

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

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR  
BATNA  
FACULTE DES SCIENCE  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

## MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de Magister  
*En Chimie Organique*

Présenté par :

M<sup>elle</sup> : SOURI NABILA

Thème :

# Etude Phytochimique de L'extrait Chloroformique de Pseuderucaria Teretifolia

Devant le jury :

Mr. LAABASSI MOHAMED	Pr.	U- Batna	Président
Mr. DIBI AMMAR	Pr.	U. Batna	Rapporteur
Mr. M.R.YASSINE EL HILOU	Pr.	C.U.O.E. Bouaghi	Examineur
Mr. BOUZAHER YASSINE	Pr.	U. Batna	Examineur



# REMERCIEMENTS

*Ce travail a été effectué au Laboratoire de phytochimie et de Synthèse Organique du département de Chimie, Faculté des Sciences Université de Batna, sous la direction du Professeur Dibi Ammar. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de préparer mon diplôme de Magister dans les meilleures conditions, plus particulièrement pour tous ses efforts et son soutien moral tout le long de cette période.*

*Je tiens également à exprimer tous mes sincères remerciements au Professeur Mohammed Laabassi qui ma fait l'honneur de présider le jury et pour ses encouragements dans des moments de doute. Je tiens encore à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide et tous ses précieux conseils.*

*Je remercie vivement :*

*Monsieur M.R.Yassine El Hilou, Professeur au C.U.O.El.Bouaghi, et Monsieur Bouzaher Yassine, Professeur à l'université de Batna qui ont bien voulu lire ce travail et faire partie du jury.*

*Je remercie Mr. M.C Aberkane pour sa disponibilité et ses précieux conseils.*

*Je remercie particulièrement toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail : Mr.H. Haba, M<sup>elle</sup> F. Bitam, M<sup>elle</sup> H. Harkat, Mr.*

*R. Chabaki .*

*J'exprime toute ma gratitude à ma sœur karima pour son aide, sa disponibilité exemplaire et pour m'avoir fait profiter de ses compétences informatiques.*

*Enfin je remercie tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail surtout : Madame Abdessmed johra et le Docteur Melkemi lamine.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste mémoire :*

*@À mes très chers parents que je remercie Dieu de les avoir protégés pour être témoins de ma réussite.*

*@À mon frère et mes sœurs qui ont été un soutien moral généreux et précieux pendant toutes mes années d'études.*

*@À tous mes vrais ami(e)s qui ont répandu(e)s présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux.*

*@Son oublier une spéciale dédicace à mes défunts Grands-parents qui auraient été si fiers de voir ce que je suis devenue*

NABILA

## ABRÉVIATIONS

Acetyl-CoA	Acetyl-Co enzyme A
ACP	protéine porteuse une fonction acétyle
br	Le signal est large.
CCM	Chromatographie sur couche mince
CoA	Coenzyme A
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert
GGPP	Géranylgéranyl pyrophosphate
HDL	high density lipoproteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Hétéronucléaire single quantum correlation
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDL	Low density lipoproteins
m	Multiplet
MS	Spectrométrie de masse
NADPH	nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
ppm	Parties par million
q	Quadruplet
Rf	Facteur de rétention
RMN	resonance magnétique nucléaire
s	Singulet
sep	septuplet
t	Triplet
TMS	Trimethylsilyl
UV	Ultra violet

Les abréviations des réactifs chimiques sont celles qui sont habituellement utilisés en chimie organique et décrite par *Daub et al* [1].

# TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

## **CHAPITRE I : TRAVAUX ANTERIEURES**

I-1-DESCRIPTION BOTANIQUE..... 3

I-1-1-CRUCIFERES..... 3

I-1-2-PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA..... 3

I-2-RECOLTE ..... 5

I-3-USAGES TRADITIONNELS..... 5

I-4-ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES..... 7

I-4-1-SUR LA FA MILLE..... 8

I-4-2-SUR L'ESPECE..... 15

## **CHAPITRE II : ETUDES DES LIPIDES**

II-1- GENERALITE ..... 16

II-2-REPARTITION DES LIPIDES ..... 16

II-3-ROLE BIOLOGIQUE DES LIPIDES..... 17

II-4-ACIDE GRAS ..... 18

II-4-1-DEFINITION ..... 18

II-4-2-NOMENCLATURE..... 18

II-4-3-STEREOCHIMIE ..... 20

II-4-4-ROLE BIOLOGIQUE DES ACIDES GRAS..... 21

II-4-5-BIOSYNTHESES DES ACIDES GRAS .....	21
II-5-STEROLS .....	23
II-5-1-DEFINITION .....	23
II-5-2-STEREOCHIMIE .....	25
II-5-3-LA BIOSYNTHESE DES STEROIDES .....	26
II-5-4-INTERET THERAPEUTIQUE DES STEROLS .....	28

**CHAPITRE III : SEPARATION DES COMPOSES ET DETERMINATION DE LEURS STRUCTURES**

III-1-EXTRACTION .....	29
III-2-SEPARATION ET PURIFICATION .....	31
III-3-IDENTIFICATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES	32
III-3-1-IDENTIFICATION DU COMPOSES A .....	32
III-3-2-IDENTIFICATION DU COMPOSES B .....	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIE .....	52

**CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE**

IV-1-METHODES ANALYTIQUES ET APPAREILS .....	57
IV-1-1-CHROMATOGRAPHIE .....	57
IV-1-1-a- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).....	57
IV-1-1-b- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE EPAISSE (CCE).....	57

IV-1-2-SPECTOSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE RMN .....	57
IV-1-3-SPECTROMETRIE DE MASSE (MS).....	58
IV-1-4-SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE (I.R).....	58
IV-1-5-NUMEROTATION DES STRUCTURES .....	58
IV-1-6-SOLVANTS .....	58
IV-2-CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS .....	59
IV-2-1-EXTRAIT ETHERO PETROLIQUE.....	59
IV-2-2-EXTRAIT CHLOROFORMIQUE.....	60
IV-2-3-EXTRAIT METHANOLIQUE.....	61
IV-3-SEPARATION ET PURIFICATION .....	61
IV-3-1-TRAITEMENT DES FRACTIONS DU LOTS N9 .....	64
IV-3-2-TRAITEMENT DES FRACTIONS DU LOTS N12 .....	65
IV-3-3-CARACTERISTIQUE SPECIALES.....	67
IV-3-3-1-COMPOSE A.....	67
IV-3-3-1-COMPOSE B .....	70
CONCLUSION .....	72

# Table des figures et tableaux

FIGURE 01 : PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA.....	4
FIGURE 02 : LIEU DE RECOLTE DE PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA.....	5
FIGURE 03 : ISOMERIES GEOMETRIQUES TRANS ET CIS .....	20
FIGURE 04 : BIOSYNTHESES DES ACIDES GRAS .....	22
FIGURE 05 : STEREOCHIMIE DE NOYAU STEROL.....	26
FIGURE 06 : BIOSYNTHESES DES STEROLS .....	27
FIGURE 07 : SCHEMA DE L'EXTRACTION.....	30
FIGURE 08 : SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE A .....	33
FIGURE 09 : SPECTRE I.R DU COMPOSE A.....	33
FIGURE 10 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE A (REGION DES METHYLES) .....	34
FIGURE 11 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE A (REGION 5.0 A 5.4 ppm) .....	35
FIGURE 12 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE A (REGION 3.48-3.58 ppm) .....	36
FIGURE 13 : SPECTRE COSY H-H DU COMPOSE A .....	37
FIGURE 14 : SPECTRE HSQC H-C DU COMPOSE A.....	38
FIGURE 15 : SPECTRE RMN <sup>13</sup> C DU COMPOSE A.....	39
FIGURE 16 : SPECTRE RMN <sup>13</sup> C (DEPT 135) DU COMPOSE A.....	40
FIGURE 17 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ET <sup>13</sup> C DU COMPOSE A.....	41
FIGURE 18 : SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE B.....	44
FIGURE 19 : SPECTRE I.R DU COMPOSE B.....	45
FIGURE 20 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE B (REGION 0.86-0.89 ppm)	45
FIGURE 21 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE B (REGION 5.30-5.40 ppm)	

.....	46
FIGURE 22 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ETALE DU COMPOSE B ( <i>REGION 11.0-11.1 ppm</i> )	
.....	46
FIGURE 23 : SPECTRE COSY H-H DU COMPOSE B.....	47
FIGURE 24 : SPECTRE HSQC H-C DU COMPOSE B.....	48
FIGURE 25 : SPECTRE RMN <sup>13</sup> C DU COMPOSE B.....	49
FIGURE 26 : SPECTRE RMN <sup>13</sup> C (DEPT 135) DU COMPOSE B.....	49
FIGURE 27 : SPECTRE RMN <sup>1</sup> H ET <sup>13</sup> C DU COMPOSE B.....	50
FIGURE 28 : EXTRAIT RTHYRO PETROLIQUE.....	59
FIGURE 29 : EXTRAIT CHLOROFORMIQUE.....	60
FIGURE 30 : EXTRAIT METHANOLIQUE.....	61
FIGURE 31 : COMPOSE A.....	67
FIGURE 32 : COMPOSE B.....	70
TABLEAU 01 : LES DIFFERENTS GLUCOSINOLATES ISOLES.....	8
TABLEAU 02 : ACIDE GRAS BIOLOGIQUE LES PLUS COMMUN.....	19
TABLEAU 03 : RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C DU COMPOSE A	
.....	42
TABLEAU 04 : RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C DU COMPOSE B	
.....	51
TABLEAU 05 : LES SOLVANTS.....	59
TABLEAU 06 : LES RESULTATS DE PREMIER FRACTIONNEMENT.....	62
TABLEAU 07 : LES 24 LOTS.....	63
TABLEAU 08 : FRACTIONNEMENT DE N9.....	64
TABLEAU 09 : FRACTIONNEMENT DE N12.....	66

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION :

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui, encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne, elle-même, s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiquement actives. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [2].

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives d'origine végétale, il est préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. La recherche des molécules aux propriétés antiradicalaires dans des plantes de montagne obit, par exemple, à cette logique. En effet, celles-ci sont plus exposées aux rayons UV en altitude et ont donc dû développer des mécanismes de protection, peut-être basés sur des métabolites secondaires spécifiques.

L'étude de *Pseuderucaria Teretifolia* entre dans le cadre d'un programme de recherche sur les plantes médicinales de la région des Aurès et du Nord saharien.

Cet intérêt est motivé, d'une part, par le fait que cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude chimique, au regard de la recherche bibliographique exhaustive effectuée, et la richesse des crucifères en substances naturelles d'un grand intérêt biologique d'autre part.

La famille des crucifères est très riche en substances naturelles tel que : les Glucosinolates, les Acides gras, les Flavonoides et les Lignans.

Ce mémoire est subdivisé en quatre chapitres :

Dans Le premier chapitre, nous décrivons quelques études phytochimiques réalisées sur la famille.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des lipides : leur définition, leur intérêt biologique et leur biosynthèse.

Le troisième chapitre est consacré au travail personnel consistant en la séparation, la purification et la détermination des structures des composés obtenus.

Le quatrième chapitre est consacré au protocole expérimental.

# CHAPITRE I

## TRAVAUX ANTERIEURES

## **I-1- DESCRIPTION BOTANIQUE**

### **I-1-1-LA FAMILLE DES CRUCIFERES**

Les Crucifères comprenant un nombre très important d'espèces, qui se répartissent sur toute l'étendue du globe. Certaines d'entre elles sont adaptées à des milieux très spéciaux comme ceux que leur offrent les hautes montagnes ou les régions désertiques[3].

La famille des Crucifères est très homogène et il est assez facile de la définir dans son ensemble. Elle comprend surtout des herbes à feuilles isolées, non stipulées presque toujours simples. Les fleurs, généralement groupées en grappes, sont hermaphrodites, actinomorphes, et leur réceptacle est convexe. Le calice comprend 4 sépales, disposés sur 2 verticilles. Les sépales internes latéraux, sont souvent un peu renflés en forme de poche à la base.

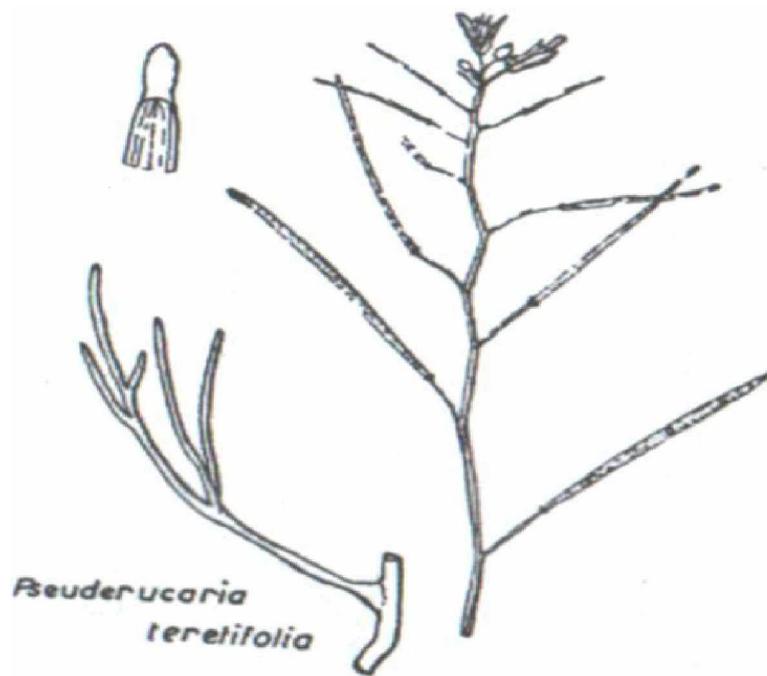
La corolle est à 4 pétales, disposées en diagonale sur un même verticille: ils alternent, en effet, avec les sépales; ils présentent un onglet bien développé, dressé, et un limbe étalé [4].

### **I-1-2- L'ESPECE PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA (DESF)**

#### **O.E.SCHULTZ**

L'espèce « PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA » à Pédoncules floraux plus longs (5-15 mm) ; silique contenant dans chaque loge 20 à 30 graines sur un seul rang ; style plus long (2 mm) ; feuilles à divisions très étroites[5].

FIGURE 01 : *Pseuderucaria teretifolia*



**FAMILLE :** *CRUCIFERE*

**GENRE :** *PSEUDERUCARIA*

**ESPECE :** *TERETIFOLIA*

## I-2- RECOLTE

Nous avons récolté les parties aériennes du *Pseudérucaria teretifolia* au mois de mai 2003 au lieu dit « Ferme Du Four » (figure2) [6] à 10 km au nord de la ville de Biskra. La plante a été identifiée par le Dr « Oudjehih Bachir » Botaniste à l'institut d'Agronomie de l'Université de Batna.

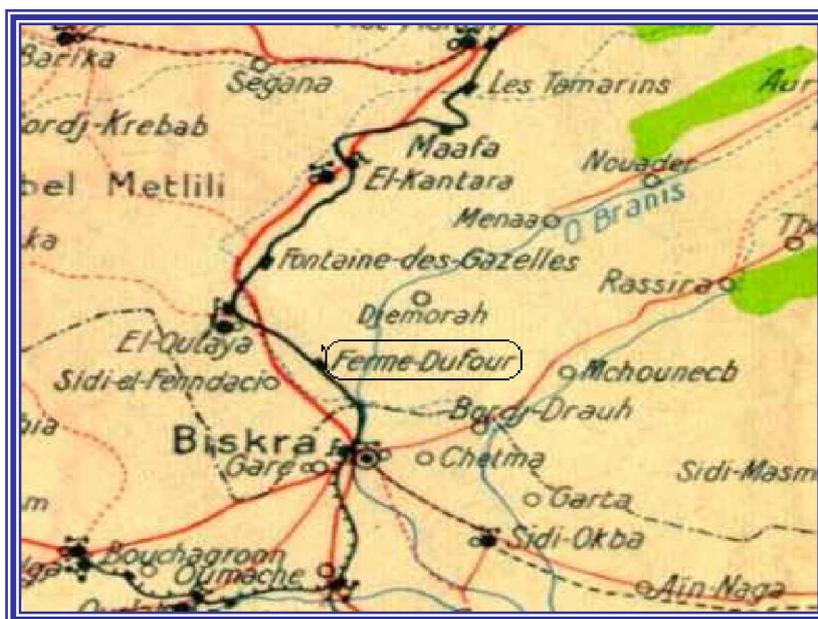


FIGURE-

2 : Lieu de

récolte de L'espèce *Pseudérucaria teretifolia*

## I-3- USAGE TRADITIONNEL

La famille des Crucifères (Cruciféracées), appelée actuellement Brassicacées, est une grande famille dispersée dans le monde entier [7].

Les crucifères sont largement utilisées en médecine traditionnelle. Ils ont été utilisés comme anticarcinogène, antiseptique, réchauffant ...etc [8]. Parmi les plantes de la famille des crucifères couramment utilisées en médecine traditionnelle, on peut citer :

**Anastatica hierochuntica L :**

Cette plante a la réputation, chez les sages-femmes pratiquant la médecine traditionnelle, de faciliter les accouchements et d'en calmer les douleurs : la macération de la plante est administrée par voie orale au moment où la patiente est sur le point d'accoucher. Cette pratique est très ancienne et relève de la théorie de la signature. La plante est aussi considérée comme porte bonheur. Aussi on emploie la plante contre les refroidissements, en infusion ou en poudre avec du miel et de l'huile d'olive [8].

**Lepidium sativum (cresson alénois) :**

Les graines sont indiquées dans le traitement de la toux, de l'asthme, de la tuberculose, de toutes les affections pulmonaires, des refroidissements, de rachitisme, de l'impuissance et de la stérilité. Pour activer l'accouchement, on administre à la patiente une bouillie de lait contenant des graines de *cresson alénois* ou un mélange de lait et d'huile d'olive contenant deux œufs entiers battus, de la cannelle et des graines de *cresson alénois* [8].

En usage externe, la farine de graines entre dans la composition de cataplasmes révulsifs contre les bronchites ou cicatrisants contre les abcès et les furoncles.

Dans le traitement du rachitisme, on fait des massages avec un liniment de poudre de graines macérée dans l'huile d'olive.

**Brassica Nigra :**

Partout, les graines de moutarde noire (B-nigra) sont prescrites comme réchauffant et entrent dans la préparation du *ras al-hanut*. Les graines sont très souvent utilisées en magie [8].

**Brassica Oleracea (choux) :**

En diététique populaire, le chou est jugé comme un mauvais aliment, de surcroît indigeste. De plus, il a la réputation de rendre le sang impur, de ne pas convenir aux tempéraments chauds et de faire baisser la fécondité. Les feuilles de chou, réchauffées sur un plat de terre cuite, sont utilisées en cataplasmes, posés sur le bas du dos, contre toutes les maladies des reins. Les graines sont administrées oralement (une cuillerée à café de poudre dans un verre de lait chaud) contre les refroidissements [8].

**Diplotaxes**

Les graines des diplotaxes sont prescrites (au même titre que les autres *Brassicacées*) par voie interne, comme réchauffant et, par voie externe, en cataplasmes, comme rubéfiant. La décoction des graines ou des feuilles de divers diplotaxes est utilisée, en frictions, contre la gale des animaux. On peut se servir aussi des feuilles fraîches contusées avec lesquelles on frotte la peau de l'animal.

Les feuilles jeunes des diplotaxes sont employées pour faire des sauces surtout dans les régions sahariennes [8].

**Pseuderucaria Teretifolia :**

Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle locale comme antalgique et analgésique.

## I-4- ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

### I-4-1- SUR LA FAMILLE

La famille des crucifères est caractérisée par la présence de métabolites secondaires à base de soufre (Glucosinolates et Isothiocyanates). Jouant un rôle essentiel dans la défense des plantes contre les agressions extérieures (insectes) [9].

Michael Reichelt et ses collaborateurs [10], dans leurs études phytochimiques menées sur la plante *Arabidopsis Thaliana* ont pu isoler 24 Glucosinolates (1 à 24).

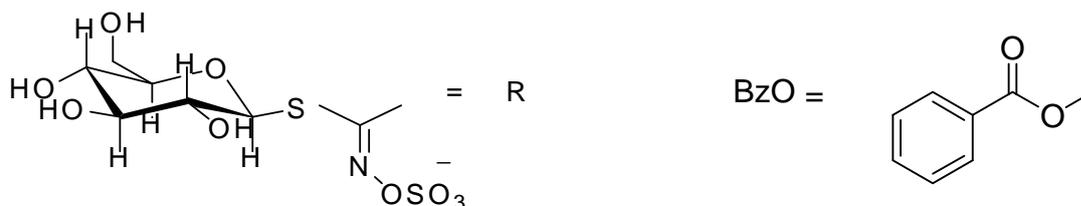
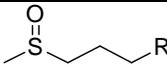
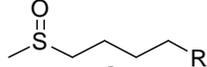
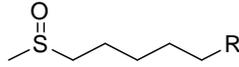
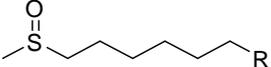
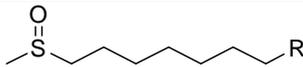
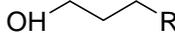
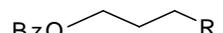
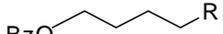
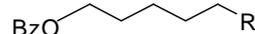
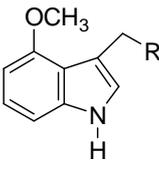
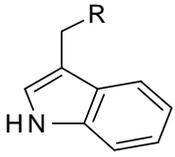
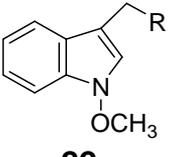
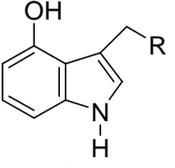
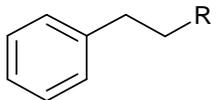


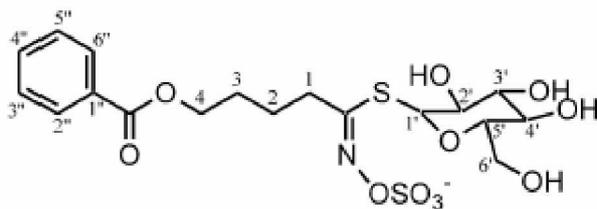
Tableau 01 : Les différents Glucosinolates isolés de *Arabidopsis Thaliana*.

Nom systématique	Non commun	Structure
3-methylthiopropyl glucosinolate	Glucoiberberin	 <b>1</b>
4-methylthiobutyl glucosinolate	Glucoerucin	 <b>2</b>
5-methylthiopentyl glucosinolate	Glucoberteroin	 <b>3</b>
6-methylthiohexyl glucosinolate	-	 <b>4</b>
7-methylthioheptyl glucosinolate	-	 <b>5</b>

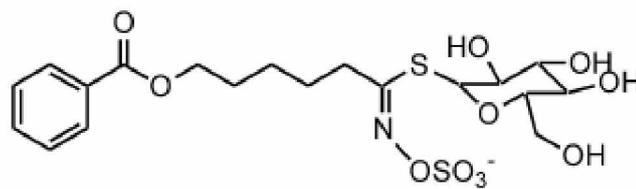
8-methylthiooctyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>6</u></b></p>
3- methylsulfinylpropyl glucosinolate	Glucoiberin	 <p style="text-align: center;"><b><u>7</u></b></p>
4- methylsulfinylbutyl glucosinolate	Glucoraphnin	 <p style="text-align: center;"><b><u>8</u></b></p>
5- methylsulfinylpentyl glucosinolate	Glucoalyssin	 <p style="text-align: center;"><b><u>9</u></b></p>
6- methylsulfinylhexyl glucosinolate	Glucohespein	 <p style="text-align: center;"><b><u>10</u></b></p>
7- methylsulfinylheptyl glucosinolate	Glucoibarin	 <p style="text-align: center;"><b><u>11</u></b></p>
8-methylsulfinyloctyl glucosinolate	Glucohirsutin	 <p style="text-align: center;"><b><u>12</u></b></p>
3-hydroxypropyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>13</u></b></p>
4-hydroxybutyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>14</u></b></p>
3-Butentyl glucosinolate	Gluconapin	 <p style="text-align: center;"><b><u>15</u></b></p>
3-benzoyloxypropyl glucosinolate	Glucomalcomii	 <p style="text-align: center;"><b><u>16</u></b></p>
4-benzoyloxybutyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>17</u></b></p>
5-benzoyloxypentyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>18</u></b></p>
6-benzoyloxyhexyl glucosinolate	-	 <p style="text-align: center;"><b><u>19</u></b></p>

4-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate	4-methoxy Glucobrassicin	 <p style="text-align: center;"><b>20</b></p>
Indol-3-ylmethyl glucosinolate	Glucobrassicin	 <p style="text-align: center;"><b>21</b></p>
1-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate	Neoglucobrassicin	 <p style="text-align: center;"><b>22</b></p>
4-Hydroxyindol-3-ylmethyl glucosinolate	4-Hydroxy glucobrassicin	 <p style="text-align: center;"><b>23</b></p>
2-Phenylethyl glucosinolate	Gluconasturtiin	 <p style="text-align: center;"><b>24</b></p>

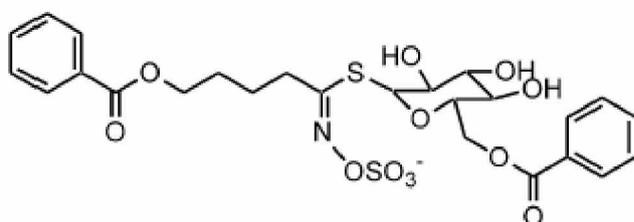
Sept nouveaux **Acides Benzoïques Glucosinolate** (25 à 31) ont été isolés aussi de graines de *Arabidopsis Thaliana* par Michael Reichelt et ses collaborateurs [11] Il s'agit des acides suivants :

**25**

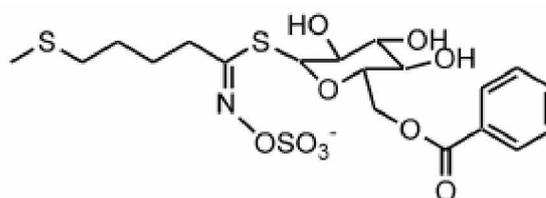
***Desulfo-4-benzoyloxybutyle  
glucosinolate.***

**26**

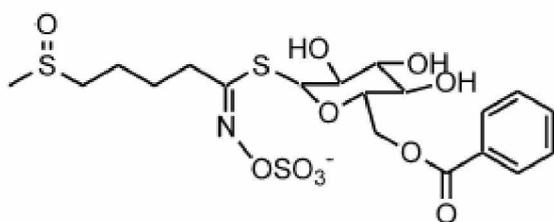
***Desulfo-5-benzoyloxybutyle  
glucosinolate.***

**27**

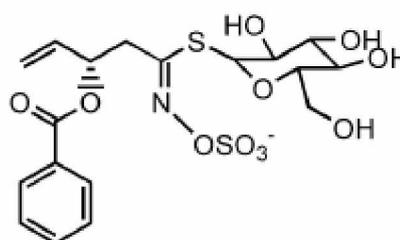
***6'-Benzoyl-4-benzoyloxybutyl  
glucosinolate.***

**28**

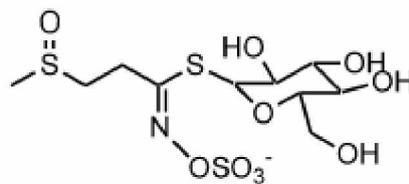
***6'-Benzoyl-4-methylthiobutyl  
glucosinolate.***

**29**

***6'-Benzoyl-4-methylsulfinylbutyl  
glucosinolate.***

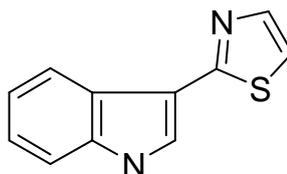
**30**

***6'-Benzoyl-2-methylsulfinylbutyl  
glucosinolate.***

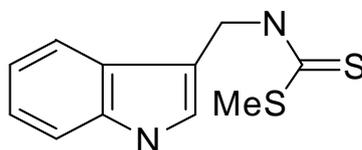
**31****2méthylsulfinyléthylglucosinolate.**

Ces structures ont été déterminées par les méthodes spectroscopiques : UV, COSYH-H, RMN de proton et de carbone et la spectrométrie de masse.

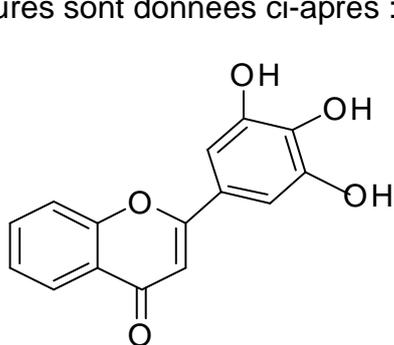
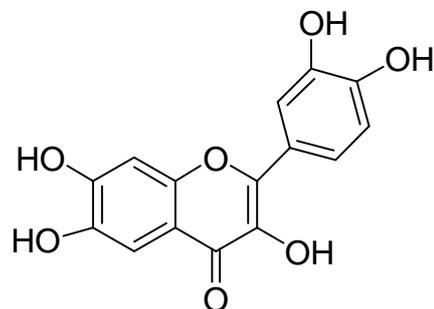
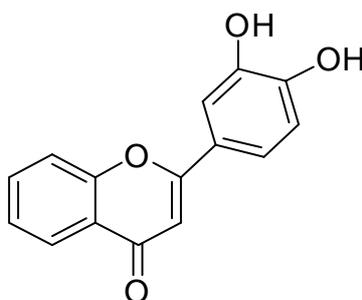
L'étude chimique de *Camelina Sativa* et *Alternaria Brassica* par Brown et ses collaborateurs [12,13,14,15], a permis de mettre en évidence la présence d'un **phytoalexine**. L'analyse spectroscopique a permis d'assigner la structure de ce composé. Il s'agit de.

**32****L'indole Camalexine**

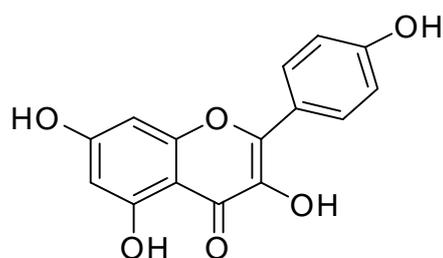
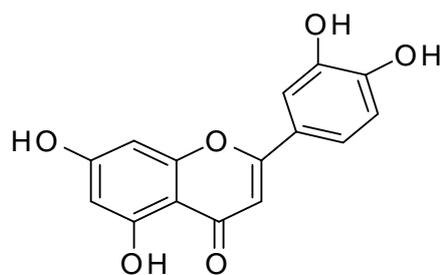
L'étude chimique de la plante *Brassicas Rapa* [16,17] par Pedras et ses collaborateurs [18,19,20,21,22] a révélé la présence d'un autre **Phytoalexine**, il s'agit de:

**33****Brassinin**

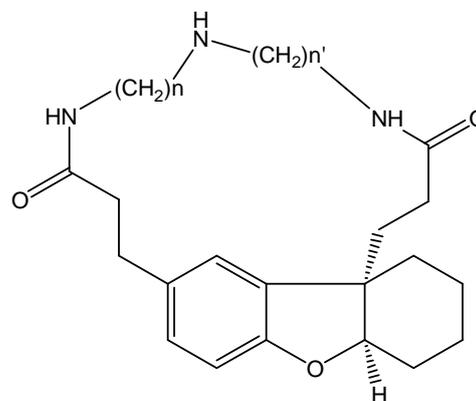
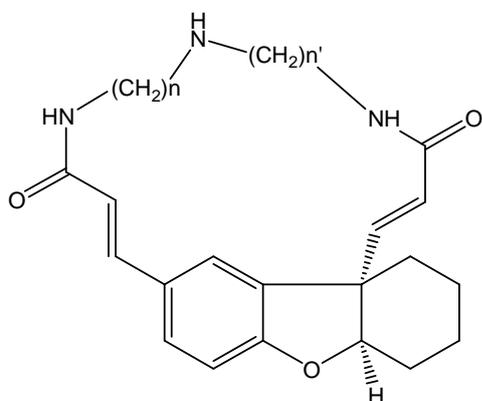
Une autre étude chimique de **Brassicac (Brocoli)** par Koo Hui Miean et Suhaila Mohamed [23,24,25] a permis d'identifier trois **Flavonoïdes** dont les structures sont données ci-après :

34**Myricetine**35**Luteolin**36**Quercetine**

Nielson et ses collaborateurs ont particulièrement étudié le genre **Brassicac** [26]. Cette étude a permis d'isoler deux **Flavonoïdes** 37 et 38 nommés respectivement **Kaempferol** et **Apigenin**.

3738

Six alcaloïdes ont été isolés du *Lunaria Biennis Moench*[27]. La Lunarine, **39** alcaloïde majoritaire a fait l'objet de nombreux travaux chimiques. Sa structure exacte a été déterminée au moyen des rayons X [28,29,30].



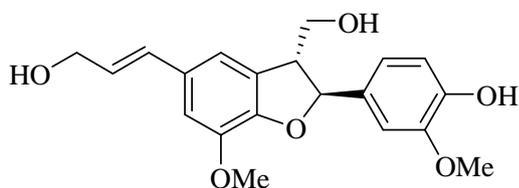
**39 Lunarine** :  $n=3$  ;  $n' = 4$

**41 Tétrahydro Lunarine** :  $n=3$ ;  $n' = 4$

**40 Lunaridine**:  $n = 4$  ;  $n' = 3$

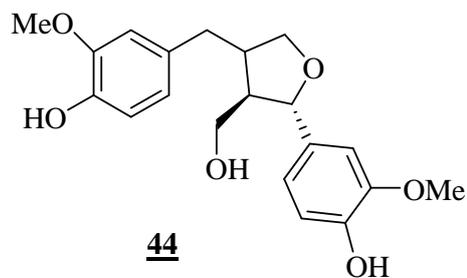
**42 Tétrahydro Lunaridine** :  $n = 4$ ;  $n' = 3$

Cutillo F et ses collaborateurs ont particulièrement étudié l'espèce *Brassica Fruticulosa* [31,32]. Cette étude a permis d'isoler deux **Lignans (43 et 44)** [33].



**43**

**Dehydroconiferil**



**44**

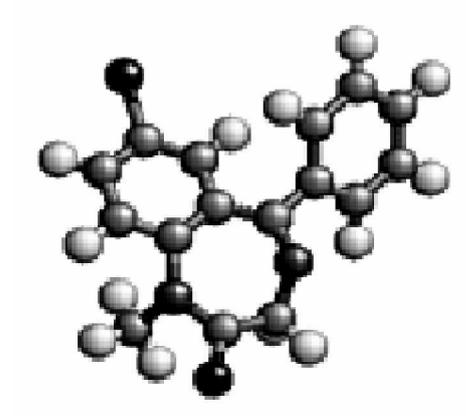
**Lariciresinol**

**I-4-2- SUR L'ESPECE**

Devant ce constat, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique de cette plante. Dans le but d'apporter bien évidemment notre modeste contribution dans la connaissance des produits naturels que recelant l'espèce « PSEUDERUCARIA TERETIFOLIA.

# CHAPITRE II

## ETUDE DES LIPIDES



## II-1- GENERALITE

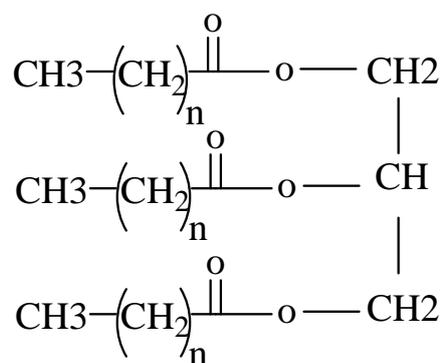
Les lipides constituent une classe de molécules biologiques définies par leur faible solubilité dans l'eau et leur grande solubilité dans les solvants non polaires. Ces molécules sont dans l'ensemble des hydrocarbures. Les lipides représentent une forme de carbone particulièrement réduit ; leur oxydation au cours du métabolisme libère de grandes quantités d'énergie. Les lipides sont donc des molécules de choix pour la mise en réserve de l'énergie métabolique [34].

L'appellation de lipide tire son nom du mot grec « lipos » signifiant « graisse » regroupe des composés sur la base d'un caractère physique commun : l'insolubilité dans l'eau.

## II-2- REPARTITION DES LIPIDES

Le terme de lipides couvre les :

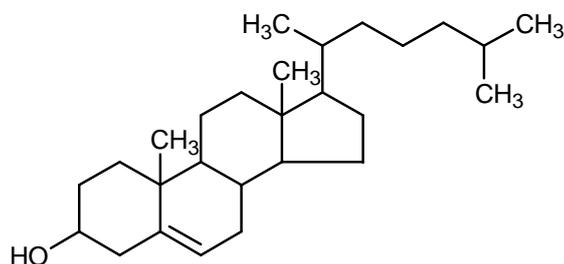
- ü Triglycérides (n >14) présents dans les graisses animales et les huiles végétales.



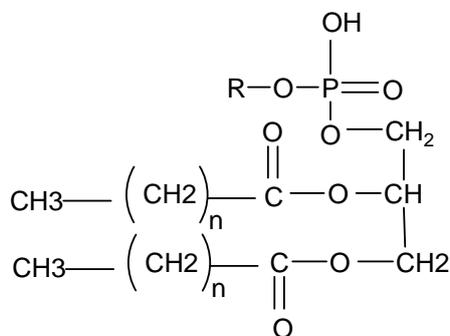
**45**

**Triglycides (huiles/ cires)**

- ü Les stéroïdes (notamment la vitamine D et les hormones synthétisées à partir du cholestérol).

**46****Cholestérol**

- ü Les phospholipides (n=16), constituants des membranes cellulaires.

**47****Phospholipide****II-3- ROLE BIOLOGIQUE**

Les lipides jouent un rôle capital pour tous les organismes vivants.

- Ils représentent environ 20 % du poids du corps.
- chaque gramme de lipide peut donner une énergie supérieure ou égale à 9 Kcal/gr.lipide
- Ils ont un rôle de précurseurs : stéroïdes, vitamines, prostaglandines.
- Les plaques d'athérome constituées de dépôt lipidique entraînent le durcissement des artères (athérosclérose).

Une consommation trop importante de lipides favorise les maladies telles que l'obésité, le diabète gras, l'hypercholestérolémie... [35].

## II-4- ACIDE GRAS (RCOOH)

### II-4-1- DEFINITION

Un acide gras comporte une longue chaîne hydrocarbonée (la queue) terminée par un groupe carboxylique (la tête). Dans les conditions physiologiques, le groupe carboxylique est normalement ionisé. Les acides gras sont présents en grandes quantités dans les systèmes biologiques, mais rarement à l'état libre, non complexé.

D'une façon générale, ils sont estérifiés par du glycérol ou liés à d'autres molécules. La très grande majorité des acides gras naturels ont un nombre pair d'atome de carbone (le plus souvent de 14 à 24). Mais il existe des acides gras à un nombre impaire d'atomes de carbone, en particulier dans des organismes marins [34].

### II-4-2- NOMENCLATURE

Les acides gras peuvent être dénommés ou décrits par plusieurs façons (Tableau 2). Par exemple l'acide gras saturé, à 18 atomes de carbone, a un nom commun (acide stéarique), et un nom systématique (acide octodécanoïque selon la nomenclature scientifique). Il est décrit dans la nomenclature générale par une notation abrégée dans laquelle le nombre des atomes de carbone est suivi par le signe de ponctuation deux points et par le nombre de doubles liaisons dans la molécule (18 :0 pour l'acide stéarique). L'acide stéarique et l'acide palmitique (16 :0) sont les acides gras naturels les plus abondants. Le Tableau 2 présente les formules et les structures de quelques acides gras [34].

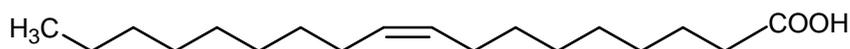
Tableau 02 : Acide gras biologique les plus commun

NOMBRE DE CARBONE	NOM COMMUN	NOM SYSTEMATIQUE	STRUCTURE
<b>ACIDE GRAS SATURÉ</b>			
12	Acide Laurique	Acide Dodécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$
14	Acide Myristique	Acide Tétradécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$
16	Acide Palmitique	Acide Héxadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide séarique	Acide octadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$
20	Acide arachidique	Acide eicosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}_2\text{H}$
22	Acide béhénique	Acide docosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}_2\text{H}$
24	Acide lignocérique	Acide tétracosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CO}_2\text{H}$
<b>ACIDE GRAS INSATURÉ</b>			
16	Acide palmitoleïque	Acide 9-hexadécènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide oléïque	Acide 9-octadécènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide linoléïque	Acide 9,12-octadécadiènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide $\alpha$ -linoléniq	Acide 9, 12,15-octadécatriènoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$
18	Acide $\gamma$ -linoléniq	Acide 6,9, 12-octadécatriènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$
20	Acide arachidonique	Acide 5, 8, 11,14-eicosatétraènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$
24	Acide nervonique	Acide 15-tétracosènoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO}_2\text{H}$

Remarque: Pour toutes les doubles liaisons les substituants sont en cis

### II-4-3- STEREOCHIMIE

La libre rotation autour de chacune des liaisons carbone-carbone rend les molécules d'acide gras saturé extrêmement flexible. Il subsiste néanmoins des contraintes stériques et la conformation la plus stable pour les acides gras saturés est la conformation étirée [34].



**48**

#### *Acide oléique*

Dans la plupart des huiles naturelles, les acides gras insaturés ont une configuration moléculaire particulière appelée cis. Cela signifie qu'un atome d'hydrogène est situé d'un côté de la double liaison, et que l'atome d'hydrogène du carbone suivant est situé du même côté [36].

En revanche, lors du processus de fabrication des margarines, certaines des doubles liaisons (non saturées) prennent une configuration trans. Dans ce cas, les radicaux liés aux carbones ne sont plus du même côté de la double liaison.

Or les acides gras de configuration trans sont moins bénéfiques que ceux de configuration cis, car ils favoriseraient les maladies coronaires. C'est pourquoi il est recommandé de limiter la consommation des acides gras de type trans.

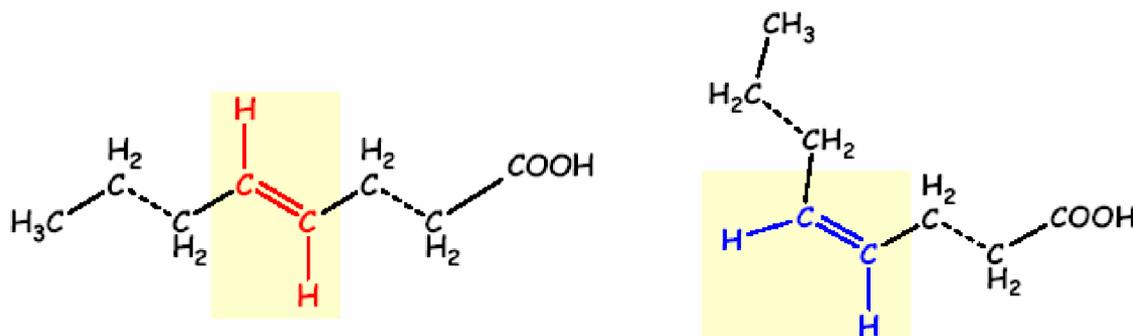


Figure 3 : Isoméries Géométriques Trans (à gauche) et cis (à droite)

#### **II-4-4- ROLE BIOLOGIQUE**

Les acides gras (mono-insaturés) ont une influence sur le taux de cholestérol sanguin. On les considère comme des éléments protecteurs des maladies cardiovasculaires. En effet, ils sont reconnus pour abaisser le mauvais cholestérol (cholestérol LDL) et pour augmenter le bon cholestérol (cholestérol HDL) [37].

Une consommation exclusive d'acides gras entraîne :

- ü Un déséquilibre en acides gras.
- ü Une carence en acides gras essentiels.

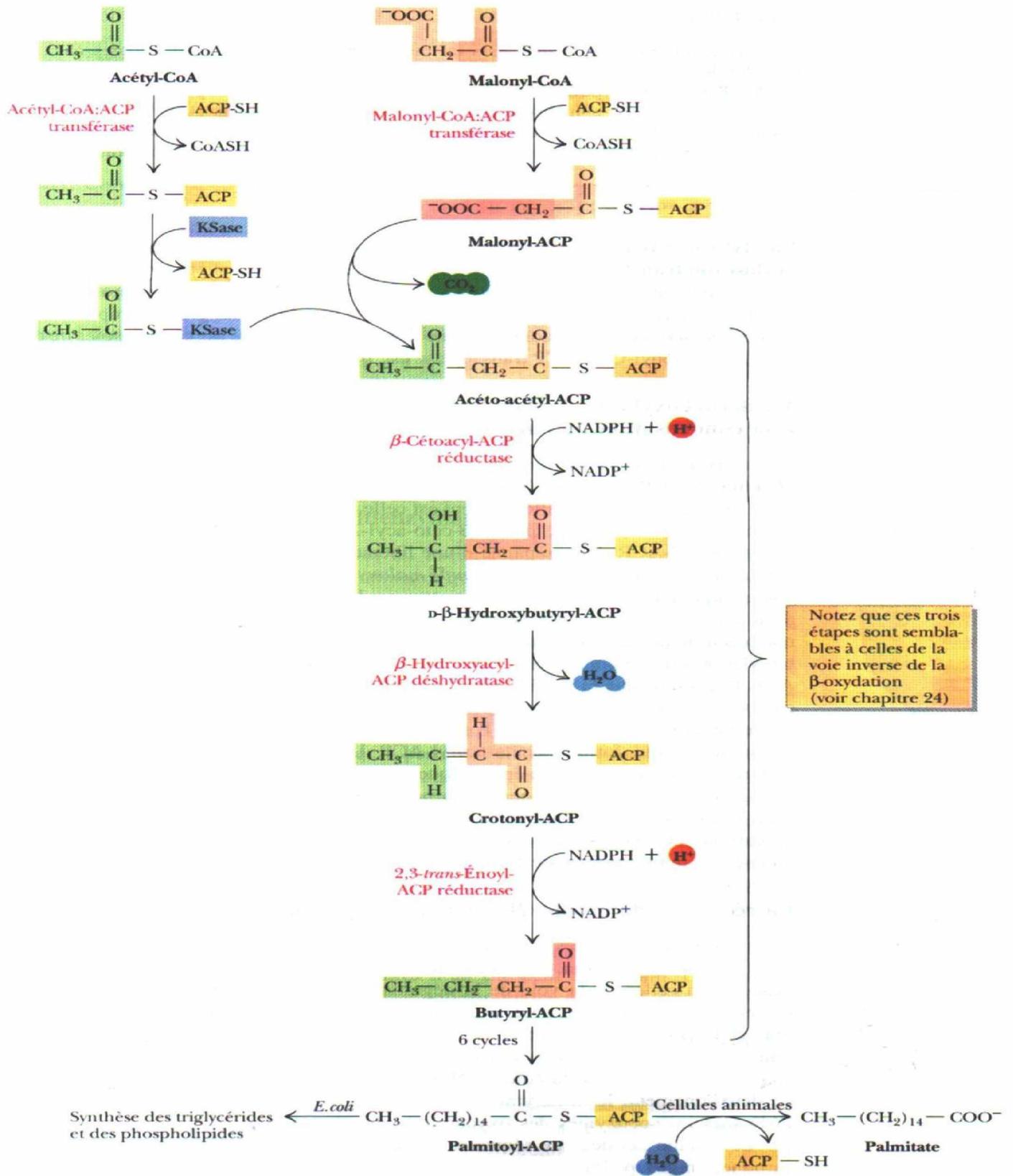
De plus, une consommation excessive de matières grasses riches en acides gras (mono-insaturés) favorise comme toute les graisses, une prise de poids pouvant conduire à l'obésité [37].

#### **II-4-5- BIOSYNTHESE DES ACIDE GRAS**

Les étapes individuelles de l'allongement des chaînes des acides gras sont pratiquement les mêmes dans les organismes (Figure 04). Les enzymes permis de distinguer chacune des étapes du processus avant de pouvoir les analyses, par extension, celui des étapes de la biosynthèse chez les animaux. Les réactions d'allongement commencent par la formation de l'Acétyl-ACP et du Malonyl-ACP.

La synthèse des acides gras s'arrête dans le cytosol au niveau de l'acide palmitique [34].

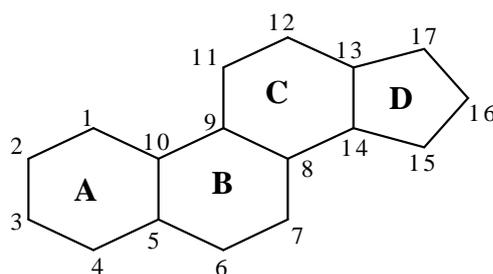
Figure 4 : La Biosynthèse des Acides gras



## II-5- STEROLS

### II-5-1- DEFINITION

Les stérols sont un constituant essentiel des membranes cellulaires. On les trouve aussi bien chez les animaux que dans les végétaux. Tous les stérols ont en commun le même noyau (**49**) et ils diffèrent par la chaîne latérale. Le cholestérol est exclusivement d'origine animale.



**49**

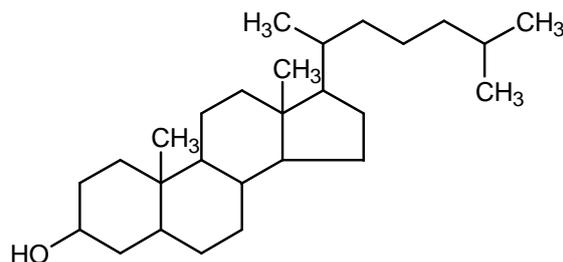
#### *Noyau Stérol*

Les stérols possèdent un groupement hydroxyle sur l'atome de carbone 3. (Généralement) une liaison double entre les atomes de carbone 5 et 6 ainsi qu'une chaîne latérale attachée au sommet 17 du noyau perhydrocyclopentano phénanthrène (**49**) [38,39,40].

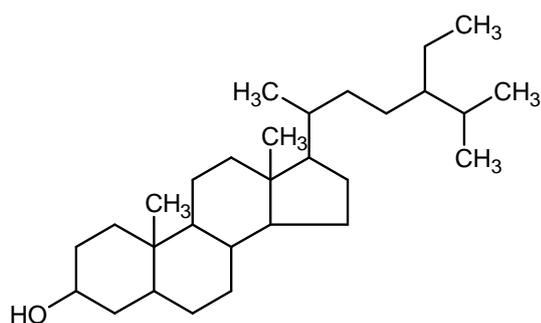
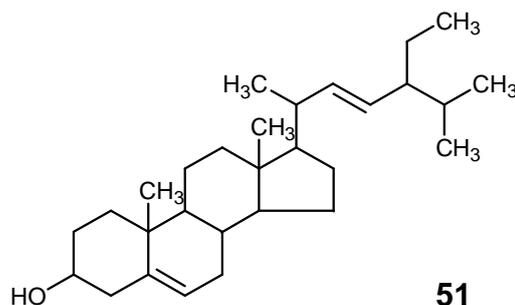
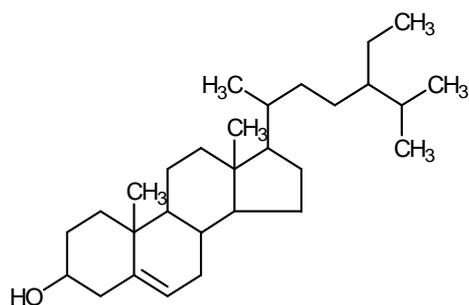
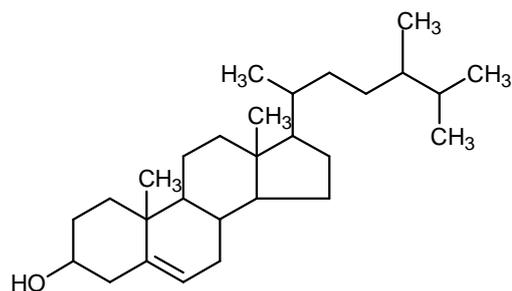
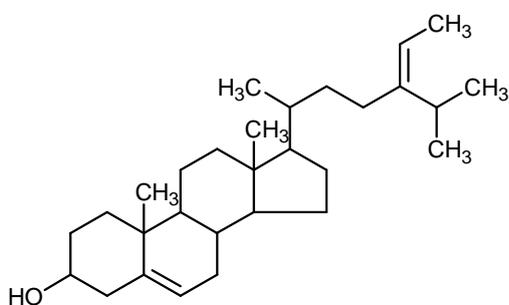
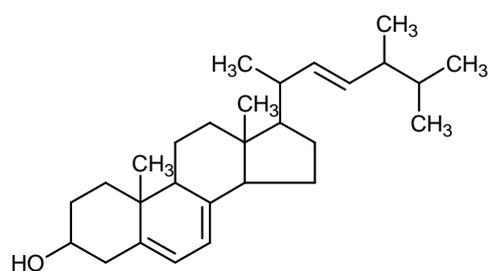
Le cholestanol (**50**) se trouve mêlé au cholestérol en très faible quantité dans les tissus animaux. Le caprostanol épimère du choléstanol, se rencontre dans les matières fécales. Le choléstanol et coprostérol sont des stérols saturés, que nous pouvons représenter par un noyau de projection plane et conventionnelle ou par des structures conformationnelles [41, 42,43].

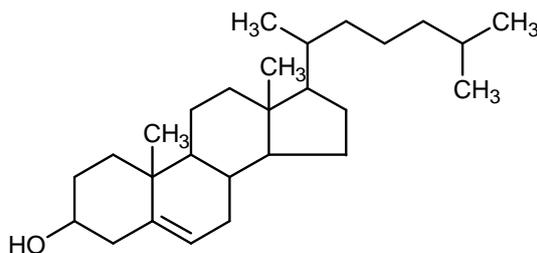
**50**

#### *Choléstanol*

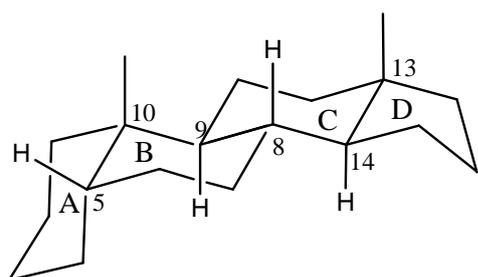
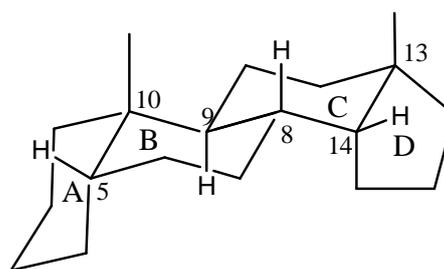


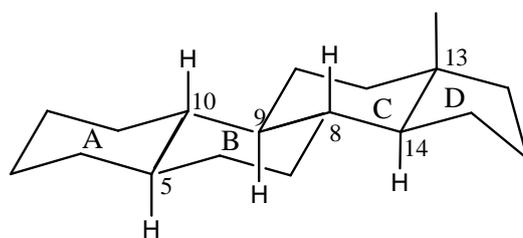
Bien que le cholestérol ne se trouve pas dans les plantes, on y rencontre plusieurs stérols apparentés, connus sous le nom de phytostérols. Le plus important est l'ergostérol, qui, par l'action des radiations de la lumière ultra violette donne le calciférol ou la vitamine D<sub>2</sub>. Cette substance possède des propriétés antirachitiques analogues à celle de la vitamine D [42, 43, 44].

**Stigmastanol****52****Stigmastérol** **$\beta$ -sitostérol****53****Campestérol****54****Fucostérol****45****Ergostérol****46**

**47****Cholestérol****II-5-2- STEREOCHIMIE**

Les différences stéréochimiques les plus observées dans la structure des stérols ont trait à l'orientation de l'hydroxyle lié au sommet 3 et à la configuration des cycles condensés A et B. l'hydroxyle sur le carbone 3 est *cis* par rapport au groupements méthyles angulaires dans les stérols naturels. On désigne cette configuration par la lettre Grecque  $\beta$  et l'orientation inverse ou *Trans*, par la lettre Grecque  $\alpha$ . Dans les stérols naturels, l'orientation de la chaîne extra nucléaire et le plus souvent  $\beta$  et la configuration habituelle des cycles condensés B/C et D/C est *trans*. La forme *cis* peut être préparée synthétiquement [43].

**A/B Cis, C/D trans****A/B Cis, C/D Cis**



**A/B trans, C/D trans**

**Figure 05** : stéréochimie de noyau stérol

### II-5-3- LA BIOSYNTHESE DES STEROIDES

Une séquence remarquable de couplage d'alcènes, au niveau intramoléculaire, est observée dans la nature lors d'un tronçon de la voie biosynthétique conduisant, au noyau stéroïde. Dans ce processus, une molécule appelée squalène est oxydée grâce à une enzyme en oxyde de squalène qui contient un cycle Oxacyclopropane. L'ouverture enzymatique, catalysée par un acide, du cycle de l'Oxacyclopropane est suivie de quatre étapes où se forment des liaisons Carbone-Carbone en cascades, selon un précurseur biologique du cholestérol. De telles cyclisations (Cyclisation biochimique des alcènes) ont également été réalisées au laboratoire. Ces réactions sont hautement Régiosélectives et Steriospécifiques et constituent un procédé commode de synthèse des stéroïdes.

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

L'oxydation (en présence de NADPH et O<sub>2</sub>) conduisant au squalène 2,3-oxyde, le quel sous l'action d'une squalène Cyclase se transforme en Cycloartanol, puis se produisent des hydrogénations partielles, la création d'une fonction alcool et la perte de trois groupements méthyle [38,45, 43]

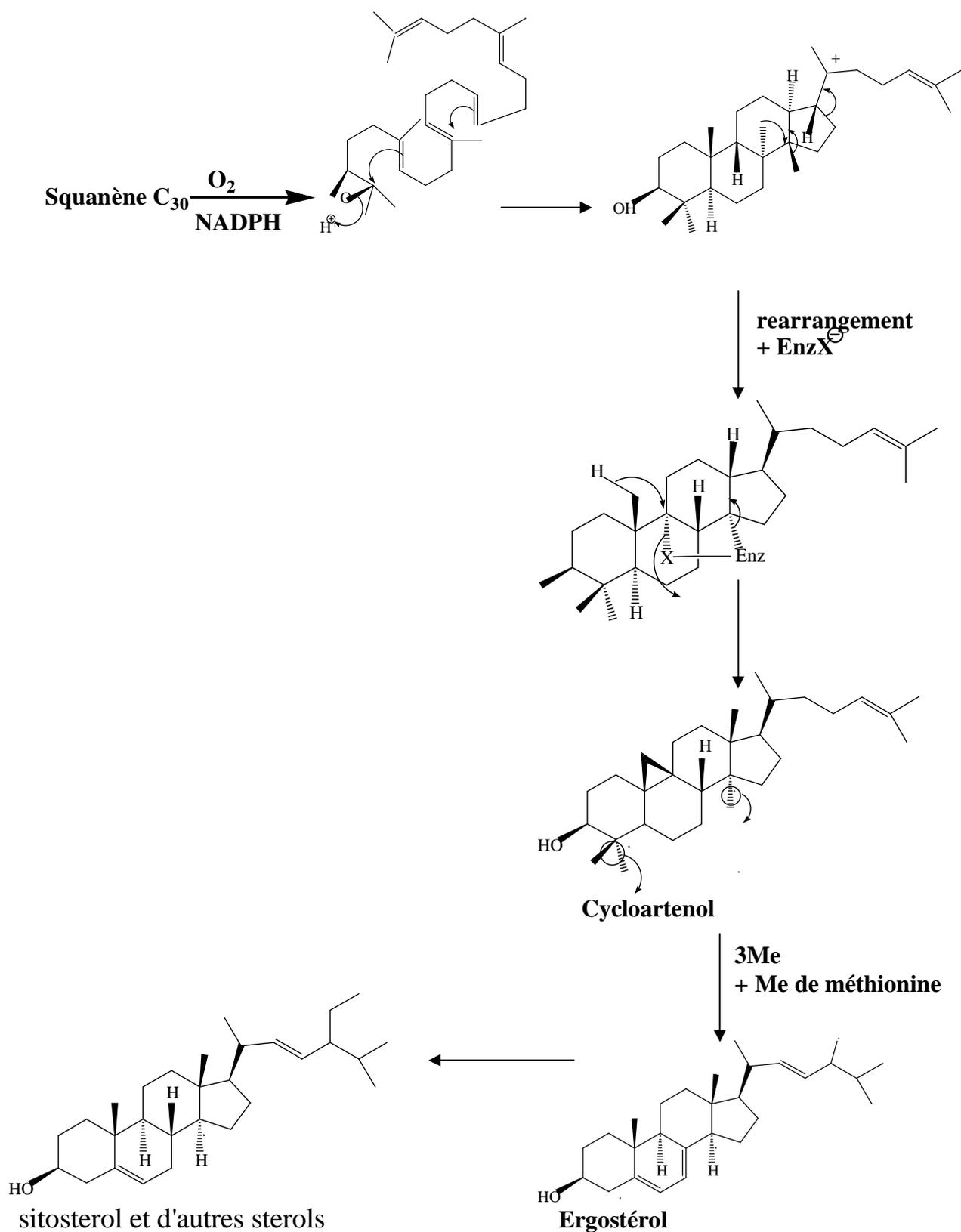


Figure 6: *Biosynthèse des stérols*

#### **II-5-4- INTERET THERAPEUTIQUE DES STEROLS**

On peu résumer les fonctions biologiques des stéroïdes par les points suivants [45, 46] :

1- Dans les plantes, algues, champignons, ainsi que chez les animaux, le cholestérol est la source de tous les métabolites de type stéroïdes.

2- les stérols ont un rôle vital dans la maintenance de l'intégrité structurale de la plupart des structures membranaires des organismes.

3- Ils assistent aussi dans la régulation de la perméabilité de ces membranes aux différents ions.

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

# CHAPITRE 3

SEPARATION DES COMPOSES  
ET DETERMINATION DE  
LEURS STRUCTURES

**III-1-EXTRACTION**

1Kg des parties aériennes de la plante préalablement séchée, est réduite en poudre, puis mise à macérer pendant 48 heures dans l'éther de pétrole(8.5 litres).Après filtration et élimination du solvant, 21 grammes de l'extrait ethyro pétrolique ont été obtenus.

Les marcs sont mis de nouveau à macérer dans le chloroforme. La filtration du mélange et la concentration de la solution obtenue ont donné 17grammes de l'extrait chloroformique, Enfin, la macération dans le méthanol du résidu issu de l'étape précédente, puis la filtration et enfin l'évaporation à sec du filtrat, a permis d'obtenir 35 grammes de l'extrait méthanolique.

L'ensemble des opérations d'extraction de la plante décrites précédemment, est illustré par le schéma d'extraction (figure 07) :

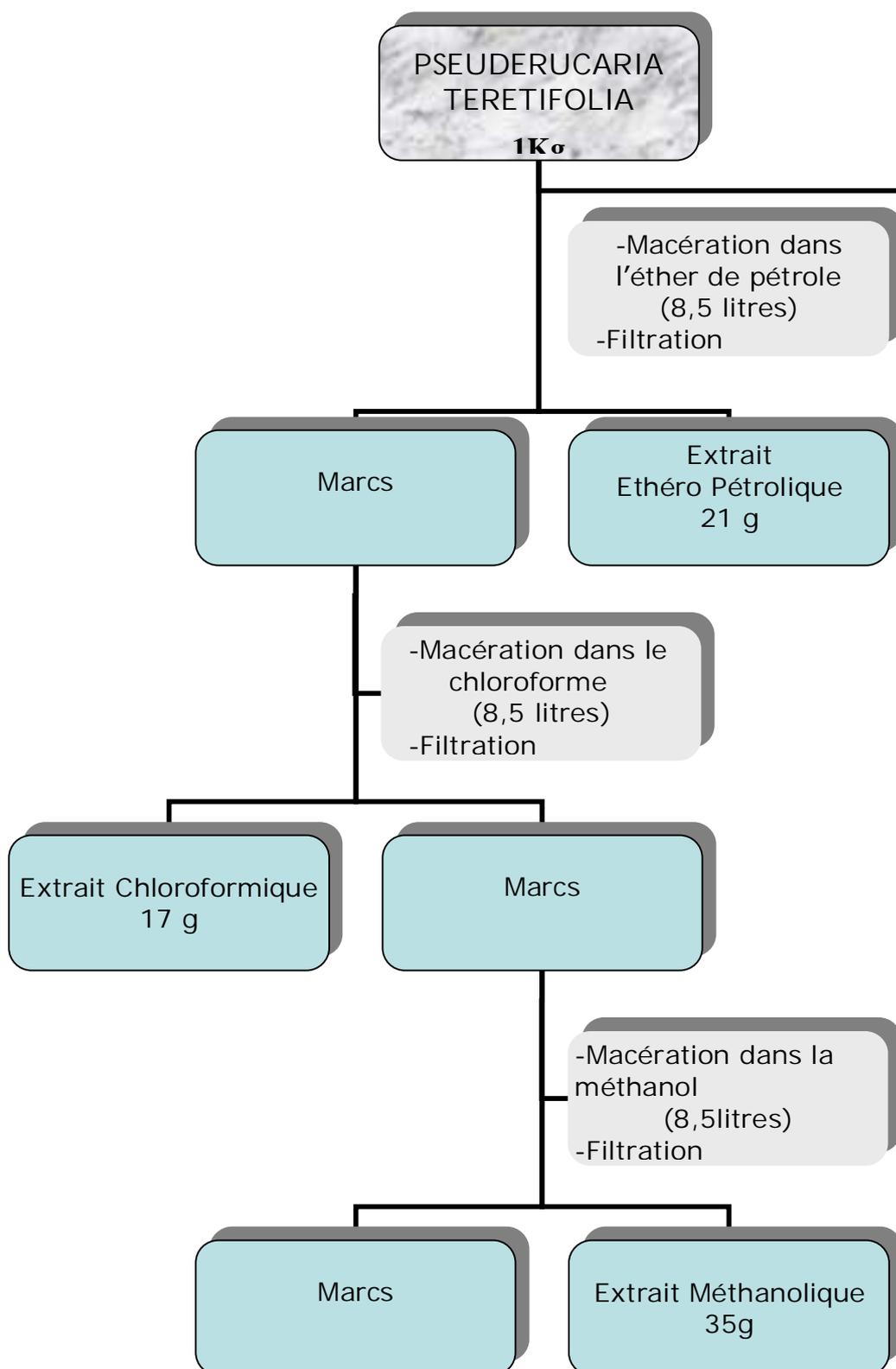


Figure 07 : Schéma de l'extraction

### III-2- SEPARATION ET PURIFICATION

L'analyse chromatographie sur couche mince montre la grande similitude des deux extraits chloroformiques et éthéro pétrolique. Notre préférence s'est portée sur l'étude de l'extrait chloroformique, et ceci pour des raisons évidentes liées à la polarité.

10 grammes de l'extrait chloroformiques, ont été mis à chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase et pression normale. L'élution est réalisée au moyen de l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle, puis par un mélange chloroforme-méthanol. On termine la chromatographie avec le méthanol pur.

.Des fractions de 50 millilitres ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince. Les plaques ont été examinées à la lumière UV et révélées à la vanilline sulfurique. Ceci a donné, après rassemblement des fractions présentant des similitudes, 24 lots.

Le lot 9 montrant en CCM un composé majoritaire invisible en UV et donnant une coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique, a été chromatographie à son tour sur une colonne de gel de silice. L'élution a été réalisée par l'éther de pétrole - acétate d'éthyle à 95/ 5.

Le composé ainsi récupéré, a nécessité une autre purification par chromatographie sur couche épaisse CCE. Finalement 100 milligrammes du produit pur (composé A) ont été obtenus.

Le lot 12 issu du même extrait chloroformique montre en CCM (éluant : éther de pétrole-acétate d'éthyle 80/20) et après révélation à la lumière UV (254 nm, 366 nm) et à la vanilline sulfurique une tâche rose bien distincte correspondant au produit majoritaire. Ce lot est ainsi soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice

normale. L'élution a été réalisée par l'éther de pétrole et l'acétate d'éthyle dont la polarité est augmenté progressivement. Le composé ainsi récupéré, a nécessité une deuxième purification par chromatographie sur colonne de gel de silice avec le même éluant mais cette fois à 95/5 EP/ACOET. Une autre purification par chromatographie sur couche épaisse CCE a été réalisée. Finalement, 90 milligrammes du produit pur (Composé B) ont été obtenus.

### III-3- IDENTIFICATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLEES

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

#### III-3-1- IDENTIFICATION DU COMPOSE A

##### ü *Aspect chromatographique :*

- Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV (254-366nm).
- La couleur de ce composé après révélation à la vanilline sulfurique est violette.

##### ü *Analyse structurale :*

Le spectre de masse ESI (électrospray ionisation) enregistrés en mode négatif (figure 08), présentent un pic d'ion moléculaire à  $m/z = 413$   $[\text{M-H}]^-$

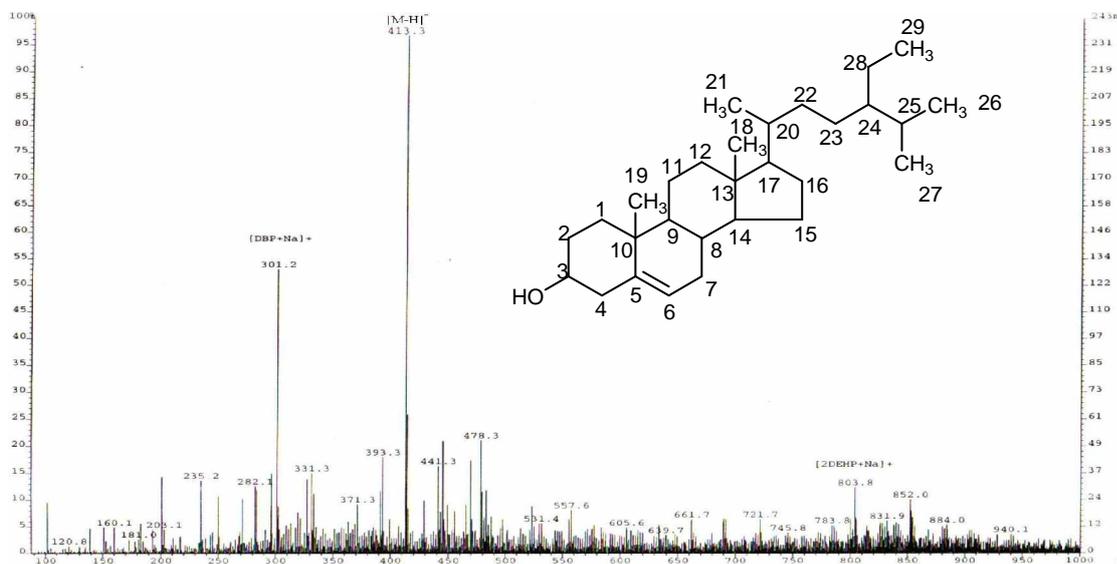


Figure 08 : Spectre de masse du composé A

Soit une masse moléculaire égale à 414 correspondant à une formule brute en  $C_{29}H_{50}O$ .

Le spectre infra-rouge (figure 09) de ce composé indique la présence : une large bande aux environs de ( $3445\text{ cm}^{-1}$ ) correspond au hydroxyle d'alcool.

Les deux bandes d'absorption aux environs de ( $2855\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ ) attribuables aux vibrations (C - H) de groupe d'alkyle  $CH_2$ ,  $CH_3$ . Tandit que la bande située autour de  $1600\text{ cm}^{-1}$  une faible intensité, correspond aux vibrations de double liaison.

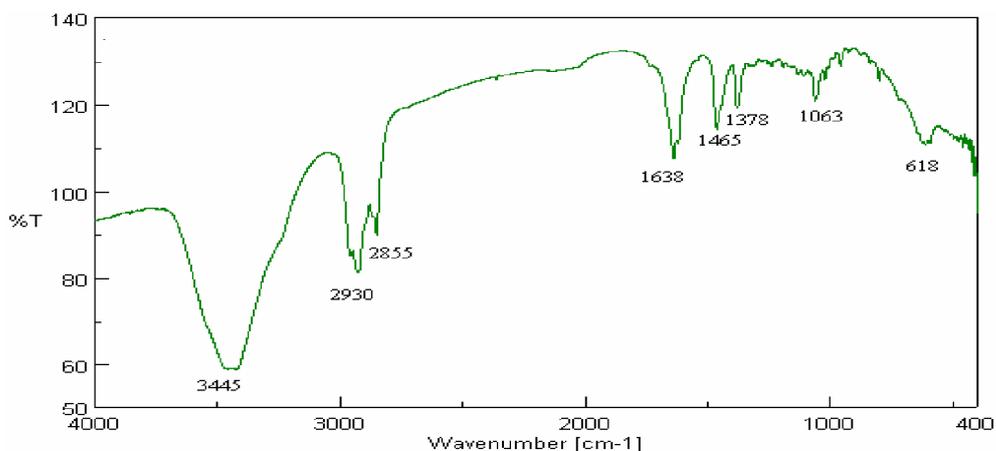


Figure 09 : Spectre IR du composé A

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la région méthylique du composé A enregistré à 400 MHz (figure 10) permet d'observer :

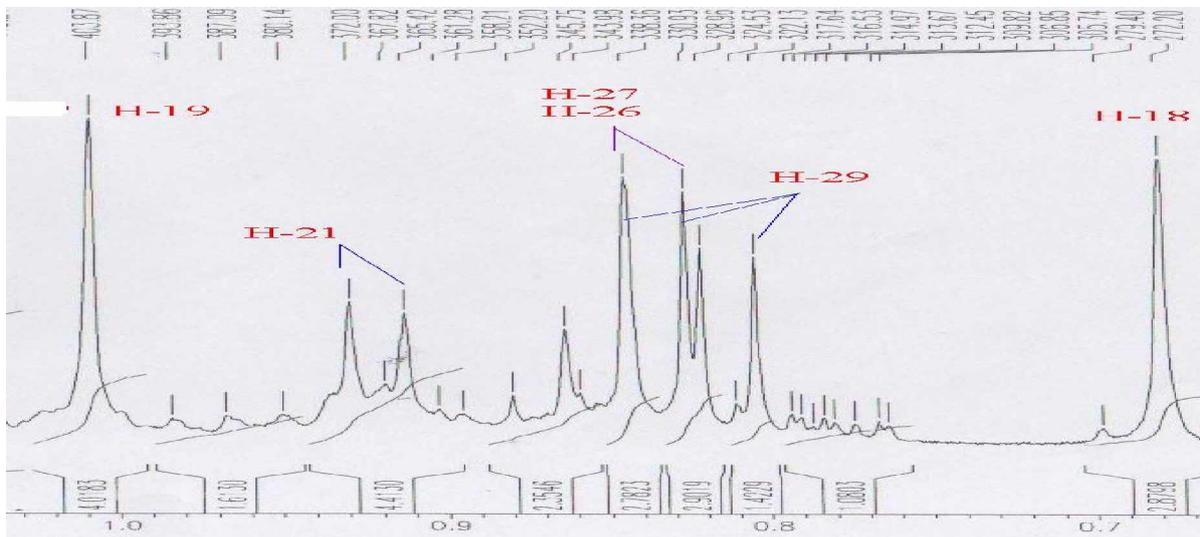
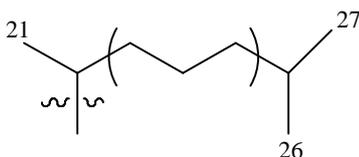
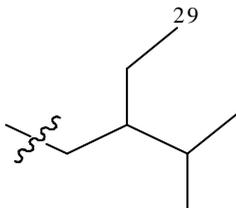


Figure 10 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé Du Composé A

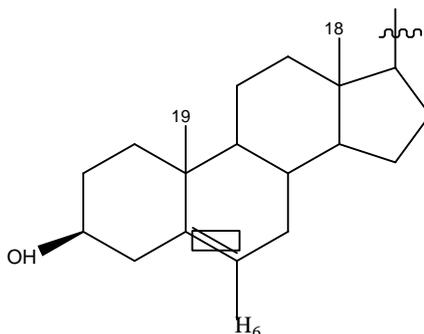
-- Présence de deux doublets (figure 11) à 0,84 ppm pour les méthyles 26, 27 et à  $\delta_{\text{H}} = 0,9$  ppm pour le méthyle 21.



- Un triplet résonant à  $\delta_{\text{H}} = 0,82$  ppm correspondant au proton méthylique C-29.



- Le signal singlet à  $\delta_H=0,69$  ppm et attribuable au méthyle H-18 et le signal singlet à  $\delta_H= 1,00$  ppm est attribuable au méthyle H-19. Ces valeurs sont en faveur d'une insaturation en position  $\Delta^5$ .



- Un signal doublet large (figure 12) à 5,35 ppm caractéristique d'un proton oléfinique H-6.

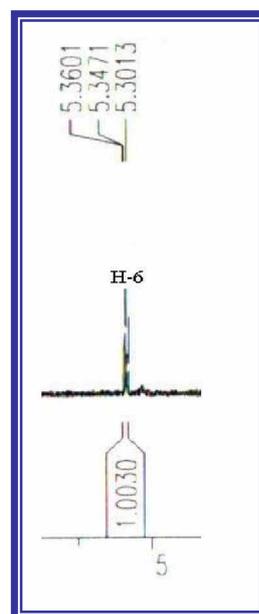


Figure 11 : Spectre RMN  $^1H$  étalé du composé A (Région 5.0 à 5.4 ppm)

- Par ailleurs on observe un signal septuplé ( $J=11,3$  Hz,  $J= 4,4$  Hz) résonnant à  $\delta_H=3,5$  ppm s'intégrant pour un proton et attribué au proton H-3.

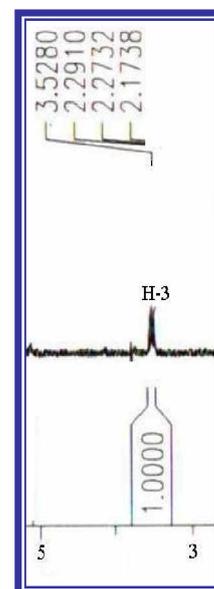
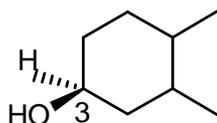


Figure 12 : Spectre RMN 1H Etale du Compose A  
(Région 3.48-3.58 ppm)

L'expérience COSY H-H (figure 14) montre clairement les corrélations entre :

- Le proton H-3 et un proton résonnant à  $\delta_H=2,28$  ppm correspondant au proton H-4
- Le proton H-3 et deux protons résonnant à  $\delta_H=1,49$  ppm et  $\delta= 1,83$  ppm correspondant respectivement au proton H-2e, H-2a.
- Le proton H-6 et deux protons H-7a résonnant à  $\delta_H=2,02$  ppm, et H-7e résonnant à  $\delta= 1,56$ .

Le spectre montre aussi les corrélations entre :

- Le proton H-1a et le proton H-1e résonnant à  $\delta_H=1,10$  ppm
- Le proton H-2a et le proton H-2e résonnant à  $\delta_H=1,83$  ppm
- Le proton H-25 et les protons des groupements méthyliques suivants : CH<sub>3</sub>-26, CH<sub>3</sub>-27 résonnant à 0,84 ppm.
- Le proton H-28 et le CH<sub>3</sub>-29 résonnant à  $\delta_H=0,82$  ppm.

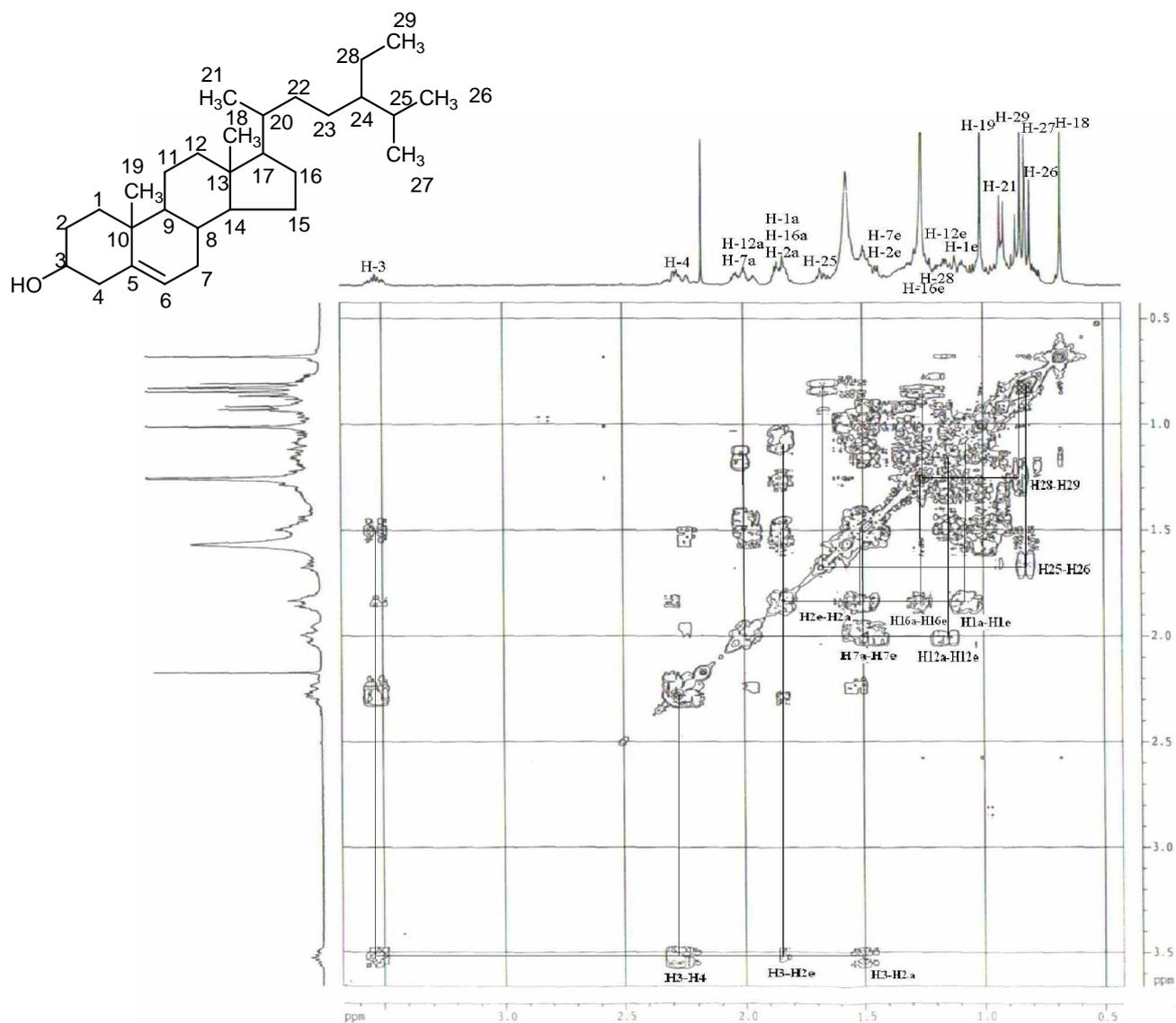


Figure 13 : Spectre COSY H-H du composé A

L'expérience de corrélation directe carbone-proton ou HSQC (figure 15) montre les couplages entre :

- Le proton H-18 et son carbone C-18 à  $\delta_c = 0,69$  ppm
- Le proton H-29 et son carbone à  $\delta_c = 11,8$  ppm
- Le proton H-26 et son carbone à  $\delta_c = 19,0$  ppm
- Le proton H-27 et son carbone à  $\delta_c = 19,8$  ppm

- Le proton H-21 et son carbone à  $\delta_c = 18,8$  ppm
- Le proton H-19 et son carbone à  $\delta_c = 19,4$  ppm
- Le proton H-28 et son carbone à  $\delta_c = 23,06$  ppm
- Le proton oléfinique H-6 et son carbone à  $\delta_c = 121,7$  ppm
- Le proton H-3 et son carbone à  $\delta_c = 71,8$  ppm

Toutes ces données spectrales nous orientent vers un squelette d'un stérol.

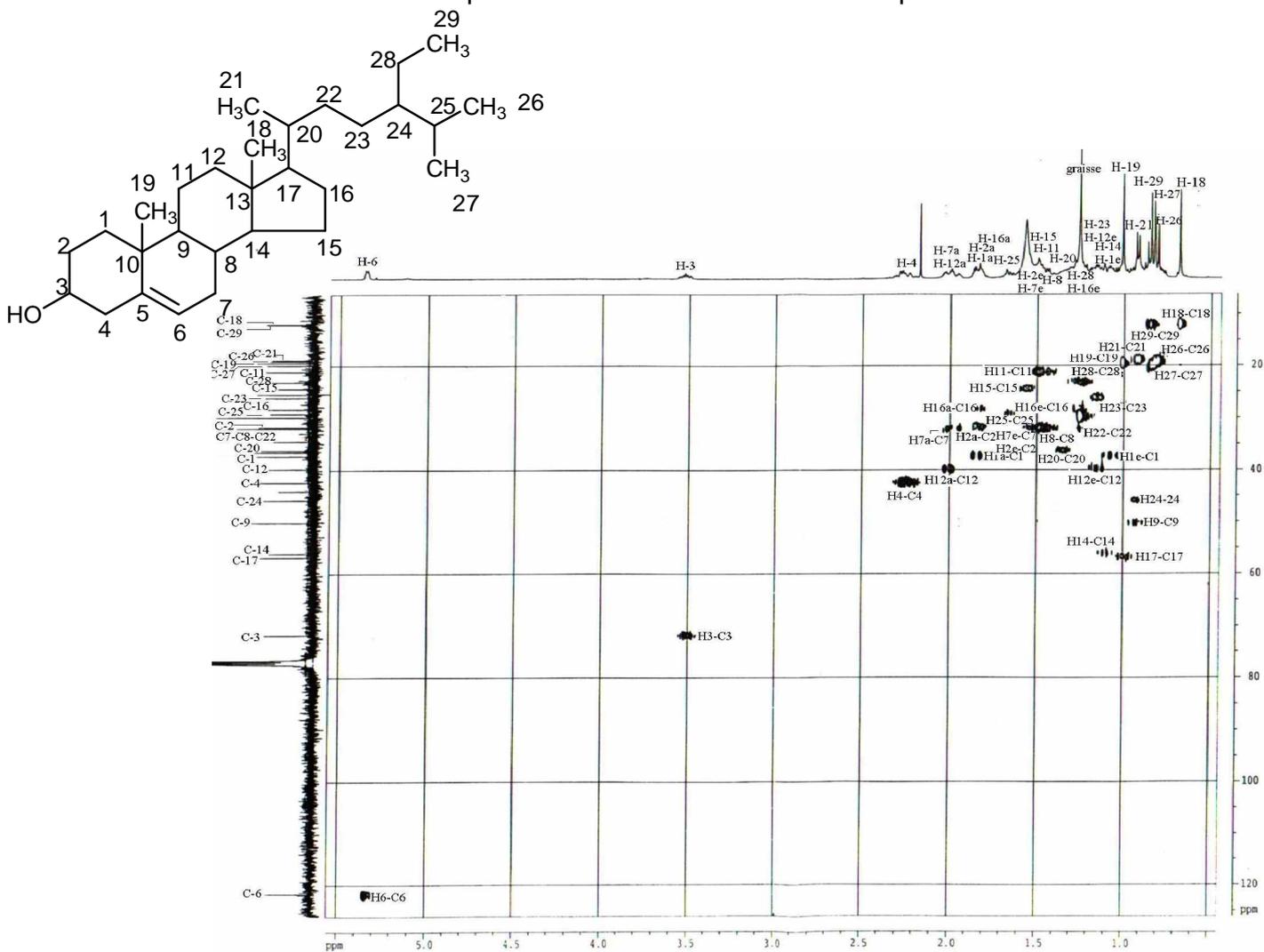


Figure 14 : Spectre *HSQC C-H* du composé A

Ces attributions sont confirmées par les données du spectre  $^{13}\text{C}$  (figure 16) qui montre la présence de 29 atomes de carbone et un pattern de signaux méthyliques caractéristiques des phytostérols (présence de six signaux méthyles).

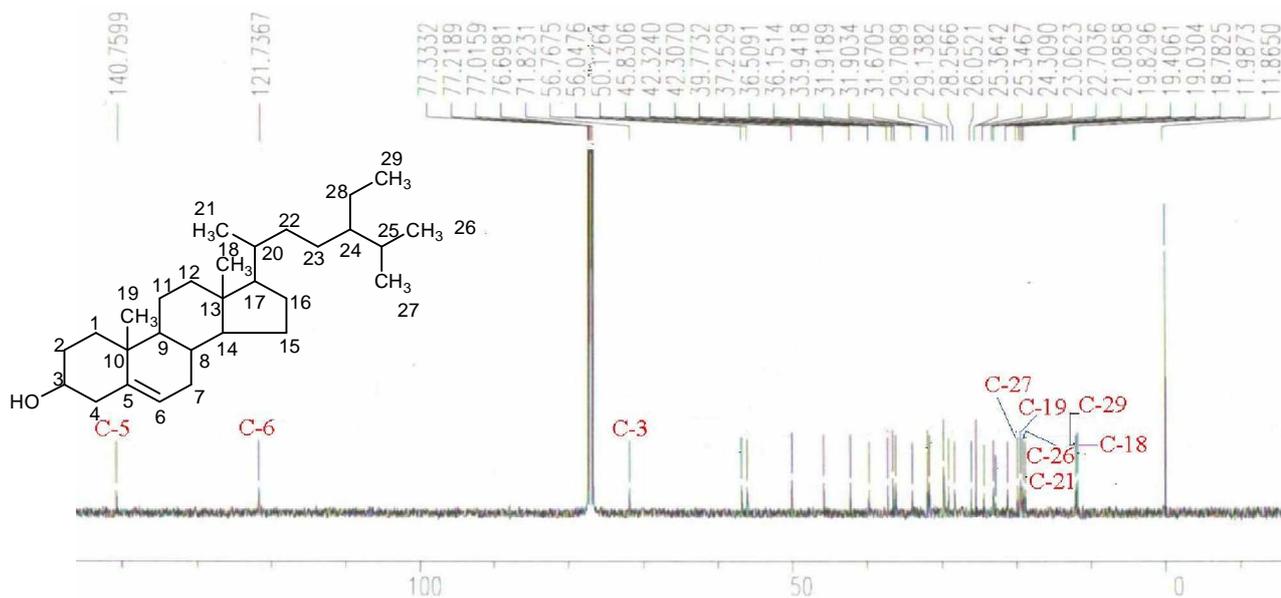


Figure 15 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A

Le spectre  $^{13}\text{C}$  montre également la présence de :

- carbone 3 porteur de la fonction  $\beta\text{-OH}$  apparaît à  $\delta=71,8$  ppm.
- Un signal caractéristique du carbone oléfinique C-6 résonnant à  $\delta=121,7$ ppm.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en J module (figure 17) de ce composé montre la présence de 29 atomes de carbone constitués principalement de :

- Six signaux méthyliques caractéristiques des phytostérols résonnant à 11,8 ppm, 11.8 ppm, 18.8ppm, 19.4ppm, 19.0ppm, 19.8 ppm attribués aux méthyles suivants :  $\text{CH}_3\text{-18}$ ,  $\text{CH}_3\text{-29}$ ,  $\text{CH}_3\text{-21}$ ,  $\text{CH}_3\text{-19}$ ,  $\text{CH}_3\text{-26}$ ,  $\text{CH}_3\text{-27}$ .

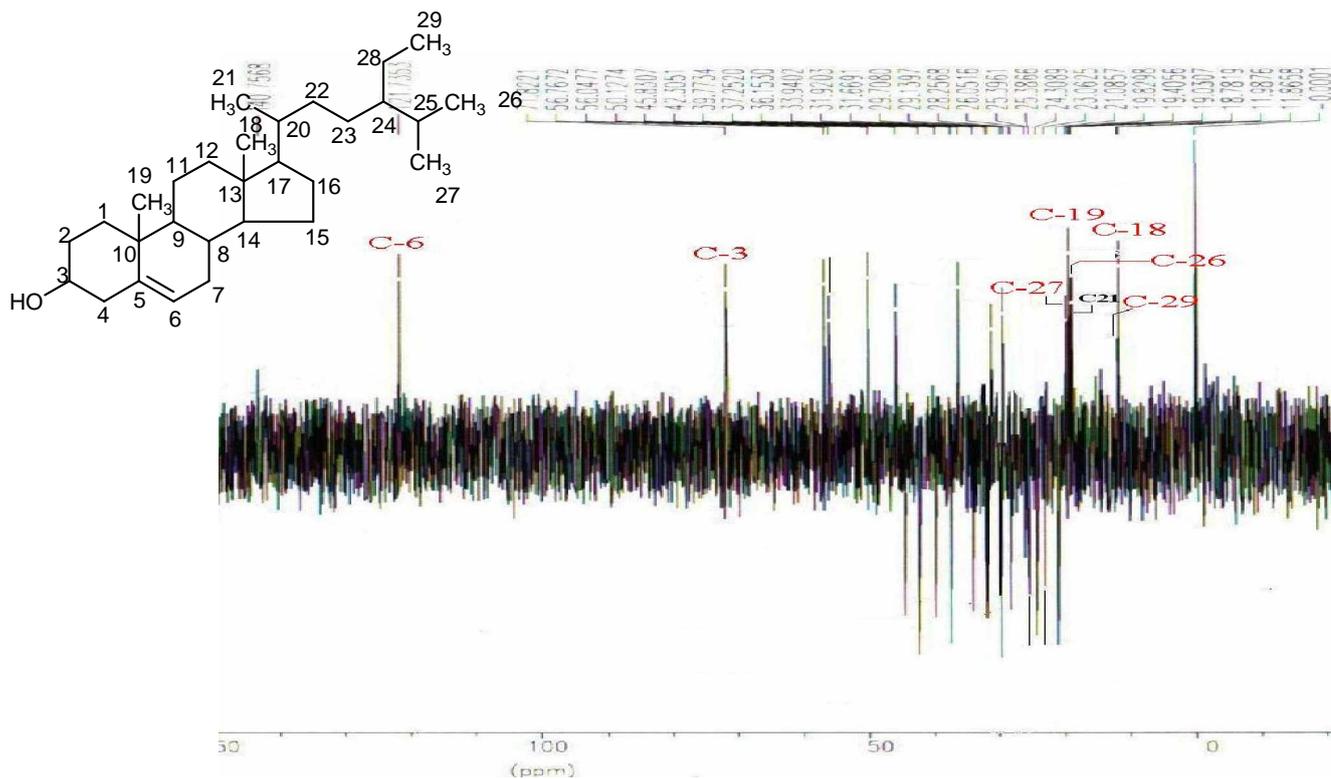


Figure 16 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135) du composé A

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en J module présente également :

- Un signal de résonance à champs faible ( $\delta_c = 121,7$  ppm) attribuable au carbone oléfinique C-6.
- Le carbone C-3 porteur de la fonction OH apparaît à  $\delta_c = 71,8$  ppm.



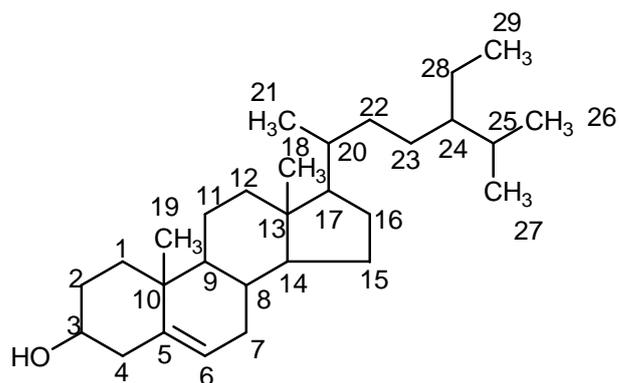
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A sont représentées dans le (tableau 3) :

Tableau 3: Résultats de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé A.

Numéro de C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	J (Hz)
1(CH <sub>2</sub> )	1,10 m 1,83 m	37,7	-
2(CH <sub>2</sub> )	1,49 m 1,83 m	31,6	-
3(CH)	3,5 sep	71,8	11.3 4.4
4(CH <sub>2</sub> )	2,28 m	39,7	-
5(C)	-	140,7	-
6(CH)	5,40 dl	121,7	-
7(CH <sub>2</sub> )	1,56 m 2,02 m	28,2	-
8(CH)	1.10-1.75 m	29,1	-
9(CH)	1.10-1.75 m	50,1	-
10(C)	-	31,9	-
11(CH <sub>2</sub> )	1.10-1.75 m	21,08	-
12(CH <sub>2</sub> )	1,11m 2,02 m	33,9	-
13(C)	-	42,3	-
14(CH)	1.10-1.75 m	56,04	-
15(CH <sub>2</sub> )	1.10-1.75 m	24,3	-
16(CH <sub>2</sub> )	1,25 m 1,83 m	26,0	-

17(CH)	1.10-1.75 m	56,7	-
18(CH <sub>3</sub> )	0,68 s	11,8	-
19(CH <sub>3</sub> )	1,00 s	19,4	-
20(CH)	1.10-1.75 m	36,1	-
21(CH <sub>3</sub> )	0,9 d	18,8	6.5
22(CH <sub>2</sub> )	1.10-1.75 m	29,7	-
23(CH <sub>2</sub> )	1.10-1.75 m	26	-
24(CH)	1.10-1.75 m	45,8	-
25(CH)	1,67 m	25,3	-
26(CH <sub>3</sub> )	0,84 d	19,0	7.0
27(CH <sub>3</sub> )	0,84 d	19,8	7.0
28(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	23,06	-
29(CH <sub>3</sub> )	0,82 t	11,8	8.8

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé A : 24-ethyl-cholest-5-en-3-ol.



### III-3-2- IDENTIFICATION DU COMPOSE B

#### ü Aspect chromatographique :

- Ce composé n'absorbe pas sous la lumière UV (254-366nm).
- La couleur de ce composé après révélation avec la vanilline sulfurique est rose.

#### ü Analyse structurale :

Le spectre de masse ESI (électrospray ionisation) enregistrés en mode positive. (Figure 18), présentent un pic d'ion moléculaire à  $m/z = 305$ .  $[M+Na]^+$ ,

Soit une masse moléculaire égale à  $M = 282$  correspondant à une formule brute relative à  $C_{18}H_{34}O_2$ .

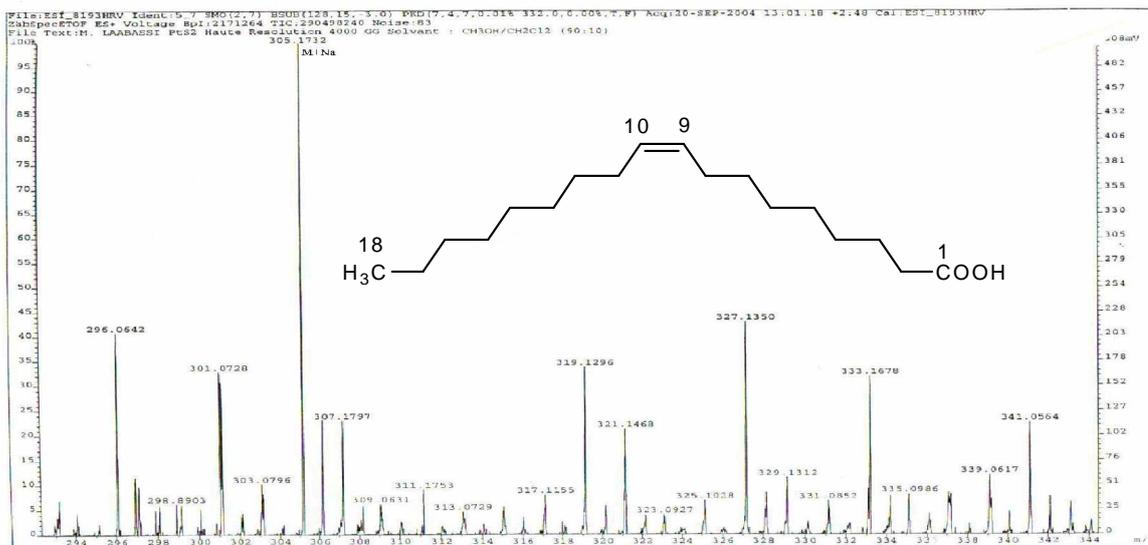


Figure 18 : Spectre de masse du composé B

Le spectre infra-rouge (figure 19) de ce composé indique la présence :

Une large bande aux environs de ( $3412\text{ cm}^{-1}$ ) correspond au hydroxyle.

Les deux bandes d'absorption aux environs de ( $2847\text{-}2922\text{ cm}^{-1}$ ) attribuables aux vibrations (C - H) de groupe d'alkyle  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , ces bandes sont très intenses ce qui indique un caractère très aliphatique. La bande située autour de  $1711\text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations des liaisons carbonyle. Tandit que une faible intensité, correspond aux vibrations de double liaison, tous ces signaux sont typique a acide gras insaturé.

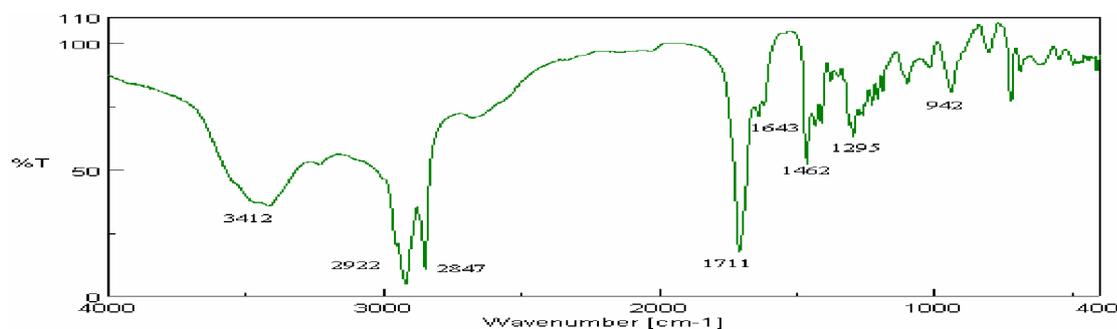
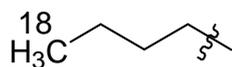
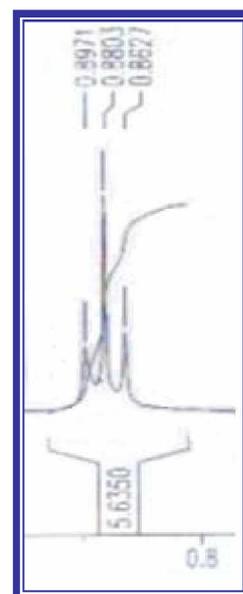


Figure 19 : Spectre I.R du composé B

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé B permet d'observer

- un triplet à  $\delta_{\text{H}} = 0.88\text{ ppm}$  correspondant au H-18 (figure 20).

Figure 20 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé du composé B (Région 0.86-0.89)

- Un signal (Figure 21) à 5.34 ppm caractéristique d'un proton H-9 et H-10.

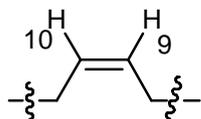
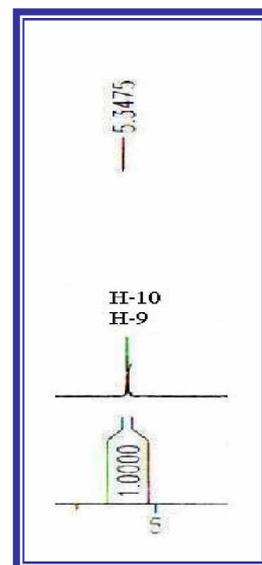


Figure 21 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé du composé B  
(Région 5.30-5.40 ppm)



- par ailleurs on observe un signal singlet résonnant à  $\delta_{\text{H}} = 11$  ppm s'intégrant pour un proton et attribué au proton acide (figure 22).

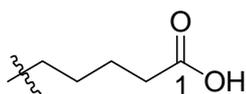
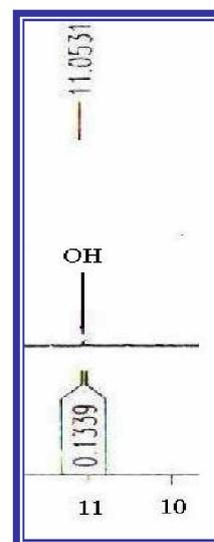


Figure 22: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé du composé B  
(Région 11.0-11.1ppm)



L'expérience de corrélation proton proton ou COSY H-H (figure 23) montre clairement les corrélations attendues entre :

- Le proton H-3 et le proton H-2 résonnant  $\delta_H = 2,36$  ppm
- Le proton H-3 et le proton H-4 résonnant à  $\delta_H = 1,25$  ppm
- Le proton H-8 et le proton H-7 résonnant à  $\delta_H = 1,25$  ppm
- Le proton H-8 et le proton H-9 résonnant à  $\delta_H = 5,34$  ppm
- Le proton H-18 et le proton H-17 résonnant  $\delta_{H17} = 1,3$  ppm

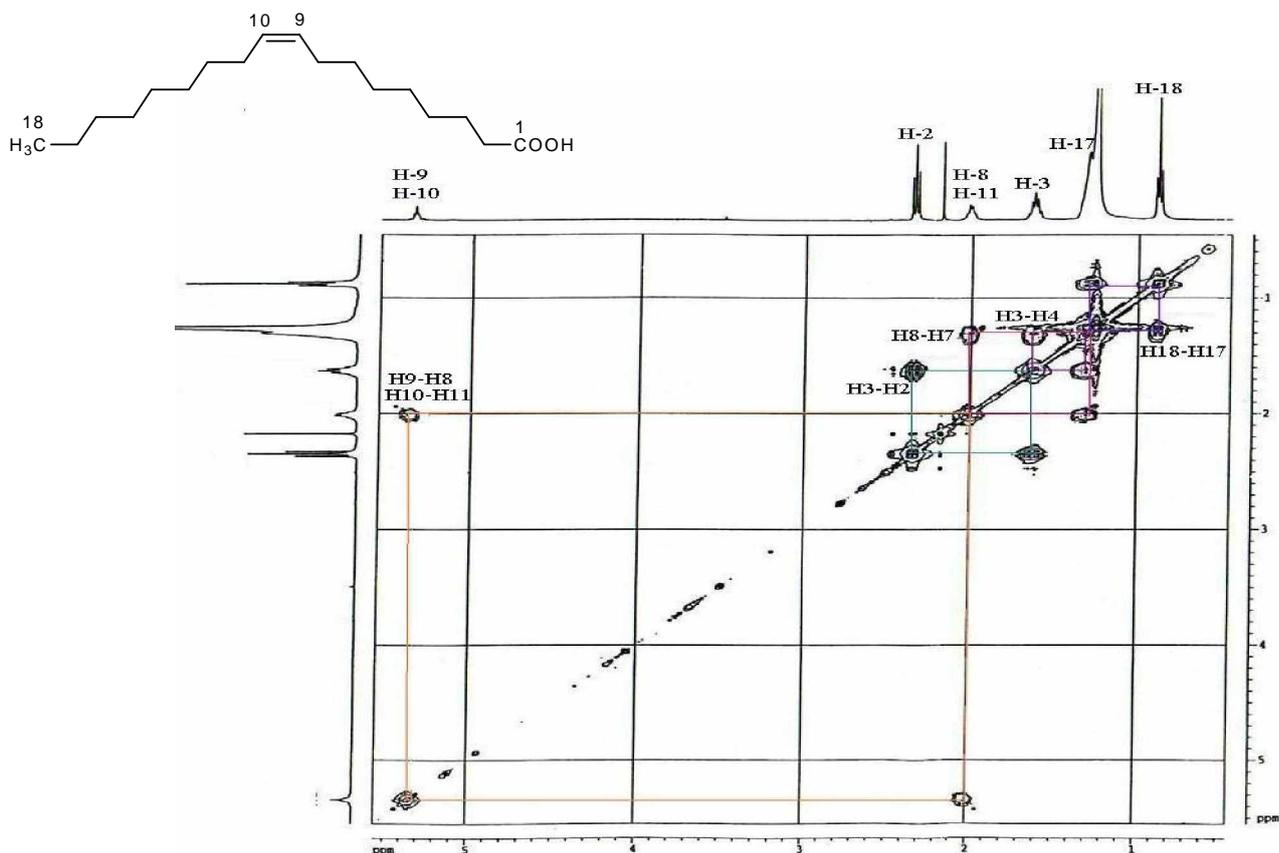


Figure 23: Spectre COSY H-H du composé B

L'expérience de corrélation proton carbone (HSQC) montre clairement les corrélations attendues entre :

- Le proton méthylique H-18 et son carbone C-18 à  $\delta_c = 14,13$  ppm
- Le proton H-17 et son carbone à  $\delta_c = 22,7$  ppm
- Le proton oléfinique H-9 et H-10 leur carbone à  $\delta_c = 130$  ppm
- Le proton H-8 et son carbone à  $\delta_c = 27,2$  ppm
- Le proton H-7 et son carbone à  $\delta_c = 29,04$  ppm
- Le proton H-4 et son carbone à  $\delta_c = 29,04$  ppm
- Le proton H-3 et son carbone à  $\delta_c = 24,69$  ppm
- Le proton H-2 et son carbone à  $\delta_c = 33,9$  ppm

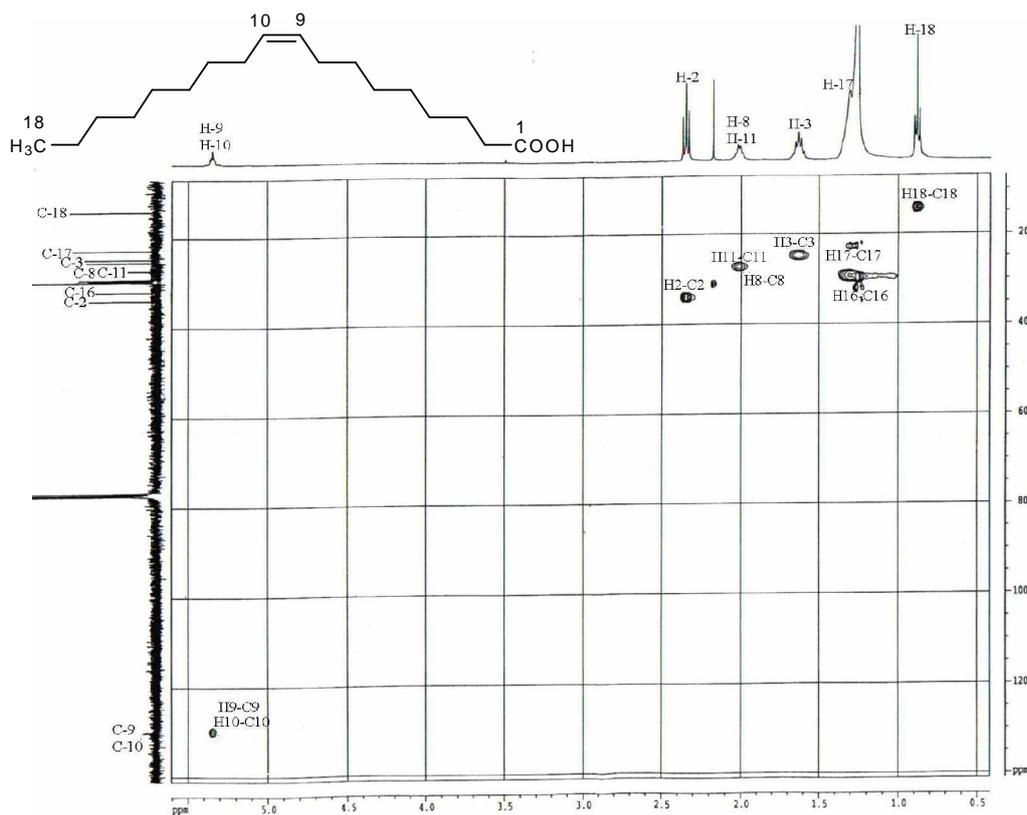
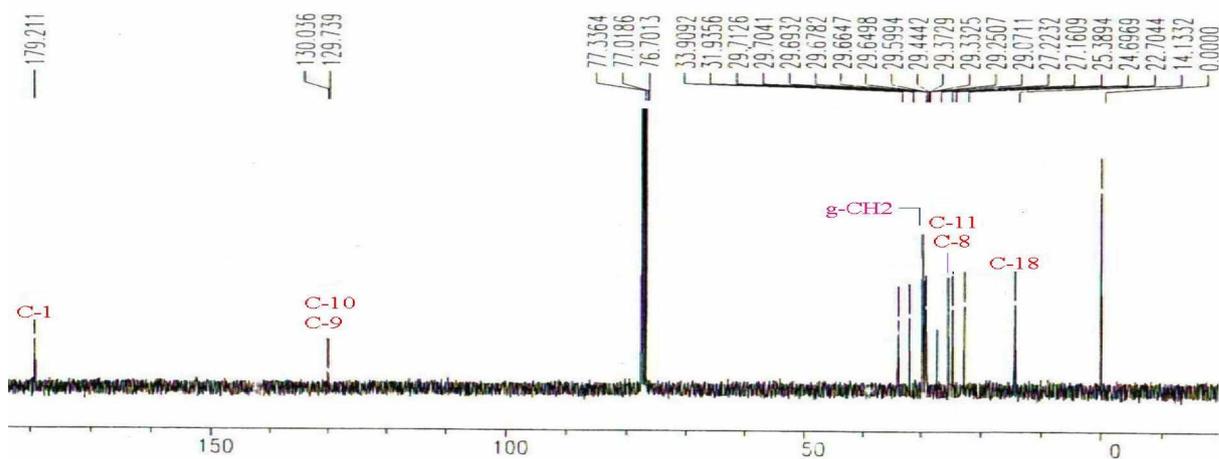


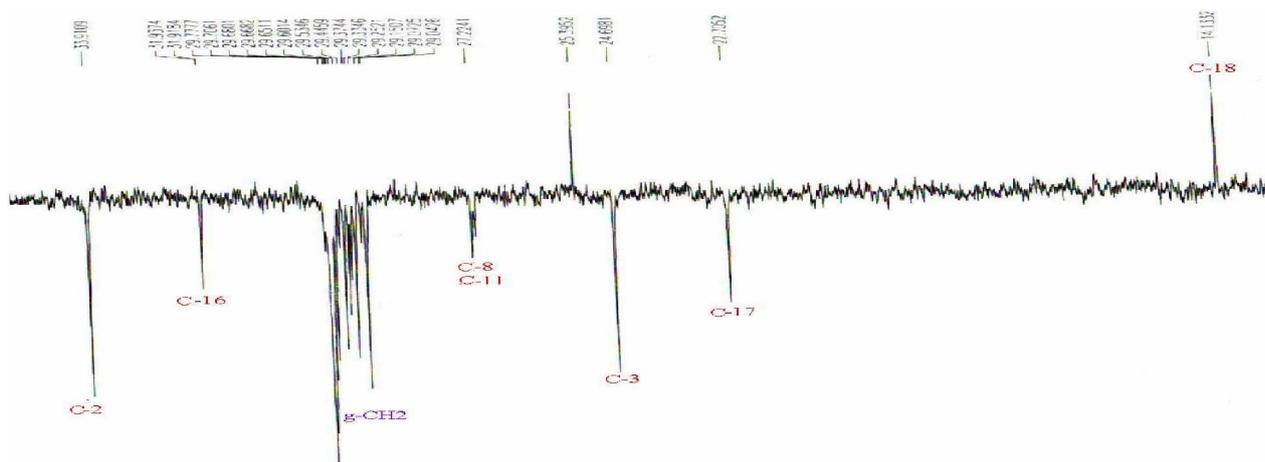
Figure 24: Spectre HSQC H-C du composé B

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé B indique (figure 25) :

Figure 25 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé B

- Un signal de résonance à champs fort ( $\delta_c = 14.13$  ppm) attribuable au carbone méthylique C-18.
- Un groupement de **CH<sub>2</sub>** résonnant à  $\delta_c = 29,4$  ppm
- Un signal résonnant à  $\delta_c = 130$  ppm. Attribuable au carbone oléfinique C-9 et C10.
- Le carbone C-1 porteur de la fonction C=O apparaît à  $\delta_c = 179,0$  ppm

Ces attributions sont confirmées par les données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en J modulé

Figure 26: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ (DEPT 135) du composé B

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  suivants montre tous les protons et les carbones du composé A.

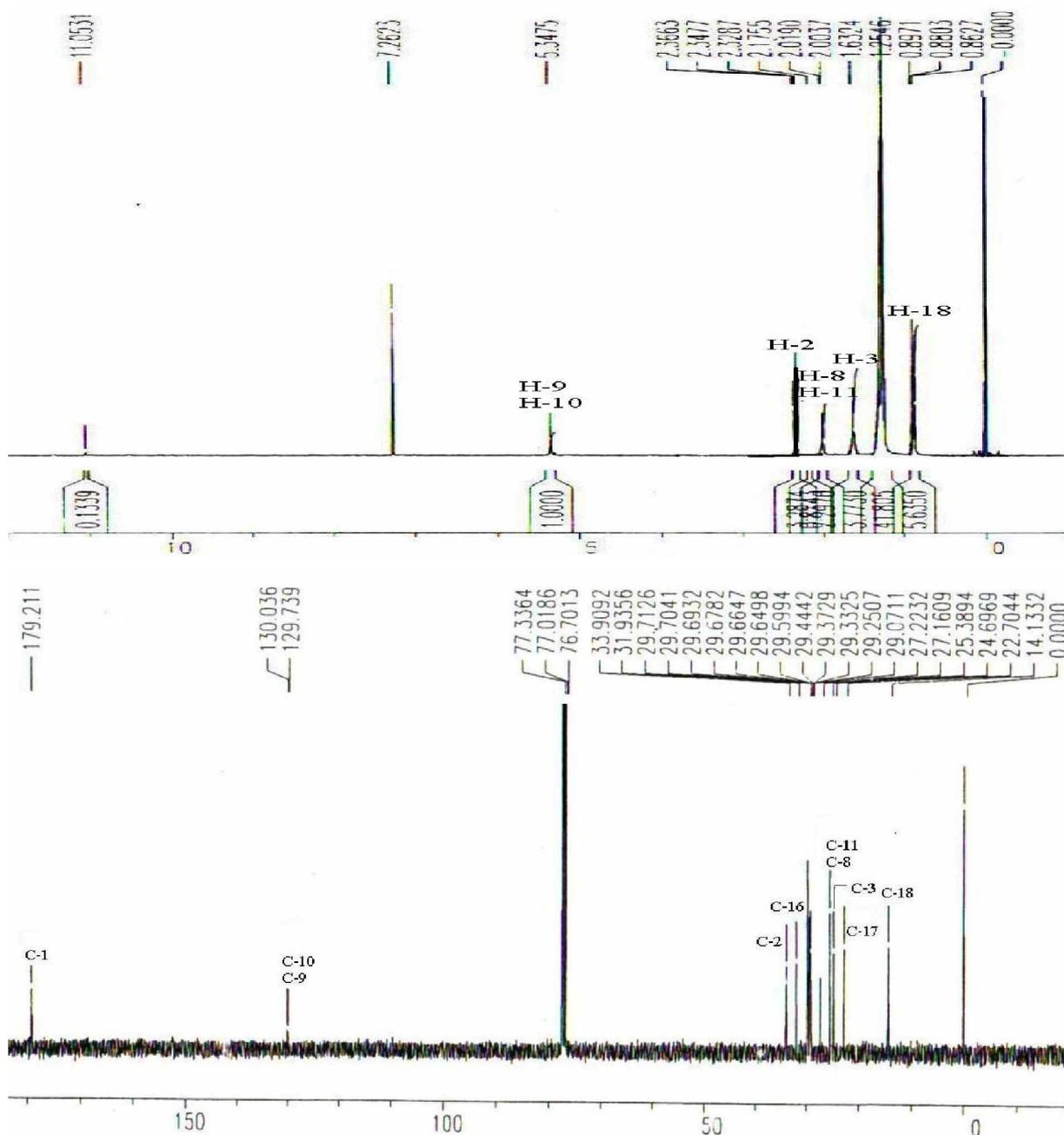


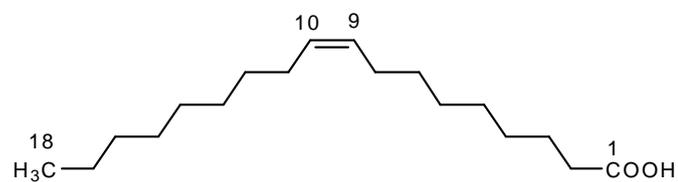
Figure 27 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé B

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé B sont représentées dans le (tableau 4) :

Tableau 4: Résultats de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé B.

Numéro de C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	J (Hz)
1(C)	-	179,0	-
2(CH <sub>2</sub> )	2,36 t	33,9	7.5
3(CH <sub>2</sub> )	1,6 m	24,69	-
4(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
5(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
6(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
7(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
8(CH <sub>2</sub> )	2,02 q	27,2	6.1
9(CH)	5,34 dtd	130	5.6 3.1 1.3
10(CH)	5,34 dtd	130	5.6 3.1 1.3
11(CH <sub>2</sub> )	2,02 q	27,2	6.1
12(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
13(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
14(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
15(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	29,04	-
16(CH <sub>2</sub> )	1,25 m	31,9	-
17(CH <sub>2</sub> )	1,3 m	22,7	-
18(CH <sub>3</sub> )	0,88	14,13	7,4

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé B : Acide (9Z) octadec-9-énoïque.



# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Daub, G. H.; Leon, A. A.; Silvermann, I. R.; Daub, G. W.; Walker, S. B.  
*Aldrichimica.Acta*, 17, 13-23. 1984.
- [2] Patrice Waridel.  
Investigation phytochimique des plantes aquatiques. Lusanne France 2003.
- [3] René Maire.  
Encyclopédie Biologique LXV III, Flore de l'afrigue Du Nord. Le chevalier, Paris  
France 1967.
- [4] P.Crété.  
Précis De Botanique. Masson 1965.
- [5] Ozenda, P.  
Flore du Sahara, ED.CNRS Paris France, 1991.
- [6] [www.google/](http://www.google.com) Biskra+image.com
- [7] Verhoeven D.T.H., Verhagen H., Goldbohm R.A., Van Den Brandt P.A.  
Van poppel G.  
A mini-review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by Brassica  
vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 103, 79-129. 1997
- [8] BELLAKHDAR, J.  
Medicine arabe ancienne et savoir populaires La pharmacopée marocaine  
traditionnelle, ibis press, 1997.
- [9] Whittaker R.H., Feeny P.P.  
Allelochemicals : chemical interactions between species. *Science*, 171 : 757-770.  
1971.
- [10] *Phytochemistry* 59 (2002) 663-671.
- [11] Hogge L.R, Reed, D.W, Underhill, E.W, Haughn, G.W.  
HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis  
thaliana* and their identification using thermospray liquide chromatography-mass  
spectometry. *Journal of Chromatographic Science* 26, 551-556. 1988.
- [12] Brown, L, M, K. L. Conn, W. A. Ayer, and J. P. Tewari.  
the camealexins-new phytoalexins produced in the leaves of *camelina sativa*  
(cruciferae). *Tetrahedron* 47 :3909-3914. 1991.
- [13] Conn, K. L., J. P. Tewari, and J. S. Dahiya.  
resistance to *Alternaria Brassicae* and phytoalexin elicitation in rapeseed and  
other crucifers. *Plant Sci.* 56 :21-25. 1988.

- [14] Jejelowo, O.A., K. L. Conn, K. L., J. P. Tewari.  
relationship between conidial concentration, germinating growth, and phytoalexin production by *Camelina sativa* leaves inoculated with *Alternaria brassicae*. Mycol. Res. 95 :928-934. 1991.
- [15] Jimenez, L. D., W.A.Ayer, and J. P. Twari.  
phytoalexins produced in the leaves of *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse). Phytoprotection 78 :99-103. 1997.
- [16] Pedras, M. S. C., I. Borgmann, and J. Taylor.  
Biotransformation of brassinin is a detoxification mechanism by the « blackleg » fungus. Phytochemistry( Life Sci. Adv.). 11 :1-7. 1992.
- [17] Pedras, M. S. C., and J. A. Q. Khan.  
Biotransformation of Brassica phytoalexin brassicanal A by the blackleg fungus. J. agric. Food Chem. 44 :3403-3407. 1996.
- [18] Pedras, M. S. C., and J. A. Q. Khan.  
unprecedented detoxification of cruciferous phytoalexin camalexin by a root phytopathogen. Bioorg. ,ed. chem. Lett. 7 :2255-2260. 1997.
- [19] Pedras, M. S. C., and J. A. Q. Khan, and J. L. Taylor.  
phytoalexins from Brassicas : overcoming plants defenses. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 658 :155-166. 1997.
- [20] Pedras, M. S. C., and J. A. Q. Khan, and J. L. Taylor. 1998.  
the phytoalexin camalexin is not metabolized by *Phoma lingam*, *Alternaria brassicae*, or phytopathogenic bacteria. Plant Sci. 139 :1-8.
- [21] Pedras, M. S. C., and F. I. Okanga.  
strategies of cruciferous fungal pathogens : detoxification of a phytoalexin by mimicry. Chem. Commun. 1998 :67-68. 1998.
- [22] Pedras, M. S. C., and J. L. Taylor.  
metabolic transformation of the phytoalexin brassinin by the blackleg fungus. J. org. Chem. 56 :2619-2621. 1991.
- [23] Koo Hui Mian et Suhaila mohamed.  
Flavonoide( Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. J. agric. Food Chem. 49, 3106-3112. 2001.
- [24] Hertog, M. G. L. ; Hollman, P. C. H., Venema, D. P. Optimization of a quantitative

- HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoid in vegetables and fruits. *J. agric. Food Cem.* 40, 1591-1598, 1992.
- [25] hertog, M. G. L. ;Hollman, P. C. H. ; Katan, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoid of 28 vegetables and fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. agric. Food Cem*, 40, 2379-2383. 1992
- [26] Nielson, J. k. ; olsen,C. e. ; Petersen,M. k.  
Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry*. 34(2), 539-544. 1993
- [27] E.Reeb, « Journal de pharmacie d'alsace- Lorraine », mai 1908.
- [28] E.Steinegger, T. Reichstein, *Pharm. Acta Helv*, 22,258. 1947
- [29] Résultats non publiés, à paraître.
- [30] Cutillo F. ; D'Abrosca B. ; Della Grecea M. ; Fiorentino A. ; Zarrelli A.  
Lignans and neolignans from *Brassica Fruticulosa* : effects on seeds germination and plant growth. *Journal Agricultural and Food Chemistry* : 51, 6165-6172. 2003.
- [31] Ackman, R.G. 1990. In "Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology." Avi Book, Van Nostrand Reinhold, New York.
- [32] Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Zarrelli A.  
Lignans and neolignans from *Brassica fruticulosa*: effects on seed germination and plant growth. *J Agric Food Chem* 51: 6165-6172. 2003.
- [33] Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Zarrelli A.  
Lignans and neolignans from *Brassica fruticulosa*: effects on seed germination and plant growth. *J Agric Food Chem* 51: 6165-6172. 2003.
- [34] Garrett, Grisham. *Biochimie*, Université de Boeck, pp. 238-241. 2000.
- [35] Jean Delaunay, *Biochimie*, 1988, pp. 447-456, Hermann, 5<sup>ème</sup> édition.
- [36] Adrian J., Potus J., Frangne R. 1999. *La Science Alimentaire de A à Z*. Lavoisier Tec & Doc ed, Paris.
- [37] Encarta 2006.
- [38] J. Guignard ; *Abrégé de biochimie à l'usage des en pharmacie*, pp. 179-183. 1974.
- [39] J. Guignard, I.Cosse et M. Henry.

- Abrégé de phytochimie, 1985, p.155, Masson.
- [40] D.G.Cram et G.S.Hammoud ; Chimie organique, 1968,pp. 918-930,  
2<sup>ème</sup> Edition, Quattheir-villars.
- [41] T.Higuchi ; Biosyntheis and biodegradation of wood components,1985,pp.380-  
420.
- [42] I.L.Finar; Organic chemistry,1994,2,pp.356-370,5<sup>ème</sup>Edition. J.M ;Secondary.
- [43] J.Mann ;Secondary ,metabolism, 1987,p.138-143,clarendon press.Oxford, 2<sup>ème</sup>  
edition.
- [44] T.Higuchi ; Biosyntheis and biodegradation of wood components,1985,pp.380-  
420.
- [45] J.Bruneton; Pharmacognosie et phytochimie des plante Médicinales, 1993,387-  
402,2<sup>ème</sup> édition, paris.
- [46] P.J.Teisseire ; Chimie des substances dorantes ; 1991, pp. 25-28.

# CHAPITRE IV

## PARTIE EXPERIMENTALE

## **IV-1- METHODES ANALYTIQUES ET APPAREILS**

### **IV-1-1- CHROMATOGRAPHIE**

#### **IV-1-1-a- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)**

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur) on été effectuées sur plaques de silice kieselgel 60 F254 MERK. (Indicateur de fluorescence). Après élution dans le solvant donné, les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm, 366 nm) puis révélation par la vanilline sulfurique.

#### **IV-1-1-b- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE EPAISSE (CCE)**

Les chromatographies analytiques sur couche épaisse (**CCE**), on été effectuées sur plaques de silice « kieselgel 60 F254 MERK ».

### **IV-1-2- SPECTROSCOPIE A RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$  1D et 2D) sont enregistrés dans le  $\text{CDCl}_3$  sur un appareil Bruker 400 MHz du laboratoire de Synthèse Organique, Université de Renne France.

Les déplacements chimiques sont relatifs au tétraméthylsilane (TMS), et les constantes de coupage sont exprimées en Hz.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135) sont enregistrés dans  $\text{CDCl}_3$  sur un appareil Bruker du laboratoire Synthèse Organique Université de Renne France.

Le standard interne pour les spectres du proton

( $^1\text{H}$ ) : TMS ( $\delta\text{H} = 0.00$  ppm) ou  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta\text{H} = 7.28$  ppm), pour les spectres du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) :  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta\text{H} = 77.0$  ppm). Les spectres  $^{13}\text{C}$  sont mesurés avec

découplage large bande en proton. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm dans l'ordre décroissant et les constantes de couplage J sont données en Hz. La multiplicité des signaux est donnée avec les abréviations.

#### **IV-1-3- SPECTROMETRIE DE MASSE (MS)**

Les spectres de masse sont enregistrés en ESI-8192 (Eléctro Spray Ionisation), en modes négatif et positif, sur un spectrométrie de masse de type Bruker LC-MS/MS type esquire-LC.

#### **IV-1-4- SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE (I.R)**

Les spectres IR sont enregistrés dans des pastilles de KBr sur un appareil de type Jasco FT/IR-4100 du département de chimie, de l'université de Batna.

#### **IV-1-5- NUMEROTATION DES STRUCTURES**

Dans la majorité des cas, la numérotation de la structure est en accord avec le nom IUPAC donné par le logiciel *Autonom*. Cependant, dans certains cas pour des raisons pratiques nous avons utilisé une numérotation arbitraire, indépendante du nom IUPAC de la molécule.

#### **IV-5- SOLVANTS**

Les solvants pour les chromatographies ainsi que pour les extractions sont des solvants de commerce purs : méthanol, chloroforme, par contre l'acétate d'éthyle, éther de pétrole sont distillés au préalable.

Solvant	Abréviation	Distillé sur
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>
Acétate d'éthyle	AcOEt	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Méthanol	MeOH	CaO
Ether de pétrole	X	CaCO <sub>3</sub>

TABLEAU 5 : les solvants

## IV-2- CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS

### IV-2-1- EXTRAIT ETHERO PETROLIQUE

Les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées sur l'extrait éthero pétrolique dans les systèmes d'élution suivants éther de pétrole 100%, éther de pétrole/ acétate d'éthyle 95/5 ; 85/15 montrent après examen par la lumière UV et révélation par la vanilline sulfurique suivie par un chauffage à 100 °C, plusieurs taches de couleur (rose, violet, vert), apparaissent (Figure 28 )

Figure 28 : *Extrait Ethéro Pétrolique*

### IV-2-2- EXTRAIT CHLOROFORMIQUE

L'analyse par CCM de l'extrait chloroformique dans les systèmes de solvants suivants: chloroforme 100%, éther de pétrole/ acétate d'éthyle 98/2, 95/5, 85/15 montrent après examen par UV et ensuite révélation par la vanilline, suivie par un chauffage à 100 °C, plusieurs taches de couleur (violet foncée, violet claire, rose) apparaissent (Figure 29).

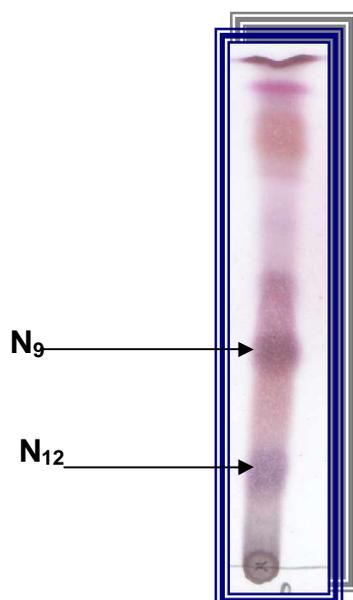


Figure 29 : *Extrait Chloroformique*

### IV-2-3- EXTRAIT METHANOLIQUE

L'extrait méthanolique examiné par CCM avec les systèmes de solvants chloroforme/méthanol : 90/ 10 montre des traînées avec des petites taches.



Figure 30 : *Extrait Méthanolique*

### IV-3- SEPARATION ET PUREFICATION

Dix grammes de l'extrait chloroformique, ont été mis à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase et pression normales. L'élution est réalisée au moyen du l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle, puis par un mélange chloroforme-méthanol 98/2 et 95/5. On termine la chromatographie avec le méthanol pur.

Des fractions de 50 millilitres ont été collectées, et analysées par chromatographique sur couche mince (CCM). Les plaques examinées à la lumière UV (254, 366nm) et révélées à la vanilline sulfurique. Ceci a donné, après rassemblement des fractions présentant des similitudes, 24 lots. Les résultats de ce traitement sont résumés dans le Tableau 6

Touts les fractions issues de cette colonne sont des mélanges plus ou moins complexes. Elles nécessitent d'autres traitements de purification.

TABLEAU 6 : les résultats de premier fractionnement

Fractions	Eluant	Observation en CCM
<b>Ether de pétrole /Acétate D'éthyle</b>		
1-4	98/2	Traînée
5-58	-	Traînée + Tâche
59-88	-	Tâche + Traînée
89-116	-	Tâche + Traînée
117-190	95/5	-
191-240	-	-
241-351	-	Tâche +Traînée
352-434	-	-
335-521	-	-
522-610	-	-
611-618	-	Tâche + Petite Traînée
619-660	-	Mélange Complexe
661-726	-	Mélange Complexe
727-764	92/8	Traînée + Petite tache
765-801	90/10	-
802-902	85/15	Mélange Complexe
903-947	-	-
948-999	75/25	Tâche + Traînée
1000-1334	70/30	Mélange Complexe

1335-1560	50/50	Traînée + Petite Tâche
1561-1581	25/75	Mélange Complexe
	<b>Chloroforme/ Méthanol</b>	
1582-1656	98 /2	Traînée
1656-1699	95/5	Néant

Les fractions sont étudiées par des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM). Examinées sous la lumière UV à 254 nm et 366 nm et révélées par la vanilline sulfurique, puis chauffées à 100°C. Les fractions présentant des similitudes sont réunies, donnant ainsi 24 lots tableau 7.

N° Lots (N <sub>x</sub> )	Fractions	Poids (mg)	Observation en CCM
1	1-22	1710	Traînée
2	23-58	170	Traînée + Petite
3	59-88	20	Tâche Traînée
4	89-116	30	Tâche + Traînée
5	117-190	100	Mélange Complexe
6	191-240	20	Traînée+ Petite Tâche
7	241-351	180	Tâche + Petite Traînée
8	352-434	130	Traînée + Petite Tâche
9	435-521	240	Tâche + Traînée
10	528-610	200	Traînée + Petite Tâche
11	611-618	240	Mélange Complexe
12	619-660	360	Tâche + Traînée
13	661-726	90	Traînée
14	727-764	60	Traînée+ Tâches

15	765-801	80	Traînée
16	802-902	210	-
17	903-947	180	-
18	948-999	170	-
19	1000_1334	630	-
20	1335-1561	240	-
21	1562-1656	180	-
22	1657-1662	320	-
23	1663-1665	690	-
24	1666-169	720	-

TABLEAU 7 : les 24 lots

Les lots 9 et 12 présentant, en CCM, des taches majoritaires avec de petites traînées, ont été mis de nouveau à chromatographier sur une colonne de gel de silice.

#### IV-3-1- TRAITEMENT DES FRACTIONS N<sub>9</sub> :

Les fractions (435-521) du tableau 7 sont réunies dans la fraction N<sub>9</sub> pour donner un mélange de 0,24 g. La fraction N<sub>9</sub> issue du même extrait chloroformique montre en CCM éluant : Éther de pétrole/acétate d'éthyle (85/15). Après révélation à la lumière UV (250nm, 366nm) et à la vanilline sulfurique, une tache violette bien distincte correspondant au produit majoritaire apparent. Ce lot est ainsi soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'élution a été réalisée respectivement par l'éther de pétrole - acétate d'éthyle à 95/ 5, Les résultats de cette manipulation sont portées dans le tableau 8.

Fractions		Eluant	Observations en CCM	Masse (mg)
1-9	H <sub>1</sub>	EP/ACOET 95/5	Traînée	10
10-17	H <sub>2</sub>	-	Traînée + Tâche	7
18-24	H <sub>3</sub>	-	Mélange complexe	20
25-31	H <sub>4</sub>	-	Traînée	10
32-39	H <sub>5</sub>	-	Traînée	3
40-44	H <sub>6</sub>	-	Traînée + Petite Tâche	30
45-52	H <sub>7</sub>	-	Traînée	-
53-59	H <sub>8</sub>	-	Tâche + Petite Traînée	40
60-67	H <sub>9</sub>	-	Tâche + Petite Traînée	100
68-94	H <sub>10</sub>	-	Mélange Complexe	4

TABLEAU 8 : le fractionnement de N9

On a mélangé les fraction H<sub>8</sub> et H<sub>9</sub> (H<sub>89</sub>). la fraction obtenue a été chromatographie sur CCE, éluée par un mélange éther de pétrole/ acétate d'éthyle 98/2 pour donner un composée A pur de masse égale 100 mg.

#### IV-3-2- TRAITEMENT DES FRACTIONS N12

Les fractions (611-618) du tableau 7 sont réunies dans la fraction N<sub>12</sub> pour donner un mélange de 0,36 g. La fraction N<sub>12</sub> montre en CCM un composé majoritaire invisible en UV qui donne une coloration violet après vaporisation à la vanilline sulfurique, Nous l'avons soumis à une nouvelle chromatographie sur colonne de gel de silice ; l'éluion a été réalisée par un mélange d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle dont la polarité est augmentée progressivement.

Les fractions de 50ml sont étudiées en chromatographie sur couche mince (CCM). Elles sont ensuite rassemblées en fonction de leur composition. Les résultats de cette manipulation sont portés dans le tableau 9.

Fractions		Eluant	Observations en CCM	Masse (mg)
1-8	M <sub>1</sub>	EP/ACOET 93/7	Traînée	130
9-57	M <sub>2</sub>	-	Tâche + Traînée	140
58-94	M <sub>3</sub>	-	Traîné	80
95-100	M <sub>4</sub>	-	-	10

TABLEAU 9 : le fractionnement de N12

140 mg (M<sub>2</sub>) ont été chromatographiés une 2<sup>ème</sup> fois sur colonne de gel de silice avec le même éluant, mais cette fois à 95/5 EP/ACOET. Les fractions de 50ml sont étudiées en chromatographie sur couche mince (CCM), elles sont ensuite rassemblées en fonction de leur composition. Les résultats de cette manipulation sont réunis dans le tableau 10.

Fractions		Eluant	Observations en CCM	Masse (mg)
1-8	S <sub>1</sub>	EP/ACOET 95/5	Mélange Complexe	12
9-57	S <sub>2</sub>	-	Tâche + Petite Traînée	110
58-94	S <sub>3</sub>	-	Tâche + Traînée	10
95-100	S <sub>4</sub>	-	Traînée	-

TABLEAU 10

Les sous fractions S<sub>2</sub> sont chromatographiées sur couche épaisse CCE. Finalement, 90 milligrammes du produit pur (composé B) ont été obtenus.

### V-3-3- CARACTERISTIQUE SPECTRALES

**V-3-3-1- COMPOSE A**

Formule brute : **C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O**

Nom systématique : 24-éthyl-cholest-5-én-3ol

Nom trivial : β-sitosterol

Etat physique : solide blanc

T de fusion = 135-137 C°

Rf =0,58 dans le système suivant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 80/20.

Composé invisible à l'UV et donne une couleur violette après révélation à la vanilline sulfurique.

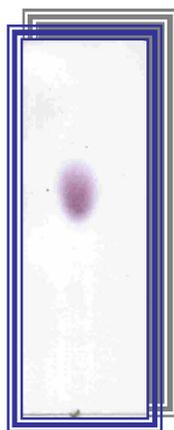


Figure 31: *le produit N<sub>9</sub>*

**SPECTRE RMN 1H (400, 13 MHz, CDCL<sub>3</sub>, TMS)**

1.83(m, 1H) =H-1a, 1.10(m, 1H) =H-1e

1.83(m,1H) =H-2a, 1.49(m,1H) =H-2e

3.5 (sep,1H) =H-3, J<sub>a-a</sub> = 11.3 Hz, J<sub>a-e</sub> =4.4 Hz

2.28(m, 2H) =H-4

5.40 (dl, 1H) =H-6

2.02(m, 1H) = H-7a 1.56(m, 1H) = H-7e

(1.10-1.75) (m, 1H) =H-8

(1.10-1.75) (m, 1H) =H-9

(1.10-1.75) (m, 2H) =H-11

2.02(m, 1H) = H-12, 1.11(m,1H)= H-12e

(1.10-1.75) (m, 1H) =H-14

(1.10-1.75) (m, 1H) =H-15

1.83(m, 1H) = H-16a, 1.25 (m, 1H) = H-16e

(1.10-1.75) (m, 1H) = H-17

0.68(s, 3H) = H-18

1.0(s, 3H) = H-19

(1.10-1.75) (m, 1H) = H-20

0.9(d, 3H) =H-21, J=6.5 Hz

(1.10-1.75) (m, 2H) = H-22

(1.10-1.75) (m, 2H) = H-23

(1.10-1.75) (m, 2H) = H-24

1.67(m, 1H) =H-25

0.84(d, 6H) = H-26, J=7 Hz

0.84(d, 6H) = H-27 J=7 Hz

1.25(m, 2H) = H-28

0.82(t, 3H) = H-29, J=8.8 Hz

#### **RMN13C (400, 13MHZ, CDCL3, TMS)**

37.7 (CH<sub>2</sub>-1), 31.6(CH<sub>2</sub>-2), 71.8(CH-3), 39.7(CH<sub>2</sub>-4), 140.7(C-5), 121.7(CH-6),

28.2(CH<sub>2</sub>-7), 29.1(CH-8), 50.1(CH-9), 31.9(C-10), 21.08(CH<sub>2</sub>-11), 33.9(CH<sub>2</sub>-12),

42.3(C-13), 56.04(CH-14), 24.3(CH<sub>2</sub>-15), 26.0 (CH<sub>2</sub>-16), 56.7(CH-17), 11.8(CH<sub>3</sub>-18),

19.4(CH<sub>3</sub>-19), 36.1(CH-20), 18.8(CH<sub>3</sub>-21), 29.7(CH<sub>2</sub>-22), 26(CH<sub>2</sub>-23), 45.8(CH-24) ,  
25.3 (CH-25), 19.0(CH<sub>3</sub>-26), 19.8(CH<sub>3</sub>-27), 23.06(CH<sub>2</sub>-28), 11.9(CH<sub>3</sub>-29)

**SPECTRE DE MASSE (m/z)**

[M-H]<sup>-</sup>=413.

M= 414.

**V-3-3-2- COMPOSE B**

Formule brute :  $C_{18}H_{34}O_2$

Nom systématique : acide (9Z) octadec-9-énoïque

Nom trivial : acide oléique

Etat physique : huile jaune

T d'ébullition: 286°C

T de fusion: 16,3°C

Rf=0,60 dans le système de solides suivant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 80/20.

Composé invisible à l'UV et donne une couleur rose après révélation à la vanilline sulfurique



Figure 32 : le produit  $N_{12}$

**SPECTRE RMN 1H (400,13 Mhz, CDCL3, TMS)**

2.36 (t, 2H) = H-2, J=7,5 Hz

1.6 (m, 2H) = H-3

1.28 (m, 2H) = H-4

1.25 (m, 2H) = H-5

1.25 (m, 2H) = H-6

1.25 (m, 2H) = H-7

2.02 (q, 2H) = H-8, J=6.1 Hz

5.34 (dtd, 1H) = H-9, J=5.6 Hz, J=3.1 Hz, J=1.3 Hz

5.34 (dtd, 1H) = H-10, J=5.6 Hz, J=3.1 Hz, J=1.3 Hz

2.02 (q, H<sub>2</sub>) = H-11, J=6.1 Hz

1.25 (m, 2H) = H-12

1.25 (m, 2H) = H-13

1.25 (m, 2H) = H-14

1.25 (m, 2H) = H-15

1.3 (m, 2H) = H-16

1.25 (m, 2H) = H-17

0.88 (t, 3H) = H-18, J=7.4 Hz

#### **RMN13C (400, 13MHZ, CDCL<sub>3</sub>, TMS)**

179. (C-1), 33.9 (CH<sub>2</sub>-2), 24.69 (CH<sub>2</sub>-3), 29.04 (CH<sub>2</sub>-4), 29.04 (CH<sub>2</sub>-5), 29.04 (CH<sub>2</sub>-6),  
29.04 (CH<sub>2</sub>-7), 27.2 (CH<sub>2</sub>-8), 130 (CH-9), 130 (CH-10), 25.38 (CH<sub>2</sub>-11), 29.04 (CH<sub>2</sub>-  
12),  
29.04 (CH<sub>2</sub>-13), 29.04 (CH<sub>2</sub>-14), 29.04 (CH<sub>2</sub>-15), 31.9 (CH<sub>2</sub>-16), 22.7 (CH<sub>2</sub>-17), 14.13  
(CH<sub>3</sub>-18).

#### **SPECTRE DE MASSE (m/z)**

[M+Na]<sup>+</sup> = 305.

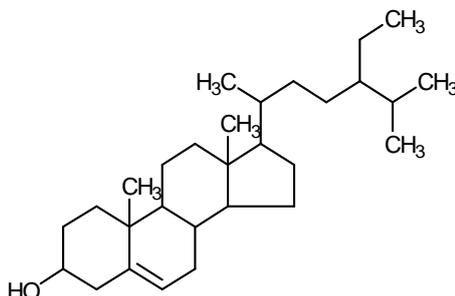
M = 282.

# CONCLUTION GENERALE

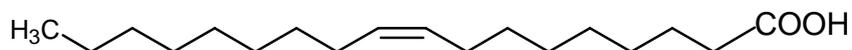
Le but principal de notre travail est d'étudier les métabolites secondaires de *Pseudérucaia teretifolia* récolté au nord du Sahara (Biskara).

Les différentes méthodes chromatographiques utilisées ont permis l'isolement et la purification de deux produits. Nous avons pu par des méthodes de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse établir les structures des deux produits isolés :

**Un Beta Sitostérol :**



**Un Acide Oléique :**



L'étude phytochimique de *Pseudérucaia teretifolia* a donné d'autres composés chimiques d'après les chromatogrammes des plaques CCM. La purification de ces composés c'est avéré très difficile sur les colonnes chromatographiques, voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales surtout RMN <sup>13</sup>C.

A l'issue de notre recherche bibliographique, on a constaté que la famille des crucifères contient peu de métabolites secondaires et les composés décrits dans la littérature sont de type Glucosinolates. Ces derniers nécessitent des méthodes spécifiques pour leurs séparations.

# مـلـخـص

يدور هذا العمل أساسا حول تحديد منتجات الأيض الثانوي لنبات *Pseuderucaria Teretifolia*, و الذي يخضع و لأول مرة للبحث الكميائي, وقد سمح لنا بتحديد بنية مركبين *Acide Oléique. (B)* و *β-sitosterole (A)*

تحديد بنية المركبات تمت بالاستعانة بمختلف التقنيات الطيفية:  $^{13}\text{C}$  RMN du,  $^1\text{H}$  RMN و H- COSY و la Masse.

ينقسم هذا العمل إلى أربعة فصول متباينة:

الفصل الأول: يقوم على دراسة الأعمال السابقة المنجزة حول النوع *Crucifère*.

الفصل الثاني: خصص لدراسة اللبيدات و التي تطرقنا فيها إلى المفاهيم و التقسيمات المختلفة, الفوائد من الناحية البيولوجية و التخليق الحيوي الخاص بها.

الفصل الثالث: يضم كل الأعمال الشخصية المتعلقة بفصل المركبات, تنقيتها و التحديد البنيوي لها.

الفصل الرابع: خصص للجزء العملي.

كلمات المفتاح: *Pseuderucaria Teretifolia*, *β-sitosterole* اللبيدات, *RMN*.

# Résumé

Mot clés : *Pseuderucaria Teretifolia*,  $\beta$ -sitosterol, Acide oléique.

Ce travail est consacré essentiellement à l'extraction et l'identification des métabolites secondaires du *Pseuderucaria Teretifolia*, ayant fait l'objet pour la première fois d'une investigation chimique. Le travail reporte ainsi la détermination de structure de deux composés : **(A)**  $\beta$ -Sitostérol et **(B)** Acide Oléique.

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

Ce travail est subdivisé en quatre chapitres :

**Dans Le premier chapitre** nous avons rapporté une étude antérieure sur la famille des crucifères.

**Le deuxième chapitre** est consacré à l'étude des lipides en parlant de leurs définitions et répartitions, leurs intérêts biologiques, et enfin leurs biosynthèses.

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

**Le Quatrième chapitre** est consacré au protocole expérimental.

# Summary

KEY WORD Pseuderucaria Teretifolia,  $\beta$ -sitosterol, oleic Acid, lipid.

This work primarily concerned the identification of the secondary metabolites of Pseuderucaria Teretifolia having been the object for the first time of a chemical investigation. work thus defers the determination of structure of two made up: (A)  $\beta$ - sitostérol and (B). oleic Acid .

The determination of structures has been realised by combining the results of spectroscopie methods wich arem the RMN<sup>1</sup>H , <sup>13</sup>C COSY H-H, HSQC C-H et la spectroscopie de masse.

This work is subdivided in four chapters:

In the first chapter we have reported a former study on the family and the kind of the specie Pseuderucaria Teretifolia

The second chapter and devoted to the study of terpenes one giving their definitions and distribution, their biosynthesis.

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

The fourth chapter presents the experimental part.