

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

**UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

MEMOIRE

Présenté par :

M^r : AICHI MOHAMMED

Pour l'obtention du Diplôme de Magister

En Chimie Organique

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE *ATRCTYLIS CANCELLA*

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mr. BOUZAHER YASSINE	Pr. U. Batna	Président
Mr. DIBI AMMAR	Pr. U. Batna	Rapporteur
Mr. M, R, YASSINE EL HILOU	Pr. C.U.O.El Bouaghi	Examineur
Mr. ABERKANE MOHAMMED CHERIF	M.C U.Batna	Examineur



Dédicace

Dédicace

JE DÉDIE CE TRAVAIL :

** A MES TRÈS CHERS PARENTS.

** A MA FEMME « MERI » QUI M'A DONNÉ UN GRAND
SOUTIENT MORAL GÉNÉREUX ET PRÉCIEUX.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de phytochimie et de synthèse organique du Département de chimie, Faculté des sciences, Université de Batna.

Le grand merci à Monsieur **DIBI AMMAR** Professeur à l'université de Batna de m'avoir proposé le sujet de ce mémoire et d'avoir porté une attention constante à mon travail et ses aboutissements. Il a assuré la direction de ce travail et je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **BOUZAHER YASSINE** Professeur à l'université de Batna de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail.

Je remercie vivement : Monsieur **ABERKANE MOHAMMED CHERIF**, maître de conférence à l'université de Batna, et Monsieur **M, R, YASSINE EL HILOU**, Professeur au C.U.O.El.Bouaghi qui ont bien voulu lire ce travail et faire partie du jury.

Je tiens à marquer un grand merci à Monsieur **MOHAMMED BENKHALED** professeur à l'université de Batna pour son aide.

Je tiens aussi à remercier Monsieur **MOHAMMED LAABASSI** professeur à l'université de Batna pour son soutien moral.

Je remercie particulièrement Monsieur **HABA HAMADA** pour sa disponibilité exemplaire et pour m'avoir fait profiter de ses compétences.

Mes remerciements vont aussi à Melle **BITAM FATIMA** pour sa participation à la réalisation de ce travail.

Enfin je remercie ma femme qui m'a beaucoup aidé.

ABREVIATION UTILISES

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CCE : Chromatographie sur couche épaisse.

COSY: Correlation Spectroscopy.

HSQC: Heteronuclear single quantum correlation.

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation.

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

TMS: Trimethylsilyl.

AcOEt : Acétate d'éthyle

MeOH : Méthanol

UV: Ultra violet.

MS : Spectrométrie de masse.

Enz : Enzyme

S: Singulet.

d: Doublet.

m: Multiplet.

q: Quadruplet.

Sep: Septuplet.

t: Triplet.

dd: Doublet de doublet.

ppm: Parties par millions.

Me : méthyle.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: TRAVAUX ANTERIEURES	
I-1- DESCRIPTION BOTANIQUE.....	2
I-1-1- La famille des composés.....	2
I-1-2- Le genre <i>Atractylis</i>	2
I-1-3- L'espèce <i>concellata</i>	3
I-2- LA RECOLTE.....	3
I-3- USAGE TRADITIONNEL.....	3
I-4- ETUDE CHIMIQUE ANTERIEURE	
I-4-1- Genre <i>Atractylis</i>	4
I-4-1-1- La production de la carboxyatractyloside et l'atractyloside	4
I-4-1-2- Neocorgmaboside, un flavone Di-C-glycoside isolé de l' <i>A.gummefera</i>	5
I-4-1-3- Etude chimique l'atractylode <i>chinensis</i> (DC)Koidz.....	5
I-4-1-4- Les glycosides isolés de l'atractylodes <i>japonica</i>	5
I-4-1-5- Les triterpènes et des acides gras isolés racines de l' <i>A.gummefera</i>	5
I-4-2- Espèce <i>concellata</i>	8
CAPITRE II : ETUDE DES STEROIDES ET DES STEROLS	
II- ETUDE DES STEROIDES ET DES STEROLS.....	10
II-1- ETUDE DES STEROIDES.....	10
II-1-1- Nomenclature.....	11
II-1-2- La stéréochimie.....	11
II-1-3- La biosynthèse des Stéroïdes.....	13
II-2- ETUDE DES STEROLS.....	15

II-2-1-		
Définition.....		15
II-2-2- La stéréochimie.....		17
II-2-3- Classification et répartition des stérols.....		18
II-2-4- Définition des phytostérols.....		18
II-2-5- Propriétés générales des phytostérols.....		20
II-2-6- Propriétés pharmacologique et l'emploi des phytostérols.....		20
II-2-7- Intérêt thérapeutique des stérols.....		21

CHAPITRE III : ISOLEMENT DES PRODUITS ET DETERMINATION DE LEURS STRUCTURES

III-1- Extraction.....		22
III-2- Séparation et purification.....		24
III-3- Détermination des structures.....		25
III-3-1- Identification du composé A.....		25
III-3-2- Identification du composé B.....		44

CAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE

IV-1-		
Généralités.....		52
IV-2- Contrôle chromatographique des extraits.....		53
IV-2-1- Extrait Etheropétrolique.....		53
IV-2-2-		
ExtraitChloroformique.....		53
IV-2-3- Extrait Méthanolique.....		53
IV-3- Séparation et purification.....		53
IV-3-1- Etude du lot N° 08.....		55
IV-3-2- Etude du lot N° 10.....		57
IV-4- Caractéristiques Spectrales.....		58
IV-4-1- Composé A.....		58

IV-4-2- Composé B.....	60
CONCLUSION GENERALE.....	63
BIBLIOGRAPHIE.....	64

Introduction générale :

Ce travail, consacré essentiellement à l'étude phytochimique des parties aériennes de *l'atractylus cancellata* et entre dans le cadre de notre programme de recherche sur les nouvelles molécules biologiquement actives.

Il est préférable de se baser sur l'intérêt des plantes à étudier notamment dans la médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier.

Ce mémoire reproduit l'étude phytochimique de l'espèce *cancellata* qui appartenant à la famille des composées qui représentent des gamopétales intérovariées tétracyclique de l'ordre des astérales, cette famille également appelée astéracées ou synanthérées est la plus importante familles végétales, avec les orchidées, Elle représente partout 10% au moins, de la flore est renferme plus de 1000 genres et 25000 espèces. Elle est définie par les deux caractères suivants :

- groupement des fleurs en capitules et soudure des étamines par leurs anthères
- Le capitule est entouré par des pièces appelées bractées dont l'ensemble forme l'involucre, ces bractées sont généralement sur plusieurs rangs et étroitement imbriquées.

Ce travail est traité selon le plan suivant :

CHAPI : travaux chimiques antérieurs réalisés sur la famille et le genre.

CHAPII : études des stéroïdes et des stérols.

CHAPIII : isolement des produits et détermination de leurs structures.

CHAPIV : partie expérimentale.

I-1-DESCRIPTION BOTANIQUE

I-1-1-LA FAMILLE DES COMPOSEES :

Les composées, sont représentées dans les régions tempérées et froides du globe [1], sont principalement des herbes, vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des herbes, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes.

Les feuilles sont le plus souvent alternées, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées [2].

Selon Gaussen, les composées sont réparties en fonction de la forme de leurs fleures en deux types : l'un ayant des fleures à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées [3].

Cette famille se distingue par l'absence de poils sur leurs parties végétatives et par le manque de paillettes sur le réceptacle de leurs capitules [4].

I-1-2-LE GENRE ATRACTYLIS :

* Plantes très épineuses, à aspect de petits chardons, à capitules entourés par les feuilles supérieures (dites feuilles involucelles) et dont les bractées externes sont elles-mêmes épineuses (souvent bordais d'un rang régulier d'épines bifurquées), achaines velus, surmontés d'une aigrette blanche très fournie [5].

* Plantes annuelles à racine grêle, à tiges ramifiées dès la base, à rameaux très étalés et peu épineuses, feuilles très différentes des autres, à divisions étroites forment un peigne régulier à Dents fines, bractées portant une longue pointe, fleures purpurines.

* Plantes vivaces à tiges épaisses, dressées, à rameaux très feuillés, feuilles toutes très épineuses, feuilles peu différentes des autres [5].

I-1-3- L'ESPECE CANCELLATA :

L'espèce *cancellata* a des capitules sans ligules à la périphérie, Il existe dans la région méditerranéenne mais ne dépasse pas au sud la zone pré désertique, ou il est d'ailleurs commun [6].

I-2- RECOLTE :

Nous avons récolté les parties aériennes de *Atractylis cancellata* au mois de mai 2005 à « ALKANTARA », situé à 50 km au sud-ouest de Batna. La plante a été identifiée par le Pr « Oudjehih Bachir » Professeur au Département d'agronomie, Faculté des sciences, Université de Batna.

I-3- USAGE TRADITIONNEL :

Les usages sont les mêmes sur tout le territoire.

La racine desséchée (un petit fragment de 3 cm environ) est utilisée à l'intérieur, après cuisson prolongée dans l'eau et essorage (pour déduire sa force négative), pour arrêter les hémorragies, faciliter les accouchements, purger et faire vomir.

Elle est prescrite également, selon le même protocole, dans les traitements de l'épilepsie et de l'hystérie.

En usage externe, elle intervient, en frictions ou en cataplasmes, dans les traitements de la gale, des taches de rousseur sur le visage, des boutons d'acné, des chancres syphilitiques, des abcès et des furoncles.

On ajoute aussi sa décoction au henné, en mélange avec du nard, de la lavande et de la rose, pour les soins de la chevelure.

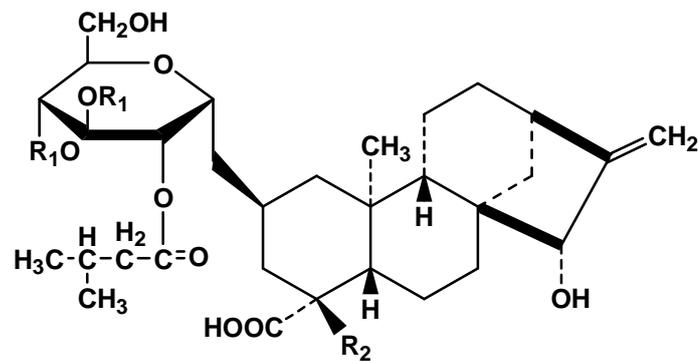
En fumigations, on l'emploie dans les traitements des rhumes de cerveau, des vertiges, des céphalées, des paralysies et des accouchements difficiles [5].

I-4- ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES :

I-4-1- Genre *Atractylis* :

I-4-1-1- La production de la carboxyatractyloside et l'atractyloside :

La culture de la suspension cellulaire a été grandie à partir de *l'atractylis gummifera* dans plusieurs milieux de culture. La biomasse accumulée a différé dans les cultures de la medias. La présence de la carboxyatractyloside et l'atractyloside a été examinée en relation avec différente culture de la medias au moyen de la HPLC. Carboxyatractyloside a été identifiée dans la biomasse produite uniquement dans un seul milieu de culture utilisée, cependant l'atractyloside n'était pas présent en quantité détectable dans n'importe qu'elle biomasse.



1. $R_1 = SO_3H$, $R_2 = H$: Atractyloside
2. $R_1 = SO_3H$, $R_2 = COOH$: Carboxyatractyloside

Atractylis gummifera (composées) pousse dans les régions méditerranéenne, ces racines contiennent *l'atractyloside* [6], un glucoside toxique qui bloque la translocation des nucléotides adénine à travers la membrane mitochondrial [7], et la carboxyatractyloside responsable d'une grande toxicité in vivo 10 fois supérieur que l'atractyloside.

Dans ce présent travail, des cultures cellulaires en suspension dans 4 milieu différent et utilisées en présence de l'atractyloside, le carboxyatrctyloside et enfin examiné à l'aide de l'HPLC.

Les grains stérilisés de *l'atractylis gummifera* étaient germés dans un milieu solide (Nitsch et Nitsch).

I-4-1-2- Neocorymboside, un flavone Di-C-glycosile isolé de l'A gummifera :

Neocorymboside, un nouveau flavone glycosilé isolé des racines de l'*atractylis gummifera* a montré qu'il correspond au composé : 6-C- β -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-galactopyranosylapigenine.

L'*atractylis gummifera* pousse dans les régions méditerranéenne sauf dans le littoral français. Ces racines contiennent le composé atractyloside connue par sa toxicité envers les cellules hépatiques. Egalement l'orientin, homoorientin, et isoschaftoside ont été trouvés dans les feuilles de l'*atractylis gummifera* [8].

L'étude a été focalisée sur l'identification d'un composé nouveau dit : flavone di-C-glycosylé isolé des racines. L'isomère de ce dernier est α -L-arabinopyranosyl a été isolé des racines de l'espèce *Carlina corymbosa*[9], et il est connu *Carlina* et *atractylis* sont intimement reliés systématiquement.

Le composé en question a été isolé de la fraction butanolique de l'extrait méthanolique de la poudre des racines sèches collectées en Algérie. Le spectre UV et les déplacements suggérés avec des hydroxyles libres en position 4, 7 et 5 [10]. La chromatographie et les propriétés hydrolytiques caractérisent un C-glycoside, aucun sucre n'a été obtenu après l'hydrolyse en milieu acide.

I-4-1-3- Etude chimique de l'atractylodes chinensis (DC) Koidz :

Les constituants chimiques ont été isolés et purifiés à partir d'une extraction et des techniques chromatographiques, les structures ont été identifiées et caractérisées en utilisant les propriétés physico-chimiques et les analyses spectrales, (04) composés ont été détectés comme suit :

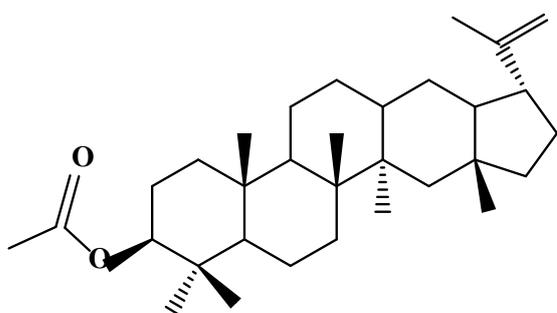
- **2-phenylethyl β -rutinoside**
- **Wogonosidemethyl ester**
- **Proteocatechualdehyde**
- **Protocatechuic acide**

I-4-1-4- Les glycosides isolés de l'*Atractylodes japonica* :

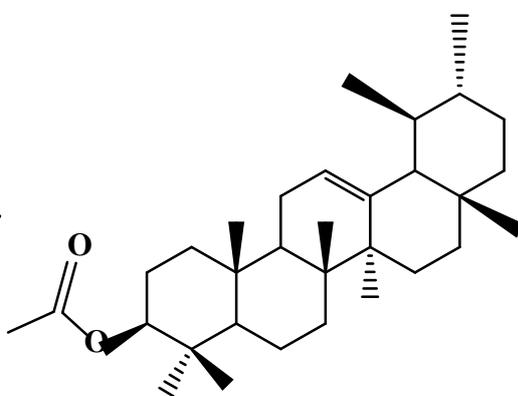
A partir de la solubilité dans l'eau terré de l'extrait méthanolique des racines sèches de l'espèce de l'*Atractylodes japonica*, Cinq nouveau sesquiterpènes glycosilés ont été isolés et dix composés connus leurs structures été identifiées par des méthodes d'analyses spectral.

I-4-1-5- Les triterpènes et des acides gras isolés des racines de l'*atractylis gummifera* :

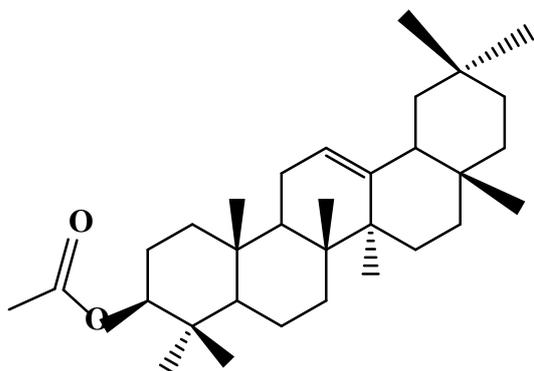
Les analyses par GC-MS et les milieux de pression chromatographique ont montrés la présence de (13) triterpènes dont les structures sont données ci-après :



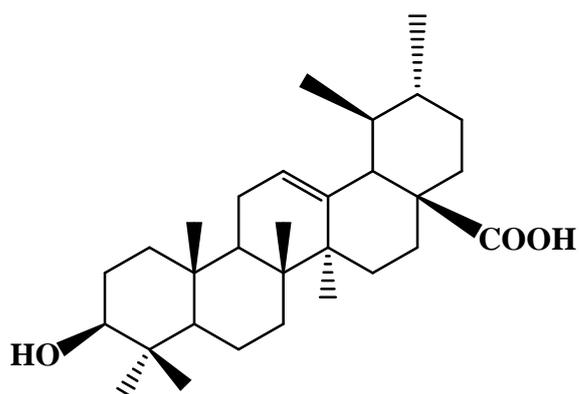
Lupenyl acetate



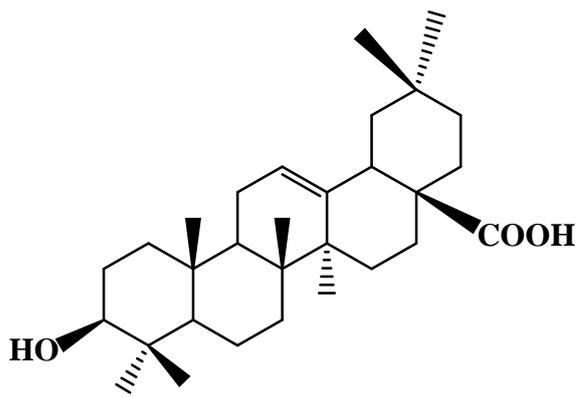
α -Amyrin acetate



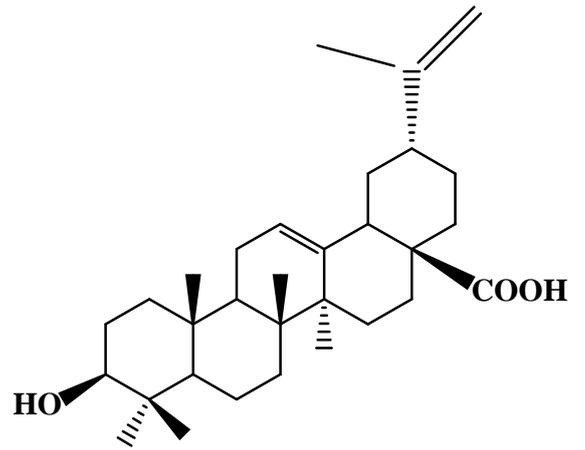
β -Amyrin acetate



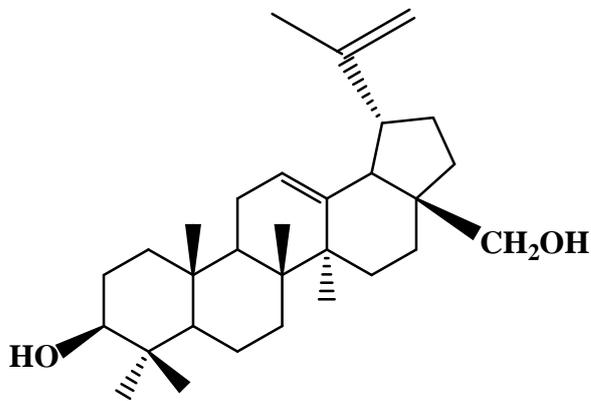
Acide ursolique



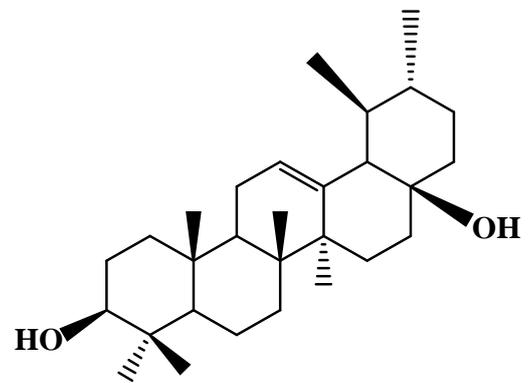
Acide oléanolique



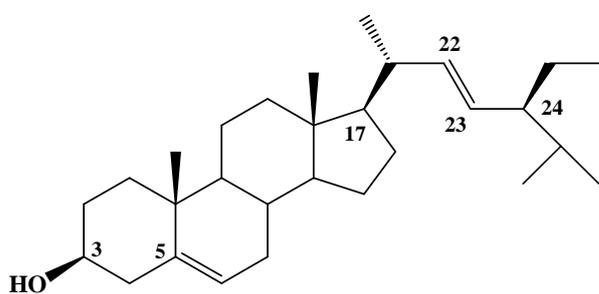
Acide betulique



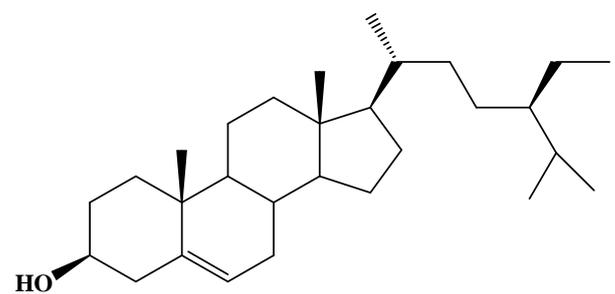
Betulin



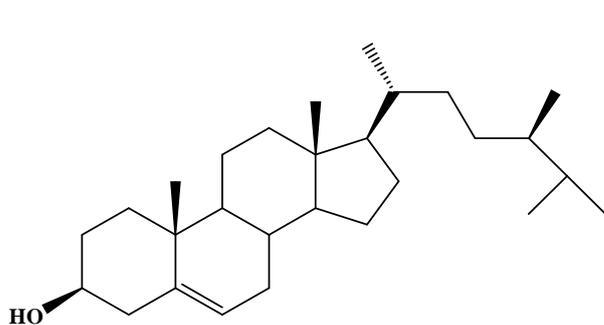
Uvaol



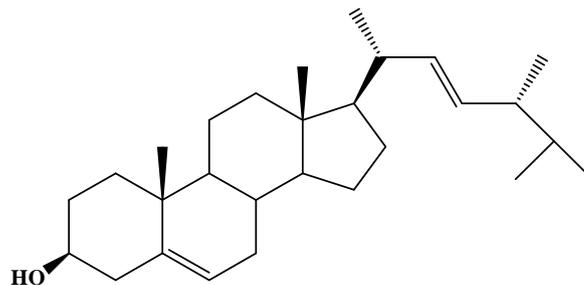
Stigmastérol



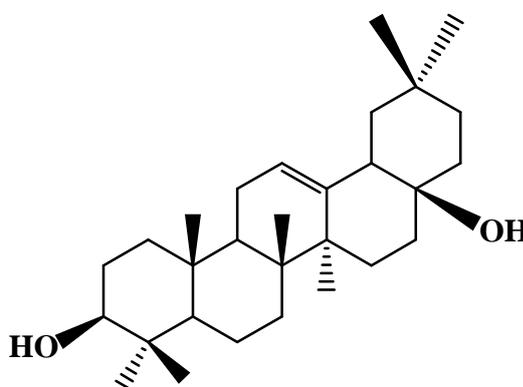
β-sitostérol



Campesterol



Brassicasterol



Erythrodrol

I-4-2- Espèce cancellata :

Les recherches bibliographiques exhaustives réalisées sur l'espèce *cancellata* ont montré que l'espèce en question n'a fait l'objet d'aucune étude antérieure.



Atractylis Cancellata

II- ETUDE DES STEROIDES ET DES STEROLS :

II-1- Etude des stéroïdes

Le mot stéroïde tire son origine du mot grec « stéréos » signifiant « solide » et désignant toutes les molécules qui se caractérisent par la présence d'un gonane (cycle perhydrocyclophénanthrène) [11, 12, 13] (Fig.1.)

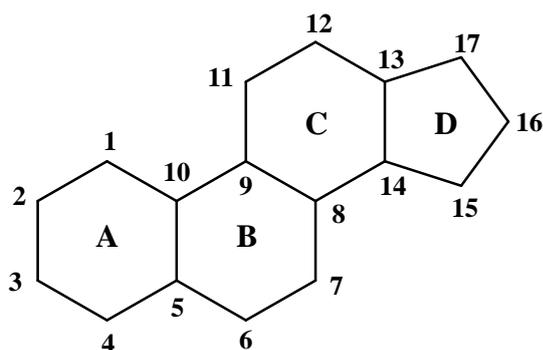
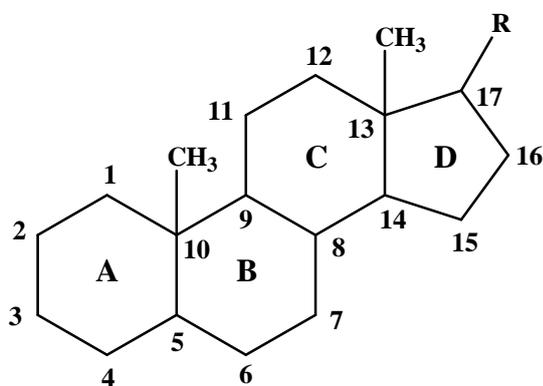


Figure -1-

-Les stéroïdes représentent un ensemble des molécules dérivées du cholestérol ou ses homologues particulièrement abondants dans les végétaux et les animaux, Ses substances naturelles présentent une sous classe de triterpènes, dont la structure chimique de base est un système tétracyclique, Les quatre cycle désignés par les lettres A, B, C, D et la numérotation commence par le cycle en bas à gauche [14, 15, 16] (Fig.2.)



Stéroïde (R = Chaîne latérale)

Figure -2-

II-1-1- Nomenclature

La nomenclature des stéroïdes est basée sur la chaîne latérale liée au cycle **D** [17, 18, 19] (fig. 3).

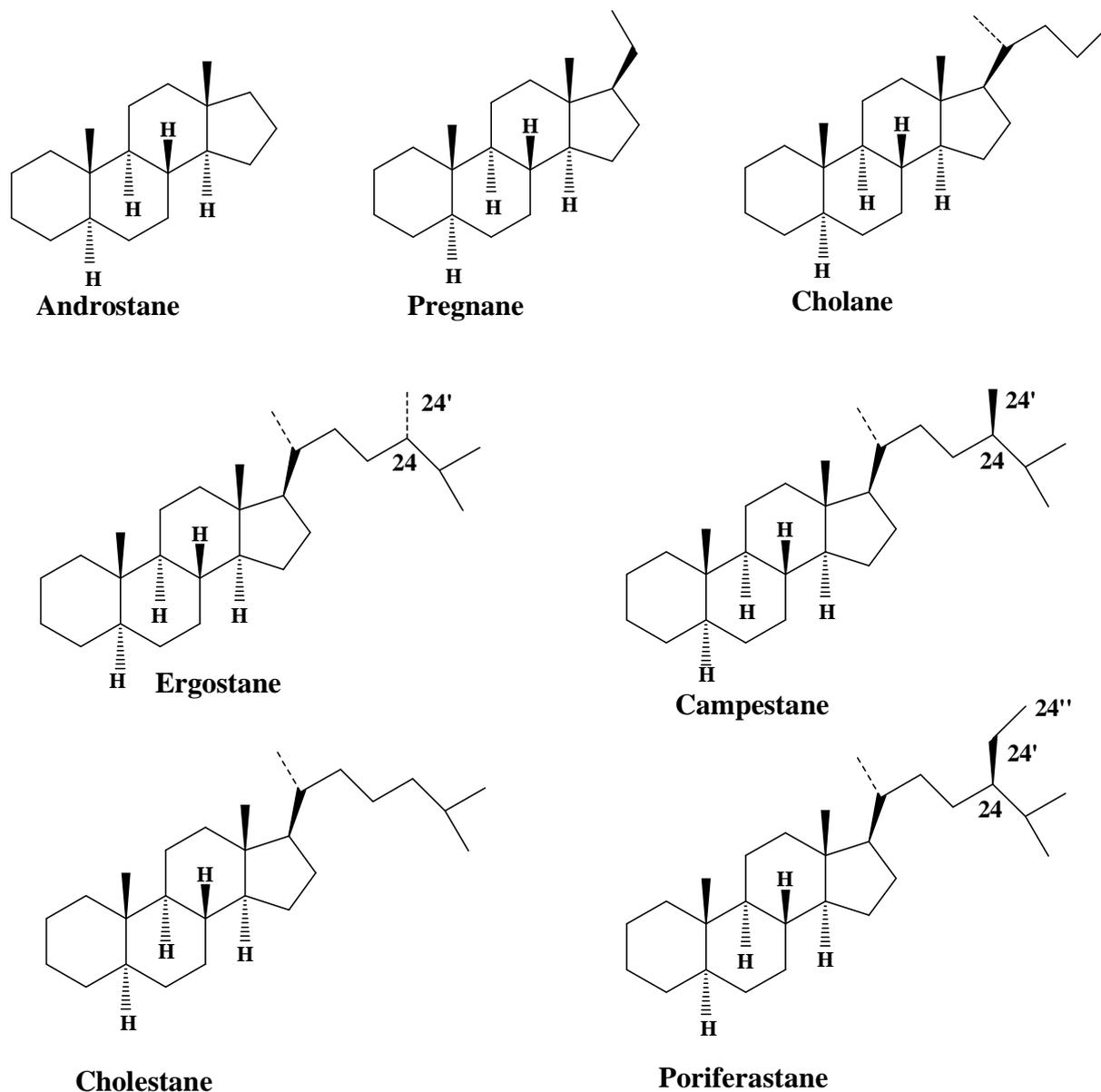


Figure-3-

II-1-2- La stéréochimie

Le rapport entre la stéréochimie et l'activité biologique est plus remarqué dans le champ stéroïdique. La stéréochimie des stéroïdes au niveau des carbones C-5 et C-14 est représentée par deux lettres grecques α et β .

α : présentant la face inférieure du cycle

β : présentant la face supérieure du cycle

*Dans les stéroïdes naturels l'orientation de la chaîne latérale est le plus souvent β et la jonction entre les cycles B et C est toujours –trans- ainsi que la jonction entre les cycles C et D est souvent de type –trans- avec l'exception pour les hétérosides cardiotoniques [12, 17, 19] (fig.4.) :

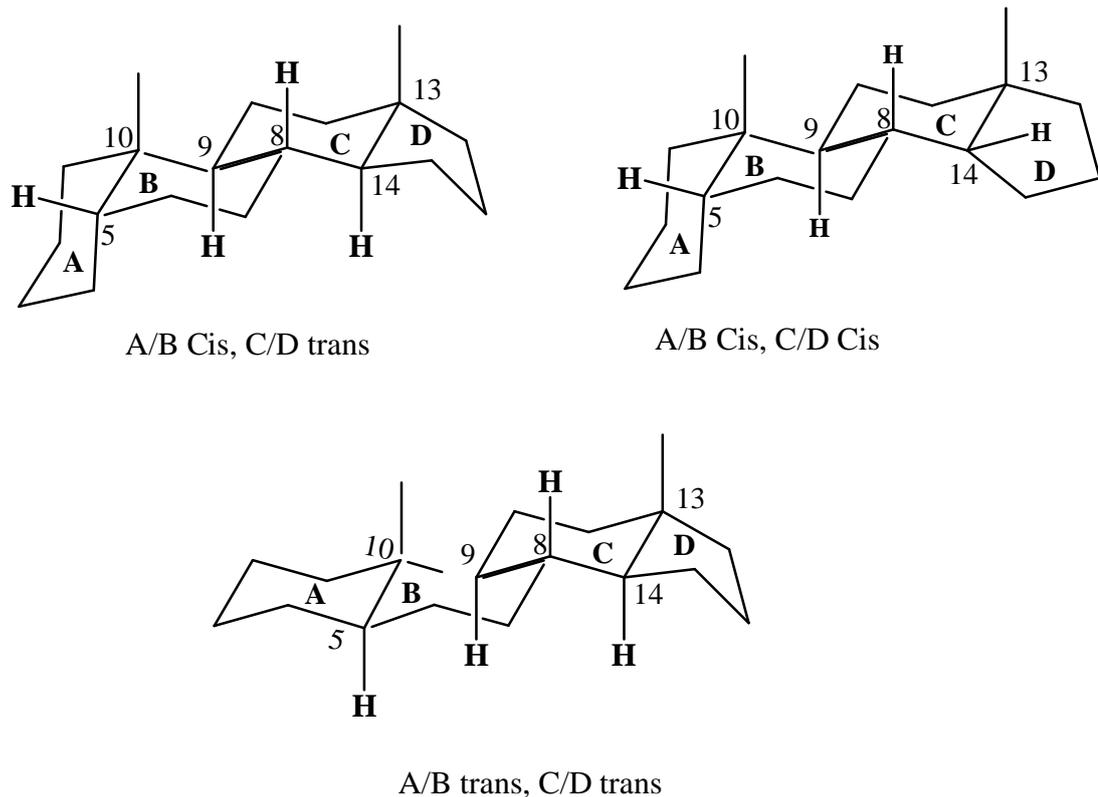


Figure-4-

Les jonctions trans. Dans les trois cycles A, B et C produisent une molécule rigide (fig.5) :

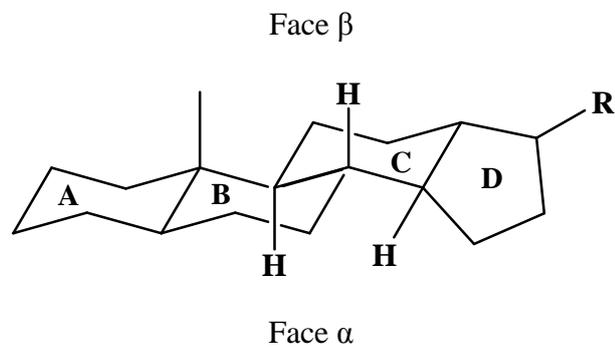


Figure-5-

II-1-3- La biosynthèse des stéroïdes

L'oxydation de la molécule appelée le squalène avec une enzyme qui contient un cycle oxacyclopropane conduisent un stéroïde comme suit :

L'ouverture enzymatique, catalysée par un acide, du cycle de l'oxa cyclopropane est suivie de quatre étapes où se forment de liaisons C-C en cascades, selon un précurseur biologique du cholestérol. De telles cyclisations (Cyclisation biochimique des alcènes) ont également été réalisées au laboratoire.

La transformation du squalène en cycloartinol précurseur des autres stérols végétaux ou phytostérols se fait en plusieurs étapes :

L'oxydation (en présence de NADPH et O₂) conduisent au squalène 2,3-oxyde, le quel sous l'action d'une squalène cyclase se transforme en cycloartinol, puis se produisent des hydrogénations partielles, avec une création d'une fonction alcool et la perte de trois groupement méthyles [20, 21, 22] (fig.6.)

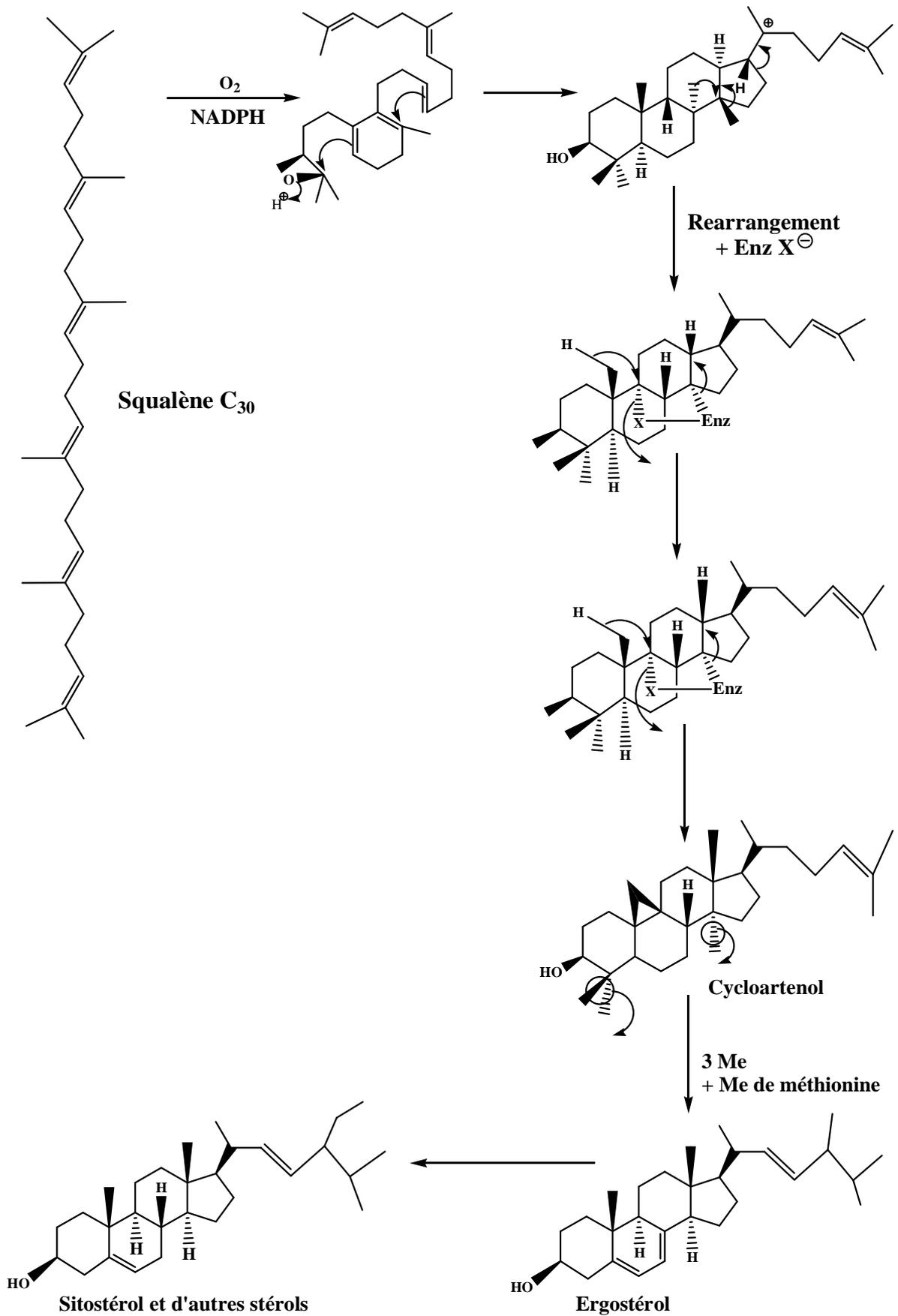


Figure-6- : Biosynthèse des stérols

II-2- ETUDE DES STEROLS :

II-2-1- Définition :

Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes, formant ainsi tout un groupe d'alcools solides [12, 27]. Ils sont également un constituant essentiel des membranes cellulaires. On les trouve aussi bien chez les animaux que dans les végétaux.

Les stérols comportent au niveau de leurs structures un hydroxyle en position C-3 d'orientation β , éventuellement des doubles liaisons. En générale ils comportent une double liaison entre les atomes de carbone C-5 et C-6 ainsi q'une chaîne latérale rattachée au sommet C-17 du noyau polycyclique dérivé du phénanthrène [20, 23, 24].

Tous les stérols ont en commun le même noyau (fig.7.) et ils diffèrent par la chaîne latérale.

Le cholestérol est exclusivement d'origine animale [26, 27] (fig.8.).

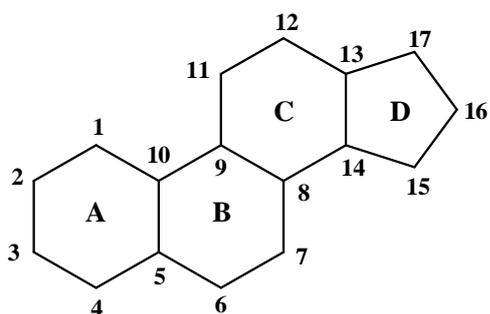


Figure-7- : Noyau Stérol

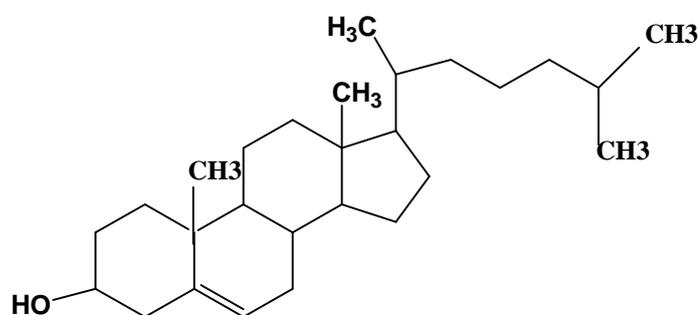
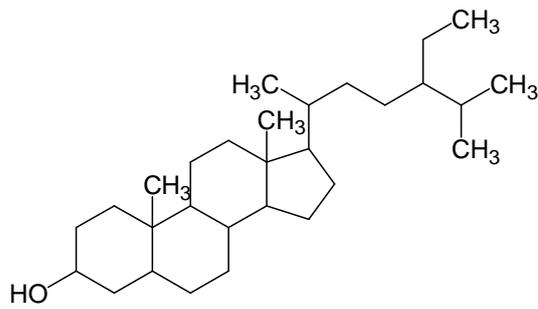
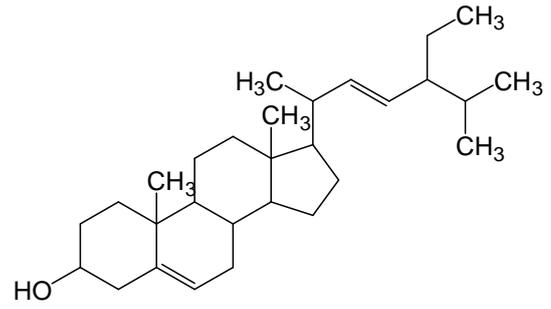


Figure-8- : Cholestérol

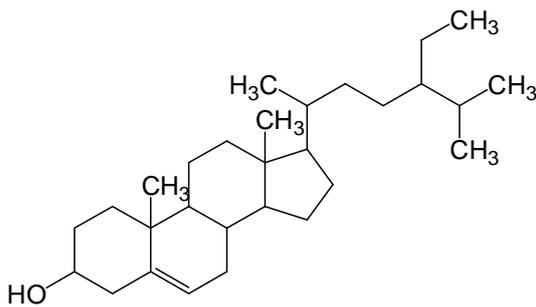
** Bien que le cholestérol ne se trouve pas dans les plantes, on y rencontre plusieurs stérols apparentés, connus sous le nom de phyostérols. Le plus important est l'ergostérol, qui par l'action des radiations de la lumière ultra violette donne le calciférol ou la vitamine D2. Cette substance possède des propriétés antirachitiques analogues à celles de vitamine D.



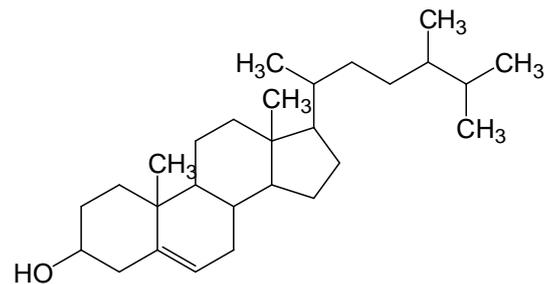
Stigmastanol



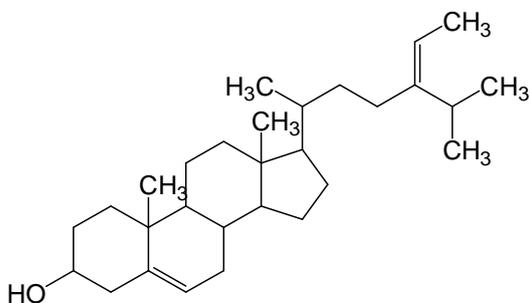
Stigmastérol



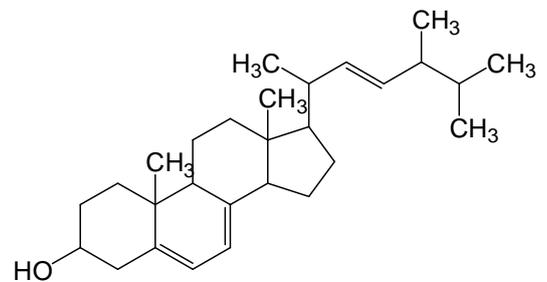
β-Sitostérol



Campestérol



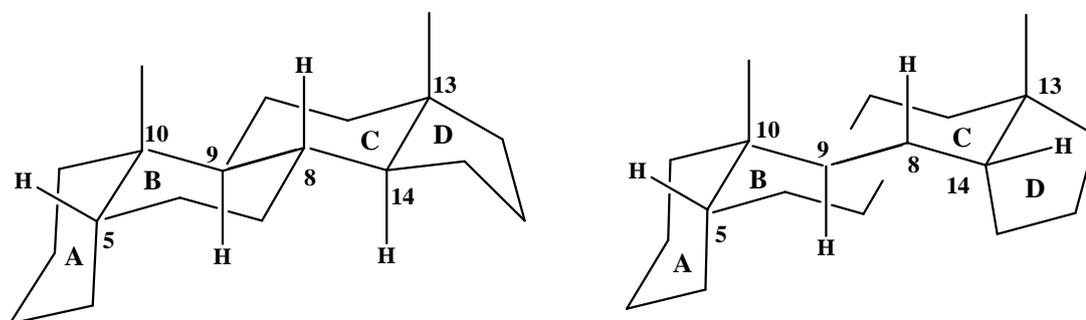
Fucostérol



Ergostérol

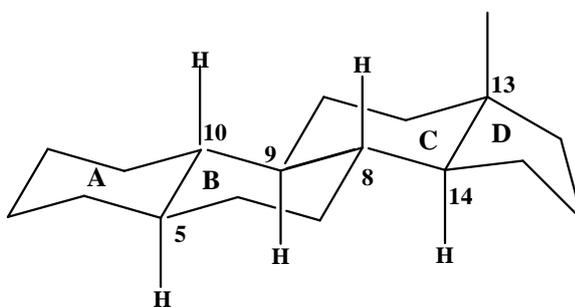
II-2-2- STERIOCHIMIE:

Les différences stéréochimiques les plus observées dans la structure des stérols ont trait à l'orientation de l'hydroxyle sur le carbone 3 et à la configuration des cycles condensés A et B. L'hydroxyle sur le carbone 3 est **cis** par rapport au groupement méthyles angulaires dans les stérols naturels. On désigne cette configuration par la lettre grec β et l'orientation inverse ou **trans** par la lettre grec α . Dans les stérols naturels, l'orientation de la chaîne extra nucléaire et le plus souvent β et la configuration habituelle des cycles condensés B/C et D/C est trans. La forme cis peut être préparées synthétiquement [22] (fig.9.).



A/B Cis, C/D trans

A/B Cis, C/D Cis



A/B trans, C/D trans

Figure-9-

II-2-3- CLASSIFICATION ET REPARTITION DES STEROLS :

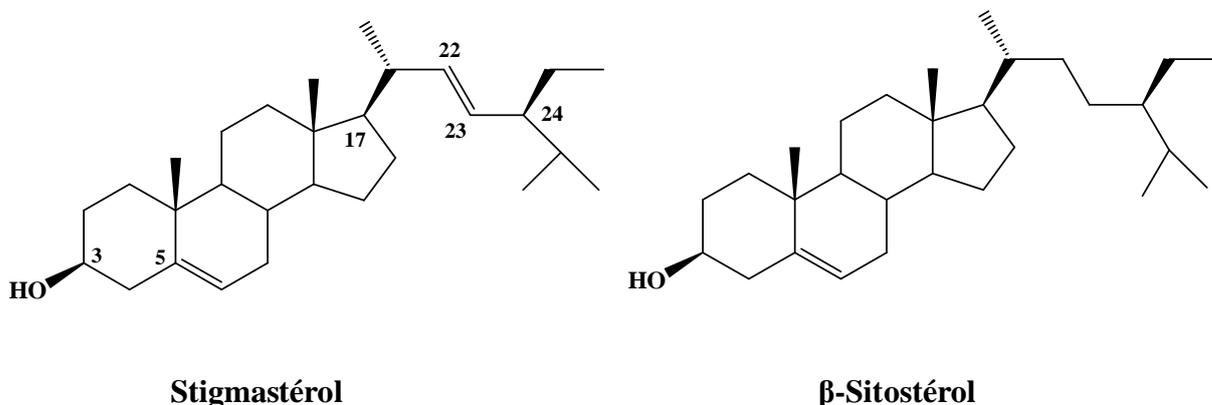
Il n'existe, à vrai dire, aucune classification spéciale de stérols. Selon l'origine biologique [12, 28, 29]. On a pris l'habitude de répartir les stérols en :

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

Notre étude étant consacrée à des plantes supérieures, nous nous sommes intéressée exclusivement aux **phytostérols**.

II-2-4- DEFINITION DES PHYTOSTEROLS :

Les phytostérols qui sont des composés naturellement présent dans la fraction lipidique des plantes supérieures et apparaissant ainsi comme les graisses végétales identiques en structure au cholestérol (graisse animale). Peuvent différer également des stérols par l'alkylation supplémentaire de la chaîne latérale en C24. Le stigmastérol, la β -sitostérol, le campestérol, et le brassicastérol, en sont la meilleure illustration (fig.10).



II-2-5- PROPRIETES GENERALES DES PHYTOSTEROLS :

Ce sont des solides cristallins à point de fusion élevée (de l'ordre de 100 C°), insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool à froid mais soluble à chaud. Ils se dissolvent dans le chloroforme, le benzène, la pyridine. Ils sont doués de pouvoir rotatoire. Les phytostérols de même que les stérols donnent facilement des esters avec les acides, en dehors des acides gras naturels qui sont unis aux stérols dans les lipides [12, 28]

II-2-6- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET L'EMPLOI DES PHYTOSTEROLS :

Les phytostérols ainsi que les stérols en générale, possèdent une gamme étendue d'effets thérapeutiques. Plusieurs études ont montré que ces derniers réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. Il en ressort ainsi qu'il nécessaire de consommer des stérols quotidiennement afin de maintenir leur concentration dans notre organisme. Ce dernier ne pouvant les produire lui-même. Comme ces graisses végétales ont une structure semblable à celle de cholestérol, il se peut qu'elles ralentissent son absorption, réduisant ainsi la quantité de cette substance dans l'organisme. Certains stérols se sont montrés très actifs sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate [30, 31].

Des phytomédicaments constitués majoritairement de β - sitostérol sont disponibles depuis plusieurs années sur le marché allemand. Ils sont prescrits pour améliorer les symptômes de l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH). IL n'a pas été observé d'effets secondaires, même pour les doses les plus élevées (130mg/j) pendant six mois [31, 32].

II-2-7- INTERET THERAPEUTIQUE DES STEROLS :

On peu résumer les fonctions biologiques des stérols comme suit [21, 27] :

** Dans les plantes, algues, champignons, ainsi que chez les animaux, le cholertérol est la source de tous les métabolites de types stéroïdes.

** Les stérols ont un rôle vital dans la maintenance de l'intégrité structurale de la plupart des structures membranaires des organismes.

** Ils assistent aussi dans la régulation de la perméabilité de ces membranes aux différents ions

** Tous les eucaryotes synthétisent les stérols, ou en ont besoin pour leur diététique.

III-1- EXTRACTION :

La poudre grossière d'une masse 800 grammes des parties aériennes de la plante préalablement séchée, est réduite en poudre, puis mise à macérer pendant 48 heures dans l'éther de pétrole (10 litres) sous agitation, après filtration et élimination du solvant, 18g de l'extrait éthero-pétrolique ont été obtenus.

Le résidu est mis de nouveau à macérer et lixivier dans le chloroforme (10 litres) pendant 48 heures aussi. La filtration du mélange donne 15g de l'extrait chloroformique.

Une autre fois, la macération et lixiviation du résidu dans le méthanol (10 litres) sous agitation, puis filtration et enfin l'évaporation à sec du filtrat, à permis d'obtenir 26g de l'extrait méthanolique.

Le schéma suivant montre les opérations d'extraction de notre plante « partie aériennes de *Atractylis cancellata* » (fig.11).

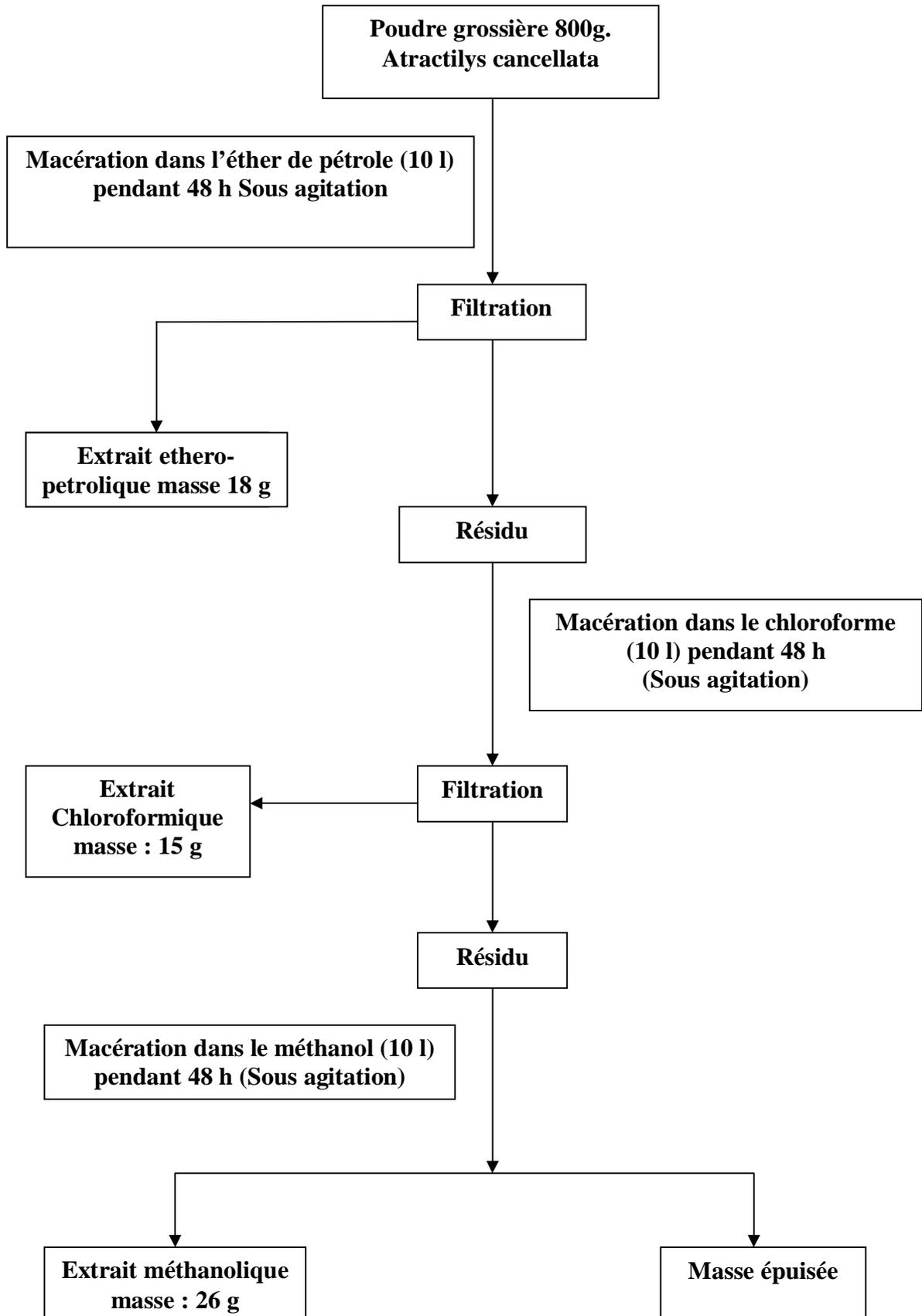


Figure-11-

III-2- SEPARATION ET PURIFICATION :

L'examen par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits éthero-pétrolique, chloroformique, et méthanolique, montre un mélange important observé pour les deux extraits éthero-pétrolique et méthanolique. Notre choix s'est porté sur l'étude de l'extrait éthero-pétrolique, et ceci pour des raisons liées à la disponibilité des solvants.

10 grammes de l'extrait éthero-pétrolique, ont été mis à chromatographie sur colonne de gel de silice en phase et pression normale. L'élution est réalisée successivement, par des solvants à polarité croissante : éther de pétrole, éther de pétrole / acétate d'éthyle, l'acétate d'éthyle / méthanol, et enfin méthanol pur. Des fractions de 50 ml ont été prélevées à chaque fois et examinées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont visualisées sous la lumière UV (254 nm – 366 nm). Puis révélées à la vanilline sulfurique, après rassemblement des fractions présentant des similitudes, donnant ainsi 13 lots.

Le lot 8 montre, en CCM, un composé majoritaire invisible en UV et donnant une coloration violette. Après révélation à la vanilline sulfurique. L'élution est réalisée par l'éther de pétrole/ acétate d'éthyle à 95/05. Ce fractionnement suivi une autre purification par chromatographie sur couche épaisse (CCE) à permis d'obtenir à l'état pur un produit pur de masse 30 milli grammes, (composé **A**).

Le lot 10 de même extrait (extrait éthero-pétrolique). L'élution est à chaque fois réalisée par un gradient des solvants : éther de pétrole / acétate d'éthyle 85/05 – éther de pétrole / acétate d'éthyle 80/20 et après révélation à la lumière (254 nm – 366 nm), puis révélées à la vanilline sulfurique permis de récupérer le composé **B**. Ce dernier obtenu a nécessité une purification par chromatographie sur couche épaisse (CCE). Enfin 20 milligrammes du composé **B** ont été obtenus.

III-3- DETERMINATION DES STRUCTURES :

Les deux composés isolés **A** et **B** ont été identifiés par les analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN ^1H , ^{13}C et 2D ainsi que la spectrométrie de masse.

III-3-1- IDENTIFICATION DU COMPOSE A :

** Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV (254nm – 366nm).

** La couleur de ce composé après révélation à la vanilline (H_2SO_4) est **rose foncée**.

** Possède une masse moléculaire = 414.

Le spectre de masse : le spectre de masse du composé A obtenu en ESI (électrospray ionisation) donne un pic à $m/z = 437$ pour l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ en mode positif et présente un pic d'ion moléculaire à $m/z = 413$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ en mode négatif.

On dit qu'il possède une masse moléculaire = 414 g/mole correspondant à une formule brute en $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$.

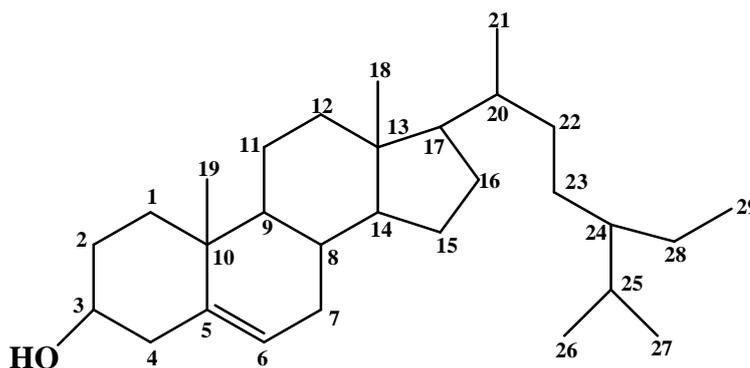
Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif montre des fragments à :

1/ $m/z = 405$ $[\text{M}-32]^+$ correspondant à la perte d'un groupement CH_3 et d'un OH.

2/ $m/z = 377$ $[\text{M}-60]^+$ correspondant à la perte d'un groupement C_2H_4 de la chaîne latérale très caractéristiques des stérols.

3/ $m/z = 307$ $[\text{M}-130]^+$ correspondant à la perte de C_8H_{17} de la chaîne latérale également caractéristiques des stérols et le groupement OH (hydroxyle).

DONC : l'ensemble des données spectrales permet de proposer pour le composé **A** la structure de : **β -sétostérol : Ethyl -24 Cholestène-5 ol-3.**



β -Sitostérol

En effet le spectre RMN ^1H enregistré à 500 MHz dans le chloroforme deutéré montre :

- Deux signaux singlets résonnent à $\delta_{\text{H}} = 0,73$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm correspondant respectivement aux deux méthyles : CH_3 -18, CH_3 -19.
- un doublet à $\delta_{\text{H}} = 0,97$ ppm correspondant au groupement CH_3 -21.
- un signal multiplet à $\delta_{\text{H}} = 0,86$ ppm, $0,87$ ppm, $0,89$ ppm attribué aux méthyles : CH_3 -26, CH_3 -27, CH_3 -29.
- un signal doublet large à $\delta_{\text{H}} = 5,41$ ppm caractéristique d'un proton oléfinique H-6.
- un signal singlet à $\delta_{\text{H}} = 0,73$ ppm et attribuable au méthyle CH_3 -18.
- un signal singlet résonne à $\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm correspondant au CH_3 -19.
- enfin on observe un signal septuplé ($J = 10,5$ Hz, $J = 5,4$ Hz) résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,58$ ppm s'intégrant pour un proton, C'est le proton H-3.

D'autre part l'expérience $\text{COSY}_{\text{H-H}}$ montre les corrélations entre :

- a/ le proton H-3 et le proton résonne à $\delta_{\text{H}} = 2,31$ ppm correspondant au proton H-4.
- b/ le proton H-3 et les deux protons résonnent à $\delta_{\text{H}} = 1,56$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,90$ ppm correspondant respectivement aux : H-2a, H-2e.
- c/ le proton H-6 et deux protons résonnant à $\delta_{\text{H}} = 2,04$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,57$ ppm correspondant aux deux protons : H-7a et H-7e.
- d/ le proton H-1a et le proton H-1e résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,12$ ppm .
- e/ les protons H-2a et H-2e résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,56$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 1,90$ ppm respectivement.
- f/ le proton H-28 et les protons CH_3 -29 résonnant à $\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm.
- g/ le proton H-25 et les protons de groupement méthyles suivant : CH_3 -26 , CH_3 -27 résonnant à $\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm.

Le spectre RMN ^{13}C montre la présence de 29 atomes de carbones, et six signaux méthyles résonnant à : $11,8$ ppm , $11,9$ ppm , $18,8$ ppm , $19,0$ ppm , $19,4$ ppm , $19,8$ ppm attribués aux méthyles suivants : CH_3 -18 , CH_3 -29 , CH_3 -21 , CH_3 -26 , CH_3 -19 , CH_3 -27.

Et montre également :

- trois carbones quaternaires à : $\delta_C = 140,7$ ppm, $\delta_C = 42,3$ ppm et à $\delta_C = 36,5$ ppm correspondant respectivement aux : C₅, C₁₃, C₁₀.

- le carbone C₃ prend la fonction OH apparaît à $\delta_C = 71,8$ ppm.

- un signal caractéristique du carbone oléfinique C₆ résonne à $\delta_C = 121,7$ ppm.

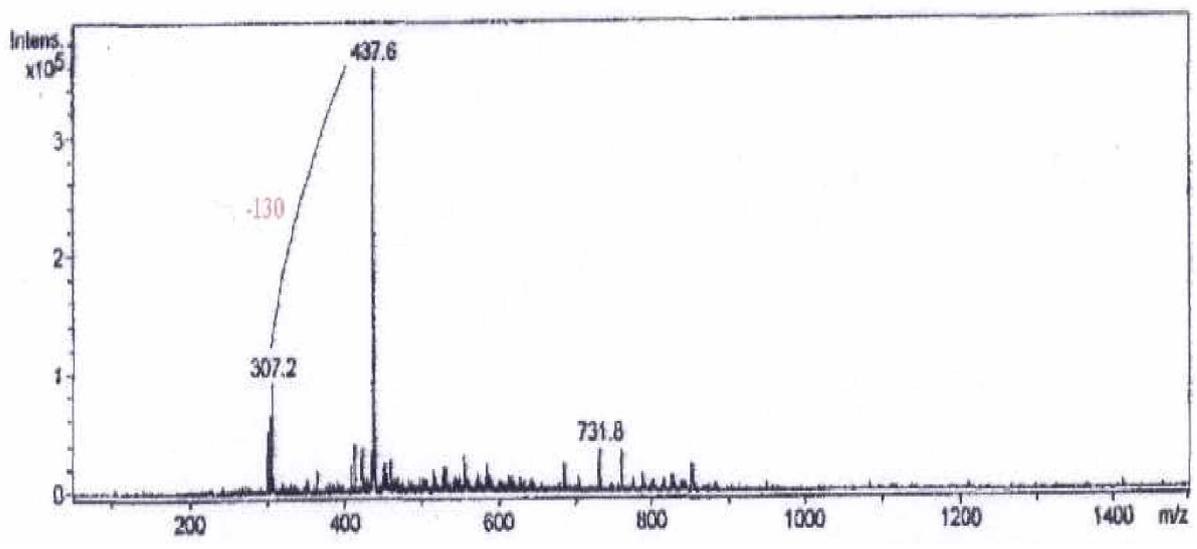
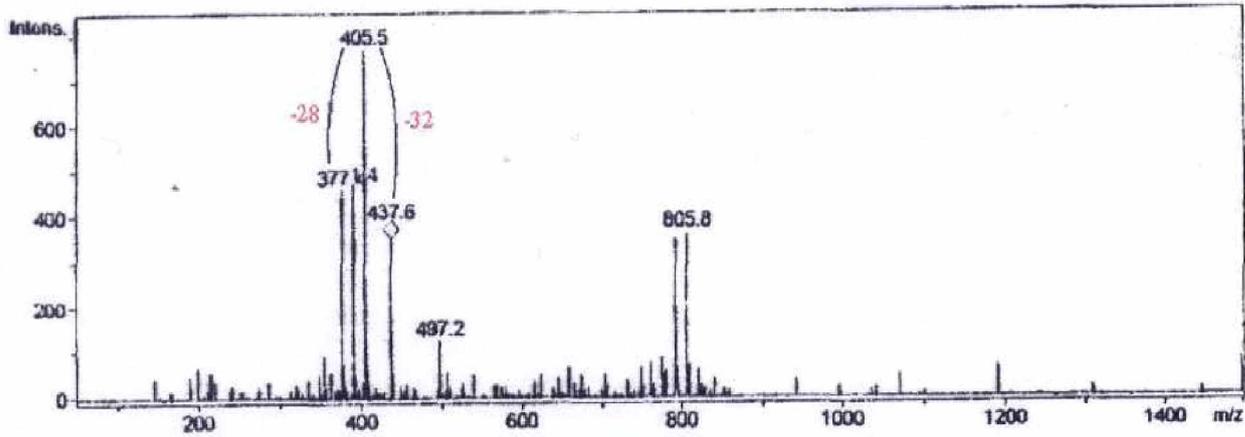
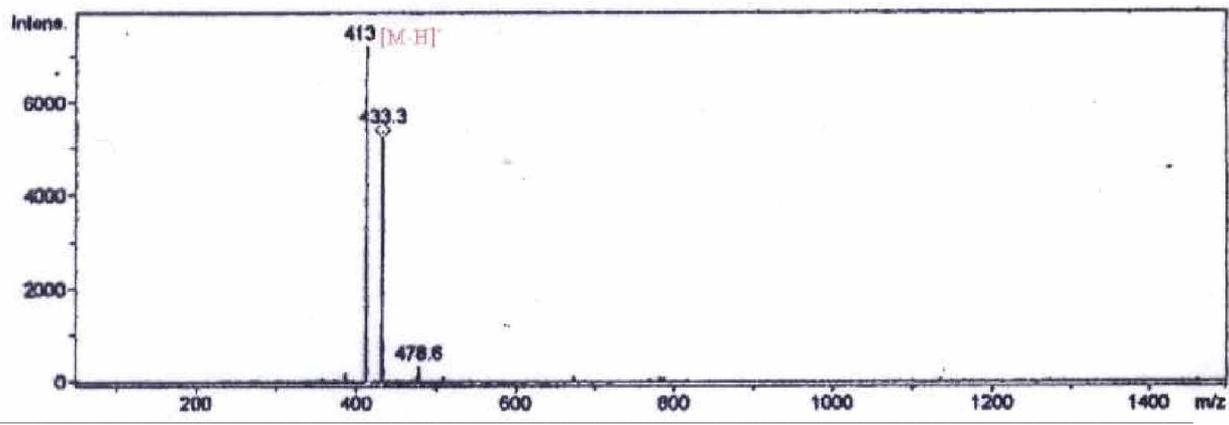
Les valeurs de déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **A** sont représentées dans le tableau (1) suivant :

Tableau-1-

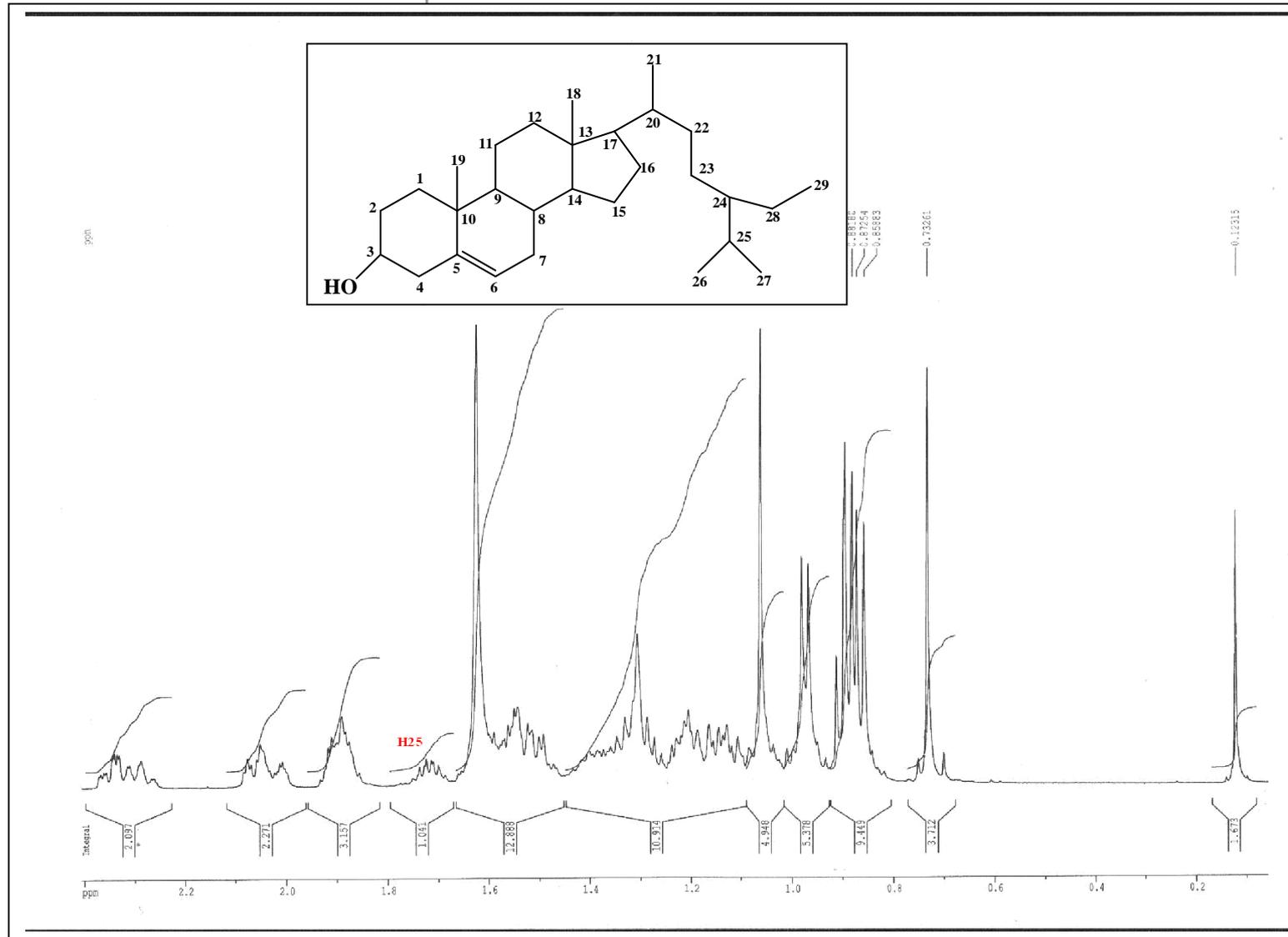
N° de carbone	δ_H (ppm), <i>m</i>	δ_C (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1 (CH ₂)	1, 12 <i>m</i> , 1, 90 <i>m</i>	37, 2	–
2 (CH ₂)	1, 56 <i>m</i> , 1, 90 <i>m</i>	31, 6	–
3 (CH)	3, 58 <i>sept</i>	71, 8	10,5
4 (CH ₂)	2, 29 <i>m</i> , 2, 35 <i>m</i>	42, 3	–
5 (C)	– –	140, 7	–
6 (CH)	5, 41 <i>m</i>	121,7	–
7 (CH ₂)	2, 04 <i>m</i> , 1, 57 <i>m</i>	31, 9	–
8 (CH)	1, 50 <i>m</i>	31, 8	–
9 (CH)	0, 98 <i>m</i>	50, 1	–
10 (C)	– –	36, 5	–
11 (CH ₂)	1, 10 <i>m</i> , 1, 77 <i>m</i>	21, 1	–
12 (CH ₂)	2, 07 <i>m</i> , 1, 20 <i>m</i>	39, 7	–
13 (C)	– –	42, 3	–
14 (CH)	1, 15 <i>m</i>	56, 0	–
15 (CH ₂)	1, 11 <i>m</i> , 1, 62 <i>m</i>	24, 3	–
16 (CH ₂)	1, 30 <i>m</i> , 1, 88 <i>m</i>	28, 2	–
17 (CH)	1, 05 <i>m</i>	56, 7	–
18 (CH ₃)	0, 73 <i>s</i>	11, 8	–
19 (CH ₃)	1, 06 <i>s</i>	19, 4	–
20 (CH)	1, 40 <i>m</i>	36, 1	–
21 (CH ₃)	0, 97 <i>d</i>	18, 8	6,4
22 (CH ₂)	1, 06 <i>m</i> , 1, 37 <i>m</i>	33, 9	–

23 (CH2)	1, 21 <i>m</i>	26, 0	–
24 (CH)	1, 97 <i>m</i>	45, 8	–
25 (CH)	1, 72 <i>m</i>	29, 1	–
26 (CH3)	0, 86 <i>m</i>	19, 0	–
27 (CH3)	0, 88 <i>m</i>	19, 8	–
28 (CH2)	1, 33 <i>m</i> , 1, 28 <i>m</i>	23, 0	–
29 (CH3)	0, 89 <i>m</i>	11, 9	–

C4 | C13 | C12 | C1 | C2 | C16 | C15 | C11



Spectres de masse du composé A



Spectre RMN¹ proton du composé A

Batna AG 5 CDCl3

Hz
2707.43
2704.53
2702.26

2598.51
2593.80

2536.92

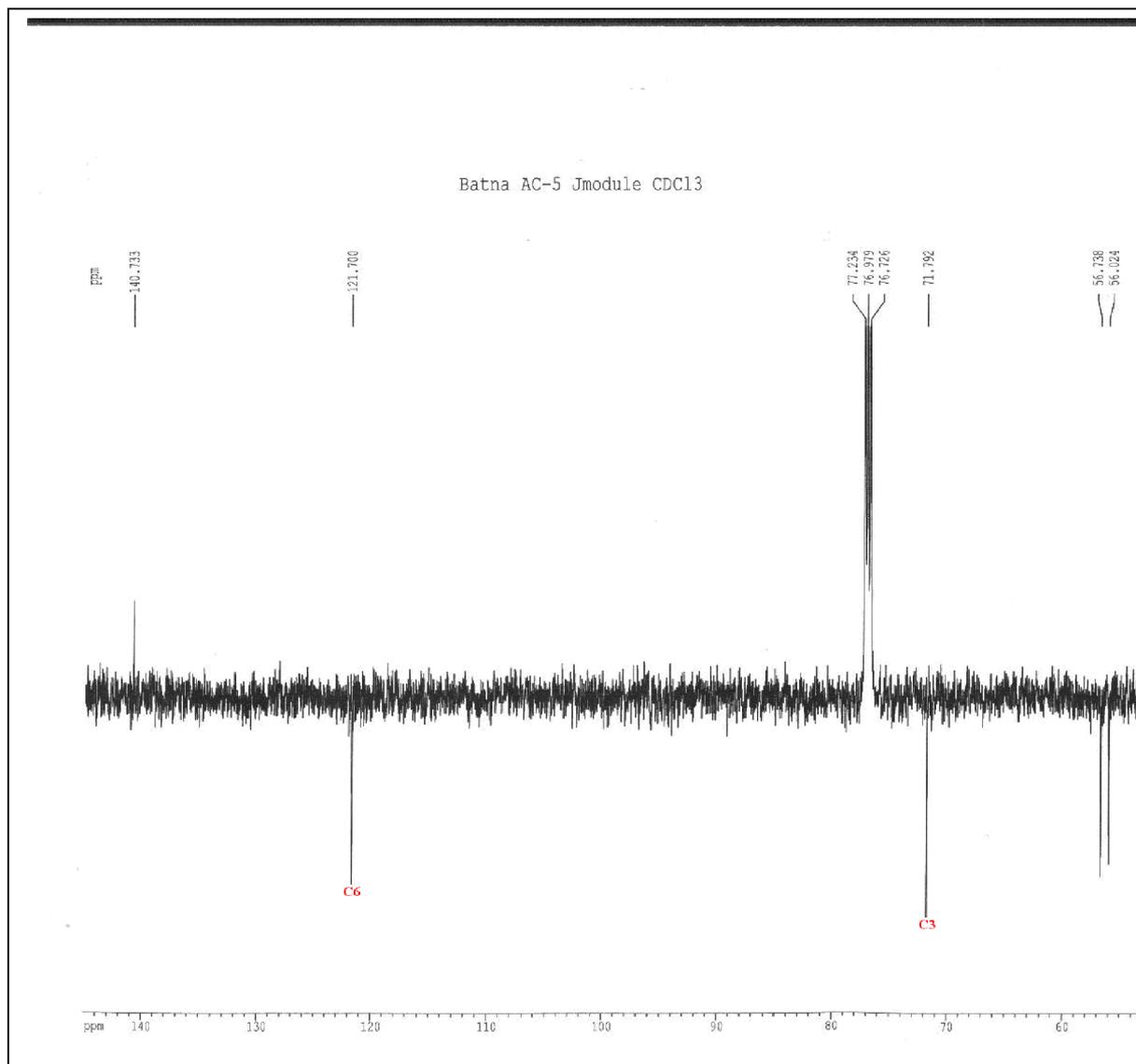
H6



Integral
1.0066

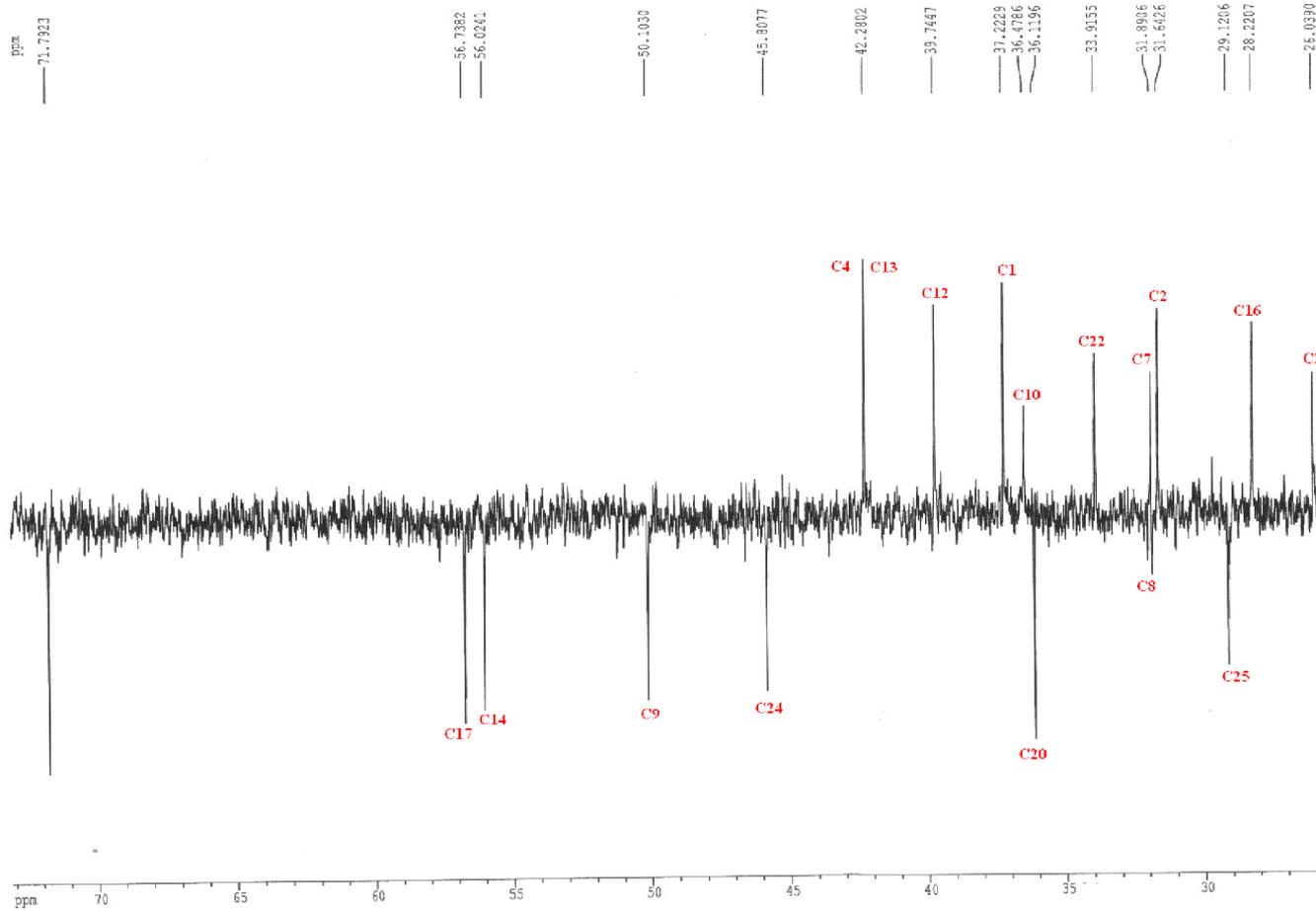
ppm 5.3 5.2 5.1 5.0 4.9 4.8 4.7 4.6 4.5 4.4 4.3 4.2 4.1

Spectre RMN 1H étalé du composé A

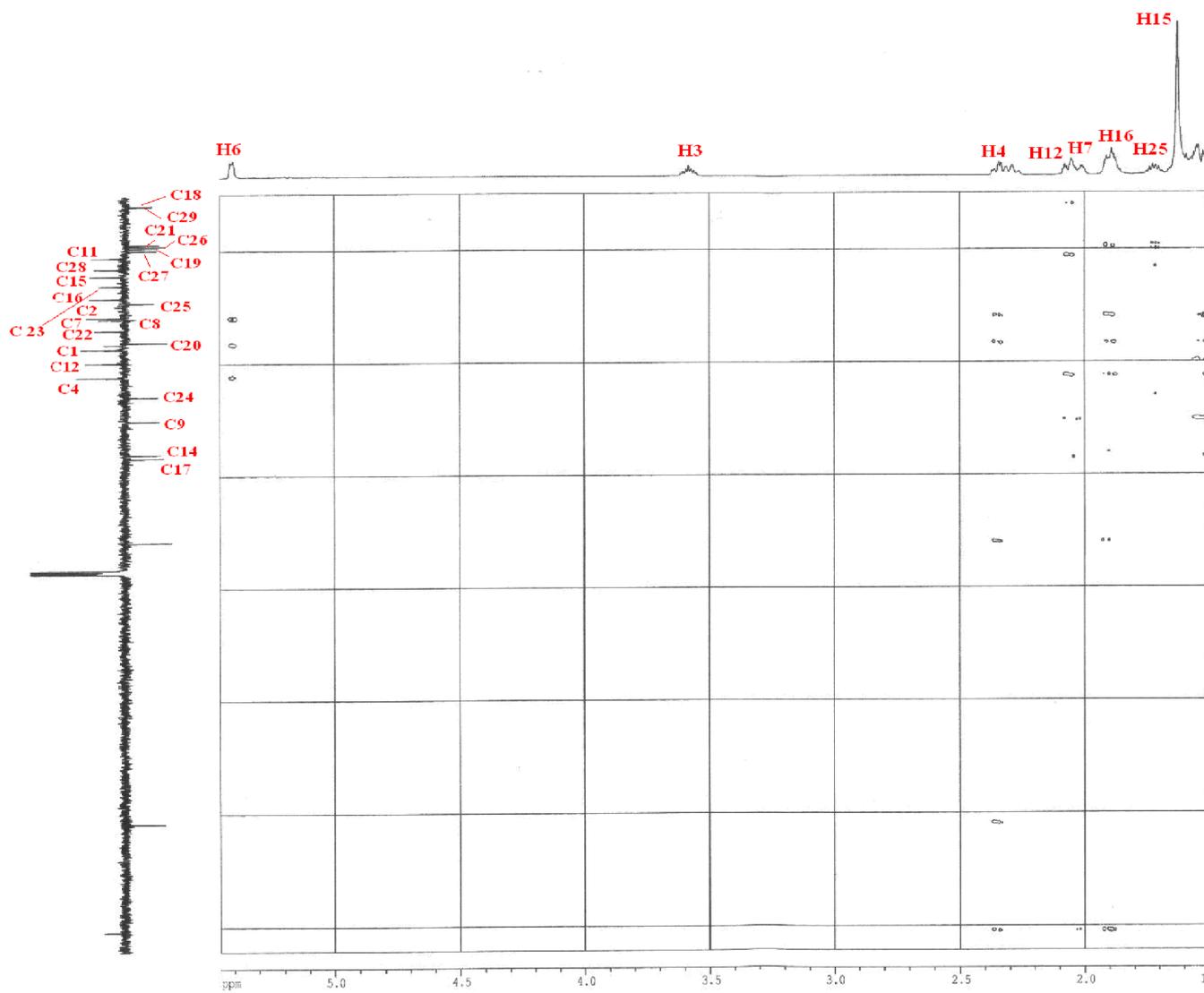


Spectre RMN ^{13}C du composé A

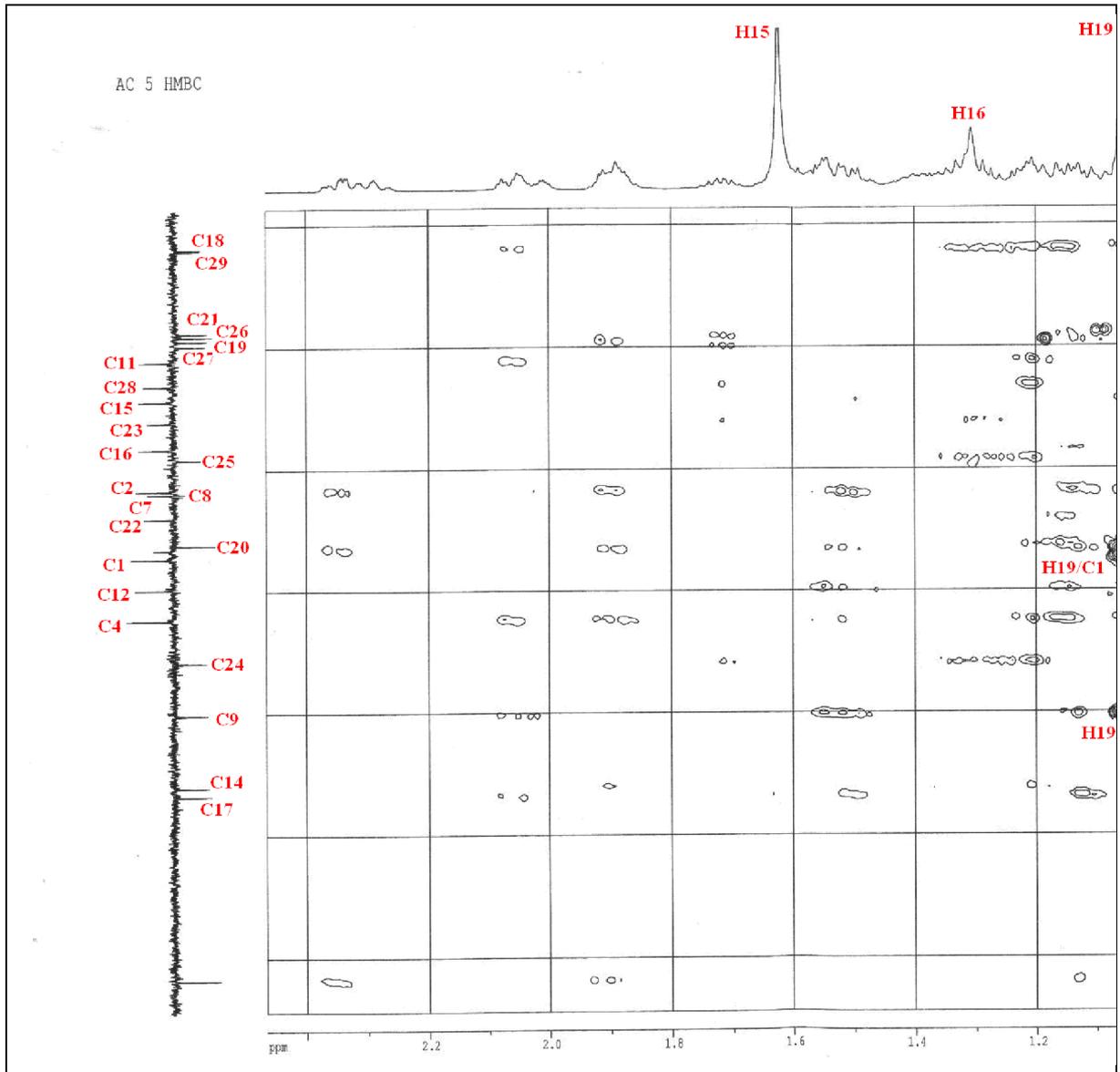
Batna AC-5 Jmodule CDCl3

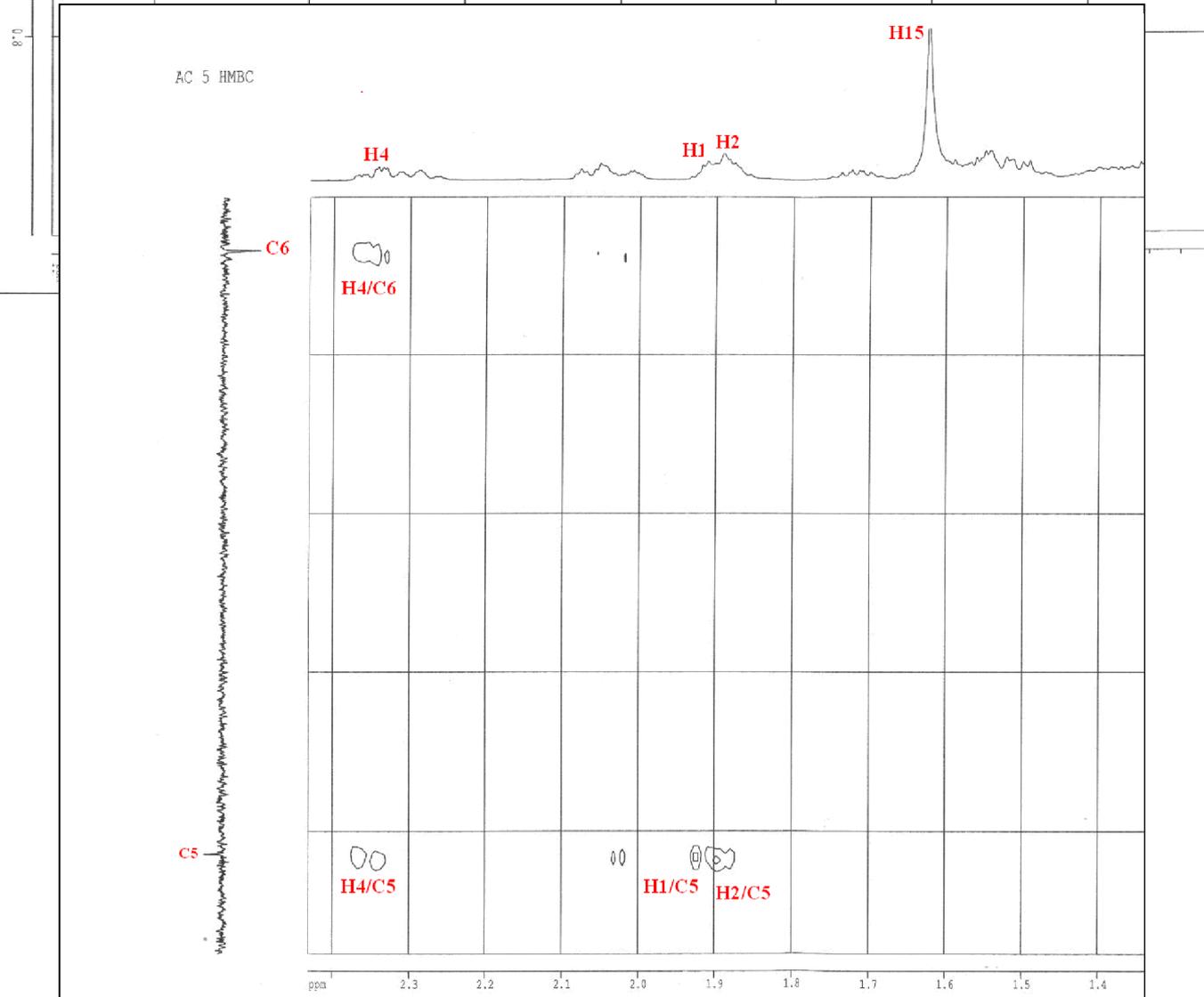
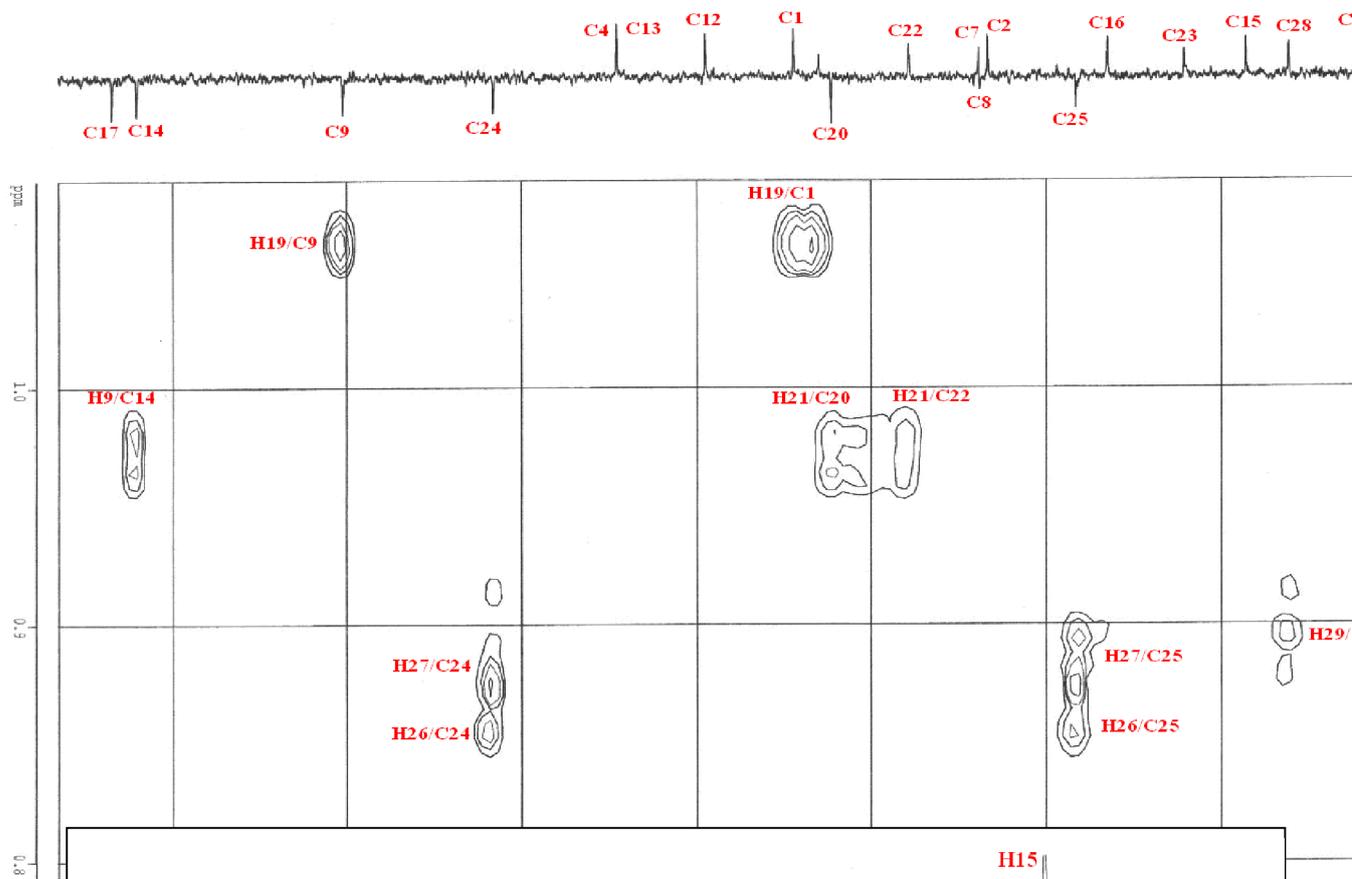


Spectre RMN 13C du composé A



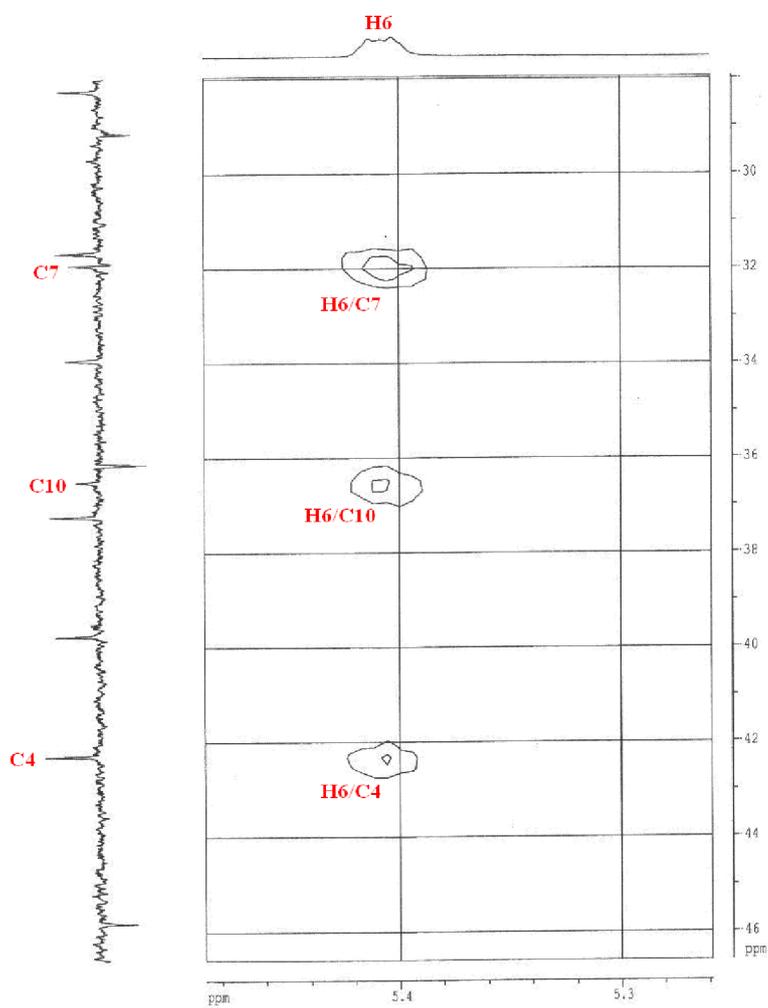
Spectre HMBC du composé A





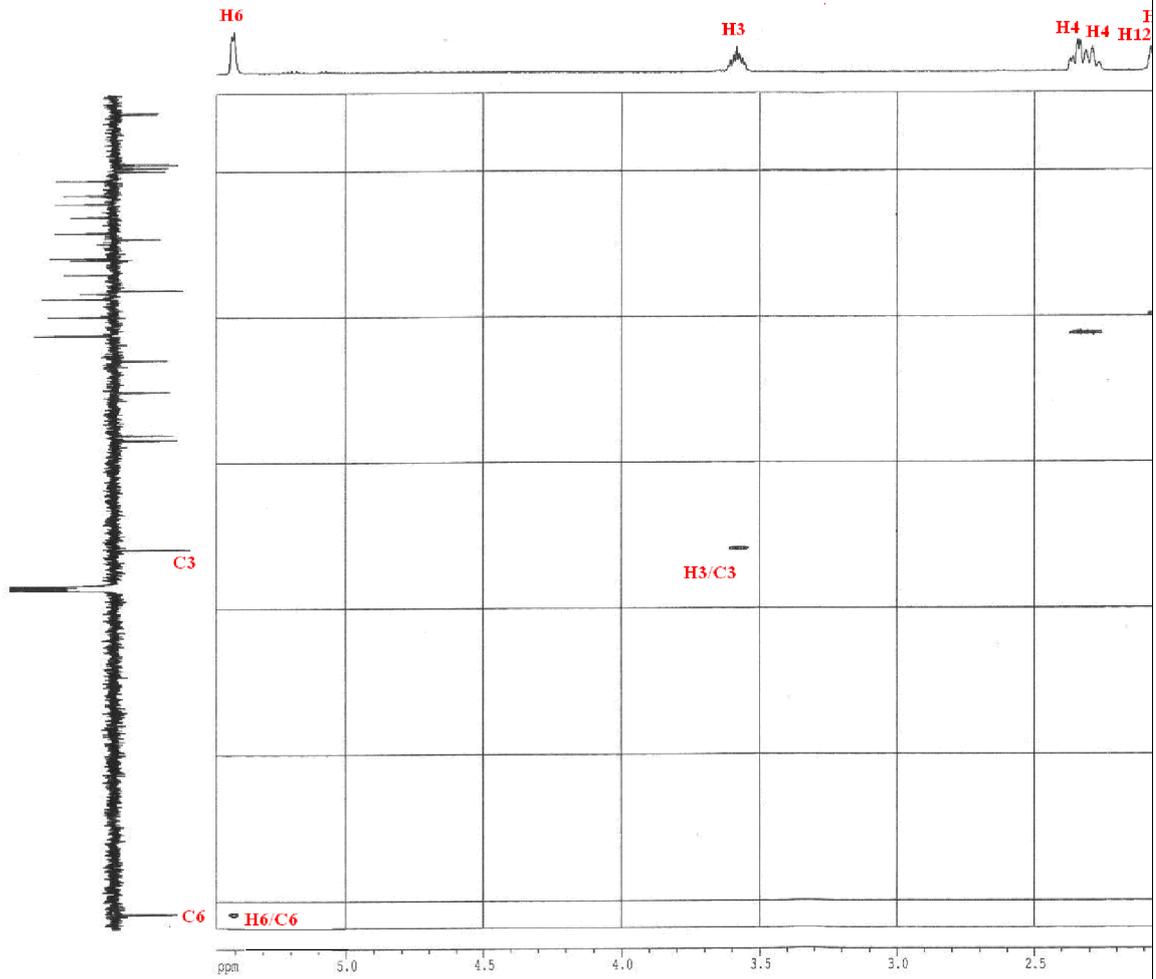
Spectre HMBC du composé A

AC 5 HMBC



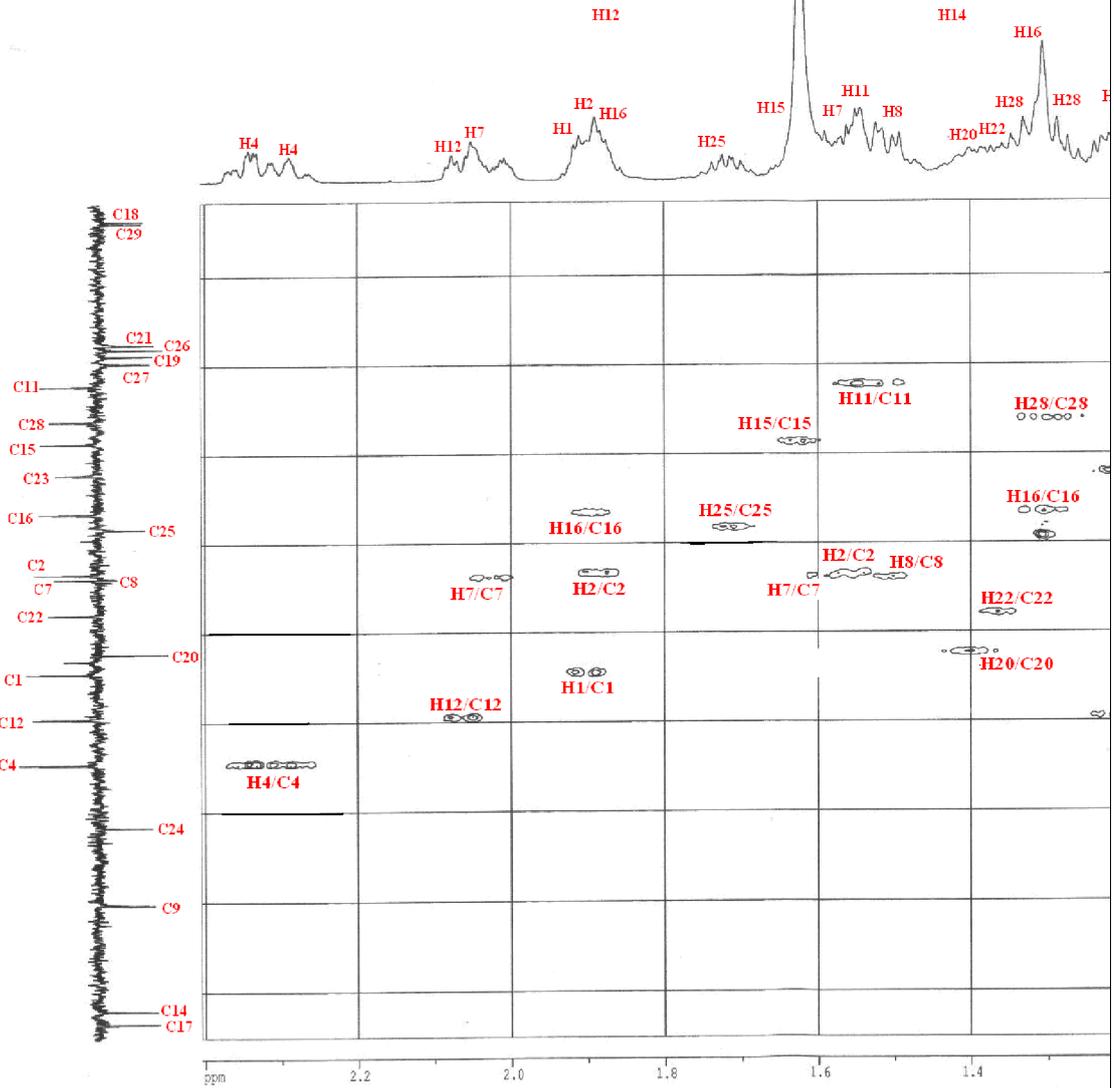
Spectre HMBC du composé A

AC 5 HSQC

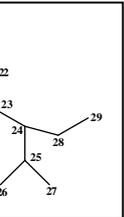
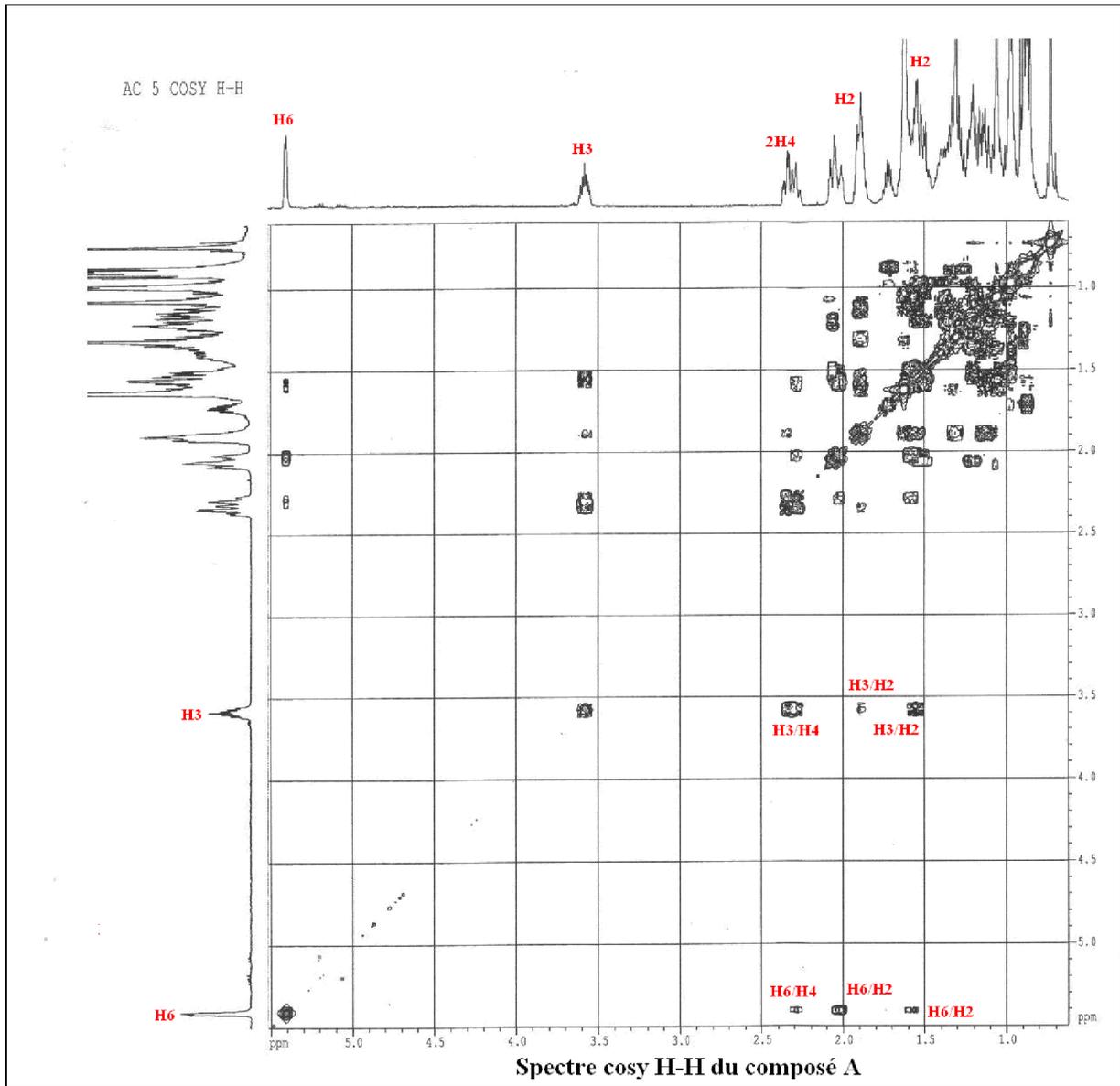


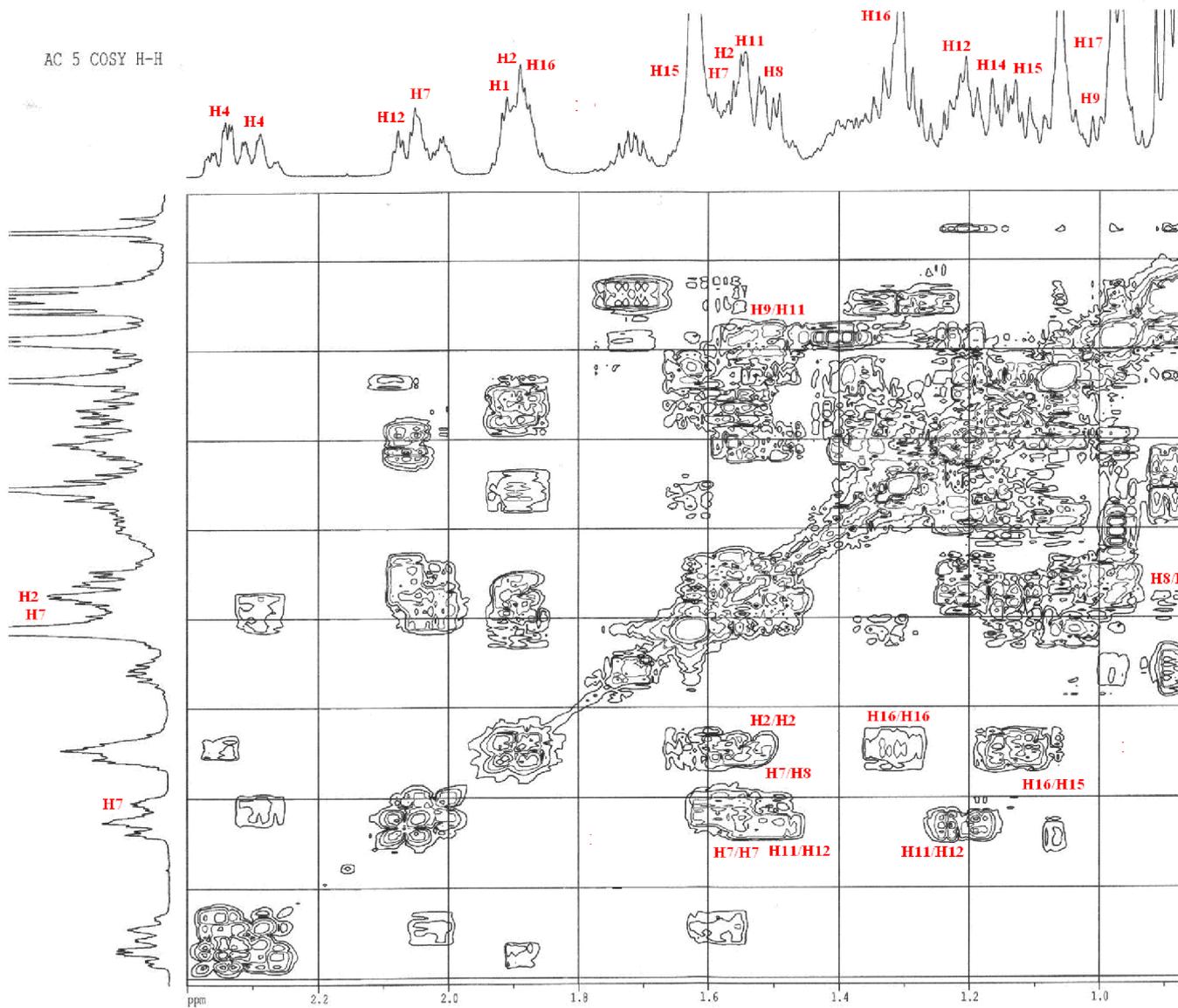
Spectre HSQC du composé A

AC 5 HSQC



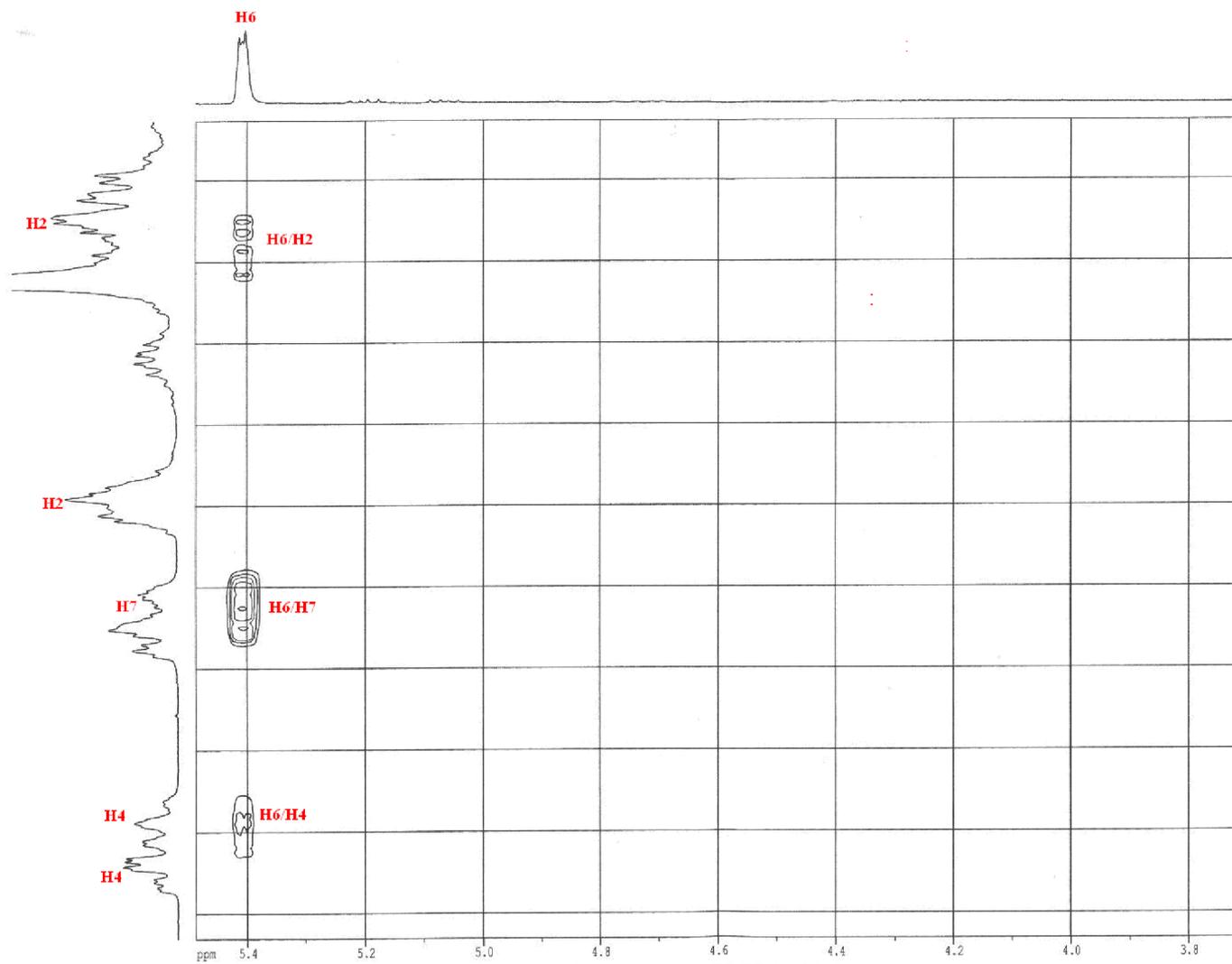
Spectre HSQC du composé A





Spectre cosy H-H du composé A

AC 5 COSY H-H



Spectre cosy H-H étalé du composé A

III-3-2- IDENTIFICATION DU COMPOSE B :

- Ce composé, obtenu par purification sur couche mince, se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe.
 - Le spectre de masse montre un ion moléculaire à $m/z = 412$ unité de masse correspondant à une formule brute de $C_{29}H_{48}O$
 - Le spectre RMN du proton enregistré dans $CDCl_3$ montre les signaux suivants :
 - deux singulets intégrant chacun pour trois protons à $\delta_H = 0,85$ ppm et $\delta_H = 1,08$ ppm correspondant respectivement aux : H-18 et H-19.
 - trois doublets intégrant chacun pour trois protons à $\delta_H = 0,91$ ppm, $\delta_H = 0,83$ ppm et $\delta_H = 0,77$ ppm correspondant aux : H-26, H-27, et H-29.
 - un signal sous forme d'un triplet intégrant aussi pour trois protons à $\delta_H = 0,74$ ppm correspondant au H-21.
 - un doublet large pour un proton à $\delta_H = 5,70$ ppm correspondant au H-6.
 - deux signaux pour un doublet de doublet à $\delta_H = 5,10$ ppm et $\delta_H = 5,00$ ppm correspondant respectivement aux : H-22 et H-23.
 - un signal sous forme de multiplet à $\delta_H = 3,51$ ppm correspondant au : H-3.
- * Le spectre RMN du carbone présente des signaux de 29 carbones avec en particulier celui à $\delta_C = 140,7$ ppm attribuable à un carbone quaternaire Sp^2 , trois carbones à $\delta_C = 121,7$ ppm, $\delta_C = 130,0$ ppm et $\delta_C = 139,2$ ppm correspondant à des CH vinyliques, un signal à $\delta_C = 70,2$ ppm attribuable à un carbone porteur d'un groupement OH.
- * Les corrélations HSQC qui nous permettant d'attribuer les protons à leurs carbones sont correspondantes :
- le proton à $\delta_H = 3,51$ ppm au carbone C_3 à $\delta_C = 70,2$ ppm.
 - le proton à $\delta_H = 5,10$ ppm au carbone C_{22} à $\delta_C = 139,2$ ppm.
 - le proton à $\delta_H = 5,00$ ppm au carbone C_{23} à $\delta_C = 130,0$ ppm.

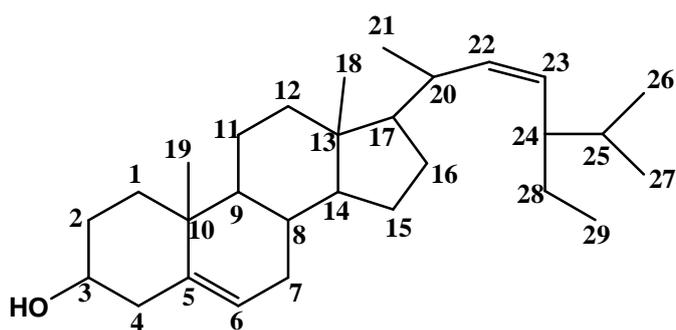
- le proton à $\delta_H = 5,70$ ppm au carbone C_6 à $\delta_C = 121,7$ ppm.

- les protons intégrant pour trois (CH_3) à $\delta_H = 0,74, 0,77, 0,83, 0,91, 1,08$ et $0,85$ ppm aux carbones suivants respectivement : C_{29} ($\delta_C = 12,2$ ppm), C_{27} ($\delta_C = 19,0$ ppm), C_{26} ($\delta_C = 18,9$ ppm), C_{21} ($\delta_C = 21,2$ ppm), C_{19} ($\delta_C = 119,5$ ppm) et C_{18} ($\delta_C = 12,0$ ppm).

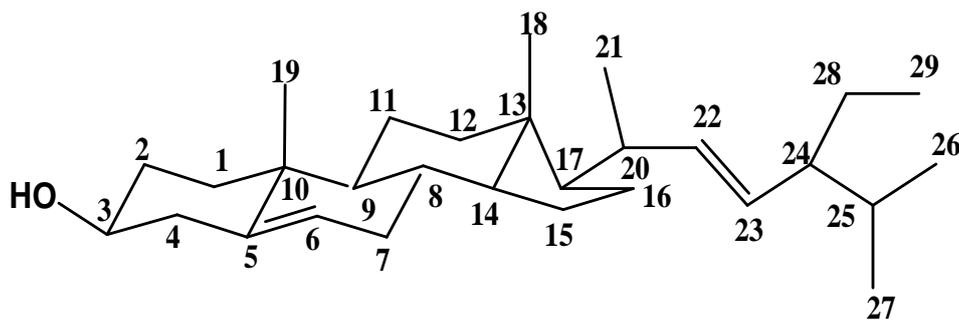
L'expérience HMBC aussi met en évidence les corrélations longues distances à deux et à trois liaisons entre :

- le proton H-22 et les carbones suivants : C-24, C-23, C-21, C-20.
- Le proton H-6 et les carbones C-8 et C-4.
- Le proton H-22 et les carbones C-17.
- Le proton H-4 et les carbones C-3, C-6 et C-5.
- Le proton H-2 et le carbone C-3.
- Le proton H-7 et les carbones C-6 et C-5.

Les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques RMN 1H et ^{13}C , la masse, la RMN 2D (cosy, HMBC) nous ont permis de proposer la structure d'un composé stéroïde doublement insaturé **B** qui est confirmé par les données de la littérature : **Le Stigmastérol (Stigmastein)**



24-Ethylcholesta-5, 22 dièn - 3 β -ol 1



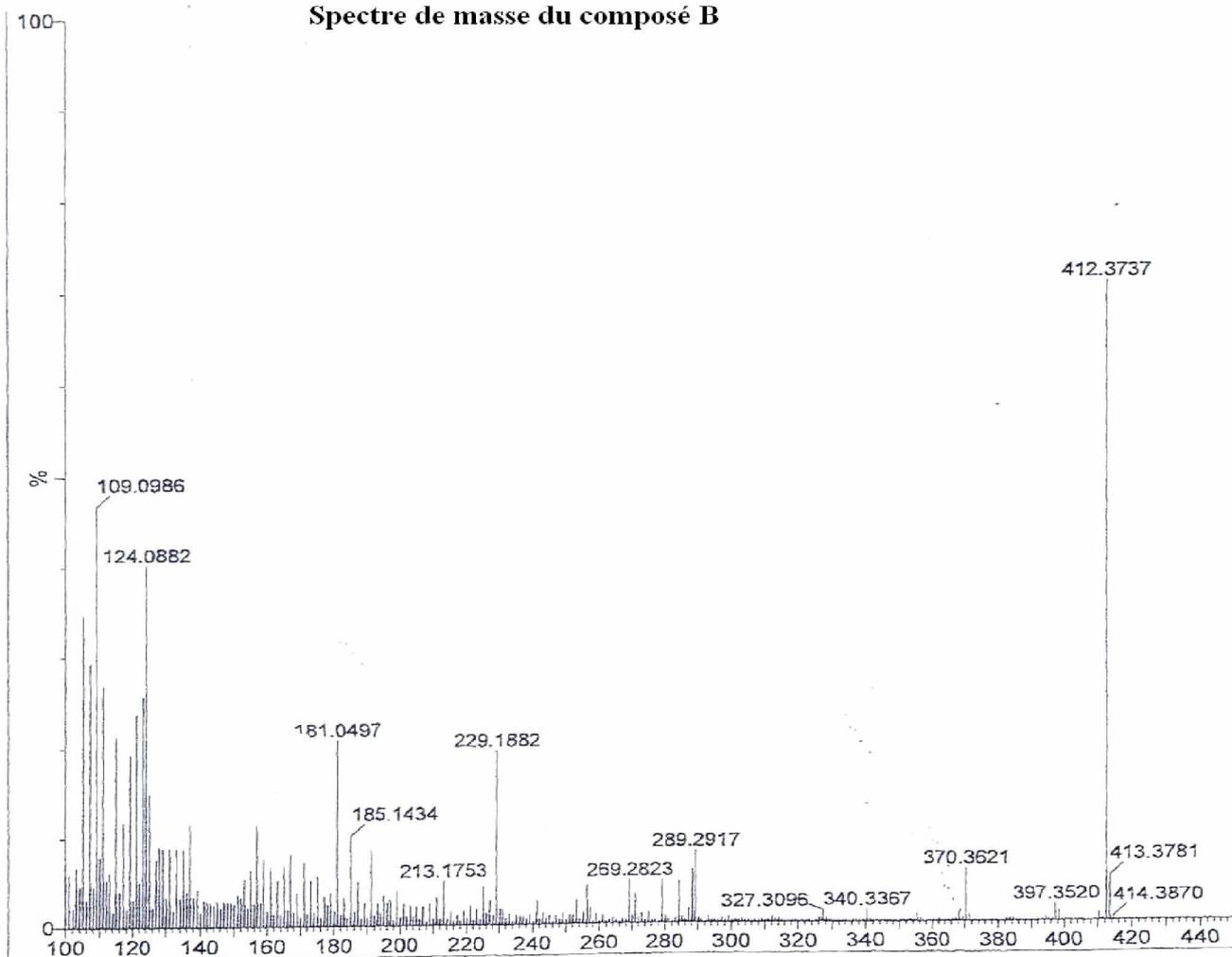
Le Stigmastérol

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **B** sont représentées dans le tableau (2) suivant:

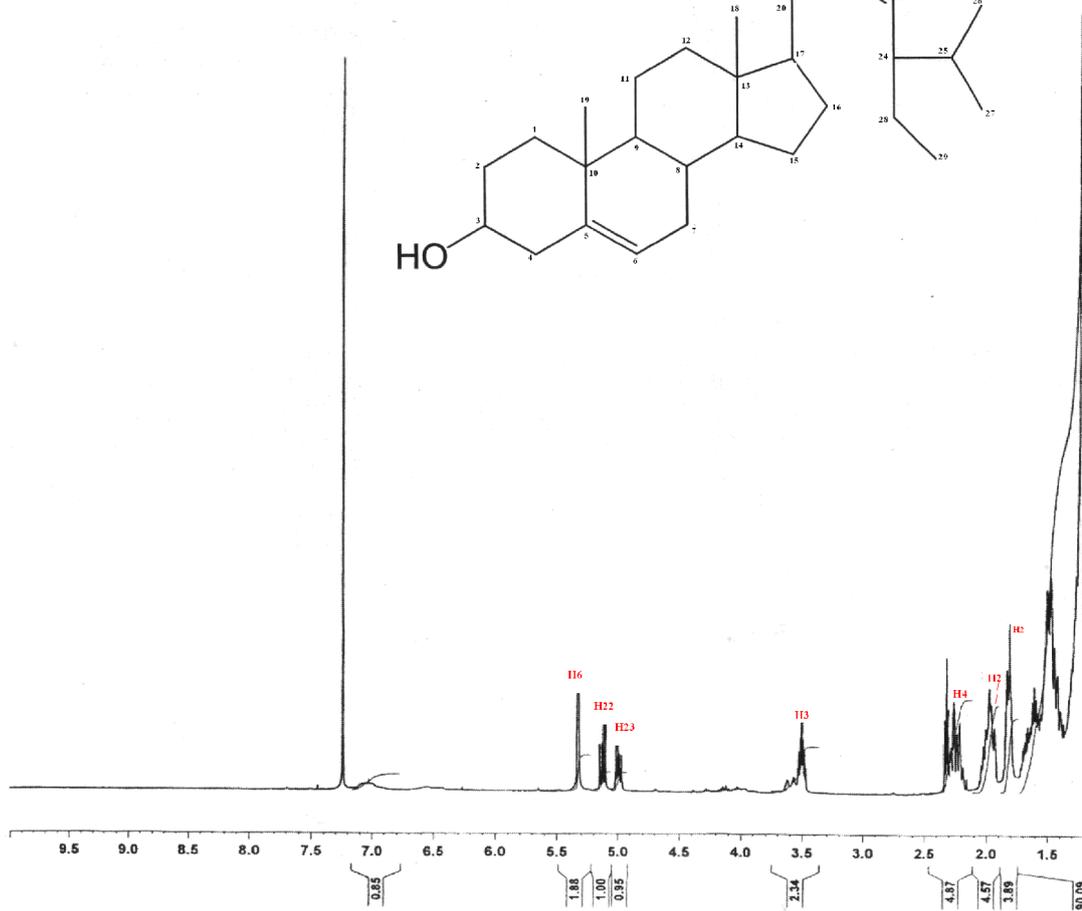
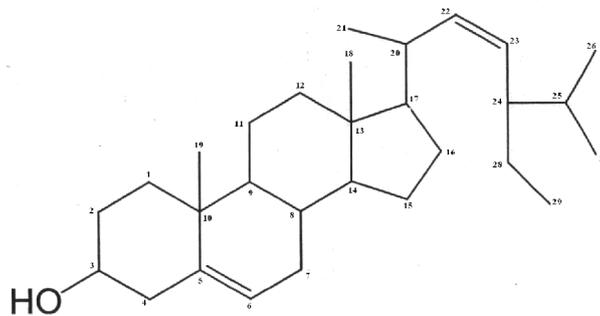
Tableau-2-

N°	δ_C (ppm) ^{13}C	δ_H (ppm) 1H		carbone
01	37, 3	1, 81 , 1, 15	<i>m</i>	CH ₂
02	31, 8	1, 56 , 1, 90	<i>m</i>	CH ₂
03	70, 2	3,51	<i>m</i>	CH
04	42, 5	2, 29 , 2, 34		CH ₂
05	140, 7			=C
06	121, 7	5, 70	<i>dl</i>	=CH
07	31, 9	1, 57 , 2, 04		CH ₂
08	31, 8	1, 80		CH
09	50, 1	0, 89		CH
10	36, 5			C
11	21, 1	1, 54		CH ₂
12	39, 7	2, 08 , 1, 20		CH ₂
13	42, 5			C
14	56, 8	1, 13		CH
15	24, 4	1, 11 , 1, 62		CH ₂
16	29, 0	1, 30 , 1, 88		CH ₂
17	56, 0	1, 11		CH
18	12, 0	0,85	<i>s</i>	CH ₃
19	19, 5	1, 08	<i>s</i>	CH ₃
20	40, 5	1, 40		CH
21	21, 2	0,91	<i>d</i>	CH ₃
22	139, 2	5,10	<i>dd</i>	=CH
23	130, 0	5,00	<i>dd</i>	=CH
24	51, 2	1, 02		CH
25	36, 0	1, 79		CH
26	18, 9	0, 83	<i>d</i>	CH ₃
27	19, 0	0, 77	<i>d</i>	CH ₃
28	25, 6	1, 30 , 1, 40	<i>m</i>	CH ₂
29	12, 2	0, 74	<i>t</i>	CH ₃

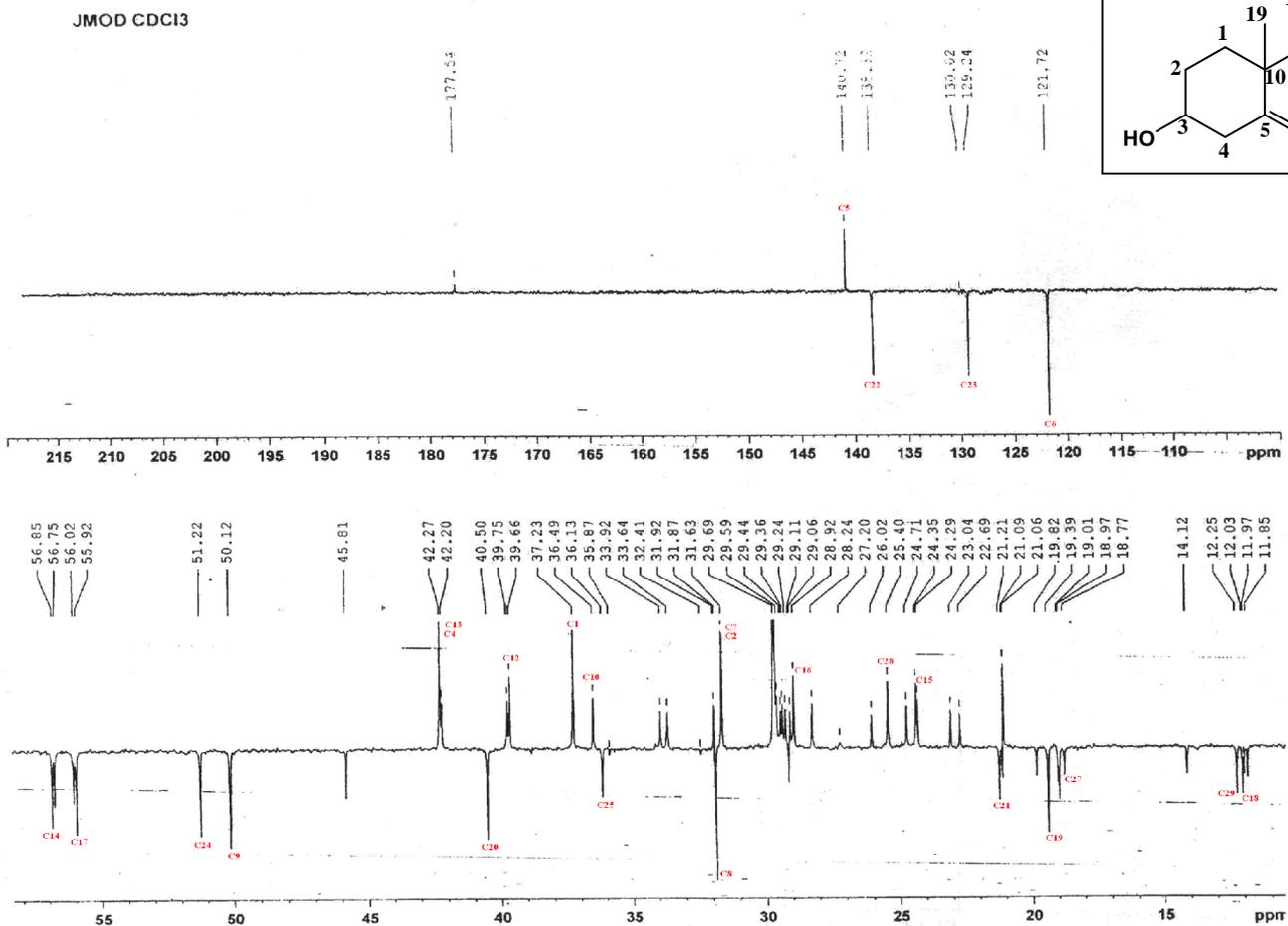
Spectre de masse du composé B



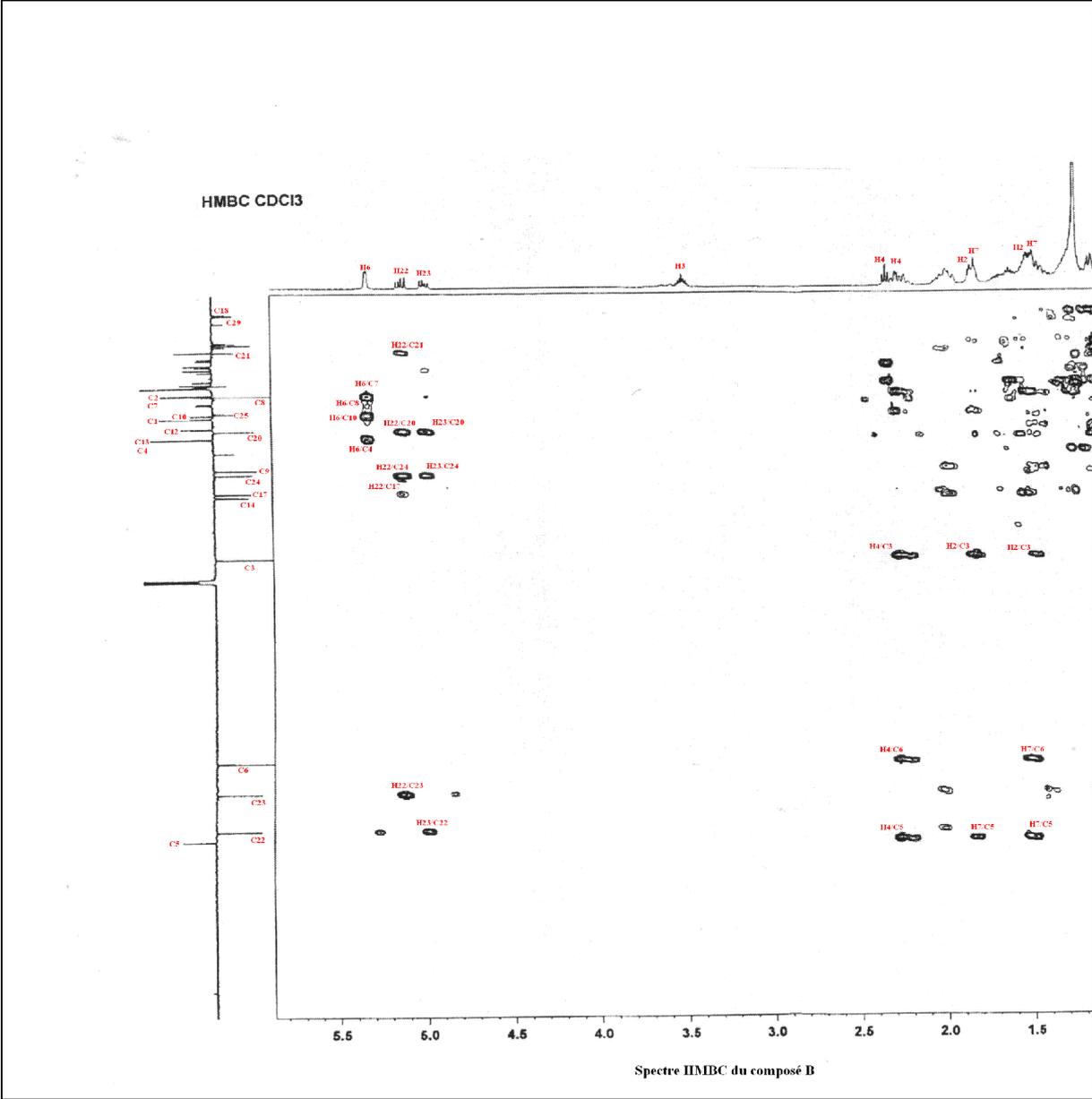
PROTON CDC13

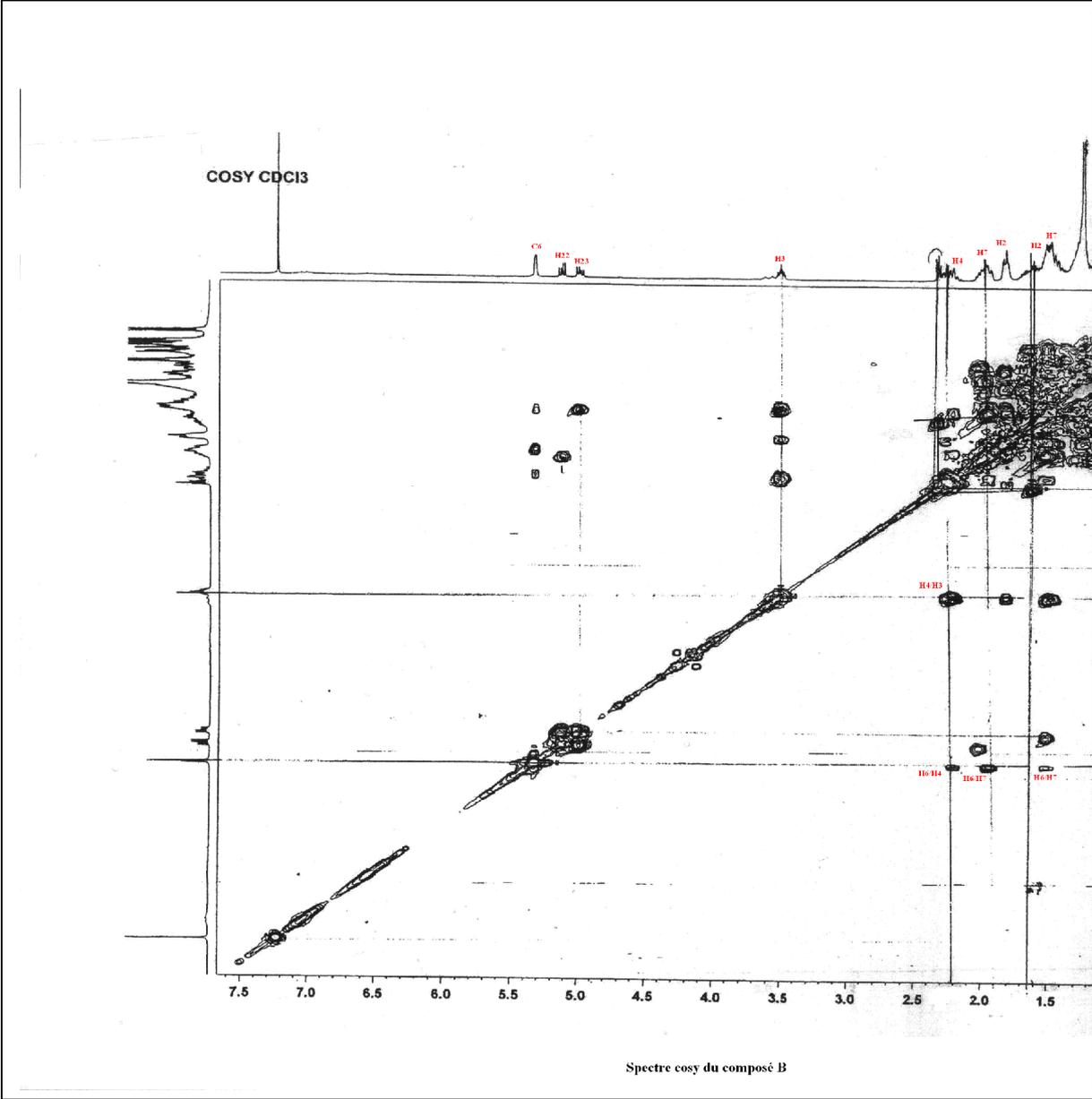


Spectre RMN 1H du composé B



Spectre RMN 13C du composé B





BIBLIOGRAPHIE

- [1] Paris R. R., Moysé H., **1971**, Précis de matière Médicale, Tome III. Paris, 397.
- [2] Paulian P., **1967**, Guide pour l'étude de quelques plantes Tropicale, Ed. Gauthier-Villards, Paris.
- [3] Quezel F., Santa S., **1962-1963**, Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.
- [4] Harborne J.B., Swain T., **1969**, Perspective In phytochemistry, Academic Press, London, New York.
- [5] BELLAKHDAR, J. Médecine Arabe ancienne et savoir populaire La pharmacopée marocaine traditionnelle, ibis press, **1997**.
- [6] Piozzi et al ., 1966 ; Piozzi, Quilice, Fuganti, Ajello, Sprio, 1967.
- [7] Daniel, Bombardelli, Bonari, & Gabetta, 1972.
- [8] Dombris, A. (1978). Thèse de Doctorat d'Université en Pharmacie, Lyon.
- [9] Besson, E., Dombris, A., Raynaud, J. and Chopin, j. (1979) phytochemistry 18, 1899.
- [10] Marby, T., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970) the systematic Identification of Flavonoids. Springer, New york.
- [11] Arnaud. P, Cours de chimie organique, Bordas, Paris, 441,1985.
- [12] Gaignaudi, J.C., Bidet. D., Gaillard. M., Perronnet. J Stérols et Sétroïdes, Paris, 11-31, **1997**.
- [13] Lehinger.A. Principe de biochimie, Flammarion, 315, **1989**.
- [14] McMurry, J. Chimie organique- les grand principes, Cours et exercices corrigés, 4^{ème} Edition, Paris, 515, **1998**.
- [15] Klyne, W., Tame, N.D. La chimie des stéroïde, Paris, 13, **1966**.
- [16] Baker, R. A., Evans, D. A., Grayson, D.H., Jones, R.C.F., Lough, A.K., Moore, P. R., Thaller, V. Aliphatic and related natural product Chemistry, **1979**.

- [17] Paul Medeurick. Medicinal natural products, a biosynthetic approach, 2^{ème} Edition, Wiley, **2002**.
- [18] Wilson, C.O., Gisvold, O., Doerge, R.F. Text Book of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, J.B., Lipincott 7^{ème} Edition, 734, **1977**.
- [19] Grahem-Solomons, T.W. Fundamentals organic chemistry, United States of America, 951, **1994**.
- [20] J.Guinard, Abrégé de biochimie à l'usage de Pharmacie, 179-183. **1974**.
- [21] J.Bruneton, Pharmaconosie et phytochimie des plantes Médicinales, 387-402, **1993**, 2^{ème} Edition, Paris.
- [22] J.Mann, Secondary, metabolism, 138-143, **1987**, Clarendon Press. Oxford, 2^{ème} Edition.
- [23] J.Guinard, I. Coss et M. Henry, Abrégé de phytochimie, 155, Masson, **1985**.
- [24] D.G. Cram et G.S.Hammoud, Chimie organique, 918-930, **1968**, 2^{ème} Edition, Quattheir-Villars.
- [25] T.Higuchi, Biosyntheis and biodegradation of wood components, 380-420, **1985**.
- [26] I.L.Finard , Organic Chemistry, 356-370, **1994**, 5^{ème} Edition. J.M ;Secondary.
- [27] Shimizu, S. Shibata, H., Maejima, S. Journal of essential oil research, 2, 21, **1990**.
- [28] Courtois, J.E., Perlé, R. Précis de Chimie biologique, 2^{ème} Edition, Masson et Cie, Paris, 424-437, **1971**.
- [29] Boulanger, P., Polonoivski, J. Tayeau, F., Mandl, P., Bisert. G. Biochimie médicinale-les Constituants des organismes vivants, Masson et Cie, Paris, 100, **1966**.
- [30] Heller, R. Biologie Végitale II : Nutrition et métabolisme, Paris, **1969**.
- [31] Bruneton, J. Pharmacognosy et phytochimie des plante médicinales, 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, 661-758 **1999**.
- [32] Bruneton, J. Pharmacognosy et phytochimie des plante médicinales, 2^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, 387-402 **1993**.

IV-1- GENERALITES :

* Les chromatographies sur colonne sont réalisées sur silice Kieselgel 60-230-400 mesh, Merck.

* Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM), ont été effectuées sur plaques de silice Kiesel 60 F₂₅₄ Merck. Les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm, 366 nm) après élution dans le solvant puis révélation par la vanilline sulfurique.

* Les chromatographies analytiques sur couche épaisse (CCE), ont été effectuées sur plaques de silice Kiesel 60 F₂₅₄ Merck.

* Les filtrations sont effectuées sur des colonnes de Sephadex LH-20.

* Les solvants utilisés sont des solvants de commerce : chloroforme, éther de pétrole, méthanol et l'acétate d'éthyle.

* Les spectres de masse sont enregistrés en ionisation par électroflash ESI (ElectroSprayIonisation), en mode positif et négatif, sur un spectromètre de masse Bruker LC-MS/MS type esquire-LC, du Centre de recherche sur les Substances Naturelles-UMS 2597-Toulouse (France).

* Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN H¹ 1D et 2D) sont enregistrés dans le CDCL₃ sur un appareil Bruker 500 MHz du Laboratoire de Pharmacognosie- UMR, Reims, France.

* Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN C¹³, Modulé) sont enregistrés dans CDCL₃ sur un appareil Bruker 125 MHz de Laboratoire de pharmacognosie UMR, Reims, France.

* Les déplacements chimiques (en ppm) sont relatifs au tétraméthylsilane « TMS », et les constantes de couplages J sont exprimées en Hz.

IV-2- CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS :

IV-2-1- Extrait éthero-pétrolique :

Les CCM effectués sur l'extrait éthero-pétrolique dans les systèmes d'élution : éther de pétrole 100%, éther de pétrole / acétate d'éthyle : 95/05, 90/10, 85/15, montrent et cela après examen à la lumière UV (254nm, 366 nm) et révélation à la vanilline sulfurique, un ensemble de plusieurs taches petites empêtrées dans une traînée de plusieurs couleurs.

IV-2-2- Extrait chloroformique :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) effectués sur l'extrait chloroformique dans les systèmes suivants : chloroforme / acétate : 95/05, 90/10 nous a permis après examen à la lumière UV et vaporisation à la vanilline sulfurique d'observer une traînée faible.

IV-2-3- Extrait méthanolique :

L'analyse par CCM de l'extrait méthanolique dans les systèmes de solvants : Chloroforme / méthanol : 95/05, 90/10 montrent un mélange complexe inclus dans une traînée

IV-3- SEPARATION ET PURIFICATION :

Les techniques de séparation et de purification mises en œuvre, sont la chromatographie sur colonne de gel de silice, et de Sephadex LH20.

Notre étude concerne l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes de la plante : *Atractylus concellata*.

3 grammes de l'extrait éthero-pétrolique, ont été mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase et pression normales. L'élution a été initialement effectuée à l'aide de l'éther de pétrole 100%, dont on augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle 95/05, 90/10, 85/15, 80/10, puis par un mélange acétate d'éthyle / méthanol et enfin on termine la colonne par le méthanol pur.

Des fractions de 50 ml sont réunies à chaque fois et analysées par (CCM). Les plaques sont examinées à la lumière UV (254 nm – 366 nm) et révélées à la vanilline sulfurique. Ceci a donné, après rassemblement des fractions présentant des similitudes, 13 lots. Les résultats obtenus se présentent comme suit :

Tableau-3-

Fractions récupérées	Eluant de la colonne	Observa en CCM
	Ether de pétrole / AcoEt	
1 – 5	100% Ether de pétrole	Néant
6 – 9	98 / 02	Traînée faible
10 – 45	97 / 03	Traînée
46– 63	96 / 04	Mélange complexe
64 – 92	95 / 05	Traînée + tache
93– 108	93 / 07	Traînée + Tache
109 – 132	90 / 10	Mélange complexe
133 – 156	85 / 15	Tache + Traînée
157 – 190	80 / 20	Tache + Traînée
191 – 278	50 / 50	Traînée
279 – 356	100% Acétate d'éthyle	Traînée faible
	Acétate d'éthyle / Méthanol	
357 – 433	90 / 10	Traînée faible
434 – 515	50 / 50	Néant
516 - 530	Méthanol	Néant

L'examen très attentif de ce fractionnement par chromatographie sur couche mince, permet de rassembler les fractions présentant des similitudes en 13 lots, Ces derniers vont à leur tour, faire l'objet d'une chromatographie (CCM), Le tableau (4) suivant englobe les résultats :

Tableau-4-

N° des lots	Fractions	Poids (mg)	Observa en CCM
1	1 – 5	00	Néant
2	6 – 13	16	Traînée faible
3	14 – 19	25	Traînée faible
4	20 – 33	56	Mélange complexe
5	34 – 45	125	Tache + traînée
6	46 – 54	90	Tache + traînée
7	55 – 63	45	Tache + traînée
8	64 – 92	150	Tache + traînée
9	93 – 156	69	Tache + traînée
10	157 – 190	90	Tache visible à l'UV + traînée
11	191 – 213	33	Traînée
12	214 – 414	45	Néant
13	415 – 530	12	Néant

Les lots 8, 9 jugés intéressants car présentent des taches pouvant correspondre à des produits, ont été à leur tour fractionnés.

IV-3-1- Etude du lot N°8 :

Poids du lot : 150 mg

La purification de ce lot a été faite suivant le tableau (5) :

Tableau-5-

Fractions récupérées	Eluant de la colonne	Observa en CCM
	Ether de pétrole / AcoEt	
1 – 5	100% éther de pétrole	Néant
6 – 13	98 / 02	Traînée faible
14 – 21	97 / 03	Traînée
22 – 34	96 / 04	Traînée + tache
35 – 57	95 / 05	Tache rose non visible à l'UV
58 – 69	93 / 07	Traînée faible
70 – 91	90 / 10	Néant
92 - 105	85 / 15	Néant

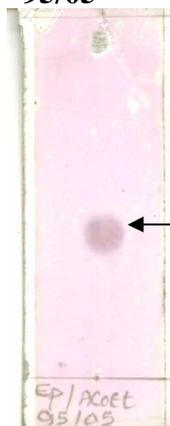
Les fractions semblables ont été rassemblées, donnant ainsi plusieurs sous lots comme suit :

Tableau-6-

N° des sous lots	Fractions	Poids (mg)	Observa en CCM
1	1 – 4	01	Néant
2	5 -27	10	Traînée faible
3	28 – 34	15	Traînée
4	35 – 57	30	Tache rose non visible à L'UV
5	58 - 105	20	Néant

Le sous lot N° 4 est chromatographies sur couche épaisse CCE, Finalement 30 milligrammes du composé **A** comme produit pur ont été obtenus.

**Ep/AcoEt
95/05**



Composé A

IV-3-2- Etude du lot N° 10 :

Poids du lot : 90 mg

La purification de ce lot a été faite comme suit :

Tableau-7-

Fractions récupérées	Eluant de la colonne	Observa en CCM
1 – 6	Ether de pétrole / AcoEt 100% éther de pétrole	Néant
7 – 27	95 / 05	Traînée
28 – 39	90 / 10	Traînée + tache
40 – 56	85 / 15	Traînée + tache
57 – 88	80 / 20	Tache + traînée
89 – 96	70 / 30	Traînée faible
97 - 105	50 / 50	Néant

Les fractions présentant des similitudes ont été rassemblées pour donner plusieurs sous lots Tableau (8):

Tableau-8-

N° des sous lots	Fractions	Poids (mg)	Observa en CCM
1	1 – 6	00	Néant
2	7 -24	25	Traînée faible
3	25 – 56	60	Traînée
4	57 – 88	20	Tache vert visible à L' UV
5	89 – 101	10	Traînée
6	102 - 105	56	Néant

Le sous lot N° 4 a subi une filtration sur couche épaisse CCE, A l'issue de cette filtration, le composé **B** de masse de 20 milligrammes qui a été obtenue à l'état pur

IV-4- CARACTERISTIQUE SPECTRALES :

IV-4-1- COMPOSE A :

Formule brute : **C₂₉H₅₀O**

Nom systématique : **24-éthyl-cholest-5-èn-3-ol**

Nom trivial : **β-sitostérol**

Etat physique : **Solide blanc P_f = 135-137 °C**

R_f = 0,45 dans le système de solvants : Ether de pétrole / Acétate d'éthyle 95/05

Composé non visible à l'UV et donne une couleur rose foncée après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 110 °C.

Spectre RMN 1H (500 MHz, CDCl₃, TMS)

1, 90 (m, 1H) = H-1a, 1, 12 (m, 1H) = H-1e

1, 90 (m, 1H) = H-2a, 1, 56 (m, 1H) = H-2e

3, 58 (*Sep*, 1H) = H-3, $J_{a-a} = 10, 5$ Hz, $J_{a-e} = 5, 4$ Hz

2, 29 (*m*, 1H) = H-4a, 2, 35 (*m*, 1H) = H-4e

5, 41 (*dl*, 1H) = H-6

2, 04 (*m*, 1H) = H-7a, 1, 57 (*m*, 1H) = H-7e

1, 50 (*m*, 2H) = H-8

0, 98 (*m*, 2H) = H-9

1, 54 (*m*, 2H) = H-11

2, 07 (*m*, 1H) = H-12a, 1, 20 (*m*, 1H) = H-12e

1, 15 (*m*, 2H) = H-14

1, 11 (*m*, 1H) = H-15a, 1, 62 (*m*, 1H) = H-15e

1, 30 (*m*, 1H) = H-16a, 1, 88 (*m*, 1H) = H-16e

1, 05 (*m*, 1H) = H-17

0, 73 (*s*, 3H) = H-18

1, 06 (*s*, 3H) = H-19

1, 40 (*m*, 1H) = H-20

0, 97 (*d*, 3H) = H-21

(1, 06-1, 37)(*m*, 2H) = H-22

(1, 06-1, 37)(*m*, 2H) = H-23

0, 97 (*m*, 1H) = H-24

1, 72 (*m*, 1H) = H-25

0, 86 (*m*, 3H) = H-26

0, 88 (*m*, 3H) = H-27

(1, 28-1, 33)(*m*, 2H) = H-28

0, 89 (*m*, 3H) = H-29

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS)

37, 2 (CH₂-1), 31, 6 (CH₂-2), 71, 8 (CH-3), 42, 3 (CH₂-4), 140, 7 (C-5), 121, 7 (CH-6), 31, 9 (CH₂-7), 31, 8 (CH-8), 50, 1 (CH-9), 36, 5 (C-10), 21,0 (CH₂-11), 39, 7 (CH₂-12), 42, 3 (C-13), 56, 0 (CH-14), 24, 3 (CH₂-15), 28, 2 (CH₂-16), 56, 7 (CH-17), 11, 8 (CH₃-18), 19, 4 (CH₃-19), 36, 1 (CH-20), 18, 8 (CH₃-21), 33, 9 (CH₂-22), 26, 0 (CH₂-23), 45, 8 (CH-24), 29, 1 (CH-25), 19, 0 (CH₃-26), 19, 8 (CH₃-27), 23, 0 (CH₂-28), 11, 9 (CH₃-29).

Spectre de masse (m/z) :

$$[M+Na]^+ = 437$$

$$[M-H]^- = 413$$

$$[(M+Na^+)-(CH_3+OH)]^+ = 405$$

$$[(M+Na^+)-(C_8H_{17}+OH)]^+ = 307$$

$$[(M+Na^+)-(CH_3+OH)]^+ = 37$$

IV-4-2- COMPOSE B:

Formule brute: **C₂₉H₄₈O**

Nom systématique : **24-Ethylcholesta-5,22 dièn - 3β- ol**

Nom trivial : **Le Stigmastérol**

Etat physique : **Poudre blanche amorphe**

Rf = 0, 48 dans le système suivant : éther de pétrole / acétate d'éthyle : 80/20

Composé visible à l'UV et donne une couleur bleu après révélation à la vanilline sulfurique.

Spectre RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS)

1, 81 (*m*, 1H) = H-1a, 1, 15 (*m*, 1H) = H-1e

1, 90 (*m*, 1H) = H-2a, 1, 56 (*m*, 1H) = H-2e

3, 51 (*Sep*, 1H) = H-3.

2, 29 (*m*, 1H) = H-4a, 2, 34 (*m*, 1H) = H-4e
5, 70 (*dl*, 1H) = H-6
2, 04 (*m*, 1H) = H-7a, 1, 57 (*m*, 1H) = H-7e
1, 80 (*m*, 2H) = H-8
0, 89 (*m*, 2H) = H-9
1, 54 (*m*, 2H) = H-11
2, 08 (*m*, 1H) = H-12a, 1, 20 (*m*, 1H) = H-12e
1, 13 (*m*, 2H) = H-14
1, 11 (*m*, 1H) = H-15a, 1, 62 (*m*, 1H) = H-15e
1, 30 (*m*, 1H) = H-16a, 1, 88 (*m*, 1H) = H-16e
1, 11 (*m*, 1H) = H-17
0, 85 (*s*, 3H) = H-18
1, 08 (*s*, 3H) = H-19
1, 40 (*m*, 1H) = H-20
0, 91 (*d*, 3H) = H-21
5, 10 (*dd*, 1H) = H-22
5, 00 (*dd*, 1H) = H-23
1, 02 (*m*, 1H) = H-24
1, 79(*m*, 1H) = H-25
0, 83 (*d*, 3H) = H-26
0, 77 (*d*, 3H) = H-27
(1, 40-1, 30)(*m*, 2H) = H-28
0, 74 (*t*, 3H) = H-29

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS)

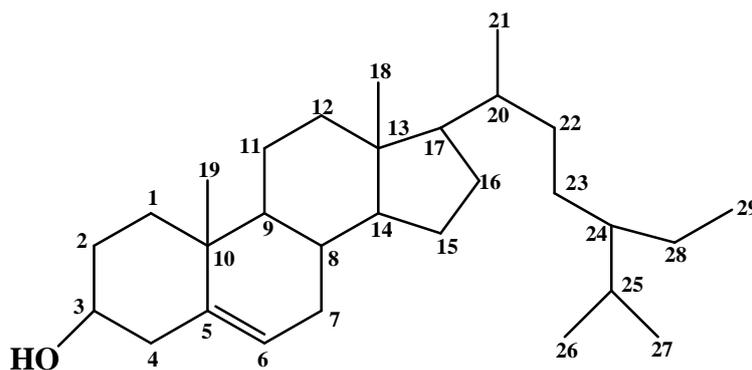
37, 3 (CH₂-1), 31, 8 (CH₂-2), 70, 2(CH-3), 42, 5 (CH₂-4), 140, 7 (C-5), 121, 7 (CH-6), 31, 9 (CH₂-7), 31, 9 (CH-8), 50, 1 (CH-9), 36, 5 (C-10), 21,1 (CH₂-11), 39, 7 (CH₂-12), 42, 5 (C-13), 56, 8 (CH-14), 24, 4 (CH₂-15), 29, 0 (CH₂-16), 56, 0 (CH-17), 12, 0 (CH₃-18), 19, 5 (CH₃-19), 40, 5 (CH-20), 21, 2 (CH₃-21), 139, 2 (CH₂-22), 130, 0 (CH₂-23), 51, 2 (CH-24), 36, 0 (CH-25), 18, 9 (CH₃-26), 19, 0(CH₃-27), 25, 6 (CH₂-28), 12, 2 (CH₃-29).

Spectre de masse (m/z) :

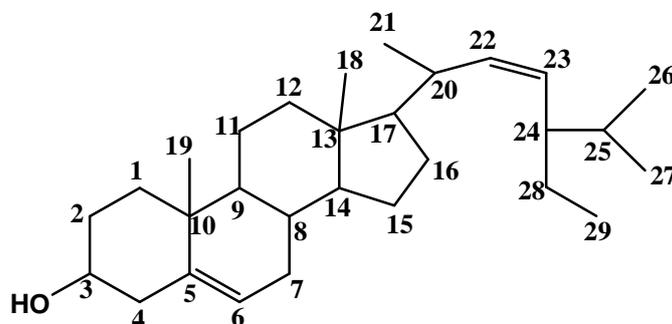
Le spectre de masse EI-MS obtenu par impact électronique montre un pic de l'ion moléculaire : $[M]^+ = 412$

CONCLUSION GENERALE:

Nous avons d'écrit précédemment par les différentes méthodes chromatographiques utilisées deux produits, comme nous avons pu par des méthodes de spectroscopie de résonance magnétique (RMN) et la spectrométrie de masse d'établir les structures des ces deux composés isolés :



β - sitostérol (A)



Stigmastérol (B)

La séparation et la purification a donné d'autres composés d'après les chromatogrammes des plaques de CCM, mais en très faible quantité qui ne permet pas la réalisation des spectres en particulier la RMN.

Les structures que nous venons de décrire sont connues dans la littérature et isolées dans les différentes plantes.

Résumé

Mot clés : *Atractylis concellata*, β - sitostérol, stigmastérol.

Ce travail est consacré essentiellement sur l'extraction et l'identification des métabolites secondaires du l' *Atractylis concellata*.

Le travail reporte ainsi la détermination de structure de deux composés :

(A) : β - sitostérol , (B) : Stigmastérol

La détermination de structure a été réalisée par la combinaison des résultats des méthodes spectroscopiques : RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY_{H-H} et la spectrométrie de masse.

Ce travail est divisé en quatre chapitres :

Dans le premier chapitre : nous avons rapporté une étude antérieure sur le genre *Atractylis* et la famille des composées.

Le deuxième chapitre : est consacré à l'étude des stéroïdes et des stérols, en parlons de leurs définitions, nomenclatures, stéréochimie, biosynthèses et leurs intérêt biologiques.

Le troisième chapitre : regroupe les travaux personnels au niveau du laboratoire concernant : la séparation, le fractionnement, la purification des composés et l'élucidation de leurs structure.

Le dernier chapitre : est consacré au protocole expérimental.

Summary

Key words: *atractylis concellata*, β - sitosterol, stigmasterol, sterols.

This work has essentially been carried on the extraction and identification of the secondary metabolism of *atractylis concellata*. The work reports thus the structure determination of two compounds: (A): β - sitosterol , (B): Stigmasterol

The determination of structures has been realised by combining the results of spectroscopic methods wich arem the: RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY_{H-H}, and the spectroscopie of the masse.

This work is subdivided in four chapters:

In the first chapter: we have reported an anterior study about the kind *atractylis* and the family of the composees.

The second chapter: is devoted to the study of steroids and sterols giving their definitions, nomenclature, Stirling, their biosynthesis, and their biologic interests.

The third chapter: gathers the personal work completed on the level of the laboratory concerning: fractionation, separation, purification of the products and the etudication of their structures.

The fourth chapter: presents the experimental part.

ملخص

يدور هذا العمل أساسا حول تحديد منتجات الأيض الثانوي لنبتة *atractylis concellata* ، والذي يخضع و لأول مرة للبحث الكيميائي، وقد سمح لنا بتحديد بنية مركبين هما:

Stigmasterol (A) ، β - sitosterol (B):

تحديد بنية المركبات تمت بالاستعانة بمختلف التقنيات الطيفية: RMN 1H ، RMN ^{13}C ، HSQC ، HMBC ، COSY_{H-H} و الكتلة (masse).

ينقسم هذا العمل الى أربعة محاور هي:

المحور الأول: يقوم على دراسة الأعمال السابقة حول النوع *atractylis* وعائلة Les composées.

المحور الثاني: خصص لدراسة الستيرويدات و الستيروولات، مفاهيم، تسميات، كيميائيتها الفراغية، الفوائد من الناحية البيولوجية والتخليق الحيوي الخاص بها.

المحور الثالث: يضم كل الأعمال الشخصية المتعلقة بفصل المركبات، تنقيتها، تحديد بنيتها، ودلك في المخبر.

المحور الرابع: خصص للجزء العملي.