

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

Filière Chimie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

*Spécialité*

Chimie Organique

*Présentée par*

M<sup>elle</sup> CHABANI SONIA

Thème

---

**Etude chimique de deux plantes sahariennes du  
genre *Atractylis*:**

***Atractylis flava* et *Atractylis serratuloides***

---

Soutenue le 12/06/2014

**JURY**

|                    |   |              |
|--------------------|---|--------------|
| Mohammed BENKHALED | Professeur Université de Batna            | Président    |
| Hamada HABA        | Maître de Conférences Université de Batna | Rapporteur   |
| Fadila BENAYACHE   | Professeur Université de Constantine      | Examinatrice |
| Ammar DIBI         | Professeur Université de Batna            | Examineur    |
| Samir BENAYACHE    | Professeur Université de Constantine      | Examineur    |
| Nasser BELBOUKHARI | Professeur Université de Béchar           | Examineur    |

2013/2014

## **Remerciements**

*Cette thèse a été réalisée au sein du groupe de phytochimie du Laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des sciences université de Batna, sous la direction de Monsieur le Docteur **Hamada Haba** Maître de Conférences au département des sciences de la matière, Filière Chimie de l'Université de Batna, je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli dans son groupe, de m'avoir permis de préparer mon doctorat en Sciences dans les meilleures conditions et de m'avoir dirigé avec compétence, rigueur scientifique, efficacité, une grande disponibilité et une patience extrême. Je tiens aussi à lui exprimer ma vive reconnaissance pour son enthousiasme et ses précieux conseils qui ont fait progresser ce travail de recherche.*

*J'adresse un grand merci à Monsieur **Mohammed Benkhaled** Professeur à l'Université de Batna et directeur du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse de Doctorat.*

*Je tiens à remercier aussi les membres du jury, les professeurs **Fadila Benayache** et **Samir Benayache** de l'Université de constantine 1, le professeur **Ammar Dibi** de l'Université de Batna et le professeur **Nasser Belboukhari** de l'Université de Béchar, qui m'ont honoré en acceptant de faire partie du jury de ce travail de thèse de doctorat en sciences.*

*J'aimerais également remercier, les Professeurs **Catherine Lavaud** de l'UFR de Pharmacie-Institut de chimie moléculaire ICMR de l'université de Reims Champagne-Ardenne France, et **Ahcene Boumendjel** de l'Université Joseph Fourier, Grenoble France et les Docteurs **Christophe Long**, du centre de Recherche sur les Substance Naturelles CNRS-Pierre Fabre et **Dominique Harakat**, de l'institut de chimie moléculaire ICMR de l'Université de Reims Champagne-Ardenne France, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le professeur **Tahar Bendaikha**, doyen de la faculté des Sciences, Université de Batna pour la réalisation des spectres IR, et monsieur le professeur **Bachir Oudjehih** du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques pour l'identification botanique des espèces étudiées dans le cadre de ce travail.*

*Un grand merci également à Monsieur le professeur **Ahmed Kasseh-Laouar** de m'avoir accueilli dans son laboratoire de microbiologie au CHU de Batna pour la réalisation des tests biologiques.*

*Je remercie également tous mes collègues du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE : **Habiba, Sawsen, Soumia, Leila, Samira** et **Hasna** pour les bons moments passés ensemble et pour leur disponibilité et gentillesse.*

# *Dédicace*

Je dédie cette thèse :

À la mémoire de **mon père**

À **ma mère** qui par sa tendresse, son amour et sa compréhension m'a encouragé durant la réalisation de ce travail

À mes chers frères: **fouzi, fateh, yazid** pour leur amour

À ma chère sœur **soraya** pour sa gentillesse et son amour

À ma famille pour leurs encouragements

À mes amies et collègues

## *Abréviation*

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| AcOEt                           | : acétate d'éthyle                             |
| ACN                             | : acétonitrile                                 |
| CHCl <sub>3</sub>               | : chloroforme                                  |
| DCM                             | : dichlorométhane                              |
| CDCl <sub>3</sub>               | : chloroforme deutéré                          |
| CD <sub>3</sub> OD              | : méthanol deutéré                             |
| DMSO                            | : diméthylsulfoxyde                            |
| EtOH                            | : éthanol                                      |
| EP                              | : éther de pétrole                             |
| MeOH                            | : méthanol                                     |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : sulfate de sodium                            |
| TFA                             | : acide trifluoroacétique                      |
| CCM                             | : chromatographie sur couche mince             |
| CCE                             | : chromatographie sur couche épaisse           |
| VLC                             | : chromatographie liquide sous vide            |
| CLHP                            | : chromatographie liquide haute performance    |
| SiO <sub>2</sub>                | : gel de silice normale                        |
| RP- 18                          | : silice greffée en C-18                       |
| ax                              | : axial  |
| éq                              | : équatorial                                   |
| <i>d</i>                        | : doublet                                      |
| <i>dd</i>                       | : doublet de doublets                          |
| <i>t</i>                        | : triplet                                      |
| <i>dl</i>                       | : doublet large                                |
| <i>s</i>                        | : singulet                                     |
| <i>sl</i>                       | : singulet large                               |
| <i>m</i>                        | : multiplet                                    |
| Cq                              | : carbone quaternaire                          |
| RMN <sup>1</sup> H              | : résonance magnétique nucléaire du proton     |
| RMN <sup>13</sup> C             | : résonance magnétique nucléaire du carbone 13 |
| COSY H-H                        | : correlated spectroscopy                      |
| HSQC                            | : heteronuclear single quantum connectivity    |
| HMBC                            | : heteronuclear multiple bonding connectivity  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| NOESY              | : nuclear overhauser effect spectroscopy        |
| ROESY              | : rotating-frame overhauser effect spectroscopy |
| TOCSY              | : total correlation spectroscopy                |
| HSQC-TOCSY         | : expérience HSQC couplée à l'expérience TOCSY  |
| $\delta$           | : déplacement chimique exprimé en ppm           |
| $J$                | : constante de couplage exprimée en Hz          |
| SM                 | : spectrométrie de masse                        |
| ESI                | : spectrométrie de masse par electrospray       |
| $m/z$              | : masse/charge d'un ion                         |
| UMA                | : unité de masse atomique                       |
| IR                 | : infrarouge                                    |
| UV                 | : ultra-violet                                  |
| Rdt.               | : rendement                                     |
| UV                 | : ultra-violet                                  |
| $\lambda$          | : longueur d'onde                               |
| Ac. gluc           | : acide glucoronique                            |
| Glu                | : glucose                                       |
| Gal                | : galactose                                     |
| Rha                | : rhamnose                                      |
| Ara                | : arabinose                                     |
| Xyl                | : xylose  |
| Api                | : apiose  |
| Fru                | : fructose                                      |
| Hba                | : acide $\beta$ -hydroxybutyrique               |
| DPPH               | : 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle               |
| ATCC               | : American Type Culture Collection              |
| MeCOEt             | : méthyl éthyl cétone                           |
| Me <sub>2</sub> CO | : acétone                                       |
| Iso-PrOH           | : isopropanol                                   |

# Sommaire

|                    |   |
|--------------------|---|
| Introduction ..... | 1 |
|--------------------|---|

## Chapitre I : Rappels bibliographiques

|  |    |
|--|----|
| I-1 Caractères botaniques de la famille Asteraceae .....                 | 4  |
| I-2 Position systématique de la famille Asteraceae .....                 | 5  |
| I-3 Tribu des Cardueae .....   | 5  |
| I-4 Présentation du genre <i>Atractylis</i> .....                        | 6  |
| I-5 Etudes phytochimiques antérieures sur la sous-tribu Carlininae ..... | 7  |
| I-5-1 Genre <i>Atractylis</i> .....                                      | 7  |
| I-5-2 Genre <i>Carlina</i> .....   | 8  |
| I-5-3 Genre <i>Atractylodes</i> .....                                    | 11 |
| I-6 Activités biologiques .....  | 16 |
| I-7 Utilisation en médecine traditionnelle .....                         | 16 |

## Chapitre II : Etude des composés phénoliques, triterpéniques et saponines

|   |    |
|---|----|
| II-1 Composés phénoliques .....                       | 18 |
| II-1-1 Définition .....                               | 18 |
| II-1-2 Flavonoïdes .....                              | 18 |
| II-1-2-1 Structures chimiques et classification ..... | 18 |
| II-1-2-2 Biosynthèse des flavonoïdes .....            | 19 |
| II-1-2-3 Substitution du squelette flavonoïde .....   | 21 |
| II-1-2-3-1 L'hydroxylation .....                      | 21 |
| II-1-2-3-2 La méthylation ou méthoxylation .....      | 21 |
| II-1-2-3-3 La <i>O</i> -glycosylation .....           | 21 |
| II-1-2-3-4 La <i>C</i> -glycosylation .....           | 22 |
| II-1-3 Rôle et intérêt des composés phénoliques ..... | 22 |
| II-1-3-1 Chez les plantes .....                       | 22 |
| II-1-3-2 Chez les humains .....                       | 23 |

|   |    |
|---|----|
| II-2 Composés triterpéniques .....                  | 23 |
| II-2-1 Introduction .....                           | 23 |
| II-2-2 Biosynthèse des triterpènes .....            | 24 |
| II-2-3 Intérêts des triterpènes .....               | 27 |
| II-3 Saponines .....                                | 29 |
| II-3-1 Définition .....                             | 29 |
| II-3-2 Structure chimique des saponosides .....     | 30 |
| II-3-2-1 Saponosides à génines stéroïdiques .....   | 30 |
| II-3-2-2 Saponosides à génines triterpéniques ..... | 30 |
| II-3-2-3 Partie osidique .....                      | 31 |
| II-3-3 Distribution de saponines .....              | 32 |
| II-3-4 Biosynthèse des saponosides .....            | 32 |
| II-3-5 Propriétés biologiques des saponosides ..... | 33 |
| II-3-5-1 Hémostatique .....                         | 33 |
| II-3-5-2 Molluscicide .....                         | 33 |
| II-3-5-3 Anti-inflammatoire .....                   | 33 |
| II-3-5-4 Antibactérienne et antiparasitaire .....   | 34 |
| II-3-5-5 Cytotoxique et antitumorale .....          | 35 |
| II-3-5-6 Antioxydante .....                         | 36 |
| II-3-5-7 Antivirale .....                           | 37 |

### **Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Atractylis flava* Desf.**

|   |    |
|---|----|
| III-1 Rappel botanique .....  | 38 |
| III-2 Usage traditionnel .....  | 38 |
| III-3 Travaux antérieurs de chimie sur l'espèce <i>Atractylis flava</i> ..... | 39 |
| III-4 Chimie extractive .....   | 40 |
| III-4-1 Extraction .....  | 40 |
| III-4-2 Purification .....  | 42 |
| III-4-2-1 Extrait butanolique ( <i>n</i> -BuOH).....                          | 42 |
| III-4-2-2 Extrait acétate d'éthyle .....                                      | 43 |
| III-4-2-3 Extrait dichlorométhane.....  | 44 |
| III-4-3 Hydrolyse .....   | 44 |

|   |     |
|---|-----|
| III-4-4 Caractérisation des produits obtenus.....                             | 45  |
| III-4-4-1 Caractérisation des flavonoïdes.....                                | 45  |
| III-4-4-1-1 Elucidation structurale du composé <b>1</b> .....                 | 45  |
| III-4-4-1-2 Elucidation structurale du composé <b>2</b> .....                 | 55  |
| III-4-4-1-3 Elucidation structurale du composé <b>3</b> .....                 | 71  |
| III-4-4-1-4 Elucidation structurale du composé <b>4</b> .....                 | 80  |
| III-4-4-1-5 Elucidation structurale du composé <b>5</b> .....                 | 85  |
| III-4-4-1-6 Elucidation structurale du composé <b>6</b> .....                 | 92  |
| III-4-4-1-7 Elucidation structurale du composé <b>7</b> .....                 | 97  |
| III-4-4-1-8 Elucidation structurale du composé <b>8</b> .....                 | 100 |
| III-4-4-1-9 Elucidation structurale du composé <b>9</b> .....                 | 103 |
| III-4-4-1-10 Elucidation structurale du composé <b>10</b> .....               | 107 |
| III-4-4-1-11 Elucidation structurale du composé <b>11</b> .....               | 111 |
| III-4-4-2 Caractérisation des saponines.....                                  | 116 |
| III-4-4-2-1 Elucidation structurale du composé <b>12</b> .....                | 116 |
| III-4-4-2-2 Elucidation structurale du composé <b>13</b> .....                | 138 |
| III-4-4-2-3 Elucidation structurale du composé <b>14</b> .....                | 150 |
| III-4-4-3 Caractérisation des triterpènes.....                                | 164 |
| III-4-4-3-1 Elucidation structurale du composé <b>15</b> .....                | 164 |
| III-4-4-3-2 Elucidation structurale du composé <b>16</b> .....                | 174 |
| III-4-4-3-3 Elucidation structurale du composé <b>17</b> .....                | 178 |
| III-4-4-3-4 Elucidation structurale du composé <b>18</b> .....                | 184 |
| III-4-4-3-5 Elucidation structurale des composés <b>19</b> et <b>20</b> ..... | 187 |
| III-4-4-3-6 Elucidation structurale des composés <b>21</b> et <b>22</b> ..... | 188 |
| III-4-4-3-7 Elucidation structurale des composés <b>23</b> et <b>24</b> ..... | 200 |
| III-4-4-3-8 Elucidation structurale du composé <b>25</b> .....                | 208 |
| III-4-4-3-9 Elucidation structurale du composé <b>26</b> .....                | 211 |
| III-4-4-3-10 Elucidation structurale du composé <b>27</b> .....               | 219 |
| III-4-4-3-11 Elucidation structurale du composé <b>28</b> .....               | 222 |
| III-4-4-3-12 Elucidation structurale du composé <b>29</b> .....               | 227 |
| III-4-4-3-13 Elucidation structurale du composé <b>30</b> .....               | 228 |
| III-5 Conclusion .....  | 231 |

## Chapitre IV : Etude phytochimique de l'espèce *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass.

|   |     |
|---|-----|
| IV-1 Rappel botanique .....                                 | 236 |
| IV-2 Usage traditionnel .....                               | 236 |
| IV-3 Chimie extractive .....                                | 236 |
| IV-3-1 Extraction .....                                     | 236 |
| IV-3-2 Purification .....                                   | 238 |
| IV-3-3 Caractérisation des produits obtenus .....           | 239 |
| IV-3-3-1 Elucidation structurale du composé <b>31</b> ..... | 240 |
| IV-3-3-2 Elucidation structurale du composé <b>32</b> ..... | 247 |
| IV-3-3-3 Elucidation structurale du composé <b>33</b> ..... | 257 |
| IV-3-3-4 Elucidation structurale du composé <b>34</b> ..... | 266 |
| IV-3-3-5 Elucidation structurale du composé <b>35</b> ..... | 266 |
| IV-3-3-6 Elucidation structurale du composé <b>36</b> ..... | 266 |
| IV-3-3-7 Elucidation structurale du composé <b>37</b> ..... | 267 |
| IV-3-3-8 Elucidation structurale du composé <b>38</b> ..... | 267 |
| VI-3-3-9 Elucidation structurale du composé <b>39</b> ..... | 268 |
| IV-4 Conclusion .....                                       | 270 |

## Chapitre V : Tests biologiques

|  |     |
|--|-----|
| V-1 Introduction .....   | 272 |
| V-2 Bactéries .....  | 272 |
| V-2-1 <i>Escherichia coli</i> .....  | 272 |
| V-2-2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 273 |
| V-2-3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 273 |
| V-3 Antioxydants .....   | 274 |
| V-3-1 Principe des antioxydants .....  | 274 |
| V-3-2 Réaction entre le radical libre DPPH <sup>•</sup> et l'antioxydant .....                               | 274 |
| V-4 Partie expérimentale .....   | 275 |
| V-4-1 Evaluation des activités antibactériennes des extraits de la plante <i>Atractylis flava</i> Desf ..... | 275 |
| V-4-1-1 Souches bactériennes .....   | 275 |
| V-4-1-2 Préparation des précultures .....  | 275 |

|  |     |
|--|-----|
| V-4-1-3 Préparation de la suspension bactérienne ..... | 275 |
| V-4-1-4 Préparation des disques .....                  | 275 |
| V-4-1-5 Préparation des solutions .....                | 275 |
| V-4-1-6 Préparation des milieux de culture .....       | 276 |
| V-4-1-7 Ensemencement .....                            | 276 |
| V-4-1-8 Expression des résultats .....                 | 276 |
| V-4-2 Test de l'activité anti-oxydante .....           | 278 |
| V-4-3 Résultats et discussion .....                    | 279 |
| Conclusion générale .....                              | 280 |

## **Chapitre VI : Partie expérimentale**

|  |     |
|--|-----|
| VI-1 Matériels et appareillage .....   | 286 |
| VI-1-1 Récolte des plantes <i>A. flava</i> Desf. et <i>A. serratuloides</i> Sieber ex Cass ..... | 286 |
| VI-1-2 Techniques préparatives de séparation .....   | 286 |
| VI-1-2-1 Chromatographie sur couche mince .....  | 286 |
| VI-1-2-2 Chromatographie liquide sous vide .....   | 286 |
| VI-1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte .....   | 286 |
| VI-1-2-4 Chromatographie d'exclusion .....   | 287 |
| VI-1-2-5 Chromatographie liquide haute performance .....   | 287 |
| VI-1-3 Chimie structurale .....  | 288 |
| VI-1-3-1 Spectroscopie de RMN .....  | 288 |
| VI-1-3-2 Spectrométrie de masse .....  | 288 |
| VI-1-3-3 Spectrométrie UV-Visible .....  | 288 |
| VI-1-3-4 Spectrométrie Infra-rouge .....   | 288 |
| VI-1-3-5 Pouvoir rotatoire .....   | 288 |
| VI-2 Etude phytochimique de l'espèce <i>Atractylis flava</i> Desf .....                          | 289 |
| VI-2-1 Extraction .....  | 289 |
| VI-2-2 Séparation et purification .....  | 289 |
| VI-2-2-1 Fractionnement et purification de l'extrait dichlorméthane .....                        | 289 |
| VI-2-2-2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle .....                      | 291 |
| VI-2-2-3 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique .....                 | 293 |
| VI-2-2-4 Hydrolyse acide de l'extrait butanolique .....  | 296 |
| VI-2-3 Composés isolés de l'espèce <i>Atractylis flava</i> .....                                 | 297 |

|   |     |
|---|-----|
| VI-3 Etude phytochimique de l'espèce <i>Atractylis serratuloides</i> Sieber ex Cass ..... | 304 |
| VI-3-1 Extraction .....   | 304 |
| VI-3-2 Séparation et purification .....   | 305 |
| VI-3-2-1 Fractionnement de l'extrait éther de pétrole .....                               | 305 |
| VI-3-2-2 Fractionnement de l'extrait dichlorméthane .....                                 | 305 |
| VI-3-2-3 Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanolique .....                          | 306 |
| VI-3-3 Composés isolés de l'espèce <i>Atractylis serratuloides</i> .....                  | 307 |
| <br>  |     |
| Références bibliographiques .....   | 310 |



# INTRODUCTION

## **INTRODUCTION**

Les plantes représentent une source inépuisable de principes actifs dont l'usage traditionnel est connu depuis bien longtemps. En effet, l'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de nombreuses maladies est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. Cette médecine, connue sous le nom de phytothérapie, s'est imposée du fait que depuis des millénaires, l'homme s'est toujours soigné par les plantes de son environnement, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. Aujourd'hui, les plantes médicinales sont une véritable ruche à médicaments car, elles interviennent régulièrement en pharmacopée traditionnelle dans la lutte contre de nombreuses maladies. Elles sont exploitées également à travers le monde dans l'industrie des parfums, de l'agro-alimentaire, des cosmétiques et dans le secteur pharmaceutique.

Le XXe siècle a été marqué par la mise au point de différentes classes de molécules de synthèse dont l'efficacité a permis de faire face aux maladies comme le paludisme, VIH, cancer...etc. Cependant, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening phytochimique et biologique des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments largement utilisés dans le traitement de nombreuses maladies.

Par ailleurs, selon l'OMS, 80% de la population mondiale emploient les plantes médicinales pour les soins de santé; cela traduit d'une part la difficulté d'accès de ces populations aux soins de la médecine moderne, et d'autre part, les plantes ont souvent montré une efficacité indéniable. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis de génération à génération et tend à disparaître.

C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'impliquent davantage pour recenser les plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche scientifique de déterminer les propriétés et valider les usages attribués. La recherche de nouvelles biomolécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances bioactives, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétique, pharmaceutique et additif nutritionnel), il y a eu un intérêt croissant, ces dernières décennies, dans l'étude des plantes aux vertus thérapeutiques reconnues et dans leurs utilisations pour le traitement de diverses maladies. De ce fait, il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes afin d'en étudier l'efficacité, le mode d'action et évidemment les effets secondaires.

La conception et la réalisation de ce travail de thèse de doctorat en chimie organique s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne particulièrement celle du Nord de Sahara, par la recherche de biomolécules nouvelles d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, notre laboratoire a déjà entrepris un programme de recherche destiné à l'exploitation de cette flore. En effet, l'Algérie dispose d'une flore particulièrement riche et variée, d'environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. <sup>[1]</sup>

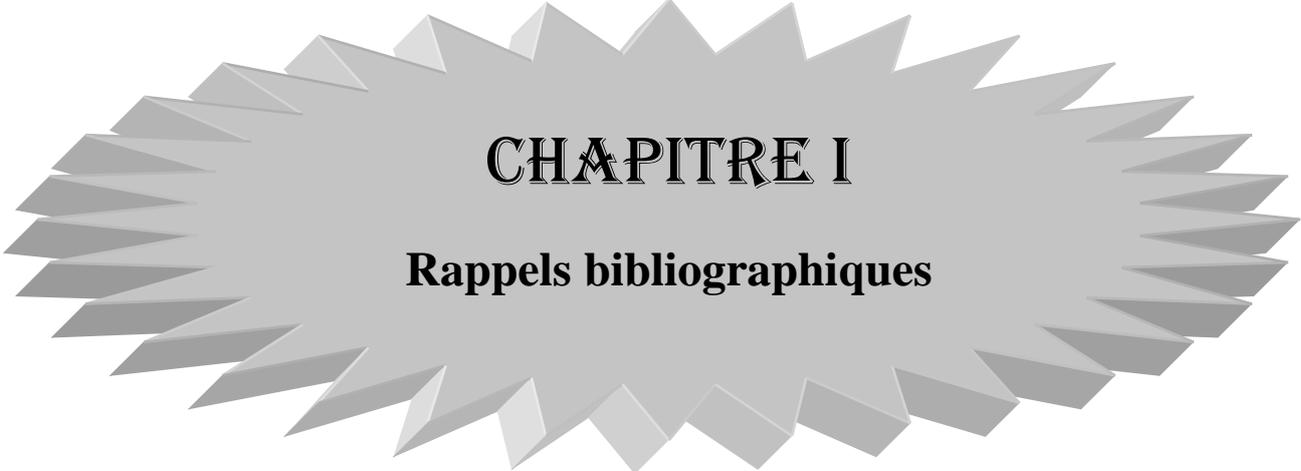
Dans cette perspective, ce travail de recherche est centré sur la recherche de substances naturelles nouvelles issues de la famille des Asteraceae. Cette dernière est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires tels que les triterpénoïdes, les sesquiterpènes lactones et les flavonoïdes. L'objectif principal de ce travail est l'extraction, l'isolement et l'identification de biomolécules isolées des extraits organiques de deux plantes médicinales sahariennes appartenant au genre *Atractylis* à savoir *Atractylis flava* Desf. et *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. de la famille Asteraceae. Ce choix est justifié du fait que ces deux plantes sont largement utilisées en médecine traditionnelle non seulement en Algérie mais aussi en Afrique du nord pour traiter l'hépatite, les désordres circulatoires, et pour leurs effets diurétiques. <sup>[2]</sup> Il est à noter que peu d'études phytochimiques et biologiques ont été consacrées à ce genre largement représenté en Afrique du Nord.

L'espèce *A. flava* connue également sous le nom *A. carduus* (Forsk.) Christ. a fait l'objet antérieurement de trois études chimiques en conduisant particulièrement à l'isolement de flavonoïdes et triterpènes connus, <sup>[3-5]</sup> tandis que la plante *A. serratuloides* n'a pas été du tout étudiée chimiquement. Ces deux espèces largement distribuées en Algérie appartiennent à la sous-tribu Carlininae de la tribu des Carduae. <sup>[6,7]</sup> Cette sous-tribu comporte également deux autres genres à savoir : *Carlina* et *Atractylodes* bien représentés aussi en Afrique du nord. Les espèces des genres *Atractylis*, *Carlina* et *Atractylodes* sont réputées généralement par leur

métabolisme secondaire riche et varié en triterpènes, flavonoïdes, sesquiterpènes et composés acétyléniques. [8-10]

Notre travail de thèse se divise en trois grandes parties :

- ◆ La première partie concerne l'étude bibliographique. Cette étude commence par une description botanique du genre *Atractylis*, description qui permet de positionner ce genre dans la systématique des Astéracées. Elle se poursuit par une synthèse des principaux résultats phytochimiques antérieurs relatifs aux genres de la sous-tribu Carlininae et finalement un aperçu théorique sur les métabolites secondaires notamment, les composés phénoliques, les triterpènes et les saponosides.
- ◆ La deuxième partie est consacrée aux résultats phytochimiques obtenus à partir de l'étude chimique des deux espèces *Atractylis* (*A. flava* et *A. serratuloides*). Cette partie rapporte d'une manière détaillée l'extraction, l'isolement, la purification et l'élucidation structurale des différents composés isolés **1-39**.
- ◆ Et enfin la dernière partie de ce travail, présente les tests biologiques (activités antibactérienne et anti-oxydante) effectués sur les extraits végétaux des deux plantes étudiées. Pour finir, une description des techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées, ainsi qu'une conclusion de ce travail de recherche sont présentées.



# CHAPITRE I

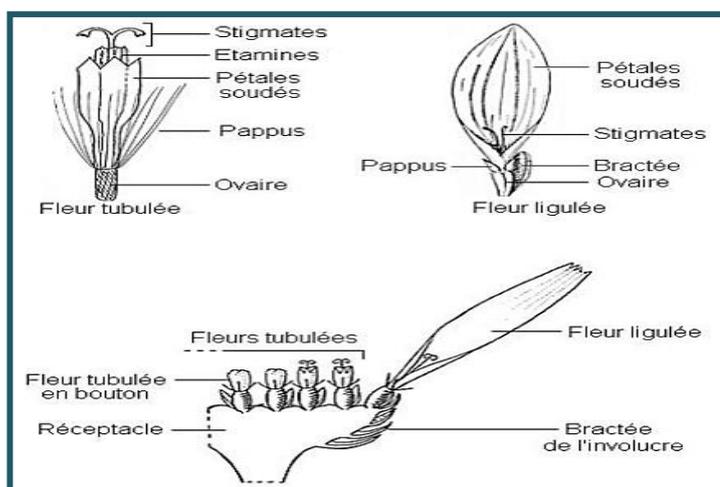
## Rappels bibliographiques

### I-1 Caractères botaniques de la famille Asteraceae

Les plantes de la famille Asteraceae se caractérisent surtout par leur inflorescence, des fleurs regroupées en capitules, plus ou moins fréquemment convexe, sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des involucre. <sup>[11]</sup>

Les fleurs (fleurons), stériles, unisexuées ou hermaphrodites, sont caractérisées par leurs anthères soudées, les ovules ont une position basale dans l'ovaire (Figure I.1). On peut les diviser en trois groupes suivant l'aspect des capitules : les tubuliflores, les liguliflores et les radiées. <sup>[12]</sup>

- Les premières ont une inflorescence uniquement composée de fleurs tubuleuses régulières, elles présentent des tubes terminés par des lèvres imperceptibles où s'ouvrent plus ou moins largement en cinq lobes (chardon, centauree).
- Les secondes composées uniquement de fleurons ligulés. Elles présentent des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, reconnaissables seulement aux dents de la languette (chicorée, laitue).
- Les dernières ont des fleurs tubuleuses régulières au centre (c'est ce qu'on appelle le disque) et des fleurs tubuleuses irrégulières ou ligulées tout autour en forme de couronne (marguerite, aster).



**Figure I.1 : Différents types de fleurons**

Le fruit des Astéracées est un akène indéhiscent, couronné, ou non, par le limbe du calice. <sup>[11]</sup>

La graine exalbuminée est dressée et son tégument est souvent soudé avec l'ovaire.

## I-2 Position systématique de la famille Asteraceae

Les plantes Asteraceae sont classées dans la famille des phanérogames regroupant le plus nombre d'espèces. Cette famille comprend plus de 1600 genres et environ 24000 espèces. <sup>[13]</sup> C'est une famille largement répandue dans le monde entier sauf l'Antarctique, mais ses plantes sont principalement localisées dans les régions tempérées. Elle se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme, sa grande variété écologique, son caractère cosmopolite. On y trouve surtout des plantes herbacées, vivaces et à feuilles alternes. <sup>[14]</sup>

La classification de la famille des Astéracées est très complexe et diverge selon les auteurs. Les plantes appartenant à cette famille ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches pour élaborer une classification plus précise de cette grande famille. Elle est partagée en de nombreuses tribus qui sont regroupées en 3 sous-familles par certains auteurs (Bremer et Jansen): Barnadesioideae, Asteroideae et Cichorioideae. <sup>[15-17]</sup>

Deux groupes de chercheurs (Baldwin et al.; Panero et Funk) <sup>[18-21]</sup> ont récemment élaboré un nouveau système de classification basé sur des critères de la phylogénie moléculaire. Ils ont pris en compte tous les caractères héréditaires, depuis ce qui est visible (base des classifications traditionnelles) jusqu'aux séquences d'ADN, en passant par les protéines et les données de la paléontologie, divisant cette famille en 12 sous-familles et 43 tribus. Ces sous-familles sont : Barnadesioideae, Stiffioideae, Mutisioideae, Wunderlichioideae, Gochnatioideae, Hecastocleidoideae, Carduoideae, Pertyoideae, Gymnarrhenioideae, Cichorioideae, Corymbioideae et Asteroideae. Parmi ces tribus on peut citer: Barnadesieae, Stiffieae, Nassauvieae, Dicomeae, Tarchonantheae, Arctotideae, Astereae, Anthemideae, Heliantheae, Cichorieae et Cardueae.

## I-3 Tribu des Cardueae

La division des plantes Asteraceae en tribus et sous-tribus a fait l'objet de nombreuses publications et propositions de modifications et de reclassements. Nous présentons ici la classification systématique la plus largement admise, stipulant que le genre *Atractylis* appartient à la sous-famille des Carduoideae et à la sous-tribu Carlininae de la tribu des Cardueae. Cette dernière comprend environ 74 genres et 2500 espèces. <sup>[16]</sup> Il s'agit d'une tribu monophylétique, bien individualisée, mais la systématique de cette tribu est sujette à controverse.

- Cassini (1819), a considéré les Cardueae comme étant une tribu divisée en deux sous-tribus, les Carduinae et les Centaureinae. <sup>[22]</sup>
- Bentham (1873) et Hoffmann (1894) ont divisé la tribu des Cardueae en quatre sous-tribus Echinopinae, Carlininae, Carduinae et Centaureinae. Cette classification a beaucoup été utilisée durant le 19<sup>ème</sup> siècle. <sup>[23,24]</sup>
- Plus récemment, Wagenitz (1976) a proposé la ségrégation de la sous-tribu Echinopinae comme une tribu séparée, appelée Echinopeae. <sup>[25]</sup>
- Dittrich (1977) a adopté quant à lui la classification de Cassini (1819). <sup>[26]</sup>
- Finalement, Bremer (1994), Susanna & al. (1995) et Garcia-Jacas & al. (2002) ont subdivisé la tribu Cardueae en 4 sous-tribus. Deux sont relativement petites, les Carlininae et les Echinopsidinae alors que les deux autres, les Carduinae et les Centaureinae regroupant notamment plus de genres sont très riches en espèces. <sup>[6,7,16]</sup>

#### I-4 Présentation du genre *Atractylis*

Le genre *Atractylis* de la famille Asteraceae comprend environ 30 espèces dont 16 en Afrique du nord. <sup>[1,11]</sup> Les *Atractylis* sont des plantes herbacées très épineuses annuelles, bisannuelles ou vivaces, à aspect de petits chardons. Localement, elles sont appelées «Assenane awragh».

Les capitules sont entourés par les feuilles supérieures (feuilles involuquées) et dont les bractées externes sont elles-mêmes épineuses; akènes velus surmontés d'une aigrette blanche très fournie. <sup>[11]</sup>

Le genre *Atractylis* est classé comme suit :

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Spermaphytes

**Classe** : Dicotylédone

**Ordre** : Aster

**Famille** : Asteraceae

**Sous-famille** : Carduoideae

**Tribu** : Cardueae

**Sous-tribu** : Carlininae

**Genre**: *Atractylis* L.

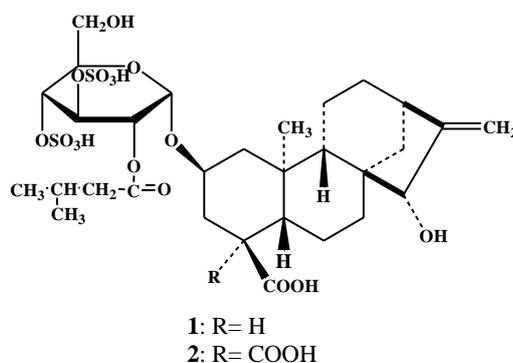
### I-5 Etudes phytochimiques antérieures sur la sous-tribu Carlininae

Les plantes appartenant à la sous-tribu Carlininae qui comprend les genres *Atractylis*, *Carlina* et *Atractylodes* ont fait l'objet, ces dernières années, de plusieurs études phytochimiques à travers le monde.

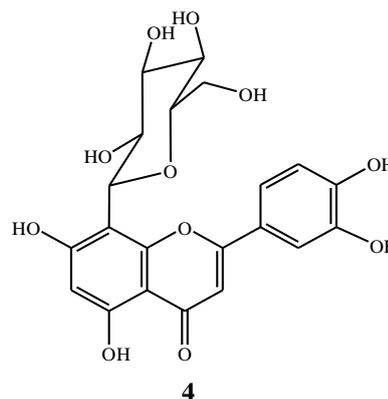
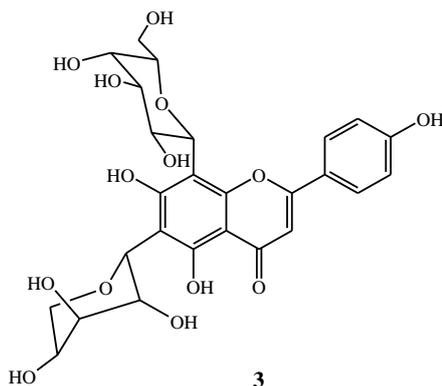
L'ensemble des composés isolés et identifiés dans la sous-tribu Carlininae est très hétérogène. Ainsi, les métabolites secondaires les plus rencontrés sont des polyphénols, triterpènes, stérols, sesquiterpènes et composés acétyléniques, dont nous allons donner quelques exemples de structures.

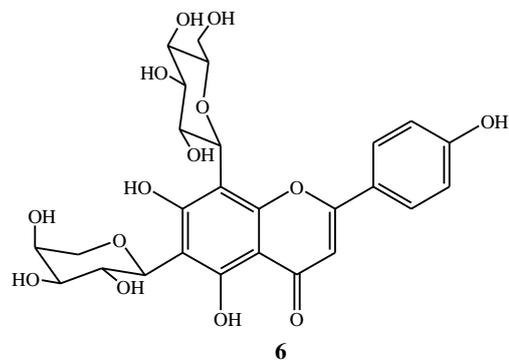
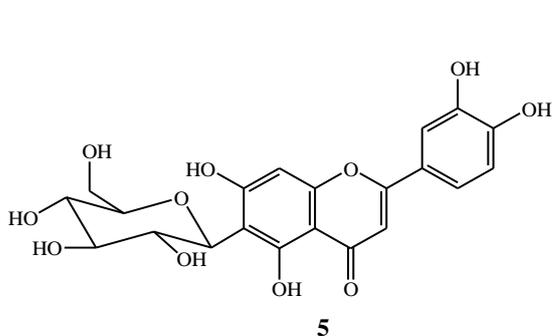
#### I-5-1 Genre *Atractylis*

- *Atractylis gummifera* L., ou chardon à glu, est une plante toxique méditerranéenne, distribuée spécifiquement en Afrique du nord. Elle se caractérise par la production de deux métabolites hautement toxiques, appelés atractyloside (1) et carboxyatractyloside (2). Ce sont deux diterpènes à squelette *ent*-kaurene qui ont été isolés par HPLC de l'extrait méthanolique des racines de cette plante. [27]

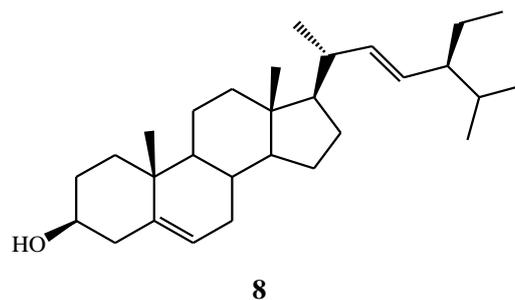
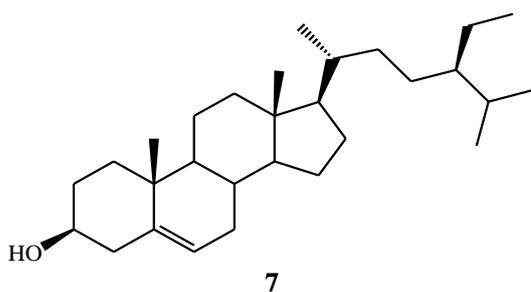


- Le composé Neocorymboside (3), un flavonoïde C-glycosylé, a été isolé des racines de l'espèce *Atractylis gummifera* collectées d'Algérie. [28] Egalement l'orientine (4), homoorientine (5) et isoschaftoside (6) ont été trouvés dans les feuilles de cette plante. [29]



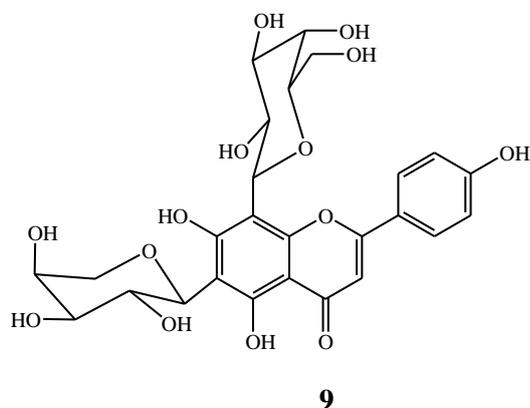


- Deux phytostérols ont été isolés de l'extrait éther de pétrole des parties aériennes de la plante *Atractylis cancellata* :  $\beta$ -sitostérol (7) et stigmastérol (8).<sup>[30]</sup>



### I-5-2 Genre *Carlina*

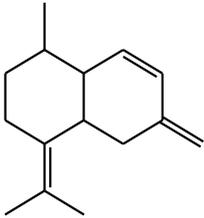
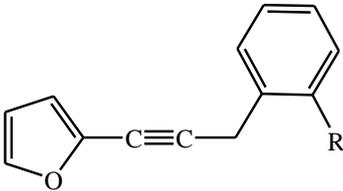
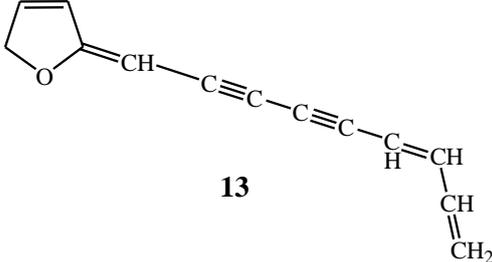
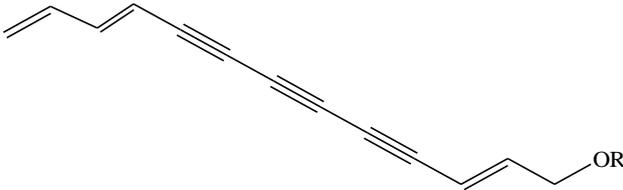
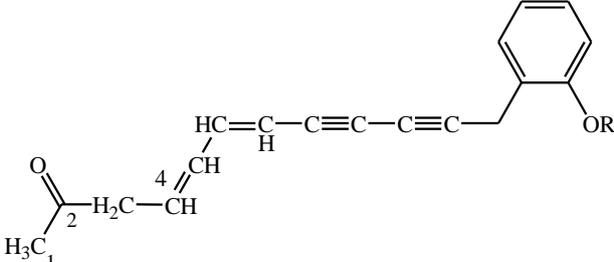
- Corymboside (9) a été isolé de la fraction *n*-butanolique de l'extrait hydro-méthanolique des racines de la plante *Carlina corymbosa*.<sup>[31]</sup>

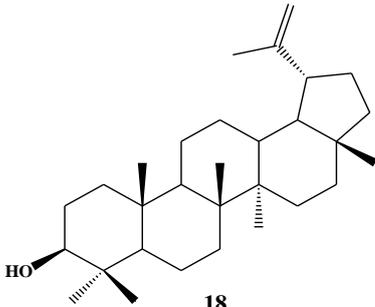
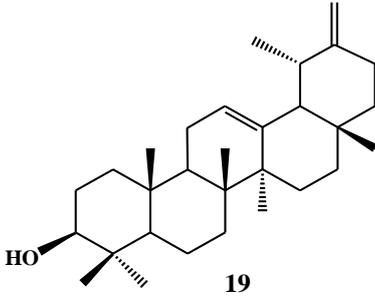
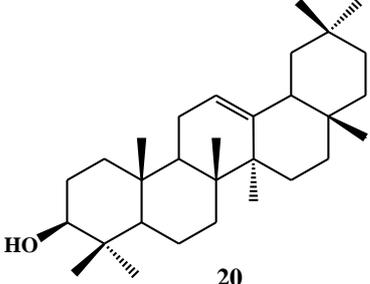
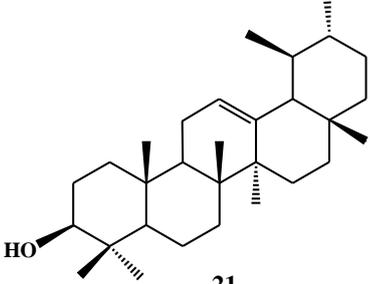
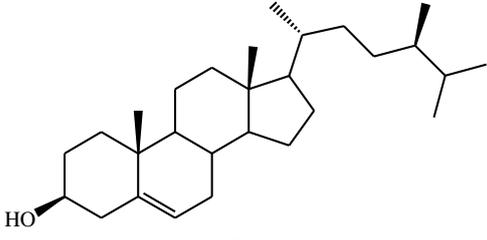
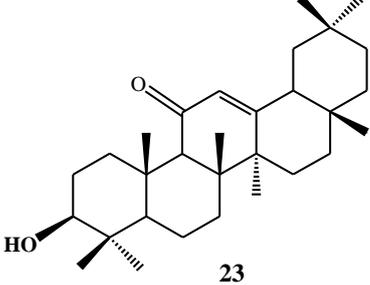
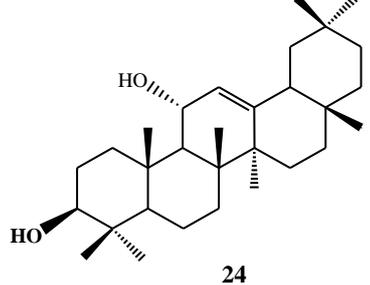
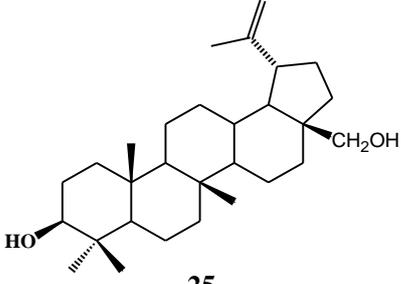
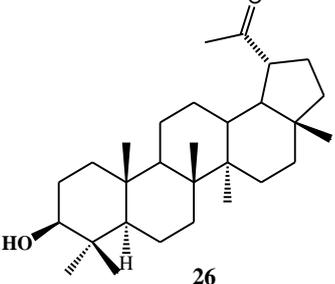


- Outre la présence de C-flavonoïde, le genre *Carlina* contient quelques métabolites secondaires tels que les composés acétyléniques, sesquiterpènes, triterpènes et phytostérols.

Différentes études chimiques ont permis l'identification, à partir de *Carlina diae* et de *Carlina corymbosa* var. *globosa*, un sesquiterpène  $\beta$ -sesquiphellandrène (**10**) et une série d'acétylènes (**11-17**) ainsi que des triterpènes pentacycliques (**18-26**) (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Différentes classes de métabolite secondaire isolées du genre *Carlina*

| Plantes   | Molécules  | Réf.   |     |
|---|--|--|-----|
| <i>Carlina diae</i>   |  <p style="text-align: center;"><b>10</b><br/><math>\beta</math>-sesquiphellandrène</p>   |  <p><b>11:</b> R=H    carlina oxide<br/><b>12:</b> R=OMe    13-méthoxy carlina oxide</p> | [8] |
|   |  <p style="text-align: center;"><b>13</b><br/>2-Nona-6,8-diène-2,4-diynylidène-2,5-dihydro-furane</p>   |  |     |
|   |  <p><b>14:</b> R= Ac    Acétique acide trideca-2,10,12-triène-4,6,8-triynyl ester<br/><b>15:</b> R= H    Trideca-2,10,12-triène-4,6,8-triyn-1-ol</p> |  |     |
|  <p><b>16:</b> R= Ac    Acétique acide 2-(11-oxo-dodeca-6,8-diène-2,4-diynyl)-phényl ester<br/><b>17a:</b> R= H    12-(2-hydroxy-phényl)-dodeca-4,6-diène-8,10-diyn-2-one<br/><b>17b:</b> R= Me    12-(2-méthoxy-phényl)-dodeca-4,6-diène-8,10-diyn-2-one</p> |  |  |     |

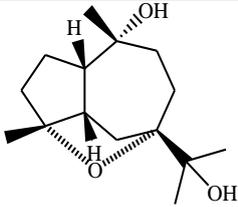
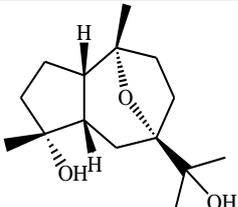
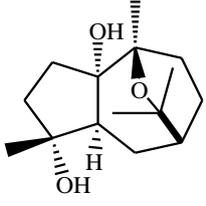
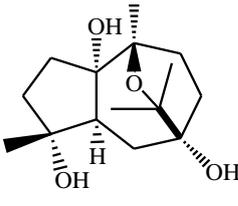
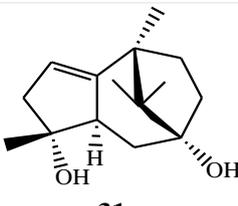
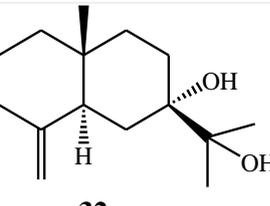
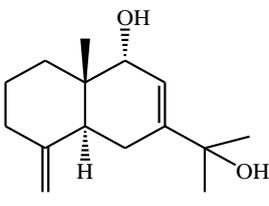
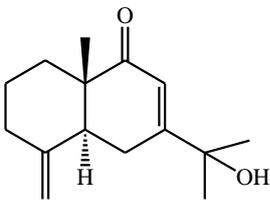
|  |  |  |             |
|--|--|--|-------------|
|  |  <p>18<br/>Lupéol</p>             |  <p>19<br/>Taraxastérol</p>                |             |
|  |  <p>20<br/>β-amyrine</p>          |  <p>21<br/>α-amyrine</p>                   |             |
| <p><i>Carlina<br/>corymbosa<br/>var. globosa</i></p> |  <p>22<br/>Campestérol</p>      |  | <p>[32]</p> |
|  |  <p>23<br/>11-oxo-β-amyrine</p> |  <p>24<br/>11α-hydroxy-β-amyrine</p>     |             |
|  |  <p>25<br/>Bétuline</p>         |  <p>26<br/>30-nor-lupan-3β-ol-20-one</p> |             |

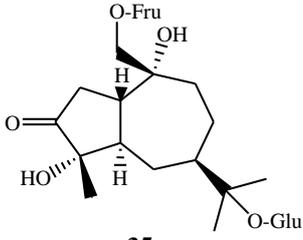
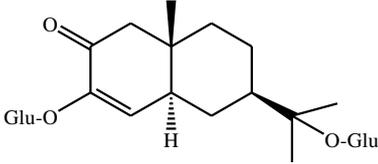
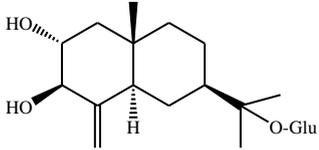
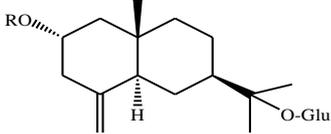
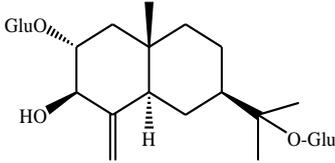
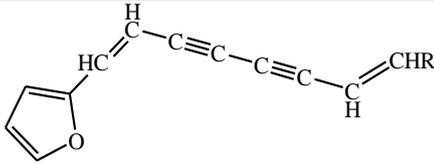
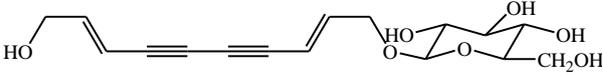
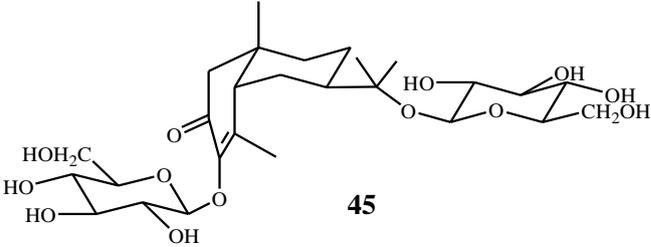
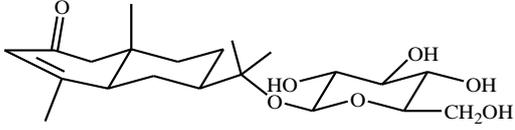
I-5-3 Genre *Atractylodes*

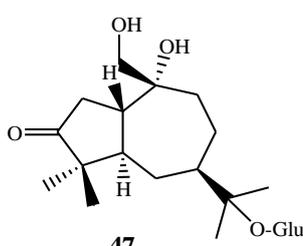
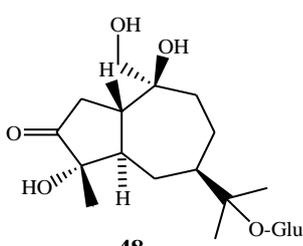
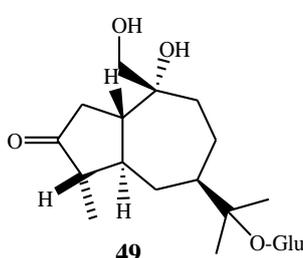
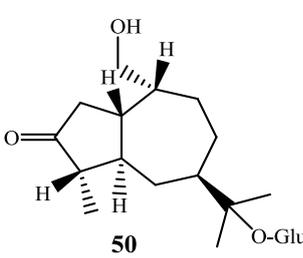
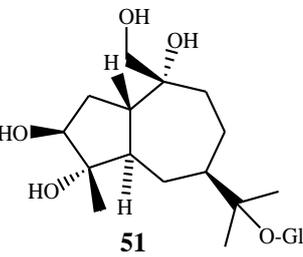
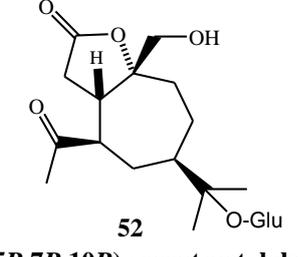
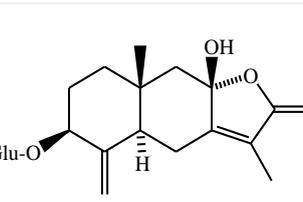
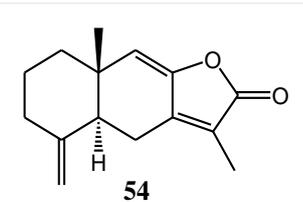
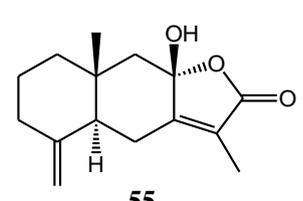
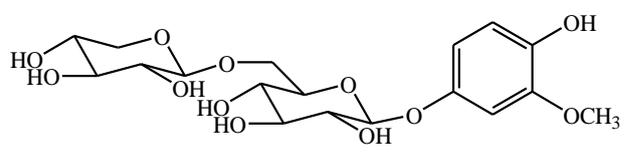
La recherche bibliographique réalisée montre bien une grande diversité du métabolisme secondaire au niveau de ce genre. Il est important de souligner que les sesquiterpènes s'y trouvent majoritairement.

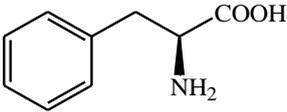
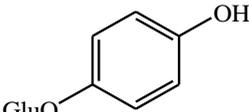
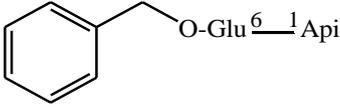
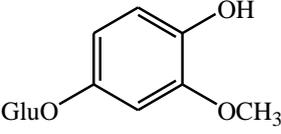
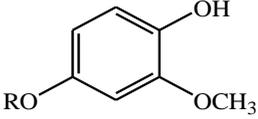
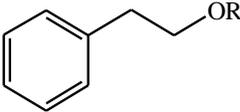
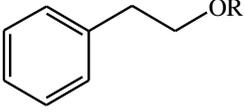
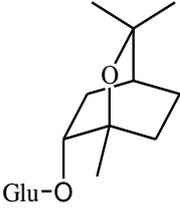
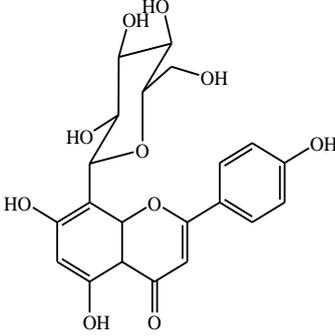
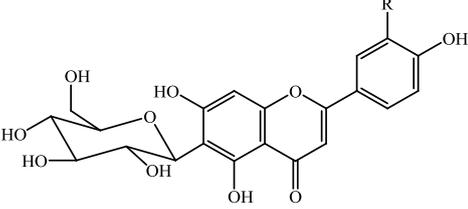
Les études chimiques de rhizomes des espèces *A. lancea*, *A. japonica*, *A. ovata*, et *A. macrocephala*, plantes asiatiques réputées dans la médecine traditionnelle chinoise, ont permis d'isoler des sesquiterpènes et sesquiterpènes glycosylés de type guainane et eudesmane ainsi que des acétylènes, phénols glycosylés, coumarines, flavonoïdes C-glycosylés et terpènes (Tableau I.2).

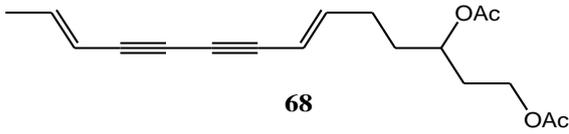
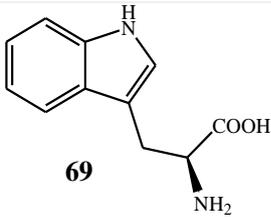
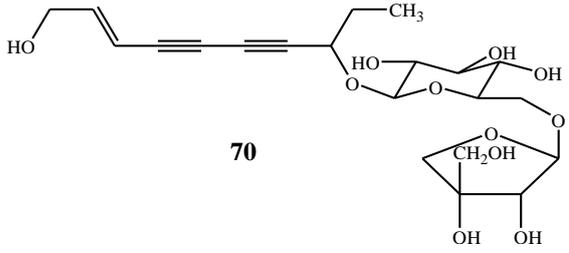
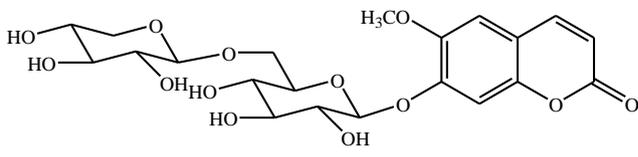
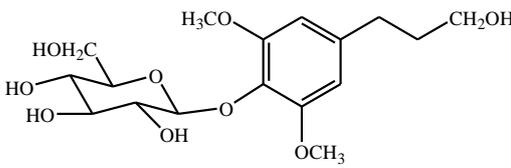
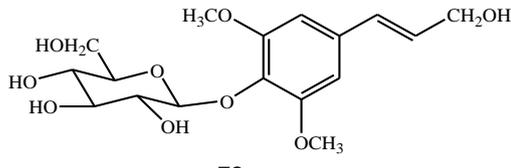
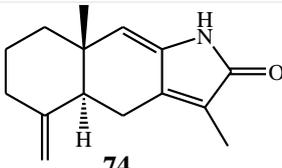
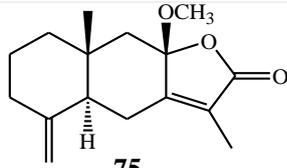
Tableau I.2 : Différentes classes de métabolites secondaires isolées du genre *Atractylodes*

| Plantes                    | Molécules   |   | Réf.      |
|----------------------------|---|---|-----------|
| <i>Atractylodes lancea</i> |   |   | [9,33,34] |
|                            | 27<br>4α,7α-epoxyguaiane-10α,11-diol  | 28<br>7α,10α-epoxyguaiane-4α,11-diol  |           |
|                            |  |  |           |
|                            | 29<br>10β,11β-epoxyguaiane-1α,4α-diol   | 30<br>10β,11β-epoxyguaiane-1α,4α,7α-triol   |           |
|                            |  |   |           |
|                            | 31<br>1-patchoulène-4α,7α-diol  | 32<br>Eudesm-4(15)-èn-7α,11-diol  |           |
|                            |  |   |           |
|                            | 33<br>Eudesm-4(15),7-dièn-9α,11-diol  | 34<br>Eudesm-4(15),7-dièn-11-ol-9-one   |           |

|                                   |  |   |
|-----------------------------------|--|---|
|                                   |  <p><b>35</b><br/><b>Atractyloside A 14-O-β-D-fructofuranoside</b></p>                                      |  <p><b>36</b><br/><b>Atractyloside I</b></p>  |
|                                   |  <p><b>37</b><br/><b>Atractyloside G</b></p>  |  <p><b>38: R= H</b>      <b>Atractyloside C</b><br/><b>39: R= Glu</b>     <b>Atractyloside D</b><br/><b>40: R= Glu (6-1) Api</b> <b>Atractyloside E</b></p> |
| <p><i>Atractylodes lancea</i></p> |  <p><b>41</b><br/><b>Atractyloside G 2-O-β-D-glucopyranoside</b></p>                                       |   |
|                                   |  <p><b>42: R= CH3</b>      <b>Atractylodine</b><br/><b>43: R= OCH3</b>    <b>9-nor-atractylodine</b></p> |   |
|                                   |  <p><b>44</b><br/><b>(2E,8E)-decadien-4,6-diyn-1,11-diol 1-O-β-D-glucopyranoside</b></p>                 |   |
|                                   |  <p><b>45</b><br/><b>Cis-atractyloside I</b></p>   |   |
|                                   |  <p><b>46</b><br/><b>(5R,7R,10S)- isoptercarpolone β-D-glucopyranoside</b></p>                           |   |

|                                     |   |  |         |
|-------------------------------------|---|--|---------|
|                                     |  <p><b>47</b><br/><b>Atractyloside A</b></p>   |  <p><b>48</b><br/><b>10-<i>epi</i>-Atractyloside A</b></p>   |         |
|                                     |  <p><b>49</b><br/><b>(1<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,7<i>R</i>,10<i>R</i>)-10,11,14-trihydroxyguai-3-one 11-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glucopyranoside</b></p> |  <p><b>50</b><br/><b>(1<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>R</i>,7<i>R</i>,10<i>R</i>)-11,14-dihydroxyguai-3-one 11-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glucopyranoside</b></p> |         |
|                                     |  <p><b>51</b><br/><b>Atractyloside B</b></p>  |  <p><b>52</b><br/><b>(1<i>S</i>,5<i>R</i>,7<i>R</i>,10<i>R</i>)-secoattractylolactone 11-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glucopyranoside</b></p>              | [35-37] |
| <p><i>Atractylodes japonica</i></p> |  <p><b>53</b><br/><b>(3<i>S</i>)-3-hydroxyattractylenolide III 3-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glucopyranoside</b></p>   |  <p><b>54</b><br/><b>Atractylonide I</b></p>   |         |
|                                     |  <p><b>55</b><br/><b>Atractylonide III</b></p>  |  |         |
|                                     |  <p><b>56</b><br/><b>4-hydroxy-3-méthoxyphényl β-<i>D</i>-xylopyranosyl (1-6)-β-<i>D</i>-glucopyranoside</b></p>                                    |  |         |

|                                     |   |   |
|-------------------------------------|---|---|
| <p><i>Atractylodes japonica</i></p> |  <p><b>57</b><br/><b>L-phénylalanine</b></p>   |  <p><b>58</b><br/><b>Seguinose B</b></p>   |
|                                     |  <p><b>59</b><br/><b>Icariside F<sub>2</sub></b></p>   |  <p><b>60</b><br/><b>4-hydroxy-3-méthoxyphénol β-D-glucopyranoside</b></p>          |
|                                     |  <p><b>61:</b> R= Glu (6-1)Api<br/><b>4-hydroxy-3-méthoxyphénol β-D-apiopyranosyl(1-6)-β-D-glucopyranoside</b></p> |  <p><b>62:</b> R= Glu (6-1)Api<br/><b>Icariside D<sub>1</sub></b></p>              |
|                                     |  <p><b>63:</b> R= Glu (6-1) Rha<br/><b>Phenethyl α-L-rhamnopyranosyl (1-6)- β -D-glucopyranoside</b></p>          |  <p><b>64</b><br/><b>(1R,2R,4S)-2-hydroxy-1,8-cineole β-D-glucopyranoside</b></p> |
|                                     |  <p><b>65</b><br/><b>Vitexine</b></p>   |   |
|                                     |  <p><b>66:</b> R= H      <b>Isovitexine</b><br/><b>67:</b> R= OH     <b>Isoorientine</b></p>                    |   |

|                                  |   |      |
|----------------------------------|---|------|
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>68</b><br/><b>Diacetyltractylodiol (TDEYA)</b></p>   |      |
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>69</b><br/><b>L-tryptophane</b></p>  |      |
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>70</b><br/><b>(2E)-decene-4,6-diyne-1,8-diol 8-O-β-D-apiofuranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside</b></p> |      |
| <i>Atractylodes ovata</i>        |  <p style="text-align: center;"><b>71</b><br/><b>Scopoletine β-D-xylopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside</b></p>                       | [9]  |
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>72</b><br/><b>Dihydroxyrindine</b></p>   |      |
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>73</b><br/><b>Syringine</b></p>  |      |
| <i>Atractylodes macrocephala</i> |  <p style="text-align: center;"><b>74</b><br/><b>Atractylenolactame</b></p>  | [38] |
|                                  |  <p style="text-align: center;"><b>75</b><br/><b>8β-méthoxyasterolide</b></p>   |      |

### I-6 Activités biologiques

Une étude biologique effectuée sur la plante *Atractylis carduus* poussant en Egypt, a révélé que les extraits méthanolique et hexanique des parties aériennes de cette espèce présentent une activité antibactérienne remarquable. En effet, cette étude a montré que ces extraits possèdent un effet sur les bactéries Gram positif (*staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*) et Gram négatif (*klepsiella pneumonia*).<sup>[39]</sup>

Une autre étude réalisé sur les extraits hexanique, acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux des parties aériennes de la plante *Atractylis serratuloïdes* poussant en Tunisie a montré que l'extrait acétate d'éthyle est actif vis-à-vis des bactéries *pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *salmonella enterica*.<sup>[40]</sup>

L'extrait méthanolique ainsi que les extraits *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH des racines de la plante *Atractylodes japonica* ont subi une investigation biologique en vue d'évaluer leurs propriétés antimicrobiennes. Les résultats ont révélé que ces extraits sont très actifs contre la souche *staphylococcus aureus*.<sup>[41]</sup>

### I-7 Utilisation en médecine traditionnelle

La phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes - ou la seule "partie active"- ayant des propriétés thérapeutiques. Elles sont regroupées dans la catégorie des plantes médicinales. L'utilisation thérapeutique des plantes et surtout leur choix ne se trouvent pas dans leur origine systématique, mais bien dans les découvertes fortuites de leurs propriétés thérapeutiques de façon empirique au cours des siècles. Ce qui a permis à l'humanité d'accumuler d'importantes connaissances sur les plantes médicinales et de transmettre leurs vertus de génération à génération.

Beaucoup d'espèces de la sous-tribu Carlininae ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique :

*Atractylis gummifera* L.: est une Astéracée connue sous le nom de chardon à glu (Addâd ou choûk el-eulk). Au Maroc en usage interne, la racine desséchée est utilisée pour arrêter les hémorragies et pour provoquer les vomissements (les émétiques). La plante, particulièrement sa racine, est utilisée comme narcotique. Elle est utile contre l'épilepsie et l'hystérie et guérit les œdèmes. Elle est aussi reconnue pour ses propriétés diurétiques et antipyrétiques, et pour le traitement des parasites intestinaux et les ulcères ainsi que des morsures de serpents. En

fumigations, on l'emploie dans le traitement des rhumes, des vertiges, des céphalées et des paralysies. En usage externe, le chardon à glu est utilisé pour ses propriétés cicatrisantes en applications locales, en frictions ou en cataplasmes, dans le traitement de la gale, des taches de rousseur, des boutons d'acné, des chancres syphilitiques, des abcès et des furoncles.

Mais ce chardon est très toxique du fait de la présence en quantité importante d'atractyloside et carboxyatractyloside ou gummiférine dans les racines de la plante. Ces molécules sont des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative de la mitochondrie.<sup>[42,43]</sup>

Le genre *Atractylodes* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle chinoise et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été démontrées par des études scientifiques. Les rhizomes de ces espèces sont prescrits comme médicaments gastriques ou diurétiques.<sup>[9]</sup>

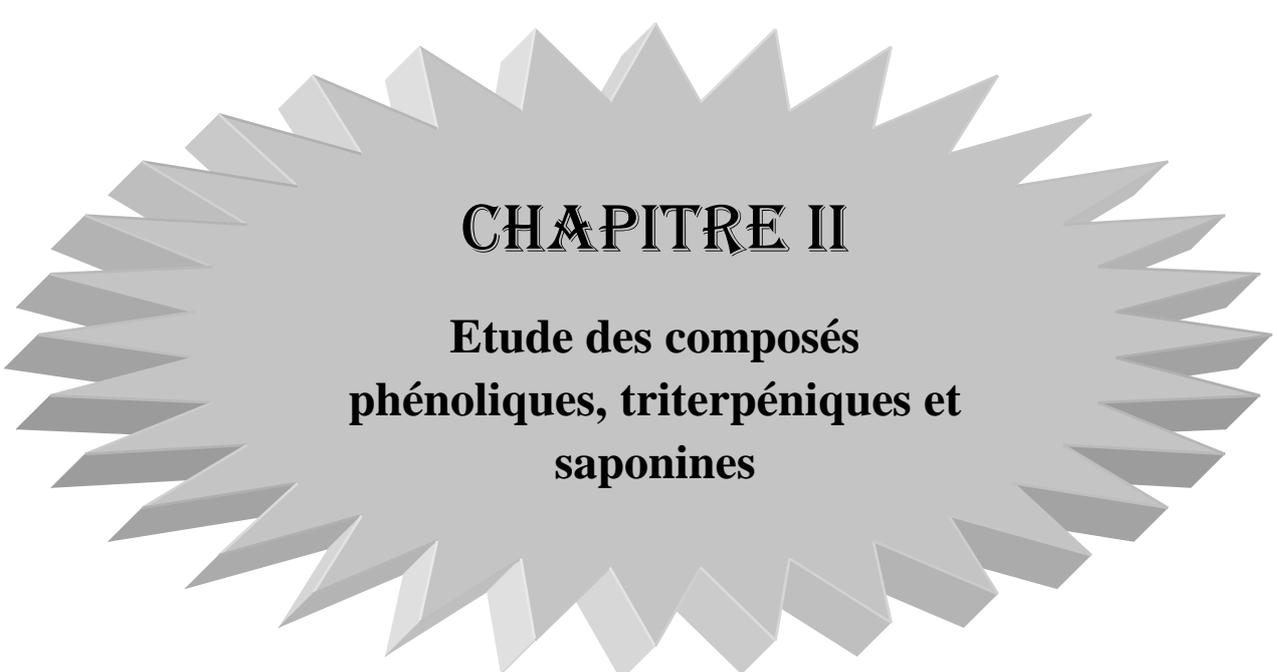
L'espèce *Atractylodes macrocephala* est utilisée pour le traitement des maladies du cœur, la rate, les poumons et l'estomac.<sup>[44]</sup>

Les plantes appartenant au genre *Carlina* sont reconnues pour leurs effets diurétique et diaphorétique. Elles sont utilisées pour traiter les troubles de reins, l'inflammation de peau, et les perturbations gastro-intestinales; à titre d'exemples :

Les racines de *Carlina acanthifolia* All. sont utilisées, en médecine traditionnelle italienne, comme diurétique et cholagogue. Des études ont montré que les racines de cette plante participent à la promotion de la transpiration et la sécrétion, par contre en Bulgarie elles ont des propriétés anti-inflammatoires et diurétiques.<sup>[45,46]</sup>

La décoction de *Carlina utzka* Hacq. et *Carlina acaulis* L. var. *sylvestris* est un remède pour la mauvaise haleine.<sup>[47]</sup>

*Carlina canariensis* Pit. est utilisée comme laxatif et *Carlina salicifolia* (L. fil.) Cav. est employée comme fourrage pour bétail.<sup>[48]</sup>



## **CHAPITRE II**

**Etude des composés  
phénoliques, triterpéniques et  
saponines**

## II-1 Composés phénoliques

### II-1-1 Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille. Le terme « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de molécules divisé en une dizaine de classes chimiques, selon le nombre d'unités phénoliques présentes. Elles présentent un point commun: la présence dans leur structure d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. <sup>[49]</sup>

Ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones. <sup>[50]</sup> Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

### II-1-2 Flavonoïdes

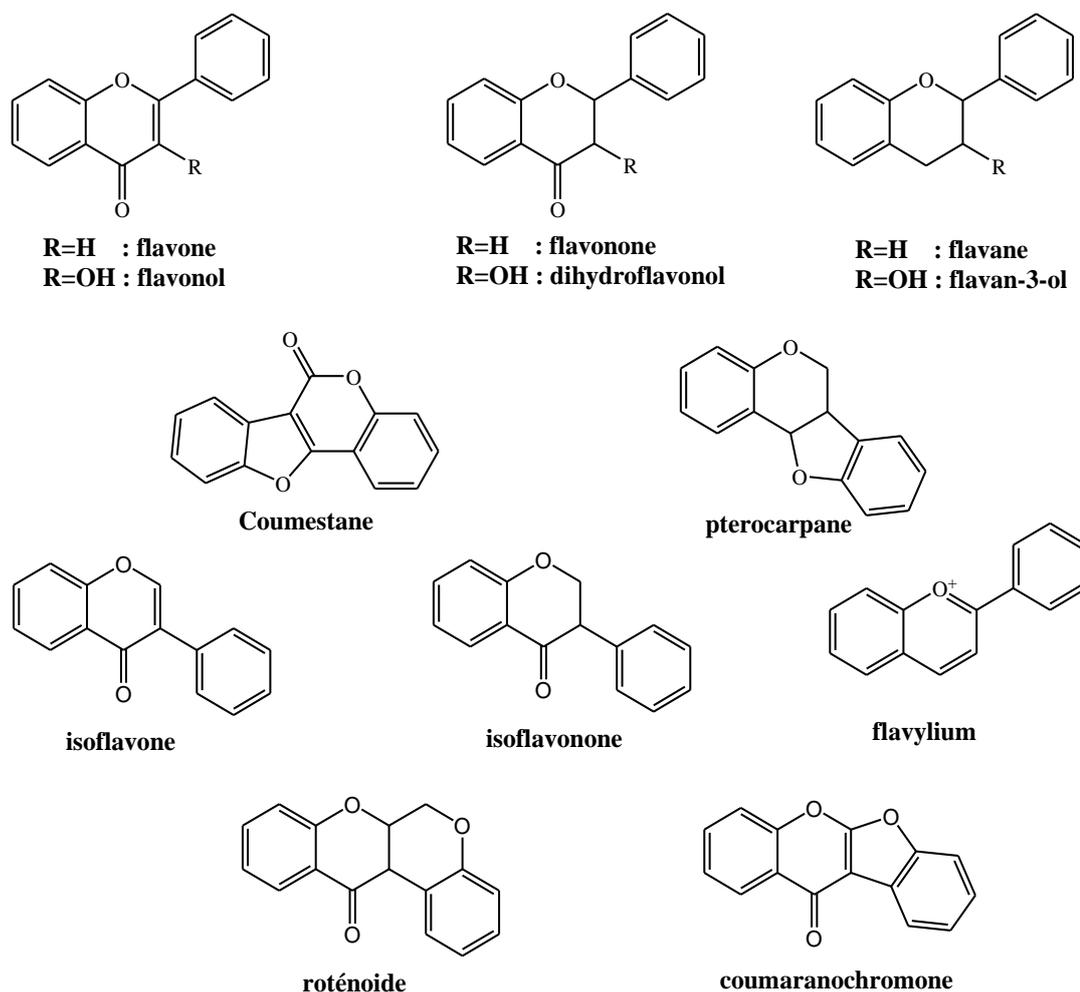
Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes, et à ce jour, plus de 6500 structures naturelles ont été isolées et caractérisées, répartie en 12 squelettes de base. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C<sub>15</sub> caractérisée par un enchaînement C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (1,3-diphénylpropane); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Figure II.1). <sup>[51]</sup>



**Figure II.1 : Structures de base des flavonoïdes**

#### II-1-2-1 Structures chimiques et classification

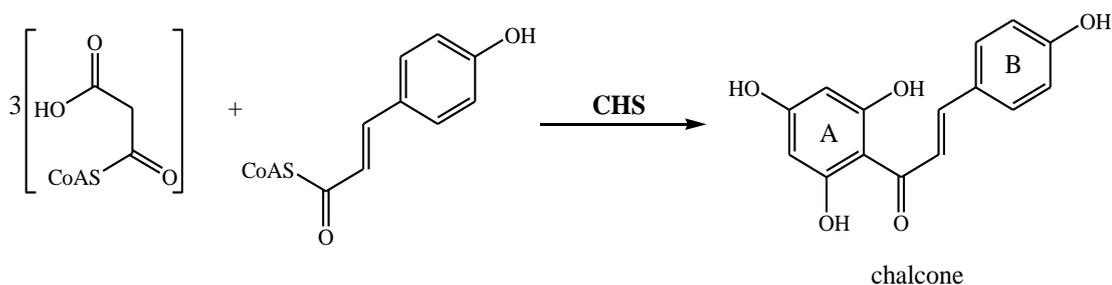
Les flavonoïdes se répartissent en: flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavyliumes, chalcones, auronnes, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes,... etc. (Figure II.2).



**Figure II.2: Structures des différents squelettes des flavonoïdes**

### II-1-2-2 Biosynthèse des flavonoïdes

Au plan biosynthétique, les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune, ils résultent de la condensation de 3 unités de malonyl-CoA en formant le noyau A, et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase (CHS), enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes, qui conduit à un précurseur appelé la chalcone (Figure II.3).



**Figure II.3: Formation de la chalcone**

La chalcone néoformée donne une 2S-flavanone (la naringénine), par une transformation stéréospécifique catalysée par une chalcone isomérase (CHI). La naringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses (Figure II.4). Les flavonesynthases (FSI) introduisent une double liaison en 2,3 pour donner une flavone. La flavanone-3-hydroxylase (F3H) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une 2S-flavanone pour donner un (2R,3R)-dihydroflavonol. Le dihydroflavonol peut ensuite être transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS), ou bien en leucoanthocyanidine par la dihydroflavonol réductase (DFR). L'anthocyanidine synthase (ANS) conduit ensuite à l'anthocyanidine qui va, à son tour, être glycosylée par la glycosyltransférase (GT) formant une anthocyanine, la pélargonidine-3-O-glucoside. La catéchine est formée par action de DFR sur la leucoanthocyanidine. [52]

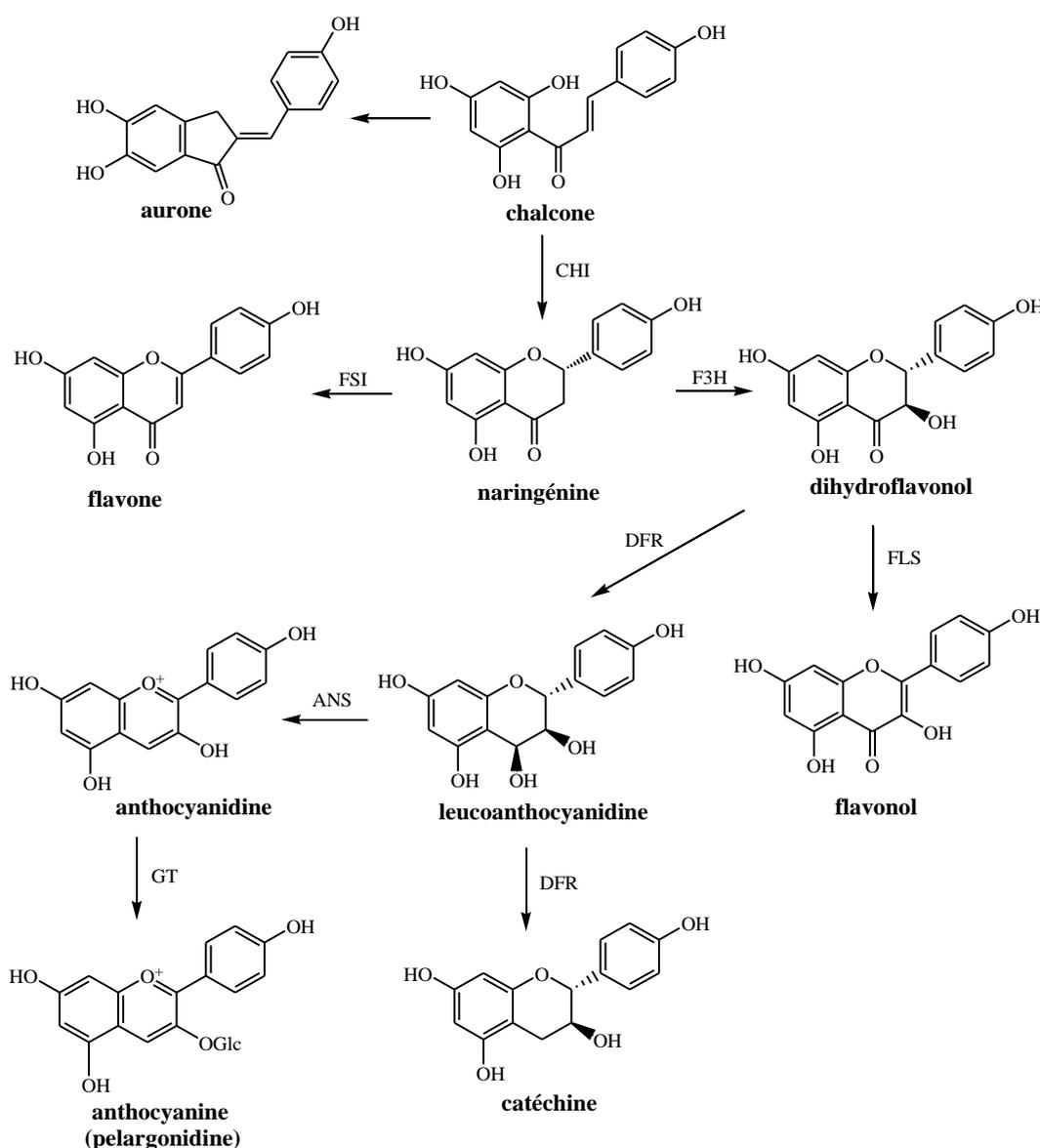


Figure II.4: Schéma conduisant aux différentes classes de flavonoïdes

### II-1-2-3 Substitution du squelette flavonoïde

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C. Par ailleurs, au sein d'une même sous-classe, les possibilités de substitution des cycles A et B sont multiples : onze carbones du squelette flavonoïde peuvent porter un substituant de type hydroxyle, méthoxyle, méthyle, isoprényle ou benzyle. Chaque groupement hydroxyle, ainsi que certains carbones, peuvent être conjugués avec un sucre et le glycoside correspondant peut être acylé à partir d'un acide phénolique ou aliphatique.

#### II-1-2-3-1 L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavonoïdes, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone. <sup>[53]</sup>

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 2', 5', 6') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases). <sup>[54,55]</sup>

#### II-1-2-3-2 La méthylation ou méthylation

La méthylation s'effectue en C-6 et/ou C-8 par contre la méthylation se fait après la fixation du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (*O*-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur de méthyle à partir de la *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone. <sup>[56,57]</sup>

Cette réaction de méthylation peut se faire aussi sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3), après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols. <sup>[56]</sup>

#### II-1-2-3-3 L'*O*-glycosylation

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose, arabinose,... etc). L'*O*-glycosylation se fait en présence de l'enzyme glycosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose).

### II-1-2-3-4 La C-glycosylation

Les C-glycosyl flavonoïdes sont présents dans de très nombreux végétaux que ce soit dans les tiges, <sup>[58,59]</sup> les feuilles <sup>[60-62]</sup> ou les fruits. <sup>[63,64]</sup> Ils possèdent des propriétés anti-agrégantes et des activités hypotensives et anti-oxydantes.

Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide. <sup>[65]</sup> D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et/ou en position C-8.

Ils peuvent être divisés en quatre groupes selon le nombre d'unités osidiques qu'ils portent et le type de glycoside :

- Les mono-C-glycosyl flavonoïdes ;
- Les di-C-glycosyl flavonoïdes ;
- Les O-glycosyl-C-glycosyl flavonoïdes ;
- Les O-acétyl-C-glycosyl flavonoïdes.

### II-1-3 Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses. Plusieurs études ont été réalisées sur l'impact de la consommation de végétaux sur la santé. La plupart d'entre elles ont mis en évidence une baisse du facteur de risque pour de nombreuses affections telles que l'infarctus et le cancer. <sup>[66-68]</sup>

#### II-1-3-1 Chez les plantes

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains nombre de fonctions telles que:

- La physiologie de la plante (lignification et contrôle de la croissance);
- Les interactions plantes-microorganismes (avec les bactéries, les champignons, les insectes et résistance aux UV);
- La pigmentation des fleurs, des fruits et des graines. De ce fait, ils jouent un rôle important dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines;
- La fertilité des plantes et la germination du pollen. <sup>[69]</sup>

### II-1-3-2 Chez les humains

Les composés phénoliques font partie d'un groupe de métabolites secondaires possédant nombreuses propriétés thérapeutiques. Ils sont exploités en phytothérapie à cause de leur rôle dans la protection contre certaines maladies. <sup>[69]</sup> On attribue aux flavonoïdes, spécifiquement, des propriétés variées telles que leur rôle dans la pigmentation des végétaux, leur actions anti-radicalaires et anti-oxydantes.

Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau II.1.

**Tableau II.1 : Différentes activités biologiques des polyphénols**

| Polyphénols        | Activités biologiques  | Réf.    |
|--------------------|--|---------|
| Acides phénoliques | anti-ulcéreuses  | [70]    |
| Coumarines         | anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiparasitaires, antitumorales et analgésiques   | [71-76] |
| Flavonoïdes        | antitumorales, antiparasitaires, antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène et anti-oxydantes. | [77-87] |
| Tannins            | anti-oxydantes et antiparasitaires   | [88,89] |
| Lignanes           | anti-inflammatoires, analgésiques et antiparasitaires  | [90-96] |

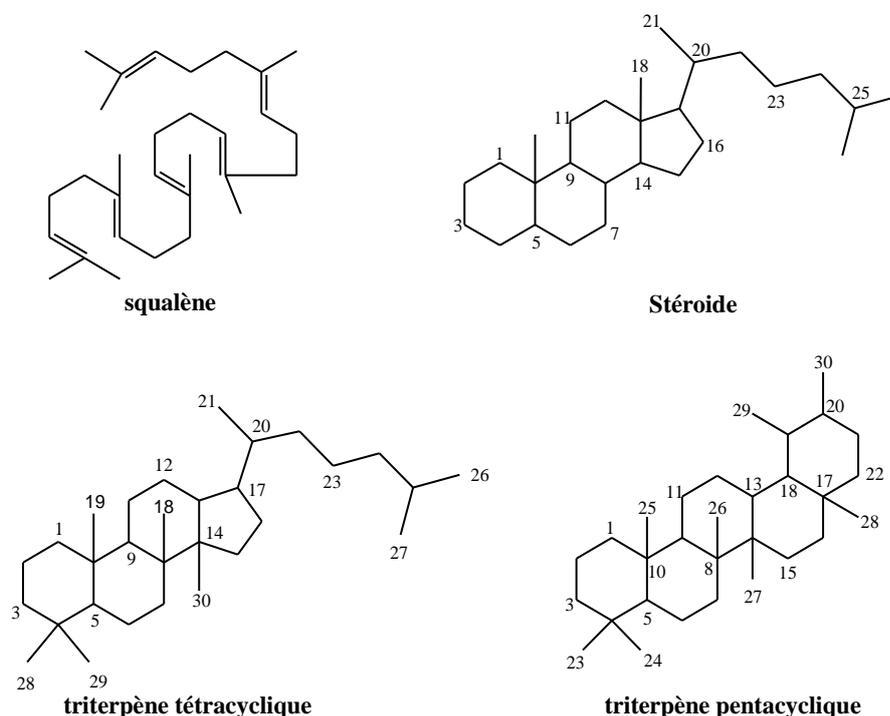
## II-2 Composés triterpéniques

### II-2-1 Introduction

Les triterpénoïdes sont une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C<sub>30</sub>, ce groupe est très répandu dans le règne végétal et animal. Ces composés sont issus de la cyclisation de l'époxysqualène et quelque fois du squalène. <sup>[49, 97,98]</sup>

Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3 étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. On dénombre plus de 4000 triterpènes, dérivés de plus de 40 types de squelettes, isolés des sources végétales. Ils peuvent être classés en trois groupes <sup>[99]</sup> (Figure II.5) :

- Acyclique comme le squalène, surtout rencontré dans le règne animal et qui se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide);
- Composés tétracycliques tels que les stéroïdes, les phytostérols et les cycloartanes;
- Composés pentacycliques très fréquents chez les plantes comme les  $\alpha$  et  $\beta$  amyrynes.



**Figure II.5 : Différentes classes de triterpénoïdes**

### II-2-2 Biosynthèse des triterpènes

Les triterpènes sont produits à partir du squalène, lui-même formé par la condensation de deux unités farnésyl de pyrophosphate (FPP) via la condensation d'unités isopréniques par la voie mévalonique (Figure II.6), qui se déroule comme suit :

Deux molécules d'acétyl-CoA réagissent ensemble en donnant naissance à l'acétoacétyl-CoA, lequel en fixant une troisième molécule d'acétyl-CoA (condensation de type Claisen) forme l'hydroxyméthylglutaryl-CoA, qui est réduit en mévalonate (MVA). Deux phosphorylations consécutives fournissent successivement le phosphomévalonate et le diphosphomévalonate. Ce dernier intermédiaire est ensuite soumis à une phosphorylation de son hydroxyle tertiaire suivie d'une décarboxylation concomitante qui conduit à l'isopentényl pyrophosphate (IPP). Finalement l'IPP est isomérisé en DMAPP (diméthylallyle de pyrophosphate) par une isomérase. <sup>[100-102]</sup> Le géranyl pyrophosphate GPP, précurseur de

monoterpènes, est formé par addition d'une molécule d'IPP sur une molécule de DMAPP selon une condensation tête à queue. Une addition similaire d'IPP conduit au FPP.

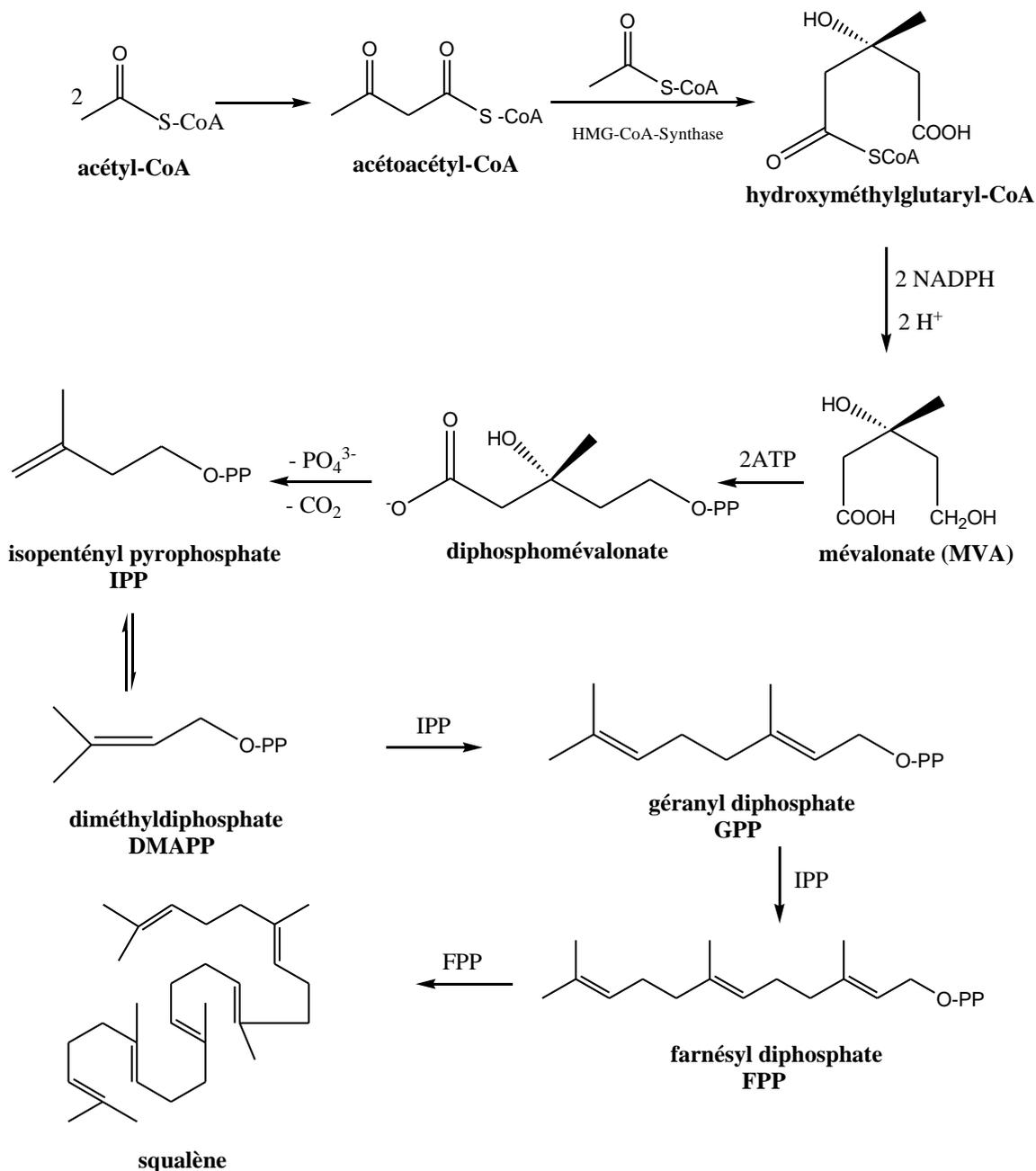
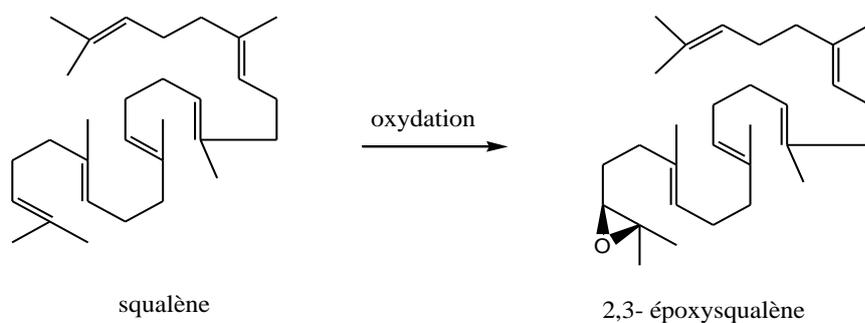


Figure II.6 : Biosynthèse du squalène

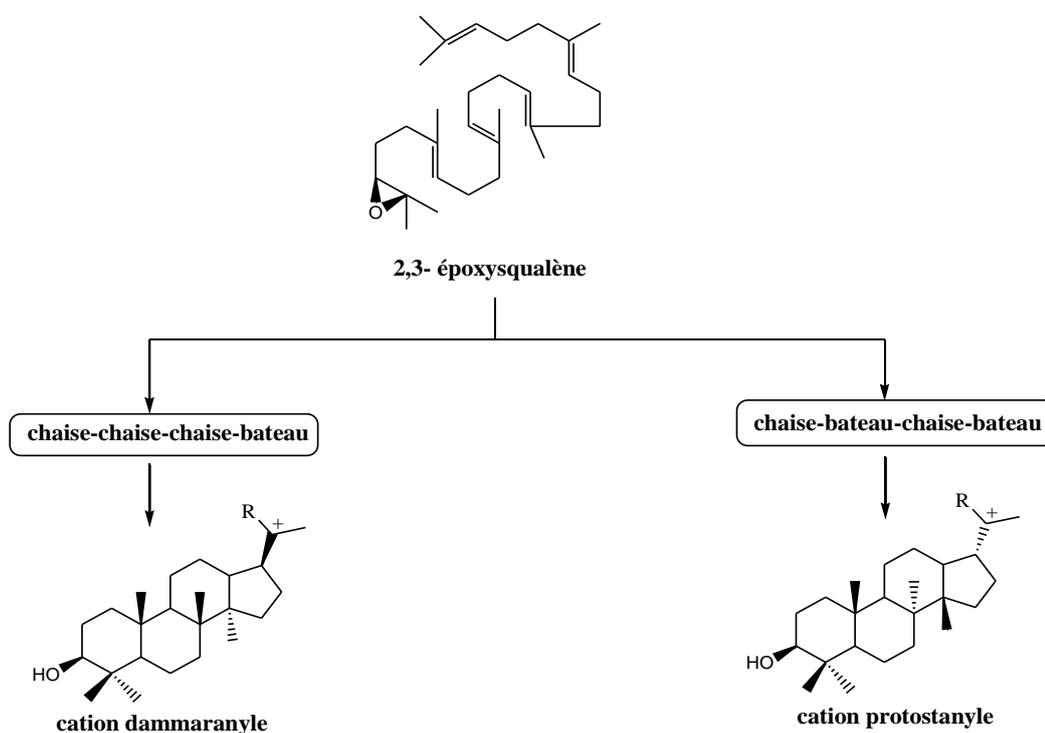
Dans la plupart des cas, le squalène est ensuite converti en 2,3-squalène époxyde (Figure II.7) par une squalène époxydase, puis est cyclisé grâce à une oxydosqualènecyclase pour donner les différentes classes de triterpénoïdes.



**Figure II.7 : Formation du 2,3-époxy-squalène**

La grande diversité structurale des triterpènes résulte d'un contrôle enzymatique sur les modes de cyclisation (chaise, bateau...) et les diverses migrations postérieures affectant les groupements méthyles (Figure II.8).

- Si l'époxy-squalène est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostanyle précurseur des cycloartanes, lanostanes et cucurbitanes.
- Si l'époxy-squalène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut subir ultérieurement des réarrangements permettant la formation des triterpènes tétracycliques à squelette euphane et tirucallane et le plus souvent il conduit aux triterpènes pentacycliques de type oléanane, ursane, lupane, ...etc.



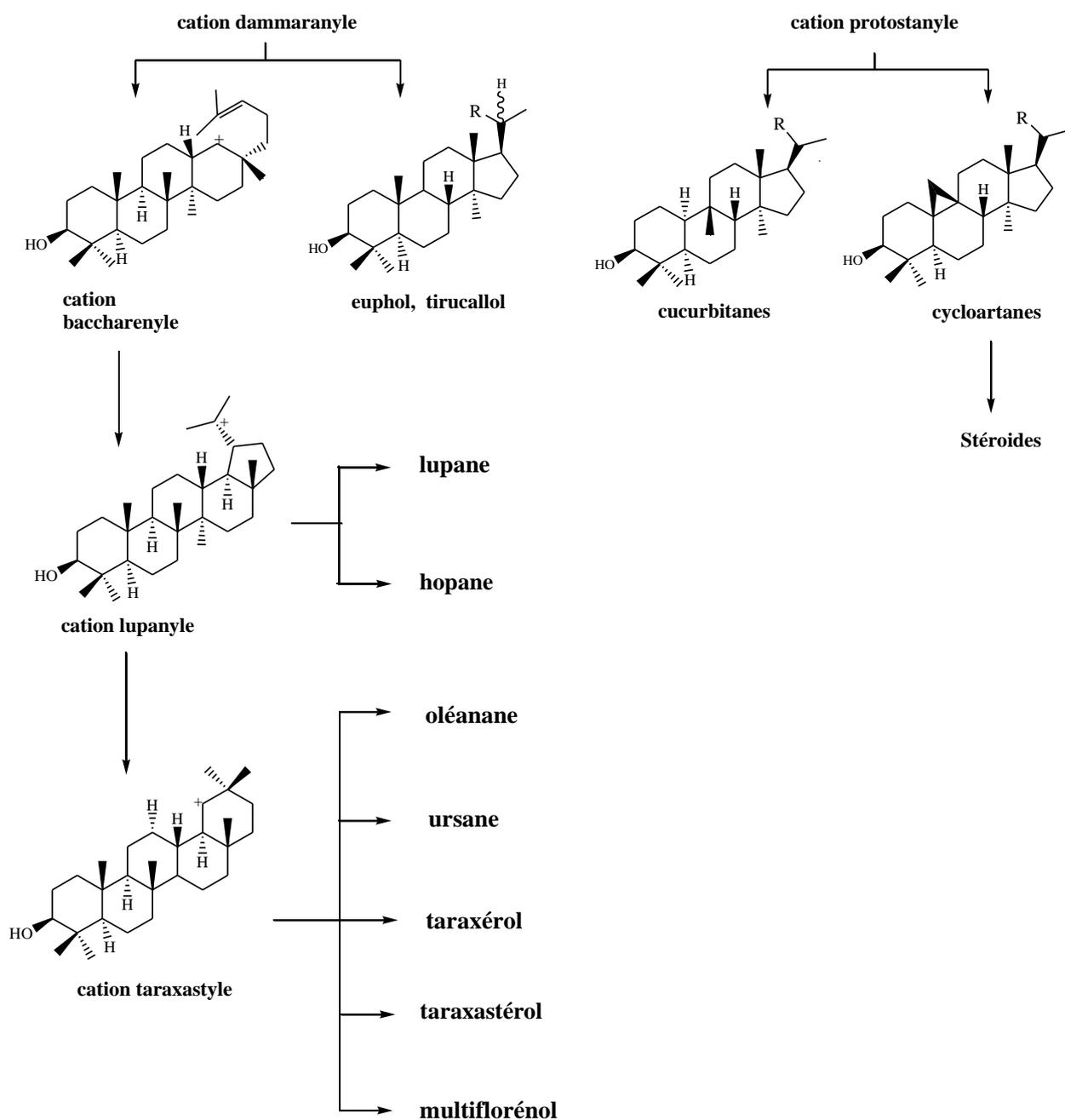


Figure II.8 : Différents squelettes de triterpénoïdes

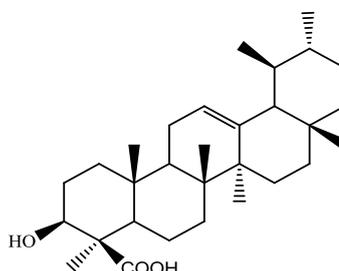
### II-2-3 Intérêts des triterpènes

Les nombreuses activités biologiques des triterpènes en font un groupe de produits naturels de première importance. Ils sont responsables d'une multitude d'activités biologiques : cytostatique, antivirale, insecticide, anti-inflammatoire, molluscicide et analgésique. <sup>[49]</sup>

A titre d'exemple :

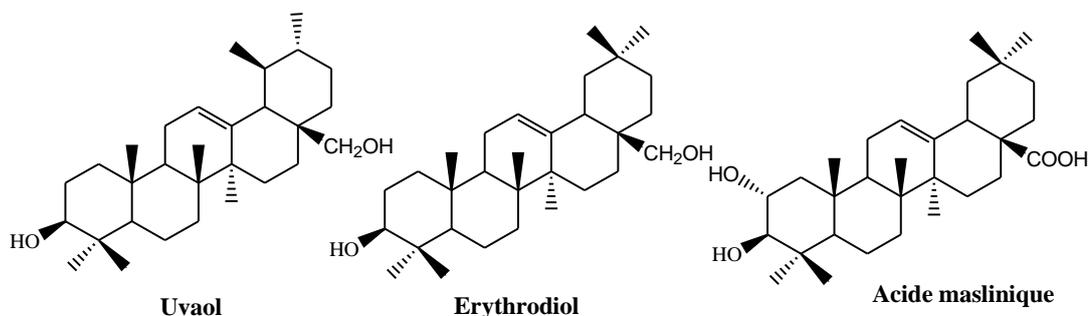
- Le lupéol est reconnu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires; <sup>[103]</sup>

- Le bétulinol a des propriétés médicinales très diversifiées (anti-inflammatoire, antiphlogistique). Il est utilisé aussi en cosmétique et comme émulsifiant; [104]
- L' $\alpha$  et  $\beta$ -amyrines, possèdent des activités anti-inflammatoire et analgésiante; [105]
- L'acide boswellique est reconnu pour son activité inhibitrice de la biosynthèse des leucotriènes et de la 5-lipoxygénase; [106]



Acide boswellique

- L'uvaol, erythrodiol, acide maslinique et l'acide oléanolique isolés de l'huile d'olive appelée « orujo » ; sont décrits pour la prévention contre le stress oxydatif et sont connus comme inhibiteurs de la pro-inflammation des cytokines dans les macrophages des murines péritonéales; [107]

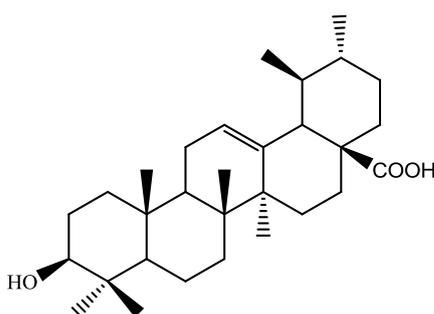


Uvaol

Erythrodiol

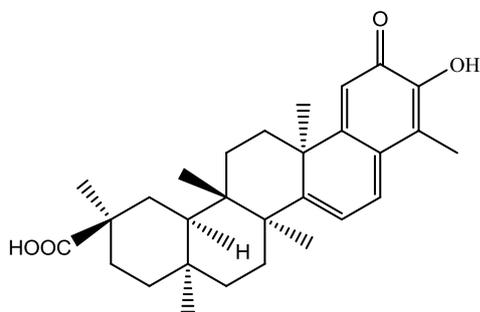
Acide maslinique

- L'acide ursolique réputé pour ses effets anticancéreux, anti-inflammatoire et anti-allergique et cardioprotectif. Une étude récente a montré que l'administration de l'acide ursolique chez des souris diabétiques diminue significativement le taux de glucose dans le sang; [108]



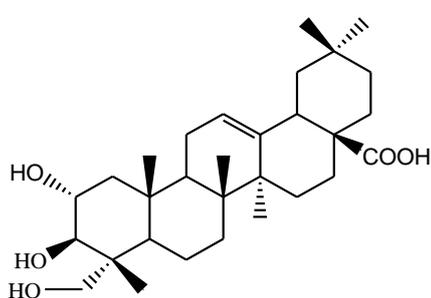
Acide ursolique

- L'acide bétulinique est reconnu pour son action anti-inflammatoire, <sup>[109]</sup> mais l'activité antitumorale est l'une de ses propriétés biologiques les plus intéressantes; <sup>[110-112]</sup>
- Le celastrol, un triterpène pentacyclique polyinsaturé isolé d'une plante chinoise utilisée en médecine traditionnelle *Tripterygium wilfordii* (famille Celastraceae) est connu pour ses activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et antitumorale. Il est utilisé pour traiter les maladies neurodégénératives comme la maladie d'alzheimer; <sup>[113]</sup>

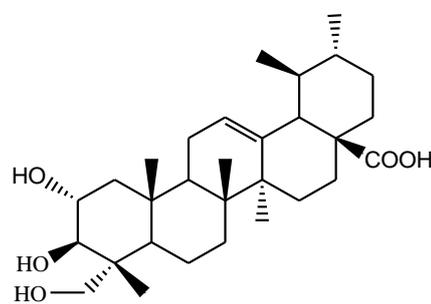


Celastrol

- Le  $\beta$ -sitostérol appartient à la famille des stérols végétaux ou phytostérols, composés naturels présents dans toutes les plantes. Le  $\beta$ -sitostérol est comparable au cholestérol. Il peut aider à réduire le taux de cholestérol en limitant la quantité de cholestérol qui peut entrer dans le corps. <sup>[114]</sup> Le  $\beta$ -sitostérol est également reconnu pour son activité anti-inflammatoire; <sup>[115]</sup>
- Et finalement l'acide arjunolique et l'acide asiatique, deux triterpènes isolés de l'espèce *Syzygium guineense* (Myrtaceae) ont montré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei*. <sup>[116]</sup>



Acide arjunolique



Acide asiatique

## II-3 Saponines

### II-3-1 Définition

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires, abondamment trouvés dans certaines familles du règne végétal. <sup>[117]</sup> Leur nom provient du latin *sapo*

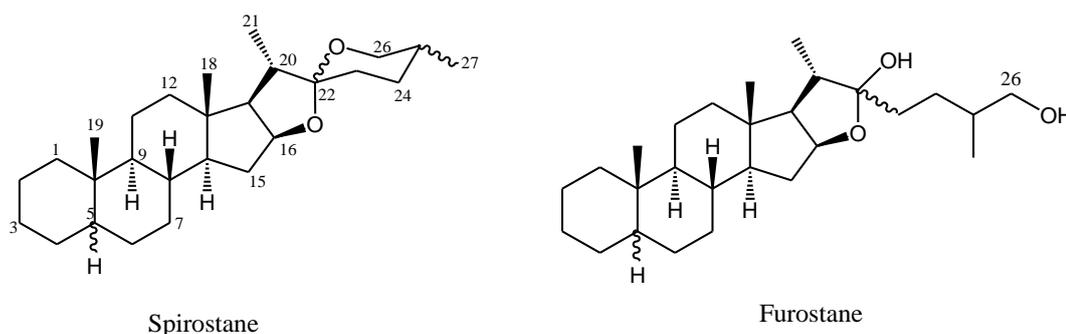
signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. <sup>[118]</sup> Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, qui se composent d'une partie lipophile l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

### II-3-2 Structure chimique des saponides

Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique ou triterpénique. <sup>[49]</sup>

#### II-3-2-1 Saponosides à génines stéroïdiques

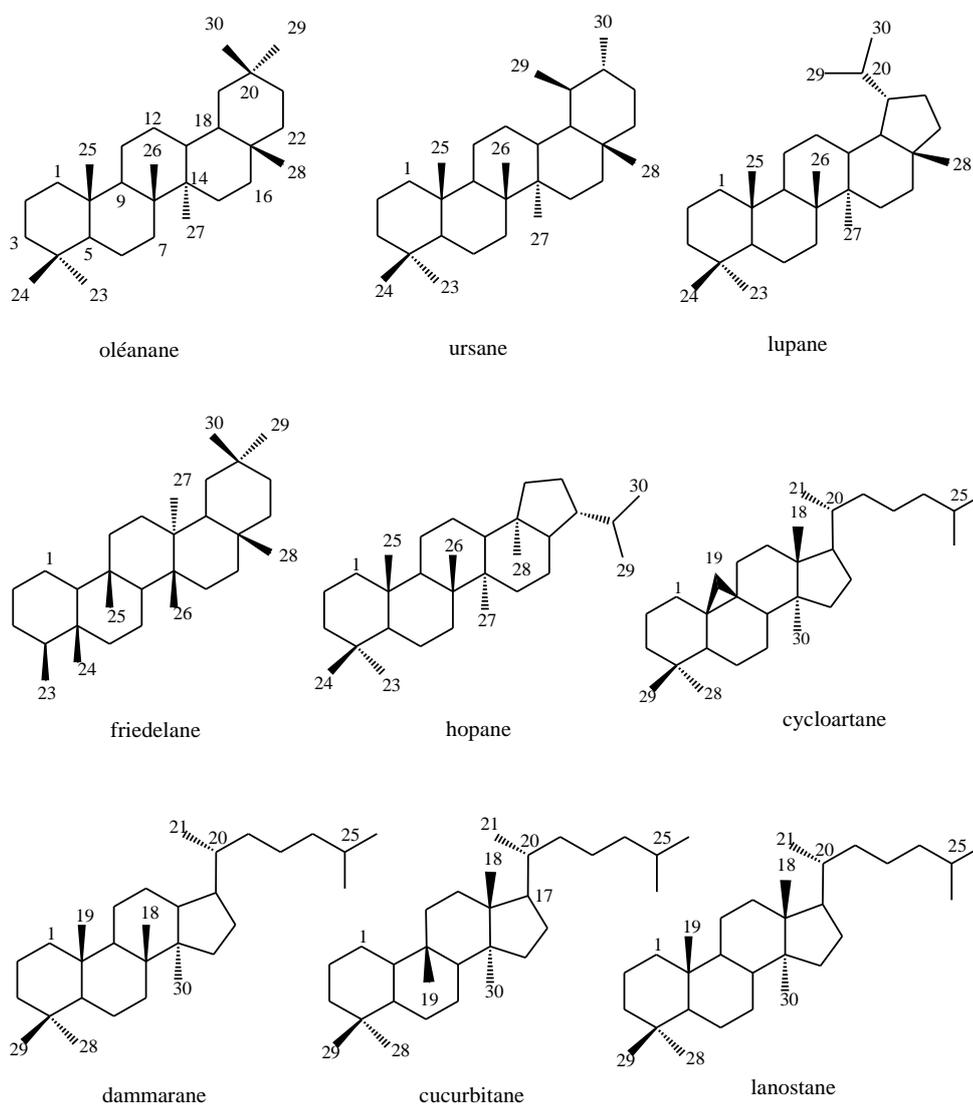
Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau furostane et spirostane (Figure II.9). Ces saponosides ont généralement un hydroxyle en position 3. Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique.



**Figure II.9: Principaux squelettes stéroïdiques**

#### II-3-2-2 Saponosides à génines triterpéniques

Ils constituent la majorité des sapogénines des angiospermes dicotylédones, <sup>[117]</sup> et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles (Figure II.10). Ce sont des dérivés du noyau oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane (pentacycle), ou parfois du noyau dammarane, cucurbitane, lanostane et cycloartane (tétracycle).

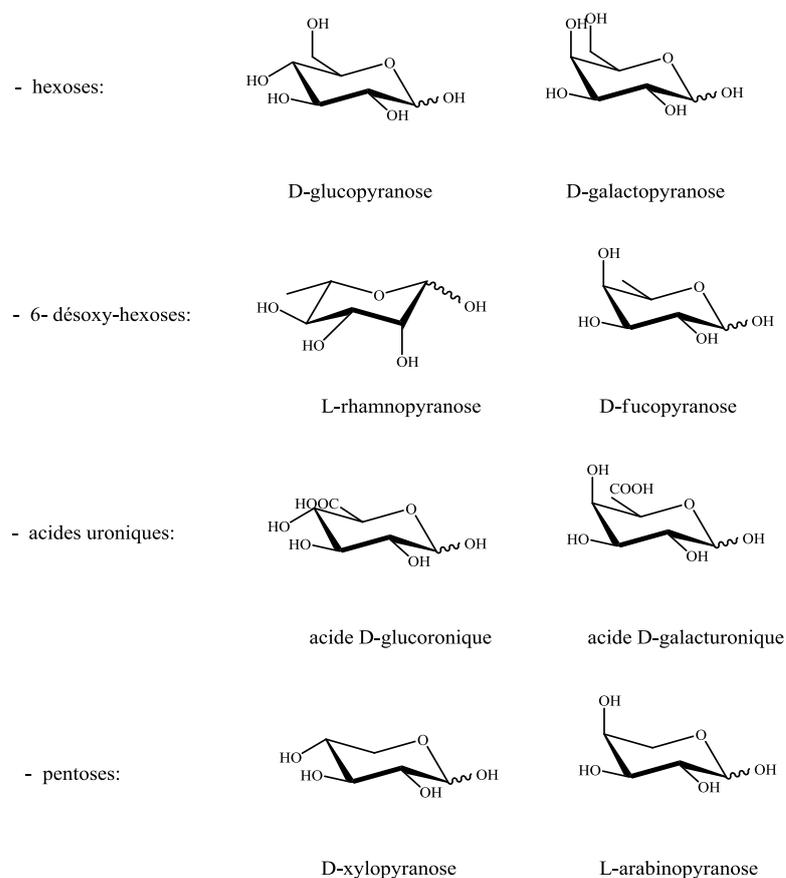


**Figure II.10 : Principaux squelettes triterpéniques**

### II-3-2-3 Partie osidique

Les unités saccharides qui constituent les saponines sont communes: D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique (Figure II.11). La partie sucre de la molécule peut compter jusqu'à 11 oses liés à la génine par une liaison de type acétal. Habituellement, la liaison glycosidique s'effectue entre une seule section saccharidique et le groupement hydroxyle en position 3 de la génine, les saponosides sont dits dans ce cas monodesmosidiques (glycyrrhizine). Toutefois, lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, en positions 3 et 28 on parle de saponosides bidesmosidiques (sénéguine III).<sup>[49]</sup>

Exceptionnellement, la littérature a rapporté l'isolation et l'identification de quelques tridesmosides et des bidesmosides chez lesquels les sections sucres sont liées d'une manière covalente par une double estérification sur un diacide (tubeimoside 1).<sup>[49]</sup>



**Figure II.11 : Différents squelettes des oses**

### II-3-3 Distribution de saponines

Les saponines sont distribuées dans une large variété de produits alimentaires tels que l'asperge, les haricots, les mûres sauvages, les pois, les pommes de terre, la betterave sucrière et le thé et dans plusieurs familles de plantes Caryophyllaceae, Caryocaraceae et Fabaceae. <sup>[119-122]</sup>

### II-3-4 Biosynthèse des saponosides

La grande diversité structurale des saponines peut être expliquée par leurs origines biosynthétiques variées. En effet, à partir de l'oxydosqualène à 30 carbones, la biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée selon diverses voies métaboliques suivie de l'assemblage des différentes sections osidiques par des enzymes telles que les glycosyltransférases et les glycosidases. <sup>[123,124]</sup>

Par la suite, des modifications subséquentes peuvent avoir lieu sur la saponine dont, entre autres, des oxydations, réarrangements, méthylations et estérifications, ce qui augmente d'autant plus la possibilité de variations structurales à l'intérieur de cette classe de produits naturels.

### II-3-5 Propriétés biologiques des saponosides

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique. [125] En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que :

#### II-3-5-1 Hémolitique

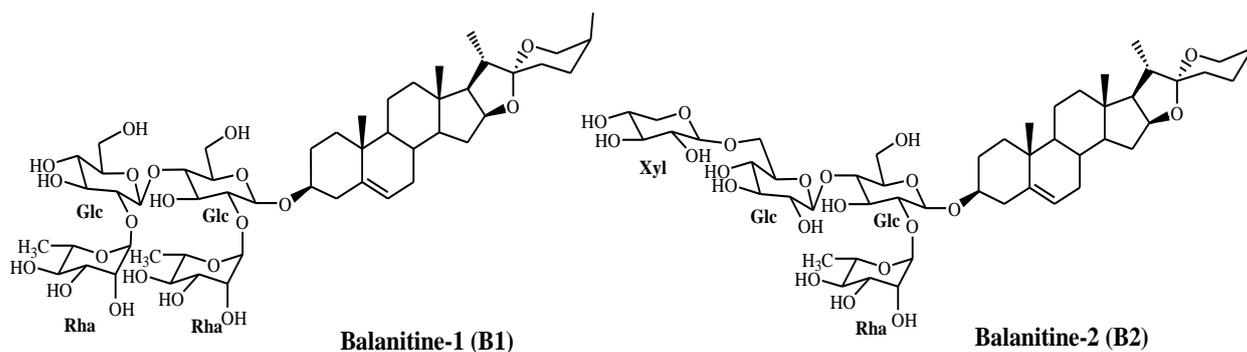
Depuis longtemps, les saponines sont réputées pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes). [126, 127]

#### II-3-5-2 Molluscicide

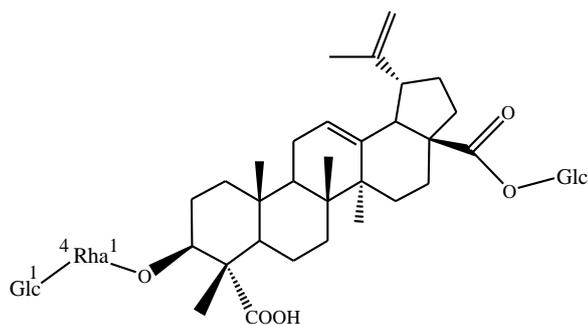
Depuis quelques années cette activité retient l'attention de plusieurs chercheurs vu son importance dans le domaine de l'agriculture. Les saponines triterpénoïdes à squelette hédéragénine isolées de *Sapindus mukorossi* Gaertn (Sapindaceae) ont des effets molluscicides contre l'escargot du pommier (*Pomacea canaliculata*) qui est devenu l'un des principaux parasites du riz et d'autres récoltes aquatiques. [128]

#### II-3-5-3 Anti-inflammatoire

Plusieurs saponines sont reconnues pour leurs effets anti-inflammatoires. Les balanines (balanitine-1 B1, balanitine-2 B2) isolées des écorces de tronc de *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Zygophyllaceae) sont des exemples de saponines stéroïdiques à propriétés anti-inflammatoires et antalgiques. [129]



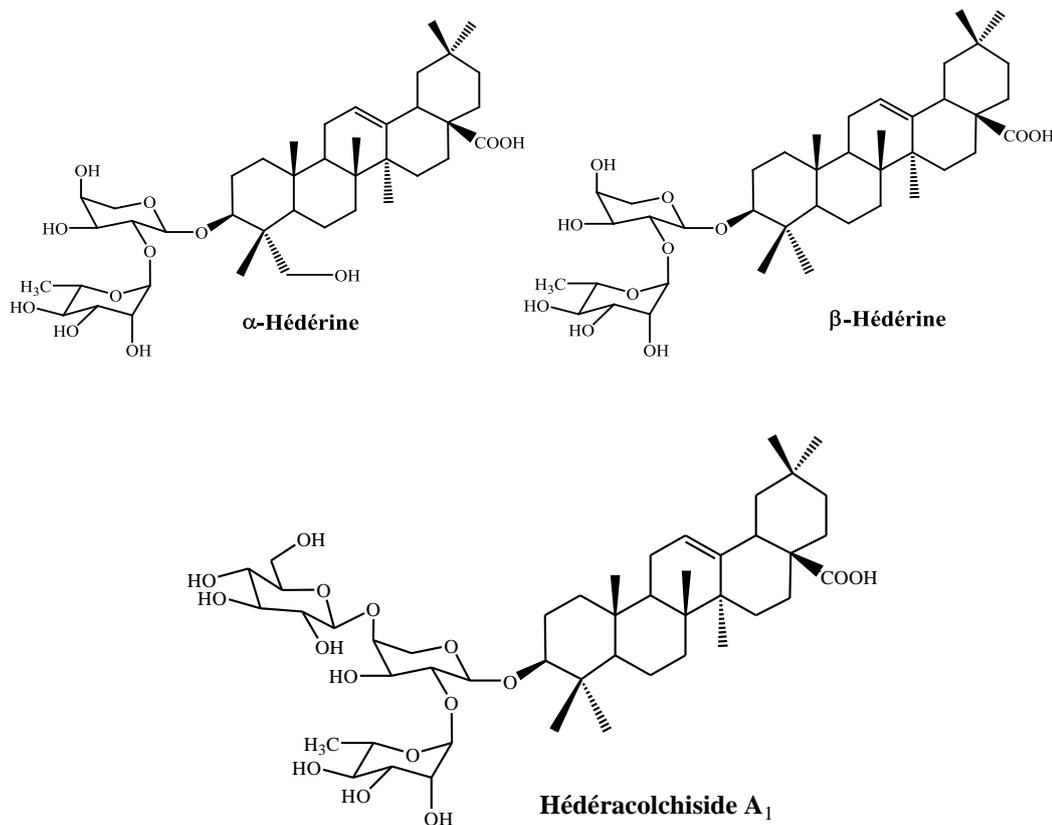
La frutesaponine B, saponine bidesmosidique, isolée de *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae), possède une activité anti-inflammatoire très significative. <sup>[130]</sup>



**Frutesaponine B**

#### II-3-5-4 Antibactérienne et antiparasitaire

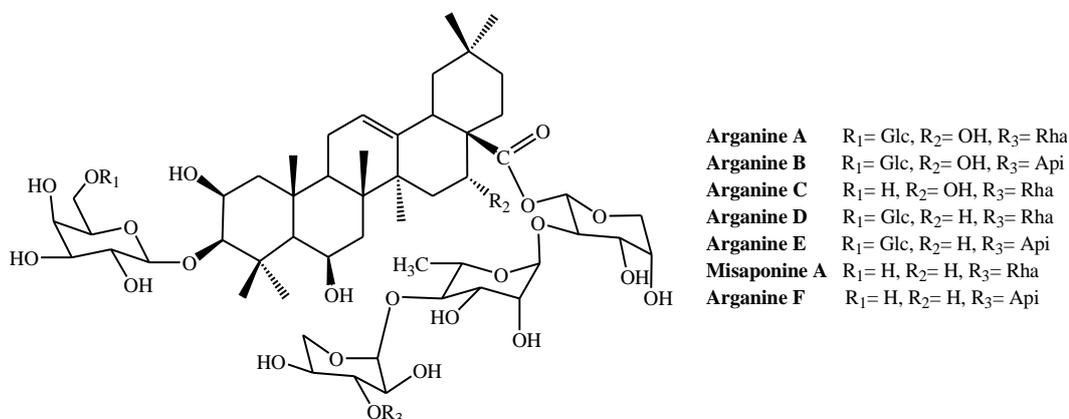
Un bon nombre de saponosides assurent la défense des végétaux contre l'attaque microbienne, il a été démontré que les trois saponines isolées de *Hedera helix* L. (Araliaceae), l'hédérine (alpha et beta) et hédéracolchiside A<sub>1</sub>, possèdent une activité antileishmaniale. <sup>[131]</sup> Les résultats ont montré que ces saponines présentent une forte action antiproliférative dans toutes les étapes de développement du parasite *Leishmania infantum*. <sup>[131]</sup>



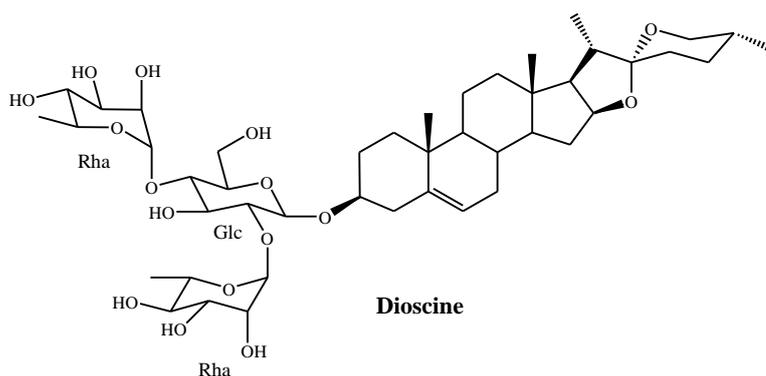
## II-3-5-5 Cytotoxique et antitumorale

De nombreuses études ont mis en évidence le caractère fortement cytotoxique, voir même antitumoral, de plusieurs saponines on y trouve :

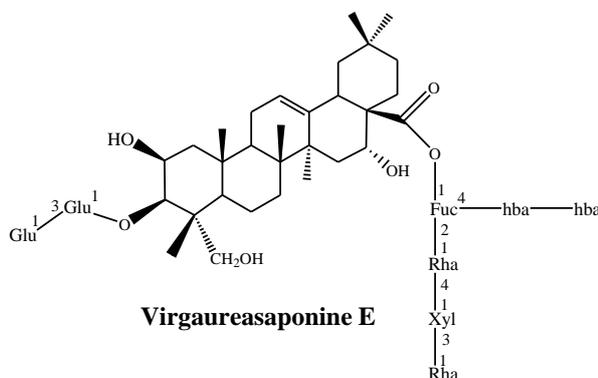
- Les saponines d'*Argania spinosa* (Arganine A-F) ont une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire PC3 (cancer de la prostate). <sup>[132]</sup>



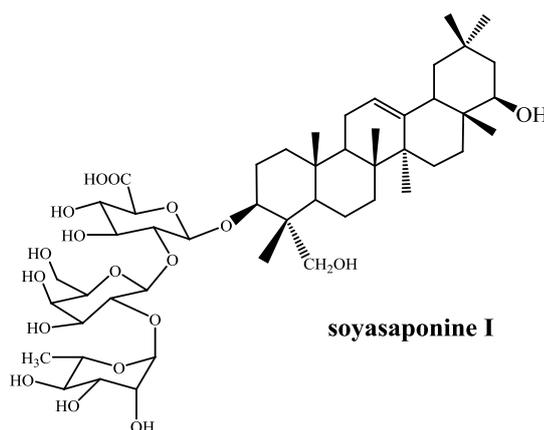
- La saponine stéroïdique, la dioscine, isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce une activité antitumorale ainsi qu'un vaste spectre d'activités biologiques (antivirale, antifongique et anti-inflammatoire). <sup>[133]</sup>



- Au niveau des saponines avec génine triterpénique, la Virgaureasaponine E exerce une activité anticancéreuse significative *in vivo* sur des souris porteuses d'un fibrosarcome. Dans cette expérience, la réduction de la taille de la tumeur est proportionnelle à la dose de la saponine administrée. <sup>[134]</sup>

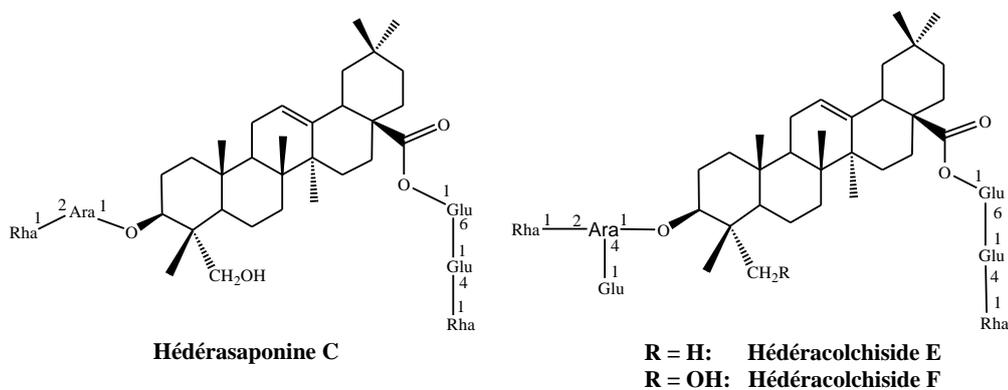


- D'autres molécules inhibent l'activité d'enzymes particulières (sialyltransférases) impliquées dans le développement des métastases (cancer des poumons) comme la soyasaponine I. <sup>[135]</sup> Et plusieurs travaux ont suggéré que les saponines du soja présentent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du colon. <sup>[136-138]</sup>



### II-3-5-6 Anti-oxydante

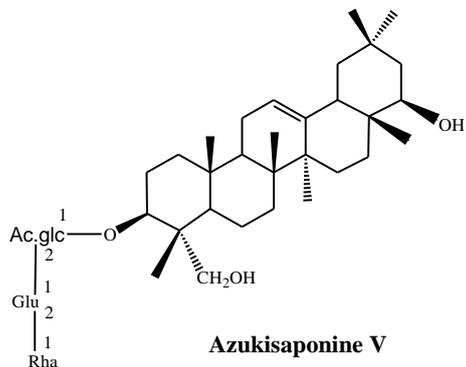
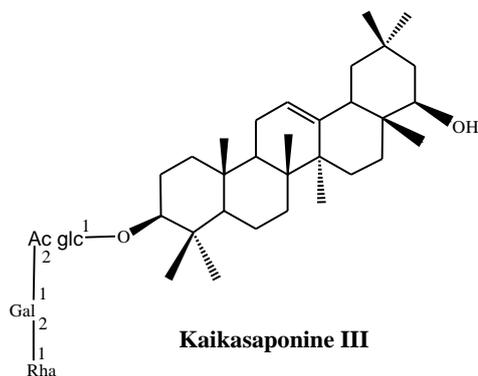
L' $\alpha$ -hédérine, l'hédérasaponine C, l'hédéracolchisides E et F présentent une forte activité anti-oxydante. <sup>[139]</sup>



### II-3-5-7 Antivirale

Arganine C, une saponine isolée des fruits de *Tieghemella heckelii* (Sapotaceae) qu'on retrouve aussi dans *Argania spinosa* présente une activité antivirale. <sup>[140]</sup>

Les saponines triterpénoïdes de type oléane isolées de quelques espèces de la famille des Fabaceae ont montré une activité anti-herpétique et leurs structures influeraient sur cette activité. <sup>[141]</sup> Ces saponines sont : kaikasaponine III et azukisaponine V.





## CHAPITRE III

**Etude phytochimique de  
l'espèce *Atractylis flava* Desf.**

### III-1 Rappel botanique

*Atractylis flava* Desf. est une plante vivace, à tiges épaisses, dressés, à rameaux très feuillés et de taille 10 à 20 cm. Les feuilles sont très épineuses, involucrales, deux fois plus longues que celles du milieu de la tige. Les capitules ne dépassant pas 2 cm de diamètre sont à fleurs jaunes (Figure III.1).<sup>[1,11]</sup>



**Figure III.1: Images de l'espèce *Atractylis flava* Desf.**

Cette espèce est répandue dans le nord saharien, Elle est désignée sous le nom vernaculaires: « serr, chouik, takesma, shawk elgamal et assenane awragh » et possède un synonyme *Atractylis carduus* (Forsk.) Christ.<sup>[1]</sup>

Cette espèce est classée comme suit :

**Famille :** Asteraceae

**Sous famille :** Carduoideae

**Tribu :** Cardueae

**Sous tribu :** Carlininae

**Genre :** *Atractylis* L.

**Espèce :** *Atractylis flava* Desf.

**Synonyme :** *Atractylis carduus* (Forsk.) Christ.

**Noms vernaculaires :** Chouik, takesma, assenane awragh (Algerie), serr (Tunisie)  
et shawk el-gamal (Egypt)

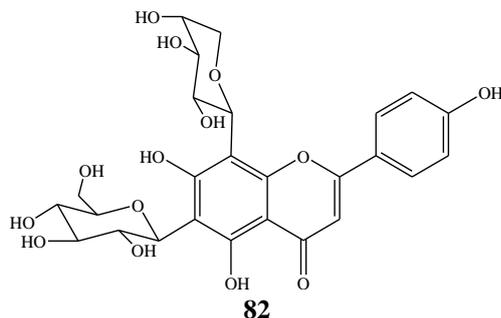
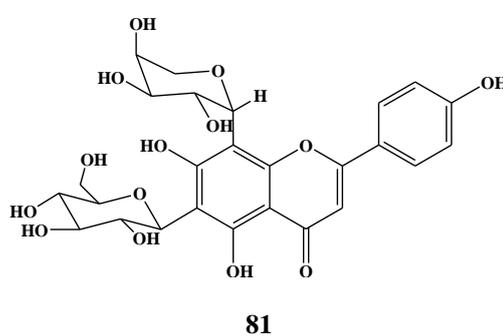
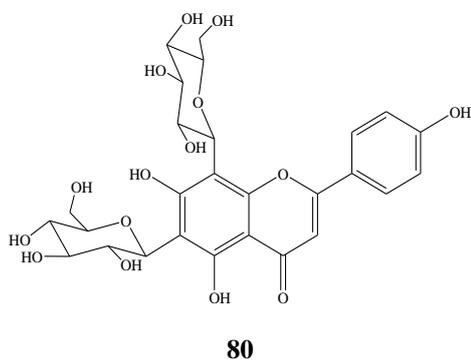
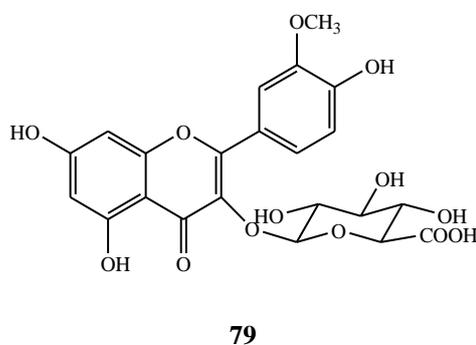
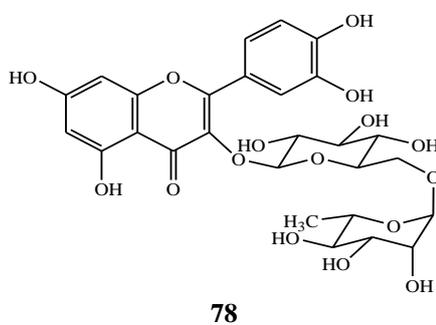
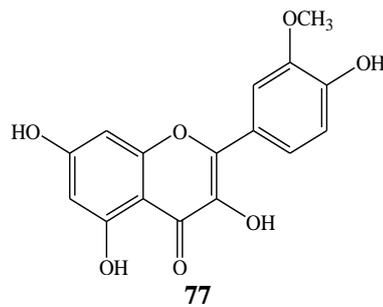
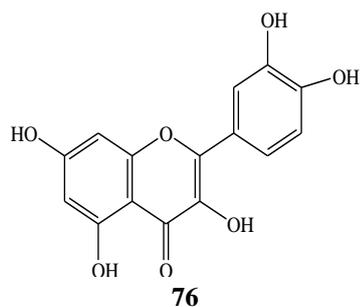
### III-2 Usage traditionnel

L'usage de la médecine traditionnelle est très répandu aussi bien dans les pays en développement que dans les pays développés. L'espèce *A. flava* est reconnue particulièrement pour ses effets diurétiques.<sup>[2]</sup>

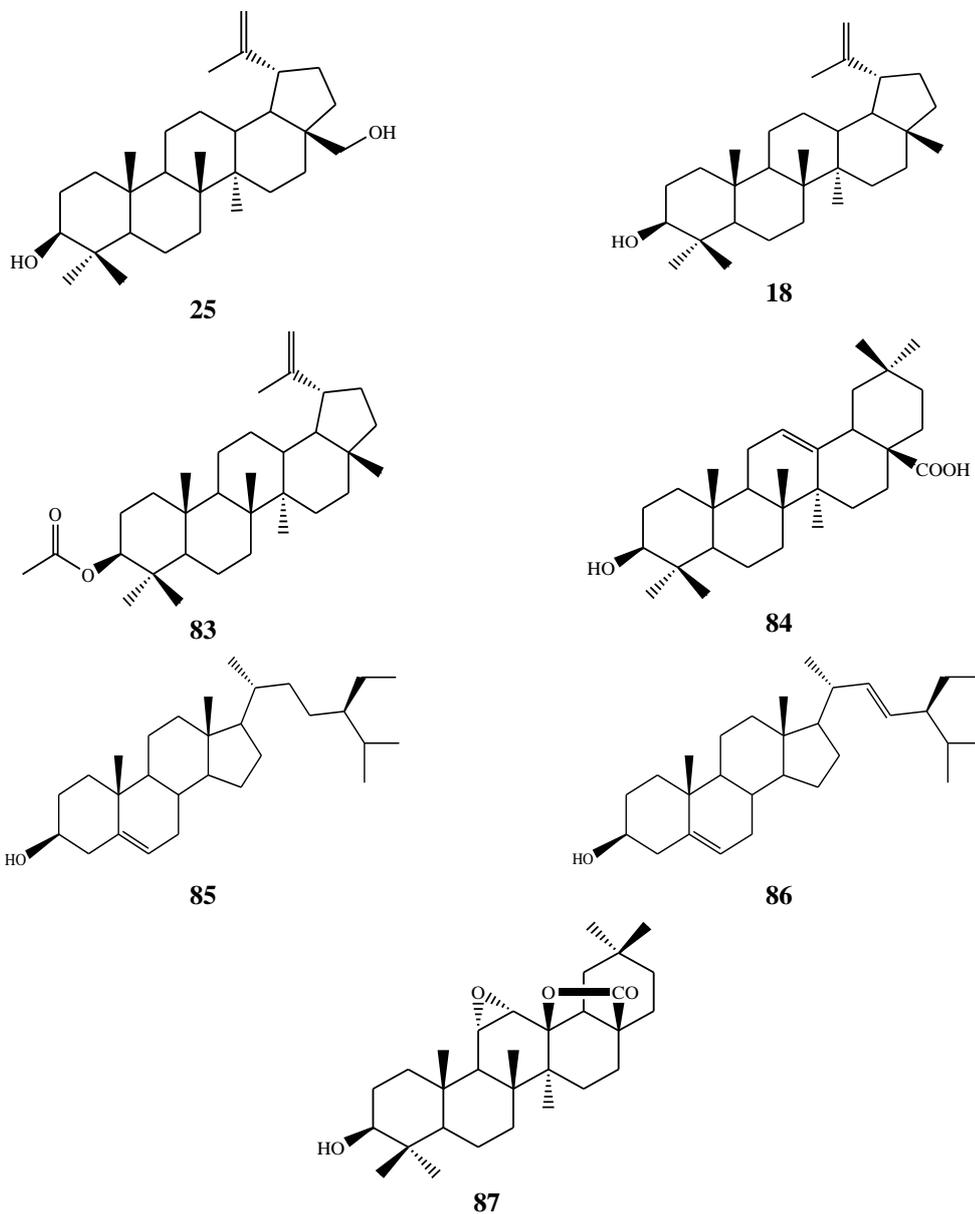
III-3 Travaux antérieurs de chimie sur l'espèce *Atractylis flava*

Plusieurs études chimiques ont été réalisées sur l'espèce *A. carduus* (*A. flava*) poussant en Egypte en conduisant à l'isolement et la caractérisation de plusieurs métabolites connus de types flavonoïdiques et triterpéniques.<sup>[3,4]</sup>

En effet, les travaux réalisés par F. Melek et al.<sup>[3]</sup> sur l'espèce *Atractylis carduus* ont permis d'isoler les flavonoïdes suivants: Quercétine (**76**), Isorhamnétine (**77**), Rutine (**78**), Isorhamnétine 3-*O*-glucuronide (**79**), Vicénine 2 (**80**), Neoschaftoside (**81**) et Schaftoside (**82**).



Une autre étude réalisée par F. Melek et al. [4] sur les parties aériennes de la même plante a conduit à l'isolation des triterpènes suivants: Bétuline (25), Lupéol (18), Lupéol acétate (83), Acide oléanolique (84),  $\beta$ -sitostérol (85), Stigmastérol (86) et 3 $\beta$ -hydroxy-11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -époxyoléanan-28,13 $\beta$ -olide (87).



### III-4 Chimie extractive

#### III-4-1- Extraction

L'extraction, à partir de la plante entière séchée et broyée de l'espèce *Atractylis flava*, est réalisée en utilisant un mélange hydro-alcoolique eau-éthanol (30:70). Après filtration et concentration, 600 ml d'extrait aqueux ont été obtenus. Ce dernier subit une extraction

liquide-liquide avec différents solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

Le schéma ci-dessous récapitule les différentes étapes de l'extraction (Figure III.2).

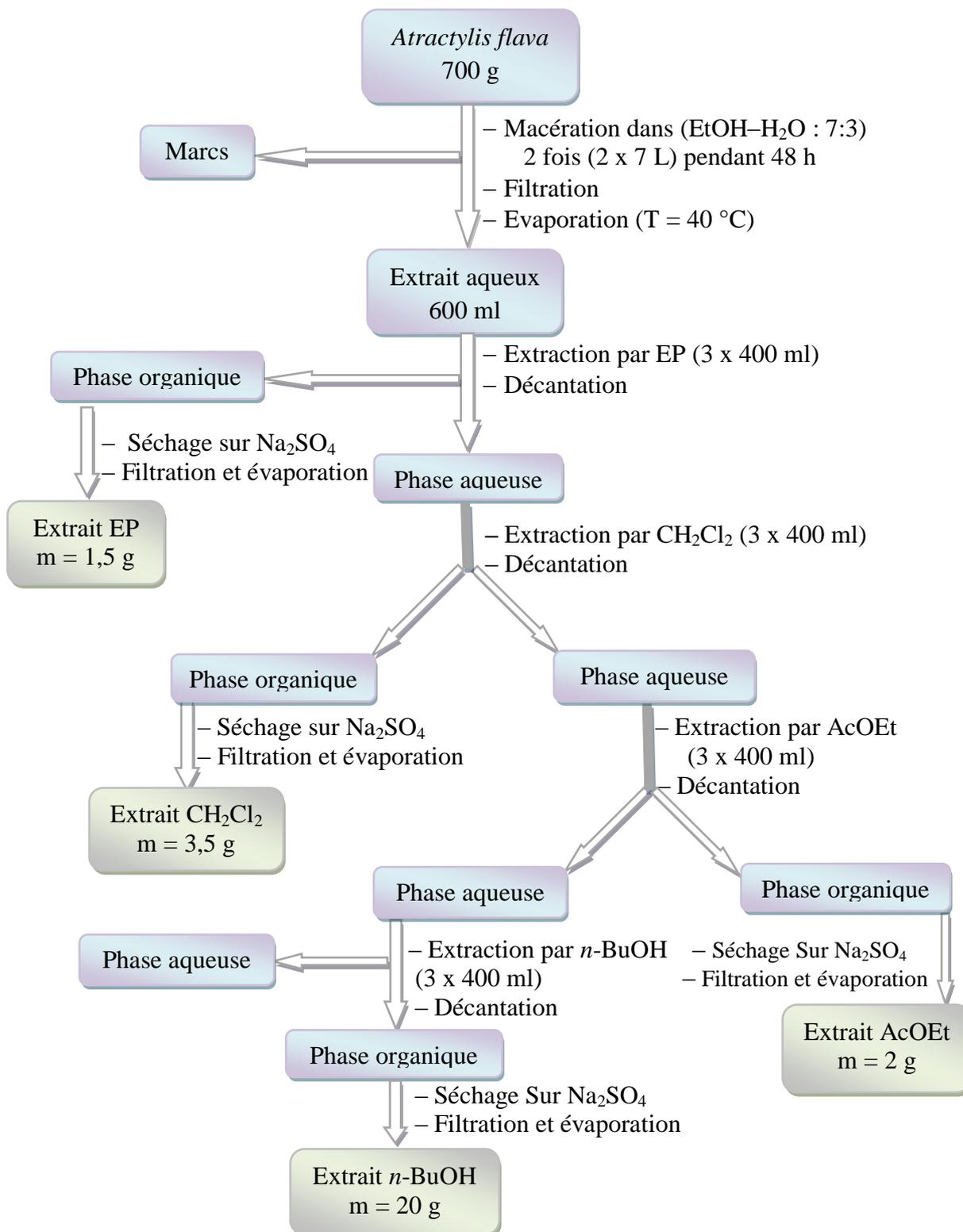


Figure III.2 : Schéma d'extraction de la plante *Atractylis flava*

## III-4-2 Purification

La comparaison des profils CCM en phases normale et inverse des quatre extraits obtenus dans différents systèmes d'éluion ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH, Ep-AcOEt,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ ), montre bien leur richesse en métabolites secondaires particulièrement de type flavonoïdes et triterpènes, ce qui nous a incité à explorer chimiquement les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol.

III-4-2-1 Extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH)

7 g de l'extrait *n*-butanolique sont fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale. L'éluion est réalisée par un mélange de solvants: chloroforme-méthanol (100:0 à 60:40) et chloroforme-méthanol-eau (60:40:1 à 0:100:10). 8 fractions ont été collectées selon l'analyse des CCM. Ces fractions sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 5 composés (**1-5**) de nature flavonoïdique ont été isolés dont deux nouveaux (Figure III.3).

De plus, 4 g du même extrait sont fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase inverse (C-18) en utilisant comme éluant méthanol-eau de (20:80) à (100:0). 9 fractions ont été collectées selon leurs profils chromatographiques. La fraction F7 jugée intéressante est mise à chromatographier par différentes techniques chromatographiques (chromatographie flash en phase inverse et HPLC). C'est ainsi que 2 flavonoïdes et 3 nouvelles saponines ont été isolés (Figure III.4).

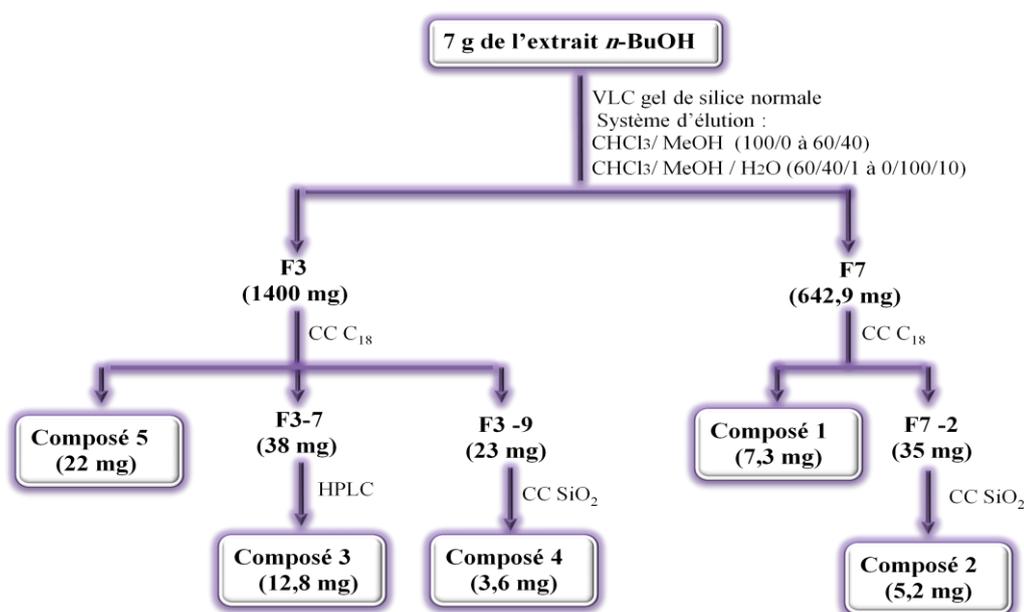


Figure III.3: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH d'*Atractylis flava*

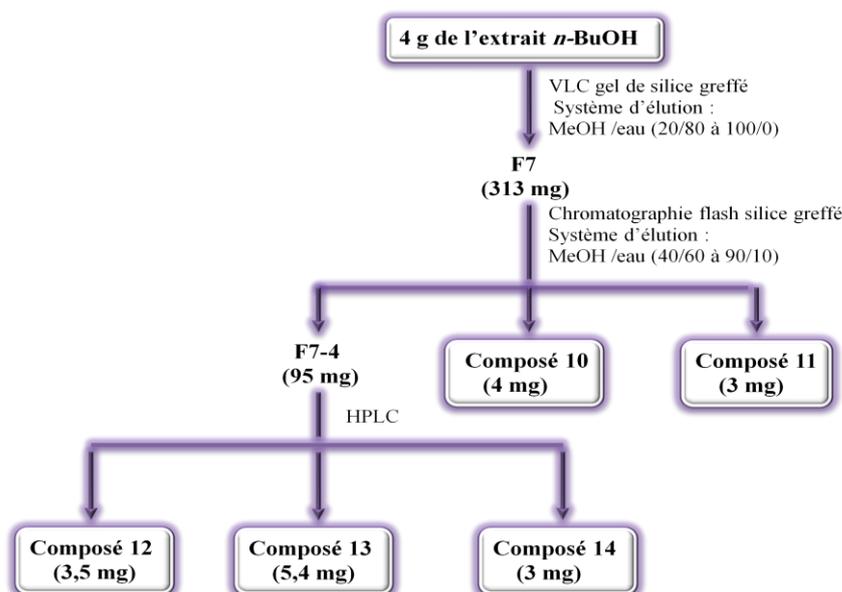


Figure III.4: Schéma de purification des produits polaires de l'extrait *n*-BuOH d'*Atractylis flava*

#### III-4-2-2 Extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de 2 g de l'extrait acétate d'éthyle a été réalisé par une chromatographie de polyamide SC-6 en utilisant un gradient d'élution toluène-méthanol allant de (100:0) à (0:100).

Ce fractionnement a permis de recueillir 13 fractions. Les fractions F2, F5, F6, F10, F11 et F13 jugées intéressantes vu leurs profils CCM, ont été mises à chromatographier en utilisant différentes techniques chromatographiques (CC SiO<sub>2</sub>, CCE et sephadex LH-20).

L'ensemble de ces opérations de purification a conduit à l'isolement de 9 composés (4 flavonoïdes, 3 triterpènes et 2 phytostérols) (Figure III.5).

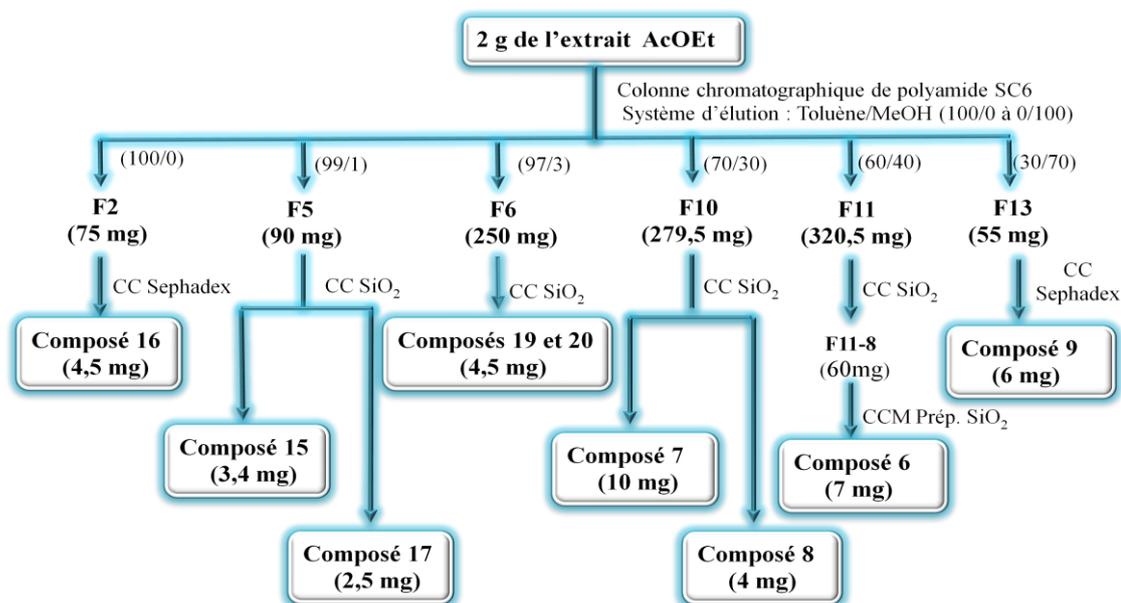


Figure III.5: Schéma de purification des produits de l'extrait AcOEt d'*Atractylis flava*

## III-4-2-3 Extrait dichlorométhane

3,3 g de l'extrait dichlorométhane sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale avec les gradients d'éluion : éther de pétrole–acétate d'éthyle (100:0 à 0:100) et acétate d'éthyle–méthanol (100:0 à 90:10). 16 fractions ont été collectées. Ces dernières sont soumises à des opérations de purification (chromatographie de gel de silice normale, sephadex et chromatographie sur couche mince et épaisse). Ce qui a permis d'isoler 9 composés de nature triterpénique (Figure III.6).

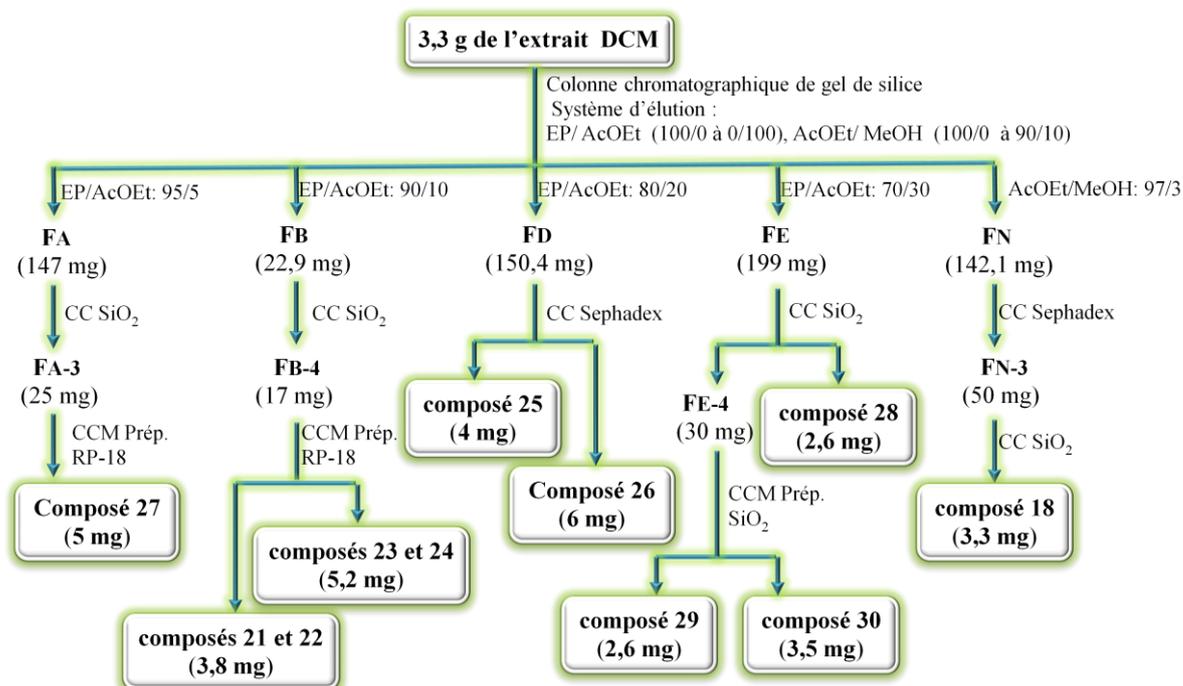


Figure III.6: Schéma de purification des produits de l'extrait DCM d'*Atractylis flava*

## III-4-3 Hydrolyse acide

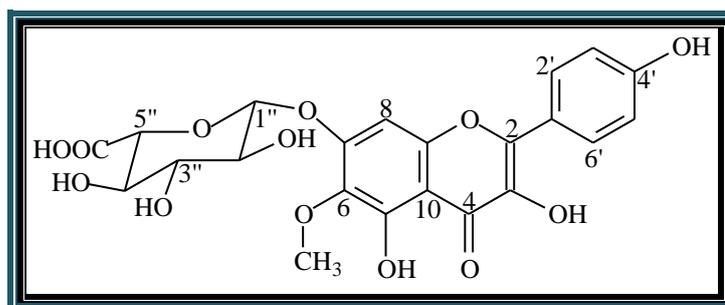
L'élucidation structurale des saponosides étant parfois difficile, il est donc utile de recourir à des méthodes sélectives de clivage, afin d'avoir accès aux différents composants de la molécule pour en faciliter l'élucidation structurale. L'hydrolyse acide est la méthode mise en œuvre, dans notre cas. Celle-ci est réalisée le plus souvent sur l'extrait brut enrichi en saponosides pour ne pas détruire les saponosides purs isolés en quantités relativement faibles. Cette hydrolyse clivant les liaisons osidiques conduisant aux génines et aux monosaccharides constitutifs des saponosides. Elle permet de connaître d'une part la nature des génines par comparaison en CCM avec des témoins, et d'autre part, de la nature des monosaccharides par CCM comparativement à des témoins ainsi que de leur appartenance à la série D ou L après isolement et mesure de leur pouvoir rotatoire.

### III-4-4 Caractérisation des produits obtenus

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

#### III-4-4-1 Caractérisation des flavonoïdes

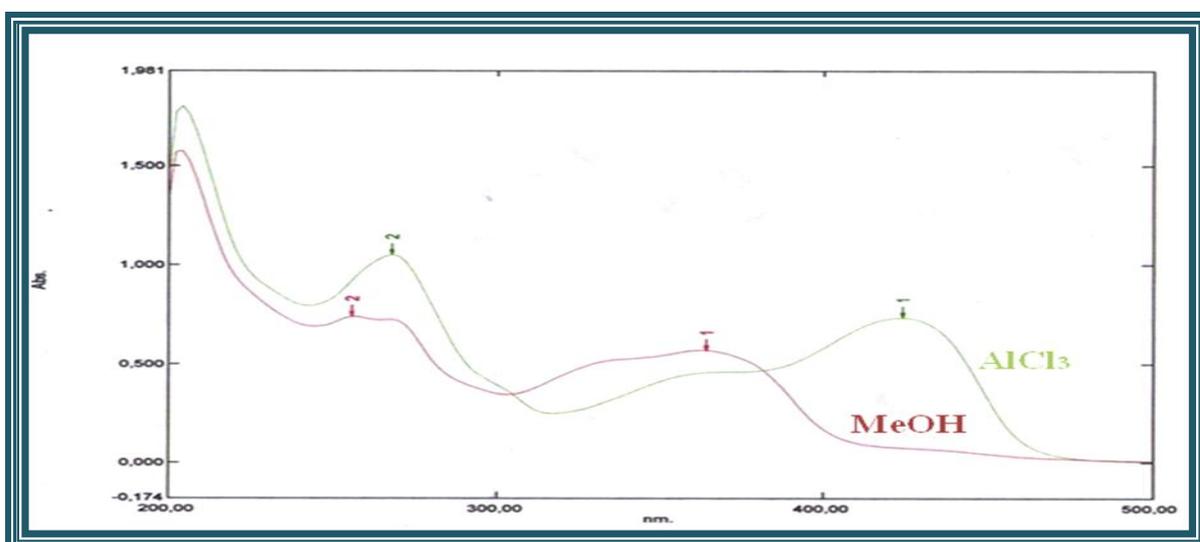
##### III-4-4-1-1 Elucidation structurale du composé 1



**6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther 7-O-β-glucopyranuronoside (1)**  
(Atraflavoside A)

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre jaune. Sa fluorescence jaune terne sous la lumière UV à 366 nm indique un squelette flavonol. Il s'agit d'un nouveau flavonoïde glycosylé appelé Atraflavoside A.

Le spectre UV de ce composé (Figure III.7) enregistré dans le méthanol présente deux maxima d'absorption : la bande I à 364 nm correspondant au cycle B (cinnamoyle) et la bande II à 256 nm correspondant au cycle A (benzoyle).



**Figure III.7: Spectre UV du composé 1**

L'addition du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) provoque un déplacement bathochromique de 12 nm pour la bande II et de 60 nm pour la bande I. Ce déplacement traduit la formation d'un complexe d' $\text{AlCl}_3$  entre la fonction carbonyle en C-4 et l'hydroxyle en C-5 du cycle A. La bande I étant inférieure à 435 nm, indique l'absence d'hydroxyle en C-8.

Le spectre IR (Figure III.8) de ce composé montre des bandes d'absorption à  $3413\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyle),  $1651\text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma$ -pyrone, C-4) et à 1608, 1580,  $1510\text{ cm}^{-1}$  (système aromatique).

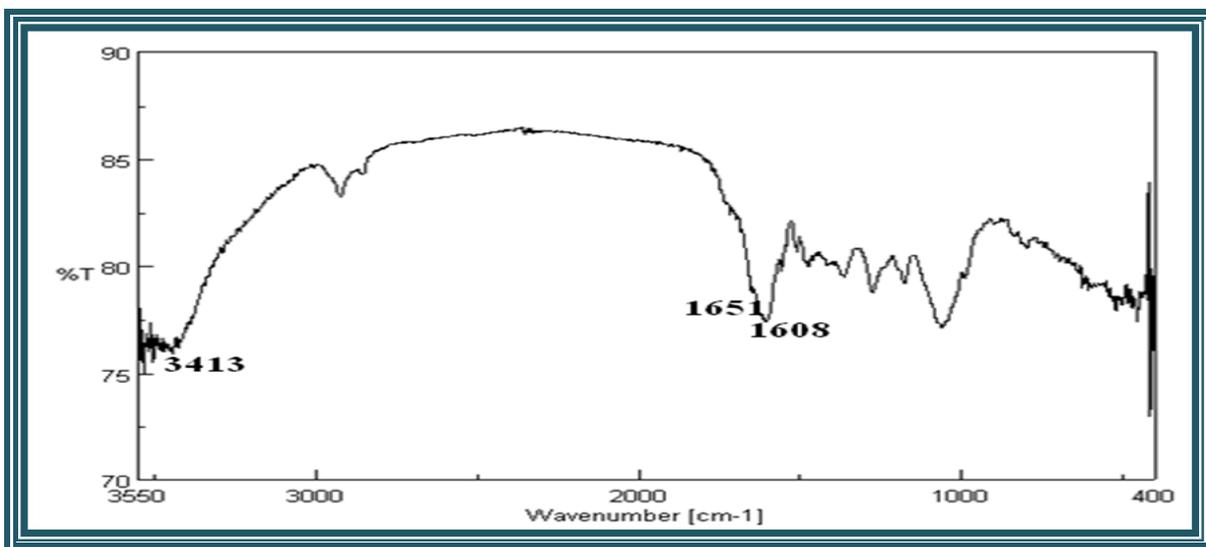


Figure III.8: Spectre IR du composé 1

Le spectre de masse, obtenu en mode positif par électrospray ESI (Figure III.9), permet d'observer plusieurs pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  531  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 553  $[(\text{M}-\text{H})+\text{Na}+\text{K}]^+$  et 569  $[(\text{M}-\text{H})+2\text{K}]^+$ . Le composé 1 a donc une masse moléculaire de 492 uma, soit une formule brute en  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ .

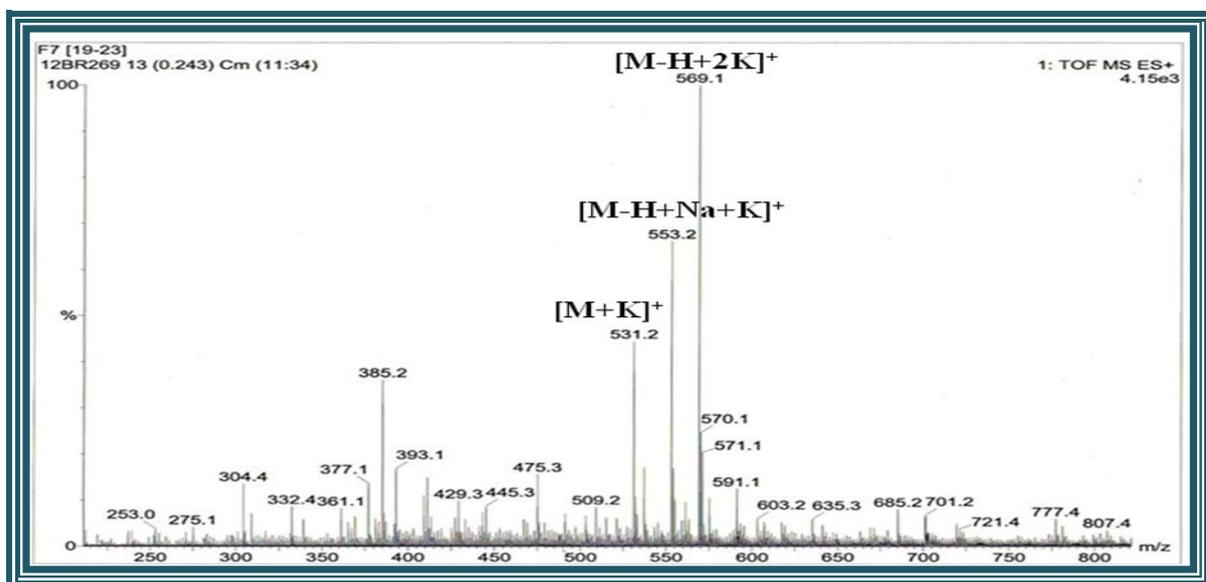


Figure III.9 : Spectre de masse ESI-MS du composé 1

Cette formule est confirmée par le spectre de masse réalisé en haute résolution HR-ESIMS (Figure III.10) montrant un pic à  $m/z$  569,0101 (calc.  $C_{22}H_{19}O_{13}K_2$ , 569,0100).

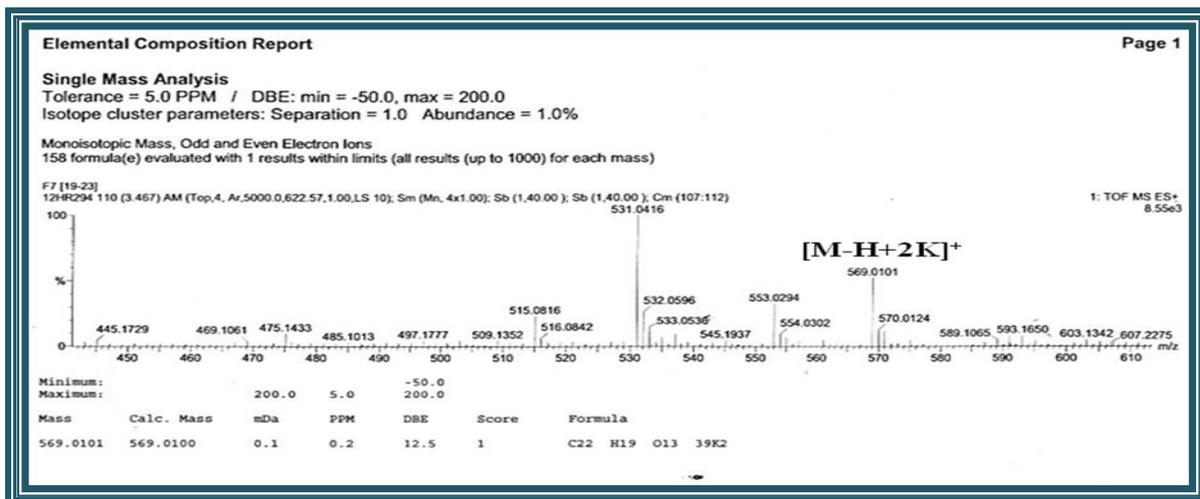


Figure III.10 : Spectre de masse HR-ESIMS du composé 1

Le spectre de RMN  $^1H$  du composé 1 enregistré dans le  $CD_3OD$  (Figure III.11) exhibe un système  $A_2X_2$  à  $\delta_H$  8,15 (2H,  $d$ ,  $J = 8,9$  Hz) et  $\delta_H$  6,93 (2H,  $d$ ,  $J = 8,9$  Hz), caractéristique d'un noyau aromatique para-substitué, correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement. Plusieurs d'autres signaux y ont été observés tels que :

- Un signal à  $\delta_H$  6,95 sous forme d'un sigulet s'intégrant pour un proton correspondant soit au proton H-6 ou H-8 du cycle A;
- Un proton anomérique à  $\delta_H$  5,15 (1H,  $d$ ,  $J = 7,6$  Hz);
- Un autre signal singulet s'intégrant pour trois protons à  $\delta_H$  3,92 correspondant à un méthoxyle;
- Des signaux de protons osidiques entre 3,3 et 4 ppm.

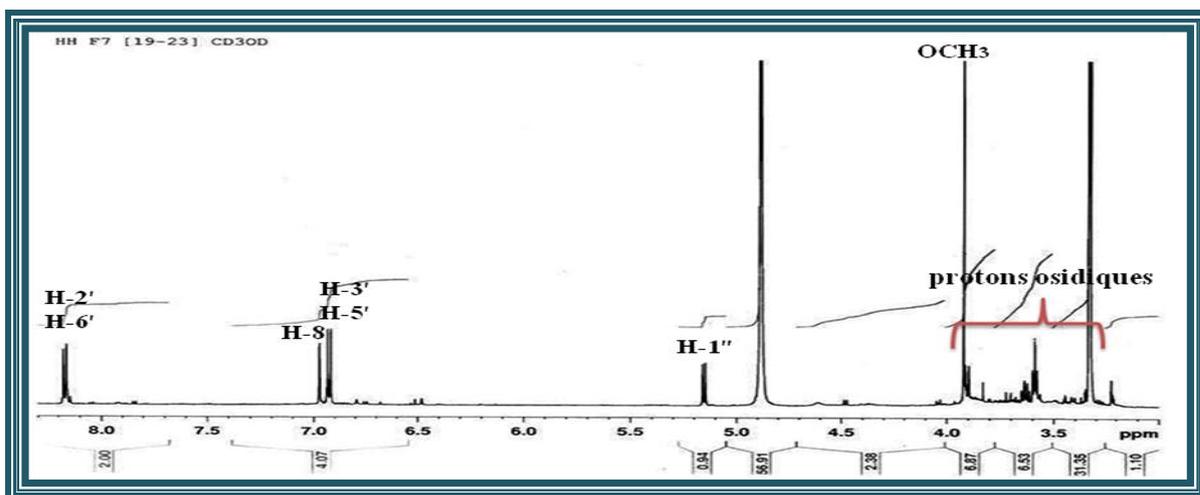


Figure III.11: Spectre RMN  $^1H$  du composé 1

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 (Figures III.12 et III.13) révèlent 22 signaux de carbones repartis en 11 carbones quaternaires, 10 méthines et un méthoxyle. Le nombre d'atomes de carbone égale à 22 confirme bien l'existence d'une structure flavonoïdique glycosylé comprenant :

- 15 atomes de carbone pour la génine (aglycone);
- 1 atome de carbone correspondant au groupement méthoxyle;
- 6 atomes de carbone pour la partie osidique.

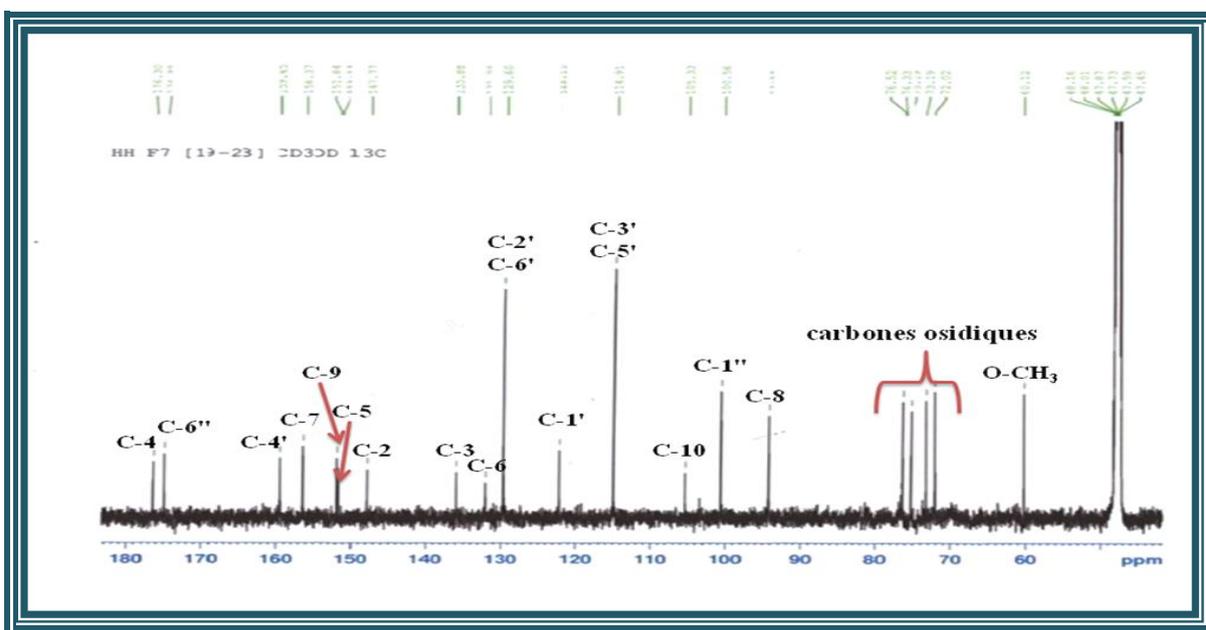


Figure III.12: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 1

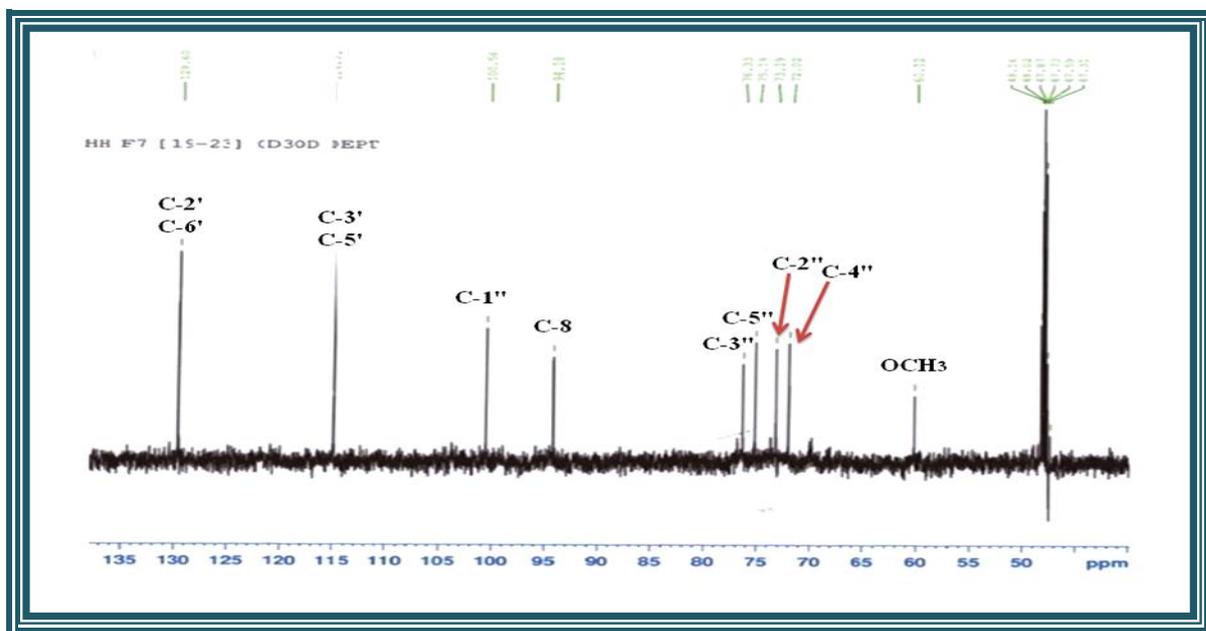


Figure III.13: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 du composé 1

L'élucidation structurale de ce composé repose principalement sur l'identification de manière séparée de l'aglycone et de la partie osidique.

### Partie aglycone

A partir des protons déjà identifiés par RMN  $^1\text{H}$ , l'expérience HSQC permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones suivants : C-2'/C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  129,6), C-3'/C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  114,9) et le méthoxyle à  $\delta_{\text{C}}$  60,1. La grande valeur du déplacement chimique de ce dernier suggère que les deux positions ortho du noyau A sont substituées.<sup>[142,143]</sup> Ce qui conduit à placer le groupement méthoxyle en position C-6 ou C-8.

L'analyse conjointe des spectres HMBC et NOESY (Figures III.16 et III.17) permet de visualiser les corrélations suivantes entre:

- Les deux protons aromatiques du cycle B H-3'/H-5' et deux carbones quaternaires en  $^3J$  résonant à  $\delta_{\text{C}}$  122,1 et 159,4 attribuables aisément aux carbones C-1' et C-4' oxygéné respectivement (Figure III.14);
- Les deux protons H-2'/H-6' et deux carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  147,8 et 159,4 s'accordant aux carbones C-2 et C-4' respectivement (Figures III.14 et III.15);
- Les protons du méthoxyle avec un carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  132 ; l'absence de l'effet NOE entre ce méthoxyle et le proton H-2' ou H-6' du cycle B indique que la position C-8 est non substituée, ce qui permet l'emplacement du méthoxyle au niveau du carbone C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  132) du cycle A (Figure III.16).

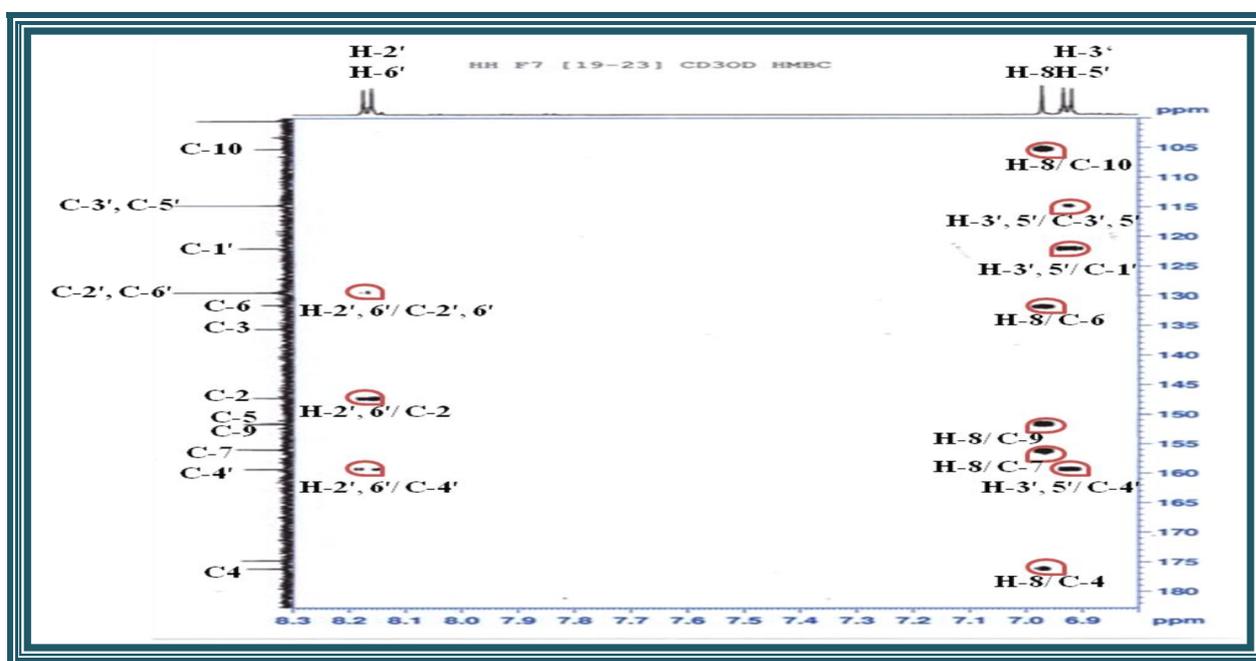


Figure III.14: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé 1

Le spectre HMBC permet d'observer aussi des taches de corrélations entre le proton H-8 ( $\delta_H$  6,95) et le carbone C-6 déjà assigné et d'autres carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  105,3, 151,8, 156,4 et 176,3 correspondant aux carbones C-10, C-9, C-7 et C-4 respectivement (Figures III.14 et III.15).

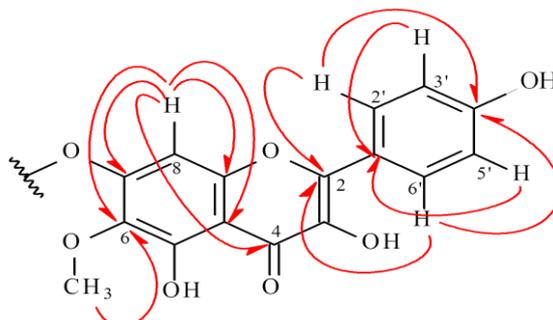


Figure III.15 : Corrélations HMBC de la partie aglycone

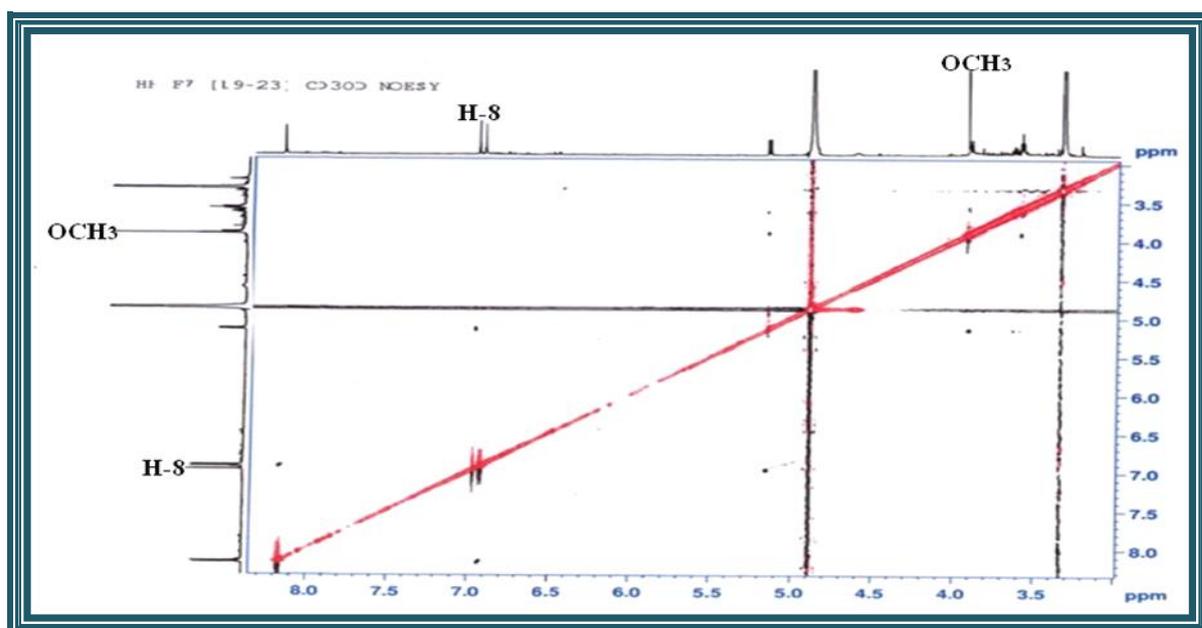


Figure III.16: Spectre NOESY du composé 1

Les carbones quaternaires oxygénés résonant à  $\delta_C$  135,9 et 151,6 sur le spectre RMN <sup>13</sup>C sont attribuables aux atomes de carbone C-3 et C-5.

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'aglycone comme étant le 6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther (Figure III.17).<sup>[144]</sup>

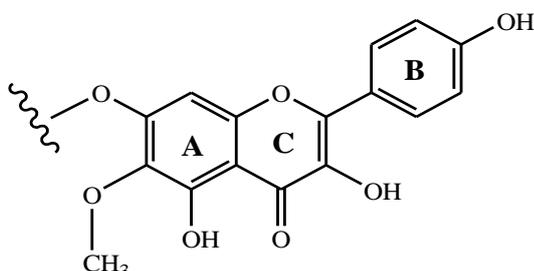


Figure III.17: 6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther

## Partie osidique

L'expérience COSY H-H permet d'attribuer les protons de l'unité osidique en révélant la présence d'un système de spins à cinq protons (Figures III.18 et III.19). On y observe les corrélations entre:

- Le proton anomérique H-1'' [ $\delta_H$  5,15 (*d*,  $J = 7,6$  Hz)] et le proton H-2'' [ $\delta_H$  3,63 (*dd*,  $J = 8,9 ; 7,6$  Hz)] ;
- Le proton H-2'' et H-3'' [ $\delta_H$  3,54 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)] ;
- Le proton H-3'' et H-4'' [ $\delta_H$  3,58 (*m*)] ;
- Le proton H-4'' et H-5'' [ $\delta_H$  3,91 (*t*,  $J = 9,4$  Hz)].

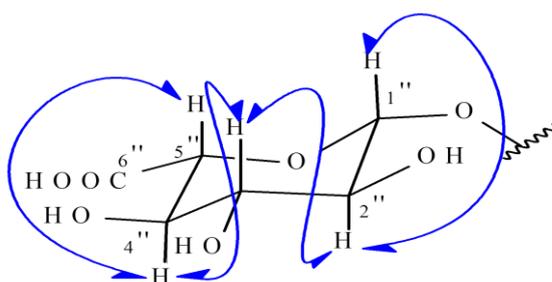


Figure III.18 : Corrélations COSY du sucre

Les constantes de couplage entre tous les protons sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons. Le proton H-5'' qui résonne sous forme d'un doublet avec une constante de couplage  $J = 9,4$  Hz est caractéristique d'un acide glucuronique. <sup>[145,146]</sup>

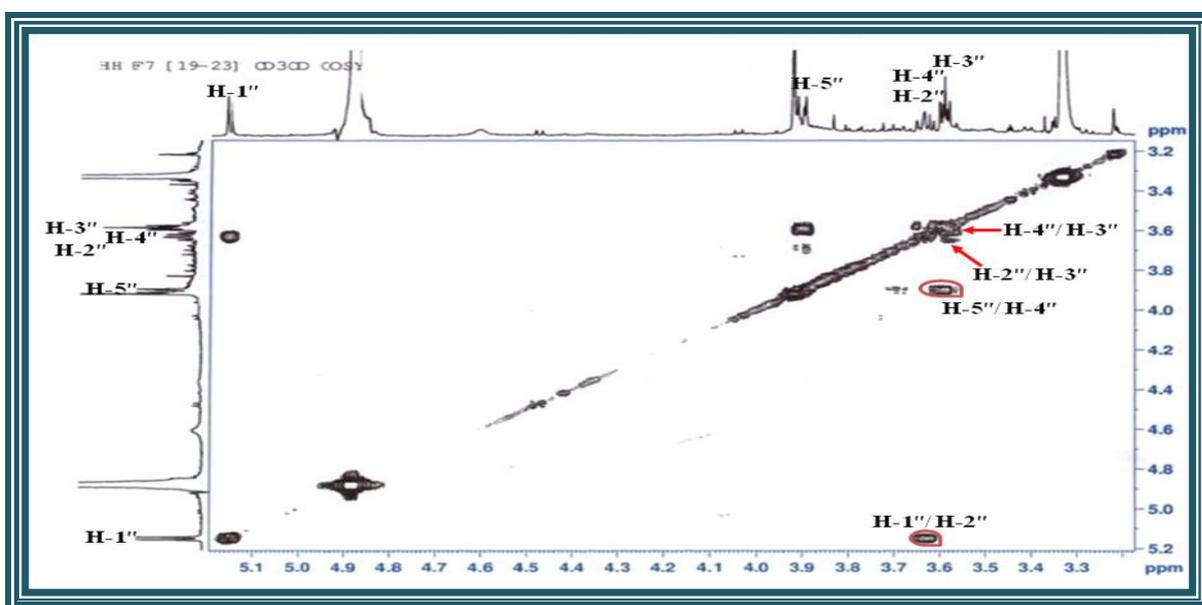


Figure III.19: Spectre COSY de la partie osidique du composé 1

Les déplacements chimiques de leur carbone sont attribués à  $\delta_C$  100,5 (C-1''), 73,2 (C-2''), 76,3 (C-3''), 72 (C-4''), 75,2 (C-5'') et 174,8 (C-6''), à partir de l'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et HSQC  $J$ -modulé (Figures III.12 et III.20). La grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-1''/H-2'' ( $J = 7,6$  Hz) indique qu'il s'agit d'un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranoïque.

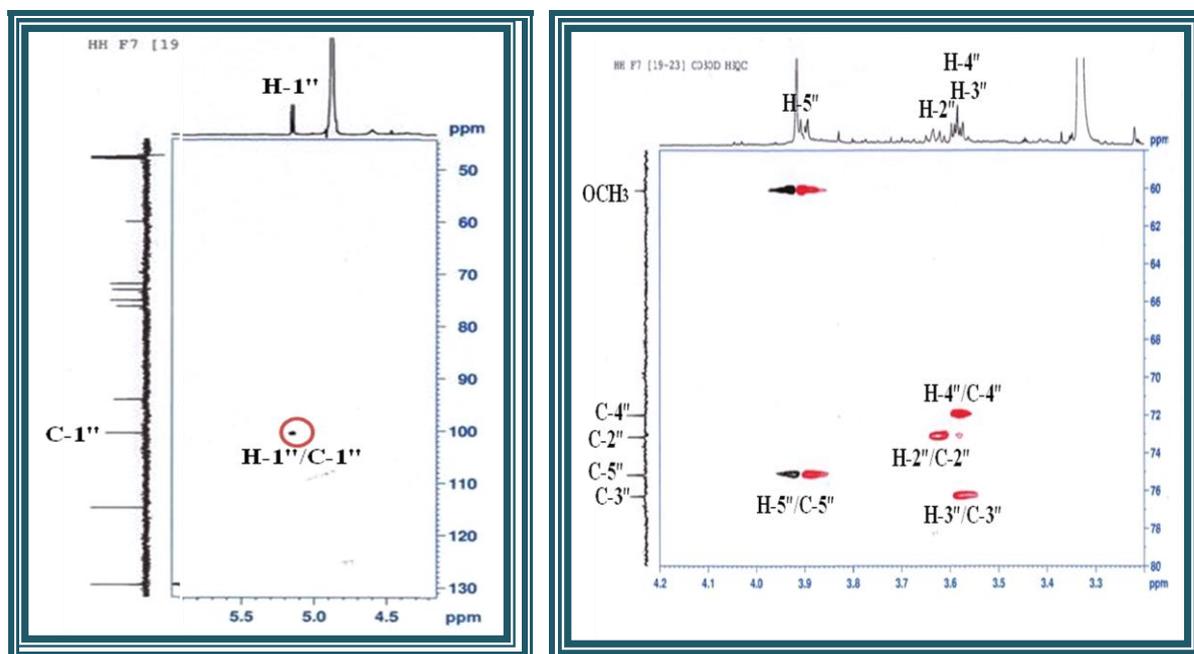


Figure III.20: Spectres HSQC de la partie osidique du composé 1

L'expérience de corrélation HMBC (Figure III.21) confirme la nature du sucre par la présence d'une tache de corrélation en  $^2J$  entre le proton H-5'' et le carbonyle acide C-6'' ( $\delta_C$  174,8) (Figure III.22).

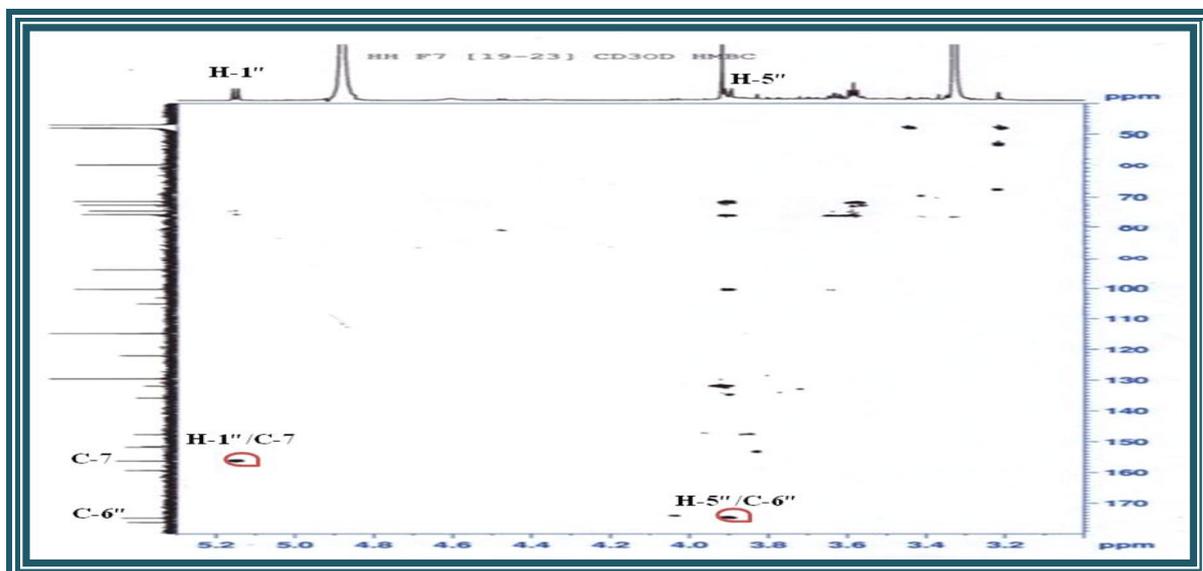


Figure III.21: Spectre HMBC du composé 1

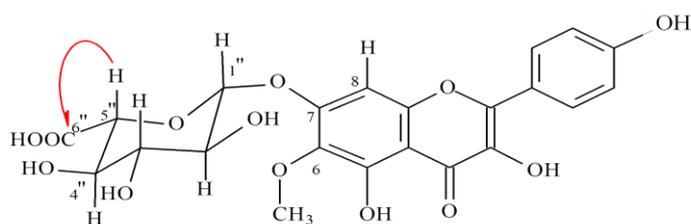


Figure III.22 : Corrélation HMBC entre H-5'' et C-6''

L'analyse du spectre NOESY (Figure III.24) atteste de la position axiale des protons osidiques par la visualisation d'effets nOe entre les protons H-1''/H-3'', H-1''/H-5'' et H-3''/H-5'' (Figure III.23).

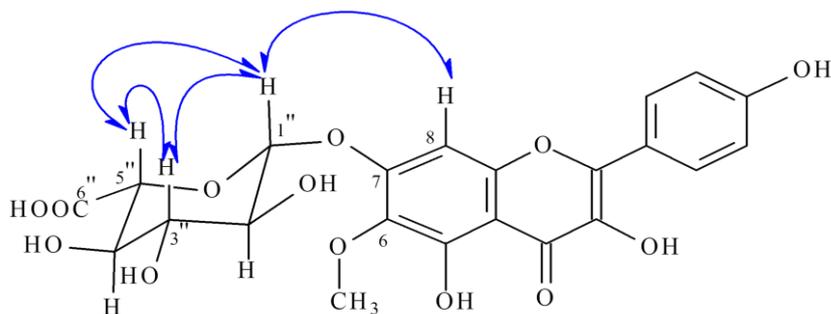


Figure III.23 : Corrélations nOe

La corrélation en  $^3J_{\text{H-C}}$  observée sur le spectre HMBC (Figure III.21) entre le proton anomère H-1'' de l'acide  $\beta$ -D-glucuronopyranoïque et le carbone C-7 de l'aglycone (cycle A) permet de déterminer le branchement du sucre à ce carbone, cela est confirmé par l'effet nOe entre le proton H-8 et le proton anomérique H-1'' (Figures III.23 et III.24).

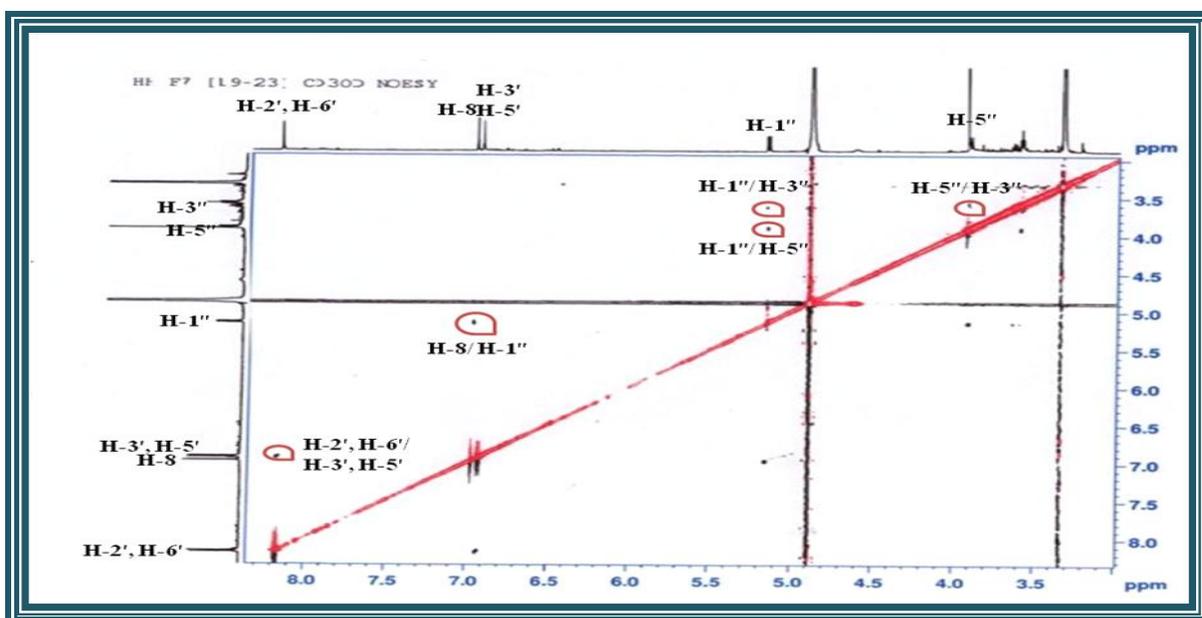


Figure III.24: Spectre NOESY du composé 1

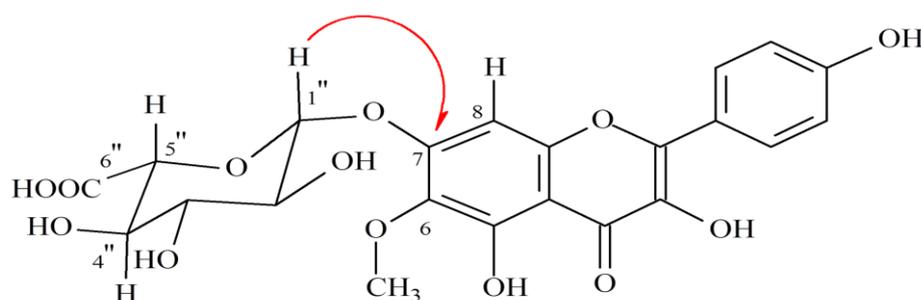


Figure III.25 : Corrélation HMBC H-1''/C-7

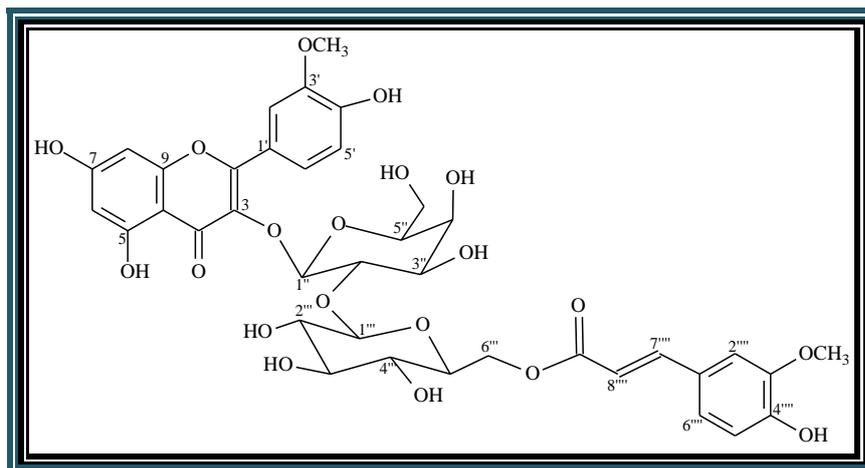
L'ensemble de ces données et la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -51.4^\circ$  ( $C = 0,35$  g/100 ml, MeOH) permettent d'assigner pour le nouveau composé **1** la structure suivante: 6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther 7-O- $\beta$ -glucopyranuronoside, appelée aussi Atraflavoside A.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **1** sont regroupés dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de **1** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| Position       | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( $m, J$ en Hz)   |
|----------------|------------------|------------------------------|
| 2              | 147,8            | -                            |
| 3              | 135,9            | -                            |
| 4              | 176,3            | -                            |
| 5              | 151,6            | -                            |
| 6              | 132              | -                            |
| 7              | 156,4            | -                            |
| 8              | 94,2             | 6,95 ( <i>s</i> )            |
| 9              | 151,8            | -                            |
| 10             | 105,3            | -                            |
| 1'             | 122,1            | -                            |
| 2'             | 129,6            | 8,15 ( <i>d</i> , 8,9)       |
| 3'             | 114,9            | 6,93 ( <i>d</i> , 8,9)       |
| 4'             | 159,4            | -                            |
| 5'             | 114,9            | 6,93 ( <i>d</i> , 8,9)       |
| 6'             | 129,6            | 8,15 ( <i>d</i> , 8,9)       |
| 6-OMe          | 60,1             | 3,92 ( <i>s</i> )            |
| 7-O-glucor-1'' | 100,5            | 5,15 ( <i>d</i> , 7,6)       |
| 2''            | 73,2             | 3,63 ( <i>dd</i> , 8,9; 7,6) |
| 3''            | 76,3             | 3,57 ( <i>t</i> , 8,9)       |
| 4''            | 72               | 3,58 ( <i>m</i> )            |
| 5''            | 75,2             | 3,91( <i>d</i> , 9,4)        |
| 6''            | 174,8            | -                            |

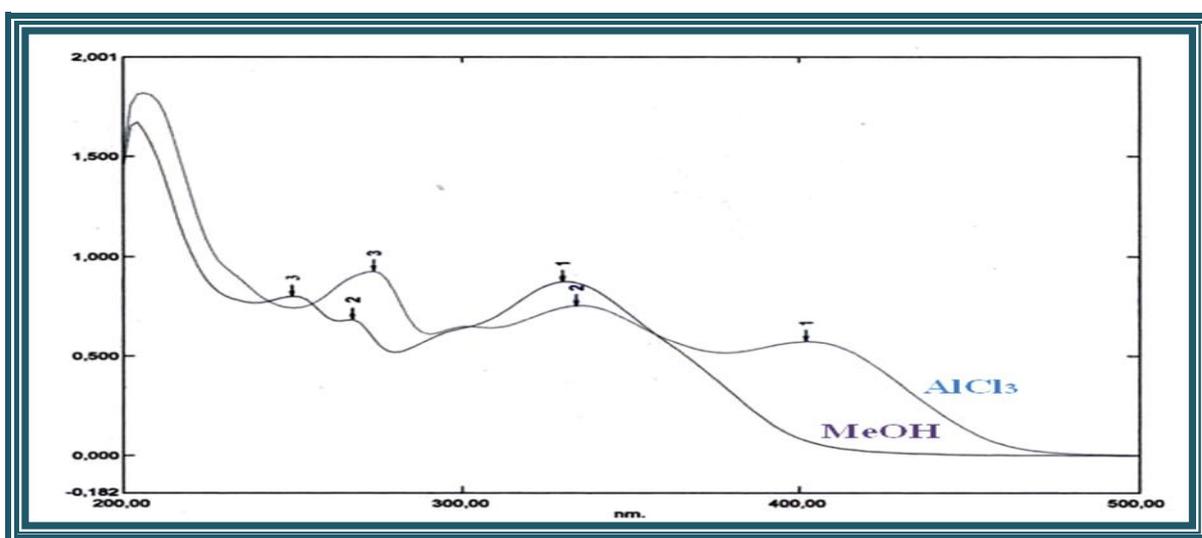
## III-4-4-1-2 Elucidation structurale du composé 2



**Isorhamnétine 3-O-[(6'''-O-E-feruloyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside (2) (Atraflavoside B)**

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible en UV à 254 et 366 nm, il se colore en jaune par pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage. Il s'agit d'un nouveau flavonoïde glycosylé appelé Atraflavoside B. La fluorescence violette sombre du composé 2 sous la lampe UV à 366 nm suggère qu'il s'agit d'une flavone ou flavonol substitué en 3 (3-OR).

Le spectre d'absorption ultraviolette (Figure III.26) enregistré dans le méthanol montre 3 bandes d'absorption à 250, 270, 330 nm, attestant de la présence d'un squelette flavonique acylé. L'addition de  $\text{AlCl}_3$  provoque un déplacement bathochromique de la bande I (+72 nm), indiquant la présence d'un OH libre en 5.



**Figure III.26 : Spectre UV du composé 2**

Le spectre IR de ce composé (Figure III.27) montre des bandes d'absorption à  $3383\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyle),  $1705\text{ cm}^{-1}$  (carbonyle),  $1651\text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma$ -pyrone, C-4) et à  $1602, 1511\text{ cm}^{-1}$  (système aromatique).

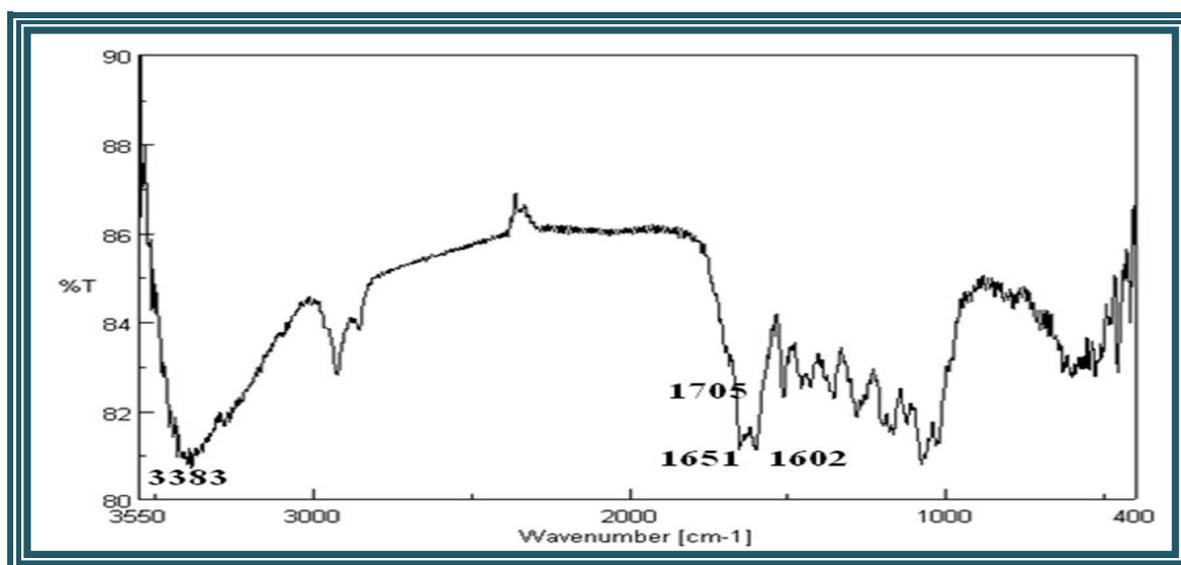


Figure III.27 : Spectre IR du composé 2

Le spectre de masse du composé 2 (Figure III.28) enregistré en mode positif par ionisation douce ESI exhibe deux pics pseudomoléculaires à  $m/z$  839  $[M+Na]^+$  et 855  $[M+K]^+$ , soit une masse moléculaire de 816 uma, correspondant à la formule brute  $C_{38}H_{40}O_{20}$ .

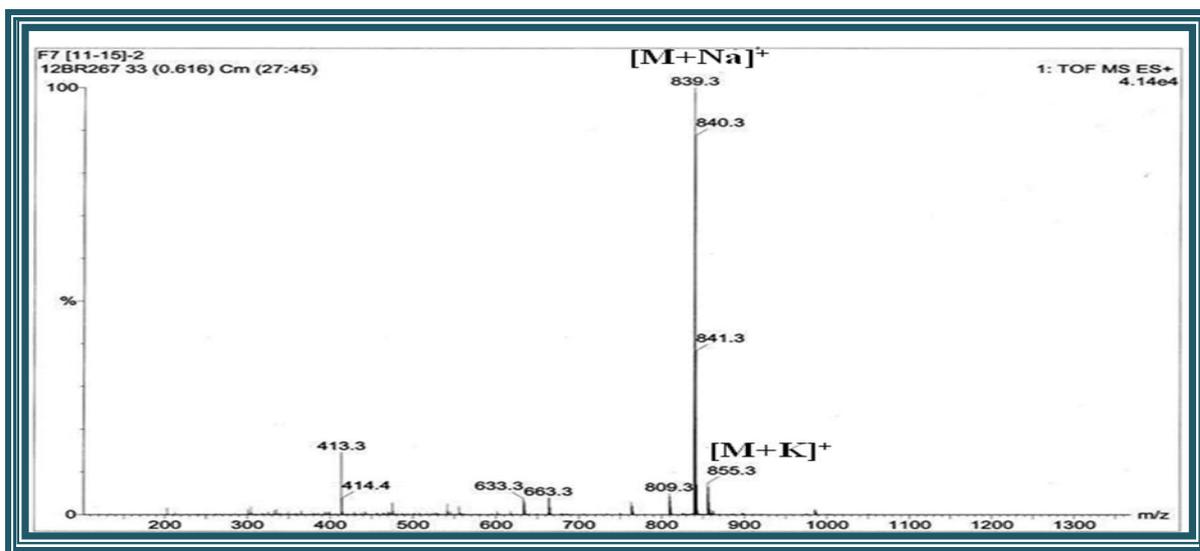


Figure III.28 : Spectre de masse ESI-MS du composé 2

Le spectre de masse HR-ESIMS (Figure III.29) du composé 2 présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  839,2017 (calc.  $C_{38}H_{40}O_{20}Na$ , 839,2011).

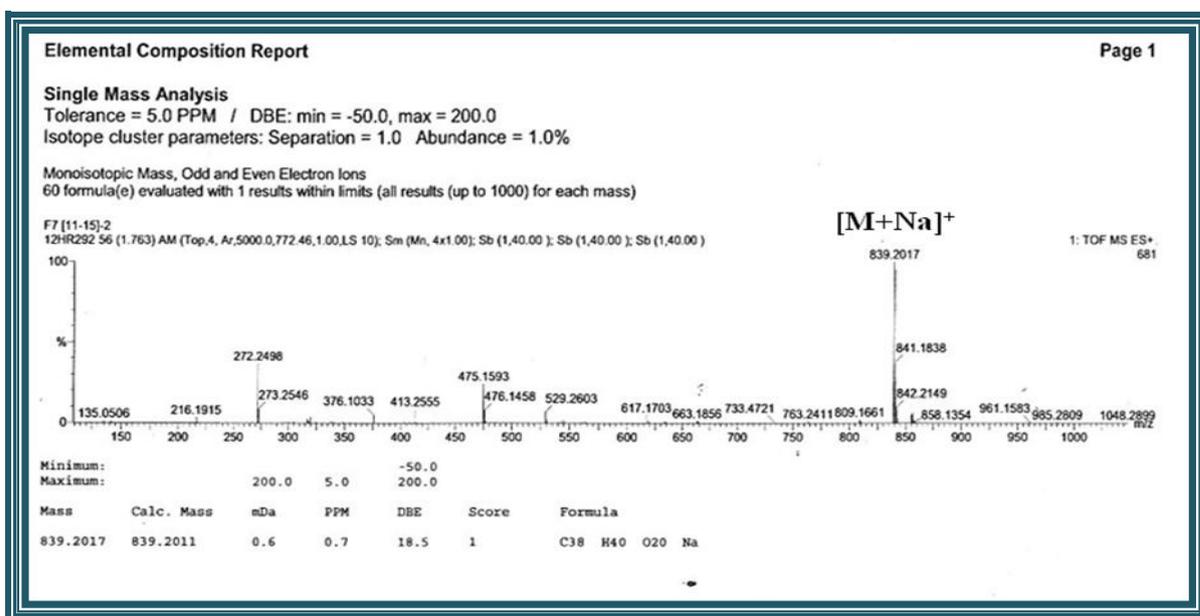


Figure III.29 : Spectre de masse HR-ESIMS du composé 2

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.30) du composé 2 enregistré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  montre des signaux de plusieurs protons aromatiques résonant entre 6,10 et 7,80 ppm et de protons osidiques sortant entre 3,30 et 5,30 ppm.

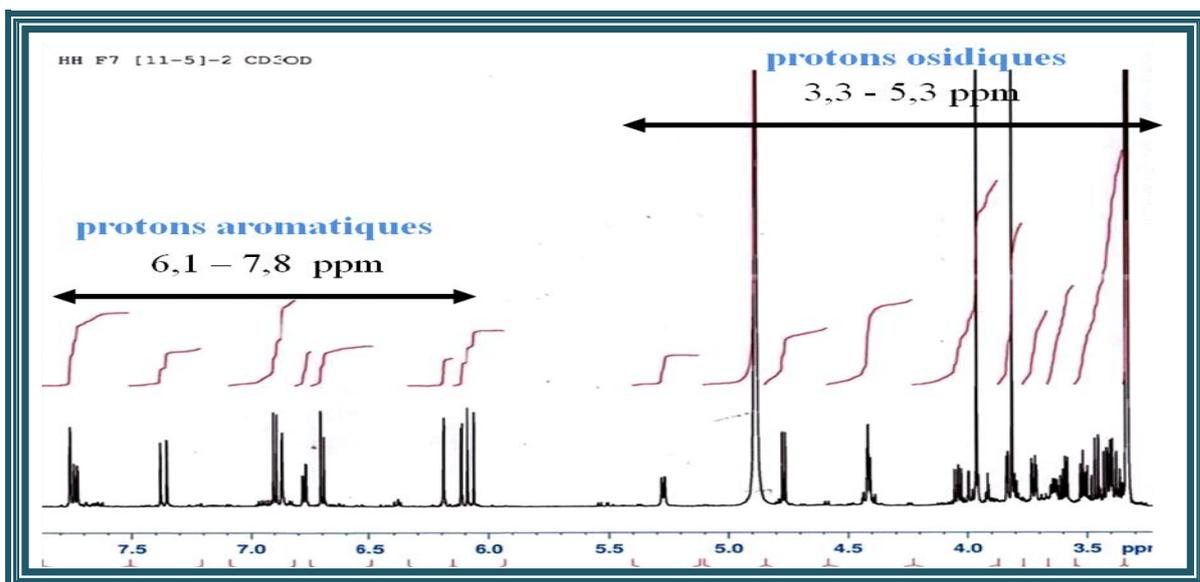


Figure III.30 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 2

L'analyse structurale des spectres de RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.32), COSY H-H (Figure III.34) du composé 2 révèle:

- Deux signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,19 et  $\delta_{\text{H}}$  6,11 d'intégration 1H chacun sous forme de doublet. La valeur des constantes de couplage entre ces protons ( $J = 2$  Hz) indique que le couplage est de type méta.

Selon le spectre COSY ces deux protons appartiennent à un même système de spins, correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonol (Figure III.31).

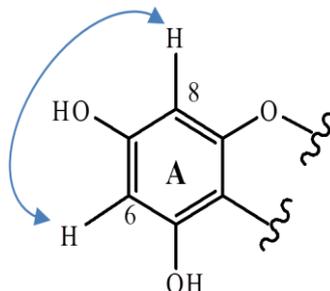


Figure III.31 : Corrélation COSY entre H- 6 et H-8 du cycle A

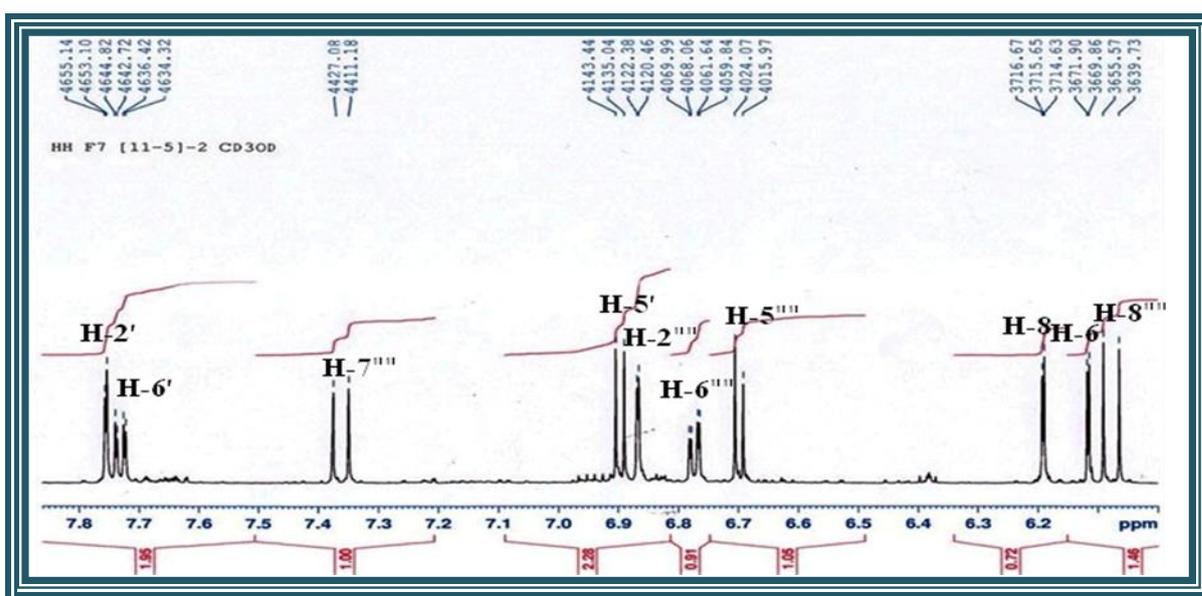


Figure III.32: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 2

- Trois protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  7,76 ( $d$ ,  $J = 2$  Hz), 6,89 ( $d$ ,  $J = 8,4$  Hz) et 7,74 ( $dd$ ,  $J = 8,4$  ; 2 Hz), dont les constantes de couplage attestent qu'ils forment un système ABX à trois protons caractéristique d'un noyau aromatique 1',3',4'-trisubstitué, qui est le cycle B du flavonol. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-5' et H-6' (Figure III.33).

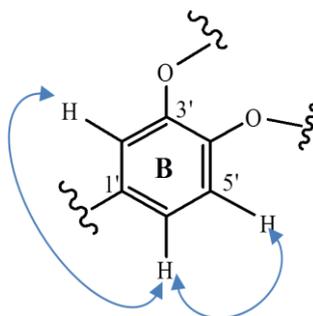


Figure III.33 : Corrélation COSY entre H- 2', H-5' et H-6' du cycle B

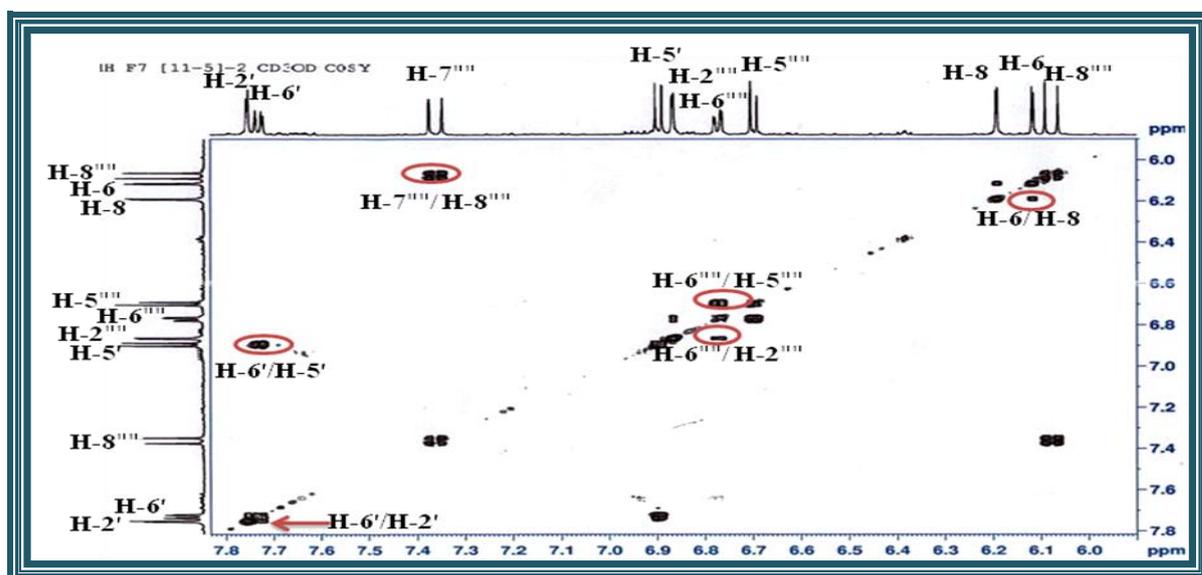
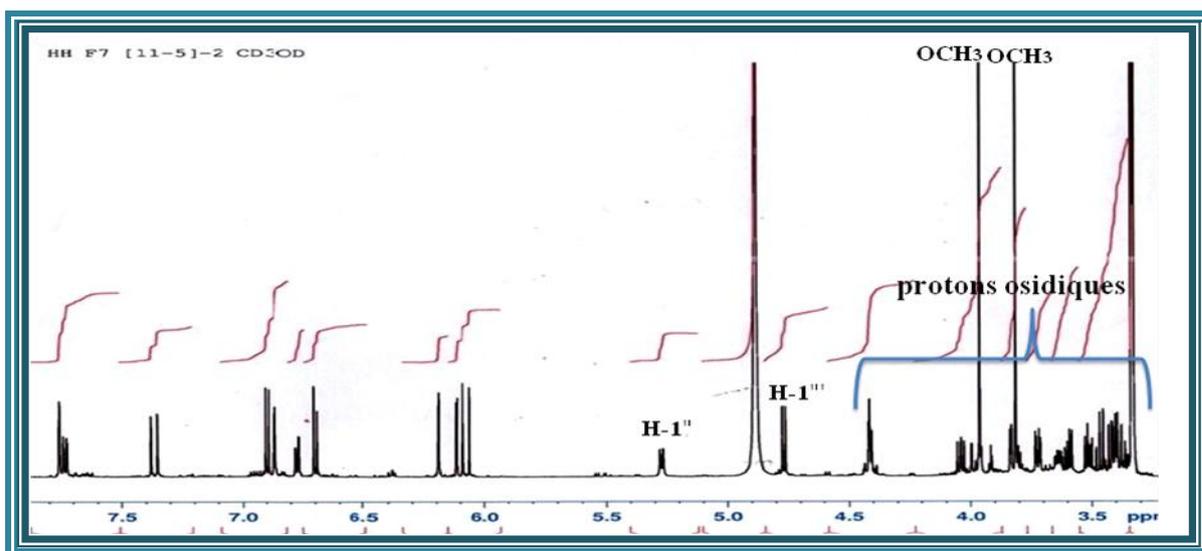


Figure III.34: Spectre COSY du composé 2

En plus de ces signaux, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.35) permet de visualiser :

- Deux méthoxyles à  $\delta_{\text{H}}$  3,95 et 3,81;
- Deux protons anomériques résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,27 ( $d$ ,  $J = 7,6$  Hz) et 4,54 ( $d$ ,  $J = 7,6$  Hz);
- Des amas de signaux entre 3,30 et 4,50 ppm attribuables aux protons d'aux moins de deux sucres.

Figure III.35: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 2

Il est également observé (Figures III.32 et III.34):

- Un deuxième système ABX constitué par trois protons aromatiques apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  6,86 ( $d$ ,  $J = 1,9$  Hz), 6,70 ( $d$ ,  $J = 8,1$  Hz) et 6,77 ( $dd$ ,  $J = 8,1; 1,9$  Hz). Selon le spectre COSY ces trois protons appartiennent à un même système de spins, correspondant aux protons H-2''', H-5'''' et H-6'''' d'un autre noyau aromatique;

- Deux protons oléfiniques détectés à  $\delta_H$  7,34 (*d*,  $J = 15,9$  Hz) et 6,07 (*d*,  $J = 15,9$  Hz), corrélant sur le spectre HSQC avec les carbones résonant à  $\delta_C$  145,4 et 113,4 respectivement. La grande valeur de la constante de couplage indique une géométrie *trans* de la double liaison (Figure III.36).

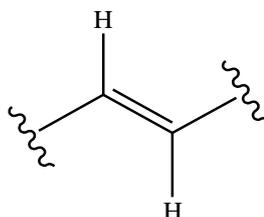


Figure III.36 : Géométrie *trans* de la double liaison

Les spectres RMN  $^{13}C$  et DEPT du composé **2** (Figures III.37 et III.38), permettent de compter 38 signaux correspondant à 38 atomes de carbone qui sont répartis comme suit:

- Deux carbonyles à  $\delta_C$  178,3 et 167,5 correspondant aux C-4 et carbonyle d'un ester;
- 12 carbones aromatiques oxygénés résonant entre 133 et 165 ppm;
- 8 CH aromatiques entre 93 et 123 ppm;
- Dix CH résonant entre 68 et 103 ppm correspondant aux carbones de deux unités osidiques;
- Deux méthoxyles ( $OCH_3$ ) détectés à  $\delta_C$  55,4 et 56;
- Deux CH éthyléniques à  $\delta_C$  113,4 et 145,4;
- Deux groupements oxyméthylènes à  $\delta_C$  60,5 et 63,1.

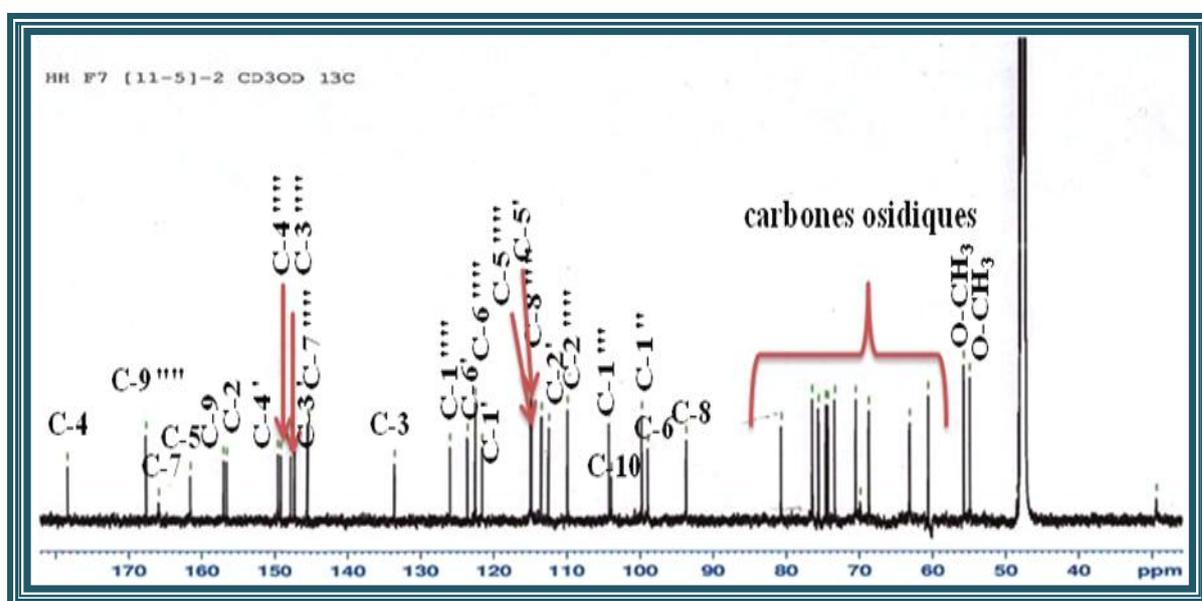


Figure III.37: Spectre RMN  $^{13}C$  du composé **2**

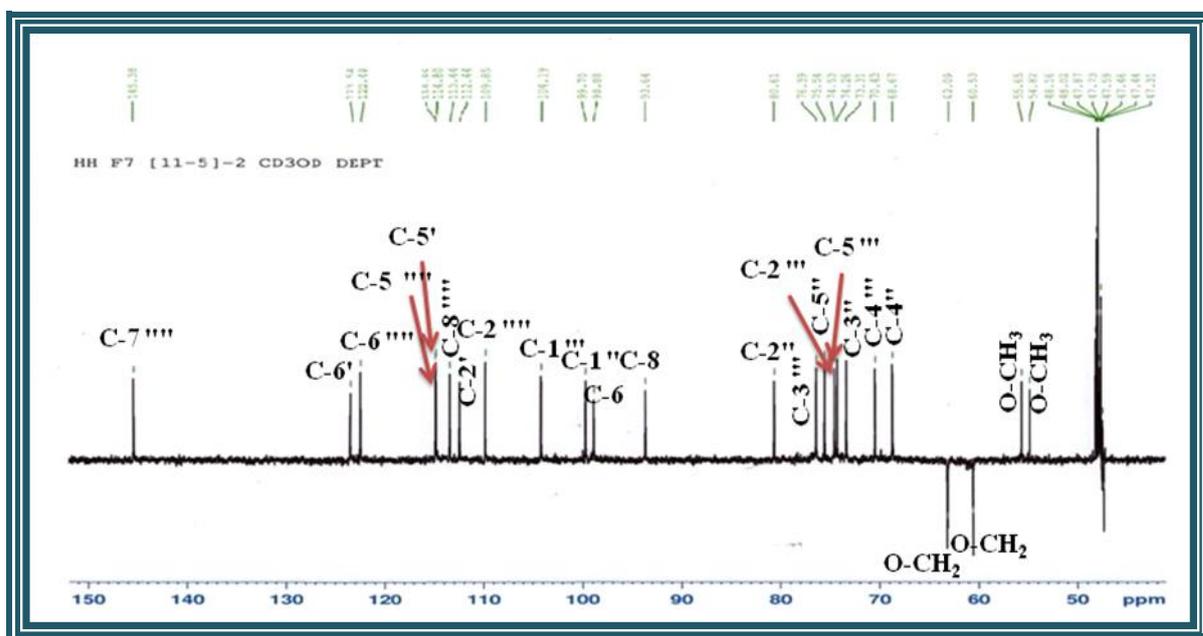


Figure III.38: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 du composé 2

L'analyse combinée des spectres HMBC et HSQC (Figures III.39, III.40 et III.41) a permis l'élaboration de la structure des parties suivantes :

#### La partie aglycone

- Les protons H-6 et H-8 du cycle A déjà identifiés couplant en HSQC avec leur carbone à  $\delta_{\text{C}}$  98,9 et 93,6 corrélient sur le spectre HMBC en  $^2J$  avec un carbone aromatique oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  165,8 (C-7) et en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  103,9 (C-10).
- Les carbones C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  161,5) et C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  156,9) sont identifiés suite aux corrélations qu'ils présentent en  $^2J$  avec les protons H-6 et H-8 respectivement.
- Les deux protons aromatiques H-2' et H-6' du cycle B corrélient en HSQC avec leur carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  112,4 (C-2') et 123,5 (C-6'). Ils couplent en HMBC en  $^3J$  avec un carbone quaternaire oxygéné C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  156,5). Son déplacement chimique confirme que le composé 2 est un flavonol substitué en C-3.<sup>[147]</sup>
- Les protons H-2' et H-5' corrélient en HMBC avec 2 carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  149,5 et 122,1 attribuables aux carbones C-4' et C-1'. Le déplacement chimique du carbone C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  114,8) est déterminé par expérience HSQC.
- Le déplacement chimique du carbone C-4 est localisé à  $\delta_{\text{C}}$  178,3 suite à la corrélation qu'il présente en  $^4J$  avec le proton H-8.
- Le déplacement chimique  $\delta_{\text{C}}$  133,5 est attribuable a priori au carbone C-3.

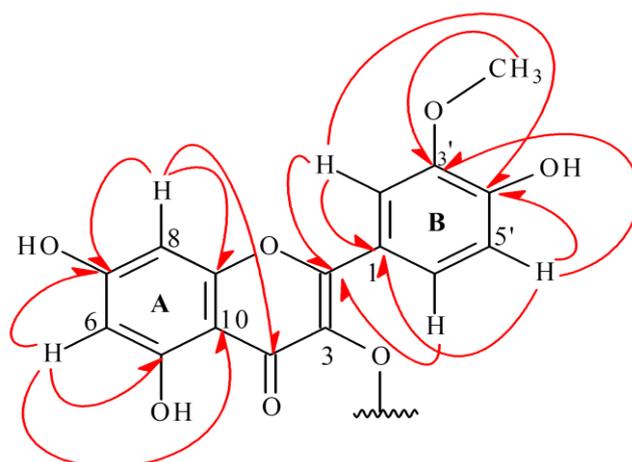


Figure III.39: Corrélations HMBC de la partie aglycone

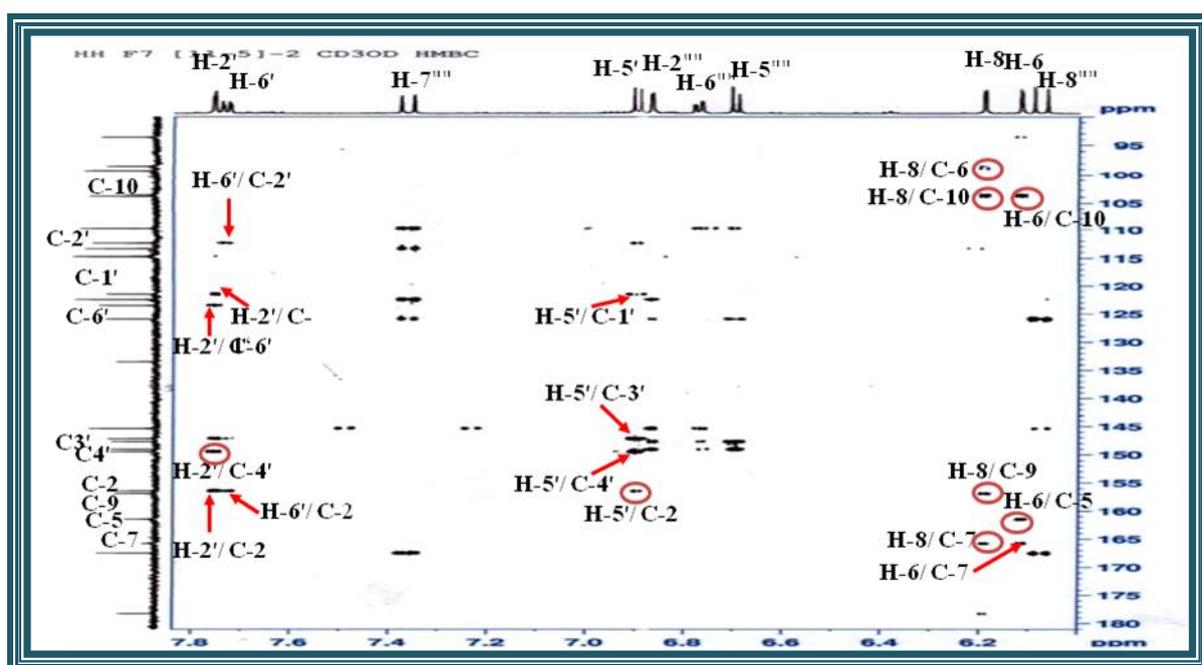


Figure III.40: Spectre HMBC du composé 2

Le carbone aromatique du cycle B porteur du groupement méthoxyle ( $\delta_{\text{H}} 3,95/\delta_{\text{C}} 55,6$ ) est assigné à  $\delta_{\text{C}} 147,2$  suite aux corrélations hétéronucléaire longue distance en  $^3J$  qu'il présente avec les protons de ce méthoxyle et le proton aromatique H-5' (Figure III.41). L'absence d'une corrélation entre H-6' et le carbone substitué par le groupement méthoxyle implique qu'il s'agit du carbone C-3'. Ceci indique que le OH en position C-4' est libre.

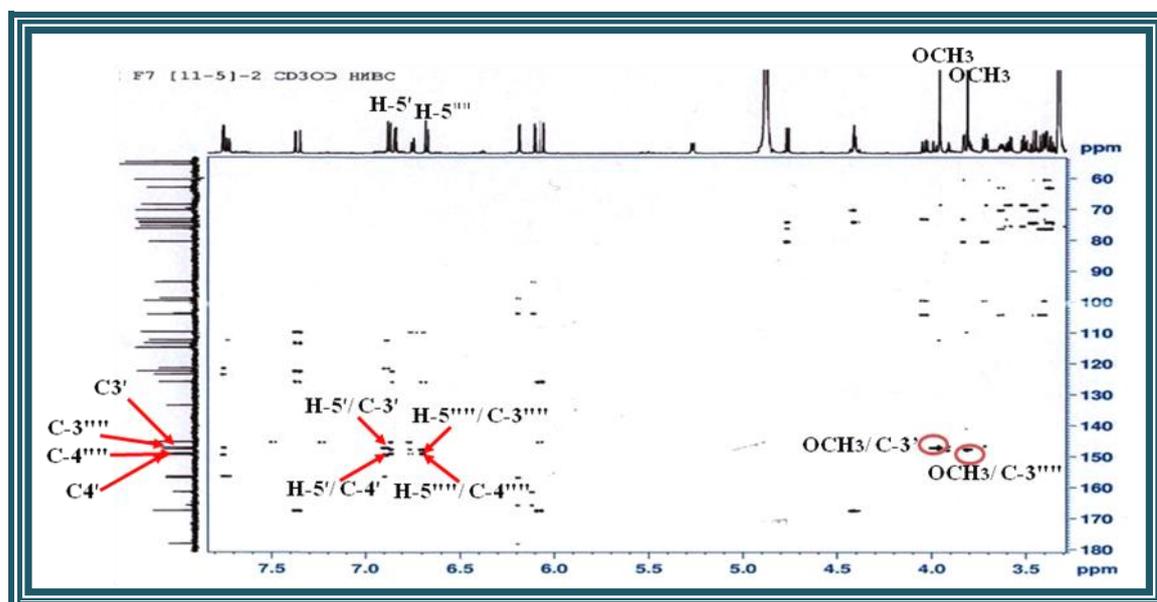


Figure III.41: Spectre HMBC du composé 2

A ce stade d'analyse, tous les protons et carbones des cycles A, B et C sont caractérisés. La partie aglycone du flavonol est identifiée à l'isorhamnétine (Figure III.42).<sup>[148]</sup>

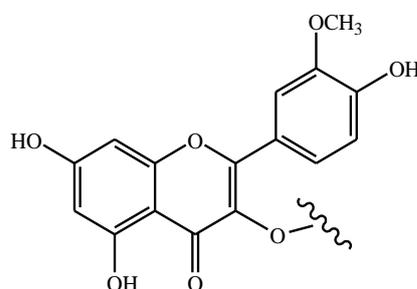


Figure III.42 : Isorhamnétine

### Partie osidique

A partir du proton anomérique H-1'' sortant à  $\delta_H$  5,27 (*d*,  $J = 7,6$  Hz), l'analyse des spectres COSY et TOCSY (Figures III.43, III.44 et III.45), permet de repérer un système de spins à sept protons attestant ainsi de la présence d'un hexose. Le proton H-2'' est localisé à  $\delta_H$  4,04 (*dd*,  $J = 9,6; 7,6$  Hz) suite aux couplages qu'il présente en COSY avec H-1'' et H-3''. Le proton H-3'' résonne à  $\delta_H$  3,72 (*dd*,  $J = 9,6; 3,5$  Hz) et le proton H-4'' dont le signal sort à  $\delta_H$  3,82 (*dd*,  $J = 3,5; 3,4$  Hz). La petite valeur de la constante de couplage entre les protons H-3'' et H-4'' ( $J_{3''-4''} = 3,5$  Hz) met en évidence une position équatoriale du proton H-4''. Le proton H-5'' [ $\delta_H$  3,4 (*m*)], couple avec le proton H-4'' et avec deux protons géminés H<sub>2</sub>-6'' [ $\delta_H$  3,52 (*dd*,  $J = 11,3; 6,3$  Hz), H-6''b et  $\delta_H$  3,59 (*dd*,  $J = 11,3; 5,9$  Hz), H-6''a]. Les valeurs des constantes de couplage entre tous les protons de cette unité osidique sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-galactose.

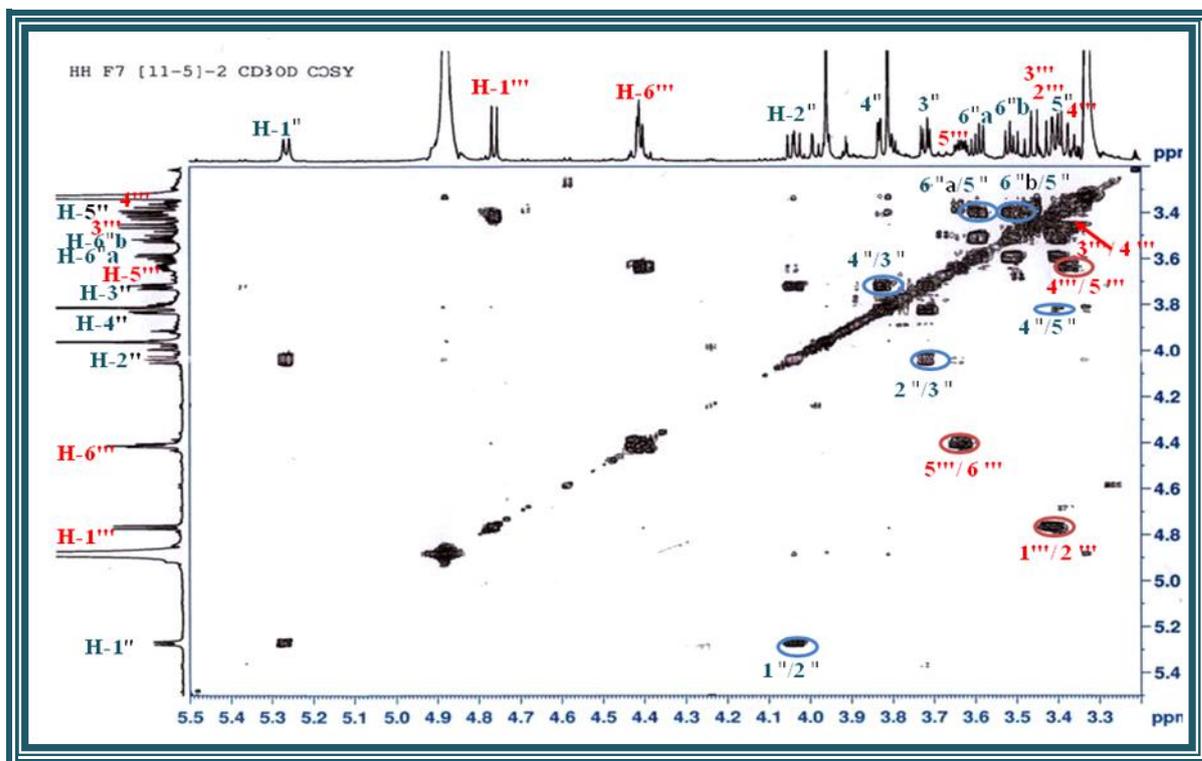


Figure III.43: Spectre COSY de la partie osidique du composé 2

L'analyse de ces spectres révèle aussi un deuxième système de sept spins d'un autre hexose à partir du deuxième proton anomérique H-1''' résonant à  $\delta_H$  4,77 (*d*,  $J = 7,6$  Hz). Les corrélations suivantes ont été observées : H-1'''/H-2''' [ $\delta_H$  3,42 (*dd*,  $J = 9,1; 7,6$  Hz), H-2'''], H-2'''/H-3''' [ $\delta_H$  3,46 (*t*,  $J = 9,1$  Hz), H-3'''], H-3'''/H-4''' [ $\delta_H$  3,38 (*t*,  $J = 9,1$  Hz), H-4'''], H-4'''/H-5''' [ $\delta_H$  3,64 (*ddd*,  $J = 9,1; 5,6; 3$  Hz), H-5'''] et H-5'''/H-6''' [ $\delta_H$  4,42 (*m*), H-6''']. Les constantes de couplage vicinales entre les protons H-1'''/H-2'''/H-3'''/H-4'''/H-5''' toutes supérieures à 7 Hz, indiquent des positions *trans*-diaxiales entre ces protons, caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucose.

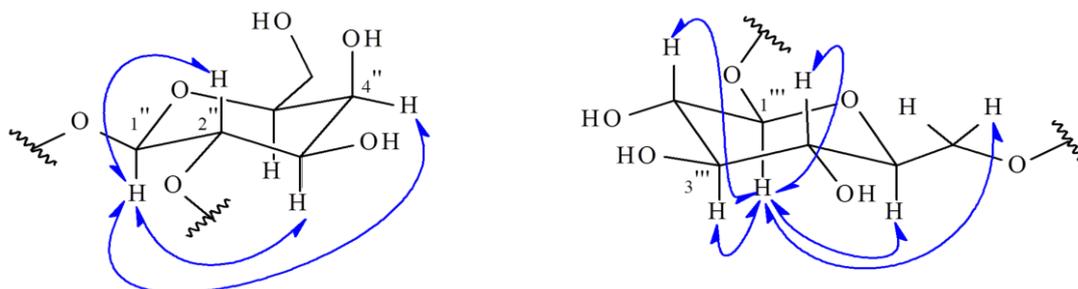


Figure III.44: Corrélations TOCSY des sucres



## Partie acyle

Le proton éthylénique H-8''' repéré à  $\delta_H$  6,07 (d,  $J = 15,9$  Hz) corrèle en HMBC (Figures III.47 et III.48) avec un carbone méthine CH-7''' ( $\delta_C$  145,4) et deux carbones quaternaires résonant à 167,5 et 125,9 ppm. La distinction entre ces deux carbones est facile car il s'agit d'un carbonyle C-9''' ( $\delta_C$  167,5) et un carbone aromatique C-1''' ( $\delta_C$  125,9).

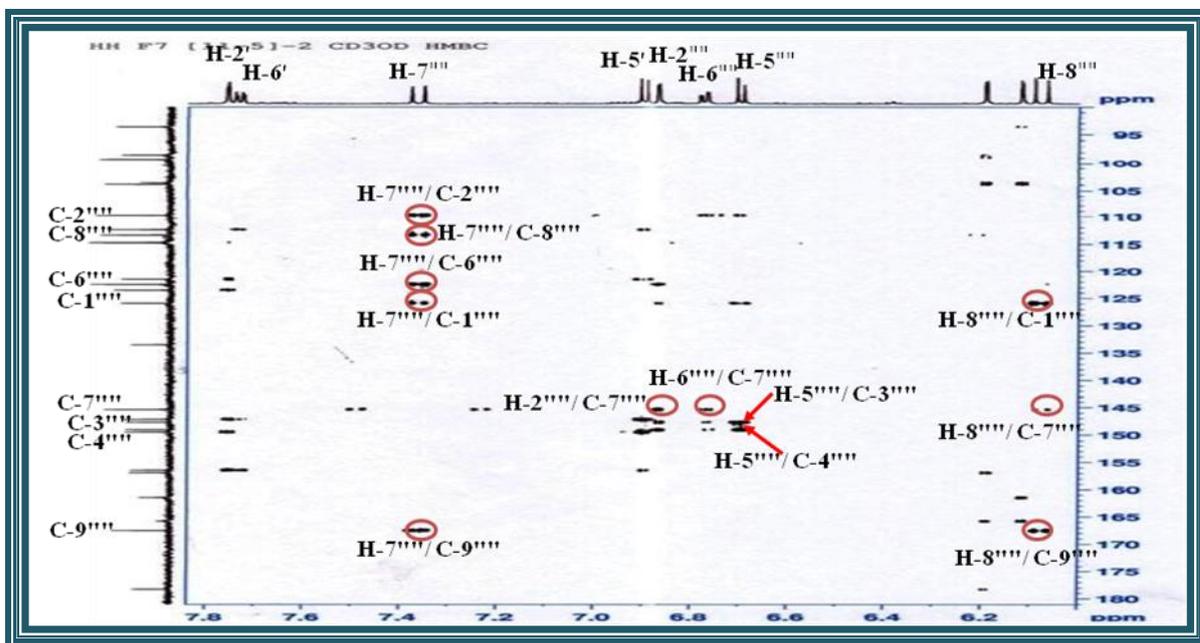


Figure III.47: Spectre HMBC de la partie acyle du composé 2

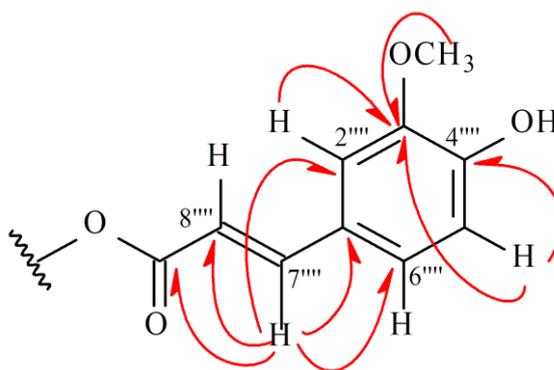


Figure III.48: Corrélations HMBC de la partie acyle

L'analyse du spectre HSQC de la partie acyle (Figure III.49) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-2''' ( $\delta_C$  109,9), C-5''' ( $\delta_C$  114,9), et C-6''' ( $\delta_C$  122,5) dont les protons ont été déjà identifiés (Figures III.32 et III.34).

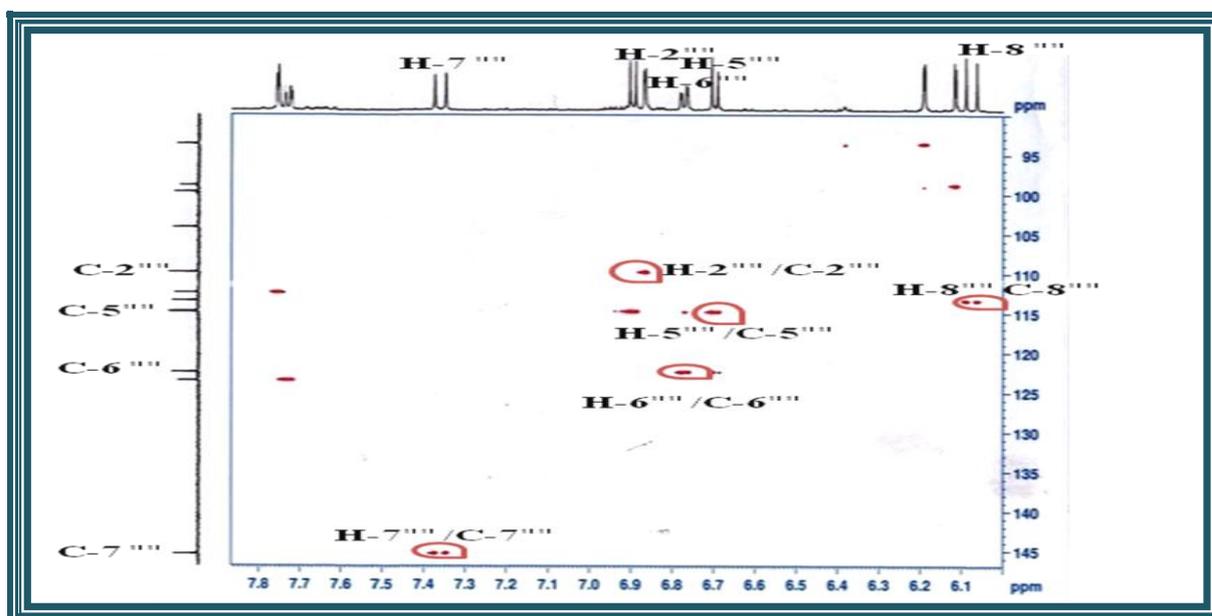


Figure III.49: Spectre HSQC de la partie acyle du composé 2

Le spectre HMBC (Figures III.47 et III.48) montre également des taches de corrélation entre le 2<sup>ème</sup> proton oléfinique H-7''' détecté à  $\delta_H$  7,34 ( $d, J = 15,9$  Hz) et cinq carbones C-2''' ( $\delta_C$  109,9), C-8''' ( $\delta_C$  113,4), C-6''' ( $\delta_C$  145,4), C-1''' ( $\delta_C$  125,9) et C-9''' ( $\delta_C$  167,5).

Il est observé aussi sur le spectre HMBC (Figures III.47 et III.48) des taches de corrélation entre les protons H-2''', H-5''' et H-6''' avec un carbone quaternaire oxygéné résonant à  $\delta_C$  149,1 ne pouvant être que le carbone C-4''' porteur d'un OH libre.

Les protons aromatiques H-2''' et H-5''' ainsi que les protons du deuxième groupement méthoxyle ( $\delta_H$  3,81/ $\delta_C$  54,8) corrélient en HMBC avec un carbone résonant à 147,7 ppm correspondant au carbone C-3'''. Ce qui permet de localiser le deuxième méthoxyle sur le carbone C-3''' du groupement acyle (Figures III.41, III.47 et III.48).

Toutes ces analyses spectroscopiques permettent d'attribuer la structure suivante à l'unité acyle comme étant *E*-feruloyle (Figure III.50).<sup>[149,150]</sup>

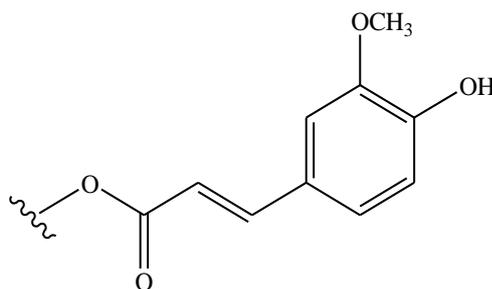


Figure III.50 : *E*-feruloyle

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.51 et III.52) permet de déterminer l'enchaînement des deux unités osidiques:  $\beta$ -D-galactose et  $\beta$ -D-glucose et l'unité feruloyle.

En effet, l'expérience HMBC montre le couplage entre les deux protons  $H_{2-6''}$  ( $\delta_H$  4,42, *m*) du  $\beta$ -D-glucoopyranosyle et le carbonyle résonant à  $\delta_C$  167,5 (C-9'''), confirmant ainsi la substitution en C-6''' par un groupement feruloyle (Figures III.51 et III.52).

La corrélation observée entre le proton anomérique  $H-1'''$  ( $\delta_H$  4,77) du  $\beta$ -D-glucose et le carbone C-2'' ( $\delta_C$  80,6) du  $\beta$ -D-galactose permet d'établir le séquençage des sucres constituant la partie osidique. Le deblindage de ce carbone indique l'existence de la liaison interglycosidique entre ces deux oses ( $1''' \rightarrow 2''$ ). [151, 152]

L'observation d'une tache de corrélation entre le carbone C-3 ( $\delta_C$  133,5) du flavonol et le proton anomérique  $H-1''$  ( $\delta_H$  5,27) du  $\beta$ -D-galactose, confirme le point de branchement en C-3 entre l'aglycone et la partie osidique (Figures III.51 et III.52).

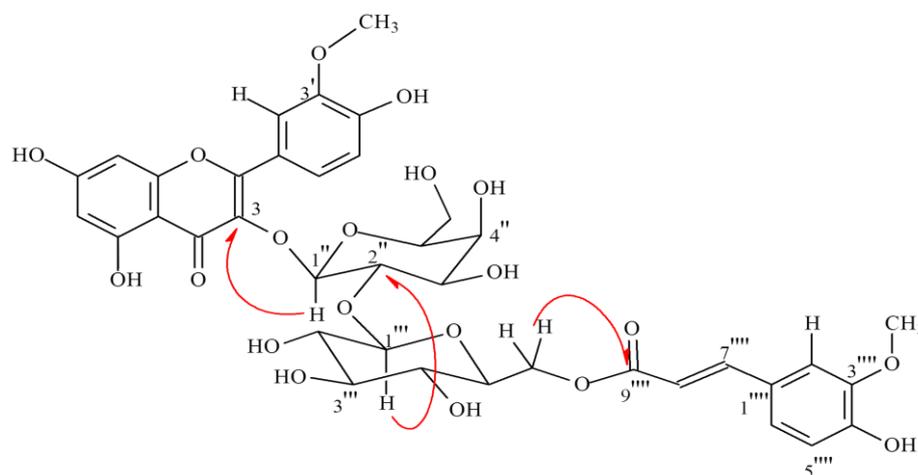


Figure III.51 : Corrélations HMBC

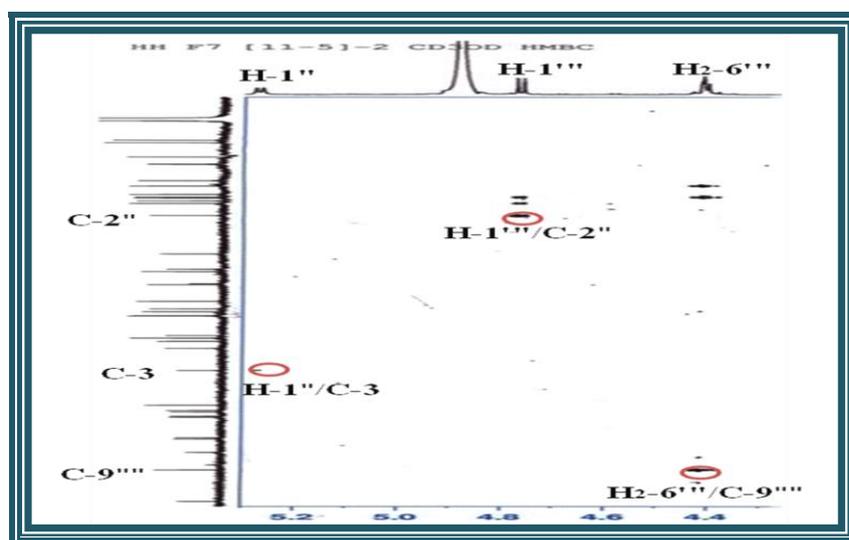


Figure III.52: Spectre HMBC du composé 2

L'analyse du spectre NOESY (Figures III.53 et III.54) permet de visualiser les corrélations à travers l'espace entre les protons :

- H-7'''/H-2''' et H-2'''/O-CH<sub>3</sub> (C-3''') de l'unité feruloyle et H-2'/O-CH<sub>3</sub> (C-3') du noyau B, confirmant les attributions de ces deux groupements méthoxyles;
- H-1''' du β-D-glucose et H-2'' β-D-galactose traduisant leur attachement ainsi que leur proximité dans l'espace.

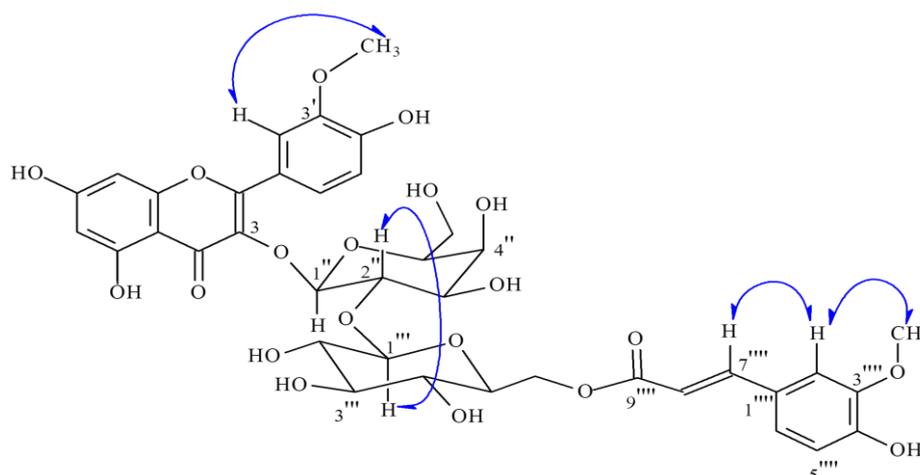


Figure III.53: Corrélations NOESY

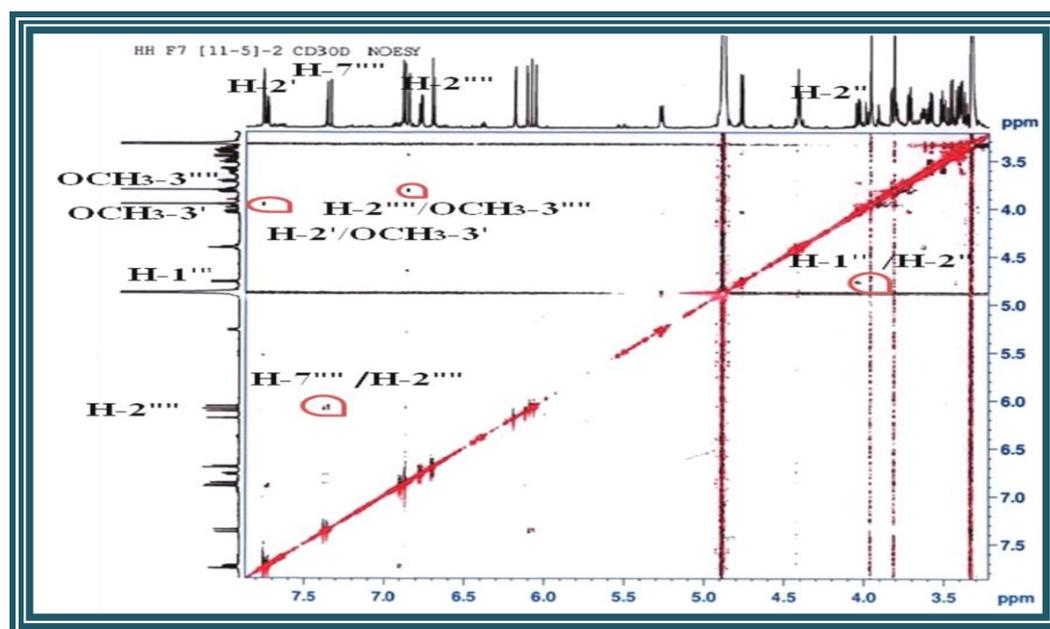


Figure III.54: Spectre NOESY du composé 2

L'ensemble de ces données et la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -31,2^\circ$  ( $C = 0,2$  g/100 ml, MeOH) permettent d'assigner pour le composé 2 la structure nouvelle suivante:

Isorhamnétine 3-*O*-[(6'''-*O*-*E*-feruloyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopyranoside, appelé aussi Atrflavoside B.

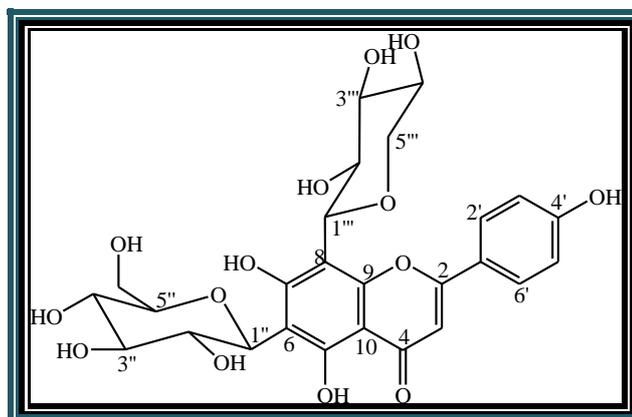
Le tableau III.2 contient tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 2.

Tableau III.2 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 2 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

| Position       | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                               |
|----------------|---------------------------|--|
| 2              | 156,5                     | -  |
| 3              | 133,5                     | -  |
| 4              | 178,3                     | -  |
| 5              | 161,5                     | -  |
| 6              | 98,9                      | 6,11 ( <i>d</i> , 2)   |
| 7              | 165,8                     | -  |
| 8              | 93,6                      | 6,19 ( <i>d</i> , 2)   |
| 9              | 156,9                     | -  |
| 10             | 103,9                     | -  |
| 1'             | 121,5                     | -  |
| 2'             | 112,4                     | 7,76 ( <i>d</i> , 2)   |
| 3'             | 147,2                     | -  |
| 4'             | 149,5                     | -  |
| 5'             | 114,8                     | 6,89 ( <i>d</i> , 8,4)   |
| 6'             | 123,5                     | 7,74 ( <i>dd</i> , 8,4; 2)   |
| 3'-OMe         | 55,6                      | 3,95 ( <i>s</i> )  |
| 3-O-galc-1''   | 99,7                      | 5,27 ( <i>d</i> , 7,6)   |
| 2''            | 80,6                      | 4,04 ( <i>dd</i> , 9,6; 7,6)   |
| 3''            | 73,3                      | 3,72 ( <i>dd</i> , 9,6 ; 3,5)  |
| 4''            | 68,7                      | 3,82 ( <i>dd</i> , 3,5 ; 3,4)  |
| 5''            | 75,5                      | 3,40 ( <i>m</i> )  |
| 6''            | 60,5                      | 3,52 ( <i>dd</i> , 11,3 ; 6,3) H-6''b<br>3,59 ( <i>dd</i> , 11,3 ; 5,9) H-6''a |
| 2''-O-glc-1''' | 104,2                     | 4,77 ( <i>d</i> , 7,6)   |
| 2'''           | 74,5                      | 3,42 ( <i>dd</i> , 9,1; 7,6)   |
| 3'''           | 76,4                      | 3,46 ( <i>t</i> , 9,1)   |
| 4'''           | 70,4                      | 3,38 ( <i>t</i> , 9,1)   |
| 5'''           | 74,3                      | 3,64 ( <i>ddd</i> , 9,1 ; 5,6 ; 3)   |
| 6'''           | 63,1                      | 4,42 ( <i>m</i> )  |

| Position           | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|--------------------|------------------|---|
| 6'''-Feruloyl-1''' | 125,9            | -                                       |
| 2'''               | 109,9            | 6,86 ( <i>d</i> , 1,9)                  |
| 3'''               | 147,7            | -                                       |
| 4'''               | 149,1            | -                                       |
| 5'''               | 114,9            | 6,70 ( <i>d</i> , 8,1)                  |
| 6'''               | 122,5            | 6,77 ( <i>dd</i> , 8,1 ; 1,9)           |
| 7'''               | 145,4            | 7,34 ( <i>d</i> , 15,9)                 |
| 8'''               | 113,4            | 6,07 ( <i>d</i> , 15,9)                 |
| 9'''               | 167,5            | -                                       |
| 3'''-OMe           | 54,8             | 3,81 ( <i>s</i> )                       |

### III-4-4-1-3 Elucidation structurale du composé 3



**Vicenine 3 (3)**

Le composé **3** est obtenu sous forme d'une poudre jaune, soluble dans le méthanol. La fluorescence violette sombre à la lumière UV ( $\lambda = 366$  nm) et la coloration jaune après révélation par une solution acide et chauffage laisse supposer qu'il s'agit d'une flavone ou flavonol 3-OR.

Son spectre UV (Figure III.55) enregistré dans le méthanol montre deux maxima d'absorption : la bande I vers 332 nm correspondant au cycle B et la bande II vers 272 nm correspondant au cycle A. L'addition d' $\text{AlCl}_3$  provoque un déplacement bathochromique de 32 nm pour la bande II et de 18 nm pour la bande I. Ce déplacement traduit la présence d'une fonction -OH en C-5 du cycle A.

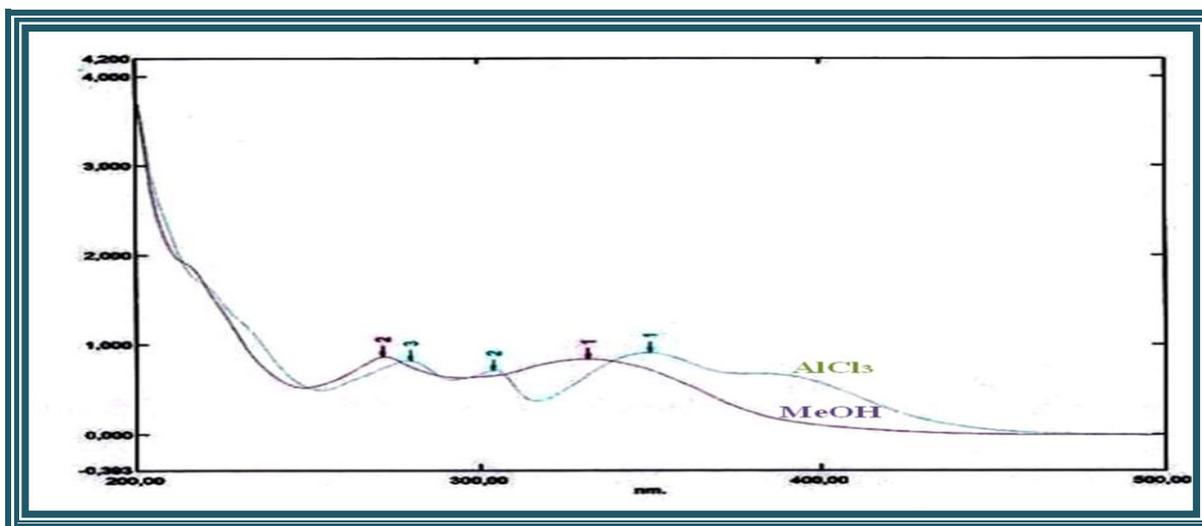


Figure III.55: Spectre UV du composé 3

Le spectre de masse du composé 3 (Figure III.56) obtenu en mode positive par ionisation douce ESI, présente deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  587 et  $[2M+Na]^+$  à  $m/z$  1151, soit une masse moléculaire de 564 correspondant à une formule brute  $C_{26}H_{28}O_{14}$ .

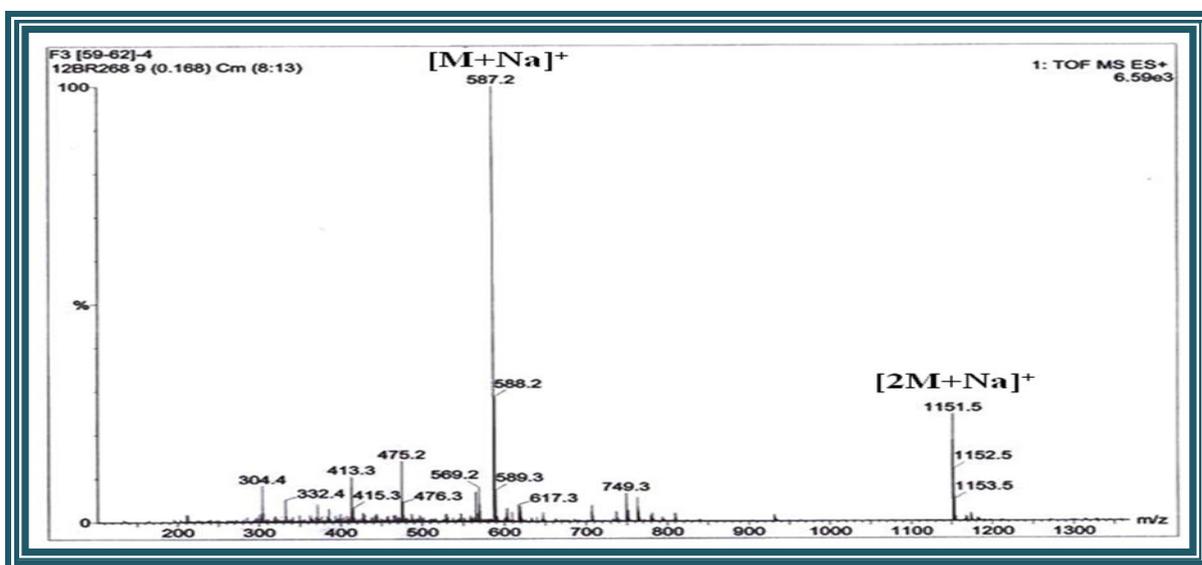


Figure III.56: Spectre de masse ESI-MS du composé 3

Comme pour les produits 1 et 2 décrits précédemment, l'ensemble des informations recueillies à partir des spectres RMN  $^1H$  (Figure III.57) COSY (Figure III.58) et HSQC (Figure III.59) révèle que ce composé fait également partie de la classe des flavonoïdes, surtout en raison de la présence des signaux de protons aromatiques à  $\delta_H$  7,92 (2H, *d*,  $J = 8,8$  Hz) et à  $\delta_H$  6,97 (2H, *d*,  $J = 8,8$  Hz), indiquant la présence d'un système  $A_2X_2$  au niveau du cycle B, correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement. Leurs carbones sont assignés, en prenant en considération leurs taches de corrélation observées sur le spectre HSQC, à  $\delta_C$  128,4 (C-2'/C-6') et à  $\delta_C$  115,7 (C-3'/C-5') (Figure III.59).

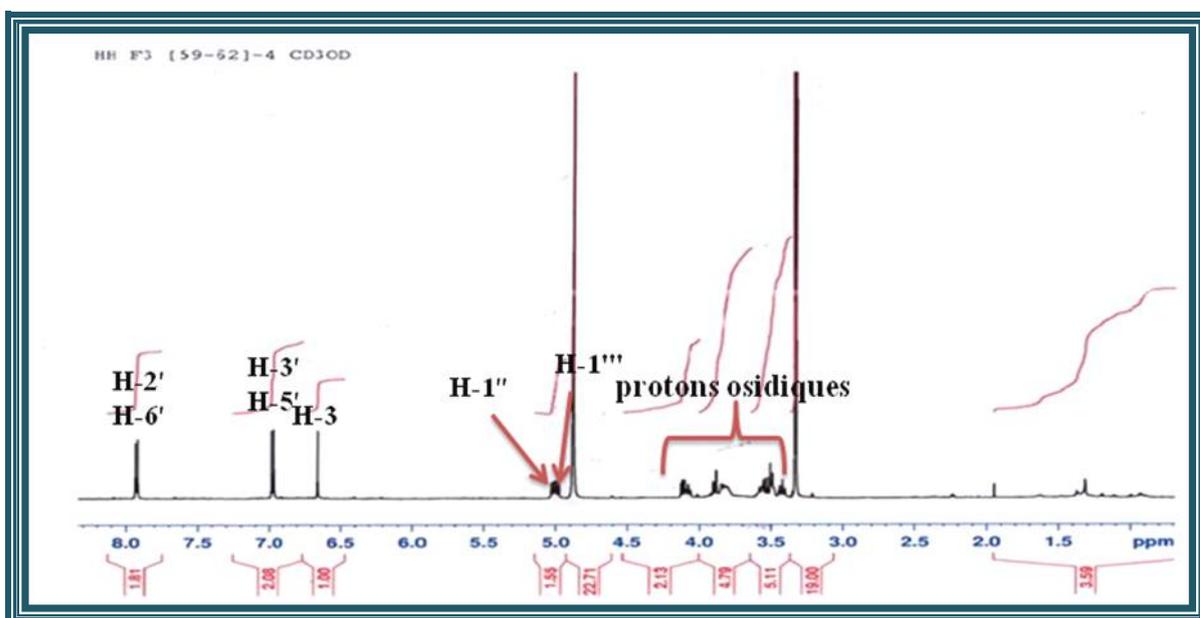


Figure III.57: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 3

Un autre signal d'intégration 1H sous forme d'un singulet fin observé à  $\delta_{\text{H}}$  6,66. Son carbone résonne à  $\delta_{\text{C}}$  102,5 selon l'expérience HSQC (Figure III.59). Les valeurs des déplacements chimiques laisseraient supposer qu'il s'agit du proton H-3.

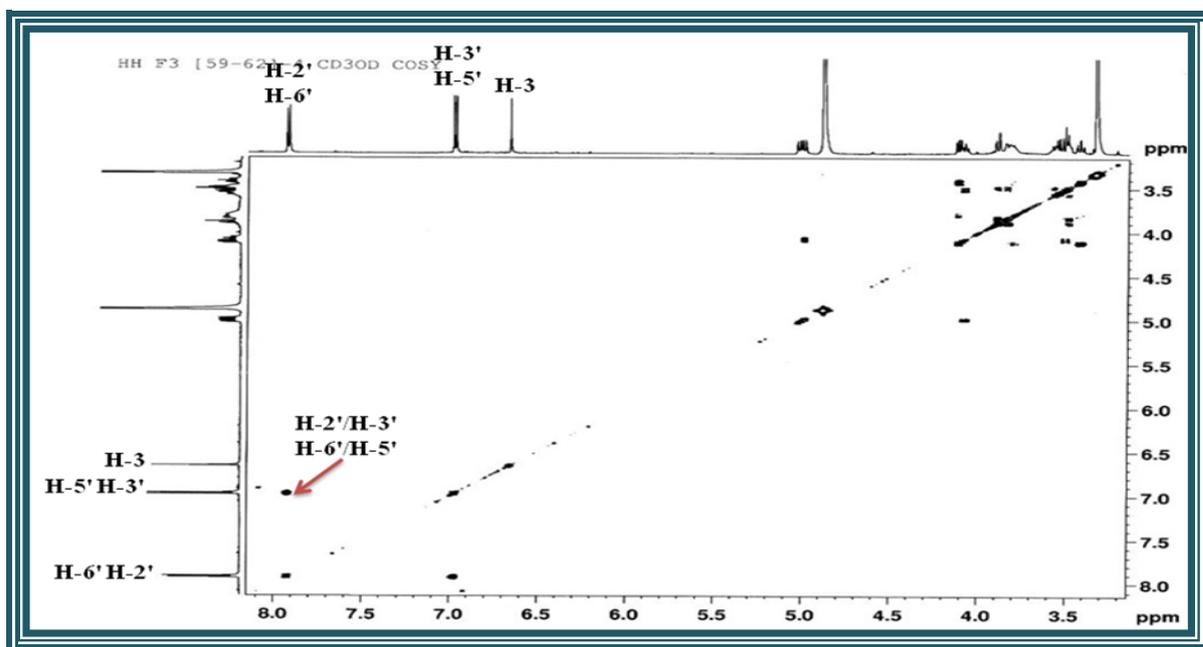


Figure III.58: Spectre COSY du composé 3

L'absence des signaux des protons H-6 et H-8 sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  en comparaison avec les produits 1 et 2 identifiés précédemment, indique que les positions 6 et 8 de cette flavone sont substituées.

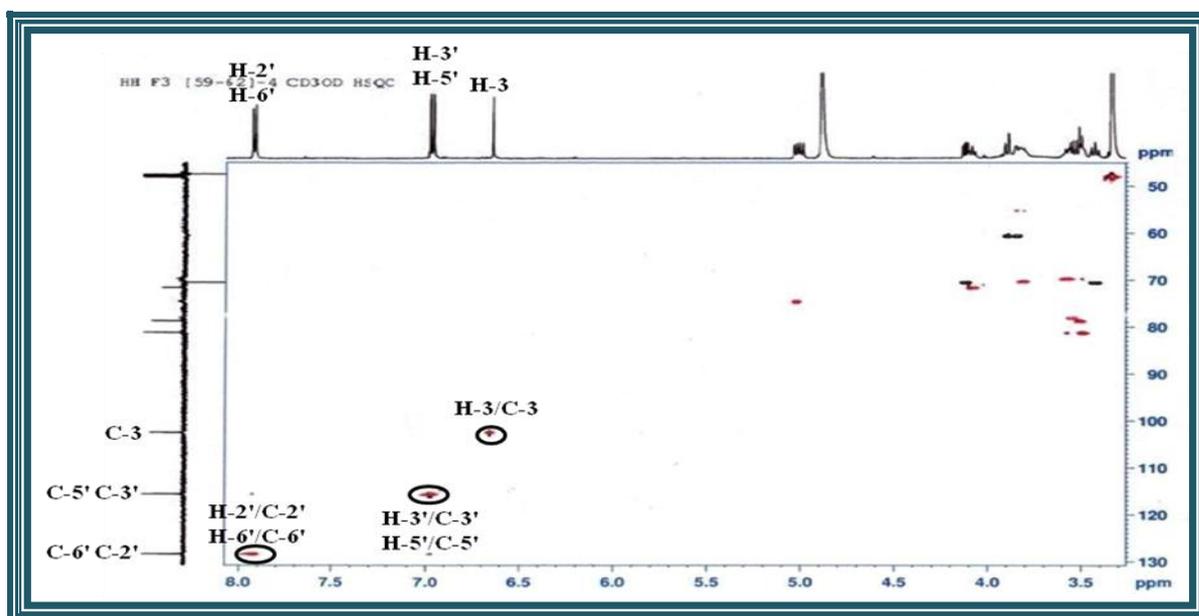


Figure III.59: Spectre HSQC du composé 3

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 3 (Figure III.60) montre la présence des signaux de carbones aromatiques résonant entre 100 et 185 ppm et de carbones osidiques sortant entre 60 et 85 ppm. L'absence de signaux entre 90 et 100 ppm, zone habituelle des carbones méthine CH-6 et CH-8 du cycle A, confirme la substitution des positions C-6 et C-8.

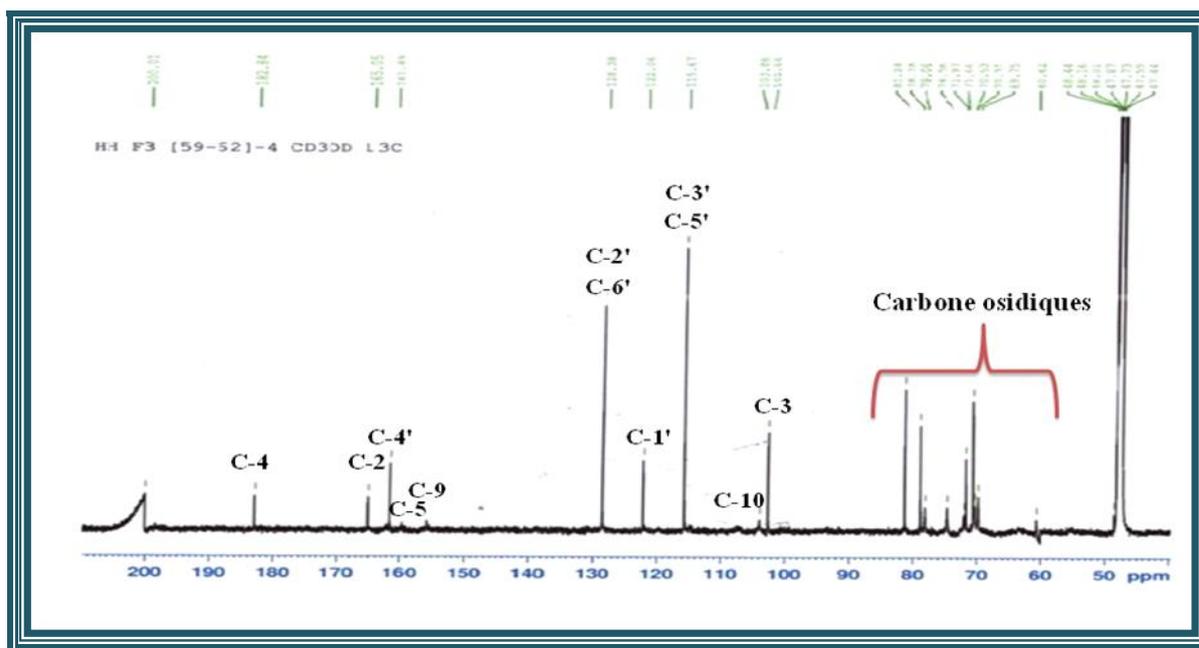


Figure III.60: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 3

L'expérience HMBC conduit à l'établissement des principaux couplages hétéronucléaires C-H longue distance du composé 3. En effet, ce spectre (Figures III.61 et III.62) permet de visualiser les corrélations suivantes :

- Les protons équivalents H-2' et H-6' corréleront en  $^2J$  avec les carbones C-3' et C-5' et en  $^3J$  avec C-6', C-2' et deux carbones quaternaires, l'un oxygéné à  $\delta_C$  161,5 (C-4') et l'autre éthylénique oxygéné à 165 ppm (C-2);
- Les protons H-3' et H-5' couplent en  $^2J$  avec C-2', C-6' et en  $^3J$  avec C-5', C-3', C-4' et en  $^4J$  avec C-2 déjà identifiés et un carbone aromatique quaternaire détecté à  $\delta_C$  122,1 (C-1');
- Le proton oléfinique H-3 corréle en  $^3J$  avec le carbone quaternaire déjà assigné C-1' et avec un autre carbone quaternaire résonnant à  $\delta_C$  103,9 correspondant au carbone C-10, et en  $^2J$  avec le carbone quaternaire éthylénique C-2 et un carbone du carbonyle C-4 ( $\delta_C$  182,8) (Figure III.61).

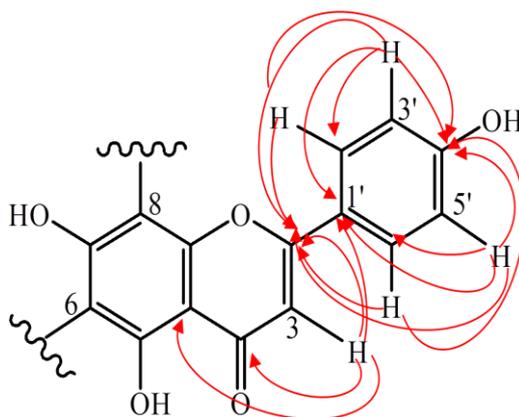


Figure III.61: Corrélations HMBC

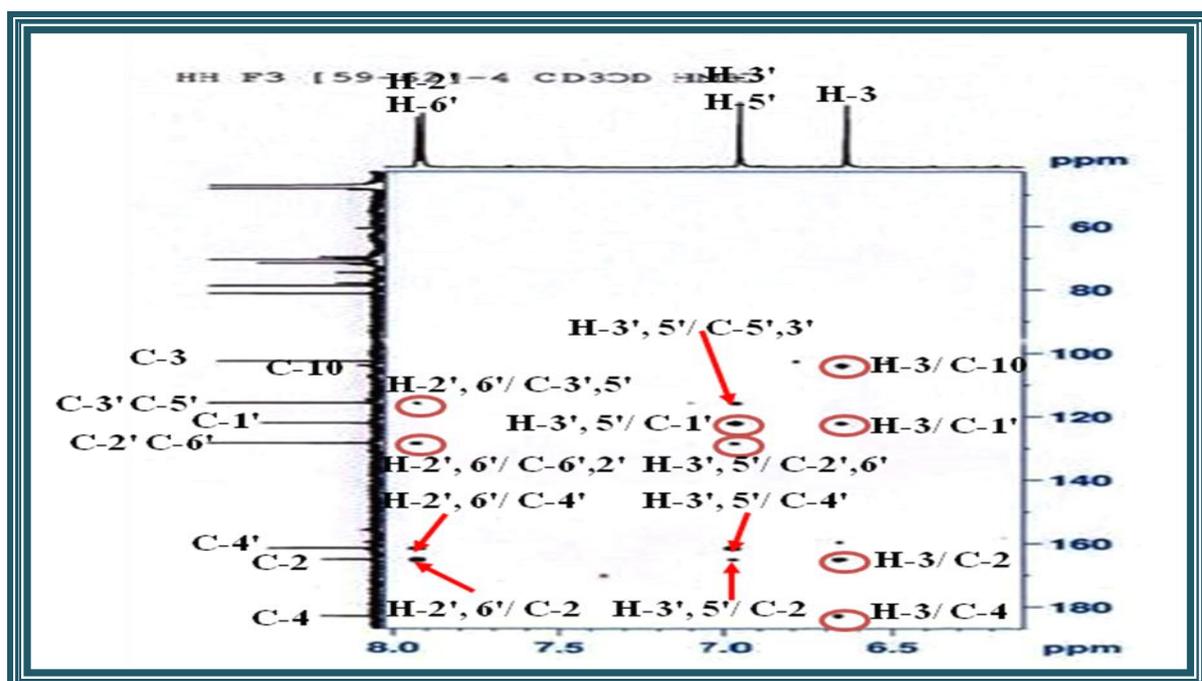


Figure III.62: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé 3

A ce stade d'analyse, la partie aglycone du composé **3** est identifiée comme étant l'apigénine substituée en C-6 et C-8 (Figure III.63).<sup>[153]</sup>

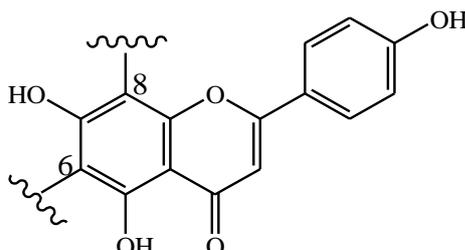


Figure III.63: Apigénine substituée en C-6 et C-8

L'expérience COSY H-H (Figures III.64 et III.65) permet l'identification de deux unités osidiques par l'observation des corrélations entre les différents protons.

Partant du proton anomère H-1'' [ $\delta_H$  5,02 (*d*,  $J = 8,9$  Hz)], un système de sept spins d'un hexose est visualisé sur le spectre COSY :

- H-1''/H-2'' [ $\delta_H$  4,08 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)] ;
- H-2''/H-3'' [ $\delta_H$  3,55 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)] ;
- H-3''/H-4'' [ $\delta_H$  3,57 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)] ;
- H-4''/H-5'' [ $\delta_H$  3,48 (*m*)] ;
- H-5''/H<sub>2</sub>-6'' [ $\delta_H$  3,84 (*dd*,  $J = 12,2 ; 3,7$  Hz, H-6''b)/  $\delta_H$  3,90 (*dd*,  $J = 12,2 ; 2,4$  Hz, H-6''a)].

Les grandes valeurs des constantes de couplage entre les protons H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5'' montrant la position *trans*-diaxiale de ces protons sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucose.

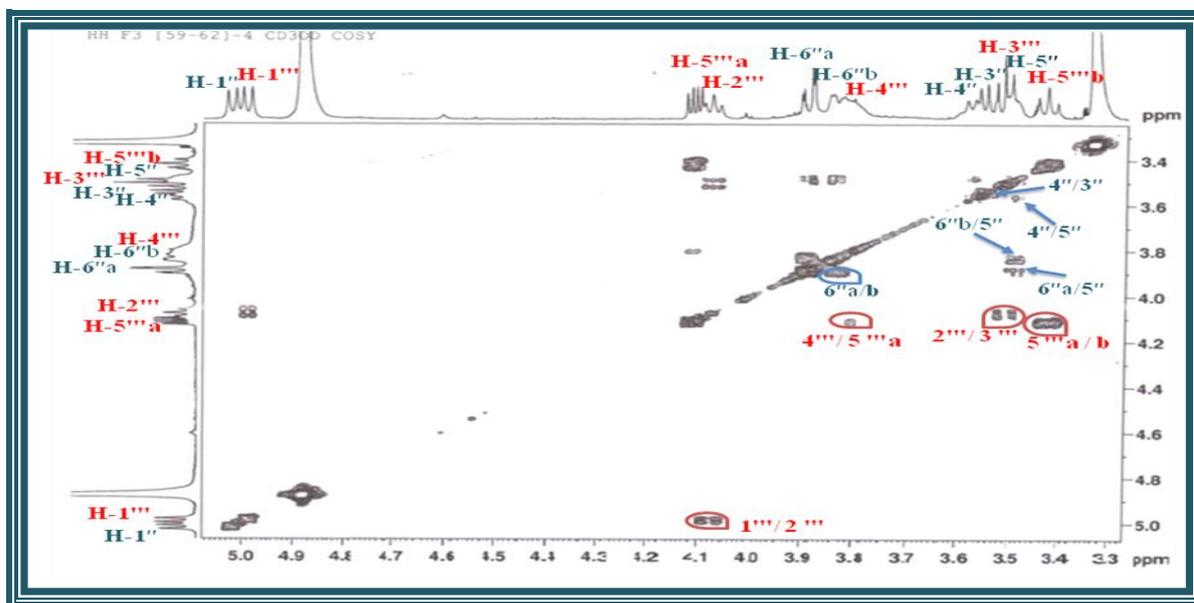
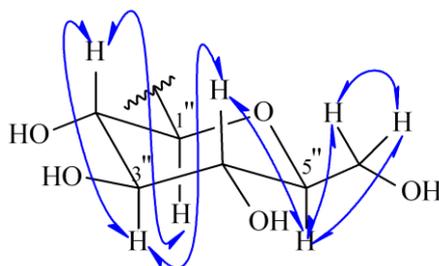
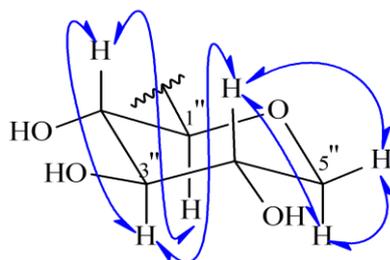


Figure III.64: Spectre COSY de la partie osidique du composé **3**

Figure III.65 : Corrélations COSY du  $\beta$ -D-glucose

En plus, le spectre COSY exhibe un autre système de spins à six protons appartenant à un pentose dont l'anomère résonne à  $\delta_H$  5,00 (*d*,  $J = 9,1$  Hz). Le proton H-2''' [ $\delta_H$  4,08 (*t*,  $J = 9,1$  Hz)] couple avec le proton H-3''' [ $\delta_H$  3,51 (*t*,  $J = 9,1$  Hz)], lui-même corrèle avec le proton H-4''' résonnant à  $\delta_H$  3,55 (*m*). Ce dernier couple avec deux protons géminés H-2-5''' [ $\delta_H$  4,12 (*dd*,  $J = 11,2; 5,5$  Hz ; H-5'''a) et  $\delta_H$  3,42 (*t*,  $J = 11,2$  Hz ; H-5'''b)]. Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquent une position *trans*-diaxiale de ces protons, caractéristiques d'un  $\beta$ -D-xylose (Figure III.66).

Figure III.66: Corrélations COSY du  $\beta$ -D-xylose

Les carbones de ces deux sucres sont identifiés par expérience HSQC (Figure III.67).

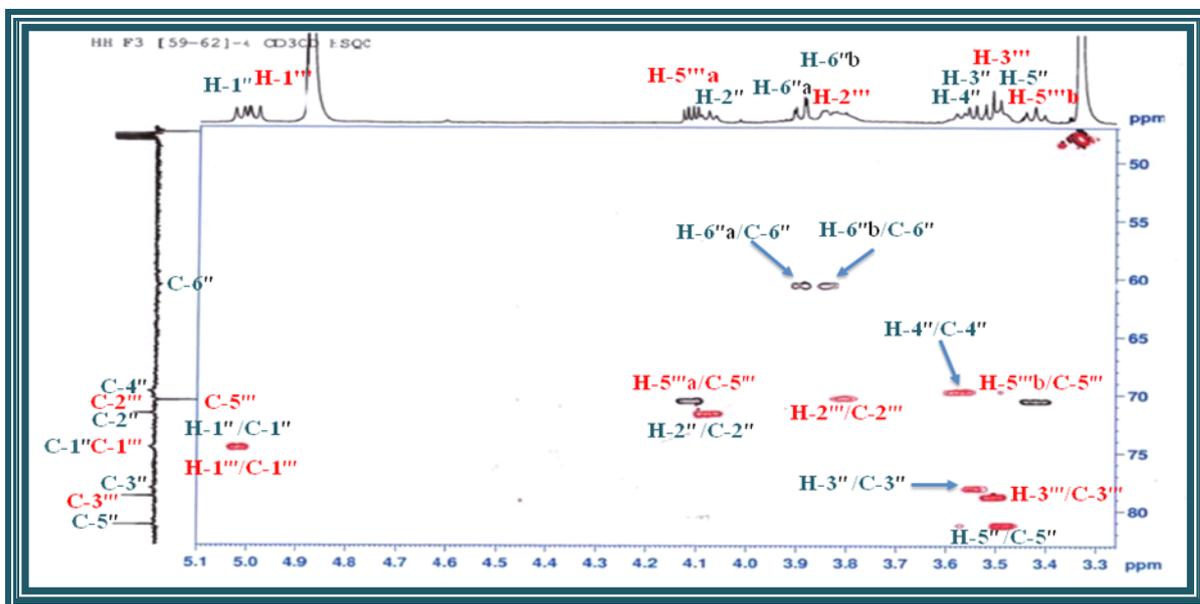


Figure III.67: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 3

La stéréochimie de la partie osidique ( $\beta$ -D-glucose et  $\beta$ -D-xylose) de ce composé est confirmée par analyse du spectre NOESY (Figure III.68) qui montre les effets nOe entre les protons:

- H-1''/ H-5'' du  $\beta$ -D-glucose ;
- H-1'''/ H-3''' et H-1'''/H-5'''b du  $\beta$ -D-xylose.

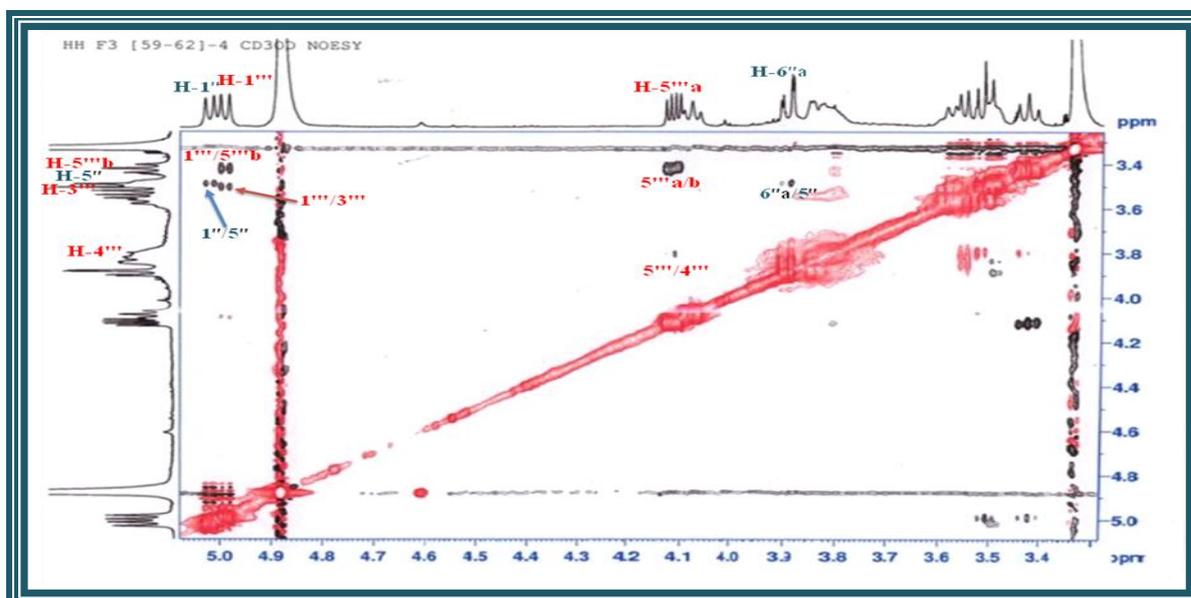


Figure III.68: Spectre NOESY du composé 3

L'emplacement des deux sucres en C-6 et C-8 est établi par analyse des corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HMBC (Figures III.69 et III.70) entre :

- Le proton H-1'' du  $\beta$ -D-glucose et les carbones C-5 ( $\delta_C$  159), C-6 ( $\delta_C$  107,2) et C-7 ( $\delta_C$  162);
- Le proton H-1''' du  $\beta$ -D-xylose et le carbone C-7, C-8 ( $\delta_C$  103,7) et C-9 ( $\delta_C$  155).

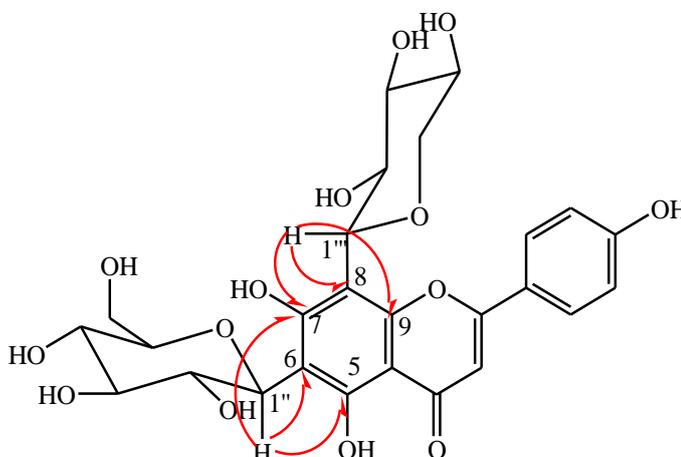


Figure III.69: Corrélations HMBC entre les protons anomères et l'aglycone

Le déplacement chimique des carbones anomériques C-1'' et C-1''' déterminé à  $\delta_C$  74,6 atteste que cette flavone est l'apigénine di-C-glycosylée en positions C-6 et C-8. <sup>[154]</sup>

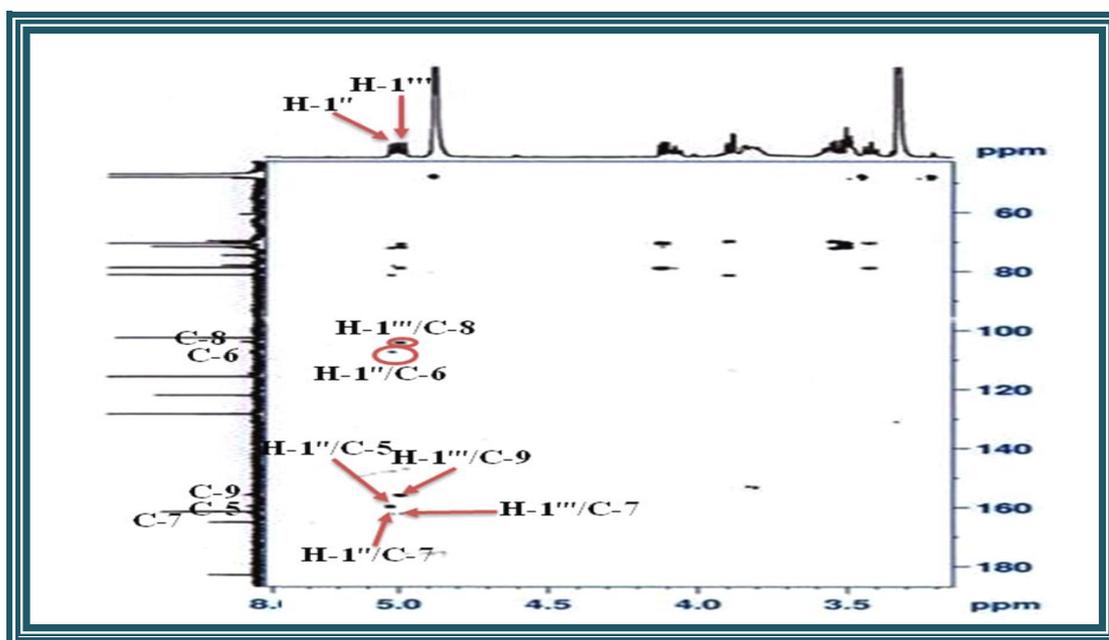


Figure III.70: Spectre HMBC du composé 3

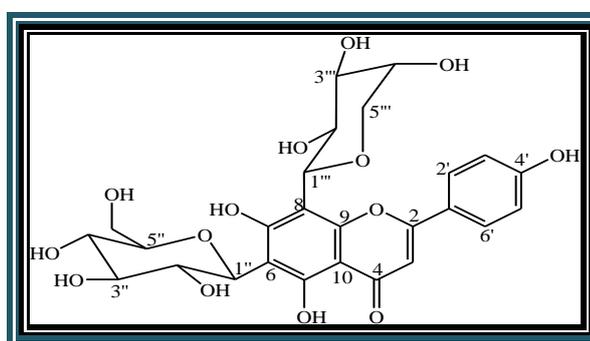
Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III.3) assignés conjointement par les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = +11,42^\circ$ ,  $C = 0,175$  g/100 ml dans MeOH), et par comparaison avec les données de la littérature, <sup>[155]</sup> permettent d'identifier le composé 3 à la vicénine 3 isolé antérieurement de l'espèce *Carex distachya* Desf. de la famille Cyperaceae. <sup>[156]</sup> Elle a été isolée pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.3: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 3 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz) |
|----------|------------------|-------------------------|
| 2        | 165              | -                       |
| 3        | 102,5            | 6,66 (s)                |
| 4        | 182,8            | -                       |
| 5        | 159              | -                       |
| 6        | 107,2            | -                       |
| 7        | 162              | -                       |
| 8        | 103,7            | -                       |
| 9        | 155              | -                       |
| 10       | 103,9            | -                       |
| 1'       | 122,1            | -                       |
| 2'       | 128,4            | 7,92 (d, 8,8)           |
| 3'       | 115,7            | 6,97 (d, 8,8)           |
| 4'       | 161,5            | -                       |
| 5'       | 115,7            | 6,97 (d, 8,8)           |
| 6'       | 128,4            | 7,92 (d, 8,8)           |

| position     | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)                                      |
|--------------|------------------|--|
| 6-C-glc-1''  | 74,6             | 5,02 (d, 8,9)  |
| 2''          | 71,9             | 4,08 (t, 8,9)  |
| 3''          | 78,1             | 3,55 (t, 8,9)  |
| 4''          | 69,7             | 3,57 (t, 8,9)  |
| 5''          | 81,2             | 3,48 (m)   |
| 6''          | 60,6             | 3,90 (dd, 12,2 ; 2,4) H-6''a<br>3,84 (dd, 12,2 ; 3,7) H-6''b |
| 8-C-xyl-1''' | 74,6             | 5,00 (d, 9,1)  |
| 2'''         | 71,7             | 4,08 (t, 9,1)  |
| 3'''         | 78,8             | 3,51 (t, 9,1)  |
| 4'''         | 70,3             | 3,55 (m)   |
| 5'''         | 70,5             | 4,12 (dd, 11,2 ; 5,5) H-5'''a<br>3,42 (t, 11,2) H-5'''b      |

#### III-4-4-1-4 Elucidation structurale du composé 4



Schaftoside (4)

Le spectre UV (Figure III.71) du composé 4 montre des absorptions maximales à 272 et 334 nm, caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol substitué en 3 (3-OR).

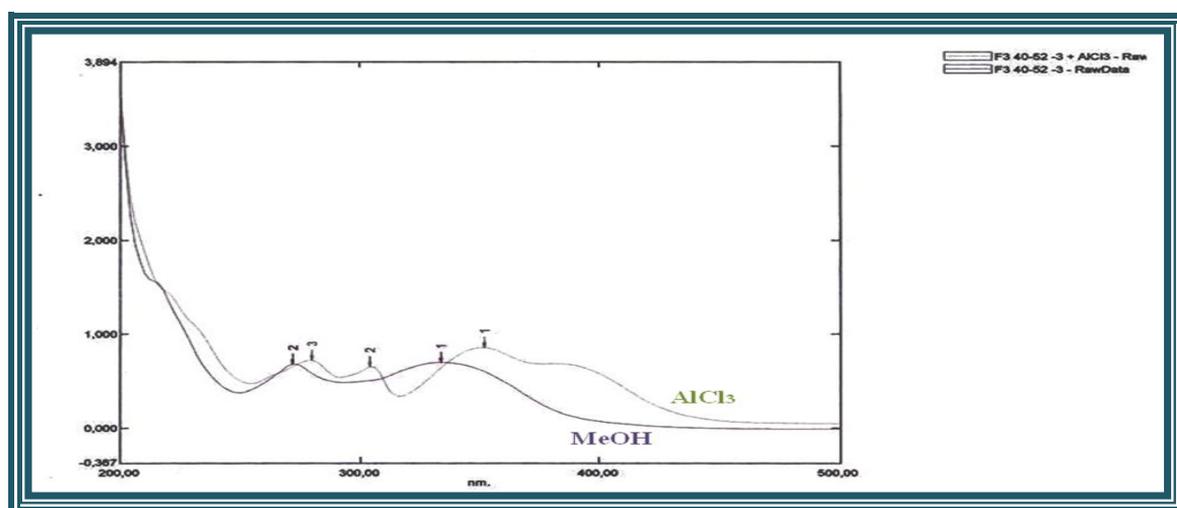


Figure III.71: Spectre UV du composé 4

Le composé **4** possède la même masse moléculaire que le produit **3** décrit précédemment, au vu des spectres de masse ESI<sup>+</sup> obtenus par ionisation douce qui montrent les mêmes pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 587$  [M+Na]<sup>+</sup> et 1151 [2M+Na]<sup>+</sup> correspondant à une même formule brute C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub> (Figure III.72). Il s'agit donc de deux isomères.

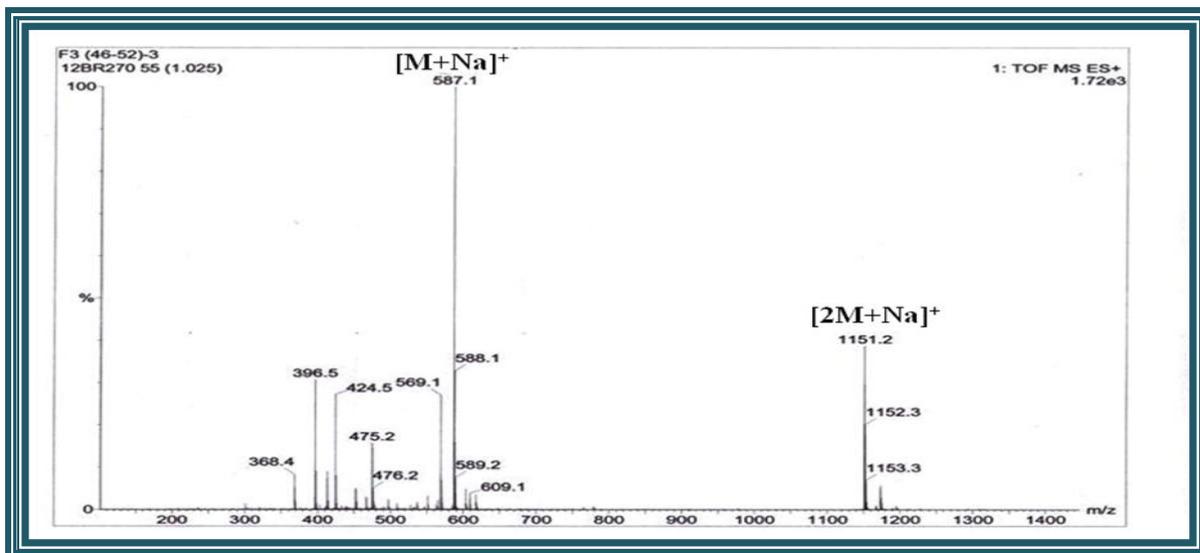


Figure III.72: Spectre de masse ESI-MS du composé **4**

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (Figures III.73 et III.74) sont très voisins à ceux du composé **3** particulièrement au niveau de la région aromatique. En effet, on reconnaît pratiquement tous les protons de l'aglycone (apigénine disubstituée) sur les spectres RMN <sup>1</sup>H et COSY (Figures III.73 et III.75) par la présence des signaux d'un système A<sub>2</sub>X<sub>2</sub> au niveau du cycle B à δ<sub>H</sub> 7,92 (2H, *sl* non résolu) et δ<sub>H</sub> 6,94 (2H, *d*, *J* = 8,6 Hz), correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement. Un autre signal sous forme d'un singulet est observé à δ<sub>H</sub> 6,64 (1H, *s*) attribuable au proton H-3. Des signaux entre 3,3 et 4,2 ppm sont attribués aux protons d'au moins de deux unités osidiques.

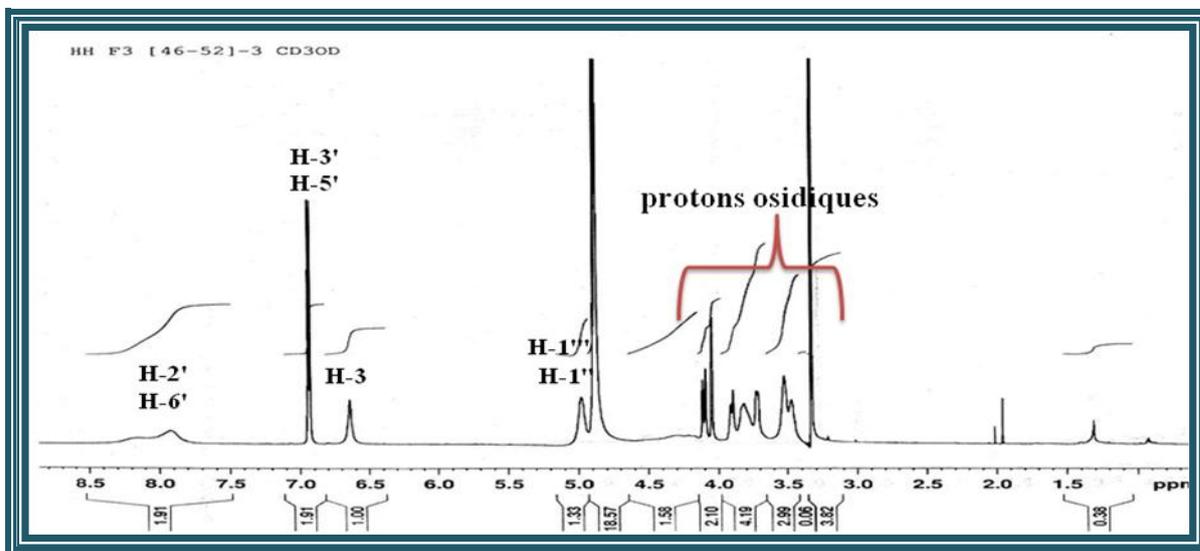


Figure III.73: Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé **4**

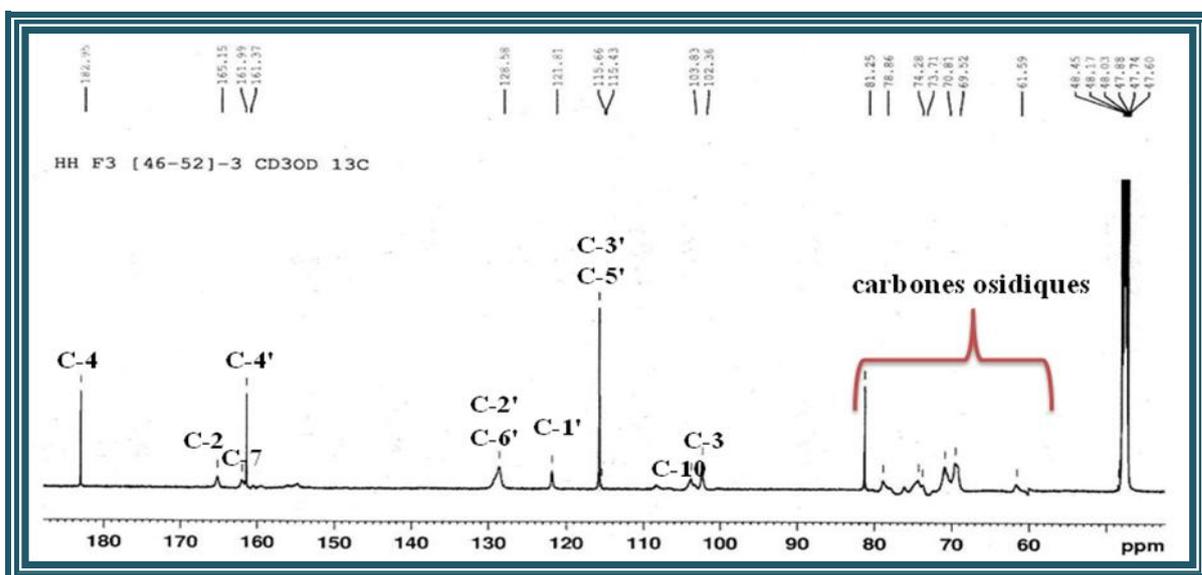
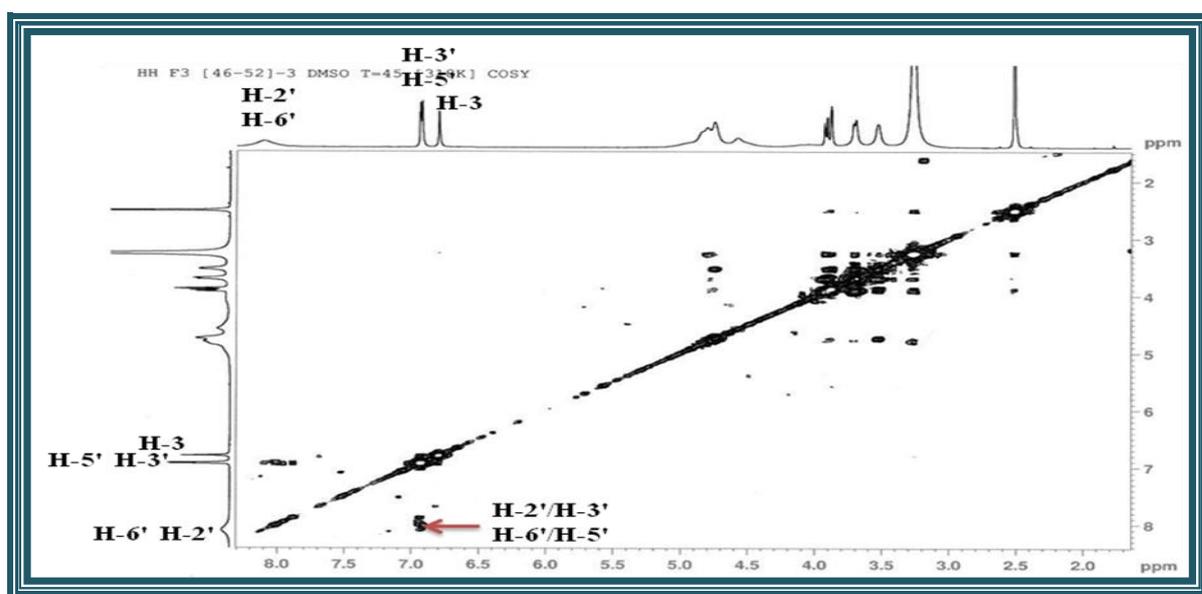
Figure III.74: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 4

Figure III.75: Spectre COSY du composé 4

Bien que le composé **4**, ait une structure similaire à celle du produit **3** (isomères), dont la différence se situe au niveau de la partie osidique, il est impératif d'identifier la nature des unités osidiques et de déterminer leurs positions sur le cycle A.

En tenant compte des signaux des deux protons anomères H-1'' et H-1''', le spectre COSY H-H, permet d'identifier les sucres comme étant  $\beta$ -glucopyranose et  $\alpha$ -arabinose. La seule différence notable entre **3** et **4** réside au niveau de la position du proton H-4''' du pentose ( $\alpha$ -arabinose). Les attributions des carbones osidiques ont été assignées par expérience HSQC (Tableau III.4). Le blindage du carbone C-3''' ( $\delta_{\text{C}}$  74,3) de ce composé comparativement au même carbone du composé précédent **3** ( $\delta_{\text{C}}$  78,8) confirme bien qu'il s'agit d'un arabinose et pas du xylose.<sup>[155]</sup>

Les points de branchements des sucres sont déterminés par expérience HMBC (Figure III.76). Cette dernière montre des corrélations entre :

- Le proton H-1'' du glucose et le carbone C-6;
- Le proton H-1''' de l'arabinose et le carbone C-8.

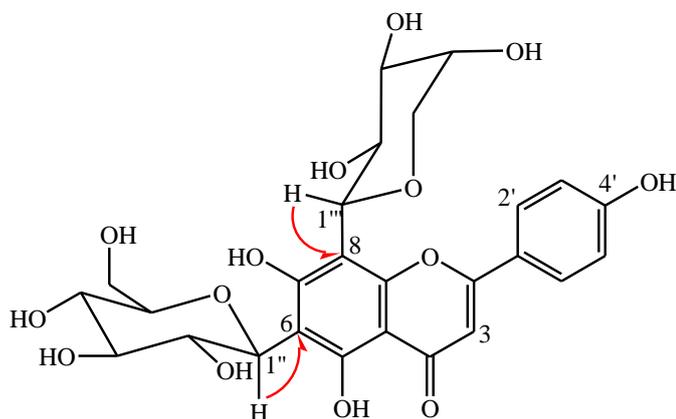


Figure III.76: Corrélations HMBC

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ce composé dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Figures III.73 et III.74) présentent une mauvaise résolution. Pour cela, ces spectres ont été refaits dans le  $\text{DMSO}-d_6$  (Figures III.76.1 et III.76.2) à  $T=45^\circ\text{C}$ , malheureusement le même phénomène persiste. Cette mauvaise résolution pourrait être expliquée par la présence de deux isomères en mélange. Mais ce phénomène a déjà été signalé pour les flavonoïdes C-glycosylés pour lesquels des mesures à  $100-120^\circ\text{C}$  dans le  $\text{DMSO}-d_6$  sont préconisés afin d'améliorer l'apparence des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . [157,158]

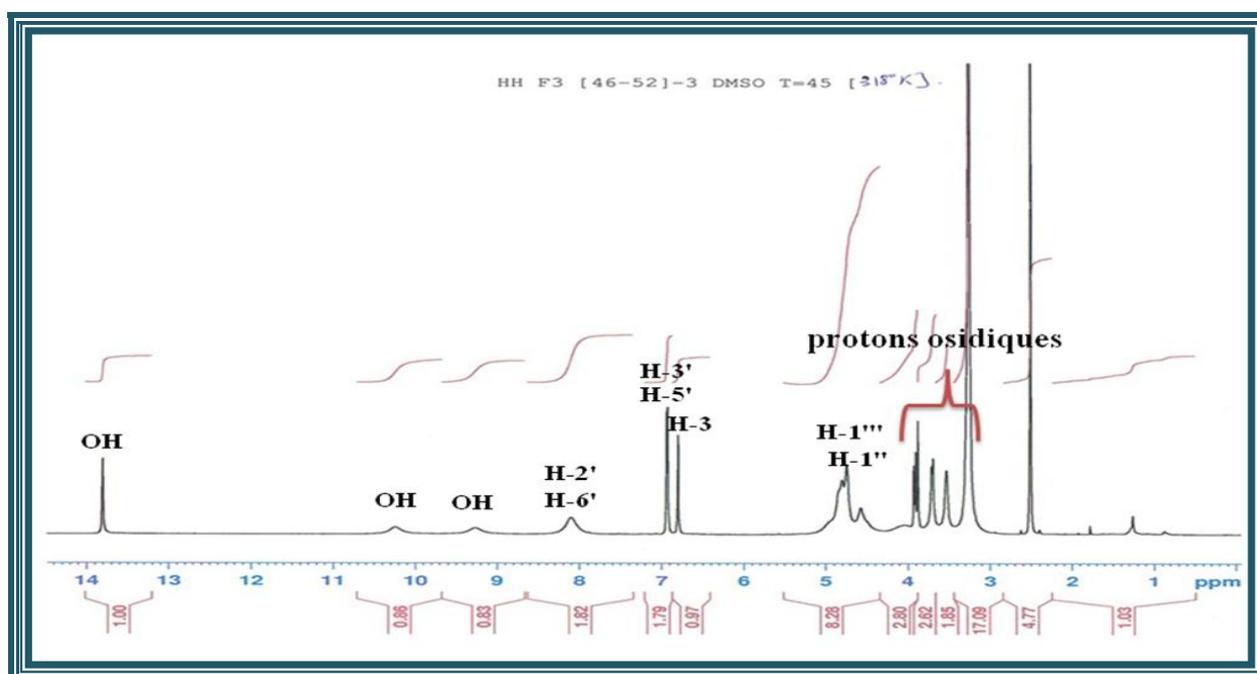


Figure III.76.1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 4 dans le  $\text{DMSO}-d_6$

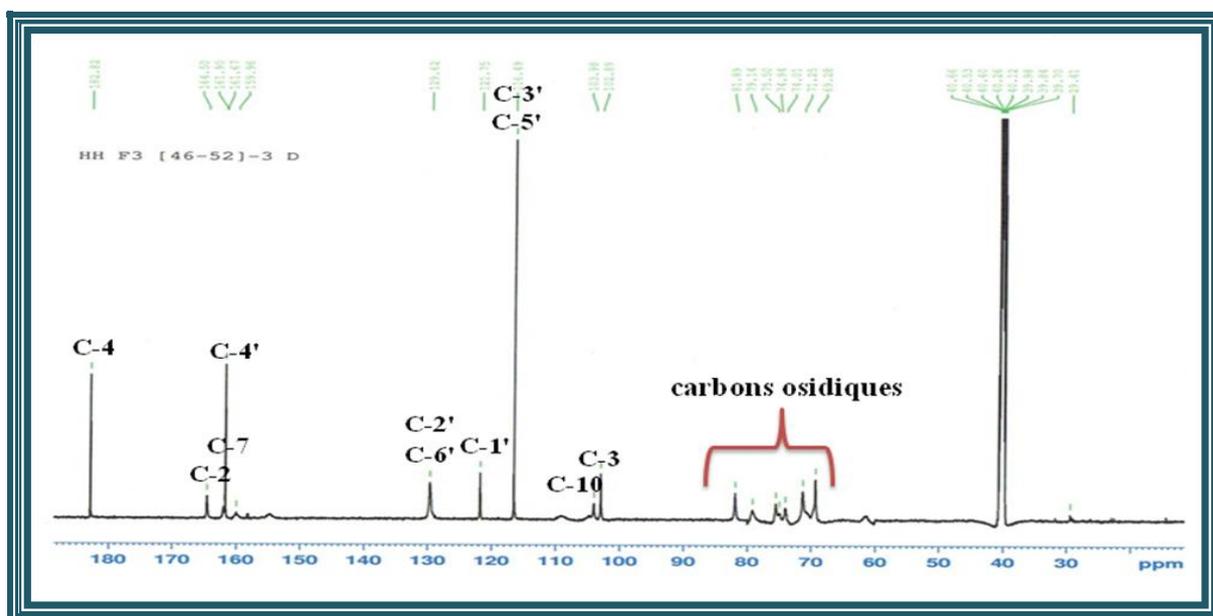


Figure III.76.2: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 4 dans le DMSO- $d_6$

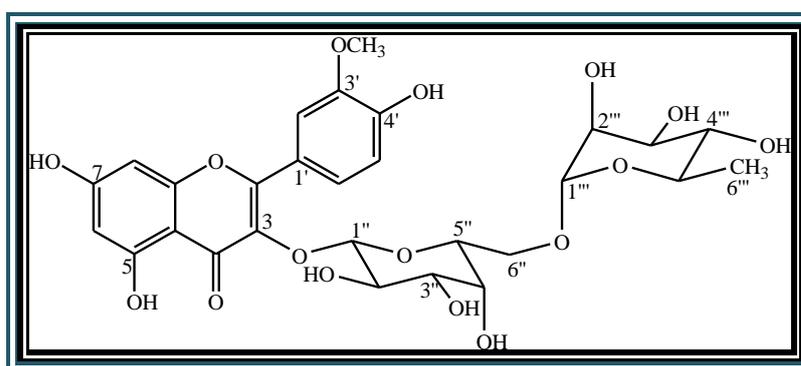
Les données spectrales établies, en plus de la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = +45,4^\circ$ ,  $C=0,14$  g/100 ml dans MeOH), et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé 4 au schaftoside, <sup>[159]</sup> antérieurement isolé des espèces *Atractylis carduus*, <sup>[3]</sup> *Centaurea hierapolitana* <sup>[160]</sup> et *C. horrida* <sup>[161]</sup> de la famille Asteraceae.

Tableau III.4: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 4 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

| position    | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
|-------------|---------------------------|----------------------------------|
| 2           | 165,1                     | -                                |
| 3           | 102,4                     | 6,64 (s)                         |
| 4           | 182,9                     | -                                |
| 5           | 159,9                     | -                                |
| 6           | 108,5                     | -                                |
| 7           | 162                       | -                                |
| 8           | 103,8                     | -                                |
| 9           | 154,5                     | -                                |
| 10          | 103,8                     | -                                |
| 1'          | 121,8                     | -                                |
| 2'          | 128,6                     | 7,92 (sl)                        |
| 3'          | 115,7                     | 6,94 (d, 8,6)                    |
| 4'          | 161,4                     | -                                |
| 5'          | 115,7                     | 6,94 (d, 8,6)                    |
| 6'          | 128,6                     | 7,92 (sl)                        |
| 6-C-glc-1'' | 75,5                      | 5,00 (sl)                        |
| 2''         | 70,8                      | 4,04 (sl)                        |

| position     | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                      |
|--------------|------------------|--|
| 3''          | 78,9             | 3,52 ( <i>m</i> )  |
| 4''          | 70,1             | 3,58 ( <i>m</i> )  |
| 5''          | 81,2             | 3,47 ( <i>m</i> )  |
| 6''          | 61,6             | 3,90 ( <i>dl</i> , 11,3) H-6''a<br>3,86 ( <i>m</i> ) H-6''b  |
| 8-C-ara-1''' | 73,7             | 5,00 ( <i>sl</i> )   |
| 2'''         | 69,5             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 3'''         | 74,3             | 3,72 ( <i>dl</i> , 7,3)                                      |
| 4'''         | 69,0             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 5'''         | 71,2             | 4,11 ( <i>t</i> , 12,1) H-5'''a<br>3,82 ( <i>m</i> ) H-5'''a |

#### III-4-4-1-5 Elucidation structurale du composé 5



Isorhamnétine 3-*O*-robinobioside (5)

Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune, la fluorescence noire sombre à 366 nm et le profil de son spectre UV enregistré dans le MeOH (Figure III.77) sont caractéristiques d'un flavonol substitué en 3 (3-OR) avec des maxima d'absorption à 352 nm (Bande I) et 254 nm (Bande II).

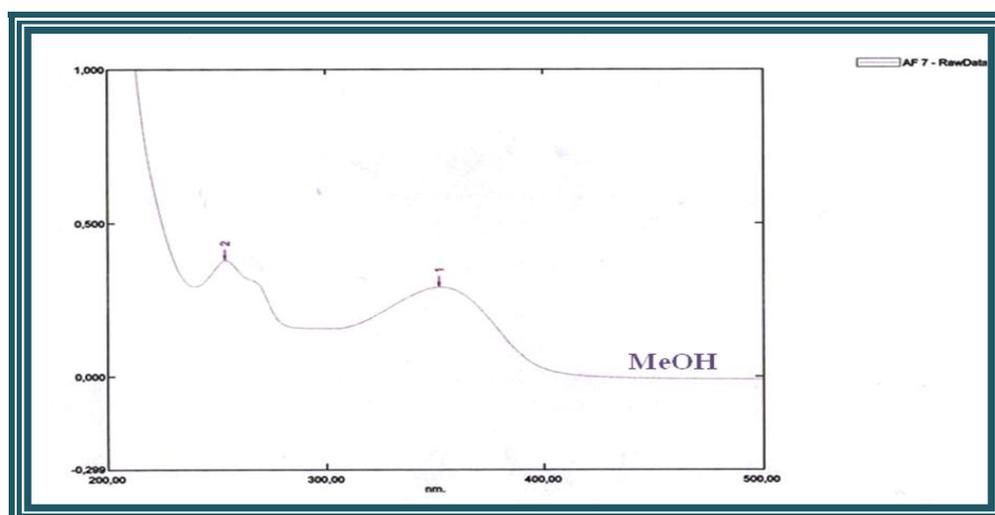


Figure III.77: Spectre UV du composé 5

La formule brute  $C_{28}H_{32}O_{16}$  du composé **5** a été déterminée sur la base des analyses de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ ).

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.78) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  647  $[M+Na]^+$  soit une masse de 624 uma.

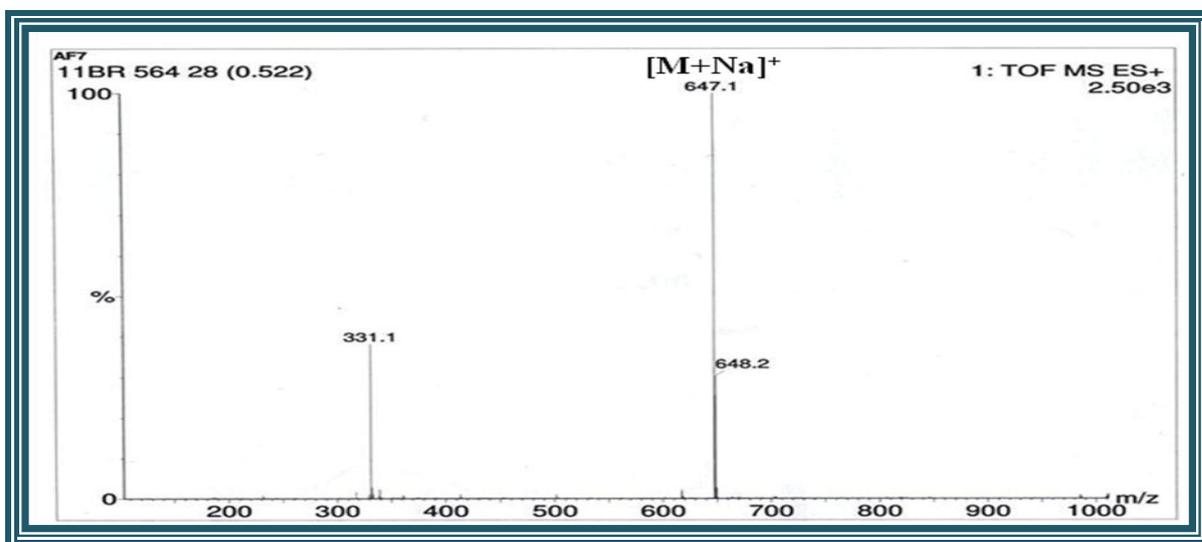


Figure III.78: Spectre de masse ESI-MS du composé **5**

Le spectre RMN  $^{13}C$  (Figure III.79) révèle la présence de 28 signaux correspondant aux 15 carbones aromatiques, 12 carbones osidiques et un méthoxyle.

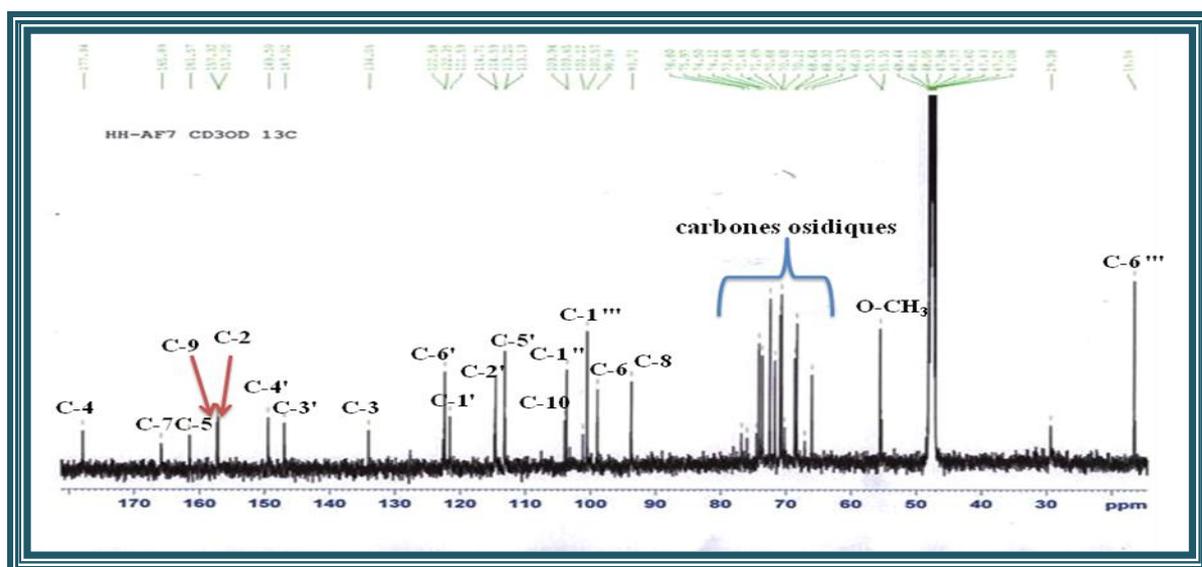


Figure III.79: Spectre RMN  $^{13}C$  du composé **5**

Les données des spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (Tableau III.5), montrent que le composé **5** est un flavonoïde diglycosylé. En effet le spectre RMN  $^1H$  de ce composé (Figure III.80), présente des signaux des protons aromatiques suivants :

- Les protons résonnant à  $\delta_H$  6,20 (*d*,  $J = 2$  Hz) et à  $\delta_H$  6,40 (*d*,  $J = 2$  Hz), sont attribuables aux protons H-6 et H-8 du cycle A, respectivement ;
- Au niveau du cycle B, le proton H-6' [ $\delta_H$  7,62 (*dd*,  $J = 8,5; 1,8$ )] corrèle en ortho avec le proton H-5' [ $\delta_H$  6,93 (*d*,  $J = 8,5$  Hz)] et en méta avec le proton H-2' [ $\delta_H$  8,05 (*d*,  $J = 1,8$  Hz)], ceci montre que le noyau B est trisubstitué.

On observe aussi sur le spectre RMN  $^1H$  un méthoxyle à  $\delta_H$  3,99. La localisation de ce méthoxyle en C-3' a été confirmée par l'expérience HMBC. Il s'agit de l'aglycone isorhamnétine déjà élucidé dans le cas du composé 2.

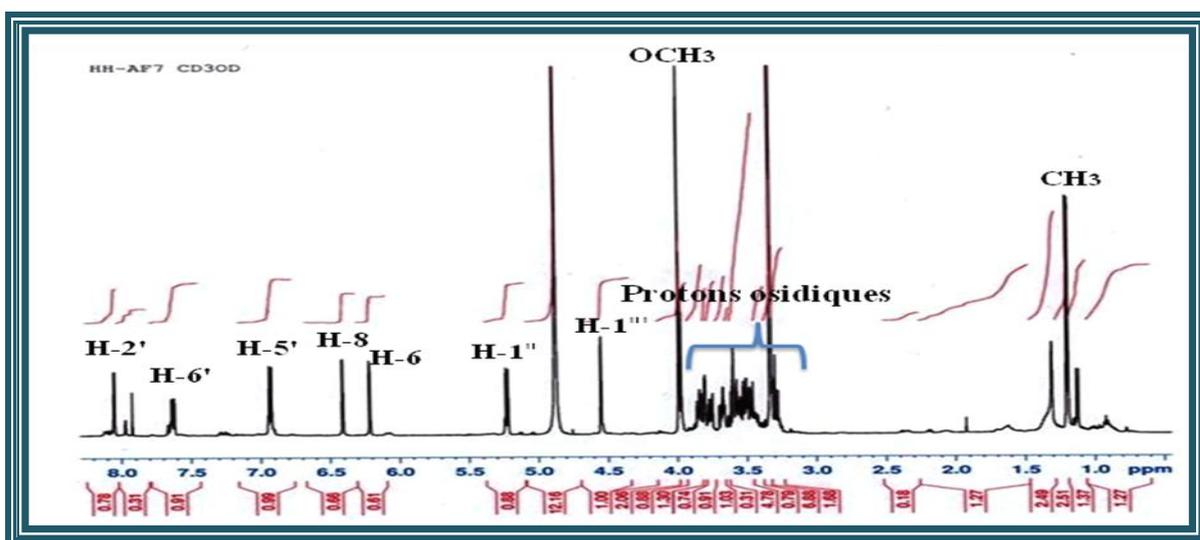


Figure III.80: Spectre RMN  $^1H$  du composé 5

De plus, le spectre RMN  $^1H$  de ce composé, montre deux signaux de protons anomériques à  $\delta_H$  5,23 (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-1'') et  $\delta_H$  4,55 (*d*,  $J = 1,1$  Hz, H-1'''). Leurs carbones respectifs résonnent à  $\delta_C$  105,6 (C-1'') et 104,9 (C-1'''), attribués à l'aide du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.81).

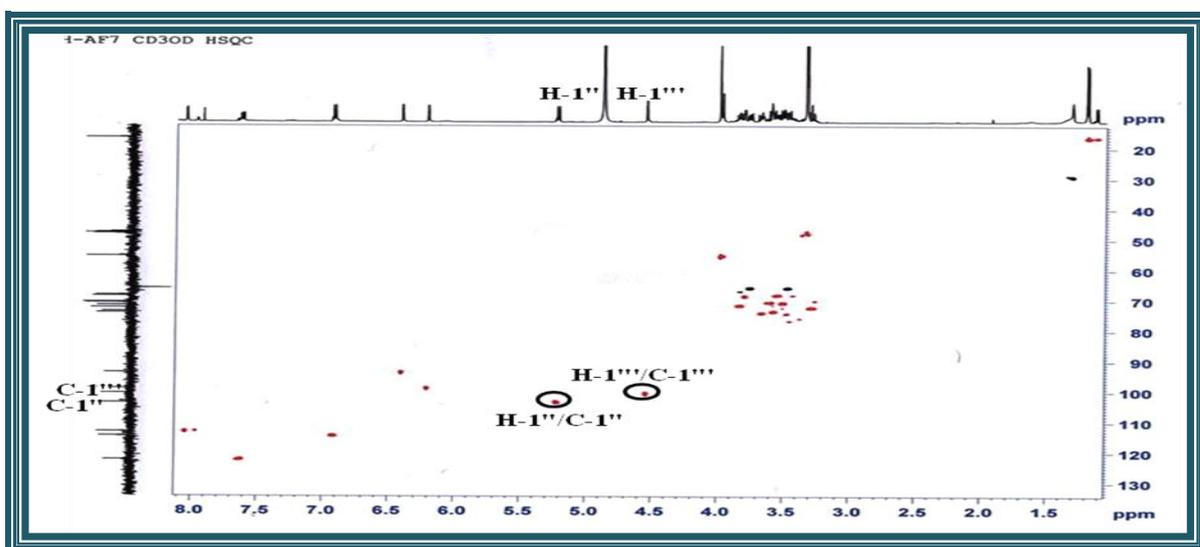


Figure III.81: Spectre HSQC du composé 5

L'analyse des spectres COSY et TOCSY (Figures III.82 et III.83), permet de repérer un système de spins à sept protons à partir du proton anomérique H-1'' ( $\delta_H$  5,23), attestant de la présence d'un hexose :

- H-1''/H-2'' [ $\delta_H$  3,84 (*dd*,  $J = 9,7 ; 7,8$  Hz)] ;
- H-2''/H-3'' [ $\delta_H$  3,58 (*dd*,  $J = 9,7 ; 3,6$  Hz)] ;
- H-3''/H-4'' [ $\delta_H$  3,80 (*dl*,  $J = 3,6$  Hz)] ;
- H-4''/H-5'' [ $\delta_H$  3,67 (*tl*,  $J = 6,3$  Hz)] ;
- H-5''/H<sub>2</sub>-6'' [ $\delta_H$  3,77 (*dd*,  $J = 10,2 ; 5,5$  Hz, H-6''a)/  $\delta_H$  3,47 (*dd*,  $J = 10,2 ; 6,3$  Hz, H-6''b)].

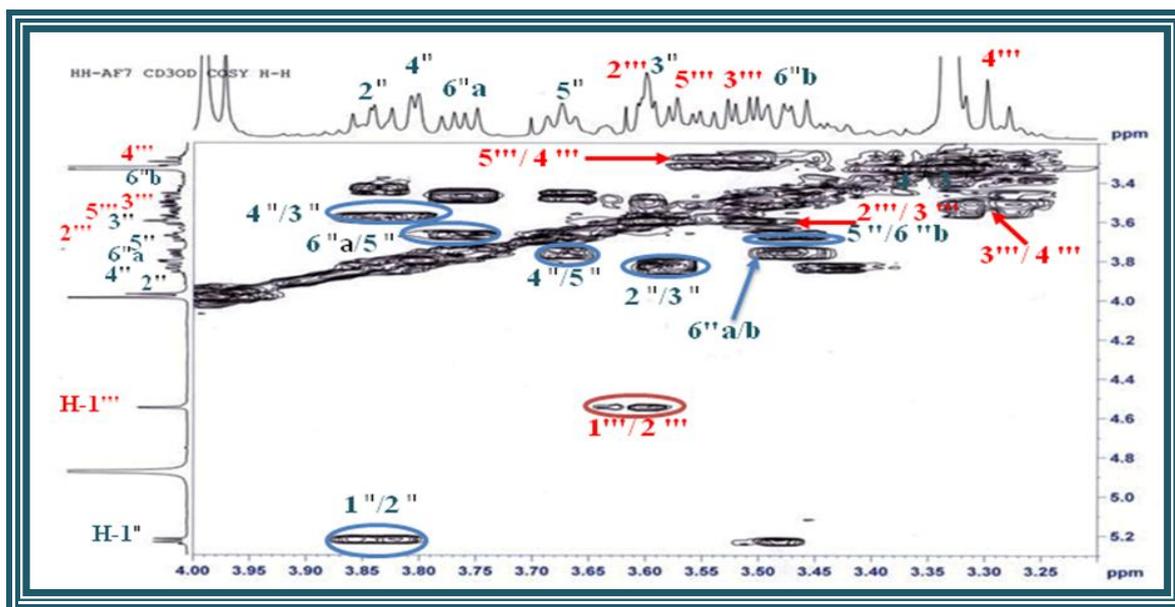


Figure III.82: Spectre COSY de la partie osidique du composé 5

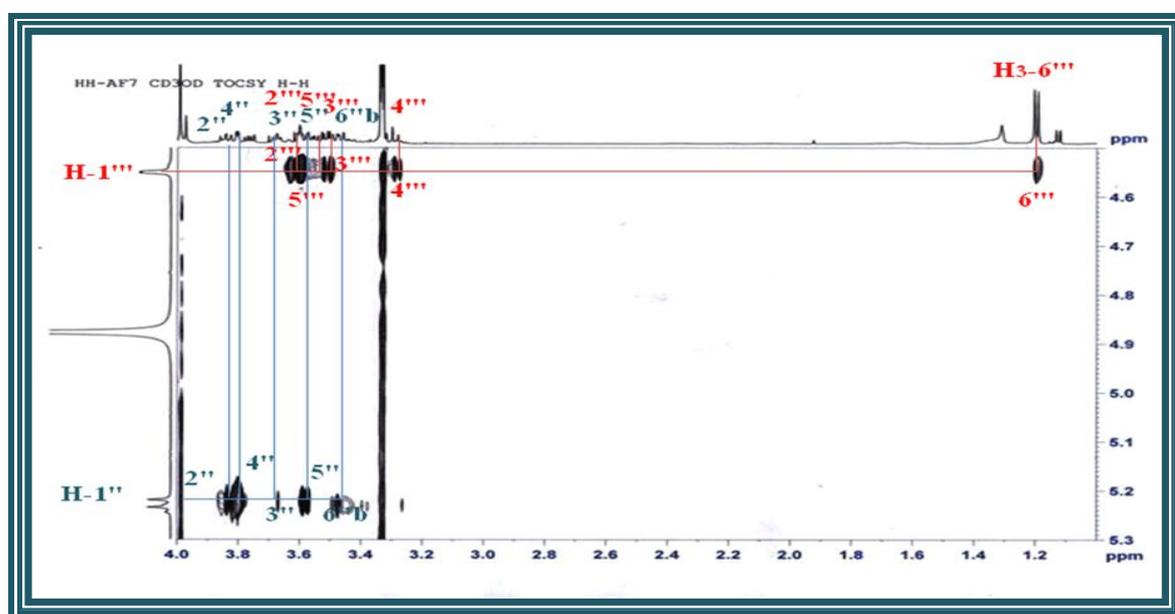
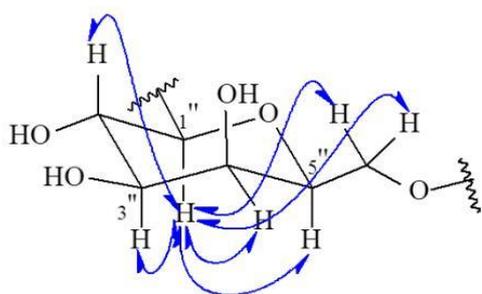
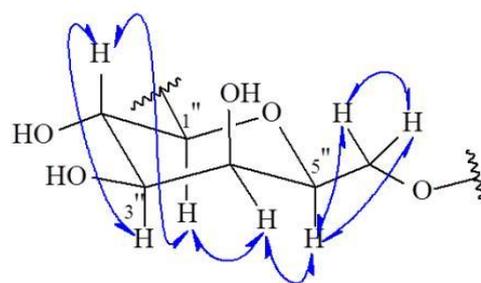
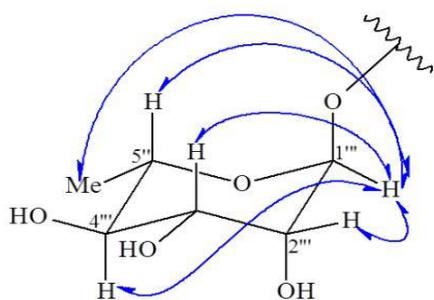
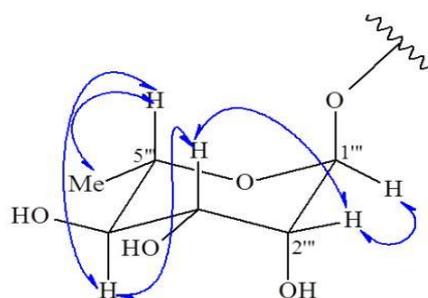


Figure III.83: Spectre TOCSY de la partie osidique du composé 5

La multiplicité du proton H-4'' sous forme d'un doublet large et la petite valeur de la constante de couplage entre les deux protons H-4'' et H-3'' ( $J = 3,6$  Hz) suggèrent la position équatoriale du proton H-4''. Les valeurs des constantes de couplage entre tous les protons de cette unité osidique sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-galactose (Tableau III.5). Le déblindage du carbone C-6'' de ce galactose à  $\delta_C$  66 est significatif d'une substitution en cette position par le second hexose.

Couplages TOCSY du  $\beta$ -D-galactoseCouplages COSY du  $\beta$ -D-galactose

En partant du 2<sup>ème</sup> proton anomérique H-1''' ( $\delta_H$  4,55), un autre système de spins à huit protons est observé sur le spectre COSY suggérant la présence d'un groupement 6-désoxyhexose. Ce spectre montre les corrélations entre le proton anomérique H-1''' [ $\delta_H$  4,55 ( $d$ ,  $J = 1,1$  Hz)] et H-2''' [ $\delta_H$  3,62 ( $dd$ ,  $J = 3,4$ ; 1,1 Hz)]; H-2''' et H-3''' [ $\delta_H$  3,52 ( $dd$ ,  $J = 9,1$ ; 3,4 Hz)]; H-3''' et H-4''' [ $\delta_H$  3,29 ( $t$ ,  $J = 9,1$  Hz)]. Ce dernier couple aussi avec le proton H-5''' [ $\delta_H$  3,55 ( $m$ )]. Les protons H<sub>3</sub>-6''' corrélant avec H-5''' résonnent sous forme d'un doublet à  $\delta_H$  1,19 ( $J = 6,2$  Hz). La grande valeur de la constante de couplage H-4'''/H-3'''  $J = 9,1$  Hz indique la position *trans*-diaxiale de ces protons, tandis que la valeur de la constante de couplage  $J = 3,4$  Hz entre H-2'''/H-3''' révèle la position équatoriale du proton H-2'''. Les constantes de couplage de ce 6-désoxyhexose indiquent qu'il s'agit bien d'un  $\alpha$ -L-rhamnose. Les attributions faites par l'expérience COSY sont confirmées par analyse du spectre TOCSY (Figure III.83).

Couplages TOCSY du  $\alpha$ -L-rhamnoseCouplages COSY du  $\alpha$ -L-rhamnose

L'expérience HSQC (Figure III.84) permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones de ces sucres.

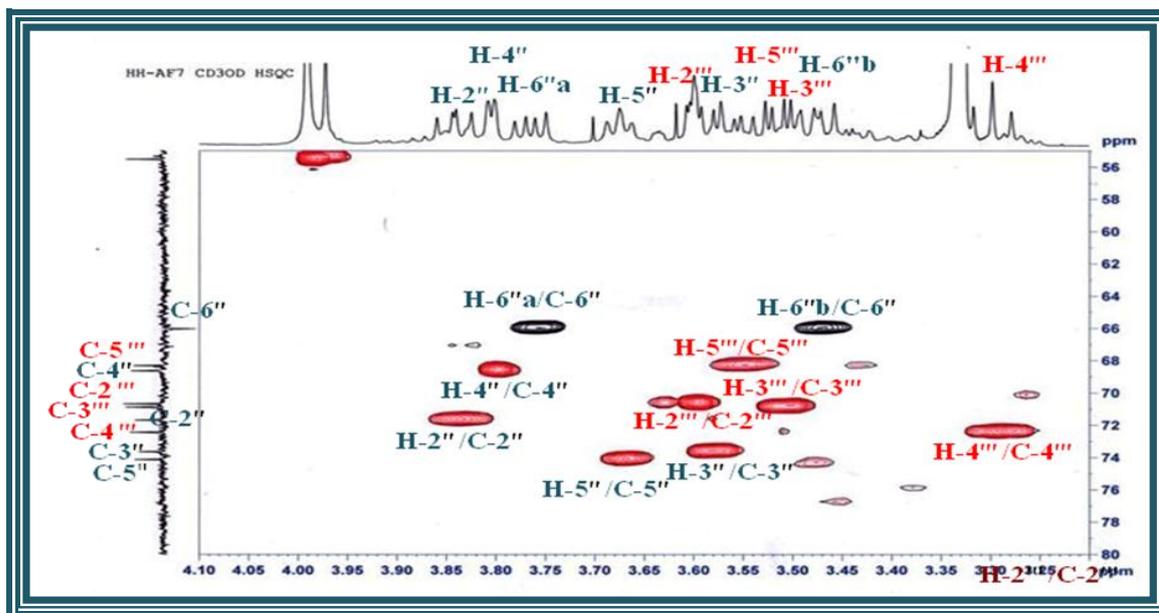


Figure III.84: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 5

Les corrélations HMBC (Figures III.85 et III.86) du proton anomérique H-1'' du  $\beta$ -D-galactose avec le carbone C-3 d'une part, et d'autre part le deuxième proton anomérique H-1''' du  $\alpha$ -L-rhamnose et le carbone C-6'', permettent de constituer l'enchaînement entre les deux unités osidiques et l'aglycone.

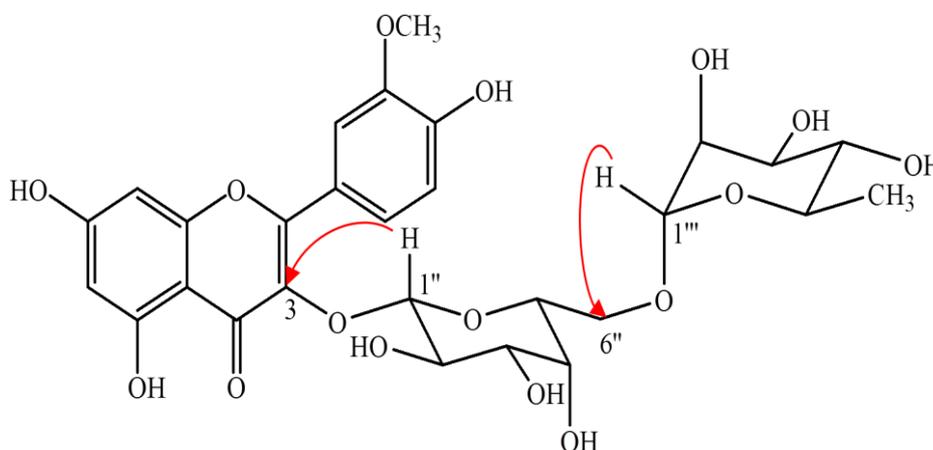


Figure III.85: Corrélations HMBC montrant la liaison entre l'enchaînement osidique et l'aglycone

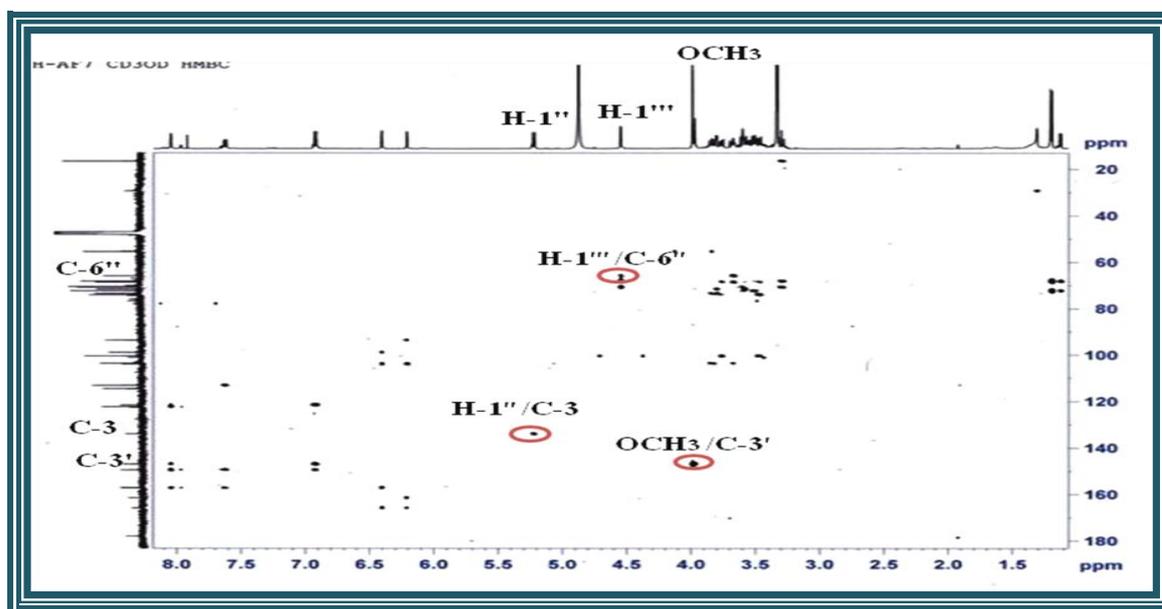


Figure III.86: Spectre HMBC du composé 5

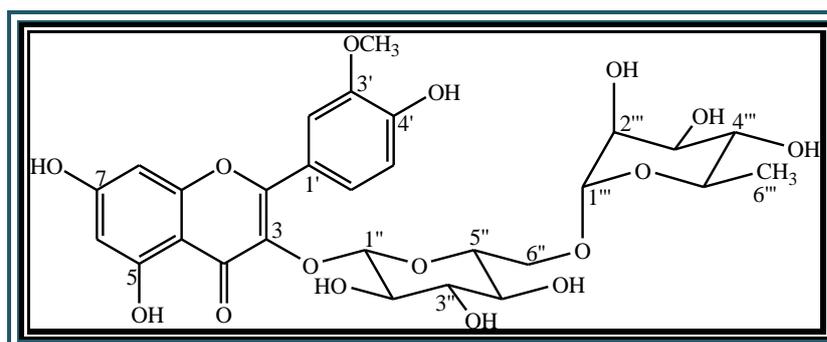
Toutes ces données sont compatibles avec celles de l'isorhamnétine 3-*O*-robinobioside isolé antérieurement des espèces *Aerva javanica* (Amaranthaceae) <sup>[162]</sup> et *Bupleurum spinosum* L. (Apiaceae). <sup>[163]</sup> Ce composé a été identifié pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.5: Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de 5 dans CD<sub>3</sub>OD

| position     | δ <sub>C</sub> (ppm) | δ <sub>H</sub> (m, J en Hz) |
|--------------|----------------------|-----------------------------|
| 2            | 157,2                | -                           |
| 3            | 134,1                | -                           |
| 4            | 177,9                | -                           |
| 5            | 161,6                | -                           |
| 6            | 98,9                 | 6,20 (d, 2)                 |
| 7            | 165,9                | -                           |
| 8            | 93,7                 | 6,40 (d, 2)                 |
| 9            | 157,3                | -                           |
| 10           | 103,9                | -                           |
| 1'           | 121,6                | -                           |
| 2'           | 114,6                | 8,05 (d, 1,8)               |
| 3'           | 147                  | -                           |
| 4'           | 149,5                | -                           |
| 5'           | 113,2                | 6,93 (d, 8,5)               |
| 6'           | 122,3                | 7,62 (dd, 8,5; 1,8)         |
| 3'-OMe       | 55,5                 | 3,99 (s)                    |
| 3-O-galc-1'' | 103,6                | 5,23 (d, 7,8)               |
| 2''          | 71,7                 | 3,84 (dd, 9,7; 7,8)         |
| 3''          | 73,6                 | 3,58 (dd, 9,7; 3,6)         |

| position       | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)                                      |
|----------------|------------------|--|
| 4''            | 68,6             | 3,80 (dl, 3,6)   |
| 5''            | 74,1             | 3,67 (tl, 6,3)   |
| 6''            | 66               | 3,77 (dd, 10,2 ; 5,5) H-6''a<br>3,47 (dd, 10,2 ; 6,3) H-6''b |
| 6''-O-rha-1''' | 100,5            | 4,55 (d, 1,1)  |
| 2'''           | 70,7             | 3,62 (dd, 3,4; 1,1)  |
| 3'''           | 70,9             | 3,52 (dd, 9,1 ; 3,4)   |
| 4'''           | 72,4             | 3,29 (t, 9,5)  |
| 5'''           | 68,3             | 3,55 (m)   |
| 6'''           | 16,6             | 1,19 (d, 6,2)  |

#### III-4-4-1-6 Elucidation structurale du composé 6



Narcissine (6)

Ce composé **6** obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, montre aussi une fluorescence violette sombre sous la lampe UV à 366 nm. Son spectre UV (Figure III.87) enregistré dans le méthanol présente deux maxima d'absorption: la bande I à 350 nm correspondant au cycle B et la bande II à 254 nm attribuable au cycle A d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (3-OR).

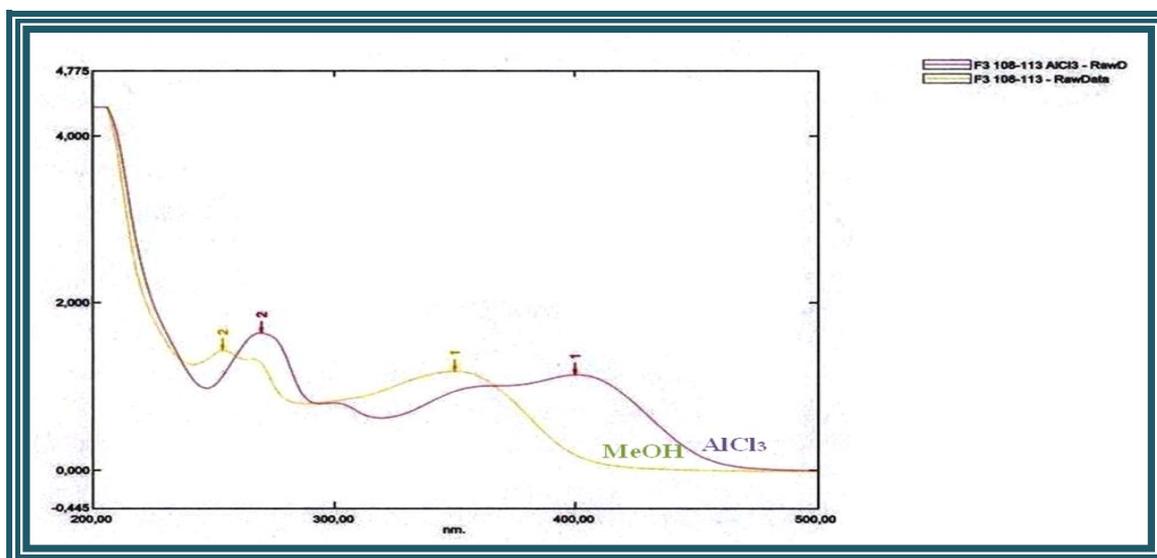


Figure III.87: Spectre UV du composé 6

Le spectre de masse ESI-MS réalisé en mode positif (Figure III.88) du composé **6** montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  647  $[M+Na]^+$  soit une masse de 624 uma et une formule brute en  $C_{28}H_{32}O_{16}$ , indiquant que les composés **5** et **6** sont aussi isomères.

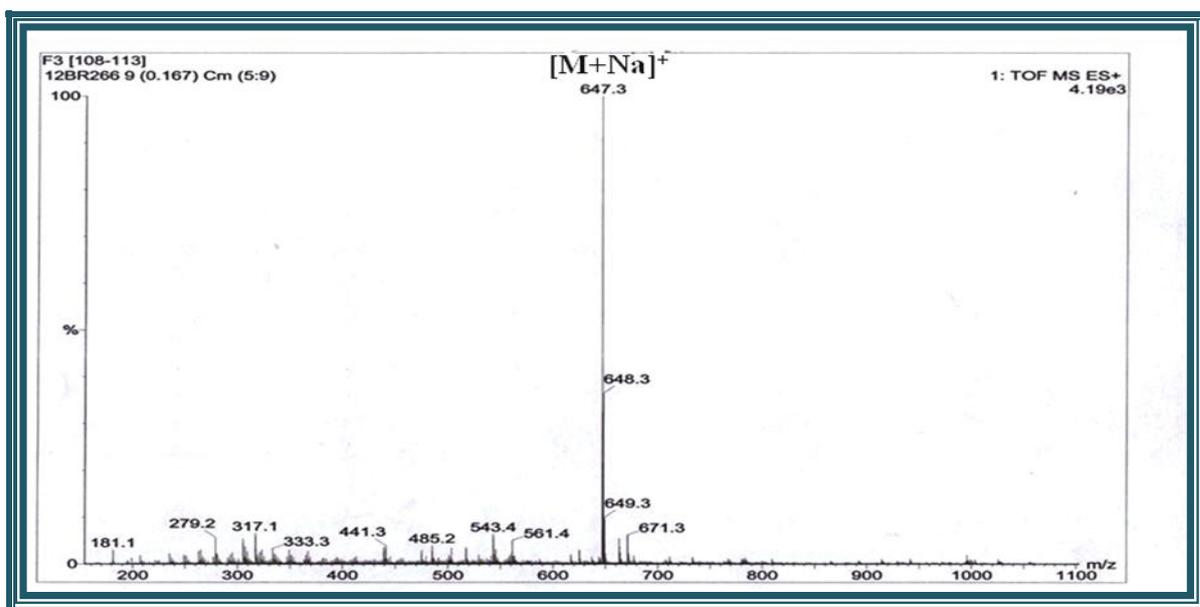


Figure III.88: Spectre de masse ESI-MS du composé **6**

Les données spectrales RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (Tableau III.6) permettent de déduire que le composé **6** possède le même aglycone (isorhamnétine) que les composés **2** et **5** décrits précédemment.

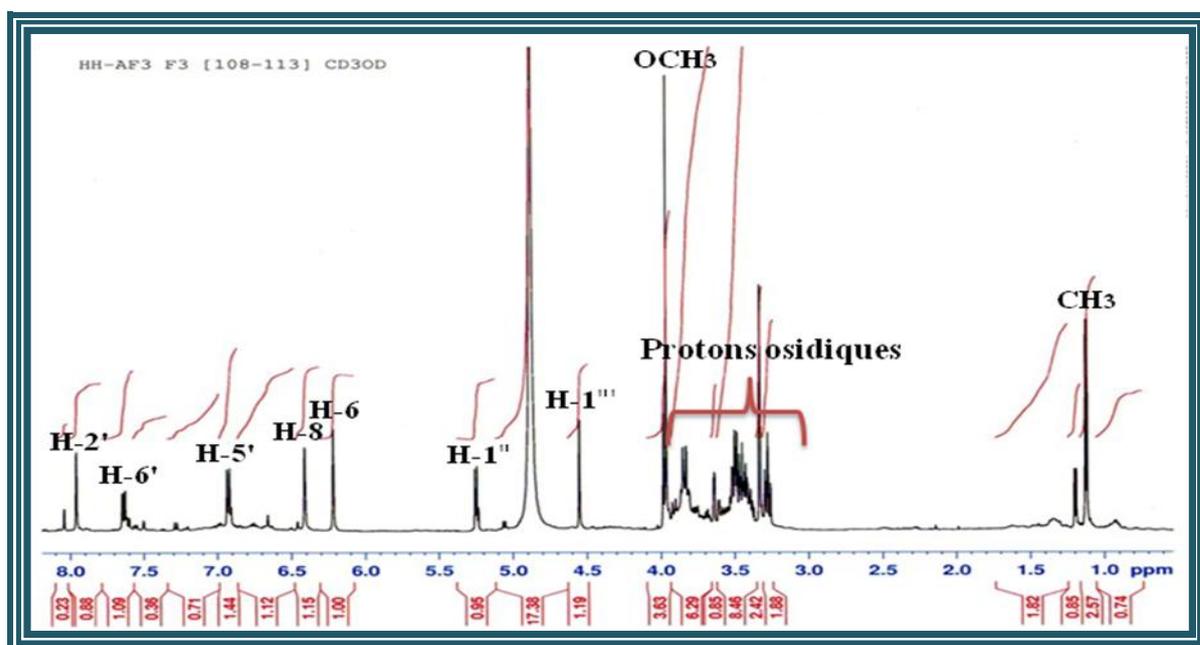


Figure III.89: Spectre RMN  $^1H$  du composé **6**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.89) comporte des signaux sous forme de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  6,22 ( $J = 2$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6,40 ( $J = 2$  Hz), qui sont caractéristiques des protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A. Pour le cycle B, on observe un signal de proton H-6' qui sort à  $\delta_{\text{H}}$  7,64 sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 8,5; 1,8$  Hz). Le premier doublet correspond à un couplage ortho avec le proton H-5' qui lui, résonne à  $\delta_{\text{H}}$  6,93 ( $J = 8,5$  Hz). Le deuxième doublet, indiquant un couplage méta avec le proton H-2' ( $J = 1,8$  Hz), est détecté à  $\delta_{\text{H}}$  7,96. On visualise aussi un signal sortant à  $\delta_{\text{H}}$  3,96 sous forme de singulet, correspondant aux protons d'un groupement méthoxyle.

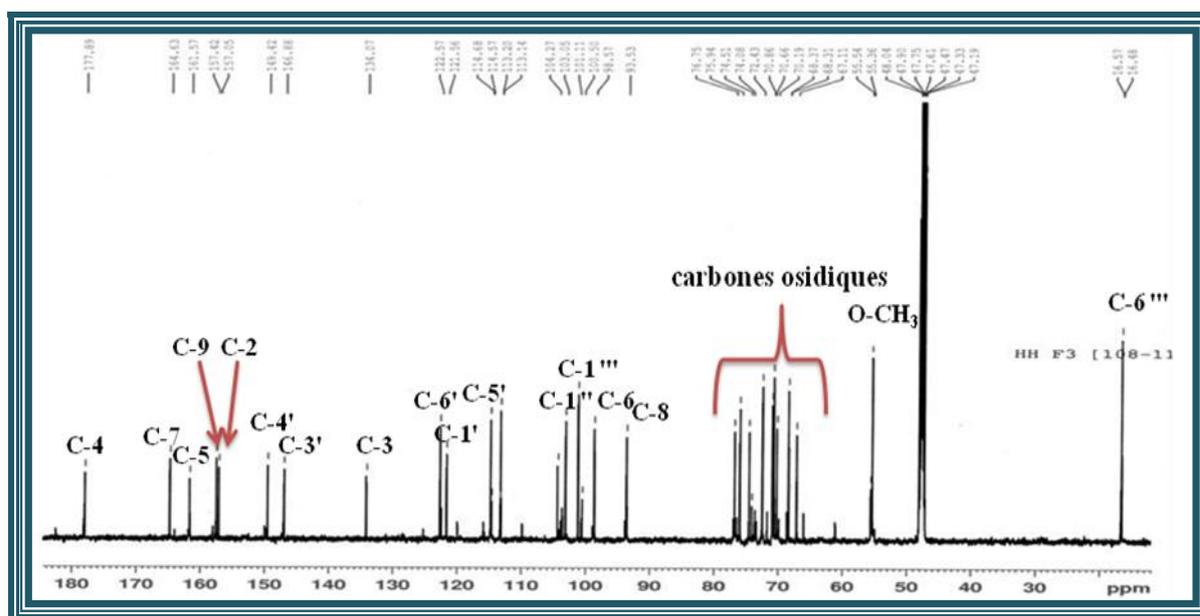


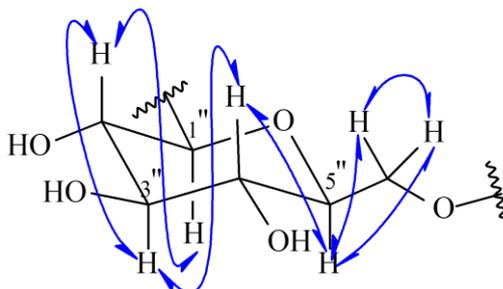
Figure III.90: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 6

L'identification de la partie aglycone comme étant l'isorhamnétine atteste que la différence entre les produits 6 et 5 déjà caractérisé se situe au niveau de la partie osidique constituée de deux sucres.

Partant du premier proton osidique H-1'' résonant à 5,25 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 7,8$  Hz), l'expérience homonucléaire COSY permet de relier 7 protons d'un hexose à travers leurs taches de corrélations comme suit :

- H-1''/H-2'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,49 (*dd*,  $J = 8,6 ; 7,8$  Hz)];
- H-2''/H-3'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,49 (*t*,  $J = 8,6$  Hz)];
- H-3''/H-4'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,27 (*t*,  $J = 8,6$  Hz)];
- H-4''/H-5'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,39 (*m*)];
- H-5''/H<sub>2</sub>-6'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,84 (*d*,  $J = 10,6$  Hz, H-6''a)/  $\delta_{\text{H}}$  3,44 (*dd*,  $J = 10,6 ; 6,1$  Hz, H-6''b)].

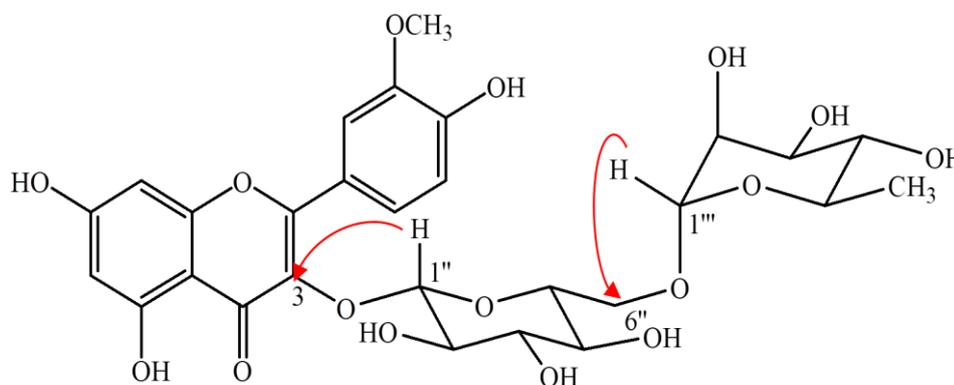
Pour cet hexose, on note la configuration  $\beta$  grâce à la constante de couplage de son proton anomérique H-1'' à  $\delta_{\text{H}}$  5,25 (*d*,  $J = 7,8$  Hz). La différence entre les composés **5** et **6** réside exactement au niveau de l'orientation du proton H-4'' axial [ $\delta_{\text{H}}$  3,27 (*t*,  $J = 8,6$  Hz)]. Les grandes constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$ .



**Figure III.91: Corrélations COSY du  $\beta$ -D-glucose**

Le rhamnose est identifié par son proton anomérique H-1''' qui résonne à  $\delta_{\text{H}}$  4,55 avec une constante de couplage faible ( $J = 1,1$  Hz) et le signal du méthyle sortant à  $\delta_{\text{H}}$  1,12 (*d*,  $J = 6,2$  Hz). Les déplacements chimiques des autres protons ainsi que leurs carbones déterminés par analyse des spectres COSY, HSQC et TOCSY confirment la présence du  $\alpha$ -L-rhamnose.

Le spectre de corrélations hétéronucléaires longue distance HMBC (Figures III.92 et III.93), permet d'établir l'enchaînement des sucres à l'aglycone en montrant le couplage du proton anomérique du glucose H-1'' avec le carbone C-3 de l'aglycone. Par ailleurs, la corrélation observée entre le proton H-1''' à  $\delta_{\text{H}}$  4,55 et le carbone situé à  $\delta_{\text{C}}$  67,1 (C-6'') conduit à relier les deux sucres identifiées comme étant un diglycoside. Il s'agit du rutinose [rhamnosyl- $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)-glucose].



**Figure III.92: Corrélations HMBC montrant l'attachement de l'enchaînement osidique à l'aglycone**

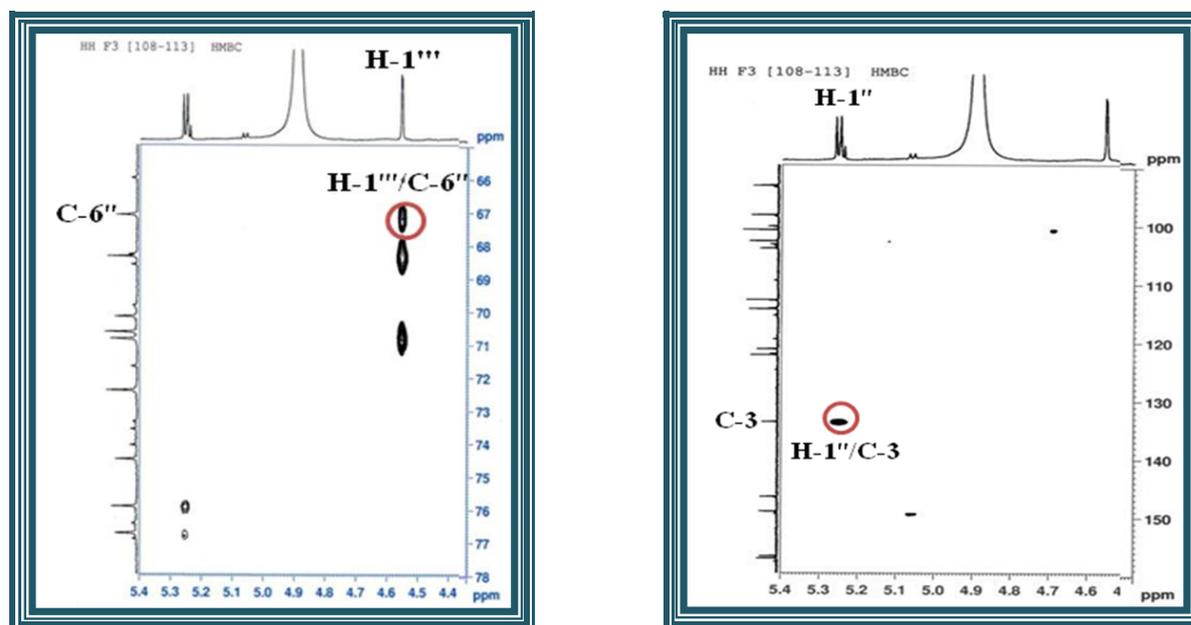


Figure III.93: Spectre HMBC du composé 6

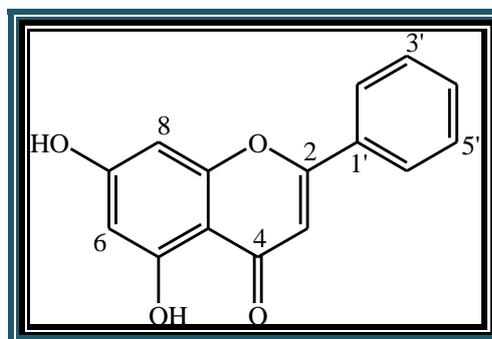
Toutes ces données spectroscopiques et la mesure du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = -15,85^\circ$ ,  $C = 1,35$  g/100 ml, MeOH) conduisent à établir la structure de composé **6** à l'isorhamnétine 3- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(6 $\rightarrow$ 1)-L-rhamnopyranoside ou Narcissine. Ce composé isolé antérieurement des espèces *Calendula officinalis* Linn. (Asteraceae) <sup>[164]</sup> et *Astragalus cruciatus* Link. (Leguminosae), <sup>[165]</sup> *Caragana bungei* Lebeb. (Fabaceae), <sup>[166]</sup> a été identifié pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.6: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 6 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| Position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz) |
|----------|------------------|-------------------------|
| 2        | 157              | -                       |
| 3        | 134,1            | -                       |
| 4        | 177,9            | -                       |
| 5        | 161,6            | -                       |
| 6        | 98,6             | 6,22 (d, 2)             |
| 7        | 164,6            | -                       |
| 8        | 93,5             | 6,40 (d, 2)             |
| 9        | 157,4            | -                       |
| 10       | 104,3            | -                       |
| 1'       | 121,6            | -                       |
| 2'       | 113,1            | 7,96 (d, 1,8)           |
| 3'       | 146,9            | -                       |
| 4'       | 149,4            | -                       |
| 5'       | 114,7            | 6,93 (d, 8,5)           |

| Position       | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m, J</i> en Hz)   |
|----------------|------------------|---|
| 6'             | 122,6            | 7,64 ( <i>dd</i> , 8,5; 1,8)  |
| 3'-OMe         | 55,4             | 3,96 ( <i>s</i> )   |
| 3-O-glc-1''    | 103,1            | 5,25 ( <i>d</i> , 7,8)  |
| 2''            | 71,5             | 3,49 ( <i>dd</i> , 8,6; 7,8)  |
| 3''            | 76,7             | 3,47 ( <i>t</i> , 8,6)  |
| 4''            | 70,2             | 3,27 ( <i>t</i> , 8,6)  |
| 5''            | 75,9             | 3,39 ( <i>m</i> )   |
| 6''            | 67,1             | 3,84 ( <i>d</i> , 10,6) H-6''a<br>3,44 ( <i>dd</i> , 10,6 ; 6,1) H-6''b |
| 6''-O-rha-1''' | 101,1            | 4,55 ( <i>d</i> , 1,1)  |
| 2'''           | 70,7             | 3,64 ( <i>dd</i> , 3,1; 1,1)  |
| 3'''           | 70,9             | 3,52 ( <i>dd</i> , 9,1 ; 3,1)   |
| 4'''           | 72,4             | 3,28 ( <i>t</i> , 9,5)  |
| 5'''           | 68,3             | 3,43 ( <i>m</i> )   |
| 6'''           | 16,5             | 1,12 ( <i>d</i> , 6,2)  |

#### III-4-4-1-7 Elucidation structurale du composé 7



Chrysin (7)

La détermination de la structure du composé **7** est basée sur l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et spectre de masse ESI-MS.

Ce composé est obtenu sous forme de cristaux jaunes visible en UV. Son spectre de masse ESI (Figure III.94) enregistré en mode positif montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  277  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et à  $m/z$  531  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Ceci correspond à une masse moléculaire de 254 uma et une formule brute en  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ .

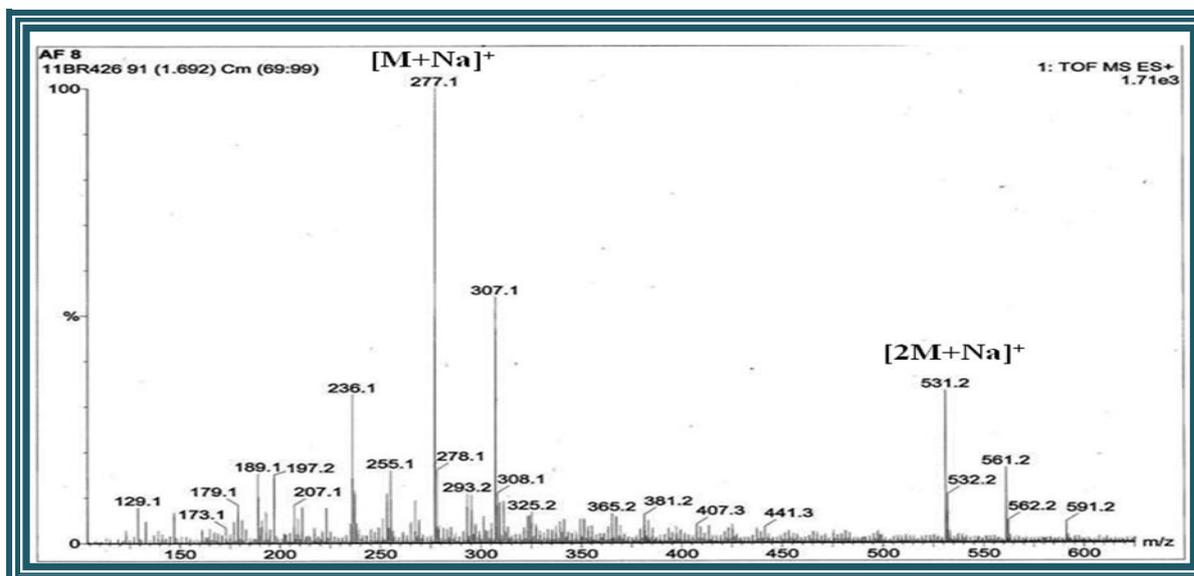


Figure III.94: Spectre de masse ESI-MS du composé 7

L'étude du spectre RMN  $^1H$  du composé 7 (Figure III.95) permet d'attribuer les signaux des protons suivants:

- Un signal à  $\delta_H$  6,23 ( $J = 2$  Hz) sous forme d'un doublet, est attribué au proton H-6 du cycle A;
- Un signal à  $\delta_H$  6,49 ( $J = 2$  Hz) sortant sous forme de doublet également, correspond à H-8 du cycle A;
- Deux protons sous forme de doublet à  $\delta_H$  8,05 ( $J = 8$  Hz), correspondent aux protons H-2' et H-6' du cycle B;
- Trois protons se présentant comme multiplet à  $\delta_H$  7,60, sont attribués aux protons H-3' et H-4' et H-5' du cycle B;
- Un proton à  $\delta_H$  6,76 sous forme d'un singulet, est attribué au proton H-3 de l'hétérocycle C.

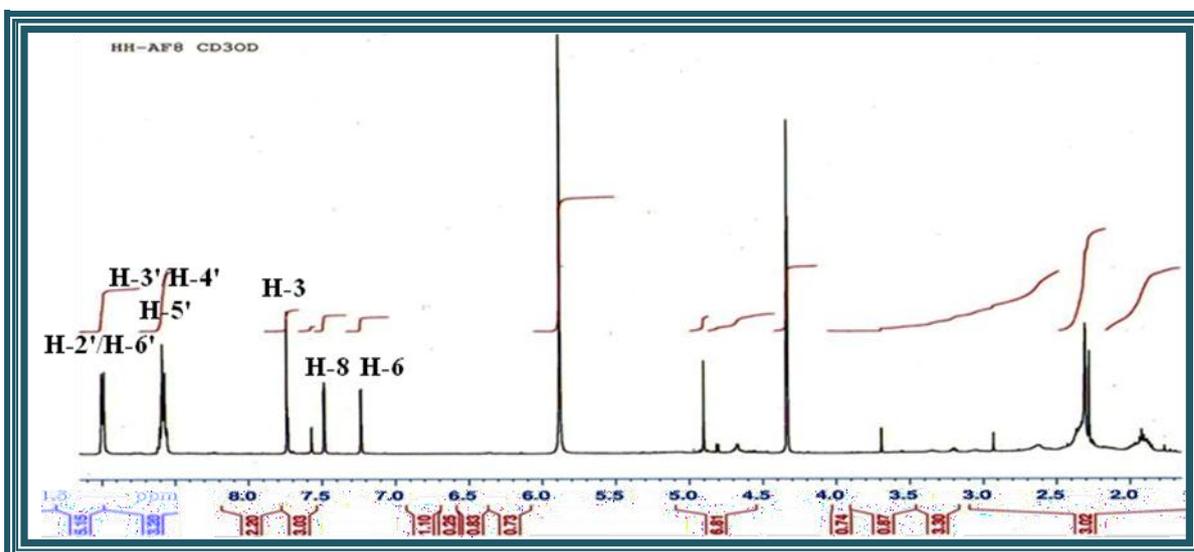


Figure III.95: Spectre RMN  $^1H$  du composé 7

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III.96) montre la présence de 15 atomes de carbone se répartissant en sept carbones quaternaires résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  164,1 (C-2), 182,4 (C-4), 161,8 (C-5), 165,9 (C-7), 158,4 (C-9), 104,7 (C-10) et 131,2 (C-1'), et huit groupements CH localisés à  $\delta_{\text{C}}$  104,2 (C-3), 99,2 (C-6), 93,9 (C-8), 131,6 (C-4'), 126 (C-2'/C-6') et 128,8 (C-3'/C-5').

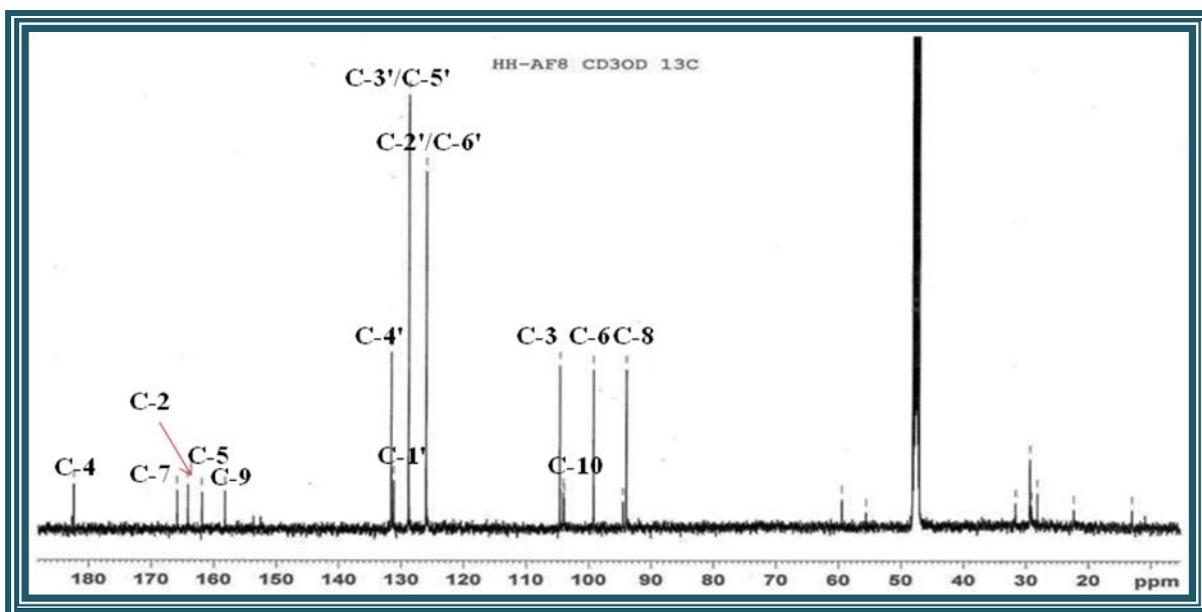


Figure III.96: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  découplé du composé 7

Toutes ces données spectroscopiques (Tableau III.7) et la comparaison avec la littérature, indiquent que le composé 7 est le 5,6-dihydroxyflavone (chryisine). Ce composé a déjà été isolé antérieurement à partir des espèces *Carthamus lanatus* <sup>[167]</sup> et *Centaurea Pseudoscabiosa* <sup>[168]</sup> *Centaurea pubescens* <sup>[169]</sup> de la famille Asteraceae. Cette flavone identifiée pour la première fois dans le genre *Atractylis* est connue pour ses activités : anti-inflammatoire <sup>[170]</sup> et anti-oxydante. <sup>[171]</sup>

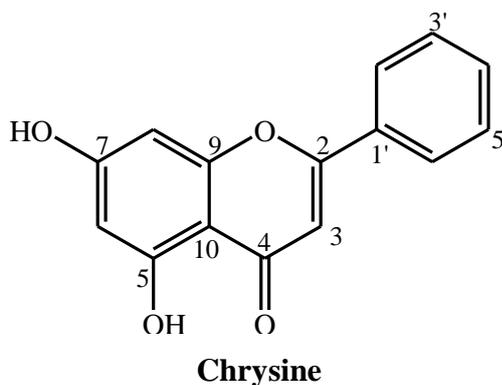
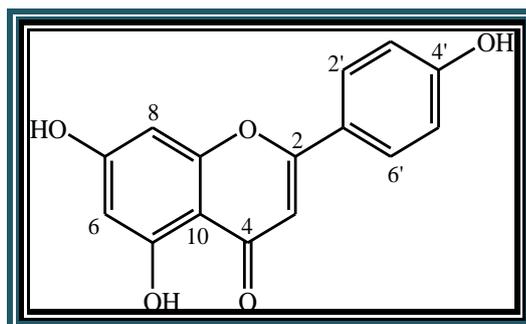


Tableau III.7: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 7 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|----------|---------------------------|--|
| 2        | 164,1                     | -  |
| 3        | 104,6                     | 6,76 ( <i>s</i> )                                |
| 4        | 182,4                     | -  |
| 5        | 161,8                     | -  |
| 6        | 99,2                      | 6,23 ( <i>d</i> , 2)                             |
| 7        | 165,9                     | -  |
| 8        | 93,9                      | 6,49 ( <i>d</i> , 2)                             |
| 9        | 158,4                     | -  |
| 10       | 104,7                     | -  |
| 1'       | 131,2                     | -  |
| 2'       | 126                       | 8,05 ( <i>d</i> , 8)                             |
| 3'       | 128,8                     | 7,60 ( <i>m</i> )                                |
| 4'       | 131,6                     | 7,60 ( <i>m</i> )                                |
| 5'       | 128,8                     | 7,60 ( <i>m</i> )                                |
| 6'       | 126                       | 8,05 ( <i>d</i> , 8)                             |

## III-4-4-1-8 Elucidation structurale du composé 8



Apigénine (8)

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, il se colore en jaune après révélation par une solution acide et chauffage.

Le spectre de masse (Figure III.97) du composé 8 donne un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  309  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , correspondant à une formule brute en  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ .

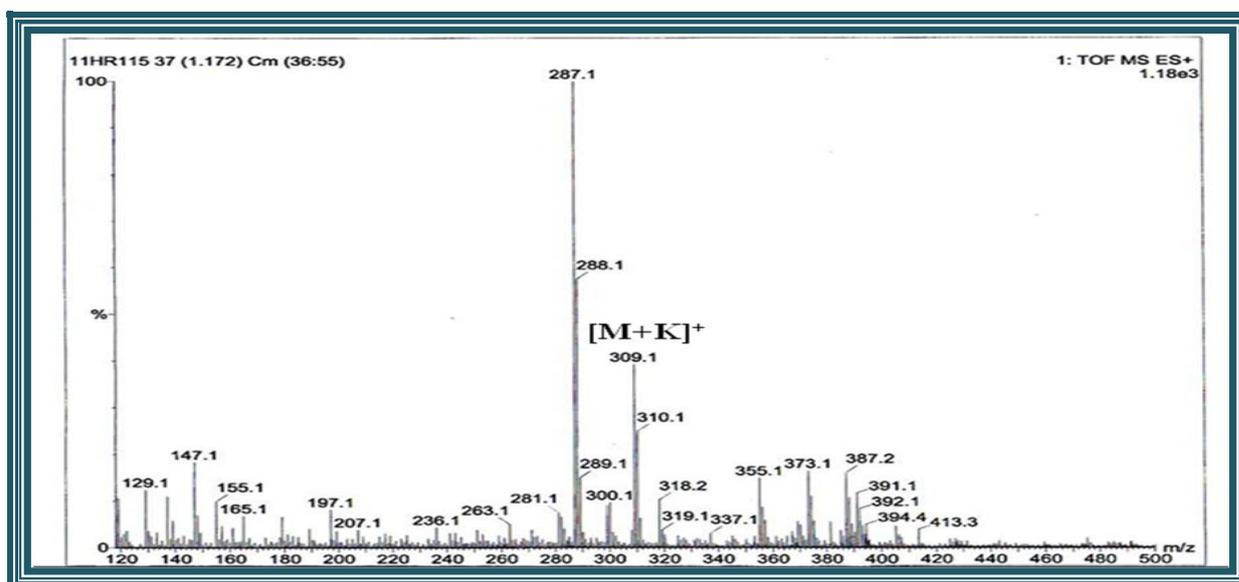


Figure III.97: Spectre de masse ESI-MS du composé **8**

La détermination de la structure du composé **8** est basée principalement sur l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et la comparaison avec les données de la littérature. <sup>[153, 172]</sup> En effet l'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.98) permet de visualiser:

- Deux signaux doublets s'intégrant pour deux protons chacun résonant à  $\delta_{\text{H}}$  7,40 ( $d, J = 8,8$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ( $d, J = 8,8$  Hz) correspondent aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du noyau B d'un flavonoïde oxygéné en position 4'.
- Deux signaux singulets larges résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,21 et 6,49 sont attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A.
- Un signal singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6,59 caractéristique d'un proton oléfinique H-3 d'une flavone.

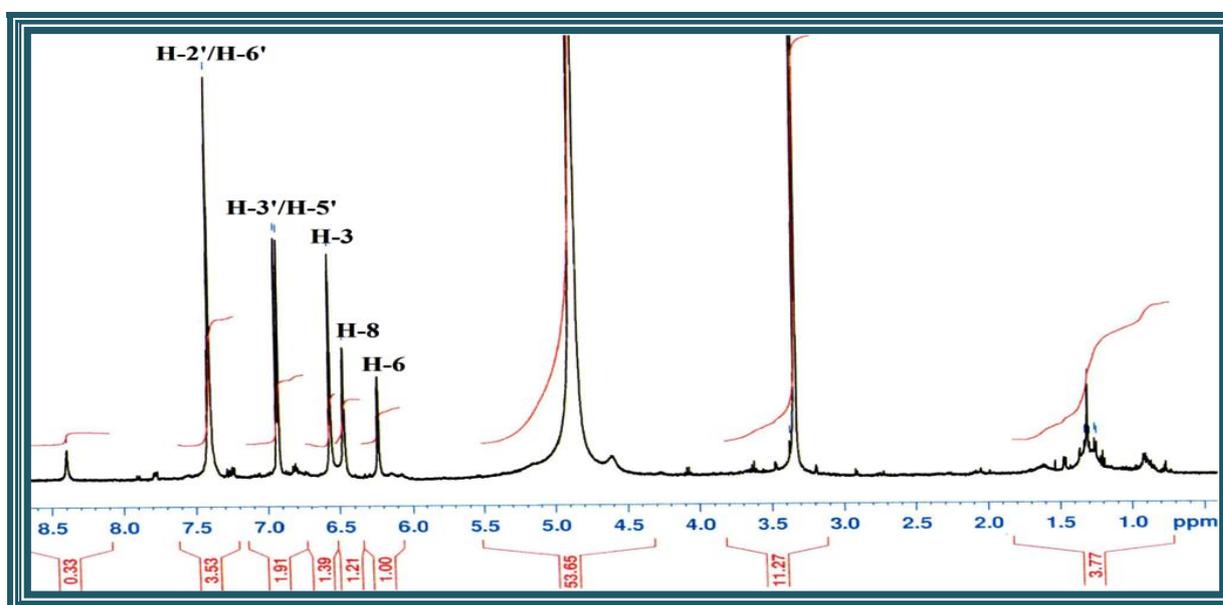


Figure III.98: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **8**

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III.99) indique la présence de 15 atomes de carbone incluant huit carbones quaternaires résonant à  $\delta_{\text{C}}$  164,6 (C-2), 182,4 (C-4), 161,81 (C-5), 164,9 (C-7), 149,5 (C-9), 103,9 (C-10), 122,3 (C-1') et  $\delta_{\text{C}}$  158 (C-4'), et sept groupements CH repérés à  $\delta_{\text{C}}$  102,4 (C-3), 98,7 (C-6), 93,5 (C-8), 127,5 (C-2'/C-6') et  $\delta_{\text{C}}$  115,3 (C-3'/C-5').

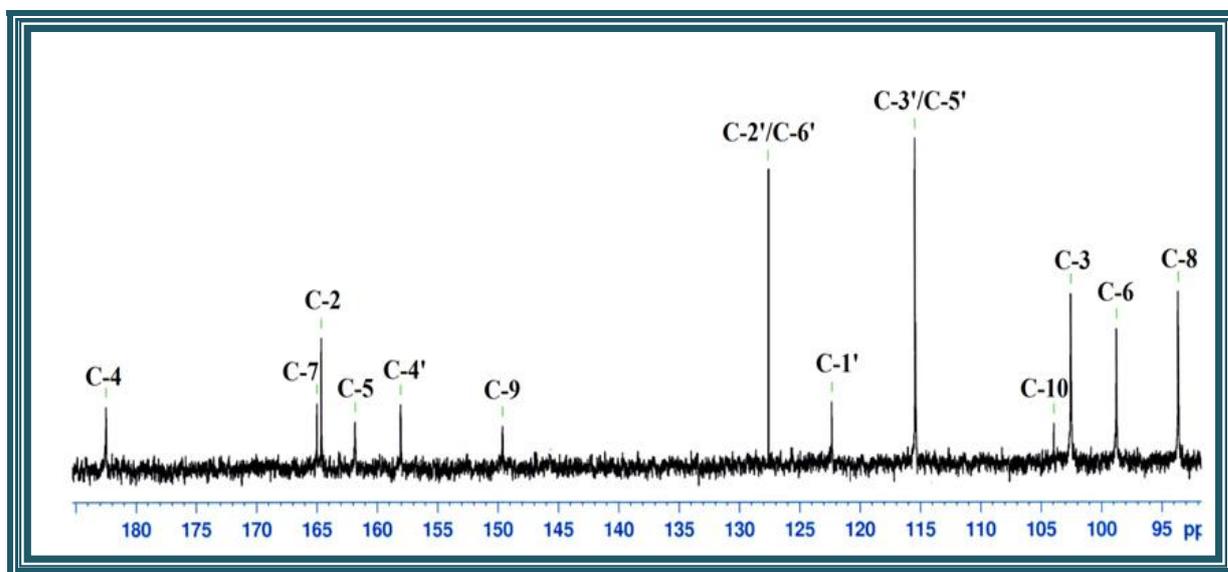


Figure III.99: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  découplé du composé 8

Toutes ces données spectrales (Tableau III.8) nous permettent de proposer pour le composé **8**, la structure suivante : 4',5,7-trihydroxyflavone, connue sous le nom d'apigénine. Ce composé a déjà été isolé à partir de l'extrait éthanolique la plante *Chresta scapigera* (Asteraceae) <sup>[173]</sup> et de l'espèce *Halophila johnsonii* (Hydrocharitaceae). <sup>[174]</sup> Il possède des activités antiallergiques <sup>[175]</sup> et anticancéreuses. <sup>[176]</sup> Il a été détecté pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

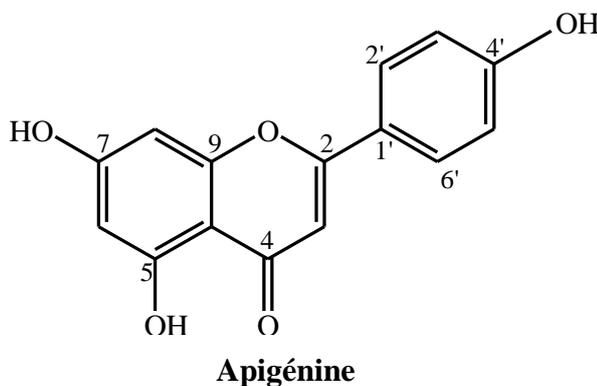
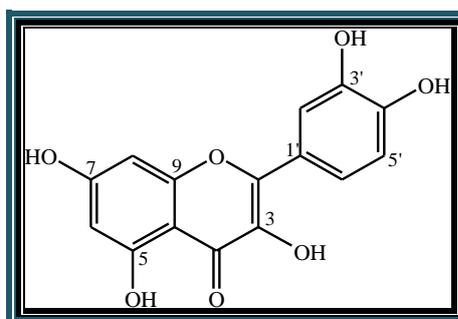


Tableau III.8: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de **8** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|----------|---------------------------|--|
| 2        | 164,6                     | -  |
| 3        | 102,4                     | 6,59 ( <i>s</i> )                                |
| 4        | 182,4                     | -  |
| 5        | 161,8                     | -  |
| 6        | 98,7                      | 6,21 ( <i>s</i> )                                |
| 7        | 164,9                     | -  |
| 8        | 93,5                      | 6,49 ( <i>s</i> )                                |
| 9        | 149,5                     | -  |
| 10       | 103,9                     | -  |
| 1'       | 122,3                     | -  |
| 2'       | 127,5                     | 7,40 ( <i>d</i> , 8,8)                           |
| 3'       | 115,3                     | 6,90 ( <i>d</i> , 8,8)                           |
| 4'       | 158,0                     | -  |
| 5'       | 115,3                     | 6,90 ( <i>d</i> , 8,8)                           |
| 6'       | 127,5                     | 7,40 ( <i>d</i> , 8,8)                           |

III-4-4-1-9 Elucidation structurale du composé **9**Quercétine (**9**)

Le spectre UV (Figure III.100) du composé **9** enregistré dans le méthanol présente deux bandes d'absorptions maximales à 356 nm et à 257 nm, caractéristiques d'un squelette flavonoïdique de type flavonol ou flavone. Un déplacement bathochromique de la bande I après l'addition d' $\text{AlCl}_3$  est enregistré également, cet effet bathochromique reste après l'ajout du HCl, ce qui indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5. Le déplacement hypsochromique de la bande I après l'addition du HCl par rapport à celle de l' $\text{AlCl}_3$  suggère l'existence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B.

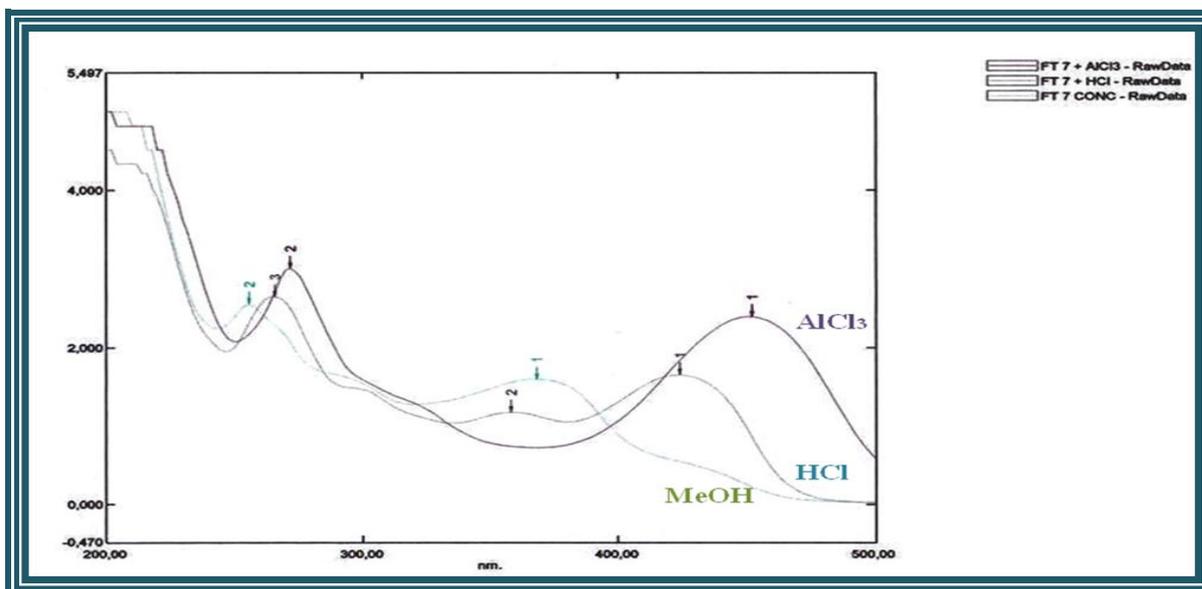


Figure III.100: Spectre UV du composé 9

L'analyse du spectre de masse effectué en ESI mode positif (Figure III.101), révèle pour le composé 9 les pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  325 et  $[M+H]^+$  à  $m/z$  303 correspondant à la formule moléculaire en  $C_{15}H_{10}O_7$ .

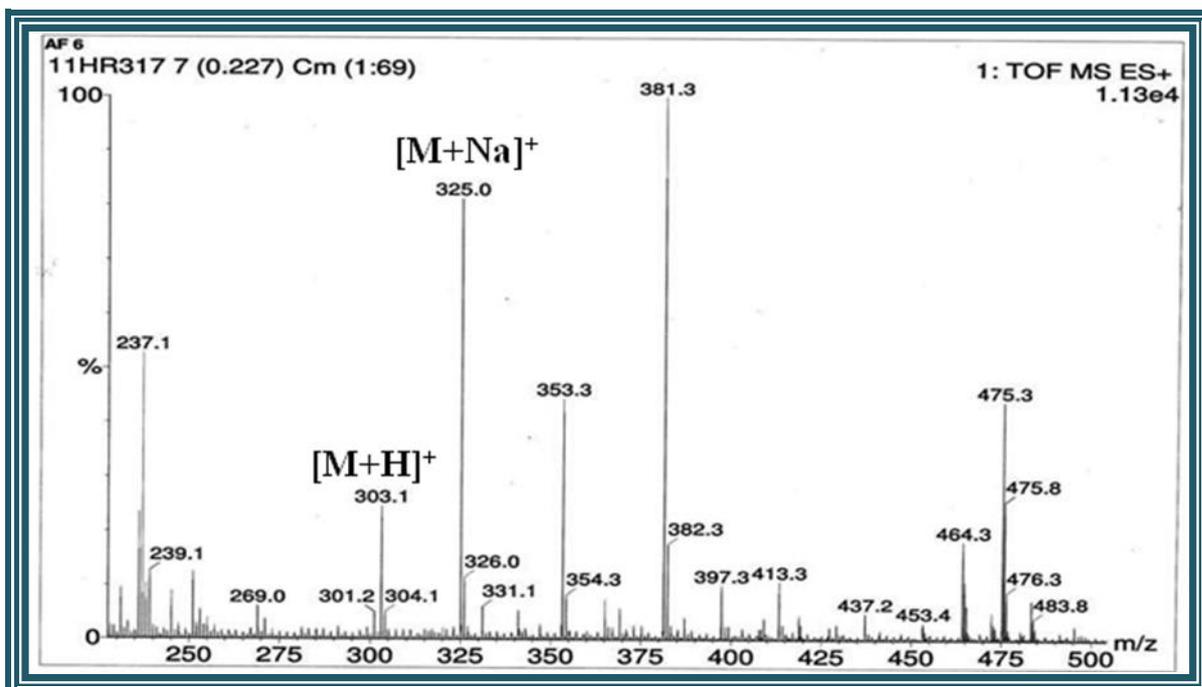


Figure III.101: Spectre de masse ESI-MS du composé 9

Sur le spectre RMN  $^1H$  (Figure III.102) du composé 9, il est observé :

- Deux protons aromatiques sous forme de deux doublets à  $\delta_H$  6,20 et  $\delta_H$  6,40 ( $J = 2$  Hz), typiques d'un couplage *mé*ta des protons H-6 et H-8 du cycle A.

➤ Trois protons aromatiques à  $\delta_H$  7,75 (*d*,  $J = 2$  Hz),  $\delta_H$  7,65 (*dd*,  $J = 8 ; 2$  Hz) et  $\delta_H$  6,9 (*d*,  $J = 8$  Hz) dont les constantes de couplage indiquent qu'ils forment un système ABX. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5' du cycle B.

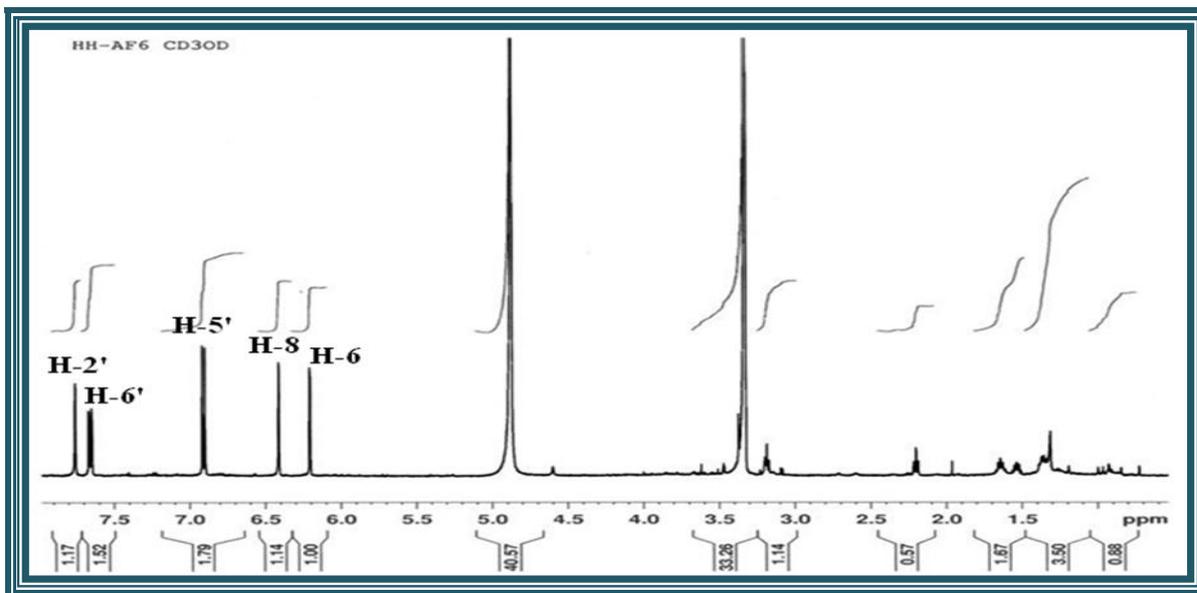


Figure III.102: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 9

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé et DEPT du composé 9 (Figures III.103 et III.104) présentent quinze signaux distincts. Parmi ceux-ci, nous distinguons dix carbones quaternaires dont un groupement carbonyle ( $\delta_C$  177,5) et un carbone oxygéné C-3 caractéristique d'un flavonol ( $\delta_C$  137,3), et cinq CH aromatiques.

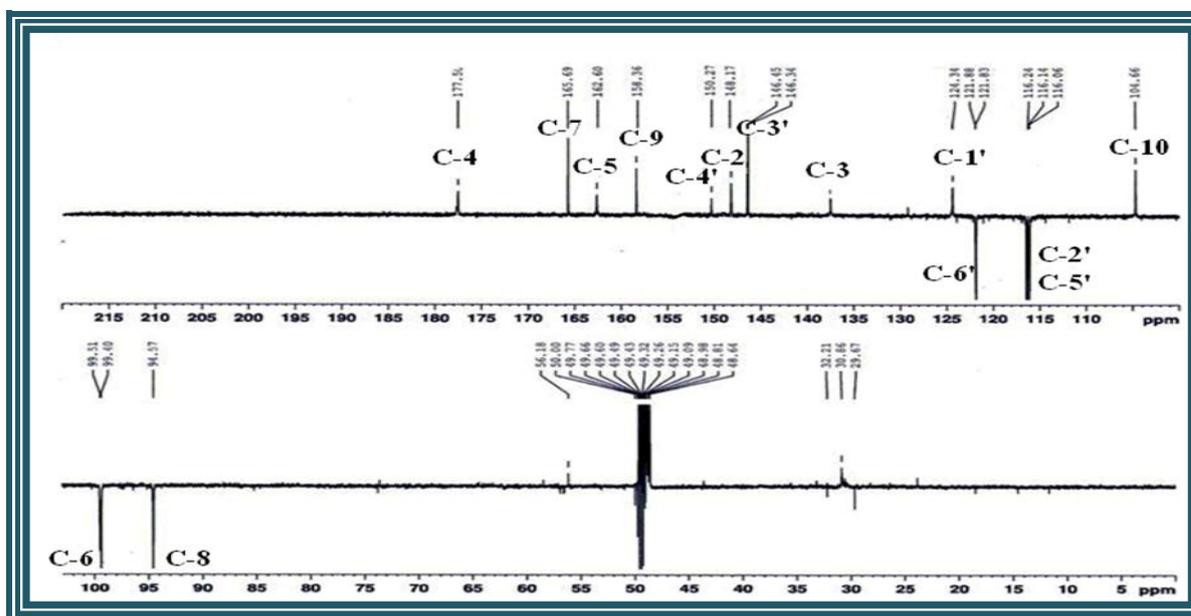


Figure III.103: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé 9

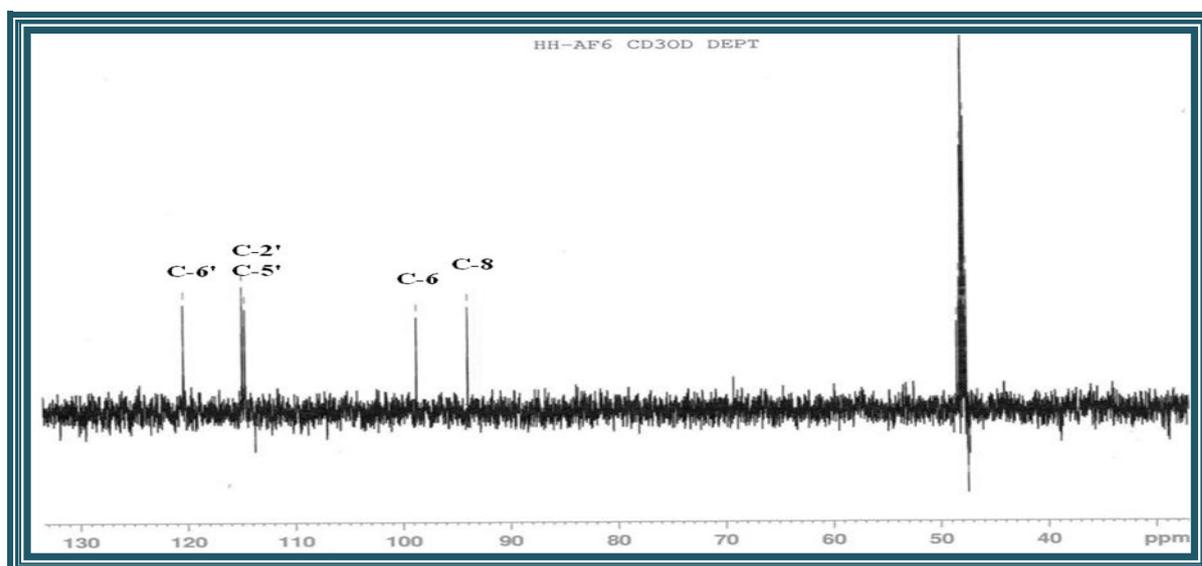


Figure III.104: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 du composé **9**

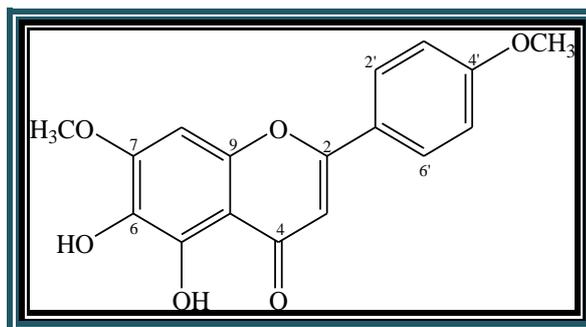
L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec les données de la littérature <sup>[177]</sup> permettent d'identifier le composé **9** comme étant la 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol (quercétine) isolé antérieurement des espèces : *Atractylis Carduus*, <sup>[3]</sup> *Centaurea alexandrina*, *Centaurea calcitrapa*, <sup>[178]</sup> et *Centaurea pubescens*. <sup>[169]</sup>

La quercétine est un flavonoïde qui a fait l'objet de plusieurs études au cours de ces dernières années. Elle semble avoir de multiples effets bénéfiques sur la santé de l'homme, incluant une protection cardiovasculaire, <sup>[179]</sup> une activité anti-oxydante, <sup>[180]</sup> ainsi qu'une activité antiallergique, <sup>[181]</sup> et anti-inflammatoire. <sup>[182]</sup>

Tableau III.9: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de **9** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
|----------|---------------------------|----------------------------------|
| 2        | 148,2                     | -                                |
| 3        | 137,2                     | -                                |
| 4        | 177,5                     | -                                |
| 5        | 162,6                     | -                                |
| 6        | 99,4                      | 6,20 (d, 2)                      |
| 7        | 165,7                     | -                                |
| 8        | 94,6                      | 6,40 (d, 2)                      |
| 9        | 158,4                     | -                                |
| 10       | 104,7                     | -                                |
| 1'       | 124,3                     | -                                |
| 2'       | 116,1                     | 7,75 (d, 2,1)                    |
| 3'       | 146,3                     | -                                |
| 4'       | 150,3                     | -                                |
| 5'       | 116,2                     | 6,9 (d, 8,5)                     |
| 6'       | 121,8                     | 7,65 (dd, 8,5 ; 2,1)             |

## III-4-4-1-10 Elucidation structurale du composé 10



Ladaneine (10)

Le composé **10** se présentant sous forme de cristaux jaunes montre sous la lumière UV ( $\lambda = 365$  nm) une fluorescence violette laissant supposer une structure flavonoïdique de type flavone ou flavonol avec 3-OR.

Le spectre d'absorption UV enregistré dans le méthanol confirme cette supposition par l'observation de deux bandes d'absorption à 332 nm (bande I) correspondant au cycle B et 285 nm (bande II) correspondant au cycle A d'un flavonoïde. L'addition du trichlorure d'aluminium provoque un déplacement bathochromique (+ 16 nm) pour la bande II et (+ 32 nm) pour la bande I, indiquant que le carbone C-5 du cycle A est porteur d'un groupement hydroxyle. La valeur de la longueur d'onde de la bande I inférieure à 435 nm, suggère l'absence de groupement hydroxyle en C-8.

Le spectre de masse ESI, obtenu en mode positif (Figure III.105), présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  337  $[M+Na]^+$  et 315  $[M+H]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 314 correspondant à une formule brute en  $C_{17}H_{14}O_6$ .

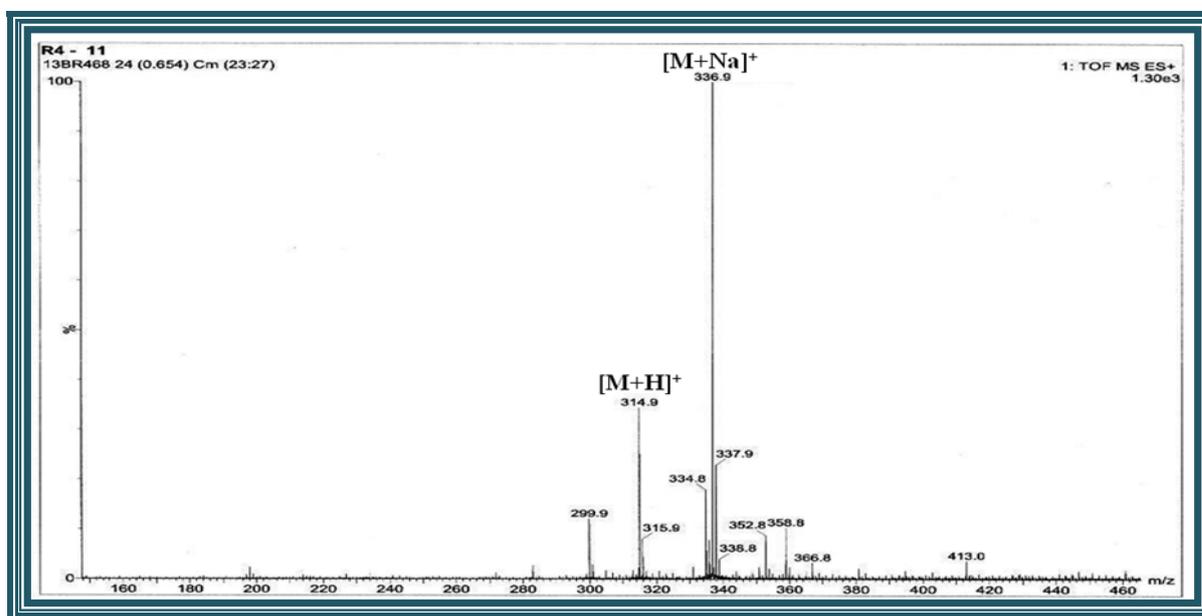


Figure III.105: Spectre de masse ESI-MS du composé 10

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **10** (Figure III.106) enregistré à 600 MHz dans le méthanol deutéré, montre :

- Un signal singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ne présentant aucun couplage sur le spectre COSY est attribué au proton H-8 ou H-6;
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,88, plus déblindé que le proton précédent, d'intégration 1H sous forme d'un singulet correspondant au proton H-3, ce qui nous oriente vers une structure de type flavone;
- Deux signaux doublets d'intégration 2H chacun repérés à  $\delta_{\text{H}}$  8,00 ( $J = 8,5$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  7,12 ( $J = 8,5$  Hz), caractéristiques de protons aromatiques d'un noyau aromatique paradisubstitué attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement ;
- Deux signaux singulets s'intégrant chacun pour 3 protons à  $\delta_{\text{H}}$  4,05 et 3,92, suggèrent la présence de deux groupements méthoxyles.

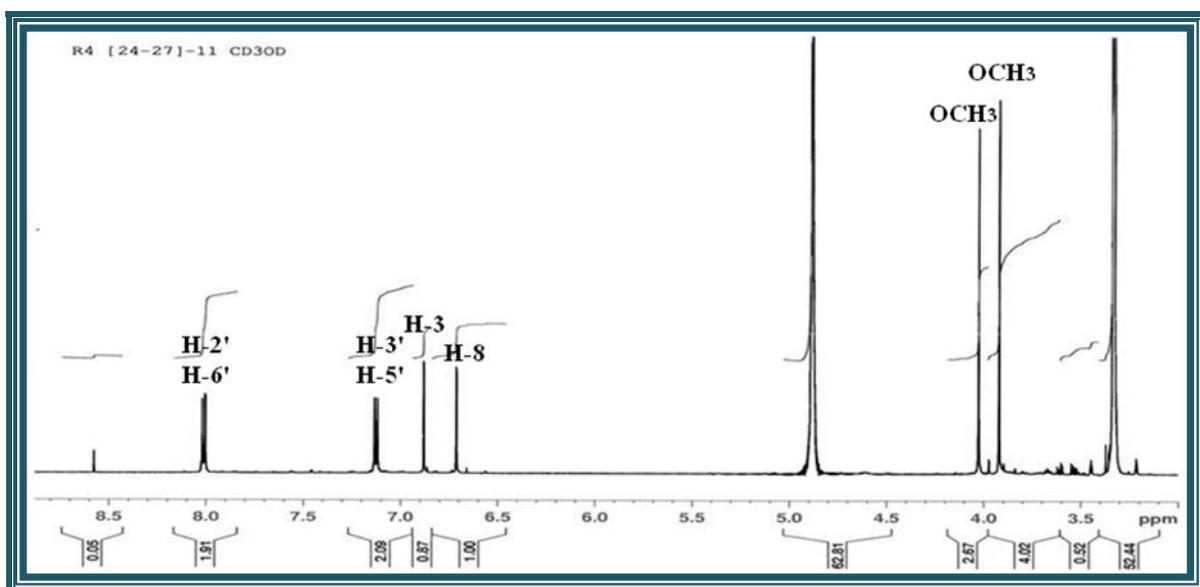


Figure III.106: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **10**

L'analyse combinée des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT (Figures III.107 et III.108) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, <sup>[183]</sup> permettent de distinguer les signaux de 17 carbones dont les déplacements chimiques correspondent à ceux des flavones. Ainsi, on peut identifier :

- Deux signaux de carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  102,7 et  $\delta_{\text{C}}$  164,7 correspondant aux carbones C-3 et C-2 respectivement ;
- Cinq signaux de carbones méthines aromatiques attribuables aux carbones C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  91,3), C-2'/C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  127,9) et C-3'/C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  114,2) ;

- Sept signaux de carbones aromatiques quaternaires dont quatre oxygénés résonnant à  $\delta_C$  150,6 (C-5); 130,1 (C-6); 154,5 (C-7); 163,0 (C-4'); 145,8 (C-9); 105,2 (C-10) et 123,3 (C-1');
- Un signal d'un carbonyle à  $\delta_C$  182,9 est attribué au carbone C-4;
- Deux signaux de carbones méthoxyliques à  $\delta_C$  55,6 et 54,7.

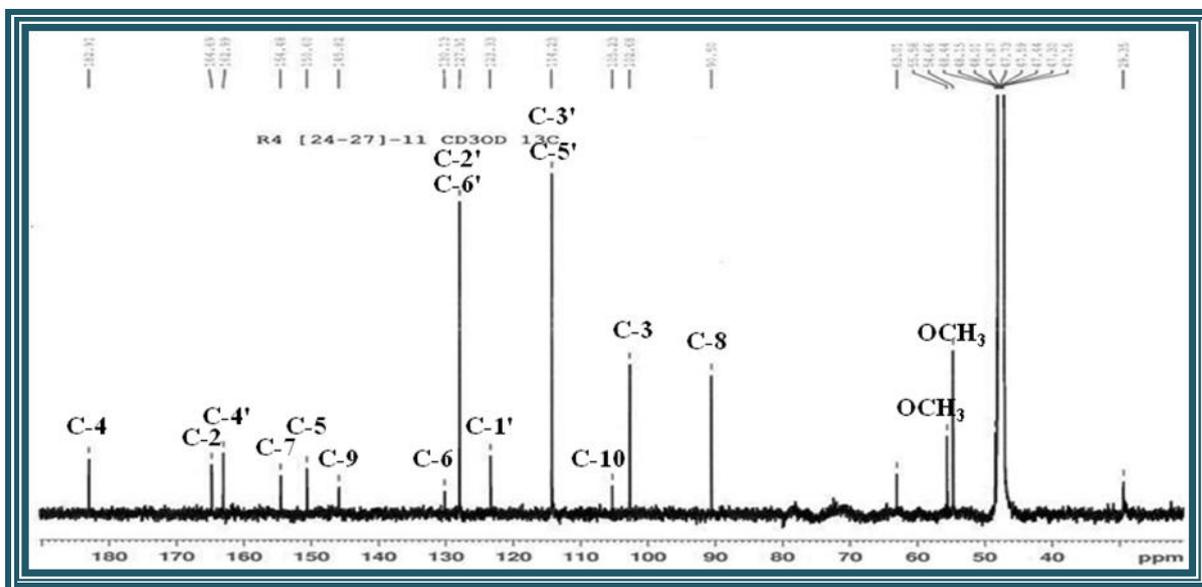


Figure III.107: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 10

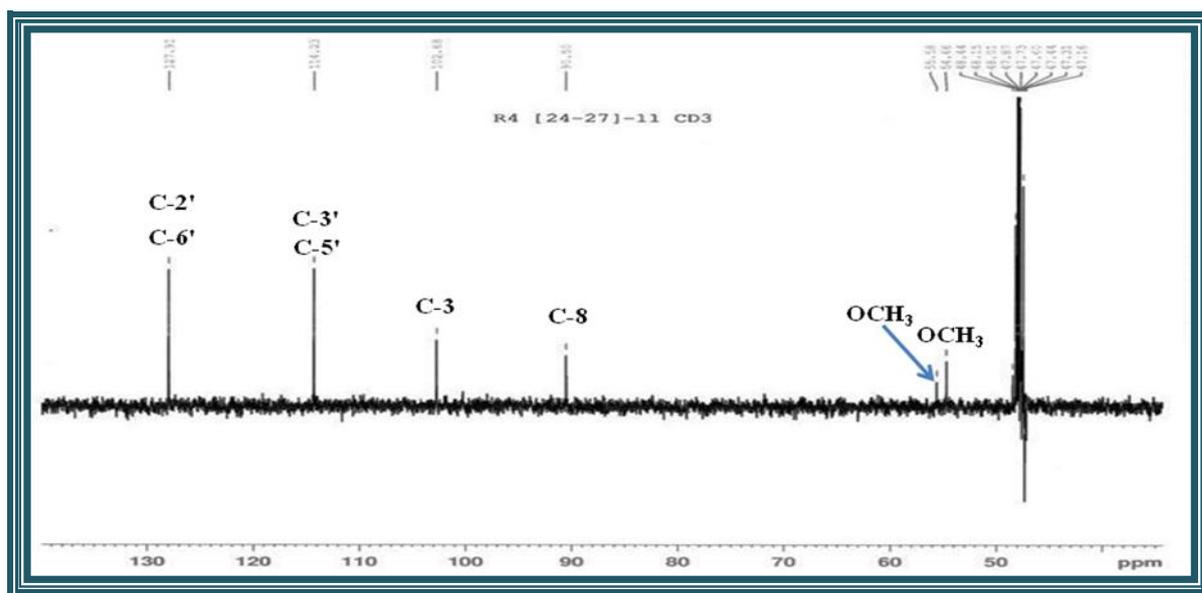
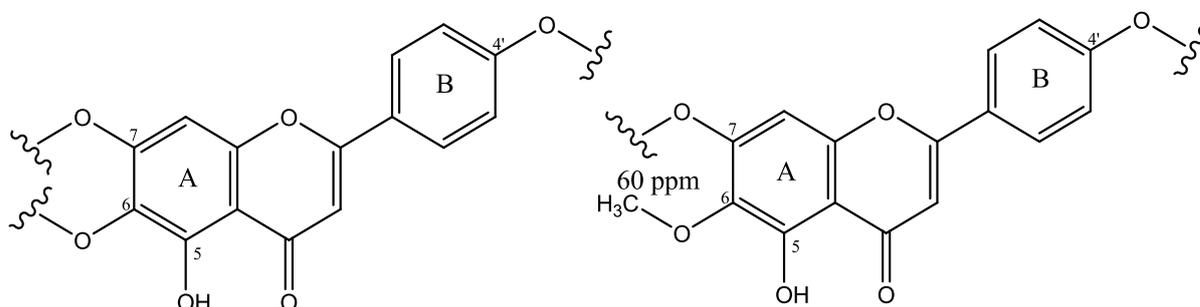


Figure III.108: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT du composé 10

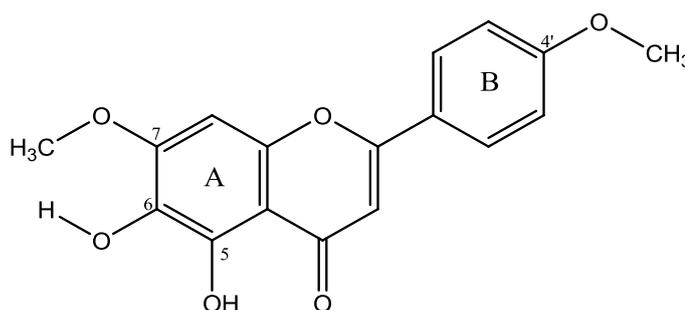
Toutes ces analyses spectrales (UV, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) nous orientent vers une flavone trisubstitué sur le cycle A et monosubstitué en para sur le cycle B. Les quatre substituants sont composés par deux groupements hydroxyles dont l'un est porté sur le carbone C-5 et par deux groupements méthoxyliques.

L'emplacement des trois substituants restant, deux méthoxyles et un hydroxyle concerne les positions 4' (cycle B), 6 et 7 (cycle A) (Figure V.109). La position C-6 (Figure III.109) ne peut pas être porteuse d'un groupement méthoxyle (ortho disubstitution) car le déplacement chimique des carbones des deux méthoxyles est inférieur à 60 ppm (55,6 et 54,7 ppm).<sup>[142,143]</sup>



**Figure III.109: Possibilité d'emplacement des groupements méthoxyles**

Par conséquent, les deux groupements méthoxyles sont positionnés sur les carbones C-4' et C-7 (Figure III.110).



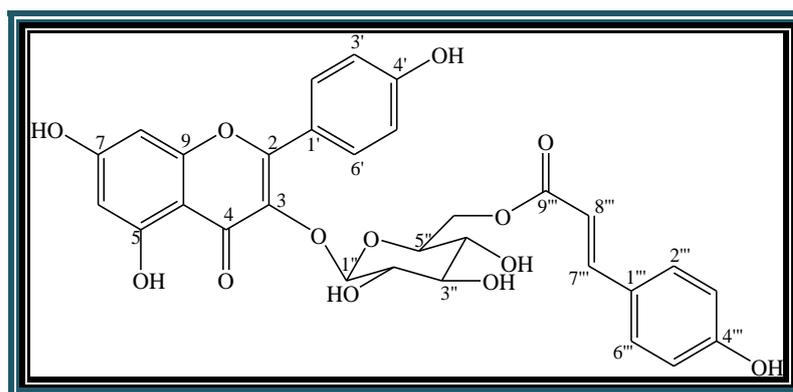
**Figure III.110: Localisation des substituants sur le squelette flavonique**

La comparaison de ces données spectroscopiques (Tableau III.10) avec celles trouvées dans la littérature permet d'identifier sans équivoque le composé **10** au 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone. Ce composé connu sous le nom de ladaneine antérieurement est isolé des espèces *Centaurea clementei*<sup>[184]</sup> et *Centaurea cuneifolia*<sup>[185]</sup> appartenant à la famille Asteraceae, et de l'espèce *Linaria aegyptiaca* de la famille Scrophulariaceae.<sup>[186]</sup> Il a été isolé pour la première fois du genre *Atractylis*. Ce composé est connu pour son activité anticancéreuse.<sup>[187]</sup>

Tableau III.10: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 10 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

| Position            | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|---------------------|---------------------------|--|
| 2                   | 164,7                     | -  |
| 3                   | 102,7                     | 6,88 ( <i>s</i> )                                |
| 4                   | 182,9                     | -  |
| 5                   | 150,6                     | -  |
| 6                   | 130,1                     | -  |
| 7                   | 154,5                     | -  |
| 8                   | 90,5                      | 6,70 ( <i>s</i> )                                |
| 9                   | 145,8                     | -  |
| 10                  | 105,2                     | -  |
| 1'                  | 123,3                     | -  |
| 2'                  | 127,9                     | 8,00 ( <i>d</i> , 8,5)                           |
| 3'                  | 114,2                     | 7,12 ( <i>d</i> , 8,5)                           |
| 4'                  | 163,0                     | -  |
| 5'                  | 114,2                     | 7,12 ( <i>d</i> , 8,5)                           |
| 6'                  | 127,9                     | 8,00 ( <i>d</i> , 8,5)                           |
| 7-OCH <sub>3</sub>  | 54,7                      | 3,92 ( <i>s</i> )                                |
| 4'-OCH <sub>3</sub> | 55,6                      | 4,05 ( <i>s</i> )                                |

## III-4-4-1-11 Elucidation structurale du composé 11



Tiliroside (11)

La fluorescence sous la lumière UV à  $\lambda = 366$  nm de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavonol substitué en position 3.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.111) du composé 11 présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  617  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , soit une masse moléculaire de 594 uma, correspondant à la formule moléculaire  $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ .

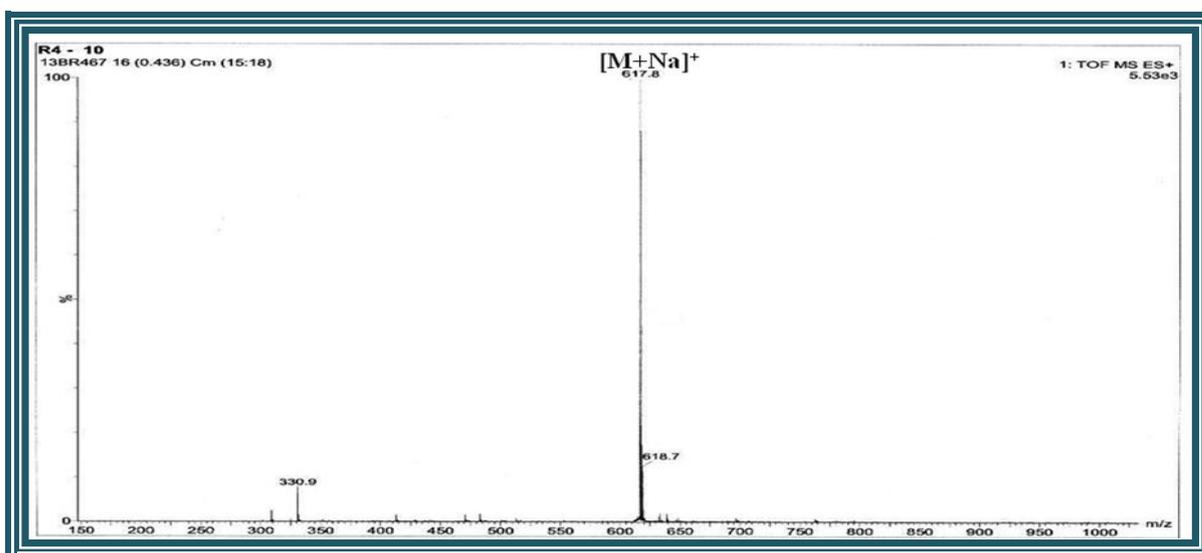
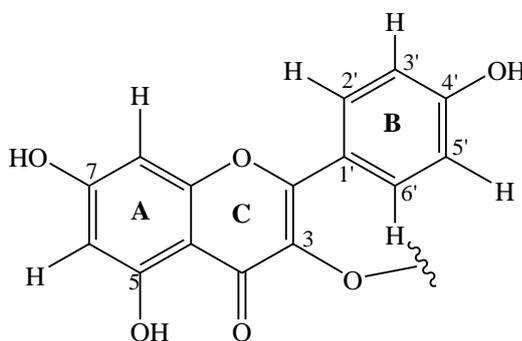


Figure III.111: Spectre de masse ESI-MS du composé 11

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.112) met en évidence la présence des signaux caractérisant un squelette Kaempferol :

- Deux signaux à  $\delta_{\text{H}}$  6,15 ( $d$ ,  $J = 2,0$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6,34 ( $d$ ,  $J = 2,0$  Hz) formant un système AB correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. La faible constante de couplage indique la position méta des 2 protons ;
- Deux doublets d'intégration 2H chacun d'un système  $A_2X_2$  résonant à  $\delta_{\text{H}}$  8,02 ( $J = 8,1$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6,85 ( $J = 8,1$  Hz) attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement du cycle B;



Squelette Kaempferol

- Un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5,25, attribuable à un proton anomérique d'un sucre, la constante de couplage ( $J = 7,6$  Hz) indique qu'il est de configuration  $\beta$ ;
- La présence de l'unité sucre est confirmée par l'observation de plusieurs signaux d'intégration 6H résonant dans l'intervalle allant de 3,3 à 4,4 ppm attribuables à un hexose.

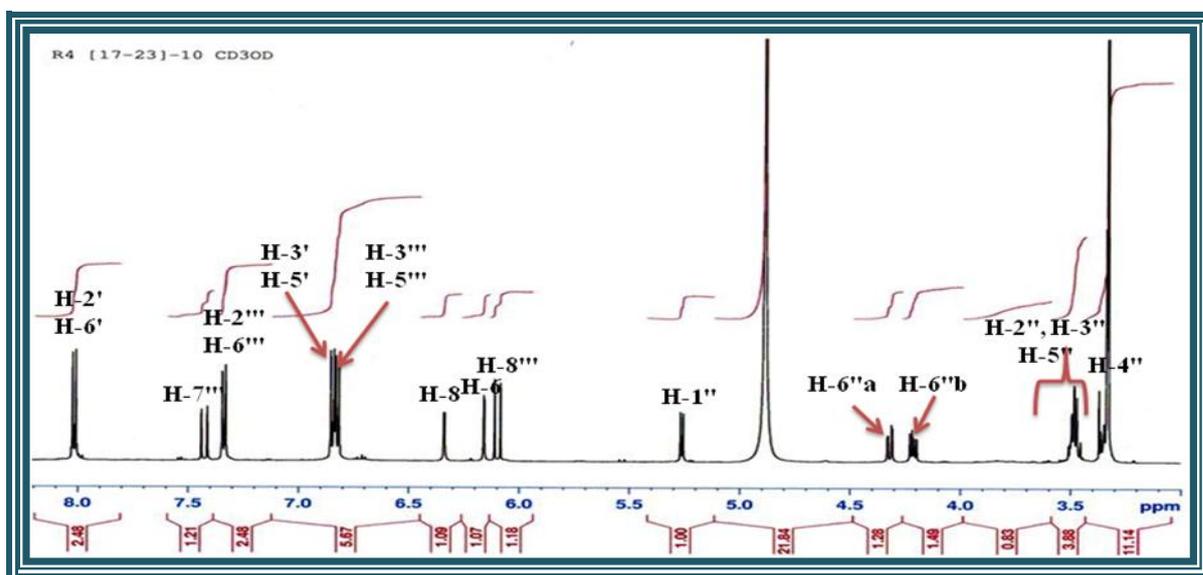
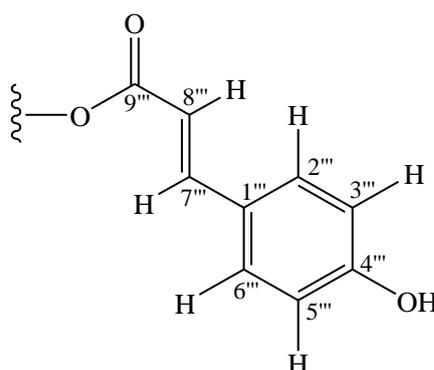


Figure III.112: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 11

Ce spectre montre également la présence d'un autre système  $A_2X_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  7,32 (2H,  $d$ ,  $J = 8,1$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  6,84 (2H,  $d$ ,  $J = 8,1$  Hz), caractéristiques d'un noyau aromatique para-substitué, correspondant aux protons H-2''/H-6''' et H-3''/H-5''' respectivement.

Des signaux des protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  6,10 (H-8'') et  $\delta_{\text{H}}$  7,43 (H-7'') sont visualisés aussi sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ . La constante de couplage entre ces protons ( $J = 16,1$  Hz) indique une géométrie *trans* de la double liaison. Toutes ces données attestent de la présence d'un groupement *p*-coumaroylé.



Groupement *p*-coumaroylé

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT  $J$ -modulé (Figures III.113 et III.114) montrent 26 signaux correspondant aux 30 atomes de carbone, dont 12 carbones quaternaires, qui sont répartis comme suit :

- Deux carbonyles à  $\delta_{\text{C}}$  178 et 167,4 correspondant aux C-4 et un carbonyle d'un ester ;
- 12 carbones aromatiques oxygénés résonant dans l'intervalle 133 et 165 ppm ;
- 8 CH aromatiques entre 93 et 123 ppm ;
- Deux CH éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  113,3 et 145,1.

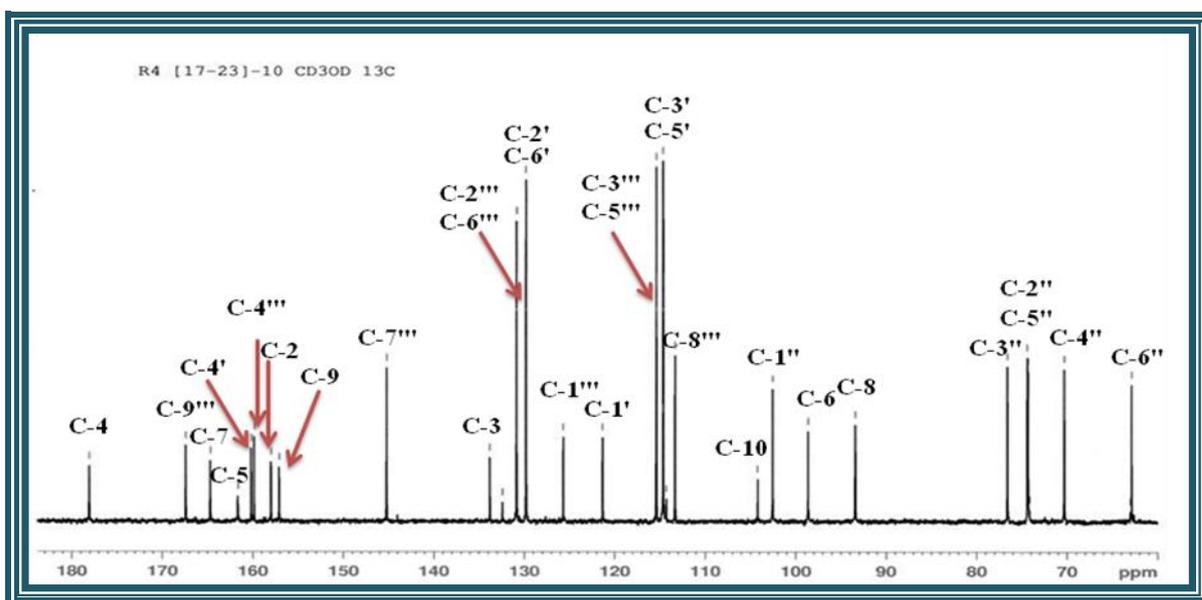
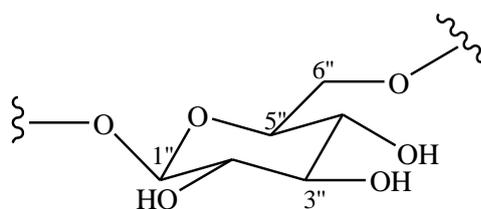


Figure III.113: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 11

La présence du groupement  $\beta$ -D-glucosyle est confirmée par les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  qui montrent un signal à  $\delta_{\text{C}}$  102,5 du carbone anomérique, un autre signal d'un carbone méthylène oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  62,7 (C-6'') et d'autres signaux de carbones oxyméthines résonant à  $\delta_{\text{C}}$  74,4 (C-2''), 76,6 (C-3''), 70,3 (C-4'') et 74,3 (C-5''). [145, 146]



Groupement  $\beta$ -D-glucosyle

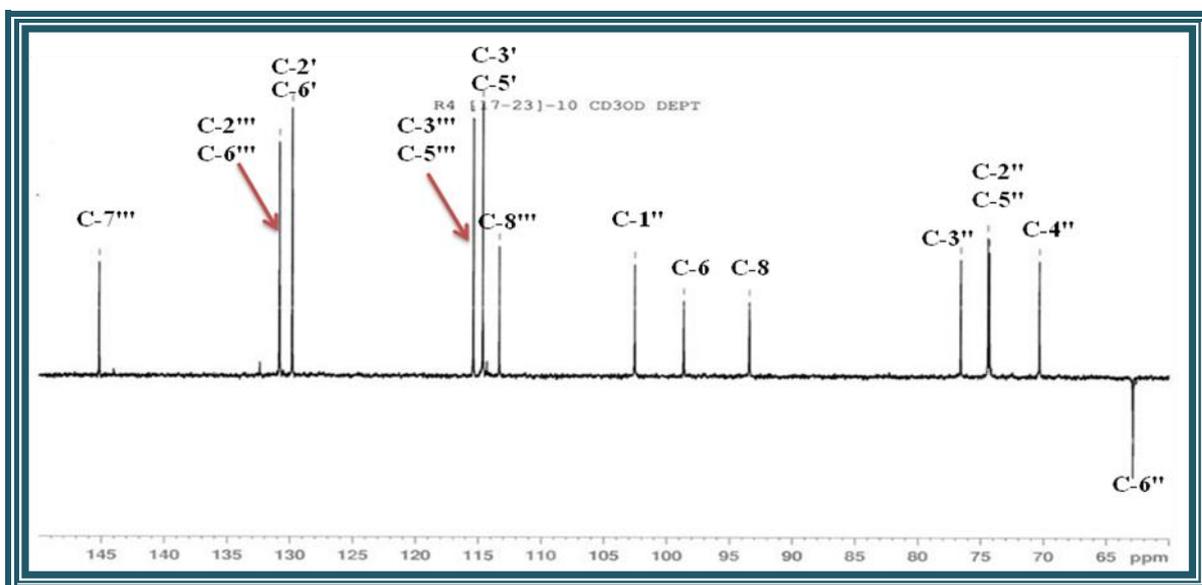
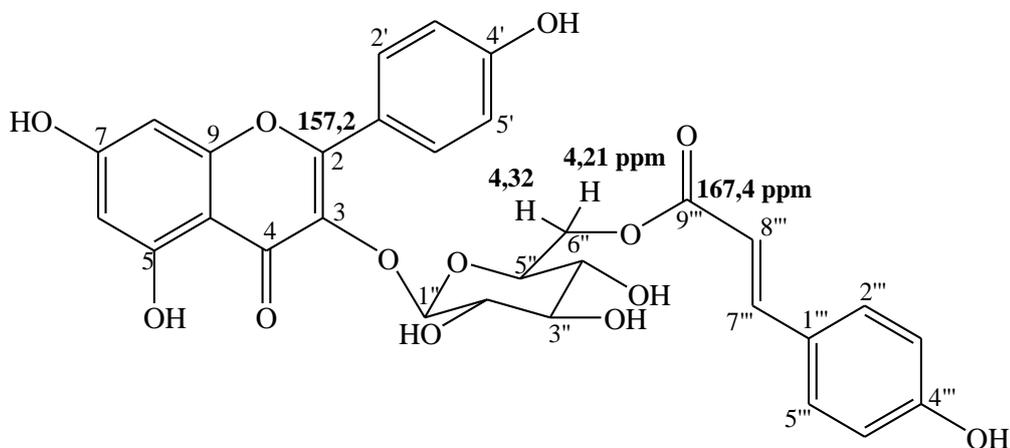


Figure III.114: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $J$ -modulé du composé 11

Le déblindage des protons H<sub>2</sub>-6'' du β-D-glucopyranoside [ $\delta_{\text{H}}$  4,32 (*dl*,  $J = 11,2$  Hz), H-6''a, 4,21 (*dd*,  $J = 11,2$ ; 6 Hz), H-6''b] indique que le carbone C-6'' est acylé par le groupement coumaroyle. Le déplacement chimique du carbone C-2 de l'aglycone (Kaempferol)  $\delta_{\text{C}}$  157,9 déblindé de plus de + 9 ppm comparativement au même carbone dans le cas d'un OH libre en C-3 [ $\delta_{\text{C}}$  148,3 (C-2)] confirme la glycosylation en position C-3.<sup>[177]</sup>



Tiliroside

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données trouvées dans la littérature, nous permettent de déterminer la structure du composé **11** comme étant le kaempferol-3-*O*-[6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside appelé Tiliroside. Ce composé est isolé antérieurement des espèces *Chresta scapigera*,<sup>[173]</sup> *Anaphalis sinica* Hance<sup>[188]</sup> (Asteraceae), mais il a été identifié pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

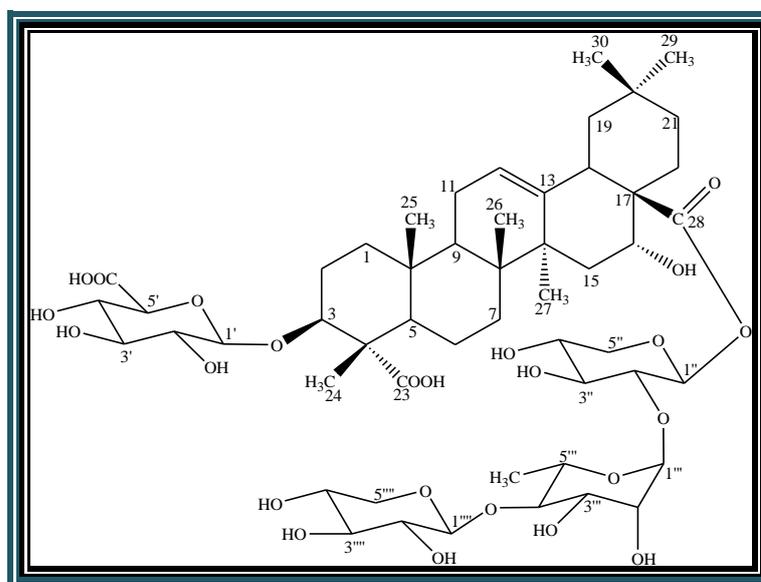
Tableau III.11 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de 11 dans CD<sub>3</sub>OD

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|----------|---------------------------|--|
| 2        | 157,9                     | -  |
| 3        | 133,8                     | -  |
| 4        | 178,0                     | -  |
| 5        | 161,6                     | -  |
| 6        | 98,6                      | 6,15 ( <i>d</i> , 2)                             |
| 7        | 164,6                     | -  |
| 8        | 93,4                      | 6,34 ( <i>d</i> , 2)                             |
| 9        | 157,0                     | -  |
| 10       | 104,2                     | -  |
| 1'       | 121,3                     | -  |
| 2'       | 129,8                     | 8,02 ( <i>d</i> , 8,1)                           |
| 3'       | 114,6                     | 6,85 ( <i>d</i> , 8,1)                           |
| 4'       | 160,1                     | -  |

| Position           | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                                |
|--------------------|------------------|--|
| 5'                 | 114,6            | 6,85 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 6'                 | 129,8            | 8,02 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 3-O-glc-1''        | 102,5            | 5,25 ( <i>d</i> , 7,6)   |
| 2''                | 74,4             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 3''                | 76,6             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 4''                | 70,3             | 3,33 ( <i>m</i> )  |
| 5''                | 74,3             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 6''                | 62,7             | 4,32 ( <i>dl</i> , 11,2) H-6''a<br>4,21 ( <i>dd</i> , 11,2 ; 6) H-6''b |
| 6''-Coumaroyl-1''' | 125,7            | -  |
| 2'''               | 130,8            | 7,32 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 3'''               | 115,4            | 6,84 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 4'''               | 159,8            | -  |
| 5'''               | 115,4            | 6,84 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 6'''               | 130,8            | 7,32 ( <i>d</i> , 8,1)   |
| 7'''               | 145,1            | 7,43 ( <i>d</i> , 16,1)  |
| 8'''               | 113,3            | 6,10 ( <i>d</i> , 16,1)  |
| 9'''               | 167,4            | -  |

### III-4-4-2 Caractérisation des saponines

#### III-4-4-2-1 Elucidation structurale du composé 12



Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (12)

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe. Il est invisible sur CCM à la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en rose à l'acide sulfurique et chauffage. Il s'agit d'une nouvelle saponine bidesmosidique nommée : Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 4")- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1" $\rightarrow$ 2")- $\beta$ -D-xylopyranosyl].

Le spectre de masse du composé **12** (Figure III.115) obtenu en mode positive par ionisation douce ESI, présente un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  1111, soit une masse moléculaire de 1088 correspondant à une formule brute  $C_{52}H_{80}O_{24}$ .

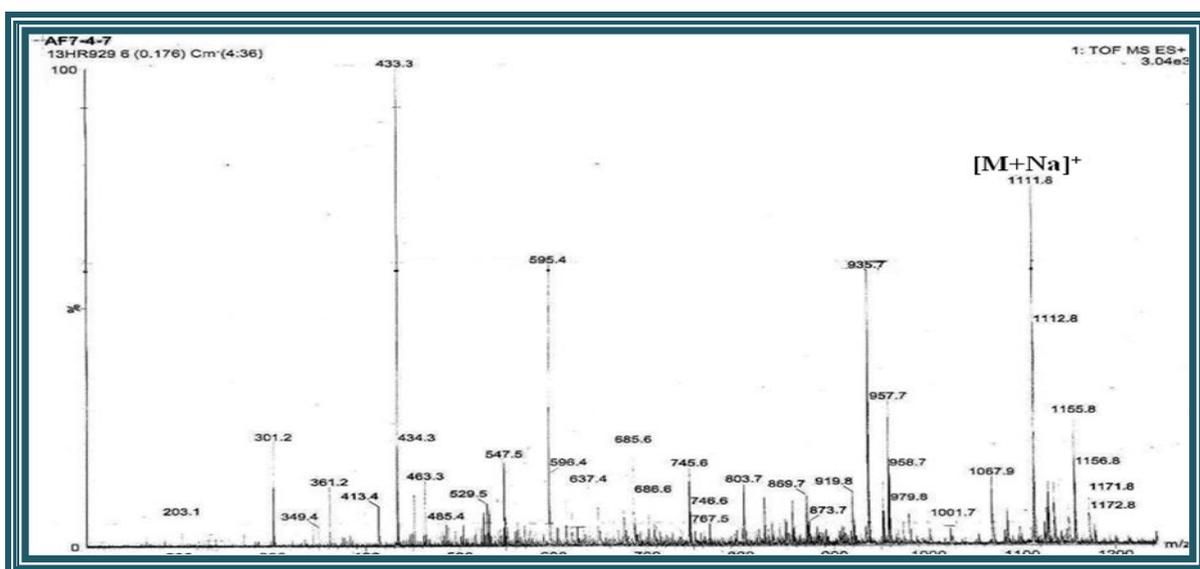


Figure III.115 : Spectre de masse ESI-MS du composé **12**

Cette formule est confirmée par le spectre de masse réalisé en haute résolution HR-ESIMS (Figure III.116) montrant un pic à  $m/z$  1111,4930 (calc.  $C_{52}H_{80}O_{24}Na$ , 1111,4937).

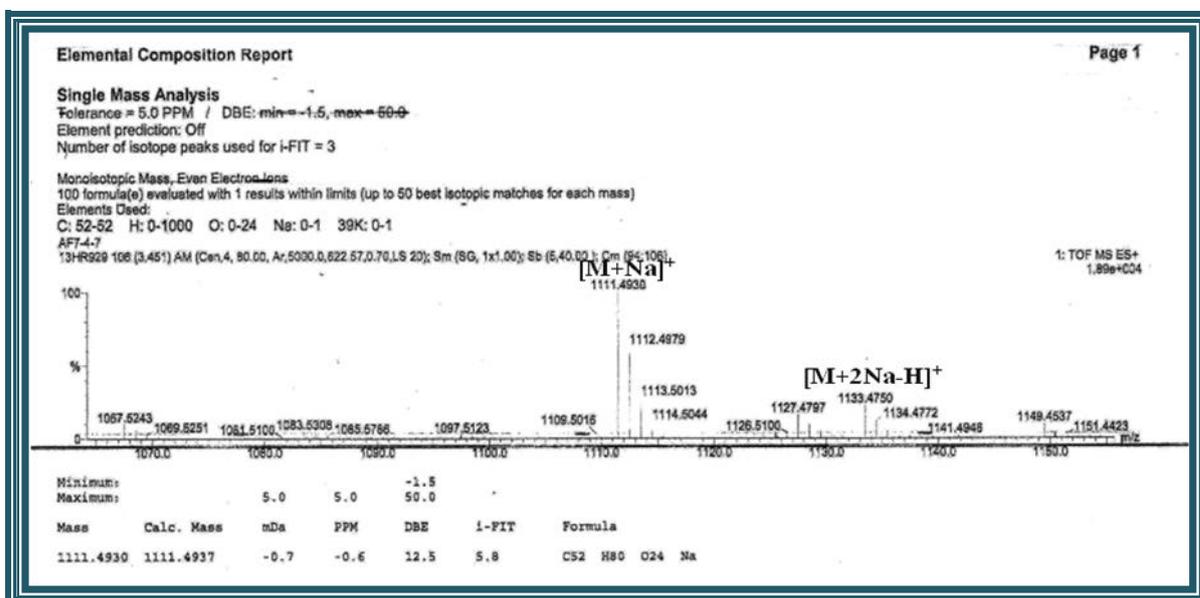


Figure III.116 : Spectre de masse HR-ESIMS du composé **12**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.117) du composé **12** présente une allure différente par rapport aux composés déjà identifiés. En effet, il montre six signaux singulets fins à champ fort entre 0,70 et 1,40 ppm, s'intégrant pour trois protons chacun correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique.

D'autres signaux sont enregistrés à  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (*t*,  $J = 3,4$  Hz), 2,99 (*dd*,  $J = 14,2 ; 3$  Hz) et 4,10 (*dd*,  $J = 11,7 ; 4,3$  Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12 et aux protons H-18 et H-3.

Un massif de protons résonant entre 1,00 à 2,40 ppm, correspondant aux CH et CH<sub>2</sub> des cinq cycles du triterpène à squelette oléanane.

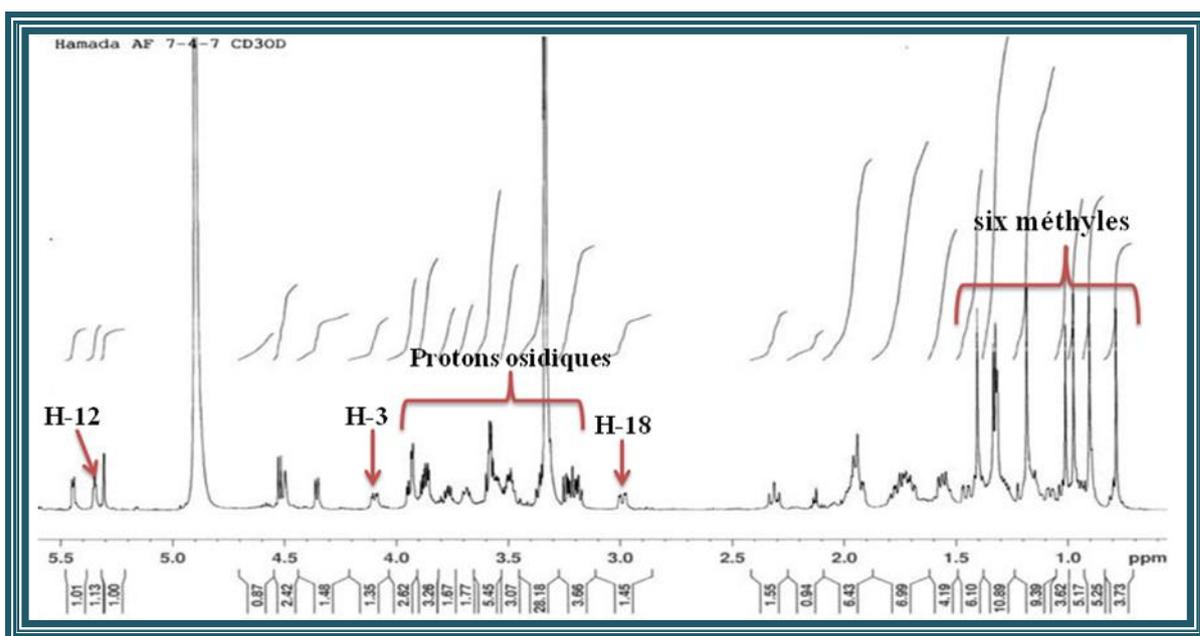


Figure III.117: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **12**

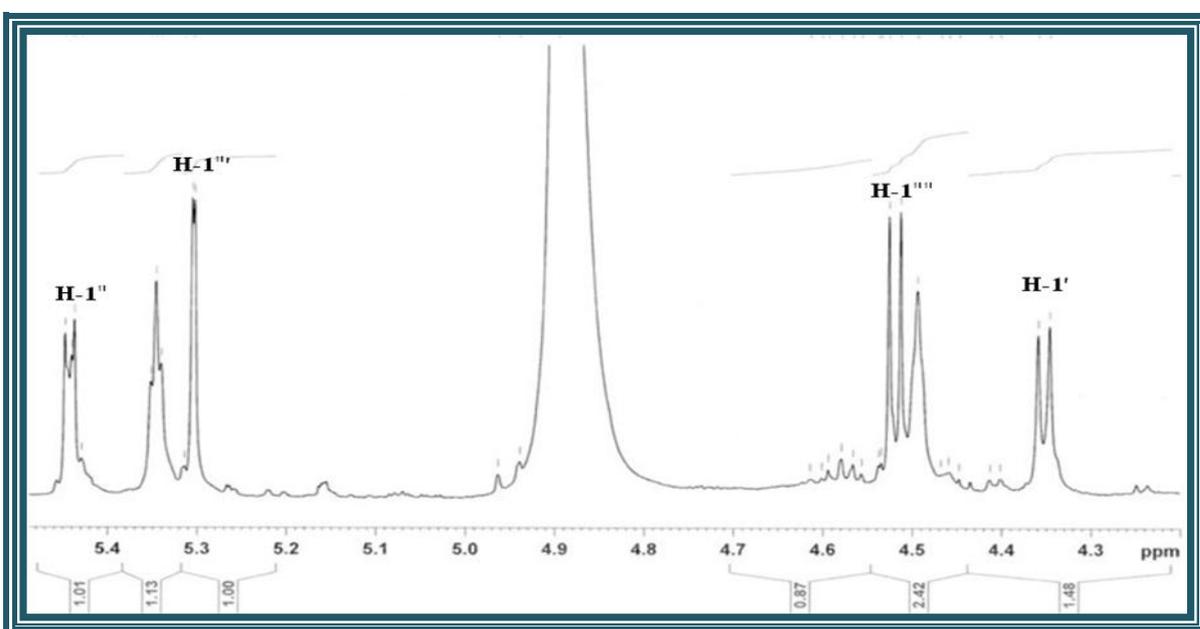


Figure III.118: Spectre RMN  $^1\text{H}$  des anomères des sucres du composé **12**

L'observation du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figures III.117 et III.118) révèle la nature glycosidique du composé. En effet, on visualise :

- Plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm caractéristiques de protons osidiques. Leur forte densité suggère la présence de plus de trois unités osidiques;
- Quatre signaux d'intégration 1H chacun résonant sous forme de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4,35 ( $d, J = 7,7$  Hz), 5,44 ( $d, J = 6,3$  Hz), 5,3 ( $d, J = 1,6$  Hz) et 4,52 ( $d, J = 7,62$  Hz) caractéristiques de protons anomères de 4 sucres.

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III.119), les signaux des carbones suivants sont observés:

- Six méthyles résonant à  $\delta_{\text{C}}$  10,9 ; 15 ; 16,2 ; 25,8 ; 31,9 et 23,4. La présence seulement de six méthyles suppose l'oxydation de deux des huit méthyles constituant habituellement le squelette oléanane. L'observation de deux signaux au delà de 170 ppm sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , laisse supposer que ces deux carbones sont probablement oxydés en carbonyles ;
- Un ensemble de carbones résonant entre 20 et 56 ppm, attribuables aux  $\text{CH}_2$ , CH et C quaternaires ;
- Les carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison sortent respectivement vers  $\delta_{\text{C}}$  121,9 et 143,3 ;
- Deux carbonyles à  $\delta_{\text{C}}$  180,3 et 175,6 d'un acide libre et d'un ester.
- Le carbone C-3 oxygéné est détecté à  $\delta_{\text{C}}$  84,8. Le déblindage de ce dernier comparé à celui du même carbone porteur d'un groupement hydroxyle, explique la substitution à ce niveau par des unités osidiques.

Ce spectre permet aussi d'observer les signaux des carbones osidiques sortant entre 65 et 106 ppm.

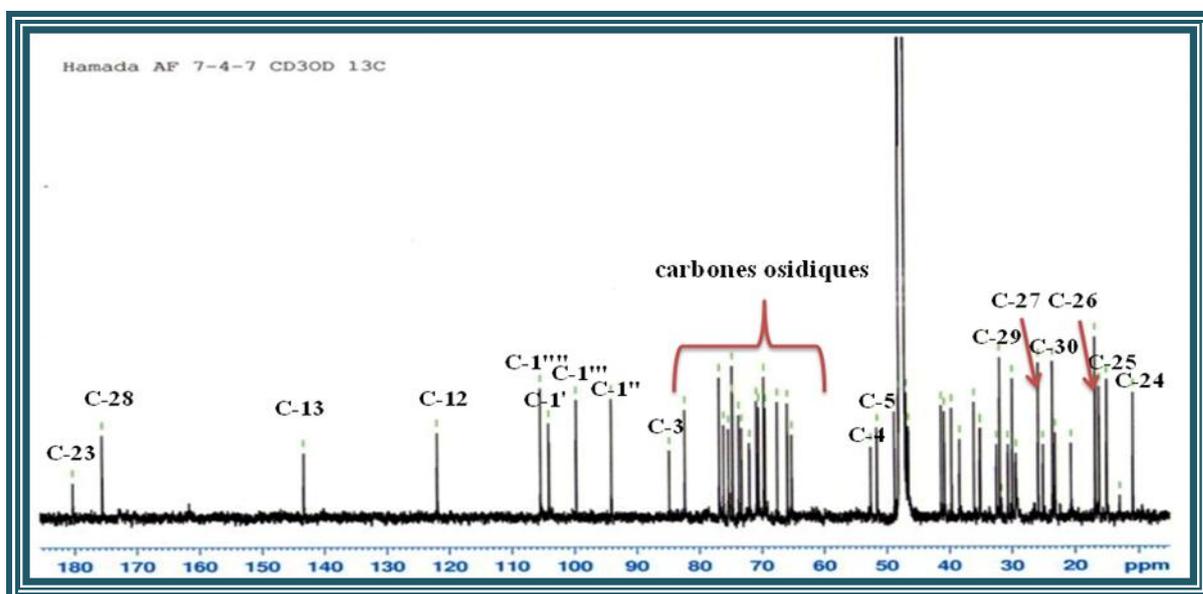


Figure III.119: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 12

Toutes ces données spectrales indiquent qu'on est en présence d'une saponine triterpénique à squelette oléanane. Son élucidation structurale se répartie en deux parties : l'identification de la génine et de la partie osidique.

### Partie génine

L'attribution des protons et carbones de la génine est réalisée grâce à l'analyse conjointe des spectres RMN de corrélations COSY, HSQC, HMBC, TOCSY et NOESY.

À partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY (Figures III.120 et III.121) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons apparaissant entre 0,73 et 2,40 ppm. En effet :

- Le proton H-3 déjà identifié corrèle avec deux protons à  $\delta_H$  1,98 et 1,75 attribuables aux protons H<sub>2</sub>-2, ces derniers corrélient à leur tour avec les deux protons H<sub>2</sub>-1 résonant à  $\delta_H$  1,71 et 1,14 ;
- Les deux protons géminés H<sub>2</sub>-11 sont détectés à  $\delta_H$  1,93 suite à leurs corrélations avec le proton éthylénique H-12;
- Le proton H-9 à  $\delta_H$  1,74 par son couplage avec les protons H<sub>2</sub>-11 ;
- Les deux protons H<sub>2</sub>-19 à  $\delta_H$  2,31 (*t*,  $J = 13,3$  Hz, H-19a) et 1,08 (*dd*,  $J = 13; 3,1$ Hz, H-19b) suite à leurs corrélations avec le proton vicinal H-18.

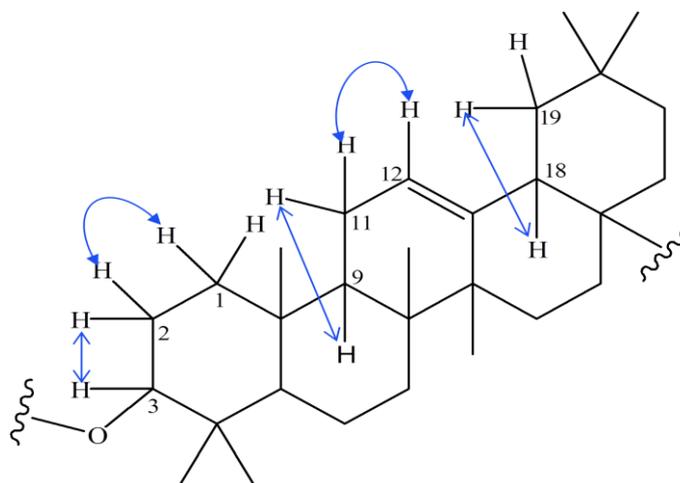


Figure III.120: Corrélations COSY entre les protons de la génine du composé 12

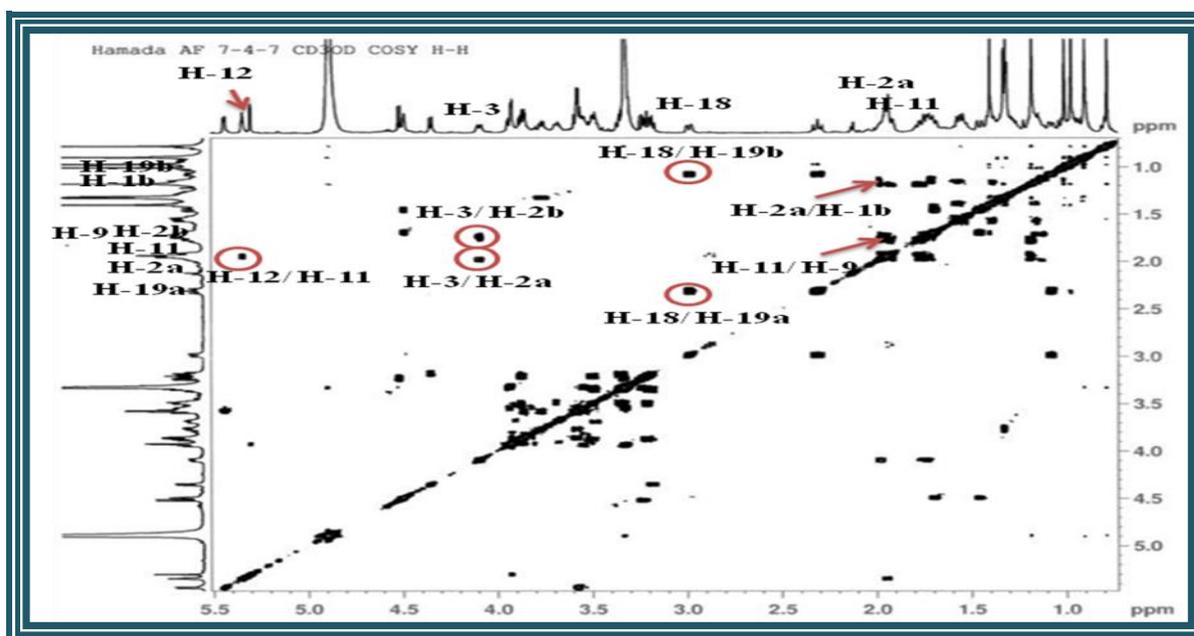


Figure III.121: Spectre COSY de la partie génine du composé 12

À partir de ces protons, l'analyse des corrélations hétéronucléaires directes  $^1J_{\text{H-C}}$  observées sur le spectre HSQC  $J$ -modulé conduit à assigner les déplacements chimiques des carbones C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  38,3), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  25), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  46,9), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  23), C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  40,8) et C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  46,5). (Figure III.122)

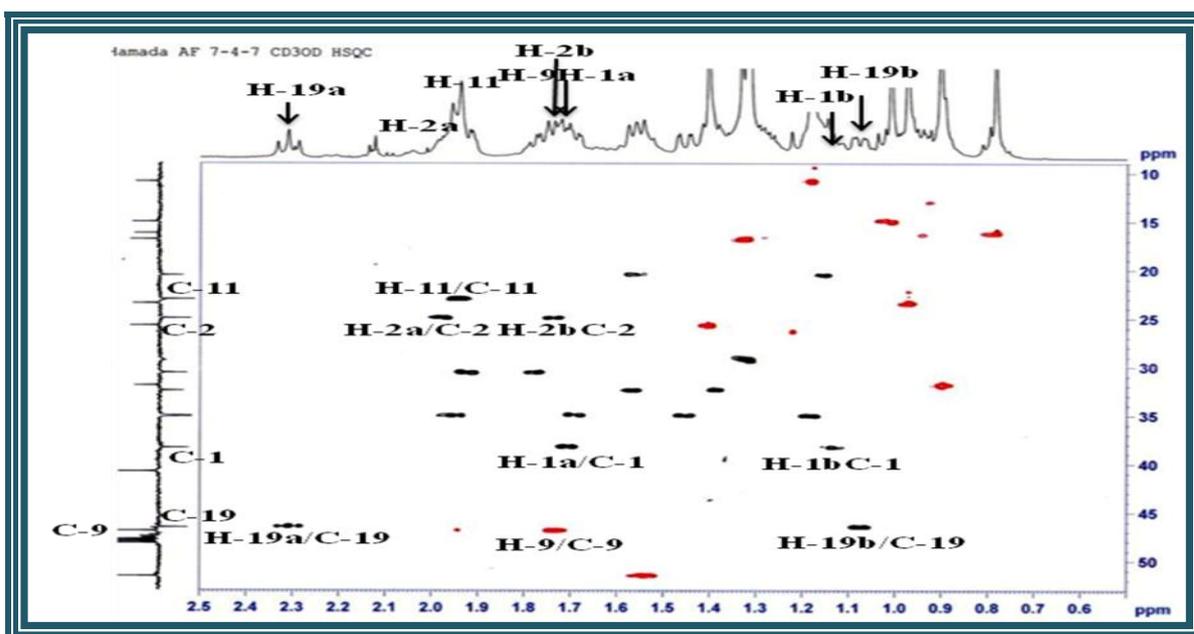
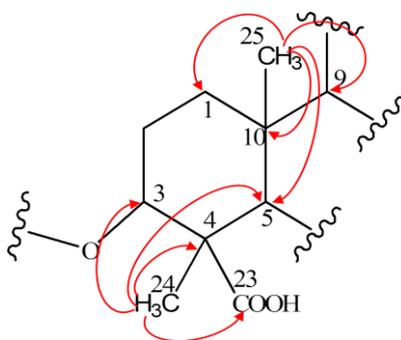


Figure III.122: Spectre HSQC de la partie génine du composé 12

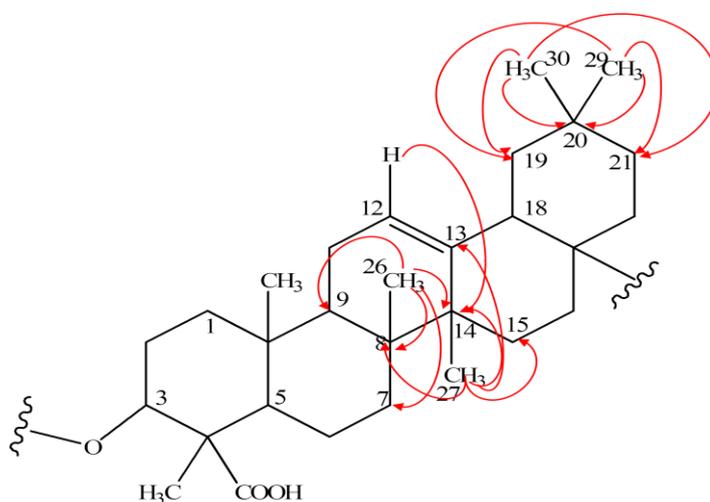
L'expérience HMBC (Figures III.125 et III.126) permet d'attribuer les méthyles ainsi que les autres carbones de la génine par l'observation de leurs couplages en  $^2J$  et  $^3J$ . Dans cette expérience, les protons des méthyles corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. On reconnaît ainsi les corrélations suivantes :

- Les protons H<sub>3</sub>-24 ( $\delta_{\text{H}}$  1,18) sont repérés par leur corrélation avec le carbone C-3 connu, Ce méthyle couple également avec le carbone C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  51,5) et avec deux carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  52,5 (C-4) et à  $\delta_{\text{C}}$  180,3 attribuable au carbone du carbonyle acide C-23 (Figure III.123).
- Les protons H<sub>3</sub>-25 ( $\delta_{\text{H}}$  1,01) corrélient avec les carbones connus C-1, C-5, C-9 et le carbone quaternaire C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  36) (Figure III.123).



**Figure III.123: Corrélations HMBC des méthyles Me-23 et Me-25**

- Les protons H<sub>3</sub>-26 ( $\delta_{\text{H}}$  0,78) corrélient avec le carbone C-9 déjà identifié et le carbone C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  32,5) ainsi qu'avec deux carbones quaternaires C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  39,6) et C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  41,3). La distinction entre ces deux carbones quaternaires est possible du fait de la corrélation  $^3J_{\text{H-C}}$  du carbone C-14 avec le proton éthylénique H-12 (Figure III.124).
- Les protons H<sub>3</sub>-27 ( $\delta_{\text{H}}$  1,4) couplent avec les carbones C-8, C-13, C-14 et C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  35,1) (Figure III.124) ;
- Les protons des méthyles géminaux H<sub>3</sub>-29 ( $\delta_{\text{H}}$  0,9) et H<sub>3</sub>-30 ( $\delta_{\text{H}}$  0,97) corrélient avec les carbones C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  29,9), C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  35) et C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  46,5) (Figure III.124).



**Figure III.124: Corrélations HMBC des méthyles Me-26, Me-27, Me-29 et Me-30**

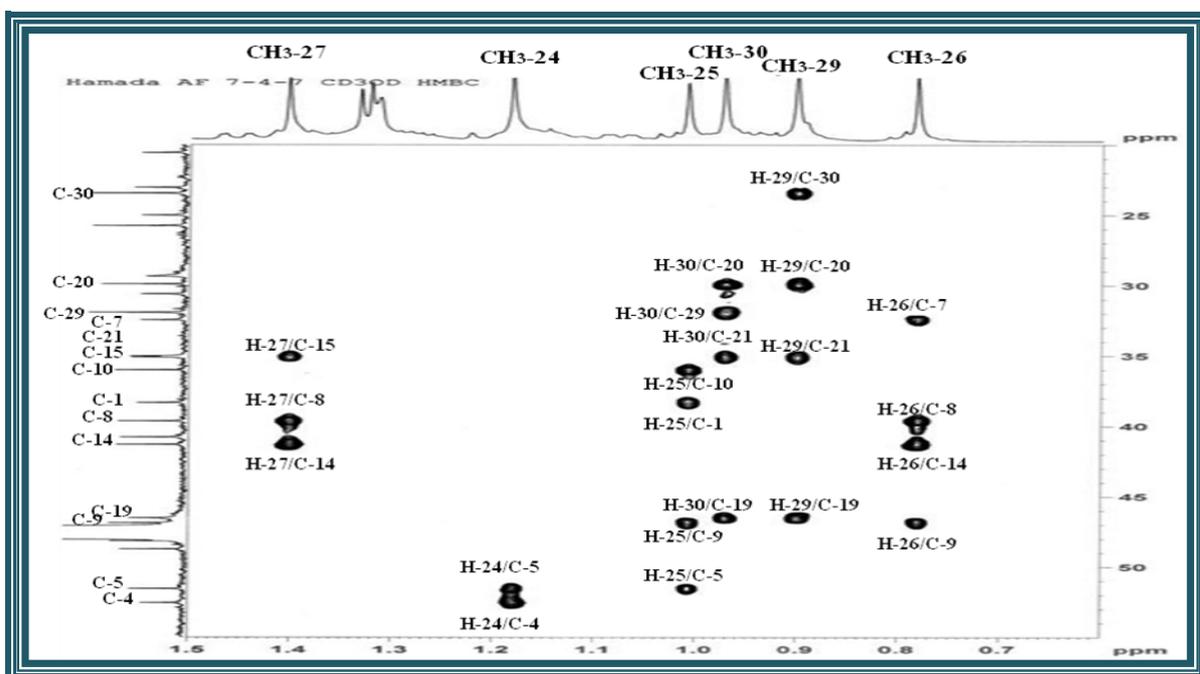


Figure III.125: Spectre HMBC de la partie génine du composé 12

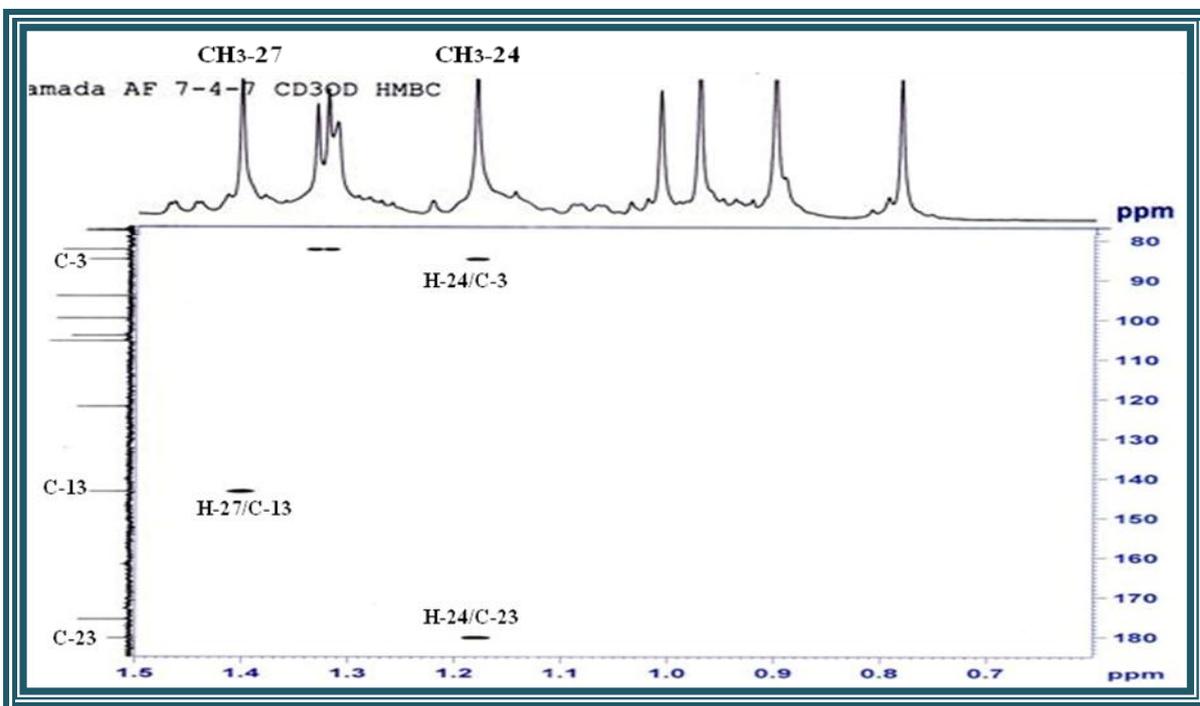


Figure III.126: Spectre HMBC de la partie génine du composé 12

Les protons respectifs H-5 ( $\delta_H$  1,52), H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_H$  1,56; 1,38), H<sub>2</sub>-15 ( $\delta_H$  1,68; 1,45) et H<sub>2</sub>-21 ( $\delta_H$  1,95; 1,2) sont assignés par expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.127).

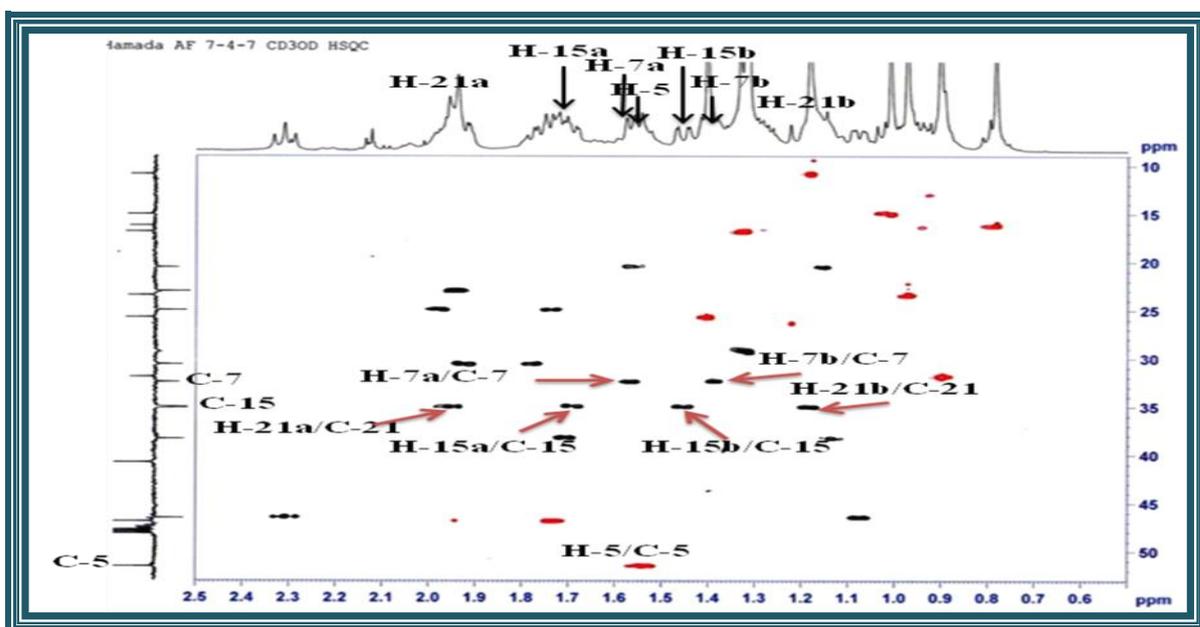


Figure III.127 : Spectre HSQC de la partie génine du composé 12

Les autres carbones et protons de la génine sont identifiés par analyse combinée des deux expériences HSQC et COSY H-H.

Les protons H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_H$  1,56 ; 1,15), H-16 ( $\delta_H$  4,49) et H<sub>2</sub>-22 ( $\delta_H$  1,91 ; 1,77) sont localisés, d'après l'expérience COSY (Figures III.128, III.129 et III.130), en raison de leurs corrélations qu'ils présentent avec les protons H<sub>2</sub>-7, H<sub>2</sub>-15 et H<sub>2</sub>-21 respectivement. Leurs carbones sont repérés à ( $\delta_C$  20,6) C-6, ( $\delta_C$  73,2) C-16 et ( $\delta_C$  30,6) C-22. Le déplacement chimique du carbone C-16 ( $\delta_C$  73,2) indique qu'il est lié un groupement hydroxyle.

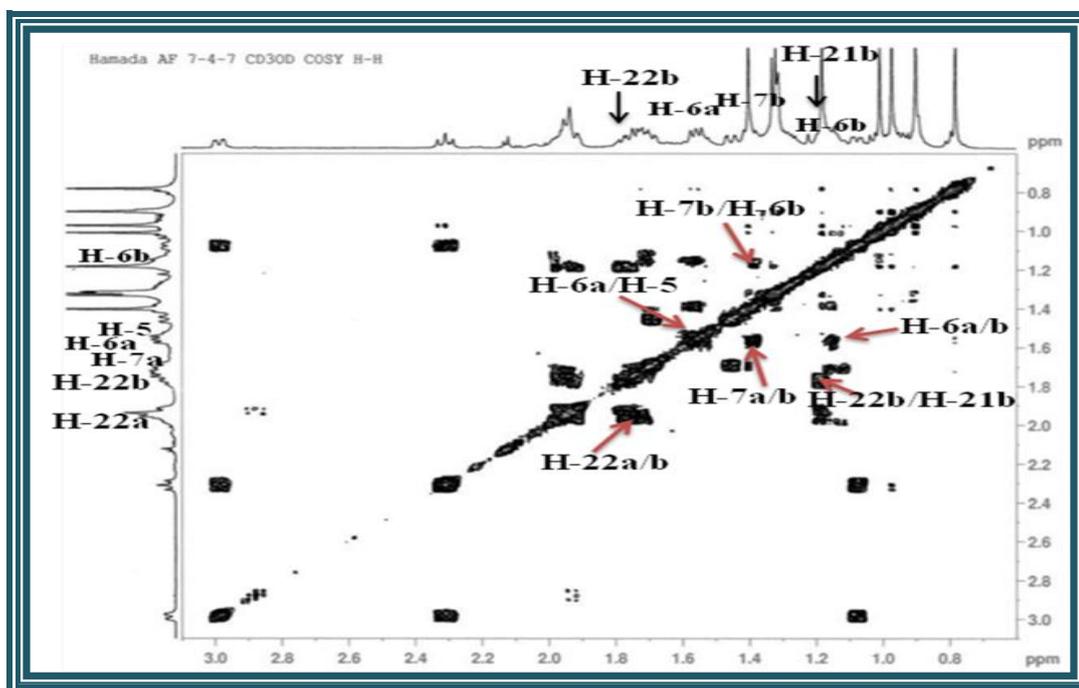


Figure III.128: Spectre COSY de la partie génine du composé 12

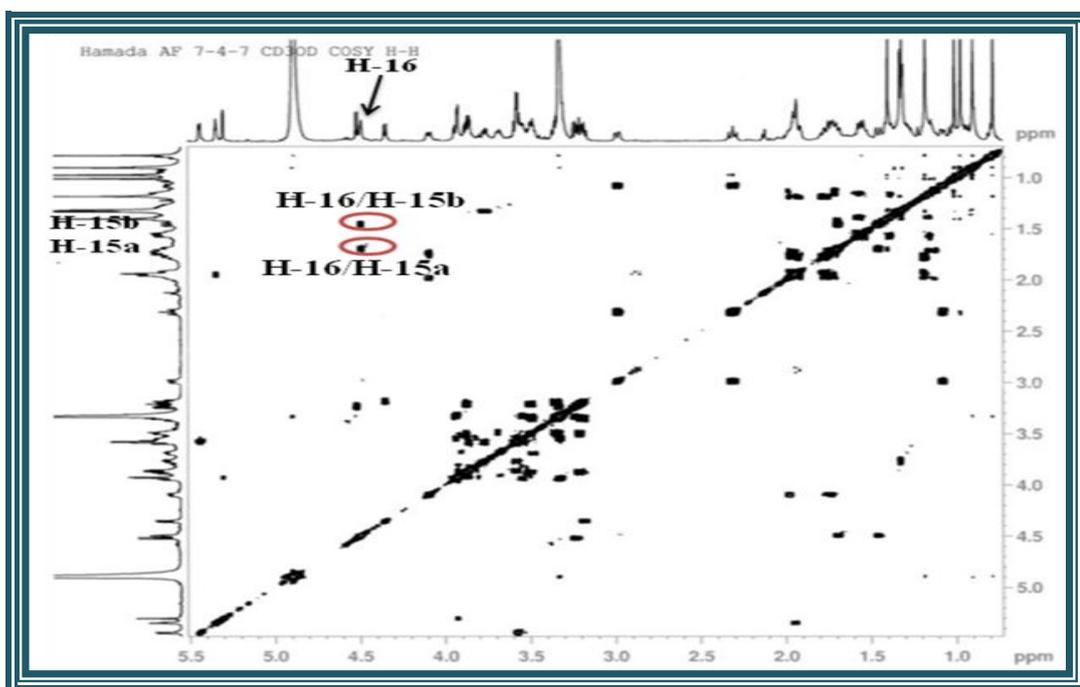


Figure III.129: Spectre COSY de la partie génine du composé **12**

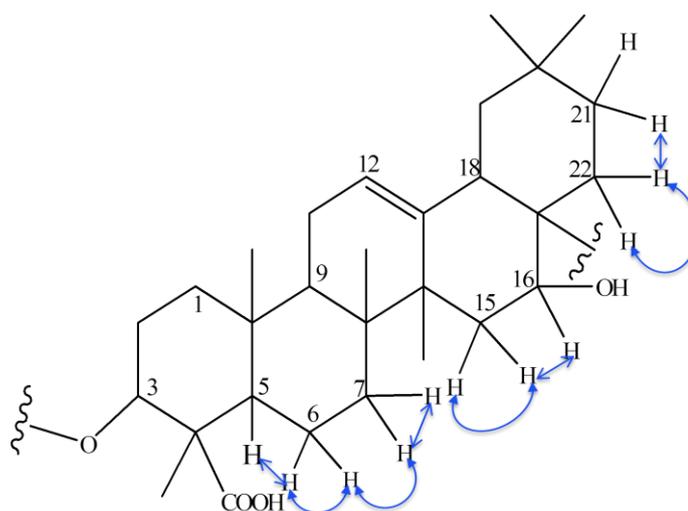


Figure III.130: Corrélations COSY entre les protons H-6/H-7, H-15/H-16 et H-21/H-22

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.131 et III.132) du composé **12** montre également une tache de corrélation entre le proton H-16 déjà identifié et un carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  48,7 attribué au carbone C-17. Un couplage est observé entre les protons H-18 et H-22a avec un carbone du carbonyle ester résonant à  $\delta_C$  175,6 assigné au carbone C-28.

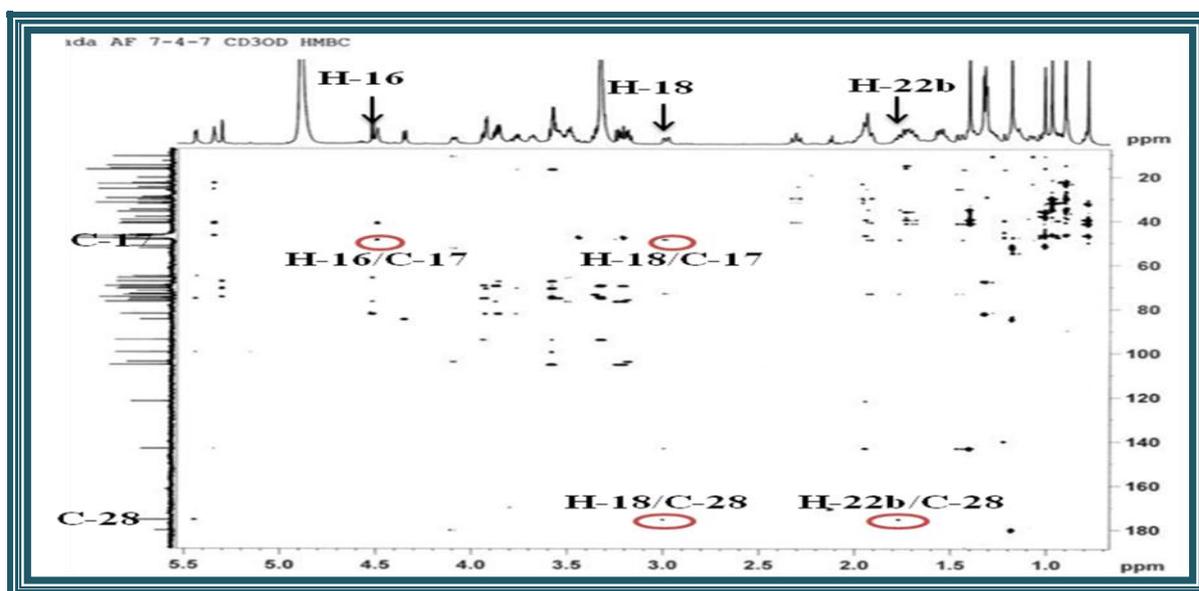


Figure III.131: Spectre HMBC de la partie génine du composé 12

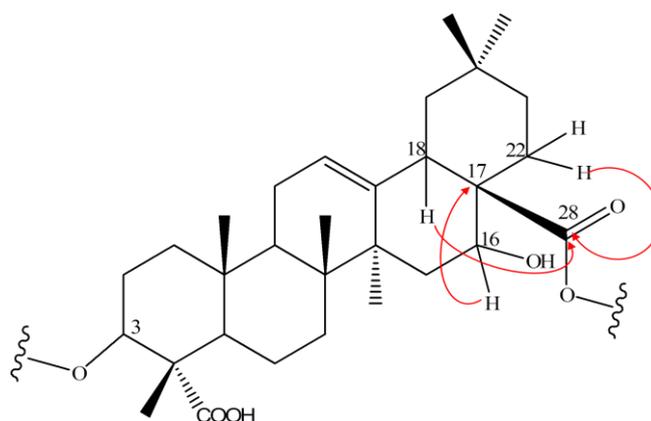


Figure III.132: Corrélations HMBC des protons H-16, H-18 et H-22

La stéréochimie des carbones asymétriques de la génine est déterminée par analyse des valeurs des constantes de couplage et des effets nOe observés sur le spectre NOESY, visualisant les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace (Figures III.133 et III.134).

- La stéréochimie  $\alpha$ -axiale du proton H-3 est confirmée par les effets nOe entre le proton H-3/H-5 et la valeur de la constante de couplage  $^3J_{3ax-2ax} = 11,7$  Hz.
- L'orientation  $\beta$ -axiale du proton H-18 est prouvée par l'effet nOe qu'il présente avec le proton éthylénique H-12 et les protons méthyliques H<sub>3</sub>-30  $\beta$ -orienté sur le spectre NOESY, et par la grande constante de couplage  $^3J_{18ax-19ax} = 14,2$  Hz.
- Les effets nOe observés entre les protons CH<sub>3</sub>-24, CH<sub>3</sub>-25 et CH<sub>3</sub>-26 confirment l'orientation  $\beta$ -axiale de ces méthyles.

- L'orientation  $\alpha$ -axiale du proton H-9 est établie suite à sa corrélation avec le proton H-5  $\alpha$ -orienté.
- L'effet nOe visualisé entre H-9  $\alpha$ -orienté et les protons méthyliques H<sub>3</sub>-27 indique la stéréochimie  $\alpha$ -axiale du Me-27.
- L'absence d'effet nOe entre les protons H<sub>3</sub>-27 et le proton oxyméthine H-16 est en faveur d'une orientation  $\beta$ -équatoriale du proton H-16. La multiplicité de ce proton sous forme d'un singulet large confirme l'orientation  $\alpha$ -axiale du groupement OH lié au carbone C-16.

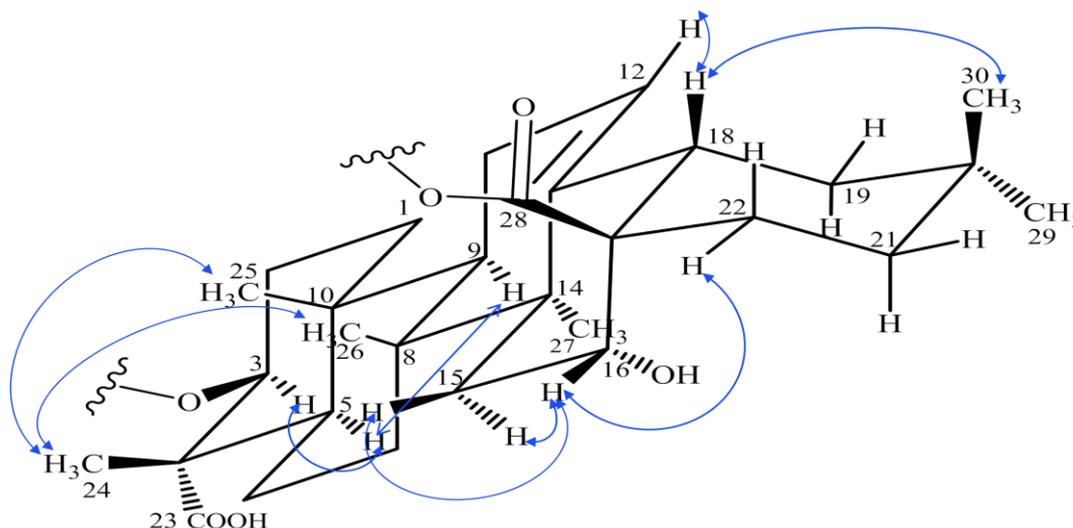


Figure III.133: Corrélations NOESY de la partie génine du composé 12

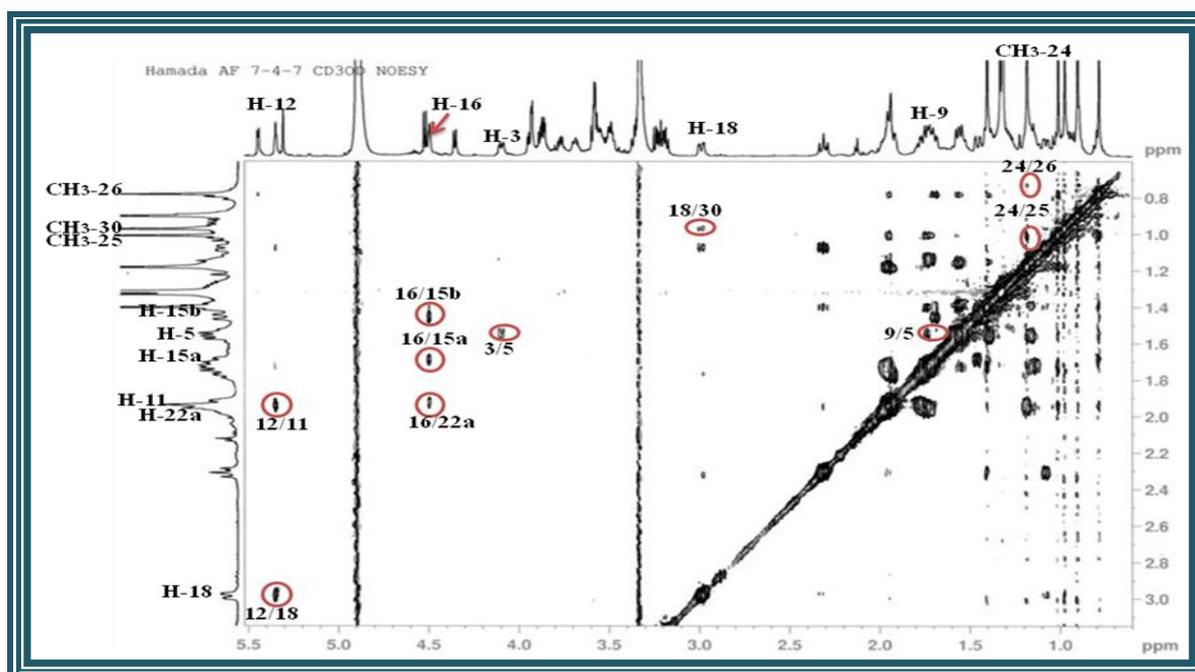
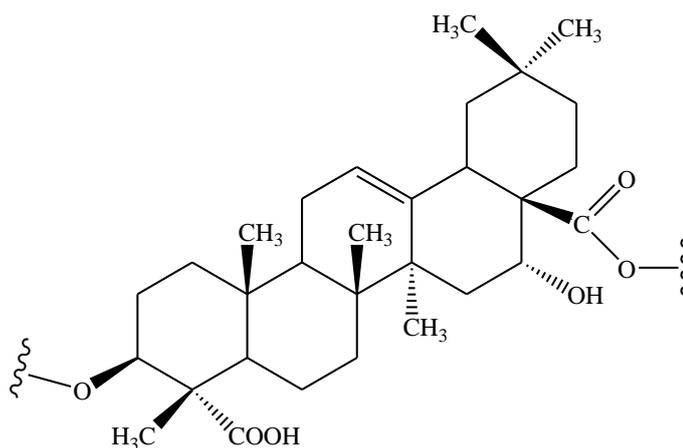


Figure III.134: Spectre NOESY de la partie génine du composé 12

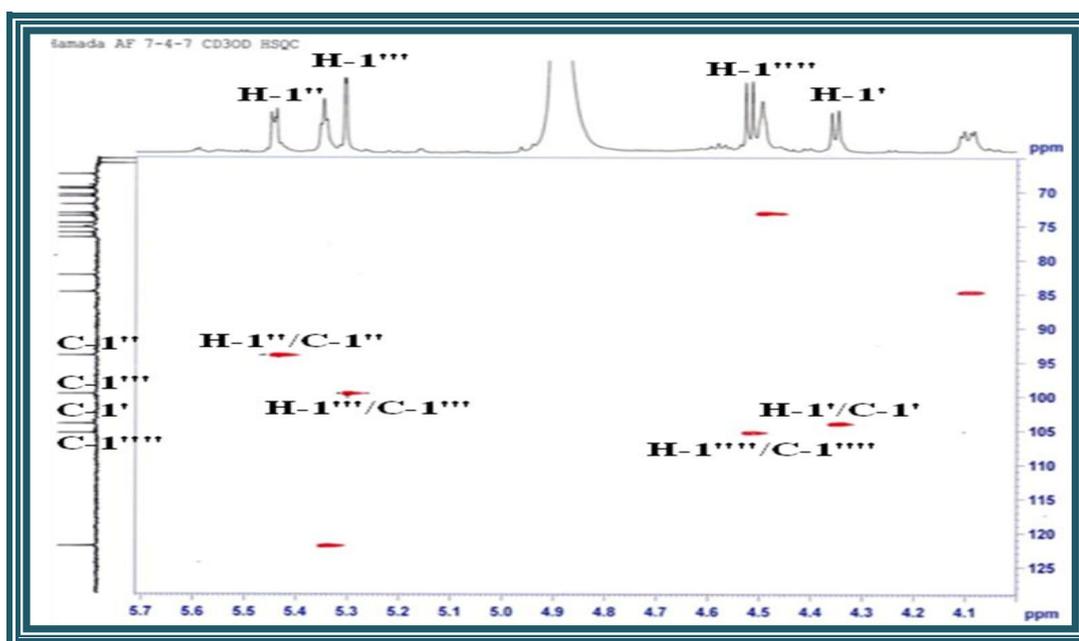
Cette analyse complète a permis d'identifier sans ambiguïté la génine à l'acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique. [145]



**Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique**

### Partie osidique

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé, quatre doublets anomériques sont observés à  $\delta_{\text{H}}$  4,35, 5,44, 5,30 et 4,52. Leurs carbones respectifs, obtenus par analyse du spectre HSQC  $J$ -modulé (Figure III.135), résonnent à  $\delta_{\text{C}}$  104 (C-1'), 94 (C-1''), 99,7 (C-1''') et 105,4 (C-1''').



**Figure III.135: Spectre HSQC des anomères**

L'analyse des spectres COSY et TOCSY (Figures III.136 et III.137) permet d'identifier un premier système de spins à cinq protons à partir du proton anomérique H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4,35). Le proton osidique H-2' résonne sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,18 ( $J = 8,5$  Hz) montrant une position *trans*-diaxiale des protons H-1', H-2' et H-3'. Ce dernier corrèle avec le proton H-4' à

$\delta_{\text{H}}$  3,49 (m). Le proton H-5' résonne sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  3,67 ( $J = 9,3$  Hz), la valeur de la constante de couplage  $J_{\text{H-4'-H-5'}} > 9$  Hz est caractéristique d'un acide glucuronique.

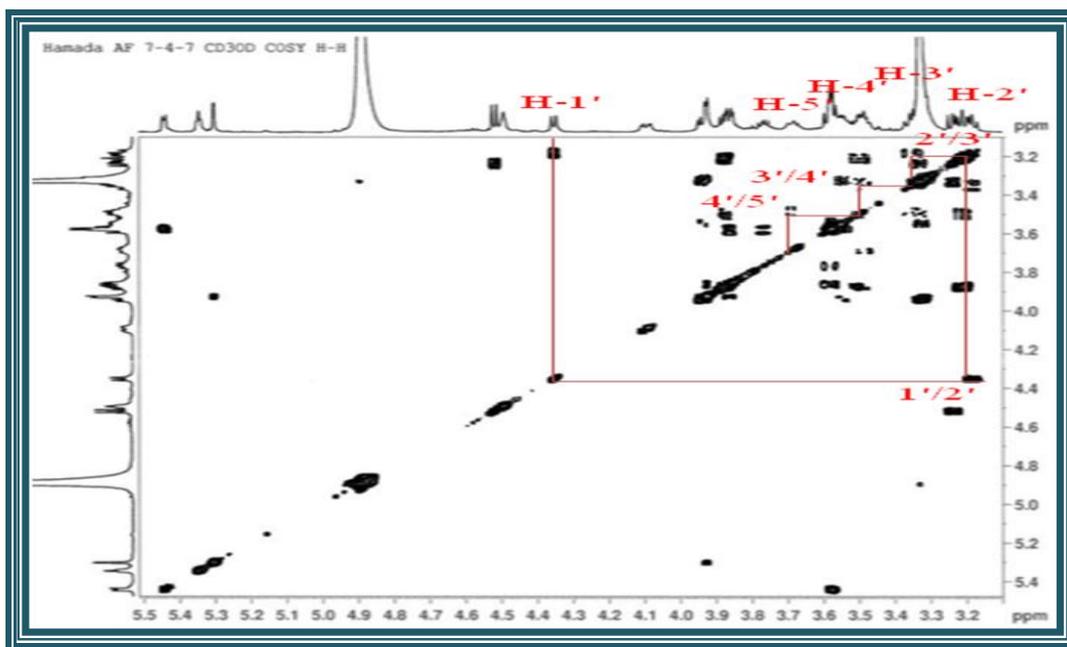


Figure III.136: Spectre COSY de l'acide glucuronique

Le spectre TOCSY (Figure III.137) met en évidence les couplages homonucléaires totaux entre tous les protons du même système de spins de l'acide glucuronique : H-1'/H-2', H-1'/H-3', H-1'/H-4' et H-1'/H-5'.

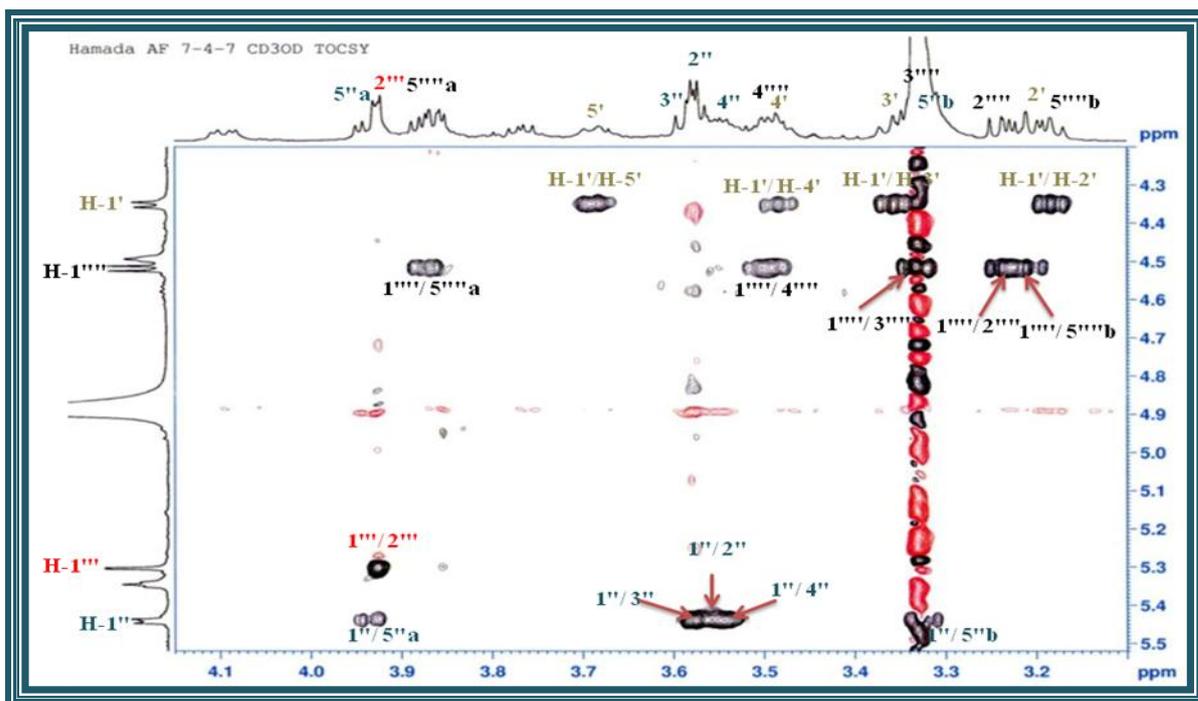
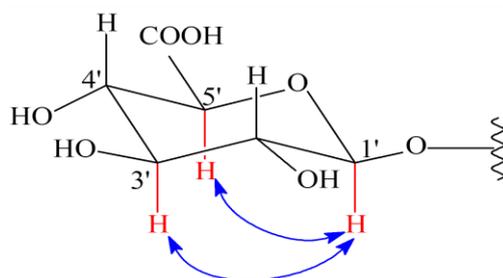


Figure III.137: Spectre TOCSY de la partie osidique du composé 12

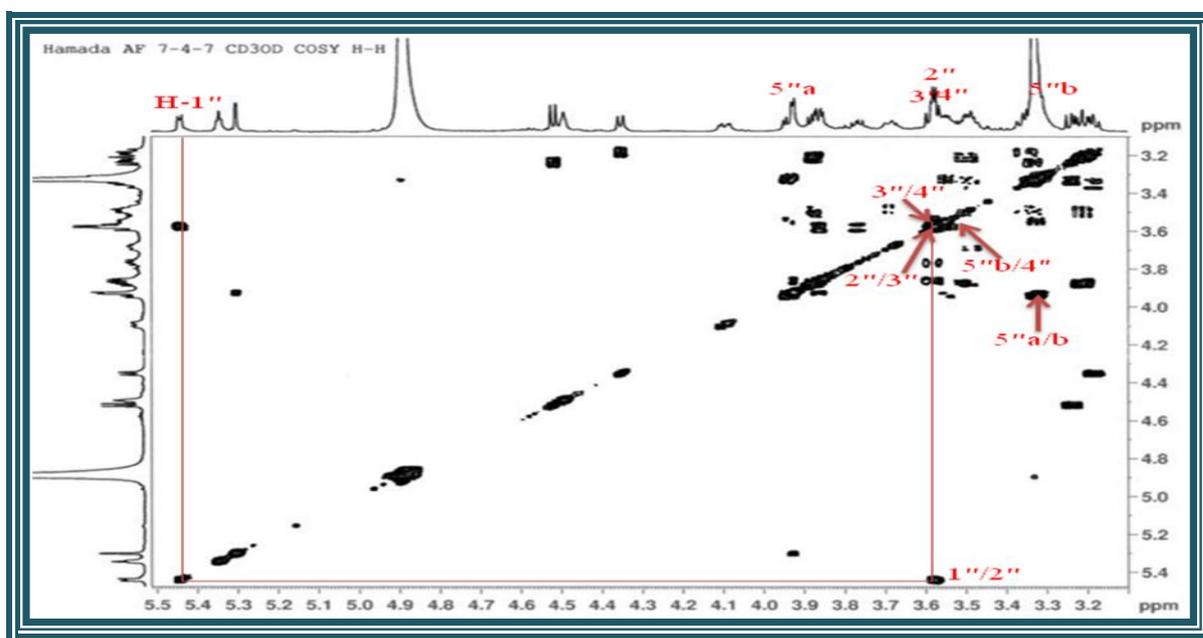
Les déplacements chimiques des carbones de l'acide glucuronique sont attribués par l'analyse du spectre HSQC  $J$ -modulé (Figure III.138).





**Figure III.140: Corrélations NOESY de l'acide glucuronique**

L'analyse des spectres COSY et TOCSY (Figures III.141 et III.137) montre un deuxième système de spins à six protons appartenant à un pentose dont l'anomère H-1'' résonne à  $\delta_H$  5,44 (*d*,  $J = 6,3$  Hz). Le proton H-2'' [ $\delta_H$  3,56 (*t*,  $J = 7$  Hz)] corrèle avec le proton anomère H-1'' et le proton H-3'' [ $\delta_H$  3,58 (*t*,  $J = 7$  Hz)]. Le proton H-4'' résonnant sous forme d'un triplet dédoublé à  $\delta_H$  3,55 (*td*,  $J = 8; 4,7$  Hz) corrèle avec les protons H-5''eq [ $\delta_H$  3,95 (*dd*, 11,6 ; 4,7), H-5''a] et H-5''ax [ $\delta_H$  3,32 (*m*), H-5''b].



**Figure III.141: Spectre COSY montrant les couplages du  $\beta$ -D-xylose**

Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position *trans*-diaxiale de ces protons. Ce pentose est identifié à un  $\beta$ -D-xylose. Sa stéréochimie a été confirmée par l'observation des effets nOe entre les protons H-1''/H-3'' et H-1''/H-5''a sur le spectre NOESY (Figures III.139 et III.142). Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce xylose déterminées à partir de l'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.138) sont en accord avec celles de la littérature. <sup>[189]</sup>

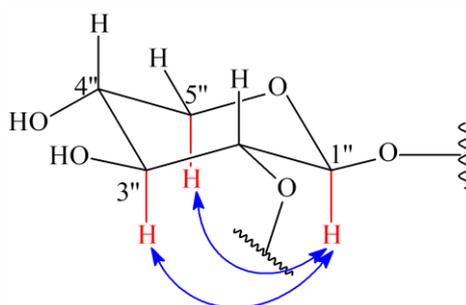


Figure III.142: Corrélations NOESY du  $\beta$ -D-xylose

A partir du troisième proton anomérique H-1''' [ $\delta_H$  5,3 (*d*,  $J = 1,6$  Hz)] un système de spins à huit protons a été identifié, selon les spectres COSY et TOCSY (Figures III.143, III.144 et III.137), attribuables aux protons d'un 6-désoxyhexose. En effet les couplages entre les protons suivants sont visualisés:

- H-2''' [ $\delta_H$  3,93 (*dd*,  $J = 3,1 ; 1,6$  Hz)] et H-3''' [ $\delta_H$  3,85 (*dd*,  $J = 9,5 ; 3,1$  Hz)], la faible valeur de la constante de couplage  $J_{H2'''-H3'''} = 3,1$  Hz traduit une position équatoriale du proton H-2''';
- H-3''' et H-4''' [ $\delta_H$  3,58 (*t*,  $J = 9,5$  Hz)], la grande constante de couplage  $J_{H3'''-H4'''} = 9,5$  Hz indique que les protons H-3''' et H-4''' sont en position *trans*-diaxiale;
- H-4''' et H-5''' [ $\delta_H$  3,77 (*dd*,  $J = 9,5 ; 6,2$  Hz)], le proton H-4''', sous forme d'un triplet dont la constante de couplage ( $J = 9,5$  Hz) atteste une position *trans*-diaxiale des protons H-4''' et H-5''';
- Les protons H<sub>3-6</sub>''' résonnent sous forme d'un doublet à  $\delta_H$  1,33 couplent avec le proton H-5''' au regard d'une constante de couplage  $J = 6,2$  Hz.

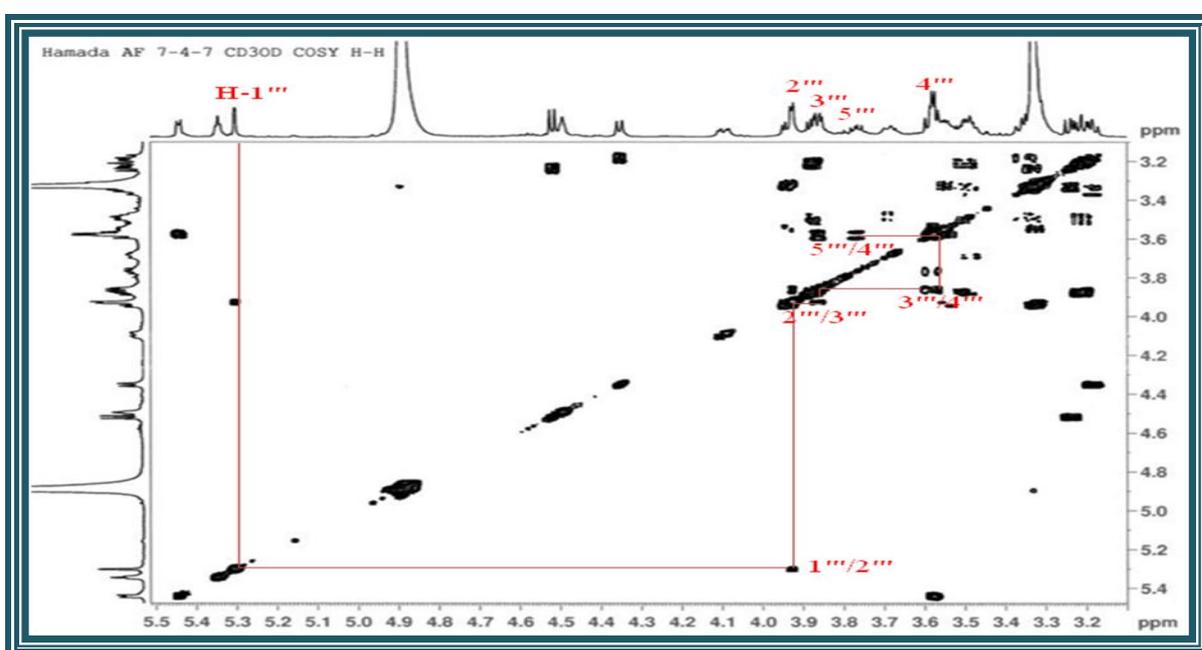


Figure III.143: Spectre COSY montrant les couplages du  $\alpha$ -L-rhamnose

Les déplacements chimiques de leurs atomes de carbone sont assignés par analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.138).

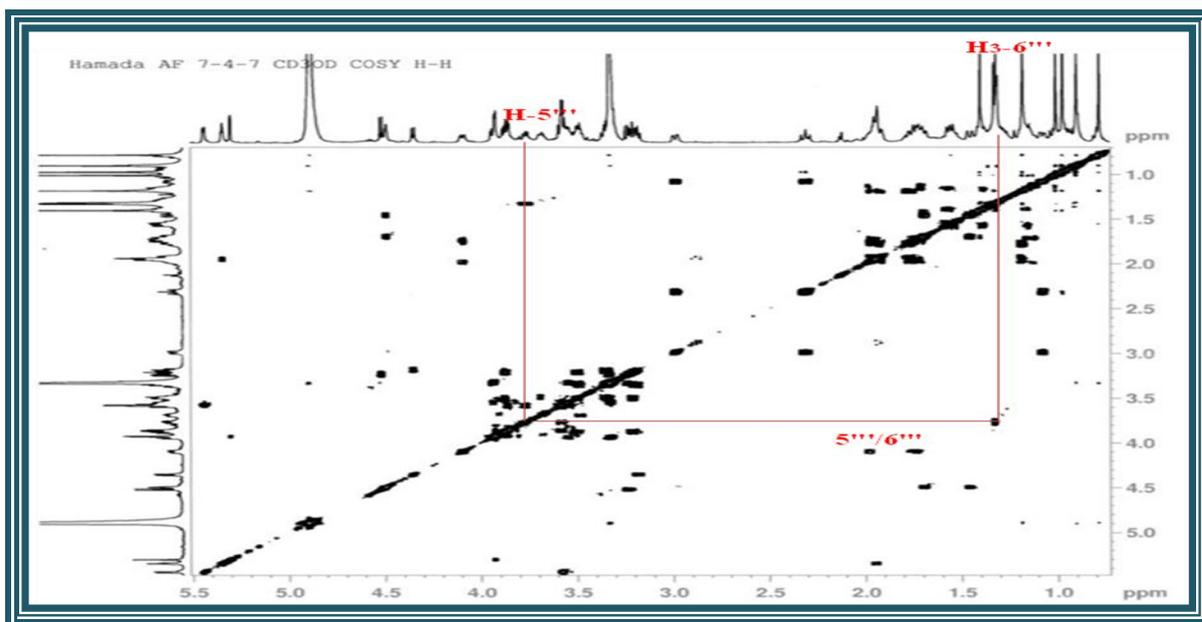


Figure III.144: Spectre COSY montrant le couplage H-5'''/H<sub>3</sub>-6''' du  $\alpha$ -L-rhamnose

La présence d'effet nOe entre les protons H-1'''/H-2''' et l'absence d'effet nOe entre les protons H-1'''/H-3''' et H-1'''/H-5''' (Figures III.139 et III.145), indiquent une position équatoriale du proton anomérique H-1''' donc une configuration  $\alpha$ . Il s'agit donc d'un  $\alpha$ -L-rhamnose.

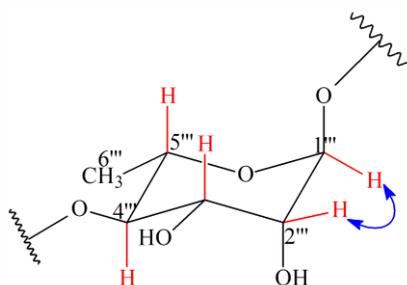


Figure III.145: Corrélations NOESY du  $\alpha$ -L-rhamnose

Les spectres COSY et TOCSY (Figures III.146 et III.137) permettent d'identifier également six protons d'un pentose supplémentaire, identifié à partir de son proton anomérique H-1'''' résonant à  $\delta_H$  4,52 (*d*,  $J = 7,6$  Hz).

En effet, à partir de ce proton on relie les protons H-2'''' [ $\delta_H$  3,24 (*dd*,  $J = 9; 7,6$  Hz)], H-3'''' [ $\delta_H$  3,35 (*m*)], H-4'''' [ $\delta_H$  3,5 (*m*)] et H-5'''' [ $\delta_H$  3,88 (*dd*,  $J = 11,2; 5,4$  Hz, H-5''''a),  $\delta_H$  3,21 (*dd*,  $J = 11,2; 9,2$  Hz), H-5''''b] à travers leurs taches de corrélation. Les grandes valeurs des constantes de couplage indiquent qu'ils sont tous axiaux. Il s'agit d'un xylose de configuration  $\beta$ .

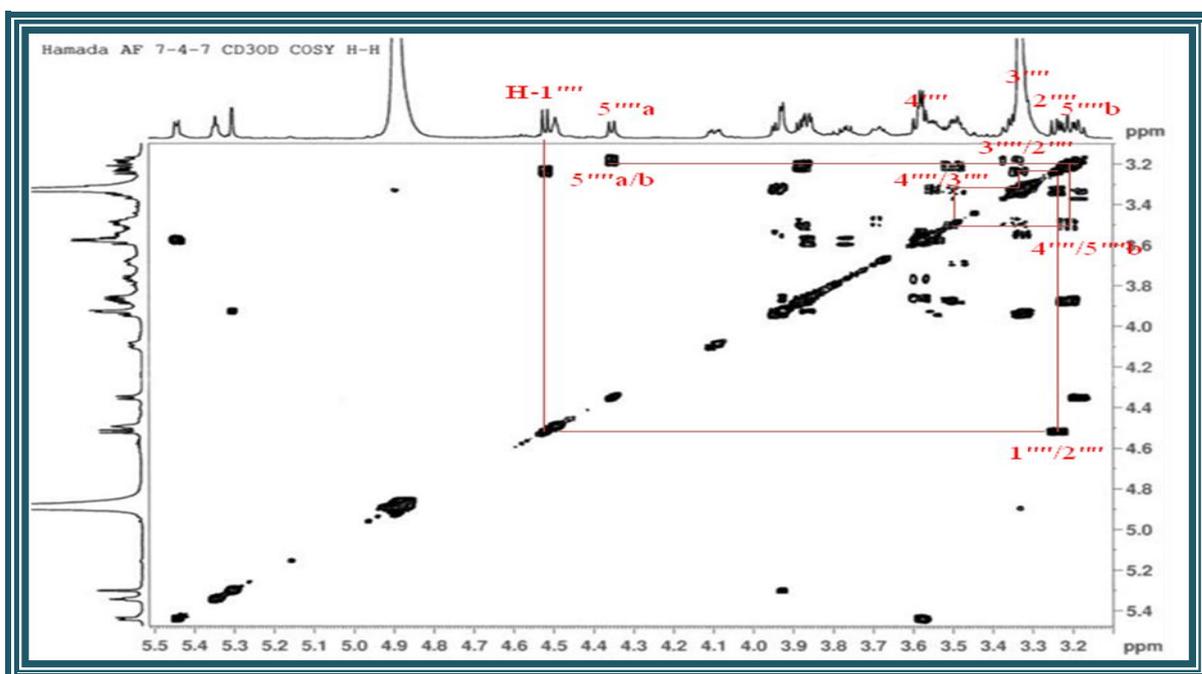


Figure III.146: Spectre COSY montrant les couplages du  $\beta$ -D-xylose

L'analyse du spectre NOESY montrant des effets nOe entre les protons : H-1''''/H-3'''' et H-1''''/H-5''''b (Figures III.139 et III.147) confirme les positions axiales de ces protons.

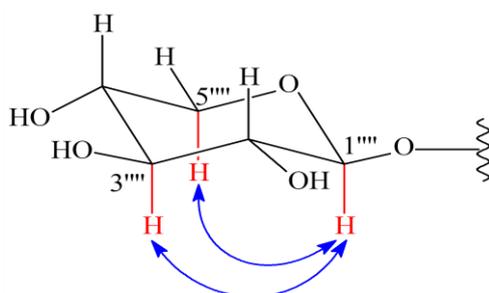


Figure III.147: Corrélations NOESY du  $\beta$ -D-xylose

Sur le spectre HMBC (Figures III.148 et III.149) les corrélations interglycosidiques sont observées entre :

- Le proton H-1'' du xylose et le carbone ester C-28 de la génine ;
- Le proton H-1'' du rhamnose et le carbone C-2'' du xylose interne ;
- Le proton H-1'''' du xylose terminal et le carbone C-4'' du rhamnose ;
- Le proton H-1' de l'acide glucuronique et le carbone C-3 de la génine.

L'enchaînement triosidique attaché en position 28 de la génine est [ $\beta$ -D-Xyl-(1'''' $\rightarrow$ 4'')- $\alpha$ -L-Rha-(1'' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-Xyl].

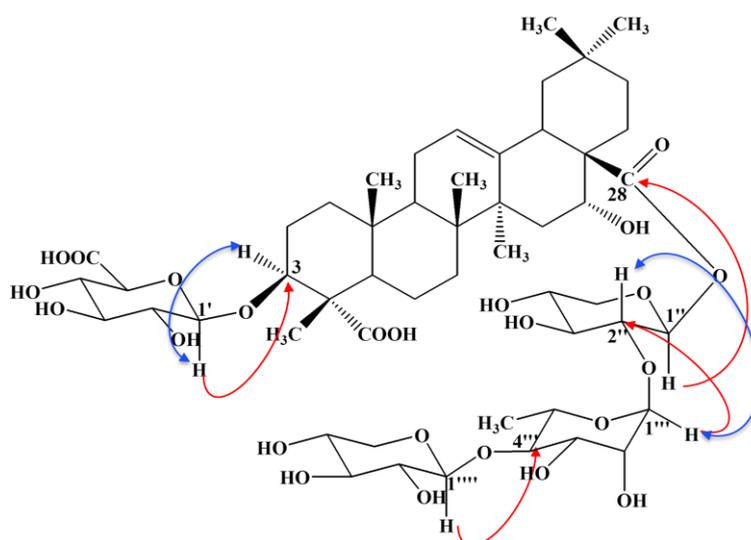


Figure III.148: Corrélations HMBC et NOESY montrant l'enchaînement entre les sucres et la génine

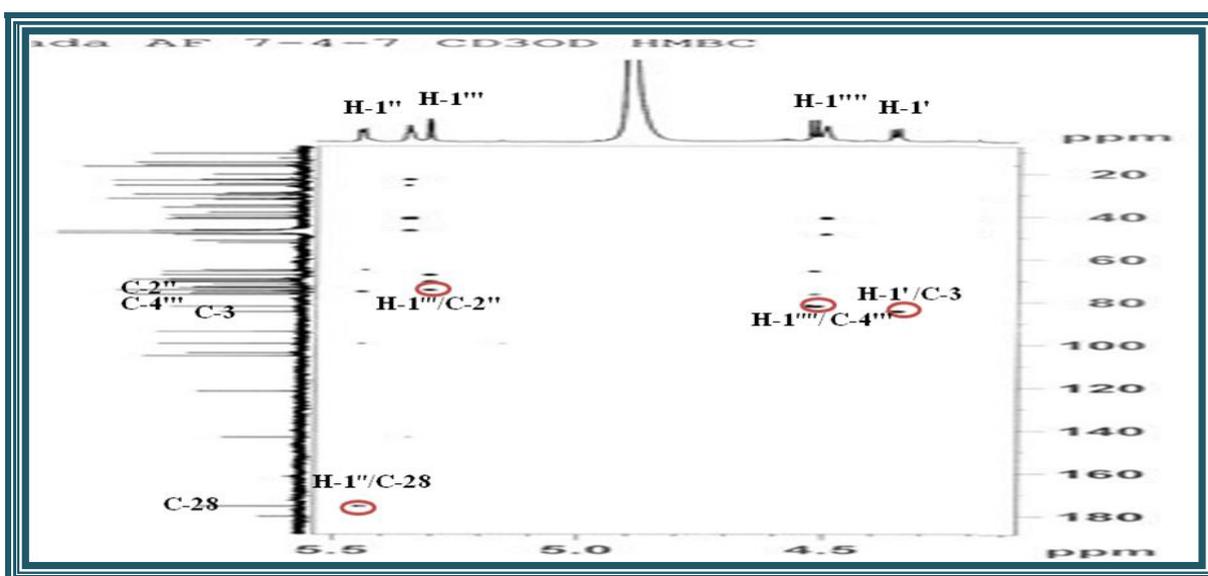


Figure III.149: Spectre HMBC du composé 12

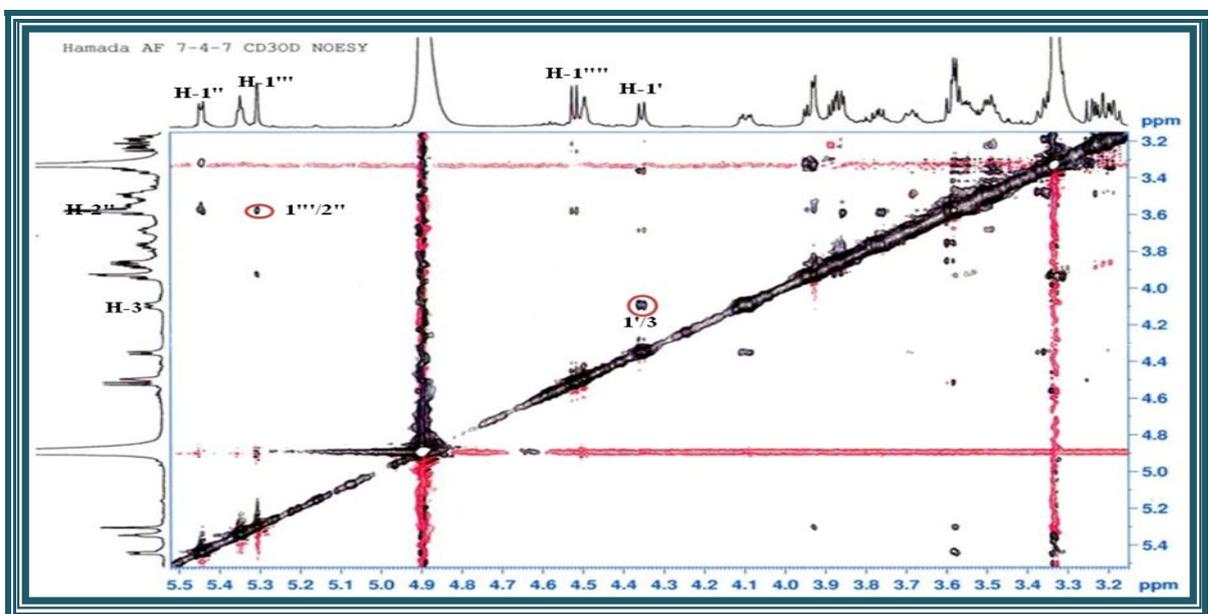


Figure III.150: Spectre NOESY de la partie osidique du composé 12

L'analyse du spectre NOESY (Figures III.148 et III.150) permet de confirmer cet enchaînement par la visualisation d'effets nOe entre les protons H-1''' du rhamnose et H-2'' du xylose interne et entre les protons H-1' de l'acide glucuronique et H-3 de la génine.

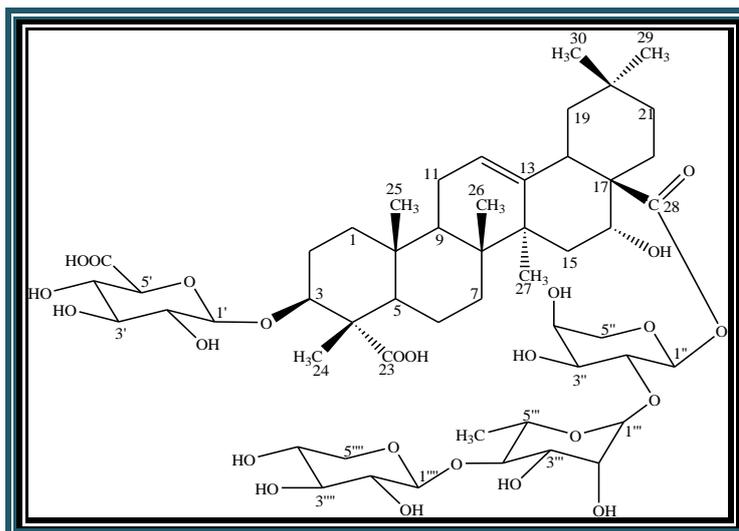
Toutes ces données spectrales (Tableau III.12) ainsi que la mesure de pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = -34,21^\circ$ , C= 0,0019 g/ ml, MeOH) permettent d'attribuer au composé **12** la structure suivante: Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-xylopyranosyl], il s'agit d'une nouvelle saponine.

**Tableau III.12 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 12 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

| position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)                          |
|----------|------------------|--|
| 1        | 38,3             | 1,71 (m) H-1a<br>1,14 (m) H-1b                   |
| 2        | 25               | 1,98 (m) H-2a<br>1,75 (m) H-2b                   |
| 3        | 84,8             | 4,10 (dd, 11,7; 4,3)                             |
| 4        | 52,5             | -  |
| 5        | 51,5             | 1,52 (m)   |
| 6        | 20,6             | 1,56 (m) H-6a<br>1,15 (m) H-6b                   |
| 7        | 32,5             | 1,56 (m) H-7a<br>1,38 (m) H-7b                   |
| 8        | 39,6             | -  |
| 9        | 46,9             | 1,74 (m)   |
| 10       | 36               | -  |
| 11       | 23               | 1,93 (m)   |
| 12       | 122,9            | 5,35 (t, 3,4)                                    |
| 13       | 143,3            | -  |
| 14       | 41,3             | -  |
| 15       | 35,1             | 1,68 (m) H-15a<br>1,45 (m) H-15b                 |
| 16       | 73,2             | 4,49 (t, 3,8)                                    |
| 17       | 48,7             | -  |
| 18       | 40,8             | 2,99 (dd, 14,2; 3)                               |
| 19       | 46,5             | 2,31 (t, 13,3) H-19a<br>1,08 (dd, 13; 3,1) H-19b |
| 20       | 29,9             | -  |
| 21       | 35               | 1,95 (m) H-21a<br>1,20 (m) H-21b                 |
| 22       | 30,6             | 1,91 (m) H-22a<br>1,77 (m) H-22b                 |

| position  | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m, J</i> en Hz)  |
|-----------|------------------|--|
| 23        | 180,3            | -  |
| 24        | 10,9             | 1,18 ( <i>s</i> )  |
| 25        | 15               | 1,01 ( <i>s</i> )  |
| 26        | 16,2             | 0,78 ( <i>s</i> )  |
| 27        | 25,8             | 1,40 ( <i>s</i> )  |
| 28        | 175,6            | -  |
| 29        | 31,9             | 0,90 ( <i>s</i> )  |
| 30        | 23,4             | 0,97 ( <i>s</i> )  |
|           |                  |  |
| 3-Ac. glu |                  |  |
| 1'        | 104              | 4,35 ( <i>d, 7,7</i> )   |
| 2'        | 73,6             | 3,18 ( <i>t, 8,5</i> )   |
| 3'        | 76,1             | 3,37 ( <i>m</i> )  |
| 4'        | 71,6             | 3,49 ( <i>m</i> )  |
| 5'        | 75,2             | 3,67 ( <i>d, 9,3</i> )   |
| 6'        | 175,6            | -  |
|           |                  |  |
| 28-Xyl    |                  |  |
| 1''       | 94               | 5,44 ( <i>d, 6,3</i> )   |
| 2''       | 74,6             | 3,56 ( <i>t, 7</i> )   |
| 3''       | 75,2             | 3,57 ( <i>t, 7</i> )   |
| 4''       | 69,4             | 3,55 ( <i>td, 8; 4,7</i> )   |
| 5''       | 65,2             | 3,95 ( <i>dd, 11,6 ; 4,7</i> ) H-5''a<br>3,32 ( <i>m</i> ) H-5''b                  |
|           |                  |  |
| 2''-Rha   |                  |  |
| 1'''      | 99,7             | 5,3 ( <i>d, 1,6</i> )  |
| 2'''      | 70,5             | 3,93 ( <i>dd, 3,1 ; 1,6</i> )  |
| 3'''      | 70,8             | 3,85 ( <i>dd, 9,5 ; 3,1</i> )  |
| 4'''      | 82,3             | 3,58 ( <i>t, 9,5</i> )   |
| 5'''      | 67,5             | 3,77 ( <i>dd, 9,5; 6,2</i> )   |
| 6'''      | 16,9             | 1,33 ( <i>d, 6,2</i> )   |
|           |                  |  |
| 4'''-Xyl  |                  |  |
| 1''''     | 105,4            | 4,52 ( <i>d, 7,6</i> )   |
| 2''''     | 74,7             | 3,24 ( <i>dd, 9 ; 7,6</i> )  |
| 3''''     | 76,8             | 3,35 ( <i>m</i> )  |
| 4''''     | 69,6             | 3,5 ( <i>m</i> )   |
| 5''''     | 65,9             | 3,88 ( <i>dd, 11,2 ; 5,4</i> ) H-5''''a<br>3,21 ( <i>dd, 11,2 ; 9,2</i> ) H-5''''b |

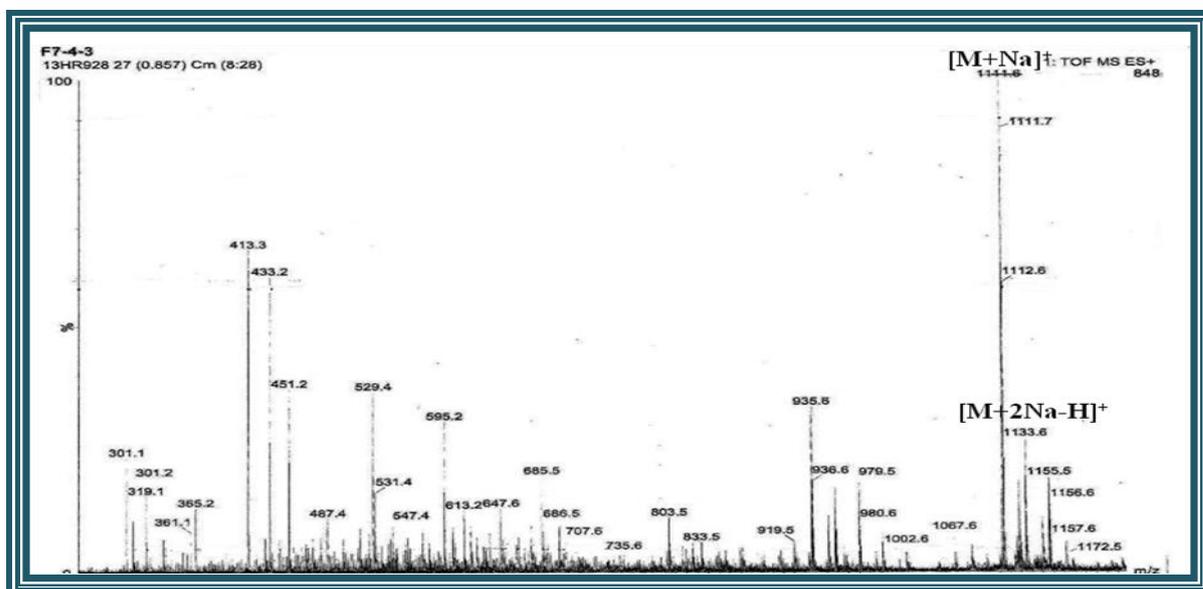
## III-4-4-2-2 Elucidation structurale du composé 13



**Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl] (13)**

Le composé **13** est isolé aussi sous forme d'une poudre blanche amorphe. Il est invisible sous lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et il donne une coloration rose foncée après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage. C'est un nouveau saponoside identifié à l'acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl].

Le composé **13** possède la même masse moléculaire que la saponine **12** décrite précédemment (isomères), au vu des spectres de masse ESI (Figure III.151) qui montrent deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  1111  $[M+Na]^+$  et 1133  $[(M-H)+2Na]^+$  soit une masse moléculaire 1088 uma et une formule brute  $C_{52}H_{80}O_{24}$ .



**Figure III.151: Spectre de masse du composé 13**

Cette formule est confirmée par le spectre de masse réalisé à haute résolution HR-ESIMS (Figure III.152) montrant un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  1111,4934 (calc.  $C_{52}H_{80}O_{24}Na$ , 1111,4937).

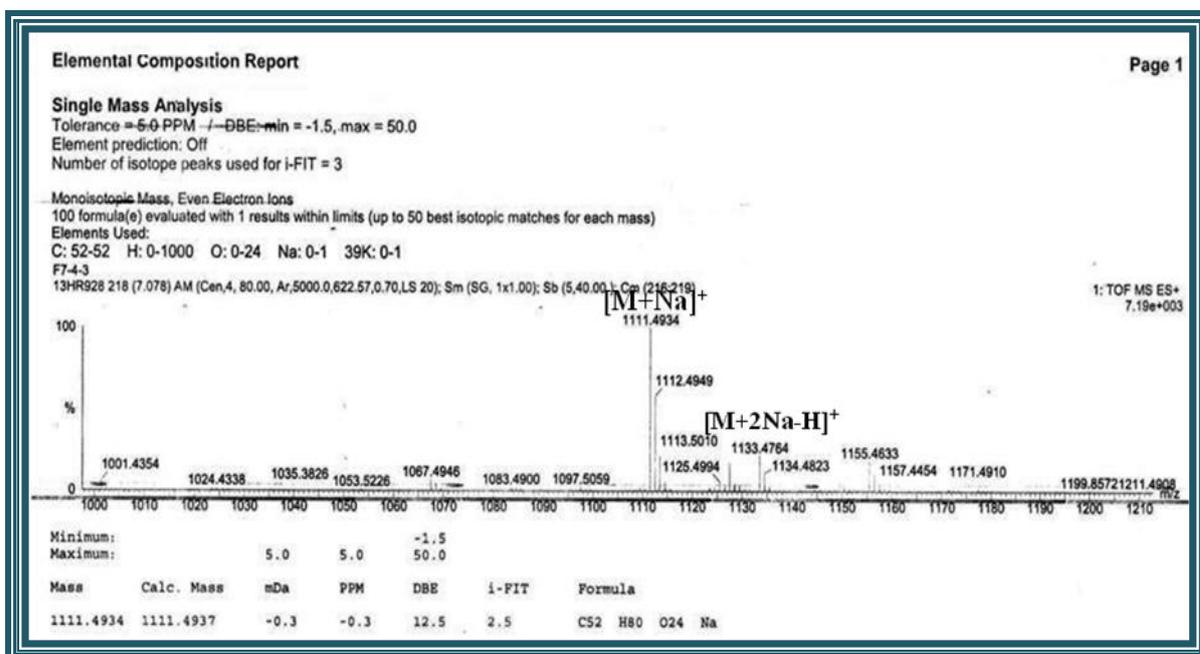


Figure III.152 : Spectre de masse HR-ESIMS du composé 13

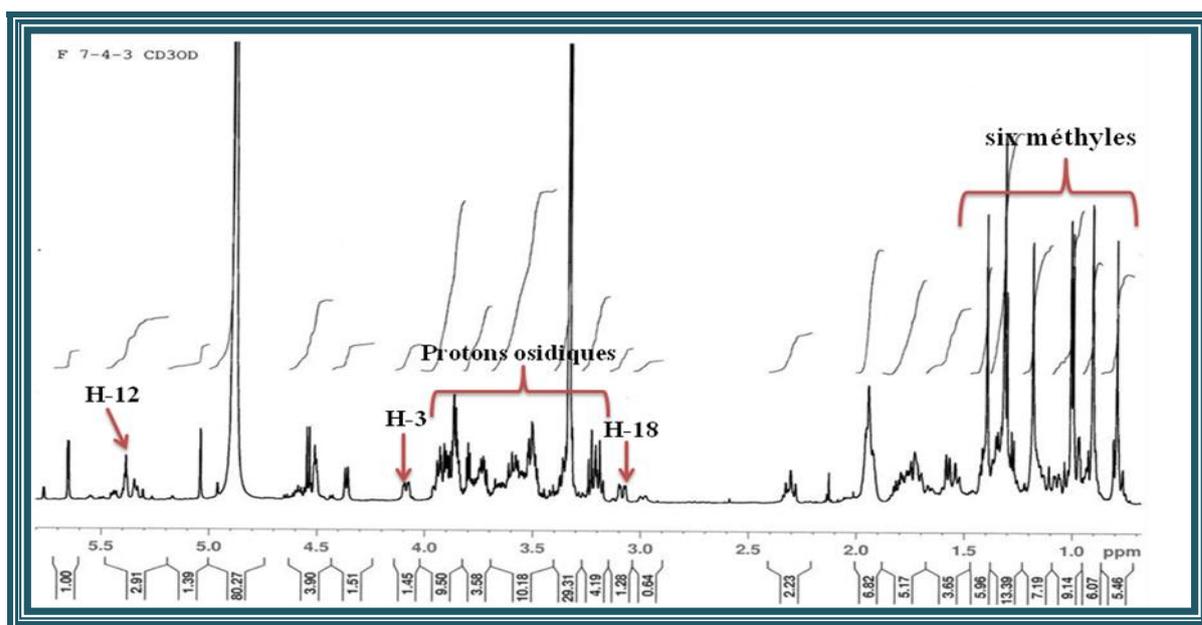
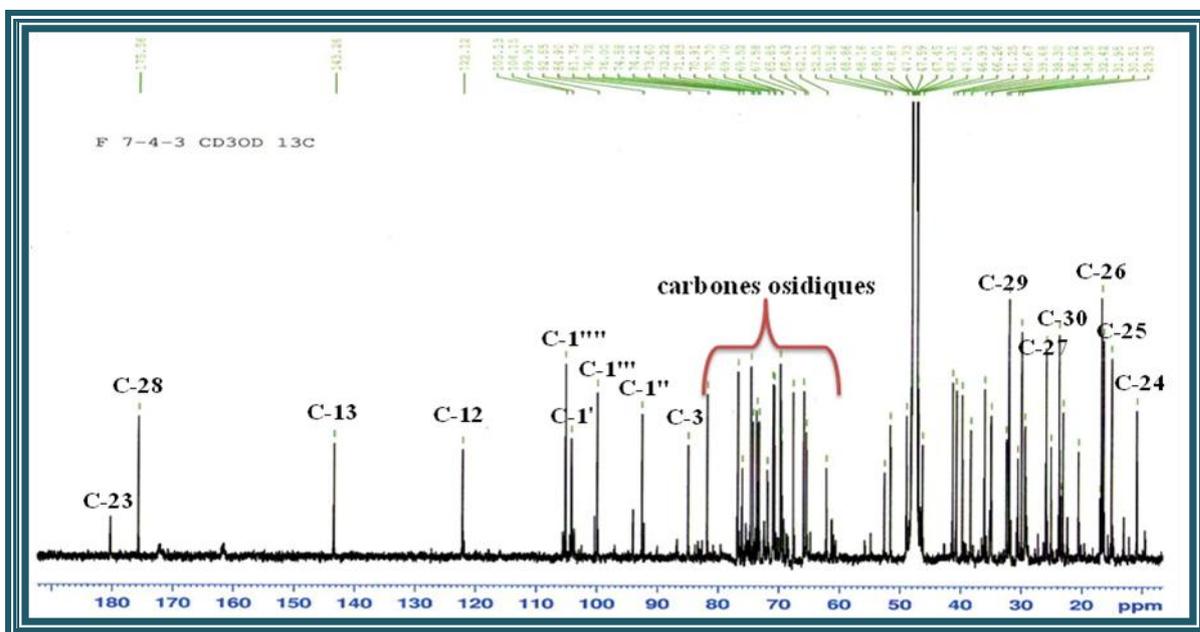
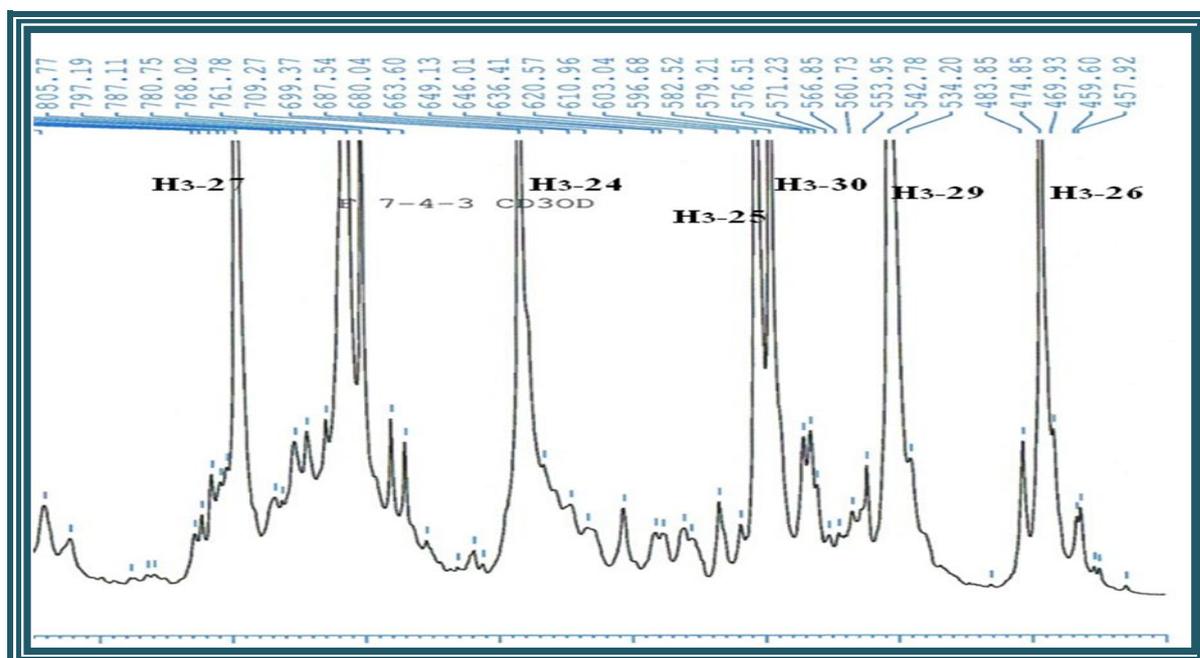


Figure III.153 : Spectre RMN  $^1H$  du composé 13

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figures III.153 et III.154) sont globalement similaires à ceux du composé 12. En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique:

- CH<sub>3</sub>-24 [ $\delta_{\text{H}}$  1,16 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  11], CH<sub>3</sub>-25 [ $\delta_{\text{H}}$  1,00 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  15], CH<sub>3</sub>-26 [ $\delta_{\text{H}}$  0,79 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  16,4], CH<sub>3</sub>-27 [ $\delta_{\text{H}}$  1,40 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  25,8], CH<sub>3</sub>-29 ( $\delta_{\text{H}}$  0,90 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  31,9), et CH<sub>3</sub>-30 [ $\delta_{\text{H}}$  0,99 (s) /  $\delta_{\text{C}}$  23,7] (Figures III.155 et III.156);
- H-3 [ $\delta_{\text{H}}$  4,03 (dd,  $J = 11,1; 3,4$  Hz) /  $\delta_{\text{C}}$  84,9], H-16 [ $\delta_{\text{H}}$  4,50 (t,  $J = 4,2$  Hz) /  $\delta_{\text{C}}$  73,2] et H-12 [ $\delta_{\text{H}}$  5,39 (t,  $J = 3,6$  Hz) /  $\delta_{\text{C}}$  122,2];
- C-28 ( $\delta_{\text{C}}$  175,6) et C-23 ( $\delta_{\text{C}}$  182).

Figure III.154 : Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé 13Figure III.155 : Spectre RMN <sup>1</sup>H des méthyles du composé 13

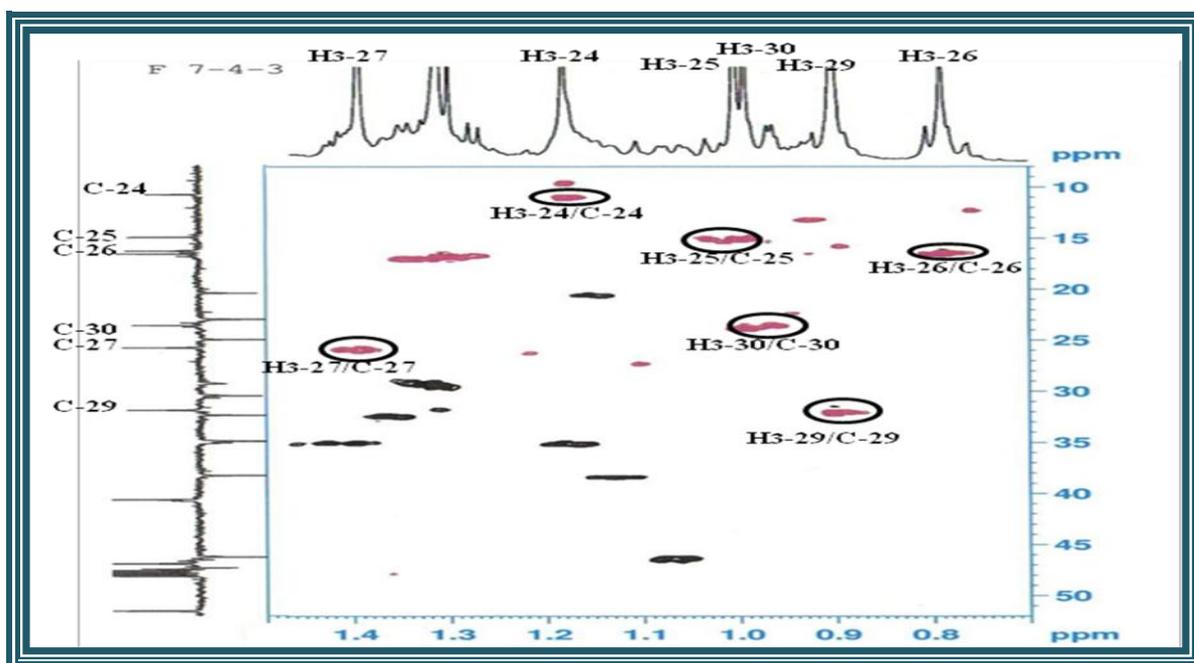
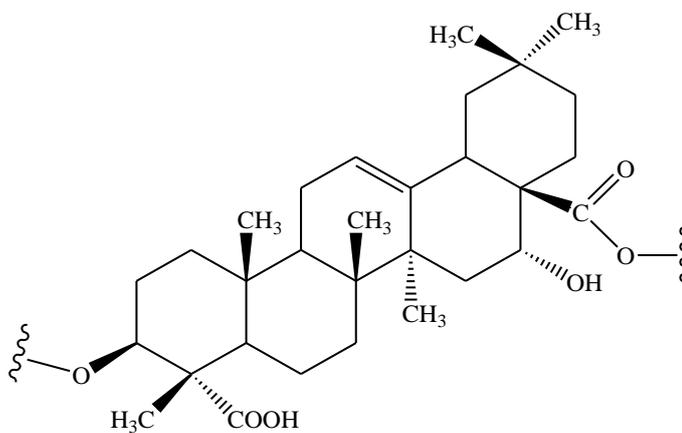


Figure III.156 : Spectre HSQC du composé 13 (partie méthyles)

Il s'agit donc de l'acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique. <sup>[145]</sup>



Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique

La partie osidique du composé **13** s'avère presque identique à celle de **12** comme l'indique l'analyse des spectres COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY et  $^{13}\text{C}$ . En effet, cette analyse permet de déterminer la nature osidique des quatre sucres, trois sont commun avec le composé précédent:

- Un acide  $\beta$ -D-glucopyranoïque, H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4,33)/ C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  103,8);
- $\alpha$ -L-rhamnose, H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  5,04)/ C-1''' ( $\delta_{\text{C}}$  99,9);
- Et le  $\beta$ -D-xylose, H-1'''' ( $\delta_{\text{H}}$  4,54)/ C-1'''' ( $\delta_{\text{C}}$  105,1). (Figures III.157 et III.158)

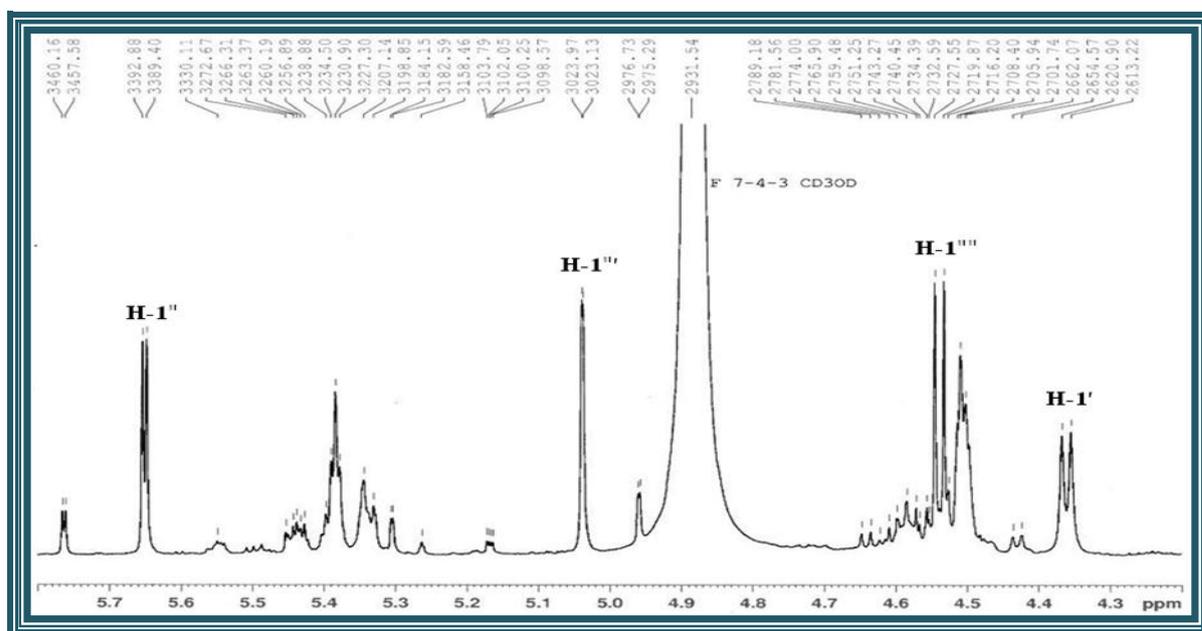


Figure III.157 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des anomères du composé 13

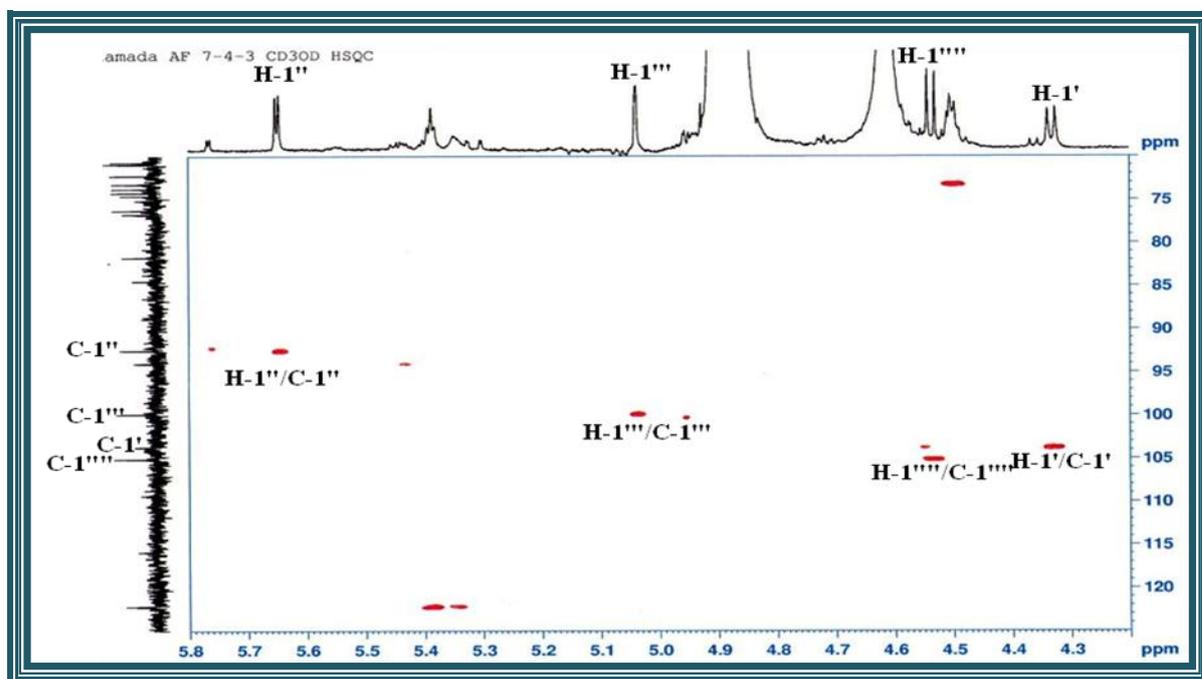


Figure III.158 : Spectre HSQC des anomères du composé 13

Le quatrième système de spins est identifié par analyse des spectres COSY, TOCSY et TOCSY-HSQC (Figures III.159, III.160, III.161 et III.162) qui montre six spins couplés appartenant à un pentose dont l'anomère H-1'' résonne à  $\delta_{\text{H}}$  5,65 (*d*,  $J = 3,5$  Hz). Le proton H-2'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,80 (*dd*,  $J = 5,2 ; 3,5$  Hz) est couplé au proton H-3'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,90 (*m*)], lui-même couplé au proton H-4'' résonnant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,84. Ce dernier corrèle avec deux protons géminés H-5''a [ $\delta_{\text{H}}$  3,93 (*m*)] et H-5''b [ $\delta_{\text{H}}$  3,52 (*m*)].

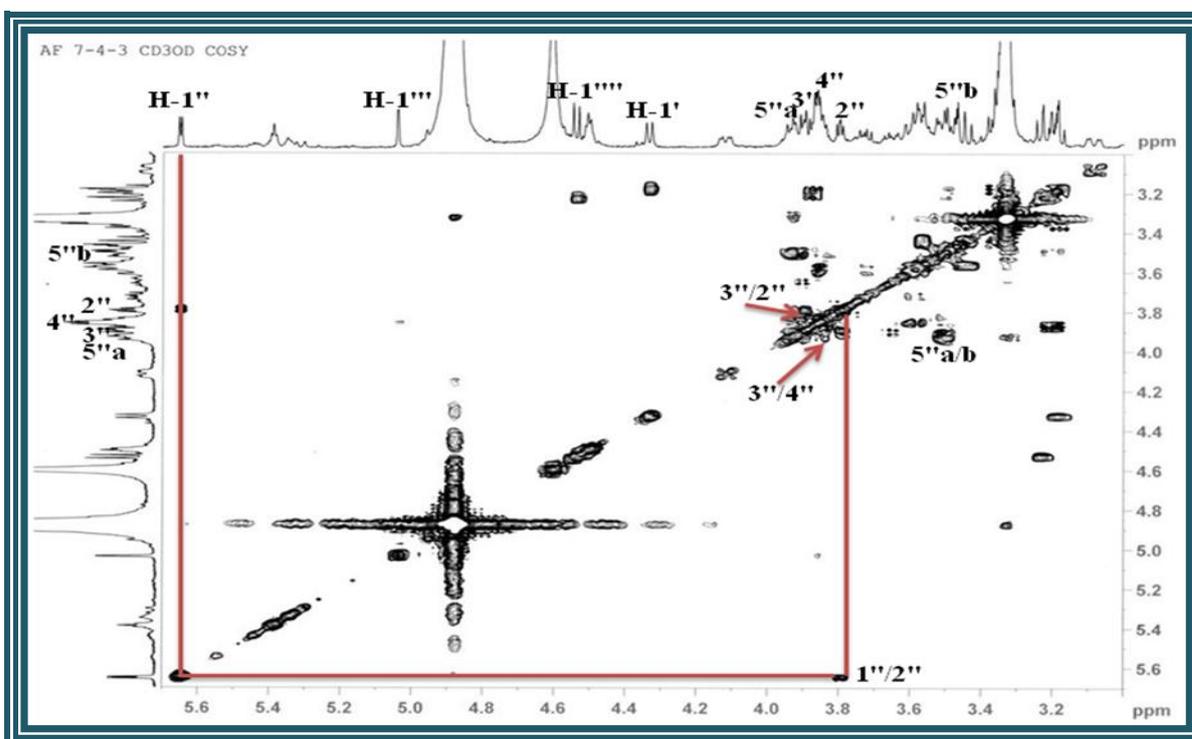


Figure III.159 : Spectre COSY de l'arabinose

L'expérience TOCSY confirme les positions des différents protons de ce sucre par la visualisation des taches de corrélation entre les protons H-1''/H-2'', H-1''/H-3'', H-1''/H-4'', H-1''/H-5''a (Figure III.160).

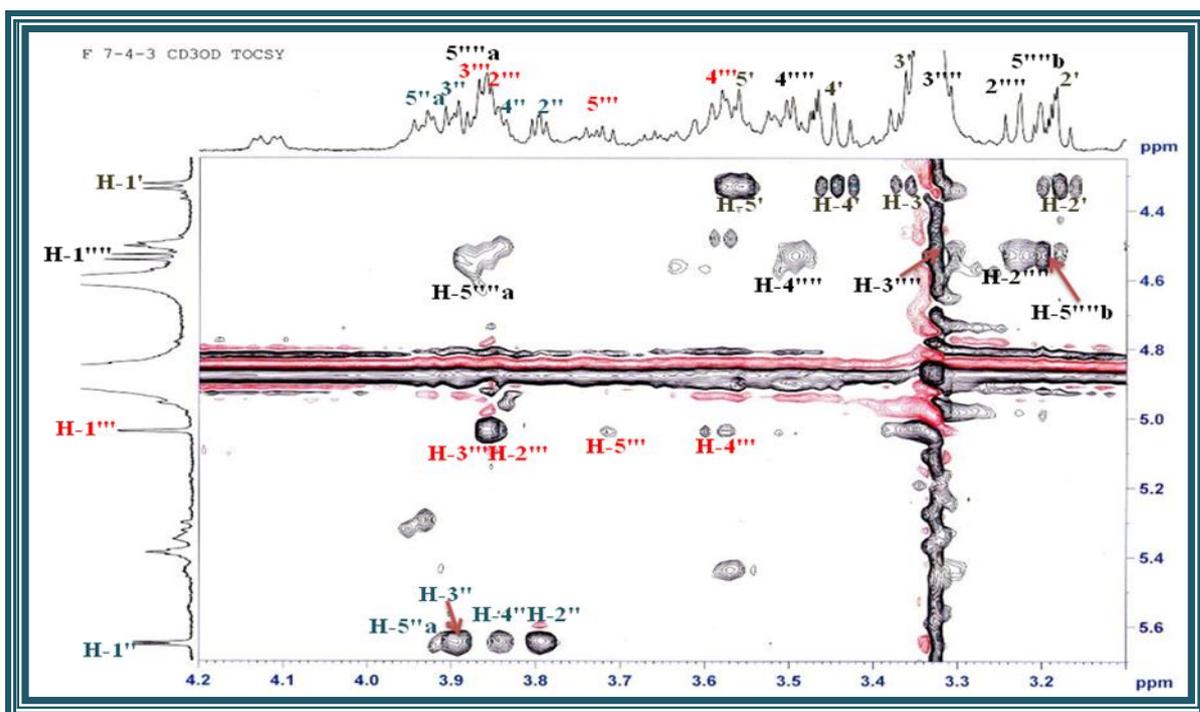


Figure III.160 : Spectre TOCSY des quatre sucres du composé 13

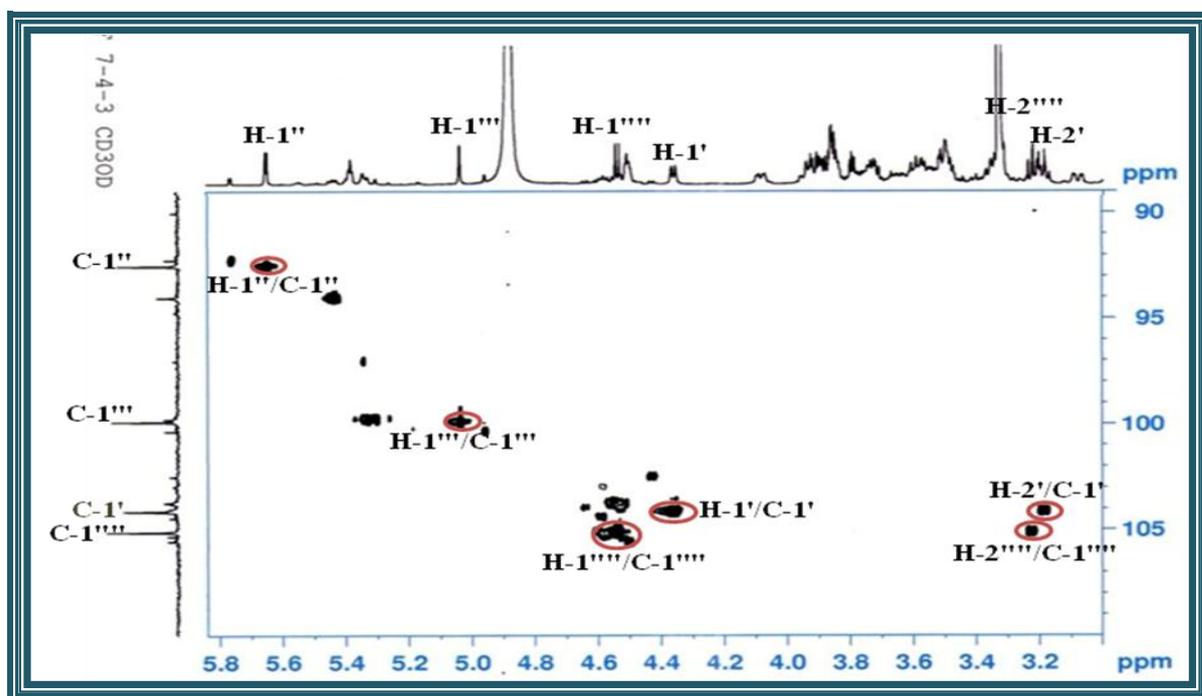


Figure III.161 : Spectre HSQC-TOCSY de la partie osidique du composé 13

L'expérience HSQC-TOCSY (Figures III.161 et III.162) est utilisée pour identifier les protons osidiques superposables et présentant un fort chevauchement dans le cas de saponines contenant quatre sucres et plus. A partir d'un carbone osidique donné on peut attribuer tous les protons du même sucre. Dans le cas de ce pentose les corrélations suivantes ont été observées : H-1''/C-1'', H-2''/C-2'', H-3''/C-3'', H-4''/C-4'' et H<sub>2</sub>-5''/C-5'' (HSQC), H-2''/H-3'', H-4''/H-5''a et H-5''a/H-5''b (TOCSY).

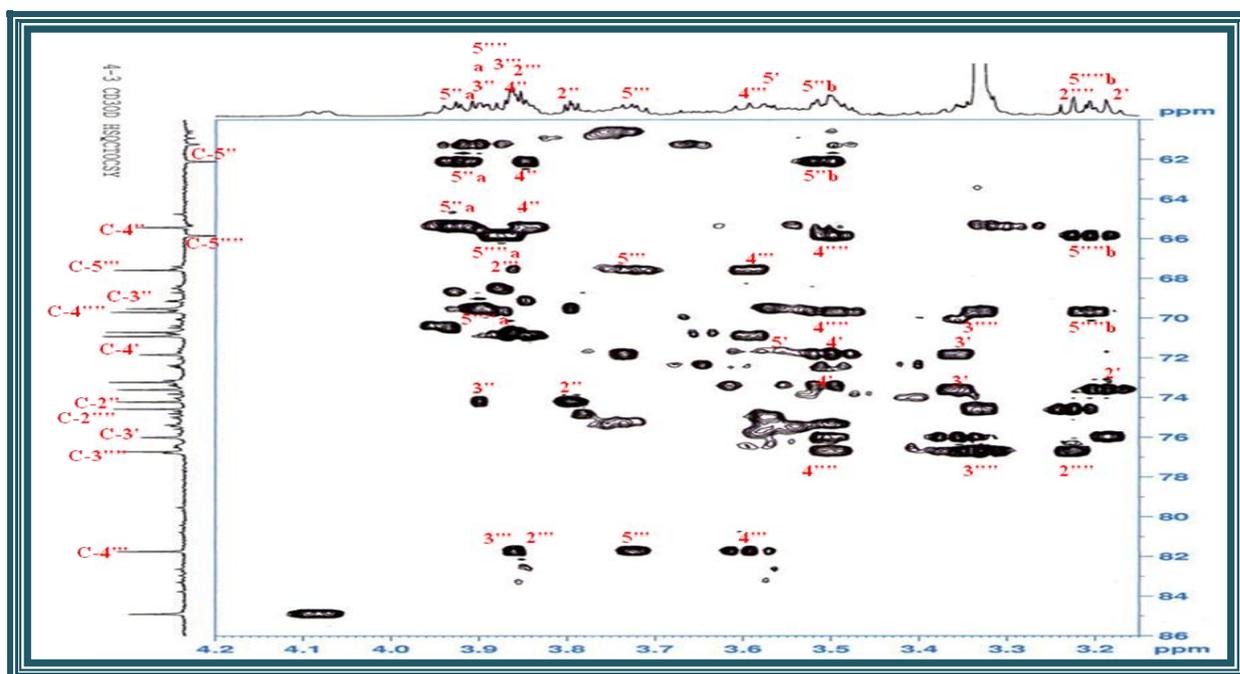


Figure III.162: Spectre HSQC-TOCSY de la partie osidique du composé 13





Le séquençage de la partie osidique est réalisé par analyse du spectre HMBC (Figures III.167 et III.168) sur lequel les corrélations  $^3J_{H-C}$  suivantes sont observées indiquant que cette saponine est de nature bidesmosidique.

- H-1'' Ara /C-28 de la génine ;
- H-1''' Rha / C-2'' Ara ;
- H-1'''' Xyl terminal/C-4''' Rha ;
- H-1' Ac. gluc/C-3 de la génine.

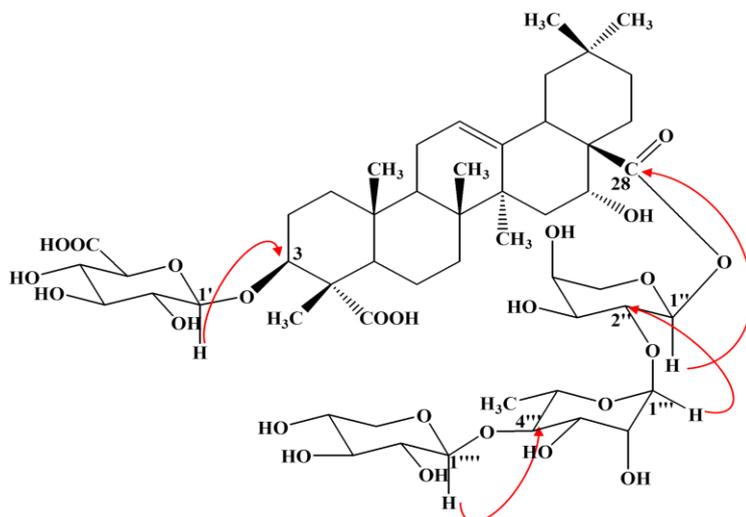


Figure III.167: Corrélations HMBC des protons anomères

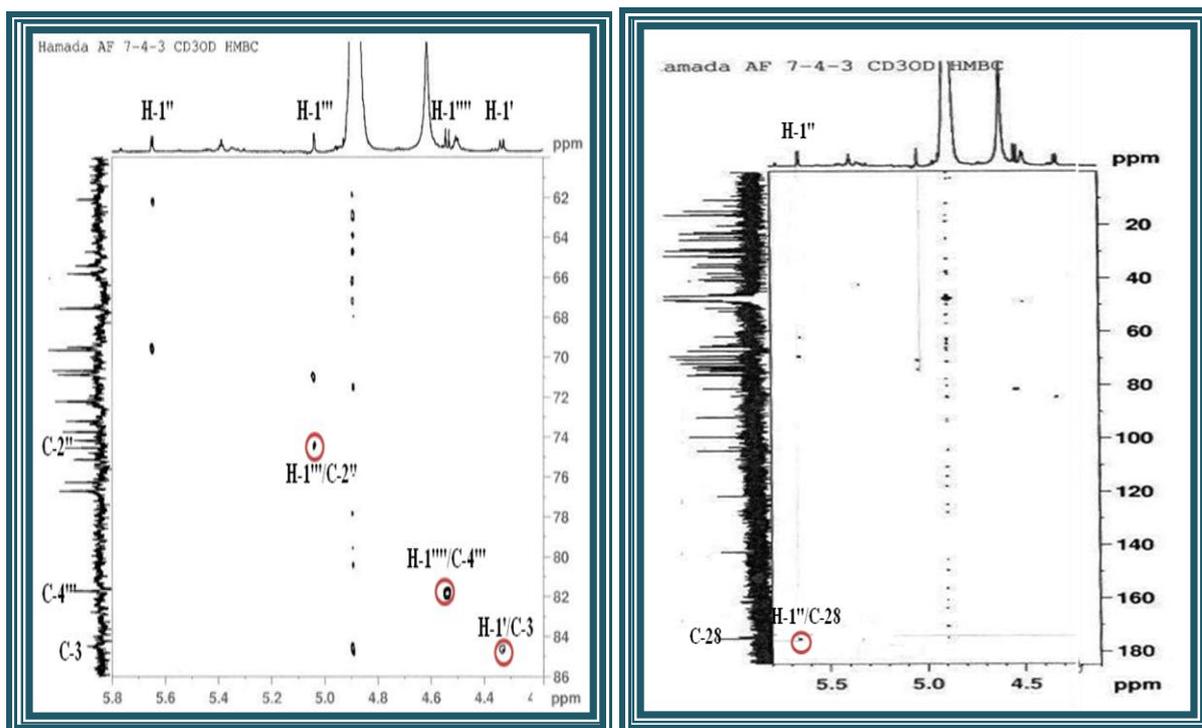


Figure III.168 : Spectre HMBC du composé 13

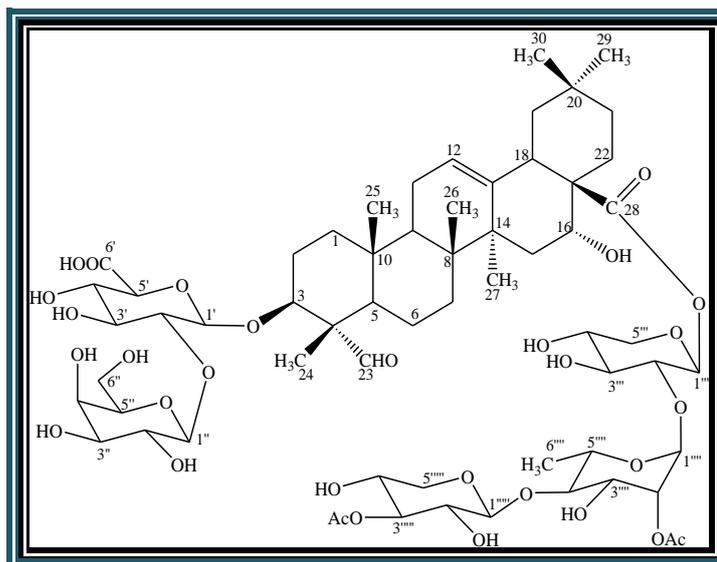
L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III.13) et la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = -13^\circ$ ,  $C = 0,001$  g/ml, MeOH) permettent l'attribution à la nouvelle saponine bidesmosidique **13** la structure suivante: Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 4")- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 2")- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl].

**Tableau III.13 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 13 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

| Position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                              |
|----------|------------------|--|
| 1        | 38,2             | 1,71 ( <i>m</i> ) H-1a<br>1,12 ( <i>m</i> ) H-1b                     |
| 2        | 25,0             | 1,96 ( <i>m</i> ) H-2a<br>1,74 ( <i>m</i> ) H-2b                     |
| 3        | 84,9             | 4,03 ( <i>dd</i> , 11,1; 3,4)  |
| 4        | 52,7             | -  |
| 5        | 51,4             | 1,53 ( <i>dl</i> , 10)   |
| 6        | 20,7             | 1,57 ( <i>m</i> ) H-6a<br>1,13 ( <i>m</i> ) H-6b                     |
| 7        | 32,3             | 1,56 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,35 ( <i>m</i> ) H-7b                     |
| 8        | 39,8             | -  |
| 9        | 47               | 1,72 ( <i>m</i> )  |
| 10       | 36               | -  |
| 11       | 23               | 1,94 ( <i>m</i> )  |
| 12       | 122,2            | 5,38 ( <i>t</i> , 3,6)   |
| 13       | 1431             | -  |
| 14       | 41,2             | -  |
| 15       | 34,9             | 1,78 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,42 ( <i>m</i> ) H-15b                   |
| 16       | 73,2             | 4,46 ( <i>t</i> , 4,2)   |
| 17       | 49               | -  |
| 18       | 40,8             | 3,08 ( <i>dd</i> , 14,3; 4,1)  |
| 19       | 46,2             | 2,30 ( <i>t</i> , 13,3) H-19a<br>1,07 ( <i>dd</i> , 12,7; 3,1) H-19b |
| 20       | 29,9             | -  |
| 21       | 34,9             | 1,96 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,15 ( <i>m</i> ) H-21b                   |
| 22       | 29,3             | 1,92 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,82 ( <i>m</i> ) H-22b                   |
| 23       | 182              | -  |
| 24       | 11               | 1,16 ( <i>s</i> )  |
| 25       | 15               | 1,00 ( <i>s</i> )  |

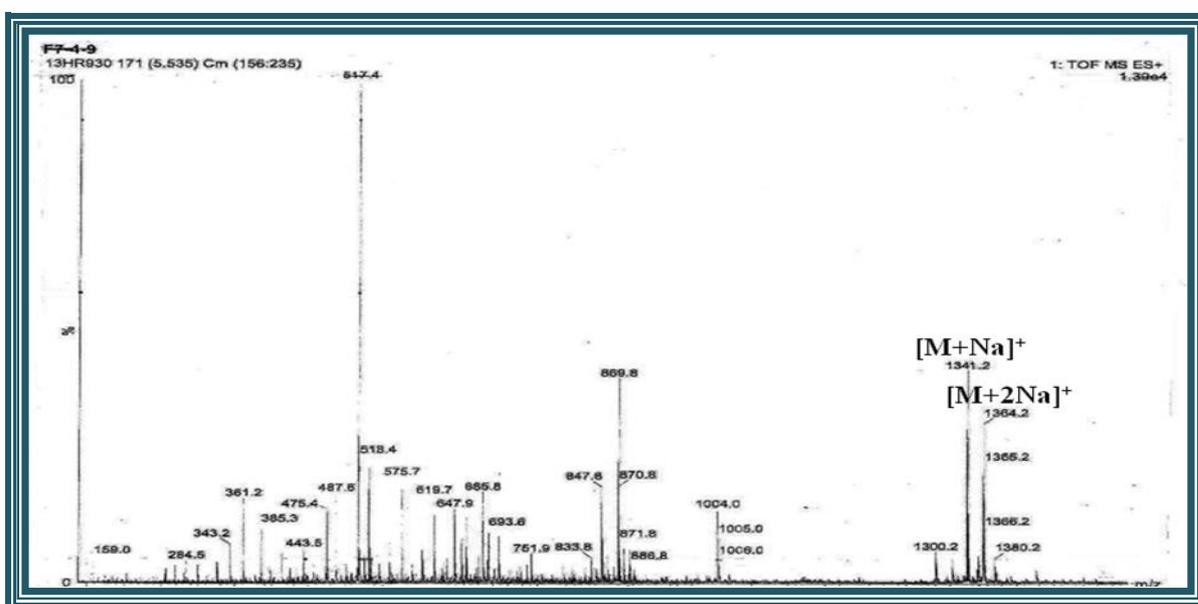
| position  | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m, J</i> en Hz)   |
|-----------|------------------|---|
| 26        | 16,4             | 0,79 ( <i>s</i> )   |
| 27        | 25,8             | 1,40 ( <i>s</i> )   |
| 28        | 175,6            | -   |
| 29        | 31,9             | 0,90 ( <i>s</i> )   |
| 30        | 23,7             | 0,99 ( <i>s</i> )   |
|           |                  |   |
| 3-Ac. glu |                  |   |
| 1'        | 103,8            | 4,33 ( <i>d, 7,6</i> )  |
| 2'        | 73,8             | 3,18 ( <i>t, 8,9</i> )  |
| 3'        | 76,3             | 3,37 ( <i>m</i> )   |
| 4'        | 72,2             | 3,45 ( <i>t, 9,3</i> )  |
| 5'        | 75,1             | 3,57 ( <i>d, 9,9</i> )  |
| 6'        | 175,6            | -   |
|           |                  |   |
| 28-Ara    |                  |   |
| 1''       | 92,5             | 5,65 ( <i>d, 3,5</i> )  |
| 2''       | 74,3             | 3,80 ( <i>dd, 5,2; 3,5</i> )  |
| 3''       | 69,5             | 3,90 ( <i>m</i> )   |
| 4''       | 65,4             | 3,84 ( <i>t, 4,1</i> )  |
| 5''       | 62,1             | 3,93 ( <i>m</i> ) H-5''a<br>3,52 ( <i>m</i> ) H-5''b                        |
|           |                  |   |
| 2''-Rha   |                  |   |
| 1'''      | 99,9             | 5,04 ( <i>d, 1,1</i> )  |
| 2'''      | 70,9             | 3,85 ( <i>dd, 3,7 ; 1,1</i> )   |
| 3'''      | 70,7             | 3,82 ( <i>dd, 8 ; 3,7</i> )   |
| 4'''      | 81,7             | 3,59 ( <i>t, 9,6</i> )  |
| 5'''      | 67,6             | 3,72 ( <i>dd, 9,6; 6,3</i> )  |
| 6'''      | 16,7             | 1,30 ( <i>d, 6,3</i> )  |
|           |                  |   |
| 4'''-Xyl  |                  |   |
| 1''''     | 105,1            | 4,54 ( <i>d, 7,7</i> )  |
| 2''''     | 74,6             | 3,23 ( <i>dd, 9,2 ; 7,7</i> )   |
| 3''''     | 76,7             | 3,32 ( <i>m</i> )   |
| 4''''     | 69,7             | 3,51 ( <i>m</i> )   |
| 5''''     | 65,8             | 3,85 ( <i>dd, 10,8 ; 5,8</i> ) H-5''''a<br>3,21 ( <i>t, 10,8</i> ) H-5''''b |

## III-4-4-2-3 Elucidation structurale du composé 14



**Acide quillaïque 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[[3''''-*O*-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 4''')-(2''''-*O*-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 2''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (14)**

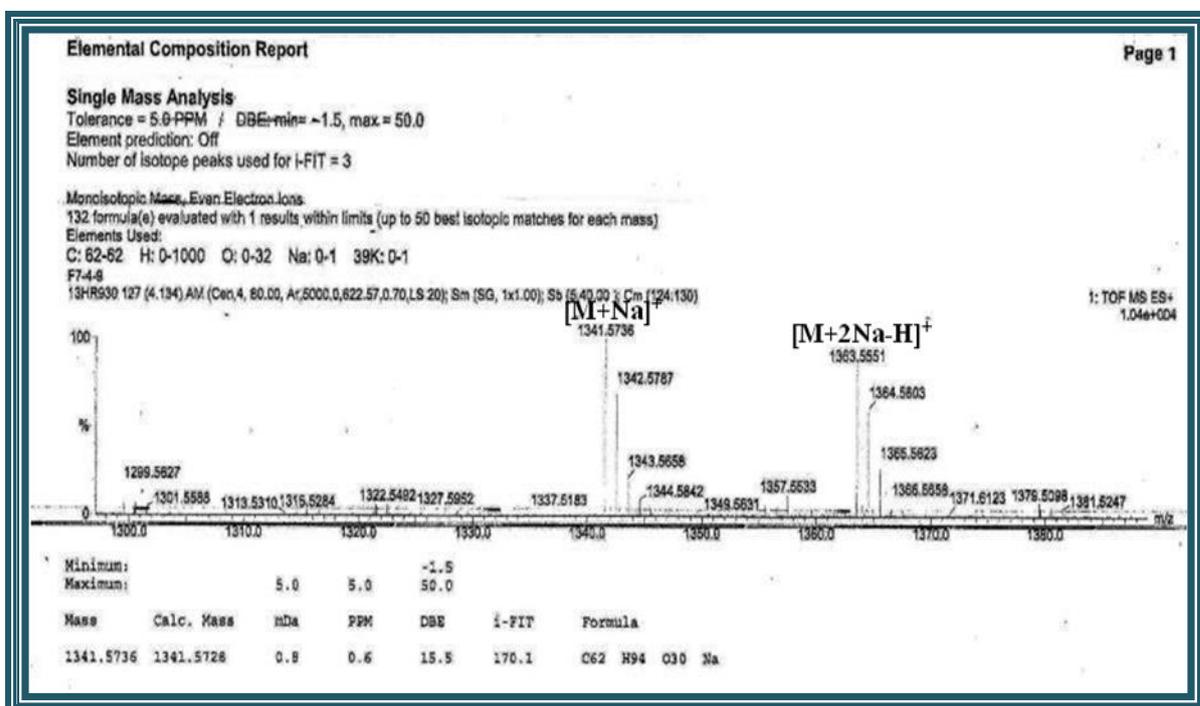
Le composé **14** est obtenu à l'état pur sous forme d'une poudre blanche amorphe. Il se comporte de la même façon que les saponines **12** et **13**, sous la lumière UV à 254 et 366 nm. Sa CCM se colore en rouge après pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage. Ce composé a été identifié à l'acide quillaïque 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[[3''''-*O*-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 4''')-(2''''-*O*-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 2''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl], une nouvelle saponine bidesmosidique aussi.



**Figure III.169: Spectre de masse ESI-MS du composé 14**

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.169) enregistré en mode positif, montre des pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[(M-H)+2Na]^+$  à  $m/z$  1341 et 1363 respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 1318 uma et une formule brute en  $C_{62}H_{94}O_{30}$ .

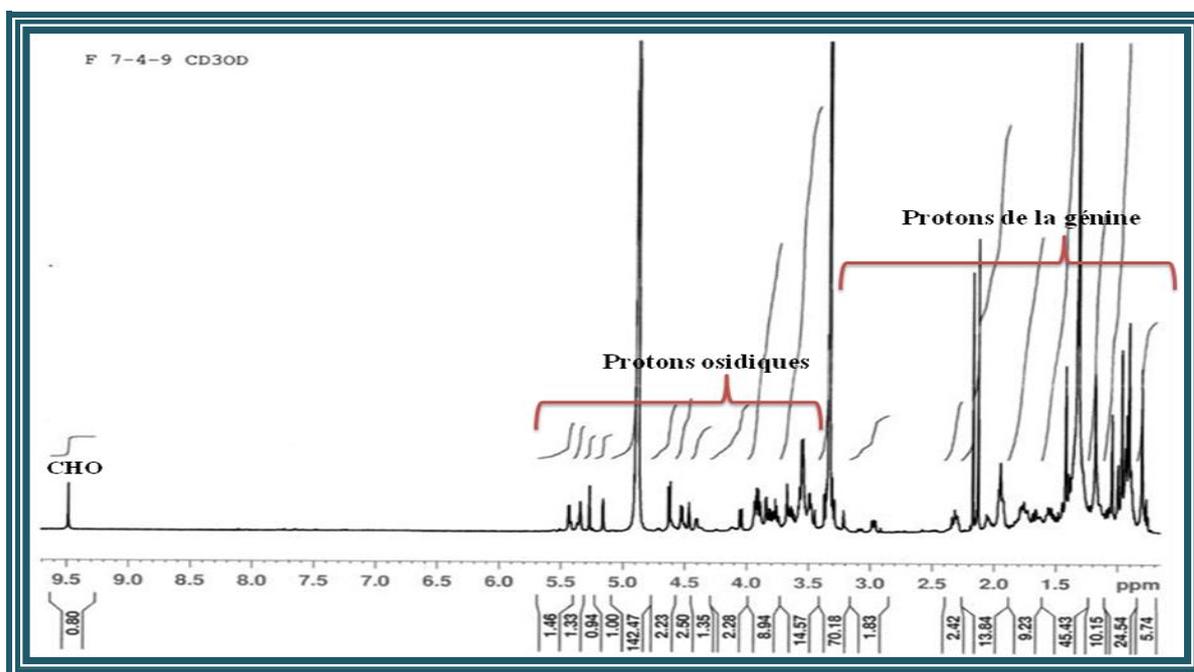
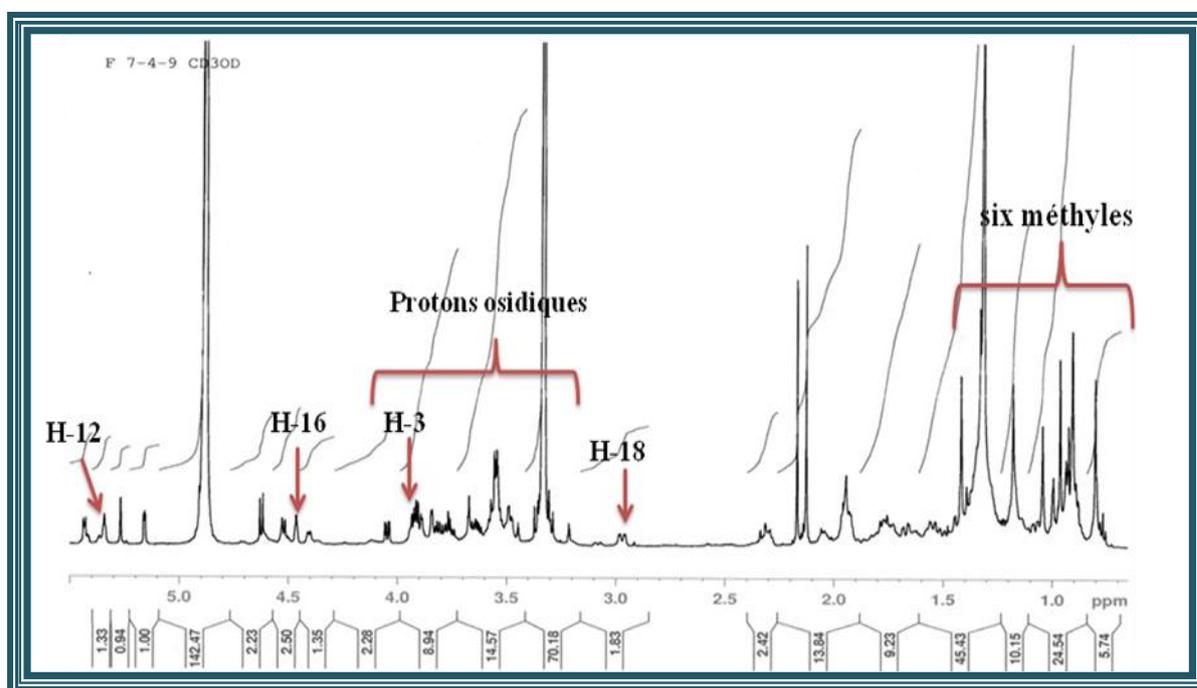
Cette formule est confirmée par le spectre de masse réalisé à haute résolution HR-ESIMS (Figure III.170) montrant un pic à  $m/z$  1341,5736 (calc.  $C_{62}H_{94}O_{30}Na$ , 1341,5728).



**Figure III.170: Spectre de masse HR-ESIMS du composé 14**

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (Figures III.171 et III.172) présentent des similitudes avec ceux des composés précédents **12** et **13**. Ils permettent de reconnaître quasiment tous les signaux de protons et carbones de la génine. En effet on identifie facilement :

- Les signaux des méthyles  $CH_3$ -24 [ $\delta_H$  1,17 (s)/  $\delta_C$  9,4],  $CH_3$ -25 [ $\delta_H$  1,04 (s)/  $\delta_C$  14,4],  $CH_3$ -26 [ $\delta_H$  0,8 (s)/  $\delta_C$  16,3],  $CH_3$ -27 [ $\delta_H$  1,39 (s)/  $\delta_C$  25,7],  $CH_3$ -29 [ $\delta_H$  0,9 (s) /  $\delta_C$  31,9] et  $CH_3$ -30 [ $\delta_H$  0,96 (s) /  $\delta_C$  23,4] ;
- Les signaux des protons et carbones de l'oxyméthine (H-3 et H-16) et de la double liaison (H-12) résonant respectivement à  $\delta_H$  3,92 (dd,  $J = 11,8 ; 5,6$  Hz)/  $\delta_C$  83,4; 4,46 (t,  $J = 3,8$  Hz)/ 73,2 et 5,32 (sl) /121,8.

Figure III.171: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 14Figure III.172: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 14

La différence notable entre le composé **14** et les saponines **12** et **13** réside dans l'apparition sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un signal déblindé d'intégration 1H résonant à  $\delta_{\text{H}}$  9,50 sous forme d'un singulet, et sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III.173) d'un signal extrêmement déblindé repéré à 209,2 ppm, correspondant à un groupement aldéhyde CHO.

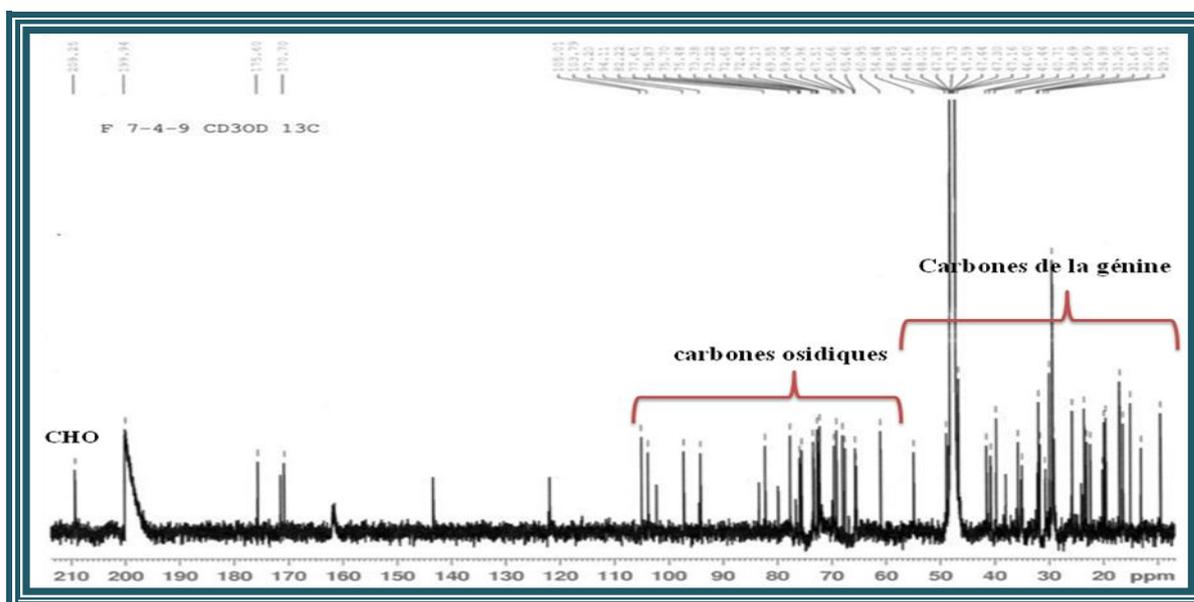


Figure III.173: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 14

L'attribution de ce groupement se fait par expérience HMBC (Figures III.174 et III.175) qui montre des corrélations en  $^3J_{\text{H-C}}$  entre le proton de cet aldéhyde et le groupement méthyle Me-24 et le carbone C-5 indiquant que le méthyle Me-23 est oxydé en aldéhyde -CHO.

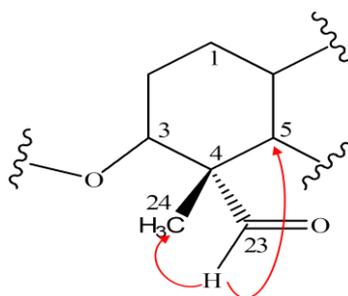


Figure III.174: Corrélations HMBC H-23/C-5 et H-23/C-24

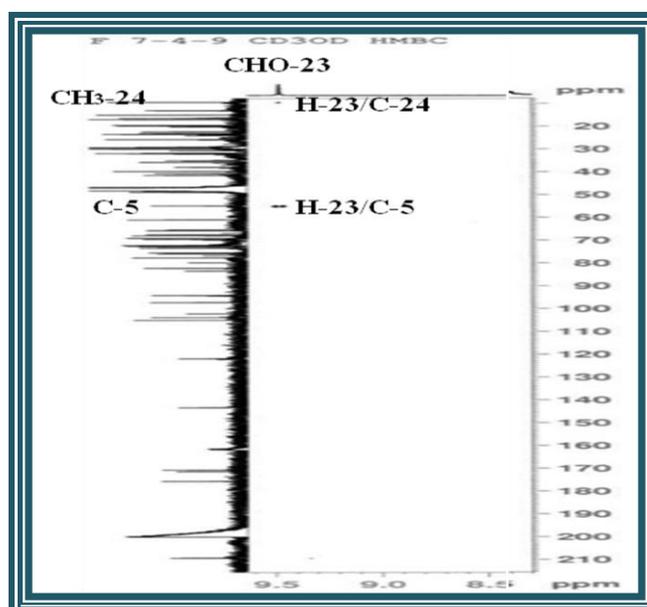
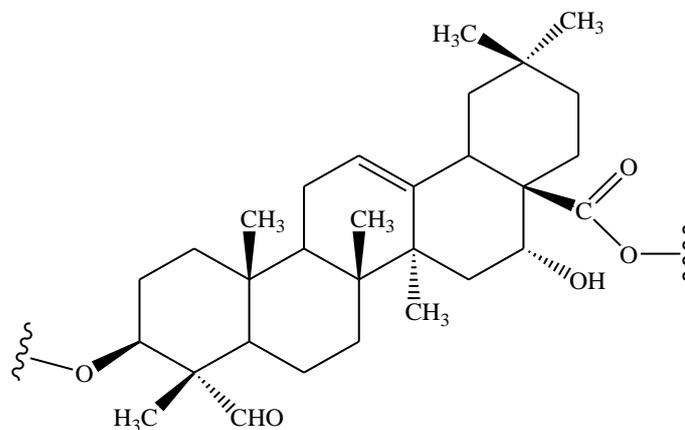


Figure III.175: Spectre HMBC du composé 14

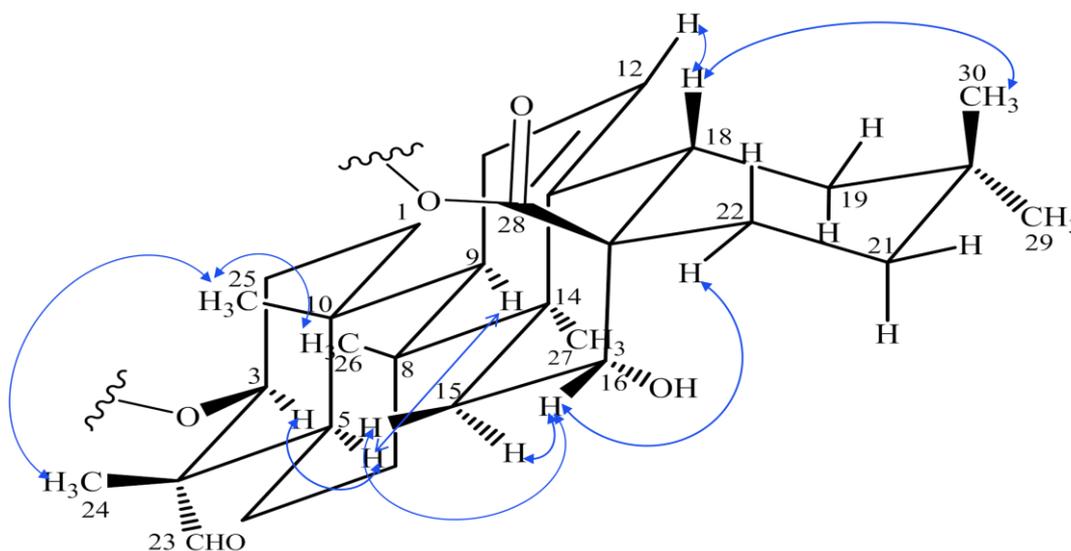
En plus le spectre RMN  $^1\text{H}$  permet de visualiser deux signaux singulets s'intégrant pour 3H chacun résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,12 et 2,18 attribuables à 2 groupements acétates.

Les expériences combinées HSQC *J*-modulé, COSY H-H et HMBC, permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques (Tableau III.14) des protons et carbones de la génine et d'attribuer sans ambiguïté à ce composé pour sa partie aglycone, la structure triterpénique suivante : Acide quillaique. <sup>[194]</sup>



**Acide quillaique**

La stéréochimie de la partie génine (acide quillaique) de ce composé a été établie par analyse des effets nOe observés sur le spectre NOESY (Figures III.176 et III.177). Cette expérience révèle les mêmes interactions constatées pour la génine acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique des deux saponines **12** et **13**.



**Figure III.176 : Corrélations NOESY de la génine**

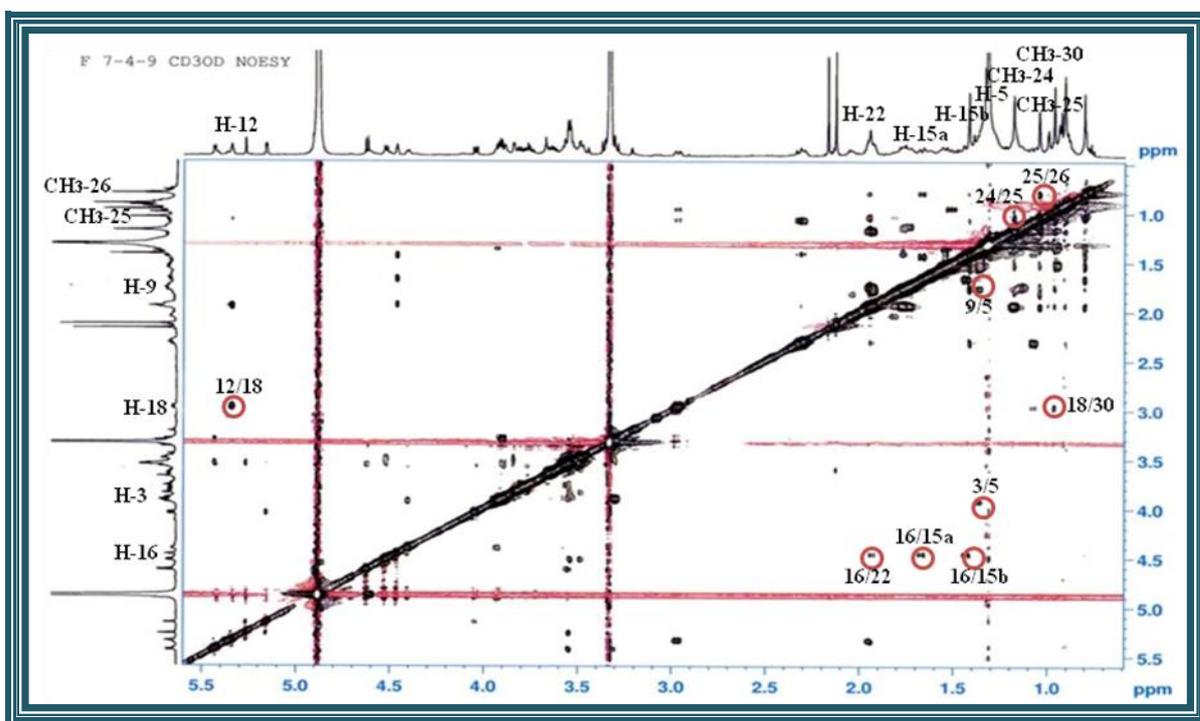


Figure III.177 : Spectre NOESY du composé 14

La partie osidique de ce saponoside est constituée de cinq unités osidiques dont les protons anomériques résonnent à  $\delta_H$  4,40 (*d*,  $J=7,4$  Hz), 4,52 (*d*,  $J=7,6$  Hz), 4,63 (*d*,  $J=7,7$  Hz), 5,28 (*d*,  $J=1,6$  Hz) et 5,45 (*d*,  $J=6,6$  Hz) (Figure III.178).

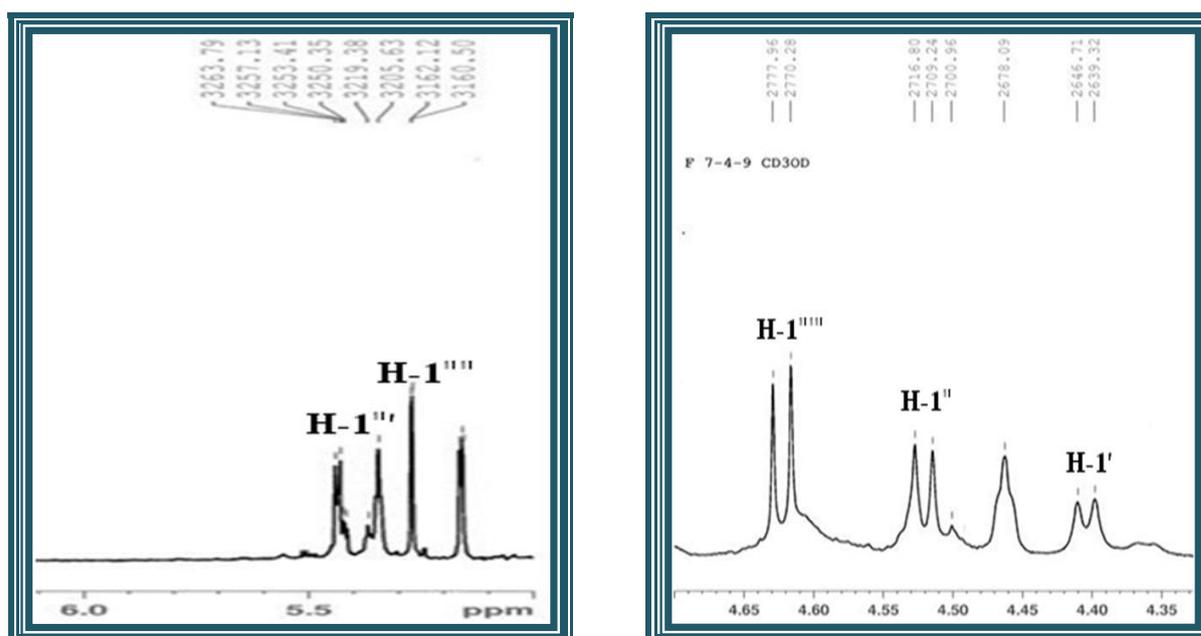


Figure III.178: Spectre RMN  $^1\text{H}$  des anomères du composé 14

L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.179) permet de détecter leurs carbones respectifs à  $\delta_C$  102,2; 103,8; 105; 97,2 et 94,1.

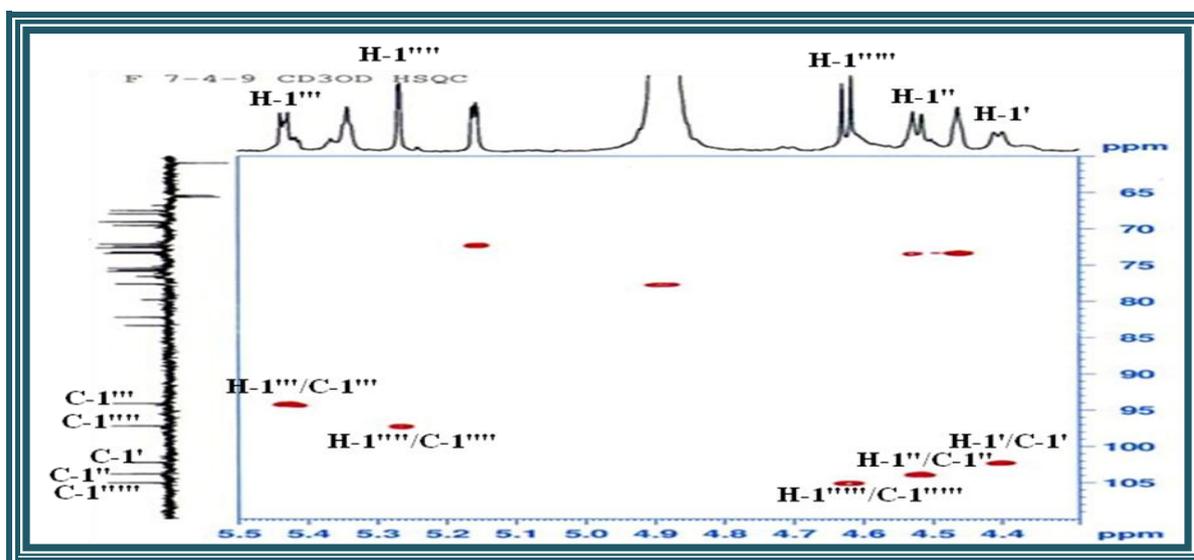


Figure III.179: Spectre HSQC des anomères du composé 14

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, NOESY et HSQC *J*-modulé du saponoside **14**, permet de déterminer la nature osidique des cinq systèmes de spins, en effet :

➤ Le premier système de spins correspond à l'acide glucuronique. Sa structure a été établie par analyse du spectre COSY et comparaison avec les deux saponines précédentes **12** et **13** ainsi qu'avec les données de la littérature. En partant du proton anomérique H-1' résonnant à  $\delta_H$  4,40 (*d*,  $J = 7,4$  Hz), les couplages suivants ont été observés :

- H-1'/H-2' [ $\delta_H$  3,50 (*m*) ] ;
- H-2'/H-3' [ $\delta_H$  3,57 (*m*) ] ;
- H-3'/H-4' [ $\delta_H$  3,50 (*m*) ] ;
- H-4'/H-5' [ $\delta_H$  3,54 (*m*) ].

Les atomes de carbone de l'acide  $\beta$ -D-glucuronique sont déterminés par analyse du spectre HSQC (Figure III.180).

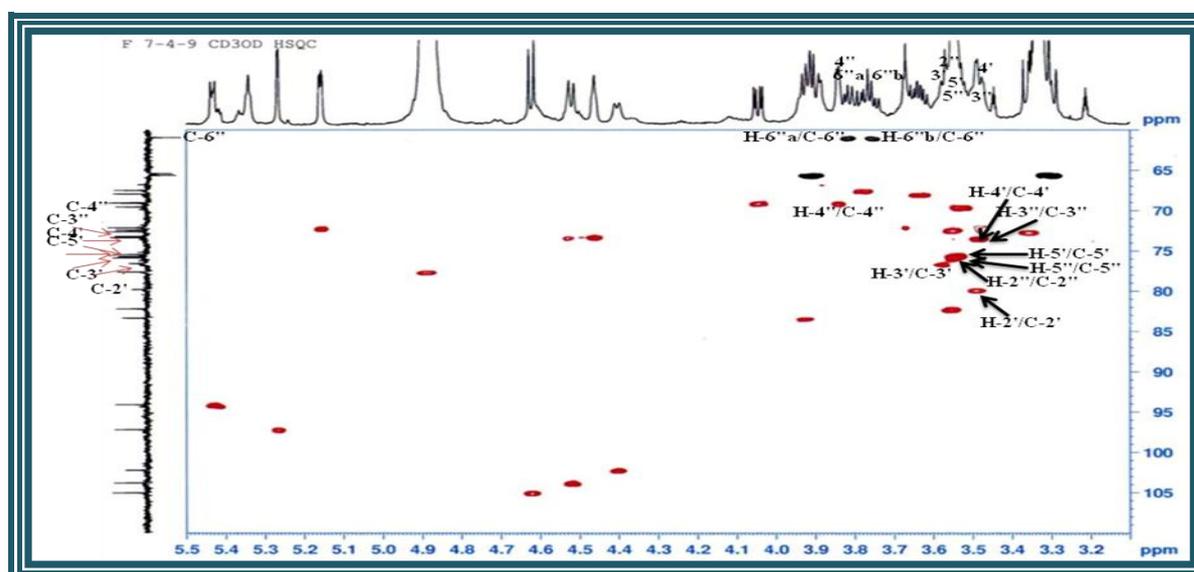


Figure III.180: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 14

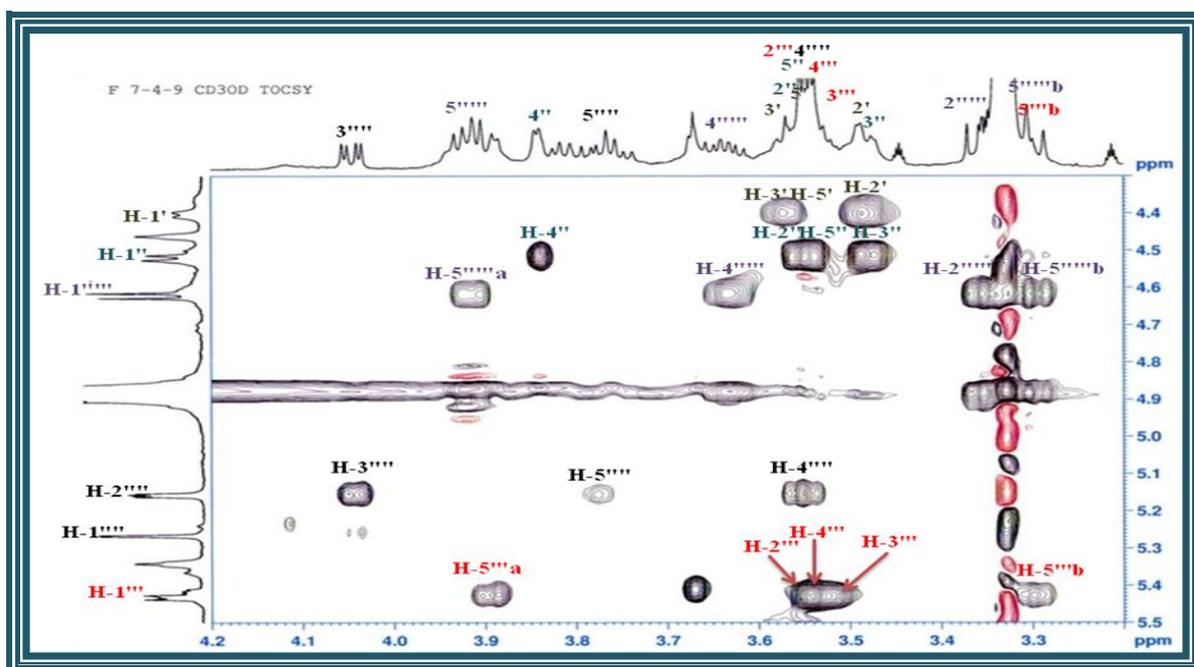


Figure III.181: Spectre TOCSY de la partie osidique du composé 14

- Un deuxième système de spins correspondant à un hexose est repéré sur les spectres COSY (Figures III.182.1 et III.182.2) et TOCSY (Figure III.181) à partir du proton anomérique H-1'' détecté à  $\delta_{\text{H}} 4,52$  (*d*,  $J = 7,6$  Hz). Cette analyse a été plus difficile du fait d'un très fort recouvrement de signaux des protons H-2'' ( $\delta_{\text{H}} 3,56$ ), H-3'' ( $\delta_{\text{H}} 3,48$ ) et H-5'' ( $\delta_{\text{H}} 3,54$ ), résonant tous sous forme de multiplets. Le proton H-4'' est détecté à  $\delta_{\text{H}} 3,84$  (*dl*,  $J = 3,2$  Hz). La faible valeur de la constante de couplage du proton H-4'' indique qu'il est en position équatoriale. Les protons H<sub>2</sub>-6'' sont localisés à partir de leurs corrélations sur le spectre COSY avec le proton H-5'' à  $\delta_{\text{H}} 3,82$  (*dd*,  $J = 11,4 ; 4,8$  Hz, H-6''a) et  $3,76$  (*dd*,  $J = 11,4 ; 5,8$  Hz, H-6''b). Cet hexose est identifié à un  $\beta$ -D-galactose. Les déplacements chimiques des atomes de carbone de ce sucre sont assignés par expérience HSQC (Figure III.181).

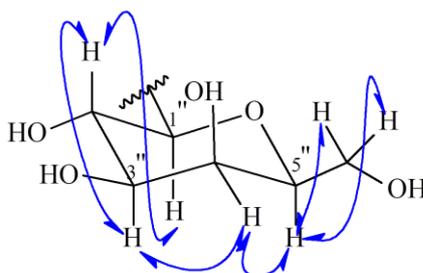


Figure III.182.1: Corrélations COSY du  $\beta$ -D-galactose

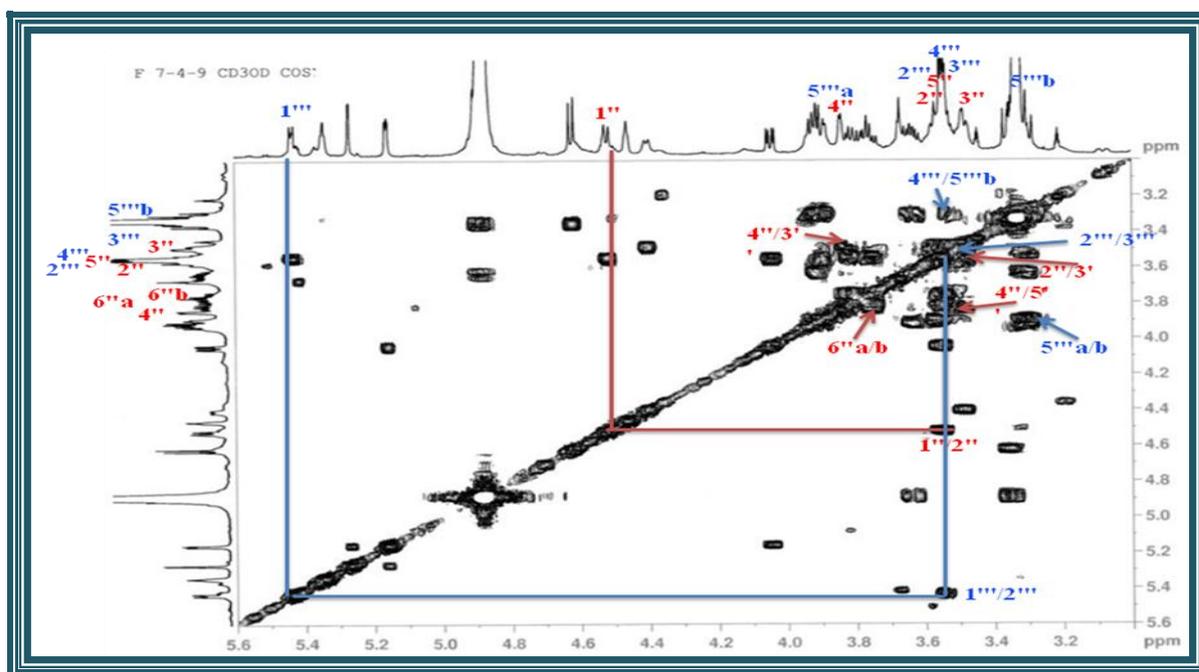
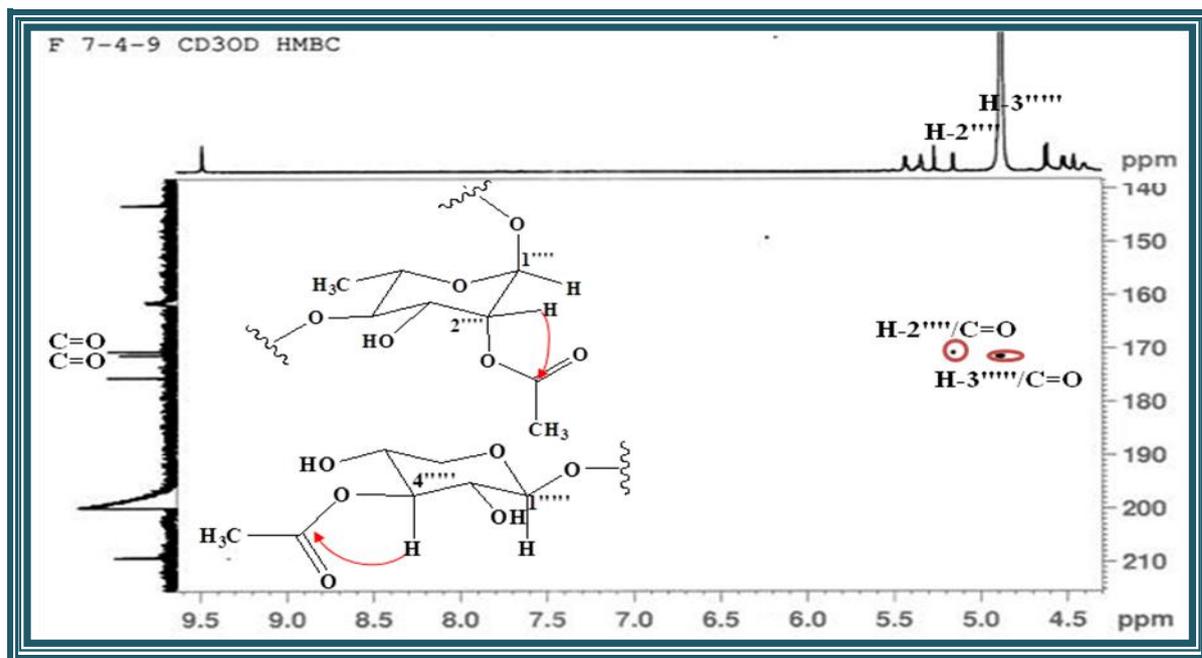


Figure III.182.2: Spectre COSY du galactose et xylose

- À partir du troisième proton anomérique résonant à  $\delta_H$  5,45 (*d*,  $J = 6,6$  Hz), un système de six spins couplés est observé sur les spectres COSY et TOCSY (Figures III.181 et III.182.2) correspondant à un pentose. Le proton H-2''' [ $\delta_H$  3,55 (*m*)] couple avec le proton H-3''' [ $\delta_H$  3,54 (*m*)]. Le proton H-4''' résonant à  $\delta_H$  3,55 (*m*) corrèle aussi avec les protons H<sub>2</sub>-5''' [ $\delta_H$  3,92 (*dl*,  $J = 6,2$  Hz), H-5'''a ; 3,32 (*m*) H-5'''b]. Leurs carbones sont déterminés par expérience HSQC. Ce pentose est identifié à un  $\beta$ -D-xylose. La configuration anomérique de ce sucre a été confirmée par l'observation sur le spectre NOESY d'effets nOe entre les protons H-1'''/H-5'''b (*ax*) (Figure III.188).
- Aussi, un autre système de spins à huit protons a été identifié à partir du proton anomérique H-1'''' résonant à  $\delta_H$  5,28 (*d*,  $J = 1,6$  Hz). L'analyse des spectres COSY et TOCSY permet d'attribuer tous les protons d'un 6-désoxyhexose. Le proton H-1'''' corrèle avec le proton H-2'''' [ $\delta_H$  5,15 (*dd*,  $J = 3,4 ; 1,6$  Hz)], lui-même couple avec le proton H-3'''' [ $\delta_H$  4,04 (*dd*,  $J = 9,4 ; 3,4$  Hz)]. La grande constante de couplage  $J = 9,4$  Hz indique que les protons H-3'''' et H-4'''' sont en position *trans*-diaxiale. Le proton H-4'''' résonne sous forme de multiplet à  $\delta_H$  3,54. Les protons H<sub>3</sub>-6'''' résonnent sous forme d'un doublet à  $\delta_H$  1,37, ils corrèlent par une constante de couplage  $J = 6,2$  Hz avec le proton H-5'''' repéré à  $\delta_H$  3,78 (*m*). Les constantes de couplage de ce 6-désoxyhexose indiquent qu'il s'agit d'un  $\alpha$ -L-rhamnose. Le proton H-2'''' ( $\delta_H$  5,15) de ce rhamnose est fortement déblindé. Cela suggère que l'hydroxyle en position 2'''' est estérifié. Sur le spectre HMBC (Figure III.183), une corrélation  $^3J_{H-C}$  est observée entre le proton H-2'''' et un carbonyle résonant

à  $\delta_C$  170,7 confirmant ainsi l'estérification de la position 2''' du rhamnose par un groupement acétate.



**Figure III.183: Spectre HMBC montrant les corrélations entre les groupements acétates et protons osidiques du composé 14**

Selon les spectres COSY et TOCSY, le dernier système de spins est un pentose dont l'anomère H-1''' résonne à  $\delta_H$  4,63 (*d*,  $J = 7,7$  Hz). Le proton H-2''' ( $\delta_H$  3,37) sous forme de multiplet corrèle avec le proton H-3''' ( $\delta_H$  4,84, *m*) lui-même couple avec le proton H-4''' résonnant sous forme d'un doublet de doublets dédoublés à  $\delta_H$  3,64 (*ddd*,  $J = 10,5 ; 9,1 ; 5,3$  Hz). Ce dernier corrèle avec deux protons géminés H<sub>2</sub>-5''' [ $\delta_H$  3,92 (*dd*,  $J = 11,8 ; 5,3$  Hz) H-5'''a et  $\delta_H$  3,32 (*m*) H-5'''b]. Les valeurs des constantes de couplage, toutes supérieures à 7 Hz indiquent une position *trans*-diaxiale de ces protons, caractéristiques d'un  $\beta$ -D-xylose. Le déblindage du proton H-3''' ( $\delta_H$  4,84) du  $\beta$ -D-xylose et le blindage des deux carbones voisins C-2''' et C-4''' (effet  $\gamma$  blindant) suggèrent que l'hydroxyle en position 3 est estérifié. Ceci est confirmé par expérience HMBC qui montre une corrélation entre le carbonyle du 2<sup>ème</sup> acétate ( $\delta_C$  171) et le proton H-3''' (Figure III.183).

L'analyse du spectre HMBC du composé 14 (Figures III.184, III.185 et III.186) montre des corrélations en  $^3J_{H-C}$  entre :

- H-1''' Xyl terminal/C-4''' Rha ;
- C-1''' Rha / H-2''' Xyl ;
- H-1'' Gal/ C-2' Ac. Gluc.

Ces corrélations permettent d'établir les liaisons interglycosydiques entre les différents sucres de cette saponine constituée de la génine acide quillaique et de deux chaînes osidiques attestant de sa nature bidesmosidique :

- $\beta$ -D-galactopyranose-(1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -D-glucuronopyranose

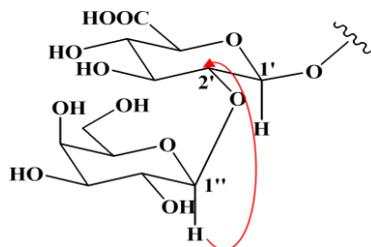


Figure III.184: Corrélation HMBC entre H-1'' du galactose et C-2' de l'acide glucuronique

- (3''''-O-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranose-(1'''' $\rightarrow$ 4'''')-(2''''-O-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose-(1'''' $\rightarrow$ 2'''')- $\beta$ -D-xylopyranose.

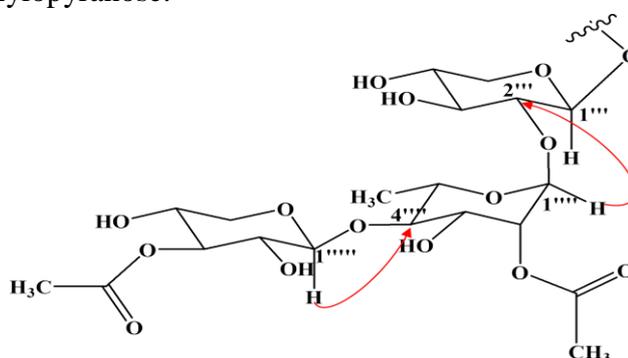


Figure III.185: Corrélations HMBC entre H-1'''' du xylose et C-2'''' de rhamnose et H-1'''' et C-2'''' du xylose

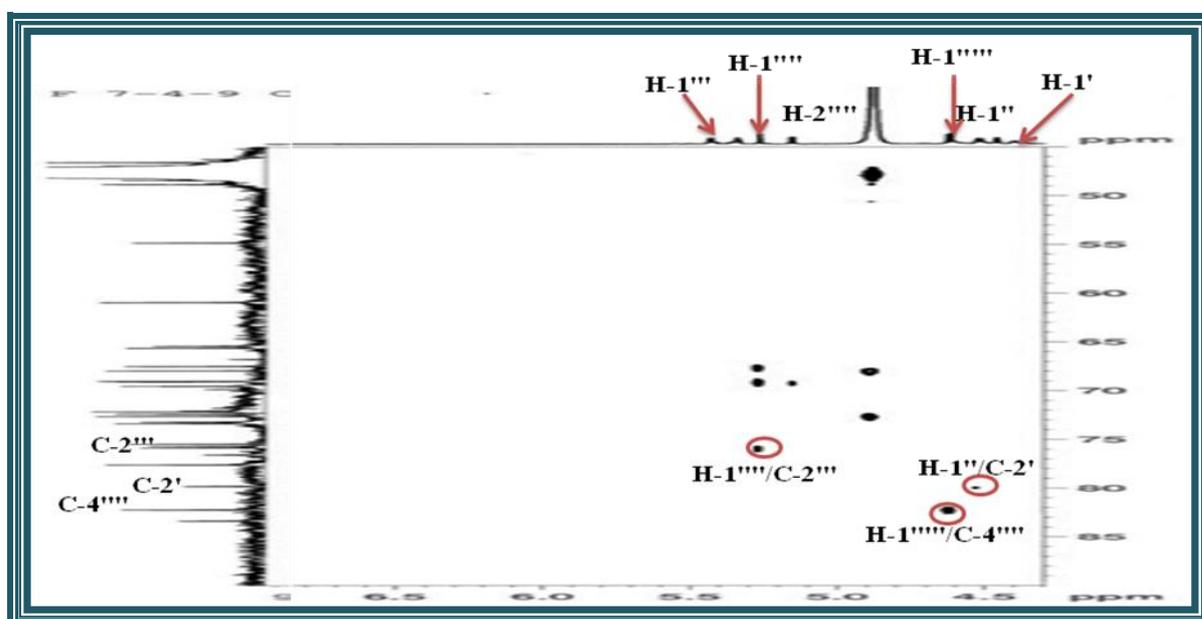


Figure III.186: Spectre HMBC montrant l'enchaînement des sucres du composé 14

Les séquences de la chaîne osidique liées aux carbones C-3 et C-28 de la génine sont faites par l'observation des effets nOe sur le spectre NOESY (Figures III.187 et III.188) entre les protons :

- H-1' Ac. gluc/H-3 de la génine,
- H-1'' Gal/H-2' Ac. gluc,
- H-1''' Rha /H-2''' Xyl,
- H-1'''' Xyl/H-4''''Rha.

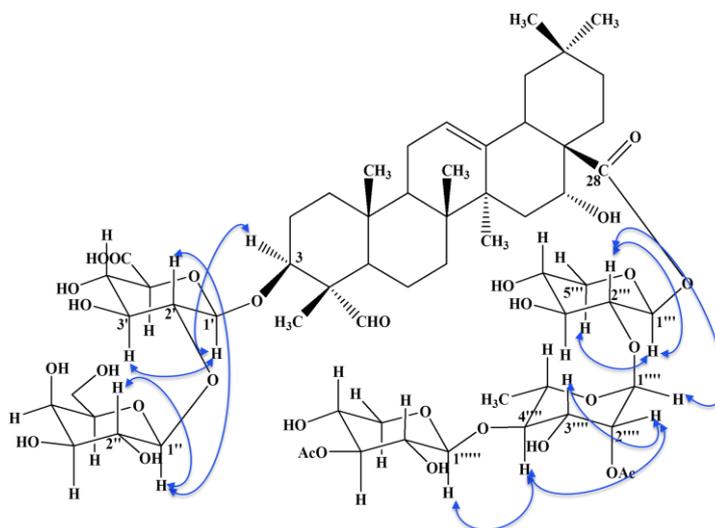


Figure III.187: Effets NOESY des unités osidiques

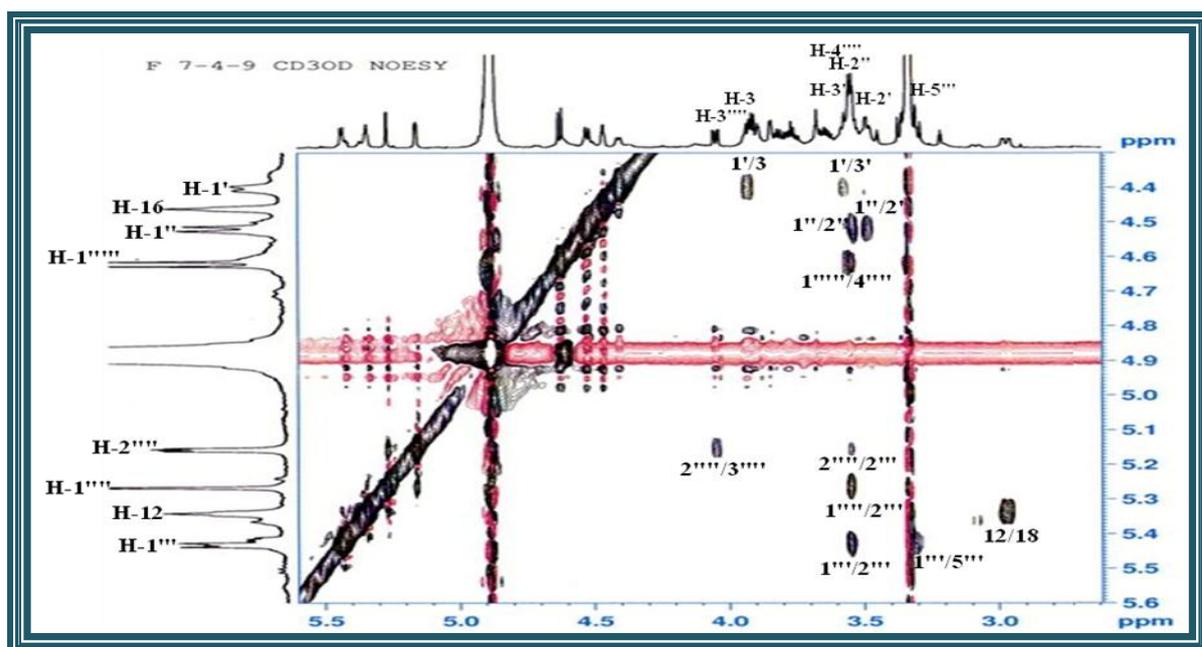


Figure III.188: Spectre NOESY de la partie osidique du composé 14

La mesure du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = -12,1^\circ$ ,  $C = 0,0019$  g/ml, MeOH), ainsi que les données spectrales (Tableau III.14) permettent d'attribuer la structure nouvelle suivante à la saponine **14** : Acide quillaïque 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')]- $\beta$ -D-

glucuronopyranosyl]-28-*O*-[[(3''''-*O*-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 4''')-((2''''-*O*-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 2''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl].

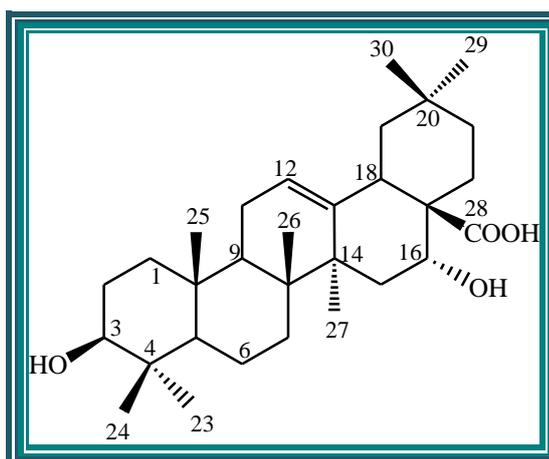
**Tableau III.14 : Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 14 dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                |
|----------|---------------------------|---|
| 1        | 37,9                      | 1,72 ( <i>m</i> ) H-1a<br>1,12 ( <i>m</i> ) H-1b                |
| 2        | 24                        | 2,05 ( <i>m</i> ) H-2a<br>1,82 ( <i>m</i> ) H-2b                |
| 3        | 83,4                      | 3,92 ( <i>dd</i> , 11,8; 5,6)                                   |
| 4        | 54,8                      | -   |
| 5        | 47,8                      | 1,35 ( <i>m</i> )   |
| 6        | 20,1                      | 1,50 ( <i>m</i> ) H-6a<br>0,93 ( <i>m</i> ) H-6b                |
| 7        | 32,1                      | 1,54 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,36 ( <i>m</i> ) H-7b                |
| 8        | 39,7                      | -   |
| 9        | 47,1                      | 1,74 ( <i>m</i> )   |
| 10       | 35,7                      | -   |
| 11       | 23                        | 1,96 ( <i>m</i> )   |
| 12       | 122,8                     | 5,32 ( <i>sl</i> )  |
| 13       | 143                       | -   |
| 14       | 41,4                      | -   |
| 15       | 35                        | 1,67 ( <i>dd</i> , 14,3 ; 3,2) H-15a<br>1,44 ( <i>m</i> ) H-15b |
| 16       | 73,2                      | 4,46 ( <i>t</i> , 3,8)  |
| 17       | 49                        | -   |
| 18       | 40,7                      | 2,97 ( <i>dd</i> , 14,4; 4,3)                                   |
| 19       | 47                        | 2,30 ( <i>m</i> ) H-19a<br>1,08 ( <i>dd</i> , 14,2; 3,2) H-19b  |
| 20       | 29,9                      | -   |
| 21       | 35,1                      | 1,94 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,18 ( <i>m</i> ) H-21b              |
| 22       | 30,6                      | 1,92 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,77 ( <i>m</i> ) H-22b              |
| 23       | 209,2                     | 9,50 ( <i>s</i> )   |
| 24       | 9,4                       | 1,17 ( <i>s</i> )   |
| 25       | 14,4                      | 1,04 ( <i>s</i> )   |
| 26       | 16,3                      | 0,80 ( <i>s</i> )   |
| 27       | 25,7                      | 1,42 ( <i>s</i> )   |
| 28       | 175,6                     | -   |
| 29       | 31,9                      | 0,90 ( <i>s</i> )   |
| 30       | 23,4                      | 0,96 ( <i>s</i> )   |

| position            | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)  |
|---------------------|------------------|--|
| 3-Ac. glu           |                  |  |
| 1'                  | 102,2            | 4,40 ( <i>d</i> , 7,7)   |
| 2'                  | 79,8             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 3'                  | 76,6             | 3,57 ( <i>m</i> )  |
| 4'                  | 73,6             | 3,50 ( <i>m</i> )  |
| 5'                  | 75,5             | 3,54 ( <i>m</i> )  |
| 6'                  | 175,6            | -  |
| 2'-Galc             |                  |  |
| 1''                 | 103,8            | 4,52 ( <i>d</i> , 7,6)   |
| 2''                 | 75,8             | 3,56 ( <i>m</i> )  |
| 3''                 | 73,6             | 3,48 ( <i>m</i> )  |
| 4''                 | 69               | 3,84 ( <i>dl</i> , 3,2)  |
| 5''                 | 75,2             | 3,54 ( <i>m</i> )  |
| 6''                 | 60,1             | 3,82 ( <i>dd</i> , 11,4 ; 4,8) H-6''a<br>3,76 ( <i>dd</i> , 11,4 ; 5,8) H-6''b |
| 28-Xyl              |                  |  |
| 1'''                | 94,1             | 5,45 ( <i>d</i> , 6,6)   |
| 2'''                | 72,4             | 3,55 ( <i>m</i> )  |
| 3'''                | 75,2             | 3,54 ( <i>m</i> )  |
| 4'''                | 69,6             | 3,55 ( <i>m</i> )  |
| 5'''                | 65,4             | 3,92 ( <i>dl</i> , 6) H-5'''a<br>3,32 ( <i>m</i> ) H-5'''b                     |
| 2'''-Rha            |                  |  |
| 1''''               | 97,2             | 5,28 ( <i>d</i> , 1,6)   |
| 2''''               | 72,4             | 5,12 ( <i>dd</i> , 3,4 ; 1,6)  |
| 3''''               | 69,1             | 4,04 ( <i>dd</i> , 9,4 ; 3,4)  |
| 4''''               | 82,2             | 3,54 ( <i>m</i> )  |
| 5''''               | 67,5             | 3,78 ( <i>m</i> )  |
| 6''''               | 16,9             | 1,37 ( <i>d</i> , 6,2)   |
| 2''''-CO            | 170,7            | -  |
| CH <sub>3</sub> -CO | 19,5             | 2,12 ( <i>s</i> )  |
| 4''''-Xyl           |                  |  |
| 1'''''              | 105              | 4,63 ( <i>d</i> , 7,7)   |
| 2'''''              | 72,4             | 3,37 ( <i>m</i> )  |
| 3'''''              | 77,6             | 4,84 ( <i>m</i> )  |
| 4'''''              | 67,5             | 3,64 ( <i>ddd</i> , 10,5 ; 9,1 ; 5,3)  |
| 5'''''              | 65,6             | 3,92 ( <i>dd</i> , 11,8 ; 5,3)<br>3,32 ( <i>m</i> )                            |
| 3'''''-CO           | 171              | -  |
| CH <sub>3</sub>     | 19,8             | 2,18 ( <i>s</i> )  |

## III-4-4-3 Caractérisation des triterpènes

## III-4-4-3-1 Elucidation structurale du composé 15



Acide echinocystique (15)

Le composé **15** nommé acide echinocystique est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Il est invisible à la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en violet après révélation de sa CCM avec une solution acide et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **15** (Figure III.189) obtenu par ionisation douce en mode positif révèle un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  495, soit une masse moléculaire  $M = 472$  uma correspondant à la formule  $C_{30}H_{48}O_4$ .

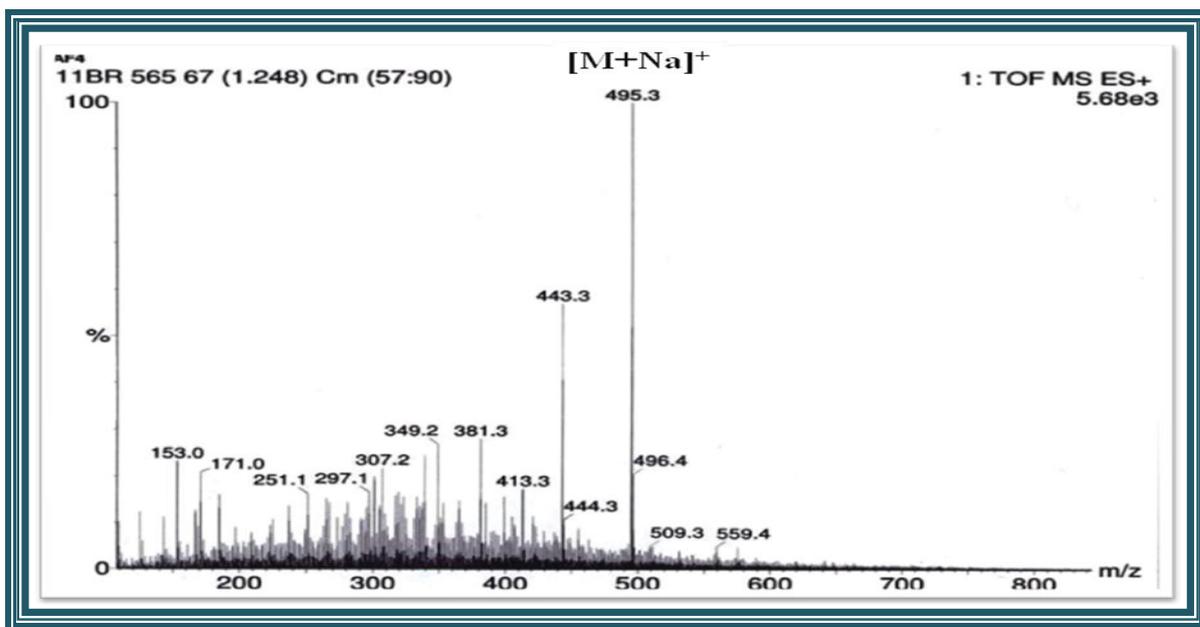


Figure III.189: Spectre de masse ESI-MS du composé 15

L'analyse du spectre RMN  $^1H$  (Figure III.190) de ce composé, enregistré dans un mélange  $CDCl_3/CD_3OD$ , montre dans la région blindée sept singulets fins (Figure III.191), s'intégrant

pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à  $\delta_H$  0,93 (CH<sub>3</sub>-23), 0,71 (CH<sub>3</sub>-24), 0,88 (CH<sub>3</sub>-25), 0,74 (CH<sub>3</sub>-26), 1,27 (CH<sub>3</sub>-27), 0,86 (CH<sub>3</sub>-29) et 0,91 (CH<sub>3</sub>-30) correspondant aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique. Le squelette de base de ce type de composé renferme 8 méthyles angulaires mais l'observation uniquement de sept groupements méthyles indique que l'un d'entre eux a été oxydé. Ceci est supporté par la présence sur le spectre RMN <sup>13</sup>C d'un carbonyle acide à 178 ppm (Figure III.193).

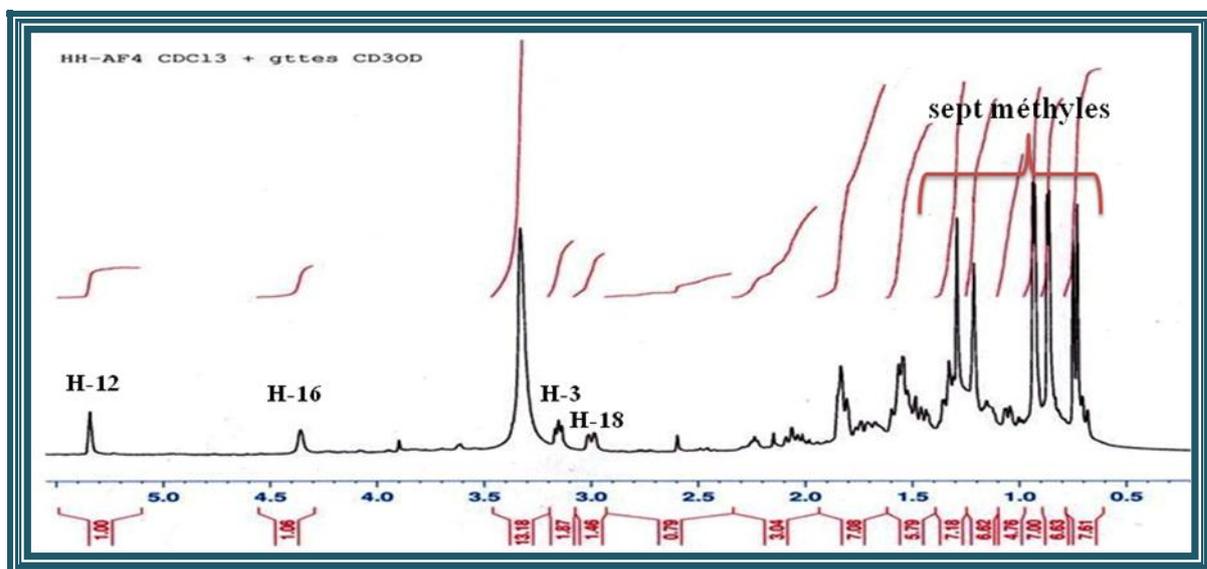


Figure III.190: Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 15

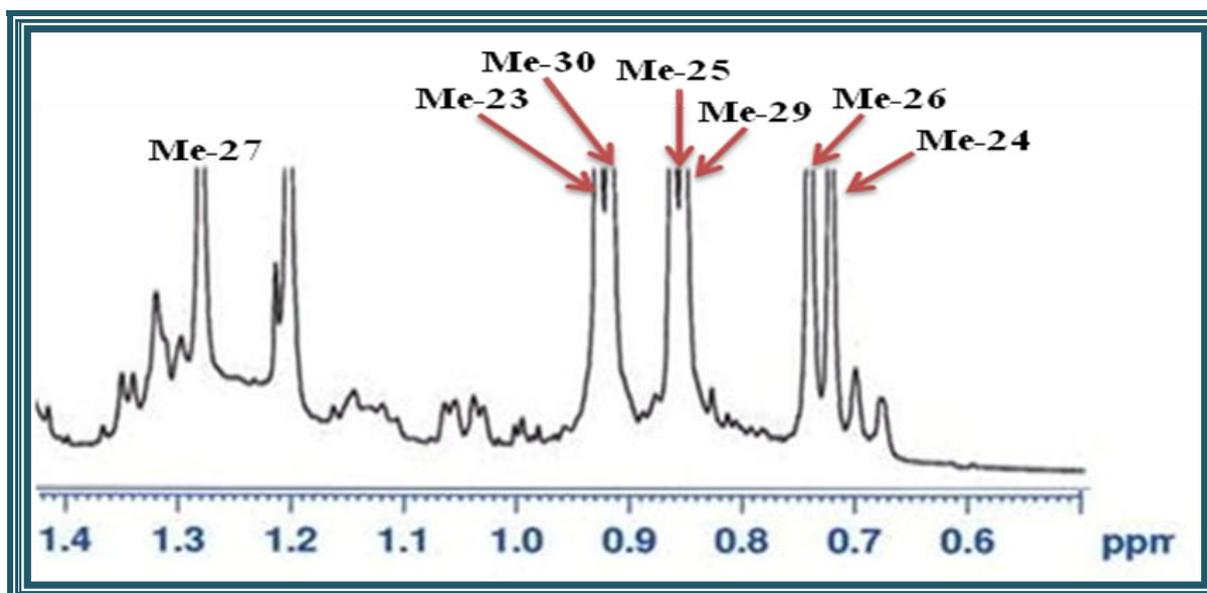


Figure III.191: Spectre RMN <sup>1</sup>H des méthyles du composé 15

De plus, on observe un massif de protons résonant entre 0,80 à 2,20 ppm correspondant aux CH et CH<sub>2</sub>, et trois signaux à  $\delta_H$  5,20 (1H, *t*, *J* = 3,5 Hz), 3,18 (1H, *dd*, *J* = 13,6 ; 4 Hz) et

3,00 (1H, *dd*,  $J = 10,1 ; 4$  Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18, des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène. Le déplacement chimique du proton H-18 ( $\delta_H$  3,00, *dl*,  $J = 13,6$  Hz) est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

L'analyse des couplages hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  visualisés sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.192) permet d'identifier les carbones C-12 ( $\delta_C$  122,5), C-3 ( $\delta_C$  78,7) et C-18 ( $\delta_C$  40,7).

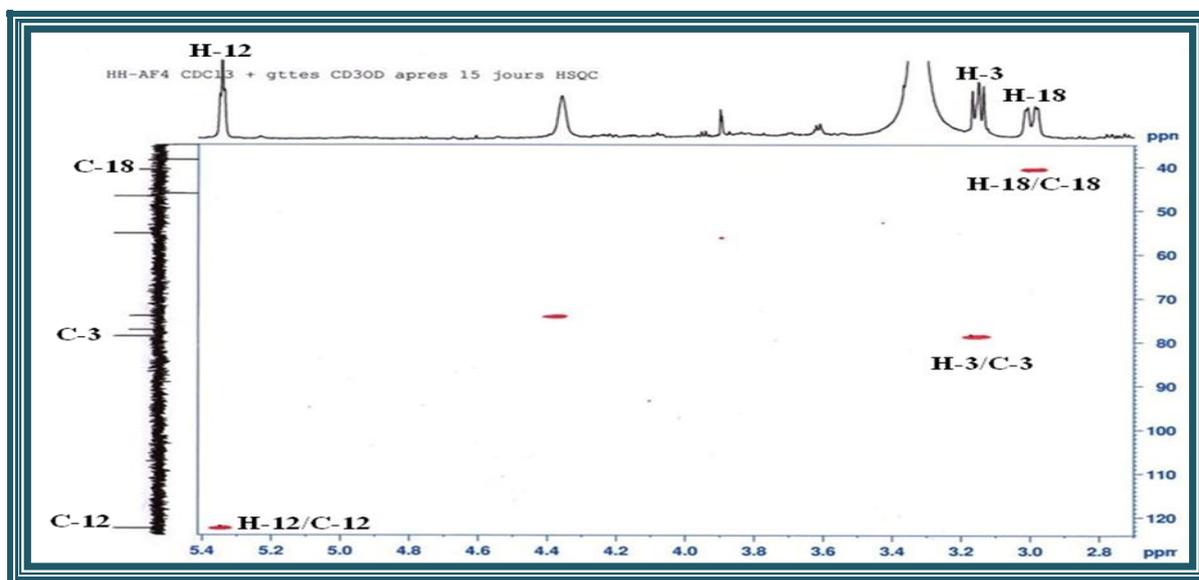


Figure III.192: Spectre HSQC montrant C-3, C-12 et C-18

Le spectre RMN  $^{13}C$  *J*-modulé (Figure III.193) et DEPT (Figure III.194) révèlent nombreux signaux correspondant à sept méthyles, neuf méthylènes, six méthines et huit atomes de carbone quaternaires, soit au total 30 atomes de carbone, confirmant ainsi la nature triterpénique de ce composé.

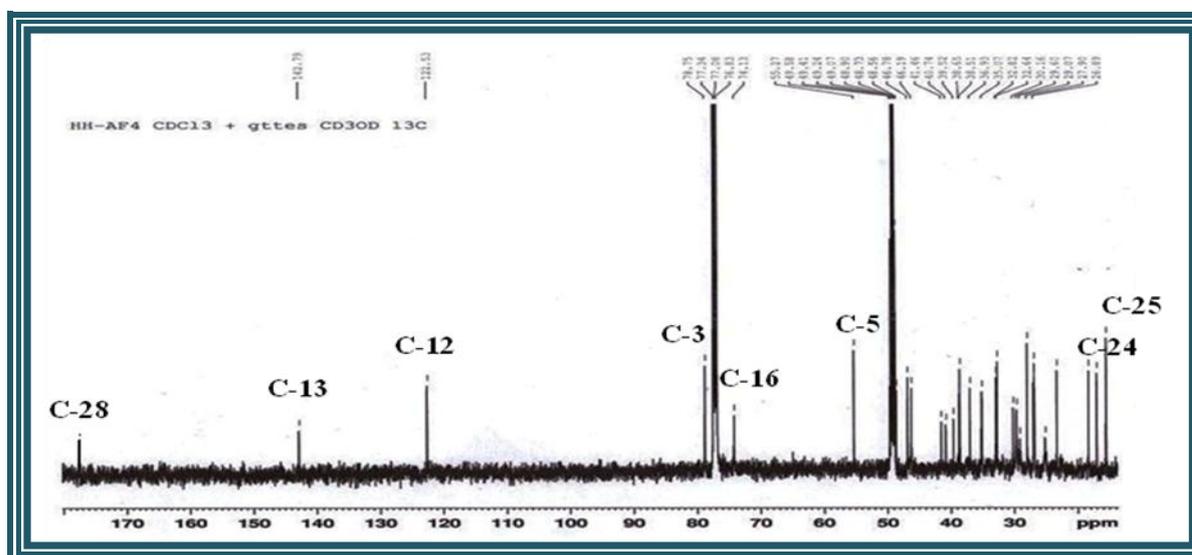


Figure III.193: Spectre RMN  $^{13}C$  composé 15

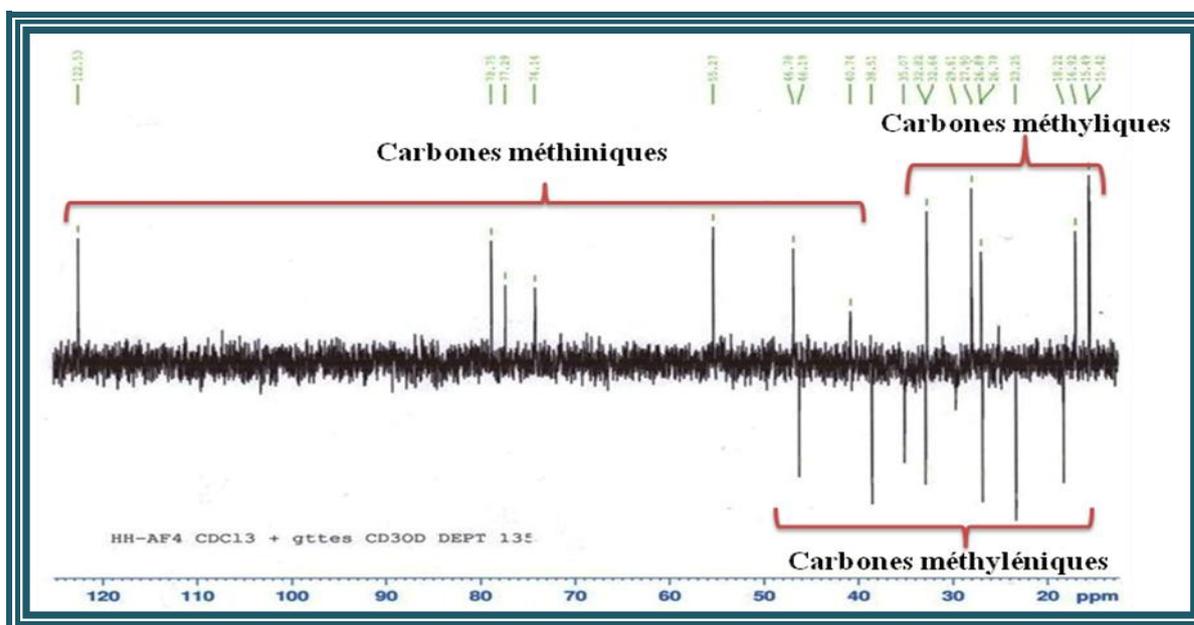


Figure III.194: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé DEPT 135 du composé 15

A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H (Figures III.195 et III.196) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons de la génine triterpénique. On reconnaît entre autres:

- Les deux protons H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_{\text{H}}$  1,55) à partir de leurs corrélations avec le proton H-3 connu ;
- Les protons H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_{\text{H}}$  1,58; 0,92) couplant avec les protons H<sub>2</sub>-2 ;
- Les protons H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_{\text{H}}$  1,84) à partir de leurs couplages avec le proton éthylénique H-12 ;
- Le proton H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  1,54) corrélant avec les protons H<sub>2</sub>-11 ;
- Les deux protons géminés H<sub>2</sub>-19 ( $\delta_{\text{H}}$  2,05; 1,05) présentant des couplages avec H-18.

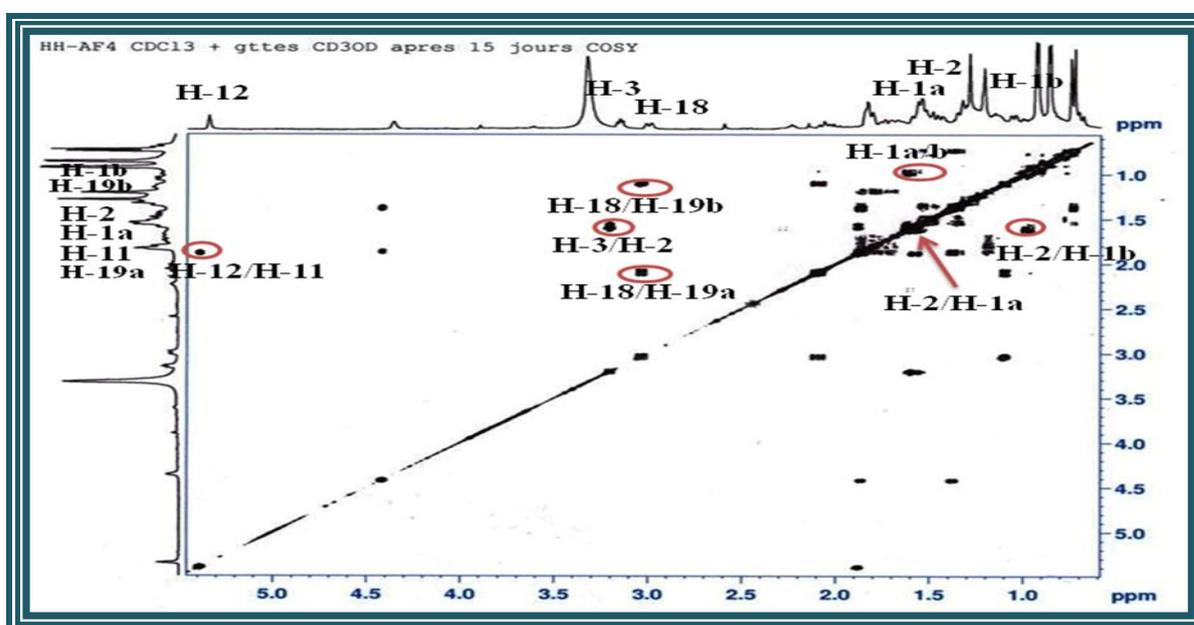


Figure III.195: Spectre COSY du composé 15

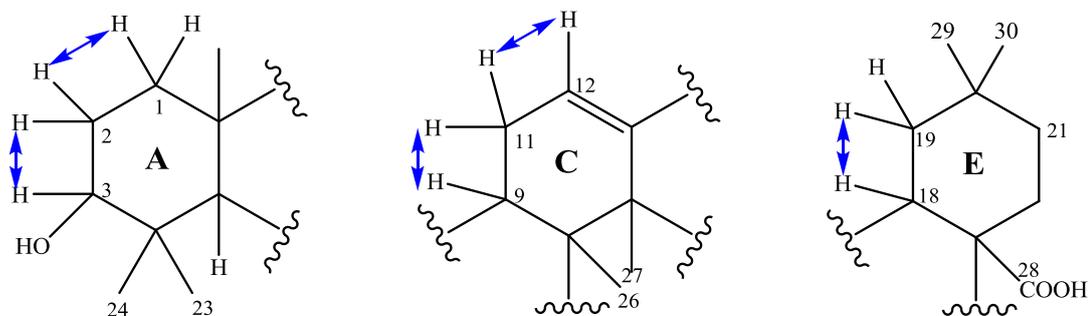


Figure III.196: Couplages COSY

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-1, C-2, C-9, C-11 et C-19 à  $\delta_c$  38,5 ; 26,8 ; 46,8 ; 23,2 et 46,2 respectivement (Figures III.197 et III.198).

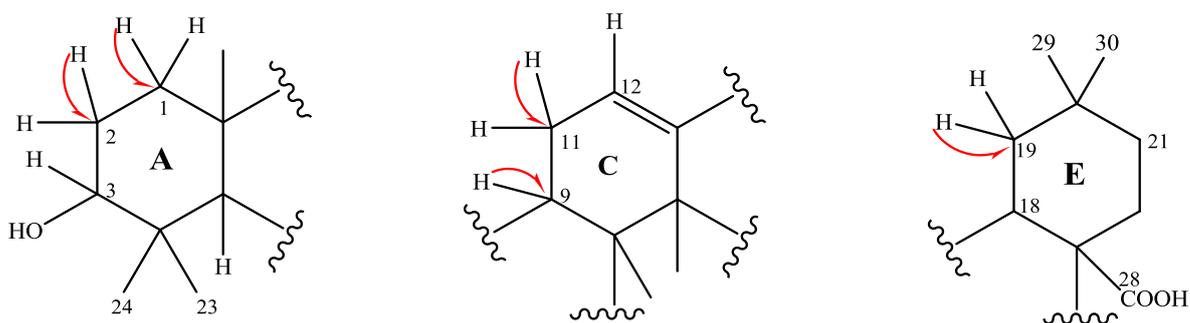


Figure III.197: Corrélations HSQC

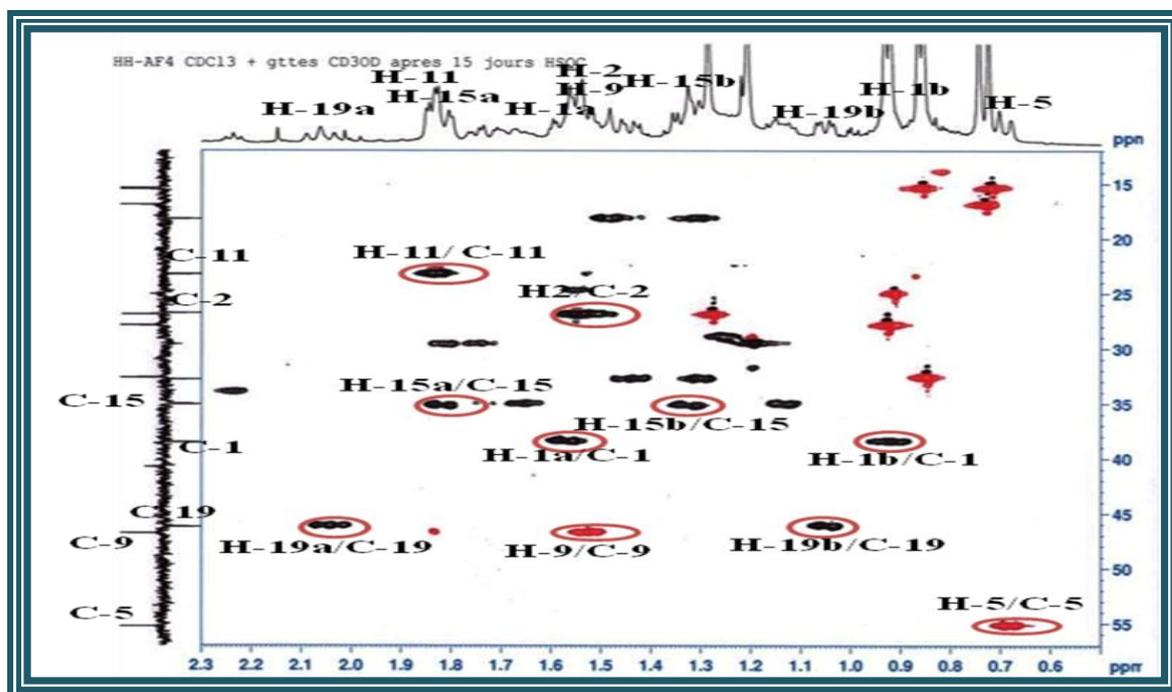


Figure III.198: Spectre HSQC du composé 15

L'élucidation structurale du composé **15** est initiée à partir du carbone C-3 connu. En effet, les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-23 ( $\delta_H$  0,93) et CH<sub>3</sub>-24 ( $\delta_H$  0,71) sont repérés suite aux corrélations qu'ils présentent sur le spectre HMBC (Figures III.199 et III.200) avec le carbone oxyméthine C-3. Ils corréleront également avec 2 carbones détectés à  $\delta_C$  55,5 et 38,6 correspondant aux carbones C-5 et C-4 respectivement.

Les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-25 ( $\delta_H$  0,88) couplent avec les carbones C-1, C-5 déjà assignés et avec deux autres carbones un CH-9 connu et un quaternaire C-10 ( $\delta_C$  36,9). Le spectre HSQC *J*-modulé permet d'attribuer le proton H-5 à  $\delta_H$  0,68 sous forme d'un doublet large ( $J = 11,4$  Hz).

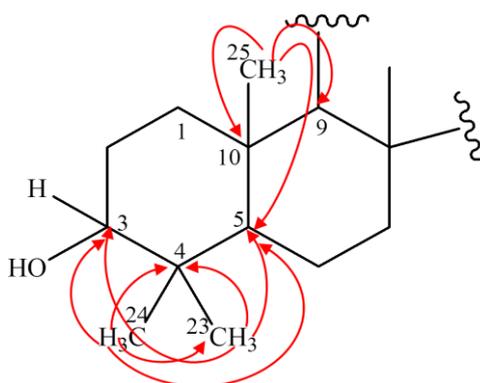


Figure III.199: Corrélations HMBC des Me-23, 24 et 25

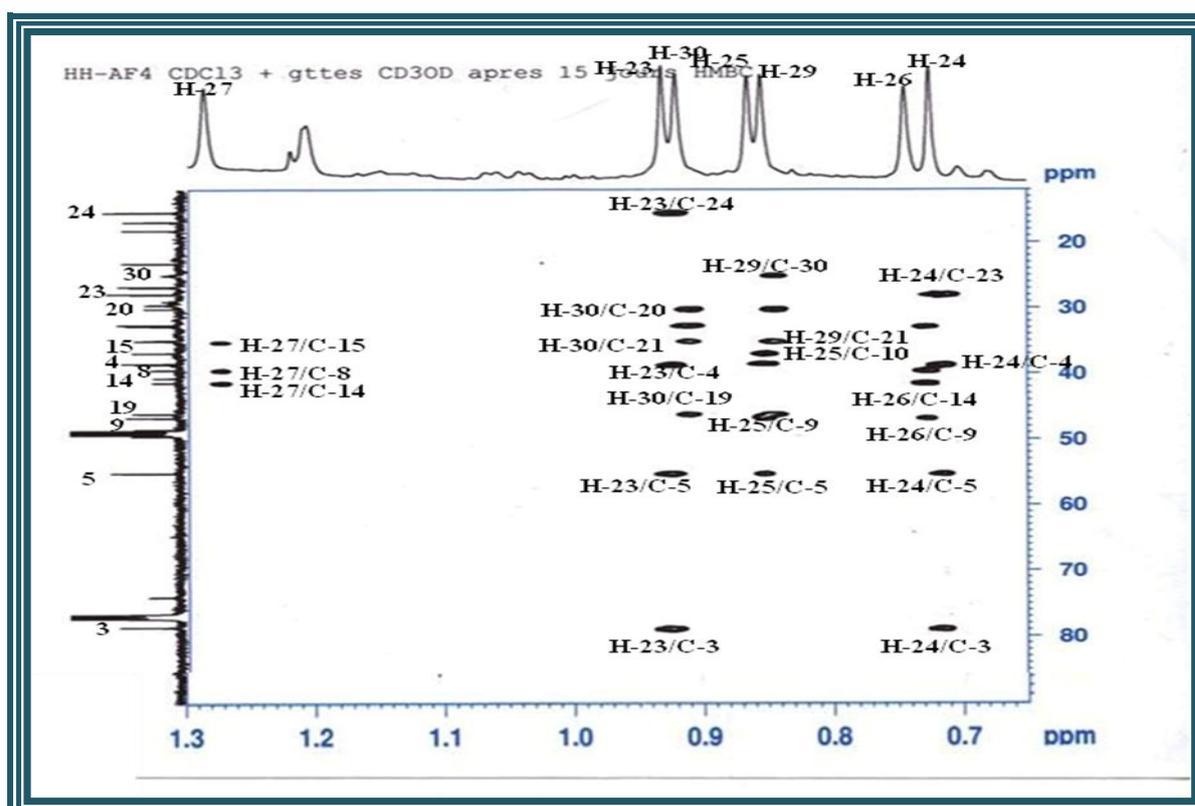


Figure III.200: Spectre HMBC du composé **15** (partie des méthyles)

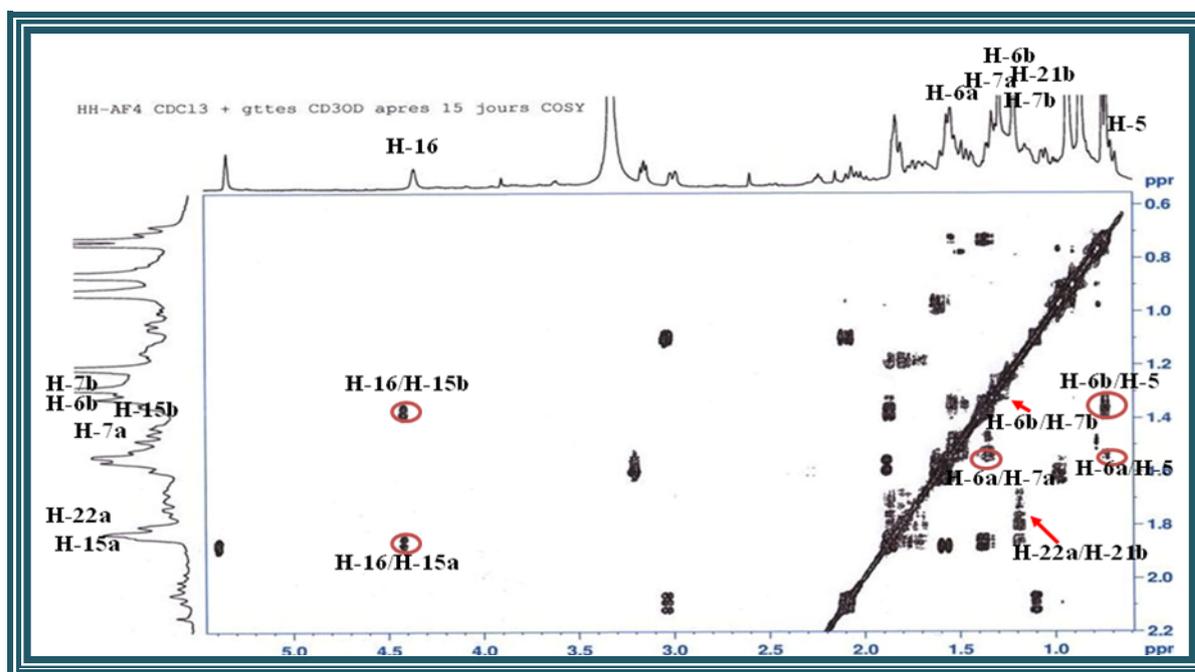


Figure III.201: Spectre COSY du composé 15

A partir du proton H-5, le spectre COSY (Figures III.201 et III.202) montre un système de spins à 5 protons révélant les couplages entre le proton H-5 et les protons H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_H$  1,78; 1,22). Ces derniers corrélient à leur tour avec deux protons voisins résonant à ( $\delta_H$  1,45; 1,32) ne pouvant être que les protons H<sub>2</sub>-7, dont les carbones sont assignés à  $\delta_C$  18,2 (C-6) et 32,8 (C-7) selon le spectre HSQC *J*-modulé.

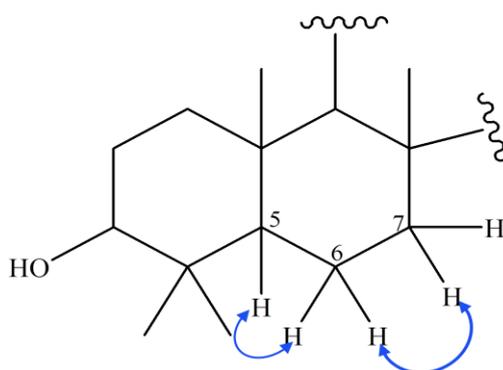


Figure III.202: Couplages des protons H-5, H<sub>2</sub>-6 et H<sub>2</sub>-7

Le CH<sub>3</sub>-26 ( $\delta_H$  0,74) est identifié suite aux couplages qu'ils présentent sur le spectre HMBC avec les carbones C-7 et C-9 déjà attribués, et deux carbones quaternaires C-8 ( $\delta_C$  39,5) et C-14 ( $\delta_C$  41,5). Le carbone C-14 identifié suite à la corrélation qu'il présente en HMBC avec le proton H-12, corrélie avec un autre groupement méthyle correspondant au méthyle Me-27 ( $\delta_H$  1,27). Ce dernier couple avec les carbones aliphatiques C-8, C-15 ainsi qu'avec un carbone éthylénique quaternaire C-13 (Figure III.203). Ces carbones résonnent à  $\delta_C$  35,1 (C-15) et 142,8 (C-13).

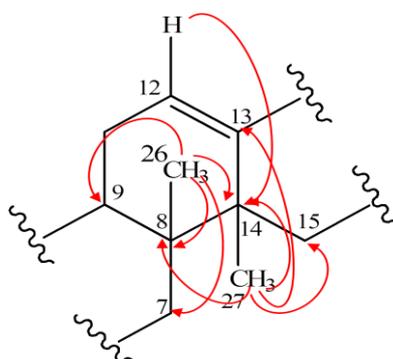


Figure III.203 : Couplages HMBC en  $^2J_{H/C}$  et  $^3J_{H/C}$  des méthyles 26 et 27

Il est facile de caractériser les  $CH_3$ -29 ( $\delta_H$  0,86) et  $CH_3$ -30 ( $\delta_H$  0,91) sur le spectre HMBC (Figure III.200) à partir du carbone C-19. Ces méthyles corréleront aussi avec les carbones C-20 ( $\delta_C$  30,2) et C-21 ( $\delta_C$  35,1). Les protons  $H_2$ -21 ( $\delta_H$  1,65; 1,14) localisés par analyse du spectre HSQC couplent en COSY avec deux protons correspondant aux protons géminés  $H_2$ -22 ( $\delta_H$  1,78; 1,22), leur carbone est repéré par expérience HSQC à  $\delta_C$  29,6.

Le spectre COSY (Figure III.201) montre les corrélations entre les protons  $H_2$ -15 ( $\delta_H$  1,82; 1,35) et le proton H-16 qui résonne à  $\delta_H$  4,40, son déplacement chimique indique qu'il est lié un groupement attracteur ne pouvant être que le groupement hydroxyle selon le spectre de masse. Son carbone est repéré à  $\delta_C$  74,1 grâce à l'analyse du spectre HSQC. Ce carbone montre des corrélations avec les protons  $H_2$ -22 et  $H_2$ -15 sur le spectre HMBC (Figure III.204).

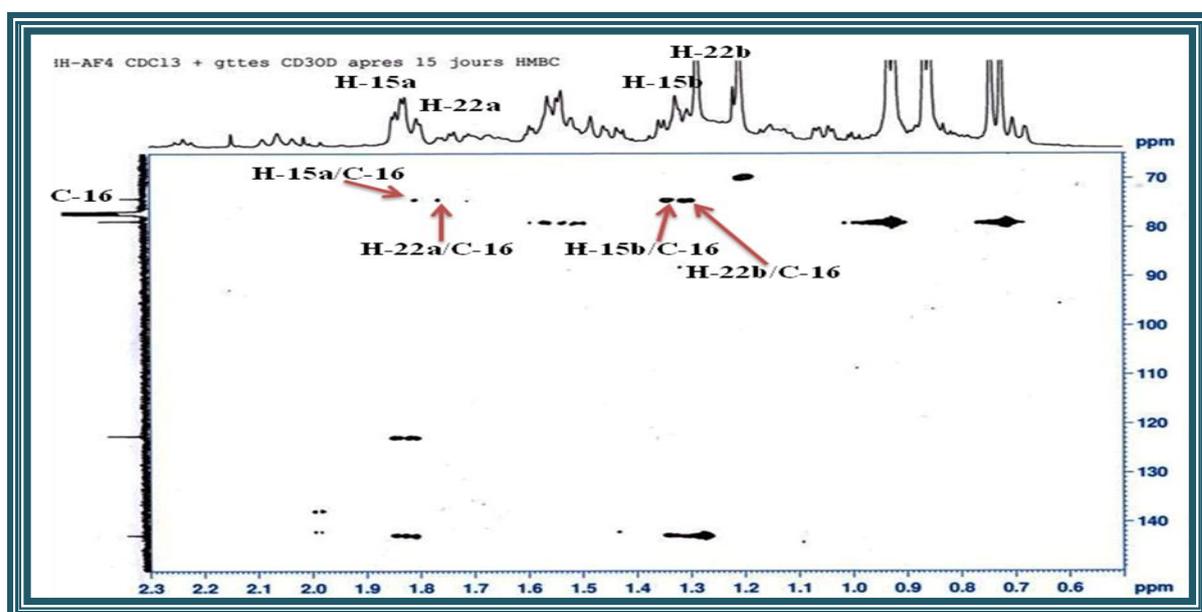


Figure III.204: Spectre HMBC du composé 15

A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones de ce composé sont attribués (Tableau III.15).

La stéréochimie des différents carbones asymétriques du composé **15** est établie par analyse du spectre NOESY et mesure des constantes de couplage. Ce spectre montre des corrélations sur la face  $\alpha$  entre : H-3/H-5 ; H-3/CH<sub>3</sub>-23 ; H-5/H-9 ; H-5/CH<sub>3</sub>-23 et CH<sub>3</sub>-27/H-9 et sur la face  $\beta$  entre : H-18/H-12 ; H-18/CH<sub>3</sub>-30, CH<sub>3</sub>-24/CH<sub>3</sub>-25 et CH<sub>3</sub>-25/CH<sub>3</sub>-26 (Figures III.205 et III.206). L'absence d'effet nOe entre les protons du méthyle Me-27 d'orientation  $\alpha$  avec le proton H-16 indique une orientation  $\alpha$ -équatoriale de ce proton. La multiplicité du proton H-16 sous forme de singulet large et l'effet nOe observé entre ce proton et H-22a (eq) confirment la configuration  $\beta$ -orientée du proton H-16.

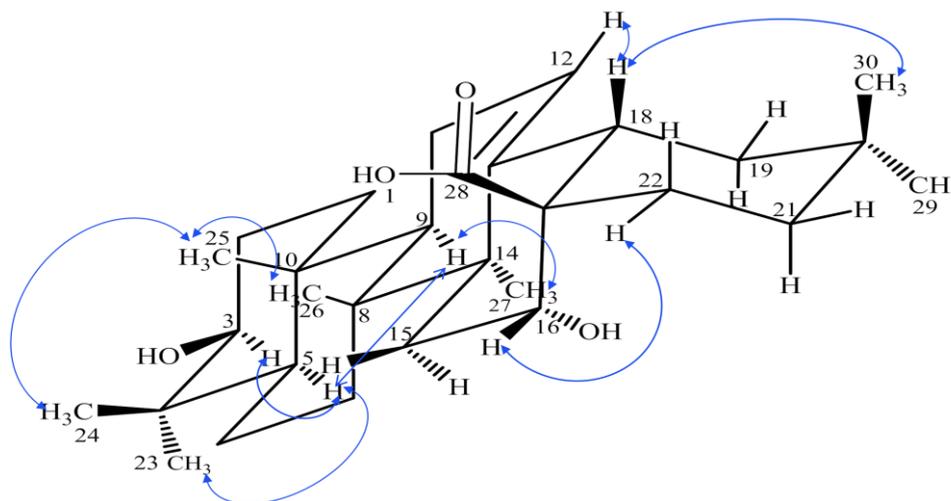
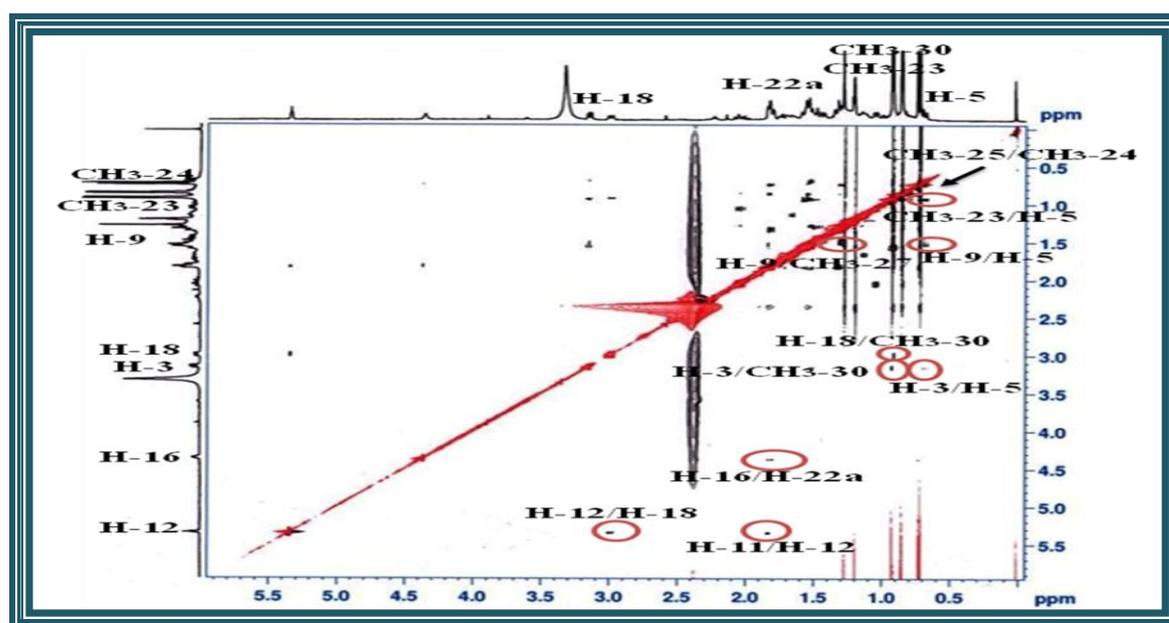


Figure III.205 : Effets nOe

Figure III.206: Spectre NOESY du composé **15**

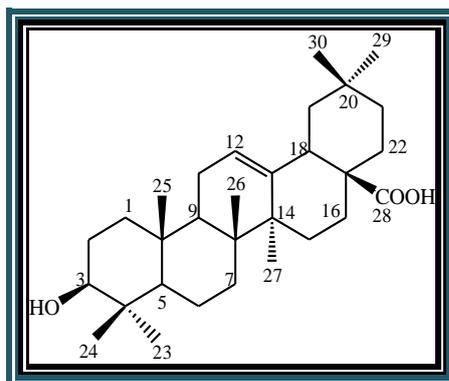
L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III.15) et la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = +12,5^\circ$ ,  $C = 0,28$  g/100 ml, MeOH) permettent d'attribuer pour le composé **15** la structure suivante : acide  $3\beta,16\alpha$ -dihydroxyoléan-12-èn-28-oïque (Acide echinocystique).

Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae). <sup>[195]</sup> Il a été trouvé pour la 1<sup>ère</sup> fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.15: Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de 15 dans CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD

| Position | δ <sub>C</sub> (ppm) | δ <sub>H</sub> (m, J en Hz)      |
|----------|----------------------|----------------------------------|
| 1        | 38,5                 | 1,58 (m) H-1a<br>0,92(m) H-1b    |
| 2        | 26,8                 | 1,55 (m)                         |
| 3        | 78,7                 | 3,18 (dd, 10,1; 4)               |
| 4        | 38,6                 | -                                |
| 5        | 55,3                 | 0,68 (dl, 11,4)                  |
| 6        | 18,2                 | 1,50 (m) H-6a<br>1,34 (m) H-6b   |
| 7        | 32,8                 | 1,45 (m) H-7a<br>1,32 (m) H-7b   |
| 8        | 39,5                 | -                                |
| 9        | 46,8                 | 1,54 (m)                         |
| 10       | 36,9                 | -                                |
| 11       | 23,2                 | 1,84 (m)                         |
| 12       | 122,5                | 5,32 (t, 3,5)                    |
| 13       | 142,8                | -                                |
| 14       | 41,5                 | -                                |
| 15       | 35,1                 | 1,82 (m) H-15a<br>1,35 (m) H-15b |
| 16       | 29,6                 | 4,40 (sl)                        |
| 17       | 49                   | -                                |
| 18       | 40,7                 | 3,00 (dl, 13,6)                  |
| 19       | 46,2                 | 2,05 (m) H-19a<br>1,05 (m) H-19b |
| 20       | 30,2                 | -                                |
| 21       | 35,1                 | 1,65 (m) H-21a<br>1,14 (m) H-21b |
| 22       | 74,1                 | 1,78 (m) H-22a<br>1,22 (m) H-22b |
| 23       | 27,9                 | 0,93 (s)                         |
| 24       | 15,5                 | 0,71 (s)                         |
| 25       | 15,4                 | 0,88 (s)                         |
| 26       | 16,9                 | 0,74 (s)                         |
| 27       | 26,9                 | 1,27 (s)                         |
| 28       | 178                  | -                                |
| 29       | 32,6                 | 0,86 (s)                         |
| 30       | 25,1                 | 0,91 (s)                         |

## III-4-4-3-2 Elucidation structurale du composé 16



Acide oléanolique (16)

Le composé **16** est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse ESI-MS montre en mode positif (Figure III.207) deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  479 et  $[M+K]^+$  à  $m/z$  495, correspondant à une masse moléculaire de 456 uma et une formule brute  $C_{30}H_{48}O_3$ .

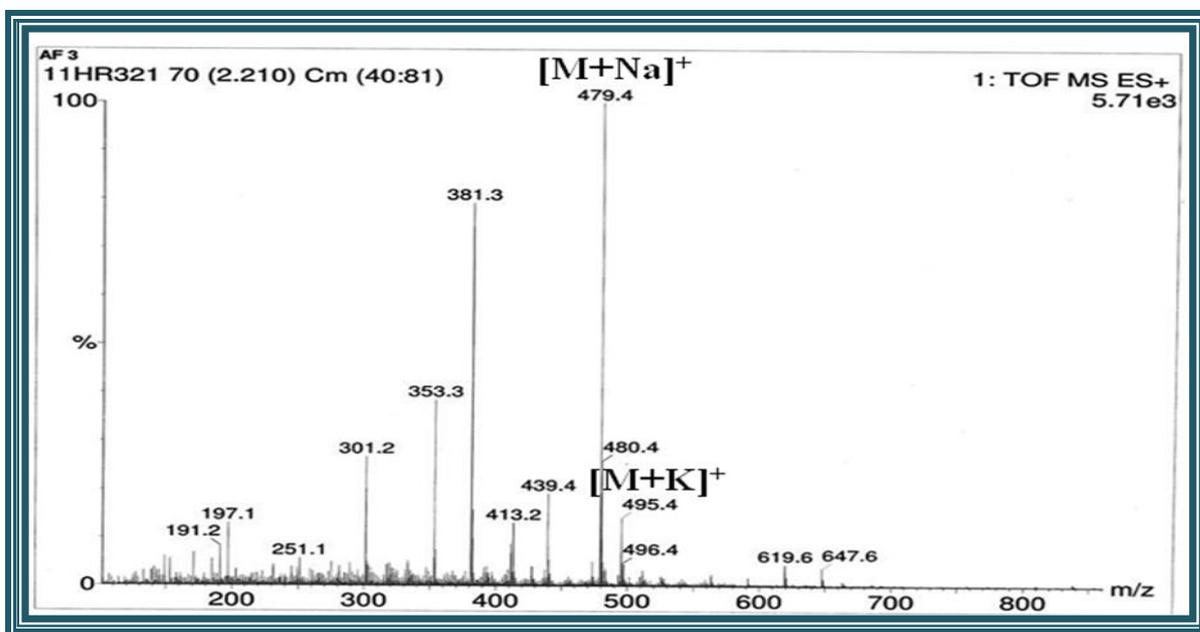


Figure III.207: Spectre de masse ESI-MS du composé 16

Les spectres RMN ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ) du composé **16** (Figures III.208, III.211 et III.212) sont presque identiques à ceux du composé précédent **15**, ce qui permet de conclure que ces deux composés présentent une petite différence dans leurs structures.

La différence par rapport au composé précédent (**15**) concerne principalement la disparition des signaux du groupement oxyméthine OCH-16 ( $\delta_H$  4,40/ $\delta_C$  74,1) sur les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , tout cela laisse à supposer que le cycle 5 de la molécule ne comporte pas de la fonction alcool.

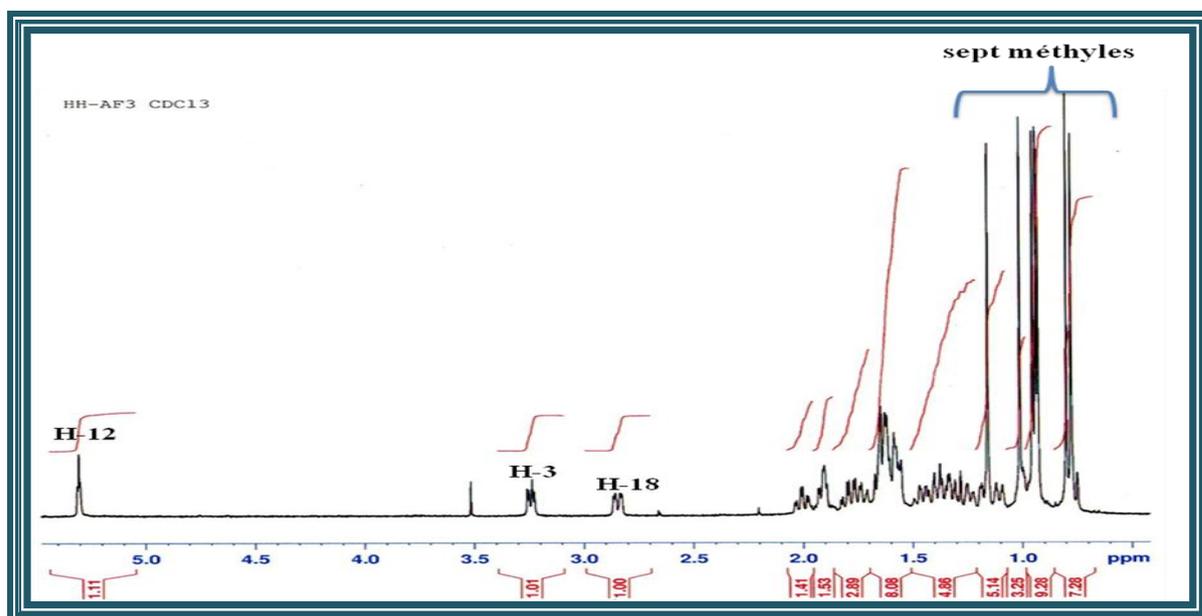


Figure III.208: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 16

Il est observé sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.208) de ce composé, un ensemble de signaux à  $\delta_{\text{H}}$  5,27 (1H, *t*,  $J = 3,5$  Hz), 3,18 (1H, *dd*,  $J = 10 ; 6,2$  Hz) et 2,84 (1H, *dd*,  $J = 13,9 ; 4,1$  Hz) attribuables respectivement aux protons H-12, H-3 et H-18 des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène.

De plus, sept signaux singulets fins sont visualisés entre 0,75 et 1,00 ppm (Figure III.209), attribuables aux sept méthyles angulaires de ce composé Me-23 ( $\delta_{\text{H}}$  0,98), Me-24 ( $\delta_{\text{H}}$  0,78), Me-25 ( $\delta_{\text{H}}$  0,92), Me-26 ( $\delta_{\text{H}}$  0,80), Me-27 ( $\delta_{\text{H}}$  1,15), Me-29 ( $\delta_{\text{H}}$  0,90), Me-30 ( $\delta_{\text{H}}$  0,93). Sur le spectre HSQC, ces méthyles résonnent entre 15 et 35 ppm (Figure III.210).

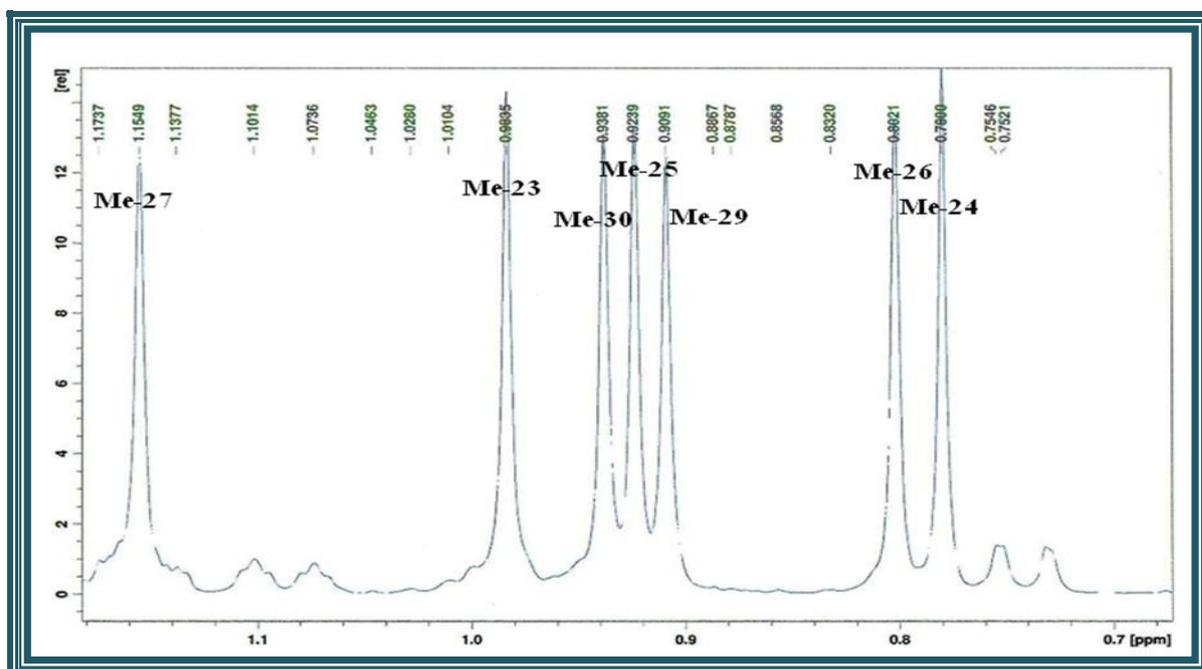


Figure III.209: Spectre RMN  $^1\text{H}$  des méthyles du composé 16

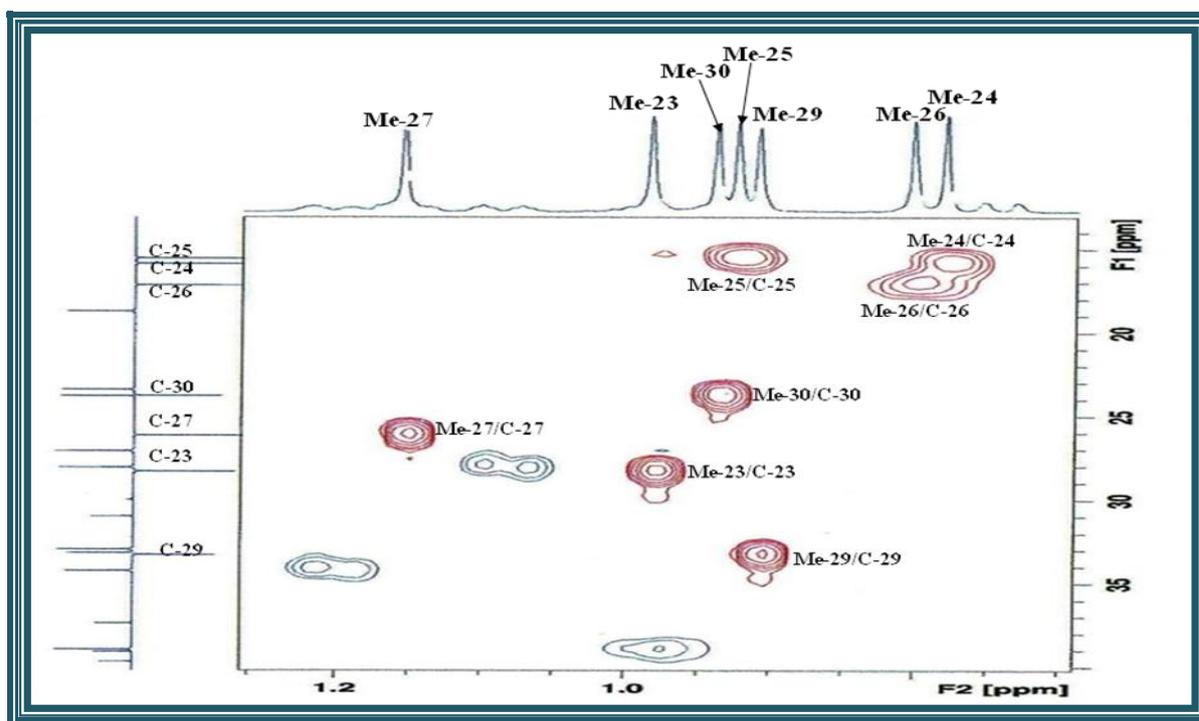
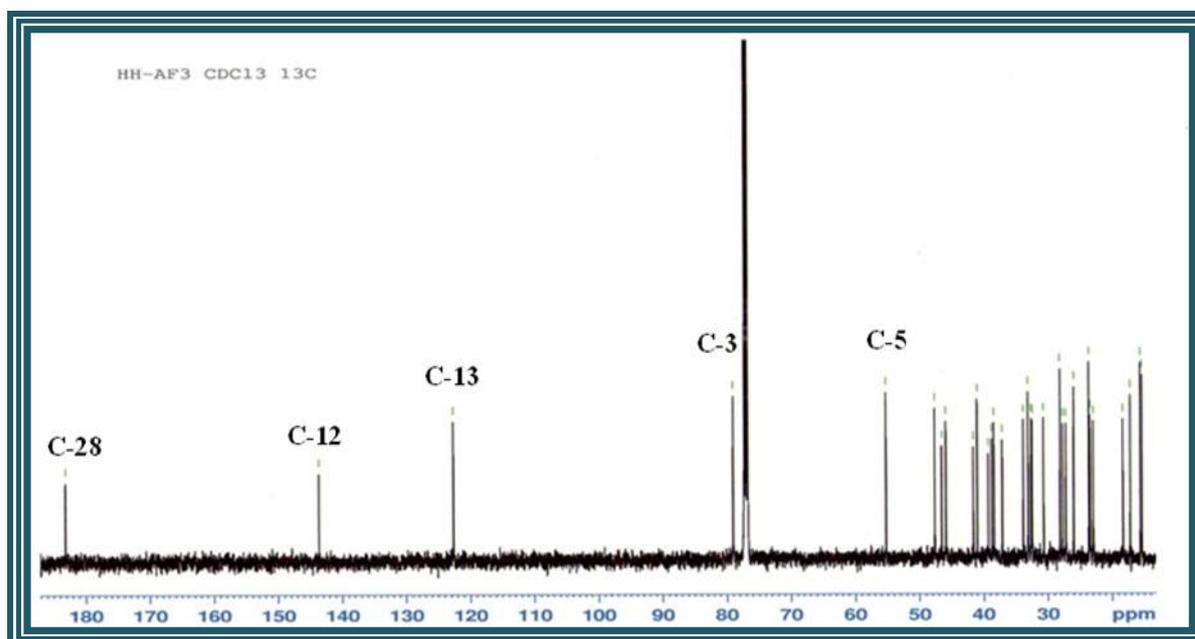


Figure III.210: Spectre HSQC des méthyles du composé 16

Figure III.211 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 16

Les spectres HSQC, RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT (Figures III.211 et III.212) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-3, C-12 et C-13 à  $\delta_{\text{C}}$  79,1, 122,8 et 144,6 respectivement.

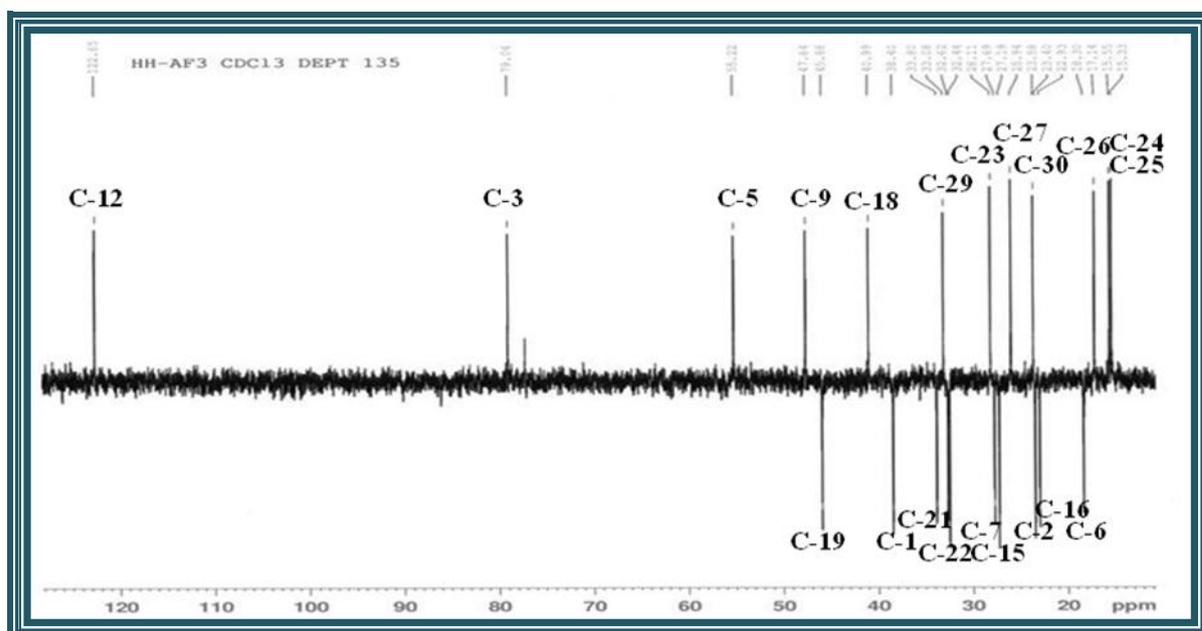


Figure III.212: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J- modulé DEPT du composé 16

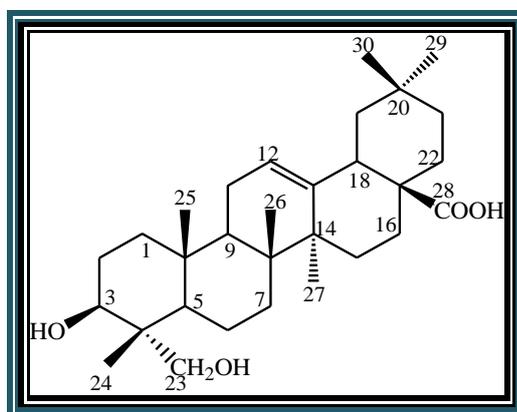
L'ensemble de ces données (Tableau III.16) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature, conduisent à l'identification du composé **16** comme étant l'acide oléanolique. Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces de la famille Asteraceae: *Atractylis carduus*,<sup>[4]</sup> *Baccharis solieri*, *Baccharis linearis*<sup>[196]</sup> et *Aster hipidus*.<sup>[197]</sup> Il est connu pour ses activités anti-inflammatoire<sup>[198]</sup> et anticancéreuse.<sup>[199]</sup>

Tableau III.16: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 16 dans  $\text{CDCl}_3$

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
|----------|---------------------------|----------------------------------|
| 1        | 38,9                      | 1,60 (m) H-1a<br>0,97(m) H-1b    |
| 2        | 27                        | 1,58 (m)                         |
| 3        | 79,1                      | 3,18 (dd, 10; 6,2)               |
| 4        | 39,7                      | -                                |
| 5        | 55,7                      | 0,75 (dl, 10)                    |
| 6        | 18,7                      | 1,54 (m) H-6a<br>1,37 (m) H-6b   |
| 7        | 32,9                      | 1,75 (m) H-7a<br>1,57 (m) H-7b   |
| 8        | 39,1                      | -                                |
| 9        | 48,1                      | 1,58 (m)                         |
| 10       | 37,4                      | -                                |
| 11       | 23,8                      | 1,88 (dt, 7,1 ; 3,5)             |
| 12       | 122,8                     | 5,27 (t, 3,5)                    |
| 13       | 144,6                     | -                                |

| position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                        |
|----------|------------------|--|
| 14       | 42,1             | -  |
| 15       | 28,1             | 1,73 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,07 ( <i>m</i> ) H-15b             |
| 16       | 23,4             | 1,98 ( <i>td</i> , 13,5; 3,9) H-16a<br>1,61 ( <i>m</i> ) H-16b |
| 17       | 46,8             | -  |
| 18       | 41,7             | 2,84 ( <i>dd</i> , 13,9; 4,1)                                  |
| 19       | 46,4             | 1,65 ( <i>m</i> ) H-19a<br>1,15 ( <i>m</i> ) H-19b             |
| 20       | 30,9             | -  |
| 21       | 34,2             | 1,36 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,20 ( <i>m</i> ) H-21b             |
| 22       | 33,2             | 1,48 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,31 ( <i>m</i> ) H-22b             |
| 23       | 28,3             | 0,98 ( <i>s</i> )  |
| 24       | 15,8             | 0,78 ( <i>s</i> )  |
| 25       | 15,5             | 0,92 ( <i>s</i> )  |
| 26       | 17,1             | 0,80 ( <i>s</i> )  |
| 27       | 26,1             | 1,15 ( <i>s</i> )  |
| 28       | 181,5            | -  |
| 29       | 33,3             | 0,90 ( <i>s</i> )  |
| 30       | 23,7             | 0,93 ( <i>s</i> )  |

### III-4-4-3-3 Elucidation structurale du composé 17



**Hédéragénine (17)**

Le composé **17** appelé hédéragénine a été isolé à l'état d'une poudre blanche. Il est invisible sous la lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et se colore en violet par révélation à l'acide et chauffage.

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT (Figures III.213 et III.214) permettent d'observer 30 signaux se répartissant en 6 méthyles, 11 méthylènes dont un hydroxyméthylène, 5 méthines, ainsi que 8 atomes de carbone quaternaires, attestant de la nature triterpénique de ce composé.

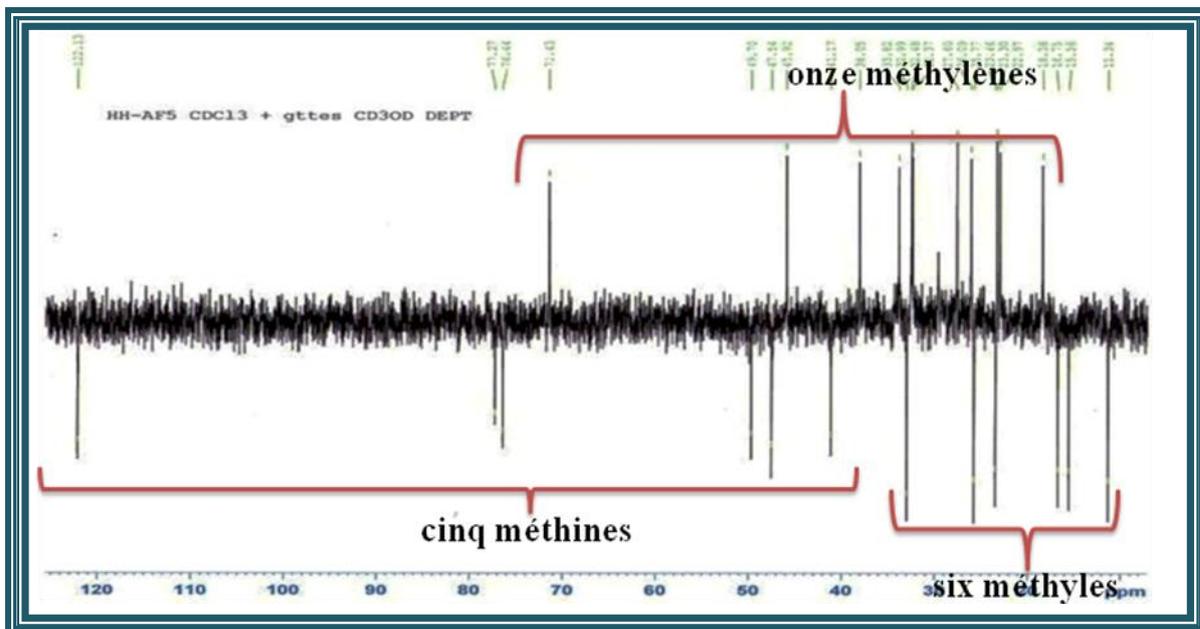


Figure III.213: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J- modulé du composé 17

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figures III.214 et III.215) de ce composé sont voisins à ceux du composé précédent, à savoir l'acide oléanolique **16**. La différence réside au niveau du nombre de groupements méthyles égale à 6, soit un méthyle en moins par rapport au composé **16** (Figure III.216).

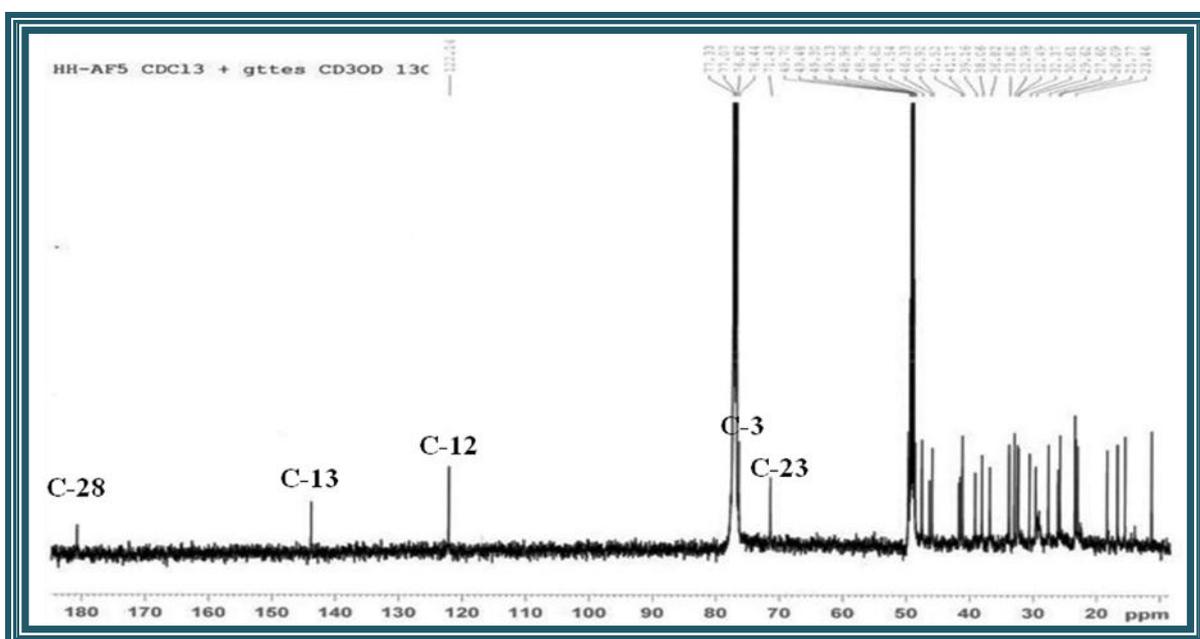
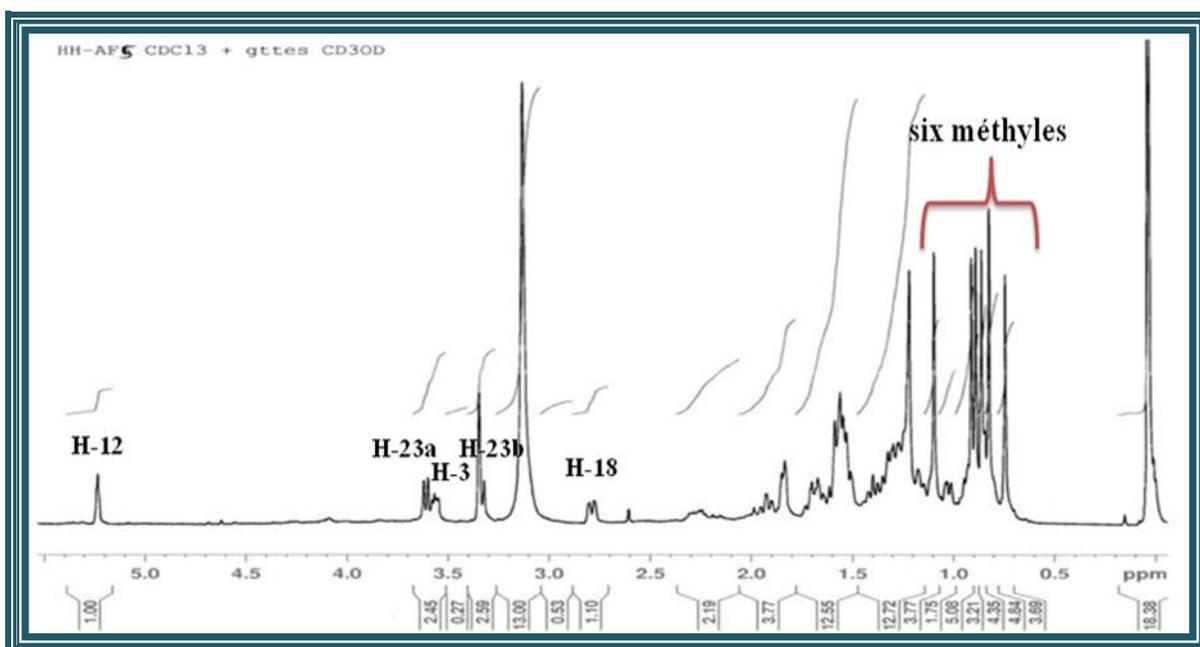
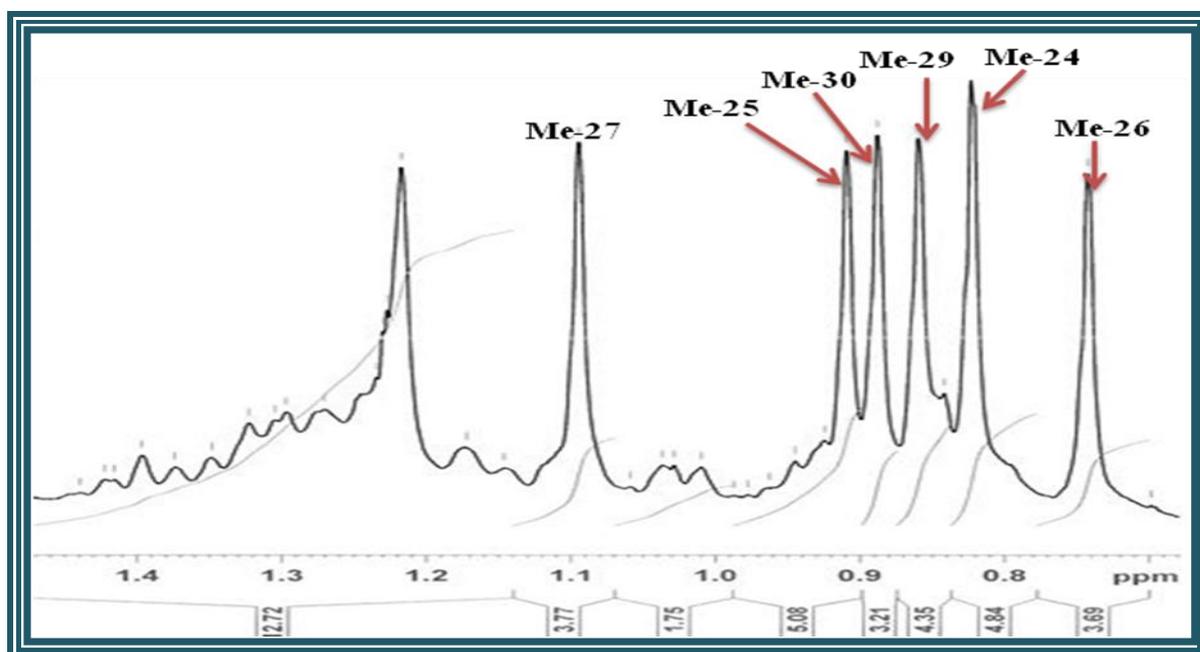


Figure III.214 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 17

Figure III.215 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 17Figure III.216: Spectre RMN <sup>1</sup>H des méthyles du composé 17

Comme pour le produit **15** décrit précédemment, le composé **17** possède la même masse moléculaire, au vu de son spectre de masse ESI (Figure III.217) qui montre un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  495, soit une masse moléculaire  $M = 472$  uma correspondant à la formule  $C_{30}H_{48}O_4$ . La masse moléculaire de ce composé et plus de 16 unités de masse atomique par rapport au composé **16** (acide oléanolique), laisse supposé la présence d'un oxygène en plus dans la structure du composé **17** en comparaison avec l'acide oléanolique (**16**), soit l'oxydation d'un méthyle en  $CH_2-OH$ .

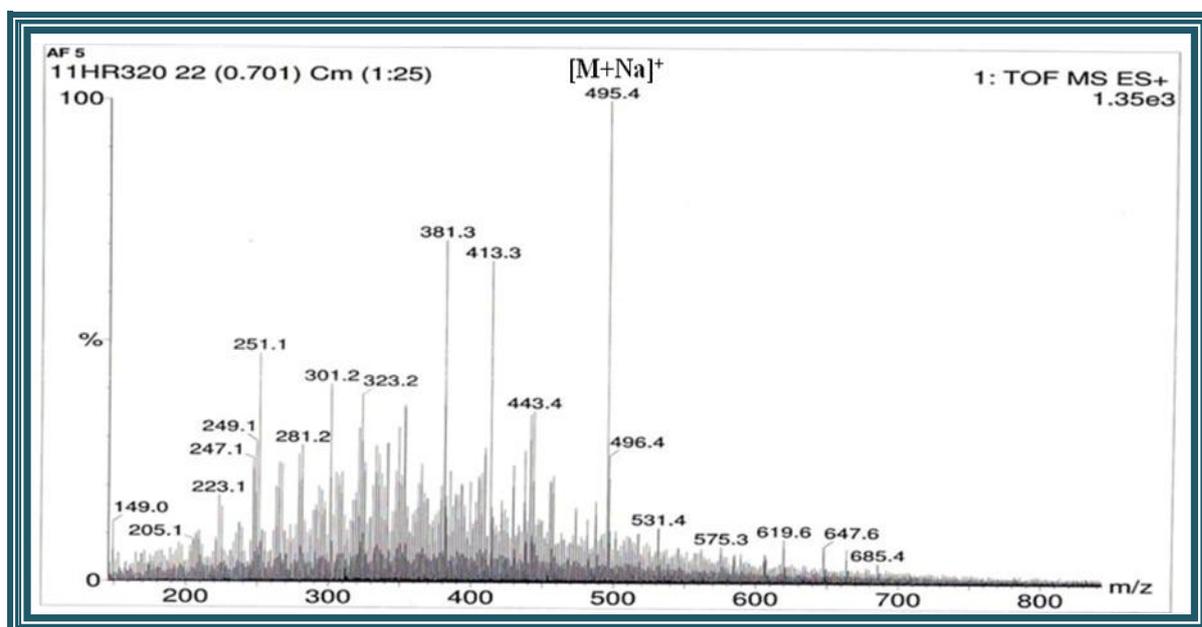


Figure III.217: Spectre de masse ESI-MS du composé 17

L'apparition sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  de deux signaux déblindés d'un système AB sous forme de deux doublets résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,61 (1H, *d*,  $J = 10,4$  Hz) et 3,32 (1H, *d*,  $J = 10,4$  Hz) confirme l'oxydation d'un méthyle en groupement hydroxyméthylène  $\text{CH}_2\text{OH}$ . Le déplacement chimique du carbone correspondant est déterminé par expérience HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  71,4 (Figure III.218).

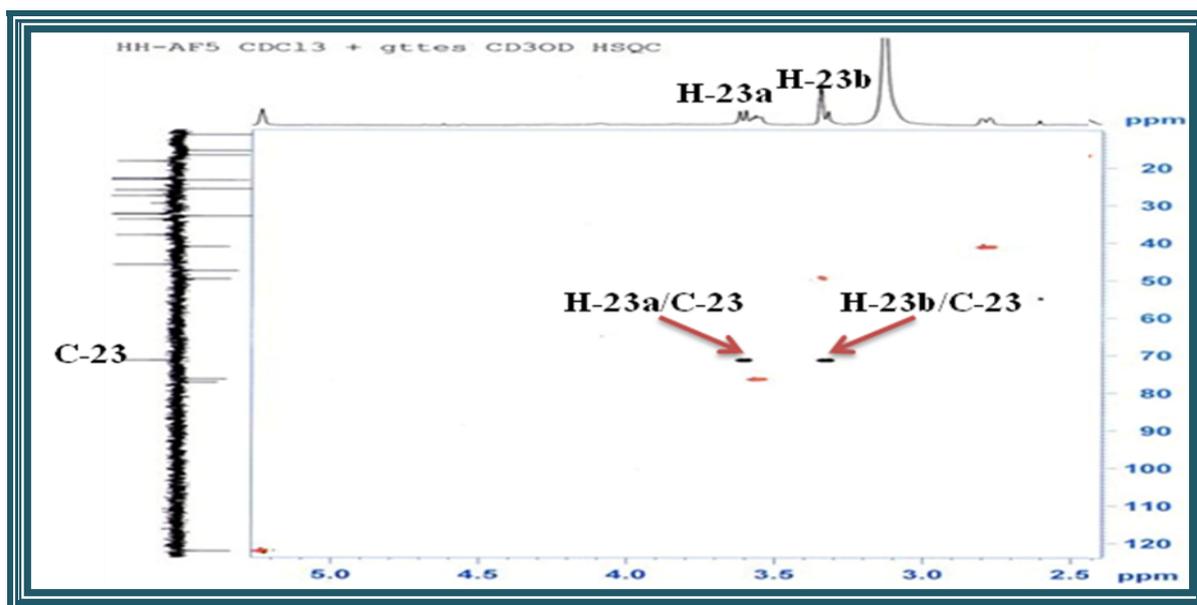


Figure III.218: Spectre HSQC du composé 17

La localisation du groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  est déduite à partir de l'analyse du spectre HMBC (Figures III.219 et III.220). En effet, les protons de ce groupement H-23a [ $\delta_{\text{H}}$  3,60 (*d*,  $J = 10,4$  Hz)] et H-23b [ $\delta_{\text{H}}$  3,32 (*d*,  $J = 10$  Hz)] corrélerent en  $^3J$  avec le carbone oxyméthine C-3

( $\delta_C$  76,4) et avec le méthyle CH<sub>3</sub>-24 ( $\delta_C$  11,3). Le déplacement chimique de ce dernier à 11,3 ppm blindé permet de positionner le groupement CH<sub>2</sub>OH en position  $\alpha$  équatoriale. [200]

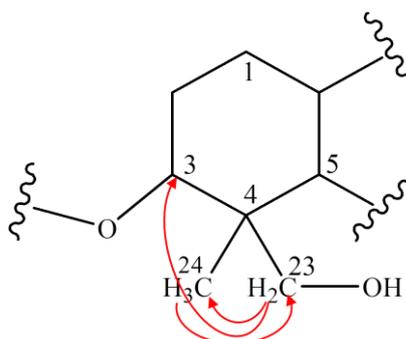


Figure III.219: Corrélations HMBC du groupement CH<sub>2</sub>-OH

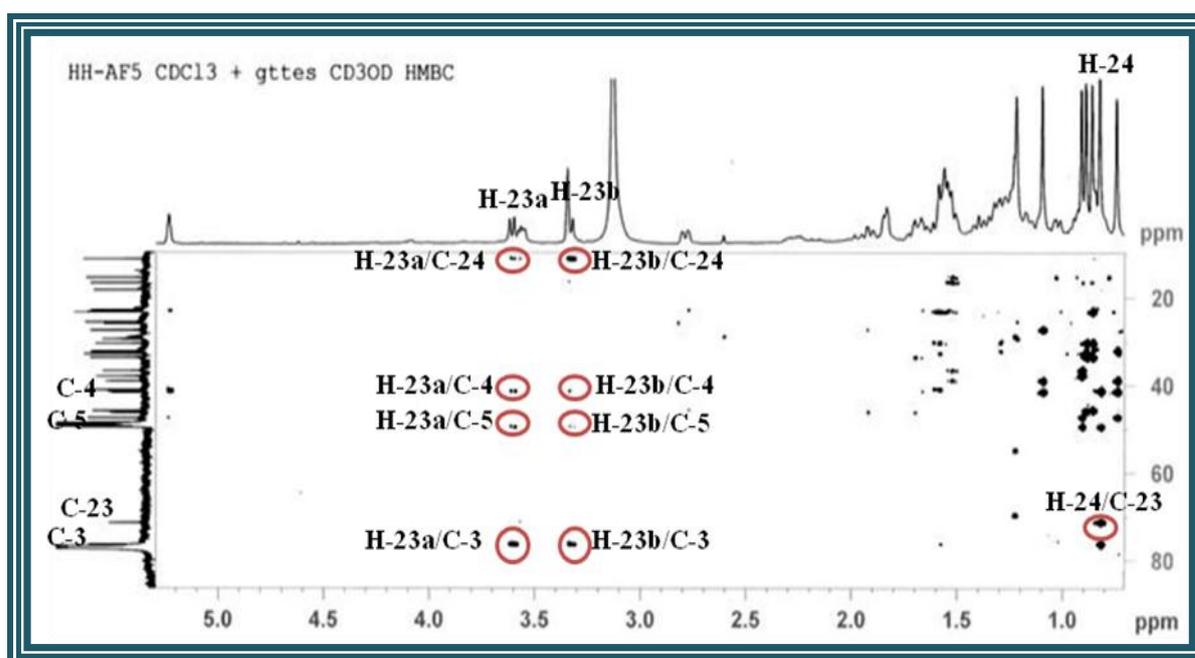


Figure III.220: Spectre HMBC du composé 17

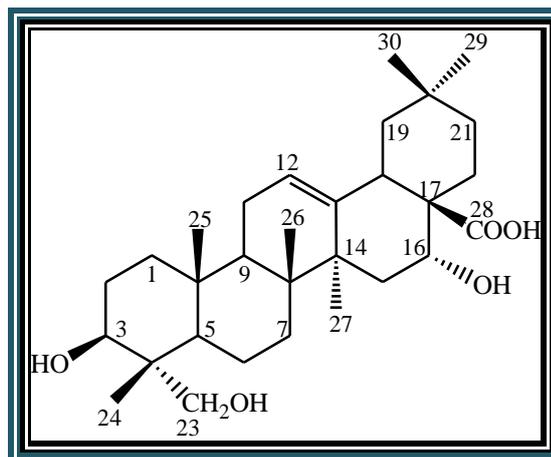
L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC permet d'assigner les déplacements chimiques des autres protons et carbones de ce composé (Tableau III.17).

Ce composé a été identifié comme étant l'hédéragénine en comparant ses données de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C à celles de la littérature, ainsi que la valeur de son pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = +25,3^\circ$ ,  $C = 0,166$  g/100 ml, MeOH). Antérieurement, il a été isolé de l'extrait *n*-butanolique de l'espèce *Nigella sativa* Linn (Ranunculaceae). [201] Ce composé a été caractérisé pour la 1<sup>ère</sup> fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.17: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 17 dans  $\text{CDCl}_3$ 

| position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)             |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 38                        | 1,57 ( <i>m</i> ) H-1a<br>0,93 ( <i>m</i> ) H-1b             |
| 2        | 27                        | 1,56 ( <i>m</i> )  |
| 3        | 76,4                      | 3,57 ( <i>m</i> )  |
| 4        | 41,5                      | -  |
| 5        | 49,7                      | 0,83 ( <i>sl</i> )   |
| 6        | 18,4                      | 1,35 ( <i>m</i> )  |
| 7        | 32,4                      | 1,41 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,23 ( <i>m</i> ) H-7b             |
| 8        | 39,2                      | -  |
| 9        | 47,6                      | 1,52 ( <i>m</i> )  |
| 10       | 36,8                      | -  |
| 11       | 23,3                      | 1,83 ( <i>m</i> )  |
| 12       | 122,1                     | 5,23 ( <i>sl</i> )   |
| 13       | 144                       | -  |
| 14       | 41                        | -  |
| 15       | 27,6                      | 1,67( <i>m</i> ) H-15a<br>1,03 ( <i>m</i> ) H-15b            |
| 16       | 23                        | 1,92 ( <i>m</i> ) H-16a<br>1,56 ( <i>m</i> ) H-16b           |
| 17       | 46,3                      | -  |
| 18       | 41,2                      | 2,79 ( <i>dl</i> , 10,6)                                     |
| 19       | 45,9                      | 1,58 ( <i>m</i> ) H-19a<br>1,10 ( <i>m</i> ) H-19b           |
| 20       | 30,6                      | -  |
| 21       | 33,8                      | 1,30 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,16 ( <i>m</i> ) H-21b           |
| 22       | 32,5                      | 1,70 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,51 ( <i>m</i> ) H-22b           |
| 23       | 71,4                      | 3,61 ( <i>d</i> , 10,4) H-23a<br>3,32 ( <i>d</i> , 10) H-23b |
| 24       | 11,3                      | 0,82 ( <i>s</i> )  |
| 25       | 15,5                      | 0,91 ( <i>s</i> )  |
| 26       | 16,7                      | 0,74 ( <i>s</i> )  |
| 27       | 25,8                      | 1,09 ( <i>s</i> )  |
| 28       | 181                       | -  |
| 29       | 33                        | 0,86 ( <i>s</i> )  |
| 30       | 23,4                      | 0,88 ( <i>s</i> )  |

## III-4-4-3-4 Elucidation structurale du composé 18



Caulophyllogénine (18)

Le composé **18** est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il est invisible sous lampe UV. La coloration violette de ce produit sur CCM, après révélation à l'aide d'un révélateur à base d'un mélange d'acides, nous oriente vers une structure de nature triterpénique.

Le spectre de masse ESI de ce composé (Figure III.221) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 511$   $[M+Na]^+$  correspondant à une masse moléculaire 488 uma, soit une formule brute  $C_{30}H_{48}O_5$ .

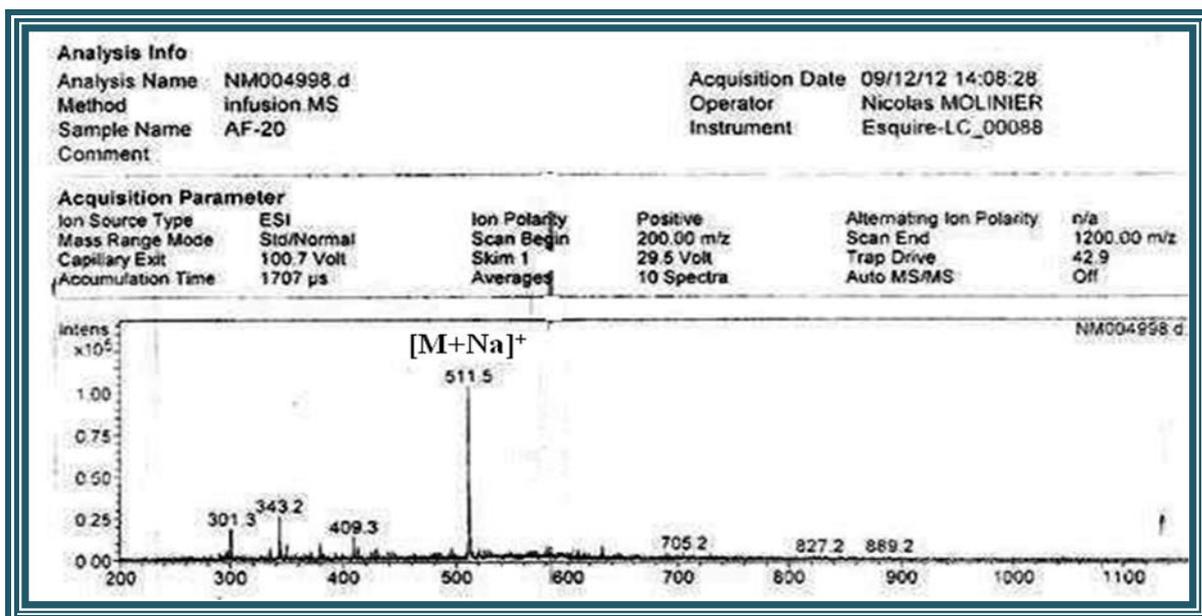


Figure III.221: Spectre de masse ESI-MS du composé 18

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III.222) du composé **18** est voisin de ceux des composés **15** et **17** élucidés précédemment. Il permet de reconnaître entre autres :

- Les protons H-3, H-12 et H-18 caractéristiques d'une molécule de nature triterpénique pentacyclique résonant à  $\delta_H$  3,48 (*m*), 5,32 (*t*,  $J = 3,5$  Hz) et 2,95 (*dd*,  $J = 13,5; 4$  Hz) ;
- Un massif de protons repéré entre 0,70 à 2,10 ppm, correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles ;
- Les méthyles détectés sous forme de six singulets fins entre 0,70 et 1,30 ppm.

La différence majeure par rapport au composé **17**, réside en la présence d'un signal sous forme d'un singulet large s'intégrant pour 1H correspondant à un proton oxyméthine résonant à  $\delta_H$  4,43. Une autre différence par rapport au composé **15**, a trait à la disparition du signal correspondant au méthyle Me-23 ( $\delta_H$  0,93) et l'apparition d'un groupement hydroxyméthylène CH<sub>2</sub>OH dont les deux protons non équivalents sont localisés à  $\delta_H$  3,68 (*d*,  $J = 10$  Hz, H-23a) et 3,37 (*d*,  $J = 10$  Hz, H-23b).

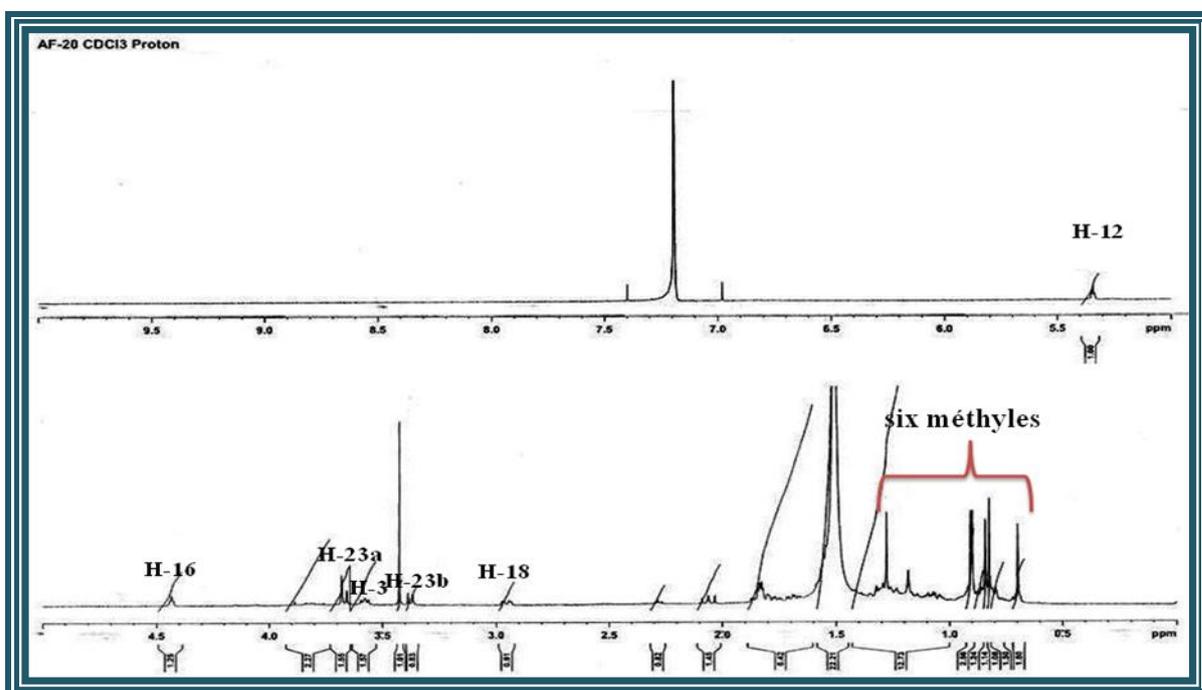


Figure III.222: Spectre RMN <sup>1</sup>H composé **18**

Le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé DEPT (Figure III.223) est quasi similaire à celui du composé **17** précédent. Par ailleurs, on note la disparition du carbone secondaire CH<sub>2</sub>-16 (23 ppm) et l'apparition d'un signal déblindé à  $\delta_C$  74,9 (CH) d'un oxyméthine correspondant au carbone C-16 observé dans le cas du composé **15**.

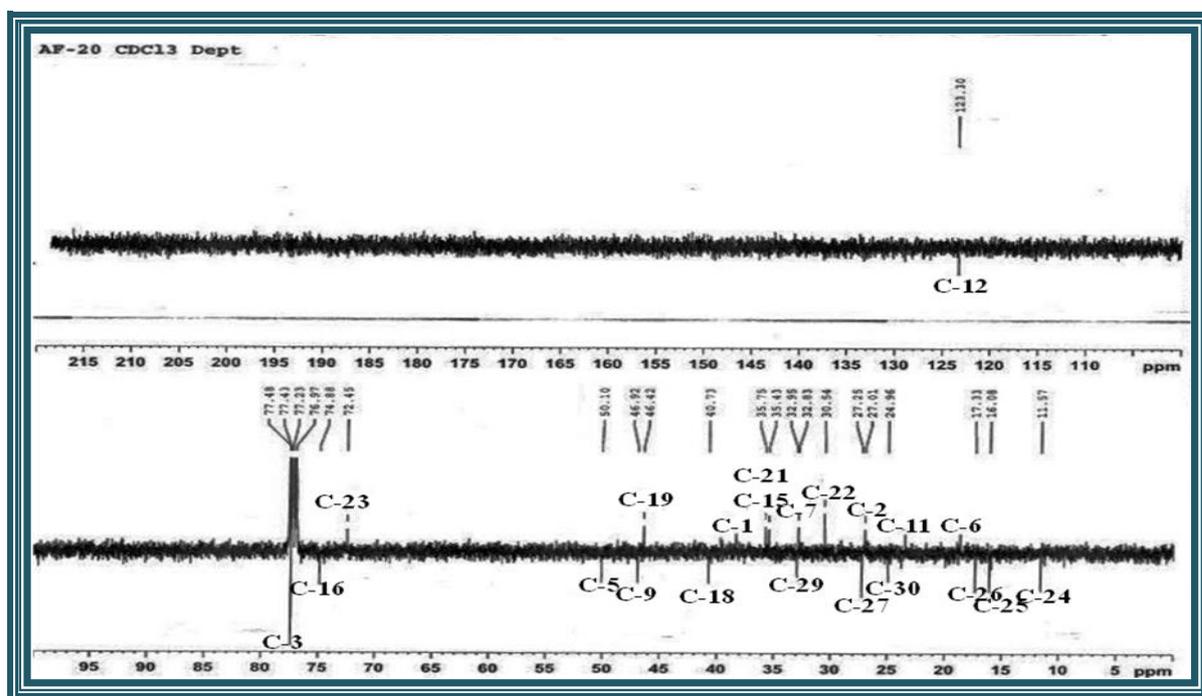


Figure III.223: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé DEPT du composé 18

Les déplacements chimiques des protons et carbones, ont été déterminés par l'analyse conjointe des spectres HSQC  $J$ -modulé, COSY et HMBC (Tableau III.18).

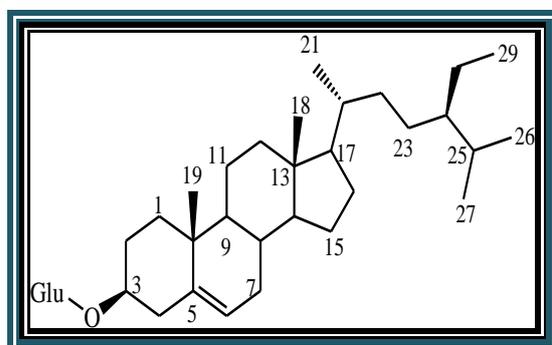
Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé : Acide  $3\beta,16\alpha,23$ -trihydroxyoléan-12-èn-28-oïque appelé également Caulophyllogénine. Il a été isolé antérieurement de l'espèce *Caulophyllum robustum* (Berberidacea).<sup>[202]</sup> Ce composé a été trouvé pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau III.18: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 18 dans  $\text{CDCl}_3$

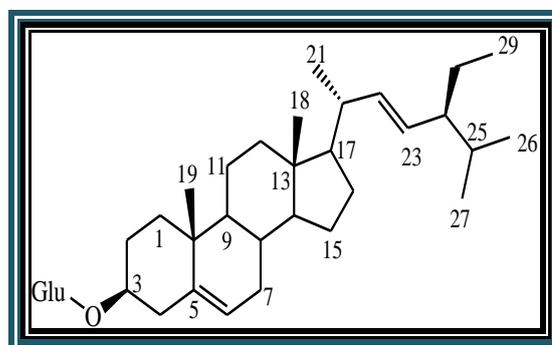
| position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( $m$ , $J$ en Hz) |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 38,5                      | 1,58 ( $m$ ) H-1a<br>0,92( $m$ ) H-1b  |
| 2        | 27,0                      | 1,55 ( $m$ )                           |
| 3        | 77,4                      | 3,48 ( $m$ )                           |
| 4        | 38,6                      | -                                      |
| 5        | 50,1                      | 0,80 ( $sl$ )                          |
| 6        | 18,5                      | 1,50 ( $m$ ) H-6a<br>1,34 ( $m$ ) H-6b |
| 7        | 32,8                      | 1,42 ( $m$ ) H-7a<br>1,28 ( $m$ ) H-7b |
| 8        | 39,5                      | -                                      |
| 9        | 46,9                      | 1,53 ( $m$ )                           |
| 10       | 37,8                      | -                                      |

| position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( <i>m, J</i> en Hz)                            |
|----------|------------------|--|
| 11       | 23,2             | 1,84 ( <i>m</i> )  |
| 12       | 123,3            | 5,32 ( <i>t, 3,5</i> )                                     |
| 13       | 143,5            | -  |
| 14       | 41,5             | -  |
| 15       | 35,7             | 1,82 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,35 ( <i>m</i> ) H-15b         |
| 16       | 74,9             | 4,43 ( <i>sl</i> )   |
| 17       | 49               | -  |
| 18       | 40,7             | 2,95 ( <i>dd, 13,5; 4</i> )                                |
| 19       | 46,4             | 2,05 ( <i>m</i> ) H-19a<br>1,05 ( <i>m</i> ) H-19b         |
| 20       | 30,2             | -  |
| 21       | 35,4             | 1,65 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,12 ( <i>m</i> ) H-21b         |
| 22       | 30,5             | 1,90 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,52 ( <i>m</i> ) H-22b         |
| 23       | 72,4             | 3,68 ( <i>d, 10</i> ) H-23a<br>3,37 ( <i>d, 10</i> ) H-23b |
| 24       | 11,6             | 0,82 ( <i>s</i> )  |
| 25       | 16,1             | 0,90 ( <i>s</i> )  |
| 26       | 17,3             | 0,71 ( <i>s</i> )  |
| 27       | 27,2             | 1,28 ( <i>s</i> )  |
| 28       | 178              | -  |
| 29       | 32,9             | 0,84 ( <i>s</i> )  |
| 30       | 24,9             | 0,91 ( <i>s</i> )  |

## III-4-4-3-5 Elucidation structurale des composés 19 et 20



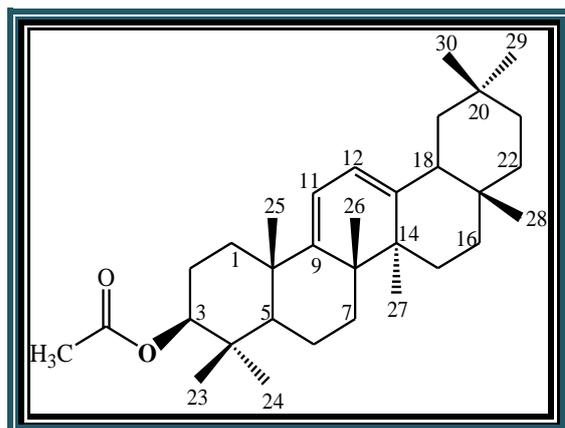
Daucostérol (19)



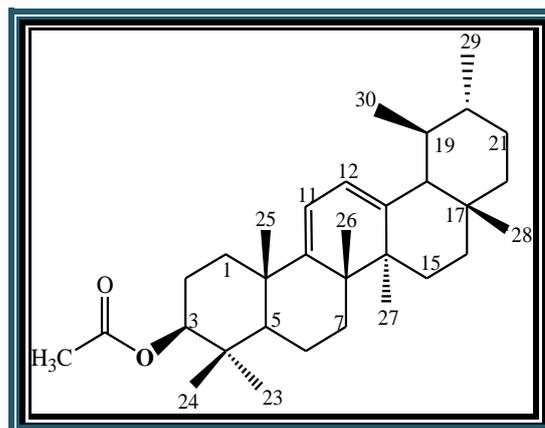
Stigmastérol glucosylé (20)

L'analyse des spectres RMN  $^1H$ , masse ESI et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier ces deux phytostérols glycosylés, isolés en mélange constitué par daucostérol (19) et stigmastérol glucosylé (20). Ils ont été isolés des espèces *Carthamus lanatus* et *Centaurea omphalotricha* appartenant à la famille Asteraceae. <sup>[169,203]</sup>

## III-4-4-3-6 Elucidation structurale des composés 21 et 22



oléana-9(11),12-diène-3-yl acétate (21)



ursina-9(11),12-diène-3-yl acétate (22)

Le mélange des composés **21** et **22**, a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.224) de ce mélange présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 489$   $[M+Na]^+$  et  $955$   $[2M+Na]^+$  correspondant à une formule brute en  $C_{32}H_{50}O_2$ .

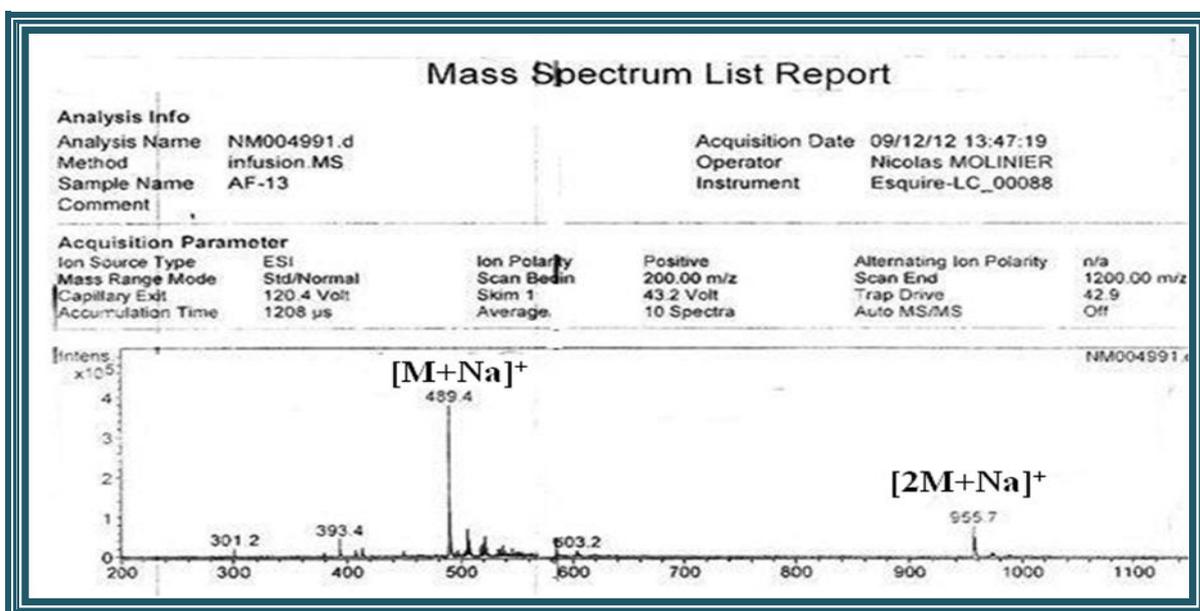


Figure III.224: Spectre de masse ESI-MS du mélange des composés 21 et 22

Dans la région des champs forts le spectre RMN  $^1H$  (Figure III.225) de ce composé permet de visualiser une série de pics très dense dans l'intervalle 0,70-1,20 ppm. Ceci suggère la présence d'un nombre élevé de méthyles avec des multiplicités doublet et singulet.

L'analyse du spectre HSQC (Figure III.226) montre plus de 10 taches de corrélations attribuables aux carbones des méthyles résonant entre 15 et 35 ppm. Ceci confirme la nature triterpénique pentacyclique de ce composé.

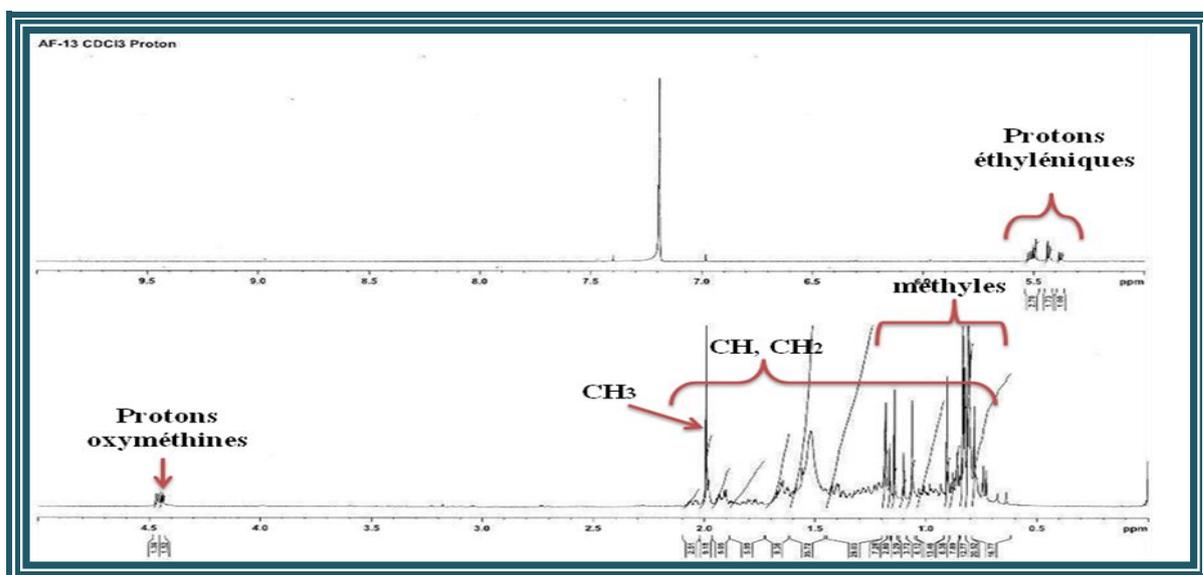


Figure III.225: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange des composés 21 et 22

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC (Figures III.225 et III.226) révèle la présence de plusieurs signaux entre 0,75-2,10 ppm correspondant au CH et  $\text{CH}_2$  d'un triterpène pentacyclique. Il est observé aussi un signal singulet d'intégration plus de 6H à 1,99 ppm attribuable au moins à deux groupements acétates, dont le carbone résonne à 21,6 ppm.

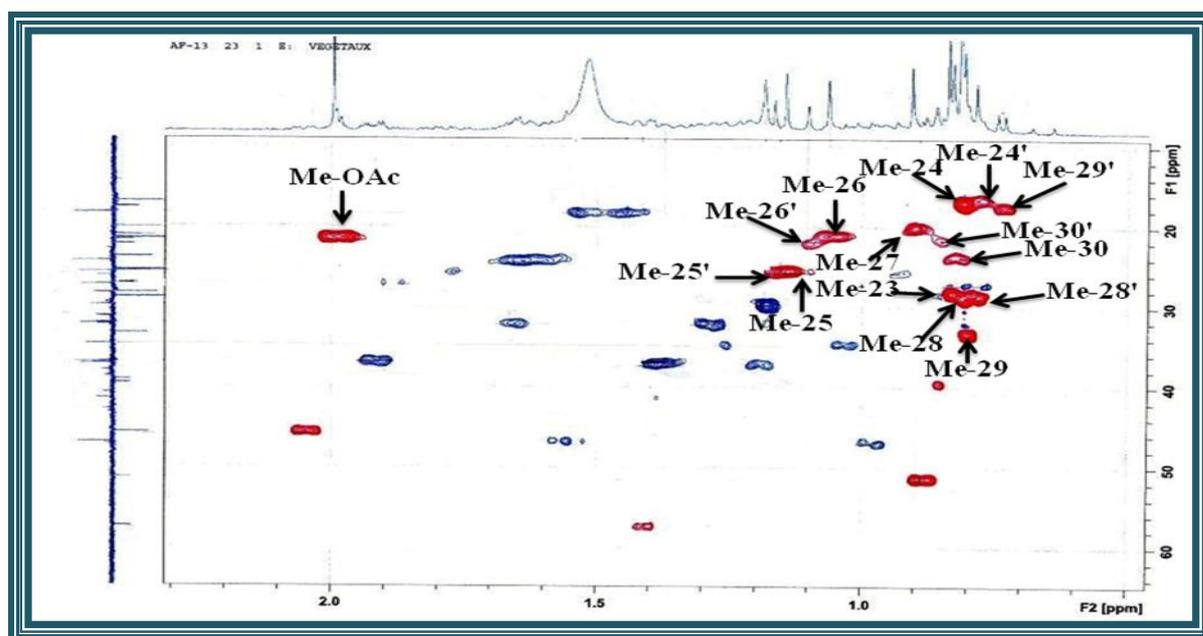


Figure III.226: Spectre HSQC du mélange des composés 21 et 22

Dans la partie déblindé du spectre RMN  $^1\text{H}$ , il est visualisé 5 signaux correspondant à six protons allant de 4,40 à 5,60 ppm, dont un sous forme d'un doublet de doublets  $\delta_{\text{H}}$  4,45 (2H,  $J = 11,4 ; 5,2$  Hz, 2 H-3) et quatre sous forme de doublet chacun détectés à  $\delta_{\text{H}}$  5,52 (1H,  $J = 5,8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5,50 (1H,  $J = 5,8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5,44 (1H,  $J = 5,8$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  5,38 (1H,  $J = 5,8$  Hz). Leurs

carbones sont déterminés par expérience HSQC (Figure III.227) à  $\delta_c$  80,8; 115,7; 116,1; 120,9 et 123,1 respectivement. Ces carbones se répartissent en un carbone oxyméthine et quatre carbones éthyléniques.

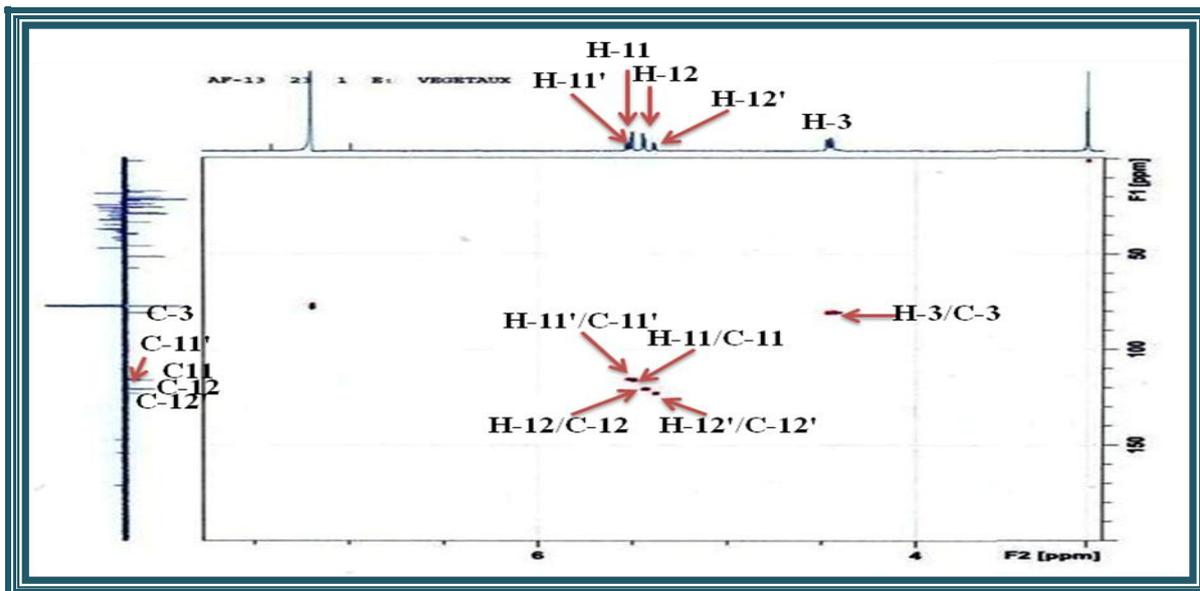


Figure III.227: Spectre HSQC du mélange des composés 21 et 22

Il en résulte que ce composé comporte deux groupements oxyméthines identiques et 4 CH éthyléniques appartenant probablement à deux molécules différentes en tenant compte de la différence d'intégration de leurs signaux de résonance observés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.228).

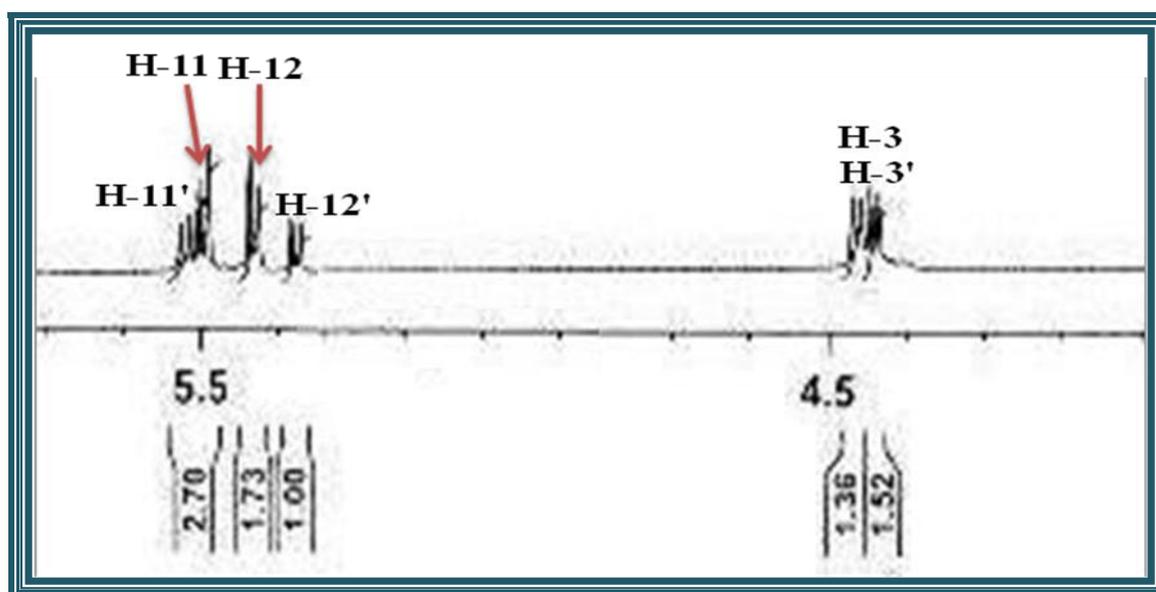


Figure III.228: Spectre RMN  $^1\text{H}$  des protons éthyléniques

Les déplacements chimiques du proton et carbone du groupement oxyméthine  $\delta_H$  4,45/  $\delta_c$  80,8 indiquent une acylation à ce niveau.

Le spectre COSY (Figure III.229) révèle les couplages entre les protons éthyléniques  $\delta_H$  5,44/5,50 et  $\delta_H$  5,38/5,52.

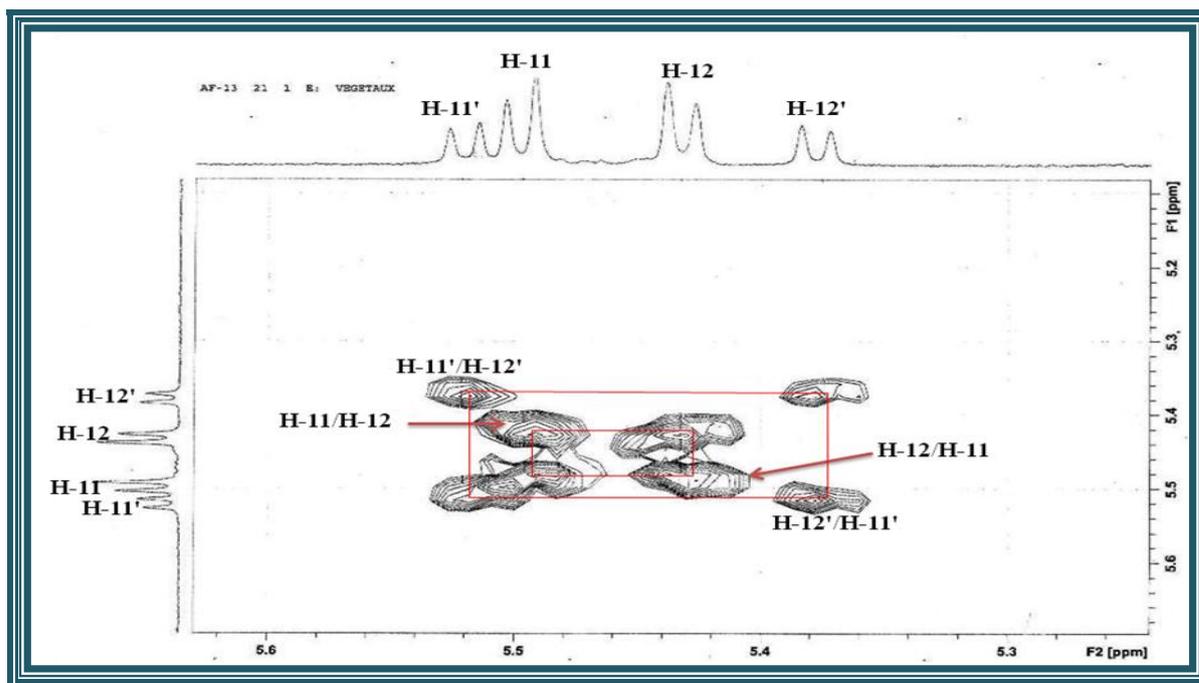
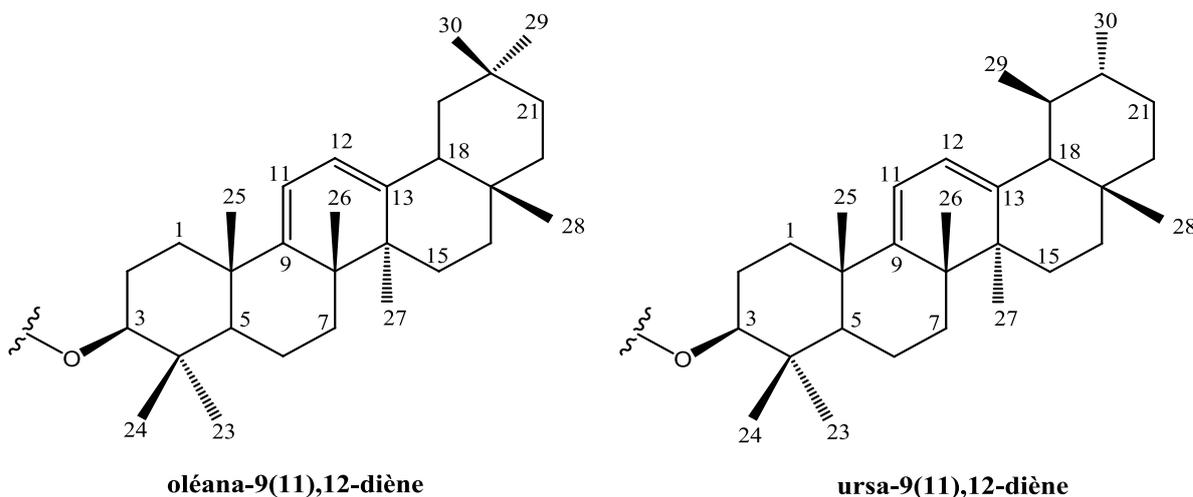


Figure III.229: Spectre COSY du mélange des composés 21 et 22

A l'issue de cette analyse et en comparaison avec les données de la littérature, <sup>[204,205]</sup> ce composé se présente sous forme d'un mélange de deux isomères à squelette : oléana-9(11),12-diène et ursina-9(11),12-diène.



La différence d'intégration entre les protons éthyléniques permet de déduire leur proportion à 63 % oléana-9(11),12-diène et 37 % ursina-9(11),12-diène.

Le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.230) confirme la présence de deux molécules en tenant compte du nombre de pics présents dans le spectre dépassant 40 atomes de carbone et donc l'existence de deux structures triterpéniques pentacycliques acylées.

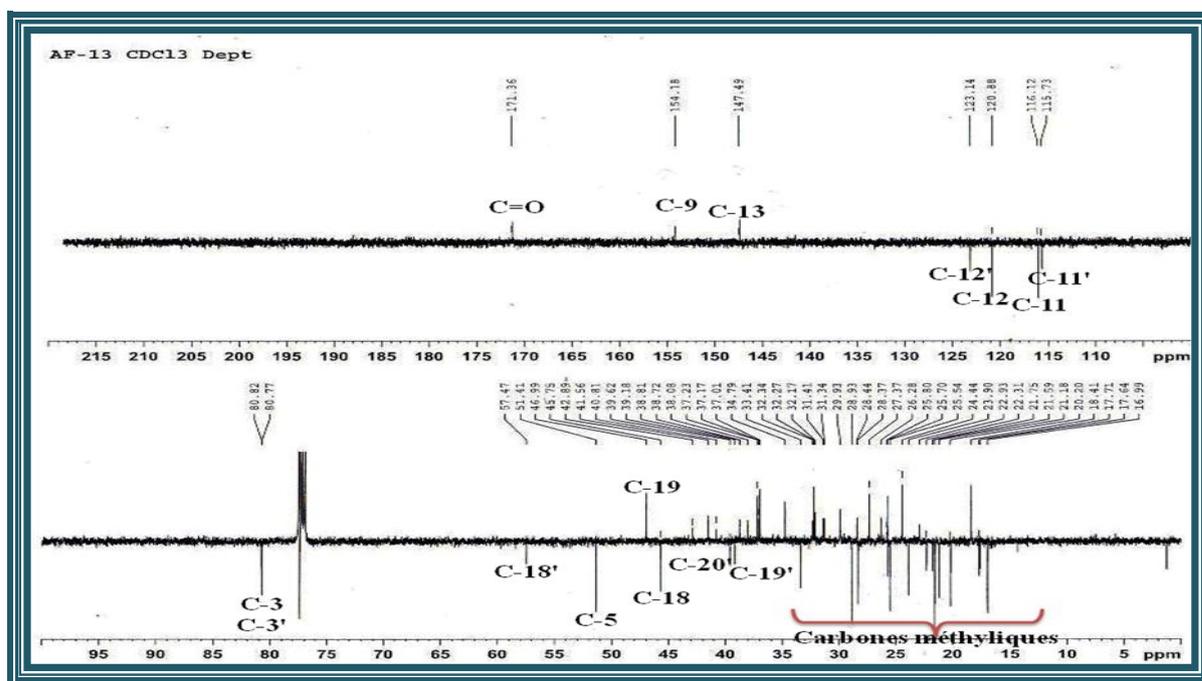


Figure III.230: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du mélange des composés **21** et **22**

Les déplacements chimiques à  $\delta\text{c}$  116,1 (C-11), 120,9 (C-12), 147,5 (C-13) et 154,2 (C-9) sont caractéristiques du squelette oléana-9(11),12-diène, <sup>[207]</sup> alors que les valeurs des déplacements chimiques  $\delta\text{c}$  115,7 ; 123,1 ; 141,4 et 155,1 sont compatibles avec les signaux des carbones C-11', C-12', C-13' et C-9' respectivement du squelette ursane-9(11),12-diène. <sup>[207]</sup>

Cette différence qui est plus nette entre les carbones C-13 des deux structures **21** et **22** s'explique par l'environnement et le positionnement des méthyles vis-à-vis de la double liaison C<sub>12</sub>=C<sub>13</sub> (Figure III.231). Le carbone C-13 est plus déblindé ( $\delta\text{c}$  147,5) dans le cas du squelette oléanique car il reçoit moins l'effet blindant des groupements méthyles portés par le carbone C-20 (Me-29, Me-30) comparativement à son homologue dans le cas du squelette ursane qui se trouve plus blindé ( $\delta\text{c}$  141,4) sous l'influence du méthyle porté par le carbone C-19 (Me-29) plus proche à la double liaison.

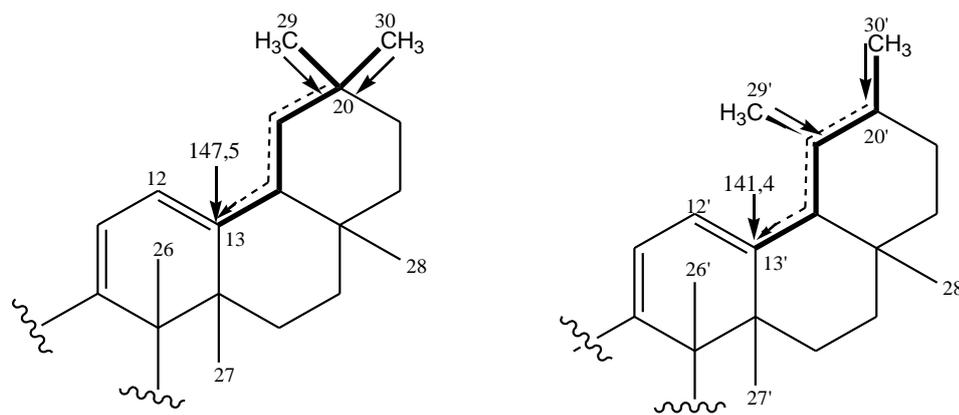


Figure III.231: Effets blindants des groupements méthyles Me-29 et Me-30

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.232 et III.233) montre des corrélations entre le proton H-12 et un carbone CH résonant à  $\delta_c$  45,7 ne pouvant être que le carbone C-18 alors que le C-18' est détecté à  $\delta_c$  57,5 suite à sa corrélation HMBC avec le proton H-12'. L'expérience HSQC permet de localiser les protons H-18 et H-18' à  $\delta_H$  2,05 (*dd*,  $J = 13,2 ; 4,3$  Hz) et 1,40 (*m*) respectivement. Cette différence de déplacement chimique est due à l'environnement chimique différent autour du carbone C-18.

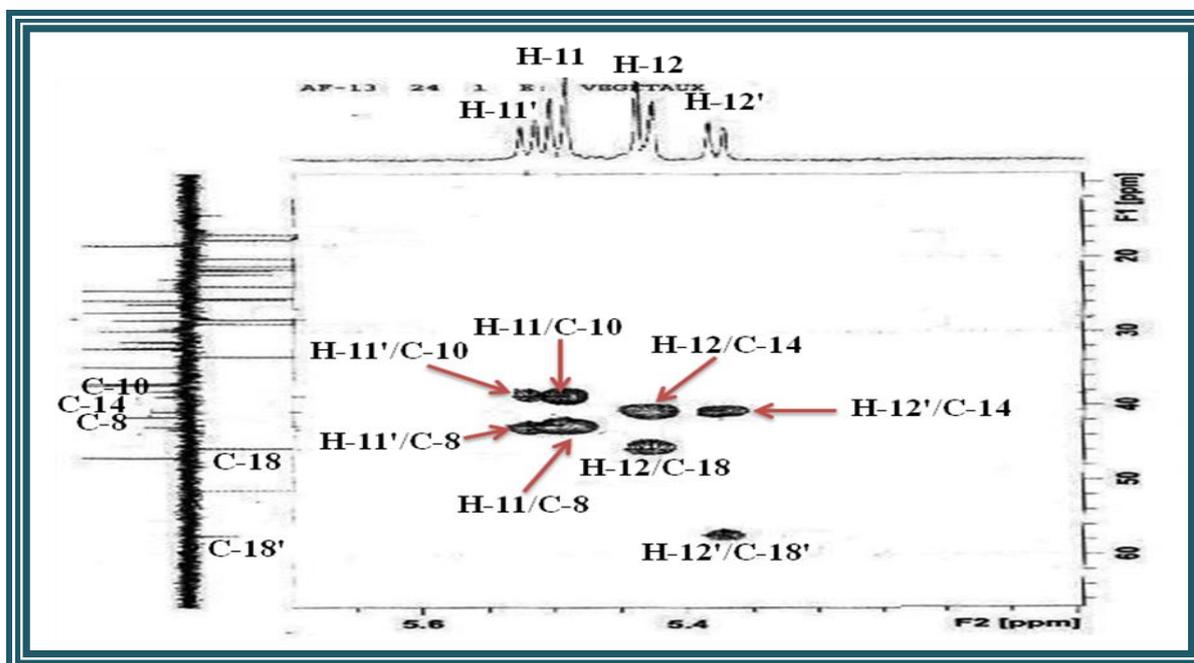


Figure III.232: Spectre HMBC du mélange des composés 21 et 22

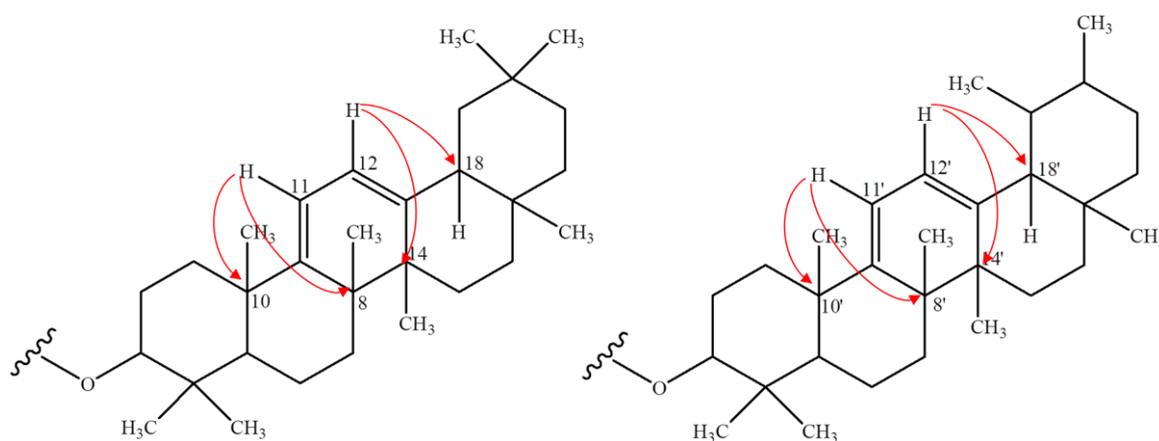


Figure III.233: Corrélations HMBC des protons éthyléniques

Les protons H-18 et H-18' couplent sur le spectre COSY (Figure III.234) avec les protons H<sub>2</sub>-19 [ $\delta_H$  1,50 (*m*) H-19a,  $\delta_H$  0,98 (*m*) H-19b] et H-19' [ $\delta_H$  0,85 (*m*)], leurs carbones sont repérés à  $\delta_c$  50 et  $\delta_c$  39,6.

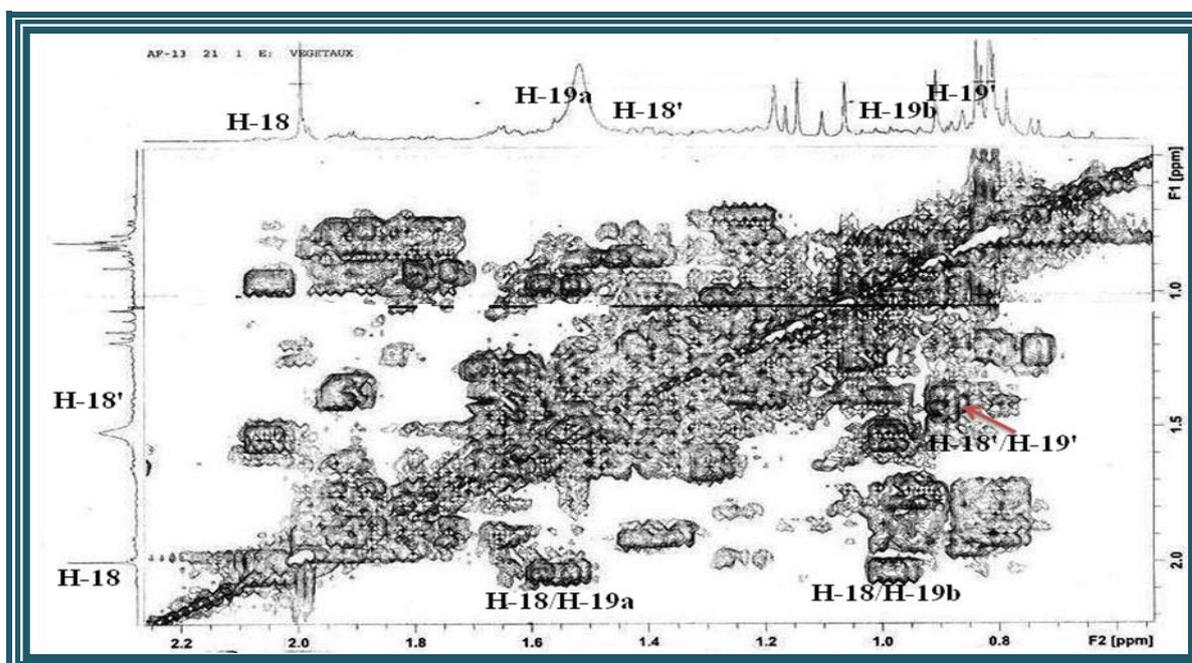


Figure III.234: Spectre COSY du mélange des composés 21 et 22

A partir des carbones C-18' et C-19', on caractérise facilement les trois méthyles Me-28' [ $\delta_H$  0,78 (*s*)], Me-29' [ $\delta_H$  0,73 (*d*,  $J = 6,6$  Hz)] et Me-30' [ $\delta_H$  0,85 (*sl*)] du composé ursanique suite aux corrélations qu'ils présentent sur le spectre HMBC (Figures III.235 et III.236) en  $^2J$  et  $^3J$ .

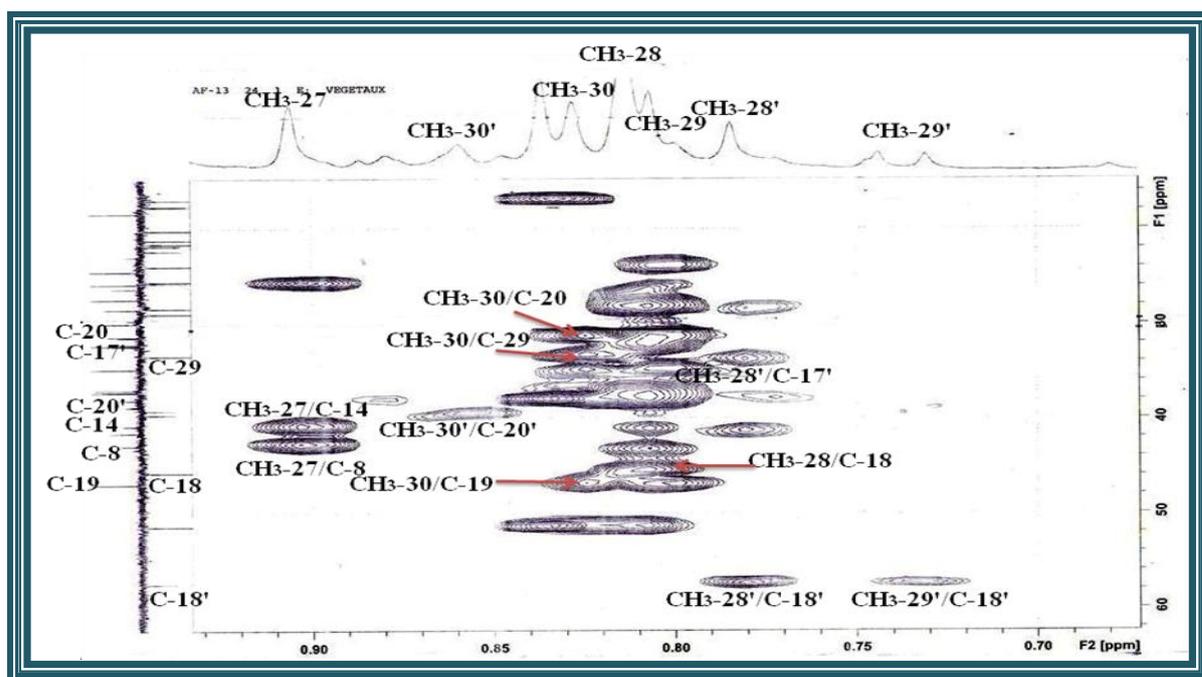


Figure III.235: Spectre HMBC du mélange des composés 21 et 22

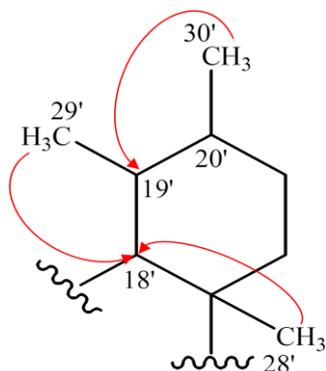


Figure III.236: Corrélations HMBC des méthyles Me-28', 29' et 30' du composé 22

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.237 et III.238) permet aussi de localiser les méthyles Me-25' [ $\delta_H$  1,16 (s)], Me-26' [ $\delta_H$  1,10 (s)] et Me-27' [ $\delta_H$  0,82 (s)] qui montrent des corrélations en  $^3J$  avec les carbones C-9' et C-13' déjà identifiés. Leurs carbones sont assignés à  $\delta_C$  25,7 (C-25') ; 22,3 (C-26') et 20,2 (C-27') par analyse du spectre HSQC.

Les protons du Me-25' couplent en HMBC (Figures III.237 et III.238) avec les carbones C-9' déjà attribué, C-10', C-1' et C-5' résonant à  $\delta_C$  38,7 ; 37,1 et 51,4 respectivement, leurs protons sont détectés à  $\delta_H$  1,92 (H-1'-a)/1,20 (H-1'b) et  $\delta_H$  0,89 (H-5')

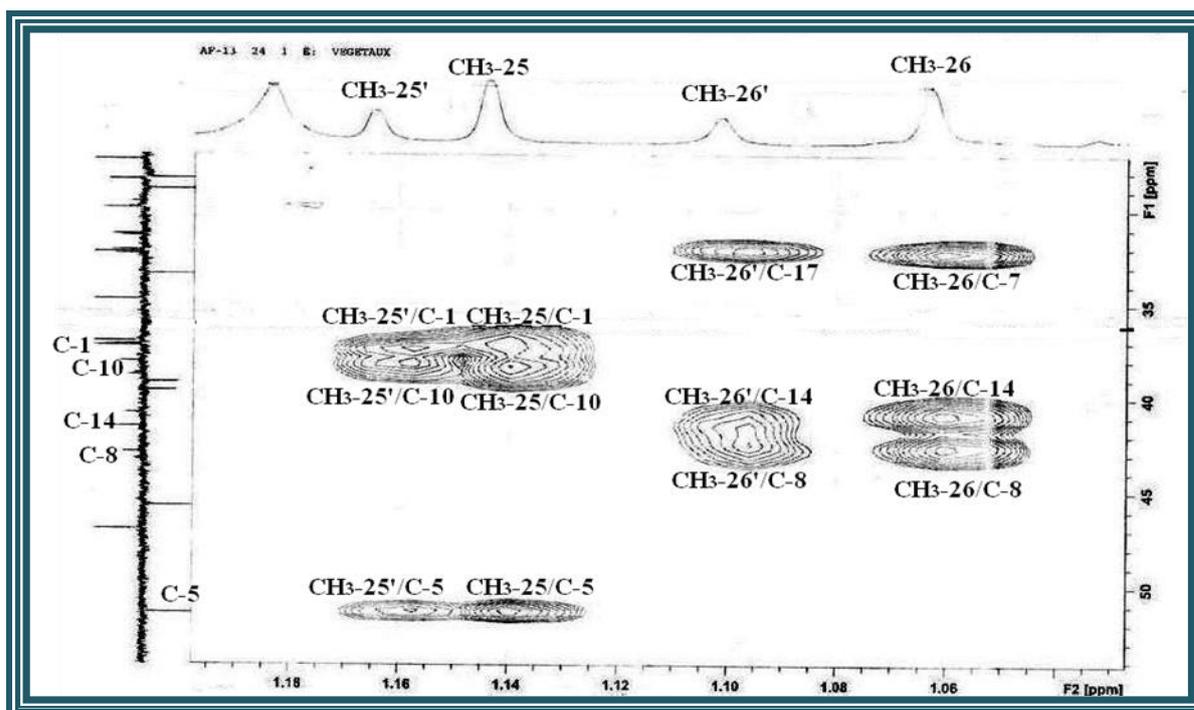
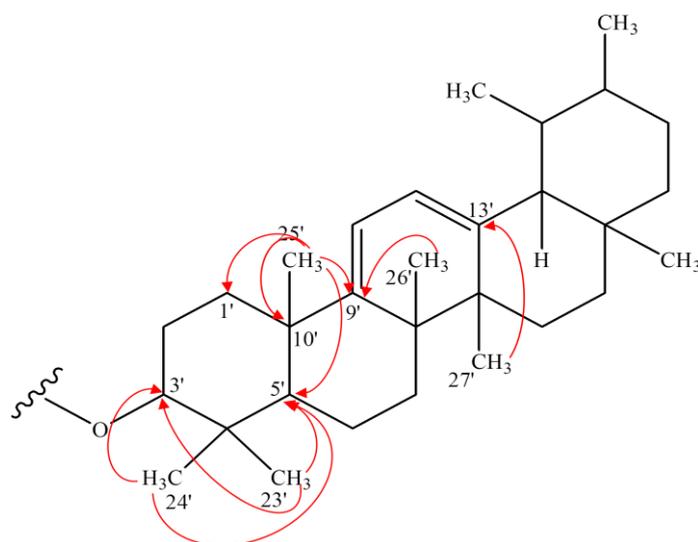
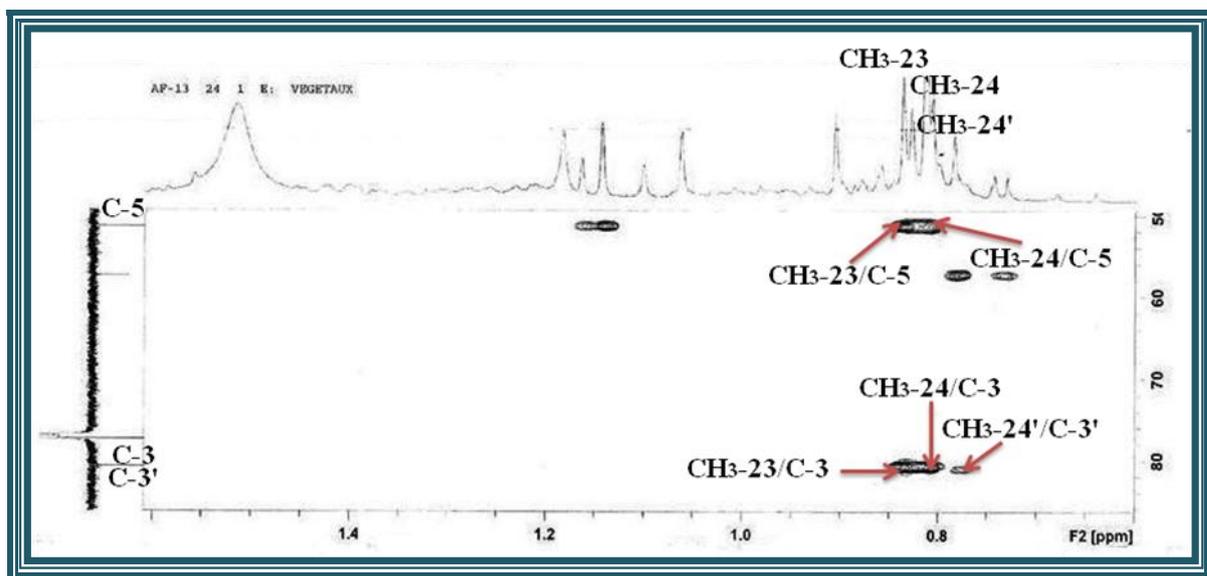


Figure III.237: Spectre HMBC du mélange des composés 21 et 22



**Figure III.238: Corrélations HMBC des différents méthyles du composé 22**

A partir des carbones C-3' et C-5', on identifie aisément les deux méthyles Me-23' [ $\delta_H$  0,84 (s)] et Me-24' [ $\delta_H$  0,78 (s)] suite aux couplages qu'ils montrent en  $^3J$  sur le spectre HMBC (Figures III.238 et III.239).



**Figure III.239: Spectre HMBC du mélange des composés 21 et 22**

Les autres protons et carbones du composé **22** à squelette ursa-9(11),12-diène sont déterminés par analyse combinée des spectres COSY, HSQC et HMBC (Tableau III.20).

De la même façon on assigne les déplacements chimiques des protons et carbones du 2<sup>ème</sup> isomère **21** à squelette oléana-9(11),12-diène (Tableau III.19).

L'analyse du spectre HMBC permet de visualiser une tache de corrélation entre le proton H-3 et un carbonyle résonant à  $\delta_C$  171,4 confirmant l'attachement du groupement acétate en position 3 (Figures III.240 et III.241).

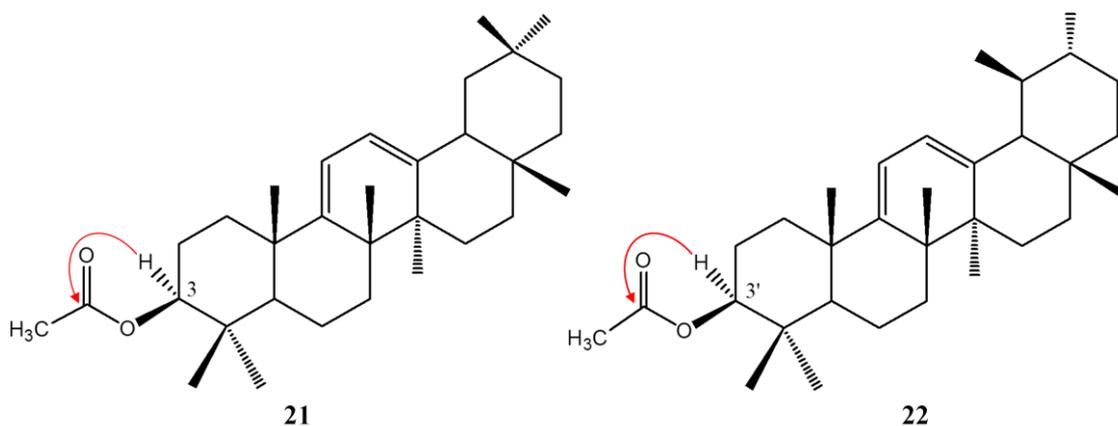


Figure III.240: Corrélations entre H-3 et le groupement acétate des composés 21 et 22

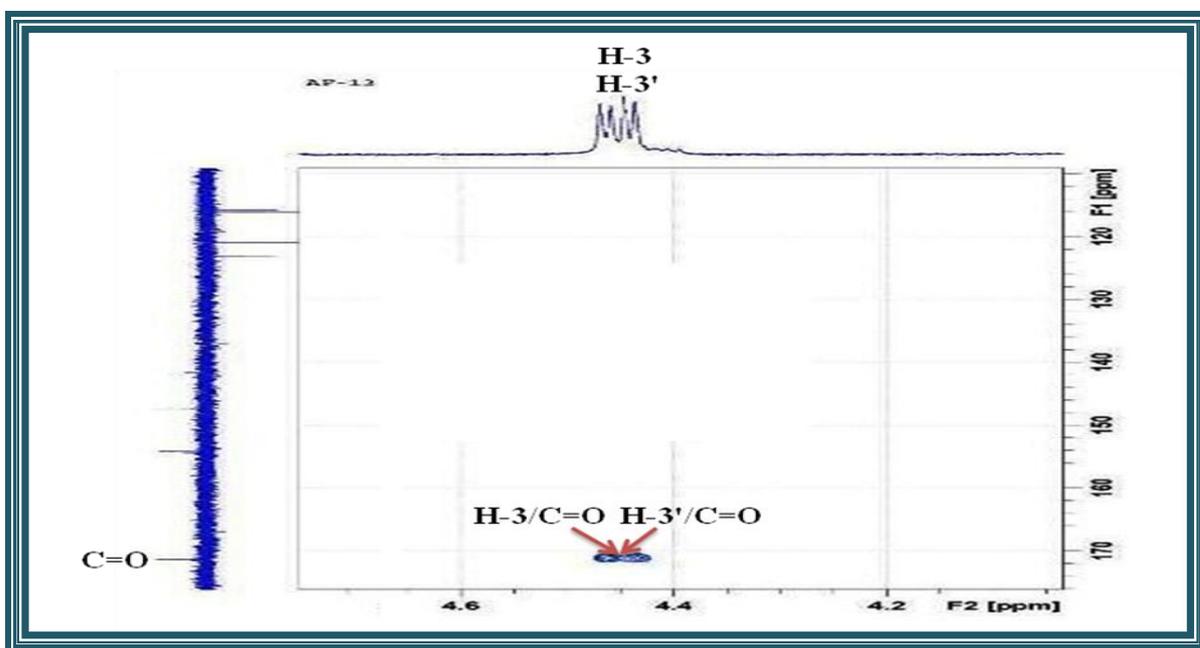


Figure III.241: Spectre HMBC du mélange des composés 21 et 22

Ces deux molécules nommées oléana-9(11),12-diène-3-yl acétate (**21**) et ursina-9(11),12-diène-3-yl acétate (**22**) ont été isolées antérieurement de l'espèce *Dorstenia arifolia* (Moraceae).<sup>[207]</sup> Elles ont été identifiées pour la 1<sup>ère</sup> fois dans le genre *Atractylis*.

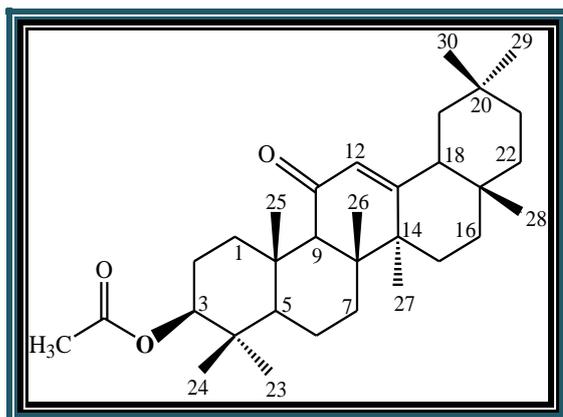
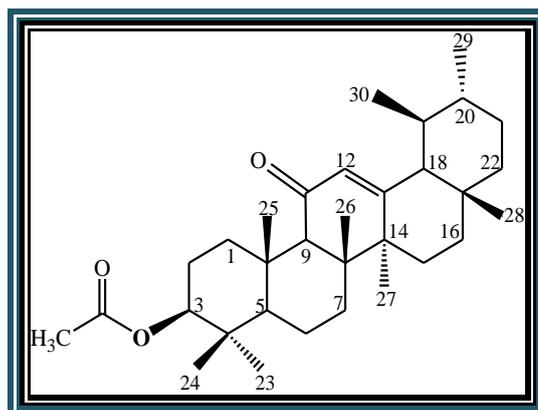
Tableau III.19: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 21 (oléana-9(11),12-dièn-3-yl acétate) dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
|----------|---------------------------|----------------------------------|
| 1        | 37,1                      | 1,92 (m) H-1a<br>1,20 (m) H-1b   |
| 2        | 24,4                      | 1,65 (m)                         |
| 3        | 80,8                      | 4,45 (dd, 11,4; 5,1)             |
| 4        | 39,2                      | -                                |
| 5        | 51,4                      | 0,89 (m)                         |
| 6        | 18,4                      | 1,56 (m) H-6a<br>1,45 (m) H-6b   |
| 7        | 32,3                      | 1,65 (m) H-7a<br>1,28 (m) H-7b   |
| 8        | 40,8                      | -                                |
| 9        | 154,2                     | -                                |
| 10       | 38,8                      | -                                |
| 11       | 116,1                     | 5,50 (d, 5,8)                    |
| 12       | 120,9                     | 5,44 (d, 5,8)                    |
| 13       | 147,5                     | -                                |
| 14       | 42,9                      | -                                |
| 15       | 25,9                      | 1,76 (m) H-15a<br>0,93 (m) H-15b |
| 16       | 27                        | 1,88 (m) H-16a<br>0,80 (m) H-16b |
| 17       | 32                        | -                                |
| 18       | 45,7                      | 2,05 (dd, 13,2 ; 4,3)            |
| 19       | 50                        | 1,50 (m) H-19a<br>0,98 (m) H-19b |
| 20       | 31,4                      | -                                |
| 21       | 34,8                      | 1,26 (m) H-21a<br>1,06 (m) H-21b |
| 22       | 37,2                      | 1,92 (m) H-22a / 1,35 (m) H-22b  |
| 23       | 28,4                      | 0,86 (s)                         |
| 24       | 17,0                      | 0,81 (s)                         |
| 25       | 25,5                      | 1,14 (s)                         |
| 26       | 21,2                      | 1,06 (s)                         |
| 27       | 20,2                      | 0,91 (s)                         |
| 28       | 28,9                      | 0,82 (s)                         |
| 29       | 33,4                      | 0,81 (s)                         |
| 30       | 23,9                      | 0,83 (s)                         |
| 1'       | 171,4                     | -                                |
| 2'       | 21,6                      | 1,99 (s)                         |

Tableau III.20: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 22 (ursa-9(11),12-dièn-3-yl acétate) dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)   |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 37,1                      | 1,92 ( <i>m</i> ) H-1a<br>1,20 ( <i>m</i> ) H-1b   |
| 2        | 24,4                      | 1,65 ( <i>m</i> )                                  |
| 3        | 80,8                      | 4,45 ( <i>dd</i> , 11,4; 5,1)                      |
| 4        | 39,2                      | -  |
| 5        | 51,4                      | 0,89 ( <i>m</i> )                                  |
| 6        | 18,4                      | 1,56 ( <i>m</i> ) H-6a<br>1,45 ( <i>m</i> ) H-6b   |
| 7        | 32,3                      | 1,65 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,28 ( <i>m</i> ) H-7b   |
| 8        | 40,8                      | -  |
| 9        | 154,2                     | -  |
| 10       | 38,7                      | -  |
| 11       | 115,7                     | 5,52 ( <i>d</i> , 5,8)                             |
| 12       | 123,1                     | 5,38 ( <i>d</i> , 5,8)                             |
| 13       | 140,5                     | -  |
| 14       | 42,9                      | -  |
| 15       | 25,9                      | 1,76 ( <i>m</i> ) H-15a<br>0,93 ( <i>m</i> ) H-15b |
| 16       | 27                        | 1,88 ( <i>m</i> ) H-16a<br>0,80 ( <i>m</i> ) H-16b |
| 17       | 33,5                      | -  |
| 18       | 57,5                      | 1,40 ( <i>m</i> )                                  |
| 19       | 39,2                      | 0,85 ( <i>m</i> )                                  |
| 20       | 39,6                      | 0,85 ( <i>m</i> )                                  |
| 21       | 34,8                      | 1,26 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,06 ( <i>m</i> ) H-21b |
| 22       | 41,1                      | 1,40 ( <i>m</i> ) H-22a/ 1,20 ( <i>m</i> ) H-22b   |
| 23       | 28,4                      | 0,84 ( <i>s</i> )                                  |
| 24       | 17,0                      | 0,78 ( <i>s</i> )                                  |
| 25       | 25,7                      | 1,16 ( <i>s</i> )                                  |
| 26       | 22,3                      | 1,10 ( <i>s</i> )                                  |
| 27       | 20,2                      | 0,91( <i>s</i> )                                   |
| 28       | 28,9                      | 0,78 ( <i>s</i> )                                  |
| 29       | 17,7                      | 0,73 ( <i>d</i> , 6,6)                             |
| 30       | 21,7                      | 0,85 ( <i>sl</i> )                                 |
| 1'       | 171,4                     | -  |
| 2'       | 21,6                      | 1,99 ( <i>s</i> )                                  |

## III-4-4-3-7 Elucidation structurale des composés 23 et 24

11-oxo- $\beta$ -amyrine acétate (23)11-oxo- $\alpha$ -amyrine acétate (24)

Le mélange des composés **23** et **24** est obtenu aussi sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse de ce mélange ESI-MS montre en mode positif (Figure III.242), deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  505 et  $[2M+Na]^+$  à  $m/z$  987, correspondant à une masse moléculaire de 488 uma et une formule brute  $C_{32}H_{50}O_3$ .

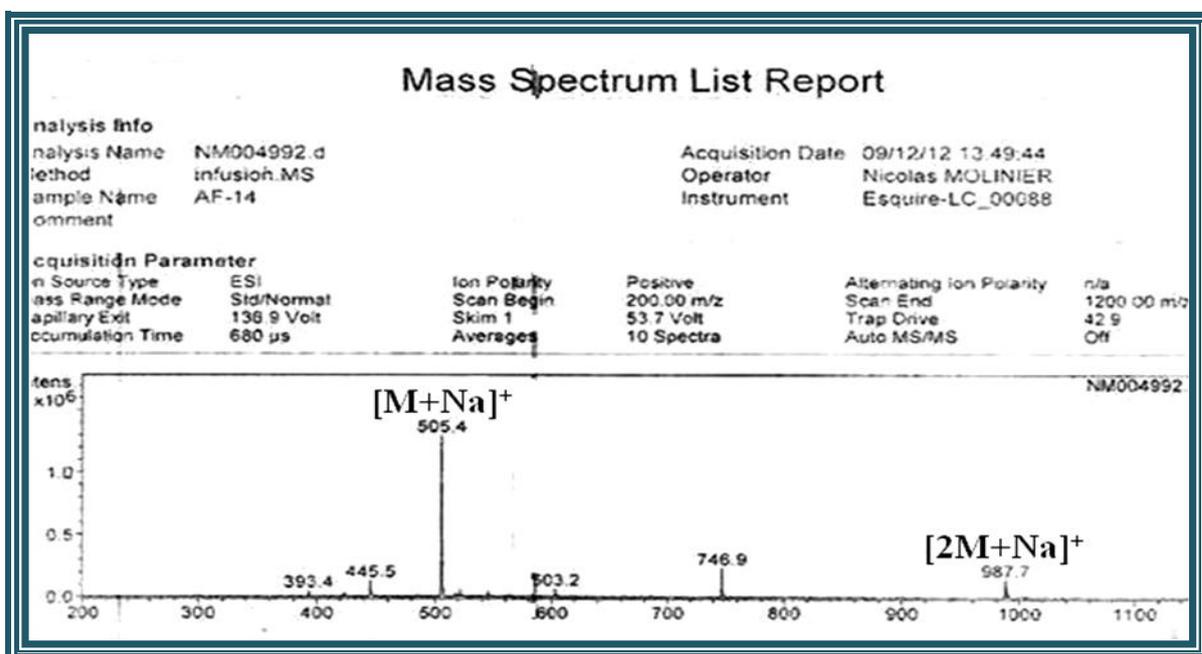


Figure III.242: Spectre de masse ESI-MS du mélange des composés 23 et 24

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figures III.243 et III.246) de ce composé montrent une similitude à ceux du mélange des composés **21** et **22** précédents. En effet, l'examen du spectre RMN  $^1H$  révèle la présence d'un nombre élevé de méthyles entre 0,70 et 1,20 ppm. L'analyse du spectre HSQC (Figure III.244) indique au moins 15 taches de corrélations entre 15 et 35 ppm correspondant à 2 triterpènes pentacycliques.

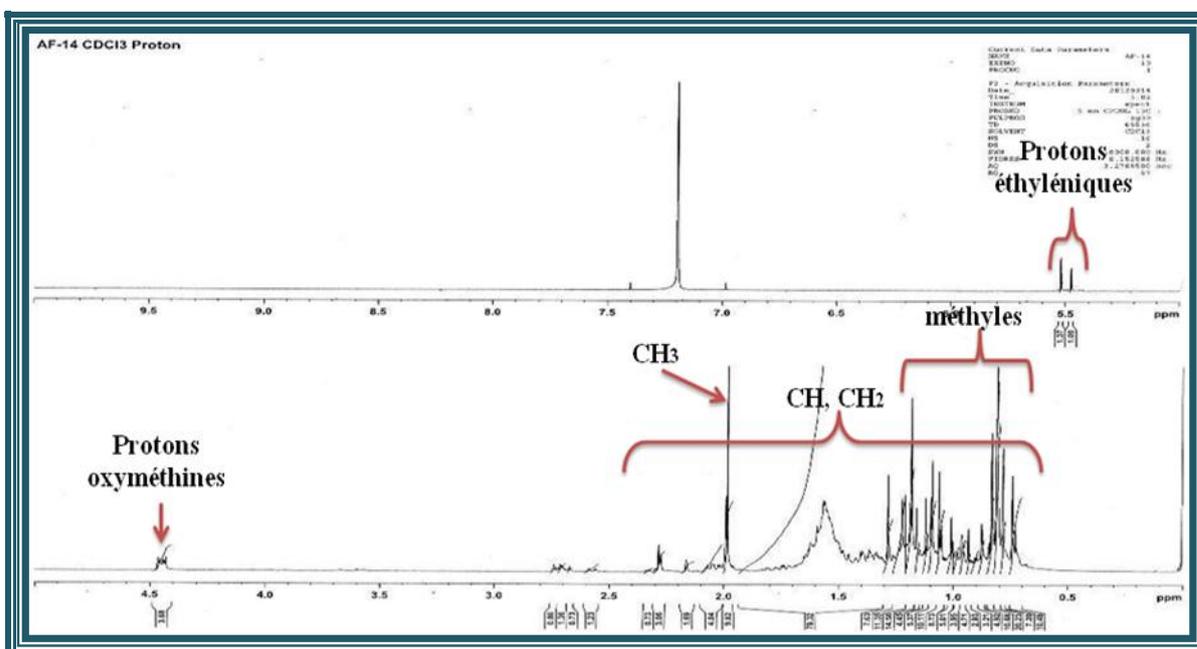


Figure III.243: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange des composés 23 et 24

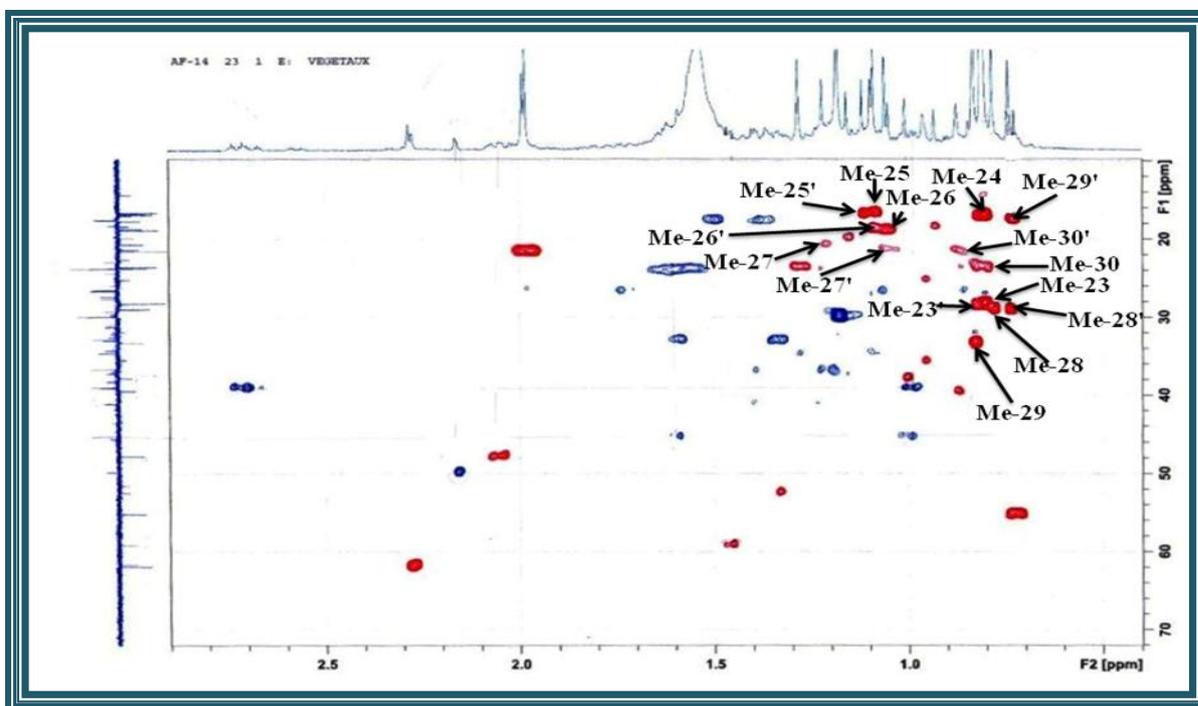


Figure III.244: Spectre HSQC du mélange des composés 23 et 24

Il est visualisé aussi sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  dans la région à champs faible 3 signaux attribuables à un proton oxyméthine H-3 [ $\delta_{\text{H}}$  4,45 (*m*)] et deux protons éthyléniques résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (*s*) et 5,52 (*s*). Leurs carbones sont détectés à  $\delta_{\text{C}}$  80,9 ; 128,4 et 130,6 respectivement (Figure III.245).

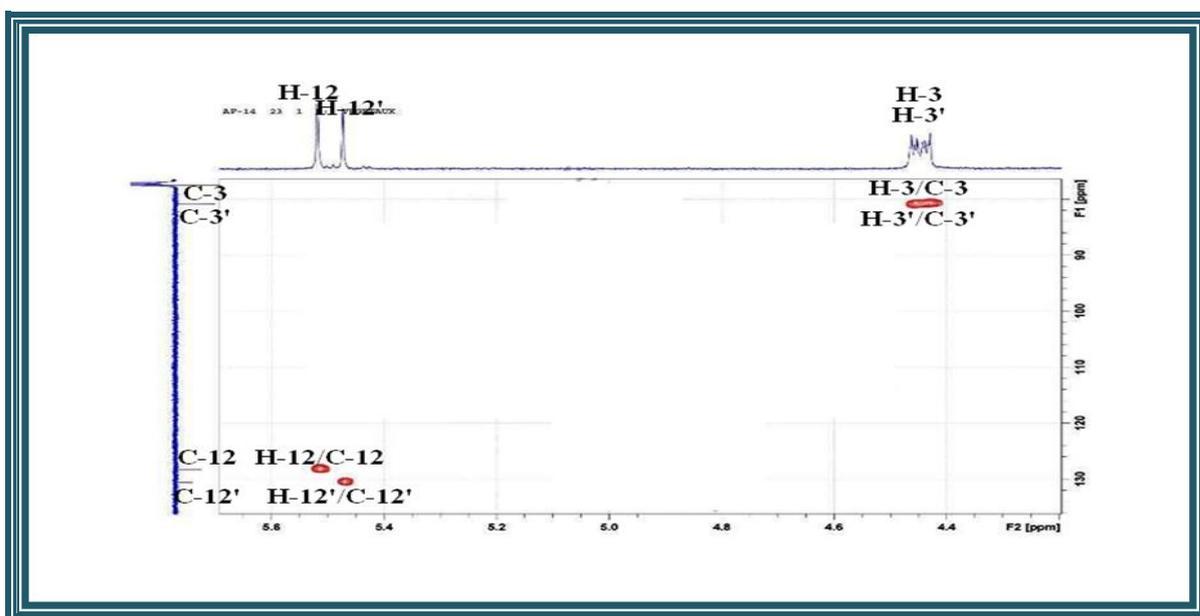


Figure III.245: Spectre HSQC du mélange des composés 23 et 24

On constate aussi l'existence d'un signal d'intégration plus de 6H à  $\delta_H$  1,99 sur le spectre RMN  $^1H$  correspondant au méthyle d'un groupement acétate.

Les valeurs des déplacements chimiques du proton et carbone C-3 à  $\delta_H$  4,45/ $\delta_C$  80,9 indiquent que la position 3 du squelette triterpénique est acylé par un groupement acétate.

Le spectre RMN  $^{13}C$  *J*-modulé (Figure III.246) révèle l'existence de plus de 40 atomes de carbones suggérant la présence d'un mélange de deux triterpènes pentacycliques isomères dont l'un est de la série oléan-12-ène et l'autre de la série urs-12-ène.

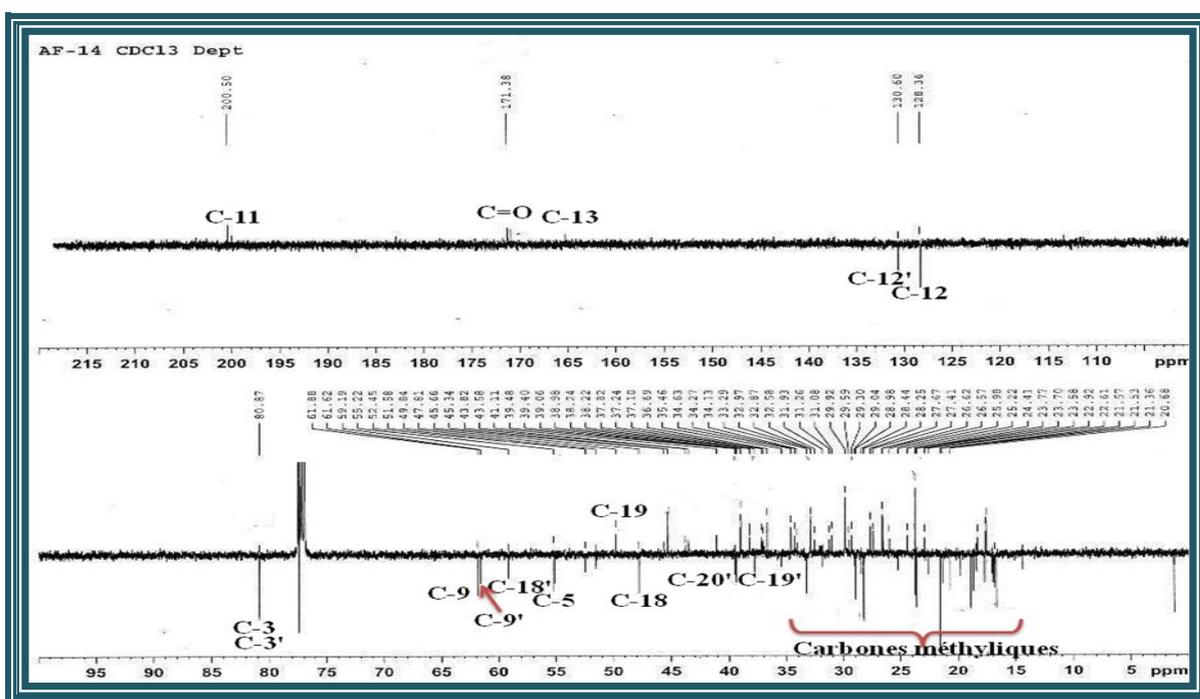


Figure III.246: Spectre RMN  $^{13}C$  DEPT du mélange des composés 23 et 24

La différence entre les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé de ce mélange et les composés **21** et **22** du mélange précédent réside dans la disparition des signaux de 2 protons éthyléniques et l'apparition sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé d'un signal fortement déblindé résonant à  $\delta_{\text{C}}$  200,5 attribuable à un groupement carbonyle d'une cétone.

L'attribution des signaux des deux protons éthyléniques H-12 et H-12' est établie en analysant le spectre HMBC (Figure III.249). En effet, le carbone C-18' du squelette urs-12-ène est repéré à 39,2 ppm suite aux corrélations en  $^3J$  qu'il présente sur le spectre HMBC avec les protons des méthyles Me-28' [ $\delta_{\text{H}}$  0,74 (*s*)] et Me-29' [ $\delta_{\text{H}}$  0,73 (*d*,  $J = 6,6$  Hz)] et le proton éthylénique H-12' [ $\delta_{\text{H}}$  5,47 (*s*)] (Figures III.247 et III.248).

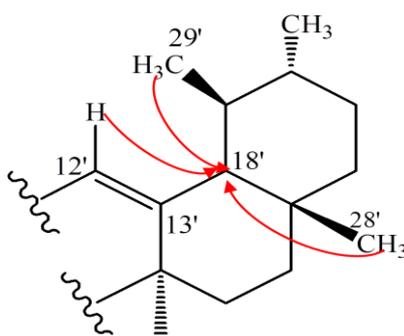


Figure III.247: Corrélations HMBC entre les protons H<sub>3</sub>-28', H<sub>3</sub>-29' et H-12' et le carbone C-18'

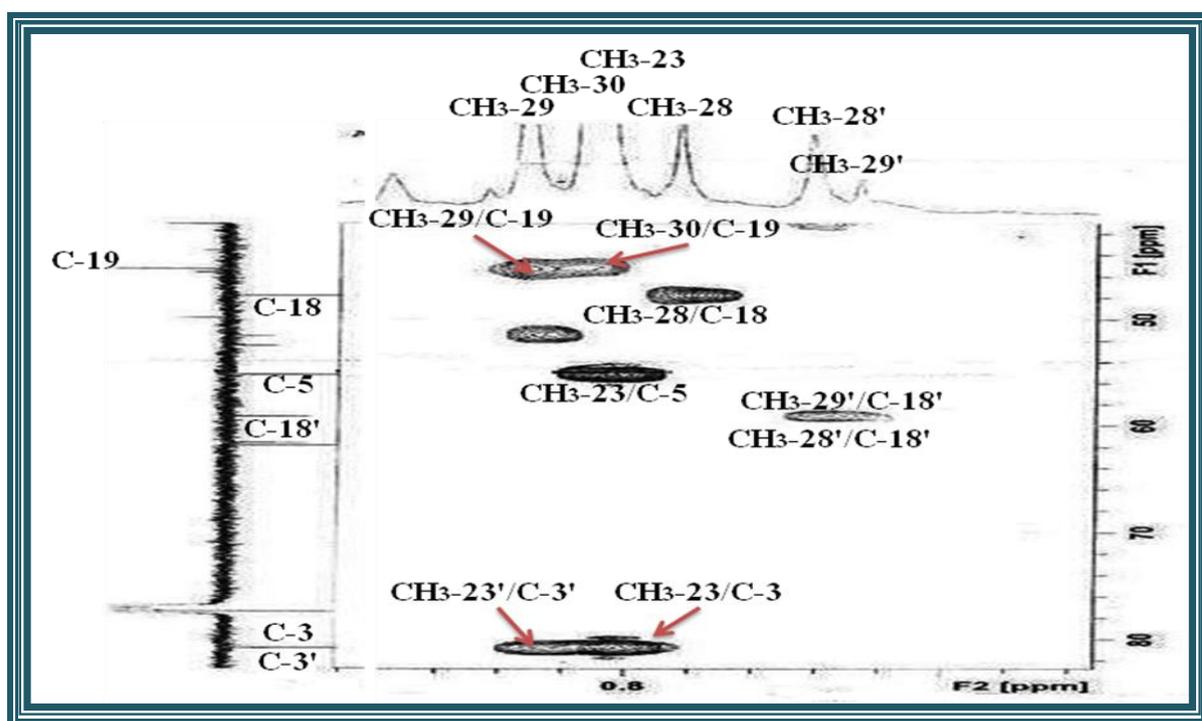


Figure III.248: Spectre HMBC du mélange des composés 23 et 24

Son carbone (C-12') est repéré à 130,6 ppm par HSQC. Le déplacement chimique du groupement méthine CH-12' déblindé en comparaison avec le même carbone dans le cas de  $\alpha$ -amyrine (124,3 ppm), <sup>[206]</sup> ainsi la multiplicité du proton H-12' sous forme de singulet indiquent la présence d'un carbone quaternaire en position C-11' porteur d'un groupement attracteur. Le déplacement chimique du carbone éthylénique quaternaire C-13' (163 ppm) fortement déblindé suggère la présence d'un système énone soit un carbonyle  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé en C-11' ( $\delta_C$  200,5). <sup>[207,208]</sup>

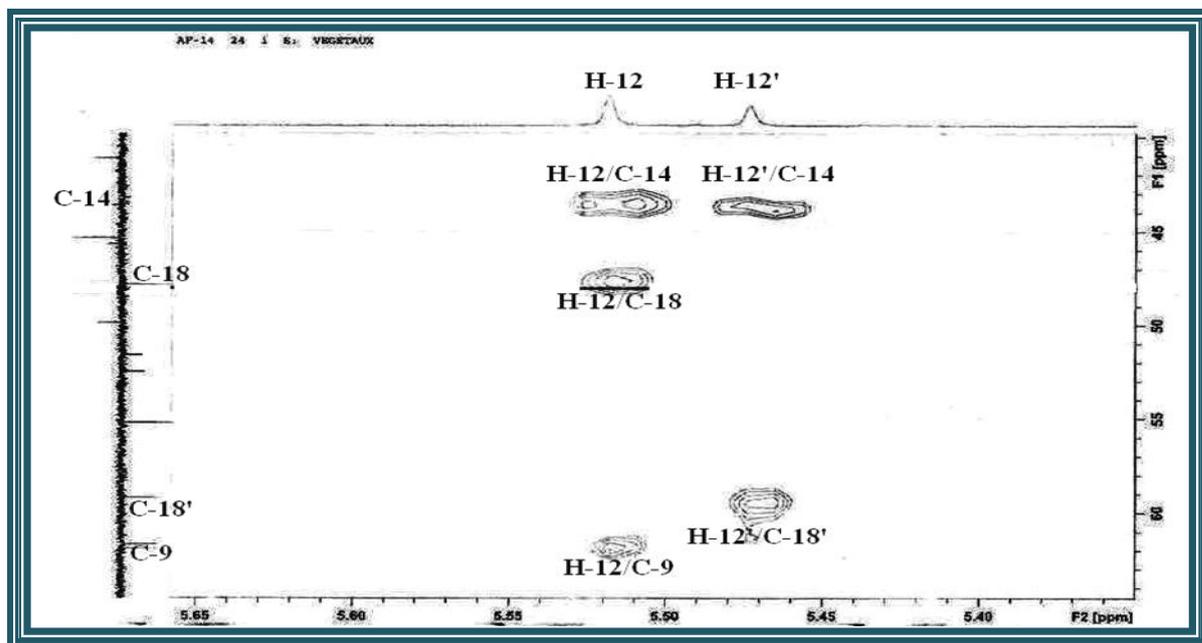


Figure III.249: Spectre HMBC du mélange des composés 23 et 24

De la même façon, le proton éthylénique H-12 [ $\delta_H$  5,52 (s)] et les protons du groupement méthylique CH<sub>3</sub>-28 (0,78 ppm) corrélient en <sup>3</sup>J sur le spectre HMBC (Figures III.249 et III.250) avec le carbone méthine CH-18 résonant à  $\delta_C$  47,8.

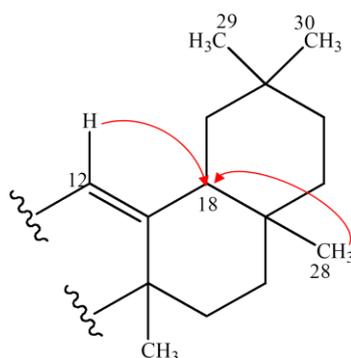
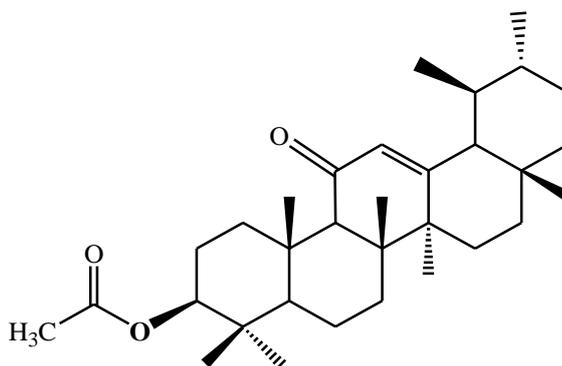


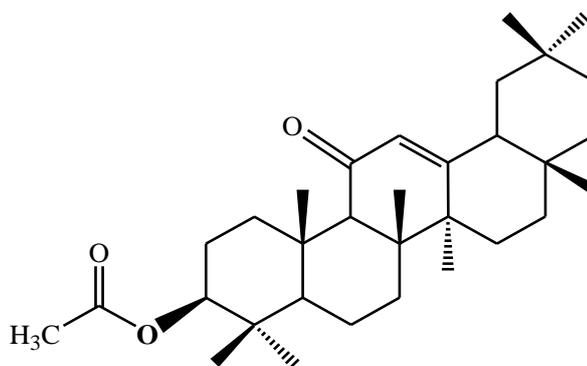
Figure III.250: Corrélations HMBC des protons H-12 et Me-28

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé, COSY, HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III.22) du composé **24** identifié à 11-oxo- $\alpha$ -amyrine acétate (**24**).<sup>[207]</sup>



**11-oxo- $\alpha$ -amyrine acétate (24)**

La structure moléculaire du 2<sup>ème</sup> isomère **23** est déterminée de la même manière que le composé **24**, il s'agit de 11-oxo- $\beta$ -amyrine acétate.<sup>[207]</sup>



**11-oxo- $\beta$ -amyrine acétate (23)**

Ces deux composés isomères (**23** et **24**) ont été identifiés antérieurement dans l'espèce *Dorstenia arifolia* de la famille Moraceae.<sup>[207]</sup> Il est à signaler que ces deux composés sont isolés pour la première fois dans le genre *Atractylis*. Les tableaux suivants (Tableau III.21 et III.22) rassemblent toutes les données spectroscopiques de ces deux composés.

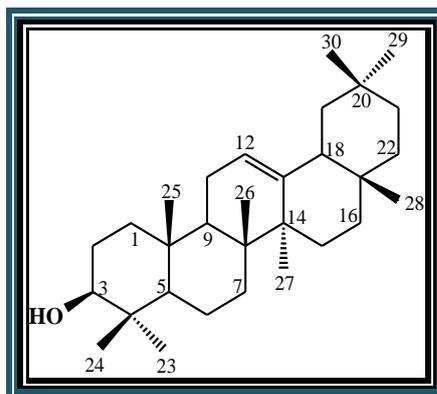
Tableau III.21: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 23 dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)   |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 39,4                      | 2,72 ( <i>m</i> ) H-1a<br>1,02 ( <i>m</i> ) H-1b   |
| 2        | 23,8                      | 1,57 ( <i>m</i> )                                  |
| 3        | 80,9                      | 4,45 ( <i>m</i> )                                  |
| 4        | 38,4                      | -  |
| 5        | 55,2                      | 0,73 ( <i>m</i> )                                  |
| 6        | 17,5                      | 1,59 ( <i>m</i> ) H-6a<br>1,37 ( <i>m</i> ) H-6b   |
| 7        | 33                        | 1,60 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,33 ( <i>m</i> ) H-7b   |
| 8        | 43,7                      | -  |
| 9        | 61,9                      | 2,27 ( <i>s</i> )                                  |
| 10       | 37,1                      | -  |
| 11       | 200,5                     | -  |
| 12       | 128,4                     | 5,52 ( <i>s</i> )                                  |
| 13       | 165                       | -  |
| 14       | 45                        | -  |
| 15       | 26,2                      | 1,32 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,04 ( <i>m</i> ) H-15b |
| 16       | 26,7                      | 1,74 ( <i>m</i> ) H-16a<br>1,07 ( <i>m</i> ) H-16b |
| 17       | 32,4                      | -  |
| 18       | 47,8                      | 2,05 ( <i>m</i> )                                  |
| 19       | 45,3                      | 1,60 ( <i>m</i> ) H-19a<br>1,02 ( <i>m</i> ) H-19b |
| 20       | 31,3                      | -  |
| 21       | 34,6                      | 1,28 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,10 ( <i>m</i> ) H-21b |
| 22       | 37,1                      | 1,40 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,20 ( <i>m</i> ) H-22b |
| 23       | 28,4                      | 0,81 ( <i>s</i> )                                  |
| 24       | 17                        | 0,82 ( <i>s</i> )                                  |
| 25       | 16,8                      | 1,08 ( <i>s</i> )                                  |
| 26       | 18,8                      | 1,12 ( <i>s</i> )                                  |
| 27       | 21,5                      | 1,22 ( <i>s</i> )                                  |
| 28       | 29,3                      | 0,78 ( <i>s</i> )                                  |
| 29       | 33,3                      | 0,83 ( <i>s</i> )                                  |
| 30       | 23,5                      | 0,82 ( <i>s</i> )                                  |
| 1'       | 171,4                     | -  |
| 2'       | 21,6                      | 1,99 ( <i>s</i> )                                  |

Tableau III.22: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 24 dans  $\text{CDCl}_3$ 

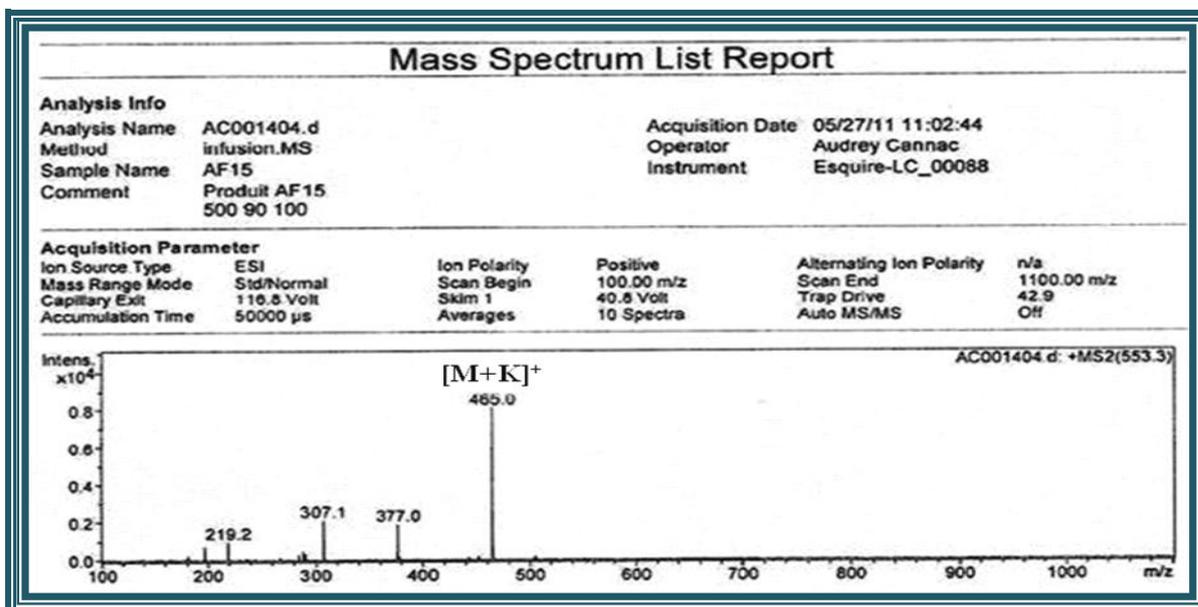
| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)   |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 39,4                      | 2,72 ( <i>m</i> ) H-1a<br>1,02 ( <i>m</i> ) H-1b   |
| 2        | 23,8                      | 1,57 ( <i>m</i> )                                  |
| 3        | 80,9                      | 4,45 ( <i>m</i> )                                  |
| 4        | 38,4                      | -  |
| 5        | 55,2                      | 0,73 ( <i>m</i> )                                  |
| 6        | 17,5                      | 1,59 ( <i>m</i> ) H-6a<br>1,37 ( <i>m</i> ) H-6b   |
| 7        | 33                        | 1,60 ( <i>m</i> ) H-7a<br>1,33 ( <i>m</i> ) H-7b   |
| 8        | 43,7                      | -  |
| 9        | 61,6                      | 2,26 ( <i>s</i> )                                  |
| 10       | 37,1                      | -  |
| 11       | 200,5                     | -  |
| 12       | 130,6                     | 5,47 ( <i>s</i> )                                  |
| 13       | 163                       | -  |
| 14       | 45                        | -  |
| 15       | 26,2                      | 1,32 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,04 ( <i>m</i> ) H-15b |
| 16       | 26,7                      | 1,74 ( <i>m</i> ) H-16a<br>1,07 ( <i>m</i> ) H-16b |
| 17       | 34                        | -  |
| 18       | 59,2                      | 1,46 ( <i>m</i> )                                  |
| 19       | 38,2                      | 1,00 ( <i>sl</i> )                                 |
| 20       | 39,5                      | 0,87 ( <i>sl</i> )                                 |
| 21       | 34,6                      | 1,28 ( <i>m</i> ) H-21a<br>1,10 ( <i>m</i> ) H-21b |
| 22       | 41,1                      | 1,40 ( <i>m</i> ) H-22a<br>1,20 ( <i>m</i> ) H-22b |
| 23       | 28,4                      | 0,83 ( <i>s</i> )                                  |
| 24       | 17                        | 0,85 ( <i>s</i> )                                  |
| 25       | 16,9                      | 1,12 ( <i>s</i> )                                  |
| 26       | 18,8                      | 1,10 ( <i>s</i> )                                  |
| 27       | 21,6                      | 1,16 ( <i>s</i> )                                  |
| 28       | 29,3                      | 0,74 ( <i>s</i> )                                  |
| 29       | 17,5                      | 0,73 ( <i>d</i> , 6,6)                             |
| 30       | 21,6                      | 0,87 ( <i>sl</i> )                                 |
| 1'       | 171,4                     | -  |
| 2'       | 21,6                      | 1,99 ( <i>s</i> )                                  |

## III-4-4-3-8 Elucidation structurale du composé 25

 **$\beta$ -Amyrine (25)**

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Il s'agit d'un triterpène pentacyclique à squelette oléanane. Il a été isolé auparavant des genres *Mikania*,<sup>[209]</sup> et *Taraxacum*,<sup>[210]</sup> et de l'espèce *Carlina corymbosa*<sup>[32]</sup> de la famille Asteraceae.

Sa formule brute  $C_{30}H_{50}O$  a été déduite du spectre de masse ESI-MS (Figure III.252) enregistré en mode positif. Ce spectre montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  465 identifiable à  $[M+K]^+$ , soit une masse moléculaire de 426 uma.

**Figure III.252: Spectre de masse ESI-MS du composé 25**

Le spectre RMN  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figure III.253) du produit **25** montre dans la région blindée, des signaux correspondant à 8 méthyles angulaires, résonant entre 15 et 34 ppm, 10 groupements méthylènes  $CH_2$  situés entre 18 et 39 ppm, 4 méthines dont un est attribué à un oxyméthine repéré à  $\delta_C$  79,2 ainsi que 6 signaux de carbones quaternaires résonant entre 31 et 42 ppm. Dans la région déblindée, deux signaux localisés à  $\delta_C$  121,9 et 145,4 sont attribuables aux carbones éthyléniques CH-12 et Cq-13. Ces valeurs de déplacements chimiques sont

caractéristiques des triterpènes à squelette oléane. <sup>[200]</sup> Le nombre d'atomes de carbone égal à 30 confirme bien la nature triterpénique de ce composé.

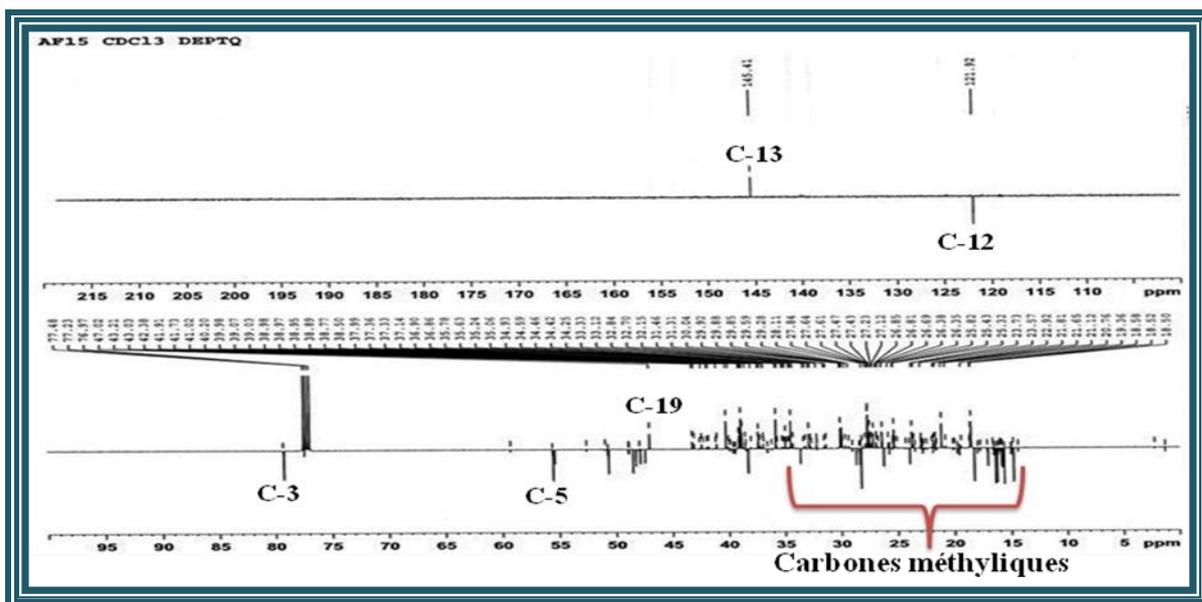


Figure III.253: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du composé 25

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.254) du composé 25 présente à champ fort huit signaux singulets fins attribuables aux groupements méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}}$  0,93 (CH<sub>3</sub>-23), 0,79 (CH<sub>3</sub>-24), 0,82 (CH<sub>3</sub>-25), 1,01 (CH<sub>3</sub>-26), 1,08 (CH<sub>3</sub>-27), 0,80 (CH<sub>3</sub>-28), 0,84 (CH<sub>3</sub>-29) et 0,83 (CH<sub>3</sub>-30).

Un massif de protons repéré entre 0,70 à 2,00 ppm correspondant aux (CH) et (CH<sub>2</sub>) des cinq cycles est observé sur ce spectre. Ce dernier montre aussi à champ faible deux signaux résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (*m*) et  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (*t*,  $J = 2,3$  Hz) attribuables respectivement à un proton oxyméthine (H-3) et un proton éthylénique (H-12).

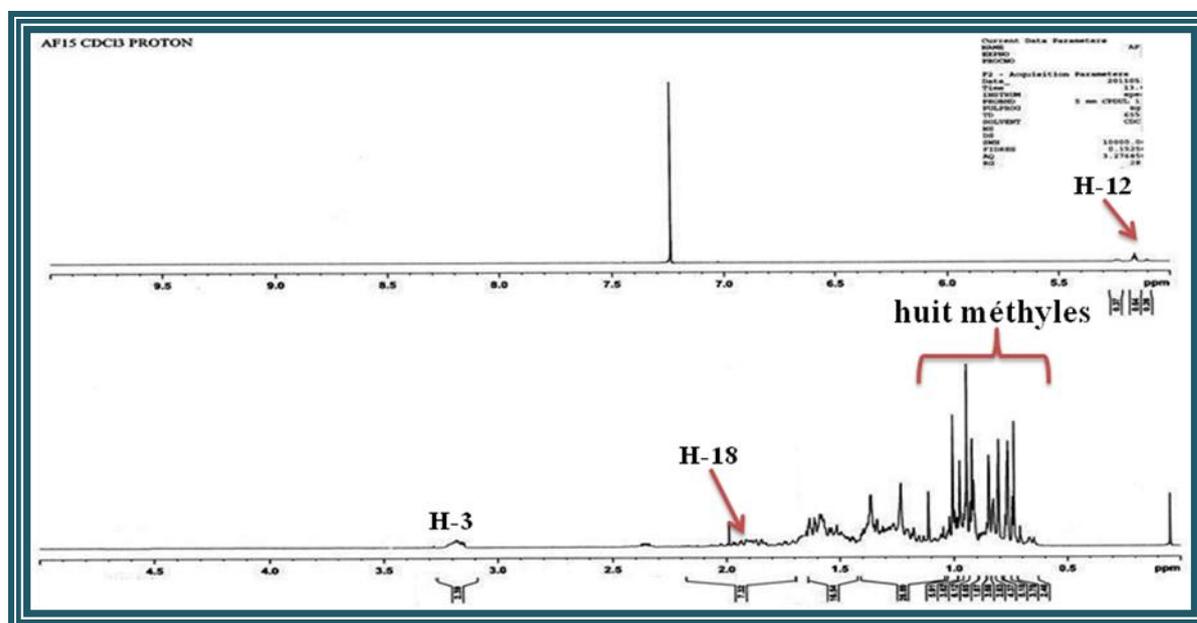


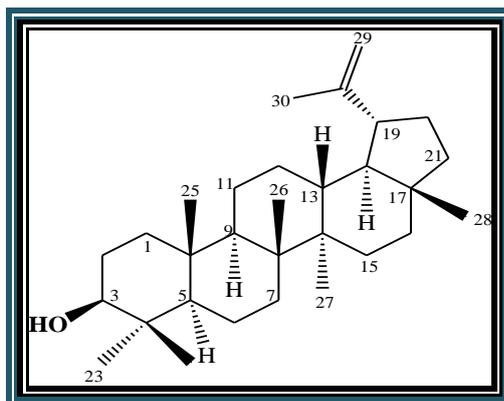
Figure III.254: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 25

L'analyse combinée des différents spectres de corrélations (COSY, HSQC et HMBC) permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé. L'ensemble des données spectroscopiques (Tableau III.23) et la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = + 88,4^\circ$  (C= 0,65, CHCl<sub>3</sub>) conduisent sans doute à identifier le composé **25** comme étant le  $\beta$ -amyrine. <sup>[211]</sup>

Tableau III.23: Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de **25** dans CDCl<sub>3</sub>

| position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)          |
|----------|------------------|----------------------------------|
| 1        | 38,8             |                                  |
| 2        | 27,2             | 1,57 (m)                         |
| 3        | 79,2             | 3,20 (m) H-3 $\alpha$            |
| 4        | 38,8             | -                                |
| 5        | 55,3             | 0,71 (m)                         |
| 6        | 18,5             | 1,48 (m) H-6a<br>1,33 (m) H-6b   |
| 7        | 32,8             | 1,35 (m)                         |
| 8        | 38,9             | -                                |
| 9        | 48,2             | 1,50 (m)                         |
| 10       | 37,4             | -                                |
| 11       | 23,7             | 1,83 (m)                         |
| 12       | 121,9            | 5,15 (t, 2,3)                    |
| 13       | 145,4            | -                                |
| 14       | 41,9             | -                                |
| 15       | 26,3             | 1,65 (m) H-15a<br>1,52 (m) H-15b |
| 16       | 27,1             | 1,84 (m)                         |
| 17       | 32,7             | -                                |
| 18       | 47,4             | 1,88 (m)                         |
| 19       | 47               | 1,62 (m) H-19a<br>0,96 (m) H-19b |
| 20       | 31,3             | -                                |
| 21       | 34,6             | 1,22 (m)                         |
| 22       | 37,3             | 1,45 (m)                         |
| 23       | 28,2             | 0,93 (s)                         |
| 24       | 15,6             | 0,79 (s)                         |
| 25       | 15,9             | 0,82 (s)                         |
| 26       | 16,1             | 1,01 (s)                         |
| 27       | 26,2             | 1,08 (s)                         |
| 28       | 28,6             | 0,80 (s)                         |
| 29       | 33,3             | 0,84 (s)                         |
| 30       | 23,9             | 0,83 (s)                         |

## III-4-4-3-9 Elucidation structurale du composé 26



Lupéol (26)

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche invisible à la lumière UV en 254 et 366 nm. La CCM de ce composé donne une coloration orange-marron après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage, ce qui permet de déduire qu'il s'agit a priori d'un triterpène.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.255) en mode positif montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  449  $[M+Na]^+$  et à  $m/z$  876  $[2M+Na]^+$  indiquant que la masse moléculaire est 426 uma compatible avec la formule moléculaire  $C_{30}H_{50}O$  ; ceci suggère que les composés 25 et 26 sont des isomères.

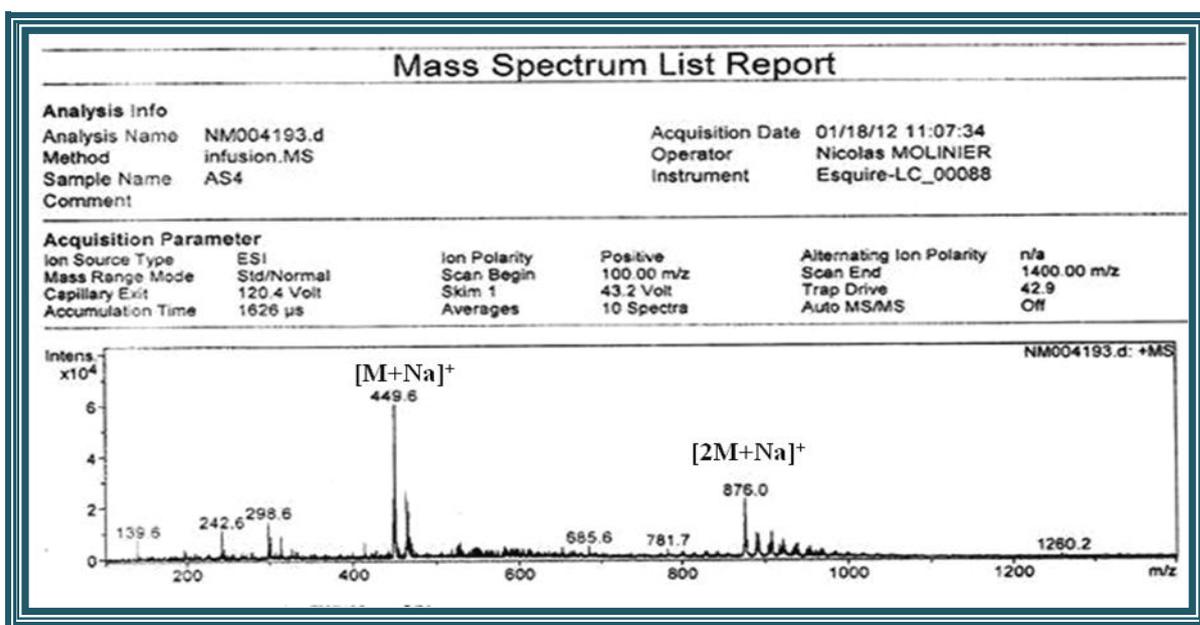


Figure III.255: Spectre de masse ESI-MS du composé 26

Il est observé sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.256) sept signaux de protons de groupements méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}}$  0,97 ( $\text{CH}_3\text{-23}$ , *s*), 0,73 ( $\text{CH}_3\text{-24}$ , *s*), 0,82 ( $\text{CH}_3\text{-25}$ , *s*), 1,01 ( $\text{CH}_3\text{-26}$ , *s*), 0,92 ( $\text{CH}_3\text{-27}$ , *s*), 0,76 ( $\text{CH}_3\text{-28}$ , *s*) et 1,54 ( $\text{CH}_3\text{-30}$ , *sl*).

Ce spectre montre aussi deux signaux doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  4,66 (*d*,  $J = 2,3\text{Hz}$ ) et 4,54 (*d*,  $J = 2,3\text{Hz}$ ) correspondant à deux protons oléfiniques. En plus, un autre signal est visualisé à  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (*m*) attribuable à un groupement oxyméthine ( $\text{CHO-3}$ ). Toutes ces données attestent que ce composé a une nature triterpénique.

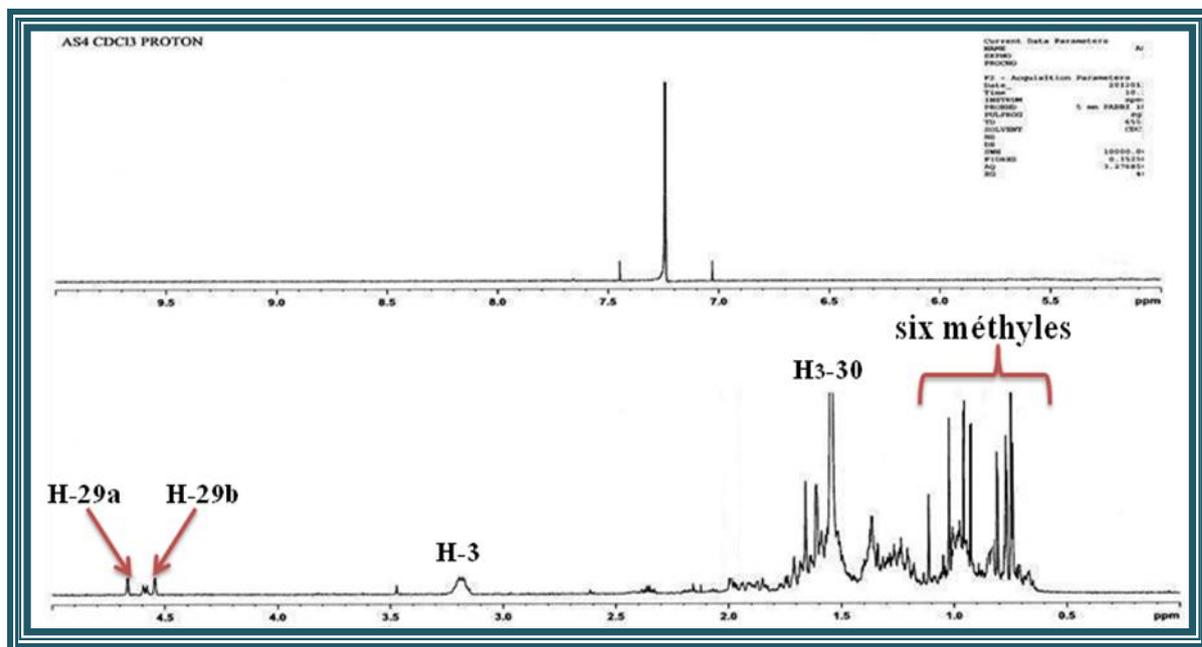


Figure III.256: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 26

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III.257) en apporte la preuve de la nature triterpénique de ce composé, et cela par l'observation des signaux suivants :

- Sept groupements méthyles résonant entre 14,5 et 27,9 ppm ;
- Trois carbones méthines (CH) entre 45 et 55 ppm correspondant aux carbones des jonctions entre les différents cycles des triterpènes (A, B, C, ...) ;
- Plus de 10 carbones  $\text{CH}_2$  et  $\text{C}_q$  localisés dans l'intervalle de 20 à 40 ppm ;
- Un carbone oxydé apparaissant à  $\delta_{\text{C}}$  79,2, suggérant la présence d'un groupement hydroxyle substituant le carbone en C-3 du triterpène ;
- Deux carbones éthyléniques, l'un secondaire ( $\delta_{\text{C}}$  109,5) et l'autre quaternaire ( $\delta_{\text{C}}$  151,2).

Ces constatations préliminaires indiquent que ce composé a un squelette triterpénique différent par rapport aux composés **15-25** déjà identifiés possédant des squelettes oléanane et ursane.

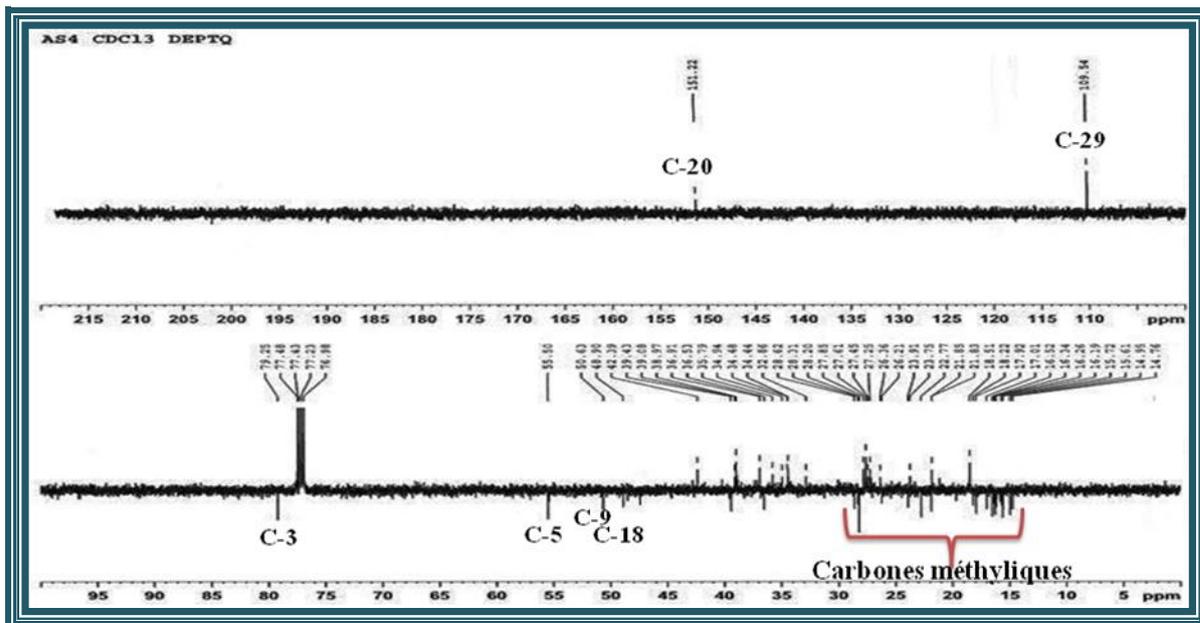


Figure III.257: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **26**

L'identification de la structure du composé **26** repose principalement sur l'examen conjoint des spectres HMBC, COSY et HSQC *J*-modulé. Cette analyse permet d'identifier et de caractériser un grand nombre de carbones et protons de ce composé. En effet l'expérience COSY H-H montre les couplages suivants :

- Le proton H-3 [ $\delta_{\text{H}}$  3,20 (*m*)] avec H<sub>2</sub>-2 [ $\delta_{\text{H}}$  1,57 (*m*)];
- H<sub>2</sub>-2 avec deux protons géminés résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,65 (*m*, H-1a) et 0,88 (*m*, H-1b).

L'expérience HSQC *J*-modulé conduit à repérer leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  38,8 (C-1), 27,4 (C-2) et 79,2 (C-3) (Figure III.258).

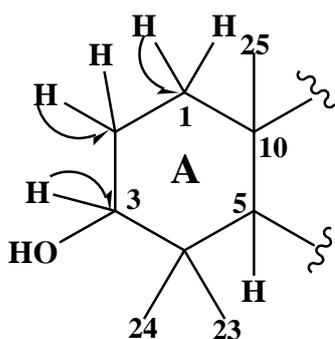


Figure III.258: Corrélations HSQC du cycle A

Les protons méthyliques Me-23 et Me-24 résonant respectivement à  $\delta_H$  0,97 et 0,73, sont caractérisés suite aux corrélations qu'ils présentent avec le carbone C-3 déjà identifié précédemment (Figure III.259). Ces méthyles Me-23 et Me-24 corréleront en  $^2J$  avec un carbone quaternaire attribuable au carbone C-4 ( $\delta_C$  39,9) et en  $^3J$  avec un carbone méthine C-5 ( $\delta_C$  55,5). Ce dernier montre une tache de corrélation en HMBC avec les protons d'un groupement méthyle résonant à  $\delta_H$  0,82 correspondant au méthyle Me-25. Ce groupement corréle avec le carbone C-1 déjà identifié et deux autres carbones, un méthine CH et un carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  50,6 et 37,1 correspondant aux carbones C-9 et C-10 respectivement. L'analyse du spectre HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons H-5 ( $\delta_H$  0,67) et H-9 ( $\delta_H$  1,25).

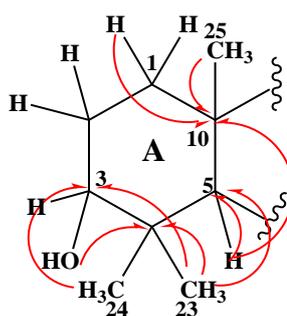


Figure III.259: Corrélations HMBC au niveau du cycle A

Le carbone C-9 couple en  $^3J$  avec deux groupements méthyles à  $\delta_H$  0,84 (Me-25) et 1,04 (Me-26). Ce dernier corréle à son tour avec un carbone secondaire CH<sub>2</sub>-7 ( $\delta_C$  34,2), ainsi qu'avec deux carbones quaternaires C-8 ( $\delta_C$  41,1) et C-14 ( $\delta_C$  43) (Figure III.260). Le spectre COSY (Figure III.260) montre un système de spin à 5 protons à partir du proton H-5 déjà identifié et permet d'assigner les protons couplés H-6a ( $\delta_H$  1,48), H-6b ( $\delta_H$  1,35), et H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_H$  1,35) qui corréleront en HSQC avec les carbones résonant à  $\delta_H$  18,5 (C-6) et 34,2 (C-7).

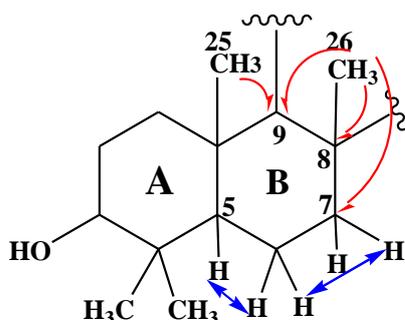


Figure III.260: Corrélations HMBC et COSY au niveau du cycle B

Les carbones C-8 et C-14 présentent des taches de corrélation dans le spectre HMBC avec un groupement méthyle détecté à  $\delta_H$  0,92 attribuable aux protons du Me-27. Ces derniers

couplent en  $^3J$  avec deux carbones résonant à  $\delta_C$  38,5 (CH) et 27,2 (CH<sub>2</sub>) correspondant aux carbones C-13 et C-15 respectivement. Leurs protons sont détectés à  $\delta_H$  1,62 (H-13), 0,96 (H-15b) et 1,61 (H-15a) selon l'expérience HSQC.

A partir du proton H-13, il est visualisé sur le spectre COSY (Figure III.261) les couplages entre les protons: H-13/H<sub>2</sub>-12 ( $\delta_H$  1,64), H-12/H-11a ( $\delta_H$  1,38) et H-12/H-11b ( $\delta_H$  1,23), H<sub>2</sub>-11/H-9 décrit précédemment.

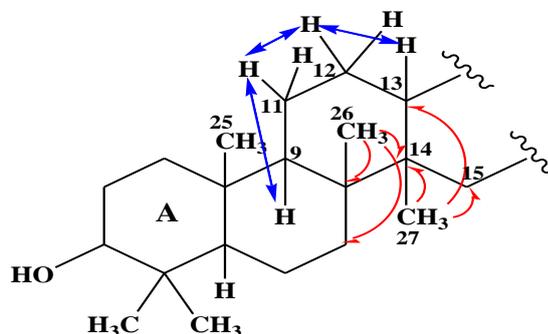


Figure III.261: Corrélations HMBC et COSY au niveau du cycle C

En plus, l'analyse structurale des spectres HSQC et COSY du composé **26** indique la présence de deux protons déblindés sous forme de doublet chacun à  $\delta_H$  4,66 ( $J = 2,3$  Hz) et 4,54 ( $J = 2,3$  Hz) attribuables respectivement aux protons géminés exocycliques H-29a et H-29b. Ces derniers couplent sur le spectre HSQC (Figure III.262) avec un même carbone résonant à  $\delta_C$  109,5 (C-29).

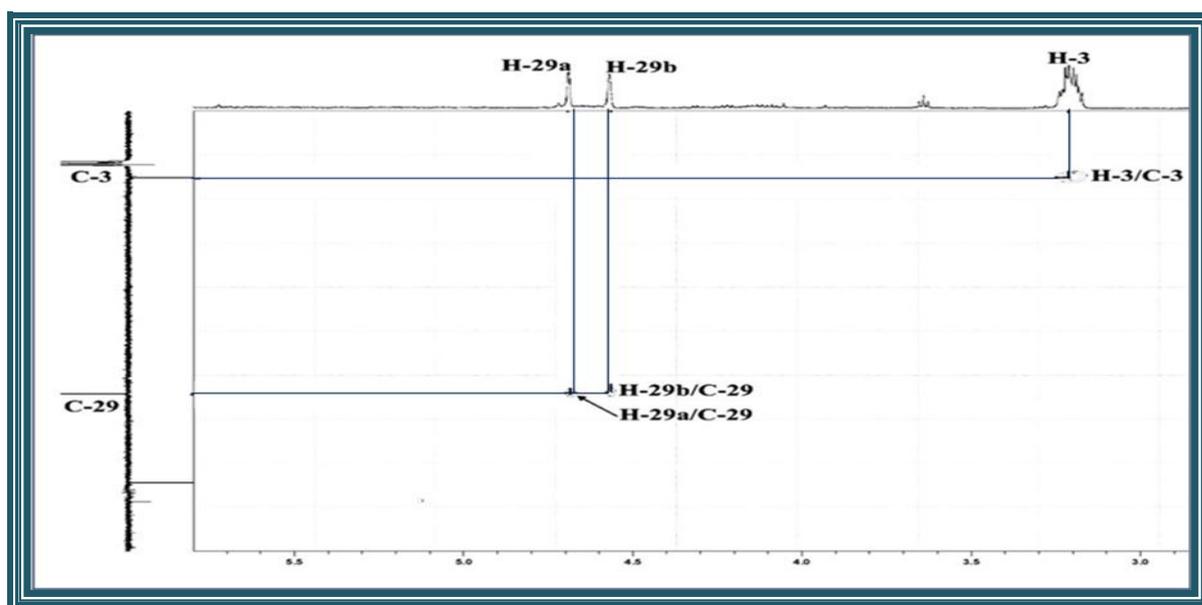


Figure III.262: Spectre HSQC du composé **26**

Ces protons corrént aussi dans l'expérience COSY (Figure III.263) en  $^4J$  avec les protons du groupement méthyle Me-30 (couplage allylique). Ces constatations suggèrent alors la présence d'un groupement isoprényle.

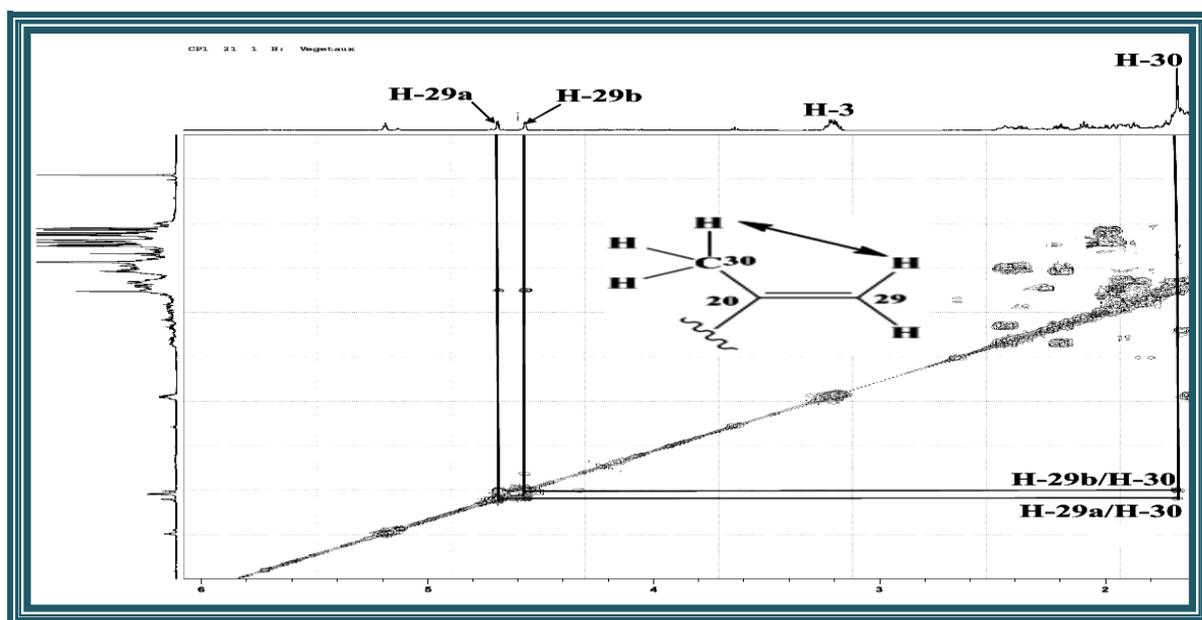
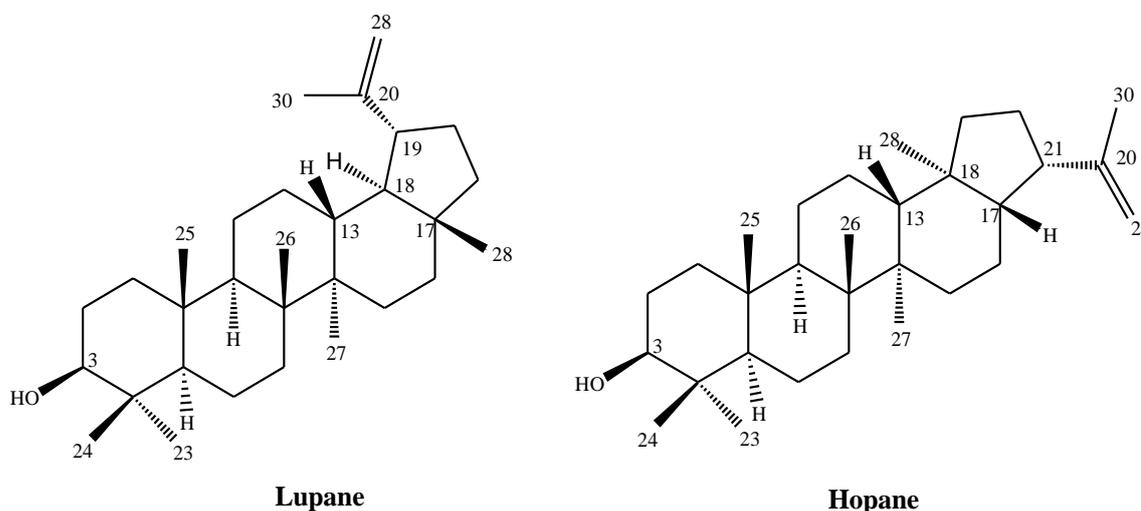


Figure III.263: Spectre COSY du composé 26

Le déplacement chimique du carbone C-13 ( $\delta_C$  38,5) suggère que ce composé appartient à la classe de lupane puisque dans le cas de hopane le carbone C-13 résonne à 50 ppm.<sup>[200,212]</sup>



Les protons H<sub>2</sub>-15 identifiés précédemment couplent en COSY avec deux protons géminés H<sub>2</sub>-16 résonant à  $\delta_H$  1,44 dont le carbone est localisé à  $\delta_C$  35,8 (C-16). Ce dernier corrèle en HMBC avec les protons du groupement Me-28 ( $\delta_H$  0,76) qui couplent à leur tour avec trois carbones se répartissant en un carbone méthine CH-18 ( $\delta_C$  48,9), un carbone méthylène CH<sub>2</sub>-22 ( $\delta_C$  40,2) et un carbone quaternaire C-17 ( $\delta_C$  43,2) (Figure III.264). Sur le spectre COSY, il est visualisé un système de spin à 5 protons H<sub>2</sub>-22/H<sub>2</sub>-21, H<sub>2</sub>-21/H-19. Le carbone C-21 est déterminé par expérience HSQC à 30 ppm.

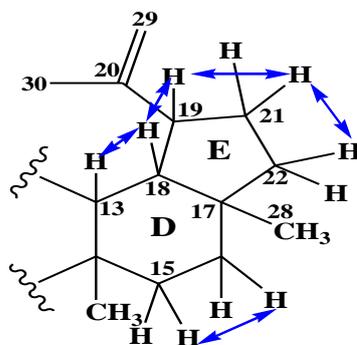


Figure III.264: Corrélations COSY au niveau des cycles D et E

La confirmation de la présence d'un groupement isoprényle lié au carbone C-19 est déduite par les taches de corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III.265) entre les protons de la double liaison exocyclique H<sub>2</sub>-29 et les carbones C-19 (47,6 ppm) et C-30 (19,7 ppm).

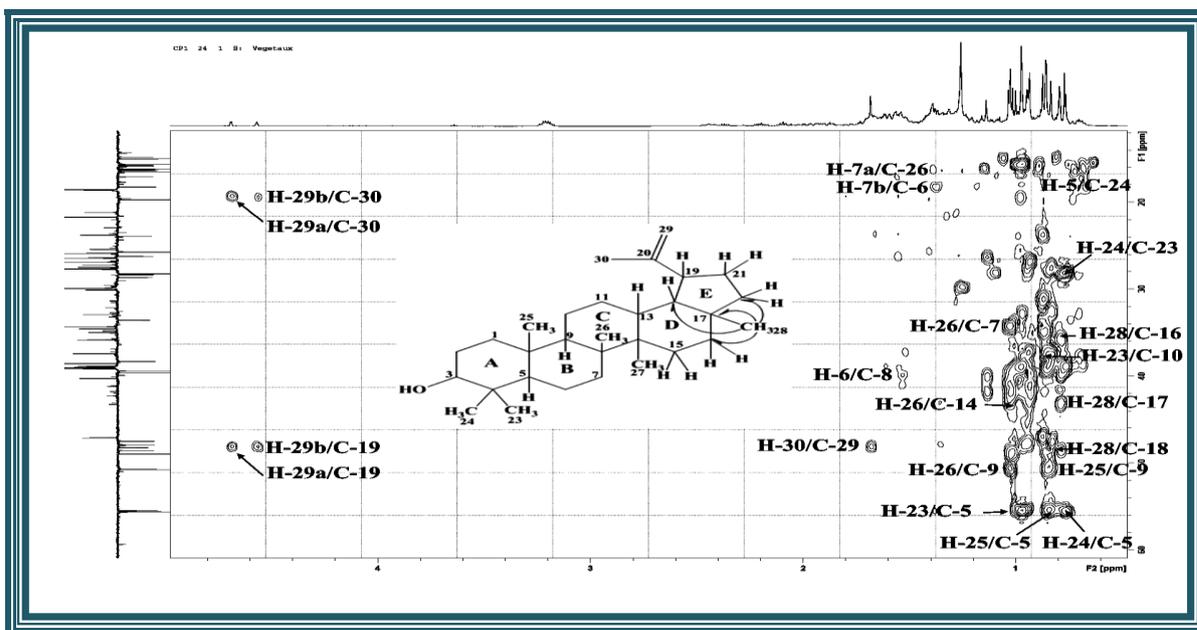


Figure III.265: Spectre HMBC du composé 26

L'analyse du spectre NOESY permet de vérifier la stéréochimie des 10 carbones asymétriques de ce composé C-3, C-5, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-17, C-18 et C-19 (Figure III.266).

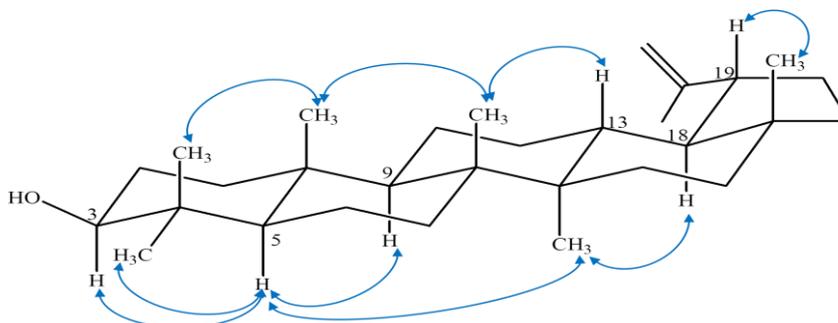


Figure III.266: Stéréochimie des carbones chiraux du composé 26

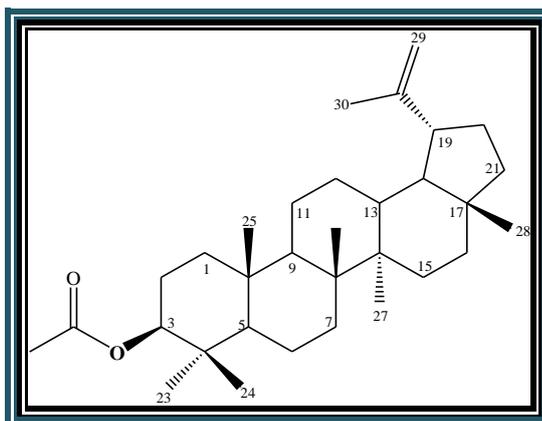
Toutes ces données spectroscopiques ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_{D=20} = +22,4^\circ$ ,  $C = 0,183$  g/100 ml, MeOH) conduisent à identifier ce composé au lupéol. Il a été isolé antérieurement des espèces *Atractylis carduus*,<sup>[4]</sup> *Carlina corymbosa*,<sup>[32]</sup> *Scorzonera aristata*,<sup>[213]</sup> et *Centaurea omphalotricha*<sup>[169]</sup> de la famille Asteraceae. Il est connu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoire et anticancéreuse.<sup>[214]</sup>

Le tableau suivant (Tableau III.24) rassemble toutes les données spectrales du composé **26**.

**Tableau III.24: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 26 dans  $\text{CDCl}_3$**

| position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz)        |
|----------|---------------------------|---|
| 1        | 38,8                      | 1,65 (m) H-1a/0,88 (m) H-1b             |
| 2        | 27,4                      | 1,57 (m)                                |
| 3        | 79,2                      | 3,20 (m) H-3 $\alpha$                   |
| 4        | 39,9                      | -                                       |
| 5        | 55,5                      | 0,67 (m) H-5 $\alpha$                   |
| 6        | 18,5                      | 1,48 (m) H-6a/1,35 (m) H-6b             |
| 7        | 34,2                      | 1,35 (m)                                |
| 8        | 41,1                      | -                                       |
| 9        | 50,6                      | 1,25 (sl) H-9 $\alpha$                  |
| 10       | 37,1                      | -                                       |
| 11       | 21,1                      | 1,38 (m) H-11a/1,23 (m) H-11b           |
| 12       | 25,3                      | 1,64 (m)                                |
| 13       | 38,5                      | 1,62 (m)                                |
| 14       | 43                        | -                                       |
| 15       | 27,2                      | 1,61(m) H-15a/0,96 (m) H-15b            |
| 16       | 35,8                      | 1,44 (m)                                |
| 17       | 43,2                      | -                                       |
| 18       | 48,9                      | 1,32 (m)                                |
| 19       | 47,6                      | 2,34 (m)                                |
| 20       | 151,2                     | -                                       |
| 21       | 30                        | 1,88 (m) H-21a/1,27 (m) H-21b           |
| 22       | 40,2                      | 1,35 (m) H-22a/1,15 (m) H-22b           |
| 23       | 28,3                      | 0,97 (s)                                |
| 24       | 15,6                      | 0,73 (s)                                |
| 25       | 15,7                      | 0,82 (s)                                |
| 26       | 16,2                      | 1,01 (s)                                |
| 27       | 14,9                      | 0,92 (s)                                |
| 28       | 17,9                      | 0,76 (s)                                |
| 29       | 109,5                     | 4,66 (d, 2,3) H-29a/4,54 (d, 2,3) H-29b |
| 30       | 19,7                      | 1,54 (s)                                |

## III-4-4-3-10 Elucidation structurale du composé 27



Lupéol acétate (27)

Le spectre de masse ESI du composé 27, montre en mode positif (Figure III.267) deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  491  $[M+Na]^+$  et à  $m/z$  959  $[2M+Na]^+$ , suggérant une masse moléculaire de 468 uma, soit une formule brute  $C_{32}H_{52}O_2$ .

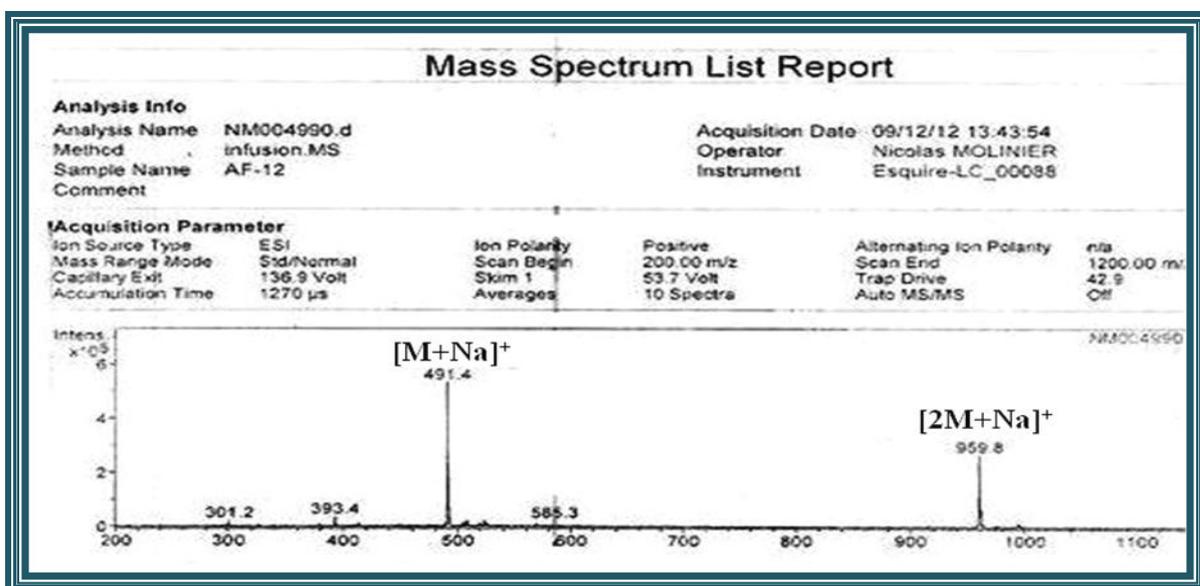


Figure III.267: Spectre de masse ESI-MS du composé 27

L'observation du spectre RMN du  $^1H$  du composé 27 (Figure III.268) révèle une grande parenté avec le composé 26 (Lupéol). On note la présence de :

- Six méthyles dans la zone 0,70 et 1,00 ppm ;
- Les protons du groupement isoprényle résonant à  $\delta_H$  4,55, 4,65 et 1,65;
- Un proton à  $\delta_H$  4,50 attribuable au proton oxyméthine (CHO-3), le déblindage de ce dernier indique qu'il est lié à un groupement attracteur.

Toutefois, ce spectre présente un signal supplémentaire d'intégration 3H par rapport au composé 26 à  $\delta_H^2$  2,02 correspondant au méthyle d'un groupement acétate, le déblindage du proton H-3 confirme l'emplacement de ce groupement en position C-3.

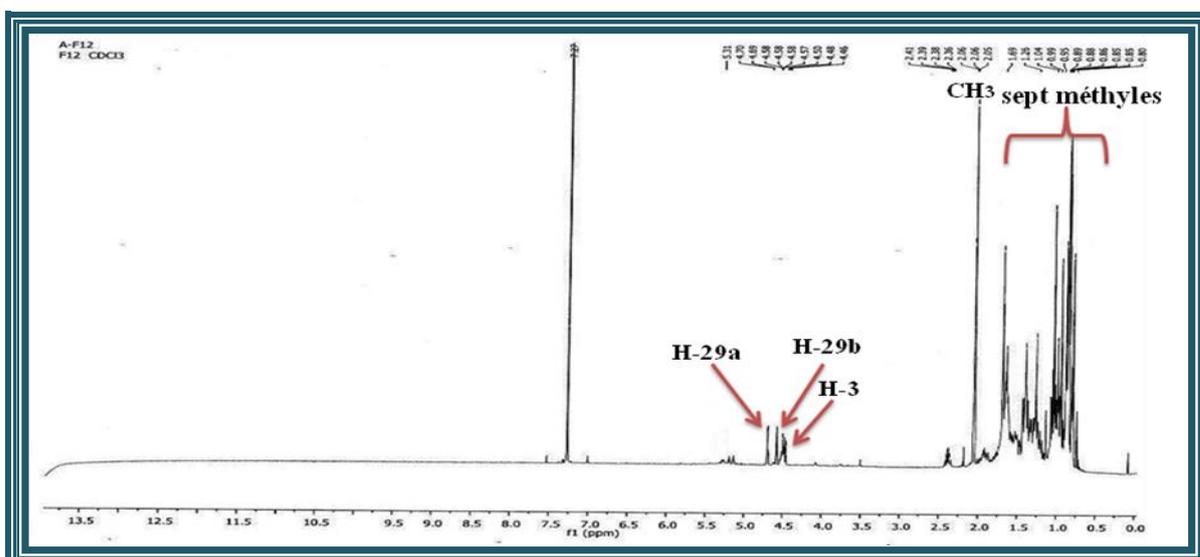


Figure III.268: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **27**

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III.269) en apporte la confirmation de la nature triterpénique à squelette lupane acylé de ce composé, en effet, on observe la présence de : 8 méthyles, 11 méthylènes, 6 méthines et 7 carbones quaternaires soit au total 32 atomes de carbone.

L'acétylation de ce composé est illustré par la présence d'un carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  172,8 et le méthyle d'un groupement acétate repéré à  $\delta_{\text{C}}$  21,4.

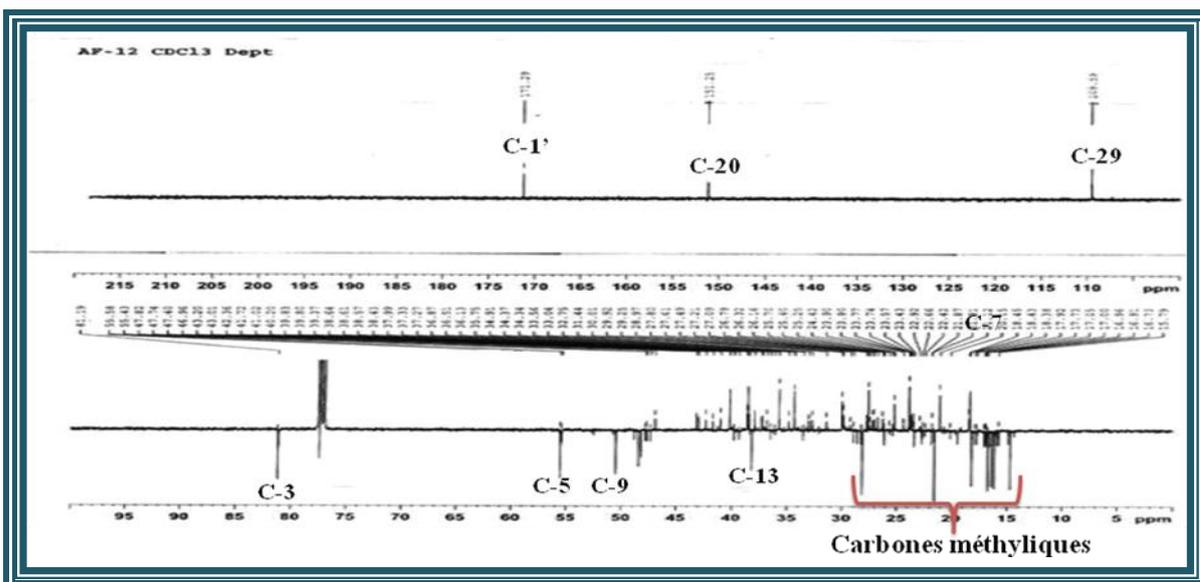


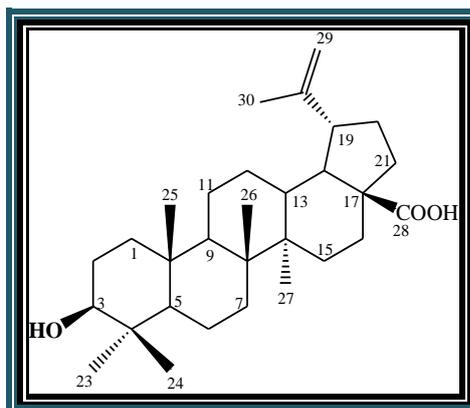
Figure III.269: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du composé **27**

L'ensemble de ces données (Tableau III.25) comparées aux résultats de la littérature permettent de déterminer la structure exacte du composé **27** qui correspond au lupényl acétate qui a déjà été isolée des espèces *Atractylis carduus*,<sup>[4]</sup> *Taraxacum japonicum*<sup>[210]</sup> et *Ptilostemon greuteri*<sup>[215]</sup> (Asteraceae).

Tableau III.25: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 27 dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)   |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 38,6                      | 1,71 ( <i>m</i> ) H-1a<br>0,95 ( <i>m</i> ) H-1b   |
| 2        | 23,7                      | 1,65 ( <i>m</i> ) H-1a<br>0,98 ( <i>m</i> ) H-1b   |
| 3        | 81,2                      | 4,50 ( <i>dd</i> , 10,4 ; 5,3)                     |
| 4        | 37,9                      | -  |
| 5        | 55,6                      | 0,82 ( <i>m</i> )                                  |
| 6        | 18,4                      | 1,49 ( <i>m</i> ) H-6a<br>1,44 ( <i>m</i> ) H-6b   |
| 7        | 34,2                      | 1,40 ( <i>m</i> )                                  |
| 8        | 41                        | -  |
| 9        | 50,5                      | 1,35 ( <i>m</i> )                                  |
| 10       | 37,4                      | -  |
| 11       | 21,1                      | 1,40 ( <i>m</i> ) H-11a<br>1,27 ( <i>m</i> ) H-11b |
| 12       | 25,5                      | 1,67 ( <i>m</i> ) H-12a<br>1,08 ( <i>m</i> ) H-12b |
| 13       | 38,4                      | 1,65 ( <i>m</i> )                                  |
| 14       | 43                        | -  |
| 15       | 27,8                      | 1,66 ( <i>m</i> ) H-15a<br>1,06 ( <i>m</i> ) H-15b |
| 16       | 36                        | 1,45 ( <i>m</i> ) H-16a<br>1,36 ( <i>m</i> ) H-16b |
| 17       | 43,2                      | -  |
| 18       | 48,5                      | 1,41 ( <i>m</i> )                                  |
| 19       | 48,1                      | 2,38 ( <i>m</i> )                                  |
| 20       | 151,2                     | -  |
| 21       | 29,9                      | 1,95 ( <i>m</i> ) H-21a/1,35 ( <i>m</i> ) H-21b    |
| 22       | 40,2                      | 1,41 ( <i>m</i> ) H-22a/1,23 ( <i>m</i> ) H-22b    |
| 23       | 28,1                      | 0,83 ( <i>s</i> )                                  |
| 24       | 16,8                      | 0,85 ( <i>s</i> )                                  |
| 25       | 16,4                      | 0,91 ( <i>s</i> )                                  |
| 26       | 16,2                      | 1,01 ( <i>s</i> )                                  |
| 27       | 14,8                      | 0,92 ( <i>s</i> )                                  |
| 28       | 18,3                      | 0,76 ( <i>s</i> )                                  |
| 29       | 109,6                     | 4,65 ( <i>sl</i> ) H-29a/4,55 ( <i>sl</i> ) H-29b  |
| 30       | 19,5                      | 1,65 ( <i>s</i> )                                  |
| 1'       | 171,3                     | -  |
| 2'       | 21,8                      | 2,06 ( <i>s</i> )                                  |

## III-4-4-3-11 Elucidation structurale du composé 28



Acide bétulinique (28)

Le composé **27** est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI-MS (Figure III.270) enregistré en mode négatif, montre des pics d'ions quasimoléculaires à  $m/z$  455  $[M-H]^-$  et 911  $[2M-H]^-$ , soit une masse moléculaire égale à 456 uma correspondant à la formule moléculaire  $C_{30}H_{48}O_3$ .

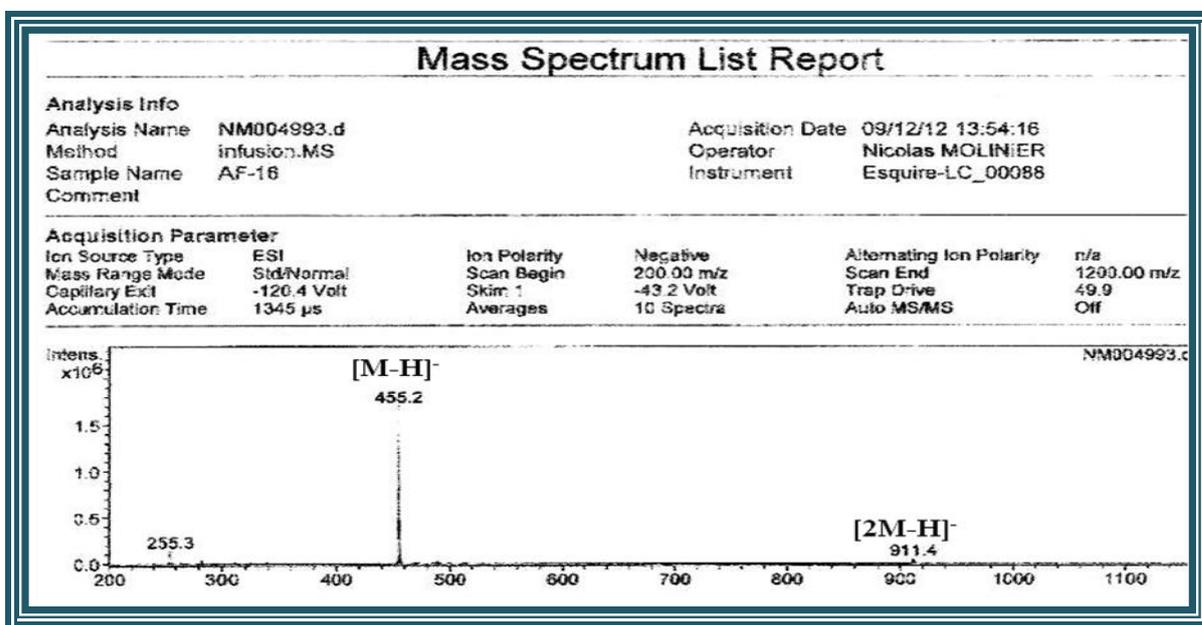


Figure III.270: Spectre de masse ESI-MS du composé 28

Les spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$   $J$ -modulé et HSQC  $J$ -modulé de ce composé **28** sont presque superposables à ceux du lupéol (**26**). En effet, le spectre RMN  $^1H$  (Figure III.271) présente 6 signaux de six groupements méthyles résonant à  $\delta_H$  0,89 (s), 0,68 (s), 0,75 (s), 0,86 (s), 0,90 (s), 1,60 (s), deux signaux déblindés sous forme de doublets à  $\delta_H$  4,54 et 4,64 typiques de deux protons non équivalents d'un groupement isoprényle d'un triterpène pentacyclique et des signaux CH et CH<sub>2</sub>.

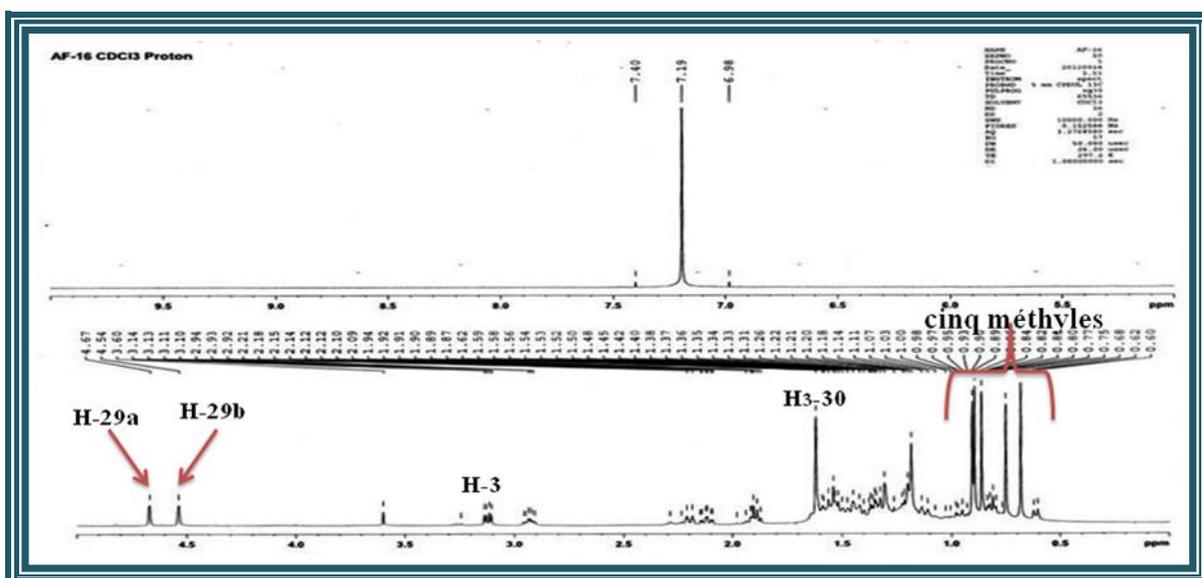


Figure III.271: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 28

La différence par rapport au composé 26, porte essentiellement sur la disparition d'un signal singulet d'un groupement méthyle sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ . L'apparition sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III.272) d'un signal déblindé résonant à  $\delta_{\text{C}}$  180,7 est attribué à un carbone carboxylique COOH ; ceci permet de conclure que l'un des groupements méthyles est oxydé en fonction acide.

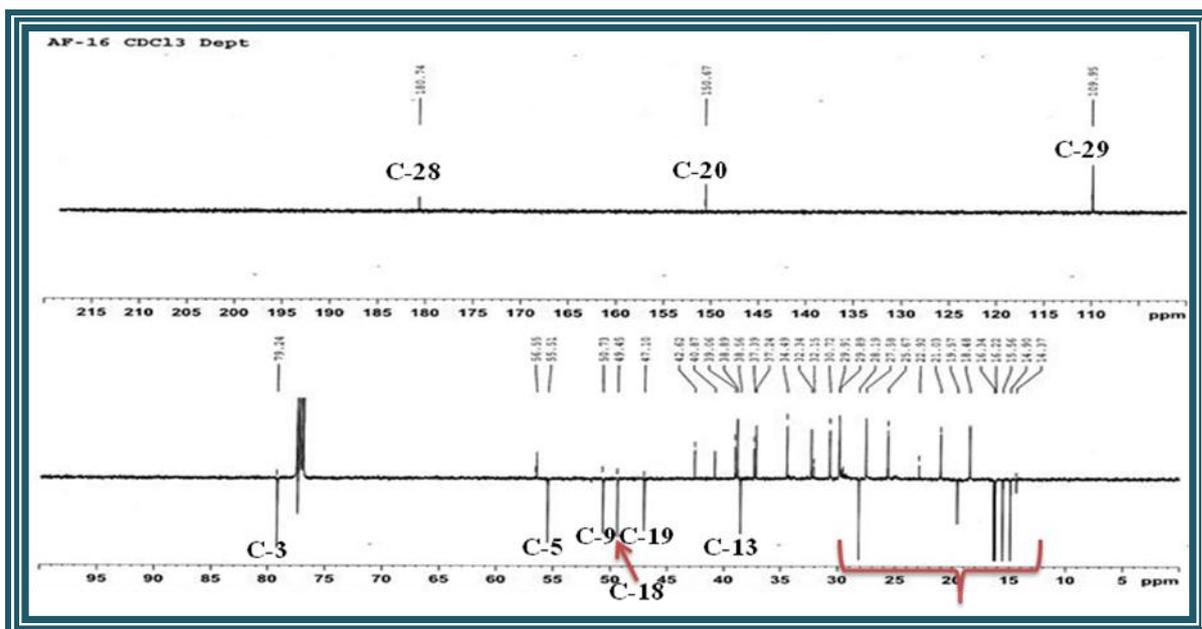


Figure III.272: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé 28

L'examen des spectres RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé et HSQC (Figures III.272 et III.273) conduit à visualiser dans la région des champs forts 6 signaux attribuables à 6 groupements méthyles résonant à  $\delta_{\text{C}}$  14,9 ; 15,6 ; 16,2 ; 16,3 ; 19,6 et 28,2.

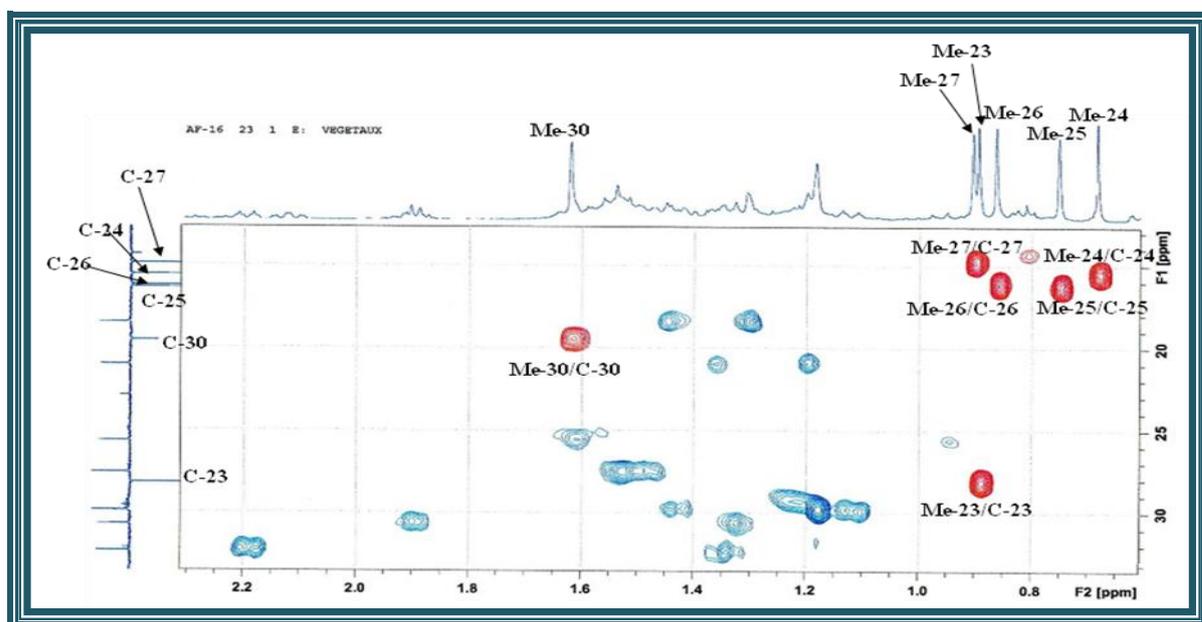


Figure III.273: Spectre HSQC des méthyles du composé 28

Dans la zone de déblindage moyen entre 35 et 55 ppm, il est observé sur les spectres RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé et HSQC 5 signaux correspondant à 5 groupements méthines repérés à  $\delta_{\text{C}}$  38,6 ; 47,1 ; 49,4 ; 50,7 et 55,5 (Figures III.274 et III.275). Ces valeurs de déplacement chimique sont caractéristiques des triterpènes pentacycliques à squelette lupane. [200]

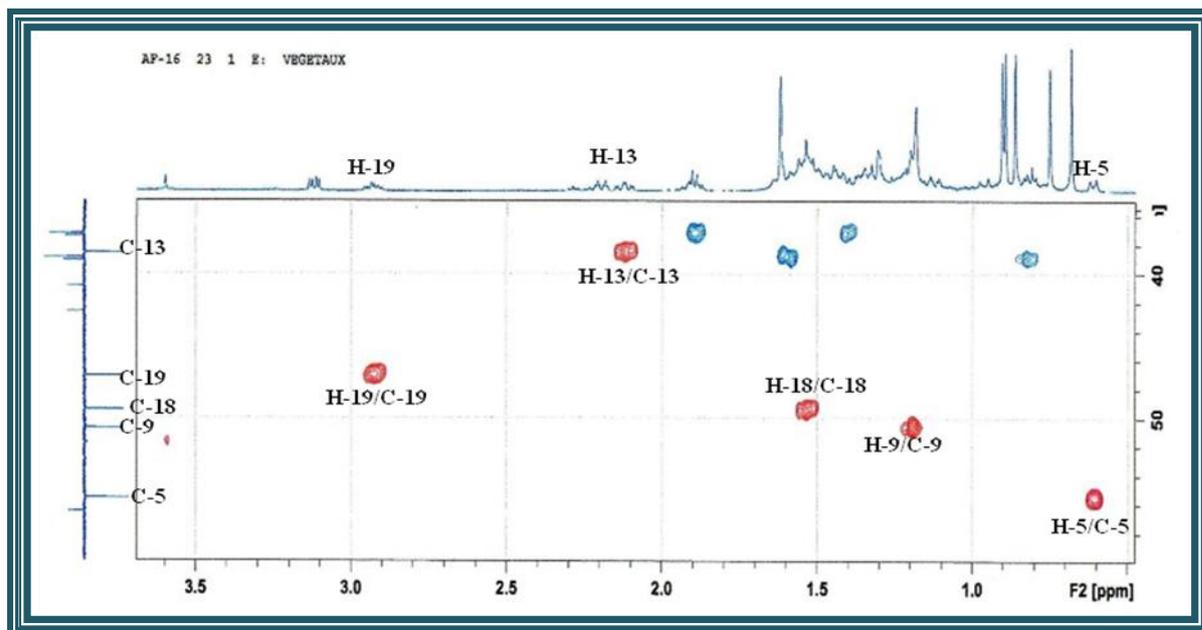


Figure III.274: Spectre HSQC des méthines du composé 28

L'analyse des spectres HSQC et COSY ainsi que la comparaison avec les données spectrales du lupéol (**26**) permettent d'assigner les protons H-5 à  $\delta_{\text{H}}$  0,61 (*dl*,  $J = 9,3$  Hz), H-9 à  $\delta_{\text{H}}$  1,18 (*sl*), H-13 à  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (*td*,  $J = 12,7 ; 3,5$  Hz), H-18 à  $\delta_{\text{H}}$  1,56 (*t*,  $J = 11,5$  Hz) et H-19 à  $\delta_{\text{H}}$  2,92 (*td*,  $J = 10,5 ; 4,8$  Hz).

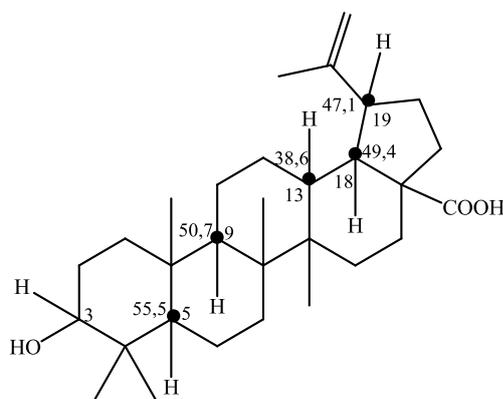


Figure III.275: Groupements méthines du composé 28

Les déplacements chimiques du proton H-19 (2,92 ppm) et du carbone C-18  $\delta_C$  49,4, déblindés de + 0,58 et + 0,5 ppm par rapport au même proton et carbone du lupéol suggèrent l'oxydation du groupement méthyle Me-28 en acide COOH ( $\delta_C$  180,7).

Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC (Figures III.276 et III.277) qui montre des corrélations en  $^3J_{H-C}$  entre les protons H-22a ( $\delta_H$  1,89), H-18 ( $\delta_H$  1,56) et H-16b ( $\delta_H$  1,34) et ce carbonyle acide C-28 (180,7 ppm).

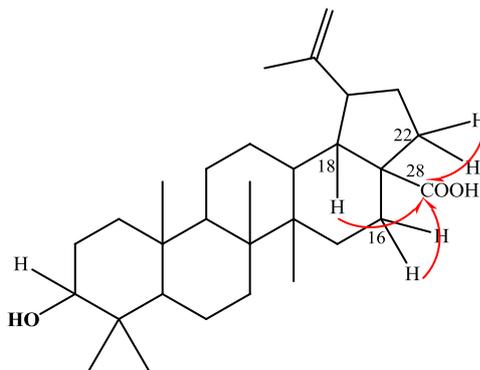


Figure III.276: Corrélation HMBC du groupement carbonyle du composé 28

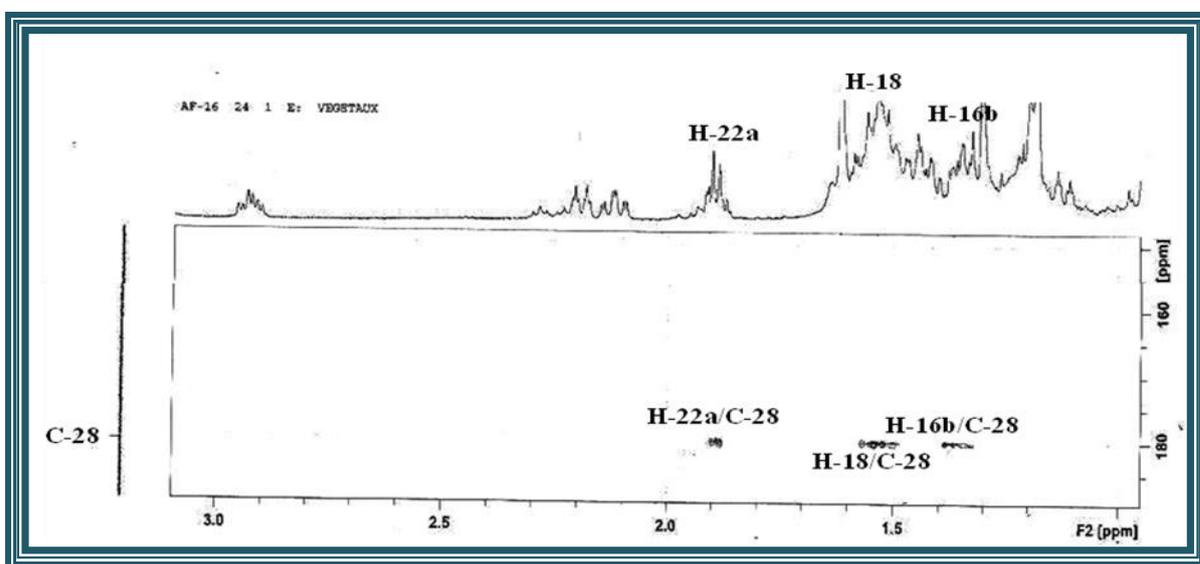


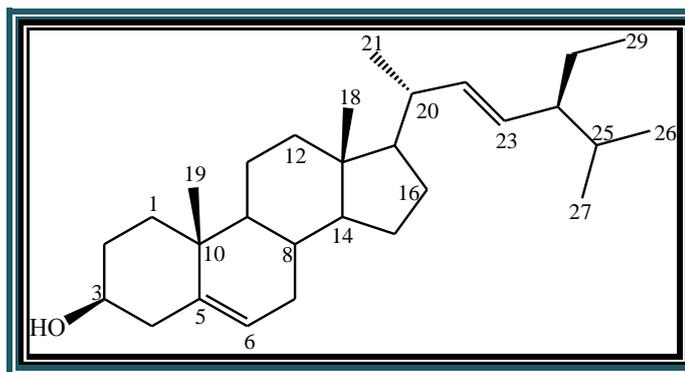
Figure III.277: Spectre HMBC du composé 28

De ce qui précède, et par comparaison de ses données spectrales (Tableau III.26) à celles de la littérature, <sup>[216]</sup> le composé **28** est identifié comme étant l'acide bétulinique, isolé antérieurement des espèces suivantes : *Saussurea lappa* <sup>[217]</sup> et *Gnaphalium affine* <sup>[218]</sup> de la famille Asteraceae. Il a été caractérisé pour la première fois dans le genre *Atractylis*. Ce composé est connu pour ses activités : anti-inflammatoire <sup>[109]</sup> et anti-tumorale. <sup>[110]</sup>

Tableau III.26: Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de **28** dans CDCl<sub>3</sub>

| Position | δ <sub>C</sub> (ppm) | δ <sub>H</sub> (m, J en Hz)        |
|----------|----------------------|------------------------------------|
| 1        | 38,9                 | 1,59 (m) H-1a/0,83 (m) H-1b        |
| 2        | 27,6                 | 1,50 (m)                           |
| 3        | 79,2                 | 3,12 (dd, 11,4; 4,8)               |
| 4        | 39,1                 | -                                  |
| 5        | 55,5                 | 0,61 (dl, 9,3)                     |
| 6        | 18,5                 | 1,45 (m) H-6a/1,30 (m) H-6b        |
| 7        | 34,5                 | 1,29 (m)                           |
| 8        | 40,9                 | -                                  |
| 9        | 50,7                 | 1,18 (sl)                          |
| 10       | 37,4                 | -                                  |
| 11       | 21                   | 1,35 (m) H-11a/1,20 (m) H-11b      |
| 12       | 25,7                 | 1,60 (m)                           |
| 13       | 38,6                 | 2,12 (td, 12,7 ; 3,5)              |
| 14       | 42,6                 | -                                  |
| 15       | 30,7                 | 1,43 (m) H-15a/1,13 (m) H-15b      |
| 16       | 32,3                 | 2,18 (m) H-16a/1,34 (m) H-16b      |
| 17       | 56,5                 | -                                  |
| 18       | 49,4                 | 1,56 (t, 11,5)                     |
| 19       | 47,1                 | 2,92 (td, 10,5 ; 4,8)              |
| 20       | 150,7                | -                                  |
| 21       | 29,9                 | 1,92 (m) H-21a<br>1,32 (m) H-21b   |
| 22       | 37,2                 | 1,89 (m) H-22a<br>1,40 (m) H-22b   |
| 23       | 28,2                 | 0,89 (s)                           |
| 24       | 15,6                 | 0,68 (s)                           |
| 25       | 16,3                 | 0,75 (s)                           |
| 26       | 16,2                 | 0,86 (s)                           |
| 27       | 14,9                 | 0,90 (s)                           |
| 28       | 180,7                | -                                  |
| 29       | 109,9                | 4,64 (sl) H-29a<br>4,54 (sl) H-29b |
| 30       | 19,6                 | 1,60 (s)                           |

## III-4-4-3-12 Elucidation structurale du composé 29



Stigmastérol (29)

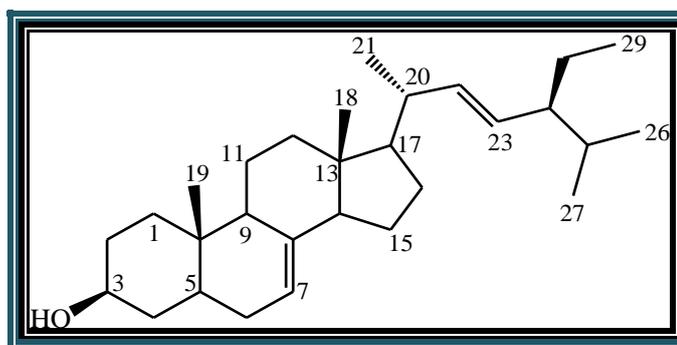
Ce composé a été identifié au stigmastérol par comparaison avec un échantillon témoin. Les données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , en apportent la confirmation (Tableau III.27). Ce métabolite secondaire a été isolé des espèces : *Atractylis carduus*, <sup>[4]</sup> *Ageratum conyzoides* <sup>[219]</sup> et *Tannacetum polycephalum* <sup>[220]</sup> (Asteraceae).

Tableau III.27: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 29 dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz) |
|----------|---------------------------|----------------------------------|
| 1        | 37,4                      | 1,86 (m) H-1a/1,09 (m) H-1b      |
| 2        | 31,8                      | 1,84 (m) H-2a/1,50 (m) H-2b      |
| 3        | 71,9                      | 3,52 (m)                         |
| 4        | 42,4                      | 2,27 (m)                         |
| 5        | 140,9                     | -                                |
| 6        | 121,9                     | 5,35 (d, 5,1)                    |
| 7        | 32,1                      | 1,98 (m) H-7a/1,43 (m) H-7b      |
| 8        | 32,1                      | 2,00 (m)                         |
| 9        | 50,2                      | 0,95 (m)                         |
| 10       | 36,6                      | -                                |
| 11       | 21,2                      | 1,51 (m) H-11a/1,03 (m) H-11b    |
| 12       | 39,9                      | 2,03 (m) H-12a/1,18 (m) H-12b    |
| 13       | 42,5                      | -                                |
| 14       | 56,9                      | 1,00 (m)                         |
| 15       | 25,6                      | 1,55 (m) H-15a/1,07 (m) H-15b    |
| 16       | 28,4                      | 1,85 (m) H-16a/1,27 (m) H-16b    |
| 17       | 56,9                      | 1,12 (m)                         |
| 18       | 12,1                      | 0,68 (s)                         |
| 19       | 19,5                      | 1,01 (s)                         |
| 20       | 36,3                      | 1,37 (m)                         |
| 21       | 18,9                      | 0,92 (d, 6,5)                    |
| 22       | 129,4                     | 5,03 (dd, 15,2 ; 8,4)            |

| Position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)         |
|----------|------------------|---------------------------------|
| 23       | 138,5            | 5,16 (dd, 15,1 ; 8,7)           |
| 24       | 40,7             | 2,03 (m)                        |
| 25       | 51,4             | 1,54 (m)                        |
| 26       | 19,2             | 0,82 (m)                        |
| 27       | 20               | 0,84 (m)                        |
| 28       | 25,9             | 1,44 (m) H-28a / 1,17 (m) H-28b |
| 29       | 12,5             | 0,83 (m)                        |

## III-4-4-3-13 Elucidation structurale du composé 30



Spinastérol (30)

Il s'agit de spinastérol, isomère du stigmastérol (29), triterpène connu et identifié dans plusieurs espèces de la famille Asteraceae: *Baccharis pseudotenuifolia* [221] et *Inula nervosa*. [222]

Ce composé 30 est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI-MS (Figure III.278) enregistré en mode positif, présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  435  $[M+Na]^+$  et à  $m/z$  847  $[2M+Na]^+$ ; soit une masse moléculaire de 412 uma, correspondant à la formule moléculaire  $C_{29}H_{48}O$ .

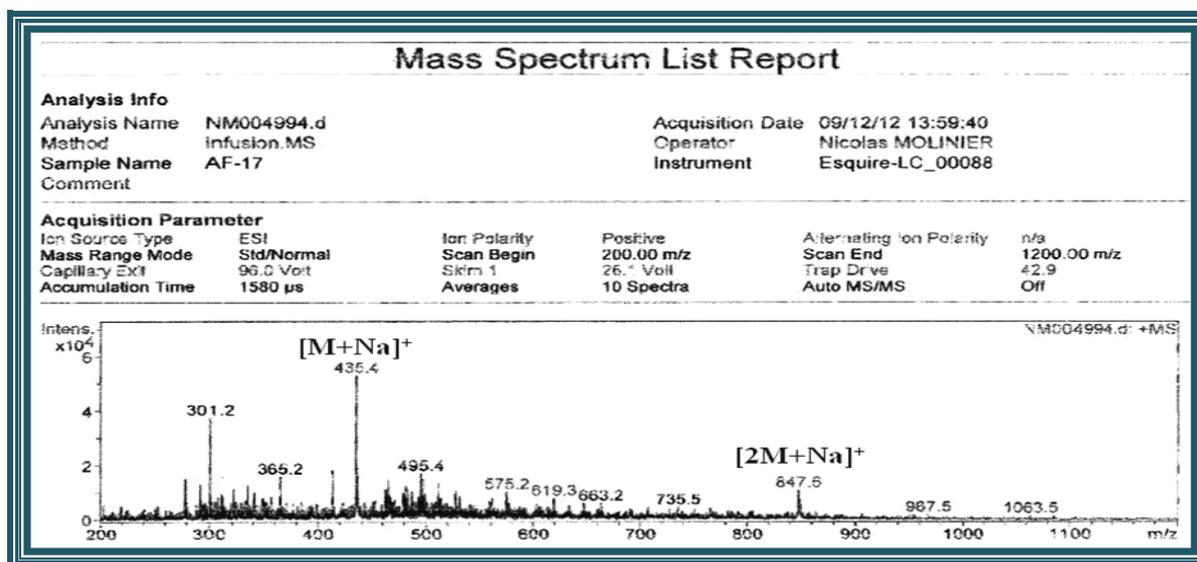


Figure III.278: Spectre de masse ESI-MS du composé 30

Les différents protons de ce composé sont visualisés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.279). En effet, on identifie :

- Deux signaux qui apparaissent sous forme de singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  0,47 et à  $\delta_{\text{H}}$  0,73 assignable aux protons des méthyles  $\text{CH}_3$ -18 et  $\text{CH}_3$ -19 des phytostérols ;
- Trois signaux de méthyles sous forme de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  0,97 (3H,  $J = 6,6$  Hz) et 0,75 (6H,  $J = 6,4$  Hz) attribuables respectivement aux méthyles  $\text{CH}_3$ -21 et  $\text{CH}_3$ -26,  $\text{CH}_3$ -27 ;
- Un signal triplet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  0,74 ( $J = 7$  Hz) correspondant au méthyle  $\text{CH}_3$ -29.

Par ailleurs, on observe également :

- Deux signaux sous forme de doublet dédoublés détectés à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (1H,  $J = 15,1 ; 8,5$  Hz) et 4,95 (1H,  $J = 15,1 ; 8,5$  Hz) caractéristiques des protons oléfiniques H-23 et H-22 respectivement. La valeur de la constante de couplage 15Hz indique une géométrie *trans* de la double liaison C-22=C-23 ;
- Un signal sous forme de multiplet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 d'un proton oléfinique ;
- Ainsi qu'un signal multiplet d'intégration 1H repéré à  $\delta_{\text{H}}$  3,52 caractéristique du proton oxyméthine H-3.

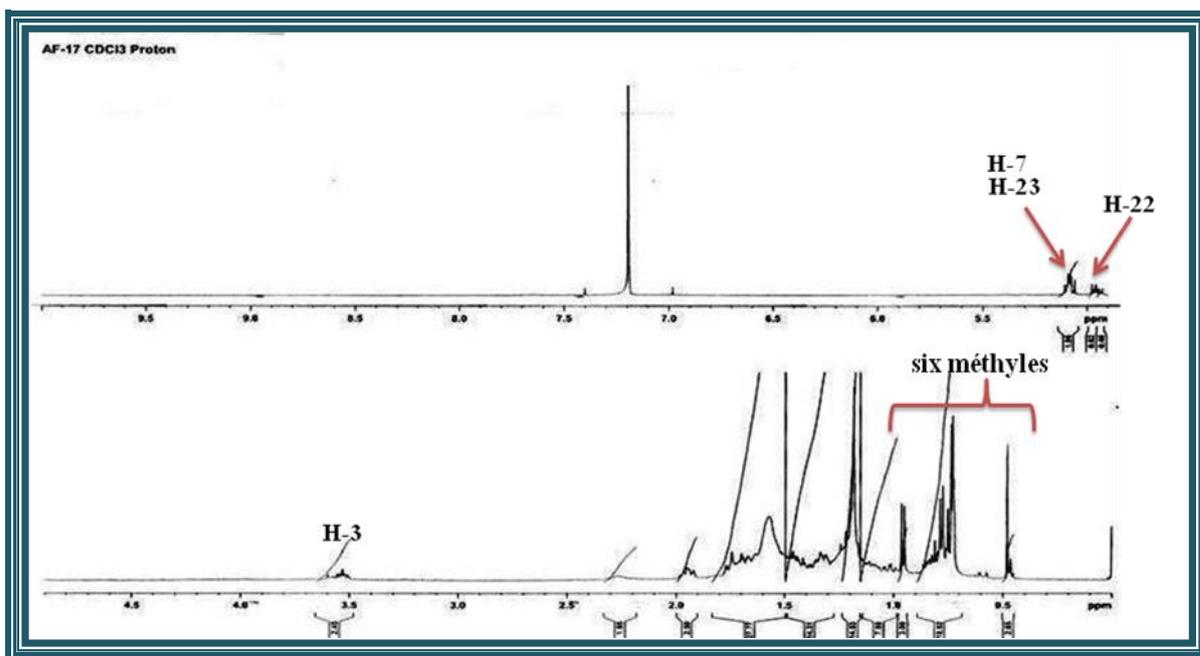


Figure III.279: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 30

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III.280) de ce composé montre 29 signaux de carbones correspondant à six méthyles, neuf méthylènes, onze méthines et trois carbones quaternaires, plaidant en faveur d'une structure stéroïdique.

Le nombre de méthyles visualisé sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III.280) égale à 6, localisé dans l'intervalle de 12 à 22 ppm confirme la nature stéroïdique du composé **30**, car dans le cas de triterpènes tetracycliques et pentacycliques, les déplacements chimiques des carbones de groupements méthyles peuvent atteindre 35 ppm (15 à 35 ppm). [200]

Dans la région des champs faibles, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III.280) met en évidence la présence de 4 signaux correspondant à 4 atomes de carbone se répartissant en CH éthyléniques ( $\text{sp}^2$ ) résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  117,7 ; 129,6 et 138,4 et un atome de carbone quaternaire ( $\text{sp}^2$ ) détecté à  $\delta_{\text{C}}$  139,8. Ceci indique l'existence de deux doubles liaisons dans le squelette de ce composé. Les carbones résonant à  $\delta_{\text{C}}$  129,6 et 138,4 sont attribués à la double liaison de la chaîne latérale C-22 et C-23, tandis que la 2<sup>ème</sup> double liaison est localisée entre les carbones C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  117,7) et C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  139,8), par comparaison avec les données de la littérature. [223]

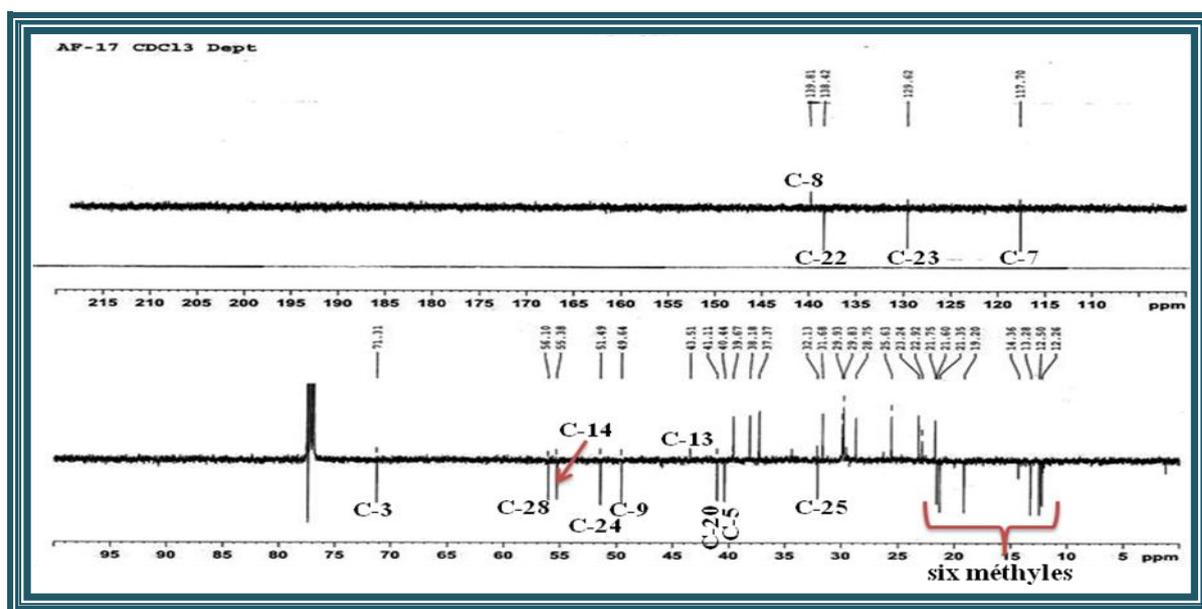
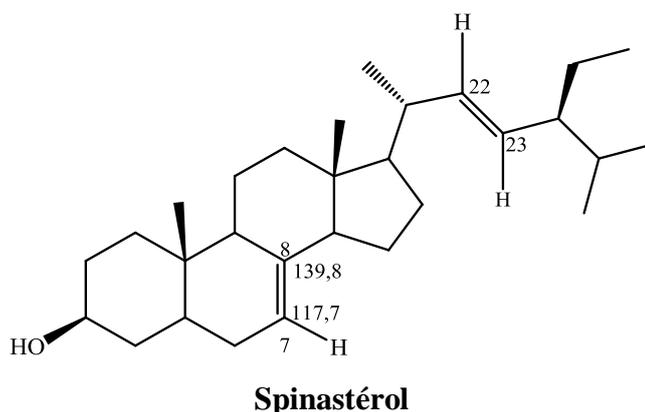


Figure III.280: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **30**

L'ensemble des résultats obtenus (Tableau III.28), appuyé par les données de la littérature, permettent d'établir la structure spinastérol pour le composé **30**.

Tableau III.28: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de 30 dans  $\text{CDCl}_3$ 

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz) |
|----------|---------------------------|--|
| 1        | 37,4                      | 1,82 ( <i>m</i> ) H-1a/1,09 ( <i>m</i> ) H-1b    |
| 2        | 31,7                      | 1,77 ( <i>m</i> ) H-2a/1,39 ( <i>m</i> ) H-2b    |
| 3        | 71,3                      | 3,52 ( <i>m</i> )                                |
| 4        | 38,2                      | 1,70 ( <i>m</i> ) H-4a/1,22 ( <i>m</i> ) H-4b    |
| 5        | 40,4                      | 1,40 ( <i>m</i> )                                |
| 6        | 29,9                      | 1,74 ( <i>m</i> ) H-6a/1,22 ( <i>m</i> ) H-6b    |
| 7        | 117,7                     | 5,08 ( <i>m</i> )                                |
| 8        | 139,8                     | -  |
| 9        | 49,6                      | 1,65 ( <i>m</i> )                                |
| 10       | 34,2                      | -  |
| 11       | 21,7                      | 1,47 ( <i>m</i> )                                |
| 12       | 39,7                      | 1,98 ( <i>m</i> ) H-12a/1,18 ( <i>m</i> ) H-12b  |
| 13       | 43,5                      | -  |
| 14       | 55,4                      | 1,80 ( <i>m</i> )                                |
| 15       | 23,2                      | 1,50 ( <i>m</i> ) H-15a/1,38 ( <i>m</i> ) H-15b  |
| 16       | 28,7                      | 1,80 ( <i>m</i> ) H-16a/1,23 ( <i>m</i> ) H-16b  |
| 17       | 56,1                      | 1,25 ( <i>m</i> )                                |
| 18       | 12,3                      | 0,47 ( <i>s</i> )                                |
| 19       | 13,3                      | 0,73 ( <i>s</i> )                                |
| 20       | 41,1                      | 1,95 ( <i>m</i> )                                |
| 21       | 21,3                      | 0,97 ( <i>d</i> , 6,6)                           |
| 22       | 138,4                     | 4,95 ( <i>dd</i> , 15,1 ; 8,5)                   |
| 23       | 129,6                     | 5,08 ( <i>dd</i> , 15,1 ; 8,5)                   |
| 24       | 51,5                      | 1,60 ( <i>m</i> )                                |
| 25       | 32,1                      | 1,49 ( <i>m</i> )                                |
| 26       | 21,6                      | 0,75 ( <i>d</i> , 6,4)                           |
| 27       | 19,2                      | 0,75 ( <i>d</i> , 6,4)                           |
| 28       | 25,6                      | 1,42 ( <i>m</i> ) H-28a /1,18 ( <i>m</i> ) H-28b |
| 29       | 12,5                      | 0,74 ( <i>t</i> , 7)                             |

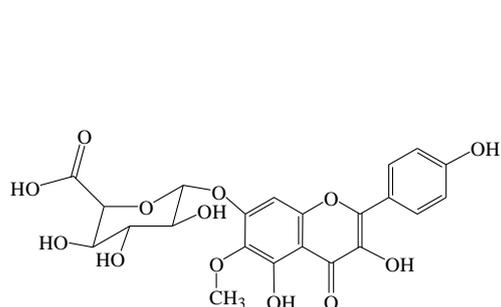
### III-5 Conclusion

Le présent travail décrit l'investigation chimique d'une plante médicinale saharienne appelée *Atractylis flava* Desf. appartenant à la famille Asteraceae. Cette étude effectuée sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la plante entière a mené à l'identification de 30 composés. Les composés caractérisés appartiennent à quatre classes de métabolites secondaires : les flavonoïdes, les triterpènes, les stéroïdes et les saponines. Ils se répartissent comme suit :

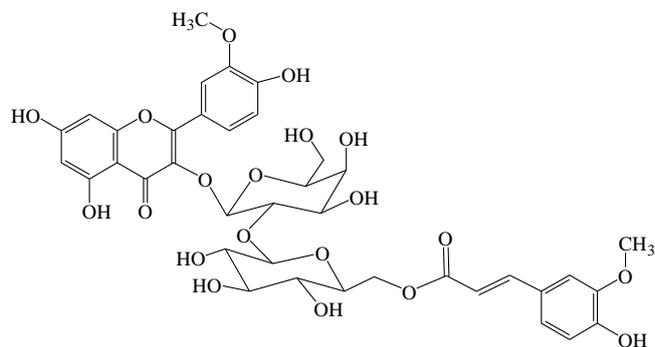
- Onze flavonoïdes dont deux sont nouveaux :
  - Atravoside A : 6-hydroxykaempférol 6-méthyl éther 7-O-β-glucopyranuronoside ;
  - Atravoside B : isorhamnétine 3-O-[(6'''-O-E-feruloyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside ;
  - Deux flavonoïdes C-glycosylés : vecenine 3 et schaftoside ;
  - Trois flavonoïdes O-glycosylés : isorhamnétine 3-O-robinobioside, narcissine, tiliroside ;
  - Quatre flavonoïdes aglycones : chrysin, quercétine, apigénine, ladanéine.
- Trois saponines bidesmosidiques nouvelles :
  - Acide 16α-hydroxygypsogénique 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-28-O-[β-D-xylopyranosyl-(1''''→4''')-α-L-rhamnopyranosyl-(1'''→2'')-β-D-xylopyranosyl] ;
  - Acide 16α-hydroxygypsogénique 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-28-O-[β-D-xylopyranosyl-(1''''→4''')-α-L-rhamnopyranosyl-(1'''→2'')-α-L-arabinopyranosyl] ;
  - Acide quillaïque 3-O-[β-D-galactopyranosyl-(1''→2')-β-D-glucuronopyranosyl]-28-O-[(3''''-O-acétyl)-β-D-xylopyranosyl-(1''''→4''')-(2'''-O-acétyl)-α-L-rhamnopyranosyl-(1''''→2''')-β-D-xylopyranosyl].
- Douze triterpènes à squelette pentacyclique :
  - Sept à squelette oléanane : acide echinocystique, acide oléanolique, hédéragénine, caulophyllogénine, oléana-9(11),12-dièn-3-yl acétate, 11-oxo-β-amyrine acétate, β-amyrine ;
  - Deux à squelette ursane : ursa-9(11),12-dièn-3-yl acétate et 11-oxo-α-amyrine acétate ;
  - Trois à squelette lupane : lupéol, lupéol acétate et l'acide bétulinique.
- Et quatre phytostérols : daucostérol, stigmastérol glucosylé, stigmastérol et spinastérol.

La méthodologie de séparation, isolement et purification de ces composés a été faite à l'aide de la combinaison de différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaque préparative de silice normale, la chromatographie sur silice greffée en C18 et la chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse, la chromatographie sur polyamide SC6, et Séphadex LH-20.

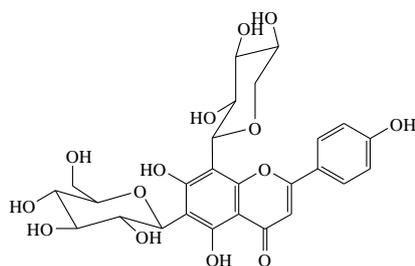
La détermination structurale des métabolites secondaires isolés **1-30** a été réalisée grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC  $J$ -modulé, HMBC, HSQC-TOCSY, TOCSY, ROESY et NOESY) et la spectrométrie de masse haute résolution (HR-ESI-MS), UV, IR, mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.



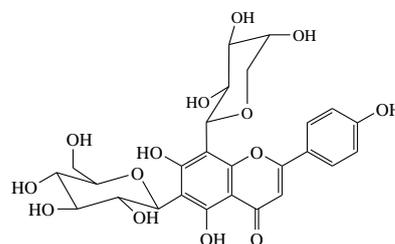
Atravloside A (1)



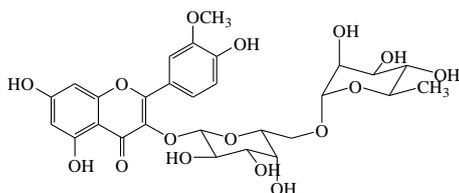
Atravloside B (2)



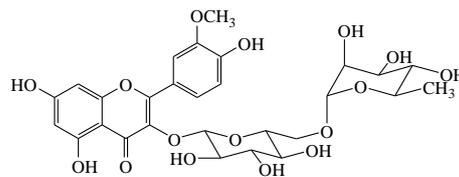
Vicenine 3 (3)



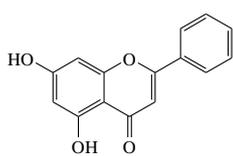
Schaftoside (4)



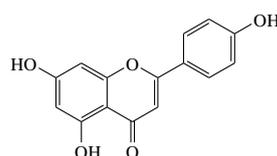
Isorhamnéttine 3-O-robinobioside (5)



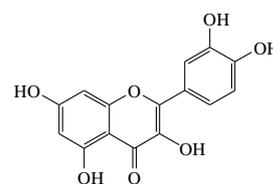
Narcissine (6)



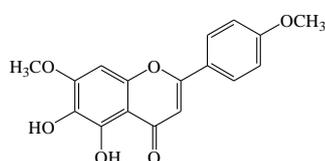
Chryssine (7)



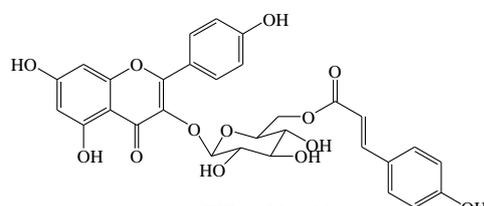
Apigénine (8)



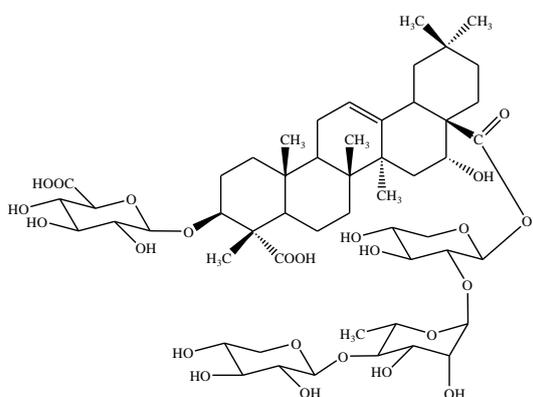
Quercétine (9)



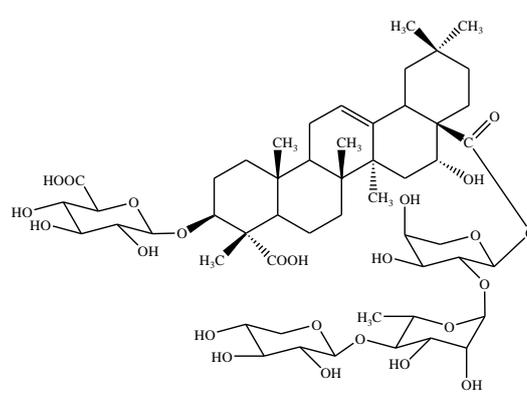
Ladaneine (10)



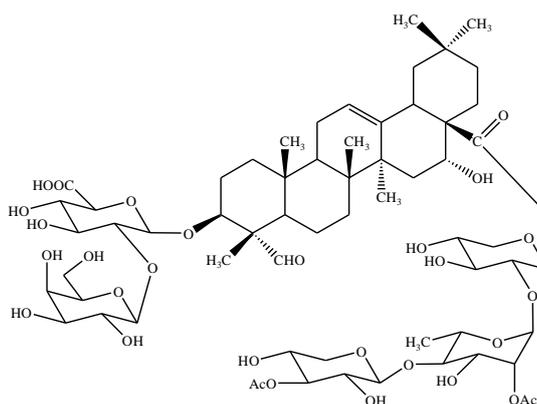
Tiliroside (11)



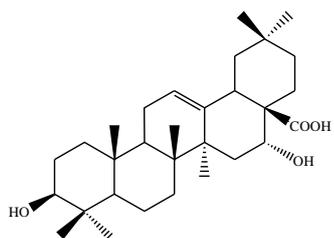
Acide 16 $\alpha$  -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$  4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$  2'')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (12)



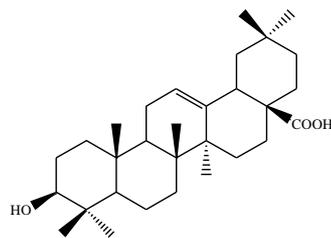
Acide 16 $\alpha$  -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$  4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$  2'')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl] (13)



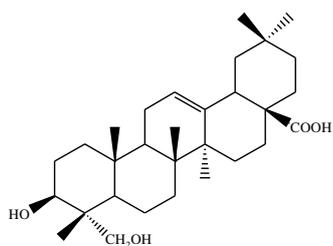
Acide quillaïque 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$  2')- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[(3''''-*O*-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$  4''')-(2''''-*O*-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$  2''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (14)



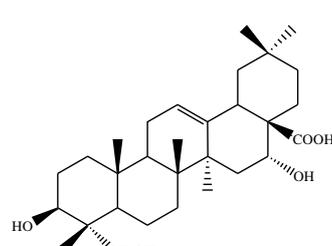
Acide echinocystique (15)



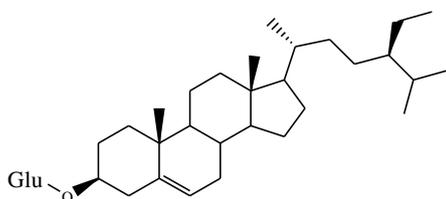
Acide oléanolique (16)



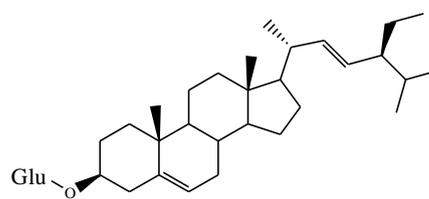
Hédéragénine (17)



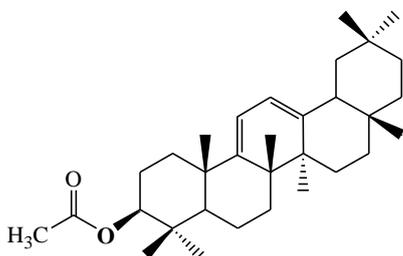
Caulophyllogénine (18)



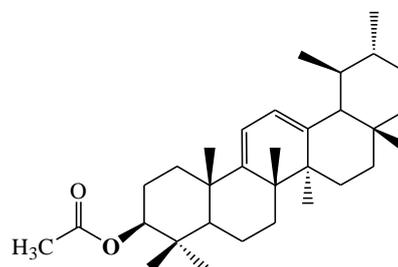
Daucostérol (19)



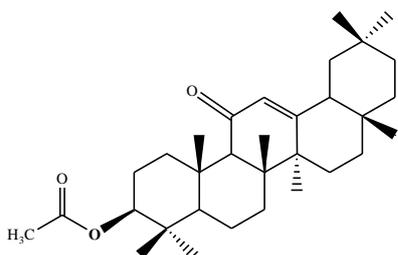
Stigmastérol glucosylé (20)



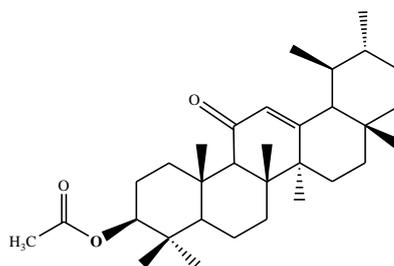
oléana-9(11),12-dièn-3-yl acétate (21)



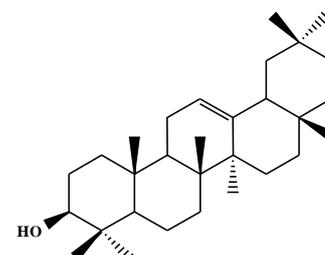
ursina-9(11),12-dièn-3-yl acétate (22)



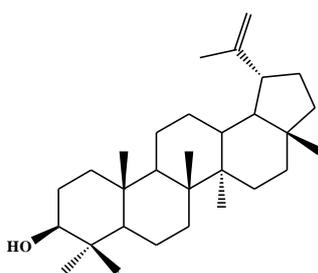
11-oxo-β-amyrine acétate (23)



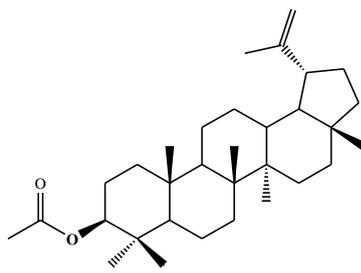
11-oxo-α-amyrine acétate (24)



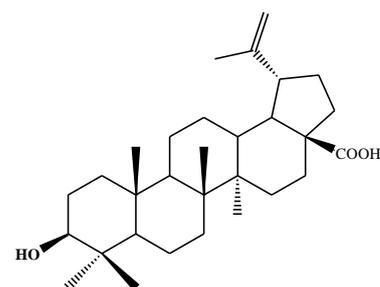
β-Amyrine (25)



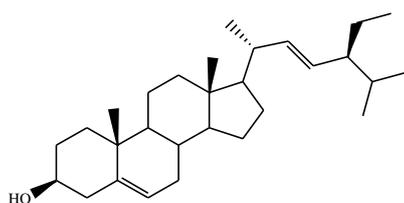
Lupéol (26)



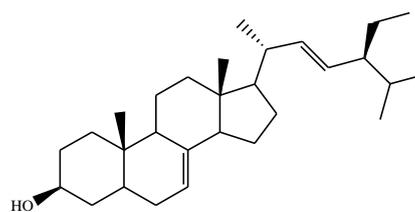
Lupéol acétate (27)



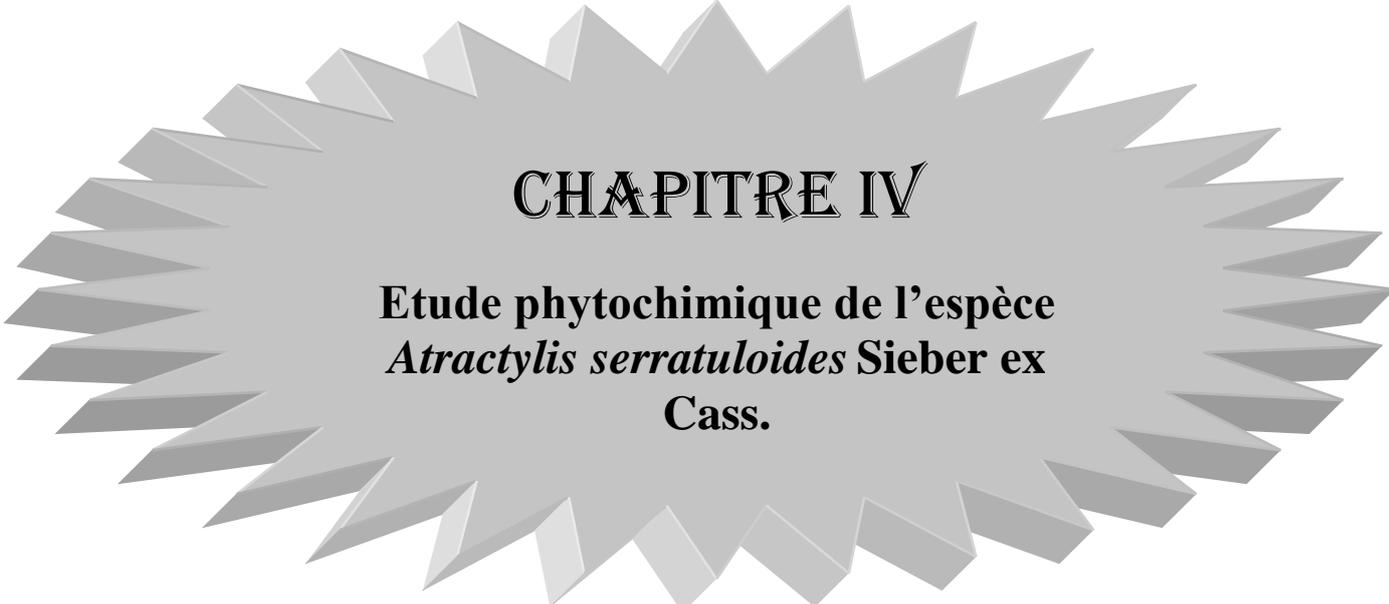
Acide bétulinique (28)



Stigmastérol (29)



Spinastérol (30)



## **CHAPITRE IV**

**Etude phytochimique de l'espèce  
*Atractylis serratuloides* Sieber ex  
Cass.**

### **IV-1 Rappel botanique**

L'espèce *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. (Figure IV.1) est une plante saharienne et vivace. Les tiges sont épaisses, dressées, rameuses et glabres mesurant entre 20-30 cm de hauteur. Les feuilles sont alternes, distantes, longues, étroites et aussi glabres. Elles sont bordées de longues dents inégales et épineuses. Les épines sont jaunes foncées et les fleurs de couleur carminées. <sup>[11]</sup> Cette plante pousse dans les regs caillouteux, les hamadas et les hauts plateaux. <sup>[11]</sup>



**Figure IV.1 : Images de l'espèce *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass.**

La classification botanique de cette plante est comme suit :

**Famille :** Asteraceae

**Sous famille :** Carduoideae

**Tribu :** Cardueae

**Sous tribu :** Carlininae

**Genre :** *Atractylis*

**Espèce :** *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass.

**Nom vernaculaire :** Chandar el djemel

### **IV-2 Usage traditionnel**

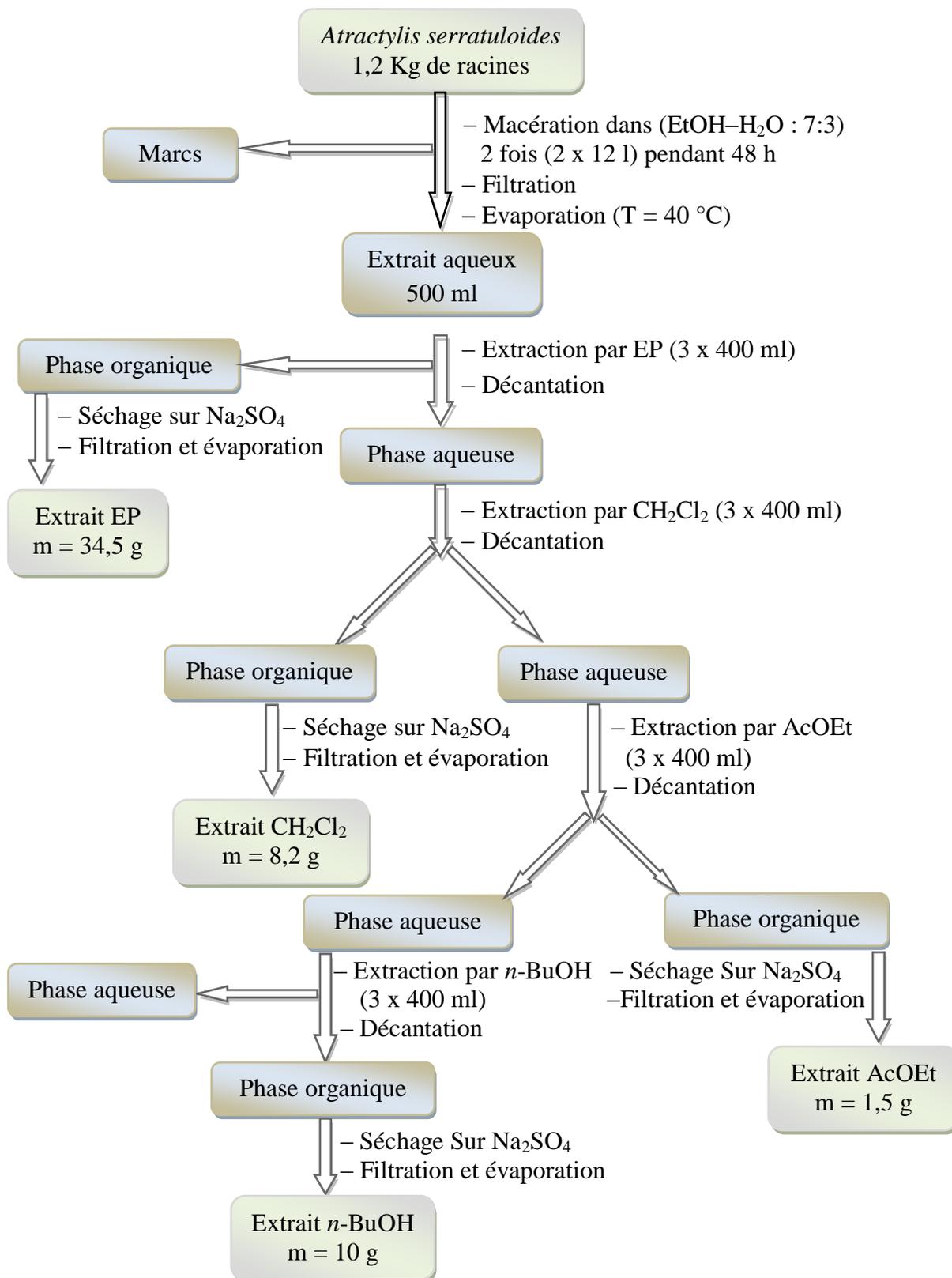
L'espèce *A. serratuloides* et particulièrement ses racines sont préconisées contre la lithiase biliaire et les désordres circulatoires, tandis que ses fruits sont recommandés pour traiter l'hépatite. <sup>[2]</sup> Les racines d'*Atractylis serratuloides* sont utilisées en Tunisie comme un latex « Loubène » qui au séchage se transforme en gomme à mâcher pour les enfants. <sup>[224]</sup>

### **IV-3 Chimie extractive**

#### **IV-3-1- Extraction**

La première étape a été de broyer les racines séchées afin d'obtenir une poudre homogène. Cette poudre, d'un poids de 1,2 kg, est soumise à une extraction hydro-alcoolique EtOH-H<sub>2</sub>O (70:30) à température ambiante. Après filtration et évaporation, 500 ml d'extrait

aqueux sont obtenus. Ce dernier est soumis à une extraction liquide-liquide en utilisant successivement des solvants à polarité croissante : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Le schéma ci-dessous (Figure IV.2) englobe les différentes étapes de l'extraction.



**Figure IV.2 : Schéma d'extraction des racines de la plante *Atractylis serratuloides***

IV-3-2 Purification

Les différents extraits obtenus sont analysés par CCM dans des systèmes d'éluion différents. Les extraits dont le profil chromatographique montrant leur richesse en métabolites secondaires sont retenus pour une étude chimique à savoir les extraits : EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et *n*-BuOH.

Les extraits EP et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont soumis à un fractionnement par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice normale en utilisant les gradients d'éluion :

- Éther de pétrole–éther diéthylique allant de 100:0 à 0:100 pour l'extrait éther de pétrole (Figure IV.3).
- Hexane–acétate d'éthyle de 100:0 à 0:100 ensuite AcOEt–méthanol de 100:0 à 0:100 pour l'extrait dichlorométhane (Figure VI.4).

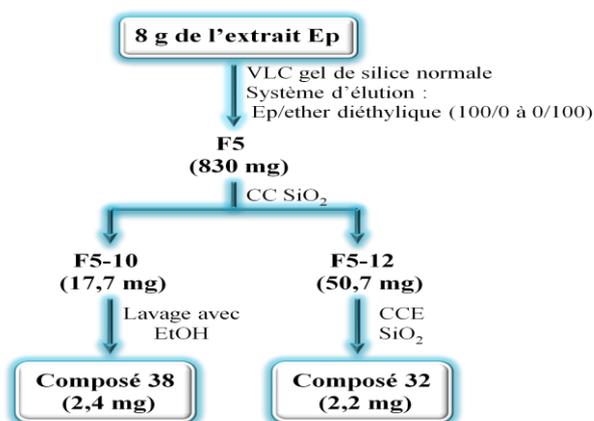


Figure IV.3: Schéma de purification des produits de l'extrait EP d'*Atractylis serratuloides*

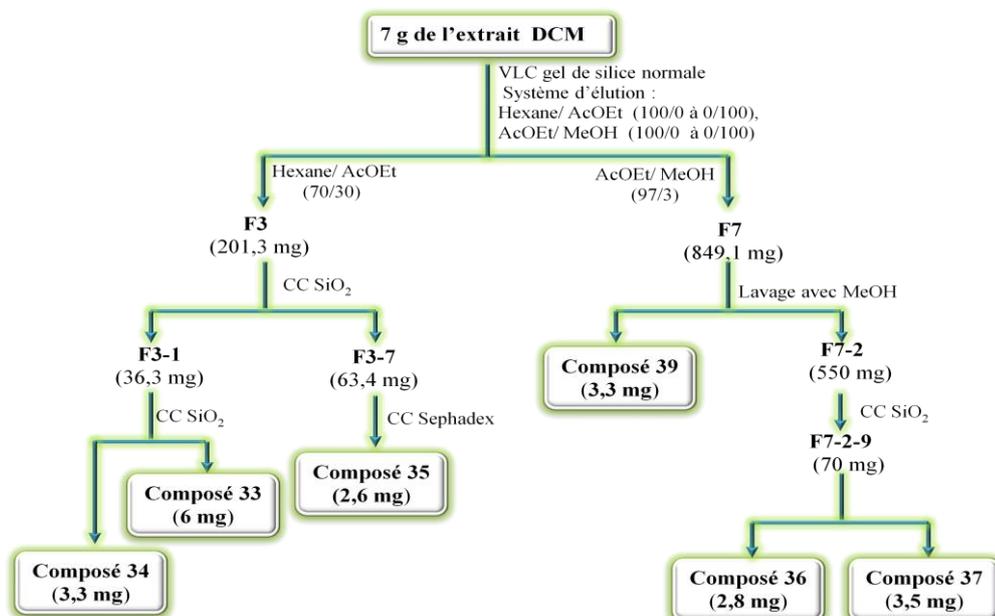
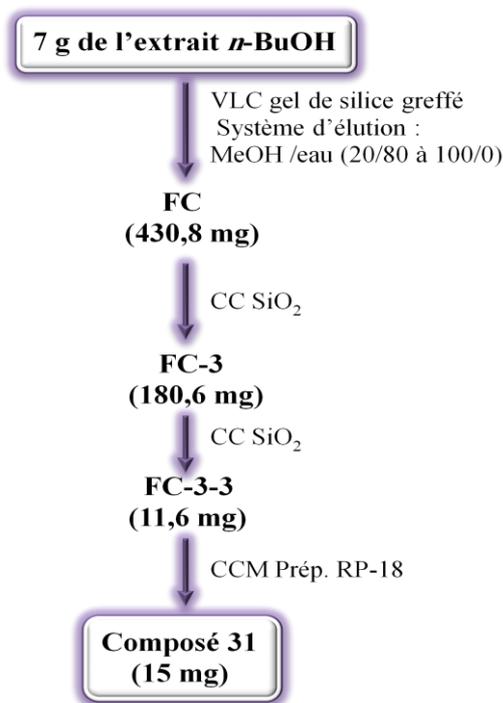


Figure IV.4: Schéma de purification des produits de l'extrait DCM d'*Atractylis serratuloides*

Par ailleurs l'extrait *n*-butanol a subi un fractionnement par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice greffé en C-18, en utilisant un gradient d'éluion méthanol-eau de 20:80 à 100:0 (Figure IV.5).



**Figure IV.5: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH d'*Atractylis serratuloides***

Les fractions obtenues sont purifiées par les différentes méthodes chromatographiques :

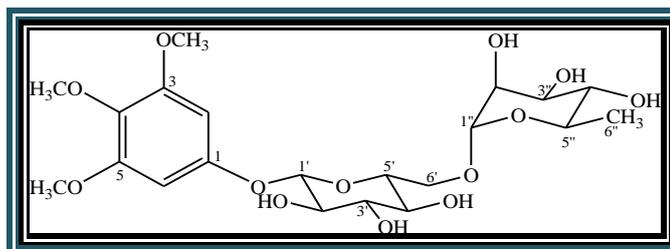
- Chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale SiO<sub>2</sub>.
- Chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20.
- Chromatographie sur plaque préparative en phase inverse (C-18).

L'utilisation combinée des techniques chromatographiques nommées précédemment, a conduit à l'isolement de 9 composés.

#### **IV-3-3 Caractérisation des produits obtenus**

Les produits isolés 1-9 ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et spectrométrie de masse ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

IV-3-3-1 Elucidation structurale du composé 31



Antiarol rutinoside (31)

Le composé **31** nommé Antiarol rutinoside a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Il est invisible à la lumière UV aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm. La CCM de ce composé se colore en jaune après pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **31** (Figure IV.6) obtenu en mode positif, montre deux pics d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  515 et à  $m/z$  1007  $[2M+Na]^+$ . En mode négatif (Figure IV.7), il révèle un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Cl]^-$  à  $m/z$  527, soit une masse moléculaire 492 uma qui correspond à une formule brute en  $C_{21}H_{32}O_{13}$ .

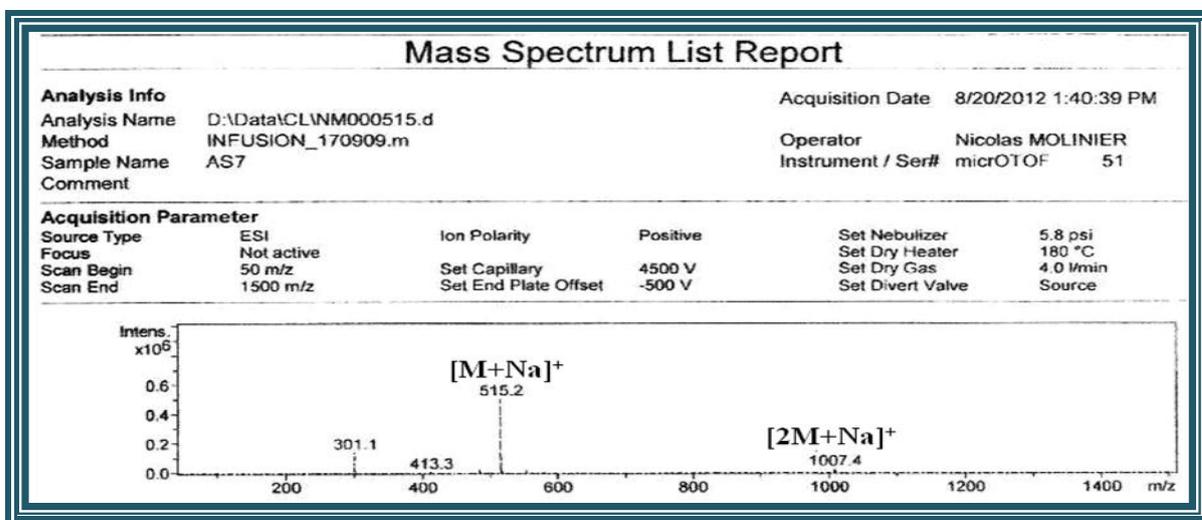


Figure IV.6: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé 31

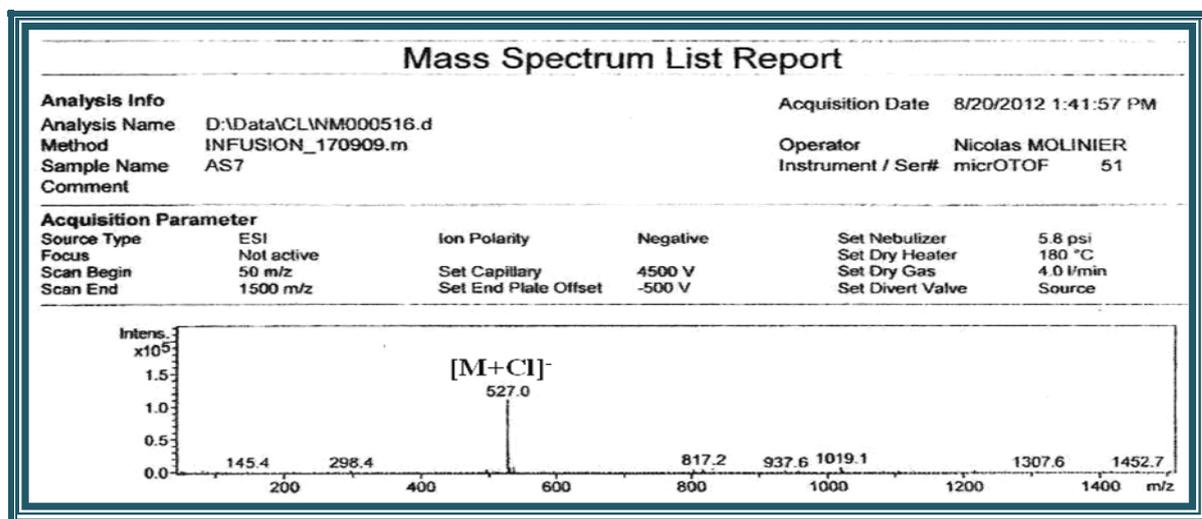


Figure IV.7: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé 31

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.8) enregistré dans le méthanol deutéré montre la présence des signaux suivants:

- Un signal sous forme de singulet s'intégrant pour deux protons résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,44 correspondant à deux protons aromatiques ;
- Deux singulets, l'un à  $\delta_{\text{H}}$  3,70, d'intégration trois protons et l'autre à  $\delta_{\text{H}}$  3,82 s'intégrant pour six protons, attribuables à trois groupements méthoxyles dont deux sont identiques.

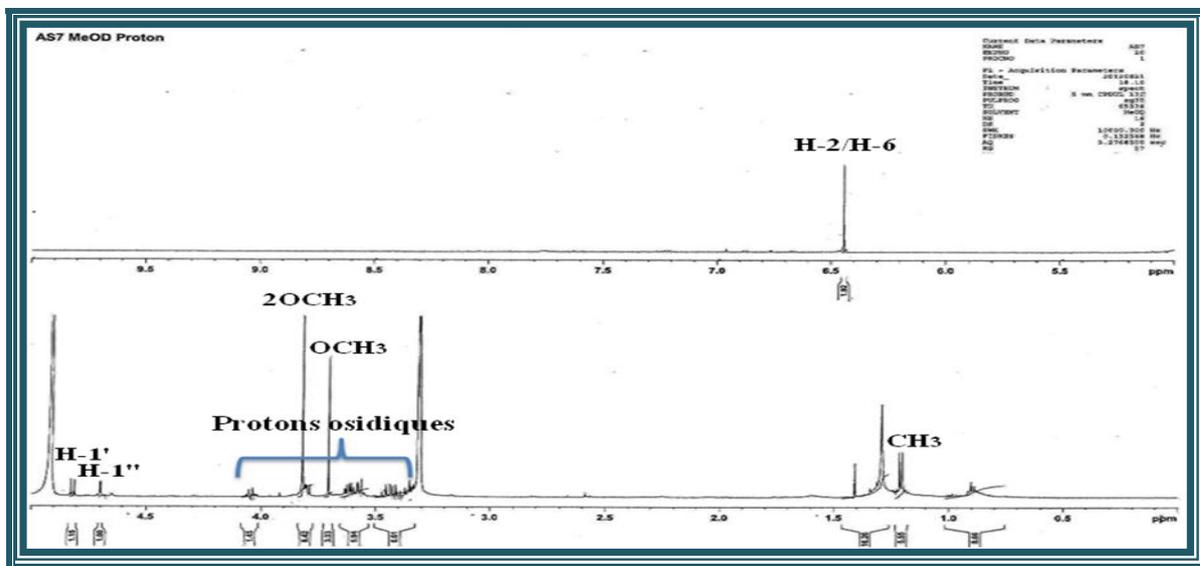


Figure IV.8: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 31

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figures IV.8 et IV.9) indiquent aussi la présence de deux signaux à  $\delta_{\text{H}}$  4,82 ( $d$ ,  $J = 7,5$  Hz) et 4,70 ( $d$ ,  $J = 1,6$ Hz) correspondant à deux protons anomériques, leur carbones résonnent à 103,1 et 102,2 ppm selon l'expérience HSQC (Figure IV.9). Nombreux signaux observés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  entre 3 et 4 ppm sont attribués aux protons d'une unité osidique contenant au moins deux sucres.

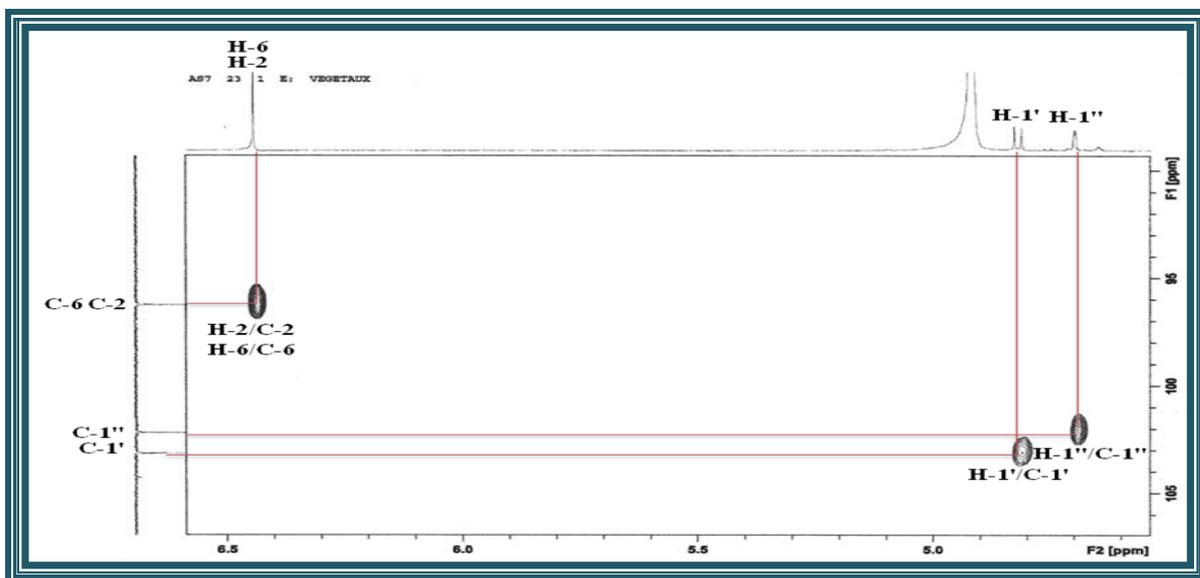
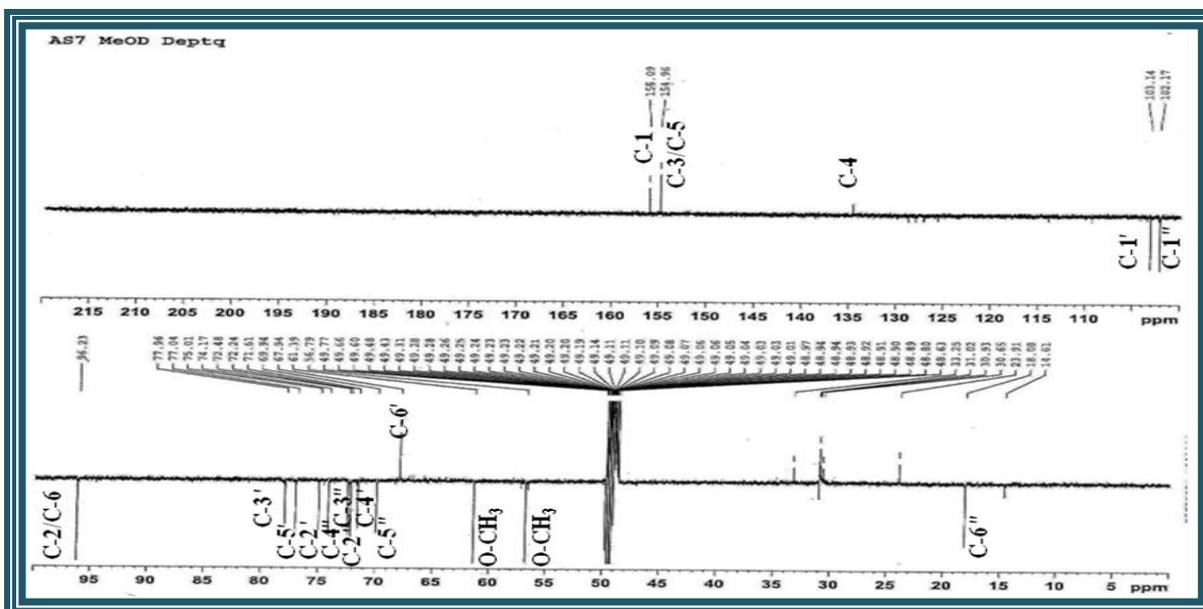
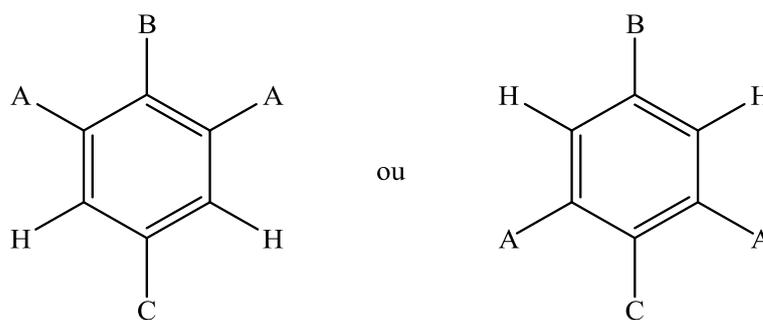


Figure IV.9: Spectre HSQC de la partie des anomères du composé 31

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure IV.10) montre dans la région déblindé la présence de quatre signaux à  $\delta_{\text{C}}$  156,1 (Cq), 155 (2 Cq), 134,7 (Cq) et 96,2 (2 CH), suggérant la présence d'un noyau aromatique tétrasubstitué. Le fait que les deux CH aromatiques et les deux atomes de carbone quaternaires oxygénés sont identiques deux à deux, suggèrent une symétrie dans le cycle aromatique (Figure IV.11).



**Figure IV.10: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé 31**

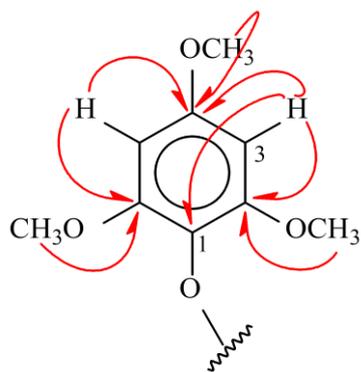


**Figure IV.11: Symétrie du noyau aromatique**

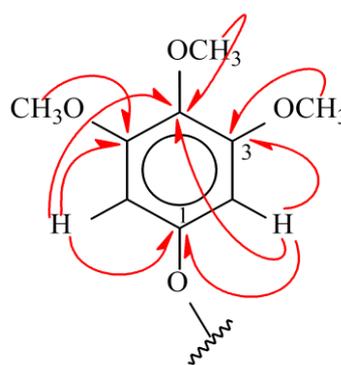
Ce spectre montre également, en plus des carbones des sucres, la présence de trois carbones de groupements méthoxyles à  $\delta_{\text{C}}$  56,8 (2 OMe) et 61,4 (1 OMe). Ceci implique que le composé **31** est constitué de deux parties: phénol triméthoxylés et sucre.

La caractérisation des protons et carbones constituant la génine, a été réalisée à travers l'analyse combinée des spectres HMBC, COSY H-H et HSQC.

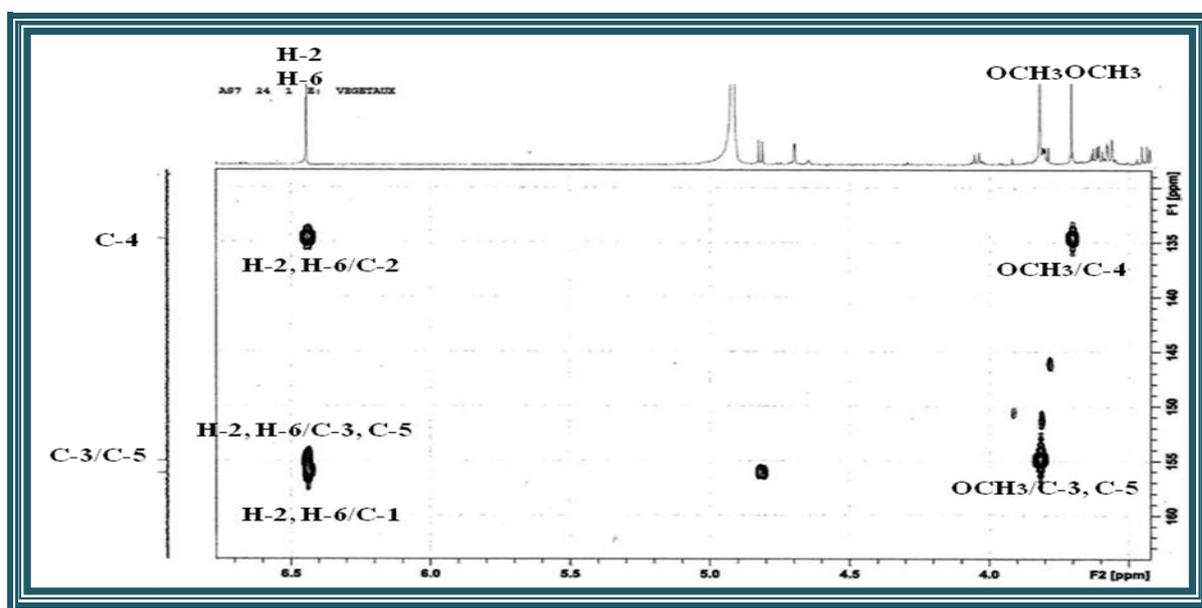
Les deux protons aromatiques à  $\delta_H$  6,44 couplant sur le spectre HSQC (Figure IV.9) avec leur carbone détecté à  $\delta_C$  96,2 corrent en HMBC (Figure IV.12) avec les carbones oxygénés résonant à 156,1 ; 155 et 134,7 ppm. Les deux groupements méthoxyles détectés à 3,82 ppm présentent des taches de corrélations avec le carbone à  $\delta_C$  155. Par ailleurs le carbone repéré à  $\delta_C$  134,7 couple avec le groupement méthoxyle résonant à 3,70 ppm, ceci conduit à proposer les deux fragments structuraux suivants :



**2,4,6-triméthoxyphénol**



**3,4,5-triméthoxyphénol**



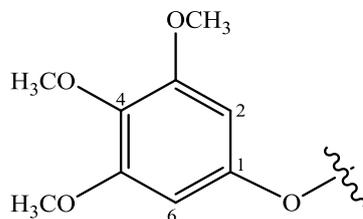
**Figure IV.12: Spectre HMBC du composé 31**

Il en résulte que l'expérience HMBC toute seule ne permet pas de distinguer entre les deux fragments proposés.

Cependant le déplacement chimique déblindé du carbone C-1 à 156,1 ppm suggère l'absence des groupements méthoxyles en positions 2 et 6 car dans le cas de 2,4,6-trisubstitutions, le carbone C-1 résonnerait à champ plus fort (blindé).<sup>[225]</sup>

Une preuve supplémentaire concernant la localisation des groupements méthoxyles en positions 3, 4 et 5 proviennent de la valeur de déplacement chimique du méthoxyle lié au carbone C-4 égale à 61,4 ppm exigeant une ortho-substitution du noyau aromatique. <sup>[142,143]</sup>

A l'issue de cette analyse la génine est identifiée comme étant 3,4,5-triméthoxyphénol (Figure IV.13).



**Figure IV.13 : 3,4,5-triméthoxyphénol substitué**

La partie osidique est représentée par deux protons anomériques H-1' et H-1". Les déplacements chimiques des protons des deux sucres déterminés par COSY sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucose et d'un  $\alpha$ -L-rhamnose (Tableau IV.1).

Pour le glucose, on note la configuration  $\beta$  grâce à la constante de couplage de son proton anomérique H-1' [ $\delta_H$  4,80 (*d*,  $J = 7,5$  Hz)]. A partir de ce proton, l'expérience COSY H-H (Figures IV.14 et IV.15) permet de repérer les corrélations entre les protons :

- H-1'/H-2' [ $\delta_H$  3,43 (*dd*,  $J = 8,9; 7,5$  Hz)]
- H-2'/H-3' [ $\delta_H$  3,45 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)] ;
- H-3'/H-4' [ $\delta_H$  3,34 (*m*)];
- H-4'/H-5' [ $\delta_H$  3,57 (*dl*,  $J = 8,2$  Hz)];
- H-5'/H<sub>2</sub>-6' [ $\delta_H$  4,04 (*dd*,  $J = 8,9; 5,3$  Hz), H-6'a], [ $\delta_H$  3,56 (*dl*,  $J = 8,9$  Hz), H-6'b].

Les grandes valeurs de constantes de couplage montrent que tous ces protons sont tous axiaux (Tableau IV.1).

Le rhamnose est identifié par son proton anomérique qui résonne à  $\delta_H$  4,70 avec une constante de couplage faible ( $J = 1,6$  Hz) et le signal du méthyle situé à  $\delta_H$  1,18 (*d*,  $J = 6,3$  Hz, H-6") ainsi que par la grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-3"/H-4" ( $J = 9,5$  Hz), indiquant que le proton H-4" est en position axiale. Les autres corrélations repérées aussi à l'aide de l'expérience COSY (Figures IV.14 et IV.15) sont :

- H-1"/H-2" [ $\delta_H$  3,80 (*dd*,  $J = 3,1; 1,6$  Hz)];
- H-2"/H-3" [ $\delta_H$  3,63 (*dd*,  $J = 9,5; 3,1$  Hz)];
- H-3"/H-4" [ $\delta_H$  3,38 (*t*;  $J = 9,5$  Hz)];
- H-4"/H-5" [ $\delta_H$  3,61 (*m*)];
- H-5"/H<sub>3</sub>-6" [ $\delta_H$  1,18 (*d*,  $J = 6,3$  Hz)].

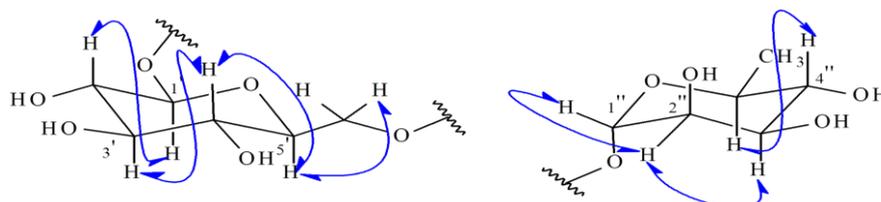


Figure IV.14 : Corrélations COSY des sucres

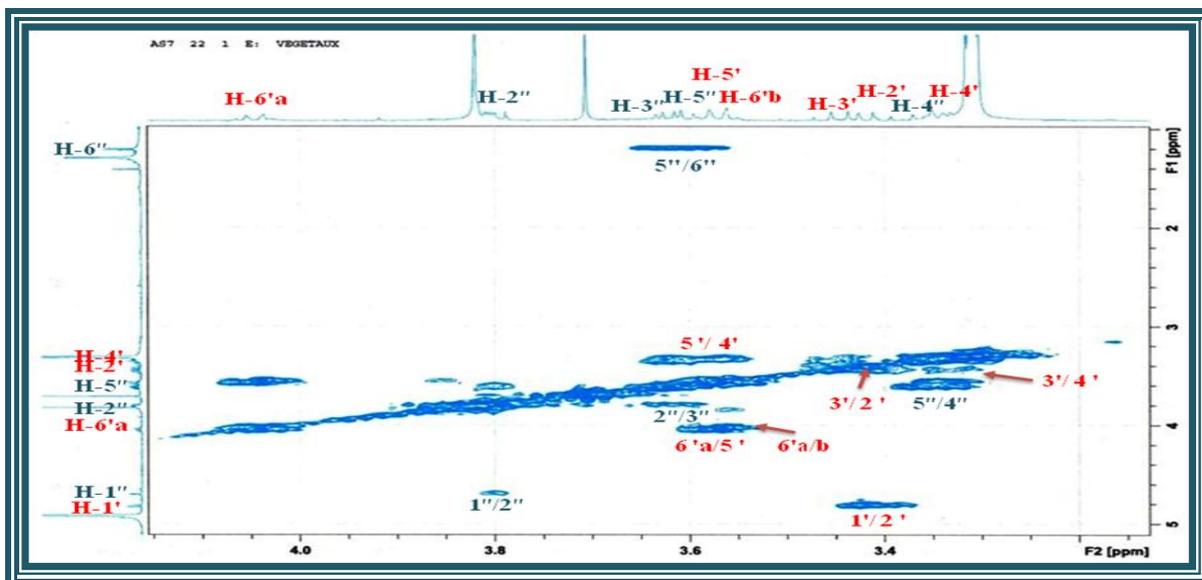


Figure IV.15: Spectre COSY de la partie osidique du composé 31

L'analyse du spectre HSQC (Figure IV.16) permet de localiser les carbones des deux sucres :

- Glucose : C-1' ( $\delta_C$  103,1), C-2' ( $\delta_C$  77,9), C-3' ( $\delta_C$  77,9), C-4' ( $\delta_C$  71,6), C-5' ( $\delta_C$  77), C-6' ( $\delta_C$  67,9) ;
- Rhamnose : C-1'' ( $\delta_C$  102,2), C-2'' ( $\delta_C$  72,2), C-3'' ( $\delta_C$  72,5), C-4'' ( $\delta_C$  74,2), C-5'' ( $\delta_C$  69,6), C-6'' ( $\delta_C$  14,6).

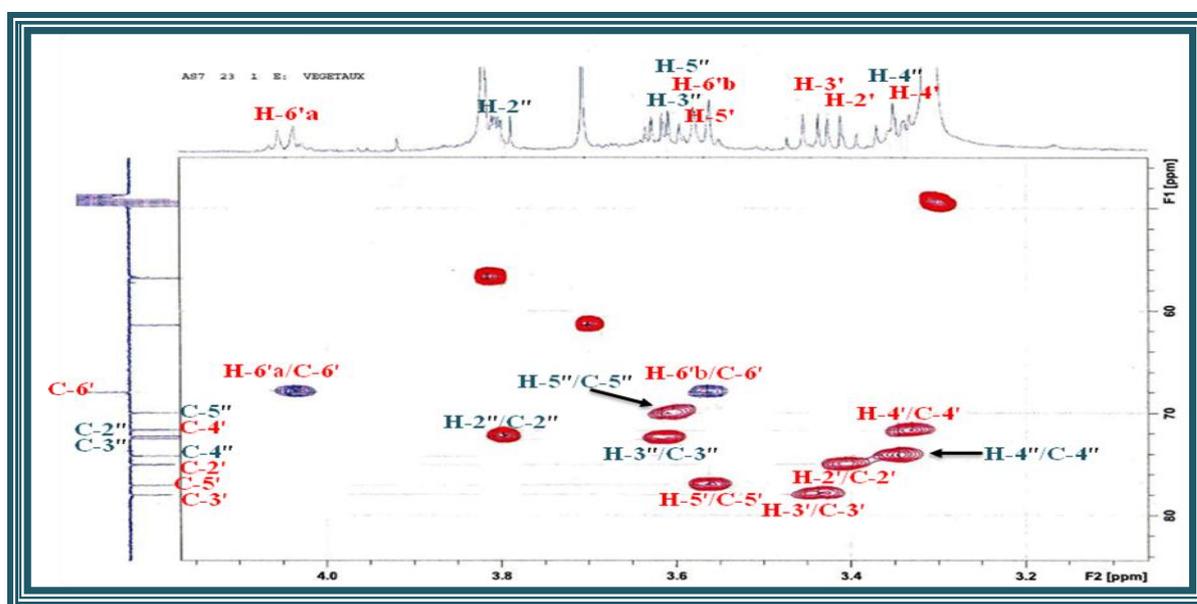
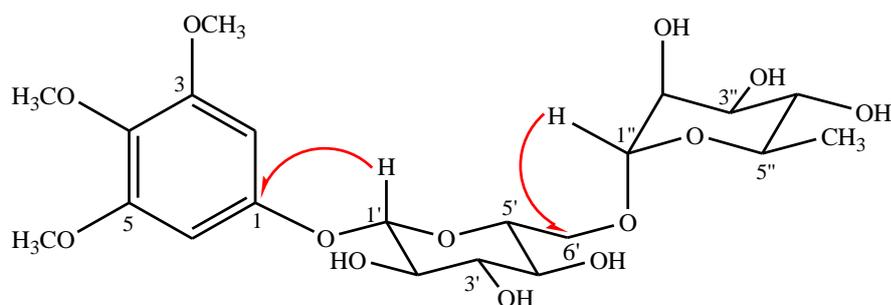


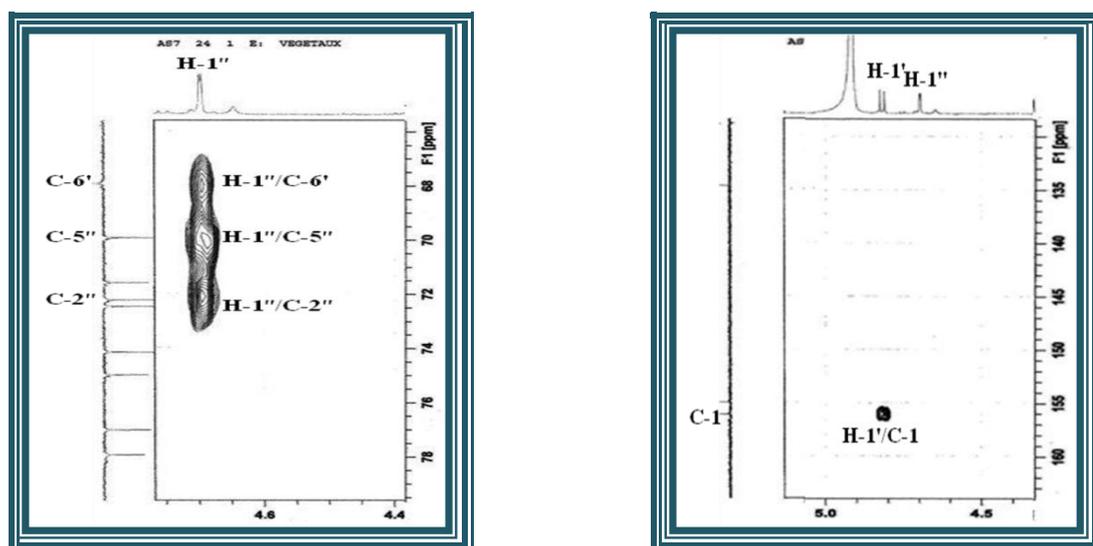
Figure IV.16: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 31

Les valeurs de déplacement chimique des protons et carbone du groupement oxyméthylène CH<sub>2</sub>-6' à  $\delta_H$  4,04 et 3,56/ $\delta_C$  67,9 indiquent que l'hydroxyle OH-6' n'est pas libre.

Sur le spectre HMBC (Figure IV.18), la corrélation observée entre le proton anomérique du rhamnose H-1'' et le carbone C-6' du glucose, et celle du proton anomérique du glucose H-1' avec le carbone C-1 du phénol résonant à  $\delta_C$  156,1 établissent la liaison interglycosidique (1''→6') ainsi que le point d'attachement de l'unité osidique à la génine (Figure IV.17). Il en résulte que ce composé est le 3,4,5-triméthoxyphényl-O-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl](1-6)- $\beta$ -D-glucopyranoside.



**Figure IV.17: Corrélations HMBC**



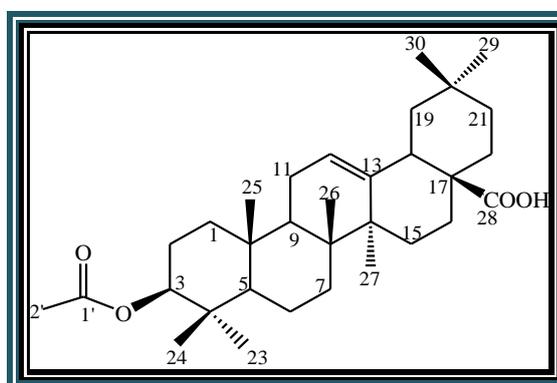
**Figure IV.18: Spectre HMBC du composé 31**

Toutes ces données spectrales (Tableau IV.1) ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -98^\circ$  ( $C = 0,05$  g/ml MeOH) indiquent qu'il s'agit d'un phénol glycosylé connu sous le nom antiarol rutinoside, isolé antérieurement de l'espèce *Ravensara anisata* (Lauraceae).<sup>[226]</sup> Il est isolé pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

Tableau IV.1: Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de 31 dans CD<sub>3</sub>OD

| position    | δ <sub>C</sub> (ppm) | δ <sub>H</sub> (m, J en Hz)                        |
|-------------|----------------------|--|
| 1           | 156,1                | -  |
| 2           | 96,2                 | 6,44 (s)   |
| 3           | 155                  | -  |
| 4           | 134,7                | -  |
| 5           | 155                  | -  |
| 6           | 96,2                 | 6,44 (s)   |
| 3-OMe       | 56,8                 | 3,82 (s)   |
| 4-OMe       | 61,4                 | 3,70 (s)   |
| 5-OMe       | 56,8                 | 3,82 (s)   |
| 1-O-glc-1'  | 103,1                | 4,82 (d, 7,5)                                      |
| 2'          | 75                   | 3,43 (dd, 7,5, 8,9)                                |
| 3'          | 77,9                 | 3,45 (t, 8,9)                                      |
| 4'          | 71,6                 | 3,34 (m)   |
| 5'          | 77                   | 3,57 (dl, 8,2)                                     |
| 6'          | 67,9                 | 4,04 (dd, 8,9 ; 5,3) H-6'a<br>3,56 (dl, 8,9) H-6'b |
| 6'-O-Rha-1" | 102,2                | 4,70 (d, 1,6)                                      |
| 2"          | 72,2                 | 3,80 (dd, 3,1 ; 1,6)                               |
| 3"          | 72,5                 | 3,63 (dd, 9,5 ; 3,1)                               |
| 4"          | 74,2                 | 3,38 (t, 9,5)                                      |
| 5"          | 69,9                 | 3,61 (m)   |
| 6"          | 14,6                 | 1,18 (d, 6,3)                                      |

#### IV-3-3-2 Elucidation structurale du composé 32



Acide 3-acétoxyoléan-12-èn-28-oïque (32)

Il s'agit d'un triterpène pentacyclique acylé à squelette oléanène. Sa formule brute C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> a été déduite des spectres de masse ESI-MS (Figures IV.19 et IV.20). Ces derniers montrent des ions pseudomoléculaires, en mode positif [M+Na]<sup>+</sup> et [2M+Na]<sup>+</sup> à m/z 521 et 1019 respectivement et en mode négatif à m/z 497 [M-H]<sup>-</sup> et 955 [2M-H]<sup>-</sup>.

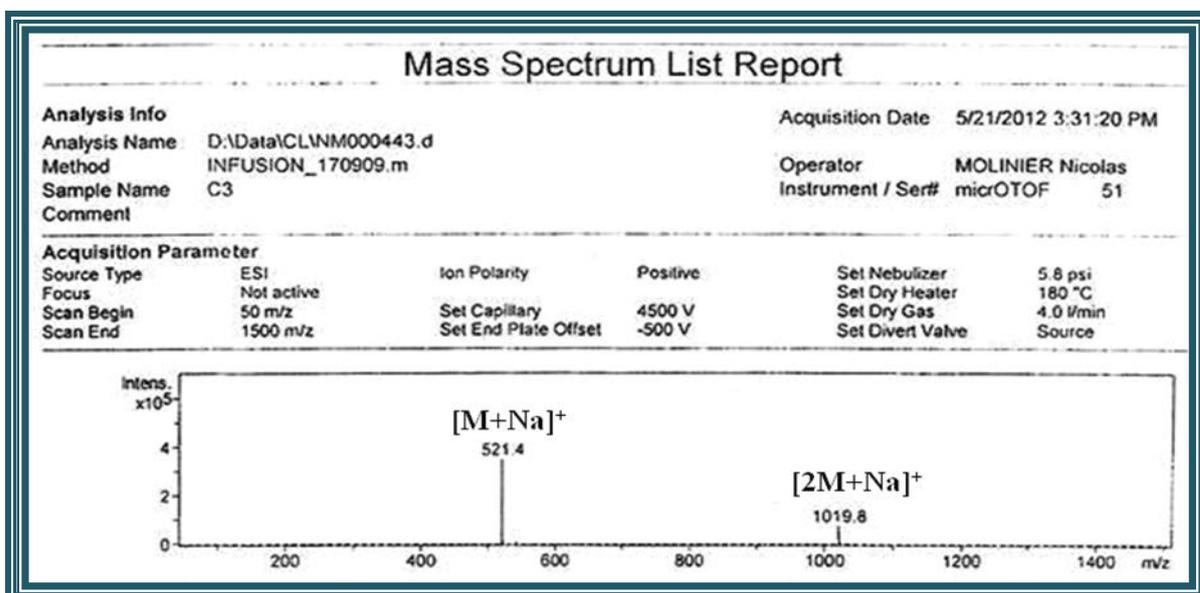


Figure IV.19: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé 32

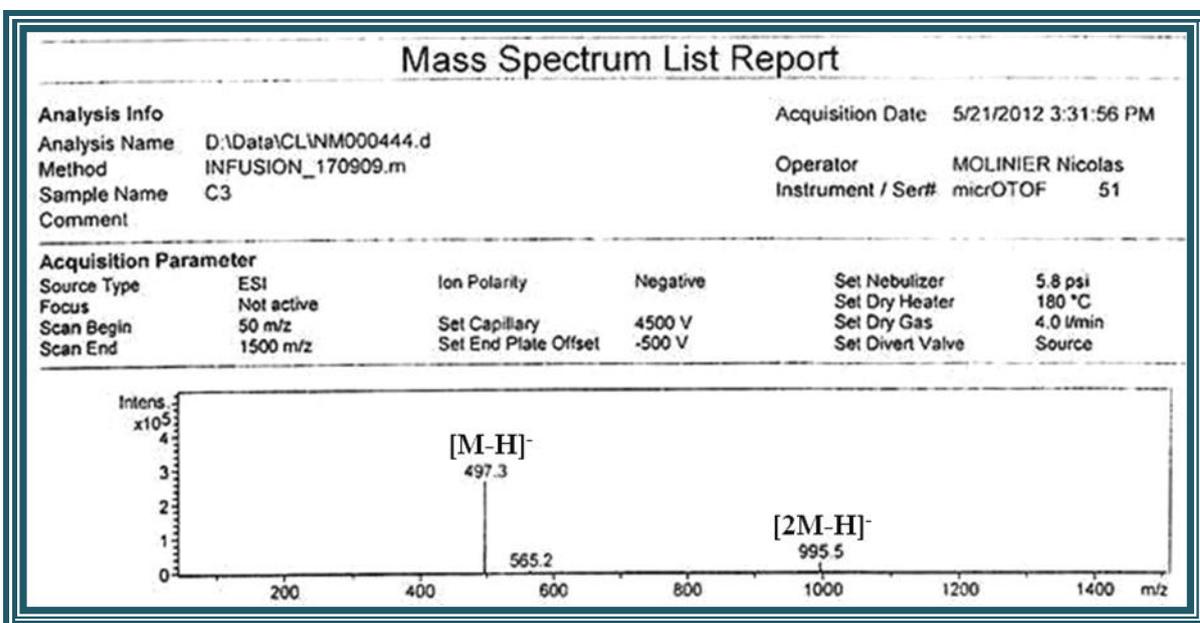


Figure IV.20: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé 32

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 32 (Figure IV.21) enregistré dans le chloroforme deutéré (CDCl<sub>3</sub>) montre dans la région blindée sept singulets fins correspondant aux sept groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique résonant à δ<sub>H</sub> 0,84 (CH<sub>3</sub>-23), 0,83 (CH<sub>3</sub>-24), 0,91 (CH<sub>3</sub>-25), 0,72 (CH<sub>3</sub>-26), 1,10 (CH<sub>3</sub>-27), 0,88 (CH<sub>3</sub>-29) et 0,90 (CH<sub>3</sub>-30).

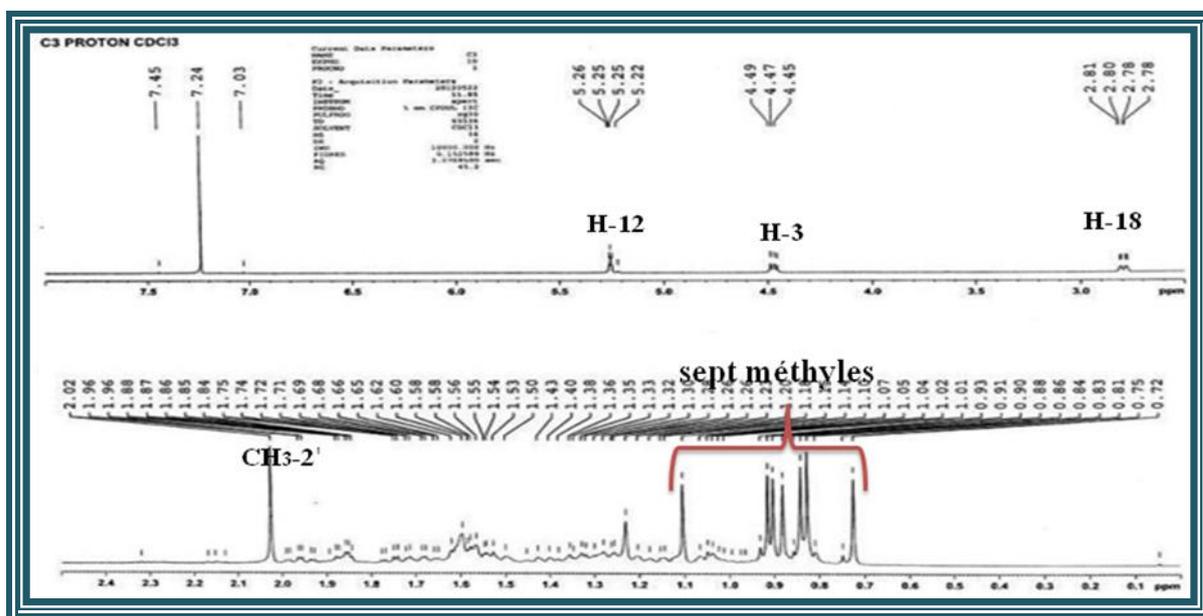


Figure IV.21: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 32

D'autres signaux sont observés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  dans la région des champs faibles:

- Un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  5,25 ( $J = 3,5$  Hz) caractéristique de proton oléfinique H-12,
- Un doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  2,81 ( $J = 13,7; 4,2$  Hz) correspondant au proton H-18. Son déplacement chimique indique que le méthyle Me-28 est oxydé en acide.

On observe également sur ce spectre un signal doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  4,47 ( $J = 11,6; 4,6$  Hz) attribuable au proton oxyméthine H-3 $\alpha$ . La valeur du déplacement chimique de ce dernier atteste d'une acylation au niveau du carbone C-3.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure IV.22) révèle la présence de 32 signaux répartis comme suit :

- Sept méthyles angulaires ;
- Un signal d'un carbone oxyméthine C-3 à  $\delta_{\text{C}}$  81,1. La valeur du déplacement chimique de ce dernier confirme que le carbone en position 3 est acylé ;
- Deux signaux apparaissant à  $\delta_{\text{C}}$  122,7 et  $\delta_{\text{C}}$  143,8 correspondent aux carbones éthyléniques C-12 et C-13 respectivement;
- Un méthyle d'un groupement acyle résonant à  $\delta_{\text{C}}$  21,5 ;
- Un signal d'un carbone correspondant au groupement ester à  $\delta_{\text{C}}$  171,3 attribuable à C-1'
- Dix méthylènes ;
- Trois méthines ;
- Sept carbones quaternaires.

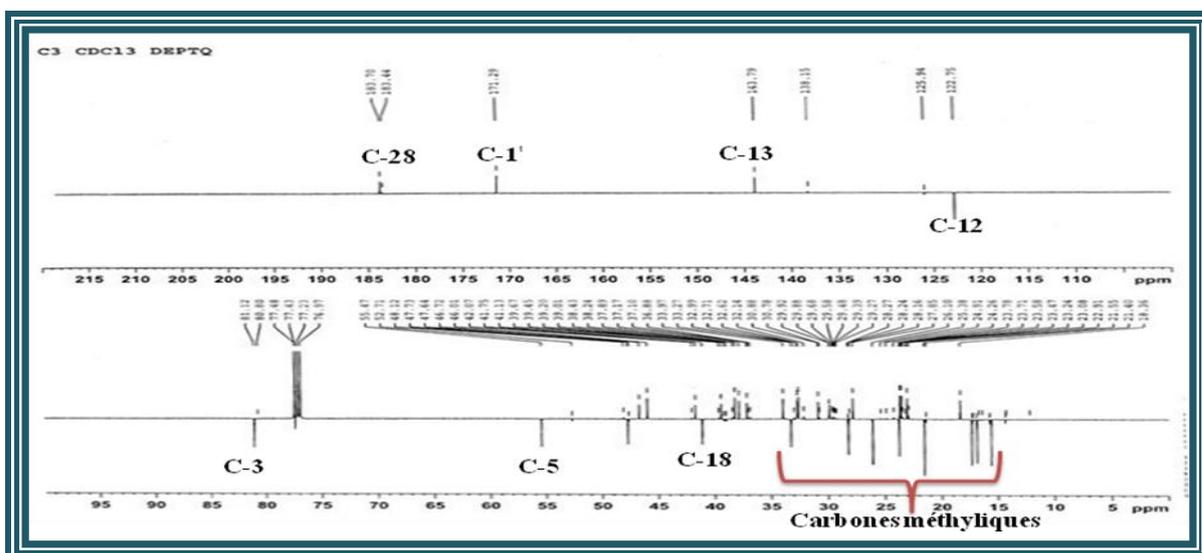


Figure IV.22: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du composé 32

L'attribution des carbones et protons de ce composé se fait par l'analyse conjointe des spectres RMN de corrélations COSY H-H, HMBC et HSQC.

L'expérience homonucléaire COSY H-H (Figures IV.23 et IV.24) montre des taches de corrélation qui permettent d'assigner les déplacements chimiques de plusieurs protons.

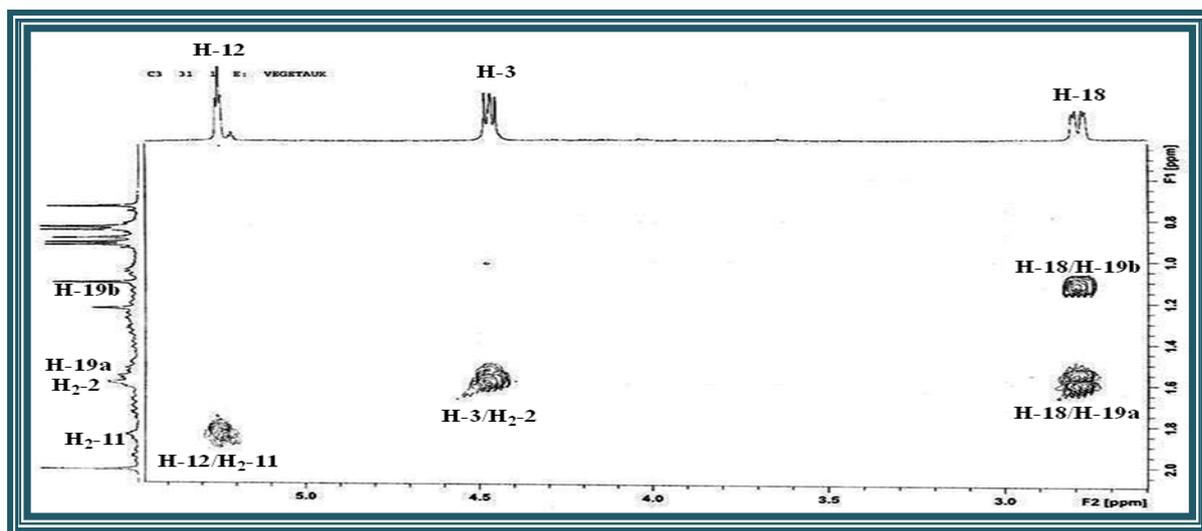


Figure IV.23: Spectre COSY du composé 32

En effet, à partir du proton H-3 $\alpha$  déjà attribué, cette expérience permet de repérer les protons H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_{\text{H}}$  1,62). Ces derniers corrént avec deux protons H<sub>2</sub>-1 résonant à  $\delta_{\text{H}}$  (1,06; 1,01). De la même manière, les protons H<sub>2</sub>-11 sont localisés à  $\delta_{\text{H}}$  1,83 suite aux corrélations qu'ils présentent avec le proton éthylénique H-12. Les protons H<sub>2</sub>-11 montrent également des taches de corrélations avec le proton H-9 sortant à  $\delta_{\text{H}}$  1,53. Les protons H<sub>2</sub>-19 sont localisés à  $\delta_{\text{H}}$  (1,59; 1,13) par leurs corrélations en  $^3J$  sur le spectre COSY avec le proton H-18 attribué précédemment.

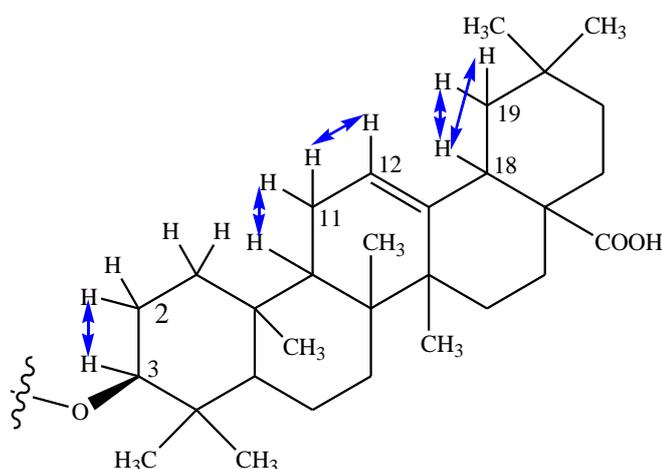


Figure IV.24:Corrélations COSY

À partir de ces protons, l'analyse des corrélations hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  observées sur le spectre HSQC  $J$ -modulé (Figure IV.25) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones les portant (C-1, C-2, C-3, C-9, C-11, C-12, C-18 et C-19) (Tableau IV.2).

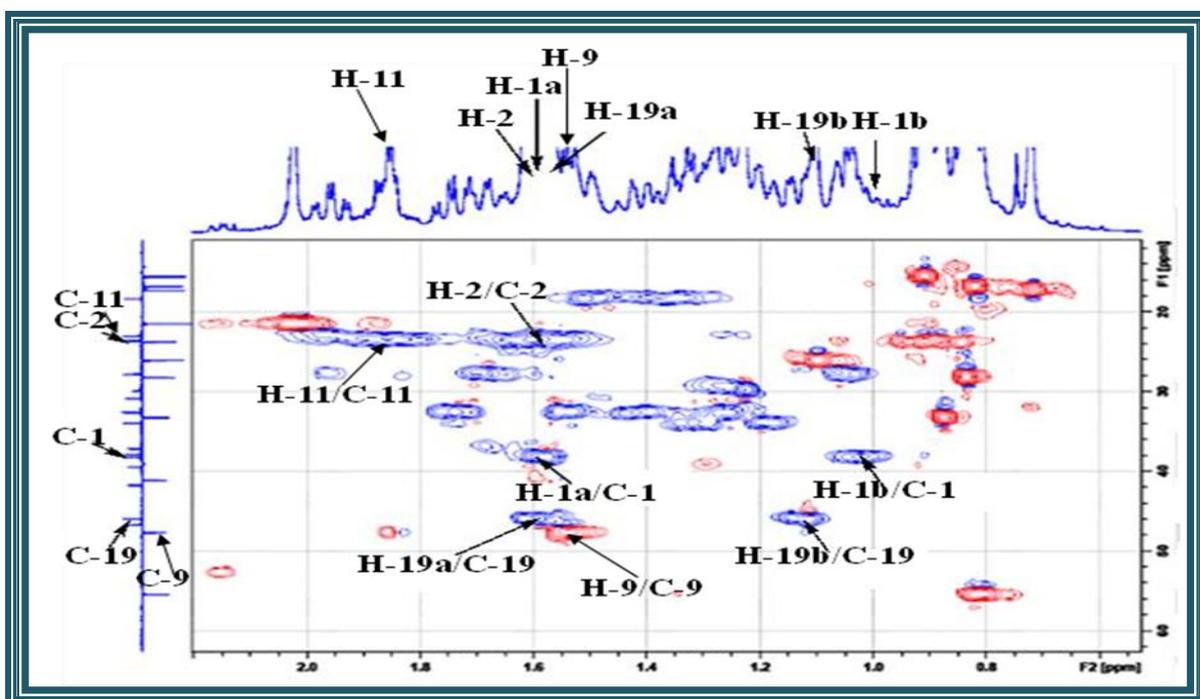


Figure IV.25: Spectre HSQC du composé 32

L'analyse des corrélations hétéronucléaires HMBC (Figures IV.26 et IV.27) longue distance en  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  permet de visualiser les corrélations entre le proton oxyméthine H-3 et les carbones C-2 et C-4 ( $\delta_C$  37,9), et deux carbones méthyliques C-23 ( $\delta_C$  28,3) et C-24 ( $\delta_C$  16,9).

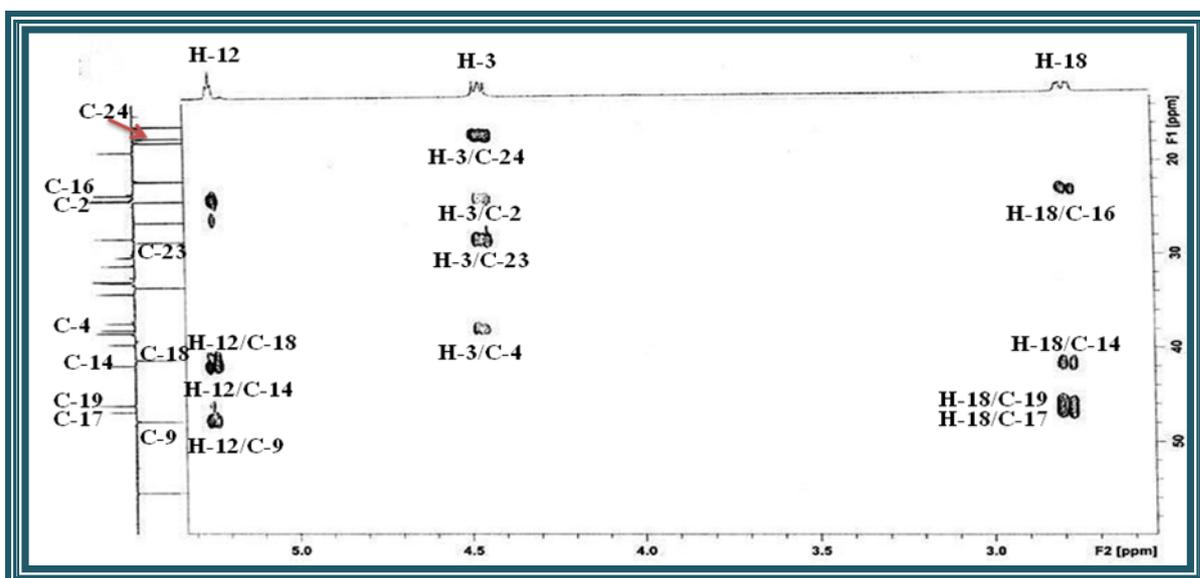


Figure IV.26: Spectre HMBC du composé 32

Le proton H-5 est localisé à  $\delta_H$  0,81 suite aux corrélations qu'il présente en HMBC (Figures IV.27 et IV.28) avec un carbone quaternaire à  $\delta_C$  37,1 (C-10), les carbones méthyliques C-23 et C-24 déjà identifiés et un autre carbone méthylique à  $\delta_C$  15,6 (C-25).

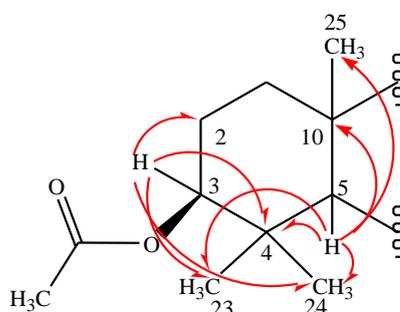


Figure IV.27: Corrélations HMBC du composé 32

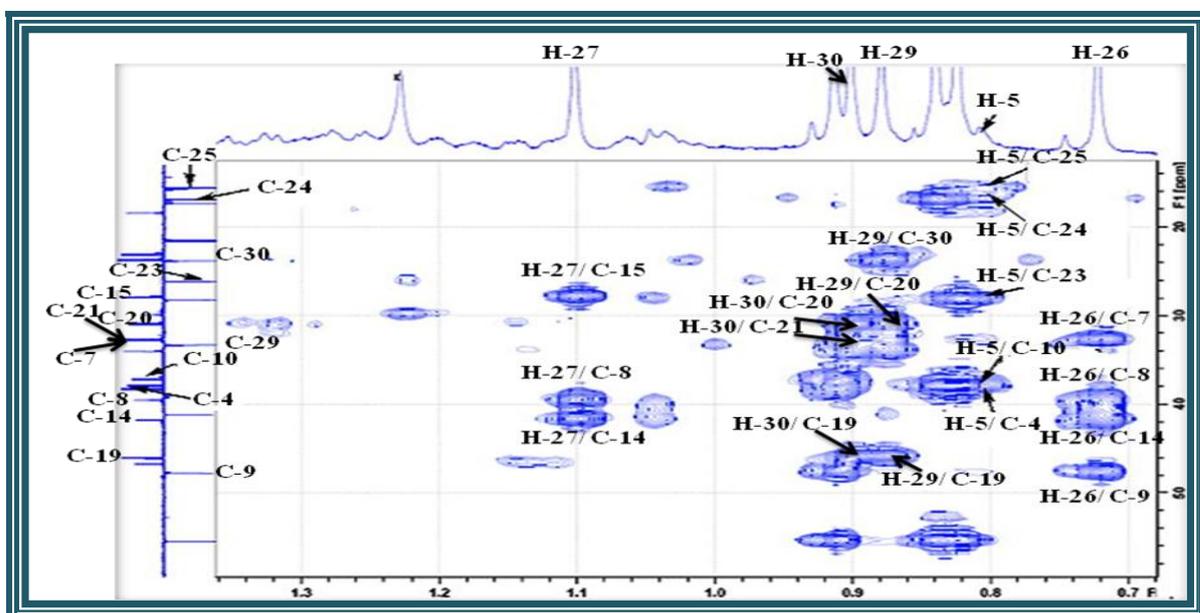
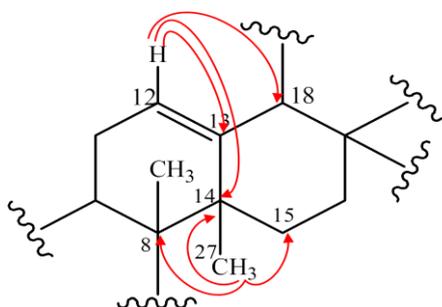


Figure IV.28: Spectre HMBC du composé 32

Le spectre HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons suivants: Me-23 ( $\delta_H$  0,84), Me-24 ( $\delta_H$  0,83), Me-25 ( $\delta_H$  0,91) et le carbone C-5 à  $\delta_C$  55,5.

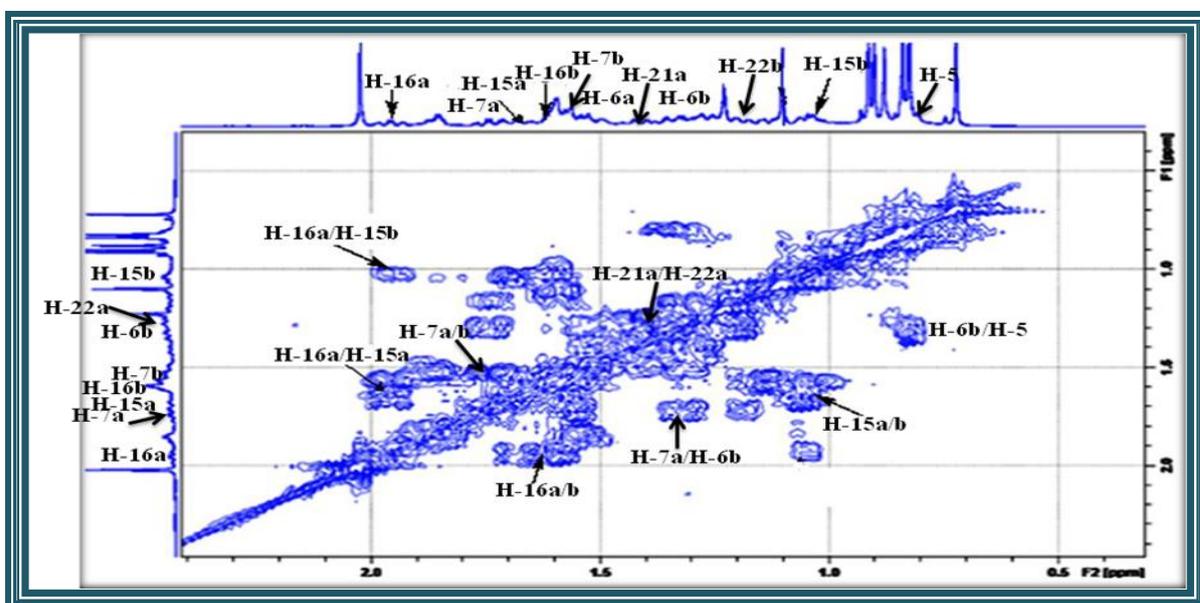
Dans l'expérience HMBC (Figure IV.26), le proton H-12 permet d'identifier les carbones suivants: C-13, C-18 déjà connus, et un autre carbone quaternaire C-14 ( $\delta_C$  41,7).



**Figure IV.29: Corrélations HMBC des protons H-12 et H<sub>3</sub>-27**

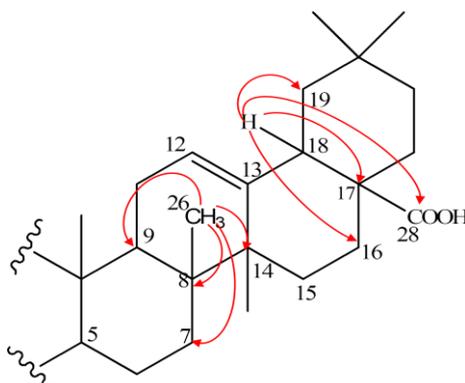
Les protons méthyliques Me-27 ( $\delta_H$  1,10) sont localisés suite aux corrélations qu'ils présentent en HMBC (Figures IV.28 et IV.29) avec le carbone C-14 déjà attribué, C-15 ( $\delta_C$  27,8) et C-8 ( $\delta_C$  39,4).

L'analyse du spectre HSQC permet d'attribuer le déplacement chimique des protons H<sub>2</sub>-15 à ( $\delta_H$  1,68; 1,03). Ces derniers corrélient avec les protons H<sub>2</sub>-16 ( $\delta_H$  1,95; 1,62) sur le spectre COSY (Figure IV.30). Cette même expérience permet de localiser les protons H<sub>2</sub>-6 [ $\delta_H$  (1,51; 1,34)], du fait des corrélations qu'ils présentent avec le proton H-5 déjà assigné. Cette expérience révèle également les couplages entre les protons H-6b et H-7a ( $\delta_H$  1,75) et H-7a avec H-7b ( $\delta_H$  1,55). Leurs carbones respectifs assignés à l'aide du spectre HSQC à  $\delta_C$  23,1 (C-16),  $\delta_C$  18,4 (C-6) et  $\delta_C$  32,7 (C-7).



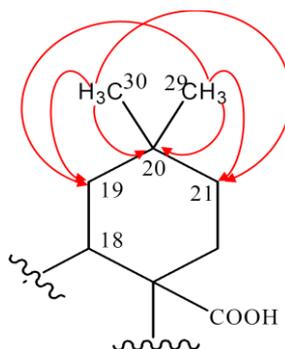
**Figure IV.30: Spectre COSY du composé 32**

Le spectre HMBC montre également le couplage entre les protons Me-26 repérés à  $\delta_H$  0,72 avec les carbones C-7, C-8, C-14 et C-9 déjà identifiés (Figures IV.28 et IV.31) ; ainsi que le couplage entre le proton H-18 connu et les carbones C-14, C-19, C-16 et C-28 identifiés précédemment et un carbone quaternaire C-17 résonant à  $\delta_C$  46,7 (Figures IV.26 et IV.31).



**Figure IV.31: Corrélations HMBC des protons H<sub>3</sub>-26 et H-18**

Par ailleurs, les protons méthyliques H<sub>3</sub>-29 ( $\delta_H$  0,88) et H<sub>3</sub>-30 ( $\delta_H$  0,90) liés aux carbones résonant à  $\delta_C$  33,3 (C-29),  $\delta_C$  23,8 (C-30), sont identifiés suite aux couplages en HMBC avec le carbone C-19 attribué précédemment, et deux autres carbones C-20 ( $\delta_C$  30,9) et C-21( $\delta_C$  32,6) (Figures IV.28 et IV.32).



**Figure IV.32: Corrélations HMBC des méthyles 29 et 30**

Les protons H<sub>2</sub>-21 sont repérés par HSQC à ( $\delta_H$  1,42; 1,25). Le spectre COSY (Figure IV.30) permet d'identifier les protons H<sub>2</sub>-22 suite aux couplages entre les protons H-21a/H<sub>2</sub>-22 ( $\delta_H$  1,32; 1,19). Le carbone C-22 est localisé à  $\delta_C$  34 par l'expérience HSQC.

De plus, le spectre HMBC (Figures IV.33 et IV.34) visualise le couplage entre les protons méthyliques Me-2' ( $\delta_H$  2,02) avec le carbone C-1' ( $\delta_C$  171,3) du groupement ester, ce dernier corrèle également en HMBC avec le proton H-3 $\alpha$ , confirmant ainsi l'acylation du triterpène par un groupement acétyle en C-3.

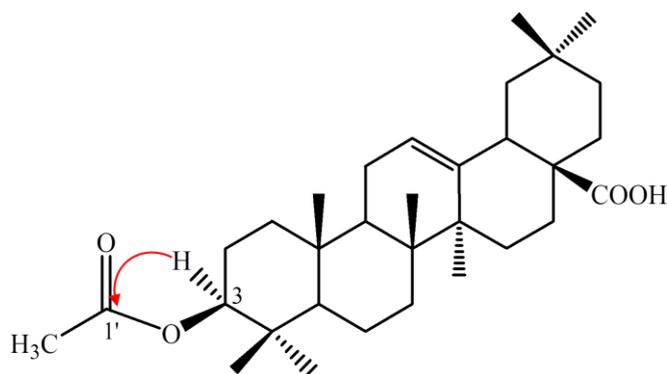


Figure IV.33: Corrélation HMBC montrant l'attachement du groupement acétate à la génine triterpénique

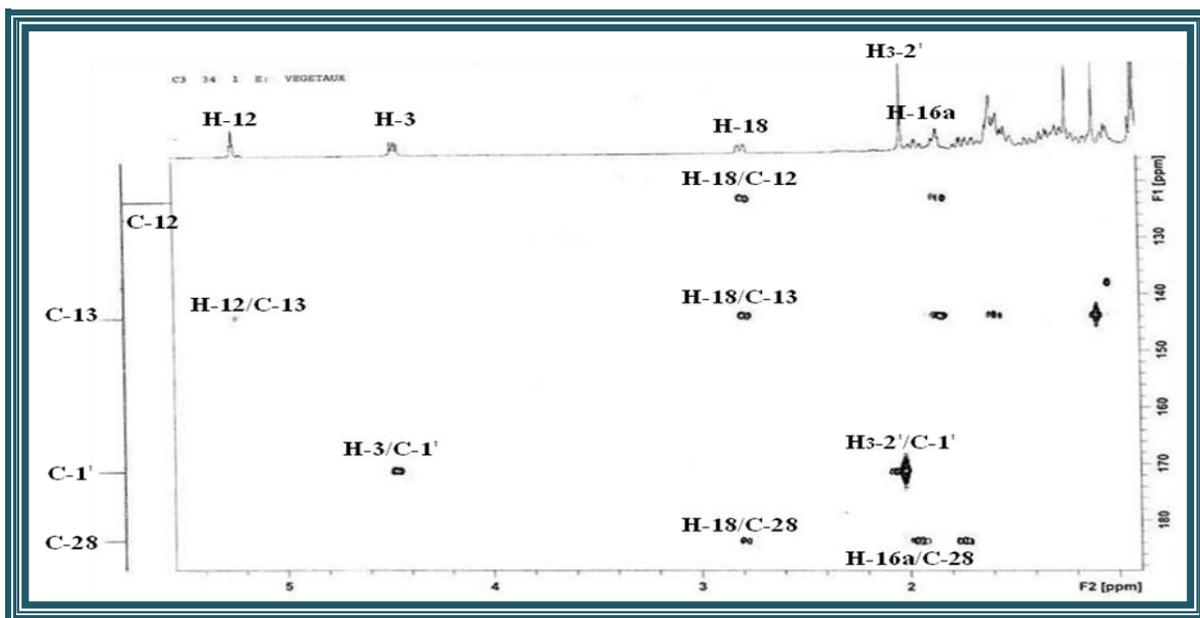


Figure IV.34: Spectre HMBC du composé 32

L'analyse du spectre NOESY permet de vérifier la stéréochimie des 10 carbones asymétriques de ce composé C-3, C-5, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-17, C-18 et C-19 (Figure IV.35).

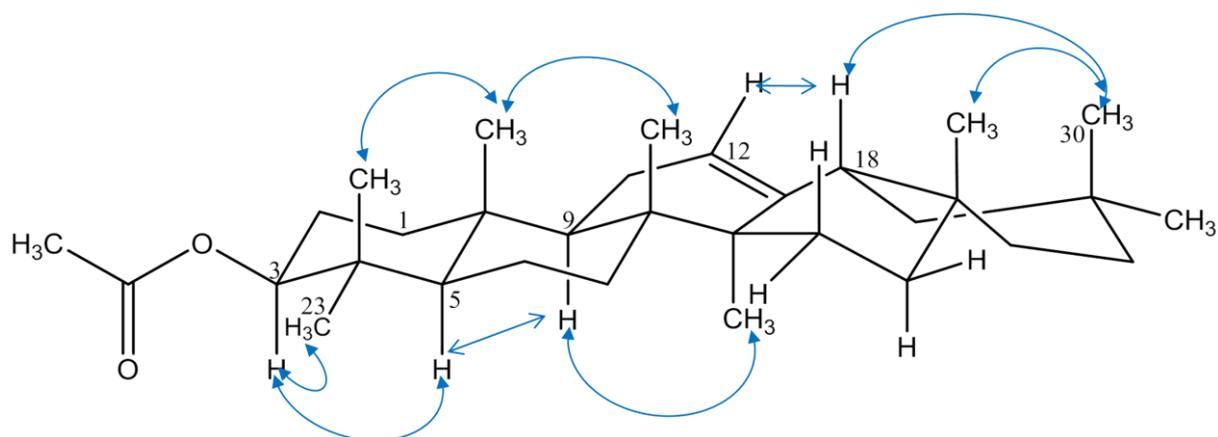


Figure IV.35 : Corrélations NOESY

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature. Le composé **31** est identifié comme étant l'acide 3-acétoxyoléan-12-èn-28-oïque. Il a été isolé antérieurement des espèces suivantes : *Silybum mariarum* (Asteraceae), [227] *Callicarpa integerrima* (Verbenaceae). [228] Ce composé a été caractérisé pour la première fois dans le genre *Atractylis*.

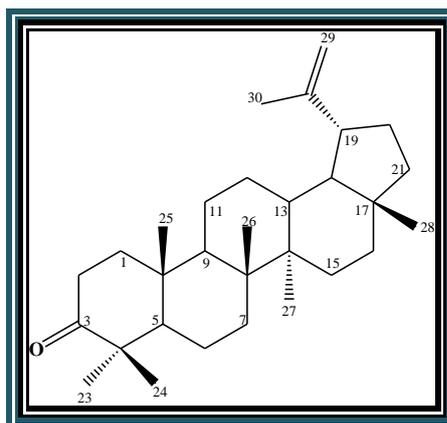
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **31** sont regroupées dans le tableau (IV.2) suivant :

**Tableau IV.2: Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C de **32** dans CDCl<sub>3</sub>**

| Position | δ <sub>C</sub> (ppm) | δ <sub>H</sub> (m, J en Hz)                |
|----------|----------------------|--|
| 1        | 38,2                 | 1,06 (m) H-1a<br>1,01 (m) H-1b             |
| 2        | 23,7                 | 1,62 (m)                                   |
| 3        | 81,1                 | 4,47 (dd, 11,6; 4,6)                       |
| 4        | 37,9                 | -  |
| 5        | 55,5                 | 0,81 (m)                                   |
| 6        | 18,4                 | 1,51 (m) H-6a/1,34 (m) H-6b                |
| 7        | 32,7                 | 1,75 (td, 13,9; 4,4) H-7a<br>1,55 (m) H-7b |
| 8        | 39,4                 | -  |
| 9        | 47,7                 | 1,53 (m)                                   |
| 10       | 37,2                 | -  |
| 11       | 23,6                 | 1,83 (m)                                   |
| 12       | 122,7                | 5,25 (t, 3,5)                              |
| 13       | 143,8                | -  |
| 14       | 41,7                 | -  |
| 15       | 27,8                 | 1,68 (m) H-15a<br>1,03 (m) H-15b           |
| 16       | 23,1                 | 1,95 (td, 11,7; 4) H-16a<br>1,62 (m) H-16b |
| 17       | 46,7                 | -  |
| 18       | 41,1                 | 2,81 (dd, 13,7 ; 4,2)                      |
| 19       | 46                   | 1,59 (m) H-19a<br>1,13 (m) H-19b           |
| 20       | 30,9                 | -  |
| 21       | 32,6                 | 1,42 (m) H-21a<br>1,25 (m) H-21b           |
| 22       | 34                   | 1,32 (m) H-22a/1,19 (m) H-22b              |
| 23       | 28,3                 | 0,83 (s)                                   |
| 24       | 16,9                 | 0,84 (s)                                   |

| Position | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ ( $m, J$ en Hz) |
|----------|------------------|----------------------------|
| 25       | 15,6             | 0,91 ( <i>s</i> )          |
| 26       | 17,2             | 0,72 ( <i>s</i> )          |
| 27       | 26,1             | 1,10 ( <i>s</i> )          |
| 28       | 183,7            | -                          |
| 29       | 33,3             | 0,88 ( <i>s</i> )          |
| 30       | 23,8             | 0,90 ( <i>s</i> )          |
| 1'       | 171,3            | -                          |
| 2'       | 21,5             | 2,02 ( <i>s</i> )          |

### IV-3-3-3 Elucidation structurale du composé 33



Lupénone (33)

Le composé **33** se présente sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse réalisé en ionisation douce ESI-MS (Figure IV.36) montre en mode positif deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  447  $[M+Na]^+$  et à  $m/z$  871  $[2M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire de 424 uma correspondant à une formule brute en  $C_{30}H_{48}O$  avec 7 insaturations.

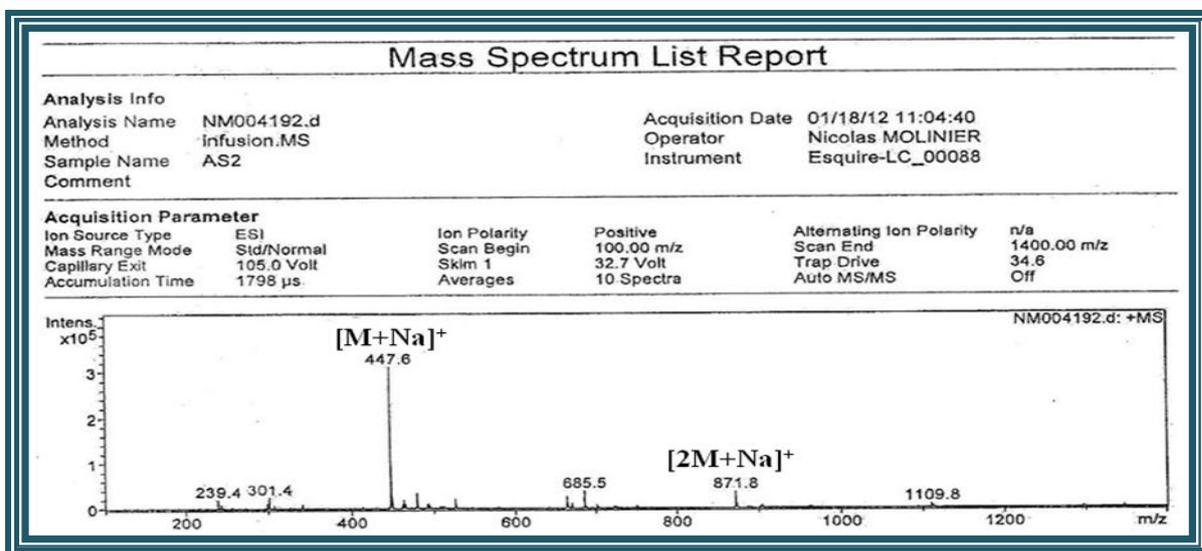
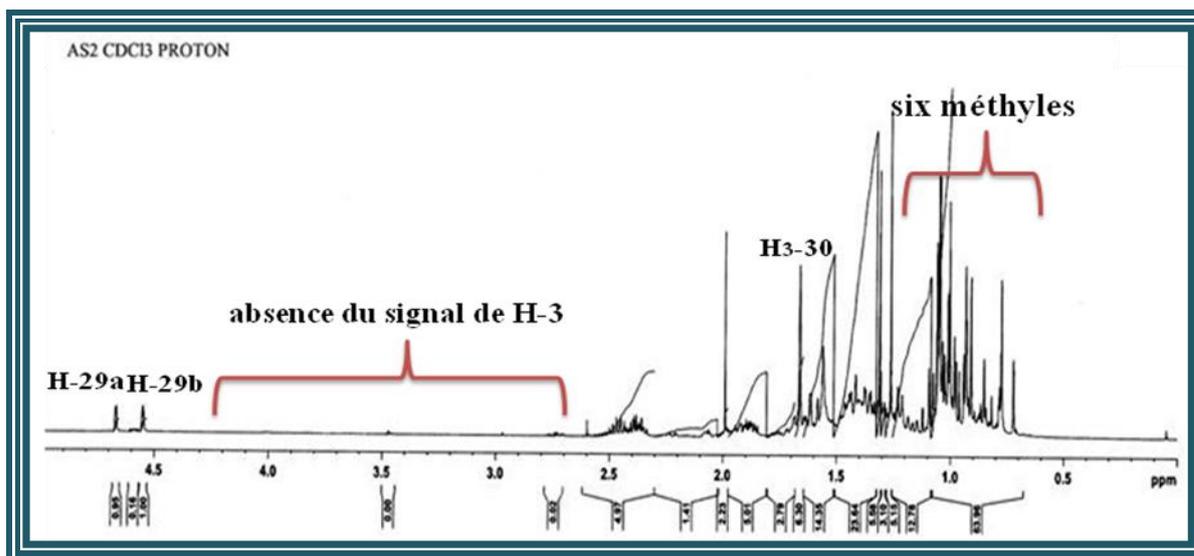


Figure IV.36: Spectre de masse ESI-MS du composé 33

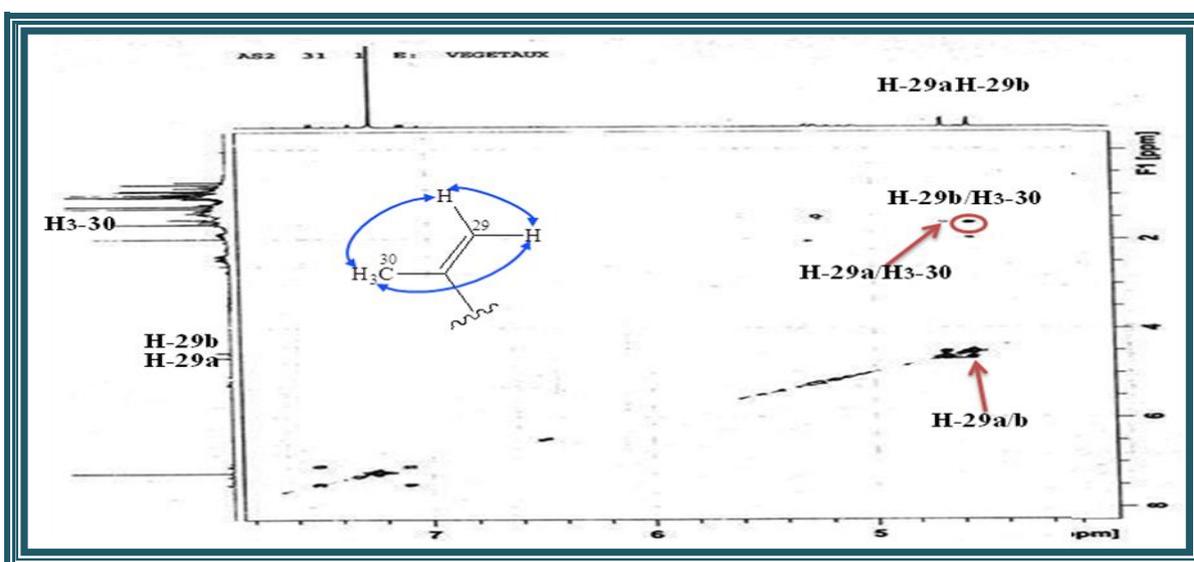
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.37) enregistré dans le chloroforme deutéré, montre la présence de six signaux singulets dans un intervalle allant de 0,70 à 1,66 ppm correspondant aux groupements méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,06 ( $\text{CH}_3\text{-23}$ ), 1,01 ( $\text{CH}_3\text{-24}$ ), 0,92 ( $\text{CH}_3\text{-25}$ ), 1,04 ( $\text{CH}_3\text{-26}$ ), 0,96 ( $\text{CH}_3\text{-27}$ ) et 0,78 ( $\text{CH}_3\text{-28}$ ).

Ce spectre montre aussi dans la région blindée la présence de deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,67 ( $J = 2,4$  Hz) et 4,55 ( $J = 2,4$  Hz) caractéristiques de protons oléfiniques d'une double liaison exocyclique. On constate aussi la présence d'un signal singulet de protons méthyliques à  $\delta_{\text{H}}$  1,66 permettant de suggérer la présence d'un groupement isoprényle.



**Figure IV.37: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 33**

L'expérience COSY H-H (Figure IV.38) atteste de la présence de ce groupement suite aux corrélations des protons oléfiniques H-29a et H-29b avec les protons du groupement  $\text{CH}_3\text{-30}$  ( $\delta_{\text{H}}$  1,66).



**Figure IV.38: Spectre COSY du composé 33**

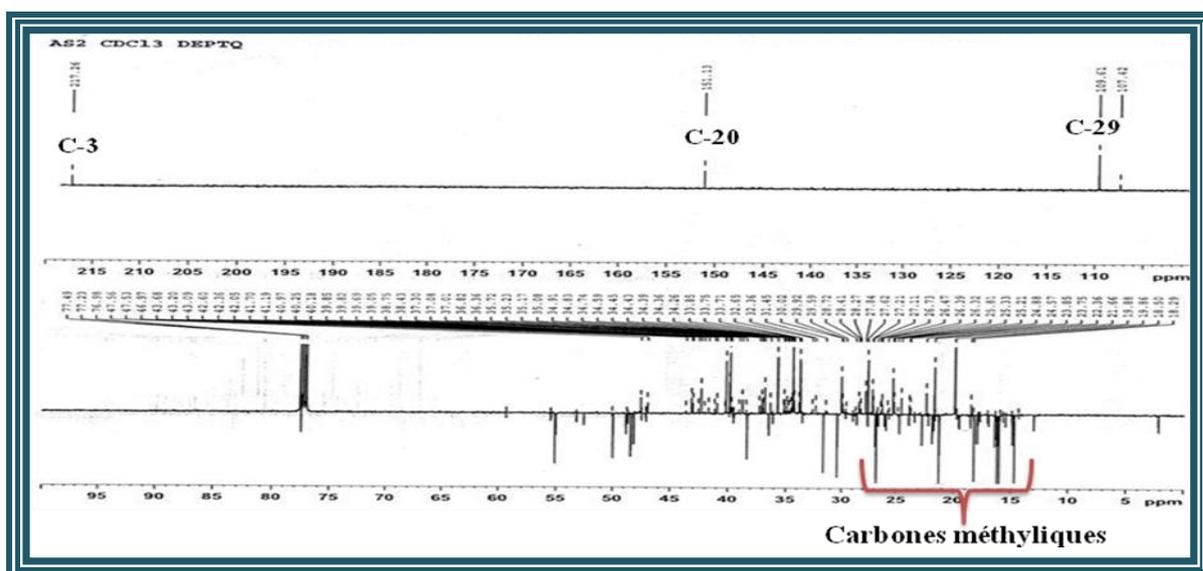
L'absence du signal du proton H-3 sortant habituellement entre 3 et 5 ppm sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.37) laisse supposé que le groupement hydroxyméthine est oxydé.

Cette première analyse RMN  $^1\text{H}$ , en plus de la masse moléculaire obtenue par spectrométrie de masse, indique que ce composé est de nature triterpénique à squelette lupane ou hopane dont la position C-3 est porteuse d'une fonction cétone.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure IV.39) en apporte la confirmation et cela par l'observation des signaux suivants :

- Sept groupements méthyles ;
- Deux signaux correspondant à deux carbones oléfiniques, l'un secondaire  $\delta_{\text{C}}$  109,6 et l'autre quaternaire  $\delta_{\text{C}}$  151,1 caractéristiques de la double liaison du groupement isoprényle, d'un triterpène à squelette lupane ou hopane ;
- Un signal à  $\delta_{\text{C}}$  217,5 correspondant à un carbonyle d'une cétone.

L'absence du signal du carbone oxyméthine sortant habituellement entre 77 et 83 ppm affirme bien que le carbone C-3 est un carbonyle d'une cétone.

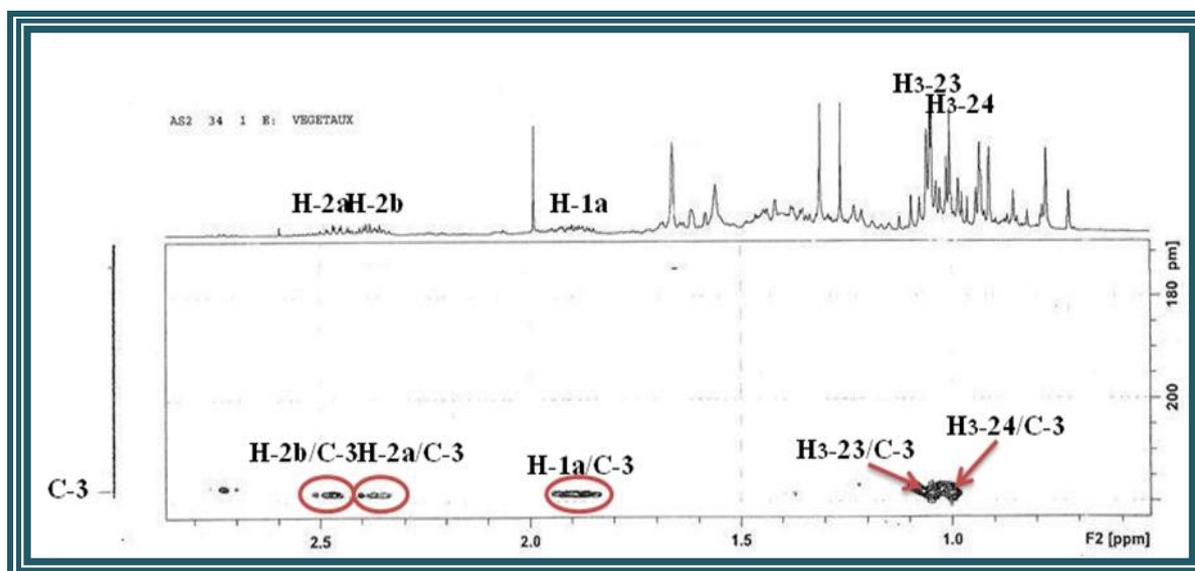


**Figure IV.39: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé du composé 33**

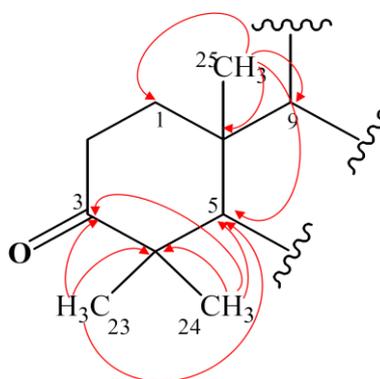
L'identification de la structure du composé **33** repose principalement sur l'examen conjoint des spectres HMBC, HSQC et COSY H-H.

L'analyse du spectre HSQC permet d'assigner les carbones des méthyles et le carbone oléfinique à  $\delta_{\text{C}}$  26,8 (C-23), 21,3 (C-24), 16,2 (C-25), 16,0 (C-26), 14,7 (C-27), 18,2 (C-28), 19,5 (C-30) et 109,6 (C-29).

L'expérience HMBC conduit à l'établissement des principaux couplages hétéronucléaires longs distance en  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  de ce composé. En effet, ce spectre (Figures IV.40 et IV.41) montre les corrélations entre le carbone C-3 ( $\delta_C$  217,5) et les protons H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_H$  2,46; 2,38), H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_H$  1,88; 1,38) ainsi qu'avec les protons méthyliques localisés à  $\delta_H$  1,06 (Me-23) et 1,01 (Me-24). Le déblindage des protons des deux méthyles atteste de la présence d'une fonction cétone en C-3. Ces protons méthyliques corréleront également avec les carbones C-4 ( $\delta_C$  42,6) et C-5 ( $\delta_C$  55,1).



**Figure IV.40: Spectre HMBC du composé 33**



**Figure IV.41: Corrélations HMBC (H→C) des méthyles 23, 24 et 25 du composé 33**

On observe aussi sur ce spectre une tache de corrélation entre le carbone C-5 déjà identifié et les protons d'un méthyle résonant à  $\delta_H$  0,92 (Me-25). Les protons de ce dernier présentent plusieurs taches de corrélation en HMBC (Figures IV.41 et IV.42) permettant d'assigner les déplacements chimiques des carbones suivants C-1 ( $\delta_C$  39,8), C-9 ( $\delta_C$  50) et C-10 ( $\delta_C$  36,4).

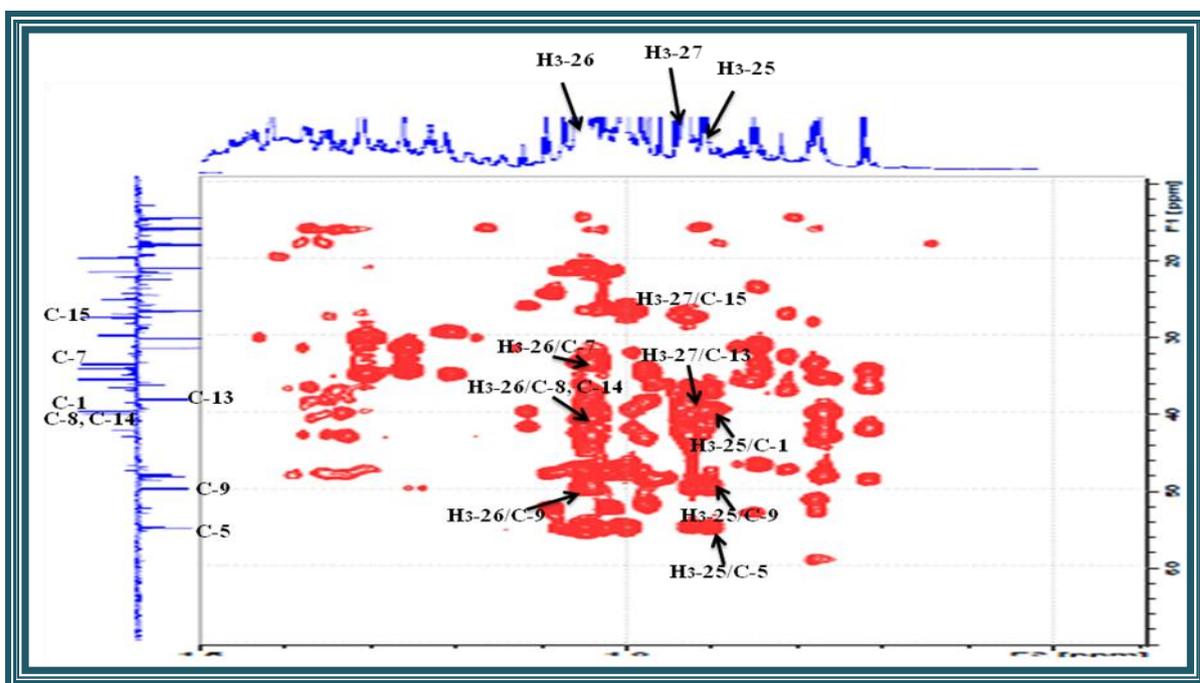


Figure IV.42: Spectre HMBC du composé 33

L'expérience HSQC (Figure IV.43) permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons H-5 ( $\delta_H$  1,30) et H-9 ( $\delta_H$  1,36). Le carbone C-2 ( $\delta_C$  34,4) est déterminé suite à son couplage en HSQC avec les deux protons H<sub>2</sub>-2 déjà identifié. Le déblindage du carbone C-2 est dû à la présence de la fonction cétone en C-3 ( $\delta_H$  217,1).

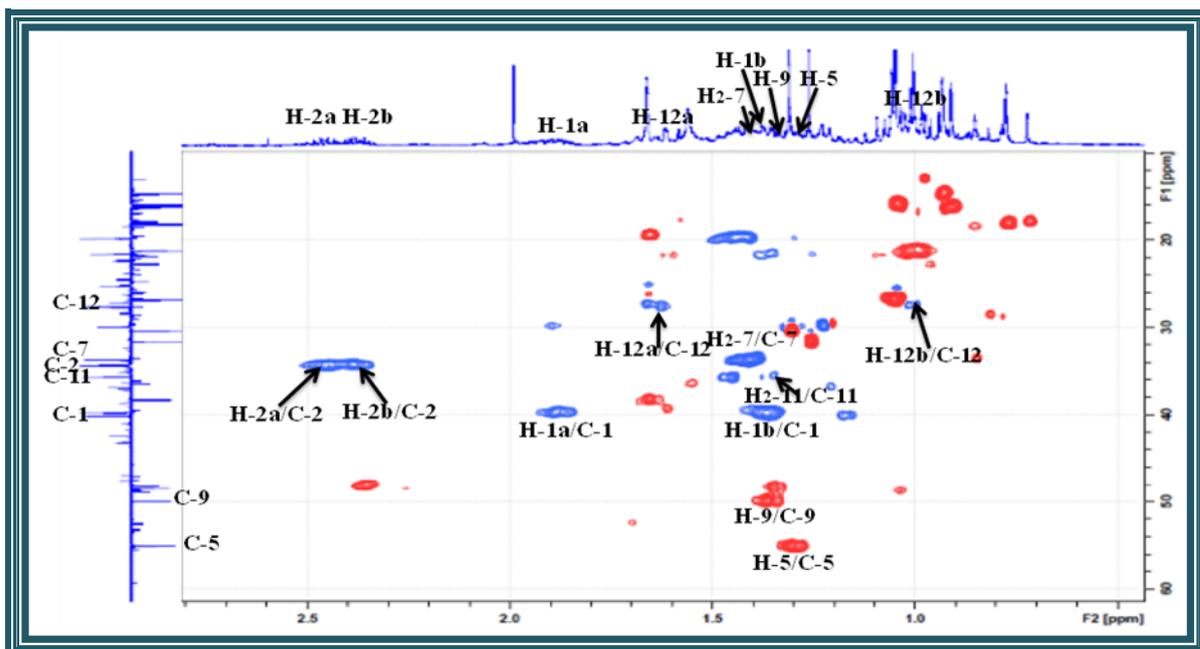
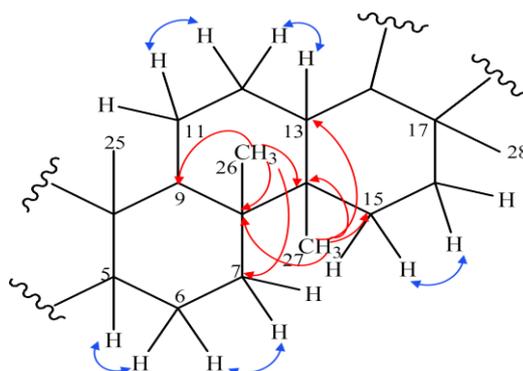


Figure IV.43: Spectre HSQC du composé 33

Le spectre HMBC (Figures IV.42 et IV.44) montre également le couplage entre le carbone C-9 déjà assigné et les protons méthyliques repérés à  $\delta_H$  1,04 (Me-26). Les protons de ce dernier permettent d'identifier les carbones C-7 ( $\delta_C$  33,7), C-8 ( $\delta_C$  41,2) et C-14 ( $\delta_C$  41,2).



**Figure IV.44: Corrélations HMBC et COSY au niveau des cycles B, C et D du composé 33**

Les protons H<sub>2</sub>-7 résonant à  $\delta_H$  1,41 sont caractérisés à l'aide du spectre HSQC. Ils montrent sur le spectre COSY H-H (Figure IV.44) des corrélations avec les protons H<sub>2</sub>-6 résonant à  $\delta_H$  1,47 dont le carbone C-6 est repéré à  $\delta_C$  19,9 par HSQC. Les protons H<sub>2</sub>-6 couplent en COSY à leur tour avec le proton H-5 (Figure IV.44).

Les deux carbones C-8 et C-14 déjà attribués présentent des corrélations en HMBC (Figure IV.44) avec un méthyle résonant à  $\delta_H$  0,96 (Me-27). Ces protons méthyliques corréleront en  $^3J$  avec deux carbones à  $\delta_C$  38,3 (C-13) et  $\delta_C$  27,7 (C-15) (Figures IV.42 et IV.44). Leurs protons sont détectés selon l'expérience HSQC à  $\delta_H$  1,67 et (1,65; 1,01) respectivement. Le déplacement chimique du carbone C-13 ( $\delta_C$  38,3) est caractéristique d'une structure à squelette lupane.

La caractérisation des protons H<sub>2</sub>-12 ( $\delta_H$  1,05; 1,67) a été établie sur la base de leur couplage COSY (Figure IV.44) avec le proton H-13. De la même manière, les protons H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_H$  1,36) sont localisés suite à leur couplage avec le proton H-12. L'expérience HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones C-12 ( $\delta_C$  25,3) et C-11 ( $\delta_C$  21,7) (Figure IV.43).

Les protons H<sub>2</sub>-16 sont déterminés à  $\delta_H$  1,46 (*m*) suite aux couplages qu'ils présentent selon l'expérience COSY avec les protons H<sub>2</sub>-15 déjà attribués. Le carbone C-16 est assigné à  $\delta_C$  35,7 par expérience HSQC.

Les protons géminés H<sub>2</sub>-29 déjà identifiés présentent en HMBC des taches de corrélation avec les carbones C-30 ( $\delta_C$  19,5) et C-19 ( $\delta_C$  48,1), indiquant l'attachement du groupement isoprényle avec le C-19 (Figure IV.45).

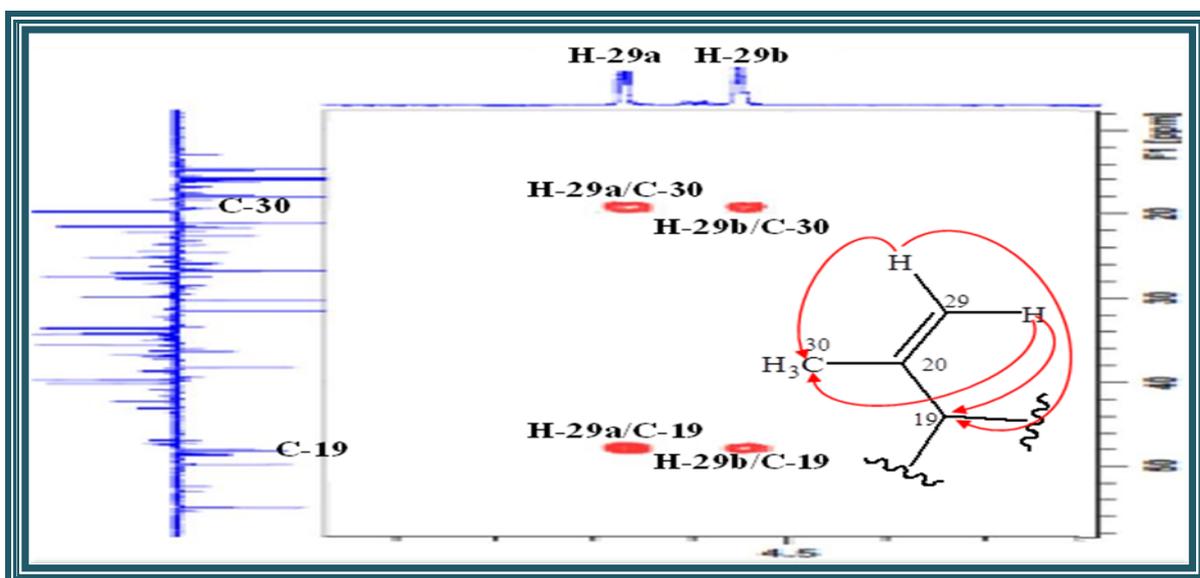


Figure IV.45: Spectre HMBC du composé 33

Les protons du méthyle Me-30 montrent, sur le spectre HMBC (Figure IV.46), des taches de corrélation avec le carbone C-29 décrit précédemment et avec un carbone quaternaire C-20 ( $\delta_C$  151,1).

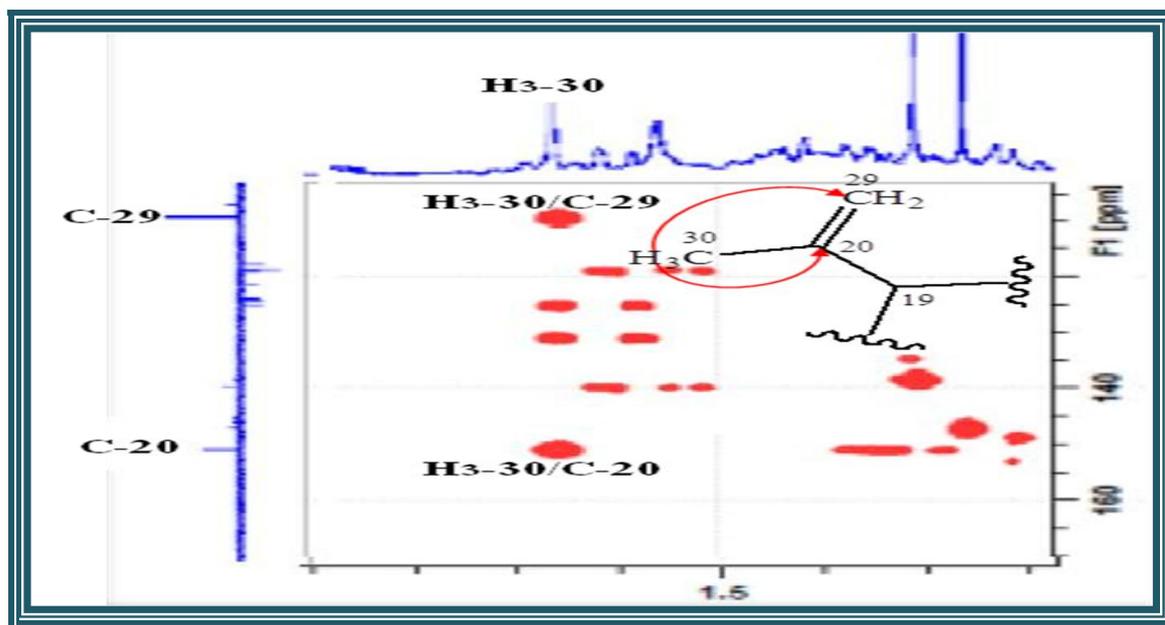


Figure IV.46: Spectre HMBC du composé 33

Le proton H-19 ( $\delta_H$  2,37), localisé par analyse du spectre HSQC, couple en HMBC avec les carbones C-18 ( $\delta_C$  48,4), C-21 ( $\delta_C$  30) et C-30 déjà assigné (Figures IV.47 et IV.48). Les protons H-18 et H<sub>2</sub>-21 résonnent respectivement à  $\delta_H$  1,34 et 1,23 suite à l'analyse du spectre HSQC. Le proton H-18 montre également en HMBC une tache de corrélation avec le carbone quaternaire C-17 ( $\delta_C$  43) (Figures IV.47 et IV.48).

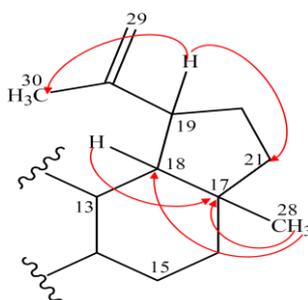


Figure IV.47: Corrélations HMBC au niveau des cycles D et E du composé 33

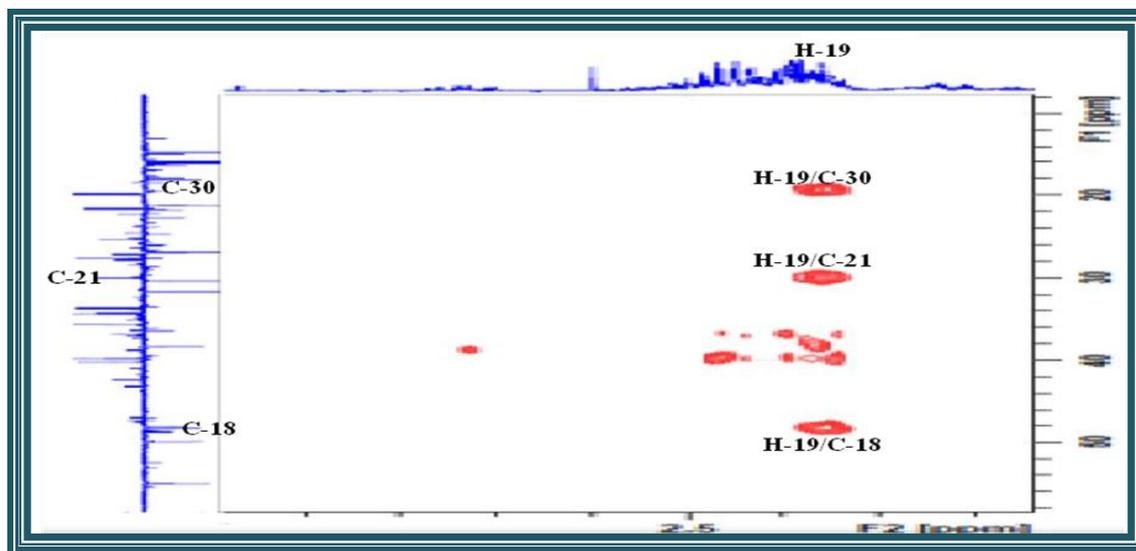


Figure IV.48: Spectre HMBC du composé 33

Les protons du groupement Me-28 ( $\delta_H$  0,78) corrélient en HMBC avec les carbones C-17 et C-18 déjà assignés et deux autres carbones secondaires C-16 ( $\delta_C$  35,7) et C-22 ( $\delta_C$  40,2) (Figure IV.49). La caractérisation des protons H<sub>2</sub>-16 ( $\delta_H$  1,46) et H<sub>2</sub>-22 ( $\delta_H$  1,18) est établie au moyen de l'expérience HSQC.

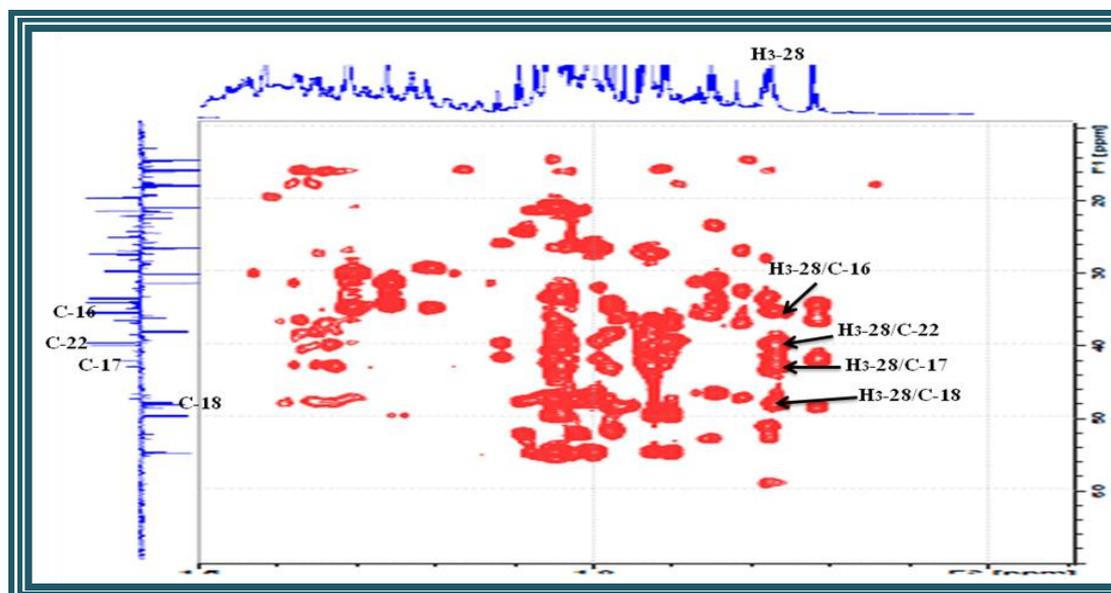


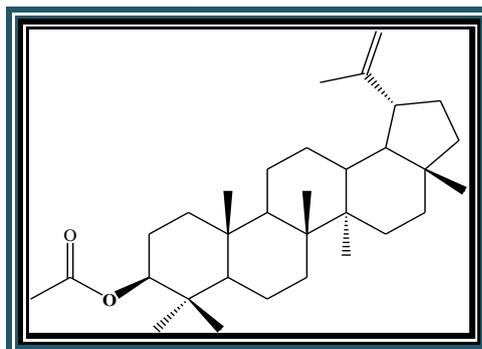
Figure IV.49: Spectre HMBC du composé 3

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau IV.3) et la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = + 36,86^\circ$ ,  $C = 0,49$  g/100ml, MeOH), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, nous permettent d'identifier sans ambiguïté le composé **33** comme étant le 20(29)-lupèn-3-one ou lupénone, isolé de l'espèce *Diospyros rubra* (Asteraceae).<sup>[229]</sup> Il est à noter que ce composé est isolé pour la première fois dans le genre *Atractylis*

**Tableau IV.3: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de **33** dans  $\text{CDCl}_3$**

| Position | $\delta_c$ (ppm) | $\delta_H$ (m, J en Hz)                       |
|----------|------------------|---|
| 1        | 39,8             | 1,88 (m) H-1a/1,38 (m) H-1b                   |
| 2        | 34,4             | 2,46 (ddd, 15,6; 8 ; 2) H-2a<br>2,38 (m) H-2b |
| 3        | 217,3            | —   |
| 4        | 42,6             | —   |
| 5        | 55,1             | 1,30 (m)                                      |
| 6        | 19,9             | 1,47 (m)                                      |
| 7        | 33,7             | 1,41 (m)                                      |
| 8        | 41,2             | —   |
| 9        | 50               | 1,36 (m)                                      |
| 10       | 36,4             | —   |
| 11       | 21,7             | 1,36 (m)                                      |
| 12       | 25,3             | 1,67 (m) H-12a/1,05 (m) H-12b                 |
| 13       | 38,3             | 1,67 m  |
| 14       | 41,2             | —   |
| 15       | 27,7             | 1,65 (m) H-15a/1,01 (m) H-15b                 |
| 16       | 35,7             | 1,46 (m)                                      |
| 17       | 43               | —   |
| 18       | 48,4             | 1,34 (m)                                      |
| 19       | 48,1             | 2,37 (m)                                      |
| 20       | 151,1            | —   |
| 21       | 30               | 1,23 (m)                                      |
| 22       | 40,2             | 1,18 (m)                                      |
| 23       | 26,8             | 1,06 (s)                                      |
| 24       | 21,3             | 1,01 (s)                                      |
| 25       | 16,2             | 0,92 (s)                                      |
| 26       | 16               | 1,04 (s)                                      |
| 27       | 14,7             | 0,96 (s)                                      |
| 28       | 18,2             | 0,78 (s)                                      |
| 29       | 109,6            | 4,67 (d, 2,4) H-29a<br>4,55 (d, 2,4) H-29b    |
| 30       | 19,5             | 1,66 (s)                                      |

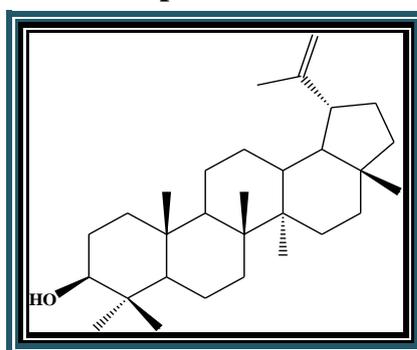
IV-3-3-4 Elucidation structurale du composé 34



Lupéol acétate (34)

Le spectre de masse ESI du composé **33** isolé sous forme de poudre blanche, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  491  $[M+Na]^+$  correspondant à la formule brute  $C_{32}H_{52}O_2$ . Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$   $J$ -modulé révèlent des signaux identiques à ceux du composé **27** déjà élucidé auparavant : lupéol acétate.

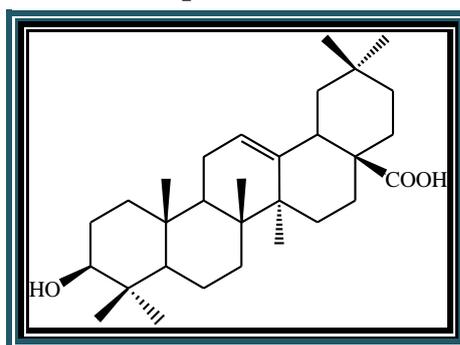
IV-3-3-5 Elucidation structurale du composé 35



Lupéol (35)

Il s'agit d'un triterpène à squelette lupane, il est invisible sous la lumière UV et se colore en marron orangé après révélation de sa CCM par une solution acide et chauffage. Ce composé est identifié au lupéol (**35**). Sa structure moléculaire a été établie par comparaison des spectres de masse ESI-MS et de RMN  $^1H$  et RMN  $^{13}C$  avec les données de la littérature.

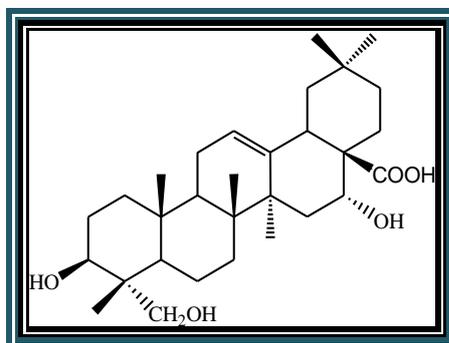
IV-3-3-6 Elucidation structurale du composé 36



Acide oléanolique (36)

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche, sa nature triterpénique est suggérée par analyse de sa CCM. Le composé est identifié comme étant l'acide oléanolique par comparaison avec un échantillon témoin. Les données RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé et masse ESI, en apportent la confirmation.

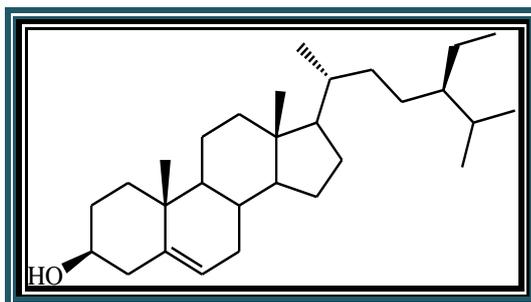
#### IV-3-3-7 Elucidation structurale du composé 37



**Caulophyllogénine (37)**

Il s'agit d'un triterpène à squelette oléanane, il est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Ce composé est identifié au Caulophyllogénine (37). Sa structure moléculaire a été établie par comparaison des spectres de masse ESI-MS et de RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  avec les données de la littérature.

#### IV-3-3-8 Elucidation structurale du composé 38



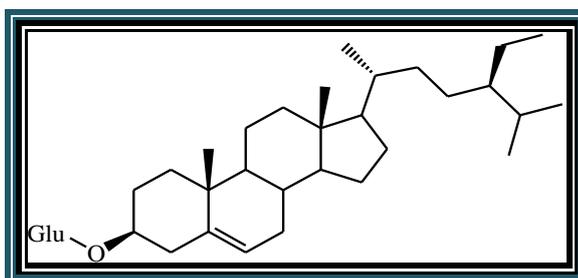
**$\beta$ -sitostérol (38)**

Ce composé a été identifié au  $\beta$ -sitostérol par comparaison avec un échantillon témoin. Les données RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé et masse ESI, en apportent la confirmation. Ce composé fait partie des stérols largement répandus dans le règne végétal. Il a été isolé antérieurement de la famille Asteraceae, on citera les espèces suivantes: *Atractylis carduus*, <sup>[4]</sup> *Centaurea omphalotricha*, <sup>[169]</sup> *Ageratum conyzoides* <sup>[219]</sup> et *Tannacetum polycephalum*. <sup>[220]</sup>

Tableau IV.4: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de 38 dans  $\text{CDCl}_3$

| Position | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz)              |
|----------|---------------------------|---|
| 1        | 37,2                      | 1,91 (m) H-1a/1,13 (m) H-1b                   |
| 2        | 31,6                      | 1,88 (m) H-2a/1,56 (m) H-2b                   |
| 3        | 71,7                      | 3,60 (tt, 11,3 ; 4,3)                         |
| 4        | 42,3                      | 2,34 (m) H-4a/2,28 (m) H-4b                   |
| 5        | 140,7                     | -   |
| 6        | 121,7                     | 5,41 (dd, 5,2 ; 2,3)                          |
| 7        | 31,9                      | 2,03 (m) H-7a/1,57 (m) H-7b                   |
| 8        | 31,9                      | 1,51 (dd, 11,2 ; 4,3)                         |
| 9        | 50,1                      | 0,96 (m)                                      |
| 10       | 36,5                      | -   |
| 11       | 21,1                      | 1,55 (m) H-11a/1,49 (m) H-11b                 |
| 12       | 39,7                      | 2,06 (dt, 12,7 ; 3,6) H-12a<br>1,20 (m) H-12b |
| 13       | 42,3                      | -   |
| 14       | 56,7                      | 1,03 (m)                                      |
| 15       | 24,3                      | 1,63 (m) H-15a/1,12 (m) H-15b                 |
| 16       | 28,2                      | 1,90 (m) H-16a/1,30 (m) H-16b                 |
| 17       | 56                        | 1,14 (t, 5,4)                                 |
| 18       | 11,8                      | 0,74 (s)                                      |
| 19       | 19,4                      | 1,06 (s)                                      |
| 20       | 36,1                      | 1,40 (m)                                      |
| 21       | 18,7                      | 0,97 (d, 6,5)                                 |
| 22       | 33,9                      | 1,36 (m) H-22a/1,06 (m) H-22b                 |
| 23       | 26                        | 1,21 (m)                                      |
| 24       | 45,8                      | 0,97 (m)                                      |
| 25       | 29,1                      | 1,72 (oct, 6,8)                               |
| 26       | 19,8                      | 0,87 (d, 6,8)                                 |
| 27       | 19                        | 0,86 (d, 6,8)                                 |
| 28       | 23                        | 1,30 (m)                                      |
| 29       | 11,9                      | 0,90 (t, 7,6)                                 |

IV-3-3-9 Elucidation structurale du composé 39



Daucostérol (39)

La comparaison des données spectrales en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **39** avec celles de la littérature, indique qu'il s'agit de daucostérol. Ce composé est obtenu sous forme de cristaux blancs. Il a été trouvé dans plusieurs espèces de la famille Asteraceae.

**Tableau IV.5: Déplacements chimiques RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de **39** dans  $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$**

| Position   | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)                        |
|------------|---------------------------|---|
| 1          | 37,5                      | 1,86 ( <i>m</i> ) H-1a/1,09 ( <i>m</i> ) H-1b                           |
| 2          | 29,8                      | 1,91 ( <i>m</i> ) H-2a/1,36 ( <i>m</i> ) H-2b                           |
| 3          | 79,3                      | 3,53 ( <i>m</i> ) H-3 $\alpha$  |
| 4          | 38,3                      | 2,37 ( <i>dd</i> , 15, 5) H-4a/2,29 ( <i>t</i> , 10) H-4b               |
| 5          | 140,8                     | -   |
| 6          | 122,3                     | 5,30 ( <i>dl</i> , 5)   |
| 7          | 32,1                      | 1,96 ( <i>m</i> ) H-7a/1,56 ( <i>m</i> ) H-7b                           |
| 8          | 32,1                      | 1,45 ( <i>m</i> )   |
| 9          | 50,4                      | 0,95 ( <i>m</i> )   |
| 10         | 36,9                      | -   |
| 11         | 21,2                      | 1,53 ( <i>m</i> ) H-11a/1,48 ( <i>m</i> ) H-11b                         |
| 12         | 40                        | 2,10 ( <i>m</i> ) H-12a/1,17 ( <i>m</i> ) H-12b                         |
| 13         | 42,5                      | -   |
| 14         | 57                        | 1,01 ( <i>m</i> ) H-14 $\alpha$   |
| 15         | 24,5                      | 1,59 ( <i>m</i> ) H-15a/1,10 ( <i>m</i> ) H-15b                         |
| 16         | 28,4                      | 1,85 ( <i>m</i> )   |
| 17         | 56,3                      | 1,15 ( <i>m</i> )   |
| 18         | 12                        | 0,61 ( <i>s</i> )   |
| 19         | 19,4                      | 0,95 ( <i>s</i> )   |
| 20         | 36,3                      | 1,36 ( <i>m</i> )   |
| 21         | 18,9                      | 0,85 ( <i>d</i> , 6)  |
| 22         | 34,1                      | 1,35 ( <i>m</i> , H-22a)/1,04 ( <i>m</i> , H-22b)                       |
| 23         | 26,3                      | 1,12 ( <i>m</i> )   |
| 24         | 46,1                      | 0,98 ( <i>m</i> )   |
| 25         | 29,3                      | 1,67 ( <i>m</i> )   |
| 26         | 19,1                      | 0,75 ( <i>d</i> , 6,7)  |
| 27         | 19,9                      | 0,76 ( <i>d</i> , 6,7)  |
| 28         | 23,2                      | 1,28 ( <i>m</i> ) H-28a/1,23 ( <i>m</i> ) H-28b                         |
| 29         | 12,1                      | 0,80 ( <i>t</i> , 7,5)  |
| 3-O-glc-1' | 101,3                     | 4,35 ( <i>d</i> , 7,8)  |
| 2'         | 73,8                      | 3,19 ( <i>t</i> , 7,8)  |
| 3'         | 76,7                      | 3,38 ( <i>t</i> , 7,9)  |
| 4'         | 70,5                      | 3,35 ( <i>t</i> , 7,7)  |
| 5'         | 76,1                      | 3,23 ( <i>m</i> )   |
| 6'         | 62                        | 3,81 ( <i>dd</i> , 11,9; 2,9) H-6'a/3,70 ( <i>dd</i> , 11,9; 4,9) H-6'b |

#### IV-4 Conclusion

Ce travail reporte l'investigation chimique de l'espèce *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass., plante médicinale saharienne appartenant à la famille Asteraceae. Elle est utilisée en médecine traditionnelle comme remède contre la lithiase biliaire et les désordres circulatoires et aussi pour le traitement de l'hépatite. Cette plante n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique antérieure.

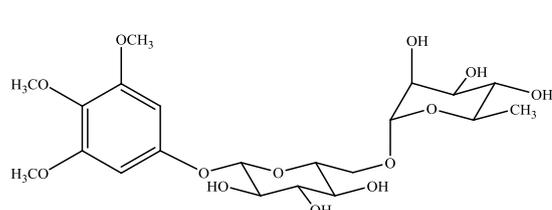
Cette étude effectuée sur les extraits éther de pétrole, dichlorméthane et *n*-butanolique des racines de l'espèce *A. serratuloides* a mené à l'identification de 9 métabolites secondaires se répartissant en :

- Un phénol glycosylé :
  - Antiarol rutinoside
  
- Six triterpènes pentacycliques :
  - à squelette lupane :
    - Lupéol
    - Lupénone
    - Lupéol acétate
  
  - à squelette oléanane :
    - Acide oléanolique
    - Acide 3-acétoxyoléan-12-èn-28-oïque
    - Caulophyllogénine
  
- Deux stérols :
  - Daucostérol
  - $\beta$ -sitostérol

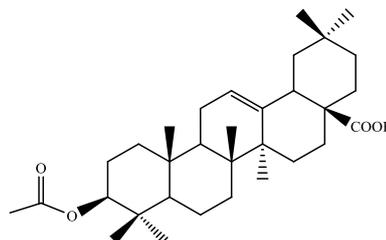
Les opérations de séparation, isolement et purification des métabolites secondaires que renferment les extraits EP, DCM et *n*-BuOH de cette plante se sont basées principalement sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques (CCM, CC et CCE) utilisées dans notre laboratoire.

L'élucidation structurale des produits isolés **1-9** a été établie par les méthodes d'analyse spectroscopiques comprenant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

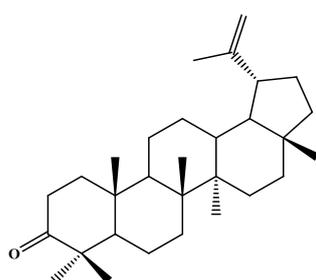
monodimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé) et bidimensionnelle (COSY, HSQC et HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse (SM-ESI), la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.



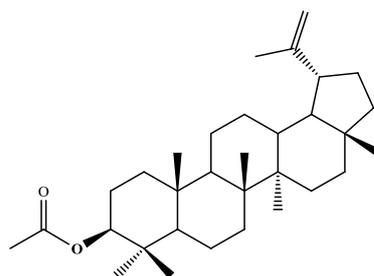
**Antiarol rutinoside (31)**



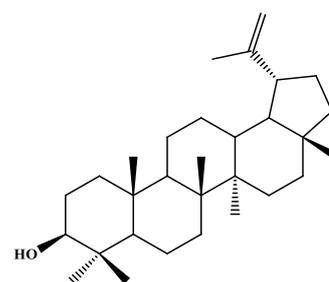
**Acide 3-acétoxyoléan-12-èn-28-oïque (32)**



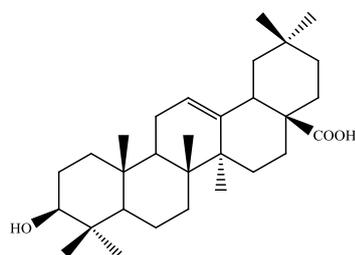
**Lupénone (33)**



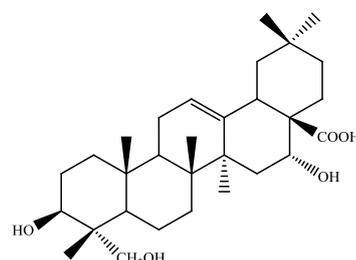
**Lupéol acétate (34)**



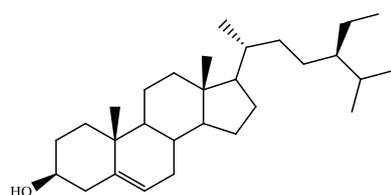
**Lupéol (35)**



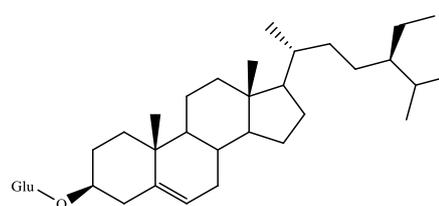
**Acide oléanolique (36)**



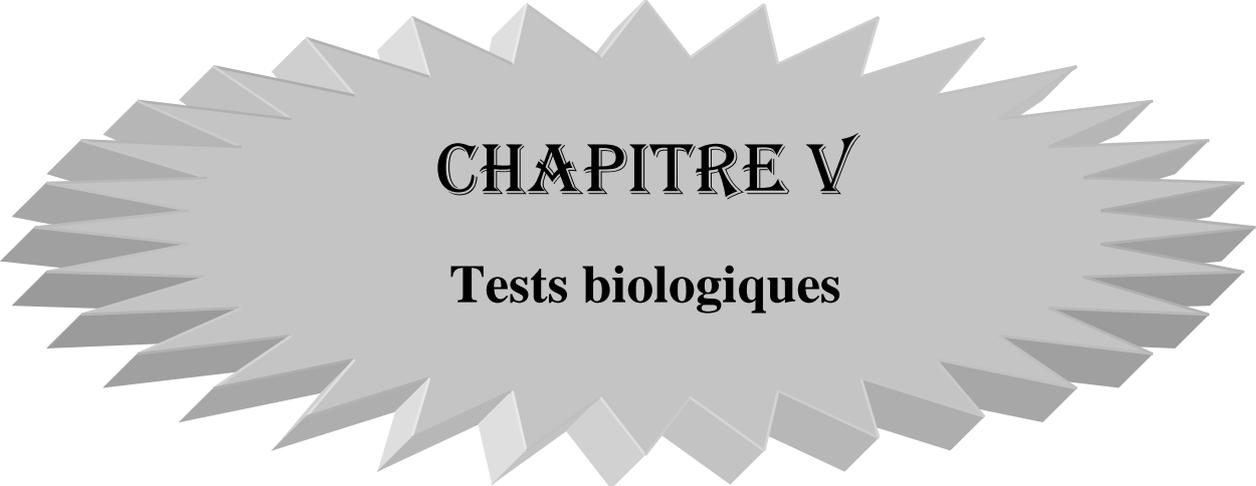
**Caulophyllogénine (37)**



**β-sitostérol (38)**



**Daucostérol (39)**



# **CHAPITRE V**

## **Tests biologiques**

## V-1 Introduction

Les bactéries sont responsables de diverses infections dans les organismes vivants. Les chercheurs ont espéré pouvoir éradiquer certaines maladies avec la découverte des antibiotiques. Malheureusement la large utilisation de ces médicaments a généré une résistance croissante des bactéries face aux antibiotiques. Dans cette perspective, il y a eu un grand intérêt pour la recherche de nouvelles substances biologiquement actives efficaces comme alternative à partir des ressources naturelles.

## V-2 Bactéries

Les bactéries représentent un groupe étonnamment complexe et fascinant. Ce sont des organismes cellulaires simples appelés **Procaryote** qui ne contiennent pas de noyaux et qui sont d'habitude trouvés en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement. Bien que les bactéries soient microscopiques, une morphologie différente est distinguée. Les formes les plus communes sont les tiges, les cocci (circulaire) et la spirale. Elles peuvent être grandes, petites, ovales grasses, longues, courtes et encore plus épaisses. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram positif et Gram négatif) basés sur la différence de la structure de la composition chimique de la paroi cellulaire.

### V-2-1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*), appelée colibacille, est un bacille Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de long et d'un diamètre d'environ 0,6  $\mu\text{m}$  (Figure V.1). *E. coli* est une bactérie fréquente du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud, normalement elle compose environ 80 % de la flore intestinale. La plupart des souches d'*E. coli* sont sans danger mais elles peuvent être pathogènes si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers. <sup>[230]</sup>

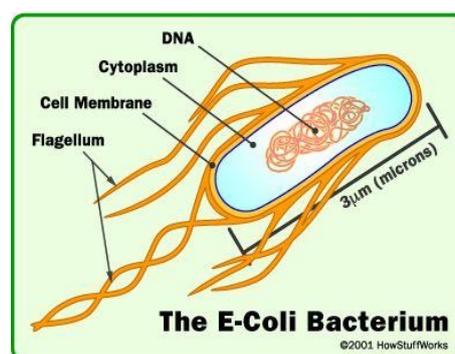
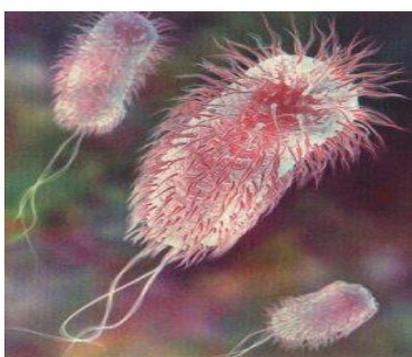
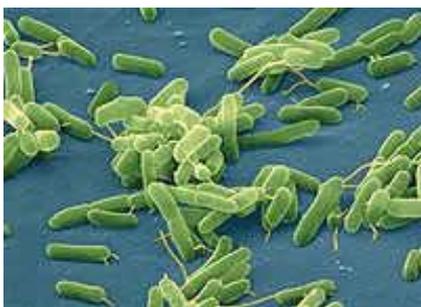


Figure V.1 Aspect morphologique d'*Escherichia Coli*

**V-2-2 *Pseudomonas aeruginosa***

Connu sous le nom de bacille pyocyanique, c'est une bactérie Gram négatif du genre *pseudomonas*. Les bacilles sont fins, mobiles aérobies stricts, se cultivent facilement sur les milieux usuels. Elle se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies (Figure V.2). [231,232]

C'est une bactérie ubiquitaire, qui vit dans les sols et en milieu humide ou sur les végétaux. Elle fait partie des germes couramment recherchés lorsque on procède à une analyse microbiologique d'un échantillon d'eau.

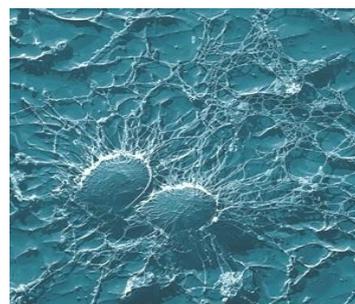


**Figure V.2 Aspect morphologique de *Pseudomonas aeruginosa***

**V-2-3 *Staphylococcus aureus***

Les *staphylocoques* sont des coques Gram positif, Il mesure de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, immobiles, dépourvus de spores et de capsules. Les staphylocoques apparaissent le plus souvent en amas (Figure V.3). Ils sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses de ses hôtes. Ces bactéries sont également isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière et air). [233]

*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène majeure pour l'homme et les animaux à sang chaud, célèbre pour son résistance aux traitements antibiotiques et son implication dans les infections nosocomiales. C'est un germe aérobic - anaérobic facultatif qui possède une catalase et une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*.



**Figure V.3 Aspect morphologique de *Staphylococcus aureus***

### V-3 Anti-oxydants

Les anti-oxydants sont des substances qui empêchent l'oxydation des protéines, acides gras et d'autres molécules du corps qui protègent l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres.

Ces derniers, naturellement présents dans l'organisme, sont des composés instables surtout formés d'oxygène. Ils sont parfois fabriqués en excès par nos cellules à cause de l'exposition prolongée au soleil, du tabac, ou sous l'effet de la pollution. Cela peut engendrer le vieillissement prématuré des cellules et l'apparition de certaines maladies.

Les principaux anti-oxydants naturels sont les flavonoïdes, les lignanes, les caroténoïdes, et les vitamines C et E présents dans certains aliments comme les fruits et les légumes.

#### V-3-1 Principe des anti-oxydants

La réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les anti-oxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules du corps. Les anti-oxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre inoffensifs et donc rendre impossible leurs oxydations par les protéines ou les acides gras.

#### V-3-2 Réaction entre le radical libre DPPH<sup>•</sup> et l'anti-oxydant

Le composé chimique 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH<sup>•</sup>.

La mesure de l'efficacité d'un anti-oxydant se fait en suivant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à  $\lambda = 517$  nm.

## V-4 Partie expérimentale

### V-4-1 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante *Atractylis flava* Desf.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité des extraits végétaux des plantes *A. flava* et *A. serratuloides* contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'activité antibactérienne des différents extraits des deux plantes est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.<sup>[234]</sup>

#### V-4-1-1 Souches bactériennes

Nous avons choisi trois bactéries pathogènes, une à Gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Elles proviennent du laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire CHU de Batna.

#### V-4-1-2 Préparation des précultures

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 18 h à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

#### V-4-1-3 Préparation de la suspension bactérienne (inoculum)

Une suspension microbienne d'une densité optique de 0,5 McFarland a été préparée, pour chaque souche, à partir de colonies bien isolées dans 10 ml d'eau physiologique contenue dans un tube à essai stérile.

#### V-4-1-4 Préparation des disques

Des disques de papier Wathman n° 3 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120 °C pendant 15 min par autoclavage), sont imprégnés avec 10 µL de l'extrait naturel à tester, correspondant à 5 mg d'extrait par disque. Des disques imprégnés de DMSO sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

#### V-4-1-5 Préparation des solutions

Les différents extraits organiques des plantes étudiées sont solubilisés dans le DMSO. Des dilutions ont été ensuite réalisées pour obtenir des concentrations de 0,5 g/ml, 0,25 g/ml, 0,125 g/ml et 0,062 g/ml pour chaque extrait testé.

**V-4-1-6 Préparation des milieux de culture**

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antibactériens sont les suivants :

- La gélose nutritive (GN) pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de la plante.

Les géloses ont été coulées dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boîtes.

**V-4-1-7 Ensemencement**

L'inoculum est ensemencé sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon. La surface entière de la gélose a été étalée à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution homogène des bactéries.

**V-4-1-8 Expression des résultats**

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les extraits à tester sont déposés délicatement à la surface de la gélose inoculée au préalable. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans les tableaux suivants :

**Tableau V.1:** Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'extrait EP d'*Atractylis flava*

|                                    | les dilutions en mg/ml |     |     |     |
|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                    | 1/1                    | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC       | -                      | -   | -   | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC | 10                     | -   | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC  | 15                     | -   | -   | -   |

**Tableau V.2:** Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'extrait DCM d'*Atractylis flava*

|                                    | les dilutions en mg/ml |     |     |     |
|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                    | 1/1                    | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC       | -                      | -   | -   | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC | -                      | -   | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC  | 11                     | 8   | -   | -   |



Figure V.4 : Effet de l'extrait DCM sur la croissance microbienne

Tableau V.3: Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'extrait *n*-BuOH d'*Atractylis flava*

|                                    | les dilutions en mg/ml |     |     |     |
|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                    | 1/1                    | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC       | -                      | -   | -   | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC | -                      | -   | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC  | 12                     | 7   | -   | -   |



Figure V.5 Effet de l'extrait *n*-BuOH sur la croissance microbienne

Tableau V.4 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'extrait DCM d'*Atractylis serratuloides*

|                                    | les dilutions en mg/ml |     |     |     |
|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                    | 1/1                    | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC       | 6                      | -   | -   | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC | 6                      | -   | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC  | 6                      | -   | -   | -   |



**Figure V.6 : Effet de l'extrait DCM de la plante *A. serratuloides* sur la croissance microbienne**

**Tableau V.5 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'extrait *n*-BuOH d'*Atractylis serratuloides***

|                                    | les dilutions en mg/ml |     |     |     |
|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                    | 1/1                    | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC       | 6                      | -   | -   | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC | 6                      | -   | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC  | 6                      | -   | -   | -   |



**Figure V.7 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de la plante *A. serratuloides* sur la croissance microbienne**

#### V-4-2 Test de l'activité anti-oxydante

Le test chimique que nous avons utilisé pour déceler la présence de composés anti-oxydants dans les extraits de la plante *Atractylis flava* repose sur le principe de la réduction des radicaux libres fournis par le 1, 1'-diphényl-2- picrylhydrazyle (DPPH).<sup>[235]</sup>

Le développement des plaques CCM a été réalisé dans des systèmes de solvants différents selon la polarité des extraits. Après migration, les chromatogrammes ont été séchés et pulvérisés avec une solution méthanolique de DPPH. En présence de substances anti-oxydantes, le DPPH est réduit et passe de la couleur pourpre (violette sombre) au jaune. Sur les plaques CCM, les zones d'activités anti-radicalaires apparaissent en jaune clair sur fond violet après un temps de 30 mn.

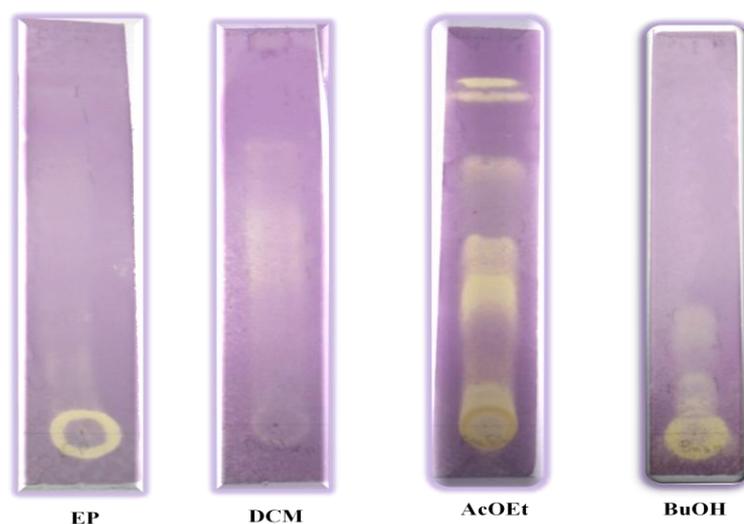


Figure V.8 : Activité anti-oxydante des différents extraits de la plante *Atractylis flava*

#### V-4-3 Résultats et discussion

L'activité antibactérienne a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre trois souches bactériennes ATCC (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition autour des disques. Les constatations suivantes ont été soulignées :

- Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que *Staphylococcus aureus* est moyennement sensible vis-à-vis des extraits testés EP, DCM, AcOEt et *n*-BuOH d'*Atractylis flava*, tandis que ces mêmes extraits se sont révélés inactifs contre la souche *Escherichia coli*.
- L'extrait éther de pétrole de la plante *Atractylis flava* a présenté une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*.
- Les extraits (DCM et *n*-BuOH) de la plante *Atractylis serratuloides* se sont révélés inactifs contre toutes les souches bactériennes testées.

Le potentiel anti-oxydant a été testé *in vitro* en utilisant le radical libre 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl (DPPH). Les résultats obtenus sur les extraits EP, DCM, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractylis flava* montrent que la capacité anti-radicalaire est plus élevée dans l'extrait AcOEt par rapport aux autres extraits.

Enfin, ces résultats préliminaires obtenus *in vitro* ne constituent qu'une première étape d'évaluation des activités biologiques anti-oxydante et antibactérienne. Des essais supplémentaires seront indispensables pour mesurer l'activité anti-oxydante et statuer sur le potentiel anti-radicalaire des différents extraits végétaux (EP, DCM, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *A. flava*.



## **Conclusion Générale**

## Conclusion générale

Le présent travail porte sur l'investigation chimique de deux plantes sahariennes appartenant au genre *Atractylis*: *A. flava* Desf. et *A. serratuloides* Sieber ex Cass. Ces deux espèces, de la grande famille Asteraceae, sont utilisées en médecine traditionnelle en Algérie et en Afrique du nord. Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires tels que les triterpénoïdes, les sesquiterpènes lactones et les flavonoïdes.

L'étude réalisée sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Atractylis flava* et éther de pétrole, dichlorométhane, et *n*-butanolique de la plante *Atractylis serratuloides*, a permis d'isoler 39 composés naturels dont 5 structures nouvelles et 5 composés communs aux deux plantes. Ces produits appartiennent à cinq classes de métabolites secondaires :

- Onze flavonoïdes comportant quatre aglycones, deux *C*-glycosylés et cinq *O*-glycosylés. Parmi les flavonoïdes *O*-glycosylés identifiés deux sont nouveaux ;
- Quatorze triterpènes pentacycliques dont huit à squelette oléanane, deux à squelette ursane et quatre à squelette lupane ;
- Trois saponosides bidesmosidiques nouveaux ;
- Cinq phytostérols ;
- Un phénol glycosylé.

L'isolement et la purification de ces composés **1-39** a été essentiellement fondée sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques (VLC, CC, CCE, CCM et HPLC) utilisant divers supports (silice normale, silice greffée RP-18, polyamide et Sephadex LH-20).

La détermination des structures a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé et DEPT, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, TOCSY, HSQC-TOCSY, ROESY et NOESY), spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI-MS, spectroscopies IR et UV, la mesure des pouvoirs rotatoires, par les transformations chimiques et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les tests biologiques (activités antibactérienne et anti-oxydante) ont été réalisés sur les extraits des deux plantes *A. flava* et *A. serratuloides*. En effet, les résultats obtenus montrent que les extraits EP, DCM et *n*-BuOH de la plante *Atractylis flava* possèdent tous une activité modérée sur la souche *Staphylococcus aureus*, tandis que les extraits DCM et *n*-BuOH de la

plante *Atractylis serratuloides* se sont avérés inactifs contre toutes les bactéries testées. En outre, les extraits de la plante *Atractylis flava* présentent une activité anti-oxydante par le test DPPH sur CCM.

L'étude menée sur *A. flava* a conduit à l'isolement de plusieurs classes de métabolites secondaires à savoir les triterpènes, stérols, flavonoïdes et saponines. Les composés de type triterpènes et flavonoïdes sont isolés de plusieurs espèces du genre *Atractylis* de la sous-tribu Carlininae. Des composés similaires ont été trouvés aussi dans des plantes des genres *Carlina* et *Atractylodes* appartenant à la même sous-tribu Carlininae.

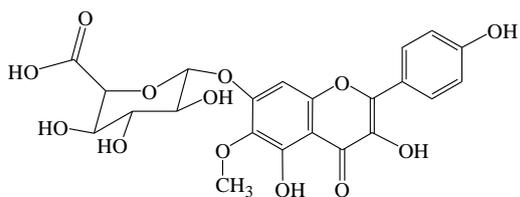
Toutefois, il est à signaler que les flavonoïdes C-glycosylés ont été caractérisés dans les trois genres : *Atractylis*, *Carlina* et *Atractylodes* de la tribu Cardueae. Ces composés pourraient être comme des marqueurs chimiotaxonomiques de ces genres, ce qui explique leur systématique commune. Par ailleurs, il est important de noter que les saponines bidesmosidiques ont été trouvées pour la 1<sup>ère</sup> fois dans la tribu Cardueae.

L'investigation chimique réalisée sur la plante *A. serratuloides* a permis l'identification d'un phénol glycosylé et de plusieurs triterpènes et stéroïdes. Aucun flavonoïde n'a été isolé de cette plante dans le cadre de cette étude. Les composés de type phénol glycosylés ont été isolés également de plusieurs espèces du genre *Atractylodes*. Ce dernier est connu pour son accumulation des métabolites secondaires de type sesquiterpène.

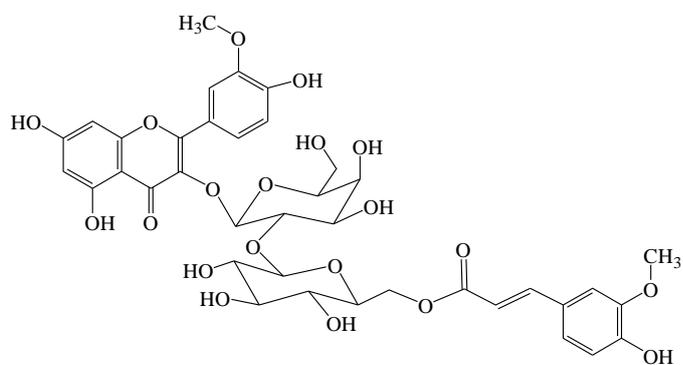
Les triterpènes à squelette oléanane et lupane sont considérés comme des métabolites secondaires communs à tous les genres de la sous-tribu Carlininae (*Atractylis*, *Carlina* et *Atractylodes*) ainsi que des plantes de la famille Asteraceae en général.

Les structures moléculaires identifiées dans l'espèce *A. serratuloides*, à l'issue de cette investigation, ne permettraient pas pour le moment d'avancer des hypothèses quant à leur signification chimiotaxonomique.

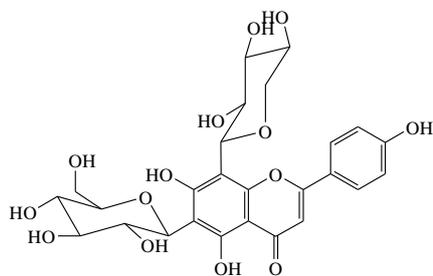
Les résultats phytochimiques obtenus tout au long de ce travail de thèse, ne peuvent qu'encourager les investigations sur d'autres espèces du genre *Atractylis* afin de rechercher de nouvelles molécules à intérêts thérapeutiques. En conséquence, l'ensemble de ces travaux confirme bien la richesse des espèces du genre *Atractylis* en triterpénoïdes et flavonoïdes qui sont des composés majoritaires des plantes de la famille Asteraceae.



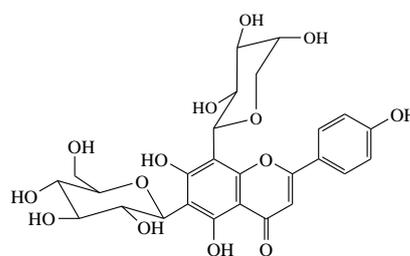
Atravloside A (1)



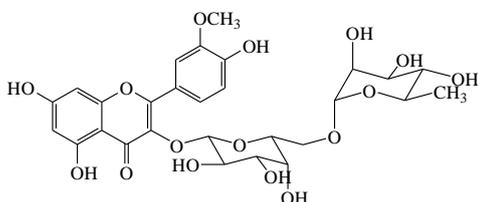
Atravloside B (2)



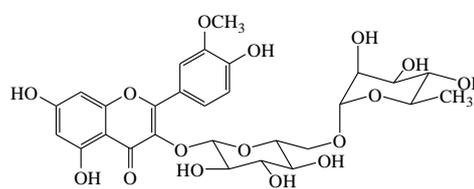
Vicenine 3 (3)



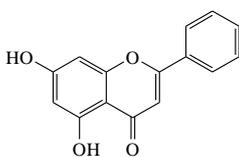
Schaftoside (4)



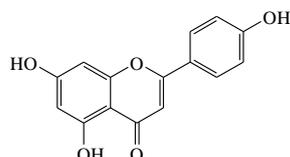
Isorhamnétine 3-O-robinobioside (5)



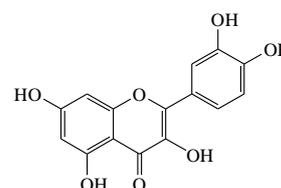
Narcissine (6)



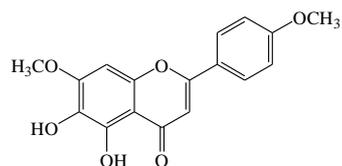
Chrysin (7)



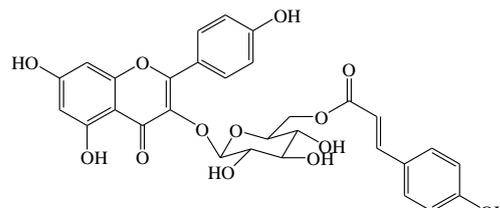
Apigénine (8)



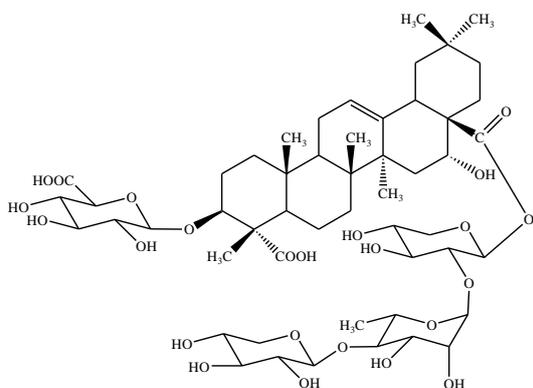
Quercétine (9)



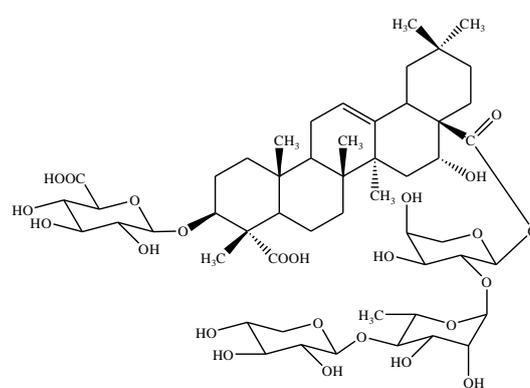
Ladaneine (10)



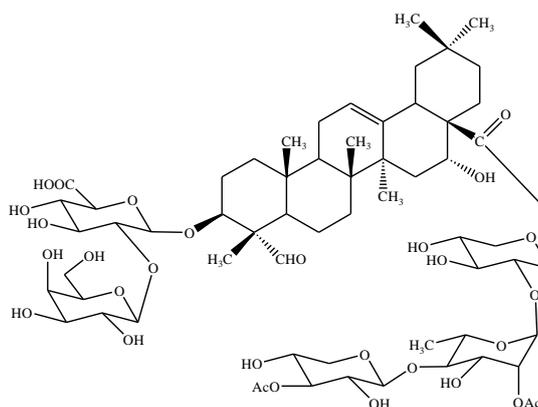
Tiliroside (11)



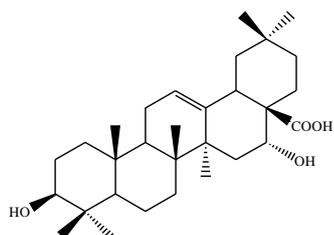
Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (12)



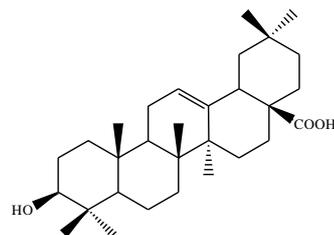
Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl] (13)



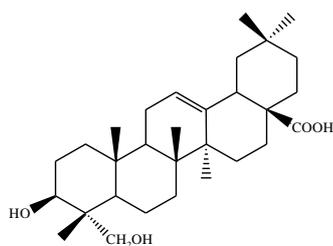
Acide quillaïque 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-O-[(3'''-O-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 4''')-(2''''-O-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 2''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl] (14)



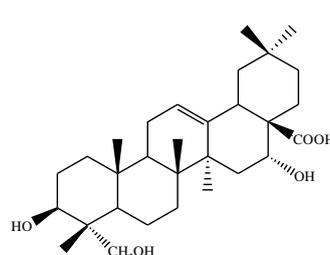
Acide echinocystique (15)



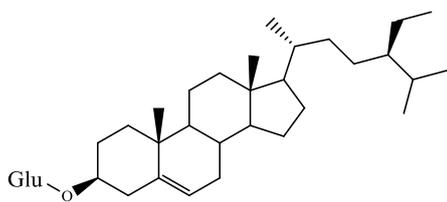
Acide oléanolique (16)



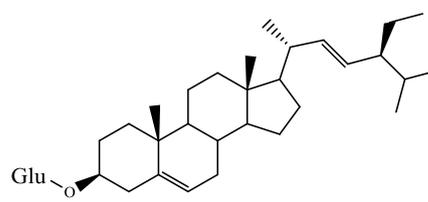
Hédéragénine (17)



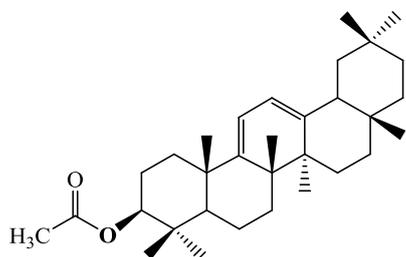
Caulophyllogénine (18)



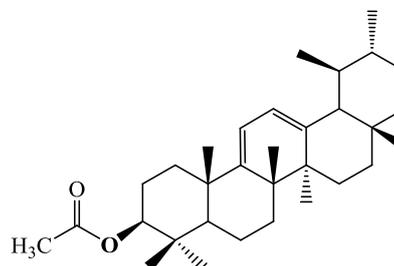
Daucostérol (19)



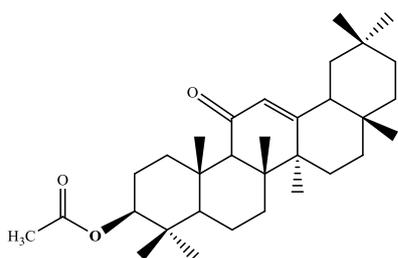
Stigmastérol glucosylé (20)



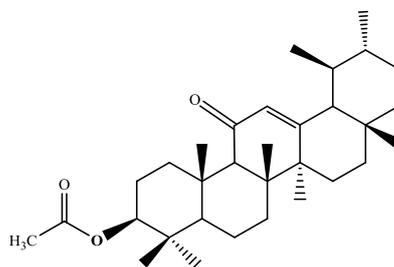
oléana-9(11),12-dièn-3-yl acétate (21)



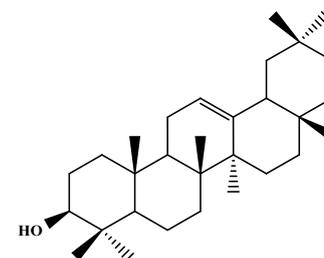
ursina-9(11),12-dièn-3-yl acétate (22)



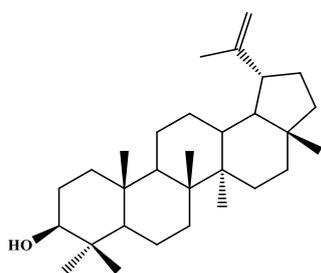
11-oxo-β-amyrine acétate (23)



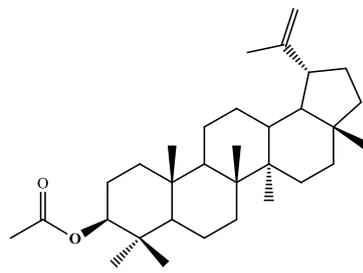
11-oxo-α-amyrine acétate (24)



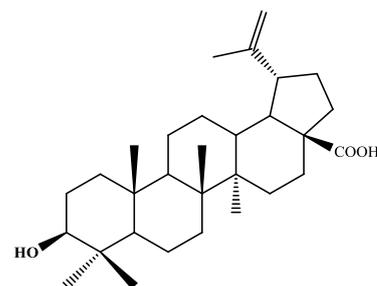
β-Amyrine (25)



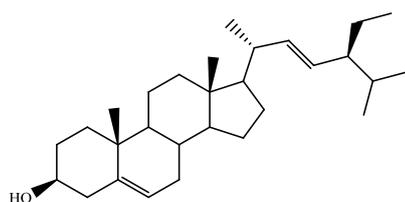
Lupéol (26)



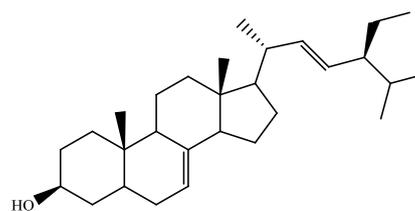
Lupéol acétate (27)



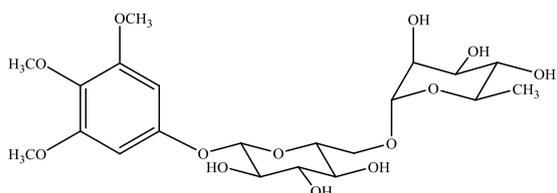
Acide bétulinique (28)



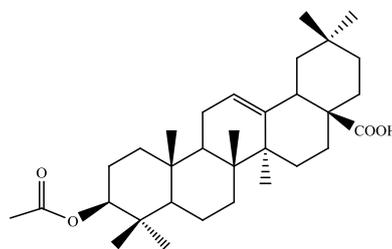
Stigmastérol (29)



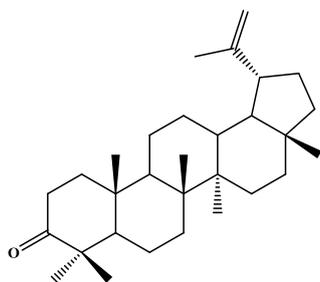
Spinastérol (30)



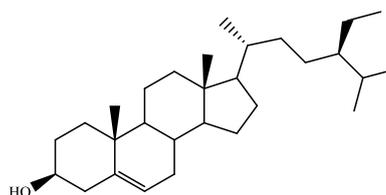
Antiarol rutinoside (31)



Acide 3-acétyloxoléan-12-èn-28-oïque (32)



Lupénone (33)



β-sitostérol (38)



# CHAPITRE VI

**Partie expérimentale**

## VI-1 Matériels et appareillage

### VI-1-1 Récolte des plantes *A. flava* Desf. et *A. serratuloides* Sieber ex Cass.

Les plantes *Atractylis flava* Desf. et *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. ont été récoltées dans la région de Biskra au mois de mai 2009 et 2011 respectivement. Elles ont été identifiées par le professeur Bachir Oudjehih du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques, université de Batna.

### VI-1-2 Techniques préparatives de séparation

#### VI-1-2-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies par CCM analytique ont été effectuées sur des plaques en verre ou en aluminium recouvertes de silice.

Support aluminium:

- En phase normale, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

Support verre:

- En phase normale, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (10 ou 20 x 20 cm).
- En phase inverse, RP 18 F<sub>254S</sub>, 200 µm Merck (5 x 10, 10 x 20 cm).

Le révélateur utilisé est un mélange d'acides (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et de l'eau 50 %.

Les purifications par CCE préparative ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

#### VI-1-2-2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et à l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) ou bien la silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63 µm), est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

#### VI-1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mises en œuvre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Les phases stationnaires utilisées au cours des différentes opérations de séparation et de purification sont énumérées ci-après :

- En phase normale, une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh), en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon, objet des procédures de purification.
- En phase inverse, une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63  $\mu\text{m}$ ), en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier.
- Sur polyamide SC6.

L'élution peut être effectuée à pression atmosphérique ou bien à l'aide d'air comprimé dans le cas d'utilisation de silice greffée RP-18. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 1-2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait à lieu sous forme solide (enrobage).

#### VI-1-2-4 Chromatographie d'exclusion stérique

Les chromatographies d'exclusion stérique sont réalisées sur gel de Sephadex LH-20 avec le méthanol ou chloroforme-méthanol comme phase mobile. Cette chromatographie repose sur la taille et à moindre degré sur la polarité des constituants d'un mélange à séparer.

#### VI-1-2-5 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'appareillage est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe quaternaire P580 A avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. Les colonnes utilisées sont :

- CLHP analytique :

Colonne Dionex C18, 4,6 x 250 mm, de granulométrie 5 $\mu$  et de porosité 90 Å.

- CLHP semi-préparative :

Colonne Dionex C18, UP 5 ODB.25M 10 x 250 mm Interchrom de granulométrie 5 $\mu$ .

Les conditions d'élution en CLHP analytique sont :

- Mode : gradient ou isocratique ;
- Système de solvants : H<sub>2</sub>O-ACN ou H<sub>2</sub>O-MeOH ;
- Débit = 1 ml/min ;
- Température = 25 °C ;
- Détection :  $\lambda$  = 208, 254 et 350 nm.

Les conditions d'élution en CLHP semi-préparative sont :

- Mode : gradient ou isocratique ;
- Système de solvants : H<sub>2</sub>O–ACN ou H<sub>2</sub>O–MeOH;
- Débit = 6 ml/min ;
- Pression = 190 bar ;
- Température = 30 °C ;
- Détection :  $\lambda$  = 205 et 254 nm.

### VI-1-3 Chimie structurale

#### VI-1-3-1 Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN sont enregistrés sur deux appareils BRUKER Avance DRX-600 et 500. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont enregistrés à 600, 500 et 150, 125 MHz respectivement.

#### VI-1-3-2 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse basse résolution ESI-MS et haute résolution HR-ESI-MS sont obtenus par electrospray (ESI) sur des spectromètres thermofinnigan MSQ et Micromasse Q-TOF respectivement; en *m/z*.

#### VI-1-3-3 Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV des composés isolés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV KONTRON Logiciel UVS900Lite.

#### VI-1-3-4 Spectrométrie Infra-rouge (IR)

Les spectres infrarouges des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Shimadzu IR-470 dans des pastilles de KBr.

#### VI-1-3-5 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques ont été mesurés sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda$  = 589 nm) dans une cuve de longueur 10 cm et de volume 1 ml à température ambiante. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

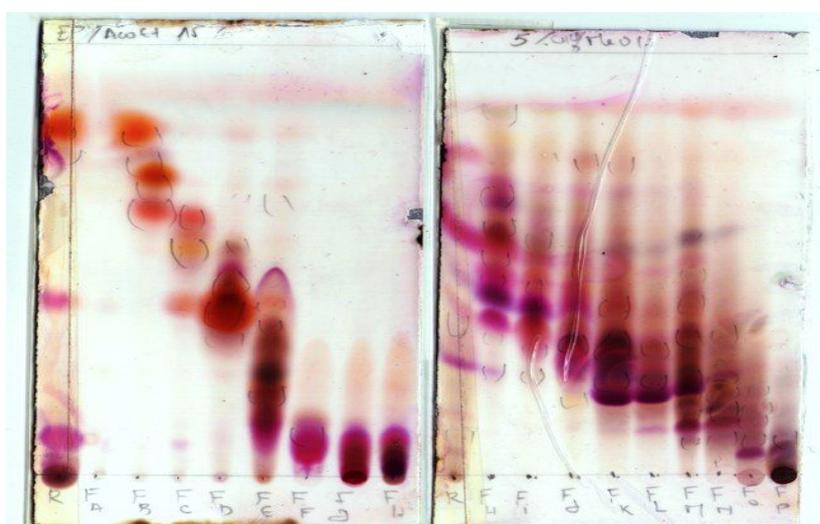
**VI-2 Etude phytochimique de l'espèce *Atractylis flava* Desf.****VI-2-1 Extraction**

La plante entière (700 g) d'*Atractylis flava* Desf. préalablement séchée et broyée est mise à macérer pendant 48 h dans un mélange hydro-alcoolique (EtOH–H<sub>2</sub>O : 70:30). La macération est effectuée 2 fois avec renouvellement de solvants. La filtration et l'évaporation du solvant ont permis d'obtenir 600 ml d'extrait aqueux.

L'extraction liquide-liquide de la phase aqueuse en utilisant successivement des solvants à polarité croissante : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol et l'évaporation à sec du solvant conduisent à quatre extraits: Ep (1,5 g), DCM (3,5 g), acétate d'éthyle (2 g) et *n*-butanol (20 g).

**VI-2-2 Séparation et purification****VI-2-2-1 Fractionnement et purification de l'extrait dichlorméthane**

3,3 g de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont soumis à un fractionnement sur une colonne de gel de silice normale. Le système d'éluion est constitué par un mélange EP–AcOEt ensuite AcOEt–MeOH à différents gradients. L'examen CCM des fractions obtenues a permis de les rassembler en 16 sous-fractions (A-P) (Figure VI.1 et Tableau VI.1).



**Figure VI.1 : CCM globale en phase normale de l'extrait DCM**

Tableau VI.1 : Fractionnement de l'extrait dichlorométhane de la plante entière *A. flava*

| Eluant                            | Fractions collectées | Masse (mg) |
|-----------------------------------|----------------------|------------|
| Ether de pétrole–acétate d'éthyle | F <sub>A</sub>       | 147,2      |
| 100-0 à 95-5                      |                      |            |
| 90-10                             | F <sub>B</sub>       | 22,9       |
| 90-10                             | F <sub>C</sub>       | 23,5       |
| 80-20                             | F <sub>D</sub>       | 150,4      |
| 70-30 à 50-50                     | F <sub>E</sub>       | 199        |
| 50-50                             | F <sub>F</sub>       | 313,1      |
| 50-50                             | F <sub>G</sub>       | 103,1      |
| 50-50                             | F <sub>H</sub>       | 60,2       |
| 30-70                             | F <sub>I</sub>       | 99,1       |
| 30-70                             | F <sub>J</sub>       | 104,6      |
| 0-100                             | F <sub>K</sub>       | 241        |
| acétate d'éthyle–méthanol         | F <sub>L</sub>       | 98,6       |
| 99-1                              |                      |            |
| 99-1                              | F <sub>M</sub>       | 128,3      |
| 97-3                              | F <sub>N</sub>       | 142,1      |
| 95-5                              | F <sub>O</sub>       | 280        |
| 90-10                             | F <sub>P</sub>       | 470,7      |

La fraction FA (147 mg) est appliquée à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange *n*-hexane–CHCl<sub>3</sub> (99:1, 97:3, 95:5: 90:10, 80:20, 70:30 et 60:40). La sous-fraction FA-3 est purifiée sur une plaque préparative en phase inverse (RP-18) dans le MeOH. Cette purification a permis d'obtenir le composé **27** (5 mg).

Les composés **21** et **22** (3,8 mg) et **23** et **24** (5,2 mg) (Figure VI.2) sont isolés, sous forme de deux mélanges, de la fraction FB (22,9 mg) suite à une purification sur colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant cyclohexane–CHCl<sub>3</sub> (99:1, 97:3, 95:5: 90:10, 80:20, 70:30 et 50:50) suivie d'une séparation sur plaque préparative en phase inverse (RP-18) dans le MeOH.



**Figure VI. 2: CCM des composés 21-24**

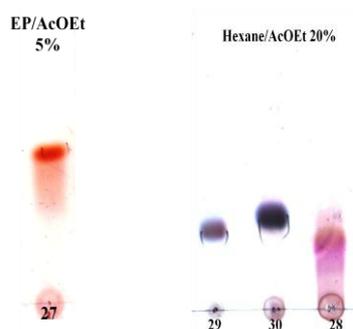
La fraction Fd (150,4 mg) est purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  comme éluant, pour conduire aux composés **25** (4 mg) et **26** (6 mg).

La purification de la fraction FN (142,1 mg) menée successivement par une chromatographie sur colonnes de Sephadex LH-20 et de gel de silice, a abouti à l'isolement du produit **18** (3,3 mg) (Figure VI.3).



**Figure VI.3 : CCM du composé 18**

La fraction FE (199 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluion est réalisée par un mélange *n*-hexane–AcOEt (99:1, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 80:20, et 70:30) pour fournir neuf sous-fractions, dont la fraction FE-8 est le composé **28** (2,6 mg) (Figure VI.4). La sous-fraction FE-4 (30 mg) contenant deux produits majoritaires est purifiée à son tour sur plaques préparatives de silice normale dans le mélange de solvants EP–AcOEt (80:20), donnant ainsi les composés **29** (2,6 mg) et **30** (3,5 mg) (Figure VI.4).



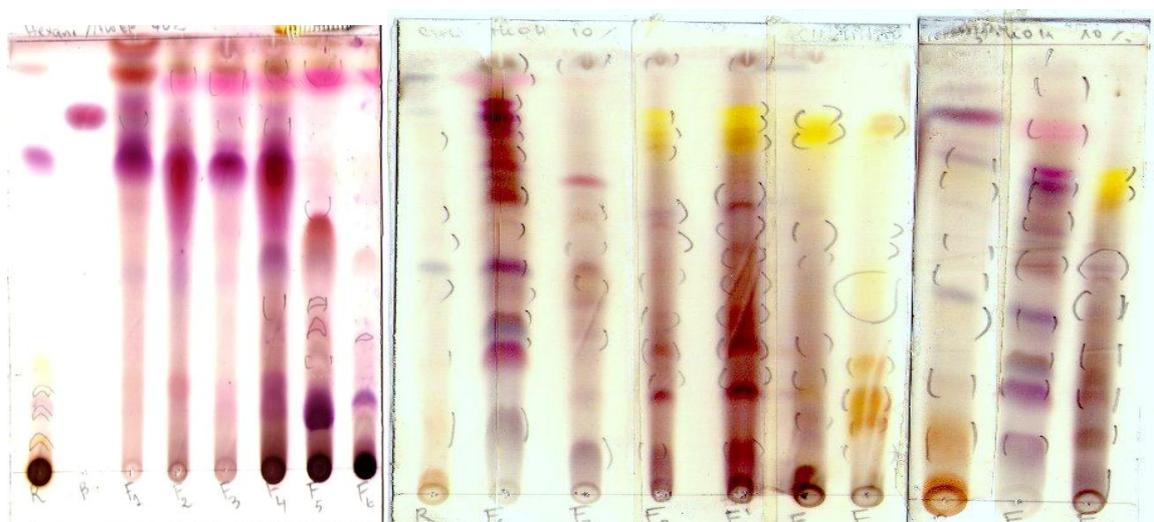
**Figure VI. 4: CCM des composés 27-30**

## VI-2-2-2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de 2 g de l'extrait acétate d'éthyle a été effectué sur une colonne de polyamide. L'élution est réalisée par un gradient toluène-méthanol (100:0 à 0:100). Cette séparation a permis de recueillir 13 fractions (F<sub>1</sub> à F<sub>13</sub>) (Tableau VI.2 et Figure VI.5).

**Tableau VI.2:** Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de la plante entière *A. flava*

| Eluant : Toluène -méthanol | Fractions collectées | Masse (mg) |
|----------------------------|----------------------|------------|
| 100-0                      | F <sub>1</sub>       | 145,7      |
| 100-0                      | F <sub>2</sub>       | 75         |
| 99-1                       | F <sub>3</sub>       | 19,8       |
| 99-1                       | F <sub>4</sub>       | 134,3      |
| 99-1                       | F <sub>5</sub>       | 90         |
| 97-3                       | F <sub>6</sub>       | 250        |
| 95-5                       | F <sub>7</sub>       | 143,4      |
| 90-10                      | F <sub>8</sub>       | 186,6      |
| 80-20                      | F <sub>9</sub>       | 215,8      |
| 80-20                      | F <sub>10</sub>      | 279,5      |
| 60-40                      | F <sub>11</sub>      | 320,5      |
| 60-40                      | F <sub>12</sub>      | 79,5       |
| 50-50                      | F <sub>13</sub>      | 55         |



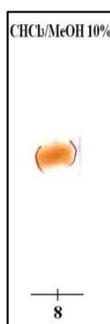
**Figure VI.5 :** CCM globale en phase normale de l'extrait AcOEt

La filtration de la fraction F<sub>2</sub> sur colonne de sephadex LH-20 en utilisant le méthanol comme éluant a permis d'isoler le composé **16** (4 mg).

Le fractionnement de F<sub>5</sub> par chromatographie sur colonne de gel de silice, en utilisant comme éluant CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0 à 95:5), a permis d'obtenir les composés **15** (3,4 mg) et **17** (2,5 mg).

La fraction F<sub>6</sub> est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange *n*-hexane-EtOAc et EtOAc-MeOH à différents gradients. Cette purification a permis d'obtenir un mélange de deux composés **19** et **20** (4,5 mg).

La fraction F<sub>10</sub> est chromatographiée sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1 à 90:10). Cette séparation a permis l'isolement à l'état pur de deux composés **7** (10 mg) et **8** (4 mg) (Figure VI.6).



**Figure VI. 6: CCM du composé 8**

La fraction F<sub>11</sub> soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale est éluee avec un mélange de solvants CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (100:0 à 0:100). Des fractions sont recueillies et rassemblées selon leur profil en CCM en phase normale pour donner 10 sous-fractions. La sous-fraction F<sub>11-8</sub> est purifiée par plaques préparatives en phase normale dans le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH (80:20), pour conduire au composé **6** (7 mg).

La fraction F<sub>13</sub> est purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 avec le méthanol comme éluant pour donner le composé **9** (6 mg).

### VI-2-2-3 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

7 g de l'extrait *n*-butanolique de cette plante ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide sur gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée en premier lieu avec le CHCl<sub>3</sub> dont on augmente la polarité par l'addition de MeOH (100:0 à 60:40), puis par un gradient de l'eau (60:40:1 à 0:100:10). A l'issue de ce fractionnement primaire, 25 fractions de 100 ml sont collectées. Le rassemblement des fractions selon leur profil chromatographique a permis de réunir 8 fractions (Tableau VI.3).

**Tableau VI.3:** Fractionnement de l'extrait *n*-butanol de la plante entière *A. flava*

| Eluant   | Fractions collectées | Masse (mg) |
|--|----------------------|------------|
| CHCl <sub>3</sub> -MeOH<br>100-0 à 80-20         | F1                   | 98,4       |
| 80-20 à 70-30                                    | F2                   | 175,9      |
| CHCl <sub>3</sub> -MeOH-eau<br>70-30-0 à 60-40-1 | F3                   | 1400       |
| 60-40-1 à 60-40-5                                | F4                   | 1433,7     |
| 60-40-5 à 60-40-7                                | F5                   | 788,2      |
| 50-50-10   | F6                   | 708,6      |
| 40-60-10 à 30-70-10                              | F7                   | 642,9      |
| 0-100-10   | F8                   | 36,3       |

La fraction F<sub>3</sub> (1400 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase inverse C-18. L'élution est réalisée par un mélange MeOH-H<sub>2</sub>O à différents gradients. Des fractions de 20 ml ont été recueillies, examinées par CCM en phase inverse (éluant : MeOH-H<sub>2</sub>O : 50:50), pour être finalement rassemblées en 23 sous-fractions. La sous fraction F<sub>3-17</sub> (22 mg), éluee avec le mélange MeOH-H<sub>2</sub>O (40:60), contient 22 mg du composé **5** à l'état pur.

La sous-fraction F<sub>3-7</sub> a fait l'objet d'une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvant (ACN-H<sub>2</sub>O) isocratique à 15%. Elle a permis l'isolement du composé **3** (12,8 mg). La sous-fraction F<sub>3-9</sub> (23 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale, éluee par un mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0 à 50:50). Cette purification a permis d'obtenir le composé **4** (3,6 mg) à l'état pur (Figure VI.7).

MeOH-H<sub>2</sub>O : 50-50**Figure VI.7:** CCM en phase inverse des composés **3** et **4**

La séparation de la fraction F<sub>7</sub> (642,9 mg) a été réalisée sur une colonne de gel de silice en phase inverse RP-18. L'élution est effectuée par un mélange de solvants MeOH-H<sub>2</sub>O (10:90 à 100:0). Le rassemblement des fractions similaires a donné 23 sous-fractions et le composé **1** (7,3 mg) à l'état pur. La sous-fraction F<sub>7.2</sub> (35 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale et éluee par le mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0, 95:5, 90:10 et 80:20), a abouti à l'isolement du produit **2** (5,2 mg).

Une autre partie de l'extrait butanolique (4 g) a été soumise à une VLC en phase inverse sur silice greffé C18 en utilisant comme éluant MeOH-H<sub>2</sub>O allant de 20:80 à 100:0. Ce fractionnement a donné neuf fractions (Figure VI.8 et Tableau VI.4).

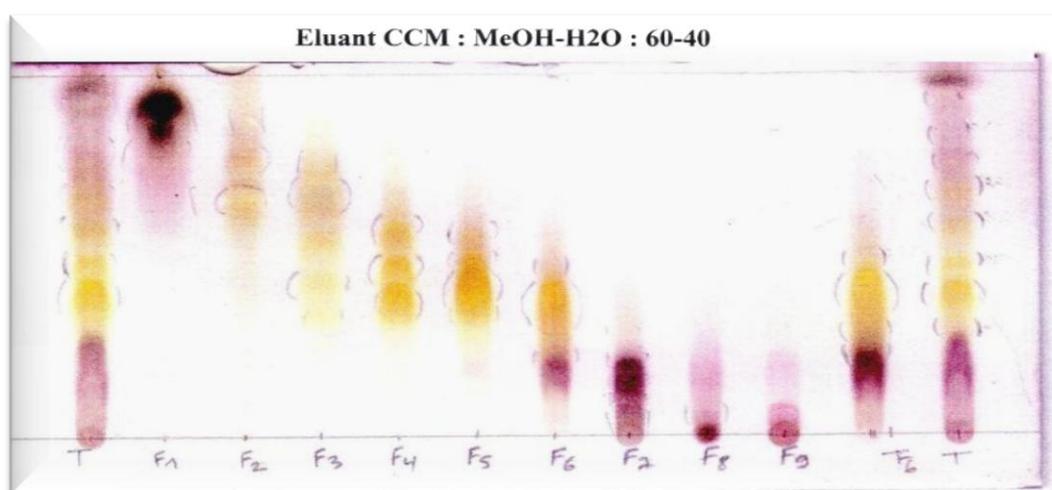


Figure VI.8 : CCM globale en phase inverse de l'extrait butanolique

Tableau VI.4: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol sur phase inverse de la plante entière *A. flava*

| Eluant                | Fractions collectées | Masse (mg) |
|-----------------------|----------------------|------------|
| MeOH-H <sub>2</sub> O |                      |            |
| 20-80                 | F1                   | 1473       |
| 20-80                 | F2                   | 417,4      |
| 30-70                 | F3                   | 307,2      |
| 40-60                 | F4                   | 203,1      |
| 40-60                 | F5                   | 470,6      |
| 60-40                 | F6                   | 512,3      |
| 80-20                 | F7                   | 313        |
| 100-0                 | F8                   | 32,4       |
| 100-0                 | F9                   | 19,3       |

La fraction F7 (300 mg) est purifiée par chromatographie flash en phase inverse, pour conduire aux composés **10** (4 mg) et **11** (3 mg) à l'état pur ainsi que 11 sous fractions. La purification de la sous-fraction F7-4 (95 mg) par HPLC semi-préparative élue par un gradient de solvants acétonitrile–eau : 20:80 à 80:20 a permis d'obtenir 3 produits : **12** (3,5 mg), **13** (5,4 mg) et **14** (3 mg) (Figure VI.9).



Figure VI.9 : CCM en phase inverse des composés **12**, **13** et **14**

#### VI-2-2-4 Hydrolyse acide de l'extrait *n*-butanolique

L'extrait *n*-butanolique (1 g) est dissout dans une solution de HCl 2N. La solution est mise à reflux en maintenant l'ébullition pendant 4 heures.

Après refroidissement, le mélange réactionnel est soumis à une extraction liquide-liquide contre l'acétate d'éthyle. Deux phases sont formées :

- Une phase organique contenant les génines triterpéniques.
- Et une phase aqueuse renfermant les sucres libres. Celle-ci est neutralisée par KOH 0,5 N puis congelée et lyophilisée. Le mélange de sucres est analysé par CCM avec des témoins de monosaccharides dans un système: MeCOEt–isoPrOH–MeCOMe–H<sub>2</sub>O (20:10:7:6).

Les sucres sont purifiés par chromatographie sur plaques préparatives en phase normale, leur pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$  est mesuré dans H<sub>2</sub>O. Les résultats de l'hydrolyse acide sont représentés dans le tableau suivant :

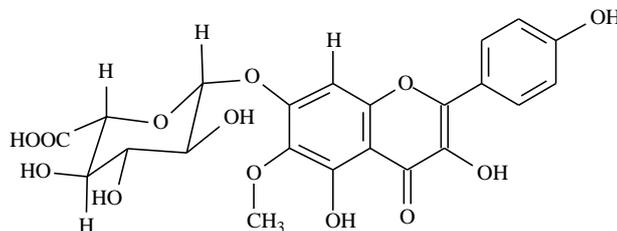
Tableau VI.5 : Résultats d'hydrolyse acide de l'extrait *n*-butanolique et pouvoirs rotatoires des sucres isolés mesurés dans H<sub>2</sub>O

| Sucres | $[\alpha]_D$ | C          |
|--------|--------------|------------|
| D-Glu  | +27,5°       | 0,73       |
| D-Gal  | +41,1°       | 0,95       |
| L-Rha  | +2,3°        | 0,97       |
| L-Ara  | +95,1°       | 0,63       |
|        | +68,4°       | 0,63 (24h) |
| D-Xyl  | +15,1°       | 0,95       |
|        | +14,1°       | 0,95 (24h) |

VI-2-3 Composés isolés de l'espèce *Atractylis flava*

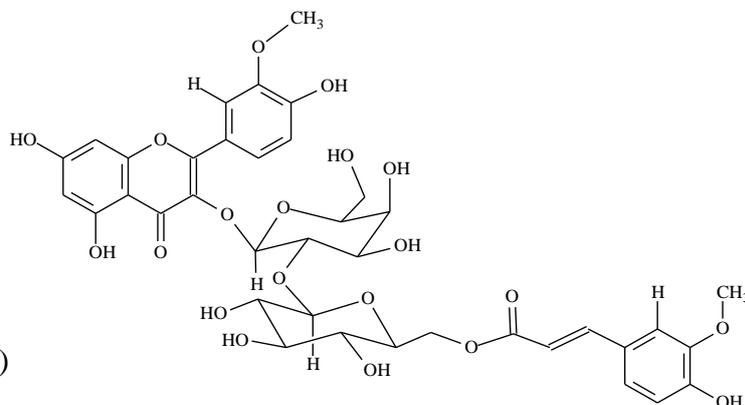
## VI-2-3-1 Composé 1

Atraflavoside A

**Formule brute** :  $C_{22}H_{20}O_{13}$  $[\alpha]_D - 51,4^\circ$  (C = 0,35, MeOH)**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 531  $[M+K]^+$ 553  $[M-H+Na+K]^+$ 569  $[M-H+2K]^+$ RMN  $^1H$  (600 MHz) et RMN  $^{13}C$  (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.1, page 54)

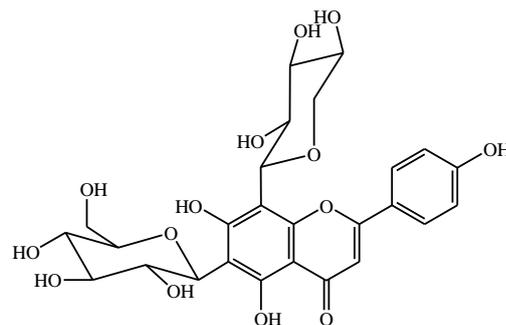
## VI-2-3-2 Composé 2

Atraflavoside B

**Formule brute** :  $C_{38}H_{40}O_{20}$  $[\alpha]_D - 31,2^\circ$  (C = 0,2, MeOH)**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 839  $[M+Na]^+$ 855  $[M+K]^+$ RMN  $^1H$  (600 MHz) et RMN  $^{13}C$  (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.2, pages 70-71)

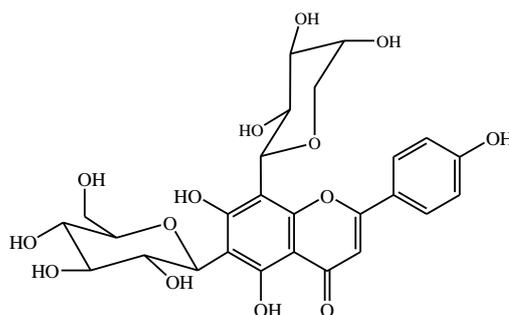
## VI-2-3-3 Composé 3

Vicénine 3

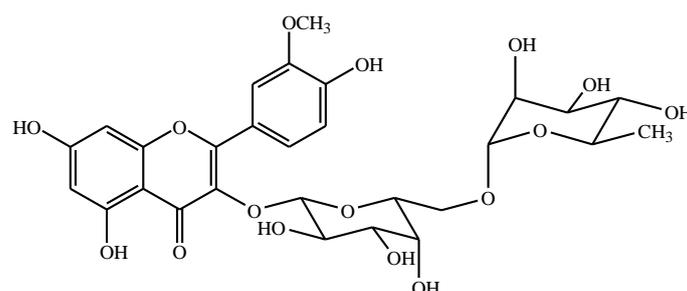
**Formule brute** :  $C_{26}H_{28}O_{14}$  $[\alpha]_D + 11,42^\circ$  (C = 0,175, MeOH)**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 587  $[M+Na]^+$ RMN  $^1H$  (600 MHz) et RMN  $^{13}C$  (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.3, pages 79-80)

## VI-2-3-4 Composé 4

Schaftoside

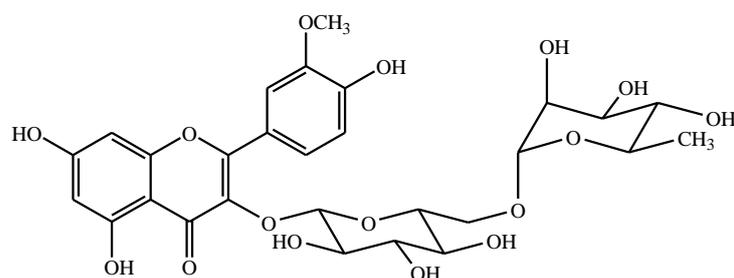
**Formule brute** : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>**[α]<sub>D</sub>** + 45,4° (C= 0,14, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 587 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.4, pages 84-85)

## VI-2-3-5 Composé 5

Isorhamnétine 3-*O*-robinobioside**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>**[α]<sub>D</sub>** - 21,4° (C= 0,86, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 647 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.5, pages 91-92)

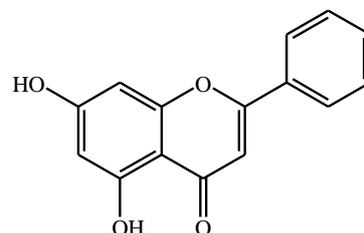
## VI-2-3-6 Composé 6

Narcissine

**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>**[α]<sub>D</sub>** - 15,85° (C= 1,35, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 647 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.6, pages 96-97)

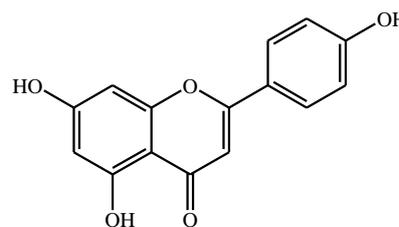
## VI-2-3-7 Composé 7

Chryisine

**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 277 [M+Na]<sup>+</sup>531 [2M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.7, pages 100)

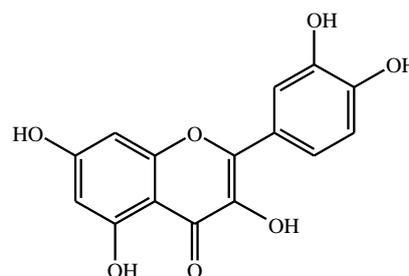
## VI-2-3-8 Composé 8

Apigénine

**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 309 [M+K]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.8, page 103)

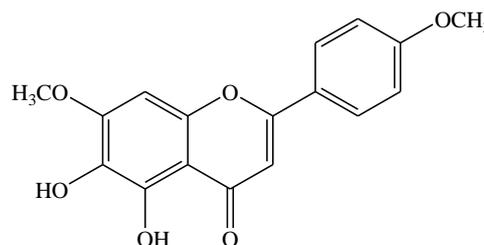
## VI-2-3-9 Composé 9

Quercétine

**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 325 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.9, page 106)

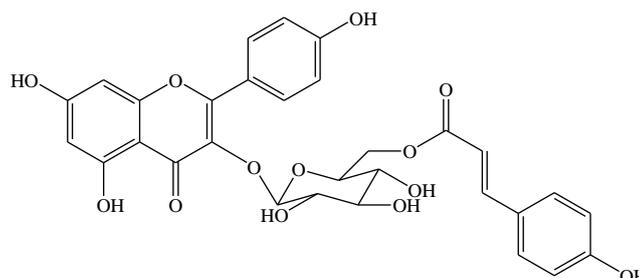
## VI-2-3-10 Composé 10

Ladaneine

**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 337 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.10, page 111)

## VI-2-3-11 Composé 11

Tiliroside

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>[α]<sub>D</sub> - 57° (C = 0,1, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 617 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.11, pages 115-116)

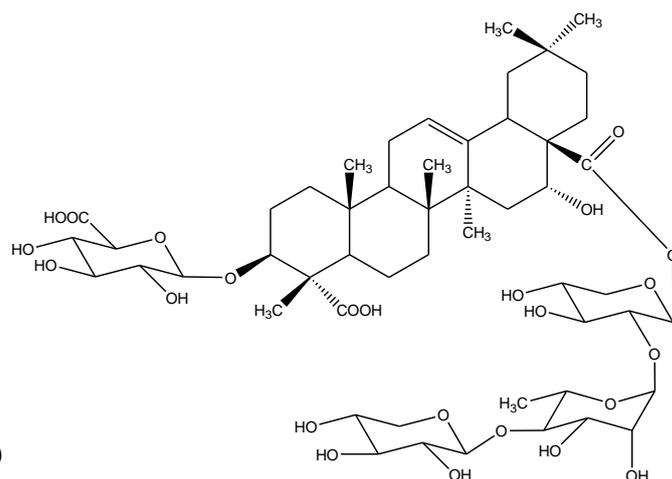
## VI-2-3-12 Composé 12

Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -Dxylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-xylopyranosyl]

**Formule brute** : C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>O<sub>24</sub>

$[\alpha]_D - 34,21^\circ$  (C = 0,0019, MeOH)

**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 1111 [M+Na]<sup>+</sup>  
 RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz)  
 dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.12, pages 136-137)



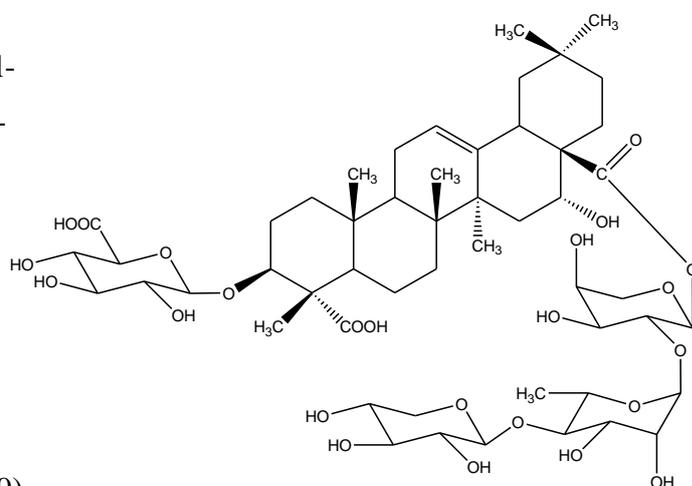
## VI-2-3-13 Composé 13

Acide 16 $\alpha$ -hydroxygypsogénique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-28-*O*-[ $\beta$ -Dxylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 4''')- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]

**Formule brute** : C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>O<sub>24</sub>

$[\alpha]_D - 13^\circ$ , C = 0,001, MeOH)

**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 1111 [M+Na]<sup>+</sup>  
 RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz)  
 dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III.13, pages 148-149)



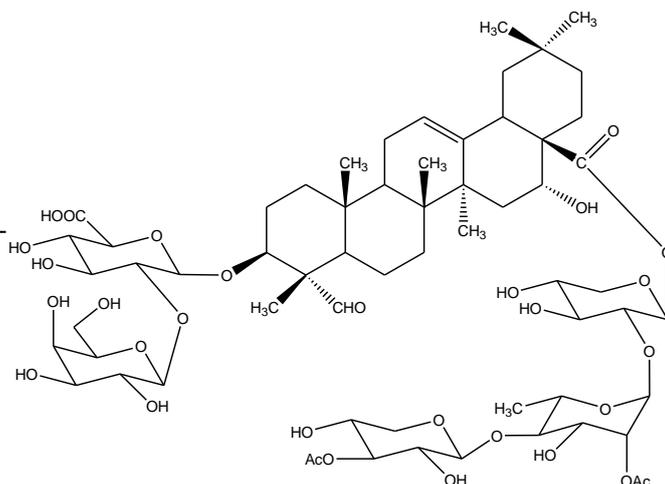
## VI-2-3-14 Composé 14

Acide quillaique 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 4''''')-((2''''-*O*-acétyl)- $\beta$ -D-xylopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 4''''')-((2''''-*O*-acétyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1'''' $\rightarrow$ 2''''')- $\beta$ -D-xylopyranosyl]

**Formule brute** : C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>O<sub>30</sub>

$[\alpha]_D - 12,1^\circ$  (C = 0,0019, MeOH)

**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 1341 [M+Na]<sup>+</sup>  
 1363 [M-H+2Na]<sup>+</sup>





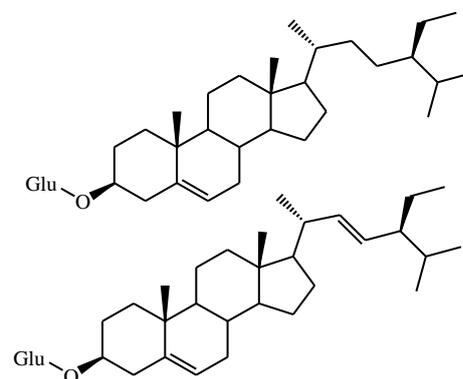
**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 511  $[M+Na]^+$   
 RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
 dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III.18, pages 186-187)

### VI-2-3-19 Composés 19 et 20

Daucostérol et Stigmastérol glucosylé

**Formule brute** : C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>

**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 499  $[M+Na]^+$   
 497  $[M+Na]^+$



### VI-2-3-20 Composés 21 et 22

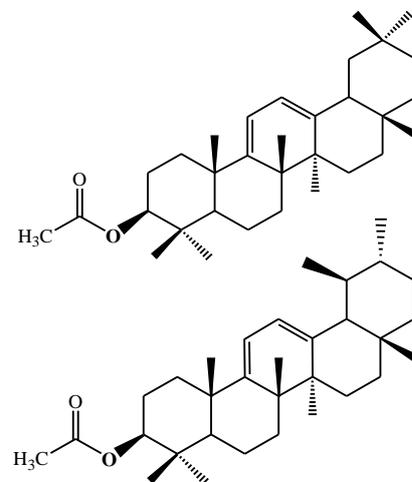
Oléana-9(11),12-diène-3-yl acétate

Ursa-9(11),12-diène-3-yl acétate

**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>

**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 489  $[M+Na]^+$   
 955  $[2M+Na]^+$

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
 dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableaux III.19 et III.20, pages 198-199)



### VI-2-3-21 Composés 23 et 24

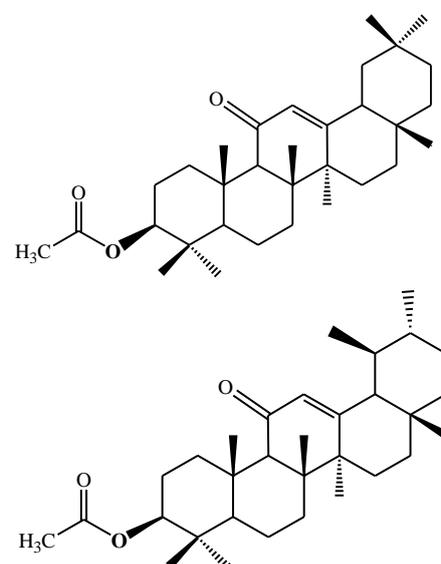
11-oxo-β-amyrine acétate

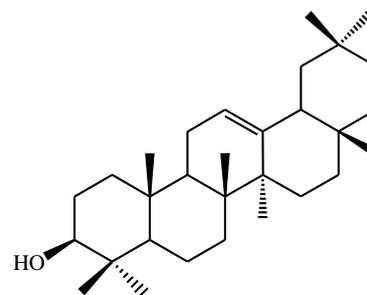
11-oxo-α-amyrine acétate

**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>

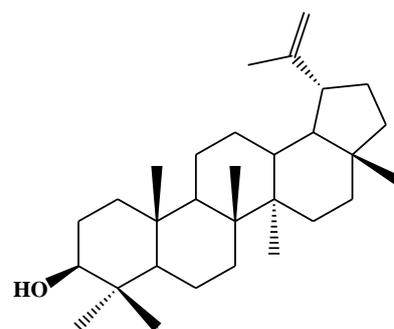
**MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 505  $[M+Na]^+$   
 987  $[2M+Na]^+$

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
 dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableaux III.21 et III.22, pages 206-207)

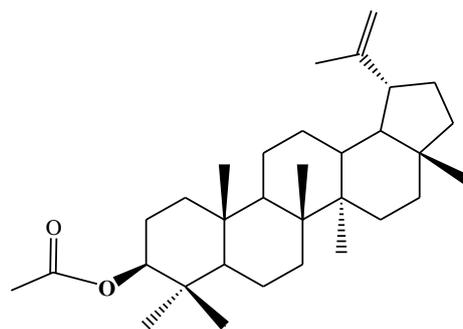


**VI-2-3-22 Composé 25** $\beta$ -amyrine**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 88,4° (C= 0,65, CHCl<sub>3</sub>)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 465 [M+K]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III.23, page 210)**VI-2-3-23 Composé 26**

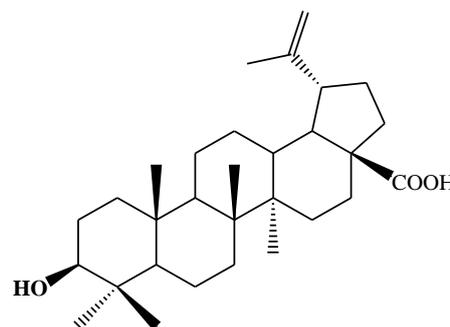
Lupéol

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 22,4° (C = 0,183, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 449 [M+Na]<sup>+</sup>876 [2M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III.24, page 218)**VI-2-3-24 Composé 27**

Lupéol acétate

**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 45° (C= 1,5, CHCl<sub>3</sub>)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 491 [M+Na]<sup>+</sup>959 [2M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III.25, page 221)**VI-2-3-25 Composé 28**

Acide bétunilique

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> - 2,5 (C= 0,005, CHCl<sub>3</sub>)**MS** : ESI (mode négatif) *m/z* : 455 [M-H]<sup>-</sup>911 [2M-H]<sup>-</sup>

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)  
dans ( $\text{CDCl}_3$ ) (Tableau III.26, page 226)

### VI-2-3-26 Composé 29

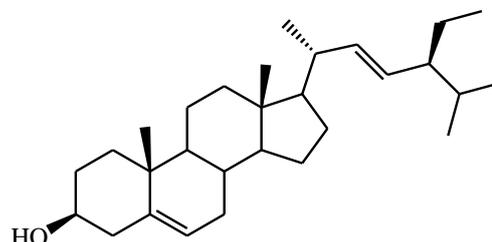
Stigmastérol

**Formule brute :**  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

$[\alpha]_{\text{D}} -50^\circ$  ( $\text{C} = 0,02$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 435  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)  
dans ( $\text{CDCl}_3$ ) (Tableau III.27, pages 227-228)



### VI-2-3-27 Composé 30

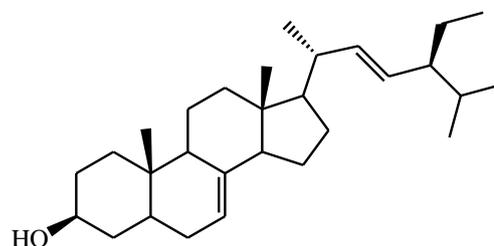
Spinastérol

**Formule brute :**  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

$[\alpha]_{\text{D}} -3,3^\circ$  ( $\text{C} = 0,56$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 435  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
847  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)  
dans ( $\text{CDCl}_3$ ) (Tableau III.28, page 231)



## VI-3 Etude phytochimique de l'espèce *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass.

### VI-3-1 Extraction

Les racines de la plante *Atractylis serratuloides* ont été séchées dans un endroit sec, aérée et à l'abri du soleil. Ces racines découpées et broyées finement (1,2 kg) sont mises à macérer dans un mélange hydro-alcoolique éthanol-eau (70 %), deux fois pendant 48 heures à température ambiante.

Après filtration et évaporation du solvant 420 ml d'extrait aqueux sont obtenus, 180 ml d'eau distillée sont additionnés. L'extraction liquide-liquide de cet extrait avec différents solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol), puis la séparation et l'évaporation des phases organiques conduisent à l'obtention de quatre extraits : Ep (34,5 g), DCM (8,2 g), AcOEt (1,5 g) et *n*-butanol (10 g).

## VI-3-2 Séparation et purification

## VI-3-2-1 Fractionnement de l'extrait éther de pétrole

Le fractionnement de l'extrait éther de pétrole (8 g) a été réalisé par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice normale (65 g) en utilisant comme éluant : Ep-éther diéthylique (100:0 à 0:100). A l'issue de ce fractionnement 16 fractions de 100 ml ont été recueillies. L'analyse des CCM de ces fractions a permis d'obtenir 8 fractions (Tableau VI.6).

**Tableau VI.6:** Fractionnement de l'extrait éther de pétrole des racines de l'espèce *A. serratuloïdes*

| Eluant (Ep-éther diéthylique) | Fractions collectées | Masse (mg) |
|-------------------------------|----------------------|------------|
| 95-5                          | F <sub>I</sub>       | 21,9       |
| 90-10 et 80-20                | F <sub>II</sub>      | 2395       |
| 70-30                         | F <sub>III</sub>     | 584        |
| 60-40 et 50-50                | F <sub>IV</sub>      | 2692       |
| 40-60                         | F <sub>V</sub>       | 852,9      |
| 30-70                         | F <sub>VI</sub>      | 643        |
| 20-80 et 10-90                | F <sub>VII</sub>     | 209,3      |
| 0-100                         | F <sub>VIII</sub>    | 117        |

La fraction F<sub>V</sub> (830 mg) est séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale (40 g). L'élution est effectuée par un mélange de solvants EP-éther diéthylique (100:0 à 50:50). Des fractions de 40 ml sont recueillies et regroupées selon leur profil en CCM pour donner 18 sous-fractions. La sous-fraction F<sub>V-10</sub> (17,7 mg) obtenue sous forme d'un précipité est lavée à l'éthanol pour donner 2,4 mg du composé **38**. La fraction F<sub>V-12</sub> est purifiée par plaques préparatives en phase normale dans le mélange de solvants : EP-AcOEt (15%) pour conduire au composé **32** (2,2 mg).

## VI-3-2-2 Fractionnement de l'extrait dichlorméthane

7 g de l'extrait dichlorméthane ont été fractionnés par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice normale. L'élution est réalisée par l'hexane dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle (100:0 à 0:100) puis par gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (100:0 à 50:50). Après rassemblement des fractions qui ont un profil chromatographique similaire, 8 fractions ont été obtenues (Tableau VI.7).

**Tableau VI.7 :** Fractionnement de l'extrait dichlorométhane des racines de l'espèce *A. serratuloides*

| Eluant                    | Fractions collectées | Masse (mg) |
|---------------------------|----------------------|------------|
| hexane-acétate d'éthyle   | F1                   | 38,6       |
| 90-10                     |                      |            |
| 80-20                     | F2                   | 53,1       |
| 70-30 et 60-40            | F3                   | 201,3      |
| 50-50 et 40-60            | F4                   | 410,4      |
| 40-60 et 30-70            | F5                   | 297        |
| 20-80 et 10-90            | F6                   | 672,1      |
| acétate d'éthyle-méthanol | F7                   | 249,1      |
| 100-0 à 95-5              |                      |            |
| 90-10 à 60-40             |                      |            |
|                           | F8                   | 3866       |

Les fractions F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub> réunies (605 mg) ont fait l'objet d'une séparation chromatographique sur colonne de gel de silice en phase normale, éluée par un mélange de solvants hexane-acétate d'éthyle (100:0 à 50:50) pour donner 18 sous-fractions. La sous-fraction F<sub>3-1</sub> (36 mg) est purifiée sur colonne de gel de silice normale avec un gradient de solvants hexane-chloroforme (100:0 à 90:10) pour obtenir deux composés **33** (6 mg) et **34** (3,3 mg). Les sous-fractions F<sub>3-6</sub> et F<sub>3-7</sub> ont été réunies, puis lavées à l'acétone pour conduire au composé **35** (2,6 mg).

La fraction F<sub>7</sub> (800 mg) est lavée par le méthanol permettant de récupérer 13,3 mg du composé **39**. Le filtrat obtenu est purifié sur colonnes de gel de silice normale et de Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant un mélange de CHCl<sub>3</sub>-MeOH à différents gradients et CHCl<sub>3</sub>-MeOH (50:50) successivement pour aboutir aux composés **36** (2,8 mg) et **37** (3,5 mg).

### VI-3-2-3 Fractionnement de l'extrait *n*-butanolique

Le fractionnement de l'extrait *n*-butanolique (7 g) a été réalisé par chromatographie liquide sous vide VLC sur gel de silice en phase inverse, en utilisant comme éluant un gradient de solvants : eau-méthanol (80:20 à 0:100). A l'issue de cette séparation 9 fractions ont été obtenues (Tableau VI.8).

**Tableau VI.8** : Fractionnement de l'extrait *n*-butanol des racines de l'espèce *A. serratuloides*

| Eluant : H <sub>2</sub> O–MeOH | Fractions collectées | Masse (mg) |
|--------------------------------|----------------------|------------|
| 80-20                          | F <sub>A</sub>       | 2791       |
| 80-20                          | F <sub>B</sub>       | 1924       |
| 60-40                          | F <sub>C</sub>       | 430,8      |
| 60-40                          | F <sub>D</sub>       | 174,6      |
| 40-60                          | F <sub>E</sub>       | 29         |
| 40- 60                         | F <sub>F</sub>       | 45,2       |
| 20-80                          | F <sub>G</sub>       | 37,2       |
| 20-80                          | F <sub>H</sub>       | 12,3       |
| 0-100                          | F <sub>I</sub>       | 19,9       |

La fraction F<sub>C</sub> (430 mg) est séparée sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant CHCl<sub>3</sub>–MeOH (50:50) comme éluant. Ce fractionnement a permis de recueillir 4 sous-fractions selon leur profil chromatographique. La sous-fraction F<sub>C-3</sub> (180,6 mg) est chromatographiée sur colonne de gel de silice normale éluee par un mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>–MeOH (100:0 à 80:20) pour conduire à 5 sous-fractions. La sous-fraction F<sub>C-3-3</sub> (15 mg) est purifiée par plaques préparatives de silice greffée en C-18 dans le mélange de solvants méthanol–eau (30:70) fournissant ainsi le composé **31** (3,1 mg).

### VI-3-3 Composés isolés de l'espèce *Atractylis serratuloides*

#### VI-3-3-1 Composé 31

Antiarol rutinoside

**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>

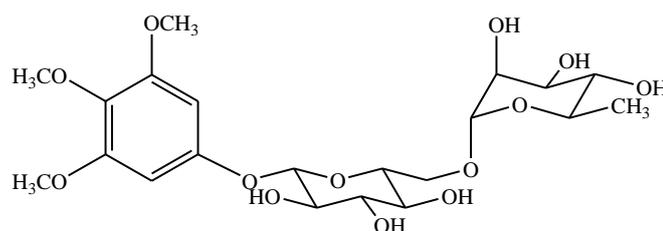
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> – 98° (C = 0,05, MeOH)

**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 515 [M+Na]<sup>+</sup>  
1007 [2M+Na]<sup>+</sup>

ESI (mode négatif) *m/z* : 527 [M+Cl]<sup>–</sup>

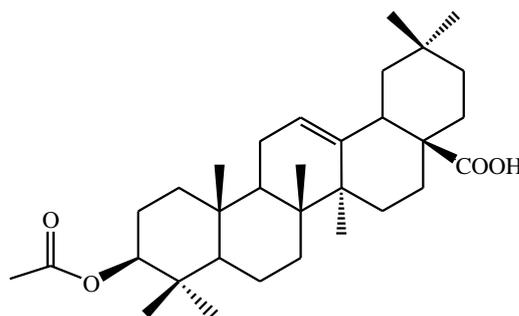
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)

dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau IV.1, page 247)

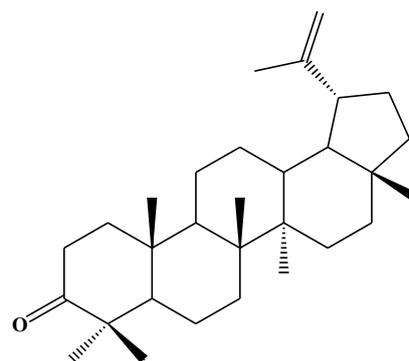


**VI-3-3-2 Composé 32**

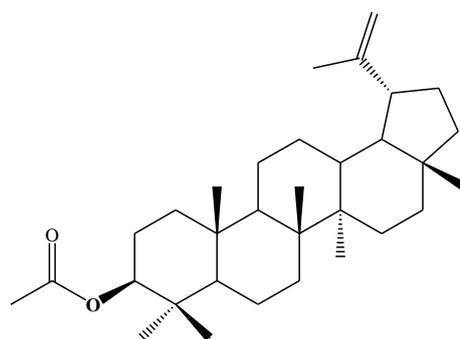
Acide 3-acétoxyoléan-12-èn-28-oïque

**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>[α]<sub>D</sub> + 75,2° (C = 0,75, CHCl<sub>3</sub>)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 521 [M+Na]<sup>+</sup>1019 [2M+Na]<sup>+</sup>ESI (mode négatif) *m/z* : 497 [M-H]<sup>-</sup>955 [2M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau IV.2, pages 256-257)**VI-3-3-3 Composé 33**

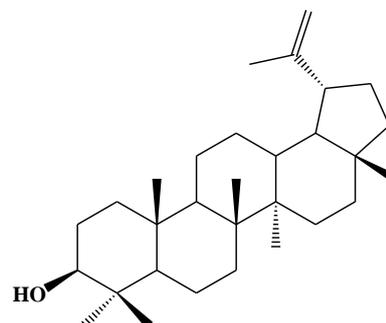
Lupénone

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O[α]<sub>D</sub> + 36,86° (C = 0,49, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* : 447 [M+Na]<sup>+</sup>871 [2M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau IV.3, page 265)**VI-3-3-4 Composé 34**

Lupéol acétate

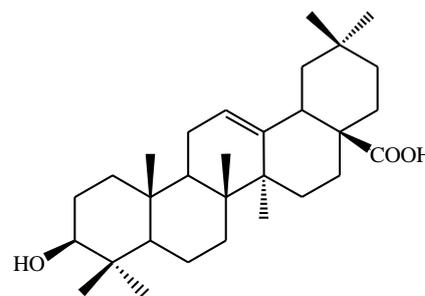
**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD)**VI-3-3-5 Composé 35**

Lupéol

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>ORMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)dans (CD<sub>3</sub>OD)

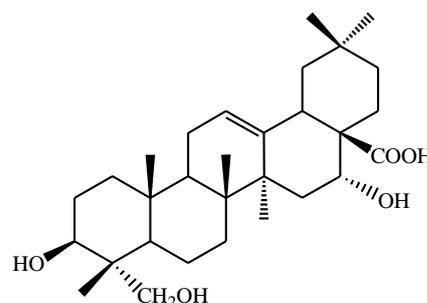
## VI-3-3-6 Composé 36

Acide oléanolique

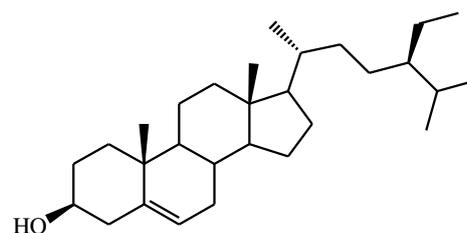
**Formule brute** :  $C_{30}H_{48}O_4$ **MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 479  $[M+Na]^+$ RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
dans ( $CDCl_3$ )

## VI-3-3-7 Composé 37

Caulophyllogénine

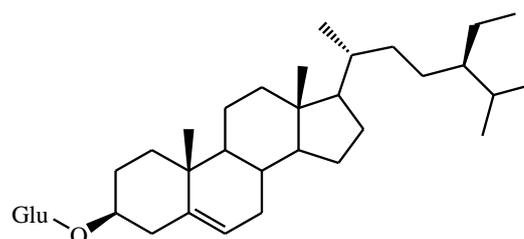
**Formule brute** :  $C_{30}H_{48}O_5$ **MS** : ESI (mode positif)  $m/z$  : 511  $[M+Na]^+$ RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
dans ( $CDCl_3$ )

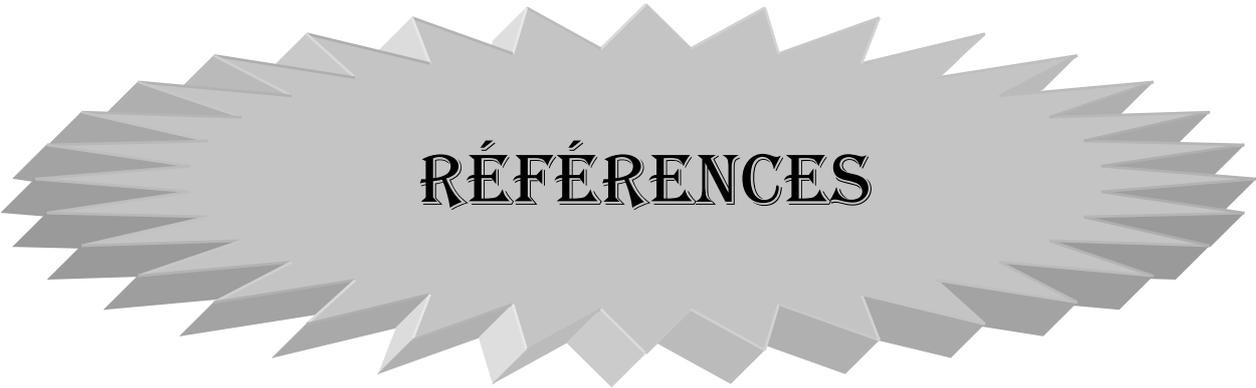
## VI-3-3-8 Composé 38

 $\beta$ -sitostérol**Formule brute** :  $C_{29}H_{50}O$  $[\alpha]_D -30^\circ$  (C= 0,8,  $CHCl_3$ )RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
dans ( $CDCl_3$ ) (Tableau IV.4, page 268)

## VI-3-3-9 Composé 39

Daucostérol

**Formule brute** :  $C_{35}H_{60}O_6$  $[\alpha]_D -41,5^\circ$  (C= 0,4, MeOH)RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz)  
dans ( $CDCl_3/CD_3OD$ ) (Tableau IV.5, page 269)



# RÉFÉRENCES

---

## Références bibliographiques

- [1] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France.
- [2] El Rhaffari, L., Zaid, A., 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Dans J. Fleurentin (éd.), Des sources du savoir aux médicaments du futur, IRD Editions, Paris, 293–318.
- [3] Melek, F. R., Aboutabl, E. A., El-Shabrawy, O., Radwan, A. S., Hilal, S. H., Hammam, A., 1992. *Atractylis carduus* angustifolia flavonoids and anti-inflammatory activity. Egypt. J. Pharm. Sci. 33, 11–19.
- [4] Melek, F. R., Radwan, A. S., Ahmed, A. A., Hamman, A. A., Aboutabl, E. A., 1989. Triterpenes from *Atractylis carduus* L. Pharmazie 44, 735.
- [5] Sadek, E. G., Metwally, M. A., Mpango, G. B., 1998. Triterpenes from *Atractylis Carduus* L. Boll. Chim. Farm. 137, 249–250.
- [6] Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D. E., Soltis, P. S., 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. Amer. J. Bot. 82, 1056–1068.
- [7] Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna A., Vilatersama, R., 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chlorochloroplast DNA analysis. Molec. Phylogenet. Evol. 22, 51–64.
- [8] Bohlmann, F., Schusterp, A., Meusel, H., 1981. A *Carlina* oxides derivative from *Carlina diae*. Phytochemistry 20, 823 – 824.
- [9] Kitajima, J., Kamoshita, A., Ishikawa, T., Takano, A., Fukuda, T., Isoda, S., Ida, Y., 2003. Glycosides of *Atractylodes lancea*. Chem. Pharm. Bull. 51, 673–678.
- [10] Kitajima, J., Kamoshita, A., Ishikawa, T., Takano, A., Fukuda, T., Isoda, S., Ida, Y., 2003. Glycosides of *Atractylodes ovata*. Chem. Pharm. Bull. 51, 1106–1108.
- [11] Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara, 3<sup>ème</sup> édition, Ed. CNRS, Paris, France.
- [12] Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., 1999. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.
- [13] Funk, V. A., Susanna, A., Steussy, T. F., Robinson, H. E., 2009. Classification of Compositae. In: Funk, V. A., Susana, A., Stuessy, T. F., Bayer, R. J., Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171–189.
- [14] Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E., 2000. Biologie végétale. Bruxelles, Book University.

- [15] Bremer, K., 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3, 210–253.
- [16] Bremer, K., 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*, Timber Press, Portland.
- [17] Bremer, K., Jansen, R. K., 1992. A new subfamily of the Asteraceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79, 414 – 415.
- [18] Baldwin, B. G., Wessa, B. L., Panero, J. L., 2002. Nuclear DNA evidence for major lineages of Hellenioid Heliantheae (Compositae). *Systematic Botany* 27, 161–198.
- [19] Panero, J. L., Funk, V. A., 2002. Toward a phylogenetic classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115, 909–922.
- [20] Panero, J. L., Funk, V. A., 2007. New infrafamilial taxa in Asteraceae. *Phytologia* 89, 356–360.
- [21] Panero, J. L., Funk, V. A., 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 757–782.
- [22] Cassini, H., 1819. Various articles in: *Dictionnaire de Sciences Naturelles*, Paris. Cited by King, R., Dawson, H. W., 1975. *Cassini on Compositae*. Oriole, New York.
- [23] Bentham, G., 1873. Compositae. 162–533 in Bentham, G., Hooker, J. D., *Genera Plantarum*. Lovell Reeve & Co., London.
- [24] Hoffmann, O., 1894. Compositae. 324–333 in Engler, A., Prantl, K., *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- [25] Wagenitz, G., 1976. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Pl. Syst. Evol.* 125, 29–46.
- [26] Dittrich, M., 1977. Cynareae-systematic review. 999–1015 in Heywood, V. H., Harborne, J. B., Turner, B. L., *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press, London–New York–San Francisco.
- [27] Calmes, M., Crespin, F., Maillard, C., Ollivier, E., Balansard, G., 1994. High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from *Atractylis gummifera* L. *J. Chromatography A* 663, 119–122.
- [28] Chaboud, A., Dellamonica, G., Raynaud, J., 1988. Neocorymboside, a di-C-glycosylflavone from *Atractylis gummifera*. *Phytochemistry* 27, 2360–2361.
- [29] Raynaud, M. J., Dombris, A., 1978. Contribution a l'étude des C-glycosyl flavonoides des feuilles d'*Atractylis gummifera* L. *Plantes médicinales et phytothérapie* 12, 220–224.
- [30] Aichi, M., 2009. Etude phytochimique de la plante *Atractylis cancellata*. Mémoire de magister, Université de Batna.
- [31] Besson, E., Dombris, A., Raynaud, J., Chopin, J., 1979. Coromboside, nouvelles di-C-glycoylflavone des racines de *Carlina corymbosa*. *Phytochemistry* 18, 1899–1900.

- [32] Piozzi, F., Savona, G., 1975. Triterpenoids from *Carlina corymbosa* var. *globosa*. *Phytochemistry* 14, 1662.
- [33] Wang, H.-X., Liu, C.-M., Liu, Q., Gao, K., 2008. Three types of sesquiterpenes from rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Phytochemistry* 69, 2088–2094.
- [34] Chen, Y., Wu, Y., Wang, H., Gao, K., 2012. A new 9-nor-atractylodin from *Atractylodes lancea* and the antibacterial activity of the atractylodin derivatives. *Fitoterapia* 83, 199–203.
- [35] Kim, Y.-C., Jun, M., Jeong, W.-S., Chung, S.-K., 2005. Antioxidant Properties of Flavone C-Glycosides from *Atractylodes japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation. *J. Food Sci.* 70, 575–580.
- [36] Kitajima, J., Kamoshita, A., Ishikawa, T., Takano, A., Fukuda, T., Isoda, S., Ida, Y., 2003. Glycosides of *Atractylodes japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 152–157.
- [37] Jeong, S.-I., Kim, S.-Y., Kim, S.-J., Hwang, B.-S., Kwon, T.-H., Yu, K.-Y., Hang, S.-H., Suzuki, K., Kim, K.-J., 2010. Antibacterial Activity of Phytochemicals Isolated from *Atractylodes japonica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 15, 7395–7402.
- [38] Chen, Z.-L., Cao, W.-Y., Zhou, G.-X., Wichtl, M., 1997. A sesquiterpene lactam from *Atractylodes macrocephala*. *Phytochemistry* 45, 765–767.
- [39] Abdel Rahman, S. M., Abd-Ellatif, S. A., Deraz, S. F., Khalil, A. A., 2011. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 10733–10743.
- [40] Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris M., Sayadi, S., 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 7017–7027.
- [41] Jeong, S.-I., Kim, S.-Y., Kim, S.-J., Hwang, B.-S., Kwon, T.-H., Yu, K.-Y., Hang, S.-H., Suzuki, K., Kim, K.-J., 2010. Antibacterial Activity of Phytochemicals Isolated from *Atractylodes japonica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 15, 7395–7402.
- [42] Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., Mazzanti, G., 2005. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 97, 175–181.
- [43] Skalli, S., Alaoui, I., Pineau, A., Zaid, A., Soulaymani, R., 2002. L'intoxication par le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) ; à propos d'un cas clinique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95, 284–286.

- [44] Su, L., Gourion, A, 1987. Utilisation des médicaments suivant le diagnostic dialectique des organes et des entrailles. *La Revue Française de Médecine Traditionnelle Chinoise* 125, 292–305.
- [45] Leporatti, M. L., Ivancheva, S., 2003. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol.* 87, 123–142.
- [46] Đorđević, S., Petrović, S., Dobrić, S., Milenković, M., Vučićević, D., Zizić, S., Kukić, J., 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109, 458–463
- [47] Leporatti, M. L., Pavesi, A., 1990. New or uncommon uses of several medicinal plants in some areas of central Italy. *J. Ethnopharmacol.* 29, 213–223.
- [48] Darias, V., Bravo, L., Rabanal, R., Sanchez Mateo, C., Gonzalez Luis, R. M., Hernandez Perez, A. M., 1989. New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *J. Ethnopharmacol.* 25, 77–92.
- [49] Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. (3), Paris.
- [50] Stalikas, C. D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295.
- [51] De Rijke E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31–63.
- [52] Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485–493.
- [53] Harborne, J. B., 1975. *Flavonoids in phytochemistry*, Vol. II, Edition Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Educational Publishing.
- [54] Iinuma, M., Mizuno, M., 1989. Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry* 28, 681–694.
- [55] Deluca, V., Ibrahim R. K., 1985. Enzymatic synthesis of polymethylated flavonols in *Chrysosplenium americanum*. II. Substrate interaction and product inhibition studies of flavonol 3-, 6-, and 4'-O-methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 238, 606–618.
- [56] Heller, W., Forkmann, G., 1988. Biosynthesis. In *the flavonoids advances in research since 1980*. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399–425.
- [57] Ebel, J., Hahlbrock, K., 1982. In *the flavonoids advances in research* eds J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall, London, 641–659.

- [58] Kuo, S.-H., Yen, M.-H., Chung, M.-I., Lin C.-N., 1996. A flavones C-glycoside and an aromatic glucoside from *Gentiana* species. *Phytochemistry* 41, 309–312.
- [59] Lin, C.-N., Kuo, S.-H., Chung, M.-I., 1997. A new flavone C-glycoside and antiplatelet and vasorelaxing flavones from *Gentiana arisanensis*. *J. Nat. Prod.* 60, 851–853.
- [60] Leitão, S. G., Delle Monache, F., 1998. 2"-O-caffeoylorientin from *Vitex polygama*. *Phytochemistry* 49, 2167–2169.
- [61] Afifi, F. U., Khalil, E., Abdalla, S., 1999. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. *J. Ethnopharmacol.* 65, 173–177.
- [62] Moreira, D. D. L., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C., 2000. A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry* 55, 783–786.
- [63] Miyake, Y., Yamamoto, K., Morimitsu, Y., Osawa T., 1997. Isolation of C-glucosylflavone from *lemon peel* and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4619 – 4623.
- [64] Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., Ma, L., Liao, N., Xu, X., 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujuba Mill* var. *spinosa*. *Tetrahedron* 56, 8915–8920.
- [65] Chopin, J., 1966. *Actualité de phytochimie fondamentale*, IIème série, édition Masson, Paris, 119.
- [66] Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. G., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M., 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 3581–3589.
- [67] Kawaii, S., Lansky, E. P., 2004. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Med. Food* 7, 13–18.
- [68] Sumner, M. D., Elliott-Eller, M., Weidner, G., Daubenmier, J. J., Chew, M. H., Marlin, R., Raisin, C. J., Ornish, D., 2005. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 96, 810–814.
- [69] Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix, J. J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121–216.
- [70] De Barros, M. P., Lemos, M., Maistro, E. L., Leite, M. F., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., De Andraded, S. F., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J. Ethnopharmacol.* 120, 372–377.

- [71] Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruabgrungsi, N., Okuda, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H., 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66, 567–572.
- [72] Win, N. N., Awale, S., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 8653–8660.
- [73] Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi- Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D.J., 2009. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their  $\alpha$ -lipoic acid adducts. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3020–3026.
- [74] Kalkhambar, R. G., Kulkarni, G. M., Shivkumar, H., Rao, R. N., 2007. Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 1272–1276.
- [75] Smyth, T., Ramachandran, V. N., Smyth, W. F., 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 33, 421–426.
- [76] Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S., Pizza, C., 2007. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry* 68, 554–561.
- [77] Rao, Y. K., Fang, S. H., Hsieh, S. C., Yeh, T. H., Tzeng, Y. M., 2009. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *J. Ethnopharmacol.* 121, 292–296.
- [78] Maurya, R., Gupta, P., Chand, K., Kumar, M., Dixit, P., Singh, N., Dube, A., 2009. Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani*. *Nat. Prod. Res.* 23, 1134–1143.
- [79] Shon, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kang, S. S., 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 11, 666–672.
- [80] Ko, W. G., Kang, T. H., Lee, S. J., Kim, N. Y., Kim, Y. C., Sohn, D. H., Lee, B. H., 2000. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem. Toxicol.* 38, 861–865.

- [81] Hirata, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M., Hongo, D., 2009. Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 25–28.
- [82] Ganapaty, S., Pannakal, S. T., Srilakshmi, G. V. K., Lakshmi, P., Waterman, P. G., Brun, R., 2008. Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochem. Lett.* 1, 175–178.
- [83] Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A., Moulis, C., 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68, 1312–1320.
- [84] Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S., 2009. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *J. Ethnopharmacol.* 121, 360–365.
- [85] Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Brito A.R.M. S., Vilegas, W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.* 97, 1–6.
- [86] Sutradhar, R. K., Rahman, A. K. M. M., Ahmad, M. U., Bachar, S. C., 2008. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochem. Lett.* 1, 179–182.
- [87] Choi, H. J., Kim, J.-H., Lee, C.-H., Ahn, Y. J., Song, J.-H., Baek, S.-H., Kwon, D.-H., 2009. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res.* 81, 77–81.
- [88] Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., Takahara, Y., 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33, 557–561.
- [89] Kubata, B.K., Nagamune, K., Murakami, N., Merkel, P., Kabututua, Z., Martin, S. K., Kalulug, T. M., Mustakuk, H., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama M., Kinoshita, T., Duszenko, M., Uradea, Y., 2005. *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol.* 35, 91–103.
- [90] Küpeli, E., Erdemoğlu, N., Yeşilada, E., Şener, B., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J. Ethnopharmacol.* 89, 265–270.
- [91] Kim, J. Y., Lim, H. J., Lee, D. Y., Kim, J. S., Kim, D. H., Lee, H. J., Kim, H. D., Jeon, R., Ryu, J. H., 2009. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 937–940.

- [92] Borsato, M. L. C., Graef, C. F. F., Souza, G. E. P., Lopes, N. P., 2000. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 55, 809–813.
- [93] Martins, R. C. C., Lago, J. H. G., Albuquerque, S., Kato, M. J., 2003. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 64, 667–670.
- [94] Felipe, L. G., Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Bolzani, V.S., Guimaraes, E. F., Cicarelli, R. M. B., Furlan, M., 2008. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* 69, 445–450.
- [95] Filho, A. A. S., Costa, E. S., Cunha, W. R., da Silva, M. L. A., Nanayakkara, N. P. D., Bastos, J.K., 2008. In vitro Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phyther. Res.* 22, 1307–1310.
- [96] Barata, L. E. S., Santos, L. S., Ferri, P. H., Phillipson, J. D., Paine, A., Croft, S. L., 2000. Antileishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55, 589–595.
- [97] Dey, P. M., Harborne, J. B., 1991. *Methods in plant biochemistry*. Volume 7. Terpenoids. Academic press.
- [98] Manitto, P., 1981. *Biosynthesis of natural products*. John Willey et sons. New York.
- [99] Milcent, R., Chau, F., 2003. *Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels*, EDP sciences.
- [100] Dewick, P. M., 1999. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 16, 97–130.
- [101] Schulte, A. E., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 1999. Microplate enzyme coupled assays of mevalonate and phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* suspension cultured cells. *Anal. Biochem.* 269, 245–254.
- [102] Bonanno, J. B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M. J., Ilyn, V., Gerchman, S. E., Studier, F. W., Sali, A., Burley, S. K., 2001. Structural genomics of enzymes involved in sterol/ isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 12896–12901.
- [103] Fernandez, M. A., De las Heras, B., Garcia, M. D., Sáenz, M. T., Villar, A. 2001. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene Iupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1533–1539.
- [104] Patocka, J., 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine significance. *J. Appl. Biomed.* 1, 7–12.

- [105] Susunaga, G. S., Siani, A. C., Pizzolatti, M. G., Yunesb, R. A., Delle Monache, F., 2001. Triterpenes from the Resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia* 72, 709–711.
- [106] Sharma, R., Singh, S., Singh, G. D., Khajuria, A., Sidiq, T., Singh, S.K., Chashoo, G., Pagoch, S. S., Kaul, A., Saxena, A. K., Johri, R. K., Taneja, S. C., 2009. In vivo genotoxicity evaluation of a plant based antiarthritic and anticancer therapeutic agent Boswellic acids in rodents. *Phytomedicine* 16, 1112–1118.
- [107] Marques-Martin, A., De La Puerta, R., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., Yaqoob, P., 2006. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* 36, 211–217
- [108] Jang, S. M., Yee, S. T., Choi, J., Choi, M. S., Do, G. M., Jeon, S. M., Yeo, J., Kim, M. J., Seo, K. I., Lee, M. K., 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic b-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *Int. immunopharmacol.* 9, 113–119.
- [109] Safayhi, H., Sailer, E.-R., 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.* 63, 487–493.
- [110] Fulda, S., Friesen, C, Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nunez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E., Debatin, K. M., 1997. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)-and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 57, 4956–4964.
- [111] Schmidt, M. L., Kuzmanoff, K. L., Ling-Indeck, L., Pezzuto, J. M., 1997. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* 33, 2007–2010.
- [112] Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., Formelli, F., 2002. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175, 17–25.
- [113] Zhang, Y.-S., Tu, Y.-Y., Gao, X.-C., Yuan, J., Li, G., Wang, L., Deng, J.-P., Wang, Q., Ma, R.-M., 2012. Strong Inhibition of Celastrol Towards UDP Glucuronosyl Transferase (UGT) 1A6 and 2B7 Indicating Potential Risk of UGT-Based Herb-Drug Interaction. *Molecules* 17, 6832–6839.
- [114] Wong, N.C., 2001. The beneficial effect of plant sterols on serum cholesterol. *Can. J. Cardiol.* 17, 715–721.
- [115] Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., Patil, A. N., 2012. Analgesic and anti inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology* 20, 219–224.

- [116] Djoukeng, J. D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Tapondjou, A. L., Bouda, H., Lontsi, D., 2005. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 101, 283–286.
- [117] Sparg, S. G., Light, M. E., Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219–243.
- [118] Dewick, P. M., 2002. Medicinal natural products A biosynthetic approach. 2ème Ed. Wiley.
- [119] Dini, I., Tenore, G. C., Schettino, O. and Dini, A., 2001. New oleanane saponins in *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3976–3981.
- [120] Xia, Z. H., Zou, M. L., Sang, S. M., Lao, A. N., 2004. Segetoside L, A New Triterpenoid saponin from *Vaccaria segetalis*. *Chin. Chem. Lett.* 15, 55–57.
- [121] Alabdul Magid, A., 2005. Étude chimique de deux Caryocar de Guyane et d'un Guioa de Nouvelle Calédonie. Thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne.
- [122] Yalcin, F. N., Piacente, S., Perrone, A., Capasso, A., Duman, H., Çalis, I., 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm. *Phytochemistry* 73, 119–126.
- [123] Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osborn, A. E., 2002. *Biothecology* 75, 31–49.
- [124] Hostettman, K. A., Marston, A., 1995. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University, Press, Cambridge, UK.
- [125] Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* 88, 587–605.
- [126] Seeman, P., Cheng, D., Iles, G. H., 1973. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell. Biol.* 56, 519–527.
- [127] Vincken, J. P., Heng, L., De Groot, A., Gruppen, H., 2007. Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275–297.
- [128] Huang, H. C., Liao, S. C., Chang, F. R., Kuo, Y. H., Wu, Y. C., 2003. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4916–4919.
- [129] Speroni, E., Cervellati, R., Innocenti, G., Costa, S., Guerra, M.C., Dall'Acqua, S., Govoni, P., 2005. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *J. Ethnopharmacol.* 98, 117–125.
- [130] Just, M. J., Recio, M. C., Giner, R. M., Cuellar, M. J., Manez, S., Bilia, A. R., Rios, J. L., 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.* 64, 404–407.

- [131] Delmas, F., Di Giorgio, C., Elias, R., Gasquet, M., Azas, N., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E., Timon-David, P., 2000. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med.* 66, 343–347.
- [132] Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., Adlouni, A., 2006. Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer invest.* 24, 588–592.
- [133] Yu, B., Tao, H., 2002. Glycosyl trifluoroacetimidates. 2. Synthesis of dioscin and Xiebai saponin I. *J. Org. Chem.* 67, 9099–9102.
- [134] Plohmann, B., Bader, G., Hiller, K., Franz, G., 1997. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie* 52, 953–957.
- [135] Chang, W., Yu, C. Y., Lin, T. W., Wang, P. H., Tsai, Y. C., 2006. Soyasaponin I decreases the expression of alpha 2, 3- linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 614–619.
- [136] Kang, J., Sung, M. K., Kawada, T., Yoo, H., Kim, Y. K., Kim, J. S., Yu, R., 2005. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer lett.* 230, 219–227.
- [137] Oh, Y., Sung, M. K., 2001. Soybean Saponins Inhibit Cell Proliferation by Suppressing PKC Activation and induce Differentiation of HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Nutr. Cancer* 39, 132 – 138.
- [138] Ellington, A. A., Berhow, M., Singletary, K. W., 2006. Inhibitions of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 298–306.
- [139] Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70, 561–563.
- [140] Gosse, B., Gnabre, J., Bates, R. B., Dicus, C. W., Nakkiew, P., Huang, R. C., 2002. Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. *J. Nat. Prod.* 65, 1942–1944.
- [141] Kinjo, J., Yokomizo, K., Hirakawa, T., Shii, Y., Nohara, T., Uyeda M., 2000. Antiherpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 887–889.
- [142] Kuroyanagi, M., Sato, M., Ueno, A., Nishi, K., 1987. Flavanoids from *Andrographis paniculata*. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 4429–4435.

- [143] Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estévez, F., León, F., Bermejo, J., Benayache, F., 2009. A flavonol with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem. Lett.* 2, 114–118.
- [144] Merfort, I., Wendisch, D., 1987. Flavonoid glycoside aus *Arnica Montana* und *Arnica chamissonis*. *Planta Med.* 53, 434–437.
- [145] Agrawal, P. K., 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307–3330.
- [146] Bock, K., Pedersen, C., 1983. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of monosaccharides *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 27–49.
- [147] Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T. J., 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389–1397.
- [148] Cao, X., Wei, Y., Ito, Y., 2009. Preparative isolation of isorhamnetin from *Stigma maydis* using high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32, 2732–2780.
- [149] Liu, H., Orjala, J., Sticher, O., Rali, T., 1999. Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *J. Nat. Prod.* 62, 70–75.
- [150] Yang, X.-W., Ma, Y.-L., He, H.-P., Wang, Y.-H., Di, Y.-T., Zhou, H., Li, L., Hao, X.-J., 2006. Iridoid Constituents of *Tarenna attenuata*. *J. Nat. Prod.* 69, 971–974.
- [151] Şahin, F. P., Ezer, N., Çalış, İ., 2004. Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. *Phytochemistry* 65, 2095–2099.
- [152] Kite, G. C., Stoneham, C. A., Veitch, N. C., 2007. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. *Phytochemistry* 68, 1407–1416.
- [153] Ersöz, T., Harput, Ü. Ş., Saracoğlu, İ., Çalış, İ., 2002. Phenolic Compounds from *Scutellaria pontica*. *Turk. J. Chem.* 26, 581–588.
- [154] Fossen, T., Andersen, O. M., 2006. « Spectroscopic techniques applied to flavonoids » in Andersen, O. M., Markham, K. R., (eds.) *Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications*, Taylor & Francis: New York, 37–143.
- [155] Lin, Y., Kong, L., 2006. Studies on the Chemical Constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. *Asian J. Trad. Med.* 1, 34–37.
- [156] Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Izzo, A., Letizia, M., Esposito, A., Monaco, P., 2008. Potential allelopathic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 691–698.

- [157] Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., Paris, R. R., 1978. Flavonoids from *Piper marginatum* isolation of a new Flavonoid, the Marginatoside. *Planta Med.* 33, 46–52.
- [158] Ferreres, F., Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Ferreira, M. A., 2003. Approach to study of  $\alpha$ -glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.* 14, 352–359.
- [159] Leong, A. C.-N., Kinjo, Y., Tako, M., Iwasaki, H., Oku, H., Tamaki, H., 2010. Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). *Food Chemistry* 119, 630–635.
- [160] Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I. A., 2007. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry* 68, 609–615.
- [161] Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., 2002. Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 1051–1054.
- [162] Saleh, N. A. M., Mansour, R. M. A., Markham, K. R., 1990. An acylated isorhamnetin glycoside from *Aerva javanica*. *Phytochemistry* 29, 1344–1345.
- [163] Bencheraiet, R., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Jay, M., 2012. Flavonol 3-O-Glycosides from Three Algerian *Bupleurum* Species. *Rec. Nat. Prod.* 6, 171–174.
- [164] Muley, B. P., Khadabadi, S. S., Banarase, N. B., 2009. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 8, 455–465.
- [165] Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2013. Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance. *Rec. Nat. Prod.* 7, 105–113.
- [166] Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Partilkhayev, V. V., Rokhin, A. V., 2012. Chemical constituents of *Caragana bungei* shoots. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 490–496.
- [167] Mitova, M., Taskova, R., Popov, S., Berger, R. G., Krings, U., Handjieva, N., 2003. GC/MS analysis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch* 58c, 697–703.
- [168] Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y., Kargioglu, M., 2002. Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry* 61, 433–437.
- [169] Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Rec. Nat. Prod.* 6, 292–295.

- [170] Cho, H., Yun, C., Park, W., Kong, J., Kim, K. S., Park, Y., Lee, S., Kim, B., 2004. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and INOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol. Res.* 49, 37–43.
- [171] Sathiavelu, J., Senapathy, G. J., Devaraj, R., Namasivayam, N., 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 809–817.
- [172] Moussaoui, F., Zellagui, A., Segueni, N., Touil, A., Rhouati, S., 2010. Flavonoid Constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and Their Antimicrobial Activity. *Rec. Nat. Prod.* 4, 91–95.
- [173] Schinor, E. C., Salvador, M. J., Ito, I. Y., Dias, D. A., 2007. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolates constituents from *Chresta scapigera*. *Braz. J. Microbiol.* 38, 145–149.
- [174] Meng, Y., Krzysiak, A. J., Durako, M. J., Kunzelman, J. I., Wrigh, J. L.C., 2008. Flavones and flavone glycosides from *Halophila johnsonii*. *Phytochemistry* 69, 2603–2608.
- [175] Park, J., Hyunkim, S., Sungkim, T., 2006. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via down-regulation of NF-AT DNA binding activity by Apigenin a flavonoid present in dietary plants. *Immunol. lett.* 103, 108–114.
- [176] Siddique, Y-H., Beg, T., Afzal, M., 2008. Antigenotoxic effect of Apigenin against anticancerous drugs. *Toxicol. n vitro* 22, 625–631.
- [177] Choi, Y. H., Kim, H. K., Linthorst, H. J. M., Hollander, J. G., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Nuzillard, J.-M., Verpoorte, R., 2006. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Nat. Prod.* 69, 742–748.
- [178] Ahmed, Z. F., Rimpler, H., Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Ismail, S. I., 1970. The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry* 9, 1595–1601.
- [179] Janssen, K., Mensink, R. P., Cox, F. J., Harryvan, J. L., Hollman, P. C., Katan, M. B., 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *J. Clin. Nutr.* 67, 255–262.
- [180] McAnlis, G. T., McEneny, J., Pearce, J., Young, I. S., 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53, 92–96.
- [181] Thornhill, S. M., Kelly, A. M., 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altern. Med. Rev.* 5, 448–454.

- [182] Tarayre, J. P., Laouressergues, H., 1977. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non steroid anti-inflammatory agents. *Arzneimittel forschung*. 27, 1144–1149.
- [183] Farjam, M. H., Rustaiyan, A., Ezzatzadeh, E., Jassbi, A. R., 2013. Labdane-Type Diterpene and Two Flavones from *Salvia Sharifii* Rech. f. and Esfan. and their Biological Activities. *Iran. J. Pharm. Res.* 12, 395–399.
- [184] Gonzalez Collado, I., Macias, F. A., Massanet, G. M., Rodriguez Luis, F., 1985. Flavonoids from *Centaurea clementei*. *J. Nat. Prod.* 48, 819–822.
- [185] Öksüz, S., Halfon, B., Terem, B., 1988. Flavonoids of *Centaurea cuneifolia*. *Planta Med.* 54, 89.
- [186] M., Ferhat, H., Harkat, C., Lavaud, H., Haba, C., Long, M., Benkhaled, 2010. Iridoids and flavonoid from *Linaria aegyptiaca* (L.) Dum. subsp. fruticosa. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 833–835.
- [187] Alkhatib, R., Joha, S., Cheok, M., Roumy, V., Idziorek, T., Preudhomme, C., Quesnel, B., Sahpaz, S., Bailleul, F., Hennebelle, T., 2010. Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Med.* 76, 86–87.
- [188] Hua, Y., Wang, H.-Q., 2004. Chemical Components of *Anaphalis sinica* Hance *J. Chin. Chem. Soc.* 51, 409–415.
- [189] Jia, Z., Koike, K., Nikaido, T., 1999. Saponarioside C, the first alpha-D galactose containing triterpenoid saponin, and five related compounds from *Saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.* 62, 449–53.
- [190] Shao, Y., Ho, C.-T., Chin, C.-K., Rosen, R. T., HU, B., Qin, G.-W., 1997. Triterpenoid saponins from *Aster lingulatus*. *Phytochemistry* 44, 337–340.
- [191] Ishii, H., Kitagawa, I., Matsushita, K., Shirakawa, K., Tori, K., Tozyo, T., Yoshikawa, M., Yoshimura, Y., 1981. The configuration and conformation of the arabinose moiety in platycodins, saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*, and mi-saponins from *Madhuca longifolia* based on carbon-13 and hydrogen-1 NMR spectroscopic evidence: the total structures of saponins. *Tetrahedron Lett.* 22, 1529–1532.
- [192] Wang, P., Li, C., Zang, J., Song, N., Zhang, X., Li, Y.X, 2005. Synthesis of two bidesmosidic ursolic acid saponins bearing a 2,3-branched trisaccharide residue. *Carbohydr. Res.* 340, 2086–2096.
- [193] Li Ren, Yong-Xiang Liu, Dan Lv, Mao-Cai Yan, Han Nie, Yang Liu and Mao-Sheng Cheng, 2013. Facile Synthesis of the Naturally Cytotoxic Triterpenoid Saponin Patrinia-Glycoside B-II and Its Conformer. *Molecules* 18, 15193–15206.

- [194] Nie, W., Luo, J.-G., Kong, L.-Y., 2010. Triterpenoid Saponins from Roots of *Gypsophila pacifica*. *Chinese Herbal Medicines* 2, 145–147
- [195] Han, L.-F., Zhao, J., Zhang, Y., Kojo, A., Liu, E.-W., Wang, T., 2013. Chemical Constituents from Dried Aerial Parts of *Eclipta prostrate*. *Chinese Herbal Medicines* 5, 313–316.
- [196] Labbe, C., Roviroso, J., Faini, F., Mahu, M., San-Martin, A., Castillo, M., 1986. Secondary Metabolites from Chilean *Baccharis* species. *J. Nat. Prod.* 49, 517–518.
- [197] Lee, S. O., Choi, S. Z., Choi, S. U., Ryu, S. Y., Lee, K. R., 2004. Phytochemical constituents of the aerial parts from *Aster hipidus*. *Nat. Prod. Sci.* 10, 335–340.
- [198] Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57–68.
- [199] Feng, J.-H., Chen, W., Zhao, Y., Ju, X.-L., 2009. Anti-Tumor Activity of Oleanolic, Ursolic and Glycyrrhetic Acid. *Open Nat. Prod. J.* 2, 48–52.
- [200] Mahato, S. B., Kundu, A. P., 1994. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575.
- [201] Joshi, B. S., Singh, K. L., Roy, R., 1999. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the pentacyclic triterpene hederagenin from *Nigella sativa* Linn. *Magn. Reson. Chem.* 37, 295–298.
- [202] Strigina, L. I., Chetyrina, N. S., Isakov, V. V., Dzizenko, A. K., Elyakov, G. B., 1974. Caulophyllogenin: A novel triterpenoid from roots of *Caulophyllum robustum*. *Phytochemistry* 13, 479–480.
- [203] Mikhova, B., Duddeck, H., Taskova, R., Mitova, M., Alipieva, K., 2004. Oxygenated Bisabolane Fucosides from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch.* 59c, 244–248.
- [204] Tanaka, R., Matsunaga, S. 1988. Triterpene dienols and other constituents from the bark of *Phyllanthus flexuosus*. *Phytochemistry* 27, 2273–2277.
- [205] Matsunaga, S., Tanaka, R., Akagi, M. 1988. Triterpenoids from *Euphorbia maculata*. *Phytochemistry* 27, 535–537.
- [206] Toriumi, Y., Kakuda, R., Kikuchi, M., Yaoita, Y., Kikuchi, M., 2003. New Triterpenoids from *Gentiana lutea*. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 89–91.
- [207] Fingolo, C. E., Santos, T. D., Vianna Filho, M. D. M., Kaplan, M. A. C., 2013. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae) *Molecules* 18, 4247–4256.
- [208] Bandaranayake, W. M., 1980. Terpenoids of *Canarium zeylanicum*. *Phytochemistry* 19, 255–257.

- [209] Souza, J. M., Taleb-Contini, S. H., Oliveira, D. C. R., 2006. Phytochemical study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W.C. Holmes. Rev. Bras. Cienc. Farm. 42, 265–268.
- [210] Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K., Ageta, H., 1999. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II. Biol. Pharm. Bull. 22, 606–610.
- [211] K. S., El Deeb, R. A., Al-Haidari, J. S., Mossa, A.-M., Ateya, 2003. Phytochemical and Pharmacological Studies of *Maytenus Forsskaoliana*. Saudi Pharm. J. 11, 184–191.
- [212] Endale, A., Wray, V., Murillo, R., Schmidt, P. C., Merfort, I., 2005. Hopane-type saponins from the seeds of *Glinus lotoides*. J. Nat. Prod. 68, 443–446.
- [213] Jehle, M., Bano, J., Ellmerer, E. P., Zidorn, C., 2010. Natural products from *Scorzonera aristata*, Asteraceae. Nat. Prod. Comm. 5, 725–727.
- [214] Gallo, M. B. C., Sarachine, M. J., 2009. Biological activities of lupeol. Int. J. Biomed. Phamac. Sci. 3, 46–66.
- [215] Di Stefano, V., Pitonzo, R., 2012. Phytochemical Studies on *Ptilostemon greuteri* Raimondo & Domina (Compositae). Rec. Nat. Prod. 6, 390–393.
- [216] Uddin, G., Waliullah, Siddiqui, B. S., Alam, M., Sadat, A., Ahmad, A., Uddin, A., 2011. Chemical Constituents and Phytotoxicity of Solvent Extracted Fractions of Stem Bark of *Grewia optiva* Drummond ex Burret. Middle-East J. Sci. Res. 8, 85–91.
- [217] Choi, J. Y., Na, M., Hyun Hwang, I., Ho Lee, S., Young Bae, E., Yeon Kim, B., Seog Ahn, J., 2009. Isolation of Betulinic Acid, its Methyl Ester and Guaiane Sesquiterpenoids with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from the Roots of *Saussurea lappa* C.B. Clarke. Molecules 14, 266–272.
- [218] Xi, Z. X., Wang, Y., Zhao, G. J., Li, X., Wu, Z. J., Sun, L. N, 2011. Chemical constituents of petroleum ether fractions of *Gnaphalium affine* D. Don. Acad. J. Second Military Med. Univ. 32, 311–313.
- [219] Kamboj, A., Saluja, A., 2011. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 3, 94–96.
- [220] Azizudin, Choudhary, M. I., 2008. Compounds Isolated from *Tannacetum polycephalum*. Turk. J. Chem. 32, 201–204.
- [221] Moreira, F. P. M., Voutinho, V., Pimentel, A. B., Caro, M. S. P., Costa, I. M., Pizzolatti, M. G., Delle, F., 2003. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia*: bioactivity on *Artemia salina*. Quim. Nova 26, 309–911.

- [222] Lan, Y., Hui-zi, J., Li-yue, N., Jiang-jiang, Q., Jian-jun, F., Wei-dong, Z., 2011. Chemical Constituents from *Inula nervosa* Wall. Nat. Prod. Res. Dev. 23, 258–261.
- [223] Ragasa, C. Y., Espineli, D. L., Mandia, E. H., Don, M.-J., Shen, C.-C., 2012. A new triterpene from *Glinus oppositifolius*. Chin. J. Nat. Med. 10, 284–286.
- [224] Edouard Le Floch, 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Editions Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique page 1031.
- [225] Pamar, V. S., Gupta, S., Bisht, K. S., Mukherjee, S., Boll, P. M., Errington, W., 1996. Synthesis and X-ray structure of 2-(3-methyl-2-butenyl)-3,4,5-trimethoxyphenol : a potent anti-invasive agent against solid tumours. Acta Chem. Scand. 50, 558–560.
- [226] Andrianaivoravelona, J. O., Terreaux, C., Sahpaz, S., Rasolondramanitra, J., Hostettmann, K., 1999. A phenolic glycoside and N-(p-coumaroyl)-tryptamine from *Ravensara anisata*. Phytochemistry 52, 1145–1148.
- [227] Ahmed, E., Malik, A., Munawar, M. A., Nagra, S. A., Ahmed, M. M., Anwar, J., Qazi, M. A., Sharif, A., Afza, N., Ashraf, M., 2008. Antifungal and antioxidant constituents from *Silybum mariarum*. J. Chem. Soc. Pak. 30, 942–949.
- [228] Zhu, C.-C., Gao, L., Zhao, Z.-X., Lin, C.-Z., 2012. Triterpenes from *Callicarpa integerrima* Champ. Acta Pharm. Sinic. 47, 77–83.
- [229] Prachayasittikul, S., Saraban, P., Cherdtrakulkiat, R., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V., 2010. New Bioactive Triterpenoids and Antimalarial Activity of *Diospyros rubra* Lec. EXCLI J. 9: 1–10.
- [230] Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheogenic *E. coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201.
- [231] Philippon, A., 1995. Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. Lett. Infectiol. 10, 619–630.
- [232] Nauciel, C., 2000. Bactériologie médicale, Masson(Ed).Paris.
- [233] Chambers, H. F., 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 10, 781–791.
- [234] Bauer, A.W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45, 493–496.
- [235] Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K., 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shell fish. Brusci. Brotech-Brochem. 58, 1780–1783.

## Résumé

Ce travail fait partie du programme de recherche de notre groupe de phytochimie du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) qui porte sur la valorisation des plantes médicinales, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle en Afrique du nord (Algérie, Maroc et Tunisie), par la recherche de nouveaux principes actifs à activités biologiques intéressantes. Dans ce contexte, deux plantes médicinales de la famille Asteraceae : *Atractylis flava* Desf. et *Atractylis serratuloides* Siber ex Cass. ont été sélectionnées pour investigations phytochimiques et screening biologique.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (CC, CPP et CLHP) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN, Masse, UV et IR) de 39 métabolites secondaires dont 11 composés de nature flavonoïdique, 25 triterpéniques et 3 saponines.

30 composés ont été isolés des extraits dichlorméthane, acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante entière *Atractylis flava* dont 5 structures nouvelles : 2 flavonoïdes glycosylés et 3 saponines bidesmosidiques. Les composés connus au nombre de 25 se répartissent en 2 flavonoïdes *C*-glycosylés, 3 flavonoïdes *O*-glycosylés, 4 flavonoïdes aglycones, 12 triterpènes pentacycliques dont 7 à squelette oléanane, 2 à squelette ursane et 3 à squelette lupane et 4 phytostérols.

A partir des extraits éther de pétrole, dichlorométhane et *n*-butanol des racines de l'espèce *Atractylis serratuloides* 9 métabolites secondaires ont été identifiés. Il s'agit de 3 triterpènes à squelette oléanane, 3 triterpènes à squelette lupane, 2 phytostérols et 1 phénol glycosylé.

Les structures moléculaires des composés isolés **1-39** ont été élucidées principalement par l'utilisation des différentes techniques de RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C *J*-modulé, DEPT, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, TOCSY, HSQC-TOCSY, HMBC, ROESY et NOESY), UV, IR, la spectrométrie de masse basse et haute résolutions (ESI-MS et HR-ESI-MS), par la mesure du pouvoir rotatoire [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les extraits végétaux de l'espèce *Atractylis flava* ont montré une activité antibactérienne modérée vis-à-vis de certaines souches bactériennes par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'activité anti-oxydante a été testée sur CCM par une solution de DPPH.

Il est à signaler que parmi les composés déjà cités dans la littérature, 14 triterpènes, 7 flavonoïdes et 1 phénol glycosylé ont été trouvés pour la première fois dans le genre *Atractylis*, ce qui révèle l'importance de cette investigation permettant une meilleure connaissance de la composition chimique de ce genre. Les flavonoïdes *C*-glycosylés pourraient avoir un intérêt chimiotaxonomique dans la caractérisation des espèces appartenant aux genres *Atractylis*, *Carlina* et *Atractylodes* de la tribu des Cardueae. Ces genres sont connus pour leur accumulation de ce type de flavonoïdes considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

**Mots clés :** Asteraceae, *Atractylis flava*, *Atractylis serratuloides*, Saponines, Flavonoïdes, Triterpènes, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse ESI, tests biologiques.

## Abstract

This work is a part of the research program of our phytochemistry group of chemistry and environmental chemistry laboratory (LCCE) which concerns the valuation of medicinal plants used in traditional medicine in North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) by the discovery of new active compounds with interesting biological activities. In this context, two medicinal plants of the Asteraceae family: *Atractylis flava* Desf. and *Atractylis serratuloides* Siber ex Cass. have been selected for phytochemical investigations and biological screening.

This work allowed the isolation by chromatographic methods (CC, TLC and HPLC), and the characterization by spectroscopic analysis (NMR 1D and 2D, Mass, UV and IR) of 39 secondary metabolites including 11 flavonoids, 25 triterpenes and 3 saponins.

30 compounds have been isolated from dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol extracts of the whole plant *Atractylis flava* from which 5 new structures were established including 2 flavonoid glycosides and 3 bidesmosidic saponins. The known secondary metabolites consist of 9 flavonoids among them 2 di-*C*-glycosylflavonoids, 9 triterpenes including 7 oleanane and 2 ursane skeletons, 3 lupane-type triterpenes, and 4 phytosterols.

From the following extracts: petroleum ether, dichloromethane and *n*-butanol of the roots of the species *Atractylis serratuloides* 9 secondary metabolites have been identified. They were devised into 3 triterpenes with oleanane skeleton, 3 lupane-type triterpenes, 2 phytosterols and 1 phenol glycoside.

The molecular structures of the isolated compounds **1-39** were mainly elucidated by the use of NMR techniques 1D and 2D ( $^1\text{H}$ , *J*-modulated  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY H-H, *J*-modulated HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY, HMBC, ROESY and NOESY), UV, IR, high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS), measurement of the optical rotations  $[\alpha]_{\text{D}}$ , and by comparison with literature data.

The extracts of the species *Atractylis flava* show a moderate antibacterial activity against some bacteria strains by the diffusion method on agar medium. The antioxidant activity was estimated on the extracts by the DPPH test (TLC).

It is very important to indicate that among known compounds reported in the literature, 14 triterpenes, 7 flavonoids and 1 phenol glycoside have been found for the first time in the plants of *Atractylis* genus. Furthermore, this study contributes to determine the chemical composition of this genus. This work allowed particularly the isolation and identification of two di-*C*-glycosylflavonoids. This finding is in agreement with that of the previous studies performed on *Atractylis* plants. It is noteworthy that the *C*-glycosylflavone compounds are occurring in *Atractylis*, *Atractylodes* and *Carlina* species which are closely related systematically and used as chemotaxonomic markers.

**Keywords:** Asteraceae, *Atractylis flava*, *Atractylis serratuloides*, Saponins, Flavonoids, Triterpenes, NMR 1D and 2D, ESI, Biological activities.

## ملخص

هذا العمل هو جزء من برنامج البحث لمخبر الكيمياء و الكيمياء البيئية (LCCE) الذي يتمحور حول بحث و تثمين بعض النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي في شمال إفريقيا (الجزائر، المغرب و تونس) وذلك بالبحث عن مركبات طبيعية جديدة ذات نشاط بيولوجي متميز. في هذا السياق قمنا باختبار نبتتين طبيئتين من عائلة *Atractylis serratuloides* و *Atractylis flava* : Asteraceae لدراسة فيتوكيميائية وتشخيص بيولوجي.

سمح هذا العمل بعزل وتحديد بنية 39 مركب طبيعي وذلك بإستعمال الطرق الكروماتوغرافية (TLC, CC و HPLC) و بإستعمال طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين المغناطيسي النووي بجميع أنواعها، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و التحت الحمراء، مطيافية الكتلة، حساب زاوية التدوير النوعي و المقارنة مع الدراسات السابقة. تنقسم هذه المركبات إلى 11 مركب ذو طبيعة فلافونويدية، 25 ذو طبيعة ثلاثية التربين و 3 ذو طبيعة صابونينية.

تم عزل 30 مركب من مستخلصات DCM، AcOEt و *n*-BuOH من نبتة *A. flava* منها 5 مركبات جديدة: 2 فلافونويدات سكرية و 3 صابونينات و 25 مركب معروف. تشمل المركبات المعروفة 2 فلافونويدات-C-سكرية، 3 فلافونويدات و 4 فلافونويدات سكرية، 12 مركب من عائلة التربينات الخماسية الحلقة منها 7 ذات هيكل اوليانان، 2 ذات هيكل اورسان و 3 ذات هيكل لوبان و 4 فيتوستيرولات.

من خلال مستخلصات EP، DCM و *n*-BuOH لجذور نبتة *A. serratuloides* 9 مركبات طبيعة تم التعرف عليها منها: 3 ثلاثية التربينات من هيكل اوليانان، 3 ثلاثية التربين من هيكل لوبان و 2 فيتوستيرولات و 1 فينول جليكوزيلي.

بينت المستخلصات الخامة لنبتة *A. flava* نشاط مثبط للبكتيريا متوسط و ذلك عن طريق الانتشار في وسط الصلب. النشاط المضاد للتأكسد تم اختباره بواسطة تقنية CCM بإستعمال جذر DPPH.

يجدر الذكر بأن نشير أنه من بين المركبات التي تم ذكرها في الدراسات السابقة 14 مركب ثلاثي التربينات، 7 فلافونويدات و 1 فينول جليكوزيلي تم عزلها لأول مرة في نوع *Atractylis* الذي يسمح بإظهار أهمية هذا العمل في المعرفة الجيدة للتركيب الكيميائي لنباتات لهذا النوع .

**الكلمات المفتاحية :** Asteraceae ، *Atractylis flava* ، *Atractylis serratuloides* ، الصابونينات ، الفلافونويدات، ثلاثية التربينات، مطيافية الرنين المغناطيسي، مطيافية الكتلة.