

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

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

SPECIALITE : CHIMIE

Présentée par

HABA HAMADA

Thème

Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes :
***Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk.**

Soutenue publiquement le 03 juillet 2008

JURY

Ammar DIBI	Professeur Université de Batna	Président
Mohammed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Rapporteur
Fadila BENAYACHE	Professeur Université de Constantine	Examinatrice
Samir BENAYACHE	Professeur Université de Constantine	Examineur
Kaddour LAAMARA	Professeur Centre Universitaire de Oum El Bouaghi	Examineur
Abdelhamid BENKOUIDER	Maître de Conférences Université de Batna	Examineur

Remerciements

Cette thèse de Doctorat en chimie est le résultat d'un travail de collaboration entre les universités de Batna Algérie et Reims France. La 1^{ère} partie de cette recherche est réalisée au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des Sciences université de Batna, sous la direction du professeur BENKHALED Mohammed, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de phytochimie du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) et de m'avoir permis de préparer mon doctorat dans les meilleures conditions. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et ses encouragements et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer la 2^{ème} partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de pharmacognosie de la faculté de pharmacie de Reims France dirigé par le professeur Janos SAPI, sous la direction du professeur Catherine LAVAUD. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de pharmacognosie, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le professeur DIBI Ammar de l'université de Batna pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de doctorat.

J'aimerais également remercier vivement Madame le professeur BENAYACHE Fadila de l'université de Constantine, Monsieur le professeur BENAYACHE Samir de l'université de l'université de Constantine, Monsieur le professeur LAAMARA Kaddour du Centre universitaire de Oum El bouaghi et Monsieur BENKOUIDER Abdelhamid, maître de conférences à l'université de Batna pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le professeur BENDAIKHA Tahar, directeur du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de l'université de Batna et doyen de la faculté des Sciences pour son soutien et ses encouragements.

J'exprime mes sincères remerciements à Georges Massiot, Laurence Marcourt, Christophe Long du centre de recherche sur les substances naturelles de Pierre Fabre de Toulouse France, pour leur aide et disponibilité en me permettant la réalisation des spectres RMN et Masse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de pharmacognosie de Reims pour leur soutien et les facilités accordées pour la réalisation de ce travail : Madame le professeur Monique ZECHES, le Dr. Abdulmagid alabdul Magid, le Dr. Laurence Voutquenne-Nazabadioko, le Dr. Christophe BLIARD, le Dr. Jean-Marc NUZILLARD, le Dr. Catherine CARON, Bernard RICHARD, Mariejoe JACQUIER, Agathe MARTINEZ, Jean PATRICK,.....

J'exprime également mes remerciements à mes collègues de l'unité de phytochimie du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE pour leur amitié et gentillesse: Mohammed, Hassina, Fatima, Lynda, Rachid, Souad, Hakim, Sonya, Fatiha, Rahima,

Je tiens à remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Algérien pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre du PNE 2006/2007 afin de finaliser ma thèse.

Dédicace

Cette thèse est dédiée à :

A mes chers parents qui m'ont encouragé à être ce que je suis, avec tant d'amour.

A ma chère femme Ikram, qui par sa compréhension, sa tendresse et ses encouragements, a soutenu sans cesse mes efforts durant la réalisation de ce travail.

A mes chers enfants : Ines, Massil et Sylia pour leur amour

A mes chers frères et Sœurs ainsi que ma famille pour leurs encouragements

A tous mes amis et collègues.

Abréviations

AcOEt	: acétate d'éthyle
MeOH	: méthanol
ACN	: acetonitrile
CHCl ₃	: chloroforme
CH ₂ Cl ₂	: dichlorométhane
EtOH	: éthanol
KOH	: hydroxyde de potassium
Na ₂ SO ₄	: sulfate de sodium
CDCl ₃	: chloroforme deutérié
CD ₃ OD	: méthanol deutéré
DMSO-d ₆	: diméthylsulfoxyde deutérié
TFA	: acide trifluoroacétique
CCM	: chromatographie sur couche mince
CC	: chromatographie sur colonne ouverte de silice
CPP	: chromatographie sur plaque préparative
GC-MS	: chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
VLC	: chromatographie liquide sous vide
CLHP	: chromatographie liquide haute performance
SiO ₂	: gel de silice normale
C ₁₈	: Silice greffée
ax	: axial
éq	: équatorial
<i>quint</i>	: quintuplet
<i>sept</i>	: septuplet
<i>q</i>	: quadruplet
<i>qd</i>	: quadruplet de doublet
<i>d</i>	: doublet
<i>dd</i>	: doublet de doublet
<i>ddd</i>	: doublet de doublet de doublet
<i>dt</i>	: doublet de triplet
<i>dtt</i>	: doublet de triplet large
<i>t</i>	: triplet
<i>td</i>	: triplet de doublet
<i>tdd</i>	: triplet de doublet de doublet
<i>ddl</i>	: doublet de doublet large
<i>dl</i>	: doublet large
<i>s</i>	: singulet
<i>sl</i>	: singulet large
<i>m</i>	: multiplet
<i>dm</i>	: doublet de multiplet
<i>l</i>	: large
C _q	: carbone quaternaire
RMN ¹ H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	: résonance magnétique nucléaire du carbone 13
COSY H-H	: correlated spectroscopy

HSQC	: heteronuclear single quantum connectivity
HMBC	: heteronuclear multiple bonding connectivity
NOESY	: Nuclear overhauser effect spectroscopy
NOE	: nuclear Overhauser effect
RMN	: résonance magnétique nucléaire
δ	: déplacement chimique exprimé en ppm
W1/2	: largeur spectrale à mi-hauteur
J (Hz)	: constante de couplage exprimée en Hz
SM	: spectrométrie de masse
EI	: impacte électronique
ESI	: spectrométrie de masse par electrospray
FAB	: bombardement d'atomes rapides
HR	: haute résolution
uma	: unité de masse atomique
m/z	: masse/charge d'un ion
Na	: sodium
K	: potassium
IR	: infra-rouge
UV	: ultra-violet
Rdt.	: rendement
ATP	: adénosine triphosphate
CDP	: copalyl diphosphate
DMAPP	: diméthylallyl diphosphate
FDP	: farnésyl diphosphate
GDP	: géranyl diphosphate
GGDP	: géranylgéranyk diphosphate
GGPP	: géranylgéranyl pyrophosphate
IPP	: isopentényl diphosphate
MVA	: mévalonate
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
VAM	: voie de l'acide mévalonique
Réf.	: référence
Lit.	: littérature

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I- Rappels bibliographiques	4
I-1- Position systématique de la famille des Euphorbiaceae.....	5
I-2- Caractères morphologiques généraux de la famille Euphorbiaceae.....	6
I-3- Utilisation en médecine traditionnelle	7
I-4- Autres usages	8
I-5- Présentation du genre <i>Euphorbia</i>	9
I-6- Métabolites isolés du genre <i>Euphorbia</i>	10
I-6-1- Diterpénoïdes.....	10
I-6-2- Triterpénoïdes.....	24
Chapitre II- Etude des terpénoïdes	37
II-1- Généralités.....	38
II-2- Biosynthèse des terpènes.....	38
II-3- Diterpènes	41
II-3-1- Introduction	41
II-3-2- Biosynthèse des diterpènes.....	41
II-3-3- Propriétés biologiques et emplois des drogues à diterpènes	46
II-4-Triterpènes.....	47
II-4-1- Introduction.....	47
II-4-2- Biosynthèse des triterpènes.....	47
II-4-3- Intérêts des triterpènes	52

Chapitre III- Etude phytochimique de l'espèce <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss and Reut.	53
III-1- Rappels botaniques	54
III-2- Toxicité	55
III-3- Utilisation en médecine traditionnelle	55
III-4-Travaux antérieurs sur l'espèce.....	55
III-5- Chimie extractive	56
III-5-1- Extraction	56
III-5-2- Purification	57
III-6- Caractérisation des produits obtenus	59
III-6-1- Produits nouveaux	59
III-6-2- Produits connus	59
III-6-3- Elucidation structurale du composé 1.....	63
III-6-4- Elucidation structurale du composé 2.....	72
III-6-5- Elucidation structurale du composé 3.....	81
III-6-6- Elucidation structurale du composé 4.....	86
III-6-7- Elucidation structurale du composé 5.....	89
III-6-8- Elucidation structurale du composé 6.....	93
III-6-9- Elucidation structurale du composé 7.....	98
III-6-10- Elucidation structurale du composé 8.....	105
III-6-11- Elucidation structurale du composé 9.....	109
III-6-12- Elucidation structurale du composé 10.....	114
III-6-13- Elucidation structurale du composé 11.....	118
III-6-14- Elucidation structurale du composé 12.....	123
III-6-15- Elucidation structurale du composé 13.....	128
III-6-16- Elucidation structurale du composé 14.....	132
III-6-17- Elucidation structurale du composé 15.....	135
III-6-18- Elucidation structurale du composé 16.....	139
III-6-19- Elucidation structurale du composé 17.....	143
III-6-20- Elucidation structurale du composé 18.....	146
III-6-21- Elucidation structurale du composé 19.....	153
III-6-22- Elucidation structurale du composé 20.....	153
III-7- Conclusion	160

Chapitre IV- Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia retusa* Forsk.

.....	161
IV-1- Description botanique	162
IV-2- Utilisation en médecine traditionnelle	162
IV-3- Travaux antérieurs sur l'espèce	163
IV-4- Extraction et fractionnement.....	166
IV-5- Purification des composés	167
IV-6- Hydrolyse alcaline des composés	167
IV-7- Caractérisation des produits isolés	169
IV-7-1- Produits nouveaux	169
IV-7-2- Produits connus	171
IV-7-3- Elucidation structurale du composé 21.....	173
IV-7-4- Elucidation structurale du composé 22.....	173
IV-7-5- Elucidation structurale des composés 23-28.....	176
IV-7-5-1- Protons et carbones communs aux composés 23-26.....	178
IV-7-5-1-1- Identification du composé 23.....	183
IV-7-5-1-2- Identification du composé 24.....	193
IV-7-5-1-3- Identification du composé 25.....	196
IV-7-5-1-4- Identification du composé 26.....	201
IV-7-5-2- Identification du composé 27.....	204
IV-7-5-3- Identification du composé 28.....	209
IV-7-6- Elucidation structurale du composé 29.....	217
IV-7-7- Elucidation structurale du composé 30.....	217
IV-7-8- Elucidation structurale du composé 31.....	224
IV-7-9- Elucidation structurale du composé 32	229
IV-7-10- Elucidation structurale du composé 33	235
IV-7-11- Elucidation structurale du composé 34	240
IV-7-12- Elucidation structurale des composés 35 et 36	244
IV-7-13- Elucidation structurale du composé 37	244
IV-7-14- Elucidation structurale du composé 38	250
IV-7-15- Elucidation structurale du composé 39	250
IV-8- Conclusion	251

Conclusion générale	252
V- Partie expérimentale	256
V-1- Matériels et appareillage	257
V-1-1- Récolte des plantes <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. et Reut et <i>Euphorbia retusa</i> Forsk.	257
V-1-2- Chimie extractive	257
V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)	257
V-1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	257
V-1-2-3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	258
V-1-3- Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	258
V-1-3- Chimie structurale.....	258
V-1-3-1- Spectroscopie de RMN.....	258
V-1-3-2- Spectrométrie de masse.....	258
V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible.....	259
V-1-3-4- Spectrométrie Infra-Rouge (IR).....	259
V-1-3-5- Pouvoir rotatoire	259
V-2- Etude de l'espèce <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. Et Reut.....	259
V-2-1- Extraction des racines de l'espèce <i>E. guyoniana</i>	259
V-2-2- Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique de l'espèce <i>E. guyoniana</i>	260
V-2-3- Composés isolés de l'espèce <i>Euphorbia guyoniana</i>	264
V-3- Etude de l'espèce <i>Euphorbia retusa</i> Forsk.....	271
V-3-1- Extraction des racines de l'espèce <i>E. retusa</i>	271
V-3-2- Fractionnement et purification.....	271
V-3-3- Composés isolés de l'espèce <i>Euphorbia retusa</i>	273
Bibliographie	279

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes pour lutter contre diverses maladies qui guettent sans cesse sa vie. De nos jours, une large couche de la population mondiale, notamment celle des pays en voie de développement, utilise les plantes médicinales du fait de son incapacité à accéder, voire bénéficier des vertus de la médecine moderne.

Ces plantes médicinales devenues par la suite une source principale de découverte de nouveaux principes actifs, occupent désormais une position primordiale dans le domaine de la recherche de nouveaux médicaments. Actuellement, plus de 50% de ces derniers sont d'origine naturelle. Paradoxalement, le règne végétal qui englobe environ 500000 espèces n'a été que partiellement étudié sur les plans chimique et pharmacologique. C'est ainsi que le développement de l'industrie pharmaceutique, depuis la découverte de l'aspirine jusqu'à l'avènement du taxol, est dû largement à la diversité des métabolites secondaires présents dans les différentes parties des plantes, permettant dans une certaine mesure d'accéder à de nouvelles molécules aux propriétés biologiques dignes d'intérêt.

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [1]. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles.

Dans le cadre de la valorisation de la flore de la région des Aurès et du nord du Sahara Algérien, par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, notre laboratoire a entamé un programme de recherche destiné à l'étude chimique de cette flore. L'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle demeurent nos critères principaux de sélection de plantes en vue d'une investigation chimique.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de deux plantes sahariennes de la famille des Euphorbiaceae : *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. Si la première plante est endémique à l'Algérie [2], la deuxième espèce est commune à toute la région méditerranéenne [1,2]. Ces deux euphorbes sont par ailleurs utilisées en médecine traditionnelle locale [3].

L'espèce *E. guyoniana* a fait l'objet récemment d'une seule étude chimique. Celle-ci réalisée sur les parties aériennes, a conduit à l'isolement et la caractérisation de deux diterpènes polyesters à squelette jatrophane [4]. L'étude phytochimique des parties aériennes de l'espèce *E. retusa* a abouti particulièrement à l'identification de flavonoïdes [5] et de triterpénoïdes tétracycliques et pentacycliques [6,7].

De ce fait, notre travail relatif à l'investigation phytochimique de ces deux espèces, a porté sur les racines. Il nous a permis d'isoler et d'identifier de nombreux triterpénoïdes et diterpénoïdes présentant plusieurs squelettes carbonés.

Notre travail sera présenté comme suit :

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Position systématique de la famille des Euphorbiaceae

Caractères morphologiques généraux de la famille Euphorbiaceae

Présentation du genre *Euphorbia*

Utilisation en médecine traditionnelle

Autres usages

Métabolites isolés du genre *Euphorbia*

Chapitre II : Etude des terpénoïdes

Généralités

Biosynthèse des terpènes

Diterpènes

Introduction

Biosynthèse des diterpènes

Propriétés biologiques et emplois des drogues à diterpènes

Triterpènes

Introduction

Biosynthèse des triterpènes

Intérêts des triterpènes

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut.

Rappels botaniques

Toxicité

Utilisation en médecine traditionnelle

Travaux antérieurs sur l'espèce

Chimie extractive : extraction et purification des composés

Caractérisation des produits obtenus

Conclusion

Chapitre IV : Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia retusa* Forsk.

Description botanique

Utilisation en médecine traditionnelle

Travaux antérieurs sur l'espèce

Extraction et fractionnement

Purification des composés

Hydrolyse alcaline des composés

Caractérisation des produits isolés

Conclusion

Conclusion générale

Chapitre V : Partie expérimentale

Bibliographie

Chapitre I
Rappels bibliographiques

I-1- Position systématique de la famille Euphorbiaceae

La famille Euphorbiaceae comprend environ 10000 espèces regroupées dans 300 genres [2]. Elle est considérée comme l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte le sous embranchement des Angiospermes [8].

Elle n'est pas assez connue sur le plan systématique. Des tendances à la division se manifestent souvent. A titre d'exemple, plus de cinquante genres ont été introduits puis considérés comme synonymes. Ce constat peut s'expliquer par sa distribution car localisée principalement dans les régions tropicales et l'existence éphémère des fleurs chez certains de ses représentants, rendant par voie de conséquence leur identification difficile et entravant ainsi toute étude botanique [9]. Cependant, les plantes Euphorbiaceae ont fait l'objet de plusieurs études menées par quelques systématiciens en vue d'élaborer une classification plus précise de cette grande famille. En effet, la classification botanique qui n'est pas statique, est une discipline en perpétuelle évolution. De nombreux travaux de recherches, tenant compte du nombre toujours plus important de caractères tant morphologiques qu'anatomiques, permettent l'établissement de nouveaux systèmes de classifications et le remaniement de certains d'entre eux. Jusqu'à ces vingt dernières années, aucune de ces modifications dans la systématique n'a eu de retombées directes sur la famille des Euphorbiaceae. D'ailleurs, la majorité des systématiciens qui se sont penchés sur sa classification se sont toujours accordés à dire que la principale famille représentative de l'ordre des Euphorbiales, définie par Lindley en 1833, restait la famille Euphorbiaceae [9]. Les changements apportés aux différents systèmes de classification élaborés concernent exclusivement la partie amont de l'ordre des Euphorbiales [8].

Dans cet ordre d'idées, plusieurs systématiciens ont émis des hypothèses de classification suivantes :

Selon Engler, les Euphorbiaceae appartiennent au taxon des Rhizophytes qui comprend l'embranchement des Spermaphytes avec comme sous embranchement celui des Angiospermes. Elles font partie de la classe des Dicotylédones, de la sous classe des Dialypétales, de la série des Thalamiflores, de l'ordre des Géraniales et du sous ordre des Euphorbiineae.

Pour Cronquist, cette même famille est rattachée au super-ordre des Rosidae et l'ordre des Euphorbiales.

Dahlgren classe la famille des Euphorbiaceae dans le super ordre des Malviflorae et l'ordre des Euphorbiales.

Thorne a élaboré une classification selon laquelle les Euphorbiaceae se trouvent dans le super-ordre des Malvanae et l'ordre des Euphorbiales.

Cependant, Webster [9] propose une autre classification et reconnaît cinq sous-familles Euphorbiaceae : phyllanthoïdeae, oldfieldioideae, Acalyphoideae, crotonoideae et Euphorbiadeae.

Taxon :	Rhizophytes
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dialypétales
Série :	Thalamiflores
Sous-série :	Méristémones
Ordre :	Tricoques
Famille :	Euphorbiaceae
Sous-famille :	Euphorbiadeae

Il est à signaler que de véritables bouleversements dans la systématique ont pu avoir lieu récemment suite à l'avènement d'une nouvelle classification connue sous le nom de classification phylogénétique. Elle se base sur les principes de la phénétique et de la cladistique pour procéder à des classifications des espèces. Ainsi les Euphorbiaceae appartiennent aux Angiospermes supérieurs ou Eudicotylédones, à l'ordre des Rosidées, Rosidées hypogynes, gamocarpellées, discifères ou glandulifères, ordre des Malpighiales [8].

I-2- Caractères morphologiques généraux de la famille des Euphorbiaceae

Les Euphorbiaceae poussent partout, sauf dans les régions antarctiques et les sommets des hautes montagnes [10]. Arbres ou buissons, lianes ou plantes succulentes, elles élaborent souvent une matière visqueuse de couleur blanche appelée latex, irritant pour les yeux et provoquant des rougeurs sur la peau. Cette famille est très hétérogène. Les plantes qui la constituent varient à la fois par leur appareil végétatif ainsi que par la structure de leurs fleurs [2,10].

Les feuilles à formes très variables, sont en général longuement pétiolées, alternes, voire plus rarement opposées, simples ou composées, palmatinervées ou pennatinervées [2,8]. Pour certaines espèces, elles sont réduites à des épines. Le limbe est le plus souvent denté. Des glandes sécrétrices sont généralement présentes sur le pétiole, le limbe et la marge du limbe.

Les inflorescences sont très variables puisqu'il s'agit de cymes, de thyrses, de grappes, d'épis ou de panicules, généralement bisexués.

Les fleurs sont déclines et rarement isolées, plus souvent groupées en grappes et chez certains genres réunies pour former un dispositif appelé cyathe, comme dans le genre *Euphorbia*.

La fleur est cyclique, achlamyde ou haplochlamyde et dans ce cas, actinomorphe et sépaloïde, trimère ou pentamère, hypogyne et unisexuée. Les sépales sont libres ou soudés par la base. La fleur mâle, souvent exempte de pétales, contient de 0 à un nombre indéfini de sépales et de 1 à un nombre indéfini d'étamines. Les anthères présentent une déhiscence qui peut être longitudinale, transversale ou encore poricide. Un ovaire rudimentaire est parfois présent. La fleur femelle ne contenant pas de pétales, peut compter de 0 à un nombre indéfini de sépales et 3 carpelles. L'ovaire, la plupart du temps tricarPELLÉ et triloculaire, est surmonté de 3 styles libres ou partiellement soudés à la base, eux même surmontés de 3 stigmates.

Le fruit est une capsule tricoque à déhiscence loculicide, septicide ou encore un schizocarpe à déhiscence explosive. La graine est albuminée et caronculée [2,8].

I-3- Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes Euphorbiaceae sont largement et universellement utilisées en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies [3]. Cette utilisation à grande échelle par les sociétés primitives, en fait un argument prépondérant qui justifie les travaux intensifs de recherches réalisés tant du point de vue phytochimique que pharmacologique. A ce jour, nombre d'espèces sont utilisées en médecine traditionnelle. On citera :

Chrozophora brocchiana (Vis.) Schweinf. : Les cendres de cette espèce sont employées par les touaregs, particulièrement dans le sud d'Algérie, pour soigner les plaies des dromadaires. Elles s'avèrent plus efficaces que le goudron.

Chrozophora tinctoria (L.) A. Juss. : Dans la région d'Agadir (Maroc), les graines de cette plante sont utilisées pour leurs propriétés purgatives et émétiques.

Croton eluteria Bennett : La drogue préparée à partir d'écorce de cette plante, est connue pour son action hypotensive chez les populations d'Amérique latine. En Europe de l'ouest, elle est particulièrement réputée comme fébrifuge. Elle est utilisée en médecine traditionnelle contre la malaria, la dysentérie et la fièvre.

Croton tiglium L. : Ses graines disponibles chez les herboristes marocains, sont préconisées en tant que purgatif énergétique. En général, on associe à ces graines de la gomme arabique pour adoucir son action.

Euphorbia resinifera Berg. : La résine de cette espèce endémique marocaine appelée communément Euphorbe résinifère, est utilisée en applications locales comme révulsivante. Pétrie avec de la farine ou de la semoule et du blanc d'œuf, elle est utilisée contre les rhumatismes et les

paralysies. Elle est également employée pour soigner les piqûres, les morsures venimeuses et les algies dentaires. Les femmes emploient aussi un mélange à base de la résine d'euphorbe comme abortif malgré ses dangers. Le latex frais de cette plante est recommandé par les berbères de Beni-Mellal, contre les verrues.

Euphorbia obtusifolia Poiret : Le latex de cette espèce est préconisé au Sahara occidental, en applications externes, en tant que remède contre les morsures de serpents et la gale animale.

Euphorbia antiquorum L. : Cette plante originaire de l'Inde et du Sri Lanka, est utilisée entièrement pour traiter les infections cutanées. Le latex est employé contre la grippe et pour soigner les problèmes des voies respiratoires, principalement la bronchite.

Euphorbia kansui L. : Les racines séchées de cette plante, connues sous le nom de « Kan Sui » dans la médecine traditionnelle chinoise, sont préconisées comme remède contre le cancer.

Euphorbia cyparissias L. : Les graines de cette espèce renfermant des saponosides, sont utilisées pour leurs propriétés purgatives et anti-inflammatoires.

I-4- Autres usages

Du fait de l'origine polygénétique des plantes Euphorbiaceae, leur distribution à travers tous les continents ainsi que leur grande diversité tant botanique que chimique, cette famille offre une grande quantité de plantes d'intérêt économique. On rencontre des plantes à latex, à fibres, oléagineuses, alimentaires et des plantes productrices du bois, du papier et des poisons [8,10,11].

Les espèces suivantes connaissent à ce jour, des utilisations dans différents domaines :

Manihot esculenta Crantz présentant un intérêt alimentaire, constitue l'aliment amylicé de base d'environ 500 millions d'habitants des zones tropicales [10]. La consommation du rhizome (manioc) requiert au préalable une préparation adéquate. Cette plante contient de cyanoglucosides responsables de sa toxicité.

Hevea brasiliensis Müell Arg. joue un rôle industriel majeur dans la production de caoutchouc naturel car elle couvre actuellement plus de 95% de la production mondiale [11].

Ricinus communis L. dont les graines produisent une huile connue depuis très longtemps pour ses propriétés purgatives. Cette huile est utilisée comme lubrifiant pour les moteurs au début du XX^e siècle et pour la fabrication de peintures et de vernis. La polymérisation de certains de ses dérivés, donne un polyamide appelé Rilsan servant à la fabrication de pièces moulées et tissus [12]

Le latex d'autres plantes Euphorbiaceae est employé comme poison de flèches en Afrique (*Euphorbia unispina* N. E. Br.), dans les Caraïbes (*Hippomane mancenilla* L.) ainsi qu'en Malaisie (*Excoecaria agallocha* L.) [10]. La toxicité est due à la présence d'esters diterpéniques à squelettes tigliane, daphnane et ingénane.

I-5- Présentation du genre *Euphorbia*

La famille des Euphorbiaceae comprend environ 300 genres et 10000 espèces dont 1600 pour le seul genre *Euphorbia*. Ce dernier est le plus représentatif de cette famille [2,8]. Les plantes du genre *Euphorbia* sont bien représentées au Sahara septentrional et en Europe.

En Algérie, on peut rencontrer principalement les espèces suivantes (tableau 1) [1,2] :

	Espèces
1	<i>E. granulata</i> Forsk.
2	<i>E. chamaesyce</i> L.
3	<i>E. echinus</i> Hook fil. et Coss.
4	<u><i>E. guyoniana</i> Boiss. et Reut.</u>
5	<i>E. calyptata</i> Cosson et DR.
6	<u><i>E. retusa</i> Forsk.</u>
7a	<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>flamandi</i> (Batt)
7b	<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>inconspicua</i> (Ball.)
7c	<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>glebulosa</i> (Cosson et DR.)
8	<i>E. pubescens</i> Vahl.
9	<i>E. peplus</i> L.
10	<i>E. terracina</i> L.
11	<i>E. helioscopia</i> L.
12	<i>E. sanguinea</i> Hochst. et steud.
13	<i>E. atlantica</i> Coss.
14	<i>E. akenocarpa</i> Guss.
15	<i>E. nicaensis</i> All.
16	<i>E. pithyusa</i> L.
17	<i>E. paniculata</i> Desf.

Tableau 1 : Espèces du genre *Euphorbia* en Algérie

Les fleurs des plantes du genre *Euphorbia* sont groupées en formant un dispositif appelé cyathe, constituée par une cupule dont le diamètre peut mesurer quelques millimètres portant sur ses bords quatre appendices généralement de couleur jaune ou rouge ; de cette cupule sortent des étamines et un pistil portés sur un pédoncule. L'étamine représente une fleur mâle et le pistil une

fleur femelle. La cyathe a donc la valeur d'une inflorescence dont la cupule et les pièces sous forme de croissant représenteraient l'involucre [1,2].

I-6- Métabolites isolés du genre *Euphorbia*

Les plantes du genre *Euphorbia* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Ces études qui concernent particulièrement leur latex, ont permis l'isolement et la caractérisation d'un nombre important de métabolites secondaires, se répartissant principalement en :

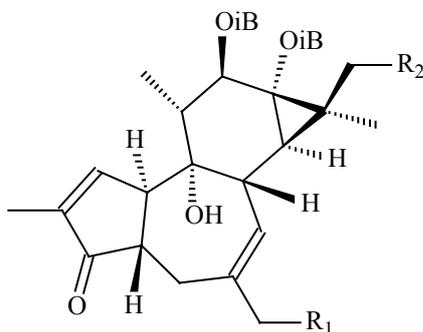
I-6-1- Diterpénoïdes

Les diterpènes constituent une vaste famille de molécules en C-20 présentant une très grande variété structurale. Les espèces du genre *Euphorbia* comptent bon nombre de squelettes différents. On citera les squelettes pimarane, abiétane, atisane, tigliane, jatropane. Elles comptent également un groupe à part de molécules, en l'occurrence les esters diterpéniques comme les dérivés du phorbol. Cette classe de composés, se trouvant chez les seules Euphorbiaceae et Thymelaeaceae, confère aux plantes de ces familles, un caractère toxique [10,13].

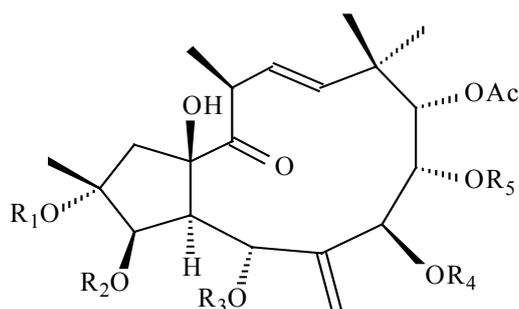
Les esters diterpéniques toxiques à structure complexe, sont présents dans 14 des 300 genres que compte la famille et notamment le genre *Euphorbia* [13]. Cependant, ils ne sont pas rencontrés dans toutes les espèces du genre en question.

Le latex de l'espèce *Euphorbia obtusifolia* contient plusieurs diterpénoïdes minoritaires à squelette tigliane et jatropane [14]. Il s'agit de : 4,20-dideoxyphorbol-12,13-bis(isobutyrate) (**1**), 4-deoxyphorbol-12,13-bis(isobutyrate) (**2**), 17-acétoxy-4-deoxyphorbol-12,13-bis(isobutyrate) (**3**), 17-acétoxy-4-deoxyphorbol-12,13-bis(isobutyrate) (**4**), 4-deoxyphorbol-12,13-bis(isobutyrate)-20-acétate (**5**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-7,8,9-triacétate-2,5-bis(2-méthylbutyrate) (**6**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-7,8,9-triacétate-2-isobutyrate-5-(2-méthylbutyrate) (**7**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-7,8,9-triacétate-2-nicotinate-5-(2-méthylbutyrate) (**8**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-8,9-diacétate-7-isobutyrate-2,5-bis(2-méthylbutyrate) (**9**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-2,8,9-triacétate-7-isobutyrate-5-(2-méthylbutyrate) (**10**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-7,9-diacétate-8-benzoate-2,3-bis(2-méthylbutyrate) (**11**), 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxyjatropha-6(17),11-dièn-14-one-8,9-diacétate-7-isobutyrate-2,3-bis(2-méthylbutyrate) (**12**).

Leur structures moléculaires ont été établies grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques (RMN 1D et 2D, FAB-MS, EI-MS et IR).

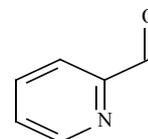
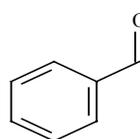
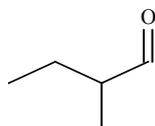
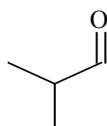


	R ₁	R ₂
1	H	H
2	OH	H
3	OH	OAc
4	H	OAc
5	OAc	H

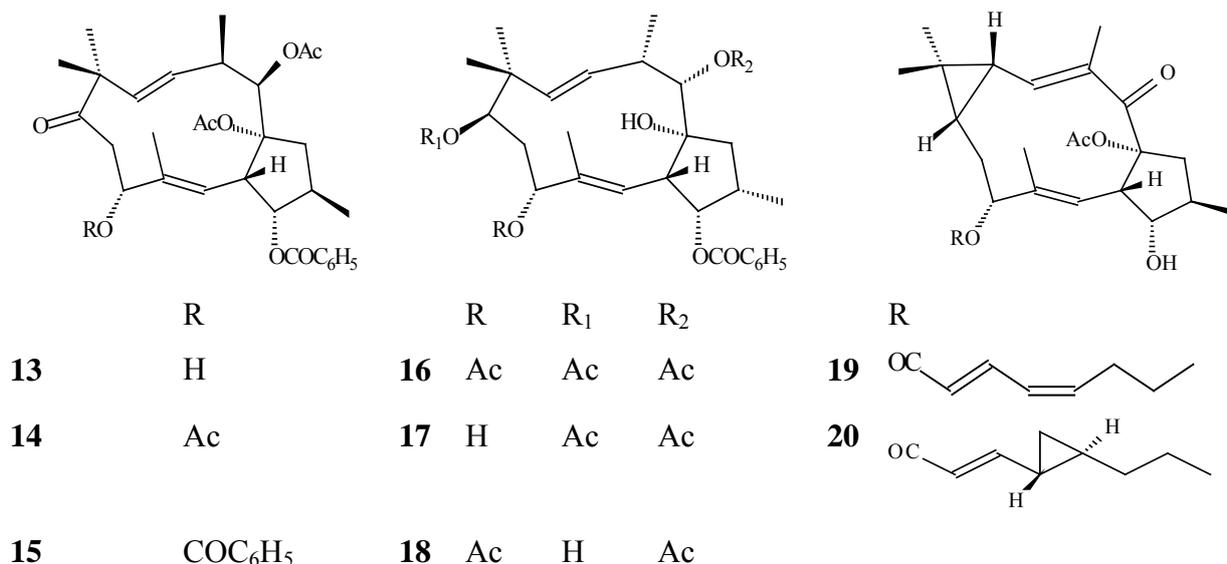


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
6	MB	H	MB	Ac	Ac
7	iB	H	MB	Ac	Ac
8	Nic	H	MB	Ac	Ac
9	MB	H	MB	iB	Ac
10	Ac	H	MB	iB	Ac
11	MB	MB	H	Ac	Bz
12	MB	MB	H	iB	Ac

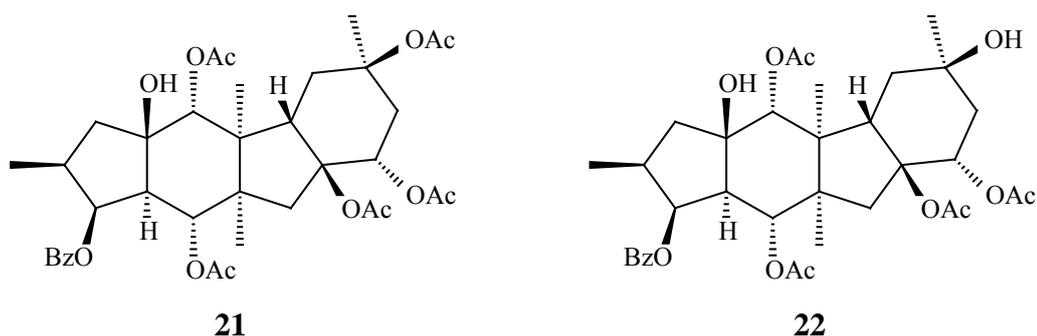
iB = isobutyrate MB = 2-méthylbutyrate Bz = benzoate Nic = nicotinate



Les racines et les tiges de *Euphorbia helioscopia* [15] renferment une quantité importante de diterpènes dont les structures ont été déterminées en se basant conjointement sur les analyses spectroscopiques et les corrélations chimiques. Parmi les composés isolés, on peut citer : euphoscopine A (**13**), euphoscopine B (**14**), euphoscopine C (**15**), euphornine (**16**), euphornine A (**17**), euphornine B (**18**), euphohelioscopine A (**19**) et euphohelioscopine B (**20**).

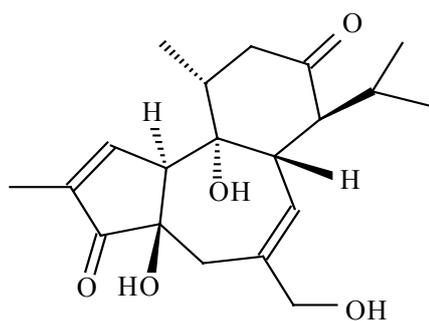


L'investigation phytochimique de la plante *Euphorbia peplus* L. [16] a conduit à l'isolement de deux diterpènes polyesters polycycliques : peplane 1 (**21**) et peplane 2 (**22**). Leurs structures ont été assignées par des méthodes spectroscopiques et notamment les techniques de la RMN 2D ainsi que par les rayons X.

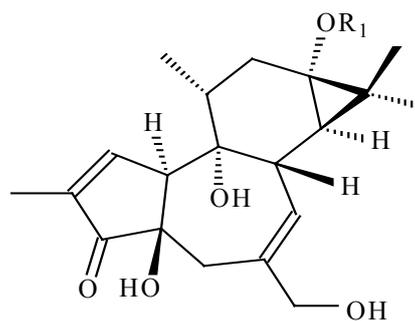


L'étude phytochimique réalisée sur les racines de l'espèce *Euphorbia fischeriana* [17] a permis d'isoler et d'identifier 3 diterpènes polycycliques à squelette tigiane, langduine A (**23**), 12-deoxyphorbol-13-hexadécanoate (**24**) et prostratine (**25**). Les deux premiers esters diterpéniques du phorbol sont nouveaux tandis que le troisième identifié précédemment dans l'espèce *E. cornigera*

[18], a été isolé pour la première fois dans cette plante et il montre des activités analgésique et sédative.



23

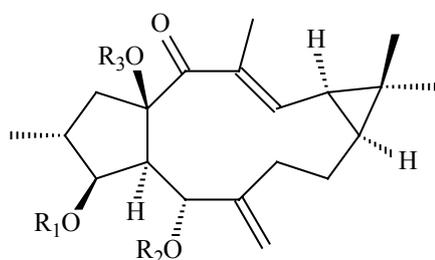


24 $R_1 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

25 $R_1 = \text{Ac}$

Les structures de ces composés ont été déterminées par les méthodes d'analyse spectroscopiques notamment la RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse EI.

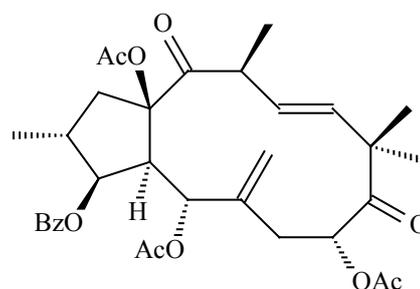
La présence des esters diterpéniques à squelette lathyrane et jatrophane dans les racines de l'espèce *E. hyberna* L. a été révélée [19] : 5,15-diacétoxy-3-benzoyloxy-14-oxolathyra-6(17),12*E*-diène (**26**), 3,5,15-triacétoxy-14-oxolathyra-6(17),12*E*-diène (**27**) et 5,8,15-triacétoxy-3-benzoyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11*E*-diène (**28**).



R_1 R_2 R_3

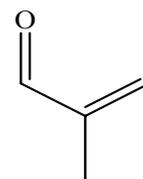
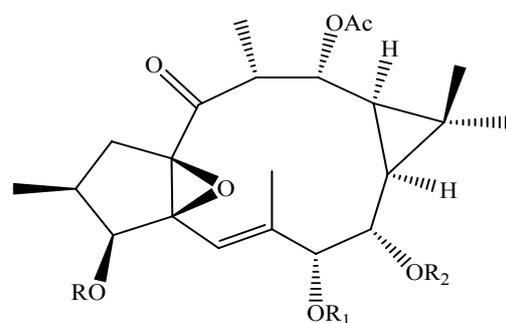
26 Bz Ac Ac

27 Ac Ac Ac



28

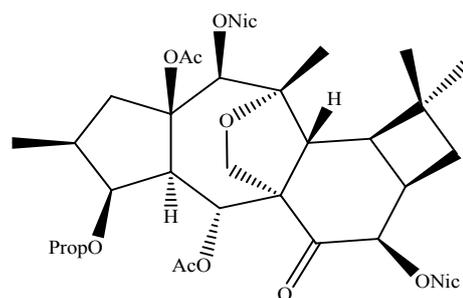
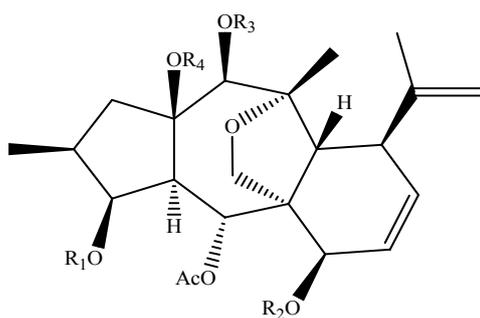
Les diterpènes macrocycliques polyesters de type ingénane ont été mis en évidence dans le latex d' *E. nivulia* [20] : 3,7,12-triacétyl-8-benzoylingol (**29**), 3,12-diacétyl-7-anféloyl-8-méthoxyingol (**30**), 7-angéloyl-12-acétyl-8-méthoxyingol (**31**), 3,12-diacétyl-8-benzoylingol (**32**) et 3,12-diacétyl-7-benzoyl-8-nicotinylingol (**33**). Ces composés ont été caractérisés par les analyses spectrales et les méthodes chimiques.



Ang = angéloyle

R = Ac	R1 = Ac	R2 = Bz
R = Ac	R1 = Ang	R2 = Me
R = H	R1 = Ang	R2 = Me
R = Ac	R1 = H	R2 = Bz
R = Ac	R1 = Bz	R2 = Nic

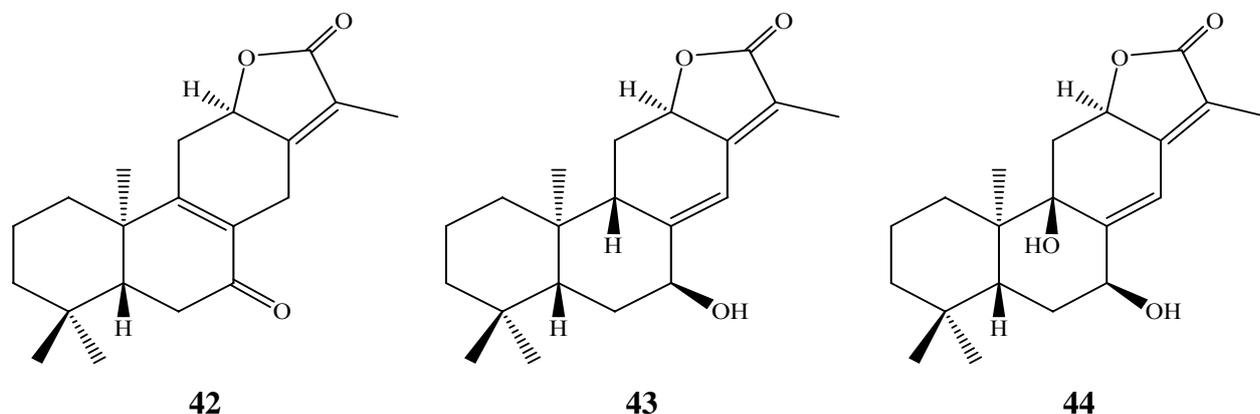
Les diterpènes polycycliques nouveaux de type myrsinane ont été isolés de la plante *Euphorbia seguieriana* [21] : 14-desoxo-3-O-propionyl-5,15-di-O-acétyl-7-O-nicotinoylmyrsinol-14β-nicotinoate (**34**), 14-desoxo-3,5,15-tri-O-acétyl-7-O-nicotinoyl-myrsinol-14β-nicotinoate (**35**), 14-desoxo-3,5,15-tri-O-acétyl-7-O-benzoyl-myrsinol-14β-nicotinoate (**36**), 14-desoxo-3-O-propionyl-5,15-di-O-acétyl-7-O-benzoylmyrsinol-14β-nicotinoate (**37**), 14-desoxo-3-O-propionyl-5,15-di-O-acétyl-7-O-benzoyl-myrsinol-14β-acétate (**38**), 14-desoxo-3-O-propionyl-5,15-di-O-acétyl-7-O-nicotinoylmyrsinol-14β-acétate (**39**), 14-desoxo-3-O-propionyl-5-O-acétyl-7-O-nicotinoylmyrsinol-14β-acétate (**40**) et 3-O-propionyl-5,10,15-tri-O-acétyl-8,14-di-O-nicotinoylcyclomyrsinol (**41**). Tous ces composés ont été caractérisés par la spectroscopie RMN multiimpulsionnelles.



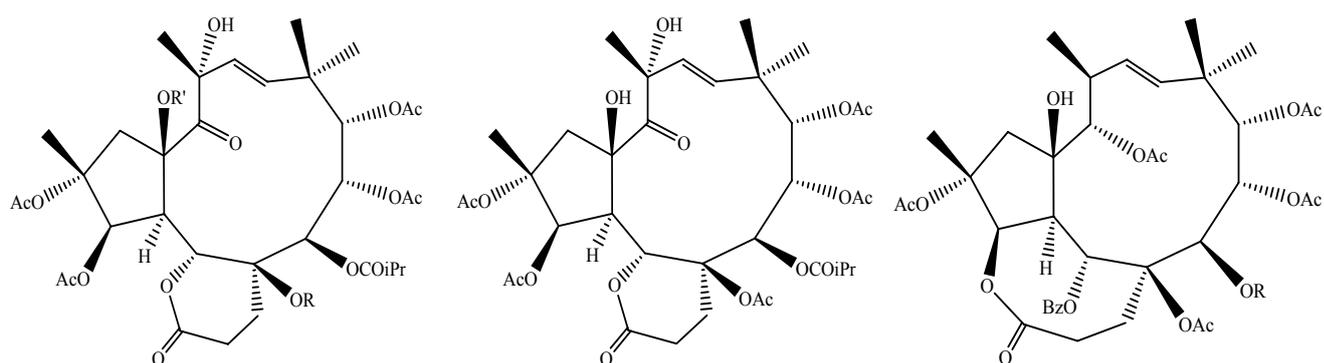
41

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
34	prop	Nic	Nic	Ac
35	Ac	Nic	Nic	Ac
36	Ac	Benz	Nic	Ac
37	prop	Benz	Nic	Ac
38	prop	Benz	Ac	Ac
39	prop	Nic	Ac	Ac
40	prop	Benz	Ac	H

A partir de la même espèce d'autres nouveaux diterpénoïdes lactones à squelette *ent*-abiétane [22] ont été isolés et identifiés également par RMN 1D et 2D. Il s'agit de 7-oxo-*ent*-abiéta-8(9),13(15)-dièn-12 α ,16-olide (**42**), 7 β -hydroxy-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-12 α ,16-olide (**43**) et 7 β ,9 β -dihydroxy-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-12 α ,16-olide (**44**).



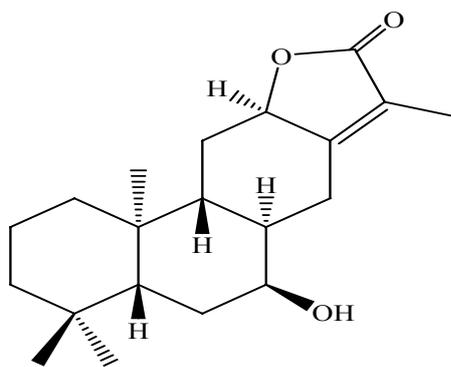
L'étude phytochimique effectuée sur l'espèce *Euphorbia terracina* [23] a fourni des dérivés polyoxygénés à squelette jatrophane de type terracinolide : 13 α -hydroxyterracinolide B (**45**), 13 α -hydroxyterracinolide G (**46**), 15-O-deacétyl-13 α -hydroxyterracinolide A (**47**), 13 α -hydroxyterracinolide I (**48**), isoterracinolide A (**49**), isoterracinolide B (**50**) et un *ent*-abiétane lactone de type jolkinolide (**51**). Les structures de ces composés ont été établies par RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse.



R = R' = Ac **45**
 R = Ac R' = H **46**
 R = Bz R' = H **47**

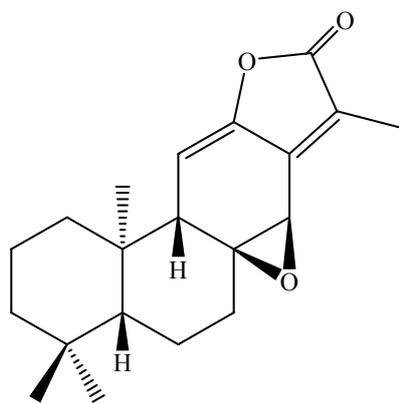
48

R = COiPr **49**
 R = COEt **50**

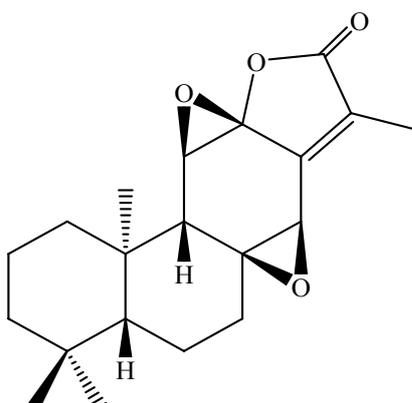


51

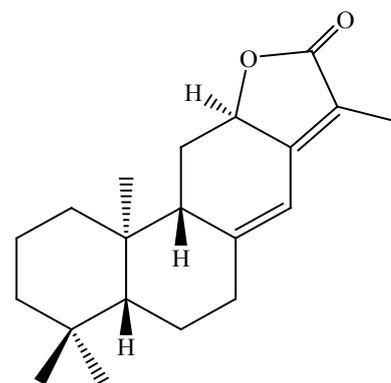
L'investigation chimique menée sur les racines de l'espèce *E. jolkini* [24] a abouti à l'isolement de deux nouveaux diterpènes lactones appartenant à la série *ent*, nommés jolkinolide A (**52**) et jolkinolide B (**53**). L'identification de ces composés a été réalisée au moyen des méthodes spectroscopiques RMN, UV, IR et EI-MS et de transformations chimiques. Une autre étude réalisée sur la même espèce [25] a permis d'isoler et de caractériser outre les diterpénoïdes précédents, un autre diterpène nouveau à squelette *ent*-abiétane lactone, appelé jolkinolide E (**54**).



52



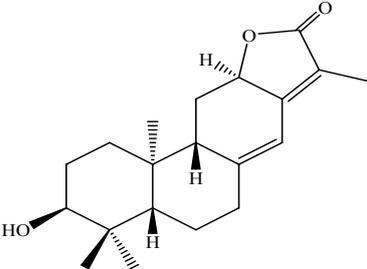
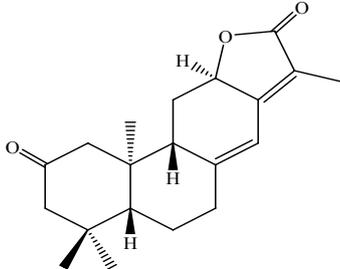
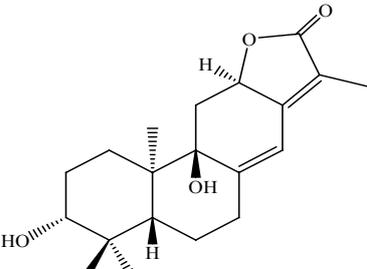
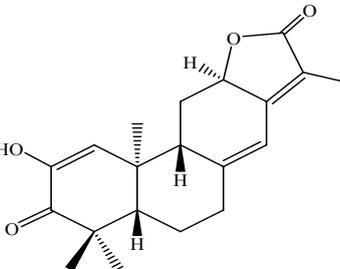
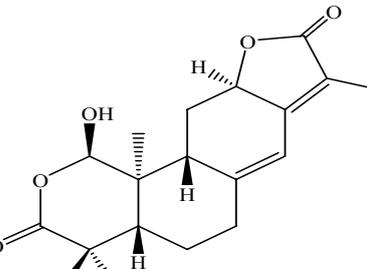
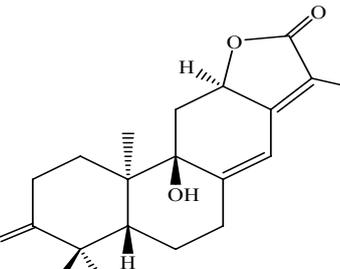
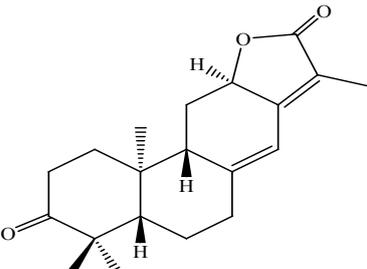
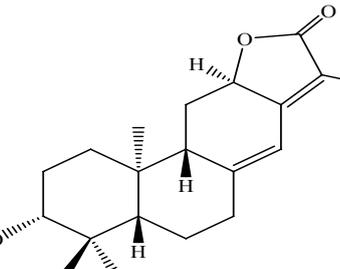
53

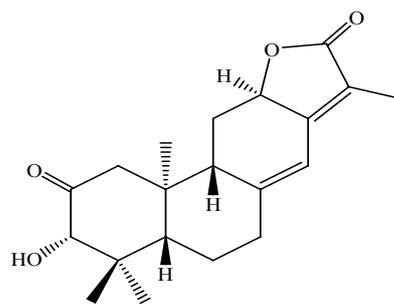


54

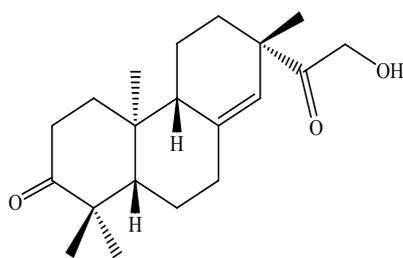
D'autres études phytochimiques ont été réalisées sur plusieurs espèces du genre *Euphorbia*. Celles-ci ont conduit à l'isolement et l'identification de diterpènes de la série *ent* à squelette *ent*-abiétane, *ent*-atisane, *seco-ent*-atisane et *ent*-pimarane (tableau 2). Leurs structures moléculaires ont été établies grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques (RMN 1D et 2D, ESI-MS, EI-MS et IR), aux rayons X et aux méthodes de transformations chimiques.

Tableau 2 : Diterpènes isolés des espèces *E. calytrata*, *E. fidjiana* et *E. sessiliflora*.

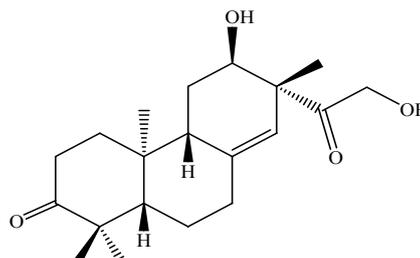
Plante	Structure		Réf.	
<i>Euphorbia calytrata</i>			[26,27]	
	helioscopinolide B (55)	helioscopinolide F (56)		
				
	helioscopinolide H (57)	helioscopinolide I (58)		
				
	helioscopinolide L (59)	helioscopinolide D (60)		
				
helioscopinolide E (61)	helioscopinolide A (62)			



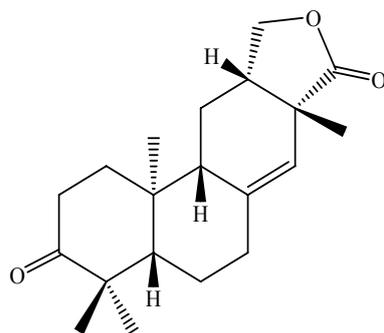
helioscopinolide C (**63**)



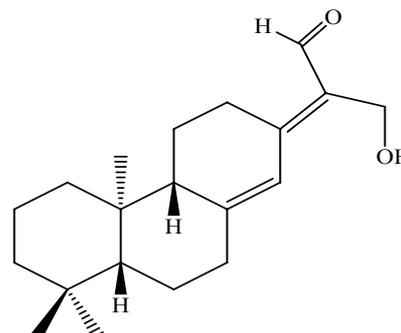
16-hydroxy-13[R]-*ent*-pimar-8(14)-ène-3,15-dione (**64**)



12 α ,16-dihydroxy-13[R]-*ent*-pimar-8(14)-ène-3,15-dione (**65**)



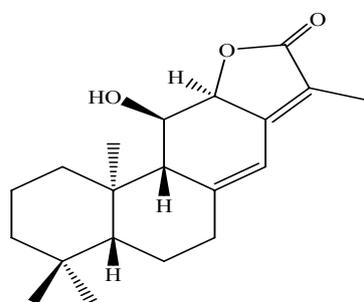
12 β -hydroxyméthyl-3-oxo-16-*ent*-norpimar-8(14)-ène-15,21-carbolactone (**66**)



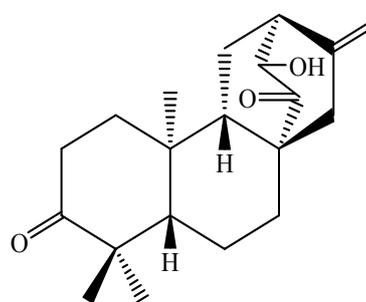
11 α -hydroxy-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**67**)

[28,29]

Euphorbia fidjiana



17-hydroxy-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16-al (**68**)



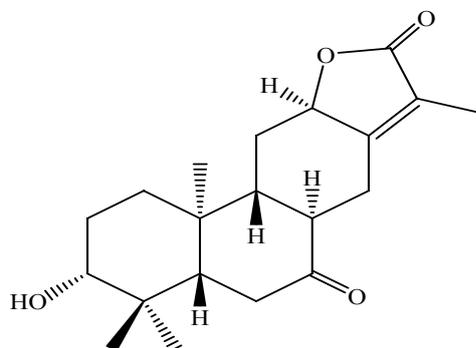
(13S)-13-hydroxy-*ent*-atis-16-ène-3,14-dione (**69**)

<p><i>ent</i>-atis-16-ène-3,14-dione (70)</p>	<p>(13<i>S</i>,14<i>S</i>)-dihydroxy-3,14-dioxo-<i>ent</i>-atis-15-èn-17-al (71)</p>
<p>(13<i>S</i>)-15β-dihydroxy-<i>ent</i>-atis-16-ène-3,14-dione (72),</p>	<p>(13<i>S</i>)-18-dihydroxy-<i>ent</i>-atis-16-ène-3,14-dione (73),</p>
<p>18-hydroxy-<i>ent</i>-atis-16-ène-3,14-dione (74),</p>	<p>3β,(13<i>S</i>)-dihydroxy-<i>ent</i>-atis-16-èn-14-one (75),</p>
<p>(13<i>S</i>)-hydroxy-14-oxo-3,4-seco-<i>ent</i>-atis-16-èn-3,4-olide (76),</p>	<p>(13<i>S</i>)-hydroxy-4,5-oxy-4,5-seco-<i>ent</i>-atis-16-ène-3,14-dione (77),</p>

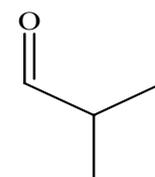
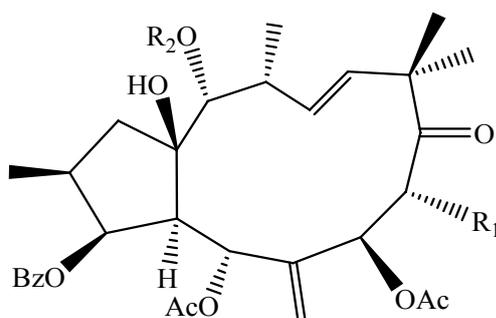
	17-chloro-(13S)-16 β -dihydroxy- <i>ent</i> -atisane-3,14-dione (78),	
	17-chloro-(13S)-16 α -dihydroxy- <i>ent</i> -atisane-3,14-dione (79),	
	7 β ,16 α ,17-trihydroxy- <i>ent</i> -atisan-3-one (80),	
	(13S),16 α ,17-trihydroxy- <i>ent</i> -atisan-3-one (81)	
	6 α ,16 α ,17-trihydroxy- <i>ent</i> -atisan-3-one (82)	
<i>Euphorbia sessiliflora</i>		[30]
	12-hydroxy-12[R]- <i>ent</i> -abiéta-(8)14,13-diène-16,12-olide (83)	
	Caudicifoline (84)	

A partir de l'extrait acétone des parties aériennes de l'espèce *E. semiperfoliata* [31], en plus de 2 diterpénoïdes connus helioscopinolide B (**55**) et helioscopinolide A (**62**), 1 nouveau *ent*-abiétanolide (**85**), 13 diterpènes polyesters macrocycliques de type jatrophane (**86-99**), 2 esters du

4-deoxyphorbol (**100** et **101**) et une paire de diterpènes macrocycliques épimères (**102** et **103**) ont été isolés et caractérisés par la combinaison des diverses méthodes d'analyse spectrales.

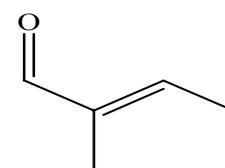
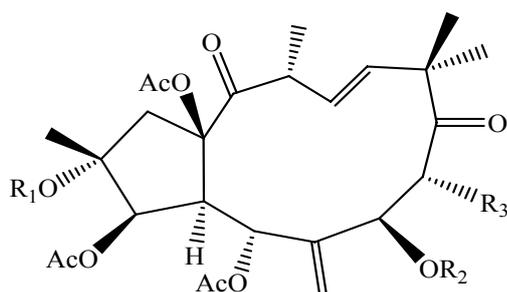


8 α ,14-dihydro-7-oxohelioscopinolide A **85**



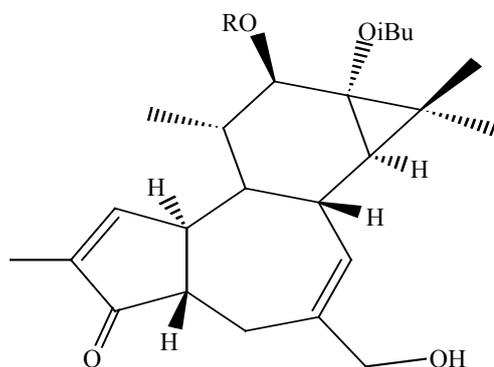
i-Bu = isobutyroyle

	R1	R2	
86	OAc	Ac	5,7,8,14-tetraacétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
87	OiBu	Ac	5,7,14-triacétoxy-3-benzoyloxy-8-isobutyroyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
88	OH	H	5,7-diacétoxy-3-benzoyloxy-8,14,15-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
90	OAc	H	5,7,8-triacétoxy-3-benzoyloxy-14,15-dihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
91	OH	Ac	5,7,14-triacétoxy-3-benzoyloxy-8,15-dihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
92	H	Ac	5,7,14-triacétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène

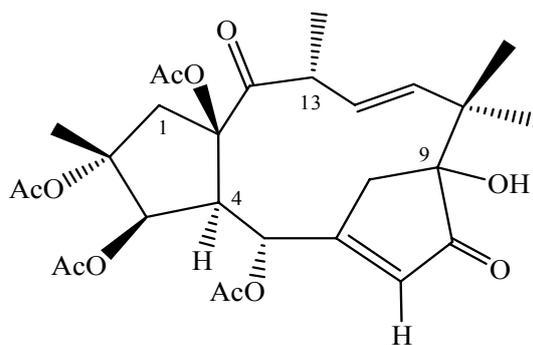


Tigl = tigloyle

	R1	R2	R3	
93	Ac	Ac	OTigl	2,3,5,7,15-pentaacétoxy-8-tigloyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
94	Nic	Ac	OAc	3,5,7,8,15-pentaacétoxy-8-tigloyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
95	Ac	Bz	OAc	2,3,5,8,15-pentaacétoxy-7-benzoyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
96	Ac	i-Bu	OAc	2,3,5,8,15-pentaacétoxy-7-isobutyroyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
97	Bz	Ac	OAc	3,5,7,8,15-pentaacétoxy-2-benzoyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
98	Ac	Ac	OH	2,3,5,7,15-pentaacétoxy-8-hydroxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène
99	Ac	i-Bu	H	2,3,5,15-tetraacétoxy-7-isobutyroyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11 <i>E</i> -diène



	R	
100	Bz	12-O-benzoyl-13-O-isobutyroyl-4-deoxyphorbol
101	Tigl	12-O-tigloyl-13-O-isobutyroyl-4-deoxyphorbol

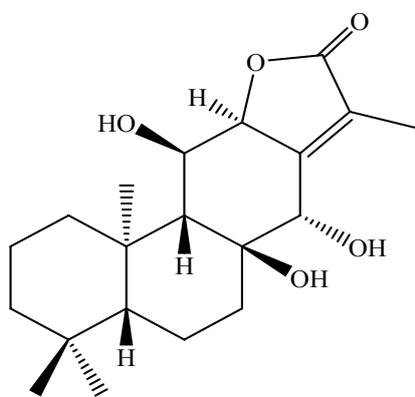


102 OH-9 α

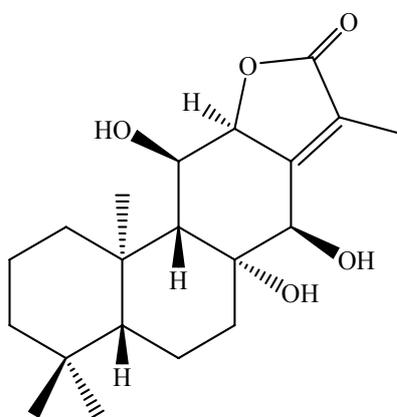
103 OH-9 β

2,3,5,15-tétraacétoxy-9-hydroxy-8,14-dioxoeuphoperfolia-6,11*E*-diène

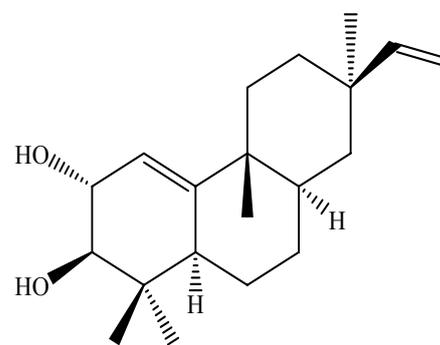
L'investigation chimique de l'extrait acétate d'éthyle des racines de l'espèce *E. ebracteolata* [32] a fourni en plus de 8 diterpénoïdes connus, 3 nouveaux diterpénoïdes appelés yuexiandajisus D (**104**), yuexiandajisus E (**105**) et yuexiandajisus F (**106**). Les structures moléculaires des composés isolés ont été déduites suite à l'analyse spectroscopique et confirmées par la diffraction aux rayons X. L'activité cytotoxique de ces composés a été évaluée, dans un second temps, contre les cellules ANA-1 et B 16 et les cellules tumorales Jurkat. A l'issue de cette étude, le composé yuexiandajisus D (**104**) s'est avéré actif contre les cellules ANA-1.



104

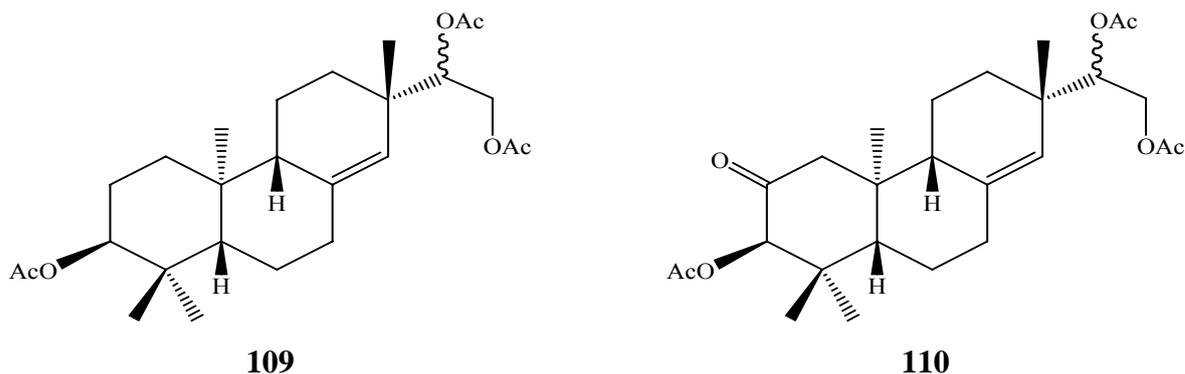
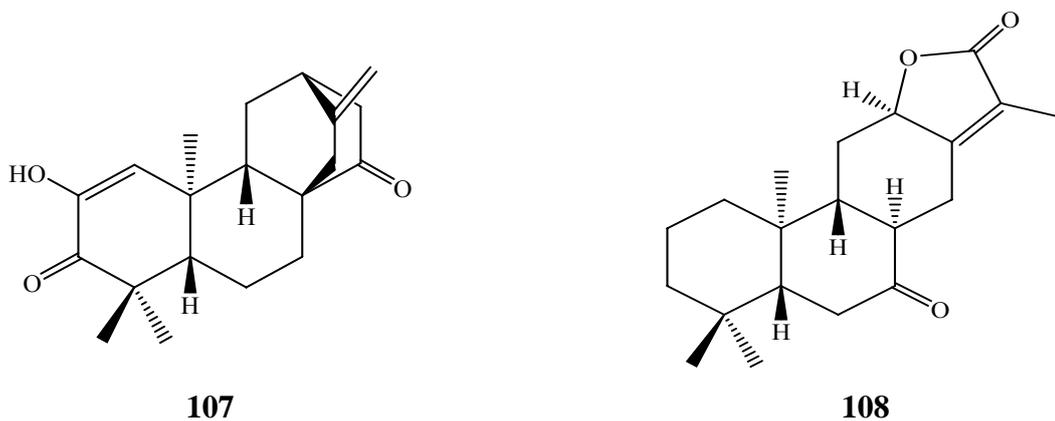


105



106

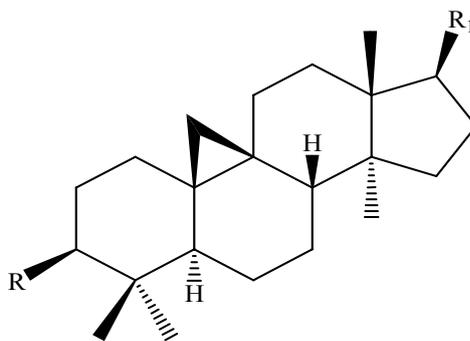
L'étude chimique de l'extrait acétone des parties aériennes de l'espèce *E. characias*, plante européenne réputée dans la médecine traditionnelle grecque et romaine [33], a permis d'isoler 13 diterpénoïdes oxygénés de type atisane, abiétane, pimarane et kaurane appartenant à la série *ent*. 4 des composés isolés sont nouveaux. Il s'agit de 2-hydroxy-*ent*-atis-1,16(17)-diène-3,14-dione (**107**), 8 α ,14-dihydro-7-oxo-jolkinolide E (**108**), 3 β ,15 ζ ,16-triacétoxy-*ent*-pimar-8(14)-ène (**109**) et 3 β ,15 ζ ,16-triacétoxy-*ent*-pimar-8(14)-èn-2-one (**110**). Leurs structures ont été établies par analyse spectrale et comparaison avec les données de la littérature.



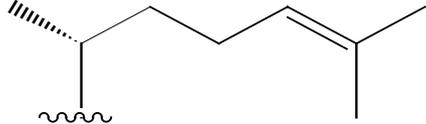
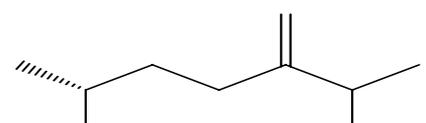
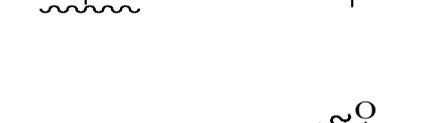
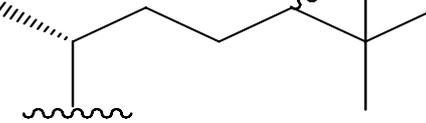
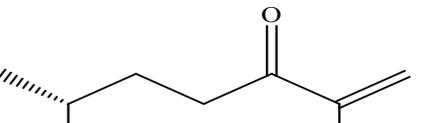
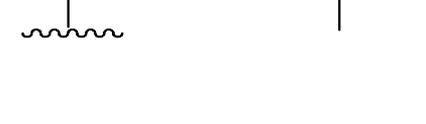
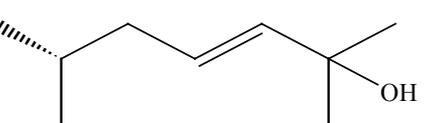
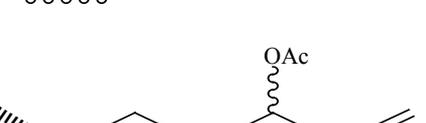
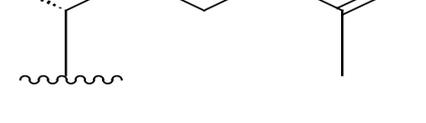
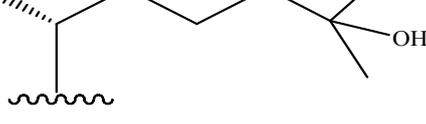
I-6-2- triterpénoïdes

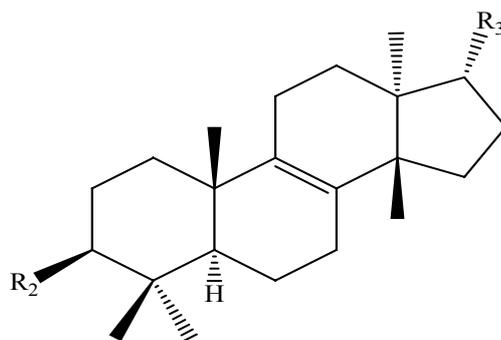
Les espèces du genre *Euphorbia* renferment des triterpénoïdes en particulier à squelette tétracyclique de type cycloartane, lanostane, euphane, tirucallane,.... Des triterpènes à squelette pentacyclique y sont également présents mais en nombre moindre.

L'investigation chimique réalisée sur les parties aériennes ainsi que le latex de l'espèce *E. broterie* a mis en évidence nombreux triterpénoïdes tétracycliques à squelette cycloartane, lanostane et euphane et pentacycliques à squelette lupane, secolupane et secotaraxerane [34]. Tous les composés isolés ont été caractérisés par les méthodes spectroscopiques RMN et masse.



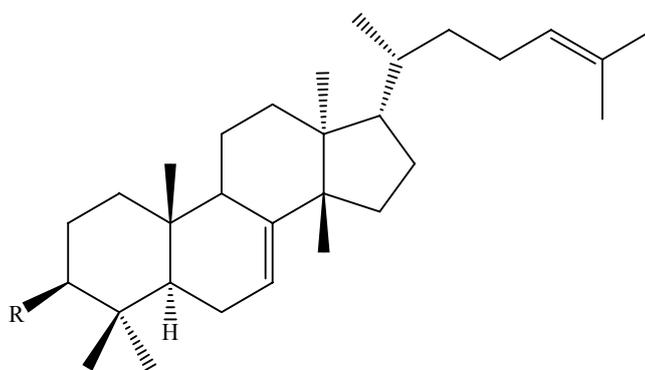
Squelette cycloartane

	R	R ₁	
111	OAc		cycloartanyl acétate
112	OH		cycloarténol
113	OAc		24-méthylèncycloartanyl acétate
114	OH		24-méthylèncycloartanol
115	OH		24-épimères 24,25-epoxycycloartanol
116	OAc		24-épimères 3β-acétoxy-24,25-époxy-cycloartane
117	OAc		3β-acétoxy-cycloart-25-ène-24-one
118	OAc		cycloart-23-ène-3β,25-diol monoacétate
119	OAc		cycloart-25-ène-3β,24-diol diacétate
120	OAc		24-épimères cycloartane-3β,24,25-triol diacétate
121			25,26,27-trisnor-3β-hydroxy-24-diméthoxycycloartane



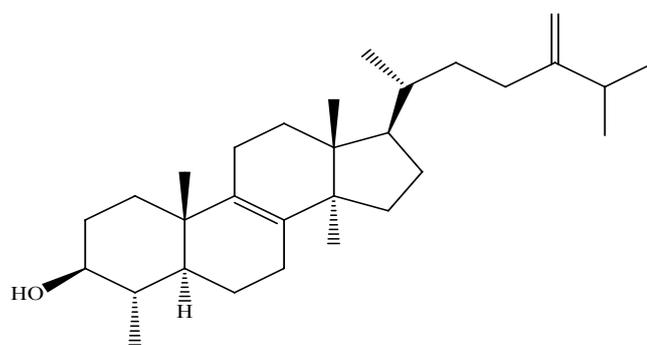
squelette euphane

	R ₂	R ₃	
122	OAc		euphol acétate
123	OH		euphol
124	OAc		euphan-8,25-diène-3β,24-diacétate



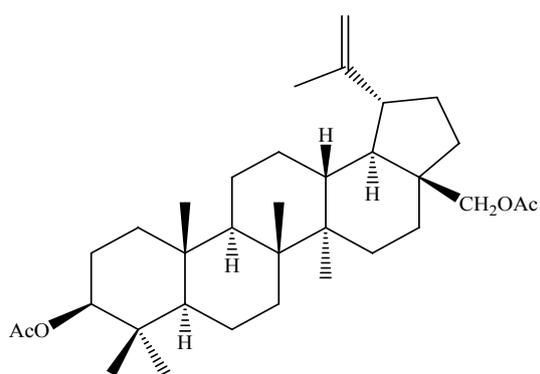
squelette euphane

	R	
125	OAc	butyrospermyl acétate
126	OH	butyrospermol

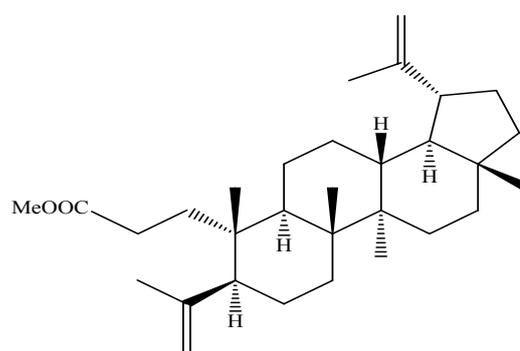


squelette lanostane

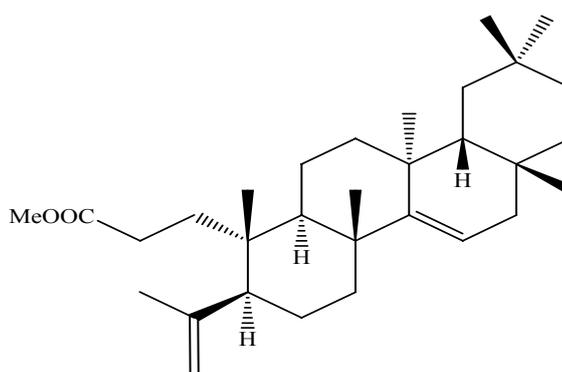
Obtusifoliol **127**



128 bituline diacétate



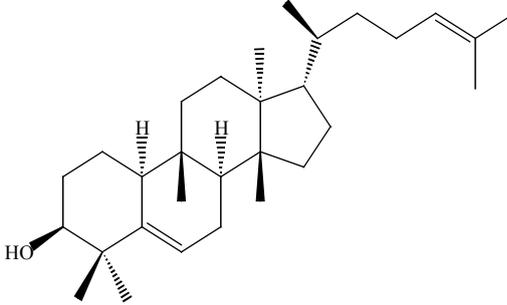
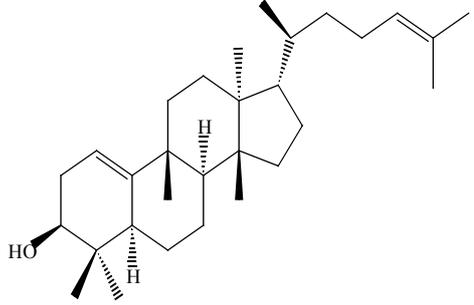
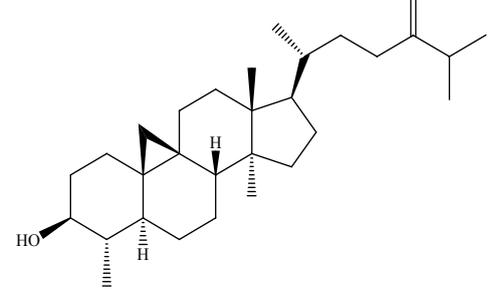
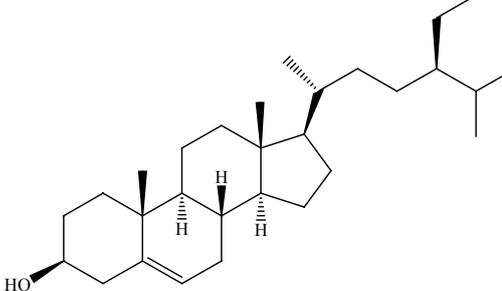
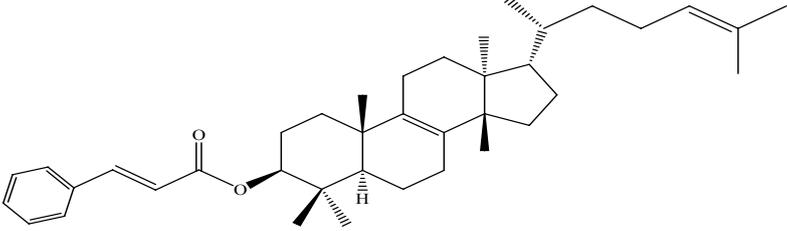
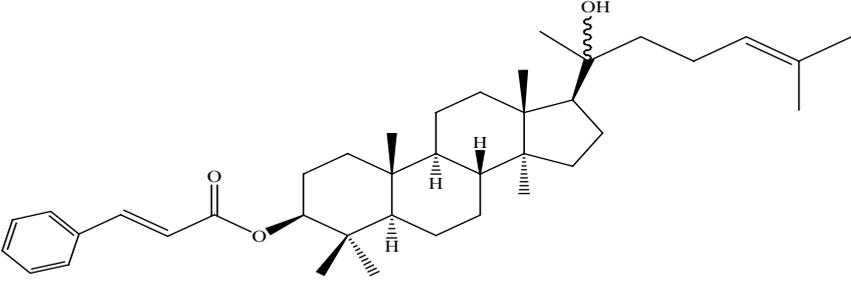
129 3,4-seco-4(23),20(30)-lupadiène-3-méthyl ester



130 3,4-seco-4(23),14-taraxeradiène-3-méthyl ester

Des composés terpéniques (tableau 3) ont été également isolés des plantes : *E. mellifera*, *E. antiquorum* et *E. chamaesyce*.

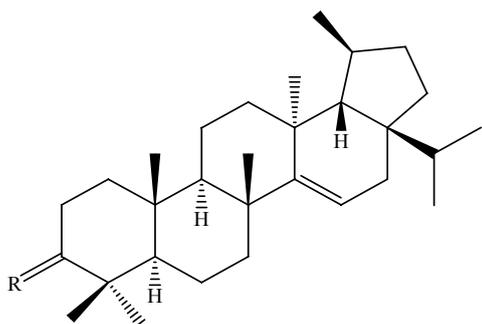
Tableau 3 : Triterpènes tétracycliques et pentacycliques identifiés dans certaines espèces *Euphorbia*

Plante	Structure		Réf.
<i>Euphorbia mellifera</i>			[35]
	euférol (131)	milliférol (132)	
			
	cycloeucaférol (133)	β-sitostérol (134)	
			
	euphol 3-O-cinnamate (135)		
			
	antiqol A (136)		

<i>Euphorbia antiquorum</i>			[36,37]
	10α-cucurbita-5,24-dièn-3α-ol (137) antiquol B	eupa-7,9(11),24-trièn-3β-ol antiquol C (138)	
	19(10,9)abeo-8α,9β,10α-eupa- 5,24-dièn-3β-ol (139)	24-méthyltirucalla-8,24(24 ¹)-dièn-3β- ol euphorbol (140)	
	lemmaphylla-7,21-dièn-3β-ol (141)	isohelianol (142)	
3β-hydroxy-4α,14α-diméthyl-5α- ergosta-8,24(28)-dièn-7-one (144)	3β-hydroxy-4α,14α-diméthyl-5α- ergosta-8,24(28)-diène-7,11-dione (145)		

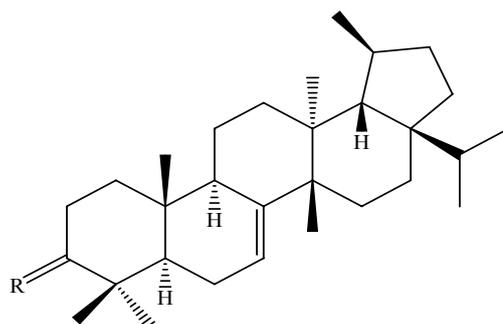
<i>Euphorbia chamaesyce</i>			[38]
	4α,14α-diméthyl-5α-ergosta-7,9(11),24(28)-trièn-3β-ol (146)	acide 3,4- <i>seco</i> -8βH-ferna-4(23),9(11)-dièn-3-oïque (147)	
	glutinol (148)	3β-hydroxymultiflor-8-èn-7-one (149)	
cycloart-23Z-ène-3β,25-diol (150).			

A partir des extraits acétoniques des feuilles et des tiges de la plante *E. stygiana* [39] deux triterpènes pentacycliques nouveaux à squelette madeirane ont été mis en évidence. Il s'agit de D-friedomadeir-14-èn-3β-yl acétate et D:C-friedomadeir-7-èn-3β-yl acétate nommés respectivement madeiranyl acétate (**151**) et isomadeiranyl acétate (**152**). En plus de ces composés, plusieurs triterpénoïdes connus à squelette madeirane, lupane et taraxerane ont été également caractérisés D-friedomadeir-14-èn-3-one (**153**), D:C-friedomadeir-7-èn-3-one (**154**), lupenyl acétate (**155**), lupenone (**156**), taraxéryl acétate (**157**) et taraxérone (**158**).



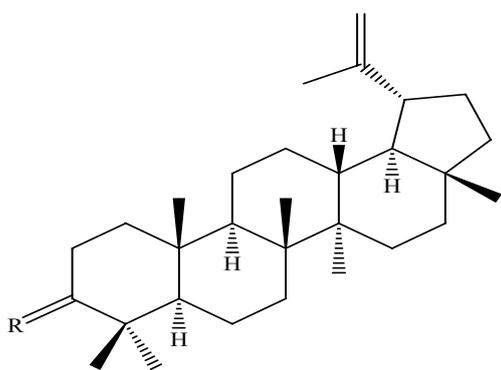
151 R α -H, β -OAc

153 R O



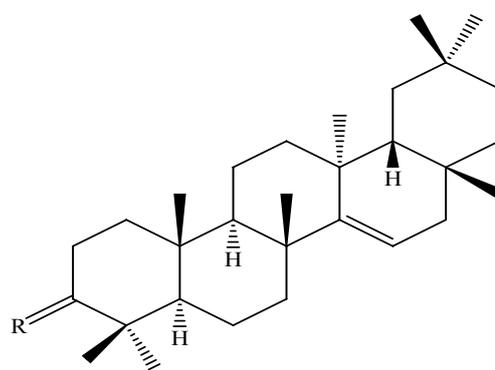
1152 R α -H, β -OAc

154 R O



155 R α -H, β -OAc

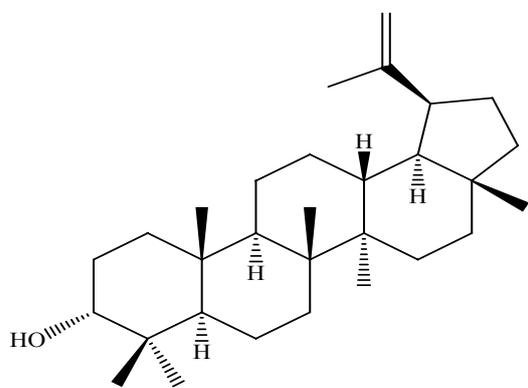
156 R O



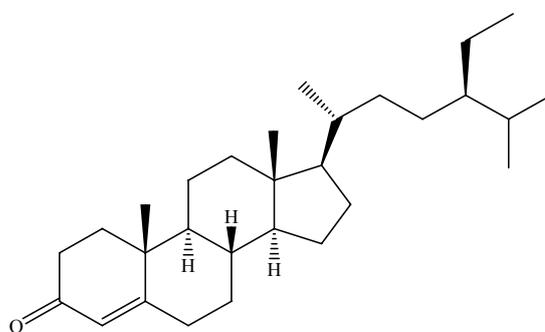
157 R α -H, β -OAc

158 R O

L'étude chimique réalisée sur l'extrait acétone de l'espèce *E. portlandica* [40] a conduit à l'isolement d'un nouveau triterpène pentacyclique à squelette lupane 3 α -hydroxy-19 α H-lup-20(29)-ène nommé lupeportlandol (**159**). Un triterpène pentacyclique : glutinol (**148**) et un stéroïde : sitosténone (**160**) connus, ont été aussi identifiés. Leurs structures ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques (RMN et masse) et par les rayons X.

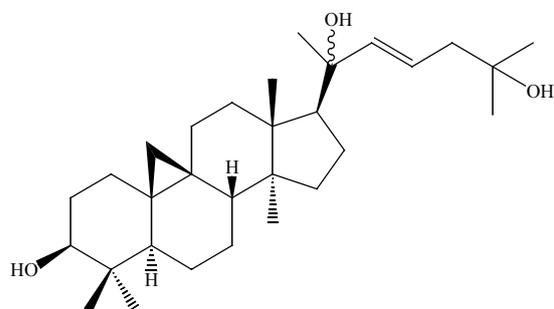


159

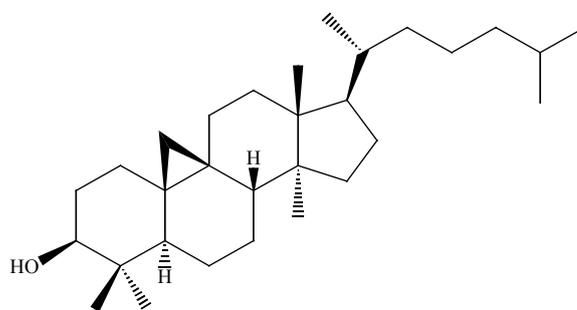


160

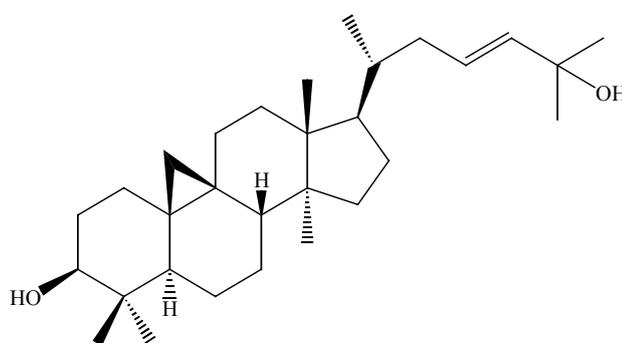
L'investigation phytochimique de l'extrait hexane de la plante *E. clarkeana* [41] a permis de caractériser un nouveau triterpénoïde à squelette cycloartane : cycloart-22-ène-3 β ,20 ϵ ,25-triol nommé cycloclarkeanol (**161**) et deux autres composés triterpéniques connus cycloartanol (**162**) et cycloart-23-ène-3 β ,25-diol (**163**).



161

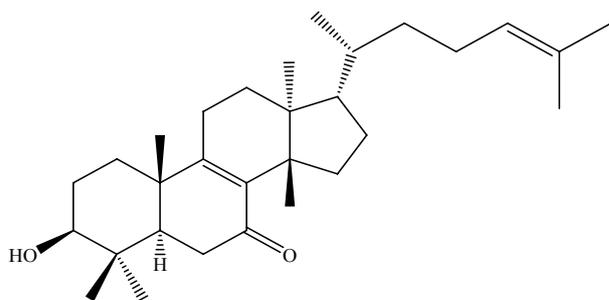


162

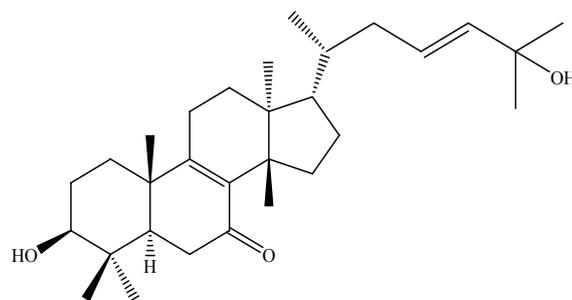


163

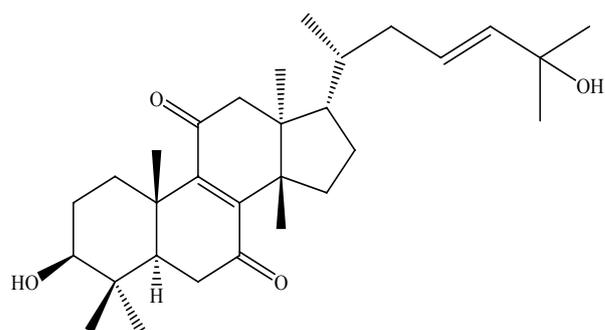
L'étude chimique de l'extrait chloroformique des racines de la plante *E. kansui* [42] a abouti à l'isolement de quatre triterpènes nouveaux à squelette euphane : kansenone (**164**), kansenonol (**165**), 11-oxo-kansenonol (**166**) et kansenol (**167**) et un nouveau triterpène de type tirucallane épi-kansenone (**168**). Leurs structures ont été élucidées grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques particulièrement la RMN 1D et 2D.



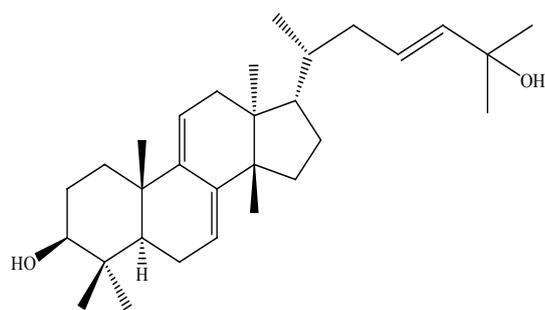
164



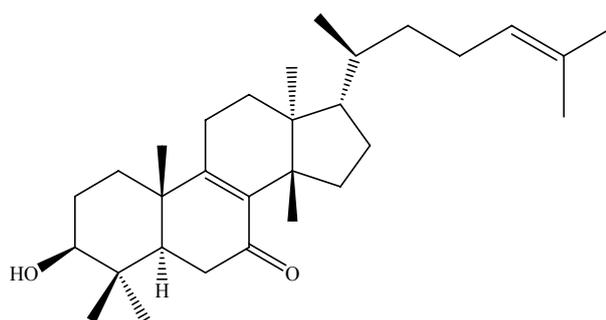
165



166



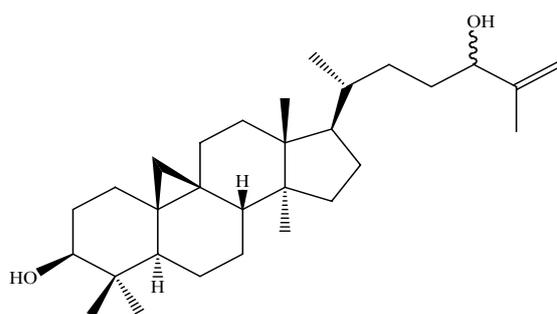
167



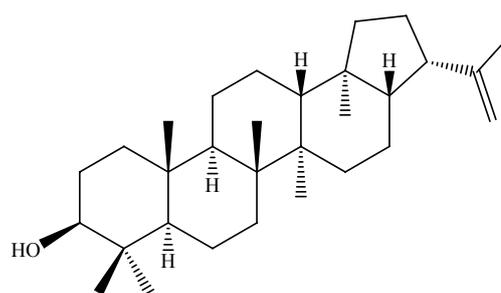
168

La séparation de l'extrait hexanique des tiges de la plante *E. trigona* [43,44] a conduit à l'isolement et la caractérisation d'un mélange de deux triterpénoïdes nouveaux du 24-épimères : cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**169**). On note également l'identification de plusieurs triterpénoïdes connus : morténol (**170**), taraxérol (**171**), lupeol (**172**), betuline (**173**) taraxéryl acétate (**157**), friedeline (**174**), friedelan-3 β -ol (**175**), friedelan-3 α -ol (**176**), cycloarténol (**112**), 24-méthylèncycloartanol (**114**), α -amyrine (**177**) et β -amyrine (**178**).

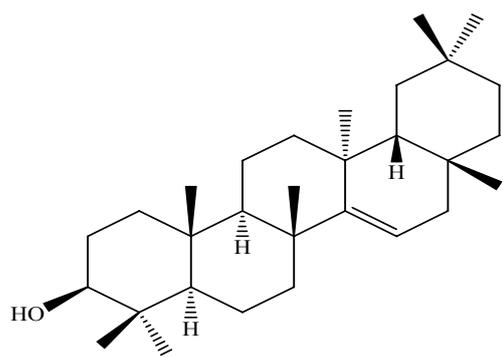
Les structures de ces composés ont été élucidées par les méthodes chimiques et d'analyse spectroscopiques notamment la RMN et la spectrométrie de masse et par comparaison avec les données de la littérature.



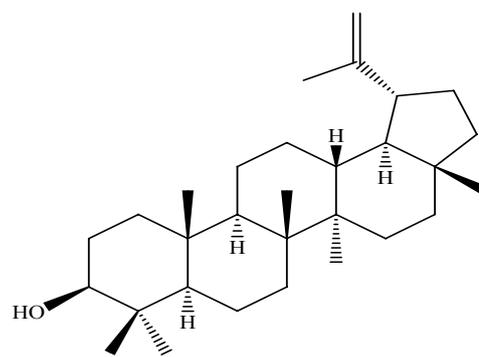
169



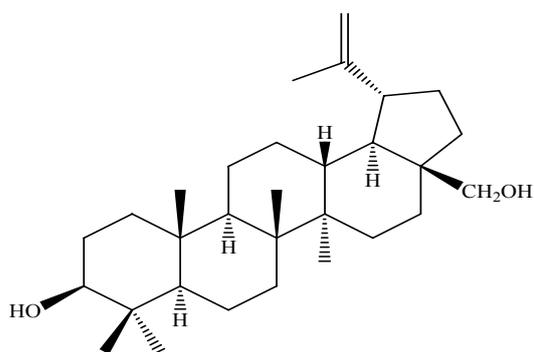
170



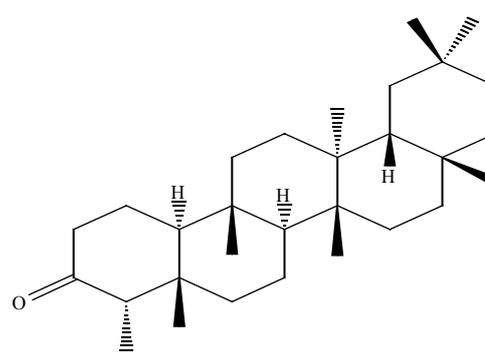
171



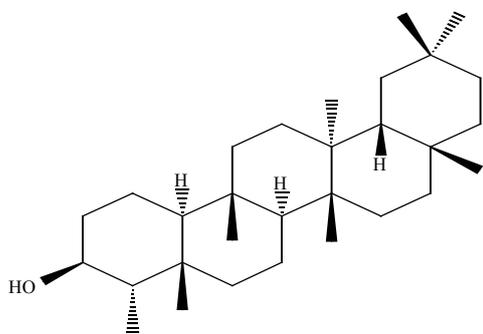
172



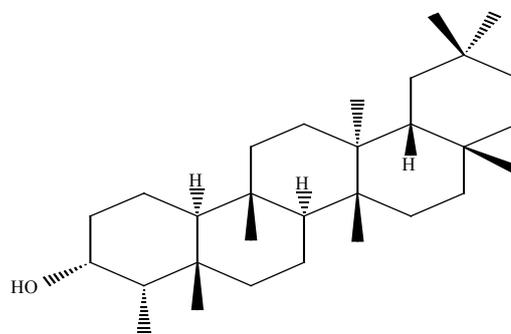
173



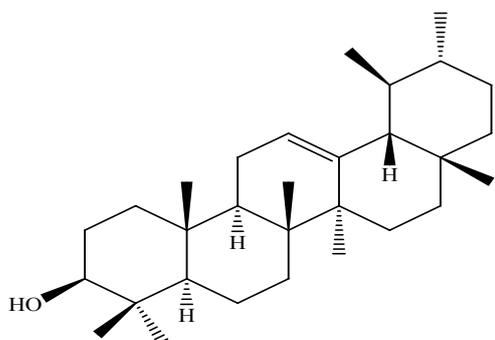
174



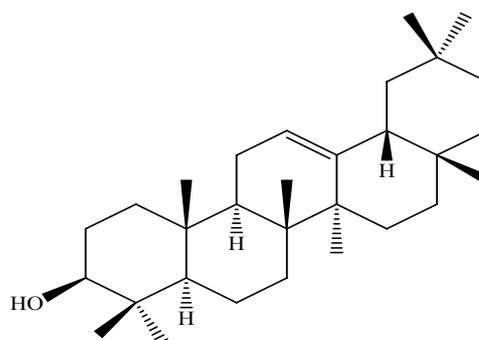
175



176

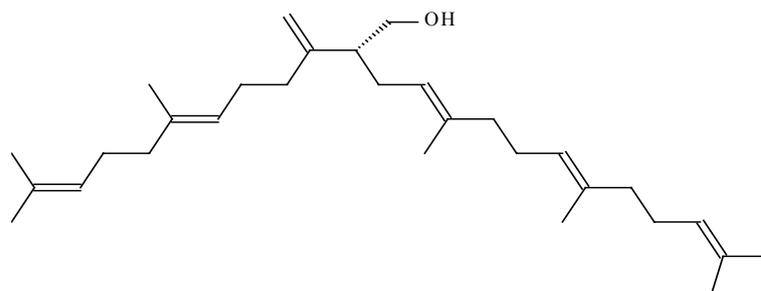


177

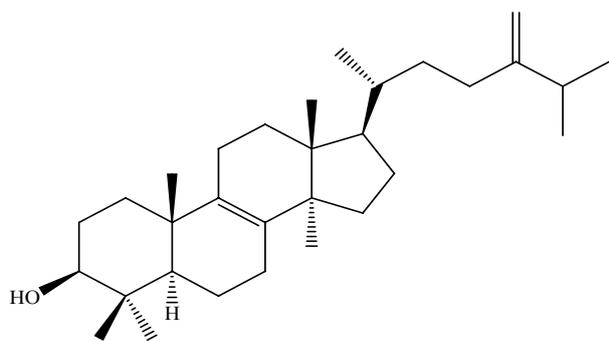


178

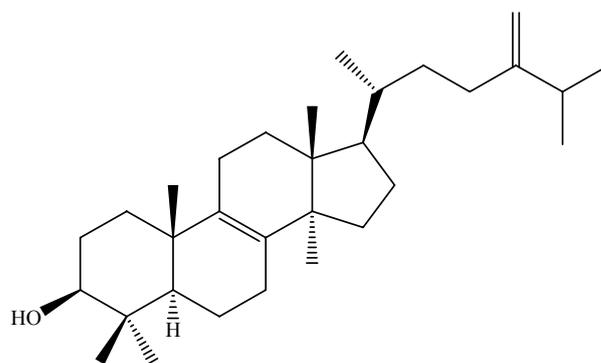
Le latex de l'espèce *E. peplus* [45] plante native de l'Europe a donné un nouveau triterpénoïde 2-(5,9-diméthyl-1-méthylène-4,8-décadiényl)-5,9,13-triméthyl-4,8,12-tétradécatrièn-1-ol nommé peplusol (**179**) et plusieurs triterpénopides connus lanostérol (**180**), 24-méthylélanostérol (**181**), cycloarténoïl (**112**), 24-méthyléncycloarténoïl (**114**) et obtusifoliol (**127**).



179

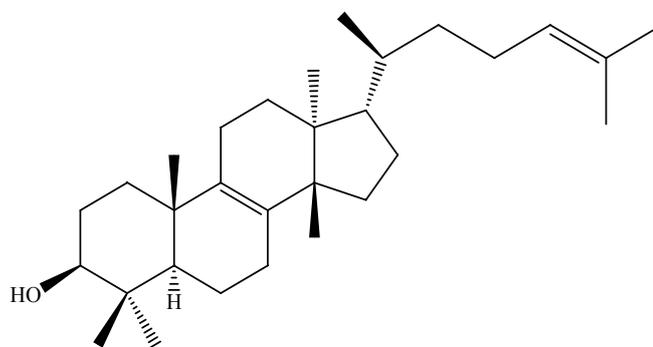


180



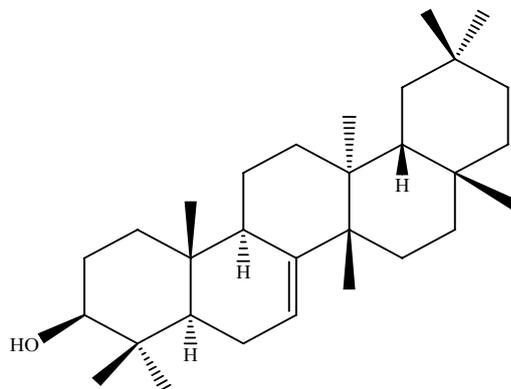
181

L'extrait acétone du latex de l'espèce *E. tirucalli* [46] soumis à une GC-MS a permis d'identifier deux triterpénoïdes tétracycliques : tirucallol (**182**) et euphol (**123**)



182

A partir du latex des espèces *E. balsamifera*, *E. globosa* et *E. marlotthii* [46], des triterpènes pentacycliques ont été identifiées par GC-MS. Il s'agit de multiflorénol (**183**), taraxérol (**171**) et lupeol (**172**)



183

Chapitre II

Etude des terpénoides

II-1- Généralités

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone [13,47,48]. A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. Ils sont présents dans tous les organismes vivants. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre :

- monoterpènes comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- sesquiterpènes contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- diterpènes comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- sesterpènes comptent 25 atomes de carbone
- triterpènes comportent 30 atomes de carbone
- tétraterpènes contiennent 40 atomes de carbone.

Certains groupes de molécules n'obéissent pas à cette règle et, parmi ceux-ci, les stéroïdes qui ne compte que 27 carbones.

Le nombre de répétitions de ce motif isoprénique, mais aussi, les réactions de cyclisation, les réarrangements et les diverses oxydations et réductions que peuvent subir le squelette carboné sont à l'origine de la grande diversité structurale de ces molécules.

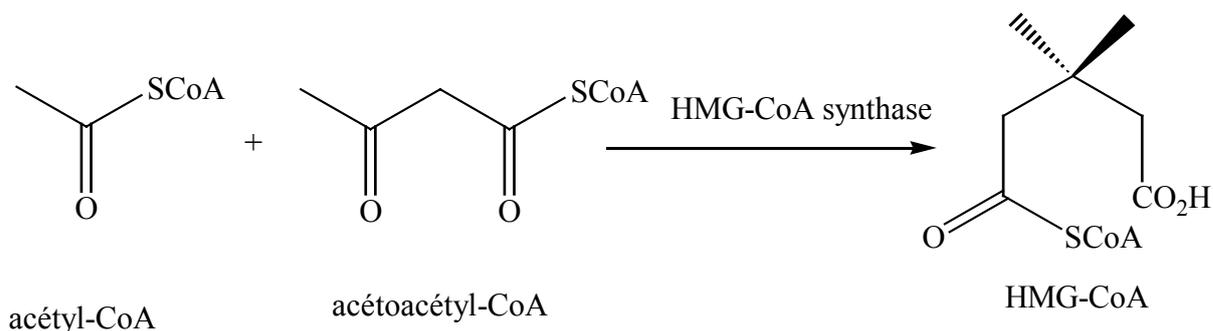
II-2- Biosynthèse des terpènes

Les réactions principales qui aboutissent à la formation des terpénoïdes [13,47,48] sont les suivantes :

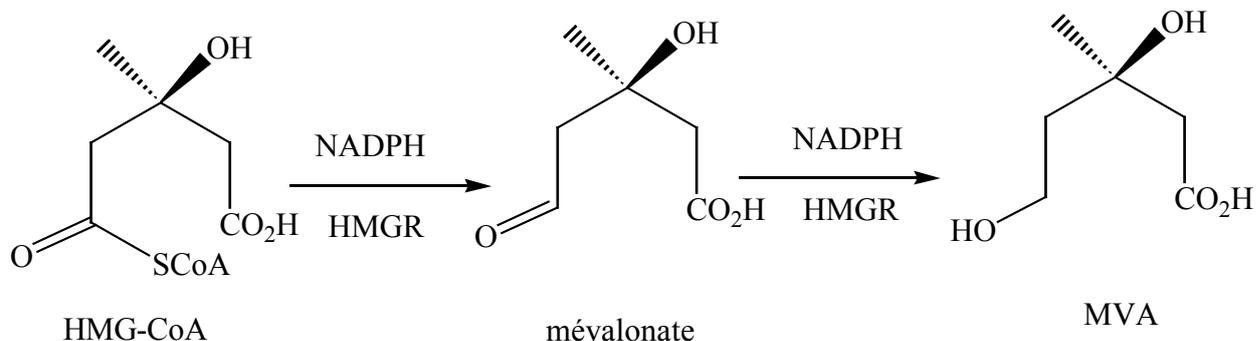
- Formation de l'unité de base isopentényl-diphosphate (IPP) à partir de l'acétate, par l'intermédiaire de l'acide mévalonique.
- Couplage tête-à-queue des unités isopréniques conduisant à la formation des mono-, sesqui-, di-, sester- et polyterpènes.
- Couplage queue-à-queue des unités en C-15 et C-20 permettant l'élaboration des triterpènes et carotènes.

La première étape de biosynthèse est la condensation de l'acétyl-CoA avec l'acétoacétyl-CoA, pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Cette réaction est catalysée par un enzyme, l'HMG-CoA synthase. Deux formes de cet enzyme sont connues chez les mammifères, l'une cytosolique, point de départ de la voie de l'acide mévalonique, et l'autre,

mitochondriale qui associe à l'HMG-CoA lyase est impliquée dans la synthèse des corps cétoniques [49]

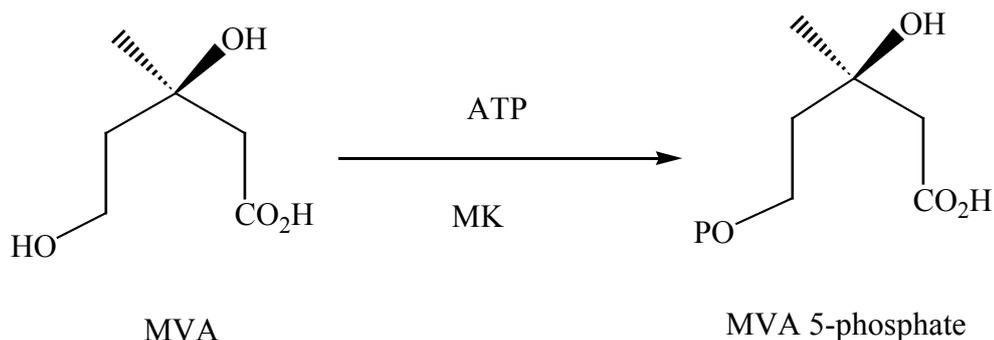


L'étape suivante consiste en une déacétylation de l'HMG-CoA conduisant au mévalonate (MVA) par l'intermédiaire du mévaldate. Cette catalyse réductive, faisant intervenir le NADPH et l'HMG-CoA réductase (HMGR).

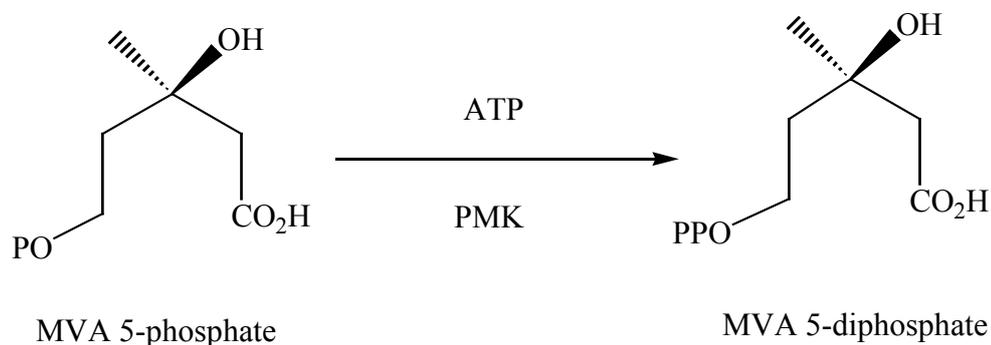


L'HMGR est considérée comme étant l'un des enzymes les plus fortement régulés du métabolisme des mammifères ; de nombreuses études démontrent que cela est également le cas chez les plantes particulièrement lors de la synthèse des phytostérols [50].

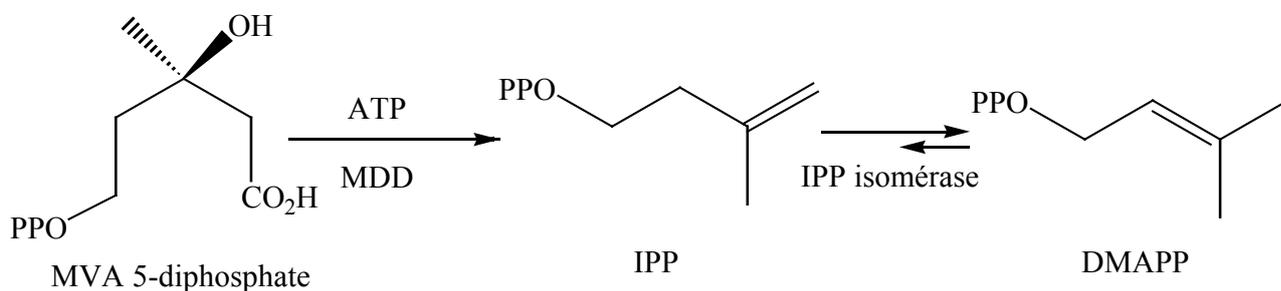
La mévalonate kinase (MK), un enzyme dimérique, catalyse ensuite la première des étapes de phosphorylation ATP-dépendante. Cet enzyme transforme le mévalonate en mévalonate-5-phosphate [49].



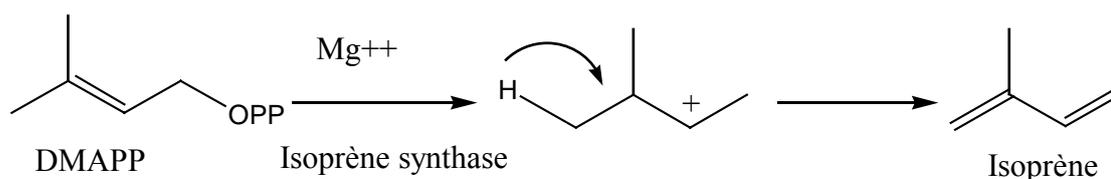
Puis par l'intermédiaire de la phosphomévalonate kinase (PMK), le mévalonate 5-phosphate est à nouveau phosphorylé conduisant au mévalonate 5-diphosphate. La PMK requiert la présence dans le milieu d'un ion divalent, en portant sa préférence sur l'ion Mg^{2+} [51].



L'ensemble de ces réactions conduit enfin à la formation de l'isopentényldiphosphate (IPP) et du diméthylallyl diphosphate (DMAPP), considérés comme étant des unités isoprènes biogénétiques. L'enzyme intervenant dans la production de l'IPP est la mévalonate 5-diphosphate décarboxylase (MDD). Enfin, un α/β métallo-enzyme, l'isopentényl diphosphate diméthylallyldiphosphate isomérase, encore appelé IPP isomérase localisé dans le cytosol catalyse le réarrangement convertissant l'IPP en DMAPP [52].



Pour finir, l'isoprène synthase, un enzyme en marge de ce processus biosynthétique localisé au niveau des chloroplastes catalyse l'élimination du motif diphosphate du DMAPP en le transformant en isoprène, un hémiterpène émis par les plantes et qui a une action protectrice [53]



Après l'isomérisation de l'IPP en DMAPP, cette dernière molécule est condensée avec une, deux ou trois unités d'IPP, par l'intermédiaire de prényltransférases et aboutit respectivement à la formation de :

- géranyl diphosphate (GDP : C-10)
- farnésyl diphosphate (FDP : C-15)
- géranylgéranyl diphosphate (GGDP : C-20).

Ces trois prényl-diphosphates acycliques subissent de nombreux réarrangements pour conduire aux squelettes carbonés parents de chaque classe de terpénoïdes. Ainsi, le GDP permet la formation des monoterpènes. Le FDP conduit aux sesquiterpènes et triterpènes et enfin le GGDP aux diterpènes et tétraterpènes [13,47].

Les transformations catalysées par des terpénoïdes synthases font appel à des mécanismes réactionnels électrophiles particuliers. Les grandes variétés de réactions carbocationiques (cyclisation, réarrangement, déplacement par hybridation,...) expliquent la grande diversité des métabolites terpéniques [54].

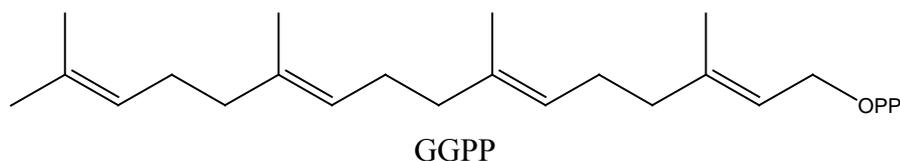
II-3- Diterpènes

II-3-1- Introduction

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du *2E,6E,10E*-géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). On dénombre plus de 1200 produits diterpéniques répartis en une centaine de squelette. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiales, Asterales et Fabales [13,47].

II-3-2- Biosynthèse des diterpènes

Le précurseur de la synthèse de diterpènes est le géranylgéranyl diphosphate (GGDP) encore appelé géranylgéranylpyrophosphate (GGPP).



Les composés cycliques sont issus de deux principaux modes de cyclisation [13,47].

Mode 1 : cyclisation en tête à queue

La cyclisation est induite par le départ du groupe diphosphate, formation d'un carbocation et alkylation d'une double liaison par celui-ci. Ce qui conduit à la formation d'un cation macrocyclique polyinsaturé, très réactif. Il peut être stabilisé par la perte d'un proton et conduire aux diterpènes macrocycliques tels le casbène, le cembrene ou le taxadiène ; mais il peut aussi conduire à la formation d'un squelette polycyclique tels le tiglane, l'ingénane, le daphnane, ...etc suite à des réactions de réarrangements intramoléculaires (figure 1).

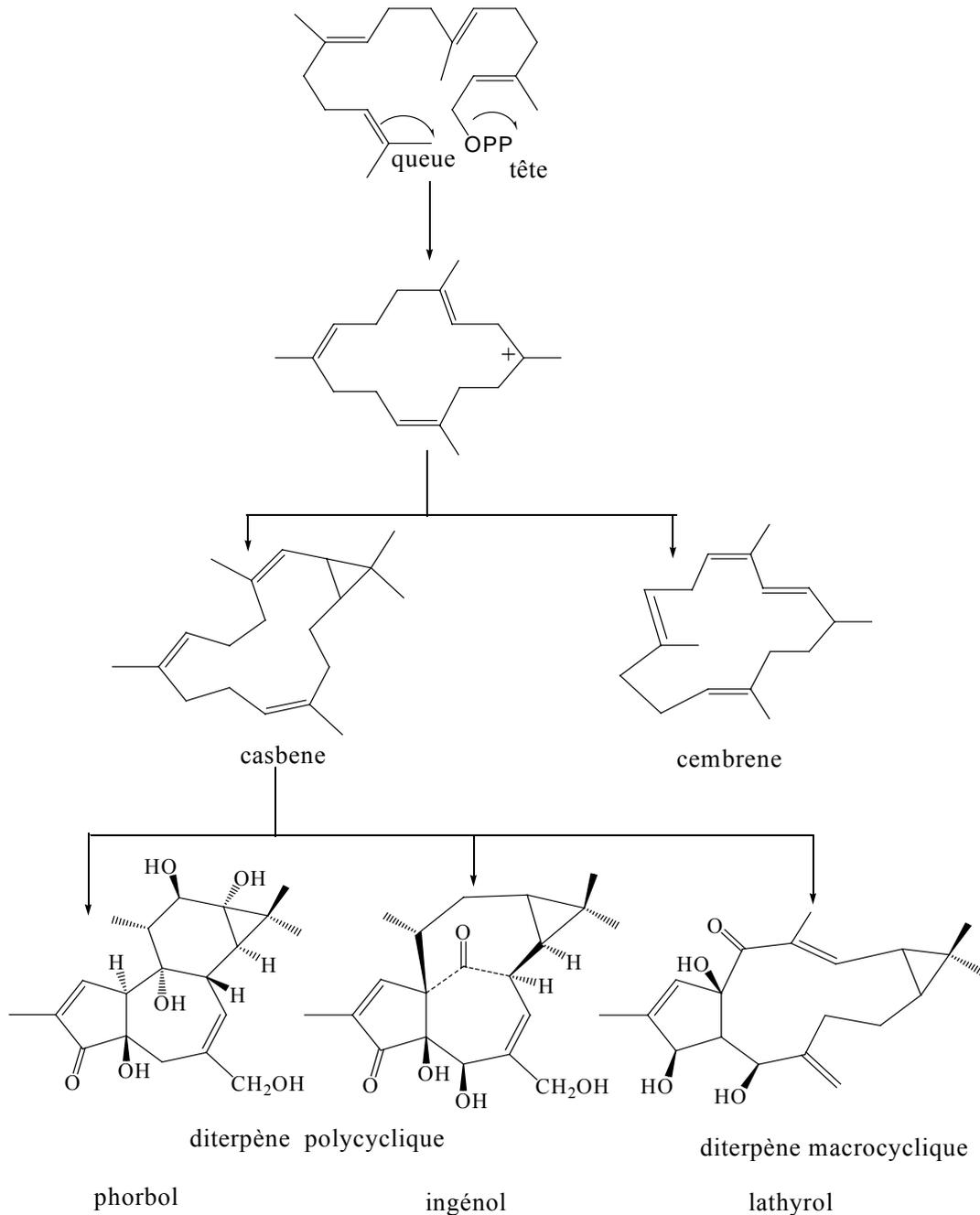


Figure 1 : Schéma de biogenèse des diterpènes polycycliques et macrocycliques

Mode 2 : cyclisation en accordéon

La cyclisation, dans ce cas, est une cyclisation acido-catalysée du GGPP similaire à celle qui intervient dans l'élaboration des triterpènes mais sans époxydation préalable conduisant à la formation d'une *trans*-décane (intermédiaire réactionnel le copalyl diphosphate CDP : pyrophosphate de labdane, figure 2). Cette cyclisation conduit aux diterpènes bicycliques et peut se poursuivre pour aboutir à des diterpènes tricycliques ou à des diterpènes tétracycliques [13,47].

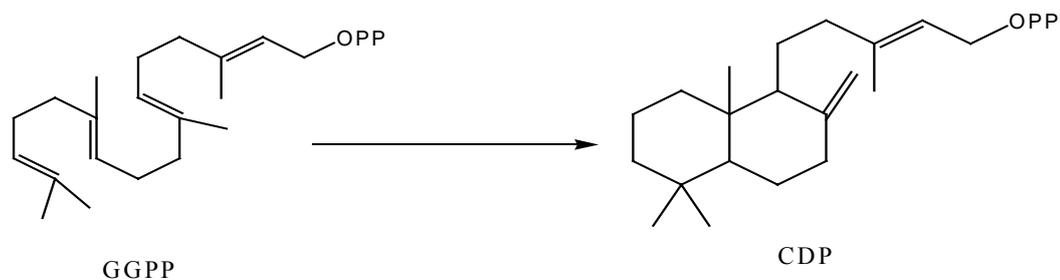


Figure 2 : Formation du CDP

Ce mode de cyclisation conduit à la formation de deux séries d'énantiomères (figure 3), différant par la configuration des carbones C-5, C-9 et C-10 [13,47].

-La série est dite normale lorsque la fusion des deux cycles est analogue à celle intervenant lors de la formation des stéroïdes : abiétane, cassane, rosane

-Elle est dite *ent* (pour énatio) lorsque c'est l'antipode ; les molécules sont alors appelées *ent*-atisane, *ent*-kaurane, *ent*-abiétane,....

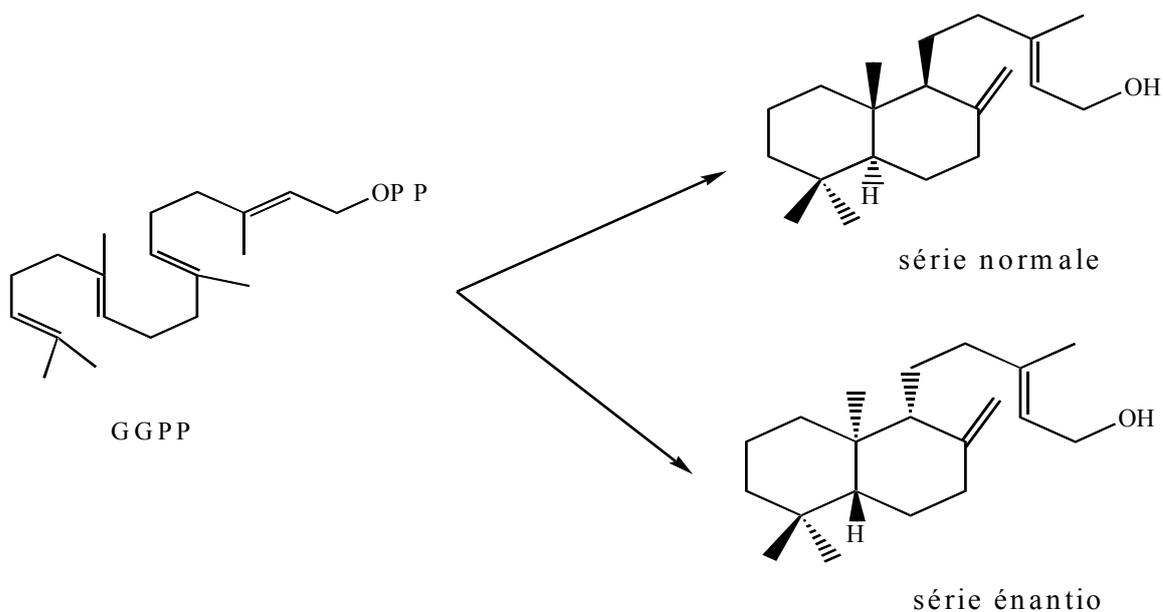


Figure 3 : Schéma de formation des deux séries normale et *ent*.

Les diterpènes tricycliques (pimarane, abiétane, cassane, rosane) sont issus de la cyclisation du cation pimarényle (figure 4) [13,47]

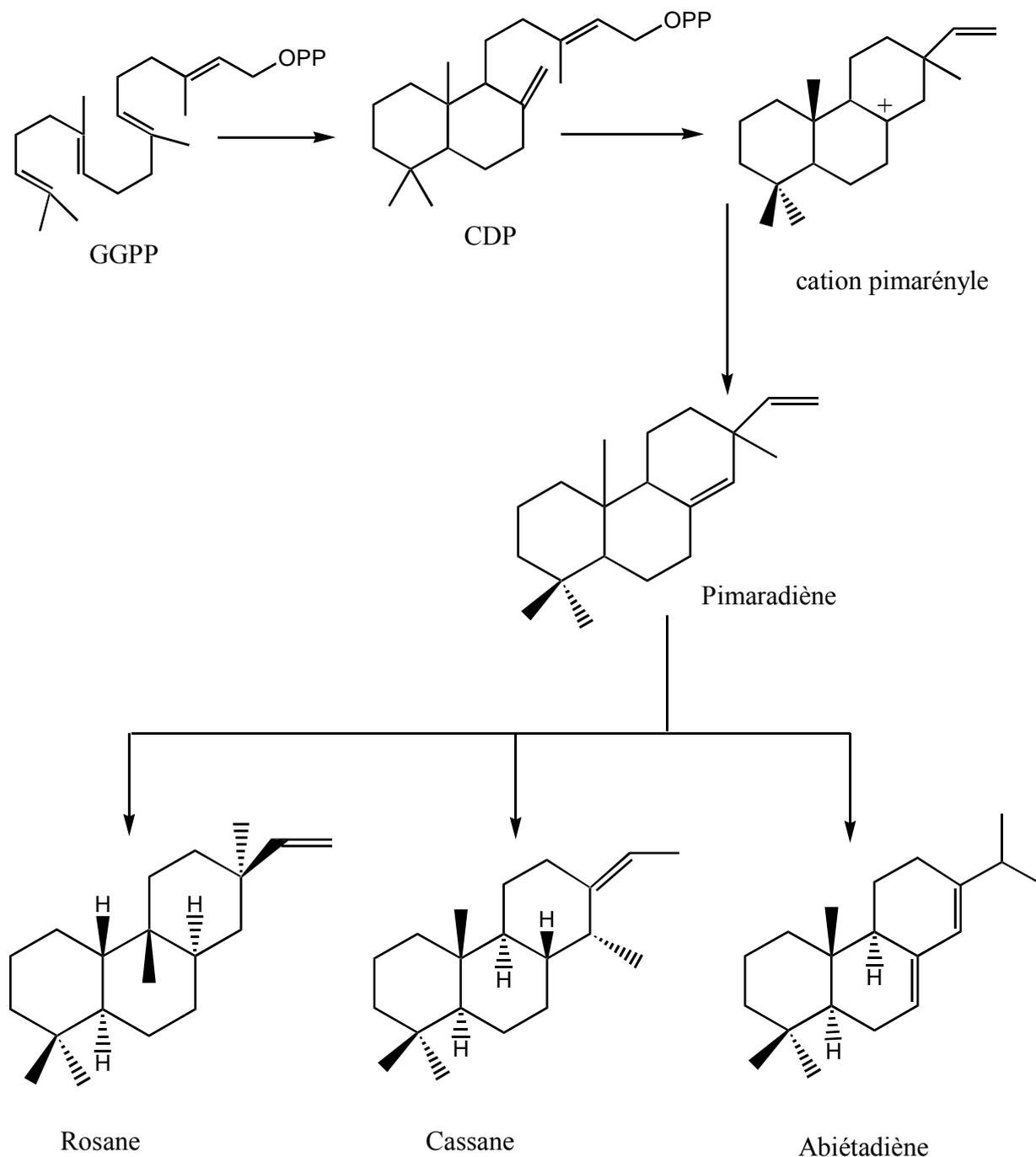


Figure 4 : Schéma de biogenèse des diterpènes tricycliques

Ce mode de cyclisation peut aboutir également à la série *ent* en formant les diterpènes *ent*-abiétanes et *ent*-pimaranes [13,47].

Les diterpènes tétracycliques proviennent de la cyclisation du pimaradiène [13,47] en passant par un intermédiaire carbocationique (figure 5).

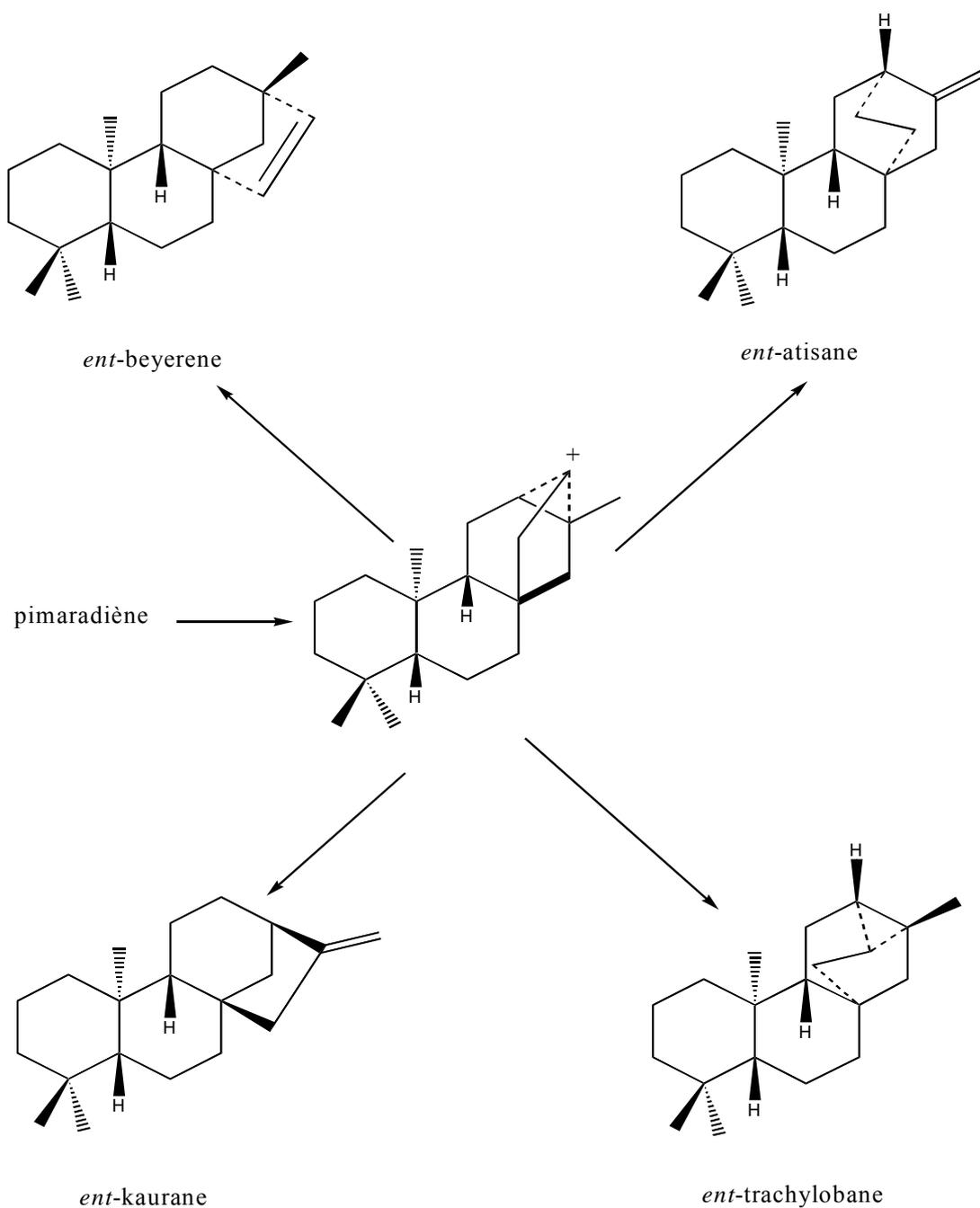


Figure 5 : Schéma de biogenèse des diterpènes tétracycliques de la série *ent*

Cet intermédiaire carbocationique pourrait donner également les diterpènes correspondants de la série normale [13,47] : atisane, kaurane, ...etc

II-3-3- Propriétés biologiques et emplois des drogues à diterpènes

Plusieurs drogues contenant des diterpènes font l'objet de formulations de phytothérapie ou entrent sous la forme de préparations galéniques [13,48]. C'est le cas des grindélias, des lamiaceae à marrubiine ou de certaines germandrées.

Les diterpènes possèdent diverses potentialités thérapeutiques: propriétés antihypertensives, abortives, antitumorales et anti-inflammatoires. Il y a lieu de signaler également l'intérêt des quinones diterpéniques dans le traitement de plusieurs affections myocardiques et la toxicité des amides diterpéniques à l'égard des insectes [13].

Des diterpènes esters toxiques dérivés du phorbol et de l'ingénol sont présents dans 14 des 300 genres que compte la famille Euphorbiaceae: *Euphorbia*, *Croton*, *Jatropha*, *Hura*,....etc. Les teneurs en composés toxiques sont habituellement très faibles (0,05 à 0,1%), ils sont tous purgatifs et irritants pour la peau et les muqueuses et leur toxicité par voie orale est importante, chez les animaux mais aussi chez l'homme. Des intoxications par l'huile de *Croton* utilisée en médecine traditionnelle ont été signalées et l'huile d'aleurites employée à des fins industrielles entraîne les mêmes dangers. La responsabilité de ces diterpènes a été évoquée pour expliquer la fréquence élevée de certains cancers chez les populations Caraïbes consommant régulièrement des infusions à base de feuilles de la plante *Croton flavens*. Leur capacité à activer des virus impliqués dans des mécanismes de cancérogenèse a également été démontrée.

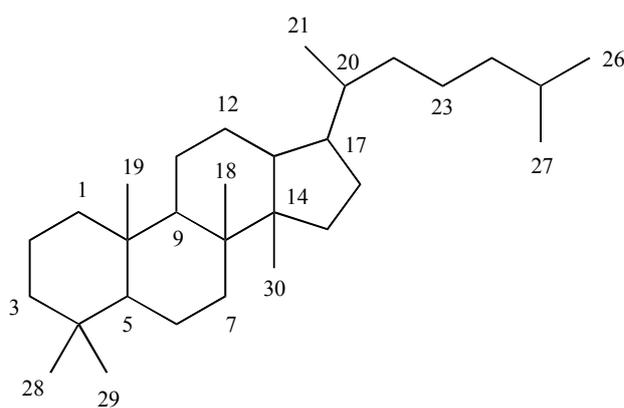
L'activité co-cancérogène des esters diterpéniques des Euphorbiaceae de type tigliane et ingénane et paradoxalement l'activité cytotoxique de certains d'entre eux ouvrent de nouvelles voies de recherche dans le domaine des substances naturelles à intérêts thérapeutiques [10,13]. Le composé le plus actif est le TPA (12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate), l'un des plus puissants inducteurs connus de tumeurs sur la peau de souris, il active la protéine kinase C en se substituant au diacylglycérol endogène. Il est à noter toutefois que ces esters diterpéniques développent un grand nombre d'effets cellulaires et biochimiques qui en font des outils d'investigation biologique et pharmacologique intéressants.

Le rôle physiologique des diterpènes, comme celui de beaucoup d'autres métabolites secondaires n'est pas bien connu à l'exception des diterpènes à squelette gibberellines considérés comme des hormones de croissance. Cependant, certains d'entre eux sembleraient avoir un rôle dans la protection à l'encontre des prédateurs et d'autres constituant des revêtements foliaires limiteraient la perte en eau.

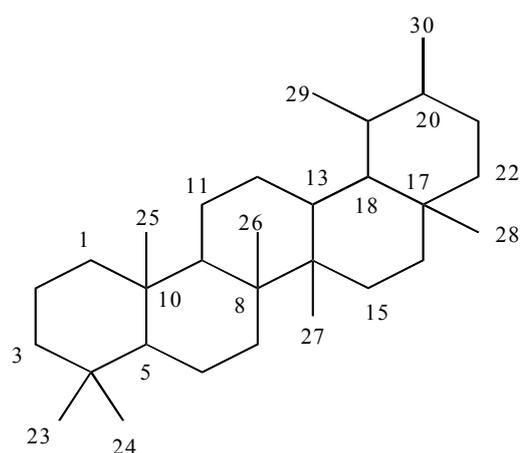
II-4- Triterpènes

II-4-1- Introduction

Les triterpènes englobent plus de 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes hydrocarbonés différents. Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxyqualène, ou plus rarement du squalène lui-même [13,47,48]. Ils sont presque toujours hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimiques ayant trait à la conformation adoptée par l'époxyqualène avant la cyclisation initiale. Le cation formé lors de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles conduisant aux différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles [13,47,48].



Triterpène tétracyclique



Triterpène pentacyclique

II-4-2- Biosynthèse des triterpènes

Les organismes végétaux ont la possibilité de cycliser l'époxyqualène qui conduit spécifiquement aussi bien aux triterpènes tétracycliques libres des plantes de la famille des Euphorbiaceae et des Laticiferes qu'aux saponosides à génine triterpénique pentacyclique ou aux triterpènes modifiés des Rutales [13,47].

Le couplage queue-à-queue de deux unités en C-15, farnésylpyrophosphate (FPP) suivi d'une oxydation permet l'élaboration de l'époxyqualène (figure 6), précurseur des triterpènes et des stéroïdes [13,47,48].

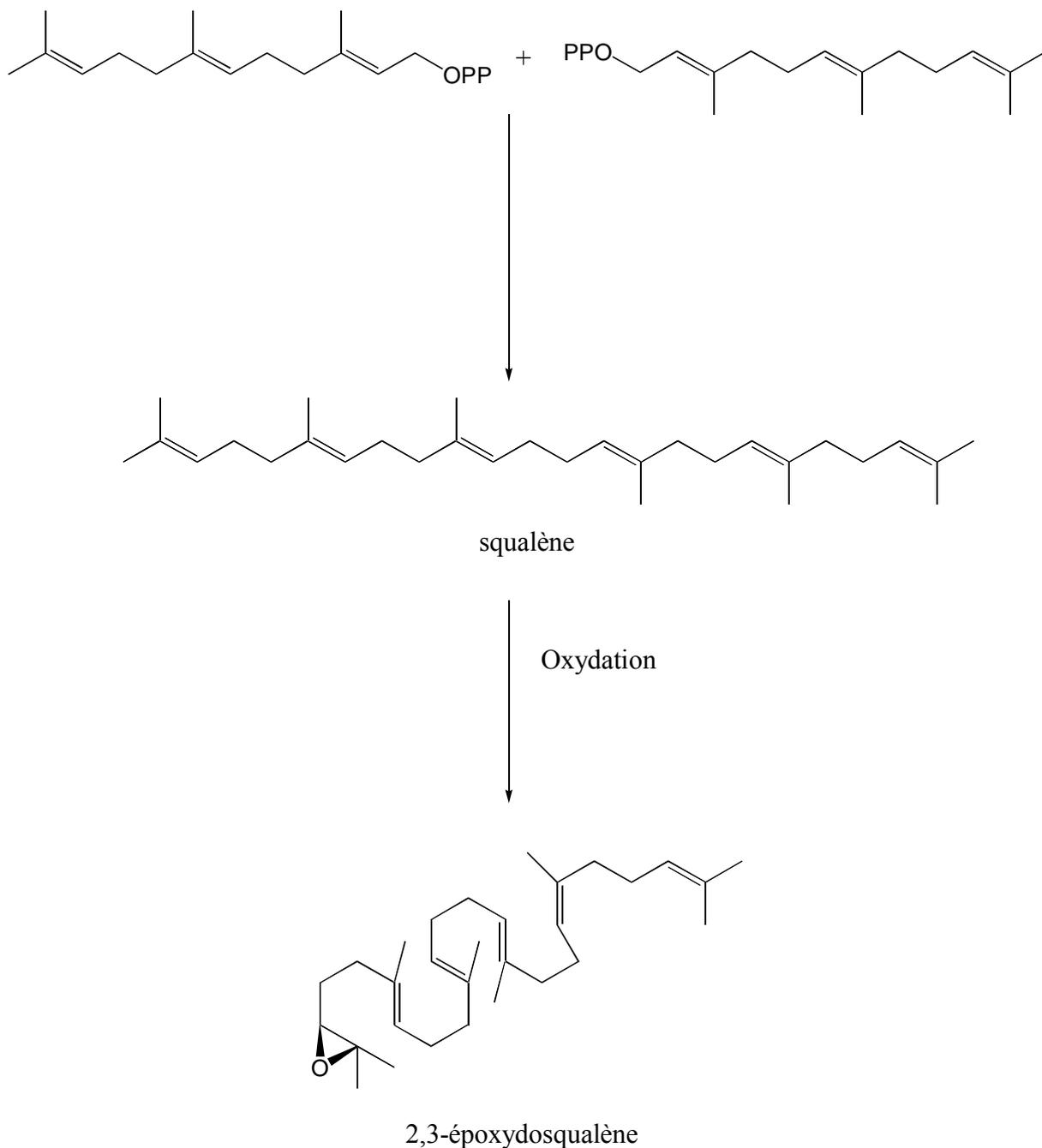
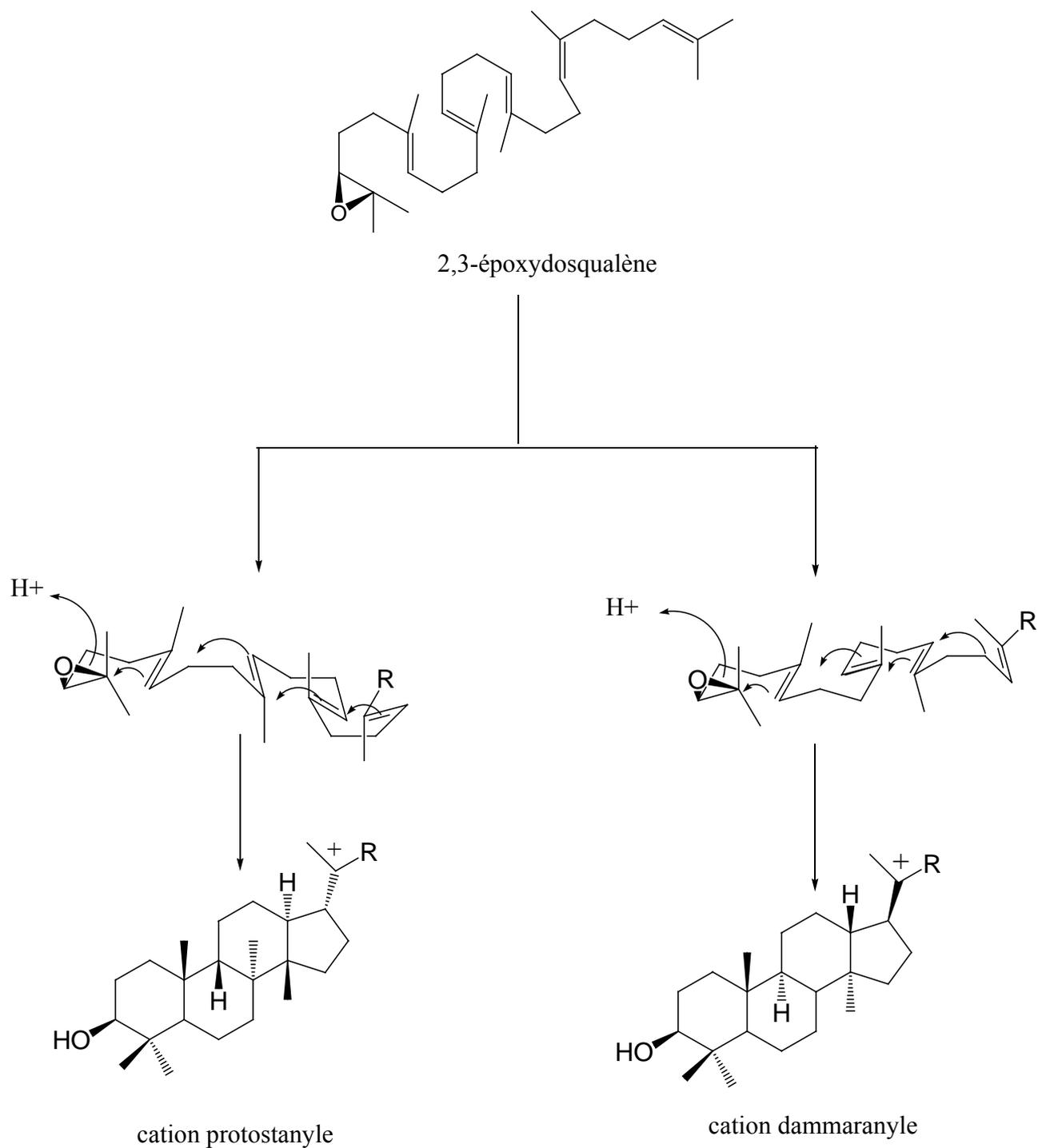


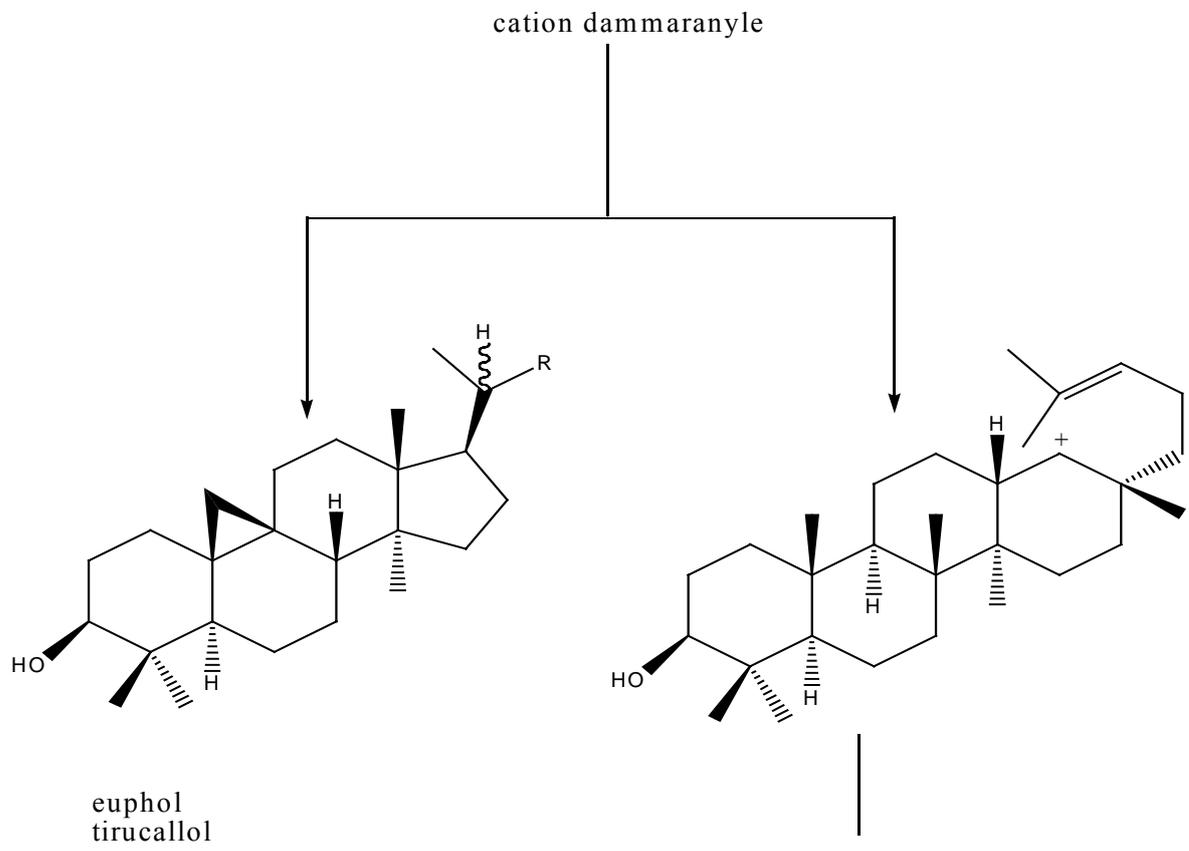
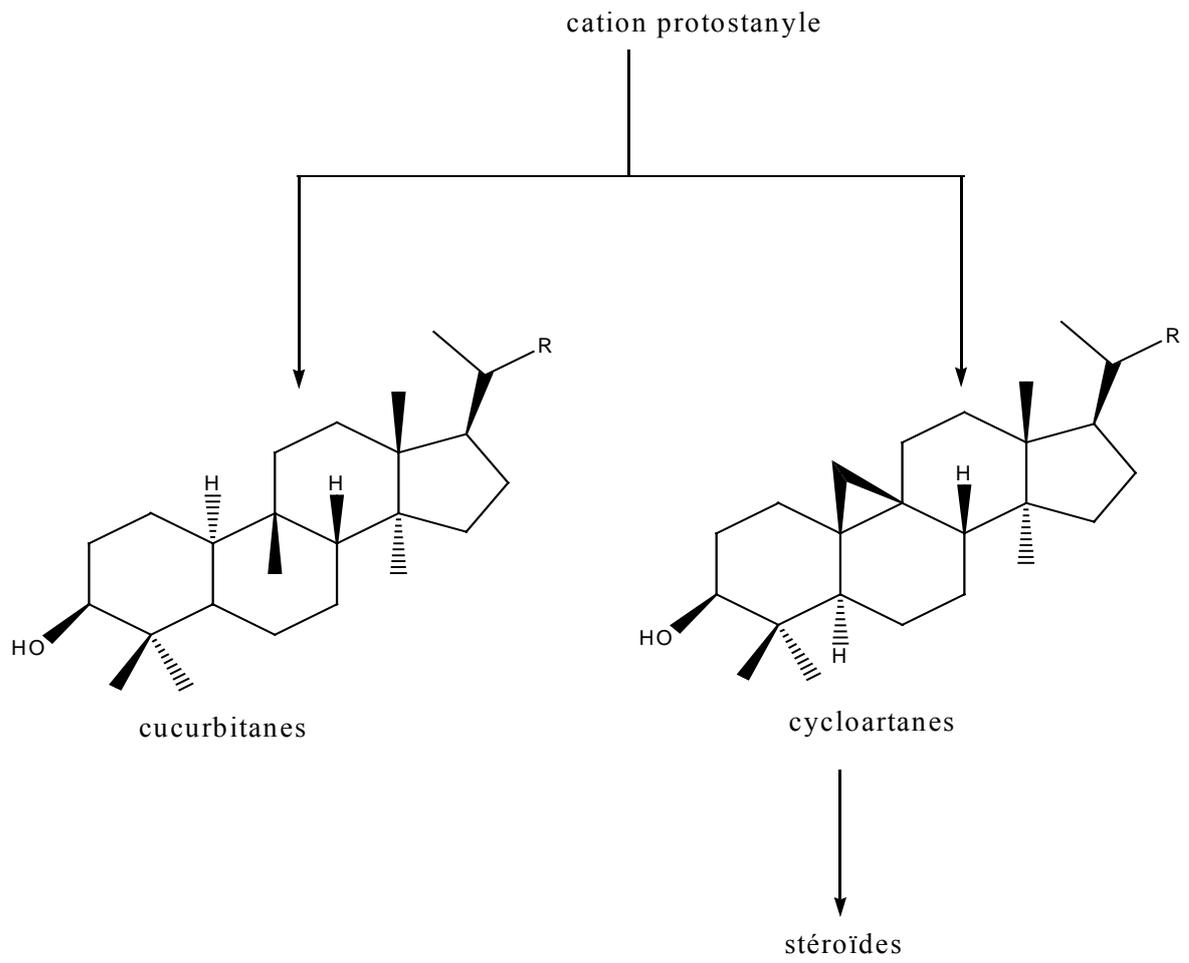
Figure 6 : Formation du squalène

L'ouverture de l'époxyde amorce la cyclisation, l'enzyme responsable de cette cyclisation stabilise la conformation du polyisoprène de telle sorte que les impératifs stéréoélectroniques soient respectés. C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme (figure 7) que dépend l'orientation de la biosynthèse vers les triterpènes tétra- et pentacycliques et les stéroïdes [13,47,48].

-Si l'époxysqualène est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostanyle précurseur des cycloartanes, des lanostanes et des cucurbitanes.

-Si l'époxydocalène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un autre cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut évoluer afin de donner naissance aux triterpènes tétracycliques à squelette euphane et tirucallane et le plus souvent il conduit aux triterpènes pentacycliques de type oléane, ursane, lupane, multiflorane, taraxérane, taraxastane,...etc.





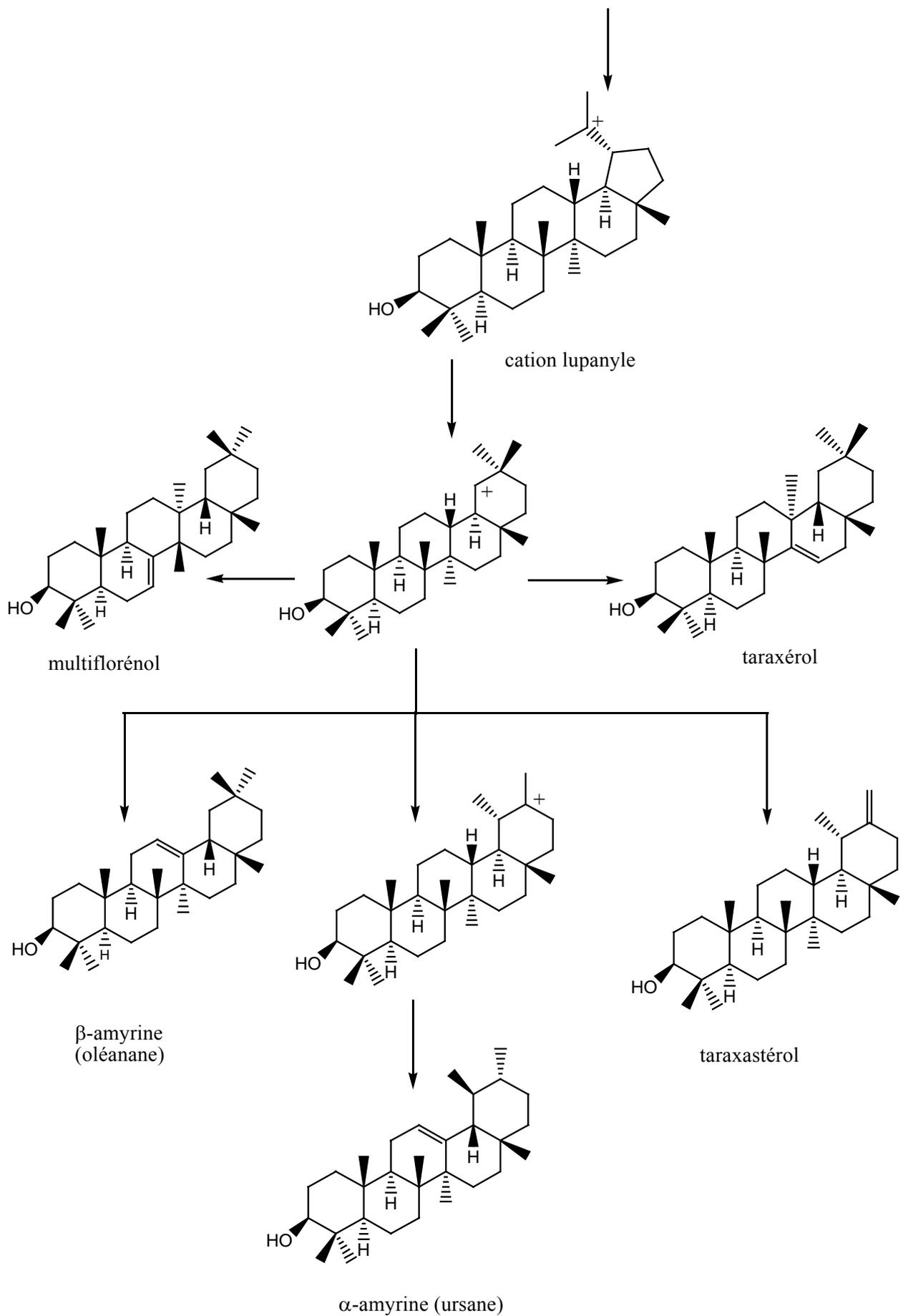


Figure 7 : Schéma de biogenèse des triterpènes tétra- et pentacycliques

II-4-3- Intérêts des triterpènes

L'utilisation industrielle et l'intérêt thérapeutique des triterpènes et stéroïdes représentent un enjeu capital dans le domaine de la recherche des substances naturelles. Les propriétés pharmacologiques diverses [13,48] attribuées à ces composés ont permis leur classement en tant qu'un groupe de métabolites secondaires de grande importance. Ces composés manifestent entre autres :

- des potentialités thérapeutiques dans les différents domaines : cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, molluscicides,etc.
- un intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique particulièrement la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés : contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoires,...etc.
- un intérêt thérapeutique concernant l'extraction des molécules bioactives, pour l'obtention des formes galéniques simples ou pour celle de préparation de phytothérapie.
- une importance économique du fait de leur utilisation dans les industries agroalimentaires.

**III- Etude phytochimique de l'espèce
Euphorbia guyoniana Boiss. et Reut.**

III-1- Rappels botaniques

L'espèce *E. guyoniana* est une plante endémique à l'Algérie [2]. C'est une hémicryptophyte, d'un vert foncé, à port herbacé très rameux et élancé. Les tiges dressées, non charnues et très ramifiées dès la base, contiennent du latex et peuvent atteindre jusqu'à 1 m de hauteur (figure 8). Les feuilles sont très petites, linéaires et alternes, se desséchant rapidement. C'est une plante puissante à souche souterraine, longuement traçante. Les graines sont sans caroncule, noirâtres et munies de côtes longitudinales grises, glandes de la cyathe arrondies, sans pointe. La floraison s'échelonne sur les saisons d'hiver et du printemps. Les fleurs ont des pétales réduits de couleurs jaune vif. Le fruit est une capsule de 4 à 5 mm, contenant des graines ailées [2].



Figure 8 : Espèce *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut.

Cette espèce existe dans les endroits sableux, dans toute la région prédesertique et le Sahara septentrional [2]. Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance se fait durant la saison suivante à partir des bourgeons enterrés dans ou au niveau du sol.

Les systématiciens de la botanique [1,2,8,10] s'accordent à classer cette espèce comme suit :

Famille : Euphorbiaceae

Sous famille : Euphorbioideae

Tribu : Euphorbieae

Sous tribu : Euphorbiinae

Genre : *Euphorbia*

Espèce : *E. guyoniana* Boiss. et Reut.

Cette espèce s'adapte à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire. En effet, les feuilles très petites, qui sont parfois absentes, diminuent la quantité d'eau perdue par transpiration [2].

III-2- Toxicité

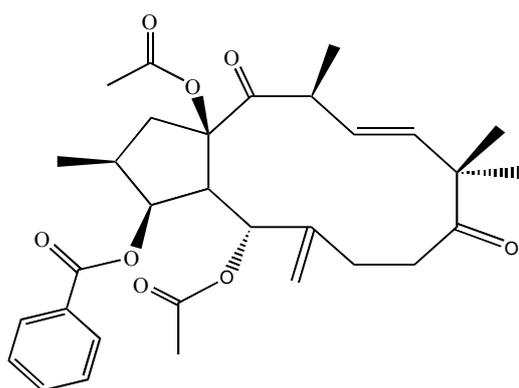
Le latex de plantes du genre *Euphorbia* provoque des rougeurs sur la peau, des érythèmes ou des phlyctènes [3]. Egalement très irritant pour les yeux, il entraîne par simple contact, même furtif, des larmoiement intenses. A des doses plus élevées, interviennent des lésions graves de l'œil pouvant aller jusqu'à la cécité. Les troubles de la vue sont accompagnés souvent de toux, de rhinite avec écoulement nasal, de laryngite et de brûlure des lèvres. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif [3].

III-3- Utilisation en médecine traditionnelle

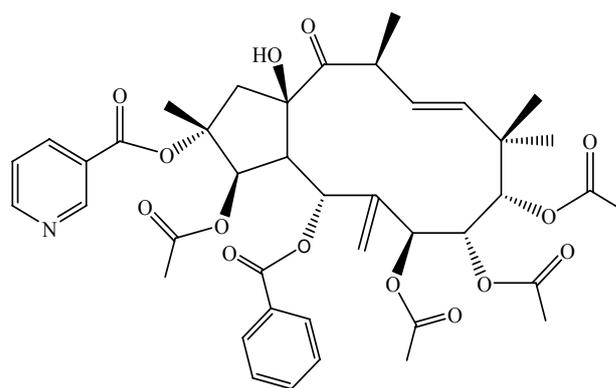
Le latex de la plante *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. est utilisé par les populations locales pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses [3].

III-4-Travaux antérieurs sur l'espèce

Une seule étude chimique a été réalisée récemment sur les parties aériennes de l'espèce *E. guyoniana* [4], et cela au moment où nous avons entrepris son investigation phytochimique. Elle a permis l'isolement et la caractérisation de deux nouveaux diterpènes polyesters de type jatrophane. Leurs structures moléculaires ont été établies par les méthodes spectroscopiques modernes, particulièrement la RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse.



Guyonianin A (184)



Guyonianin B (185)

III-5- Chimie extractive

Les triterpènes et diterpènes, métabolites secondaires peu polaires et fréquents dans le règne végétal, sont généralement des poudres blanches solubles dans les solvants moyennement polaires comme le chloroforme, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Ces composés se trouvent souvent dans la plante sous forme d'un mélange complexe de plusieurs molécules de propriétés physico-chimiques voisines. De ce fait, les processus de purification et d'isolement des produits à l'état pur sont difficiles et assez longs, nécessitant le recours à plusieurs techniques chromatographiques.

III-5-1- Extraction

L'extraction primaire, à partir des racines séchées et broyées de l'espèce *Euphorbia guyoniana*, est réalisée en utilisant le chloroforme. Après filtration et évaporation à sec du solvant, 14 g d'extrait chloroformique ont été obtenus (rdt. 2,8 %). Cet extrait renferme un grand nombre de composés moyennement polaires. Le résidu issu de cette extraction est ensuite mis à macérer dans un solvant polaire, le méthanol. 24 g d'extrait méthanolique ont été ainsi obtenus (rdt. 4,8 %). Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure 9.

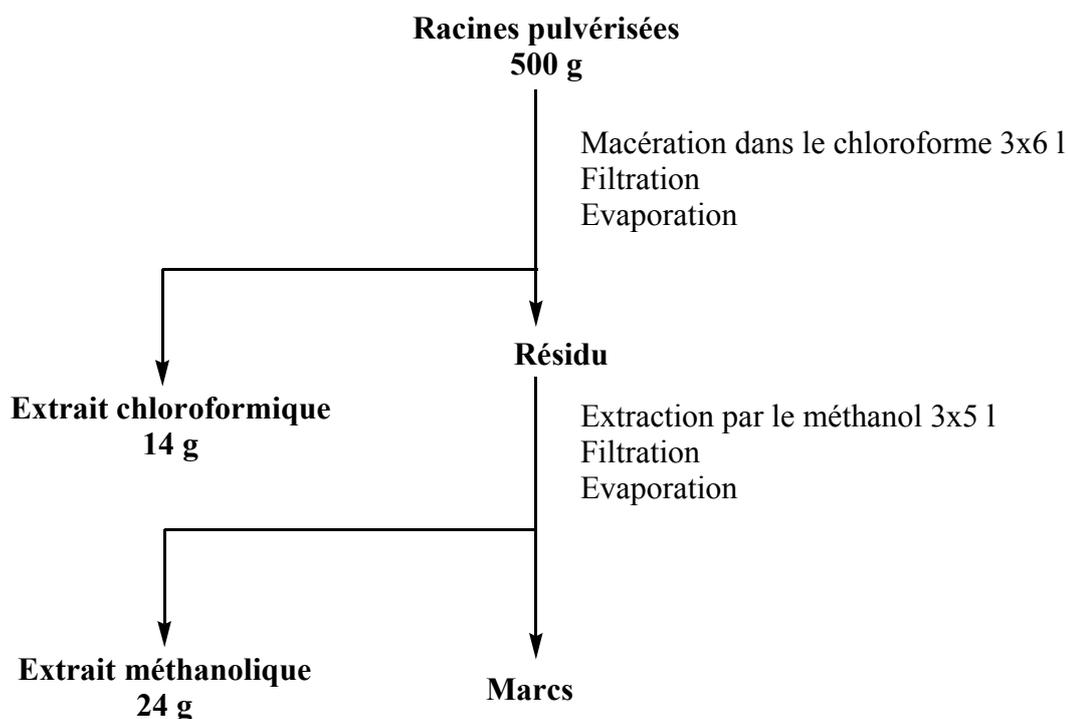


Figure 9 : Schéma général d'extraction des racines de l'espèce *E. guyoniana*.

III-5-2- Purification

La comparaison des profils CCM en phase normale des deux extraits obtenus précédemment dans différents systèmes d'élution, hexane-acétate d'éthyle (90:10 et 80:20), hexane-acétone (95:5 et 90:10) et chloroforme-méthanol (99:1, 97:3, 95:5 et 90:10), montre bien la richesse de l'extrait chloroformique en métabolites secondaires. L'intérêt porté à l'investigation chimique de l'extrait chloroformique est justifié par ce constat.

10 g de cet extrait sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale avec les gradients d'élution : éther de pétrole-acétate d'éthyle (100:0 à 0:100) et acétate d'éthyle-méthanol (100:0 à 20:80). 434 fractions ont été collectées. L'analyse CCM de ces fractions aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et la révélation à la vanilline sulfurique puis chauffage à 120 °C, permettent de constituer 41 fractions. Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 20 composés (15 triterpénoïdes et 5 diterpénoïdes) ont été isolés.

La purification de ce nombre important de composés a été faite grâce à l'utilisation de la chromatographie sur colonne de gel de silice normale (CC), sur plaque préparative (CPP), sur colonne de silice greffée C₁₈ et sur sephadex LH-20. Le recours à la CLHP semi-préparative s'est avéré nécessaire pour séparer plusieurs composés de nature triterpénique, présentant des similitudes structurales et des polarités voisines.

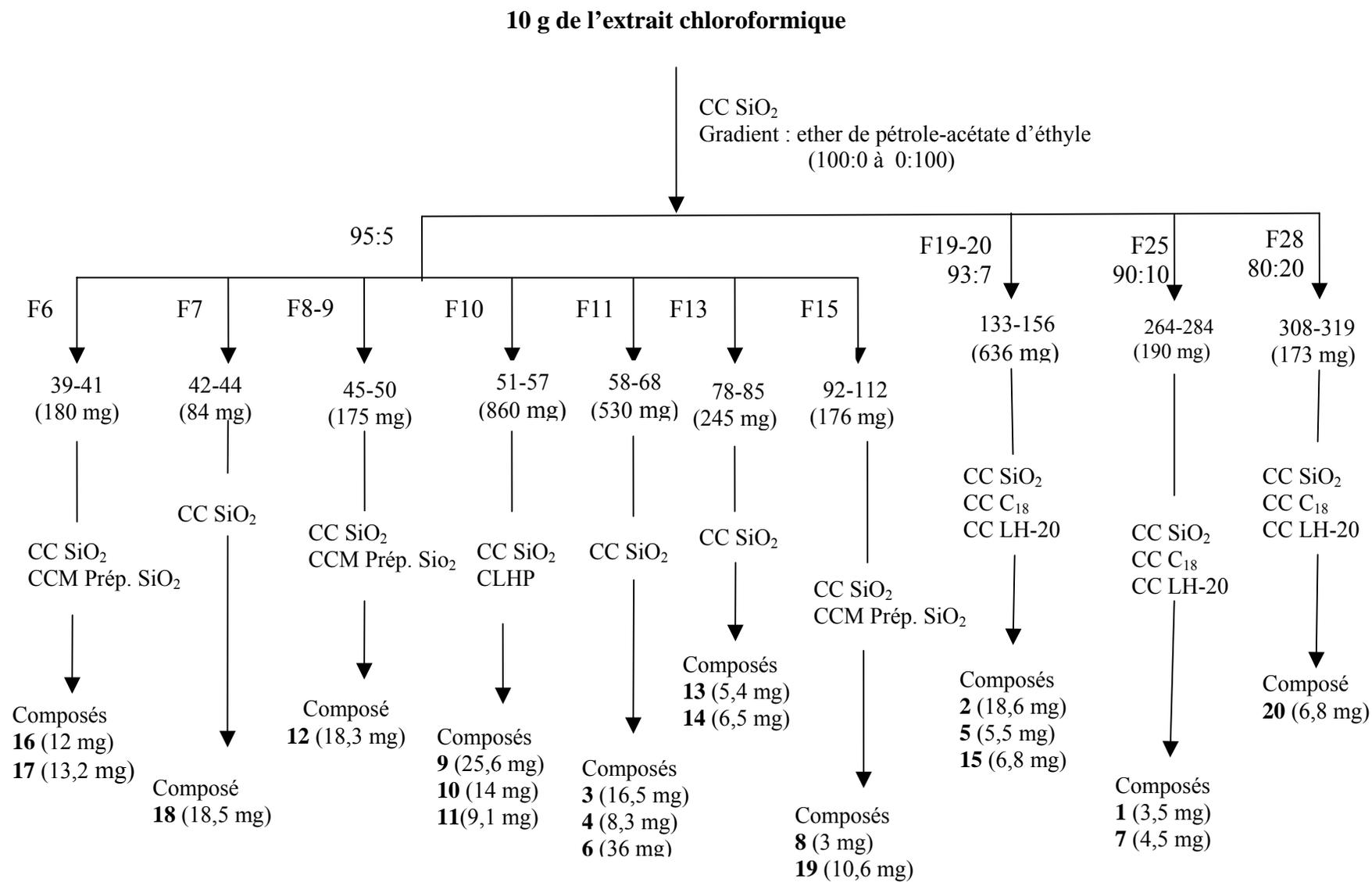
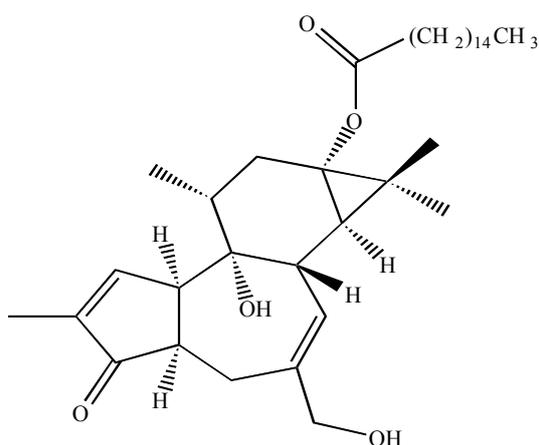


Figure 10 : Schéma de purification des triterpénoïdes et diterpénoïdes des racines de l'espèce *E*.

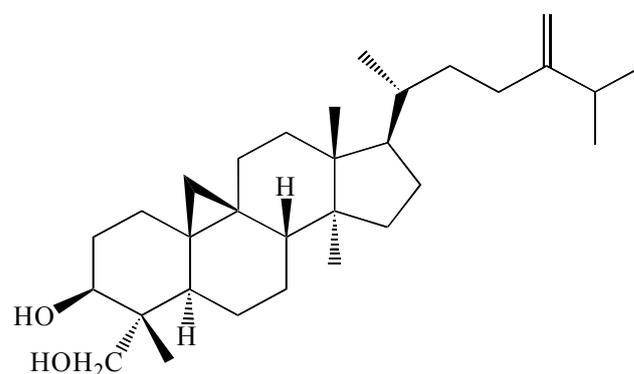
III-6- Caractérisation des produits obtenus

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, NOESY), UV, IR, spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI et HR-EI, par la mesure du pouvoir rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

III-6-1- Produits nouveaux

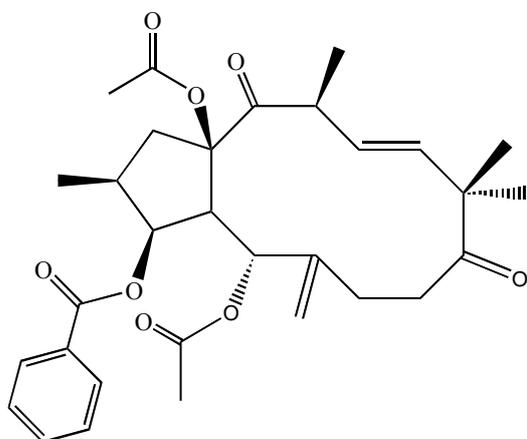


4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate (**1**)

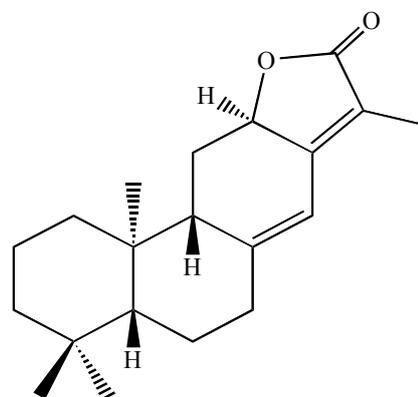


28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol (**7**)

III-6-2- Produits connus

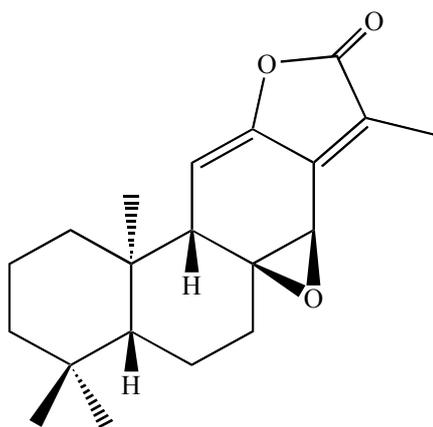


3-benzoyloxy-5,15-diacétoxy-9,14-dioxojatrophane

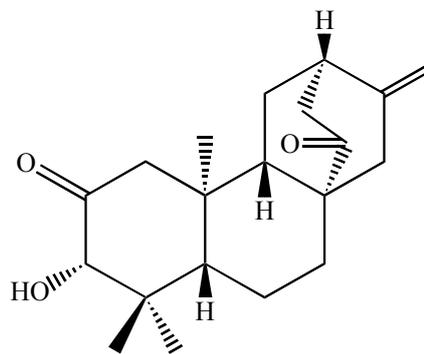


jolkinolide E (**3**)

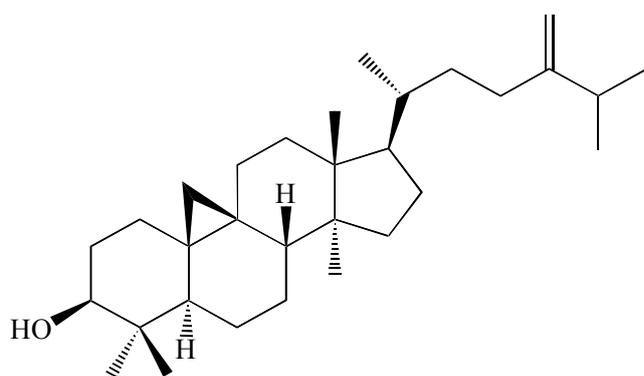
6(17),11-diène (2).



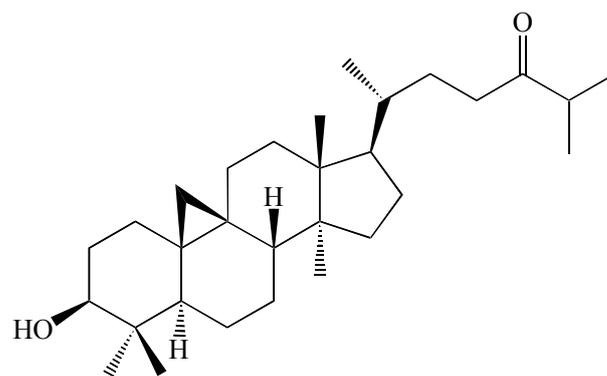
Jolkinolide A (4)



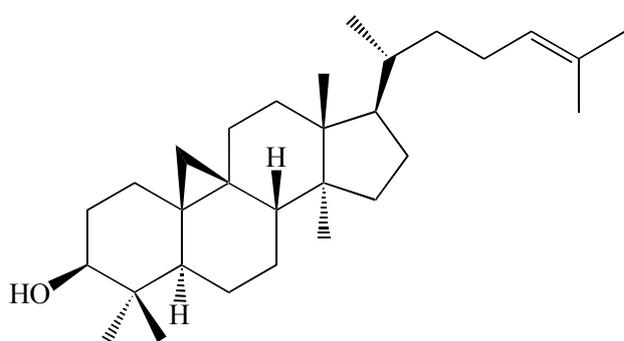
3 α -hydroxy-*ent*-atis-16(17)-ène-2,14-dione (5)



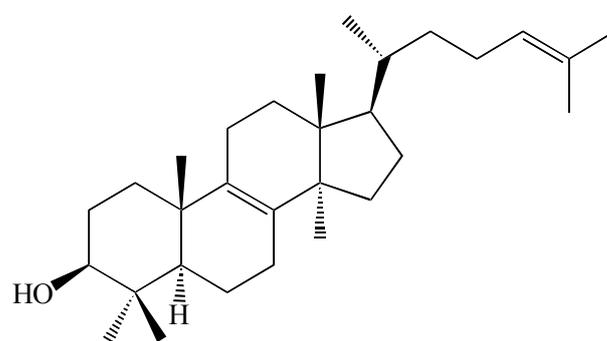
24-méthylèncycloartanol (6)



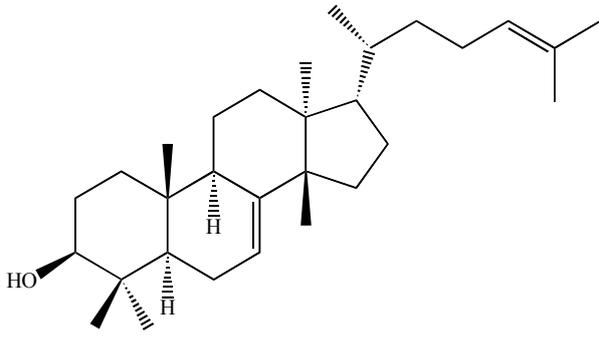
3-hydroxycycloartan-24-one (8)



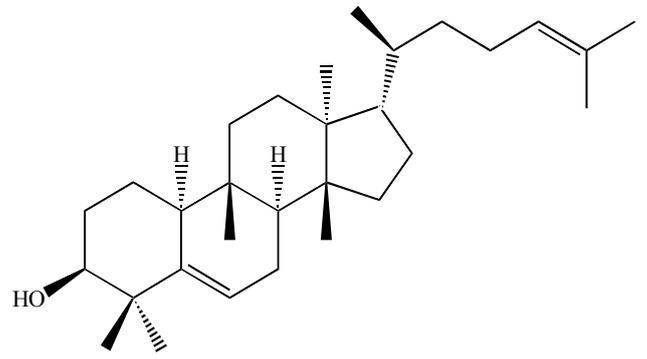
cycloarténol (9)



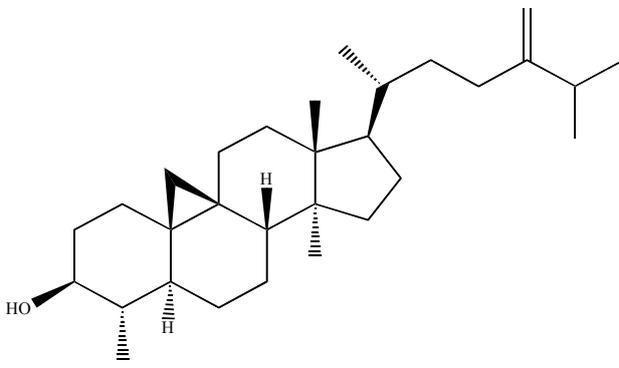
lanostérol (10)



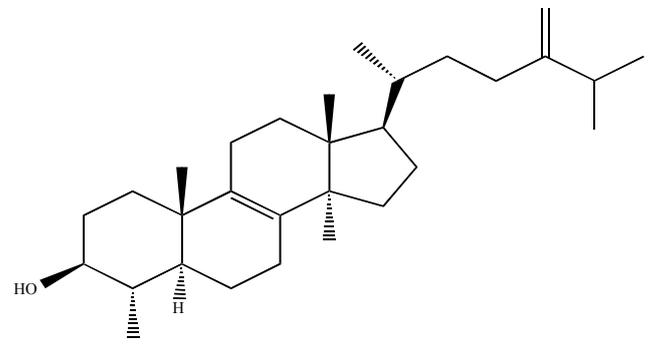
butyrospermol (11)



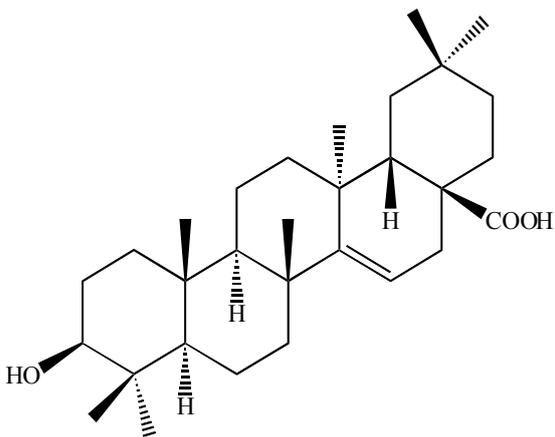
euférol (12)



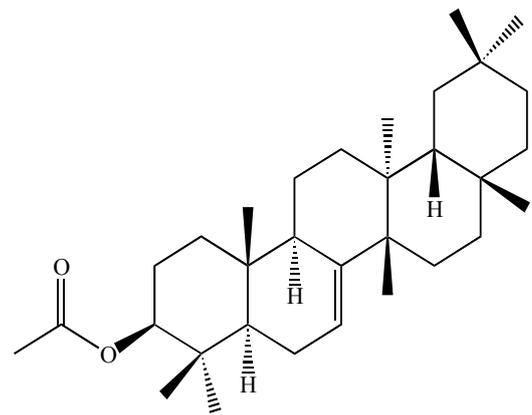
cycloeucalénol (13)



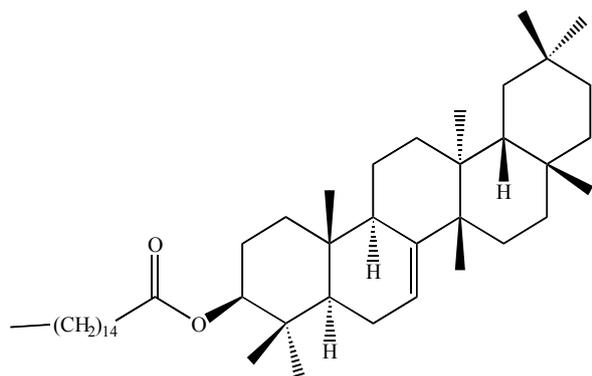
obtusifoliol (14)



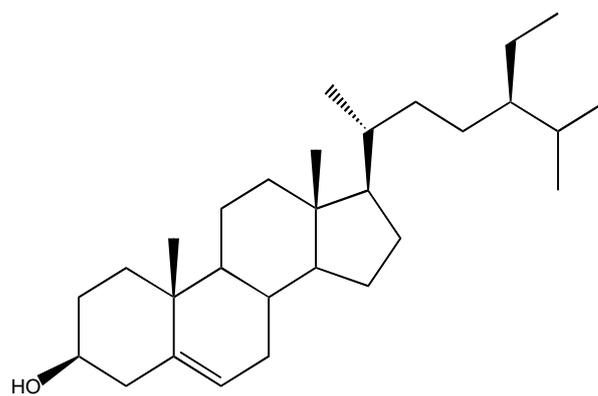
acide 3-hydroxytaraxer-14-èn-28-oïque (15)



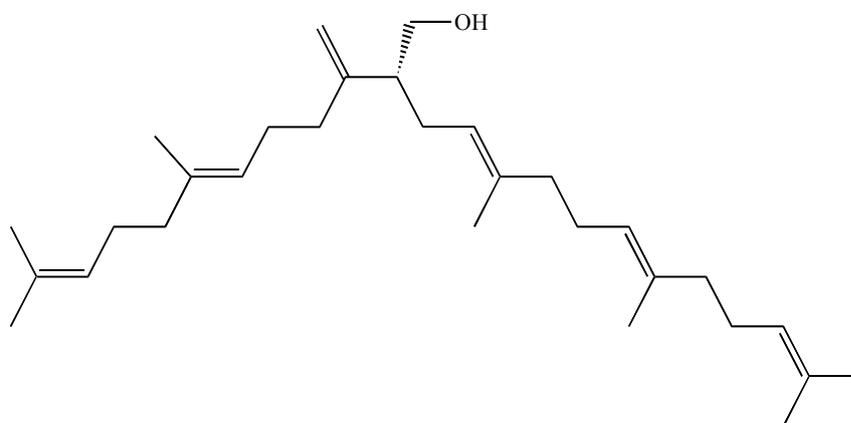
multiflorenyl acétate (16)



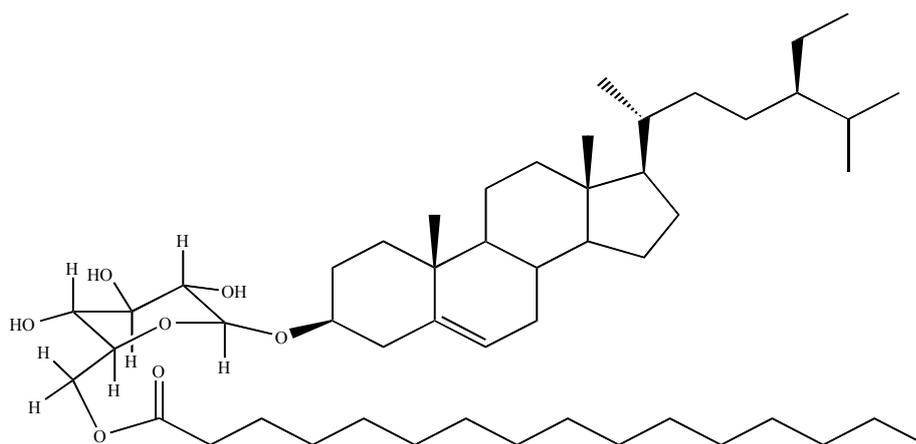
multiflorenyl palmitate (17)



β -sitostérol (19)

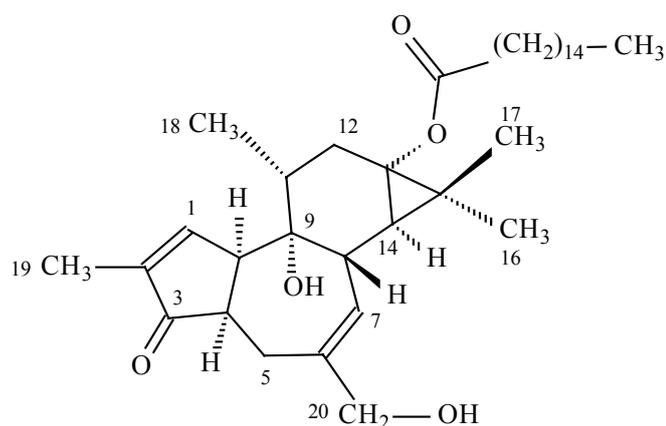


peplusol (18)



β -sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate (20)

III-6-3- Elucidation structurale du composé 1



4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate (**1**)

Le spectre de masse ESI-MS du composé **1** présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 593 [M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 570 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{36}H_{58}O_5$. Cette dernière est confirmée par le spectre de masse réalisé en haute résolution HR-ESI-MS (figure 11) montrant un pic à $m/z = 593,4174$ (cal. $C_{36}H_{58}O_5Na$, 593,4176).

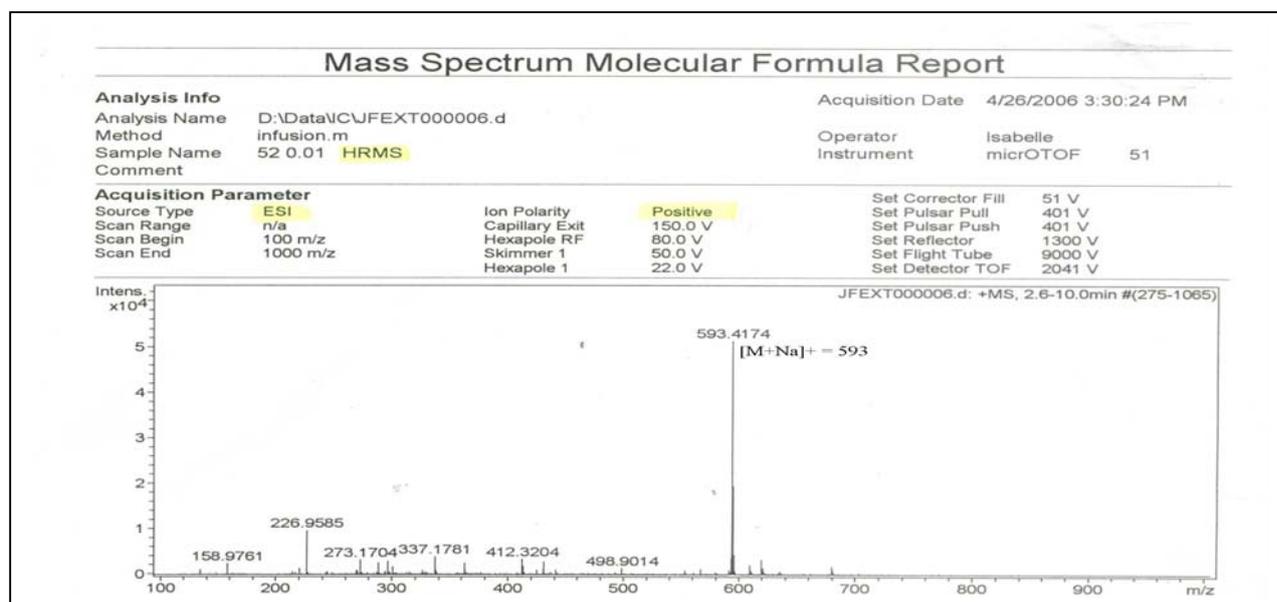


Figure 11 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **1**

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3405 cm^{-1} (hydroxyle), 1715 cm^{-1} (carbonyle) et à 1630 cm^{-1} (double liaison).

Sur le spectre UV, des maxima d'absorption sont observés à 236 et 335 nm, suggérant la présence d'un système énone.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé (tableau 4) du composé **1** comportent des signaux typiques d'esters de phorbol appartenant à une classe de diterpènes à squelette tigiane [14,55-58]. En effet, le spectre RMN ^1H montre des signaux (figure 12) de quatre groupements méthyles (δ_{H} 1,12, d , $J=6,4$ Hz, H-18, 1,09, s , H-17, 1,19, s , H-16, 1,83, sl , H-19) et de deux protons oléfiniques (δ_{H} 7,11, sl , H-1 et 5,15, sl , H-7). Il montre également à champ fort, un signal sous forme de doublet à δ_{H} 0,58 ($J=5,0$ Hz) attribuable au proton H-14 ainsi qu'un système AB correspondant aux protons du groupement méthylène oxygéné se traduisant par un signal sous forme de deux doublets à δ_{H} 4,06 (1H, d , $J=12,1$ Hz, H-20a), 3,93 (1H, d , $J=12,1$ Hz, H-20b).

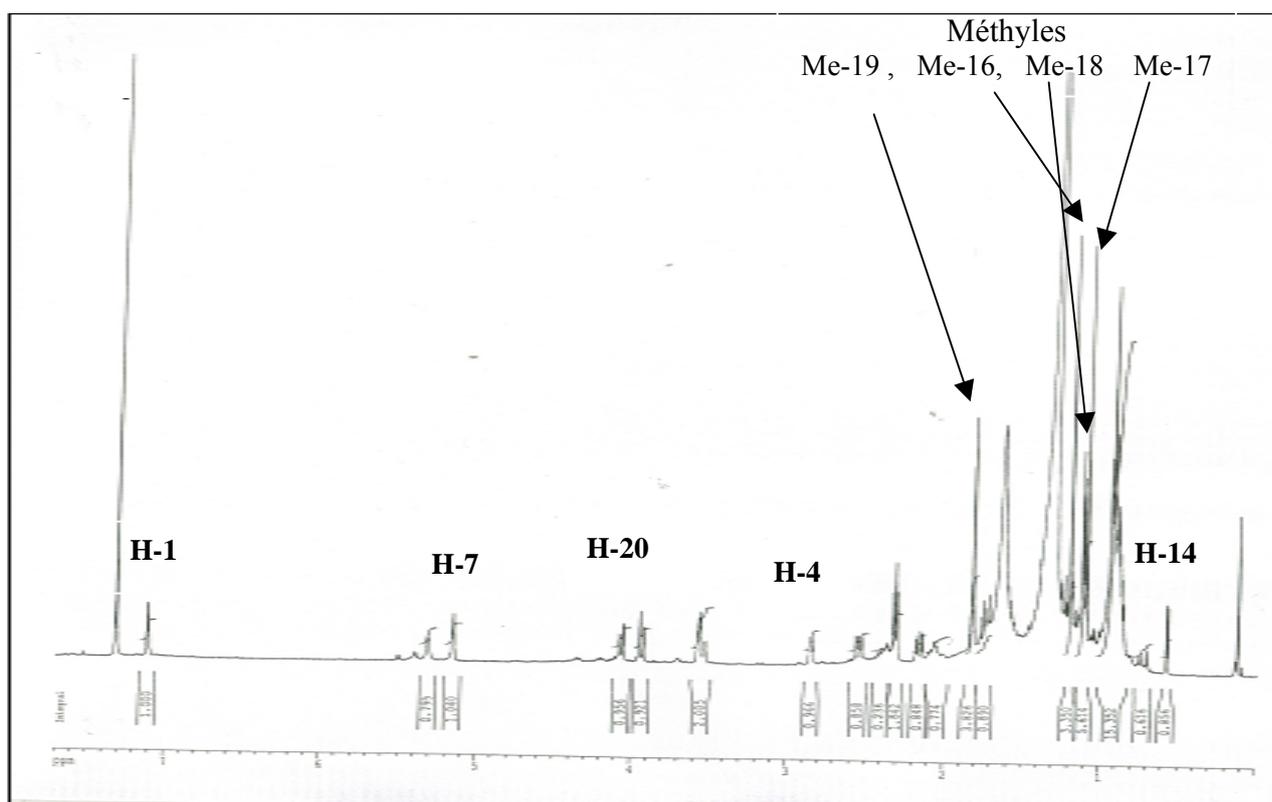
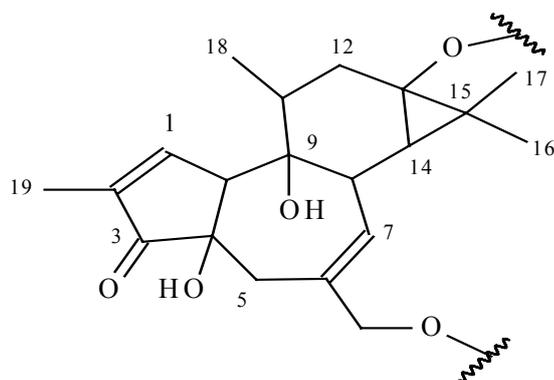


Figure 12 : Spectre RMN ^1H du composé **1**

Un signal déblindé résonant à 5,32 ppm sous forme d'un singulet large attribué au groupement 9-OH, du fait qu'il ne montre aucune corrélation sur le spectre HSQC J -modulé [18,55], est également observé. L'absence d'un signal à 5,40 ppm sous la forme d'un doublet correspondant au proton H-12, habituellement observés dans le cas de dérivés d'esters de phorbol et l'apparition de deux doublets de doublets à δ_{H} 2,16 (1H, dd , $J=14,5$ et 6,4 Hz, H-12 β) et 1,75 (1H, dd , $J=14,5$ et 12,0 Hz, H-12 α), laissent supposer qu'il s'agit à priori d'un dérivé d'ester 12-deoxyphorbol [18,55].



Ester 12-deoxyphorbol

Le spectre RMN ^{13}C en J -modulé (figure 13) permet de voir des signaux caractéristiques du 12-deoxyphorbol à l'exception du carbone en C-4 qui apparaît pour ce composé à 50,1 ppm au lieu de 74.0 ppm pour les dérivés du 12-deoxyphorbol [17].

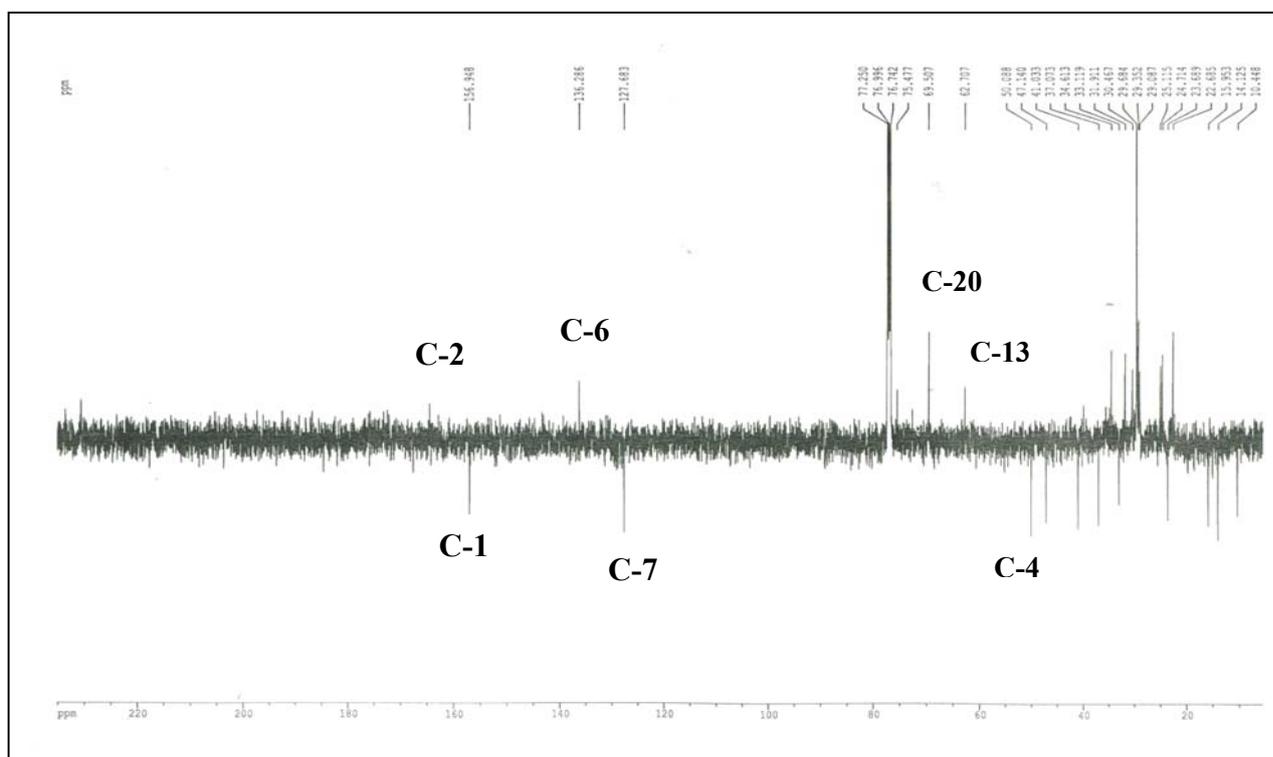
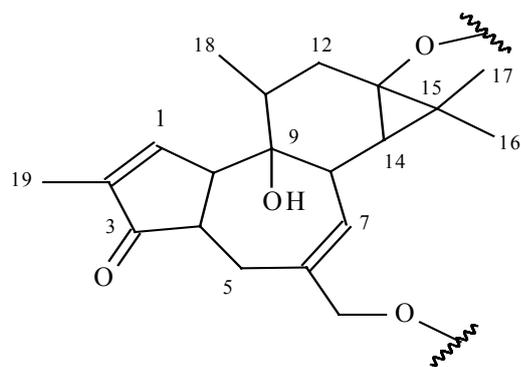


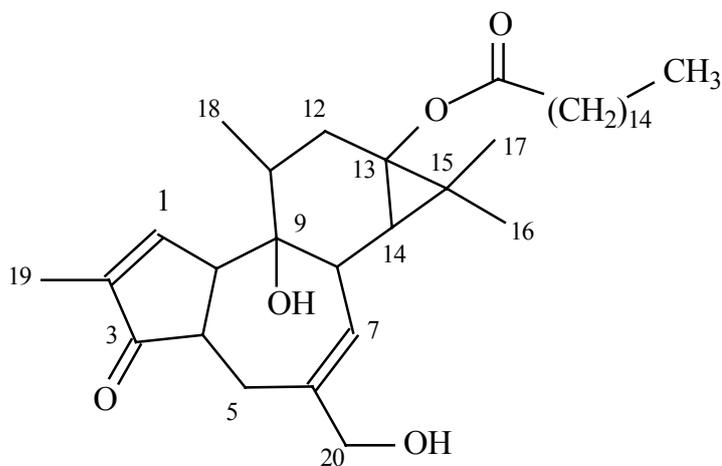
Figure 13 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé 1

Ce blindage de $\Delta + 23,9$ ppm prouvant que celui-ci ne porte pas de groupement hydroxyle, nous oriente vers un dérivé d'ester 4,12-dideoxyphorbol.



Ester 4,12-dideoxyphorbol

La présence du groupement hexadécanoyle est déduite du fragment caractéristique observé sur le spectre de masse en mode positif (figure 11) à m/z 337 $[(M+Na)-256]^+$, correspondant à la perte d'un acide gras saturé en C-16. Le triplet du groupement méthyle à δ_H 0,92 ($J= 6,9$ Hz) et à δ_C 14,1, les signaux de groupements méthylènes à δ_H 2,32 (2H, t , $J= 7,6$ Hz), 1,62 (2H, m), 1,30-1,35 (24H, m) et δ_C 34,6 ; 24,7 ; 22,7 ; 29,1-29,7 ; 31,9 et le signal du carbone du carbonyle à δ_C 176,0, attestent de la nature du groupement hexadécanoyle. Les déplacements chimiques des protons allyliques H-20 indiquent que le carbone en C-20 est porteur d'un hydroxyle libre [18]. En conséquence, le groupement ester hexadécanoyle ne peut être lié qu'au carbone C-13 [18].



4,12-dideoxyphorbol-13-hexadécanoate

Toutes ces attributions sont par ailleurs confirmées par les expériences de corrélations HSQC J -modulé, HMBC et COSY H-H. Cette dernière (figure 14) révèle les couplages attendus entre le proton H-4 résonant à 2,85 ppm et les protons H-5 repérés à 2,54 et 3,54 ppm et H-10 détecté à 3,57 ppm (figure 15).

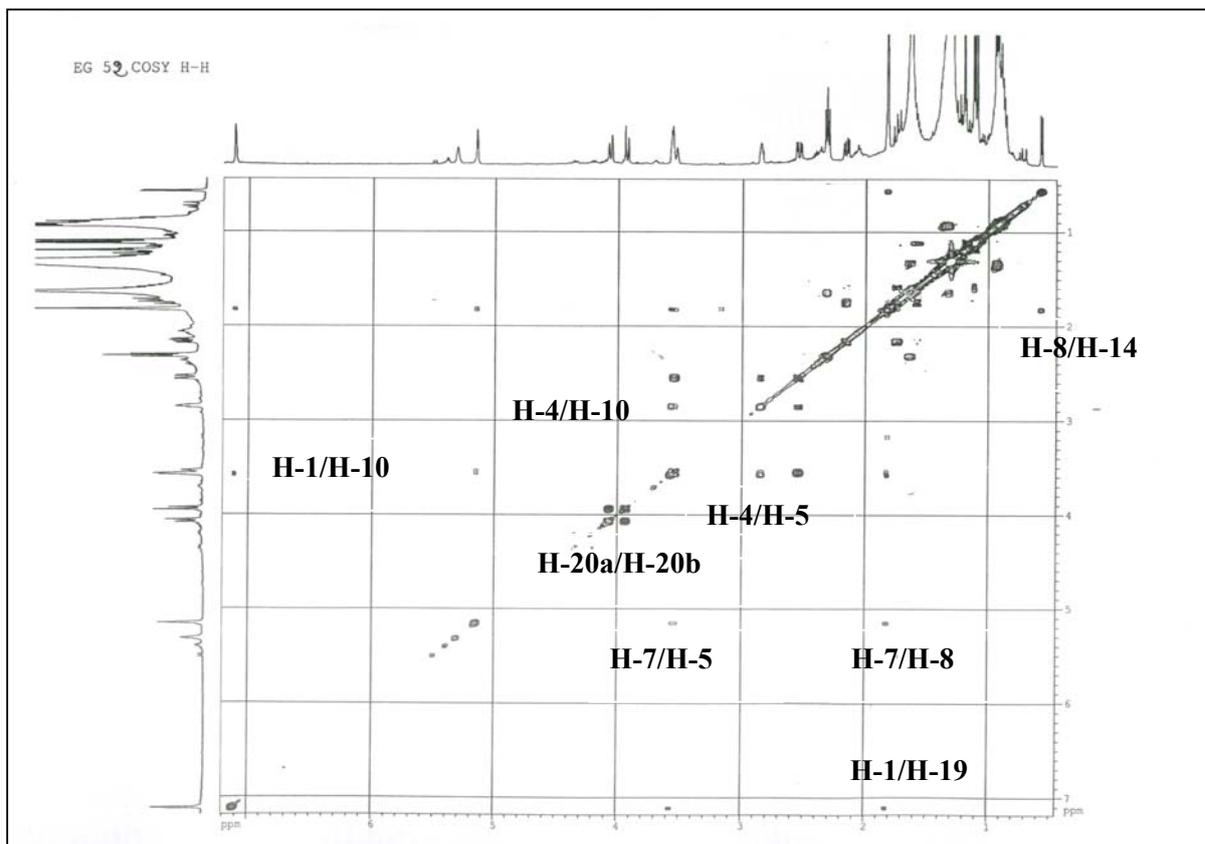


Figure 14 : Spectre COSY H-H du composé 1

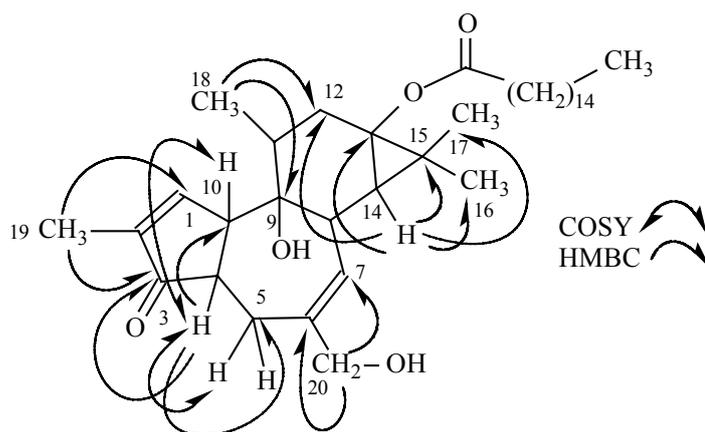


Figure 15 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé 1

Le spectre HMBC (figure 16) montre des couplages en 2J et 3J entre :

- le proton H-4 et les carbones résonant à δ_C 25,1 (C-5), 47,1 (C-10) et 213,8 (C-3).
- le proton H-14 et les carbones à δ_C 30,5 (C-12), 62,7 (C-13), 22,5 (C-15), 23,7 (C-16) et 15,2 (C-17).
- les protons du groupement méthyle Me-18 et les carbones à δ_C 75,5 (C-9), 37,1 (C-11) ainsi que le carbone C-12.
- les protons du groupement méthyle Me-19 et les carbones éthyléniques C-1 (156,9 ppm), C-2 (143,0 ppm) et le carbone C-3 du carbonyle.
- les protons oxométhyléniques H-20 et les carbones éthyléniques C-6 (136,3 ppm), C-7 (127,7 ppm) et le carbone méthylénique C-5 résonant à 25,1 ppm.

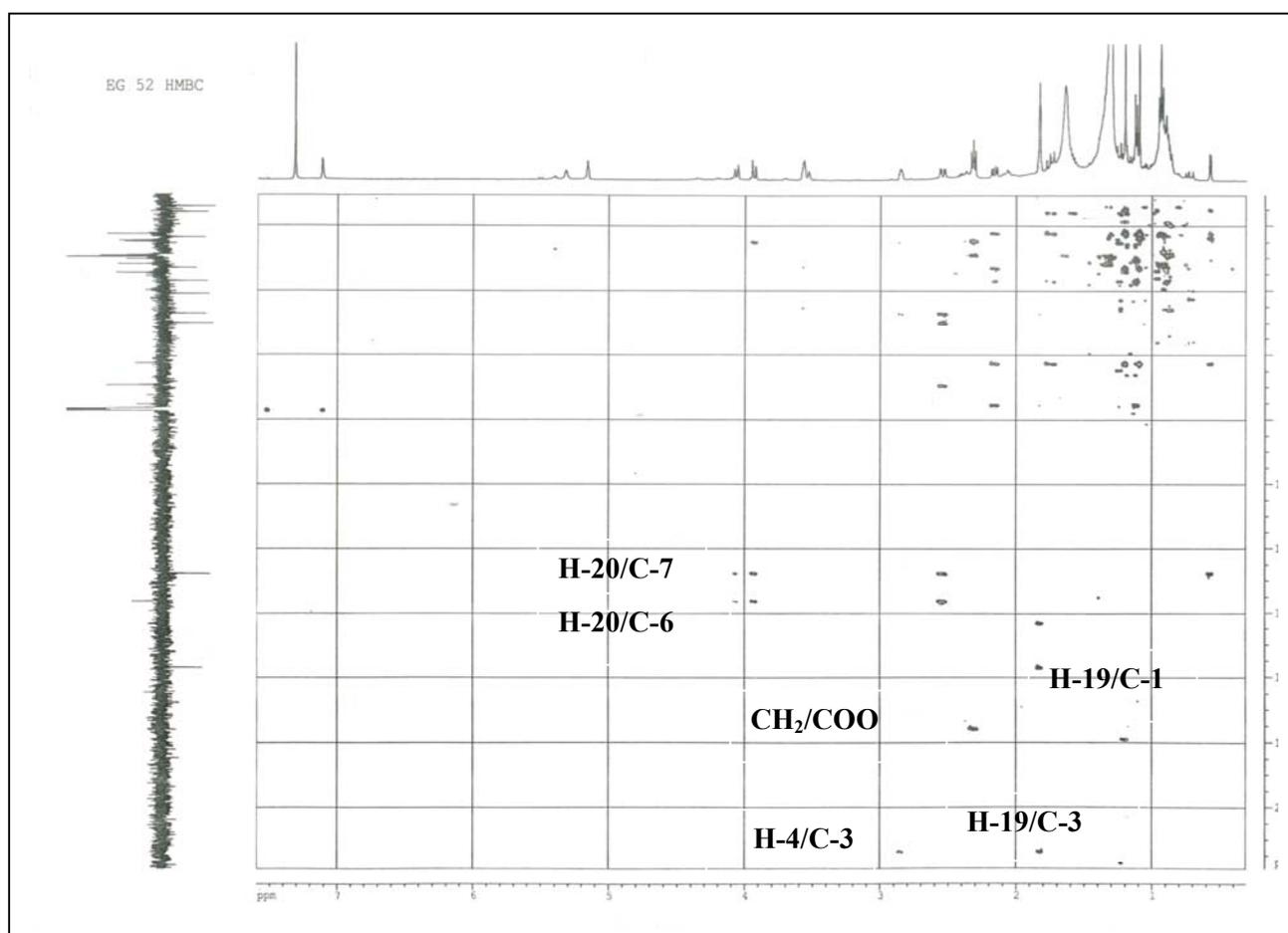


Figure 16 : Spectre HMBC du composé 1

La stéréochimie relative du composé **1** est établie par analyse des valeurs des constantes de couplage et du spectre NOESY (figure 17). Il est à rappeler que tous les diterpénoïdes de type tiglane isolés du règne végétal ont la configuration suivante : H-8 β , C-9-OH α et H-10 α [14,17,56].

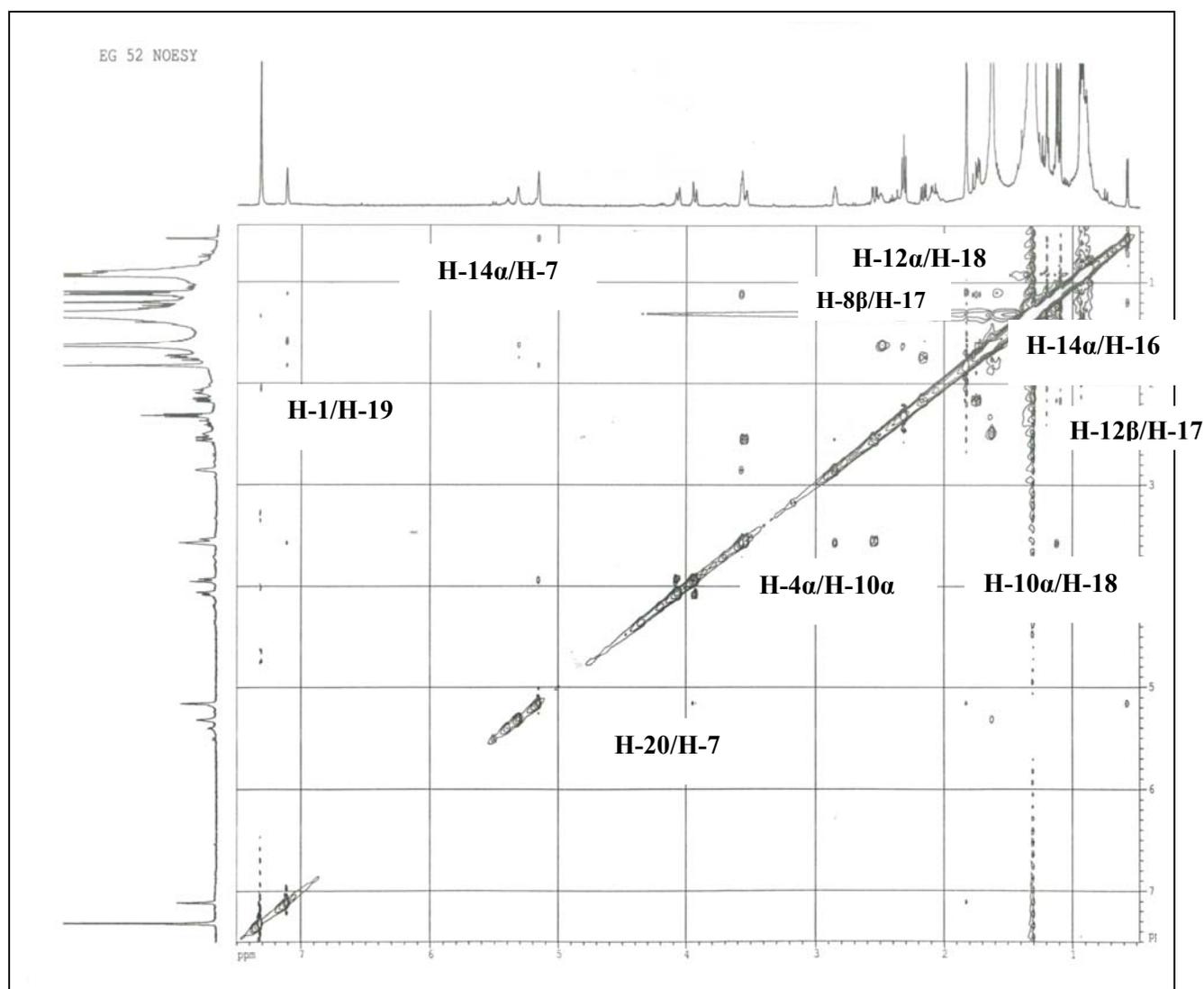


Figure 17 : Spectre NOESY du composé **1**

Les constantes de couplage de valeurs 12,0 et 6,4 Hz entre les protons H-12 et H-11 et l'effet NOE observés entre les protons méthyliques Me-18 et H-12 α , indiquent que le proton H-11 est β -axial. Les corrélations visualisées entre les protons du groupement méthyle Me-17 et les protons H-8 et H-11 β , impliquent que tous ces protons sont β -orientés. L'absence d'effet NOE entre les protons H-14 et H-8 β , prouve que le proton H-14 est en position α . La corrélation observée entre les protons du groupement Me-18 et H-10, confirme l'orientation α du proton H-10. D'autres effets NOE sont visualisés entre les protons Me-17/H-12 β , Me-16/H-14 α , H-14 α /H-7 et H-7/H-20. Le

proton H-4 est α -orienté du fait de sa corrélation avec le proton H-10 α . Cette orientation est également soutenue par l'absence de corrélation entre les protons H-4 et H-8 β . Le déplacement chimique du proton H-1 de l'ordre de 7,11 ppm et les valeurs des constantes de couplage du proton H-4 (*ddd* $J= 6,7, 5,0$ et $3,0$ Hz), comparés à ceux enregistrés dans le cas de dérivés de l'ester 4,12-dideoxyphorbol à stéréochimie H-4 β , sont en accord avec une configuration α [59]. Il en résulte ainsi que la stéréochimie de ce composé est : 4 α -H, 8 β -H, 9 α -OH, 10 α -H, 11 α -Me, 13 α -OCO(CH₂)₁₄CH₃ et 14 α -H (figure 18).

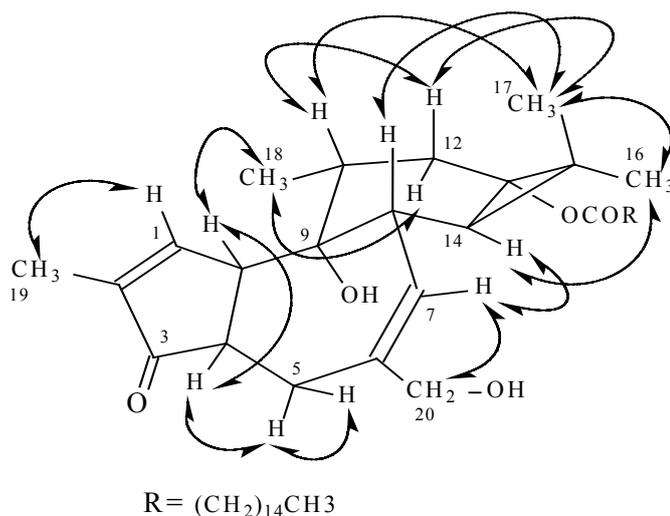


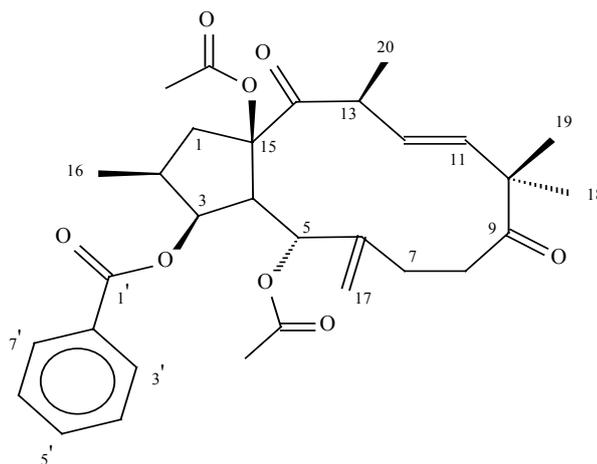
Figure 18 : Importantes corrélations NOESY observées pour le composé **1**

Toutes ces données (tableau 4) nous permettent de proposer pour ce composé nouveau, la structure suivante : 4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate (**1**).

Tableau 4 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **1** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	7,11 <i>sl</i>	156,9
2	-	143,0
3	-	213,8
4	2,85 <i>ddd</i> 6,7, 5,0, 3,0 H-4 α	50,1
5	2,54 <i>dd</i> 15,4, 5,0 H-5 α 3,54 <i>dm</i> 15,4 H-5 β	25,1
6	-	136,3
7	5,15 <i>sl</i>	127,7
8	1,82 <i>m</i> H-8 β	41,0
9	5,32 <i>sl</i> OH-9 α	75,5
10	3,57 <i>sl</i> H-10 α	47,1
11	1,58 <i>m</i> H-11 β	37,1
12	1,75 <i>dd</i> 14,5, 12,0 H-12 α 2,16 <i>dd</i> 14,5, 6,4 H-12 β	30,5
13	-	62,7
14	0,58 <i>d</i> 5,0 H-14 α	33,1
15	-	22,5
16	1,19 <i>s</i>	23,7
17	1,09 <i>s</i>	15,2
18	1,12 <i>d</i> 6,4	15,9
19	1,83 <i>sl</i>	10,4
20	4,06 <i>d</i> 12,1 H-20a 3,93 <i>d</i> 12,1 H-20b	69,5
1'	-	176,0
2'	2,32 <i>t</i> 7,6	34,6
3'	1,62 <i>m</i>	24,7
4'-15'	1,30-1,35 <i>m</i>	22,7, 29,1-29,7, 31,9
16'	0,92 <i>t</i> 6,9	14,1

III-6-4- Elucidation structurale du composé 2



3-benzoyloxy-5,15-diacétoxy-9, 14-dioxojatropha-6(17), 11-diène (2).

Le spectre de masse ESI-MS du composé **2** obtenu sous forme d'une huile incolore, montre en modes positif (figure 19) et négatif respectivement des ions à m/z 561 $[M+Na]^+$ et 1099 $[2M+Na]^+$, m/z 537 $[M-H]^-$ et 573 $[M+Cl]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 538 uma et une formule brute en $C_{31}H_{38}O_8$.

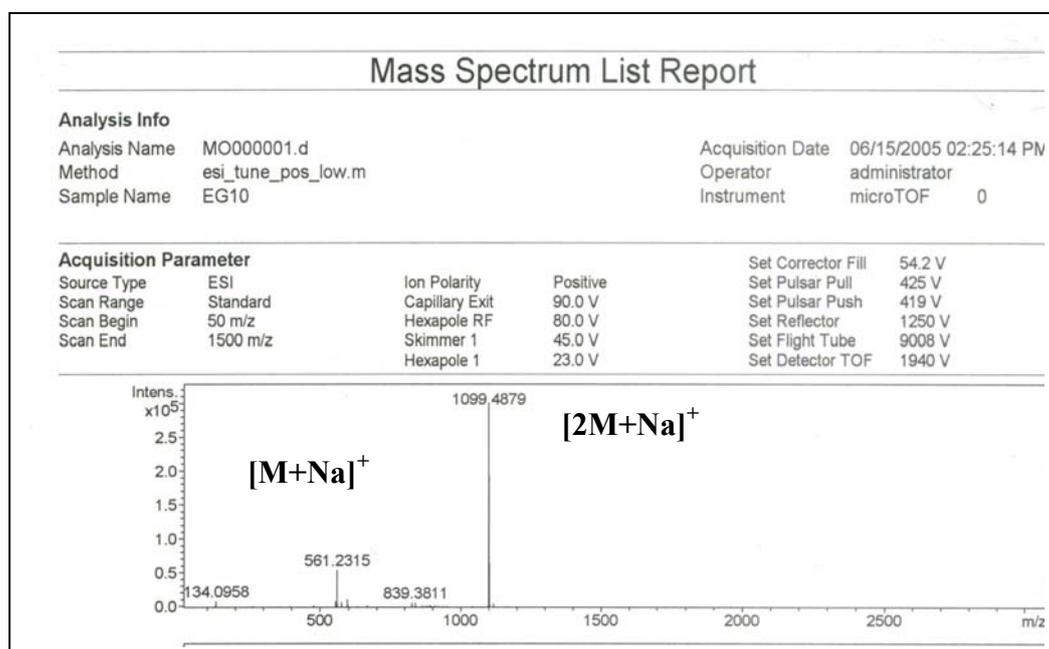


Figure 19 : Spectre de masse ESI-MS du composé **2**

Le spectre UV montre des absorptions à 238, 270 et 300 nm attestant de la présence d'un système aromatique conjugué.

Le spectre IR montrant une large bande d'absorption à 1733 cm^{-1} , suggère la présence de fonctions ester et cétone. Les bandes d'absorption apparaissant à 3091 cm^{-1} , 1653 , 1602 et 1449 cm^{-1} indiquent l'existence d'un système aromatique et de doubles liaisons.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé (figures 20 et 21) présentent un ensemble de signaux caractéristiques de diterpènes macrocycliques de type jatrophane polyesters isolés antérieurement de quelques espèces du genre *Euphorbia* [60-64]. En effet, il montre des signaux (tableau 5) d'un groupement benzoate à $\delta_{\text{H}} 8,08\text{ dd}$ (2H, H-3' et H-7'), $7,46\text{ t}$ (2H, H-4' et H-6'), $7,59\text{ t}$ (1H, H-5'), $\delta_{\text{C}} 129,6$ (2xCH, C-3' et C-7'), $128,4$ (2xCH, C-4' et C-6'), $133,2$ (CH, C-5'), $165,2$ (C=O, C-1') et de deux groupements acétates à $\delta_{\text{H}} 2,18, 1,55$, $\delta_{\text{C}} 170,3, 169,5$, (C=O) et $19,8, 20,7$ (CH_3).

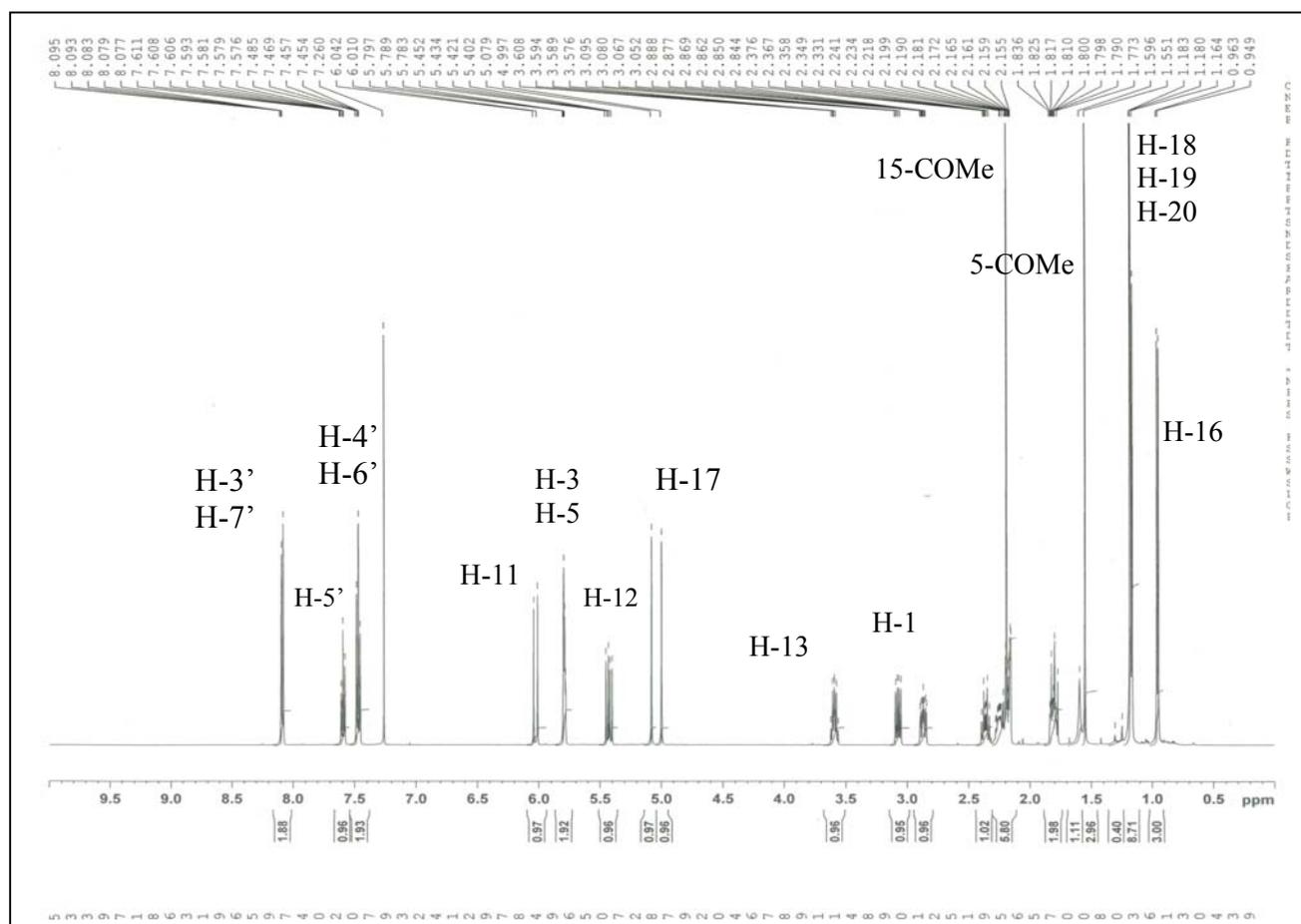
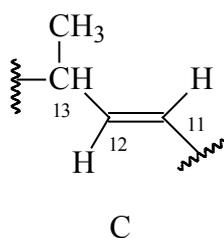


Figure 20 : Spectre RMN ^1H du composé 2

- un dernier fragment structural C composé de 6 protons résonant à δ 6,02 (*d*, $J= 15,8$ Hz, H-11), 5,43 (*dd*, $J=15,8, 9,4$ Hz, H-12), 3,59 (*dq*, $J= 9,3, 6,6$ Hz, H-13) et 1,17 (*d*, $J= 7,6$ Hz, Me-C-13).



Les corrélations observées sur le spectre COSY H-H d'une part entre les protons exométhyléniques (δ 5,07 *sl*, H-17a et 4,99 *sl*, H-17b) et le proton acyloxyméthine H-5, traduisant un couplage allylique et en HMBC d'autre part, entre les protons du groupement méthylène H-7 et le carbone oléfinique exocyclique C-17 résonant à 114,1 ppm, permettent de relier les fragments structuraux A et B par l'intermédiaire du carbone quaternaire de la double liaison exocyclique C-6=CH₂-17 (figure 22).

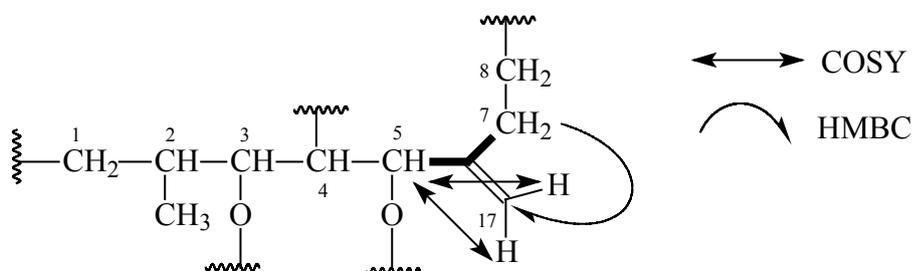


Figure 22 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **2**

L'expérience HMBC montre également des corrélations en 2J entre le carbone quaternaire résonant à δ_C 92,6 (C-15) et les protons H-1, H-4 et en 3J avec les protons H-3 et H-5, suggérant ainsi que le fragment A fait partie d'un cycle à cinq atomes de carbone substitué par un méthyle (figure 23). Ce motif est présent dans de nombreux diterpènes polycycliques et macrocycliques isolés de plantes de la famille des Euphorbiaceae [62,64,65].

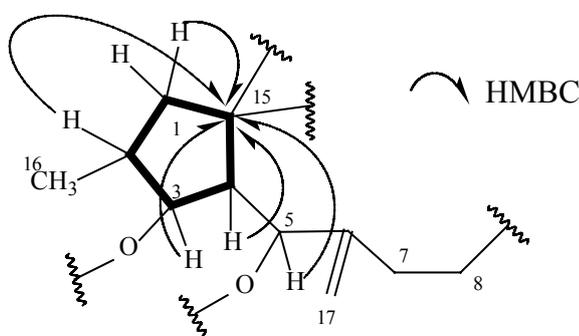


Figure 23 : Corrélations HMBC du composé **2**

Le spectre HMBC révèle bien que les protons H-7 et le proton éthylénique H-11 corrélient en 3J avec un carbone quaternaire résonant à δ_C 211,8, ne pouvant être que le carbonyle C-9. Ce dernier corréle également en 3J avec les protons des groupements méthyliques Me-18 et Me-19 résonant à 1,18 ppm (figure 24). Ces corrélations indiquent que les fragments B et C sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'une chaîne à 2 carbones (1 C=O et 1 C_q portant 2 CH₃). L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'assigner les déplacements chimiques des carbones C-18 (δ_C 22,5) et C-19 (δ_C 25,9).

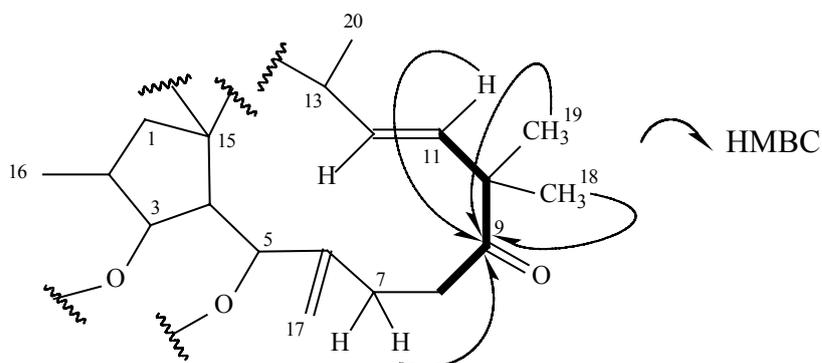


Figure 24 : Corrélations HMBC du composé **2**

Les corrélations en 3J observées sur le spectre HMBC (figure 25) entre le deuxième proton éthylénique (H-12), le proton H-1, et les protons du groupement méthylique Me-20 avec le deuxième carbonyle résonant à 213,5 attribuable au carbone C-14, impliquent la fermeture du cycle à ce niveau et par voie de conséquence, la présence d'un macrocycle à 12 chaînons caractéristique d'un diterpène à squelette jatrophane, précédemment isolé de certaines espèces du genre *Euphorbia* [65-67].

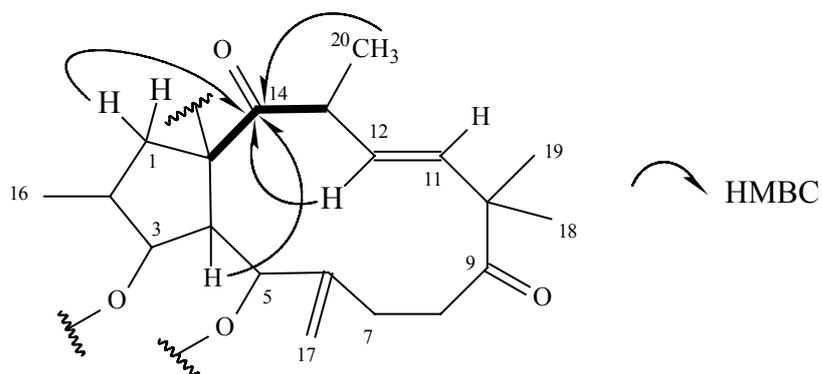


Figure 25 : Corrélations HMBC du composé **2**

Les positions des différents groupements acyles sur le squelette jatrophane (figure 26 et 27) sont aussi déterminées par expérience HMBC. La localisation du groupement benzoate sur le

carbone C-3 est déduite de la corrélation que présente le proton H-3 avec le carbonyle C-1' résonnant à 165,2 ppm. La corrélation du proton oxyméthine H-5 avec le carbonyle de l'acétate à δ_C 169,5 atteste que ce dernier est branché en C-5. Le deuxième groupement acétyle résonnant à δ_H 2,11 et ne montrant aucune corrélation est obligatoirement porté par le carbone C-15.

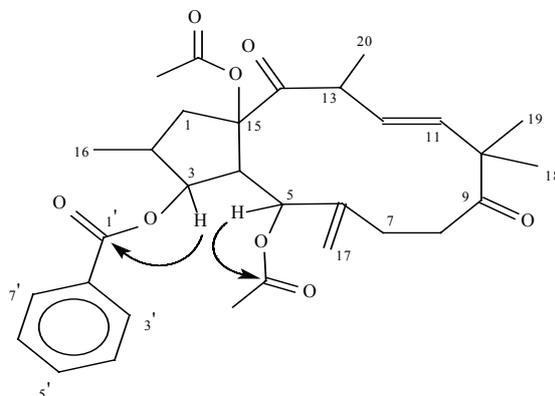


Figure 26 : Corrélations HMBC des groupements acyles du composé 2

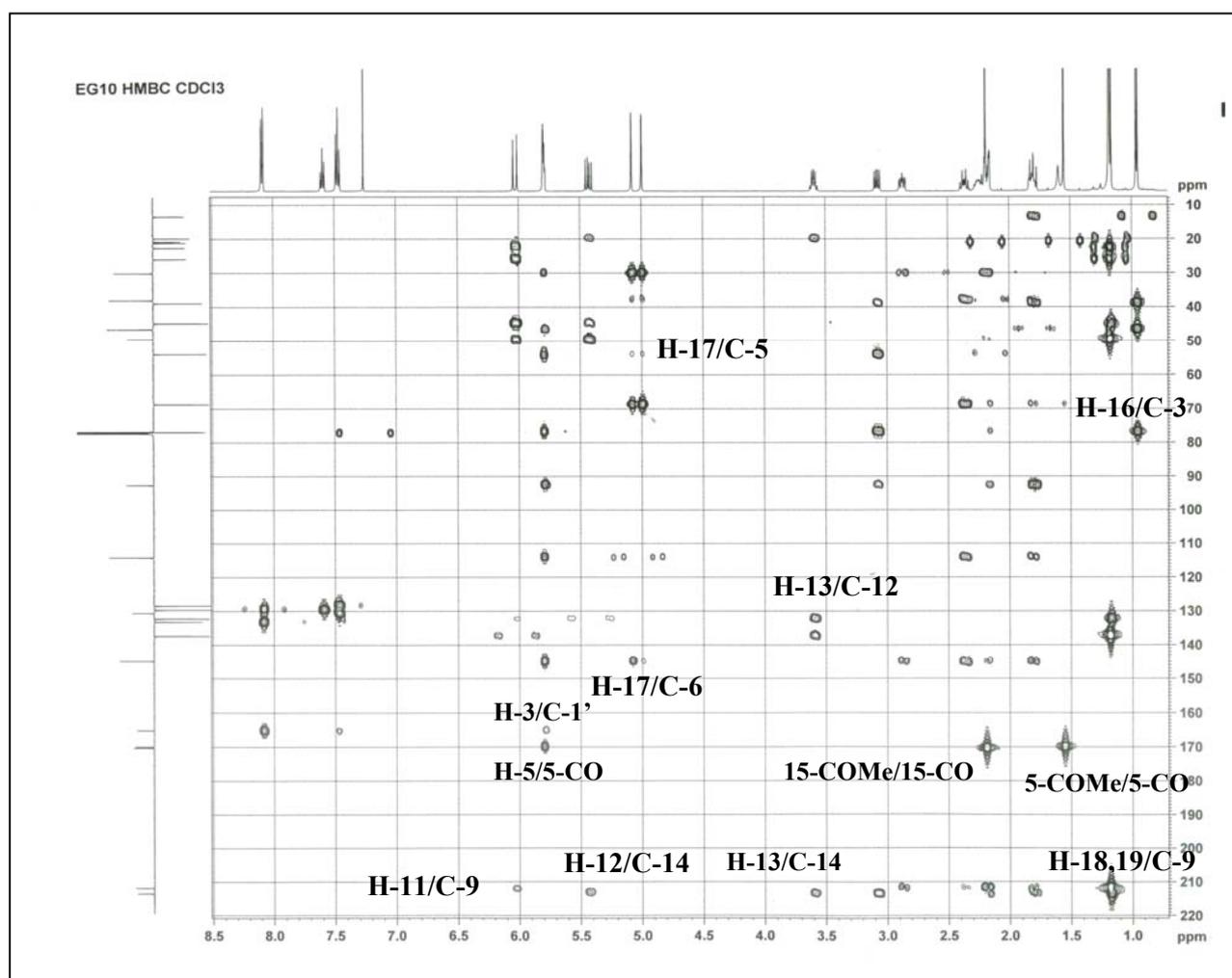


Figure 27 : Spectre HMBC du composé 2

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé, COSY H-H, HSQC J -modulé et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les protons et carbones (tableau 5).

Toutes ces données permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé, la structure suivante: 3-benzoyloxy-5,15-diacétoxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11-diène (2).

Sa stéréochimie relative est établie en tenant compte des valeurs des constantes de couplage et de l'analyse du spectre NOESY (figure 28). Le proton H-4 est pris comme point de référence et il est en position α [19,65]. La valeur zéro de la constante de couplage observée chez bon nombre de diterpènes à squelette jatrophane isolés du genre *Euphorbia*, entre les protons H-5 et H-4, plaide pour une orientation β du proton H-5 [62]. Cette orientation est confirmée par l'absence sur le même spectre de corrélation entre ces deux protons.

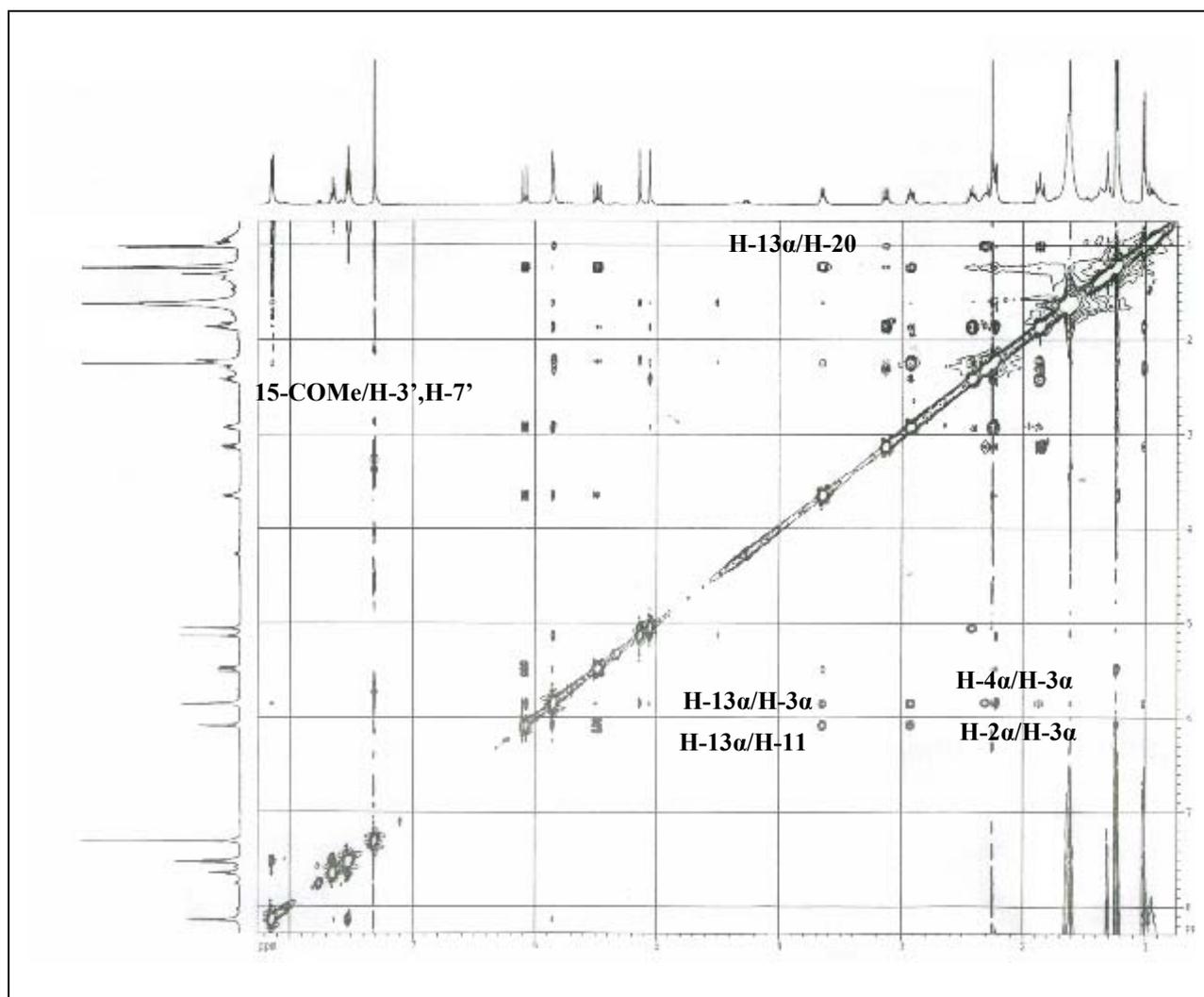


Figure 28 : Spectre NOESY du composé 2

Le spectre NOESY montre également des corrélations H-4/H-3 et H-3/H-2, assignant par conséquent une orientation β aux groupements méthyle Me-16 et benzoate. Les corrélations observées entre les protons H-20/15-OCOMe ; H-13/H-11 d'une part et 15-OCOMe/H-7', H-3' d'autre part, suggèrent que les groupements Me-20 et 15-OCOMe sont β -orientés. L'absence de corrélation entre H-4 et les protons du groupement 15-OAc indique que ce dernier est β orienté. Les petites valeurs des constantes de couplage $J_{4,5} = 3,10$ et $2,00$ Hz montrent bien que le jatropane adopte préférentiellement une conformation où le groupement 6,17-exométhylène est dirigé vers l'extérieur, parallèlement au plan principal du cycle en conformité avec la structure d'un macrocycle à 12 chaînons [19,65]. Il en résulte à l'issue de cette analyse que la stéréochimie relative du composé **2** est : 2β -Me, 3β -OBz, H-4 α , 5α -OCOMe, 13β -Me, 15β -OCOMe (figure 29).

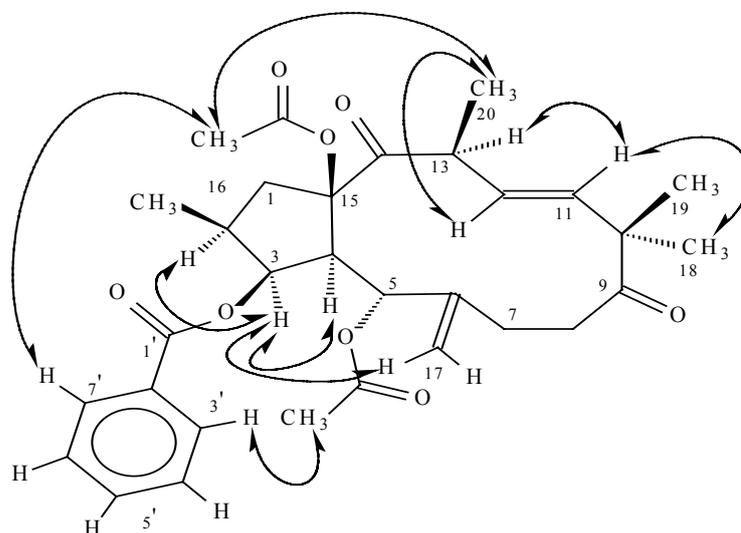


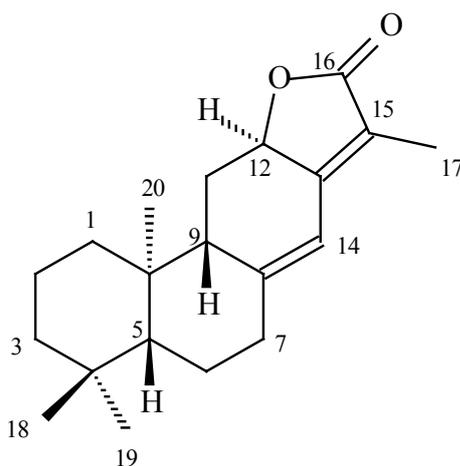
Figure 29 : Principaux effets NOE observés pour le composé **2**

La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -88^\circ$, $C = 0,12$ g/100 ml) mesuré dans le chloroforme, confirme qu'il s'agit de : 3β -benzoyloxy- 5α , 15β -diacétoxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11-diène (**2**), un diterpène macrocyclique à squelette jatropane, appelé guyonianin B. Il a été isolé récemment des parties aériennes de la même espèce [4].

Tableau 5 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **2** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>mult J</i> Hz	δ_{C}
1 α	3,06 <i>dd</i> 14,0, 7,4	46,4
1 β	1,79 <i>t</i> 13,8	
2 α	2,24 <i>m</i>	38,8
3 α	5,78 <i>t</i> 3,1	76,8
4 α	2,16 <i>dd</i> 3,1, 2,0	53,8
5 β	5,79 <i>sl</i>	68,7
6	-	144,8
7 α	2,35 <i>dt</i> 13,7, 9,2	30,0
7 β	1,82 <i>m</i>	
8 β	2,86 <i>dd</i> 13,3, 9,1, 3,2	37,9
8 α	2,18 <i>m</i>	
9	-	211,8
10	-	49,5
11	6,02 <i>d</i> 15,8	137,3
12	5,43 <i>dd</i> 15,8, 9,4	132,9
13 α	3,59 <i>dd</i> 9,3 6,6	44,7
14	-	213,5
15	-	92,6
16	0,95 <i>d</i> 6,6	13,3
17a	5,07 <i>sl</i>	114,1
17b	4,99 <i>sl</i>	
18	1,18 <i>s</i>	22,5
19	1,18 <i>s</i>	25,9
20	1,17 <i>d</i> 7,6	21,1
OBz		
1'	-	165,2
2'	-	130,6
3', 7'	8,08 <i>dd</i> 7,9, 1,3	129,6
4', 6'	7,46 <i>t</i> 8,0	128,4
5'	7,59 <i>tl</i> 7,4	133,2
OAc		
5-CO	-	169,5
5-COMe	1,55 <i>s</i>	20,7
15-CO	-	170,3
15-COMe	2,18 <i>s</i>	19,3

III-6-5- Elucidation structurale du composé 3



ent-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**3**)

Il s'agit du *ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide appelé également jolkinolide E. Cet abiétanolide a été antérieurement isolé des espèces *E. jolkinii* [25], *E. calyptrata* [26], *E. fidjiana* [28] et *E. characias* [33].

Le spectre de masse HR-EI- MS du produit **3** présente un ion moléculaire à m/z 300,2059 $[M]^+$, correspondant à la formule brute $C_{20}H_{28}O_2$.

Le spectre IR indique la présence d'une fonction γ -lactone α,β insaturée (1750 cm^{-1}) et une double liaison conjuguée (1645 cm^{-1}).

Le spectre UV montre deux bandes d'absorption maximales à 204 et 277 nm.

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H , ^{13}C J -modulé (figure 30 et 31) et HSQC J -modulé montrent la présence de quatre groupements méthyles (δ_{H} 1,89, 0,91, 0,97, 0,98, chacun 3H, s ; δ_{C} 8,3 C-17, 21,7 C-19, 33,8 C-18, 16,8 C-20). Le nombre de méthyles atteste de la nature diterpénique du composé [25,26,28,33]. Le spectre RMN ^1H présente également un proton éthylénique qui apparaît sous la forme de singulet large à 6,32 ppm, attribuable au proton H-14 (tableau 6).

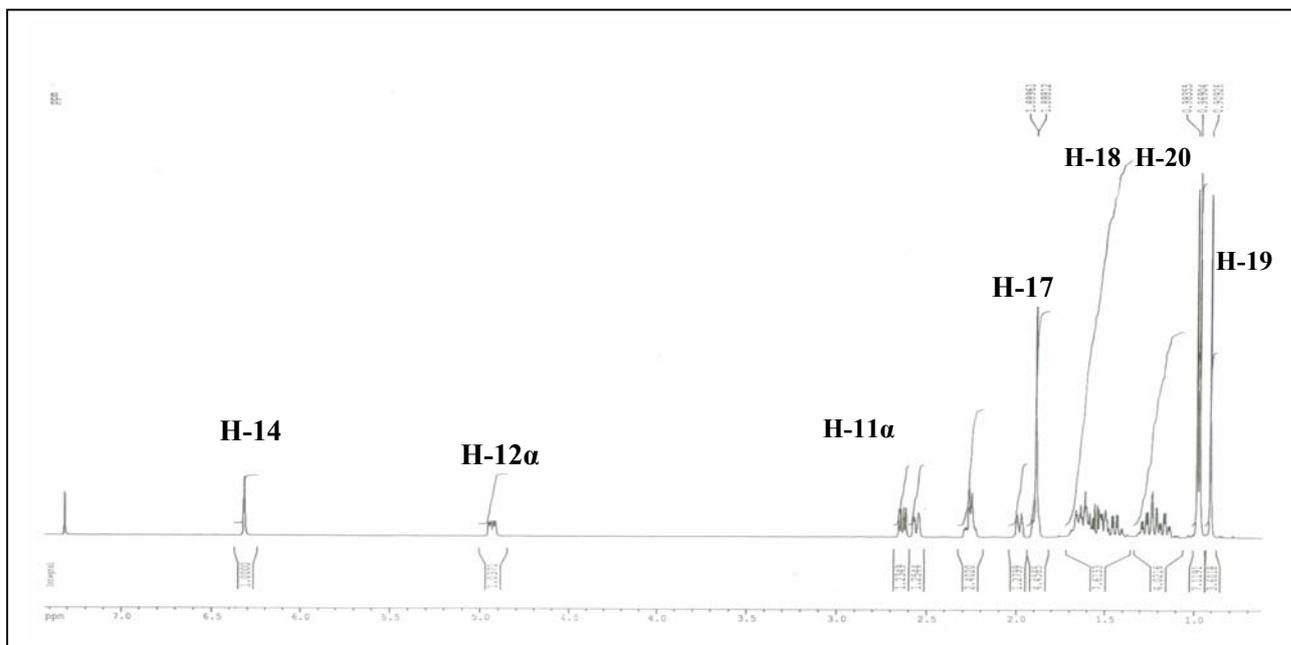


Figure 30 : Spectre RMN ^1H du composé **3**

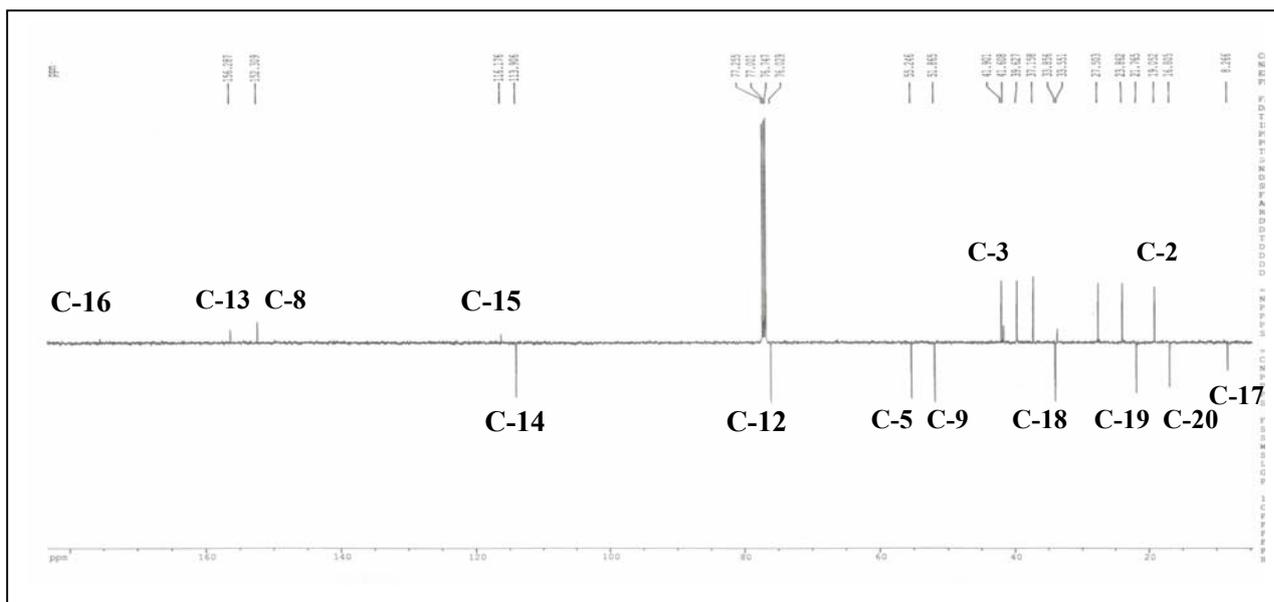


Figure 31 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **3**

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (tableau 6) comporte 20 atomes de carbones dont six quaternaires, quatre CH, six CH_2 et quatre CH_3 , confirmant ainsi la présence d'un squelette diterpénique. Les corrélations observées sur le spectre HMBC permettent d'identifier tous les protons et carbones de ce composé (figure 32).

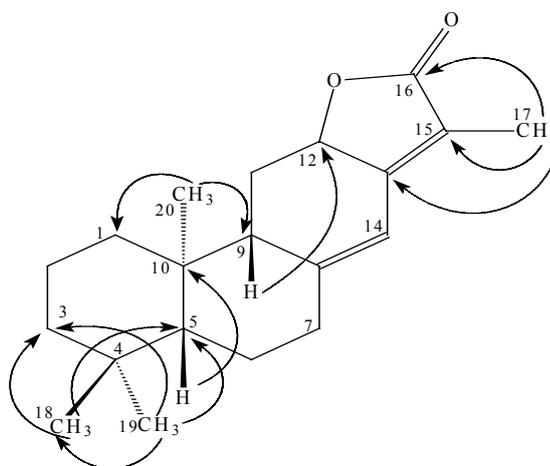
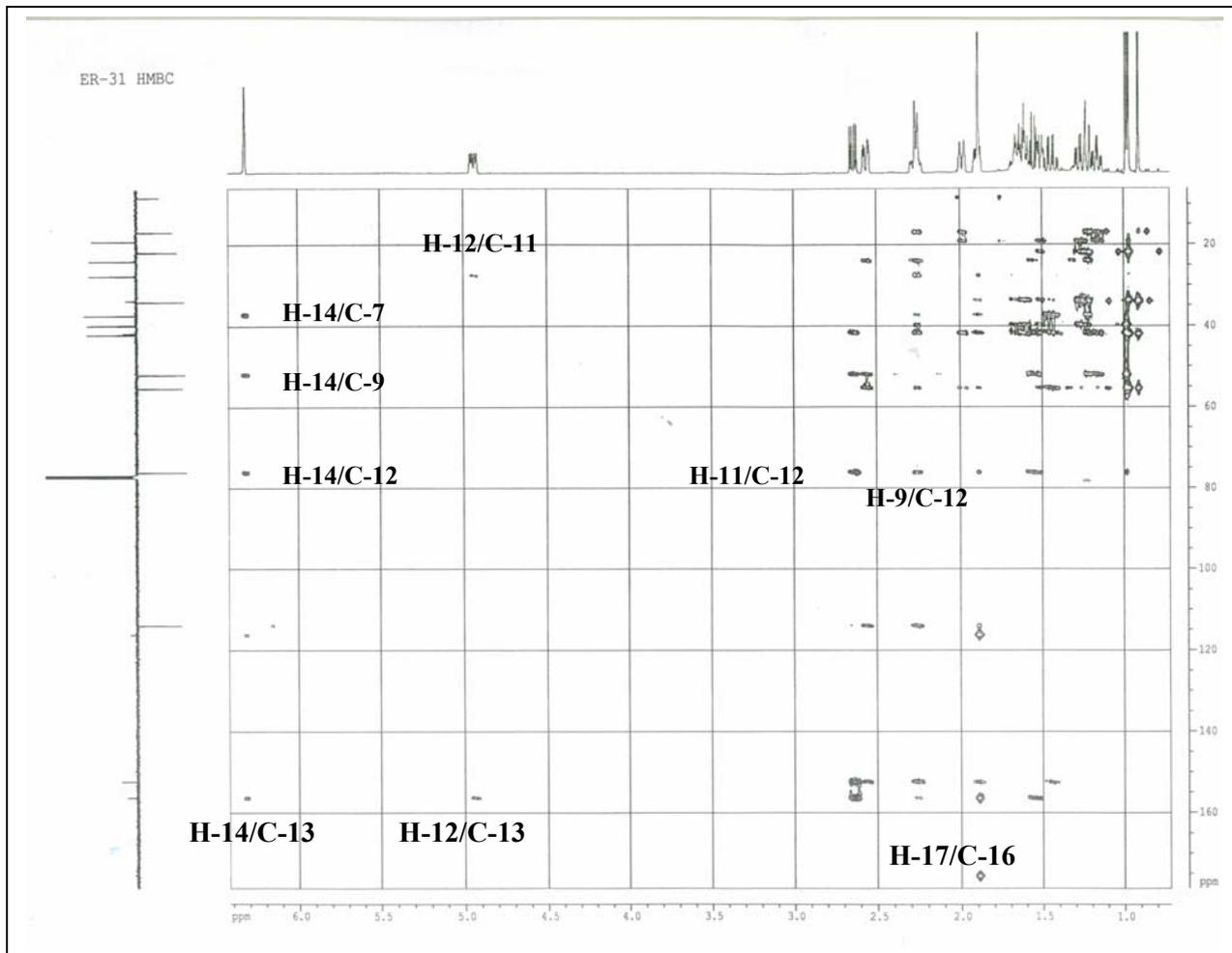


Figure 32 : Spectre HMBC du composé 3

La stéréochimie relative de la molécule peut être déduite des valeurs des constantes de couplage et de l'analyse du spectre NOESY (figure 33). La multiplicité, les valeurs des constantes de couplages et les déplacements chimiques des protons H-12, H-11 et H-9 indiquent que les protons H-9 et H-12 sont en position β -axiale et α -pseudoaxiale respectivement [68]. L'orientation α -axiale du groupement méthyle Me-20 est déterminée du fait de sa corrélation avec le proton H-12 α . Les effets NOE observés entre les protons H-9, H-5 et Me-18 indiquent qu'ils sont donc de configuration β .

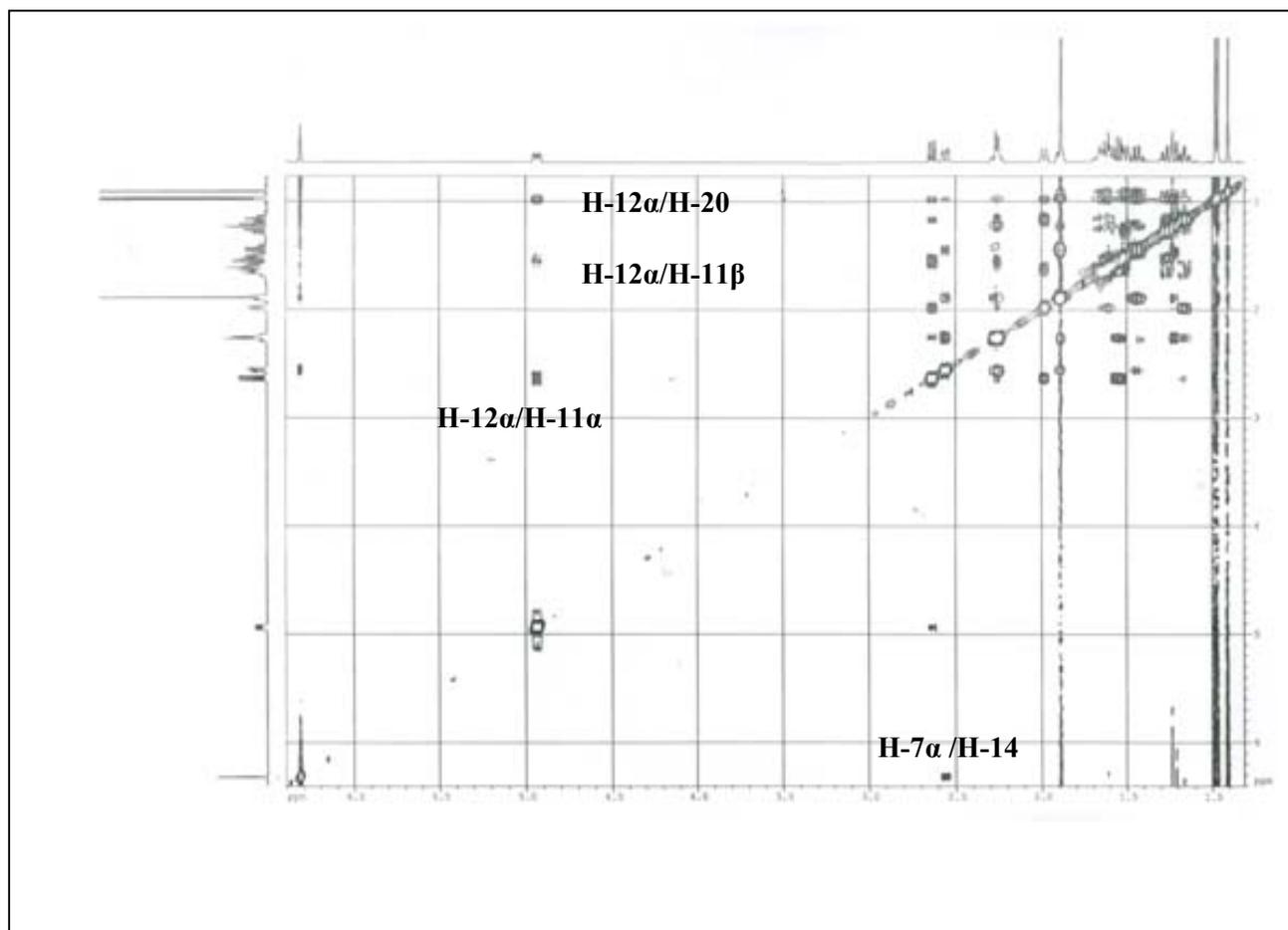


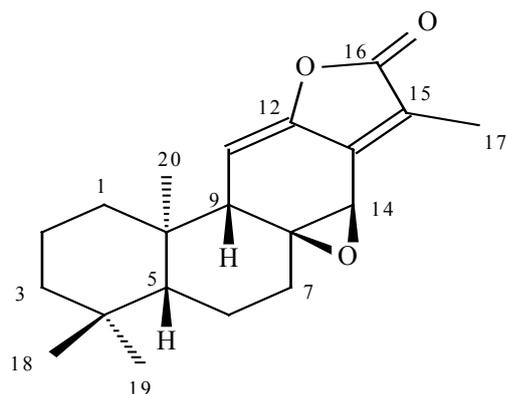
Figure 33 : Spectre NOESY et principaux effets NOE observés pour le composé **3**

La mesure du pouvoir rotatoire de ce composé réalisée dans CHCl_3 ($[\alpha]_D = +328,4^\circ$, $C = 0,34$ g/100 ml), confirme bien qu'il s'agit du : *ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (jolkinolide E) [26,28].

Tableau 6 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **3** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,16 <i>td</i> 12,7, 4,4 H-1 β 1,98 <i>dm</i> 11,9 H-1 α	31,9
2	1,61 <i>m</i> H-2 β 1,65 <i>m</i> H-2 α	19,0
3	1,26 <i>td</i> 13,2, 4,5 H-3 β 1,51 <i>dm</i> 13,2 H-3 α	41,9
4	-	33,5
5	1,22 <i>dd</i> 12,6, 2,4 H-5 β	55,2
6	1,44 <i>qd</i> 13,0, 4,1 H-6 α 1,89 <i>m</i> H-6 β	23,8
7	2,26 <i>m</i> H-7 β 2,56 <i>ddd</i> 13,5, 4,0, 1,5 H-7 α	37,1
8	-	152,3
9	2,26 <i>dtt</i> 8,0, 2,0 H-9 β	51,8
10	-	41,6
11	1,55 <i>td</i> 13,5, 8,5 H-11 β 2,63 <i>dd</i> 13,5, 6,2 H-11 α	27,5
12	4,94 <i>ddd</i> 13,4, 6,1, 1,2 H-12 α	76,0
13	-	156,3
14	6,32 <i>sl</i>	113,9
15	-	116,2
16	-	176,0
17	1,89 <i>d</i> 1,3	8,3
18	0,97 <i>s</i>	33,8
19	0,91 <i>s</i>	21,7
20	0,98 <i>s</i>	16,8

III-6-6- Elucidation structurale du composé 4



8 β ,14 β -époxy-*ent*-abiéta-11,13(15)-dièn-16,12-olide (4)

Ce composé à squelette abiétane lactone a été identifié au 8 α ,14 α -époxy-*ent*-abiéta-11,13(15)-dièn-16,12-olide (5), appelé jolkinolide A. Il a été isolé des espèces *Euphorbia jolkinii* [25] et *Euphorbia fidjiana* [28].

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif, montre des ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$ à m/z 337 et 651 respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 314 uma et une formule brute en $C_{20}H_{26}O_3$. Le spectre IR révèle les bandes d'absorption à 1770 cm^{-1} (lactone), 1665 et 1650 cm^{-1} (doubles liaisons). Le spectre UV montre une bande d'absorption maximale à 286 nm.

Le spectre RMN 1H du composé 4 (figure 34) présente des signaux de quatre groupements méthyliques à 2,01, 0,90, 0,81 et 0,68 ppm, attribuables respectivement aux Me-17, Me-18, Me-19 et Me-20 [25,26,28,33].

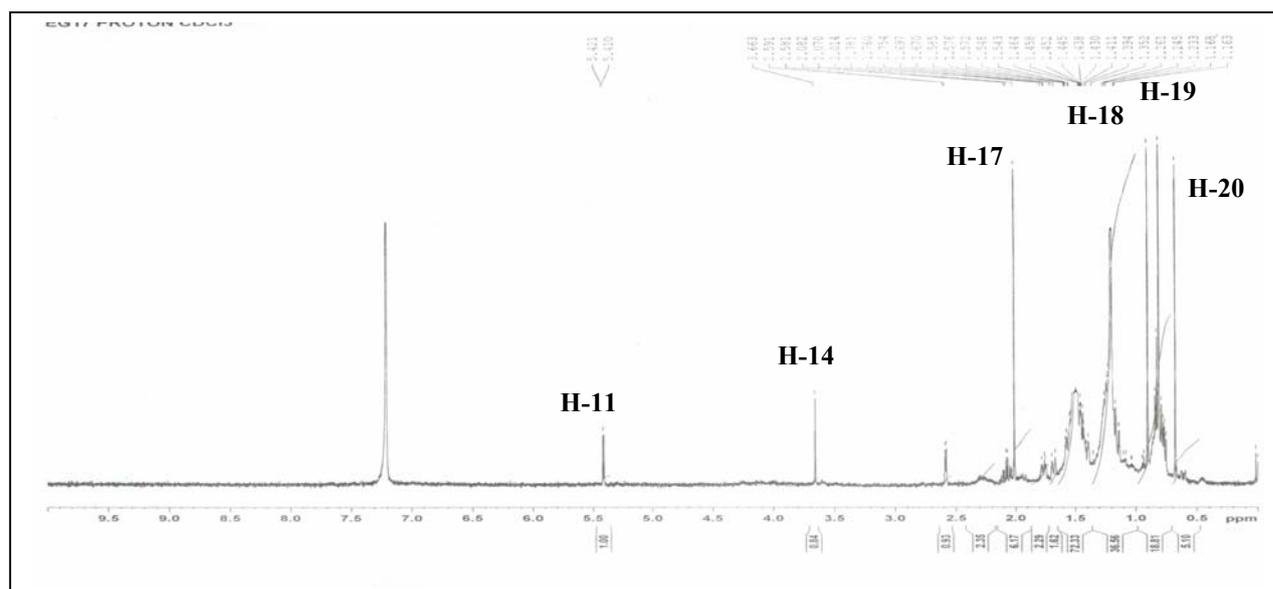


Figure 34: Spectre RMN 1H du composé 4

Les spectres RMN ^{13}C J -modulé et HSQC J -modulé permettent d'identifier les carbones C-17 (δ_{C} 8,7), C-18 (δ_{C} 33,8), C-19 (δ_{C} 21,9) et C-20 (δ_{C} 15,1). Tous ces déplacements chimiques sont caractéristiques d'un diterpène à squelette abiétane lactone de type jolkinolide [25,26,28,33]. Une comparaison avec les données spectrales du composé **3** décrits précédemment, montre la disparition d'une part des signaux du carbone C-12 résonnant à δ_{C} 76,0 et du proton H-12 à δ_{H} 4,94 sur les spectres RMN ^{13}C J -modulé et ^1H , et l'apparition d'autre part de signaux à δ_{C} 147,5 correspondant à un carbone éthylénique quaternaire et à δ_{H} 3,66 caractéristique d'un proton oxyméthinique, attribuables d'après l'expérience HMBC (figure 35) au carbone C-12 et au proton H-14.

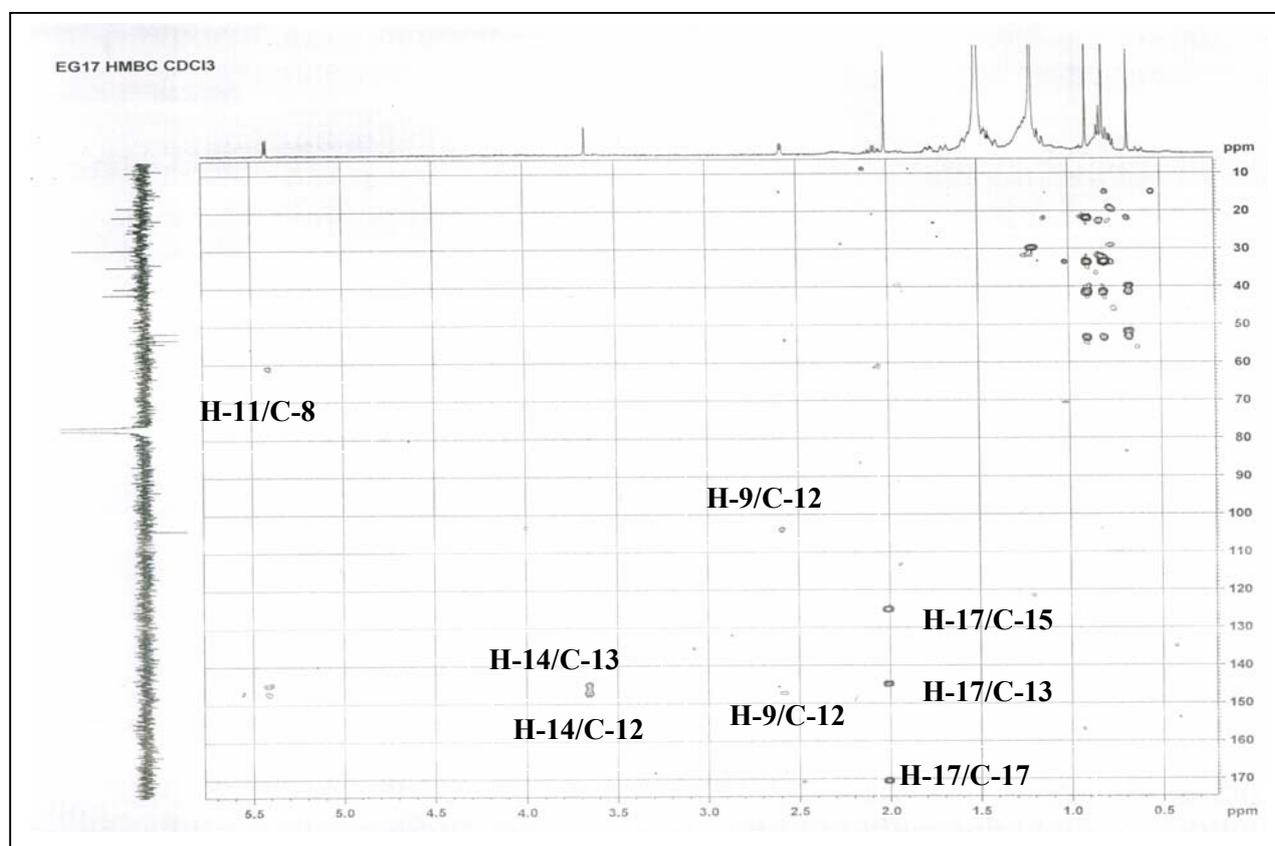
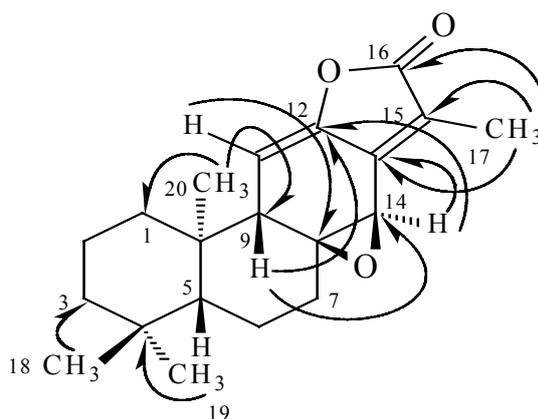


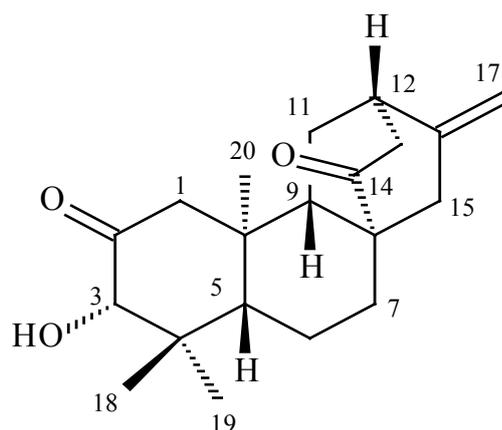
Figure 35: Spectre HMBC du composé **4**

Le pouvoir rotatoire, mesuré dans le chloroforme de ce composé, égale à +126° (C= 0,3 g/100 ml), confirme qu'on est en présence de 8β,14β-époxy-*ent*-abiéta-11,13(15)-dièn-16,12-olide (**4**) [25,28] .

Tableau 7 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **4** dans CDCl₃

Position	δ _H <i>m J Hz</i>	δ _C
1	1,19 <i>m</i> H-1β 1,68 <i>dt</i> 13,6, 4,2 H-1α	39,9
2	1,45 <i>m</i>	18,5
3	1,20 <i>m</i> H-3β 1,39 <i>m</i> H-3α	41,5
4	-	33,8
5	1,15 <i>dd</i> 12,5, 2,3 H-5β	53,5
6	1,46 <i>m</i> H-6α 1,77 <i>dm</i> 10,2 H-6β	20,9
7	1,56 <i>m</i> H-7β 2,08 <i>td</i> 10,8, 5,6 H-7α	34,1
8	-	61,5
9	2,59 <i>d</i> 5,1 H-9β	51,8
10	-	41,5
11	5,42 <i>d</i> 5,3	104,1
12	-	147,5
13	-	145,0
14	3,66 <i>s</i> H-14α	54,5
15	-	125,0
16	-	170,5
17	2,01 <i>s</i>	8,7
18	0,90 <i>s</i>	33,8
19	0,81 <i>s</i>	21,9
20	0,68 <i>s</i>	15,1

III-6-7- Elucidation structurale du composé 5



3 α -hydroxy-*ent*-atis-16(17)-ène-2,14-dione (5)

Le spectre de masse ESI-MS du composé **5** enregistré en mode positif présente deux ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$ à m/z 347 et 655, soit une masse moléculaire $M=316$ correspondant à une formule brute en $C_{20}H_{28}O_3$ et 7 insaturations.

Les bandes d'absorption à 3480, 1710 et 1660 cm^{-1} observées en IR, sont respectivement indicatrices de la présence de groupements hydroxyle, carbonyle et d'une double liaison.

Le spectre RMN 1H (figure 36) montre un signal déblindé résonant à δ_H 3,90 sous forme de singlet. L'expérience HSQC J -modulé permet de détecter son carbone à 82,8 ppm. Ces signaux indiquent la présence d'un groupement hydroxyle secondaire. Les spectres RMN ^{13}C J -modulé (figure 37) et HSQC J -modulé révèlent l'existence de 20 atomes de carbones dont deux correspondant à une double liaison exocyclique et résonant à δ_C (146,7 et 107,4), deux carbones quaternaires très déblindés résonant à δ_C 210,0 et 215,8, correspondant à deux fonctions cétones. Ceci nous permet donc de compter 3 insaturations sur les 7 que renferme le composé. Il en résulte que ce dernier est un diterpène tétracyclique. Le spectre RMN 1H présente, dans la zone des champs forts, trois signaux singlets attribuables aux groupements méthyles Me-18 (δ_H 1,19), Me-19 (δ_H 0,67) et Me-20 (δ_H 0,67), attestant de sa nature diterpénique. L'expérience de corrélation HSQC J -modulé permet d'identifier leur carbones à δ_C 29,4 (C-18), 16,9 (C-19) et 13,9 (C-20).

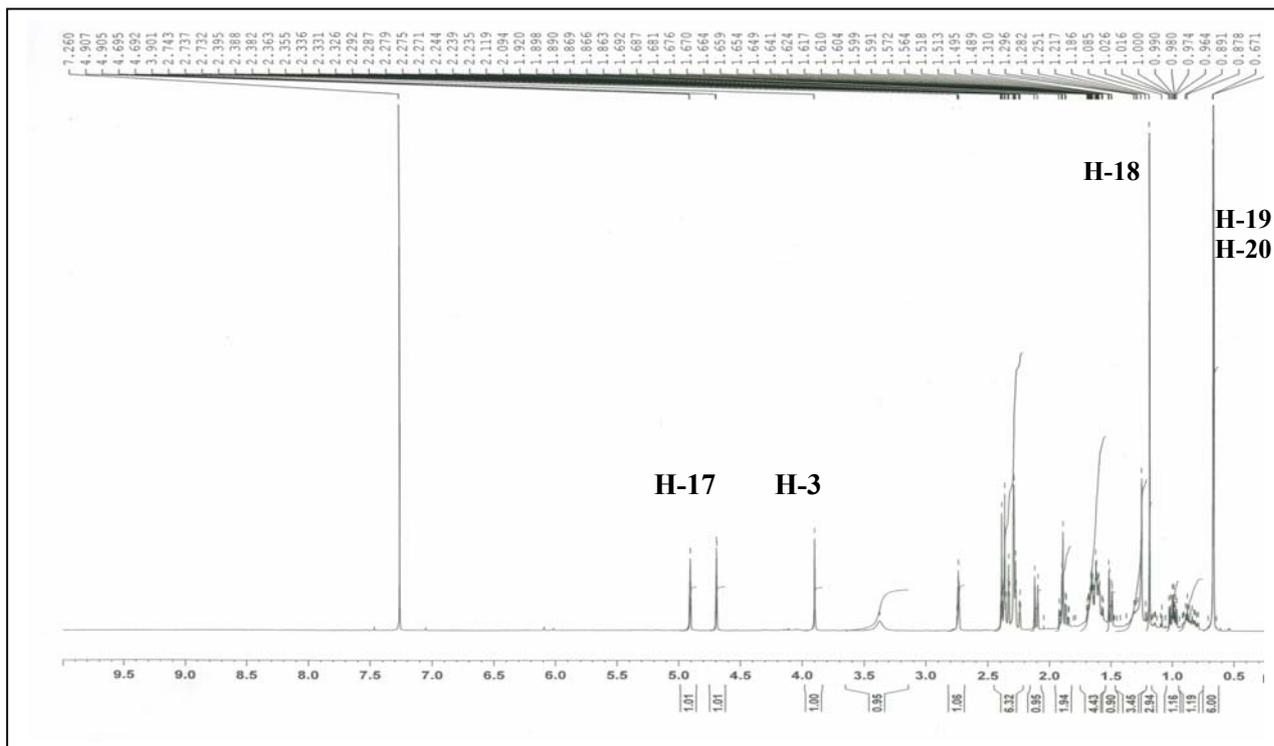


Figure 36 : Sspectre RMN ^1H du composé **5**

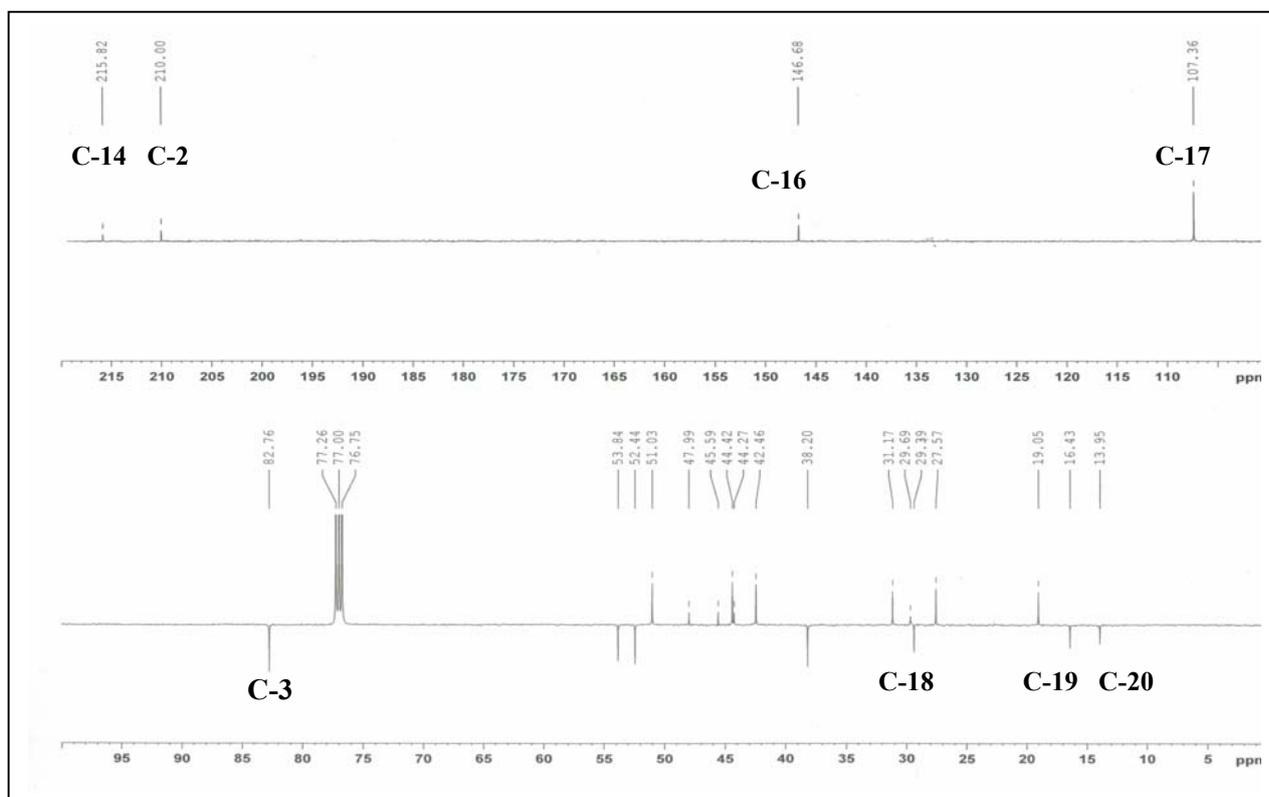


Figure 37: Sspectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **5**

L'analyse conjointe des spectres COSY H-H et HSQC *J*-modulé permet d'identifier deux systèmes de spin $^9\text{CH}-^{11}\text{CH}_2-^{12}\text{CH}-^{13}\text{CH}_2$ et $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CH}_2$, constitués de 6 et 5 protons chacun. Ces caractéristiques spectrales comparées aux données de la littérature, suggèrent que le composé **5** est un diterpène à squelette atisane [28,29,33]. Ce type de composés est présent dans le genre *Euphorbia* [28,29,33]. Les corrélations observées sur le spectre HMBC (figure 38) confirment cet argument et permettent de déterminer en particulier la position des groupements fonctionnels. En effet, les protons H-1 et H-3 corrélient avec le carbone du carbonyle C-2 résonnant à 210,0 ppm. Les protons éthyléniques géminés H-17 présentent des corrélations avec les carbones C-12 (δ_{C} 38,2), C-15 (δ_{C} 42,5) et C-16 (δ_{C} 146,7). Le carbone C-14 du second carbonyle résonnant à 215,8 ppm, corrélie quant à lui avec les protons H-7, H-9, H-12, H-13, H-15 (figure 38).

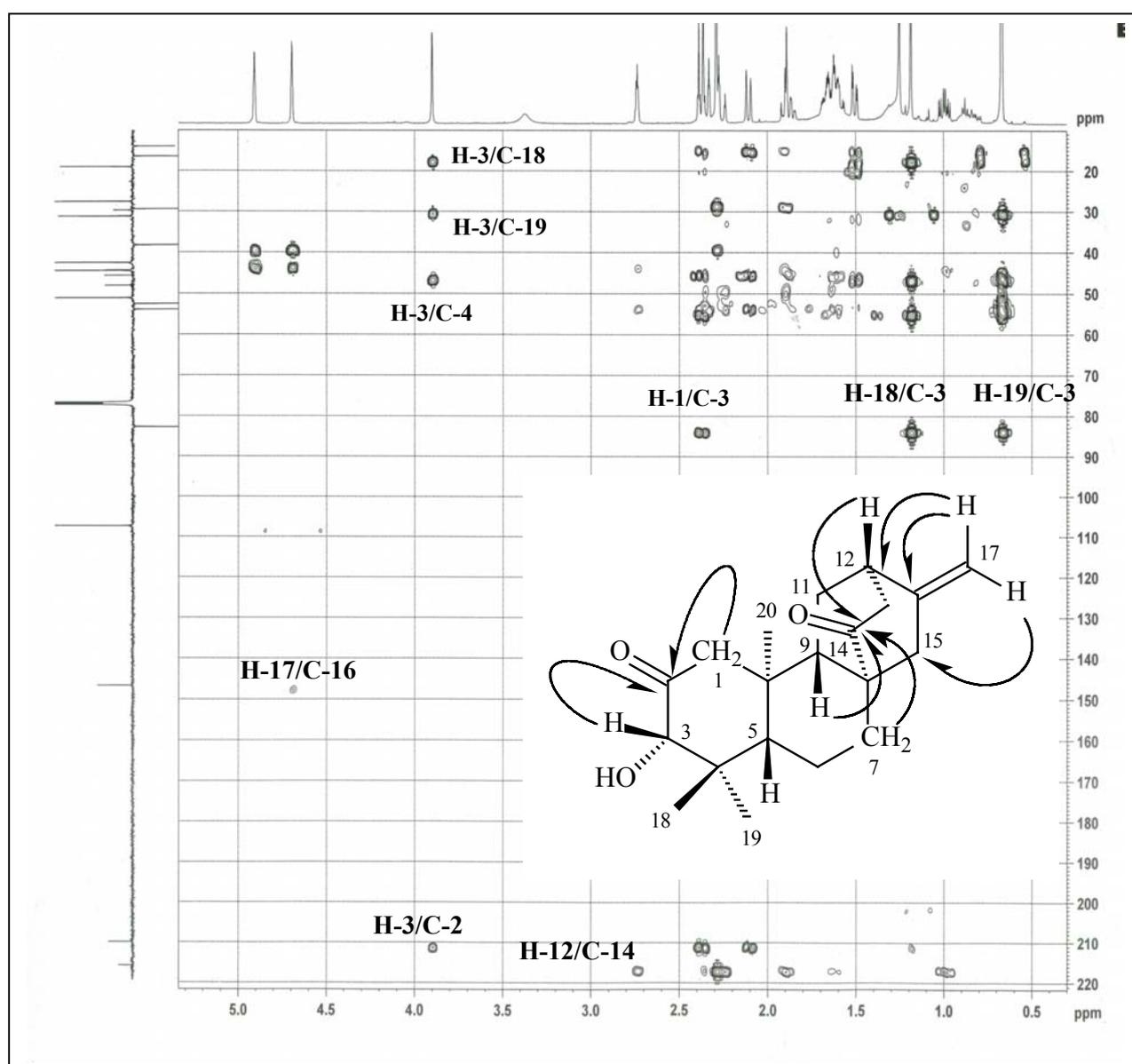


Figure 38 : Spectre HMBC du composé **5**

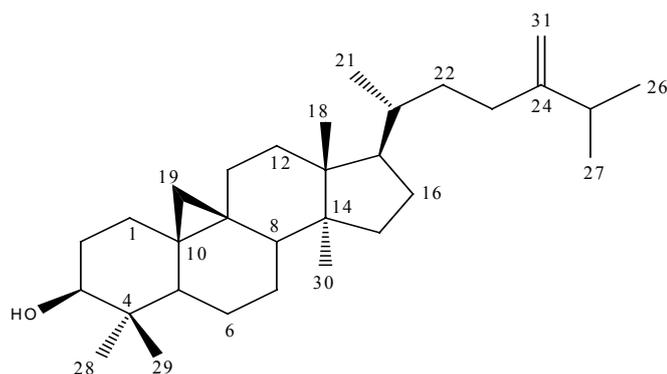
L'analyse conjuguée des spectres HSQC *J*-modulé et HMBC, permet de caractériser tous les protons et carbones de la molécule (tableau 8).

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme ($[\alpha]_D = -17^\circ$, $C = 0,38$ g/100 ml), confirme bien que ce composé appartient également à la série *ent* [33]. Le composé **5** est donc : 3 α -hydroxy-*ent*-atis-16(17)-ène-2,14-dione. Il a été isolé pour la première fois à partir d'un arbre nommé *Homalanthus acuminatus* [69].

Tableau 8 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **5** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	2,11 <i>d</i> 12,4 H-1 β 1,98 <i>d</i> 12,4 H-1 α	51,0
2		210,0
3	3,90 <i>s</i> H-3 β	82,8
4	-	45,6
5	1,51 <i>dd</i> 11,8, 2,7 H-5 β	55,2
6	1,61-1,70 <i>m</i>	23,8
7	0,99 <i>td</i> 13,0, 5,3 H-7 β 2,38 <i>dt</i> 12,4, 4,3 H-7 α	37,1
8	-	48,0
9	1,89 <i>d</i> 7,2 H-9 β	52,4
10	-	44,3
11	1,60 <i>td</i> 13,6, 3,9 H-11 β 1,85 <i>dt</i> 13,6, 3,9 H-11 α	27,5
12	2,74 <i>quint</i> 6,8 H-12 α	76,0
13	2,29 <i>d</i> 2,46	156,3
14	-	215,8
15	2,23 <i>dt</i> 17,1, 2,9 H-15 α 2,35 <i>dt</i> 16,1, 2,3 H-15 β	42,5
16	-	146,7
17	4,69 <i>dl</i> 1,0 4,91 <i>dl</i>	107,4
18	1,19 <i>s</i>	29,4
19	0,67 <i>s</i>	16,9
20	0,67 <i>s</i>	13,9

III-6-8- Elucidation structurale du composé 6



24-méthylèncycloartanol (**6**)

Le spectre de masse HR-EI-MS du composé **6** isolé à l'état de poudre blanche, montre un pic d'ion moléculaire à m/z 440,4111 $[M]^+$ (calculé 440,4018) correspondant à la formule brute $C_{31}H_{52}O$. Il présente également des fragments à m/z 422,3974 $[M-18]^+$, 407,3730 $[M-18-15]^+$ et 297,2556 $[M-125-18]^+$ correspondant respectivement à la perte d'une molécule d'eau, d'un groupement méthyle et d'une molécule d'eau, du groupement alkyle C_9H_{17} et d'une molécule d'eau. Ces fragmentations sont caractéristiques d'un triterpène à squelette cycloartanol [41].

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3396 cm^{-1} (groupement hydroxyle) et 1640 cm^{-1} (double liaison).

Le spectre RMN 1H (figure 39) montre des signaux similaires à ceux d'un composé déjà connu : 24-méthylèncycloartanol isolé de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* dont *E. broterie* [34], *E. peplus* [45] et *E. heteradena* [70].

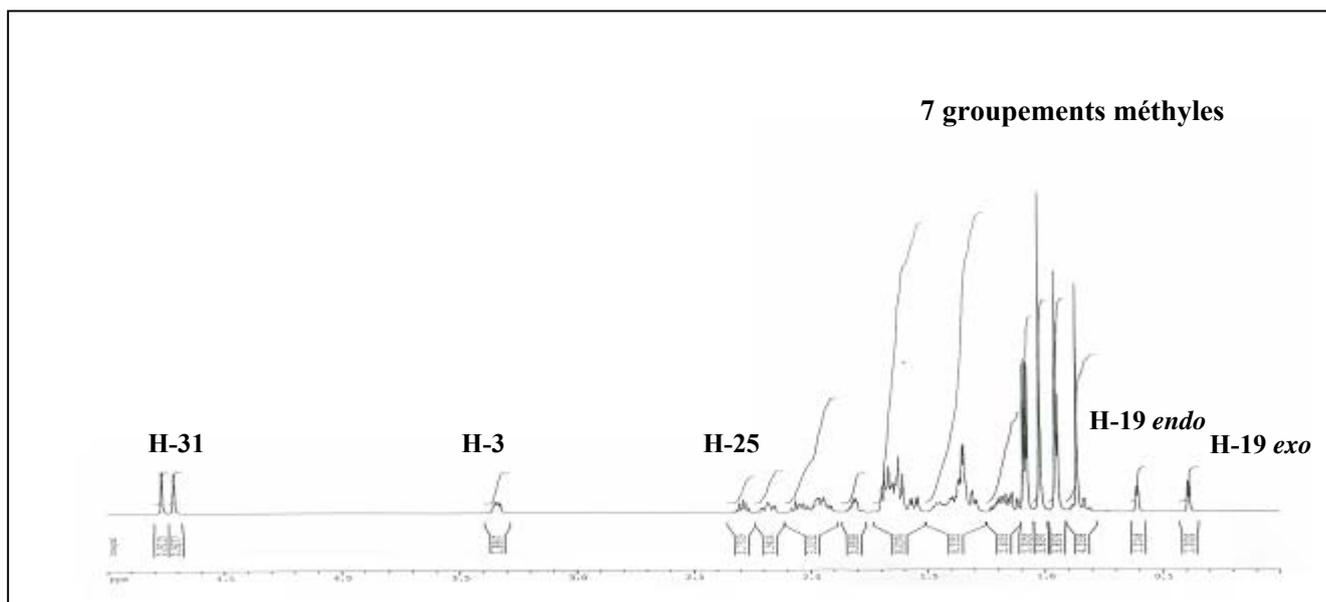


Figure 39 : Spectre RMN 1H du composé **6**

Le spectre RMN ^{13}C en *J*-modulé (figure 40) qui présente 31 signaux correspondant à sept méthyles, douze méthylènes, six méthines et six atomes de carbone quaternaires, confirme ainsi la nature triterpénique du composé en question.

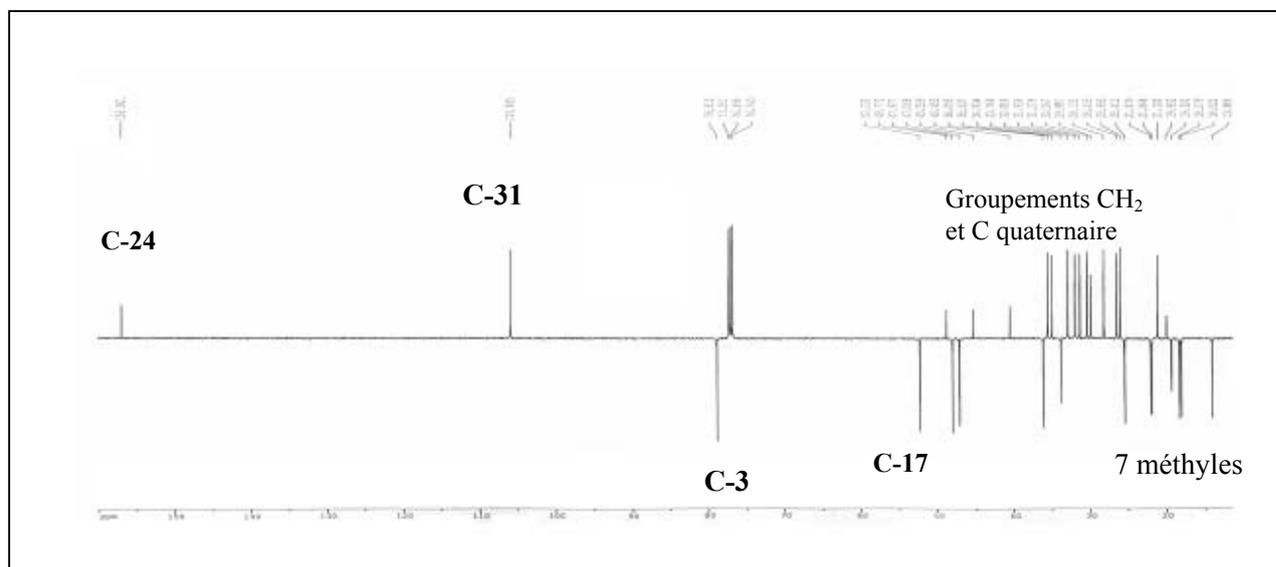


Figure 40 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **6**

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé (figure 41) et HMBC (figure 42) permet d'identifier tous ses protons et carbones.

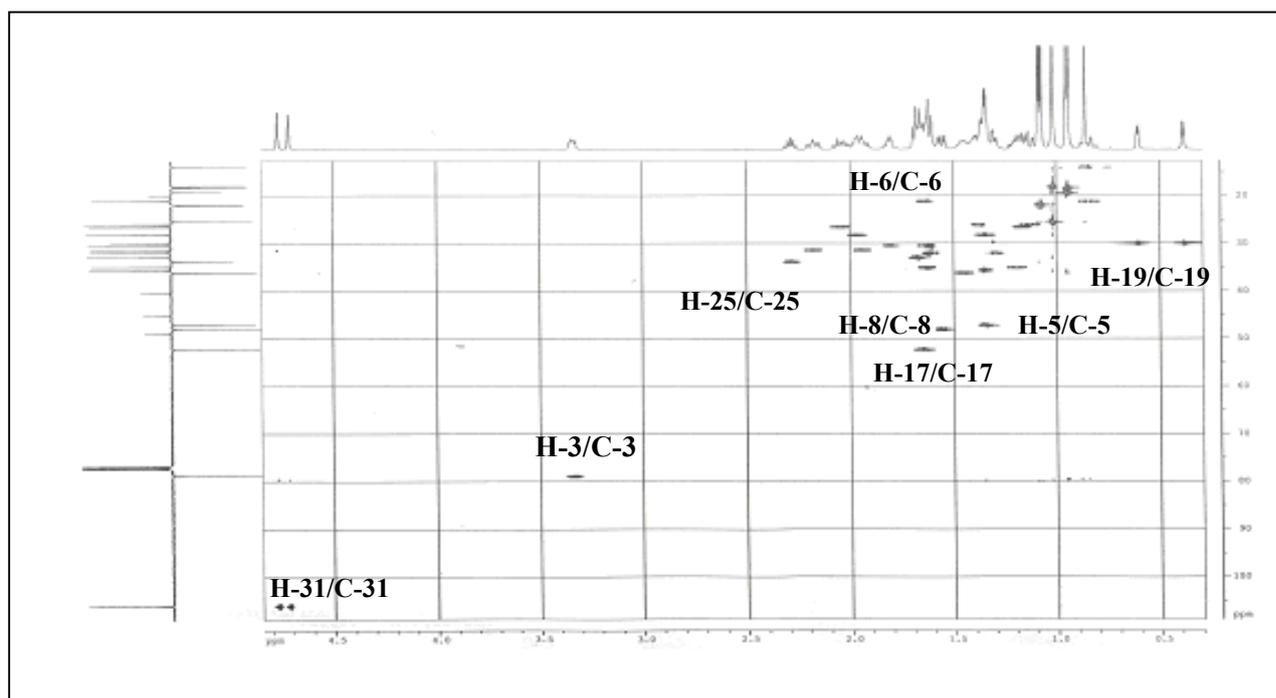


Figure 41 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **6**

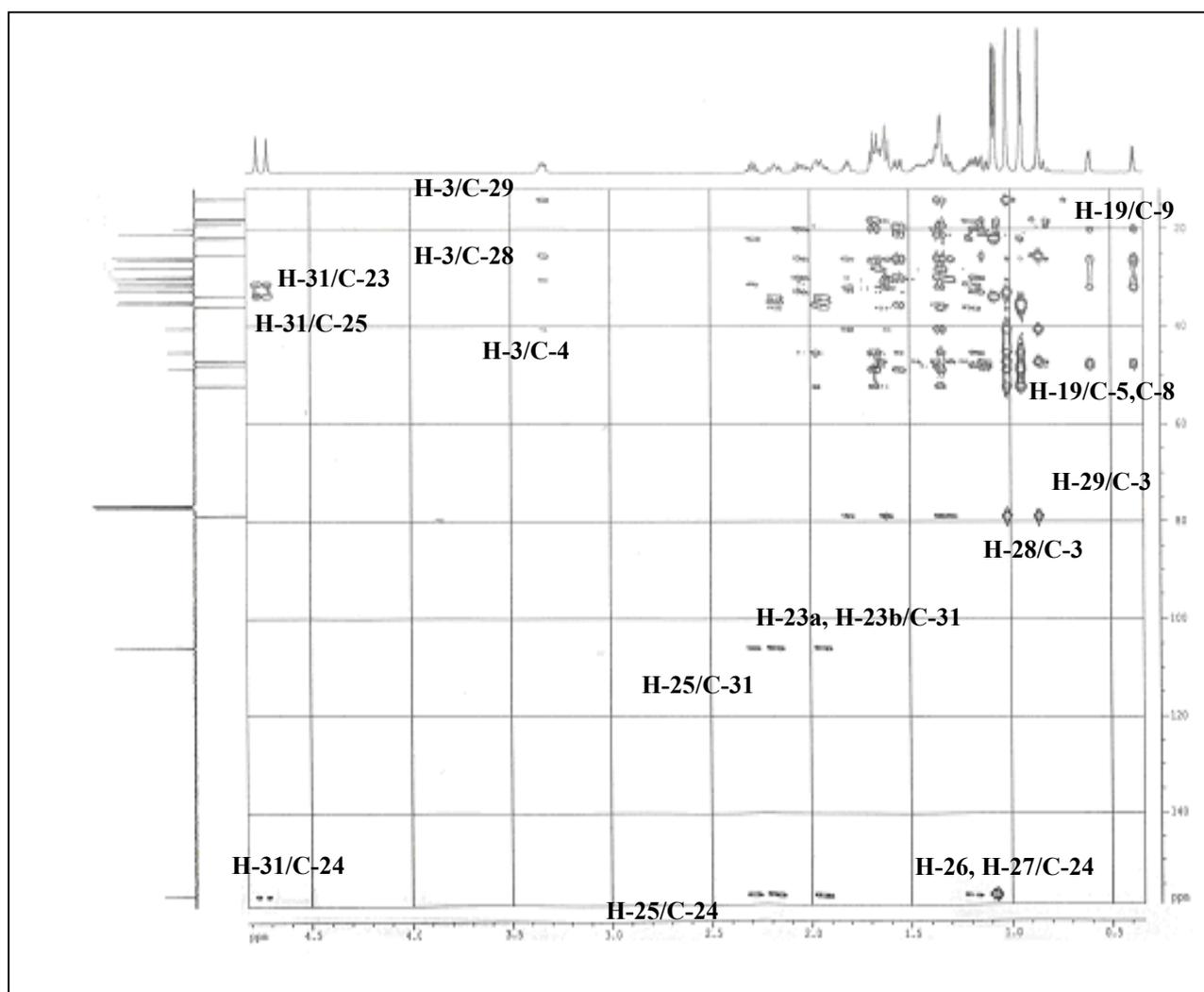


Figure 42 : Spectre HMBC du composé **6**

La stéréochimie du composé **6** a été établie principalement par analyse des corrélations observées sur le spectre NOESY (figure 43). En effet, ce dernier montre les taches de corrélation entre le proton H-19 *endo* du groupement CH₂ du cyclopropane qui est en position β [17] et les protons du groupement méthyle H-29 β-axial, les protons du méthyle H-28 équatorial et les protons H-5, H-3 et H-6 leur conférant ainsi des orientations α. D'autres effets NOE sont observés également entre les protons du groupement méthyle H-18 β-axial et les protons H-8β, H-19 *endo* et H-16β (figure 43).

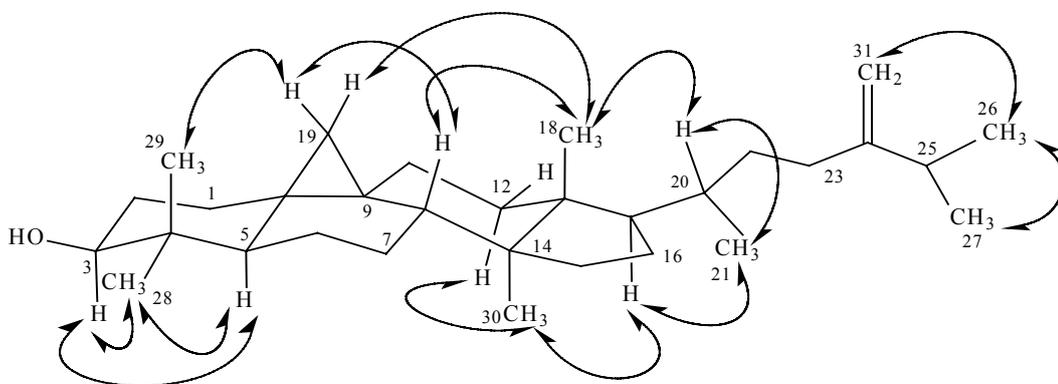
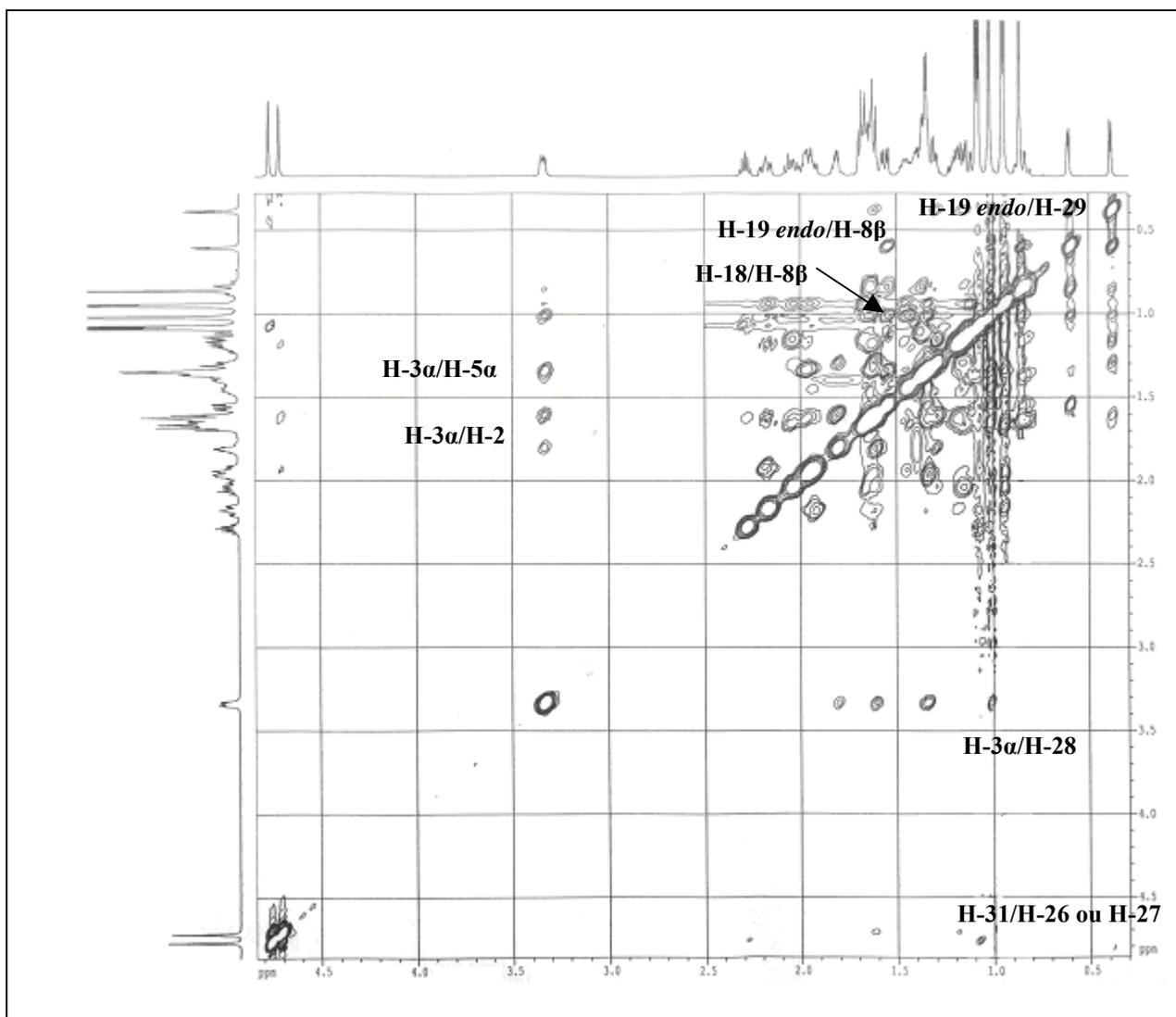


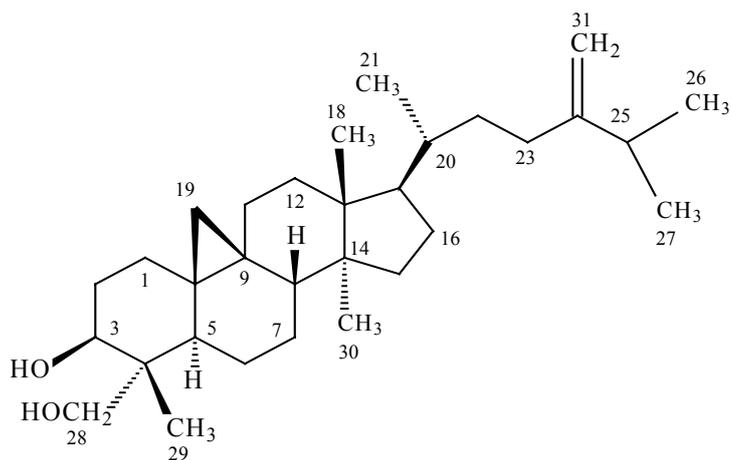
Figure 43 : Spectre NOESY et principales corrélations NOE observées pour le composé 6

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme du composé **6** ($[\alpha]_D^{20} = +40,2^\circ$, $C = 1,01$ g/100 ml), confirme qu'on est en présence du 24-méthylèneglycoartanol (**6**) [34].

Tableau 9 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **6** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,29-1,61 <i>m</i>	31,9
2	1,60-1,80 <i>m</i>	30,3
3	3,33 <i>dd</i> 11,2 , 4,3 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,35 <i>m</i> H-5 α	47,1
6	0,84-1,64 <i>m</i>	21,1
7	1,12 <i>dd</i> 12,5, 2,6 H-7 α 1,38 <i>m</i> H-7 β	26,0
8	1.55 <i>dd</i> 12,3, 4,7 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,16-2,05 <i>m</i>	26,4
12	1,67 <i>t</i> 6,3	32,8
13	-	45,2
14	-	48,7
15	1.35 <i>m</i>	35,5
16	1,36-1,96 <i>m</i>	28,1
17	1,66 <i>t</i> 8,2	52,2
18	1,01 <i>s</i>	18,0
19	0,38 <i>d</i> 4,1 H-19 <i>exo</i> 0,60 <i>d</i> 4,0 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,45 <i>m</i>	36,1
21	0,93 <i>d</i> 6,2	18,3
22	1,19-1,63 <i>m</i>	34,9
23	1,94 <i>m</i> H-23b 2,17 <i>ddd</i> 15,5, 12,0, 4,5 H-23a	31,3
24	-	156,8
25	2,28 <i>sept</i> 6,8	33,7
26	1,08 <i>d</i> 6,8	21,8
27	1,07 <i>d</i> 6,8	21,9
28	1,01 <i>s</i>	25,4
29	0,86 <i>s</i>	13,9
30	0,95 <i>s</i>	19,3
31	4,76 <i>sl</i> H-31a 4,71 <i>sl</i> H-31b	105,9

III-6-9- Elucidation structurale du composé 7



28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol (7)

Ce dérivé du cycloartanol détecté antérieurement lors du processus de déméthylation du 24-méthylèncycloartanol au niveau des plantes supérieures, par des microsomes de maïs [71], n'a pas été isolé comme produit pur. De ce fait, les données spectrales de ce produit n'ont pas été données auparavant.

Le spectre de masse ESI-MS du composé 7 (figure 44) enregistré en mode positif, montre des pics quasimoléculaires à $m/z = 479 [M+Na]^+$ et $935 [2M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 456 uma correspondant à une formule brute en $C_{31}H_{52}O_2$. Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS ($m/z = 479,3868$, calc. $C_{31}H_{52}O_2Na$, 479,3860) en apporte la confirmation.

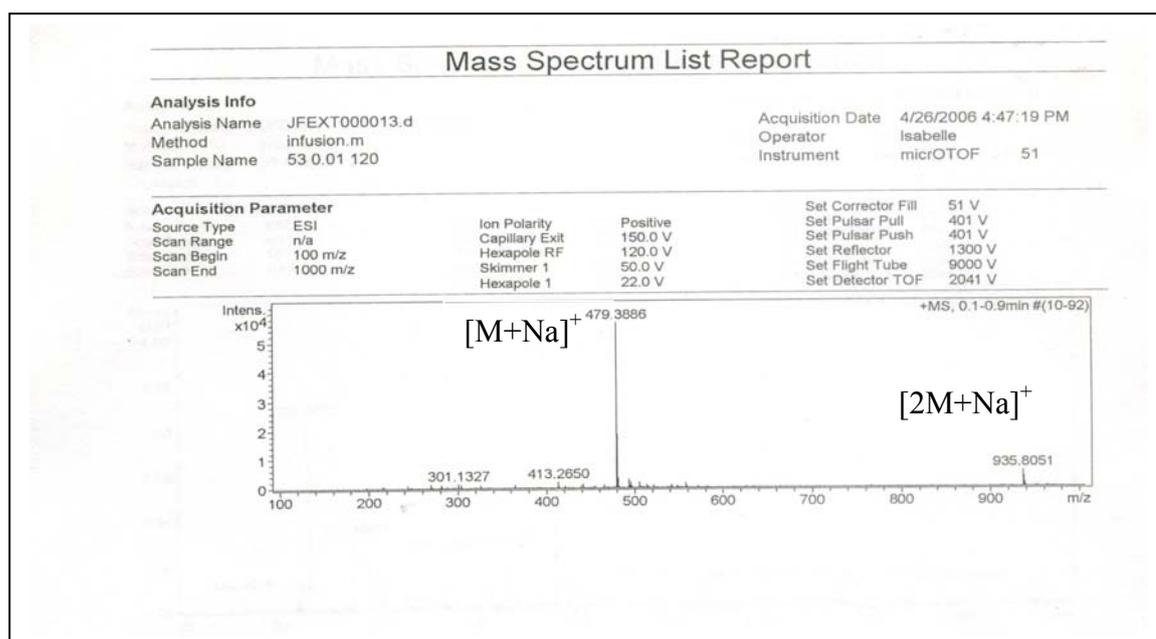


Figure 44 : Spectre de masse ESI du composé 7

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3430cm^{-1} (groupement hydroxyle) et 1640cm^{-1} (double liaison).

Le spectre RMN ^{13}C en J -modulé (tableau 10) montre les signaux correspondant à six méthyles, treize méthylènes, six méthines et six atomes de carbone quaternaires, confirmant la nature triterpénique du composé. Le spectre RMN ^1H (figure 45) montre deux signaux doublets à δ_{H} 0,44 (1H, d , $J= 4,2$ Hz, H-19 *exo*) et 0,65 (1H, d , $J= 3,9$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane tétrasubstitué de composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïdes [34,70]. Il montre en outre des signaux de six groupements méthyles à δ_{H} 0,94 (3H, s , H-30), 0,95 (3H, d , $J= 5,2$ Hz, H-21), 1,00 (3H, s , H-29), 1,01 (3H, s , H-18), 1,07 (3H, d , $J= 6,8$ Hz, H-27) et 1,08 (3H, d , $J= 6,8$ Hz, H-26) correspondant à un triterpène tétracyclique. Le spectre montre également la présence des signaux à δ_{H} 4,77 (1H, sl , H-31a) et 4,71 (1H, dl , $J= 1,2$ Hz, H-31b) d'un groupement méthylène exocyclique lié au carbone C-24. Il en résulte ainsi que les données RMN de ce composé sont voisines de celles du composé précédent, à savoir le 24-méthylèneglycolartanol [34,70].

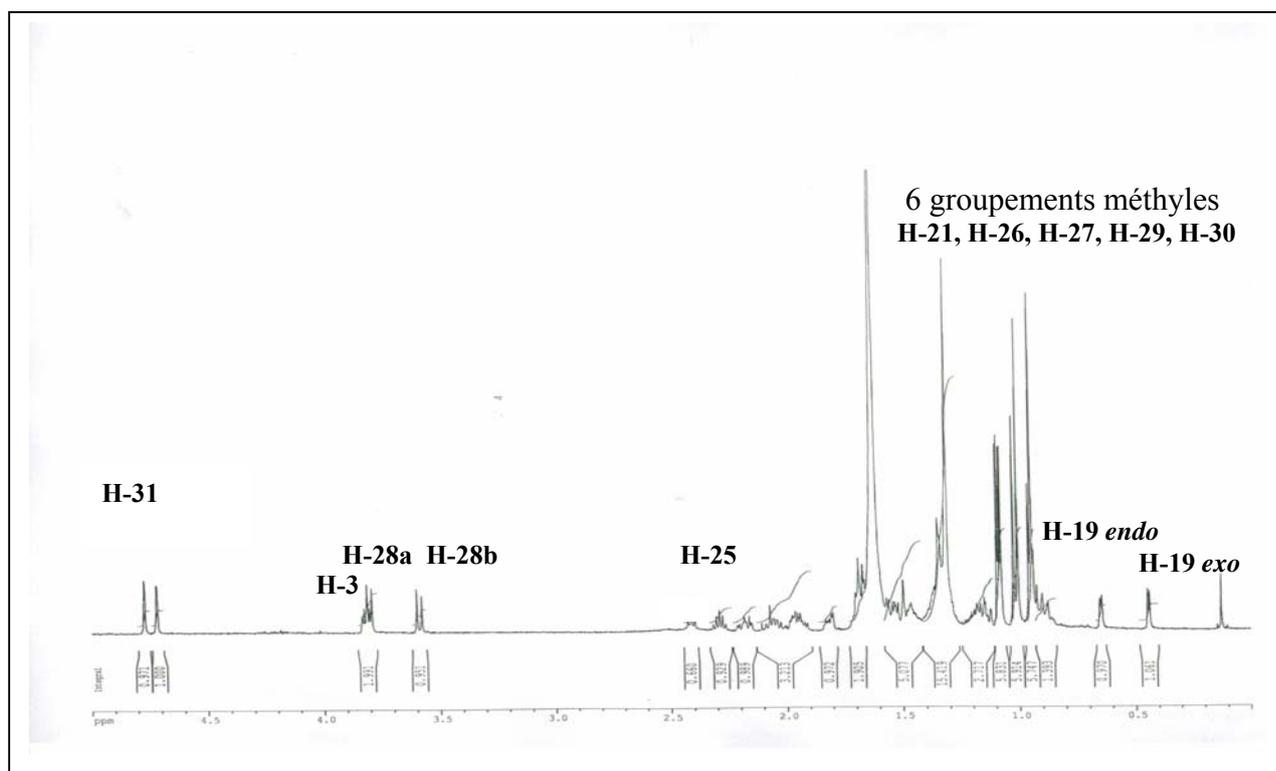


Figure 45 : Spectre RMN ^1H du composé 7

La seule différence réside en la substitution d'un méthyle lié au carbone C-4 par un groupement hydroxyméthylène CH₂OH au niveau du squelette cycloartanol. Les déplacements chimiques du carbone quaternaire C-4 et du carbone du groupement méthyle Me-29 résonant respectivement à 43,8 et 10,1 ppm permettent de localiser le groupement CH₂-OH en position équatoriale C-4 α . La présence de ce groupement est justifiée par l'apparition des signaux déblindés d'un système AB sous forme de deux doublets résonant à δ_H 3,80 (1H, *d*, *J*= 10,3 Hz, H-28a) et 3,59 (1H, *d*, *J*= 10,5 Hz, H-28b). L'expérience de corrélation COSY H-H (figure 46) montre les corrélations attendues entre les protons géminés du groupement hydroxyméthylène H-28a et H-28b, le proton H-3 et les deux protons H-2, le proton H-25 et les protons des groupements méthyles Me-26 et Me-27. L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'identifier tous les protons de ce composé ainsi que les carbones qui les portent.

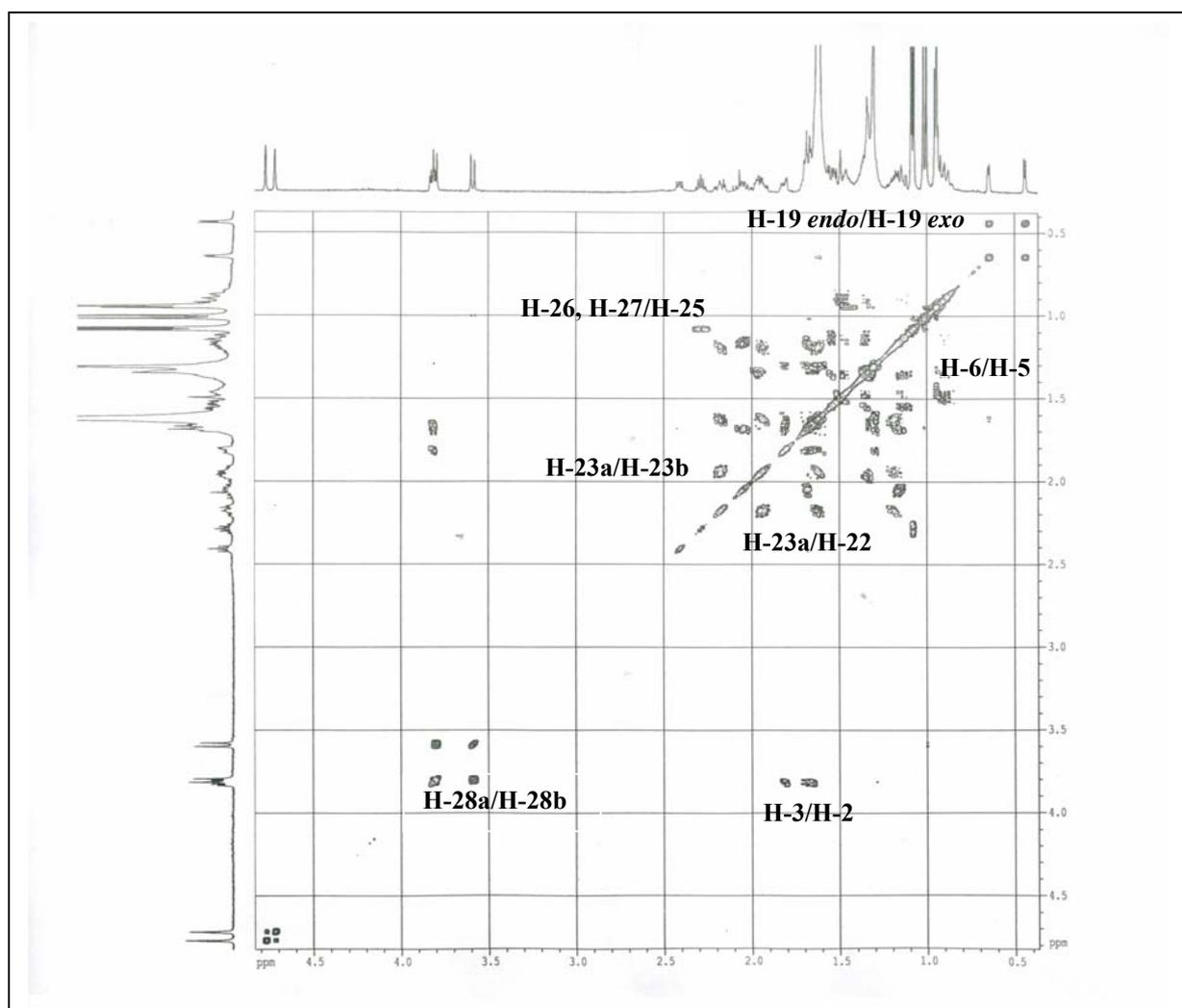


Figure 46 : Spectre COSY H-H du composé 7

L'expérience HMBC (figures 47 et 48) montre les taches de corrélation entre :

- les protons du groupement hydroxyméthylène H-28 et les carbones C-4, C-29 préalablement attribués et le carbone oxyméthine C-3 (δ_C 76,4).
- les protons du groupement méthyle Me-29 et les carbones C-3, C-4, C-28 déjà attribués et le carbone C-5 résonant à 42,5 ppm.
- les protons du groupement méthylènes H-19 et les carbones C-1 (δ_C 31,8), C-7 (δ_C 25,9), C-8 (δ_C 47,9), C-9 (δ_C 19,9) et C-10 (δ_C 26,5).
- les protons du groupement méthyle Me-18 et les carbones C-13 (δ_C 45,2), C-14 (δ_C 49,0) et C-17 (δ_C 52,2).
- les protons du groupement méthyle Me-30 et les carbones C-8, C-13 et C-14.
- les protons du groupement méthyle Me-26 et les carbones C-24 (δ_C 156,9), C-25 (δ_C 33,8) et C-27 (δ_C 21,9).
- les protons du groupement méthyle Me-27 et les carbones C-24, C-25 et C-26 (δ_C 21,8).
- les deux protons oléfiniques géminés en position 31 et le carbone C-25 à 33,8 ppm.

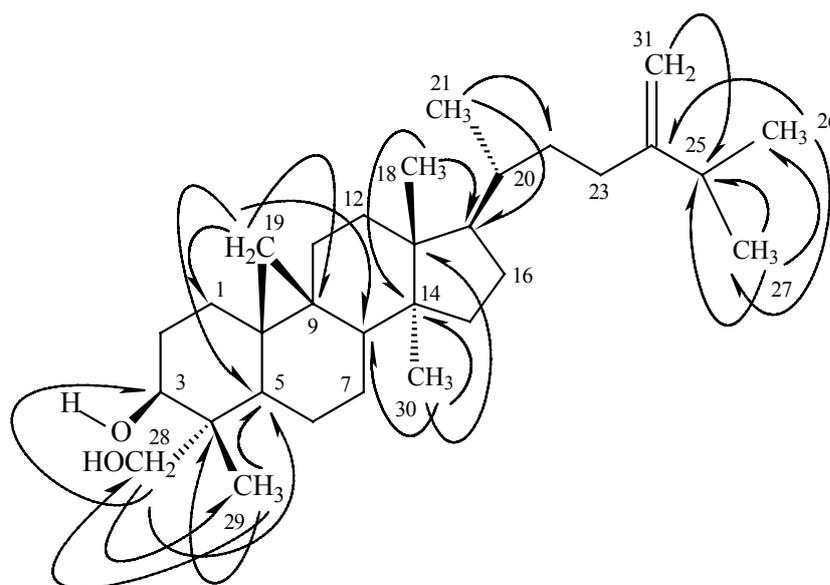


Figure 47 : Corrélations HMBC observées pour le composé 7

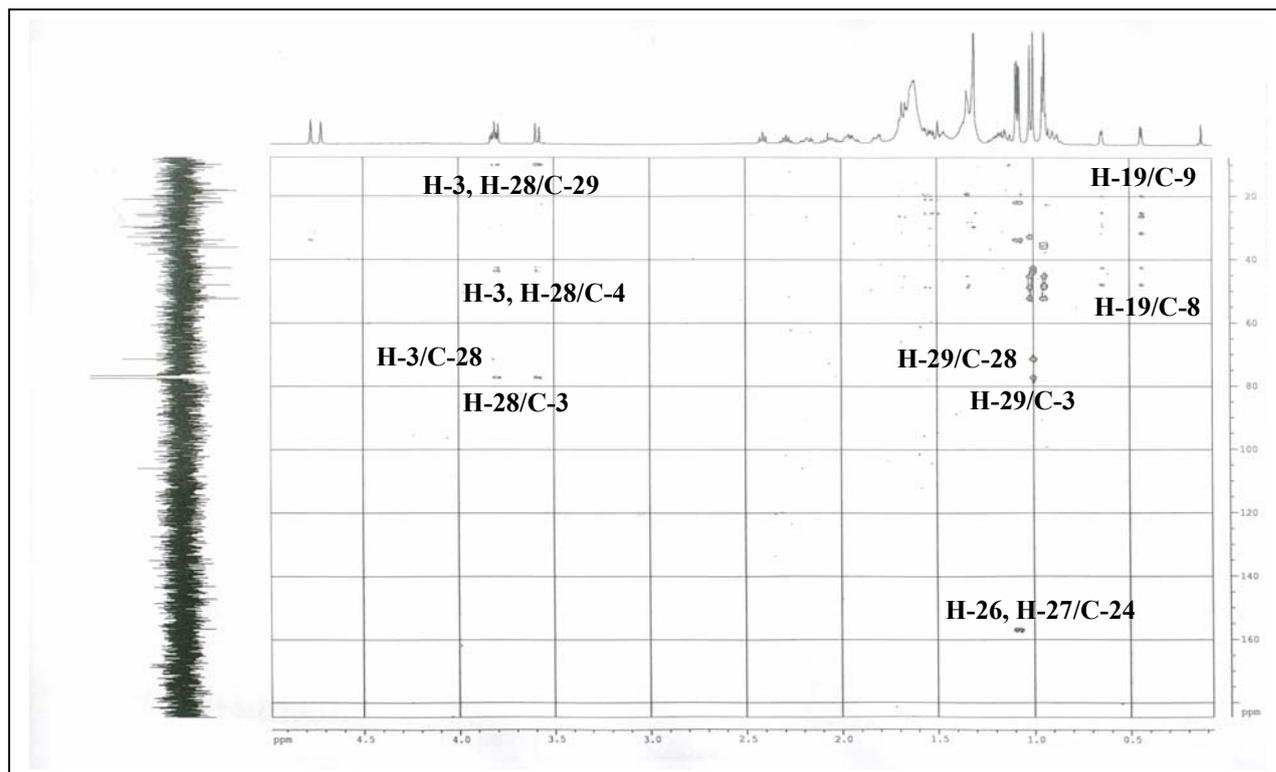


Figure 48 : Spectre HMBC du composé 7

L'analyse combinée des expériences COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC permet d'identifier tous les protons et carbones de ce composé (tableau 10).

La stéréochimie de ce composé est établie par analyse du spectre NOESY (figures 49 et 50). La position β du groupement méthylène CH₂-19 est rencontrée dans bon nombre de composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïdes [71]. La stéréochimie α -équatoriale du groupement hydroxyméthylène H-28 est confirmée par les effets NOE observés sur le spectre NOESY entre les protons H-28/H-3 α , H-28/H-5 α , H-28/H-6 α . Le signal à champ fort du déplacement chimique du carbone méthylique Me-29 (10,1 ppm) est en faveur de sa position β -axiale. La corrélation entre le proton H-19 *endo* et les protons méthyliques Me-29 confirme l'orientation β -axiale de ce groupement. L'absence de corrélation H-19/H-5 confirme que le proton H-5 est α -orienté. Les corrélations observées entre le proton H-19 *exo* et les protons Me-18, le proton H-8 et les protons H-19, impliquent que H-8 et Me-18 sont β -orientés. Les protons de ce dernier corrént avec le proton H-20 comme il est constaté dans tous les dérivés cycloartaniques [34,45,70-72]. Le groupement méthyle Me-30 est α -axial suite à sa corrélation avec les protons H-6 α , H-12 α et H-17 α . Le proton H-17 α montre un effet NOE avec les protons du groupement méthyle Me-21 confirmant ainsi la configuration 20R au niveau du carbone C-20 [34,45,70-72]. Il en résulte que ce composé a pour structure : 28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol (7).

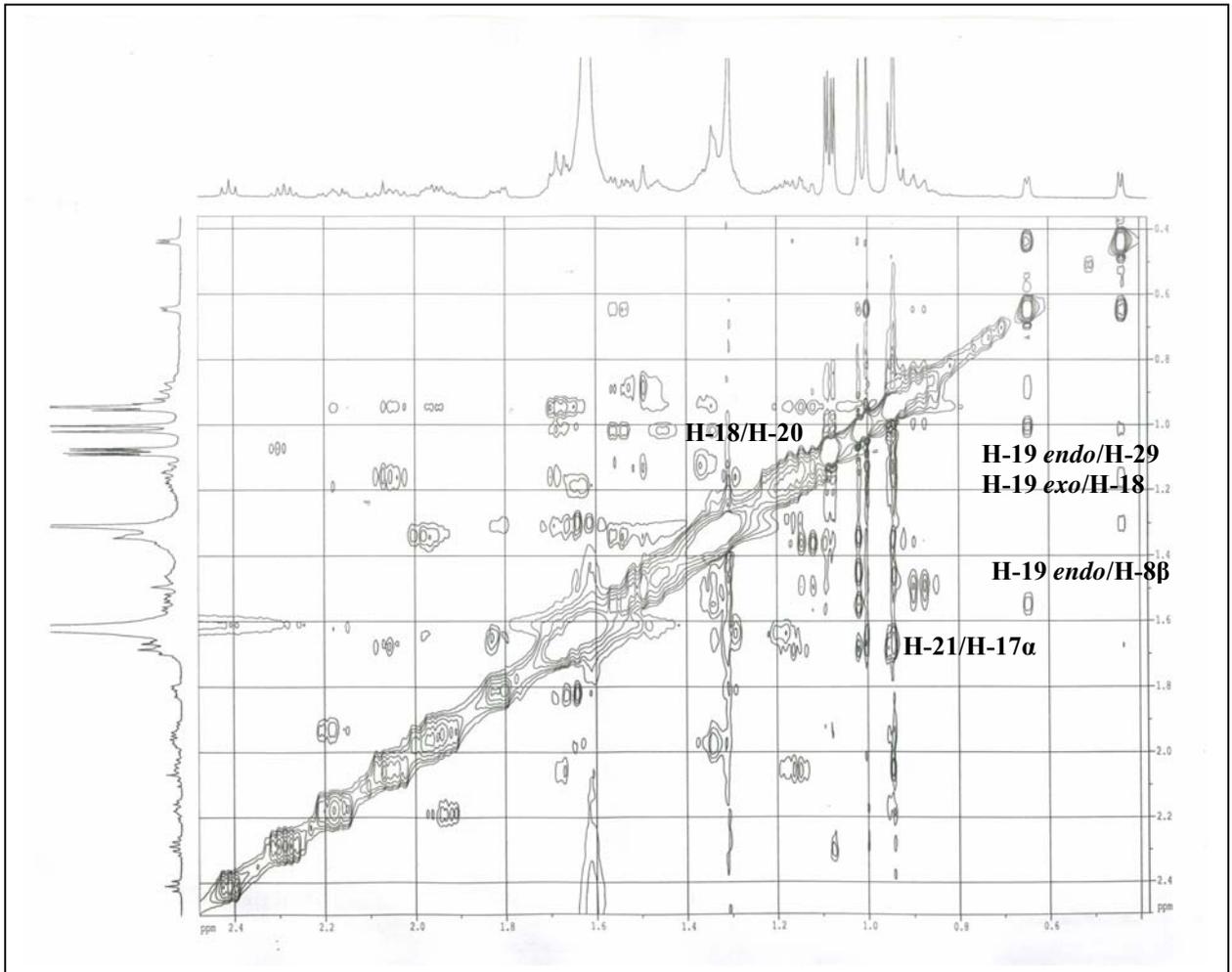


Figure 49: Spectre NOESY (zone blindée) du composé 7

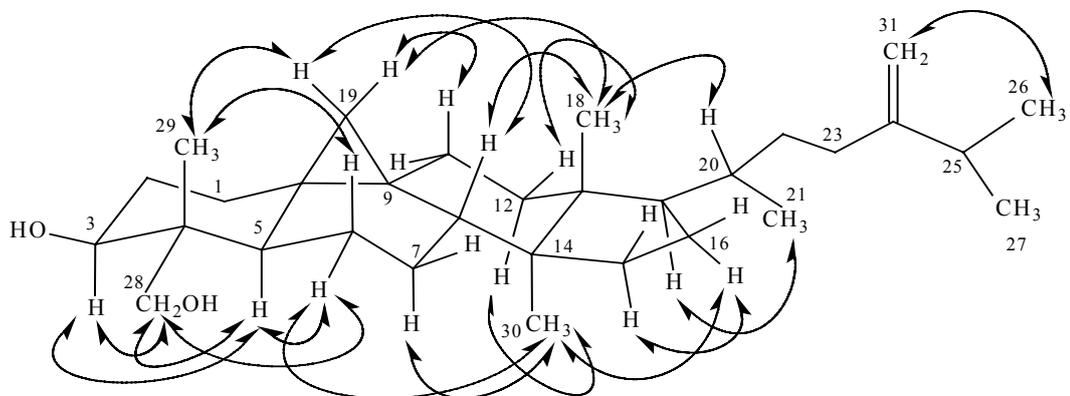
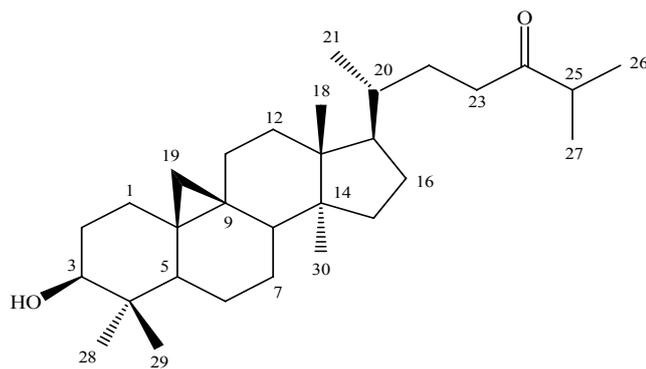


Figure 50 : Principales corrélations NOESY observées pour le composé 7

Tableau 10 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **7** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,29-1,62 <i>m</i>	31,8
2	1,66-1,82 <i>m</i>	30,4
3	3,82 <i>dd</i> 10,6, 4,8 H-3 α	77,1
4	-	43,8
5	1,52 <i>m</i> H-5 α	42,5
6	0,88-1,49 <i>m</i>	21,0
7	1,13-1,38 <i>m</i>	25,9
8	1,55 <i>dd</i> 12,2, 5,2 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,5
11	1,35-1,38 <i>m</i>	28,1
12	1,34 <i>m</i>	35,7
13	-	45,2
14	-	49,0
15	1,68 <i>m</i>	32,8
16	1,17-2,05 <i>m</i>	26,5
17	1,65 <i>m</i>	52,2
18	1,01 <i>s</i>	18,0
19	0,44 <i>d</i> 4,2 H-19 <i>exo</i> 0,65 <i>d</i> 3,9 H-19 <i>endo</i>	30,2
20	1,45 <i>m</i>	36,1
21	0,95 <i>d</i> 5,2	18,3
22	1,19-1,62 <i>m</i>	35,1
23	1,93-2,18 <i>m</i>	31,3
24	-	156,9
25	2,29 <i>sept</i> 6,8	33,8
26	1,08 <i>d</i> 6,8	21,8
27	1,07 <i>d</i> 6,8	21,9
28	3,80 <i>d</i> 10,3 H-28a 3,59 <i>d</i> 10,5 H-28b	71,3
29	1,00 <i>s</i>	10,1
30	0,94 <i>s</i>	19,2
31	4,77 <i>sl</i> H-31a 4,10 <i>dl</i> 1,2 H-31b	106,1

III-6-10- Elucidation structurale du composé 8



3-hydroxycycloartan-24-one (**8**)

Le spectre de masse haute résolution HR-EI-MS du composé **8**, présente un pic d'ion moléculaire à m/z 442,3927 $[M]^+$ (calculé 442,3811), correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O_2$. Les fragments apparaissant à m/z 424,3750 $[M-H_2O]^+$ et 409,3488 $[M-(H_2O+CH_3)]^+$, correspondent respectivement à la perte d'une molécule d'eau et un méthyle plus une molécule d'eau. Il montre également un fragment à m/z 315,2615 $[M-127]^+$, correspondant à la perte de la chaîne alkyle latérale $C_8H_{15}O$. Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3428 et 1708 cm^{-1} attribuables respectivement aux groupements hydroxyle et carbonyle.

Les spectres RMN 1H , ^{13}C J -modulé et HSQC J -modulé de ce composé (tableau 11) sont voisins de ceux du 24-méthylèncycloartanol (**6**). En effet, le spectre RMN 1H (figure 51) présente deux signaux blindés sous forme de doublets à δ_H 0,38 (1H, d , $J = 3,8$ Hz, H-19 *exo*), 0,61 (1H, d , $J = 3,7$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane d'un dérivé cycloartanique, 7 signaux de sept groupements méthyles et des signaux CH et CH_2 d'un triterpène à squelette tétracyclique [34,45,70-71].

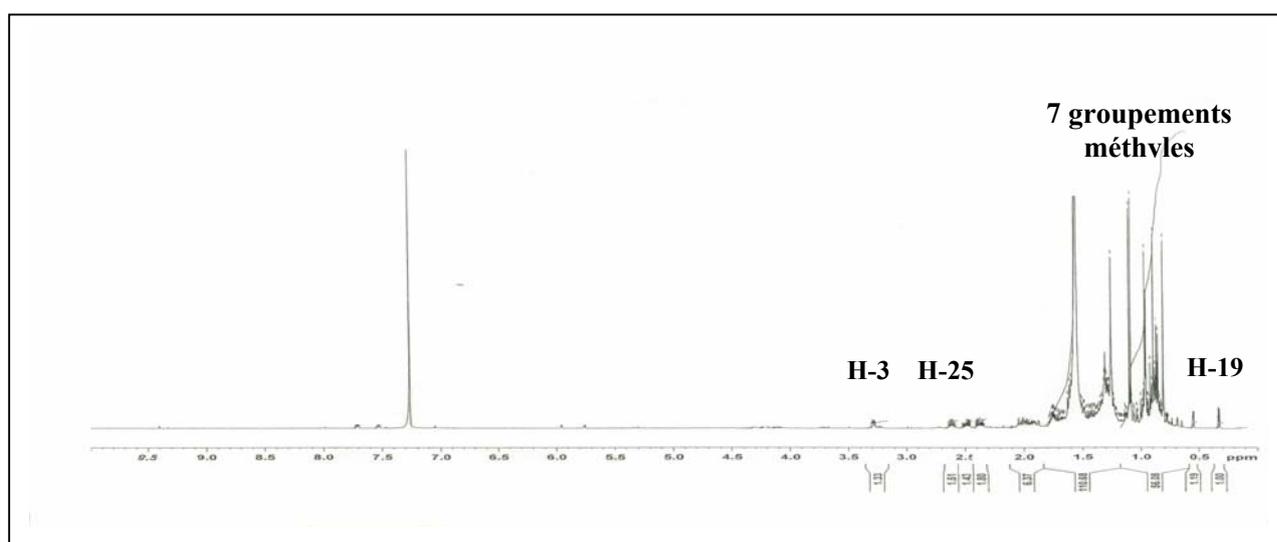


Figure 51 : Spectre RMN 1H du composé **8**

La différence par rapport au composé **6**, a trait à la disparition des signaux déblindés des deux protons géminés de la double liaison exocyclique H-31a et H-31b ainsi que leurs carbones, et l'apparition sur le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 52) d'un signal extrêmement déblindé résonant à 215,8 ppm attribuable au carbonyle C-24 d'une cétone.

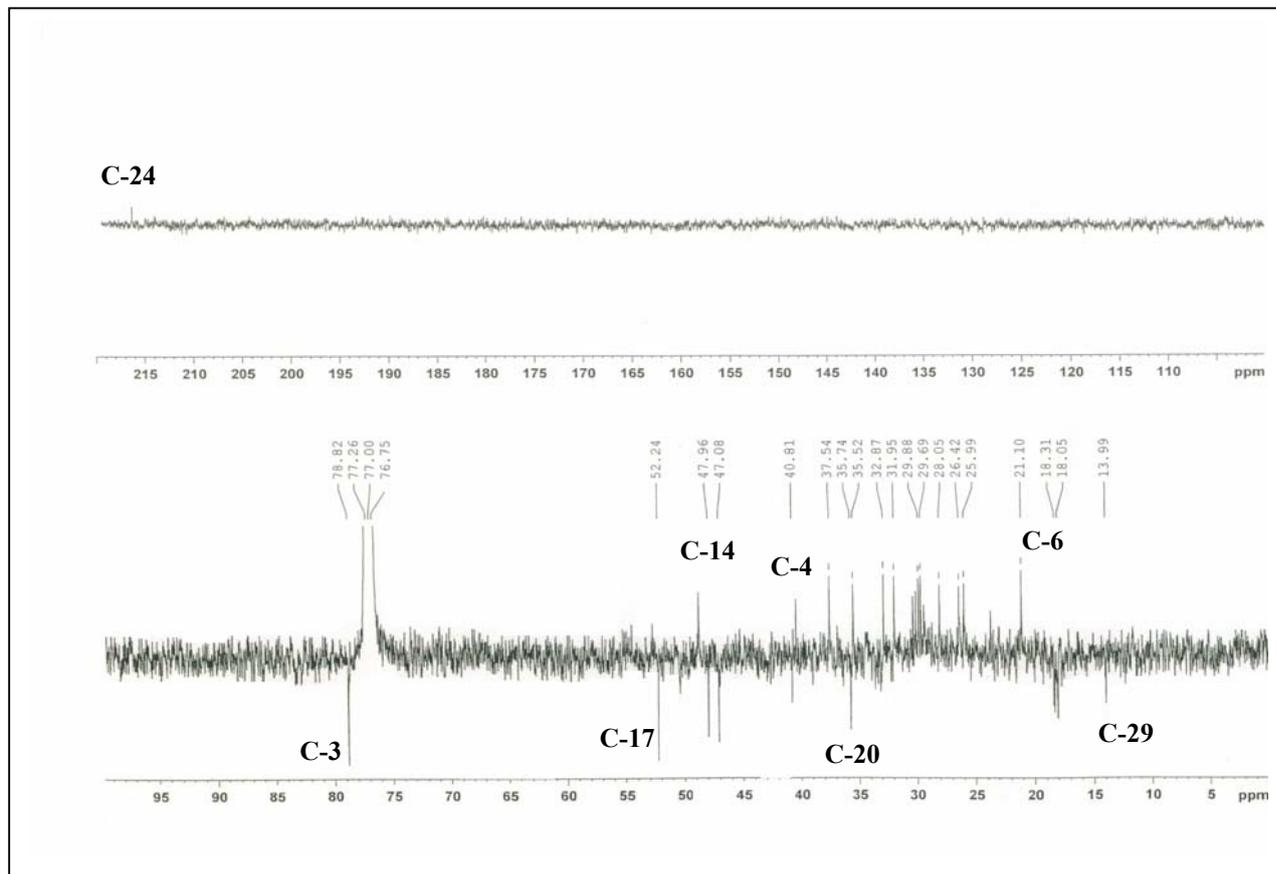


Figure 52 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **8**

Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC (figure 53) qui montre des corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ entre les protons des groupements méthyles Me-26 et Me-27 résonant à 1,07 ppm sous la forme de doublet chacun ($J= 6,8$ Hz) et ce carbonyle.

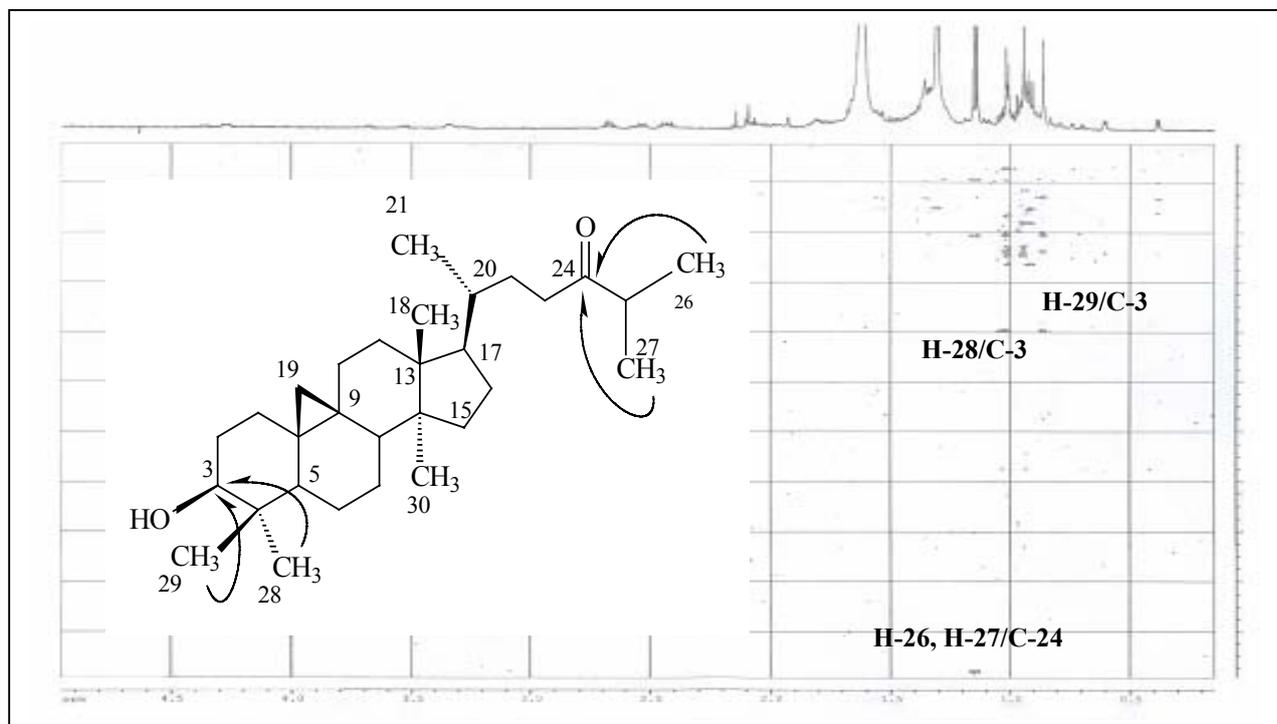


Figure 53 : Spectre HMBC du composé **8**

Les déplacements chimiques relativement déblindés des protons H-23 sont repérés à 2,45-2,56 ppm car situés en position α du carbonyle. A partir de ces derniers, l'analyse COSY H-H (figure 54) permet d'attribuer les protons H-22, H-20 et H-21 constituant un même système de spin. En effet, on observe les couplages entre les protons H-23/H-22 de la chaîne latérale, H-22/H-20 et H-20/H-21 résonnant respectivement à δ_H 1,29-1,83 (*m*, H-22), 1,50 (*m*, H-20) et 0,92 (*d*, $J=6,8$ Hz, H-21). Ces protons présentent en HSQC J -modulé, des corrélations $^1J_{H-C}$ avec les carbones C-23 (δ_C 37,5), C-22 (δ_C 32,9), C-20 (δ_C 35,5) et C-21 (δ_C 18,3).

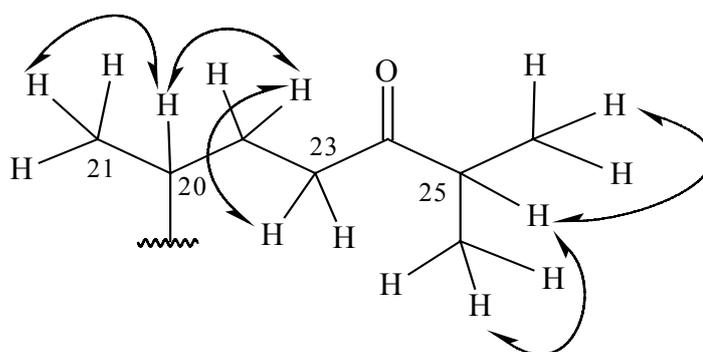


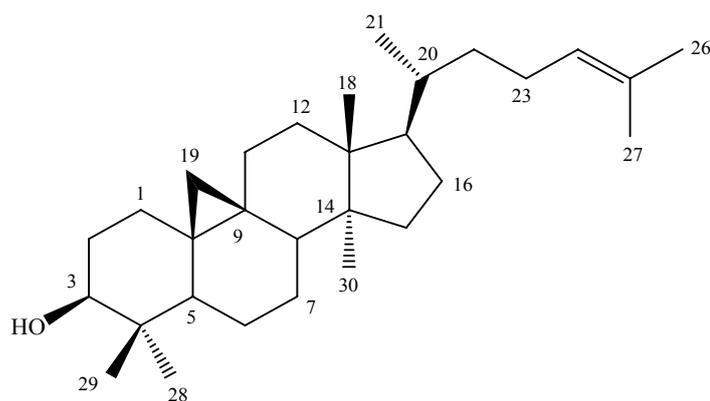
Figure 54: Corrélations COSY H-H de la chaîne latérale du composé **8**

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme donne $[\alpha]_D = +35,4^\circ$ (0,45, CHCl_3), valeur qui concorde avec celle trouvée dans la littérature ($+33^\circ$) [72].

Tableau 11 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **8** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,30-1,60 <i>m</i>	31,9
2	1,61-1,81 <i>m</i>	29,9
3	3,28 <i>dd</i> 11,0, 4,1 H-3 α	78,8
4	-	40,8
5	1,38 <i>m</i> H-5 α	47,1
6	0,88-1,65 <i>m</i>	21,1
7	1,12-1,38 <i>m</i>	28,0
8	1,56 <i>dd</i> 12,3, 5,2 H-8 β	47,6
9	-	21,1
10	-	26,0
11	1,18-2,05 <i>m</i>	26,0
12	1,68 <i>m</i>	35,5
13	-	45,3
14	-	48,6
15	1,33 <i>m</i>	32,9
16	1,35-1,96 <i>m</i>	26,4
17	1,62 <i>m</i>	52,2
18	1,01 <i>s</i>	18,0
19	0,61 <i>d</i> 3,7 H-19 <i>endo</i> 0,38 <i>d</i> 3,8 H-19 <i>exo</i>	29,7
20	1,50 <i>m</i>	35,5
21	0,92 <i>d</i> 6,8	18,3
22	1,29-1,83 <i>m</i>	32,9
23	2,45-2,56 <i>m</i>	37,5
24	-	215,8
25	2,68 <i>sept</i> 6,9	40,8
26	1,17 <i>d</i> 6,8	18,3
27	1,17 <i>d</i> 6,8	18,1
28	1,02 <i>s</i>	25,3
29	0,86 <i>s</i>	14,0
30	0,96 <i>s</i>	19,2

III-6-11- Elucidation structurale du composé 9



Cycloarténol (9)

Le spectre de masse haute résolution HR-EI-MS du composé **9**, montre un pic d'ion moléculaire à m/z 426,3909 $[M]^+$ (calculé 426,3862), correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. D'autres fragments observés à m/z 408,3796 et 393,3563 sont attribuables respectivement à $[M-H_2O]^+$ et $[M-(H_2O+CH_3)]^+$. Il présente également un fragment à m/z 297,2615 $[M-111-18]^+$, correspondant à la perte d'un groupement alkyle C_9H_{15} et d'une molécule d'eau.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3440 cm^{-1} attestant de la présence de groupement hydroxyle et à 1640 cm^{-1} caractérisant une double liaison.

Le spectre RMN ^{13}C en J -modulé (figure 55) montre 30 signaux correspondant à sept méthyles, onze méthylènes, six méthines et six atomes de carbone quaternaires. Ces signaux attestent de sa nature triterpénique [34,72]. Ce composé présente un carbone en moins par rapport au 24-méthylèneglycoartanol (**6**).

Le spectre RMN 1H (figure 56) est presque identique à celui du composé **6**. En effet, il montre deux signaux blindés sous la forme de doublets à δ_H 0,38 (1H, d , $J= 4,1\text{ Hz}$, H-19 *exo*), 0,60 (1H, d , $J= 4,0\text{ Hz}$, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane d'un composé à squelette glycoartanol [34,70-72]. Il montre également 7 signaux caractéristiques de sept groupements méthyles dont 5 résonant entre 0,86 et 1,02 et deux résonant à 1,66 et 1,74 ppm. Les déplacements chimiques relativement déblindés de ces deux derniers impliquent qu'ils sont liés à une double liaison.

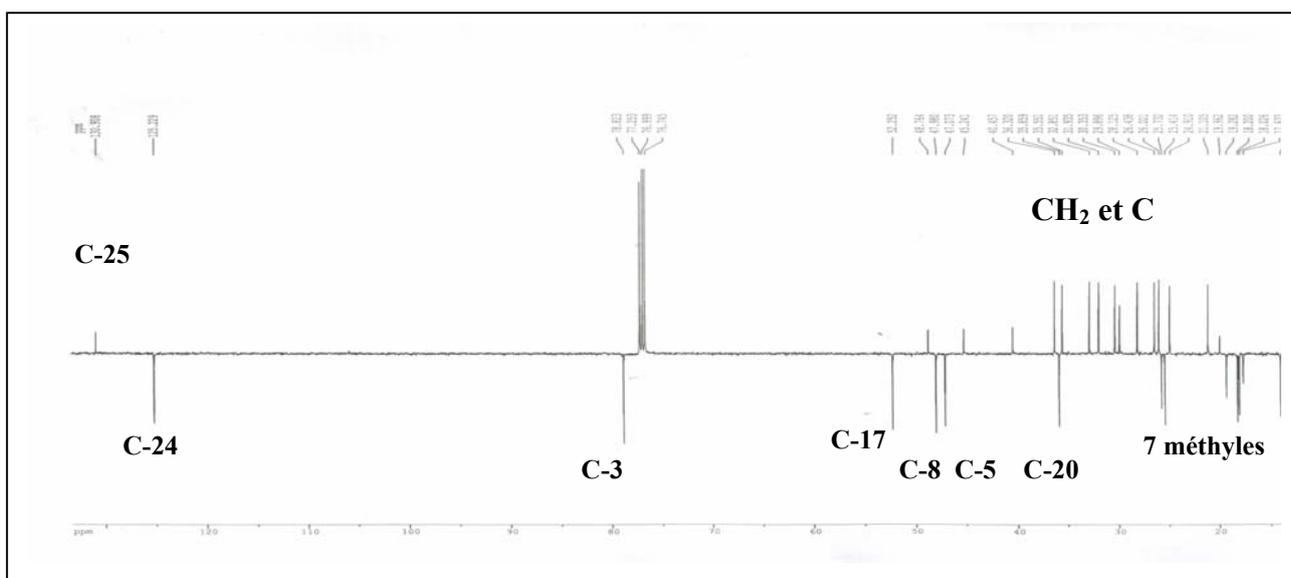


Figure 55 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **9**

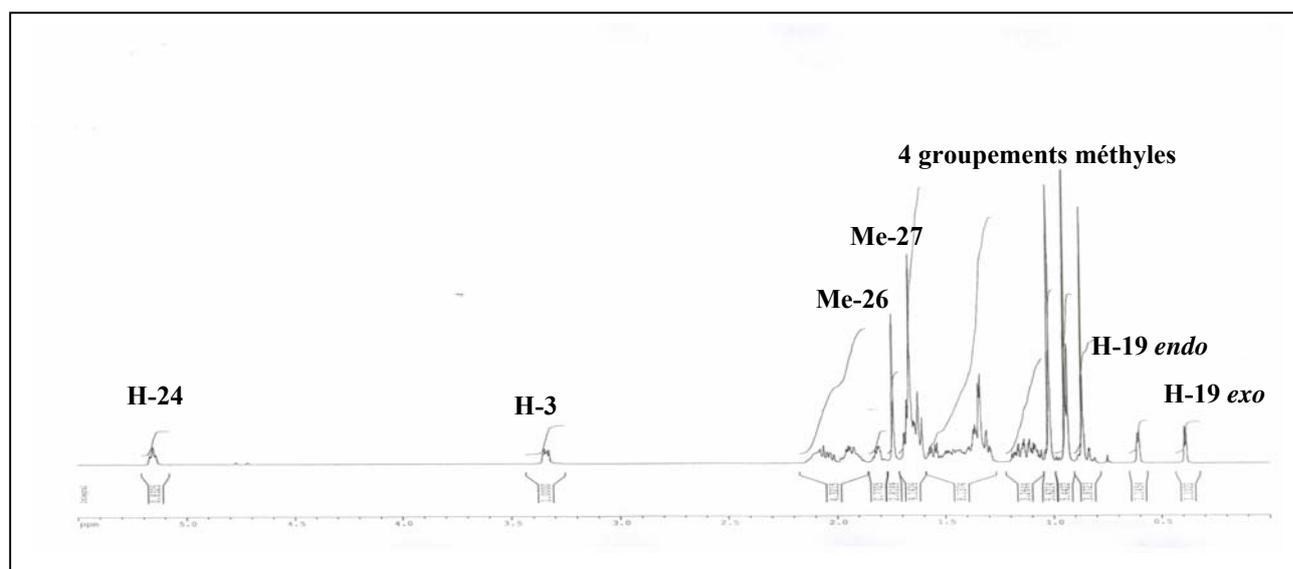


Figure 56 : Spectre RMN ^1H du composé **9**

La différence entre ce composé et le 24-méthylèncycloartanol (**6**) concerne la chaîne latérale liée au carbone C-17 (R-17) et elle a trait particulièrement à la disparition des signaux des deux protons éthyléniques de la double liaison exocyclique et l'apparition d'un signal déblindé résonant à 5,15 ppm sous la forme de triplet ($J= 7,0$ Hz) attribuable au proton oléfinique H-24. Ce dernier corrèle en HSQC *J*-modulé avec son carbone résonant à 125.2 ppm (C-24) et en HMBC avec les carbones des méthyles Me-26 et Me-27 résonant respectivement à 25,7 et 17,6 ppm. Le carbone C-26 déblindé, se trouve donc en position *trans*. L'effet NOE observé sur le spectre

NOESY entre les protons du méthyle Me-26 et le proton éthylénique en position 24, confirme l'attribution des deux méthyles Me-26 et Me-27 (figure 57).

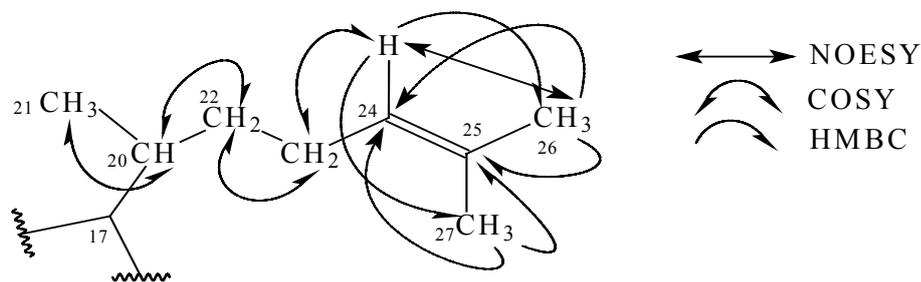


Figure 57 : Corrélations NOESY, COSY H-H et HMBC de la chaîne latérale du composé **9**

A partir du proton éthylénique H-24, le spectre COSY H-H permet d'identifier les protons de la chaîne latérale (figure 57), à savoir :

- les deux protons H-23 résonant à 1,91 et 2,09 ppm à partir de leurs corrélations avec le proton H-24.
- les deux protons H-22 résonant à 1,09 et 1,49 ppm corrélant avec les protons H-23.
- le proton H-20 à 1,44 ppm couplant avec les protons H-22.
- les protons méthyliques Me-21 à 0,93 ppm corrélant avec le proton H-20.

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent C-20 (δ_C 35,8), C-21 (δ_C 18,2), C-22 (δ_C 36,3) et C-23 (δ_C 24,9).

Le spectre HMBC présente des corrélations en 2J entre les protons des groupements méthyles vinyliques Me-26 et Me-27 et le carbone éthylénique quaternaire C-25 résonant à 130,9 ppm.

Toutes ces données spectroscopiques sont regroupées dans le tableau 12.

La stéréochimie de ce triterpène a été établie en analysant les corrélations observées sur le spectre NOESY (figure 58). En effet, il montre les taches de corrélation entre le proton H-19 *endo* et les protons du groupement méthyle Me-29, les protons du méthyle Me-28 et les protons H-5 α , H-3 α et H-6 α . Les effets NOE sont visualisés également entre les protons du groupement méthyle Me-18 et les protons H-8 β , H-19 *exo* et H-16 β et entre les protons du groupement méthyle Me-21 et le proton H-12 et H-20 (figure 58).

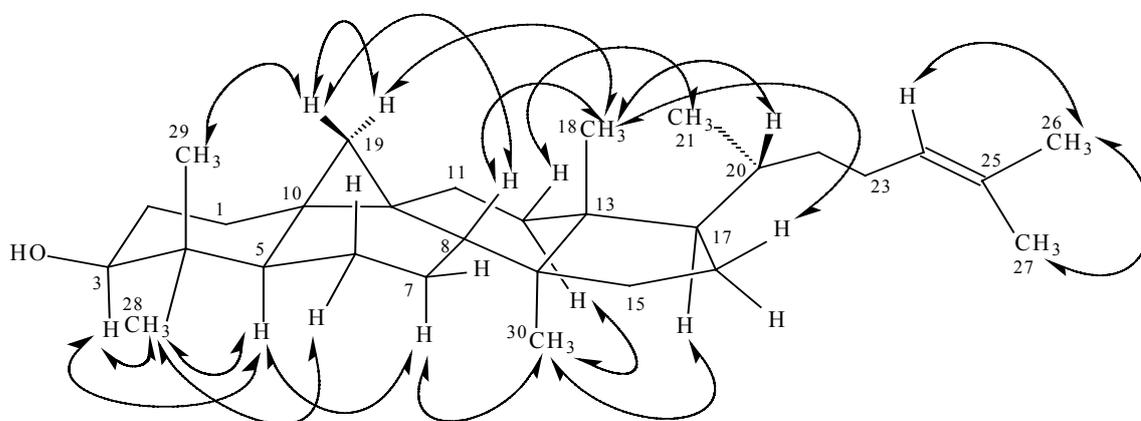
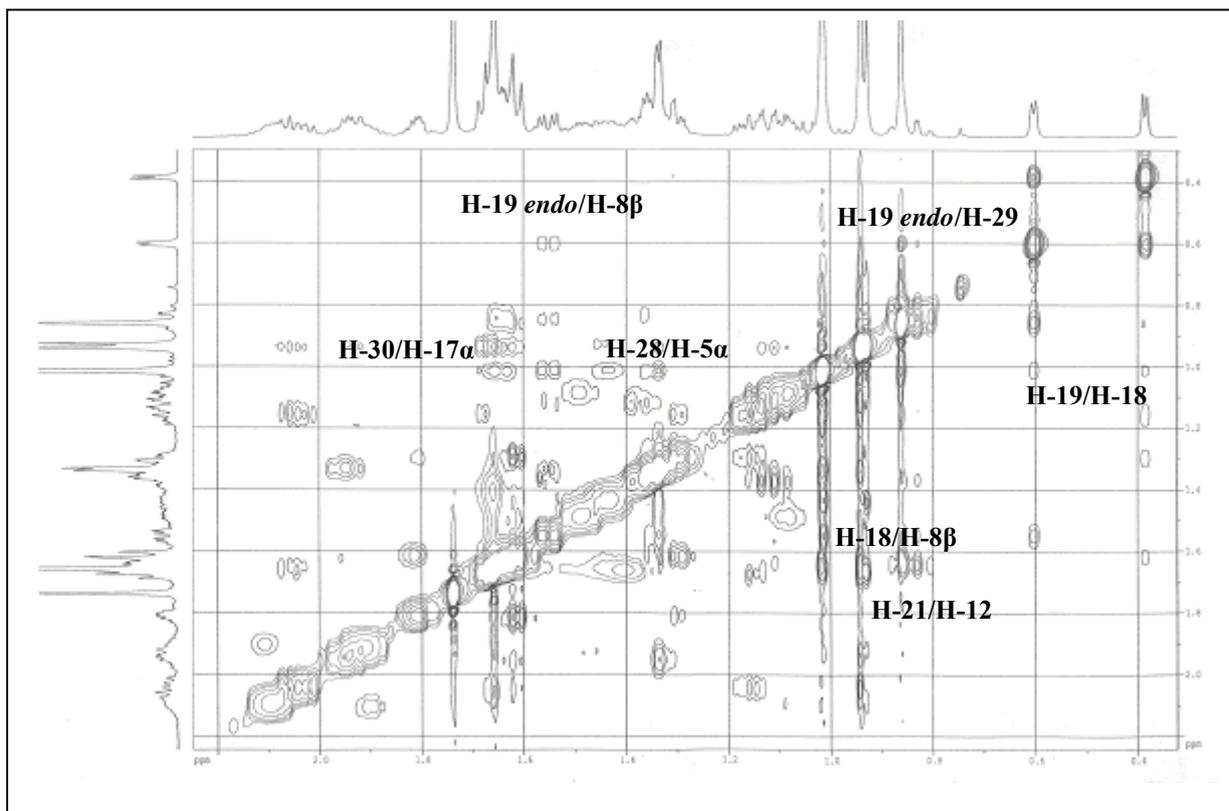


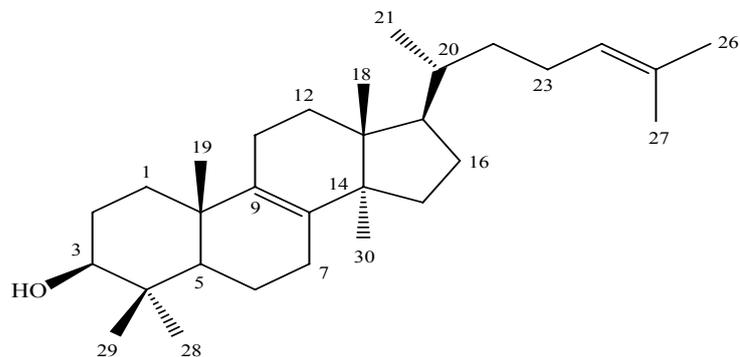
Figure 58 : Corrélations NOESY observées pour le composé **9**

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme du composé **9** ($[\alpha]_D = +46^\circ$, $C = 0,70$ g/100 ml, CHCl_3), (lit. $[\alpha]_D = +48^\circ$, $C = 1,0$ g/100 ml [34]) confirme qu'on est en présence du cycloarténol (**9**). Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* : *E. broterii* [34], *E. peplus* [45] et *E. heteradena* [70].

Tableau 12 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **9** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,30-1,61 <i>m</i>	31,9
2	1,62-1,81 <i>m</i>	30,3
3	3,34 <i>dd</i> 11,0, 4,3 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,35 <i>m</i> H-5 α	47,0
6	0,83 <i>td</i> 12,6, 2,3 H-6 β 1,64 <i>m</i> H-6 α	21,1
7	1,12-1,38 <i>m</i>	26,0
8	1,55 <i>dd</i> 12,3, 4,7 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,16-2,04 <i>m</i>	26,4
12	1,68 <i>m</i>	32,8
13	-	45,2
14	-	48,7
15	1,33 <i>m</i>	35,5
16	1,33-1,94 <i>m</i>	28,1
17	1,63 <i>m</i>	52,2
18	1,02 <i>s</i>	18,0
19	0,60 <i>d</i> 4,0 H-19 <i>endo</i> 0,39 <i>d</i> 4,1 H-19 <i>exo</i>	29,8
20	1,44 <i>m</i>	35,8
21	0,93 <i>d</i> 6,5	18,2
22	1,09-1,49 <i>m</i>	36,3
23	1,91-2,09 <i>m</i>	24,9
24	5,15 <i>t</i> 7,0	125,2
25	-	130,9
26	1,74 <i>s</i>	25,7
27	1,66 <i>s</i>	17,6
28	1,01 <i>s</i>	25,4
29	0,86 <i>s</i>	13,9
30	0,94 <i>s</i>	19,2

III-6-12- Elucidation structurale du composé 10



lanostérol (10)

Le spectre de masse haute résolution réalisé par impact électronique HR-EI-MS montre un pic d'ion moléculaire à m/z 426,3899 $[M]^+$ (calculé 426,3862), correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. Il présente un fragment à m/z 393,3521 $[M-18-15]^+$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau et d'un groupement méthyle.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3392 et 1634 cm^{-1} suggérant la présence de groupement hydroxyle et une double liaison.

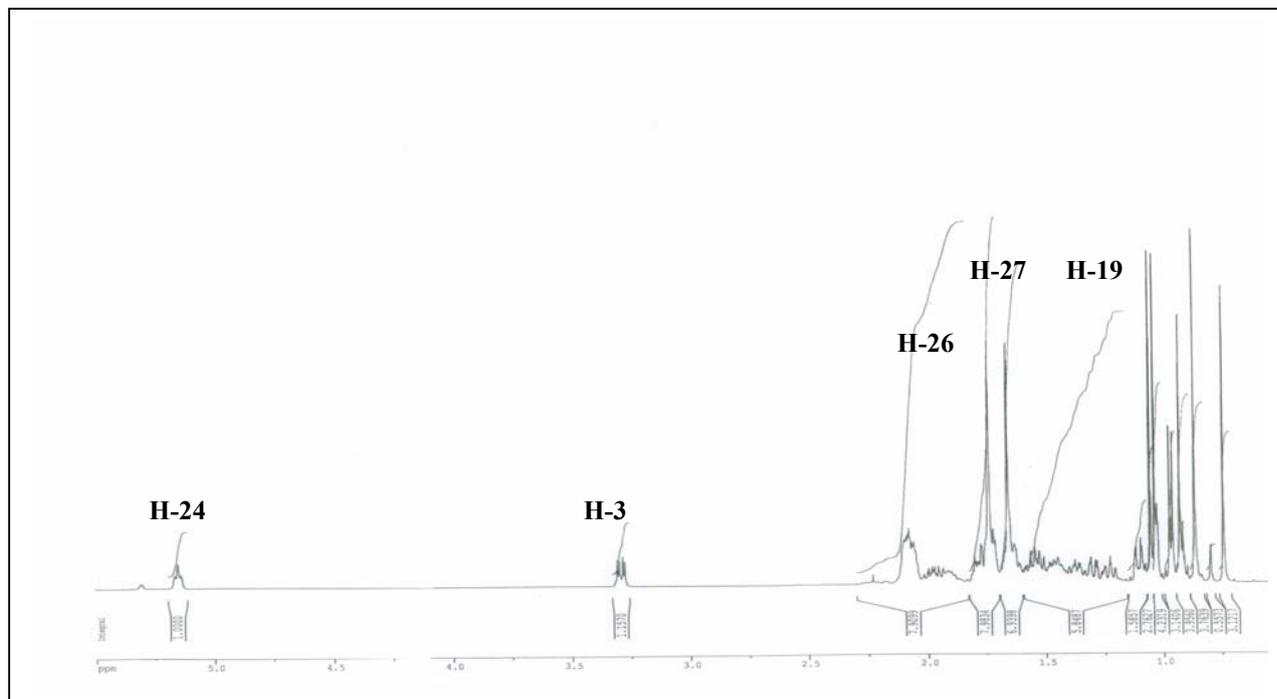


Figure 59 : Spectre RMN 1H du composé 10

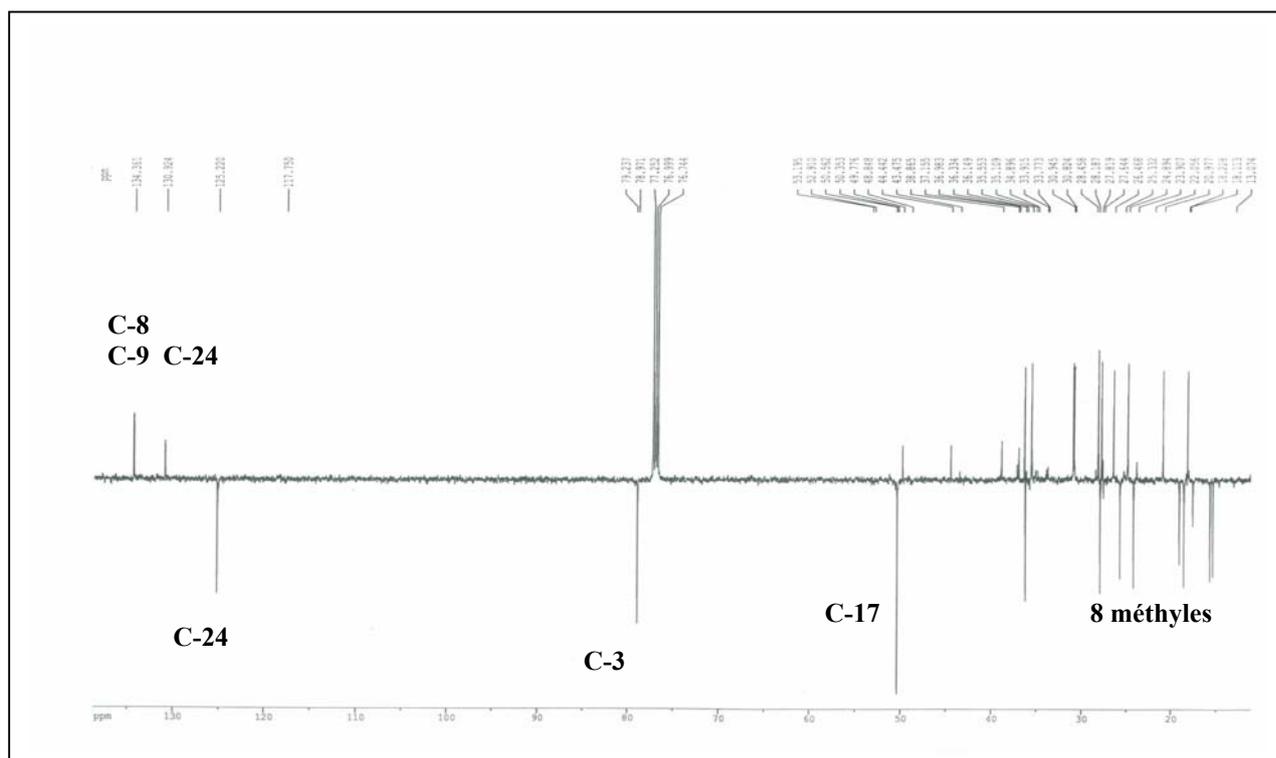


Figure 60 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **10**

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé (figures 59 et 60) sont globalement similaires à ceux du cycloartenol (**9**). Les spectres RMN ^{13}C J -modulé et HSQC J -modulé permettent d'observer dans la région déblindée en plus des signaux de la double liaison C-24=C-25 résonant à 125,2 et 130,9 ppm respectivement, un signal à 134,3 ppm attribuable à un carbone éthylénique quaternaire.

La différence par rapport au composé précédent (**9**), observée en RMN du proton, concerne principalement la disparition des signaux des deux protons non équivalents du noyau cyclopropane et l'apparition d'un méthyle supplémentaire résonant à 1,09 ppm attribuable au méthyle Me-19. Ce dernier corrèle en 3J sur le spectre HMBC (figure 61) avec les carbones (CH) C-1 (δ_{C} 35,5), C-5 (δ_{C} 50,3) et un carbone éthylénique quaternaire résonant à 134,3 ppm qui ne peut être que le carbone C-9. En HMBC, les protons du groupement méthyle Me-30 corrèle en 3J avec les carbones C-13 (δ_{C} 44,4), C-15 (δ_{C} 30,8) et un carbone éthylénique quaternaire résonant à 134,3 ppm attribuable donc au deuxième carbone de la double liaison C-8.

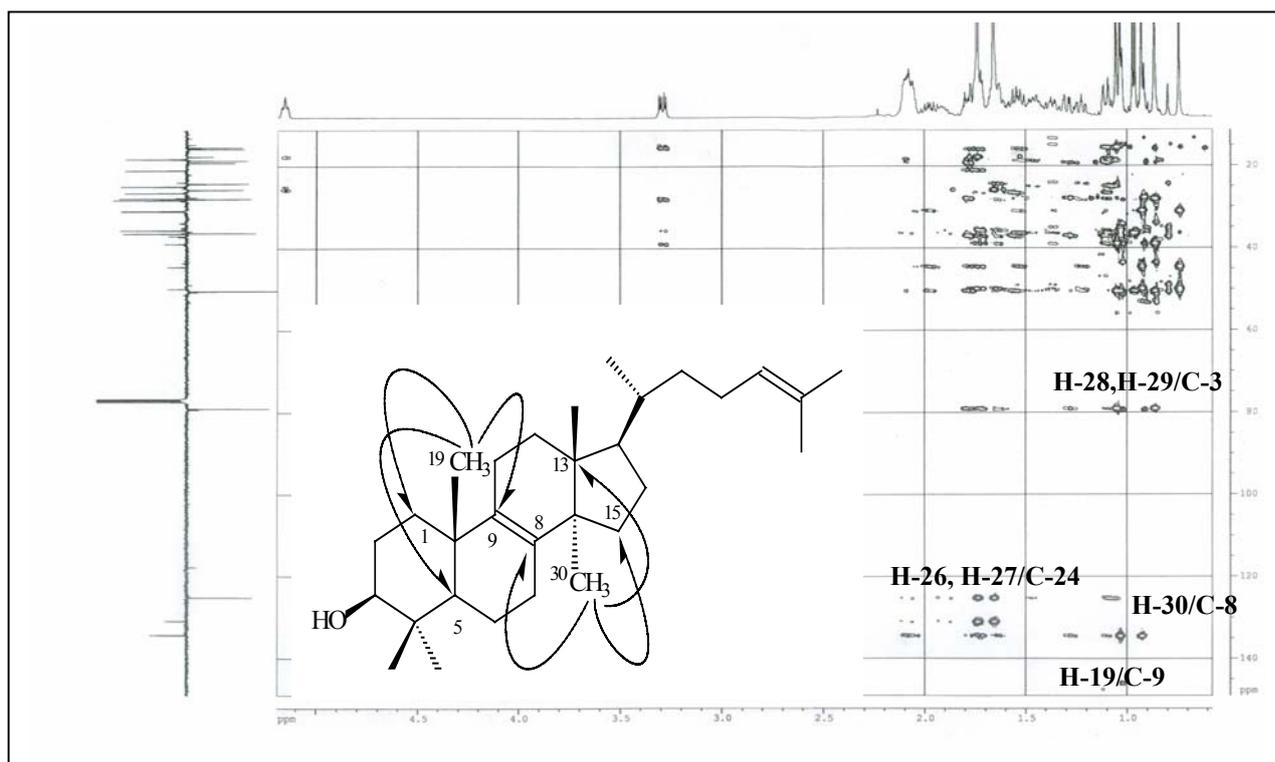


Figure 61 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **10**

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé (tableau 13).

La stéréochimie de ce composé est établie en analysant le spectre NOESY (figure 62) qui montre en plus des corrélations observées pour le composé précédent, des effets NOE entre les protons du groupement méthyle Me-19 et les protons Me-29, Me-18, H-11 β , H-6 β , H-1 β et H-2 β .

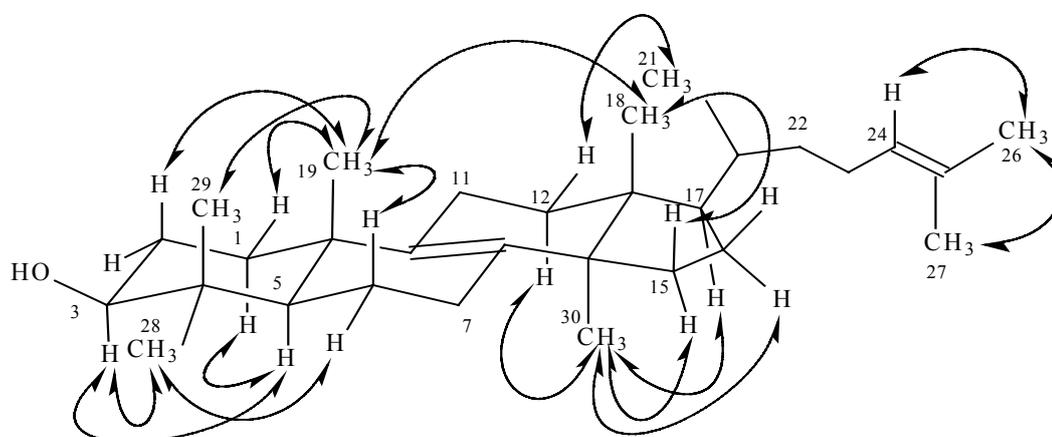


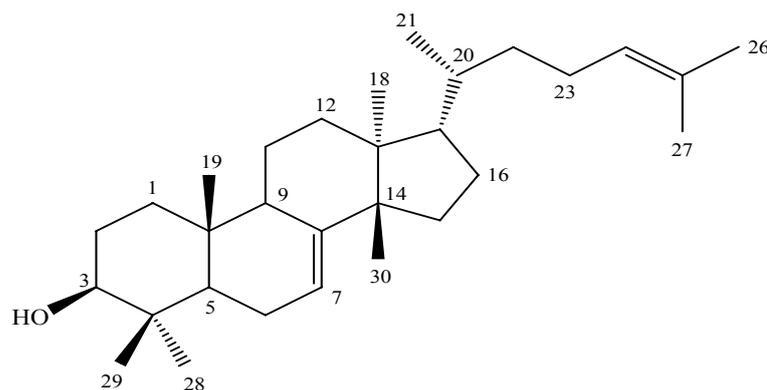
Figure 62 : Importants effets NOE observés pour le composé **10**

La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = +56^\circ$, $C = 0,75$ g/100 ml), mesuré dans le chloroforme confirme qu'il s'agit du lanostérol (**10**) (lit. $[\alpha]_D = +59,5^\circ$ ($C = 8,2$ g/100 ml, CHCl_3 [73]). Ce composé a été isolé également de plusieurs espèces *Euphorbia* : *E. peplus* [45], *E. aphylla* [46] et *E. characias* [46].

Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **10** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,0 <i>ddd</i> 13,2, 10,3, 3,4 H-1 α 1,79 <i>m</i> H-1 β	35,5
2	1,64-1,72 <i>m</i>	27,8
3	3,29 <i>dd</i> 11,6, 4,5 H-3 α	79,2
4	-	38,8
5	1,01 <i>dd</i> 12,6, 2,2 H-5 α	50,3
6	1,58 <i>m</i> H-6 β 1,74 <i>m</i> H-6 α	18,2
7	2,10 <i>m</i>	26,4
8	-	134,3
9	-	134,3
10	-	36,9
11	2,06 <i>m</i>	20,9
12	1,76-1,81 <i>m</i>	30,9
13	-	44,4
14	-	49,7
15	1,23 <i>ddd</i> 11,7, 9,5, 1,9 H-15 α 1,64 <i>m</i> H-15 β	30,8
16	1,37 <i>m</i> H-16 β 1,98 <i>m</i> H-16 α	28,1
17	1,54 <i>m</i> H-17 α	50,3
18	0,74 <i>s</i>	15,7
19	1,09 <i>s</i>	19,1
20	1,45 <i>m</i>	36,2
21	0,96 <i>d</i> 6,4	18,6
22	1,09-1,48 <i>m</i>	36,3
23	1,91-2,09 <i>m</i>	24,8
24	5,15 <i>td</i> 7,1, 1,3	125,2
25	-	130,9
26	1,73 <i>s</i>	25,7
27	1,65 <i>s</i>	17,6
28	1,05 <i>s</i>	27,9
29	0,86 <i>s</i>	15,4
30	0,92 <i>s</i>	24,2

III-6-13- Elucidation structurale du composé 11



Butyrospermol (11)

Ce composé triterpénique à squelette euphane, a été isolé antérieurement de l'espèce *Euphorbia broterie* [34]. Il s'agit de : eupha-7,24-diène-3-ol.

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS révèle un pic de l'ion moléculaire à m/z 426,3898 $[M]^+$ (calculé 426,3862), correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. Il présente un fragment à m/z 393 $[M-18-15]^+$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau et d'un groupement méthyle. Il montre également des fragments à m/z 410 $[M-16]^+$ et 411 $[M-15]^+$ correspondant respectivement au départ de la molécule CH_4 et du groupement CH_3 .

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3426 cm^{-1} (OH) et 1628 cm^{-1} (double liaison).

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 63) permet d'observer 30 signaux se répartissant en 8 méthyles, 9 méthylènes, 7 méthines dont 1 oxyméthine et 2 vinyliques, ainsi que 6 atomes de carbone quaternaires dont 2 hybridés sp^2 , attestant la nature triterpénique du composé.

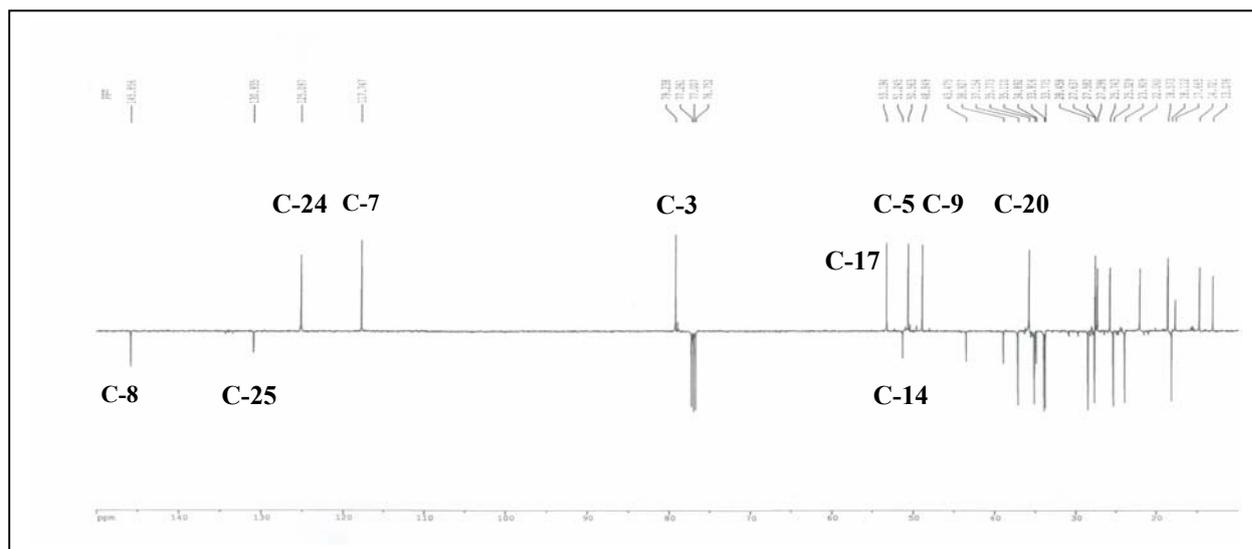


Figure 63 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé 11

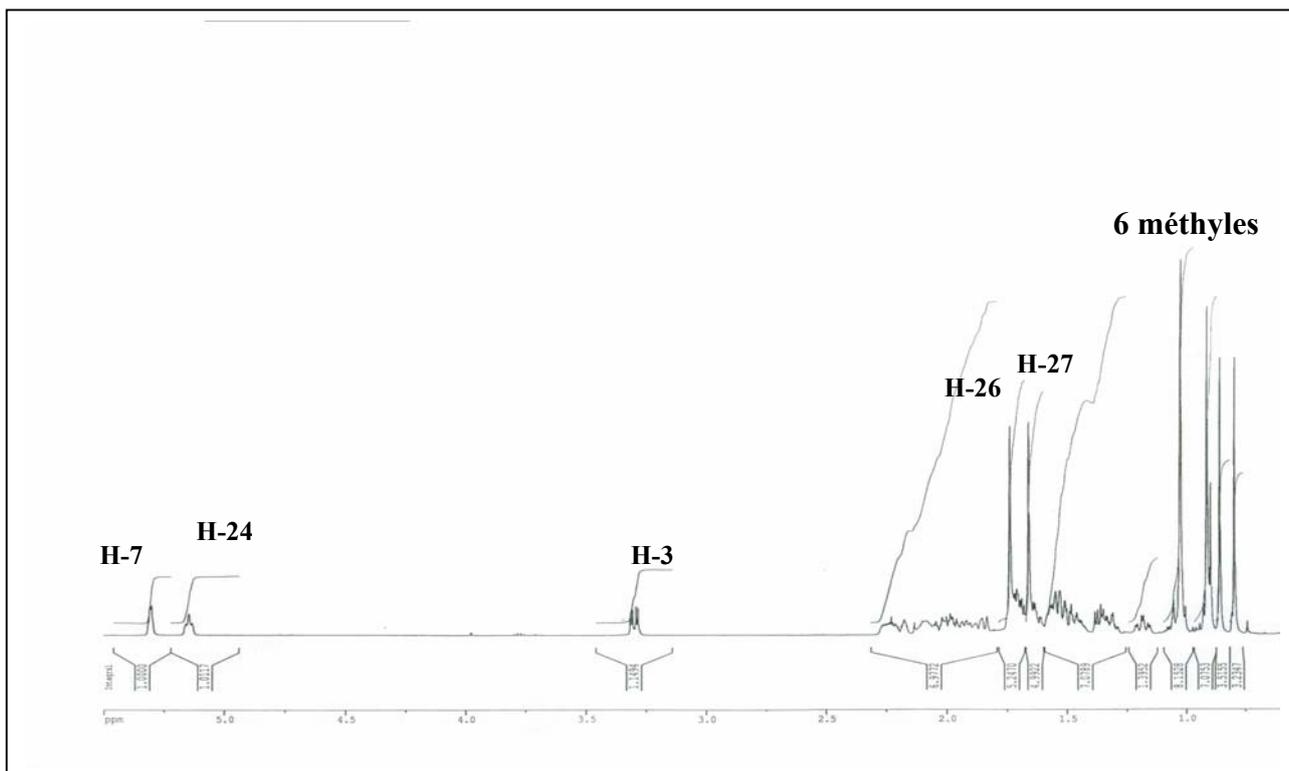


Figure 64 : Spectre RMN ^1H du composé **11**

Le spectre RMN ^1H (figure 64) montre des ressemblances avec le composé précédent, à savoir le lanostérol (**10**), notamment au niveau de la chaîne latérale et les cycles A et D. En effet, il présente les signaux des 8 méthyles dont 5 résonant sous forme de singulets Me-18, M-19, Me-28, Me-29 et Me-30 et 3 méthyles sous forme de doublets Me-21, Me-26 et M-27 ainsi qu'un signal doublet dédoublé résonant à 3,34 ppm correspondant au proton H-3 α ($J= 11,4$ et $4,1$ Hz). Il montre également deux signaux déblindés résonant à 5,14 ppm (H-24) et 5,25 ppm attribuables à 2 protons éthyléniques. Le spectre HSQC J -modulé permet d'assigner les carbones C-3 (δ_{C} 79,2), C-2 (δ_{C} 125,1), C-25 (δ_{C} 130,9) et les carbones de la deuxième double liaison à 117,7 ppm (CH) et 145,8 ppm (C $_q$). La position de cette dernière a été déterminée par analyse des spectres COSY H-H et HMBC. En effet, l'expérience HMBC (figure 65) montre des corrélations entre le carbone C-3 et les protons des groupements méthyles Me-28 (δ_{H} 1,02, s) et Me-29 (δ_{H} 0,92, s) et les protons H-1 (δ_{H} 1,18-1,73, m), H-2 (δ_{H} 1,64-1,71, m) et H-5 (δ_{H} 1,36, dd , $J= 11,9$ et $5,6$ Hz).

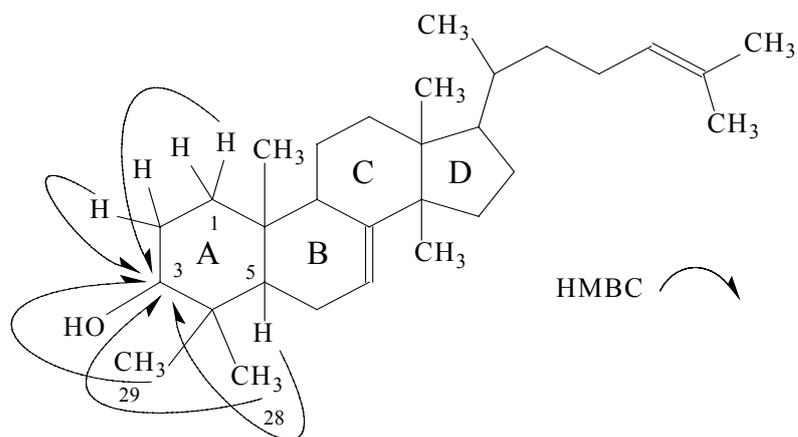
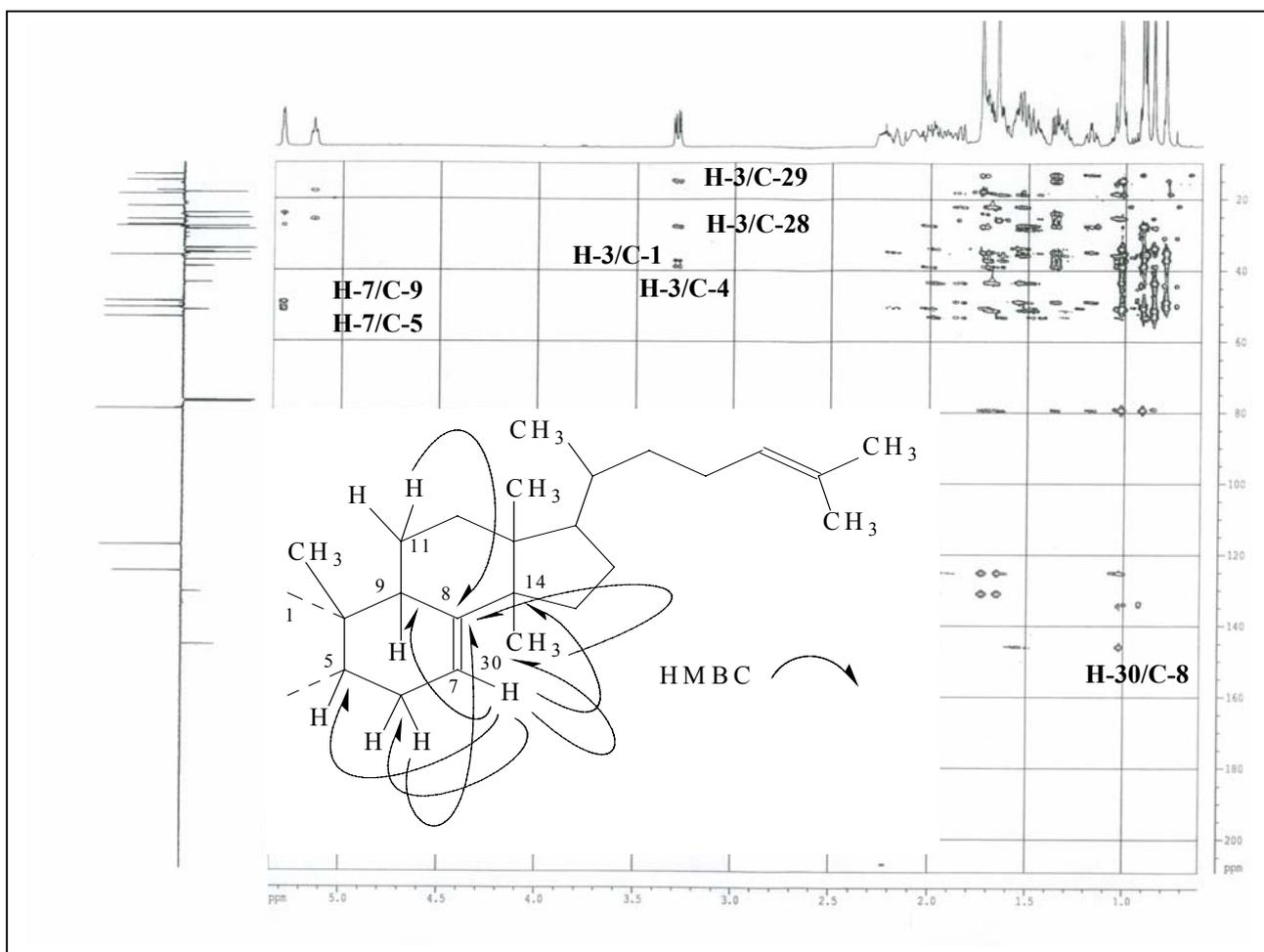


Figure 65 : Spectre HMBC du composé 11

A partir du proton H-5, l'expérience de corrélations COSY H-H (figure 66) permet de repérer un système de spin constitué de quatre protons $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CH}$, résonant à 2,01, 2,19 et 5,25 ppm, attribuables selon l'expérience HSQC *J*-modulé aux protons H-6 et H-7 respectivement. Les carbones C-5, C-6 et C-7 sont ainsi identifiés à 50,5, 23,9 et 117,7 ppm respectivement. Il en résulte que la liaison est positionnée en C-7=C-8.

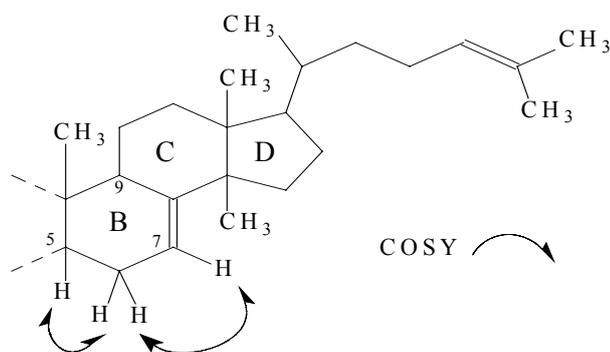


Figure 66 : Corrélations COSY H-H du composé **11**

Cette attribution est confirmée par le spectre HMBC (figure 65) qui montre des corrélations entre le proton éthylénique H-7 et les carbones C-5 et C-6 déjà attribués ainsi que les carbones C-9, C-14 et C-30. La distinction entre ces derniers est facile puisqu'il s'agit d'un CH-9 (δ_C 48,8), C_q-14 (δ_C 51,2) et CH₃-30 (δ_C 27,2). D'autres corrélations sont observées entre les protons H-6 (δ_H 2,01-2,19, *m*), H-9 (δ_H 2,25, *m*), H-11 (δ_H 1,52-1,58, *m*), Me-30 (δ_H 1,03, *s*) et le carbone éthylénique quaternaire C-8 (δ_C 145,8).

L'ensemble des spectres RMN ^1H , ^{13}C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC conduit à identifier tous les protons et carbones de la molécule (tableau 14).

Ce composé pourrait appartenir aux séries euphane ou tirucallane du fait qu'elles ne se différencient que par la configuration au niveau du carbone C-20, en l'occurrence C-20 (R) pour la série euphane [34,37] et C-20 (S) pour la série tirucallane [74,75]. L'analyse du spectre NOESY (figure 67) permet d'élucider la stéréochimie au niveau des différents centres asymétriques C-3, C-5, C-9, C-10, C-13, C-14 et C-17. Les corrélations visualisées sur le même spectre (figure 67) entre les protons du groupement Me-21 (δ_H 0,89, *d*, $J = 6,4$ Hz) et les protons H-16 (δ_H 1,32-1,98, *m*) plutôt caractéristiques de la série euphane [37,76,77], permettent donc d'assigner une configuration C-20 (R) et d'identifier par conséquent le composé en question au butyrospermol [34].

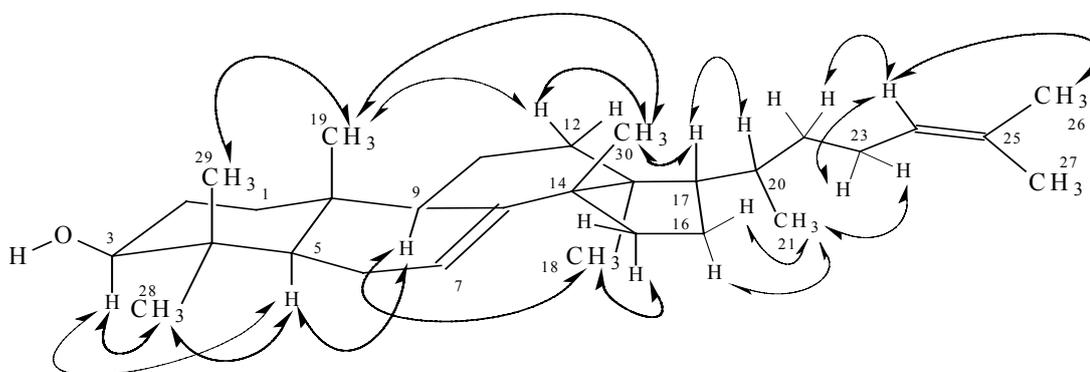


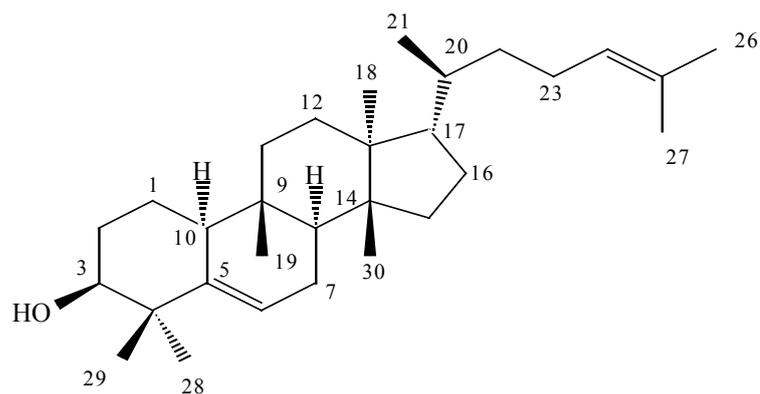
Figure 67 : Principaux effets NOE observés pour le composé **11**

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme ($[\alpha]_D = -10^\circ$, $C = 0,75$ g/100 ml) confirme bien la stéréochimie de ce composé (lit. $[\alpha]_D = -12^\circ$, $C = 1,2$ g/100 ml [34]).

Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **11** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,18 <i>td</i> 12,7, 4,3 H-1 α 1,73 <i>m</i> H-1 β	37,1
2	1,64-1,71 <i>m</i>	27,6
3	3,34 <i>dd</i> 11,4, 4,1 H-3 α	79,2
4	-	38,9
5	1,36 <i>dd</i> 11,9, 5,6 H-5 α	50,5
6	2,01-2,19 <i>m</i>	23,9
7	5,25 <i>dd</i> 6,4, 2,7	117,7
8	-	145,8
9	2,25 <i>m</i>	48,8
10	-	34,8
11	1,52-1,58 <i>m</i>	18,1
12	1,69-1,85 <i>m</i>	33,7
13	-	43,4
14	-	51,2
15	1,48-1,54 <i>m</i>	33,9
16	1,32 <i>m</i> H-16 α 1,98 <i>m</i> H-16 β	28,4
17	1,54 <i>m</i> H-17 β	53,1
18	0,85 <i>s</i>	22,1
19	0,79 <i>s</i>	13,1
20	1,45 <i>m</i>	35,7
21	0,89 <i>d</i> 6,4	18,5
22	1,04-1,63 <i>m</i>	35,1
23	1,92-2,09 <i>m</i>	25,3
24	5,14 <i>td</i> 6,8, 1,3	125,1
25	-	130,9
26	1,74 <i>s</i>	25,7
27	1,66 <i>s</i>	17,6
28	1,02 <i>s</i>	27,5
29	0,92 <i>s</i>	14,7
30	1,03 <i>s</i>	27,2

III-6-14- Elucidation structurale du composé 12



Euférol (12)

Il s'agit d'un triterpène tétracyclique à squelette tirucallane 19(10→9)*abeo*-8 α ,9 β ,10 α -tirucall-5-èn-3 β -ol, connu sous le nom Euférol. Il a été isolé précédemment d'une espèce *Euphorbia*, *E. mellifera* [35].

Le spectre de masse haute résolution enregistré par impact électronique HR-EI-MS, montre un pic de l'ion moléculaire à m/z 426,3891 [M]⁺ (calculé 426,3862), correspondant à la formule brute C₃₀H₅₀O. Il présente également un fragment à m/z 408 [M-18]⁺ correspondant à la perte d'une molécule d'eau. Des fragments à m/z 393 [M-18-15]⁺ et 313 [M-113]⁺ correspondant respectivement au départ d'une molécule d'eau et de groupements CH₃ et C₈H₁₇, sont aussi observés. Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3430 cm⁻¹ (OH) et 1632 cm⁻¹ (double liaison).

Le spectre RMN ¹H (figure 68) montre comme le composé précédent, 8 signaux résonant entre 0,86 et 1,74 ppm attribuables aux 8 méthyles d'un triterpène tétracyclique comportant une chaîne latérale avec une double liaison.

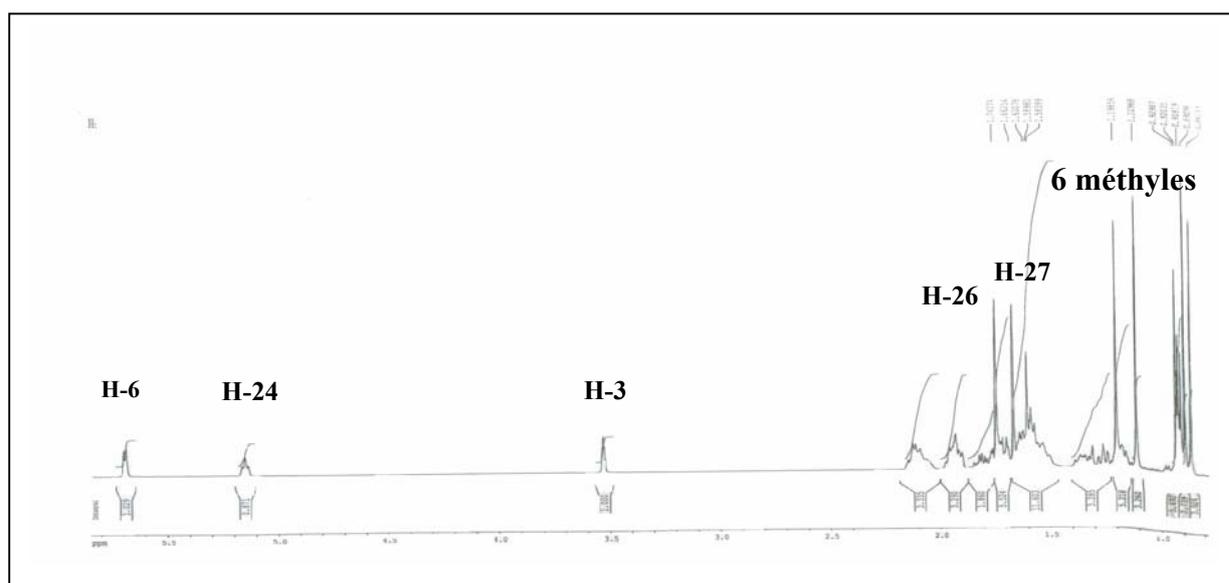


Figure 68 : Spectre RMN ¹H du composé 12

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 69) présente 30 signaux correspondant aux 8 groupements méthyles CH_3 résonant entre 15,3 et 28,9 ppm, 9 groupements méthylènes CH_2 , 7 méthines CH dont un oxyméthine CH-O (δ_{C} 76,3) et 2 groupements éthyléniques $\text{C}=\text{CH}$ (δ_{C} 121,8 et 125,1) ainsi que 6 atomes de carbone quaternaires dont 2 éthyléniques (δ_{C} 141,9 et 130,9), confirmant ainsi la nature triterpénique du composé.

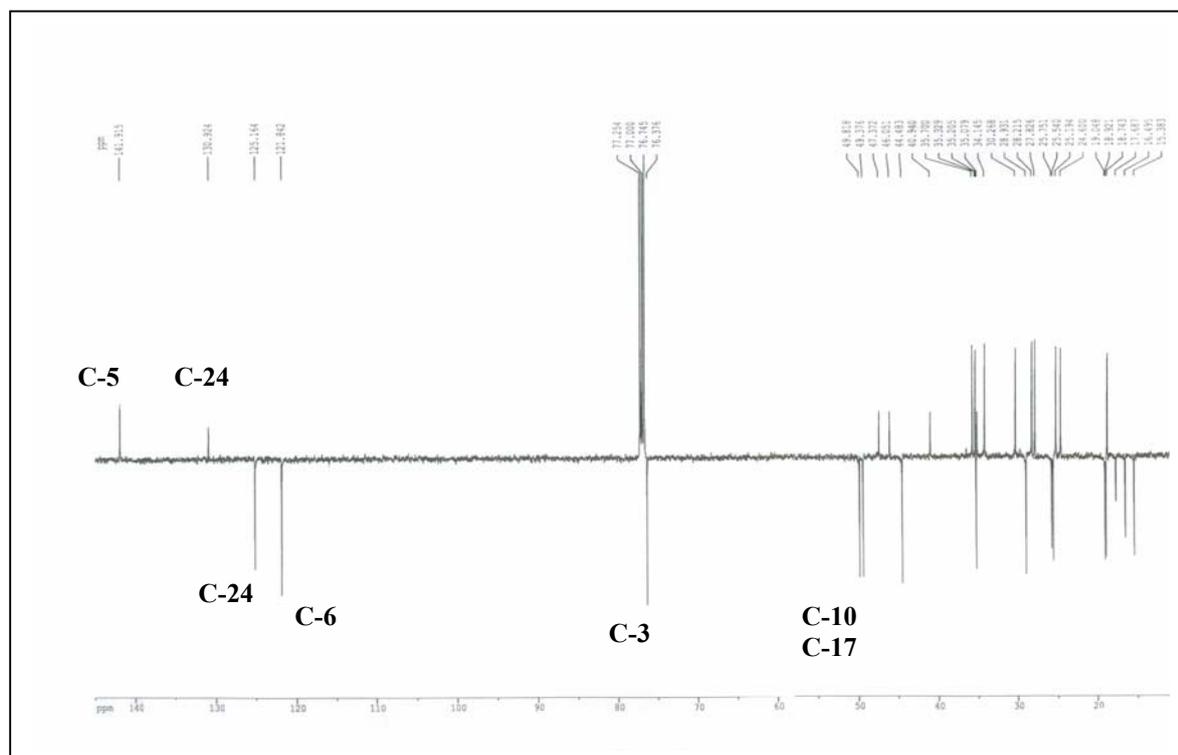


Figure 69 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **12**

L'élucidation structurale de ce composé part du proton H-3 résonant à δ_{H} 3,52 (*t*, $J = 2,7$ Hz) qui corrèle sur le spectre HMBC (figure 70) avec les carbones C-1 (δ_{C} 18,7), C-2 (δ_{C} 27,8), C-4 (δ_{C} 40,9), C-28 (δ_{C} 28,9), C-29 (δ_{C} 25,5) et un carbone éthylénique quaternaire attribuable au carbone C-5 (δ_{C} 141,9). L'expérience de corrélations COSY H-H (figure 70) montre un système de spin à 6 protons constituant l'enchaînement $^3\text{CH}-^2\text{CH}_2-^1\text{CH}_2-^{10}\text{CH}$, résonant à (δ_{H} 1,76-1,93, *m*, H-2), (δ_{H} 1,51-1,63, *m*, H-1) et (δ_{H} 2,12, *m*, H-10). Le spectre HSQC *J*-modulé permet de repérer le carbone C-10 à 49,3 ppm. Les corrélations observées sur le spectre HMBC (figure 70) entre les protons H-1 et H-10 et les protons des groupements méthyles Me-28 (δ_{H} 1,10, *s*) et Me-29 (δ_{H} 1,19, *s*) avec le carbone C-5, permettent de former le cycle A.

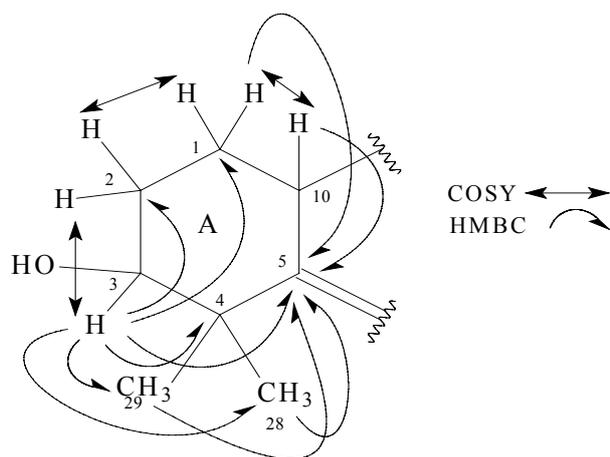


Figure 70 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **12**

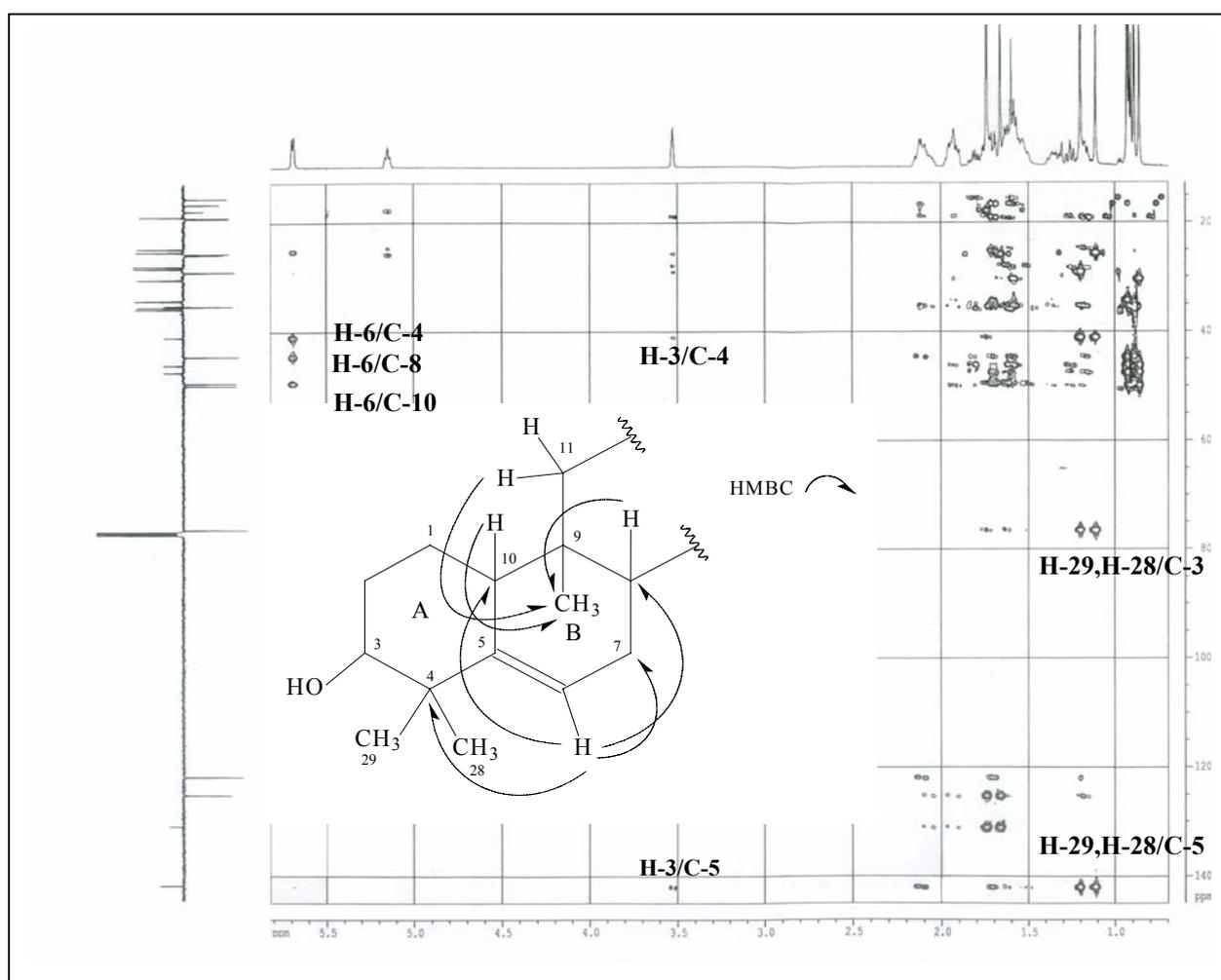


Figure 71 : Spectre HMBC du composé **12**

Le cycle B est déterminé à partir du proton H-6 résonant à 5,64 ppm sous forme de doublet ($J= 5,8$ Hz) qui corrèle en HMBC (figure 71) avec les carbones C-4, C-10 préalablement identifiés et les carbones C-7 (CH₂) et C-8 (CH) résonant respectivement à 25,2 et 44,4 ppm. Les corrélations

HMBC (figure 71) observées entre les protons H-10, H-8 (δ_H 1,71, *dd*, $J= 12,7, 4,1$ Hz), et H-11 (δ_H 1,61, *m*) avec le carbone méthylique Me-19 résonnant à 16,5 ppm, impliquent que ce groupement est attaché au carbone C-9.

L'analyse conjointe des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC aboutit à l'identification des protons et carbones non encore identifiés des cycles C et D, de même que la chaîne latérale (tableau 15).

La stéréochimie de ce composé est établie par analyse du spectre NOESY (figure 72). En effet, il montre des corrélations entre le proton H-3 α et les protons des groupements méthyles Me-28 et Me-29. Les protons du groupement Me-28 α -axial corrélient avec le proton H-10 qui à son tour, couple avec le proton H-8. Ce dernier corrélie également avec les protons du groupement méthyle Me-18 impliquant ainsi une orientation α -axiale des protons H-8, H-10 et Me-18. L'absence d'effet NOE entre le proton H-10 α et les protons Me-19, permet de placer ce groupement en position β -axiale. Les corrélations Me-19/Me-30, Me-30/H-20 traduisent une configuration β -axiale de ces protons. En conséquence, la chaîne latérale C₈H₁₅ liée au carbone C-17 est α -orientée à l'image des composés à squelette tirucallane [74,75] ou euphane [34,37]. La stéréochimie au niveau du carbone C-20 est assignée sur la base d'un effet NOE observé entre les protons du groupement méthyle Me-21 et le proton H-12 α , observé particulièrement pour les composés triterpéniques de la série tirucallane [42,74,75], d'où l'attribution d'une stéréochimie C-20 (S). Ces constatations stéréochimiques nous autorisent à identifier ce composé triterpénique à squelette tirucallane à l'Euferol [35].

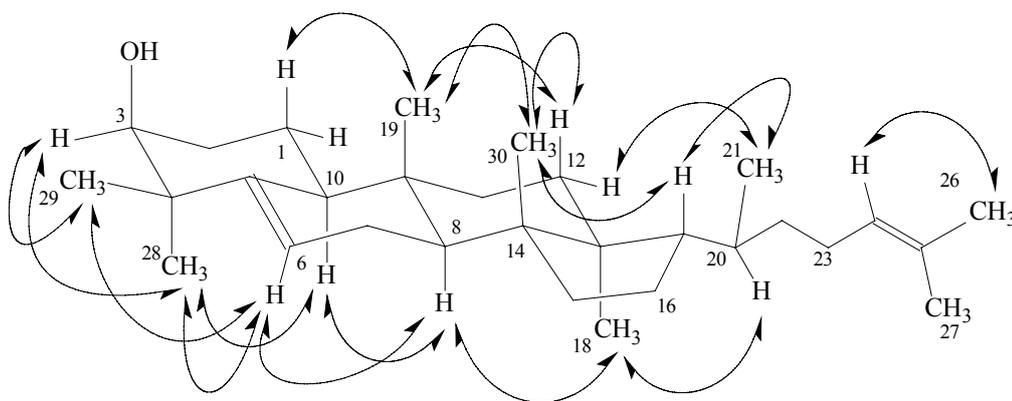


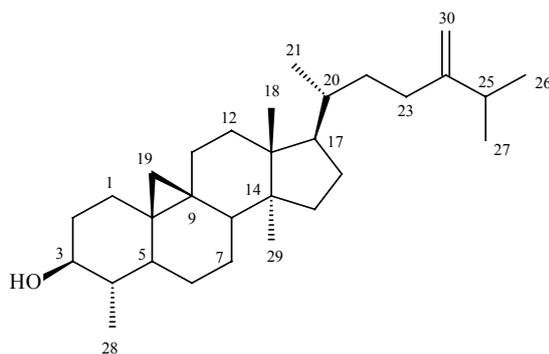
Figure 72 : Corrélations NOESY observées pour le composé **12**

La comparaison entre le pouvoir rotatoire de ce composé mesuré dans le chloroforme donnant une valeur de + 24°, C= 0,90 g/100 ml et celui trouvé dans la littérature + 25,7°, C= 1,20 g/100 ml [35], confirme bien cette identification.

Tableau 15 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **12** dans CDCl₃

Position	δ_H <i>m, J</i>	δ_C
1	1,51-1,63 <i>m</i>	18,7
2	1,76-1,93 <i>m</i>	27,8
3	3,52 <i>t</i> 2,7 H-3 α	76,3
4	-	40,9
5	-	141,9
6	5,64 <i>d</i> 5,8	121,8
7	1,72-2,13 <i>m</i>	25,2
8	1,71 <i>dd</i> 12,7, 4,1 H-8 α	44,4
9	-	35,1
10	2,12 <i>m</i> H-10 α	49,3
11	1,61 <i>m</i>	35,7
12	1,62 <i>m</i> H-12 α	30,2
	1,81 <i>td</i> 11,5, 6,4 H-12 β	
13	-	47,4
14	-	46,0
15	1,16 <i>m</i> H-15 α	34,1
	1,26 <i>td</i> 9,4, 1,9 H-15 β	
16	1,35-1,93 <i>m</i>	28,2
17	1,59 <i>m</i> H-17 β	49,8
18	0,86 <i>s</i>	15,3
19	0,89 <i>s</i>	16,5
20	1,56 <i>m</i>	35,2
21	0,91 <i>d</i> 6,1	19,0
22	1,19-1,63 <i>m</i>	35,3
23	1,95-2,07 <i>m</i>	24,6
24	5,15 <i>td</i> 7,0, 1,3	125,1
25	-	130,9
26	1,74 <i>s</i>	25,7
27	1,66 <i>s</i>	17,6
28	1,10 <i>s</i>	28,9
29	1,19 <i>s</i>	25,5
30	0,92 <i>s</i>	18,9

III-6-15- Elucidation structurale du composé 13



Cycloeucalénol (13)

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif, montre des pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 449 $[M+Na]^+$ et 465 $[M+K]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 426 uma et une formule brute $C_{30}H_{50}O$. Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3436 cm^{-1} (OH) et 1610 cm^{-1} (double liaison).

Les spectres RMN 1H et ^{13}C J -modulé (figures 73 et 74) montrent de grandes ressemblances avec le 24-méthylèncycloartanol (6) décrit précédemment. En effet, le spectre RMN du proton montre deux signaux doublets blindés à δ_H 0,01 (1H, d , $J= 4,0$ Hz, H-19 *exo*), 0,023 (1H, d , $J= 4,1$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau 9β , 19-cyclopropane d'un dérivé à squelette cycloartanol [34], deux protons éthyléniques résonant à δ_H 4,56 (*sl*, H-30a) et δ_H 4,51 (*dl*, $J= 1,3$ Hz, H-30b) attribuables au groupement méthylène exocyclique ainsi que six signaux résonant entre 0,72 et 0,88 ppm correspondant aux six méthyles.

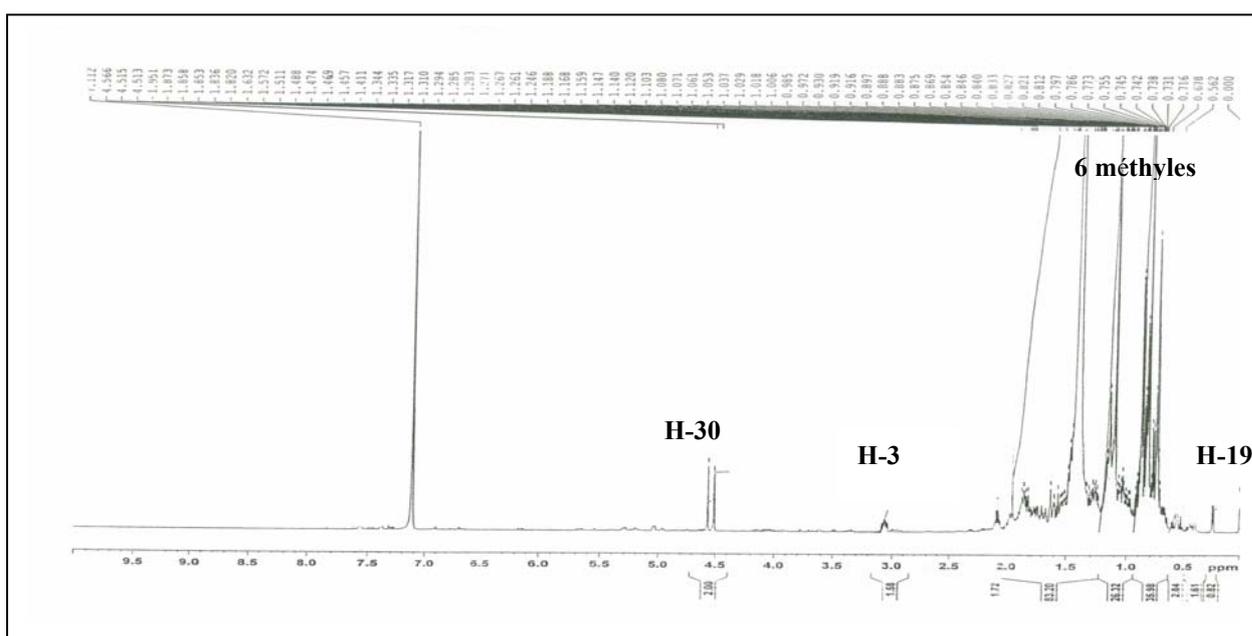


Figure 73 : Spectre RMN 1H du composé 13

L'analyse combinée des spectres RMN carbone-13 *J*-modulé (figure 74) et HSQC *J*-modulé permet de compter 30 atomes de carbone (tableau 16) se répartissant en six méthyles, douze méthylènes, six méthines, un oxyméthine et cinq atomes de carbone quaternaires, confirmant ainsi sa nature triterpénique.

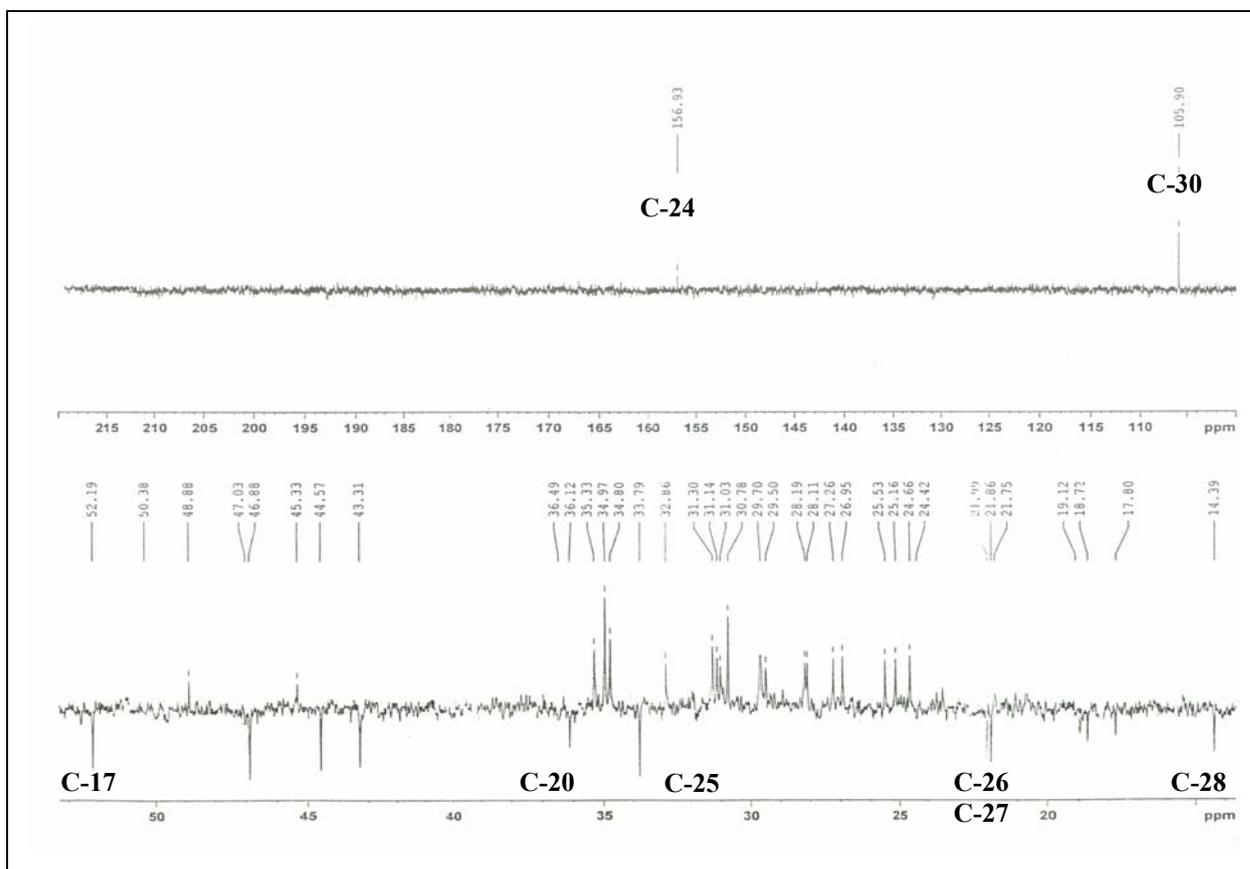


Figure 74 : Spectre RMN ¹³C *J*-modulé du composé 13

Le nombre de méthyles réduit suggère qu'il s'agit du 24-méthylèncycloartanol (**6**) amputé d'un groupement méthyle, en l'occurrence le Me-29. Ceci est déduit par expérience COSY H-H (figure 75). En effet, le proton oxyméthinique H-3 résonant à δ_H 3,05 (*td*, $J = 11,7, 5,2$ Hz, H-3 α) corrèle non seulement avec les deux protons H-2 à 1,28-1,85 ppm (2H, *m*) mais aussi avec un autre proton méthinique résonant à δ_H 1,03, ne pouvant être que le proton H-4. Ce dernier corrèle avec le proton H-5 et les protons du groupement méthyle Me-28 δ_H 0,84 (*d*, $J = 6,5$ Hz) confirmant ainsi la disparition du deuxième méthyle porté habituellement par le carbone C-4. Les valeurs des constantes de couplage du proton H-3 résonant sous forme de triplet dédoublé ($J = 11,7$ et $5,2$ Hz), traduisent des orientations α et β axiales des protons H-3 et H-4 respectivement.

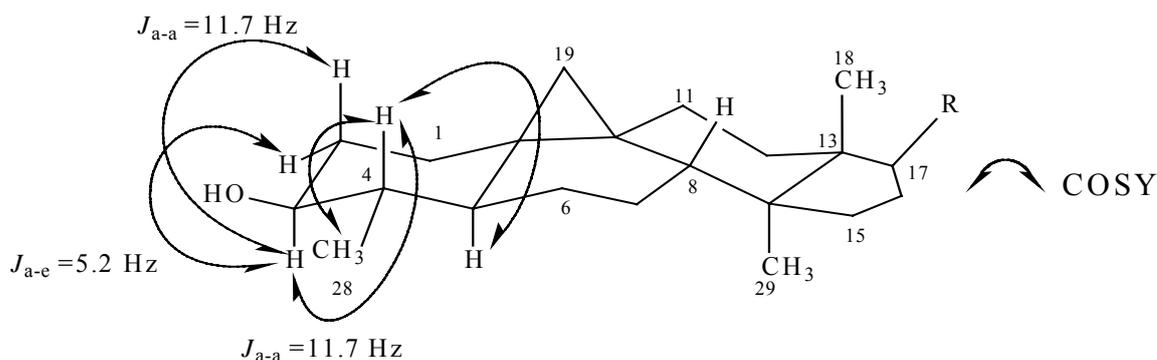


Figure 75 : Corrélations COSY H-H au niveau du cycle A du composé **13**

Le spectre HMBC montre, en plus des principaux couplages observés pour le 24-méthylèncycloartanol, des corrélations en 2J et 3J (figure 76) entre :

- les protons du groupement méthyle Me-28 et les carbones C-3 (δ_C 76,5), (CH) C-4 et C-5.
- les protons H-1 et les carbones C-3 et C-2 (δ_C 34,8).
- les protons H-2 et les carbones C-3 et C-4 (δ_C 44,6).
- le proton H-4 et les carbones C-2 et C-5 (δ_C 43,3).

L'ensemble de ces corrélations corrobore parfaitement les attributions établies.

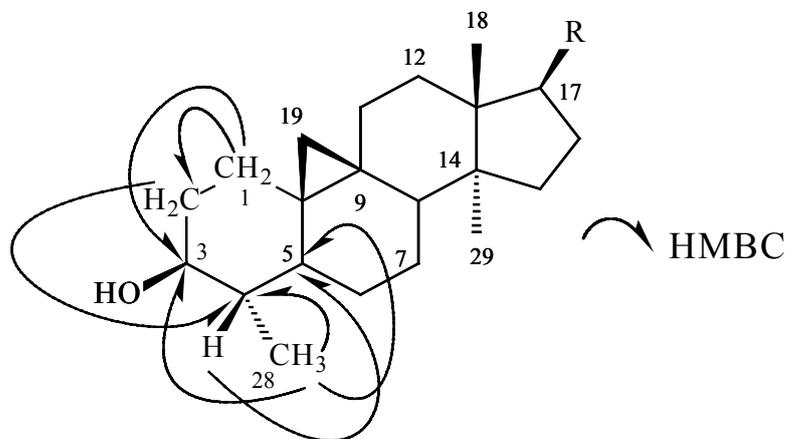


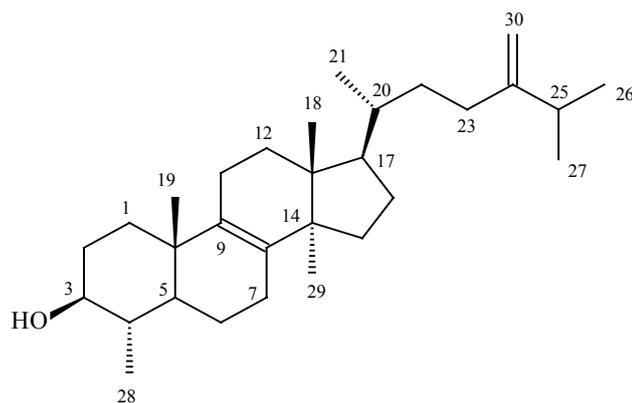
Figure 76 : Corrélations HMBC du composé **13**

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme ($[\alpha]_D = +44^\circ$, $C = 0,40$ g/100 ml), confirme la structure triterpénique attribuée à ce composé (lit. [78], $[\alpha]_D = +45^\circ$, CHCl_3) : cycloeucaalénol (**13**). Il a été isolé de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* dont *E. broterie* [34] et *E. heteradena* [70].

Tableau 16 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **13** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J</i> Hz	δ_{C}
1	1,10-1,40 <i>m</i>	30,8
2	1,28-1,85 <i>m</i>	34,8
3	3,05 <i>td</i> 11,7, 5,2 H-3 α	76,5
4	1,03 <i>m</i> H-4 β	44,6
5	1,05 <i>m</i> H-5 α	43,3
6	0,42-1,52 <i>m</i>	24,4
7	1,13-1,77 <i>m</i>	28,1
8	1,43 <i>m</i> H-8 β	46,8
9	-	23,4
10	-	29,5
11	1,86 <i>m</i>	25,5
12	1,15 <i>m</i>	35,3
13	-	45,3
14	-	48,9
15	1,48 <i>m</i>	32,9
16	1,04-1,84 <i>m</i>	26,9
17	1,45 <i>m</i>	52,2
18	0,82 <i>s</i>	17,8
19	0,01 <i>d</i> 4,0 H-19 <i>exo</i> 0,23 <i>d</i> 4,1 H-19 <i>endo</i>	27,3
20	1,26 <i>m</i>	36,1
21	0,74 <i>d</i> 6,7	18,7
22	1,01-1,41 <i>m</i>	35,0
23	1,70-1,98 <i>m</i>	31,3
24	-	156,9
25	2,08 <i>sept</i> 6,8	33,8
26	0,88 <i>d</i> 6,8	21,7
27	0,86 <i>d</i> 6,8	22,0
28	0,84 <i>d</i> 6,5	14,4
29	0,72 <i>s</i>	19,1
30	4,56 <i>sl</i> H-30a 4,51 <i>dl</i> 1,3 H-30b	105,9

III-6-16- Elucidation structurale du composé 14



Obtusifoliol (14)

Il s'agit de l'obtusifoliol, isomère du cyccoleucalénol (13), triterpène connu et identifié dans plusieurs espèces du genre *Euphorbia* dont *E. obtusifolia* [79], *E. chamaesyce* [80] et *E. broterii* [34].

Son spectre de masse ESI-MS enregistré en modes négatif et positif montre des pics d'ions quasimoléculaires $[M-H]^-$ 425, $[M+Na]^+$ 449 et $[M+K]^+$ 465, soit une masse moléculaire égale à 426 uma correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3438 cm^{-1} (OH) et 1614 cm^{-1} (double liaison)

Le spectre RMN carbone-13 *J*-modulé (figure 77) permet de compter 30 atomes de carbones (tableau 17) constitués de sept méthyles, onze méthylènes, cinq méthines, un oxyméthine et six atomes de carbone quaternaires dont trois éthyléniques.

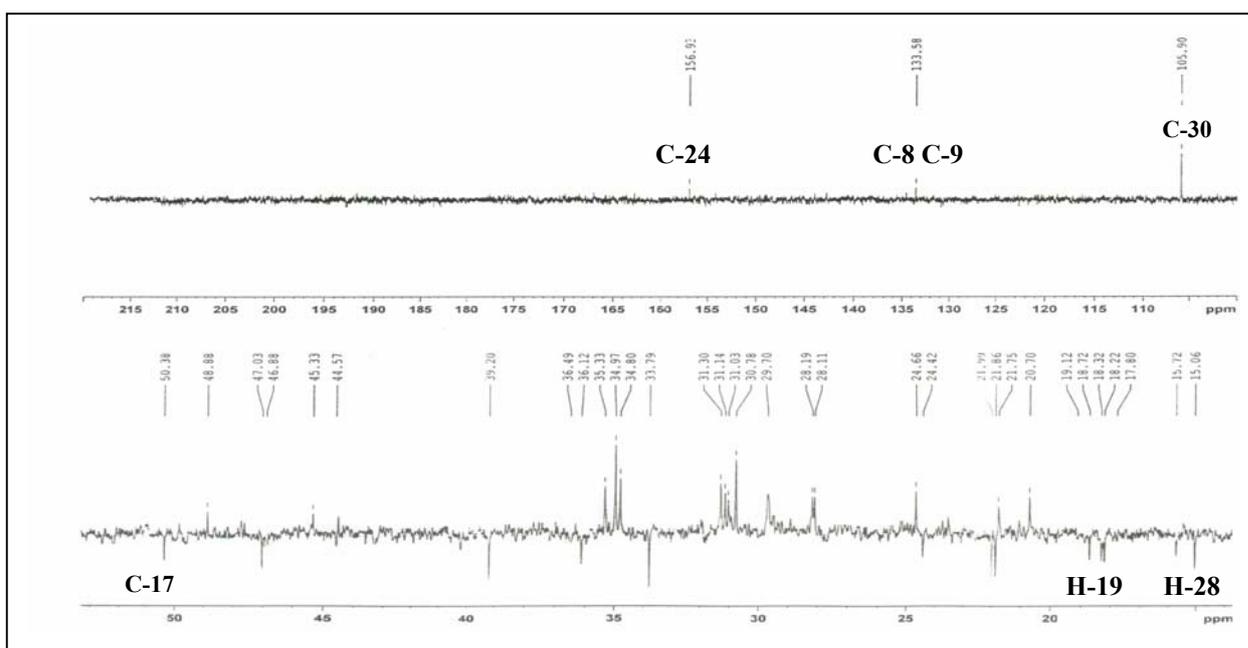


Figure 77 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé 14

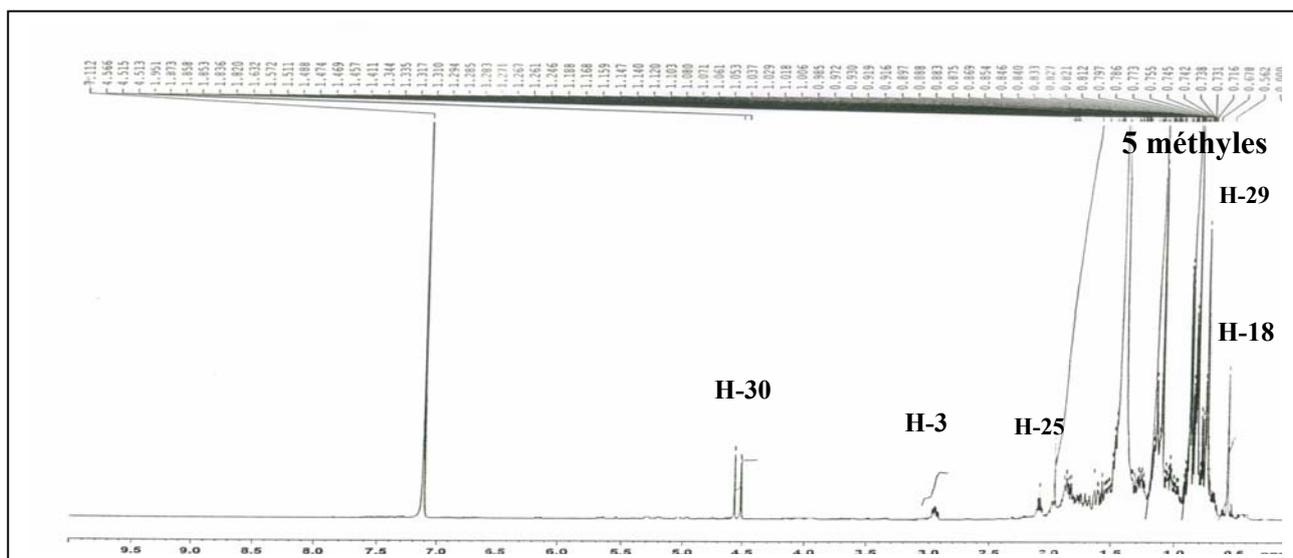


Figure 78 : Spectre RMN ^1H du composé **14**

Le spectre RMN ^1H (figure 78) présente des similitudes avec celui du composé précédent. Il permet de reconnaître quasiment tous les signaux de protons du cycloeucalénol. La différence réside en la disparition des signaux blindés des deux protons non équivalents du groupement méthylène CH_2 -19 du noyau cyclopropane et l'apparition d'un signal singulet correspondant à un groupement méthyle. Ce qui laisse supposer a priori l'ouverture du cycle $9\beta,19$ -cyclopropane et la formation d'un groupement méthyle résonant à 0,83 ppm attribuable au Me-19 [119]. Ce dernier corrèle en 3J sur le spectre HMBC (figure 79) avec les carbones C-1 (δ_{C} 35,3), C-5 (δ_{C} 35,3) et un carbone éthylénique quaternaire résonant à 134,4 ppm ne pouvant être que le carbone C-9. L'autre atome de carbone quaternaire éthylénique est attribué le plus logiquement au carbone C-8 (δ_{C} 133,6) du fait de sa corrélation en 3J avec les protons du groupement méthyle Me-29. Ces derniers corrélant aussi avec deux carbones quaternaires C-13 et C-14 et un carbone secondaire C-15 résonant respectivement à 44,6, 48,9 et 30,8 ppm. Cette expérience montre également des corrélations entre les protons du groupement méthyle α -équatorial Me-28 et le carbone C-5 identifié et les carbones C-3 (δ_{C} 76,5) et C-4 (δ_{C} 39,2).

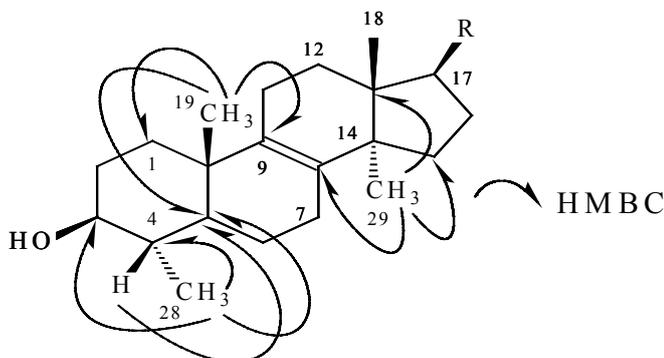


Figure 79 : Corrélations HMBC du composé **14**

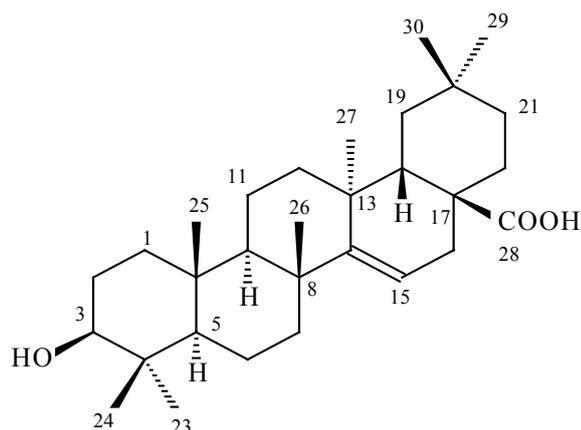
Les expériences HSQC *J*-modulé, COSY H-H et HMBC combinées, permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (tableau 17) et d'attribuer sans ambiguïté à ce composé, la structure triterpénique suivante : obtusifoliol (**14**).

La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = +70^\circ$, $C = 0,75$ g/100 ml) mesurée dans le chloroforme (lit. [34], $+73^\circ$, $C = 1$ g/100 ml, CHCl_3), confirme bien qu'il s'agit de l'obtusifoliol (**14**).

Tableau 17 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **14** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,14 <i>m</i>	35,3
2	1,04-1,39 <i>m</i>	31,0
3	2,96 <i>td</i> 11,4, 5,3 H-3 α	76,5
4	1,16 <i>m</i> H-4 β	39,2
5	0,81 <i>m</i> H-5 α	47,0
6	1,09-1,60 <i>m</i>	20,7
7	1,10-1,77 <i>m</i>	28,2
8	-	133,6
9	-	134,4
10	-	36,5
11	1,84-1,91 <i>m</i>	21,7
12	1,51 <i>m</i>	24,7
13	-	44,6
14	-	48,9
15	1,57-1,69 <i>m</i>	30,8
16	1,41-1,98 <i>m</i>	31,1
17	1,36 <i>m</i>	50,4
18	0,56 <i>s</i>	15,7
19	0,83 <i>s</i>	18,7
20	1,25 <i>m</i>	36,1
21	0,78 <i>d</i> 6,5	18,2
22	0,98-1,41 <i>m</i>	34,8
23	1,68-1,98 <i>m</i>	31,3
24	-	156,9
25	2,08 <i>sept</i> 6,8	33,8
26	0,88 <i>d</i> 6,7	21,9
27	0,86 <i>d</i> 6,8	22,0
28	0,84 <i>d</i> 6,2	15,0
29	0,73 <i>s</i>	24,4
30	4,56 <i>sl</i> H-30a	105,9
	4,51 <i>dl</i> 1,2 H-30b	

III-6-17- Elucidation structurale du composé 15



Acide 3 β -hydroxytaraxer-14-èn-28-oïque (**15**)

Le composé **15** est l'acide 3 β -hydroxytaraxer-14-èn-28-oïque nommé acide aleuritolique. Cet acide a été isolé antérieurement d'une plante de la famille Euphorbiaceae, *Maprounea africana* [79,80].

Le spectre de masse obtenu par électronébulisation ESI-MS donne en mode négatif deux ions pseudomoléculaires $[M-H]^-$ et $[2M-H]^-$ à m/z 455 et 911 respectivement, et en mode positif un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 479, soit une masse moléculaire $M = 456$ correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{48}O_3$.

L'analyse du spectre RMH 1H (figure 80) montre dans la région blindée allant de 0,78 à 0,95 ppm, sept fins singulets correspondant aux sept méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonant à δ_H 0,95 (H-23), 0,78 (H-24), 0,90 (H-25), 0,94 (H-26), 0,91 (H-27), 0,92 (H-29), 0,89 (H-30). Un massif de protons résonant entre 0,75 et 1,95 ppm et correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles est également observé. D'autres signaux sont enregistrés à δ_H 3,16 (1H, *dd*, $J = 11,2, 4,6$ Hz, H-3 α), 0,74 (1H, *dd*, $J = 12,3, 2,1$ Hz, H-5 α) et 2,25 (1H, *dd*, $J = 13,0, 3,3$ Hz, H-18 β). Les grandes valeurs des constantes de couplage de tous ces protons impliquent qu'ils sont tous axiaux. Le spectre RMH 1H présente également un signal déblindé sous forme de doublet dédoublé à δ_H 5,52 ($J = 8,0, 3,4$ Hz) attribuable à un proton éthylénique. Partant de ce dernier, l'expérience HSQC J -modulé permet de déterminer le déplacement chimique de son carbone résonant à 116,5 ppm. Le deuxième carbone éthylénique quaternaire résonne à 160,8 ppm. Les valeurs de leurs déplacements chimiques sont caractéristiques de triterpènes pentacycliques à squelette taraxerane avec une double liaison localisée en position $C_{14}=C_{15}$ [81-83].

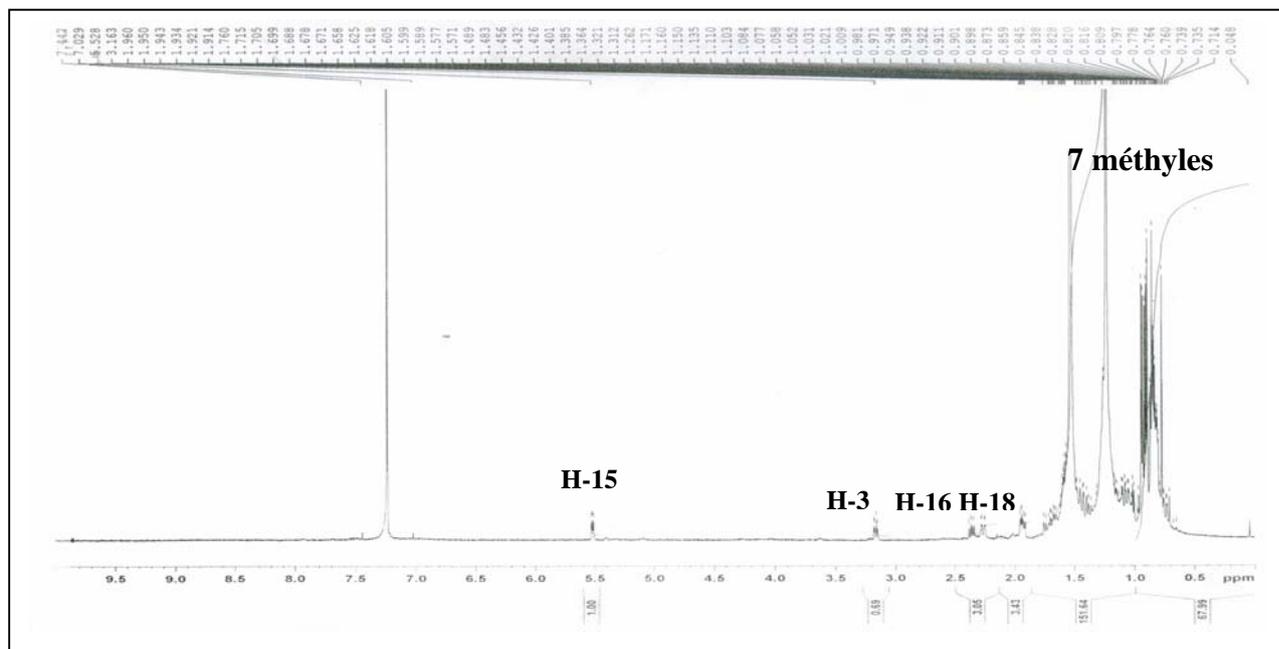


Figure 80 : Spectre RMN ^1H du composé **15**

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 81) montre des signaux correspondant à sept méthyles, dix méthylènes, cinq méthines et huit atomes de carbone quaternaires, soit au total 30 atomes de carbone, confirmant ainsi la nature triterpénique du composé.

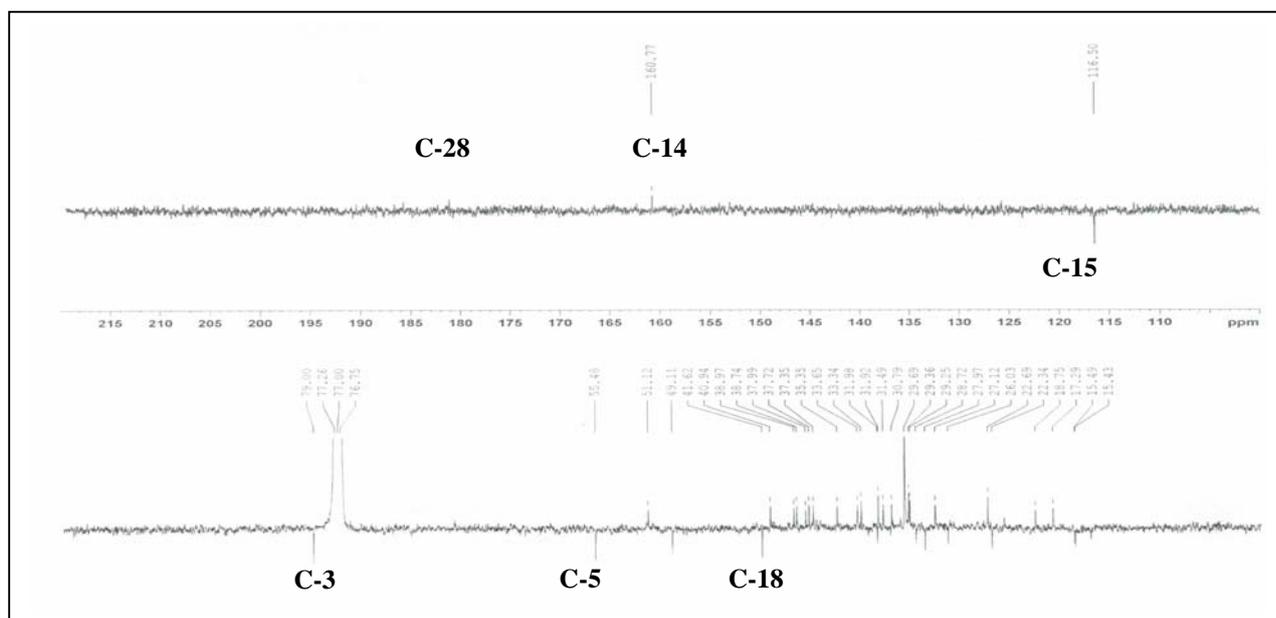


Figure 81 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **15**

A partir des protons caractéristiques individualisés et identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H permet d'identifier la plupart des protons non analysables directement sur le spectre RMN ^1H . L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{\text{H-C}}$ visualisés sur le spectre HSQC *J*-modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent (tableau 18).

L'analyse HMBC (figure 82) permet d'attribuer les méthyles ainsi que les autres carbones du composé. Dans cette expérience, les protons méthyliques corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. On reconnaît ainsi les corrélations entre :

- les protons H-23 et H-24 et le carbone C-3 connu ainsi que les carbones C-4 et C-5.
- les protons H-25 et les carbones C-1, C-5, C-9 de même que le carbone quaternaire C-10.
- les protons H-26 et les carbones C-8, C-9 ainsi que le carbone éthylénique quaternaire C-14 résonnant à 160,8 ppm, confirmant ainsi la double liaison en C₁₄=C₁₅.
- les protons H-27 et les carbones C-12, C-13, C-14 et C-18.
- les protons des groupements méthyles Me-29 et Me-30 corréleront avec les carbones C-19 et C-20 et C-21.

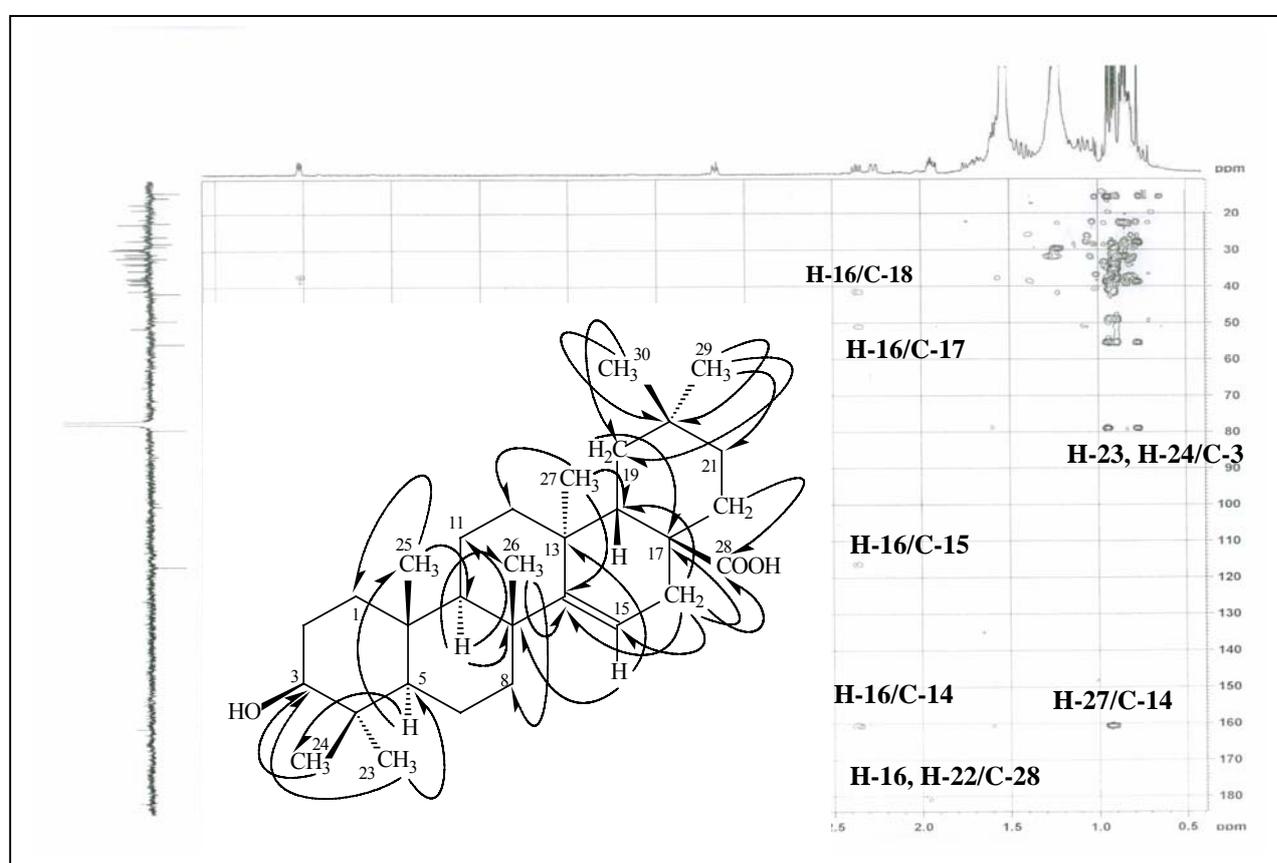


Figure 82 : Importantes corrélations HMBC observées pour le composé **15**

Le déplacement chimique de 180,0 ppm observé sur le spectre HSQC *J*-modulé est attribué au carbone C-28 de la fonction COOH, connue biogénétiquement comme le fruit d'une oxydation de CH₃-28 [13,47,48]. Ce groupement induit un effet de déblindage sur le carbone C-17 résonnant ainsi à δ_C 51,1. Ce dernier corréle avec les protons H-16. Les protons H-22 couplent quant à eux en 3J avec le carbone C-28.

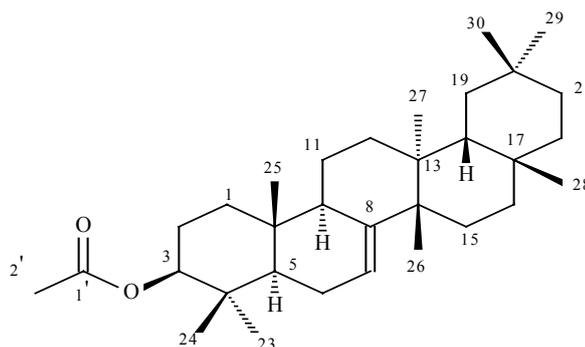
La mesure du pouvoir rotatoire de ce composé dans le chloroforme donnant une valeur égale à +13° (C= 0,36 g/100 ml), en parfait accord avec celle donnée dans la littérature (+12,8°, C=0,40 g/100 ml [81]), permet de confirmer la stéréochimie H-3 α , H-5 α , H-9 α , H-18 β , Me-25 β , Me-26 β , Me-27 α , COOH-28 β .

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer sans équivoque pour ce composé la structure suivante : acide 3 β -hydroxytaraxer-14-èn-28-oïque (**15**).

Tableau 18 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **15** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,23-1,59 <i>m</i>	37,7
2	1,24-1,27 <i>m</i>	22,7
3	3,16 <i>dd</i> 11,2, 4,6 H-3 α	79,0
4	-	38,9
5	0,74 <i>dd</i> 12,3, 2,1 H-5 α	55,5
6	1,41 <i>m</i>	18,7
7	1,61-1,74 <i>m</i>	33,3
8	-	38,7
9	1,39 <i>dl</i> 10,1 H-9 α	49,1
10	-	38,0
11	1,48-1,52 <i>m</i>	17,3
12	1,42-1,69 <i>m</i>	30,8
13	-	37,3
14	-	160,8
15	5,52 <i>dd</i> 8,0, 3,4	116,5
16	1,93 <i>dd</i> 14,3, 3,4 H-16 β 2,38 <i>dd</i> 14,4, 7,9 H-16 α	31,5
17	-	51,1
18	2,26 <i>dd</i> 13,0, 3,3 H-18 β	41,6
19	1,08-1,20 <i>m</i>	35,3
20	-	29,2
21	1,22-1,95 <i>m</i>	27,1
22	1,26-1,95 <i>m</i>	40,9
23	0,95 <i>s</i>	27,9
24	0,78 <i>s</i>	15,5
25	0,90 <i>s</i>	15,4
26	0,94 <i>s</i>	26,0
27	0,91 <i>s</i>	28,7
28	-	180,0
29	0,92 <i>s</i>	31,9
30	0,89 <i>s</i>	22,3

III-6-18- Elucidation structurale du composé 16



Multiflorenyl acétate (**16**)

Il s'agit d'un triterpène pentacyclique acylé à squelette multiflorane appelé également 3-acétoxymultiflor-7-ène. Il a été isolé précédemment de *Polypodium niponicum* [84].

Sa formule brute $C_{32}H_{52}O_2$ a été déduite du spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif. Il montre un pic d'ion quasimoléculaire à m/z 491 identifiable à $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 468 uma. Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 1733 et 1240 cm^{-1} caractéristiques de la fonction ester.

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 83) du produit **16** montre dans la région blindée, 8 signaux entre 16,0 et 34,1 ppm correspondant aux huit méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique et dans la région déblindée, trois signaux résonant à 117,5, 147,6 et 171,0 ppm attribuables respectivement à un carbone éthylénique (CH) et deux carbones quaternaires.

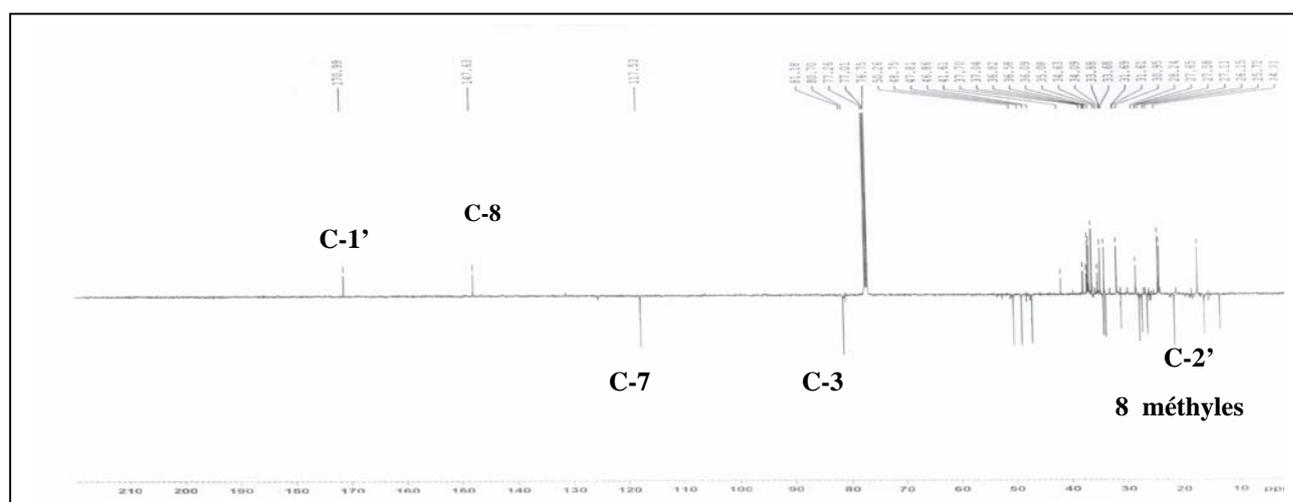


Figure 83 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **16**

Le spectre RMN 1H (figure 84) présente à champ fort huit signaux singulets fins attribuables aux groupements méthyles résonant à δ_H 0,79 (3H, s, H-23), 0,87 (3H, s, H-24), 0,69 (3H, s, H-25),

1,01 (3H, *s*, H-26), 1,02 (3H, *s*, H-27), 0,99 (3H, *s*, H-28), 0,90 (3H, *s*, H-29), 0,91 (3H, *s*, H-30) et un massif de protons résonant entre 0,75 à 1,95 ppm correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles. Il montre aussi à champ faible, deux signaux résonant sous forme de doublet dédoublé chacun à 4,45 et 5,40 ppm, correspondant respectivement à un proton oxyméthine (H-3) et un proton éthylénique. La valeur du déplacement chimique de H-3 suggère une acylation au niveau du carbone C-3, plus précisément par un groupement CH₃CO au regard d'un signal singulet d'intégration 3H résonant à 1,98 ppm. L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'identifier les carbones qui les portent. Ils résonnent respectivement à 81,2 (C-3) et 117,5 ppm. La multiplicité de H-3 (*dd*, *J*= 11,3, 4,3 Hz) implique qu'il est α -axial.

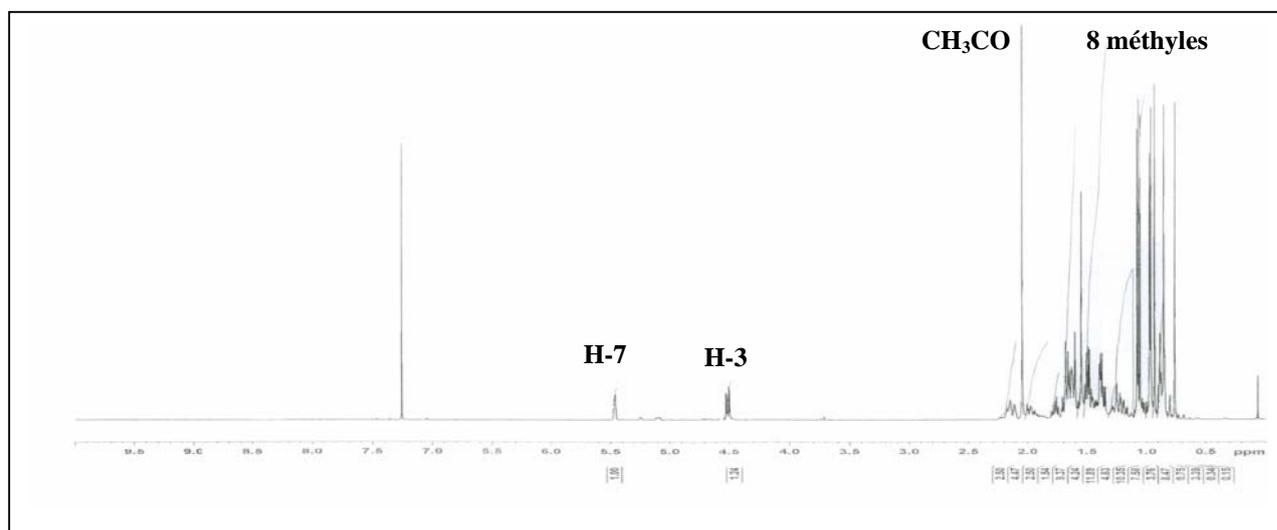


Figure 84 : Spectre RMN ¹H du composé **16**

L'élucidation structurale du composé en question est initiée à partir du carbone connu C-3. Ce dernier présente en HMBC (figure 85), des corrélations avec les protons H-1 (δ_H 1,13-1,63), H-2 (δ_H 1,55-1,60), H-5 (δ_H 1,30), les protons des groupements méthyles Me-23 (δ_H 0,79) et Me-24 (δ_H 0,87) ainsi qu'avec les protons du groupement acétoxy CH₃COO résonant à 1,98 ppm lié au carbone C-3. Le proton H-3 corrèle avec les carbones C-2 (δ_C 24,2), C-4 (δ_C 37,7), C-23 (δ_C 27,6), C-24 (δ_C 16,0) et un carbone quaternaire fortement déblindé résonant à 171,0 ppm attribuable au carbonyle du groupement acyle Me-CO. L'expérience de corrélation COSY H-H montre les couplages entre le proton H-5 et les protons H-6 (δ_H 1,91-2,06). Ces derniers corrélient à leur tour avec un proton déblindé résonant à 5,40 ppm qui ne peut être que le proton éthylénique H-7 porté par le carbone C-7 résonant à 117,5 ppm d'après le spectre HSQC *J*-modulé. Le deuxième carbone éthylénique C-8 est repéré à 147,6 ppm en vertu de sa corrélation HMBC (figure 85) avec les protons du groupement méthyle Me-26. Ces derniers corrélient avec les deux carbones quaternaires C-13 et C-14 ainsi qu'un carbone méthylénique C-15 résonant respectivement à 37,0, 41,6 et 31,7

ppm. La double liaison se trouve ainsi localisée en $C_7=C_8$, suggérant en conséquence qu'on est en présence d'un triterpène pentacyclique à squelette multiflorane [84,85].

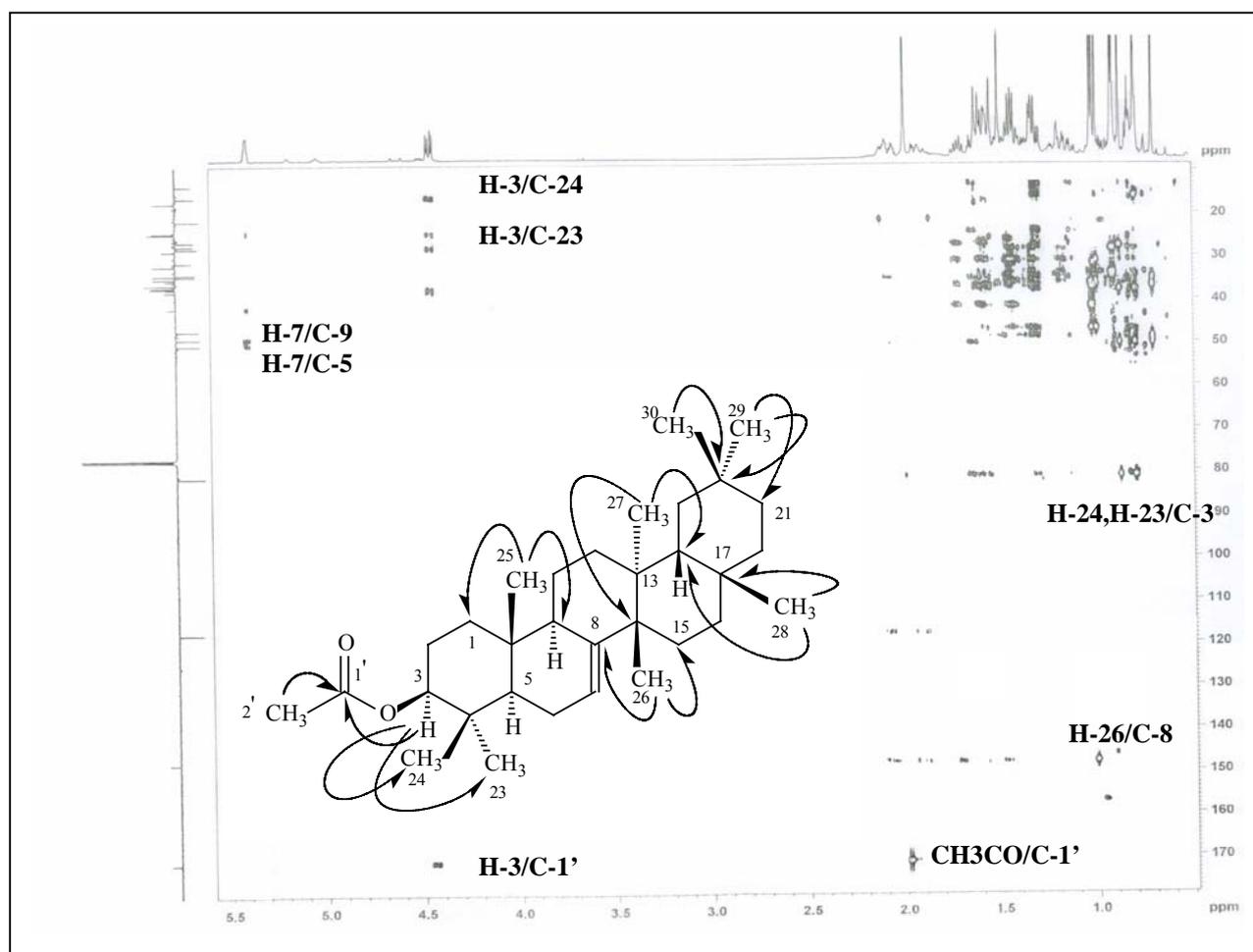


Figure 85 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **16**

La stéréochimie relative de ce composé a été établie par analyse du spectre NOESY (figure 86). En effet, il présente les corrélations $H-3\alpha/H-5\alpha$, $H-5\alpha/Me-23$, $Me-23/H-3\alpha$, $Me-27/H-9\alpha$, $Me-27/Me-29$. Il montre également sur la face β , les corrélations $Me-24/Me-25$, $Me-25/Me-26$, $Me-26/H-7$, $Me-28/H-18\beta$ et $Me-28/Me-30$. La valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = 0^\circ$, $C = 0,38$ g/100 ml $CHCl_3$, (lit [85], $[\alpha]_D = 0^\circ$, $CHCl_3$), confirme la stéréochimie de ce composé.

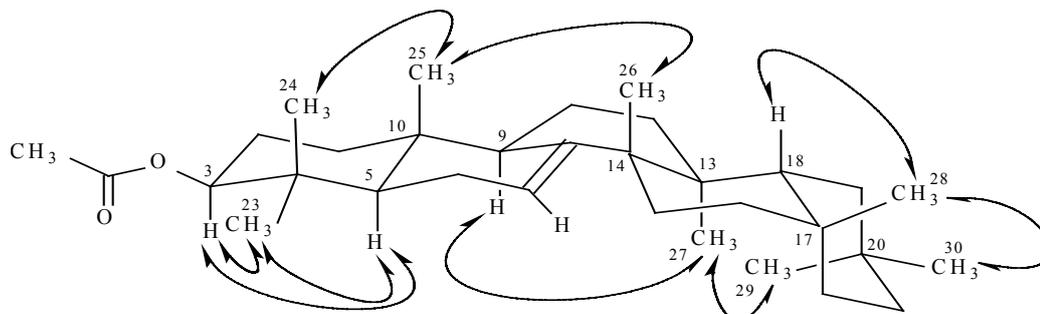


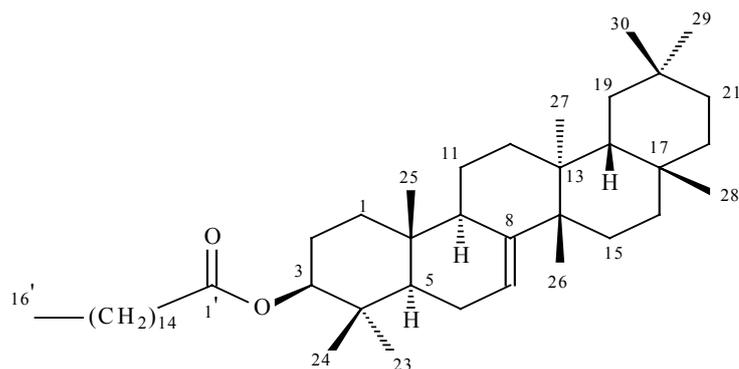
Figure 86 : Importantes corrélations NOESY observées pour le composé **16**

L'ensemble des données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C J -modulé, COSY H-H, HSQC J -modulé, HMBC et NOESY conduit sans ambiguïté au multiflorenyl acétate [84].

Tableau 19 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **16** dans CDCl_3

Position	δ_{H} m J Hz	δ_{C}
1	1,13 <i>td</i> 13,5, 4,5 H-1 α 1,63 <i>m</i> H-1 β	36,8
2	1,55-1,60 <i>m</i>	24,2
3	4,45 <i>dd</i> 11,3, 4,3 H-3 α	81,2
4	-	37,7
5	1,30 <i>dd</i> 12,7, 5,6 H-5 α	50,3
6	1,91-2,06 <i>m</i>	24,0
7	5,40 <i>dd</i> 6,9, 2,6	117,5
8	-	147,6
9	2,10 <i>m</i> H-9 α	48,7
10	-	35,1
11	1,37-1,48 <i>m</i>	17,1
12	1,31-1,57 <i>m</i>	36,1
13	-	37,0
14	-	41,6
15	1,59 <i>m</i> H-15 α 1,71 <i>td</i> 13,9, 6,8 H-15 β	31,7
16	1,43 <i>m</i>	36,6
17	-	30,8
18	1,43 <i>t</i> 7,0 H-18 β	46,9
19	1,31 <i>m</i>	34,6
20	-	28,2
21	1,16 <i>dm</i> 14,3 H-21 α 1,42 <i>dd</i> 14,3, 7,8 H-21 β	33,9
22	0,81-1,58 <i>m</i>	36,1
23	0,79 <i>s</i>	27,6
24	0,87 <i>s</i>	16,0
25	0,69 <i>s</i>	13,2
26	1,01 <i>s</i>	27,1
27	1,02 <i>s</i>	26,2
28	0,99 <i>s</i>	30,9
29	0,90 <i>s</i>	34,1
30	0,91 <i>s</i>	33,7
1'	-	171,0
2'	1,98 <i>s</i>	21,3

III-6-19- Elucidation structurale du composé 17



Multiflorenyl palmitate (**17**)

La formule moléculaire brute $C_{46}H_{80}O_2$ du composé **17** a été déduite à partir du spectre de masse par électrobulbation ESI-MS enregistré en mode positif. Il montre en effet des pics d'ions quasimoléculaires à m/z 687 et 703 identifiables respectivement à $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$, correspondant à une masse moléculaire égale à 664 uma. Il présente également un fragment à 413 $[(M+Na)-426+H_2O]^+$ correspondant à la perte de la génine multiflor-7-èn-3-ol.

Outre les signaux correspondant à la génine multiflorane [84,85], le spectre RMN ^{13}C présente des signaux attribuables à la chaîne de l'acide gras saturé et résonant à δ_C 173,7 (C-1'), 34,8 (C-2'), 25,1 (C-3'), 22,7, 29,1-29,7, 31,9 (C-4' à C-15') et 13,2 (C-16'). L'analyse combinée des spectres RMN 1H et HSQC J -modulé montrent en plus des signaux du noyau multiflorane, des protons résonant à δ_H 2,36 (2H, t , $J=7,0$ Hz, H-2'), 1,63 (2H, m , H-3'), 1,30-1,35 (24H, m , H-4' à H-15') et 0,93 (3H, t , $J=6,8$ Hz, H-16') caractéristiques du groupement palmitoylé (tableau 20).

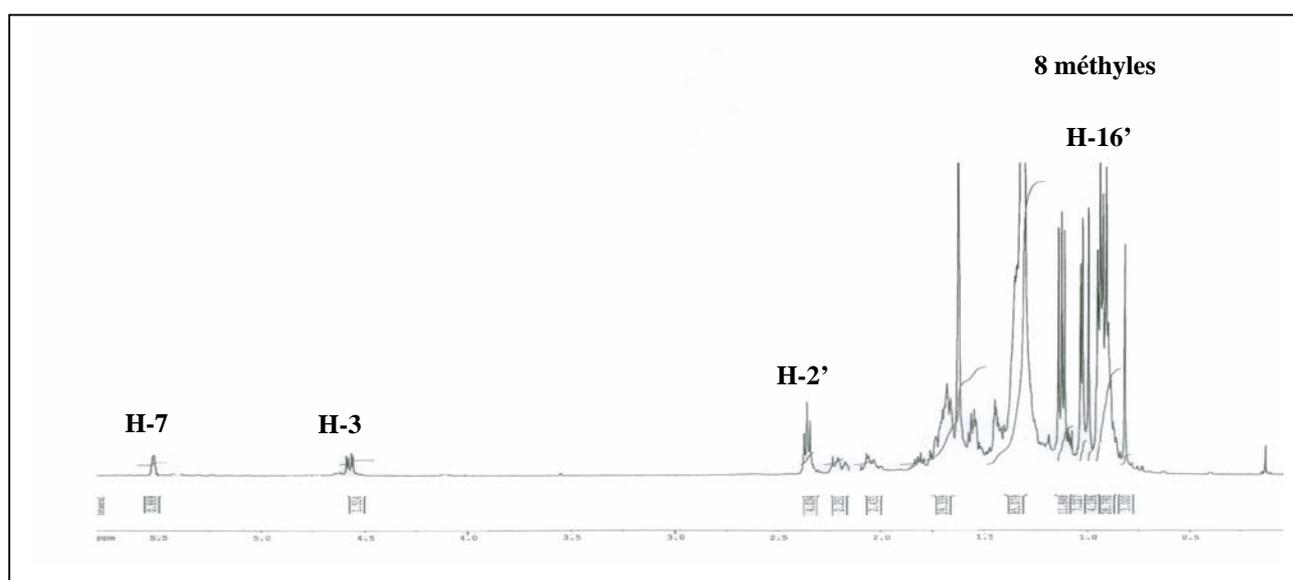


Figure 87 : Spectre RMN 1H du composé **17**

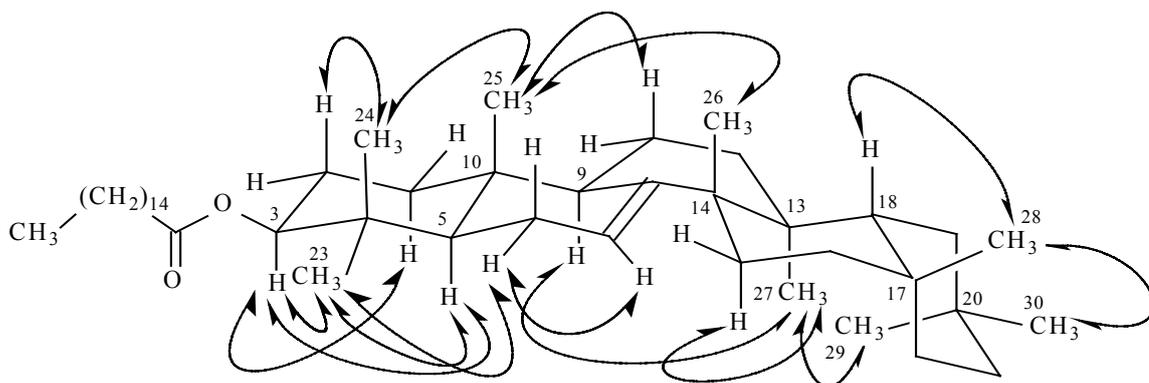


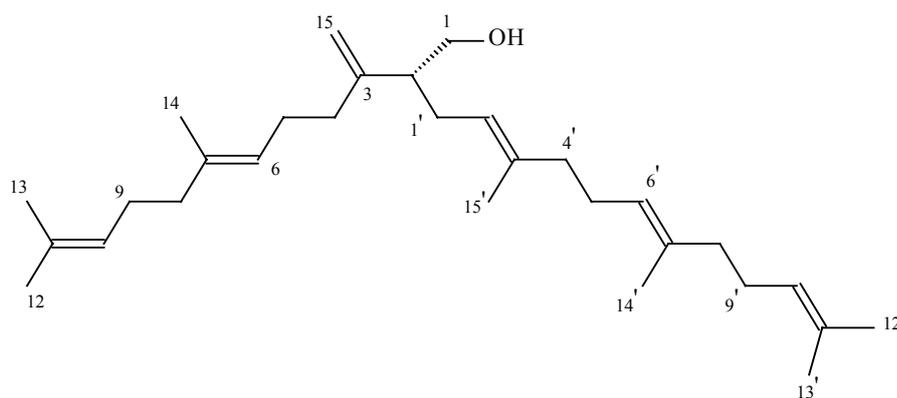
Figure 89 : Principaux effets NOESY observés pour le composé **17**

L'analyse RMN ^1H , ^{13}C J -modulé, COSY H-H, HSQC J -modulé, HMBC et NOESY permet d'identifier le composé **17** au multiflorenyl palmitate, connu également sous le nom de palmitoyle multiflor-7-ène, et isolé antérieurement des fruits et des feuilles de *Tabernaemontana longipes* Donn. Smith. [86].

Tableau 20 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **17** dans CDCl_3

Position	δ_{H} m J Hz	δ_{C}	Position	δ_{H} m J Hz	δ_{C}
1	1,25-1,75 m	36,7	19	1,45 m	34,5
2	1,67-1,72 m	24,2	20	-	28,2
3	4,58 dd 11,4, 4,4 H-3 α	80,8	21	1,28-1,54 m	33,8
4	-	37,6	22	0,94-1,68 m	35,9
5	1,42 m H-5 α	50,2	23	0,90 s	27,6
6	2,03 m H-6 β 2,19 dm 12,2 H-6 α	23,9	24	0,99 s	16,0
7	5,52 m $W_{1/2} = 9,0$	117,5	25	0,81 s	13,2
8	-	147,5	26	1,12 s	27,0
9	2,22 m H-9 α	48,6	27	1,14 s	26,2
10	-	35,2	28	1,11 s	30,9
11	1,51 m H-11 β 1,61 m H-11 α	17,1	29	1,03 s	34,1
12	1,43 m H-12 β 1,68 m H-12 α	36,0	30	1,02 s	33,6
13	-	37,2	1'	-	173,7
14	-	41,3	2'	2,36 t 7,0	34,8
15	1,82 td 14,5, 7,4 H-15 β 1,71 m H-15 α	31,5	3'	1,68 m	25,1
16	1,55 m	36,5	4'-15'	1,30-1,35 m	22,7, 29,1-29,7, 31,9
17	-	30,6	16'	0,93 t 6,8	13,2
18	1,57 t 7,2 H-18 β	46,8			

III-6-20- Elucidation structurale du composé 18



Peplusol (18)

Le composé **18** est un triterpène à squelette linéaire *E*-2-(5,9-diméthyl-1-méthylène-4,8-décadiényl)-5,9,13-triméthyl-4,8,12-tétradécatrièn-1-ol. Il a été isolé du latex d'*Euphorbia peplus* sous le nom de peplusol [45]. Ayant été cité une seule fois, il nous a paru indispensable de soumettre ce composé à une analyse spectroscopique approfondie afin de lever toute équivoque quant à sa structure et stéréochimie.

Le spectre de masse par électrobulisaison ESI-MS enregistré en mode positif, montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 449 $[M+Na]^+$ et 465 $[M+K]^+$, soit une masse moléculaire égale à 426 uma et une formule brute en $C_{30}H_{50}O$ correspondant à 6 insaturations. Le spectre de masse MS/MS en mode positif de l'ion moléculaire révèle un fragment à m/z 419 $[(M+Na)-30]^+$ plaidant la perte d'une molécule de CH_2O .

Le spectre IR présente des bandes d'absorption à 3436 et 1622 cm^{-1} attribuables respectivement à des fonctions OH et une double liaison.

Le spectre RMN 1H (figure 90 et 92) montrant des similitudes structurales avec le squalène, implique que ce composé est un isoprénoïde. Il présente à champ faible 4 signaux :

- un singulet large d'intégration 5H allant de 5,01 à 5,06 ppm attribuable aux protons éthyléniques H-6, H-10, H-2', H-6' et H-10'.
- un singulet à δ_H 4,80 (*sl*) et un doublet à δ_H 4,89 (*dl*, $J= 1,3$ Hz) d'intégration 1H chacun, correspondant respectivement aux protons éthyléniques géminés H-15b et H-15a.
- un multiplet d'intégration 2H résonant à 3,48 ppm attribuable aux protons du groupement hydroxyméthylène H-1.

A champ fort, on repère des signaux relatifs aux groupements méthyles, méthylènes et méthines. La présence de 5 protons oléfiniques et 7 groupements méthyles allyliques indiquent l'existence de 5 unités isopréniques régulières dont deux terminales.

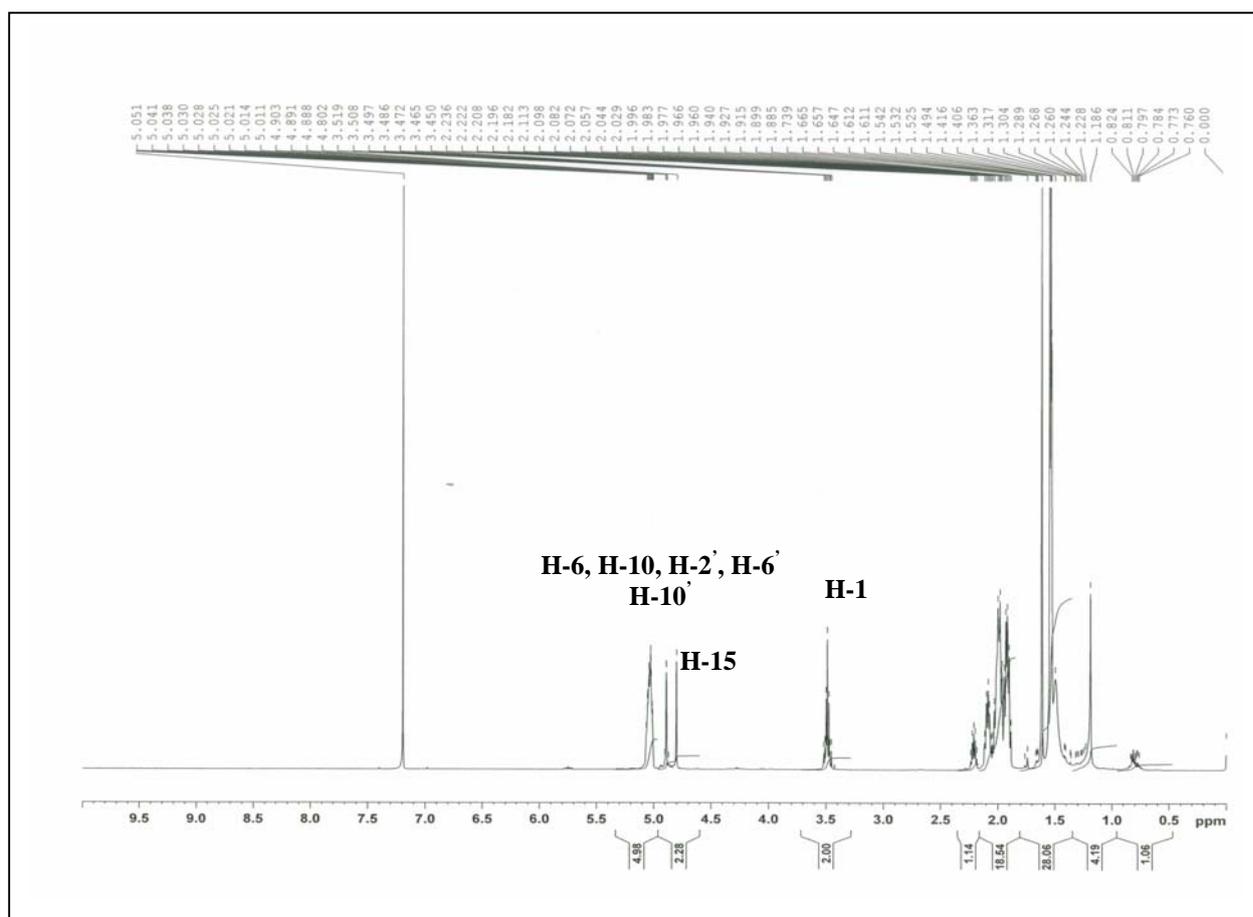


Figure 90 : Spectre RMN ^1H du composé **18**

Les spectres RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 91) et HSQC *J*-modulé (tableau 20) montrent des signaux correspondant à 7 groupements méthyles résonant entre 16,0 et 25,7 ppm, 9 groupements méthylènes CH_2 situés entre 26,2 et 39,8 ppm, 1 hydroxyméthylène $\text{CH}_2\text{-OH}$ repéré à 64,0 ppm, 1 groupement méthylène oléfinique CH_2 détecté à 111,0 ppm, 1 méthine CH résonant à 48,8 ppm, 5 méthines éthyléniques localisés entre 122,1 et 124,4 ppm et 6 atomes de carbone éthyléniques quaternaires résonant entre 131,3 et 149,5 ppm. Ce qui permet de compter 6 doubles liaisons correspondant exactement au nombre d'insaturations que présente la molécule. Le nombre d'atomes de carbone égal à 30 confirme bien qu'il s'agit d'un triterpène acyclique issu vraisemblablement d'une condensation tête à tête de deux unités farnésyles conduisant habituellement au squalène, précurseur des triterpénoïdes [13,47,48].

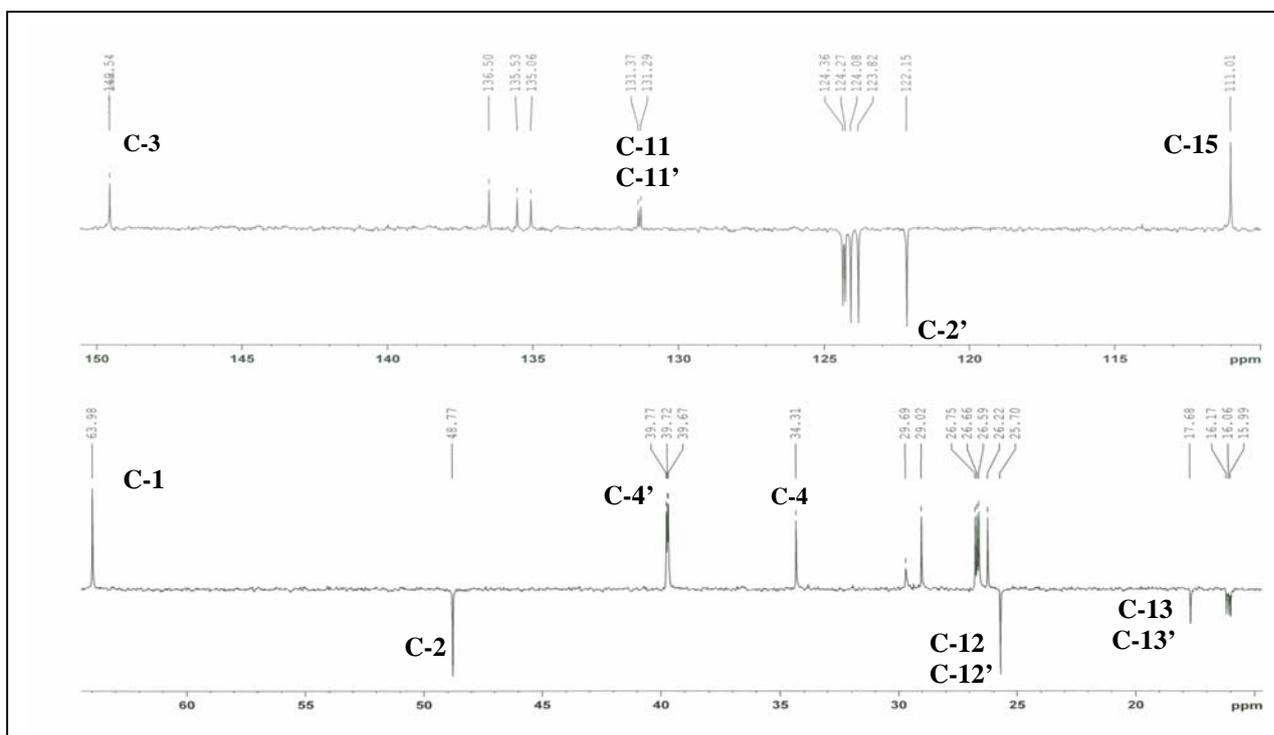


Figure 91 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **18**

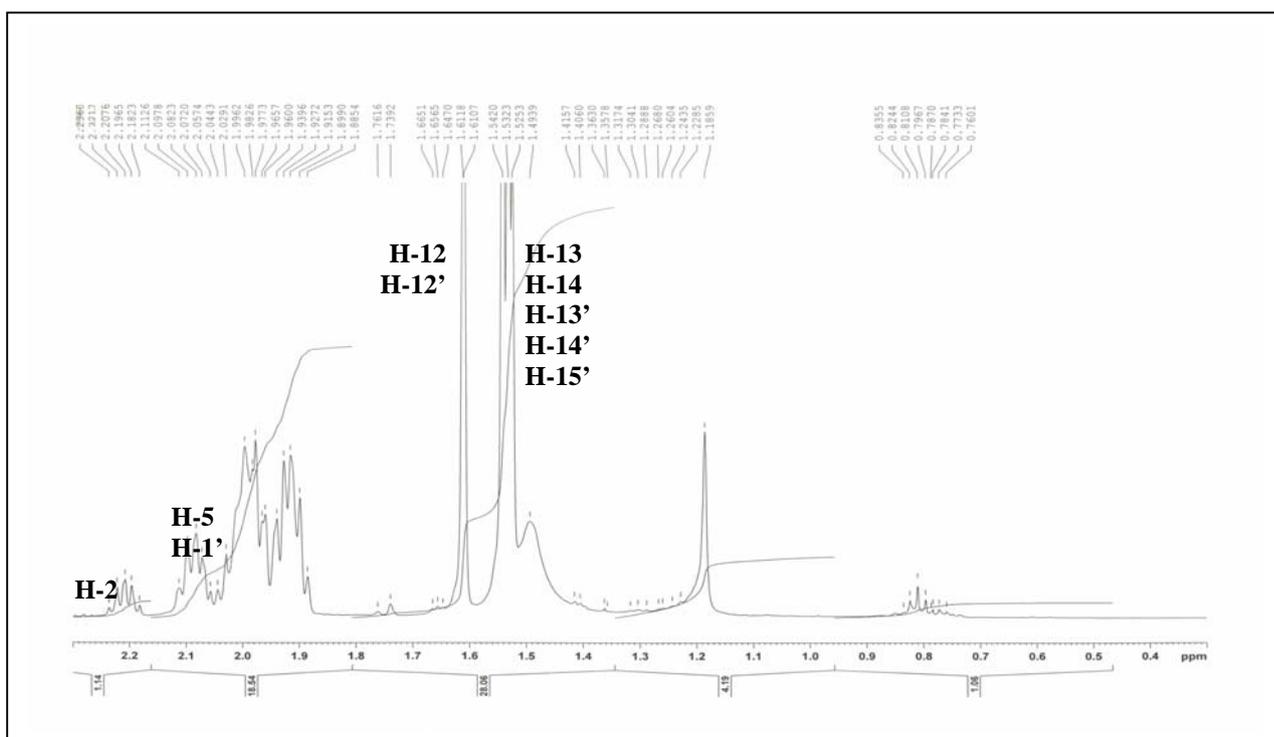


Figure 92 : Spectre RMN ^1H (région blindée) du composé **18**

L'élucidation structurale proprement dite est initiée à partir du proton H-1 du groupement hydroxyméthylène qui couple sur le spectre COSY H-H (figure 93) avec le proton H-2 résonnant à δ_H 2,21 sous forme de quintuplet ($J= 6,7$ Hz). Ce dernier corrèle avec deux protons H-1' résonnant à 2,03-2,07 ppm, qui à leur tour couplent avec un proton éthylénique H-2' résonnant à 5,01-5,06 ppm. Le spectre HSQC *J*-module permet d'identifier les carbones C-2 (48,7 ppm), C-1' (29,0 ppm) et C-2' (122,1 ppm).

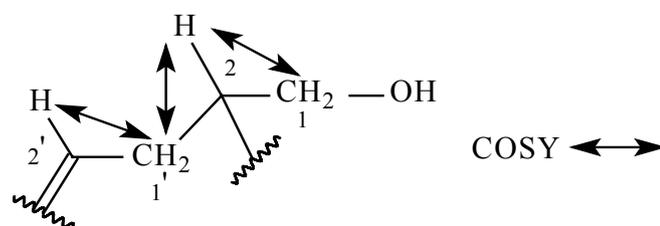


Figure 93 : Corrélations COSY H-H du composé **18**

Ces attributions sont confirmées par les corrélations observées sur le spectre HMBC (figure 94) entre le proton H-2 et les carbones C-1, C-1' et C-2' préalablement identifiés ainsi que C-3, C-4, et C-15 résonnant respectivement à 149,5, 34,3 et 111,0 ppm. L'expérience HSQC *J*-modulé permet de repérer également les déplacements chimiques des protons allyliques H-4 à 1,96 ppm et éthyléniques géminés H-15 à 4,80 et 4,89 ppm. Le carbone éthylénique quaternaire C-3' est détecté à 135,1 ppm suite à sa corrélation avec les protons H-1'. Les carbones C-2' et C-3' corrélient aussi avec les protons du groupement méthyle Me-15' résonnant à 1,52 ou 1,53 ppm, et dont le carbone est observé en HSQC *J*-modulé à 15,9 ou 16,1 ou 16,2 ppm. La difficulté d'assigner les déplacements chimiques des protons et du carbone du groupement Me-15, est due au fait qu'ils apparaissent en RMN 1H et ^{13}C *J*-module, dans la même région que les méthyles Me-14 et Me-14'. Les protons H-15' donnent en HMBC des corrélations en 3J avec le carbone C-4' localisé à 39,6 ou 39,7 ou 39,8 ppm (figures 91 et 92).

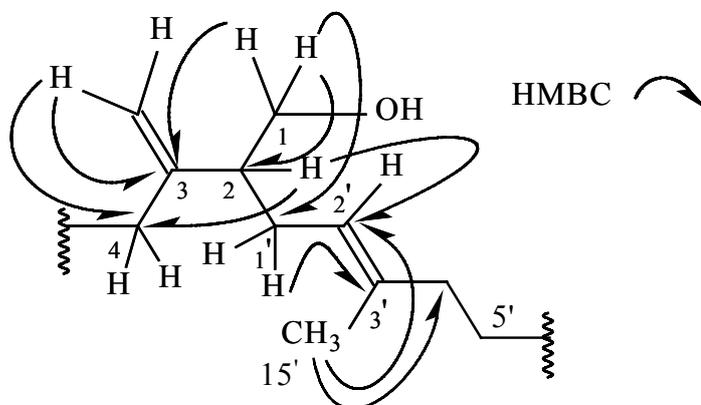


Figure 94 : Corrélations HMBC du composé **18**

Les déplacements chimiques des carbones quaternaires étyléniques C-7, C-7', C-11 et C-11' sont attribués par expérience HMBC (figures 95 et 96). Les protons des groupements méthyles Me-12, Me-12', Me-13, Me-13' et des groupements méthylènes H-9, H-9' corrént avec les carbones étyléniques quaternaires C-11 (131,4 ppm) et C-11' (131,3 ppm). Les méthyles terminaux Me-12 et Me-12', en position *trans*, sont les plus déblindés (δ_C 25,7). Les protons des groupements méthyles Me-14 et Me-14' et des groupements méthylènes H-9, H-9' corrént avec les carbones étyléniques quaternaires C-7 (136,5 ppm) et C-7' (135,5 ppm). En plus de ces corrélations, il montre en 3J des couplages entre:

- Me-12/-13 et le carbone étylénique C-10 localisant ainsi son signal à 124,3 ppm.
- Me-12'/-13' et le carbone étylénique C-10' permettant d'identifier ce carbone à 123,9 ppm.
- Me-14/-14' et les carbones oléfiniques C-6/-6' localisés respectivement à 124,4 et 124,1 ppm.

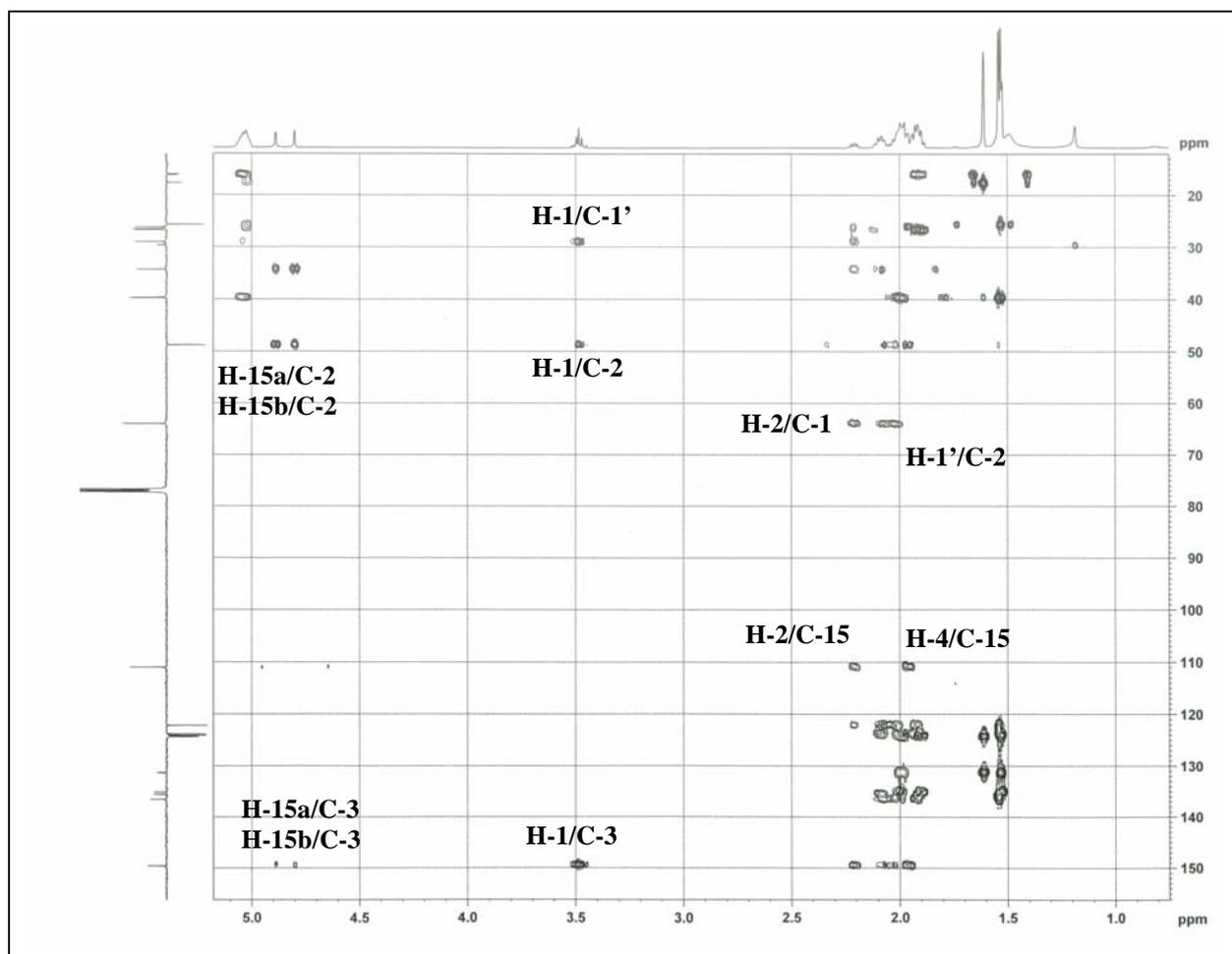


Figure 95 : Spectre HMBC du composé **18**

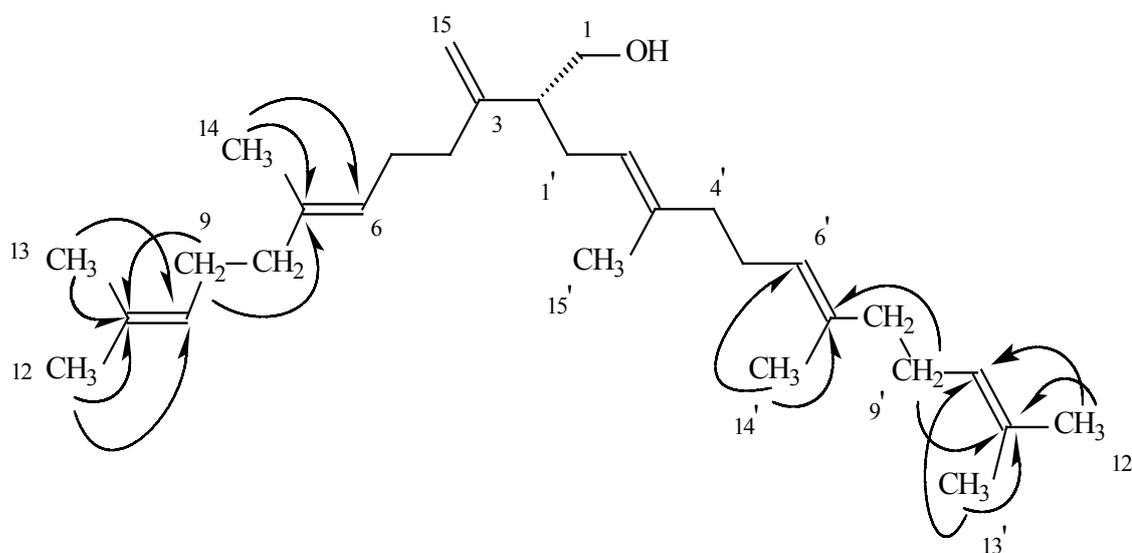


Figure 96 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **18**

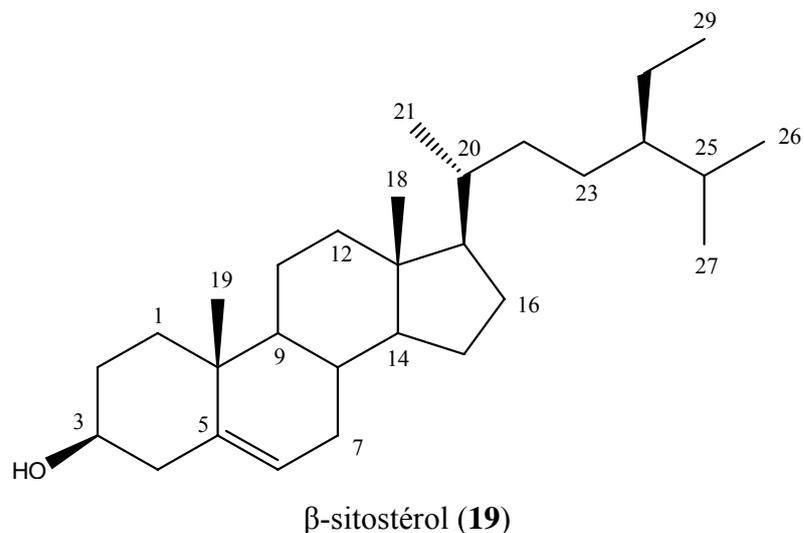
Les déplacements chimiques des carbones des groupements méthyles Me-13, Me-13', Me-14, Me-14' et Me-15' inférieurs à 20 ppm, indiquent que toutes les doubles liaisons des deux unités farnésyliques possèdent une stéréochimie *E* [87]. L'absence de signaux CH₂ (C-4', C-8 et C-8') dans la zone 30-33 ppm, élimine les autres configurations possibles du farnésyle [87].

La structure complète de la molécule est déterminée sans ambiguïté par l'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC ainsi que par comparaison de la valeur du pouvoir rotatoire mesuré dans le chloroforme ($[\alpha]_D = -20^\circ$, $C = 0,60$ g/100 ml) à celle de la littérature, égale à -18° ($C = 0,74$ g/100 ml) [45]. Il s'agit donc de l'isomère R du *E*-2-(5,9-diméthyl-1-méthylène-4,8-décadiényl)-5,9,13-triméthyl-4,8,12-tétradécatrièn-1-ol (**18**).

Tableau 21 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **18** dans CDCl_3

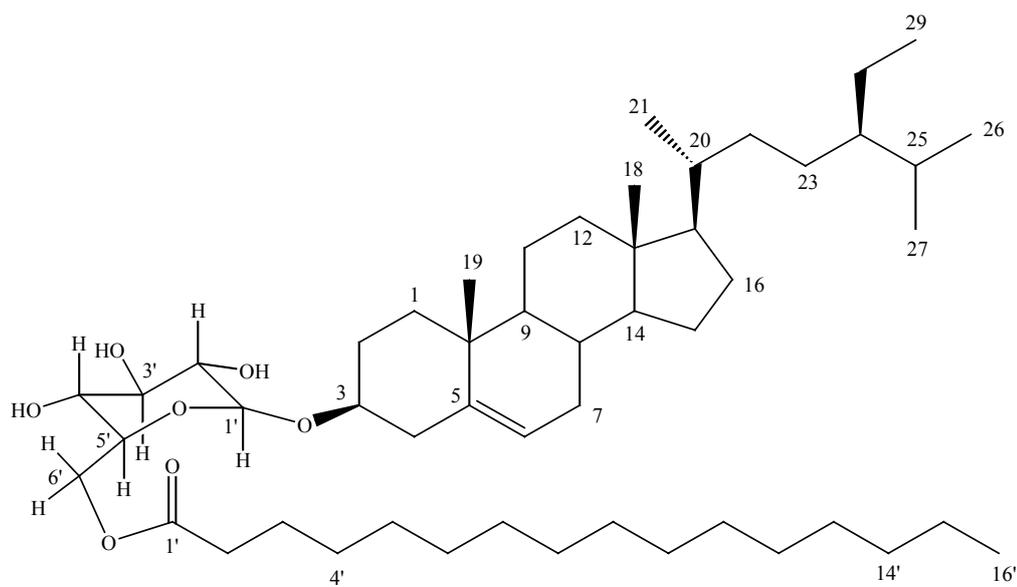
Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	3,48 <i>m</i>	64,0
2	2,21 <i>quint</i> 6,7	48,7
3	-	149,5
4	1,96 <i>m</i>	34,3
5	2,04 <i>m</i>	26,2
6	5,01-5,06 <i>m</i>	124,4
7	-	136,5
8	1,93-1,97 <i>m</i>	39,6, 39,7 ou 39,8
9	1,95-2,02 <i>m</i>	26,5, 26,6 ou 26,7
10	5,01-5,06 <i>m</i>	124,3
11	-	131,4
12	1,61 <i>d</i> 0,6	25,7
13	1,53-1,54 <i>s</i>	17,7
14	1,52-1,53 <i>s</i>	15,9, 16,1 ou 16,2
15	4,89 <i>d</i> 1,3 H-15a	111,0
	4,80 <i>sl</i> H-15b	
1'	2,03-2,07 <i>m</i>	29,0
2'	5,01-5,06 <i>m</i>	122,1
3'	-	135,1
4'	1,93-1,97 <i>m</i>	39,6, 39,7 ou 39,8
5'	1,95-2,02 <i>m</i>	26,5, 26,6 ou 26,7
6'	5,01-5,06 <i>m</i>	124,1
7'	-	135,5
8'	1,93-1,97 <i>m</i>	39,6, 39,7 ou 39,8
9'	1,95-2,02 <i>m</i>	26,5, 26,6 ou 26,7
10'	5,01-5,06 <i>m</i>	123,9
11'	-	131,3
12'	1,61 <i>d</i> 0,6	25,7
13'	1,53-1,54 <i>s</i>	17,7
14'	1,53-1,54 <i>s</i>	15,9, 16,1 ou 16,2
15'	1,52-1,53 <i>s</i>	15,9, 16,1 ou 16,2

III-6-21- Elucidation structurale du composé 19



Ce composé a été identifié au β -sitostérol par comparaison avec un échantillon témoin. Les données RMN ^1H , ^{13}C J -modulé et masse ESI (m/z 437 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) et la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} = -30^\circ$ ($C = 0,80$ g/100 ml, CHCl_3), en apportent la confirmation. Ce métabolite secondaire commun à toutes les plantes, a été isolé de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* : *E. broterie* [43], *E. boetica* [88], *E. nicaensis* [89], *E. nivula* [90],....etc.

III-6-22- Elucidation structurale du composé 20



β -sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate (20)

Il s'agit d'une saponine stéroïdique, β -sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate (**20**), isolée antérieurement des espèces suivantes : *Euphorbia soongarica* [91], *Centaurea regia* [92], *Plumbago zeylanica* [93], *Valeriana officinalis* [94], *Rantherium suaveolens* [95] et *Asparagus gobicus* [96].

Les spectres de masse ESI enregistrés en modes positif et négatif, montrent respectivement des ions pseudomoléculaires à m/z 837 $[M+Na]^+$ et 849 $[M+Cl]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 814 uma et une formule brute en $C_{51}H_{90}O_7$.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 1734 et 1620 cm^{-1} attribuables respectivement à un groupement ester et une double liaison.

Hormis les signaux de protons et carbones (tableau 22) de la génine stéroïdique (sitostérol) identifiables par comparaison avec le composé précédent **19** et les données de la littérature [88-90], le spectre RMN 1H (figures 97-99) montre un proton anomérique déblindé résonnant à 4,32 ppm sous forme d'un doublet à grande constante de couplage $J_{H1'-H2'} = 7,4$ Hz.

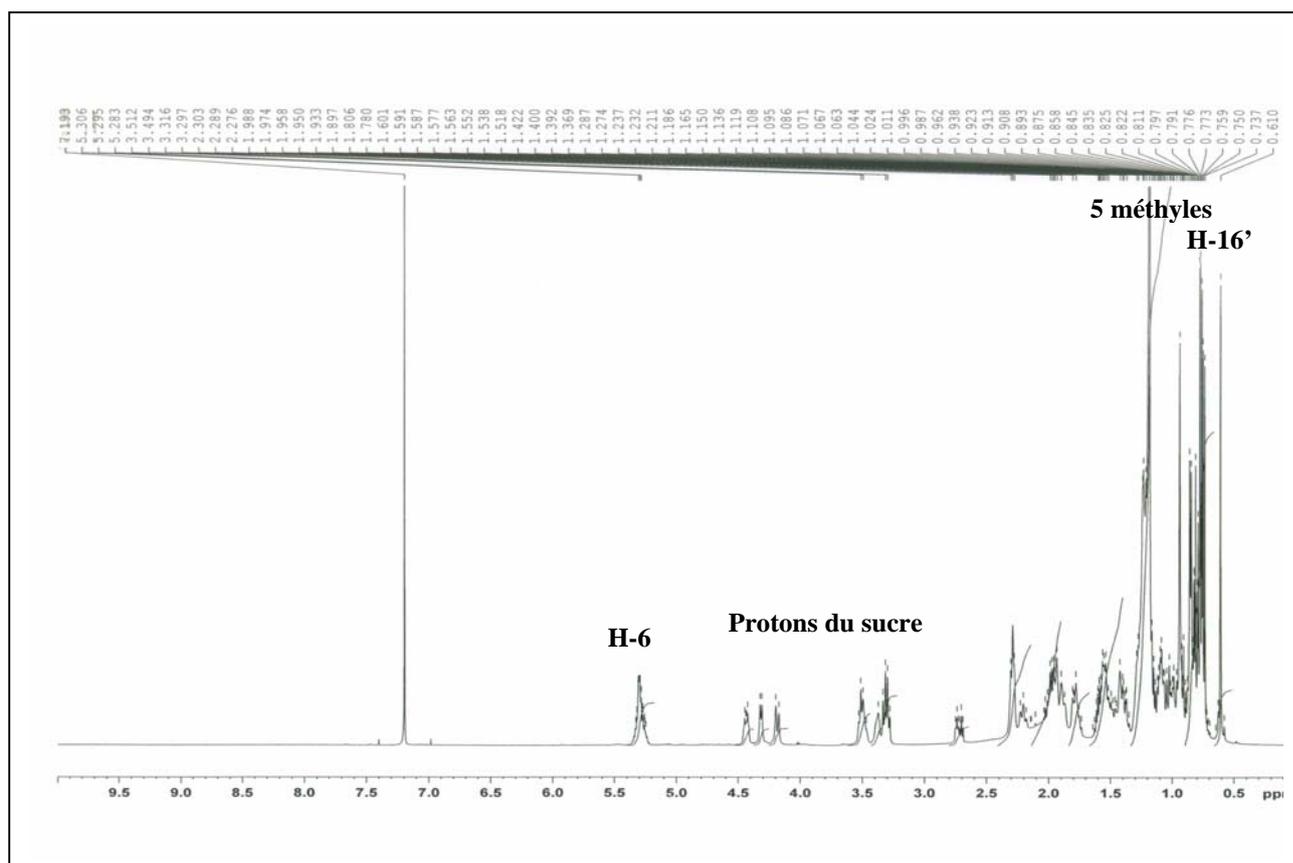


Figure 97 : Spectre RMN 1H du composé **20**

4,43 H-6'a ; δ_H 4,18 H-6'b) indiquent une substitution à ce niveau par un groupement acyle. Ceci est confirmé par l'expérience HMBC (figure 101) qui montre une corrélation entre le proton H-6'a et le carbonyle du groupement ester résonant à 174,8 ppm (C-1'').

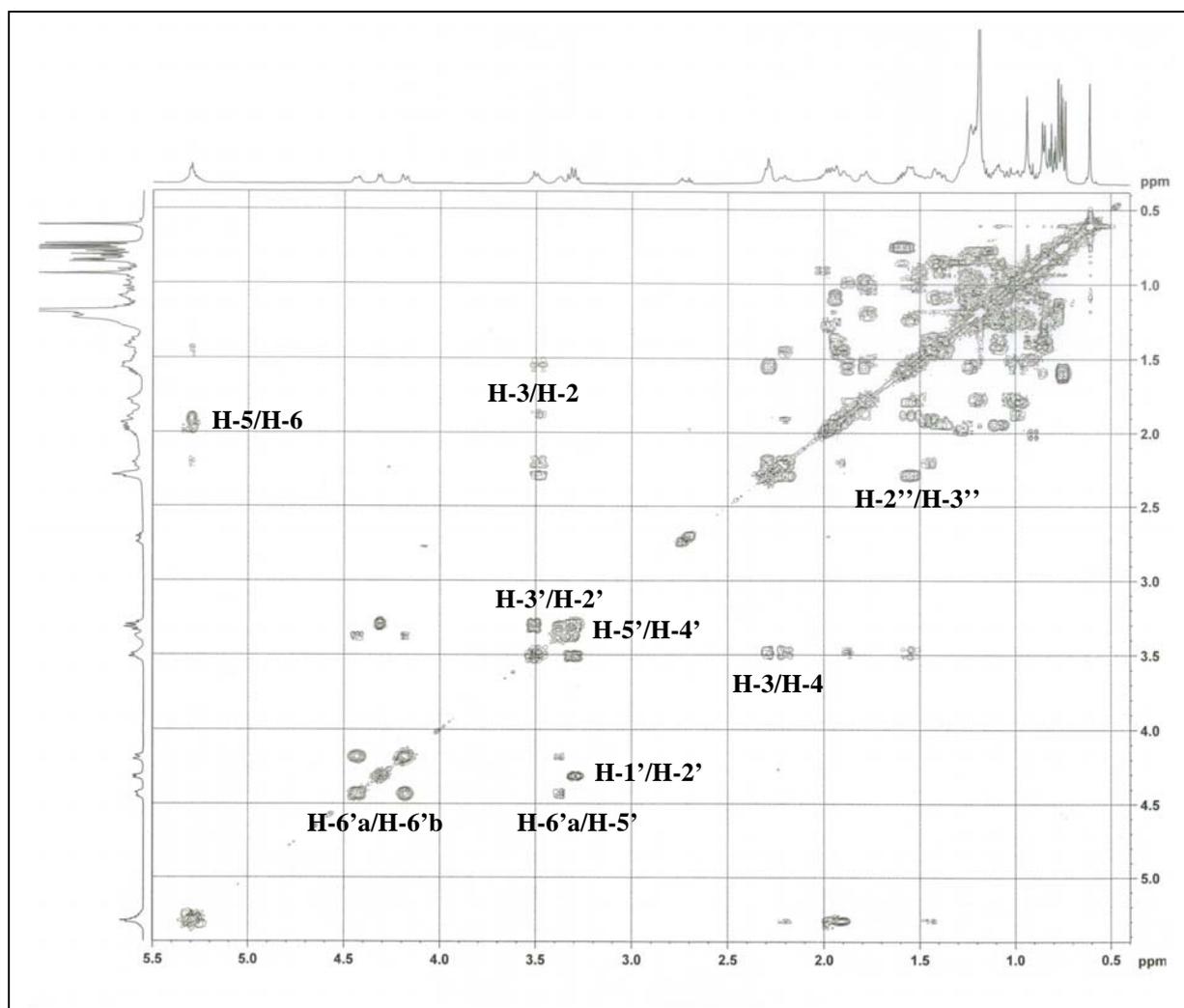


Figure 100 : Spectre COSY H-H du composé **20**

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose (tableau 22).

La corrélation $^3J_{H-C}$ observée sur le spectre HMBC (figure 101) entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine, montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position C-3.

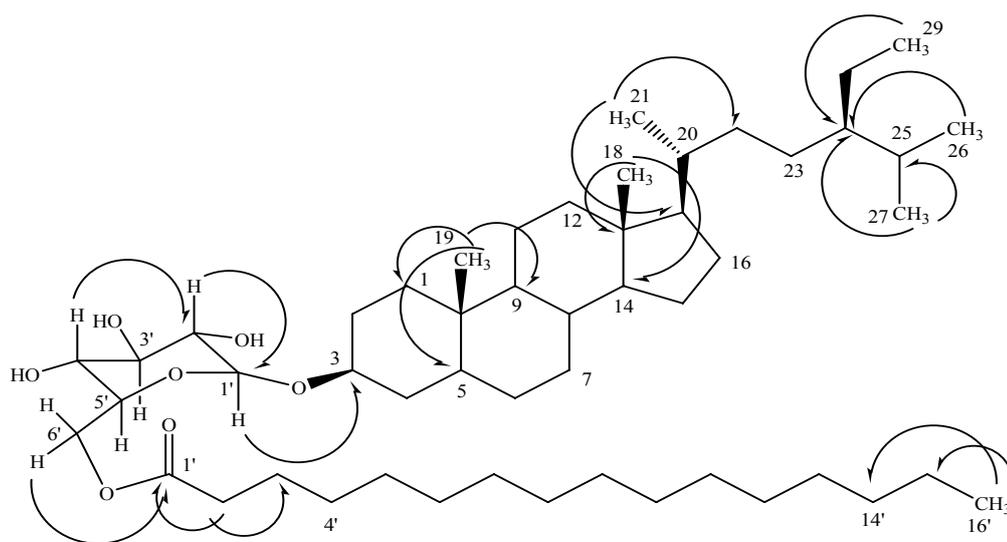
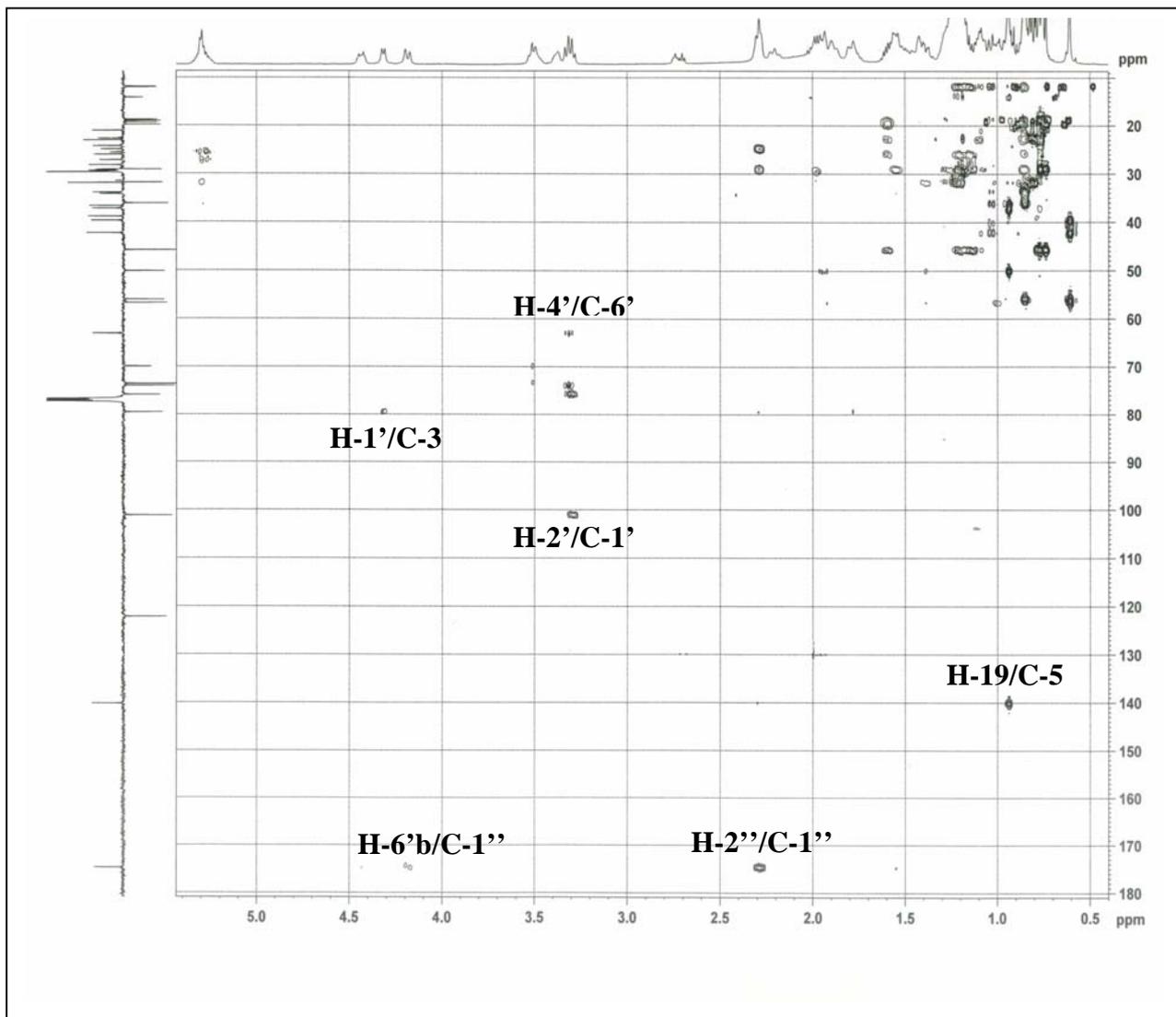


Figure 101 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **20**

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C *J*-modulé (tableau 22) permet de mettre en évidence les signaux du groupement ester à δ_{H} 2,28 (*t*, $J= 7,3$ Hz, H-2'') et δ_{C} 34,2 (C-2''), 1,55 (*m*, H-3'') et δ_{C} 24,9 (C-3''), 1,20-1,26 (*m*, H4'-H13'') et δ_{C} 29,2-29,7 (C4''-C-13''), 1,18 (*m*, H-14'') et δ_{C} 31,9 (C-14''), 1,26 (*m*, H-15'') et δ_{C} 22,7 (C-15'') et 0,81 (*t*, $J= 7,1$ Hz, H-16'') et δ_{C} 14,1 (C-16''). Ces signaux sont caractéristiques d'un acide gras saturé en C-16 [93]. La masse moléculaire de l'ordre de 814 uma, confirme bien qu'il s'agit du groupement palmitoyle.

L'ensemble de ces données et la valeur du pouvoir rotatoire de ce composé dans le chloroforme (-40° , $C= 1,0$ g/100 ml, lit. $[\alpha]_{\text{D}} = -43^\circ$, $C= 1,7$ g/100 ml CHCl_3 [96]), permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé la structure suivante : β -sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate (**20**).

Tableau 22 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **20** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J</i> Hz	δ_{C}
1	1,00-1,78 <i>m</i>	37,2
2	1,52-1,87 <i>m</i>	29,7
3	3,48 <i>m</i> H-3 α	79,5
4	2,21-2,29 <i>m</i>	38,9
5	-	140,2
6	5,30 <i>m</i>	122,2
7	1,46-1,90 <i>m</i>	31,9
8	1,38 <i>m</i> H-8 β	31,8
9	0,85 <i>m</i> H-9 α	50,1
10	-	36,7
11	1,36-1,42 <i>m</i>	21,0
12	1,08-1,94 <i>m</i>	39,7
13	-	42,3
14	0,92 <i>m</i> H-14 α	56,7
15	0,98-1,49 <i>m</i>	24,3
16	1,60-1,79 <i>m</i>	28,2
17	1,03 <i>m</i> H-17 α	56,0
18	0,61 <i>s</i>	11,8
19	0,95 <i>m</i>	19,3
20	1,28 <i>m</i>	36,1
21	0,86 <i>s</i>	18,8
22	0,94-1,25 <i>m</i>	33,9
23	1,08 <i>m</i>	26,0
24	0,86 <i>m</i>	45,8
25	1,59 <i>m</i>	29,1
26	0,74 <i>d</i> 6,8	19,0
27	0,74 <i>d</i> 6,8	19,8
28	1,15-1,20 <i>m</i>	23,0
29	0,77 <i>d</i> 6,8	11,9

Glucose		
1'	4,32 <i>d</i> 7,4	101,2
2'	3,30 <i>t</i> 8,8	73,5
3'	3,52 <i>m</i>	75,9
4'	3,32 <i>t</i> 9,5	70,0
5'	3,38 <i>m</i>	73,9
6'	4,43 <i>m</i> H-6'a	63,1
	4,18 <i>dl</i> 12,1 H-6'b	
Ester palmitoyle		
1''	-	174,8
2''	2,28 <i>t</i>	34,2
3''	1,55 <i>m</i>	24,9
4''-13''	1,19-1,26 <i>m</i>	29,2-29,7
14''	1,18 <i>m</i>	31,9
15''	1,22 <i>m</i>	22,7
16''	0,81 <i>t</i> 7,1	14,1

III-7- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *E. guyoniana* Boiss. et Reut., plante endémique à l'Algérie et appartenant à la famille Euphorbiaceae a abouti à l'isolement de 5 diterpénoïdes et 15 triterpénoïdes. Ces composés ont été obtenus à l'état pur par l'utilisation souvent combinée des différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaque préparative de silice normale, la chromatographie sur silice greffée en C₁₈ et la chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse.

L'identification des métabolites secondaires isolés est rendue possible grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D (¹H et ¹³C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY) et la spectrométrie de masse haute résolution (HR-ESI-MS et HR-EI-MS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés identifiés appartiennent à trois classes de métabolites secondaires : les diterpènes, les triterpènes et les stéroïdes présents souvent dans les plantes du genre *Euphorbia*. Ils se repartissent comme suit :

- un diterpène polycyclique nouveau à squelette tigliane, dérivé du phorbol
- un diterpène macrocyclique à squelette jatrophane
- deux diterpènes de type abiétane lactone appartenant à la série *ent*
- un diterpène à squelette *ent*-atisane.
- un triterpène de type cycloartane nouveau
- quatre triterpènes tétracycliques à squelette cycloartane
- deux triterpènes tétracycliques à squelette lanostane
- un triterpène tétracyclique à squelette euphane
- un triterpène tétracyclique à squelette tirucallane
- deux triterpènes pentacycliques à squelette multiflorane
- un triterpène pentacyclique à squelette taraxerane
- un triterpène acyclique
- deux stéroïdes.

Cette étude montre une autre fois la richesse des plantes du genre *Euphorbia* en métabolites secondaires de type diterpènes et triterpènes particulièrement tétracycliques. Ces derniers sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

**IV- Etude phytochimique de l'espèce
Euphorbia retusa Forsk.**

IV-1- Description botanique

L'espèce *E. retusa* Forsk., est une plante annuelle bleu-verte à feuilles alternes longues, élargies en cœur à la base, denticulées dans leur moitié supérieure (figure 102). La capsule est large, mesurant 4.5-5 mm et présentant une constriction annulaire vers son milieu. Caroncule 4-5 côtes épaisses ; glandes à deux cornes courtes et obtuses formées par deux lobes qui partent du dessous de la glande. Graines lisses gris-bleuté [1-2].



Figure 102 : Espèce *Euphorbia retusa* Forsk.

Les spécialistes de la botanique [1,2,8,10] s'accordent en fait à classer l'espèce *Euphorbia retusa* Forsk. comme suit :

Famille : Euphorbiaceae

Sous famille : Euphorbioideae

Tribu : Euphorbieae

Sous tribu : Euphorbiinae

Genre : *Euphorbia*

Espèce : *Euphorbia retusa* Forsk.

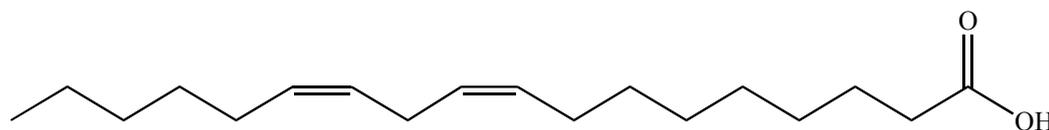
IV-2- Utilisation en médecine traditionnelle

Le latex de la plante *Euphorbia retusa* Forsk est utilisé, par les populations locales, contre les verrues et pour extirper les épines. Il est aussi employé, en application sur les cils, contre le trichiasis. Au Maroc, on l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses [3].

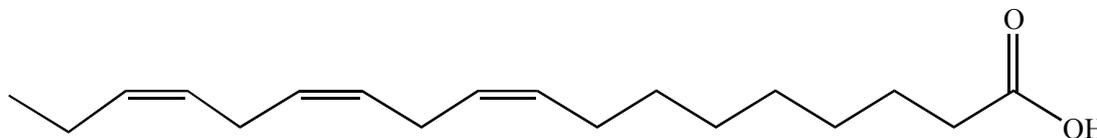
IV-3- Travaux antérieurs sur l'espèce

Les travaux de chimie effectués antérieurement sur l'espèce *E. retusa* ont porté sur les parties aériennes. Ils ont permis d'isoler et de caractériser des acides gras [97], des triterpènes tétracycliques et pentacycliques [97,98] et des flavonoïdes [99].

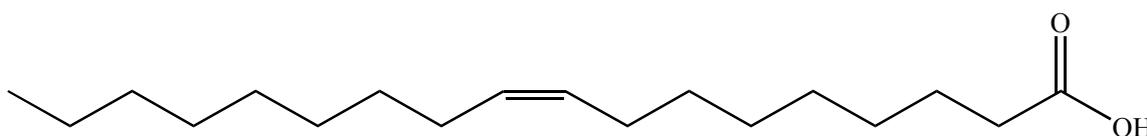
L'étude chimique réalisée par Harraz et al. [97], sur les parties aériennes de cette plante, a abouti à l'isolement et l'identification de deux types de métabolites secondaires : triterpènes tétra- et pentacycliques : cycloarténol (**112**), 24-méthylèncycloartanol (**114**), euphol (**123**), cycloeucalénol (**133**), β -sitostérol (**134**), 24-épimères cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**169**) et bétuline (**173**) et plusieurs acides gras : **186** à **189**. Les triterpènes isolés ont été caractérisés par les méthodes spectroscopiques (RMN et Masse). Les acides gras ont été identifiés par analyse GC-MS.



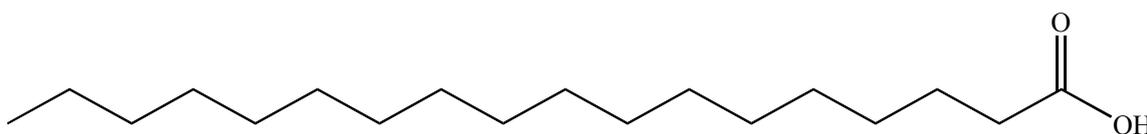
acide linoléique (**186**)



acide linolénique (**187**)

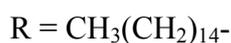
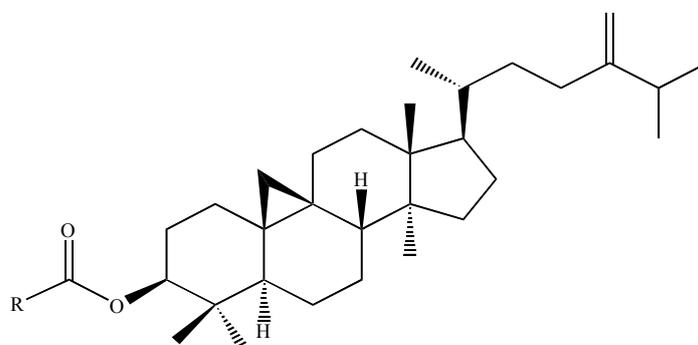


acide oléique (**188**)

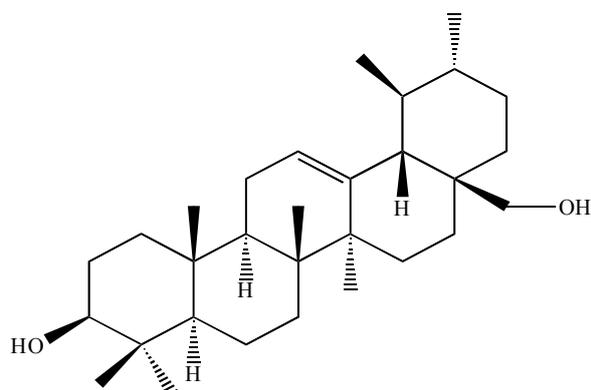


acide palmitique (**189**)

Une étude phytochimique, menée par Saif-Eldin et al. [98], s'est soldée par l'isolement et l'identification de quatre triterpènes : bétuline (**173**), 24-méthylène-9,19-cyclolanostan-3 β -yl palmitate (**190**), uvaol (**191**) et erythrodiol (**192**). Tous les composés isolés ont été caractérisés par les méthodes spectrales.

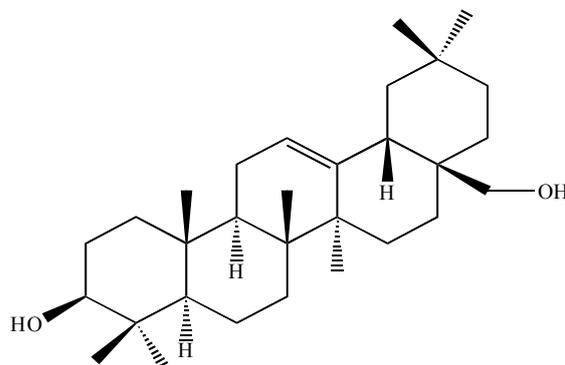


24-méthylène-9,19-cyclolanostan-3 β -yl palmitate (**190**)



uvaol (**191**)

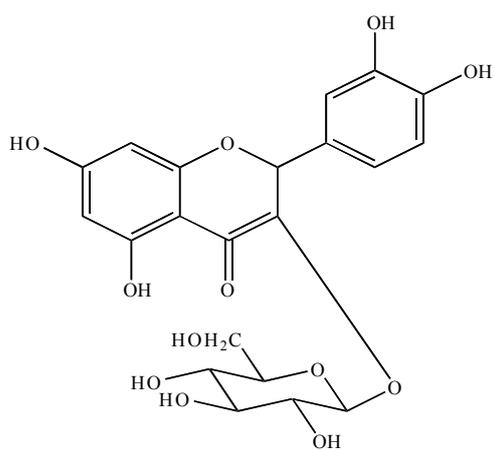
urs-12-ène-3,28-diol



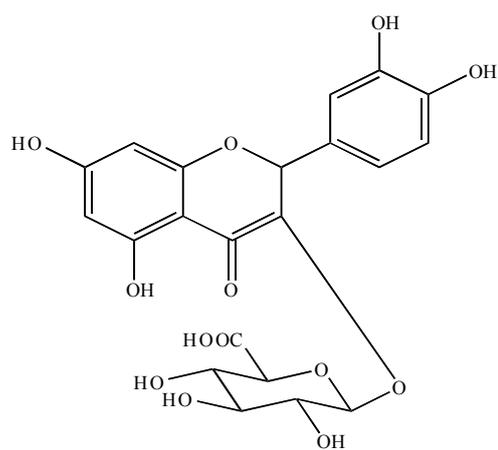
erythrodiol (**192**)

oléan-12-ène-3,28-diol

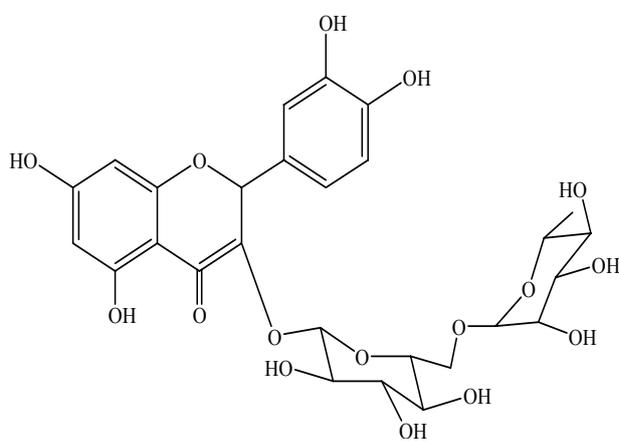
Une autre investigation chimique effectuée par Salah N. sur cette espèce [99], a permis l'identification de cinq flavonoïdes glycosilés à génine quercétine : quercétine-3-glucoside (**193**), quercétine-3-glucuronide (**194**), quercétine-3-rutinoside (**195**), quercétine-3-rhamnoside (**196**) et quercétine-3-glucuronide-7-glucoside (**197**).



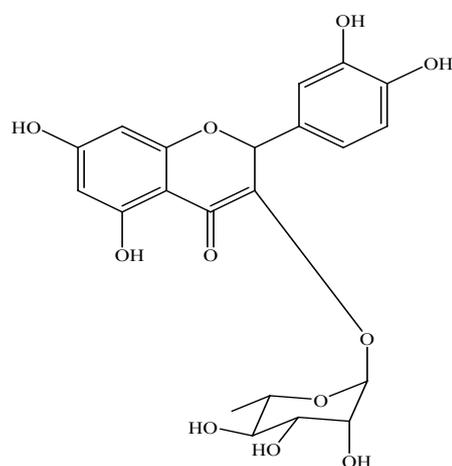
quercétine-3-glucoside (193)



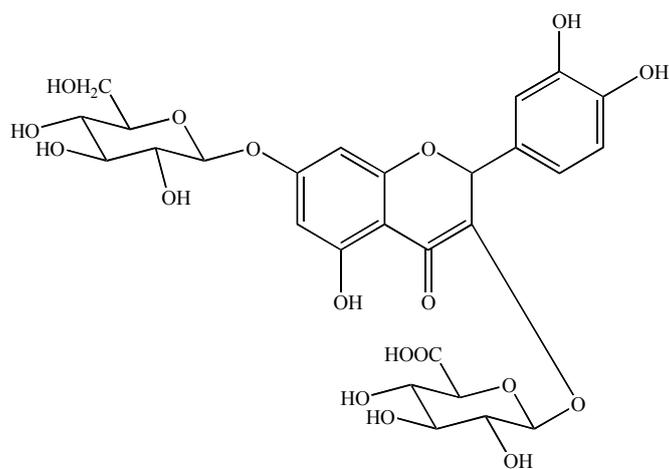
quercétine-3-glucuronide (194)



quercétine-3-rutinoside (195)



quercétine-3-rhamnoside (196)



quercétine-3-glucuronide-7-glucoside (197)

IV-4- Extraction et fractionnement

Les racines (600 g) de la plante préalablement réduites en poudre, ont subi une extraction solide-liquide par le dichlorométhane (2x5 l) pendant 4 jours. Après macération, filtration et évaporation du solvant, 10 g (rdt. 1,66 %) constituant l'extrait dichlorométhane, ont été obtenus.

Les marcs récupérés sont de nouveau mis à macérer dans le méthanol (2x5 l) pendant 4 jours. La filtration du mélange et l'évaporation totale du solvant, sous pression réduite et une température modérée, ont donné 18 g de l'extrait méthanolique, soit un rendement de 3 %.

L'ensemble de ces opérations d'extraction est représenté dans le protocole suivant (figure 103):

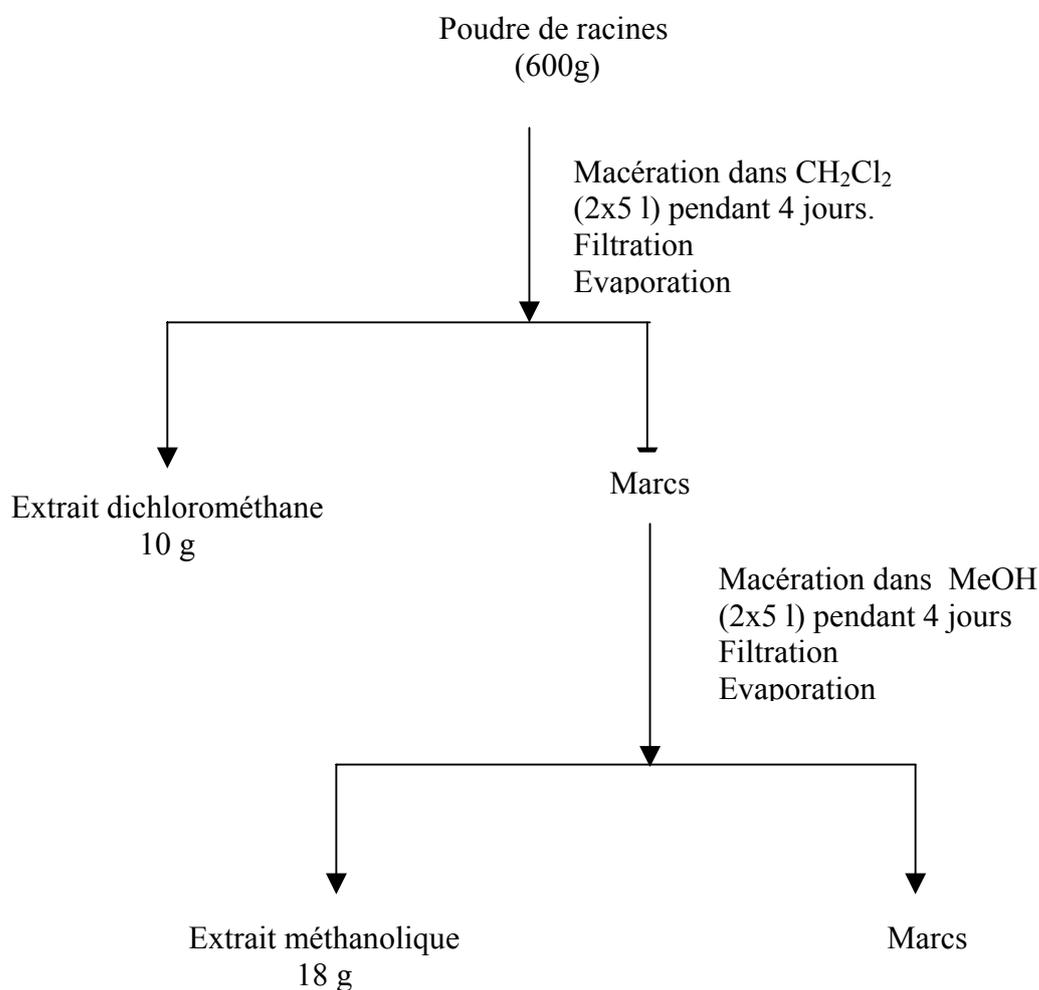


Figure 103 : Protocole d'extraction des racines de l'espèce *Euphorbia retusa* Forsk.

IV-5- Purification des composés

Les CCM réalisées sur les deux extraits obtenus et cela dans plusieurs systèmes d'élution, révèlent la richesse de l'extrait dichlorométhane comparativement à l'extrait méthanolique, d'où notre motivation quant à l'investigation chimique de l'extrait dichlorométhane.

Cet extrait est soumis à un fractionnement par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice normale en utilisant un gradient d'élution hexane-acétate d'éthyle allant de 10:0 à 0:10. Cette étape s'est soldée par l'obtention de 9 fractions (figure 104).

Les fractions obtenues sont purifiées par les différentes méthodes chromatographiques :

- Chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale CC
- Chromatographie sur colonne en phase inverse sur silice greffée C₁₈
- Chromatographie sur plaque préparative CPP en phase normale
- Chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse

L'utilisation souvent combinée des techniques chromatographiques citées précédemment, a conduit à l'isolement de 19 composés dont 9 se sont avérés nouveaux (figure 104).

IV-6- Hydrolyse alcaline des composés

La détermination des configurations des différents centres chiraux des triterpènes estérifiés étant parfois difficile, il est donc utile de recourir à des méthodes de clivage, afin d'avoir accès aux différents composants de la molécule pour en faciliter l'élucidation structurale. L'hydrolyse alcaline est la méthode mise en œuvre, dans notre cas. Cette hydrolyse clivant les liaisons esters en C-3 de la génine, a fourni des triterpènes alcools de structures simplifiées et connues dans la littérature.

Les triterpènes estérifiés sont solubilisés dans des solutions méthanoliques de KOH (5 %). Les mélanges sont mis sous agitation à une température de 25 °C. Après addition de l'eau, les solutions sont extraites à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ puis filtrées. L'évaporation à sec du solvant et la purification sur colonne de gel de silice normale, ont permis de récupérer les triterpènes alcools correspondants qui seront ensuite identifiés par RMN et par la mesure des pouvoirs rotatoires.

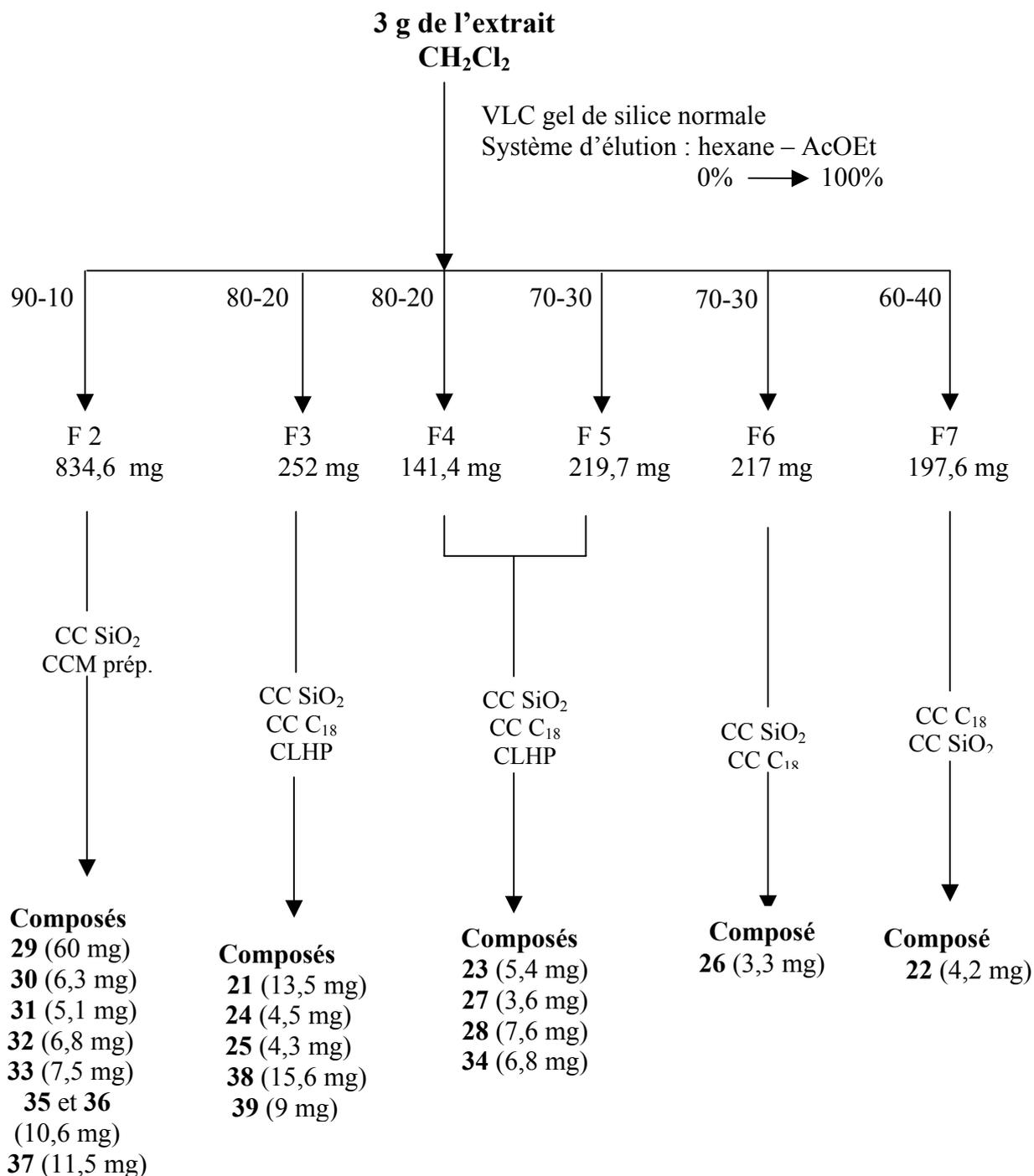


Figure 104 : Isolement des composés de l'extrait dichlorométhane des racines de l'espèce *E. retusa* Forsk.

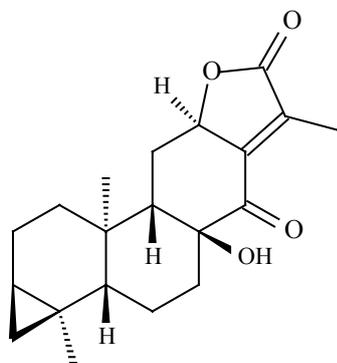
IV-7- Caractérisation des produits isolés

L'élucidation structurale des produits isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres RMN 1D et 2D, de masse, UV, IR, à la mesure des pouvoirs rotatoires et à la comparaison avec les données de la littérature.

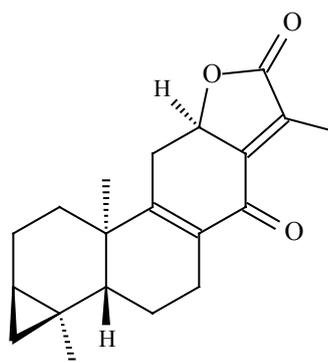
Les produits caractérisés appartiennent en général à deux classes de métabolites secondaires : triterpènes et diterpènes, très présents dans le genre *Euphorbia*.

IV-7-1- Produits nouveaux

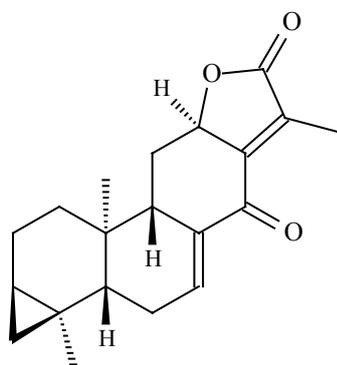
L'extrait CH₂Cl₂ a fourni 6 diterpènes originaux **23**, **24**, **25**, **26**, **27** et **28**, appartenant tous à la série abiétane lactone.



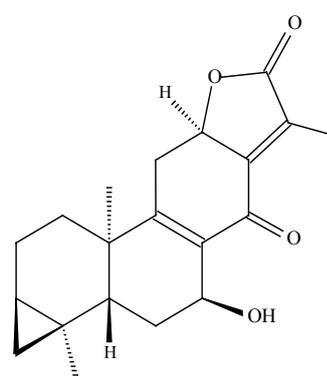
3,4,18β-cyclopropa-8β-hydroxy-14-oxo-*ent*-abiét-13,15-èn-16,12-olide (**23**)



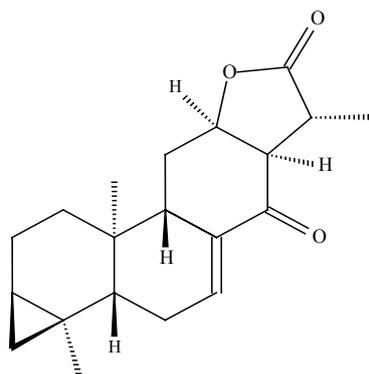
3,4,18β-cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide (**24**)



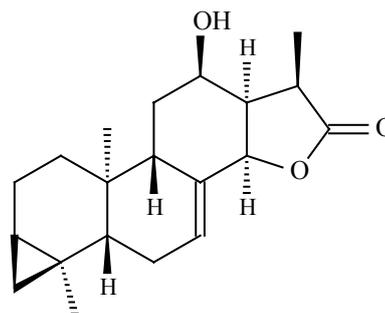
3,4,18β-cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-7,8,13,15-dièn-16,12-olide (**25**)



3,4,18β-cyclopropa-7β-hydroxy-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide (**26**)

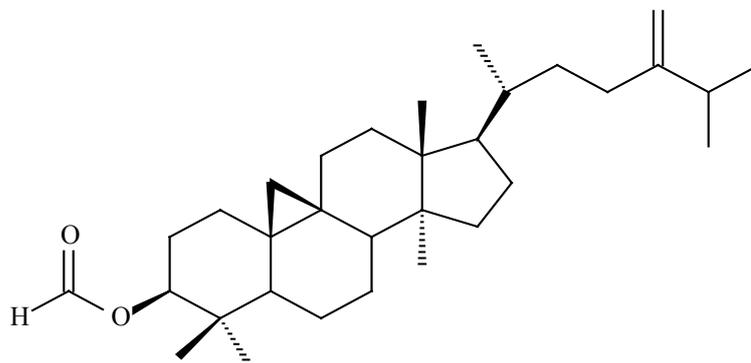


3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiét-7,8-èn-16,12-olide (**27**)

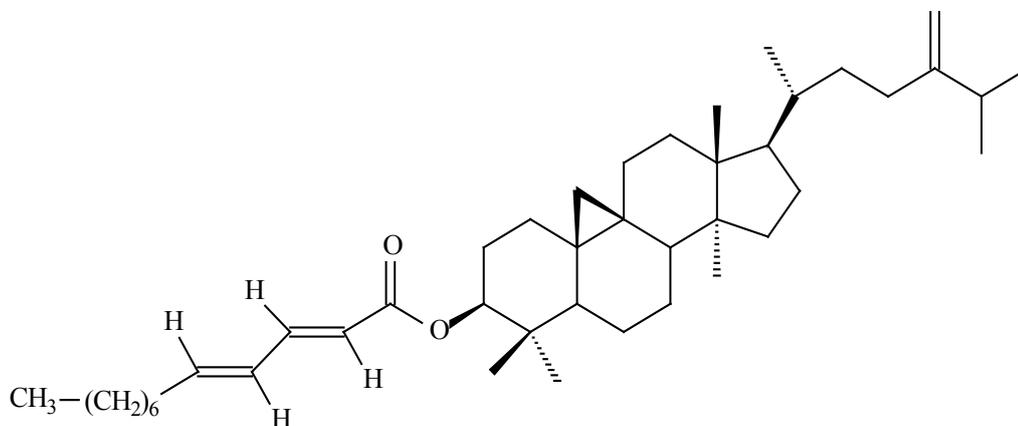


3,4,18 β -cyclopropa-12 β -hydroxy-*ent*-abiét-7-èn-16,14-olide (**28**)

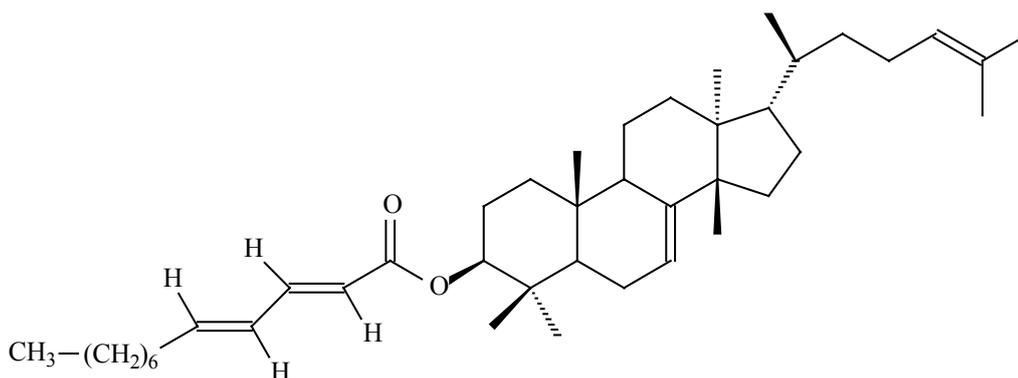
Deux triterpènes à squelette cycloartane, non décrits dans la littérature, ont été également caractérisés. Il s'agit de : 24-méthylèncycloartanyl formate (**30**) et 24-méthylèncycloartanyl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate (**31**). Un autre triterpène nouveau à squelette tirucallane, tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate (**32**), a été également identifié.



24-méthylèncycloartanyl formate (**30**)



24-méthylèncycloartanyl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate (**31**)



Tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate (**32**)

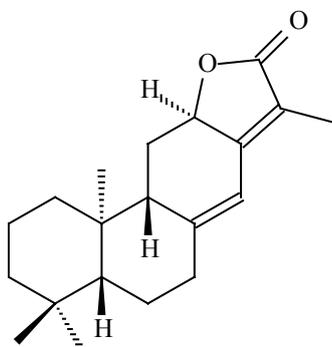
IV-7-2- Produits connus

Deux diterpènes connus de la série antipode ont été isolés : *ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**21**), appelé jolkinolide E [25,26,28,33] et *ent*-3-oxoabiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**22**), appelé helioscopinolide E [27].

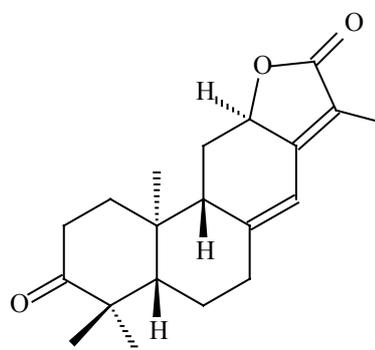
Parmi les triterpènes, ont été identifiés des dérivés à squelette cycloartane et lanostane : 24-méthylèncycloartanol (**29**) [34,45,97], 24-méthylèncycloartanone (**33**) [100], cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**34**) [44,70] cycloeucalénol (**35**) [34,97] et obtusifoliol (**36**) [34,79,80].

Un dérivé de l'acide cinnamique a été identifié : 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-propénoate d'hexacosyle (*E*) (**37**) [101,102].

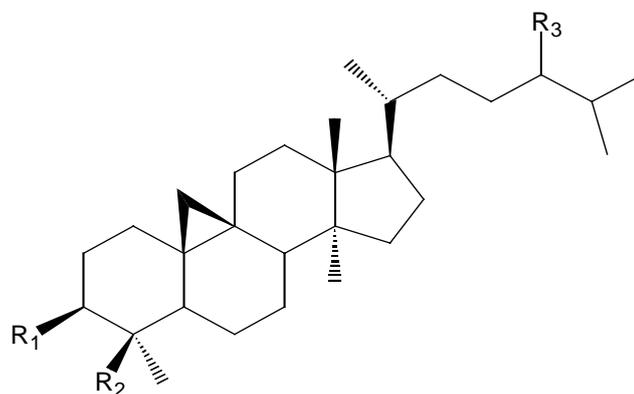
Le β -sitostérol (**38**), stéroïde commun à tout le règne végétal et un dérivé du glycérol, à savoir l'acide 9-octadécénoïque 2,3-bis[(1-oxododécyl)oxy]propyl ester (**39**), ont été également isolés [103,104].



ent-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide
jolkinolide E (**21**)



ent-3-oxoabiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide
helioscopinolide E (**22**)

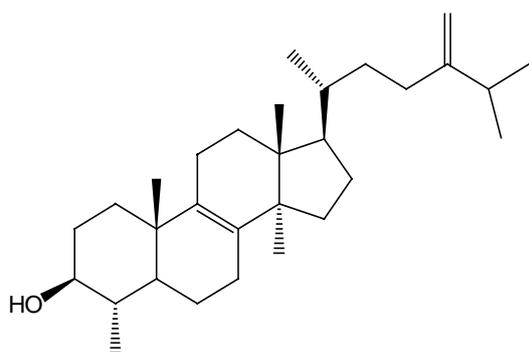


$R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{CH}_2$ 24-méthylèncycloartanol (**29**)

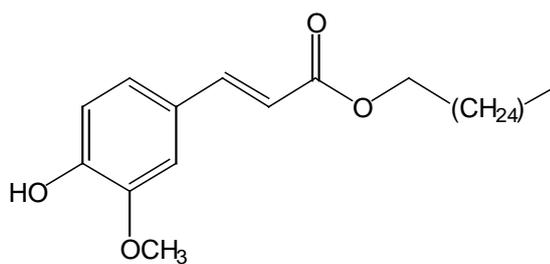
$R_1 = \text{O}$ $R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{CH}_2$ 24-méthylèncycloartanone (**33**)

$R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{OH}$ cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**34**)

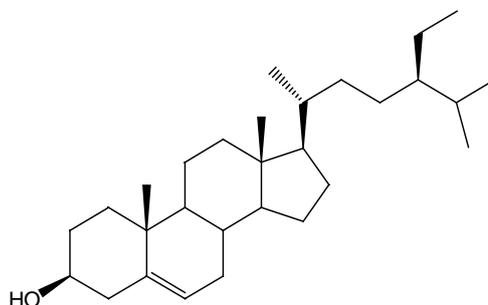
$R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{CH}_2$ cycloeucalénol (**35**)



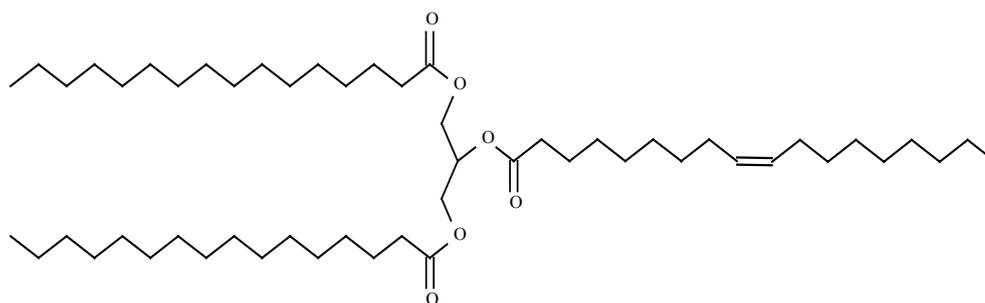
Obtusifoliol (**36**)



3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-propénoate d'hexacosyle (*E*) (**37**)

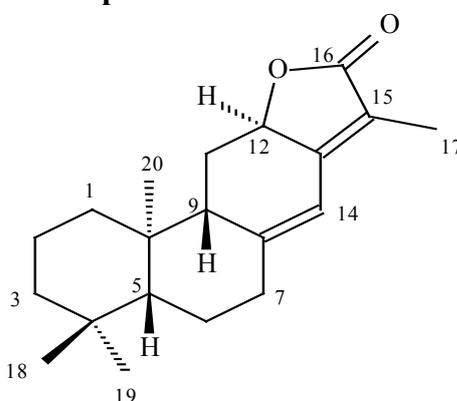


β -sitostérol (**38**)



Acide 9-octadécénoïque 2,3-bis[(1-oxododécyl)oxy]propyl ester (**39**)
(Triacylglycérol)

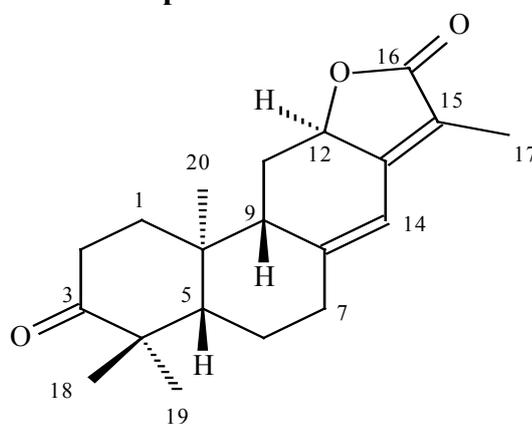
IV-7-3- Elucidation structurale du composé **21**



ent-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**21**)

Toutes les données spectrales RMN (^1H , ^{13}C , COSY H-H, HMBC et NOESY), masse et la valeur du pouvoir rotatoire, ont permis d'identifier le composé suivant : *ent*-abieta-8(14),13(15)-dien-16,12-olide appelé également jolkinolide E [25,26,28,33]. Ce composé isolé de *E. guyoniana*, a déjà fait l'objet d'une détermination structurale.

IV-7-4- Elucidation structurale du composé **22**



3-oxo-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**22**)

Ce composé à squelette abiétane lactone a été identifié au 3-oxo-*ent*-abiéta-8(14),3(15)-dièn-16,12-olide (**22**), appelé 3-oxojolkinolide E ou helioscopinolide E. Il a été isolé de l'espèce *Euphorbia calyptрата* [27].

Les spectres UV, IR, SM et ^{13}C *J*-modulé du composé **22**, indiquent la présence d'une fonction γ -lactone α,β insaturée, deux doubles liaisons dont une tétrasubstituée et une formule moléculaire en $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$.

Les spectres RMN ^1H (figure 105) et ^{13}C *J*-modulé (tableau 23) montrent la présence de trois méthyles singulets à 1,19, 1,12 et 1,15 ppm et un méthyle vinylique doublet à 1,91 ppm, caractéristiques d'un diterpène lactone de type jolkinolide/helioscopinolide [26-28]. La comparaison avec le composé **21** montre la disparition des signaux du carbone et protons CH_2 en position C-3 résonant à δ_{C} 41,9 et δ_{H} 1,26-1,51 sur les spectres RMN ^{13}C et HSQC *J*-modulé, et l'apparition d'un signal supplémentaire fortement déblindé à 215,7 ppm caractéristique d'un carbone quaternaire du carbonyle.

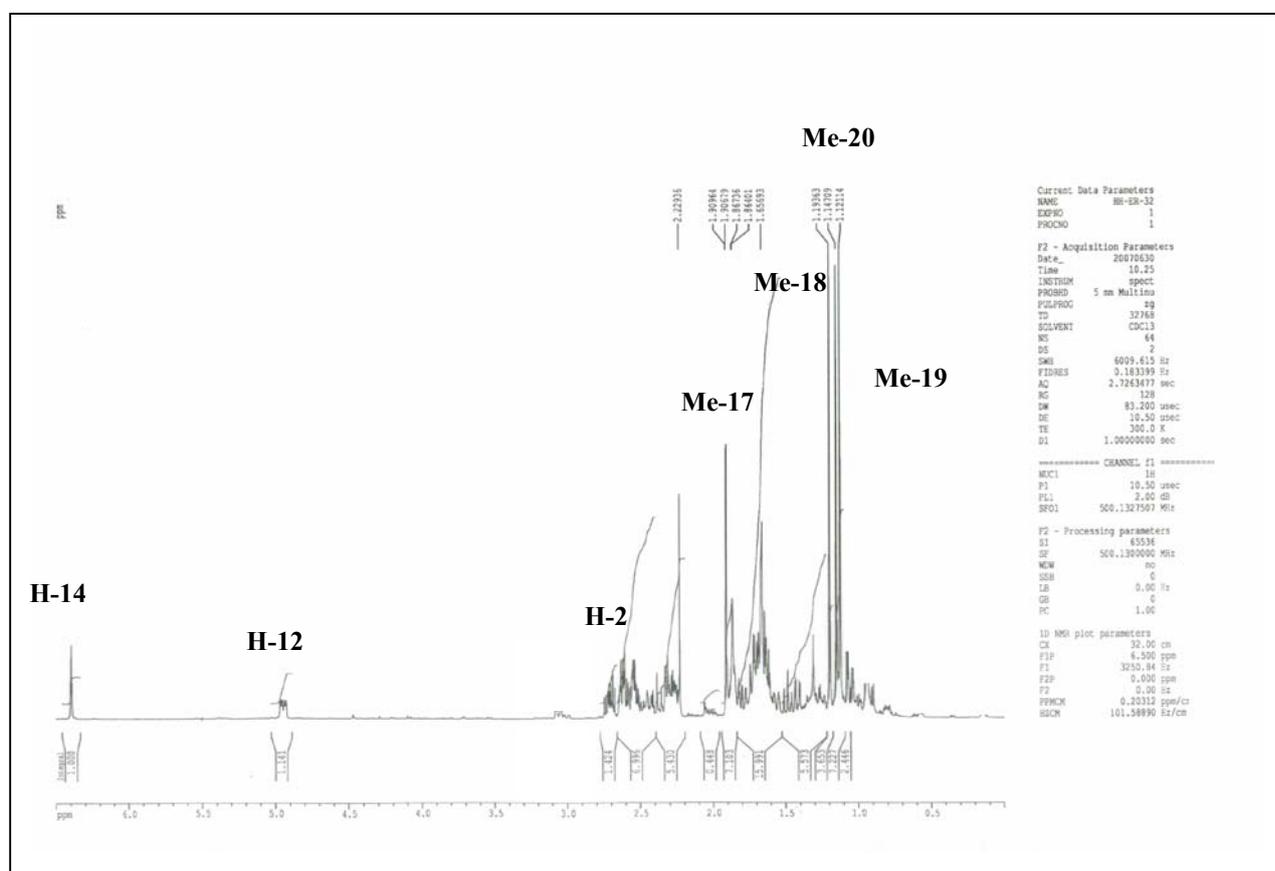


Figure 105 : Spectre RMN ^1H du composé **22**

L'expérience HMBC (figure 106) met en évidence les couplages entre les protons H-1, H-2, H-5, Me-18 et Me-19 et le carbone résonant à 215,7 ppm, attribué donc au carbone du carbonyle C-3.

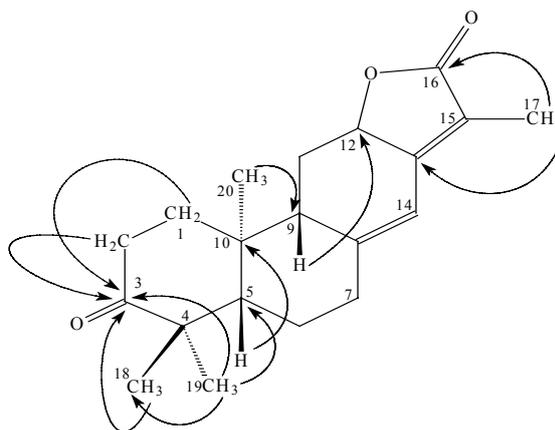


Figure 106 : Importantes corrélations HMBC observées pour le composé **22**

Les corrélations observées sur le spectre NOESY (figure 107) entre les paires de protons H-12/Me-20 et H-9/H-5 ainsi que l'absence de corrélation entre H-9 et H-20, montrent que ces deux paires de protons ont une orientation opposée par rapport au plan moyen de la molécule. Les déplacements chimiques du proton H-9 et sa multiplicité δ_H 2,32 (*d*, $J = 8,6$ Hz), du proton H-12 et sa multiplicité δ_H 4,95 (*ddd*, $J = 13,4, 5,9, 1,4$ Hz), impliquent qu'ils sont respectivement β et α -axiaux [105].

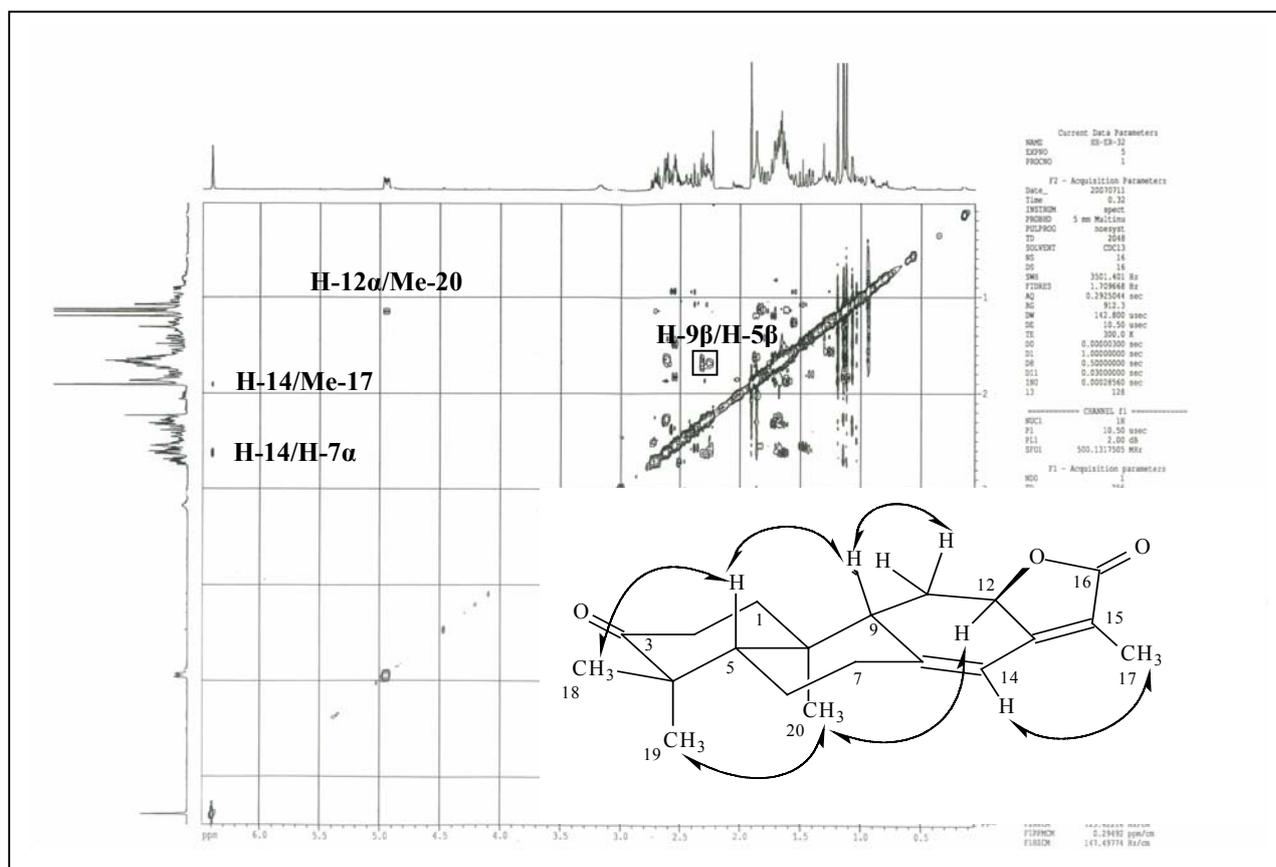


Figure 107 : Spectre NOESY du composé **22**

Le pouvoir rotatoire de ce composé égal à +126° (C= 0,35 g/100 ml, CHCl₃), est en accord avec ceux observés dans le cas de diterpénoïdes de type helioscopinolide/jolkinolide [106]. Les données spectroscopiques du composé **22**, représentées dans le tableau 23, sont aussi en parfait accord avec celles de la littérature [27,106].

Tableau 23 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **22** dans CDCl₃

Position	δ _H <i>m, J</i>	δ _C
1	1,69 <i>m</i> H-1β 2,26 <i>m</i> H-1α	37,4
2	2,53 <i>m</i> H-2β 2,71 <i>m</i> H-2α	34,4
3		215,7
4	-	47,6
5	1,72 <i>dd</i> 12,5, 2,5 H-5β	54,7
6	1,62-1,86 <i>m</i>	24,6
7	2,30-2,63 <i>m</i>	36,6
8	-	150,2
9	2,32 <i>dl</i> 8,6 H-9β	50,6
10	-	40,9
11	1,65 <i>m</i> H-11β 2,61 <i>m</i> H-11α	27,7
12	4,95 <i>ddd</i> 13,4, 5,9, 1,4 H-12α	75,7
13	-	155,6
14	6,39 <i>sl</i>	114,7
15	-	117,2
16	-	175,1
17	1,91 <i>d</i> 1,4	8,3
18	1,19 <i>s</i>	26,5
19	1,12 <i>s</i>	21,8
20	1,15 <i>s</i>	16,3

IV-7-5- Elucidation structurale des composés 23-28

L'analyse des spectres de masse EI-MS, UV, IR, RMN monodimensionnelle, RMN bidimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire, ainsi que la comparaison des données spectrales obtenues avec celles de la littérature pour des structures apparentées connues, nous ont permis de caractériser les composés **23** à **26**, **27** et **28** (page : 169-170).

Sur les spectres IR, tous les composés montrent au moins deux bandes d'absorption aux alentours de 1760 et 1650 cm^{-1} correspondant respectivement à une fonction γ -lactone et une double liaison. Les spectres UV de ces composés indiquent des absorptions maximales aux environs de 260 nm.

Les spectres RMN de tous ces composés, à l'exception de ceux du composé **28** qui fera l'objet d'une élucidation à part, présentent un grand nombre de similitudes structurales caractéristiques de molécules diterpéniques à squelette abiétane lactone de type jolkinolide/helioscopinolide, rencontrées dans bon nombre d'espèces du genre *Euphorbia*. On peut citer *E. seguieriana* [22], *E. Terracina* [23], *E. Jolkini* [25], *E. Calyprata* [26,27], *E. Sessiliflora* [30], *E. ebracteolata* [32] et *E. characias* [33].

Il est à signaler que nous n'avons pu établir de façon certaine que les composés isolés présentent une configuration absolue de type *ent*-abiétanolide, du fait que nous n'avons pas pu obtenir de cristaux à même d'effectuer une analyse par cristallographie RX. Nous considérons à priori tout au long de l'analyse structurale, qu'il s'agit d'abiétane lactones de la série antipode (*ent*). Cette hypothèse repose sur le fait que les deux diterpènes isolés et décrits précédemment **21** et **22** ont été définis comme appartenant à la série *ent* par analyse de leurs spectres et comparaison avec les données de la littérature. Elle est confortée par le fait qu'il paraît improbable qu'au sein d'une même plante, puissent coexister les deux séries : *ent* et normale (figure 108).

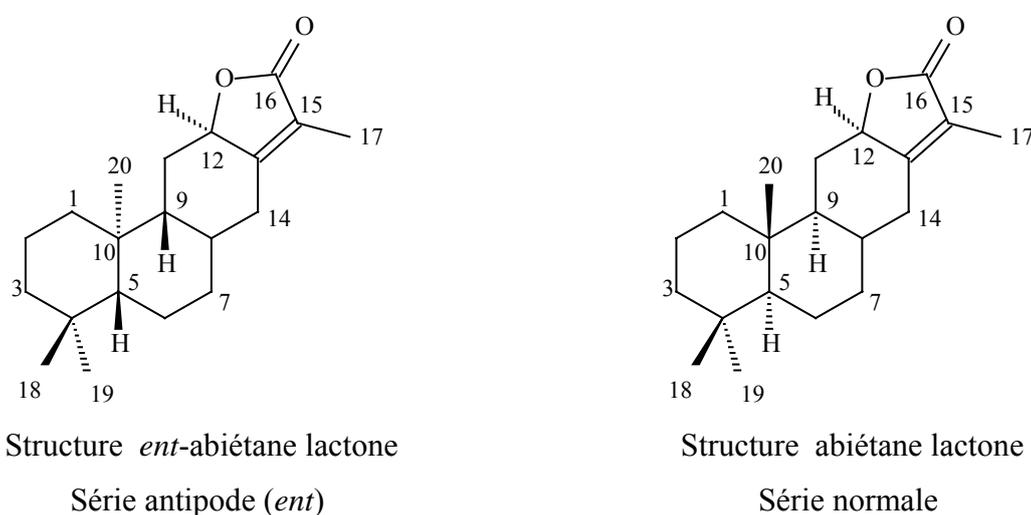


Figure 108 : Série *ent* et normale des diterpènes lactones

Sur les spectres de RMN ^1H , on observe des signaux récurrents, spécifiques d'un noyau ou d'un type de molécules étudiées. Sont également répertoriés des éléments pour la caractérisation des groupements fonctionnels

IV-7-5-1- Protons et carbones communs aux composés 23-26

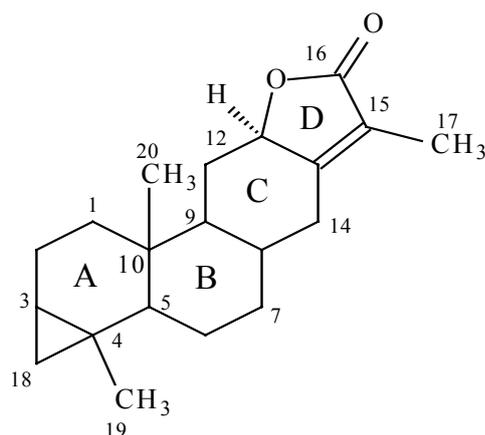


Figure 109 : Squelette abiétane lactone

Les protons correspondant aux deux groupements méthyles Me-19 et Me-20 (figure 109) résonnent à haut champ dans la région allant de 0,85 à 1,20 ppm (figures 110-113). Les protons du méthyle Me-17 relativement déblindés apparaissent dans la zone 2,05-2,25 ppm, du fait qu'ils sont sur le carbone lié à la double liaison. Ils se présentent sous forme de doublet ($J= 2,1$ Hz) du fait d'un couplage avec le proton H-12, avec une constante de couplage homoallylique de type *W* comme le montre l'analyse COSY H-H. Ce couplage apparaît particulièrement dans le cas des abiétanes lactones possédant le proton H-12 α -axial [105,107,108]. Ce dernier résonnant entre 4,98 et 5,39 ppm a été identifié grâce à la multiplicité caractéristique de son signal sous forme de doublet de doublet dédoublé ou doublet de doublet de quadruplet [26-28,109,110] avec des constantes de couplage d'environ 11,0, 7,0 et 2,1 Hz.

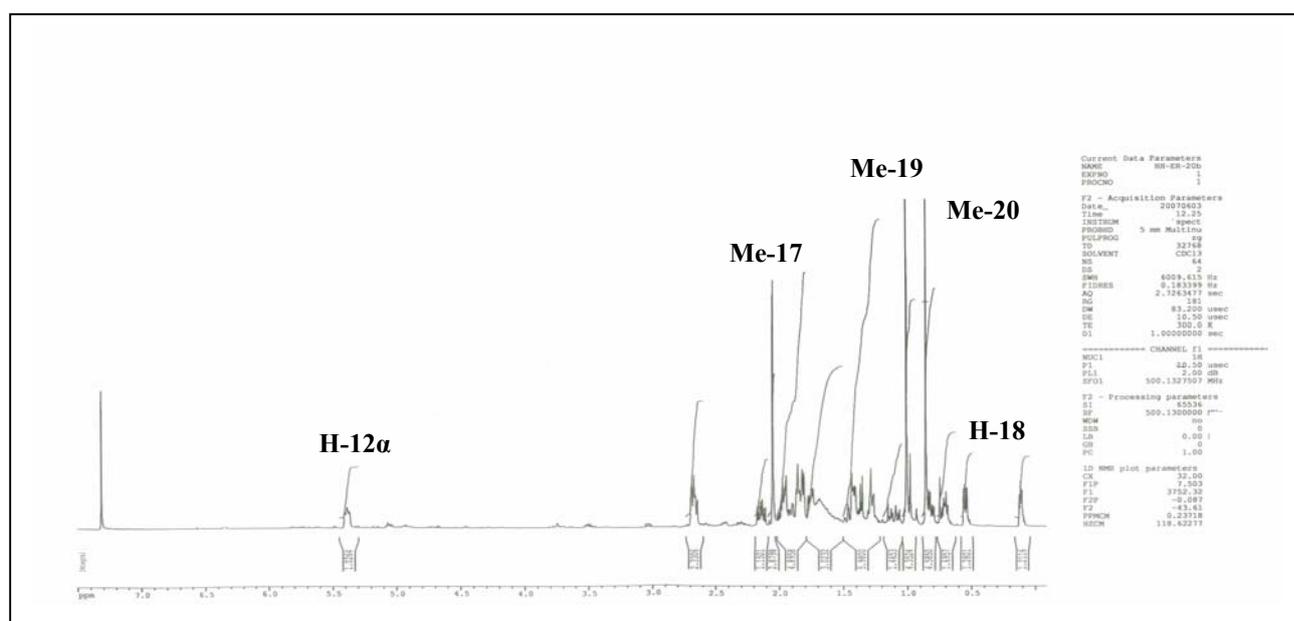


Figure 110 : Spectre RMN ^1H du composé 23

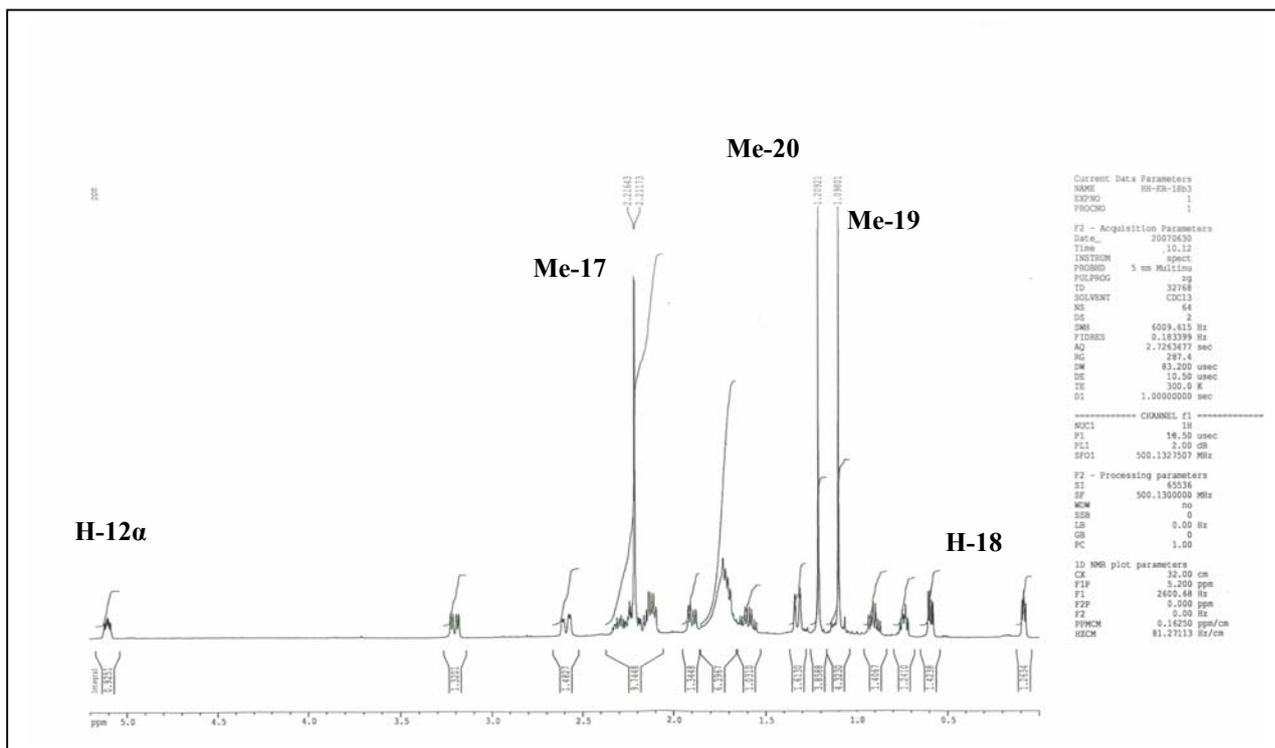


Figure 111 : Spectre RMN ^1H du composé 24

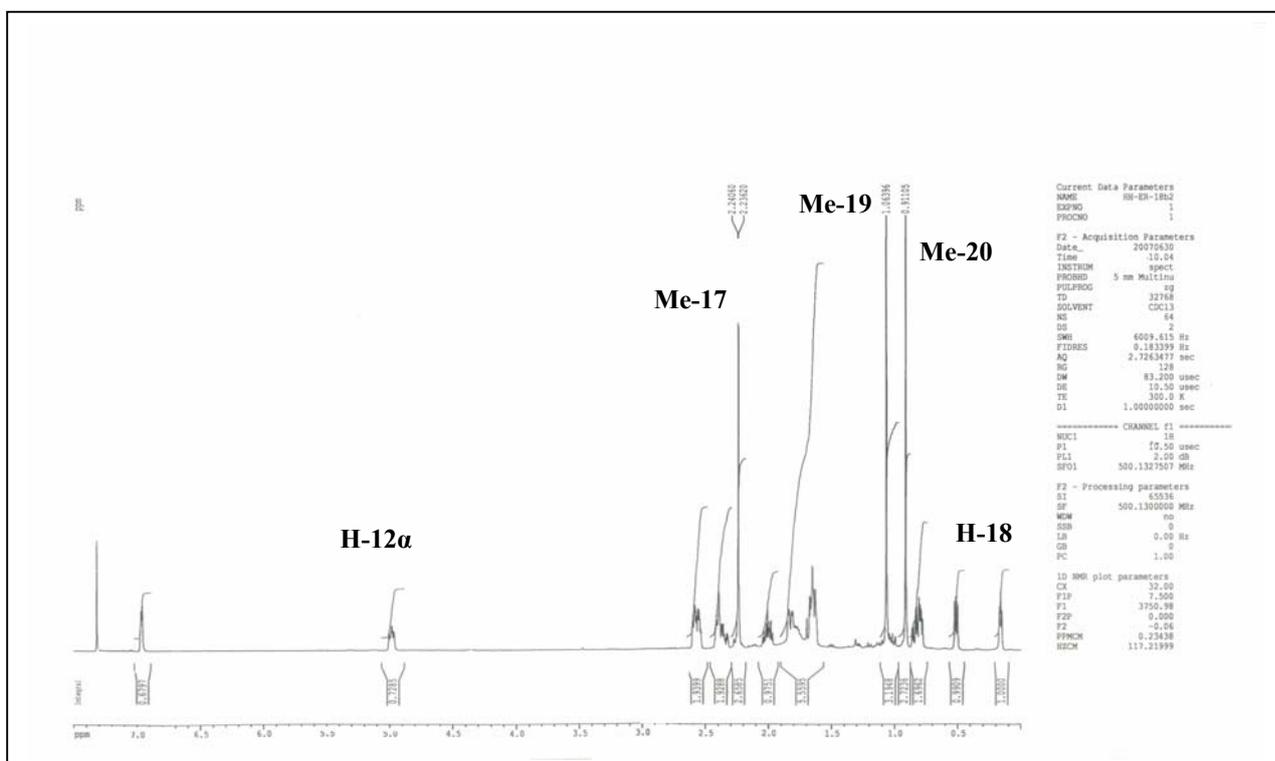


Figure 112 : Spectre RMN ^1H du composé 25

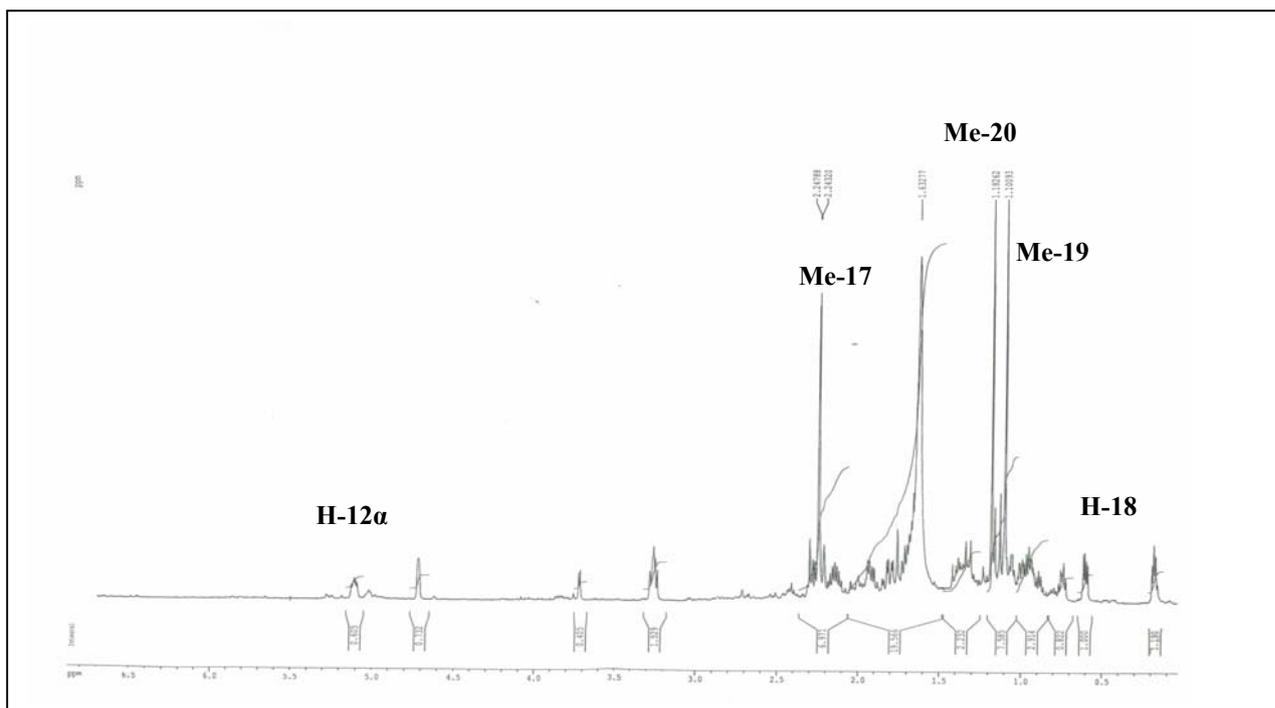


Figure 113 : Spectre RMN ^1H du composé **26**

Les spectres RMN ^{13}C *J*-modulé (figures 114-117) montrent les signaux attribuables aux groupements méthyles Me-17, Me-19 et Me-20 résonant globalement vers 10, 24 et 17 ppm respectivement, à l'exception du composé **25** dont le signal du Me-20 apparaît vers 12 ppm. Le méthyle Me-18 des diterpènes de type jolkinolide/helioscopinolide observé à des valeurs supérieures à 25 ppm [12-14, 25-30] y est remarquablement absent.

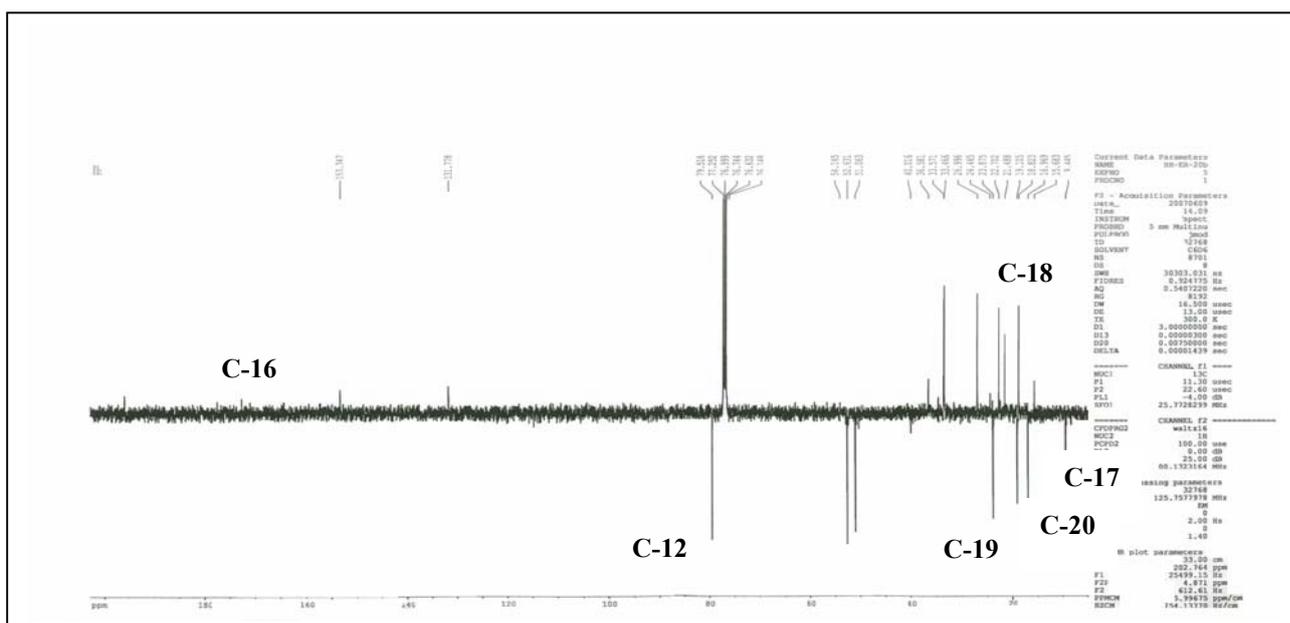


Figure 114 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **23**

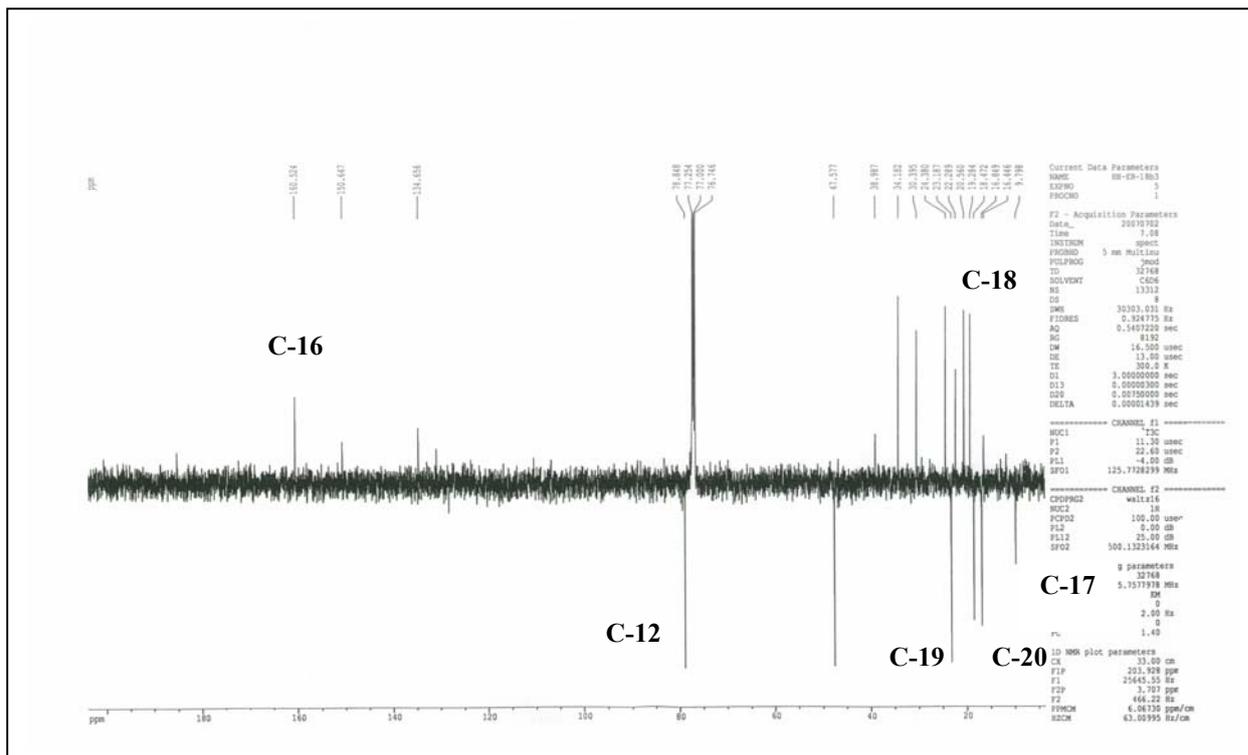


Figure 115 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **24**

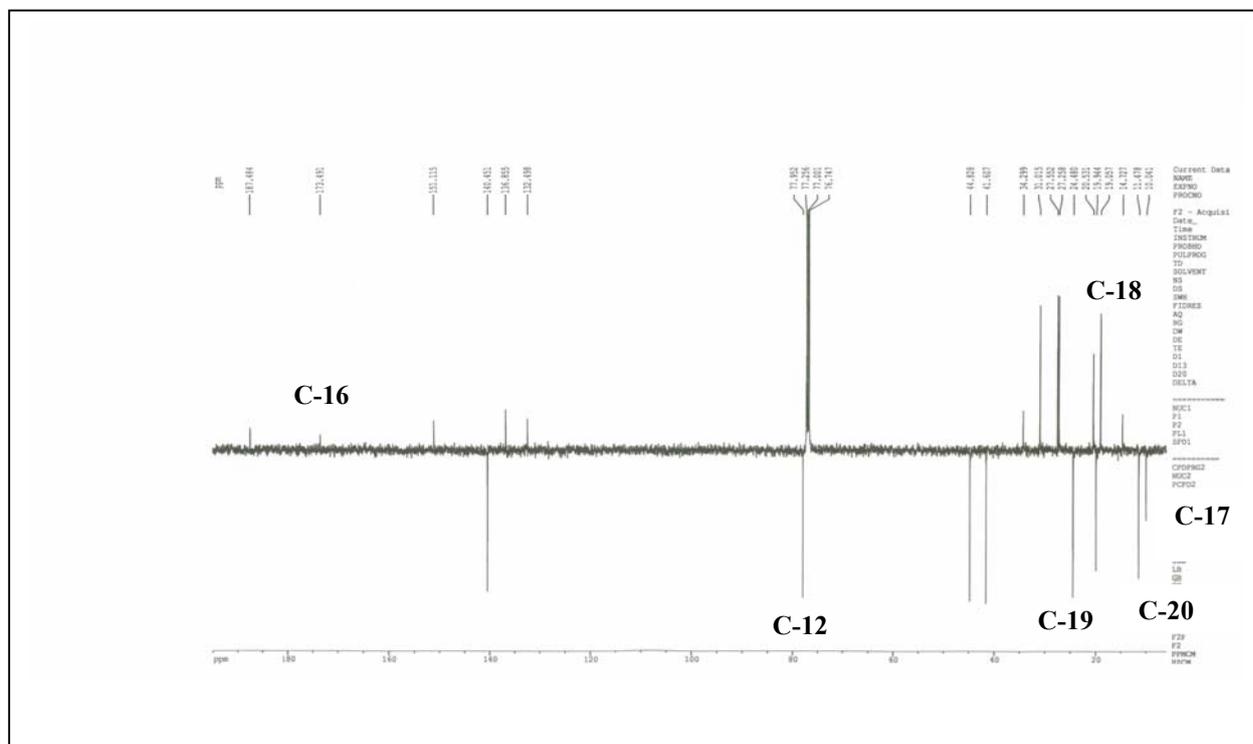


Figure 116 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **25**

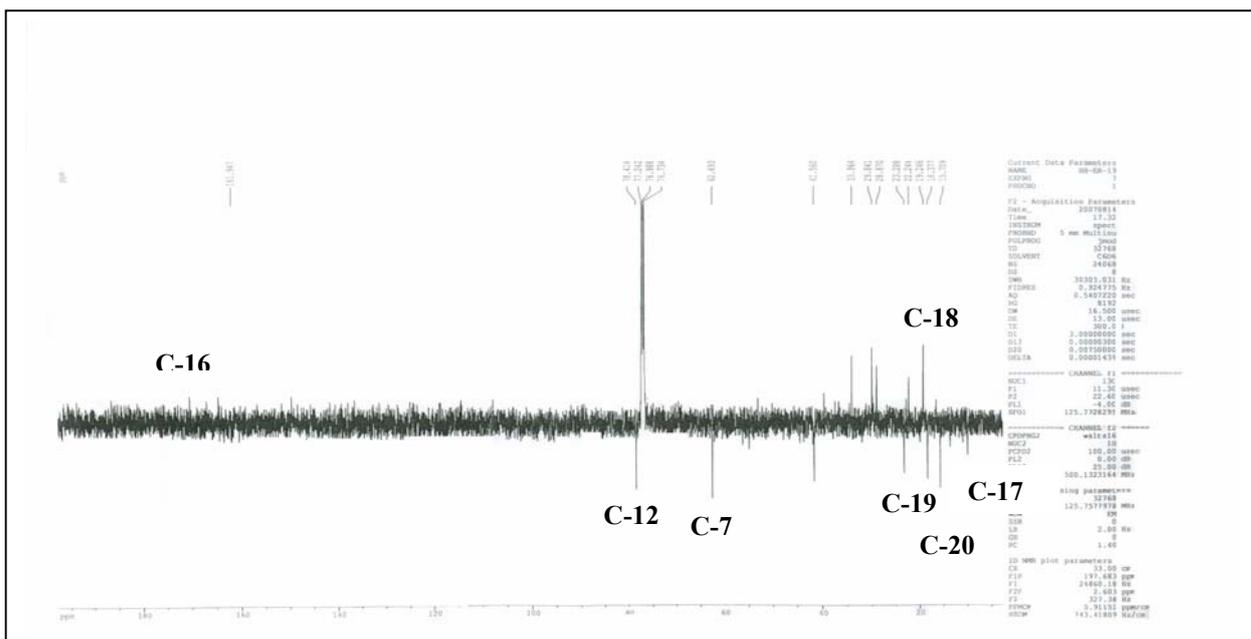


Figure 117 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **26**

L'analyse des spectres RMN ^{13}C J -modulé et HSQC J -modulé permet de repérer un signal déblindé, aux alentours de 22 ppm correspondant à un groupement méthylène CH_2 (H-18). Les protons de ce dernier résonant dans la région très blindée 0,08-0,61 ppm, sont caractéristiques des protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [109-112]. Ils présentent des corrélations sur les spectres HMBC avec le Me-19 attaché au carbone C-4 et les carbones C-2, C-3, C-4 et C-5. Ce qui permet de déduire que le cyclopropane se situe au niveau des carbones C-3 et C-4 [109-112].

Les spectres RMN ^{13}C J -modulé montrent également dans la région déblindée, aux environs de 130 et 150 ppm, des signaux correspondant respectivement à la double liaison tétrasubstituée C-15=C-13 du cycle lactonique. Le carbone quaternaire C-16 appartenant au cycle lactone, résonne aux alentours de 170 ppm sur les différents spectres [22-24,26-28,30,32,33,107-110].

Les protons H-3 et H-18 du noyau cyclopropane trisubstitué apparaissent dans la zone de déplacements chimiques 0,71-0,79 ppm (H-3), 0,08-0,19 ppm (H-18 *endo*) et 0,51-0,61 ppm (H-18 *exo*). Si les signaux des deux protons non équivalents H-18 se présentent pour toutes les molécules sous la forme de doublet de doublet, la multiplicité des signaux correspondant au proton H-3 varie : doublet dedoublé, doublet de triplet et multiplet ($J_{18\text{exo-3}} = 9,3$ Hz, $J_{18\text{endo-18exo}} = 4,3$ Hz, $J_{18\text{endo-3}} = 5,6$ Hz) [109-112]. Le couplage entre ces protons est par ailleurs confirmé par les taches de corrélation observables sur les différents spectres COSY H-H entre H-18 *endo* et H-18 *exo*, H-18 *endo* et H-3 et entre H-18 *exo* et H-3. L'expérience HSQC J -modulé permet d'attribuer le carbone C-3 aux alentours de 19 ppm sur les différents spectres.

L'appartenance de ces composés à la série *ent*, plutôt qu'à la série dite normale, est confortée par les valeurs des déplacements chimiques du proton H-3 δ_H 0,71-0,79 et du carbone C-3 δ_C 19 environ du noyau cyclopropane, en accord avec celles trouvées dans la littérature pour les diterpènes à squelette semblable ayant le proton H-3 en position α [109-112].

Il en résulte que ces composés appartiennent aux abiétane lactones de type jolkinolide/helioscopinolide (figure 109), possédant un noyau cyclopropane trisubstitué en positions 3 et 4 [109-112].

L'analyse RMN ^{13}C *J*-modulé constitue un bon moyen d'identification des fonctions présentes dans le squelette de base jolkinolide/helioscopinolide attribué précédemment aux composés étudiés. En effet, elle montre certains signaux plus ou moins caractéristiques permettant d'identifier les fonctions existantes. Ces signaux se rapportent au carbone quaternaire de la fonction cétone aux déplacements chimiques caractéristiques de 179 à 196 ppm, et aux carbones primaire et quaternaire de la fonction alcool résonant à 63,8 et 76,1 ppm respectivement.

IV-7-5-1-1- Identification du composé 23

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS (figure 118) montre un ion moléculaire à m/z 330,1819 $[M]^+$ (calculé 330,1831) correspondant à la formule brute $C_{20}H_{26}O_4$ et un fragment à m/z 312,1711 $[M-18]^+$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau.

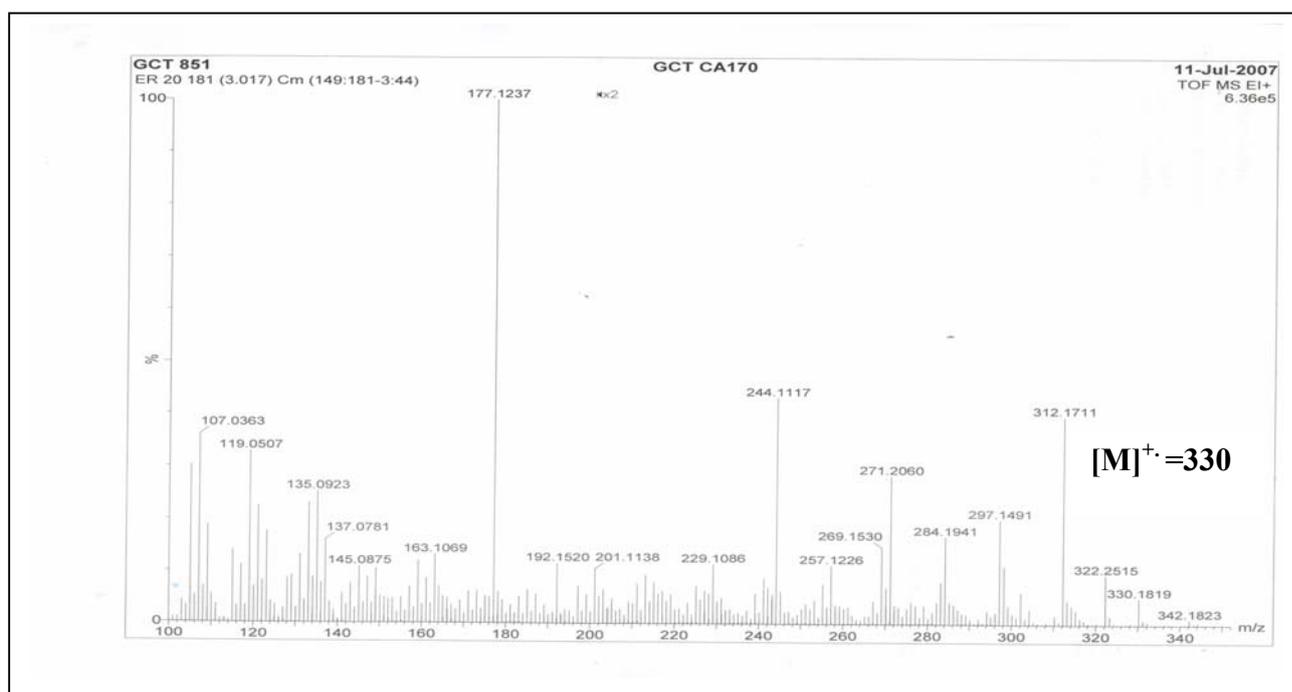


Figure 118 : Spectre de masse HR-EI-MS du composé 23

Le spectre IR présente une bande large à 3451 cm^{-1} caractéristique du groupement OH, des bandes fines à 1765 , 1685 , 1654 et 1615 cm^{-1} indiquant la présence d'une lactone, d'une fonction cétone et d'une double liaison.

Sur les 20 signaux observés sur le spectre RMN ^{13}C enregistré en *J*-modulé (figure 114), trois correspondent à des carbones primaires des méthyles Me-17, Me-19 et Me-20 à $9,4$, $23,9$ et $16,9\text{ ppm}$ respectivement et quatre à des carbones tertiaires (CH). L'observation du spectre RMN HSQC *J*-modulé permet de distinguer sur les treize signaux restants, six carbones secondaires (CH_2) et sept carbones quaternaires. Sur les quatre atomes d'oxygène du composé, deux font partie intégrante de la fonction γ -lactone α,β insaturée. Il est donc nécessaire de savoir dans quel type de fonction et dans quel cycle sont impliqués les deux atomes d'oxygène restants. L'analyse combinée des spectres RMN ^{13}C *J*-modulé et HSQC *J*-modulé permet d'identifier un signal caractéristique d'une fonction cétone avec un carbone quaternaire extrêmement déblindé résonant à $196,0\text{ ppm}$. Le dernier atome d'oxygène forme une fonction alcool attachée à un atome de carbone quaternaire comme le montre le signal à $\delta_{\text{C}} 76,1$. La bande d'absorption IR à 3451 cm^{-1} confirme la présence du groupement OH. A l'issue de cette analyse, il apparaît que le composé **23** est un abiétane lactone comportant une fonction cétone et une fonction alcool.

L'analyse combinée des spectres RMN 2D COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY permet d'établir la position de ces dernières et également d'identifier les différents signaux de protons et carbones du composé (tableau 24).

Le carbone méthylé Me-19 résonant à $23,9\text{ ppm}$ constitue le point de départ de notre élucidation structurale. Il corrèle en HMBC (figure 119) avec les protons méthyléniques H-18 ($\delta_{\text{H}} 0,12$, *dd*, $J= 5,3, 4,8\text{ Hz}$, H-18 *endo* et $\delta_{\text{H}} 0,55$, *dd*, $J= 9,3, 4,2\text{ Hz}$, H-18 *exo*) caractéristiques du noyau cyclopropane [109-110]. Sur le spectre COSY H-H (figure 119), les protons H-18 couplent entre eux et avec le proton H-3 résonant à $0,71\text{ ppm}$ sous forme de doublet de triplet ($J= 9,3$ et $6,1\text{ Hz}$). L'expérience COSY H-H, à travers les taches de corrélation, permet d'établir la présence d'une chaîne ayant le même système de spin, à savoir $^{18}\text{CH}_2\text{-}^3\text{CH}\text{-}^2\text{CH}_2\text{-}^1\text{CH}_2$ (figure 119). Les carbones correspondant à cette chaîne ont été assignés par HSQC *J*-modulé : C-18 ($21,5\text{ ppm}$), C-3 ($19,1\text{ ppm}$), C-2 ($18,8\text{ ppm}$) et C-1 ($33,6\text{ ppm}$).

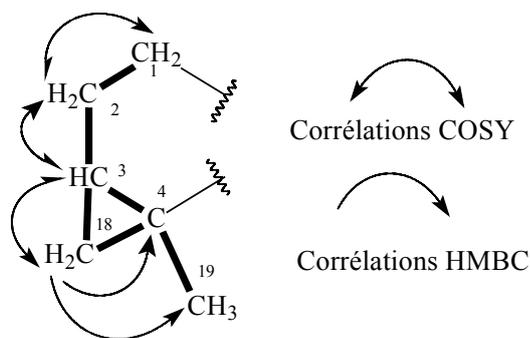


Figure 119 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **23**

Les protons du méthyle Me-19 à 1,00 ppm, corrélient en HMBC (figure 120) avec les carbones C-18 et C-3 déjà attribués ainsi que les carbones C-4 et C-5. Les déplacements chimiques de ces derniers sont aisément repérables sur le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 114) puisqu'il s'agit d'un primaire CH (C-5) et d'un quaternaire (C-4) résonnant respectivement à 51,1 et 15,7 ppm.

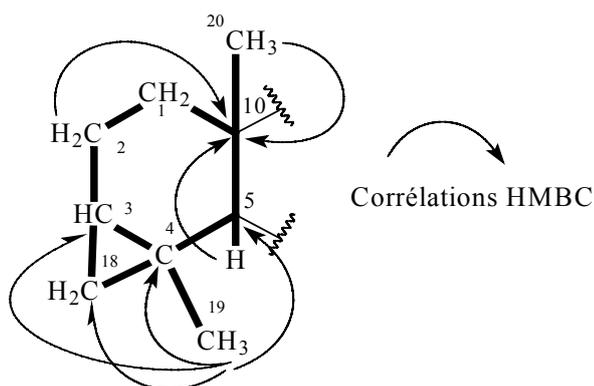


Figure 120 : Corrélations HMBC observées au niveau du cycle A du composé **23**

Les corrélations HMBC en 3J des protons H-2 à 1,85-1,97 ppm sous forme de multiplet, en 2J des protons du méthyle Me-20 à 0,25 ppm sous forme de singulet et du proton H-5_{ax} à 1,28 ppm (dd , $J= 11,0$ et $2,7$ Hz) avec le carbone quaternaire C-10 (figure 120), permettent de localiser ce dernier à 36,6 ppm et de fermer le cycle A.

Les protons H-6 résonant à 1,41 et 1,95 ppm sont identifiés en COSY H-H (figure 121) à travers leurs taches de corrélations avec le proton vicinal H-5_{ax}. Ils corrélient également avec les protons H-7 résonant à 1,43 ppm (m , H-7_{ax}) et 2,68 ppm (dd , $J= 12,7$ et $4,4$ Hz, H-7_{eq}). Ce qui permet de constituer l'enchaînement $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CH}_2$. Les carbones correspondant qui corrélient en HMBC avec le proton H-5_{ax} (figure 121), résonnent en HSQC J -modulé à 22,7 ppm (C-6) et 33,5 ppm (C-7).

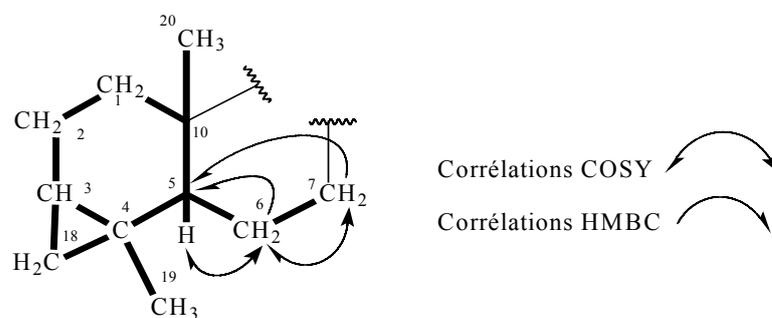


Figure 121 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **23**

Sur le spectre HMBC, les protons du méthyle Me-20, H-1 et H-5 corrélient en 3J (figure 122) avec un CH qui ne peut être que le C-9 résonant à 52,6 ppm. L'expérience HSQC J -modulé permet de caractériser le proton H-9 à 1,82 ppm (d , $J= 6,3$ Hz). Ce dernier faisant partie d'un système de spin constitué de quatre protons facilement identifiables sur le spectre COSY H-H (figure 122). Il couple avec deux protons géminés H-11 à 2,66 ppm (dd , $J= 12,7$ et $7,7$ Hz, H-11a) et 2,14 ppm (ddd , $J= 13,4$, $12,2$ et $6,3$ Hz, H-11b), eux même couplant avec le proton H-12 à 5,39 ppm (ddd , $J= 11,3$, $6,7$, $1,9$ Hz, H-12). Les protons du méthyle vinylique Me-17 du cycle lactonique montrant un couplage homoallylique de type W avec le proton H-12, apparaissent à 2,05 ppm sous forme de doublet avec une faible constante de couplage ($^5J_{H17-H12}= 2,2$ Hz). Le spectre HSQC J -modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-11 à 27,0, C-12 à 79,5 et C-17 à 9,4 ppm.

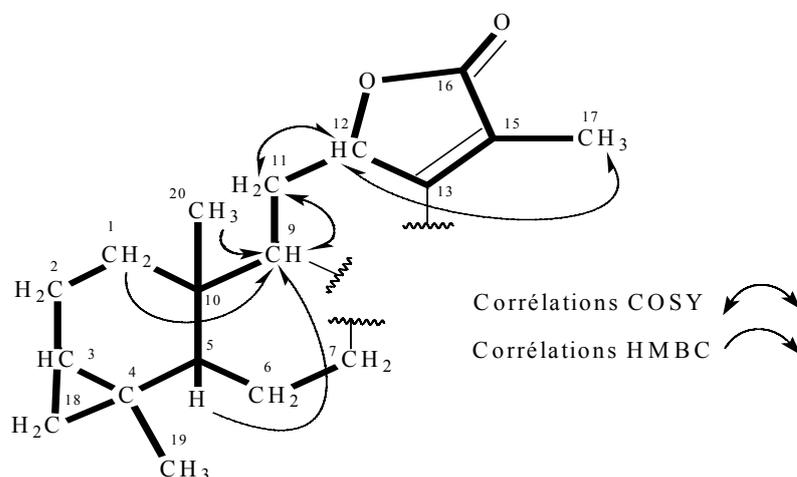


Figure 122 : Corrélations HMBC et COSY H-H du composé **23**

Les protons H-6 et H-11 corrélient en HMBC (figure 123) à travers un couplage 3J , avec le carbone quaternaire C-8 résonant à δ_C 76,1 attribué au carbone C-8. La valeur de son déplacement chimique indique qu'il est porteur du groupement hydroxyle. Ceci permet de fermer le deuxième cycle B par une liaison C-8 – C-9, formant ainsi la décaline. A l'issue de l'analyse, il en découle que la fonction cétone ne peut être qu'en position C-14. Les taches de corrélation en 3J visualisées

sur le spectre HMBC entre le carbone quaternaire C-14 résonant à 196,0 ppm et les protons H-9 et H-7 (figure 123), confirment cette attribution.

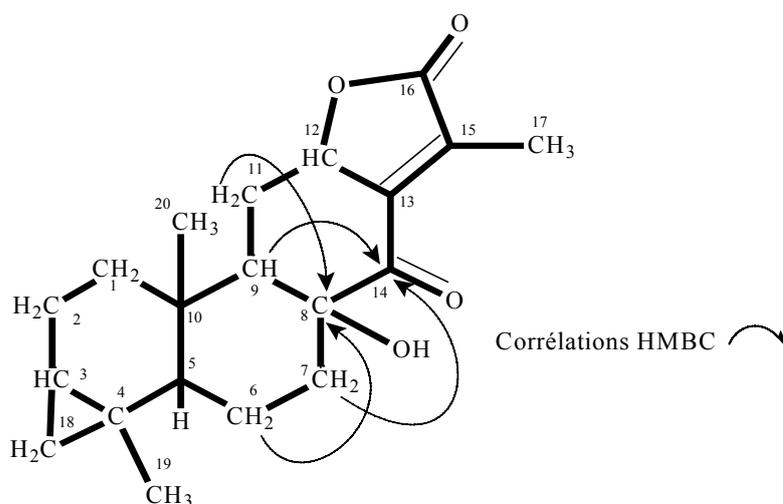


Figure 123 : Corrélations HMBC du composé **23**

Enfin, la distinction entre les carbones éthyléniques quaternaires C-13 et C-15 est rendue possible grâce à l'analyse HMBC (figure 124). En effet, le carbone C-13 résonant à 153,3 ppm a été aisément identifié suite aux corrélations en 3J (figure 125) qu'il présente avec les protons H-11 et les protons vinyliques Me-17. Ces derniers couplent aussi en 4J avec le carbonyle de la fonction cétone C-14, en 3J (figure 125) avec le carbone quaternaire de la γ -lactone C-16 à 172,9 ppm et en 2J avec le deuxième carbone éthylénique à 131,8 ppm (C-15).

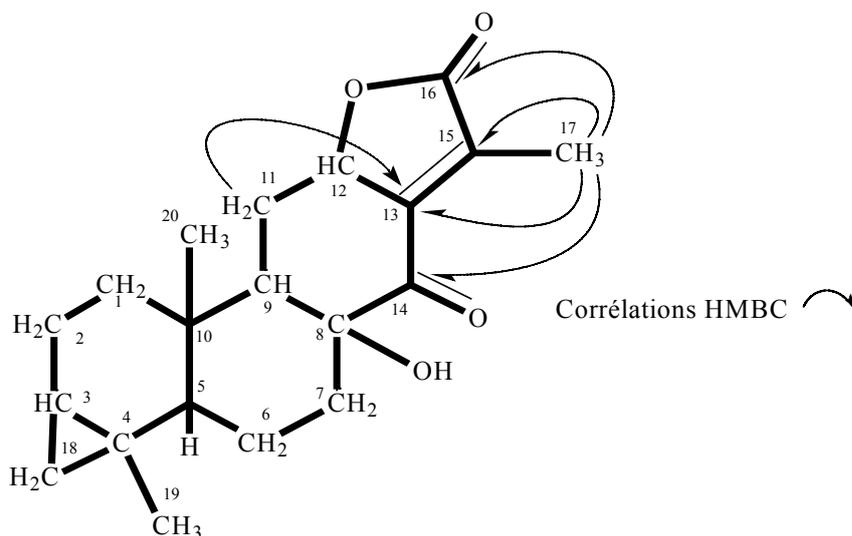


Figure 125 : Corrélations HMBC du composé **23**

Tous les signaux de protons et carbones du composé **23** ont été établis au moyen des spectres COSY H-H, HSQC J -modulé et HMBC (tableau 24).

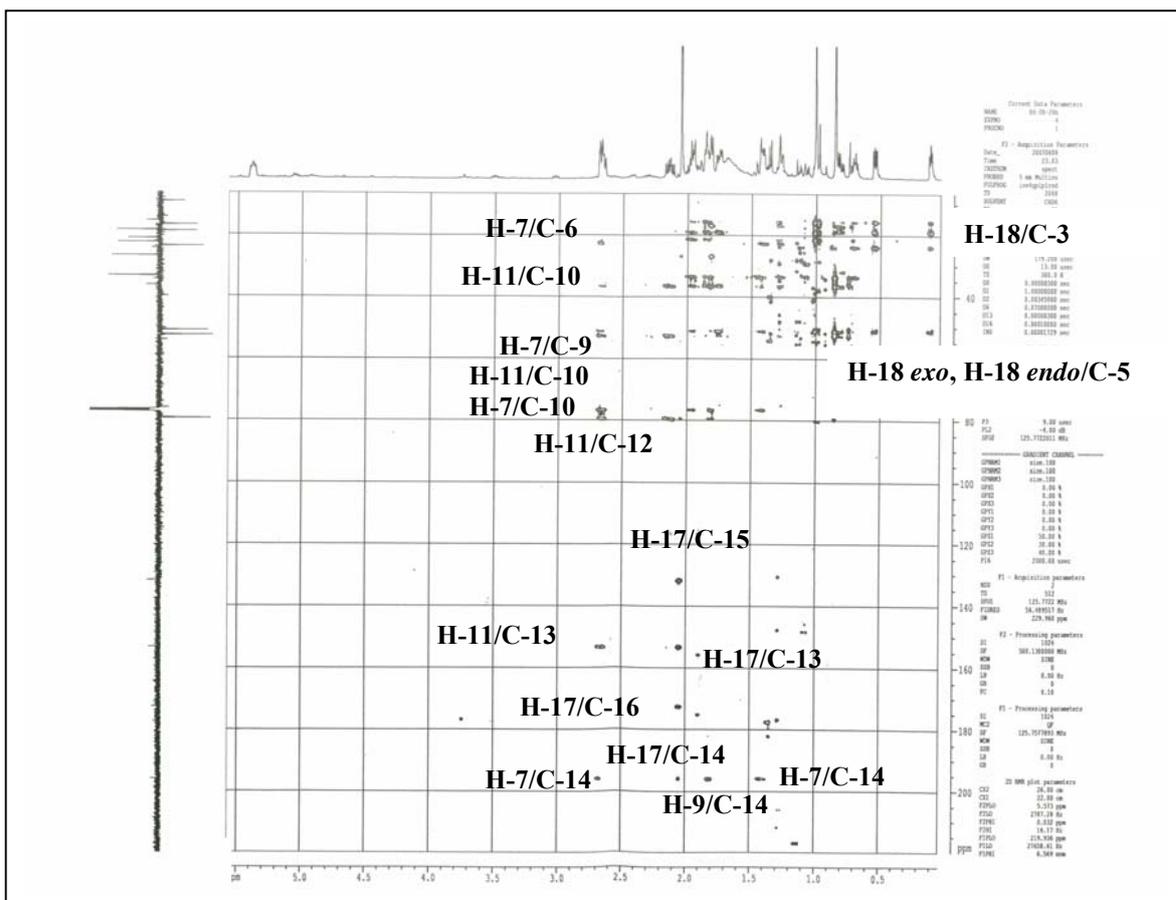


Figure 124 : Spectre HMBC du composé **23**

La détermination de la configuration relative du composé repose généralement sur l'analyse des effets NOE observables sur le spectre de RMN 2D homonucléaire NOESY. Nous pouvons recourir, le cas échéant, à l'étude des valeurs des constantes de couplage de certains protons caractéristiques qui seront ensuite comparées aux valeurs théoriques déduites de la courbe de Karplus, après analyse des angles dièdres déterminés sur le modèle moléculaire de Dreiding. Enfin, en se basant sur certaines références de la littérature, le simple déplacement chimique de carbones et protons ainsi que leurs multiplicité, permettent de déduire la stéréochimie relative d'un composé. La stéréochimie de la jonction entre les cycles A et B a été établie comme étant *trans* pour des considérations de biogenèse [105,107,109,110]. Le proton H-12 est α -orienté tandis que le proton H-9 est positionné en β . Cette affirmation s'appuie sur les valeurs des constantes de couplage et la multiplicité des signaux des protons H-9, H-11 et H-12 et sur la comparaison avec les données spectrales des structures apparentées [105,22-24,30,32,33, 107-110]. Le proton H-12 apparaît à 5,39 ppm sous forme de doublet de doublet de doublet large ($J= 11,3, 6,7, 1,9$ Hz). En se référant à la courbe de Karplus, la constante de couplage $J_{H12-H11b}$ égale à 11,3 Hz, correspond à un angle dièdre

de l'ordre de 180° (figure 126), entre les protons vicinaux H-12 et H-11b, impliquant ainsi un couplage axial-axial. Le proton H-11b axial est donc β -orienté, imposant une orientation α (équatoriale) pour le proton H-11a. La constante $J_{H_{12ax}-H_{11b}}$ de 6,7 Hz correspondant à un angle dièdre de 42° (figure 126), confirme cette orientation.

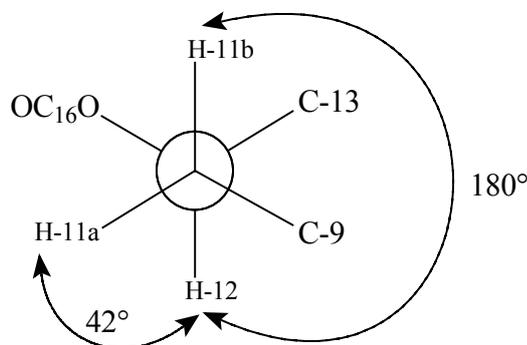


Figure 126 : Représentation de Newman des carbones C-11 et C-12 du composé **23**

La valeur de la constante de couplage du proton H-9 résonant à 1,82 ppm sous la forme de doublet $J_{H_9-H_{11b}} = 6,3$ Hz avec les protons vicinaux H-11, conduit à un angle dièdre (figure 127) de l'ordre de 37° , valeur en accord avec l'orientation β -axiale du proton H-9. Le deuxième angle dièdre (80°) formé entre les protons H-9 β et H-11a d'orientation α , correspond à une valeur de la constante de couplage $J = 0$ Hz (figure 127). Ce qui explique bien la multiplicité du signal du proton H-9 β .

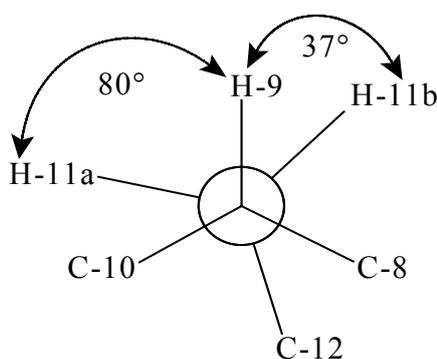


Figure 127 : Représentation de Newman des carbones C-9 et C-11 du composé **23**

Les valeurs de constantes de couplage des protons H-11 résonant à 2,66 ppm (*dd*, $J = 12,7$ et $7,7$ Hz, H-11a) et à 2,14 ppm (*td*, $J = 12,2$ et $6,3$ Hz, H-11b) corroborent cette affirmation. La réalisation du modèle moléculaire de Dreiding pour ce composé, permet de mesurer les angles dièdres suivants : 180° pour les protons H-12 α , H-11 β , 44° pour H-12 α , H-11 α , 78° pour H-9 β , H-11 α_x et 38° pour H-9 β , H-11 β . Ces valeurs sont en parfait accord avec les valeurs annoncées

dans la littérature pour les diterpènes à squelette *ent*-abiétane lactone à protons H-12 α -axial et H-9 β -axial [105].

L'orientation des protons restants a été établie par analyse NOESY (figure 127). En effet, le proton H-12 α présentant des effets NOE avec les protons méthyliques Me-20 et H-11a, permet de déduire qu'ils sont situés du même côté de la molécule. L'orientation β -axiale des protons H-9 et H-5, est confirmée par l'absence de corrélations entre ces deux protons et les protons du méthyle Me-20 α -axial d'une part, et la valeur de la constante de couplage $J_{H5-H6} = 11,0$ Hz correspondant à un couplage axial-axial ainsi que par l'effet NOE visualisé entre les protons H-5 et H-9 d'autre part. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le proton H-7 résonant à 1,43 ppm, prouvant qu'il est également β -axial. Ces constatations plaident davantage quant à l'appartenance de ce composé à la série *ent*.

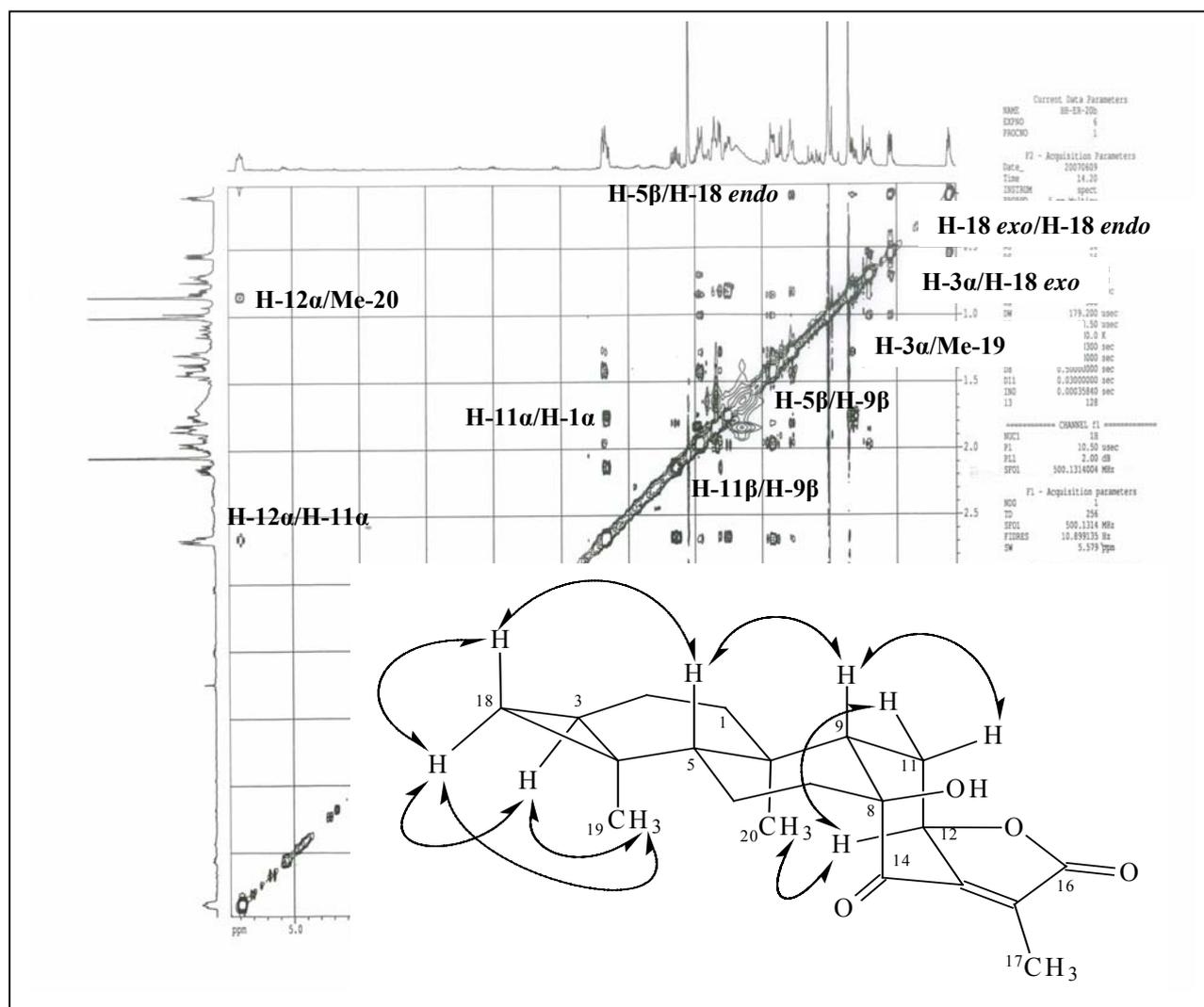


Figure 127 : Spectre NOESY du composé 23

D'autres effets NOE (figure 127) sont observés entre le proton H-5 β -axial et les protons H-18 *endo*, le proton H-6 α résonant à 1,95 ppm et le proton H-1b repéré à 0,83 ppm. Ces protons se trouvent donc tous sur la même face β de la molécule. L'absence de corrélation entre H-5 β et les protons du méthyle Me-19 implique qu'il est α -orienté. Il est également observé sur la face α de la molécule, des effets NOE entre les protons du méthyle Me-19 et les protons H-18 *exo*, H-3, H-6b résonant à 1,41 ppm et H-2a repéré à 1,97 ppm. Des corrélations entre les protons H-3 α /H-18 *exo*, H-18 *endo*/H-18 *exo*, H-6 α /H-7 α , Me-20/H-6 α et H-18 *endo*/H-2 β , ont été également repérées sur le spectre NOESY.

Il reste maintenant à déterminer l'orientation du groupement OH attaché au carbone C-8. Le spectre NOESY (figures 127,128) montre une corrélation entre les protons du méthyle Me-20 et le proton H-12 α , d'intensité nettement supérieure à la corrélation entre les protons H-11 α et H-12 α . Ce constat nous autorise légitimement à suggérer que les protons méthyliques Me-20 et H-12 α sont très proches entre eux, comparé aux protons H-11 α et H-12 α . Le modèle moléculaire de Dreiding montre que cette corrélation ne peut être observée avec une telle intensité, que si le groupement hydroxyle se trouve en position β .

Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆, permet de repérer le signal correspondant au proton de l'hydroxyle résonant sous forme de singulet large à 5,88 ppm. Le spectre HMBC présente une tache de corrélation entre ce proton et le carbone C-8 à 75,8 ppm. Il corréle également en NOESY (figure 128) avec les protons H-9 β , Me-17 et H-7 β , confirmant ainsi l'orientation β du groupement OH.

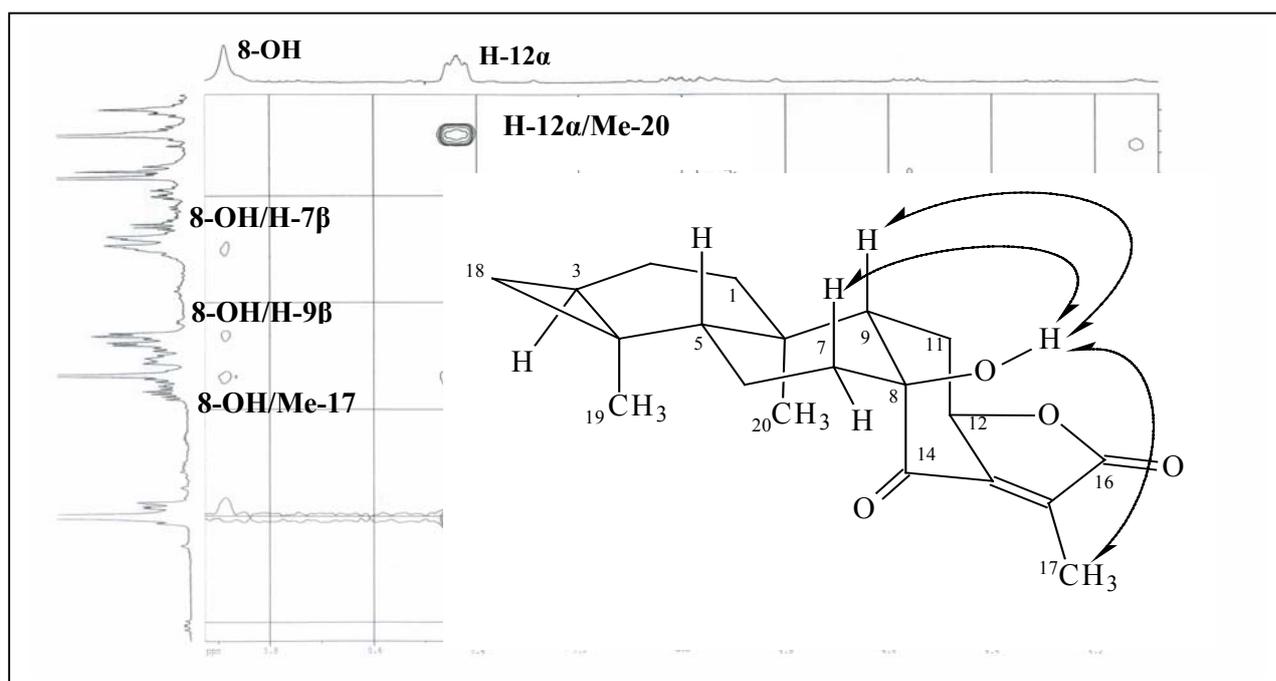
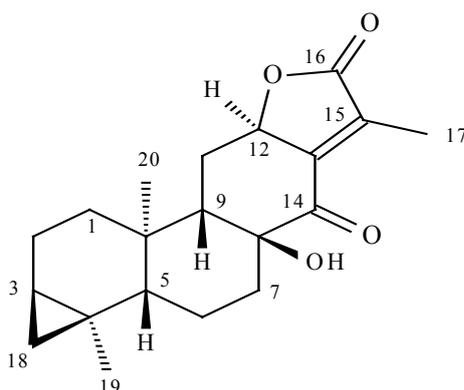


Figure 128 : Spectre NOESY du composé **23** dans le DMSO-*d*₆

Cette analyse spectrale permet d'attribuer sans ambiguïté, la structure suivante pour le composé **23** nouveau : 3,4,18β-cyclopropano-8β-hydroxy-14-oxo-*ent*-abiét-13,15,èn-6,12-olide.

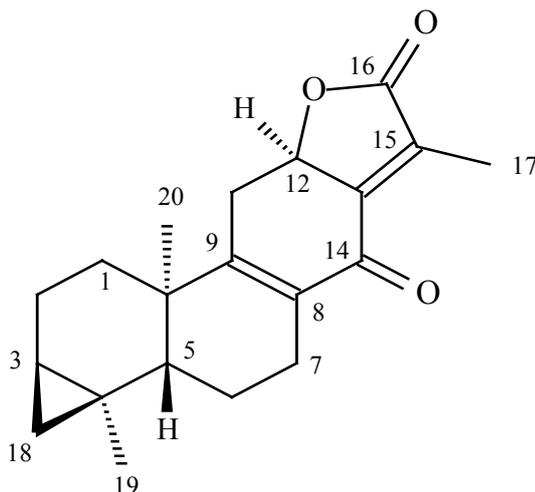


3,4,18β-cyclopropano-8β-hydroxy-14-oxo-*ent*-abiét-13,15,èn-6,12-olide (**23**)

Tableau 24 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **23** dans CDCl₃

Position	δ _H <i>m J</i> Hz	δ _C
1a	1,76 <i>dd</i> 12,7, 5,9 H-1α	33,6
1b	0,83 <i>td</i> 13,4, 6,0 H-1β	
2a	1,97 <i>m</i> H-2α	18,8
2b	1,85 <i>m</i> H-2β	
3	0,71 <i>dt</i> 9,3, 6,1 H-3α	19,1
4	-	15,7
5	1,28 <i>dd</i> 11,0, 2,7 H-5β	51,1
6a	1,95 <i>m</i> H-6β	22,7
6b	1,41 <i>m</i> H-6α	
7a	2,68 <i>dd</i> 12,7, 4,4 H-7α	33,5
7b	1,43 <i>m</i> H-7β	
8	-	76,1
9	1,82 <i>d</i> 6,3 H-9β	52,6
10	-	36,6
11a	2,66 <i>dd</i> 12,7, 7,7 H-11α	27,0
11b	2,14 <i>td</i> 12,2, 6,3 H-11β	
12	5,39 <i>ddd</i> 11,3, 6,7, 1,9 H-12α	79,5
13	-	153,3
14	-	196,0
15	-	131,8
16	-	172,9
17	2,05 <i>d</i> 2,2	9,4
18a	0,55 <i>dd</i> 9,3, 4,2 H-18 <i>exo</i>	21,5
18b	0,12 <i>dd</i> 5,3, 4,8 H-18 <i>endo</i>	
19	1,00 <i>s</i>	23,9
20	0,85 <i>s</i>	16,9

IV-7-5-1-2- Identification du composé 24



3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-diène-16,12-olide (**24**)

Le spectre RMN du proton (figure 111) s'avère presque identique à celui du composé **23** décrit précédemment. Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 115) présente l'ensemble des signaux observés pour le composé **22** à l'exception des carbones C-8 et C-9 qui résonnent à des valeurs plus déblindées égales à 134,6 et 160,5 ppm, attribuables selon l'expérience HSQC *J*-modulé, aux carbones quaternaires de la double liaison C-8=C-9. Cette dernière affecte par conséquent les carbones voisins, particulièrement les groupements méthylènes CH_2 en position C-7 et C-11 qui résonnent respectivement à 24,4 et 34,2 ppm et le carbone de la cétone C-14 à 185,7 ppm comme le montrent les spectres HSQC *J*-modulé, ^{13}C *J*-modulé et COSY H-H. Ces expériences permettent par la suite d'attribuer tous les protons ainsi que leurs carbones correspondants (tableau 25).

L'attribution précise des déplacements chimiques des carbones quaternaires éthyléniques C-8 et C-9 est faite par analyse HMBC. Elle montre des corrélations 3J (figure 129) entre le carbone C-9 (δ_{C} 160,5 ppm) et les protons H-1 (δ_{H} 0,90 et 1,71 ppm), H-7 (δ_{H} 2,30 et 2,59 ppm) et Me-20 (δ_{H} 1,20 ppm) et entre le carbone C-8 (δ_{C} 134,6 ppm) et les protons H-6 (δ_{H} 2,12 ppm) et H-11 (δ_{H} 2,21 et 3,21 ppm). Le déblindage de $\Delta + 24.9$ ppm du carbone C-9 par rapport à C-8 implique que la double liaison est conjuguée avec le carbone C-14 de la cétone (cétone α,β insaturée). Les autres corrélations permettent d'assigner les carbones non encore identifiés.

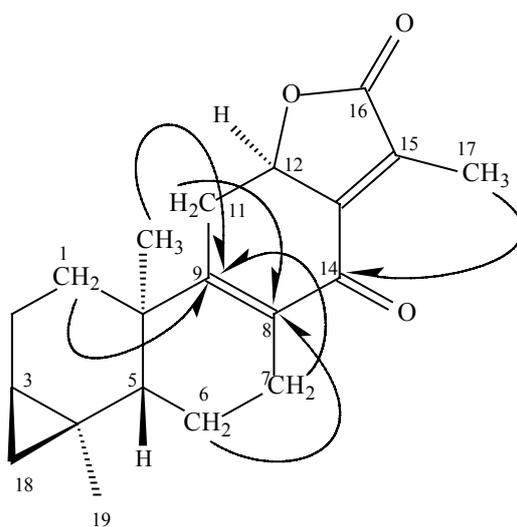


Figure 129 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **24**

Le spectre IR montre des bandes fines correspondant à des fonctions γ lactone (1760 cm^{-1}), cétone (1682 cm^{-1}) et doubles liaisons (1618 cm^{-1}).

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS, donne un ion moléculaire à m/z 312,1723 $[M]^+$ (calculé 312,1725) correspondant à la formule brute $C_{20}H_{24}O_3$ (figure 130). La différence de 18 unités correspondant à la perte d'une molécule d'eau, confirme la présence d'une double liaison comparativement au composé **23**. L'absence d'une large bande d'absorption aux environs de 3400 cm^{-1} sur le spectre IR, apporte une confirmation supplémentaire.

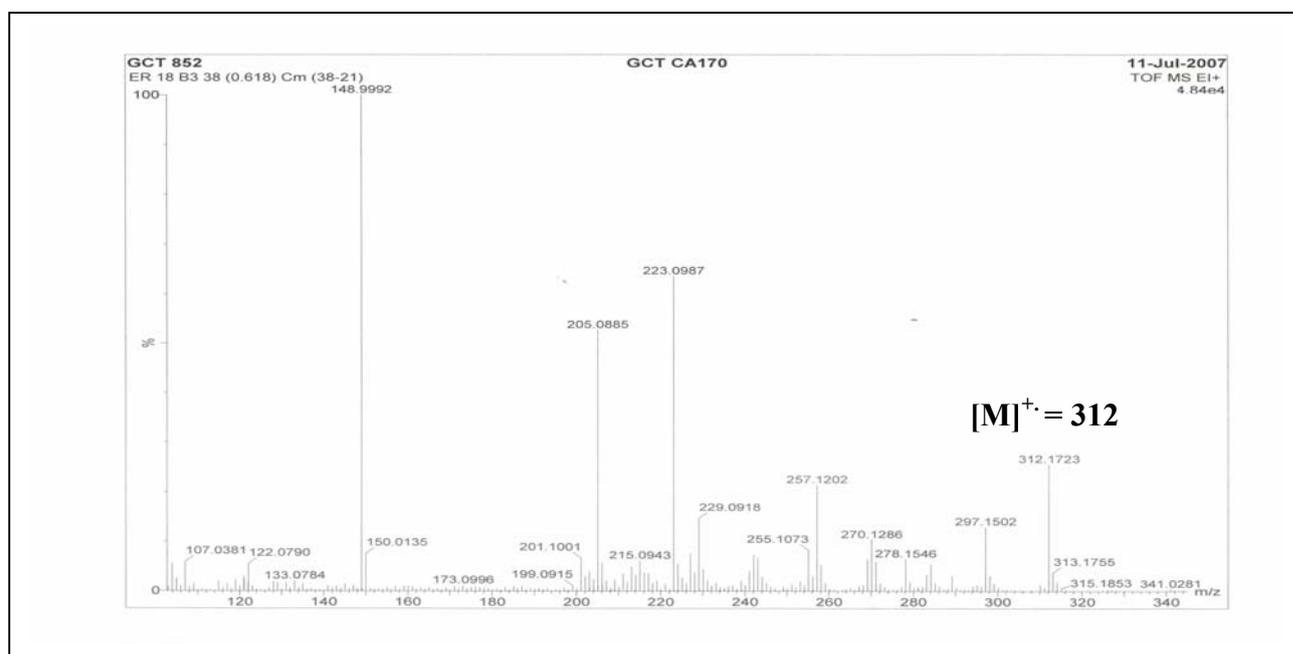


Figure 130 : Spectre de masse HR-EI-MS du composé **24**

La stéréochimie relative du composé **24** est déduite de l'analyse du spectre NOESY (figure 131) et de la mesure des valeurs des constantes de couplage. Le proton H-12 est pris en position α -axiale du fait de son signal qui apparaît à 5,11 ppm, sous forme de doublet de doublet de quadruplet ($J= 10,4, 6,4, 2,3$ Hz) [105,107-110]. La petite valeur de la constante de couplage $J= 2,3$ Hz traduit un couplage homoallylique de type *W* avec les protons du méthyle Me-17. Ce couplage est observé particulièrement dans le cas des abiétanes lactones possédant le proton H-12 en position α [105]. Les effets NOE entre les protons H-12 α /H-11b, H-11b/H-20, Me-20/Me-19, Me-20/H-3 et Me-19/H-18 *exo*, indiquent l'orientation α des protons H-11b, Me-20, Me-19 et H-3. Il en résulte par conséquent que le noyau cyclopropane est β -orienté. La corrélation entre les protons H-5 et H-18 *endo* suggère l'orientation β du proton H-5. L'absence d'effets NOE entre le proton H-5 et les protons méthyliques Me-20 et Me-19, de même que la valeur de la constante de couplage $J_{H5-H6}= 13,4$ Hz traduisant un couplage axial-axial, confirme l'orientation β -axiale du proton H-5.

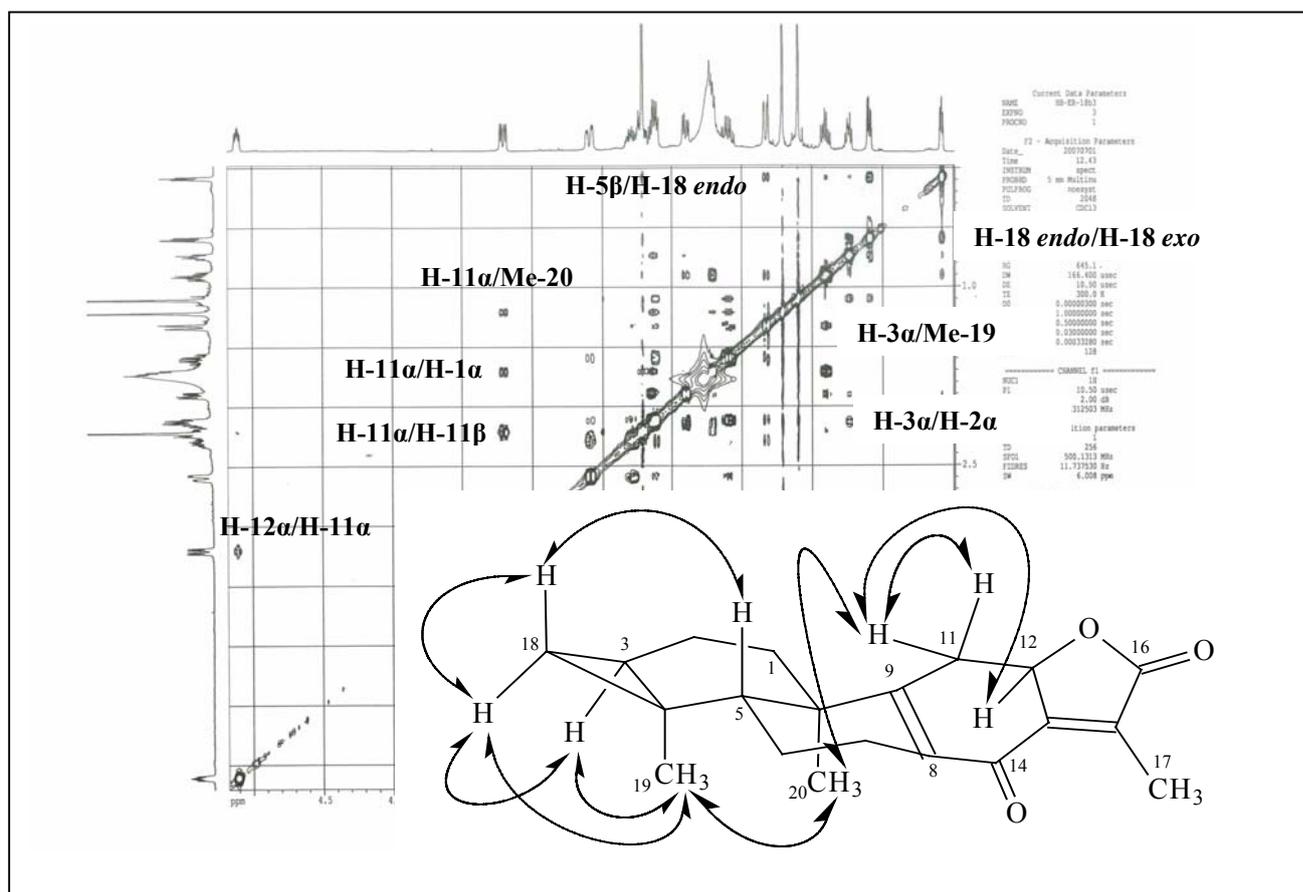


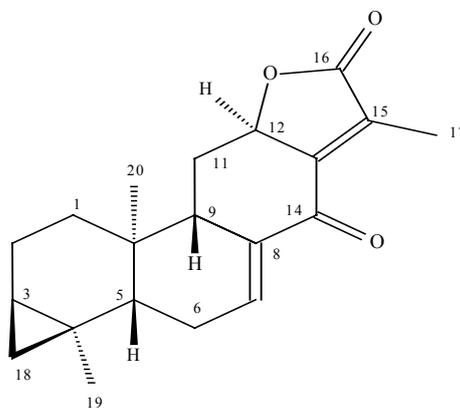
Figure 131 : Effets NOE observés pour le composé **24**

L'ensemble des données spectroscopiques conduisent à proposer sans ambiguïté pour ce composé, la structure nouvelle suivante : 3,4,18 β -cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide (**24**).

Tableau 25 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **24** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1a	1,71 <i>dd</i> 12,1, 6,2 H-1 α	30,4
1b	0,90 <i>ddd</i> 13,0, 10,9, 6,6 H-1 β	
2a	2,15 <i>dd</i> 13,0, 7,1 H-2 α	19,3
2b	1,90 <i>dd</i> 14,4, 5,8 H-2 β	
3	0,74 <i>dt</i> 9,3, 6,4 H-3 α	18,5
4	-	16,4
5	1,33 <i>dd</i> 13,4, 2,7 H-5 β	47,6
6a	2,12 <i>m</i> H-6 β	20,6
6b	1,59 <i>dddd</i> 19,1, 12,0, 11,8, 5,7 H-6 α	
7a	2,59 <i>dddd</i> 18,2, 5,7, 3,6, 1,9 H-7 α	24,4
7b	2,30 <i>m</i> H-7 β	
8	-	134,6
9	-	160,5
10	-	38,9
11a	3,21 <i>ddd</i> 15,8, 6,7, 1,3 H-11 α	24,2
11b	2,21 <i>m</i> H-11 β	
12	5,11 <i>ddq</i> 10,4, 6,4, 2,3 H-12 α	78,8
13	-	150,6
14	-	185,7
15	-	131,1
16	-	172,8
17	2,22 <i>d</i> 2,4	9,8
18a	0,59 <i>dd</i> 9,3, 4,3 H-18 <i>exo</i>	22,3
18b	0,08 <i>dd</i> 5,8, 4,4 H-18 <i>endo</i>	
19	1,10 <i>s</i>	23,2
20	1,20 <i>s</i>	16,8

IV-7-5-1-3- Identification du composé **25**



3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-7,8,13,15-diène-16,12-olide (**25**)

Le spectre de masse haute résolution réalisé par impact électronique HR-EI-MS, montre un ion moléculaire à m/z 312,1716 $[M]^+$ (calculé 312,1725) qui correspond à la formule brute $C_{20}H_{24}O_3$ et donc une masse moléculaire égale à celle du composé précédent. On peut dire qu'il s'agit alors de son isomère.

Sur le spectre IR de ce composé, on observe les mêmes bandes d'absorption comme pour le composé précédent et particulièrement à 1765 cm^{-1} (lactone), 1680 cm^{-1} (cétone), 1658 et 1618 cm^{-1} (doubles liaisons). Ce qui permet d'écarter la possibilité d'un isomère de fonction et de suggérer plutôt l'hypothèse d'un isomère de position.

Le spectre RMN ^1H (figure 112) montre, en plus des signaux observés pour le composé **25**, des signaux à :

-6,97 ppm sous forme de doublet de triplet ($J= 5,3$ et $2,5$ Hz) attribuable à un proton éthylénique déblindé, faisant partie d'un système de spin constituant un fragment structural $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$, repéré sur le spectre COSY H-H (figure 132).

-2,40 ppm sous forme de doublet dédoublé ($J= 7,5$ et $2,7$ Hz) correspondant à un proton méthine. Ce dernier est attribué sans ambiguïté au proton H-9 du fait de son appartenance au même système de spin observé en COSY H-H que les protons H-12 (δ_{H} 4,98, ddq , $J= 11,3$, $7,1$ et $2,1$ Hz), H-11a (δ_{H} 2,58, ddd , $J= 10,7$, $7,1$ et $2,7$ Hz) et H-11b (δ_{H} 1,67, m).

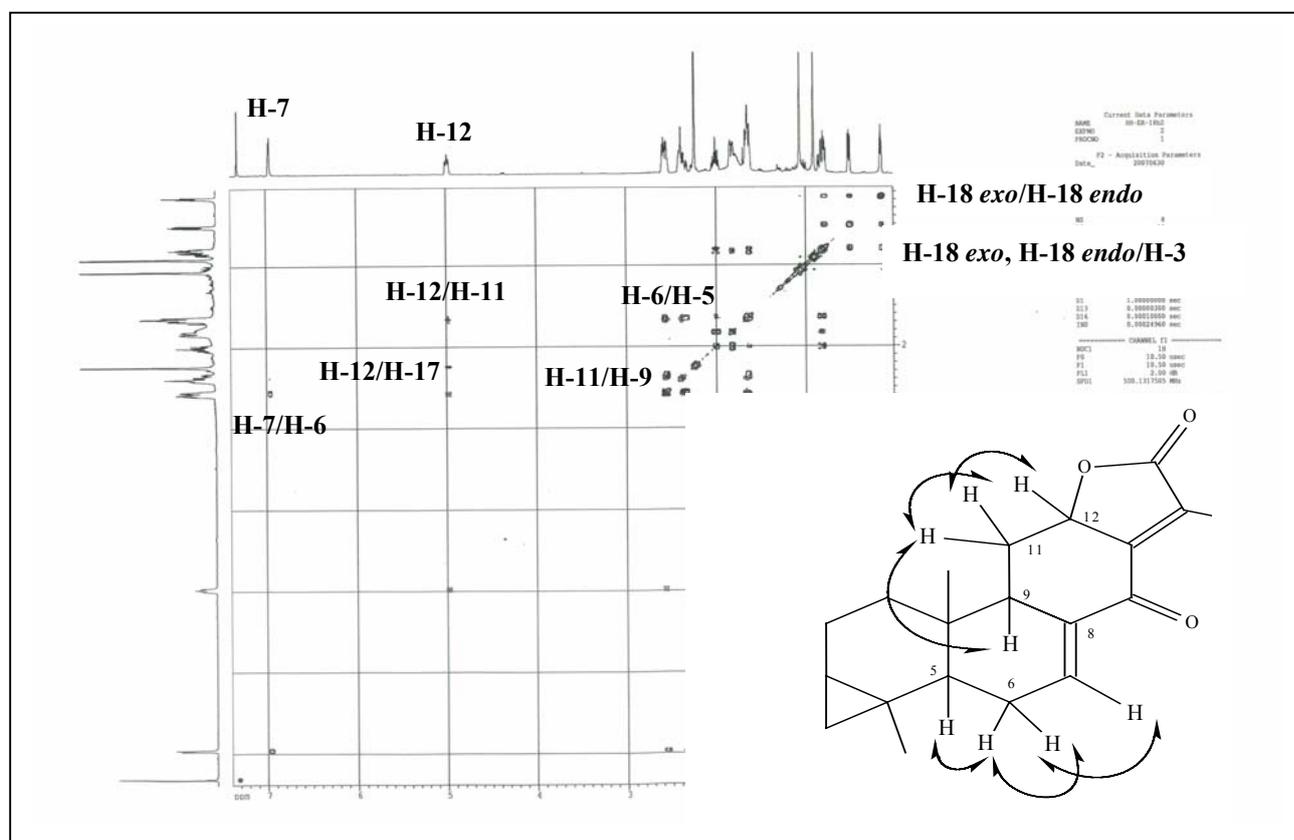


Figure 132 : Spectre COSY H-H du composé **25**

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 116) est quasiment similaire à celui du composé **24** précédent. On note la disparition du carbone quaternaire C-9 (160,5 ppm) et l'apparition de deux signaux à 41,6 ppm (CH) et 140,4 ppm d'un carbone CH éthylénique. Le déblindage de ce dernier implique qu'il est engagé dans un système délocalisé. La détermination de la position de la double liaison éthylénique a été faite par analyse des spectres HMBC et HSQC J -modulé. L'expérience HMBC (figure 133) montre des corrélations 3J entre le carbone C-14 résonnant à 187,5 ppm et le proton H-9 (δ_{H} 2,40) d'une part et le proton éthylénique d'autre part. Ce dernier attribuable au proton H-7 résonnant à 6,97 ppm, atteste de la présence d'un système cétone α,β insaturée. Il corrèle en 3J avec le carbone C-9 (41,6 ppm) identifié par HSQC J -modulé et un autre CH qui ne peut être que le carbone C-5 résonnant à 44,8 ppm.

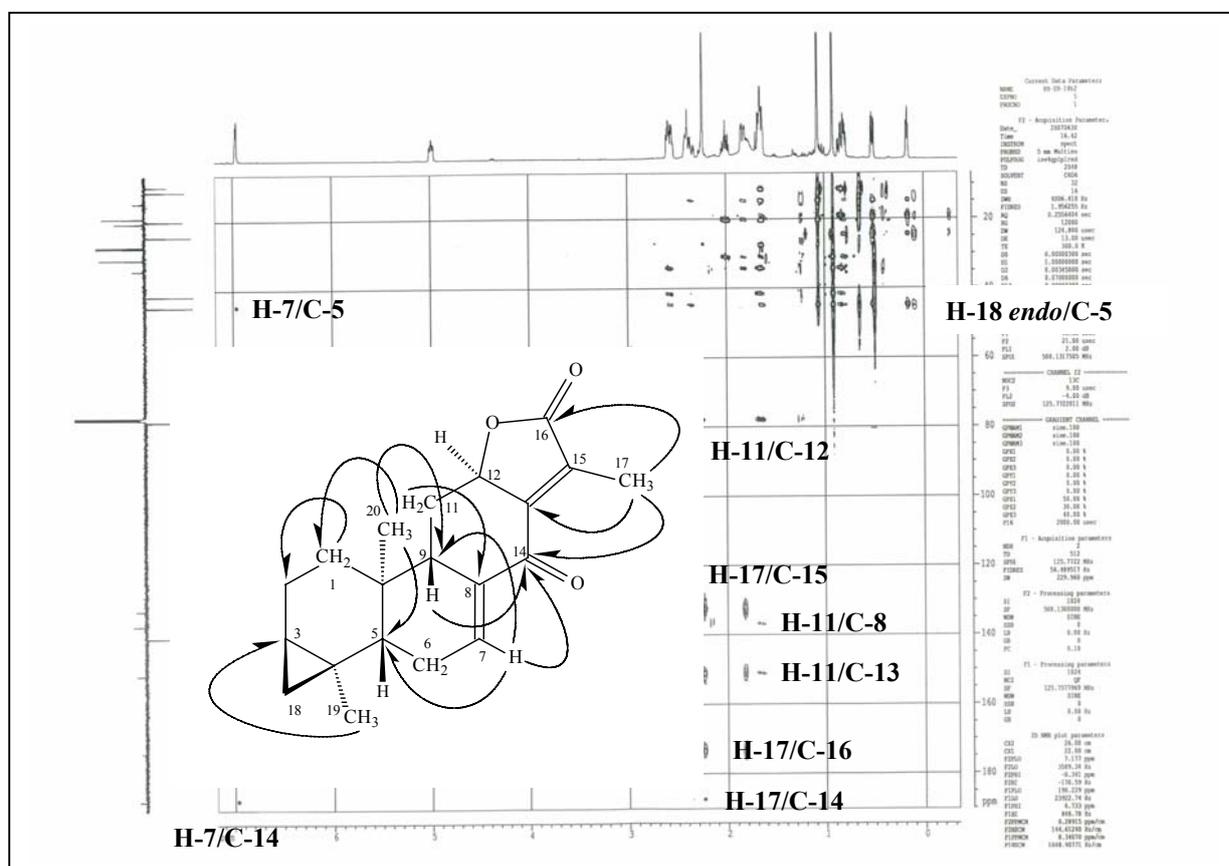


Figure 133 : Spectre HMBC du composé **25**

A partir de ce dernier qui corrèle en HSQC J -modulé avec le proton H-5 à 1,65 ppm (dd , $J=5,6$ et $2,8$ Hz), on peut repérer facilement sur le spectre COSY H-H les deux protons vicinaux H-6a (δ_{H} 2,55, ddd , $J=11,2$, $5,5$ et $2,5$ Hz) et H-6b (δ_{H} 2,36, m) corrélant à leur tour avec le proton éthylénique H-7. Ce qui permet de confirmer la présence du fragment $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CH}$.

Les déplacements chimiques des autres protons et carbones non encore attribués, ont été déterminés par l'analyse conjointe des spectres HSQC *J*-modulé (figure 134) et HMBC (tableau 26).

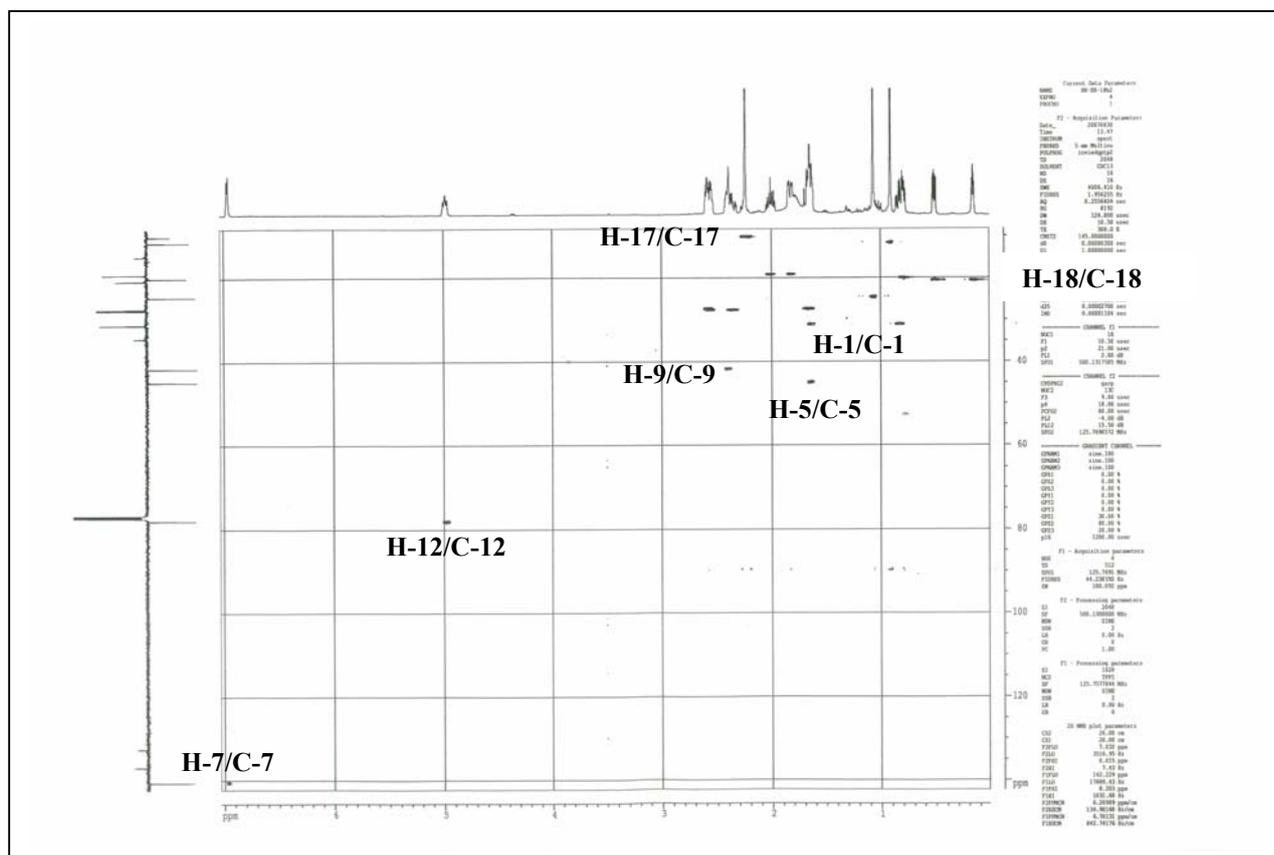


Figure 134 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé 25

La stéréochimie relative de ce composé a été établie de la même façon que les autres diterpènes. Eu égard aux multiplicités et valeurs de constantes de couplage des protons H-9 à 2,40 ppm (*dd*, $J = 7,5, 2,7$ Hz) et H-12 à 4,98 ppm (*ddq*, $J = 11,3, 7,1, 2,1$ Hz), ces derniers disposent donc respectivement d'une orientation β et α , en accord avec celles des mêmes protons des autres abiétanes lactones déjà identifiés [105,107-110].

Les corrélations visualisées sur le spectre NOESY (figure 135) entre les protons H-12 α /H-11a, H-12 α /Me-20 et H-11a/Me-20, montrent qu'ils sont tous en position α . L'effet NOE observé entre le proton H-9 β -orienté et le proton H-5 permet d'attribuer une configuration β à ce dernier, d'où l'appartenance également de ce composé à la série *ent*. Le spectre NOESY montre également des corrélations Me-20/H-2a, H-18 *endo*/H-5 β , H-18 *exo*/H-3 et H-18 *exo*/Me-19.

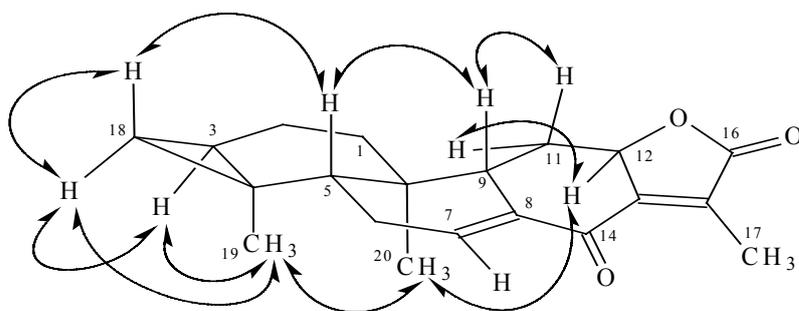


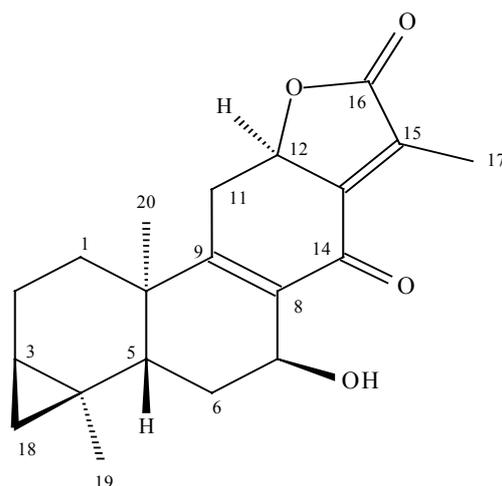
Figure 135 : Corrélations NOESY observées pour le composé **25**

Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé :
3,4,18 β -cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiéta-7,8,13,15-diène-16,12-olide (**25**).

Tableau 26 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **25** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1a	1,64 <i>ddd</i> 12,1, 4,6, 1,5 H-1 α	31,0
1b	0,83 <i>td</i> 13,5, 5,3 H-1 β	
2a	2,01 <i>tt</i> 13,8, 5,7 H-2 α	19,1
2b	1,83 <i>ddd</i> 13,9, 5,1, 1,7 H-2 β	
3	0,79 <i>dd</i> 8,7, 5,0 H-3 α	19,9
4	-	14,7
5	1,65 <i>dd</i> 11,3, 5,6 H-5 β	44,8
6a	2,55 <i>ddd</i> 11,2, 5,5, 2,5 H-6 α	27,5
6b	2,36 <i>m</i> H-6 β	
7	6,97 <i>dt</i> 5,3, 2,5	140,4
8	-	136,8
9	2,40 <i>dd</i> 7,5, 2,7 H-9 β	41,6
10	-	34,3
11a	2,58 <i>ddd</i> 10,7, 7,1, 2,7 H-11 α	27,2
11b	1,67 <i>m</i> H-11 β	
12	4,98 <i>ddq</i> 11,3, 7,1, 2,1 H-12 α	77,9
13	-	151,1
14	-	187,5
15	-	132,5
16	-	173,5
17	2,24 <i>d</i> 2,3	10,0
18a	0,51 <i>dd</i> 9,2, 4,4 H-18 <i>exo</i>	20,5
18b	0,16 <i>dd</i> 5,1, 5,1 H-18 <i>endo</i>	
19	1,06 <i>s</i>	24,5
20	0,91 <i>s</i>	11,5

IV-7-5-1-4- Identification du composé 26



3,4,18 β -cyclopropano-7 β -hydroxy-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-diène-16,12-olide (**26**)

Le spectre IR révèle, en plus des bandes d'absorption du composé **24** à 1767, 1675 et 1645 cm^{-1} attribuables aux fonctions lactone, cétone et double liaison, une large bande d'absorption à 3438 cm^{-1} correspondant au groupement OH.

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS, montre un ion moléculaire à m/z 328,1682 $[\text{M}]^+$ (calculé 328,1675) qui correspond à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$ et donc une masse moléculaire supérieure à celle du composé **24** de 16 unités, soit un atome d'oxygène en plus.

Les spectres RMN ^1H (figure 113) et ^{13}C J -modulé (figure 117) du composé **26** sont voisins à ceux du composé **24**. La seule différence réside dans la disparition du signal du carbone C-7 (δ_{C} 24,4) et l'apparition d'un signal déblindé résonant à 4,72 ppm sous forme d'un singulet large, attribuable à un proton oxyméthine (CH-O). L'expérience HSQC J -modulé permet d'identifier son carbone C-7 à 62,5 ppm. Le déblindage de ce dernier indique qu'il porte un groupement OH confirmé d'ailleurs par la présence d'une large bande d'absorption sur le spectre IR à 3438 cm^{-1} . L'analyse du spectre COSY H-H (figure 136) montrant un système de spin de quatre protons $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CHOH}$, atteste de ces attributions et permet par conséquent de repérer les protons H-5 à 1,76 ppm et H-6 à 1,79-2,25 ppm. Le spectre HSQC J -modulé permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones qui les portent C-5 (41,6 ppm) et C-6 (28,9 ppm).

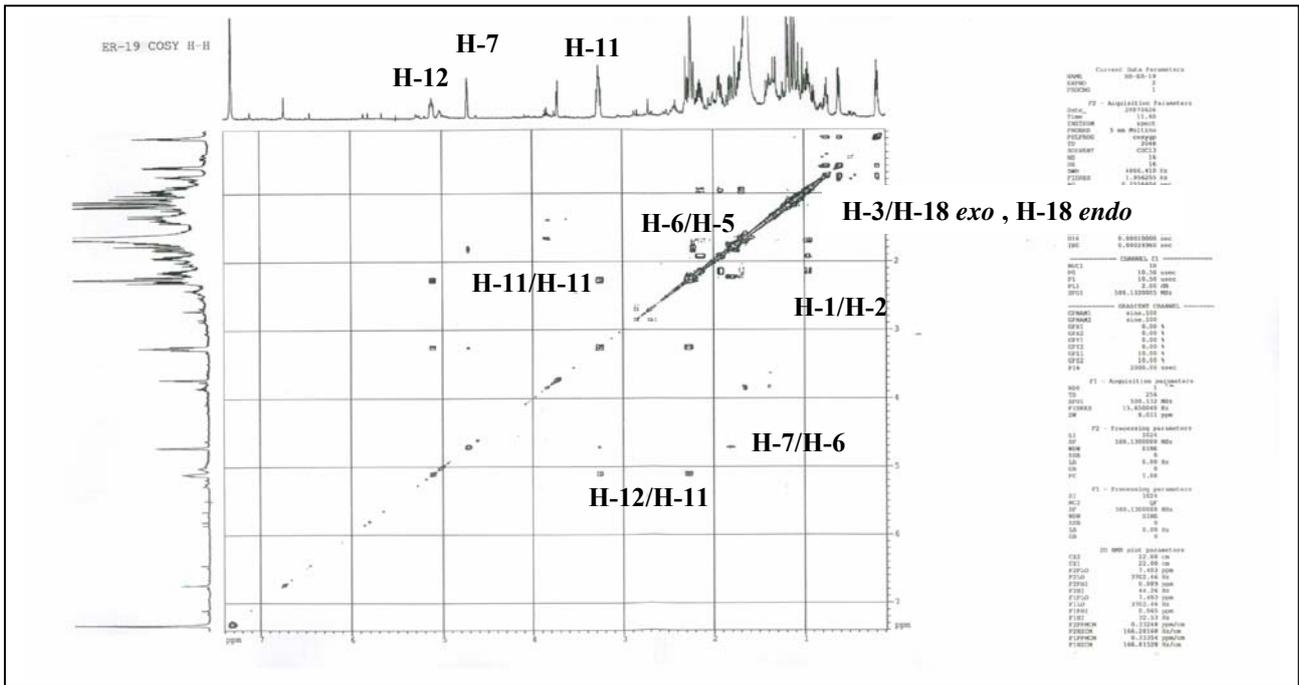


Figure 136 : Spectre COSY H-H du composé 26

L'analyse combinée des spectres HMBC (figure 137), HSQC *J*-modulé et ¹³C *J*-modulé (tableau 27) conduit à attribuer tous les déplacements chimiques des protons et carbones.

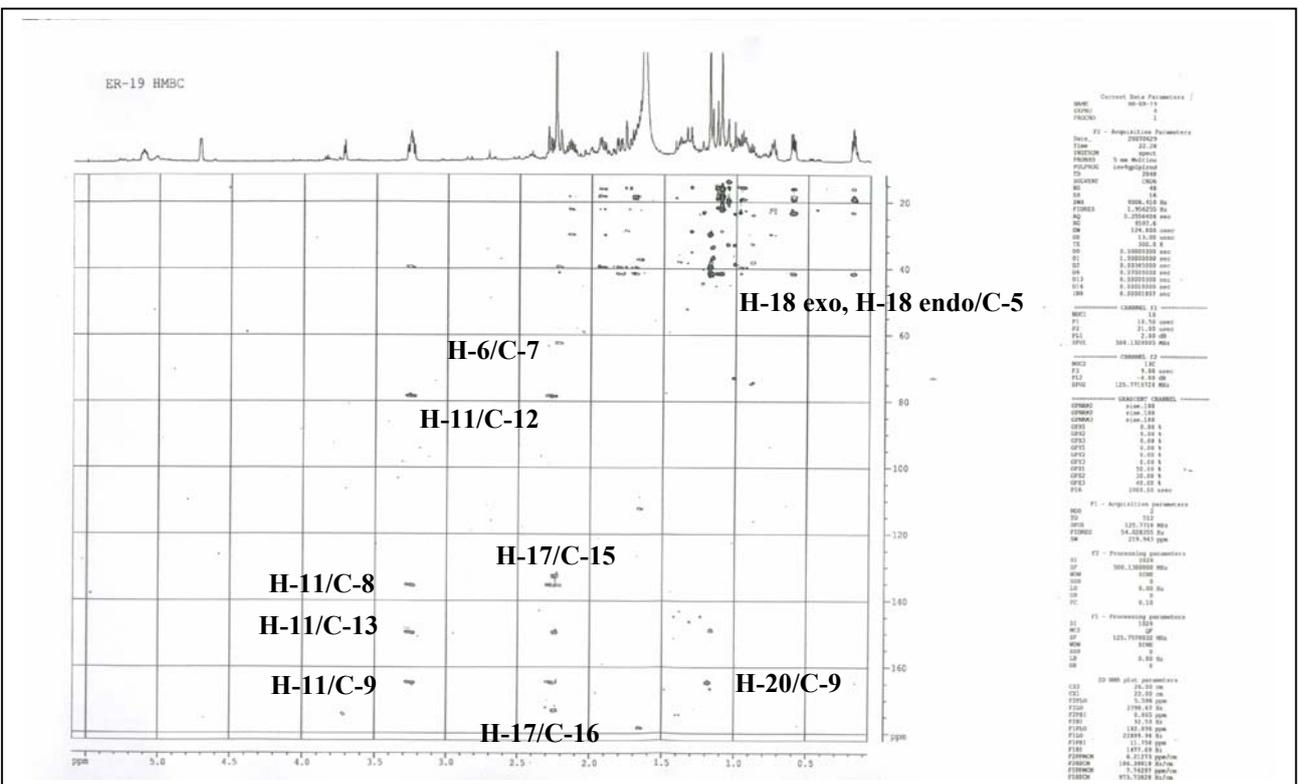


Figure 137 : Spectre HMBC du composé 26

La stéréochimie relative de ce composé est établie en analysant le spectre NOESY (figure 138) et les valeurs de constantes de couplage. En effet, il présente sur la face α des corrélations entre les protons H-12 α /H-11 α , H-11 α /Me-20, Me-20/H-6b, H-6b/Me-19 et Me-19/H-18 *exo*. Des effets NOE visualisés entre H-18 *endo*/H-5 et H-5/H-6a indiquent que ces protons sont β -orientés. Toutes ces corrélations sont caractéristiques des abiétanes lactones de la série antipode [105-111]. Le proton H-7 montre des corrélations avec les deux protons H-6a et H-6b. Ces effets NOE ne peuvent être observés d'après le modèle moléculaire de Dreiding que si le proton H-7 est α -orienté et par conséquent le groupement OH se trouve en position β -axiale. Les faibles valeurs des constantes de couplage entre les protons H-6 et H-7 résonnant respectivement sous forme de doublet de doublet ($J_{H_{6ax}-H_{6éq}} = 27,6$ Hz, $J_{H_{6ax}-H_{5ax}} = 13,8$ Hz et $J_{H_{6ax}-H_{7éq}} = 4,4$ Hz) et de singulet large, confirment la position α -équatoriale du proton H-7.

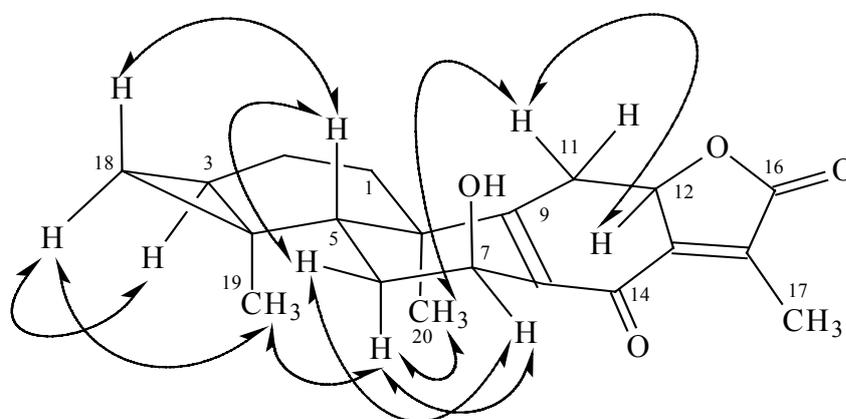


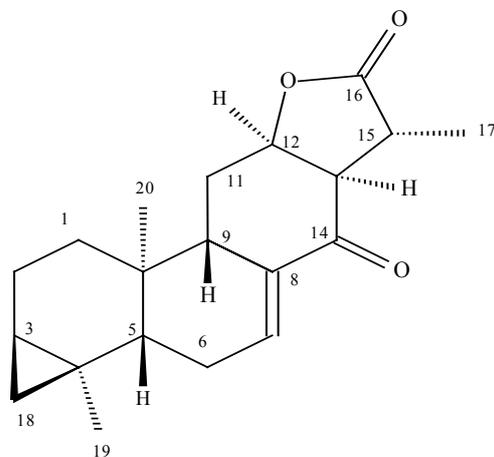
Figure 138 : Principales corrélations NOESY observées pour le composé **26**

A l'issue de cette analyse, le composé **26** nouveau a été identifié au 3,4,18 β -cyclopropano-7 β -hydroxy-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-diène-16,12-olide.

Tableau 27 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **26** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J</i> Hz	δ_{C}
1a	1,70 <i>m</i> H-1 α	29,8
1b	0,95 <i>m</i> H-1 β	
2a	2,15 <i>ddd</i> 26,8, 13,7, 6,7 H-2 α	19,2
2b	1,95 <i>m</i> H-2 β	
3	0,76 <i>m</i> H-3 α	18,4
4	-	16,6
5	1,76 <i>dl</i> 13,9 H-5 β	41,6
6a	2,25 <i>m</i> H-6 β	28,9
6b	1,79 <i>ddd</i> 27,6, 13,8, 4,4 H-6 α	
7	4,72 <i>sl</i> H-7 α	62,5
8	-	135,7
9	-	164,9
10	-	39,8
11a	3,27 <i>dd</i> 11,4, 6,5 H-11 α	33,9
11b	2,29 <i>m</i> H-11 β	
12	5,11 <i>ddd</i> 10,1, 6,3, 2,3 H-12 α	78,4
13	-	149,9
14	-	187,0
15	-	132,8
16	-	173,3
17	2,25 <i>d</i> 2,3	9,9
18a	0,61 <i>dd</i> 9,3, 4,5 H-18 <i>exo</i>	22,2
18b	0,19 <i>dd</i> 5,5, 5,3 H-18 <i>endo</i>	
19	1,11 <i>s</i>	23,2
20	1,20 <i>s</i>	15,7

IV-7-5-2- Identification du composé **27**



3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiét-7,8-èn-16,12-olide (**27**)

Le spectre IR du composé **27** montre de bandes d'absorption à 1777 cm^{-1} (lactone) 1665 cm^{-1} (liaison double).

Le spectre de masse haute résolution réalisé par impact électronique HR-EI-MS, montre un ion moléculaire à m/z 314,1889 $[M]^+$ (calculé 314,1882) qui correspond à la formule brute $C_{20}H_{26}O_3$.

Hormis les signaux des protons des cycles A, B et C identiques à ceux du composé **25**, le spectre RMN ^1H (figure 139) présente des signaux suivants :

- un doublet s'intégrant pour trois protons à 1,43 ppm ($J= 7,4\text{ Hz}$) attribuable au groupement méthyle Me-17. Le blindage de ces protons de $\Delta - 0,81\text{ ppm}$ par rapport à ceux du composé **25** indique qu'il est attaché à un carbone sp^3 .
- un quintuplet s'intégrant pour un proton à 2,82 ppm (*quint*, $J= 7,3\text{ Hz}$)
- un doublet de doublet d'intégration 1H (*dd*, $J= 8,4\text{ et }7,3\text{ Hz}$) à 2,98 ppm.

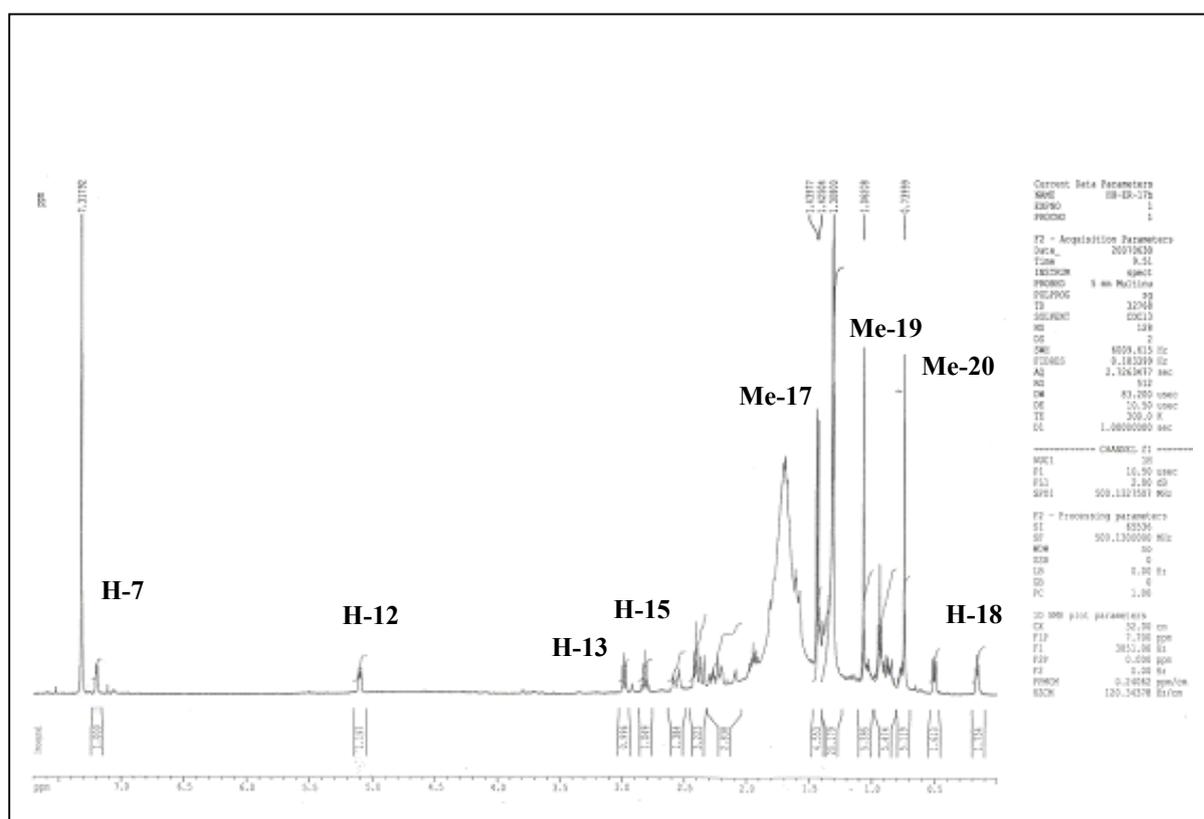


Figure 139 : Spectre RMN ^1H du composé **27**

Sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé (tableau 28) sont visualisés entre autres des signaux correspondants aux carbones :

- un CH_3 à 16,2 ppm, corrélant en HSQC J -modulé avec les protons à 1,43 ppm (C-17).
- deux CH à 40,0 et 52,9 ppm. Leur corrélation HSQC J -modulé avec les protons résonant à 2,82 et 2,98 ppm permet leur attribution aux carbones C-15 et C-13 respectivement

L'analyse du spectre COSY H-H (figure 140) relie les protons couplés pour former l'enchaînement $^{17}\text{CH}_3\text{-}^{15}\text{CH-}^{13}\text{CH-}^{12}\text{CHO-}^{11}\text{CH}_2\text{-}^9\text{CH}$ rentrant dans la constitution des deux cycles C et D des abiétanes lactones. Ce qui prouve la disparition de la double liaison au niveau du cycle lactonique D (figure 141).

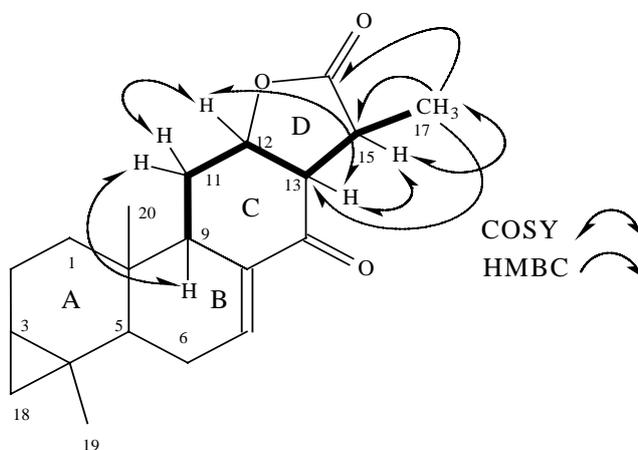


Figure 141 : Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **27**

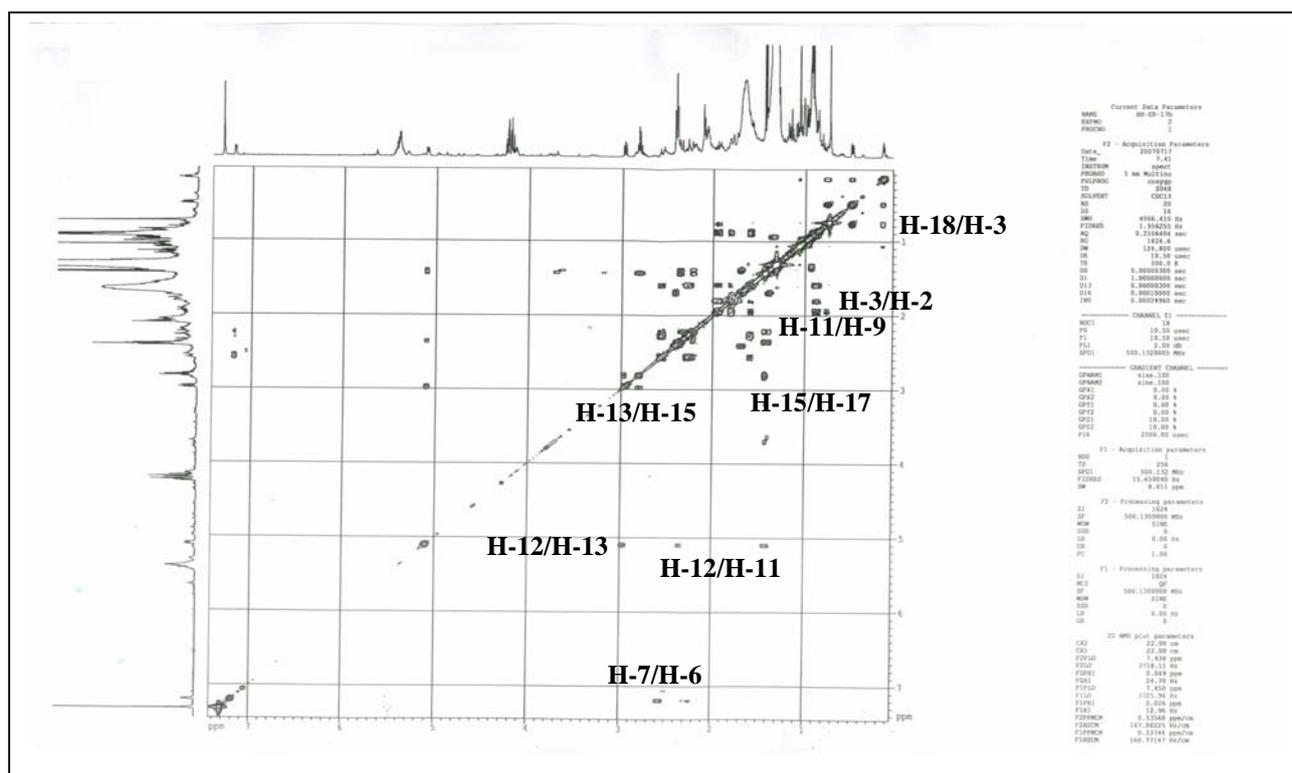


Figure 140 : Spectre COSY H-H du composé **27**

Sur le spectre HMBC (figures 141), les protons méthyliques Me-17 corrént avec deux carbones CH (C-13 et C-15) identifiés précédemment et un carbone quaternaire résonant à 178,2 ppm attribuable au carbone du carbonyle C-16.

L'analyse conjointe des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC permet l'identification des protons et carbones non encore attribués (tableau 28).

La valeur de la constante de couplage entre les protons H-12 et H-13 ($J = 8,4$ Hz) traduit une configuration *cis* des protons H-12 et H-13 et par conséquent une jonction *cis* entre les cycles C et D. Les effets NOE observés sur le spectre NOESY (figure 143) entre H-12/H-13 confirment cette stéréochimie. Les valeurs de déplacements chimiques quasi-identiques des carbones au niveau des cycles A et B, comparativement au composé **25** laissent supposer que les carbones asymétriques C-3, C-4, C-5, C-9 et C-10 possèdent les mêmes stéréochimies relatives. Les valeurs observées dans le cas de composés à squelette apparenté, plaident en faveur de cette attribution [109-112]. Il en résulte que ce composé appartient également à la série *ent* comme les abiétanes lactones décrits précédemment **23-26**.

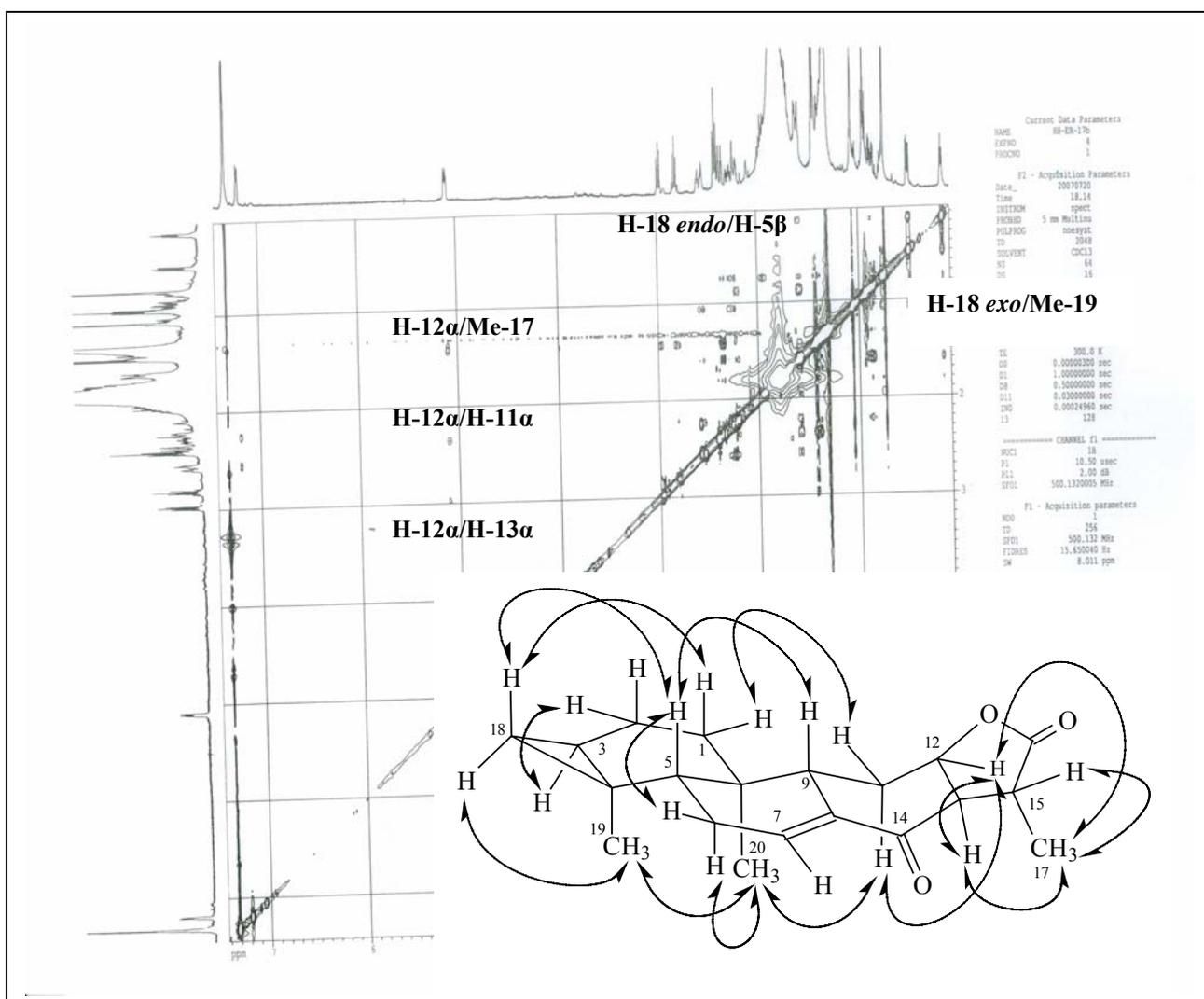


Figure 143 : Spectre NOESY du composé **27**

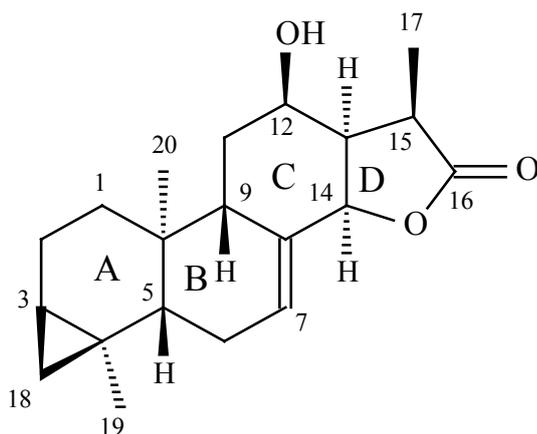
Le spectre NOESY (figure 143) présentant des corrélations entre les protons Me-20/Me-19, Me-19/H-18 *exo*, Me-20/H-6b, Me-20/H-11b, H-11b/H-12, H-12/Me-17, indiquent qu'ils sont tous de configuration α . Des effets NOE sont visualisés également entre le proton H-5 et les protons H-18 *endo*, H-9 et H-6a confirmant ainsi leur orientation β .

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure nouvelle suivante au composé **27** : 3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiét-7,8-èn-16,12-olide.

Tableau 28 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **27** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1a	1,59 <i>m</i> H-1 α	31,4
1b	0,88 <i>m</i> H-1 β	
2a	1,96 <i>m</i> H-2 α	19,2
2b	1,80 <i>m</i> H-2 β	
3	0,77 <i>m</i> H-3 α	19,9
4	-	14,8
5	1,59 <i>dd</i> 11,8, 4,7 H-5 β	44,1
6a	2,55 <i>dm</i> 22,8 H-6 β	27,6
6b	2,28 <i>m</i> H-6 α	
7	7,19 <i>m</i>	139,9
8	-	134,8
9	2,23 <i>sl</i> H-9 β	40,6
10	-	35,2
11a	2,37 <i>dm</i> 14,7 H-11 β	27,7
11b	1,41 <i>dd</i> 14,6, 3,7 H-11 α	
12	5,10 <i>ddd</i> 8,4, 3,7, 2,3 H-12 α	76,7
13	2,98 <i>dd</i> 8,4, 7,3 H-13 α	52,9
14	-	196,2
15	2,82 <i>quint</i> 7,3 H-15 β	40,0
16	-	178,2
17	1,43 <i>d</i> 7,4	16,2
18a	0,50 <i>dd</i> 9,2, 4,4 H-18 <i>exo</i>	20,4
18b	0,17 <i>dd</i> 5,5, 4,7 H-18 <i>endo</i>	
19	1,06 <i>s</i>	24,7
20	0,75 <i>s</i>	12,4

IV-7-5-3- Identification du composé 28



3,4,18 β -cyclopropa-12 β -hydroxy-*ent*-abiét-7-èn-16,14-olide (**28**)

Le spectre IR du composé **28** révèle des bandes d'absorption à 3450 cm^{-1} (OH), 1757 cm^{-1} (lactone) et 1650 cm^{-1} (double liaison).

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS, montre un ion moléculaire à m/z 316,2015 $[\text{M}]^+$ (calculé 316,2038), correspondant à une formule brute en $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ et à sept insaturations. Comparativement aux diterpènes lactones précédents **24** et **25**, le composé **28** contient quatre unités de masse atomique supplémentaires (+4 uma) et deux insaturations en moins.

Le spectre RMN du proton (figure 144) est voisin de ceux des composé **25** et **27** notamment au niveau des cycles A et B. Il permet de reconnaître entre autres :

- les protons H-18 blindés caractéristiques du noyau cyclopropane trisubstitué résonant à 0,08 ppm (*dd*, $J= 5,2, 4,9$ Hz, H-18 *endo*) et 0.38 ppm (*dd*, $J= 9,1, 4,1$ Hz, H-18 *exo*).
- les protons des méthyles Me-19 et Me-20 sous forme de singulet chacun à 0,98 et 0,67 ppm respectivement.
- le proton H-5 à 1,64 ppm sous forme de doublet de doublet avec des constantes de couplage égales à 12,6 et 5,1 Hz.
- le proton éthylénique H-7 à 5,99 (*m*, $W_{1/2}= 11,0$ Hz).

La différence majeure par rapport au composé **25**, réside en la présence d'un signal sous forme de doublet s'intégrant pour 3H correspondant au troisième méthyle Me-17 du cycle lactonique D. Les protons de ce dernier plus blindés comparativement aux composés précédents **23-26**, résonnent à 1,35 ppm. La valeur de la constante de couplage $J= 6,9$ Hz indique qu'ils couplent avec un proton vicinal lié à un carbone sp^3 . Une autre différence par rapport au composé **25**, a trait à la disparition du signal du proton H-12 (4,98 ppm).

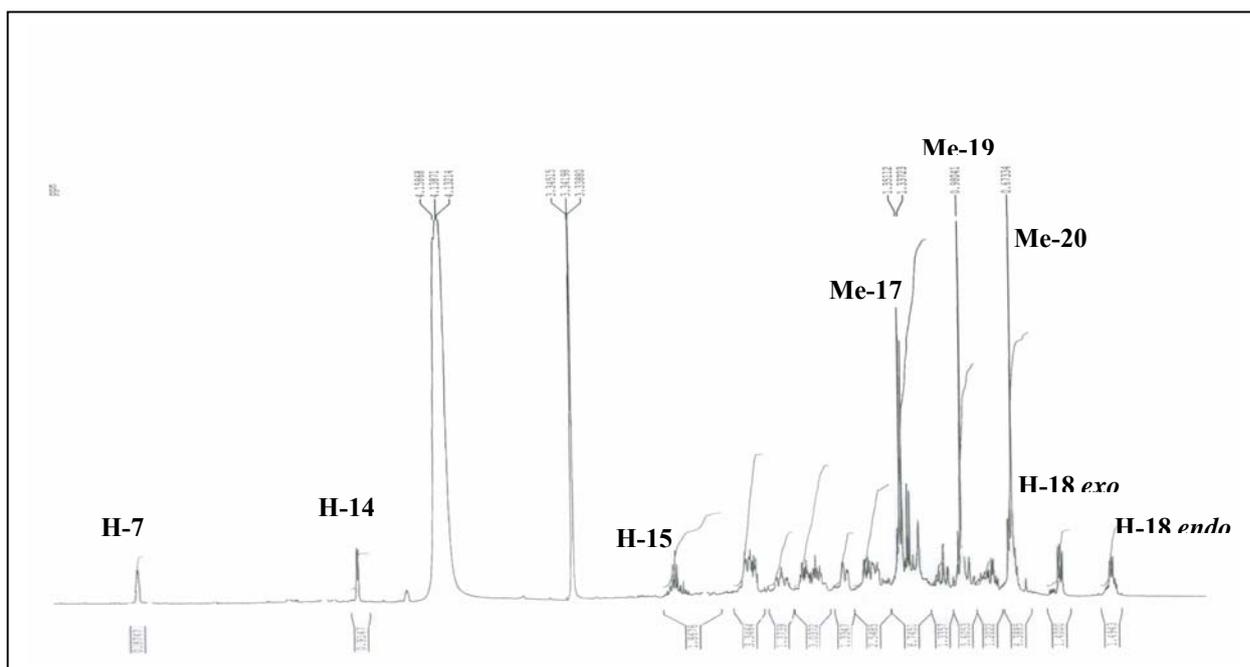


Figure 144 : Spectre RMN ^1H du composé **28**

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 145) presque identique à celui du composé **25**, permet de compter 20 atomes de carbones dont deux quaternaires déblindés à 181,7 et 131,3 ppm, deux oxyméthines à 63,8 et 83,3 ppm, un CH oléfinique à 133,0 ppm, cinq CH_2 résonnant entre 18,9 et 30,9 ppm, cinq CH allant de 19,9 à 44,4 ppm et les trois méthyles à 8,8, 24,3 et 12,8 ppm. La disparition des signaux de deux carbones éthyléniques quaternaires C-13 et C-15, laisse supposer que le cycle lactonique D de la molécule est saturé contrairement au composé **25**.

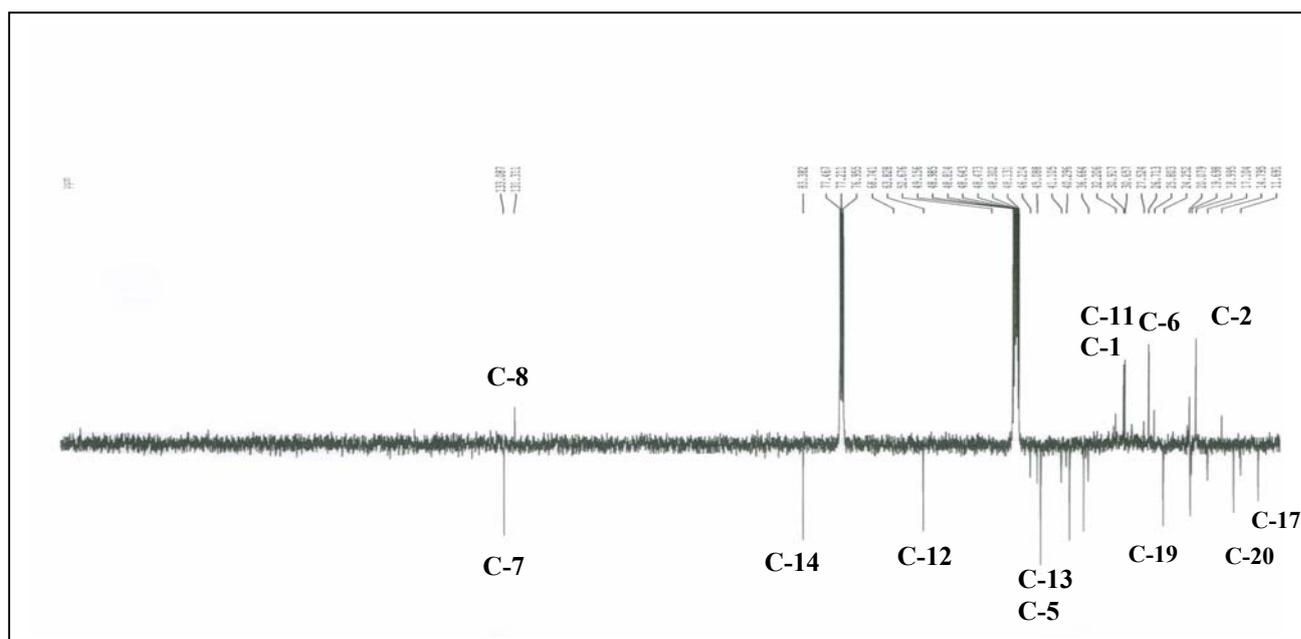


Figure 145 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **28**

- L'expérience de corrélation COSY H-H permet de repérer trois systèmes de spin :
- un système composé de sept protons, caractérisant le cycle A avec le noyau cyclopropane.
 - un système de quatre protons formant une chaîne CH-CH₂-CH (H-5, 2H-6 et H-7) qui fait partie du cycle B.
 - un troisième système composé de dix protons, caractérisant les autres cycles restants C et D.

A partir des protons des cycles C et D, l'expérience HSQC *J*-modulé permet de localiser leurs carbones résonant entre 30,6 et 83,3 ppm, confirmant ainsi l'absence de la double liaison au niveau du cycle D.

L'élaboration structurale des cycles C et D peut être entamée par analyse du spectre HMBC (figure 146) qui montre des corrélations longue distance ³*J* entre les protons Me-20 et H-7 et le signal du carbone primaire C-9 à 37,4 ppm. Le spectre HSQC *J*-modulé permet d'identifier le proton H-9 résonant à 2,28 ppm (*dd*, *J*= 12,8, 3,7 Hz).

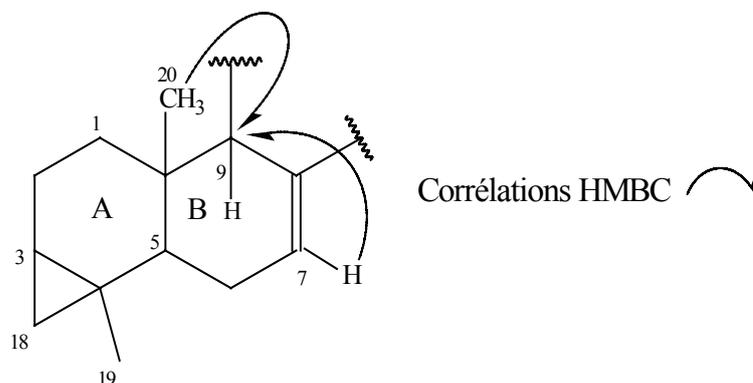


Figure 146 : Corrélations HMBC du composé **28**

Sur le spectre COSY H-H (figure 147), le proton H-9 corrèle avec les protons H-11a à 1,94 ppm (*dt*, *J*= 13,3, 4,2 Hz) et H-11b à 1,09 ppm (*td*, *J*= 13,3, 1,4 Hz), eux-mêmes corrélant avec un autre proton résonant à 4,13 ppm attribuable à H-12. Ce dernier couple également avec le proton H-13 résonant à 2,23 ppm sous forme de doublet de triplet (*J*= 6,5, 4,2 Hz). L'expérience HSQC *J*-modulé permet de déduire les déplacements chimiques des carbones qui les portent, à savoir C-11 (30,6 ppm), C-12 (63,8 ppm) et C-13 (44,4 ppm). Le blindage du carbone C-12 (Δ -14,1 ppm) et du proton H-12 (Δ - 0,85 ppm) par rapport au composé **25** permet de suggérer que le carbone C-12 est porteur d'un groupement hydroxyle au lieu d'être le point de fermeture du cycle lactone (D), comme il est constaté lors de la cyclisation des abiétanes lactones rencontrés dans le règne végétal [105,22-24,30,32,33 ,107-110].

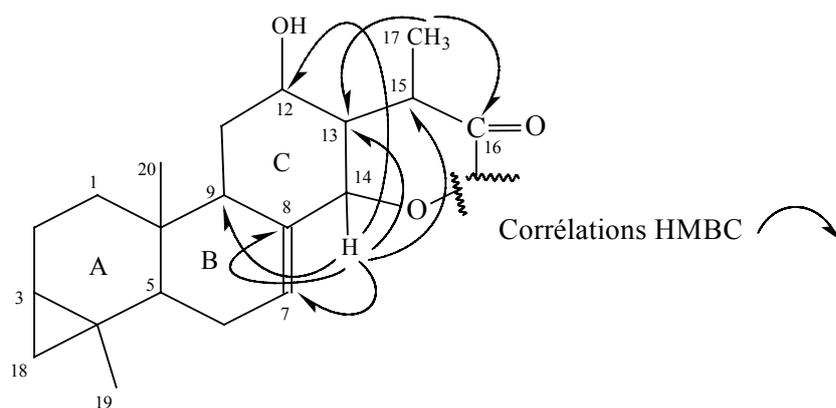


Figure 150 : Corrélations HMBC du composé **28**

Les valeurs déblindées des déplacements chimiques du proton H-14 résonnant à 4,65 ppm et du carbone C-14 à 83,3 ppm ainsi que le spectre de masse, prouvent bien une fermeture à ce niveau avec formation d'une lactone (cycle D). Le carbone du méthyle Me-17 (8,8 ppm) est fortement blindé du fait de l'anisotropie qu'il subit par le carbonyle.

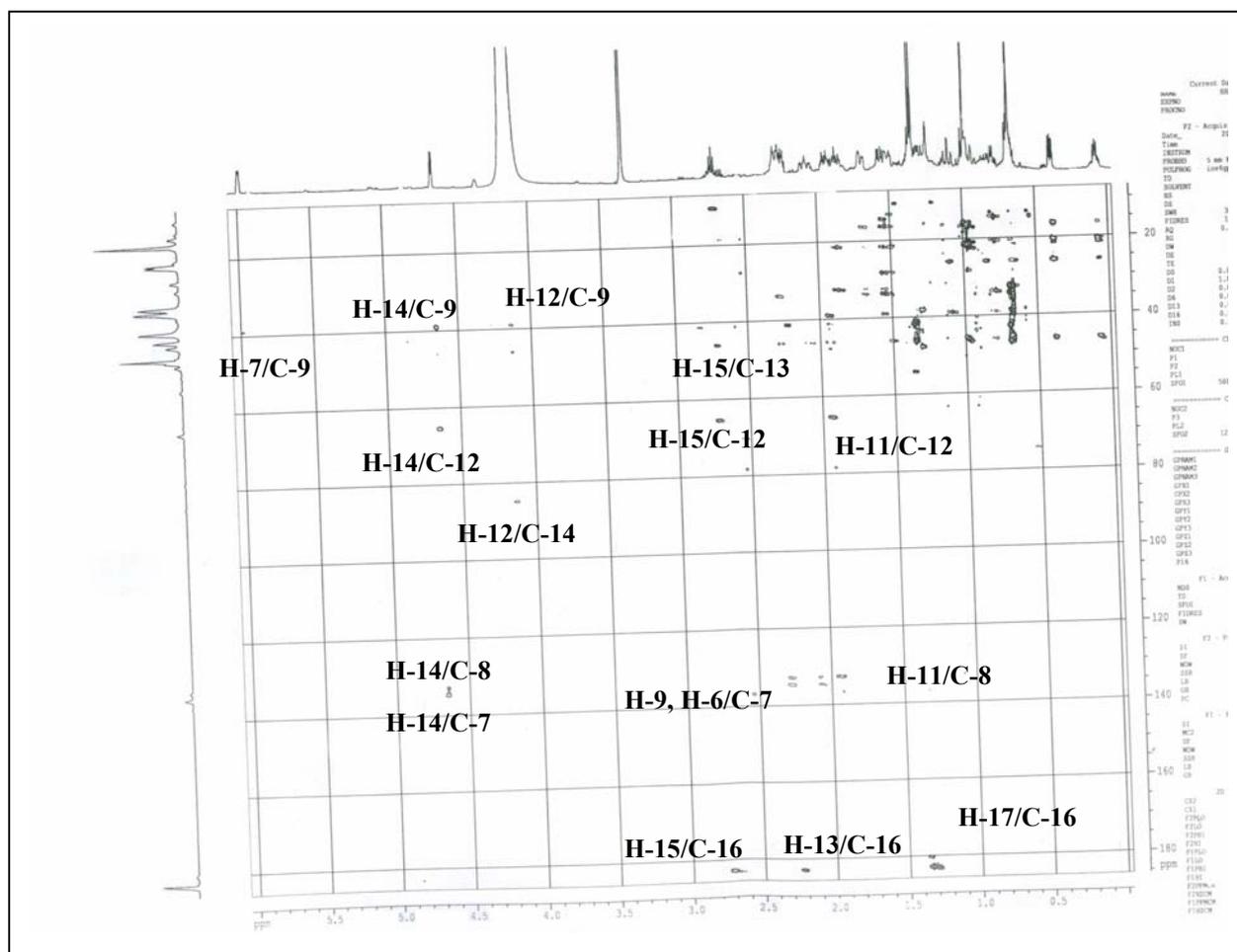
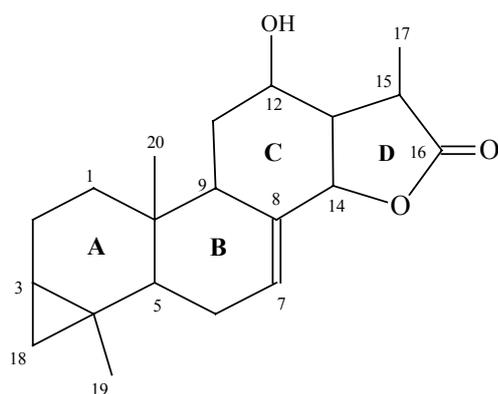


Figure 149 : Spectre HMBC du composé **28**

L'ensemble de ces attributions (tableau 29) conduit à proposer pour le composé **28**, la structure plane suivante :



Structure plane du composé **28**

Ce composé appartient donc à une nouvelle classe de métabolites secondaires à squelette diterpénoïde lactone de type jolkinolide/helioscopinolide réarrangé avec un noyau cyclopropane en positions 3 et 4. En effet, au lieu d'une lactonisation C-16/C-12 fréquemment observée pour ce genre de composés [105,22-24,30,32,33,107-110], la cyclisation a lieu au niveau du carbone C-14 (figure 150).

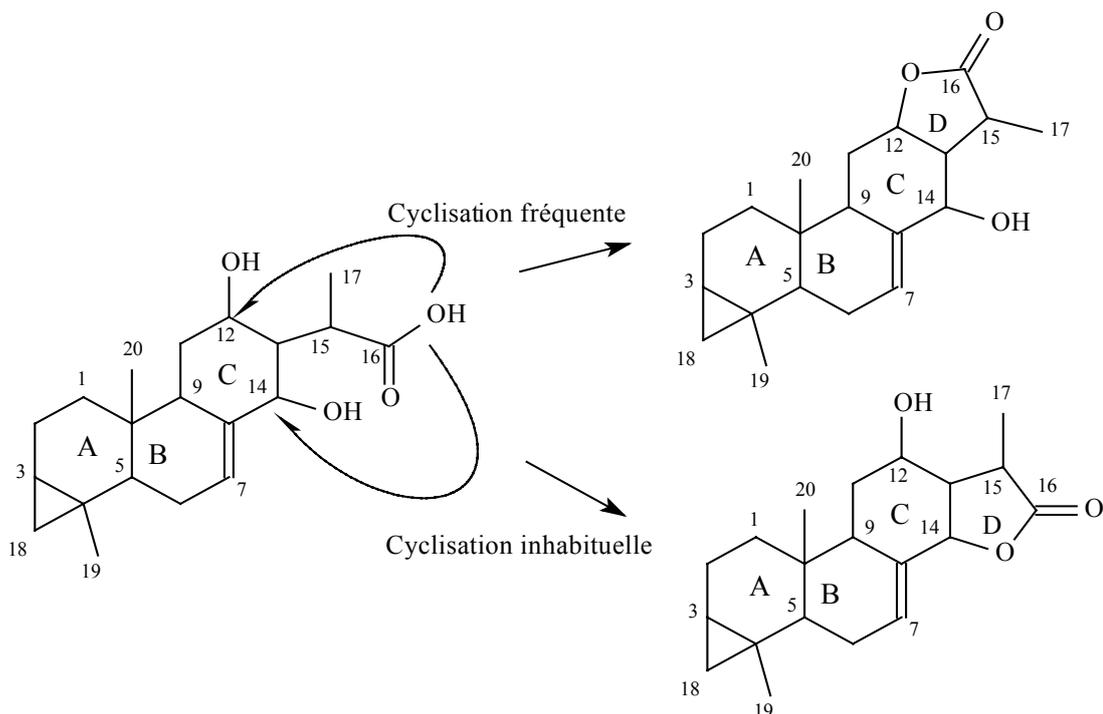


Figure 150 : Cyclisations conduisant aux diterpènes lactones

La stéréochimie relative du composé **28** a été établie par analyse du spectre NOESY (figure 151), des valeurs des constantes de couplage et comparaison avec les valeurs de déplacements chimiques de carbones des composés apparentés à stéréochimie connue. En effet, le

spectre RMN ^{13}C J -modulé (tableau 28) présente des signaux identiques à ceux observés pour les composés **25** et **27**, notamment au niveau des cycles A et B. Les valeurs de déplacements chimiques du C-3 à 19,9 et H-3 à 0,66 ppm laissent supposer que ce composé appartient également à la série *ent* comme les autres diterpènes lactones décrits précédemment. En série normale, leur déplacement chimique est nettement inférieur (C-3, δ_{C} 15,7 et H-3, δ_{H} 0,35) [110]. Le spectre NOESY montre les corrélations attendues sur la face α entre les protons Me-20/Me-19, Me-20/H-11b, Me-20/H-6b, Me-19/H-18 *exo* et Me-19/H-3 et sur la face β entre les protons H-9/H-5, H-5/H-18 *endo*, H-9/H-11a, H-9/H-1b, H-9/H-6a. La valeur de la constante de couplage du proton H-5 égale à 12,6 Hz confirme qu'il est β -axial, permettant ainsi d'établir la jonction *trans* entre les cycles A et B. L'absence d'une tache de corrélation entre le proton H-9 β -axial et les protons H-12 et H-14, indiquent que ces derniers sont α -orientés. La valeur faible de la constante de couplage entre les protons H-13 et H-14 ($J=4,4$ Hz) traduit une configuration *cis* de ces protons et par conséquent une jonction *cis* entre les cycles C et D, confirmée par la tache de corrélation observée sur le spectre NOESY (figure 151) entre les protons H-13 et H-14. Les effets NOE visualisés entre les protons H-11b/H-12, H-12/H-13, H-14/H-15 et H-13/H-15 impliquent qu'ils ont tous une configuration α .

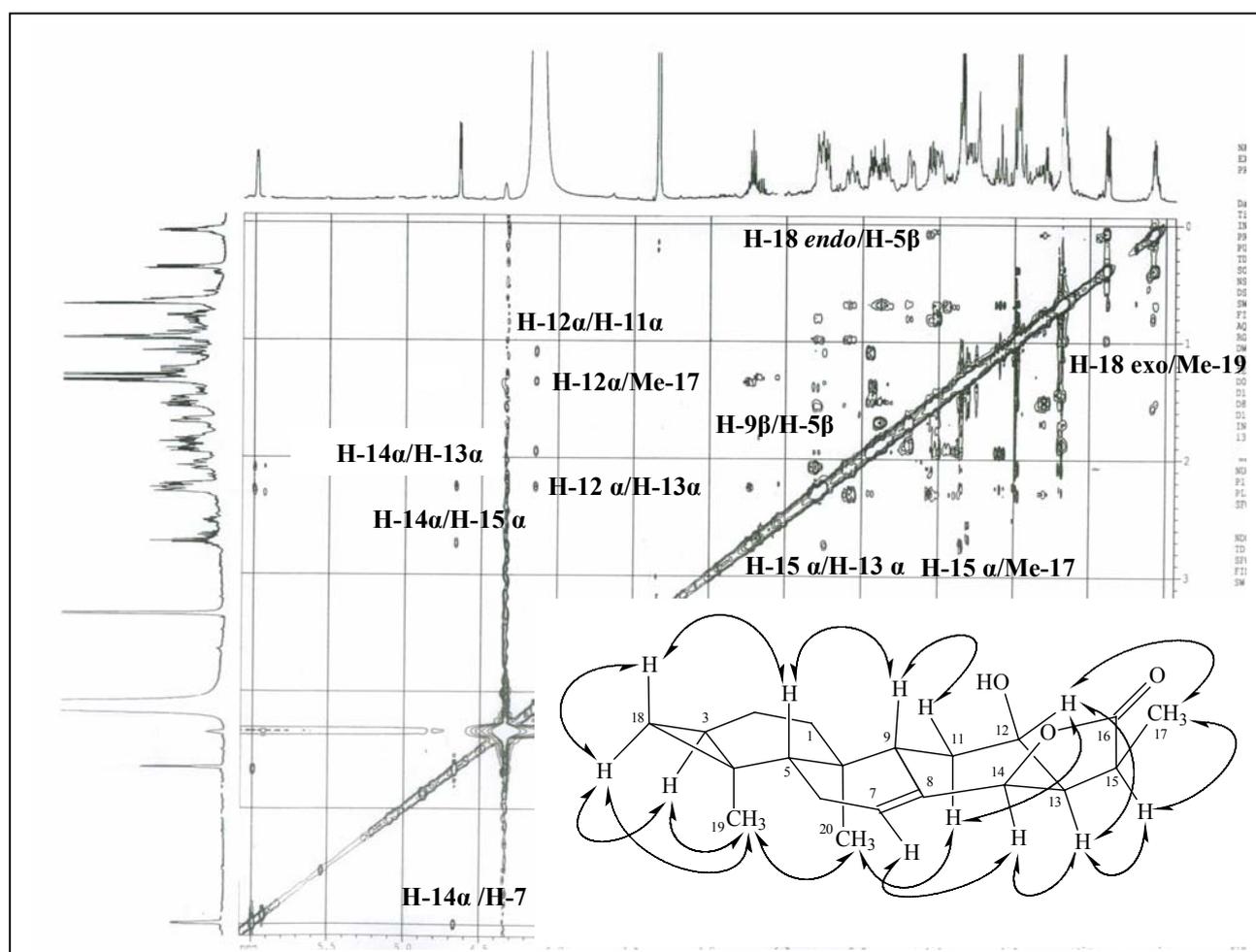


Figure 151 : Spectre NOESY du composé **28**

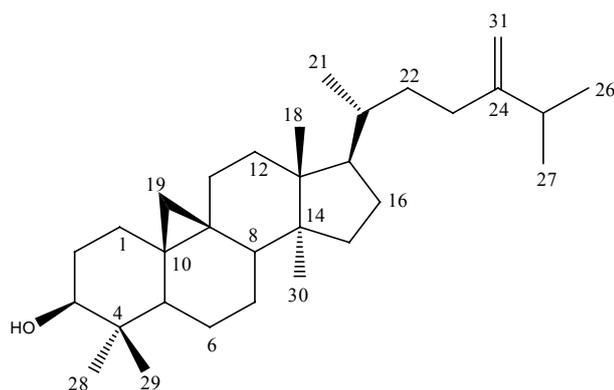
Toutes les données spectrales (RMN ^1H et ^{13}C J -modulé) représentées dans le tableau 29, permettent d'identifier sans ambiguïté la structure du composé **28** original. Il s'agit du 3,4,18 β -cyclopropa-12 β -hydroxy-*ent*-abiét-7-èn-16,14-olide.

La biogenèse de ce composé semble similaire à celle intervenant lors de la formation des cycles A, B et C des abiétanes lactones ordinaires [105]. La lactonisation avec le carbone C-14 formant le cycle D, serait probablement favorisée par la présence de la double liaison éthylénique C-7=C-8. Cette dernière, en stabilisant le carbocation formé en C-14 lors du processus de biosynthèse [105], conduirait à la formation d'un abiétane lactone réarrangé.

Tableau 29 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **28** dans $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$

Position	δ_{H} m J Hz	δ_{C}
1a	1,51 <i>ddm</i> 12,8, 3,2 H-1 α	30,9
1b	0,70 <i>td</i> 13,3, 5,1 H-1 β	
2a	1,87 <i>tt</i> 13,7, 5,4 H-2 β	18,9
2b	1,69 <i>ddl</i> 13,8, 3,1 H-2 α	
3	0,66 <i>m</i> H-3 α	19,9
4	-	14,7
5	1,64 <i>dd</i> 12,6, 5,1 H-5 β	44,4
6a	2,28 <i>dm</i> 11,7 H-6 β	26,7
6b	2,08 <i>tm</i> 14,3 H-6 α	
7	5,99 <i>m</i> $w_{1/2} = 11,0$	133,0
8	-	131,3
9	2,28 <i>dd</i> 12,8, 3,7 H-9 β	37,4
10	-	32,2
11a	1,94 <i>dt</i> 13,3, 4,2 H-11 β	30,6
11b	1,09 <i>td</i> 13,3, 1,4 H-11 α	
12	4,13 masqué H-12 α	63,8
13	2,23 <i>dt</i> 6,5, 4,2 H-13 α	44,4
14	4,65 <i>d</i> 4,4 H-14 α	83,3
15	2,72 <i>quint</i> 6,8 H-15 α	39,7
16	-	181,7
17	1,35 <i>d</i> 6,9 H-17 β	8,8
18a	0,38 <i>dd</i> 9,1, 4,1 H-18 <i>exo</i>	20,1
18b	0,08 <i>dd</i> 5,2, 4,9 H-18 <i>endo</i>	
19	0,98 <i>s</i>	24,3
20	0,67 <i>s</i>	12,8

IV-7-6- Elucidation structurale du composé **29**



24-méthylèncycloartanol (**29**)

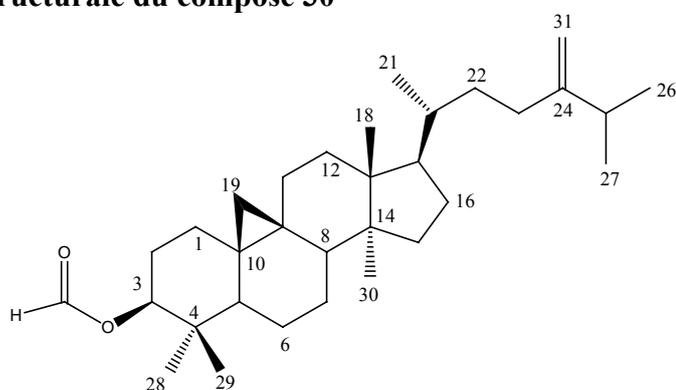
Le spectre de masse HR-EI-MS du composé **29** isolé à l'état de poudre blanche, montre un ion moléculaire à m/z 440,4111 $[M]^+$ (calculé 440,4018) correspondant à la formule brute $C_{31}H_{52}O$. Il présente également des fragments à m/z 422,3974 $[M-18]^+$, 407,3730 $[M-18-15]^+$ et 297,2556 $[M-125-18]^+$ correspondant respectivement à la perte d'une molécule d'eau, d'un groupement méthyle et d'une molécule d'eau, du groupement alkyle C_9H_{17} et d'une molécule d'eau. Ces fragmentations sont caractéristiques d'un triterpène à squelette cycloartanol [41].

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 3396 cm^{-1} attestant de la présence de groupement hydroxyle et à 1640 cm^{-1} caractérisant une double liaison.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C J -modulé montrent des signaux identiques à ceux d'un composé déjà connu : 24-méthylèncycloartanol (**6**) isolé de *E. guyoniana*.

La mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme ($[\alpha]_D = +40,2^\circ$, $C = 1,01\text{ g}/100\text{ ml}$), en apporte la confirmation.

IV-7-7- Elucidation structurale du composé **30**



24-méthylèncycloartanyl formate (**30**)

Le composé **30** est obtenu à l'état de poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution réalisé par impact électronique HR-EI-MS, montre un pic de l'ion moléculaire à m/z 468,3970 $[M]^+$ (calculé 468,3967), correspondant à la formule brute $C_{32}H_{52}O_2$.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 1727 cm^{-1} et 1641 cm^{-1} , attestant respectivement de la présence d'un groupement ester et d'une double liaison.

Le spectre RMN ^{13}C en J -modulé (figure 152) montre les signaux correspondant à sept méthyles, douze méthylènes, six méthines et à sept atomes de carbone quaternaires, confirmant ainsi sa nature triterpénique.

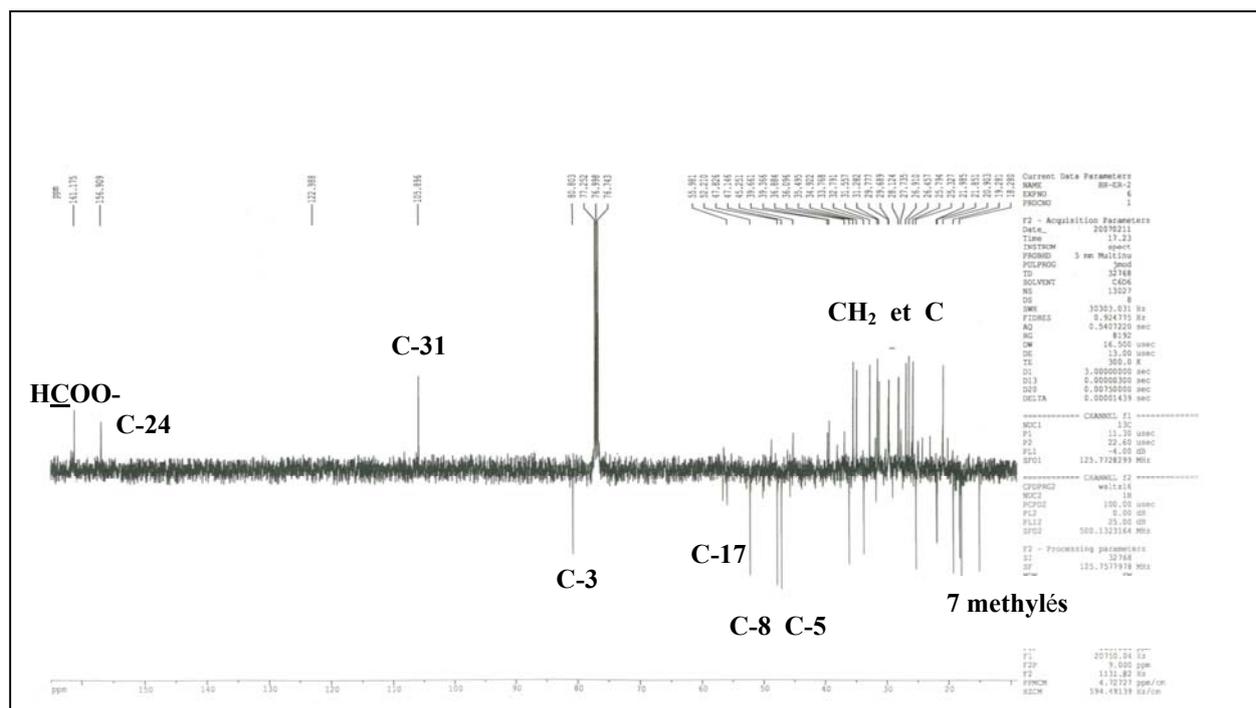


Figure 152 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **30**

Le spectre RMN ^1H (figure 153) montre deux signaux blindés sous forme de doublet à δ_{H} 0,41 (1H, d , $J= 4,2$ Hz, H-19 *exo*) et 0,64 (1H, dl , $J= 3,9$ Hz, H-19 *endo*), typiques de deux protons non équivalents du noyau cyclopropane d'un dérivé cycloartanol [34,113,114]. Les signaux correspondant aux sept groupements méthyles apparaissent à δ_{H} 0,95 (3H, s , H-30), 0,95 (3H, d , $J= 7,1$ Hz, H-21), 0,96 (3H, s , H-29), 1,02 (3H, s , H-18), 1,08 (3H, d , $J= 6,8$ Hz, H-27) et 1,09 (3H, d , $J= 6,7$ Hz, H-26). Il permet également de repérer les protons suivants :

- le proton H-3 α -axial résonant à δ_{H} 4,75 sous forme de doublet de doublet ($J_{\text{ax-ax}}= 11,5$ et $J_{\text{ax-eq}}= 4,7$ Hz).
- le proton H-25 résonant à δ_{H} 2,29 sous forme d'un septuplet ($J= 6,8$ Hz).
- les protons H-31 résonant sous forme de deux singulets larges à δ_{H} 4,76 (1H, sl , H-31a) et 4,72 (1H, sl , H-31b) attribuables au groupement méthylène exocyclique lié au carbone C-24.

-les protons H-23a et H-23b résonant respectivement à 2,18 ppm sous forme de doublet de doublet de doublet et à 1,94 ppm sous forme de multiplet. Leur déblindage est le fait de la proximité de la double liaison *exo*.

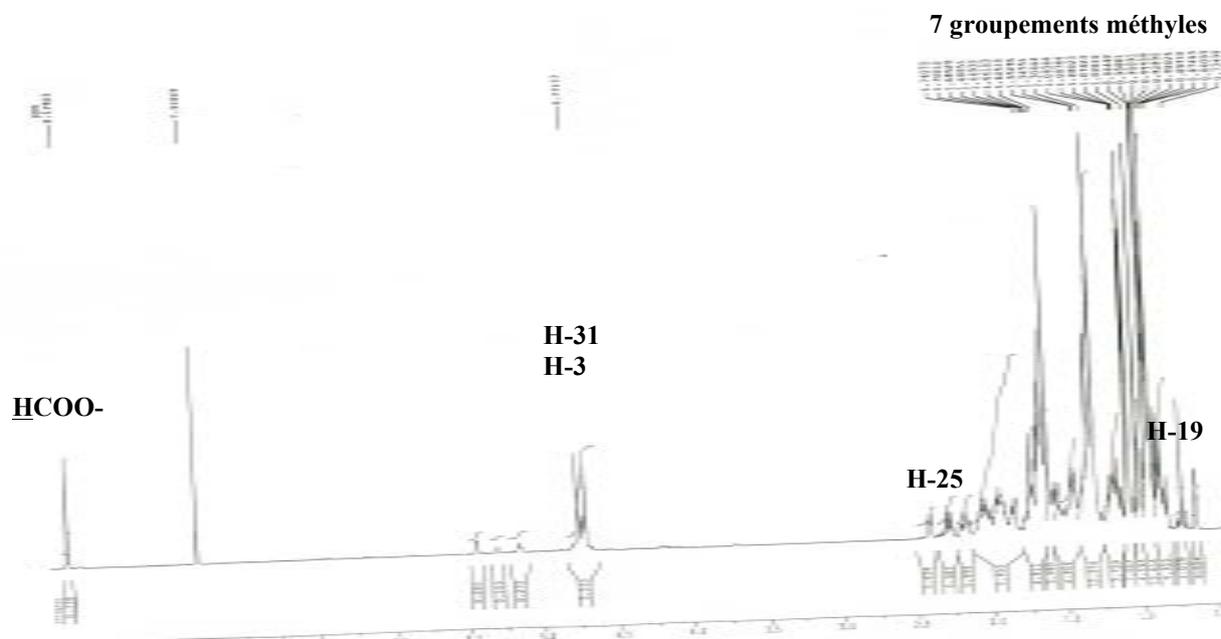


Figure 153 : Spectre RMN ^1H du composé **30**

A partir des protons caractéristiques repérés précédemment, l'expérience COSY H-H permet de localiser les déplacements chimiques de la plupart des protons (figure 154). On reconnaît en effet :

- les deux protons H-2 à partir de leurs couplages avec le proton vicinal H-3.
- les deux protons H-1 à partir de leurs couplages avec les protons H-2.
- les deux protons H-22 à partir de leurs corrélations avec les protons vicinaux H-23.

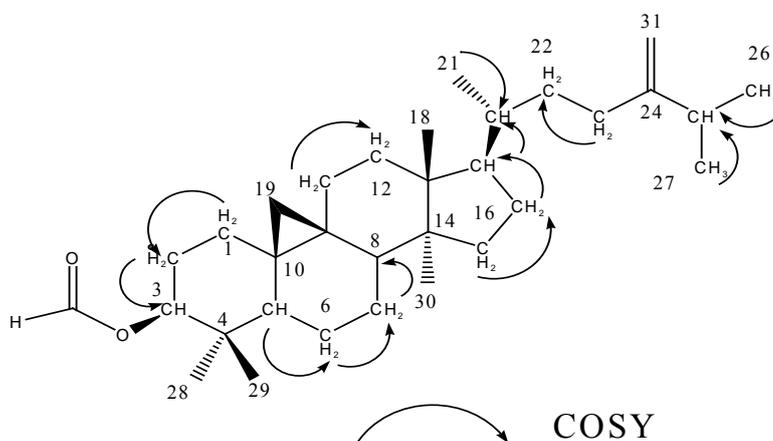


Figure 154 : Corrélations observées sur le spectre COSY H-H du composé **30**

A partir des protons précédemment identifiés, l'analyse des corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HSQC *J*-modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent (tableau 30).

A partir des protons du groupement méthylène H-19 connu et corrélant comme le montre l'expérience HMBC avec 6 carbones C-1, C-5, C-9, C-8, C-10 et C-11, il est à priori possible de faire l'attribution des carbones C-1 et C-11. La distinction entre ces carbones est réalisée à l'aide des spectres COSY H-H, ^{13}C *J*-modulé et HSQC *J*-modulé. Les autres carbones sont différenciés en deux groupes par l'expérience HSQC *J*-modulé puisqu'il s'agit de deux quaternaires (C-9 et C-10) et de deux CH (C-5 et C-8).

Dans l'expérience HMBC (figure 155), les protons des méthyles corrént au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. Ainsi :

-les protons H-28 et H-29 sont repérés au moyen de leur corrélation avec le carbone C-3 déjà identifié et les carbones C-4 et C-5.

-les protons H-18 corrént avec les carbones C-12, C-13, C-14 et C-17. La distinction entre les carbones quaternaires C-13 et C-14 est possible du fait de la corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ du carbone C-13 avec les protons H-11. La localisation du carbone C-12 permet d'attribuer le carbone C-9 en se basant sur la corrélation de ce dernier avec les protons H-12. Ce qui permet par conséquent de repérer le carbone C-10.

-les protons H-30 corrént avec les carbones C-8, C-13, C-14 et C-15, permettant ainsi de localiser les carbones C-8 primaire et C-15 secondaire.

-les protons H-21 corrént avec le carbone C-17 préalablement attribué ainsi que les carbones C-20 et C-22. La distinction entre les carbones CH-20 et CH₂-22 est réalisée grâce aux spectres ^{13}C *J*-modulé et HSQC *J*-modulé.

-les protons H-26 et H-27 corrént avec les carbones C-24, C-25, C-26 et C-27.

-les protons H-26 et H-27 corrént avec les carbones C-24, C-25, C-26 et C-27.

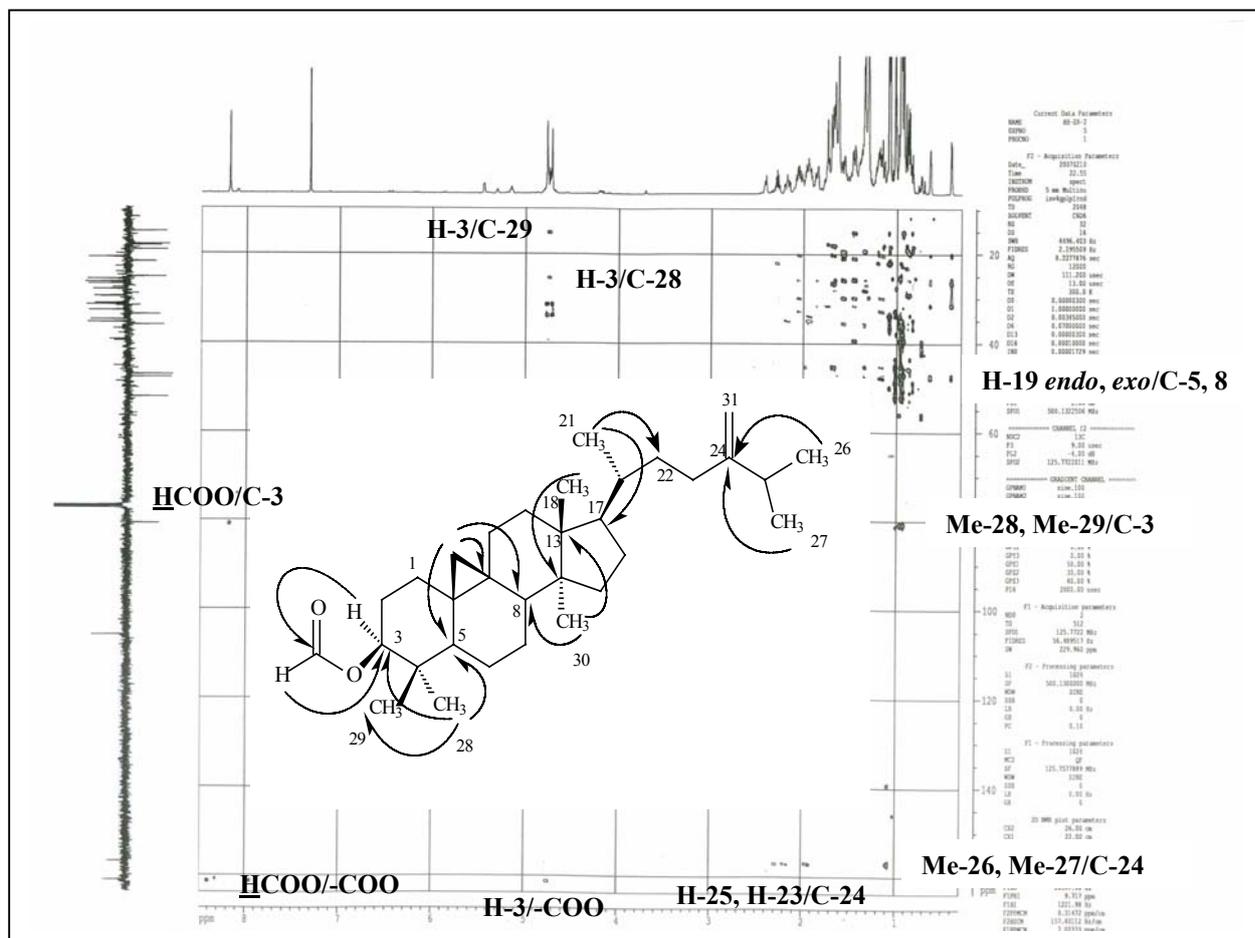


Figure 155 : Spectre HMBC du composé **30**

La différence entre les composés **30** et **29** décrit précédemment, réside dans la substitution du groupement OH lié au carbone C-3 par un groupement formate (HCOO-). Cette substitution est confirmée par les corrélations observées en HMBC (figure 155), d'une part entre le proton du groupement formate HCOO- résonant sous forme de singulet à δ_H 8,18, et le carbone C-3 résonant à δ_C 80,8 et entre le proton H-3 de la génine et le carbone du carbonyle à 161,2 ppm d'autre part. En outre, l'observation sur le spectre de masse EI-MS d'un fragment à m/z 422 $[M-46]^+$ correspondant à la perte de l'acide formique HCOOH prouve l'existence de ce groupement. Les déplacements chimiques des carbones C-3 à δ_C 80,8, C-2 à δ_C 26,9 et du carbone du carbonyle à δ_C 161,2 d'une part et la valeur du déplacement chimique du proton H-3 relativement déblindée à δ_H 4,75 d'autre part, confirment cette estérification [115].

La stéréochimie du composé **30** est déduite de l'analyse du spectre NOESY (figure 156) et des valeurs des constantes de couplage. Il est à noter que le groupement méthylène CH₂-19 du noyau cyclopropane est pris en position β à l'instar des composés analogues, en l'occurrence les 9,19-cyclotriterpénoïdes [71]. L'absence d'une tache de corrélation entre les protons H-19 et H-5,

implique que le proton H-5 est en position α -axiale. Les effets NOE observés entre le proton H-5 et le proton H-3, le proton H-5 et les protons du groupement méthyle H-28, indiquent qu'ils sont du même côté du cycle A. L'orientation α -axiale du proton H-3 est confirmée par la valeur de la constante de couplage $^3J_{3ax-2ax} = 11,5$ Hz. La stéréochimie β -axiale du groupement méthyle Me-29 est confirmée par l'effet NOE observé entre les protons H-29/H-19 *endo*. Les effets NOE entre les protons H-18/H-19 *exo*, H-18/H-8 et H-8/H-19 *endo* attestent de la stéréochimie β -axiale des protons du groupement méthyle H-18 ainsi que du proton H-8. La valeur de la constante de couplage $^3J_{8ax-7ax} = 12,2$ Hz confirme l'orientation H-8 β .

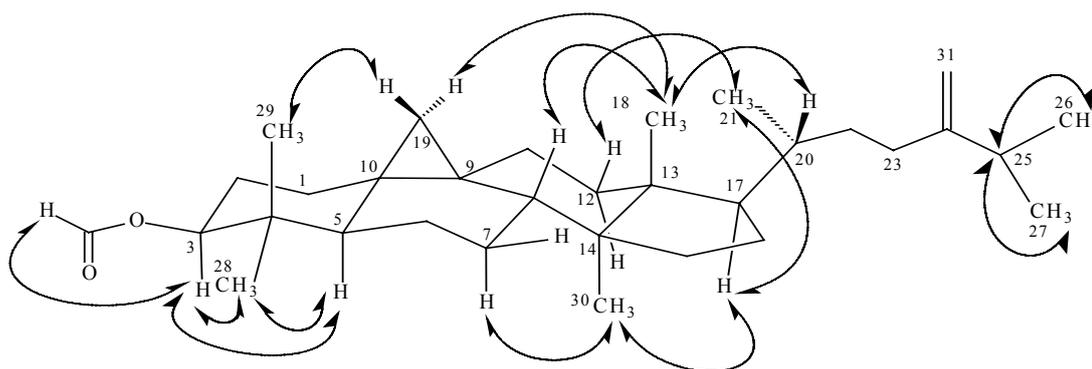
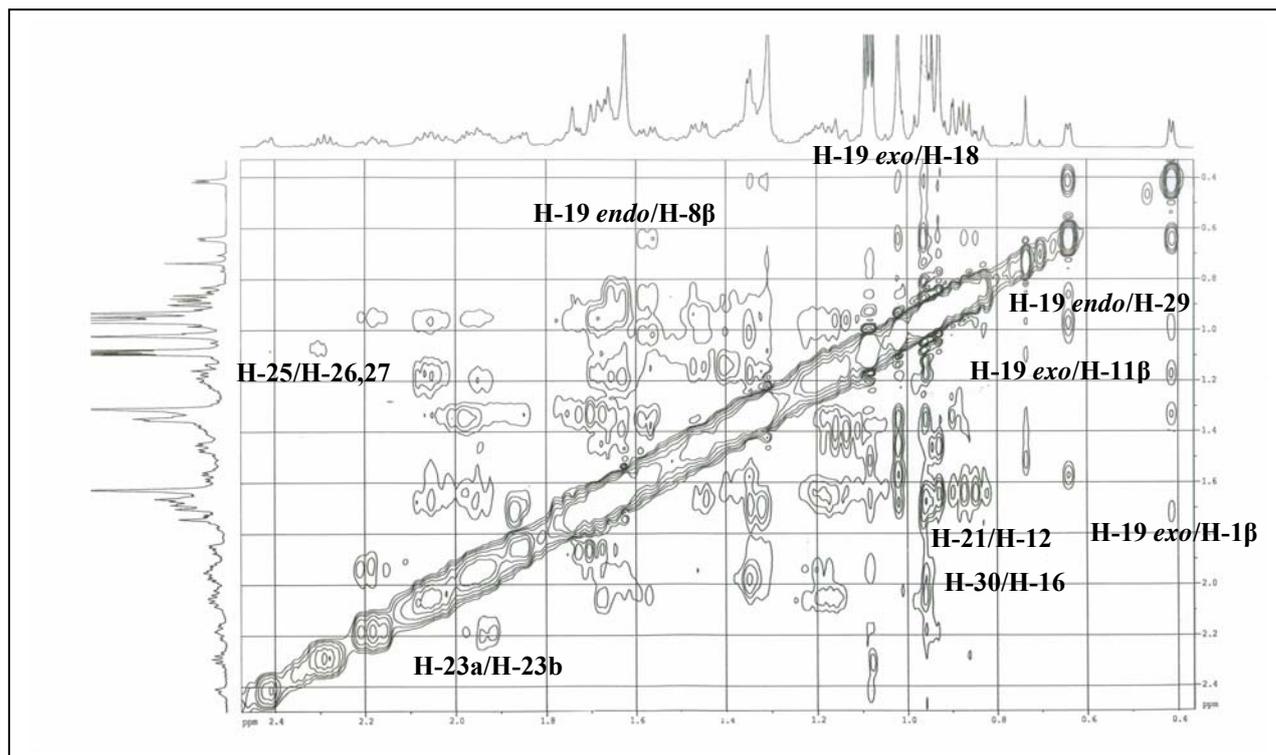


Figure 156 : Principales corrélations NOESY observées pour le composé **30**

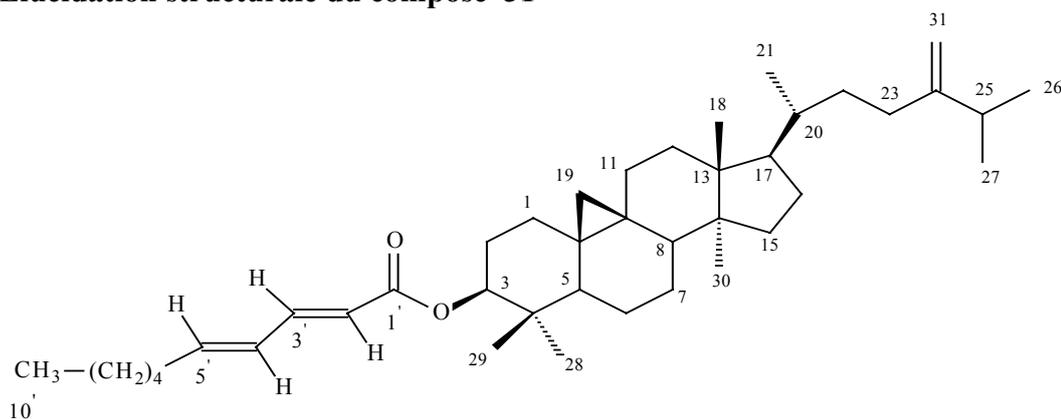
L'hydrolyse alcaline de ce composé a permis de récupérer le triterpène alcool correspondant. Celui-ci a été identifié au 24-méthylèncycloartanol (**29**), d'après son spectre RMN ^1H et la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = +40,5^\circ$, $C = 0,42$ g/100 ml, CHCl_3) [34].

Ces données spectrales permettent de caractériser sans ambiguïté ce composé nouveau de structure : 24-méthylènegyloartanyl formate (**30**).

Tableau 30 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **30** dans CDCl_3

Atome	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,33-1,70 <i>m</i>	31,5
2	1,75-1,85 <i>m</i>	26,9
3	4,75 <i>dd</i> 11,5, 4,7 H-3 α	80,8
4	-	39,4
5	1,46 <i>dd</i> 12,2, 4,3 H-5 α	47,1
6	0,87-1,64 <i>m</i>	20,9
7	1,13-1,39 <i>m</i>	25,8
8	1,57 <i>dd</i> 12,2, 4,8 H-8 β	47,8
9	-	20,2
10	-	25,8
11	1,17 <i>m</i> H-11 β 2,05 <i>m</i> H-11 α	26,4
12	1,69 <i>m</i>	32,8
13	-	45,2
14	-	48,8
15	1,34 <i>m</i>	35,5
16	1,33-1,97 <i>m</i>	28,1
17	1,66 <i>m</i>	52,2
18	1,02 <i>s</i>	17,9
19	0,64 <i>dl</i> 3,9 H-19 <i>endo</i> 0,41 <i>d</i> 4,2 H-19 <i>exo</i>	29,7
20	1,45 <i>m</i>	36,1
21	0,95 <i>d</i> 7,1	18,3
22	1,22-1,62 <i>m</i>	34,9
23	2,18 <i>ddd</i> 15,0, 10,5, 4,5 H-23a 1,94 <i>m</i> H-23b	31,3
24	-	156,9
25	2,29 <i>sept</i> 6,8	33,7
26	1,09 <i>d</i> 6,7	21,9
27	1,08 <i>d</i> 6,8	21,8
28	0,93 <i>s</i>	25,3
29	0,96 <i>s</i>	15,1
30	0,95 <i>s</i>	19,3
31	4,76 <i>sl</i> H-31a 4,72 <i>sl</i> H-31b	105,9
HCOO-	8,18 <i>s</i>	161,2

IV-7-8- Elucidation structurale du composé **31**



24-méthylencycloartanyl 2',4'E-décadiénoate (**31**)

Le spectre de masse ESI-MS du composé **31** enregistré en mode positif, révèle la présence d'un ion pseudomoléculaire à m/z 613 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{41}H_{66}O_2Na$. Formule confirmée par le spectre de masse HR-ESI-MS (m/z 613,4971; calc. 613,4961). Le spectre MS/MS de l'ion pseudomoléculaire montre en mode positif, un fragment à m/z 191 $[(M+Na)+H_2O-440]^+$, correspondant à la perte de la molécule 24-méthylencycloartanol (**29**).

Le spectre UV montre deux bandes d'absorption à 203 et 262 nm attestant de la présence d'un système de doubles liaisons conjuguées.

Le spectre IR présente des bandes d'absorption à 1718 et 984 cm^{-1} correspondant respectivement au groupement carbonyle de l'ester et aux protons (C-H) de doubles liaisons conjuguées *trans*.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C J -modulé du composé **31** sont voisins de ceux du composé **29**. En effet, le spectre RMN 1H (figure 157) présente les signaux suivants caractéristiques d'un triterpène à squelette cycloartane :

- deux doublets blindés à δ_H 0,41 (1H, *d*, $J = 3,8$ Hz, H-19 *exo*) et 0,64 (1H, *d*, $J = 3,7$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [34,113,114].
- des signaux de sept groupements méthyles localisés entre 0,95 et 1,09 ppm.
- deux singulets larges à δ_H 4,77 (1H, *sl*, H-31a) et 4,72 (1H, *sl*, H-31b), correspondant au groupement méthylène exocyclique.
- un doublet de doublet déblindé à δ_H 4,70 ($J_{ax-ax} = 10,9$ et $J_{ax-eq} = 4,7$ Hz), attribuable au proton H-3 α -axial.

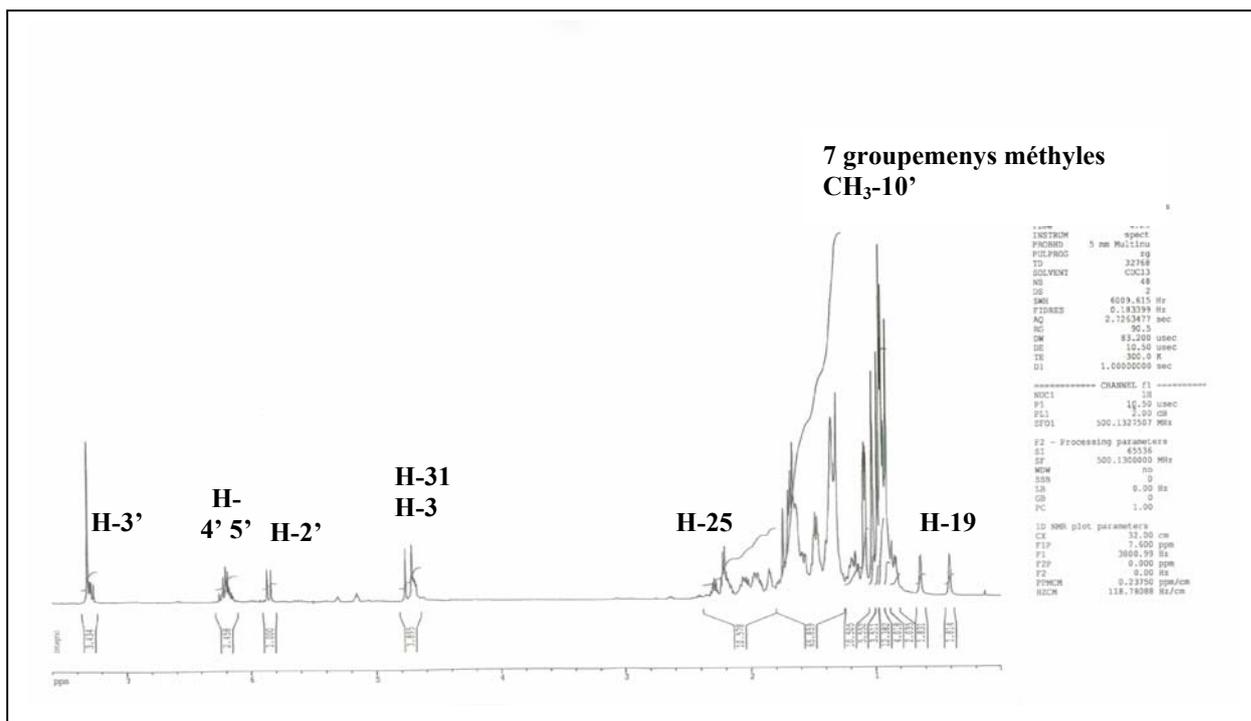


Figure 157 : Spectre RMN ¹H du composé **31**

Le déblindage du proton H-3 qui traduit une acylation à ce niveau et l'analyse du spectre de masse ESI-MS, permettent de suggérer la présence d'une chaîne d'acide gras branchée en C-3. La nature de cette chaîne peut être déduite du spectre de masse ESI-MS. En effet, l'analyse de ce spectre montre un fragment à m/z 445 [(M+Na)-168]⁺ correspondant à la perte d'un acide gras insaturé C₉H₁₅COOH lié à la génine. Les signaux apparaissant sur le spectre RMN ¹H (figure 157), dans la zone déblindée allant de 5,86 à 7,29 ppm, sont attribuables aux protons éthyléniques, ceux observés entre 0,93 et 2,22 ppm correspondent aux quatre groupements méthylènes et au méthyle terminal de cet acide.

Le spectre RMN ¹³C *J*-modulé (figure 158) montre, en plus des carbones propres à la génine, des signaux de quatre carbones éthyléniques à 119,8, 144,7, 128,3 et 144,5 ppm, de quatre CH₂ à 32,9, 28,4, 31,3 et 22,4 ppm et d'un CH₃ à 14,0 ppm. Il est en outre détecté un carbone quaternaire attribuable au carbonyle de l'ester à 167,2 ppm. L'ensemble de ces signaux confirme la présence de la chaîne d'acide gras insaturé.

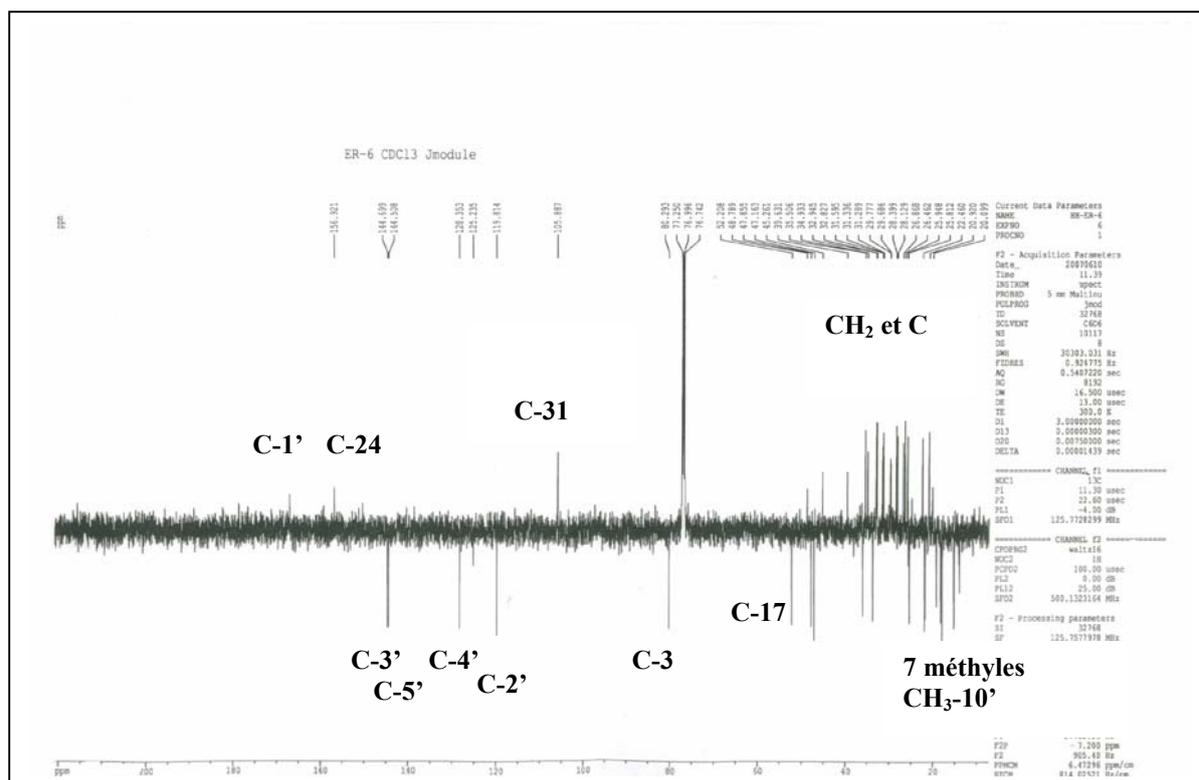


Figure 158 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **31**

La localisation des positions des doubles liaisons de l'acide gras et la détermination de leur stéréochimie, ont été établies conjointement par l'analyse des spectres COSY H-H, HSQC J -modulé et HMBC. En effet, le spectre HMBC permet d'attribuer le carbonyle de l'ester C-1' à 167,2 ppm, du fait de sa corrélation avec le proton H-3 connu. Deux protons éthyléniques corrélant entre eux en COSY H-H, montrent sur le spectre HMBC des corrélations avec le carbone C-1', démontrant ainsi que la double liaison est conjuguée à l'ester. Ces protons se présentant sous forme de doublet à 5,86 ppm ($J=15,3$ Hz) et de doublet dédoublé à 7,29 ppm ($J= 15,4$ et 10,1 Hz) sont attribuables respectivement aux protons H-2' et H-3'. La valeur de la constante de couplage égale à 15,4 Hz, témoigne de la géométrie *trans* de la double liaison. Le proton H-3' déblindé du fait de sa position en face du cône d'anisotropie du carbonyle d'ester, couple à son tour avec le proton H-4' résonant à 6,21 ppm. Le proton H-5' corrélant avec le proton H-4' et résonant à 6,19 ppm, couple également avec le proton H-6' à 2,22 ppm. Ces couplages démontrent que les deux doubles liaisons sont conjuguées. La multiplicité des protons H-4' (*dd*, $J= 15,3, 10,2$ Hz) et H-5' (*dd*, $J= 15,3, 6,8$ Hz), implique également une configuration *E* au niveau de la liaison C4'-C-5'.

Partant des protons H-2', H-3', H-4', H-5' et H-6' déjà identifiés, l'analyse du spectre HSQC J -modulé permet d'attribuer les carbones correspondants (tableau 31). Le déplacement chimique du carbone C-6' (32,9 ppm) supérieur à 30 ppm [87] et la bande d'absorption observée sur le spectre IR à 984 cm^{-1} , sont significatifs d'une stéréochimie *E* de toutes les doubles liaisons. Les corrélations

H-H et H-C, observées respectivement en COSY H-H et HSQC *J*-modulé, permettent de déterminer les déplacements chimiques des autres protons et carbones de la chaîne d'acide gras insaturé qui n'est autre que le 2'*E*,4'*E*-décadiénoyle (tableau 31) .

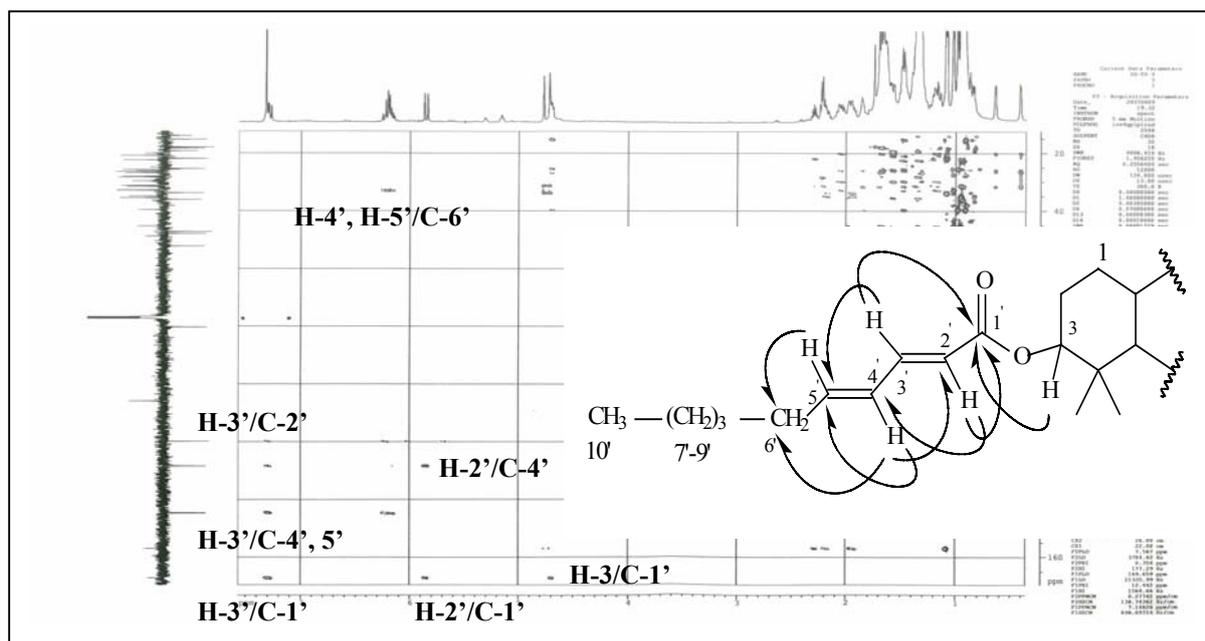


Figure 159 : Spectre HMBC du composé **31**

Le spectre NOESY du composé **31** permet de visualiser, en plus des corrélations caractéristiques de la génine 24-méthylèncycloartanol (**29**), des effets NOE entre les protons éthyléniques H-2' et H-4' d'une part, entre H-3' et H-5' d'autre part, permettant par conséquent de confirmer encore la configuration 2'*E*,4'*E*-décadiénoyle (figure 160).

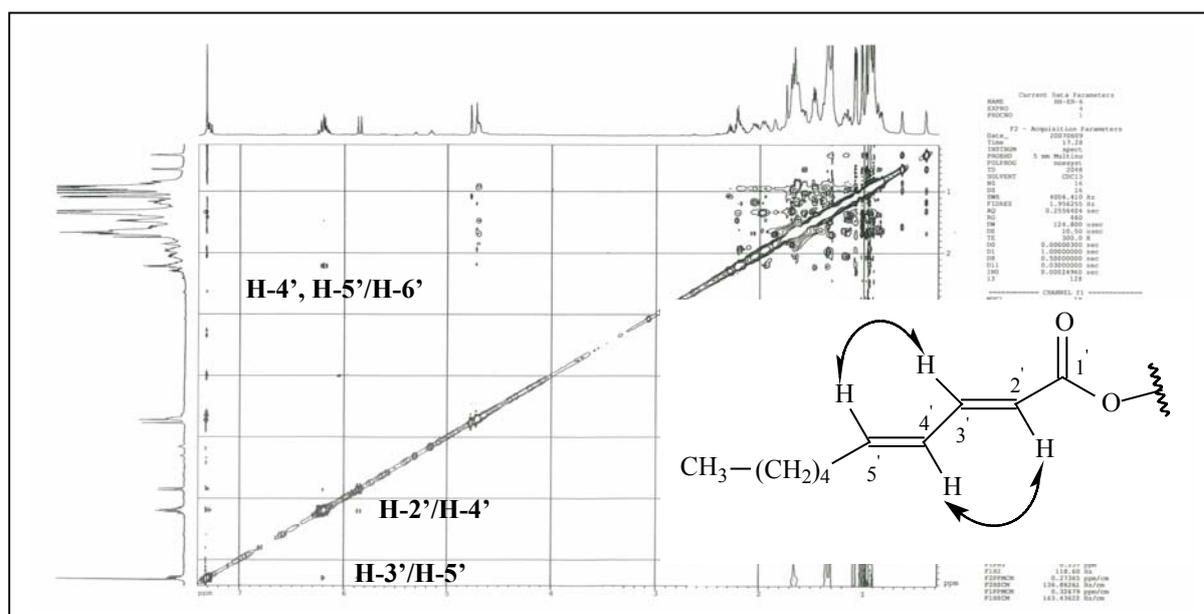


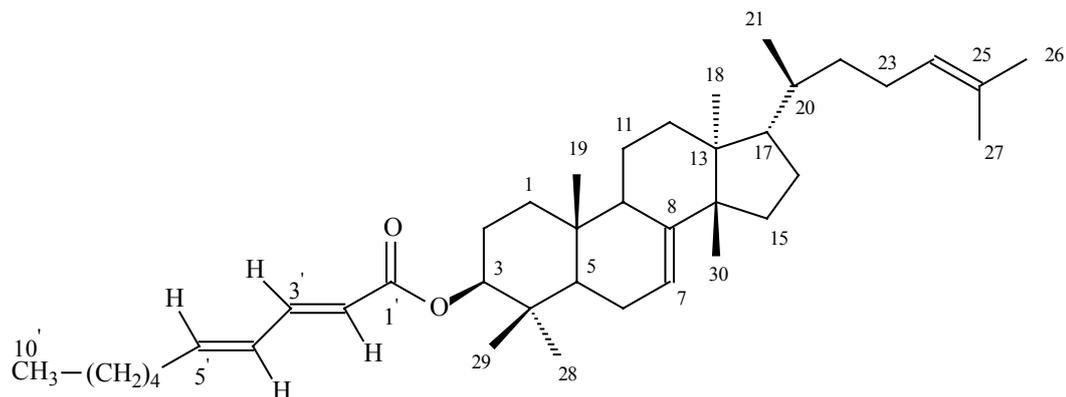
Figure 160 : Principaux effets NOE observables sur le spectre NOESY de la chaîne d'acide gras (2'*E*,4'*E*-décadiénoyle) du composé **31**

L'hydrolyse alcaline de ce triterpène conduit comme dans le cas du composé précédent, au 24-méthylèncycloartanol (**29**). Le spectre RMN ^1H et la valeur du pouvoir rotatoire en apportent la confirmation ($[\alpha]_{\text{D}} = +38,8^\circ$, $C = 0,52 \text{ g}/100 \text{ ml}$, CHCl_3) [34].

Tableau 31 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **31** dans CDCl_3

Atome	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}	Atome	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,31-1,70 <i>m</i>	31,6	1'	-	167,2
2	1,71-1,86 <i>m</i>	26,9	2'	5,86 <i>d</i> 15,3	119,8
3	4,70 <i>dd</i> 10,9, 4,7 H-3 α	80,3	3'	7,29 <i>dd</i> 15,4, 10,1	144,7
4	-	39,6	4'	6,21 <i>dd</i> 15,3, 10,2	128,3
5	1,48 <i>dd</i> 12,5, 5,0 H-5 α	47,1	5'	6,19 <i>dd</i> 15,3, 6,8	144,5
6	0,86-1,64 <i>m</i>	20,9	6'	2,22 <i>q</i> 7,0	32,9
7	1,15-1,38 <i>m</i>	25,8	7'	1,49 <i>m</i>	28,4
8	1,57 <i>dd</i> 12,5, 4,3 H-8 β	47,8	8'	1,35 <i>m</i>	31,3
9	-	20,1	9'	1,37 <i>m</i>	22,4
10	-	25,9	10'	0,93 <i>t</i> 6,6	14,0
11	1,18 <i>m</i> H-11 α 2,05 <i>dt</i> 16,0, 9,0 H-11 β	26,5			
12	1,69 <i>tl</i> 9,0	32,5			
13	-	45,2			
14	-	48,8			
15	1,37 <i>m</i>	35,5			
16	1,33-1,98 <i>m</i>	28,1			
17	1,67 <i>tl</i> 12,0 H-17 α	52,2			
18	1,03 <i>s</i>	17,9			
19	0,64 <i>d</i> 3,7 H-19 <i>endo</i> 0,41 <i>d</i> 3,8 H-19 <i>exo</i>	29,8			
20	1,46 <i>m</i>	36,1			
21	0,96 <i>d</i> 6,7	18,2			
22	1,20-1,64 <i>m</i>	34,9			
23	1,93-2,17 <i>m</i>	31,2			
24	-	156,9			
25	2,29 <i>sept</i> 6,8	33,8			
26	1,08 <i>d</i> 6,7	21,8			
27	1,09 <i>d</i> 6,5	21,9			
28	0,92 <i>s</i>	25,4			
29	0,99 <i>s</i>	13,9			
30	0,96 <i>s</i>	19,3			
31	4,77 <i>sl</i> H-31a 4,72 <i>sl</i> H-31b	105,9			

IV-7-9- Elucidation structurale du composé 32



Tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate (**32**)

Le spectre de masse du composé **32** obtenu par ESI-MS montre en mode positif, deux ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 599 et $[M+K]^+$ à m/z 615, correspondant à une masse moléculaire de 576 uma et une formule brute en $C_{40}H_{64}O_2$. Ceci est également confirmé par le spectre de masse HR-ESI-MS (m/z 599,4792 ; calculé 599,4804). Le fragment observé à m/z 191 $[(M+Na)+H_2O-426]^+$ correspond à la perte d'une molécule à squelette triterpénique $C_{30}H_{50}O$. La fragmentation donnant un ion à m/z 431 $[(M+Na)-168]^+$ constaté auparavant pour le composé **31**, atteste de l'existence d'un acide gras insaturé, en l'occurrence 2'*E*,4'*E*-décadiénoyle. Cette fragmentation indique donc que le composé **32** est constitué d'une génine triterpénique et d'une chaîne d'acide gras insaturé.

Le spectre UV du composé **32** révèle deux bandes d'absorption à 207 et 251 nm attestant de la présence d'un système de doubles liaisons conjuguées.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption à 1712 et 999 cm^{-1} attribuables respectivement au groupement carbonyle de l'ester et aux protons (C-H) de doubles liaisons conjuguées de géométrie *trans*.

Le spectre RMN 1H du composé **32** (figure 161) montre les signaux de cinq méthyles dans la zone blindée allant de 0,83 à 1,02 ppm et de deux méthyles relativement déblindés à 1,66 et 1,74 ppm. Il est en plus observé un massif de protons résonant entre 1,09 et 2,29 ppm correspondant aux CH et CH_2 de la molécule.

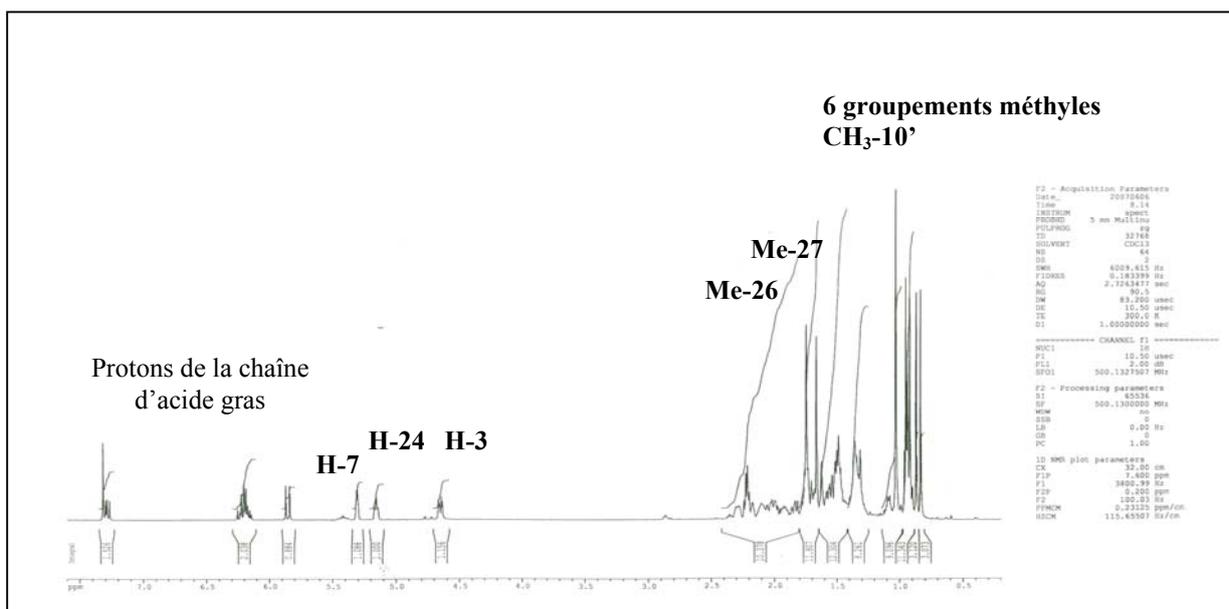


Figure 161 : Spectre RMN ^1H du composé **32**

Les spectres RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 162) et HSQC *J*-modulé présentent 40 signaux. Ceux relatifs aux méthyles localisés entre 13,1 et 27,6 ppm plaident pour un triterpène tétracyclique estérifié par une chaîne d'acide gras insaturé 2'*E*,4'*E*-décadiénoyle, en accord avec l'analyse du spectre de masse ESI-MS.

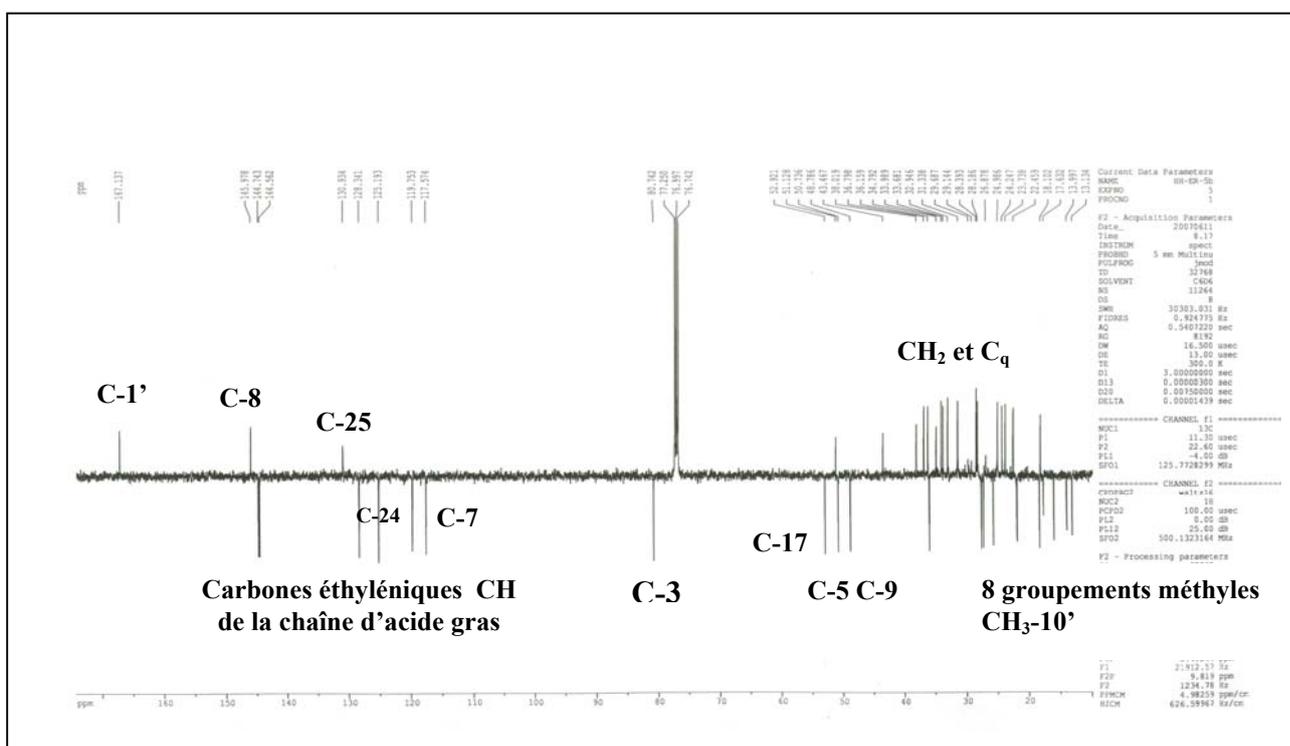


Figure 162 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **32**

La présence de la chaîne d'acide gras est confirmée par le spectre RMN ^1H (figure 161) qui montre les signaux caractéristiques du groupement $2'E,4'E$ -décadiénoyle, à savoir :

- un doublet repéré à 5,85 ppm correspondant au proton H-2', couplant avec le proton H-3' résonant à 7,29 ppm, au regard de la constante de couplage $J= 15,3$ Hz (*trans*)
- un doublet dédoublé résonant à 7,29 ppm attribuable au proton H-3' du fait de son couplage avec les deux protons H-2' et H-4' ($J= 15,2, 9,9$ Hz).
- un doublet dédoublé résonant à 6,19 ppm correspondant au proton H-5'. Ce dernier couple avec deux protons H-4' et H-6', avec des constantes de couplage égales à 15,1 et 6,4 Hz (*trans*).
- un doublet dédoublé détecté à 6,21 ppm, attribuable au proton H-4'.
- un quadruplet d'intégration 2H repéré à 2,21 ppm ($J= 6,9$ Hz), correspondant au CH_2 -6' voisin du système de doubles liaisons conjuguées.
- trois multiplets s'intégrant chacun pour deux protons à 1,47 (H-7'), 1,33 (H-8') et 1,36 ppm (H-9').
- un triplet d'intégration 3H résonant à 0,95 ppm ($J= 6,5$ Hz), attribuable au méthyle terminal Me-10' de l'acide gras.

Les multiplicités et les déplacements chimiques des protons oléfiniques H-2', H-3', H-4' et H-5' de la chaîne ester, identiques à ceux du composé **31** déjà identifié, indiquent une stéréochimie $2'E, 4'E$.

L'analyse conjuguée des spectres COSY H-H, HSQC J -modulé et RMN ^{13}C J -modulé, permet de déterminer sans ambiguïté les déplacements chimiques de carbones du groupement $2'E,4'E$ -décadiénoyle (tableau 32).

Les différents protons de la génine sont également visualisés sur le spectre RMN ^1H (figure 161). On identifie :

- le proton H-3 α -axial résonant à $\delta_{\text{H}} 4.65$ sous la forme de doublet de doublet ($J_{\text{ax-ax}}= 11,1$ Hz et $J_{\text{ax-eq}}= 4,3$ Hz).
- le proton H-5 α -axial repéré à $\delta_{\text{H}} 1.49$ sous la forme de doublet de doublet également ($J_{\text{ax-ax}}= 13,0$ Hz et $J_{\text{ax-eq}}= 6,5$ Hz).
- le proton H-9 α -axial résonant à $\delta_{\text{H}} 2,29$ (*m*, $W_{1/2}= 25$ Hz).
- les protons éthyléniques H-7 et H-24 détectés à $\delta_{\text{H}} 5,30$ (*ql*, $J= 2,7$ Hz) et 5,16 (*t*, $J= 6,6$ Hz) respectivement. Les déplacements chimiques de ces protons et l'allure de leurs signaux sont en bon accord avec leur localisation en C-24 et C-7 [117].
- Les protons des méthyles vinyliques Me-26 et Me-27 résonant sous forme de singulet à 1,74 et 1,66 ppm respectivement

La présence de deux doubles liaisons dans la génine $\Delta^{7,8}$ à $\delta_{\text{C}} 117,6$ et 145,9 (C-7=C-8) et $\Delta^{24,25}$ à $\delta_{\text{C}} 125,2$ et 130,9 (C-24=C-25) [117,118], est confirmée par l'examen du spectre RMN ^{13}C en J -modulé (figure 162)

L'analyse des spectres ^{13}C J -modulé, COSY H-H, HSQC J -modulé et HMBC permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé (tableau 32).

L'ensemble des résultats obtenus, appuyé par les données de la littérature, nous oriente vers une génine triterpénique à squelette tirucallane [74] (figure 163) ou euphane [34] (figure 164) avec deux doubles liaisons en positions C-7 et C-24. Les deux séries se différencient seulement par la configuration au niveau du carbone en C-20.

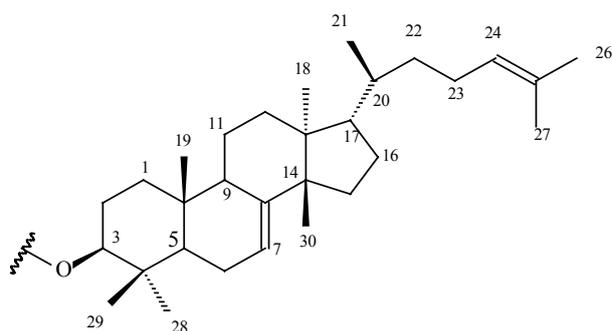


Figure 163 : tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl (20S)

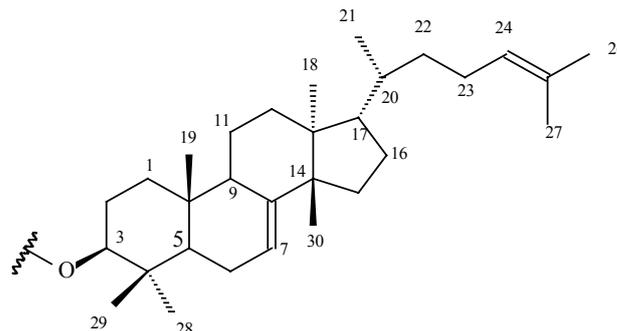


Figure 164 : eupha-7,24-dièn-3 β -yl (20R)

Pour pouvoir différencier les deux séries euphane/tirucallane et assigner sans ambiguïté la configuration au niveau du carbone en C-20, c'est-à-dire 20R/euphane ou 20S/tirucallane, le recours à l'expérience de RMN bidimensionnelle homonucléaire NOESY s'avère judicieux. En effet, le spectre NOESY (figure 165) permet de visualiser les corrélations significatives sur la face β entre H-19/H-29, H-19/H-1 β , H-29/H-2 β , H-19/H-30, H-30/H-17 β , H-17 β /H-12 β et H-12 β /H-30 et sur la face α entre H-3 α /H-28, H-28/H-5 α , H-5 α /H-9 α , H-18/H-9 α , H-18/H-12 α , H-18/H-15 α et H-21/H-12 α . Ces effets NOE observés pour un nombre important de composés triterpéniques possédant le même squelette carboné, sont caractéristiques d'un triterpène tétracyclique de nature tirucallane [74,75]. Il y a lieu de signaler que l'absence d'effet NOE H-21/H-16, important dans le cas de composés à squelette euphane [37], et la valeur du déplacement chimique des protons du méthyle Me-21 (δ_{H} 0,94, d , 6,5 Hz), confirment l'appartenance du composé **32** à la série tirucallane [42,76]. La valeur négative du pouvoir rotatoire ($-9,4^\circ$, $C= 0,37$ g/100 ml, CHCl_3) est également significative de composés à squelette tirucallane [23,116]. La configuration 2' E ,4' E des doubles liaisons de la chaîne d'acide gras insaturé, a été vérifiée également par analyse NOESY. En effet, il est observé des effets NOE H-2'/H-4' et H-3'/H-5'.

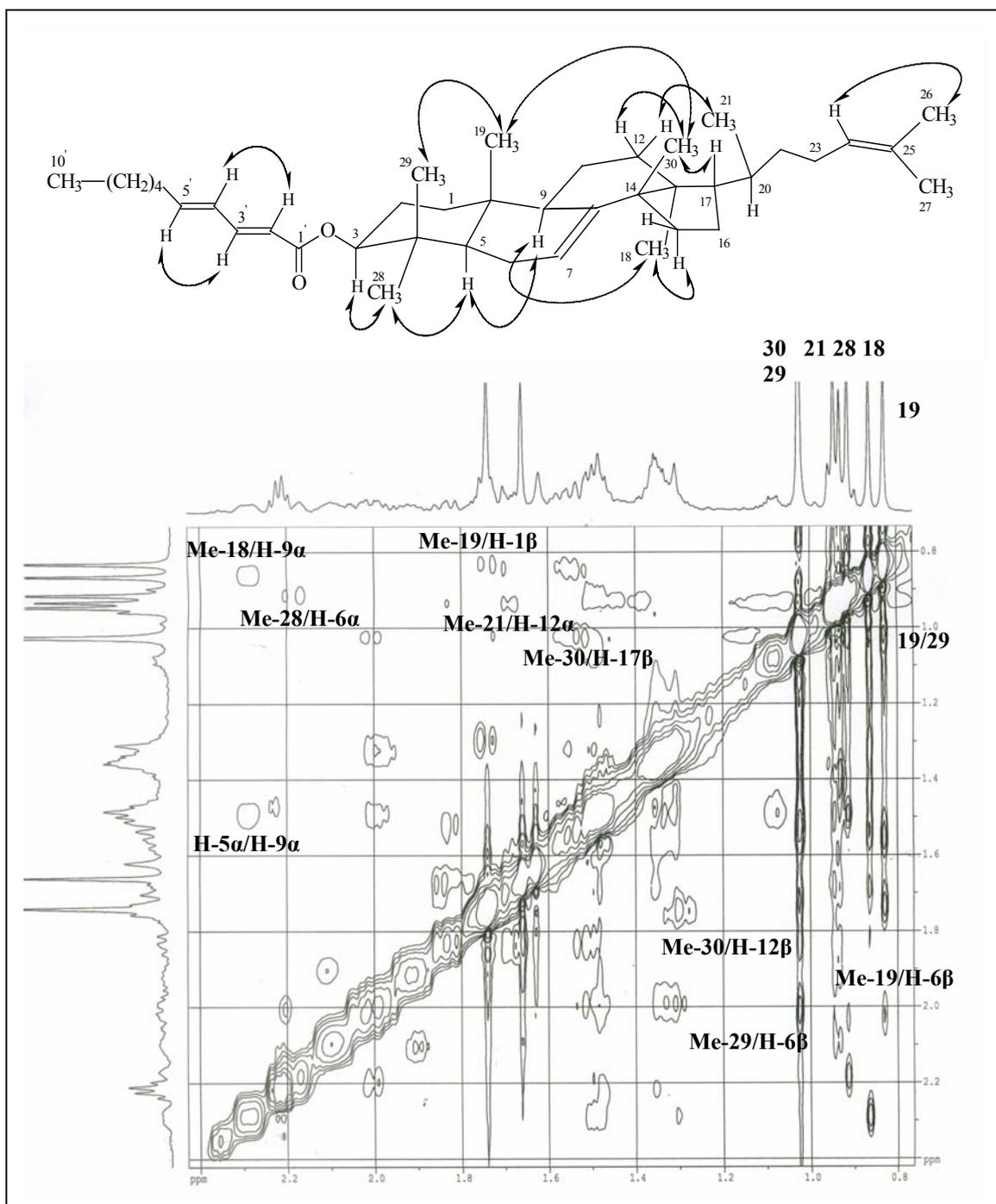


Figure 165 : Principaux effets NOE observés (partie blindée) pour le composé **32**

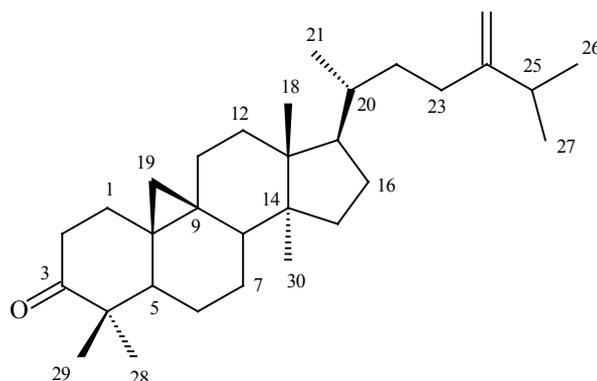
L'hydrolyse alcaline de ce composé a permis d'obtenir le triterpène alcool correspondant à savoir le tirucalla-7,24-dièn-3 β -ol. Sa structure et stéréochimie ont été vérifiées par analyse du spectre RMN ^1H et par mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -45,7^\circ$, $C = 0,49$ g/100 ml, CHCl_3 , lit. -49° , $C = 1,21$ g/100 ml, CHCl_3 [117] et $-47,5^\circ$, $C = 0,5$ g/100 ml, CHCl_3 [118])

Les données précédentes indiquent que la structure du composé **32** est : tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate.

Tableau 32 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **32** dans CDCl_3

Atome	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}	Atome	δ_{H} <i>m</i> , J Hz	δ_{C}
1	1,30-1,74 <i>m</i>	36,8	1'	-	167,1
2	1,76-1,84 <i>m</i>	24,2	2'	5,86 <i>d</i> 15,3	119,7
3	4,65 <i>dd</i> 11,1, 4,1 H-3 α	80,7	3'	7,29 <i>dd</i> 15,2, 9,9	144,7
4	-	38,0	4'	6,21 <i>dd</i> 15,2, 10,0	128,3
5	1,49 <i>dd</i> 13,0, 6,5 H-5 α	50,7	5'	6,19 <i>dd</i> 15,1, 6,4	144,5
6	2,01-2,19 <i>m</i>	23,7	6'	2,21 <i>q</i> 6,9	32,9
7	5,30 <i>ql</i> 2,7	117,6	7'	1,47 <i>m</i>	28,4
8	-	145,6	8'	1,33 <i>m</i>	31,3
9	2,29 <i>m</i> $W_{1/2}$ 25 H-9 α	48,8	9'	1,36 <i>m</i>	22,4
10	-	34,8	10'	0,95 <i>t</i> 6,5	14,0
11	1,56 <i>m</i>	18,1			
12	1,67-1,83 <i>m</i>	33,7			
13	-	43,5			
14	-	51,1			
15	1,51-1,54 <i>m</i>	33,9			
16	1,35-1,98 <i>m</i>	28,2			
17	1,52 <i>q</i> 10,0 H-17 β	52,9			
18	0,86 <i>s</i>	21,8			
19	0,83 <i>s</i>	13,1			
20	1,44 <i>m</i>	35,9			
21	0,94 <i>d</i> 6,5	18,3			
22	1,09-1,50 <i>m</i>	36,1			
23	1,92-2,10 <i>m</i>	24,9			
24	5,16 <i>t</i> 6,6	125,2			
25	-	130,9			
26	1,74 <i>s</i>	25,7			
27	1,66 <i>s</i>	17,6			
28	0,91 <i>s</i>	27,6			
29	1,02 <i>s</i>	15,9			
30	1,02 <i>s</i>	27,2			

IV-7-10- Elucidation structurale du composé 33



24-méthylèncycloartanone (**33**)

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-EI-MS, montre un pic d'ion moléculaire à m/z 438,3862 $[M]^+$ (calculé 438,3862), correspondant à une formule brute en $C_{31}H_{50}O$. Il révèle également des fragments caractéristiques de la chaîne latérale des triterpènes à squelette tétracyclique [41] à m/z 423 $[M-15]^+$, 395 $[M-43]^+$, 355 $[M-83]^+$ et 313 $[M-125]^+$ correspondant respectivement à la perte des groupements méthyle, isopropyle, C_6H_{11} et C_9H_{17} .

Le spectre IR du composé **33** révèle des bandes d'absorption à 1707 et 1630 cm^{-1} , attribuables respectivement à une fonction cétone incluse dans un cycle à 6 chaînons et une double liaison.

Le spectre RMN 1H (figure 166) présente des éléments structuraux similaires à ceux du 24-méthylèncycloartanol (**29**), particulièrement au niveau des cycles B, C et D et de la chaîne latérale [34,113,114,115]. Il permet de reconnaître facilement :

- les deux protons non équivalents H-19 sous la forme de deux doublets résonant à δ_H 0,63 (d , $J= 4,2$ Hz, H-19 *endo*) et 0,84 (d , $J= 4,0$ Hz, H-19 *exo*), caractéristiques d'un noyau cyclopropane de composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïde [34,113,114,115].
- le proton H-8 résonant sous forme de doublet dédoublé à 1,65 ppm (dd , $J= 8,0, 3,1$ Hz, H-8 β).
- les deux protons éthyléniques exocycliques H-31 résonant à δ_H 4,77 (sl , H-31a) et 4,72 (sl , H-31b).
- les protons des groupements méthyles Me-18 (δ_H 1,04, s), M-21 (δ_H 0,95, d , $J= 6,0$ Hz), Me-26 (δ_H 1,09, d , $J= 7,0$ Hz), Me-27 (δ_H 1,08, d , $J= 6,9$ Hz) et Me-30 (δ_H 0,96, s).
- le proton H-25 repéré à 2,29 ppm sous forme de septuplet ($J= 6,8$ Hz).

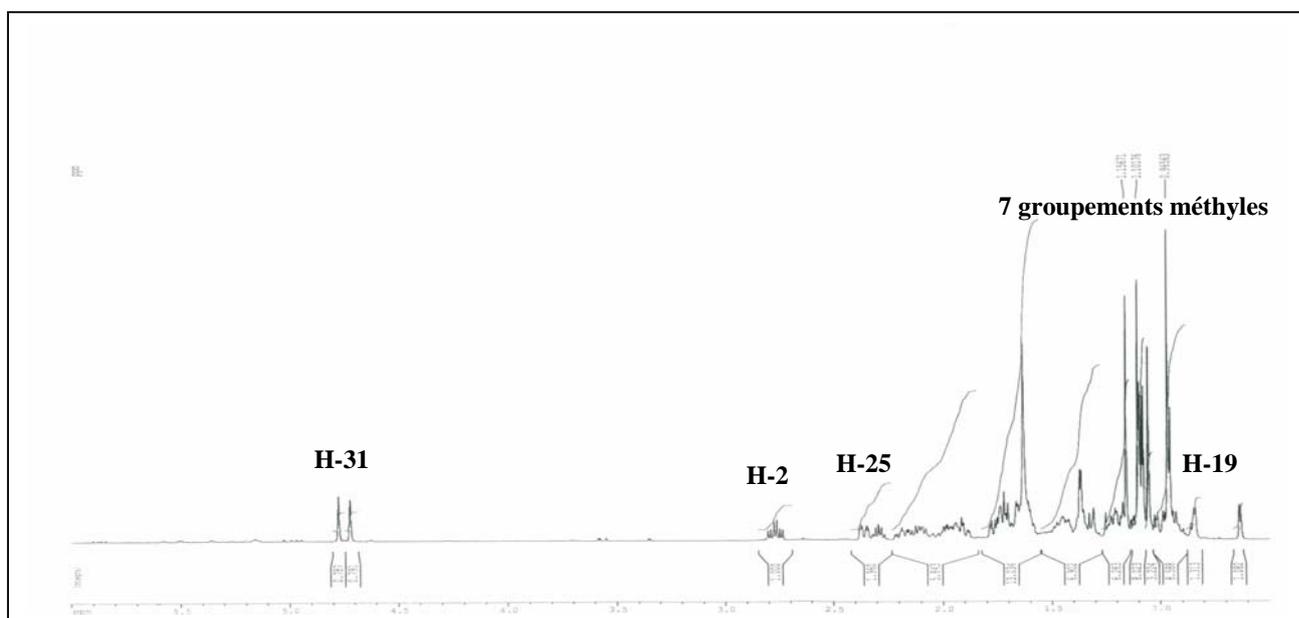


Figure 166 : Spectre RMN ^1H du composé **33**

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 167) presque identique à celui du 24-méthylèncycloartanol (**29**) [34], permet de compter 30 atomes de carbone dont un quaternaire fortement déblindé à 216,7 ppm, correspondant au carbone du carbonyle. La disparition du signal du carbone oxyméthine C-3 résonnant habituellement aux alentours de 78 ppm et celui du proton déblindé H-3 résonant entre 3 et 4 ppm dans le cas des dérivés du cycloartanol [34,41,113,114], laisse supposer que le cycle A de la molécule ne porte pas de fonction OH [115]. L'absence d'une large bande d'absorption entre 3300 et 3600 cm^{-1} sur le spectre IR, confirme cette hypothèse.

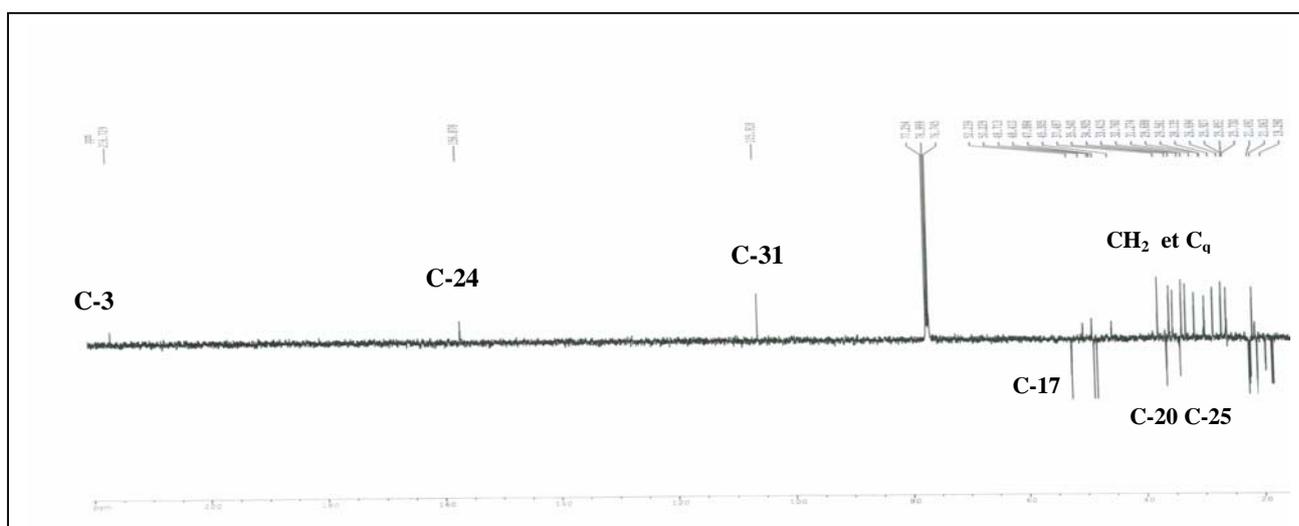


Figure 167 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **33**

La détermination de la structure de ce composé peut être initiée à partir des protons non équivalents H-19 du noyau cyclopropane, donnant en HMBC une corrélation $^3J_{H-C}$ (figure 168) avec les carbones C-1, C-5 et C-8. La distinction entre C-1 et les carbones C-5 et C-8 est aisée car il s'agit de deux carbones primaires CH (C-5, δ_C 48,4 et C-8, δ_C 47,9) et d'un carbone secondaire CH₂ (C-1, δ_C 33,4). Ce dernier présente des corrélations sur le spectre HSQC *J*-modulé avec les protons H-1 repérés à δ_H 1,60 (*m*) et 1,91 (*td*, $J= 13,5$ et $4,4$ Hz). A partir des protons H-1, l'analyse COSY H-H (figure 169) permet d'assigner les déplacements chimiques des protons adjacents H-2, faisant partie d'un même système de spin et résonant à δ_H 2,36 (*dt*, $J= 13,9$ et $3,3$ Hz) et 2,77 (*td*, $J= 13,8$ et $6,3$ Hz). Le déblindage des protons H-2 implique qu'ils sont en position α d'un groupement électroattracteur (α -cétone). Cette attribution est confirmée par les corrélations visualisées en HMBC (figure 168) entre les protons H-1, H-2 et H-5 et les protons des groupements méthyles Me-28, Me-29 et le carbone résonant à 216,7 ppm, ne pouvant être donc que le carbonyle en C-3.

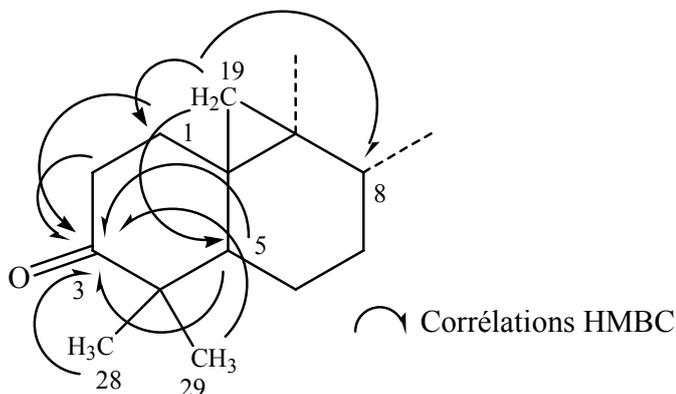


Figure 168 : Corrélations HMBC du composé **33**

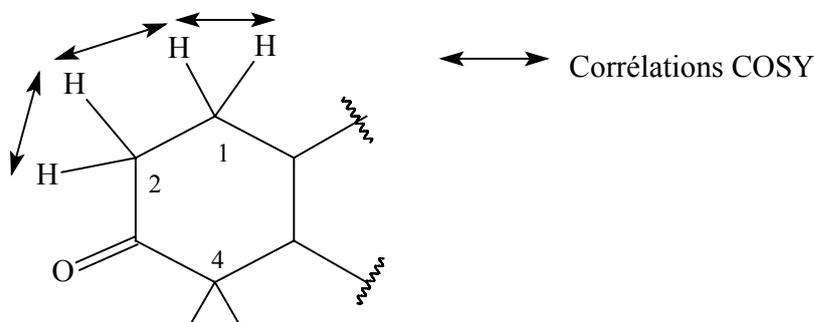


Figure 169 : Corrélations COSY H-H du composé **33**

L'analyse NOESY (figure 170) permet d'établir la stéréochimie de ce composé. En effet, elle montre sur la face β , les corrélations H-19 *endo*/H-8 β , H-19 *endo*/Me-29, Me-29/H-2 β , Me-18/H-8 β , Me-18/H-19 *exo* et Me-18/H-20 et sur la face α , les corrélations Me-28/H-5 α , Me-28/Me-30/H-17 α , Me-30/H-16 α et Me-30/H-11 α . D'autres effets NOE sont également visualisés entre les protons de la chaîne latérale : H-31a/H-25, H-31a/Me-26 ou Me-27, H-31b/H-22, H-31b/H-23 et H-25/Me-18. Toutes ces corrélations permettent d'assigner la stéréochimie au niveau des centres asymétriques des 4 cycles. L'observation d'une corrélation entre le proton H-17 α et les protons du groupement méthyle Me-21, permet de déduire une configuration 20R au niveau du carbone C-20 [34,113,114]. Le pouvoir rotatoire de ce composé, mesuré dans le chloroforme, égal à $+16,6^\circ$ (C= 0,35 g/100 ml) confirme la stéréochimie attribuée à ce composé (lit. $+15^\circ$ C= 0,34 g/100 ml, CHCl₃ [72]).

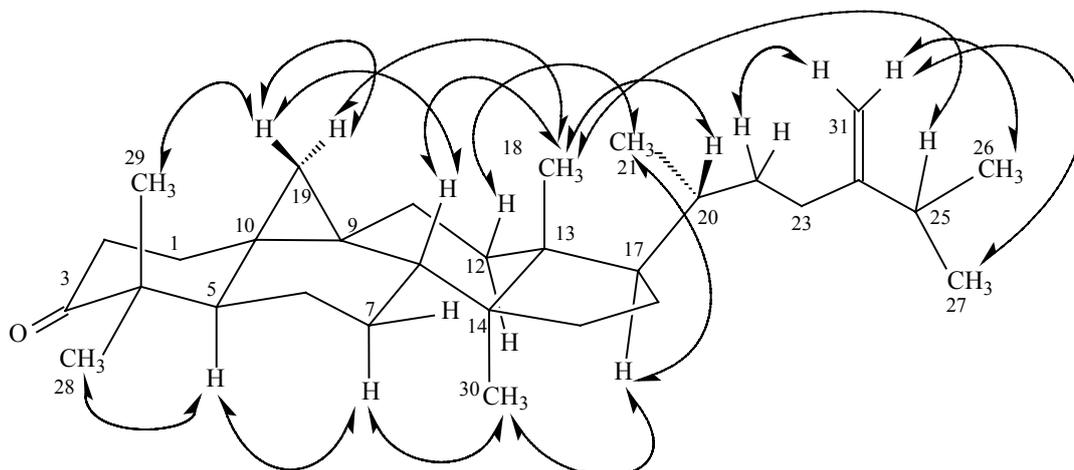


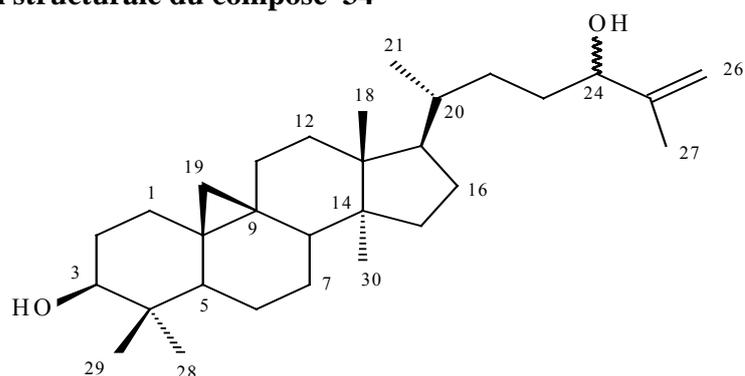
Figure 170 : Importantes corrélations visualisées sur le spectre NOESY du composé **33**

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau 33, permettent d'identifier ce composé au 24-méthylène-cycloartanone (**33**), isolé antérieurement de *Bhesa nitidissima* [100].

Tableau 33 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **33** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,60 <i>m</i> H-1 β	33,4
2	1,91 <i>td</i> 13,5, 4,4 H-1 α 2,36 <i>dt</i> 13,9, 3,3 H-2 α 2,77 <i>td</i> 13,8, 6,3 H-2 β	37,5
3	-	216,7
4	-	50,2
5	1,77 <i>dd</i> 12,3, 4,4 H-5 α	48,4
6	1,01-1,62 <i>m</i>	21,5
7	1,19-1,44 <i>m</i>	25,8
8	1,65 <i>dd</i> 8,0, 3,1 H-8 β	47,9
9	-	21,1
10	-	25,9
11	1,24 <i>m</i> H-11 2,10 <i>dt</i> 14,0, 8,5 H-11	26,7
12	1,72 <i>m</i> 8,6	32,7
13	-	45,3
14	-	48,7
15	1,36 <i>m</i>	35,5
16	1,36-1,98 <i>m</i>	28,1
17	1,68 <i>m</i>	52,2
18	1,04 <i>s</i>	18,1
19	0,63 <i>d</i> 4,2 H-19 <i>endo</i> 0,84 <i>d</i> 4,0 H-19 <i>exo</i>	29,5
20	1,48 <i>m</i>	36,1
21	0,95 <i>d</i> 6,0	18,3
22	1,21-1,64 <i>m</i>	34,9
23	2,19 <i>ddd</i> 15,0, 10,9, 4,0 H-23a 1,94 <i>m</i> H-23b	31,3
24	-	156,8
25	2,29 <i>sept</i> 6,8	33,8
26	1,09 <i>d</i> 7,0	21,9
27	1,08 <i>d</i> 6,9	21,8
28	1,10 <i>s</i>	22,1
29	1,15 <i>s</i>	20,7
30	0,96 <i>s</i>	19,3
31	4,77 <i>sl</i> H-31a 4,72 <i>sl</i> H-31b	105,9

IV-7-11- Elucidation structurale du composé **34**



24-épimères cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**34**)

Il s'agit d'un mélange de deux épimères en C-24 du cycloart-25-ène-3 β ,24-diol. Ils ont été isolés précédemment de l'espèce *Euphorbia trigona* [43].

Le spectre de masse haute résolution HR-EI-MS, indique un pic de l'ion moléculaire à m/z 442,3805 [M]⁺ (calculé 442,3811), correspondant à une formule brute en C₃₀H₅₀O₂. Il montre également des fragments caractéristiques de dérivés de cycloartaniques à m/z 424 [M-18]⁺, 409 [M-18-15]⁺, 391 [M-2x18-15]⁺ et 315 [M-127]⁺, correspondant respectivement à la perte d'une molécule d'eau, une molécule d'eau et un groupement méthyle, deux molécules d'eau et un groupement méthyle, et enfin un groupement C₈H₁₅O.

Le spectre IR du composé **34** montre une large bande d'absorption à 3424 cm⁻¹ (OH) et une petite bande à 1648 cm⁻¹ (double liaison).

Les spectres RMN ¹H et ¹³C *J*-modulé (tableau 34) montrent des ressemblances avec le 24-méthylène-cycloartanol (**29**, notamment au niveau des cycles A, B, C et D [34,70,72]. En effet, le spectre RMN ¹H (figure 171) permet d'attribuer les deux protons non équivalents H-19 résonant sous forme de deux doublets à δ_H 0,61 (*d*, *J*= 4,0 Hz, H-19 *endo*) et 0,39 (*d*, *J*= 4,1 Hz, H-19 *exo*), caractéristiques d'un noyau cyclopropane des composés terpéniques à squelette 9,19-cyclo-triterpénoïdes [34,113,114], le proton oxyméthine déblindé H-3 résonant à 3,30 ppm sous la forme de doublet dédoublé (*J*= 11,3 et 4,6 Hz) ainsi que les protons des groupements méthyles Me-18 (δ_H 1,02, *s*), M-21 (δ_H 0,93, *d*, *J*= 6,2 Hz) et Me-30 (δ_H 0,95, *s*).

La différence, par rapport au 24-méthylène-cycloartanol (**29**), porte essentiellement sur la disparition du signal de l'un des méthyles terminaux de la chaîne latérale. Le signal du méthyle restant repéré à 1,78 ppm correspond à un méthyle vinylique Me-27. Le spectre RMN ¹H montre également dans la région déblindée, un signal résonant à 4,09 ppm sous la forme d'un triplet (*J*= 6,3 Hz)

correspondant à un deuxième proton oxyméthine (H-24) et deux signaux attribuables à un groupement méthylène résonant à δ_H 4,98 (*dl*, $J=7,0$ Hz, H-26a) et 4,89 (*sl*, H-26b). Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 172) et l'expérience HSQC J -modulé permettent d'attribuer le déplacement chimique du carbone oxyméthine à 76,2-76,3 ppm (C-24) et le carbone oléfinique à 110,9-111,4 ppm (C-26).

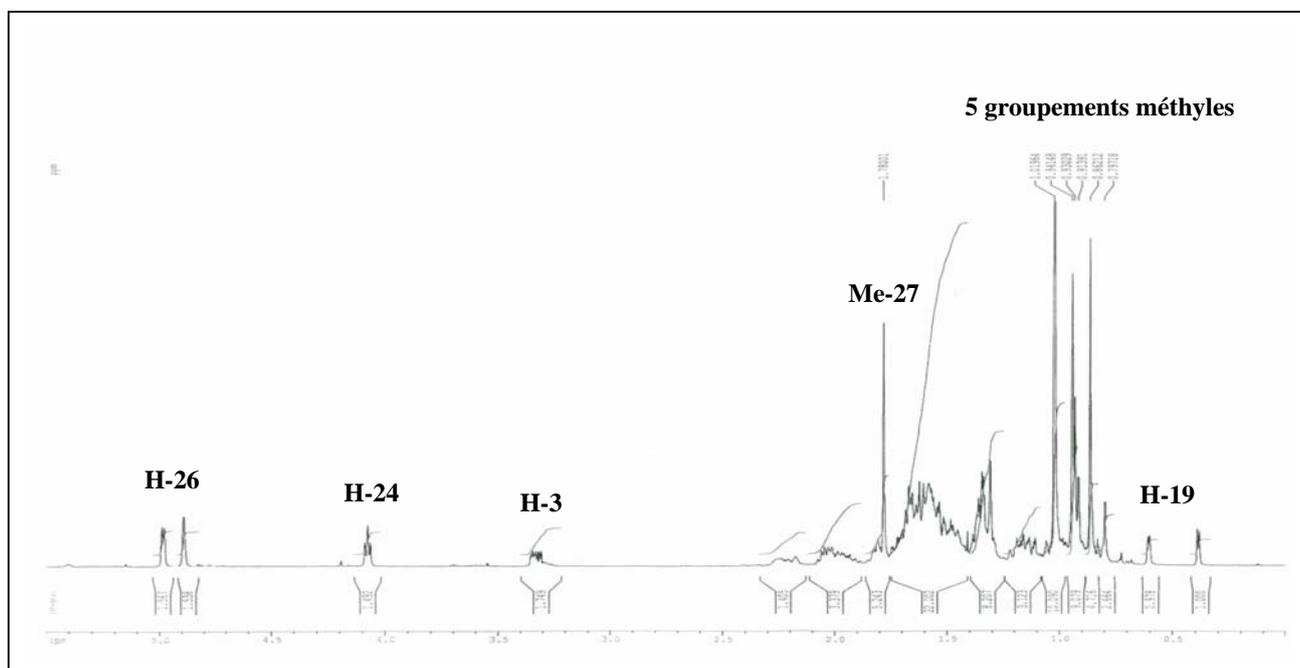


Figure 171 : Spectre RMN 1H du composé **34**

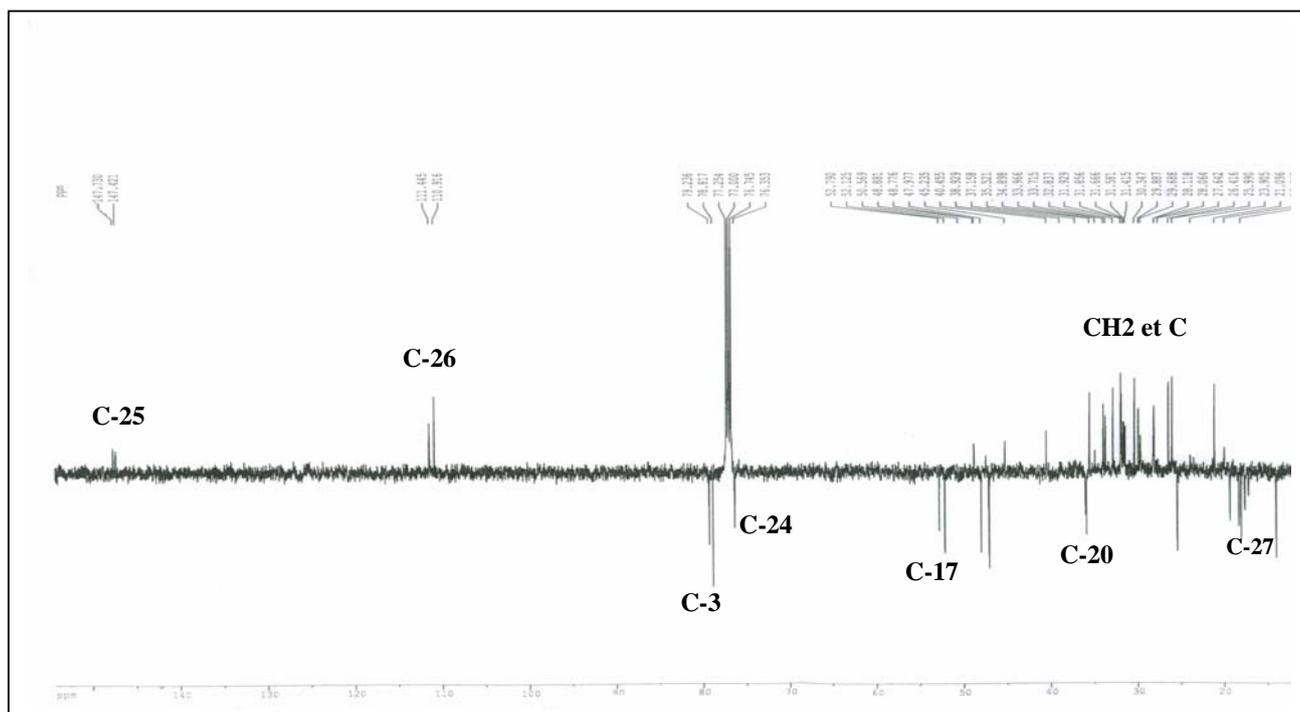


Figure 172 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **34**

Partant des protons méthylique Me-21, l'expérience COSY H-H (figure 173) permet de visualiser les corrélations vicinales $^3J_{\text{H-H}}$ et longue distance $^4J_{\text{H-H}}$ à travers la double liaison, entre les protons de la chaîne latérale résonant à δ_{H} 1,46 (m, H-20), 1,51-1,56 (m, H-22), 1,50-1,68 (m, H-23).

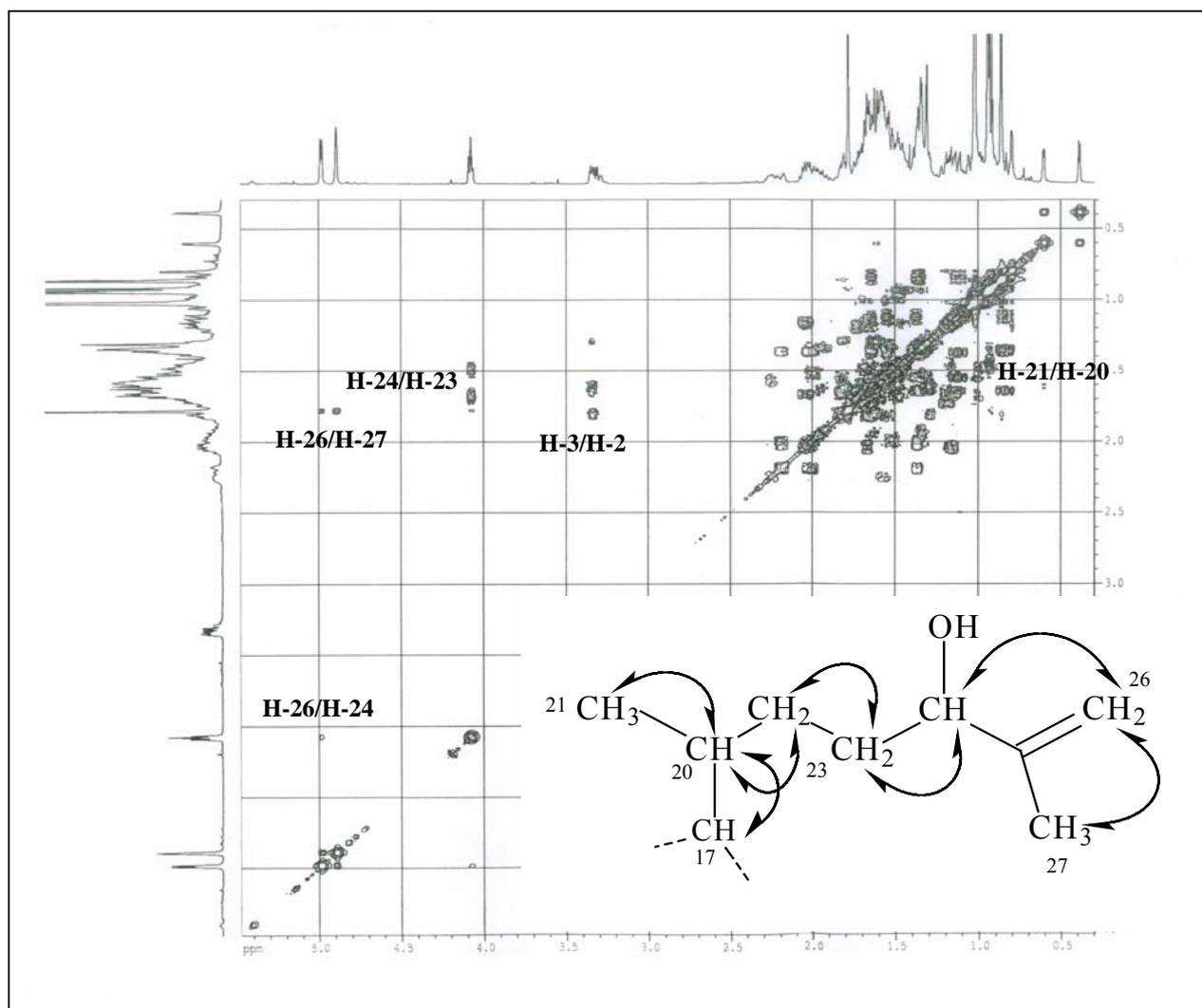


Figure 173 : Corrélations COSY H-H de la chaîne latérale du composé **34**

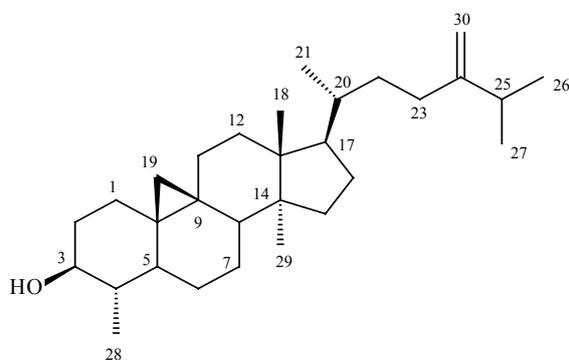
L'expérience de corrélation HSQC J -modulé permet d'assigner les déplacements chimiques des carbones : C-17 (δ_{C} 52,1-52,7), C-20 (δ_{C} 35,8-35,9), C-21 (δ_{C} 18,3-18,4), C-22 (δ_{C} 33,7-33,9), C-23 (δ_{C} 31,4-31,5), C-25 (δ_{C} 147,4-147,7) et C-27 (δ_{C} 17,1-17,5). Le dédoublement des signaux de ces carbones laisse supposer qu'il s'agit d'un mélange d'épimères (24R et 24S) en C-24 de ce composé [43]. La valeur du pouvoir rotatoire de ce mélange égale à $+30,1^\circ$ (C= 0,33 g/100 ml), est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature [114].

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau 34, permettent d'identifier ce composé au 24-épimères cycloart-25-ène-3 β ,24-diol (**34**).

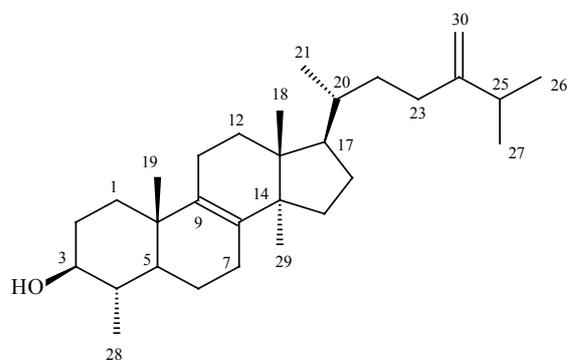
Tableau 34 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **34** dans CDCl_3

Position	δ_{H} <i>m, J</i>	δ_{C}
1	1,30-1,62 <i>m</i>	31,9
2	1,62-1,81 <i>m</i>	30,3
3	3,30 <i>dd</i> 11,3, 4,6 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,36 <i>dd</i> 10,1, 4,4 H-5 α	47,1
6	0,85-1,65 <i>m</i>	21,1
7	1,13-1,38 <i>m</i>	25,9
8	1,55 <i>m</i> H-8 β	48,9
9	-	19,9
10	-	26,4
11	1,17-2,05 <i>m</i>	26,4
12	1,67 <i>m</i>	35,5
13	-	45,2
14	-	48,7
15	1,35 <i>m</i>	35,5
16	1,33-1,97 <i>m</i>	28,0-28,1
17	1,64 <i>m</i>	52,1-52,7
18	1,02 <i>s</i>	18,0
19	0,61 <i>d</i> 4,0 H-19 <i>endo</i> 0,39 <i>d</i> 4,1 H-19 <i>exo</i>	29,9
20	1,46 <i>m</i>	35,8-35,9
21	0,93 <i>d</i> 6,2	18,3-18,4
22	1,51-1,56 <i>m</i>	33,7-33,9
23	1,50-1,68 <i>m</i>	31,4-31,5
24	4,09 <i>t</i> 6,3	76,2-76,3
25	-	147,4-147,7
26	4,98 <i>dl</i> 7,0 H-26a 4,89 <i>sl</i> H-26b	110,9-111,4
27	1,78 <i>s</i>	17,1-17,5
28	0,87 <i>s</i>	13,9
29	1,02 <i>s</i>	25,4
30	0,95 <i>s</i>	19,3

IV-7-12- Elucidation structurale des composés 35 et 36



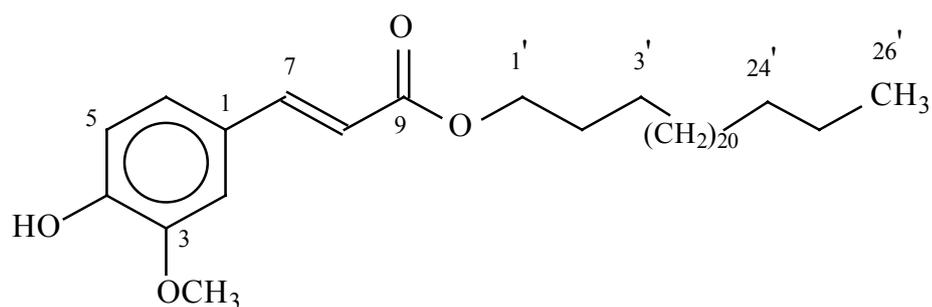
Cycloeucalénol (35)



Obtusifoliol (36)

L'analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C J -modulé, COSY H-H, HSQC J -modulé et HMBC permet l'attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones de ces deux triterpénoïdes, isolés en mélange constitué par les cycloeucalénol et obtusifoliol. A noter que ces deux composés sont des isomères et ne se différencient que par l'ouverture du noyau 9 β ,19-cyclopropane [119]. Ils ont été isolés de *E. guyoniana*.

IV-7-13- Elucidation structurale du composé 37



3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-propénoate d'hexacosyle (*E*) (37)

Le spectre de masse ESI-MS du composé **37** enregistré en mode négatif, présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 557$ [M-H]. Ceci correspond à une masse moléculaire de 558 uma et une formule moléculaire en $C_{36}H_{62}O_4$.

L'analyse du spectre IR met en évidence la présence d'un noyau aromatique (1464, 1516 et 1601 cm^{-1}). Les bandes d'absorption à 1632 et 1712 cm^{-1} caractérisent respectivement une double liaison et un carbonyle d'ester. La large bande d'absorption observée à 3428 cm^{-1} indique la présence d'un groupement hydroxyle.

Le spectre UV montre des bandes d'absorption maximales à 237, 288 et 324 nm, caractéristiques d'un chromophore cinnamoyle [120].

Le spectre RMN 1H (figure 174) du composé **37** permet d'observer :

-deux doublets déblindés s'intégrant chacun pour un proton à δ_H 7,66 (d , $J= 15,9$ Hz) et 6,35 (d , $J= 15,9$ Hz), attribuables à deux protons éthyléniques appartenant au même système de spin. La valeur de la constante de couplage indique une géométrie *trans*.

-trois signaux également déblindés à δ_H 7,09 (d , $J= 1,8$ Hz, couplage méta), 6,97 (d , $J= 8,2$ Hz, couplage ortho) et 7,13 (dd , $J= 8,2$ et 1,8 Hz, couplages ortho et méta), caractéristiques de trois protons d'un noyau aromatique. La multiplicité des signaux et les valeurs des constantes de couplage indiquent que le noyau aromatique est 1,3,5-trisubstitué.

-un signal singulet d'intégration 3H résonant à 3,98 ppm, correspondant aux protons d'un groupement méthoxyle.

-un signal s'intégrant pour 1H à 5,85 ppm sous forme d'un singulet et ne donnant aucune corrélation en HSQC J -modulé, attribuable au proton OH phénolique.

La présence de deux protons éthyléniques et trois protons aromatiques, montre que le composé contient un groupement *trans*-cinnamoyle (figure 175).

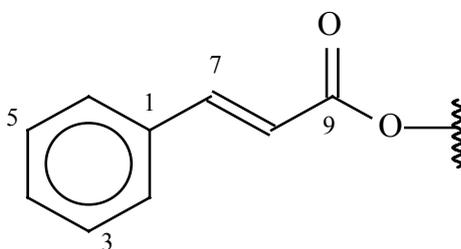


Figure 175 : groupement *trans* cinnamoyle

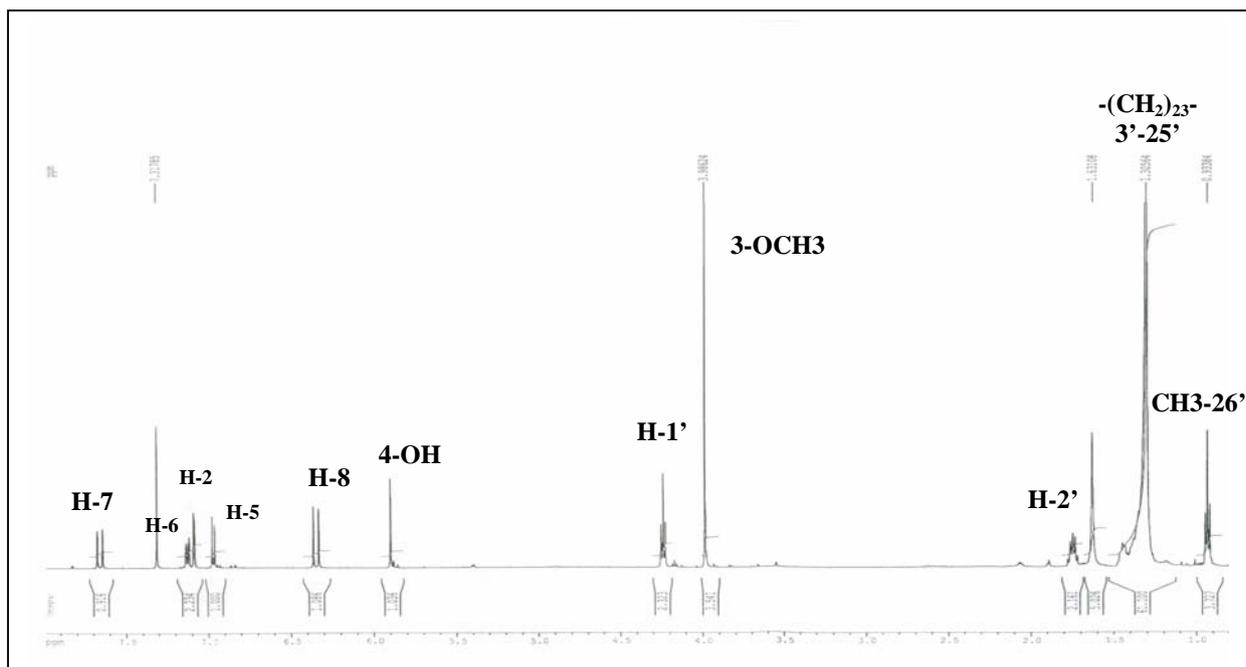
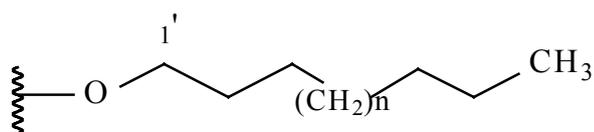


Figure 174 : Spectre RMN ^1H du composé **37**

Sur les spectres RMN ^{13}C *J*-modulé et HSQC *J*-modulé (tableau 35) sont visualisés des signaux correspondant à :

- un carbonyle à 167,4 ppm.
- deux carbonnes éthyléniques à 144,6 et 115,6 ppm.
- trois CH aromatiques à 109,2, 114,6 et 123,0 ppm.
- trois carbonnes aromatiques dont deux oxygénés à 127,0, 146,7 et 147,8 ppm, attestant de la présence d'un noyau aromatique trisubstitué.
- un $\text{CH}_3\text{-O}$ à 55,9 ppm,
- un $\text{CH}_2\text{-O}$ aliphatique à 64,6 ppm,
- un ensemble de CH_2 aliphatiques entre 22,7 et 31,9 ppm.
- un CH_3 à 14,1 ppm.

Ces données indiquent, outre le groupement cinnamoyle, la présence d'une chaîne aliphatique linéaire [121,122].



Chaîne alkyle linéaire

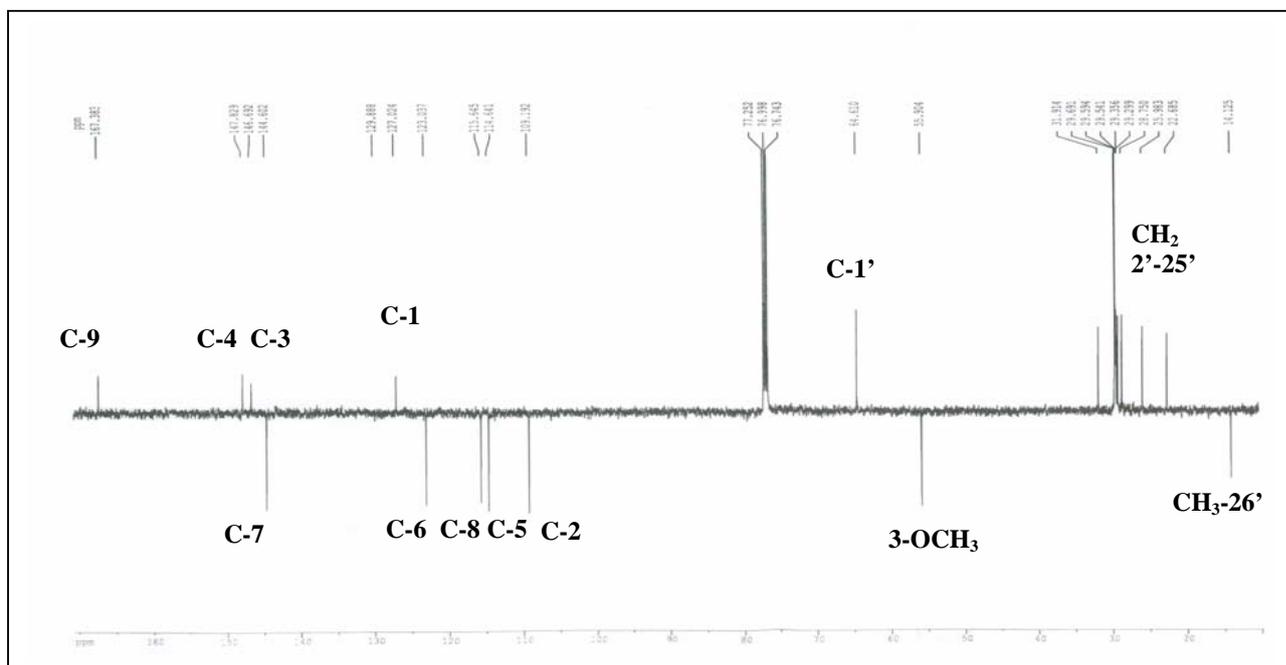


Figure 176 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **37**

Les spectres RMN ^1H (figure 174) et ^{13}C *J*-modulé (figure 176) montrent également des signaux caractéristiques de la chaîne aliphatique correspondant à un alcool gras :

- un triplet d'intégration 2H résonant à δ_{H} 4,25 ($J = 6,7$ Hz) attribuable aux protons H-1', couplant en HSQC *J*-modulé avec le carbone C-1' (CH₂) à 64,6 ppm.

- un quintuplet s'intégrant pour 2H à 1,75 ppm ($J = 7,1$ Hz) correspondant aux protons CH₂ et dont le carbone C-2' résonne à 28,7 ppm. Ces protons couplent en COSY H-H avec les protons vicinaux H-1' et H-3'.

- un multiplet résonant à 1,45 ppm attribuable aux protons H-3'. L'expérience HSQC *J*-modulé permet de localiser son carbone à 25,9 ppm.

- un multiplet résonant à 1,30 ppm correspondant aux protons allant de H-4' à H-23'. Ils corrélient en HSQC *J*-modulé avec les carbones C-4' jusqu'à C-23' (δ_{C} 29,3-29,7).

- deux multiplets repérés à 1.30 ppm, attribuables aux protons H-24' et H-25'. Leurs carbones résonnent respectivement à 31,9 et 22,7 ppm.

- un triplet résonant à 0,94 ppm correspondant aux protons du méthyle Me-26' terminal. Ils corrélient en COSY H-H avec les protons H-25'. L'expérience de corrélation HSQC *J*-modulé permet d'attribuer le déplacement chimique du carbone C-26' (14,1 ppm).

Toutes ces données (tableau 35), appuyées par l'analyse de la spectrométrie de masse, plaident pour un groupement alkyle hexacosyle [120].

Les corrélations en 2J et 3J observées en HMBC (figure 177), permettent de lier le groupement alkyle hexacosyle à la fonction ester du groupement *trans* cinnamoyle cité précédemment et de localiser les différents substituants sur le noyau aromatique. En effet, il est observé des corrélations entre le proton H-1' du radical alkyle et le carbone du carbonyle résonant à 167,4 ppm (C-9), lui-même corrélant avec les protons de la double liaison éthylénique, H-7 (δ_H 7,66) et H-8 (δ_H 6,35). L'analyse HSQC *J*-modulé permet d'identifier leurs carbones à δ_C 144,6 (C-7) et 115,6 (C-8). Le proton H-7 couple en 3J avec deux carbones aromatiques CH résonant à δ_C 109,2 (C-2) et 123,0 (C-6) et en 2J avec un carbone aromatique quaternaire C-1 repéré à δ_C 127,0. Le spectre HSQC *J*-modulé permet également d'attribuer les deux protons aromatiques H-2 (δ_H 7,09) et H-6 (δ_H 7,13).

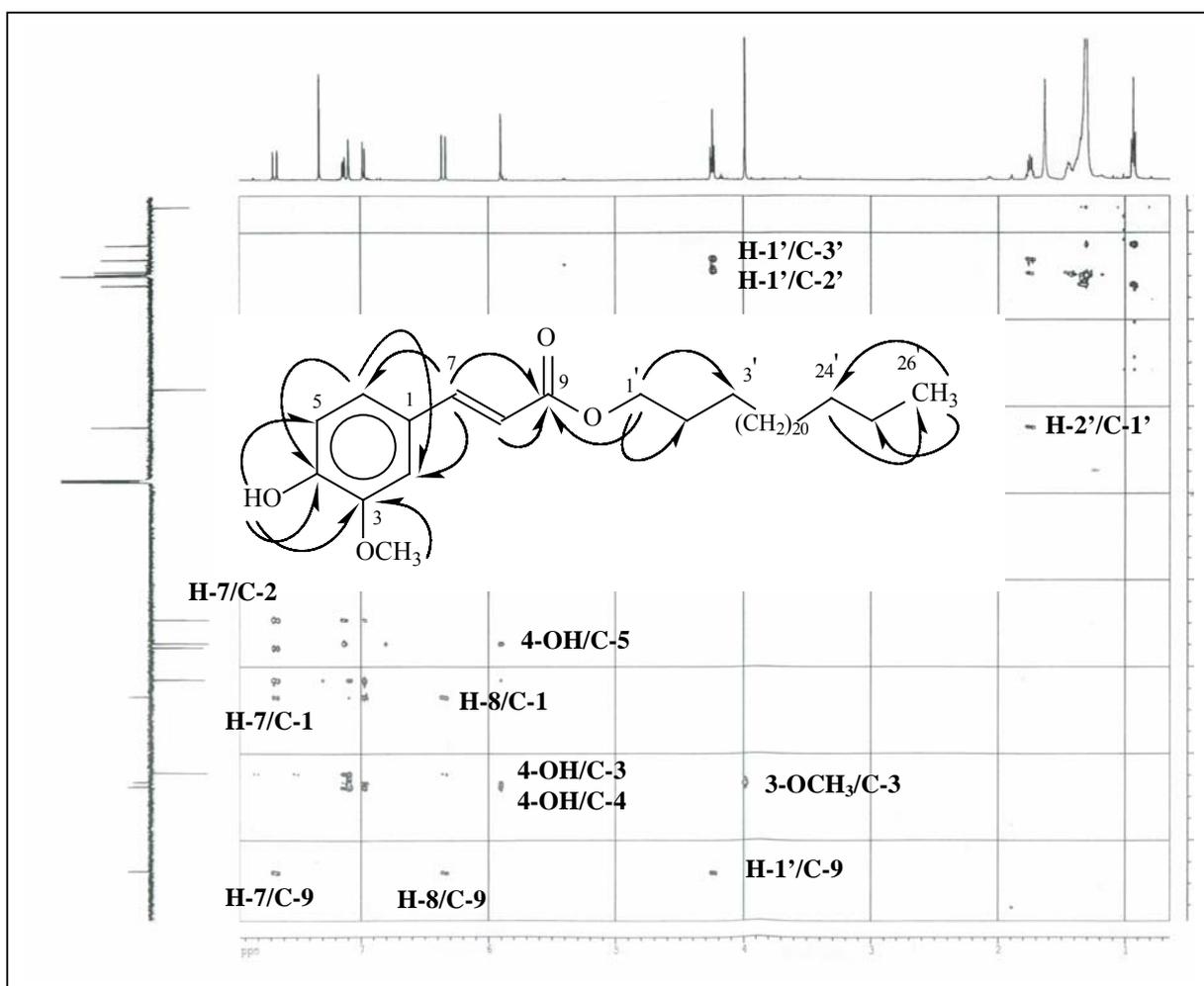


Figure 177 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **37**.

Les corrélations observées en HMBC (figure 177) entre le proton H-6 résonant sous forme de doublet de doublet ($J_{H_6-H_5} = 8,2$ Hz et $J_{H_6-H_2} = 1,8$ Hz) et les carbones aromatiques (CH) C-2 et C-5 (δ_C 109,2 et 114,6) et un quaternaire déblindé résonant à 147,8 ppm (C-4), permettent de placer le groupement hydroxyle en position C-4. Son proton détecté à 5,85 ppm sous forme de singulet, présente des corrélations avec les carbones C-4 et C-5 attribués et un autre carbone quaternaire oxygéné C-3 résonant à 146,7 ppm. Ce dernier corrèle avec les protons aromatiques H-2 et H-5 ainsi que les protons d'un groupement méthoxyle (3-OCH₃).

Toutes ces données spectroscopiques récapitulées dans le tableau 35, permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé **37**, la structure suivante : 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-propénoate d'hexacosyle (*E*). Ces données sont conformes à celles de la littérature [101,102].

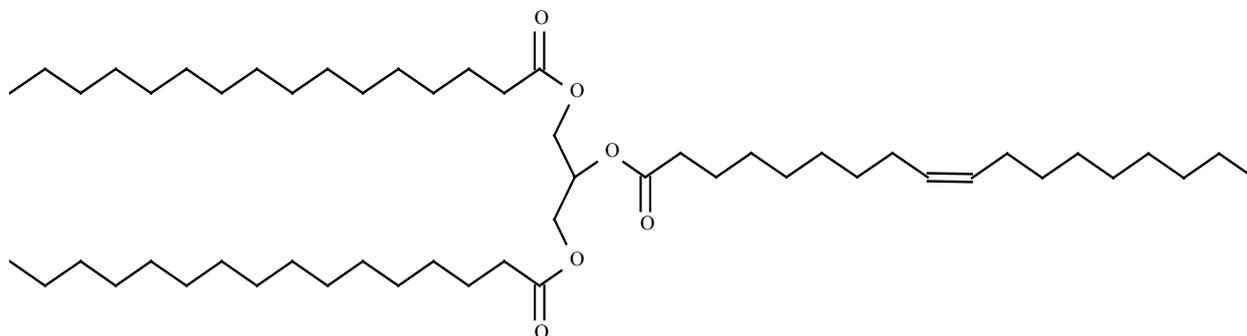
Tableau 35 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **37** dans CDCl₃

Position	δ_H <i>m, J</i>	δ_C
1	-	127,0
2	7,09 <i>d</i> 1,8	109,2
3	-	146,7
4	-	147,8
5	6,97 <i>d</i> 8,2	114,6
6	7,13 <i>dd</i> 8,2, 1,8	123,0
7	7,66 <i>d</i> 15,9	144,6
8	6,35 <i>d</i> 15,9	115,6
9	-	167,4
3-OCH ₃	3,98 <i>s</i>	55,9
4-OH	5,85 <i>s</i>	-
1'	4,25 <i>t</i> 6,7	64,6
2'	1,75 <i>quint</i> 7,1	28,7
3'	1,45 <i>m</i>	25,9
4'-23'	1,30 <i>m</i>	29,3-29,7
24'	1,30 <i>m</i>	31,9
25'	1,30 <i>m</i>	22,7
26'	0,94 <i>t</i> 6,9	14,1

IV-7-14- Elucidation structurale du composé 38

Il s'agit du β -sitostérol identifié par comparaison avec un échantillon témoin, analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C J -modulé et de masse EI-MS (m/z 414,324) ainsi que par la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} = -30^\circ$ ($C = 0,80$ g/100 ml, CHCl_3) [104]. C'est un métabolite secondaire commun à toutes les plantes. Il a été isolé de *E. guyoniana*.

IV-7-15- Elucidation structurale du composé 39



Acide 9-octadécénoïque 2,3-bis[(1-oxododécyl)oxy]propyl ester (**39**)
(Triacylglycérol)

Ce composé est identifié à un ester gras très présent dans le règne végétal, l'acide 9-octadécénoïque 2,3-bis[(1-oxododécyl)oxy]propyl ester (**39**). Sa structure moléculaire a été établie par comparaison des spectres de masse ESI-MS ($m/z = 855$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et 871 $[\text{M}+\text{K}]^+$) et de RMN ^1H avec les données spectroscopiques trouvées dans la littérature [103,123,124].

IV-8- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les racines de la plante *Euphorbia retusa* Forsk., espèce poussant dans toute la région méditerranéenne et appartenant à la famille Euphorbiaceae, a permis d'isoler, par diverses méthodes chromatographiques, 19 composés naturels répartis en trois classes de métabolites secondaires :

- 9 triterpénoïdes dont 3 nouveaux
- 8 diterpénoïdes dont 6 originaux
- 1 phenylpropanoïde connu

L'identification de ces composés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de masse haute résolution HR-EI-MS et HR-ESI-MS, RMN 1D (^1H et ^{13}C *J*-modulé et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY), UV, IR et la comparaison avec les données de la littérature.

Sur le plan chimiotaxonomique, la constitution chimique est tout à fait en accord avec celle des plantes du même genre. En effet, elle renferme aussi bien des triterpènes à squelette cycloartane que des diterpènes de type *ent*-abiétane lactone.

Il est important de signaler que les diterpènes isolés et caractérisés sans ambiguïté, appartiennent à une rare classe d'abiétanes lactones possédant un noyau cyclopropane en positions 3 et 4. Le composé **28** original constitue, au regard de la recherche bibliographique exhaustive réalisée, un premier exemple d'abiétane lactone réarrangé isolé naturel.

Conclusion générale

L'étude que nous avons présentée dans cette thèse, porte sur l'investigation chimique des racines de deux plantes algériennes *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut., endémique à l'Algérie et *Euphorbia retusa* Forsk. commune de la région méditerranéenne. Ces deux espèces, appartenant à la grande famille Euphorbiaceae, font l'objet localement d'un usage thérapeutique traditionnel. D'après la recherche bibliographique exhaustive, cette investigation est considérée comme la première étude chimique entreprise sur les racines de ces deux plantes.

Cette étude réalisée sur les extraits chloroformique et dichlorométhane des racines des deux espèces *E. guyoniana* et *E. retusa* respectivement, a permis d'isoler 39 composés naturels dont 11 composés originaux et 5 composés communs aux deux plantes. Ces produits appartiennent à 4 classes de métabolites secondaires :

- triterpènes (tétra- et pentacycliques)
- diterpènes (polycyclique, macrocyclique, tétracyclique et tricyclique)
- stéroïdes
- phenylpropanoïde

L'isolement de ce nombre important de métabolites secondaires est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques de séparation et de purification des substances naturelles, à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale SiO₂ 60H, la chromatographie sur colonne de silice greffée C₁₈, la chromatographie sur colonne de sephadex LH-20, la chromatographie sur plaques préparatives de silice normale CPP et la chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse.

Les structures des produits isolés ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D ¹H et ¹³C *J*-modulé, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY), spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI-MS et HR-EI-MS, spectroscopies IR et UV, par la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature.

La réalisation des modèles moléculaires « Dreiding » a permis de vérifier les configurations des carbones chiraux des composés isolés et préalablement attribués par analyse NOESY. Pour certains d'entre eux, particulièrement les diterpènes de type abiétane lactone, ces modèles s'avèrent précieux car ils renseignent non seulement sur la détermination de leur stéréochimie relative mais aussi sur leur appartenance à la série *ent*.

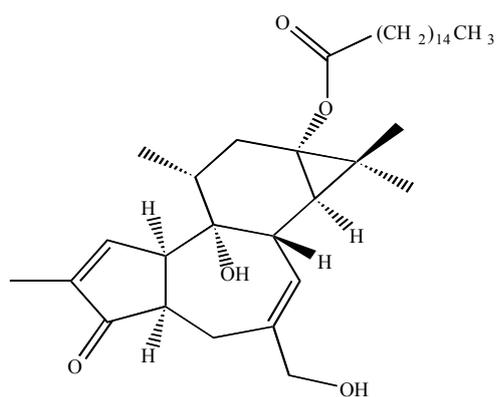
Le diterpène polycyclique nouveau isolé de l'espèce *Euphorbia guyoniana* et possédant un squelette tigiane, 4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate, fait partie des dérivés de l'ester du phorbol, composés diterpéniques toxiques caractéristiques de la famille Euphorbiaceae et connus pour leurs activités biologiques jugées intéressantes : cytotoxique et co-cancérogène.

Dans le cas des triterpènes estérifiés nouveaux isolés de l'espèce *Euphorbia retusa*, le recours aux méthodes chimiques de transformation (hydrolyse alcaline) s'est avérée nécessaire pour récupérer les triterpènes alcools correspondants afin d'attribuer la stéréochimie des différents centres asymétriques.

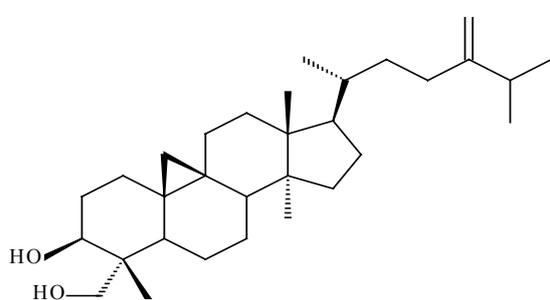
Les diterpènes tricycliques originaux issus de l'espèce *Euphorbia retusa*, sont tous à squelette abiétane lactone renfermant un noyau cyclopropane trisubstitué en positions 3 et 4. Ils constituent, au vu de la recherche bibliographique, de rares exemples de diterpènes lactones naturels. Les composés similaires identifiés dans l'espèce *Suregada multiflora* (Euphorbiaceae), sont dotés de propriétés biologiques prometteuses.

Les composés isolés et identifiés sont constitués majoritairement de triterpènes tétracycliques à squelettes cycloartane, euphane, lanostane et tirucallane, présentant souvent des inversions de configuration au niveau des carbones C-13, C-14, C-17 et C-20. Ces composés sont utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Euphorbia*.

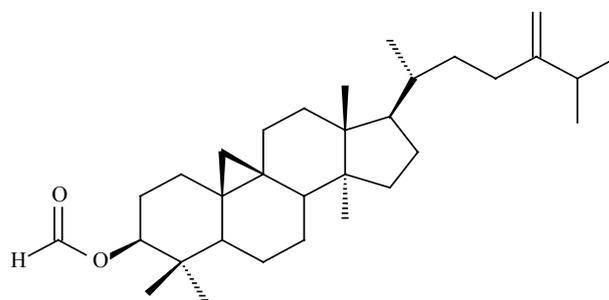
En conclusion, ce travail consacré à l'étude chimique des racines de *Euphorbia guyoniana* et *Euphorbia retusa*, et qui a permis d'isoler et de caractériser 11 composés naturels nouveaux, constitue sans doute une contribution importante dans la connaissance des métabolites secondaires de la famille Euphorbiaceae en général et le genre *Euphorbia* en particulier.



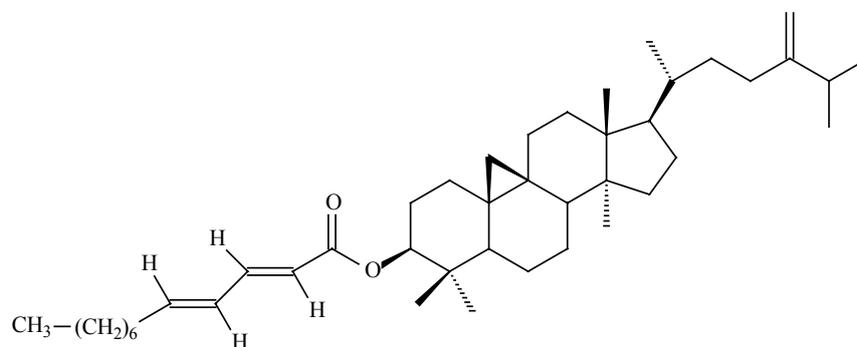
4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate



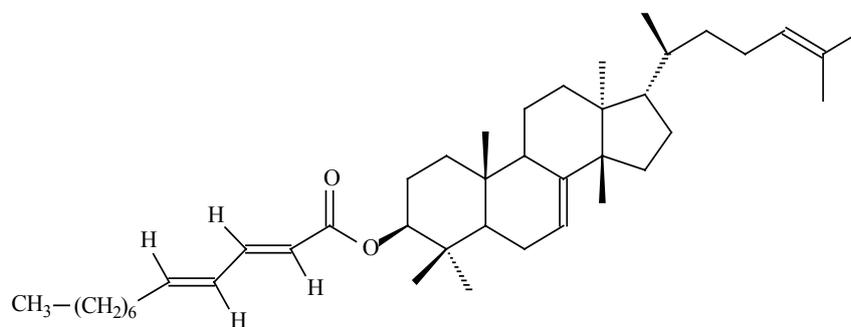
28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol



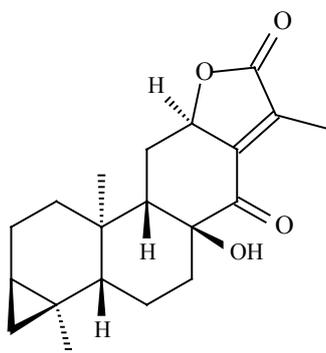
24-méthylèncycloartanyl formate



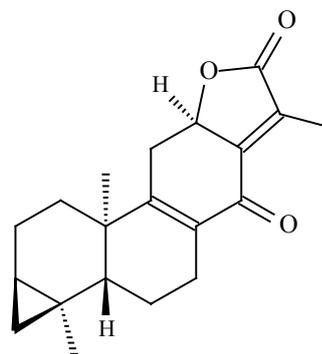
24-méthylèncycloartanyl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate



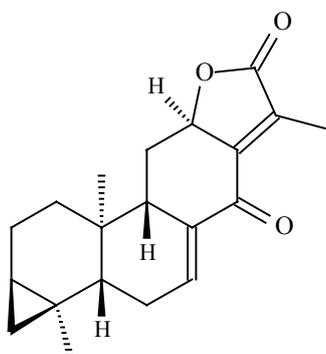
tirucalla-7,24-dièn-3 β -yl 2'*E*,4'*E*-décadiénoate



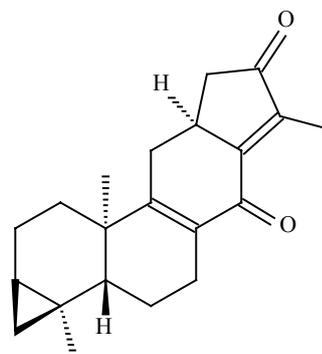
3,4,18 β -cyclopropano-8 β -hydroxy-14-oxo-*ent*-abiét-13,15-èn-16,12-olide



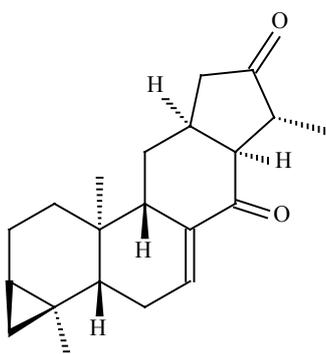
3,4,18 β -cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide



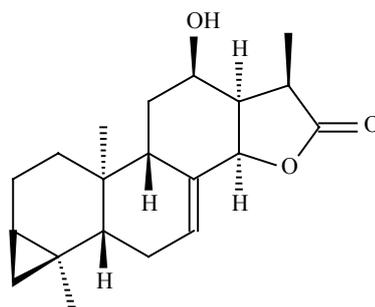
3,4,18 β -cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiéta-7,8,13,15-dièn-16,12-olide



3,4,18 β -cyclopropano-7 β -hydroxy-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide



3,4,18 β -cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiét-7,8-èn-16,12-olide



3,4,18 β -cyclopropano-12 β -hydroxy-*ent*-abiét-7-èn-16,14-olide

Chapitre V
Partie expérimentale

V-1- Matériels et appareillage

V-1-1- Récolte des plantes *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut et *Euphorbia retusa* Forsk

Les plantes *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut et *Euphorbia retusa* Forsk. ont été récoltées dans la région de Biskra (Sud-Est algérien) au mois de mai 2003 et 2005 respectivement. Elles ont été identifiées par le Docteur Bachir oudjehih département d'agronomie faculté des sciences universités de Batna. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les racines ont été coupées en petits morceaux et pesées : *E. guyoniana* (500 g) et *E. retusa* (600 g).

V-1-2- Chimie extractive

V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies par CCM analytique ont été effectuées sur des plaques en verre ou en aluminium recouvertes de silice.

Support aluminium: en phase normale, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (20x20 cm).

Support verre:

-en phase normale, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (10 ou 20x20 cm)

-en phase inverse, MKC 18F, 200 µm Whatman (2.5x7.5, 5x20 cm), ou RP 18 F_{254S}, 200 µm Merck (5x10, 10x20 cm)

Le révélateur utilisé est l'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

Les purifications par CCM préparative ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (20x20 cm).

V-1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographie classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

V-1-2-3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les phases stationnaires utilisées au cours des différentes opérations de séparation et de purification sont énumérées ci-après :

-en phase normale, une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh), en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon, objet des procédures de purification.

-sephadex LH-20, en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon à purifier.

-en phase inverse, une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63 μm), en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier.

L'élution peut être effectuée à pression atmosphérique ou bien à l'aide d'air comprimé dans le cas d'utilisation de silice greffée RP-18.

V-1-2-4- Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'appareillage utilisé au laboratoire est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe P580 A quaternaire avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne employée est UP 5 ODB.25M 250x10 mm Interchrom.

V-1-3- Chimie structurale

V-1-3-1- Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil BRUKER Avance DRX-500. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés à 500 et 125 MHz respectivement.

V-1-3-2- Spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont obtenus par impact électronique (EI) sur un appareil « Maldimicro MX, micromasse walter » et par electrospray (ESI) sur un spectromètre Micromasse Q-TOF.

V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre UV KONTRON Logiciel UVS900Lite. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution.

V-1-3-4- Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres IR ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr ou de film de CHCl₃, sur un appareil à transformée de Fourier Nicolet Avatar 320 FT-IR piloté par un logiciel E₂Ommic ESP 5.2a.

V-1-3-5- Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm). La cuve employée est de 1 ml et une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

V-2- Etude de l'espèce *Euphorbia guyoniana* Boiss. Et Reut.

V-2-1- Extraction des racines de l'espèce *E. guyoniana*

500 g de racines de la plante sous forme de poudre sont mis à macérer dans le chloroforme (18 litres) pendant 3 jours à la température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, 14 g de l'extrait chloroformique (gomme marron) ont été obtenu. Le résidu de la filtration subit une extraction solide-liquide par le méthanol (15 litres) durant 3 jours à la température ambiante. La filtration et l'évaporation à sec de la solution conduit à l'extrait méthanolique (24 g). Les CCM effectuées sur les deux extraits dans plusieurs systèmes de solvants révèlent la richesse de l'extrait chloroformique en produits.

V-2-2- Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique de l'espèce *E. guyoniana*

10 g de l'extrait chloroformique des racines de cette plante ont été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale SiO₂ 60H (40 g). L'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (100-0 à 20-80). A l'issue de ce fractionnement 434 fractions de 50 ml ont été recueillies. Leur examen à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 120 °C permettent de regrouper les fractions ayant la même constitution, fournissant ainsi 41 fractions (tableau 36).

Tableau 36 : Fractionnement de l'extrait chloroformique des racines de l'espèce *E. guyoniana*

Eluant	Fractions collectées	Masse en mg
éther de pétrole	F1	20
	F2	40
	F3	25
éther de pétrole-acétate d'éthyle		
99-1	F4	86
97-3	F5	65
95-5	F6	180
	F7	84
	F8	90
	F9	85
	F10	860
	F11	530
	F12	680
	F13	245
	F14	123
	F15	176
93-7	F16	230
	F17	92
	F18	175

	F19	288
	F20	348
	F21	246
90-10	F22	315
	F23	136
85-15	F24	105
	F25	190
	F26	145
	F27	134
	F28	173
	F29	242
80-20	F30	457
70-30	F31	218
50-50	F32	179
30-70	F33	237
acétate d'éthyle	F34	206
acétate d'éthyle-méthanol		
99-1	F35	180
97-3	F36	240
95-5	F37	325
90-10	F38	120
80-20	F39	95
50-50	F40	60
20-80	F41	50

La fraction F6 (180 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale (8 g) et éluée avec un mélange de solvant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 95-5. Des fractions de 10 ml sont recueillies et regroupées selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le système d'éluion éther de pétrole-acétate d'éthyle : 95-5, pour donner 6 fractions. La fraction F6 (68-72) est purifiée par plaques préparatives en phase normale dans le solvant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 93-7 avec double migration, pour conduire aux composés **16** (12 mg) et **17** (13,2 mg).

La fraction F7 (84 mg) est chromatographiée sur colonne de gel de silice SiO₂ 60H (6 g) en utilisant comme éluant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 95-5. La fraction F7 (18-25) purifiée sur colonne de gel de silice en phase normale et éluee par le solvant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 99-1, fournit la fraction [23-27], qui fait l'objet à son tour d'une purification sur colonne de gel de silice SiO₂ 60H. L'élution réalisée par l'éther de pétrole pur, permet l'isolement à l'état pur du composé **18** (18,5 mg).

Les fractions F8 et F9 réunies (175 mg) ont été fractionnées sur colonne de gel de silice en phase normale (7,5 g) avec l'éluant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 90-10 pour donner 4 fractions. La fraction F8 et 9 (26-33) soumise à une purification sur plaques préparatives de silice normale dans le système d'élution éther de pétrole-acétate d'éthyle : 80-20 aboutit au composé **12** (18,3 mg).

La fraction F10 (860 mg) est purifiée sur colonne de gel de silice SiO₂ 60H (35 g) et éluee avec un gradient de solvant hexane-éther diéthylique : 100-0 à 70-30, pour conduire à 13 fractions. La purification de la fraction F10 (26-29) par HPLC semi-préparative éluee par un mélange de solvant acétonitrile-méthanol : 50-50 en mode isocratique permet d'obtenir 3 produits : **9** (26,6 mg), **10** (14 mg) et **11** (9,1 mg).

La fraction F11 (530 mg) est chromatographiée sur colonne de gel de silice normale (22 g) avec l'éluant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 80-20. Des fractions de 20 ml sont collectées et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans le solvant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 85-15.

-La fraction F11 (21-28) est purifiée sur colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 80-20 en conduisant à 5 fractions. La fraction [10-18] purifiée sur une colonne de gel de silice normale et éluee avec un gradient hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 85-15, aboutit aux composés **3** (16,5 mg) et **4** (8,3 mg).

-La fraction F11 (32-40) est chromatographiée sur colonne de gel de silice normale. L'élution est réalisée par un mélange de solvant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 70-30, pour fournir 6 fractions. La fraction [15-23] est purifiée à son tour sur une colonne de gel de silice en phase normale et éluee par un gradient de solvant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 80-20, permettant ainsi l'isolement du composé **6** (36 mg).

La fraction F13 (245 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale (10 g). L'élution est effectuée par le mélange de solvant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 70-30 pour

conduire à 7 fractions. La fraction F13 (30-44) purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec l'éluant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 85-15, aboutit au composé **13** (5,4 mg) et à une fraction contenant un produit majoritaire [16-25]. Cette dernière soumise à son tour à une purification sur colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant hexane-acétate d'éthyle 100-0 à 90-10, fournit le composé **14** (6,5 mg).

La fraction F15 (176 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale (7,5 g) avec un gradient d'élution hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 70-30 pour donner la fraction F6 (46-58). Celle-ci est purifiée à nouveau sur une colonne de gel de silice normale en utilisant comme système d'élution hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 75-25, pour donner la fraction [27-43]. Cette dernière est purifiée à son tour par plaques préparatives de silice normale dans le solvant hexane-chloroforme-acétate d'éthyle : 45-55-2,5 avec double migration, fournissant ainsi les composés **8** (3 mg) et **19** (10,6 mg).

Les fractions F19 et F20 sont regroupées (636 mg), puis fractionnées sur une colonne de gel de silice SiO₂ 60H (26 g) avec un gradient d'élution hexane-acétate d'éthyle 100-0 à 60-40. Des fractions de 15 ml ont été récupérées et rassemblées en fonction de leur profil en CCM en phase normale dans le solvant hexane-acétate d'éthyle : 80-20 et 70-30, pour donner 11 fractions. La fraction (42-64) chromatographiée sur une colonne de silice greffée C₁₈ avec un gradient d'élution méthanol-eau : 60-40 à 100-0, permet l'isolement des composés **5** (5,5 mg) et **15** (6,8 mg). La fraction [30-35] issue de cette dernière, est purifiée à son tour sur une colonne de sephadex LH-20 avec l'éluant méthanol pur, pour conduire au composé **2** (18,6 mg).

La fraction F25 (190 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale (8 g) et éluee avec un gradient hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 60-40. Des fractions de 6 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans le solvant hexane-acétate d'éthyle : 70-30, pour donner 8 fractions.

-La fraction F25 (66-78) est soumise à une purification sur colonne de silice greffée C₁₈ en utilisant comme éluant méthanol-eau : 50-50 à 100-0, pour conduire à 5 fractions. La fraction [20-26] subie une ultime purification sur une colonne de sephadex LH-20 par le méthanol, permet l'isolement du composé **1** (3,5 mg).

-La fraction F25 (80-95) est purifiée sur colonne de silice greffée C₁₈ avec le gradient d'élution méthanol-eau : 50-50 à 100-0, pour donner à 6 fractions. La fraction [36-45] faisant l'objet d'une

ultime purification sur une colonne de sephadex LH-20 en utilisant comme éluant le méthanol, aboutit au composé **7** (4,5 mg).

La fraction F28 (173 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice SiO₂ 60H (7 g). L'éluion est effectuée par le mélange de solvant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 20-80. Des fractions de 5 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans le solvant hexane-acétate d'éthyle : 60-40, pour donner 10 fractions. La fraction F28 (73-88) est chromatographiée sur une colonne de silice greffée C₁₈ avec le système d'éluion méthanol-eau : 40-60 à 100-0, en conduisant à 7 fractions. La fraction [52-64] est ensuite filtrée sur une colonne de sephadex LH-20 par le méthanol pour fournir le composé **20** (6,8 mg).

V-2-3- Composés isolés de l'espèce *Euphorbia guyoniana*

V-2-3-1-Composé 1

4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadécanoate.

Formule brute : C₃₆H₅₈O₅

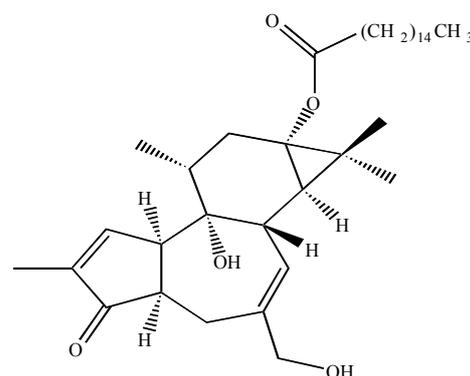
[α]_D +54° (c 0,21, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 593 [M+Na]⁺

337 [(M+Na)-256]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 4, page 71)



V-2-3-2-Composé 2

3-benzoyloxy-5,15-diacétoxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11-diène.

Formule brute : C₃₁H₃₈O₈

[α]_D -88° (c 0,12, CHCl₃)

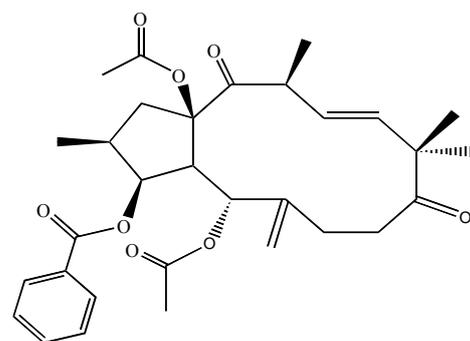
MS : ESI (mode positif) *m/z* : 561 [M+Na]⁺

1099 [2M+Na]⁺

ESI (mode négatif) *m/z* : 537 [M-H]⁻, 573 [M+Cl]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 5, page 80)



V-2-3-3-Composé 3

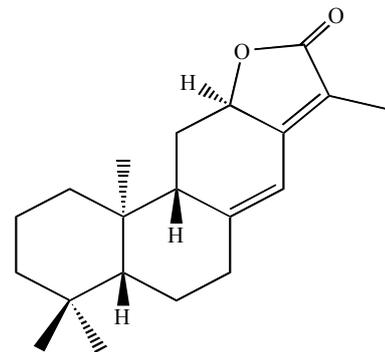
ent-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide

Formule brute : C₂₀H₂₈O₂

[α]_D +328,4° (c 0,34, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 300 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 6, page 85)



V-2-3-4-Composé 4

8 β ,14 β -époxy-*ent*-abiéta-11,13(15)-dièn-16,12-olide

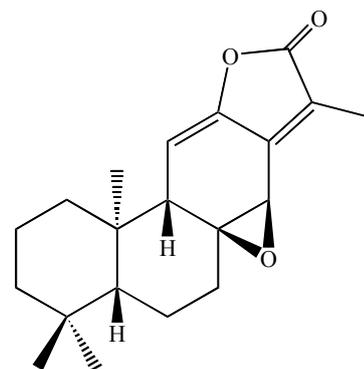
Formule brute : C₂₀H₂₆O₃

[α]_D +126° (c 0,30, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 337 [M+Na]⁺

651 [2M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 7, page 88)



V-2-3-5-Composé 5

3 α -hydroxy-*ent*-atis-16(17)-ène-2,14-dione

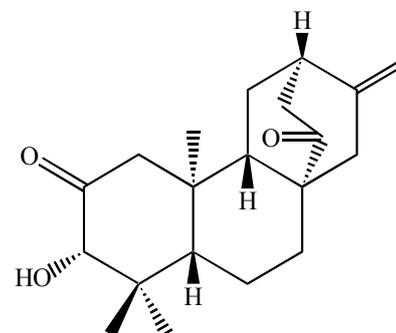
Formule brute : C₂₀H₂₈O₃

[α]_D -17° (c 0,38, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 339 [M+Na]⁺

655 [2M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 8, page 94)



V-2-3-6-Composé 6

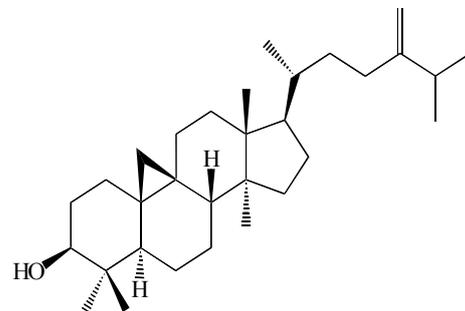
24-méthylèncycloartanol

Formule brute : C₃₁H₅₂O

[α]_D +40,2° (c 1,01, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 440 [M]⁺, 422 [M-18]⁺, 407 [M-18-15]⁺,
297,2556 [M-125-18]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 9, page 97)



V-2-3-7-Composé 7

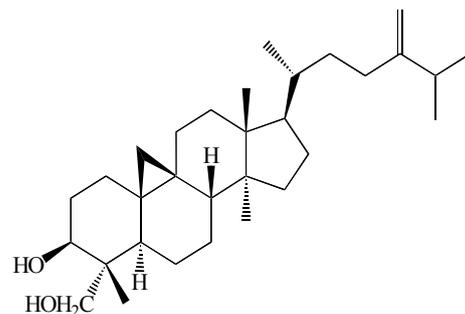
28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol

Formule brute : C₃₁H₅₂O₂

[α]_D +64° (c 0,38, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 479 [M+Na]⁺
935 [2M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 10, page 104)



V-2-3-8-Composé 8

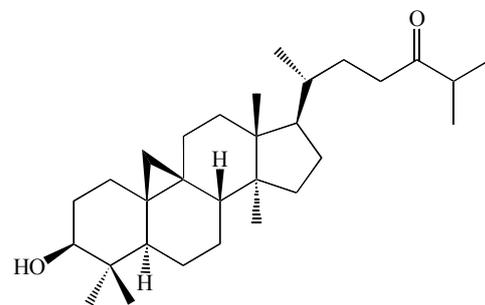
3-hydroxycycloartan-24-one

Formule brute : C₃₀H₅₀O₂

[α]_D +35,4° (c 0,45, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 442 [M]⁺, 424 [M-18]⁺, 409 [M-18-15]⁺,
315 [M-127]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 11, page 108)



V-2-3-9-Composé 9

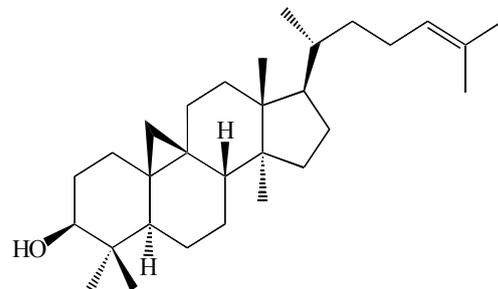
Cycloarténol

Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D +46° (c 0,70, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 426 [M]⁺, 408 [M-18]⁺, 393 [M-18-15]⁺,
297 [M-111-18]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 12, page 113)



V-2-3-10-Composé 10

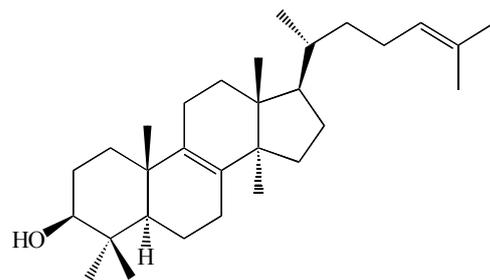
Lanostérol

Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D + 56° (c 0,75, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 426 [M]⁺, 393 [M-18-15]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 13, page 117)



V-2-3-11-Composé 11

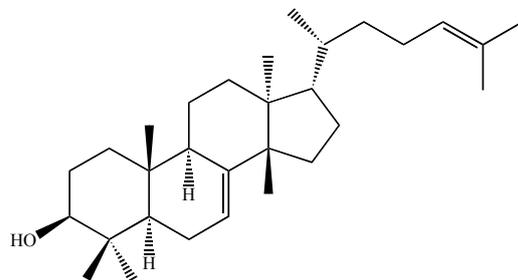
Butyrospermol

Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D -10° (c 0,75, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 426 [M]⁺, 410 [M-16]⁺, 411 [M-15]⁺,
393 [M-18-15]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 14, page 122)



V-2-3-12-Composé 12

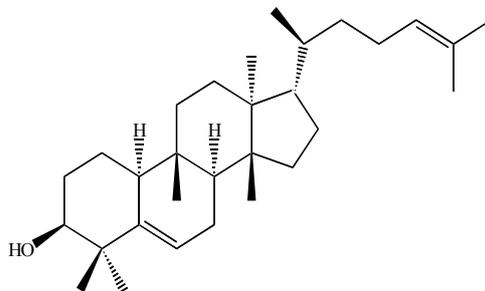
Euferol

Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D + 24° (c 0,90, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 426 [M]⁺, 408 [M-18]⁺, 393 [M-18-15]⁺,
313 [M-113]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 15, page 127)



V-2-3-13-Composé 13

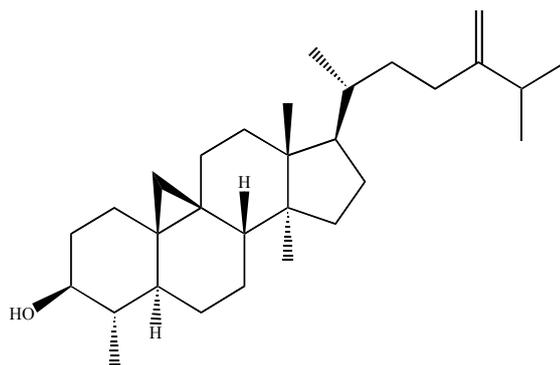
Cycloeucalénol

Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D +44° (c 0,40, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 449 [M+Na]⁺
465 [(M+K)]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(CDCl₃) (tableau 16, page 131)



V-2-3-14-Composé 14

Obtusifoliol

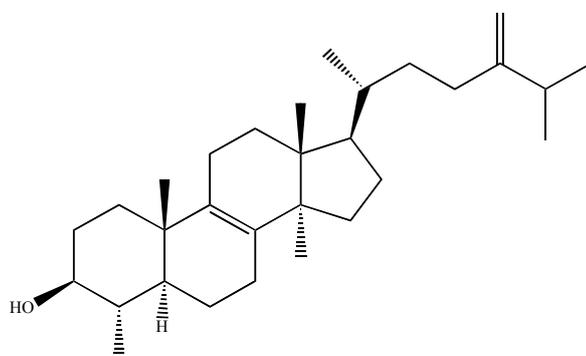
Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D +70° (c 0,75, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 449 [M+Na]⁺
465 [(M+K)]⁺

ESI (mode négatif) *m/z* : 425 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(CDCl₃) (tableau 17, page 134)



V-2-3-15-Composé 15

Acide 3 β -hydroxytaraxer-14-èn-28-oïque

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃

[α]_D +13° (c 0,36, CHCl₃)

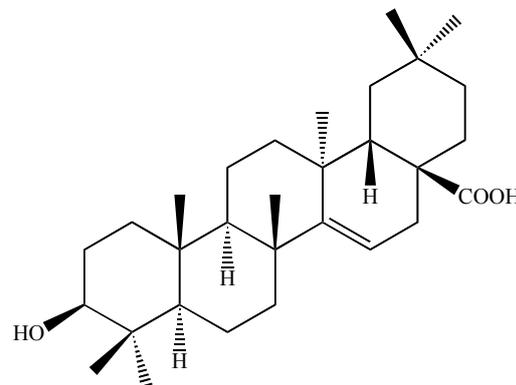
MS : ESI (mode positif) *m/z* : 479 [M+Na]⁺

ESI (mode négatif) *m/z* : 455 [M-H]⁻

911 [2M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 18, page 138)



V-2-3-16-Composé 16

Multiflorenyl acétate.

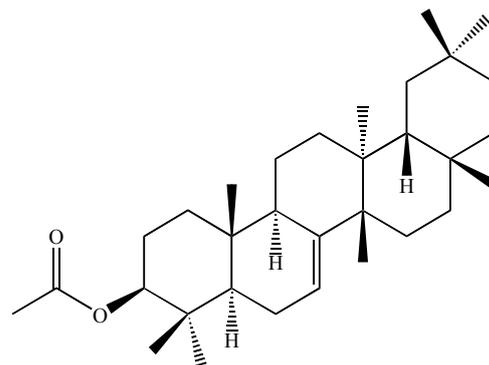
Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

[α]_D 0° (c 0,38, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 491 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 19, page 142)



V-2-3-17-Composé 17

Multiflorenyl palmitate

Formule brute : C₄₆H₈₀O₂

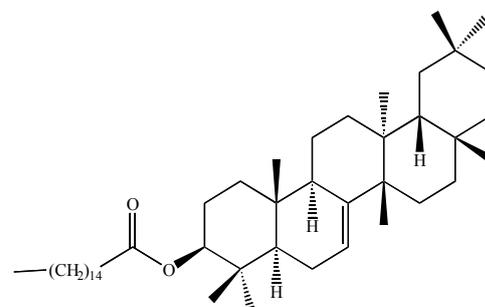
[α]_D -3° (c 0,40, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 687 [M+Na]⁺, 703 [M+K]⁺

413 [(M+Na)+18-426]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 20, page 145)



V-2-3-18-Composé 18

Peplusol

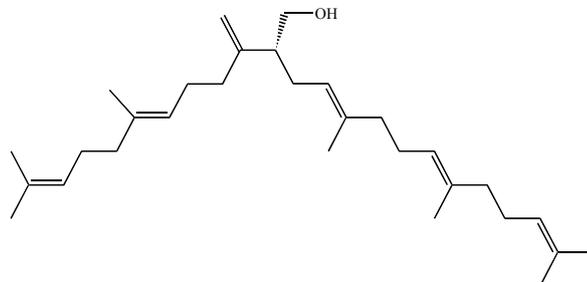
Formule brute : C₃₀H₅₀O

[α]_D -20° (c 0,60, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 449 [M+Na]⁺
465 [M+K]⁺

MS/MS (mode positif) *m/z* : 419 [M-30]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(CDCl₃) (tableau 21, page 152)



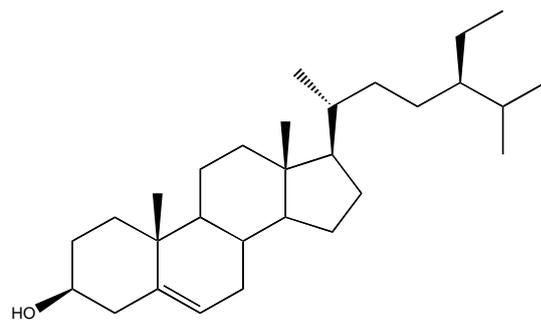
V-2-3-19-Composé 19

β-sitostérol

Formule brute : C₂₉H₅₀O

[α]_D -30° (c 0,80, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 437 [M+Na]⁺



V-2-3-20-Composé 20

β-sitostéryl-3β-glucopyranoside-6'-O-palmitate

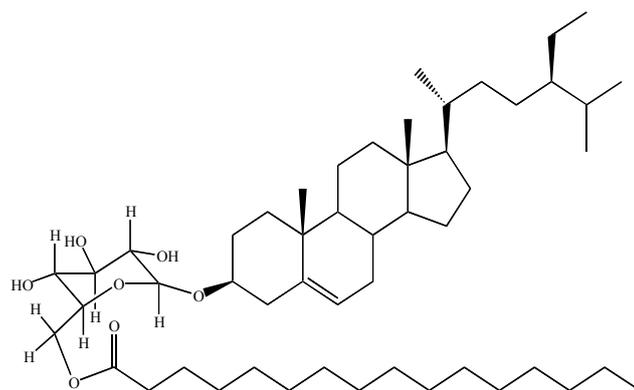
Formule brute : C₅₁H₉₀O₇

[α]_D -40° (c 1,00, CHCl₃)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 837 [M+Na]⁺

ESI (mode négatif) *m/z* : 849 [M+Cl]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(CDCl₃) (tableau 22, page 158)



V-3- Etude de l'espèce *Euphorbia retusa* Forsk.

V-3-1- Extraction des racines de l'espèce *E. retusa*

600 g de racines de l'espèce *E. retusa* Forsk. préalablement séchées et pulvérisées, sont mis en macération dans le CH₂Cl₂ (10 l) pendant 4 jours. Le mélange est ensuite filtré et concentré à sec, donnant ainsi 10 g d'extrait dichlorométhane. Les marcs sont ensuite extraits par 10 l de méthanol durant 4 jours. Après filtration et évaporation du solvant, 18 g d'extrait méthanolique ont été obtenus. Les CCM réalisées sur les deux extraits dans différents systèmes de solvants, montrent bien que l'extrait dichlorométhane est plus riche en produits.

V-3-2- Fractionnement et purification

3 g de l'extrait CH₂Cl₂ sont filtrés sur silice normale par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale (30 g). L'élution est effectuée en premier lieu avec l'hexane puis un gradient hexane-acétate d'éthyle et enfin avec l'acétate d'éthyle pur. A l'issue de ce fractionnement primaire, 9 fractions sont recueillies (tableau 37).

Tableau 37 : Fractionnement de l'extrait dichlorométhane de l'espèce *E. retusa*

Eluant	Fractions collectées	Masse en mg
Hexane	F1	-
Hexane-AcOEt		
9-1	F2	834,6
8-2	F3	252,0
8-2	F4	141,4
7-3	F5	219,7
7-3	F6	217,0
6-4	F7	197,6
1-1	F8	88,5
AcOEt	F9	272

La fraction F2 (834,6 mg) est ensuite chromatographiée sur une colonne de silice en phase normale (35 g) avec l'éluant hexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 0-100. Des fractions de 20 ml ont été

récupérées et rassemblées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant hexane-acétone : 95-5 et 85-15, pour donner 13 fractions

-La fraction F2 (98-101) éluée par le mélange hexane-acétate d'éthyle 98-2, permet d'isoler le composé **29** (60 mg).

-La fraction F2 (46-49) éluée par le même système de solvant conduit aux fractions [67-102], [103-124] et [175-205]. Les deux premières fractions sont purifiées par plaques préparatives dans le système cyclohexane-toluène-acétate d'éthyle : 18-1.5-0.5, pour donner les composés **30** (6,3 mg), **31** (5,1 mg) et **32** (6,8 mg). La fraction [175-205] purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale en utilisant comme éluant hexane-chloroforme : 100-0 à 90-10, aboutit à l'isolement du produit **33** (7,5 mg).

-La fraction F2 (113-141) éluée par le mélange hexane-acétate d'éthyle 98-2, subit une purification par CCM sur plaque préparative dans le solvant cyclohexane-acétate d'éthyle 85-15, fournissant un mélange de deux composés **35** et **36** (10,6 mg).

-La fraction F2 (142-174) purifiée sur une colonne de silice normale avec l'éluant cyclohexane-acétate d'éthyle 100-0 à 90-10, aboutit au composé **39** (9 mg) et à la fraction [41-133], qui fait l'objet à son tour d'une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion réalisée par le mélange cyclohexane-chloroforme : 100-0 à 80-20, permet la purification du produit **37** (11,5 mg).

La fraction F3 (252 mg) est fractionnée sur une colonne de silice en phase normale (11 g). L'éluion a été faite par le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 90-10. Des fractions de 10 ml sont recueillies et regroupées.

-La fraction F3 (129-146) éluée par le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle 99-1, permet l'isolement du composé **21** (13,5 mg).

-La fraction F3 (185-228) éluée par le mélange hexane-acétate d'éthyle 99-1, permet la purification du composé **38** (15,6 mg).

-La fraction F3 (246-260) fait l'objet d'une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvant (ACN/H₂O) isocratique à 20%. Elle permet l'isolement des deux composés **24** (4,5 mg) et **25** (4,3 mg).

Les fractions F4 et F5 (361,1 mg) sont réunies puis purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (15 g), avec le gradient d'éluion n-heptane-acétate d'éthyle : 100-0 à 80-20. Des fractions de 10 ml ont été récupérées et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée dans le solvant hexane-acétate d'éthyle : 80-20, pour donner 11 fractions.

-La fraction F4-5 (226-244) est purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale, avec le gradient d'éluant CH₂Cl₂-EtOH : 99.9-0.1 à 99-1. Le composé **34** (6,8 mg) est ainsi obtenu.

-La fraction F4-5 (288-346) éluées par le mélange n-heptane-acétate d'éthyle : 100-0 à 60-40 aboutit à 7 fractions. La fraction [33-40] purifiées par HPLC semi-préparative dans le système de solvant (ACN/H₂O) isocratique à 20%, permet l'isolement du composé **28** (7,6 mg).

-La fraction F4-5 (245-283) subit une ultime purification par chromatographie sur colonne de silice en phase inverse (éluant MeOH-H₂O : 60-40 à 100-0), conduisant aux produits **23** (5,4 mg) et **26** (3,3 mg).

La fraction F6 (217 mg) est fractionnée sur une colonne de silice en phase normale (9 g). L'éluant a été effectuée par le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 50-50. Des fractions de 6 ml ont été recueillies et rassemblées selon leur profil en CCM réalisée dans le solvant hexane-acétate d'éthyle : 70-30, pour donner 9 fractions. La fraction F6 (93-105) purifiée sur une colonne de silice en phase inverse et éluee par le mélange MeOH-H₂O : 60-40 à 100-0, aboutit au produit **27** (3,6 mg).

La fraction F7 (197,6 mg) est chromatographiée sur une colonne de silice greffée C₁₈ (6 g), avec l'éluant MeOH-H₂O : 50-50 à 100-0. Des fractions de 10 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM effectuée en phase normale dans le solvant cyclohexane-acétate d'éthyle 60-40, pour conduire à 13 fractions. La fraction F7 (21-25) éluee avec le solvant MeOH-H₂O 70-30 est purifiée sur une colonne de silice en phase normale avec un gradient d'éluant cyclohexane-acétate d'éthyle : 100-0 à 70-30, pour donner le composé **22** (4,2 mg).

V-3-3- Composés isolés de l'espèce *Euphorbia retusa*

V-3-3-1-Composé **22**

3-oxo-*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide

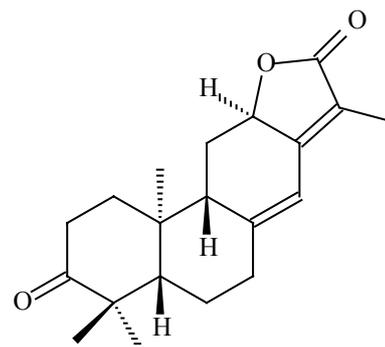
Formule brute : C₂₀H₂₆O₃

[α]_D +126° (c 0,35, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 314 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 23, page 176)



V-3-3-2-Composé 23

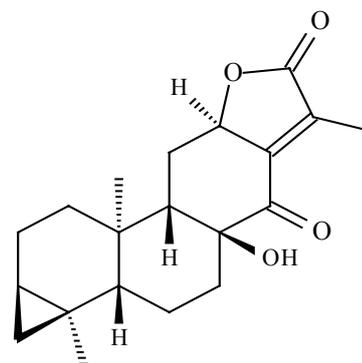
3,4,18 β -cyclopropa-8 β -hydroxy-14-oxo-*ent*-abiét-13,15-èn-16,12-olide

Formule brute : C₂₀H₂₆O₄

[α]_D +29,5° (c 0,35, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 330 [M]⁺, 312 [M-18]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 24, page 192)



V-3-3-3-Composé 24

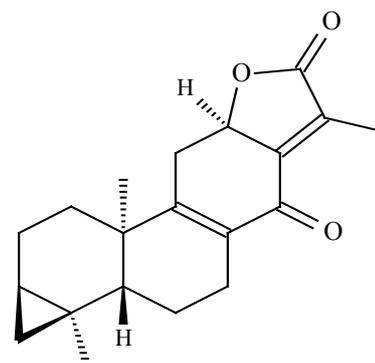
3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dièn-16,12-olide

Formule brute : C₂₀H₂₄O₃

[α]_D -80,3° (c 0,34, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 312 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 25, page 196)



V-3-3-4-Composé 25

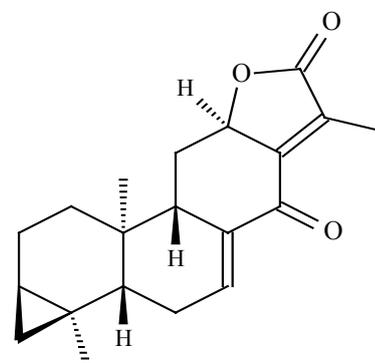
3,4,18 β -cyclopropa-14-oxo-*ent*-abiéta-7,8,13,15-dièn-16,12-olide

Formule brute : C₂₀H₂₄O₃

[α]_D -37,3° (c 0,40, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 312 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)
(tableau 26, page 200)



V-3-3-5-Composé 26

3,4,18β-cyclopropano-7β-hydroxy-14-oxo-*ent*-abiéta-8,9,13,15-dién-16,12-olide

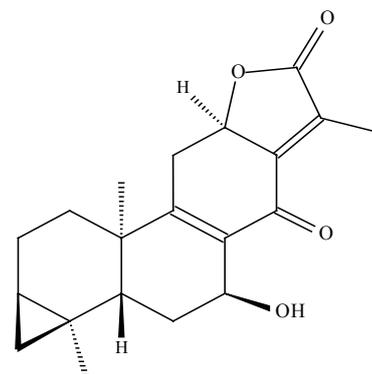
Formule brute : C₂₀H₂₄O₄

[α]_D +127,6° (c 0,16, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 328 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 27, page 85)



V-3-3-6-Composé 27

3,4,18β-cyclopropano-14-oxo-*ent*-abiét-7,8-èn-16,12-olide

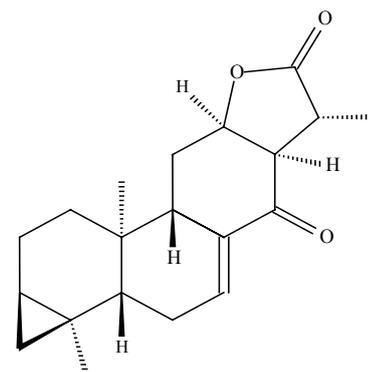
Formule brute : C₂₀H₂₆O₃

[α]_D +9,2° (c 0,08, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 314 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CDCl₃)

(tableau 28, page 208)



V-3-3-7-Composé 28

3,4,18β-cyclopropano-12β-hydroxy-*ent*-abiét-7-èn-16,14-olide

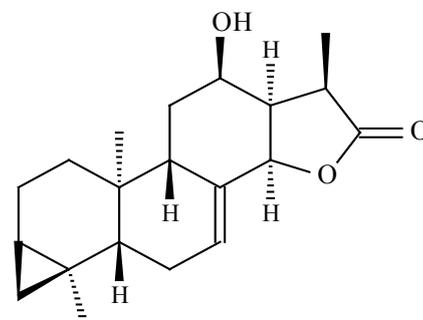
Formule brute : C₂₀H₂₈O₃

[α]_D -44,8° (c 0,24, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 316 [M]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans

(CDCl₃ + CD₃OD) (tableau 29, page 216)



V-3-3-8-Composé 30

24-méthylèncycloartanyl formate

Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

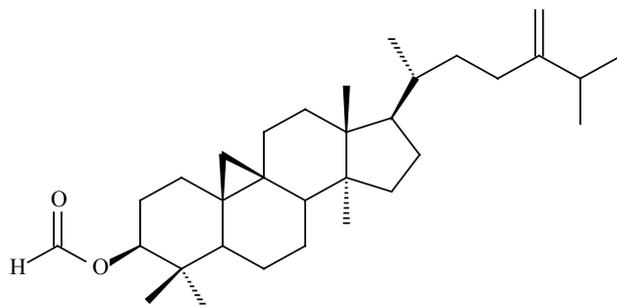
[α]_D +38,4° (c 0,36, CHCl₃)

MS : EI *m/z* : 468 [M]⁺

422 [M-46]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans (CDCl₃) (tableau 30, page 223)



V-3-3-9-Composé 31

24-méthylèncycloartanyl 2[']*E*,4[']*E*-décadiénoate

Formule brute : C₄₁H₆₆O₂

[α]_D +32,4° (c 0,32, CHCl₃)

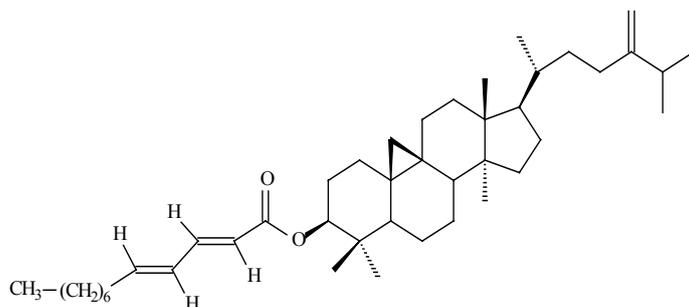
MS : ESI (mode positif) *m/z* : 613 [M+Na]⁺

445 [(M+Na)-168]⁺

191 [(M+Na)+18-440]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans (CDCl₃) (tableau 31, page 228)



V-3-3-10-Composé 32

tirucalla-7,24-dièn-3β-yl 2[']*E*,4[']*E*-décadiénoate

Formule brute : C₄₀H₆₄O₂

[α]_D -9,4° (c 0,37, CHCl₃)

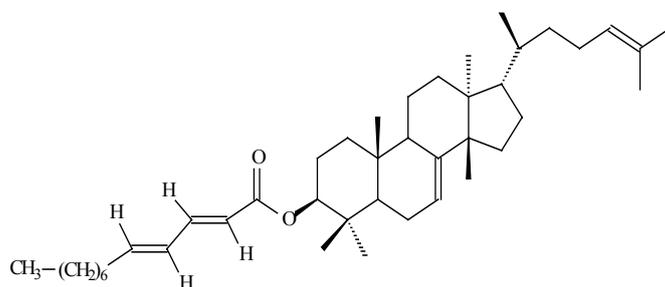
MS : ESI (mode positif) *m/z* : 599 [M+Na]⁺

615 [M+K]⁺

431 [(M+Na)-168]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans (CDCl₃) (tableau 32, page 234)



V-3-3-11-Composé 33

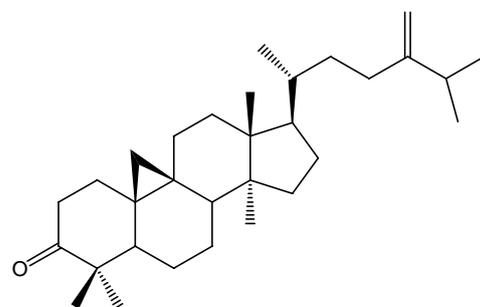
24-méthylèncycloartanone

Formule brute : C₃₁H₅₀O

[α]_D +16,6° (c 0,35, CHCl₃)

MS : EI m/z : 438 [M]⁺, 423 [M-15]⁺, 395 [M-43]⁺,
355 [M-83]⁺, 313 [M-125]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans
(CDCl₃) (tableau 33, page 239)



V-3-3-12-Composé 34

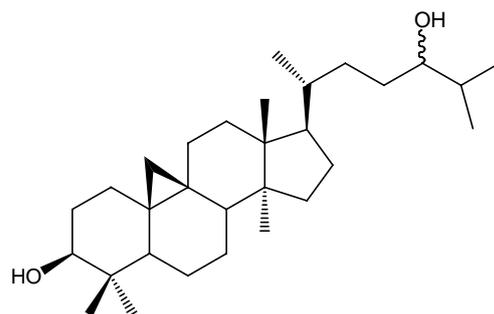
24-épimères cycloart-25-ène-3 β ,24-diol

Formule brute : C₃₀H₅₀O₂

[α]_D + 30,1° (c 0,33, CHCl₃)

MS : EI m/z : 442 [M]⁺, 424 [M-18]⁺, 409 [M-18-15]⁺,
391 [M-2x18-15]⁺, 315 [M-127]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
dans (CDCl₃) (tableau 34, page 243)



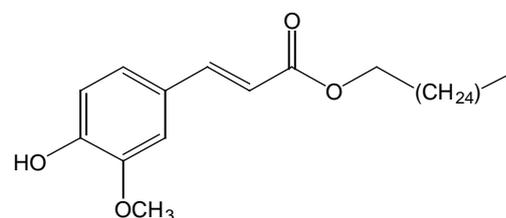
V-3-3-13-Composé 37

3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-propénoate
d'hexacosyle (*E*)

Formule brute : C₃₆H₆₂O₄

MS : ESI (mode négatif) m/z : 557[M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
dans (CDCl₃) (tableau 35, page 249)

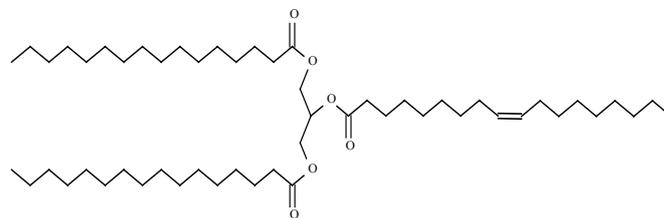


V-3-3-14-Composé 38

Acide 9-octadécénoïque 2,3-bis[(1-oxododécyl)
oxy]propyl ester

Formule brute : $C_{20}H_{28}O_2$

MS : ESI (mode positif) m/z : 855 $[M+Na]^+$
871 $[M+K]^+$



Bibliographie

- [1] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [2] Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris.
- [3] Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- [4] Ahmed, A. A., Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Rhouati, S., Gad, M. H., Ohta, S., Hirata, S., 2006. Guyonianin A and B, two polyester diterpenes from Algerian *Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications 4, 273-279.
- [5] Nabel, A., Salah, M., 1985. Flavonol glycosides of *Euphorbia retusa* and *E. Sanctae-catharinae*. Phytochemistry 24, 371-372.
- [6] Harraz, F.M., Gurek, F., Oksuz, S., Ulubelen, A., 1994. Triterpenes and fatty acids from *Euphorbia retusa*. Turk. J. Chem. 18, 251-257.
- [7] Saif-Eldin, N.A., 1994. Triterpenes from *Euphorbia retusa*. Alexandria journal of pharmaceutical sciences. 8, 23-24.
- [8] Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., 2000. Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne.
- [9] Webster, G.L., 1987. The saga of the spurge : a review of classification and relationships in the Euphorbiales. Botanical Journal of Linnean Society. 94, 3-44.
- [10] Bruneton, J., 1996. Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et documentation, Paris.
- [11] Schulte, R.E., 1987. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. Botanical Journal of Linnean Society. 94, 77-96.
- [12] Reynaud, J., 2002. La flore du pharmacien. Technique et documentation, Paris.
- [13] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3). Techniques et documentation, Paris.
- [14] Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Checa, J., Palomares, E., Fraga, B. M., 1999. Jatrophone and tiglane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. Phytochemistry 52, 479-485.
- [15] Yamamura, S., Shizuri, Y., Kosemura, S., Ohtsuka, J., Tayama, T., Ohba, S., Ito, M., Saito, Y., Terada, Y., 1989. Diterpenes from *Euphorbia helioscopia*. Phytochemistry 28, 3421-3436.
- [16] Hohmann, J., Günter, G., Vasas, A., Kalman, A., Argay, G., 1999. Isolation and structure revision of pepluane from *Euphorbia peplus*. J. Nat. Prod. 62, 107-109.

- [17] Ma, Q.-G., Liu, W.-Z., Wu, X.-Y., Zhou, T.-X., Qin, G.-W., 1997. Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry* 44, 663-666.
- [18] Miana, G.A., Bashir, M., Evans, F. J., 1985. Isolation of prostratin from *Euphorbia cornigera*. *Planta Medica* 51, 353-354.
- [19] Ferreira, A.M.V.D., Carvalho, L.H.M., Carvalho, M.J.M., Sequeira, M.M., Silva, A.M.S., 2002. Jatrophone and lathyrane diterpenoids from *Euphorbia hyberna* L. *Phytochemistry* 61, 373-377.
- [20] Ravikanth, V., Reddy, V.L.N., Rao, T.P., Diwan, P.V., Ramakrishna, S., Venkateswarlu, Y., 2002. *Phytochemistry* 59, 331-335.
- [21] Oksüz, S., Gürek, F., Qiu, S.-X., Cordell, G.A., 1998. Diterpene polyesters from *Euphorbia seguieriana*. *J. Nat. Prod.* 61, 1198-1201.
- [22] Jeske, F., Jakupovic, J., Berendsohn, W., 1995. Diterpenes from *Euphorbia seguieriana*. *Phytochemistry*, 40, 1743-1750.
- [23] Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Yuste, A., Jakupovic, J., 1999. Isoterracinolides A a Novel bishomoditerpene lactones from *Euphorbia terracina*. *J. Nat. Prod.* 62, 110-113.
- [24] Uemura, D., Hirata, Y., 1972. Two new diterpenoids, jolkinolides A and B, obtained from *Euphorbia jolkini* Boiss. (*Euphorbiaceae*). *Tetrahedron letters*, 15, 1387-1390.
- [25] Uemura, D., Hirata, Y., 1974. Diterpenoids from *Euphorbia jolkini*. *Chem. Letters*, 819.
- [26] Crespi-Perellino, N., Garofano, L., Arlandini, E., Pincioli, V., 1996. Identification of new diterpenoids from *Euphorbia calyptata* cell cultures. *J. Nat. Prod.* 59, 773-776.
- [27] Borghi, D., Baumer, L., Ballabio, M., Arlandini, E., 1991. Structure elucidation of helioscopinolides D and E from *Euphorbia calyptata* cell culmtures. *J. Nat. Prod.* 54, 1503-1508.
- [28] Lal., A.R., Cambie, R.C., Rutledge, P.S., Woodgate, P.D., 1990. *Ent*-pimarane and *ent*-abietane diterpens from *Euphorbia fidjiana*. *Phytochemistry* 29, 2239-2246.
- [29] Lal., A.R., Cambie, L.R.C., Rutledge, P.S., Woodgate, P.D., 1990. *Ent*-atisane diterpenes from *Euphorbia fidjiana*. *Phytochemistry* 29, 1925-1935.
- [30]] Suthivaiyakit, S., Thapsut, M., Prachayasittikul, V., 2000. Constituents and bioactivity of the tubers of *Euphorbia sessiliflora*. *Phytochemistry* 53, 947-950.
- [31] Appendino, G., Jakupovic, S., Tron, G. C., Jakupovic, J., Milon, V., Ballero, M., 1998. Macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* 61, 749-756.
- [32] Shi, H-M., Williams, I.D., Sung, H. H-Y., Zhu, H-X., Ip, N. Y., Min, Z-D., 2005. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med.* 71, 349-354.

- [33] Appendino, G., Bellerio, E., Tron, G. C., Jakupovic, J., Ballero, M., 2000. Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*. *Fitoterapia* 71, 134-142.
- [34] Teresa, J. De P., Urones, J. G., Marcos, I. S., Basabe, P., Cuadrado, M. J. S., Moro, R. F., 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 26, 1767-1776.
- [35] Ferreira, M.J.U., 1990. Euferol and melliferol: two novel triterpenoids from *Euphorbia mellifera*. *J. Chem. Soc. Perkin trans 1*, 185-187.
- [36] Gewali, M.B., Hattor, M., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Namba, T., 1990. Constituents of the latex of *Euphorbia antiquorum*. *Phytochemistry* 29, 1625-1628.
- [37] Akihisa, T., Wijeratne, E.M.K., Tokuda, H., Enjo, F., Toriumi, M., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., Tezuka, Y., Nishino, H., 2002. Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol (Antiquol C) and other triterpenes from *Euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J. Nat. Prod.* 65, 158-162.
- [38] Tanaka, R., Ida, T., Kita, S., Kamisako, W., Matsunaga, S., 1996. A 3,4-seco-8 β H-fernadienoic acid and other constituents from *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry* 41, 1163-1168.
- [39] Lima, E.M.C., Medeiros, J.M.R., Davin, L.B., 2003. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* 63, 421-425.
- [40] Madureira, A.M., Duarte, M.T., Piedade, M.F.M., Ascenso, J.R., Ferreira, M.-J. U., 2004. Isoprenoid compounds from *Euphorbia portlandica*. X-ray structure of lupeportlandol, a new lupane triterpene. *J. Braz. Chem. Soc.* 15.
- [41] Ayatollahi, S.A., Ahmed, Z., Malik, A., Afza, N., Badar, Y., 1992. Cycloarkeanol, a new triterpene from *Euphorbia clarkeana*. *J. Nat. Prod.* 55, 959-962.
- [42] Wang, L.-Y., Wang, N.-L., Yao, X.-S., Miyata, S., Kitanaka, S., 2003. Euphane and tirucallane triterpenes from roots of *Euphorbia kansui* and their in vitro effects on the cell division of *Xenopus*. *J. Nat. Prod.* 66, 630-633.
- [43] Anjaneyulu, V., Rao, G.S., Prasad, K.H., 1983. triterpenoids from *Euphorbia trigona*. *Phytochemistry* 24, 1610-1612.
- [44] Anjaneyulu, V., Rao, G.S., Connolly, J.D., 1985. Occurrence of 24-epimers of cycloart-25-ene-3 β ,24-diols in the stems of *Euphorbia trigona*. *Phytochemistry* 24, 1610-1612.
- [45] Giner, J.-L., Berkowitz, J. D., Andersson, T., 2000. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplus*. *J. Nat. Prod.* 63, 267-269.
- [46] Nielsen, P.E., Nishimura, H., Liang, Y., Calvin, M., 1979. Steroids from *Euphorbia* and other latex-bearing plants. *Phytochemistry* 18, 103-104.
- [47] Dey, P.M., Harborne, J.B., 1991. *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
- [48] Manitto, P., 1981. *Biosynthesis of natural products*. John Willey & Sons. New York.

- [49] Dewick, P.M., 1999. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compound. *Nat. Prod. Rep.* 16, 97-130.
- [50] Mc castill, D., Croteau, R., 1998. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Tibtech.* 16, 348-355.
- [51] Schulte, A.E., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., 1999. Microplate enzyme-coupled assays of mevalonate and phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* suspension cultured cells. *Anal. Biochem.* 269, 245-254.
- [52] Bonanno, J.B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M.J., Ilyin, V., Gerchman, S.E., Kycia, H., Studier, F.W., Sali, A., Burley, S.K., 2001. Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12896-12901.
- [53] Sharkey, T.D., Yeh, S., 2001. Isoprene emission from plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 407-436.
- [54] Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases : molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4126-4133.
- [55] Gschwendt, M., Hecker, E., 1969. Tumor prooting compounds from *Euphorbia triangularis*: mono- and diesters of 12-desoxy-phorbol. *Tetrahedron letters* 40, 3509-3512.
- [56] Furstenberger, G., Hecker, E., 1977. The new diterpene 4-deoxphorbol and its highly unsaturated irritant diesters. *Tetrahedron letters* 11, 925-928.
- [57] Kinghorn, A.D., 1979. Characterozation of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of natural products* 42, 112-115.
- [58] Karalai, C., Wiriyaichitra, P., Sorg, B., Hecker, E., 1995. Medicinal plants of Euphorbiaceae occurring and utilized in Thailand. V. Skin irritants of the daphnane and tiglane type in latexof *Excoecaria bicolor* and the Uterotonic activity of the leaves of the tree. *Phytotherapy research* 9, 482-488.
- [59] Appendino, G., Bellerio, E., Tron, G. C., Jakupovic, J., Ballero, M., 1999. Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp *cupanii*. *J. Nat. Prod.* 62, 1399-1404.
- [60] Seip, E. H. , Hecker, E., 1984. Derivatives of characiol, macrocyclic diterpene esters of the jatropane type from *Euphorbia characias*. *Phytochemistry* 23, 1689-1694.
- [61] Abdegaleil, S. A. M., Kassem, S. M. I., Doe, M., Baba, M., Nakatani, M., 2001. Diterpenoids from *Euphorbia paralia*. *Phytochemistry* 58, 1135-1139.
- [62] Hohmann, J., Vasas, A., Gunther, G., Dombi, G., Blazso, G., Falkay, G., Mathé, I., Jerkovich, G., 1999. Jatropane diterpenoids from *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry* 51, 673-677.

- [63] Rédei, D., Hohmann, J., Evanics, F., Forgo, P., Szabo, P., Mathé, I., 2003. Isolation and structural characterization of new, highly functionalized diterpenes from *Euphorbia serrulata* Helvetica Chimica Acta 86, 280-289.
- [64] Hohmann, J., Evanics, F., Dombi, G., Molnar, J., Szabo, P., 2001. Euphosalicin, a new diterpene polyester with multidrug resistance reversing activity from *Euphorbia salicifolia*. Tetrahedron 57, 211-215.
- [65] Li, P., Feng, Z. X., Ye, D., Huan, W., Gang, W. D., Dong, L. X., 2003. Chemical constituents from the whole plant of *Euphorbia altotibetic*. Helvetica Chimica Acta 86, 2525-2532.
- [66] Jakupovic, J., Jeske, F., Morgenstern, T., Tzichritzis, F., Marco, J.A., Berendsohn, W., 1998. Diterpenes from *Euphorbia segetalis*. Phytochemistry 47, 1583-1600.
- [67] Corea, G., Fattorusso, C., Fattorusso, E., Lanzotti, V., 2005. Amygdaloidins A-L, twelve new 13 α -OH jatrophane diterpenes from *Euphorbia amygdaloides* L. Tetrahedron 61, 4485-4494.
- [68] Talapatra, S.K., Das, G., Talapatra, B., 1989. Stereostructures and molecular conformations of six diterpene lactones from *Gelonium multiflorum*. Phytochemistry 28, 1181-1989.
- [69] Gustafson, K. R., Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Cardellina II, J. H., McMahon, J. B., Gulakowski, R. J.; Cragg, G. M., Cox, P. A., Brinen, L. S., Clardy, J., Boyd, M. R., 1991. HIV inhibitory natural products. Diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. Tetrahedron 47, 4547-4554.
- [70] Öksüz, S., Ulubelen, A., Barla, A., Voelter, W., 2002. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. Turk. J. Chem. 26, 457-463.
- [71] Pascal, S., Taton, M., Rahier, A., 1993. Plant sterol biosynthesis. The journal of biological chemistry 268, 11639-11654.
- [71] Nes, W. D., Koike, K., Jia, Z., Sakamoto, Y., Satou, T., Nikaido, T., Griffin, J. F., 1998. 9 β , 19-cyclosterol analysis by H and C NMR, crystallographic observations, and molecular mechanics calculations. J. Am. Chem. Soc. 120, 5970-5980.
- [72] Ohtsu, H., Tanaka, R., Michida, T., Shingu, T., Matsunaga, S., 1998. Tetracyclic triterpenes and other constituents from the leaves and bark of *Larix kaempferi*. Phytochemistry 49, 1761-1768.
- [73] Maienthal, M., Franklin, P.J., 1955. Preparation of lanosterol from bromolanosterol. Journal of Organic Chemistry 20, 1627-30.
- [74] Akihisa, T., Kimura, Y., Koike, K., Shibata, T., Yoshida, Z.-Y., Nikaido, T., Tamura, T., 1998. Isohelianol: A 3,4-seco-triterpene alcohol from *Sasnqua* oil. J. Nat. Prod. 61, 409-412.
- [75] Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S.-I., Yamanouchi, S., Tamura, T., 1997. Triterpenes alcohols from *Camellia* and *Sasanqua* oils and their anti-inflammatory effects. Chem. Pharm. Bull. 45, 2016-2023.

- [76] Arai, Y., Hirohara, M., Ageta, H., 1989. Fern constituents: Three new skeletal triterpenoid hydrocarbons isolated from *Polypodiodes niponica*. Tetrahedron letters. 30, 7209-7212.
- [77] Mishra, M., Shukla, Y.N., Kumar, S., 2000. Euphane triterpenoid and lipid constituents from *Butea monosperma*. Phytochemistry 54, 835-838.
- [78] Cox, J. S. G., King, F. E., King, T. J., 1956. Chemistry of extractives from hardwoods. XXVI. Cycloeucalenol, a triterpene from *Eucalyptus microcorys*. Journal of the Chemical Society 1384-1392.
- [79] Gonzalez, A.G., Breton, J.L., Dergado, M.J., Fraga, B.M., 1972. Steroids from *Euphorbia obtusifolia*. Annales de Chimie 68, 203.
- [80] Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Matsunaga, S., 1999. Obtusifoliol and related steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. Phytochemistry 51, 457-463.
- [81] Wani, M. C., Schaumberg, J. P., Taylor, H. L., Thompson, J. B., Wall, M., 1983. Plant Antitumor Agents, 19.¹ Novel Triterpenes from *Maprounea Africana* J. Nat. Prod. 46, 537 – 543.
- [82] Mc Phail, A., Mc Phail, D.R., 1989. Identity of maprounic acid with aleuritolic acid. Revision of the structure of maprounic acid: X ray crystal structure of p-bromobenzyl acetylmaprounate. Journal of natural products 52, 212-216.
- [83] Razdan, T.K., Harkar, S., Kachroo, V., Koul, G.L., 1982. Phytolaccanol and epi-acetylaleuritolic acid, Two triterpenoids from *Phytolacca acinosa*. Phytochemistry 21, 2339-2342.
- [84] Ageta, H.; Arai, Y. 1983. Fern constituents: pentacyclic triterpenoids isolated from *polypodium niponicum* and *P. formosanum*. Phytochemistry 22, 1801-1808.
- [85] Misra, D. R., Naskar, D. B., Ray, T. K., Khastgir, H. N., 1973. Phytosterols in plants. Phytochemistry 12, 1819-20.
- [86] Ciccio, J. F., Hoet, P., 1981. Some constituents of the fruit and leaves of *Tabernaemontana longipes* Donn. Smith. Revista Latinoamericana de Quimica 12, 88-90.
- [87] Tanaka, Y., 1991. Rubber and related polyprenols. Methods in plant biochemistry vol. 7 (terpenoids). ED. Dey, P.M., Harborne, J.B., London: academic Press Limited 519-536.
- [88] Ferreira, M.-J. U., Ascenso, J. R., 1999. Steroids and tetracyclic diterpene from *Euphorbia boetica*. Phytochemistry 51, 439-444.
- [89] Oksuz, S., Shieh, H.-L., Pezzuto, J. M., Ozhatay, N., Cordell, G. A., 1993. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; Part1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaensis* subsp. *glareosa*. Planta Med. 59, 472-473.
- [90] Satyanarayana, V., Krupadanam, G. L. D., Srimannarayana, G., 1992. Tetracyclic triterpenes from the latex of *Euphorbia nivulia*. Fitoterapia 63, 82-83.

- [91] Yili, D., Yuting, L., 1992. Lipid soluble components of Zhungaerdaiji (*Euphorbia soongarica*). *Zhongcaoyao* 23, 570-572.
- [92] Ulubelin, A., Oksuz, S., Mericli, A. H., 1988. *Phytochemistry* 27, 3964-3965.
- [93] Nguyen, A.T., Malonne, H., Duez, P., Vanhaelen-Faster, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., 2004. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia* 75, 500-504.
- [94] Püllela, S.V., Choi, Y.W.; Khan, S. I., Khan, I. A., 2005. New acylated clionasterol glycosides from *Valeriana officinalis*. *Planta Medica* 71, 960-961.
- [95] Oueslati, M. H., Jannet, H. Ben, M. Z., Matthew, S., Abreu, P. M., 2007. A new C9 nor-isoprenoid glucoside from *Rantherium suaveolens*. *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis* 21, 884-888.
- [96] Yang, C.-X., Huang, S.-S., Yang, X.-P., Jia, Z.-J., 2004. Nor-lignans and steroidal saponins from *Asparagus gobicus*. *Planta Medica* 70, 446-451.
- [97] Harraz, F.M., Öksuz, S., Gurek, F., Ulubelen, A., 1994. Triterpenes and fatty acids from *Euphorbia retusa*. *Turk. J. Chem.* 18, 251-257.
- [98] Saif-Eldin, N.A., 1994. Triterpenes from *Euphorbia retusa*. *Alexandria journal of pharmaceutical sciences* 8, 23-24.
- [99] Salah, N.A.M., 1985. Flavonol glycosides of *Euphorbia retusa* and *E. sanctae-catharinae*. *Phytochemistry* 24, 371-372.
- [100] Jayasinghe, U. L. B., Vithana, H.S.K., Wannigama, G. P., Fujimoto, Y., 2001. 24-methylenecycloartanone from *Bhesa nitidissima*. *Fitoterapia* 72, 594-595.
- [101] Wandji, J., Nkengfack, A. E., Fomum, Z. T., Ubillas, R., Killday, K. B., Tempesta, M.S., 1990. A new prenylated isoflavone and long chain esters from two *Erythrina* species. *J. Nat. Prod.* 53, 1425-1429.
- [102] Achenback, H., Stocker, M., Constanta, M. A., 1986. *Z. Naturforsch* 41,164.
- [103] Vlahov, G., Chepkwony, P. K., Ndalut, P. K., 2002. ¹³C NMR characterization of triacylglycerols of *Moringa oleifera* seed oil: An oleic-vaccenic acid oil. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 970-975.
- [104] Nes, W. D., Norton, R. A., Benson, M., 1992. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [C] mevalonates. *Phytochemistry* 31, 805-811.
- [105] Talapatra, S.K., Das, G., Talapatra, B., 1989. Stereostructures and molecular conformations of six diterpene lactones from *Gelonium multiflorum*. *Phytochemistry* 28, 1181-1989.
- [106] Shizuri, Y., Kosemura, S., Yamamura, S., Ohba, S., Ito, M., Saito, Y., 1983. Isolation and structures of helioscopinolides, new diterpenes from *Euphorbia helioscopia* L. *Chemistry letters* 65-68.

- [107] Talapatra, B., Das, G., Das, A.K., Biswas, K., Talapatra, S.K., 1998. Stereostructures and conformations of four diterpenes lactones from *Gelonium multiflorum*. *Phytochemistry* 49, 1353-1359.
- [108] Lee, C.-L., Chang, F.-R., Hseih, P.-W., Chiang, M.-Y., Wu, C.-C., Huang, Z.-Y., Lan, Y.-H., Chen, M., Lee, K.-H., Yen, H.-F., Hung, W.-C., Wu, Y.-C., 2008. Cytotoxic *ent*-abietane diterpenes from *Gelonium arquoreum*. *Phytochemistry* 69, 276-287.
- [109] Jahan, I.A., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Shaheen, F., Parween, Z., Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., 2002. Novel diterpene lactones from *Suregada multiflora*. *J. Nat. Prod.* 65, 932-934.
- [110] Jahan, I.A., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Shaheen, F., Parween, Z., Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., 2004. Six new diterpenoids from *Suregada multiflora*. *J. Nat. Prod.* 67, 1789-1795.
- [111] Lyakhova, E.G., Kalinovsky, A.I., Kolesnikova, S.A., Vaskovsky, V.E., Stonik, V.E., 2004. Halogenated diterpenoids from the red ALGA *Laurencia Nipponica*. *Phytochemistry* 65, 2527-2532.
- [112] Kurata, K., Taniguchi, K., Agatsuma, Y., Suzuki, M., 1998. Diterpenoid feeding- deterrents from *Laurencia saitoi*. *Phytochemistry* 47, 363-369.
- [113] Anjaneyulu, V., Prasad, K. H., Ravi, K., Connolly, J. D., 1985. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* 24, 2359-2367.
- [114] Greca, M. D., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtiera, L., 1994. Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus*. *Phytochemistry* 35, 1017-1022.
- [115] Cantillo-Ciau, Z., Brito-Loeza, W., Quijano, L., 2001. Triterpenoids from *Tillandsia fasciculata*. *J. Nat. Prod.* 64, 953-955.
- [116] Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T., 1976. Tirucalla-7,24-dienol, a new triterpene alcohol from *tea* seed oil. *Lipids* 11, 434-441.
- [117] Kumar, V., Niyaz, N. M. M., Wickramaratne, D. B. M., Balasubramaniam, S., 1991. Tirucallane derivatives from *Paramignya monophylla* fruits. *Phytochemistry* 30, 1231-1233.
- [118] Polonsky, J., Baskevitch-Varon, Z., Das, B. C., 1976. Triterpenes tetracycliques du *Simarouba amara*. *Phytochemistry* 15, 337-339.
- [119] Rahier, A., Cattel, L., Benveniste, P., 1977. Mechanism of the enzymatic cleavage of the 9 β , 19-cyclopropane ring of cycloeucalenol. *Phytochemistry* 16, 1187-1192.
- [120] Tanaka, R., Inosiri, A., Yoneda, M., Ishida, T., Numada, A., Matsunaga, S., 1990. A tetracyclic triterpene lactone and other constituents from the bark of *Abies firma*. *Phytochemistry* 29, 3263-3265.

- [121] Anselmi, C., Bernardi, F., Centini, M., Gaggelli, E., Gaggelli, N., Valensini, D., Valensini, G., 2005. Interaction of ferulic acid derivatives with human erythrocytes monitored by pulse field gradient NMR diffusion and NMR relaxation studies. *Chemistry and physics of lipids* 134, 109-117.
- [122] Boonyaratavej, S., Tantayanontha, S., Kitchanachai, P., 1992. Trans-triacontyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate, a new compound from the Thai plant *Bridelia ovata*. *Journal of Natural Products* 55, 1761-1763.
- [123] Wright, L. C., Obblink, L. G., Delikatny, E. J., Santangelo, R. T., Sorell, T. C., 2000. The origin of ^1H NMR-Visible triacylglycerol in human neutrophils high fatty acid environments result in preferential sequestration of palmitic acid into plasma membrane triacyl glycerol. *Eur. J. Biochem.* 267, 68-78.
- [124] Wright, L. C., Dlordjevic, J. T., Schibeci, S. D., Himmebreich, U., Muljadi, N., Williamson, P., Lynch, G. W., 2003. Detergent-resistant membrane fractions contribute to the total ^1H NMR –Visible lipid signals in cells. *Eur. J. Biochem.* 270, 2091-2100.

Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*

Hamada Haba^a, Catherine Lavaud^b, Hassina Harkat^a, Abdulmagid Alabdul Magid^b,
Laurence Marcourt^c, Mohammed Benkhaled^{a,*}

^a Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna 05000, Algeria

^b Laboratoire de Pharmacognosie, CNRS FRE 2715, IFR53 Biomolécules, BP 1039, 51097 Reims Cedex 2, France

^c Centre de Recherche sur les Substances Naturelles, UMS CNRS 2597, 3 Rue des Satellites, BP 94244, 31432 Toulouse, France

Received 11 December 2006; received in revised form 18 January 2007

Available online 6 March 2007

Abstract

Two new compounds with tigliane and cycloartane skeletons: 4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadecanoate (**1**) and 24-methylenecycloartane-3,28-diol (**2**), respectively, in addition of four known diterpenoids and 13 triterpenoids: 3-benzoyloxy-5,15-diacetoxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11-diene (**4**), *ent*-abieta-8(14),13(15)-dien-16,12-olide (**5**), *ent*-8 α ,14 α -epoxyabieta-11,13(15)-dien-16,12-olide (**6**), *ent*-3-hydroxyatis-16(17)-ene-2,14-dione (**7**), 3 β -hydroxytaraxer-14-en-28-oic acid (**8**), β -sitosteryl-3 β -glucopyranoside-6'-*O*-palmitate (**9**), multiflorenyl acetate (**10**), multiflorenyl palmitate (**11**), peplusol (**12**), 24-methylenecycloartanol (**3**), lanosterol (**13**), euferyl (**14**), butyrospermol (**15**), cycloartenol (**16**), obtusifoliol (**17**), cycloeucalenol (**18**) and β -sitosterol (**19**), were isolated from the roots of *Euphorbia guyoniana*. Their structures were established on the basis of physical and spectroscopic analysis, including 1D and 2D homo- and heteronuclear NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC and NOESY) and by comparison with the literature data.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Euphorbia guyoniana*; Euphorbiaceae; Diterpenoids; Triterpenoids

1. Introduction

Euphorbia guyoniana (Boiss. and Reut.) is an endemic Saharan plant growing in sandy and desert habitat (Quezel and Santa, 1963), and belongs to the large family of Euphorbiaceae. With more of 1600 species, *Euphorbia* genus is the most representative of the family (Ozenda, 1991). Plants of this genus are known for their rich content in secondary metabolites. Indeed, numerous studies undertaken on this genus have revealed presence of triterpenes (Lima et al., 2003), diterpenes (Shi et al., 2005), macrocyclic diterpenes (Rédei et al., 2003), steroids (Tanaka et al., 1999) and aromatic compounds (Öksüz et al., 2002). Chemically, *E. guyoniana* has received little attention apart from the work done recently on the aerial

parts from which two new diterpene polyesters with jatropane skeleton have been isolated (Ahmed et al., 2006). This species contains an irritant white latex for the eyes and skin (Bellakhdar, 1997), alike the other species of the genus *Euphorbia*. Present work describes the isolation and structural determination of one new diterpenoid (**1**) and one new cycloartane-type triterpene (**2**), together with 17 known compounds isolated from the roots of *E. guyoniana*. Structures were established mainly by 1D and 2D homo- and heteronuclear NMR and mass spectrometry experiments.

2. Results and discussion

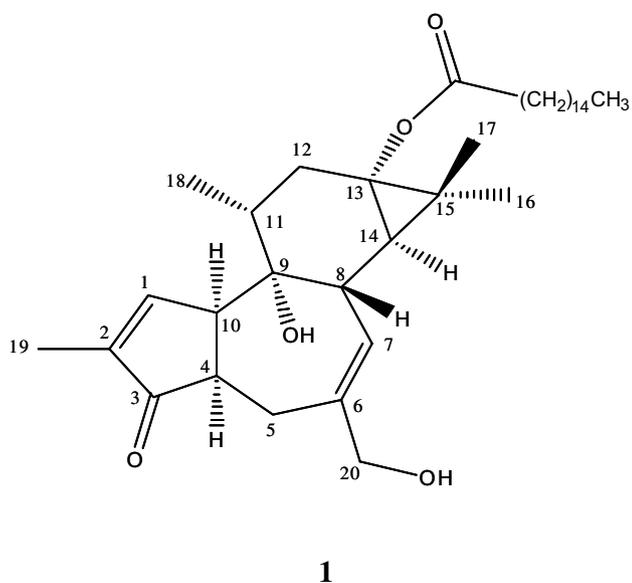
The chloroform extract of the roots of *Euphorbia guyoniana* was subjected to silica gel chromatography and

* Corresponding author. Tel./fax: + 213 33 86 89 46.

E-mail address: benkhaled_m@caramail.com (M. Benkhaled).

semi-preparative HPLC to afford two new compounds **1** and **2**, in addition to 17 known products (**3**–**19**).

The known compounds were identified by using spectroscopic methods including $[\alpha]_D^{25}$, ESIMS, 1D and 2D NMR analysis and also by comparing experimental data with those described in the literature as 3-benzoyloxy-5,15-diacetoxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11-diene (**4**) (Ahmed et al., 2006), *ent*-abieta-8(14),13(15)-dien-16,12-olide (**5**), *ent*-8 α ,14 α -epoxyabieta-11,13(15)-dien-16,12-olide (**6**) (Crespi-Perellino et al., 1996; Che et al., 1999) and *ent*-3-hydroxyatis-16(17)-ene-2,14-dione (**7**) (Appendino et al., 2000; Gustafson et al., 1991), 3 β -hydroxytaraxer-14-en-28-oic acid (**8**) (McPhail et al., 1989), β -sitosteryl-3 β -glucopyranoside-6'-*O*-palmitate (**9**) (Yili and Yuting, 1992), multiflorenyl acetate (**10**), multiflorenyl palmitate (**11**) (Ciccio and Hoet, 1981; Ageta and Arai, 1983), peplusol (**12**) (Giner et al., 2000), 24-methylenecycloartanol (**3**), lanosterol (**13**), euferyl (**14**), butyrospermol (**15**), cycloartenol (**16**), obtusifoliol (**17**), cycloeucalenol (**18**) and β -sitosterol (**19**) (Teresa et al., 1987; Satyanarayana et al., 1992; Öksüz et al., 1993).



1

Compound **1** was obtained as colourless oil. The ESI⁺ mass spectrum of compound **1** showed a quasi-molecular ion signal at m/z 593 $[(M+Na)]^+$, indicating a molecular mass of 570 uma. The molecular formula was confirmed as C₃₆H₅₈O₅ by HRESIMS (m/z 593.4174; calc. for C₃₆H₅₈O₅Na, 593.4176). In the UV spectrum, maximum absorptions were observed at 236 and 335 nm suggesting the presence of an enone system. The IR spectrum indicated the presence of an OH group (3405 cm⁻¹), a conjugated carbonyl (1715 cm⁻¹) and a double bond (1630 cm⁻¹). The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) showed typical signals of phorbol esters with tiglane-type diterpene skeleton (Marco et al., 1999). The ¹H NMR

displayed signals for four methyl groups (δ_H 1.12, *d*, J = 6.4 Hz, H-18; 1.09, *s*, H-17; 1.19, *s*, H-16; 1.83, *brs*, H-19) and two olefinic protons (δ_H 7.11, *brs*, H-1 and 5.15, *brs*, H-7). The doublet at δ_H 0.58 with a coupling constant J = 5.0 Hz was attributed to H-14, and an AB system corresponding to an oxymethylene group was detected at δ_H 4.06 (1H, *d*, J = 12.1 Hz, H-20a) and 3.93 (1H, *d*, J = 12.1 Hz, H-20b). A large deshielded singlet at δ_H 5.32 that showed no correlation in the HSQC spectrum, was assigned to the hydroxyl group 9-OH (Miana et al., 1985). The lack of a downfield doublet signal at 5.40 ppm ascribable to H-12 in the case of an ester derivative of phorbol and the appearance of two doublets of doublets centered at δ_H 2.16 (1H, *dd*, J = 14.5, 6.4 Hz, H-12 β) and 1.75 (1H, *dd*, J = 14.5, 12.0 Hz, H-12 α) indicated that compound **1** is an ester derivative of 12-deoxyphorbol (Miana et al., 1985). The J -modulated ¹³C NMR (Table 1) showed signals characteristic of a 12-deoxyphorbol except for the signal due to C-4 which appeared at 50.1 ppm for **1** instead of 74 ppm reported for the 12-deoxy (Ma et al., 1997). This shielding of Δ 23.9 ppm indicated that it did not bear a hydroxyl group. The presence of an hexadecanoyl (palmitoyl) ester was deduced from the characteristic fragment ion peak in the mass spectrum at m/z 337 $[(M+Na)-256]^+$, due to the loss of a C₁₆ saturated fatty acid; the triplet of a methyl group at δ_H 0.92 (J = 6.9 Hz) and δ_C 14.1, signals for methylene groups at δ_H 2.32 (2H, *t*, J = 7.6 Hz), 1.62 (2H, *m*), 1.30–1.35 (24H, *m*) and δ_C 34.6, 24.7, 22.7, 29.1–29.7, 31.9, and the carbonyl carbon at δ_C 176.0 attested the nature of palmitoyl ester. The values of chemical shifts for allylic protons H-20 indicated that the C-20 hydroxyl was free (Miana et al., 1985). Therefore, the ester hexadecanoyl moiety was connected to the C-13. These observations were further confirmed by analysis of the HSQC, HMBC and COSY experiments. This latter experiment showed the expected correlations between the protons H-4 at δ_H 2.85 with H-5 (δ_H 2.54 and 3.54) and H-10 (δ_H 3.57). The HMBC spectrum revealed significant correlations between H-4 and carbons at δ_C 25.1 (C-5), 47.1 (C-10) and 213.8 (C-3) (Table 1). The relative stereochemistry of (**1**) was studied by analysis of the NOESY spectrum (Fig. 1). All tiglane diterpenoids discovered in nature up to now show a configuration H-8 β , C-9-OH α and H-10 α (Ma et al., 1997). The coupling constants of H-12 with H-11 (12.0 and 6.4 Hz) and the NOE effects of H-18 with H-12 α indicated that H-11 was β -axial. The observed NOE correlations from H-17 to H-8 and H-11 β indicated that these protons were on the same side of the molecule and involved in a β configuration. The absence of NOE effects between H-8 β and H-14 proved that H-14 was α oriented. The NOE effect between H-18 and H-10 confirmed the α orientation of H-10. Further NOE correlations were observed between H-17 β and H-12 β , H-16 α and H-14 α , H-7 and H-14 α . Since, H-4 exhibited NOE interaction with H-10, the two protons were α oriented.

Table 1
 ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** in CDCl_3

Atom	1		
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1	7.11 brs	156.9	–
2	–	143.0	–
3	–	213.8	–
4	2.85 ddd 6.7, 5.0, 3.0, H-4 α	50.1	C-3, C-5, C-10
5	2.54 dd 15.4, 5.0, H-5 α 3.54 dm 15.4, H-5 β	25.1	C-4, C-6, C-7, C-10, C-20
6	–	136.3	–
7	5.15 brs	127.7	C-20
8	1.82 m H-8 β	41.0	C-9, C-10
9	OH 5.32 brs	75.5	–
10	3.57 brs H-10 α	47.1	–
11	1.58 m H-11 β	37.1	C-8, C-18
12	1.75 dd 14.5, 12.0, H-12 α 2.16 dd 14.5, 6.4, H-12 β	30.5	C-11, C-13, C-15, C-18 C-9, C-11, C-13, C-14, C-15
13	–	62.7	–
14	0.58 d 5.0, H-14 α	33.1	C-7, C-12, C-13, C-15, C-16, C-17
15	–	22.5	–
16	1.19 s	23.7	C-13, C-14, C-15, C-17
17	1.09 s	15.2	C-13, C-14, C-15, C-16
18	1.12 d 6.4	15.9	C-9, C-11, C-12
19	1.83 brs	10.4	C-1, C-2, C-3
20	4.06 d 12.1, H-20a 3.93 d 12.1, H-20b	69.5	C-6, C-7 C-5, C-6, C-7
COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	–	176.0	–
COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	2.32 t 7.6	34.6	COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃ COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃ COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃
COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	1.62 m	24.7	COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃
COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	1.30–1.35 m	22.7, 29.1–29.7, 31.9	COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃ COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃
COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃	0.92 t 6.9	14.1	COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃ COCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃

The α arrangement of H-4 was also supported by the absence of NOE correlations between H-4 and H-8 β . The chemical shift of H-1 and the values of the coupling constants of H-4 agreed with an α -configuration in comparison with those reported for the H-4 β (Appendino et al., 1999). The compound **1** exhibited a positive optical rotation alike the other phorbol derivatives isolated from *Euphorbia* species (Appendino et al., 1999; Ma et al.,

1997; Marco et al. 1999). This result was indeed supported by the isolation and characterization of an ester of 4-deoxyphorbol with H-4 α (Marco et al. 1999). Therefore, the relative stereochemistry of this compound was 4 α -H, 8 β -H, 9 α -OH, 10 α -H, 11 α -Me, 13 α -OCO (CH₂)₁₄CH₃ and 14 α -H. All of the above data are compatible with the structure of **1** being 4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadecanoate (**1**).

Compound **2** was isolated as a white powder. Its ESI⁺ mass spectrum gave quasi-molecular ion peaks at m/z 479 [M+Na]⁺ and 935 [2M+Na]⁺ indicating a molecular mass $M = 456$ corresponding to the formula C₃₁H₅₂O₂ which was supported by HRESIMS (m/z 479.3868; calc. for C₃₁H₅₂O₂Na, 479.3860). The IR spectrum showed a signal at 3430 cm⁻¹, indicating the presence of hydroxyl group. The ^{13}C NMR spectrum of **2** (Table 2) showed signals consisting of six methyl, 13 methylene, six methine and six quaternary carbon atoms which confirmed its triterpenic nature. The ^1H NMR spectral data of **2** are found to be closely similar to those of cycloartane-type triterpene like 24-methylenecycloartanol (**3**) which was previously isolated from numerous *Euphorbia* species (Öksüz et al., 2002; Teresa et al., 1987). The characteristic pair of high field doublets signals of the cyclopropane ring bearing two non equivalent

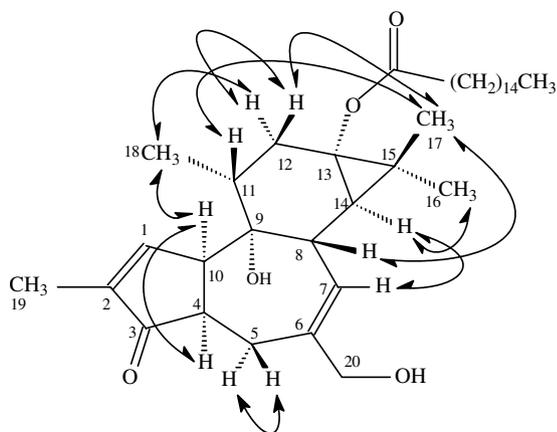


Fig. 1. Relevant NOE correlations observed for compound **1**.

Table 2
 ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** in CDCl_3

Atom	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1	1.29–1.62 m	31.8	C-19
2	1.66–1.82 m	30.4	C-10
3	3.82 dd 10.6, 4.8, H-3 α	77.1	C-4, C-5, C-28, C-29
4	–	43.8	–
5	1.52 m H-5 α	42.5	C-6, C-9
6	0.88–1.49 m	21.0	C-7
7	1.13–1.38 m	25.9	C-8, C-14
8	1.55 dd 12.2, 5.2, H-8 β	47.9	C-6, C-9, C-11, C-14
9	–	19.9	–
10	–	26.5	–
11	1.35–1.38 m	28.1	–
12	1.34 m	35.7	C-11, C-13
13	–	45.2	–
14	–	49.0	–
15	1.68 m	32.8	C-13, C-16
16	1.17–2.05 m	26.5	–
17	1.65 m	52.2	–
18	1.01 s	18.0	C-13, C-14, C-15, C-17
19	0.44 d 4.2, H-19 <i>exo</i>	30.2	C-1, C-5, C-7, C-8, C-9, C-10
	0.65 d 3.9, H-19 <i>endo</i>		C-5, C-7, C-8
20	1.45 m	36.1	–
21	0.95 d 5.2	18.3	C-17, C-20, C-22
22	1.19–1.62 m	35.1	–
23	1.93–2.18 m	31.3	–
24	–	156.9	–
25	2.29 sept 6.8	33.8	–
26	1.08 d 6.8	21.8	C-24, C-25, C-27
27	1.07 d 6.8	21.9	C-24, C-25, C-26
28	3.80 d 10.3, H-28a	71.3	C-3, C-4, C-5, C-29
	3.59 d 10.5, H-28b		C-3, C-4, C-29
29	1.00 s	10.1	C-3, C-4, C-5, C-28
30	0.94 s	19.2	C-8, C-12, C-13, C-14
31	4.77 brs H-31a	106.1	C-25
	4.71 brd 1.2, H-31b		–

protons appeared at δ_{H} 0.44 (1H, *d*, $J = 4.2$ Hz, H-19 *exo*) and 0.65 (1H, *d*, $J = 3.9$ Hz, H-19 *endo*). The spectrum exhibited six methyl signals at δ_{H} 0.94 (3H, *s*, H-30), 0.95 (3H, *d*, $J = 5.2$ Hz, H-21), 1.00 (3H, *s*, H-29), 1.01 (3H, *s*, H-18), 1.07 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, H-27) and 1.08 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, H-26) and an exocyclic methylene group attached to a quaternary carbon C-24 at δ_{H} 4.77 (1H, brs, H-31a) and 4.71 (1H, brd, $J = 1.2$ Hz, H-31b). The only difference between **3** and **2** was that compound **2** had a hydroxymethylene group at C-4 instead of a methyl group in the cycloartenol skeleton. The chemical shifts of C-4 at δ_{C} 43.8 and C-29 methyl group at δ_{C} 10.1 led to locate the $-\text{CH}_2\text{OH}$ group at the C-28 position. Two doublets of an AB system were detected at δ_{H} 3.80 (1H, *d*, $J = 10.3$ Hz, H-28a) and 3.59 (1H, *d*, $J = 10.5$ Hz, H-28b). This assignment was further confirmed by the detection of HMBC correlations between H-28 and C-3, C-4 and C-29 (Table 2). The COSY, HSQC and HMBC experiments allowed identification of all protons of this compound and the corresponding carbons. It was well established that cycloartenol and some related cycloartenol isomers are bent structures (9 β , 19-cyclosterol) (Nes et al., 1998). The α -

equatorial stereochemistry of the hydroxymethylene 28 was confirmed by the NOE effects between the H-28 and the protons H-3 α , H-5 α and H-6 α observed in the NOESY spectrum (Fig. 2). Additionally, this spectrum showed correlations of H-19 *endo*, H-2 β and H-29 as well as between H-19 *exo* and H-11 β and H-18 confirming the β -axial position of both methyl 29 and 18. These spectral data allowed

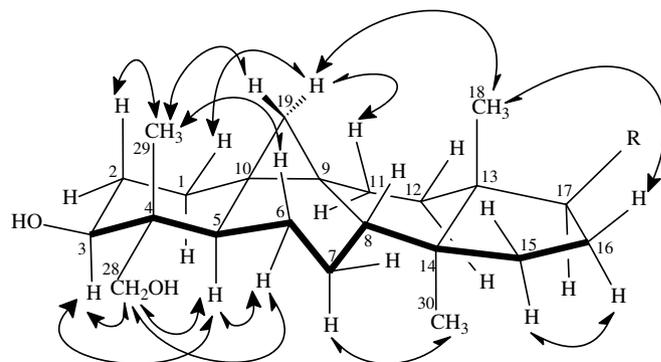
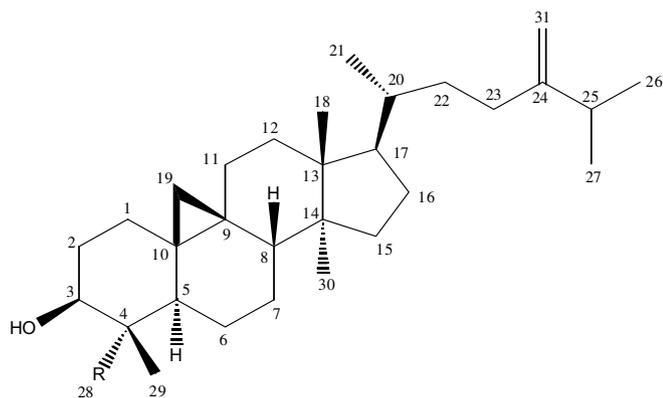


Fig. 2. Pertinent correlations observed in NOESY spectrum for compound **2**.

unambiguously the proposal of the following structure: 24-methylenecycloartane-3,28-diol (**2**). Although this compound was detected by radiochemical assay, during the C4-demethylation process of phytosterols in higher plants by maize microsomes (Pascal et al., 1993), this is the first time that it has been isolated from natural source as a pure product and its spectroscopic data is herein described.



- 2** R = CH₂OH
3 R = CH₃

To the best of our knowledge the present work, on the roots of *E. guyoniana*, has not performed elsewhere and led successfully to the isolation and structural elucidation of two new compounds, one cycloartane-type triterpene and another diterpenoid with tigliane skeleton. It allowed also the identification of seventeen natural products whose major constituents are triterpenoids often present in the genus *Euphorbia* and used as chemotaxonomic markers (Giner et al., 2000). This result is in good agreement with that of the previous studies made on this genus (Teresa et al., 1987; Giner et al., 2000; Öksüz et al., 1993).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

UV spectra were measured on a Shimadzu UV-3101 spectrophotometer and IR spectra were recorded using a Shimadzu model IR-470 spectrometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained on a Bruker Avance spectrometer and Bruker Avance 2 spectrometer equipped with dual crysonde in CDCl₃ (500 MHz and 125 MHz, respectively). 2D NMR experiments were performed using standard Bruker microprograms (XWIN-NMR version 2.6 software and TOPSPIN 1.3). Positive and negative mass spectra were performed using a Bruker Esquire Ion trap. HRMS spectra were performed on a Bruker Micromass Q-TOF. Optical rotations were measured on a P 3001 electronic polarime-

ter. CC was carried out on Kieselgel 60 (63–200 mesh) Merck. HPLC was performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, a P580 pump, a diode array detector UVD 340S and a chromeleon software. Column interchim (UP5 ODB.25M, 250 × 10 mm, 5 μm) was used for semi-preparative HPLC using an isocratic elution (acetonitrile–methanol: 50–50) at 25 and 35 °C, and a flow rate of 5 ml/min, the chromatogram was monitored at 205, 210 and 220 nm. Analytical and preparative (1 mm thickness) TLCs were carried out on silica gel plates (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck).

3.2. Plant material

Roots of *Euphorbia guyoniana* were collected on May 2003 in Biskra area (Algeria). The voucher specimen was identified by Dr. Bachir Oudjehih of Agronomic Institute of Batna University where a voucher was deposited under reference LCCE/03/153.

3.3. Extraction and isolation

Powdered roots (500 g) of *Euphorbia guyoniana* were macerated for three days with CHCl₃ (18 l) at room temperature. Filtration and evaporation to dryness gave 14 g of a brown gummy residue of which 10 g were chromatographed on silica gel column. Elution was performed with pure petroleum ether, petroleum ether–ethyl acetate: 99.5:0.5, 99:1, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70 and 0:100, then by a gradient methanol–ethyl acetate: 0.5:99.5, 1:99, 3:97, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 50:50 and 80:20. 434 fractions of 50 ml were collected according to absorption at 254 and 366 nm. TLC analysis of the fractions with sulfuric vanillin and heating at 150 °C, allowed the constitution of 33 fractions. Fraction 25 (180 mg) subjected to purification by silica gel column using a gradient ethyl acetate–petroleum ether (1:99, 3:97, 5:95, 10:90, 20:80, 50:50, 70:30) and ethyl acetate gave two sub-fractions 1 and 2. Sub-fraction 1 (45 mg) showing a major component, submitted to purification by silica gel column by elution with a gradient ethyl acetate–hexane (100% hexane, then increment of 2%) provided the pure compound **1** (3.5 mg). A preparative TLC (eluent: petroleum ether–ethyl acetate 60:40) was performed on the second sub-fraction 2 (95 mg) to allow isolation of the pure separated compounds **2** (4.5 mg) and **9** (3.8 mg). Fraction 13 (65 mg) was purified on a silica gel column. Elution was performed by a gradient of ethyl acetate–hexane (1:99, 3:97, 5:95 and 10:90). The pure compound **3** (35.4 mg) was obtained. Fraction 22 (145 mg) presented three major products at close *R_F*, and was further purified on silica gel column eluting with a gradient ethyl acetate–hexane (3:97, 5:95, 7:93, 10:90, 20:80, 40:60, 70:30) and ethyl acetate. After repeated silica gel column chromatography using the same solvents, three pure compounds were obtained **4** (8.6 mg), **7** (5.5 mg), and **8** (6.8 mg). Fraction 11 (90 mg) showing two major components was submitted to

purification by silica gel column under the same conditions to afford two products **5** (6.5 mg) and **6** (5.3 mg). Fraction 6 (90 mg) containing a mixture of products was purified on a silica gel column. Elution performed first with hexane then by a gradient of ethyl acetate–hexane (1:99, 3:97, 5:95, 7:93 and 10:90) afforded three compounds **10** (12 mg), **11** (13.2 mg) and **12** (18.5 mg). Purification of fraction **10** (80 mg) by semi-preparative HPLC, using an isocratic elution (acetonitrile–methanol: 50:50) led to the isolation of compounds **13** (14 mg), **14** (18.3 mg), **15** (9.1 mg) and **16** (25.6 mg). Fraction 15 (130 mg) was submitted to silica gel column chromatography using petroleum ether and a gradient ethyl acetate–petroleum ether (2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10:90, 20:80, 50:50, and 70:30). Fractions eluted with ethyl acetate 6% were combined and purified on silica gel column. Elution was performed with petroleum ether and a gradient ethyl acetate–petroleum ether (1:99, 3:97, 5:95, 7:93, 10:90, 15:85, 20:80 and 30:70) to provide three pure compounds **17** (6.5 mg), **18** (5.4 mg) and **19** (10.6 mg).

3.3.1. 4,12-Dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadecanoate (**1**)

Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} + 54$ (CHCl₃; *c* 0.21); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ): 236 (3.50), 335 (2.25) nm; IR (CCl₄) ν_{\max} : 3405, 2954, 2848, 1715, 1630, 1508, 1464, 1128, 1050 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃), see Table 1; ESIMS positive mode: *m/z* 593 [M+Na]⁺, 337 [(M+Na)-256]⁺; HRESIMS: *m/z* 593.4174 (calcd for C₃₆H₅₈O₅Na, 593.4176).

3.3.2. 24-Methylenecycloartane-3,28-diol (**2**)

White powder; m.p. 142–144 °C; $[\alpha]_D^{25} + 64$ (CHCl₃; *c* 0.38); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ): 205 (3.64) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3430, 2914, 2840, 1645, 1454, 1365, 1128, 1020 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Table 2; ESIMS positive mode: *m/z* 479 [M+Na]⁺, 935 [2M+Na]⁺; HRESIMS: *m/z* 479.3868 (calcd for C₃₁H₅₂O₂Na, 479.3860).

Acknowledgements

The authors thank Drs. G. Massiot and B. David of the Centre de Recherche sur les Substances Naturelles for fruitful discussion and to CNRS, Pierre FABRE Company and DRS (Algeria) for financial support.

References

Ageta, H., Arai, Y., 1983. Fern constituents: pentacyclic triterpenoids isolated from *Polypodium niponicum* and *P. formosanum*. *Phytochemistry* 22, 1801–1808.

Ahmed, A.A., Gherraf, N., El-Bassuony, A.A., Rhouati, S., Gad, M.H., Ohta, S., Hirata, S., 2006. Guyonianin A and B, two polyester diterpenes from Algerian *Euphorbia guyoniana*. *Nat. Prod. Commun.* 4, 273–279.

Appendino, G., Bellero, E., Tron, G.C., Jakupovic, J., Ballero, M., 1999. Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp *Cupanii*. *J. Nat. Prod.* 62, 1399–1404.

Appendino, G., Bellero, E., Tron, G.C., Jakupovic, J., Ballero, M., 2000. Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*. *Fitoterapia* 71, 134–142.

Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press, pp. 290–291.

Che, C.-T., Zhou, T.-X., Ma, Q.-G., Qin, G.-W., Williams, I.D., Wu, H.-M., Shi, Z.-S., 1999. Diterpenes and aromatic compounds from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry* 52, 117–121.

Ciccio, J.F., Hoet, P., 1981. Some constituents of the fruit and leaves of *Tabernaemontana longipes* Donn. *Smith. Rev. Latinoam. Quim.* 12, 88–90.

Crespi-Perellino, N., Garofano, L., Arlandini, E., Pinciroli, V., 1996. Identification of new diterpenoids from *Euphorbia calyptata* cell cultures. *J. Nat. Prod.* 59, 773–776.

Giner, J.-L., Berkowitz, J.D., Andersson, T., 2000. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplus*. *J. Nat. Prod.* 63, 267–269.

Gustafson, K.R., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Cardellina II, J.H., McMahon, J.B., Gulakowski, R.J., Cragg, G.M., Cox, P.A., Brinen, L.S., Clardy, J., Boyd, M.R., 1991. HIV inhibitory natural products. Diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* 47, 4547–4554.

Lima, E.M.C., Medeiros, J.M.R., Davin, L.B., 2003. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* 63, 421–425.

Ma, Q.-G., Liu, W.-Z., Wu, X.-Y., Zhou, T.-X., Qin, G.-W., 1997. Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry* 44, 663–666.

Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Checa, J., Palomares, E., Fraga, B.M., 1999. Jatrophone and tigliane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry* 52, 479–485.

McPhail, A.T., McPhail, D.R., Wani, M.C., Wall, M.E., Nicholas, A.W., 1989. Identity of maprounic acid with aleuritolic acid. Revision of the structure of maprounic acid: X-ray crystal structure of *p*-bromobenzyl acetylmaprounate. *J. Nat. Prod.* 52, 212–216.

Miana, G.A., Bashir, M., Evans, F.J., 1985. Isolation of prostratin from *Euphorbia cornigera*. *Planta Medica* 51, 353–354.

Nes, W.D., Koike, K., Jia, Z., Sakamoto, Y., Satou, T., Nikaido, T., Griffin, J.F., 1998. 9 β , 19-Cyclosterol analysis by ¹H and ¹³C NMR, crystallographic observations, and molecular mechanics calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5970–5980.

Öksüz, S., Shieh, H.-L., Pezzuto, J.M., Ozhatay, N., Cordell, G.A., 1993. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; Part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp *glareosa*. *Planta Med.* 59, 472–473.

Öksüz, S., Ulubelen, A., Barla, A., Voelter, W., 2002. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. *Turk. J. Chem.* 26, 457–463.

Ozenda, P., 1991. Flore et Végétation du Sahara. CNRS, Paris, pp. 329–331.

Pascal, S., Taton, M., Rahier, A., 1993. Plant sterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 11639–11654.

Quezel, P., Santa, S., 1963. In: Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vols. 1–2. CNRS, Paris, pp. 600–601.

Rèdei, D., Hohmann, J., Evanics, F., Forgo, P., Szabo, P., Mathé, I., 2003. Isolation and structural characterization of new, highly functionalized diterpenes from *Euphorbia serrulata*. *Helv. Chim. Acta* 86, 280–289.

Satyanarayana, V., Krupadanam, G.L.D., Srimannarayana, G., 1992. Tetracyclic triterpenes from the latex of *Euphorbia nivula*. *Fitoterapia* 63, 82–83.

Shi, H.-M., Williams, I.D., Sung, H.H.-Y., Zhu, H.-X., Ip, N.Y., Min, Z.-D., 2005. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med.* 71, 349–354.

Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Matsunaga, S., 1999. Obtusifoliol and related steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry* 51, 457–463.

Teresa, J.De.P., Urones, J.G., Marcos, I.S., Basabe, P., Cuadrado, M.J.S., Moro, R.F., 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 26, 1767–1776.

Yili, D., Yuting, L., 1992. Lipid soluble components of Zhungaerdaiji (*Euphorbia soongarica*). *Zhongcaoyao* 23, 570–572.

Abstract

This report is concerning the phytochemical study of two saharan plants belonging to the family Euphorbiaceae : *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. and *Euphorbia retusa* Forsk., used in traditional medicine in Algeria. This study led to the isolation by chromatographic methods (CC, CPP, HPLC) and characterization by spectroscopic methods (NMR, Mass, UV, IR) of 39 secondary metabolites. 37 from the isolated compounds are diterpenes and triterpenes.

20 compounds type diterpenes and triterpenes were isolated from the chloroform extract of the roots of *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. from which 2 new products with cycloartane and tiglane skeleton. The later is among ester phorbol derivatives known for their important cytotoxic and co-cancerogene properties.

The dichloromethane extract of the roots of *Euphorbia retusa* Forsk. allowed the isolation and characterization of 19 secondary metabolites from which 9 compounds are new : 3 esterified tetracyclic type triterpenes and 6 diterpenes with abietane lactone skeleton belonging to the rare class of diterpene lactones which possess a cyclopropane ring at 3 and 4 positions.

The structures of isolated compounds were established particularly by the use of NMR heigh-field 1D and 2D technics (^1H , ^{13}C *J*-modulated, COSY H-H, HSQC *J*-modulated, HMBC and NOESY), mass spectroscopy heigh resolution (HR-EI-MS and HR-ESI-MS), chemical transformation, measurement of rotatory power and comparison with literature data.

The identified compounds from *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. and *Euphorbia retusa* Forsk. present a lot of similarities and are in good agreement with *Euphorbia* plants which are containing diterpenes and triterpenes used as chemotaxonomic markers.

Key-words : Phytochemistry, Euphorbiaceae, *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut., *Euphorbia retusa* Forsk., Diterpenes, Triterpenes, NMR 1D and 2D, mass spectroscopy.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes sahariennes appartenant à la famille des Euphorbiaceae : *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk., sélectionnées d'une part, pour leur utilisation en médecine traditionnelle locale et d'autre part, pour le caractère endémique de l'espèce *Euphorbia guyoniana*. Ces deux euphorbes contiennent un latex blanc irritant. Cette étude a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (CC, CPP et CLHP) et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques (RMN, Masse, UV et IR) de 39 métabolites secondaires dont 37 composés de nature diterpénique et triterpénique.

20 composés ont été isolés de l'extrait chloroforme des racines de l'espèce *E. guyoniana* dont 2 nouveaux : un triterpène tétracyclique à squelette cycloartane et un diterpène polycyclique à squelette tiglane dérivé des esters de phorbol réputés pour leur cytotoxicité et propriétés co-cancérogènes prometteuses.

A partir de l'extrait dichlorométhanique des racines de l'espèce *E. retusa* 19 métabolites secondaires en majorité de type diterpènes et triterpènes, ont été identifiés. Parmi les composés isolés 9 sont nouveaux, il s'agit de 3 triterpènes tétracycliques estérifiés et 6 diterpènes à squelette abiétane lactone. Ces derniers appartenant à une rare classe de diterpènes lactones avec un noyau cyclopropane en positions 3 et 4, sont originaux.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY), par la spectrométrie de masse haute résolution (HR-EI-MS et HR-ESI-MS), par les méthodes de transformation chimique, par la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature.

D'un point de vue chimiotaxonomique, la composition chimique des deux espèces étudiées présente beaucoup de similitudes structurales et elle est en parfait accord avec les plantes du genre *Euphorbia* qui renferment particulièrement des diterpènes et triterpènes utilisés comme marqueurs chimiques.

Mots clés : Phytochimie, Euphorbiaceae, *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut, *Euphorbia retusa* Forsk., Diterpènes, Triterpènes, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse.