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

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR
BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

***Option* :** *CHIMIE ORGANIQUE*

Présenté par :

Melle LARAOUI Habiba

****

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE DE *BUPLEURUM ATLANTICUM*

****

Soutenue le : 15 février 2007, devant le jury :

M.*BENKHALED,*	***P****rof-U. Batna*	***P****résident*
S. *DRIDI,*	***M****.C-U. Batna*	***R****apporteur*
H.*DENDOUGUI,*	***M.****C-U.Ouargla*	***E****xaminateur*
R.*MEKKIOU,*	***M****.C-U.Constantine*	***E****xaminateur*

à mes chères parents ;

à mes soeurs ;

à mes frères ;

à toute ma famille ;

à mes amis ;

pour leur présence de tous les instants,
pour le soutien qu'ils m'ont apporté,
avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement, au Département de chimie, à la Faculté des Sciences de l'Université de Batna, sous la direction de Docteur DRIDI Seloua, Maître de conférences à l'université de Batna.

Tout d'abord, j'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur, DRIDI Seloua, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Ses compétences et son efficacité ont fortement contribué à la réalisation de ce travail.

J'aimerais remercier Monsieur le Professeur BENKHALED Mohammed, d'avoir accepter de présider le jury de ce travail.

Monsieur DENDOUGUI Hacene, Professeur à l'université de Ouargla, et Docteur MEKKIOU Ratiba, Maître de conférences à l'université de Constantine, ont bien voulu s'intéresser à ce travail et ont accepté d'en d'être examinateur. Je suis très honorée de leur présence dans ce jury, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à BITAM Fatima, HARKAT Hassina et HABA Hamada, et les remercier pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances et expériences, sans oublier leurs aides durant la réalisation de ce travail.

Mes remerciements iront également à toutes les personnes qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble : Lynda, Abla, Hanane, Nabila, Nouara, Rofia *et* B.Habiba.

Finalement, toutes ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études, à mes frères et sœurs pour leur patience et leur soutien pendant cette longue et pénible épreuve que représente ce mémoire.

ABRÉVIATIONS

AND: Acide désoxyribonucléique

***B**: Bupleurum*

COSY: Correlation spectroscopy

d: Doublet

dd : doublet de doublet

Dept: Distortionless enhancement by polarisation transfer

EI: Electronic Impact

HSQC: Heteronuclear spin quantum correlation

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation

IR: Infrarouge

LDL: Low density Lipoprotein

ppm: Partie par million

PCC : Pyridinium chlorochromate

Rf : Facteur de retardation.

RMN : Résonance magnétique nucléaire

s : Singulet

TMS : Tétraméthylsilane

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I: ETUDES ANTERIEURES

I.1. Etude et classification botanique 5

I.1.1. Le genre *Bupleurum* (Buplèvres) 5

I.1.2. L'espèce *Atlanticum* 6

I.2. Usages traditionnels 8

I.2.1. Genre *Bupleurum* 8

I.2.2. Espèce *Atlanticum* 11

I.3. Etudes chimiques antérieures 11

I.3.1. Métabolites secondaires isolés du genre *Bupleurum* 11

I.3.1.1. Les saponosides 11

I.3.1.2. Les flavonoides 15

I.3.1.3. Les coumarines 17

I.3.1.4. Les lignanes 19

I.3.1.5. Les tèrpenoides 24

I.3.1.6. Les hydrocarbures 28

I.3.2. Etudes pharmacologique du genre *Bupleurum* 32

CHAPITRE II: COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. Introduction 35

II.2. Classification 35

II.3. Les coumarines 38

II.3.1. Définition 38

II.3.2. Structures chimiques et classification 39

a. Coumarines simples 39
b. Coumarines prénylées 40
c. Furanocoumarines 41
d. Pyranocoumarines 42
e. Dicoumarines 43
f. Tricoumarines 43
II.3.3. Biosynthèse des coumarines 44
II.3.4. Intérêt pharmacologique des coumarines 47
II.3.5. La toxicité des coumarines 49
II.3.6. Analyse structurale des coumarines 50
II.4. Les lignanes 55
II.4.1. Définition 55
II.4.2. Structures chimiques et classification 56
a. Lignanes dibenzylbutanes 56
b. Lignanes monofuraniques 57
c. Lignanes butyrolactone 58
d. Lignanes arylnaphtalène 59
e. Lignanes dibenzocycloctane 61
f. Lignanes furanofuranique 61
II.4.3. Biosynthèse des lignanes 62
II.4.4. Intérêt pharmacologique des lignanes 66
II.4.5. Synthèse des lignanes 67

CHAPITRE II: ISOLEMENT DES COMPOSES ET DETERMINATION DE LEURS STRUCTURES

III.1.Récolte du matériel végétal 71
III.2.Extraction 71
III.3.Séparation et purification des composants de l’extrait chloroformique 73

III.3.1.Fractionnement 73
III.3.2.Purification 73
III.3.3. Identification des structures 73
*a. Identification du composé **A*** 74
*b. Identification du composé **B*** 82
*c. Identification du composé **C*** 96

CONCLUSION 110

BIBLIOGRAPHIE 112

CHAPITRE IV: PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. Téchniques d'analyse 118
IV.2. Extraction 119
IV.3. Etude de l'extrait chloroformique 119
IV.4. Purification des produits 121
IV.5. Résultats obtenus 123
IV.5.1. Analyse structurale du composé **A** 123
IV.5.1. Analyse structurale du composé **B** 124
IV.5.1. Analyse structurale du composé **C** 126

INTRODUCTION

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: malaria, première cause de mortalité dans le tiers monde, cancer, Alzheimer, infections virales et bactériennes. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux.

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ce potentiel n'est que faiblement exploité. En effet, sur environ des milliers d'espèces végétales, seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [1], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Le genre *Bupleurum* qui appartient à la famille des Apiaceae a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs types de produits notamment les saponines, les coumarines, les lignanes et les flavonoides.

De cet effet nous avons entrepris l'étude phytochimique de *Bupleurum atlanticum* ; espèce qui à notre connaissance n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique. Cette étude est réalisée dans le cadre d'un projet de recherche lancé par notre laboratoire intitulé : « Exploration de la flore algérienne: Recherche de métabolites secondaires à activité antitumorale ».

Nous avons donc procédé à son étude phytochimique générale, qui a abouti à l'isolement de deux coumarines et un lignane.

Notre travail sera présenté comme suit :

- Le premier chapitre est consacré aux études antérieures réalisées sur le genre, incluant également une étude sur les multiples usages traditionnels et l'activité pharmacologique du genre *Bupleurum*.
- Dans le deuxième chapitre, nous donnons un aperçu général sur les composés phénoliques, notamment, les coumarines et les lignanes, en présentant leurs différentes structures chimiques, leurs biosynthèses ainsi que leurs intérêts thérapeutiques.
- L'interprétation et la discussion des résultats obtenus sont présentées dans le troisième chapitre.
- Le quatrième chapitre est réservé à la description du protocole expérimental.

Chapitre I

Travaux antérieurs

I.1. Etude et classification botanique

I.1.1. Le genre *Bupleurum* (Buplèvres)

Les Buplèvres sont des plantes appartenant au genre *Bupleurum* et à la famille des Apiaceae (Ombellifères), il en existe plusieurs espèces d'aspect assez différent [1].

Ce sont des plantes annuelles ou vivaces à feuilles simples et entières. Les fleurs sont vertes ou jaunes, groupées en petites ombelles reposant sur des involucres de bractées et de bractéoles, elles n'ont pas de sépales et leurs pétales ne sont pas échancres, donnant l'impression que la fleur est toujours fermée [2].

Fig I.1 : Ombelle

Ce genre qui comprend environ 200 espèces est essentiellement localisé dans l'hémisphère Nord euro-asie (Eurasia), en Amérique du Nord, en Europe particulièrement dans la région méditerranéenne [3] et en Afrique du Nord [4].

I.1.2. L'espèce Atlanticum

Ø Classification botanique

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	*Bupleurum*
Nom binominal	*Bupleurum atlanticum*

Ø Description botanique

Selon Quezel [2], l'espèce *Bupleurum atlanticum* est une plante non épineuse, vivace élancée à racine ligneuse. Les feuilles rigides, en général en rosettes basales forment des touffes denses. Avec des fleurs jaunes qui sont réunies en ombelles à 3-5 rayons grêles. Pièces de l'involucre et de l'involucelle linéaires longues de 0,5-1 mm.

En Algérie, cette espèce se rencontre généralement dans les pâturages des montagnes des Aurès.

Fig I.2 : L'espèce *Bupleurum atlanticum* **(**Ombellifère).

I.2. Usages traditionnels

I.2.1. Le genre *Bupleurum*

La médecine traditionnelle (Kampo), développée au Japon sur la base de la médecine traditionnelle chinoise (Chai Hu), qui date de plus de 2000 ans est basée sur les plantes médicinales [5]. Avec le ginseng (*Panax ginseng*), le gingembre (*Zingiber officinale*) et le curcuma (*Curcuma longa*), *Bupleurum* occupe le premier rang dans cette médecine, les espèces de ce genre peuvent être prescrites seules, ou en combinaison avec d'autres plantes, constituant ainsi une « formule herbale ». *Bupleurum* entre dans la composition de plusieurs dizaines de ces combinaisons [5].

Ø *Bupleurum* en formules herbales

Nous présentons uniquement les formules dans lesquelles il est l'ingrédient clé avec leurs indications correspondantes, sans oublier de noter que ces formules sont manufacturées dans plusieurs pays avec des quantités standardisées des ingrédients. Ces formules sont :

a. Sho-saiko-to

C'est l'extrait d'un mélange de sept plantes. Cette préparation est prescrite en cas de pneumonie, bronchite, grippe, troubles entérogastriques chroniques et en cas de maladie du foie, cette association semble retarder l'apparition de l'hépatocarcinome chez les patients cirrhotiques [6].

b. Saiko-keishi-to

Saiko-keishi-to est l'extrait d'un mélange de neuf plantes. Cette formulation est utilisée pour le traitement des gastrites accompagnées de douleurs abdominales et des états grippaux (fièvre, maux de tête, nausées).

c. Saiboku-to

Saiboku-to est l'extrait d'un mélange de dix plantes. Il est préconisé dans le cas d'asthme chez les enfants, l'asthme branchial et pour soulager la toux.

d. Sairei-to

Extrait d'un mélange de douze plantes. Il est prescrit en cas de diarrhées, entérogastrite et également en cas d'œdème.

e. Hochu-ekki-to

Est l'extrait d'un mélange de dix plantes. Cette formule peut revendiquer les indications suivantes : traitement de l'anorexie, convalescence et l'impuissance.

f. Otsuji-to

Extrait d'un mélange de six plantes. Il est traditionnellement présenté comme laxatif et antihémorroïdaire.

g. Shingyaku-san

Extrait d'un mélange de quatre plantes. Cet extrait est préconisé dans les cas de cholécystite, ulcère gastrique, gastrite et même pour soulager les troubles du sommeil et l'anxiété.

h. Kami-shyo-san

Extrait d'un mélange de dix plantes. Il est conseillé aux femmes de faible constitution se plaignant de fatigue chronique, et d'anxiété avec tendance à des constipations occasionnelles. Cette préparation de la médecine Kampo est également prescrite en cas de troubles menstruels et pour soulager les symptômes de la ménopause.

i. ***Long-dan-tan***

Extrait d'un mélange de cinq plantes [7]. C'est la formule herbale chinoise (***Zhong yao***) la plus utilisée pour le traitement des hépatites chroniques. On rapporte même que cette formule pourrait montrer un effet bénéfique pour les patients souffrant d'un carcinome hépatocellulaire, mais jusqu'à ce jour aucune étude scientifique n'a été entreprise pour mettre en évidence cette activité.

j. ***Li Tan Jiang Zhi Tang***

Cette formule inclues *Bupleurum chinense* et neuf autres types de plantes[8]. Elle représente l'hypocholestérolémiant de choix dans la médecine traditionnelle chinoise. Elle accélère l'excrétion biliaire et aide au drainage de l'excès des lipides. Son effet est bien établi par une étude menée par l'équipe de Yamamoto et al [8], qui a bien montré qu'elle réduit le cholestérol LDL dans le sérum des souris hypercholestérimiques.

Ø ***Bupleurum* seule**

Bupleuri radix, est décrit dans la pharmacopée chinoise comme étant les racines séchées de *B. chinense Dc* ou *B. scorzonerifolium wild.* Au Japon, les racines de *B.falcatum* sont la source principale de Bupleuri radix [9,10], également désigné par « **Saiko** » au Japon et « **Chai-hu** » en Chine [11]. C'est de loin la drogue la plus fréquemment prescrite dans la médecine orientale. Elle est indiquée pour le traitement : des hépatites chroniques [9,12,13], hépatotoxcicité [14,15,16], cirrhose [17], syndromes néphrotiques [18], maladies inflammatoires [19,20], menstruations irrégulières [16,21], aménorrhée [5], maladie auto-immunes [14,18], hypochenderie [9,22], ulcère des organes digestifs [19], traitement des fièvres et fièvres intermittentes [4,15], fatigue chronique [22], états grippaux [21], malaria [21], lithiase biliaire [23], hémorroïdes et prolapsus pelvien et utérin [10], elle est également connue pour sont effet stimulant [4], diurétique [4] et analgésique [11].

Avec toutes ces indications et ces multiples usages, cette plante mérite d'être nommée par excellence « **plante miraculeuse** ».

D'autres espèces de ce genre sont utilisées ça et là à travers le monde :

Bupleurum kaoi représente le bupleuri radix en Taiwan [24]. Elle est consommée sous forme de boisson herbale [25], et revendique les mêmes indications que bupleuri radix Chinois et Japonais.

B. wenchuanense, une espèce qui pousse dans la Province de Sichuan en Chine est préconisée pour le traitement des symptômes inflammatoires [22,26].

Dans la médecine folklorique méditerranéenne d'autres espèces sont utilisées telles que : *B. frutucosum, B. frutiscens* et *B. rotundiofolium* où elles sont considérées comme remèdes antirhumatismaux en Italie [13,19] ou antiseptiques et anti-inflammatoires pour la cavité buccale en Espagne [27] où *B. frutiscens* est appelée « **hierba de la inflamacion**».

L'usage des *Bupleurum* comme plantes ornementales est également très réputé dans la région méditerranéenne [3].

I.2.2. L'espèce *Atlanticum*

L'espèce *Bupleurum atlanticum* est appelée localement « Aouadhmi ». Sa racine est utilisée pour réduire la malaria, et d'autres fièvres et également pour traiter le trouble du foie. Les autres parties de *B. atlanticum* sont employées pour soulager les douleurs dorsales et les maux de tête [28].

I.3. Etudes chimiques antérieures

I.3.1. Métabolites secondaires isolés du genre *Bupleurum*

Le genre *Bupleurum* est riche en métabolites secondaires, les principaux constituants incluent les saponines, les coumarines, les flavonoides, les lignanes, les polyacétylènes et les stéroïdes [11,4].

I.3.1.1. Les saponosides

On dénombre environ 90 saponines, issues de différentes espèces du genre *Bupleurum*. Ce sont des saponines triterpéniques de la série oléanane appelées (**saikosaponines**). Ces saikosaponines possèdent une grande variété d'activités

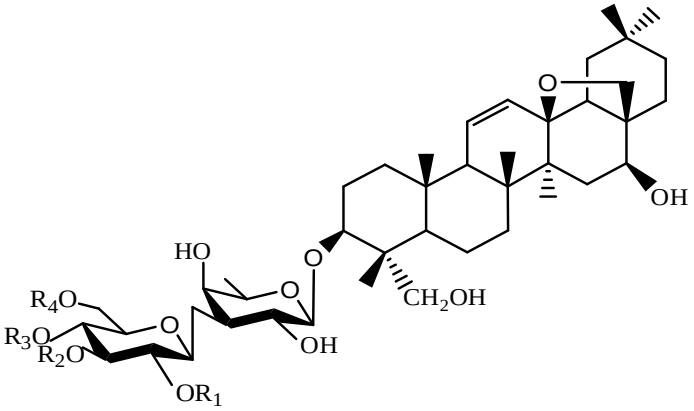
biologiques telles que : antipyrétique, antalgique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire, anticoagulante et anti-artériosclérotique [29].

Les sucres habituellement attachés à la saikogenine sont : le glucose, le fucose, le rhamnose et rarement le xylose. Ces sucres peuvent parfois être acétylés ou porteurs d'un groupement sulfate.

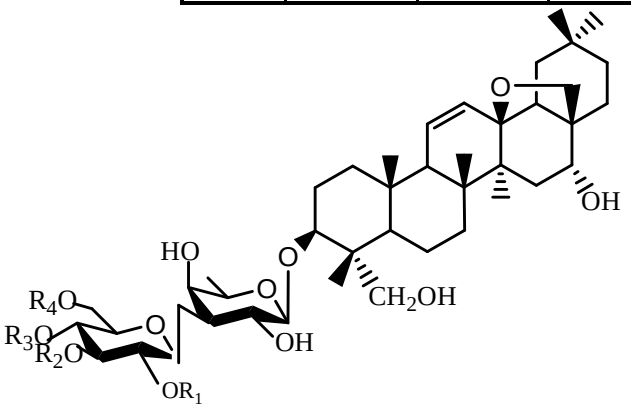
Etant très nombreuses, nous n'exposons ici que les saponines issues du *B.falcatum,* espèce qui a été sujette à un plus grand nombre d'études chimiques et pharmacologiques.

N° de structure		Nom du composé	Réf
1	**1a**	Saikosaponine **a**	[6,29]
	1b	6"-O-Malonyl saikosaponine **a**	[30]
	1c	2"-O-Acétyl saikosaponine **a**	
	1d	3"-O- Acétyl saikosaponine **a**	
	1e	4"-O- Acétyl saikosaponine **a**	
	1f	6"-O- Acétyl saikosaponine **a**	
2	**2a**	Saikosaponine **d**	[6,29]
	2b	6"-O-Malonyl saikosaponine **d**	[30]
	2c	2"-O-Acétyl saikosaponine **d**	
	2d	3"-O- Acétyl saikosaponine **d**	
	2e	4"-O- Acétyl saikosaponine **d**	
	2f	6"-O- Acétyl saikosaponine **d**	
3		Saikosaponine **c**	[6,29]
4	**4a**	Hydrosaikosaponine **a**	[30]
	4b	Hydrosaikosaponine **c**	
	4c	Saikosaponine $\mathbf{b_3}$	[31]
5		Saikosaponine **b2**	

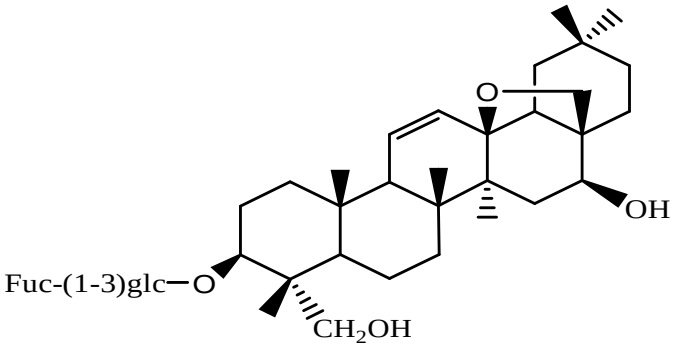
Tableau I.1 : Les saikosaponines isolées de l'espèce *B. falcatum.*



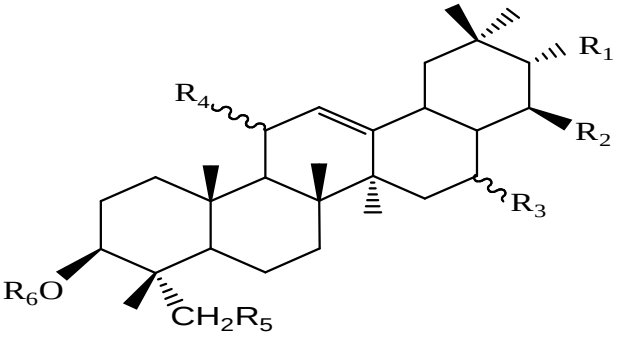
	R_1	R_2	R_3	R_4
1a	H	H	H	H
1b	H	H	H	$COCH_2CO_2H$
1c	Ac	H	H	H
1d	H	Ac	H	H
1e	H	H	Ac	H
1f	H	H	H	Ac



	R_1	R_2	R_3	R_4
2a	H	H	H	H
2b	H	H	H	$COCH_2CO_2H$
2c	Ac	H	H	H
2d	H	Ac	H	H
2e	H	H	Ac	H
2f	H	H	H	Ac



3



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
4a	H	CH_2OH	βOH	αOH	OH	Fuc-(1-3)glc
4b	H	CH_2OH	βOH	αOH	H	glc-(1-6)glc ' (1-4)rha
4l	H	CH_2OH	βOH	OCH_3	OH	Fuc-(1-3)glc

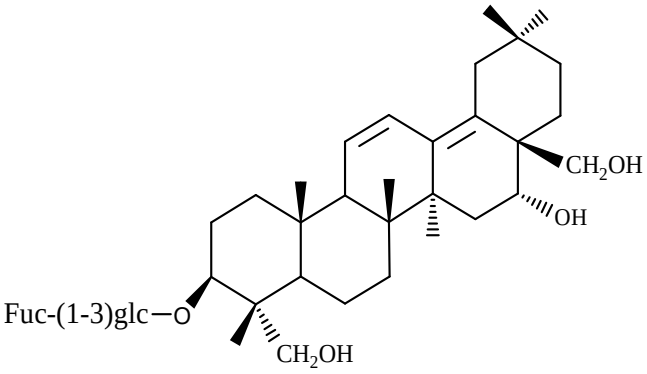


Schéma I.1 : Structures chimiques des saikosaponines isolées de l'espèce *B. falcatum* .

I.3.1.2. Les flavonoides

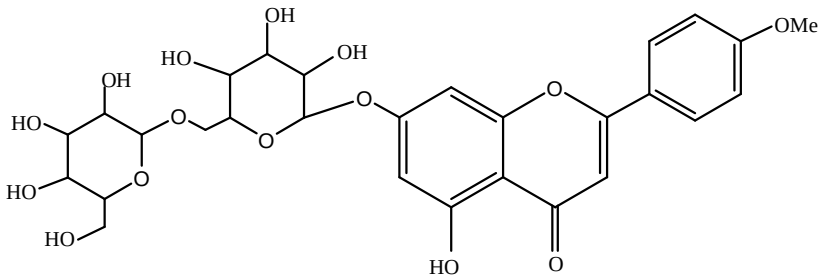
Les flavonoides sont des substances naturelles qui forment une grande partie des métabolites secondaires. Cette catégorie de composés naturels possède divers intérêts thérapeutiques ; ils sont anticancérogènes, anti-inflammatoires, antitumoraux et antioxydants [32].

Ils sont présents dans les *Bupleurum* à l'état libre ou sous forme d'hétérosides. Les sucres constituant la partie osidique sont habituellement le glucose, le galactose, le rhamnose et l'arabinose.

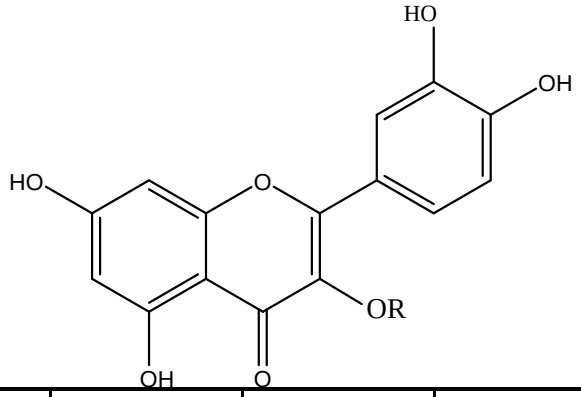
Dans ce genre, les flavonoides sont représentés par les flavonols et les flavones.

N° de structure		Nom du composé	Nom de l'espèce	Réf
6		3-O-β-D- arabinopyranosyl quercétine	*B. spinosum*	[33]
7	**7a**	3-α-L-arabinofuranosyl avicularine	*B. falcatum*	[31]
	7b	3-α-L-arabinopyranosyl guaijaverine		
	7c	Rutine		
8	**8a**	8-méthoxy isoscutellareine	*B. scorzoneri-folium*	[17]
	8b	Oroxyline		
	8c	wogonine		
9	**9a**	Tamarixétine	*B. spinosum*	[34]
	9b	3-O-β-D-galactopyranosyl tamarixétine.		
	9c	3-robinobiosyl tamarixétine.		

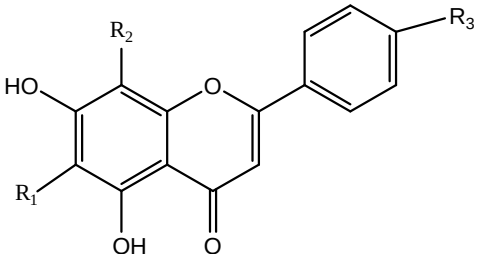
Tableau I.2 : Les flavonoides isolés du genre *Bupleurum*

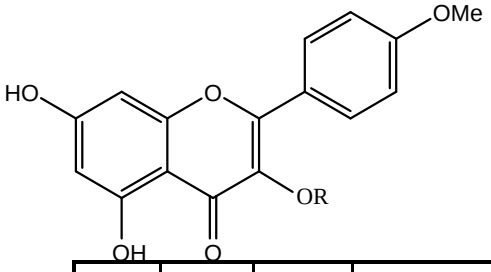


6



	7a	**7b**	**7c**
R	α-L-araf	α-L-arap	β-rutinosyl





	9a	**9b**	**9c**
R	H	Gal	Rham (1-6)-gal

	R_1	**R_2**	**R_3**
8a	H	OMe	OH
8b	OMe	H	H
8c	H	OMe	H

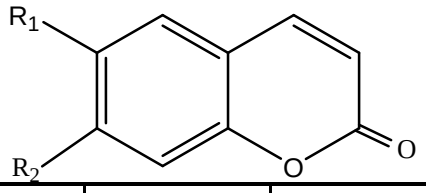
Schéma.I.2 : Structures chimiques des flavonoides isolés du genre *Bupleurum*

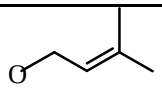
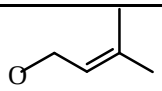
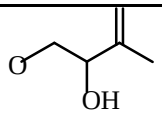
I.3.1.3. Les coumarines

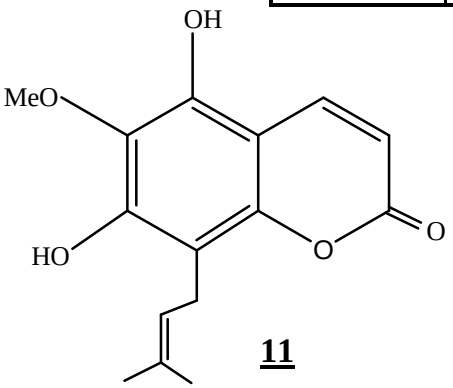
Une étude phytochimique menée par l'équipe de L.Pistelli [16] sur les racines de l'espèce *B. fruticosum* a permis d'isoler et de caractériser neuf composés coumariniques. D'autres coumarines qui sont citées dans le tableau I.3 ont été isolées de différentes espèces. Ce sont surtout des coumarines simples ou prénylées. Une pyranocoumarine angulaire ; l'anomaline **13** a été également isolée de *B. falcatum.*

N° de structure		Nom du composé	Nom de l'espèce	Réf
10	**10a**	Scopolétine	*B. fruticosum*	[16]
	10b	Isoscopolétine	*B. frutiscens*	[33]
	10c	Scoparone	*B. fruticosum*	[16]
	10d	Prenylétine		
	10e	Aesculétine		
	10f	7-(3-méthyl-2-butenyloxy)-6-méthoxy-coumarine.		
	10g	7-(2-hydroxy-3-méthyl-3-butenyloxy)-6-méthoxy-coumarine.		
11		5,7-dihydroxy-6-méthoxy-8-(3-méthyl-2-butenyl) coumarine.		
12	**12a**	Fraxétine		
	12b	Capensine	*B. fruticosum* *B. falcatum*	[16] [33]
13		Anomaline	*B. falcatum*	[33]

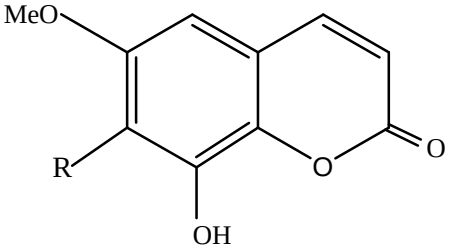
Tableau I.3 : Les coumarines isolées du genre *Bupleurum.*

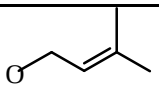


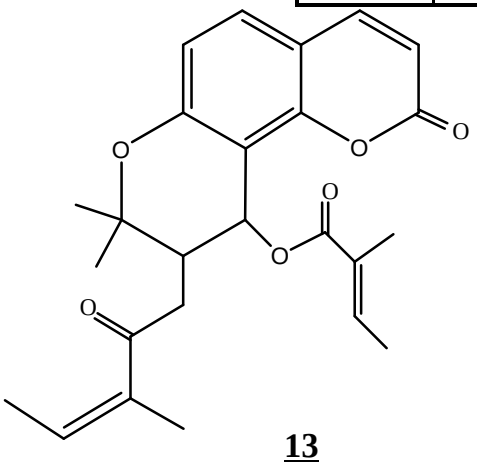
	R_1	R_2
10a	OMe	OH
10b	OH	OMe
10c	OMe	OMe
10d	OH	
10e	OH	OH
10f	OMe	
10g	OMe	



11



	12a	**12b**
R	OH	



13

Schéma I. 3 : Structures chimiques des coumarines isolées du genre *Bupleurum*.

I.3.1.4. Les lignanes

Les lignanes sont des composés dimériques, formés essentiellement par l'union de deux molécules d'un dérivé phénylpropane.

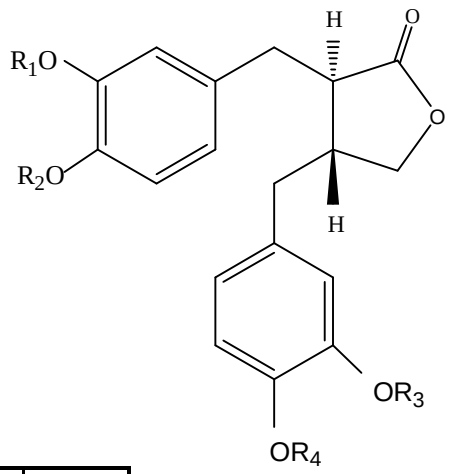
Les lignanes isolés à partir des *Bupleurum* sont essentiellement de type arylnaphthalene, dibenzylbutyrolactone et furanofuranique.

N° de structure		Nom du composé	Nom de l'espèce	Réf
14	**14a**	Bupleurol	*B. salicifolium*	[13]
	14b	Guayarol		
	14c	Bursehernine		[13] [35]
	14d	Diméthyl éther matairésinol		
	14e	Guamaroline		[36]
	14f	Matairésinol		
15	**15a**	Nenerosine	*B. scorzoneri-folium*	[17]
	15b	Karophylline	*B. scorzoneri-folium* *B. salicifolium*	[17] [36]
	15c	Vizguamarol	*B. salicifolium*	[36]
16	**16a**	Isochaihulactone	*B. scorzoneri-folium*	[17]
	16b	Isokaerophylline	*B. scorzoneri-folium* *B. salicifolium*	[17] [36]
	16c	Isoguamarol	*B. salicifolium*	[36]

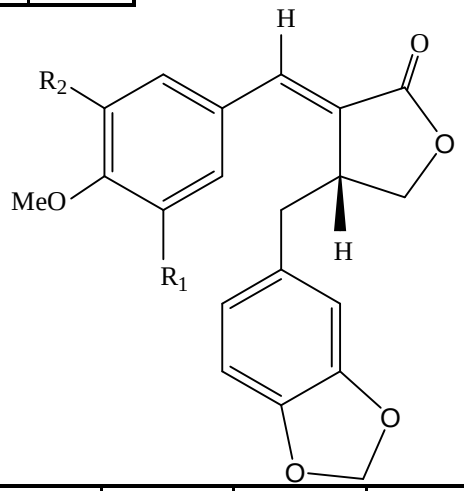
N° de structure		Nom du composé	Nom de l'espèce	Réf
17	**17a**	2β-hydroxy-2α-3',4'-diméthoxybenzyl-3α-3'',4''-méthylènedioxybenzyl-γ-butyrolactone.	*B. salicifolium*	[35]
	17b	2β-acétyl-2α-3',4'-diméthoxybenzyl-3α-3'',4''-méthylènedioxybenzyl-γ-butyrolactone.		
18		(-)-yateine	*B. scorzoneri-folium*	[17]
19		Chaihunaphtone		
20	**20a**	Chinensinaphtol		
	20b	Chinensine	*B. salicifolium* *B. handiense*	[35] [36]
21		9,(3,4-diméthoxyphenyl)-5,9-dihydro-8H-furo[3',4' :6,7] naphtol [2,3-d][1,3]dioxol-6-one.	*B. handiense*	[36]
22		Wenchuanensine	*B. wenchuanense*	[37]
23		Phillyrine		
24		3',4'-diméthoxybenzyl-3,3'',4''-méthylènedioxybenzyl-2,3-déhydroxy-γ-butyrolactone.	*B. salicifolium*	[35]

Tableau I.4 : Les lignanes isolés du genre *Bupleurum*

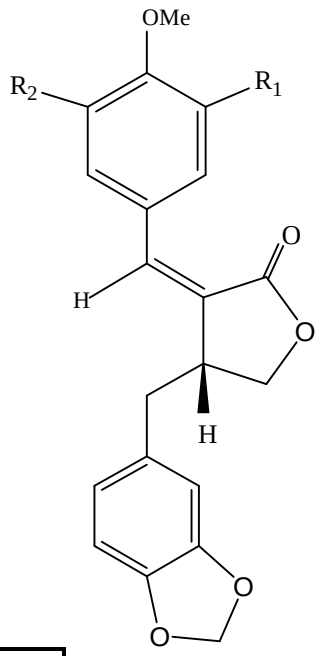
B. salicifolium et *B. scorzonerifolium* comme l'on remarque d'après les données du tableau I.4 manifestent une spécificité intéressante pour l'élaboration des lignanes, ces derniers sont responsables dans ces espèces de l'inhibition de la Topo-isomérase II ; une enzyme associée à la réplication du virus HIV-I responsable du SIDA[36].



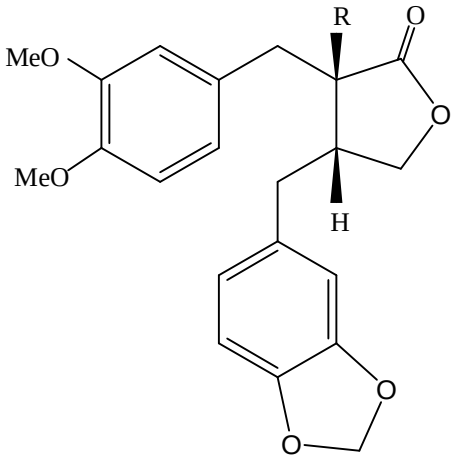
	R_1	R_2	R_3	R_4
14a	Me	Me	Me	H
14b	Me	Me	H	H
14c	Me	Me	$-CH_2-$	
14d	Me	Me	Me	Me
14e	OH	Me	$-CH_2-$	
14f	Me	OH	Me	OH



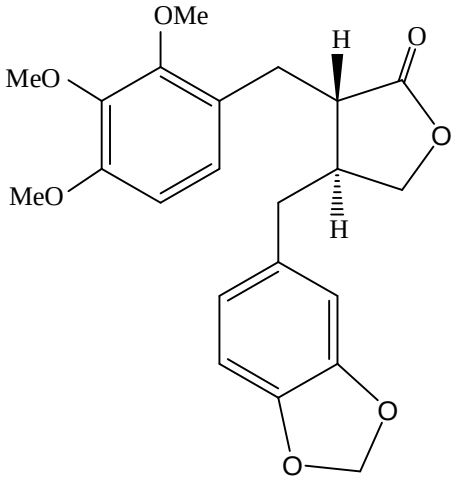
	15a	**15b**	**15c**
R_1	OMe	H	H
R_2	OMe	OMe	OH



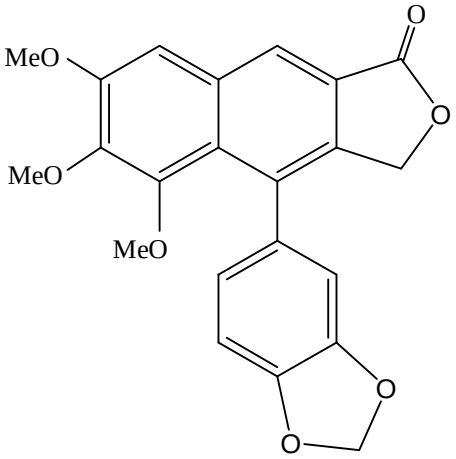
	16a	**16b**	**16c**
R_1	OMe	H	H
R_2	OMe	OMe	OH



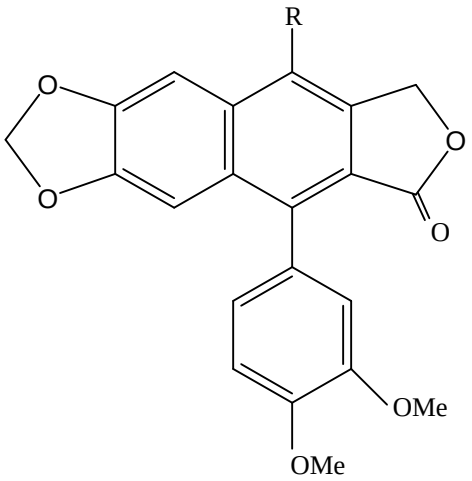
	17a	**17b**
R	OH	OAc



18



19



	20a	**20b**
R	OH	H

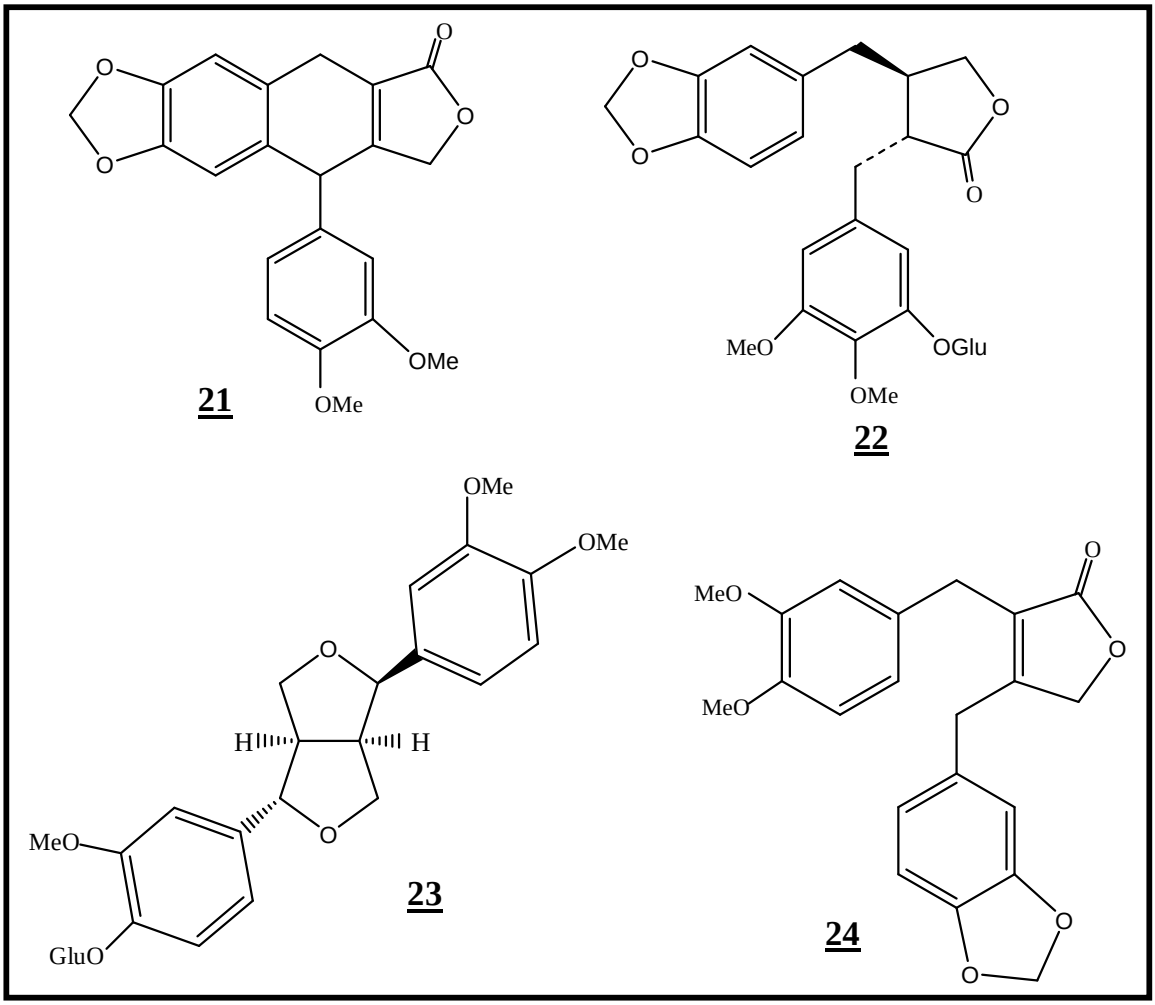
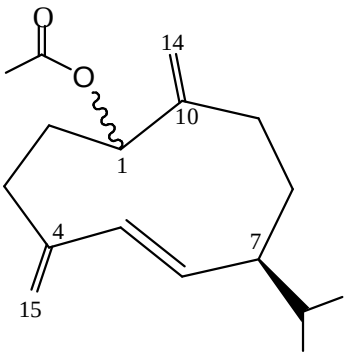


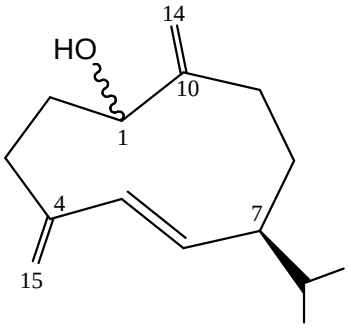
Schéma I.4: Structures chimiques des lignanes isolés du genre *Bupleurum*.

I.3.1.5. Les terpènoides

Alejandro, F.B. et collaborateurs [34] ont réalisé une étude phytochimique sur les parties aériennes de l'espèce *B. spinosum*. Cette étude a permis l'isolement de deux sesquiterpènes dérivés du germacrane : germacra-4(15)-5,10(14)-triènyl acétate **25** et germacra-4(15)-5,10(14)-triènol **26**.



25



26

D'autres études phytochimiques [9,11], effectuées sur différentes espèces du genre *Bupleurum* et menées par différentes équipes de chercheurs, se sont soldées par l'isolement de plusieurs composés triterpéniques. Ces derniers sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

N° de structure	Nom du composé	Nom de l'espèce	Réf
27	Bupleurogenine **a**	*B. scorzoneri-folium*	[9,11]
28	Bupleurogenine **b**		
29	Saikogenine **C**		
30	Saikogenine **A**		
31	Saikogenine **Q**	*B. smithii*	
32	Saikogenine **H**	*B. falcatum*	
33	Rotundiogenine **C**	*B. rotundio-folium*	
34	Saikogenine **F**	*B. falcatum*	
35	Rotundiogenine **A**	*B. rotundio-folium*	

Tableau I.5 : Les triterpènes isolés du genre *Bupleurum*

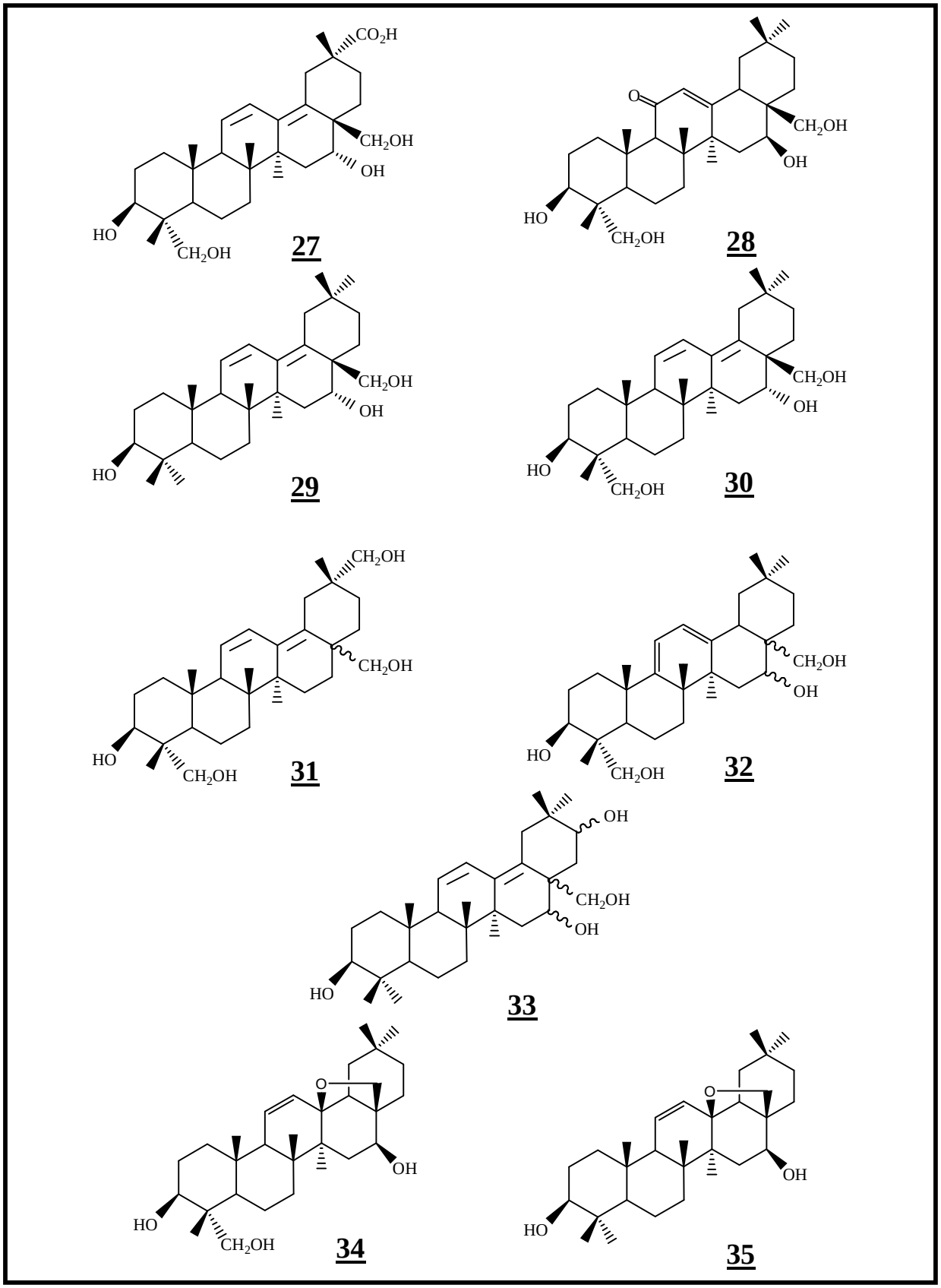
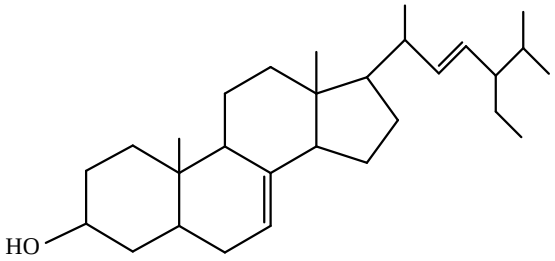


Schéma I.5: Structures chimiques des triterpènes isolés du genre *Bupleurum.*

M. Massanet et al [4] ont rapporté l'isolement et l'élucidation structurale du spinastérol **36** à partir de *B. fruticosum*.



36

Huiles essentielles

D'autre part, une équipe Italienne [38], s'est intéressée par l'extraction de l'huile essentielle de cette même espèce et à l'identification de ses constituants.

Le tableau I.7 regroupe les différents constituants identifiés de cette huile.

Tricyclène	β-(E)-ocimène
α-thujène	γ-terpinène.
α-pinène	α-terpinolène
Sabinène	Linalool
β-pinène	Terpinen-4-ol
β-myrcène	Methyl chavicol
α-phellandrène	Trans carveol
δ-3-carène	Geraniol
α-terpinène	Acétate de Citronellyle.
β-terpinène	α-copène
P-cymène	Germacrène D
Limonène	Bicyclogermacrène
β-phellandrène	δ-cadinène
β-(Z)-ocimène	(E)-nerolidol
	Acétate de géranyle.

Tableau I.7 : Les constituants de l'huile essentielle de l'espèce *B. fruticosum.*

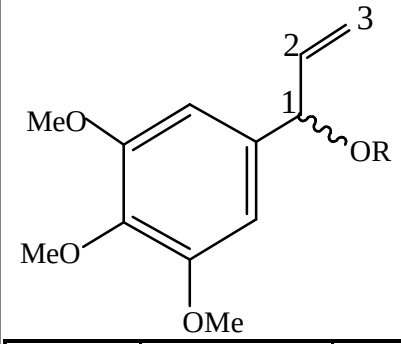
I.3.1.6. Les hydrocarbures

a. Les hydrocarbures aromatiques

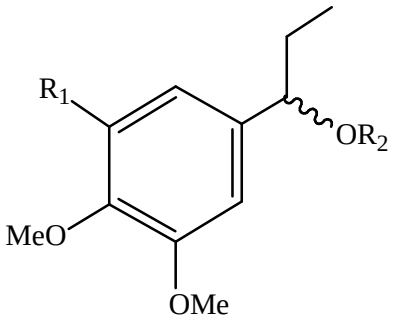
Par la même équipe et à partir de l'espèce *B. fruticosum*, neuf phénylpropanoides, ont été obtenus, parmi lesquels, huit sont isolés pour la première fois.

N° de structure		Nom du composé	Réf
37	**37a**	3-(3,4,5-triméthoxyphenyl)-2E-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	[4]
	37b	3-(3,4-diméthoxyphenyl)-2E-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	
	37c	1,2,3-triméthoxy-5-(3-éthoxy-1E-propenyl)-benzene.	
	37d	1,2-diméthoxy-4-(3-éthoxy-1E-propenyl)-benzene.	
38		3-(3,4-diméthoxyphenyl)-2Z-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	
39	**39a**	1-(3,4,5-triméthoxyphenyl)-2-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	
	39b	1,2,3-triméthoxy-5-(1-éthoxy-2-propenyl)-benzene.	
40	**40a**	1-(3,4,5-triméthoxyphenyl)-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	
	40b	1-(3,4-diméthoxyphenyl)-propenyl 2-(2-méthyl-2Z-butenoyloxyméthyl)-2Z-butenoate.	

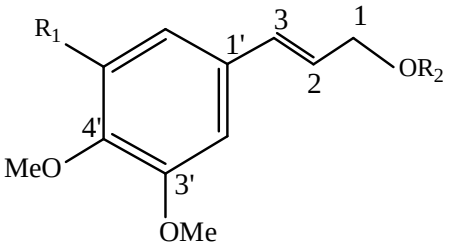
Tableau I.6 : les phénylpropanoides isolés du *B. fruticosum.*



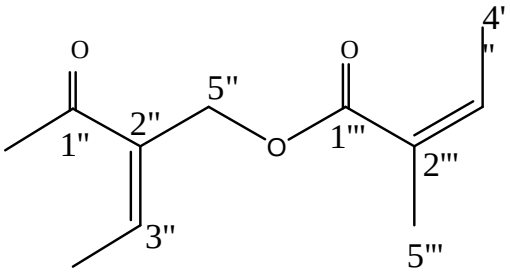
	39a	**39b**
R	A	Et



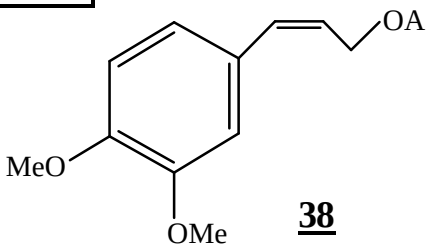
	R1	**R2**
40a	OMe	A
40b	H	A



A =



	37a	**37b**	**37c**	**37d**
R_1	OMe	H	OMe	H
R_2	A	A	Et	Et

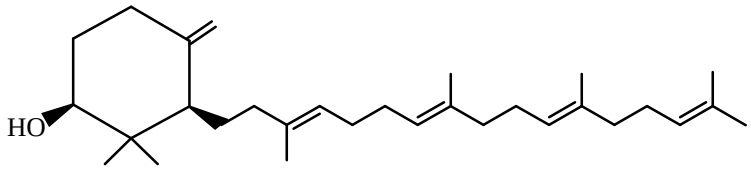


38

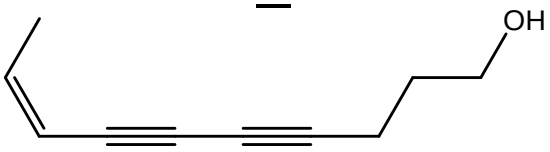
Schéma.I.6: Structures chimiques des phénylpropanoides isolées du *B.fruticosum*

b. Les hydrocarbures aliphatiques

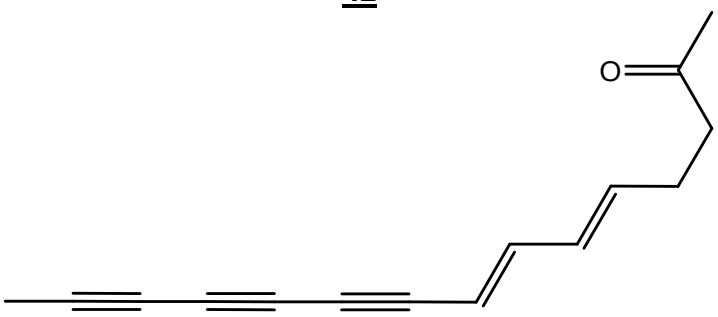
Les dérivés polyéniques et polyacétyléniques marquent également une forte présence dans ce genre. L'espèce *B. spinosum* [38] a fourni l'achilleol **A** **41** et trois autres dérivés polyinsaturés : Z-8-decène-4,6-diyn-1-ol **42**, (E,E)-pentadéca-5,7-diène-9,11,13-triyn-2-one **43** et le (3E, 5Z, 7Z, 9E)-tridéca-3,5,7,9-tetraène **44**.



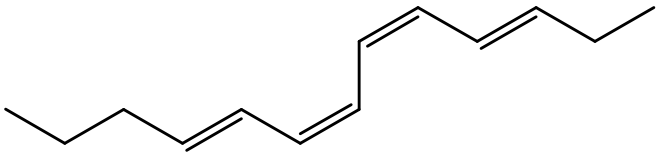
41



42

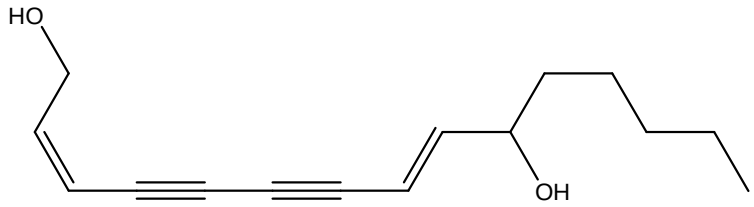


43

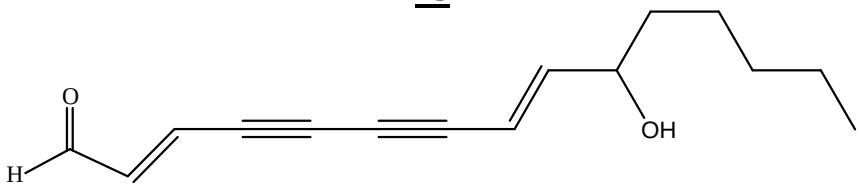


44

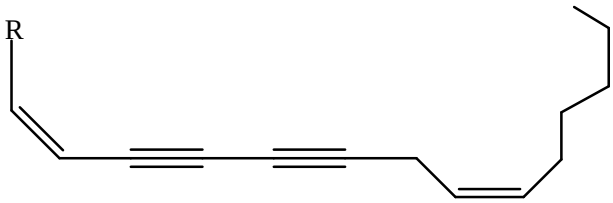
L'étude effectuée sur la fraction étheropétrolique a révélé également la présence de trois nouveaux polyacétylènes [11]: la saikodiyne **A** **45**, la saikodiyne **B** **46** et la saikodiyne **C** **47a** et un quatrième polyacétylène connu : le 2Z-9Z-pentadécadiéne-4,6-diyn-1-ol **47b**.



45



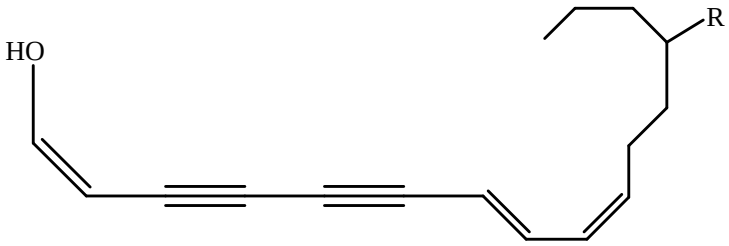
46



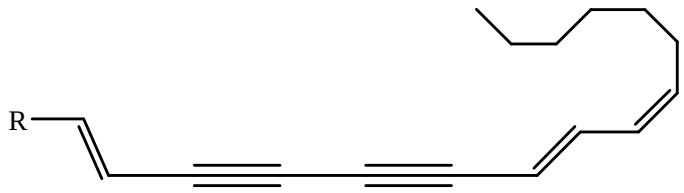
47a R = $-CH_2OAc$
47b R = $-CH_2OH$

Les structures de ces composés ont été établies par les méthodes spectroscopiques.

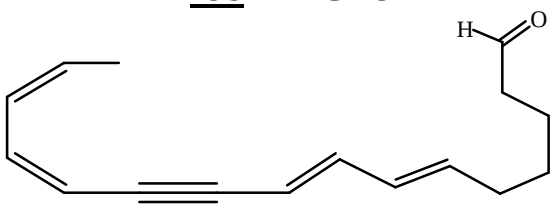
D'autres études chimiques relatives au genre *Bupleurum* ont mis en évidence la présence d'autres polyacétyléniques dans différentes espèces [34]. Ces composés sont : la bupleurotoxine **48a** (isolée du *B. longiradiatum*), l'acétyl bupleurotoxine **48b** (*B. longiradiatum*), bupleuronol **48c** (*B. longiradiatum*), bupleurynol **49a** (*B. acutifolium, B. radiatum*), 2,8,10-octadécatriène-4,6-diyinal **49b** (*B. acutufolium*) et 6,8,12,14-hexadécatetraène-10-ynal **50** (*B. gibraltaricum*).



48a R= OH
48b R= $OCOCH_3$
48c R= CHO



49a R= OH
49b R= CHO



50

I.3.2. Etudes pharmacologiques du genre *Bupleurum*

Les usages ancestraux et la recherche moderne s'accordent si bien quant aux activités des *Bupleurum*s, si bien que beaucoup de médecins japonais pratiquant la médecine classique utilisent des extraits de buplèvre pour soigner les problèmes du foie[40]. Les études pharmacologiques menées par différentes équipes de recherche ont bien mis en évidence et ont rationalisé les multiples activités attribuées aux *Bupleurum* tel que ; l'effet anti-inflammatoire [6], antipyrétique, antitussif [8], antiviral et antihépatitique [41], anticonvulsif [42], anti-cancer [39], immunostimulant [9] et anti-ulcereux [41]. Ces études ont touché les plantes entières, les extraits ainsi que les principes actifs isolés à l'état pur. Nous citrons quelques unes.

L'effet antiprolifératif aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et anti-cancéreux de l'extrait acétonique de *B. scorzonerifolium* a été bien mis en évidence par Yeung-Leung Cheng et al [39].

Be-Jen Wanga et al [25] se sont intéressés à l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Bupleurum kaoi Liu*. Ce dernier exhibe une forte activité. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a bien montré que cet effet corrèle bien avec la teneur en composés phénoliques.

Les extraits éthanolique et aqueux de *B. chinense* ont été examinés pour leur effet anti-ulcéreux ; tous les deux ont montré une action anti-*helicobacter pilori* plus prononcée que celle de l'ampicilline utilisée comme référence [40].

Il a été prouvé par d'autres chercheurs que cette activité est en partie due aux polysaccharides de type pectine, présents dans la plupart des espèces de ce genre. Ces composés jouissent également d'un effet immunomodulateur puissant [41].

La fraction des composés volatiles de *B. fruticosum* a été explorée par Lara Testaia et al [42], avec la démonstration de son effet antispasmodique et anti-inflammatoire.

La majeure partie de l'activité des *Bupleurum* est due aux saikosaponines, en effet des études *in vitro* ont indiqué que ces substances jouissent d'un effet anti-inflammatoire considérable par inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique, ainsi d'une faible activité antihistaminique [43].

Leur effet apoptotique mis en évidence *in vitro* pourrait être partiellement du à l'accroissement du niveau des C-myc et p53 mRNA accompagné par la diminution du niveau des bcl-2, mRNA6 et par l'inhibition de l'activité tolémerase [44].

La saikosaponine **d** est un immunorégulateur promoteur de la production des interleukine, aussi bien qu'en modulant la fonction des lymphocytes T [45].

En plus, les saponines du *Bupleurum* jouissent d'un effet antiadhésif et hémolytique pour les cellules des tumeurs solides [46,47], et sans oublier leurs propriétés antibacteriennes et antivirales [21].

Chapitre II

Composés phénoliques

II.1. Introduction

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside [6].

Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus ; les flavonoides, les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthones, les coumarines et d'autres classes existent en nombres considérables [48].

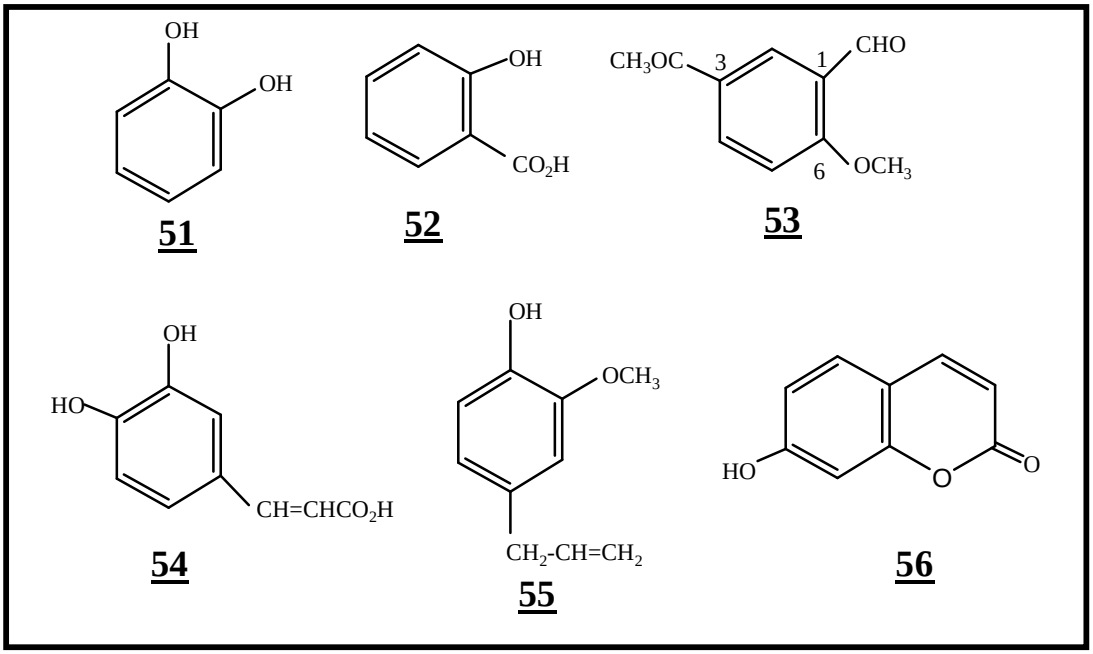
II.2. Classification

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base. Les différentes classes principales de ces composés phénoliques isolés des plantes sont illustrées dans le tableau suivant :

Nombre d'atomes de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C_6	Phénols simples	Catéchol **51**
7	C_6-C_1	Acides phénoliques	Acide salicylique **52**
8	C_6-C_2	Acétophénones	3-Acetyl-6-méthoxybenzaldéhyde **53**
9	C_6-C_3	-Acide hydroxycinnamique -Phénylpropènes -Coumarines -Isocoumarines - Chromones	-Acide caféique **54** -Eugénol **55** -Ombelliférone **56** -6,7-Diméthoxy 8-hydroxy 3-méthyl isocoumarine **57** -Eugenine **58**

10	C_6-C_4	Naphtoquinones	Juglone **59**
13	C_6-C_1-C_6	Xanthones	1,2,3,7-tétraméthoxy xanthone **60**
14	C_6-C_2-C_6	-Stilbènes -Anthraquinones	-Acide hunularique **61** -Emodine **62**
15	C_6-C_3-C_6	-Flavonoides -Isoflavonoides	-Quercetine **63** -Genisteine **64**
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanes	Podophyllotoxine **65**
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoides	Kayaflavone **66**
n	$(C_6$-$C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6$-C_3-$C_6)_n$	-Lignines -Catéchol mélanines -Flavolanes (Tannins condensés)	- - -

Tableau II.1 : Les principales classes des composés phénoliques.



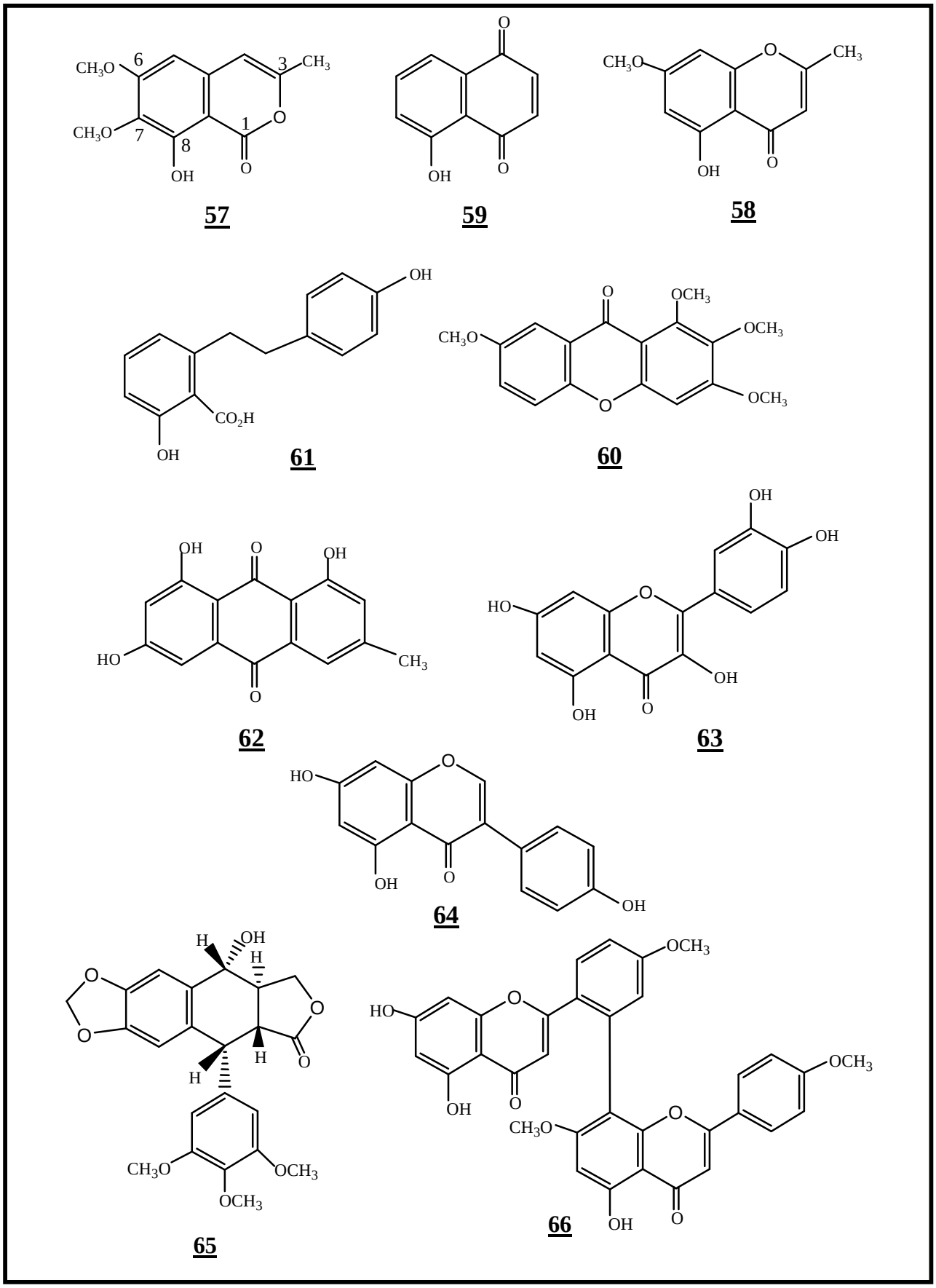


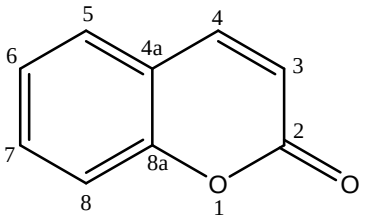
Schéma II.1: Structures chimiques de quelques composés phénoliques.

Notre intérêt est essentiellement focalisé sur les coumarines et les lignanes, substances que nous avons pu isoler de l'extrait chloroformique de *Bupleurum atlanticum*.

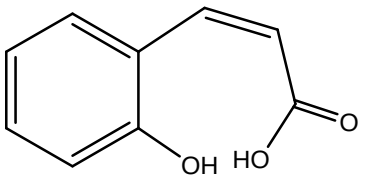
II.3. Les coumarines

II.3.1. Définition

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la *fève tonka*, d'où fut isolée pour la première fois en 1820 la coumarine **67** [6]. Les coumarines sont des 2*H*-1-benzopyran-2-ones, que l'on peut considérer en première approximation, comme étant des lactones des acides 2- hydroxy-Z- Cinnamiques.



67



Acide 2-hydroxy-Z-Cinnamique

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes. Elle donne une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché [52,53].

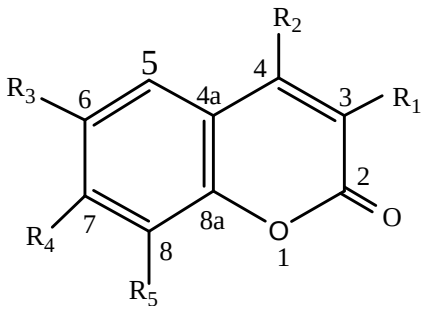
Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines [49]. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Ces phytoalexines sont synthétisées au niveau des sites d'infection. Leur activité antimicrobienne est démontrée *in vitro* [49].

En général, les coumarines sont répandues dans tout le règne végétal. Les familles les plus riches en coumarines sont *:* Légumineuses, Rutacées, Apiacées et Thyméléacées. Elles se trouvent dans toutes les parties des plantes et également dans les fruits [50].

II.3.2. Structures chimiques et classification

La coumarine est le point de départ d'une famille de composés, qui se forment par une substitution sur un cycle aromatique [51]. De ce fait et d'après la nature des substitutions [50], on peut classer les coumarines en cinq catégories :

a. Coumarines simples [52]



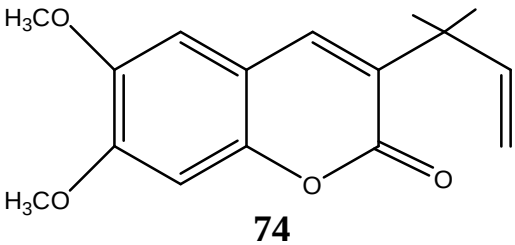
N°	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Coumarine
67	H	H	H	H	H	Coumarine
68	OH	H	H	H	H	3-Hydroxy coumarine
69	H	OH	H	H	H	4-Hydroxy coumarine
56	H	H	H	OH	H	Ombelliférone
70	H	OCH_3	H	H	H	4-Méthoxy coumarine
71	H	H	H	OCH_3	H	Herniarine

72	H	CH_3	H	OH	H	7-Hydroxy-4-méthoxy coumarine
10a	H	H	CH_3	OH	H	Scopolétine
10c	H	H	OCH_3	OCH_3	H	Scoparone
73	H	CH_3	H	$OCOCH_3$	H	7-Acetoxy-4-méthylcoumarine
12a	H	H	OCH_3	OCH_3	OH	Fraxidine

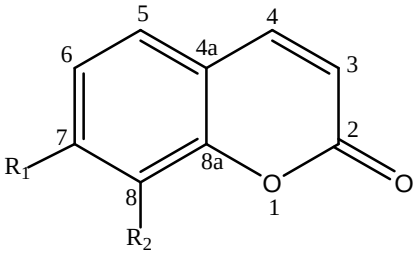
Tableau II.2

b. Coumarines prénylées

Ce sont des coumarines portant une unité isoprène, comme la rutacultine **74**, l'osthol **75** et la subérosine **76** [50].



74

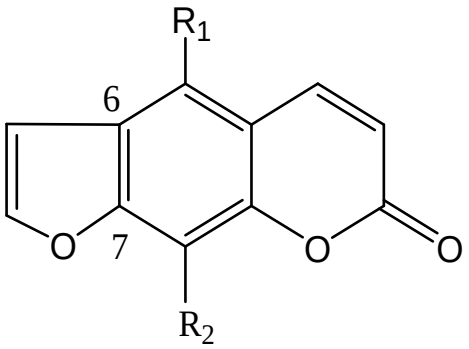


	75	**76**
R_1	OCH_3	$-CH_2-CH=C$
R_2	$-CH_2-CH=C$	OCH_3

c. Furanocoumarines

Les furanocoumarines sont les dérivés de l'ombelliférone **65** [53]. On peut distinguer deux types de composés furanocoumarines : furanocoumarines linéaires et furanocoumarines angulaires.

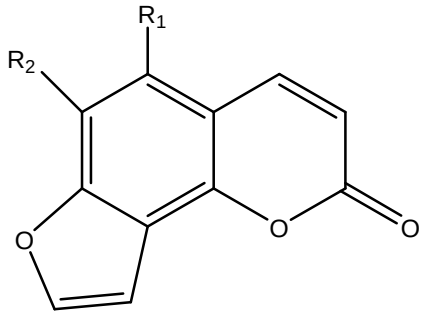
* *furanocoumarines linéaires* (6,7–Furanocoumarines)



N°	R_1	R_2	Furanocoumarine
77	H	H	Psoralène
78	OCH3	H	Bergaptène
79	H	OCH3	Xanthotoxine
80	OCH3	OCH3	Isopimpinélline
81	H	$-OCH_2-CH=C(CH_3)_2$	Impératorine

Tableau II.3

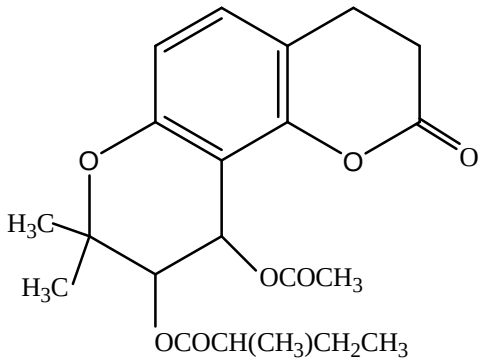
* *furanocoumarines angulaires* (7,8–Furanocoumarines)



N°	R_1	R_2	Furanocoumarine
82	H	H	Angélicine
83	OCH_3	OCH_3	Pimpinélline

Tableau II.4

d. Pyranocoumarines

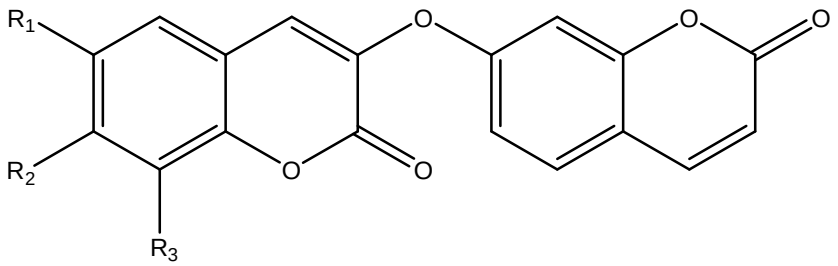


La visnadine **84**

Les coumarines peuvent également exister à l'état dimérique ou trimérique [53].

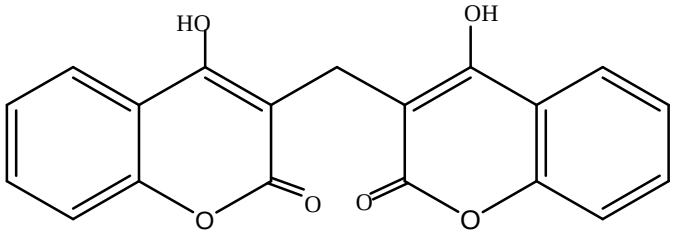
e. Dicoumarines (coumarines dimériques)

Ce sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariniques simples [54].



N°	R_1	R_2	R_3	Nom
85	OCH_3	OH	H	Daphnorétine
86	OH	OH	H	Edgeworthine

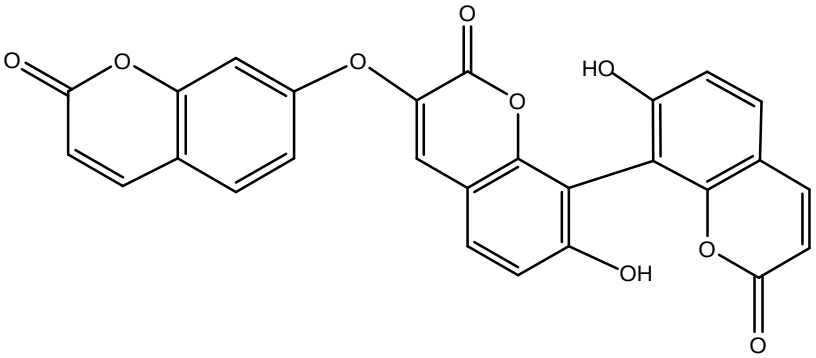
Tableau II.5



Dicoumarol **87**

f. Tricoumarines (coumarines trimériques)

Ce sont des coumarines issues de l'union de trois entités coumariniques [54].



Triumbéllatine **88**

II.3.3. Biosynthèse des coumarines

Ü *Par la voie du shikimate*

Dans des conditions normales de croissance, 20% du carbone fixé par les plantes passe par la voie du shikimate [49]. Cette dernière lie le métabolisme des carbohydrates à la voie de biosynthèse des composés aromatiques en conduisant à la synthèse de la structure de base : le noyau aromatique. Dans une succession de sept étapes métaboliques, le phosphoenolpyruvate (PEP ; un intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose 4-phosphate (E4P ; un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate (schéma II.2).

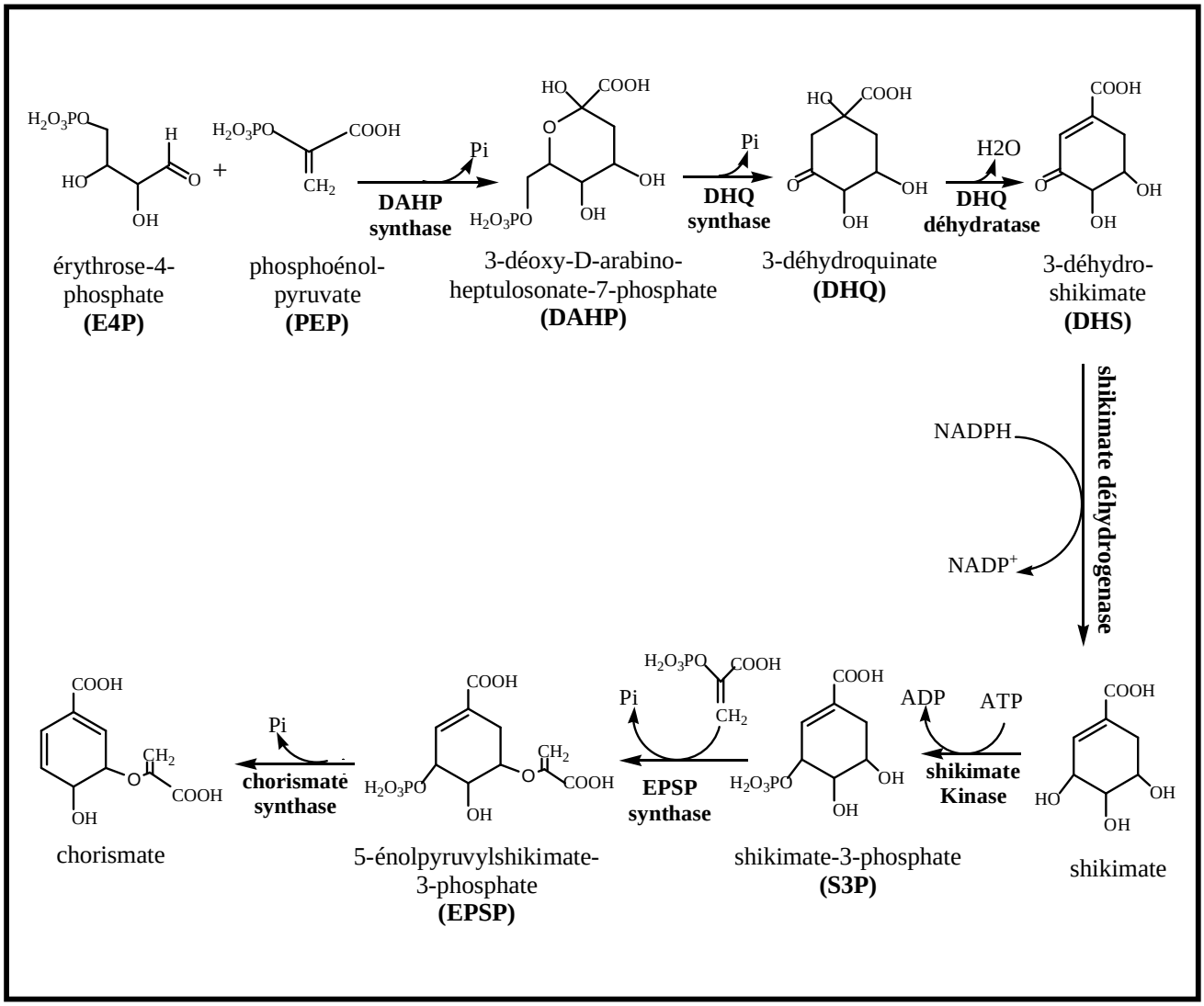


Schéma II.2: La voie du préchorismate (étapes enzymatiques et intermédiaires métaboliques).

La première étape est une condensation aldolique entre le phosphoénol-pyruvate (PEP) et l'érythrose-4-phosphate (E4P), pour donner le 3-déoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP). Ce dernier transformé en 3-déhydroquinate (DHQ), qui subit une réaction de déshydratation pour donner le 3-déhydroshikimate (DHS), ensuite le DHS est réduit en acide shikimique, qui est alors converti en son 3-phosphate (S3P).

Une deuxième condensation avec une unité phosphoénol pyruvate donne le 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP). L'élimination 1,4 de l'acide phosphonique conduit alors à l'acide chorismique (chorismate).

La voie du shikimate est un processus multi-branches qui peut être divisé en trois parties. La voie qui part du PEP et E4P pour arriver au chorismate est appelée voie préchorismate. Puis après le chorismate, la voie du shikimate se sépare en deux branches : l'une conduit à la phénylalanine et la tyrosine et l'autre au tryptophane, qui sont à l'origine de plusieurs type de métabolites secondaires indoliques et aromatiques [49].

La partie qui nous intéresse est le chemin qui conduit à la coumarine (c'est à dire le chemin qui aboutit à la PHE) (schéma II.3).

La formation de la phénylalanine à partir de l'acide chorismique implique un réarrangement de Claisen catalysé par l'enzyme (chorismate mutase), cet acide aminé est transformé en intermédiaire phényle propanoïque (acide coumarinique), qui donne la coumarine après une isomérisation et lactonisation.

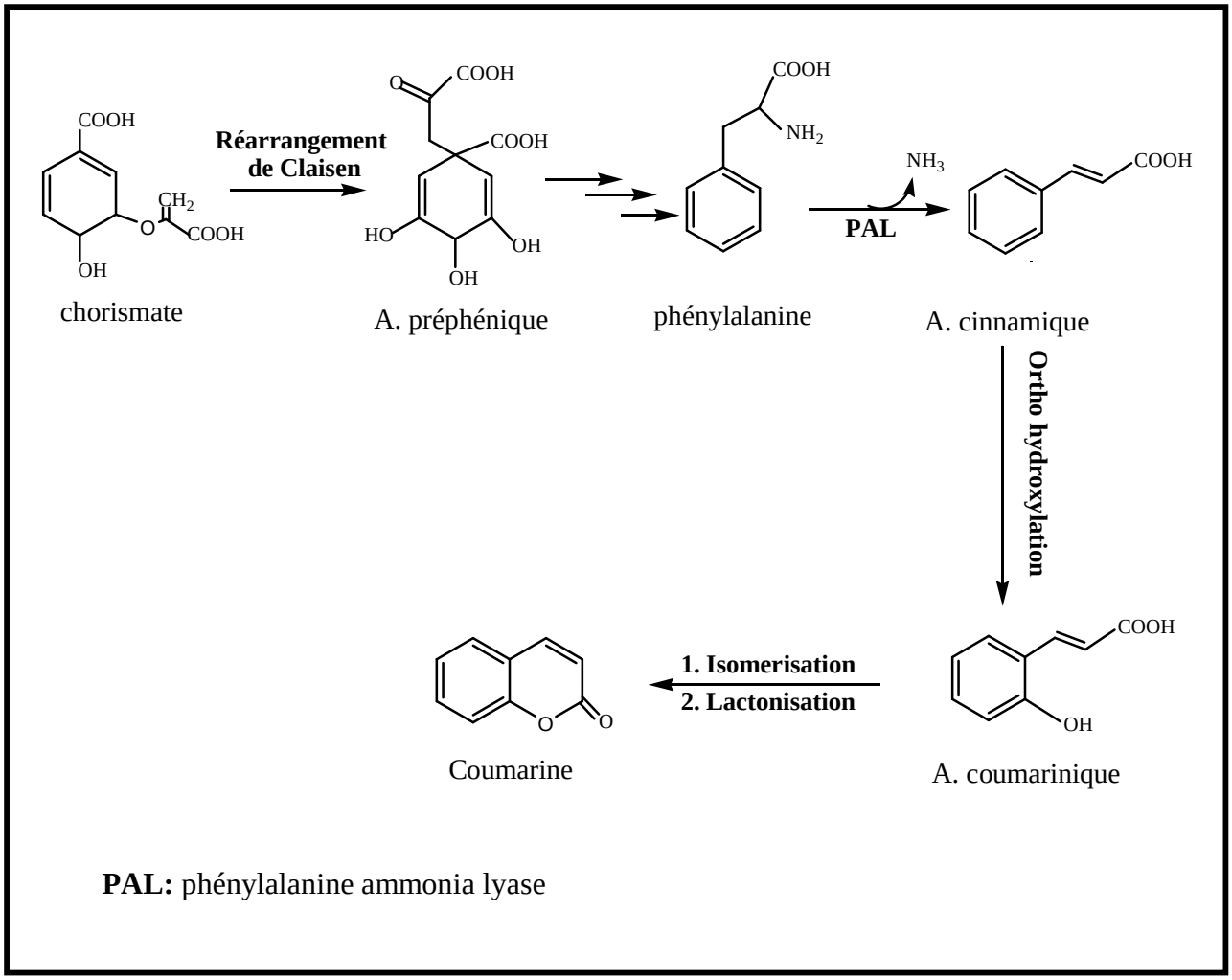
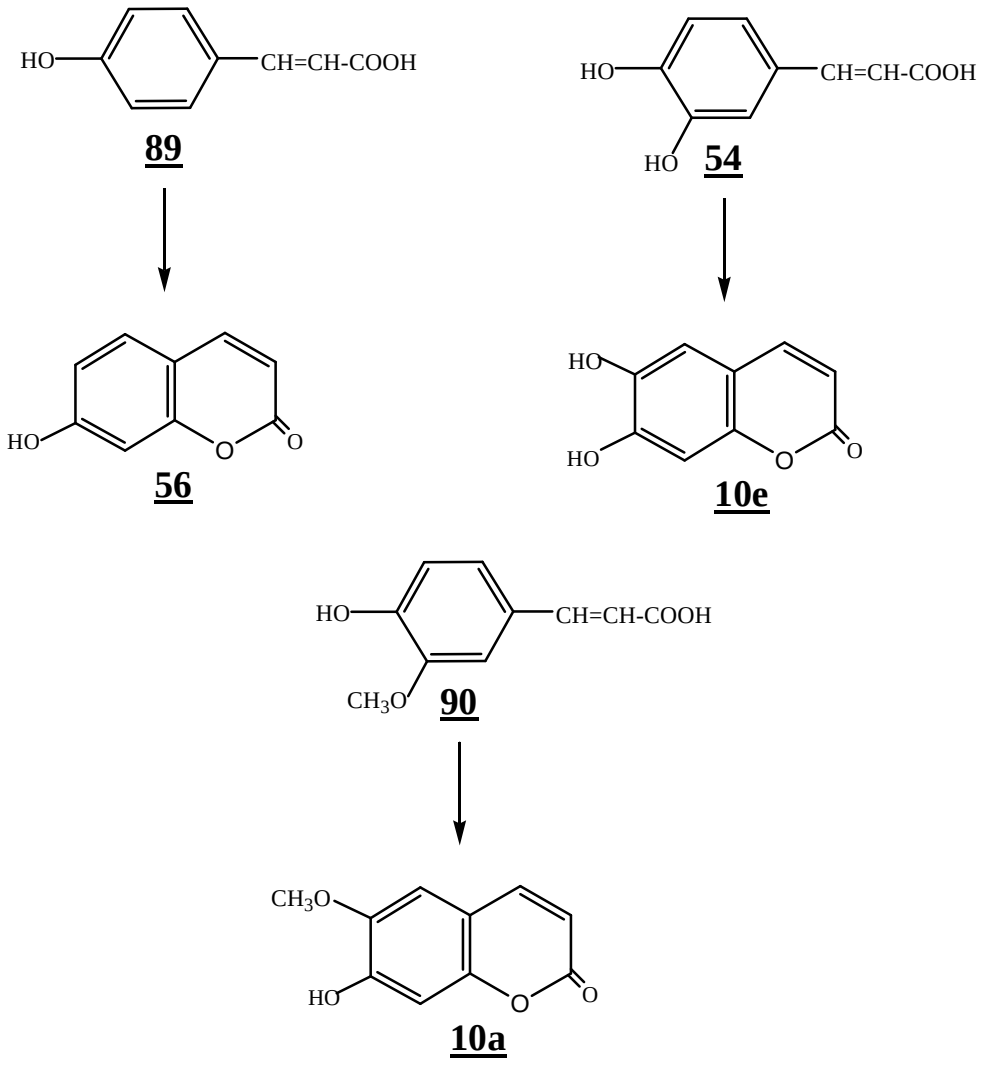


Schéma II.3 : Formation de la coumarine selon le chemin de la phénylalanine.

D'une façon analogue à ce qui se passe pour la coumarine, d'autres représentants de la famille de l'acide cinnamique dérivent par voie biosynthétique de l'acide coumarinique **89**, de l'acide caféique **54** ou de l'acide férulique **90** : l'ombelliférone **56**, l'aesculétine **10e**, la scopolétine **10a**, toutes pourvues d'un cycle lactone [51].



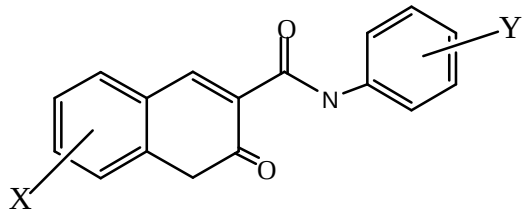
II.3.4. Intérêt pharmacologique des coumarines

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane, telles que l'activité antifongique, anti-tumorale, anti-agrégation plaquettaire, inhibitrice de plusieurs enzymes, antivirale, anti-inflammatoire, anticoagulante, diurétique et analgésique [55].

La coumarine elle-même a fait l'objet de plusieurs études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés : elle est immunostimulante et développerait une activité cytotoxique [6].

Les psoralènes ; furanocoumarines typiques, sont des photosensibilisateurs d'UVA dans la gamme de 320-380nm, une gamme où les acides nucléiques et les protéines cellulaires montrent les bandes d'absorption faible. Cette propriété photochimique a été exploitée par les Egyptiens antiques dans leur médecine pour le traitement de la dépigmentation de la peau [6,56].

Au niveau de l'institut de Fels pour la recherche sur le cancer, des composés coumariniques dérivés de la 3-(N-aryl)carboxamide coumarine ont été synthétisés et leurs activités cytotoxiques des cellules tumorales ont été évaluées. Ces composés empêchent d'une manière sélective la croissance des cellules cancéreuses [57].



X : H, OEt, Br, Cl.
Y : Br, I, NO_2, NH_2.

Les dérivés de 3-(N-aryl)carboxamide coumarine

Par ailleurs, des chercheurs espagnols ont évalué l'activité anti-VIH de onze composés dérivés de la 4-phénylcoumarine qu'ils ont isolé de l'espèce *Marila pluricostata*. Les résultats obtenus prouvent que l'effet antiviral des dérivés de la 4-phenylcoumarine peut être lié à l'inhibition de N-F-jB et du Tat, et suggèrent que ces composés peuvent être utiles dans le traitement de l'infection par le VIH [58].

II.3.5. La toxicité des coumarines

Le jus de *l'Ammi visnaga L* (Apiaceae), ainsi que les grains de *Psoralea* (Fabaceae), ont était utilisés par les Egyptiens pour les manifestations du vitiligo [6]. Les constituants phototoxiques, communs à toutes ces espèces, sont des furanocoumarines linéaires : psoralène **78**, bergaptène **79** et xanthotoxine **80** ; les furanocoumarines angulaires ne sont que faiblement phototoxiques (angélicine **83,** pimpinélline **84**). Il a été démontré que les furanocoumarines peuvent donner lieu à des cycloadditions sur les carbones (C3, C4) et/ou (C4', C5') avec les bases pyrimidiques de l'ADN (schémaII.3). Ces cycloadditions peuvent être mono ou bifonctionnelles et, dans ce dernier cas, elle établissent des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques et induisent des liaisons du génome. Il est possible que ces propriétés aient un rapport avec la phototoxicité dont le mécanisme reste à élucider. Elles expliquent mieux les propriétés mutagènes et cancérogènes [6].

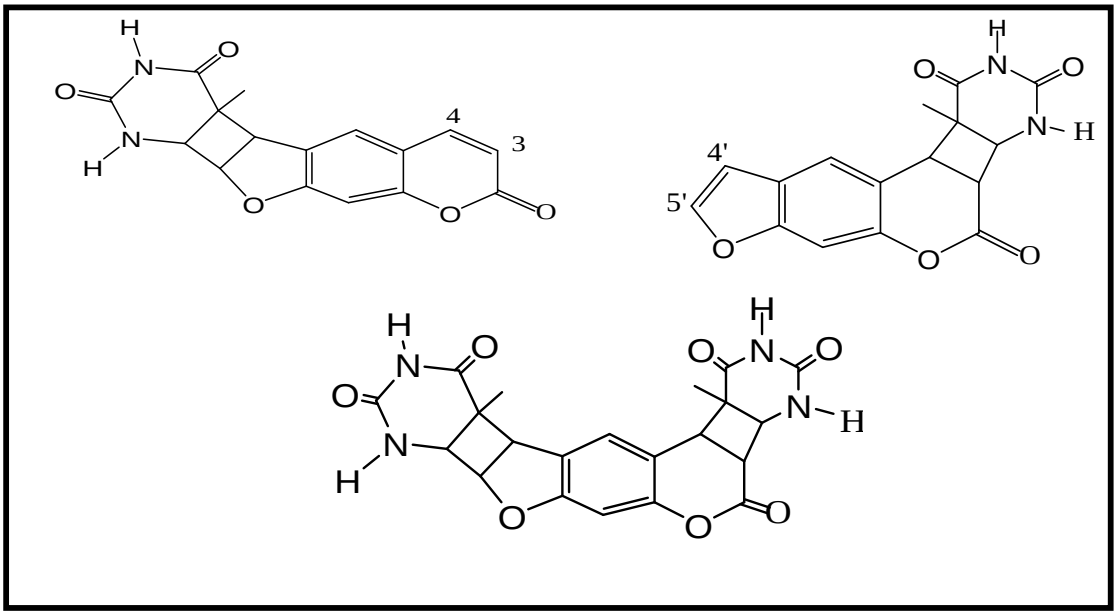


Schéma II.3

En 1941, le dicoumarol s'est avéré être le composé responsable de la mort hémorragique du bétail après la consommation du foin à partir de Meliot (*Melilotus Med alba* (Fabaceae)) [52].

II.3.6. Analyse structurale des coumarines

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que le dioxyde d'éthyle ou les solvants chlorés avec les quels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau [6].

La valeur du Rf et la fluorescence sous la lumière UV, donnent une idée initiale sur la nature des composés coumariniques. La spectrométrie IR, la spectrométrie d'absorption ultraviolette et enfin les résultats de la spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire, permettent de déterminer et de confirmer les structures de ces composés.

a. Fluorescence sous la lumière UV

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence à l'UV à 365 nm, cette fluorescence est en général :

* Bleue pour les coumarines hydroxylées en 7 (ombelliférone **56**) ;
* Pourpre pour les coumarines prénylées.
* Jaune pour les Furanocoumarines.

Cette fluorescence est intensifiée en chromatogramme par les vapeurs de NH_3.

Les composés coumariniques possédant des groupements phénoliques, peuvent être identifiés par le Perchlorure de fer [50].

b. Spectroscopie infrarouge IR

La spectroscopie infrarouge IR est une méthode de détermination de structure, qui renseigne sur l'absorption des radiations infrarouges par la molécule. Cette technique fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule.

Pour les coumarines [59]:

* L'absorption C=O de la lactone conjuguée apparaît pratiquement dans la région (1720-1750cm^{-1}).

* L'absorption OH du phénol est observée à 3550cm^{-1}.

c. Spectroscopie ultraviolette UV

Cette technique d'analyse concerne les systèmes des électrons π. Lorsqu'une molécule conjuguée est irradiée avec de la lumière ultraviolette, il y a absorption d'énergie, conduisant à l'excitation des électrons π vers des niveaux énergétiques supérieures. Plus la conjugaison est grande, plus l'énergie nécessaire à cette transition électronique est faible et plus la longueur d'onde de la radiation est grande [59].

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin : KOH, NaOH, $NaOCH_3$ et en présence d'$AlCl_3$.

$AlCl_3$ forme un complexe avec les hydroxyles portés par des carbones adjacents, ce qui induit un déplacement bathochrome [6].

Pour la coumarine, les absorptions maximales sont présentées dans le schéma suivant :

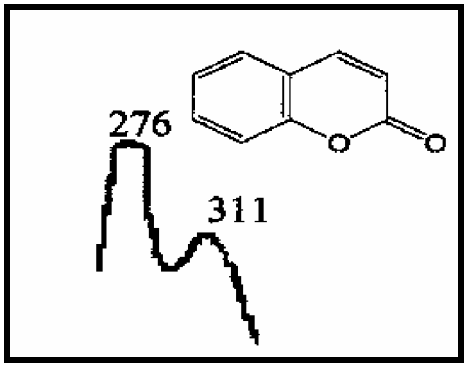


Schéma II.4

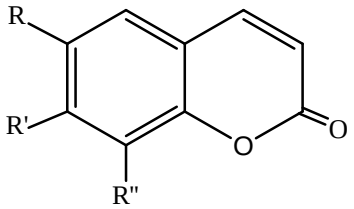
Lorsqu'il y a des substituants alkylés, peu de modifications seraient constatées. En revanche, la présence d'un OH sur un cycle benzénique occasionne un effet bathochrome (311 → 325 cm^{-1}). Selon la position de OH, le déplacement est plus au moins fort [6].

Le tableau suivant donne une idée sur la relation entre le Rf, la fluorescence sous la lumière UV, l'absorption maximale (spectre UV) λ_{max} dans l'ethanol et la structure de quelques hydroxycoumarines [60].

Coumarine	Rf(x100) dans			Fluorescence sous la lumière UV	λ_{max}(EtOH)
	BAW	H_2O	AcOH 10%		
Aglycones					
Coumarine **67**	92	67	76	aucun	212, 274, 282, $^{+}$312.
Umbelliférone **56**	89	57	60	bleu brillant	210, 240, $^{+}$325.
Aesculétine **10e**	79	28	45	bleu	230, 260, 303, 351.
Scopolétine **10a**	83	29	51	bleu-violet	229, 253, 300, 346.
Daphnétine **91**	81	61	54	jaune pâle	215, 263, 328.
Glycosides	BAW	H_2O	BN		
Aesculine **92**	53	56	13	bleu clair	224, 252, 293, 338.
Cichoriine **93**	53	61	10	rose pâle	228, 255, 290, 345.
Scopoline **94**	53	64	44	mauve	227, 250, 288, 339.

Tableau II.6

$^{+}$ Inflexion.



	91	**92**	**93**	**94**
R	H	OGlc	OH	OCH_3
R'	OH	OH	OGlc	OGlc
R''	OH	H	H	H

d. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est la plus performante des techniques spectroscopiques courantes. C'est la première méthode utilisée par les chimistes organiciens pour déterminer les structures des molécules. Cette méthode conduit à avoir une idée sur l'enchaînement carbone-hydrogène présent [59].

L'allure des spectres RMN^{1}H des coumarines est caractéristique. Les protons oléfiniques H-3 et H-4 apparaissent respectivement sous forme de deux doublets à :
δ (ppm) [6,10-6,40], [7,50-7,90].
Le (schéma II.5) montre quelques exemples de spectres RMN^{1}H des produits coumariniques [50].

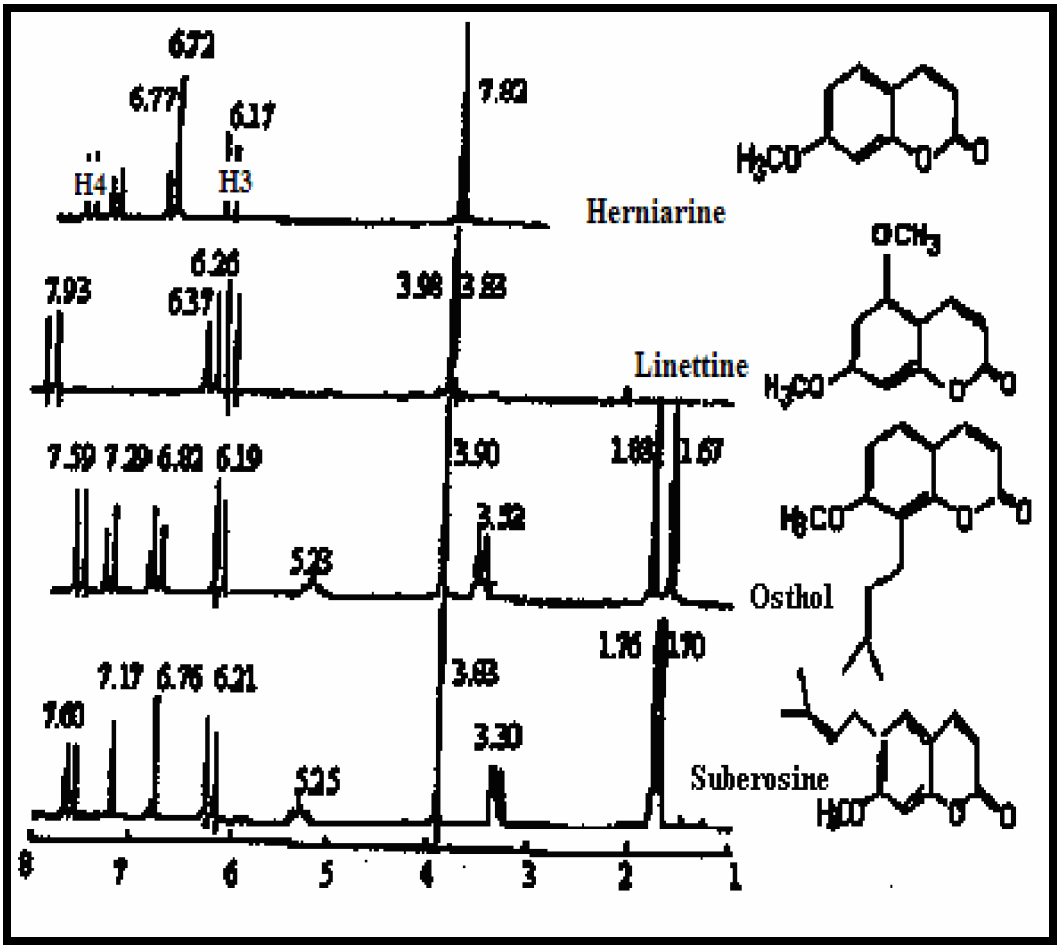


Schéma II.5

e. La spectrométrie de masse des coumarines

La spectrométrie de masse est une méthode importante pour déterminer la masse moléculaire relative, et même la fragmentation élémentaire d'un composé. Ces informations permettent d'établir des prévisions importantes à propos de l'édifice moléculaire.

Les composés cycliques fortement insaturés telles que la « coumarine », et même les ions qui ont été formés par fragmentation α au niveau d'un groupement carbonyle, ont la propriété de pouvoir perdre un groupement CO (28 uma). S'il y a plusieurs groupements CO dans une molécule, ils peuvent être éliminés les uns après les autres [59,61].

II.4. Les lignanes

II.4.1. Définition

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936 [62], désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phényl propane (liaison 8-8') (schéma II.6) [24].

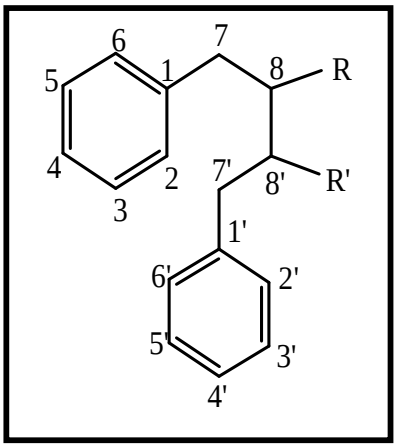


Schéma II.6

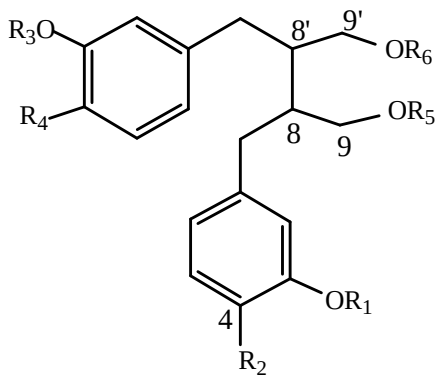
Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal. La distribution botanique des lignanes est large : Plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les gymnospermes, ils sont surtout rencontrés dans le bois alors que chez les Angiospermes, ils ont été identifiés dans tous les tissus [49]. Ils ont été découverts dans toutes les parties des plantes: les racines, les feuilles, les fruits et les graines [62].

Dans les arbres, l'accumulation des lignanes dans le centre est importante pour la longévité de l'espèce. On assume également que les lignanes fonctionnent comme phytoalexines, devant assurer la protection pour les plantes contre les maladies et les parasites.

II.4.2. Structures chimiques et classification

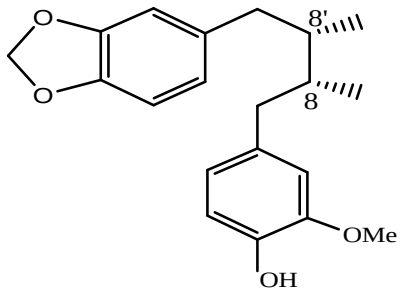
Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes ont été caractérisés chez différentes familles du règne végétal [6].

a. Lignanes dibenzylbutanes les plus simples (liaison 8-8')



N°	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	Nom
95	H	H	H	H	H	H	Entérodiol
96	Me	OH	Me	OH	H	H	Sécoisolaricirésinol
97	Me	OH	Me	OH	Glc	Glc	9,9'-O-β-D-diglucosyl sécoisolaricirésinol
98	Me	Glc	Me	OH	H	H	4-O-β-D-glucosyl sécoisolaricirésinol

Tableau II.7

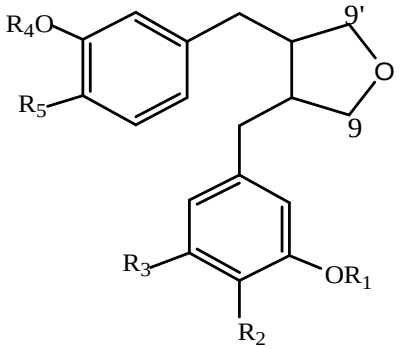


Macélignane **99**

b. Lignanes monofuraniques

Les lignanes dibenzylbutanes peuvent engendrer, par cyclisation, trois types de lignanes monofuraniques [6].

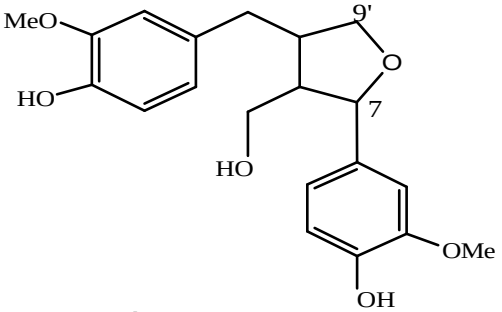
* *Monofuraniques par la cyclisation 9-O-9'*



N°	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Nom
100	H	H	H	H	H	Entérofurane
101	Me	OH	H	Me	OH	Shonanine
102	Me	OMe	OMe	$-OCH_2-$		Burserane

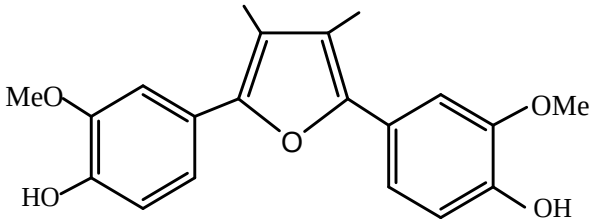
Tableau II.8

* *Monofuraniques par la cyclisation 7-O-9'*



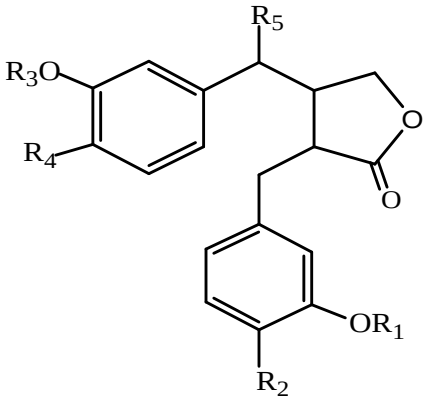
Laricirésinol **103**

* *Monofuraniques par la cyclisation 7-O-7'*



α-guaiaconique acide **104**

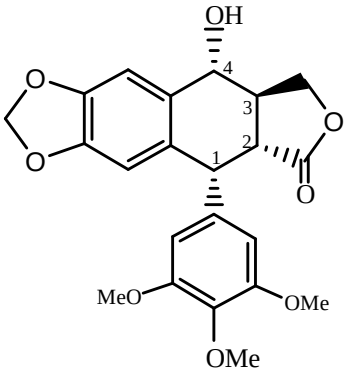
c. Lignanes butyrolactones



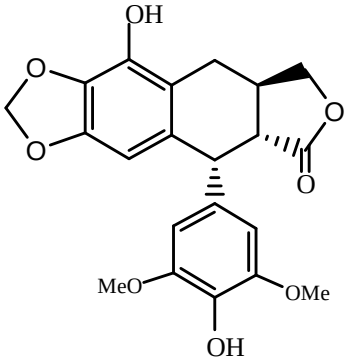
N°	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Nom
105	H	H	H	H	H	Entérolactone
106	H	H	H	H	OH	7'-Hydroxyentérolactone
14f	Me	OH	Me	OH	H	Matairsinol
107	Me	OH	Me	OH	OH	7'-Hydroxymatairésinol
108	Me	OGlc	Me	OH	H	Matairésinoside

Tableau II.9

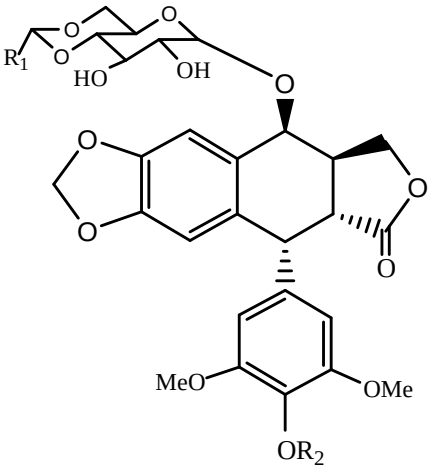
d. Lignanes aryltétralines



Podophyllotoxine **65**

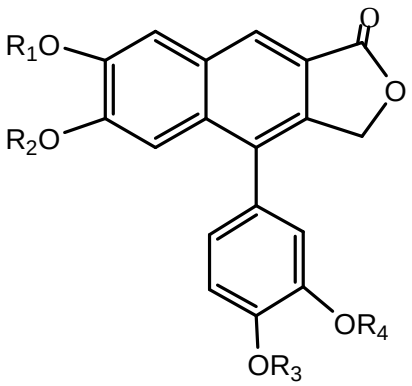


α-peltatine **109**



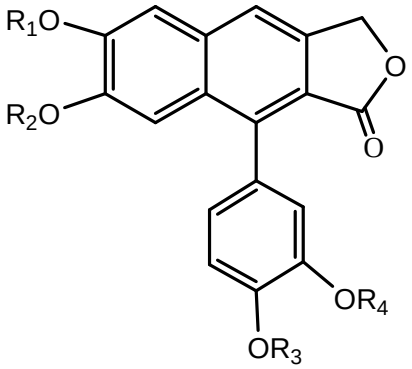
R_1= Me, R_2 = H, étoposide**110**
R_1= thiényl, R_2 = H, téniposide**111**
R_1= Me, R_2 = $PO(OH)_2$, étopophos **112**

Dans ce groupe, on peut distinguer des structures dont le troisième cycle à six est également aromatisé. On les appelle les arylnaphtalènes.



N°	R_1	R_2	R_3	R_4	Nom
113	Me	Me	$-CH_2-$		Rétrojusticidine **B**
114	$-CH_2-$		$-CH_2-$		Justicidine **E**
115	$-CH_2-$		Me	Me	Rétrochinensine

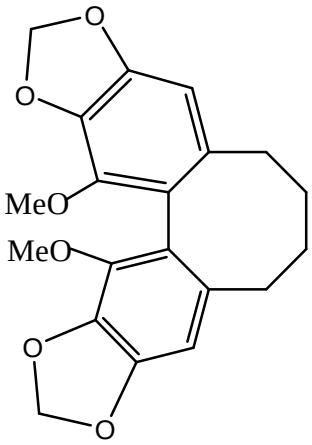
Tableau II.10



N°	R_1	R_2	R_3	R_4	Nom
116	Me	Me	$-CH_2-$		Justicidine **B**
117	$-CH_2-$		$-CH_2-$		Taiwanine **C**
20b	$-CH_2-$		Me	Me	Chinensine

Tableau II.11

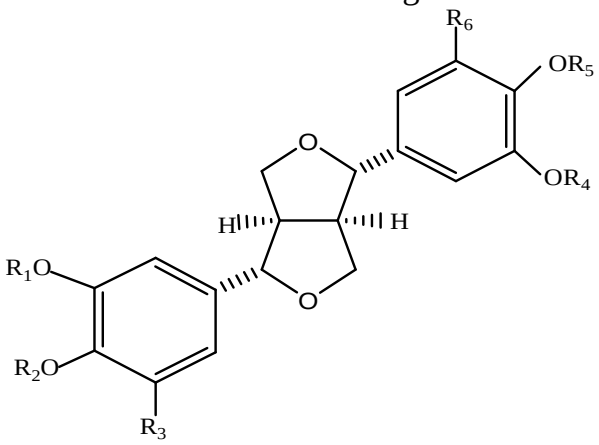
e. Lignanes dibenzocycloctanes



Wuweizicu **C 118**

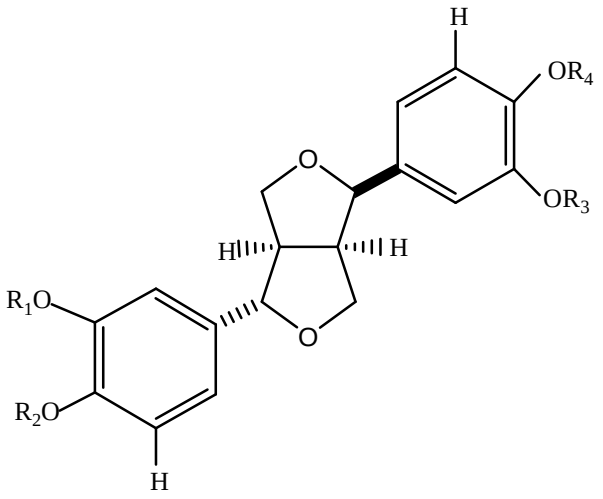
f. Lignanes furanofuraniques

La double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furanofuraniques [6].



N°	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	Nom
119	$-CH_2-$		H	$-CH_2-$		H	Sésamine
120	Me	H	H	$-CH_2-$		H	Pipéritol
121	Me	Me	OMe	Me	Me	OMe	Dimétyle éther liriorésinol B

Tableau II.12



N°	R1	R2	R3	R4	Nom
122	$-CH_2-$		$-CH_2-$		Asarinine
123	Me	H	$-CH_2-$		Xanthoxylol
124	$-CH_2-$		Me	H	Pluviatilol
125	Me	Me	Me	Me	Epieudesmine

Tableau II.13

II.4.3. Biosynthèse des lignanes

Les lignanes se trouvent dans les différentes parties des plantes : l'écorce, les racines, les fleurs et les graines. Biosynthétiquement, ils sont élaborés comme tous les dérivés des phénylpropanoides par la voie du schikimate (voir la biosynthèse des coumarines) via l'alcool coniférylique. La biosynthèse de ce dernier à partir de la phénylalanine n'est pas une voie simple et droite, mais une grille métabolique complexe (schéma II.7) [63, 64]. L'alcool coniférylique est également précurseur des lignines.

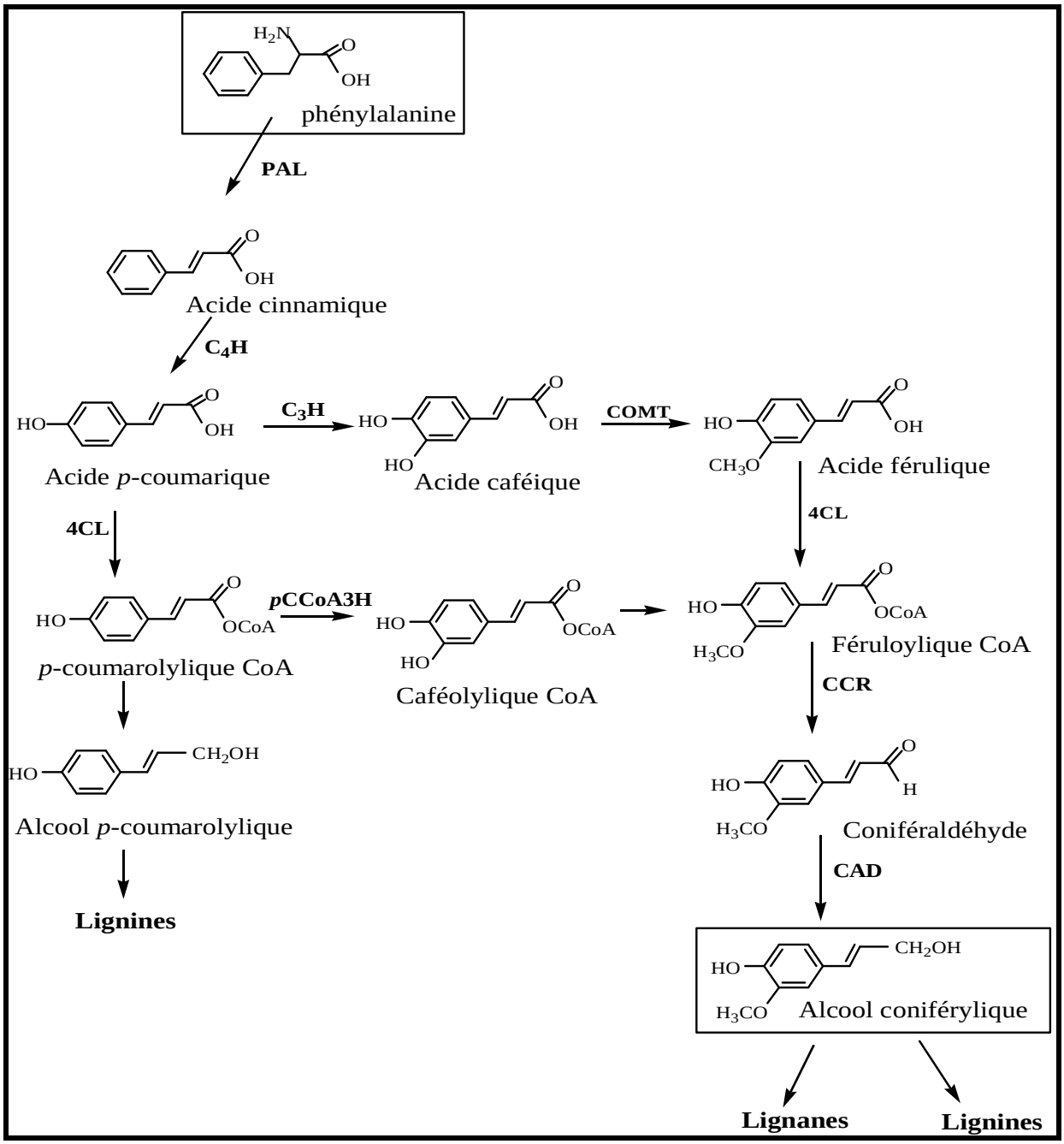


Schéma II.7

PAL : phénylalanine ammonia lyase, **C4H :** cinnamate 4-hydroxylase, **C3H :** *p*-coumarate 3-hydroxylase, **COMT :** acide caféique O-méthyltransférase. **4CL :** 4-(hydroxyl) cinnamoyl CoA ligase, ***p*CCoA3H :** *p*-coumaroyl CoA 3-hydroxylase, **CCR :** cinnamoyl CoA réductase, **CAD :** cinnamoyl alcool déhydrogénase.

Les données expérimentales concernant cette biosynthèse sont rares [6], elle est donc basée sur des hypothèses partiellement vérifiées. On présume que les lignanes se produisent par une dimérisation enzymocatalysée d'un radical phénylpropanoide.

Le premier schéma présentatif du couplage oxydatif de deux unités phénylpropanoides a été déjà décrit par Haworth en 1936 [65].

En théorie, il est possible de concevoir que l'oxydation de l'acide coniférylique par exemple, conduit à un radical qui peut exister sous quatre formes mésomères ce qui implique un grand nombre de couplages possibles parmi lesquels, cinq sont fréquents (8-8', 8-1', 8-3', 8-O-4', 3-3') (schéma II.8).

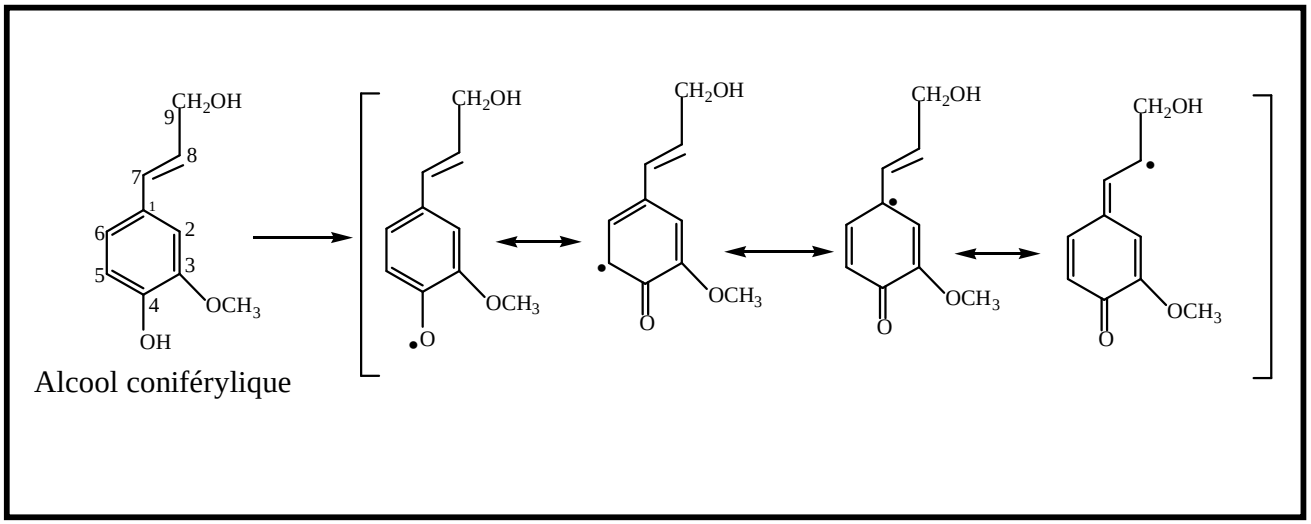


Schéma II.8

Logiquement, la condensation de deux radicaux doit conduire à une méthinequinone qui peut subir ensuite un retour à l'aromaticité, induisant le plus souvent, une cyclisation (ex : furanofuranes, dihydrobenzofuranes) schéma II.9 [6,63].

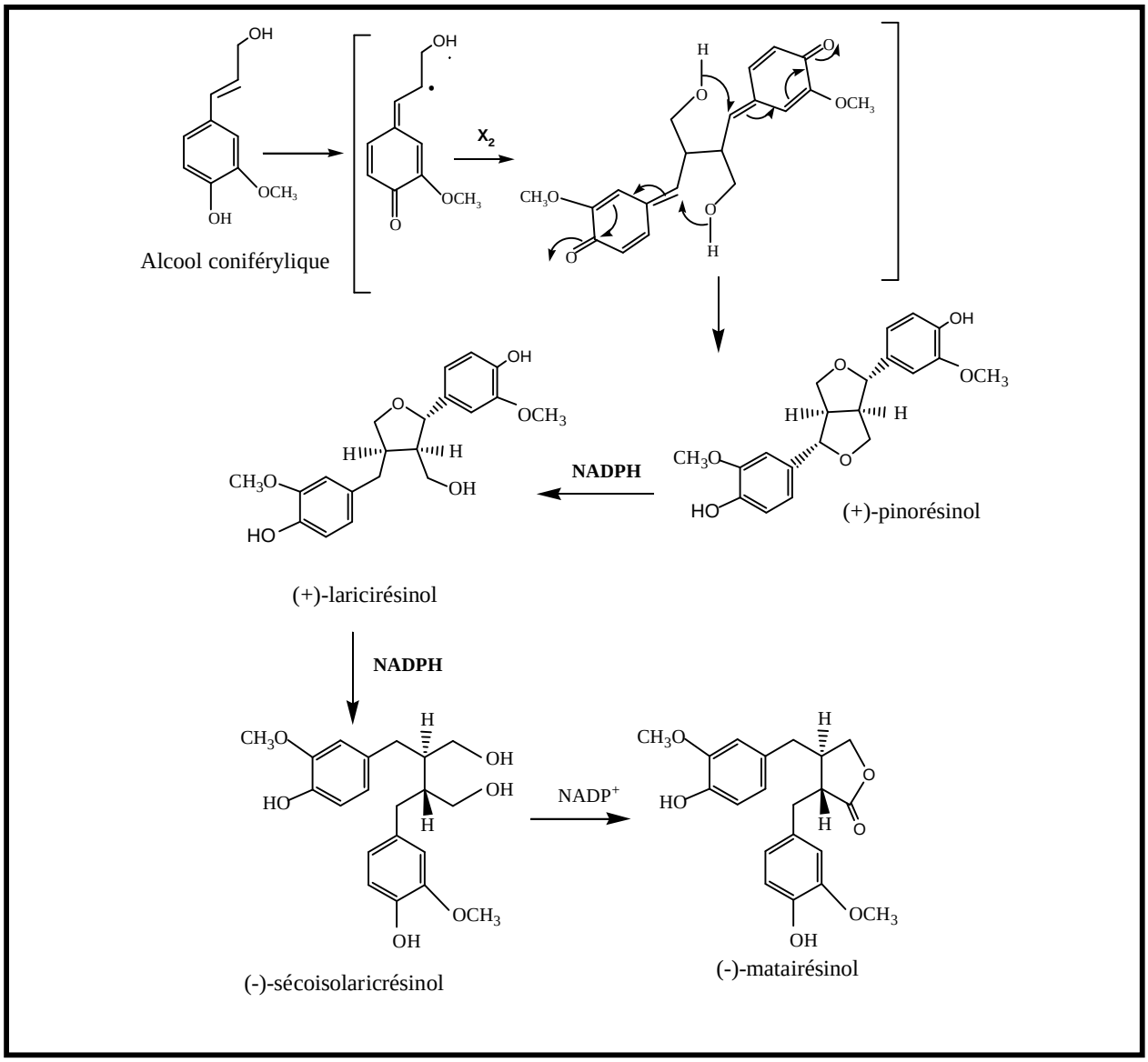


Schéma II.9 : Biosynthèse du matairésinol.

La régio et la stéréospécificité étonnantes de ce couplage sont attribuées à une protéine isolée pour la première fois par Davin et Lewis à partir de *Fosythia intermedia* [66]. Cette protéine ne présente aucune capacité oxydante, mais porte des sites capables de relier les radicaux monomères dans une orientation spécifique. Pour cela, elle a été baptisée « protéine directrice ».

Le produit du couplage de l'alcool coniférylique est le pinorésinol. Ce composé est alors doublement réduit conduisant ainsi au sécoisolarésinol. Le noyau lactonique est alors formé pour donner le matairésinol. Et à partir du matairésinol, la biosynthèse des lignanes bifurque dans différentes directions conduisant à une grande diversité de lignanes [66].

II.4.4. Intérêt pharmacologique des lignanes

Les indigènes de la Chine, du Japon et de l'Amérique avaient l'habitude d'utiliser les plantes riches en lignanes pour traiter le cancer, l'arthrite, l'ulcère et les douleurs. La podophylline; l'extrait alcoolique des racines de *podophyllum* dont le principe actif est la podophyllotoxine **65**, était utilisé en Amérique entre 1820 et 1942 comme agent cathartique et cholagogue [65].

Ces composés possèdent une large gamme d'activités biologiques incluant, l'activité antitumorale, anti-oestrogénique. Ce sont également des inhibiteurs des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones sexuelles [67]. Par cet effet inhibiteur, ils réduisent probablement les taux d'estradiol et de la testostérone libres dans le plasma sanguin, ce qui a pour effet d'empêcher le développement des maladies hormono-dépendantes [67]. La recherche scientifique a aussi démontré que les lignanes sont transformés par les bactéries intestinales en composés qui protègent des maladies hormonales [65]. les femmes en période de la ménopause tirent bien profit de ces substances, qui en plus du soulagement des bouffées de chaleurs ménopausiques, pourraient avoir un effet protecteur contre toutes les maladies liées aux troubles oestrogéniques telles que l'ostéoporose [52] et le cancer du sein [6].

Les lignanes sont aussi des antioxydants spéciaux qui ont fait preuve de remarquables effets bénéfiques sur la santé. Ils ont entre autres une activité antivirale, bactéricide, antifongique et anti-inflammatoire. En plus ils agissent contre le lupus, le diabète et les taux élevés de cholestérol [67].

Les lignanes aryltétrahydronaphtaléniques et les dibenzocyclo-octaniques possèdent des propriétés antimitotiques. Seuls les dérivés hémisynthétiques de la podophyllotoxine font l'objet d'une exploitation dans un but thérapeutique [6]. La podophyllotoxine est utilisé pour le traitement de la condylome, elle est également le précurseur de trois produits anticancéreux ; l'étoposide **110**, le téniposide **111** et l'étopophos **112** [68].

II.4.5. Synthèse des lignanes du type arylnaphtalènes

Comme tous les métabolites secondaires, les lignanes existent dans les plantes en faibles quantités. Et pour pouvoir multiplier les essais biologiques, pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action, la recherche de nouvelles approches synthétiques permettant l'accès à ces molécules s'impose. En effet, plusieurs voies de synthèse accédant aux lignanes ont été élaborées. Nous représentons ici une approche élégante décrite par Stuart et all [69], qui présente, par rapport aux méthodes antérieures l'avantage de permettre la diversité de substitution et d'accéder aux deux séries d'arylnaphtalènes.

Cette approche est réalisée selon le schéma suivant.

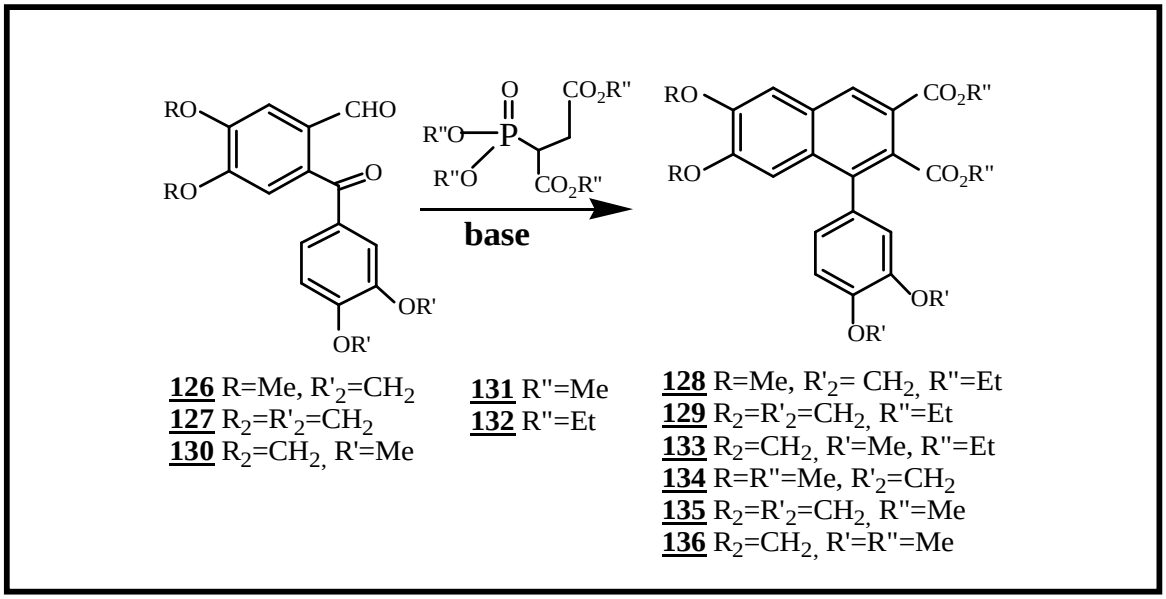


Schéma II.10

L'étape clé dans cette approche est une réaction d'annulation aromatique originale, basée sur le tandem réaction d'Horner-Emmons/condensation de Claisen. Elle est accomplie par une simple agitation à 0°C d'une solution du cétoaldéhyde **126** et le phosphosuccinate **132** en présence de l'éthylate de sodium et fournit l'arylnaphtalène **128** avec un rendement de 68%. Suite à ce résultat encourageant, l'annulation a été étendue à d'autres cétoaldéhydes **127**, **130** et le phosphosuccinate **131**. Dans tous les cas, l'annulation procède avec un bon rendement.

La suite des étapes a été réalisée, en se basant sur une procédure développée par Padwa et al [70]; selon laquelle les diesters **128**, **129** et **133** ont été saponifiés par emploi du

triméthylsilanoate de potassium pour conduire aux demi-acides correspondants **137**, **138** et **139**. Ces derniers sont alors réduits par le sulfure de diméthylborane donnant ainsi l'accès après acidification aux lactones : justicidine **B 116**, taiwanine **C 117** et à la chinensine **20b** respectivement. Par contre la déprotonation des acides esters par l'hydrure de sodium, suivie par la réduction des fonctions esters et achevée par une lactonisation en milieu acide conduit directement aux rétrolactones correspondantes : rétrojusticidine **B 113**, justicidine **E 114** et la rétrochinensine **115** (schéma II.11).

L'accès à ces rétrolactones a été réalisé par un autre jeu de réactions ; en premier lieu, les auteurs procèdent à la réduction des diesters en diols correspondants par emploi de $LiAlH_4$, et l'oxydation sélective de ces derniers soit par MnO_2 ou par $BaMnO_4$ conduit aux rétrolactones **113**, **114** et **115** avec des rendements satisfaisants.

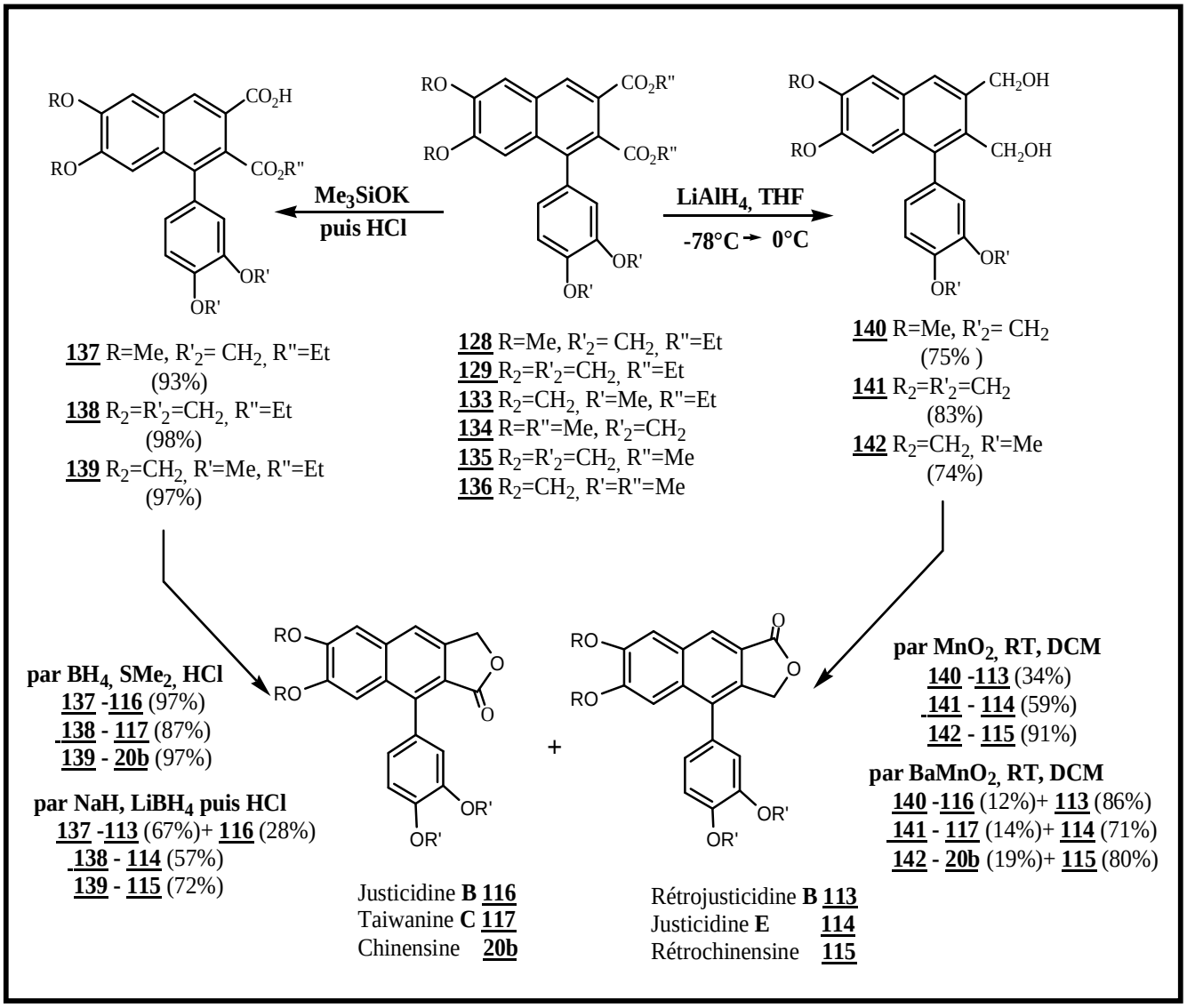


Schéma II.11

Les matières premières dans cette approche ; les cétoaldéhydes **126**, **127** et **130** ont été facilement obtenus à partir des dialkoxy benzaldéhydes**143** en quatre étapes conformément au schéma II.12.

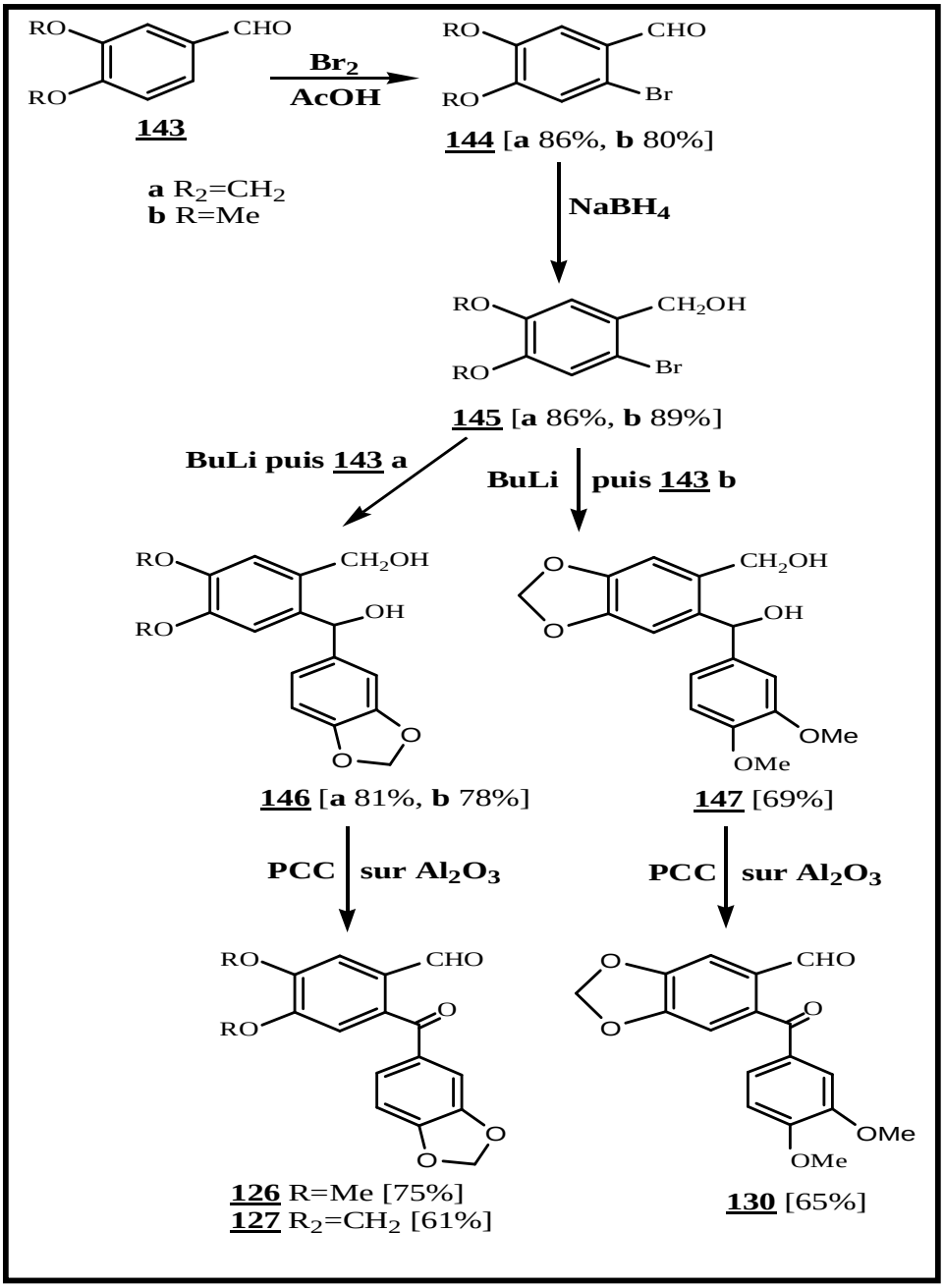


Schéma II.12 : La synthèse des cétoaldéhydes **126**, **127** et **130**

Les dialkoxybenzaldéhydes subissent d'abord une bromation, les aldéhydes bromés obtenus sont alors réduits en alcools et transformés en organolithiens correspondants. La condensation de ces derniers avec les molécules de départ fournit les diols, qui par oxydation par PCC (sur Al_2O_3) donnent les cétoaldéhydes requis.

Chapitre III

Isolement des composés et détermination de leurs structures

III.1. Récolte du matériel végétal

L'espèce *Bupleurum atlanticum* a été récoltée de la région de Djerma (Batna), au mois de Juillet 2004. Cette plante est identifiée par Monsieur : HAMCHI ABDELHAFID.

Après séchage à l'air libre et à l'abri des rayons solaires, les feuilles et les tiges (parties aériennes) ont été broyées et pesées (1Kg).

III.2. Extraction

1Kg de la matière végétale sèche est mis à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau ; 70/30 v/v) pendant 24 h. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant, les trois solutions sont réunies et concentrées sous pression réduite et une température modérée (45°C).

La solution aqueuse obtenue est épuisée successivement par l'hexane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n.butanol (schéma III.1).

Les quatre phases organiques récupérées sont séchées avec Na_2SO_4 anhydre puis filtrées et concentrées à sec.

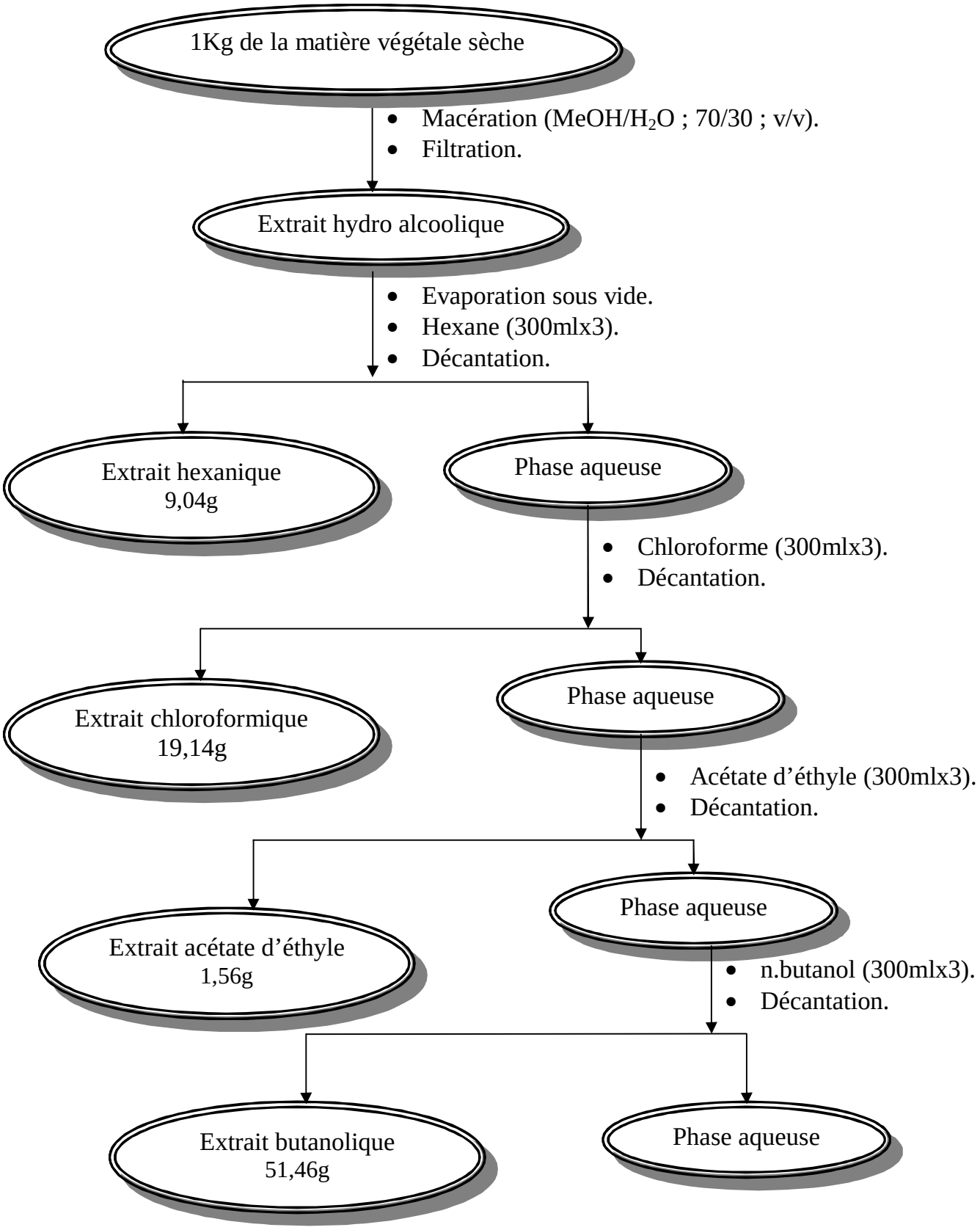


Schéma III. 1 : Schéma général de l'extraction.

III.3. Séparation et purification des composants de l'extrait chloroformique

La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait chloroformique montre des taches intéressantes, leurs fluorescences sous la lumière UV (254 et 366 nm) nous a orienté vers des structures phénoliques.

III.3.1. Fractionnement

5g de l'extrait chloroformique est chromatographié sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparé dans l'éther de pétrole. L'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole puis par un gradient de CH_2Cl_2 dans l'éther de pétrole : 95/5, 90/10, 80/20,60/40, 50/50, 40/60, 20/80, 10/90, CH_2Cl_2 pur. La polarité de l'éluant est ensuite augmentée par l'addition graduelle du méthanol 98/2, 95/5, 90/10, 70/30, 50/50, et enfin le MeOH pur. Des fractions de 50 ml sont collectées.

Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM), visualisées à la lumière UV aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm et révélées à l'acide sulfurique. Les fractions présentant des similitudes sont rassemblées ; 16 lots sont ainsi obtenus.

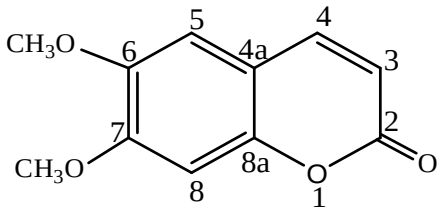
III.3.2. Purification

Parmi les 16 lots recueillis précédemment, trois sont jugés intéressants (les lots N° 8, 9 et 12) car ils contiennent des cristaux. La purification de ces lots a nécessité plusieurs opérations de purification pour obtenir trois produits correspondant aux composés **A**, **B** et **C**.

III.3.3. Identification des structures

Les analyses spectroscopiques RMN^{1}H, ^{13}C (1D et 2D), IR, UV ainsi que la spectrométrie de masse nous ont permis d'identifier les structures des composés **A**, **B** et **C.**

*a. Identification du composé **A***



Composé A

La scoparone (6,7-diméthoxy coumarine)

Le composé **A** se présente sous forme de cristaux blancs (Rf = 0,48 dans le $CHCl_3$), Pf = 145 °C.

Il montre sur le chromatogramme une tache visible à l'UV ; donnant une fluorescence violette aux longueurs d'onde λ = 254 nm et λ = 366 nm.

L'enregistrement du spectre UV du composé **A** (Fig III.1) est réalisé dans le MeOH. Ce spectre montre quatre bandes d'absorptions maximales à 230, 250, 290 et 345 nm, ces absorptions sont caractéristique d'un noyau coumarinique.

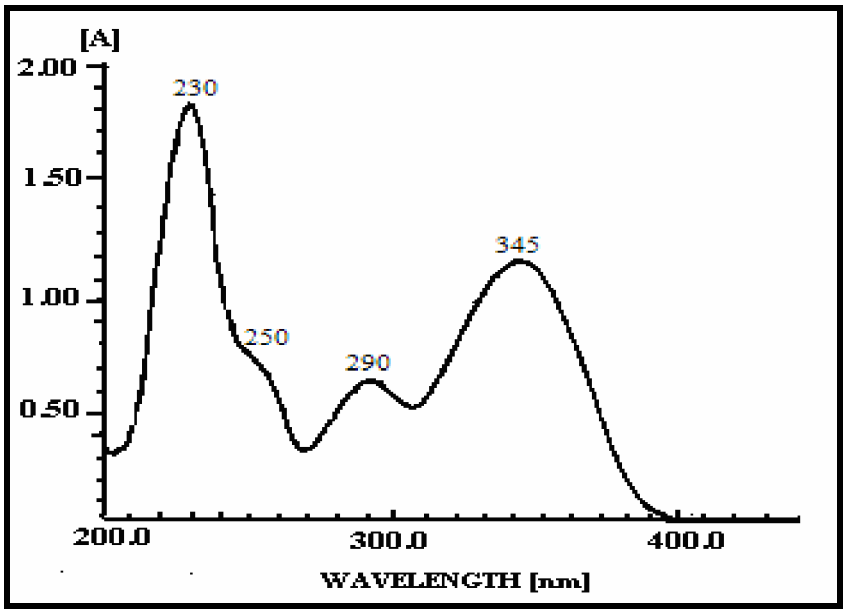


Fig III.1 : Spectre UV du composé **A**

Sur son spectre IR (Fig.III.2) apparaissent les bandes d'absorption d'un carbonyle à 1734 cm^{-1}, d'une double liaison à 1633 cm^{-1} et d'un système aromatique (1513 et 1449 cm^{-1}). L'ensemble de ces bandes confirme la nature coumarinique de ce composé [71].

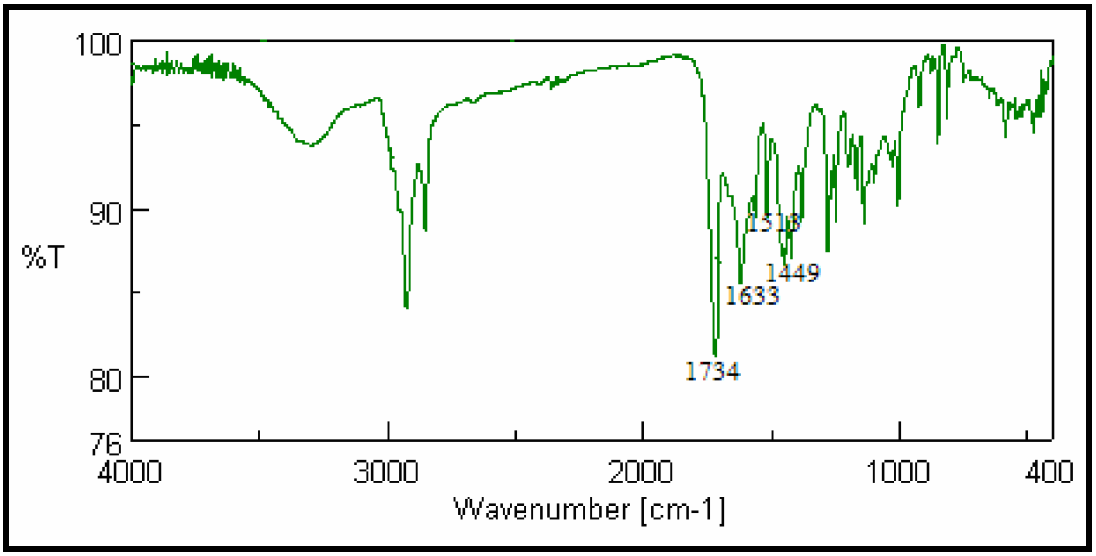


Fig III.2 : Spectre IR du composé **A**

Le spectre RMN^{1}H de la région aromatique (6,00-7,80 ppm) (Fig.III.3) du composé **A** montre :

* Une paire de doublets typique des coumarines à 6,28 et 7,62 ppm (J = 9,3Hz) attribués aux protons H-3 et H-4 respectivement.

Le déblindage de H-4 relativement à celui de H-3 peut s'expliquer par la délocalisation du système oléfinique des protons H-3 et H-4 (schéma III.2).

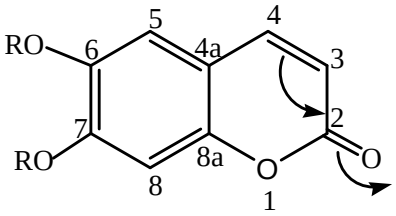


Schéma III.2

La position relative de H-4 à haut champ est indicatrice de l'absence de substituant oxygéné en C-5 [72].

* Les deux protons aromatiques apparaissant chacun sous forme d'un signal singulet à 6,84 et 6,85 ppm, caractéristiques de H-8 et H-5 respectivement.

Ceci représente une claire indication de la présence de deux substituants oxygénés en C-6 et C-7 [16].

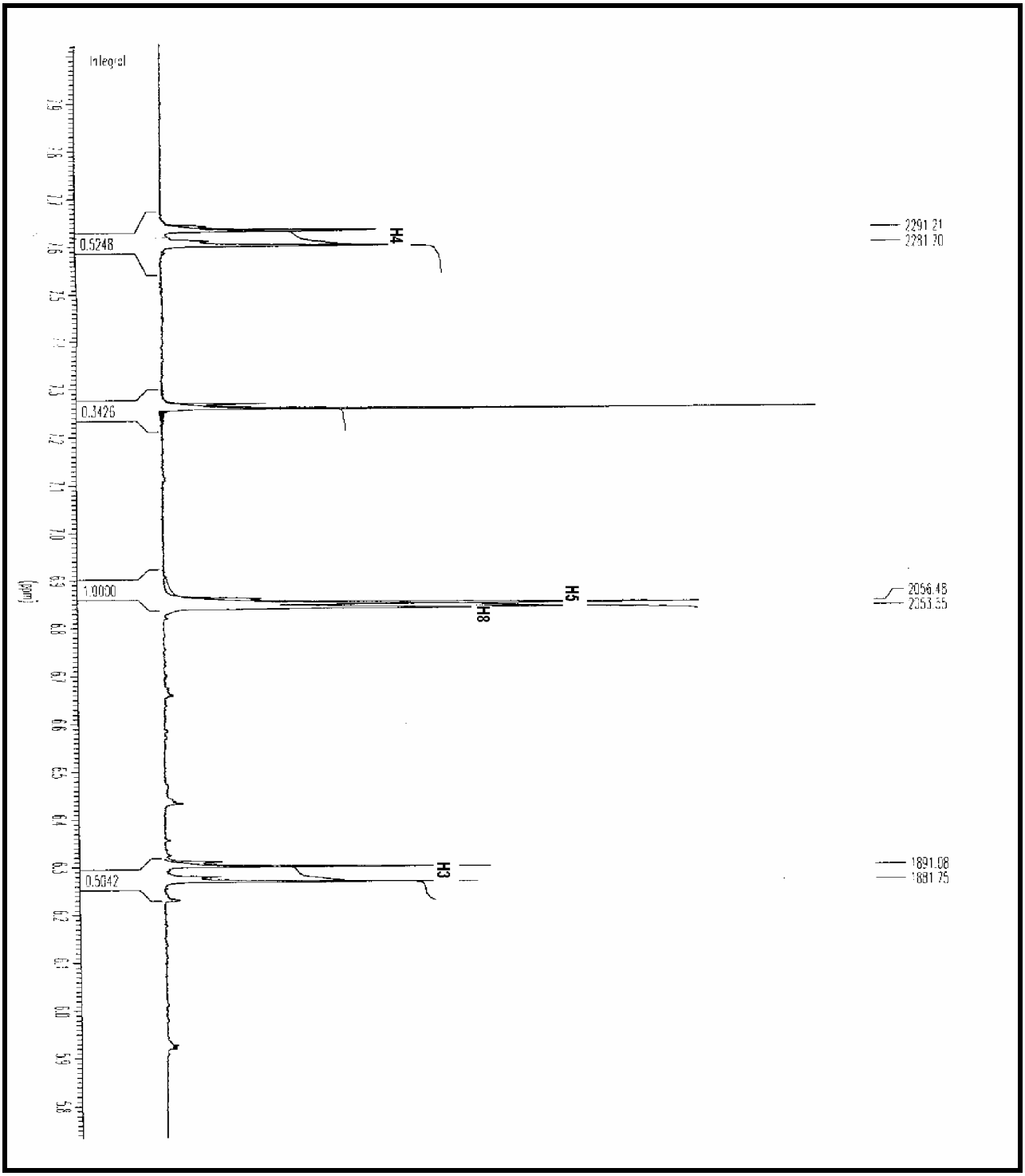


Fig III.3 : Spectre RMN^{1}H étalé du composé **A** (Région 6,00-7,80 ppm).

* La présence de deux singulets (Fig III.4) résonant au champs forts à 3,92 et 3,94 ppm indique donc que les substituants oxygénés en C-6 et C-7 sont bien des groupements méthoxyles.

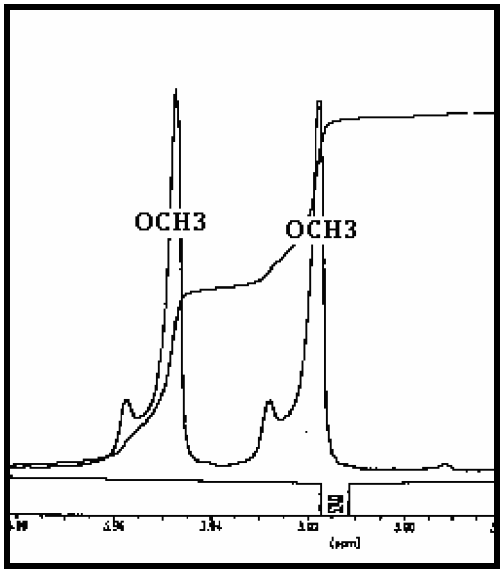


Fig III.4 : Spectre RMN^{1}H étalé du Composé **A**
(Région 3,80-4,00 ppm)

Tous ces déplacements chimiques corrèlent bien avec ceux rapportés dans la littérature pour la Scoparone [73].

δH (ppm) Composé A	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	δH(ppm) Données de la littérature [73]	Interprétation
6,28	d	1H	9,3	6,24 (d ; 9,4)	H-3
7,62	d	1H	9,3	7,57 (d ; 9,4)	H-4
6,85	s	1H	-	6,82 (s)	H-5
6,84	s	1H	-	6,79 (s)	H-8
3,94	s	3H	-	3,97 (s)	OCH_3-6
3,92	s	3H	-	3,93 (s)	OCH_3-7

Tableau III.1 : Déplacements chimiques des protons du composé **A**.

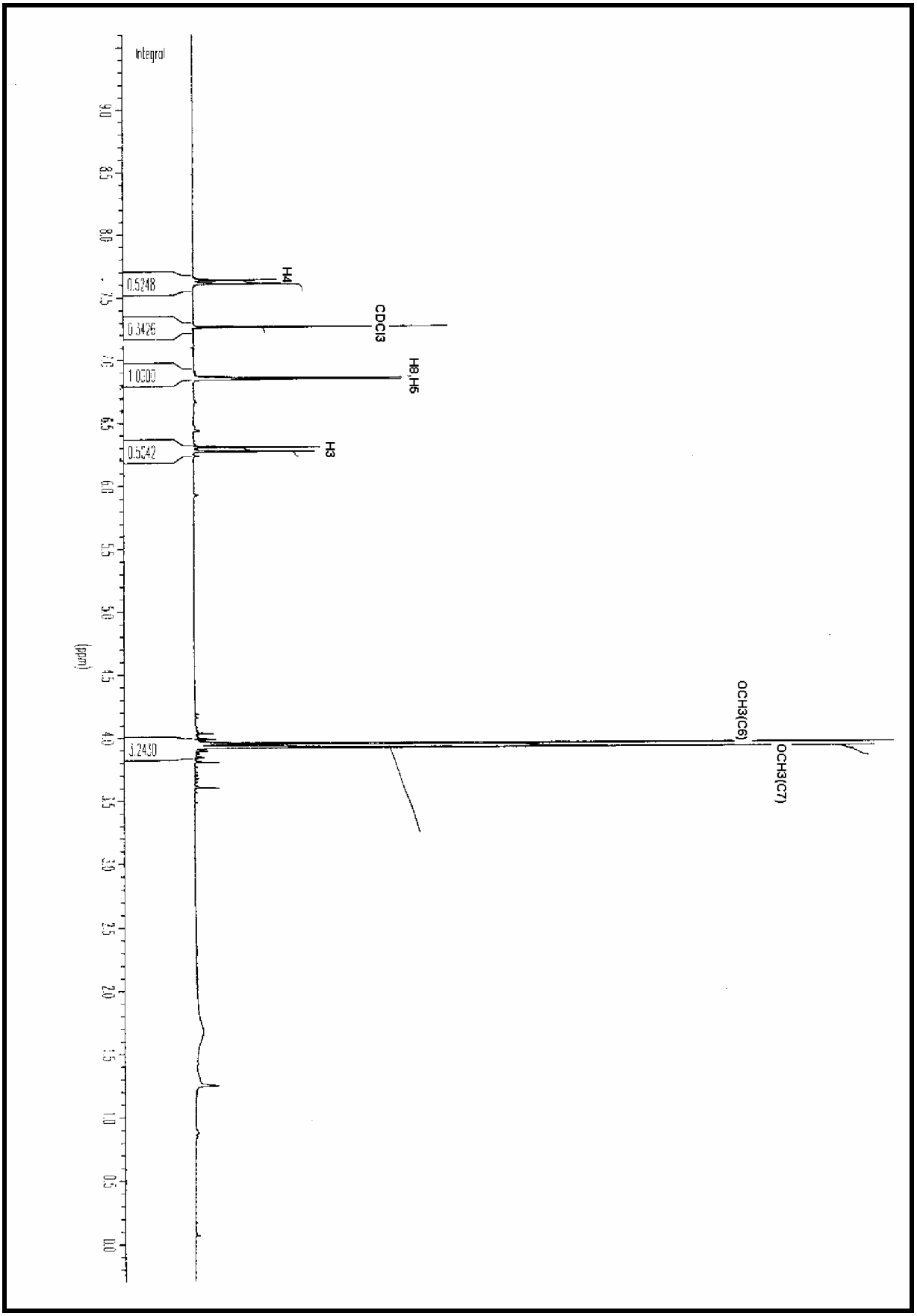


Fig III.5 : Spectre RMN^{1}H du Composé **A**.

Les données du spectre RMN^{13}C (Fig.III.6) corrèlent bien avec la structure avancée. En effet il montre la présence de onze atomes de carbone, que l'on peut attribuer, en s'appuyant sur les données de la littérature [73].

* Un signal caractéristique du carbonyle d'une lactone (C-2) résonant à δ=161,3ppm.
* Les carbones résonants à 113,5 et 143,2 ppm correspondant aux carbones de la double liaison oléfinique (C-3) et (C-4) respectivement.

Il montre également des signaux caractéristiques des carbones aromatiques : C-4a à 111,4 ppm, C-5 à 107,9 ppm, C-6 à 146,3 ppm, C-7 à 152,8 ppm, C-8 à 100,0 ppm et C-8a à 150,0 ppm.

Le tableau III.5 rassemble les déplacements chimiques des onze atomes de carbones du composé **A** et ceux rapportés dans la littérature pour le même composé [73].

δc (ppm) Composé A	**Interprétation**	**δc (ppm) Données de la littérature [73]**
161,3	C-2	161,5
113,5	C-3	113,3
143,2	C-4	143,3
111,4	C-4a	111,3
107,9	C-5	108,1
146,3	C-6	146,6
152,8	C-7	152,1
100,0	C-8	101,2
150,0	C-8a	149,9
56,3	OCH_3 (C-6)	56,3
56,3	OCH_3 (C-7)	56,3

Tableau III.2 : Déplacements chimiques des carbones du composé **A**.

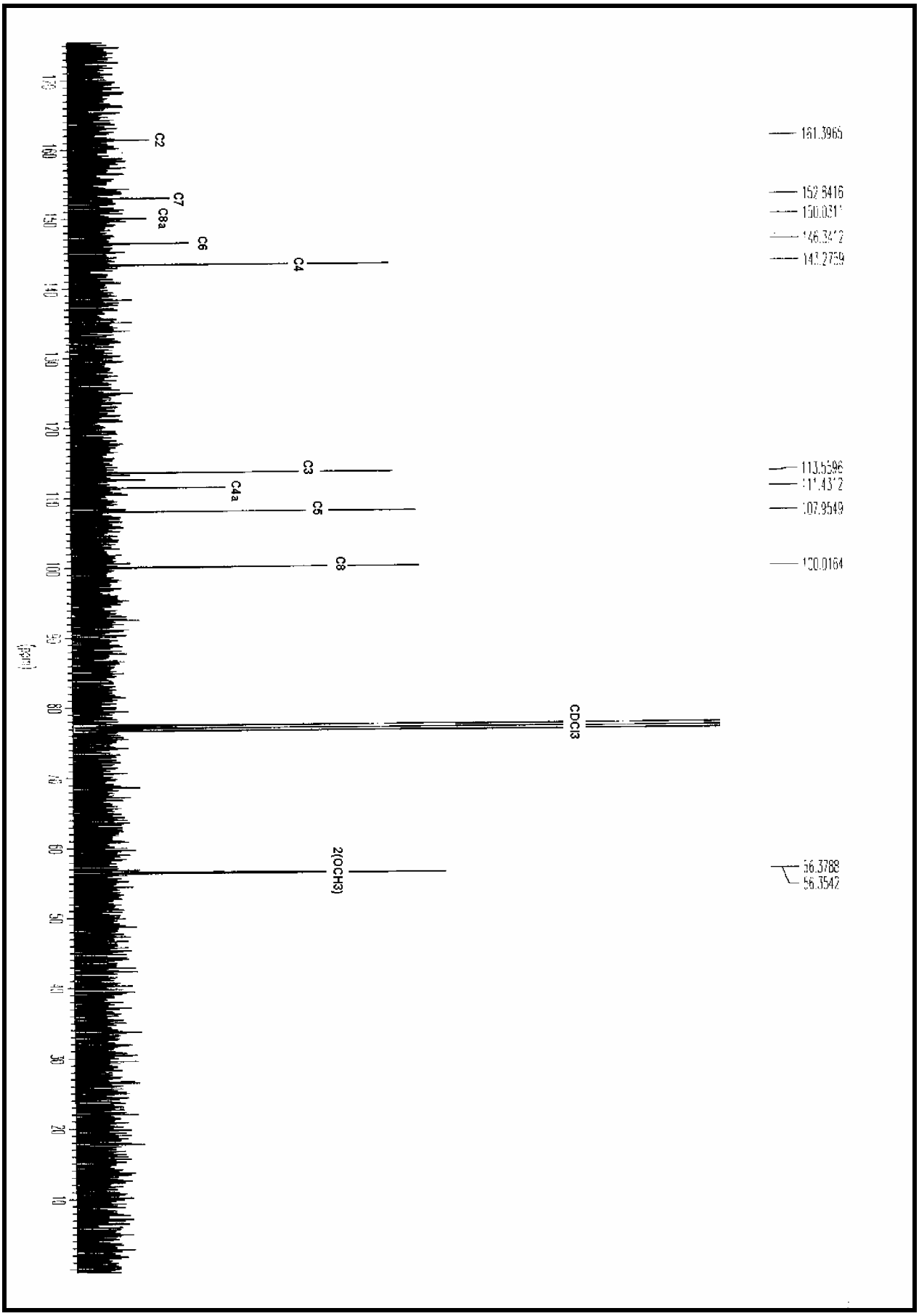
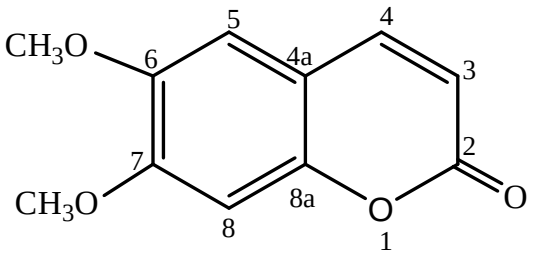


Fig III.6 : Spectre RMN^{13}C du composé **A**

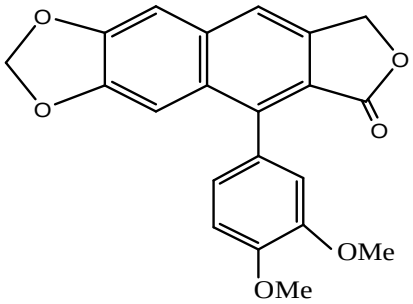
Donc, l'ensemble de ces données, appuyées par celles de la littérature ont permis de conclure sans ambiguïté quant à la structure du composé **A** qui n'est autre que la Scoparone. Ce composé a été déjà isolé de l'espèce *Bupleurum fruticosum* de ce genre [16].



Composé A

La scoparone (6,7-diméthoxy coumarine)

*b. Identification du composé **B***



Composé B

Chinensine (3',4'-diméthoxyphenyl-2,3-naphtalide-γ-butyrolactone)

Le composé **B** se présente également sous forme des cristaux blancs (Rf = 0,43 dans le $CHCl_3$), Pf = 224°C.

Il montre une tache visible sous la lumière UV, qui donne une fluorescence jaunâtre à la longueur d'onde λ = 366 nm et une fluorescence bleu brillant à la longueur d'onde λ= 254 nm. Sa révélation par l'acide sulfurique donne une coloration rose-violette.

Le spectre d'absorption UV (Fig III.7) montre des bandes d'absorption maximales à λ = 220, 255, 310 et 350 nm.

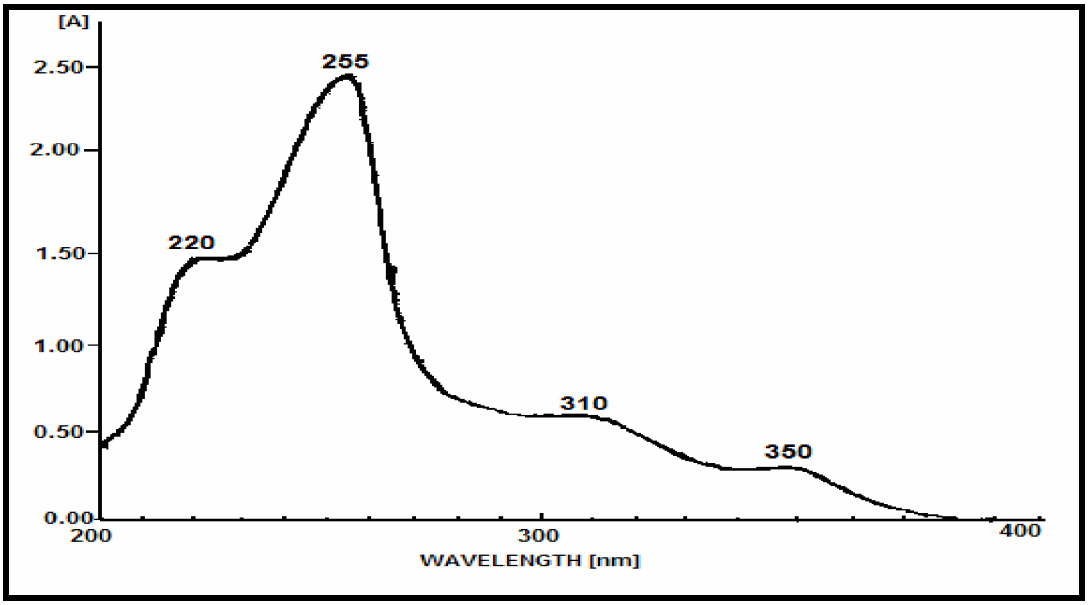


Fig III.7 : Spectre UV du composé **B**.

Sur le spectre IR (Fig III.8) de ce composé, apparaissent les bandes d'absorptions suivantes :

* à 1762 cm^{-1} caractéristique du carbonyle δ-lactone conjuguée.
* à 1615 et 1467 cm^{-1} correspondant au cycle aromatique.
* à 934 cm^{-1} correspondant à l'absorption du métyhlènedioxy [74].

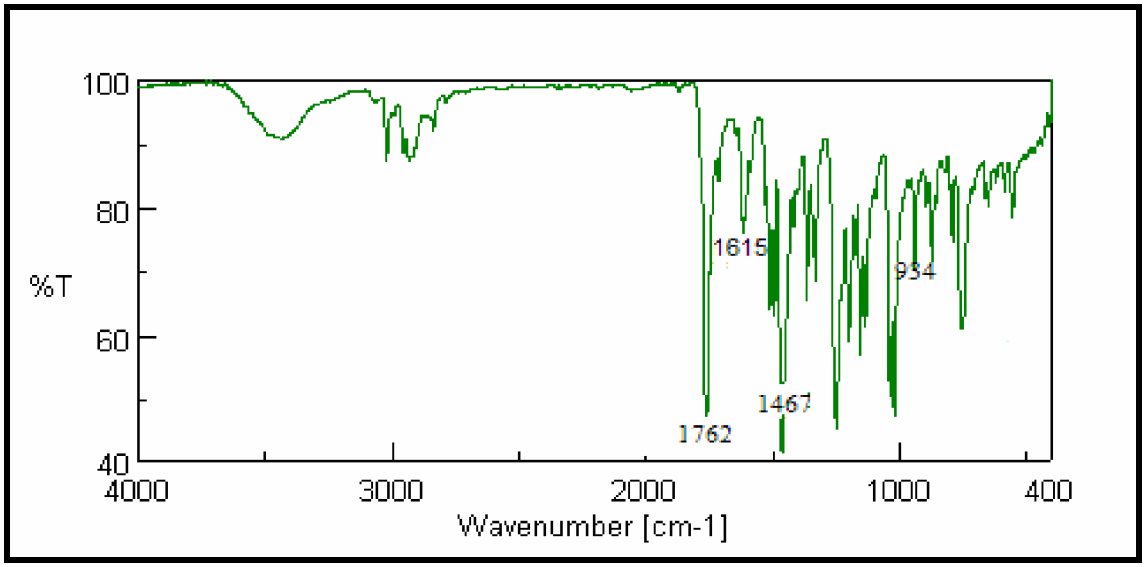


Fig III.8 : Spectre IR du composé **B**.

Toutes ces données sont consistantes avec un squelette lignane de type arylnaphtalène [74].

Sur le spectre RMN^{1}H (Fig III.9) on observe bien la présence :

* D'une série de protons aromatiques.
* Deux signaux singulets à δ = 3,85 et δ = 3,95 ppm et s'intégrant chacun pour trois protons, attestant de la présence de deux groupements méthoxyles.
* Deux protons résonant à δ = 5,35 ppm, caractéristiques d'un méthylène lactonique d'un lignane de type 1-aryl-2,3-naphtalène [75].
* Un deuxième signal singulet s'intégrant pour deux protons et résonant à δ = 6,09 ppm, révélateur de l'existence d'un groupement méthylènedioxy [74].

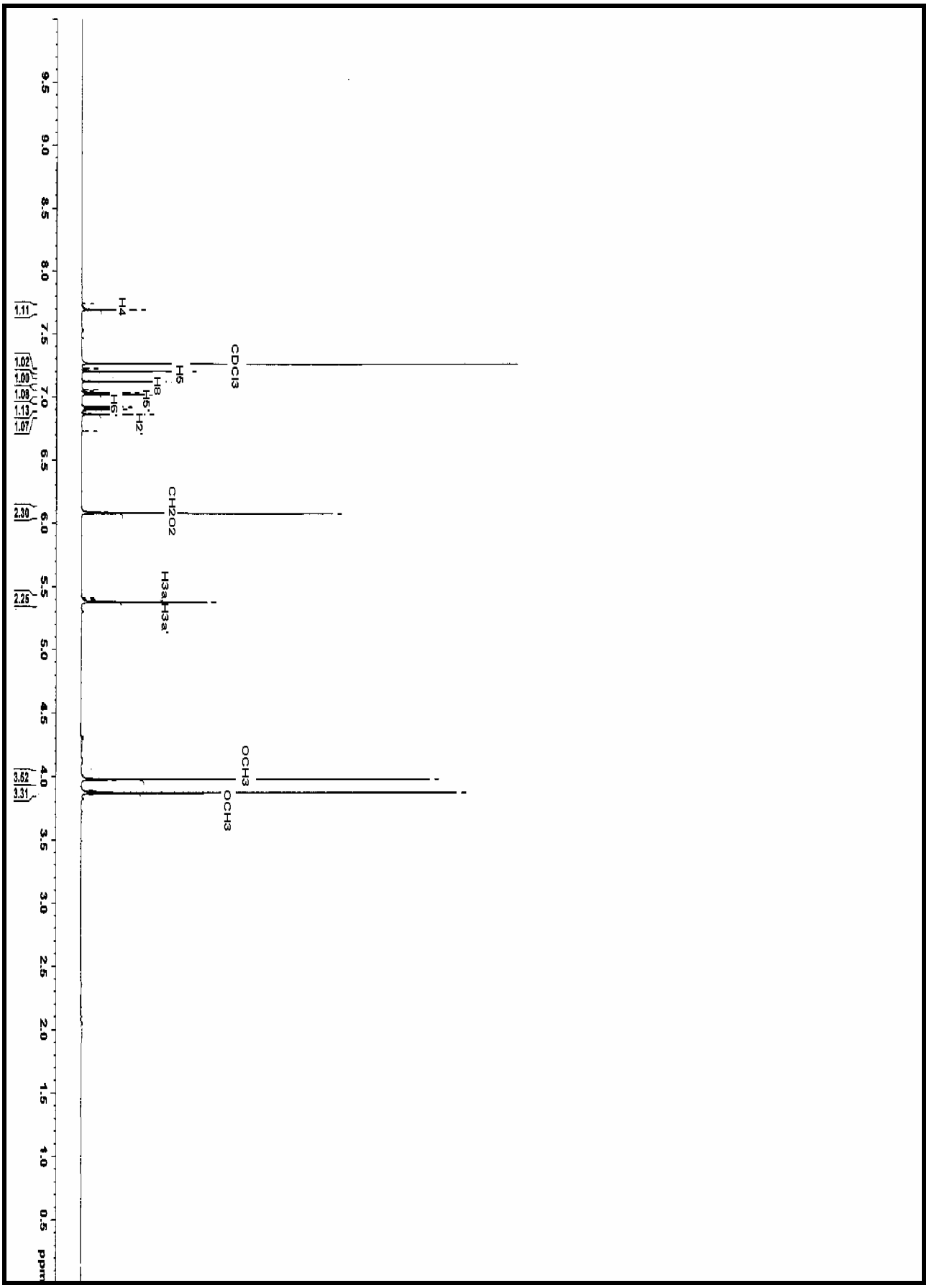


Fig III.9 : Spectre RMN^{1}H du composé **B**.

Le spectre de masse EI (fig III.10), présente un ion moléculaire $[M]^{\cdot+}$ à m/z 364,0 correspondant à la formule brute $C_{21}H_{16}O_6$.

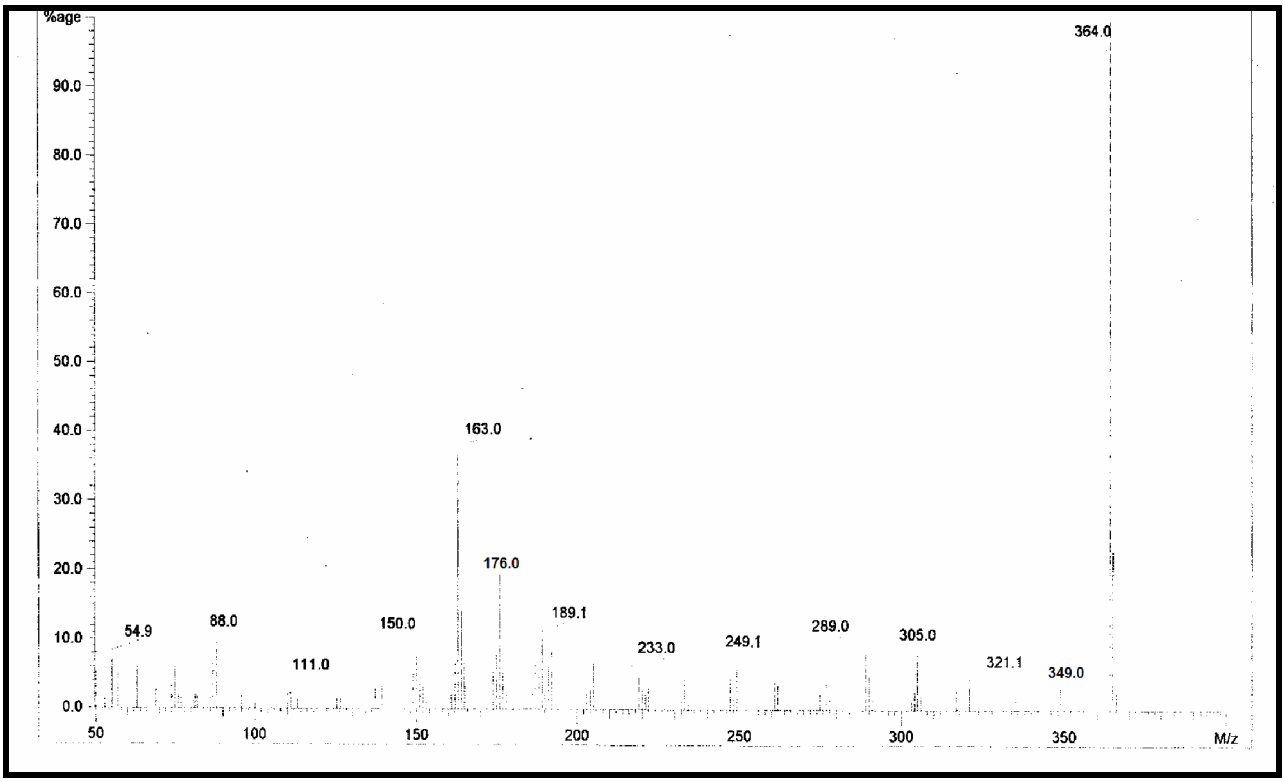
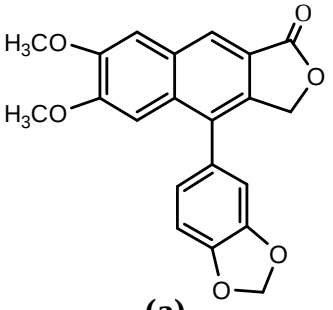
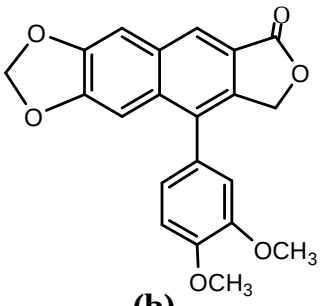


Fig III.10 : Spectre de masse du composé **B**

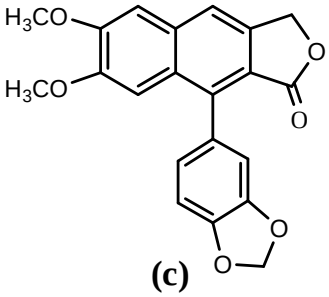
Ces données permettent de proposer les quatre structures possibles suivantes qui sont bien fréquentes dans la nature.



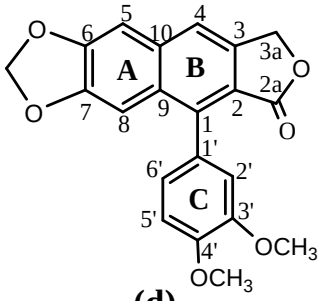
(a)



(b)



(c)



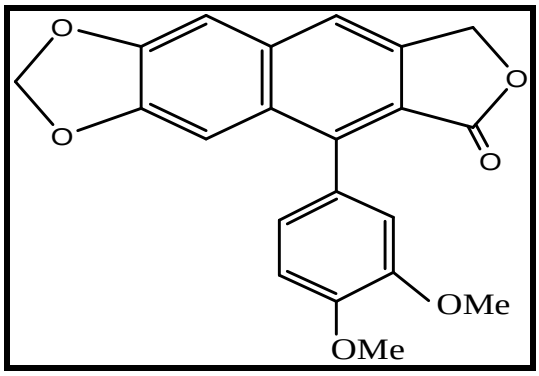
(d)

Sur le spectre RMN^{1}H (fig III.9), les protons aromatiques s'étalent sur l'intervalle (6,86-7,69 ppm). L'absence de tout signal de proton aromatique de déplacement chimique δ > 7,72 ppm permet déjà d'éliminer les structures **(a)** et **(b)** [74], et soutient donc la rétrodisposition du cycle lactonique.

rétrodisposition

La localisation des deux méthoxyles (à δ = 3,85 et à δ = 3,95 ppm) en C-6 et C-7 est à exclure. Cette exclusion est basée sur l'observation rapportée par Stevenson [76]; selon laquelle : la différence des déplacements chimiques $\Delta\delta$ des méthoxyles portés par le noyau A est toujours supérieures à 0,2 ppm, alors que dans le cas présent, elle n'est que de 0,1 ppm.

Donc, seule la structure **(d)** concorde bien avec toutes les données précédentes et qui correspond à celle de la Chinensine qui est présente dans plusieurs espèces de ce genre [35,36].



Composé B

Chinensine (3',4'-diméthoxyphenyl-2,3-naphtalide-γ-butyrolactone)

La fragmentation qui apparaît sur le spectre de masse EI (fig III.10), corrèle bien avec la structure avancée. Les pics élémentaires m/z 349, 321, 176 et 163 correspondent

aux fragments suivants (schéma III.3), qui sont bien connus dans cette série de lignanes[74].

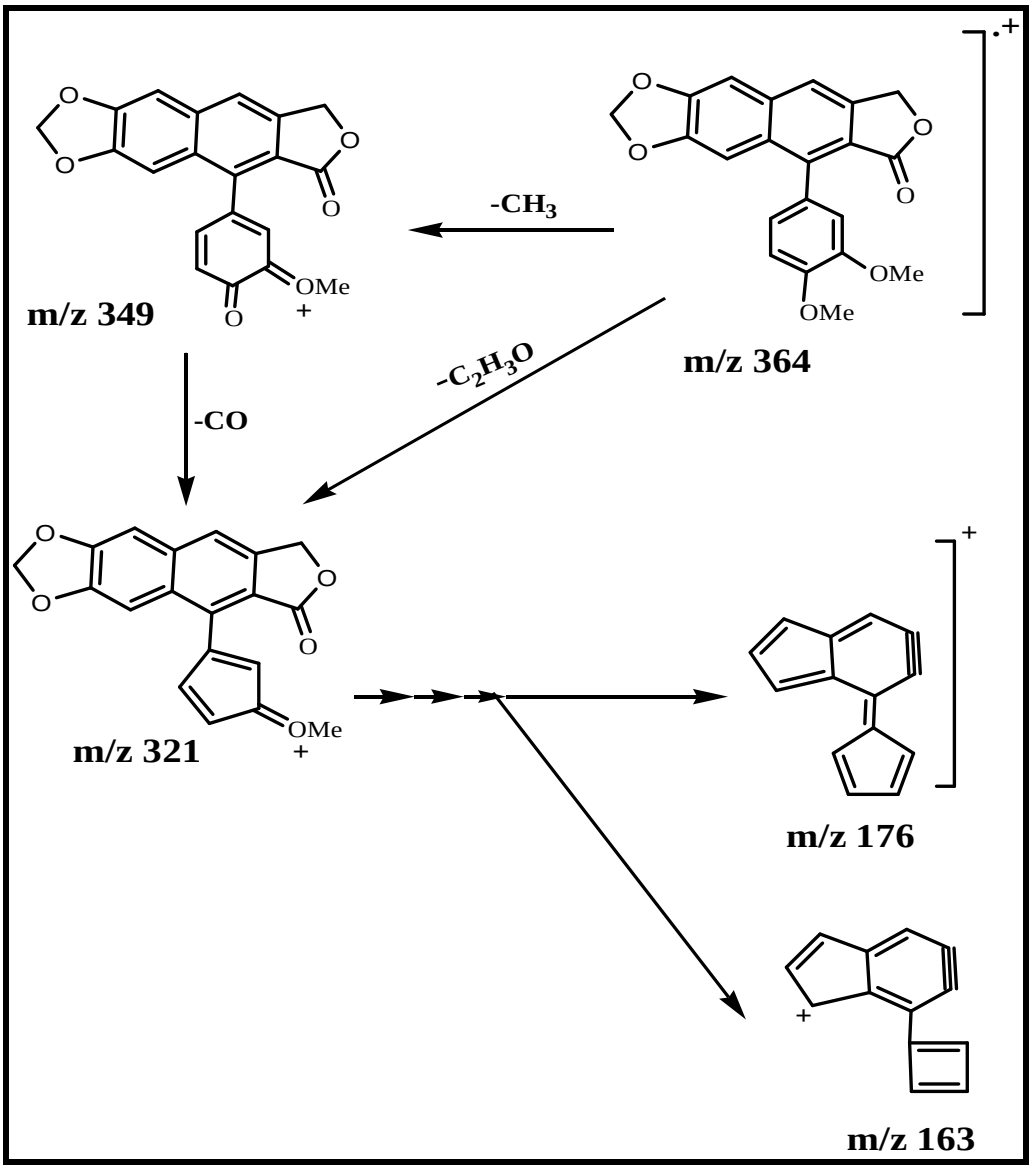


Schéma III.3 : les fragmentations élémentaires principales du composé **B**.

Sur le spectre étalé de la région aromatique (fig III.11), les déplacements d'un système vératrique (ABX) peuvent être clairement observés :

- à δ= 6,91 (dd ; J_1 = 8,2 Hz et J_2 = 1,9 Hz).
- à δ= 7,03 (d ; J = 8,2 Hz).
- à δ= 6,86 (d ; J = 1,9 Hz).

Qui sont donc attribués sans ambiguïté aux protons H-6', H-5'et H-2' respectivement.

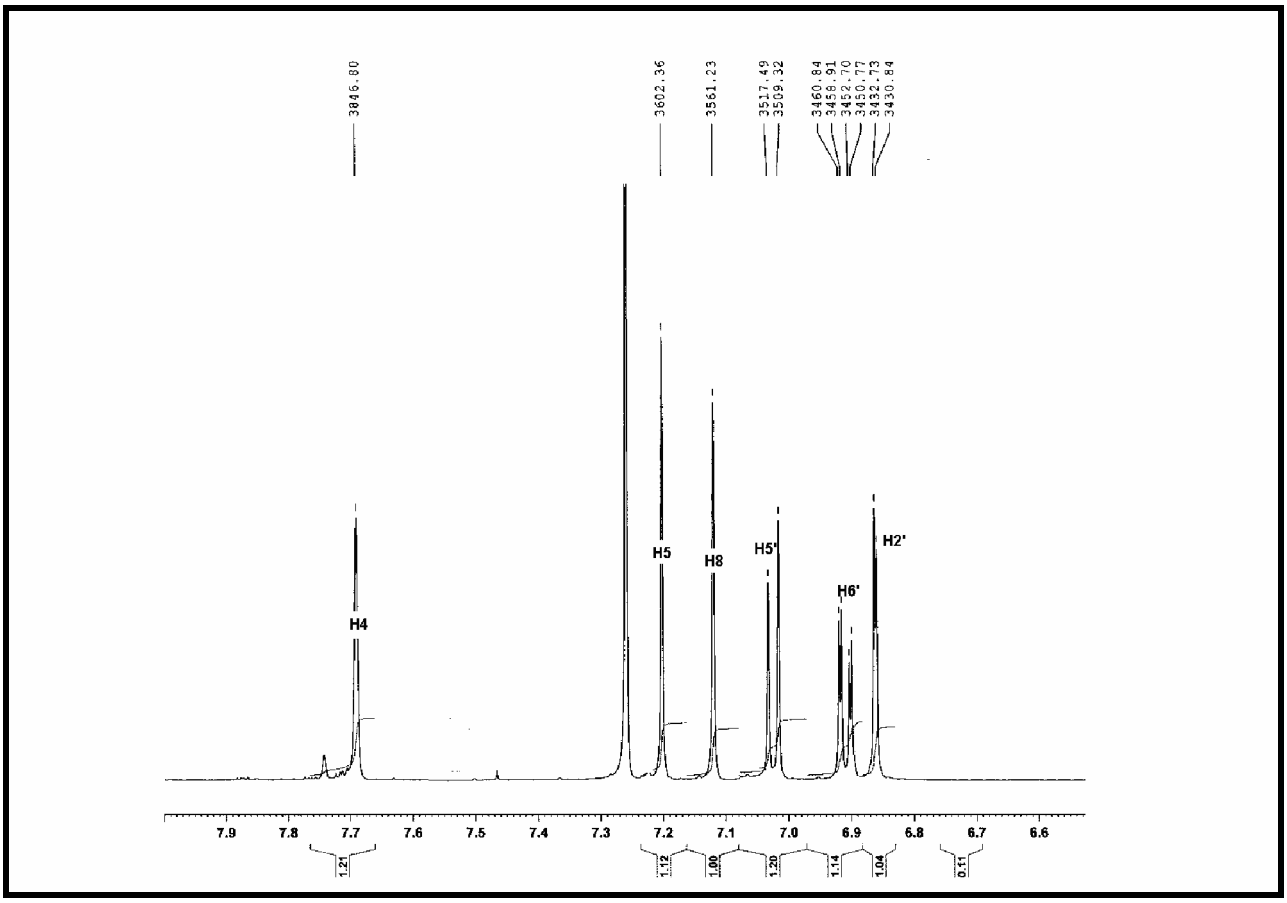


Fig III.11 : Spectre RMN^{1}H du composé **B** (région 6.86-7.69 ppm**)**.

L'expérience COSY H-H (Fig III.12) montre deux couplages à longue distance :

* Entre les protons H-3a (δ = 5,37 ppm) et le proton H-4 (δ = 7,69 ppm).
* Entre le proton H-4 (δ = 7,69 ppm) et le proton H-5 (δ = 7,20 ppm).

Le signal singulet restant à δ = 7,12 ppm correspond donc à H-8.

On observe également les couplages attendus entre :

* Le proton H-5' (7,03 ppm) et le proton H-6' (6,91 ppm).
* Le proton H-2' (6,86 ppm) et le proton H-6' (6,91 ppm).

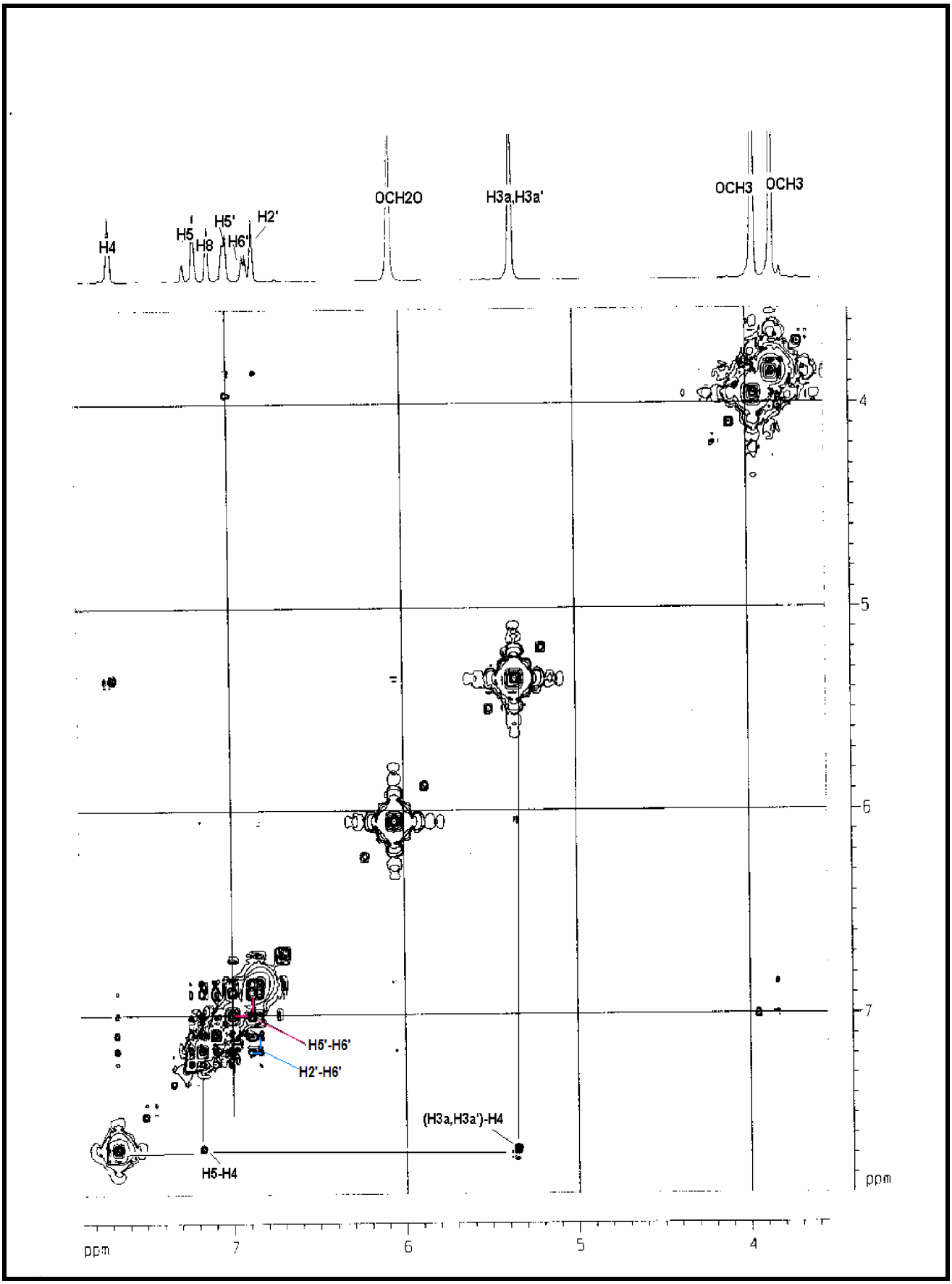


Fig III.12 : Spectre COSY du composé **B**.

L'observation du spectre RMN^{13}C ; J modulé (fig III.13) permet de localiser :

- Onze carbones quaternaires.
- Six carbones tertiaires.
- Deux carbones secondaires.
- Deux carbones primaires.

On note également la présence des signaux suivants :

* Le signal d'un carbonyle lactonique à δ = 169,8 ppm.
* Le signal à δ = 101,7 ppm attribuable au carbone du méthylènedioxy (OCH_2O).
* Le signal à δ = 67,9 ppm correspondant au carbone du groupement méthylène lactonique.
* Les deux signaux à δ = 55,8 ppm et δ = 55,9 ppm correspondant aux deux groupements méthoxyles.

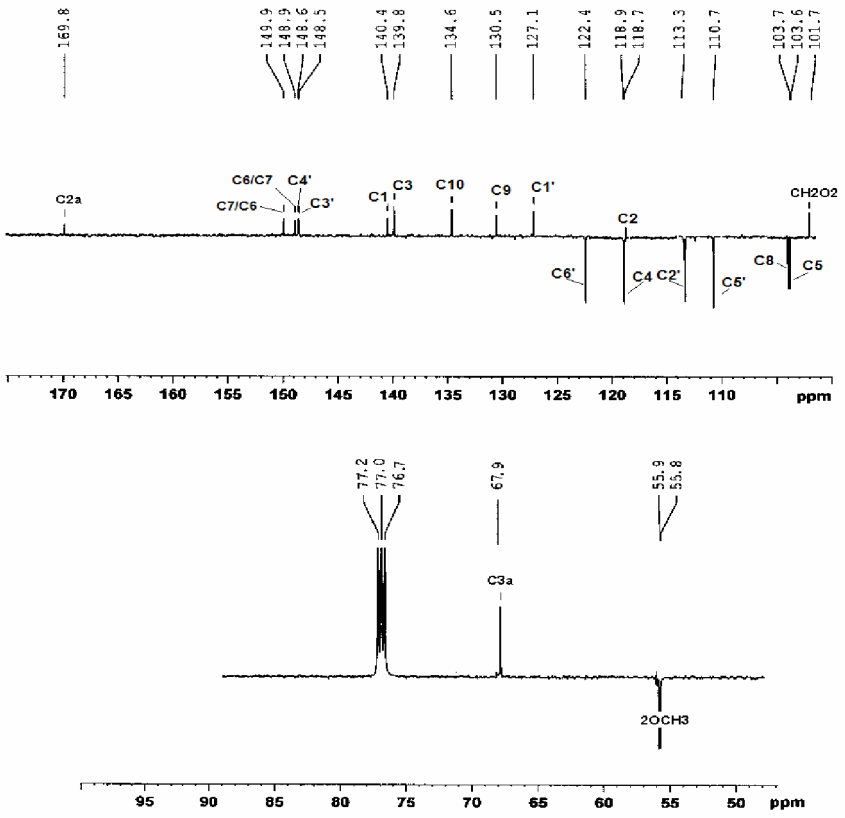


Fig III.13 : Spectre de RMN^{13}C en JMOD du composé **B**.

Sur le spectre de l'expérience HSQC (fig III.14), qui montre le couplage direct $^{1}J_{C\text{-}H,}$ on observe les couplages suivants :

* Entre les protons H-3a et le carbone C-3a résonant à δ = 67,9 ppm.
* Entre le proton H-4 et le carbone C-4 résonant à δ = 118,9 ppm.
* Entre le proton H-5 et le carbone C-5 résonant à δ = 103,6 ppm.
* Entre le proton H-8et le carbone C-8 résonant à δ = 103,7 ppm.
* Entre le proton H-2' et le carbone C-2' résonant à δ = 113,3 ppm.
* Entre le proton H-5' et le carbone C-5' résonant à δ = 110,7 ppm.
* Entre le proton H-6' et le carbone C-6' résonant à δ = 122,4 ppm.
* Entre les protons CH_2O_2 et le carbone OCH_2O résonant à δ = 101,7 ppm.

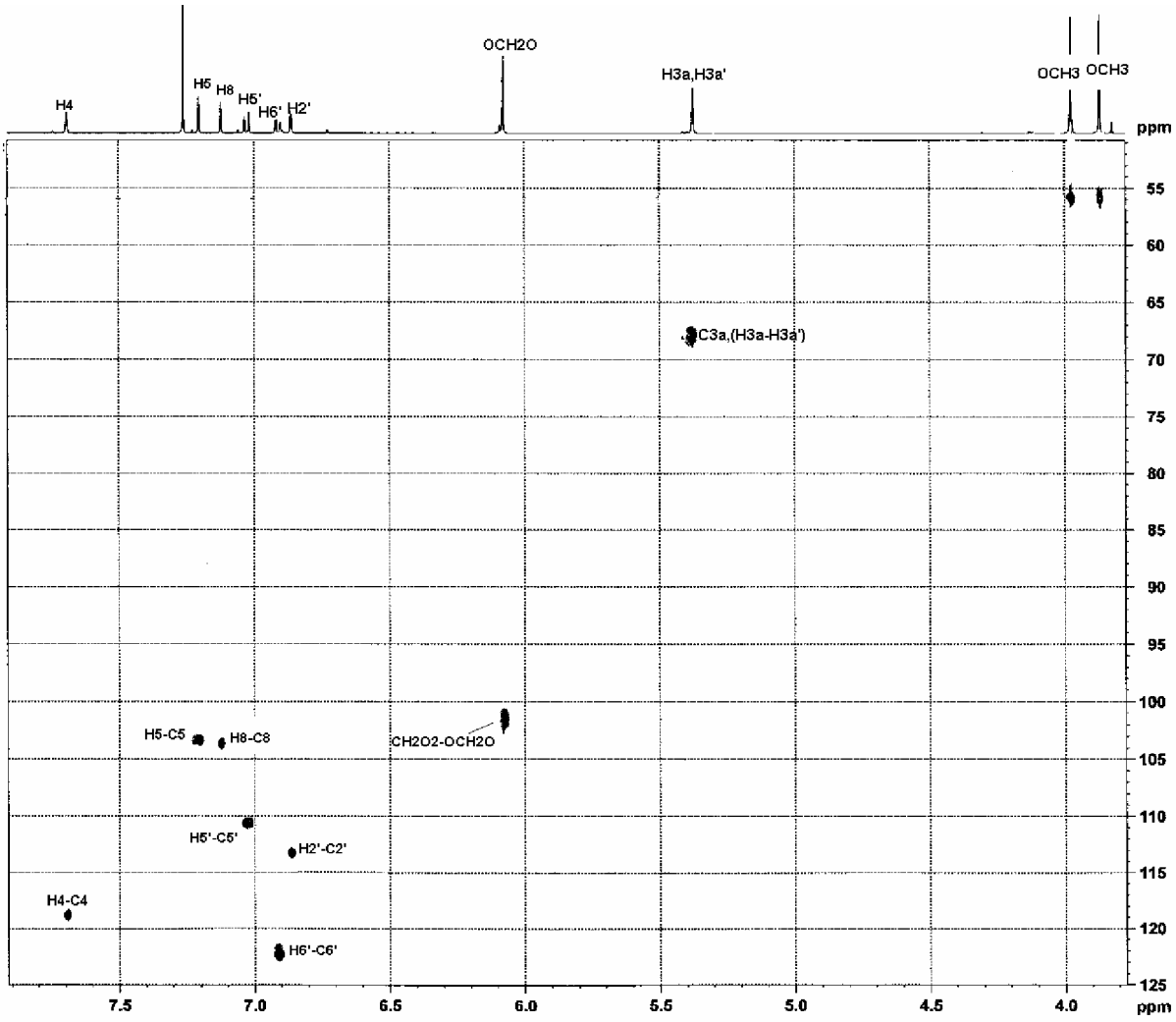
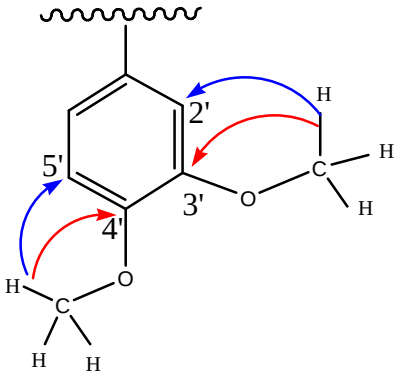


Fig III.14 : Spectre HSQC du composé **B**.

L'expérience HMBC (fig III.15) montrant les couplages C-H à longue distance permet l'attribution des signaux des carbones suivants :

* Le groupement méthoxyle résonant à δ = 3,85 ppm montre une tache de corrélation avec le carbone C-2' résonant à δ = 113,3 ppm ce qui permet de le positionner sur le carbone C-3' résonant à δ = 148,5 ppm, qui à son tour, montre une tache de corrélation avec les protons du même méthoxyle.

* Le deuxième méthoxyle résonant à δ = 3,95 ppm corrèle avec le carbone C-5' résonant à δ = 110,7 ppm. Il est donc situé sur le carbone C-4' résonant à δ=148,6 ppm, qui corrèle également avec les protons du même groupement.

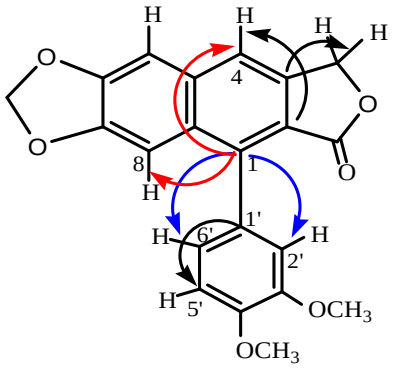


* Le signal apparaissant à δ = 139,8 ppm et corrélant avec les protons H-3a est attribué au carbone C-3.

* Le signal résonant à δ = 118,7 ppm et corrélant avec le proton H-4 est attribué au carbone C-2.

* Le signal résonant à δ = 140,4 ppm et corrélant avec les protons H-4, H-8, H-6' et H-2' est attribuable au carbone C-1.

* Le signal résonant à δ = 127,1 ppm et corrélant avec le proton H-5' est attribué au carbone C-1'.



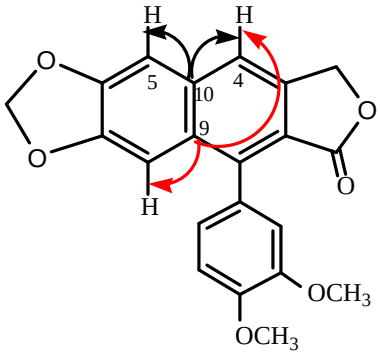
* Les deux signaux résonants à δ = 149,9 ppm et à δ = 148,9 ppm, portant des substituant oxygénés au regard de leurs déblindages, (C-6 et C-7) donnent les mêmes taches de corrélations, ce qui ne permet pas de les distinguer l'un de l'autre sur la base de l'HMBC.

* Le carbone résonant à δ = 130,5 ppm, corrèle avec le proton H-4 (tache intense) et le proton H-5.

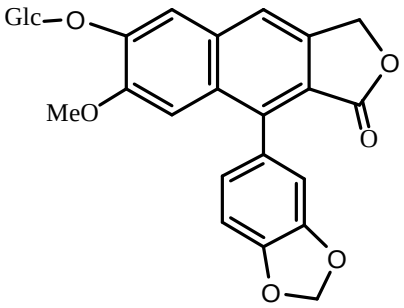
* Le carbone résonant à δ = 134,6 ppm, corrèle avec le proton H-4 (tache de faible intensité) et avec le proton H-8.

Ces deux signaux sont relatifs aux deux carbones restants C-9 et C-10.

Au regard de l'intensité des taches de corrélation des deux carbones avec le proton H-4, on peut attribuer le premier signal à C-9 et le second à C-10.



Pour un composé de structure analogue ; le Daurinol glucoside décrit par Yousef Al-Abed, et al [77]; les auteurs ont attribué mais sans mentionner aucune justification le signal le plus blindé à C-9.



Daurinol glucoside

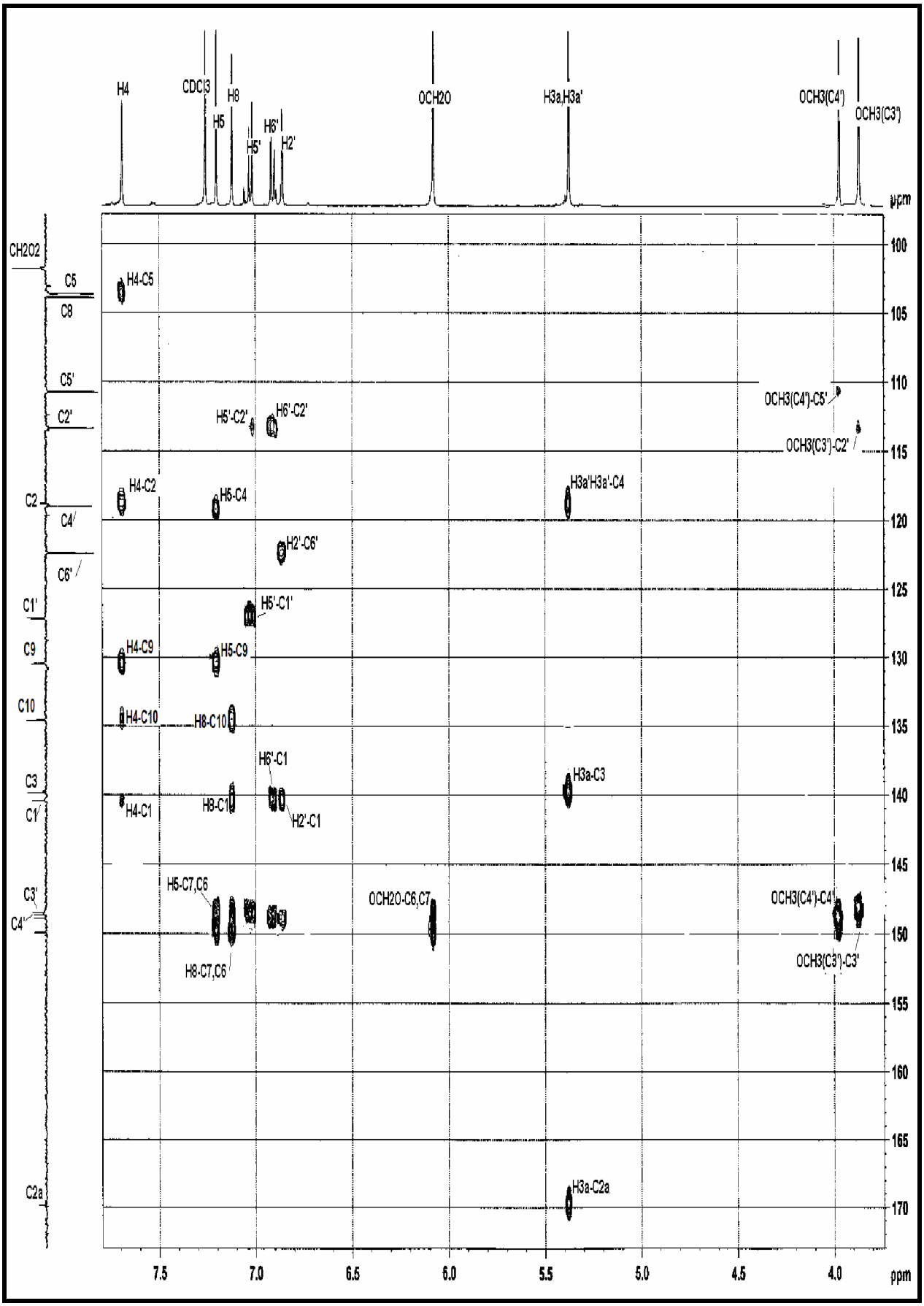


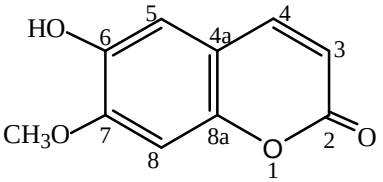
Fig.III.15 : Spectre HMBC du composé **B**.

Les déplacements chimiques de tous les protons et les carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau suivant, avec ceux rapportés pour le Daurinol glucoside.

N°	δ_C (ppm) du composé B	δ_C (ppm) données de la littérature [77]	δ_H (ppm) du composé B
1	140,4	138,4	-
2	118,7	118,2	-
2a	169,8	169,4	-
3a	67,9	68,0	5,35 (s)
3	139,8	139,7	-
4	118,9	119,2	7,69 (s)
5	103,6	110,3	7,20 (s)
6	148,9/149,9	149,9	-
7	149,9/148,9	149,0	-
8	103,7	105,6	7,12 (s)
9	130,5	128,3	-
10	134,6	132,6	-
1’	127,1	128,3	-
2’	113,3	108,0	6,86 (d ; J = 1,9 Hz)
3’	148,5	147,0	-
4’	148,6	147,0	-
5’	110,7	111,0	7,03 (d ; J = 8,2 Hz)
6’	122,4	123,5	6,91(dd ; J_1=8,2Hz, J_2=1,9 Hz)
OCH_3 (C-3’)	55,9	-	3,85 (s)
OCH_3 (C-4’)	55,8	-	3,95 (s)
CH_2O_2 (C-6 et C-7)	101,7	-	6,09 (s)

Tableau III.3 : déplacements chimiques des carbones et protons du composé **B**.

c. *Identification du composé **C***



Composé C

L'isoscopolétine (6-hydroxy 7-méthoxy coumarine)

Le composé **C** se présente sous forme de cristaux jaune-pales (Rf = 0,34 dans le $CHCl_3$), Pf = 186°C.

Il montre sur le chromatogramme une tache visible à l'UV (violette à 254 et à 366 nm).

Le spectre IR de ce composé (Fig III.16) montre :

* Une bande à 1712 cm^{-1} caractéristiques d'un carbonyle d'une lactone.
* Une bande à 3346 cm^{-1} indiquant la présence d'un hydroxyle.
* Une bande à 1617 cm^{-1} caractéristiques d'une double liaison (C=C).
* Des bandes caractéristiques du noyau aromatique à 1565 et 1514 cm^{-1}.

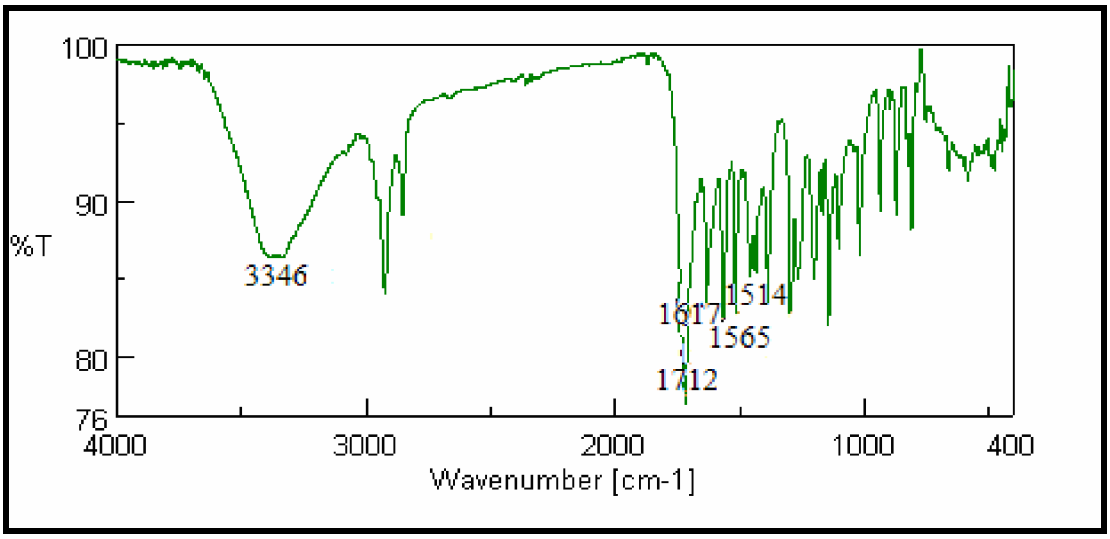


Fig III.16 : Spectre IR du composé **C**.

Son spectre d'absorption UV, réalisé dans le méthanol (Fig III.17) montre les mêmes bandes d'absorptions que le composé **A,** mais avec un léger effet bathochrome ; à 230, 255, 295 et 350 nm, attestant ainsi de la nature coumarinique de ce composé.

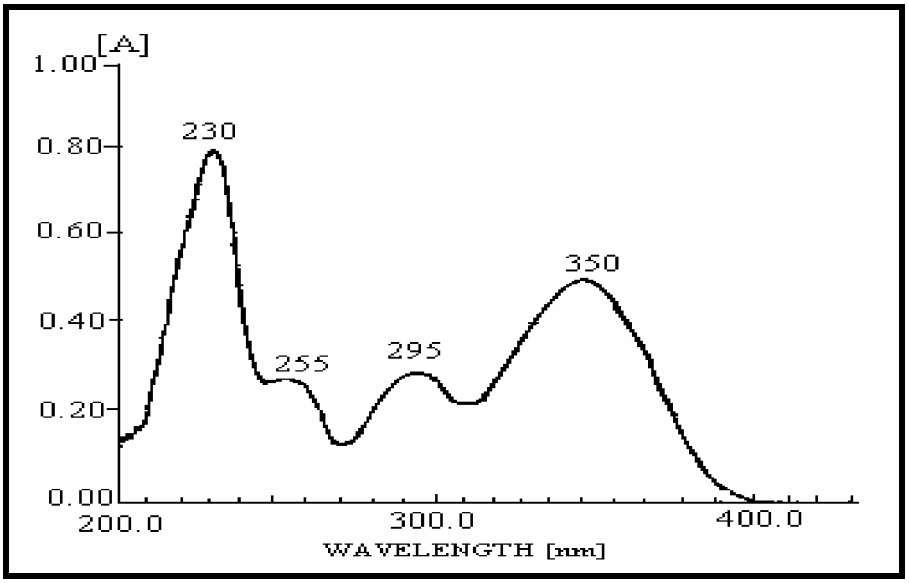


Fig III.17 : Spectre UV du composé **C**.

Son spectre RMN^{1}H (Fig III.18) présente également une grande similitude avec celui de la Scoparone, hormis quelques légères différences concernant les déplacements chimiques des protons. On observe, en effet les signaux suivants :

* Deux protons oléfiniques (H-3) et (H-4) sous forme de deux doublets avec une constantes de couplage J = 9,4Hz résonant respectivement à 6,26 et 7,57 ppm.

* Deux signaux singulets apparaissant à 6,81 et 6,94 ppm, correspondant aux protons H-8 et H-5.

* Un singal singulet s'intégrant pour trois protons et résonant à 3,95 ppm correspondant au groupement méthoxyle OCH_3.

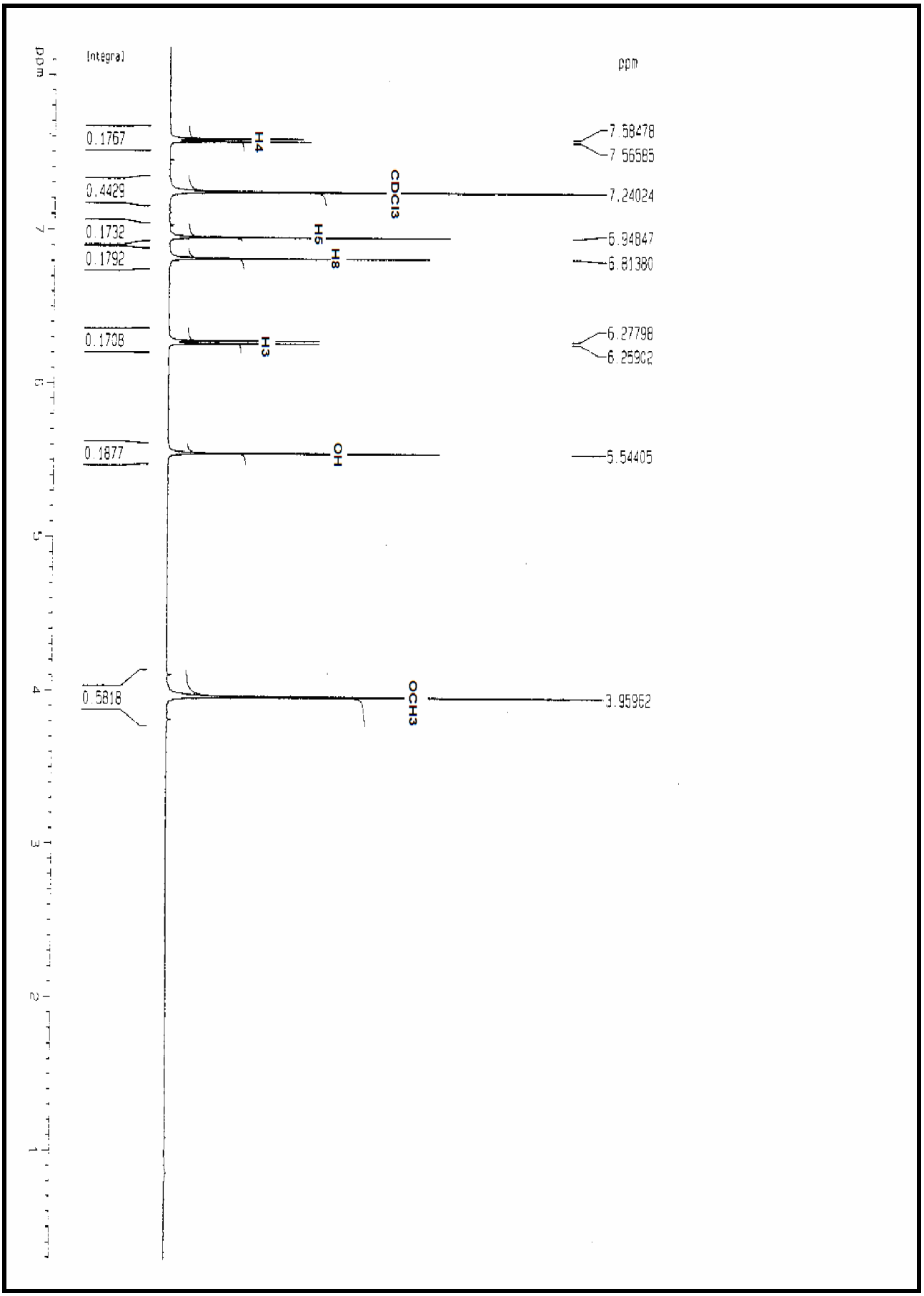


Fig III.17 : Spectre RMN^{1}H du composé **C**.

L'expérience COSY H-H (fig III.18) montre les corrélations entre les protons oléfiniques H-3 et H-4, et la corrélation entre le proton H-4 et un autre proton qui apparaît sous forme d'un signal singulet, à δ = 6,94 ppm qui est donc le proton H-5.
Le signal singulet restant à δ = 6,81ppm est alors attribué au proton H-8.

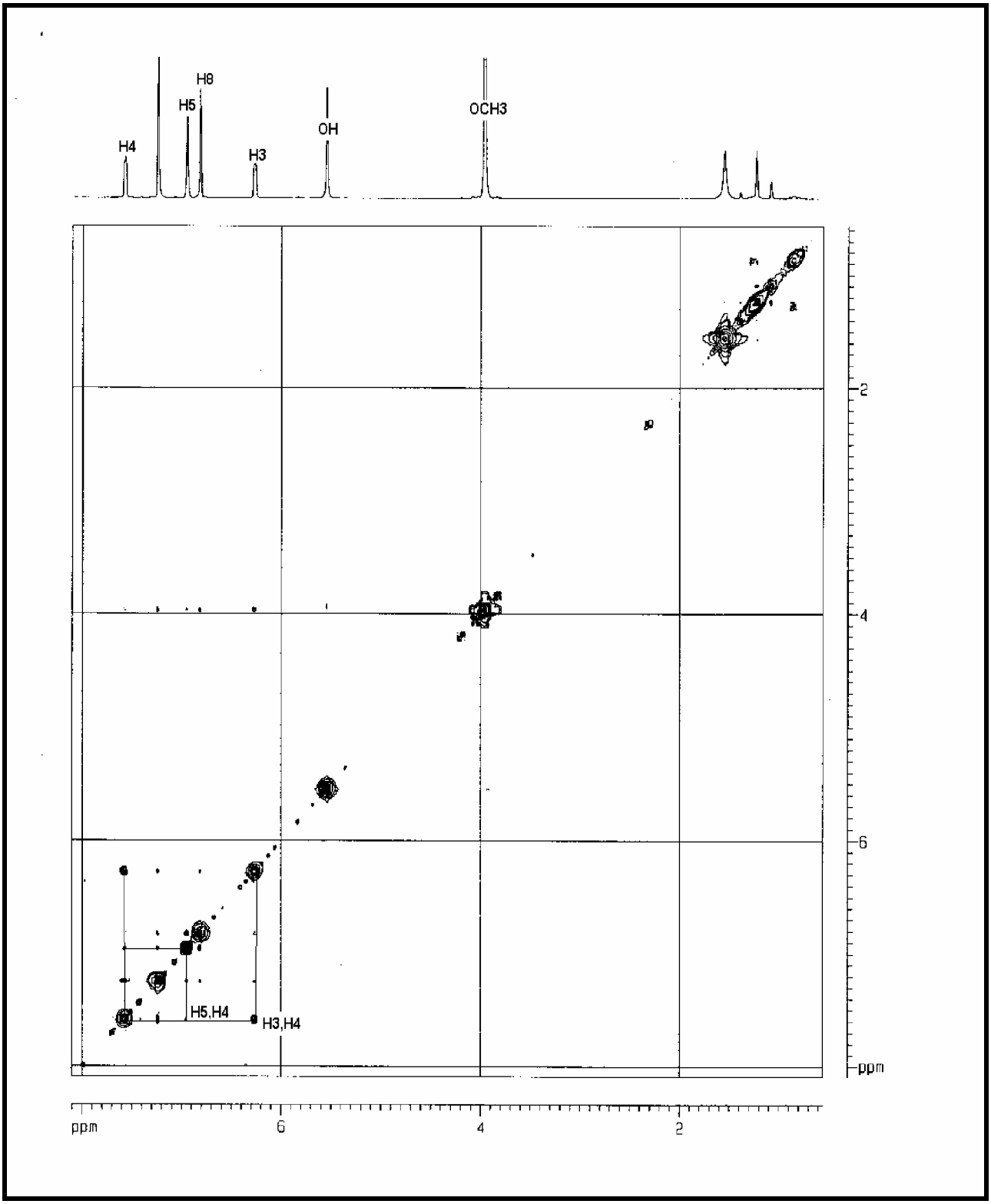


Fig III.18 : Spectre COSY H-H du composé **C**.

Sur son spectre de RMN^{13}C (fig III.19), on observe la présence de dix atomes de carbone, dont cinq sont quaternaires d'après le spectre Dept 135 (fig III.20).

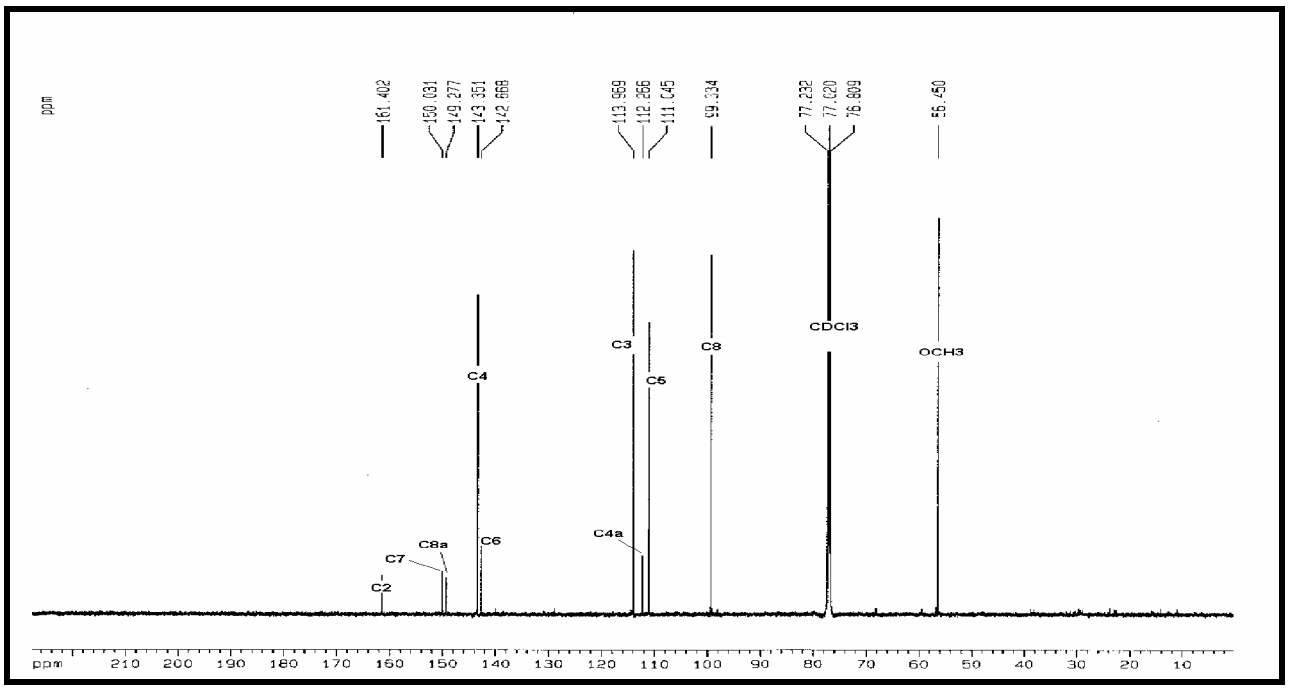


Fig III.19 : Spectre RMN^{13}C du composé **C**.

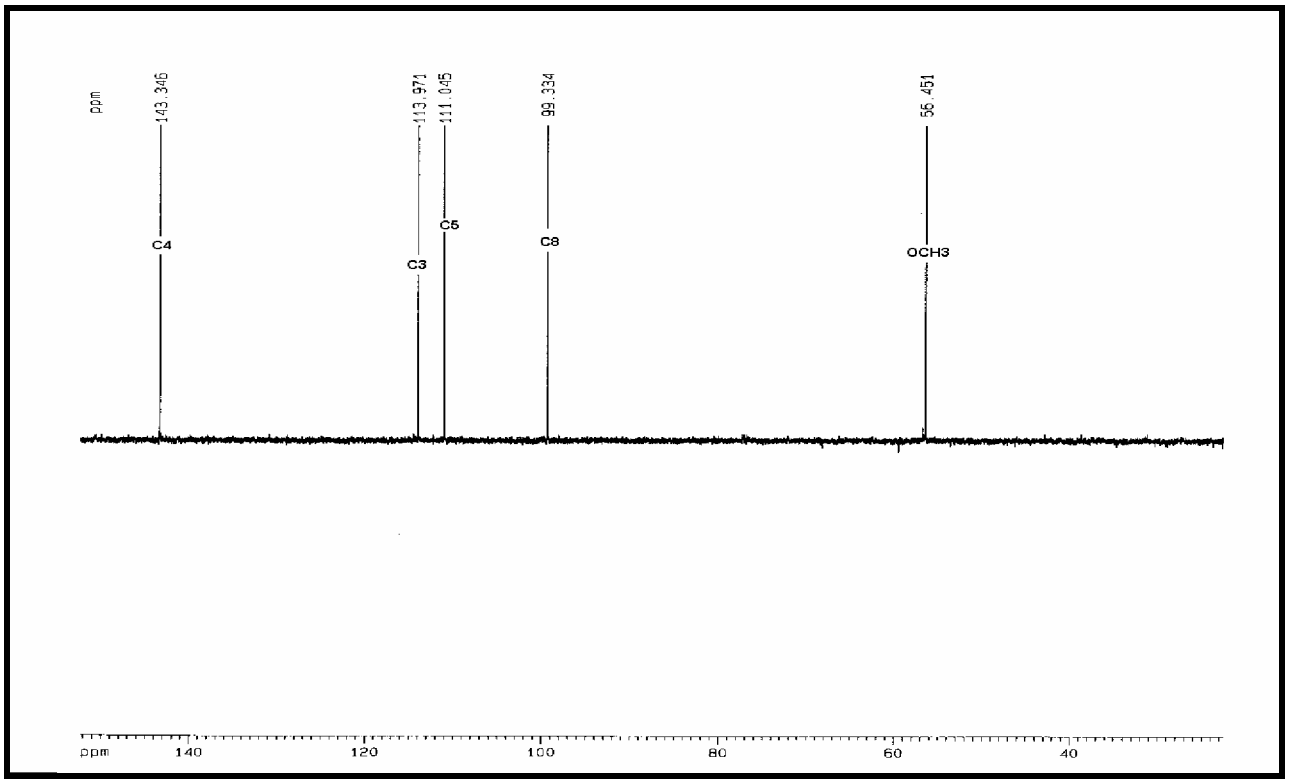


Fig III.20 : Spectre RMN^{13}C (Dept) du composé **C**.

L'expérience de corrélation carbone-proton HSQC (fig III.21) montre les couplages directs ($^1J_{C-H}$) entre :

* Le proton du groupement méthoxyle et son carbone à δ_c = 56,4 ppm.
* Le proton oléfinique H-3 et son carbone à δ_c = 113,9 ppm (C-3).
* Le proton oléfinique H-4 et son carbone à δ_c = 143,3 ppm (C-4).
* Le proton aromatique H-5 et son carbone à δ_c = 111,0 ppm (C-5).
* Le proton aromatique H-8 et son carbone à δ_c = 99,3 ppm (C-8).

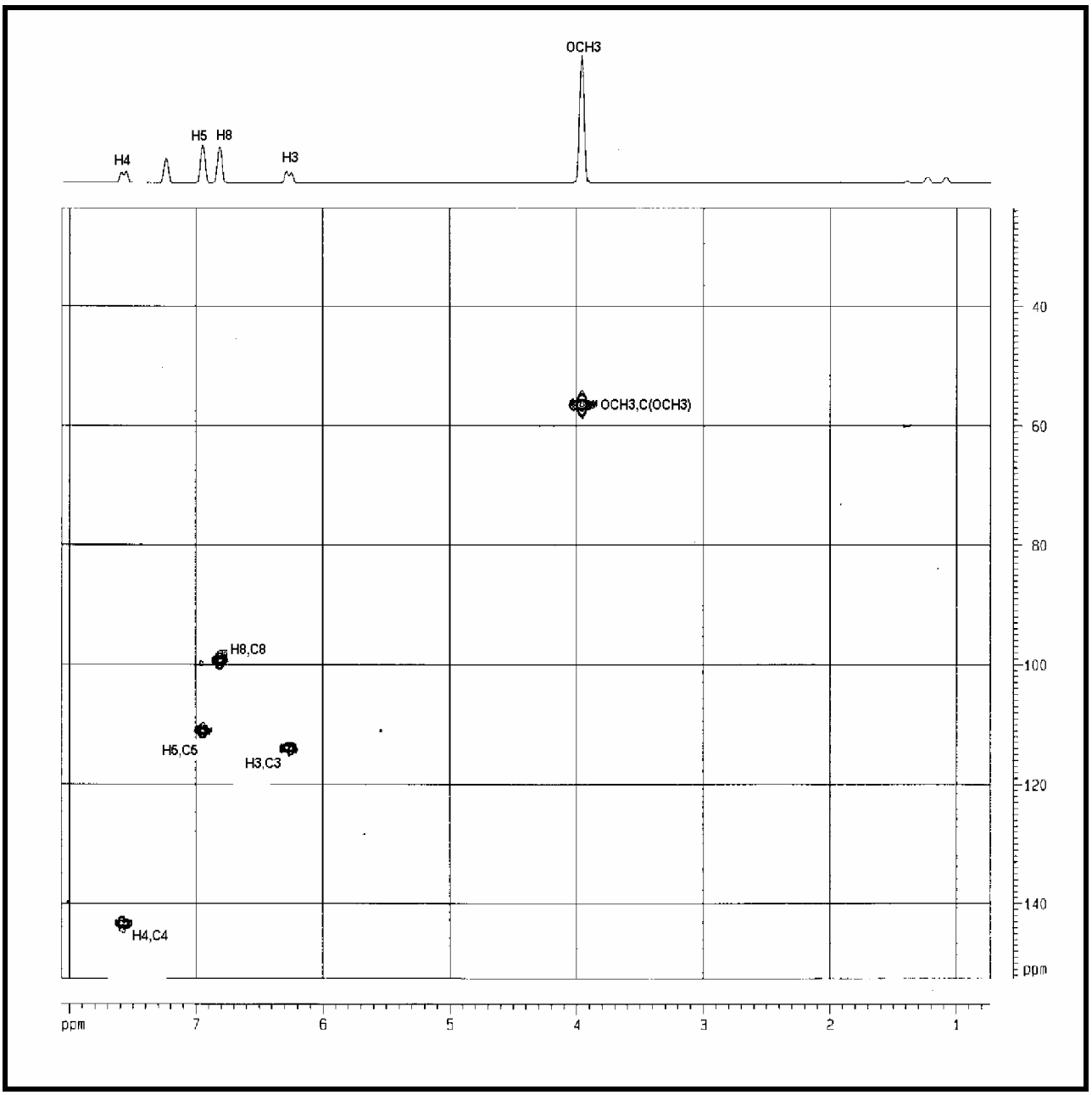


Fig III.21 : Spectre HSQC du composé **C**.

La différence la plus notable avec le spectre de la Scoparone est la disparition d'un singal méthoxyle et l'apparition d'un signal singulet à δ = 5,54 ppm s'intégrant pour un seul proton et ne donnant aucune corrélation sur le spectre HSQC, ce qui permet donc de déduire que l'un des méthoxyle est remplacé par un hydroxyle. Ceci est confirmé par le spectre de masse EI (fig III.22) qui présente un pic d'un ion moléculaire $[M]^{\cdot+}$ à m/z 192,0, correspondant à la formule brute $C_{10}H_8O_4$.

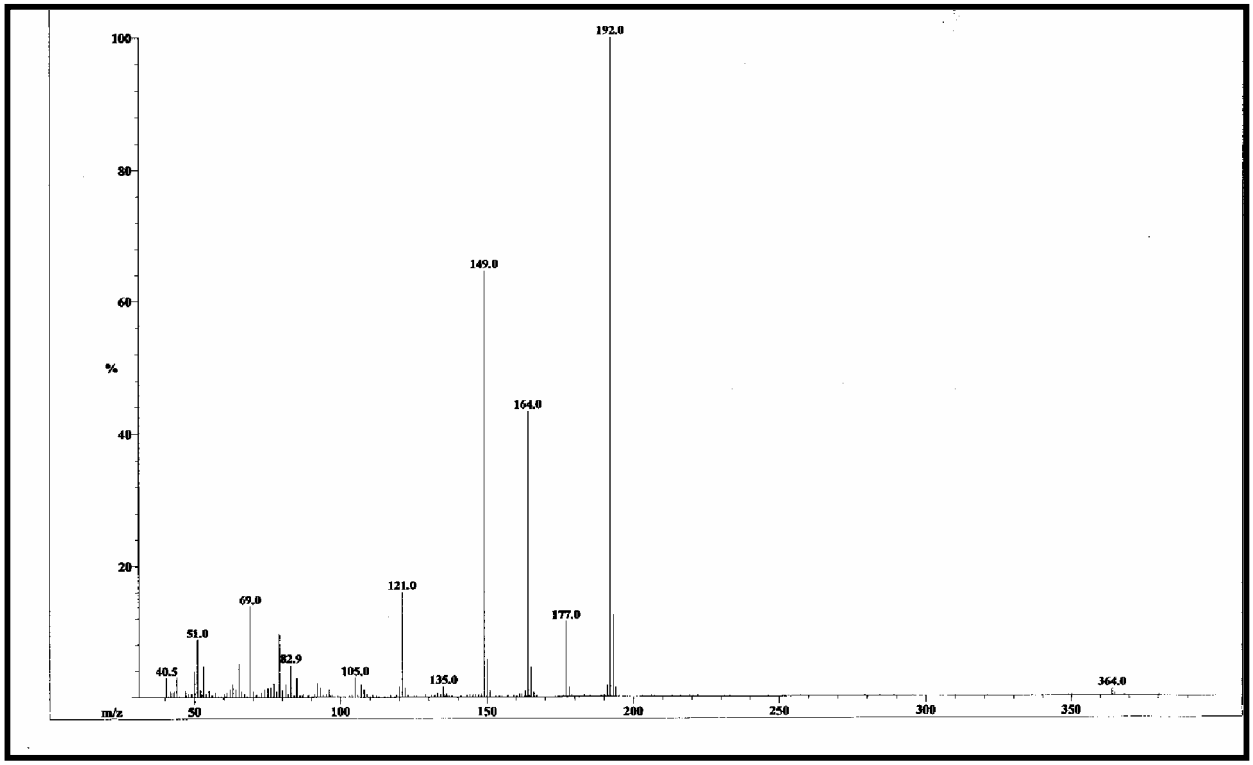
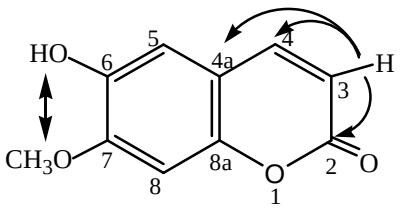


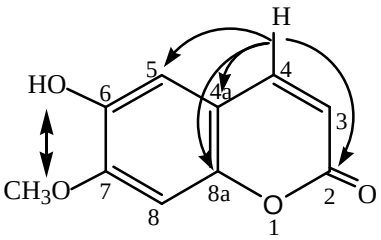
Fig.III.22 : Spectre de masse de composé **C**.

L'expérience HMBC (fig.III.23) et (fig.III.24) met en évidence les couplages indirects en $^2J_{C\text{-}H}$ et $^3J_{C\text{-}H}$ entre :

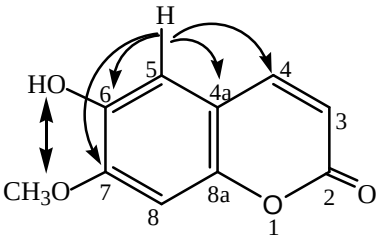
* Le proton H-3 et trois carbones résonant à 161,4 ppm, 143,3ppm et 112,2 ppm. Ces déplacements chimiques sont attribués respectivement aux carbones C-2, C-4 et C-4a.



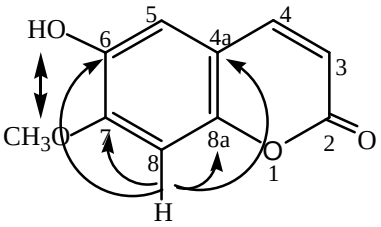
* Le proton H-4 et les carbones C-2, C-4a, C-5 et un autre carbone résonant à 149,2 ppm, correspondant au carbone C-8a.



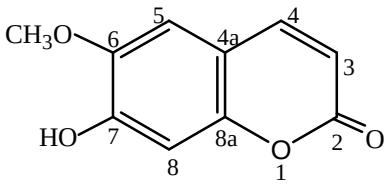
* Le proton H-5 et les carbones C-4, C-4a et deux autres carbones quaternaires résonant à 142,6 ppm et 150,0 ppm, qui ne sont autre que C-6 et C-7 respectivement.



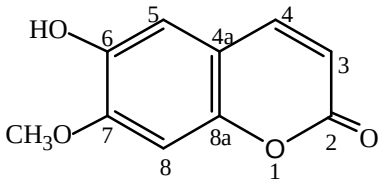
* Le proton H-8 et les carbones C-4a, C-7, C-6 et C-8a.



Le problème qui reste à résoudre concerne le positionnement des deux substituants oxygynés ; l'hydroxyle et le méthoxyle, sur les carbones C-6 et C-7. Il faut donc trancher entre les deux structures possibles ; celle de la Scopolétine ou celle de l'Isoscopolétine.



Scopolétine

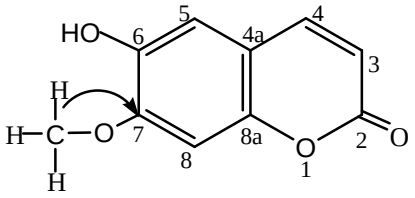


Isoscopolétine

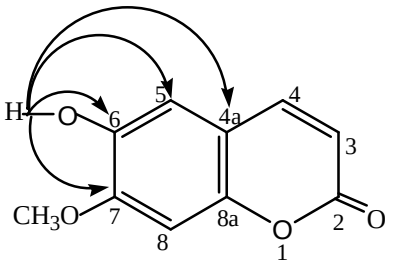
Ces deux composés ont été déjà rencontrés dans le genre *Bupleurum* [16,33].

En plus des corrélations déjà mentionnées, on observe sur le spectre de l'expérience HMBC :

* Des corrélations des protons du groupement méthoxyle et le carbone C-7, ce qui permet de le situer sur ce carbone (fig III.25).



L'hydroxyle est donc porté par le carbone C-6. L'HMBC montre la corrélation avec les carbones C-6, C-5, C-7 et exhibe même un couplage en J^4 avec C-4a.



Il s'agit donc bien de l'Isoscopolétine.

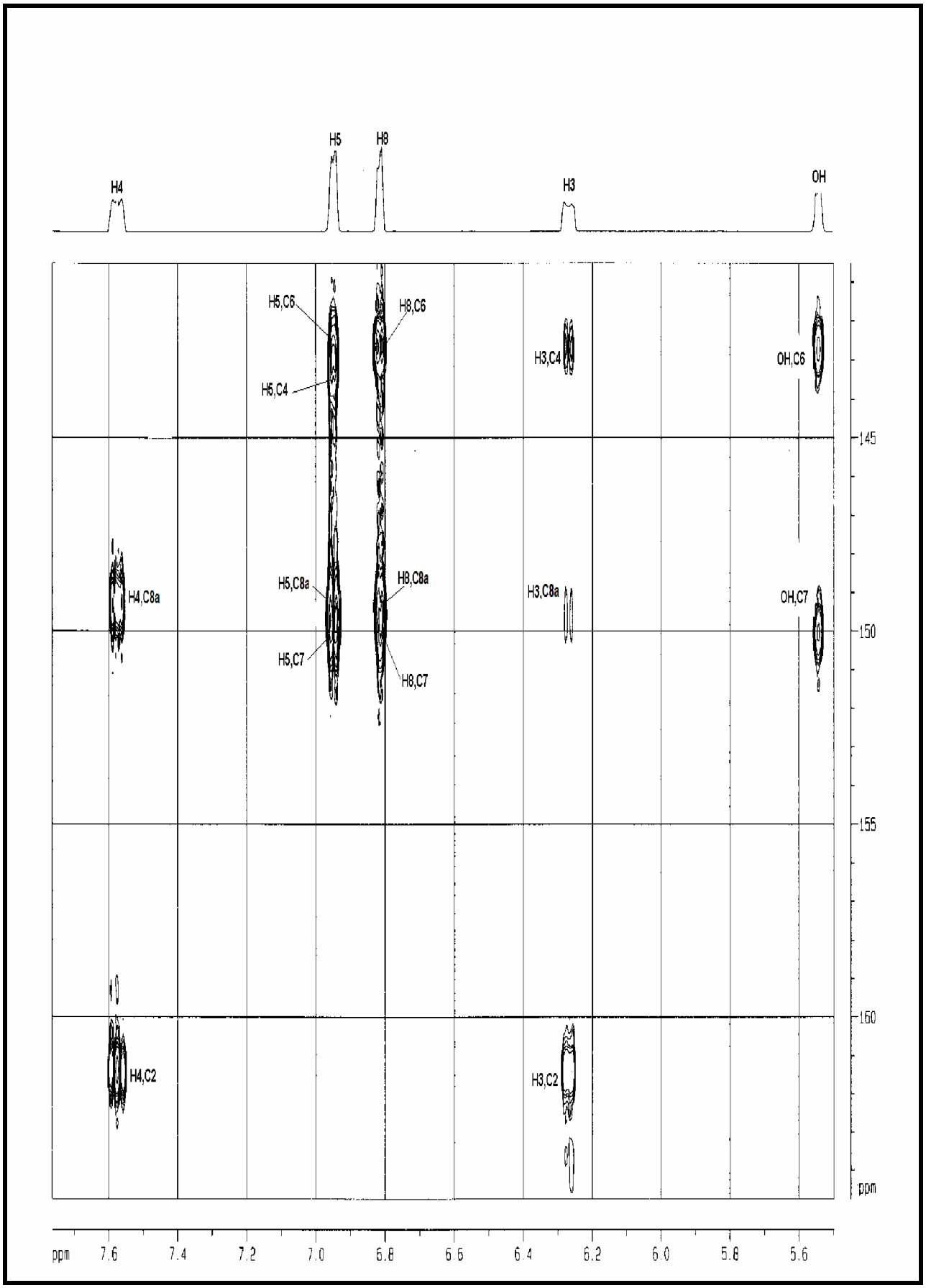


Fig III.23 : Spectre HMBC étalé du composé **C**.

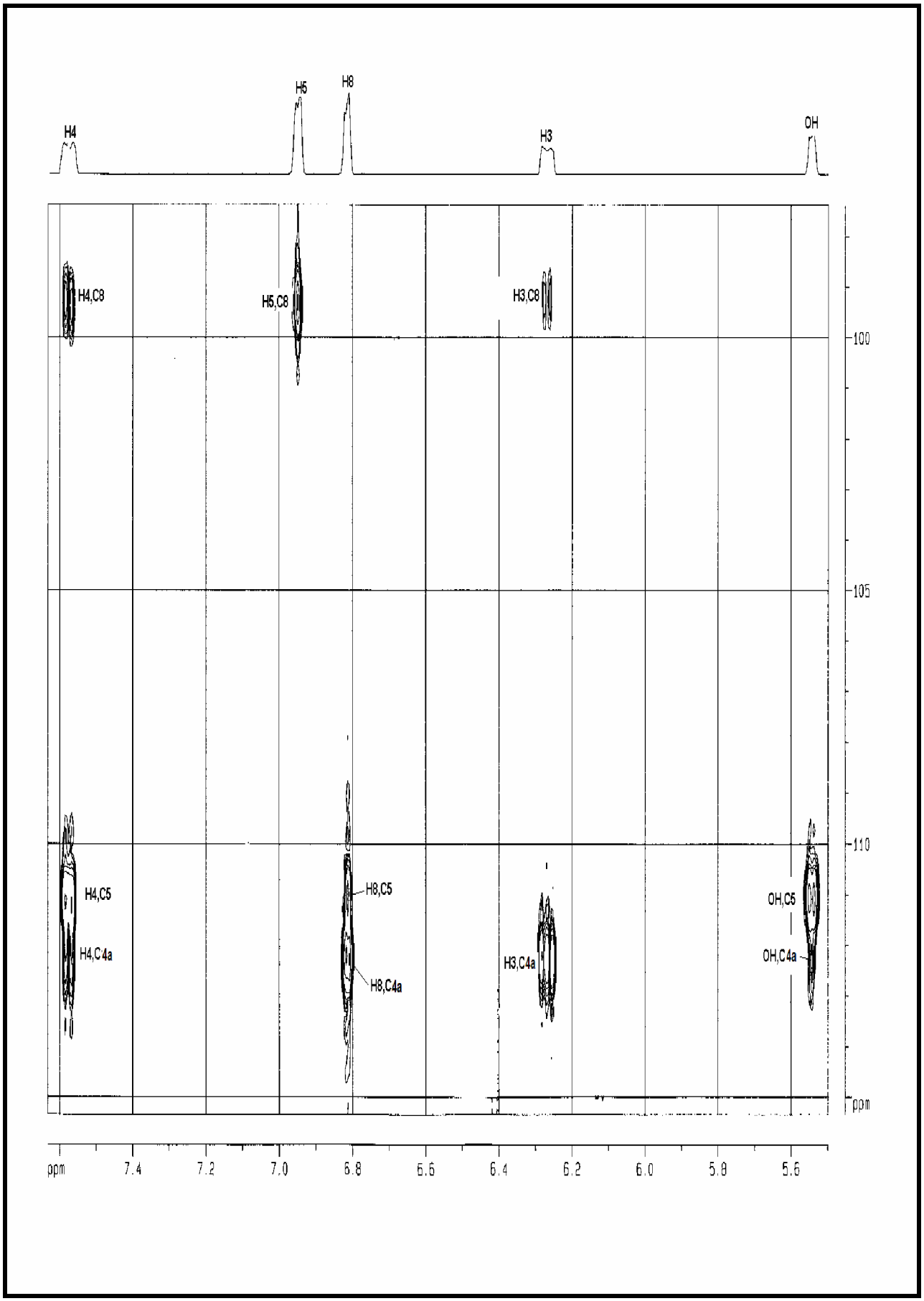


Fig III.24 : Spectre HMBC étalé du composé **C**.

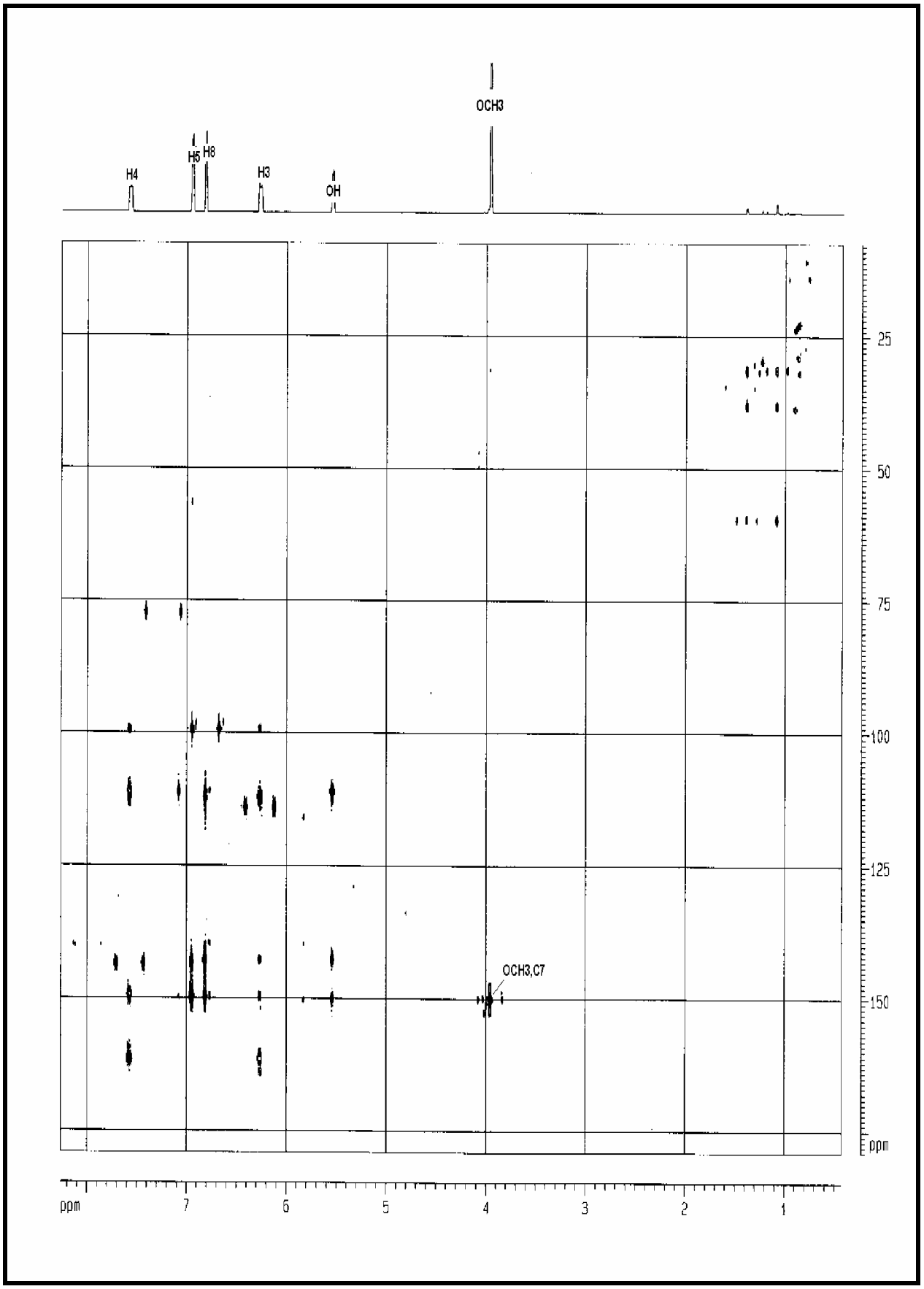


Fig III.25 : Spectre HMBC globale du composé **C**.

Toutes ces données analytiques, issues des expériences COSY, HSQC et HMBC ont permis d'attribuer sans ambiguïté, tous les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **C,** qui sont rassemblés dans le tableau III.7, avec ceux rapportés dans la littérature pour le même composé [78].

N°	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) données de la littérature [78]
2	-	-	161,4	-
3	6,26 (d)	9,4	113,9	6,16 (d ; J = 10 Hz)
4	7,57 (d)	9,4	143,3	7,55 (d ; J = 10 Hz)
4a	-	-	112,2	-
5	6,94 (s)	-	111,0	6,89 (s)
6	-	-	142,6	-
7	-	-	150,0	-
8	6,81 (s)	-	99,3	6,75 (s)
8a	-	-	149,2	-
OCH_3	3,95 (s)	-	56,4	3,91 (s)
OH	5,54 (s)	-	-	-

Tableau III.7 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **C**.

La fragmentation qui apparaît sur son spectre de masse EI est en bon accord avec cette structure. On observe en effet les fragments à m/z 164, m/z 149 et m/z 121, qui sont issus des fragmentations illustrées dans le schéma suivant :

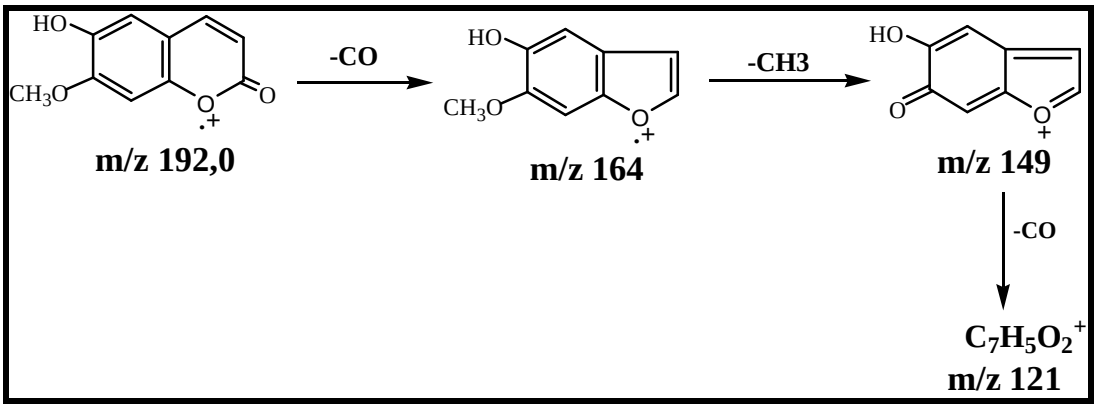


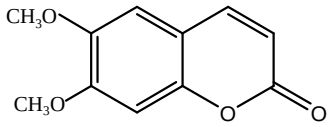
Schéma III.4 : Les fragmentations élémentaires principales du composé **C**.

CONCLUSION

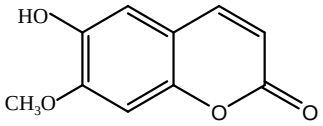
Ce travail est destiné à étudier les métabolites secondaires de *Bupleurum atlanticum*, "ombellifère" récoltée de la région des Aurès, à la suite de recherche sur les plantes d'origine Algérienne, objectif primordial assigné par notre laboratoire, afin de découvrir l'intérêt biologique de ces végétaux, et évaluer l'importance de la flore de notre pays.

L'extraction des parties aériennes de cette plante a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques sur colonne de gel de silice et sur plaques épaisses (C.C.E) deux produits coumariniques, à savoir:

* *Le composé **A** :* La scoparone (6,7-Diméthoxy coumarine)

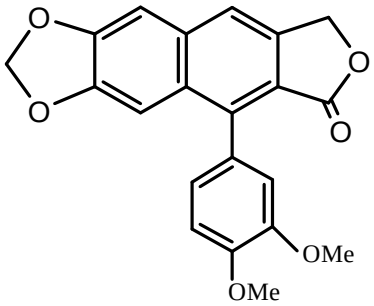


* *Le composé **C*** **:** L'isoscopolétine (6-Hydroxy-7-méthoxy coumarine)



Et un autre composé de type lignane :

* *Le composé **B***: Chinensine (1-3',4'-diméthoxy phényl-2,3-naphtalide-γ-butyrolactone)



L'élucidation de ces structures repose sur la conjugaison de différentes méthodes d'analyses spectrales (RMN, IR, UV) et notamment sur les techniques de RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et comparaison avec les données de la littérature.

BIBLIOGRAPHIE

[1] **Ozenda,P.**
Flore du sahara.Ed.CNRS, Paris France, 1962, 1963

[2] **Quezel,P.et Santa,S.**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales. 1963, Tome II, CNRS, Paris, France.

[3] **Lara,t., Chericoni,S.,Bader,A.,Pistelli,L. et al**
Journal of Ethnopharmacology, 96, 93-97, 2005.

[4] **Guillermo,M.M., Francisco,M.G.,Zacarias,D.J. et Luis,G.C.**
Phytochemistry, 44, 173-177, 1997.

[5] **Fumio,I.,Yuichi,F., Kazuhisa,I. et Tetsuo.S.**
Chemio-Biological Interactions,145, 235-250, 2003.

[6] **Bruneton,J.**
Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales), 3eme Edition, 1998, Paris, france.

[7] **Chou,C.C., Pan,S.L., Teng,C.M. et Guh,J.H.**
European Journal of Pharmaceutical Sciences, 19, 403-412, 2003.

[8] **Cheng,B.J., Moritomo,A., Yamasaki,Y., Li,X.W. et al**
Journal of Ethnopharmacology, 94, 275-278, 2004.

[9] **Hong-Xiang,S.**
Vaccine, 1-8, 2005.

[10] **Masateru,O., Aki,Y., Yasuyuki,I. et Toshihuro,N.**
Phytochemistry, 51, 819-823, 1999.

[11] **Mokoto,M., Kaoru,N., Yukinobu,I. et Hiroshi,M.**
Phytochemistry, 30, 1543-1545, 1991.

[12] **Li,T., Yuying,Z., Guanagzhong,T., Bin,W., Shoaging,C. et Riuji,Z.**
Phytochemistry, 50, 139-142,1999.

[13] **Masayuki,Y., Toshiyuki,M., Kazuhiro,H. et al**
Tetrahedron Letters, 38,7359-7398, 1997.

[14] **Yu-Ying,Z., He-Sheng,L., Bin,W., Li-Bian,M. et al**
Phytochemistry, 42, 1673-1675, 1996.

[15] **Hisashi,M., Toshiyuki,M., Kiyofumi,N., Masahio,I. et Masayuki,Y..**
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2193-2198, 1997.

[16] **Pistelli,L., Bertoli,A., Bilia,A.R. et Morelli,I.**
Phytochemistry, 41, 1579-1582, 1996.

[17] **Yaung-leung,C., Wen-Liang,C., Shin-Chun,L. et al**
Life Sciences, 73, 2383-2394, 2003.

[18] **Tsukasa,M., Masumi,H., Hiroki,K. et Haruki,Y..**
Carbohydrate Research, 270, 221-229, 1995.

[19] **Guo,Y., Tsukasa,M., Yuji,K., Takashi,I., Benxiang,W. et Haruki,Y.**
Immunopharmacology, 49, 307-316, 2000.

[20] **Pilar,N., Guer,R.M., Recio,M.G., Manez,S. et al**
Life Sciences, 68, 1199-1206, 2001.

[21] **Chang,W.L., Chiu,L.W., Lai,J.H. et Lin,H.C.**
Phytochemistry, 64, 1375-1379, 2003.

[22] **Si-Qi,L., Long-Ze,L. et Geoffrey,A.G.**
Phytochemistry, 33, 1197-1205, 1993.

[23] **Moga,M.M.**
Medical Hypotheses, 60, 143-147, 2003.

[24] **Chun,C., Ming-Hong,Y., Yen-Yin,C., Cheng-hsung,C. et Tsumo,N.**
American Journal of Chinese Medicine, 17, 265-274, 1991.

[25] **Wang,B.J., Liu,C.T., Tseng,C.Y. et Yu,Z.R.**
LWT, 38, 281-287, 2005.

[26] **Si-Qi,L.,Long-Ze,L. et Geoffrey,A.G.**
Phytochemistry,33,193-196,1993.

[27] **Prieto,J.M.,Giner,R.M., Recio,M.C.,Manez,S. et Rios,J.L.**
Fitoterapia,75,179-186,2004.

[28] **Lesley,B.**
Plantes aromatiques et médicinales (700 espèces), Edition originale, P-155, 1994.

[29] **Namsoo,K. et In-Seon,P.**
Biosci.Biotechnol.Biochem.,65,1648-1651,2001.

[30] **Naobumi,E., Kaoru,N., Koji,H., Minoru,O. et Masao,M.**
Phytochemistry, 41, 895-901, 1996.

[31] **Pistelli,L., Cammilli,A., Manunta,A., Marsil,A. et Morelli,I.**
Phytochemistry, 33, 1537-1539, 1993.

[32] **Heimeur,N., Idrissi,H.L.M. et Amine,S.M.**
Biology and Biotechnology, 37-42, 2004.

[33] CD-ROM, Version 14 :2, Copyright c, 1982-2006.

[34] **Alejandro,F.B., Haidour,A., Munoz-Dorado,M., Akssira,M. et Ibn Mansour.**
Phytochemistry, 48, 1237-1240, 1998.

[35] **Antonio,G.G., Rafael,E.R., Carmen,M. et Ana,M.E.B.**
Phytochemistry, 29, 1981-1983, 1990.

[36] **Estevez-Reue,R., Estevez-Braun.A. et Conzalez,AG**
Phytochemistry, 29, 1981-1983, 1990.

[37] **Lopez,H. et Valerea,N.**
J.Nat.Prod, 59, 493-494, 1996. **.**

[38] **Bertoli,A., Pistelli,L., Morelli,L. et al.**
Plant Science, 167, 807-810, 2004.

[39] **Yeung-Leung,CH., Shuh-Chun,L., Shinn-Zong,L., Wen-Liang,CH. Et al.**
Cancer Letters, 222, 183-193, 2005.

[40] **Yang,L., Chen,X., Qiang,Z., Jun,Y.L. et Ken,X.T.**
Journal of Ethnopharmacology, 98, 329-333, 2005.

[41] **Cecili,S.N., Drissa,D., Kari,I., Terje,E.M., Tsukasa,M. et al.**
Journal of Ethnopharmacology, 96, 285-269, 2005.

[42] **Lara,T., Chericoni,S., Bader,A., Pistelli,L. et al.**
Journal of Ethnopharmacology, 96, 93-97, 2005.

[43] **Park,K.H. et al.**
Phytochemistry,16, 359-363,2002.

[44] **Chen,Y.L., Lin,S.Z., Chang,W.L. et al.**
Life Sciences, 75, 179-186, 2004.

[45] **Kato,M., Isob,K., Iwamoto,I., Nayase,F. et Zang.**
Cell Immunol, 159, 15-25, 1994.

[46] Biochem.Biophys.Res.Commun, 285, 183-187,2001.

[47] **Tsukasa,M., Kanato.H.n., Guo,Y.J., Takashi,I. et Haruki,Y.**
Interaction Immunopharmacology, 5, 1373-1386, 2005.

[48] **Mann,J., Daridson,R.S., Hobbs,J.B., Banthorope,D.V. et Harborne,J.B.**
Natural Product : Their Chemistry and biological Significance,[1ere] Edition,1994.

[49] **Hofmann, L.**
Thèse de doctorat: Etude du métabolisme des phénylpropanoides, strasbourg, France, 2003.

[50] **Guignard,J.L.**
Biochimie végétale. Masson, Paris, 1996.

[51] **Gerhard,L.**
Métabolisme des végétaux; physiologie et biochimie, 5eme Edition, Allemand, 1988.

[52] **Booth,N.L., Dejan,N., Richard,B. et Stacie,E.**
Clinical Pharmacology and Therapeutics, 76, 511-516, 2004.

[53] **Deiana,M., Rosa,A., Casu,V., Cottiglia,F. et Bonsignore,L.**
Journal-of-the-American-oil- Chemists- Society, 80, 65-70, 2003.

[54] Dictionnaire des produits naturels, version 2003.

[55] **Maged,A.S.**
J. Braz. Chem. Soc, 13, 67-69, 2002.

[56] **Kitamura,N.,Kontami,S. et Stacie,N.R.**
Photochemistry and photobiology C,6,168-185,2005.

[57] **Reddy,N.s.,Gumireddy,K. et Mallireddigari,M.R.**
Bioorganic and Medicinal chemistry Letters, 13,3141-3147,2005.

[58] **Redoyal,L.M.,Beltran,M.,Sancho,R. et Olmedo,D.A.**
Bioorganic and Medicinal chemistry Letters, 15,4447-4450,2005

[59] **Silverstenin,R.M., Basler,G.C., Moill,T.C.**
Identification électrométrique de composés organiques. 5e édition Paris, 1998.

[60] **Ullah,N., MED,S., Mohammad,P., Rabnawaz,H.A. et Malik,A.**
FITOTERAPIA, 70, 214 – 215, 1999.

[61] **Harborne,I.B.**
Phytochemical Methods: A guide to Modern techniques of plant analysis, 2nd Edition, 1984.

[62] **Raffaeilli,B.A., Hoikkala,A.B. et Wahala,K.**
Chromatography B, 777, 29-43, 2002.

[63] **Humphreys,J.M., Hemm,M.R. et Chpple,C.**
Prod. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 10045-10050, 1999.

[64] **Whetten,R.W., Mackay,J.J et Sederoff,R.R.**
Ann. Rev. Plant physol. Plant Mol. Biol., 49, 585-609, 1998.

[65] **Chi Yau**
Thesis Master of Science; atropisomerism and the synthesis of lignans, university of Manitoba Wininpeg, Manitoba Canada, 2001.

[66] **Davin,L.B. et Lewis,N.G.**
Plant. physol., 123, 453-461, 2000.

[67] **Raffaelli,B. et al.**
Journal Chromatogr. B, 77, 29-43, 2002.

[68] **Imbert,T. F.**
Discovery of podophyllotoxins, Biochimie, 80, 207-222, 1998.

[69] **Stuart,R.F., David,C.H. et Mark,B.**
Tetrahedron, 58, 5989-6001, 2002.

[70] **Padwa,A., Cochran,J.E. et Kappe,C.O.**
J. Org. Chem., 61, 3709, 1996.

[71] **Ling-Yu,K.,Yi Lu, Zhi-da,M., Xian Li et Ting-Ru,Z.**
Phytochemistry, 41, 1423-1426, 1996.

[72] **Silvia,D., Elena,L., Jorged,C., Norbert,K. et Mark,B.**
Phytochemistry, 48, 707-710, 1998.

[73] **Jong,K., Bob,L. et Francis,J.**
J. Nat. Prod, 64, 1081-1083, 2001.

[74] **Shibnath,G., Ramaballav,P.S., Chauhan et Radhey,S.S.**
Phytochemistry, 13, 2281-2284, 1974.

[75] **Horii,Z., tsujiuchi,M. et Momosse,T.**
Tetrahedron Letters, 1079, 1969.

[76] **Stevenson,R. et Holmes,T.L.**
J. Org. Chem., 36, 3450, 1971.

[77] **Yousef,A.A., Salim,S., Musa,A.Z., zahir,S. et Atta-ur-Rahman.**
Phytochemistry, 29, 2659-2661, 1990.

[78] **Hiroki,T., Sueo,H., Sansei,N., david,G.R. et John,P.R.**
Phytochemistry, 23, 699-700, 1984.

Chapitre IV

Partie expérimentale

IV.1. Techniques d'analyse

La chromatographie sur colonne est réalisée sur silice Kieselgel 60-230-400 Mesh, Merck.

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de silice Kieselgel 60 F_{254} Merck.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire, des deux composés **B** et **C**, sont enregistrés dans le $CDCl_3$ sur un appareil Brucker (RMN^1H à 400 MHz et $RMN^{13}C$ à 100 MHz), du centre de recherche HEJ (Research Institute of Chemistry), Université de Karachi, Pakistan. Les spectres de résonance magnétique nucléaire du composé **A** sont enregistrés dans le $CDCl_3$ sur un appareil Brucker (RMN^1H à 300 MHz et $RMN^{13}C$ à 75 MHz), du laboratoire de réactivité et de synthèse organique, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Les spectres de masse des deux produits **B** et **C** ont été enregistrés en EI (Impact Electronique) sur un spectromètre de masse de type Jeol JMS 600, du centre de recherche HEJ (Research Institute of Chemistry), Université de Karachi, Pakistan.

Les spectres IR sont enregistrés dans des pastilles de KBr sur un appareil de type Shimadzu FT/IR-460, du département de Chimie de l'Université de Batna.

Les spectres UV sont enregistrés dans le Méthanol sur un appareil de type Shimadzu Mini 1240, de l'Université de Biskra.

Les solvants utilisés sont des solvants commerciaux purs : chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol. L'éther de pétrole est distillé au préalable.

IV.2. Extraction

Le protocole d'extraction des parties aériennes de la plante a été déjà décrit dans le chapitre III (partie résultats et discutions page 72).

IV.3. Etude de l'extrait chloroformique

05g de l'extrait chloroformique sont chromatographiés sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparé dans l'éther de pétrole. L'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole puis par un gradient de CH_2Cl_2 dans l'éther de pétrole : 95/5, 90/10, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 et 10/90, CH_2Cl_2 pur. La polarité de l'éluant est ensuite augmenté par addition graduelle du méthanol 95/5, 90/10, 80/20, 50/50, et enfin le MeOH pur, des fractions de 50 ml sont collectées à chaque fois.

Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM), visualisées à la lumière UV aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm et révélées à l'acide sulfurique.
Le tableau suivant rassemble les différentes fractions

Fractions	Eluant de la colonne	Observation
0-5	Ether de pétrole	Néant
	Ether de pétrole/CH_2Cl_2	
06-09	95/5	Traînée
10-14	90/10	Traînée
15-20	80/20	Graisse
21-25	60/40	Graisse
26-29	50/50	Traînée
30-35	//	Chlorophylle+traînée

36-39	//	Chlorophylle+traînée
	Ether de pétrole/CH_2Cl_2	
40-44	40/60	Néant
45-50	//	Mélange complexe
51-58	//	Deux taches+ petite traînée (cristaux)
59-65	//	Une tache+ petite traînée (cristaux)
66-68	20/80	Mélange
69-74	//	Traînée
75-80	10/90	Une tache+petite traînée (cristaux)
81-89	//	Néant
90-95	CH_2Cl_2 100%	Traînée
96-99	CH_2Cl_2/MeOH 2%	Traînée
100-105	CH_2Cl_2/MeOH 5%	Mélange complexe
106-110	CH_2Cl_2/MeOH 10%	Mélange complexe
111-118	CH_2Cl_2/MeOH 30%	Traînée
119-129	CH_2Cl_2/MeOH 50%	Traînée
130-134	MeOH 100%	Traînée

Tableau IV.1: Fractionnement de l'extrait chloroformique des parties aériennes.

Les fractions présentant des similitudes ont été rassemblées, donnant au total 16 lots.

N° des lots	Fractions	Poids mg	Observation
1	0-5	00	Néant
2	06-14	90	Traînée
3	15-25	400	Graisse
4	26-29	100	Traînée
5	30-39	750	Chlorophylle+traînée
6	40-44	00	Néant
7	45-50	530	Mélange complexe
8	51-58	560	Deux taches + petite traînée
9	59-65	480	Une tache + petite traînée
10	66-68	200	Mélange
11	69-74	270	Traînée
12	75-80	420	Une tache + petite traînée
13	81-89	00	Néant
14	90-99	60	Traînée
15	100-110	370	Mélange complexe
16	111-134	400	Traînée

Tableau IV.2

IV.4. Purification des produits

Le chromatogramme du lot N° 8, montre un mélange de deux composés, dont les taches se chevauchent presque totalement, les deux taches sont visibles sous la lumière UV.

La séparation des deux composés a été réalisée sur plaques préparatives de gel de silice avec le CH_2Cl_2 comme éluant. La résolution des deux bandes n'a été obtenue

qu'après trois migrations successives dans le même éluant pour donner les deux composés purs **A** (le moins polaire) et **B** (tableau VI.3), qui se présentent sous forme de cristaux blancs.

N° du lot	Bandes	Poids mg	Examen à la C.C.M Eluant $CHCl_3$	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C
8 Poids : 80 mg	1 2	8 20	composé **B** Rf = 0,43 composé **A** Rf = 0,48	rose-violet aucune révélation

Tableau IV.3

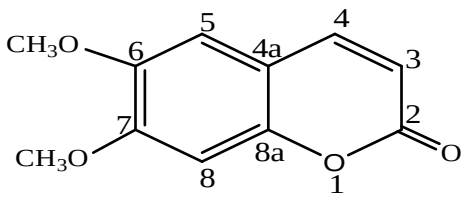
Les lots N° 9 et 12, se présentent sous forme de cristaux, leurs chromatogrammes montrent une seule tache empêtrée dans une traînée, la révélation de la CCM du lot N°9 par l'acide sulfurique montre une tache rose-violette, par contre celle du lot N° 12 ne donne aucune révélation. La purification des deux composés cette fois ci a été entreprise par recristallisation ; après plusieurs essais, le méthanol a été jugé le meilleur solvant pour réaliser cette opération sur les deux lots pour donner les deux produits **B** et **C** purs.

N° du lot	Poids mg	Examen à la C.C.M Eluant $CHCl_3$	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C
9 (poids : 60 mg)	28	composé **B** Rf = 0,43	rose-violet
12 (poids : 60 mg)	30	composé **C** Rf = 0,34	aucune révélation

Tableau IV.4

IV.5. Résultats obtenus

IV.5.1. Analyse structurale du composé A



La scoparone (6,7-diméthyl coumarine)

- **Formule brute :** $C_{11}H_{10}O_4$
- **Poids moléculaire :** 206 $g.mol^{-1}$.
- **Quantité de produit :** 20 mg
- **Etat physique :** cristaux blancs
- **Point de fusion :** 145°C
- **Comportement chromatographique :** Rf = 0,48 (dans le $CHCl_3$), fluorescence violette sous la lumière UV
- **Spectre UV λ_{max} (MeOH) :** 230, 250, 290 et 345 nm.
- **Spectre IR (KBr) :** 1734 (C=O), 1633 (C=C), 1513 et 1449 (C=C aromatique) cm^{-1}.

Spectre RMN^{1}H : ($CDCl_3$; 300 MHz)

3,92 (s; 3H = OCH_3 (C-7)).

3,94 (s; 3H = OCH_3 (C-6)).

6,28 (d; J = 9,3 Hz; 1H = H-3).

6,84 (s; 1H = H-8).

6,85 (s; 1H = H-5).

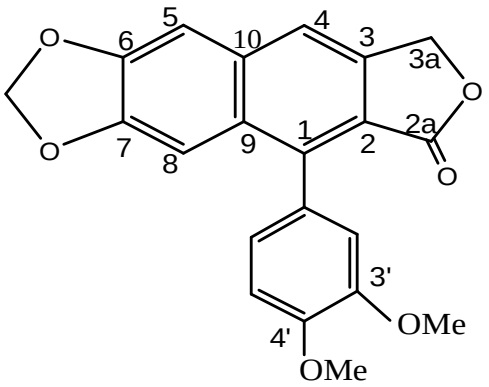
7,62 (d; J = 9,3 Hz; 1H = H-4).

ü **Spectre RMN^{13}C** :

161,3 (C-2), 113,5 (C-3), 143,2 (C-4), 111,4 (C-4a), 107,9 (C-5),

146,3 (C-6), 152,8 (C-7), 100,0 (C-8), 150,0 (C-8a), 56,3 (2 OCH_3).

IV.5.2. Analyse structurale du composé B



Chinensine (3',4'-diméthoxyphenyl-2,3-naphtalide-γ-butyrolactone)

ü **Formule brute :** $C_{21}H_{16}O_6$

ü **Poids moléculaire :** 364 g.mol^{-1}.

ü **Quantité de produit :** 36mg

ü **Etat physique :** cristaux blancs

ü **Point de fusion :** 224°C

ü **Comportement chromatographique :** Rf = 0,43 (dans le $CHCl_3$), fluorescence bleu brillant sous la lumière UV.

- **Spectre UV λ_{max} (MeOH) :** 220, 255, 310 et 350 nm.
- **Spectre IR (KBr) :** 1762 (C=O), 1615 et 1467 (C=C aromatique), 934 (méthylènedioxy) cm^{-1}.

- **Spectre RMN^{1}H : (**$CDCl_3$; 400 MHz)

3,85 (s; 3H = OCH_3 (C-3')).

3,95 (s; 3H = OCH_3 (C-4')).

5,35 (s; 2H = H3a, H3a').

6,09 (s; 1H = CH_2O_2).

7,69 (s; 1H = H-4).

7,20 (s; 1H = H-5).

7,12 (s; 1H = H-8).

6,86 (d; J = 1,9 Hz; 1H = H-2').

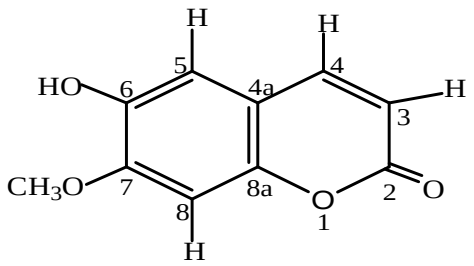
6,91 (dd; J_1 = 8,2 Hz et J_2 = 1,9 Hz; 1H = H-6').

7,03 (d; J = 8,2 Hz; 1H = H-5').

- **Spectre RMN^{13}C** :

140,4 (C-1), 118,7 (C-2), 169,7 (C-2a), 67,8 (C-3a), 139,8 (C-3), 118,9 (C-4), 103,6 (C-5), 149,9/148,9 (C-6), 148,9/ 149,9 (C-7), 103,7 (C-8), 130,5 (C-9), 134,6 (C-10), 127,1 (C-1'), 113,3 (C-2'), 148,5 (C-3'), 148,6 (C-4'), 110,7 (C-5'), 122,4 (C-6'), 55,9 (OCH_3 (C-3')), 55,8 (OCH_3(C-4')), 101,7 (OCH_2O).

IV.5.3. Analyse structurale du composé C



L'isoscopolétine (7-méthoxy 6-hydroxy coumarine).

- **Formule brute :** $C_{10}H_8O_4$
- **Poids moléculaire :** 192 $g.mol^{-1}$.
- **Quantité de produit :** 30 mg
- **Etat physique :** cristaux jaune-pales.
- **Point de fusion :** 186°C
- **Comportement chromatographique :** Rf = 0,34 (dans le $CHCl_3$), fluorescence violette sous la lumière UV
- **Spectre UV λ_{max} (MeOH) :** 230, 255, 295 et 350 nm.
- **Spectre IR (KBr) :** 1712 (C=O), 3346 (OH), 1617 (C=C), 1514 et 1565 (C=C aromatique) cm^{-1}.

Spectre RMN^{1}H : ($CDCl_3$; 300 MHz)

3,95 (s; 3H = OCH_3).

5,54 (s; 1H = OH).

6,26 (d; J = 9,4 Hz; 1H = H-3).

6,81 (s; 1H = H-8).

6,94 (s; 1H = H-5).

7,57 (d; J = 9,4 Hz; 1H = H-4).

ü **Spectre RMN^{13}C** :

161,4 (C-2), 113,9 (C-3), 143,3 (C-4), 112,2 (C-4a), 111,0 (C-5), 142,6 (C-6), 150,0 (C-7), 99,3 (C-8), 149,2 (C-8a), 56,4 (OCH_3).

Résumé

Ce travail a porté essentiellement sur l'identification des métabolites secondaires de *Bupleurum atlanticum*, ayant fait l'objet pour la première fois d'une investigation chimique. Le travail reporte ainsi la détermination de structure de trois composés : deux coumarines simples ; la Scoparone et l'Isoscopolétine, et un lignane ; la Chinensine.

L'élucidation des différentes structures a été réalisée au moyen des techniques analytiques modernes telle que : la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN ^{1}H et RMN ^{13}C, notamment les techniques RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC), IR, UV et la spectrométrie de masse EI.

Cette étude est présentée dans quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré aux études antérieures réalisées sur le genre incluant: la description botanique de L'espèce, et rapporte les multiples usages traditionnels et activités thérapeutiques du genre.

Dans le deuxième chapitre, nous avons présenté un aperçu général sur les composés phénoliques ; notamment les coumarines et les lignanes, leurs structures chimiques, leurs biosynthèses et leurs intérêts thérapeutiques.

L'interprétation des résultats obtenus est présentée dans le troisième chapitre.

Le quatrième chapitre est réservé à la description du protocole expérimental.

Abstract

This work has essentially been carried on the identification of the secondary metabolites of *Bupleurum atlanticum* which have been for the first time an object of chemical investigation. The work reports thus the structure determination of three compounds: two coumarins; Scoparon and Isoscopoletin, and a lignan; Chinensin.

The structures of these compounds are determined using physical techniques: the ^{13}C NMR and ^{1}H NMR, especially 2D NMR (COSY, HMBC, and HSQC), IR, UV and EI mass spectrometry.

This work is presented in four chapters:

In the first one, we presented the anterior studies particularly, botanical description and traditional use of the genus.

In the second one, an over view of the phenolic compounds; in particular coumarins and lignans, their chemical structures, biosynthesis, and therapeutic interests.

We presented the interpretation of our results in the third chapter.

The fourth chapter presents the experimental part.

ملخص

هذا العمل مخصص لتحديد مركبات الأيض الثانوي للجنس *Bupleurum atlanticum*، الذي يخضع للدراسة الكيميائية لأول مرة. و هذا العمل يدرج التعرف على بنية ثلاث مركبات: اثنان من نوع الكومارينات البسيطة Scoparone وIsoscopolétine و الثالث من نوع اللينيان Chinensine.

تم التعرف على بنية هذه المركبات باستخدام طرق التحليل الفيزيائي كمطيافية الرنين المغناطيسي RMN ^{1}H وRMN ^{13}C و بالأخص RMN 2D (COSY, HMBC,HSQC)، الأشعة فوق البنفسجية UV، الأشعة تحت الحمراء IR و كذلك مطيافية الكتلة (EI) .

قدمت هذه الدراسة في أربعة فصول :

الفصل الأول يتطرق للدراسة السابقة و يشمل وصف النبتة والاستعمال التقليدي للنوع *Bupleurum*.

يمثل الفصل الثاني نظرة عامة حول المركبات الفينولية و بالأخص الكومارينات و اللينيانات. بنيتها الكيميائية، اصطناعها البيولوجي و الأهمية البيولوجية لها.

مناقشة النتائج المتحصل عليها بينت في الفصل الثالث.

الفصل الرابع يمثل الجزء العملي.