

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR BATNA
FACULTE DES SCIENCES



DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

Mémoire Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE

Présenté par :

Melle **Amira DJEBARA**

Thème

Etude Phytochimique du *Pallenis spinosa*

Soutenue publiquement le 24 / 04 / 2013

Devant le jury :

Mohamed Cherif ABERKANE

Ammar DIBI

Malek Rassoul Yassine AL HILOU

Hassina HARKAT

Maître de Conférences Université de Batna

Professeur Université de Batna

Professeur Université d'Oum El Bouagui

Maître de Conférences Université de Batna

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes **chers parents**, qui ont toujours su raviver
en moi cette flamme d'espoir et je leurs dis :

Merci de m'avoir donnée une bonne éducation.

Merci de m'avoir soutenu et encouragé durant mes études.

Merci d'avoir partagé mes joies et mes peines.

Merci de croire en moi, de m'avoir fait confiance.

Merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté.

Merci pour tout.

Je prie le **bon Dieu** de me donner la force et

Les moyens de prendre toujours soin de vous.

A mes **chères sœurs** **Ibtisam** et **Amel**,

A mes **chers frères** **Samir**, **Lotfi** et **Walid**,

A toute la famille : **DJEBARA** et **RIGHI**.

Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont
participé à sa réalisation et auxquelles j'exprime ma profonde
reconnaissance et mes vifs remerciements.

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie le **BON DIEU** le tout puissant qui m'a donné cette volonté, le courage, et cette patience pour pouvoir parcourir tout ce chemin avec succès durant mes années d'études.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de mémoire Monsieur le Professeur **Ammar Dibi**, qui m'a permis d'effectuer mes travaux au sein de son laboratoire, pour son soutien moral et ses conseils.

Comme j'adresse un grand merci à M^{elle} **Fatma BITAM** Maître de Conférences à l'Université de Batna. Ce travail aurait été incomplet sans sa disponibilité, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et ses compétences techniques. Merci pour ta gentillesse, le temps que tu m'as consacré, tes orientations, ton humanisme, ton soutien et surtout aux moments les plus difficiles. A vrai dire, je ne sais pas comment vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté, transmis et appris tout au long de ce travail. Merci pour l'énorme contribution que m'avez apportée afin d'accomplir ce mémoire de Magister.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Docteur **ABERKANE Mohammed Cherif** Maître de Conférences à l'Université de Batna pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse de Magister.

Je tiens à remercier M^{elle} **Hassina HARKAT** Maître de Conférences à l'Université de Batna qui a accepté avec enthousiasme et bienveillance de juger ce travail.

J'adresse, également, mes remerciements à Monsieur **Malek Rassoul Yassine AL HILOU** Professeur Université d'Oum El Bouagui qui m'a honoré en acceptant de faire partie du jury.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Bachir OUDJHIH** de l'institut agro-vétérinaire de l'Université de Batna pour l'identification de la plante.

J'exprime mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour leur aides et disponibilité en me permettant la réalisation des spectres:

M^{elle} **Rofia MEZACHE** et M^{elle} **Fatma BITAM** maîtres de conférences de l'université de Batna.

M^r **Paul MOSSET** professeur de ENSC de l'université de Renne pour son aide et disponibilité en me permettant la réalisation des spectres.

M^{me} **Fadhila BENAYACHE** professeur de laboratoire de Phytochimie et Analyses Physico-Chimiques et Biologiques, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri de Constantine, merci M^{me} pour ta gentillesse.

Je remercie Messieurs: **BENSADEK A., NEOUI Y., MSELLEM Y., BEHLOUL H., CHRAYET T. et BERBACHI A.** pour ses nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux, comme je remercie aussi M^{me} **Hakima SIADA**, M^{me} **ARAR**, M^{me} **BAGOUR**, le professeur **MELLIZI** et Docteurs : **Saloua DRIDI, Souad ARRIF, Kafia OULMI** et **Hamada HABA**.

J'exprime également mes remerciements à mes collègues de laboratoire et mes amies, je leur souhaite la réussite et une bonne continuation, je cite ici: **Naïma, Siham, Mouna, Fouzia, Dalila, Soria, Zina** et tous les autres car trop nombreux pour les nommer tous.

ABREVIATIONS UTILISEES

AcOEt	Acétate d'éthyle
ATP	Adénosine triphosphate
BuOH	n-Butanol
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
CHCl ₃	Chloroforme
COSY	Spectroscopie de Correlation ¹ H- ¹ H
CCM	Chromatographie sur couche mince
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
°C	Degré celsuis
1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublet
<i>dl</i>	Doublet large
DMAPP	Diméthylallyl pyrophosphate
EP	Ether de pétrole
ESI	Spectrométrie de masse par electrospray
F	Fraction
FDP	Farnésyl diphosphate
g	Gramme
Glc	Glucose
Gal	Galactose
GDP	Géranyl diphosphate
GGDP	Géranylgéranyk diphosphate
GGPP	Géranylgéranyl pyrophosphate
H ₂ O	Eau
Hex	Hexane
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
Hz	Hertz
IPP	Isopentényl diphosphate

<i>J</i>	Constante de couplage
L	Litre
<i>m</i>	Multiplet
MeOH	Méthanol
<i>m/z</i>	Masse/charge électrique
Me	Méthyle
mg	Milligramme
MS/MS	Spectrométrie de masse / Spectrométrie de masse
ml	Millilitre
MHz	Megahertz
MVA	Mévalonate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMe	Méthoxyle
PAMA	Plantes alimentaires médicinales et aromatiques
ppm	Partie par million
POP	Produit d'oxydation des phytosterols (Oxyphytosterol)
PS	phytosterol
PS ₁ , PS ₂ , PS ₃ ...	Symboles pour les composées isolés de la plante étudiée
R _f	Rapport frontal
Rha	Rhamnose
RP-8	Gel de silice phase inverse (silice gréffé RP-8)
SM	Spectrométrie de masse
SiO ₂	Gel de silice normale 60F
TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultra-violet
uma	Unité de masse atomique
VAM	Voie de l'acide mévalonique
VLC	Chromatographie liquide sous vide
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I. 1 Généralités	
I.1.1 Critères de sélection des plantes	5
I.1.2 Critères de sélection des extrait	6
I.1.3 Généralités sur les métabolites secondaires	7
I. 2 Description botanique	
I.2.1 Famille des Astéracées	8
I.2.1.1 Généralités	8
I.2.1.2 Position systématique	8
I.2.1.3 Caractères morphologiques généraux	8
I.2.1.4 Classification des Asteraceae	9
I.2.2 Tribu Inulée	10
I.2.2.1 Généralités	10
I.2.2.2 Etude chimique de quelques espèces des genres de Inulée	10
I.2.3 Genre <i>Pallenis</i>	14
I.2.4 Espèce <i>Pallenis spinosa</i> (L.)	15
I.2.4.1 Ethymologie	15
I.2.4.2 Caractéristiques botaniques	15
I.2.4.3 Noms vernaculaires et Synonymes	17
I.2.4.4 Classification systématique	18
I.2.4.5 Utilisation médicinale	18
I.2.4.6 Etudes chimiques antérieures d'espèce <i>Pallenis spinosa</i>	19
CHAPITRE II : ETUDE DES STEROIDES	
II.1 Stéroïdes	
II.1.1 Etymologie	25
II.1.2 Généralités	25
II.1.3 Nomenclature	27

II.1.4 Stéréochimie	31
II.1.5 Les principaux stéroïdes	33
II.1.5.1 Les hormones	33
II.1.5.2 Les acides biliaires	34
II.1.5.3 Autres composés	35

II.2 Stérols

II.2.1 Définition des stérols	35
II.2.2 Quelques Stérols différent selon l'insaturation	36
II.2.3 Classification des stérols	38
II.2.4 Biosynthèse des stérols	39
II.2.4.1 Synthèse de l'IPP	40
A. Voie du mévalonate (MVA)	41
B. Voie du MEP (Non-mévalonate)	42
II.2.4.2 Synthèse de l'époxyde de squalène	43

II.3 Phytostérols (Stérols des plantes)

II.3.1 Définition des phytostérols	47
II.3.2 Distribution	50
II.3.3 Propriétés pharmacologiques des stérols	51

II.4 Les Oxyphytostérols

II.4.1 Généralités	52
II.4.2 Nomenclature des Oxyphytosterols	53
II.4.3 Formation des produits d'oxydation des phytosterols	54
II.4.3.1 Auto-oxydation et Oxydation Thermique	54
II.4.3.2 Photoxydation	56
II.4.3.3 Oxydation de la chaîne latérale des phytostérols	56
II.4.4 Occurrence des oxyphytosterols dans la nourriture.....	57
II.4.5 Les effets biologiques possible des oxyphytostérols	58
II.4.6 La médecine traditionnelle	58

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Extraction	60
III.2 Purification des composés	61

III.3	Caractérisation des produits obtenus.....	63
III.3.1	Elucidation structurale du composé PS1	63
III.3.2	Elucidation structurale du composé PS2 et PS3.....	69
III.3.3	Elucidation structurale du composé PS4	75
III.3.4	Elucidation structurale du composé PS5	80
 CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE		
“ Extraction – Purification ”		
IV.1	Récolte de la plante	88
IV.2	Chimie extractive	
IV.2.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	88
IV.2.2	Chromatographie liquide sous vide (VLC)	88
IV.2.3	Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	89
IV.3	Chimie Structurale	
IV.3.1	Spectroscopie de RMN	89
IV.3.2	Spectrométrie de masse	89
IV.4	Etude de l'espèce <i>Pallenis spinosa</i>	
IV.4.1	Extraction	90
IV.4.2	Contrôle chromatographique	90
IV.4.3	Etude de l'extrait Chloroformique de l'espèce <i>pallenis spinosa</i>	91
IV.4.4	Purification	94
IV.4.4.1.	Etude de la fraction $F_5=F_5+F_6$	94
IV.4.4.2.	Etude de la fraction F_8	96
IV.4.4.2.1	Etude de la sous fraction $F_{8-6-15'}$	98
IV.4.4.2.2	Etude de la sous fraction $F_{8-6-19'}$	99
IV.4.4.3.	Etude de la fraction F_{13}	100
IV.5	Constantes physiques et données spectrales des composés isolés	101
 Conclusion Générale		104
Bibliographie		107
Abstract		

INTRODUCTION GENERALE

Au fil des temps, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, vêtements et pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extra ordinaires vertus des plantes, pour le traitement des maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire de l'humanité.

Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs, via le repérage de sources naturelles a résulté la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines^[1].

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne et aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs produits^[2].

L'Algérie, est un pays qui est connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques^[3].

Les ressources naturelles en plantes alimentaires, médicinales et aromatiques (PAMA) constituent une richesse pour le développement socio-économique des populations de l'Algérie et en particulier celles des régions des Aurès et du nord du Sahara. L'étude chimique de ces ressources (PAMA) est un sujet porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques sont toujours en concurrence pour l'élaboration de nouveaux principes actifs

d'origine végétale. Les activités de recherche passent tout d'abord par la récolte et l'identification des espèces végétales présentant un intérêt en médecine traditionnelle en particulier, à l'extraction de la matière végétale, au criblage biologique des extraits obtenus, à l'isolement des molécules ainsi qu'à leur caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques et à l'évaluation biologique des produits isolés à l'état pur. Les structures découvertes ayant un potentiel pharmacologique intéressant vont servir de modèle moléculaire pour la conception de nouveaux médicaments et faire face à la résistance bactérienne aux antibiotiques. A cet effet, des investissements colossaux ont été entrepris par des laboratoires pharmaceutiques à travers le monde pour la mise au point de médicaments susceptibles de guérir des maladies telles que: le cancer, le sida et le diabèteetc.

Étant donné que les plantes médicinales offrent diverses biomolécules utilisées comme remèdes contre plusieurs maladies et qu'une frange importante de la population en Algérie et notamment au niveau des zones rurales a recours aux plantes médicinales, réputées pour leurs vertus thérapeutiques, il est impératif de donner beaucoup d'importance à cette catégorie d'espèces végétales, et de réaliser des recherches phytochimique et pharmacologique sur cette ressource naturelle pour en isoler de nouvelles molécules aux activités biologiques prometteuses. Cette thématique transversale s'intéresse donc à la substance naturelle, support de l'activité biologique. La chimie et la biologie sont donc indispensables pour préciser la relation entre la structure et l'activité des molécules, notamment celles d'intérêts thérapeutiques. Ces composés bioactives sont vraisemblablement à l'origine du développement de l'industrie pharmaceutique^[4].

Ce mémoire est consacré à l'étude phytochimique d'une plante appartenant à la famille Aste-raceae qui pousse au niveau de la région des Aurès wilaya de Batna (Est Algerien), il s'agit de l'espèce ***Pallenis spinosa*** qui est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires. Cette étude a l'objectif d'avoir la nouveauté des métabolites secondaires de cette plante qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique.

Ce travail sera présenté comme suit :

Le premier chapitre de ce travail concerne tout d'abord à l'étude bibliographique de la plante. Cette étude commence d'abord par une description botanique de la famille, de genre et

de l'espèce étudiée, cette description permet de positionner l'espèce étudiée dans la systématique des plantes Astéracées. Elle se poursuit également par les travaux antérieurs relatifs à l'espèce.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général sur le type des métabolites secondaires a isolé c'est les stéroïdes (les phytostérols et les oxyphytosterols).

Le troisième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques personnels obtenus à partir des parties aériennes de la plante ***Pallenis spinosa***. Cette partie décrit l'isolement, la purification et la caractérisation structurale de cinq produits naturels issus de l'extrait chloroformique ainsi que les techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées.

Le quatrième chapitre résume les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de l'investigation phytochimique des extraits bruts chloroformique et butanolique des parties aériennes de la plante ***Pallenis spinosa*** : Fractionnement, purification et élucidation structurale des composés isolés.

RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 Généralités

I.1.1. Critères de sélection des plantes

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes et de trouver de nouvelles voies d'applications, tant dans les domaines de la pharmacie que de la cosmétique et afin de rendre la stratégie d'isolement plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier. Dans cette optique, certains critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes d'étude phytochimique.

➤ L'enquête ethnobotanique et ethnopharmacologique

Les informations d'enquête montrent que les plantes utilisées, en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques ^[1]. Une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires (substances chimiques synthétisées par les plantes) qui lui permettent de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, antiparasitaire ou antioxydant par exemple) ^[5].

➤ Aspects botaniques et chimiotaxonomiques

La connaissance des plantes choisies sur la base des enquêtes ethnobotaniques peut être enrichie par la connaissance botanique des espèces citées. Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines qui poussent dans les mêmes biotopes sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. La chimiotaxonomie, ou classification des plantes, en fonction des leurs métabolites secondaires, complète les classifications botaniques, basées sur des critères morphologiques et moléculaires (génétiques) ^[6]. Elle permet (si des substances sont particulièrement connues pour leur potentiel thérapeutique), de choisir des plantes chimiotaxonomiquement proches de celles dans laquelle la substance a été détectée et étudiée.

Par ailleurs, la rareté éventuelle d'une espèce, son époque de floraison et sa disponibilité, en terme de quantité, peuvent également constituer des critères de choix.

➤ **Etude bibliographique**

Le chercheur devra se renseigner sur éventuels travaux scientifiques antérieurs (étude bibliographique détaillée sur les connaissances phytochimiques des espèces et de leurs genres d'appartenance). Dans l'optique de la découverte de nouvelles molécules ou de nouvelles voies d'applications thérapeutiques ou cosmétiques, il est plus judicieux de choisir des plantes qui ont été peu ou pas étudiées chimiquement. Cependant, si la famille ou le genre a déjà été étudié, il sera plus facile de trouver des procédés analytiques, d'identifier rapidement les composés déjà connus et de trouver des traceurs qualitatifs et quantitatifs. Cela permet également d'éliminer les genres et/ou les espèces connues pour leur toxicité.

➤ **L'origine géographique commune**

Parmi les critères de choix des plantes : l'environnement de la plante, chaque région se diffère selon le type du sol, de l'eau et de météo ...). Les espèces évoluant dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques.

I.1.2 Critères de sélection des extraits

Le critère important c'est la quantité d'extrait brut (l'isolement des quantités suffisantes à l'identification des composés purs). Plusieurs méthodes sont mises à la disposition du phytochimiste pour évaluer les extraits bruts. Il s'agit du criblage chimique et biologique.

➤ **Criblage chimique**

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM) et les observations sous les lampes UV à 254 nm et 366 nm après révélation, avec des réactifs chimiques spécifiques ^[7], nous permet, dans un premier temps, d'avoir une idée sur les classes de composés des extraits testés. L'analyse par HPLC/UV, couplée ou non à la MS, des extraits bruts permet de déduire des informations importantes sur la composition de ces extraits.

➤ **Criblage biologique**

Pour guider l'isolement de nouvelles molécules actives, chaque extrait est soumis à une multitude de tests biologiques. Ces tests doivent être simples, rapides et spécifiques

pour permettre une sélection efficace des extraits. Notons toutefois qu'un résultat négatif, obtenu pour un extrait testé sur une cible biologique donnée, n'exclut pas toujours la présence de substances actives dans cet extrait (cas de synergie). Dans certains cas également, la concentration de ces substances est peut être très faible pour que l'on puisse détecter leur activité. Par conséquent, d'autres tests sont à envisager avant d'écarter tel ou tel extrait. Dans le cas où des extraits donnent des résultats positives, on peut passer à des étapes ultérieures de fractionnement de ces extraits pour rechercher les fractions actives par priorité, jusqu'à obtention des molécules pures responsables de l'activité biologique imputée à l'extrait ou à la plante (fractionnement guidé par l'activité biologique)^[8].

I.1.3 Généralités sur les métabolites secondaires

Métabolites secondaires sont les substances chimiques synthétisées par les plantes, ils sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement. D'une part, les pigments et les arômes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpènes...) sont très souvent impliqués dans des relations à bénéfices réciproques établies au cours de l'évolution entre plantes et animaux (pollinisation, dissémination des semences...). D'autre part, la plupart des métabolites secondaires des végétaux sont des phytoalexines (des molécules biologiquement actives), impliquées dans la défense des végétaux. Les propriétés de ces molécules sont, très souvent, mises à profit dans le cadre des médecines traditionnelles et la médecine allopathique moderne à travers l'usage de molécules purifiées ou issues d'hémisynthèses chimiques. Dans certains cas, la synthèse chimique est plus coûteuse que la production des molécules directement biosynthétisées par les plantes. La culture au champ de plantes médicinales est parfois délicate. Les efforts se sont multipliés depuis maintenant près de 20 ans pour produire des molécules à partir de cultures *in vitro* de tissus végétaux^[9,10].

Les métabolites secondaires (substances naturelles) issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale, la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels, à base de plantes, sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du 19^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment, le cas des phytosterols et les oxyphytosterols qui sont utilisés, en thérapeutique, comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques.

I.2 Description Botanique

I.2.1 Famille des Asteracées

I.2.1.1 Généralités

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Les Astéracées (Martynov 1820) anciennement appelées Composées (Compositae) (Giseke 1792), sont une famille appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces décrites dont 750 endémiques. C'est l'une des familles les plus importantes des Angiospermes. Ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent, des racines charnues rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes ^[11-13].

I.2.1.2 Position systématique

Selon Engler, les Asteracées appartiennent à l'ordre des Campanulales. Pour Cronquist, cette même famille est rattachée au superordre des Asteridées et l'ordre des Astrales. Dahlgren classe la famille des Asteracées dans le super ordre des Asteriflorées et l'ordre des Astrales. Thorne a élaboré une classification selon laquelle les Asteracées se trouvent dans le superordre des Asteranées et l'ordre des Astrales ^[12].

D'après APG II, l'immense famille des Asteracées est subdivisée en cinq sous familles principales : Barnadesioïdées, Mutisioïdées, Carduoïdées, Cichorioïdées et Astéroïdées. ^[13]

I.2.1.3 Caractères morphologiques généraux

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues ^[14]. Bien que généralement ce soit des plantes herbacées à feuilles isolées ^[11]. L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les Asteracées sur ce seul critère. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques: le capitule et Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus provenant du calice.

➤ **L'inflorescence** : Le capitule comprend un réceptacle plan ou plus moins bombé sur lequel sont insérés de l'extérieur vers l'intérieur, en ordre spirale :

- D'abord des bractées stériles vertes (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses) formant un involucre.
- Ensuite des petites bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur.

L'ensemble forme une inflorescence composée, d'où l'ancien nom de la famille. Les capitules sont parfois isolées (pâquerette), mais plus généralement ils sont à leur tour diversement regroupés : en grappe, en épi, en cyme, ou encore en corymbe chez le groupe des Radiées, voire en capitule ^[14].

➤ **La fleur** : les fleurs sont donc regroupées en capitules qui peuvent compter plusieurs centaines de fleurs. Les capitules sont parfois réduits à quelques fleurs (genre *Achillea*) voire, exceptionnellement à une seule fleur (genre *Echinops*) ^[14]. Les fleurs sont sessiles, axillées par une bractée mère. Le calice est très réduit. Ces fleurs, à pétales soudées, peuvent être tubuleuses (on parle de fleurons) ligulées (on parle de demi-fleurons) ou très rarement bilabiées. Il y a 5 étamines dont les anthères sont soudées en tubes (androcée synanthérée).

L'ovaire, formé de 2 carpelles est uniloculaire et ne possède qu'un ovule.

- **Fruits** : Ce sont des akènes (fruits secs indéhiscents uniséminés) possédant, le plus souvent, un pappus provenant du développement du calice après la fécondation.
- **Graines** : Elles sont exalbuminées.

I.2.1.4 Classification des Asteraceae

Selon le type de fleur composant le capitule, on distingue trois types de capitules ^[14] :

- Liguliflores dont les capitules sont uniquement composés de ligules (languettes comme les pissenlits, chicorées, etc);
- Tubuliflores dont les capitules sont uniquement composés de tubules (petits tubes comme chez les chardons) ;
- Radiées : en faisant la synthèse des deux types de fleurons on obtient les radiées dont le capitule est composé de ligules imitant les pétales à la périphérie et de tubules imitant les étamines et le pistil au centre ^[12,15].

Cinq étamines soudées en tube par les anthères, autour du style. Dans tous les cas, le fruit provenant de l'ovaire infère est un akène surmonté généralement d'une aigrette de soies (Pappus) provenant du développement du calice après fécondation. ^[12,13,16]

I.2.2 La tribu Inulée

I.2.2.1 Généralités

L'Inulée est une tribu comprend 38 genres et environ 480 espèces. Elle a été initialement établi comme l'un des Cassini (1819, 1822) 20 tribus. Il a inclus un certain nombre de genres désormais classés dans la Astereae, et a exclu quelques genres désormais considérés comme des membres de la Inulée ou séparer les deux tribus Gnaphaliées et Plucheeae (par exemple Pluchea). La classification de sous-tribu a été essentiellement répétée par HOFFMANN (1890), qui a aligné l'orthographe des noms subtribale.

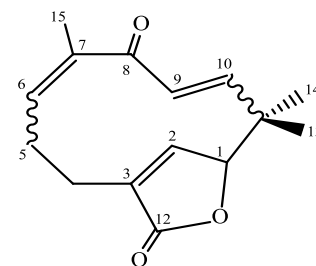
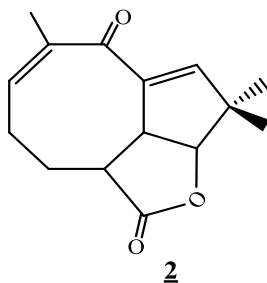
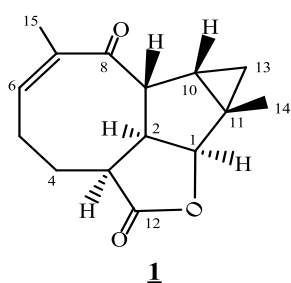
Les genres les plus connu de la tribu inulées sont : *Asteriscus* ^[21], *Nauplius* ^[22], *Bubonium*, *Pallenis*, *Odontosperum*, *Rhanterium*, *Buphtalmum*, *Saulcya*, *Athalmum* ^[23,25]. La nomenclature et la classification de ces genres et leurs espèces changent selon la taxonomie proposée par les botanistes basant sur des critères morphologiques. Les genres *Asteriscus*, *Buphtalmum*, *Nauplius*, *Bubonium*, *Odontosperum*, *Rhanterium* ont des caractères botanique très proches au genre *Pallenis* ^[25].

1.2.2.2 Etude chimique de quelques espèces des genres d'Inulée

En ce qui concerne l'étude chimique antérieure de la tribu Inulée, on prend comme exemple les genres suivants :

Le genre *Nauplius*

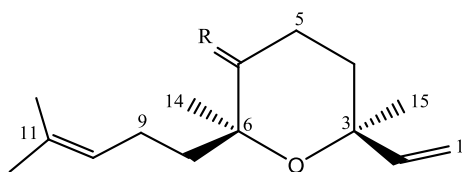
Une étude chimique réalisée sur l'extrait chloroformique de *Nauplius graveolensa* a permis l'identification de six sesquiterpènes lactones dont quatre asteriscunolides à squelette humulène. Il s'agit de : 14,15-diméthyl-8-oxo-tétracyclique [6.3.2.1] dodéca-12,1-olide 1, 6,7, 9,10-tétradihydroasteriscanolide 2, 8-oxo-humula-6Z,9Z-diène-12,1-olide 3, 8-oxohumula-6E,9Z-diène-12,1-olide 4, 8-oxo-humula-6Z,9Z-diène-12,1-olide 5, 8-oxo-6E,9E-diène-12,1-olide 6 ^[29].



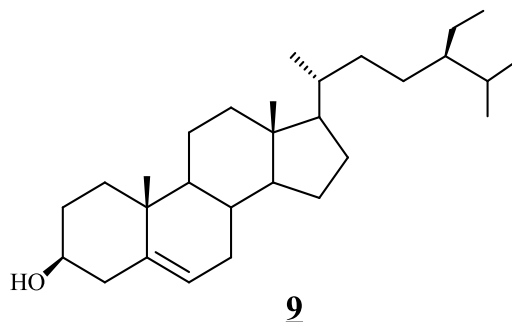
<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
6Z, 9Z	6E, 9Z	6Z, 9E	6E, 9E

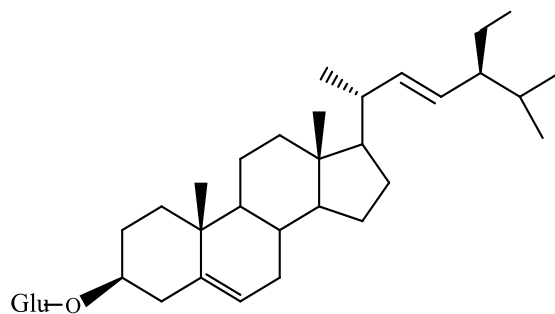
- Le genre *Asteriscus*

Asteriscus sericeus les métabolites isolés de cette espèce sont les dérivées d'asteriscunolide humulène. Une autre étude phytochimique réalisée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes ^[27-28], a abouti à l'isolement de huit composés : asteriscunolide 3-6, 6-oxocyclonérolidol 7, 6α-hydroxycyclonérolidol 8, β-sitostérol 9 et stigmastérol-β-D-glucopyranoside 10.

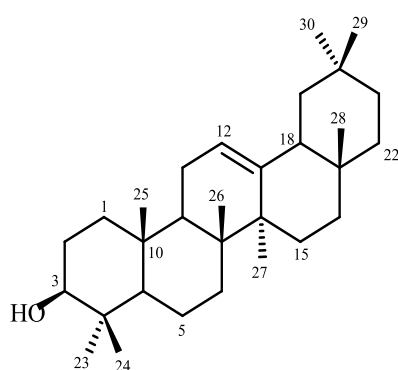
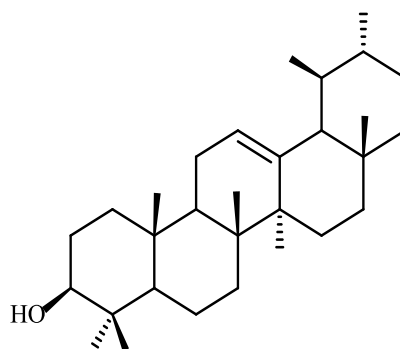
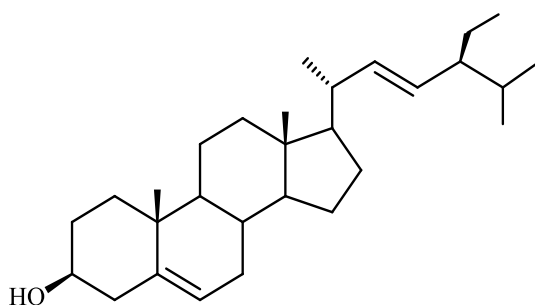
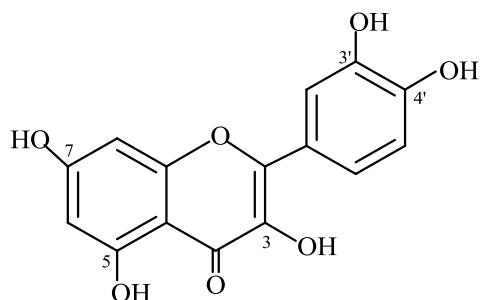


7 R = O
8 R = αOH,H



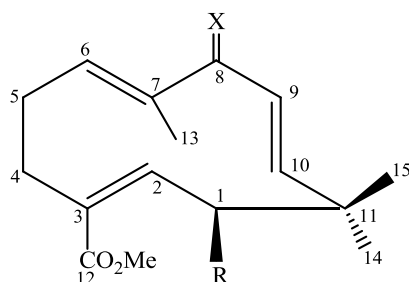
**10**

Une étude phytochimique de l'extrait chloroformique de *Inula crithmoides* ^[30], a permis d'isoler et d'identifier les triterpènes suivants : β -amyrine (3-hydroxyoléan-12-ène), **11**, α -amyrine (3-hydroxyurs-12-ène), **12**, stigmastérol **13**, β -sitostérol **9**. L'étude de l'extrait acétate d'éthyle a mis en évidence la présence d'un flavonoïde nommé quercétine ou 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone **14**.

**11****12****13****14**

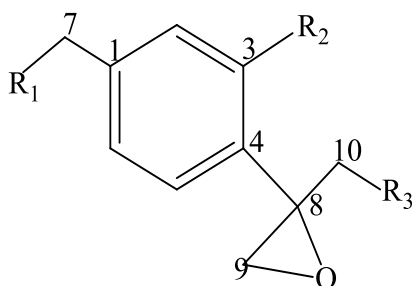
- Le genre *Odontospermum*

Ainsi l'étude chimique de l'espèce *O. graveolens* ^[31] a abouti à l'isolement et la caractérisation de onze sesquiterpènes lactones à squelette humulène : **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23** et **24**.

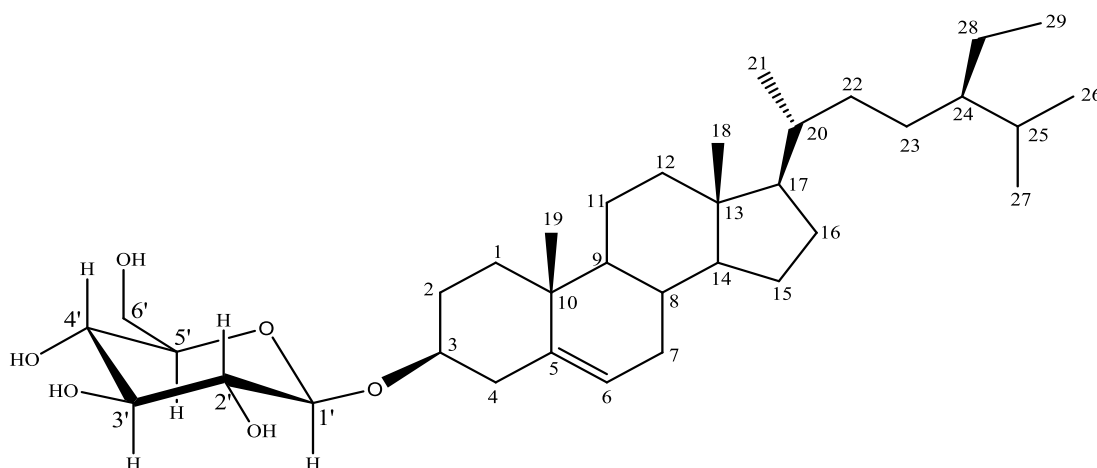


	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>21</u>	<u>22</u>	<u>23</u>	<u>24</u>
R	H	H	H	H	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	H
X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	α OH,H
Δ^6	E	E	Z	Z	E	E	Z	Z	E	E
Δ^9	E	Z	Z	E	E	Z	E	Z	Z	Z

Une recherche bibliographique exhaustive a permis de relever des études phytochimiques a été réalisée sur l'espèce *Odontospermum pygmaeum* ^[23,24]. Ces études ont abouti à la mise en évidence de six composés ; 3-O- β -D-glucopyranosyl stigmastérol **10**, stigmastérol **13**, 3-O- β -D-glucopyranosyl β -Sitostérol **25**, **26**, **27** et **28** dérivés du thymol et farnésol. Leurs structures sont représentées ci-dessous.



	<u>26</u>	<u>27</u>	<u>28</u>
R₁	H	OCOCHMe ₂	OCOCH ₂ CHMe ₂
R₂	OCOCHMe ₂	OCOCHMe ₂	OCOCHMe ₂
R₃	OCOCHMe ₂	OCOCHMe ₂	OCOCHMe ₂



25

I.2.3 Le genre *Pallenis*

Le mot *Pallenis* est dérivé de *palea* (paillettes). Ce genre de plantes appartient à la tribu naturelle des Inulées. Les caractères génériques du *Pallenis* sont^[26] : Capitules hétérogam, fleurs margiales sur deux rands. Involucre double, l'extérieur étalé et constitué par des bractées foliacées, spinescentes, étalées en étoile; dépassant ou non les ligules; l'intérieur à bractées courtes, cuspidées. Akène dimorphes, ceux du rayon très comprimés d'avant en arrière, ailés latéralement et à ailes membraneuses, sans aigrette ou presque (différence avec *Asteriscus*); ce disque comprimés latéralement, avec une seule aile longitudinale et postérieure à aigrette courte, coroniforme, membraneuse et fortement laciniée^[32,33].

C'est un genre méditerranéen typique, occurrence dans le désert et côtier habitats de l'Europe méridionale, l'Afrique du nord, les îles Canaries et le le Moyen-Orient. En se basant sur les données des deux références Ozynda^[32] et Quzel^[33] disant que le genre *Pallenis* est un genre monotypique contient qu'une seule espèce *Pallenis spinosa* avec deux Sous espèces:

Sous espèce *Cuspidata* (Pom.)Batt. Feuilles caulinaires longuement cuspidées, plante grêle, involucre externe à bractées étroites, courtes, souvent dépassées par les ligules, réceptacle à paillettes internes non ailées sur le dos. Special aux régions steppiques^[32].

Sous espèce Eu-spinosa M. Plant robuste généralement velue, involucre externe à bractées oblongues ou lancéolées, dépassant les ligules, égales ou inégales, réceptacle à paillettes internes soit non ailées, soit ailées sur le dos^[32].

I.2.4 Espèce *Pallenis spinosa*

I.2.4.1 Ethymologie

Les fleures de cette plante deviennent brunatres, en se fanant, d'où le nom générique, dérivé d'un verbe latin, signifiant « perdre sa couleur », l'épithète spinosa, s'applique aussi bractées « épineuses »^[34].

I.2.4.2 Caractéristiques botaniques

C'est une plante herbacée, annuelle ou biannuelle, dont la tige, haute d'environ un pied, est dressée, dure, velue, un peu rameuse, presque dichotome. Les feuilles radicales sont étalée, longues, étrécies vers la base, obtuses au sommet, denticulées sur les bords, velues. Celles de la tige sont alternes, sessiles, embrassantes, lancéolées et velues, les posées de fleurs jaunes, réunies en capitules de 18 à 25 mm (**Figure I.1 et I.2**). On trouve cette plante sur le bord des champs, dans les provinces méridionales forêts claires, paturages,^[32] Lieux incultes de la région méridionale, bord des chemins commun, où elle fleurit en Juin et Juillet^[32-34].

Cette espèce est distribuée dans toute la région méditerranéenne : Moyen-Orient, Amman, Jarash, Palestine^[36], Libya^[38], Maroc^[39], Egypte^[40] Europe, Nord d'Afrique^[41] et Algérie^[42].



Figure I.1: *Pallenis spinosa* L. (Cass.)

I.2.4.3 Noms vernaculaires et Synonymes

➤ **Synonymes** : les synonymes les plus connus sont ^[35]:

- *Asteriscus spinosus* (L.) Gren. & Godr.
- *Athalmum spinosum* (L.) Kuntze
- *Bubonium spinosum* (L.) Hill
- *Buphthalmum asteroideum* Viv.
- *Buphthalmum spinosum* L.
- *Pallenis spinosa* (L.) Cass.
- *Aterescus spinosus* G.G.

➤ **Noms vernaculaires**

Les noms vernaculaires les plus communs de l'espèce *Pallenis spinosa* sont regroupés dans le **Tableau I.1**:

Tableau I.1 : Les noms vernaculaires communs de *Pallenis spinosa*.

	Noms vernaculaires
Arabe	Nougé ou Rebian.
Français	Astérolide épineux - Buphthalme épineux - Pallénis épineux.
Anglais	Spiny Fleabane - Spiny Golden-star - Spiny Starwort.
Allemand	Stachliges Sternauge - Stechendes Goldauge - Stechendes Sternauge.
Italien	Asterisco spinoso.
Espagnol	Castañuela - Estrellada Espinosa.
Grec	Αστερίσκος ο ακανθωτός - Καρφόχορτα - Καρφόχορτο - Παλλενίς η αγκαθωτή.

Le code de taxon de l'espèce *Pallenis spinosa* est **Ps** ^[37].

I.2.4.4 Classification systématique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Asterales.

Famille : Asteraceae.

Tribu : Inuleae.

Genre : *Pallenis*.

Espèce : *Pallenis spinosa*.

I.2.4.5 Utilisation médicinale

L'espèce *Pallenis spinosa* est utilisée éventuellement comme remède de quelques maladies^[43-45] présentées dans le tableau suivant (**Tableau I.2**) :

Tableau I.2 : Quelques maladies remèdes par *Pallenis spinosa*.

Maladie	Partie utilisée de la plante	Méthode utilisée	Administration
Maladies gastriques. Problèmes de circulation.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Orale
Blessures.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Orale et topique
Inflammation.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Topique
Infections bucales, Problèmes de respiration.	Plante fleurées	Infusion	Topique
Douleurs.	Fleurs	Infusion	Orale et topique

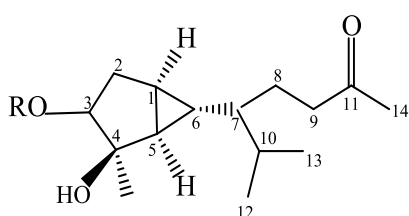
Un groupe espagnol a fait une étude des extraits de la plante montre une activité Anti-insect^[46].

I.2.6 Etudes chimiques antérieures de l'espèce *Pallenis spinosa*

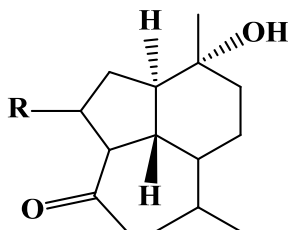
Une recherche bibliographique réalisée sur l'espèce *Pallenis spinosa* montre qu'elle a fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Ce qui a permis d'isoler un nombre intéressant de substances naturelles connues pour leurs diverses activités biologiques, dont les plus majoritaires :

I.2.6.1 Les sesquiterpènes

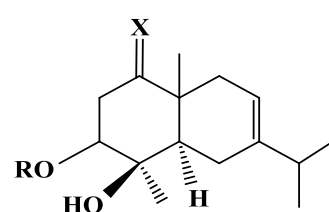
Les études phytochimique antérieures réalisée sur l'espèce *Pallenis spinosa*, ont mis en évidence des oplodiols comme les eudesmanes, germacrane et ses dérivés de type sesquiterpène ^[47-49] : 3β-acétoxy-4β-hydroxypallenone **29**, 3β, 4β dihydroxypallenone **30**, 3β-acétoxyoplopanone **31**, 3β-hydroxyoplopanone **32**, oplopanone **33**, dicétone d'oplopallenone **34**, eudesmane **35**, 3 β-hydroxyoplodiol **36**, le diacétate eudesmane 3 β-acétoxyoplodiol-1-acétate **37**, un céto-acétate d'oplodiol **38**, 3β-acétoxy-4β-hydroxygermacra-1(10), 5-diène **39**, 3β,4β-dihydroxygermacra-1(10),5-diène **40**, α- cadinol **41**, T-Cadinene **42**, 8-acetyltovarol **43**, shiromool **44** et 1β, 10α ; 4β,5α-diépoxy-7-germacran-6β-ol **45** et le diastérisomère de 1,10-époxyde de shiromool (**46**), 1,10-époxyde de 3β-acétoxy-4β-hydroxygermacra-1(10), 5-diène **47** et l'isodocane **48**.



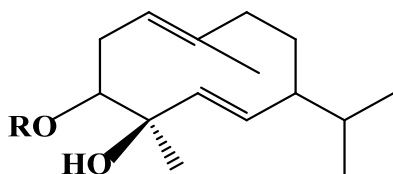
	R
29	Ac
30	H



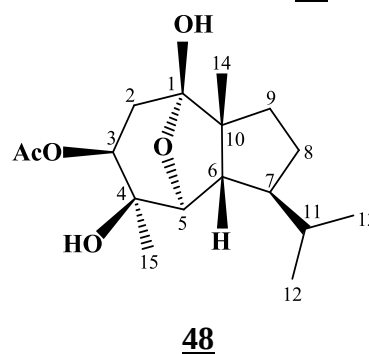
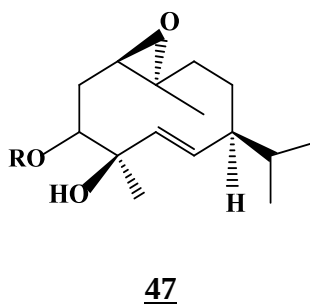
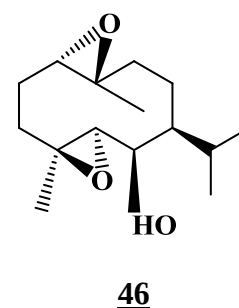
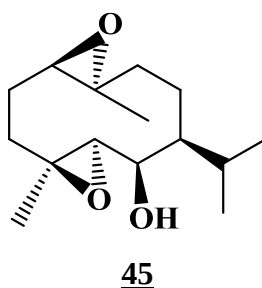
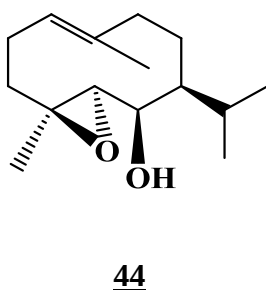
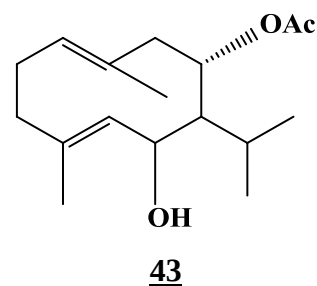
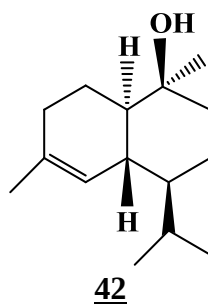
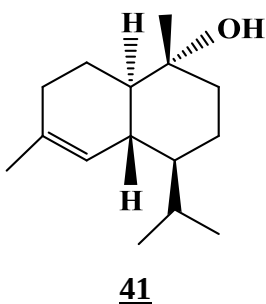
	R
31	Ac
32	OH
33	H
34	O



	R	X
35	Ac	β-OH, H
36	H	β-OH, H
37	OAc	B-OAc, H
38	AC	O

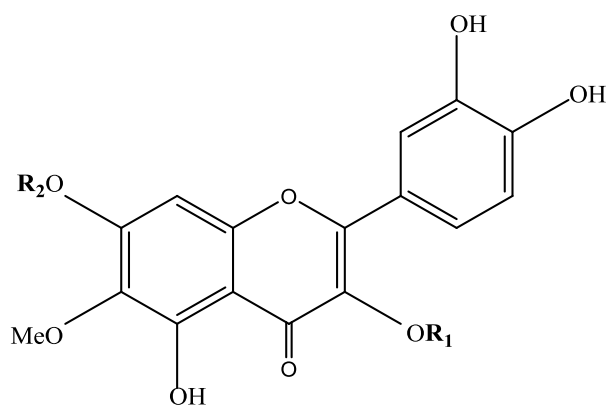


	R
<u>39</u>	Ac
<u>40</u>	H

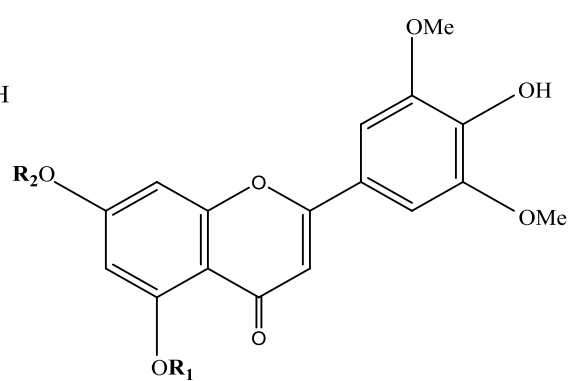


I.2.6.2 Les Flavonoides

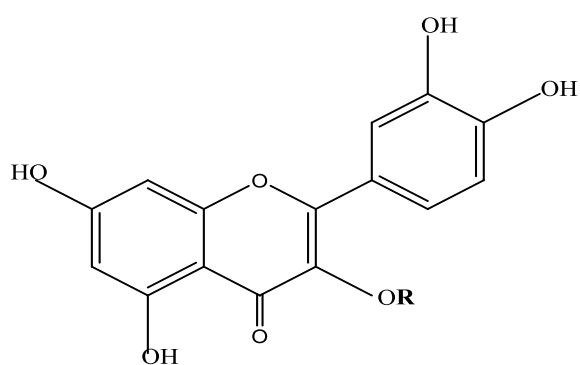
L'étude phytochimique réalisée sur les parties aérienne de l'espèce *Pallenis spinosa*, a mis en évidence 11 flavonoides ^[50] : la patuletin 49, 3-O-β-D-galactoside 50, 7-O-β-D-galactoside 51 et 3-O-β-L-rhamnosyl (1-6)-β-D-galactoside de patuletin 52, le 5-O-β-D-glucoside 54 et 7-O-β-D-glucoside de tricin 55, le 3-O-β-D-galactoside de quercétine 57 et quercetin 3-méthyl éther 58, le aglycones kaempferol 59 et le 3-méthyl éther 60, le 3,5,6,7,3'-penta-méthyl éther 62 et 3,5,6,7,3',4'-hexamethyl ether de quercetagein 63.



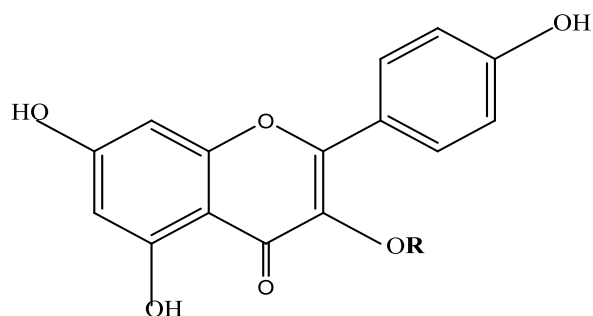
	R1	R2
<u>49</u>	H	H
<u>50</u>	Gala	H
<u>51</u>	H	Gala
<u>52</u>	Rham-Gala	H



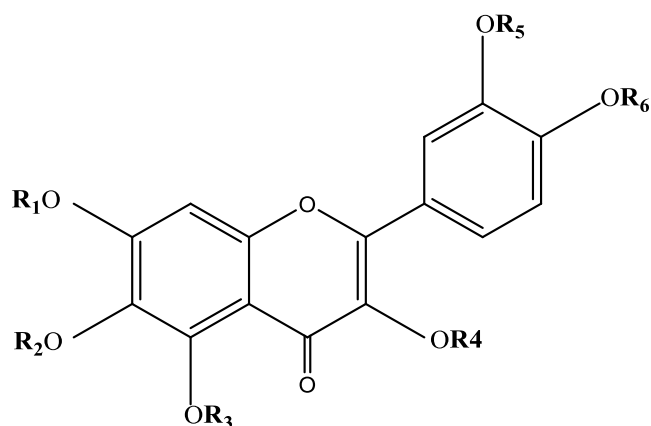
	R1	R2
<u>53</u>	H	H
<u>54</u>	Gluc	H
<u>55</u>	H	Gluc



	R
<u>56</u>	H
<u>57</u>	Gala
<u>58</u>	Me



	R
<u>59</u>	H
<u>60</u>	Me



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<u>61</u>	H	H	H	H	H	H
<u>62</u>	Me	Me	Me	Me	Me	H
<u>63</u>	Me	Me	Me	Me	Me	Me

I.2.6.3 Huiles Essentielles

D'autre part, une équipe Italienne ^[51], s'est intéressée à l'extraction de l'huile essentielle de l'espèce *Pallenis spinosa* et à l'identification de ses constituants. Au total, ils ont obtenu 38 composés identifiés par la GC et GC-MS. 60% de l'huile sont des sesquiterpénoids oxygénés, regroupés dans le **Tableau I.3**.

Les constituants majoritaires sont :

- Germacra-1(10),5-diène-3,4-diol (18.4 %).
- α -cadinol (14.1%).
- 3-acetoxygermacra-1-(10),5-diene-4-ol (13.0 %).
- T-cadinol (8.2 %).
- δ -cadinene (5.8 %).

Tableau I.3: La composition de l'huile essentielle de l'espèce *Pallenis spinosa*.

Composant	Pourcentage (%)
β -Pinene	0.4
α -Phellandrene	1.5
p-Cymene	2.6
Phenylacetaldehyde	0.3
Decanal	0.5
Thymol methyl ether	4.2
C ₁₂ H ₁₈	0.2
p-Methoxyacetophenone	0.3
Undecanal	0.4
α -Cubebene	0.3
β -Caryophyllene	0.3
α -Cadinene	0.4
(E)- β -Farnesene	0.8
γ -Murolene	0.4
Germacrene-D	1.0
Bicyclogermacrene	3.6
C ₁₅ H ₂₄	0.4
α -Murolene	1.1
Viridiflorene	1.2
γ -Cadinene	1.5
δ -Cadinene	5.8
Elemol	0.3

Composant	Pourcentage (%)
γ -Elemene	0.3
Germacrene D-4-ol	3.2
Globulol	0.3
β -Oplopenone	0.4
T-Cadinol	8.2
α -Cadinol	14.1
Torreyol	1.7
Germacrene-1(10), 5-dien-3,4-diol	18.4
C ₁₅ H ₂₄ O	0.6
Phytol	0.9
6,10, 14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0.4
3Acetoxygermacrene-1(10), 5-dien-4-ol	13.0
Palmitic acid	3.8
Methyl linoleate	0.6
Methyl linolenate	0.3
Heneicosane	0.1
Tricosane	0.3
Pentacosane	0.4
Heptacosane	0.2

ETUDE
DES
STEROIDES

II.1 STEROIDS

II.1.1 Etymologie

Le terme stéroïde tire son origine du mot grec "Stéréos" signifiant "Solide" est désignant toutes les molécules comportant un squelette tétracyclique correspondant à un perhydrocyclopentanophénanthréne (Gonane) (**Figure II.1.1**) ^[52-54].

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

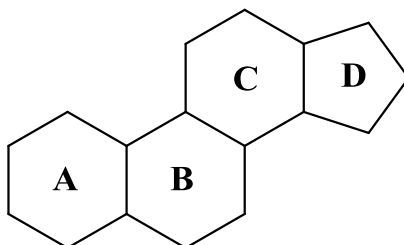
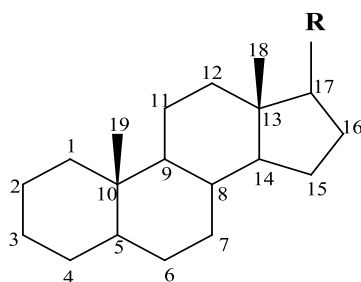


Figure II. 1. 1 : Structure de base des stéroïdes

II.1.2 Généralités

La numérotation des atomes de carbone du squelette stéroïdique est comme suit : le carbone en haut du cycle A porte le N°1, les atomes des deux cycles A et B sont numérotés successivement en tournant dans le sens (1 à 10); on passe ensuite aux atomes du cycle C (11 à 14) puis D (15 à 17). Les radicaux méthyles liés aux carbones 13 et 10 sont désignés par les nombres 18 et 19. Enfin, une chaîne alkyle en C-17 (**Figure II.1.2**). Les deux cycles A et B peuvent avoir aussi des insaturations au niveau des carbones C-4, C-5 et C-7 (**Figure II.1.3**) ^[55- 59].



(R = diverses chaînes latérales)

Figure II. 1. 2 : Numérotation des atomes de carbones de Stéroïde.

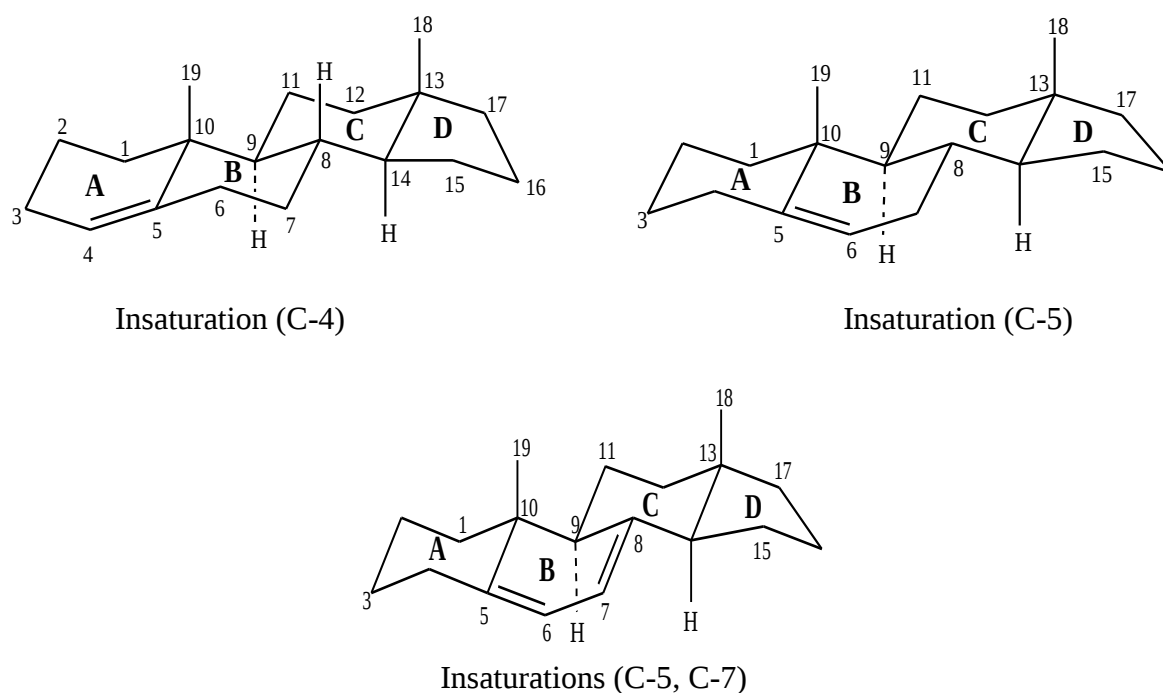


Figure II. 1. 3: L'insaturation au niveau des cycles du noyau stéroïdique.

Dans certains composés stéroïdiques, le cycle A peut être aromatique (les œstrogènes), les cycles A, B et C sont aromatiques appelant les stéroïdes triaromatiques (Sédiments ou Pétrole) ^[62]. Cette aromaticité entraîne obligatoirement la perte du méthyle angulaire en C-10 et / ou C-13 (**Figure II.1.4**) ^[54, 60, 61].

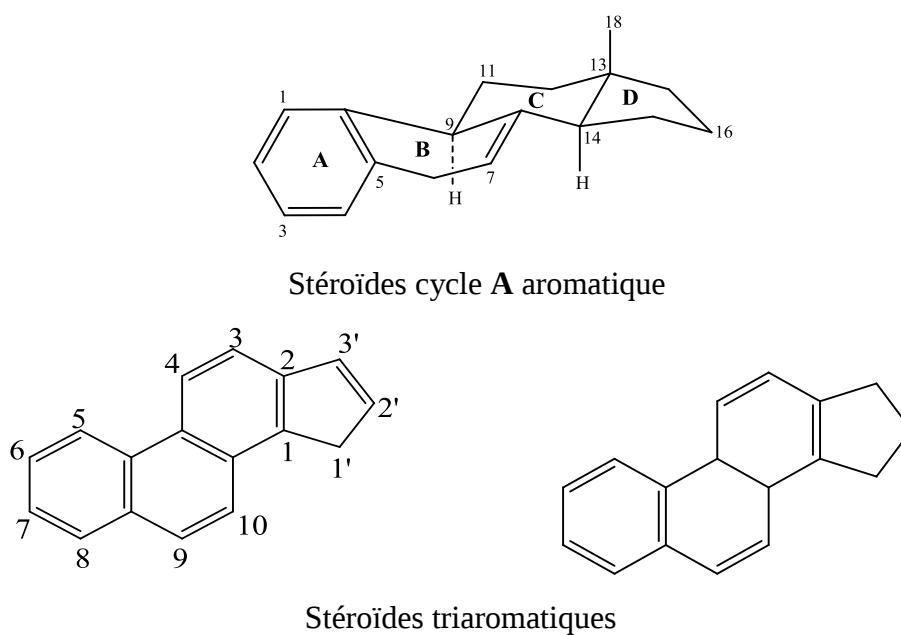
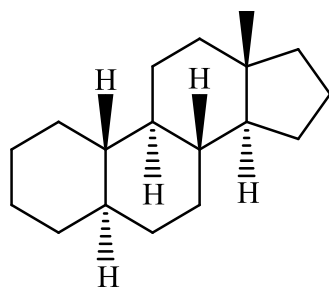
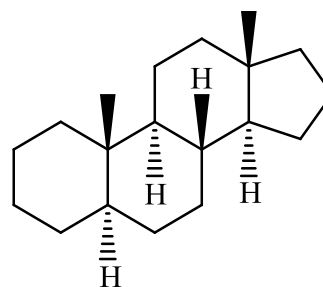
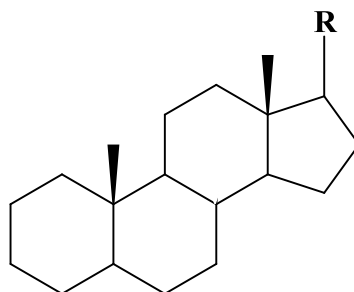
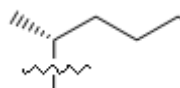
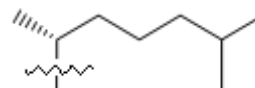
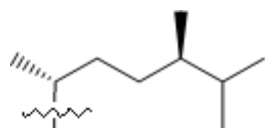
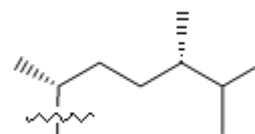
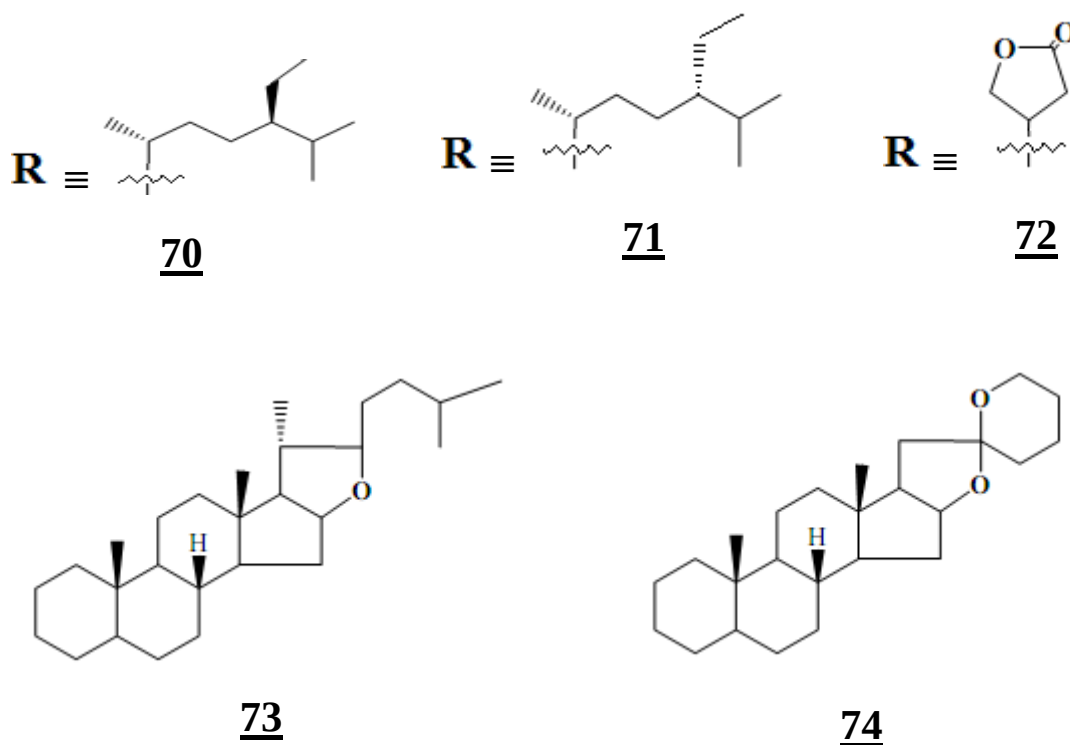


Figure II.1.4 : Les Structures de base des Stéroïdes Aromatiques.

II.I.3 Nomenclature

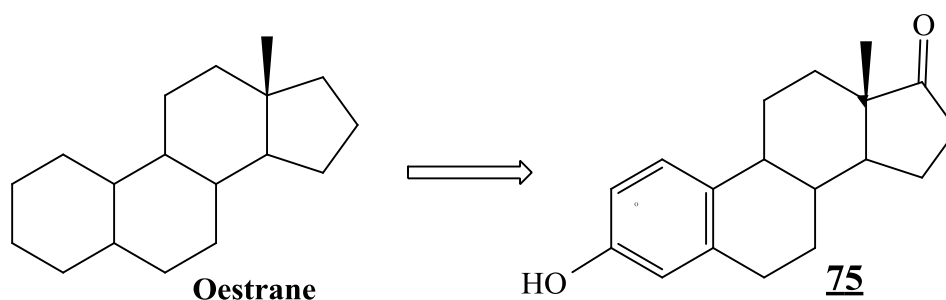
Les règles de nomenclature des stéroïdes sont celles énoncées par l'IUPAC-IUB ^[63]. La nomenclature des stéroïdes naturels est basée généralement sur le nom du squelette de base. Les noms des stéroïdes dérivent de plusieurs molécules de base : Oestrane **63** (18C), l'androstane (19C) **64**, le prégnane (21C) **65**, le cholane (24C) **66**, cholestane (C27) **67**, Compéstan **68**, l'ergostane **69** (28C), le stigmastane **70** et poriferastane **71** (29C) Cardanolide **72** (21C), Furostane **73** (27C) et Spirostane **74** (23C). Dans ces structures la configuration (20R)-8 β , 9 α , 10 β , 13 β , 14 α , 17 β est implicite. La configuration en C-24 de l'ergostane et du stigmastane est respectivement S et R ^[62, 64-66].

**63****64****65****R** $\equiv$ **66****R** $\equiv$ **67****R** $\equiv$ **68****R** $\equiv$ **69****R** $\equiv$ 



Ces structures diffèrent par la substitution sur les positions 10,13 et 17 (noyau stéroïdique) et par la chaîne latérale.^[56]

- 1- Oestrane (appelée aussi norandostane) (18C) qui comporte, en plus des 4 cycles A, B, C, D un méthyle en position 13. A cette série appartient l'œstrone **75**, hormone féminine (**Figure II.2.1**).
- 2- Androstane, (19C) qui comporte deux méthyles en positions 10 et 13. Le principal représentant de cette série est la testostérone **76**, qui est une hormone masculine (**Figure II.2.1**).
- 3- Prénane, (21C) avec deux méthyles en 10 et 13 et un groupement éthyle en 17, comme dans le cas de la cortisone **77** (**Figure II.2.1**).



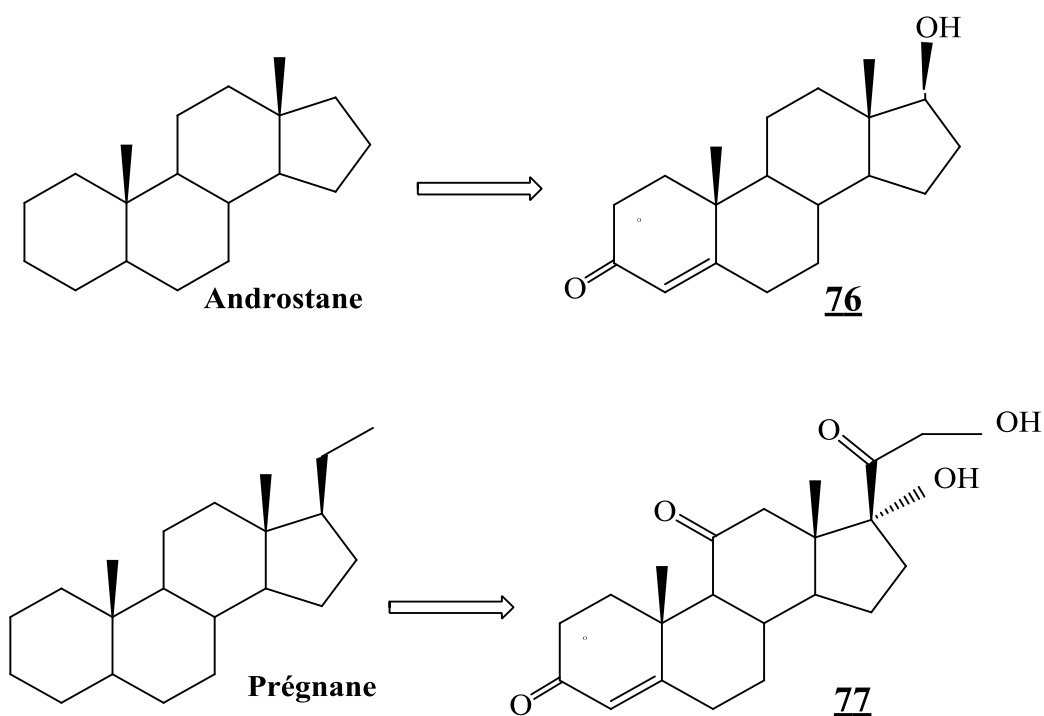
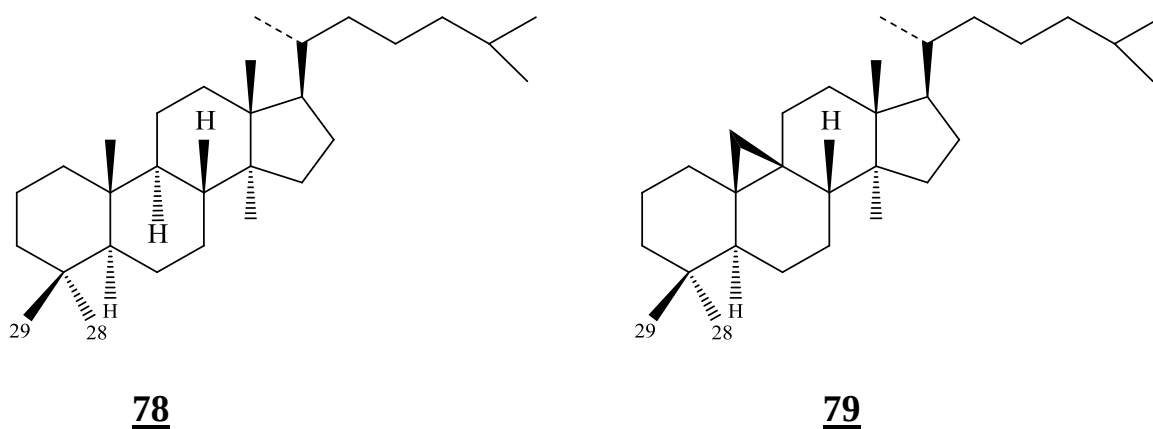


Figure II.2.1 : Les séries des stéroïdes.

Les hydrocarbures triterpéniques à squelettes lanostane 78 et cycloartane 79, sont également utilisés dans la nomenclature systématique des stéroïdes ^[58, 65, 66].

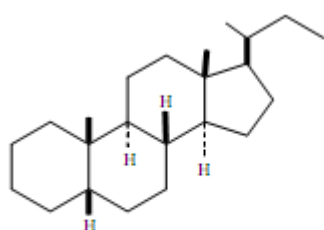


La nomenclature de l'insaturation au niveau du squelette stéroïdique, représentée par le symbole $\Delta^{x,y,z}$. Les variables x, y et z indiquent les positions des liaisons insaturées.

Le groupement fonctionnel prioritaire est ajouté, comme suffixe, au nom original du squelette stéroïdique. D'autres groupements sont ajoutés, comme prefixes, par utilisation de termes spécifiques^[52, 54, 58, 66]. On citera les termes :

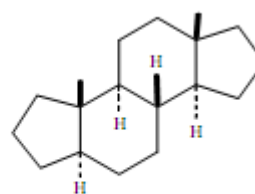
- *Nor* indiquant la contraction d'un cycle.
- *Homo* présentant l'expansion d'un cycle.
- *Seco* pour indiquer la scission d'une liaison.
- *Des* utilisé pour indiquer l'élimination d'un cycle ou un groupement Méthyl.
- *Abeo* indiquant la contraction d'un cycle et l'expansion simultanée d'un cycle contigu.

Quelques exemples sur ces règles sont cités ci-dessous (**Figure II.2.2**)^[54]:



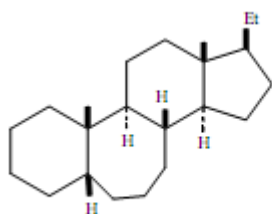
23-nor-5 β -cholane

80



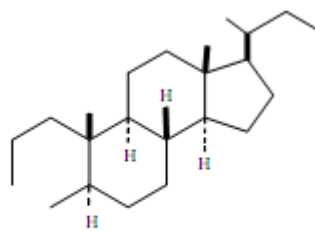
A-nor-5 α -androstane

81



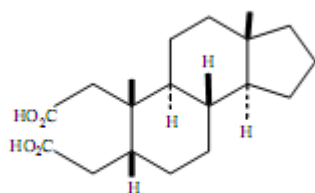
β -homo-5 β -pregnane

82



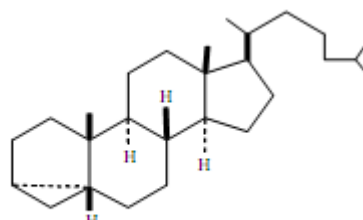
3,4-seco-5 α -choleane

83



2,3-seco-5 β -androstane-2,3dioic acid

84



3 α ,5 α -cyclocholestane

85

Figure II.2.2 : Nomenclature des stéroïdes.

II.1.4 Stéréochimie

La relation entre la stéréochimie et l'activité biologique est assez marquée dans le champ stéroïdique. Comme on peut le constater, dans le cas du cholestérol **86**, il y a un nombre élevé de carbones asymétriques, ce qui supposerait un grand nombre de stéréoisomères.

La stéréochimie des stéroïdes au niveau des carbones C-5 et C-14 est représentée par les deux lettres grecques α et β . α présentant la face inférieure de cycle et β la face supérieure, ceci par rapport aux méthyles angulaires axiaux de conformation β .

Dans le cas des stéroïdes naturels, la chaîne latérale est le plus souvent β orientée et la jonction entre les cycles B et C, est toujours de type *trans*. Toutefois, les stéroïdes à jonction *cis* peuvent être préparés synthétiquement, la jonction entre les cycles C et D est souvent de type *trans* (**Figure II.3.1**), cependant il y a quelques exceptions pour les hétérosides cardiotoniques^[58, 66, 68-70].

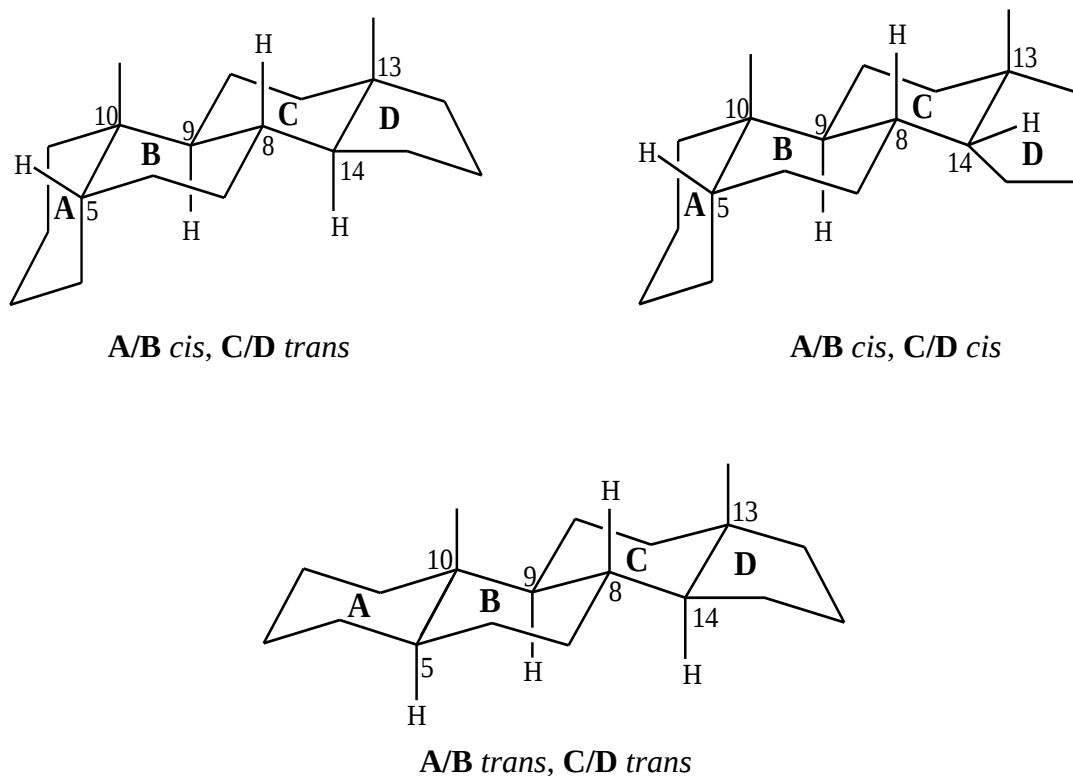
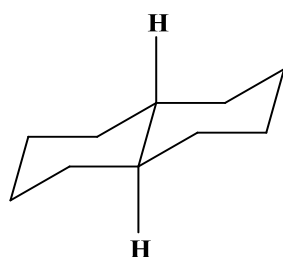


Figure II.3.1: La jonction entre les cycles du noyau stéroïdique.

La jonction entre les cycles A et B peut être soit de type:

Type trans

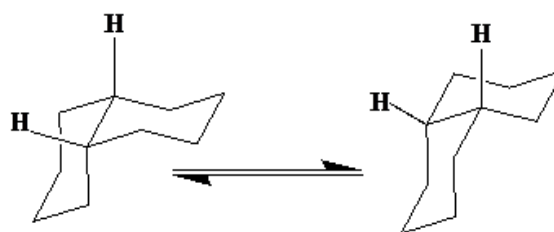
comme dans la *trans* décaline **87**



Exemple de cholestane

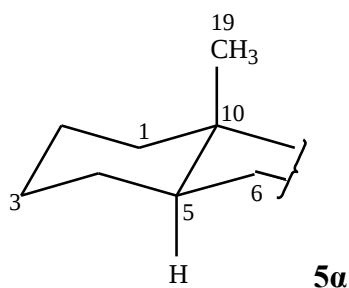
Type cis

comme dans la *cis* décaline **88**

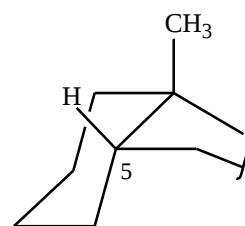


Exemple de coprostane

Cet aspect de la jonction conduit donc à deux types de stéroïdes différenciables uniquement par la conformation 5α ou 5β ^[58, 66, 68], comme il est indiqué dans la **Figure II.3.2**.



5α



5β

Figure II.3.2: Type de stéroïds selon la conformation 5α ou 5β .

Les jonctions *trans* dans les trois cycles A, B et C (**Figure II.5**), imposent une conformation rigide pour la molécule. Cette rigidité occasionne inévitablement des tensions stériques, du fait que la molécule ne bénéficie plus de l'interconversion habituelle du cyclohexane ^[70-72].

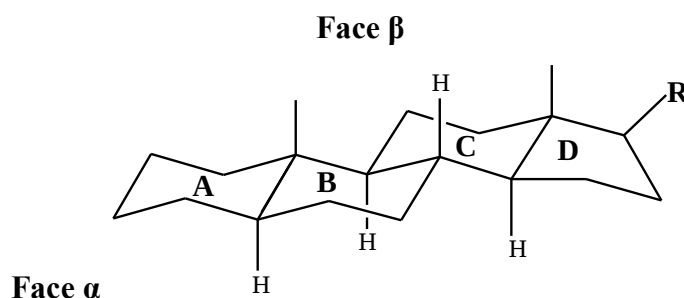


Figure II.3.3: Conformation rigide des jonctions *trans* (cycles A, B et C).

II.1.5 Les Principaux Stéroïdes

Les stéroïdes comprennent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent : les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les acides biliaires, les stérols, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines, quelques alcaloïdes et d'autres groupes mineurs ^[76]. Les stéroïdes les plus importants se retrouvent dans les hormones, les acides biliaires et certaines vitamines ^[56].

II.1.5.1 Les hormones

Les hormones sont des molécules émises par une glande. Elles ont des structures différentes : acides aminés, polypeptides ou stéroïdes. Ces dernières sont des régulateurs de l'activité biologique (caractères sexuels secondaires et physiologie de la reproduction).

Les hormones sont bio synthétisées à partir du cholestérol. Leurs structures n'ont été élucidées que depuis une cinquantaine d'années en raison de leurs très faibles proportions dans l'organisme, elles sont de deux types ^[56,73]:

- **Les hormones sexuelles :**

1. Les androgènes : ce sont des hormones mâles (testostérone **89** et androstérone **90**) produites par les testicules la testostérone responsable du caractère male et qu'on retrouve dans les urines sous forme d'androstérone. Elles sont responsables des caractères masculins (pilosité, gabarit, voix grave...).
2. Les oestrogènes: ce sont des hormones femelles comme (œstrone **75** (folliculine), œstradiol **91** dont la présence dans les urines dénote la grossesse. Elles contrôlent le cycle menstruel et sont responsables du développement des caractères sexuels secondaires féminins (voix, pilosité...).
3. Les progestatifs: sont plus communément connus sous le nom d'hormones de « grossesse » (progestérone **92**). Associées aux oestrogènes, elles sont responsables de la nidation de l'ovule fécondée et régulent l'évolution de la grossesse.

- **Les Corticoïdes**

Elles sont produites au niveau des glandes surrénales (corticosurrénales). La fonction oxygénée en C-11 est caractéristique de ce groupe dont la plus connue est la cortisone **77** et aldostérone **93**. Elles ont la particularité d'être substituées en position 5 ou 9 comme la dexaméthasone **94**. Elles sont utilisées comme médicaments et se sont avérées

plus actives que la cortisone^[56]. Ce sont des anti-inflammatoires très puissants (traitement des allergies, de l'asthme, des rhumatismes, de l'arthrite...) et elles participent au contrôle du métabolisme des protéines et des glucides.^[56,73]

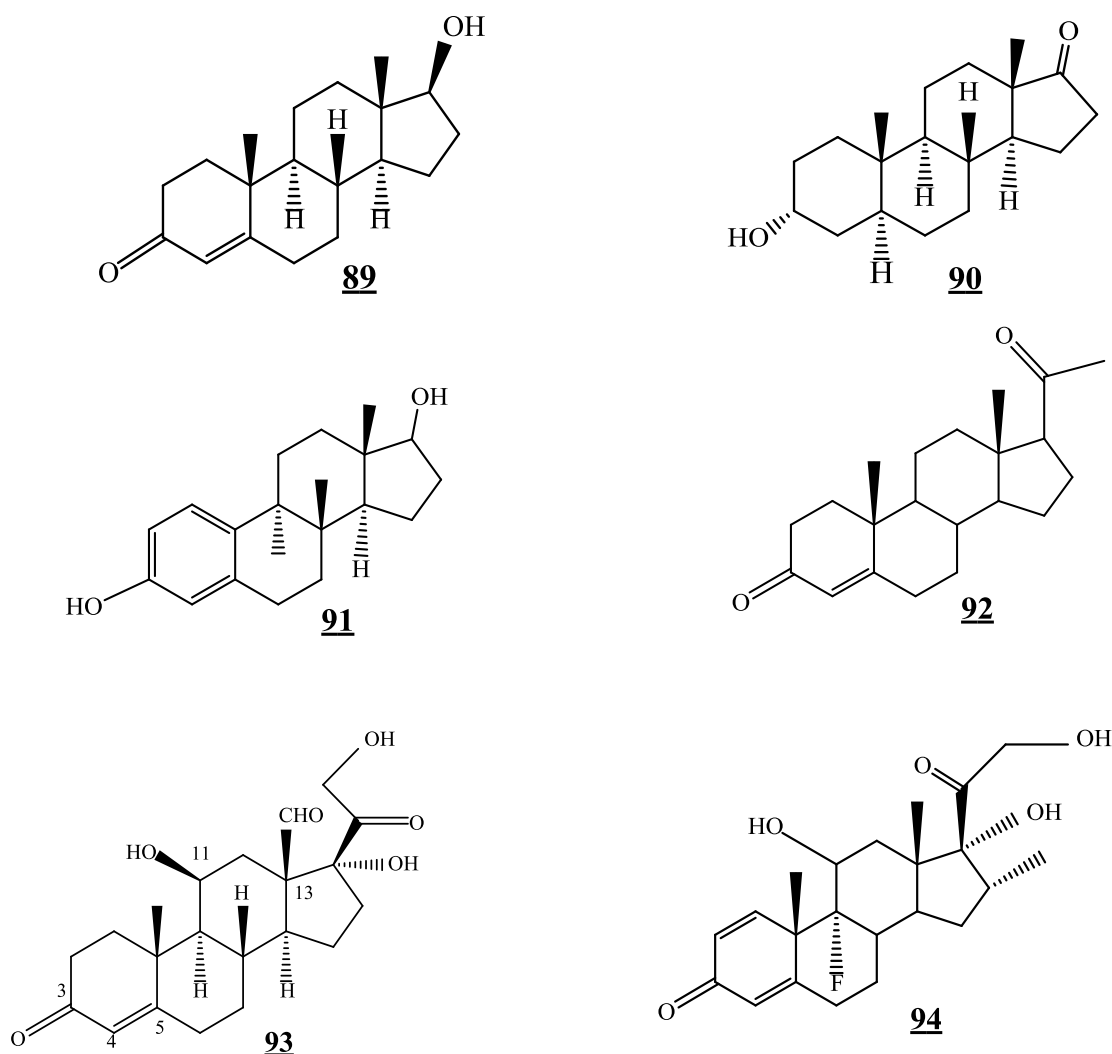
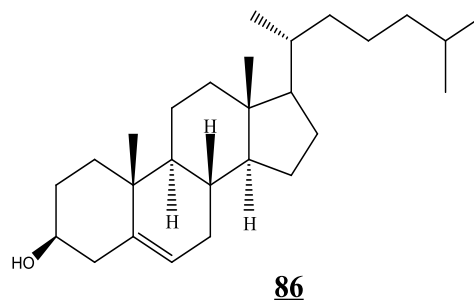
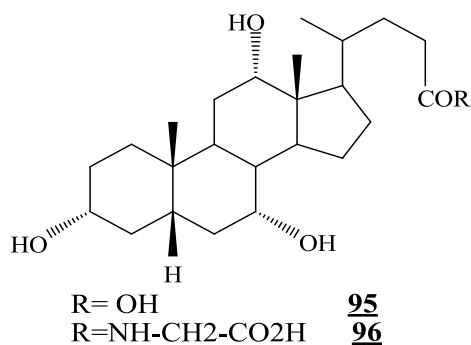


Figure II.4 : Quelques hormones stéroïdiennes.

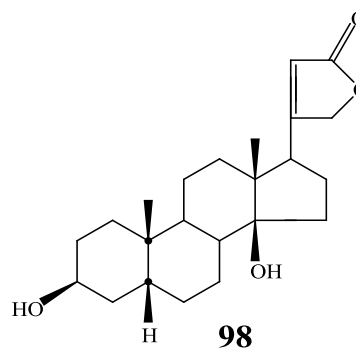
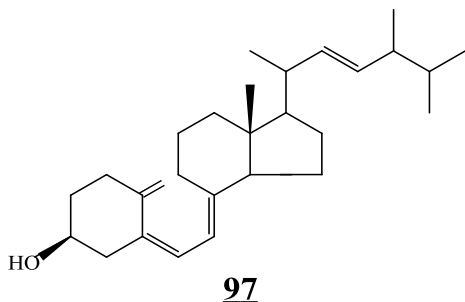
II.1.5.2 Les acides biliaries

Les acides biliaries proviennent de la dégradation du cholestérol **86** au niveau du foie et sont sécrétés par la bile, d'où leur nom. Le plus important est l'acide cholique **95**, qu'on retrouve sous forme d'acide glycocholique **96**, dont le rôle est l'émulsification des graisses au cours de la digestion^[56].



II.1.5.3 Autres composés

La vitamine D2 **97** joue un grand rôle dans le métabolisme des ions calcium. On peut citer un stéroïde particulier, la digitoxigénine **98** qui est présente dans certaines plantes sous forme de glycosides (combinaison avec un sucre). Cette dernière a la particularité d'avoir des jonctions *cis* pour A/B et pour C/D; elle sert à préparer la digitaline, qui est un médicament pour les affections cardiaques ^[56].



II.2 LES STÉROLS

II.2.1 Définition des Stérols

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols ^[56,84]. Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides ^[52, 60, 85]. Ils sont des composés tétracycliques comportant le plus souvent 27, 28 ou 29 atomes de carbone. Le noyau perhydrocyclopentanophénanthrène possède le plus souvent une double liaison fréquemment en 5(6), mais que l'on peut rencontrer en 7(8), beaucoup

plus rarement en C-8(9), en C-8(14) ou en C-9(11). Les groupes méthyle 18 et 19, la fonction alcool en 3 et la chaîne latérale en 17 sont en configuration β ^[52, 55, 74, 75]. La chaîne latérale qui peut être saturée ou comporter une ou deux doubles liaisons possède 8, 9 ou 10 atomes de carbone (**Figure II.5**). Ils sont les constituants des membranes de divers métabolites cellulaires, dont le plus caractéristique est le cholestérol **86** ^[75].

Ils sont très répandus dans les règnes :

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

II.2.2 Quelques Stérols diffèrent selon l'insaturation

Les stérols sont appelés par opposition à leurs homologues saturés, les stanols ^[87]. Voilà quelques structures séroliques diffèrent selon l'insaturation au niveau de la chaîne latérale et ou dans le noyau stéroïdique ^[77] (**Tableau II.1**).

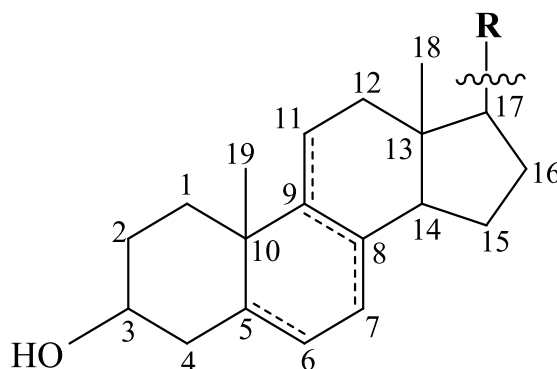
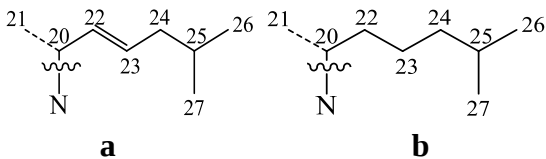
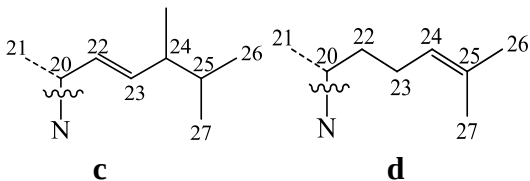
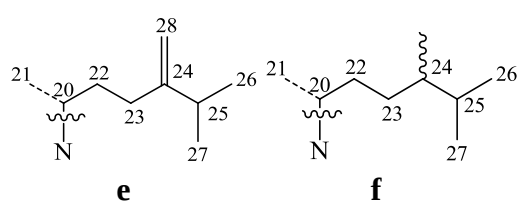
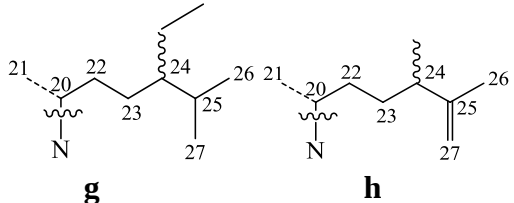
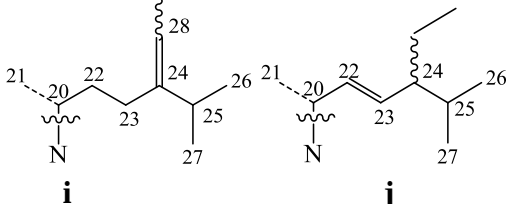
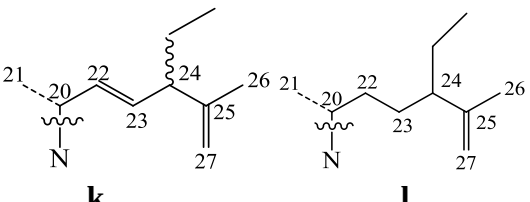


Figure II.5 : Structures stéroïques selon l'insaturation.

Tableau II.1 : Différentes structures stéroliques selon l'insaturation.

Nom	Δ	R	
Cholestanol	-	a	
Ergostanol (24R)	-	e	
Ergostanol (24S)	-	e	
Stigmastanol (24R)	-	h	
Cholestérol	5	a	
Campesterol (24R)	5	e	
Sitostérol (24R)	5	h	
Cholesta-5,22-dièn-3 β -ol	5	b	
Brassicastérol (24S)	5	d	
Stigmastérol (24S)	5	i	
Desmostérol	5	c	
Ergosta-5, 24(28)-dièn-3 β -ol	5	f	
Isofucostérol[24(28)Z]	5	j	
Fucostérol[24(28)E]	5	j	
Codistérol (24S)	5	g	
Stigmasta-5, 25-dièn-3 β -ol	5	k	
Stigmasta-5, 25-trièn-3 β -ol	5	l	
Lathostérol	7	a	
Ergosta 7, 22-dièn-3 β -ol	7	e	
Schotténol (24R)	7	h	
Ergosta-7, 22-dièn-3 β -ol	7	d	
Spinastérol (24S)	7	i	
Epistérol	7	f	
Isoavénastérol [24(28)E]	7	j	
Avénastérol [24(28)Z]	7	j	
Stigmasta-7, 25-dièn-3 β -ol	7	j	
Stigmasta-7, 22, 25-trièn-3 β -ol	7	k	
Zymostérol	8	l	
Fécostérol	8	c	
Stigmasta-8, 22-dièn-3 β -ol	8	f	
Stigmasta-8, 25-dièn-3 β -ol	8	i	
Stigmasta-9(11)-èn-3 β -ol	9(11)	k	
7- Déhydrocholestérol	5,7	h	
Ergostérol (24S)	5,7	a	

II.2.3 Classification des stérols

Les stérols sont retrouvés chez beaucoup de microorganismes. Il n'existe, à vrai dire, aucune classification spéciale des stérols. Selon l'origine biologique ^[52], ils peuvent être regroupés en familles : stérols fongiques, stérols animaux et stérols végétaux et stérols algues. Ces familles de stérols sont illustrées en **Figure II.6** par leurs principaux représentants. Le stérol majeur est l'ergostérol dont la particularité est la présence de deux liaisons alcènes conjuguées.

- ❖ **Zoostérols** : dont les stérols chez les animaux. Les membranes animales contiennent un stérol prépondérant : le cholestérol (cholestanol) ^[54].
- ❖ **Mycostérols** : (stérols chez les champignons inférieurs) Les stérols fongiques ont été très étudiés chez la levure. Le stérol majeur est l'ergostérol dont la particularité est la présence de deux liaisons alcènes conjuguées. Les autres stérols prépondérants chez la levure sont l'épistérol et le zymostérol ^[52,54].
- ❖ **Phytostérols** : (stérols chez les plantes supérieures) Les végétaux contiennent un mélange complexe de stérols composé essentiellement de sitostérol, de campestérol et de stigmastérol ^[81]. Ces trois stérols diffèrent des stérols décrits précédemment par la présence d'une insaturation en position 22 (cas du stigmastérol) et la longueur de la chaîne alkyle greffée sur le carbone C-24 (un seul carbone dans le cas du campestérol, deux pour le sitostérol et le stigmastérol). Cependant, de nombreux autres stérols végétaux sont connus, notamment des intermédiaires biosynthétiques. Chez le maïs par exemple, soixante et un stérols et dérivés sont identifiables dans divers organes ^[82]. (La composition stérolique varie selon les familles de plantes).

Stérols chez les algues : Les stérols sont retrouvés chez beaucoup de microorganismes comme les microalgues ou les protozoaires ^[83].

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

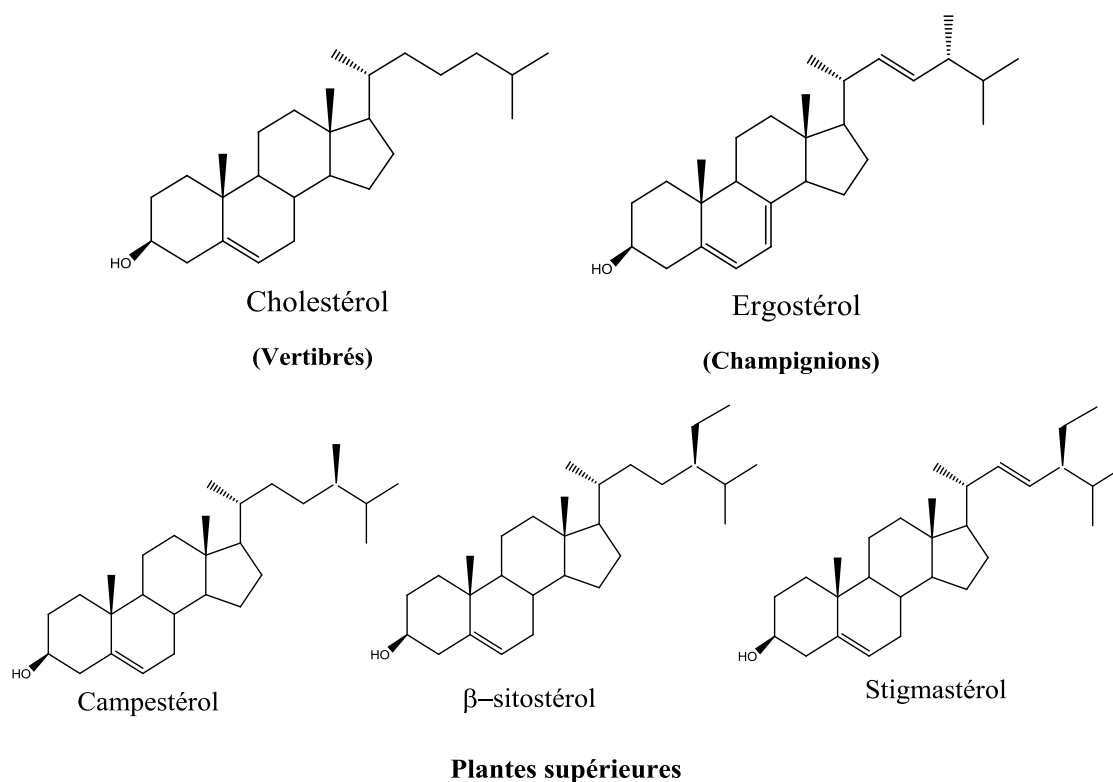


Figure II.6 : Structures des principaux stéroïds.

II.2.4 Biosynthèse des stéroïds

Les stéroïds appartiennent à la famille des isoprénoides. Cette famille rassemble aujourd'hui plus de 30 000 composés. Ces molécules ont une grande diversité de structures et de fonctions mais ont en commun de dériver de l'assemblage du même motif: l'isoprène $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ^[84]. Les monoterpènes sont composés de deux motifs isopréniques, les sesquiterpènes de trois, les diterpènes de quatre, les triterpènes (dont les stéroïds) de six et les caroténoïdes de huit motifs isopréniques.

Chez les plantes, l'élucidation de la voie de biosynthèse des stéroïds a été réalisée notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs biosynthétiques. Cette approche permet de renseigner à la fois sur les mécanismes enzymatiques des enzymes ciblées par ces inhibiteurs et aussi sur les conséquences physiologiques du blocage d'une étape de cette voie sur le développement des plantes ^[90].

Les stéroïds sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et toutes les enzymes en aval de la cyclisation de l'époxyde de squalène sont membranaires ^[91]. Les étapes de la biosynthèse des stéroïds diffèrent entre le règne végétal et les règnes animal et fongique. Cette dichotomie présentée en **Figure II.9** débute par la première réaction subie par l'épo-

xyde de squalène, qui est cyclisé en lanostérol chez les organismes non chlorophylliens (Champignons et Animaux), alors qu'il est cyclisé en cycloarténol chez les Végétaux. Le cycloarténol possède un cycle propanique impliquant les carbones C-9, C-10 et C-19, alors que le lanostérol possède une double liaison en Δ^8 et un groupement méthyle sur le carbone C-10.

La synthèse des stérols est poursuivie par des étapes qui sont souvent communes aux deux groupes. Cependant, l'ordre des réactions enzymatiques et la spécificité peuvent varier selon le groupe. Deux réactions caractéristiques sont toutefois propres au règne végétal: tout d'abord, l'ouverture du cycle propanique par la COI (cycloeucalénol-obtusifoliol isomérase)^[92], ensuite les méthylations successives en C-24 et C28 respectivement par SMT1 et SMT2 (S-adénosyl-méthionine-stérol C méthyltransférase), enzymes responsables de la formation des ethylstérols, stérols typiquement et spécifiquement végétaux^[93, 94].

A partir du cycloarténol, onze étapes successives mènent au sitostérol chez les plantes: étapes de déméthylation sur les carbones C-4^[95] et C-14^[96], étapes de formation, isomérisation et réduction de doubles liaisons^[81]. Les deux déméthylations successives sur le carbone C-4 permettent de passer à partir de 4,4-diméthyl stérols à des 4-méthyl stérols et enfin à des 4-desméthyl stérols. Le cholestérol animal et l'ergostérol chez la levure sont synthétisés selon les mêmes processus enzymatiques mais à partir du lanostérol. Le cholestérol végétal est synthétisé à partir du cycloarténol.

La biosynthèse des stérols s'articule autour de trois grandes séquences. Tout d'abord, la synthèse de l'IPP (isopentényl diphosphate) qui est la molécule de base de la synthèse des isoprénoïdes, ensuite la condensation successive de six molécules d'IPP pour former l'époxyde de squalène précurseur de tous les stérols, et enfin la transformation différenciée de cet époxyde entre animaux, champignons et végétaux pour aboutir aux stérols majeurs décrits précédemment.

II.2.4.1 Synthèse de l'IPP

Il existe deux voies métaboliques de synthèse de l'IPP. La première, dite voie du mévalonate, est présente chez les organismes fongiques et animaux et se situe dans la cytoplasme. En plus de cette voie cytoplasmique, les végétaux contiennent une seconde voie à localisation plastidiale dite voie du MEP (2-C-méthyl-(D)-erythritol-4-phosphate) ou voie Rohmer. Chez les végétaux, la voie plastidiale conduit à la formation des mono-

terpènes, des diterpènes et des caroténoïdes. La voie cytoplasmique permet la synthèse des sesquiterpènes et des triterpènes.

A. Voie du mévalonate (MVA) :

La voie du mévalonate sommairement décrite en (**Figure II.7.A**) a pour origine l'acétylCoA. Trois molécules d'acétylCoA sont successivement condensées pour former du 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl Coenzyme A (ou HMGCoA). Cette molécule est réduite en mévalonate par l'HMGCoA réductase (ou HMGR), l'enzyme qui régule le flux biosynthétique des stérols^[85]. Chez les plantes en particulier, l'HMGR est l'enzyme limitante de la biosynthèse des stérols et sa surexpression permet d'augmenter la quantité totale de stérols.^[86] Le mévalonate est la première molécule caractéristique et spécifique de la voie des stérols^[87]. Le mévalonate est transformé en IPP par deux phosphorylations successives et une décarboxylation. Toutes les enzymes impliquées dans la synthèse de l'IPP sont cytoplasmiques, l'HMGR exceptée, cette dernière est liée au réticulum endoplasmique.

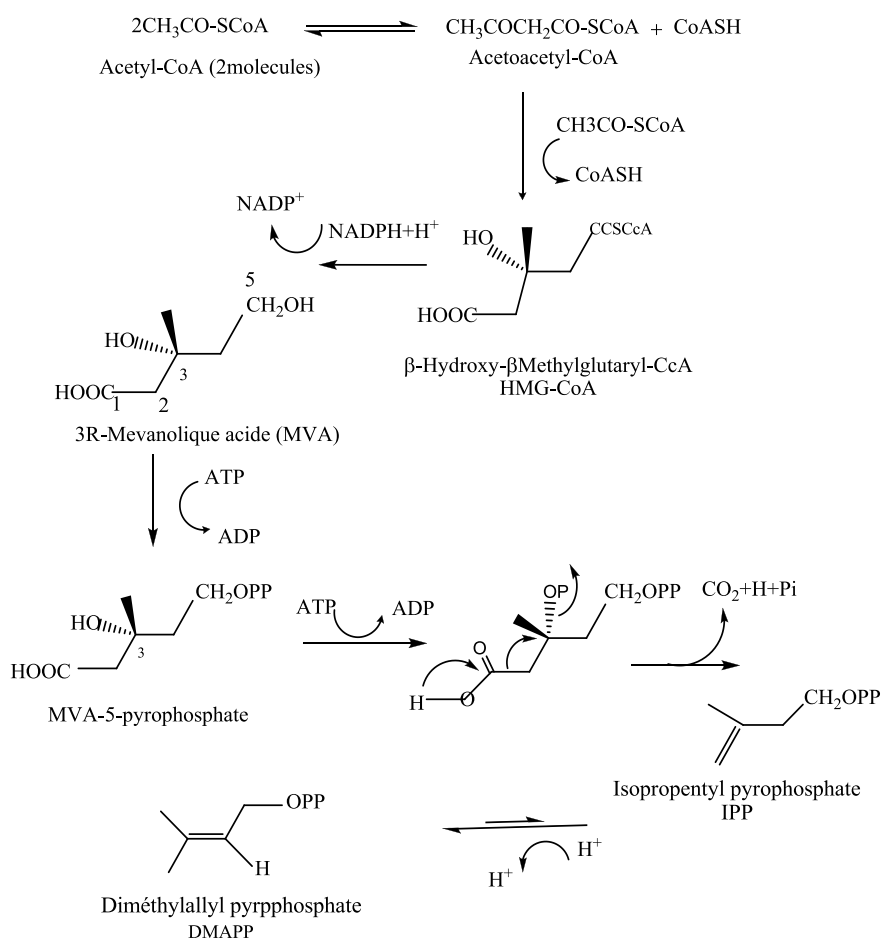


Figure II.7.1: Biosynthèse de l'IPP via la voie du mévalonate.

B. Voie du MEP (Non-mévalonate):

La voie du MEP (Non-MVA) a pour origine l'acide pyruvique et le glycéraldéhyde-3-phosphate (**Figure II.7.2**). La condensation de ces deux molécules forme le 1-désoxyxylulose-5-phosphate qui par réduction, phosphorylations et réarrangements successifs est transformé, via le MEP, en IPP ^[88]. Des échanges entre la voie cytoplasmique et la voie plastidiale sont possibles. La voie du mévalonate est la voie préférentielle pour la synthèse des stéroïls, toutefois lorsque cette voie est bloquée par des inhibiteurs de l'HMGR, les stéroïls peuvent être synthétisés à partir de la voie du MEP. ^[89]

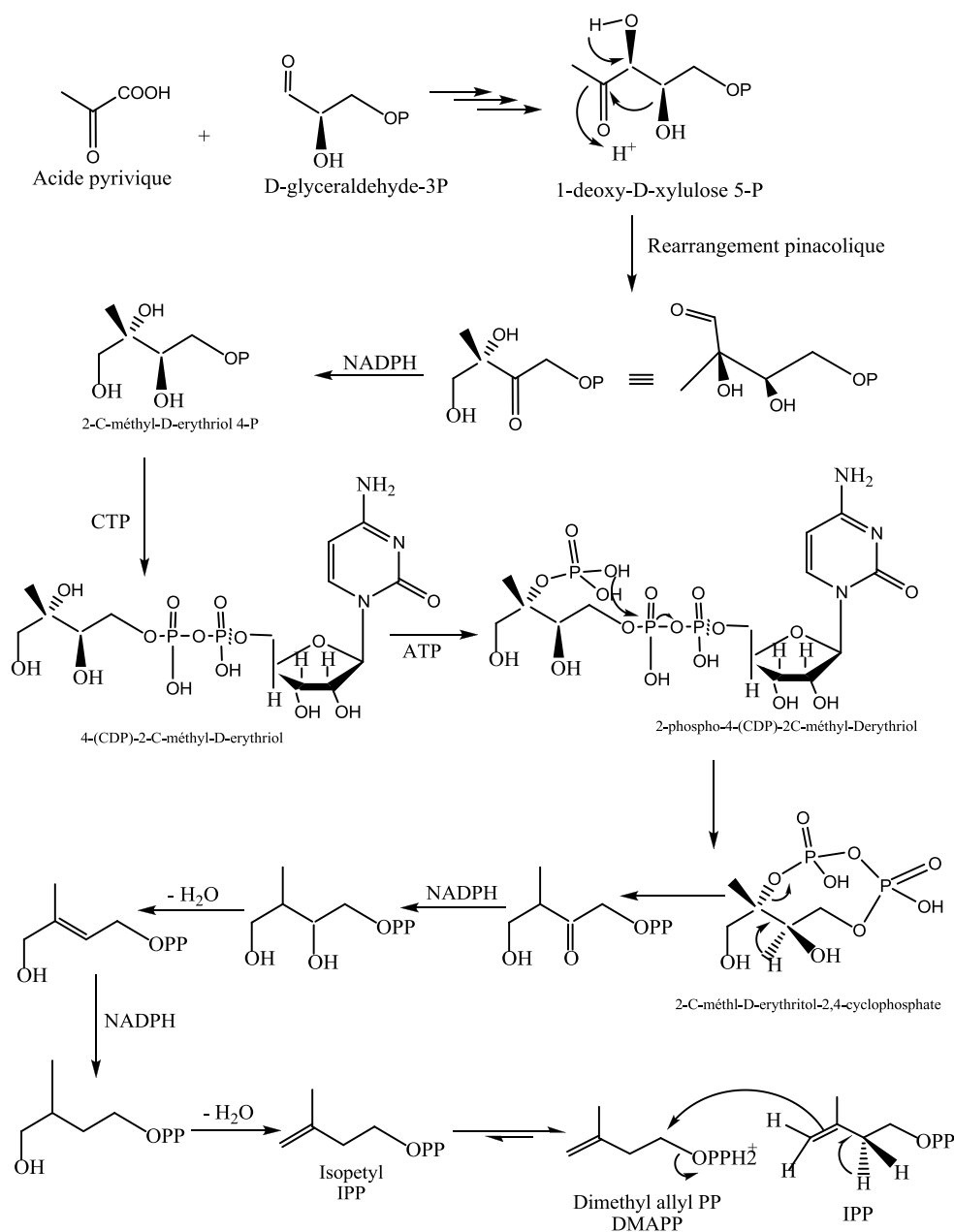


Figure II.7.2: Biosynthèse de l'IPP via la voie MEP (non-Mévalonate voie).

II.2.4.2 Synthèse de l'époxyde de squalène

L'époxyde de squalène est formé en plusieurs étapes, de condensation puis une oxydation, étapes présentées en (**Figure II.8**). L'IPP est formé de 5 atomes de carbone. Premièrement, la condensation de trois molécules d'IPP forme successivement une molécule de géranyl diphosphate (GPP) à 10 atomes de carbone, puis une molécule de farnésyl diphosphate (FPP) à 15 atomes. Deuxièmement, deux molécules de FPP se condensent à leur tour pour former le squalène, composé au final d'une chaîne de 30 atomes de carbone. Pour finir, le squalène est oxydé en 2, 3-époxyde de squalène par la squalène époxydase.

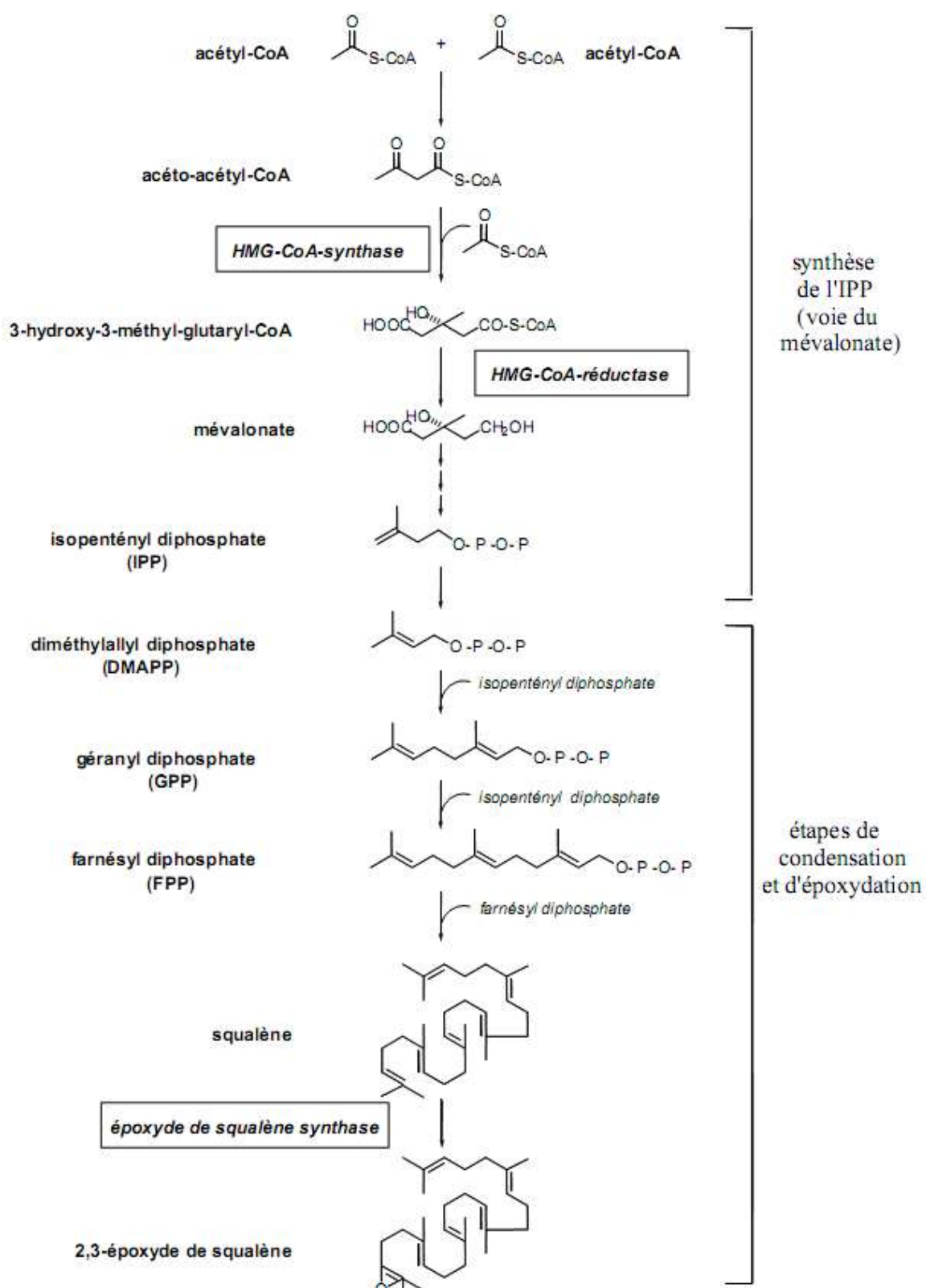
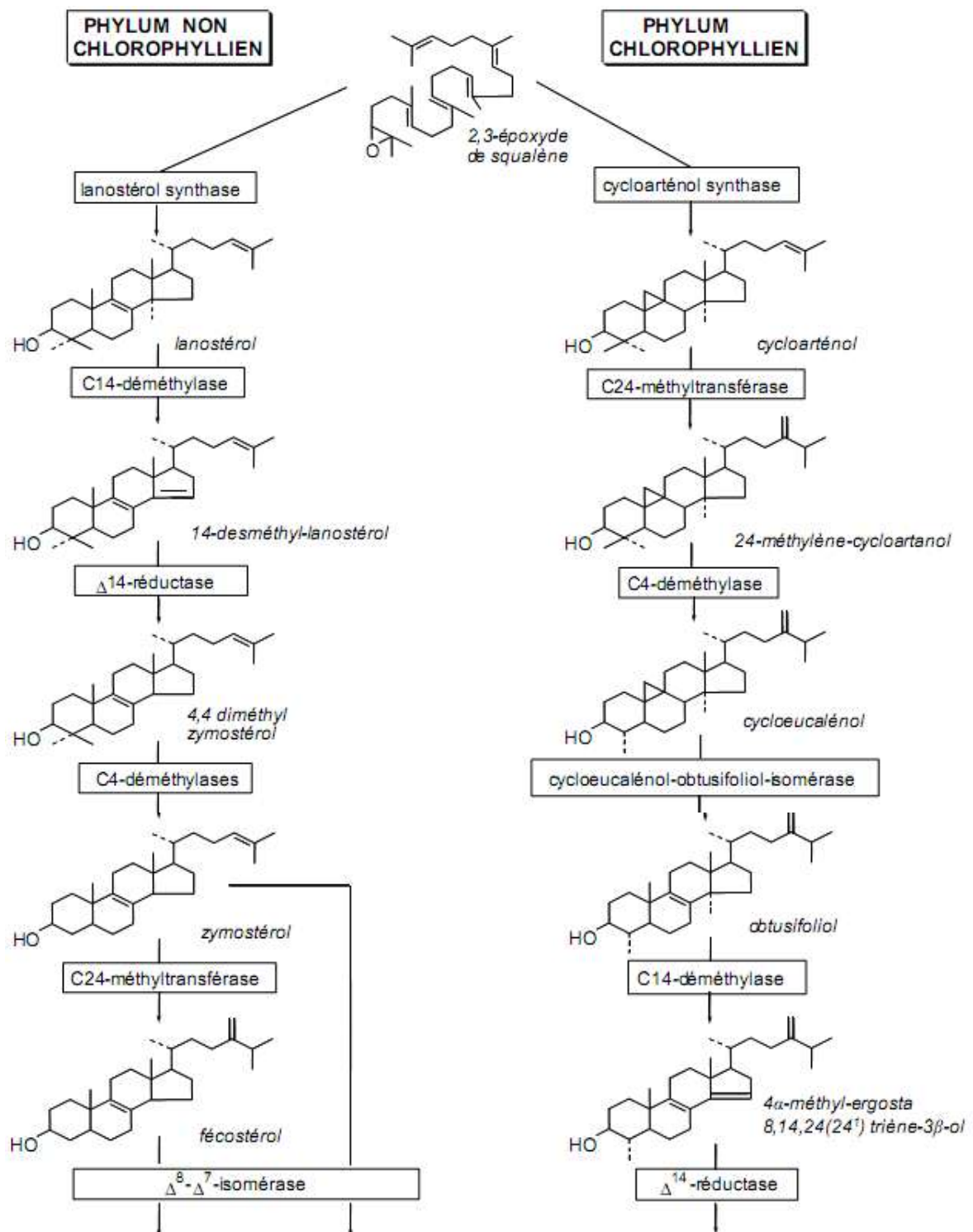


Figure II.8: Tronc commun de la biosynthèse des stérols.



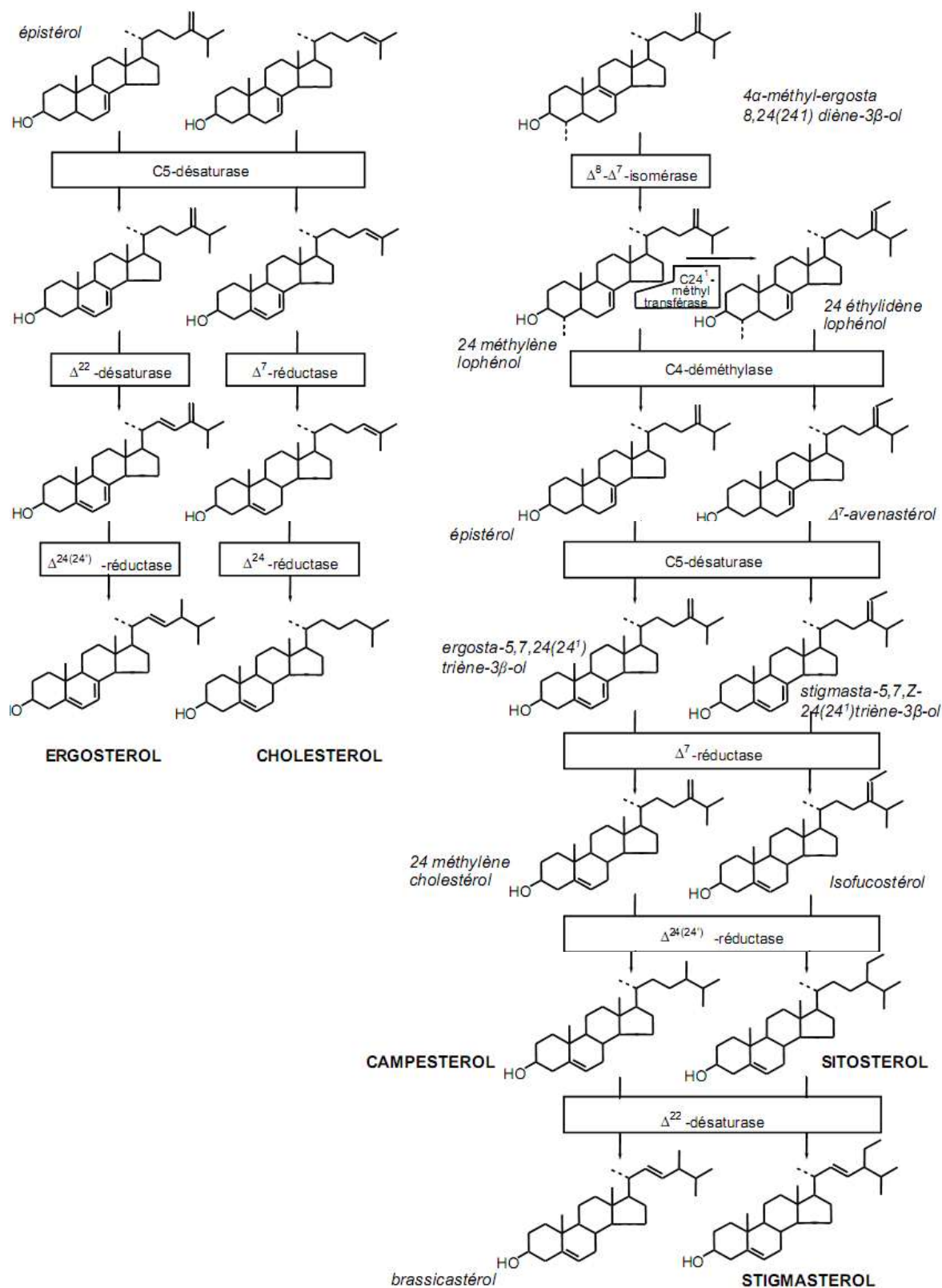


Figure II.9: Schéma de biosynthèse des stérols à partir de l'époxyde de squalène.

II.3 PHYTOSTEROLES (Stérols Des Plantes)

II.3.1 Définition des Phytostérols

Du point de vue structural, ils se caractérisent par la présence en position 3, en général de stéréochimie β du noyau cyclopenténophénanthrénique, d'un hydroxyle libre, estérifié (glycosylés) ou estérifié par un acide gras (stérides: sans intérêt pharmacologique connu) de deux méthyles en position 10β , 13β et d'une chaîne carbonée en 17β (**Figure II.11**)^[104].

Les stérols végétaux possèdent généralement une double liaison ou plus; ils sont alors appelés les phytostérols, leurs analogues saturés sont appelés les phytostanols.^[107, 110] Les stérolines sont les glycosides des stérols.

Tableau II.2 : Les phytostérols les plus communs.

N°	Nom trivial	Nom systématique
<u>9</u>	Δ^5 -Sitostérol	Stigmast-5-èn-3 β -ol
<u>99</u>	Δ^5 -Campestérol	Campest-5-èn-3 β -ol
<u>100</u>	$\Delta^5,22$ -Brassicastérol	(22E)-ergosta-5,22-dièn -3 β -ol
<u>101</u>	$\Delta^5,22$ -Stigmastérol	(22E)-stigmasta-5,22-dièn -3 β -ol
<u>102</u>	Δ^7 -Spinastérol	(22E)-stigmasta-7,22-dièn -3 β -ol

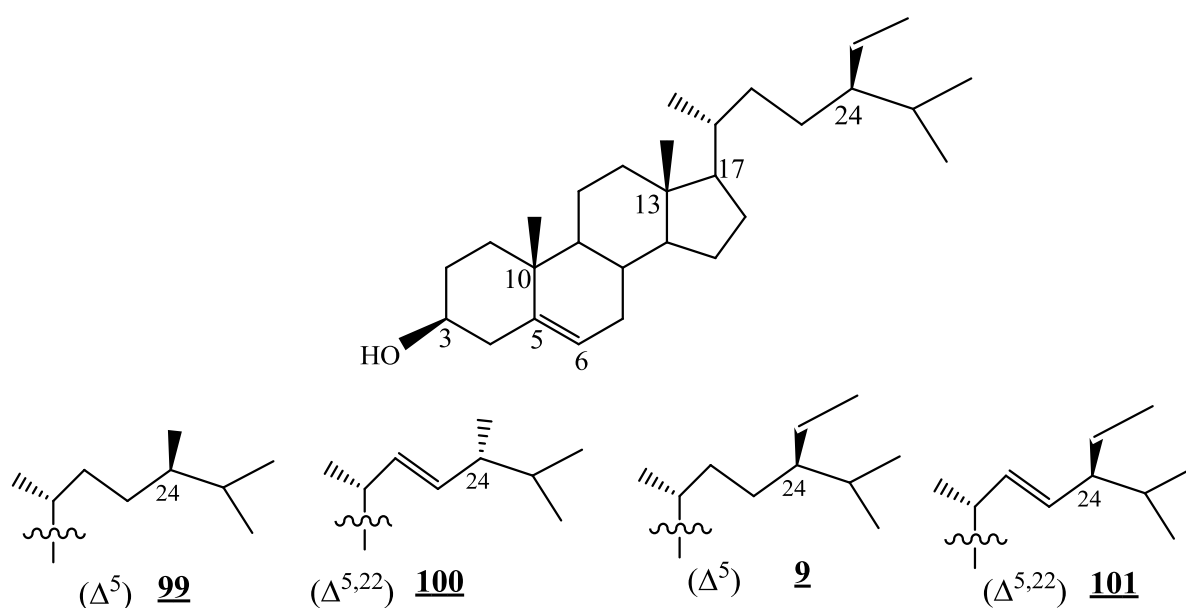


Figure II.10: Les phytostérols d'origine végétale les plus communs.

Les stérols sont présents dans tous les tissus végétaux, sous plusieurs formes : à l'état libre, estérifiés par combinaison avec les acides gras, et parfois glycosylés (**Figure II.11**) on peut les classer selon la forme de la fonction OH en C-3 en groupes ^[54, 64, 102, 103] :

- Les phytostérols libres **FS**. (β -sitosterol **9**).
- Les phytostérols esterifiés, ces derniers peuvent se présenter sous trois formes :
 1. Sous forme d'ester d'un glucoside **SG** ; le groupe OH est lié avec un hexose le plus généralement le glucose. (Daucostérol **10**)
 2. Sous forme d'ester d'acide gras **SE**; le groupe hydroxyle est lié avec un acide gras (Sitostéryl stéarate **103**).
 3. Sous forme d'ester d'un glucoside acylé **ASG**, ce dernier diffère de **SG** par l'addition d'un acide gras estérifié en (6-OH) de l'hexose **104** ^[105,107].

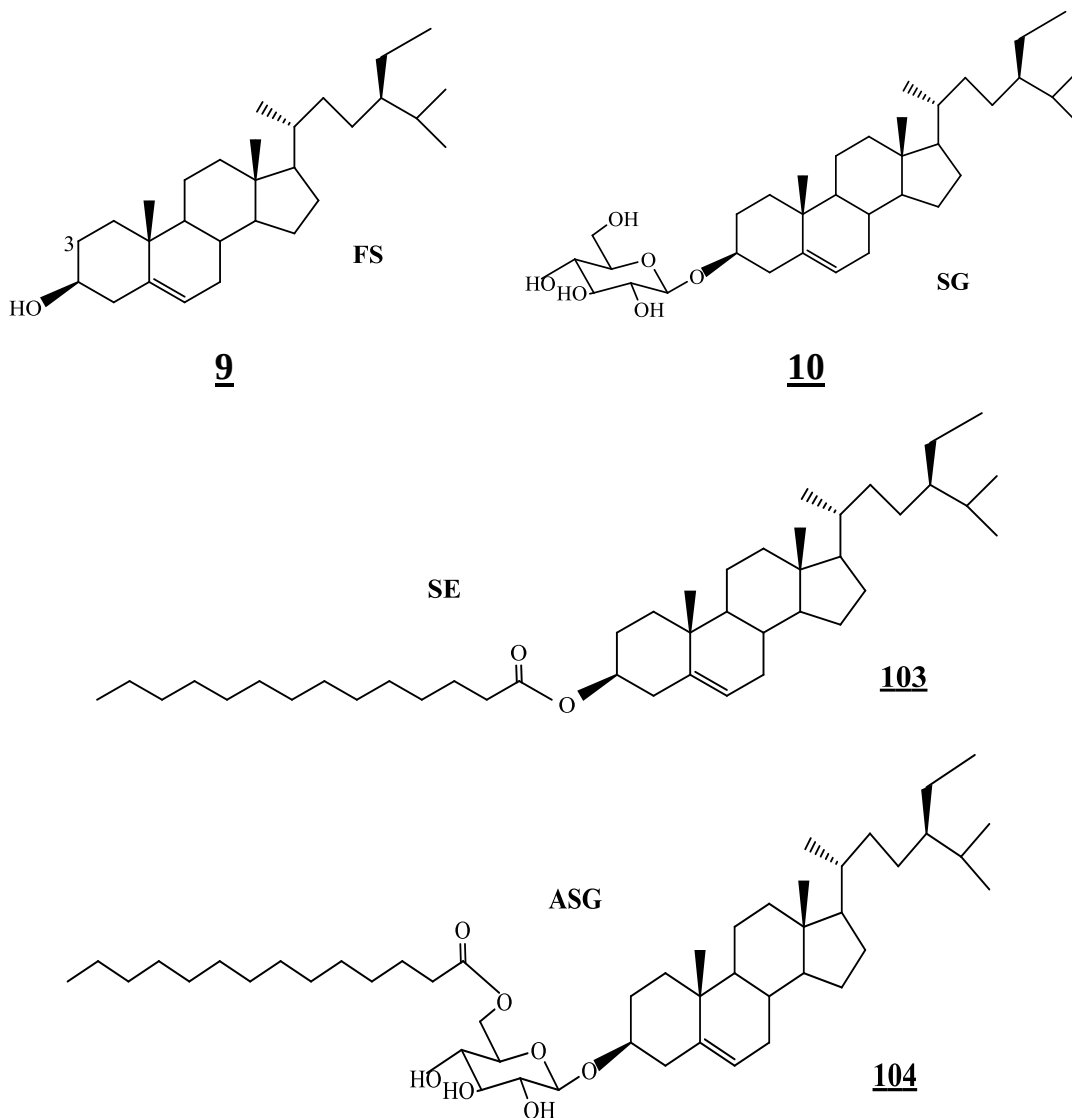


Figure II.11: Formes de présence des phytostérols dans les tissus végétaux.

La quantité de stérols libres est hautement régulée dans les membranes. Deux mécanismes sont mis en jeu : *l'acylation en esters de stérols* et *la glycosylation* (Figure II.12).

La glycosylation consiste à la condensation de la fonction alcool du stérol et de la fonction hémi-acétal du carbone C-1, d'un résidu osidique, en general, le glucose grâce à une UDP-glucose stérol glucosyltransférase^[97]. La fonction alcool située sur le carbone C-6 du stéryl glucoside formé peut être estérifiée par un acide gras pour former un acyl-stérylglucoside. Les glucosides et acyl-glucosides de stérol sont des constituants du tonoplaste et serviraient de modulateurs de l'activité des protéines membranaires. Par exemple, les acylglucosides de stérols réduisent l'activité de la pompe à proton ATPasique, tandis que les glucosides de stérol stimulent cette activité. Le glucosylation et l'acylglucosylation modifient le micro-environnement phospholipidique autour des protéines membranaires^[98]. La glycosylation modifie les propriétés physico-chimiques des stérols, notamment leur hydrophilie. Elle serait un moyen pour la cellule de réguler finement la quantité en stérols libres des membranes plasmiques et donc sa fluidité^[99]. Des interconversions selon les besoins cellulaires entre les formes libres, estérifiées, glycosylées et acyl-glycosylées des stérols sont envisagées chez les plantes^[100].

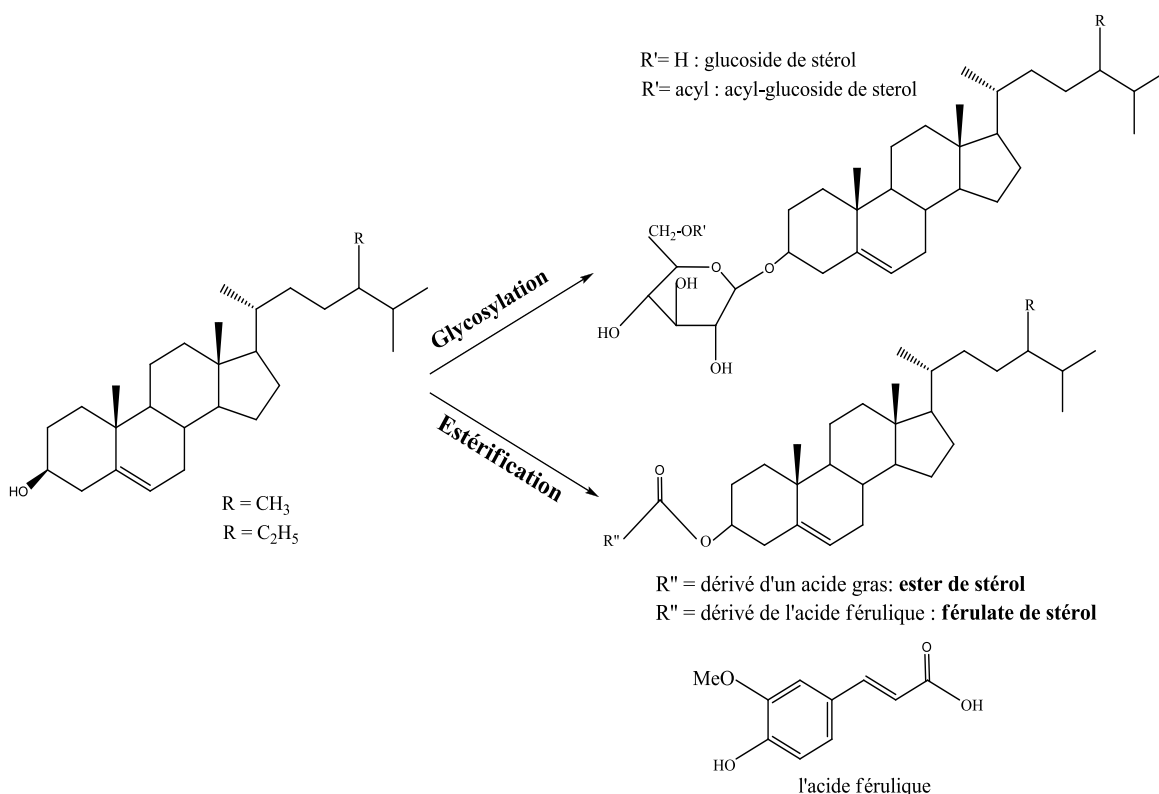


Figure II.12: Métabolisme des phytostérols.

II.3.2 Distribution

Les stérols végétaux, sont très répandus dans la nature. Les stérols représentent en général une part notable de l'insaponifiable: de 30 à 60%. La détermination de la composition stérolique d'une huile végétale constitue un critère important d'identification de son origine botanique: généralement, des plantes appartenant à une même famille botanique présentant la même composition qualitative pour les stérols. Par contre, l'espèce, la race sont différenciées par des compositions quantitatives différentes ^[26].

Les stérols sont naturellement présents en petites quantités dans de nombreux fruits, légumes, fruits secs, céréales, légumineuses, huiles végétales et autres sources végétales, ce sont des éléments essentiels des membranes cellulaires végétales. Les stanols sont présents à l'état de traces dans le même type d'aliment et résultent de l'hydrogénation des phytostérols lors de leur transformation en produits à usage commercial. Les stérols et stanols végétaux ont une structure très comparable à celle du cholestérol **86**.

Les Δ^7 -phytostérols tel que le Spinastérol sont généralement peu nombreux dans les plantes, mais ils se trouvent en quantités importantes dans les Cucurbitacées et les Chenopodiacées ^[78,107]. Les stérols des Cucurbitacées possèdent une insaturation entre les carbones C-25 et C-27 ^[79]; les Brassicacées contiennent beaucoup de cholestérol, jusqu'à une teneur de 70% pour le navet, et de Brassicastérol un taux de 10 % ^[80, 107, 109].

Le Cholestérol est présent notamment chez les animaux mais aussi accompagne les phytostérols dans la plupart des plantes supérieures. Il représente 1-2 % de tous les stérols végétaux ^[107], à l'exception de quelques espèces du genre *Solanum* (Solanaceae) qui produisent des quantités relativement élevées en cholestérol ^[107,109]; dans les fractions de FS et SE de six espèces de ce genre, le taux du cholestérol s'élève à 5% et dans l'espèce *S. pseudocapsicum*, il peut atteindre 10 à 22%. Chez les Brassicacées, le Cholestérol est le stérol majoritaire dans les mûres d'*Arabidopsis*; il constitue 26% de tous les stérols ^[107].

Le Sitostérol et le Sigmastérol, sont les phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les plantes supérieures ^[107,109], ils représentent plus de 80 % des stérols existants ^[109]. Le Campastérol se produit par un rapport 2:1 avec son épimère le 22 dihydrobrassicastérol ^[107].

II.3.3 Propriétés pharmacologiques des stérols

Le rôle premier des stérols est de renforcer les membranes cellulaires. Grâce à leur propriété amphiphile, les stérols s'intègrent dans la bicouche lipidique. L'addition des stérol à une bicouche de phospholipides provoque la condensation de la membrane et donc son renforcement. L'ajout de cholestérol permet d'augmenter la micro-viscosité des membranes ^[111]. La condensation diminue aussi la perméabilité. le sitostérol et le campesterol sont les stérols les plus efficaces pour ordonner la membrane cellulaire, ils sont même plus efficaces que le cholestérol ^[112]. Les stérols végétaux diffèrent du cholestérol animal par leur groupement alkyle en C24, ils sont rapidement dégradés en sels biliaires dans le foie, ce qui résulte en une très faible concentration de stérols végétaux dans le plasma, le cholestérol est environ 500 à 1000 fois plus concentré ^[113].

Les phytostérols ont également des rôles annexes sur la santé humaine. Des activités immunologiques par leur action anti-inflammatoire, et des activités anti-cancéreuses en agissant sur la prolifération cellulaire sont décrites. Certains stérols se sont montrés très actifs sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate. Des phytomédicaments majoritairement à squelette β -sitostérol sont prescrits pour améliorer les symptômes de l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) sans provocation d'effets secondaires, même pour les doses les plus élevées (130 mg/j) ^[106, 114, 115].

Les phytostérols diminuent la quantité de cholestérol libéré dans la circulation sanguine, d'où un effet hypocholestérolémiant ^[116]. L'excès de cholestérol qui touche près un adulte sur 5 est un des facteurs de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Grâce à leur structure proche de celle du cholestérol, les phytostérols entrent en compétition avec lui dans l'intestin et empêchent son absorption.

Le sitostérol est prescrit comme drogue pour diminuer le cholestérol aux années 1950, mais sa moindre solubilité et bioavailability a fait rapidement diminuer son utilisation. Cependant, la solubilité des phytostérols a été améliorée par estérification, ceci est remarqué dans le premier produit commercial des phytostérols contenant les margarines. Des études ont dévoilé, par la suite, que 2-3 g/jour du phytostanyl ester, contenant la margarine a constamment réduit le taux du cholestérol ^[117]. **Le stigmastérol**, a des effets antiperoxydative et antidiabétique, il est considéré aussi comme inhibiteur de thyroïde ^[118].

Les stérols amines 6-aminocholestanols et 25-aminocholestérol montrent successivement une activité antimicrobienne et une activité antifongique très élevée ^[119].

II.4. LES OXYPHYTOSTÉROLS

Les phytosterols sont des molécules relativement stables, mais peuvent avoir des réactions d'oxydation et autres réactions de transformations. Les oxyphytosterols sont des produits formés à partir d'une réaction d'oxydation des phytosterols (POP). Ces produits d'oxydation peuvent être divisés en deux groupes, en se basant sur la polarité des composés ^[120]. La plus part des études se sont intéressées aux composés polaires, contenant les fonctions hydropéroxy, hydroxyl-, époxy, céto-phytosterols et triols phytostanols qui sont des produits résultant d'une oxydation secondaire et de l'oxydation primaire (**Figure II.13**) Les composés stéroliques non oxydés sont aussi des produits des réactions réalisées à des températures élevées, telles que les réactions de déshydratation ou déhydrogénation.

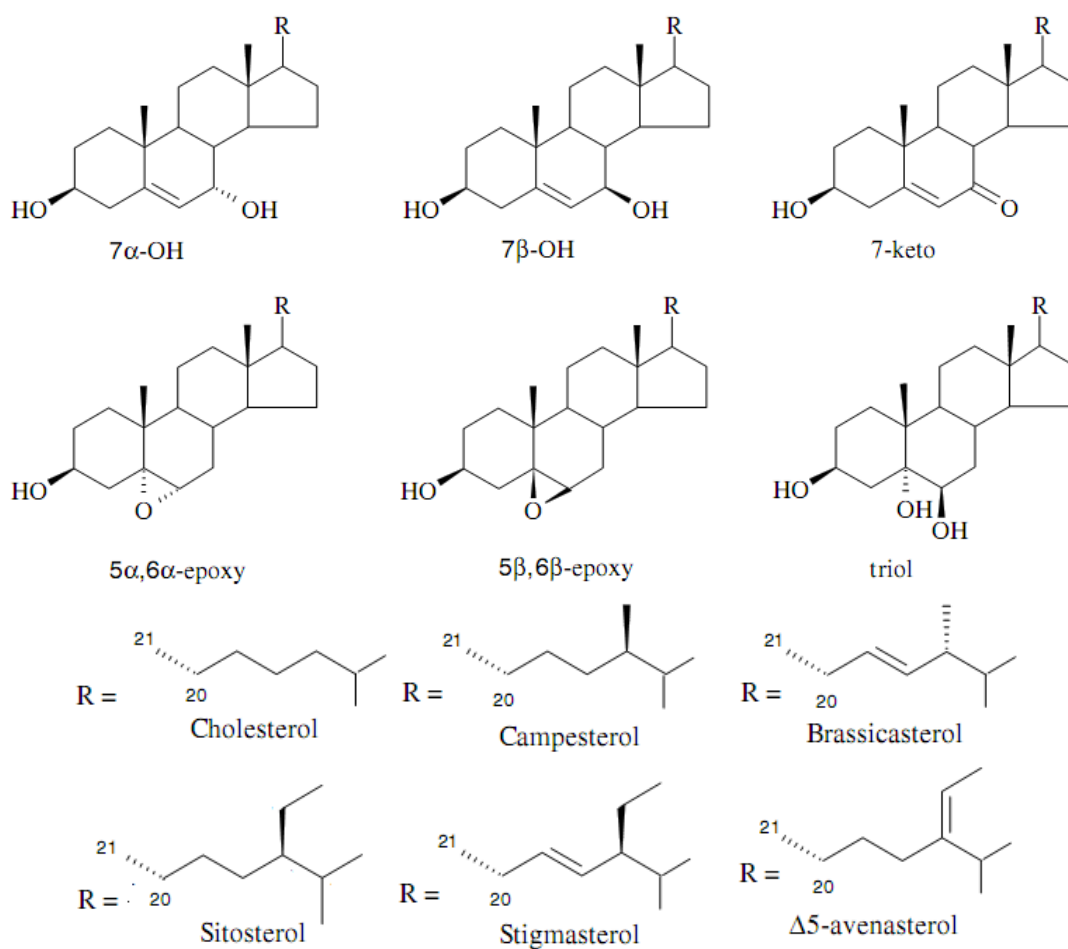


Figure II.13: Les structures chimiques des oxyphystérols les plus communes.

II.4. 1 Nomenclature des Oxyphytosterols

Les nomenclatures systématiques et triviales de la majorité des produits résultant d'une oxydation secondaire et quelques composés résultant de l'oxydation primaire de cholestérol, sitosterol, stigmasterol, campesterol et brassicasterol sont présentées dans le tableau suivant^[121] **Tableau II.3 :**

Tableau II.3: La nomenclatures systématiques et triviales utilisées pour les oxyphytostérols

Nom Systématique	Nom Trivial	Abbréviation
cholest-5-en-3β-ol β -hydroxycholest-5-en-25-hydroperoxide β -hydroxycholest-5-en-5 α -hydroperoxide β -hydroxycholest-5-en-6 α -hydroperoxide β -hydroxycholest-5-en-6 β -hydroperoxide β -hydroxycholest-5-en-7 α -hydroperoxide β -hydroxycholest-5-en-7 β -hydroperoxide cholest-5-en-3 β ,25-diol cholest-4-en-3-one-6 α -ol cholest-4-en-3-one-6 β -ol 5,6 α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol 5,6 β -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol β -hydroxycholest-5-en-7-one cholest-5-en-3 β ,6 β -diol cholest-5-en-3 β ,7 α -diol cholest-5-en-3 β ,7 β -diol 5 α -cholest-3 β ,5 α ,6 β -triol	cholesterol 25-hydroperoxycholesterol 5 α -hydroperoxycholesterol 6 α -hydroperoxycholesterol β -hydroperoxycholesterol 7 α -hydroperoxycholesterol 7 β -hydroperoxycholesterol 25-hydroxycholesterol 6 α -hydroxy-3-ketocholesterol 6 β -hydroxy-3-ketocholesterol cholesterol-5 α ,6 α -epoxide cholesterol-5 β ,6 β -epoxide 7-ketocholesterol β -hydroxycholesterol 7 α -hydroxycholesterol β -hydroxycholesterol cholestantriol	cholesterol 25-OOH-cholesterol 5 α -OOH-cholesterol 6 α -OOH-cholesterol 6 β -OOH-cholesterol 7 α -OOH-cholesterol 7 β -OOH-cholesterol 25-OH-cholesterol 6 α -OH-3-ketocholesterol 6 β -OH-3-ketocholesterol 5 α ,6 α -epoxycholesterol β ,6 β -epoxycholesterol 7-ketocholesterol β -OH-cholesterol 7 α -OH-cholesterol β -OH-cholesterol cholesterol-triol
(24R)-ethylcholest-5-en-3β-ol (24R)-ethylcholest-4-en-3-one-6 α -ol (24R)-ethylcholest-4-en-3-one-6 β -ol (24R)-5 α ,6 α -epoxy-24-ethylcholestan-3 β -ol (24R)-5 β ,6 β -epoxy-24-ethylcholestan-3 β -ol (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol-7-one (24R)-ethylcholest-5-en-3 β ,6 β -diol (24R)-ethylcholest-5-en-3 β ,7 α -diol (24R)-ethylcholest-5-en-3 β ,7 β -diol	β-sitosterol 6 α -hydroxy-3-ketositosterol β -hydroxy-3-ketositosterol sitosterol-5 α ,6 α -epoxide sitosterol-5 β ,6 β -epoxide 7-ketositosterol β -hydroxysitosterol 7 α -hydroxysitosterol β -hydroxysitosterol	β-sitosterol 6 α -OH-3-ketositosterol β -OH-3-ketositosterol 5 α ,6 α -epoxysitosterol β ,6 β -epoxysitosterol 7-ketositosterol β -OH-sitosterol 7 α -OH-sitosterol β -OH-sitosterol
(24R)-methylcholest-5-en-3β-ol (24R)-methylcholest-4-en-3-one-6 α -ol (24R)-methylcholest-4-en-3-one-6 β -ol (24R)-5 α ,6 α -epoxy-24-methylcholestan-3 β -ol (24R)-5 β ,6 β -epoxy-24-methylcholestan-3 β -ol (24R)-methylcholest-5-en-3 β -ol-7-one (24R)-methylcholest-5-en-3 β ,6 β -diol (24R)-methylcholest-5-en-3 β ,7 α -diol (24R)-methylcholest-5-en-3 β ,7 β -diol	campesterol 6 α -hydroxy-3-ketocampesterol β -hydroxy-3-ketocampesterol campesterol-5 α ,6 α -epoxy campesterol-5 β ,6 β -epoxy 7-ketocampesterol β -hydroxycampesterol 7 α -hydroxycampesterol β -hydroxycampesterol	campesterol 6 α -OH-3-ketocampesterol β -OH-3-ketocampesterol 5 α ,6 α -epoxycampesterol β ,6 β -epoxycampesterol 7-ketocampesterol β -OH-campesterol 7 α -OH-campesterol β -OH-campesterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3β-ol (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-25-hydroperoxide (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-5 α -hydroperoxide (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-6 α -hydroperoxide (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-6 β -hydroperoxide (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7 α -hydroperoxide (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7 β -hydroperoxide	stigmasterol 25-hydroperoxystigmasterol 5 α -hydroperoxystigmasterol 6 α -hydroperoxystigmasterol 6 β -hydroperoxystigmasterol 7 α -hydroperoxystigmasterol 7 β -hydroperoxystigmasterol	stigmasterol 25-OOH-stigmasterol 5 α -OOH-stigmasterol 6 α -OOH-stigmasterol β -OOH-stigmasterol 7 α -OOH-stigmasterol β -OOH-stigmasterol

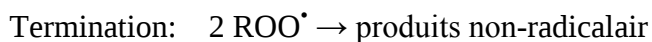
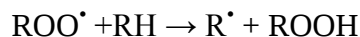
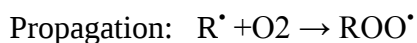
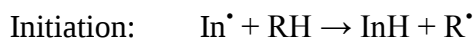
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7 α -hydroperoxide	7 α -hydroperoxystigmasterol	7 α -OOH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7 β -hydroperoxide	7 β -hydroperoxystigmasterol	β -OOH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,25-diol	25-hydroxystigmasterol	25-OH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-4,22-dien-3-one-6 α -ol	6 α -hydroxy-3-ketostigmasterol	6 α -OH-3-ketostigmasterol
(24S)-ethylcholest-4,22-dien-3-one-6 β -ol	β -hydroxy-3-ketostigmasterol	β -OH-3-ketostigmasterol
(24S)-5 α ,6 α -epoxy-24-ethylcholest-22-en-3 β -ol	stigmasterol-5 α ,6 α -epoxide	5 α ,6 α -epoxystigmasterol
(24S)-5 β ,6 β -epoxy-24-ethylcholest-22-en-3 β -ol	stigmasterol-5 β ,6 β -epoxide	β ,6 β -epoxystigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-one	7-ketostigmasterol	7-ketostigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,6 β -diol	β -hydroxystigmasterol	β -OH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,7 α -diol	7 α -hydroxystigmasterol	7 α -OH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,7 β -diol	β -hydroxystigmasterol	β -OH-stigmasterol
(24S)-ethylcholest-22-en-3 β ,5 α ,7 β -triol	stigmasteroltriol	stigmasterol-triol
(24S)-methylcholest-5,22-dien-3β-ol	brassicasterol	brassicasterol
(24S)-methylcholest-4,22-dien-3-one-6 α -ol	6 α -hydroxy-3-ketobracicasterol	6 α -OH-3-ketobracicasterol
(24S)-methylcholest-4,22-dien-3-one-6 β -ol	β -hydroxy-3-ketobracicasterol	6 β -OH-3-ketobracicasterol
(24S)-5 α ,6 α -epoxy-24-methylcholest-22-en-3 β -ol	brassicasterol-5 α ,6 α -epoxide	5 α ,6 α -epoxybracicasterol
(24S)-5 β ,6 β -epoxy-24-methylcholest-22-en-3 β -ol	brassicasterol-5 β ,6 β -epoxide	β ,6 β -epoxybracicasterol
(24S)-methylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-one	7-ketobracicasterol	7-ketobracicasterol
(24S)methylcholest-5,22-dien-3 β ,6 β -diol	β -hydroxybracicasterol	β -OH-bracicasterol
(24S)methylcholest-5,22-dien-3 β ,7 α -diol	7 α -hydroxybracicasterol	7 α -OH-bracicasterol
(24S)methylcholest-5,22-dien-3 β ,7 β -diol	β -hydroxybracicasterol	β -OH-bracicasterol

II.4. 3 Formation des produits d'oxydation des phytosterols (POP)

Une grande partie du connaissance sur les mécanismes d'oxydation des phytostérols referent au études d'oxydation du cholestérol à cause de leurs structures similaires^[122-126]. Les produits d'oxydation des phytosterols (POP) peuvent formés soit par une oxydation enzymatique ou non-enzymatique^[127-129]. L'oxydation non-enzymatique des sterols est un mécanisme radicalaire libre qui peut être initialisé par différents facteurs telque: la chaleur, la lumière, l'air, l'eau et les métaux de transition^[122-124,127]. Les sterols peuvent être oxydés par différent espèces d'oxygènes, telque l'état de base d'oxygène ($^3\text{O}_2$), ozone (O_3), oxygène singlet ($^1\text{O}_2$), hydro-peroxydes (H_2O_2), cation dioxygène (O_2^+) et le radical hydroxy ($\text{HO}\bullet$)^[130].

II.4. 3.1 Auto-oxydation et Oxydation Thermique

L'auto-oxydation est un processus d'enchaînement de réactions radicalaires renfermant les étapes d'initiation de propagation et de termination (**Figure II.14**)^[131,132]. A des hautes températures, les réactions d'auto-oxydation sont dites les **oxydations thermiques**. L'auto-oxydation des phytosterols suit le même chemin que celui du cholestérol.



In = initiateur, R = partie lipidique, $\bullet$ = radical.

Figure II.14: Auto-oxydation radicalaire libre.

Le mécanisme d'oxydation des stérols le plus commun est l'auto-oxydation par l'oxygène triplet ($^3\text{O}_2$), c'est une réaction radicalaire qui commence par la substitution du proton réactif (proton allylique en position C-7) qui donne une série des composés d'oxydation des cycles A et B. Le proton allylique, substitué, donne naissance à un radical qui va réagir avec l'oxygène triplet, pour former le radical 7-péroxy à son tour et par addition d'hydrogène allylique libéré donne le 7-hydroperoxyde, la réaction de dismutation de ce dernier produit donne les deux composés stables 7-hydroxysterols et 7-cétostérols ^[124,127] (**Figure II.15**).

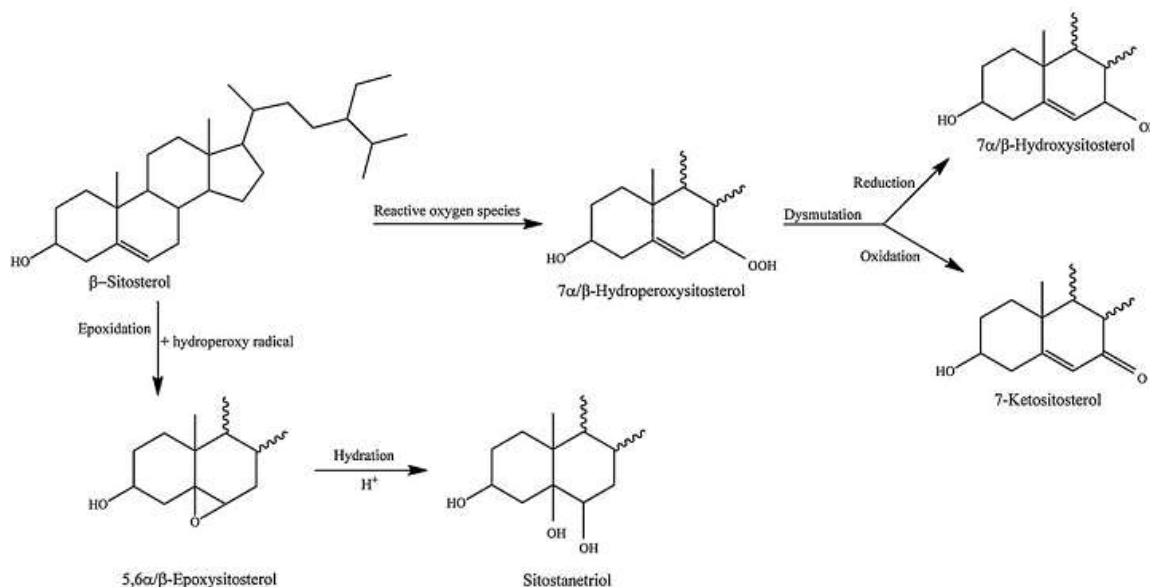


Figure II.15: Auto-oxydation des phytosterols.

Les autres produits majoritaires, qui peuvent être produits durant l'auto-oxydation, sont les époxydes et les triols. La formation d'époxyde se fait par un mécanisme bimoléculaire, entre une molécule de départ stérolique, non oxydée, réagit avec le radical peroxyde formé

durant le processus d'auto-oxydation (**Figure II.15**)^[133-135].

Les époxydes les plus formés sont l'époxy 5 α , 6 α - et 5 β , 6 β -, ce dernier est le composé le plus majoritaire, ceci pourra s'expliquer par le gêne stérique du groupement OH en position 3.

Les triols peuvent être formés à partir des deux épimères 5 α , 6 α - et 5 β , 6 β - époxydes par une hydroxylation dans un milieu acide^[122].

II. 4. 3 .2 Photo-oxydation

L'oxydation d'un gras insaturé, accélérée par l'exposition à la lumière est appelée une photo-oxydation^[136]. L'oxydation des phytostérols peut, aussi, commencer par l'état exciter d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, ce mécanisme d'oxydation non-radicalaire connu comme photo-oxydation, l'oxygène singulet est très réactif et peut réagir rapidement avec les doubles liaisons des molécules stéroïdiques par une ène-réaction spécifique^[136]. À l'état singulet deux électrons impaires au niveau des orbitales ont des spins opposées, résulte de la grande répulsion électronique^[132]. L'oxygène singulet a deux états excités, ils sont actifs 1500 fois plus que le triplet oxygène ordinaire, par une attaque électrophylque sur l'une des deux faces du double liaison de la molécule stéroïdique^[127,136]. Le produit primaire formé par photo-oxydation est l'hydroperoxyde^[123,137,138], et comme il est déjà mentionné que les produits primaires de la photo-oxydation sont très instables donc ils sont convertis en des produits d'une oxydation secondaire plus stable tel que 7- hydroxysterols et 7- cétostéroïde.

II. 4. 3. 3 Oxydation de la chaîne latérale des phytostérols

L'oxydation au niveau de la chaîne latérale des phytostérols est aussi remarquée. L'oxygène attaque cette fois-ci les carbones tertiaires de la chaîne latérale, spécialement les sites favorables C-20, C-24 et C-25 tertiaires. Le mécanisme d'oxydation est le même que celui de la partie cyclique de la structure (**Figure II.16**)^[123]. Les composés résultants sont des hydroperoxydes (20-OOH, 24-OOH et 25-OOH) qui se transforment par une oxydation secondaire, pour aboutir à des phytostérols oxydés. Ces composés sont nommés les Oxyphytostérols de la chaîne latérale^[123,139]. Les groupements alkyles, en position C-24, favorisent l'hydroxylation 24S- et limitent la formation des 20- ou 25-hydroxyphytostérols.

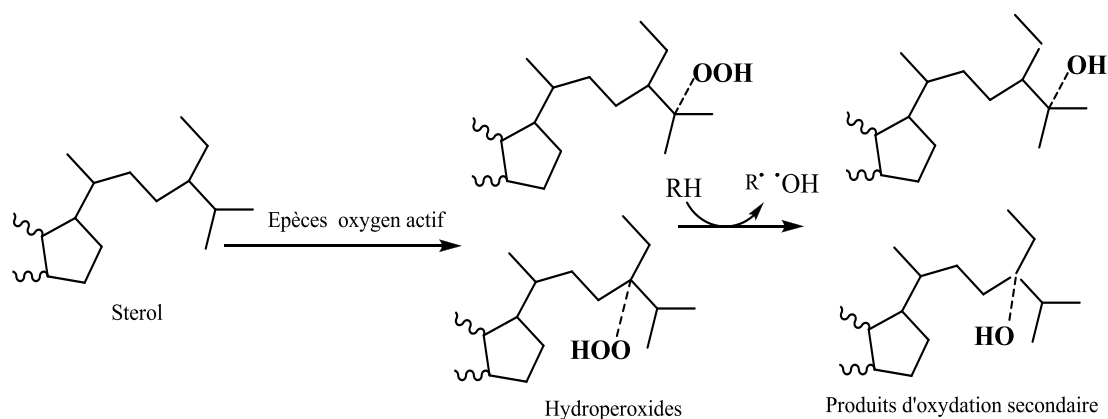


Figure II.16: Oxydation de la chaîne latérale des phytostérols.

II.4.4 Occurrence des oxyphytosterols dans la nourriture

L'extention de la formation des oxyphytosterols et la quantification dans l'alimentation dépend de la composition de l'aliment lui même: matière brute et / ou ingrédients, opération et conditions de stockage (température, temps, lumière, etc). En effet l'évolution et quantification des oxyphytosterols dans l'aliment est difficile, a cause de la faiblesse des témoins commerciales et le grand nombre des composés formés avec des structures similaires pendant l'oxydation du mélange des phytosterols (les sterols inoxyds et les lipides).

La plusparts des études sur les POP (produits d'oxydation des phytosterols) dans l'aliment sont basées sur: les huiles des végétaux ^[134,137,140-142], les frites, chips de pomme de terre ^[141], céréals au lait ^[144,145] margarine ^[146] et la farine ^[147]. Les oxyphytosterols majoritaires qui sont identifiés dans les produits alimentaires étudiés sont les dérivées de 7-hydroxy et 7-(C=O)-phytosterols suivis par 5, 6-époxy et triols.

Avec les sources des oxyphytosterols de l'alimentation, ils peuvent aussi arriver a partir d'absorption de la peau des produits cosmetiques et oxyds par la lumiere UV ^[148].

Tableau II.4: Quelques oxyphytosterols qui sont identifiés dans les produits alimentaires étudiés.

Produits alimentaires	Oxyphytostérol Identifier	Références
French fries Potato chips Huiles végétales	7 α -OH-, 7 β -OH-, 7=O, 5 α , 6 α -époxy-, 5 β , 6 β -époxy et composés triol du β -sitosterol et campesterol	[140-142]
Tournesol Huile d'olive	7 α -OH-, 7 β -OH-, 5 α , 6 α -époxy, 5 β , 6 β -époxy-, 7=O- β - sitosterol et β -sitosterol triol	[142]
Lait	7 α -OH, 7 β -OH- et 7-C=O β -sitosterol.	[142],[146]
Farine de blé	5 α , 6 α -époxy, 5 β , 6 β -époxy, 7 α -OH- et 7 β -OH- β -sitosterol	[147]

II.4.5 Les effets biologiques possible des oxyphytostérols

Dans ces dernières années, des effets de divers potentiels d'activités biologiques des différents oxyphytosterols ont été étudiés. Les activités anti-inflammatoire ^[154], antitumorale et des propriétés antidiabétique, diminution de la quantité des lipides ^[149, 151], modulation de mécanisme du cholestérol ^[152,153] et modulation d'immunité ^[154] sont attribuées à des oxyphytosterols spécifiques.

II.4.6 La Médecine Traditionnelle

Les oxyphytosterols sont identifiés dans les plantes de la médecine chinoise traditionnelle à cause de leurs activités antitumorale, comme pour les racines d'*Euphorbia fischeriana* qu'elle contient le 7 α -OH-, 7 β -OH- et 7(C=O) dérivées de campesterol, β -sitosterol et stigmasterol ^[155]. 7 α -, 7 β -OH- β -Sitosterol et leurs correspondant glucosides, sont isolés à partir d'*Urtica dioica* L., la plante recommandée pour le traitement de prostate adénomateux ^[156].

RESULTATS

ET

DISCUSSION

III.1 Extraction

Les parties aériennes de la plante *Pallenis spinosa* sont séchées et broyées sous forme d'une poudre fine (2Kg) et mises à macérer à la température ambiante dans le chloroforme (3×5L). Cette macération est répétée 2 fois avec le renouvellement du solvant pendant 72 heures. Après filtration et évaporation à sec du solvant sous vide, 40 g de l'extrait chloroformique ont été obtenus. Le résidu de la filtration est de nouveau mis à macérer dans le butanol (3×5L) pendant 3 jours. Après filtration et évaporation à sec du solvant sous pression réduite, on obtient 12 g d'extrait n-butanol (**Figure III.1**).

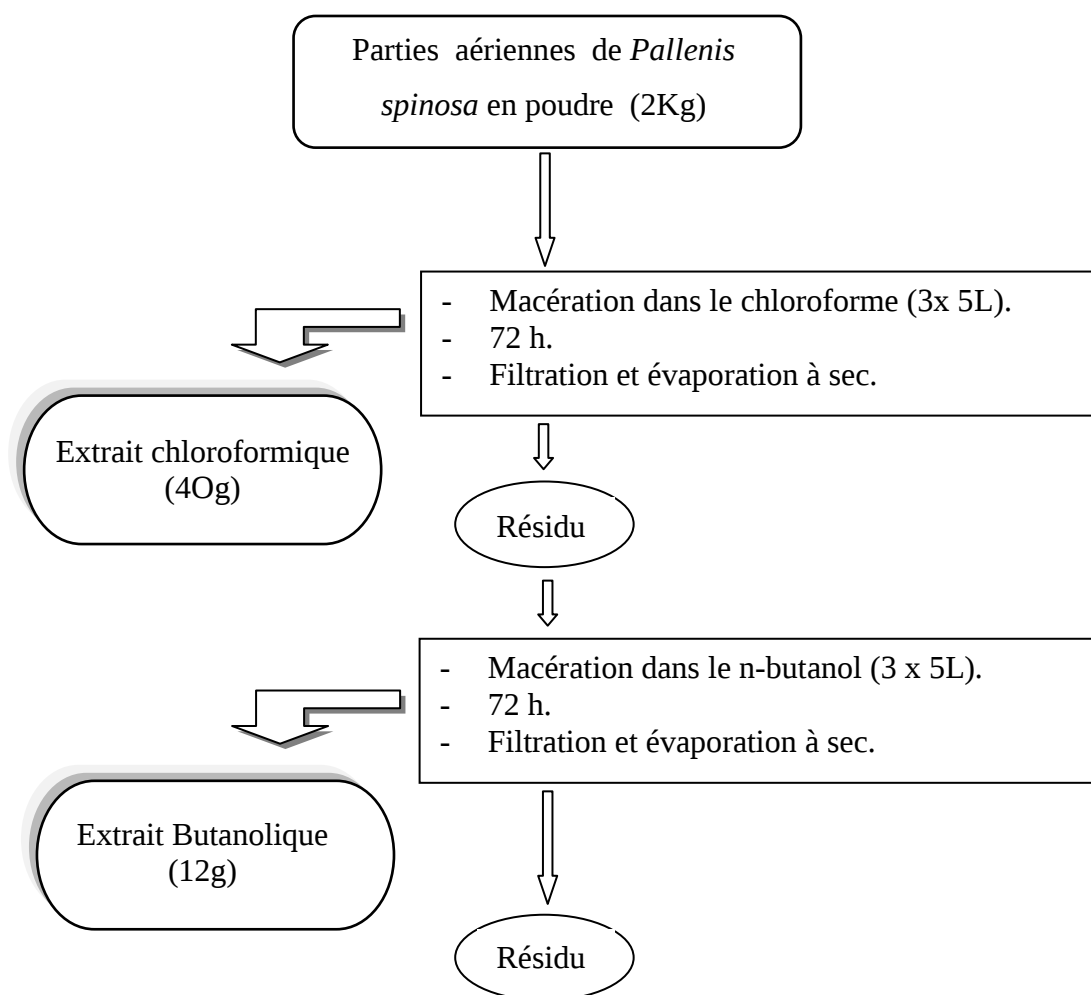


Figure III.1 : Schéma de protocole d'extraction des parties aériennes de *Pallenis spinosa*.

III.2 Purification des composés :

Une analyse chromatographique sur couche mince CCM a été réalisée sur les deux extraits obtenus précédemment, en utilisant différents systèmes d'élution: EP/AcOEt et $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; l'analyse montre plusieurs tâches, de différentes couleurs, à des R_f différents avec une traînée, surtout pour l'extrait chloroformique.

Le développement des plaques CCM s'effectue dans l'éluant approprié. L'observation se fait sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation au sulfate de cérium et la vanilline sulfurique.

20g d'extrait CHCl_3 sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice phase normale. Le système d'élution est le mélange: EP/AcOEt à différentes polarités, suivit par un gradient de AcOEt/MeOH. Après l'examen des fractions collectées, nous avons récupéré 13 fractions. Les quatre premières fractions sont des huiles (12g). Les fractions : F_5 et F_6 (A), F_8 (B) et F_{13} (C) sont choisies à purifier selon leur profil en CCM, ils ont des produits relativement séparables nous semblent intéressants.

La fraction A (1g) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice SiO_2 et éluee avec le mélange d'EP/AcOEt. La sous fraction A' purifiée on a séparé (5mg) du composé **PS₁** ($R_f=0.5$ dans le système de EP/AcOEt : 80/20).

La fraction B (1.813g) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice SiO_2 l'élution est effectuée avec le mélange d'EP/AcOEt (70/30) dont on augmente la polarité, 12 sous fractions ont été réunies. La sous fraction B' (243mg) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase inverse R_p , l'élution est menée dans le mélange H_2O / méthanol à différents gradients de 50/50 à MeOH 100%.

La sous fraction B'₁ (10.1mg) a subi une purification par fractionnement sur une colonne de gel de silice SiO_2 et éluee par le mélange d'hexane/AcOEt (50/50). La sous fraction f (1-7) révèle sur la plaque CCM en une tâche invisible de couleur bleu royale après révélation. Cette tâche représente le mélange des deux composés **PS₂** et **PS₃** (6.3mg, $R_f=0.5$ dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 90/10).

La sous fraction B'₂ (32,4 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec un système d'élution d'AcOEt / Hexane à différents gradients allant de (50-50) à

100%, puis dans le méthanol pur. La sous fraction f (38-42) montrant une tâche invisible en UV et rose après une révélation avec le sulfate de cérium, cette fraction a fourni 5mg de composé **PS**₅ ($R_f = 0.5$ dans le système de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} : 93/07$).

La fraction C se précipite dans le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10), ce qui nous a permis d'isoler 10mg de composé **PS**₄ sous forme de précipité ($R_f=0.49$ dans le système de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} : 90/10$).

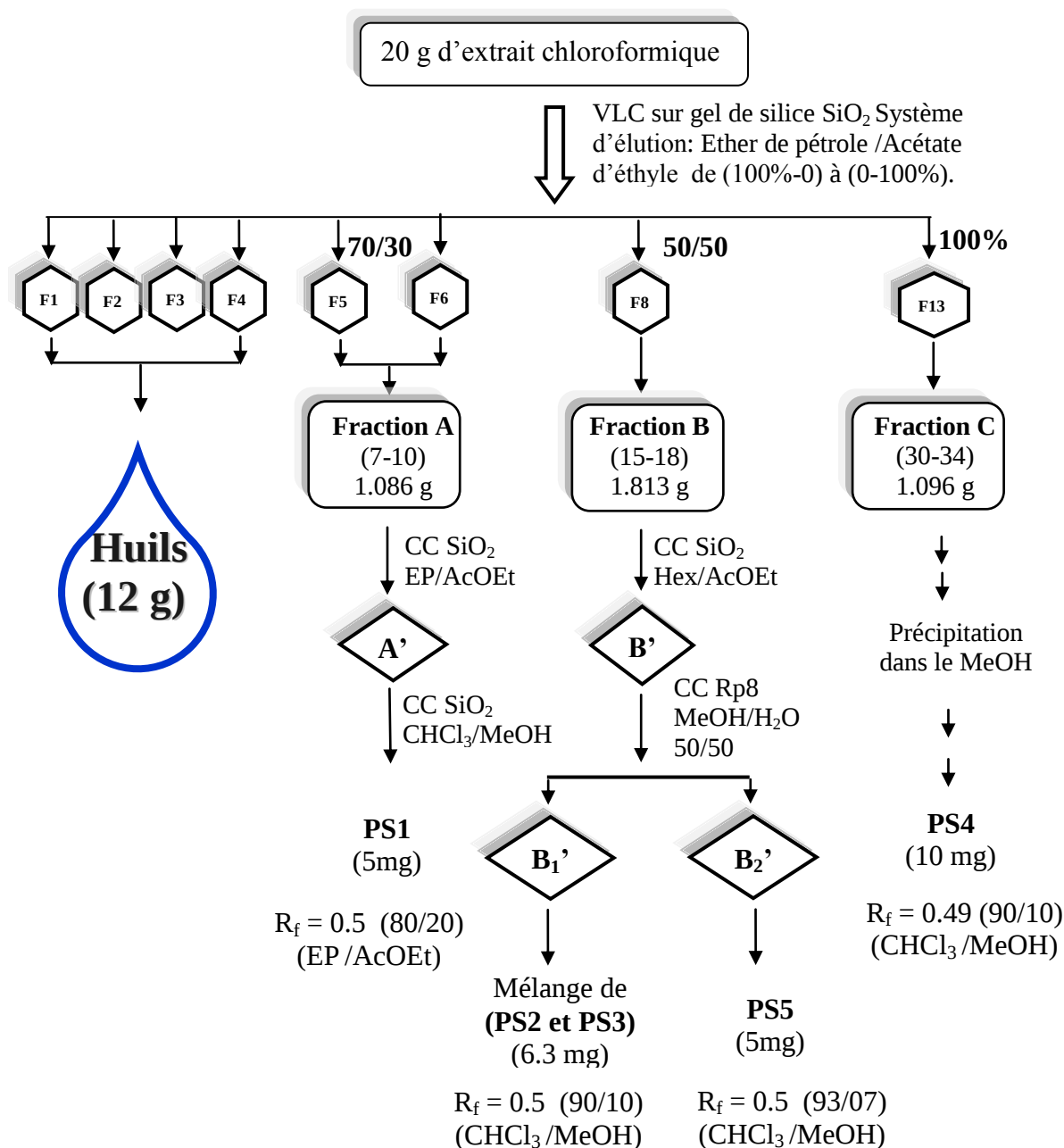
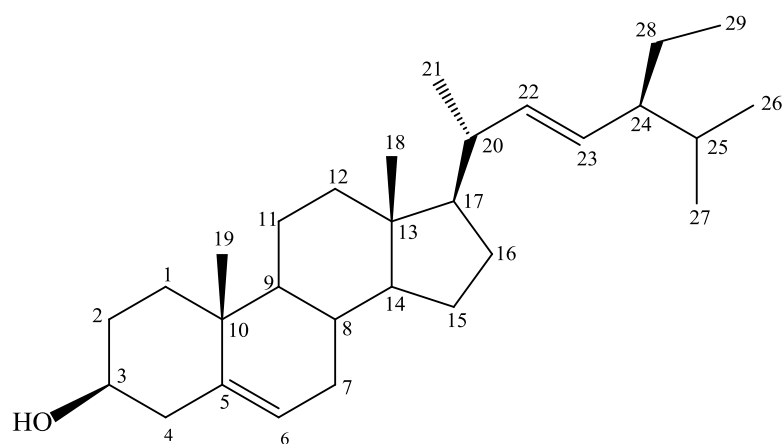


Figure III.2 : Isolement des composés de l'extrait chloroformique d'espèce *Pallenis Spinosa*.

III.3 Caractérisation des produits obtenus

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyses spectroscopiques particulièrement, la RMN 1D de ^1H et de ^{13}C , RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HSQC), spectrométrie de masse ESI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.

III.3.1. Elucidation structurale du composé PS1



24-éthylcholest-5,22-èn-3-ol

(Stigmasterol)

Le composé PS1 est le 24-éthylcholest-5,22-èn-3-ol, c'est un phytosterol nommé communément le stigmasterol, il se présente sous forme de cristaux blanc, soluble dans le chloroforme. Sur la plaque CCM le composé **PS1** se présente sous forme d'une monotâche invisible sous la lampe UV et se révèle avec le sulfate de cérium en coloration rose ($R_f=0.5$ dans le système AcOEt /EP : 80/20).

Le spectre de masse obtenu par impact électronique EI du composé **PS1** (**Figure III.3**) montre un pic d'ion moléculaire à m/z 412 correspondant à une masse moléculaire égale à 412 uma soit une formule brute en $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$.

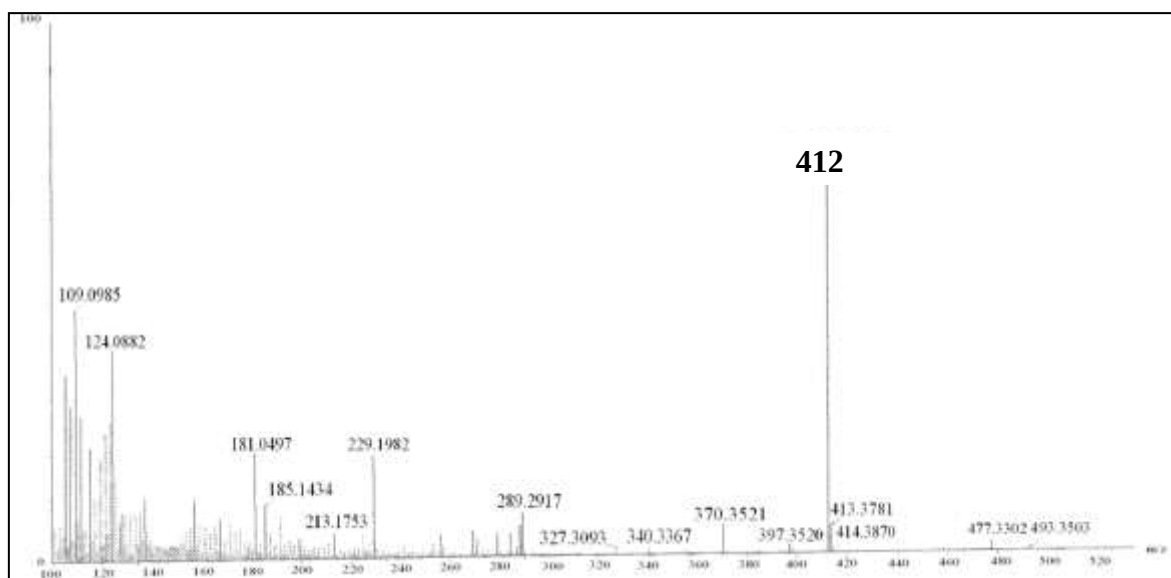


Figure III.3: Spectre de masse EI du composé PS1

Le spectre RMN ^1H enregistré dans CDCl_3 (**Figures III.4**) du composé PS1 indique un ensemble de signaux méthyliques, qui nous oriente vers un squelette stéroïdique.

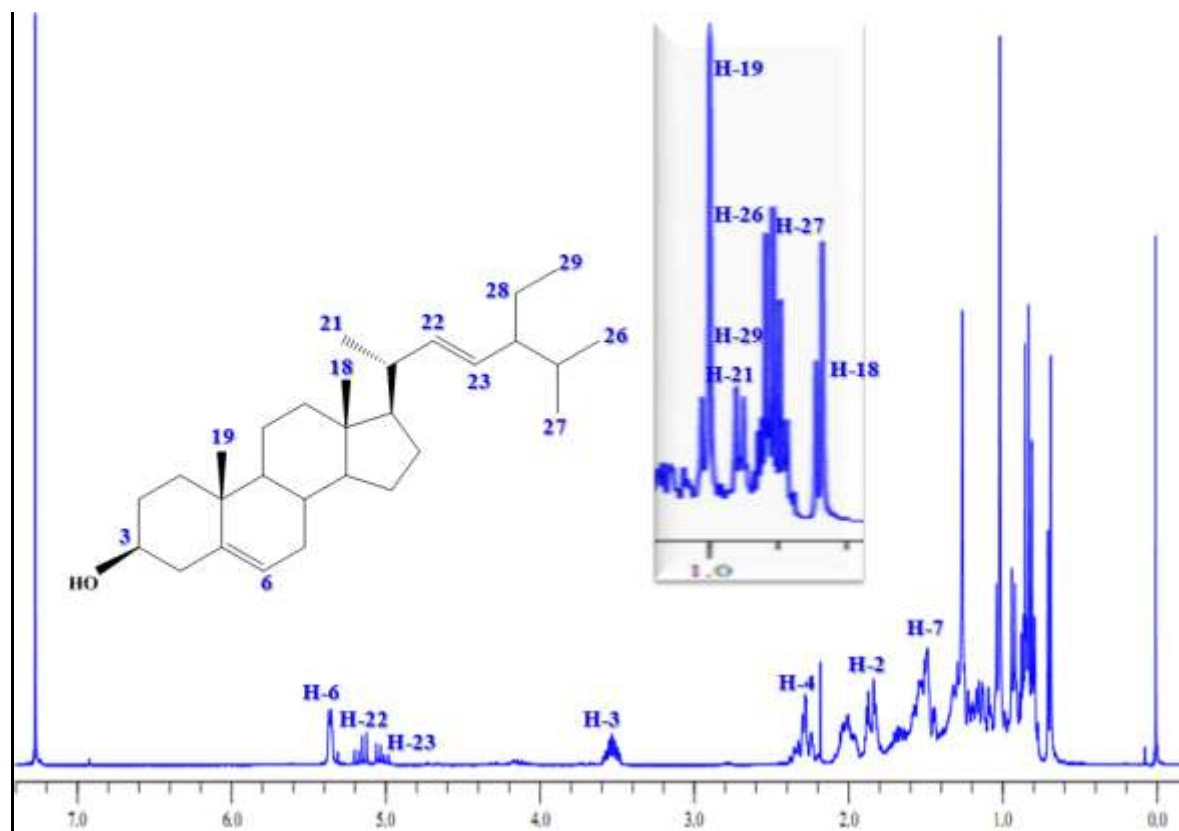


Figure III.4: Spectre de RMN ^1H du composé PS1.

En effet, les signaux observés entre [δ_H 0.6–1.01] sont reportées comme suit, leur attribution est basée par comparaison des déplacements chimiques avec ceux reportées dans la littérature de même composé :

- ❖ Deux signaux singulets résonnant à champ fort (δ_H 0.68 et δ_H 1.01), s'intégrant pour trois protons, chacun correspondant respectivement aux protons méthyliques H-18 et H-19.
- ❖ Trois signaux doublets à δ_H 0.92 ($J = 6.6$ Hz), δ_H 0.85 ($J = 6.5$ Hz) et δ_H 0,80 ($J = 6.5$ Hz), correspondent respectivement aux protons méthyliques H-21, H-26 et H-27.
- ❖ Le signal à δ_H 0.82 ($J = 7.0$ Hz) sous forme de triplet correspond à H-29.

En plus de ces signaux, le spectre RMN 1H montre :

- ❖ Un signal déblindé sous forme de multiplet résonant à δ_H 3.52, correspondant au proton oxyméthine H-3 caractéristique des stéroïdes (**Figure III.5**).

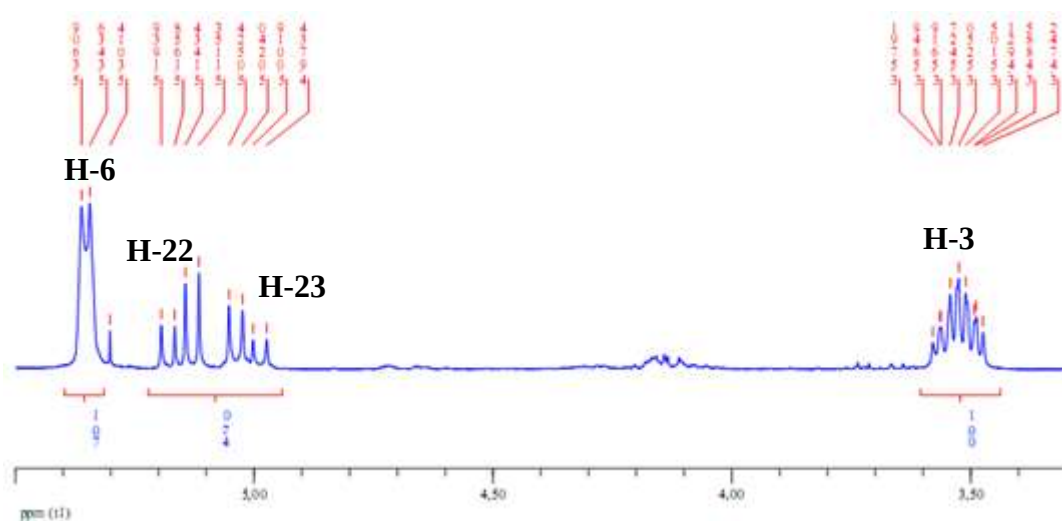


Figure III.5: Spectre RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) du composé **PS₁**

(Elargissement de la zone : 3.5- 6 ppm)

- ❖ Un signal sous forme de doublet large à δ_H 5.35 ($J = 5.2$ Hz) caractéristique d'un proton oléfinique H-6.

- ❖ Deux signaux chacun sous forme de doublet de doublet (*dd*) repérés à δ_H 5.15 ($J_{trans} = 15.2$) et δ_H 5.02 ($J_{cis} = 8.6$), sont attribuables respectivement aux protons oléfinique H-22 et H-23 (**Figure III.5**).

L'expérience de corrélation proton-proton COSY 1H - 1H (**Figure III.6**) montre les corrélations suivantes entre :

- Le proton H-22 et le proton H-23.
- Les protons H-6, H-4 et le proton H-7.
- Le proton H-7 et le proton H-8.
- Les protons H-4, H-2 et le proton H-3.

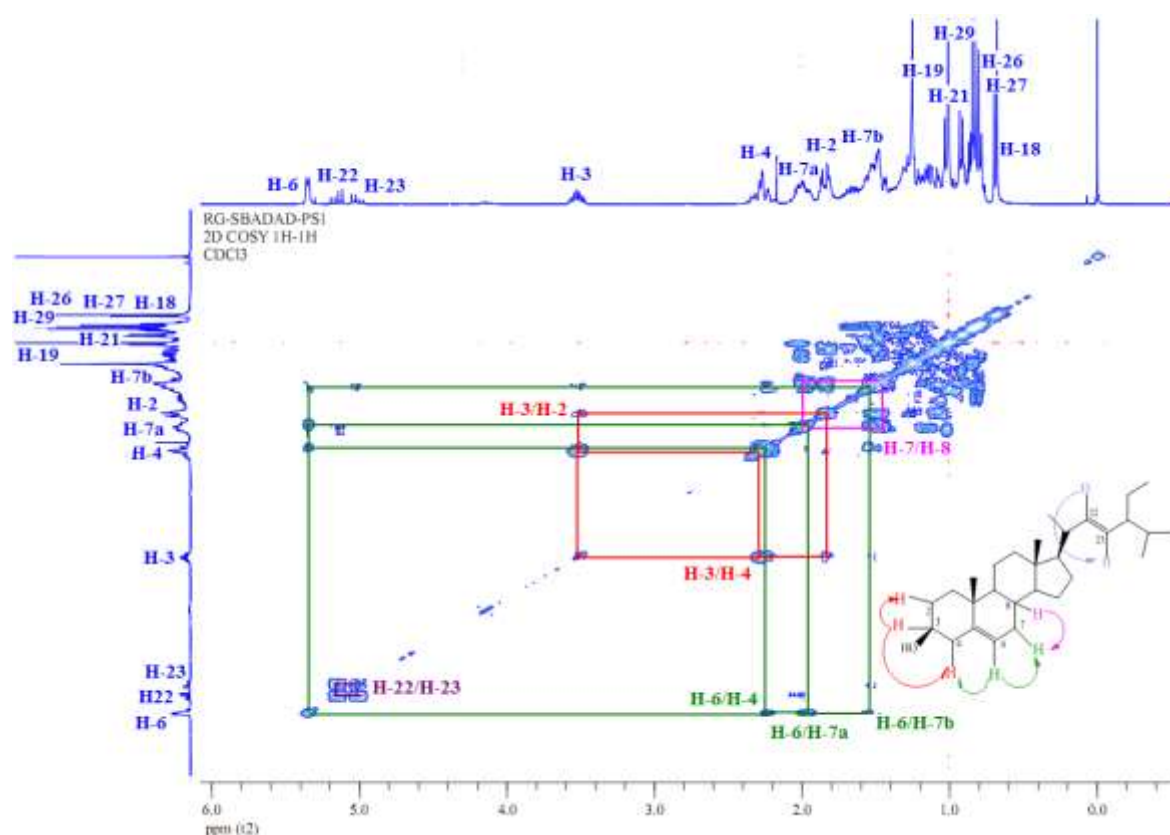


Figure III.6 : Spectre COSY 1H - 1H du composé PS1.

L'étude du spectre RMN ^{13}C (**Figure III.7**) de ce composé montre la présence de 29 atomes de carbones avec en particulier les signaux suivants :

- Six signaux méthyliques caractéristiques des phytostérols résonant à champ fort à [δ_C 12.0 (C-18), 19.4 (C-19), 21.2 (C-21), 21.1 (C-26), 19.0 (C-27) et 12.2 (C-29)].

- Un signal apparaissant à $\delta_C 71.8$ attribué à un carbone porteur de la fonction OH (C-3).
- Un signal résonant à $\delta_C 140.8$ (C-5) correspondant à un carbone quaternaire sp^2 , les signaux à $\delta_C 121.7$ (C-6) et à $\delta_C 138.3$ (C-22) et 129.3 (C-23) attribuables à la présence de deux doubles liaisons $C_5=C_6$ et $C_{22}=C_{23}$ respectivement.

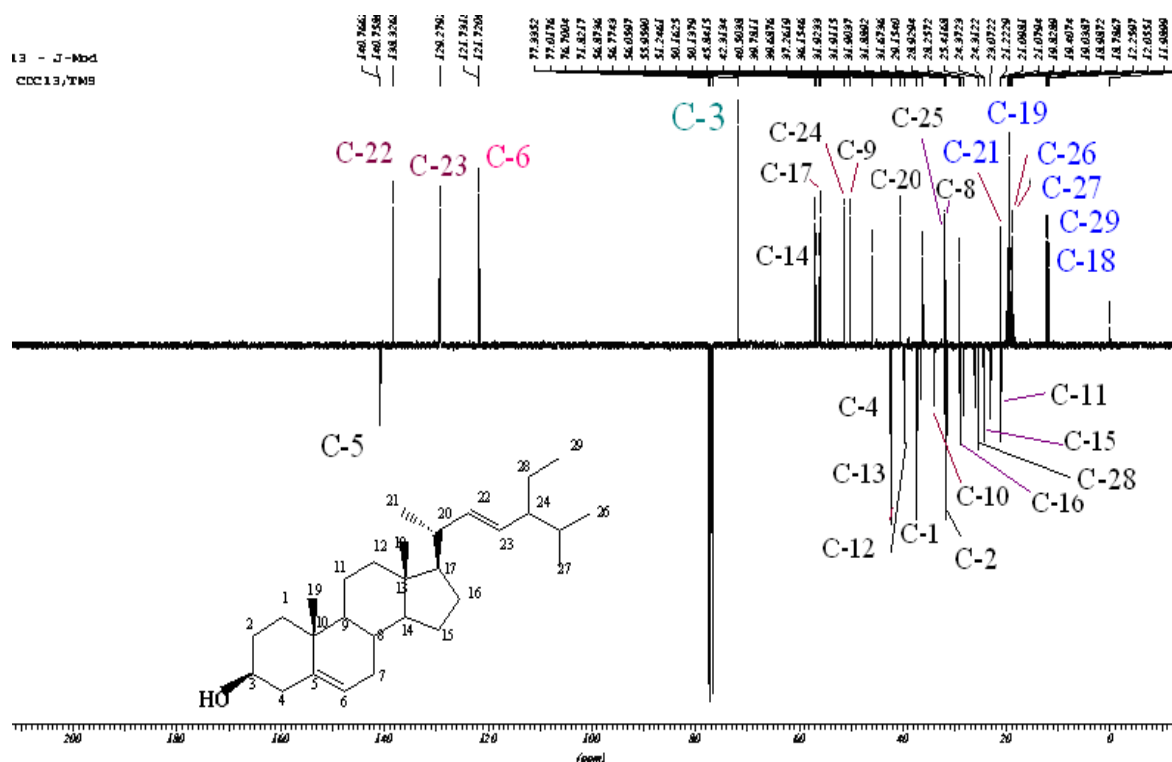


Figure III.7 : Spectre de RMN¹³C du composé PS₁.

L'ensemble de données obtenues et la comparaison avec les données de la littérature, nous a permis, d'attribuer la structure au produit **PS₁**, à un phytostérol qui porte un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone C3, deux doubles liaisons en $C_5=C_6$ et en $C_{22}=C_{23}$ ^[157,168], qui est le 24-éthyle-cholest-5,22-diène-3-ol appelé également stigmastérol. Ce composé est décrit ici pour la première fois dans l'espèce *Pallenis spinosa* et même pour le genre *Pallenis*.

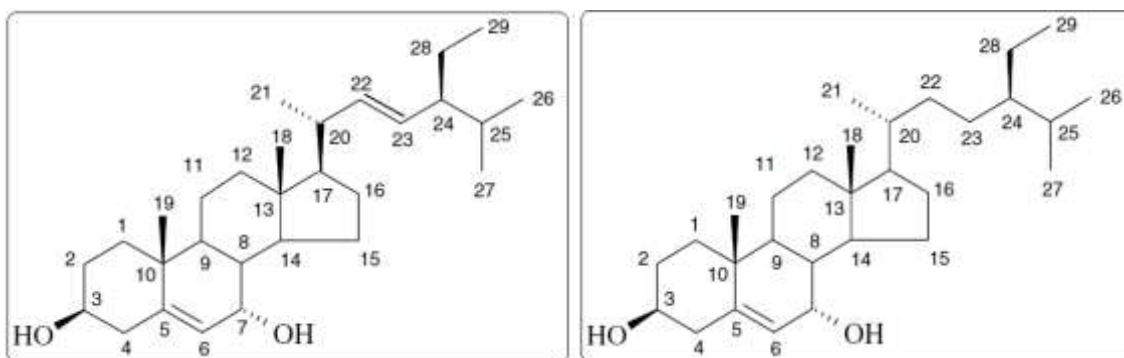
Le stigmastérol **PS₁** est déjà obtenu dans le genre *Asteriscus* au sein de l'espèce *Asteriscus maritimus* (*Odontospermum pygmaeu*)^[24], il est largement distribué dans le monde végétal et a été antérieurement isolé de plante appartenant à la famille Asteraceae comme *Santolina rosmarinifolia*^[156].

Le **Tableau III.1** suivant regroupe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé:

Tableau III.1 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C de **PS₁** dans CDCl_3 .

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) ; m, J(Hz)
1 (CH_2)	37.2	1.84 (β) m – 1.08(α) m
2 (CH_2)	31.7	1.83 (α) m – 1.49(β) m
3 (CH)	71.8	3.52 (α) m
4 (CH_2)	42.3	2.28 (α) m- 2.23(β) m
5 (C)	140.8	-
6 ($=\text{CH}$)	121.7	5.35 <i>dl</i> 5.2
7 (CH_2)	31.9	1.97(β) m – 1.48 (α) m
8 (CH)	31.9	1.46(β) m
9 (CH)	50.1	1.01(α) m
10 (C)	36.5	-
11 (CH_2)	21.1	1.52 (α, β) m
12 (CH_2)	39.7	2.05 (β) m -1.18(α) m
13 (C)	42.3	-
14 (CH)	56.8	1.03 (α) m
15 (CH_2)	24.4	1.56 (α) m - 1.06 (β) m
16 (CH_2)	28.9	1.65 (α) m - 1.25(β) m
17 (CH)	56	1.14(α) m
18 (CH_3)	12.0	0.68 s
19 (CH_3)	19.4	1.01 s
20 (CH)	40.5	2.04 m
21 (CH_3)	21.2	0.92 <i>d</i> 6.6
22 ($=\text{CH}$)	138.3	5.15 <i>dd</i> 15.2 ; 8.6
23 ($=\text{CH}$)	129.3	5.02 <i>dd</i> 15.2 ; 8.6
24 (CH)	51.2	1.54 m
25 (CH)	31.9	1.55 m
26 (CH_3)	21.1	0.85 <i>d</i> 6.5
27 (CH_3)	19.0	0.80 <i>d</i> 6.5
28 (CH_2)	25.4	1.19-1.43 m
29 (CH_3)	12.2	0.82 <i>t</i> 7.0

III.3.2 Elucidation structurale du composé PS₂ et PS₃



PS₂: 7 α -Hydroxy-stigmastérol

PS₃ : 7 α -Hydroxy-sitostérol

Ce composé a été isolé à partir d'un mélange à l'état solide. La plaque CCM de ce composé est comparée avec le composé PS1 présente une différence importante de polarité, ce composé a un $R_f = 0.5$ dans le système de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90 :10) et d'une couleur bleu nuit, après révélation avec le sulfate de cérium et chauffage.

Le spectre de masse ESI enregistrés en modes positif (**Figure III.8**), montre des pics d'ions pseudomoléculaires à: m/z 429.32, m/z 451.35 et m/z 453.36 correspondant respectivement aux pics moléculaires $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

La différence de deux unités de 2H entre les deux pics à m/z 451.35 et m/z 453.36 prouve l'existence de deux composées de formule brute de $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ (**PS₂**) et $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (**PS₃**).

Les masses de ces composés sont de 428 (**PS₂**) et de 430 uma (**PS₃**) soit une différence de 16 unités par rapport au stigmastérol (412 uma) et β -sitostérol (414 uma) (présence d'une fonction hydroxyle OH).

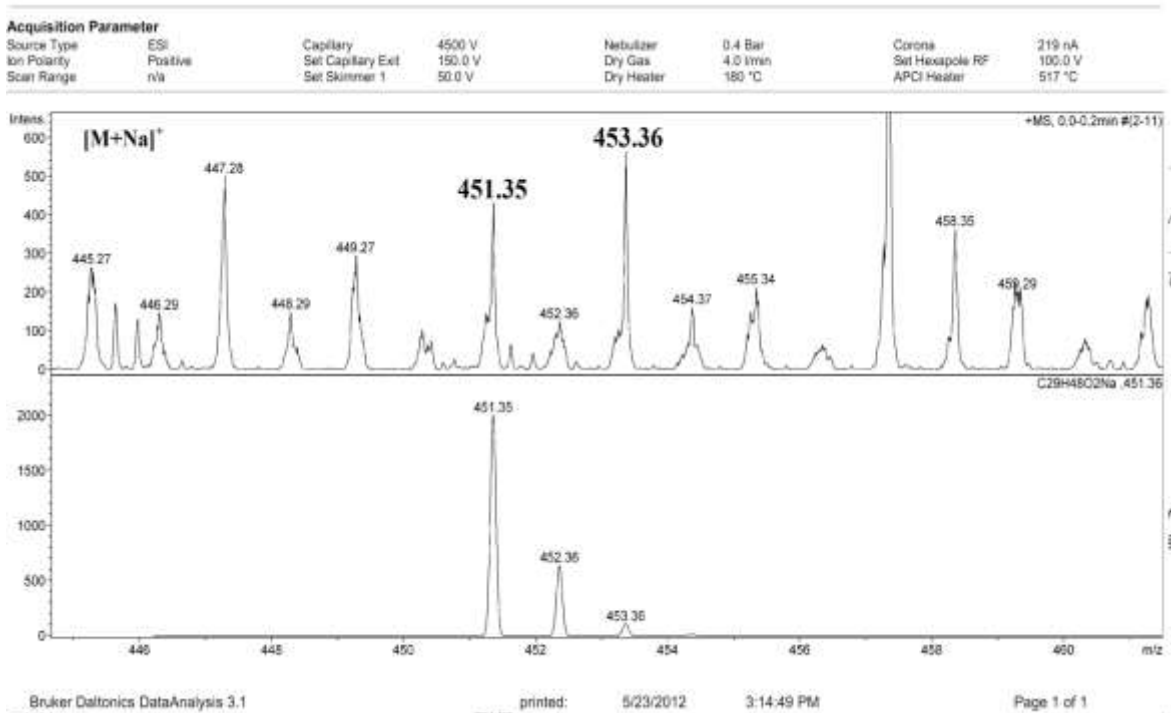
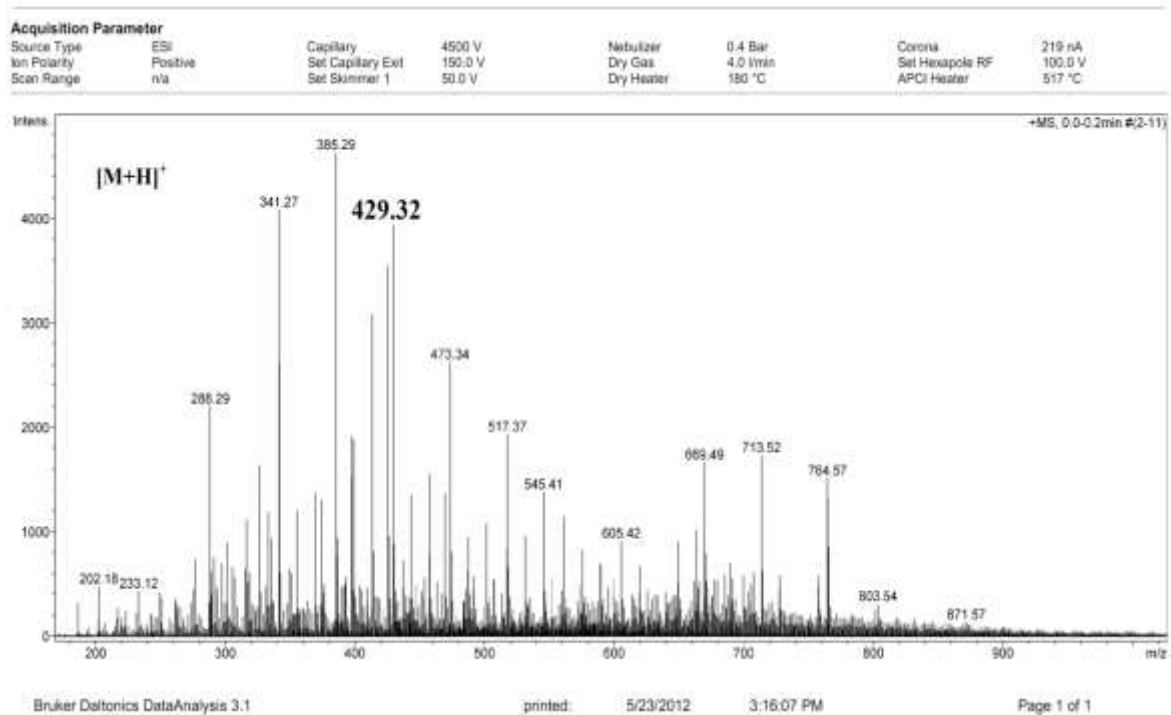


Figure III.8: Spectres de masse ESI (mode positif) des composés du mélange PS_2 et PS_3 .

Le spectre RMN ^1H de ces deux composés (**Figure III.9**) présente une grande similitude de signaux, en comparaison avec le spectre du composé **PS₁** suggérant que la structure de ce produit exhibe un squelette d'un phytostérol.

En effet, le spectre RMN ^1H montre la présence de six signaux d'intégration 3H chacun correspondant à des groupements méthyliques repérés à [δ_{H} 0.70 H-18 (s), 0.84 H-27 (d, $J = 6.7$ Hz), 0.78 H-26 (d, $J = 6.7$ Hz), 0.80 H-29 (t, $J = 7$ Hz), 0.99 H-19 (s) et 1.02 H-21 (d, $J = 6.7$ Hz)].

Un signal multiplet résonant à δ_{H} 3.51 attribuable au proton H-3, deux résonant à [δ_{H} 5.01 (H-23) et 5.17 (H-22)] attribuables aux protons oléfiniques.

Le spectre RMN ^1H présente aussi un signal résonant à δ_{H} 3.86 (H-7) attribuable à un proton oxyméthine.

Le déblindage de proton H-6 δ_{H} 5.61 (1H, dl, $J = 5$ Hz) en comparaison avec H-6 du composé **PS₁** résonant à δ_{H} 5.35 (1H, dl, $J = 5.2$ Hz) suggère que le groupement hydroxyle est attaché au carbone C-7.

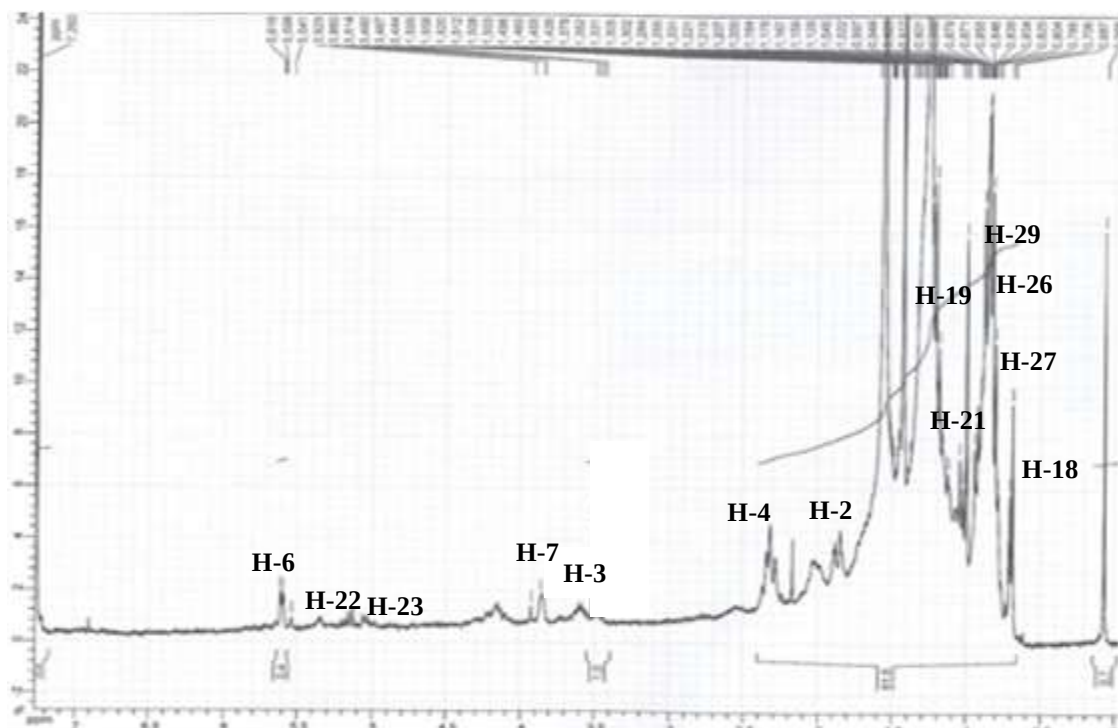


Figure III.9 : Spectre RMN ^1H du composé **PS₂**.

Dans le spectre RMN ^{13}C (**Figure III.10**) on observe des signaux caractéristiques d'un squelette de phytostérol:

- Six signaux de carbones méthyliques à [$\delta_{\text{C}}11.7(\text{C-18})$, $\delta_{\text{C}}19.2(\text{C-19})$, $\delta_{\text{C}}18.4(\text{C-21})$, $\delta_{\text{C}}18.9(\text{C-26})$, $\delta_{\text{C}}19.9(\text{C-27})$ et $\delta_{\text{C}}11.9(\text{C-29})$].
- Deux signaux de deux carbones oxyméthine apparaissant à $\delta_{\text{C}}71.5$ et $\delta_{\text{C}}65.5$ correspondant respectivement au carbone attribuable aux carbones C-3 et C-7.
- Des signaux de carbones oléfiniques sortant à [$\delta_{\text{C}}124.1(\text{C-6})$, $\delta_{\text{C}}129.5(\text{C-22})$ et $\delta_{\text{C}}138.3(\text{C-23})$]. (**Figure III.10**)

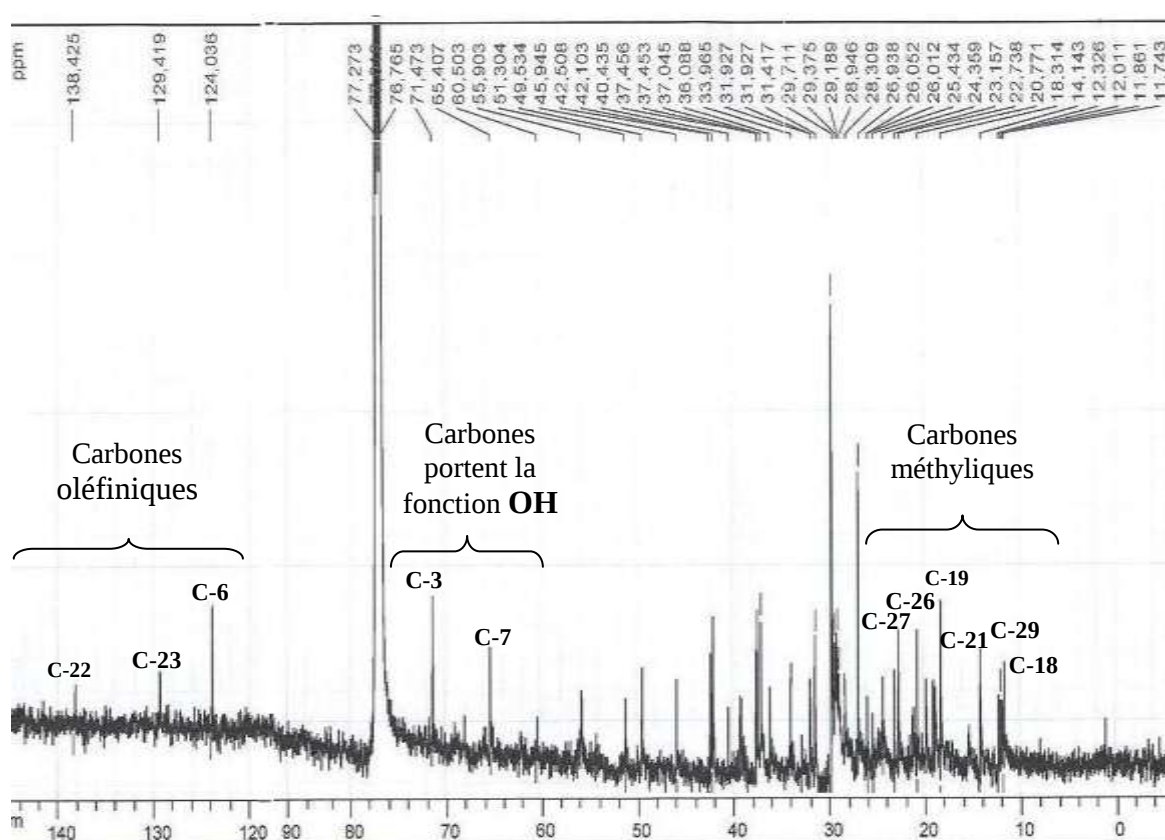


Figure III.10 : Spectre RMN ^{13}C du composé PS_2 .

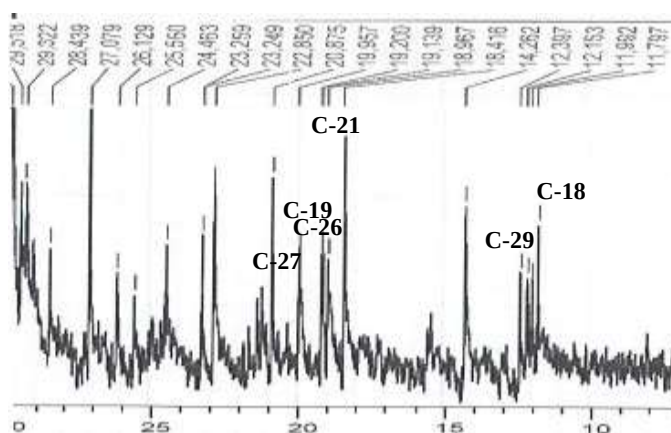


Figure III.10 : Spectre RMN ^{13}C du composé **PS₂**
(Elargissement de la zone [11- 20] ppm.)

La recherche exhaustive effectuée sur les dérivés 7- α -OH (Δ^5 et $\Delta^{5,22}$) phytostérol montrent une grande ressemblance des données spectrales avec celle du mélange **PS₂** et **PS₃**.

Ces composés sont identifiés dans les racines d'*Euphorbia Fischeriana* ^[155], les grains d'*Urtica Dioica* ^[155], *Ornithoussativus* ^[162], *Helianthus tuberosus* ^[163], *Leucase cephalotes* ^[166] et *Chenopodium Rubrum* ^[167]. En notant que ces composés ont été isolés sous formes des mélanges diastéréoisomérique au niveau de C-7 (α -OH et β -OH).

La distinction entre les composés avec α -OH ou β -OH au niveau de C-7 est basée sur le déplacement chimique du proton en C-6. Il apparaît que $\delta_{\text{H-6}}$ (α -OH) est à 5.61 par contre le déplacement chimique est à 5.29 en cas de (β -OH) en C-7. Par simple comparaison et dans le cas du (**PS₂**) le proton H-6 apparaît à δ_{H} 5.61 ce qui est en bon accord avec une configuration α de OH en C-7.

Les composés identifiés sont utilisés dans la médecine traditionnelle Chinoise pour leur activités antitumeur ^[166, 171, 172], comme pour les racines d'*Euphorbia fischeriana* ^[155], et traitement de prostate adénomateuse pour l'espèce *Urtica dioica* ^[156].

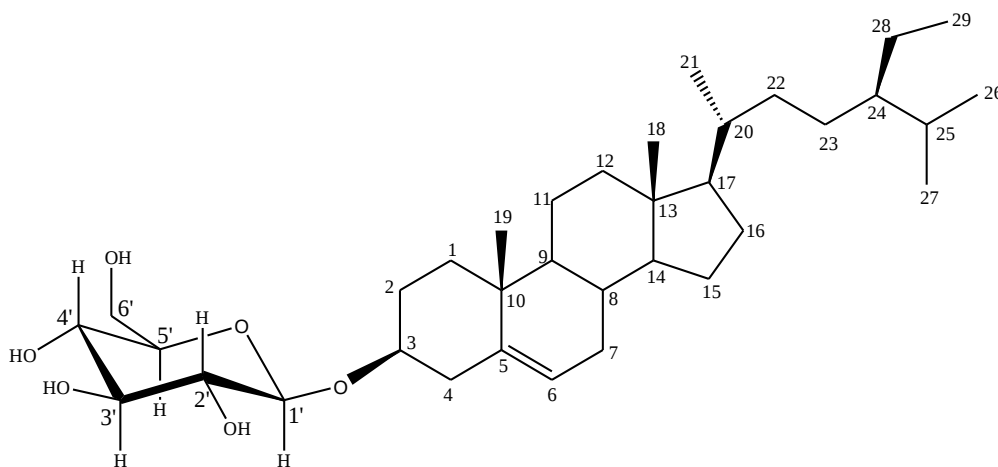
De ce qui précède, le composé **PS₂**, il s'agit d'un 7 α -OH stigmasterol, et d'après le spectre de masse qui présente une différence de deux unités de 2H entre les deux pics à m/z 451.35 et m/z 453.36 prouve l'existence d'un deuxième composé suite de formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (**PS₃**) il s'agit d'un 7 α -OH β -sitosterol.

Tous les déplacements chimiques du composé **PS₂** et ceux de littérature sont illustrés dans les tableaux suivants **Tableau III.2**:

Tableau III.2 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de **PS₂** dans CDCl₃.

Position	7α-Hydroxy stigmastérol			
	PS₂		Littérature ^[166,170, 186]	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) ; m, J(Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) ; m, J(Hz)
1 (CH ₂)	37.5	1.84 m	37.5	1.84 m, 1.08m
2 (CH ₂)	31.5	1.82 m	31.5	1.83 m, 1.49 m
3 (CH)	71.5	3.51m	71.5	3.58m
4 (CH ₂)	42.1	2.28m	42.1	2.28 β ; 2.36 α m
5 (C)	Non identifier		146	-
6 (CH)	124.1	5.61 dl 5	124.1	5.60 dl 5.2
7 (CH)	65.5	3.86m	65.5	3.85 m
8 (CH)	37.0	1.42 m	37.0	1.43 m
9 (CH)	42.4	1.19 m	42.4	1.15 m
10 (C)	37.6	-	37.6	-
11 (CH ₂)	21.8	1.49 m	21.8	1.49 m
12 (CH ₂)	39.2	1.97 m	39.2	1.97 ; 1.12 m
13 (C)	42.3	-	42.3	-
14 (CH)	49.6	1.42 m	49.6	1.41 m
15 (CH ₂)	24.4	1.04 m	24.4	1.66, 1.08 m
16 (CH ₂)	28.4	1.25 m	28.9	1.65 α - 1.25 β
17 (CH)	55.3	1.15 m	56	1.14 (α) m
18 (CH ₃)	11.7	0.70 s	11.7	0.70s
19 (CH ₃)	19.2	0.99 s	19.2	0.99 s
20 (CH)	36.1	2.04 m	36.1	2.04 m
21 (CH ₃)	18.4	1.02 d 6.7	19.4	1.03 d 6
22 (CH)	129.5	5.01 dd 15.2 ; 8.6	129	5.01 dd 15.2 ; 8.6
23 (CH)	138.3	5.17dd 15.2 ; 8.6	138	5.17 dd 15.2 ; 8.6
24 (CH)	46.0	0.94 m	45.8	0.93 m
25 (CH)	25.5	1.55 m	25.5	1.54 m
26 (CH ₃)	18.9	0.78 d 6.7	18.8	0.79 m
27 CH ₃)	19.9	0.84 d 6.7	19.9	0.85 m
28 (CH ₂)	22.5	0.90 m	22.8	0.90 m
29 (CH ₃)	11.9	0.80 t 7	11.9	0.80 t 7

III.3.3 Elucidation structurale du composé PS₄



3-O-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le mélange chloroforme/ méthanol.

Les spectres de masse ESI du composé **PS₄**, enregistrés en modes positif (**Figure III.11**) et négatif (**Figure III.12**), montrent des pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z 599.3 $[M+Na]^+$ et 575 $[M-H]^-$, donnant une masse moléculaire égale à 576 uma en accord avec une formule brute en C₃₅H₆₀O₆.

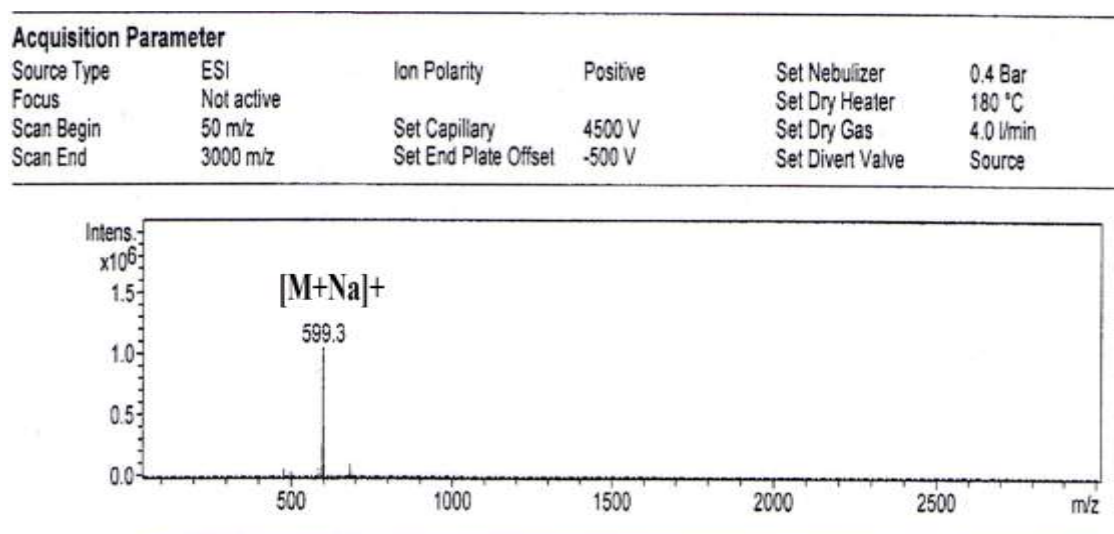


Figure III. 11: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé PS₄.

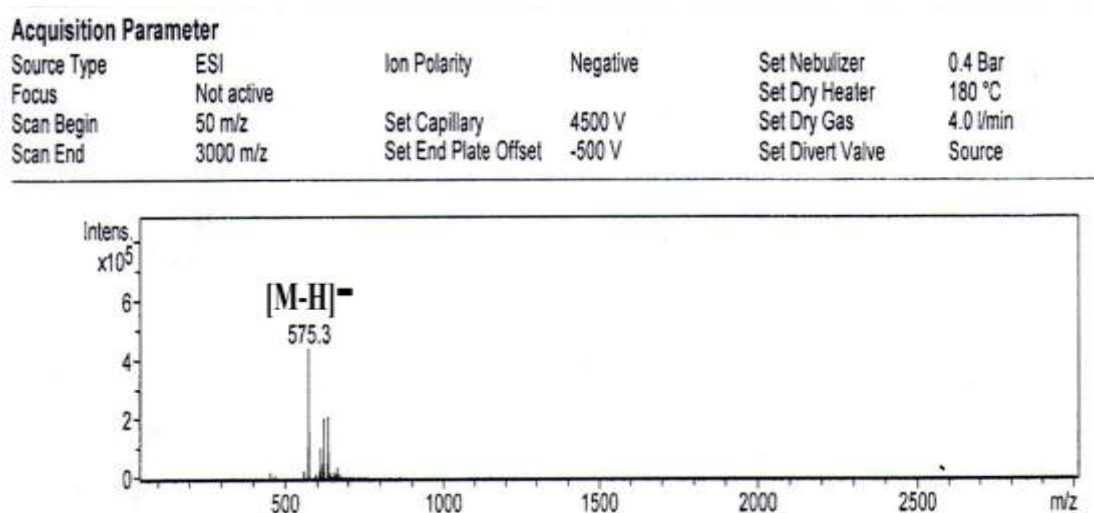


Figure III. 12 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé PS₄.

Comme pour les produits décrits précédemment, l'ensemble des informations récoltées au niveau du spectre RMN ¹H (**Figure III.13**) montre que ce composé fait également partie de la classe des phytostérols, notamment en raison de la présence de six signaux à haut champ, d'intégration 3H, chacun correspondant à des groupements méthyliques, repérés à [δ_H 0.71 H-18 (s), δ_H 1.03 H-19 (s), δ_H 0.94 H-21 (d, $J = 6.7$ Hz), δ_H 0.86 H-26 (d, $J = 6.7$ Hz), δ_H 0.84 H-27 (d, $J = 6$ Hz) et δ_H 0.87 H-29(t, $J = 7.5$ Hz).

En outre, l'observation d'un signal multiplet à δ_H 3.63 attribuable au proton H-3 ainsi que d'un signal de proton oléfinique à δ_H 5.38 H-6 (1H, *dl*, $J = 5$ Hz) (**Figure III.13**) atteste de l'appartenance de ce composé à la famille des stérols.

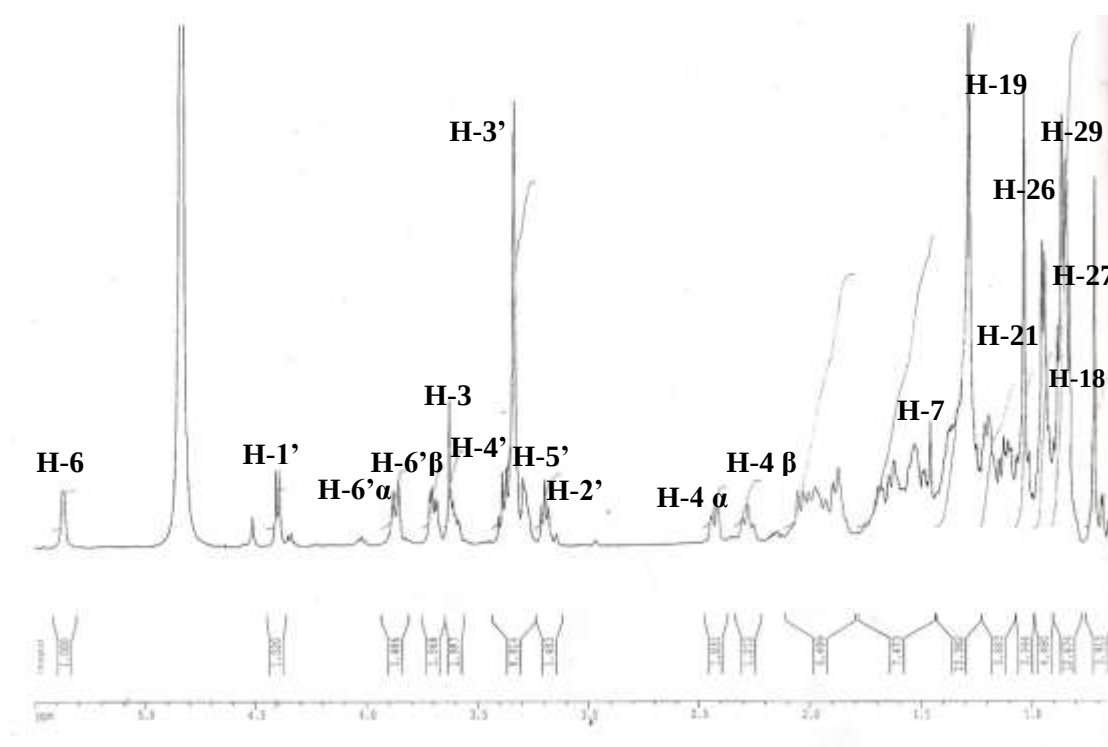


Figure III.13 : Spectre RMN ^1H du composé PS_4

Ce spectre (**Figure III.13**) suggère aussi l'existence d'une unité osidique en raison du nombre de signaux résonant entre [$\delta_{\text{H}}3$ et 4.5 ppm] et d'un signal doublet (1H, $J = 7.8$ Hz) localisé à $\delta_{\text{H}} 4.43$ caractéristique d'un proton anomère H-1' de sucre.

Les données obtenues par l'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure III.14**) confirment bien notre hypothèses en ce qui concerne la génine avec la localisation :

- de six carbones méthyliques à $\delta_{\text{C}}12.2(\text{C-18})$, $\delta_{\text{C}}19.1(\text{C-19})$, $\delta_{\text{C}}18.3(\text{C-21})$, $\delta_{\text{C}} 18.7(\text{C-26})$, $\delta_{\text{C}} 19.1(\text{C-27})$ et $\delta_{\text{C}} 12.2(\text{C-29})$.
- d'un carbone oxyméthine (CH-O) à $\delta_{\text{C}}78.6$ attribuable au carbone C-3. La valeur du déplacement chimique de ce dernier indique qu'il est le point de branchement de la génine avec le sucre.
- de deux carbones oléfiniques, l'un quaternaire sortant à $\delta_{\text{C}} 140.3(\text{C-5})$ et un carbone CH à $\delta_{\text{C}} 121.5 (\text{C-6})$.

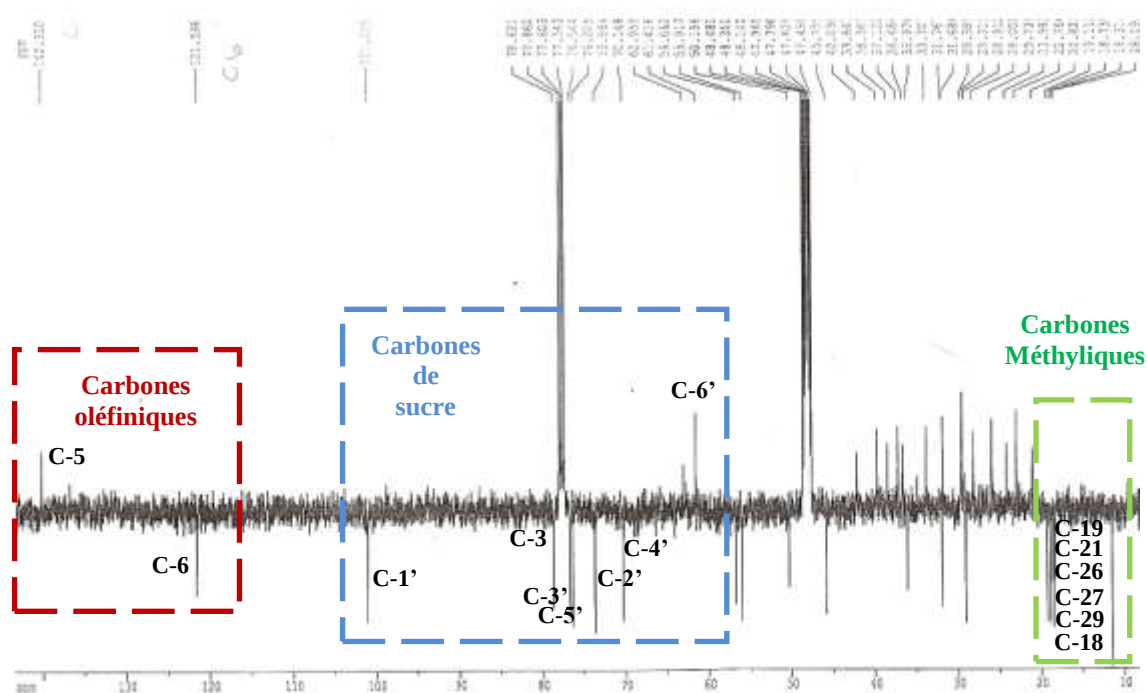


Figure III.14 : Spectre RMN ^{13}C du composé PS_4 .

De même que pour l'unité osidique, le spectre RMN ^{13}C (**Figure III.14**) montre la présence :

- d'un carbone anomérique à δ_{C} 101.0 (C-1').
- de quatre groupements CH à (δ_{C} 70.1 C-4'), (δ_{C} 73.5 C-2'), (δ_{C} 76.2 C-5') et (δ_{C} 76.5 C-3').
- d'un carbone méthylénique CH_2 sortant à (δ_{C} 61.4 C-6').

A l'issue de ces résultats spectraux et de la comparaison avec les données de la littérature ^[181,182] le composé PS_4 est identifié comme 3 β -D-glucopyranosyl β -sitostérol connu sous le nom Daucostérol^[175], isolée antérieurement des espèces appartenant à la famille Asteraceae comme *Odontospermum pygmaeum*^[24], *Centaurea africana*^[176], *Centaurea bracteata*^[174], *Scorzonera undulata*^[177].

Des études réalisées sur ce composé montrent qu'il présente des propriétés : anti-inflammatoire, anti-cholestérol ^[179,179], anti-pyrétique, anti-néoplasique et anti-mutagénique ^[190]. Il est également utilisé dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate ^[181].

Tableau III.3: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **PS₄**.

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) ; m, J(Hz)
1 CH ₂	37.1	1.89 <i>m</i> H-1 α 1.08 <i>m</i> H-1 β
2 CH ₂	29.3	1.61 <i>m</i> H-2 β ; 1.92 <i>m</i> H-2 α
3 CH	78.6	3.63 <i>m</i>
4 CH ₂	38.3	2.27 <i>tl</i> 13 H-4 β ; 2.43 <i>dm</i> 13; 2 H-4 α
5 C	140.3	-
6 CH	121.5	5.38 <i>dl</i> 5
7 CH ₂	31.7	1.45 -2.00 <i>m</i>
8 CH	31.6	1.97 <i>m</i>
9 CH	50.1	0.98 <i>m</i>
10 C	36.4	-
11 CH ₂	20.8	1.50 <i>m</i> H-11 α , 1.02 <i>m</i> H-11 β
12 CH ₂	39.6	1.10 <i>m</i> H-12 α -2.1 <i>m</i> H-12 β
13 C	42.0	-
14 CH	56.6	1.06 <i>m</i>
15 CH ₂	25.7	1.52 <i>m</i> H-15 α ; 1.02 <i>m</i> H-11 β
16 CH ₂	28.0	1.87 <i>m</i> H-16 α ; 1.27 <i>m</i> H-16 β
17 CH	55.9	1.14 <i>m</i>
18 CH ₃	12.2	0.71 <i>s</i>
19 CH ₃	19.1	1.03 <i>s</i>
20 CH	35.9	1.36 <i>m</i>
21 CH ₃	18.3	0.94 <i>d</i> 6.7
22 CH ₂	33.7	1.34 <i>m</i> H-22 α ; 1.06 <i>m</i> H-22 β
23 CH ₂	25.7	1.19 <i>m</i>
24 CH	45.7	0.95 <i>m</i>
25 CH	29.3	1.68 <i>m</i>
26 CH ₃	18.7	0.86 <i>d</i> 6.7
27 CH ₃	19.1	0.84 <i>d</i> 6
28 CH ₂	22.7	1.27 <i>m</i>
29 CH ₃	12.2	0.87 <i>t</i> 7.5
Glucose		
1' CH	101.0	4.43 <i>d</i> 7.8
2' CH	73.5	3.20 <i>t</i> 7.9
3' CH	76.5	3.35 <i>m</i>
4' CH	70.1	3.39 <i>m</i>
5' CH	76.2	3.28 <i>m</i>
6' CH ₂	61.4	3.88 <i>d</i> H-6' α 3.71 <i>dd</i> 11.9 ; 4.9 H-6' β

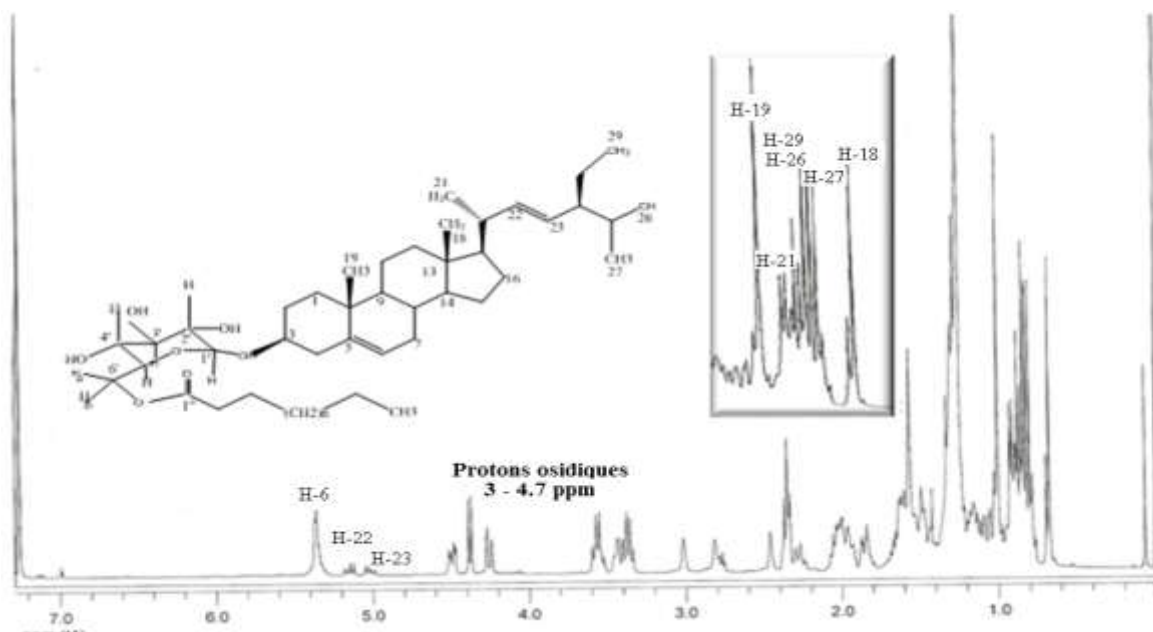


Figure III.15: Spectre RMN ^1H du composé **PS₅**.

Ce spectre aussi montre un nombre de signaux résonant entre δ_{H} [3.1- 4.7] caractéristiques à l'unité osidique (**Figure III.16**) résonants à:

- δ_{H} 4.37 correspond à un proton anomérique H-1'.
- δ_{H} 3.30 correspond à un proton H-2'.
- δ_{H} 3.57 correspond à un proton H-3'.
- δ_{H} 3.42 correspond à un proton H-4'.
- δ_{H} 3.44 correspond à un proton H-5'.
- δ_{H} 4.48, δ_{H} 4.27 correspondent respectivement aux deux protons H-6'a et H-6'b.

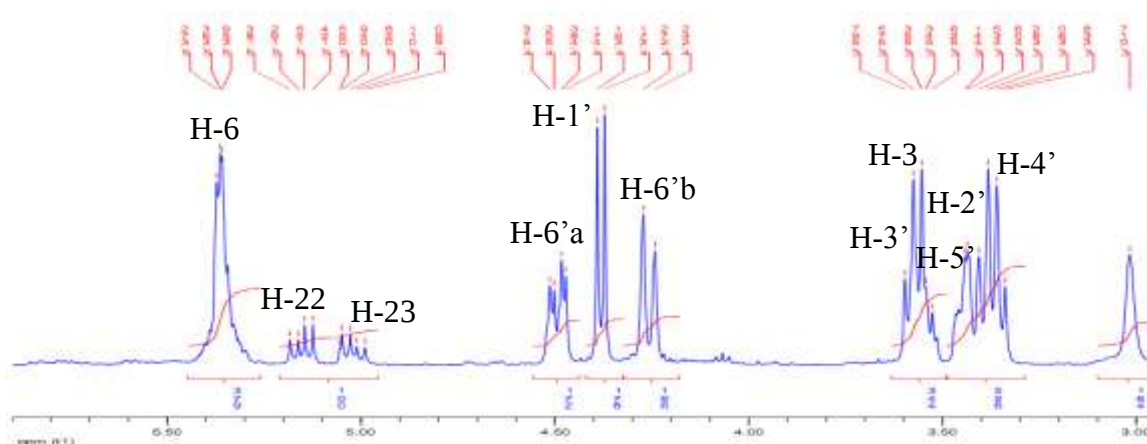


Figure III.16: Spectre RMN ^1H (protons osidiques) du composé **PS₅**.

Le spectre COSY ^1H - ^1H (**Figure III.17**) montre les corrélations suivantes :

- Le proton H-22 et le proton H-23 apparaissant respectivement à δ_{H} 5.17 et δ_{H} 5.03.
- Le proton H-6 et le proton H-7 apparaissant respectivement à δ_{H} 5.38 et δ_{H} 1.79.
- Le proton H-3 et les protons H-4 et H-2 apparaissant respectivement à δ_{H} 3.55, δ_{H} 2.36 et δ_{H} 1.95.

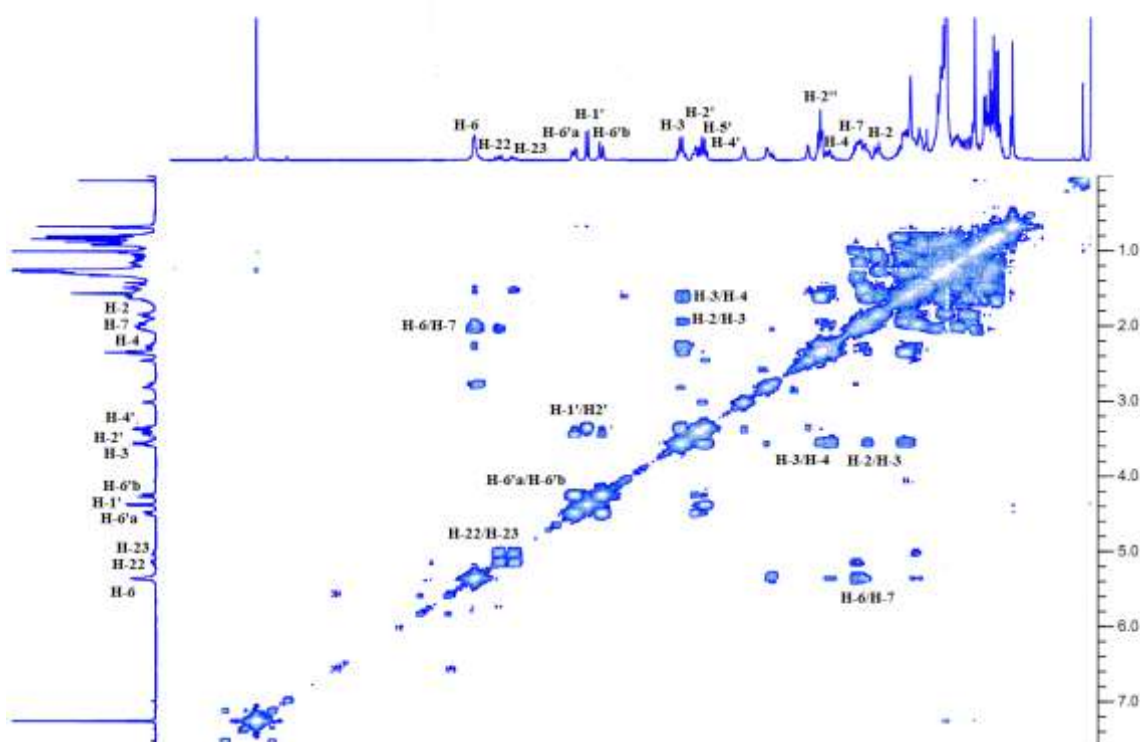


Figure III.17 : Spectre COSY ^1H - ^1H du composé **PS₅**.

Le spectre COSY ^1H - ^1H (**Figure III.18**) permet d'identifier sept protons d'un hexose. En effet et partant du proton anomérique H-1', on relie à travers leurs taches de corrélation les protons δ_{H} 3.30 (H-2'), δ_{H} 3.57 (H-3'), δ_{H} 3.42 (H-4'), δ_{H} 3.44 (H-5') et H-6' (δ_{H} 4.48, H-6'a et δ_{H} 4.27, H-6'b). Les grandes valeurs de constantes de couplage ($J_{\text{H1}'\text{-H2}'} = 7.4$ Hz ; $J_{\text{H2}'\text{-H3}'} = 8$ Hz ; $J_{\text{H4}'\text{-H5}'} = 8$ Hz) indiquent qu'ils sont tous axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{\text{H1}'\text{-H2}'} = 7.4$ Hz. Les déplacements chimiques déblindés des protons H-6' (δ_{H} 4.48 H-6'a ; δ_{H} 4.27 H-6'b) indiquent une substitution à ce niveau par un groupement acyle. Ceci est confirmé par des données de la

littérature ^[183,185] qui montre une corrélation entre le proton H-6'a et le carbonyle du groupement ester résonant à $\delta_{\text{H}}174.6$ (C-1'').

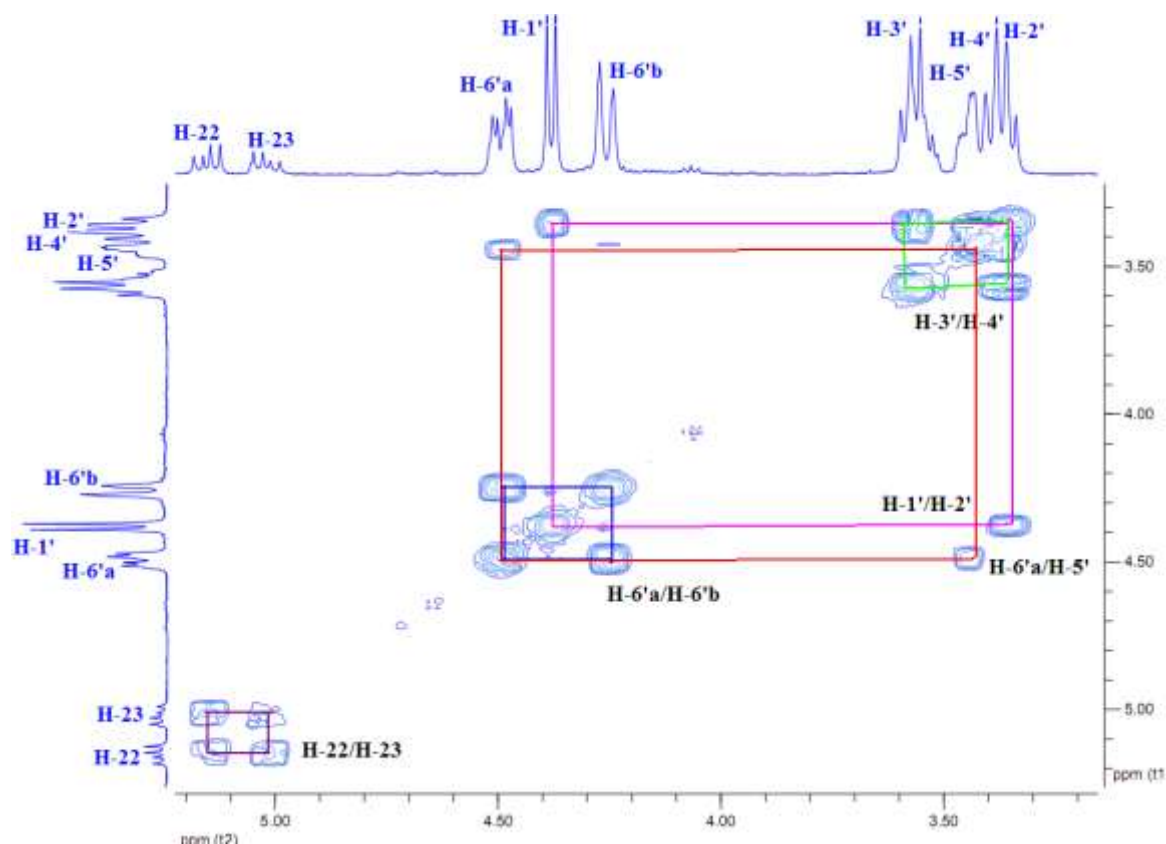


Figure III.18 : Spectre COSY ^1H - ^1H (protons osidiques) du composé PS_5 .

La comparaison du spectre RMN ^{13}C du PS_5 (**Figure III.19**) et celle du composé PS_1 (**Figure III.7**) montre qu'il est un dérivé du stigmasterol avec en particulier les signaux suivants :

- Six signaux méthyliques caractéristiques des phytostérols résonant à champ fort entre $\delta_{\text{C}}11.8$ (C-18), $\delta_{\text{C}}19.3$ (C-19), $\delta_{\text{C}}19.0$ (C-21), $\delta_{\text{C}}19.0$ (C-26), $\delta_{\text{C}}19.8$ (C-27) et $\delta_{\text{C}}12.2$ (C-29).
- Un signal apparaissant à $\delta_{\text{C}} 79.5$ attribué à un carbone porteur de la fonction OH (C-3).

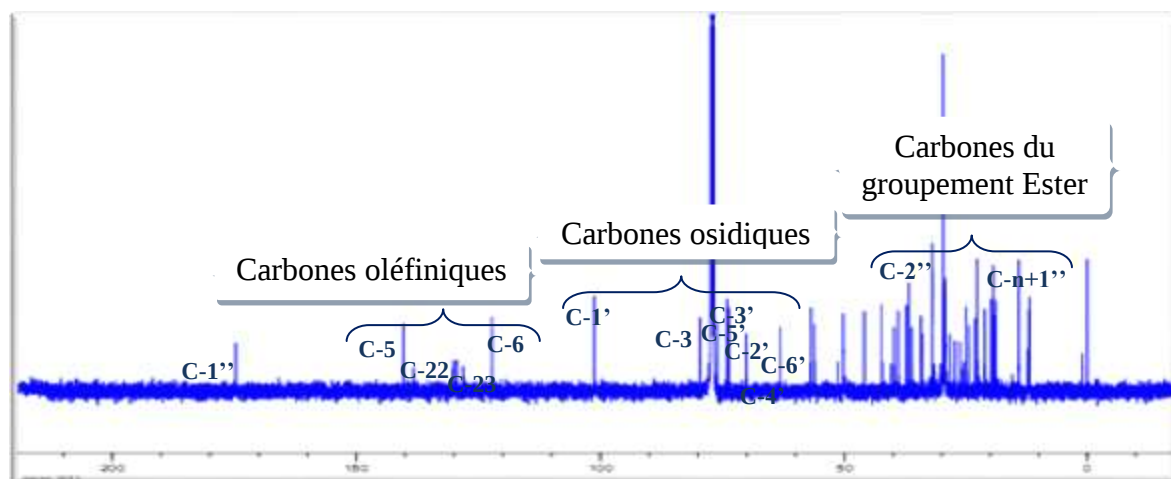


Figure III.19 : Spectre RMN ^{13}C du composé PS_5 .

- Des signaux à : δ_{C} 140.8 correspondant a un carbone quaternaire sp^2 (C-5), et à δ_{C} 122.1 relatif à un carbone éthylénique C-6, confirme la présence de la double liaison
- Les signaux apparaissant à δ_{C} 129.3 et δ_{C} 138.2 sont attribuables à des CH vinyliques (C-23, C-22).

L'expérience HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du glucose **Figure III.20** et **Tableau III.4**.

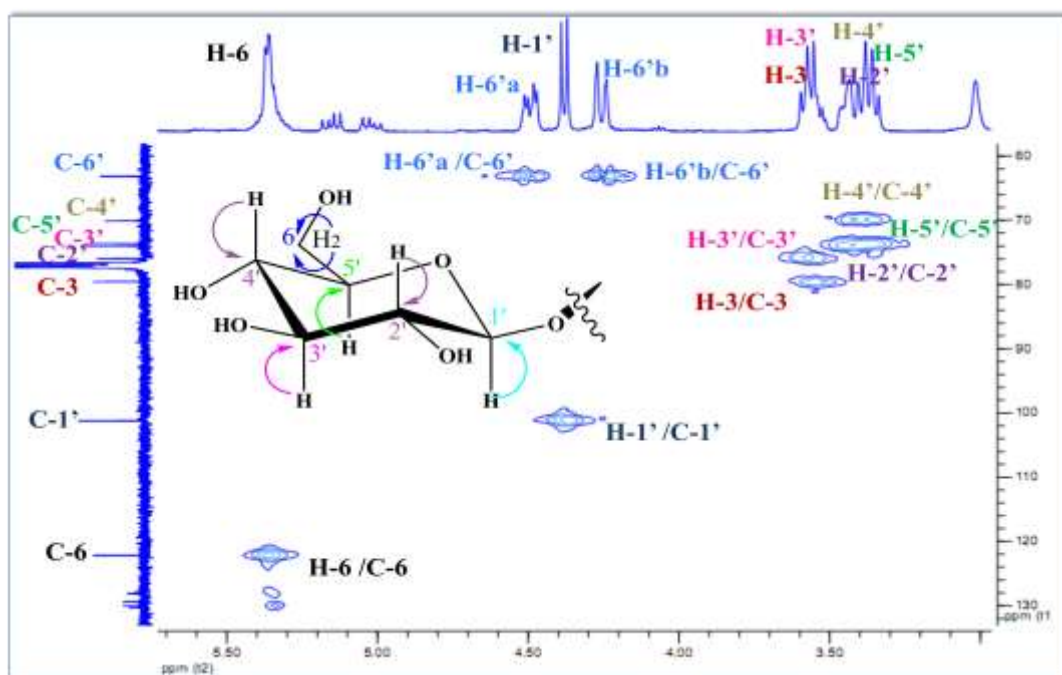
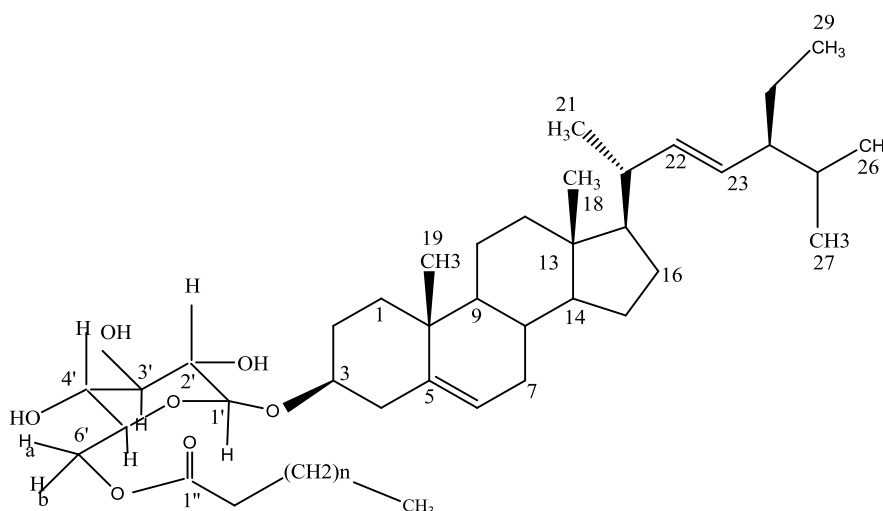


Figure III.20 : Spectre HSQC (Région Osidique) du composé PS_5 .

La comparaison des données de la littérature et en particulier des composés qui sont isolés de l'espèce *Euphorbia soongarica*^[182], *Centaurea regia*^[183] et *Euphorbiaguyoniensis*^[184], avec les spectres RMN ¹H et ¹³C (**Figure III.15**) et (**Tableau III.4**) permet de mettre en évidence les signaux du groupement ester à δ_H 2.33 (t, $J = 2.3$ Hz, H-2'') / δ_C 34.2 (C-2''), δ_H 1.61 (m, H-3'') / δ_C 24.9 (C-3''), δ_H 1.19-1.26 (m, H- n'') / δ_C 29.2-29.7 (C- n'') et 0.88 (s, H-(n''+1)) / δ_C 14.1 (C-(n''+1)). Ces signaux sont caractéristiques de la chaîne latérale branchée au 6'- O du glucose c'est un acide gras en C- n ^[183,185].



De ce qui précède, le composé **PS5** est estérifié en position C-6' du glucose par une chaîne latérale d'un acide gras $-O-C(=O)-CH_2-(CH_2)_n-CH_3$. La structure de cet acide gras n'est pas confirmée, vu qu'on n'a pas pu réaliser le spectre de masse pour ce produit à fin de déterminer le nombre exact de l'unité (CH₂).

On peut dire que ce composé a une structure d'un dérivé de stigmasteryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-ester.

Les déplacements chimiques de ce composé sont regroupés dans le tableau **Tableau III.4**:

Tableau III.4: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de **PS₅**

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) ; <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
1 CH ₂	37.3	3.46 <i>d</i> 3.5
2 CH ₂	29.5	1.95 <i>m</i>
3 CH	79.5	3.55 <i>m</i>
4 CH ₂	38.9	2.36 <i>m</i>
5 C	140.8	-
6 (=CH)	122.1	5.38 <i>dl</i>
7 CH ₂	31.9	1.46-1.90 <i>m</i>
8 CH	31.9	1.38 <i>m</i>
9 CH	50.2	0.85 <i>m</i>
10 C	36.1	-
11 CH ₂	21.1	1.36-1.42 <i>m</i>
12 CH ₂	39.8	1.08-1.94 <i>m</i>
13 C	42.3	-
14 CH	56.1	0.91 <i>m</i>
15 CH ₂	24.3	0.93-1.33 <i>m</i>
16 CH ₂	28.2	1.80-2.00 <i>m</i>
17 CH	56.9	1.03 <i>m</i>
18 CH ₃	11.8	0.68 <i>s</i>
19 CH ₃	19.3	1.00 <i>s</i>
20 CH	36.7	1.28 <i>m</i>
21 CH ₃	19.0	0.91 <i>d</i> 7.5
22=CH ₂	138.2	5.17 <i>m</i>
23=CH ₂	129.3	5.03 <i>m</i>
24 CH	51.2	0.93 <i>m</i>
25 CH	31.9	1.59 <i>m</i>
26 CH ₃	19.0	0.86 <i>d</i> 6.7
27 CH ₃	19.8	0.81 <i>d</i> 6.7
28 CH ₂	25.4	1.26 <i>m</i>
29 CH ₃	12.2	0.84 <i>m</i>
Glucose		
1' CH	101.2	4.37 <i>d</i> 7.4
2' CH	73.6	3.30 <i>t</i> 8
3' CH	76.0	3.57 <i>t</i> 8
4' CH	70.2	3.42 <i>t</i> 8
5' CH	74.0	3.44 <i>m</i>
6' CH ₂	63.1	4.48 <i>dd</i> 5-12.2 H-6'a 4.27 <i>d</i> 11.1 H-6'b
Ester		
1'' C	174.6	-
2'' CH ₂	34.2	2.33 <i>t</i> 7.9
3'' CH ₂	24.9	1.61 <i>m</i>
n'' CH ₂	29.2-29.7	1.19-1.26 <i>m</i>
(n+1)'' CH ₃	14.1	0.88 <i>t</i> 7.1

PARTIE

EXPERIMENTALE

IV.1 Récolte de la plante

La plante *Pallenis spinosa* a été récoltée dans la région de Batna (Nord-Est algérien) au mois de Juin 2009. Elle a été identifiée par le professeur Bachir OUDJEHIH de l'institut d'agro-vétérinaire de l'université de Batna. Elle a été séchée à l'abri de la lumière du soleil. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre à l'aide d'un broyeur pour augmenter la surface de contact avec les solvants extracteurs, cette poudre a été soumise à des extractions par différents solvants.

IV.2 Chimie extractive

IV.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications. Ces analyses sont réalisées sur des plaques d'aluminium, en phase normale Kieselgel (60 F₂₅₄ Merck) 250 µm (20x20 cm) et en phase inverse RP18 F_{254S} (Merck) 200 µm Merck (20x20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre de plusieurs volumes saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Les révélateurs utilisés sont :

- La vanilline sulfuré : 10% H₂SO₄, 10% Acide acétique et 80 % eau et une petite cuillère (spatule) de vanilline.
- Le sulfate de cérium : 380 ml eau, 120 ml H₂SO₄ (96%) et une petite cuillère de sulfate de cérium tétra hydraté.

L'observation des plaques CCM est faite sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation au sulfate de cérium ou la vanilline sulfurique.

IV.2.2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et consomme moins de solvants par rapport aux autres méthodes de chromatographies classiques. Le fractionnement sous vide a été effectué dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté N° 4, rempli avec la phase stationnaire silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) 10 fois la masse de l'extrait.

IV.2.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Le type de colonne (taille et diamètre), le débit de la phase mobile et le volume des fractions récupérées ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à purifier. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base de l'analyse des plaques CCM.

Les phases stationnaires utilisées au cours des différentes opérations de séparation et de purification sont citées au-dessous :

- Phase normale : la quantité de la silice Kieselgel Merck (70-230 mesh) est généralement 40 fois le poids de l'échantillon à purifier. L'élution est effectuée à pression atmosphérique.
- Phase inverse : la silice greffée Lichroprep RP-8 Merck (40-63 μm), en utilisant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier. L'élution est effectuée à l'aide d'air comprimé par un compresseur (la pression varie selon l'éluant utilisé).

IV.3 Chimie structurale

IV.3.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN 1D (RMN ^1H et RMN ^{13}C) sont enregistrés sur un appareil Bruker Avance DRX-500. Les fréquences d'irradiation sont respectivement de 300 MHz pour le ^1H , de 125 MHz pour le ^{13}C .

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

IV.3.2 Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en ESI (Electro Spray Ionisation), sur un spectromètre « Micromasse Q-TOF ».

IV.4 Etude de l'espèce *Pallenis spinosa*

IV.4 .1 Extraction

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour extraire les principes actifs. Elle ne doit être confondue avec l'infusion ou la décoction.

Les parties aériennes de *Pallenis spinosa* sont séchées et broyées sous forme d'une poudre fine. (2Kg) sont mises à macérer à température ambiante dans le chloroforme (3×5L). Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 72heures. Après filtration et évaporation à sec du solvant à température 35°C, 40 g de l'extrait chloroformique ont été obtenus. Le résidu de la filtration est de nouveau mis à macérer dans le n-butanol (3×5L) la filtration puis l'évaporation à sec du solvant sous pression réduite, ont permis d'obtenir 12g d'extrait n-butanol.

Les solvants utilisés pendant la purification sont des solvants du commerce: Ether de pétrole, Hexane, Chloroforme, Acétate d'éthyle, n-Butanol et le méthanol sont distillés au préalable.

IV.4 .2 Contrôle chromatographique

Une analyse chromatographique sur couche mince CCM a été réalisée sur les deux extraits obtenus précédemment, en utilisant différents systèmes d'élution: (EP / AcOEt), (CHCl₃/MeOH), montrent après examen à la lumière UV (254,366 nm) et révélation à la vanilline sulfurique et sulfate de cérium puis chauffage, plusieurs taches de différentes couleurs à des R_f différents (**Figure IV-1**).

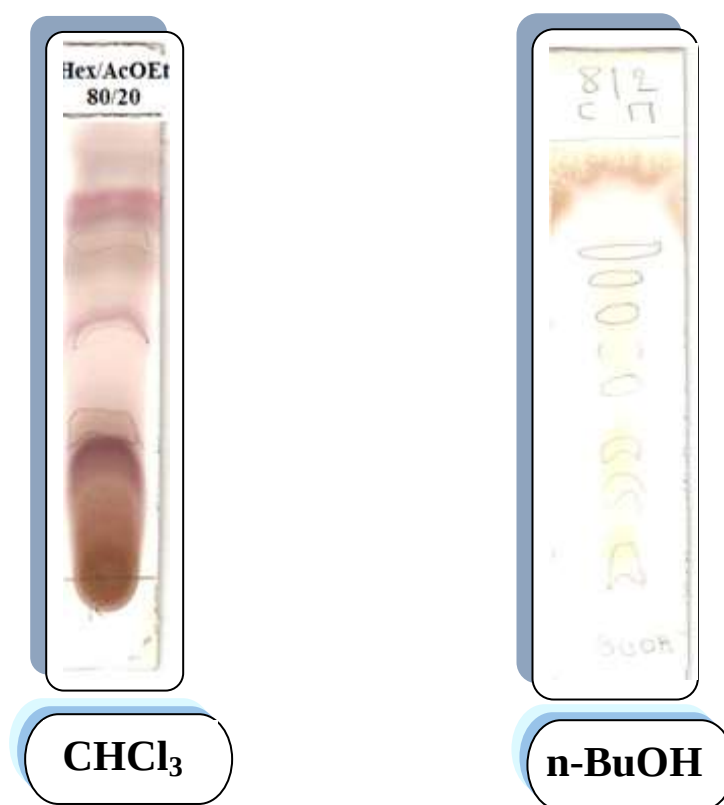


Figure IV.1 : Analyse CCM des extraits bruts de la plante.

IV.4.3 Etude d'extrait chloroformique de l'espèce *Pallenis spinosa*

20g d'extrait CHCl₃ sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant (200g) comme phase stationnaire (silice normale SiO₂), l'élution est effectuée en premier lieu avec 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 100). A l'issue de fractionnement primaire fractions de 100 ml ont été recueillies (**Tableau IV.1**) :

Tableau IV. 1 : Fractionnement de l'extrait chloroformique.

Fractions récupérées	Eluant de la colonne	Observation sur CCM
1	Ether de pétrole	Neant
2	EP	Tâche invisible
3	EP	Tâche bleu invisible
4	EP	Deux tâches invisibles révèlent en bleu
	Ether de pétrole/acétate d'éthyle	
5	90/10	Mélange complexe
6	80/20	Mélange complexe de plusieurs tâches
7	80/20	Mélange complexe de plusieurs tâches
8	70/30	Mélange complexe
9	//	Mélange complexe
10	//	Mélange de plusieurs tâches
11	60/40	Mélange de plusieurs tâches + traînée
12	//	Mélange de plusieurs tâches
13	50/50	Mélange séparable
14	//	Mélange de plusieurs tâches
15	//	Mélange complexe
16	//	Mélange séparable
17	//	Mélange séparable
18	//	Mélange de plusieurs tâches
19	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
20	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
21	//	Mélange séparable
22	20/80	Mélange de plusieurs tâches
23	//	Mélange de plusieurs tâches
24	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
25	//	Mélange de plusieurs tâches
26	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
27	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
28	//	Mélange de plusieurs tâches + traînée
29	//	Trois tâches + traînée
30	100% acétate d'éthyle	Deux tâches+ traînée
	Acétate d'éthyle/Méthanol	
31	99/1	Mélange de trois tâches
32	95/5	Mélange de trois tâches+traînée
33	90/10	Deux tâches+traînée
34	80/20	Deux tâches+traînée
35	70/30	Traînée
36	100	Traînée

Les fractions obtenues subissent une chromatographie sur CCM avec les systèmes d'élution suivants :

- Pour les fractions de 1 à 5 (AcOEt/EP: 6/94),
- Pour les fractions de 6 à 7 (MeOH / CHCl₃: 1/99),
- Pour les fractions de 8 à 10 (MeOH / CHCl₃: 3/97),
- Pour les fractions de 11 à 18 (MeOH / CHCl₃: 5/95),
- Pour les fractions de 19 à 29 (MeOH / CHCl₃: 8/92), et (12/88) pour les fractions restantes.

Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis révélées avec la vanilline sulfurée. Ce fractionnement nous a permis de rassembler les fractions semblables en 13 fractions selon le tableau suivant (**Tableau IV.2**) :

Tableau IV. 2 : Rassemblement des fractions semblables d'extrait chloroformique.

Fractions	Fractions récupérées	Eluant de la colonne	Masse (g)
1	1-2	100% EP	0.169
2	3-4	//	0.320
3	5	10	8.900
4	6	20	2.600
5	7-8	30	0.390
6	9-10	30	0.696
7	11-14	50	1.050
8	15-18	//	1.813
9	19-21	//	0.413
10	22-23	80	0.801
11	24-29	80	0.532
12	30-33	100 Ac	1.020
13	34-36	Me	1.256

IV.4.4 PURIFICATION

IV.4.4.1 Etude de la fraction F₅

Les deux fractions F₅ et F₆ sont réunies pour donner (A) F'₅ d'une masse égale à 1g, La fraction F'₅ est fractionnée sur une colonne de gel de silice phase normale (40g) et éluée avec l'éther de pétrole et l'acétate d'éthyle. Les fractions recueillies sont de 25 ml. Ils sont rassemblés selon leur profil en CCM (Phase normale) réalisée dans un mélange de solvants :

- CHCl₃ pur pour les fractions de 1 à 116
- Pour les fractions de 117 à 143 (MeOH / CHCl₃: 1/99),
- Pour les fractions de 144 à 189 (MeOH / CHCl₃: 3/97),
- Pour les fractions de 190 à 378 (MeOH / CHCl₃: 5/95) et (MeOH / CHCl₃: 8/92) pour les fractions restantes.

Cet examen a fournis 15 fractions (**Tableau IV. 3**) :

Tableau IV. 3: Rassemblement des sous fractions de la fraction F'₅.

Fractions	Sous fractions	Eluant de la colonne	Observation sur CCM	Masse (mg)
F'5-1	1-11	100% EP	Néant	10
F'5-2	12-52	2Ac	Trois tâches visibles + une bleue	37.3
F'5-3	53-63	4Ac	mélange de trois tâches + traînée	28.9
F'5-4	64-78	4Ac	mélange de plusieurs tâches	63.5
F'5-5	79-116	6Ac	mélange complexe	145
F'5-6	117-143	6Ac	mélange de plusieurs tâches + traînée	110
F'5-7	144-155	8	mélange de plusieurs tâches + traînée	139
F'5-8	156-189	10	Mélange complexe de plusieurs tâches	115
F'5-9	190-240	14	plusieurs tâches avec deux majoritaires	90
F'5-10	241-266	18	mélange de plusieurs tâches + traînée	65
F'5-11	267-292	20	mélange de plusieurs tâches + traînée	40
F'5-12	293-332	30	Tache move+ traînée	30.5
F'5-13	324-349	50	mélange de plusieurs tâches + traînée	54
F'5-14	350-378	80	Deux tâches+traînée	3.8
F'5-15	379-400	80	traînée	68

La sous fraction **F'5-6**(110 mg) a purifiée sur une colonne de gel de silice phase normale (4.4g) et éluée avec le chloroforme. Des fractions de 10 ml sont collectées et réunies selon leur profil CCM (éluant : Ether de pétrole/acétate d'éthyle 88/12),donnant 6 sous fractions allant de 1 à 6 (**Tableau IV.4**).

Tableau IV. 4: Rassemblement des sous fractions de la fraction F'5-6.

Fractions	Sous fractions	Eluant	Observation sur CCM	Masse (mg)
F'5-6-1	1-3	Chloroforme	trainée	6.6
F'5-6-2	4-7	//	Mélange complexe	7.5
F'5-6-3	8-12	//	Une tâche invisible+ trainée	11.5
F'5-6-4	13-16	//	Mélange complexe	60
F'5-6-5	17-19	CHCl ₃ /MeOH 95/5	trainée	9.3
F'5-6-6	20-23	100 % MeOH	trainée	15

La recristallisation de la fraction **F'5-6-3** d'un poids de 11.5 mg dans l'éther de pétrole a permis d'obtenir (5 mg) de produit **PS1** à l'état pur.



Figure IV.2 : Plaque CCM de produit **PS1**.

IV.4.4.2 Etude de la fraction F8

La fraction (B) **F8** (1.813g) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice (73g) en phase et pression normale l'élution est effectuée en premier lieu avec un mélange de l'éther de pétrole et de l'acétate d'éthyle (70/30) dont on augmente la polarité jusqu'au 100% puis par l'augmentation pourcentage de MeOH : 5% - 10% à 100%. Des fractions de 100 ml ont été recueillies et réunies selon leur profile en CCM pour fournir 12 fractions (**Tableau IV.5**) :

Tableau IV. 5 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F8.

Sous fractions	Fractions collectées	Eluant (colonne) AcOEt /Ep	Observation sur CCM	Poids mg
F8-1	1-2	30/70	néant	32.8
F8-2	3-5	30/70	Trois tâches + traînée	18.4
F8-3	6-8	50/50	mélange de plusieurs tâches	40.1
F8-4	9-10	50/50	plusieurs tâches + traînée	151.9
F8-5	11-14	60/40	plusieurs tâches + traînée	230
F8-6	15-17	70/30	mélange de plusieurs taches	243
F8-7	18-20	70/30	plusieurs tâches + traînée	188
F8-8	21-22	90/10	mélange complexe	58.9
F8-9	23-24	100%	plusieurs tâches + traînée	89
		AcOEt/MeOH		
F8-10	25	95/5	traînée	138.4
F8-11	26	90/10	traînée	433
F8-12	27	100% MeOH	traînée	186.7

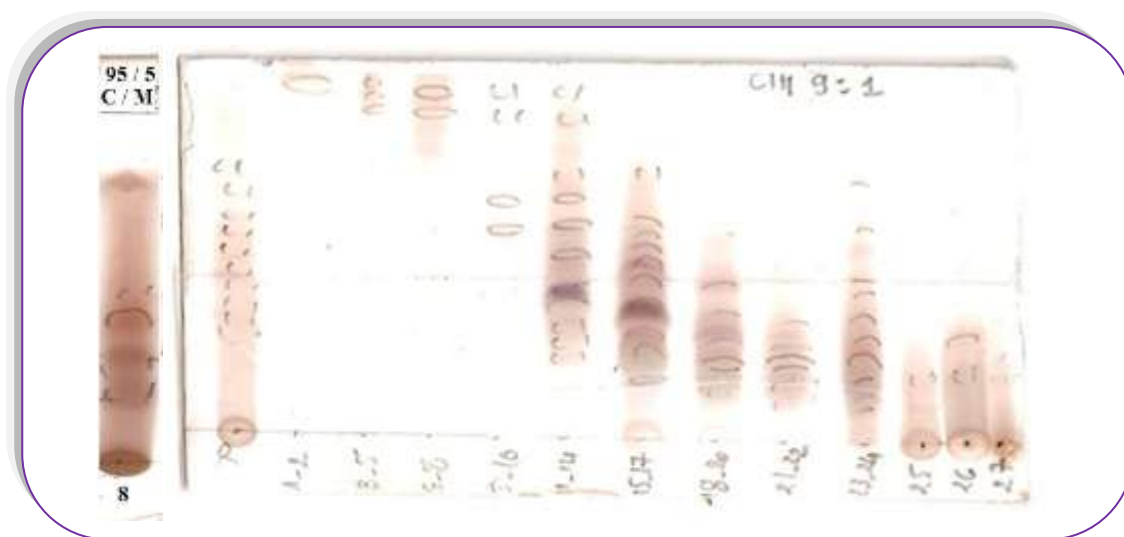


Figure IV. 3 : Plaque récapitulative d'étude de la fraction F8.



Figure IV. 4 : Teste d'analyse des sous fractions F8-5 et F8-6 sur une CCM phase inverse Rp₁₈.

La fraction (B') **F8-6** (243 mg) (**Figure IV.4**) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice phase inverse Rp8 merck (10 g). L'élution est menée dans un mélange d'eau / méthanol a différents gradients de 50/50 à MeOH 100%. Des fractions de 20ml sont collectées et réunies pour donner 20 fractions (**Tableau IV.6**) :

Tableau IV. 6 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F8-6.

Sous fractions	Fractions collectées	Eluant (colonne)	Observation sur CCM	Poids (mg)
		MeOH /H ₂ O		
F8-6-1	1-3	50/50	Trainée	9
F8-6-2	4-5	50/50	Trainée	7.5
F8-6-3	6-7	50/50	Deux tâches+traînée	6
F8-6-4	8-9	60/40	plusieurs tâches	5.5
F8-6-5	10-13	60/40	Mélange de plusieurs tâches	10.2
F8-6-6	14-15	70/30	Mélange de plusieurs tâches	13.9
F8-6-7	16	70/30	Mélange de plusieurs tâches	22.4
F8-6-8	17	70/30	Plusieurs tâches + traînée	13
F8-6-9	18-19	90/10	Plusieurs tâches + traînée	18.1
F8-6-10	20	90/10	Mélange de plusieurs tâches	22.2
F8-6-11	21-22	90/10	Mélange de plusieurs tâches	15.5
F8-6-12	23-24	90/10	Mélange complexe	8.3
F8-6-13	25-27	90/10	Plusieurs tâches + traînée	13.8

F8-6-14	28	MeOH	Mélange complexe	3.9
F8-6-15	29-31	100	Une tâche bleu majoritaire + traînée	10,1
F8-6-16	32-33	//	Mélange de plusieurs tâches	17.7
F8-6-17	34	//	Mélange complexe	11
F8-6-18	35	//	Trois tâches invisibles + traînée	24
F8-6-19	36-37	//	Trois tâches invisibles + traînée	8.4
F8-6-20	38-39	//	Tâches invisible + petite traînée	1.2
F8-6-21	40-44	100	Tâche invisible marron	2

IV.4.4.2.1 Etude de la sous fraction F8-6-15

La sous fraction B'₁(10.1mg) a subi une purification sur une colonne de gel de silice (100 mg) éluée avec le mélange de l'hexane et l'acétate d'éthyle (50/50) dont on augmente la polarité, selon le profil des CCM 8 fractions ont été obtenus. (**Tableau IV.7**)

Tableau IV.7 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F8-6-15

Sous fractions	Fractions collectées	Eluant (colonne) (%) AcOEt /Hex	Observation sur CCM	Poids mg
F8-6-15-1	1	50/50	Une tâche bleu + petite traînée	0.1
F8-6-15-2	2-3	50/50	Une tâche bleu	4.6
F8-6-15-3	4-7	50/50	Une tâche bleu + traînée	1.6
F8-6-15-4	8-11	60/40	Une tâche bleu + traînée	0.4
F8-6-15-5	12-29	70/30	Trois tâches	1.1
F8-6-15-6	30-33	100% AcOEt	Plusieurs tâches + traînée	1.6
		AcOEt/ MeOH		
F8-6-15-7	34	99/1	Une tâche visible + traînée	0.3
F8-6-15-8	35	100% MeOH	Tâche visible majoritaire + traînée	0.4

Les trois premiers sous fractions sont rassemblées en F₈₋₆₋₁₅₋₁, leur plaque de CCM en phase normale effectuée dans le (CHCl₃/MeOH : 90/10) montre une seule tâche invisible à l'UV (254-366nm), se colorant en bleu royal après une révélation par le sulfate de cérium. Cette sous fraction représente le mélange des deux produits **PS2** et **PS3** (6.3mg) (**Figure IV.5**).



Figure IV.5 : Plaque CCM du mélange des produits PS2 et PS3.

IV.4.4.2.2 Etude de la sous fraction F8-6-19'

Les sous fractions F₈₋₆₋₁₈ (24mg) et F₈₋₆₋₁₉ (8.4mg) sont rassemblées en (B'₂) F8-6-19' (32,4mg), cette dernière est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est menée dans un mélange Acétate d'éthyle/Hexane à différents gradients. Ce fractionnement a donné 7 fractions (**Tableau IV.8**).

Tableau IV.8 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F8-6-19'.

Sous fractions	Fractions collectées	Eluant (colonne) (%)	Observation sur CCM	Poids (mg)
F8-6-19'-1	1-10	AcOEt / Hex 50/50	Une tâche + petite traînée	1.6
F8-6-19'-2	11-16	50/50	Une tâche invisible + traînée	0.3
F8-6-19'-3	17-20	60/40	Une tâche invisible + traînée	13
F8-6-19'-4	21-34	60/40	Deux tâches+une visible	6.2
F8-6-19'-5	35-37	60/40	Trois taches	3.1
F8-6-19'-6	38-42	100% AcOEt	Une tâche invisible + traînée	5
F8-6-19'-7	43-47	100%MeOH	Une tâche invisible + traînée	3.2

La fraction F8-6-19'-6(38-42) montrant une tâche invisible en UV et mauve après révélation, a fourni le composé **PS5** (5 mg) (**Figure IV.6**).



Figure IV.6 : Plaque CCM de produit PS5.

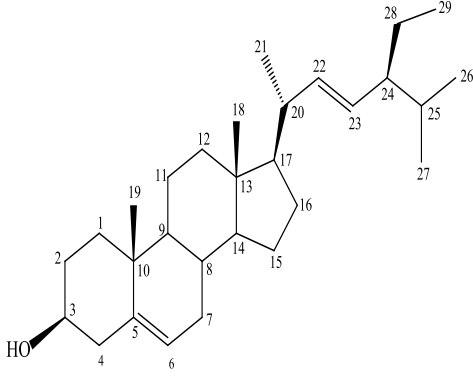
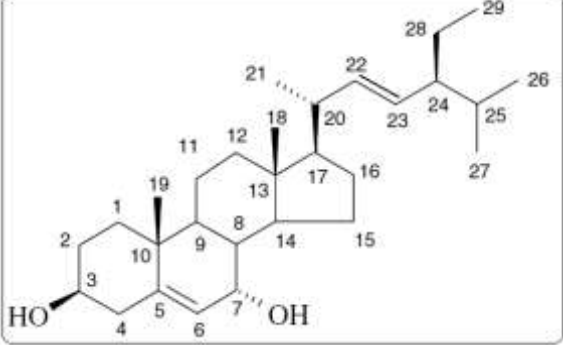
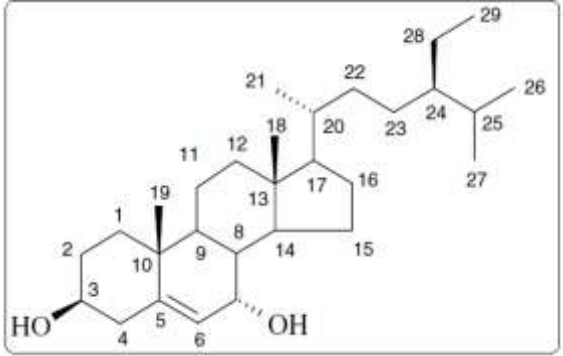
IV.4.4.3 Etude de la sous fraction F13

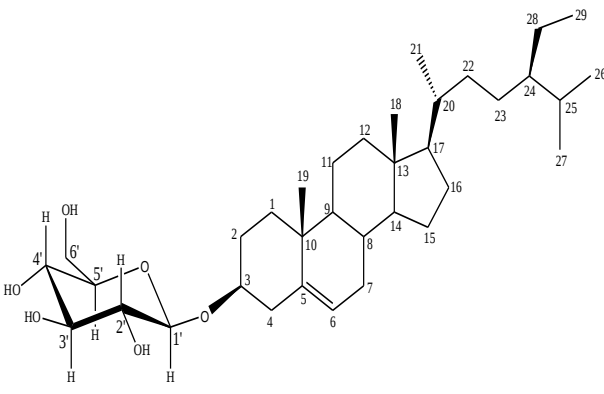
La fraction (C) F₁₃ précipitée dans le méthanol a permis d'isoler 10mg de composé PS₄ ($R_f=0.49$ dans le système de CHCl₃/MeOH : 90/10) **Figure IV.7**.

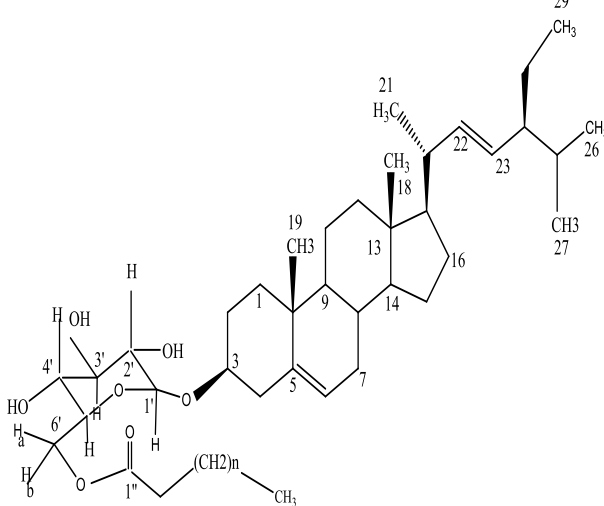


Figure IV.7 : Plaque CCM de produit PS4.

IV.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

IV.5.1 Le composé PS1	24-éthylcholest-5,22-èn-3-ol (Stigmasterol)
Formule brute : C₂₉H₄₈O Masse moléculaire : 412 g/mol Quantité du produit : 5mg Aspect : cristaux blancs R_f = 0.5 (80/20 : EP /AcOEt) EI-MS : 412 [M]⁺ RMN ¹H : (400 MHz, CDCl₃) et RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ (Tableau III.1 page 68)	
IV.5.2 mélange de composés (PS2 et PS3)	PS ₂ : 7α-Hydroxy-stigmastérol
Formule brute : C₂₉H₄₈O₂ (PS₂) C₂₉H₅₀O₂ (PS₃) Masse moléculaire : 428 g/mol 430 g/mol Quantité du produit : 6,3mg Aspect : cristaux blancs R_f = 0.5 (90/ 10 : CHCl₃/ MeOH) ESI (modes positif) : PS₂ m/z : 429.32 [M+H]⁺ m/z : 451.35 [M+Na]⁺ PS₃ m/z : 453.36 [M+Na]⁺ RMN ¹H : (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CDCl₃ (Tableau III.2 page 74)	
	PS₃ : 7α-Hydroxy-sitostérol 

IV.5.3 Le composé PS4	3-O-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol (Daucostérol)
Formule brute : C₃₅H₆₀O₆ Masse moléculaire : 576 g/mol Quantité du produit : 10mg Aspect : poudre blanche R_f = 0.5 (90 /10 : CHCl₃/ MeOH) MS : ESI (mode positif) : <i>m/z</i> 599.3 [M+Na]⁺ ESI (mode négatif) : <i>m/z</i> 575 [M-H]⁻ RMN ¹H : (500 MHz, CDCl₃) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CDCl₃ (Tableau III.3 page79)	

IV.5.4 Le composé PS5	Dérivé d'un stigmastéryl-3β-glucopyranoside-6'-O-Ester
Quantité du produit : 5mg Aspect : poudre blanche R_f = 0.5 (90 /10 : CHCl₃/ MeOH) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III.4 page 86)	

CONCLUSION

GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail entre dans le cadre de la recherche de nouveaux composés chimiques qui ont un intérêt thérapeutique, notre objectif principal était la détermination structurale des substances isolées de la plante Algérienne *Pallenis spinosa* L. (Cass.) de la famille *Asteracées*.

L'investigation chimique de l'extrait CHCl_3 des parties aériennes, a abouti à l'isolement de trois composés à l'état pur ainsi un mélange de deux composés. L'élucidation structurales de ces produits a été établie au moyen de méthodes spectrales: la spectrométrie de masse MS, la résonance magnétique nucléaire monodimensionnelles ^1H RMN, ^{13}C RMN et bidimensionnelles 2D et par la comparaison avec les données de la littérature.

Ces composés sont isolés pour la première fois dans l'espèce *Pallenis spinosa* et même aussi pour le genre *Pallenis*. Ils sont des dérivées de phytostéroles:

- ✓ 24-éthylcholest-5,22-diène-3 β -ol (Stigmastérol).
- ✓ 24-éthylcholest-5,22-diène-3 β ,7 α -diol (7- α -OH stigmastérol) et le 24-éthylcholest-5-ène-3 β ,7 α -diol.
- ✓ 24-éthylcholest-5-ène-3-O- β -D-glucopyranosyl (Daucostérol).
- ✓ 24-éthylcholest-5,22-diène-(6'-O-Ester)-3 β -O-D-glucopyranoside.

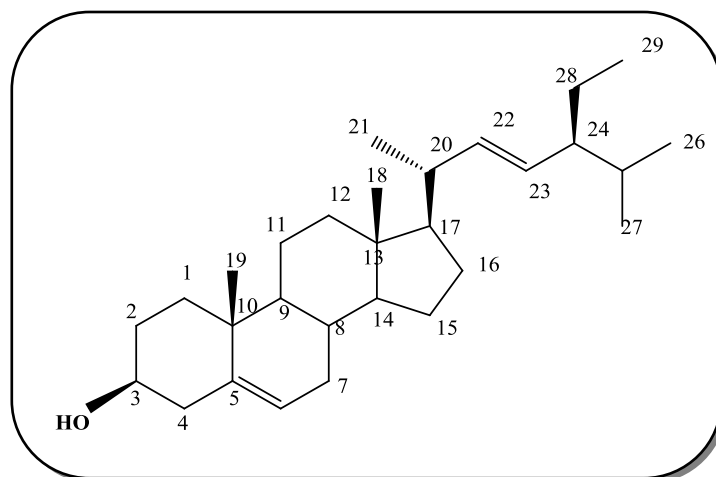
La méthodologie de fractionnement, séparation et purification des métabolites secondaires de l'extrait CHCl_3 a été essentiellement basée sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques à savoir :

- la chromatographie liquide sous vide (VLC).
- la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et de silice greffée en C_8 .

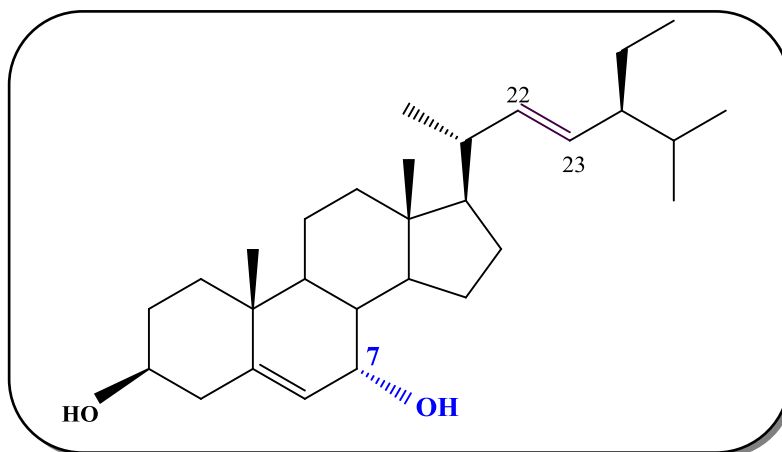
La purification a donné d'autres métabolites secondaires mais en très faibles quantités, ce qui ne nous a pas permis la réalisation des analyses spectroscopiques pour la détermination structurale.

Dans nos perspectives de recherche futures, il est envisagé de continuer l'étude phytochimique des parties racines de notre espèce *Pallenis spinosa* (L.) afin d'isoler d'autres métabolites secondaires ainsi la réalisation des testes biologiques.

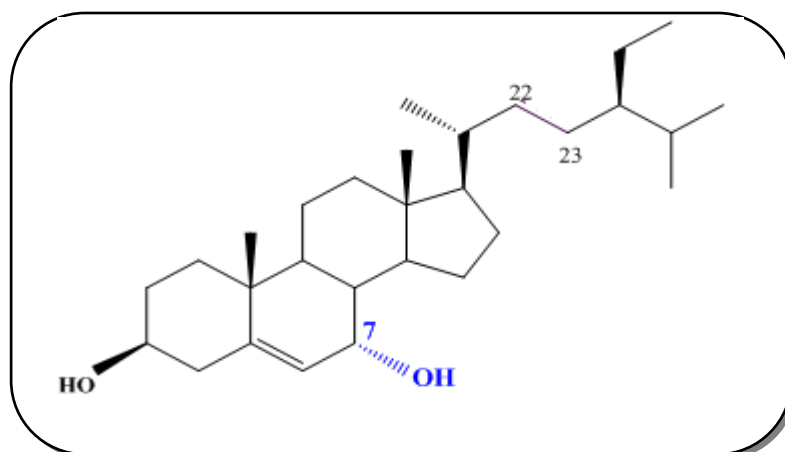
Les structures des composés isolés des parties aériennes de l'extrait CHCl_3 , sont reproduites ci-dessous:



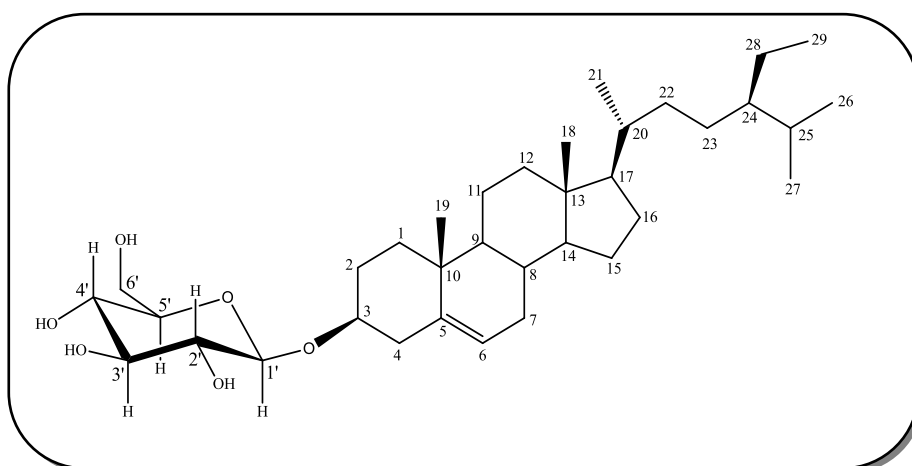
PS₁ : Stigmastérol



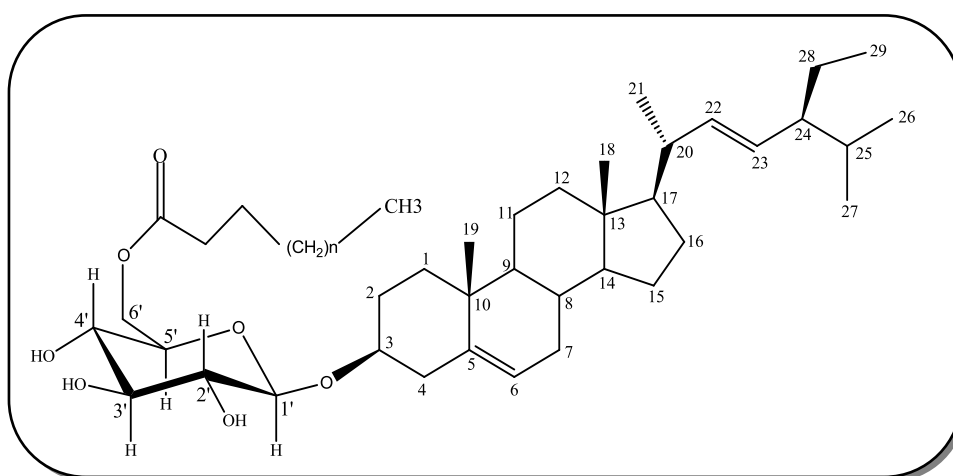
PS₂: 7 α -Hydroxy-stigmastérol



PS₃: 7 α -Hydroxy- β -sitostérol



PS₄ : 3-O- β -D-glucopyranosyl β -Sitostérol



PS₅: Stigmastérol-3-O- β -D-glucopyranoside-6'-O-Ester.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, 27, 1-93.
- [2] Pelt J.M. Les nouveaux actifs naturels. *Marabout*. 2001. 219-124.
- [3] Amélie, L. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches agauria salicifolia hook.f ex oliver, agauria polyphylla Baker (ericaceae), tambourissa trichophylla baker (monimiaceae) et mbelia concinna baker (myrsinaceae), Thèse de Doctorat, Institute National Polytechnique De Toulous. 2007.
- [4] Gaussen H., Leroy H. F., Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed., 1982. 426.
- [5] Mouffok S., Etude des métabolites secondaire de *Centaurea pubescens ssp.Omphalotricha* (Asteraceae). Mémoire de magister, Université de Batna, 2011.
- [6] Grayer R.J., Chase M.W., and Simmonds M.S.J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27, 369-393.
- [7] Kurt R., Gauthier V. chromatographie sur couche mince. 1971, 50, 398.
- [8] AMEUR B., Etude Phytochimique de L'espece *Globularia alypum* L. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. 2006.
- [9] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., et Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001. 161, 839-851.
- [10] Rao, S.R., et Ravinshankar, G.A. *Biotechnology Advances*. 2002. 20, 101-153.
- [11] Crete P. Persée : Des mots et des plantes (dans le *Bencao gangmu* de Li Shizhen). *Précis de botanique*. Edition 1965, 2, 429.
- [12] Spichiger, R. E.; Savolainen V.V., Botanique Systématique des plantes à fleurs. 3^{ème} édition, 2004. 348-349.
- [13] Dupont, F. et Guignard, J. L. Botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition, Elsevier Masson. 2007. 248.
- [14] Bonnier. Flore complète de France, Suisse et Belgique. Edition, 1934. 10, 118.
- [15] Florin, J.M. Les astéracées, une famille solaire. *Biodynamis*, 2008. 64.
- [16] Blamey, M.; Grey-wilson, C., La flore d'Europe occidentale ; plus de 2400 plantes décrites et illustrées en couleurs. 2003.
- [17] OSMAN A. K. Contributions To The Pollen Morphology Of The Tribe Inuleae (Subfamily Asteroideae-Compositae) In The Flora Of Egypt. *Feddes Repertorium*. 2006, 117, 193-206.

- [18] JAVIER F., JOO PARK S. Origin and evolution of the endemic Macarone-sian Inuleae (Asteraceae): evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2001, 72, 77-97.
- [19] Merxmüller, H.; Leins, P. and Roessler, F. "Inuleae. Systematic review", en "The biology and chemistry of the Compositae". *Academic Press*. 1977, II, 577-619.
- [20] Francisco J., Pérez G. "Estudio De Metabolitos Secundarios De Especies Endémicas Canarias De Los Géneros Tolpis Y Pulicaria: Aplicaciones Quimiotaxonómicas Y De Actividad Biológica" Mémoire, Universiad Palmas De Gran Canaria. 2008.
- [21] Annette W., The genus *Asteriscus* (Asteraceae-Inuleae). *Nordic Journal of Botany*. 1985.5, 299–314.
- [22] Annette W., The genus *Nauplius* (Asteraceae-Inuleae), *Nordic Journal of Botan.* 1987, 7, 1–23.
- [23] Ahmed A. Ahmed, Farnesol And Thymol Derivatives From *Asteriscus* *Journal of Natural Products*. 1992, 55, 824-827.
- [24] Mesellem. Y, Etude phytochimique de *Odontospermum pygmaeum* (Asteraceae). Mémoire de magister, Université Batna, 2011.
- [25] Werner Greuter, Save *Asteriscus*, sink *Nauplius* (compositae). *Flora mediter Ranea*. 1997, 7, 41-48.
- [26] Dictionnaire des sciences naturelles dans lequel on traite méthodiquement. 275-277.
- [27] El-Dahmy, S., Jakupovic, J., New humulene derivatives from *asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*, 1985, 41, 309-316.
- [28] Jakupovic, J., Lehmann, L., Nerolidol derivalives from *Asteriscus Sericeus*. *Phytochemistry*. 1987, 26, 2854.
- [29] Mohamed A., Fouad M., A sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens subsp. Odorus*. *Tetrahedron. Letters*, 2006, 47, 6719-6721.
- [30] Belloum Z., Etude phytochimique des plantes médicinales *Inula crithmoides* Algériennes, cas de l'espèce, thèse de magister, Université Constantine, 2007.
- [31] Eldahmy S., J. Jakupovic, F. Bohlmann and T.M. SARG, *Tetrahedron*, 41. 316, 1985.
- [32] Quezel F., Santa S., Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, 1962-1963, P 949-950.
- [33] Ozenda, P., Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris. 1991.
- [34] Beniston W.S., Beniston N. T., Fleurs D'Algérie. N° de réf. du libraire. 32569, 222.

- [35] Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist, ETI Bioinformatics.
- [36] Theodore M. Barkley, Luc B., Strother "Asteraceae", in *Flora of North America*. Oxford University Press. 19, 20 and 21 p 3-70.
- [37] Thierry, D., Source des haies en production fruitière intégrée. *Ecologia mediterranea*, 2006. 32,71-84.
- [38] A. K. Hegazy1.vegetation and species altitudinal distribution in al-jabal al-akhdar landscape, Libya. *J. Bot.*, 2011, 43, 1885-1898,
- [39] Jamal B., Allal D. Contribution à la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'achach, plateau central (maroc). *Acta botanica malacitana*. 2004.28; 23-41
- [40] ZAREH M. M., Systematic and anatomical studies of Inuleae and Plucheeae in Egypt *Feddes Repertorium*.2005. 116, 47 ,43–53.
- [41] JAVIER F., Origin and evolution of the endemic Macaronesian Inuleae (Asteraceae): evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA .*Biological Journal of the Linnean Society*, 2001, 81.77-97.
- [42] Boumediene M., Mohammed I. ; LA FLORE VASCULAIRE DES MONTS DES TRARA(Algerie).*Acta Botanica Malacitana*, 2009. 62, 57-75.
- [43] Benítez G., Onzález M.G, Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 129, 87–105.
- [44] Amots D.,The Doctrine Of Signatures In Present-Day Israel. *Economy Botany*. 2002, 56, 328-334
- [45] Antoni A., Joan V. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants.*Journal of Ethnopharmacology*. 2003,84,211-227.
- [46] Maria J. P., Antonio R., Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*.1999, 27, 10.
- [47] Giovanni A.,Giancarlo C., A sesquiterpene alcohol from *Pallenis spinosa*. *Phytochemistry*, 1997, 46, 1039 -1043.
- [48] Sanz,Jl.; Marcoj. A.A Germacrane, Derivative From *Pallenis Spinosa*.*Phytochemistry*.1991, 30,2788-2790.
- [49] Ahmed A., Jakupovic J.,Dihydroxypallenone, a sesquiterpene with a New carbon Skeleton from *Pallenis spinosa* .*Phytochemistry*,1990. 29, 3355-3358.

- [50] Ahmed, A. A.; Mark, S.; A sesquiterpene alcohol from *Pallenis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1992, 20, 785-786.
- [51] Senatore, F.; Bruno, M. Composition of the essential oil of *Pallenis spinosa* (L.) Cass. (Asteraceae) *Flavour and Fragrance Journal*. 2003, 18, 195–197.
- [52] Gagnault J.C., Bidet D., Gaillard, M., Perronnet, J. *Stérols et stéroïdes*, 1997, 11-31.
- [53] Lehinger, A. Principe de biochimie, Flammarion, 1989, 315.
- [54] Bahar A. Chemistry of natural products, *Steroids*, 2007, 2, 1-26.
- [55] Arnaud.P. Cour de chimie organique, *Bordas*, 1985, 441.
- [56] Rahal, S. Chimie des Produits Naturels et des Êtres Vivants, 2004, 39, 39-44.
- [57] Raisonnier, A. Lipides et lipoprotéines. Objectifs au cours de Biochim PCEM2. *Biocchimie Métabolique et Régulations*, 2003.
- [58] Paul Mdeurick. Medicinal natural product, abiosynthetic approach. 2^{ème} édition, *Wiley*, 2002. 232-251.
- [59] Barton, D.H.R The conformation of the steroid nucleus, *Experientia*, 1950, 6, 316-320.
- [60] Klyne, W., Tame, N.D. La chimie des stéroïdes, *Gauthier-Villars*, Paris. 1966. 13.
- [61] Moore, J.A., Alain, S. Chimie organique modern, *Masson*, Montréal, Toronto, 1975. 335-343.
- [62] Lichtfouse, E., Nouveau steroids aromatiques fossils. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1989.
- [63] Definitive rules for nomenclature of steroids. *Pure appl. Chem.* , 31, 285-322.
- [64] Kark H. P., *South African Journal of Science*, 1997. 93, 263-268.
- [65] Wilson, C.O., Gisvold, O., Doerge, R.F. Text book of organique medicinal and pharmaceutical chemistry, J.B., Lippincott 7^{ème} édition, 1977, 734.
- [66] Grahom, S., Fundamentals organic chemistry, *United States of America*, 951. 1994.
- [67] Simmonds, R. J. Composition spécifique de la plante marrubium desrti. *Chemistry of biomolecules*, 1992. 151.
- [68] Gagnault, J.C., Bidet. D., Gaillard. M., Perronnet. J. *Stérols et stéroïdes*, 1997, 11-31.
- [69] I Kan, R. Natural products, 2^{ème} édition, *Academic Pres*, 1991, 127, 153.
- [70] Hill, R. S., Making, H. L. J, Dictionary of steroids-chemical data-structures and bibliographies, *Champan & Hall*, 1991.
- [71] Finar, I., Organic chemistry-stereochemistry and the chemistry of natural products, 5^{ème} édition, *Great Britain*, 1994, 518.

- [72] Mcmurry, J. Chimie organique-les grands principes Cours et exercices corrigés, 4^{ème} édition, 1998, Paris, 515.
- [73] Cheriet, T. ; Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *linaria atlantica boiss*. Memoire de magister, Université Mentouri Constantine, 2011.
- [74] Donald, J.C., et George S.H., « Chimie organique », 2 Edition, Gautier Villars, 1968.
- [75] Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D. V., Harborne, J.B. Natural products: Their chemistry and biological significance, 1^{ère} édition, Longman, England, 1994, 331-343.
- [76] AYAD R., Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce: *ZYGOPHYLLUM CORNUTUM*. Mémoire de magister, Université Mentouri de Constantine, 2008.
- [77] Bereau, D. Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse, 2001.
- [78] Alder, J.H., Salt, T.A Phytosterol structure and composition in the chemosystematics of the Caryophyllales. In The metabolism, structure, function of plant sterols, 1987, 119-121.
- [79] Akihisha, T., Shimizu, N., Sterols of the cucurbitaceae. *Phytochemistry*. 1987, 26, 1693-1700.
- [80] Noda, M., Tanaka, M., Occurrence of cholesterol as a major component in leaf surface lipid. *Lipids*, 1988, 23, 439-444.
- [81] Benveniste, P. Sterol metabolism. In The Arabidopsis Book, eds C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, Rockville. 2002.
- [82] Guo, D.A., Venkatramesh, M., Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids*, 1995, 30, 203-219.
- [83] Volkman, J.K. Sterols in microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 60, 495-506.
- [84] Chappel, J. The genetics and molecular genetics of terpene and sterol biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002, 5, 151-157.
- [85] Goldstein, J.L., Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, 343, 425-430.
- [86] Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M.L., Tan, C.T., Song, T.H. and Chua, N.H. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K) Müll. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol.* 1995, 109, 761-770.

- [87] Bach, T.J. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? *Lipids*.1986, 21, 82-88.
- [88] Rodriguez-Concepcion, R. and Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*.2002,130, 1079-1089.
- [89] Hemmerlin, A., Hoeffler J.F., Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathway in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem*. 2003,278, 26666-26676.
- [90] Benveniste, P. and Rahier, A. Target sites of sterol biosynthesis inhibitors in plants. *CRC Press*, 1992, 207-225.
- [91] Hartmann, M.A. and Benveniste, P. Plant membrane sterols: isolation, identification and bioynthesis. *Methods Enzymol*.1987, 148, 632-650
- [92] Lovato, M.A., Hart E.A., Segura, M.J., Giner, J.Z. and Matsuda, S.P. Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucalenol cycloisomerase. *J. Biol. Chem*. 2000, 275, 13394-13397.
- [93] Husselstein, T., Gachotte, D., Desprez, T., Bard, M., Benveniste, P. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with a DNA encoding a sterol C-methyltransferase from *Arabidopsis thaliana* results in the synthesis of 24-ethyl sterols. *FEBS Lett*. 1996,386, 87-92.
- [94] Bouvier-Navé, P., Husselstein, T. and Benveniste P. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem*. 1998, 256, 88-96
- [95] Darnet, S. and Rahier, A. Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4- α -methyl oxidases. *Biochem. J*.2004, 378, 889-98.
- [96] Pascal, S., Taton, M. and Rahier, A. Plant sterol biosynthesis. Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C4-demethylation. *J. Biol. Chem*. 1993, 268, 11639-54.
- [97] Ullmann, P., Ury, A., Rimmele, D., Benveniste, P., Bouvier-Nave, P. UDP-glucose sterol beta-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. *Biochimie*, 1993, 75, 713-723.
- [98] Yamaguchi, M. and Kasamo, K. Modulation of proton pumping across proteoliposome membranes reconstituted with tonoplast H⁺-ATPase from cultured rice (*Oriza sativa* L. var. Boro) cells by acyl sterol glucoside and sterol glucoside. *Plant Cell Physiol*. 2002, 43, 816-822.

- [99] Hartmann, M.A. Sterol glucosylation in plasma membranes from maize coleoptiles In Structure, function and metabolism of plant lipids, *Siegenthaler P.A. and Eichenberger Weditors*, 1984, 315-318.
- [100] Mudd, J.B Sterol interconversions. In The biochemistry of plant. A comprehensive treatise. *Stympe P.K. and Conn E.E, edt Acad. Pres*, 1980, 509-534.
- [101] Khalik-uz-Zaman, S. M. Studies on the chemical constituents of *Asparagus* species and synthesis of biotin analogues, *Karachi*, 1999.19-34.
- [102] Courtios, J.E., Perlés, R. Précis de chimie biologique, 2^{ème} édition, Masson et Cie, *Paris*, 1971, 424-437.
- [103] Adolf, W; Hecker, E.; Balmain, A.; Lhomme, M. F.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Ponsinet, G.; Pryce, R.J.; Santhanakrishnan, T.S.; Matyukhina, L.G.; Saltikova, I.A. "Euphorbiasteroid" (Epoxylathyrol): A new tricyclic diterpene from *Euphorbia lathyris* L. *Tetrahedron Letters*, 1970. 26, 2241-2244.
- [104] Valdes L.J., *J.Psychoactive Drugs*. 1994.26, 277-283.
- [105] Iwashina T., The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res*. 2000. 113, 287.
- [106] Bruneton, J. Pharmacognosie des plantes médicinales, 3^{ème} édition, *Tec & Doc*, 1999.Lavoisier,Paris.
- [107] Robert A. Moreau, Bruce D. Whitaker, Kevin B. Hicks *Progress in Lipid Research*, 2002, 41, 457-500.
- [108] Patrick Breinholder, Livia Mosca, Wolfgang Lindner *Journal of Chromatography B*, 2002. 777, 67–82.
- [109] J.C. Gaignaut, D. Bitdet, M. Gaillard, J. Perronnet Stérols et stéroïdes, Partie I, *Paris*, 1989, 11-31.
- [110] Tanya J., Howell, Effects of Natural and Synthetic Phytosterol Administration on Cholesterol Metabolism in Normolipidemic Humans, *National Library of Canada*.1997.
- [111] Bloch, K.E., Sterol structure and membrane function. *Critic. Rev. Biochemistry*, 1983, 14, 47-91.
- [112] Alexandre N., Étude d'une famille de gènes d'*Arabidopsis thaliana* homologues de la lécithine cholestérol acyltransférase humaine. Caractérisation d'une nouvelle phospholipase A1 et étude d'un stérol acyltransférase. Thèse de Doctorat, 2004.
- [113] Turley S.D. and Dietschy, J.M. Sterol absorption by the small intestine. *Curr. Opin. Lipidol*. 2002. 14, 333-40.

- [114] Heller, R. Biologie végétale II : Nutrition et metabolism, Paris : Masson et Cie, 5^e edition. 1969.
- [115] Bruneton, J. Pharmacognosie des plantes médicinales, 3^{ème} édition, Tec & Doc, 1993. 387-402.
- [116] Peterson, D.W., Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1951, 78, 143–7.
- [117] Neason, A.; Eskin, M. ; Tamir, S. Dictionary of nutraceuticals and functional foods, 2006, 345.
- [118] Panda, S.; Jafri, M.; Kar, A.; Meheta, B.K. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Buettneria*. *Fitoterapia*, 2009, 80, 123-126
- [119] Beuchet, P.; Letourneux Y., Hemisynthèse de stérols marins polyhydroxyles sulfates ou amines à partir de stéroïdes naturels. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1998, 137, 37-53.
- [120] Dutta P.C. and Savage, G.P., Formation and content of phytosterol oxidation products in foods. In: Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects, *AOCS Press*, 2002, 319-334.
- [121] Suvi Kemmo, HPLC analysis of plant sterol oxidation products. *Academic Dissertation*. 2008, 1-72.
- [122] Smith L.L., Cholesterol Autoxidation. *Plenum Press*, 1981, 1–673.
- [123] Smith L.L., The oxidation of cholesterol, Biological Effects of Cholesterol Oxides. *CRC Press*, 1992, 7–31.
- [124] Smith, L.L., Review of progress in sterol oxidation: 1987–1995. *Lipids*, 1996, 31, 453–487.
- [125] Schroepfer, G.J., Oxysterols. Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol.* 2000, 80, 361-554.
- [126] Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M.T., Cholesterol oxidation mechanisms. Cholesterol and Phytosterols Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. *AOCS Press*. 2002, 1–25.
- [127] Dutta, P.C., Chemistry, analysis, and occurrence of phytosterol oxidation products in foods. *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*. Marcel Dekker Inc, 2004, 397–417.
- [128] Ryan, E., McCarthy, F.O., Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence and biological effects. *Food Rev.* 2009, 25, 157–174.

- [129] Otaegui-Arrazola, A., Menéndez, M., Oxysterols: a world to explore. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 3289–3303.
- [130] Dutta, P.C., Przybylski, R., Formation and analysis of oxidized sterols in frying fat. Deep Frying. Chemistry, Nutrition and Practical Applications. AOCS Press, 1996, 112–150.
- [131] Porter, N.A., Caldwell, S.E. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 1995, 30, 277-290.
- [132] Frankel, E.N., Lipid Oxidation. *The Oily Press*, 1998, 1–303.
- [133] Bortolomeazzi, R., De Zan, M., Mass spectrometry characterization of the 5 α ,7 α - and 7 β -hydroxy derivatives of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol and brassicasterol. *J. Agric. FoodChem.* 1999, 47, 3069–3074.
- [134] Lampi, A.M., Juntunen, L., Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *Chromatogr.* 2002, 777, 83–92.
- [135] Grandgirard, A., Martine, L., Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 2004, 91, 101–106.
- [136] Kulig, M.J., Smith, L.L., Sterolmetabolism.XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *J. Org. Chem.* 1973, 38, 3639–3642.
- [137] Yanishlieva, N., Tasheva, E.M., Effect of the unsaturation of lipid media on the autoxidation sitosterol. *Grasas y Aceites* 1986, 37, 343–347.
- [138] Säynäjoki, S., Sundberg, S., Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2003, 80, 415–421.
- [139] Yanishlieva, N., Schiller, H., Autoxidation of sitosterol II: Main products formed at ambient and high temperature treatment with oxygen. *Riv.Ital. Sost. Grasse LVII*, 1980, 572–576.
- [140] Dutta, P.C. Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in french fries prepared in these oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997,74, 659-666.
- [141] Dutta, P.C. and Appelqvist, L.-Å. Studies on phytosterol oxides. Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*1997, 74, 647-657.
- [142] Zhang, X., Julien-David, D., Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids*, 2005, 70: 896-906.

- [143] Soupas, L., Huikko, L., Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 266-273.
- [144] García-Llatas, G., Cercaci, L., Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 469–475.
- [145] Zunin, P., Calcagno, C., Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *J. Dairy Res.* 1998, 65, 591-598.
- [146] Conchillo, A., Cercaci, L., Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: Application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7844-7850.
- [147] Nourooz-Zadeh, J. ; Appelqvist, L.Å. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *J. Am. Oil Chem.* 1992, 69, 288-293.
- [148] Tonello A, Poli G. Serum phytosterols not only from dietary intake. *Br J Nutr.* 2006, 96, 791–2.
- [149] Ikeda I, Konno R,. Campester-5-en-3-one, an oxidized derivative of campesterol, activates PPARalpha, promotes energy consumption and reduces visceral fat deposition in rats. *Biochim Biophys Acta.* 2006, 1760, 800–807.
- [150] Suzuki K, Tanaka M,. Effects of 5-campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on the type 2 diabetes mellitus model animal C57BL/KsJ-db/db mice. *Horm Metab Res.* 2002, 34, 121–126.
- [151] Konno R, Kaneko Y., Effect of 5-campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on Zucker diabetic fatty rats as a type 2 diabetes mellitus model. *Horm Metab Res.* 2005, 37, 79–83.
- [152] Kaneko E., Matsuda M., Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* 2003, 278, 36091–36098.
- [153] Janowski BA., Willy PJ., An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996, 383, 728–731.
- [154] Kimura Y, Yasukawa K, Takido M, Akihisa T, Tamura T. Inhibitory effect of some oxygenated stigmastane-type sterols on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol Pharm Bull.* 1995, 18, 1617–1619.
- [155] Schroeder G, Rohmer M., 7-Oxo-, 7 α -hydroxy- and 7 β -hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry* .1980, 19, 2213–2215.

- [156] Chaurasia N, Wichtl M. Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *J Nat Prod*. 1987, 50, 881–885.
- [157] H.Kojima, N. Sato, A. Hatano, H. Ogura Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*. 1990, 29, 2351-2355.
- [158] Bourezzane S., Etude phytochimique de la plante *Santolina rosmarinifolia* L. Mémoire de Magister, 2010.
- [159] Pateh U. U., Haruna A. K., Isolation Of Stigmasterol, B-Sitosterol And 2-Hydroxy-hexadecanoic Acid Methyl Ester From The Rhizom-Es Of *Stylochiton Lancifolius* Pyer And Kotchy (Araceae). *Nig. Journ. Pharm. Sci*, 2009,7, 19 – 25.
- [160] Smith W.B. ; Annual Reports on NMR Spectroscopy, 1978,8, 199.
- [161] Blunt J.W., Stothers J.B. ; Oxidation Reactions in 9a-Halosteroids by Jones Reagent. *Org. Magn. Res*. 1977. 9, 439.
- [162] Rgen J. S., Barbara S., Sterol Constituents In Seeds Of *Ornithopus Sativus*. *Phytochemrstry*. 1993, 33, 506 -507.
- [163] Xiao D. L., Feng P. M.; Two New Epoxysteroids from *Helianthus tuberosus*. *Molecules*, 2011, 16, 8646-8653.
- [164] Yukinori M., Akiko S., Studies on Nepalese Crude Drugs. XXIX. Chemical Constituents of Dronapuspi, the Whole Herb of *Leucas cephalotes* SPRENG. *Chem. Pharm. Bull*. 2006,54, 1370-1379.
- [165] Greca M. D., Monaco P., “Stigmasterols from *Typha latifolia*” *J. Nat. Prod*. 1990. 53, 1430-1435
- [166] Nagano H., Poyser J. P. ; Side-chain oxysterol regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl. *J. Chem.Res*. 1977, 218, 2522-2571
- [167] Werner M., Gerhard S., Oxidized Phytosterols Increase By Ageing In Photoautotrophic Cell Cultures Of *Chenopodium Rubrum*. *Phytochemistry*. 1997. 45, 297-302.
- [168] Slatkin D. J., Knapp J. E. Synthesis of (24R)-3 β -hydroxystigmast-5-en-7-one - Springer. *Phytochemistry*. 1975, 14, 580.
- [169] Cheng, K. P, Nagano H., Physiology and Biochemistry of Sterols. *J. CLIPS. Res.J. Chem. Res*. 1977, 217. 2501-2521.
- [170] Kovganko N.V., Chernov Yu.G. ; Synthesis Of 7-Oxo- And 7-Hydroxyderivatives of stigmasterol *Chemistry of Natural Compounds*. 1996, 32, 183-186.
- [171] Zhang X., Geoffroy P. ; Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol. Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids*. 2005, 70, 886–95.

- [172] Notaro G. ; Piccialli V. New steroidal hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona Copiosa*. *Journal of natral products*. 1992, 55, 1588-1594.
- [173] Roberta M., Schaffer P. S.; β -Sitosteryl D-glucoside and β -sitosterol from commercially dried grapefruit pulp. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1953, 47, 419- 423.
- [174] Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. *Phytochemistry*. 2001, 58, 1229-1233.
- [175] Voutquene L., Lavaud C., Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. 1999, 50, 63-69.
- [176] Ramdane, S., Ouahiba, B., Ratiba, M., Flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry*. 2009, 2, 114–118.
- [177] Benabdelaziz I., Etude des composés chimiques de *Scorzonera undulata* (Asteraceae). Mémoire de magister. Université de Batna. 2011.
- [178] Kun-Young, P., Jung, K. O., Antimutagenic effects of Doenjang (Korean fermented soy paste) and its active compounds. *Mutation research*. 2003, 523-524.
- [179] Wang N., C. Can. The beneficial effect of plant sterols on serum cholesterol. *J. Cardiol*, 2001. 17; 715-721.
- [180] Klippel, K. F., Hiltl, D. M., Schipp, B., A multicentric placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol for the treatment of benign prostate hyperplasia. *British journal of urology*. 1997, 80, 427-432.
- [181] B. Auradatif, Y. Gan, C-S.Fink. *Nutr. Cancer*, 2000. 36; 74-78.
- [182] Yili, D., Yuting, L., Lipid soluble components of Zhungaerdaiji (*Euphorbia soongarica*). *Zhongcaoyao*, 1992, 23, 570-572.
- [183] Ulubelin, A., Oksuz, S., Mericli, A. H., Palmitic acid ester of sitosteryl-3 β -glucoside from *Centaurea regia*. *Phytochemistry*, 1988, 27, 3964-3965.
- [184] Haba H., Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : *Euphorbia guyoniana* Boiss., *Reut.* et *EupSorbia retusa* Forsk. These de Doctorat, Université de Batna, 2008.
- [185] Nguyen, A.T., Malonne, H., Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fito-terpia*. 2004, 75, 500-504.
- [186] Tasyriq M., Nadjmudeen I. ; 7 α -Hydroxy- β Sitosterol from *Chisocheton tomentosus* Induces Apoptosis via Dysregulation of Cellular Bax/Bcl-2 Ratio and Cell Cycle Arrest by

Downregulating ERK1/2 Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 12.

الملخص

هذا العمل يعتمد على الدراسة الفيتوكيميائية لنبات *Pallenis Spinosa* التي تنبت في الجزائر من عائلة *Asteraceae* بهدف إيجاد مواد الأيض الثانوية ذات الأهمية العلاجية.

انطلاقاً من مستخلص CHCl_3 المستخرج من القسم الهوائي لنبات *Pallenis Spinosa* تم عزل خمسة مركبات أفضية ثانوية من نوع الستيرويدات (الستيروول النباتي) و لأول مرة بالنسبة لنباتة *Pallenis Spinosa* وحتى بالنسبة للنوع *Pallenis* اثنان منها تعرف ب Oxyphytosterols :

- ✓ Stigmastérol (PS1).
- ✓ $7\alpha\text{-OH}$ stigmastérol (PS2), $7\alpha\text{-OH}$ β -sitostérol (PS3)
- ✓ β -sitostérol glycoside (PS4).
- ✓ Stigmastérol - 3β -glucopyranoside- $6'$ -O-ester (PS5).

إنّ عزل و تحديد بنية المركبات المستخرجة يعتمد على استعمال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (CCM, VLC, ...CC) وكذا باستخدام طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين المغناطيسي بجميع انواعها الاحادية الخاصة بالبروتون ^1H و الكربون ^{13}C وثنائية الابعاد, مطيافية الكتلة وكذا المقارنة مع الدراسات السابقة.

الكلمات المفتاح:

الفيتوكيمياء, فيتوستيرول (الستيروول النباتي), عائلة المركبات *Pallenis Spinosa*, *Asteraceae*, الطب الشعبي, الفيتوستيرول المؤكسد Oxyphytosterol .

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Pallenis spinosa* trouve à l'Algerie, de la famille Asteraceae (Composés). Dans le but de rechercher de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique.

Le fractionnement, la séparation et la purification des biomolécules à partir de l'extrait chloroformique des parties aériennes de l'espèce *Pallenis spinosa* ont été réalisés par l'utilisation en alternance de diverses méthodes chromatographiques appliquées dans notre laboratoire à savoir :

- ✓ la chromatographie liquide sous vide (VLC) de gel de silice.
- ✓ la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et gel de silice greffée en C₈ (phase inverse).

La détermination structurale des composés isolés est basée sur l'utilisation combinée des différentes techniques physicochimiques et spectroscopiques telles que la RMN 1D (¹H, ¹³C) et 2D, la spectrométrie de masse et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés isolées ont été identifiées sont des stéroïdes (Phytostérols):

- ✓ Stigmastérol (**PS1**).
- ✓ 7 α -OH stigmastérol (**PS2**), 7 α -OH β -sitostérol (**PS3**).
- ✓ β -sitostérol glycoside (**PS4**).
- ✓ Dérivé stigmastérol -3 β -glucopyranoside-6'-ester (**PS5**).

Mots clés: Phytochimie, *Pallenis spinosa*, Asteracée, phytosterol, médecine traditionnelle, Oxyphytosterols.

Abstract

This work is concerned with the phytochemical study of the species *Pallenis spinosa* wich grows in Algeria, belonging to the *Asteraceae* family. With the aim of discovering new natural therapeutics compounds.

The isolation and structure determination of isolated compounds were based on the different chromatographic methods (CC, TLC and VLC), also by physicochemical and spectroscopic technics, such as 1D (^1H , ^{13}C) and 2D NMR, by mass spectrometry and comparison with literature data.

The isolated compounds are identified as stéroïds (Phytosterols):

- ✓ Stigmasterol (**PS1**).
- ✓ 7α -OH stigmasterol (**PS2**), 7α -OH β -sitosterol (**PS3**).
- ✓ β -sitosterol glycoside (**PS4**).
- ✓ Derivative stigmastérol-3-O- β -D-glucoside (6'-O-ester) (**PS5**).

Keywords: Phytochemistry, *Pallenis spinosa*, Asteraceae, phytosterol, folk medicine. Plant sterol oxidation products (POP).