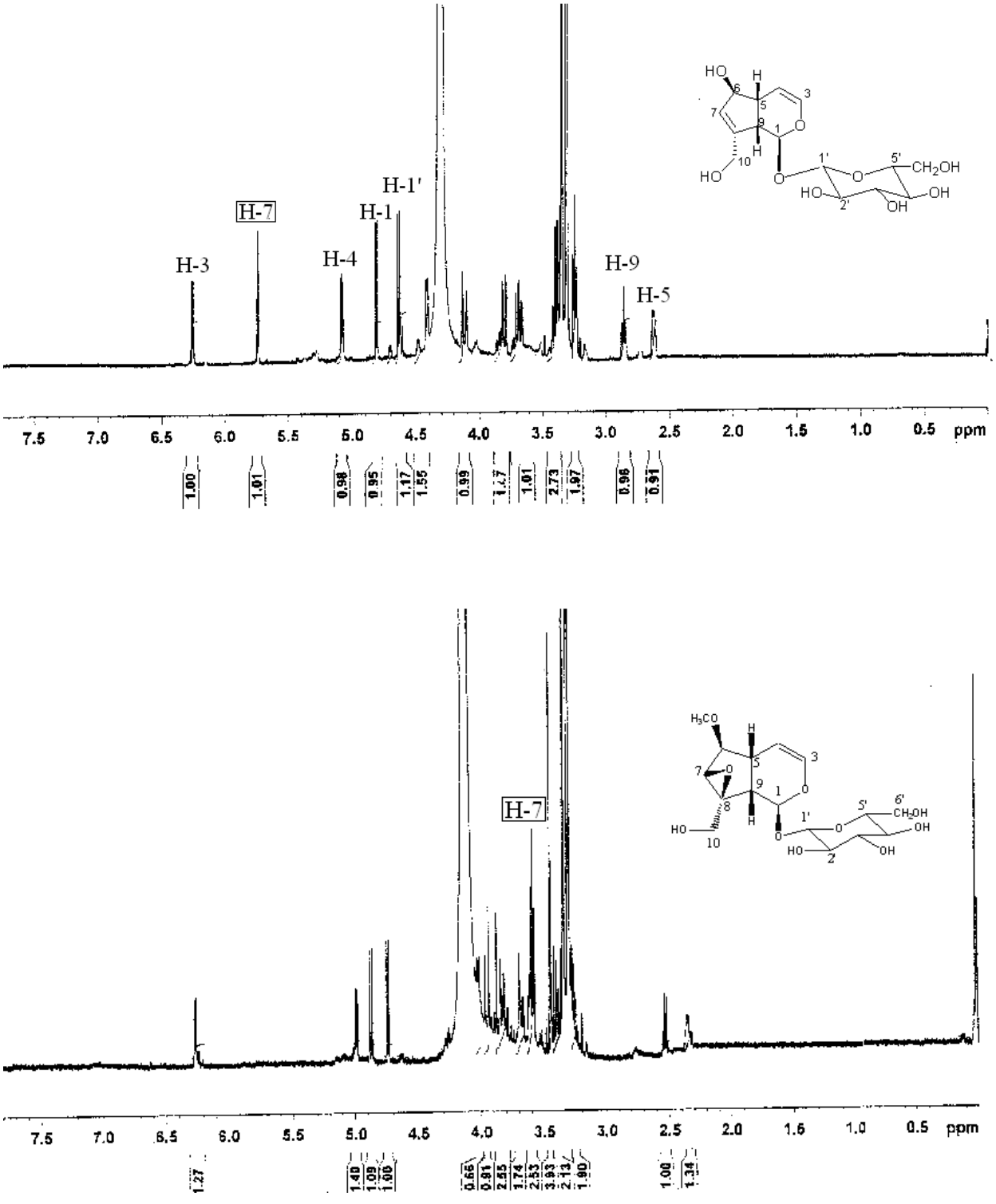


Figure 3.57 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) des composés G (haut) et F (bas)

L'expérience COSY H-H (Figure 3.58) permet de retrouver toutes les corrélations qui ont permis de caractériser le glucose et la génine, particulièrement la corrélation entre le proton oléfinique H-7 et le proton H-6 résonnant à δ = 4,41 ppm.

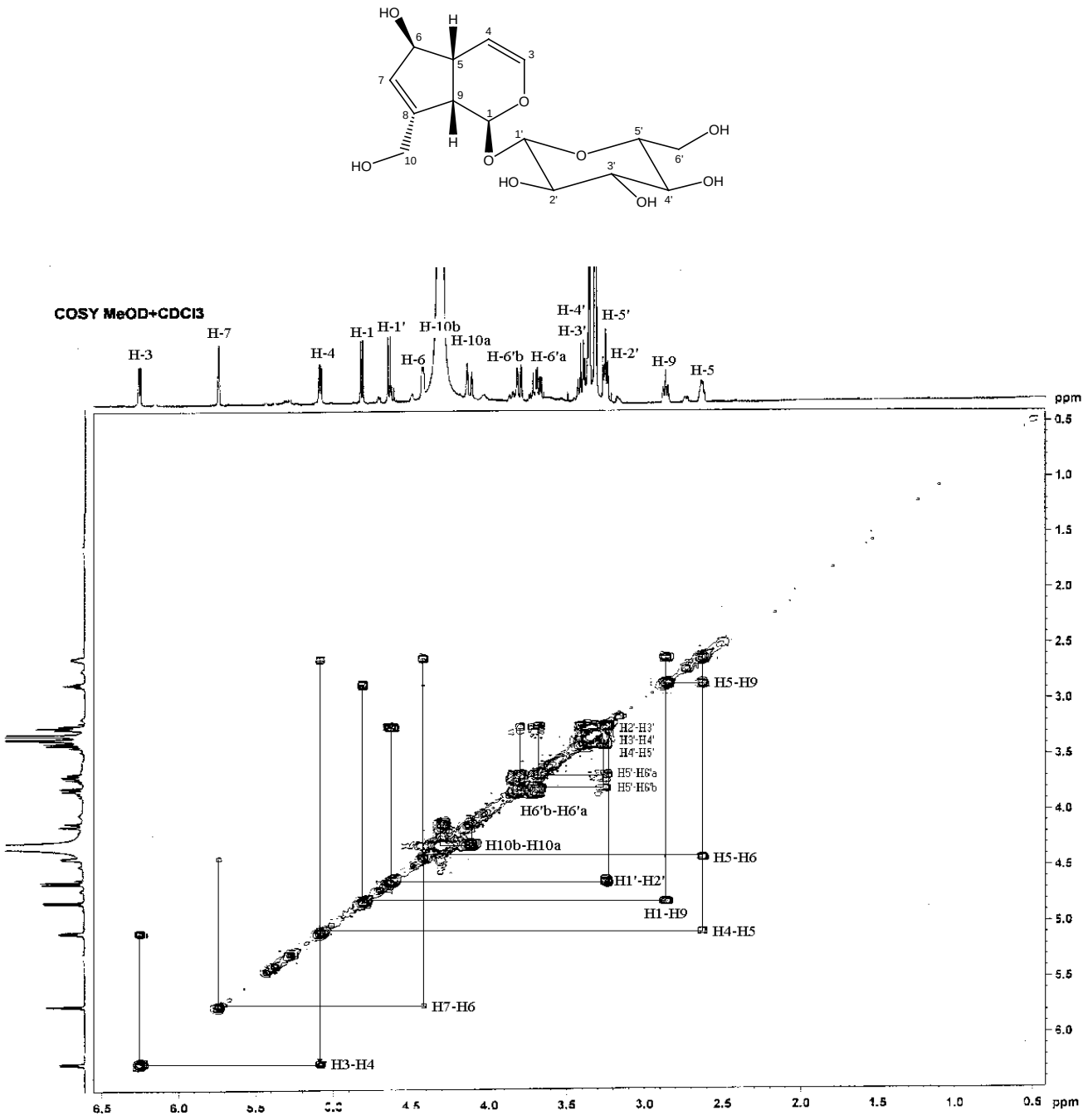


Figure 3.58 : Spectre COSY H-H du composé G

Le spectre RMN ^{1}H suivant (Figure 3.59) montre toutes les attributions des protons de la molécule.

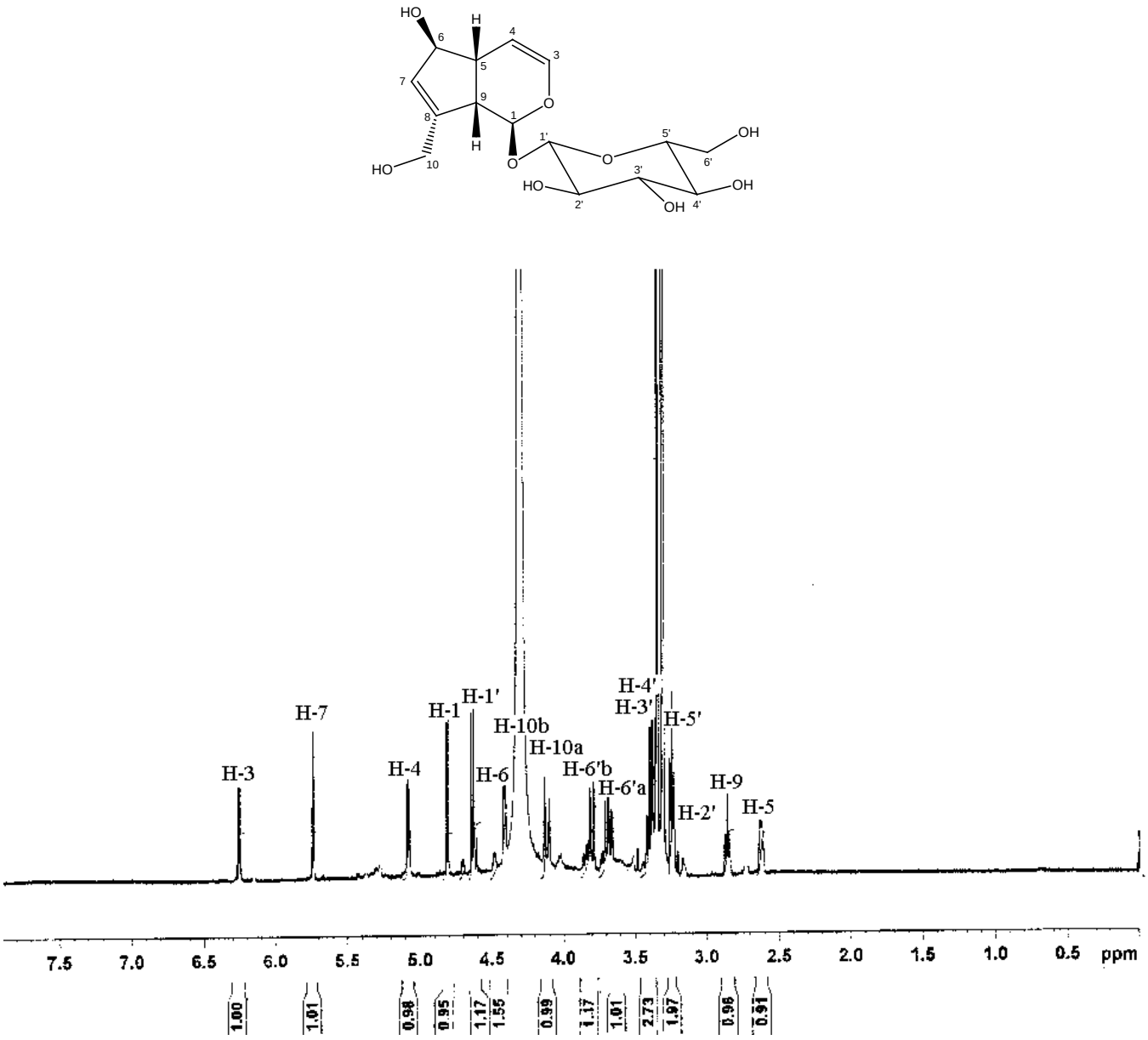


Figure 3.59 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé G

Ces attributions se sont avérées identiques à celles des protons d'un composé également commun à la famille des Scrophulariaceae, connu sous le nom d'aucubine isolé initialement de *Aucuba japonica* [65].

L'expérience HSQC (Figure 3.60) montre les couplages entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à δ = 97,7 ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à δ = 140,7 ppm.
- Le proton H-4 et son carbone C-4 résonant à δ = 105,1 ppm.
- Le proton H-5 et son carbone C-5 résonant à δ = 45,4 ppm.
- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à δ = 81,9 ppm.
- Le proton H-7 et son carbone C-7 résonant à δ = 130,2 ppm.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ = 47,1 ppm.
- Les deux protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ = 60,6 ppm.

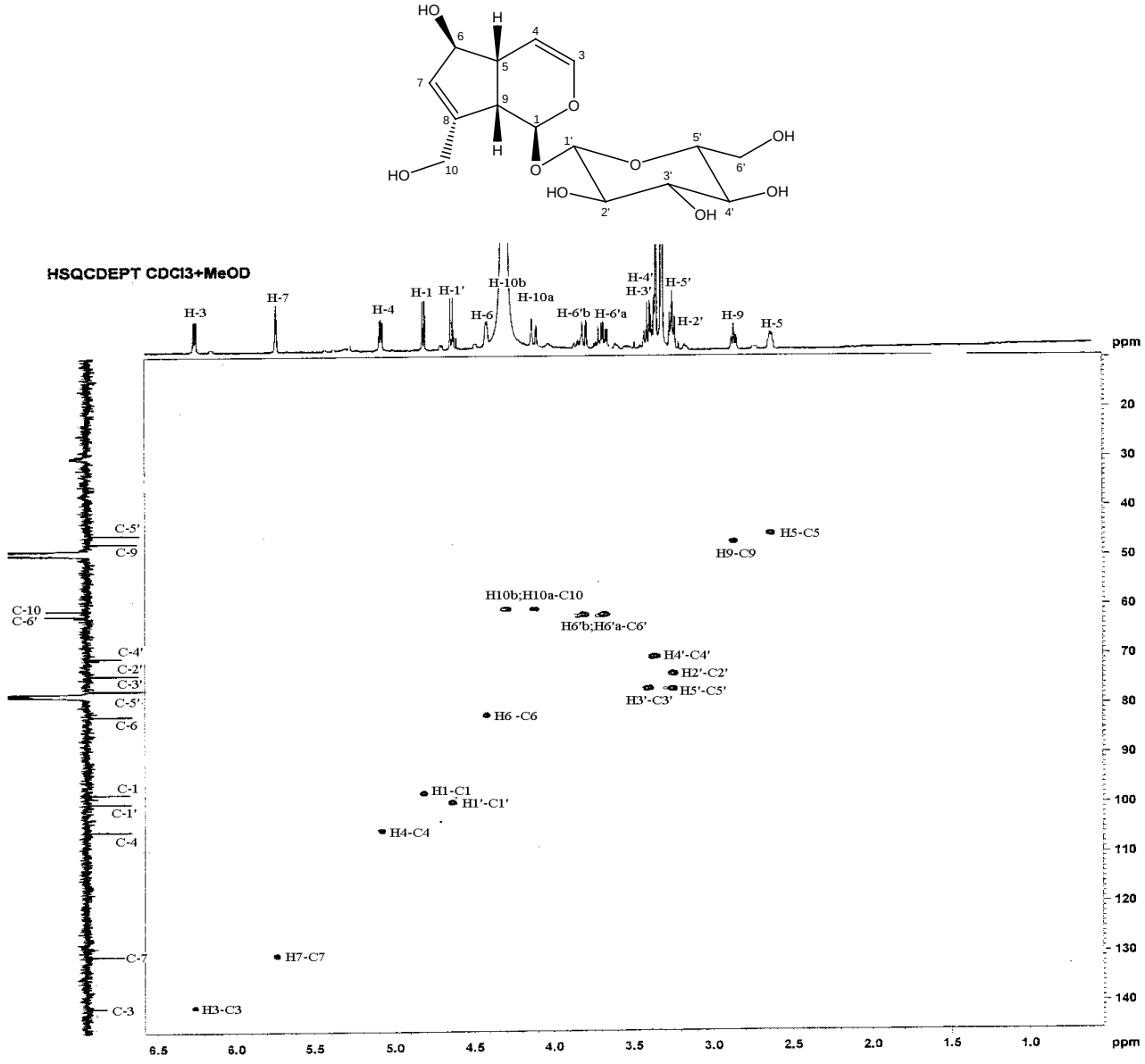


Figure 3.60 : Spectre HSQC du composé G

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance ou HMBC (Figure 3.61) confirme la structure proposée.

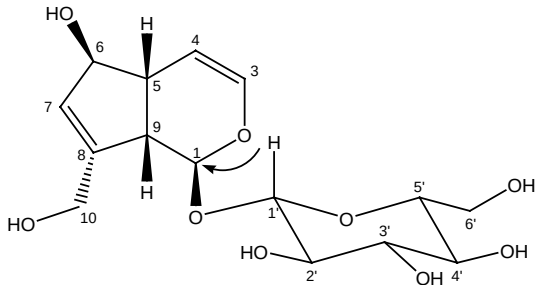


Schéma 3.11 : ***Corrélation HMBC du composé*** **G**

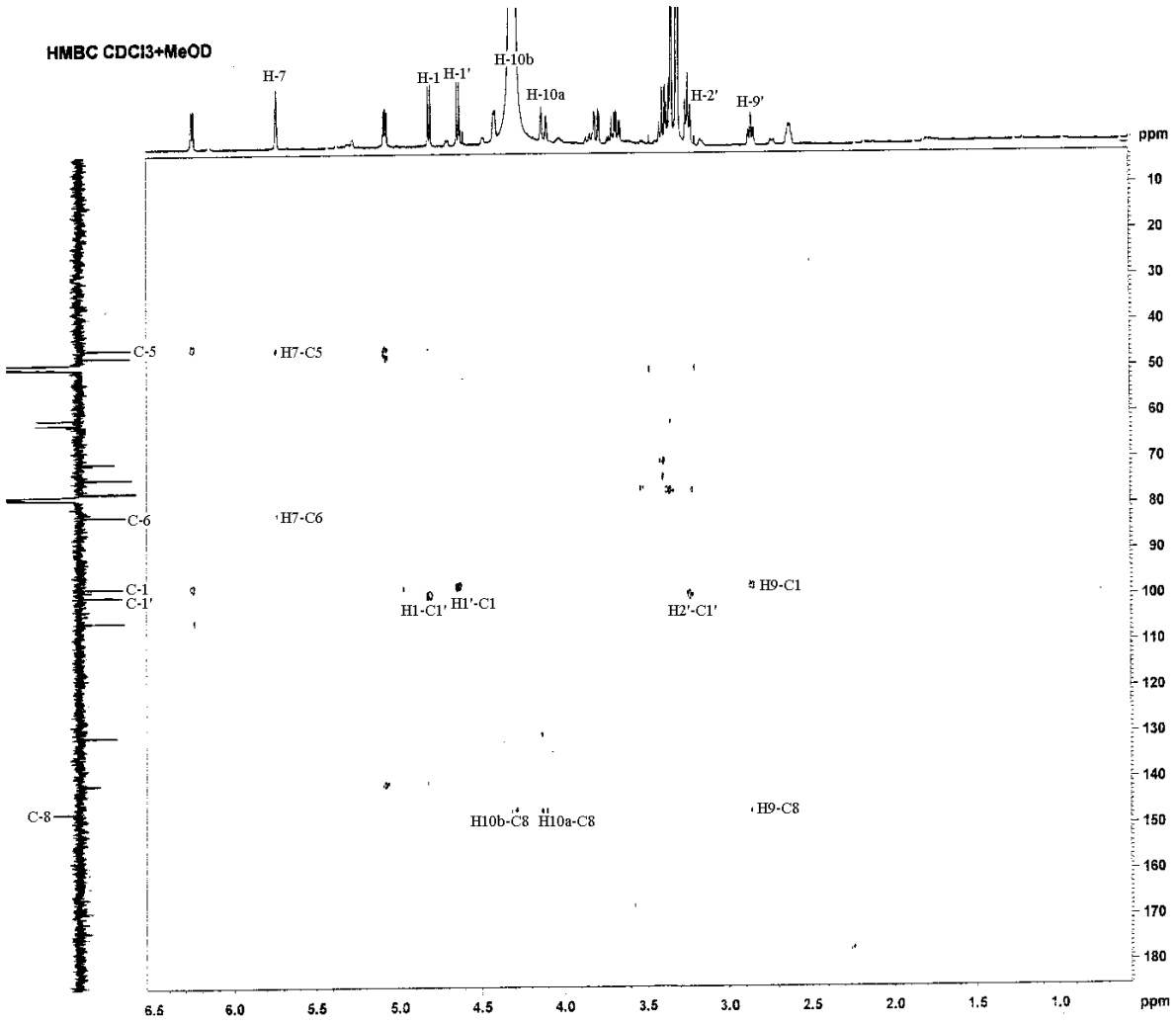


Figure 3.61 : Spectre HMBC du composé G

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure 3.62).

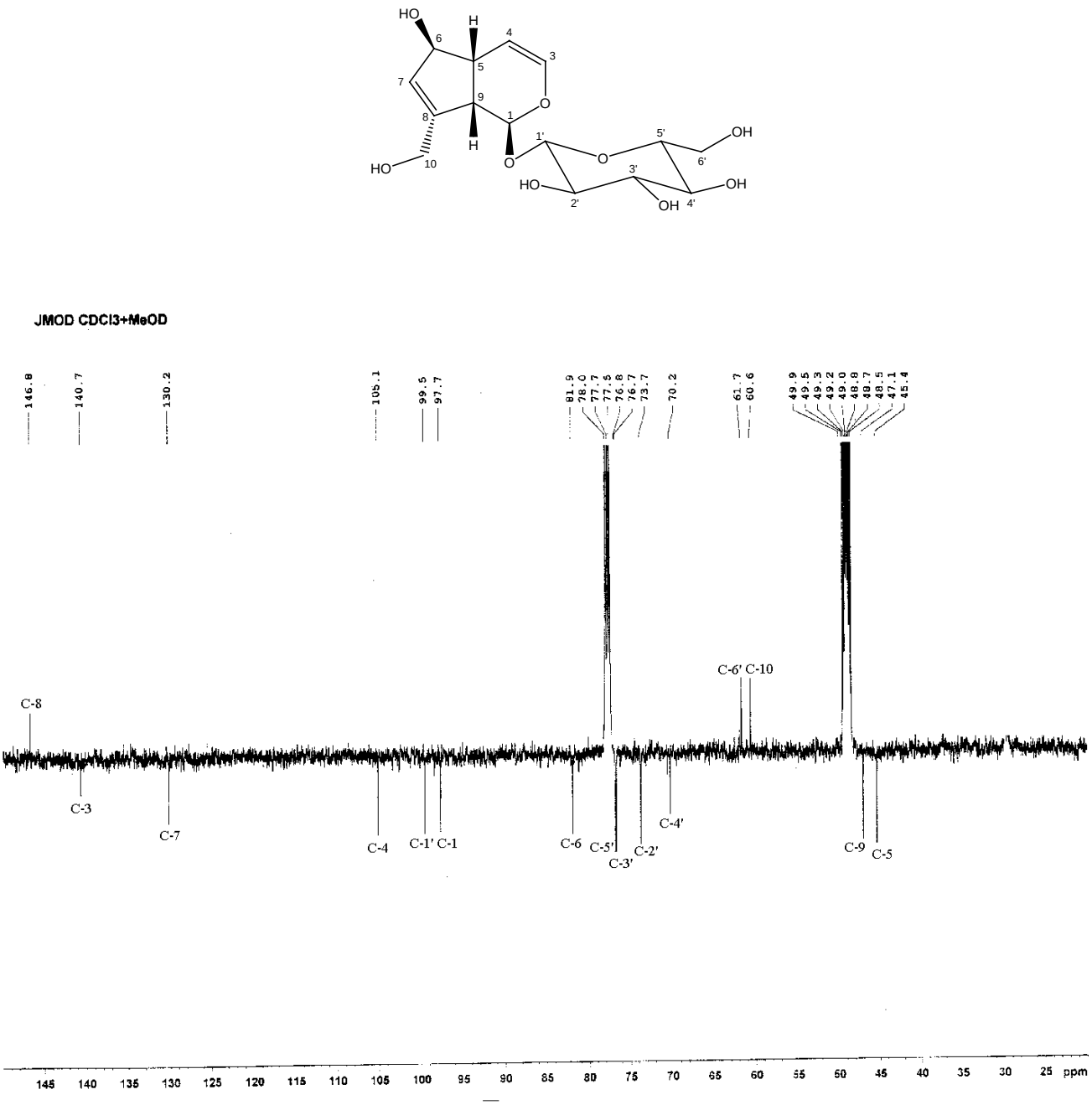
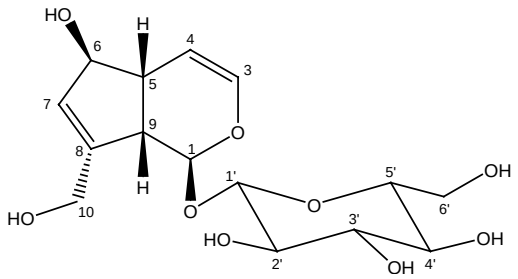


Figure 3.62 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé G

Le tableau suivant reproduit les déplacements chimiques de tous les carbones et les protons du composé **G**.

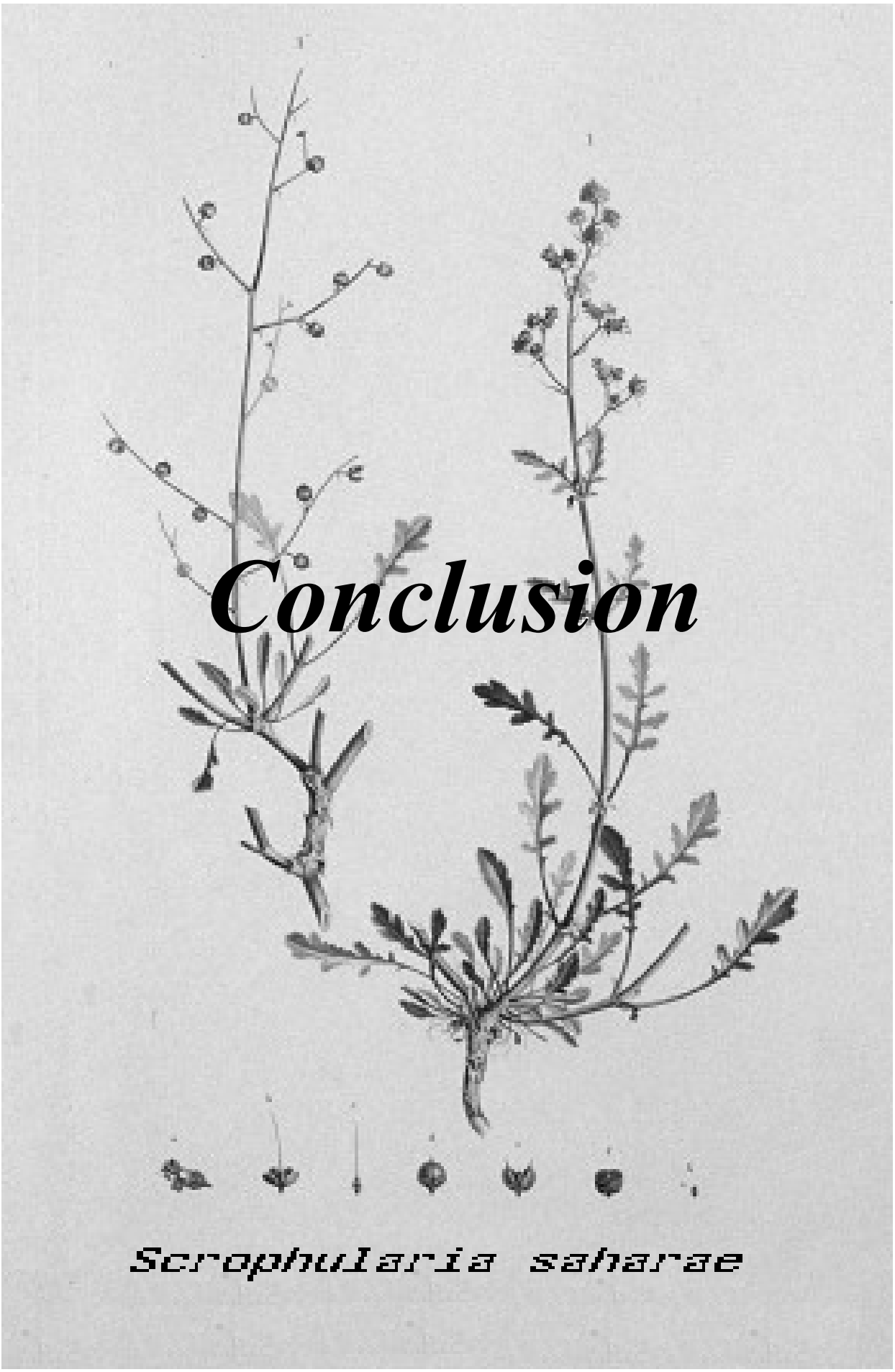
N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
Aglycone			
1(CH)	97,7	4,80 *d*	7,3
3(CH)	140,7	6,24 *dd*	1,9 – 6,1
4(CH)	105,1	5,05 *dd*	6,1 – 3,9
5(CH)	45,4	2,61 *m*	-
6(CH)	81,9	4,41 *dd*	3,4 – 1,7
7(CH)	130,2	5,73 *sl*	-
8(C)	146,8	-	-
9(CH)	47,1	2,86 *t*	7,3
10(CH_2)	60,6	4,10 *d* (H-10a)	15,1
		4,27 *d* (H-10a)	15,1
Glucose			
1'(CH)	99,5	4,62 *d*	7,9
2'(CH)	73,7	2,42 *dd*	7,9 – 9
3'(CH)	76,8	3,35 *t*	9
4'(CH)	70,2	3,32 *t*	9
5'(CH)	76,7	3,40 *m*	-
6'(CH_2)	61,7	3,60 *dd* (H-6'a)	1,6 – 12,4
		3,67 *dd* (H-6'b)	12,4 – 4,7

Tableau 3.7 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé G



Composé G

Conclusion



Scrophularia sahara

CONCLUSION

Le présent travail reporte une étude chimique réalisée séparément sur les extraits chloroformique des racines et méthanolique des parties aériennes de *Scrophularia saharae* Batt. (Scrophulariaceae), plante commune dans tout le Sahara septentrional. Au cours de cette investigation qui a contribué à compléter nos connaissances sur les constituants chimiques des plantes scrophulariaceae sahariennes, sept iridoïdes (**A-G)** ont été isolés par différentes méthodes chromatographiques. A cet effet, le recours à la chromatographie en phase inverse a été salutaire tant ces composés sont difficilement séparables par les méthodes classiques.

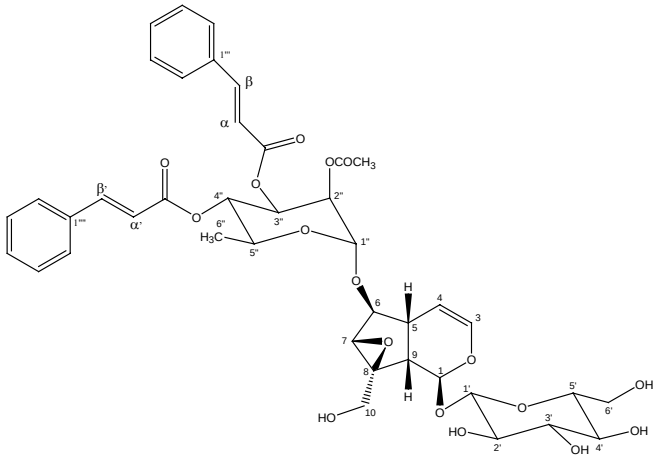
L'extrait chloroformique a fourni cinq iridoïdes dont trois (**A**, **B** et **C**) dérivant du catalpol et deux (**D** et **E**) dérivant de l'harpagide. Ces deux derniers présentent une activité anti-inflammatoire reconnue.

L'extrait méthanolique a donné deux iridoïdes, l'un (**F**) dérivant du catalpol et l'autre (**G)** étant tout simplement l'aucuboside, substance à activité anti-inflammatoire établie.

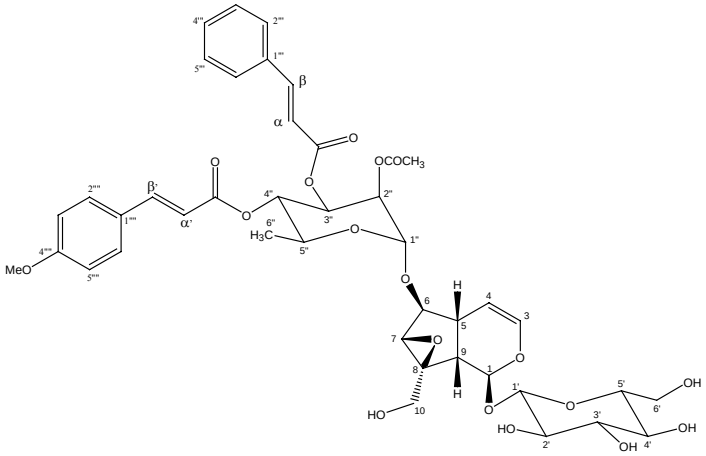
L'élucidation des structures de ces composés a été réalisée au moyen des méthodes modernes d'analyse spectroscopique, particulièrement la RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, ROESY et NOESY) et la spectrométrie de masse.

Cette étude qui complète celle réalisée au laboratoire sur une autre plante scrophulariaceae endémique saharienne, *Verbascum ballii* en l'occurrence, a montré encore une fois que les iridoïdes notamment glycosilés demeurent sans conteste les constituants dominants des Scrophulariaceae en général.

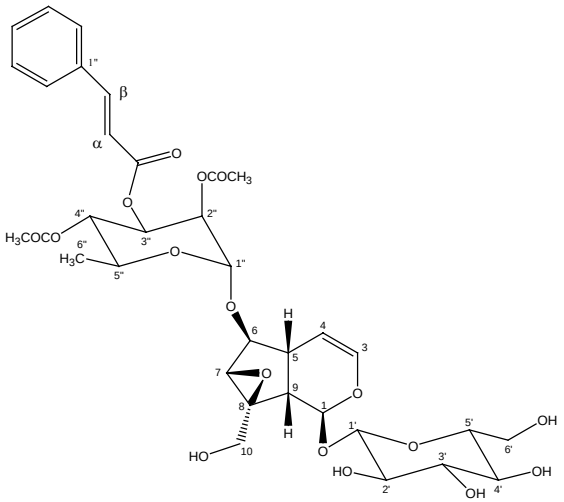
En conclusion, notre travail a permis d'isoler et de déterminer les structures de sept iridoïdes **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** et **G** correspondant aux formules suivantes :



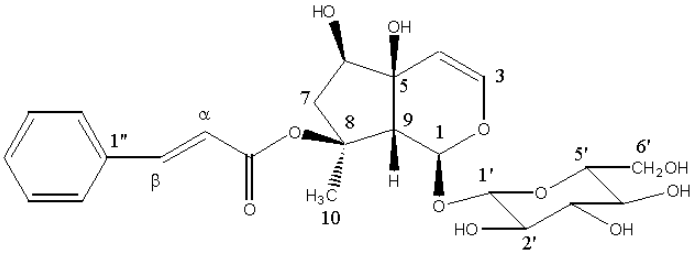
***Composé* A : 6-*O*-[(2"-*O*-acétyl-3", 4"-di-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol**



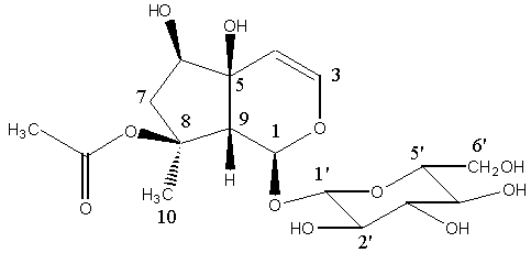
***Composé* B : 6-*O*-[(2"-*O*-acétyl-3"-*O*-*p*-méthoxy- trans-cinnamoyl-4"-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol**



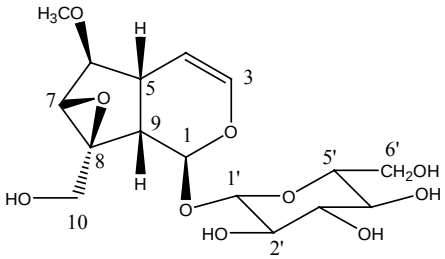
***Composé* C : 6-*O*-[(2″,4″-di-*O*-acétyl-3″-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol**



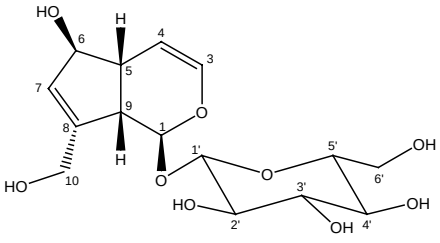
***Composé* D : 8-*O*-trans-cinnamoylharpagide**



***Composé* E : 8-*O*-acétylharpagide**

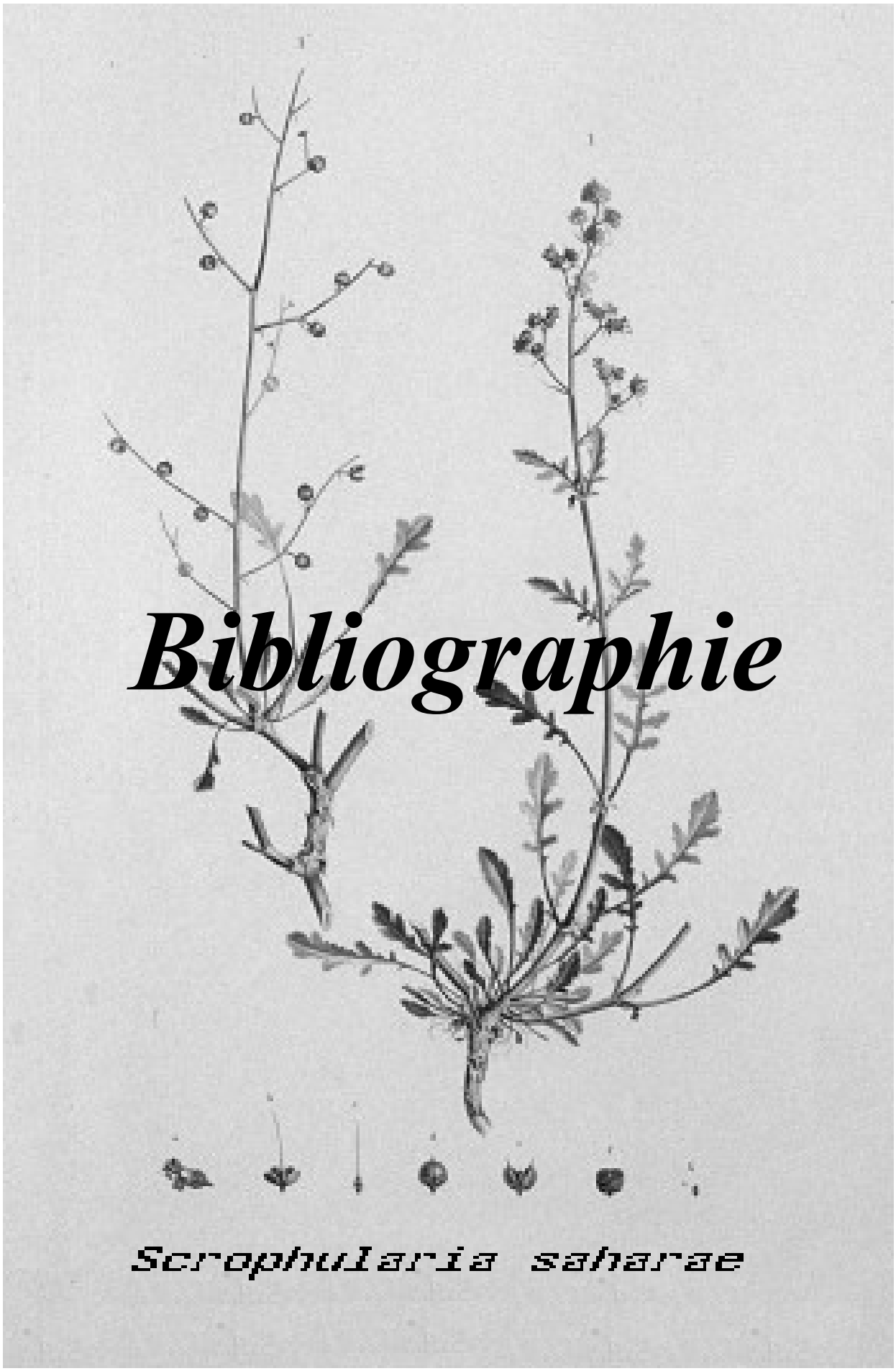


***Composé* F : 6-*O*-méthylcatalpol**



***Composé* G** : **Aucuboside**

Bibliographie



BIBLIOGRAPHIE

[1] **Richardson, I.B.K.**

Flowering plants of the world (Scrophulariaceae), Oxford University Press, New York, NY, 243–245, 1993

[2] **Heywood V.H.**

Las plantas con flores. Barcelona: Reverté, 1985

[3] **Valdés B., Talavera, S. et Fernandez-Galiano E.**

Flora vascular de Andalucia Occidental (Scrophulariaceae), 2.Barcelona: Ketres, 486-547, 1987

[4] **Angiosperm Phylogeny Group.**

Annals of the Missouri Botanical Garden 85, 531-553, 1998

[5] **Hilliard, O.M.**

The *Manulae*, a tribe of Scrophulariaceae. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1- 212,1994

[6] **Quezel, F. Santa, S.**

Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques meriodionales. Vol.1-2.Ed.CNRS, Paris France, 1962,1963

[7] **Ozenda, P.**

Flore du Sahara. Ed. CNRS, Paris France, 1991

[8] **Battandier, J.A.**

flore de l'Algérie (Dicot.), Alger, Algérie, 634, 1888-1890

[9] **Paul, I., Micchel, M. et Jean-Pierre, R.**

Encyclopédie des plantes médicinales, 2 ^{eme} ed, 2001

[10] **Bellakhdar, J.**

La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press, 1997

[11] **Poletti, A.**

Fleur et plantes médicinales, 2eme ed. Delachaux & Niestlé, Neuchatel Suisse, 1988

[12] **Seifert, F.; Preiss, Johne, S.; Schmidt, J. et Lien, N.T.**

Phytochemistry, 30, 3395-3400, 1991

[13] **Tina, H., Tanya, H., Kate, S., Blanche, S., Daphne, R., Carol, A., Maryann, R. et Steve, G.**

Les plantes médicinales, Encyclopédie pratique, 2 ^{eme} ed , 2001

[14] **Rosa, M.G., Maria, L.V., Maria, D.C.R., Salvador, M., Alexander, I.G. et Jose, L.R**
J. Nat. Prod., 61,1162-1163, 1998

[15] **Ahmed, B., Al-Rehaily, A.J., Al-Howiriny, T.A., El-Sayed, K.A. et Ahmad, M.S.**
Biol. Pharm.Bull., 26, 462-467, 2003

[16] **Garcia, D., Fernandez, A., Saenz, T. et Ahumada, C.**
PubMed., 51, 443, 1996

[17] **Ana, M.D., Maria, J.A., Lidia, F., Ana, M.S., Javier, D.S. et Paulina, B.**
Life Sciences, 74, 2515-2526. 2004

[18] **Deniz, T., Nadide, D.G., Remo, P., Reto, B., Ali, A.D., Ihsan, C. et Peter, R.**
Phytochemistry, 66, 355-362, 2005

[19] **Kim, S.R., Young, S.K, Yong, K.L., Seung, H.K., George, J.M. et Young C.K.**
Cognitive Brain Research, 17, 454–461, 2003

[20] **Toshio, M. et Mimatsu, A.**
J. Nat. Prod., 62,1079-1084, 1999

[21] **Philip, C.S., Monique, S.J.S., Julia, S., Peter, J.H. et Peter, G.**
Phytother. Res, 16, 33-35, 2002

[22] **Bhandari, S.P.S., Mishara, A., Roy, R. et Garg, H.S.**
Phytochemistry, 31, 689-691, 1992

[23] **Bhandari, S.P.S., Roy, R., Agrawal, P.K. et Garg, H.S.**
Phytochemistry, 41, 879-882, 1995

[24] **Bhandari, S.P.S., Babu, U.V. et Garg, H.S.**
Phytochemistry, 45, 1717-1719, 1997

[25] **Calis, I., Gross, G.A., Winkler, T. et Sticher, O.**
Planta Medica, 168-170, 1988

[26] **Calis, I., Zor, M. et Basaran, A.A.**
J. Nat. Prod., 56, 606-609, 1993

[27] **Calis, I., Zor, M. et Basaran, A.A.**
Helvetica Chimica Acta, 76, 1352-1360, 1993

[28] **Lidia, F., Ana, M.D., Evelyne, O., Robert, F. et Guy, B.**
Phytochemistry, 40, 1569-1571, 1995

[29] **Yi-Ming, L., Shan-Hao, J., Wen-Yun, G. et Da-Yuang, Z.**
Phytochemistry, 50, 101-104, 1999

[30] **Anh-Tho, N., Jeanine, F., Hugues, M., Magda C., Michel, L. et Pierre, D.**
Phytochemistry, 66, 1186-1191, 2005

[31] **Da-yuan, Z., Shuang-jun, L., Shan-hao, J., Yi-ming, L. et Jia-feng, Z.**
Tetrahedron letters, 41, 1069-1071, 2000

[32] **Nangia, A., Prasuna, G. et Bheema, Rao.**
Tetrahedron, 53, 14507-14545, 1997

[33] **Bruneton, J.**
Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales, 3 eme ed.Tec & Doc, paris, 1999

[34] **Bianco, A.**
Elsevier Science Publishers, 7, 329, 1990

[35] **Takeda, Y., Morimato, Y. et Matsumoto, Y.**
J. Nat Prod., 58, 1217-1221,1995

[36] **Nangia, A. et Prasuna, G.**
Tetrahedron, 52, 3435, 1996

[37] **Pavan, M.**
Chim. e Industr, 37, 625, 1955

[38] **Fusc, R., Trave, R. et Vercellone, A.**
Chim. e Industr, 37, 251, 1955

[39] **Brown, R.T. et C.L. Chapple, C.L.**
Tetrahedron Letters, 17, 787-790, 1976

[40] **Damtoft, S., Franzyk, H. et Jensen, S.R.**
Phytochemistry, 45, 743-750, 1997

[41] **Damtoft, S., Franzyk, H. et Jensen, S.R.**
Phytochemistry, 45, 743–750, 1997

[42] **Konstantia, G., Nektarios, A., Ioanna, B.C. et Catherine, H.**
Z. Naturforsch, 57c, 95-99, 2002

[43] **Shen, Y.C., Lin, T.T., Lu, T.Y., Hung, S.E. et Sheu, J.H.**
Chem. Soc., 46, 197–200, 1999

[44] **Boros, C.A. et Stramitz, F.R.**
J. Nat. Prod., 54, 1173, 1991

[45] **Ghisalberti, E.L.**
Phytomedicine, 5, 147–163, 1998

[46] **Fernandez, L., Diaz, A.M., Ollivier, E., Faure, R.B. et Balansard, G.**
Phytochemistry, 40, 1569 –1571, 1995

[47] **Bermejo, P., Abad, M.J., Diaz, A.M., Fernandez, L., De Santos, J., Sanchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L. et Irurzun, A.**
Planta Medica, 68, 106 –110, 2002

[48] **Litchi, H. et Von Wartburg, A.**
Tetrahedron letters, 5, 835-843, 1964

[49] **De Urbina, A.V.O., Martin, M.L., Fernandez, B., Sanroman, L. et Cubillo, L.**
Planta Medica, 60, 512-515, 1994

[50] **Dewick, P.M.**
Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, 2 eme ed, 2002

[51] **Jensen, S.R., Franzyk, H. et Wallander, W.**
Phytochemistry, 60, 213-231, 2002

[52] **Frederiksen, L. B., Damtoft S. et Jensen, S. R.**
Phytochemistry, 52, 1409, 1999

[53] **Yamamoto, H., Katano, N., Ooi, A. et Inoue, K.**
Phytochemistry, 50, 417, 1999

[54] **Dewick, P.M**
Nat. Prod. Rep., 19, 181-222, 2002

[55] **Kuwajima, H., Tanahashi, T., Inoue K. et Inouye, H.**
Chem. Pharm. Bull., 47, 1634, 1999

[56] **Massiot. G., Lavaud, C. et Besson, V.**
Bull.Soc. Chem. Fr, 127, 440-445, 1995

[57] **Hosny, M. et Rosazza, J.P.N.**
J. Nat. Prod., 61, 734-742, 1998

[58] **Arrif, S., Benkhaled, M., Long, C., Lavaud, C., et David, B.**
Biochemical Systematics and Ecology, 34, 259-262, 2006

[59] **Zhang, W., Yang, Y., Liu, Y. et Yang, G.**
Yunnan Zhiwu Yanjiu, 18, 229, 1996

[60] **Pachaly,P., Barion, J, et Sin, K.S.**
Pharmazie, 49, 150, 1994

[61] **Galindes, J.D.S., Fernandez, M.L. et Diaz, L.A.**
PubMed., 56, 513-520, 2001

[62] **Potterat, O., Saadou, M. et Hostettmann, K.**
Planta Medica, 55, 1989

[63] **Robah, B., Skaltsounis, A.L., Tillequin, F., Michel, K. et Jacques, P.**
Planta Medica, 57, 1991

[64] **Zeliha, S., AKDEM, I., Irem, T., Erdal, B. et Ikhlas, A. K.**
Turk J Chem., 28, 227-234, 2004

[65] **Eroz, T., Yalcin, F.N., Tasdemir, D., Sticher, O. et Calis, I.**
Turk. J. Med. Sci., 28, 397-400, 1998

Chapitre 4

Partie expérimentale

4.1 Matériel et méthodes

La plante *Scrophularia saharae* a été récoltée au mois de juin 2002 dans la région de Biskra-Algérie, et identifiée par le Dr Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie de l'Université de Batna où un échantillon de référence est déposé.

4.1.1 Méthodes chromatographiques analytiques

4.1.1.1 *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de Silice Kieselgel 60 F_{254} à support aluminium (Merck) et silice RP-18. Après développement dans des cuves en verre (Camag), les plaques ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm, et révélées par la vanilline sulfurique et chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs sur un fond jaunâtre.

4.1.2 Méthodes préparatives

4.1.2.1 *Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)*

a. ***Chromatographie d'adsorption***

Des colonnes ouvertes sur gel de silice 60 (320-400-mesh) et polyamide SC6 ont été utilisées dans la première ou seconde étape de fractionnement des extraits. La taille des colonnes, le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par C.C.M.

b. ***Chromatographie d'exclusion***

Les chromatographies d'exclusion ont été réalisées sur Sephadex LH-20 comme étapes de filtration, avec le méthanol comme phase mobile à un débit de 10 à 15 ml.

4.1.2.2 *Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC)*

Les opérations de chromatographie HPLC semi-préparative/analytique ont été effectuées sur un appareillage constitué des éléments suivants :

- Pompe Waters 600E.
- Détecteur à barrette diode Waters 996.
- Injecteur automatique Waters 717.
- Traitement des données : logiciel Millénium Waters.

4.1.2.3 *Chromatographie préparative sur couche épaisse (C.C.E)*

Les Chromatographie préparative sur couche épaisse ont été effectuées sur des plaques de Silice Kieselgel 60 F_{254} (Merck) et silice RP-18. Après, les plaques ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm.

4.1.3 Méthodes physico-chimiques

4.1.3.1 *Spectres ultraviolets (UV)*

Les spectres UV des composés naturels sont enregistrés dans une solution de méthanol sur un appareil de type Beckman Du-600, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

4.1.3.2 Spectres de masse (SM)

Les spectres de masse des produits isolés ont été enregistrés en electroflash ESI (Electro Spray Iionisation), en modes négatif et positif sur un spectromètre de masse de type Brucker LC-MS/MS type esquire-LC , du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

4.1.3.3 *Spectres infra-rouge (IR)*

Les spectres IR sont enregistrés dans des pastilles de KBr sur un appareil de type Shimadzu IR-470 (composés **A** et **C**) et JASCO FT/IR-4100 (autres composés) du département de Chimie de l'Université de Batna.

4.1.3.4 *Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)*

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN ^{1}H et RMN ^{13}C (RMN 1D et 2D) sont enregistrés dans $CDCl_3$ et CD_3OD sur un appareil Brucker à 500 MHz et 125 MHz respectivement, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France). Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

3.2 EXTRACTION

Le protocole d'extraction des racines et parties aériennes a été antérieurement décrit dans la partie résultats et discussions (pages 46 et 49).

4.3 CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS

4.3.1 RACINES

L'examen en chromatographie sur couche mince (C.C.M) des trois extraits cyclohexanique, chloroformique et méthanolique des racines dans les systèmes d'élution suivants : chloroforme/méthanol 97/3, 95/5, 90/10, 80/20 et 60/40, montrent pour l'extrait chloroformique et cela après examen à la lumière UV (254 et 366 nm) et révélation à la vanilline sulfurique, quatre taches majoritaires dont deux de couleur rose (Figure 4.1).

4.3.2 PARTIES AERIENNES

Les C.C.M effectuées sur les extraits des parties aériennes dans les systèmes de solvants suivants : chloroforme/méthanol 97/3, 95/5, 90/10, 80/20 et 60/40 montrent pour l'extrait méthanolique, après la révélation par la vanilline sulfurique et chauffage à 120 °C, les mêmes taches observées pour l'extrait chloroformique en plus d'un mélange de plusieurs taches à Rf voisins et incluses dans une longue traînée (Figure 4.1).

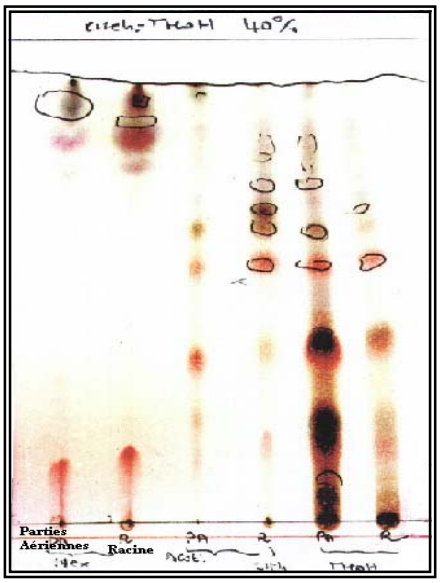


Figure 4.1 : ***L'analyse des extraits bruts de la plante par chromatographie sur couche mince (CCM)***

4.4 SEPARATION ET PURIFICATION

4.4.1 RACINES

4.4.1.1 *Extrait chloroformique*

4 grammes de l'extrait chloroformique sont mis à chromatographie sur une colonne de gel de silice. L'élution se fait initialement au moyen d'un mélange de solvants : éther de pétrole/acétate d'éthyle 95/5. La polarité de l'éluant est ensuite augmentée par l'addition graduelle de l'acétate d'éthyle : 90/10, 85/15, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60 et 20/80. Les fractions de 50 ml recueillies à chaque fois, sont soumises à une chromatographie sur couche mince (C.C.M), visualisées à la lumière UV aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm et révélées à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C.

Les résultats obtenus se présentent comme suit (Tableau 4.1) :

Fractions récupérées	**Elution (colonne)**	**Examen C.C.M**
	Ether de pétrole/AcOEt	
1-6	95/5	néant
17-25	90/10	″
26-27	″	petite tache
28-30	″	deux taches
31-38	″	néant
39-61	″	″
62-80	85/15	petite tache
81-91	″	deux taches
92-45	″	″
116-133	″	″
134-145	″	″
156-167	80/20	″
168-186	″	tache + traînée
187-205	″	tache
106-228	″	petite tache
230-248	60/40	néant
249-263	″	″
264-300	50/50	″
301-316	40/60	″
317-320	20/ 80	deux taches
321-322	″	″
323-326	″	″
327-328	″	″
329-333	″	deux taches + traînée
334-337	″	″
338-343	″	″
344-355	″	″
356-375	″	deux taches + traînée
376-384	″	néant

Tableau 4.1 : Fractionnement de l'extrait chloroformique des racines

Le suivi de ce fractionnement par chromatographie sur couche mince, a permis de rassembler les fractions présentant des similitudes en plusieurs lots conformément au tableau 4.2 suivant :

lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1-6	05	néant
2	17-25	07	″
3	26-27	30	petite tache + traînée
4	28-30	20	deux taches + traînée
5	31-38	39	″
6	39-61	10	néant
7	62-80	20	tache + traînée
8	81-91	33	trois taches + traînée
9	92-45	42	deux taches + petite traînée
10	116-133	30	″
11	134-145	25	″
12	156-167	34	mélange de plusieurs taches
13	168-186	25	″
14	187-205	15	tache + grande traînée
15	106-228	18	″
16	230-248	40	plusieurs taches + traînée
17	249-263	35	″
18	264-300	20	″
19	301-316	130	deux taches + traînée
20	317-320	90	″
21	321-322	216	″
22	323-326	723	deux taches + petite traînée
23	327-328	270	trois taches + petite traînée
24	329-333	450	trois taches + traînée
25	334-337	189	trois taches
26	338-343	104	trois taches + traînée
27	344-355	100	quatre taches + traînée
28	356-365	86	″
29	366-384	284	″
30	385-407	10	néant

Tableau 4.2 : Rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique des racines

Les lots 22, 25 et 29 (Figure 4.2) jugés intéressants sont de nouveau mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase et pression normales.

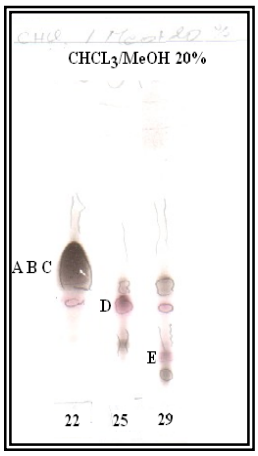


Figure 4.2 : ***CCM sur gel de silice des Lots 22,25 et 29 de l'extrait chloroformique des racines***

a. ***Etude du lot 22***

Poids de l'échantillon : 723 mg

Gel de silice : 30 g

Le fractionnement de ce lot a été effectué comme suit :

Fractions récupérées	Eluant (colonne)	Examen C.C.M
	Hexane/AcOEt	
1-10	80/20	néant
11-30	60/40	″
31-40	″	″
41-66	50/50	″
67-80	30/70	″
81-118	20/80	″
	AcOEt	
120-128	″	petite tache
129-133	″	tache
134-140	″	″
141-145	″	″
146-166	AcOEt	tache
167-176	″	″
177-194	″	″
195-220	″	″
221-229	″	″
230-240	″	″
241-258	″	″
259-276	″	″
277-300	″	deux taches
301-308	″	″

Tableau 4.3 : Fractionnement du lot 22 de l'extrait chloroformique des racines

Les fractions présentant des similitudes ont été rassemblées, donnant ainsi plusieurs sous-lots (Tableau 4.4).

Sous-lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1-119	15	néant
2	120-128	24	tache
3	129-133	27	″
4	134-140	51	″
5	141-145	36	″
6	146-166	85	″
7	167-176	53	″
8	177-194	41	″
9	195-220	71	″
10	221-229	91	″
11	230-240	18	″
12	241-258	29	″
13	259-276	39	″
14	277-300	22	deux taches
15	301-308	30	″

Tableau 4.4 : Rassemblement des fractions du lot 22 de l'extrait chloroformique des racines

Comme il a été discuté précédemment dans la partie résultats et discussions (pages 37), le fractionnement du sous-lot 10 (91 mg) a permis d'isoler trois composés **A**, **B** et **C**. Le composé **C** (Figure 4.3) a été obtenu par C.C.E sur silice RP-18 (éluant : MeOH/H_2O 70/30).

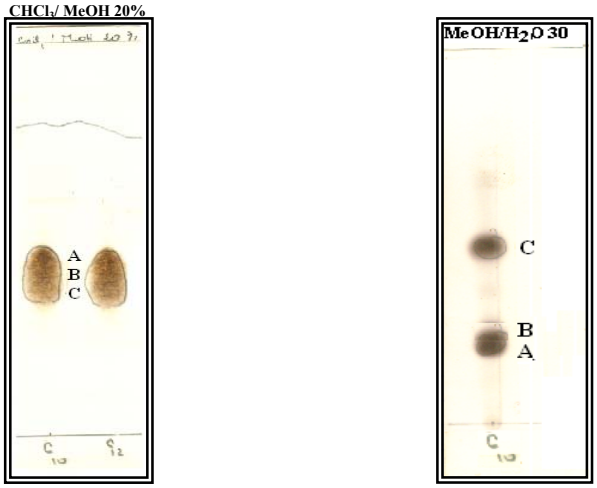


Figure 4.3 : ***CCM sur silice normale des* sous-*lots 10 et 12*** ***CCM sur silice RP-18 du sous-lot 10***

Les deux composés **A** et **B** possédant pratiquement le même Rf ont été isolés par chromatogaphie liquide haute performance en phase inverse (RP-18 HPLC). Celle ci a été menée selon le mode opératoire suivant :

Phase mobile : H_2O (+ 0.1% acide acétique)/acétonitrile (+ 0.1% acide acétique) de 60/40 à 40/60 en 37,5 min
Colonne : Lichrospher 100 RP-18, 250 x 25,5 µm
Débit : 30 ml/min
Détection : 283 nm
Quantité injectée : 2 x 45 mg

Le tableau suivant (tableau 4.5) reproduit les résultats obtenus.

Sous-lot 10	Poids	Observation	Rf
119 mg	composé **A** (14 mg) composé **B** (10 mg) composé **C** (20 mg)	Trois taches visibles en UV, marron foncée après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C	0,69 0,69 0,69

Tableau 4.5 : Résultats obtenus à l'issue de la purification du sous-lot 10

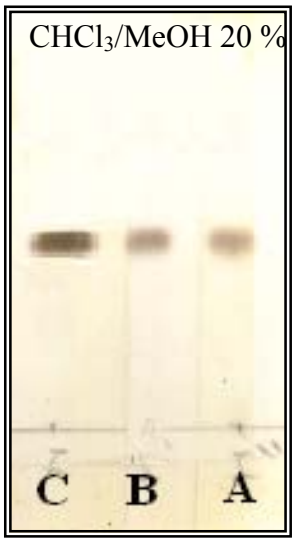


Figure 4.3 : ***CCM sur gel de silice normale des composés*** **A ,B** ***et*** **C**

b. ***Etude du lot 25***

Poids de l'échantillon : 189 mg

Gel de silice : 7,5 g

Le fractionnement de ce lot a été mené comme suit (Tableau 4.6) :

Fractions récupérées	**Eluant (colonne)**	**Examen C.C.M**
	Ether de pétrole/AcOEt	
1-11	80/20	néant
12-22	50/50	″
23-34	20/80	″
35-40	10/90	″
41-69	AcOEt	″
	AcOEt / MeOH	
70-80	99,5/0,5	néant
81-89	99 / 1	″
90-101	98 / 2	petite tache
102-110	″	tache
111-114	″	″
115-118	″	″
119-122	″	″
123-126	″	″
127-130	″	néant

Tableau 4.6 : Fractionnement du lot 25 de l'extrait chloroformique des racines

L'examen systématique par C.C.M des fractions présentant des ressemblances ont permis de les regrouper en 7 sous-lots conformément au tableau 4.7 suivant :

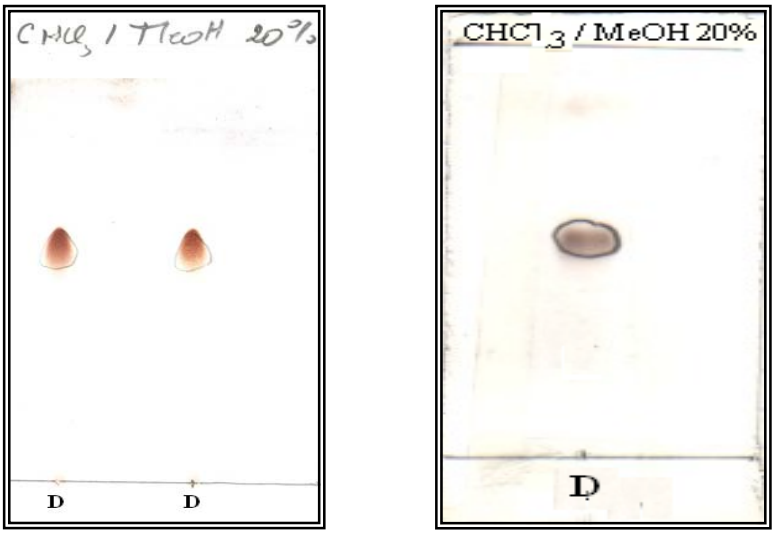
Sous-lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1-101	10	néant
2	102-110	68	traînée
3	111-114	30	petite tache
4	115-118	23	deux taches
5	119-122	34	″
6	123-126	38	″
7	127-130	10	néant

Tableau 4.7 : Rassemblement des fractions du lot 25 de l'extrait chloroformique des racines

Le sous-lot 6 soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice normale (C.C.E) au moyen d'un mélange chloroforme/méthanol 70/30, puis une filtration sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a permis d'isoler le composée **D** pur.

Sous-lot 6	Poids (composé **D**)	Observation	Rf
38 mg	13 mg	Tache visible en UV, rose après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C	0,56

Tableau 4.8 : Résultats de la purification du sous-lot 6



(a) **(b)**

Figure 4.4 : ***CCM sur gel de silice du composé D ((a) avant, (b) après chauffage)***

c. ***Etude du lot 29***

Poids de l'échantillon : 218 mg

Gel de silice : 7 g

Le fractionnement de ce lot a été mené comme suit (Tableau 4.9) :

Fractions récupérées	Eluant (colonne)	Examen C.C.M
	Hexane / AcOEt	
1-11	50/50	néant
12-20	20 / 80	tache + traînée
21-30	″	petite tache
31-47	AcOEt	néant
48-56	″	″
	AcOEt / MeOH	
57-65	99.5 / 0.5	tache +petite traînée
66-76	99 / 1	″
77-87	98 / 2	tache
88-94	″	″
95-102	″	″
103-109	″	néant

Tableau 4.9 : Fractionnement du lot 29 de l'extrait chloroformique des racines

L'examen systématique par C.C.M des fractions présentant des ressemblances a permis de les regrouper en 6 sous-lots conformément au tableau 4.10 suivant :

Sous-lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1-11	10	néant
2	11-30	30	tache + traînée
3	31-56	15	traînée
4	57-76	18	deux taches + traînée
5	77-102	25	tache
6	103-109	08	néant

Tableau 4.10 : Rassemblement des fractions du lot 29 de l'extrait chloroformique des racines

Une filtration du sous-lot 5 obtenu à l'état de quasi-pureté, sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a permis d'obtenir le composé **E** à l'état pur.

Sous-lot 5	Poids (composé **E)**	Observation	Rf
25 mg	9 mg	Tache invisible en UV, rose après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120 °C.	0,48

Tableau 4.11 : Résultats de la purification du sous-lot 5

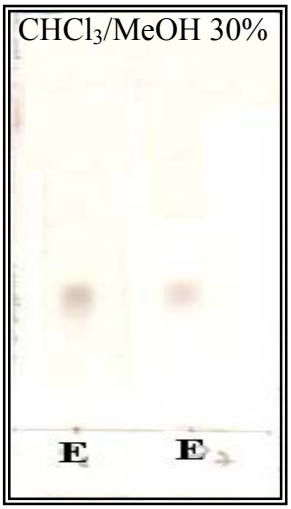


Figure 4.5 : **CCM sur gel de silice du composé *E***

4.4.1 PARTIES AERIENNES

4.4.2.1 *Extrait méthanolique*

15 grammes de l'extrait méthanolique des parties aériennes sont mis à chromatographier sur colonne de polyamide SC6, sous pression normale. L'élution est réalisée au moyen de l'eau, puis un gradient eau-méthanol 80/20, 50/50, 20/80. 42 fractions de 50 ml ont été collectées.

Les fractions obtenues sont reportées dans le tableau 4.12.

Fractions récupérées	**Eluant (colonne)**	**Examen C.C.M**
1-4	H_2O	mélange de plusieurs taches
5-6	″	″
7-8	″	quatre taches + traînée
9-15	″	tache + traînée
	H_2O /MeOH	
16-20	20/80	deux taches + traînée
21-27	″	″
28-32	50/50	traînée
33-42	20/80	″

Tableau 4.12 : Fractionnement sur Polyamide SC6 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

L'analyse C.C.M de ces fractions a permis de les rassembler en cinq lots (Tableau 4.13).

lots	Fractions	Poids (g)	Observation
1	1-2	08	mélange de plusieurs taches
2	3-4	03	″
3	5-6	1.5	trois taches + traînée
4	7-8	0.45	quatre taches + traînée
5	9-42	02	traînée

Tableau 4.13 : Rassemblement des fractions de l'extrait méthanolique des parties aériennes

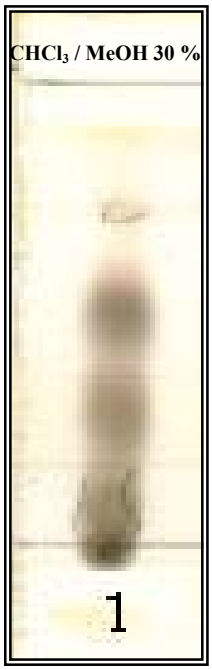


Figure 4.6 : ***CCM sur gel de silice du lot*** **1**

a. ***Etude du lot 1***

Poids de l'échantillon : 1 g

Gel de silice : 40 g

Le fractionnement de ce lot a été réalisé selon le tableau 4.14 qui suit :

Fractions récupérées	**Eluant (colonne)**	**Examen C.C.M**
1-7	$CHCl_3$	néant
8-14	$CHCl_3$/ MeOH/ H_2O 95/5/0,5	″
16-18	″	″
19-25	90/10/ 1	″
26-32	″	″
33-35	″	petite tache
36-44	″	tache
45-51	″	deux taches
52-58	″	″
59-63	″	″
64-67	″	tache
68-74	″	″
75-82	″	″
83-89	″	″
90-94	″	″
95-99	″	deux taches
100-106	″	″
107-125	″	deux taches + traînée
126-138	80/20/2	deux taches
139-144	80/20/2	tache + traînée
145-151	″	traînée
152-158	70/30/3	néant

Tableau 4.14 : Fractionnement du lot 1 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

Les fractions similaires sont regroupées en 14 lots (tableau 4.15).

lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1-18	05	néant
2	19-25	15	″
3	26-32	10	″
4	33-37	20	traînée
5	38-42	27	deux taches + traînée
6	43-44	35	petite tache
7	45-58	126	trois taches
8	59-63	110	″
9	64-67	38	″
10	68-94	163	″
11	95-106	190	″
12	107-125	226	deux taches + traînée
13	126-143	50	traînée
14	144-151	25	″

Tableau 4.15 : Rassemblement des fractions du lot 1 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

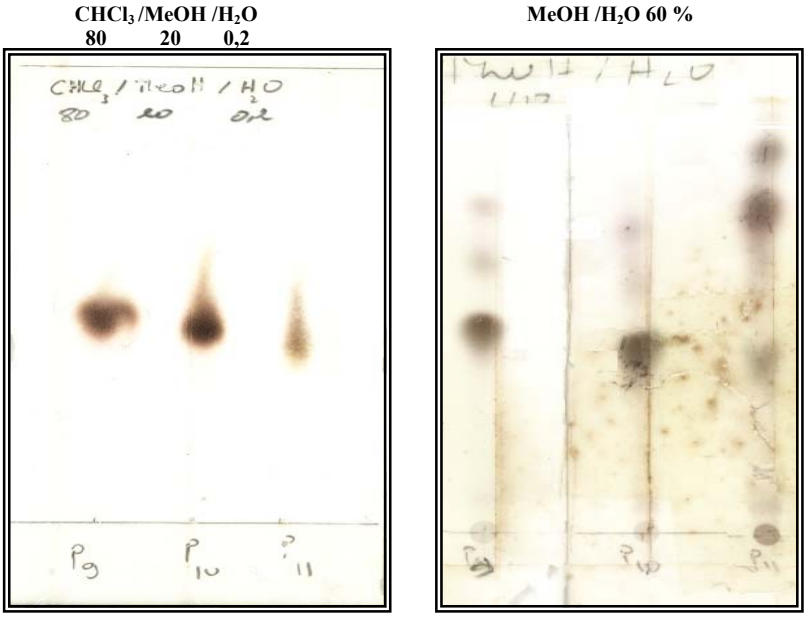


Figure 4.7 : ***CCM sur silice normale des lots 9,10 et 11*** ***CCM sur silice RP-18 des lots 9,10 et 11***

a.1 ***Etude des lots 9 et 10***

Poids de l'échantillon : 200 mg

Gel de silice : 8 g

Les lots 9 et 10 présentant en CCM la même constitution ont été rassemblés. Leur fractionnement a été effectué selon le tableau 4.16 suivant :

Fractions récupérées	**Eluant (colonne)**	**Examen C.C.M**
	$CHCL_3$/MeOH/H_2O	
01 - 22	90/10/01	néant
22 - 30	″	tache
31 – 36	″	″
37 – 62	″	″
63 – 69	″	néant
70 – 80	″	″

Tableau 4.16 : Fractionnement des lots 9 et 10 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

L'examen par C.C.M des fractions récupérées a permis de les réunir en 6 sous-lots (Tableau 4.17).

Sous-lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1 - 22	05	néant
2	22 - 30	35	trois taches + petite traînée
3	31 – 36	27	″
4	37 – 62	18	″
5	63 – 69	30	tache + traînée
6	70 – 80	10	néant

Tableau 4.17 : Rassemblement des fractions des lots 9 et 10 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

Les sous-lots 3 et 4 soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 (élution : méthanol/eau 60/40) ont permis d'isoler les deux composés **E** et **F**.

Sous-lots 3 et 4	Poids	Observation	Rf
45 mg	composé **E** (18 mg)	Tache invisible en UV, rose après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C.	0,57
	composé **F** (12 mg)	Tache invisible en UV, gris après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120°C.	0,57

Tableau 4.18 : Résultats de la purification des sous-lots 3 et 4

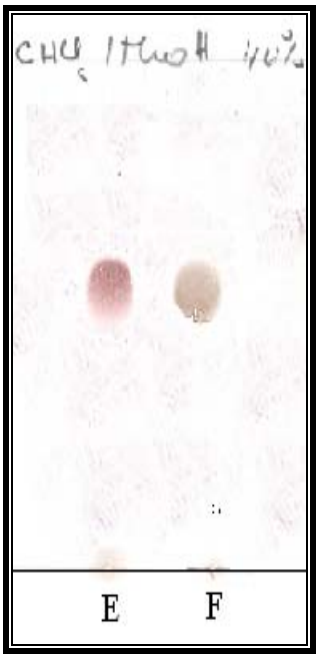


Figure 4.8 : ***CCM sur silice RP- 18 des composés* E *et* F** ***CCM sur silice normale des composés* E *et* F**

a.2 ***Etude du lot N° 11***

Poids de l'échantillon : 190 mg

Gel de silice : 8 g

Le tableau 4.19 reprend le fractionnement de ce lot.

Fractions récupérées	Eluant (colonne)	Examen C.C.M
	$CHCl_3$/MeOH/H_2O	
1 – 10	90/10/01	néant
11 – 20	″	″
21 – 28	″	tache
29 – 46	″	″
47 – 58	″	néant
59 – 76	″	″
77 – 101	″	″
	80/20/02	
102 – 106	″	néant
107 – 110	″	tache
111 – 116	″	deux taches + traînée
117 – 124	″	deux taches
125 - 128	″	néant

Tableau 4.19 : Fractionnement du lot 11 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

Les fractions similaires sont regroupées en 11 sous-lots (Tableau 4.20)

sous-lots	Fractions	Poids (mg)	Observations
1	1 – 21	09	néant
2	21 – 28	32	deux taches + traînée
3	29 – 46	42	″
4	47 – 58	10	néant
5	59 – 76	15	″
6	77 – 101	12	″
7	102 – 106	35	deux taches
8	107 – 110	15	deux taches + traînée
9	111 – 116	31	″
10	117 – 124	22	″
11	125 - 128	19	tache + traînée

Tableau 4.20 : Rassemblement des fractions du lot 11 de l'extrait méthanolique des parties aériennes

Les sous-lots 7 et 8 soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice RP-18 (élution : méthanol/eau 60/40), ont abouti à l'isolement du composé **G**.

Sous- lots 7 et 8	Poids (composé **G**)	Observation	Rf
50 mg	10 mg	Tache invisible en UV, gris après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120 °C	0,58

Tableau 4.21 : Résultats de la purification des sous-lots 7 et 8

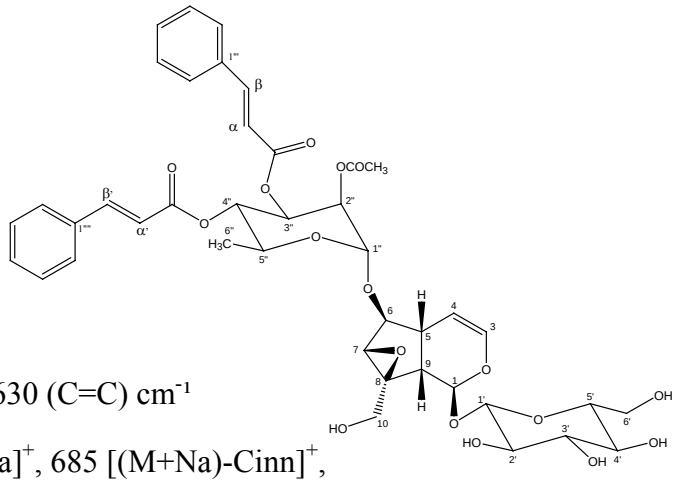
H_2O / MeOH 40 %

Figure 4.9 : ***CCM sur silice RP-18 du composé*** **G**

4.5 *Constantes physiques et données spectrales des composés isolés*

4.5.1 *Composé* A

6-*O*-[(2"-*O*-acétyl-3", 4"-di-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol



Formule brute : $C_{41}H_{46}O_{17}$

Poids moléculaire : 810 $g.mol^{-1}$

Quantité de produit : 14 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre UV λ_{max} (MeOH) : 201, 217 et 277 nm

Spectre IR (KBr) : 3400 (OH), 1700 (C=O) et 1630 (C=C) cm^{-1}

Spectre de masse (m/z) : 809 $[M-H]^-$, 833 $[M+Na]^+$, 685 $[(M+Na)-Cinn]^+$, 495 $[(M+Na)-Cinn -AcOH]^+$

Spectre RMN ^1H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

5,03 (*d*, *J* = 9,7 Hz, 1H) = H-1

6,39 (*dd*, *J* = 1,6 et 6 Hz, 1H) = H-3

5,13 (*dd*, *J* = 4,7 et 6 Hz, 1H) = H-4

2,55 (*m*, 1H) = H-5

4,06 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H) = H-6

3,57 (*sl*, 1H) = H-7

2,65 (*dd*, *J* = 7,6 et 9,7 Hz, 1H) = H-9

4.11 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10a

3,89 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10b

4,81 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

3,33 (*dd*, *J* = 7,9 et 9 Hz, 1H) = H-2'

3,46 (*t*, *J* = 9 Hz, 1H) = H-3'

3,31 (*t*, *J* = 9,5 Hz, 1H) = H-4'

3,35 (*m*, 1H) = H-5'

3,71 (*dd*, *J* = 5,4 et 12,1 Hz, 1H) = H-6'a

3,92 (*dd*, *J* = 1,3 et 12,1 Hz, 1H) = H-6'b

5,08 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 1H) = H-1"

5,42 (*dd*, *J* = 1,7 et 3,5 Hz, 1H) = H-2"

5,54 (*dd*, *J* = 3,5 et 10,3 Hz, 1H) = H-3"

5,33 (*t*, *J* = 10,3 Hz, 1H) = H-4"

4,13 (*m*, 1H) = H-5"

1,30 (*d*, *J* = 6,2 Hz, 3H) = H-6"

7,50 (*m*, 2H) = H-2'", H-6'"

7,37 (*m*, 3H) = H-3'", H-4'", H-5'"

6,36 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α

7,62 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β

7,53 (*m*, 2H) = H-2"", H-6""

7,37 (*m*, 3H) = H-3"", H-4"", H-5""

6,44 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α'

7,71 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β'

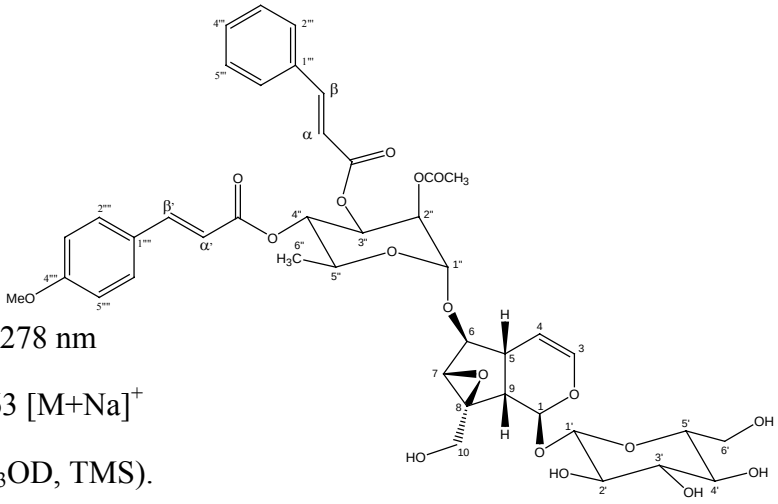
2,22 (*s*, 3H) = $COCH_3$

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

93,7 (CH-1), 141,1 (CH-3), 101,8 (CH-4), 35,7 (CH-5), 83,5 (CH-6), 58 (CH-7), 65,1 (C-8), 41,8 (CH-9), 60 (CH_2-10). 98,2 (CH-1'), 73,4 (CH-2'), 76,2 (CH-3') 70,6 (CH-4'), 77,2 (CH-5'), 61,5 (CH_2-6'), 96,3 (CH-1"), 70,3 (CH-2"), 70 (CH-3"), 71 (CH-4"), 66,8 (CH-5"), 16,4 (CH_3-6"), 134 (C-1'" et C""-1), 127,9 (CH-2'" , CH-6'"et CH-2"" , CH-6""), 128,6 (CH-3'", CH-5'" et CH-3"", CH-5""), 130,3 (CH-4'" et CH-4""), 116,4 (CH-α), 146 (CH-β), 165,8 (CO-Cinn'"), 116,1 (CH-α'), 146,2 (CH-β'), 166,2 (CO- Cinn""), 19,3 ($CO\underline{C}H_3$), 170,2 ($\underline{C}OCH_3$).

4.5.2 *Composé* B

6-*O*-[(2''-*O*-acétyl-3''-*O*-*p*-méthoxy- trans-cinnamoyl-4''-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol



Formule brute : $C_{42}H_{48}O_{18}$

Poids moléculaire : 840 $g.mol^{-1}$

Quantité de produit : 10 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre UV λ_{max} (MeOH) : 203, 216 et 278 nm

Spectre de masse (m/z) : 875 $[M+Cl]^-$, 863 $[M+Na]^+$

Spectre RMN ^1H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS).

5,02 (*d*, *J* = 9,7 Hz, 1H) = H-1

6,39 (*dd*, *J* = 1,6 et 6,1 Hz, 1H) = H-3

5,13 (*dd*, *J* = 4,8 et 6,1 Hz, 1H) = H-4

2,55 (*m*, 1H) = H-5

4,06 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-6

3,67 (*sl*, 1H) = H-7

2,64 (*dd*, *J* = 7,6 et 9,7 Hz, 1H) = H9

4,11 (*d*, *J* = 13,1 Hz, 1H) = H-10a

3,89 (*d*, *J* = 13,1 Hz, 1H)= H-10b

4,80 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

3,31 (*dd*, *J* = 8,7 et 9,7 Hz, 1H) = H-2'

3,45 (*t*, *J* = 8,7 Hz, 1H) = H-3'

3,37 (*t*, *J* = 8,7 Hz, 1H) = H-4'

3,34 (*m*, 1H) = H-5'

3,71 (*dd*, *J* = 5,3 et 12 Hz, 1H) = H-6'a

3,92 (*dd*, *J* = 2 et 12 Hz, 1H) = H-6'b

5,07 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 1H) = H-1"

5,42 (*dd*, *J* = 1,7 et 3,5 Hz, 1H) = H-2"

5,54 (*dd*, *J* = 3,5 et 10 Hz, 1H) = H-3"

5,33 (*t*, *J* = 10 Hz, 1H) = H-4"

4,13 (*m*, 1H) = H-5"

1,31 (*d*, *J* = 6,2 Hz, 3H) = H-6"

7,51 (*m*, 2H) = H-2'", H-6'"

7,36 (*m*, 2H) = H-3'", H-5'"

7,37 (*m*, 1H) = H-4'"

6,36 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α

7,62 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β

7,48 (*d*, J = 8,9 Hz, 2H) = H-2"", H-6""

6,90 (*d*, J = 8,9 Hz, 2H) = H-3"", H-5""

6,29 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α'

7,71 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β'

3,83 (*s*, 3H) = OCH_3

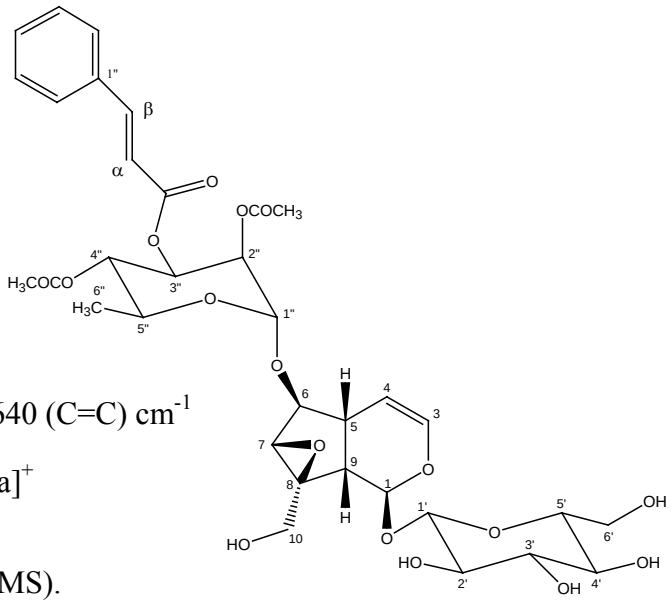
2,10 (*s*, 3H) = $COCH_3$

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

93,7 (CH-1), 141,1 (CH-3), 101,7 (CH-4), 35,7 (CH-5), 83,3 (CH-6), 58 (CH-7), 65,1 (C-8), 41,8 (CH-9), 59,9 (CH_2-10), 98,2 (CH-1'), 73,4 (CH-2'), 76,2 (CH-3') 70,3 (CH-4'), 77,2 (CH-5'), 61,5 (CH_2-6'), 96,3 (CH-1"), 70 (CH-2"), 69,4 (CH-3"), 70,8 (CH-4"), 66,8 (CH-5"), 16,3 (CH_3-6"), 134 (C-1'" et C-1""), 127,9 (CH-2'" et CH-6'"), 128,5 (CH-3'", CH-5'"), 130,3 (CH-4'"), 116,4 (CH-α), 146 (CH-β), 165,9 (CO- Cinn'"), 129,8 (CH-2"" et CH-6""), 113,9 (CH-3"" et CH-5""), 161,8 (C-4""), 113,6 (CH-α'), 145,9 (CH-β'), 166,2 (CO- Cinn""), 54,4 (O<u>C</u>H3), 19,2 (CO<u>C</u>H_3), 170,2 (<u>C</u>OCH_3).

4.5.2 *Composé* C

6-*O*-[(2″,4″-di-*O*-acétyl-3″-*O*-trans-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol



Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{17}$

Poids moléculaire : 722 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 20 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre UV λ_{max} (MeOH) : 206, 216 et 278 nm

Spectre IR (KBr) : 3400 (OH), 1720 (C=O) et 1640 (C=C) cm^{-1}

Spectre de masse (m/z) : 721 $[M-H]^-$, 745 $[M+Na]^+$

Spectre RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS).

5,02 (*d*, *J* = 9,7 Hz, 1H) = H-1

6,39 (*dd*, *J* = 1,2 et 6,2 Hz, 1H) = H-3

5,09 (*dd*, *J* = 4,7 et 6,2 Hz, 1H) = H-4

2,52 (*m*, 1H) = H-5

4,04 (*dd*, *J* = 8,3 et 0,7 Hz, 1H) = H-6

3,65 (*sl*, 1H) = H-7

2,63 (*dd*, *J* = 7,8 et 9,7 Hz, 1H) = H-9

4,10 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10a

3,88 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10b

4,80 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

3,31 (*dd*, *J* = 8,1 et 9,3 Hz, 3H) = H-2'

3,45 (*t*, *J* = 8,8 Hz, 1H) = H-3'

3,28 (*t*, *J* = 8,8 Hz, 1H) = H-4'

3,34 (*m*, 1H) = H-5'

3,70 (*dd*, *J* = 5,4 et 12,2 Hz, 1H) = H-6'a

3,91 (d*d*, *J* = 1,4 et 12,2 Hz, 1H) = H-6'b

5,05 (*d*, *J* = 1,6 Hz, 1H) = H-1"

5,38 (*dd*, *J* = 1,6 et 3,7 Hz, 1H) = H-2"

5,43 (*dd*, *J* = 3,7 et 10,2 Hz, 1H) = H-3"

5,18 (*t*, *J* = 10,2 Hz, 1H) = H-4"

4,04 (*m*, 1H) = H-5"

1,26 (*d*, *J* = 6,3 Hz, 3H) = H-6"

7,56 (*m*, 2H) = H-2'", H-6'"

7,41 (*m*, 3H) = H-3'", H-4'", H-5'"

6,39 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α

7,66 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β

2,19 (*s*, 3H) = $COCH_3$

2,06 (*s*, 3H) = $COCH_3$

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3$/CD_3OD, TMS)

93,7 (CH-1), 141,9 (CH-3), 101,7 (CH-4), 35,7 (CH-5), 83,3 (CH-6), 57,9 (CH-7), 65,1 (C-8), 41,8 (CH-9), 60 (CH_2-10). 98,2 (CH-1'), 73,3 (CH-2'), 76,2 (CH-3') 70,3 (CH-4'), 77,1 (CH-5'), 61,5 (CH_2-6'), 96,2 (CH-1"), 69,7 (CH-2"), 69,3 (CH-3"), 71,8 (CH-4"), 66,6 (CH-5"), 16,4 (CH_3-6"), 134 (C-1'"), 128 (CH-2'" et CH-6'"), 128,6 (CH-3'", CH-5'"), 130,4 (CH-4'"), 116,4 (CH-α), 146 (CH-β), 165,8 (CO-Cinn),19,4 (CO<u>C</u>H_3), 19,4 (CO<u>C</u>H_3),170,4 (<u>C</u>OCH_3), 170,4 (<u>C</u>OCH_3).

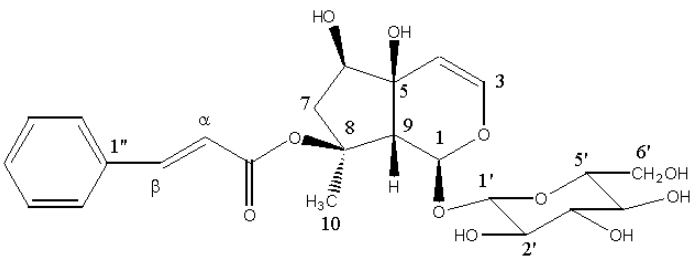
4.5.4 *Composé* D

8-*O*-trans-cinnamoylharpagide

Formule brute : $C_{24}H_{30}O_{11}$

Poids moléculaire : 494 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 13 mg



Etat physique : Poudre blanche

Spectre UV λ_{max} (MeOH) : 202 et 279 nm

Spectre IR (KBr) : 3399 (OH), 1697(C=O) et 1635 (C=C) cm^{-1}

Spectre de masse (m/z) : 517 $[M+Na]^+$, 533 $[M+K]^+$, 345 $[(M+Na)\text{-}CinnH]^+$

Spectre RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

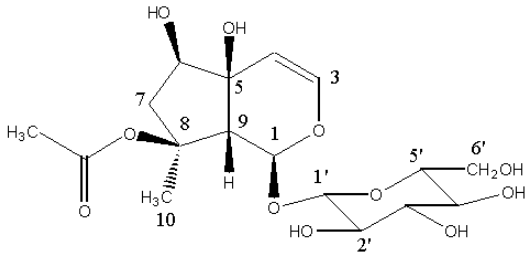
6,21 (*s*, 1H) = H-1
6,38 (*d*, 1H, *J* = 6,4 Hz) = H-3
4,87 (*dd*, 1H, *J* = 1,4 et 6,4 Hz) = H-4
3,80 (*d*, 1H, *J* = 4,2 Hz) = H-6
1,92 (*dd*, 1H, *J* = 15,5 et 4,2 Hz) = H-7a
2,28 (*d*, 1H, *J* = 15,5 Hz) = H-7b
2,96 (*s*, 1H) = H-9
1,49 (*s*, 3H) = H-10
4,63 (*d*, 1H, *J* = 7,9 Hz) = H-1'
3,28 (*dd*, 1H *J* = 7,9 et 8,8 Hz) = H-2'
3,46 (*nd*, 1H) = H-3'
3,35 (*nd*, 1H) = H-4'
3,39 (*m*, 1H) = H-5'
3,73 (*dd*, *J* = 5,3 et 12,3 Hz, 1H) = H-6'a
3,93 (*dd*, *J* = 12,3 et 1,7 Hz, 1H) = H-6'b
7,51 (*m*, 2H) = H-2", H-6"
7,36 (*m*, 2H) = H-3", H-5"
7,31 (*m*, 1H) = H-4"
6,41 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-α
7,61 (*d*, *J* = 16 Hz, 1H) = H-β

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

93,7 (CH-1), 143,1 (CH-3), 104,7 (CH-4), 72,4 (C-5), 76,2 (CH-6), 45 (CH_2-7), 87,7 (C-8), 53,8 (CH-9), 22,2 (CH_3-10), 98,5 (CH-1'), 72,8 (CH-2'), 76,1 (CH-3'), 70,1 (CH-4'), 76,4 (CH-5'), 61,7 (CH_2-6'), 134,1 (C-1"), 128 (CH-2"), 128,8 (CH-3"), 130,1 (CH-4"), 128,8 (CH-5"), 128 (CH-6"), 118,7 (CH-α), 145,1 (CH-β), 167,5 (CO-Cinn).

4.5.5 *Composé* E

8-*O*-acétylharpagide



Formule brute : $C_{17}H_{26}O_{11}$

Poids moléculaire : 406 $g.mol^{-1}$

Quantité de produit : 27 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre IR (KBr) : 3391 (OH), 1718 (C=O) et 1652 (C=C) cm^{-1}

Spectre de masse (m/z) : 429 $[M+Na]^+$, 369 $[(M+Na)-AcOH]^+$

Spectre RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

6,10 (*s*, 1H) = H-1

6,35 (*d*, *J* = 6,4 Hz, 1H) = H-3

4,85 (*dd*, *J* = 6,4 et 1,5 Hz, 1H) = H-4

3,71 (*d*, *J* = 4,2 Hz, 1H) = H-6

1,88 (*dd*, *J* = 15,3 et 4,2 Hz, 1H) = H-7a

2,17 (*d*, *J* = 15,3 Hz, 1H) = H-7b

2,84 (*sl*, 1H) = H-9

1,41 (*s*, 3H) = H-10

4,58 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

3,22 (*dd*, *J* = 7,9 et 9 Hz, 1H) = H-2'

3,40 (*t*, *J* = 9 Hz, 1H) = H-3'

3,33 (*nd*, 1H) = H-4'

3,31 (*m*, 1H) = H-5'

3,68 (*dd*, *J* = 5,6 et 12,2 Hz, 1H) = H-6'a

3,88 (*dd*, *J* = 12,2 et 1,6 Hz, 1H) = H-6'b

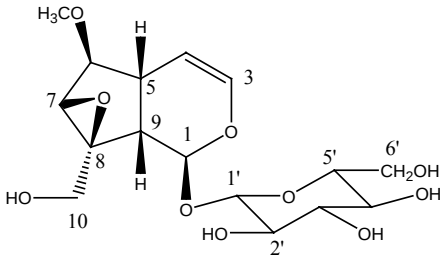
2,0 (*s*, 3H) = $COCH_3$

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

93,2 (CH-1), 142,2 (CH-3), 104,5 (CH-4), 72,2 (C-5), 76,2 (CH-6), 44,8 (CH_2-7), 87,6 (C-8), 53,7 (CH-9), 21,8 (CH_3-10), 98,4 (CH-1'), 72,7 (CH-2'), 76,1 (CH-3'), 70 (CH-4'), 76,2 (CH-5'), 61,5 (CH_2-6'), 21,8 ($CO\underline{C}H_3$), 172,2 ($\underline{C}OCH_3$).

4.5.6 *Composé* F

6-*O*-méthylcatalpol



Formule brute : $C_{16}H_{24}O_{10}$

Poids moléculaire : 376 $g.mol^{-1}$

Quantité de produit : 12 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre de masse (m/z) : 399 $[M+Na]^+$

Spectre RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

4,88 (*d*, *J* = 9,7 Hz, 1H) = H-1

6,27 (*dd*, *J* = 6 et 1,7 Hz, 1H) = H-3

4,99 (*dd*, *J* = 6 et 4,7 Hz, 1H) = H-4

2,35 (*m*, 1H) = H-5

3,58 (*sl*, 1H) = H-6

3,59 (*sl*, 1H) = H-7

2,53 (*dd*, *J* = 7,8 et 9,7 Hz, 1H) = H-9

3,86 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10a

3,97 (*d*, *J* = 13,2 Hz, 1H) = H-10b

3,45 (*s*, 3H) = H-11

4,74 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

3,27 (*dd*, *J* = 7,9 et 9,1 Hz, 1H) = H-2'

3,39 (*nd*, 1H) = H-3'

3,33 (*t*, *J* = 8,7 Hz, 1H) = H-4'

3,25 (*m*, 1H) = H-5'

3,68 (*dd*, *J* = 5,4 et 12,2 Hz, 1H) = H-6'a

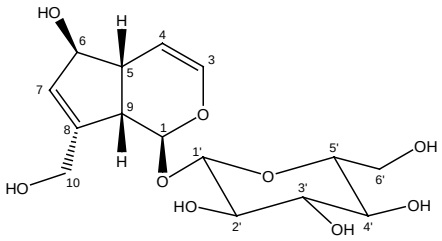
3,83 (*dd*, *J* = 12 ,2 et 2,5 Hz, 1H) = H-6'b

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3$, CD_3OD, TMS)

94,7 (CH-1), 142,2 (CH-3), 103,4 (CH-4), 36,3 (CH-5), 87,3 (CH-6), 58,1 (CH-7), 67,7 (C-8), 42,4 (CH-9), 61 (CH_2-10), 57,8 (CH_3-11), 99 (CH-1'), 73,5 (CH-2'), 76,5 (CH-3'), 70,2 (CH-4'), 77 (CH-5'), 61,7 (CH_2-6').

4.5.6 *Composé* G

3 Aucuboside



Formule brute : $C_{15}H_{22}O_9$

Poids moléculaire : 346 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 10 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre de masse (m/z) : 369 $[M+Na]^+$, 399 $[M+Cl]^-$

Spectre RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3$/CD_3OD, TMS)

4,80 (*d*, *J* = 7,3 Hz, 1H) = H-1

6,24 (*dd*, *J* = 6,1 et 1,9 Hz, 1H) = H-3

5,05 (*dd*, *J* = 6,1 et 3,9 Hz, 1H) = H-4

2,61 (*m*, 1H) = H-5

4,41 (*dd*, *J* = 3,4 et 1,7 Hz,1H) = H-6

5,73 (*sl*, 1H) = H-7

2,86 (*t*, *J* = 7,3 Hz, 1H) = H-9

4,10 (*d*, *J* = 15,1 Hz, 1H) = H-10a

4,27 (*d*, *J* = 15,1 Hz, 1H) = H-10b

4,62 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H) = H-1'

2,42 (*d*, *J* = 7,9 et 9 Hz, 1H) = H-2'

3,35 (*t*, *J* = 9 Hz, 1H) = H-3'

3,32 (*t*, *J* = 9 Hz, 1H) = H-4'

3,40 (*m*, 1H) = H-5'

3,67 (*dd*, *J* = 1,6 et 12,4 Hz, 1H) = H-6'a

3,60 (*dd*, *J* = 12,4 et 4,7 Hz, 1H) = H-6'b

Spectre RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS)

97,7 (CH-1), 140,7 (CH-3), 105,1 (CH-4), 45,4 (CH-5), 81,9 (CH-6), 130,2 (CH-7), 146,8 (C-8), 47,1 (CH-9), 60,6 (CH_2-10), 99,5 (CH-1'), 73,7 (CH-2'), 76,8 (CH-3'), 70,2 (CH-4'), 76,7 (CH-5'), 61,7 (CH_2-6').

Résumé

Scrophularia sahara

RESUME

Le présent travail est le bilan d'une étude phytochimique, que nous avons menée sur *Scrophularia saharae* Batt. (Scrophulariaceae), plante commune dans tout le Sahara septentrionnal.

Nos investigations ont porté sur les extraits chloroformique des racines et méthanolique des parties aériennes de cette plante. Plusieurs métabolites secondaires ont été caractérises et sont de composés iridoïdiques.

Ainsi cinq iridoïdes ont été isolés de l'extrait chloroformique et deux de l'extrait méthanolique par différentes méthodes chromatographiques, et leurs structures ont été élucidées sur la base des méthodes spectroscopiques notamment la spectrométrie de masse, la spectroscopie infra-rouge et la résonance magnétique nucléaire dans ses multiples techniques : RMN ^{1}H, RMN ^{13}C et RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY).

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- Une première partie appelée travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques du genre *Scrophularia* ainsi qu'aux études chimiques antérieures réalisées sur les genre et espèce.
- Une seconde partie consacrée à une étude impliquant la structure, classification, activité biologique et biosynthèse des iridoïdes.
- Une troisième partie décrivant nos travaux personnels allant de la séparation à la détermination de structures des produits isolés.
- Une quatrième partie constituant la partie expérimentale.

ملخص

هذا العمل عبارة عن حصيلة للدراسة الفيتوكيميائية ، التي أنجزة على *Scrophularia saharae* .نبتة معروفة في جميع أنحاء الصحراء.

أبحاثنا متعلقة بالمستخلص كالكلوروفورمي للجذور و الميثانولي للجزء الهوائي لهذه النبتة. كثير من الأيض الثانوي تم تمييزها و هي مركبات إيريدويدية.

بالإضافة إلى خمس إيريدويدات تم عزلها من المستخلص الكلوروفورمي و إثنان من المستخلص الميثانولي بواسطة مختلف طرق الفصل الكروماتوغرافي ، و بنيتها وضّحت على أساس الطرق المطيافية لا سيما مطيافية الكتلة، مطيافية تحت الحمراء و الرنين المغناطيسي النووي بمختلف تقنياته:

RMN ^{1}H, RMN ^{13}C و RMN 2D (ROESY و NOESY, COSY H-H, HSQC, HMBC)

نتائج هذا العمل ستوضح كما يلي :

الفصل الأول بعنوان الأعمال المقدمة مخصصة للوصف النباتي للنبتة، الخصائص البيولوجية لنوع *Scrophularia* و كذلك الدراسة الكميائية حول النوع و الصنف

الفصل الثاني مخصص لدراسة متضمنة البنية ، التصنيف، و النشاط البيولوجي و الخلق الحيوي للإيريدويدات .

الفصل الثالث يضم الأعمال الشخصية و المتعلقة بفصل و تحديد بنية المركبات المعزولة.

الفصل الرابع يخص الجزء العملي.