

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE HADJ LAKHDAR –BATNA-**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA MATIERE**

***MEMOIRE***

*Pour l'obtention du diplôme de*

***MAGISTER***

*Spécialité : Chimie*

*Élaboré par*

*Mme : SIFOUANE Sihem*

***Thème***

***ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE***  
***LA PLANTE ERYNGIUM CAMPESTRE***

***Membres de jury***

- |                                 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| - Ammar Dibi                    | Pr U.Batna Président    |
| - Md cherif ABERKANE            | M.C U.Batna Rapporteur  |
| - Malek Rassoul Yassin EL HILOU | Pr U.OEB Examineur      |
| - Hassina HARKAT                | Mc U.Batna Examinatrice |
| - Fatma BITAM                   | M.C.B U.Batna Invitée   |

***L'Année Universitaire : 2011 /2012***

*Faculté des Sciences*  
*Département de Sciences de la matière*

*MEMOIRE de MAGISTÈRE*  
*Spécialité : Chimie*

*Élaboré par*  
*Mme : SIFOUANE Sihem*

*Thème*

*ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE*  
*LA PLANTE ERYNGIUM CAMPESTRÈ*

*Ammar Dibí*

*Pr U.Batna Président*

*Md cherif ABERKANE*

*M.C U.Batna Rapporteur*

*Malék Rassoul Yassin EL HILOU*

*Pr U.OEB Examineur*

*Hassina HARKAT*

*Mc U.Batna Examinatrice*

*Fatma BITAM*

*M.C.B U.Batna Invitée*

*L'année universitaire : 2011/2012*



## REMERCIEMENT

*Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant pour la force, la volonté et la patience qu'il m'a donné pour réaliser ce travail. Je tiens à remercier ici tous ceux qui ont contribué plus ou moins directement à ce que je parvienne au bout de ce mémoire.*

*Ce travail a été réalisé à l'université EL-HADJ LAKHDAR -Btana- au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement dirigé par Monsieur Mohamed chérif ABERKANE, Maître de conférence à l'université de Batna. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et m'a guidé dans mon périple scientifique. Par ses conseils et sa disponibilité.*

*J'exprime les sincères remerciements à monsieur DIBI Ammar, professeur à l'université de BATNA qui m'a fait honneur d'accepter de juger et d'être président de jury de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur Malek rassoul yassine EL HILOU, Professeur à l'université d'OUUM EL-BOUAGHI, pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*La présence de Fatma BITAM, m'a également été très profitable. Je la remercie de tout cœur d'avoir co-encadré ce travail et de m'avoir toujours apporté son aide que ce soit à la paillasse ou au cours de l'interprétation des résultats et la rédaction de ce manuscrit.*

*J'exprime également mes plus respectueux remerciements à Madame Hassina HARKAT, Maître de conférence l'université de BATNA; à Madame Fatma BITAM, Maître de conférence à*

*l'université de BATNA, pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Je profite l'occasion pour remercier tous mes collègues du laboratoire et spécialement Amira DJEBARA et Imen BEN ABDELAZIZE pour le soutien, l'encouragement et les moments agréables passés ensemble*

*Je remercie tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.*

*Dédicace*

*A mes chers parents pour leur amour,  
leur présence à Chaque instant,  
leur soutien,  
que Dieu les protège*

*A mon frère et mes sœurs*

*A mon mari*

*A toute ma belle famille*

## *Abréviations*

<b>AcOEt :</b>	Acétate d'éthyle
<b>EP :</b>	Ether de pétrole
<b>MeOH :</b>	Méthanol
<b>CHCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlorométhane
<b>CDCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme deutéré
<b>CD<sub>3</sub>OD :</b>	Méthanol deutéré
<b>C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O</b>	Acétone deutéré
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CC :</b>	Chromatographie sur colonne ouverte
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>RP- 18 :</b>	Silice greffée en C-18
<b>s :</b>	Singulet
<b>sl :</b>	Singulet large
<b>d :</b>	Doublet
<b>dd :</b>	Doublet de doublets
<b>t :</b>	Triplet
<b>m :</b>	Multiplet
<b>RMN <sup>1</sup>H :</b>	Résonance magnétique nucléaire du proton
<b>RMN <sup>13</sup>C :</b>	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<b>HMBC :</b>	Heteronuclear multiple bond correlation
<b>HSQC :</b>	Heteronuclear single quantum correlation
<b>COSY H-H :</b>	Correlation spectroscopy H-H
<b>δ :</b>	Déplacement chimique
<b>J :</b>	Constante de couplage
<b>Glc :</b>	Glucose
<b>Rha :</b>	Rhamnose
<b>Rut</b>	Rutinose
<b>CoA :</b>	Coenzyme-A
<b>F :</b>	Fraction
<b>ppm :</b>	Partie par million

<b>Hz :</b>	Hertz
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>R<sub>f</sub></b>	Facteur de rétention ou rapport frontière
<b>IE</b>	Impact électronique
<b>PPE</b>	Pyrophosphate de Farnesyl

## Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre I</b>	
<b>I.1 Description botanique de la plante</b>	5
I.1.1 La famille des Apiacées	5
I.1.1.1 Généralités	5
I.1.1.2 Distribution de la famille à travers le monde	5
I.1.1.3 Classification systématique	6
I.1.1.4 Caractérisation botanique	6
I.1.2 Le genre <i>Eryngium</i>	7
I.1.2.1 Distribution géométrique du genre	7
I.1.2.2 Caractérisation botanique	7
I.1.3 L'espèce <i>campestre</i>	7
I.1.3.1 Classification systématique	7
I.1.3.2 Caractérisation botanique	8
<b>I.2 Propriétés ethnobotaniques de la plante</b>	9
I.2.1 Introduction	9
I.2.2 Utilisation en médecine traditionnelle	9
I.2.2.1 Le genre <i>Eryngium</i>	9
I.2.2.2 L'espèce <i>campestre</i>	10
I.2.3 Activité biologique	10
I.2.3.1 Le genre <i>Eryngium</i>	10
I.2.3.2 L'espèce <i>campestre</i>	11
<b>I.3 Travaux phytochimiques antérieurs</b>	12
I.3.1 Sur le genre <i>Eryngium</i>	12
I.3.2 Sur l'espèce <i>campestre</i>	16
<b>Chapitre II : Etude des flavonoïdes et des stéroïdes</b>	
<b>II.A les flavonoïdes</b>	19
<b>II.1 Généralités</b>	19
<b>II.2 Biosynthèse des flavonoïdes</b>	19
II.2.a La voie de l'acide shikimique	20
II.2.b La voie malonate	21
<b>II.3 Synthèse organique des flavonoïdes</b>	21
<b>II.4 Structure chimique et classification</b>	22
<b>II.5 Substitution du squelette flavonique</b>	22
II.5.1 La O-substitution	23
II.5.1.a L'hydroxylation	23
II.5.1.b La méthyoxylation	24
II.5.2 La O-glycosylation	24
II.5.3 La C-substitution	26
II.5.3.a La C-méthylation	26
II.5.3.b La C-glycosylation	26
<b>II.6 Activité biologique des flavonoïdes</b>	26
II.6.1 Activité anti-oxydante	27
II.6.2 Activité antimicrobienne	27
II.6.3 D'autres activités biologiques	27
<b>II.7 Propriétés des flavonoïdes</b>	27
<b>II.B Les stéroïdes</b>	29

<b>II.1</b>	<b>Etymologie</b>	<b>29</b>
<b>II.2</b>	<b>Généralités</b>	<b>29</b>
<b>II.3</b>	<b>Classification et nomenclature</b>	<b>30</b>
<b>II.4</b>	<b>Stéréochimie</b>	<b>31</b>
<b>II.5</b>	<b>Les principaux stéroïdes</b>	<b>33</b>
	II.5.1 Les hormones	33
	II.5.2 Les acides biliaires	34
	II.5.3 Autres composés	34
<b>II.6</b>	<b>Définition des stéroïdes</b>	<b>35</b>
<b>II.7</b>	<b>Classification des phytostérols</b>	<b>35</b>
<b>II.8</b>	<b>Définition des phytostérols</b>	<b>35</b>
<b>II.9</b>	<b>Biosynthèse des phytostérols</b>	<b>36</b>
<b>II.10</b>	<b>Propriétés pharmacologiques des stérols</b>	<b>44</b>
	<i>Chapitre III : Résultats et discussions</i>	
<b>III.1</b>	<b>Extraction</b>	<b>46</b>
<b>III.2</b>	<b>Séparation et purification</b>	<b>47</b>
<b>III.3</b>	<b>Détermination des structures</b>	<b>49</b>
	III.3.1 Elucidation structurale du composé A	49
	III.3.2 Elucidation structurale du composé B	54
	III.3.3 Elucidation structurale du composé C	63
	III.3.4 Elucidation structurale du composé D	66
	<i>Chapitre IV : Partie expérimentale</i>	
<b>IV.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>75</b>
	IV.1.1 Méthodes chromatographiques analytiques	75
	IV.1.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	75
	IV.1.2 Méthodes préparatives	75
	IV.1.2.1 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	75
	IV.1.2.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	75
	IV.1.3 Méthodes physico-chimiques	76
	IV.1.3.1 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)	76
<b>IV.2</b>	<b>Extraction</b>	<b>76</b>
<b>IV.3</b>	<b>Contrôle chromatographique des extraits</b>	<b>76</b>
<b>IV.4</b>	<b>Séparation et purification</b>	<b>76</b>
	IV.4.1 Extrait acétate d'éthyle	76
<b>IV.5</b>	<b>Constantes physiques et données spectrales des composés isolés</b>	<b>81</b>
	IV.5.1 Composé A	81
	IV.5.2 Composé B	83
	IV.5.3 Composé C	84
	IV.5.4 Composé D	85
	<b>Conclusion</b>	
	<b>Référence bibliographique</b>	
	<b>Résumé</b>	



## *Introduction*

## **Introduction**

Depuis le début du siècle les nouvelles techniques ont permis d'extraire de nombreuses substances naturelles à principes actifs, et de mettre en évidence les propriétés pharmacologiques des plantes, qui représentent une source inépuisable et renouvelable. L'usage médical traditionnel est connu depuis bien longtemps, dont quatre-vingts pour cent de la population du monde emploie la médecine traditionnelle pour traiter les maladies à base de plantes médicinales.

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans la production de nombreux produits de consommation. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise réputation parmi le grand public. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (pharmaceutiques, additifs nutritionnels, cosmétiques...).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques <sup>[1]</sup>. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques <sup>[1]</sup>, ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Dans cette optique et dans le cadre du programme d'étude de la flore algérienne particulièrement des Aurès et du Nord Sahara au niveau de notre laboratoire, nous nous sommes basés, dans ce travail sur la contribution dans la recherche de principes actifs par extraction, séparation et purification à partir de la plante médicinale algérienne *Eryngium campestre* de la famille des Apiacées, récoltée près de Imedghassene.

Dans un premier temps, nous avons effectué une recherche bibliographique qui porte sur quelques principaux axes:

- ✓ Une étude bibliographique réalisée sur la famille, le genre et l'espèce de la plante concernant la description botanique, les propriétés biologiques et pharmacologiques ainsi que très peu d'études phytochimiques antérieures, nous avons noté, d'après cette

étude, qu'il n'existe pas beaucoup d'informations de nature chimique et/ou biologique sur cette espèce. Cela représente le premier chapitre.

- ✓ Une étude chimique effectuée sur l'origine biosynthétique et les différentes activités biologiques de certaines classes de produits naturels qui sont considérées typiques dans le l'espèce d'après l'étude bibliographique qui a été réalisée ailleurs, citons : les stéroïdes et les flavonoïdes. Ceci constitue le deuxième chapitre.

Dans deuxième temps, nous avons décrit la caractérisation structurale des composés isolés, réalisée au moyen des méthodes d'analyse spectroscopiques : la RMN 1D ( $H^1$  et  $C^{13}$ ), la RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), puis nous avons présenté notre travail expérimental au niveau de notre laboratoire, en débutant par l'extraction, La méthodologie de séparation et de purification des composés, qui a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques sur gel de silice, et les méthodes modernes (HPLC) car les composés sont difficilement séparables par les méthodes classiques. C'est le troisième et le quatrième chapitres.

En conclusion, nous avons énuméré les résultats obtenus à travers cette étude chimique des constituants de cette plante.

## *Chapitre I*

*1. Description botanique*

*2. Propriétés ethnobotaniques*

*3. Travaux phytochimiques antérieurs*

## I.1 Description botaniques de la plante

### I.1.1 La famille des Apiacées

#### I.1.1.1 Généralité

La famille des Apiacées ou Ombellifères est une grande famille de plantes. Cette famille contient de nombreuses espèces environ 3000, qui ont des propriétés pharmacologiques utilisées en médecine traditionnelle, en raison de la présence des métabolites secondaires bioactifs tels que : les huiles essentielles, les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines (Furano et pyranocoumarins), les saponines, les alcaloïdes et les polyacétylènes. <sup>[2] [3]</sup>

En Algérie, cette famille est très importante, elle est représentée par 55 genres <sup>[93]</sup>, est mal représentée au Sahara, notamment dans sa partie centrale <sup>[4]</sup>.

#### I.1.1.2 Distribution de la famille à travers le monde

La famille des Apiacées renferme environ 300 genres pour plus de 2500 espèces. La famille est répartie sur la majeure partie du globe (figure I.1), plus commune dans les régions montagneuses tempérées et relativement rare en zone tropicale <sup>[5]</sup>.

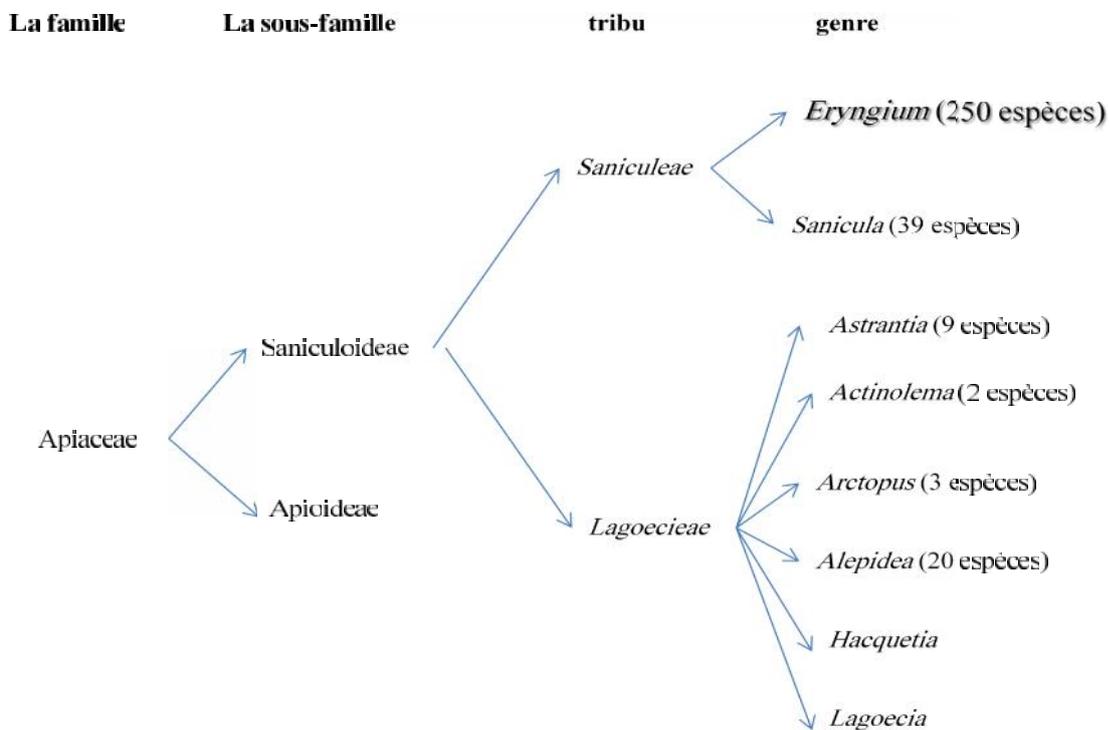


Figure I. 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae. <sup>[6]</sup>

### I.1.1.3 Classification systématique

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae

D'après Drude (1898) <sup>[7]</sup> et Wolff (1913) <sup>[8]</sup>, la famille Apiaceae se partage en deux sous-familles, Apioideae et Saniculoideae, cette dernière comprend deux tribus *Saniculeae* et *Lagoeciae*, avec huit genres et environ de 330 espèces. *Sanicula* et *Eryngium* sont les seuls genres de Saniculoideae représentés dans l'hémisphère occidental.



**Tableau 1: la classification du genre *Eryngium***

### I.1.1.4 Caractérisation botanique

Arbustes, plantes sous-frutescentes ou herbacées, très variables, à feuilles en général très divisées. Inflorescences ombelliformes munies à leur base de bractées souvent très caduque (*involucre*), simple ou le plus souvent composés d'ombellules munies ou non de bractéoles à leur base (*involucelle*). Fleurs sépales en général très petits ou nuls. Pétales libres, égaux ou parfois rayonnants, plus grands à la périphérie des ombellules. Ovaire infère, formé

de deux carpelles antéropostérieurs, surmonté du disque (*stylopode*) <sup>[1]</sup>, la fleur des Apiaceae consiste en cinq pétales, cinq étamines libres, un calice très réduit, un ovaire infère avec deux carpelles et deux loges, et un stylopode soutenant les deux styles. Les fruits présentent une grande diversité. Il s'agit à la base d'un fruit sec schizocarpique qui se fend à maturité le long d'un septum en deux méricarpes à une graine, restant généralement suspendus quelque temps au carpophore puis s'en détachant. La surface externe du méricarpe possède normalement cinq côtes primaires et entre celles-ci quatre côtes valléculaires secondaires. Dans les sillons entre les côtes primaires, dans les côtes elles-mêmes ou sur tout le fruit, se trouvent fréquemment des canaux résinifères <sup>[9]</sup>.

## **I.1.2 Le genre *Eryngium***

### **I.1.2.1 Distribution géographique**

Le genre *Eryngium* L. est le plus répandu sur le plan taxonomique de la famille Apiaceae, il se représente par environ 250 espèces qui font partie de la sous famille Saniculoideae <sup>[10]</sup>. Ce genre est distribué dans les régions tempérées de tous les continents <sup>[11,12]</sup>, principalement en Eurasie, en Afrique du nord et en Amérique du sud <sup>[13,14,15]</sup>, cependant la richesse spécifique est inégalement réparti entre et dans les hémisphères Est et Ouest, deux centres de diversité sont reconnues dans chaque hémisphère: le centre-ouest de Mexique, le centre-est de l'Amérique du sud (sud de Brésil, nord-est de l'Argentine et de l'Uruguay), l'ouest Méditerranée et sud-ouest de l'Asie, mais environ les deux tiers des espèces sont distribués dans le nord, le centre et le sud de l'Amérique <sup>[11,16]</sup>.

### **I.1.2.2 Caractérisation botanique**

*Eryngium* ou Panicaut, C'est une plante annuelle, bisannuelle ou vivace plus au moins épineuse. Inflorescences capituliformes entourées de bractées en général épineuses. Fleurs sessiles, chacune à l'aisselle d'une bractée épineuse. Calice à cinq dents foliacées épineuses. Cinq pétales, petits, connivents. Fruits ovoïdes couvert d'écailles ou de tubercules à côtes bandelettes nulles ou peu apparentes <sup>[1]</sup>.

## **I.1.3 L'espèce *campestris***

### **I.1.3.1 Classification systématique**

Nom commun	panicaut du champ, chardon roulant
Régne	Plantae

Sous-régne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiale
Famille	Apiaceae
Sous-famille	Saniculoideae
Tribu	Saniculeae
Genre	Eryngium
Synonyme	Eryngium Lotifolium Hoffmanns

### **I.1.3.2 Caractérisation botanique**

Des plantes ne végétant pas sur des feuilles radicales et caulinaires pinnatipartites sauf parfois les feuilles primordiales. Bractées florales toutes entières. Feuilles épineuses à tige courte, caulinaires embrassantes à la base, à pétiole longuement ailé. Inflorescences très ramifiées corymbiformes <sup>[1]</sup>.



## I.2 Propriétés ethnobotaniques de la plante

### I.2.1 Introduction

Une grande proportion des populations des pays sous développés utilisent la médecine traditionnelle à base de plantes, parce qu'elle répond à leurs besoins de soins, en raison du coût élevé des produits pharmaceutiques, et parce que la médecine traditionnelle est généralement plus acceptable d'un point de vue culturel et spirituel <sup>[17,18]</sup>, Selon l'OMS (2002) (l'Organisation Mondiale de Santé) jusqu'à 90% de la population dans les pays sous développés utilise la médecine traditionnelle. Plusieurs enquêtes dans la région méditerranéenne ont révélé qu'un grand nombre de plantes indigènes sont encore en usage en thérapie <sup>[19,20,21]</sup>.

### I.2.2 Utilisation en médecine traditionnelle

#### I.2.2.1 Le genre *Eryngium*

En Turquie, des différentes espèces du genre *Eryngium* sont utilisées éventuellement comme remèdes de quelques maladies, Les racines sont utilisées contre les divers troubles inflammatoires, l'œdème, la sinusite, les infections urinaires, ou les inflammations, et les morsures de serpents ou de scorpions. Des racines et des feuilles sont utilisées contre l'infertilité et les herbes pour cicatriser les plaies et comme un aliment à l'état frais <sup>[21,22]</sup>, L'infusion des partie aérienne et racines de la plante *Eryngium maritimum* est utilisée dans les remèdes populaires comme un antitussif, diurétique, apéritif, stimulant et aphrodisiaque <sup>[23]</sup>.

Des utilisations similaires ont été trouvées dans les anciens documents de l'époque médiévale, comme des traitements contre les plaies, les brûlures, les douleurs, les hémorroïdes et les maladies sexuellement transmissibles <sup>[24]</sup>.

Les effets des racines de différentes espèces du genre *Eryngium* sont indiqués contre les divers inflammatoires, il est également bien connu dans la médecine traditionnelle à travers le monde, par exemple, que la plante *Eryngium creticum* est recommandée pour guérir les inflammations des blessures <sup>[25]</sup>.

En Italie, la plante *Eryngium amethystinum* est connue sous le nom de "calcatreppola ametistina". En médecine populaire de ce pays, cette plante est employée pour les propriétés diurétiques et laxatives, elle est indiquée aussi pour les traitements des maux urinaires, de l'œdème et l'acidose, et elle est également utilisée comme digestif <sup>[26]</sup>.

En médecine traditionnelle d'Amiata Mount (Italie) les racines de la plante sont utilisées comme un diaphoretique et contre le cellulite

L'*Eryngium yuccifolium* Michx., connue sous le nom de “rattlesnake master”, “button eryngo”, ou “button snakeroot”, est une plante vivace naturellement distribuée dans l'est de l'Amérique du Nord. Traditionnellement, elle est utilisée comme compresses ou teintures. Les racines de cette espèce étaient utilisées contre les morsures de serpents, les fièvres, ou troubles de la reproduction [27,28,29]. Cependant, il n'y a pas de rapport disponible sur la recherche phytochimique et bioactif sur cette espèce.

### **I.2.2.2 L'espèce *campestre***

L'*Eryngium campestre* est connu en Turquie sous le nom “Boğadikenî”, il est largement distribué dans toute la Turquie. L'infusion des parties aériennes et racines de cette espèce est utilisée comme un antitussif, un stimulant, apéritif et diurétique [23].

L'extrait aqueux des racines d'*Eryngium campestre* est utilisé par voie orale et appliquée comme un cataplasme pour le remède contre les piqûres de scorpions dans Balıkesir – Turquie [30].

Il est également documenté dans les sources de phytothérapie populaire que l'espèce *Eryngium campestre* est recommandée contre les inflammations des reins et des voies urinaires et de l'œdème [31].

## **I.2.3 Activité biologique**

### **I.2.3.1 Le genre *Eryngium***

Plusieurs utilisations populaires attribuées pour les espèces d'*Eryngium* ont fait l'objet d'une recherche biologique en utilisant des méthodes expérimentales. Afifi [32] et Alkofahi [33] ont confirmé les effets guérissant des racines du genre *Eryngium creticum* contre les morsures de serpents et de scorpions.

Les études scientifiques qu'ont été réalisées pour confirmer l'activité anti-inflammatoire ainsi que l'antinociception restent limitées, malgré les applications très répandues des espèces du genre *Eryngium* à travers le monde, sauf : la partie aérienne de la plante *Eryngium yuccifolium* [34]. La partie aérienne et les racines de la plante *Eryngium bilardieri* [35], les feuilles de la plante *Eryngium foetidum* [36,37], les racines de la plante *Eryngium maritimum* [38].

### **I.2.3.2 L'espèce *campestre***

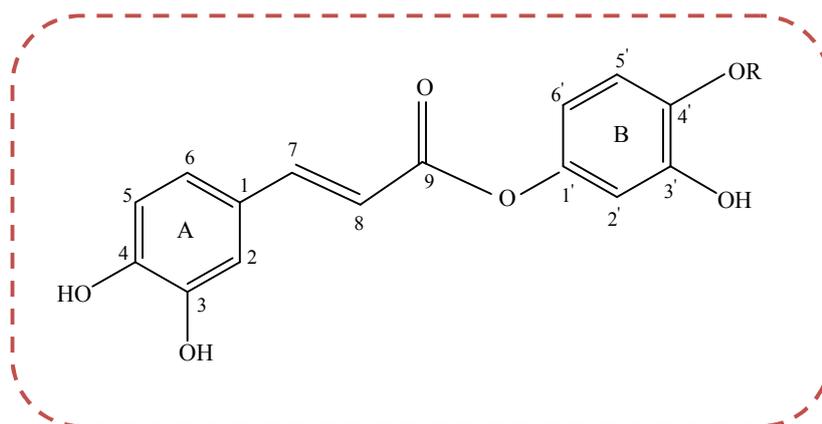
Les effets bioactifs des racines d'*Eryngium campestre* sont exploités comme un antioedeme <sup>[39]</sup>. L'activité antidiabétique des feuilles d'*Eryngium campestre* a été prouvée par Jaghabir (1991) <sup>[40]</sup>. Les activités anti-inflammatoires et antinociceptions ont été également prouvées sur les extraits éthanoliques et aqueux des parties aériennes et racines de la plante *Eryngium Campestre* récoltées en Turquie <sup>[30]</sup>.

## I.3 Travaux photochimiques antérieurs

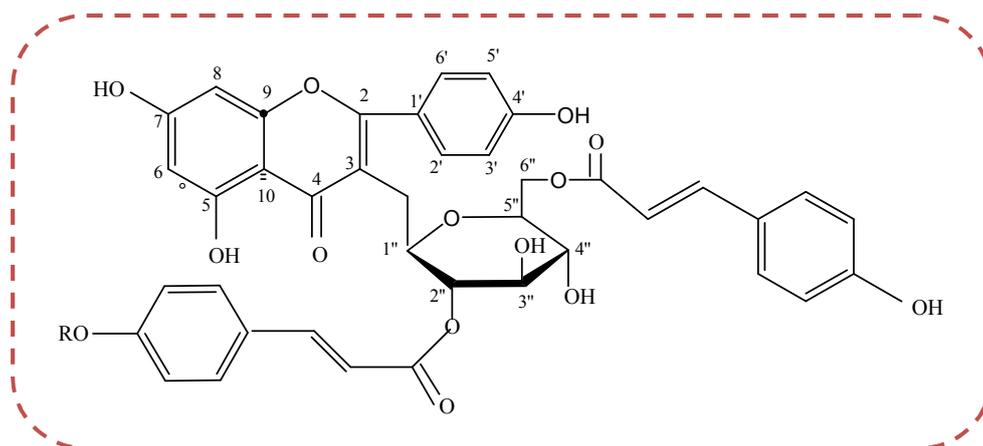
### I.3.1 Sur le genre *Eryngium*

Une investigation phytochimique exhaustive réalisée sur les plantes du genre *Eryngium*, a mis en évidence l'isolement et l'identification de divers métabolites secondaires, composés essentiellement de : les flavonoides [41,42,43,44,45] les huiles essentielles [10,13,46,47], les coumarines [48], les dérivés de l'acide rosmarinique [49] et les saponines [40,51,52,53].

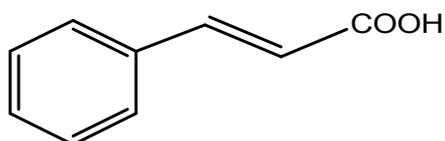
Une étude chimique effectuée sur l'extrait éthanolique des parties aériennes de *E. yuccifolium* poussant en Texas (USA), a permis d'isoler et de caractériser trois composés phénoliques et douze triterpenoides saponines polyhydroxylés nommés eryngiosides A-L et deux autres triterpenoides saponines polyhydroxylés, acide caféique avec deux flavonoides [54]. Les structures de ces composés ont été élucidées par les différentes analyses spectroscopiques extensives et par la dégradation chimique.



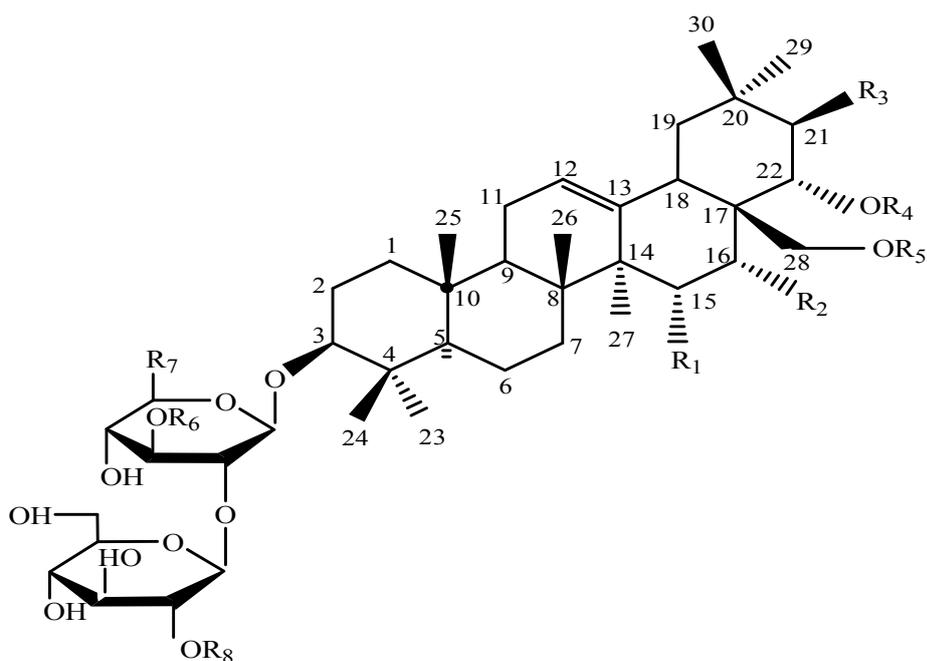
Composé	R	
1	H	3,4-dihydroxyphenyl caffeate
2	$\beta$ -D-glucopyranosyl 	(4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-3-hydroxyphenyl caffeate



Composé	R	
3	CH <sub>3</sub>	kaempferol-3-O-(2-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -methoxycoumaroyl)-6-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside
4	H	kaempferol-3-O-(2,6-di-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-β-D-glucopyranoside



Composé 17 acide caféique



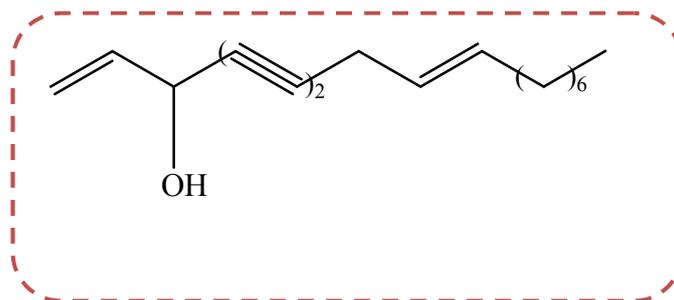
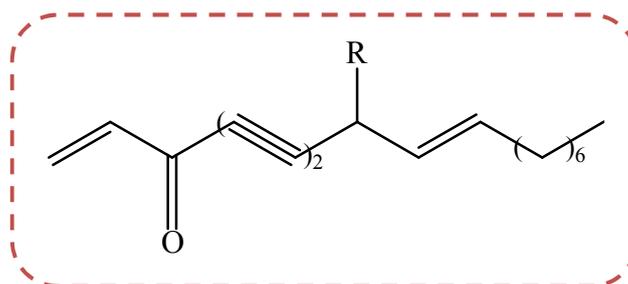
Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
5	H	OH	H	Glc	H	H	CH <sub>2</sub> OH	Glc
6	H	OH	H	Glc	H	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal
7	H	=O	H	Glc	H	H	CH <sub>2</sub> OH	Glc
8	H	OH	H	H	Glc	H	CH <sub>2</sub> OH	Glc
9	OH	OH	OH	Ang	H	Xyl	COOH	H
10	H	OH	OH	Ang	H	Xyl	COOH	H
11	OH	OH	O-Ang	H	H	Xyl	COOH	H
12	OH	OH	O-Ang	H	H	Ara	COOH	H
13	OH	OH	H	Ang	H	Xyl	COOH	H
14	OH	OH	H	Ang	H	Ara	COOH	H
15	OH	OH	O-Ang	Ac	H	Xyl	COOH	H
16	OH	OH	O-Ang	Ac	H	Ara	COOH	H
17	H	OH	O-Ang	Ac	H	Xyl	COOH	H
18	H	OH	O-Ang	Ac	H	Ara	COOH	H

Composé	Nomenclature
5	3β-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosyl oxy-22α-β-D-glucopyranosyloxyolean-12-ene-16α,28-diol
6	3β-[β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosyloxy-22α-β-D-glucopyranosyloxyolean-12-ene-16α,28-diol.
7	3β-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosyl oxy-22α-β-D-glucopyranosyloxyolean-12-ene-16-oxo-28-ol
8	3β-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosyl oxy-28-β-D-glucopyranosyloxyolean-12-ene-16α,22α-diol
9	22α-angeloyloxy-3β-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15α, 16α, 21β,28-tetrol

10	22 $\alpha$ -angeloyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-16 $\alpha$ , 21 $\beta$ ,28-triol
11	21 $\beta$ -angeloyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,22 $\alpha$ ,28-tetrol
12	21 $\beta$ -angeloyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- [ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ , 22 $\alpha$ ,28-tetrol.
13	22 $\alpha$ -angeloyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,28-triol
14	22 $\alpha$ -angeloyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,28-triol
15	21 $\beta$ -angeloyloxy-22 $\alpha$ -acetyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,28-triol
16	saniculasaponin III
17	21 $\beta$ -angeloyloxy-22 $\alpha$ -acetyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-16 $\alpha$ ,28-diol
18	21 $\beta$ -angeloyloxy-22 $\alpha$ -acetyloxy-3 $\beta$ -[ $\beta$ -Dglucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyloxyolean-12-ene-16 $\alpha$ ,28-diol

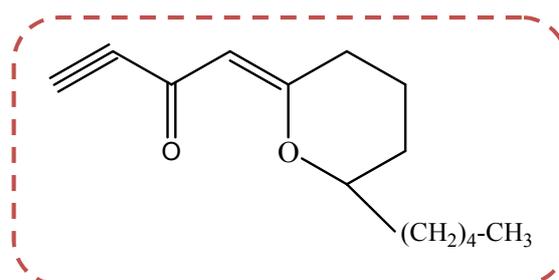
Une autre étude chimique sur la partie racines de *E. bourgatii*, réalisée par Jorgen. L a permis d'isoler: Falcarinone, folcarinolone, falcarinol, 6-pentyl-2-[2-oxo-butin-(3)-yliden]-tetrahydropyran (**isomère E**) et (**isomère Z**) <sup>[55]</sup>. Leurs structures ont été déterminées par les méthodes d'analyses spectroscopiques et notamment la RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C et la spectrométrie de masse EI.

	<b>R</b>
<b>19</b>	H
<b>20</b>	OH

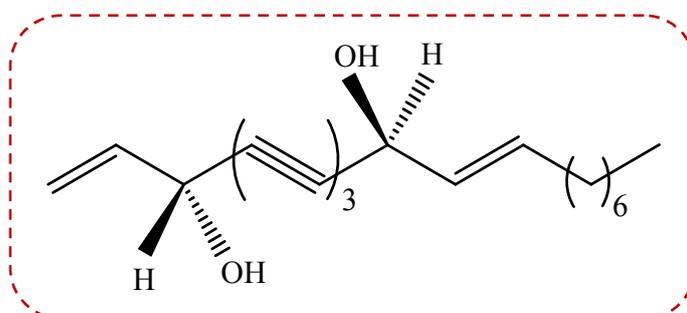


**Composé 21**

	R
22	Isomère <i>E</i>
23	Isomère <i>Z</i>



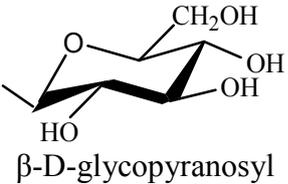
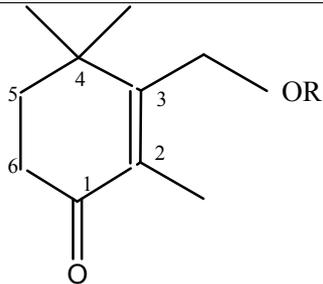
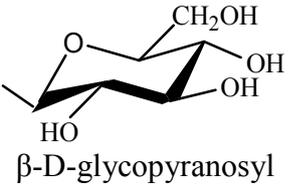
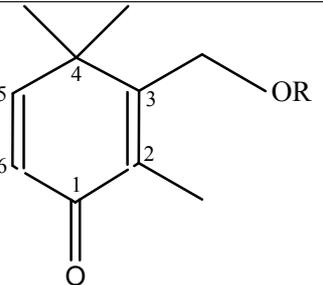
Ayoub Nahla <sup>[10]</sup> a lancé une étude phytochimique sur la plante *Eryngium yuccifolium*, l'extrait de hexane des partie aériennes de cette plante a permis d'isoler un nouveau polyacetylene nommé : Yuccifolol (I, nonadeca-1,11-diene-4,6,8-triène-3,10-diol). Sa structure a été assignée par les méthodes spectroscopiques et notamment les techniques : DEPT, COSY, HMQC, HMBC et l'analyse HRESI-MS.



### I.3.2 Sur l'espèce *campestre*

Des recherches phytochimiques sont réalisées sur l'espèce *E.campestre*, permet d'isoler et d'identifier des métabolites secondaires à base des terpènes et des flavonoides, mais sont très rares, et la plupart des études chimiques qui ont été effectuées, ont conduit à l'isolement d'huiles essentielles.

L'étude phytochimique qui a été réalisée par Clemens a montré l'isolement et l'élucidation de deux monoterpènes glycosilés de type cyclohexenone dont les structures ont été déterminées en se basant sur les analyses spectroscopiques tel que RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C et spectrométrie de mass EI. Ces deux composés ont été isolés à la première fois dans cette espèce <sup>[56]</sup>.

Composé	R	Structure
24	 <p data-bbox="406 667 671 705"><math>\beta</math>-D-glycopyranosyl</p>	 <p data-bbox="767 562 1249 622">3-(<math>\beta</math>-D-glycopyranosyloxymethyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one</p>
25	 <p data-bbox="406 667 671 705"><math>\beta</math>-D-glycopyranosyl</p>	 <p data-bbox="767 931 1249 992">3-(<math>\beta</math>-D-glycopyranosyloxymethyl)-2,4,4-trimethyl-2,5-cyclohexandien-1-one</p>

## *Chapitre II*

### *Etude des flavonoïdes et des stéroïdes*

## II.A Les flavonoïdes

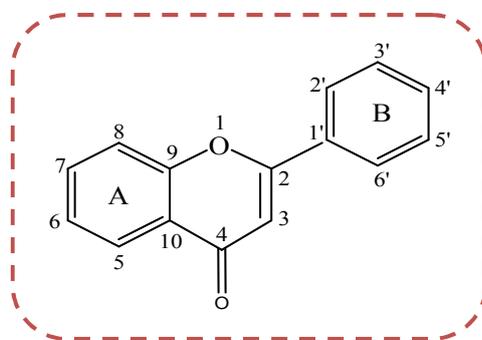
### II.1 Généralité

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires issus des plantes, occupant une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Le terme flavonoïde provenant du mot latin « flavus » qui veut dire « jaune ». Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux bien qu'ils sont présents dans toutes les organes des plantes : feuilles, fleurs, graines, racines, etc.

A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits [5,13]. Structuellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont : les flavones, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavone, les isoflavonones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins [13].

Les flavonoïdes présentent une diversité structurale très importante. Ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirale, anti-inflammatoire, et anticancéreuse. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [57].

Leurs structure de base est représentée dans la figure 1 :



La figure II.1 : Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes se présentent souvent sous forme d'hétérosides, solubles dans l'eau (localisés généralement dans les vacuoles cellulaires) ou solubles dans les solvants apolaires (situés dans le cytoplasme) [6].

### II.2 Biosynthèse des flavonoïdes

Dérivant d'une origine biosynthétique commune, les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C

proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

### II.2.a La voie de l'acide shikimique

Les travaux de Davis ont montré le rôle de l'acide shikimique dans la formation du noyau B et l'élément central C-3 à partir du glucose [58]. Le chemin général de la formation de l'acide coumarique est représenté dans le schéma II-1.

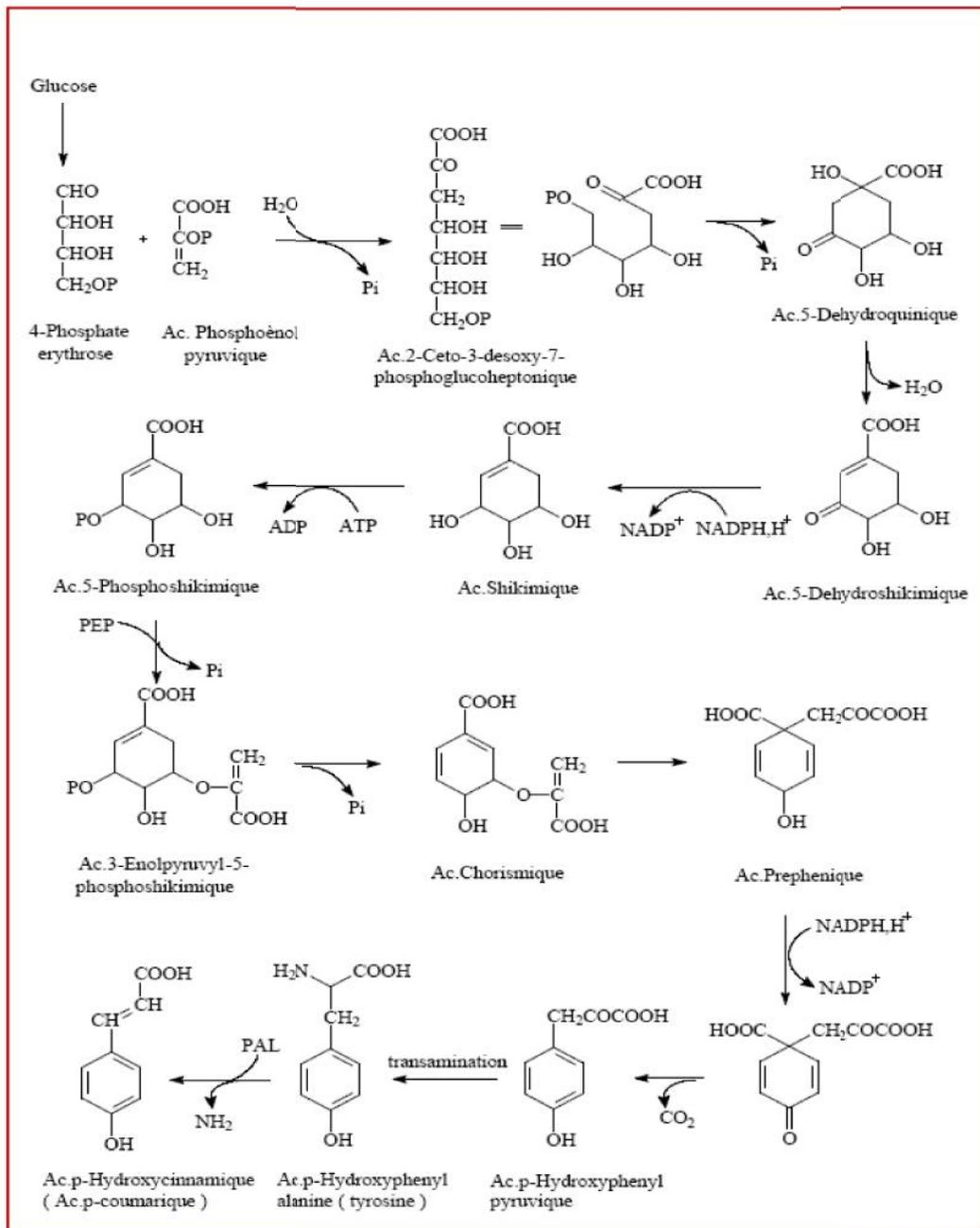


Schéma II.1 : La biosynthèse des flavonoïdes selon la voie de l'acide shikimique

## II.2.b La voie malonate :

A travers cette voie s'effectue la cyclisation de la chaîne poly-cétonique obtenue par condensation répétée d'unités acétates, et catalysée par l'acétyl-CoA.

## II.3 Synthèse organique des flavonoïdes

Les voies synthétiques les plus utilisées pour former le squelette C<sub>15</sub> des flavonoïdes, commencent à partir d'unités simples, passant par l'intermédiaire chalcone et sont représentés dans la figure II.3 <sup>[3]</sup>.

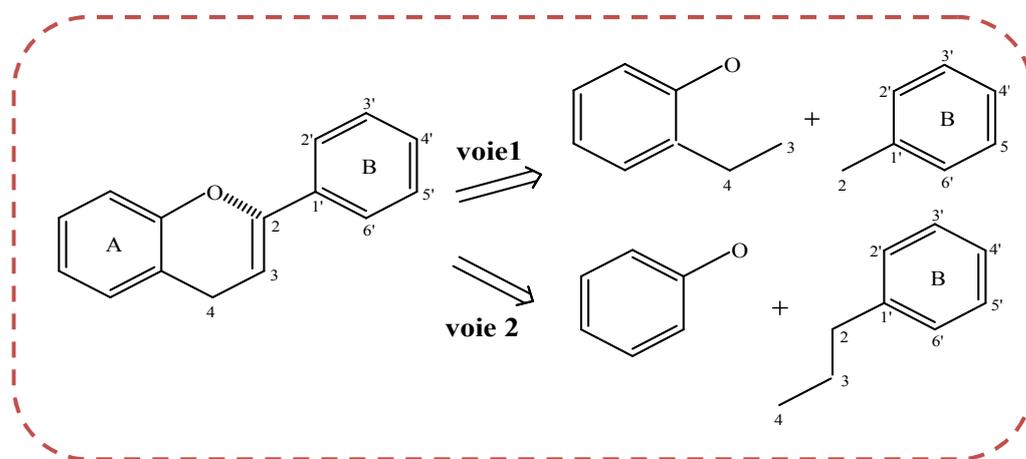


Figure II.2 : Voies rétrosynthétiques d'accès au squelette flavonoïde

La voie A est la plus utilisée en synthèse organique, elle utilise une condensation d'un dérivé de l'acétophénone (unité C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>) avec un dérivé du benzaldéhyde (unité C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>).

La voie B, qui correspond au chemin biosynthétique, consiste en l'acylation d'un phénol (unité C<sub>6</sub>) par un dérivé d'acide cinnamique (unité C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Dans tous les cas les intermédiaires clé de synthèse racémique sont des chalcones et dihydrochalcones [Figure II.3 composés (1) et (2)].

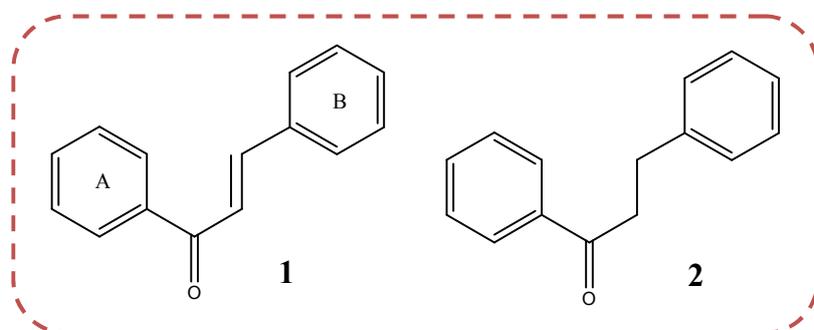


Figure II.3 : Squelette de chalcone (1), de dihydrochalcone (2)

Les chalcones intermédiaires clés dans la synthèse des flavonoïdes, peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés de l'acétophénone et du benzaldéhyde substitués (catalyse acide ou basique).

L'une des condensations, qui a été très utilisée, s'effectue en catalyse basique (Figure II.3). Elle utilise de la potasse aqueuse ou de la soude maintenue entre 0° et 20°C durant une période de 15 à 72 heures. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des substrats ayant des groupes hydroxyles méthylés ou benzylés. Notant que de bons rendements ont été obtenus avec des substrats non protégés, mais dans ce cas les temps de réaction peuvent être supérieurs à huit jours.

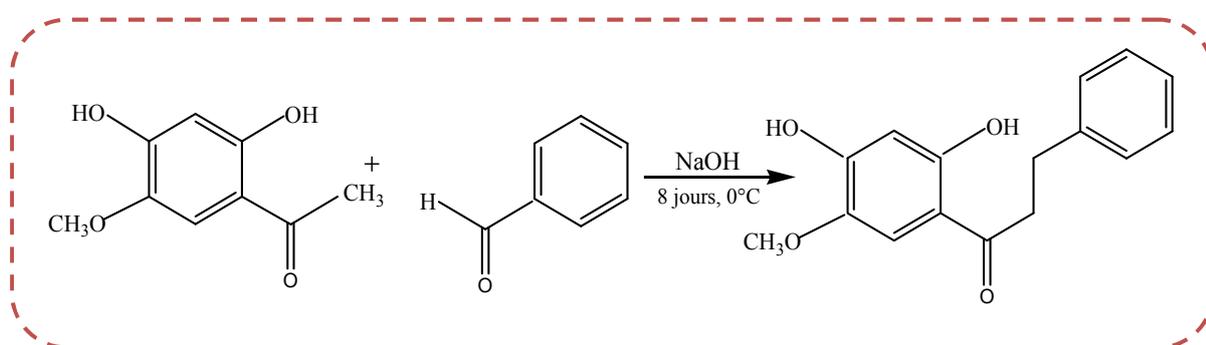


Figure II.4: Synthèse de la Flimichapparin [59]

## II.4 Structure chimique et classification

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C 3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [60]

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

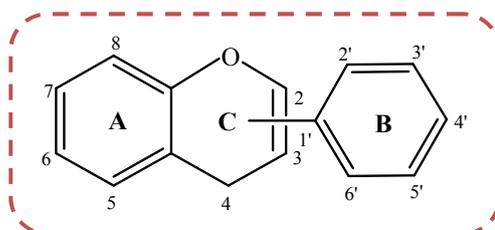


Figure II.5

La figure II.5 et le tableau II.1 montrent les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes

Flavones	Flavonols	Flavonone	Isoflavones	Chalcones	Aurones
Apigénine Lutéoline	Kaempférol quercétine	Eriodictyol	Génistéine	Butéine Phlorétine	Sulfurétine

Tableau II.1: Division des flavonoïdes

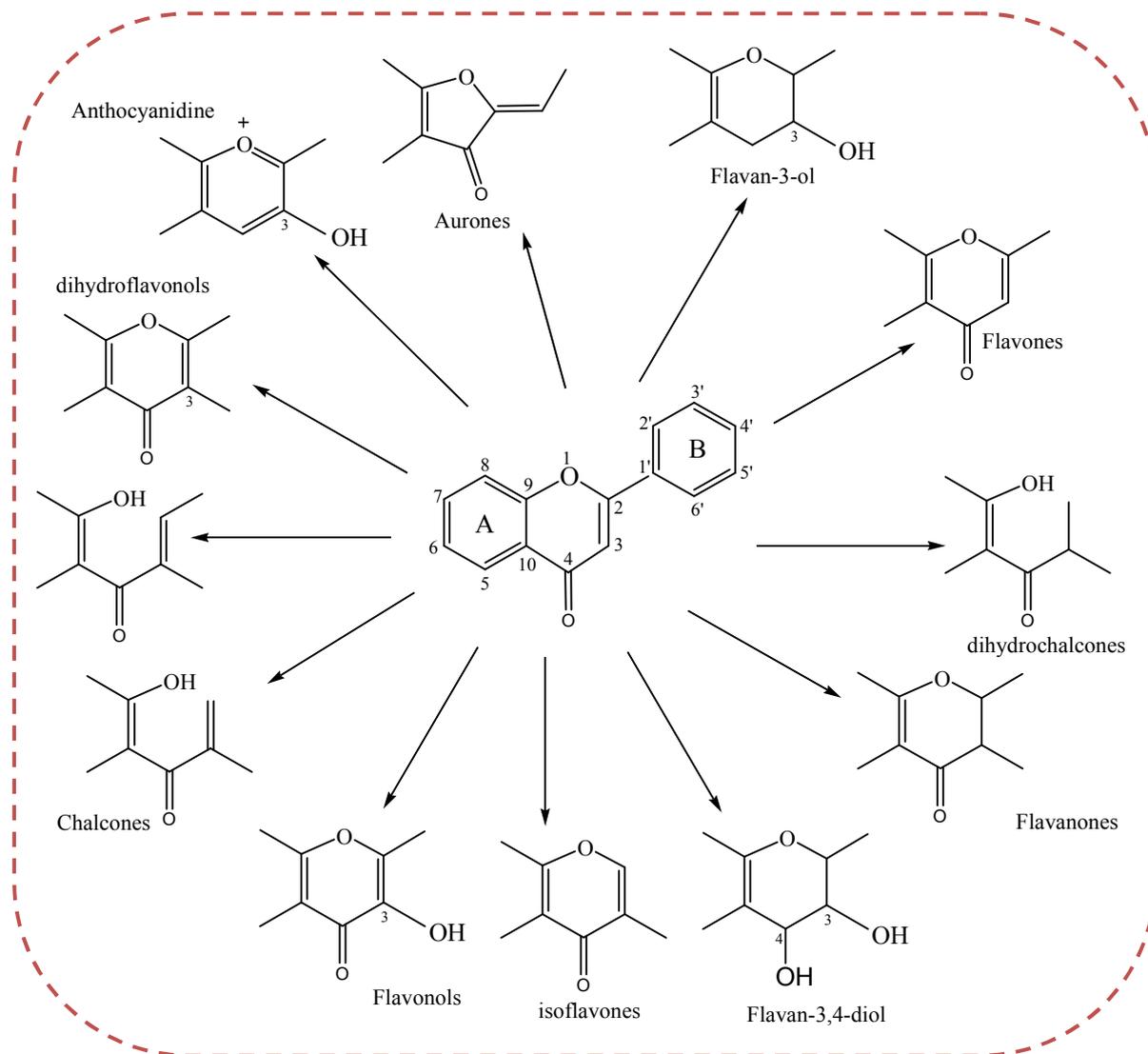


Figure II.6 : Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

## II.5 Substitution du squelette flavonique

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthyloxylation et des glycosylation. Les composés de chaque sous-groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire <sup>[61]</sup>.

## II.5.1 La O- substitution

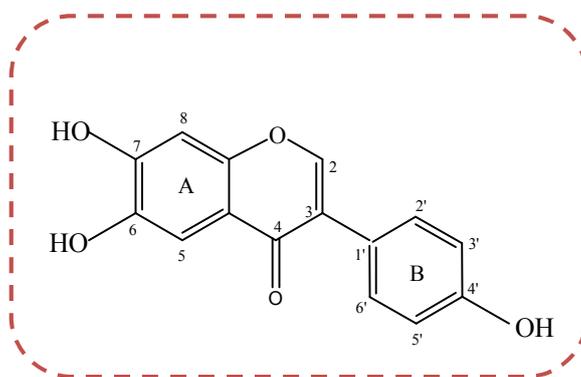
### II.5.1.a. L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogénèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [62].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est -à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [63].

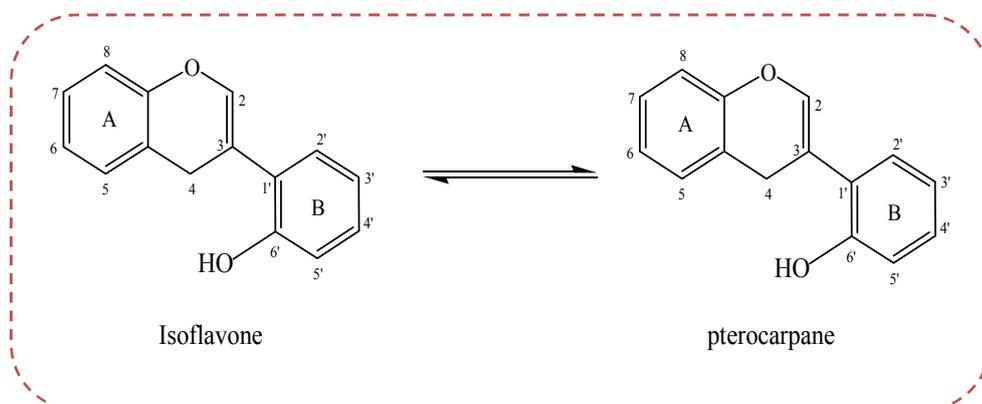
Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées [39].

#### Exemple



**4', 5,7-trihydroxyisoflavone (génistéine)** [64]

Dans le cas des isoflavones, l'hydroxylation de la position 2' du cycle B conduit le plus souvent en présence des enzymes spécifiques à la formation du ptérocarpane [38].



**Figure II.7 : Transformation de l'isoflavane en pterocarpane**

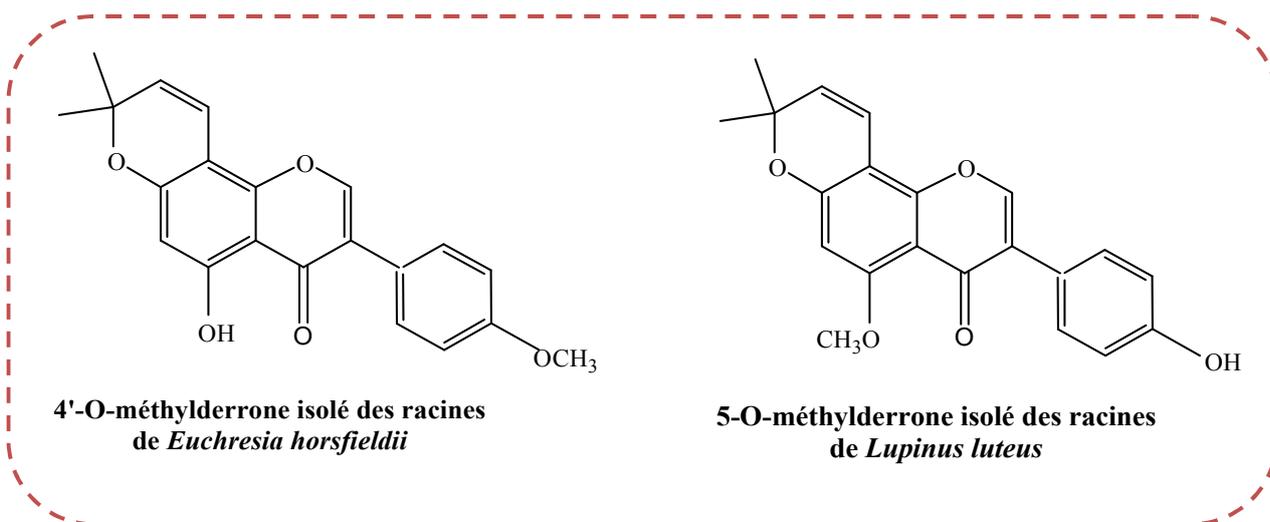
### II.5.1.b La méthylation

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone <sup>[65,66]</sup>.

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols <sup>[65]</sup>.

Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri <sup>[43]</sup>, on peut citer à titre d'exemple les deux isoflavones méthoxylés en positions 4' et 5' <sup>[66,67]</sup>.

**Exemple :**



### II.5.2 La O-glycosylation

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose).

Un deuxième sucre (ou plusieurs) peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé.

La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glycosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose). D'une manière générale,

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

### II.5.3 La C- substitution

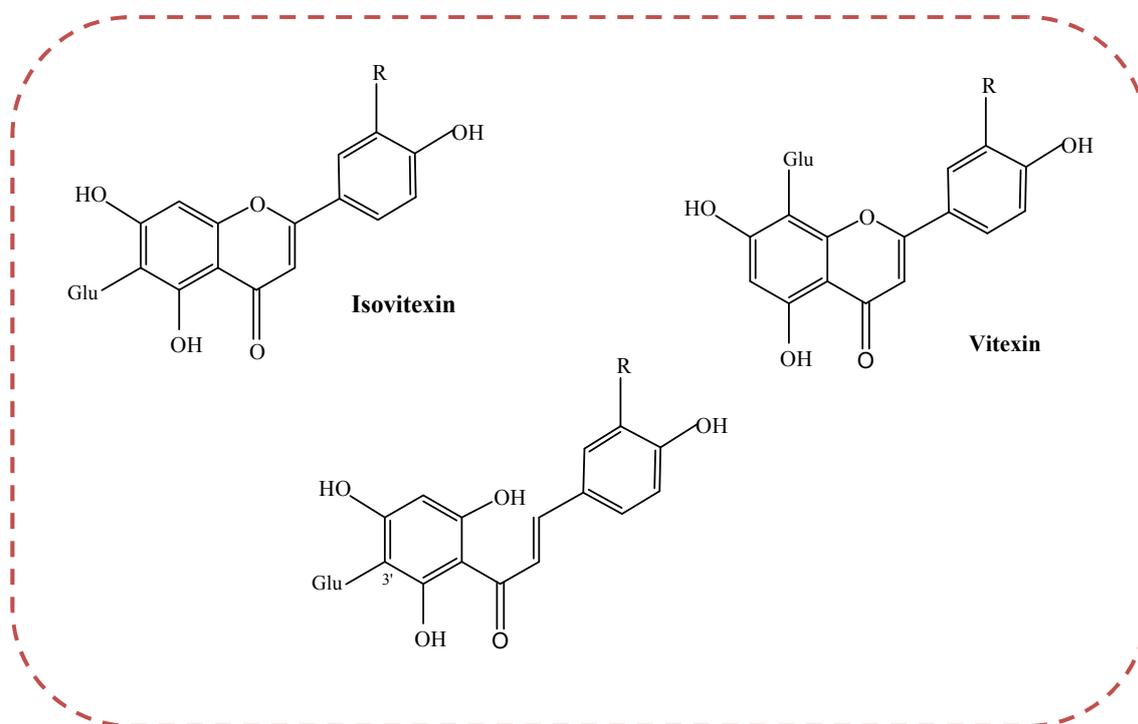
#### II.5.3.a La C-méthylation

Le méthyle est lié au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone, cette liaison est rencontrée en position 6 ou en position 8, ou encore en positions C-6 et C- 8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en positions 6 et /ou 8 est toujours inconnue [69].

#### II.5.3.b La C- glycosylation

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [70]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [71].

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



## II.6 Activités biologiques des flavonoïdes :

La plupart des flavonoïdes présentent des activités biologiques intéressantes telles que, les activités anti-oxydante et antimicrobienne.

### II.6.1 Activité anti-oxydante :

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure flavonique et l'activité antioxydante <sup>[72]</sup>. Parmi les agents qui augmentent cette activité le nombre des groupements hydroxyles sur le noyau B, quand le nombre augmente l'activité augmente <sup>[73]</sup>.

### II.6.2 Activité antimicrobienne :

Il est connu que certains flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne <sup>[74]</sup>. Il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes <sup>[63,75]</sup>.

### II.6.3 D'autres activités biologiques :

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase <sup>[76]</sup>. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques <sup>[66,67]</sup>. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires <sup>[77]</sup>.

## II.7 Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... . Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, des fleurs et des feuilles. Les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs <sup>[78]</sup>.

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes <sup>[79]</sup>.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les

diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoides présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937), chercheur de l'université de Szeged (Hongrie).

Le monde animal est lui aussi très concerné par les flavonoides. On trouve par exemple de la chryisine **(1)**, de la galangine **(2)** de la quercétine **(3)**, dans la propolis des abeilles.

Si tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine visible, ils présentent tous une bande dans l'ultraviolet proche du visible <sup>[80]</sup>.

Certains dont l'absorption en UV est importante, protègent la plante vis-à-vis des rayons UV-B de la lumière du soleil <sup>[81]</sup>.

## II.B les stéroïdes

### II.1 Etymologie

Le terme stéroïde tire son origine du mot grec " Stéréos" signifiant "Solide" et désignant toutes les molécules comportant un squelette tétracyclique correspondant à un perhydro cyclopentanophénanthrène (Gonane) (Figure II.7) [12,82].

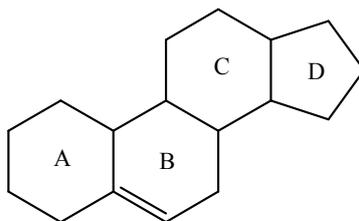


Figure II.7

### II.2 Généralité

Les stéroïdes représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol ou de ses homologues particulièrement abondants dans les végétaux et les animaux. Cette classe de substances naturelles présente une sous-classe de triterpènes. Les quatre cycles sont désignés par les lettres A, B, C et D.

La numérotation des atomes de carbone du squelette stéroïdique est comme suit : le carbone en haut du cycle A porte le n°1, les atomes des deux cycles A et B sont numérotés successivement en tournant dans le sens direct (1 à 10); on passe ensuite aux atomes du cycle C (11 à 14) puis D (15 à 17). Les radicaux méthyles liés aux carbones 13 et 10 sont désignés par les nombres 18 et 19. Enfin, une chaîne alkyle en C-17. Les deux cycles A et B peuvent avoir aussi des insaturations au niveau des carbones C-4 et C-5 (Figure II.8) [52,83,84].

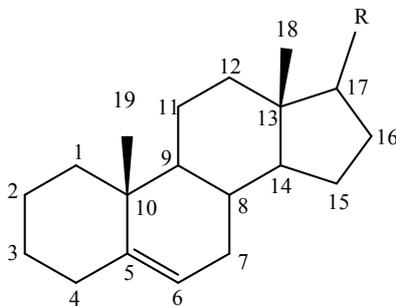


Figure II.8 : Stéroïde (R = diverses chaînes latérales)

### II.3 Classification et nomenclature

La classification qui consiste à prendre comme base trois hydrocarbures différents par la substitution sur les positions 10,13 et 17 conduit à trois séries de stéroïdes <sup>[83]</sup>:

1-Série oestrane (appelée aussi norandostane) qui ne comporte en plus des 4 cycles A, B, C, D qu'un méthyle en position 13. A cette série appartient l'oestrone **61**, hormone féminine (Figure II.9).

2-Série androstane, qui comporte deux méthyles en positions 10 et 13. Le principal représentant de cette série est la testostérone **62**, qui est une hormone masculine (Figure II.9).

3-Série prégane, avec deux méthyles en 10 et 13 et un groupement éthyle en 17, comme dans le cas de la cortisone **63** (Figure II.9)

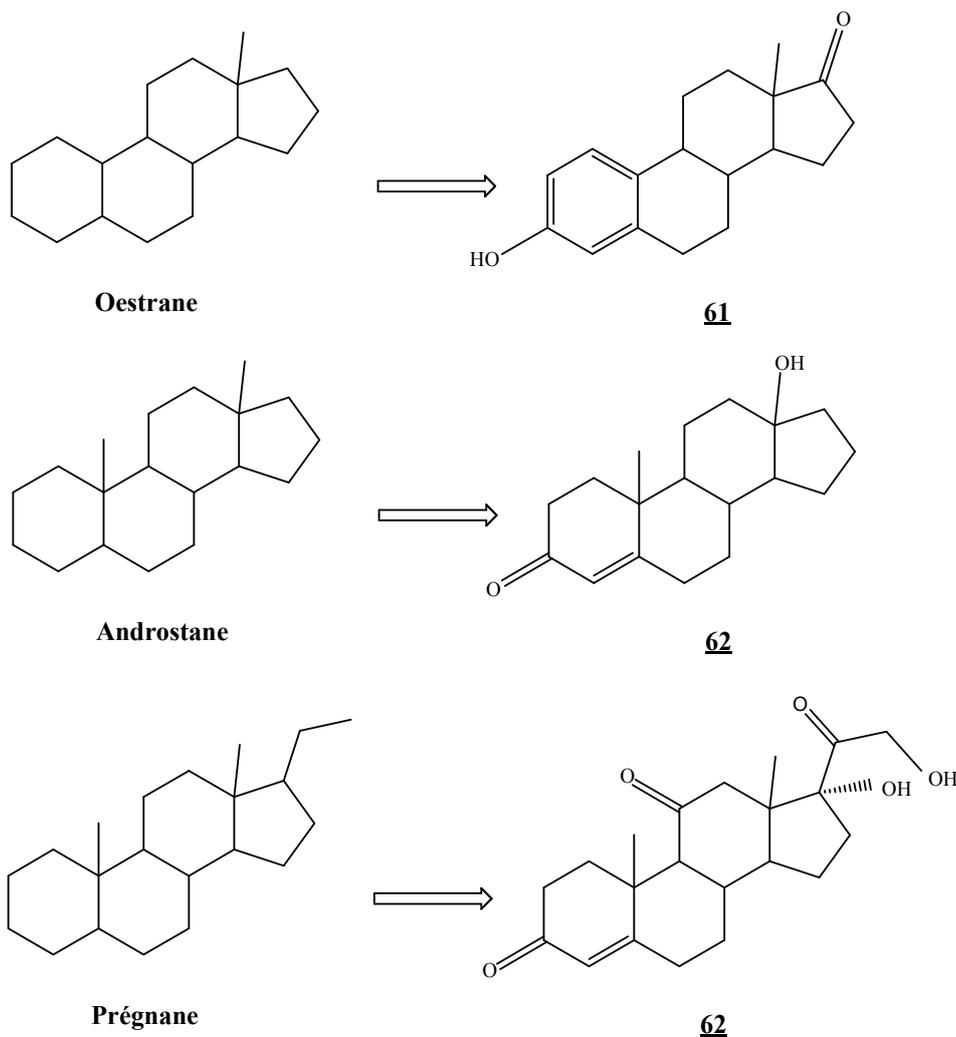
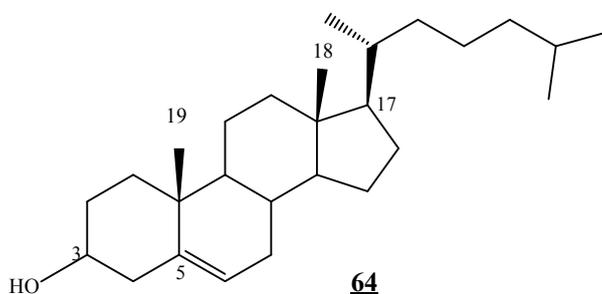


Figure II.9

En utilisant cette nomenclature, il est possible de rattacher tout stéroïde à l'un de ces squelettes ; la jonction *trans* ou *cis* des cycles A et B est précisée par la position des substituants, et indiquée en précisant en plus la stéréochimie de l'hydrogène en position 5 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). Dans cette nomenclature, la cortisone **63** peut également être nommée dihydroxy-17 $\alpha$ , 21 prégène-4 trion-3, 11,20 <sup>[83]</sup>.

La nomenclature de l'insaturation au niveau du squelette stéroïdique, par le symbole  $\Delta_{x,y,z}$  ou  $x,y,z$  indiquent les positions des liaisons insaturées. A titre d'exemple, le nom systématique du cholestérol **64** s'écrit  $\Delta^5$ -cholestane-3ol au lieu de cholest-5ène-3ol. Le groupement fonctionnel prioritaire est ajouté comme un suffixe au nom original du squelette stéroïdique.



## II.4 Stéréochimie

Comme on peut le constater dans le cas du cholestérol **64**, il y a un nombre élevé de carbones asymétriques, ce qui supposerait un grand nombre de stéréo-isomères. Cependant, seuls quelques composés existent à l'état naturel, et ceci est dû au fait que les jonctions entre les cycles B et C sont toujours de type *trans*. Les jonctions entre C et D sont toujours de type *trans*, avec cependant quelques exceptions pour les hétérosides cardiotoniques <sup>[52]</sup> (Figure II.10)

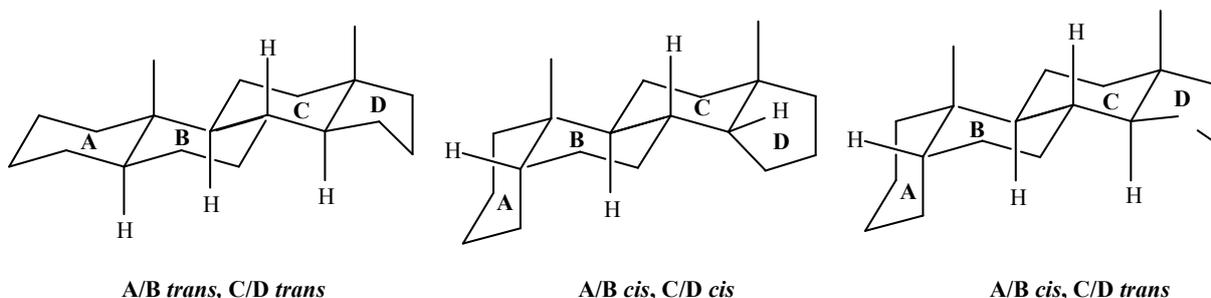
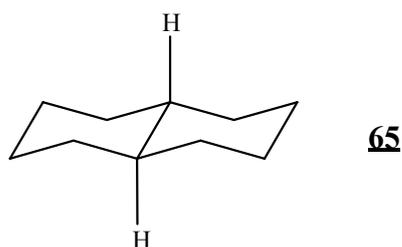


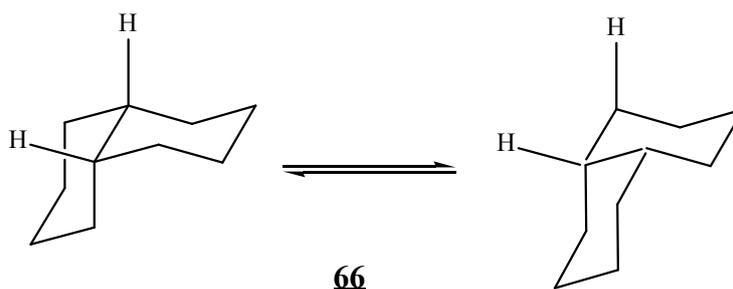
Figure II.10

La jonction entre les cycles A et B peut être soit

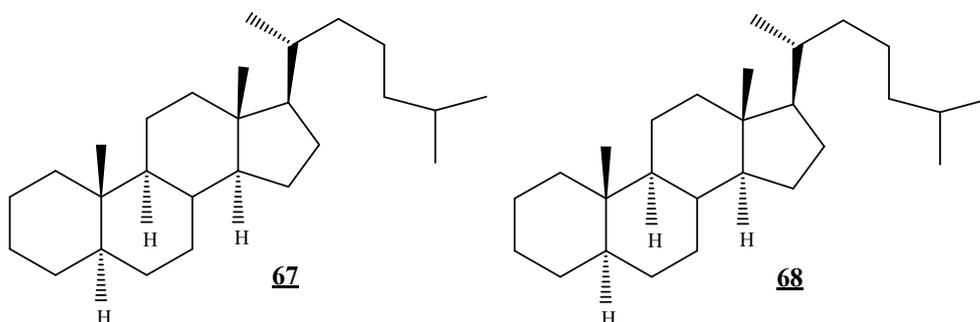
- ✓ de type *trans*, comme dans la *trans* décaline **65**:



- ✓ de type *cis*, comme dans la *cis* décaline **66**:



Le type *trans* comme dans le cholestane **67**, ou *cis* comme dans le cas du coprostanane **68**. Ces deux hydrocarbures proviennent de la réduction du cholestérol **64** et servent de base pour la nomenclature systématique des stéroïdes <sup>[52]</sup>.



Les substituants du noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène peuvent être liés à la face supérieure (espace  $\beta$ ) ou à la face inférieure (espace  $\alpha$ ) <sup>[85]</sup>. Donc dans la chimie des stéroïdes, on parle de série normale dans le cas des stéroïdes rattachés au coprostanane **68**; cette série se rencontre dans les acides biliaires et on l'appelle aussi  $5\beta$  pour montrer que l'hydrogène en position 5 est en  $\beta$ . Pour ceux qui sont rattachés au cholestane **67**, on parle d'allo ( $5\alpha$ ) stéroïdes, comme il est indiqué dans la (figure II.11) <sup>[83]</sup>.

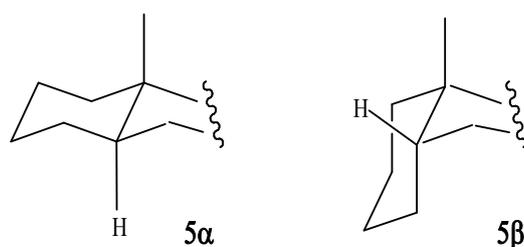


Figure II.11

La représentation de ces molécules dans l'espace montre une structure plutôt plate pour le cholestane **67**, avec des cycles cyclohexaniques en conformation chaise, les méthyles 18 et 19 sont dits angulaires et sont en position  $\beta$ , ce qui est pratiquement toujours le cas dans les stéroïdes <sup>[83]</sup>.

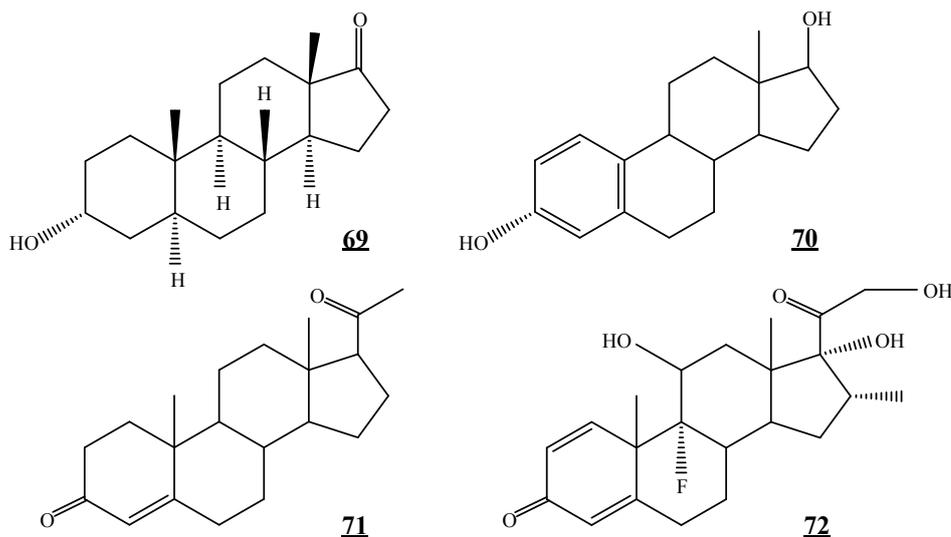
## II.5 Les principaux stéroïdes

Les stéroïdes les plus importants se retrouvent dans les hormones, les acides biliaires et certaines vitamines <sup>[83]</sup>.

### II.5.1 Les hormones

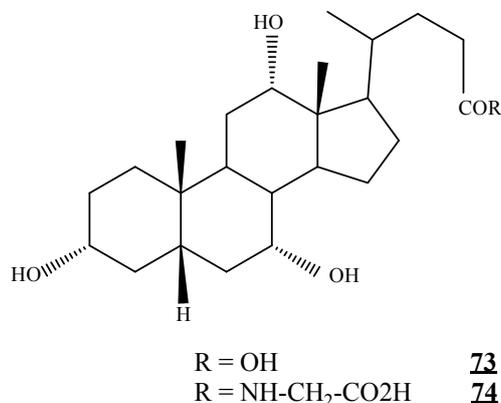
Les hormones sont bio synthétisées à partir du cholestérol. Leurs structures n'ont été élucidées que depuis une cinquantaine d'années en raison de leurs très faibles proportions dans l'organisme. Elles sont de trois types :

- ✓ Les hormones sexuelles mâles qu'on retrouve dans les urines sous forme d'androstérone **69**.
- ✓ Les hormones sexuelles femelles comme l'oestradiol **70**, qui peut donner l'oestrone **61**, dont la présence dans les urines dénote la grossesse. Il y'a aussi les hormones progestatives comme la progestérone **71** dont le rôle est de préparer la nidation et maintenir gestation.
- ✓ Les hormones corticoïdes dont la plus connue est la cortisone **63**, utilisée comme anti-inflammatoire. Elles ont la particularité d'être substituées en position 5 ou 9 comme la dexaméthasone **72**. Elles sont utilisées comme médicaments et se sont avérées plus actives que la cortisone <sup>[83]</sup>.



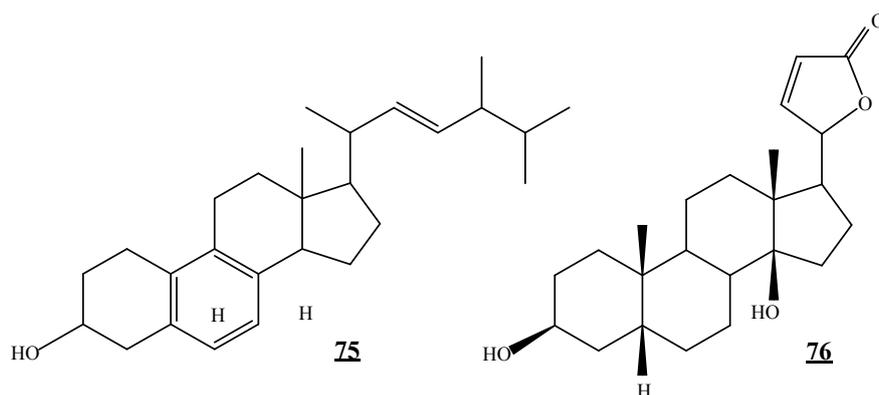
## II.5.2 Les acides biliaires

Les acides biliaires proviennent de la dégradation du cholestérol **64** au niveau du foie et sont secrétés par la bile, d'où leur nom. Le plus important est l'acide cholique **73**, qu'on retrouve sous forme d'acide glycocholique **74**, dont le rôle est l'émulsification des graisses au cours de la digestion <sup>[83]</sup>.



## II.5.3 Autres composés

La vitamine D2 **75** joue un grand rôle dans le métabolisme des ions calcium. On peut citer un stéroïde particulier, la digitoxigénine **76** qui est présente dans certaines plantes sous forme de glycosides (combinaison avec un sucre). Cette dernière a la particularité d'avoir des jonctions *cis* pour A/B et pour C/D; elle sert à préparer la digitaline, qui est un médicament pour les affections cardiaques <sup>[83]</sup>.



## II.6 Définition des stérols

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols <sup>[83,85]</sup>. Ils sont très répandus dans les règnes :

- ✓ **Végétal**, depuis les champignons inférieurs jusqu'aux plantes supérieures <sup>[86]</sup>.
- ✓ **Animal**, de la bactérie aux métazoaires (spongiaires, madrépores, vers, mollusques, insectes, reptiles, mammifères) les plus complexes <sup>[86]</sup>.
- ✓ **Minéral**, dans les sédiments d'origine organique bien qu'en fait provenant initialement de végétaux ou d'animaux <sup>[86]</sup>.

Ils comportent au niveau de leurs structures, un hydroxyle en position C-3 d'orientation  $\beta$ , éventuellement des doubles liaisons, en général une double liaison entre les carbones 5 et 6 ainsi qu'une chaîne latérale rattachée au sommet C-17 <sup>[52]</sup>, par exemple le cholestérol 64.

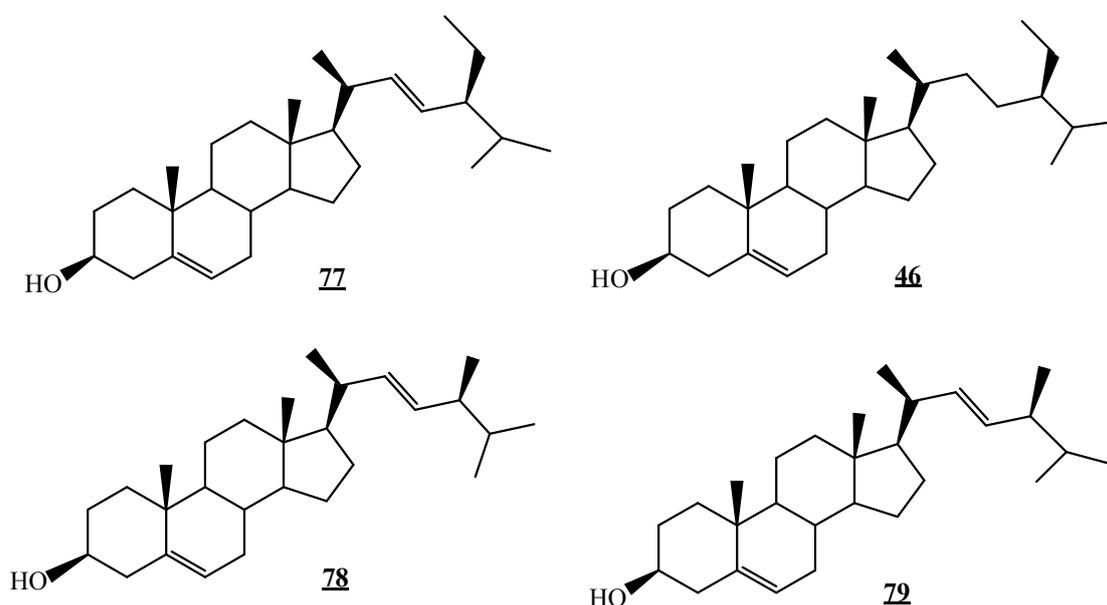
## II.7 Classification et répartition des stérols

Il n'existe, à vrai dire, aucune classification spéciale des stérols. Selon l'origine biologique <sup>[82]</sup>, on a pris l'habitude de répartir les stérols en :

- ✓ **Zoostérols** (stérols chez les animaux)
- ✓ **Mycostérols** (stérols chez les champignons inférieurs)
- ✓ **Phytostérols** (stérols chez les plantes supérieures)
- ✓ **Stérols chez les algues**

## II.8 Définition des phytostérols

Les phytostérols (stérols végétaux) sont des composés naturellement présents dans la partie lipidique (grasse) des plantes <sup>[83,85]</sup>, il existe plus que 100 différents phytostérols <sup>[82]</sup>. Ils apparaissent ainsi comme des graisses végétales identiques en structures au cholestérol 64 (graisse animale), peuvent différer également des stérols par l'alkylation supplémentaire de la chaîne latérale en C-24. Le  $\beta$ -sitostérol 46, le stigmastérol 77, le compèstérol 78 et le brassicastérol 79, en sont la meilleure illustration <sup>[82]</sup>.



## II.9 Biosynthèse des stérols

Elaborés à partir des mêmes précurseurs, les terpènes et les stérols constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux <sup>[87]</sup>.

Les stérols végétaux sont issus, via le squalène, du mévalonate. Tous les terpènes et les stérols, et c'est là un point commun essentiel, peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène: déjà, en 1887, O.Wallach envisageait que les terpènes devaient être construits à partir d'unités isopréniques et, quelques dizaines d'années plus tard (1953), Ruzicka, après plus de trente années consacrées à l'étude des terpènes, transformait cette

hypothèse en une règle générale dont le principe a été, depuis, confirmé expérimentalement. Les stérols sont issus par condensation « tête-à-queue » d'unités isopréniques <sup>[87]</sup>.

Les précurseurs des stérols sont des esters pyrophosphoriques d'alcools en (C5) n formés au premier temps par l'addition séquentielle d'une unité en C5, le pyrophosphate d'isopentényle (IPP), sur une molécule *starter*, un pyrophosphate de prénil allylique, le premier terme de la série étant le pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP), ce qui les différencie par rapport aux terpènes c'est la suite de dégradation et de réarrangements du squelette triterpénique <sup>[87]</sup>.

### Biosynthèse de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA

Initialement, le marquage isotopique permet de montrer que le squelette carboné des terpènes provenait de l'acétate. Ultérieurement, il fut démontré que l'acide mévalonique devait être un précurseur universel de ces composés. L'étape initiale du processus implique la condensation de deux molécules de l'acétyl-CoA : formation de l'acéto-acétate coenzyme A (Claisen) et condensation (aldolique) de celui-ci avec une molécule d'acétylcoenzyme A pour former 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) (Schéma II.1.1) <sup>[87]</sup>.

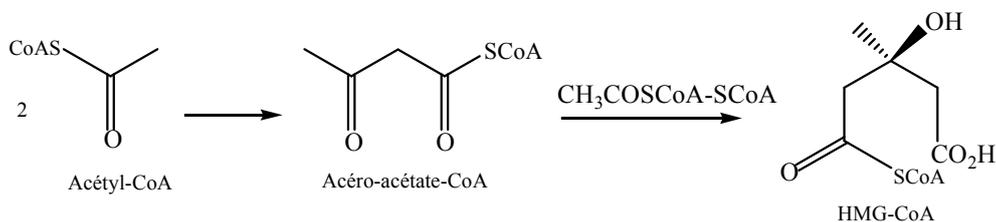


Schéma II.2

Une autre enzyme, l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A-réductase, effectue la réduction NADPH-dépendante du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) formé en acide 3R-mévalonique (MVA) (Schéma II.3) <sup>[87]</sup>.

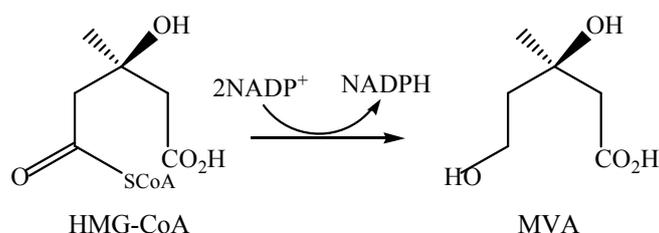


Schéma II.3

## Biosynthèse du squalène à partir de l'acide mévalonique

La conversion de l'acide mévalonique en structures hémiterpéniques débute par une double phosphorylation (Schéma II.4) <sup>[87]</sup>.

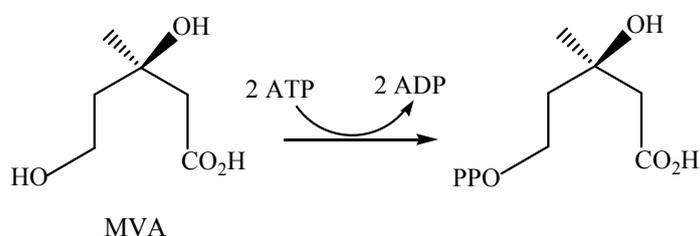


Schéma II.4

Une nouvelle phosphorylation permet d'introduire un bon groupe partant, le groupe pyrophosphate dont l'élimination assistera la décarboxylation : la mévalonate 5diphosphatédécarboxylase induit la formation du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) (Schéma II.5) <sup>[87]</sup>.

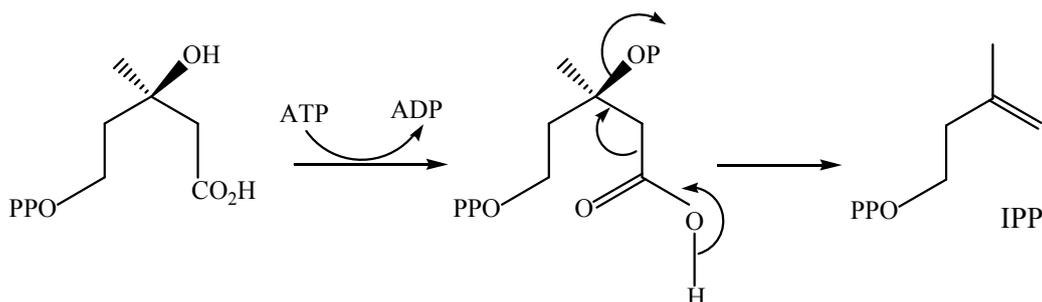


Schéma II.5

L'isopenténylpyrophosphate (IPP) est isomérisé par l'isopentényldiphosphate (DMAPP). Le réarrangement allylique 1,3 implique l'addition d'un proton du milieu et l'élimination du proton *pro-2R* (Schéma II.6) <sup>[87]</sup>.

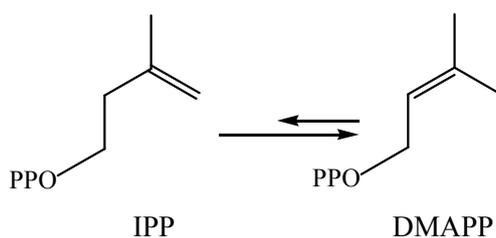


Schéma II.6

Ce DMAPP est hautement réactif : il est susceptible de subir une attaque nucléophile en C-1 avec départ concomitant du groupe pyrophosphate ; l'attaque peut être le fait d'une molécule d'IPP ou de toute autre molécule réactive <sup>[87]</sup>.

L'addition du DMAPP sur la double liaison de l'IPP est catalysée par une prényltransférase, la GPP-synthase; la réaction implique l'ionisation du pyrophosphate d'allyle et le départ du groupe pyrophosphate qui permet l'attaque électrophile simultanée et stéréosélective du carbocation allylique formé sur la double liaison du pyrophosphate d'isopentényle. La condensation s'accompagne de l'élimination d'un proton H *pro-2R* de l'IPP. La même réaction de prénylation peut se poursuivre : l'addition du GPP sur un IPP conduit au farnésylpyrophosphate (FPP) et ainsi de suite pour former la série des pyrophosphates de prényls allyliques homologues. L'élongation est catalysée par des prényl-transférases dont certains sont spécifiques pour une longueur de chaîne donnée [87].

Les stérols proviennent du squalène issu du couplage queue à queue de deux unités de FPP (2 x C<sub>15</sub> = C<sub>30</sub>). Le mécanisme de ce couplage « queue à queue » n'a été que tardivement élucidé avec l'isolement d'un autre intermédiaire, le pyrophosphate de présqualène. La structure cyclopropanique de ce dernier permet de penser que la liaison C-2-C-3 d'un FPP est alkylée par une autre molécule de FPP et que l'élimination d'un proton conduit à la formation du cyclopropane. Si le milieu est déficient en NADPH, le pyrophosphate de squalène s'accumule; dans le cas contraire il se réarrange en squalène, sans doute par l'intermédiaire d'un carbocation cyclobutanique (Schéma II.7) [87,88].

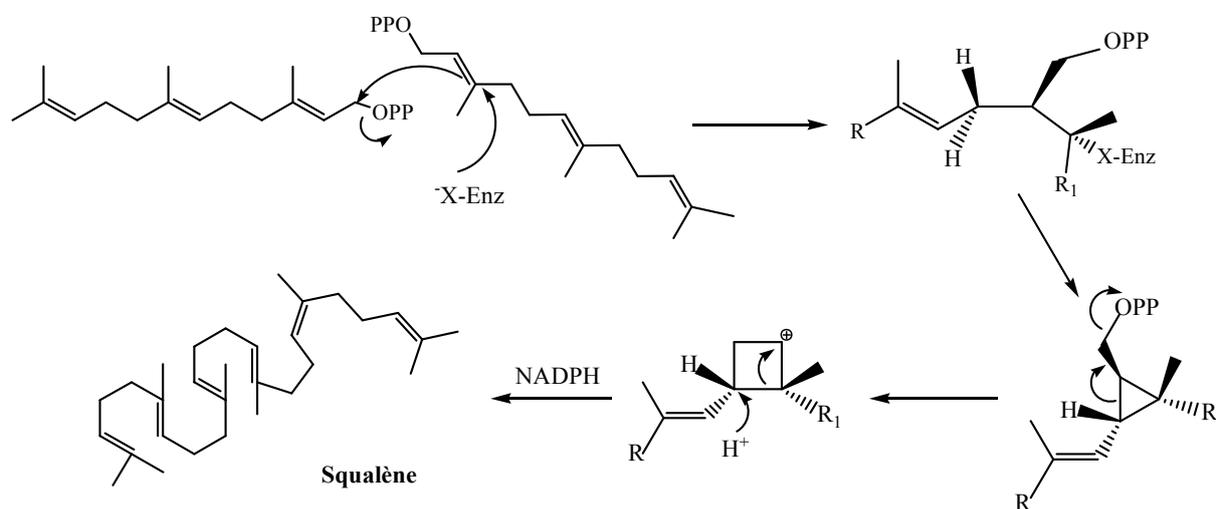


Schéma II.7

### Biosynthèse de l'époxy 2,3-squalène à partir du squalène

Le squalène époxydase catalyse alors une réaction d'oxydation de la molécule pour former la fonction 3β-alcool caractéristique des stérols.

Cette réaction porte sur la liaison éthylénique entre les carbones 3 et 4 du squalène. L'oxygène de la respiration sert d'oxydant : un des atomes d'oxygène formera un pont époxyde entre les carbones 3 et 4, tandis que l'autre formera une molécule d'eau avec les deux hydrogènes apportés par un NADPH et un proton (Schéma II.8) [88,89].

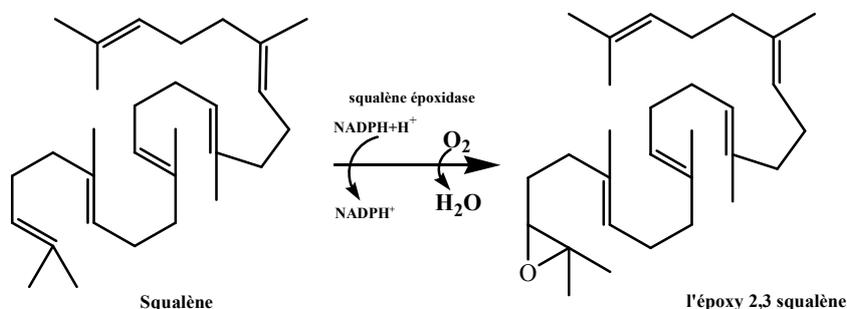


Schéma II.8

L'époxydation du squalène peut produire aussi des 24,25-époxy-squalènes, conduisant aux oxystérols (25-hydroxy cholestérol, par exemple) [89].

De la conformation initiale de l'époxy 2,3-squalène, dépend l'orientation de la biosynthèse vers les stérols d'une part et les triterpènes, d'autre part. Il apparaît ainsi que:

- ✓ Si l'époxy 2,3-squalène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane qui se réarrange ensuite en cycloarténol ou lanostérol.
- ✓ Si l'époxy 2,3-squalène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation, ce dernier peut subir un réarrangement, formant un cycle supplémentaire qui conduit aux triterpènes penta cyclique [52].

### Biosynthèse des stérols à partir de l'époxy 2,3-squalène

Chez les animaux le squalène 2,3 oxide est convertit en lanostérol, cette réaction arrive aussi dans les levures et les champignons. Tandis que le premier composé formé, chez les plantes supérieures et les algues, est le cycloarténol, isomère du lanostérol et possédant un cyclopropane au lieu de la double liaison  $\Delta^8$  (Schéma II.9) [52, 88, 90].

Chez les plantes supérieures, le cycloarténol peut être transformé aussi en cholestérol par la décyclisation du cyclopropane, désaturation des carbones 5 et 6, et enfin réduction de la double liaison  $\Delta^{24}$  (Schéma II. 9) [85].

Le passage du cycloarténol aux derniers stérols se produit dans trois étapes de

déméthylation en positions C-4 et C-14 du squelette des stérols [91].

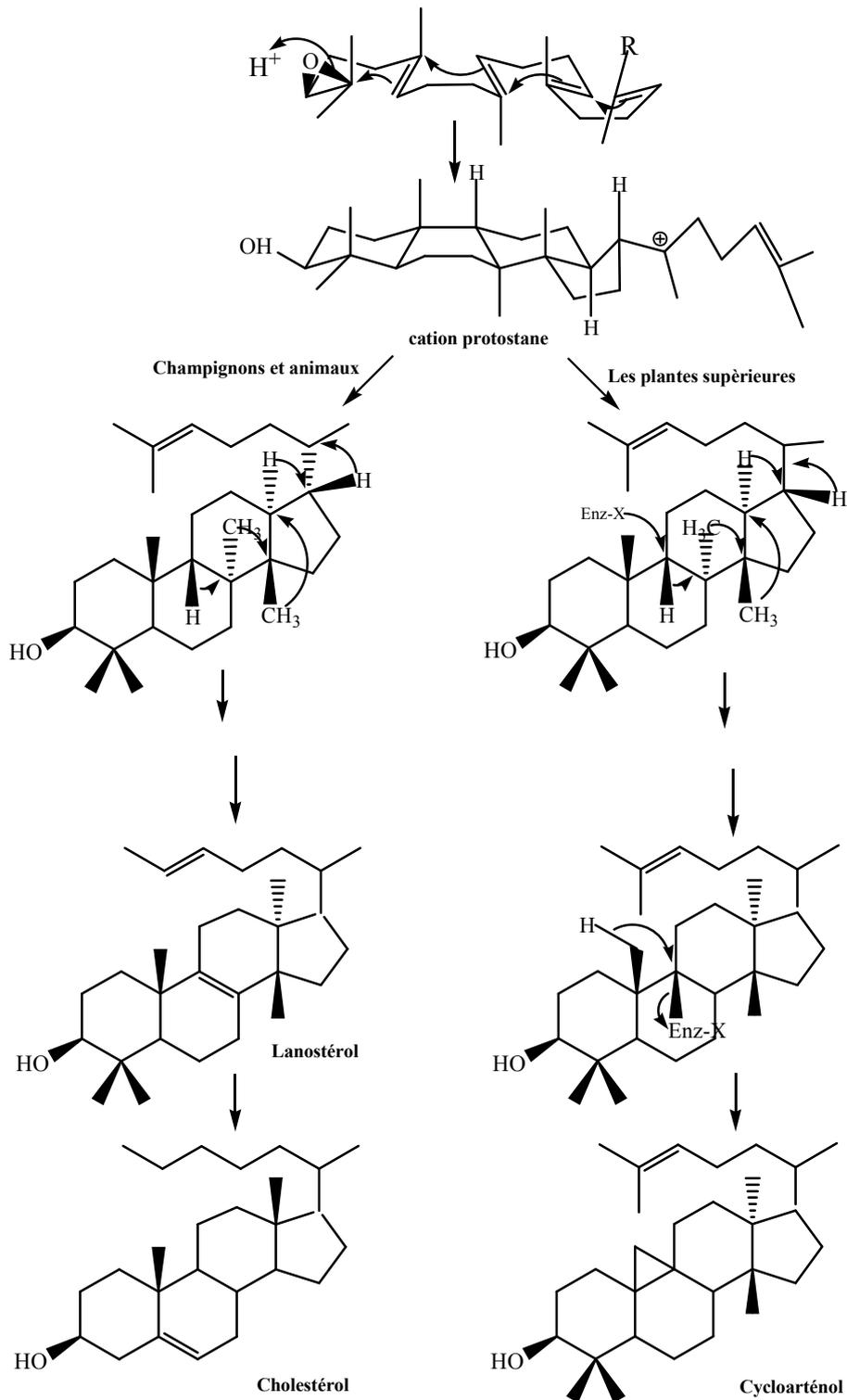
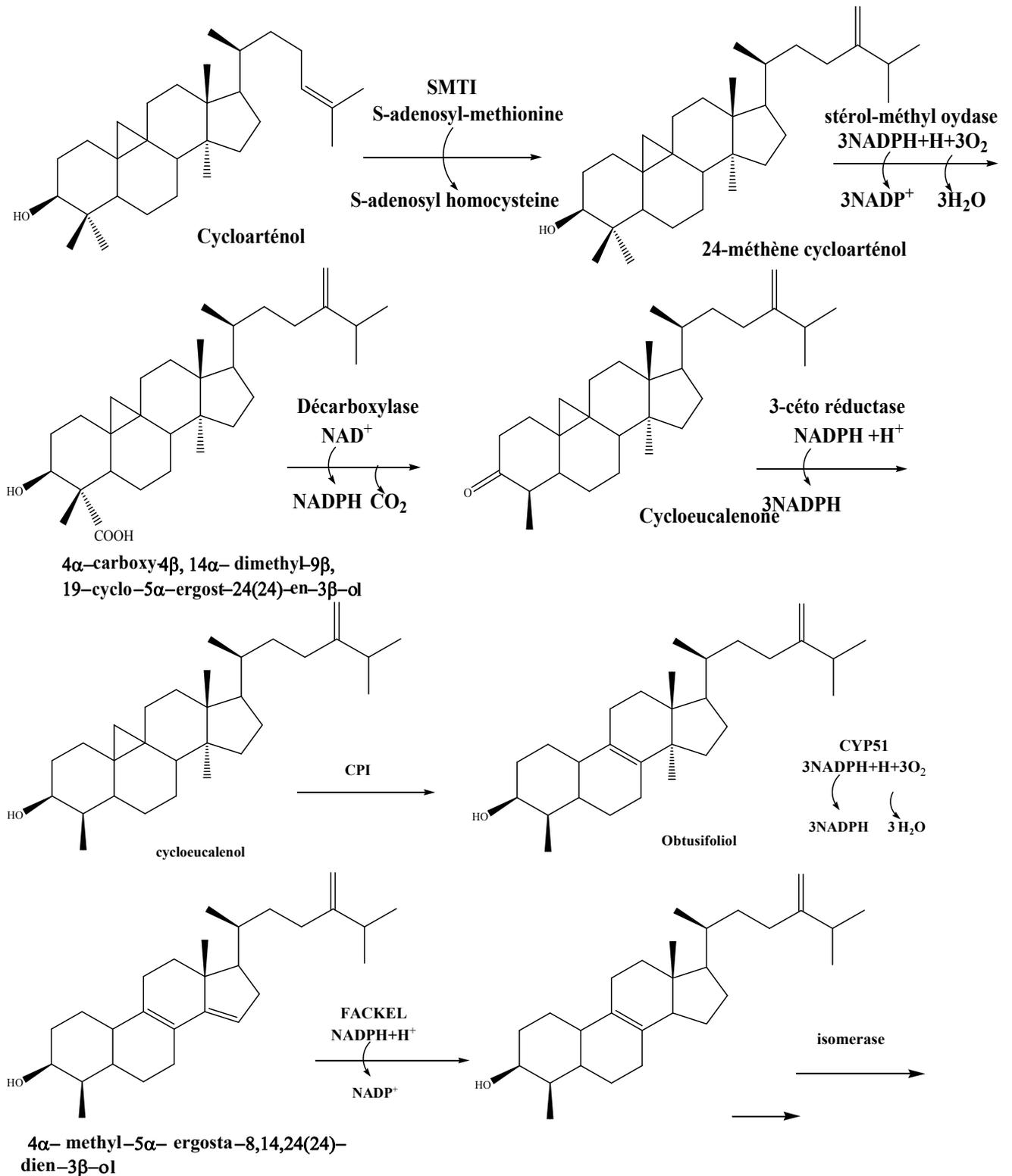
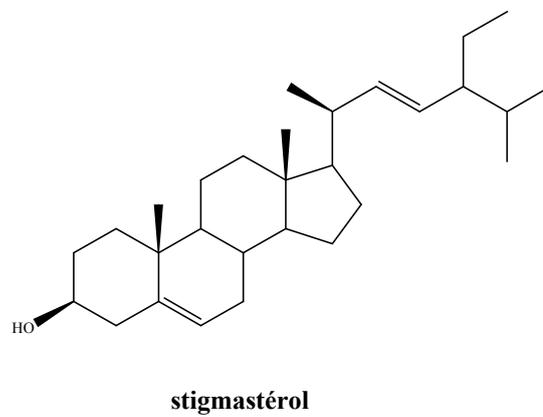
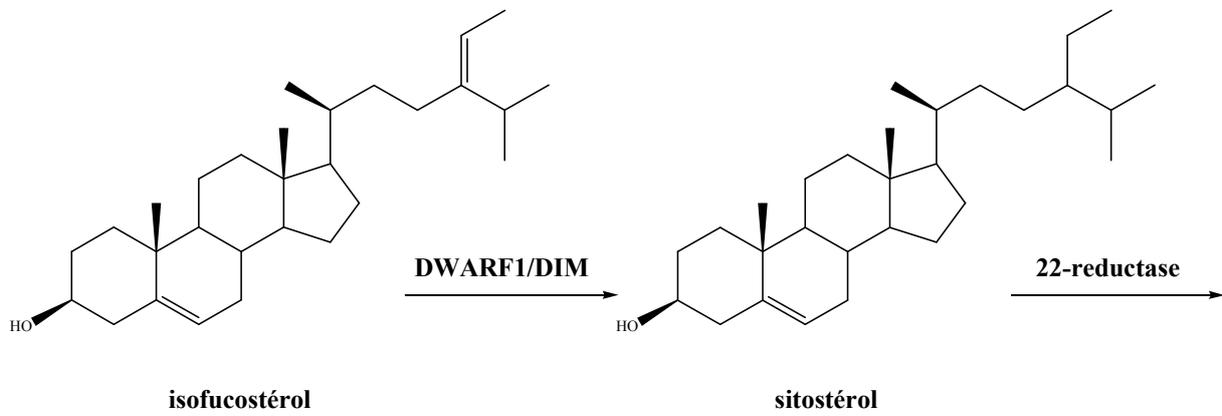
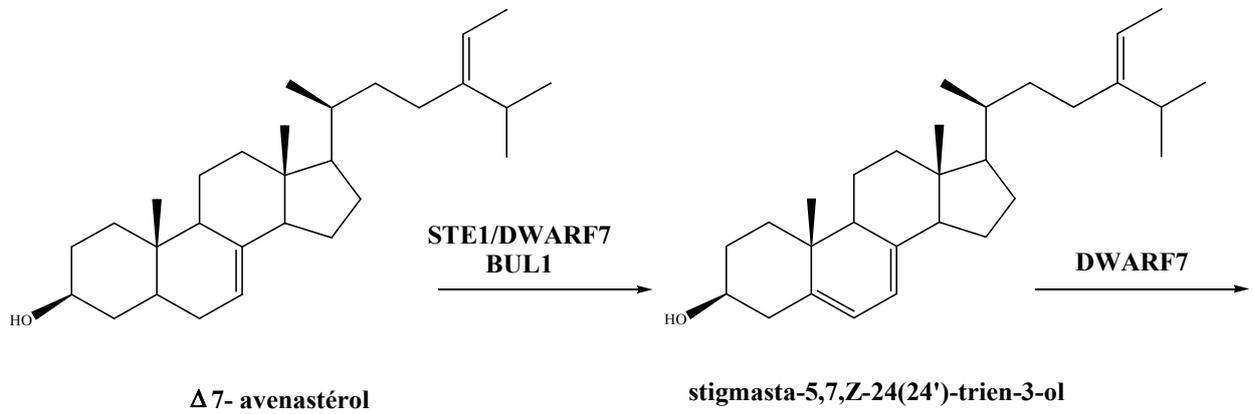
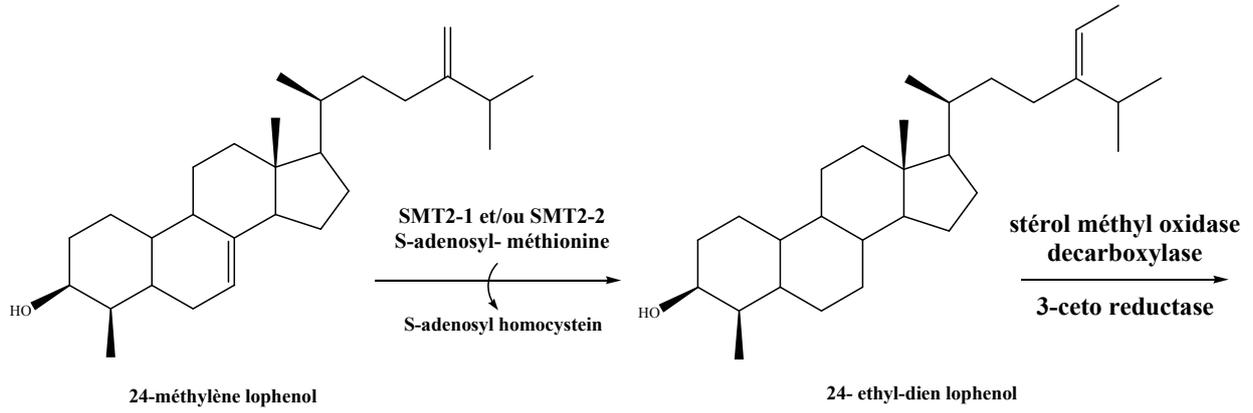


Schéma II.9

Le schéma II.10 présente les progressions les plus importantes qui se développent entre le cycloartérol et le stigmastérol [91].





SMT1,SMT2 = stérol-méthyltransférases; FACKEL =  $\Delta 8,14$ -stérol- $\Delta 14$ -réductase; STE1/DWARF7/BUL1 =  $\Delta 7$ -stérol-C5(6)-désaturase; DWARF5 =  $\Delta 5,7$ -stérol- $\Delta 7$ -réductase; DWARF1/DIM =  $\Delta 5$ -stérol-  $\Delta 24$ -réductase(isomérase); CPI = cyclopropyl stérol isomérase; CYP51 = obtusifoliol-14 $\alpha$ -diméthylase.

**Schéma II.10** : Voie de biosynthèse des stérols chez les plantes

## II.10 Propriétés pharmacologiques des stérols

Les produits enrichis en phytostérols sont présentés comme aidant à la réduction du taux de cholestérol sanguin. L'excès de cholestérol qui touche près un adulte sur 5 est un des facteurs de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Grâce à leur structure proche de celle du cholestérol, les phytostérols entrent en compétition avec lui dans l'intestin et empêchent son absorption. Le sitostérol est prescrit comme drogue pour diminuer le cholestérol aux années 1950, mais sa moindre solubilité et bioavabilité a fait rapidement diminuer son utilisation. Cependant, la solubilité des phytostérols a été améliorée par estérification, ceci est remarqué dans le premier produit commercial des phytostérols contenant les margarines. Des études ont dévoilé, par la suite, que 2-3 g/jour du phytostanyl ester, contenant la margarine a constamment réduit le taux du cholestérol <sup>[61]</sup>.

Chez les animaux, le cholestérol contribue à la structure des membranes. Il est aussi le précurseur de plusieurs molécules bioactives importantes : les acides biliaires, qui sont produits dans le foie et qui émulsionnent les graisses alimentaires en vue de leurs digestion et de leur absorption intestinale; des hormones stéroïdes produites par des cellules endocrines (ex. surrénales, ovaires, testicules); la vitamine D3 produite dans la peau et les reins. Les arthropodes ont besoin de cholestérol et d'autres stérols pour produire des membranes et des hormones ecdystéroïdes, qui contrôlent le développement <sup>[92,93]</sup>.

Le stigmastérol et le stigmastérol 3 $\beta$ -glucoside, isolés de la plante *Hertia cheirifolia*, présentent une activité anti-inflammatoire <sup>[94]</sup>. Le stigmastérol, a des effets antiperoxydative et antidiabétique, il est considéré aussi comme inhibiteur de thyroïde <sup>[95]</sup>.

Les stérols aminés 6-aminocholestanols et 25-aminocholestéro montrent successivement une activité antimicrobienne et une activité antifongique très élevée <sup>[89]</sup>.

*Chapitre III*

*Résultats et discussions*

### **III.1. Extraction**

Les procédés d'extraction sont basés sur la différence de solubilité des composés présents dans un solvant. Nous nous intéressons ici à l'extraction à partir d'un système solide, c'est la plante.

Les parties aériennes de la plante sont séchées puis finement broyées. La poudre obtenue (900g) est mise à macérer pendant 48 heures sous vive agitation à température ambiante dans un mélange méthanol-eau (80/20 : v/v). Cette opération est répétée trois fois avec un renouvellement du solvant. Après filtration et concentration à chaque fois, la phase aqueuse obtenue subit une série d'extraction liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante ; l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol. Les phases organiques obtenues sont filtrées et évaporées à sec. On a obtenu à la fin de cette procédure : 4g d'extrait éthéropétrolique qui extraire dans son contient la chlorophylle et les lipides, 9g de l'extrait d'acétate d'éthyle qui renferme un grand nombre de composés moyennement polaires et 40 g d'extrait butanolique qui regroupe les composés les plus polaires et la majorité des hétérosides.

Le protocole général de cette opération est schématisé ci-après (schéma III.1)

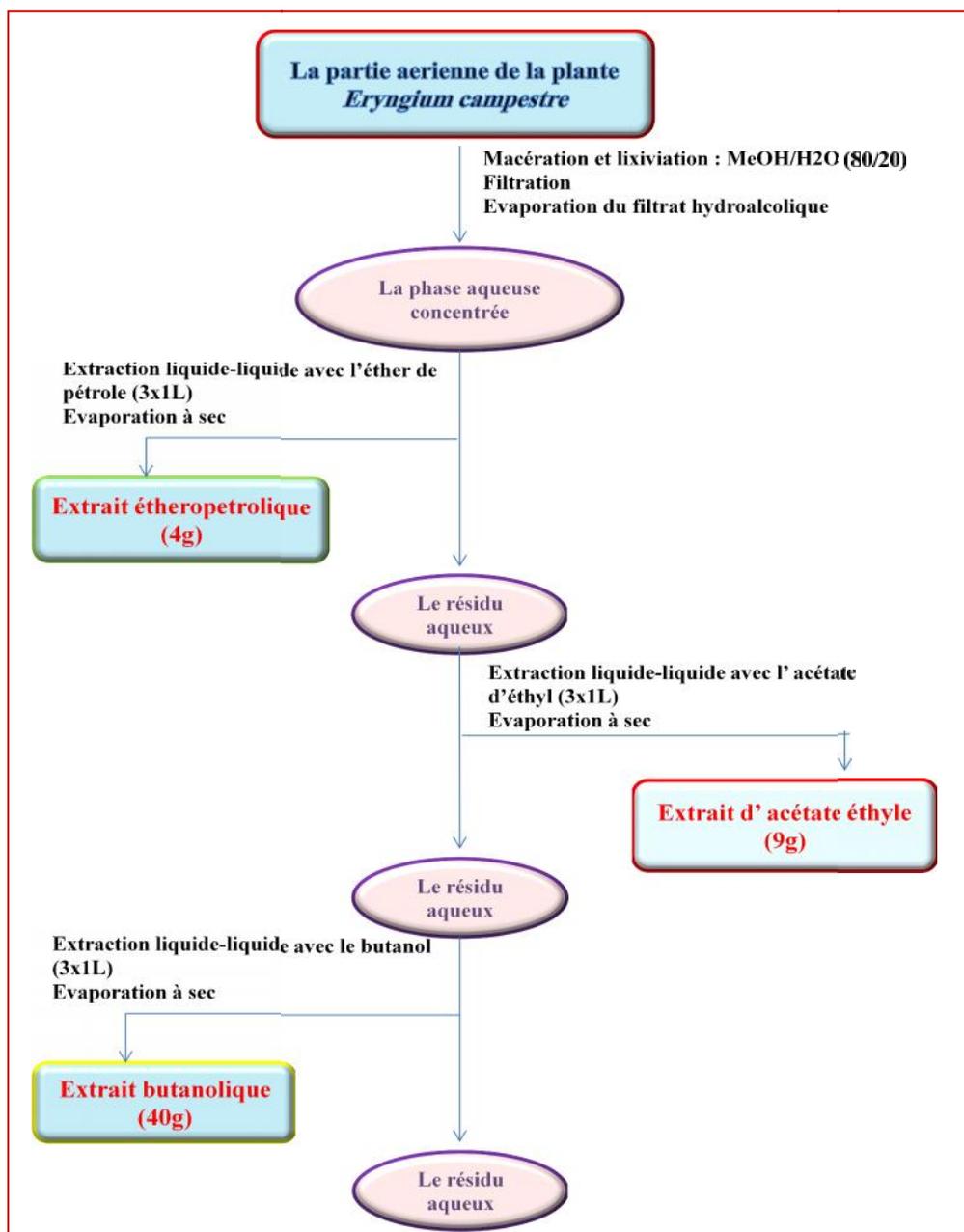


Schéma III.1 : Schéma générale de protocole de l'extraction

### III.2 Séparation et purification

Après une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des trois extraits, il apparaît que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus tenant à étudier en premier, en raison de sa richesse en métabolites secondaires.

Deux (2g) de l'extrait d'acétate d'éthyle a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale, en utilisant comme système d'élution le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  à différentes polarités. Après l'examen des fractions collectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) en phase normale et en phase inverse, et après

leurs révélation par une solution de sulfate de cérium, nous avons récupéré 11 fractions (F1-F11).

La fraction F7 (185,6 mg) révèle sur sa plaque CCM deux taches majoritaires dans une traînée. Par suite, une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale a été réalisée sur cette fraction élue par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et en augmentant progressivement la polarité avec le méthanol. Cette opération nous a permis d'obtenir six fractions (G1-G6).

La fraction G1 se précipite dans le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (90\10), ce qui nous a permis d'obtenir le composé **A** (25.5 g) de cette fraction.

La fraction G5 présente deux tâches visibles sur CCM en phase inverse (RP 18) (éluant  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  : 7:3) et qui se révèlent par la solution de sulfate de cérium en donnant une coloration jaune, ce qui suggère à première vue une nature flavonoïdique à ces composés, qu'est fréquemment présente dans notre genre. Les essais de séparation de cette fraction sur colonne normale de gel de silice n'a abouti à voir des composés purs, et par conséquence, cette fraction a été mise à séparer par une chromatographie liquide à haute performance sur silice en phase inverse (HPLC). L'éluant utilisé est le système  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , en augmentant progressivement la polarité par le MeOH, ce qui nous a permis à isoler deux composés à l'état pur, **B** (1 mg,  $t_R=12,5$  min) et **C** (1,6 mg,  $t_R=17,5$  min). Le chromatogramme de cette opération est illustré dans la figure III.1. D'autres composés qui sont isolés de cette fraction comme le montre le chromatogramme, sont minoritaires. Qu'on n'a pas pu d'enregistrer leurs spectres en raison de leurs quantités faibles.

Sur la plaque CCM en phase inverse de la fraction F9 (135mg), montre une tâche majoritaire. Elle a été soumise à une colonne de filtration sur gel de silice, et élue avec le système d'éluant  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (7:3), ceci a permis l'isolement du composé **D** à l'état pur (73,3 mg,  $R_f=0,4$ ).

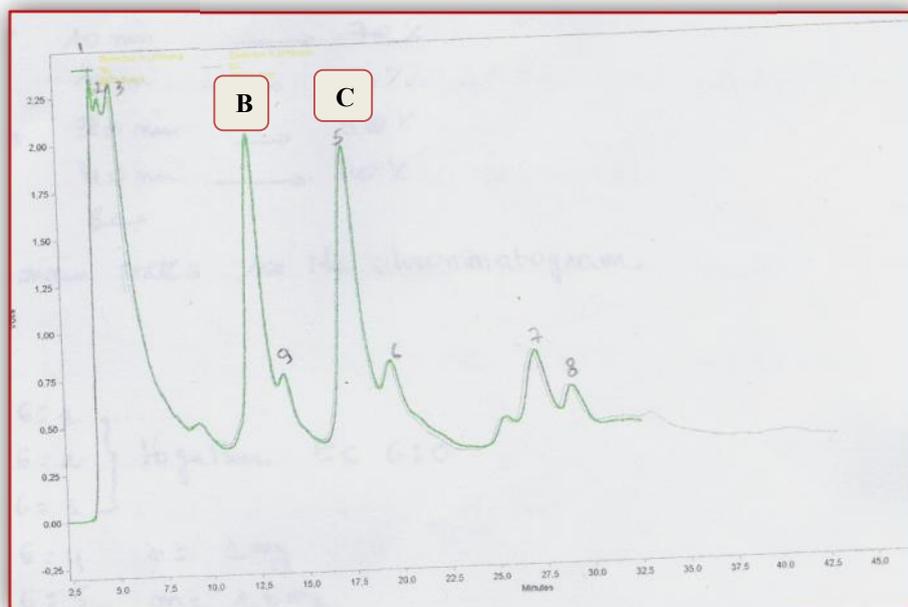
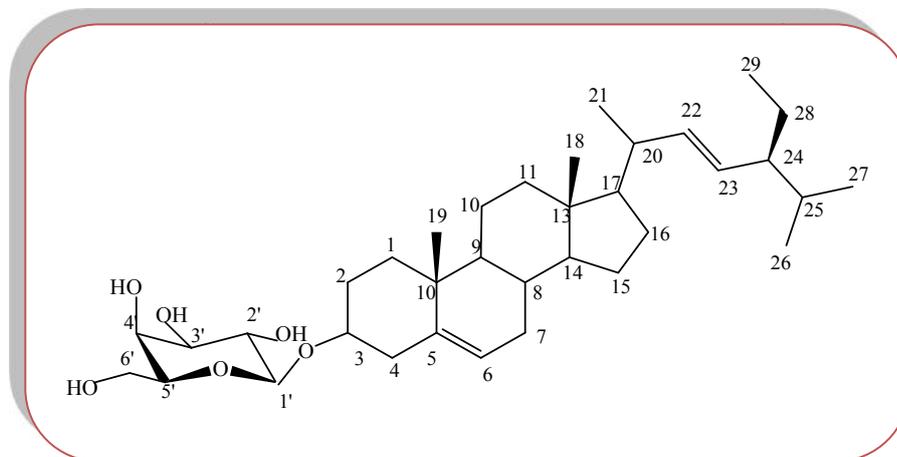


Figure III.1 : Chromatogramme des composés B et C isolés par HPLC

### III.3 Détermination des structures

#### III.3.1 Détermination structurale du composé A

##### Composé A



Ce composé, invisible en UV, a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans un mélange de chloroforme/méthanol avec chauffage.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré à 400 MHz dans l'acétone deutéré C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O (figures III.2) permet l'observation des principaux signaux caractéristique d'un squelette stéroïdique suivants :

- Deux signaux à  $\delta_H = 0,68$  et  $0,92$  ppm chacun sous forme d'un singlet sont attribuables respectivement aux protons méthyliques H-18 et H-19.

- Trois signaux sous forme d'un doublet à  $\delta_H = 0,97$  ppm ( $J = 6,8$  Hz),  $\delta_H = 0,85$  ppm ( $J = 6,4$  Hz) et  $\delta_H = 0,69$  ppm ( $J = 6,4$  Hz), correspondent respectivement aux protons méthyliques H-21, H-26 et H-27.
- Le signal à  $\delta_H = 0,92$  ppm ( $J = 7,0$  Hz) sous forme de triplet correspond à H-29.
- Le signal sous forme de doublet large à  $\delta_H = 5,34$  ppm ( $J = 5,3$  Hz) correspond à un proton oléfinique H-6.
- Deux signaux chacun sous forme d'un doublet de doublets repérés à  $\delta_H = 5,12$  ( $J_{trans} = 15,2$  et  $J_{cis} = 8,4$  Hz) et  $\delta_H = 5,01$  ( $J_{trans} = 15,2$  et  $J_{cis} = 8,4$  Hz), sont attribuables respectivement à H-22 et H-23.
- Le signal sous forme d'un doublet à  $\delta_H = 4,23$  ppm ( $J = 5,3$  Hz) et l'ensemble des signaux dans la région 2,9 - 3,8 ppm suppose la présence d'une unité osidique. La grande valeur de constante de couplage du proton anomérique  $J_{1'',2''} = 6,3$  Hz indique qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$ .

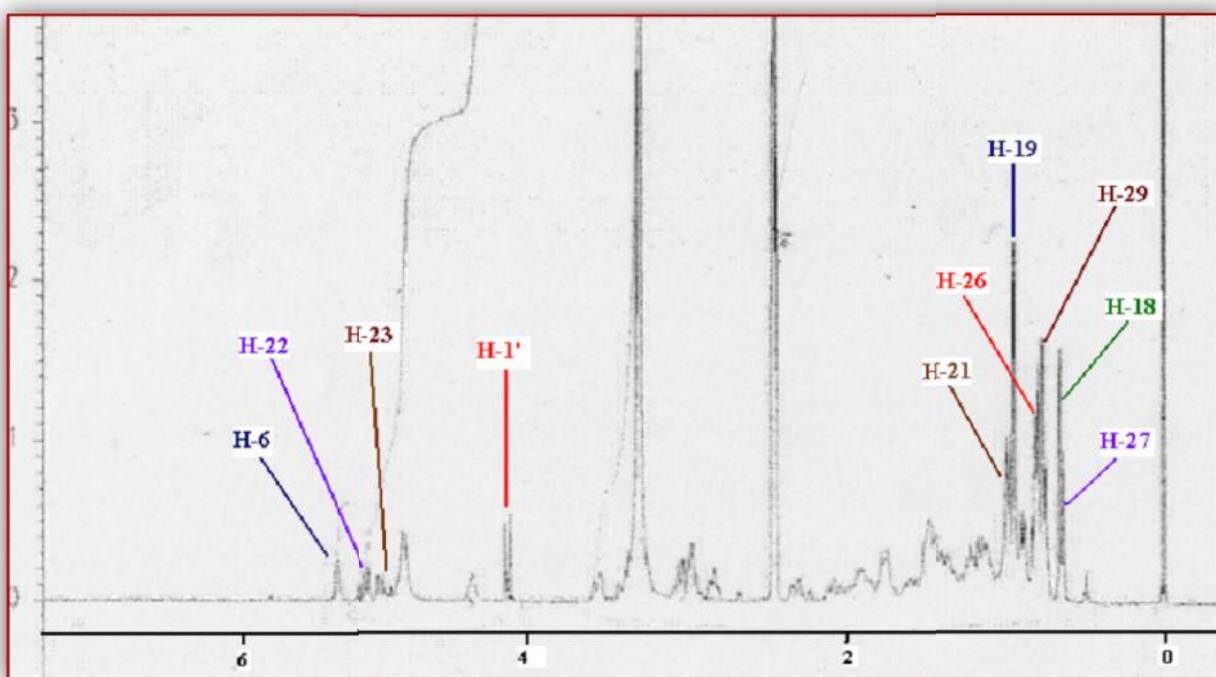


Figure III.2 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé A (400 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ )

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$  modulé (figure III.3). En effet on observe la présence de 29 atomes de carbones avec en particulier les signaux suivants :

- Le signal apparaissant à  $\delta_C = 142,7$  ppm attribuable à un carbone quaternaire C-5

- ♣ Les signaux apparaissant à  $\delta_C = 121,1$  ;  $128,7$  et  $138,0$  ppm sont attribuables à des CH vinyliques (C-6, C-23, C-22).
- ♣ Le signal apparaissant à  $\delta_C = 100,73$  correspond à un carbone anomérique du glucose (C-1').
- ♣ Les signaux apparaissant à  $\delta_C = 71,1$  ;  $73,5$  et  $77,9$  ppm correspondent à des groupements osidiques CH.
- ♣ Le signal apparaissant à  $\delta_C = 60,7$  ppm correspond à un groupement oléfinique CH<sub>2</sub> du sucre.
- ♣ Le signal apparaissant à  $\delta_C = 80,2$  ppm correspond à un groupement oxyméthine en position C-3. La valeur du déplacement chimique de ce dernier indique qu'il est le point de branchement de la génine avec le sucre.

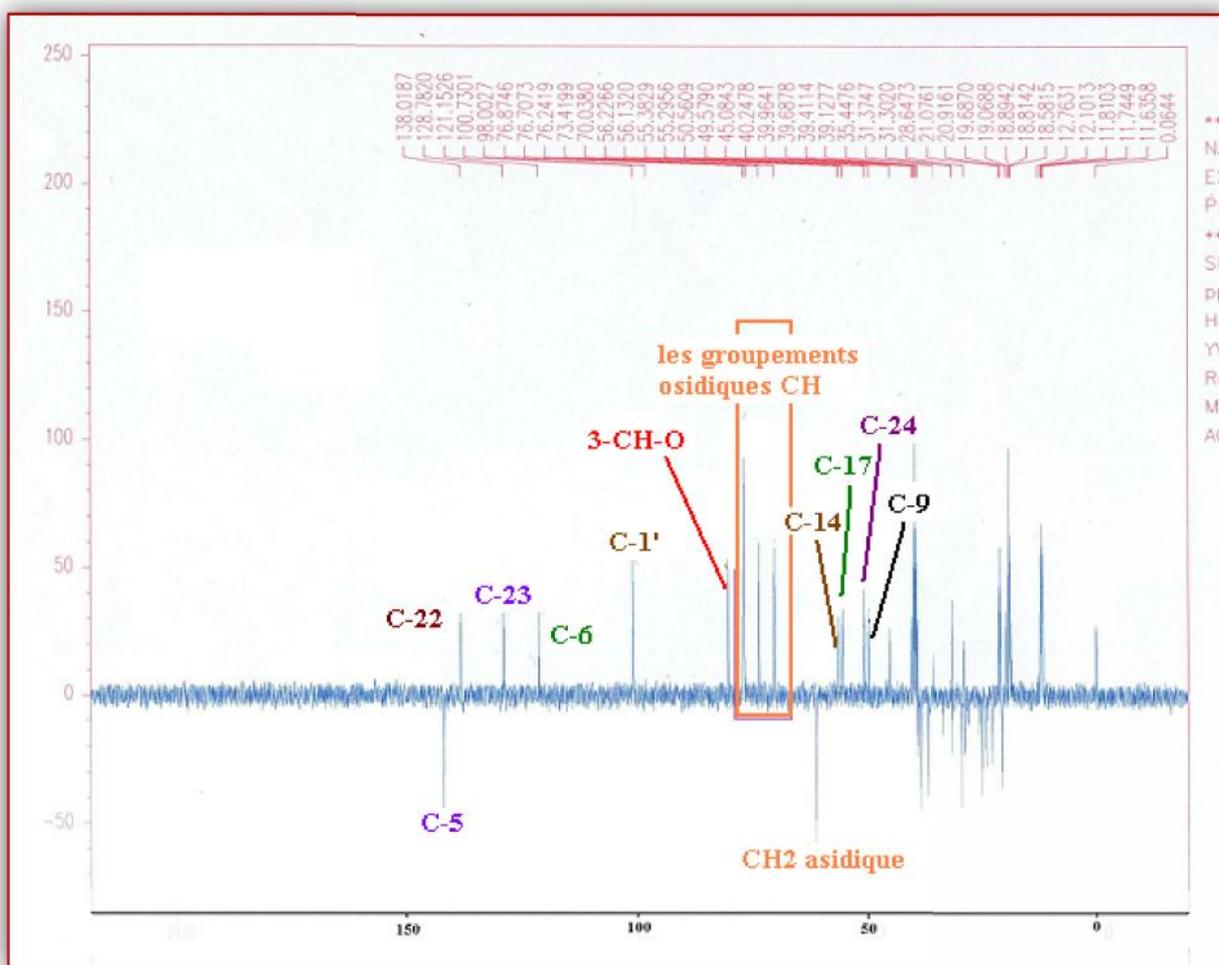
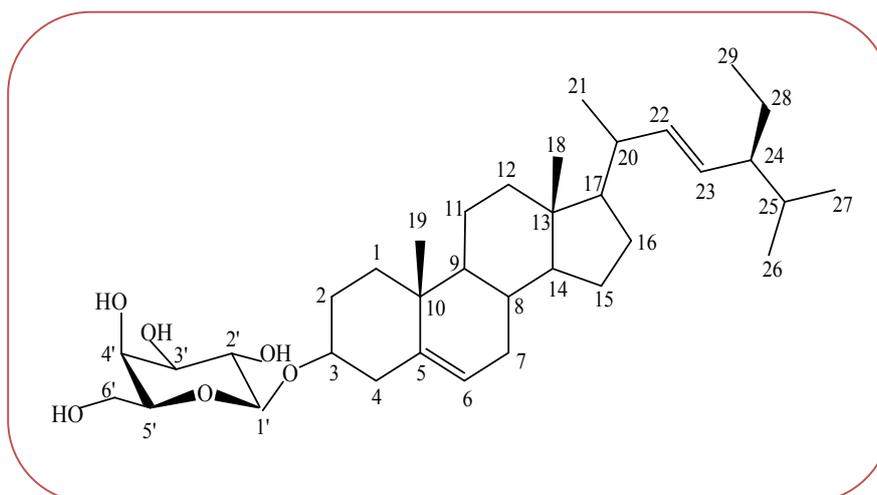


Figure III.3 : Spectre du carbone <sup>13</sup>C J-modulé du composé A (400 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis, de donner sans hésitation la structure suivante au produit A. Il s'agit du 24-éthyle-cholest-5,22-diène-3β-D-glycopyranosyde appelé également Stigmastérole-3β-D-glycopyranosyde.



**Composé A : Stigmastérole-3β-D-glycopyranoside**

Le tableau 6 suivant regroupe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé:

N°	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1	1,09-1,86	<i>m</i>	37,8
2	1,5-1,85	<i>m</i>	31,7
3	3,56	<i>tt</i> ; 11,3-4,7	80,2
4	2,39	<i>m</i>	42,5
5	/		142,7
6	5,34	<i>d</i> ; 5,3	121,15
7	1,49-2,2		31,3
8	1,54		31,9
9	1,98		50,9
10	/		36,5
11	1,44		21,6
12	1,15-2,13		39,8
13	/		42,1
14	1,12		56,8
15	1,24-1,54	<i>m</i>	24,7
16	1,09-1,61	<i>m</i>	28,6
17	1,17		56,3

<b>18</b>	0,68	<i>s</i>	12,1
<b>19</b>	0,92	<i>s</i>	19,5
<b>20</b>	1,95		40,7
<b>21</b>	0,97	<i>d</i> ; 6,8	21,4
<b>22</b>	5,12	<i>dd</i> ; 15,2 ; 8,4	138,01
<b>23</b>	5,02	<i>dd</i> ; 15,2 ; 8,4	128,73
<b>24</b>	1,58		50,2
<b>25</b>	1,49		32
<b>26</b>	0,85	<i>d</i> ; 6,4	21,7
<b>27</b>	0,69	<i>d</i> ; 6,4	19,8
<b>28</b>	1,26-1,52	<i>m</i>	26,1
<b>29</b>	0,92	<i>t</i> ; 7,0	13
<b>1' (3-O-Glu)</b>	4,23	<i>d</i> ; 6,3	100,73
<b>2'</b>	3,32		/
<b>3'</b>	3,56		73,5
<b>4'</b>	3,39		71,1
<b>5'</b>	3,31		77,9
<b>6'</b>	3,86		60,7
	3,69		

Tableau III.1 : Déplacement chimiques des protons et carbones du composé A (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)

### III.3.2 Elucidation structurale du composé B

Le composé **B**, visible dans l'UV, a été obtenu également sous forme d'une poudre jaune soluble dans un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure III.4) enregistré à 400 MHz dans le méthanol deutéré du composé **B** montre des signaux dans l'intervalle de 6,25 ppm jusqu'à 7,93 ppm correspondant à des protons aromatiques, et des signaux dans l'intervalle de 3,20 à 5,30 ppm correspondant à des protons osidiques. Cette première analyse des protons suppose que notre produit est un flavonoïde glycosylé. Le composé porte un groupement méthoxy  $\text{OCH}_3$  par la présence d'un signal intense résonant à  $\delta_{\text{H}} = 4,97$  ppm et intégrant pour 3 protons.

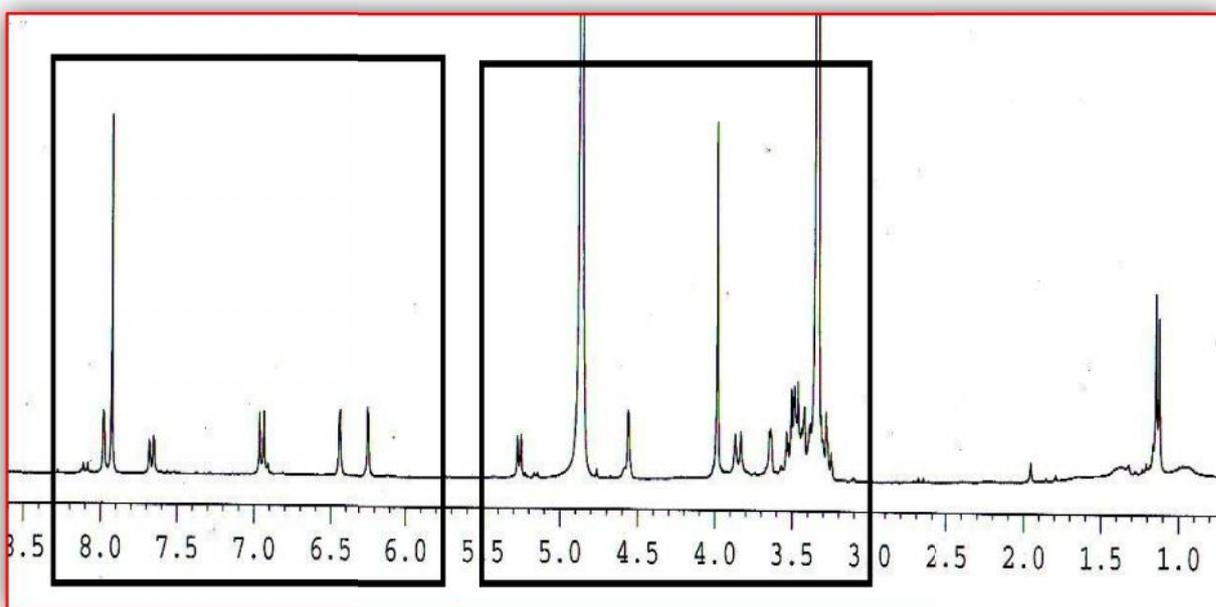
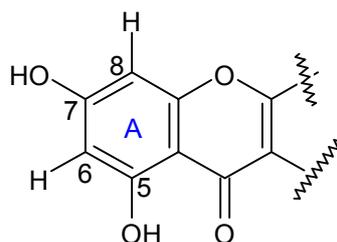


Figure III.4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé B (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

L'analyse de ces protons (figure III.5) donne les informations suivantes :

❖ **Cycle A :**

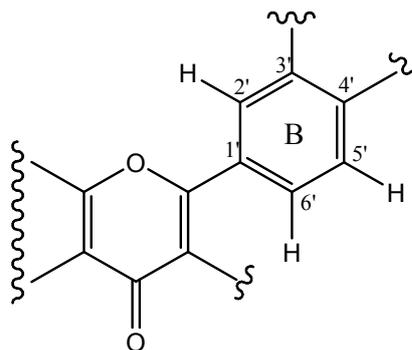
Une *meta* substitution est déduite l'existence de deux doublets (*d*,  $J = 2,6\text{Hz}$ ) d'intégration 1H résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6,22$  et  $6,45$  ppm attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8.



❖ Cycle B :

Une ortho substitution est déduite l'existence de deux doublets d'intégration 1H résonant à  $\delta_H = 6,95$  et  $7,98$  ppm ( $d, J = 7,8$  et  $3,5$  Hz) attribuables respectivement aux protons H-5' et H-2', et une meta substitution est déduite l'existence d'un doublet de doublet d'intégration 1H résonant à  $\delta_H = 7,68$  ppm ( $dd, J = 3,5 ; 7,8$ ) attribuables au proton H-6'

L'absence de signal de résonance due aux protons H-3' et H-4' laisse supposer que les positions H-3' et H-4' sont substituées.



❖ Cycle C :

L'absence de signal de résonance de proton H-3 dans l'intervalle de résonance des protons H-6 et H-8 indique que ce cycle en cette position (H-3) est aussi substituée.

Les deux signaux résonants respectivement à  $\delta_H = 5,27$  et  $4,56$  ppm sous forme d'un doublet intégrant chacun pour un proton ( $d, J = 7,7$  et  $1,9$  Hz) sont attribuables à deux protons anomères ce qui confirme l'existence de deux unités osidiques.

Le signal résonant à  $\delta_H = 1,14$  ppm sous forme d'un doublet et intégrant pour 3 protons ( $d, J = 6,5$  Hz) correspond à la présence d'un groupement méthyle. L'ensemble de ces données spectrales est en accord avec la présence l'unité rhamnose dans la structure.

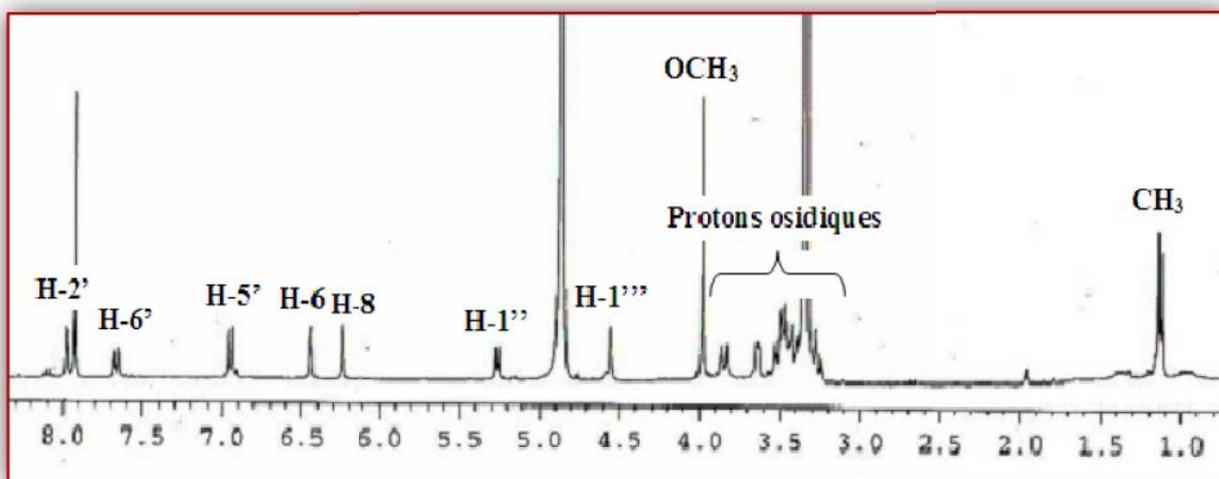


Figure III.5 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé B (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC.

Le spectre COSY (figure III.6) a permis de confirmer les corrélations entre les protons de l'aglycone :

- Le proton H-6 résonant à  $\delta_H = 6,22$  (d, 2,6 ; 1H) corrèle avec le proton H-8 résonant à  $\delta_H = 6,45$  ppm (d, 2,6 ; 1H).
- Le proton H-5' résonant à  $\delta_H = 6,95$  ppm (d, 7,8 ; 1H) corrèle avec le proton H-6' résonant à  $\delta_H = 7,68$  ppm (dd, 3,5 ; 7,8 ; 1H).
- Le proton H-6' résonant à  $\delta_H = 7,68$  ppm (dd, 3,5 ; 7,8 ; 1H) corrèle avec le proton H-2' résonant à  $\delta_H = 7,99$  ppm (d, 3,5 ; 1H).

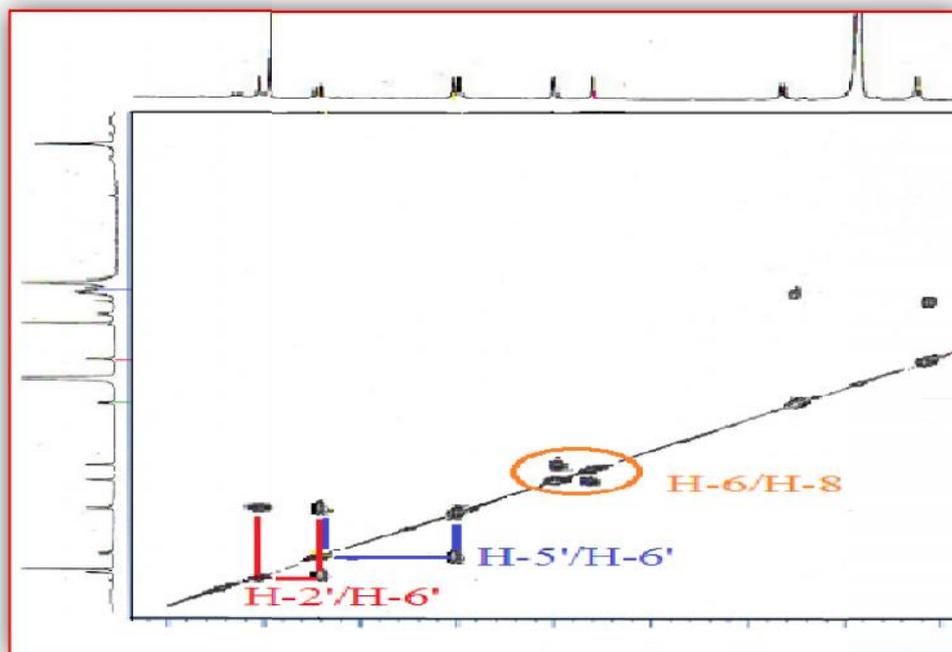


Figure III.6 : Partie du spectre COSY H-H du composé B (aglycone)

Cette expérience nous a facilité surtout de la détermination de la partie osidique. Partant des protons anomériques de chaque hexose (figures III.7 et III.8).

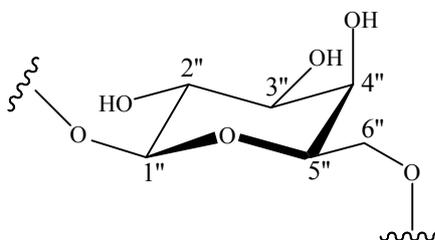
#### La première unité osidique :

Cette unité est identifiée par son proton anomérique H-1'' résonant à  $\delta_H = 5,27$  ppm sous forme d'un doublet avec  $J = 7,7$  Hz, les autres protons sont déterminés par les couplages entre :

- Le proton H-1'' et le proton H-2'' résonant à  $\delta_H = 3,49$  ppm qui est sous forme d'un doublet de doublet avec une constante de couplage  $J = 7,7 ; 8,9$  Hz.

- entre le proton H-2'' et le proton H-3'' résonant à  $\delta_H = 3,45$  ppm sous forme d'un triplet (t, 1H,  $J = 8,9$  Hz).
- le proton H-3'' et le proton H-4'' résonant à  $\delta_H = 3,25$  ppm sous forme d'un triplet (t, 1H,  $J = 8,9$  Hz).
- Le proton H-4'' et le proton H-5'' résonant à  $\delta_H = 3,39$  ppm sous forme d'un doublet de doublet ( $dd, J = 8,9 ; 6,5$  Hz).
- Le proton H-5'' et le proton (H-6''a) résonant à  $\delta_H = 3,83$  ppm sous forme d'un doublet de doublet ( $dd, J = 6,5 ; 11,3$  Hz), aussi entre H-5'' et le proton (H-6''b) résonant à  $\delta_H = 3,43$  ppm sous forme d'un doublet ( $d, J = 11,3$  Hz).

Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  au regard de la constante de couplage  $J_{1'',2''}$  égale à 7,7 Hz.



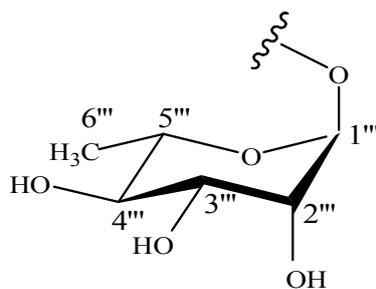
**Glucose de configuration  $\beta$**

#### La deuxième unité osidique :

Cette est identifié par le proton anomérique H-1''' résonant à  $\delta_H = 4,56$  ppm sous forme d'un doublet ( $d, J = 1,9$  Hz), et avec la présence d'un signal du méthyle situé à  $\delta_H = 1,14$  ppm sous forme d'un doublet ( $d, J = 6,5$  Hz) caractérisant l'unité rhamnose. Les autre protons sont déterminés par les couplages entre :

- Le proton H-1''' et le proton H-2''' (3,64 ppm,  $d, J = 3,2$  Hz)
- Le proton H-2''' et le proton H-3''' (3,53 ppm,  $dd, J = 9,1 ; 3,2$  Hz)
- Le proton H-3''' et le proton H-4''' (3,28 ppm,  $t, J = 9,1$  Hz)
- Le proton H-4''' et le proton H-5''' (3,42 ppm,  $m$ )
- Le proton H-5''' et le proton H-6''' (CH<sub>3</sub>) (1,14ppm,  $d, J = 6,5$  Hz)

Ces donnés assurent que cet hexose est un rhamnose de configuration  $\alpha$ .



Rhamnose de configuration  $\alpha$

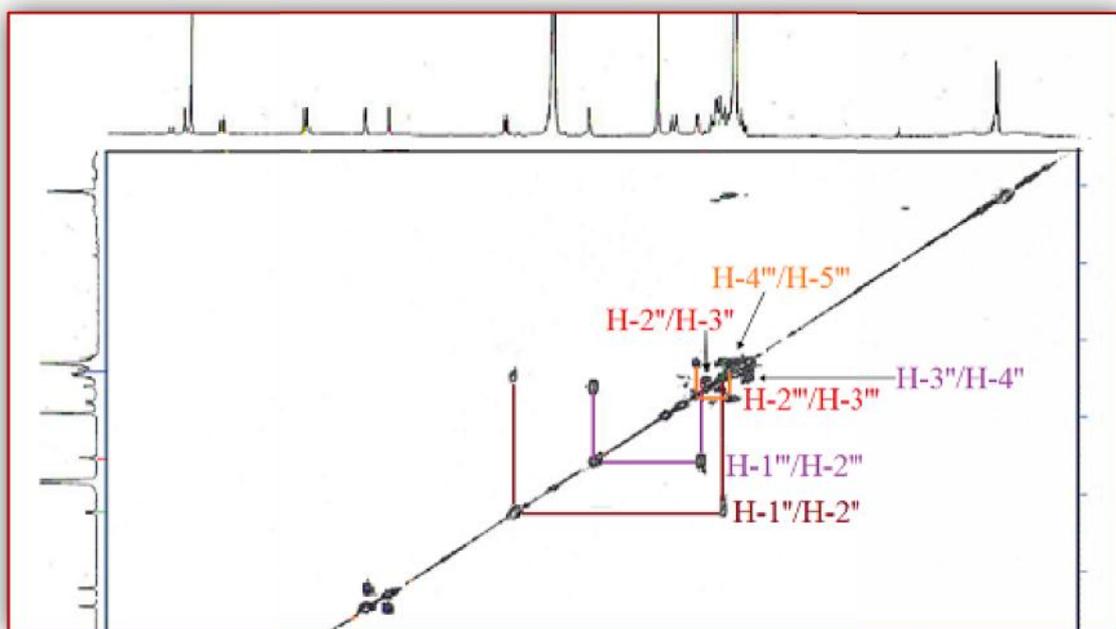


Figure III.7 : Partie du spectre COSY H-H du composé B (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

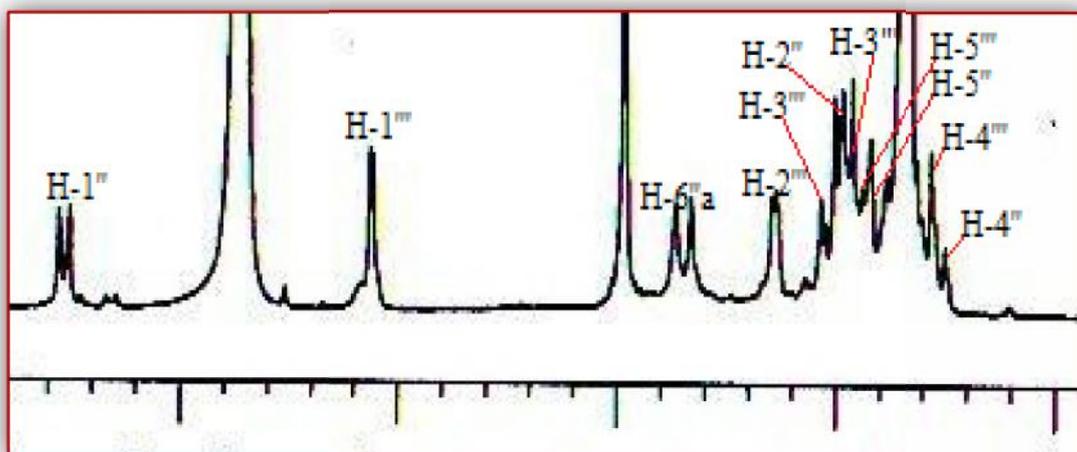


Figure III.8 : Spectre RMN <sup>1</sup>H de la partie osidique du composé B (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Le spectre HSQC (figure III.9) conduit à citer les corrélations proton - carbone suivantes :

- ♣ Le proton H-6 repéré à  $\delta_H = 6,22$  ppm et son carbone C-6 résonant à  $\delta_C = 98,7$  ppm.
- ♣ Le proton H-8 repéré à  $\delta_H = 6,45$  ppm et son carbone C-8 résonant à  $\delta_C = 93,3$  ppm.
- ♣ Le proton H-2' repéré à  $\delta_H = 7,99$  ppm et son carbone C-2' résonant à  $\delta_C = 113,5$  ppm.
- ♣ Le proton H-5' repéré à  $\delta_H = 6,95$  ppm et son carbone C-5' résonant à  $\delta_C = 114,9$  ppm.
- ♣ Le proton H-6' repéré à  $\delta_H = 7,68$  ppm et son carbone C-6' résonant à  $\delta_C = 123,0$  ppm.
- ♣ Le proton H-1'' repéré à  $\delta_H = 5,27$  ppm et son carbone C-1'' résonant à  $\delta_C = 103,5$  ppm.
- ♣ Le proton H-1''' repéré à  $\delta_H = 4,56$  ppm et son carbone C-1''' résonant à  $\delta_C = 101,5$ .
- ♣ Les protons du groupement méthoxy O-CH<sub>3</sub> repéré à  $\delta_H = 4,99$  ppm et leur carbone résonant à  $\delta_C = 55,6$  ppm.
- ♣ Les protons du groupement méthyle repéré à  $\delta_H = 1,14$  ppm et leur carbone résonant à  $\delta_C = 16,7$  ppm.

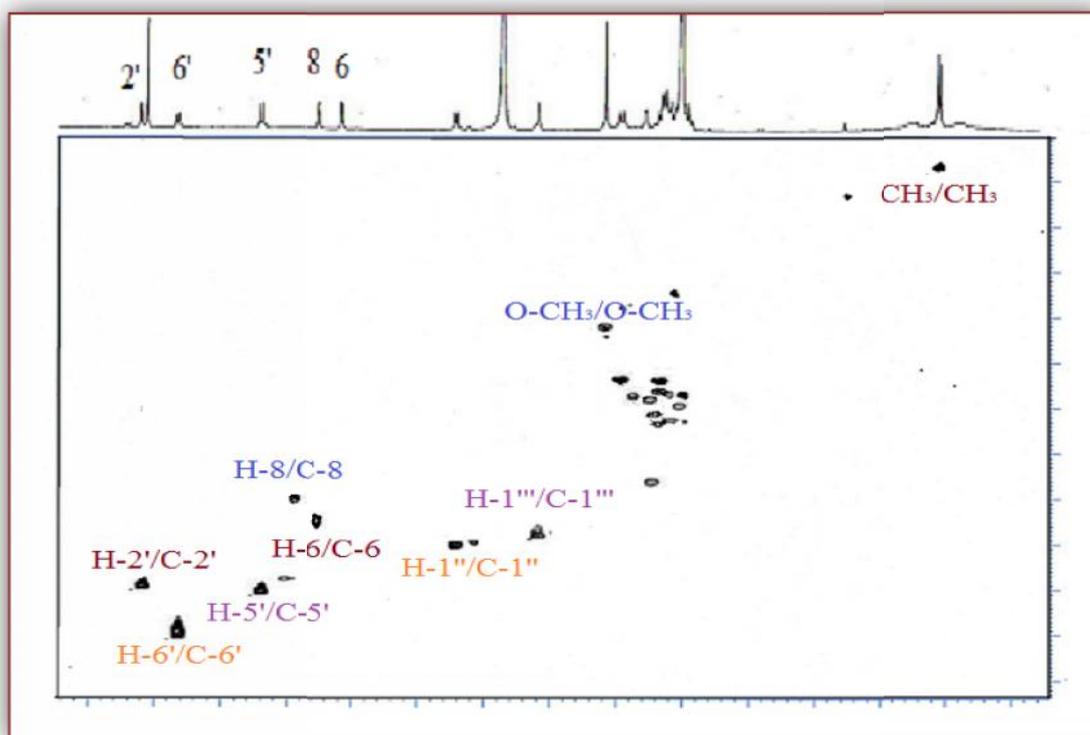
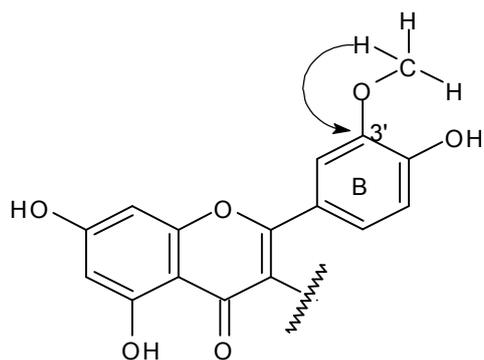


Figure III.9 : Spectre HSQC du composé B

L'enregistrement du spectre HMBC (figure III.10) a conduit à l'établissement des corrélations géminales RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé B. Il a ainsi pu être démontré que le groupement OCH<sub>3</sub> était attaché au carbone C-3' du cycle B.



Alors que l'enchaînement des deux sucres est déterminé par la corrélation du proton anomérique H-1'' du rhamnose avec le carbone C-6'' du glucose ce qui donne le rutinoside.

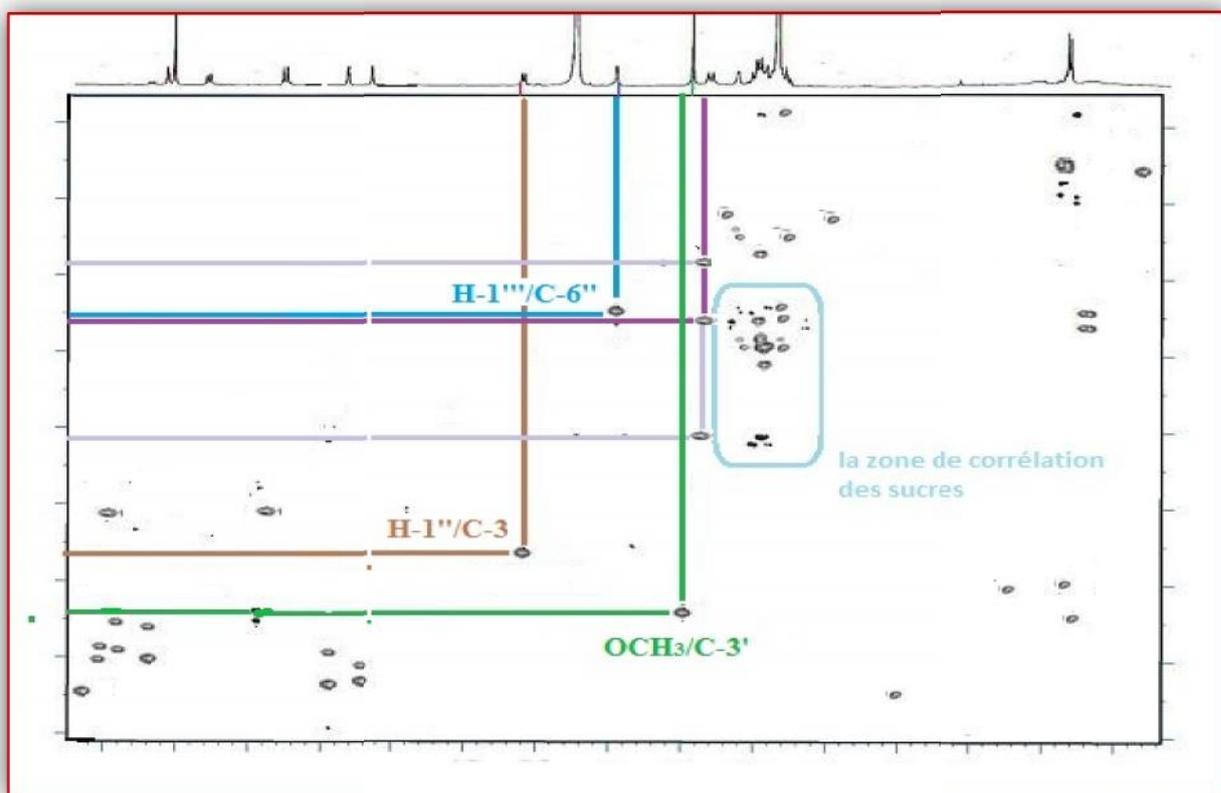
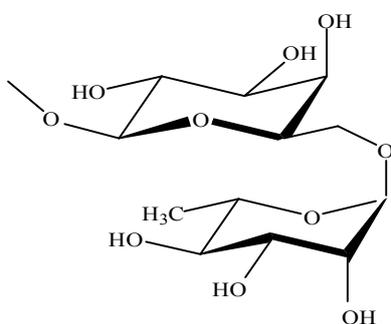


Figure III.10 : Spectre HMBC du composé B

Ce spectre a montré également la corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-3 du cycle C permettant de localiser le point de branchement du rutinoside avec la partie aglycone.

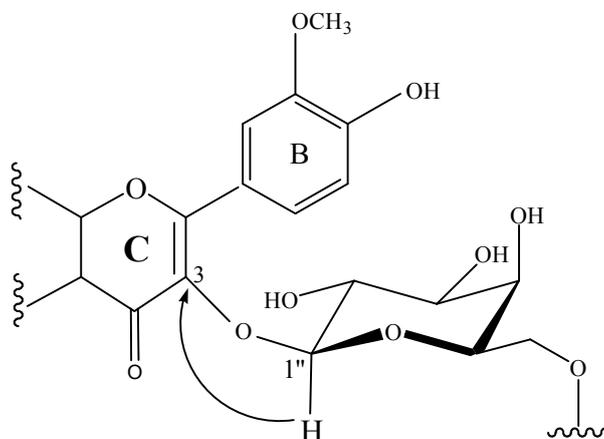
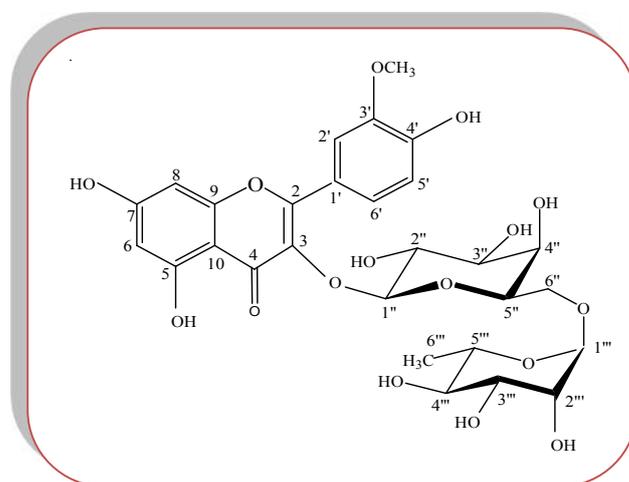


Figure III.11 : Corrélation HMBC du point de branchement du rutinoside.

L'ensemble de ces données et par la comparaison avec les données de la littérature <sup>[96]</sup> la structure du composé **B** est identifiée sans équivoque comme étant la **3'-O-Methyl quercétine 3-rutinoside** ou **isorhamnétine 3-O-rutinoside** ou le **narcissine**, isolé pour la première fois des fleurs du *Narcissus tazetta* par Kubota et Hase <sup>[97]</sup>.



Composé **B** : isorhamnétine 3-O-rutinoside ou narcissine

Ce composé est décrit pour la première fois dans le genre *Eryngium*

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce dernier (composé **B**) sont regroupées dans le tableau suivant (tableau III.2) :

N°	$\delta_H$ (ppm)	m, J (Hz)	$\delta_C$ (ppm)
2 (C)	-	-	
3 (C)	-	-	134,3
4 (C=O)	-	-	
5 (C-OH)	-	-	
6 (CH)	6,22	<i>d</i> , 2,6	98,7
7 (C-OH)	-	-	
8 (CH)	6,45	<i>d</i> , 2,6	93,3
9 (C)	-	-	
10 (C)	-	-	
1' (C)	-	-	
2' (CH)	7,98	<i>d</i> , 3,5	113,5
3'(C-OH)	-	-	146,9
4' (C-OH)	-	-	149,5
5' (CH)	6,95	<i>d</i> , 7,8	114,9
6' (CH)	7,68	<i>dd</i> , 3,5 ; 7,8	123,0
3'-OCH <sub>3</sub>	4,97	<i>s</i>	55,6
1'' (3-O-Glu)	5,27	<i>d</i> , 7,7	103,5
2''	3,49	<i>dd</i> , 7,7 ; 8,9	74,5
3''	3,45	<i>t</i> , 8,9	76,4
4''	3,25	<i>t</i> , 8,9	71,0
5''	3,39	<i>dd</i> , 8,9 ; 6,5	76,7
6''a	3,83	<i>dd</i> , 6,5 ; 11,3	69,9
6''b	3,43	<i>d</i> , 11,3	
1''' (Rha)	4,56	<i>d</i> , 1,9	101,5
2'''	3,46	<i>d</i> , 3,2	71,1
3'''	3,53	<i>dd</i> , 9,1 ; 3,0	71,4
4'''	3,28	<i>t</i> , 9,1	72,9
5'''	3,42	<i>m</i>	69,8
6''' (CH <sub>3</sub> )	1,14	<i>d</i> , 6,5	16,7

Tableau III.2 : Déplacement chimiques des protons et carbones du composé B (CD<sub>3</sub>OD)

### III.3.3 Elucidation structurale du composé C

Le composé **C**, visible dans l'UV, a été obtenu également sous forme d'une poudre jaune soluble dans un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . L'allure générale du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure III.12) du composé **C** montre une grande ressemblance avec celle du composé **B**.

En effet, les deux signaux résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6,22$  et  $6,42$  ppm sous forme d'un doublet d'intégration 1H pour chacun ( $d, J=2,6$  Hz) sont attribuables aux protons aromatiques H6 et H8 respectivement. Ces protons apparaissent dans la région de déplacement chimique que ceux du composé **B**, ce qui confirme le même noyau A.

Deux signaux résonant à  $\delta_{\text{H}} = 7,32$  et  $7,55$  ppm sous forme d'un doublet d'intégration 2H pour chacun ( $d, J= 8,4$  Hz) indique que ce cycle est mono substitué en *para*, ces signaux sont attribuables aux protons (H-3', H-5') et (H-2', H-6') respectivement.

Une simple comparaison des déplacements chimiques de deux composés **B** et **C** indique une grande similarité ce qui confirme qu'ils ont le même squelette de base sauf, la seule différence est l'absence de deuxième unité rhamnose par l'absence du signal due au groupement méthyle.

Un singlet résonant à  $\delta_{\text{H}} = 4,98$  ppm sous forme d'un singlet d'intégration 3H, montre la présence d'un groupement méthoxy  $\text{O-CH}_3$ .

Un signal résonant à  $\delta_{\text{H}} = 5,41$  ppm sous forme d'un doublet et intégrant pour un proton ( $d, J= 7,8$  Hz) est attribuable à un proton anomérique. La présence de l'unité sucre est confirmée par une série des signaux résonant dans l'intervalle [ $\delta_{\text{H}} = 3,4 - 4,8$  ppm].

L'attachement du groupement méthoxy est suggère d'être en position C-4' du noyau B et l'unité glucose est attachée au carbone C-3' du noyau C.

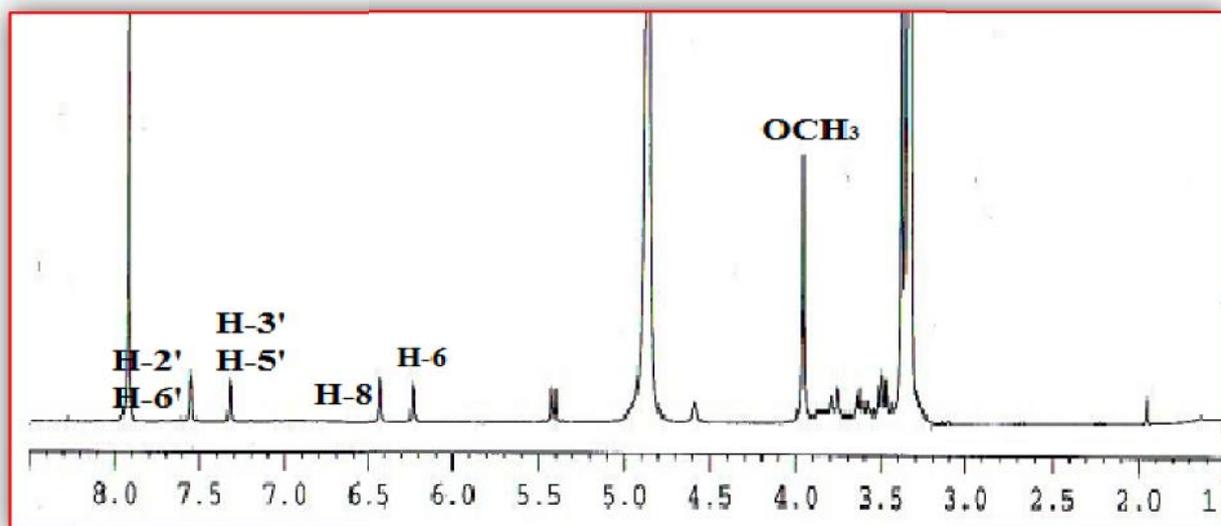


Figure III.12 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé C

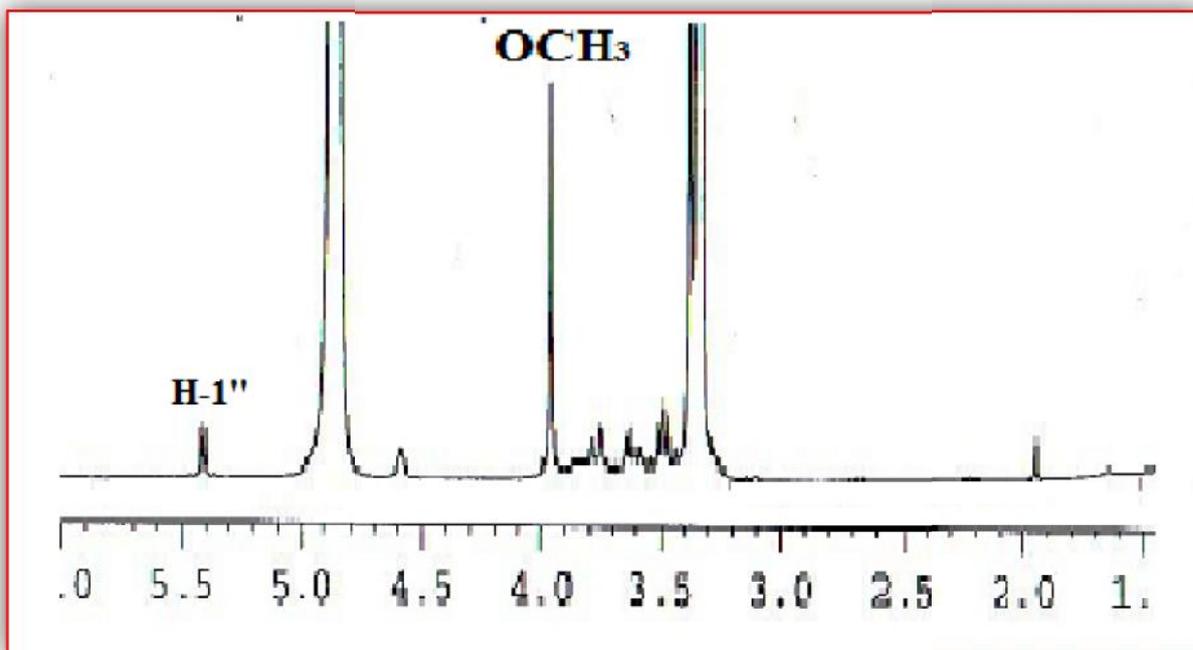
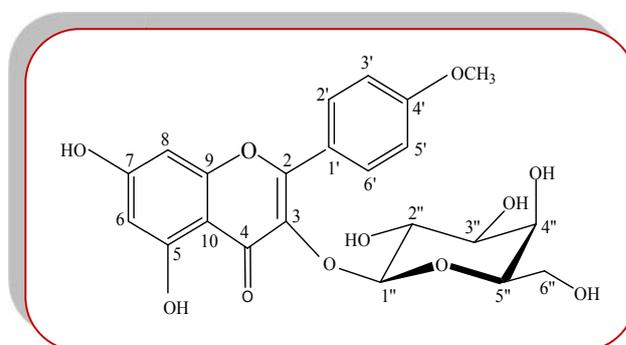


Figure III.13 : Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C (partie osidique)

Ainsi, la confirmation finale de la structure du composé C est déduite sans ambiguïté par la comparaison de ces données spectrales avec celles décrites dans la littérature <sup>[96]</sup>, il s'agit de « 4'-méthoxy-3-( $\beta$ -D-glucoperanosyl) kaempferol



Composé C : 4'-méthoxy-3-( $\beta$ -D-glucoperanosyl) kaempferol

Ce composé est décrit pour la première fois dans le genre *Eryngium*

Les valeurs de déplacements chimiques des protons de ce dernier (composé C) sont regroupées dans le tableau suivant (tableau III.3) :

N°	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
2 (C)	-	-
3 (C)	-	-
4 (C=O)	-	-
5 (C-OH)	-	-
6 (CH)	6,22	<i>d</i> , 2,6
7 (C-OH)	-	-
8 (CH)	6,42	<i>d</i> , 2,6
9 (C)	-	-
10 (C)	-	-
1' (C)	-	-
2' (CH)	7,55	<i>d</i> , 8,4
3'(CH)	7,32	<i>d</i> , 8,4
4' (C-OCH <sub>3</sub> )	-	-
5' (CH)	7,32	<i>d</i> , 8,4
6' (CH)	7,55	<i>d</i> , 8,4
3'-OCH <sub>3</sub>	4,98	<i>s</i>
1'' (3-O-Glu)	5,41	<i>d</i> , 7,7
2''	3,49	<i>dd</i> , 7,7 ; 8,9
3''	3,45	<i>t</i> , 8,9
4''	3,25	<i>t</i> , 8,9
5''	3,39	<i>dd</i> , 8,9 ; 6,5
6''a	3,83	<i>dd</i> , 6,5 ; 11,3
6''b	3,43	<i>d</i> , 11,3

Tableau III.3 : Déplacement chimiques des protons et carbones du composé C (CD<sub>3</sub>OD)

### III.3.4 Elucidation structurale du composé D

Le composé **D**, visible dans l'UV, se présente comme une poudre blanche, soluble dans le mélange chloroforme/méthanol. Ce produit présente un caractère polaire sur la plaque CCM RP18 ( $R_f=0,4$ , H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50). Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré à 400 MHz dans le méthanol deutéré (figure III.14) permet d'observer :

- Deux signaux résonant à  $\delta_H = 6,30$  et  $7,53$  ppm sous forme d'un doublet (d,  $J = 15,1$  Hz) et intégrant chacun pour un proton correspondant à deux protons oléfiniques. La constante de couplage ( $J = 15,1$  Hz) élevée indique une géométrie *trans* de la double liaison. Le déblindage de déplacement chimique de l'un de ces protons ( $\delta_H = 7,53$  ppm) distingue que ce proton est lié à un noyau aromatique.
- Des signaux résonant dans l'intervalle [6,63-7,09 ppm] intégrant pour six protons caractéristiques des protons aromatiques, montre la présence de deux noyaux aromatiques.
- Un signal se forme d'un doublet de doublet résonant à  $\delta_H = 5,10$  ppm (dd,  $J = 8,5 ; 4,0$  Hz) et intégrant pour un proton correspondant à un groupement oxyméthine OCH. Le déblindage fort de ce proton, en comparaison avec les protons oléfiniques suggère qu'il est lié à une fonction qui présente un pouvoir attracteur puissant.
- Deux signaux, l'un apparaît sous forme d'un multiplet à  $\delta_H = 2,92$  ppm et l'autre apparaît sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_H = 3,13$  ppm (dd,  $J = 14,7 ; 8,5$  Hz), correspondant à deux protons oléfiniques formant un système AB.

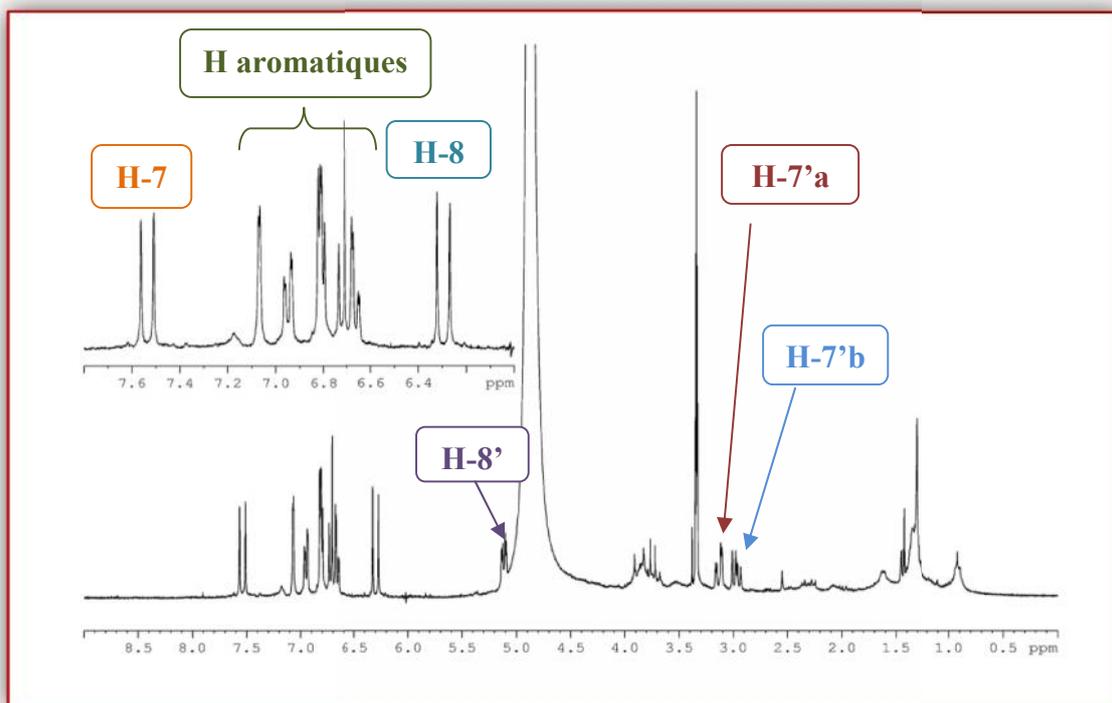
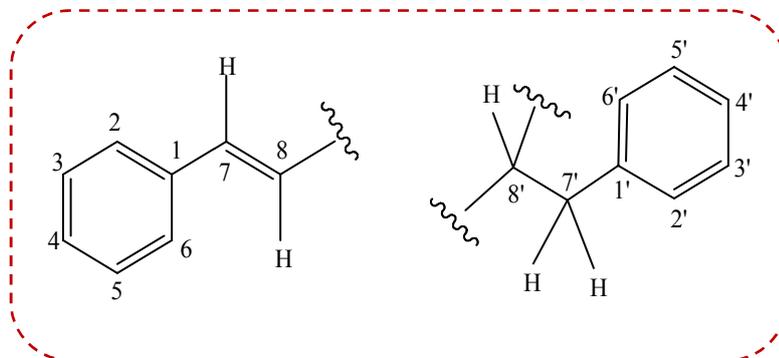


Figure III.14 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé D

Ce raisonnement permet de suggérer les fragmentations suivantes qui appartiennent d'un composé phénolique :



L'expérience COSY H-H (figure III.15) met en évidence les corrélations entre :

- ♣ Le proton (H-7'a) et le proton (H-7'b) résonant respectivement à  $\delta_{\text{H}} = 2,92$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 3,13$  ppm.
- ♣ Les deux protons H-7' et le proton H-8' résonant à  $\delta_{\text{H}} = 5,1$  ppm.
- ♣ Les protons de la double liaison, H-7 résonant  $\delta_{\text{H}} = 7,53$  ppm à et H-8 résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6,3$  ppm.
- ♣ Les protons aromatiques dans la zone 6,63-7,09 ppm.

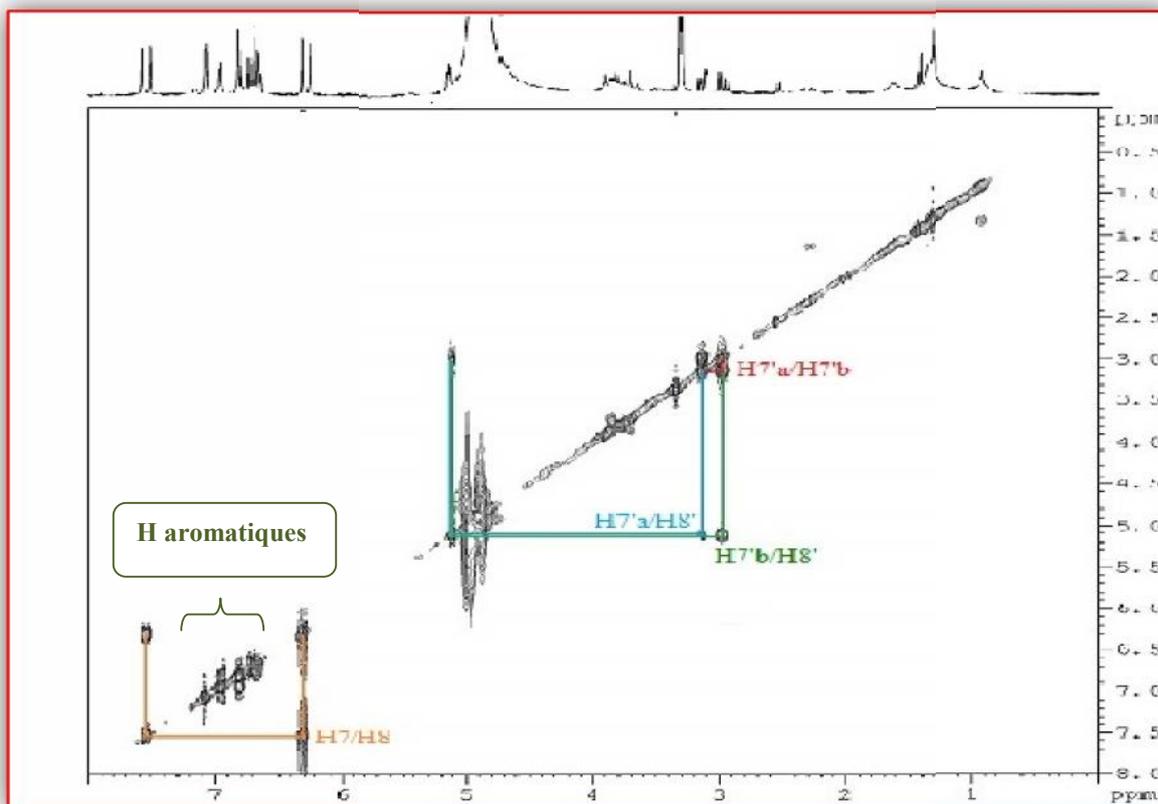


Figure III.15 : Spectre COSY H-H du composé D

L'expérience de corrélation hétéronucléaire directe C-H ou HSQC (Figure III.16), montre les couplages des protons liés directement aux carbones. Les corrélations illustrées sont :

- ♣ Les deux protons H-7' ( $\delta_H = 2,92, 3,13$  ppm) et leurs carbones C-7' repéré à  $\delta_C = 38$  ppm.
- ♣ Le proton H-8' ( $\delta_H = 5,10$  ppm) et son carbone C-8' repéré à  $\delta_C = 78$  ppm.
- ♣ Le proton H-7 ( $\delta_H = 7,53$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 147$  ppm.
- ♣ Le proton H-8 ( $\delta_H = 6,30$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 116$  ppm.

Les protons aromatiques :

- ♣ Le proton H-2' ( $\delta_H = 6,72$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 122$  ppm.
- ♣ Le proton H-6' ( $\delta_H = 6,64$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 117$  ppm.
- ♣ Le proton H-2 ( $\delta_H = 7,09$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 115$  ppm.
- ♣ Le proton H-6 ( $\delta_H = 6,92$  ppm) et son carbone repéré à  $\delta_C = 123$  ppm.
- ♣ Les protons H-5 et H-5' son superposés, leurs carbones sont observés entre 115 et 118 ppm.

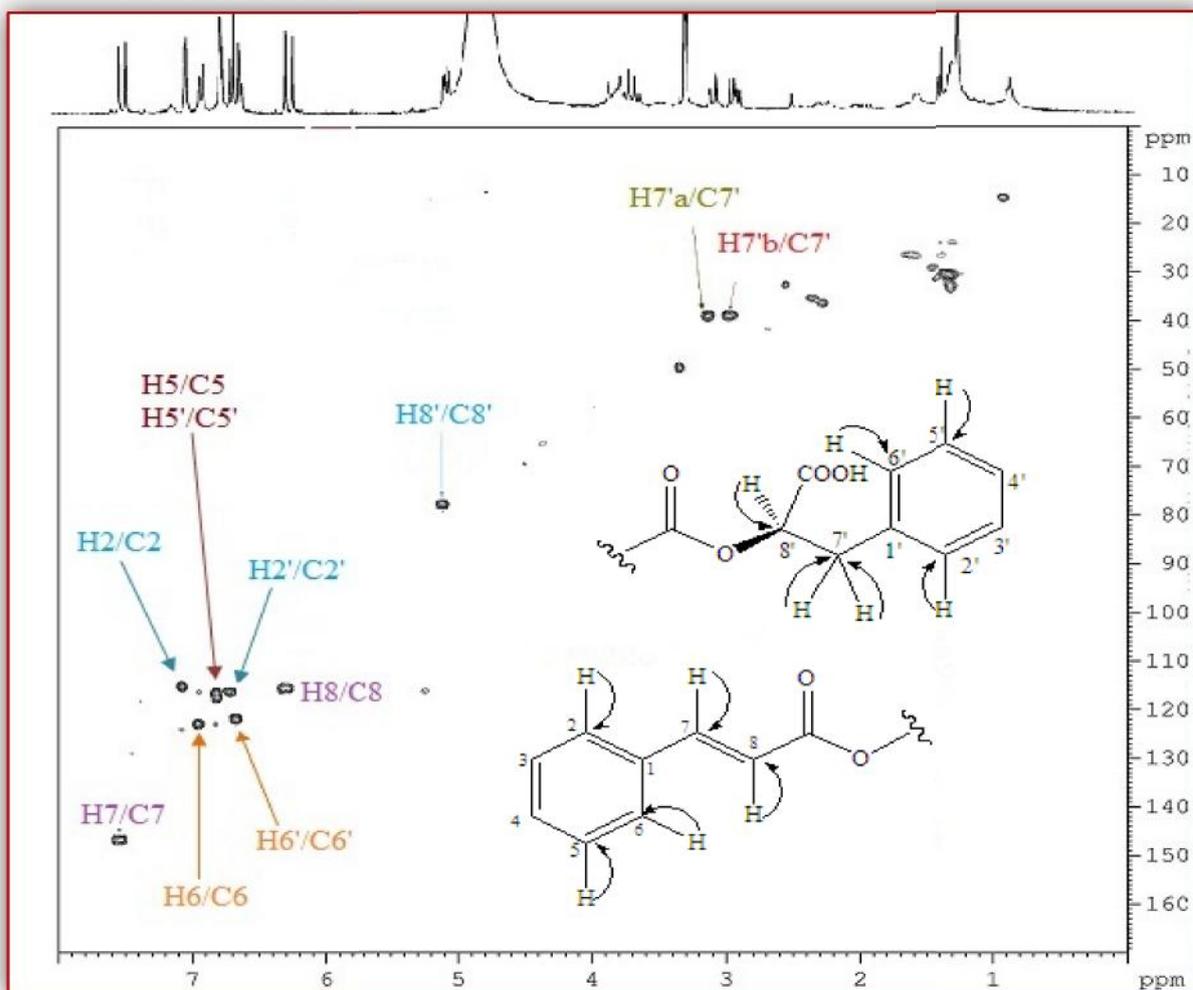
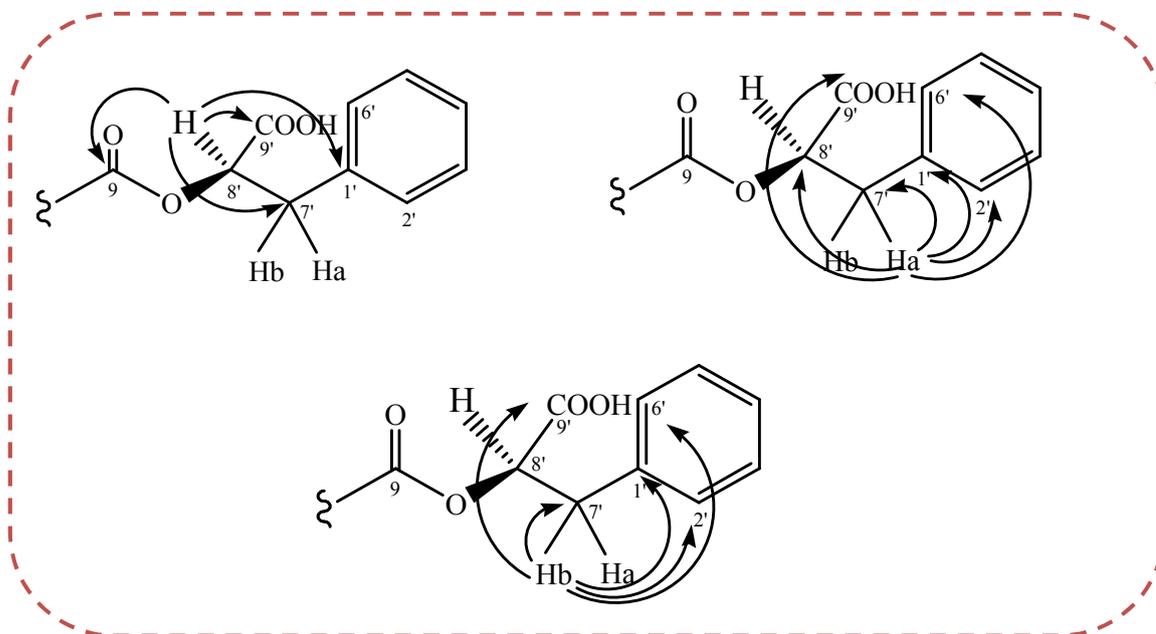


Figure III.16 : Spectre HSQC du composé D

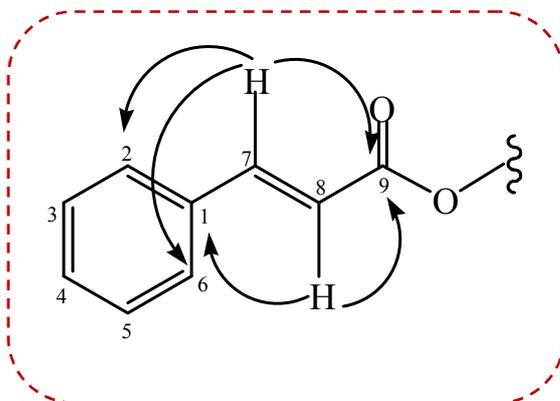
L'expérience de corrélation hétéronucléaire carbone-proton longue distance ou HMBC (Figure III.17) permet de confirmer et compléter la structure proposée, et cela par l'observation des autres couplages en  $^2J_{C-H}$  et en  $^3J_{C-H}$ , citons :

- Les protons H-7' corrélient avec les carbones résonant à  $\delta_C = 177,1$  ppm et  $130,3$  ppm en  $^3J$  et  $^2J$  respectivement, ces deux carbones ne montrent aucune corrélation C-H dans l'expérience HSQC qui nous prouve que ce sont des carbones quaternaires, la valeur de déplacement chimique ( $\delta_C = 177,1$  ppm) montre que c'est un carbone d'une fonction acide C-9', et le deuxième c'est le carbone aromatique C-1'.
- Ces deux protons montrent des tâches de corrélation en  $J^3$  avec les carbones résonants à  $\delta_C = 117,2$  et  $122,4$  ppm, ce sont les carbones C-6' et C-2' respectivement.
- Une tâche de corrélation entre le proton (H-7'b) et le carbone C-8' résonant à  $\delta_C = 78,1$  ppm.

- Des tâches de corrélation sont observées entre le proton H-8' ( $\delta_H = 5,10$  ppm) et les carbones C-7', C-9' et C-1' respectivement ( $\delta_C = 37,8, 177,1$  et  $130,3$  ppm).
- Ce proton corrèle avec un carbone résonant à  $\delta_C = 169,7$  ppm en  $^3J$ , qui devrait être un carbonyle d'une fonction ester C-9.



- Le proton oléfinique H-7 ( $\delta_C = 147,3$  ppm) corrèle avec les carbones C-9, C-2 et C-6 résonant à  $\delta_C = 169,7, 115,7$  et  $123,2$  ppm respectivement, avec une constante de couplage en  $^3J$  pour chacun.
- Le douzième proton oléfinique H-8 résonant à  $\delta_H = 6,30$  ppm corrèle avec le carbone C-9 ( $\delta_C = 169,7$  ppm) et un carbone quaternaire résonant à  $\delta_c = 128,1$  ppm en  $^2J$ , qui devrait être le carbone aromatique C-1.



Toutes ces corrélations sont illustrées dans le spectre HMBC (figure III.5) ci-après :

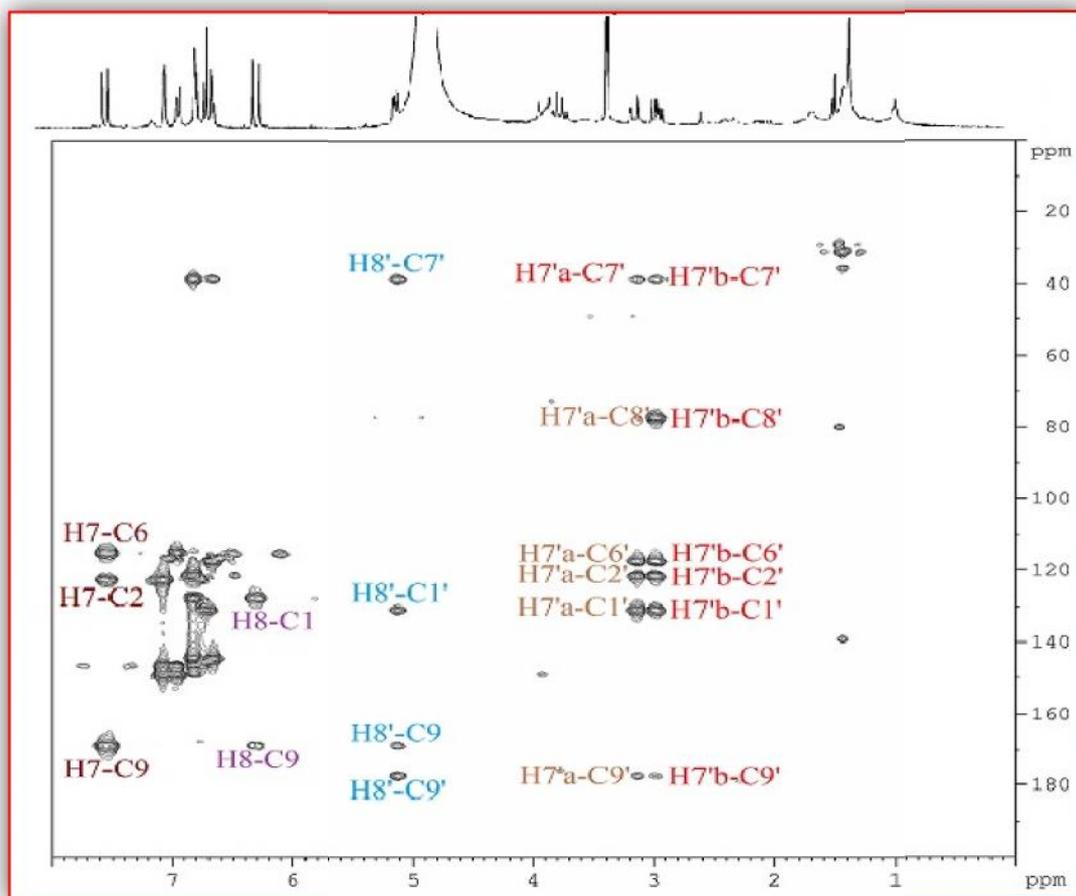


Figure III.17 : Spectre HMBC du composé D

- Les protons H-2 et H-6 corrélient avec les carbones aromatiques quaternaires résonants à  $\delta_c = 146,5$  et  $149,1$  ppm, ce indique que sont les carbones qui portent les fonctions hydroxy OH, C-3 et C-4 respectivement.
- Le proton H-2' corréle avec le carbone C-1', et corréle aussi avec un carbone qui apparait dans cette expérience à  $\delta_c = 145,6$  ppm qui ne donne aucun signal dans le spectre HSQC, c'est le carbone C-3' portant le groupement hydroxyle OH a cause de son déplacement chimique.
- Le proton H-6' corréle avec un carbone résonant à  $\delta_c = 144,8$  ppm, c'est le carbone aromatique quaternaire C-4' portant la fonction hydroxy OH.

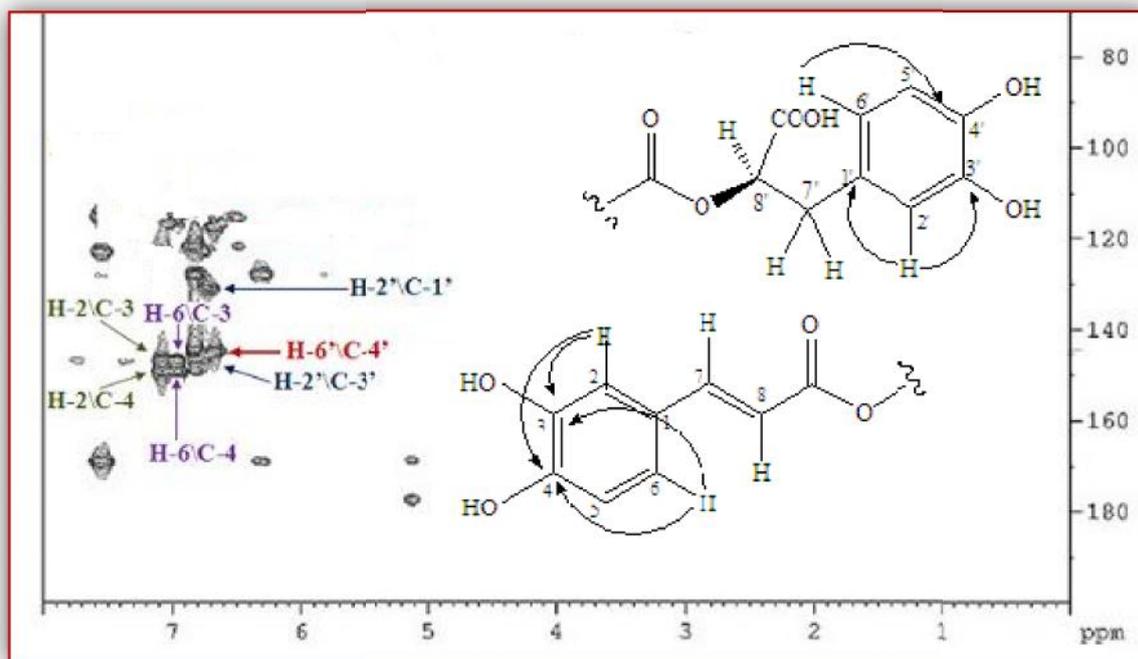
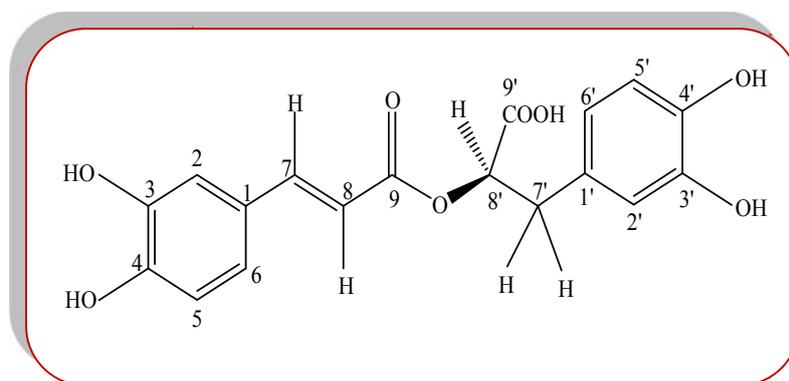


Figure III.18 : Partie du spectre HMBC du composé D

A la lumière de toutes ses données spectrales, et par leur comparaison à celles de la littérature <sup>[98]</sup>, nous permet d'établir la structure du composé D, il s'agit de l'acide rosmarinique.



### Composé D : l'acide rosmarinique

L'acide rosmarinique est un ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphenyllactique, il a été isolé pour la première fois à l'état pur par deux chimistes italiens, Scarpati et Oriente, en 1958 <sup>[89,99,100]</sup>. Son nom provient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus Officinalis*) <sup>[99]</sup>.

L'acide rosmarinique est présent dans les espèces de la famille des *Lamiaceae* <sup>[99,100]</sup>, ainsi que dans certaines plantes de la famille des *Boraginaceae* <sup>[101,102]</sup> et des *Apiaceae* <sup>[102]</sup>.

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce dernier (composé **D**) sont regroupées dans le tableau suivant (tableau III.4) :

N°	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)
<b>1 (C)</b>	-	-	128,1
<b>2 (CH)</b>	7,09	<i>d</i> , 2,3	115,7
<b>3 (C-OH)</b>	-	-	146,5
<b>4 (C-OH)</b>	-	-	149,1
<b>5 (CH)</b>	6,8	<i>m</i>	
<b>6 (CH)</b>	6,92	<i>dd</i> , 8,1 ; 2,3	123,2
<b>7 (CH)</b>	7,53	<i>d</i> , 15,1	147,3
<b>8 (CH)</b>	6,3	<i>d</i> , 15,1	115,6
<b>9 (CH)</b>	-	-	169,7
<b>1'(C)</b>	-	-	130,3
<b>2' (CH)</b>	6,72	<i>d</i> , 2,4	122,4
<b>3' (C-OH)</b>	-	-	145,6
<b>4'(C-OH)</b>	-	-	144,8
<b>5' (CH)</b>	6,8	<i>m</i>	
<b>6' (CH)</b>	6,64	<i>dd</i> , 8,5 ; 2,4	117,2
<b>H-7'a</b>	3,13	<i>m</i>	
<b>H-7'b</b>	2,92	<i>dd</i> , 14,7 ; 8,5	37,8
<b>8'</b>	5,1	<i>dd</i> , 8,5 ; 4,0	78,1
<b>9'</b>	-	-	177,1

Tableau III.4 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **D** (CD<sub>3</sub>OD)

*Chapitre IV*

*Partie Expérimentale*

## **IV. 1 Matériels et méthodes**

La plante *Eryngium campestre* a été récoltée dans la région de Imedghessene-Batna-Algérie au mois de Mai 2008, et identifiée par le professeur Bachir Oudjehih du département d'Agronomie faculté des sciences université de Batna. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les parties aériennes ont été broyées (900g).

### **IV.1.1 Méthodes Chromatographiques analytiques**

#### **IV.1.1.1 Chromatographies sur couche mince (CCM)**

Les chromatographies analytiques sur couches minces CCM ont été effectuées en phase normale sur des plaques Silicagel Kieselgel (60 F<sub>254</sub> Merck) et en phase inverse RP18 F<sub>254S</sub> (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre. L'observation sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation au sulfate de céruim et la vanilline sulfurique.

#### **IV.1.2 Méthodes préparatives**

##### **IV.1.2.1 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)**

Des colonnes ouvertes de gel de silice en phase normale (60-320 mesh) ont été utilisées dans la deuxième étape de fractionnement des extraits. La taille des colonnes, le débit de la phase mobile et le volume des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'éluion, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base de l'analyse sur CCM.

##### **IV.1.2.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La séparation par chromatographie liquide haute performance semi-préparative ou analytique a été largement utilisée pour l'analyse et la séparation de la majorité des composés. Elle a été réalisée sur un Shimadzu LC-10AD équipé d'un détecteur UV-SPD-10A à une longueur d'onde (à 210 et 254 nm) et contrôlée par des logiciels classe-VP. Le système a été équipé de deux pompes (pompe A pour solvant aqueux et une pompe B pour solvant organique). Les colonnes utilisées étaient de différents types et tailles. En particulier Kromasil 5 microns 100A C18 (250 x 4,60) Phenomenex, Kromasil 5 microns 100A C18 (250 x 10 mm), Kromasil 5 microns 100A de silice (250 x 4,6 mm), Kromasil 5 microns 100A de silice (250 x 10 mm) et Synergi 4 microns d'Hydro-RP 80A (250 x 4,60) colonnes Phenomenex ont été utilisés.

L'injection a été faite par la seringue et les échantillons ont été injectés à travers la boucle, après leur dissolution dans le solvant et l'élimination appropriée des particules insolubles par filtration ou centrifugation. Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC et l'eau était ultra-pure.

### **IV.1.3 Méthodes physico chimiques**

#### **IV.1.3.1 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN 1D (RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ) et RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) sont enregistrés dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  et  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  sur un appareil Bruker Avance-400 à 400 MHz, de l'institut de chimie et chimie biomoléculaire, Naples-Italie et du centre national de recherche (CNR) -France.

Les déplacements chimiques 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

### **IV. 2 Extraction**

Le protocole d'extraction des parties aériennes a été antérieurement décrit dans le chapitre résultat et discussion (pages 50 et 51).

### **IV.3 Contrôle chromatographique des extraits**

L'examen en chromatographie sur couche mince (CCM) des trois extraits étheropétrolique, l'acétate d'éthyle et butanolique des parties aériennes dans des différents systèmes d'élution montre, après la révélation par la vanilline sulfurique et chauffage, plusieurs taches à des  $R_f$  différents et incluses dans des traînées, mais l'extrait d'acétate d'éthyle contient plusieurs tâches intéressantes et pour cela on a choisi de l'étudier.

### **IV.4 Séparation et purification**

#### **IV.4.1 Extrait de l'acétate d'éthyle**

Deux grammes de l'extrait d'acétate d'éthyle sont traités par chromatographie sur une colonne de gel de silice. On a utilisé le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  comme un système d'élution. Des fractions de 50 ml recueillies à chaque fois, sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous la lumière UV à 254 et 366 nm, révélées par le sulfate de cérium et chauffées.

L'examen des plaques CCM a permis de rassembler les fractions qui présentent des similitudes en plusieurs lots.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (tableau IV.1) :

<b>N° de lot</b>	<b>Fraction</b>	<b>Eluant (colonne) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH</b>	<b>Poids (mg)</b>
<b>F1</b>	1-2	CHCl <sub>3</sub> pur	14
<b>F2</b>	3	CHCl <sub>3</sub> pur	14
<b>F3</b>	4-5	90/10	154
<b>F4</b>	6-7	"	220
<b>F5</b>	8	80/10	205
<b>F6</b>	9	"	180
<b>F7</b>	10	70/10	185,6
<b>F8</b>	11	"	156
<b>F9</b>	12	50/50	135
<b>F10</b>	13-14	CH <sub>3</sub> OH pur	380,9
<b>F11</b>	15	CH <sub>3</sub> OH pur	/

**Tableau IV.1 : Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle**

Les examens des plaques CCM en phase normale (figure IV.1) et en phase inverse (figure IV.2) sont illustrés dans les figures ci-après :

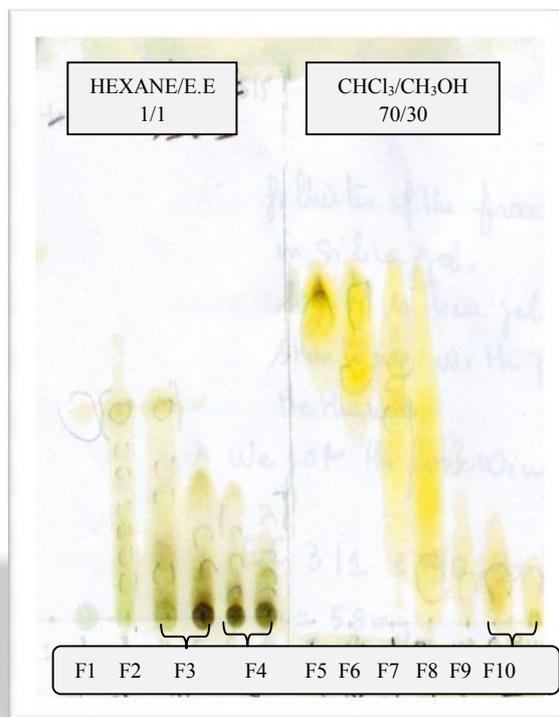


Figure IV.1 : CCM en phase normale des lots F1-F11 de l'extrait acétate d'éthyle

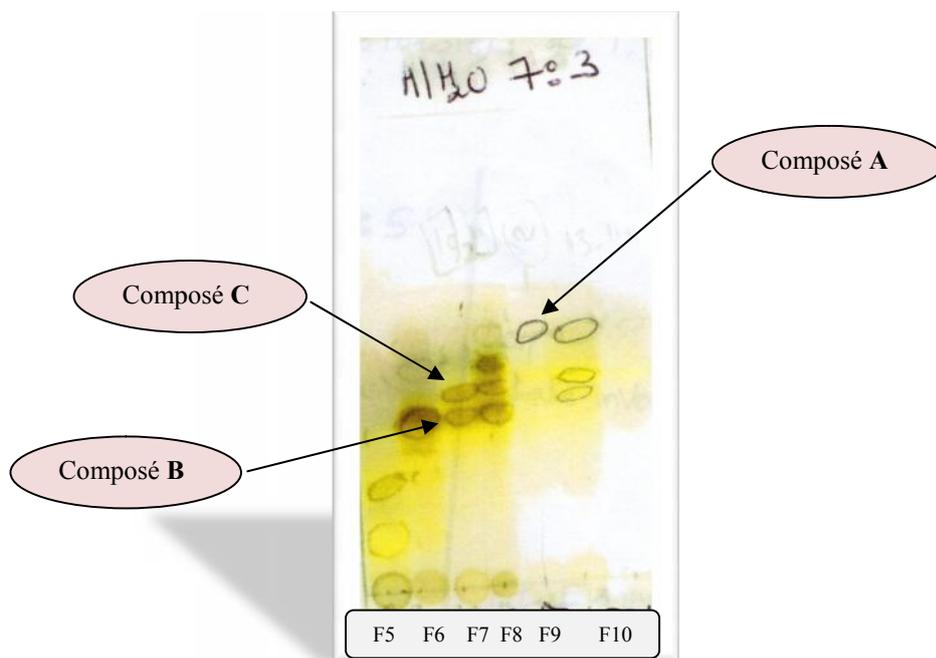


Figure IV.2 : CCM en phase inverse des lots F1-F11 de l'extrait acétate d'éthyle

D'après les CCM, les lots F7 et F9 nous semblent intéressants, ils sont donc de nouveau mis à chromatographier sur colonne de gel de silice en phase normale puis examinés par les plaques CCM en phase normale et en phase inverse.

**A. L'étude du lot F7**

D'après la plaque CCM de ce lot, est observée la présence de deux tâches majoritaires. Une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale a été réalisée sur ce lot (185.6 mg). Après l'examen en CCM en phase normale et en phase inverse suivi, d'une révélation à la vanilline sulfurique et chauffage, les fractions similaires sont réunies. Le tableau (IV.2) suivant reproduit la progression de ce fractionnement.

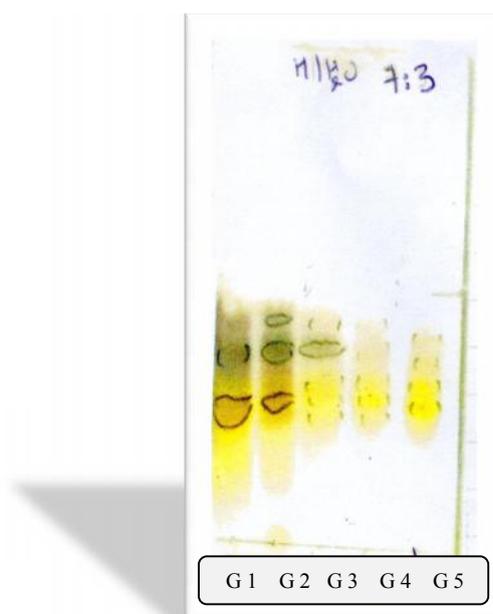
Poids de l'échantillon : 185 mg

Gel de silice : 6g

N° de lot	fraction	Eluant (colonne) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH	Poids (mg)
<b>G1</b>	1-2	90/10	36,6
<b>G2</b>	3-4	"	18
<b>G3</b>	5-10	85/15	28
<b>G4</b>	11-16	"	27
<b>G5</b>	17	CH <sub>3</sub> OH pur	12,7

**Tableau IV.2 : Fractionnement du lot F7**

La figure (IV.3) suivante illustre la CCM en phase inverse de ce lot.



**La figure (IV.3) : CCM en phase inverse du lot F7.**

Le lot G1 (36,6 mg) précipite et représente le composé **A** (25.5 g) en majorité. Le lot G5 (12,7 mg) a subi une chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur gel de silice inverse RP18 en utilisant le mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH comme éluant, cette opération est conduis à isoler le composé **B** (1 mg) et le composé **C** (1,6 mg) à l'état pur. Le tableau IV.3 suivant regroupe les différentes étapes de cette opération :

<b>Temps (min)</b>	<b>Eluant H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH</b>
10	30/70
20	20/80
30	10/90
40	CH <sub>3</sub> OH pur

**Tableau IV.3 : Fractionnement du lot C5**

**B. L'étude du lot F9**

La plaque CCM en phase inverse de la fraction F9 (135mg) montre une tâche majoritaire dans une traînée. Elle est soumise à une colonne de filtration de gel de silice (20g). Éluée par le système d'éluion CHCl<sub>3</sub>/MeOH : (70/30), elle conduit l'isolement du composé **D** à l'état pur (73,3 mg ; Rf= 0,4), ce composé est illustré dans la figure suivante (figure IV.3).

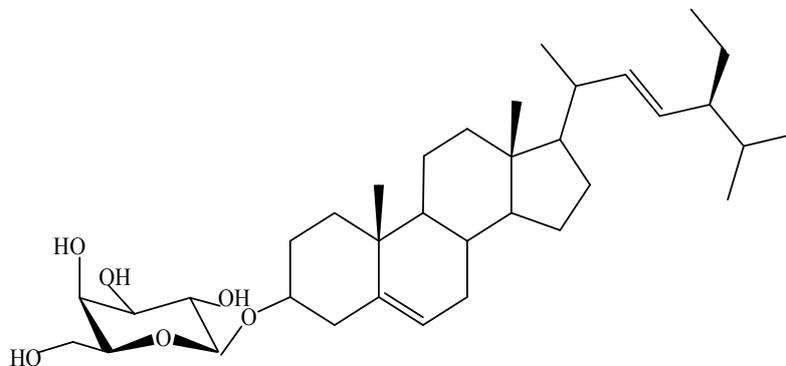


**Figure IV.3 : CCM du composé D**

## IV.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

### IV.5.1 Composé A

#### Stigmastérole-3 $\beta$ -D-glycopyranosyde



**Formule brute :** C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>

**Quantité du produit :** 32 mg

**Aspect :** poudre blanche

**RMN <sup>1</sup>H :** 400 MHz, acétone deutéré

1,09-1,86 (m, 1H, H-1)

1,5-1,85 (m, 1H, H-2)

3,56 (tt, 1H, 11,3 ; 4,7, H-3)

2,39 (m, 2H, H-4)

5,34 (d, 1H, 5,3, H-6)

1,49-2,2 (2H, H-7)

1,54 (1H, H-8)

1,98 (1H, H-9)

1,44 (2H, H-11)

1,15-2,13 (2H, H-12)

1,12 (1H) = H-14

1,24-1,54 (m, 2H, H-15)

1,09-1,61 (m, 2H, H-16)

1,17 (1H, H-17)

0,68 (s, 3H, H-18)

0,92 (s, 3H, H-19)

1,95 (1H, H-20)

0,95 (d, 3H, 6,8, H-21)

5,12 (dd, 1H, 15,2 ; 8,4, H-22)

5,02 (dd, 1H, 15,2 ; 8,4, H-23)

1,58 (1H, H-24)

1,49 (1H, H-25)

0,85 (d, 3H, 6,4, H-26)

0,69 (d, 3H, 6,4, H-27)

1,26-1,52 (d, 2H, 6,4, H-28)

0,92 (t, 3H, 7,0, H-29)

Glu 4,23 (d, 1H, 5,3, H-1')

3,32 (1H, H-2')

3,56 (1H, H-3')

3,39 (1H, H-4')

3,31 (1H, H-5')

3,86 (1H, H-6'a)

3,69 (1H, H-6'b)

**RMN <sup>13</sup>C:**

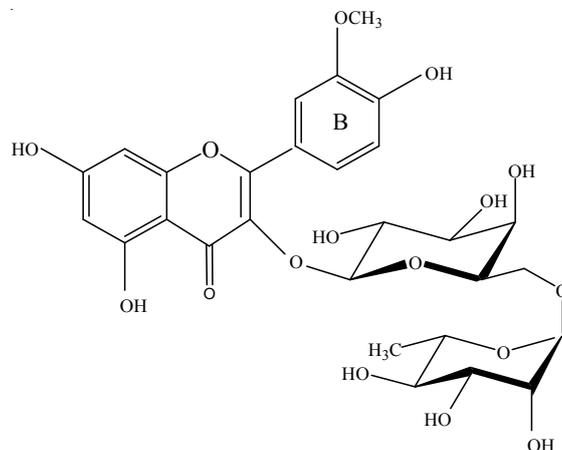
37,8 (CH-1), 31,7 (CH-2), 71,5 (CH-3), 42,5 (CH-4), 140,1 (CH-5), 121,15 (CH-6), 31,3 (CH-7), 31,9 (CH-8), 50,9 (CH-9), 36,5 (CH-10), 21,6 (CH-11), 39,8 (CH-12), 42,1 (CH-13), 56,8 (CH-14), 24,7 (CH-15), 28,6 (CH-16), 56,3 (CH-17), 0,68 (CH-18), 19,5 (CH-19), 40,6 (CH-20), 21,4 (CH-21), 138,01 (CH-22), 128,73 (CH-23), 50,2 (CH-24), 32 (CH-25), 21,7 (CH-26), 19,8 (CH-27), 26,1 (CH-28), 13 (CH-29), 100,73 (CH-1'), 75,3 (CH-2'), 77,5 (CH-3'), 70,5 (CH-4'), 75,9 (CH-5'), 62,8 (CH-6').

## VI.5.2 Composé B

3'-O-méthylquercétin 3-rutinoside ou

isorhamnétine 3-O-rutinoside ou

narcissine



**Formule brute :**  $C_{28}H_{32}O_{16}$

**Quantité du produit :** 1 mg

**Aspect :** poudre jaune

**RMN  $^1H$  :** 400 MHz, MeOD

6,22 (d, 1H, H-6)

6,45 (d, 1H, H-8)

7,99 (d, 1H, 7,8 ;5,2, H-2')

6,95 (d, 1H, 7,8, H-5')

7,68 (d, 1H, 5,2, H-6')

4,99 (s, 3H, H-3')

Glu : 5,27 (d, 1H, 7,7, H-1'')

3,49 (dd, 1H, 7,7 ;8,9, H-2'')

3,45 (t, 1H, 8,9, H-3'')

3,25 (t, 1H, 8,9, H-4'')

3,39 (dd, 1H, 8,9 ;6,5, H-5'')

3,83 (dd, 1H, 6,5 ;11,3, H-6''a)

3,43 (d, 1H, 11,3, H-6''b)

Rha : 4,56 (d, 1H, 1,9, H-1''')

3,46 (d, 1H, 3,2, H-2''')

3,53 (dd, 1H, 9,1 ; 3,0, H-3''')

3,28 (t, 1H, 9,1, H-4''')

3,42 (m, 1H, H-5''')

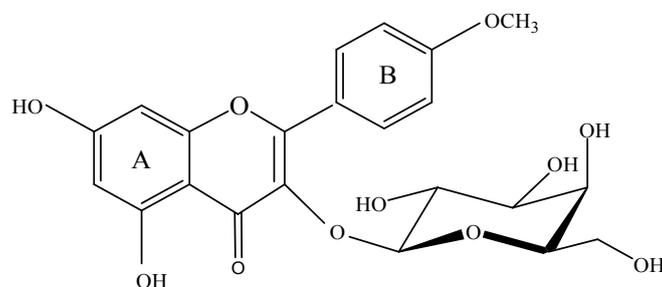
1,14 (d, 1H, 6,5, H-6''')

**RMN <sup>13</sup>C:**

98,7 (CH-6), 94,3 (CH-8), 114,2 (CH-2'), 114,9 (CH-5'), 123,3 (CH-6'), 56,6 (OCH<sub>3</sub>), 105,3 (CH-1''), 75,5 (CH-2''), 76,4 (CH-3''), 71,0 (CH-4''), 76,7 (CH-5''), 68,6 (CH-6''), 102,5 (CH-1'''), 71,1 (CH-2'''), 71,4 (CH-3'''), 72,9 (CH-4'''), 69,8 (CH-5'''), 16,7 (CH-6''').

### VI.5.3 Composé C

#### 4'-méthoxy-3-(β-D-glucoperanosyl) kaempferol



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

**Quantité du produit :** 1,6 mg

**Aspect :** poudre jaune

**RMN <sup>1</sup>H :** 400 MHz, MeOD

6,22 (d, 1H, H-6)

6,42 (d, 1H, H-8)

7,55 (d, 1H, H-2')

7,32 (d, 1H, H-3')

6,32 (d, 1H, H-5')

7,55 (d, 1H, H-6')

4,99 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>-3')

Glu : 5,41 (d, 1H, 7,7, H-1'')

3,49 (dd, 1H, 7,7 ; 8,9, H-2'')

3,45 (t, 1H, 8,9, H-3'')

3,25 (t, 1H, 8,9, H-4'')

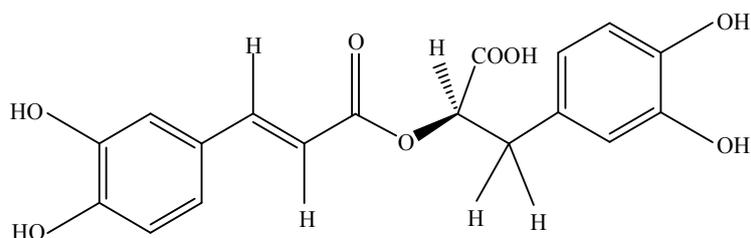
3,39 (dd, 1H, 8,9 ;6,5, H-5'')

3,83 (dd, 1H, 6,5 ;11,3, H-6''a)

3,43 (d, 1H, 11, 3, H-6''b)

#### IV.5.4 Composé D

##### Acide rosmarinique



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>

**Quantité du produit :** 73,3 mg

**Aspect :** poudre blanche

**RMN <sup>1</sup>H :** 400 MHz, MeOD

7,09 (d, 1H, H-2)

6,8 (m, 1H, H-5)

6,92 (dd, 1H, H-6)

7,53 (d, 1H, H-7)

6,3 (d, 1H, H-8)

6,72 (d, 1H, H-2')

6,8 (m, 1H, H-5')

6,64 (dd, 1H, H6')

3,13 (m, 1H, H-7'a)

2,92 (dd, 1H, H-7'b)

5,1 (dd, 1H, H-8')

**RMN <sup>13</sup>C:**

128 (C-1), 115 (CH-2), 145 (C-3), 149 (C-4), 123 (CH-6), 147 (CH-7), 116 (CH-8), 169 (CH-9), 130 (C-1'), 122 (CH-2'), 117 (CH-6'), 38 (CH-7'), 78 (CH-8')

*Conclusion*

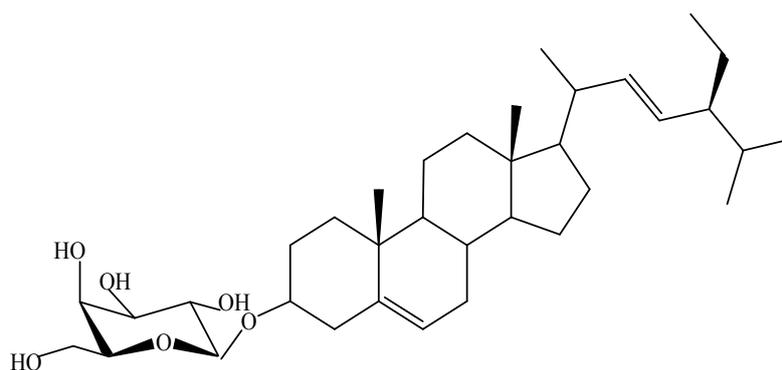
## Conclusion générale

Le présent travail décrit une investigation phytochimique d'une plante médicinale *Eryngium campestre*, cette plante est parmi les plantes de grande importance pharmacologique, appartient à la famille des Apiacées qui constituent une vaste subdivision du règne végétal. Cette famille est connue également par sa richesse en métabolites secondaires bioactifs tels que : les flavonoïdes, les saponines, les coumarines et les alcaloïdes.

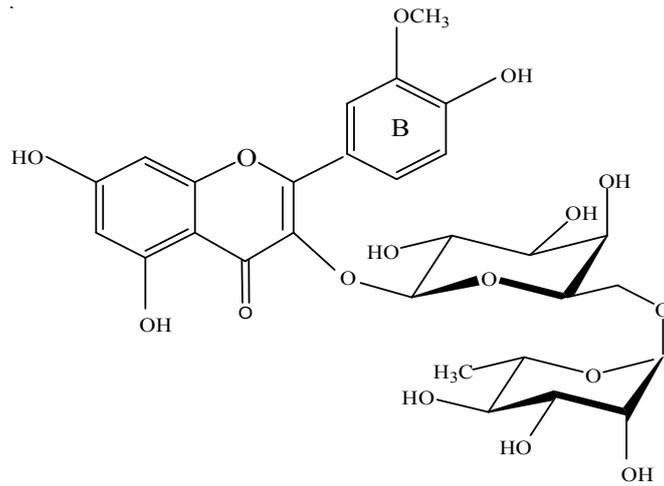
Au cours de notre travail, nous avons isolé les composés majoritaires de cette espèce. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince) et les méthodes chromatographiques modernes (HPLC).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN). Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC), nous ont permis d'établir la détermination structurale définitive et sans équivoque des métabolites secondaires isolés.

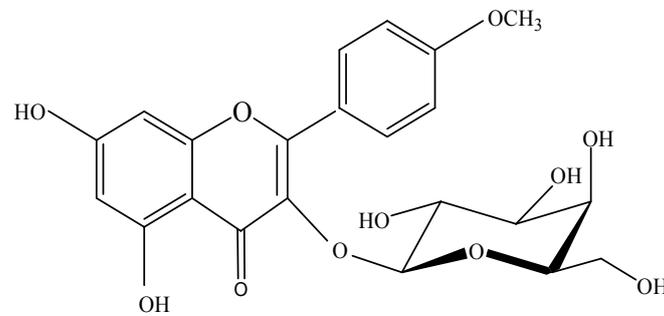
En conclusion, nous avons isolé à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de cette espèce quatre produits purs (**A-D**), et dont **A** est un stéroïde, **B** et **C** sont des flavonoïdes et **D** est un composé phénolique, leurs structures sont les suivantes :



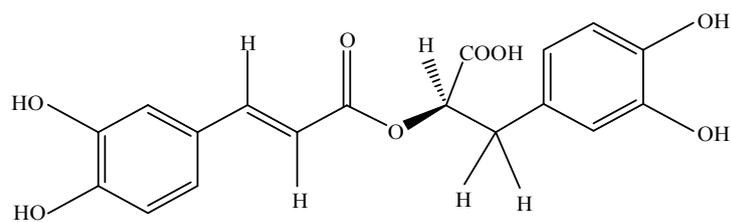
**Composé A : Stigmastérole-3 $\beta$ -D-glycopyranosyde**



**Composé B : Isorhamnétine 3-O-rutinoside (narcissine)**



**Composé C : 3-O-β-D glucopyranosyl Kaempferol**



**Composé D : Acide rosmarinique**

## *Bibliographie*

- [1] Quezel P ; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol.1-2.Ed.CNRS, Paris ; 1963.
- [3] Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Basel und Studgart: Birkhauser Verlag 1997 band VI, IX, X.
- [2] Christensen LP, Brandt K. J Pharm Biomed Anal; 683; 41; 2006.
- [4] Ozenda, P., Flore et végétation du Sahara, 1991, CNRS, Paris.
- [5] Heywood V. H., Moore D. M., Richardson I. B. K. et Stearn W. T ; Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale ; 218- 219 ; 1996.
- [6] Pimenov, M. G, and Leonov, M.V; The genera of the Umbelliferae Nomenclator. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom; 1993.
- [7] Drude, C.G.O; Umbelliferae. In: Engler, A., Prantl, K. (Eds.), Die natürlichen
- [8] Wolf, H; Umbelliferae-Saniculoideae. In: Engler, A. (Ed.), Das Pflanzenreich,. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany; 1–305; vol. IV 228; 1913.
- [9] Benhmed M; Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des apiaceae : *Carum montanum* Coss.&Dur. Et *Bupleurum montanum* Coss. These de Doctorat ; constantine; 2009.
- [10] Ayoub, N., Al-Azizi, M., König, W., Kubeczka, K; Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michaux. (Apiaceae). Flav. Fragr; J864–868; 21; 2006.
- [11] Turmel, J.M ; Géographie des *Eryngium*. I. Ancien ; Répartition géographique; 1948.
- [12] Lehinger, A. Principe de biochimie, Flammarion ; 315 ; 1989.
- [13] J. Pal-Pal, M.J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, J. Varadé, A.M. Villa, J. Sanz, J.J. Brophy, Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain, J. Chromatogr; 235–239; A 1074; 2005.
- [14] G. Flamini, M. Tebano, P.L. Cioni, Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy); Food Chem; 671–674; 107;2008.
- [15] N.A. Ayoub, K.H. Kubeczka, M.A.M. Nawwar, An unique n-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae), Pharmazie ; 674–676; 58; 2003.
- [16] Turmel, J.M ; Géographie des *Eryngium*. II. Nouveau ; Répartition géographique; 1949.
- [17] Astin, J.A., Marie, A., Pelletier, K.R., Hansen, E., Haskell, W.L ; A review of the incorporation of complementary and alternative medicine by mainstream physicians. Archives of Internal Medicine; 2303–2310; 158; 1998.

- [18] Yawar, A; Spirituality in medicine: what is to be done? *Journal of the Royal Society of Medicine*;529–533; 94; 2001.
- [19] Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T; Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*; 95–115; 75; 2001.
- [20] Abu-Irmaileh, B.E., Afifi, F.U.; Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of Ethnopharmacology*; 193–197; 89; 2003.
- [21] Everest, A., Ozturk, E; Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*; 1; 6; 2005.
- [22] Yesilada, E., Sezik, E; Part 28. A survey on the traditional medicine in Turkey: semi-quantitative evaluation of the results. In: Singh, V.K., Govil, J.N., Hashmi, S., Singh, G. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants; “Ethnomedicine and Pharmacognosy-II”*. Studium Press, LLC, Houston, Texas; 389–412; Vol. VII; 2003.
- [23] Baytop, T., *T`urkiye’de Bitkilerle Tedavi-Gec,mis,ten Bug`une* (Therapy with Medicinal Plants in Turkey-Past and Present); Nobel Tıp Basımevi, Istanbul, Turkey; 169; 2<sup>nd</sup> ed; 1999.
- [24] Lev, E; Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham. *Journal of Ethnopharmacology*; 167–179; 80; 2002.
- [25] Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, M.R., Faidi, Y.R., Salem, K., Al-Nuri, M.A., Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 265–271 ;1998.
- [26] Valnet, J ; *Cura delle malattie con le piante*. Firenze: Giunti Editore; 1977.
- [27] Weiner, M.A. *Earth Medicine, Earth Food*. Ballantine Books; 1980.
- [28] Foster, S., Duke, J.A. *A Field Guide to Medicinal Plants. Eastern and Central N. America*. Houghton Mifflin Co; 1990.
- [29] Moerman, D ; *Native American Ethnobotany*. Timber Press, Oregon; 1998.
- [30] Esra kupeli, murat Kartal, Sinem Aslan,Erdem Yasilda, comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species, *journal of ethnopharmacologie*; 32- 37; 107; 2006.
- [31] Gruenwald, J. Brendler, T. Jaenicke, C; *PDR for Herbal Medicines*; Medical Economics Company; New Jersey; 729–733; 2<sup>nd</sup> ed ; 2000.
- [32] Afifi, F.U., Al-khalil, S., Aqel, M., Al-muhtesep, M.H., Jaghabir, M., Saket, M., Muheid, A; Antagonistic effect of *Eryngium creticum* extract on scorpion venom in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*; 43–49; 29; 1990.

- [33] Alkofahi, A., Sallal, A.J., Disi, A.M; Effect on *Eryngium creticum* on the hemolytic activities of snake and scorpion venoms. *Phytotherapy Research* ; 540–542; 11; 1997.
- [34] Benoit, P.S., Fong, H.H.S., Svoboda, G.H., Farnsworth, N.R., Biological and Phytochemical evaluation of plants. XIV. Antiinflammatory evaluation of 163 species of plants; *Journal of Natural Products*; 160–181; 39; 1976.
- [35] Yesilada, E., Tanaka, S., Tabata, M., Sezik, E; . The anti-inflammatory activity of the fractions from *Eryngium billardieri* in mice. *Phytotherapy Research*; 38–40; 3; 1989.
- [36] Saenz, M.T., Fernandez, M.A., Garcia, M.D; Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). *Phytotherapy Research*; 380–383; 11; 1997.
- [37] Garcia, M.D., Saenz, M.T., Gomez, M.A., Fernandez, M.A; Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytotherapy Research* ; 78–80 ; 13 ; 1999.
- [38] Lisciani, R., Fattorusso, E., Surrano, V., Cozzolino, S., Giannattasio, M., Sorrentino, L.; Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 263–270; 12; 1984.
- [39] Loporatti, M.L., Ivancheva, S ; Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*; 123–142; 87; 2003.
- [40] Jaghabir, M ; Hypoglycaemic effects of *Eryngium campestre*. *Archives of Pharmacal Research* ; 14; 295–297; 1991. *Activité biologique espèce campestre*.
- [41] Ikramov, M.T., Bandyukova, V.A., Khalmatov, K.K ; Flavonoids of some species of *Eryngium*. *Chem. Nat. Comp* ; 7; 108.1973.
- [42] Zarnack, J., Hildebrandt, B., Hiller, K; To the knowledge of the compounds contained in some Saniculoideae Part XXXIII. Isolation of flavonol glycosides from *Eryngium giganteum* M.B. *Z. Chem*; 214–215; 19; 1979.
- [43] Hiller, K., Pohl, B., Franke, P; Flavonoid spectrum of *Eryngium maritimum* L; Components of some Saniculoideae. *Pharmazie*; 113–114; 35; 1981.
- [44] Kartnig, T., Wolf, J; Flavonoids from the aboveground parts of *Eryngium campestre*. *Planta Med* 59; 285; 1993.
- [45] Hohmann, J., Pall, Z., Gunther, G., Mathe, I. Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*. *Planta Med.* 63, 96; 1997.
- [46] Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Copeland, L.M., Pala-Paul, J; Essential oil of *Eryngium* L. species. *J. Essent. Oil Res*; 392–397; 15; 2003.

- [47] Ayoub, N.A., Kubeczka, H.H., Nawwar, M.A; An unique N-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae) ; 674–676; 58; 2003.
- [48] Erdelmerier, C.A., Sticher, O; Coumarin derivatives from *Eryngium campestre* L. *Planta Med*; 407–409; 51; 1985.
- [49] Le Claire, E., Schwaiger, S., Banaigs, B., Stuppner, H., Gafner, F ; Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *J. Agric. Food Chem*; 4367–4372; 53; 2005.
- [51] Anam, E.M; A novel triterpenoid saponin from *Eryngium foetidum*. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem*; 1500–1503; 41B; 2002.
- [52] Kartal, M., Mitaine-Offer, A.C., Abu-Asaker, M., Miyamoto, T., Calis, I., Wagner, H., Lacaille-Dubois, M.A; Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*; *Chem. Pharm. Bull*; 318–320; 53; 2005.
- [53] Kartal, M., Mitaine-Offer, A.C., Paululat, T., Abu-Asaker, M., Wagner, H., Mirjolet, J.F., Lacaille-Dubois, M.A; Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *J.2006*.
- [54] Zhizhen z, shiyou l, stacy awenby, ping wang, wei yuan, wanli zhang, r. scott Beasley, phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*; *phytochemistry*; 2070-2080; 69; 2008.
- [55] Jorgen Lam, Lars P. Christensen, Tove Thomssen, Acetylenes from roots of *Eryngium bourgatii*, *phytochemistry*, 2881-2882, 31; 1992.
- [56] Clemens. A, Erdelmeier.J, Stto Sticher, a cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium camestre*, *phytochemistry*,; 741-743; 25; 1986.
- [57] A. Merfak, Thèse d'état (biophysique). Radiolyse Gamma des flavonoides, université de limoges ; France ; 2003.
- [58] Davis, B.D; *Advenced in Enzymology*; 16; 227 ; 1955.
- [59] Adityachaudhury N., Kitaniga C. L. and Mukherjee B; The Structure and Synthesis of Flemichapparin Chalcones of *Flemingia Chapper Ham*; 2111-2117; *Tetrahedron* 27 ; 1971.
- [60] Korte, F., Barkemeyer, H. and Korte, I; *Pflanzliche Bitterstoffe*. In: *Fortschr.d. chemie Organ.Naturstoffe* (Zechmeister, L, ed); wien : springer; p.124; 17; 1959.
- [61] I, Litton Educational Publishing. M.V.H.Hywood, les plantes à fleurs, Nathan ; 1996.
- [62] Harborne J.B, *Flavonoids in phytochemistry*, Edition Lawrence, P.L; Litton Educational Publishing ; Vol. II; 1991.
- [63] Recio, M.C., Rios, J. L. and Villar, A; A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phototherapy*; 117-125; 3; 1989.

- [64] Dixon, R. A, et steele C.L Flavonoides et isoflavonoides. Usine Sci. 4.2 De tendance ; 394-400 ;1999.
- [65] Monde. Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. 2a Se'r. 21, 120–131.
- [66] Ong.K.C, Khoo.H.E. Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol; 121-126; 29; 1997.
- [67] Ong.K.C, Khoo.H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. Life Sci; 1695-1705; 67; 2000.
- [68] Harbone, J.B. and Williams; C.A.. The flavonoids advances in research since. ed. J.B. 1986.
- [69] Heller, W; Forkmann, G. In the flavonoides advences in research since 499-535;1993.
- [70] Bruneton, J ; Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, lavoisier, Paris ; 3; 3<sup>ème</sup> ed ; 1999.
- [72] Rice-evans, C.A., Miller, N. J., Bolwer, P.G., Bramley, P.M. and Ridham, J.B;The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, Free Rad. Res; 375-3.83; 22; 1995.
- [71] Chopin, J ; Actualité de phytochimie fondamentale, lième série, édition Masson, Paris ; 119 ; 1996.
- [73] COOK, M.C. and SAMMAN; 7; 1996.
- [74] Dixon, R.A., Dey, P. M. and Lamb, C. J; Phytoalexins: Enzymology andmolecular biology, Adv. Enzymol; 1-136; 55; 1983.
- [75] COWAN, M. M; Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev; 564-582; 12; 1999.
- [76] Chaudhry.P.S, Cabrera.J, Juliani.H.R, Varma.S.D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. Biochem Pharmacol; 1983; 32; 1995.
- [77] Hertog.M.G, Feskens.E.J, Hollman.P.C, Katan.M.B, Kromhout.D.D. antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.Lancet ; 1007-1011; 342 ; 1993.
- [78] Nitsh.J.P,et Nitsh.C, Synergistes naturels des auxines et des giberlilines ; 2237-2240 ; Bull.soc.Fr.26 ; 1961. Ch II propriétés des flavonoïdes.
- [79] Alibert .G Rangiva.R et Boudet.M.A ;Organistion subcellulaire res vois de synthèse des composés phynolique ; Physiol ;279-301 ; Veg.15 ;1997.
- [80] Middelton.Jr.E, ET Kardasnam.C, 1993. The flavonoides, advences in research since. 617-652 ; ed.J.B.Harborn, Chapman and Hall, London ; 1986.

- [81] Harborne, J.B. and Williams, C.A 200. Advances in Research Since. Phytochemistry ; 481-564; 55; 1992.
- [82] Gagnautl, J.C. Bidet, D. Gaillard, M. Perronnet, J. Stérols et steroids; Paris; 11-31; Ch II ;1997
- [83] Rahal, S. Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants, 39-44 ; 2004.
- [84] Raisonnier, A. Lipides et lipoprotéines. Objectifs au cours de Biochimie PCEM2. Biochimie Métabolique et Régulations ; 2003.
- [85] Khalik-uz-Zaman, S. M. Studies on the chemical constituents of Asparagus species and synthesis of biotin analogues, Karachi, 19-34 ; 1999.
- [86] Adolf, w ; hecker, e.; Balmain, A.; Lhomme, M. F.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.;Ponsinet, G.; Pryce, R.J.; Santhanakrishnan, T.S.; Matyukhina, L.G.; Saltikova, I.A ; "Euphorbiasteroid" (Epoxylythyrol): A new tricyclic diterpene from Euphorbia lathyris L. Tetrahedron Letters ;2241-2244 ; 26;1970.
- [87] Bruneton, J ; Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales; Tec&Doc, Paris ;387-402 ; 2<sup>nd</sup> ed ; 1993.
- [88] Yoder, R. A.; Johnston, J. N. A case study in biomimetic total synthesis: polyolefin carbocyclizations to terpenes and steroids. Chem Rev ; 4730-4756 ; 105(12) ; 2005.
- [89] Beuchet, P.; Letourneux, Y ; Hemisynthèse de stérols marins polyhydroxyés sulfates ou amines à partir de stéroïdes naturels. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux ; 37-53 ; 137 ; 1998
- [90] Danielsson, H. Sjovall, J. Sterols and bile acids. New Comprehensive Biochemistry; 12; 175; 1985.
- [91] Benveniste, P ; Sterol Metabolism. The Arabidopsis Book ; 2002.
- [92] Frénot, M; Vierling, E.Biochimie des aliments: diététique du sujet bien portant, 104-105 ; 2<sup>nd</sup> ed ; 2002.
- [93] Lodish ; Berk ; Matsudaira ; Kaiser ; Krieger ; Scott ; Zipursky ; Darnell. Biologie moléculaire de la cellule ; 750-752 ; 3<sup>ème</sup> éd; 2005.
- [94] Ammar, S.; Edziri, H.; Mahdjoub, M.A; Chatter, R.; Bouraoui, A.; Mighri, Z; Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*; Phytomedicine; 1156-1161 ; 16; 2009
- [95] Panda, S. Jafri, M.; Kar, A.; Meheta, B.K. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Bueta monosperma*. Fitoterapia; 123-126 ; 80 ; 2009.
- [96] Cailean C, Dan Stærk, Steen Honore Hansen, Jerzy W. Jaroszewski, Hyphenation of Solid-Phase Extraction with Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance:

Application of HPLC-DAD-SPE-NMR to Identification of Constituents of *Kanahia laniflora*,  
Anal. Chem ; 3547-3553 ; 77; 2005

[97] Kubota T; Hase T ; J. Inst. Polytech; 5 ; 49; 1956.

[98] Trute .A; Nahrstedt .A; Separation of Rosmarinic Acid Enantiomers by Three Different  
Chromatographic Methods (HPLC, CE, GC) and the Determination of Rosmarinic Acid in  
*Hedera helix* L, Phytochemical Analysis, Phytochemical Analysis; 204 –208; 7; 1996.

[99] Petersen .M; Simmonds. M. S.J; Rosmarinic acid, Phytochemistry; 121 –125; 62; 2003.

[100] Scarpati. M; Oriente. G, Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal  
*Rosmarinus off*) Ric. Sci; 2329-2333; 28; 1958.

[101] Lopez-Arnaldos. T; Lopez-Serrano. M; Ros Barcelo. A; Calderon. A.A; Zapata. J.M;  
Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation  
with Fe<sup>2+</sup> ions, Fresenius J. Anal. Chem; 311 -314; 351 ; 1995.

[102] J. L. Lamaison, C. Petitjean-Freytet, A. Carnat, Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic  
derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiceae medicinals,  
Ann Pharm Fr ; 103-8; 48; 1990.

## Annexe

**Sinusite** : inflammation des sinus de la face, elle se développe dans la muqueuse qui tapisse les sinus. La sinusite peut être aiguë. [Sinus : nom donne à certaines cavités de l'organisme].

**Infection** : invasion d'un organisme vivant par des micro-organismes pathogènes (bactérie, virus, champignon, parasite).

**Infection urinaire** : présence de germe dans les voies urinaires.

**Inflammation** : réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression (blessure, infection, irradiation, etc ...)

**Antitussif** : médicament utilisé dans le traitement symptomatique de la toux.

**Aphrodisiaque** : substance destinée à stimuler le désir et à améliorer la performance sexuelle, de manière réelle ou supposée.

**Acidose** : trouble de l'équilibre acido-basique de l'organisme correspondant à une augmentation dans le plasma et les liquides interstitiels.

**Antidiabétique** : médicament capable de diminuer le taux de glucose de sang (glycémie).

**Hémorroïde** : varice des veines situées autour de l'anus. [Anus est l'orifice terminal du tube digestif permettant la défécation].

**Brûlure** : lésion de la peau ou des muqueuses provoquées par leur exposition à une chaleur intense, ou

par leur contact avec un agent physique ou chimique.

**Cellulite** : modification ou altération visible du tissu cutané ou sous-cutané.

**Digestif** : un aide à la digestion : ensembles des processus mécanique et biochimique assurant la transformation et l'absorption des aliments.

**Œdème** : rétention pathologique de liquide dans les tissus de l'organisme, en particulier le tissu conjonctif.

**Laxatif** : médicament utilisé dans le traitement de constipation.

**Diurétique** : médicament augmentant l'excrétion urinaire de l'organisme, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle et des œdèmes.

**Fièvre** : température corporelle supérieure à 37°C, mesurée dans la bouche ou dans le rectum.

**Cataplasme** : préparation étalée entre deux linges et appliquée sur la peau pour soulager une inflammation (bronchite, douleur dorsale).

## Résumé

Le présent travail est le bilan d'une étude phytochimique, qui nous avons menée sur l'*Eryngium campestre* (famille Apiaceae).

Nos investigations ont porté sur l'extrait d'acétate d'éthyle des parties aériennes de cette plante. Quatre métabolites secondaires ont été caractérisés et sont des composés phénoliques, composés flavoniques et stéroïdes.

Les structures de ces quatre composés sont élucidées sur la base des méthodes spectroscopiques notamment la spectrométrie RMN dans ses multiples techniques, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC).

Les différentes parties de notre travail sont :

- ✓ Une première partie sur les travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante aux propriétés biologiques de l'espèce *campestre* et aux études chimiques antérieures réalisées sur la famille, l'espèce et le genre.
- ✓ Une seconde partie consacrée à une étude impliquant la structure, la classification, activité biologique, et biosynthèse des flavonoïdes et stéroïdes.
- ✓ 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.

**Mots clés** : phytochimie, apiaceae, *eryngium campestre*, composé flavonoidique.

## ملخص

هذا العمل عبارة عن حصيلة للدراسة الفيتوكيميائية التي أنجزت على النبتة *Eryngium campestre* والتي تنتمي إلى عائلة Apiaceae.

أبحاثنا متعلقة بمستخلص اسيتات الاثيل للجزء الهوائي لهذه النبتة حيث تم تمييز أربع مركبات، مركب فبنولي، مركبان فلافونيان و آخر مركب ستيرويدي.

تم عزل هذه المركبات العضوية بواسطة مختلف طرق الفصل الكروماتوغرافي و حددت بنيتها على أساس مختلف الطرق المطيافية لاسيما الرنين المغناطيسي النووي بمختلف تقنياته.

نتائج هذا العمل جاءت موضحة وفق الفصول التالية

- ✓ الفصل الأول : عبارة عن الوصف النباتي للنبتة محل الدراسة، الخصائص البيولوجية و كذا دراسة كيميائية حول العائلة، النوع و الصنف.
- ✓ الفصل الثاني : مخصص لدراسة متضمنة البنية، النشاط البيولوجي و الخلق الحيوي و الكيميائي للفلافونويدات.
- ✓ الفصل الثالث : يضم الأعمال الشخصية المتعلقة بفصل و تحديد بنية المركبات المعزولة.
- ✓ الفصل الرابع: متضمن الجزء العملي.

## **Abstract**

The present work is the result of a phytochemical study that we conducted on the *Eryngium campestre* (Apiaceae family).

Our investigation focused on the ethyl acetate extract of the aerial parts of this plant. Four secondary metabolites have been characterized and are phenolic compounds, flavonoid compounds and steroids.

The structures of these four compounds were elucidated based on spectroscopic methods including NMR spectrometry in its many technical, NMR  $^1\text{H}$ , NMR  $^{13}\text{C}$ , and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC).

The different parts of our work are:

- ✓ The first part on previous work devoted to the botanical description of the plant to the biological properties of the species *campestre* and chemical studies performed earlier on the family, the species and gender.
- ✓ A second part devoted to a study involving the structure, classification, biological activity, and biosynthesis of flavonoids and steroids.
- ✓ A third section describes our personal work from the separation to the determination of structures of isolated products.
- ✓ A fourth part constituting the experimental part.

**Keywords:** Phytochemistry, apiaceae, *Eryngium campestre*, flavonoid compound.