République Algérienne Démocratique Et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR BATNA

FACULTE DES SCIENCES - DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option : *Chimie Organique*

Présenté par **:**

Mesellem Yamin

Thème

Etude phytochimique de *Odontospermum pygmaeum* (Asteraceae)

JURY

Hamada HABA	**M.C.A- Université de Batna**	**Président**
Mohammed BENKHALED	**Prof.- Université de Batna**	**Rapporteur**
Amar DIBI	**Prof.- Université de Batna**	**Examinateur**
Kaddour LAAMARA	**Prof.- Université d'Oum El Bouaghi**	**Examinateur**
Noureddine GHERRAF	**M.C.A- Université d'Oum El Bouaghi**	**Examinateur**

Année Universitaire : 2010-2011

République Algérienne Démocratique Et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR BATNA

FACULTE DES SCIENCES - DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option : *Chimie Organique*

Présenté par **:**

Mesellem Yamin

Thème

Etude phytochimique de *Odontospermum pygmaeum* (Asteraceae)

JURY

Hamada HABA	**M.C.A- Université de Batna**	**Président**
Mohammed BENKHALED	**Prof.- Université de Batna**	**Rapporteur**
Amar DIBI	**Prof.- Université de Batna**	**Examinateur**
Kaddour LAAMARA	**Prof.- Université d'Oum El Bouaghi**	**Examinateur**
Noureddine GHERRAF	**M.C.A- Université d'Oum El Bouaghi**	**Examinateur**

Année Universitaire : 2010-2011

REMERCIEMENTS

Ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de synthèse Organique et Phytochimie du Département des Sciences de la Matière, de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna sous la direction du Professeur **Mohammed BENKHALED**.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de travail, Monsieur **Mohammed BENKHALED**, Professeur à l'Université de Batna, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses orientations, ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et surtout sa confiance tout au long de ce travail. Je le remercier également pour tous les efforts qu'il a consentis sans cesse durant la rédaction de ce mémoire et son dynamisme pour la recherche des produits naturels et qui ont été pour moi une source de motivation.

Je remercie très vivement le Docteur **Hamada HABA**, Maitre de Conférences à l'Université de Batna, pour m'avoir également suivi, orienté dans l'accomplissement de ce travail et fait profiter de ses grandes compétences dans le domaine des substances naturelles, et également pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur **Amar DIBI**, de l'Université de Batna, Monsieur le Professeur **Kaddour LAAMARA** et Monsieur le Docteur **Noureddine GHERRAF**, de l'Université d'Oum El Bouaghi, pour avoir aimablement accepté de juger ce modeste travail.

Je remercier le Docteur Catherine LAVAUD, Professeur à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, le Docteur Christophe Long, du Centre de Recherche sur les Substance Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

Mes remerciements vont également à mes collègues de laboratoire, merci à vous tous.

Je ne saurais oublier toute ma famille, particulièrement mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans cette longue et pénible épreuve que représente ce mémoire et mes frères, **Salah**, **Abderrezzak**, **Ahmed**, **Arbi**, **Youssouf** et **Moussa**.

Abréviations et symboles

Ac	acétate
AcOEt	acétate d'éthyle
Ang	angéloyl
Oival	isovalérate
CC	chromatographie sur colonne
VLC	chromatographie liquide sous vide
SiO_2	gel de silice normale
CCM	chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	chloroforme deutéré
CD_3OD	méthanol deutéré
$CHCl_3$	chloroforme
CH_2Cl_2	dichlorométhane
COSY	correlated spectroscopy
1D	monodimensionnel
2D	bidimensionnel
d	doublet
dd	doublet de doublet
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
EP	Ether de pétrole
ESI	electro spray ionisation
G	gramme
Hz	hertz
Glc	glucose
Gal	galactose
t	triplet
s	singulet
sl	singulet large
m	multiplet
MeOH	méthanol
RMN ^{1}H	résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ^{13}C	résonance magnétique nucléaire du carbone

HMBC	heteronuclear multiple bonding connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum connectivity
H_2O	eau
J	constantes de couplage
Uma	unité de masse atomique
m/z	masse/charge électrique
Na	sodium
Me	méthyle
Mg	milligramme
MHz	megahertz
Ml	millilitre
MS/MS	mass spectroscopy / mass spectroscopy
ppm	partie par million
RP-18	reversed phase silica with C-18 functional groups
SM	spectrométrie de masse
δ	déplacement chimique exprimé en ppm

SOMMAIRE

INTRODUCTION ……..2

Chapitre I : Rappel bibliographique

I-1 Description botanique……...4
I-1-1 Famille Asteraceae……...4
I-1-2 Genre *Odontospermum*……....4
I-1-3 Espèce *Odontospermum pygmaeum*……....5
I-2 Usages traditionnels…….....5
I-3 Place dans la systématique……....5
I-4 Travaux antérieurs……7
I-4-1 Sur la famille.....7
I-4-2 Sur le genre.....10
I-4-3 Sur l'espèce.....13

Chapitre II : Etude des stéroïdes et saponosides

II-1 Etude des stéroïdes……..15
II-1-1 Généralités……15
II-1-1-1 Nomenclature……16
II-1-1-2 Stéréochimie……...19
II-1-2 Définition des stérols……21
II-1-3 Définition des phytostérols……....22
II-1-3-1 Propriétés générales des phytostérols……24
II-1-3-2 Intérêt pharmacologique des phytostérols et leur emploi……...24
II-2 Etude des saponosides……25
II-2-1 Généralités ……25
II-2-2 Structure chimique des saponosides……..25

II-2-2-1 Génines stéroïdiques……26
II-2-2-2 Génines triterpéniques……..28
II-2-2-3 Partie osidique……..30
II-2-2-4 Acides organiques……31
II-2-3 Propriétés biologiques des saponosides……...31
II-3 Biogénèse des stéroïdes et saponosides……32

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1 Extraction……44
III-1-1 Matériel végétal……..44
III-1-2 Séparation et purification…….....45
III-1-3 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle……..45
III-1-4 Fractionnement de l'extrait méthanolique……..45
III-2 Détermination de structure ……...46
III-2-1 Elucidation structurale du composé **OP4**……...46
III-2-1-1 Identification de la partie aglycone……50
III-2-1-2 Identification de la partie osidique…….56
II-2-2 Elucidation structurale du composé **OP15**……..60
II-2-3 Elucidation structurale du composé **OP16**……..68

Conclusion…….74
Bibliographie……77

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV-1 Matériels et appareillage……82
IV-1-1 Récolte de la plante *Odontospermum pygmaeum*……..82
IV-1-2 Chimie extractive……....82
IV-1-2-1 Chromatographie sur couche mince **(CCM)**……...82
IV-1-2-2 Chromatographie liquide sous vide **(VLC)**……82
IV-1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte **(CC)**……...82

IV-1-2-4 Chromatographie sur plaque préparative **(CCE)**…….....83
IV-1-3 Chimie structurale****……..83
IV-1-3-1 Spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire **(RMN)**……..83
IV-1-3-2 Spectroscopie de masse **(SM)**…….83
IV-1-3-3 Pouvoir rotatoire**……**.83
IV-2 Etude de l'espèce *Odontospermum pygmaeum*……..84
IV-2-1 Fractionnement et purification**……**...84
IV-2-2 Fractionnement et purification de l'extrait l'acétate d'éthyle**……**85
IV-2-2-1 Etude de la fraction **F9**……...86
IV-2-3 Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique**……..**87
IV-2-3-1 Etude de la fraction **F8**……...89
IV-2-3-2 Etude de la fraction **F8'**……..90
IV-3 Constantes physiques et données spectrales des composées isolées……91
IV-3-1 Composé **OP4**……91
IV-3-2 Composé **OP15**…….....93
IV-3-3 Composé **OP16**……..95

Résumé……98
ملخـــص……99

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes médicinales, dont l'utilisation à différentes fins remonte très loin dans l'histoire, connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt partout dans le monde. Ces plantes qui demeurent la principale source de substances naturelles de plus en plus utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques ou agro-alimentaires occupent une place de choix dans l'agriculture, l'industrie, la recherche scientifique, la médecine et l'environnement.

D'ailleurs, les plantes médicinales sont considérées comme une richesse pour les pays en voie de développement. Pour prés de 90% de la population, dans certains pays d'Afrique, les plantes médicinales représentent l'unique source de remèdes thérapeutiques traditionnels.

L'Algérie est très connue par sa biodiversité, disposant de plantes toxiques et médicinales. Sa flore comporte de milliers d'espèces présentant, dans une certaine mesure, une matière pour la recherche scientifique.

Dans ce contexte et notamment dans la continuité du programme de recherches de notre laboratoire sur les plantes toxiques et médicinales, nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Odontospermum pygmaeum* (*Asteriscus pygmaeus*), plante poussant dans le Sahara septentrional algérien (au Sud-ouest du massif des Aurès). Elle est utilisée traditionnellement dans le traitement de maladies digestives. C'est ce caractère thérapeutique qui nous a incités à étudier chimiquement cette plante afin d'apporter notre contribution à une plus grande connaissance de ses constituants chimiques et déterminer éventuellement ses principes actifs. Notre intérêt porté à l'étude de cette plante est motivé également par le fait qu'elle n'a pas fait l'objet d'un travail chimique conséquent.
Notre travail réparti en quatre chapitres sera présenté comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à un rappel bibliographique comprenant une description botanique de la famille, du genre et enfin de l'espèce de notre plante.
- Le deuxième chapitre est consacré à une étude des stéroïdes et saponosides.
- Les travaux personnels seront présentés dans le troisième chapitre.
- Le quatrième chapitre constitue la partie expérimentale.

Chapitre I

Rappel bibliographique

I-1 Description Botanique

I-1-1 Famille des Asteraceae

Les plantes de la famille Asteraceae, surtout représentées dans les régions tempérées et froides du globe [1], sont principalement des herbes vivaces ou annuelles, des arbustes ou sous-arbrisseaux, rarement des plantes aquatiques ou grimpantes. Elles se caractérisent par leurs feuilles qui sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées [2]. Elles sont réparties, selon la forme de leurs fleurs, en deux types : l'un ayant des fleurs à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées [3].

La famille Asteraceae est l'une des plus distribuées dans le règne végétal. Elle comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [4, 3]. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces [5]. Cette vaste famille est économiquement importante car fournissant des plantes alimentaires : laitues (*Lactuca*), endives, chicorée (*Cichorium*), artichauts (*Cynara*), salsifis (*Trapogon*).

Plusieurs espèces sont utilisées comme plantes médicinales et cosmétiques : armoise (*Artemisia vulgaris*), arnica (*Arnica montana*), camomille sauvage (*Chamomilla recutita*), camomille romaine (*Chamaemelum nobile*), grande aunée ou inule (*Inula helenium*), souci des jardins (*Calendula officinalis*), millefeuille (*Achillea millefolium*), pissenlit (*Taraxacum officinale*), camomille puante (*Anthemis cotula*) ou encore grande camomille (*Tanaoetum parthenium*) [6].

Les plantes de la famille Asteraceae ou Compositae se caractérisent par un groupement de fleurs (capitule) entouré par des bractées dont l'ensemble forme l'involucre. Dans chaque involucre, les fleurs sont juxtaposées mais ne possèdent pas la même forme. La partie libre des pétales est représentée par un tube appelé corolle [7]. Leurs fruits sont des achaines et contenant chacun une seule graine. L'ornementation joue un rôle important dans la reconnaissance des genres et espèces. Les caractères du fruit sont généralement identiques pour les diverses espèces du même genre [7].

I-1-2 Genre *Odontospermum*

La plante caractérisant le genre *Odontospermum* est une plante basse, ramifiée dès la

base, à rameaux peu nombreux et très étalés ; feuilles étroites, pétiolées ; capitules à bractées larges, très coriaces et dures à maturité, à mouvements hygrométriques très nets ; achaine de même forme que dans le genre précédent, mais plus petit et à écailles nombreuses ; paillettes du réceptacle membraneuses et transparentes, à une nervure opaque. Localement, le genre *Odontospermum* est commun dans tout le Sahara septentrional et absent, voire rare plus au Sud (Tassili des Ajjer). Les capitules des plantes constituant ce genre sont de 5 à 12 mm, isolés et non dépassés par les feuilles [7].

I-1-3 Espèce *Odontospermum pygmaeum*

L'espèce *O. pygmaeum* (*Asteriscus pygmaeus*) est une plante annuelle [9]. C'est une espèce reconnue saharo-sindienne mais rencontrée aussi dans le désert arabique. Elle serait la rose de Jéricho [8]. Autrefois, cette plante était connue par le nom *Asteriscus maritimus*. Elle se caractérise par un balcon doté de couronnes étroitement liées et par sa hauteur qui ne dépasse pas 5 cm. Certains disent qu'elle est venue en Algérie à travers le Sahara. Cette plante fleurit peu de temps après la germination et dessèche ensuite.

I-2 Usage traditionnel

Selon Bellakhdar, l'infusion de cette plante est principalement utilisée au Sahara, pour calmer les maux d'estomac [10].

I-3 Place dans la systématique :

Règne : Plante
Embranchement : Spermatophytae
Classe : Dicotyledoneae
Ordre : Asterales
Famille : Asteraceae
Genre : *Odontospermum*
Espèce : *Odontospermum pygmaeum*

Figure I.1: ***Asteriscus pygmaeus*** (DC.) Coss. & Dur. **(*Odontospermum pygmaeum*)**

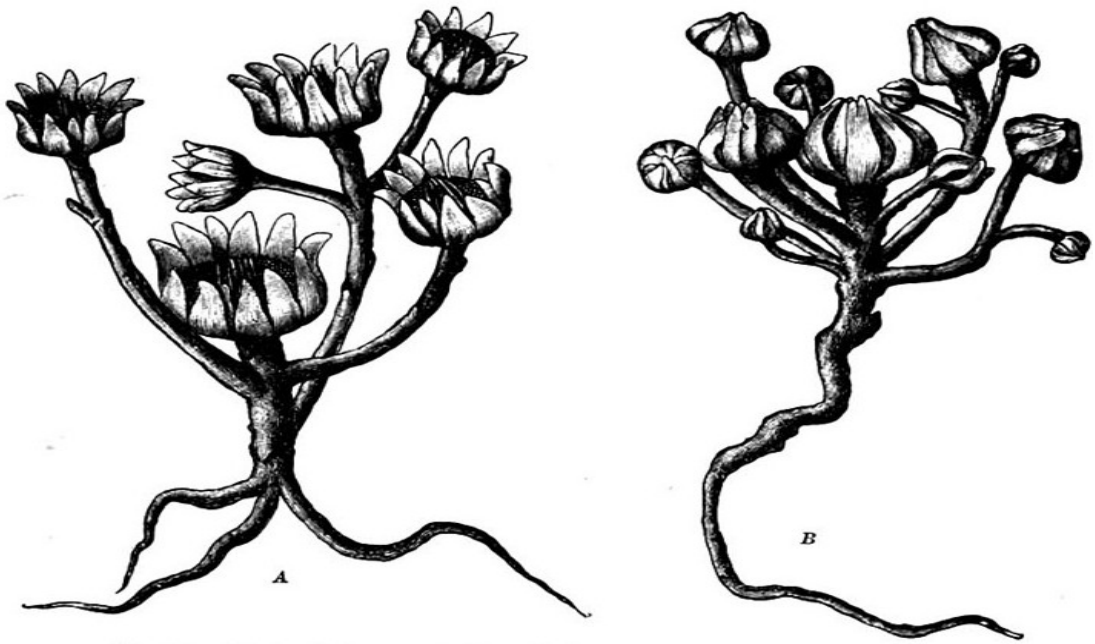


Fig. 471. **Wahre Roſe von Jericho** ***(Odontospermum pygmaeum)***.
A Im Waſſer geöffnet. *B* Geſchloſſen. (Nach Engler-Prantl.)

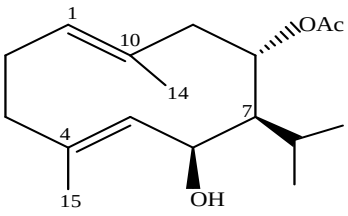
Figure I.2 : Espèce *O. pygmaeum*

I-4 Travaux antérieurs

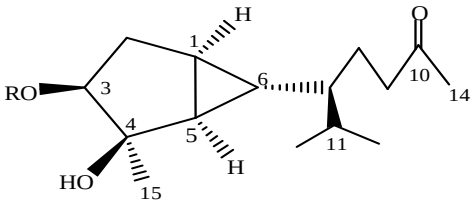
I-4-1 Sur la famille

Les plantes relevant de la famille Asteraceae ont fait l'objet d'intenses investigations chimiques. Ces investigations ont permis de mettre en évidence un nombre important de métabolites secondaires aux diverses activités biologiques comme les flavonoïdes, sesquiterpènes lactones et triterpènes.

Une étude phytochimique réalisée par Giovanni et collaborateurs [11], sur l'espèce *Pallenis spinosa*, a mis en évidence 11 sesquiterpénoïdes : 8-acetyltovarol **(1)**, 3β-acetoxy-4β-hydroxypallenone **(2)**, 3β,4β-dihydroxypallenone **(3)**, 3β-acetoxyoplopanone **(4)**, 3β-hydroxyoplopanone **(5)**, oplopanone **(6)**, 1α,5α-époxy-3β-acetoxy-6βH-isodaucane-1β,4β-diol **(7)**, 3β-acetoxy-4β-hydroxygermacra-1(10),5-diène **(8)**, 3β,4β-dihydroxygermacra-1(10),5-diène **(9)**, eudesmane **(10)** et cadinane (**11**).

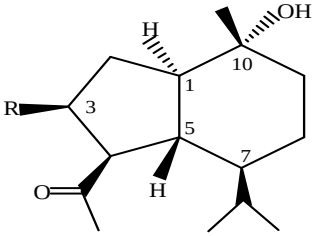


1



2 **R**= Ac

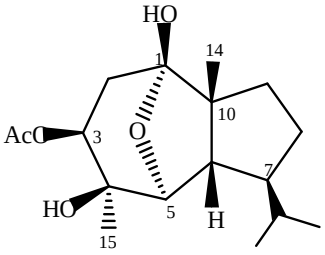
3 **R**= H



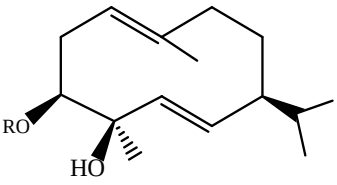
4 **R**= OAc

5 **R**= OH

6 **R**= H

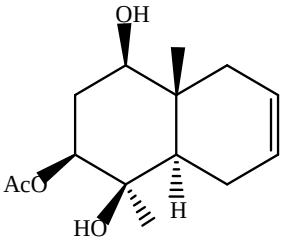


7

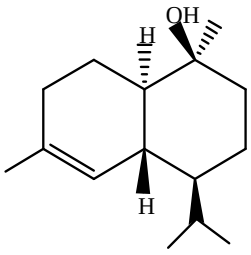


8 **R**= Ac

9 **R**= H

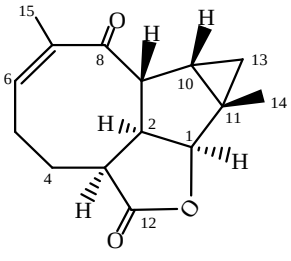


10

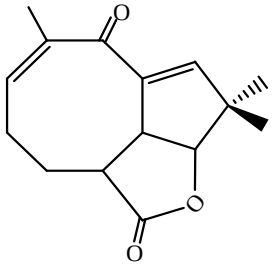


11

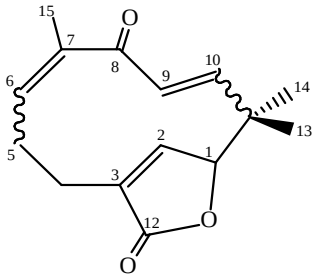
Une étude chimique réalisée sur l'extrait chloroformique de *Nauplius graveolens*a ant permis l'identification de six sesquiterpènes lactones dont quatre asteriscunolides à squelette humulène. Il s'agit de : 14,15-diméthyl-8-oxo-tétracycliqu[6.3.2.1]dodéca-12,1-olide **(12)**, 6,7,9,10-tétradihydroasteriscanolide **(13)**, 8-oxo-humula-6Z,9Z-dièn-12,1-olide **(14)**, 8-oxo-humula-6E,9Z-dièn-12,1-olide **(15)**, 8-oxo-humula-6Z,9E-dièn-12,1-olide **(16)**, 8-oxo-humula-6E,9E-dièn-12,1-olide **(17)** [12].



12

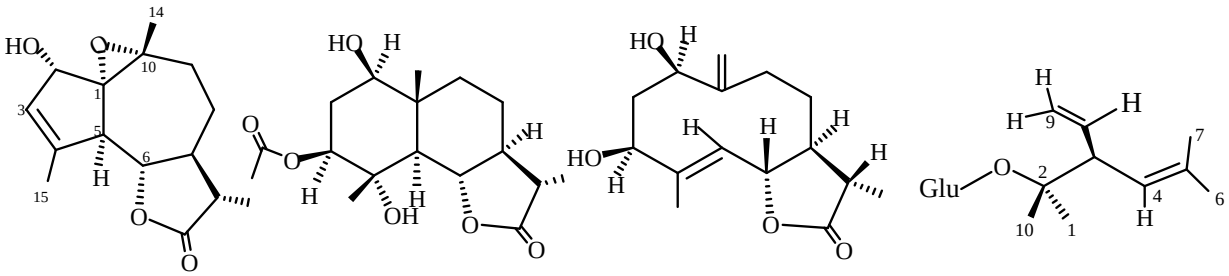


13



14	**15**	**16**	**17**
6Z, 9Z	6E, 9Z	6Z, 9E	6E, 9E

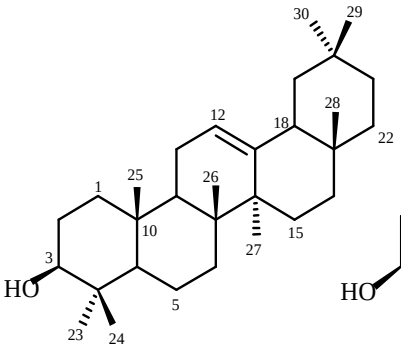
L'investigation chimique de l'extrait chloroformique de la plante *Matricaria chamomilla* [13] a permis d'identifier, par les méthodes d'analyse spectroscopiques, quatre composés constitués majoritairement de sesquiterpènes lactones à squelettes germacranolide, guaianolide et eudesmanolide : 1α,10α-epoxy-2α-hydroxy-(5α,6β,7α,11βH)-guai-3(4)-èn,12,6α,olide (*2α-hdroxy arborescine*) **(18)**, 3β-acétoxy-1β,4α-dihydroxy-(5α,6β,7α,11βH-10β-méthyl)-eudesman-12,6α-olide (*Matricolone*) **(19)**, 1β,3β-dihydroxy-(1α,3α,6β,7α,11βH)-germacra-4(5),10(14)-dièn-12,6α-olide (*dihydroridentine*) **(20)**, 2,5-diméthyl-3-vinylhex-4-ène-2-*O*-β-D-glucopyranoside (*Chamolol*) **(21)**.



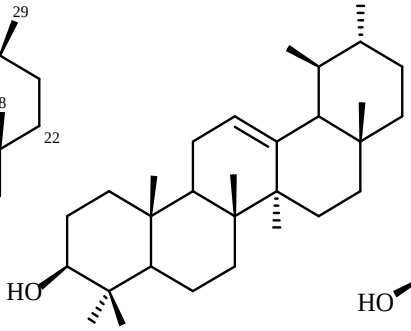
18 **19** **20** **21**

Une étude phytochimique de l'extrait chloroformique de *Inula crithmoides* [14], a permis d'isoler et d'identifier les triterpènes suivants : β-amyrine (3-hydroxyoléan-12-ène),

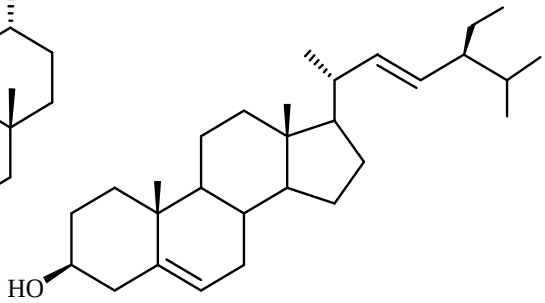
(22), α-amyrine (3-hydroxyurs-12-ène), **(23)**, stigmastérol **(24)**, β-sitostérol **(25)**. L'étude de l'extrait acétate d'éthyle a mis en évidence la présence d'un flavonoïde nommé quercétine ou 3, 5, 7,3', 4'-pentahydroxyflavone **(26)**.



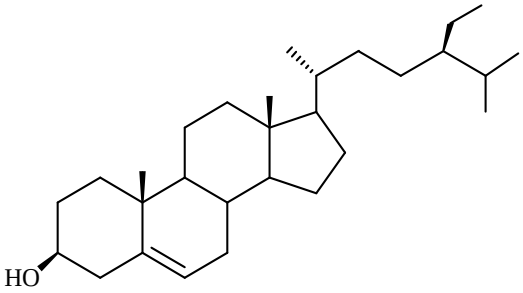
22



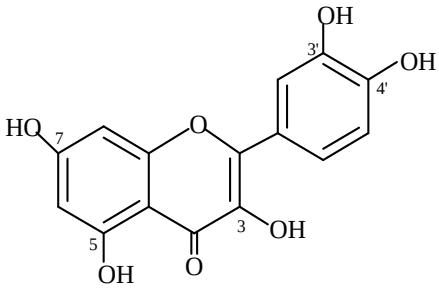
23



24

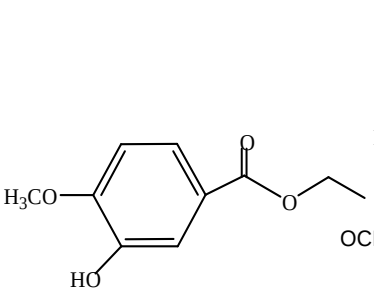


25

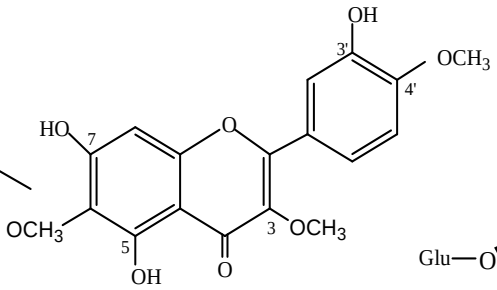


26

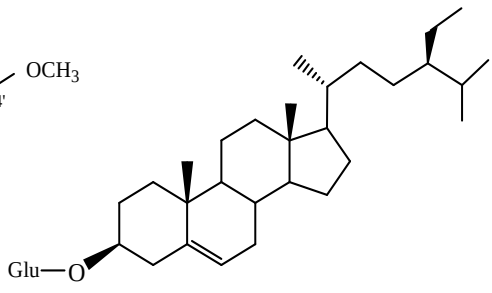
Une étude chimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle d'une centaurée nommée *Centaurea africana*, a révélé la présence de quatre composés : 3-hydroxy-4-méthoxybenzoate d'éthyle **(27)**, β-sitostérol **(25)**, 5,7,3'-trihydroxyflavone (Centaureidine) **(28)**, 3-β-D-glucopyranosyl β-sitostérol **(29)** [15].



27

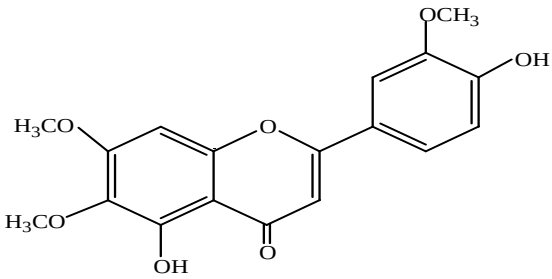


28

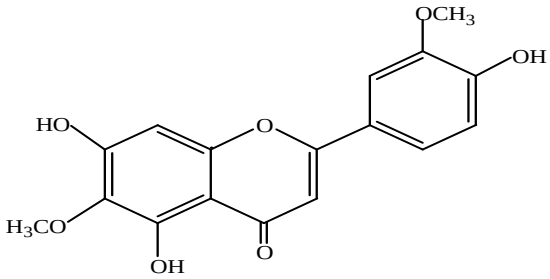


29

Une investigation chimique de l'extrait chloroformique de *Centaurea nicaensis*, a abouti à l'isolement de deux flavonoïdes nommés cirsilineol **(30)** et jacéosidine **(31)** [15].



30



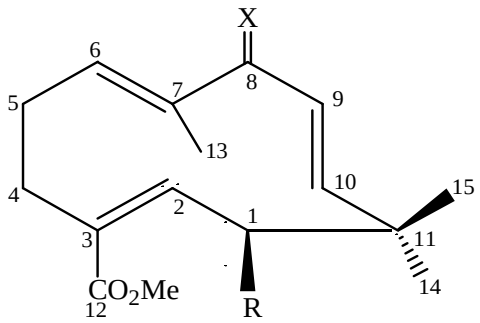
31

Ces composés ont été aussi identifiés par les méthodes d'analyse spectroscopiques : IR, UV, RMN et spectrométrie de masse.

I-4-2 Sur le genre

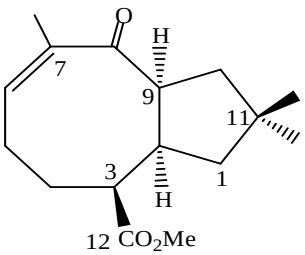
Le genre *Odontospermum*, comme les autres genres de la famille Asteraceae, a fait l'objet d'investigations chimiques qui ont abouti à la mise en évidence d'un nombre non négligeable de métabolites secondaires. Ces derniers constitués principalement de flavonoïdes, sesquiterpènes lactones et triterpènes, sont considérés comme composés typiques de la famille Asteraceae en général.

Ainsi l'étude chimique de l'espèce *O. graveolens* [16] a abouti à l'isolement et la caractérisation de onze sesquiterpènes lactones à squelette humulène : **(32)**, **(33)**, **(34)**, **(35)**, **(36)**, **(37)**, **(38)**, **(39)**, **(40)**, **(41)**, et **(42)**.

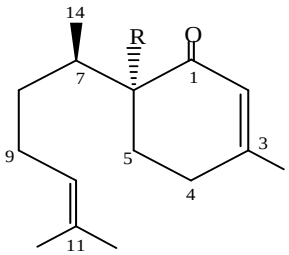


	32	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**	**41**	**42**
R	H	H	H	H	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	H
X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	αOH,H
Δ^{6}	E	E	Z	Z	E	E	Z	Z	Z	E	E
Δ^{9}	E	Z	Z	E	E	Z	E	Z	Z	Z	Z
									2E	2E	

Ce même travail a révélé également la présence de cinq constituants chimiques que sont : 6,7,9,10-tétradihydroasteriscanolide **(13)**, méthyl-2α-3α,9αH-asteriscan-12-oate **(43)**, bisabol-2,10-dièn-1-one **(44)**, 6α-hydroxybisabol-2,10-dièn-1-one **(45)**, coniféryl-diisovalérate **(46)**.

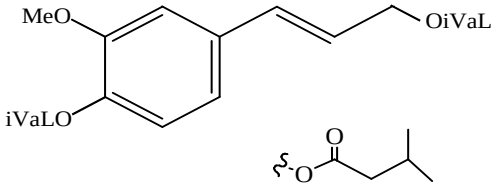


43



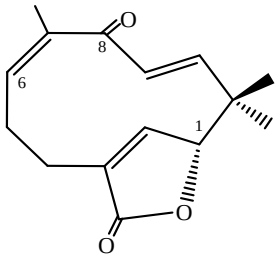
44 **R=** H

45 **R=** OH

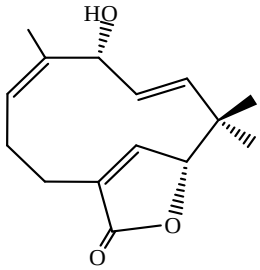


46 Oival= isovalérate

L'étude chimique réalisée par San Feliciano et collaborateurs [17] sur l'extrait hexanique de *O. aquaticum*, a permis de mettre en évidence par les mêmes méthodes décrites ci-dessous, la présence des deux sesquiterpènes lactones à squelette humulène suivants : 8-oxo-humula-2,6,9,-trièn-12,1-olide **(47)**, 8α-hydroxy- humula-2,6,9,-trièn-12,1-olide **(48)**.

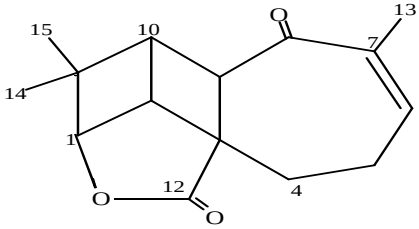


47



48

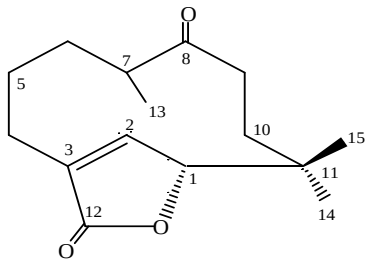
Une étude chimique plus récente effectuée sur la même espèce et le même extrait [18], a permis d'identifier un sesquiterpène lactone nommé *Asteriscunolide* **(49)**.



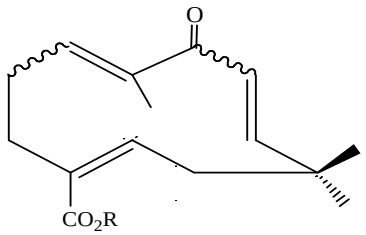
Asteriscunolide **49**

L'investigation chimique de l'extrait chloroformique de l'espèce *O. vogelii* [19], a

permis d'identifier dix composés constitués exclusivement de sesquiterpènes lactones à squelette humulène : 8-oxo-6,7,9,10-tétraheptahydrohumulèn-12,1-olide **(50)**, asteriscunolides **(14),** (**16**) et **(17)**, acide 8-oxo-α-humula-6Z,9E-dièn-12-oïque **(51)**, acide 8-oxo-α-humula-6E,9Z-dièn-12-oïque **(52)**, acide 8-oxo-α-humula-6E,9E-dièn-12-oïque **(53)**, **(32)**, **(33)** et **(35)**.

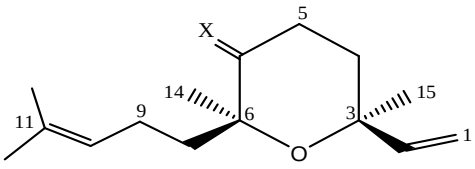


50



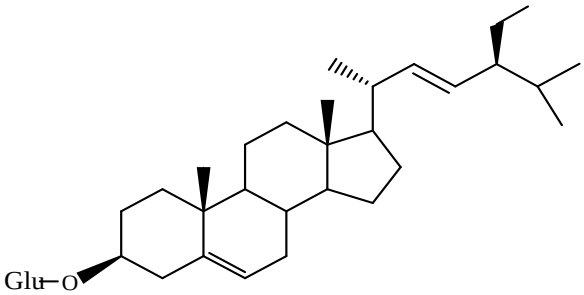
	51	**52**	**53**
R	H	H	H
	6Z, 9E	6E, 9Z	6E, 9E

Une autre étude phytochimique réalisée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Odontospermum sericum* [20], a abouti à l'isolement de huit composés : asteriscunolide **(14-17),** 6-oxo-cyclonérolidol **(54)**, 6α-hydroxycyclonérolidol **(55)**, β-sitostérol **(25)** et stigmastérol-β-D-glucopyranoside **(56)**.



54 **X=** O

55 **X=** αOH,H



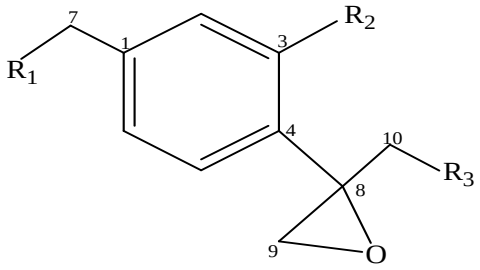
56

L'espèce *O. schimperi* s'est avérée extrêmement riche en sesquiterpènes [21]. En effet, l'investigation chimique de l'extrait chloroformique a permis d'isoler et d'identifier six sesquiterpènes dont deux à squelette bisabolone **(44)** et **(45)**, et quatre à squelette humulène **(14)**, **(15)**, **(16)** et **(17)**.

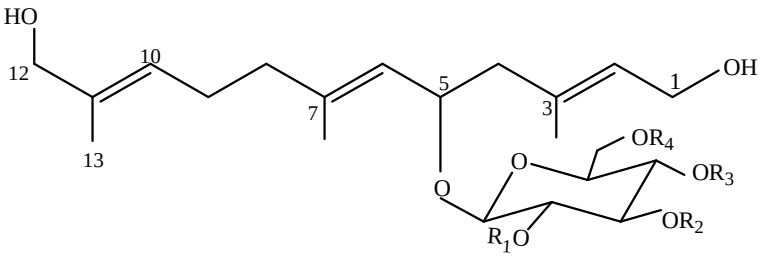
Ces composés ont été également identifiés par les méthodes d'analyse spectroscopiques : IR, UV, RMN et spectrométrie de masse.

I-4-3 Sur l'espèce

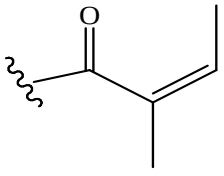
Une recherche bibliographique exhaustive a permis de relever qu'une seule étude phytochimique a été réalisée sur l'espèce *Odontospermum pygmaeum* [22]. Cette étude menée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes, a abouti à la mise en évidence de sept composés dérivés du thymol et farnésol. Leurs structures sont représentées ci-dessous **(57-63)**.



	57	**58**	**59**
R_1	H	$OCOCHMe_2$	$OCOCH_2CHMe_2$
R_2	$OCOCHMe_2$	$OCOCHMe_2$	$OCOCHMe_2$
R_3	$OCOCHMe_2$	$OCOCHMe_2$	$OCOCHMe_2$



	60	**61**	**62**	**63**
R_1	H	H	Ac	Ac
R_2	H	Ac	Ac	Ac
R_3	Ang	Ang	Ang	Ang
R_4	H	H	H	Ac



Ang = Angéloyl

La recherche bibliographique réalisée montre bien la grande diversité du métabolisme secondaire aussi bien au niveau de la famille qu'au niveau du genre. Les classes prédominantes sont celles des composés phénoliques notamment flavonoïdiques, triterpénoïdes et sesquiterpènes essentiellement lactoniques.

Chapitre II

Etude des stéroïdes et saponosides

II-1 Etude des stéroïdes

II-1-1 Généralités

Les stéroïdes sont des stérols et lipides neutres possédant une structure rigide. Le nom étymologique donné à cette classe vient du mot grec stéréos signifiant ‘’solide’’. Ils dérivent du noyau cyclopentanoperhydrophénanthrénique (Gonane) [23, 24, 25]. Cette classe de substances naturelles présente une sous-classe de triterpènes dont la structure chimique de base est un système tétracyclique. Les stéroïdes représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol et elles peuvent être regroupés en trois familles : stérols fongiques, stérols animaux et stérols végétaux. Les stéroïdes sont composés de 4 cycles hydrocarbonés nommés A, B, C et D qui forment une structure plane et rigide de nature apolaire [26, 27, 28]. Ainsi la numérotation des cycles et des carbones est standardisée pour tous les stéroïdes comme il est indiqué dans la figure II.1 ci-dessous.

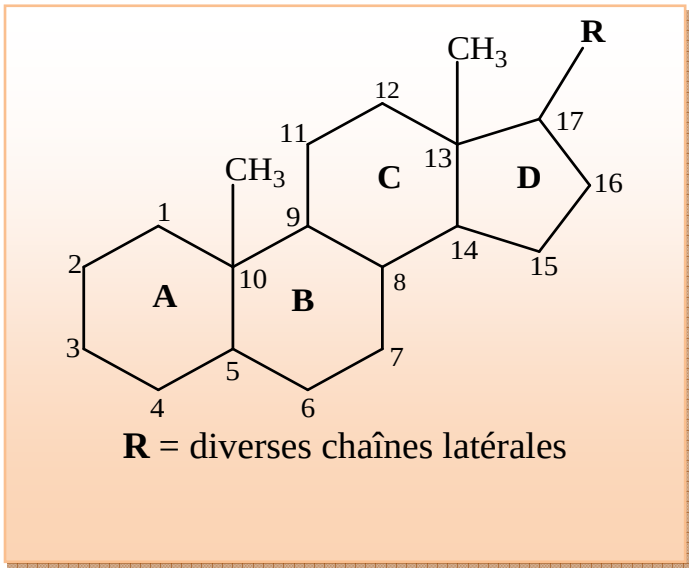
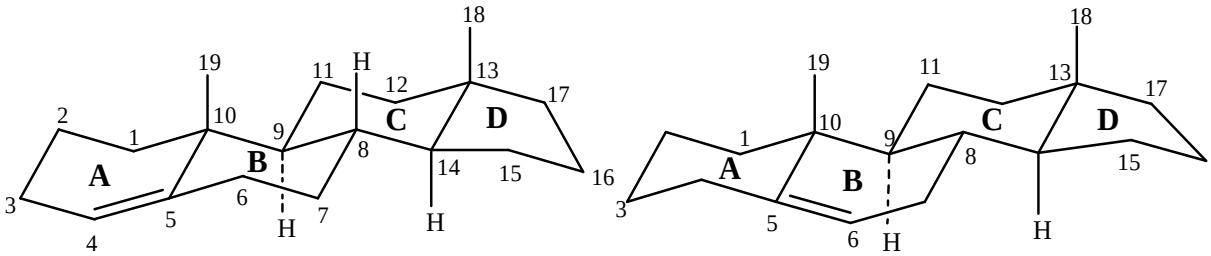
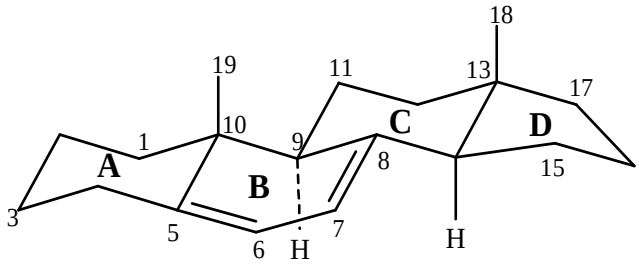


Figure II.1 : Stéroïde

Les atomes de carbones sont numérotés en commençant par le cycle A. Ils comportent généralement des méthyles en C_{10} et C_{13} appelés méthyles angulaires, souvent une chaîne alkyle de 8 à 10 carbones, plus ou moins ramifiée sur le carbone en C_{17}. Les deux cycles A et B peuvent avoir aussi des insaturations au niveau des carbones C-4, C-5 et C-7 [23, 29, 30] comme il est présenté dans la figure II.2.



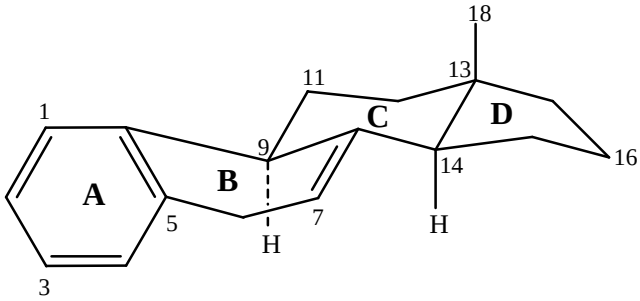
Insaturation (C-4) Insaturation (C-5)



Insaturations (C-5, C-7)

Figure II.2

Dans certains composés stéroïdiques, notamment les œstrogènes, le cycle A peut être aromatique. Cette aromaticité entraine obligatoirement la perte du méthyle angulaire en C-10 (Figure II.3) [27, 31].



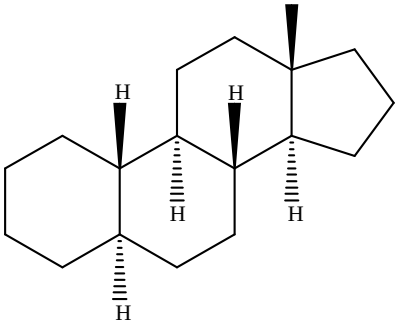
Cycle **A** aromatique

Figure II.3

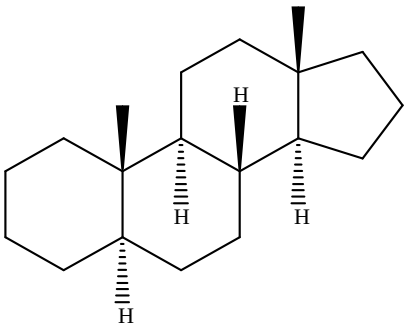
II-1-1-1 Nomenclature

La nomenclature systématique est basée généralement sur le nom du squelette de base du stéroïde en question. Les différents squelettes sont nommés estrane **(64)**, androstane **(65)**,

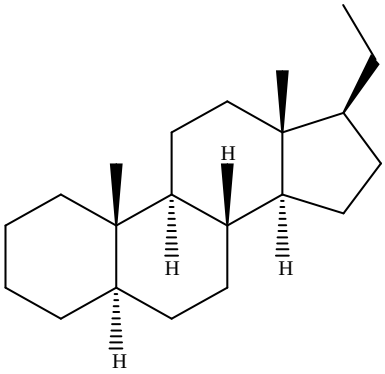
pregnane **(66)**, cholane **(67)**, ergostane **(68)**, campestane **(69)**, cholestane **(70)**, poriferastane **(71)** et stigmastane **(72)** (Figure II.4) [29, 32, 33].



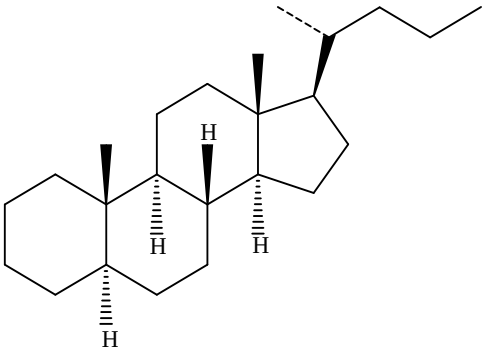
Estrane **64**



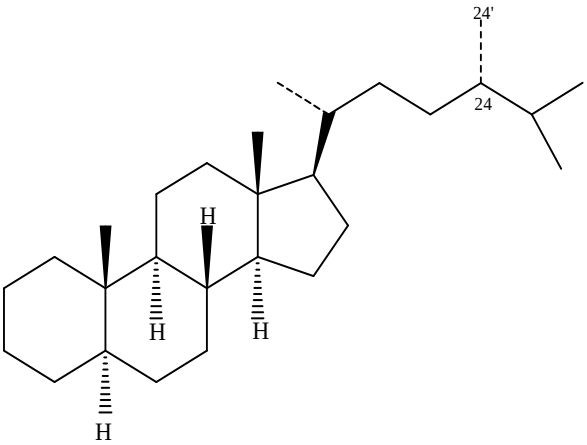
Androstane **65**



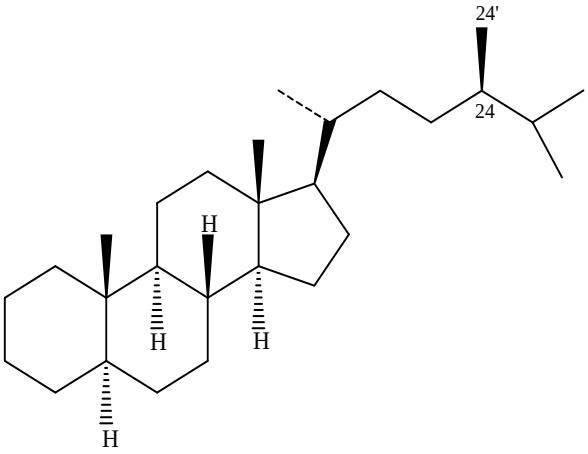
Pregnane **66**



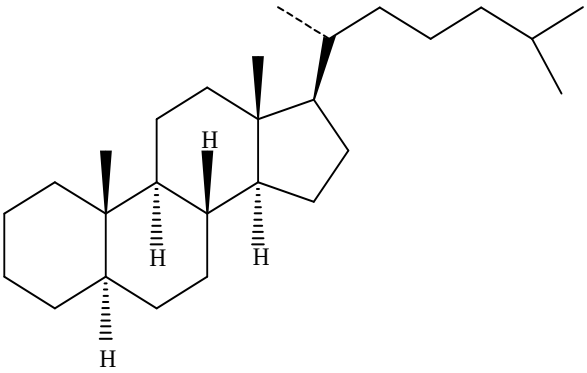
Cholane **67**



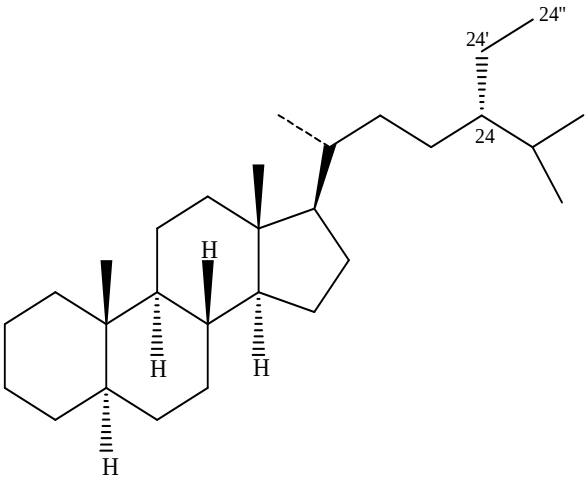
Ergostane **68**



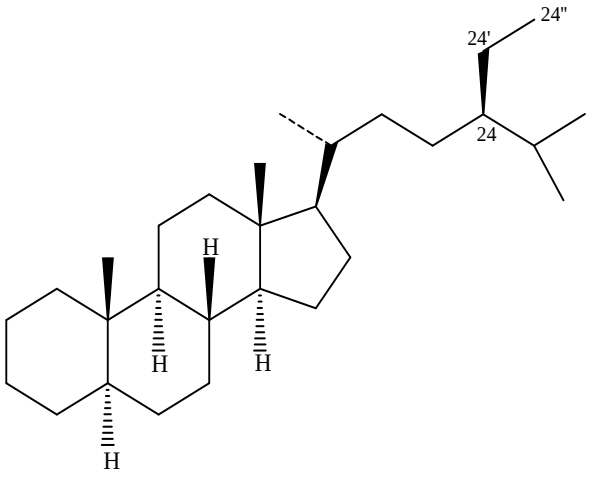
Campestane **69**



Cholestane **70**



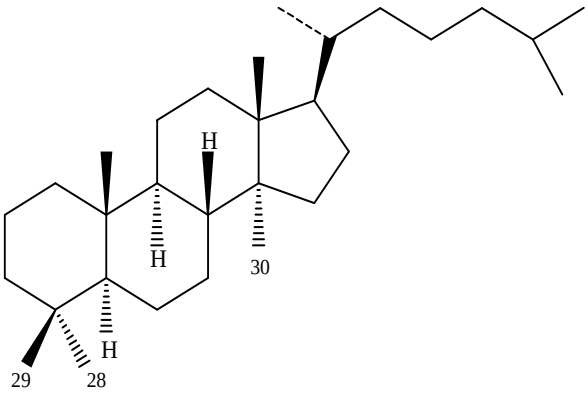
Poriferastane **71**



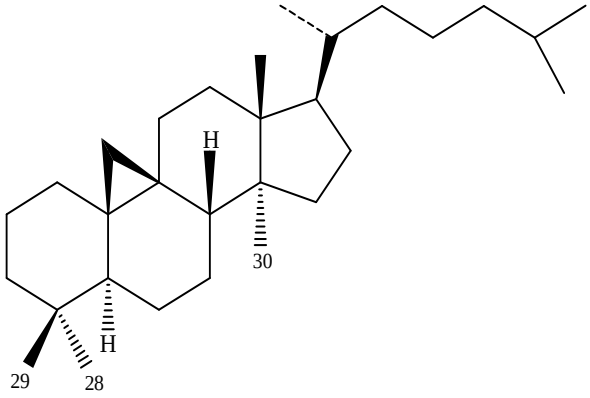
Stigmastane **72**

Figure II.4

Les hydrocarbures triterpéniques à squelettes lanostane **(73)** et cycloartane **(74)** caractérisé par la présence d'un groupement cyclopropanique, sont également utilisés dans la nomenclature systématique des stéroïdes (Figure II.5) [29, 32, 33].



Lanostane **73**



Cycloartane **74**

Figure II.5

Le symbole $\Delta^{x,\ y,\ z}$ est fréquemment utilisé en série stéroïdique pour représenter l'insaturation au niveau du squelette. Les variables x, y et z indiquent les positions des liaisons insaturées comme il est illustré dans le tableau II.1 ci-dessous.

N°	Nom trivial	Nom systématique
1	Δ^5- Cholestérol	Cholest-5-èn-3β-ol
2	Δ^5- Sitostérol	Stigmast-5-èn-3β-ol
3	Δ^5- Campestérol	Campest-5-èn-3β-ol
4	$\Delta^{5,22}$- Brassicastérol	(22E)-ergosta-5,22-dièn-3β-ol
5	$\Delta^{5,22}$- Stigmastérol	(22E)-stigmasta-5,22-dièn-3β-ol

Tableau II.1 : Phytostérols communs

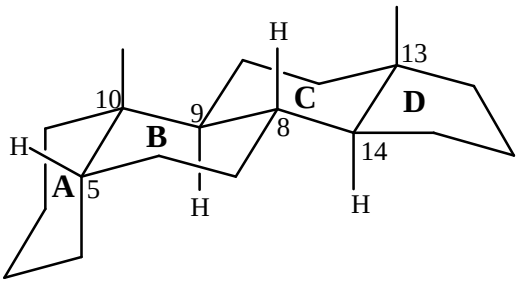
Le groupement fonctionnel prioritaire est ajouté comme suffixe au nom original du squelette stéroïdique. D'autres groupements sont ajoutés comme préfixes et par utilisation de termes spécifiques [24, 29, 34]. On citera les termes :

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

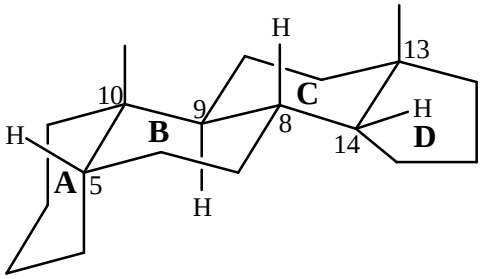
II-1-1-2 Stéréochimie

La relation entre la stéréochimie et l'activité biologique est assez marquée dans le champ stéroïdique. La stéréochimie des stéroïdes au niveau des carbones C-5 et C-14 est représentée par les deux lettres grecques α et β. α présentant la face inférieure de cycle et β la face supérieure, ceci par rapport aux méthyles angulaires axiaux de conformation β. Ces derniers sont CH_3-19 et CH_3-18, portés respectivement par les carbones C-10 et C-13.

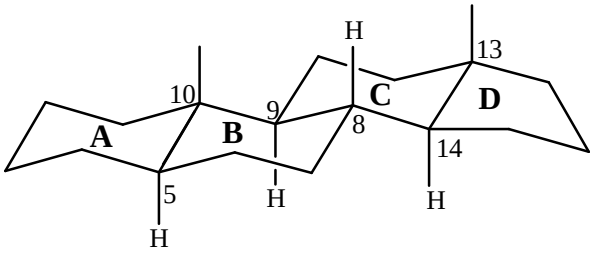
Dans le cas des stéroïdes naturels, la chaîne latérale est le plus souvent β orientée et la jonction entre les cycles B et C, est toujours de type *trans*. Toutefois, les stéroïdes à jonction *cis* peuvent être préparés synthétiquement. La jonction entre les cycles C et D est souvent de type *trans* (Figure II.6), avec cependant quelques exceptions pour les hétérosides cardiotoniques [24, 29, 33, 35, 36].



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



A/B *cis*, **C/D** *cis*

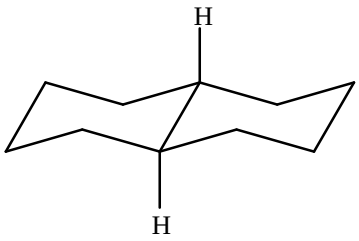


A/B *trans*, **C/D** *trans*

Figure II.6

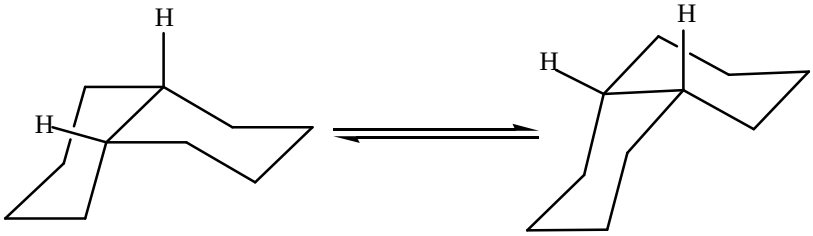
Par contre, les cycles A et B peuvent être de :

- jonction *trans*, comme il est présenté dans la trans décaline.



trans décaline

- de jonction *cis*, comme la cis décaline indiquée ci-dessous.



cis décaline

Cet aspect de la jonction conduit donc à deux types de stéroïdes différenciables uniquement par la conformation 5α ou 5β [24, 29, 33], comme il est indiqué dans la figure II.7.

5α **5β**

Figure II.7

Les jonctions *trans* dans les trois cycles A, B et C (Figure II.8), imposent une conformation rigide pour la molécule. Cette rigidité occasionne inévitablement des tensions stériques, du fait que la molécule ne bénéficie plus de l'interconversion habituelle du cyclohexane [26, 37, 38].

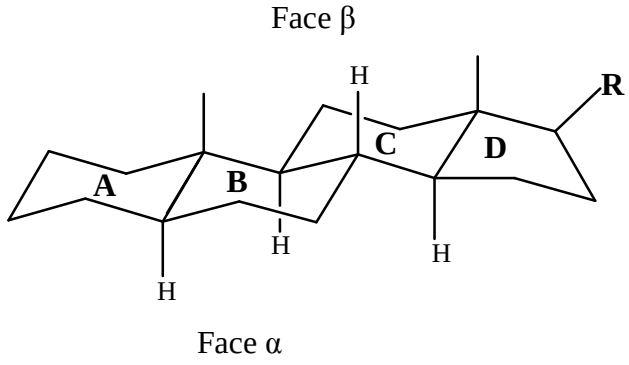
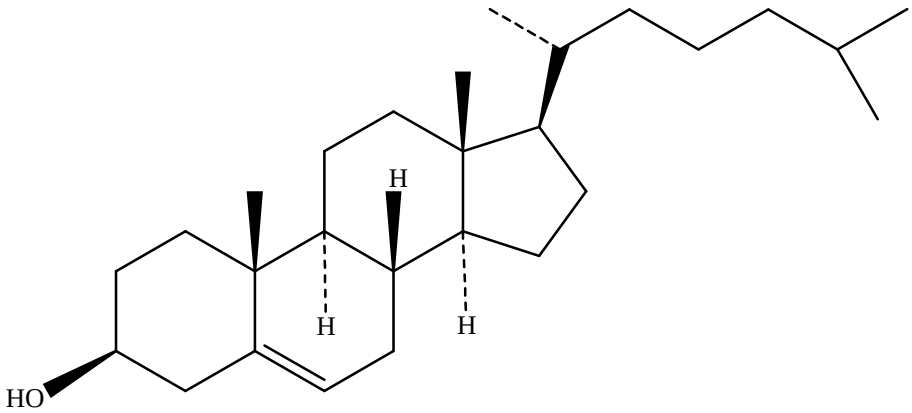


Figure II.8

II-1-2 Définition des stérols

Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides [24, 27, 39]. Ils comportent au niveau de leurs structures, un hydroxyle en position C-3 en général d'orientation β, éventuellement une double liaison, le plus souvent localisée entre les atomes C-5 et C-6 ainsi qu'une chaîne latérale substituant le carbone C-17

du noyau polycyclique dérivé du phénanthrène [24, 38]. Ils sont les constituants des membranes de divers métabolites cellulaires, dont le plus caractéristique est le cholestérol **(75)** (Figure II.9), détecté par Conradi dans les calculs biliaires [38, 40].

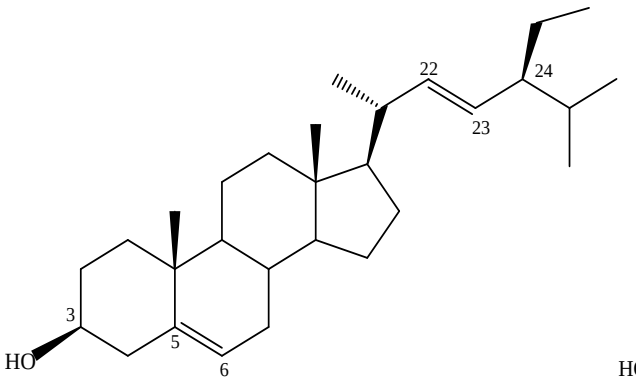


Cholestérol **75**

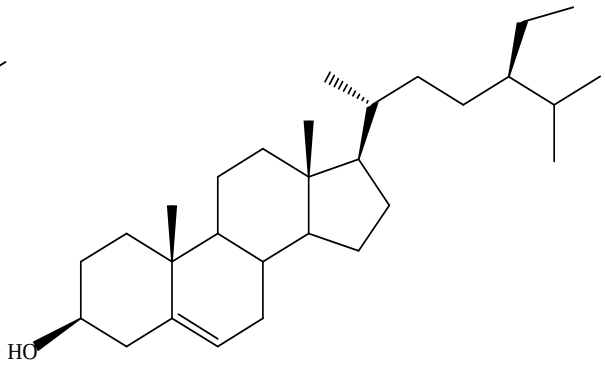
Figure II.9

II-1-3 Définition des phytostérols

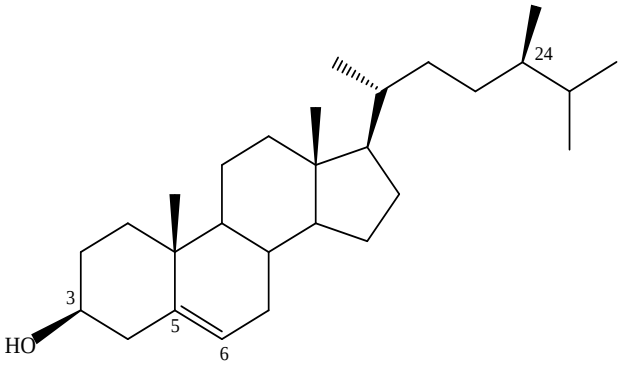
Les phytostérols sont des composés naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes supérieures et apparaissent ainsi comme des graisses végétales identiques en structure au cholestérol (graisse animale). Ils peuvent différer des stérols par l'alkylation supplémentaire de la chaîne latérale en C-24. Le stigmastérol **(76)**, le β-sitostérol **(77)**, le campestérol (**78)** et le brassicastérol **(79)** sont les meilleurs exemples (Figure II.10).



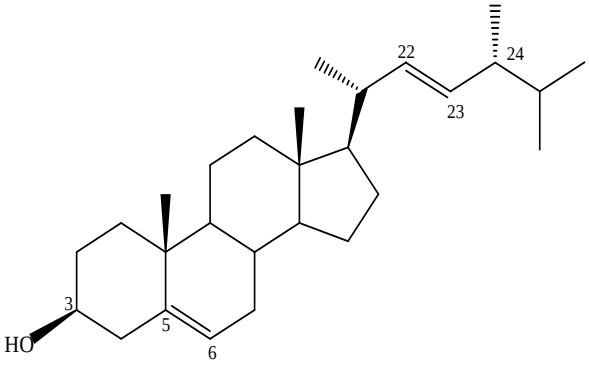
Stigmastérol **76**



β- Sitostérol **77**



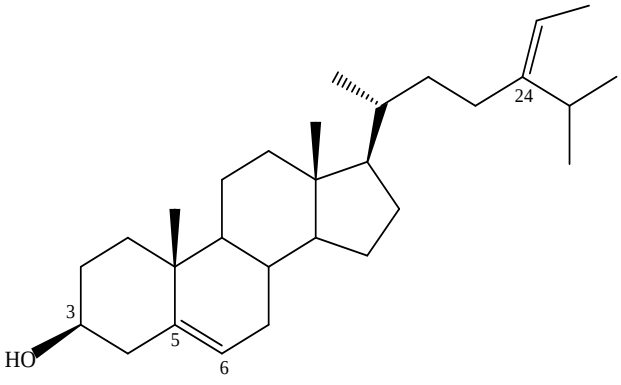
Campestérol **78**



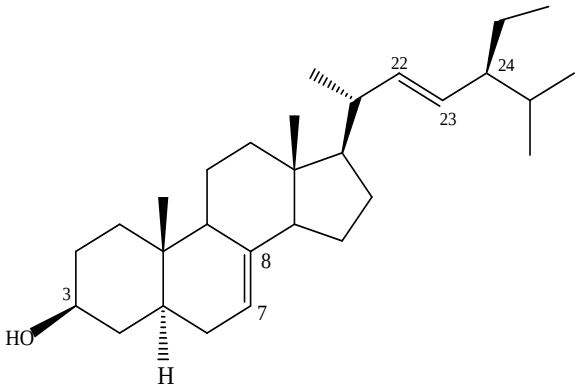
Brassicastérol **79**

Figure II.10

On peut citer également l'isofucostérol **(80)** et le spinastérol **(81)**.



Isofucostérol **80**



Spinastérol **81**

Ils s'avèrent qu'ils possèdent tous un noyau cholestérol avec une chaîne latérale modifiée [24, 39, 41, 42].

Ces composés, non synthétisés par l'homme et l'animal, ne peuvent être par conséquent apportés que par l'alimentation. Ils sont présents chez pratiquement toutes les plantes, mais leur concentration est cependant variable. On les trouve en concentration assez élevée dans les huiles de graines et de noix non transformées et dans une moindre mesure, dans les fruits et légumes.

II-1-3-1 Propriétés générales des phytostérols

Ce sont des solides cristallins à point de fusion élevé (de l'ordre de 100 °C), insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool à froid mais solubles à chaud. Ils se dissolvent dans le chloroforme, le benzène, la pyridine. Ils sont doués de pouvoir rotatoire, en général lévogyres. Les phytostérols de même que les stérols donnent facilement des esters avec les acides, en dehors des acides gras naturels qui sont unis aux stérols dans les lipides. [39, 41, 42].

II-1-3-2 Intérêt pharmacologique des phytostérols et leur emploi

Les phytostérols ainsi que les stérols en général, possèdent une gamme étendue d'effets thérapeutiques. Plusieurs études ont montré que ces derniers réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. Il s'avère ainsi nécessaire de consommer des stérols quotidiennement afin de maintenir leur concentration dans notre organisme. Ce dernier ne pouvant les produire lui-même. Les graisses végétales ayant une structure semblable à celle du cholestérol, peuvent ralentir son absorption, réduisant ainsi la qualité de cette substance dans l'organisme. Elles joueraient un rôle important dans le bon état de fonctionnement du système immunitaire [44]. Certains stérols se sont montrés très actifs sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate [43, 44].

Des phytomédicaments majoritairement à squelette β-sitostérol sont disponibles depuis plusieurs années sur le marché allemand. Ils sont prescrits pour améliorer les symptômes de l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) sans provocation d'effets secondaires, même pour les doses les plus élevées (130 mg/j) [44, 45].

Dans les plantes, algues et champignons, une certaine variété de phytostérols jouent un rôle de substrat pour un métabolisme ultérieur alors que chez les animaux, le cholestérol est la source de tous les métabolites de type stéroïde. Il s'avère que les stérols ont un rôle vital dans la maintenance de l'intégrité structurale de la plupart des structures membranaires des organismes. Ils contribuent aussi à la régulation de la perméabilité de ces membranes aux différents ions [45, 46, 47].

II-2 Etude des saponosides

II-2-1 Généralités

Les saponosides sont des métabolites secondaires hétérosidiques [48, 44], présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins où ils auraient un rôle de défense contre des agents pathogènes extérieurs comme les champignons, bactéries et autres insectes.

Ces molécules sont connues depuis longtemps pour leur propriété tensio-active. Elles ont des propriétés caractéristiques comme pouvoir aphrogène, perméabilité membranaire des cellules, destruction des hématies (pouvoir hémolytique) et toxicité vis-à-vis des animaux à sang froid (ichtyotoxicité) [49]. Ces hétérosides sont utilisés pendant de nombreuses années comme savon d'où le nom étymologique donné à cette classe de métabolites secondaires (*sapo* veut dire «savon» en latin).

Ces produits issus du métabolisme secondaire des plantes, sont constitués d'une partie lipophile appelée génine ou aglycone et d'une partie hydrophile osidique. Les baies du Lierre (*Hedera helix*), les fruits du Tamier (*Tamus communis*) ainsi que les fruits du Phytolaque (*Phytolacca decandra*) sont connus pour être riches en saponosides toxiques [49].

Les saponosides possèdent de nombreuses autres activités biologiques plus ou moins marquées. On citera les activités antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-hémorroïdaires et anti-appétantes [49].

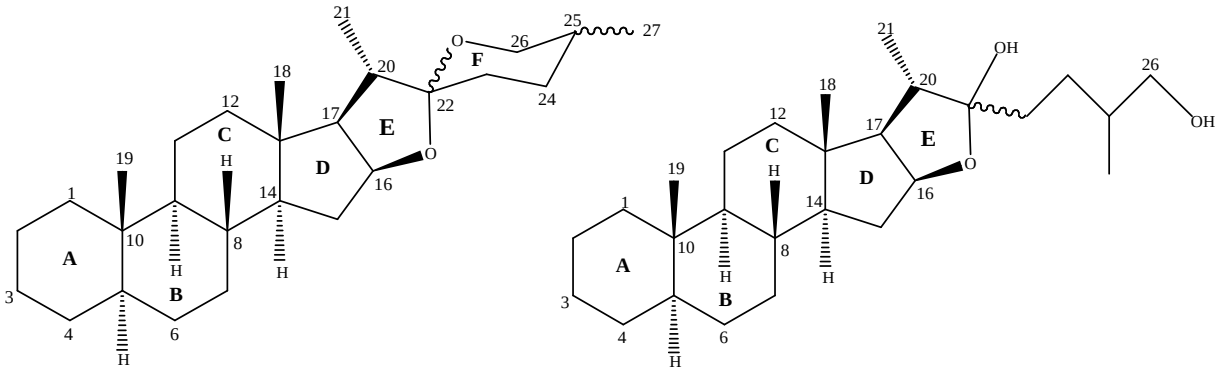
II-2-2 Structure chimique des saponosides

Les saponosides se classent en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être stéroïdique ou triterpénique [44]. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques [44]. Les différents hydroxyles de ces molécules, que ce soit au niveau de la génine ou de la partie osidique, peuvent être le siège d'une estérification par des acides organiques [44].

II-2-2-1 Génines stéroïdiques

La structure chimique des génines stéroïdiques est similaire à celle de nombreuses hormones humaines. De nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale. Ainsi la plante *Dioscorea villosa* connue vernaculairement sous le nom d'igname sauvage, contient des saponines stéroïdiques à partir desquelles, on synthétisa la pilule contraceptive [50].

Les saponosides stéroïdiques sont pour la plupart présents chez les angiospermes monocotylédones (Liliaceae, Amaryllidaceae, Dioscoraceae…..) et rarement chez les dicotylédones (Fabaceae, Scrophulariaceae, Ranunculaceae,…..). Leur génine dont plus d'une centaine est connue, est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbone. Deux principaux types de squelette existent, l'un hexacyclique (spirostane **82**) et l'autre pentacyclique (furostane **83**) (Figure II.11) [44].

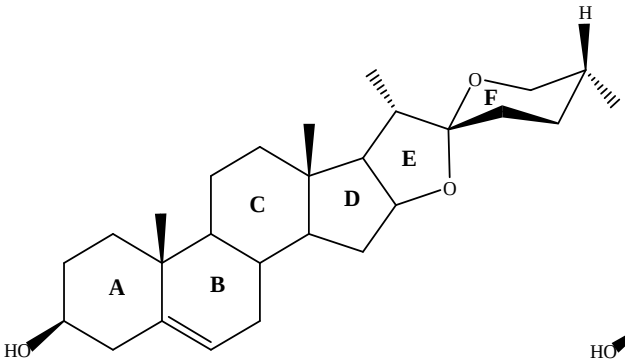


Spirostane **82** Furostane **83**

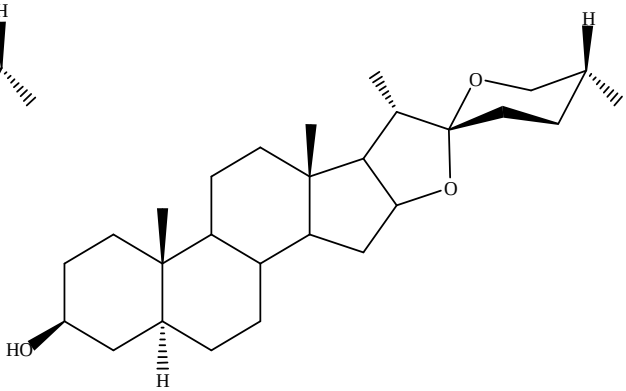
Figure II.11

Pour les saponosides à squelette furostane, le carbone C-26 est toujours glycosilé (saponoside bidesmosidique) dans la plante fraîche. Son hydrolyse conduit spontanément au dérivé spirostanique [44].

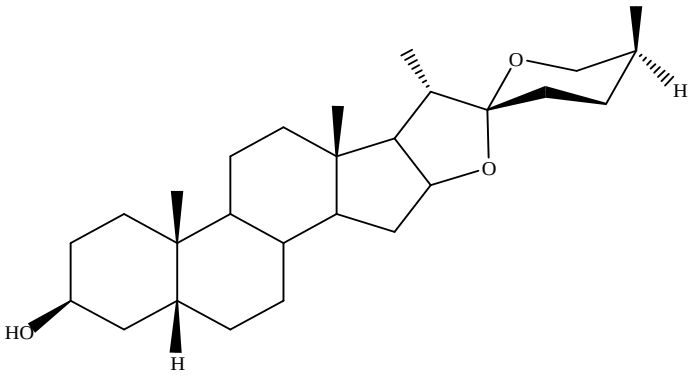
La double liaison en 5(6) peut être conservée comme c'est le cas de la diosgénine **(84)** ou réduite. La fusion des cycles A et B peut être *trans* (H-5α) comme la tigogénine **85** ou *cis* (H-5β) comme la sarsasapogénine **86** (Figure II.12) [44].



Diosgénine **84**



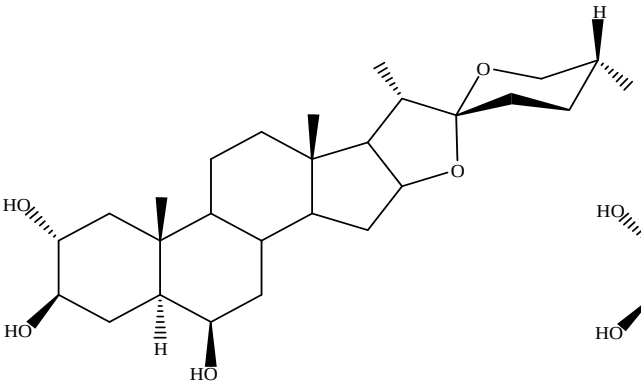
Tigogénine (25 R, H-5α) **85**



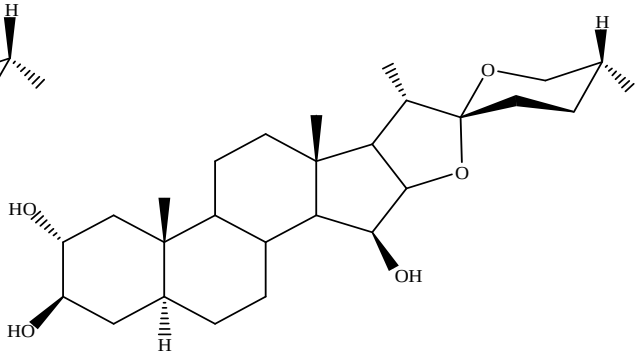
Sarsasapogénine (25 S, H-5β) **86**

Figure II.12

L'hydroxyle porté par le carbone C-3 est de configuration β. Cependant, une éventuelle oxydation peut aussi concerner d'autres carbones. Ainsi les carbones C-1, C-2, C-5, C-6 et plus rarement C-17 ou encore C-24 comme il est rencontré chez les plantes Liliaceae [44], offrent des possibilités d'hydroxylation. On citera le cas de l'agigénine **(87)**. Il est également enregistré une autre possibilité d'oxydation en C-2 et/ou en C-15 rencontrée chez les plantes Scrophulariaceae [44]. La digitogénine **(88)** en est un exemple (Figure II.13).



Agigénine **87**

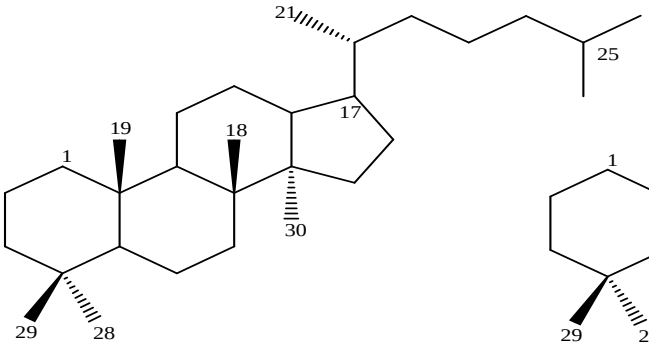


Digitogénine **88**

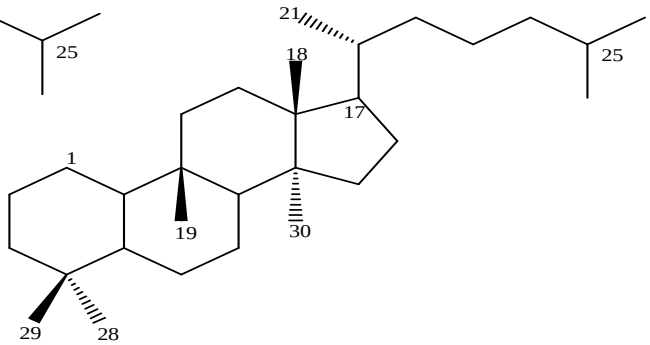
Figure II.13

II-2-2-2 Génines triterpéniques

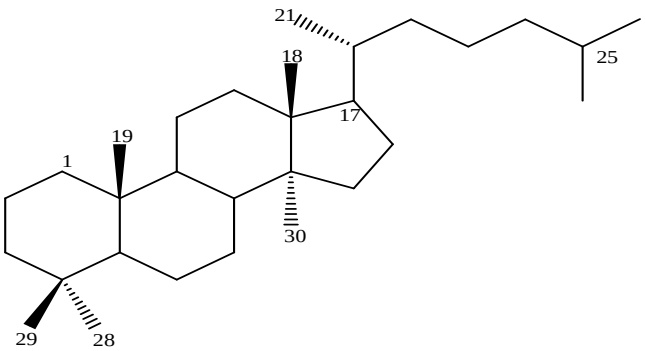
Les saponosides triterpéniques, rencontrés principalement chez les dicotylédones (Saponaire, Marronnier d'inde, Luzerne, Ginseng,….) et quelques organismes marins tels les étoiles de mer, sont de loin les plus nombreux. Leur génine à 30 atomes de carbone peut être tétracyclique (Dammarane **89**, Cucurbitane **90**, Lanostane **73**) ou pentacyclique (Oléanane **91**, Ursane **92**, Lupane **93**, Friedelane **94**, Hopane **95**) (Figure II.14) [51].



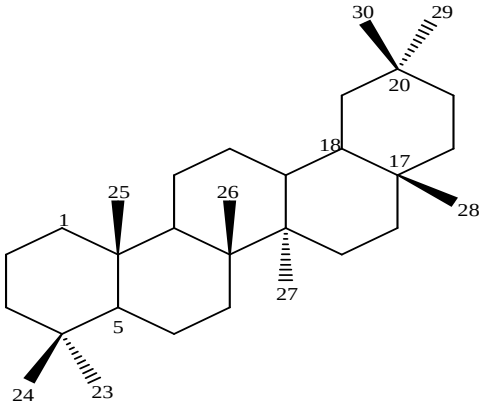
Dammarane **89**



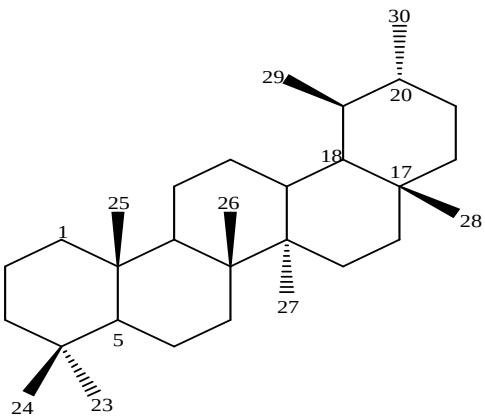
Cucurbitane **90**



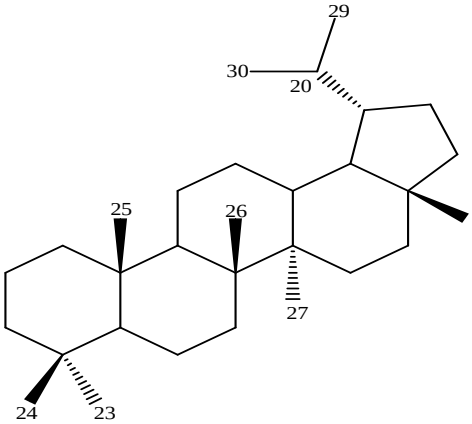
Lanostane **73**



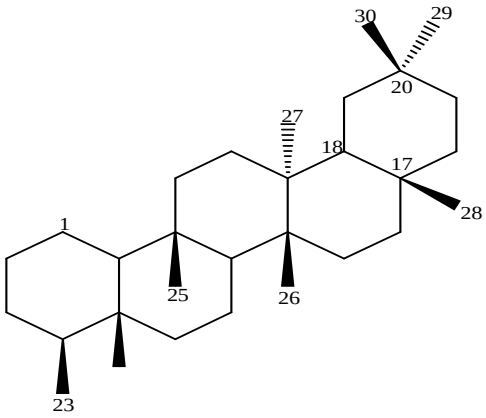
Oléanane **91**



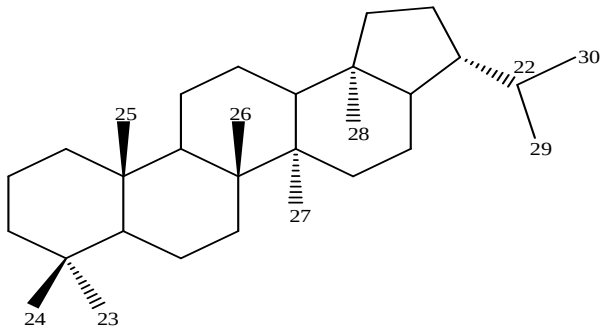
Ursane **92**



Lupane **93**



Friedelane **94**

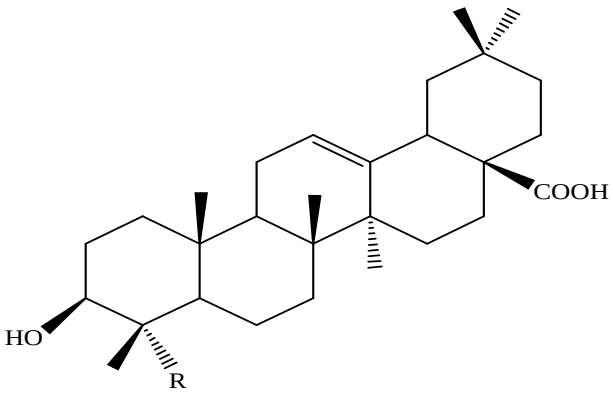


Hopane **95**

Figure II.14

Ces saponosides ont également un hydroxyle en position 3, généralement de type β et le plus souvent substitué par une chaîne osidique. Les positions C-23, C-24, C-28, C-29 et C-30 sont souvent fonctionnalisées sous forme hydroxyle, aldéhyde au acide carboxylique. De nombreux carbones peuvent être hydroxylés à l'instar des carbones C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21 et C-22. Les saponosides bidesmosidiques possèdent généralement leur seconde chaîne osidique sur l'acide carboxylique en C-28. Quelques saponosides tridesmosidiques ont aussi été isolés [52].

Plus de la moitié des saponosides isolés appartiennent au type oléanane (β-amyrine) dont le squelette oléan-12-ène (acide oléanolique **96**, hédéragénine **97**) (Figure II.15).



R= CH_3 : acide oléanolique **96**
R= CH_2OH : hédéragénine **97**

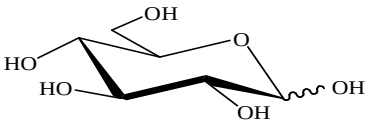
Figure II.15

II-2-2-3 Partie osidique

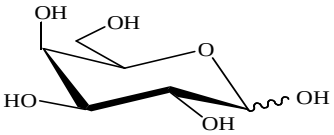
Une ou plusieurs chaînes osidiques peuvent substituer les génines triterpéniques ou stéroïdiques pour former les saponosides qui peuvent être constitués d'une à douze unités osidiques en chaîne linéaire ou ramifiée.

Les sucres les plus courants au niveau des saponosides sont les :

- hexoses :

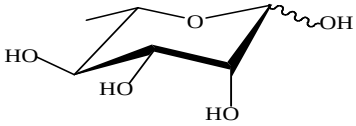


D-glucopyranose

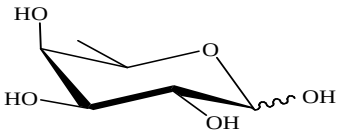


D-galactopyranose

- 6-désoxy-hexoses :

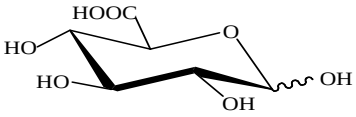


L-rhamnopyranose

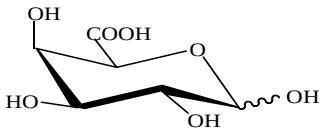


D-fucopyranose

- acides uroniques :

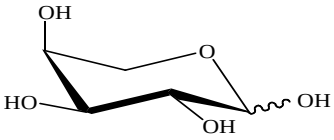


acide D-glucuronique

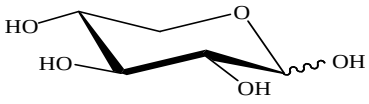


acide D-galacturonique

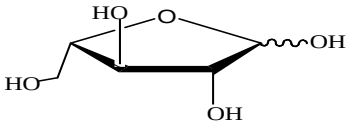
- des pentoses :



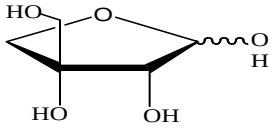
L-arabinopyranose



D-xylopyranose



L-arabinofuranose



D-apiose

La configuration anomérique de ces sucres est généralement de type β dans la série D et de type α dans la série L. La majorité des sucres se trouvent sous la forme pyrane en conformation chaise [53].

II-2-2-4 Acides organiques

Des acides organiques (Figure II.16) peuvent estérifier les hydroxyles présents sur les chaînes osidiques ou sur la génine.

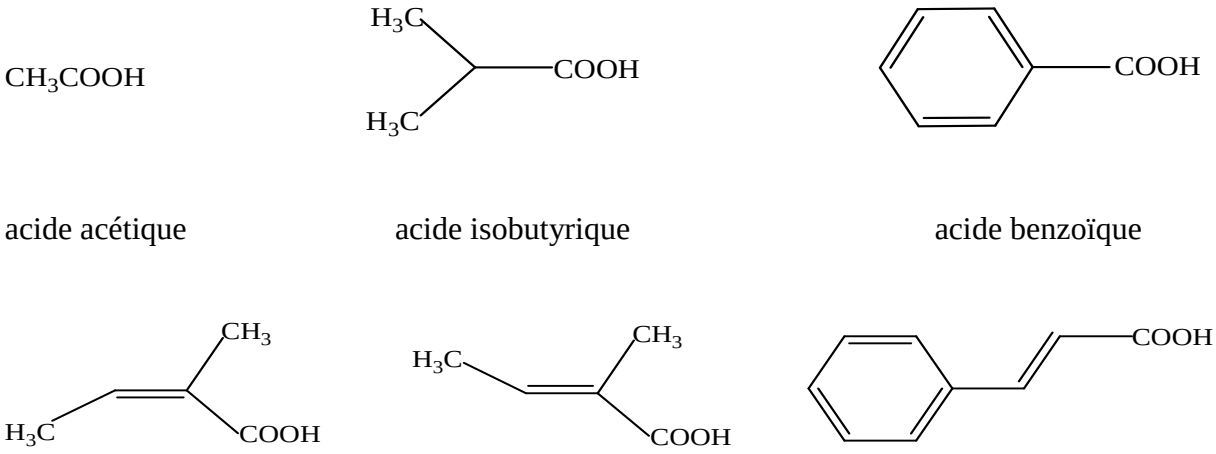


Figure II.16

II-2-3 Propriétés biologiques des saponosides

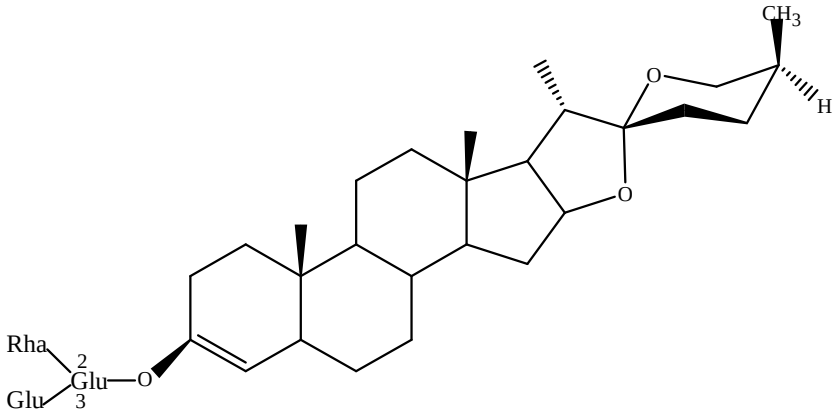
Les saponines jouent un rôle important dans la nature. Ce sont des composés à fort pouvoir hémolytique. Cette propriété dépend de la nature de la génine et du nombre d'unités osidiques. La comparaison des activités des saponines monodesmosidiques et bidesmosidiques a prouvé que les saponines monodesmosidiques sont généralement plus hémolytiques [44, 54].

Les saponines sont aussi connues par leur activité anti-fongique. Les saponines à génine stéroïdique sont des fongicides plus efficaces que les saponines à génine triterpénique [55].

Les saponines sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, particulièrement les poissons [44, 55]. Ils possèdent également des propriétés cytotoxiques [44] et anti-tumorales [44, 56].

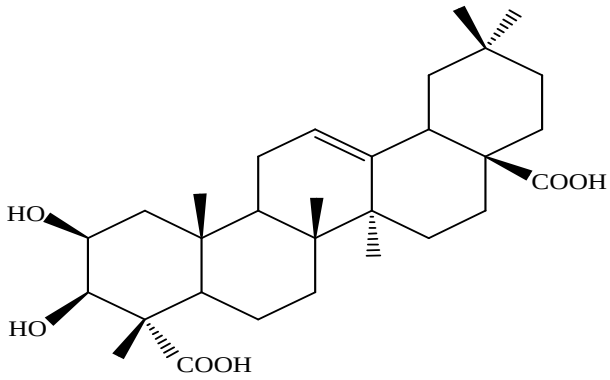
Des saponines dotées de propriétés médicinales importantes, On peut citer particulièrement :

- la dioscine **(98)**, saponine à génine stéroïdique trouvée dans certains légumes et connue pour son activité anti-fongique [57].



Dioscine **98**

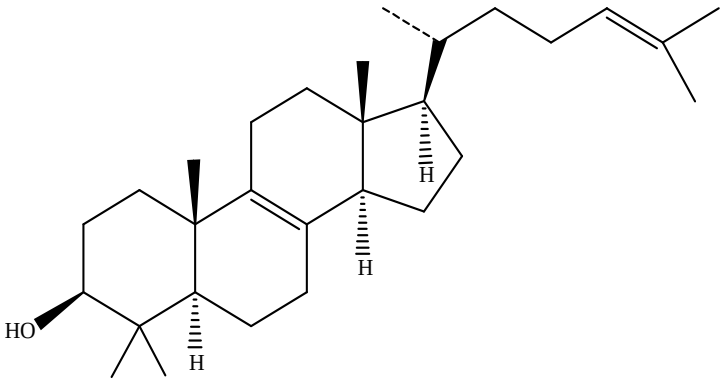
- les saponines de certaines variétés de luzerne dérivée de l'acide médicagénique **(99)**, présentent également des propriétés anti-nutritionnelles [58].



Acide médicagénique **99**

II-3 Biogénèse des stéroïdes et saponines

La biogenèse des stéroïdes est étroitement liée à celle des terpènes. Ce constat est étayé par la structure du lanostérol **(100)**, cet alcool tétracyclique trouvé en compagnie du cholestérol dans les graisses de laines, et dont les propriétés sont si proches de celles des stérols [59, 60].



Lanostérol **100**

Des expériences récentes basées sur le marquage isotopique au niveau des plantes, ont montré qu'à partir du squalène, transpolyène terpénique à 30 atomes de carbones qui s'accumule en grande quantité dans le foie de requin et de nombreux animaux ainsi que dans l'huile d'olive, débutent les synthèses de stérols d'origine végétale ou animale comme le stigmastérol, β-sitostérol, cholestérol et la vitamine D [38, 39].

Le véritable précurseur universel du squalène ainsi que tous les terpènes est l'acide mévalonique obtenu par condensation de deux molécules d'acétyl-CoA « acétate activé », suivie d'une réduction du carbonyle combiné au CoA en alcool par l'intermédiaire de NADPH, selon le processus général suivant (Figure II.17) :

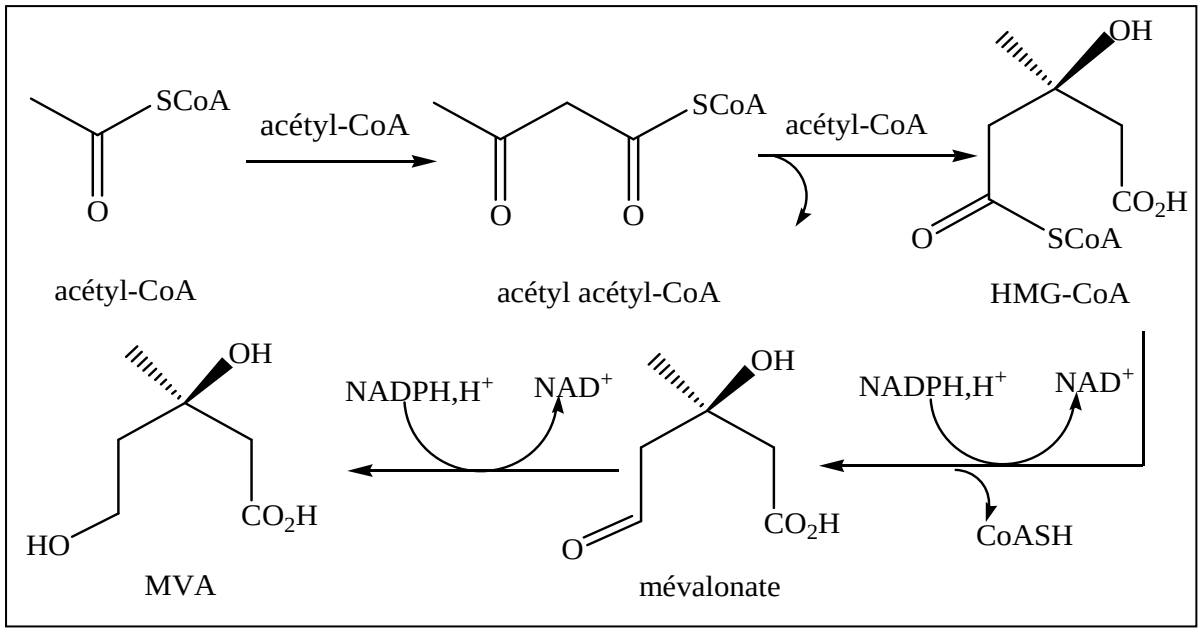


Figure II.17

L'acide mévalonique est phosphorylé par l'ATP qui lui cède en deux temps, deux groupements phosphates formant un pyrophosphate. En présence d'une nouvelle molécule d'ATP, la mévalonyle-5-pyrophosphate est convertie en pyrophosphate d'isopentényle (IPP) avec perte de CO_2, libération de phosphate et d'ADP (Figure II.18).

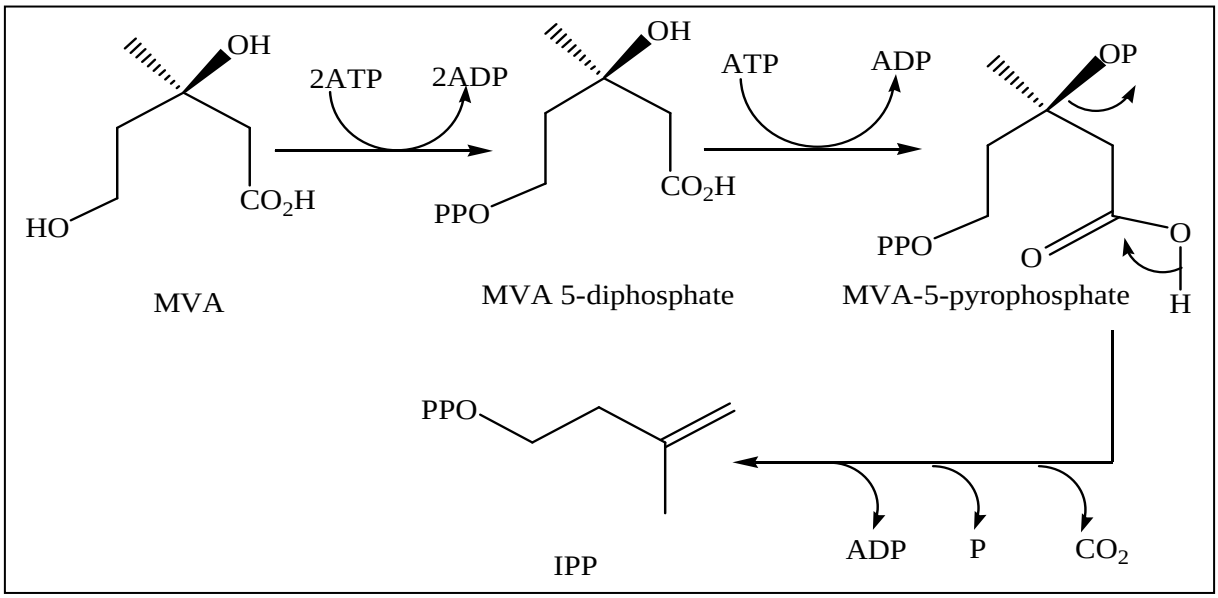


Figure II.18

Le pyrophosphate d'isopentényle s'isomérise ensuite en pyrophosphate de diméthylallyle par l'enzyme isopenténylpyrophosphate isomérase (Figure II.19).

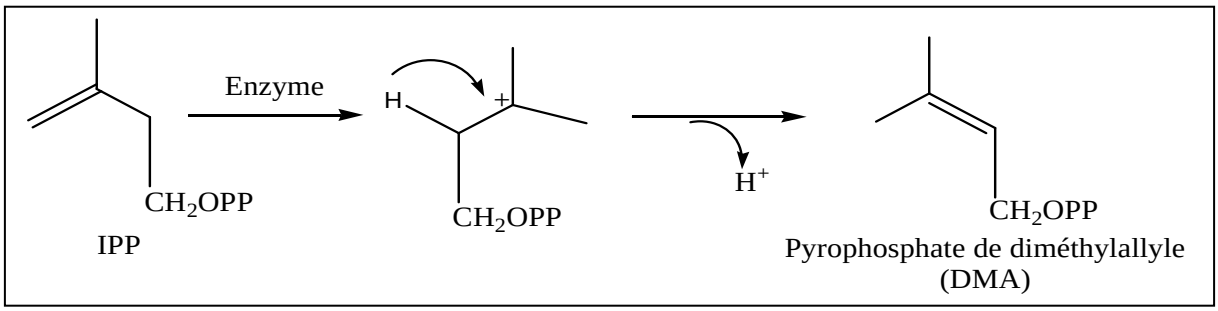


Figure II.19

La condensation tête-queue du diméthylallylpyrophosphate formé avec une nouvelle molécule d'IPP, donne le pyrophosphate de géranyle (GPP). L'addition d'une autre molécule de pyrophosphate d'isopentényle (IPP) au pyrophosphate de géranyle, conduit au pyrophosphate de farnésyle (FPP) (Figure II.20).

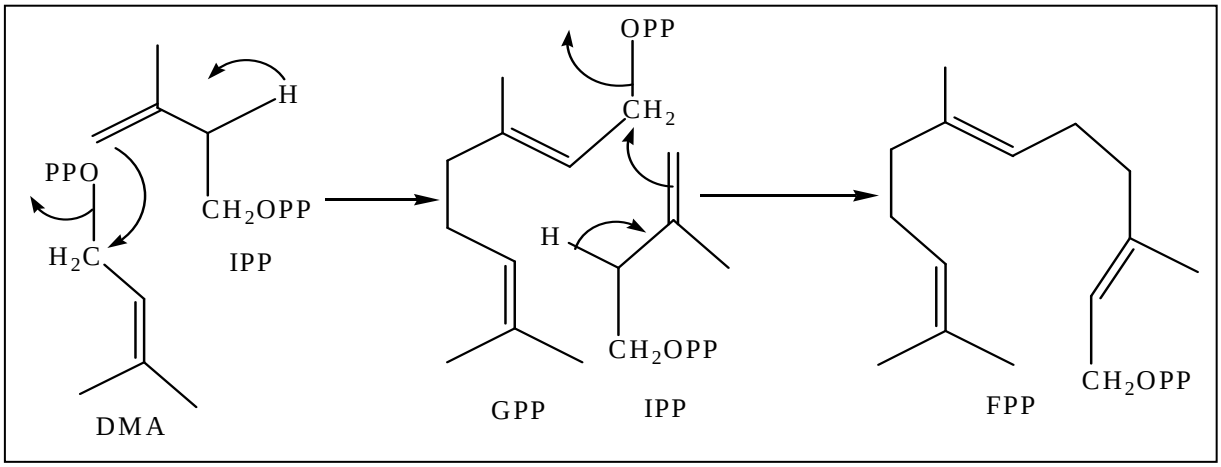


Figure II.20

La biosynthèse du squalène débute par l'enchaînement de deux molécules de FPP, en passant par le pyrophosphate alcool ou présqualène [38, 61, 62]. Cette étape nécessite toutefois l'intervention d'une enzyme spécifique appelée squalène synthétase [24] (Figure II.21).

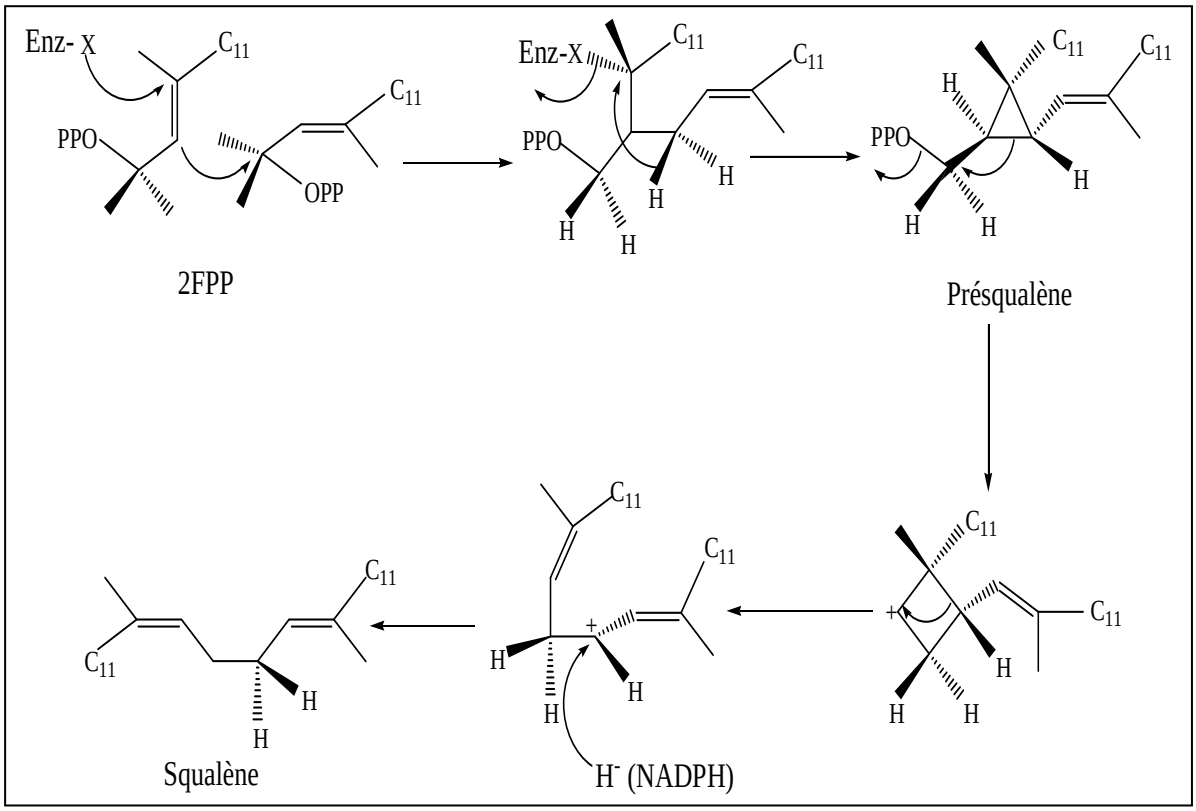


Figure II.21

Le squalène est ensuite converti par oxydation, en époxy 2,3 squalène (Figure II.22).

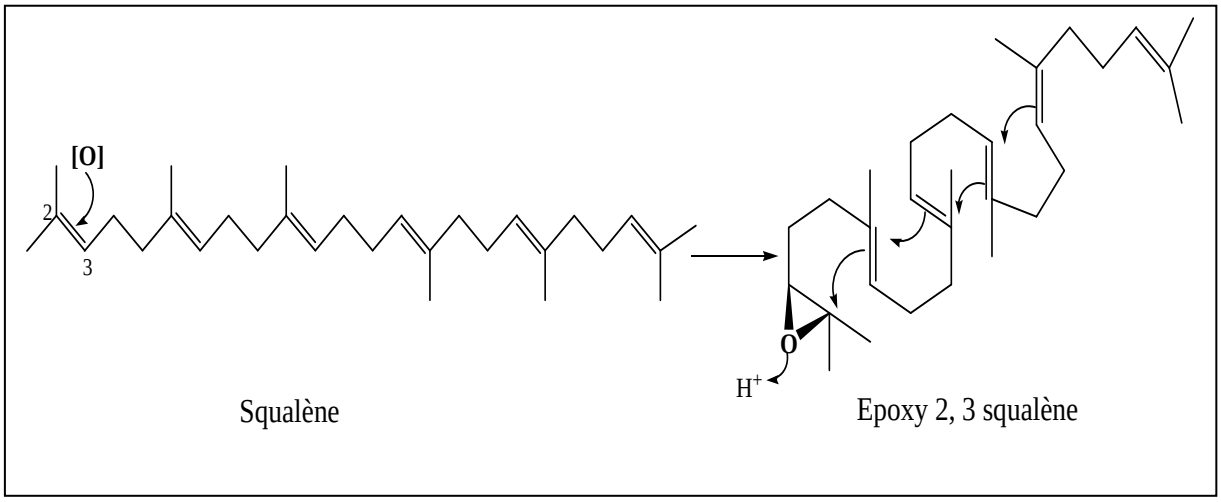


Figure II.22

L'ouverture de l'époxyde amorce la cyclisation. L'enzyme responsable de cette cyclisation stabilise la conformation du polyisoprène de telle sorte que les impératifs stéréoélectroniques soient respectés. C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme (Figure II.23) que dépend l'orientation de la biosynthèse vers les triterpènes tétra- et pentacycliques ainsi que les stéroïdes [44, 45]. Ainsi si l'époxysqualène :

- est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostanyle précurseur des cycloartanes, des lanostanes et des cucurbitanes.

- adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un autre cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut engendrer les triterpènes tétracycliques à squelettes euphane et tirucallane mais le plus souvent, il conduit aux triterpènes pentacycliques de type oléanane, ursane, lupane, multiflorane, taraxérane, taraxastane,….etc.

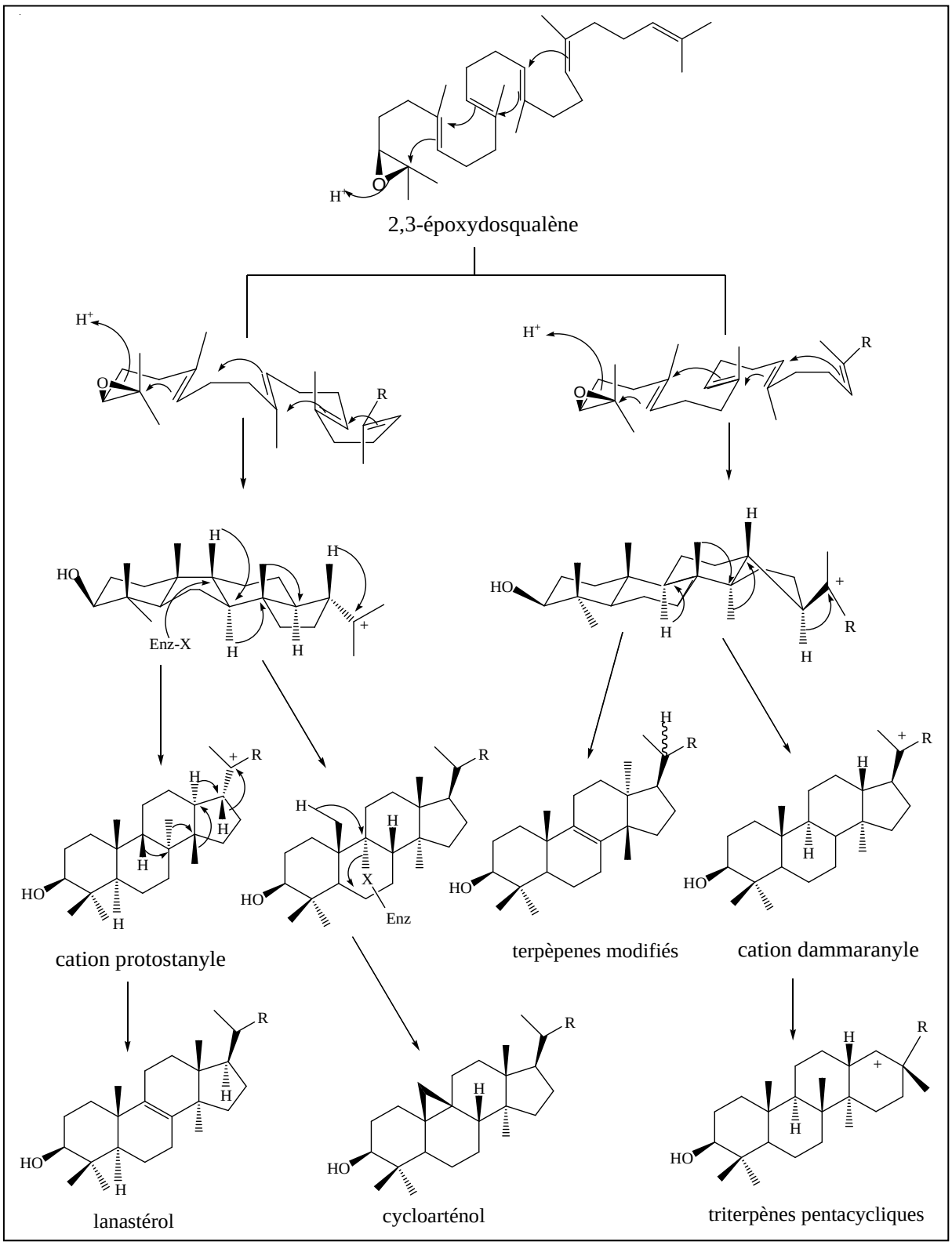


Figure II.23

L'époxy-2,3-squalène (Figure II.24) est transformé en cycloarténol chez les végétaux réalisant la photosynthèse, par l'intermédiaire du cycloeucalénol et de l'obtusifoliol. Celui-ci

conduit aux phytostérols. Par contre, chez les organismes ne réalisant par la photosynthèse (animaux, champignons, levures), l'époxy-2,3-squalène est transformé en lanostérol et zymostérol. Les levures et certains champignons convertissent ce dernier en ergostérol, alors que les animaux supérieurs et les invertébrés le transforment en cholestérol. Les végétaux chlorophylliens ou non, synthétisent aussi du cholestérol probablement à partir du cycloarténol et par l'intermédiaire du lanostérol [24, 38, 64].

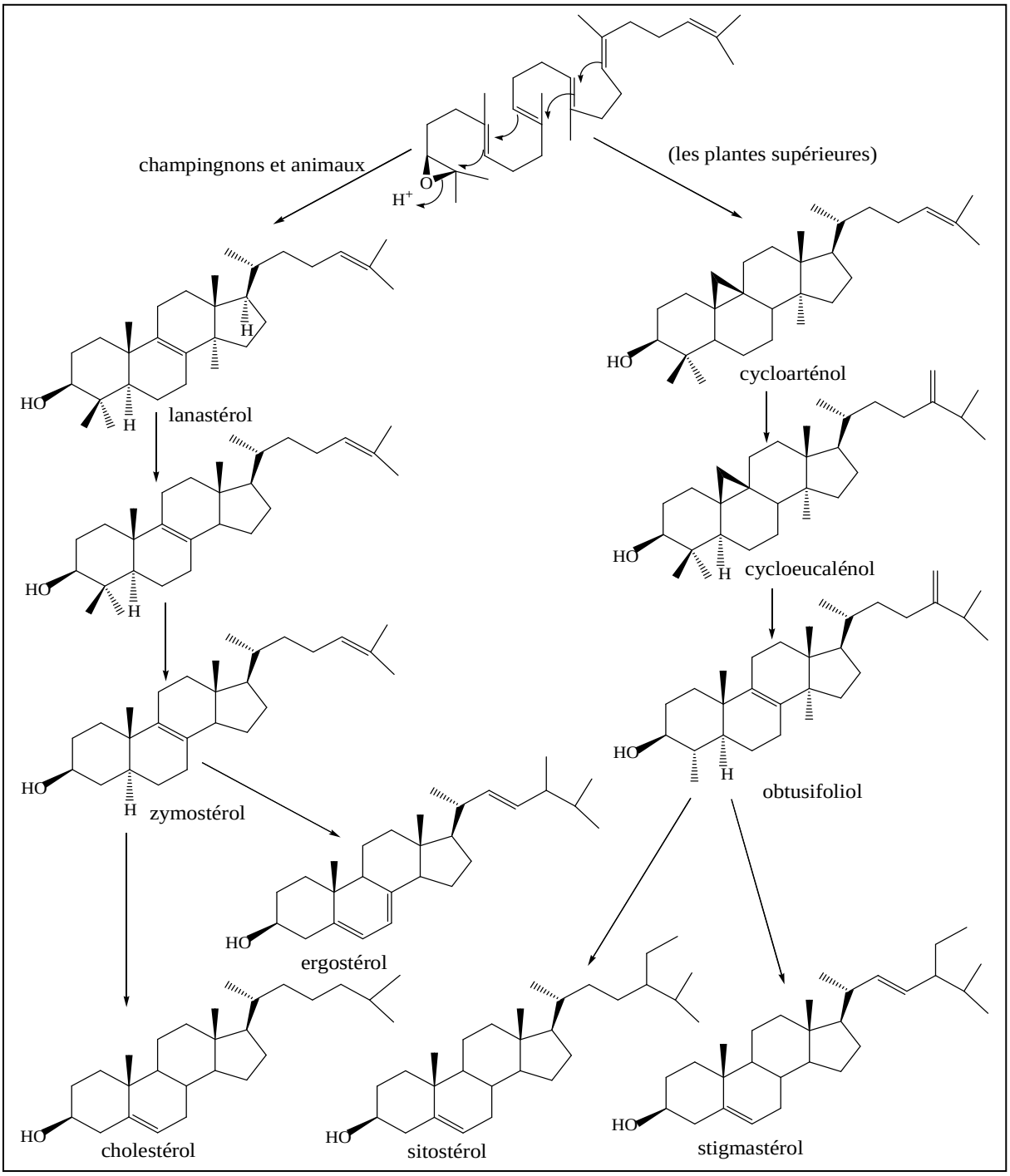
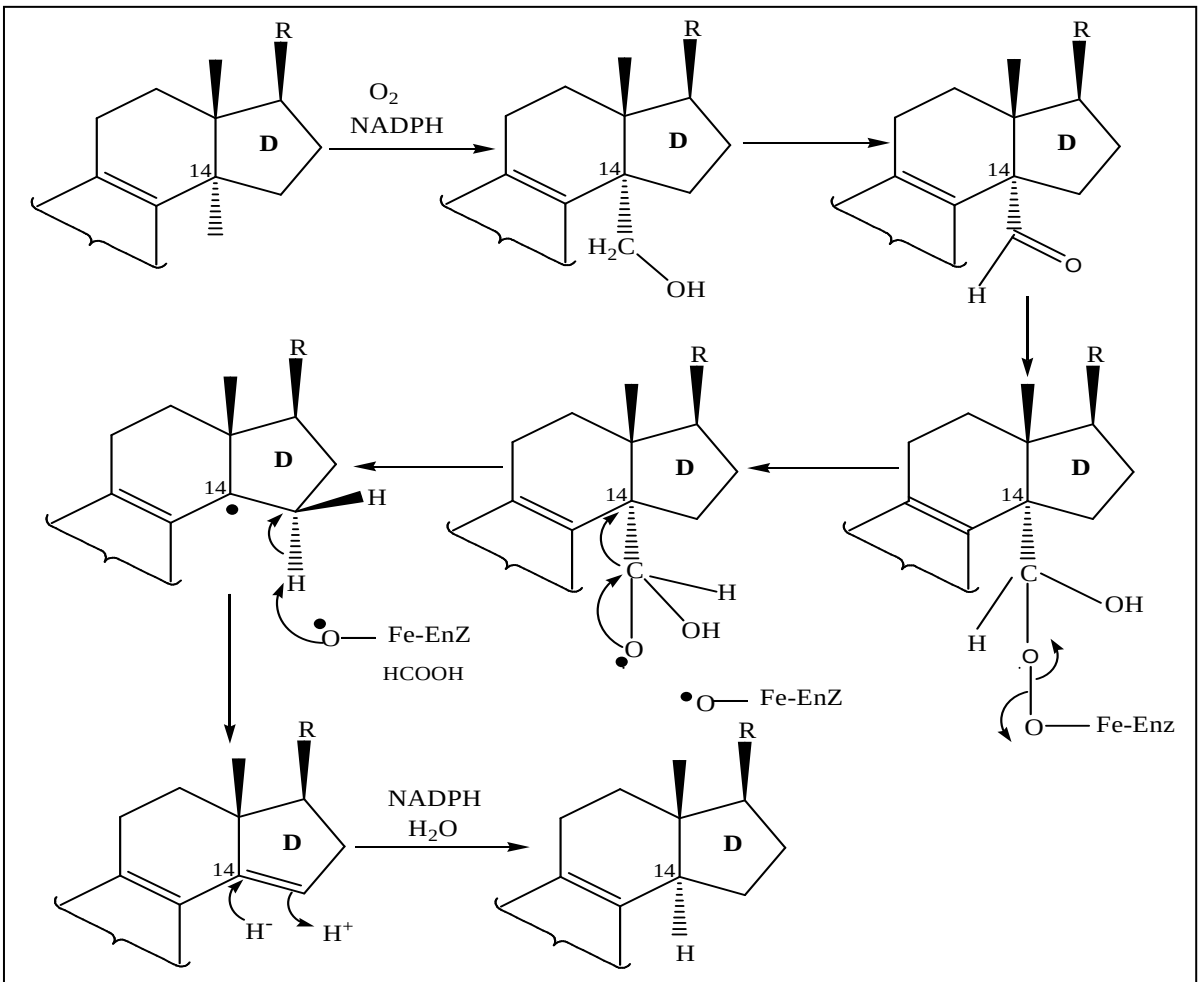


Figure II.24

Le passage d'un squelette à 30 atomes de carbone tels le cycloarténol ou le lanostérol, à un squelette à 27 atomes de carbones ou moins, c'est-à-dire aux stéroïdes ou stérols, implique une déméthylation progressive en C-14 et en C-4, une rupture du cyclopropane et un déplacement de la double liaison engendrée par cette rupture. Le méthyle en C-14 est le premier qui doit être éliminé après oxydation sous forme d'acide formique. Les deux méthyles en C-4 sont transformés par une suite d'oxydations $CH_3 \rightarrow CH_2OH \rightarrow CHO \rightarrow COOH$ se terminant par une décarboxylation facilitée par une oxydation préalable de l'hdroxyle en C-3, conduisant à un α-cétoacide (Figure II.25 et 26).



Elimination du méthyle en C-14

Figure II.25

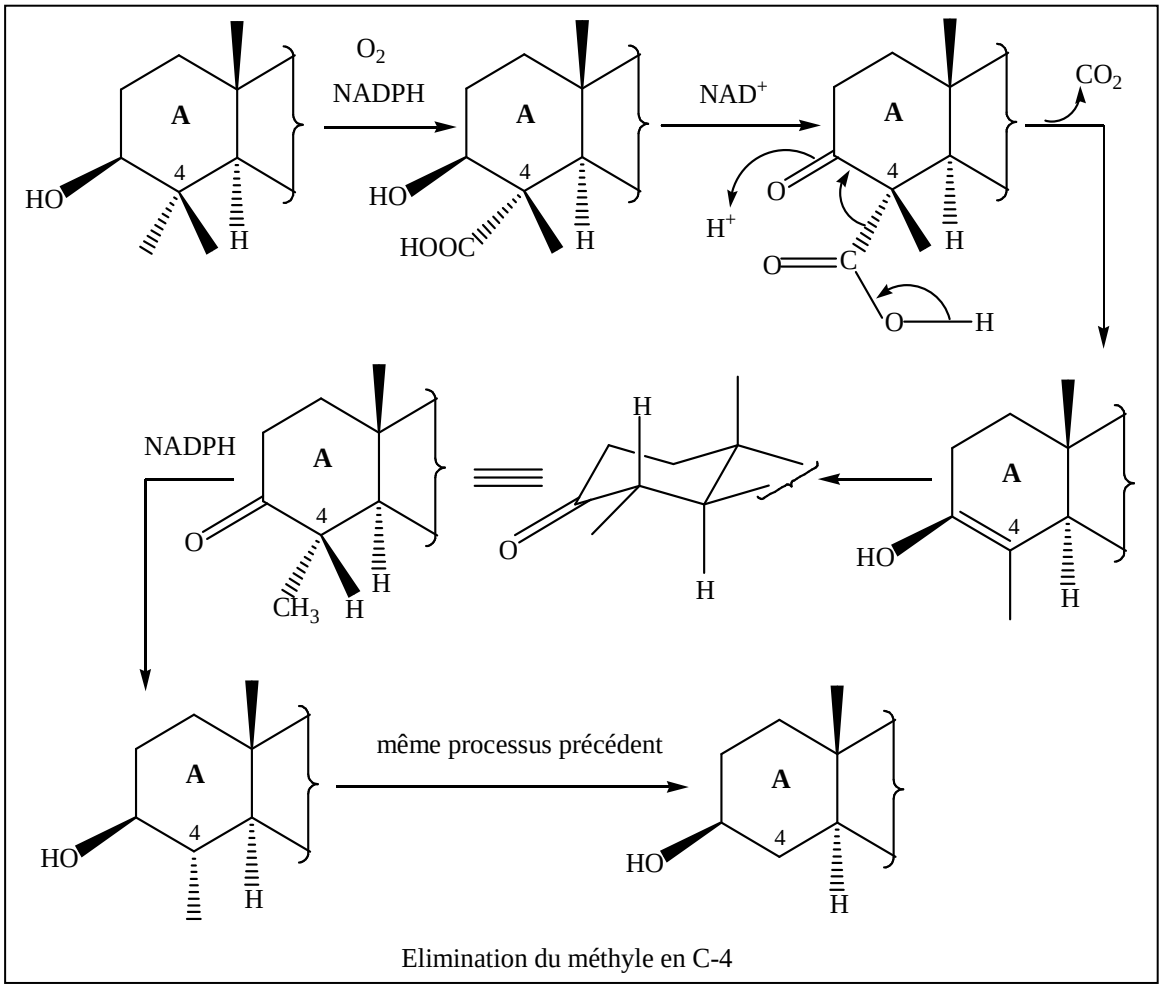


Figure II.26

L'ouverture du cyclopropane, suite à l'attaque d'un nucléophile enzymatique, engendre une double liaison en position $\Delta^{8,9}$ comme il est illustré par la figure II.27.

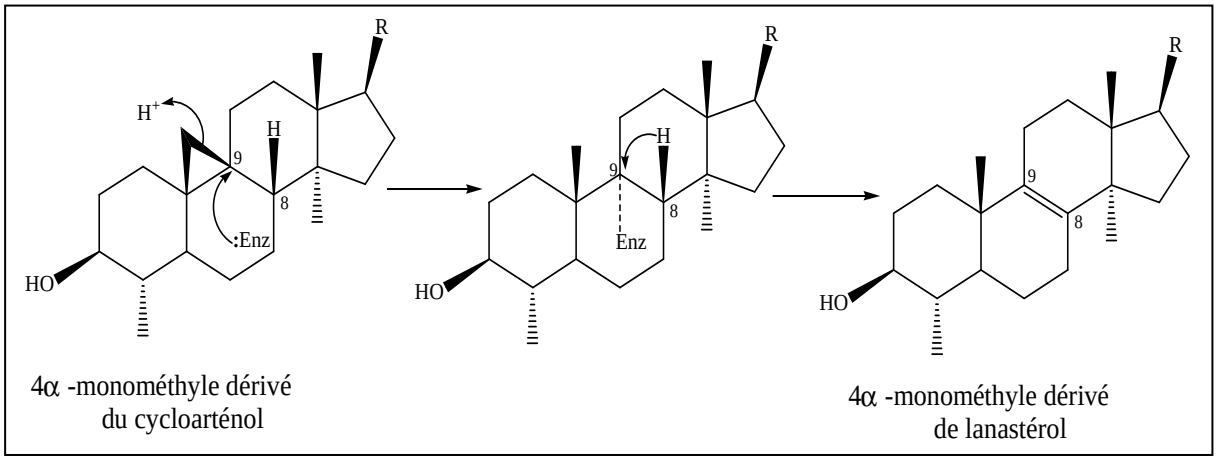


Figure II.27

La double liaison engendrée par la rupture du cyclopropane, subit un déplacement vers la position $\Delta^{5,6}$ comme il est représenté dans la Figure II.28.

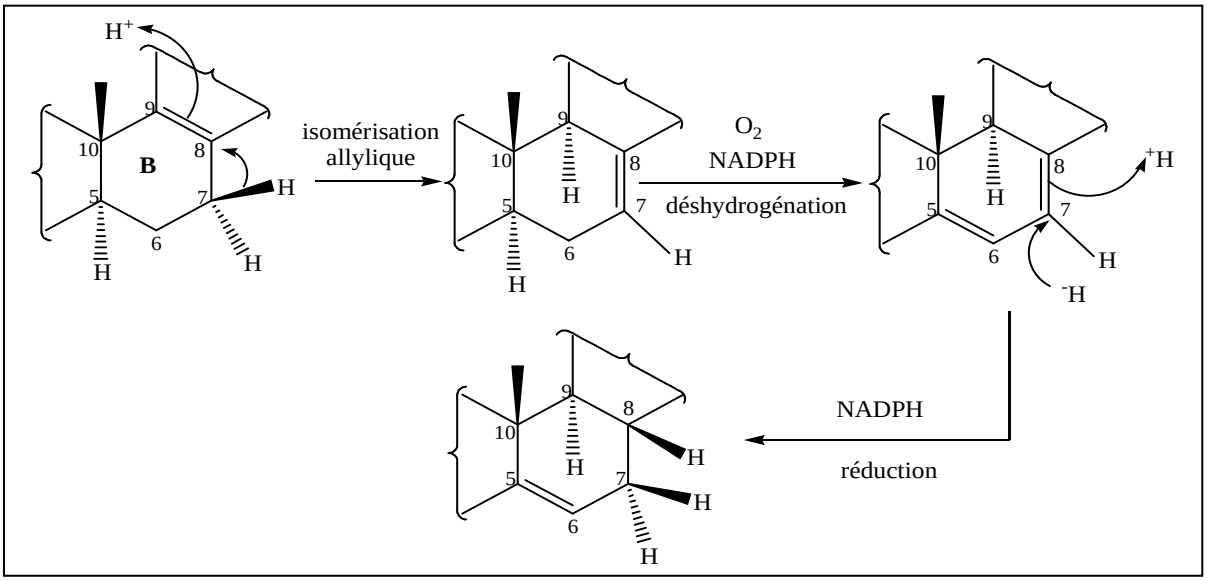
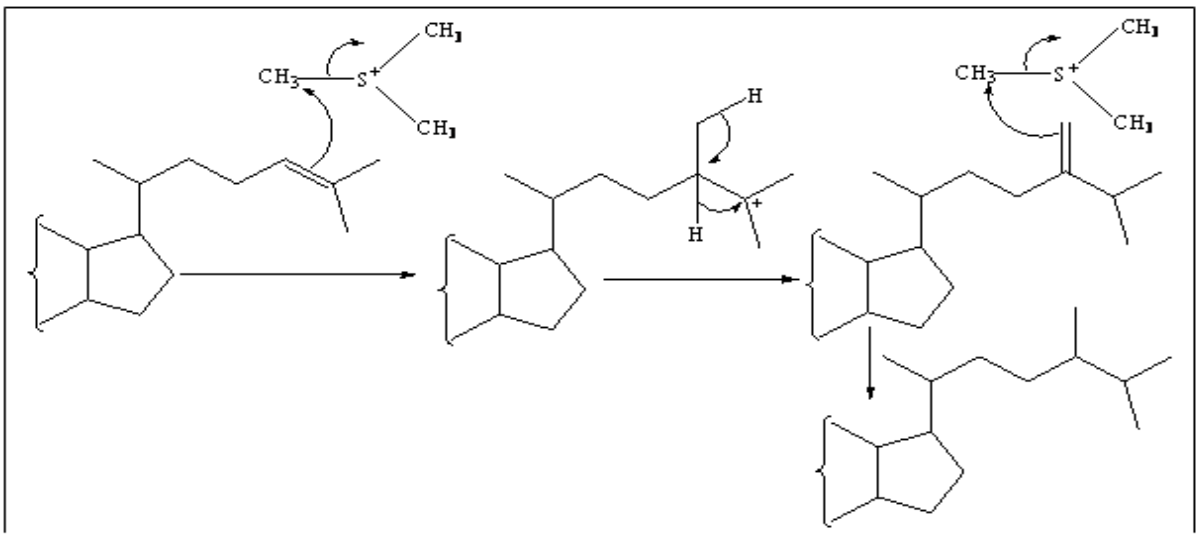


Figure II.28

La chaine latérale des stéroïdes, particulièrement les phytostérols, peut avoir un ou deux carbones supplémentaires fixés en C-24, soit sous forme d'un groupe méthyle ou méthylène, soit sous forme éthyle ou éthylène. L'introduction de ces carbones supplémentaires au niveau de la chaîne latérale, se fait par méthylation impliquant la S-adénosylméthionine [44, 65, 66], comme il est indiqué dans la figure II.29.



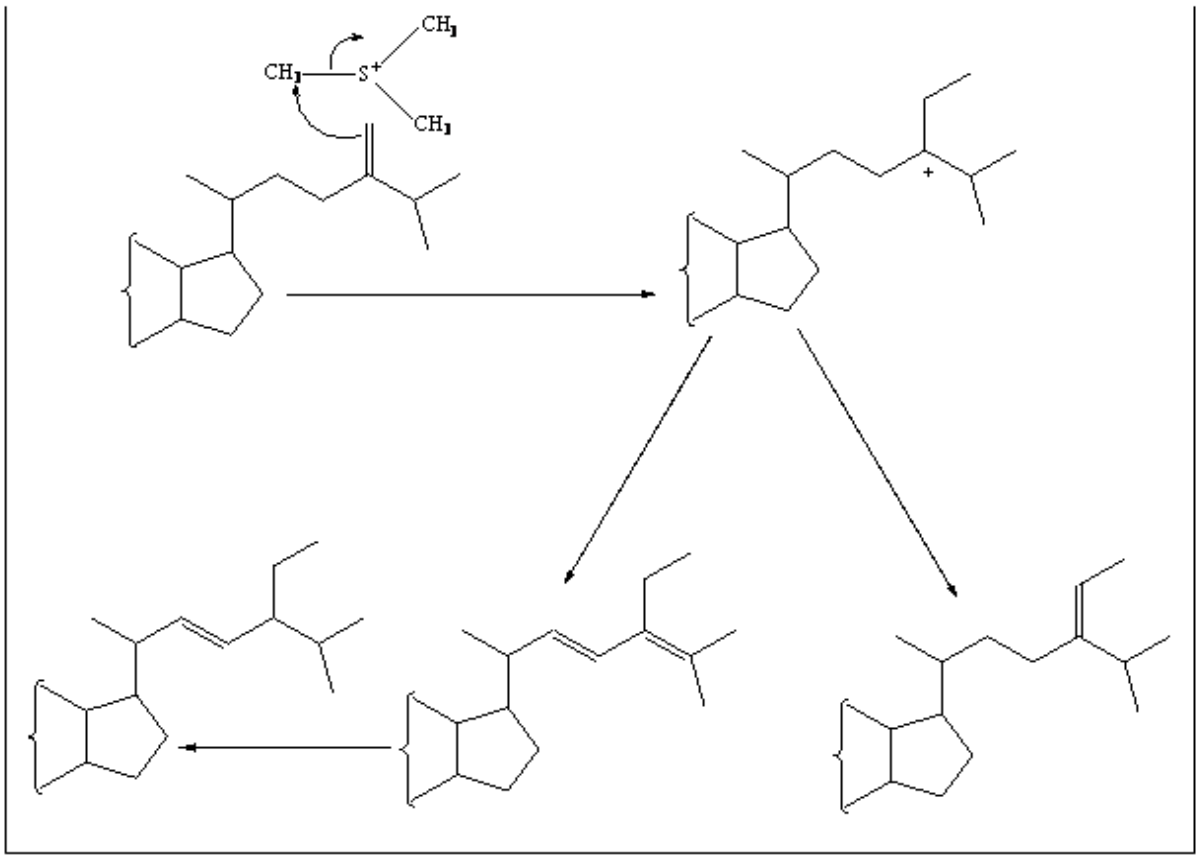


Figure II.29

Il apparaît, à la lumière des études biosynthétiques réalisées, que la génine et la partie osidique des stérols glycosylés ou saponines, sont synthétisées séparément puis combinées entre elles par l'action d'une enzyme spécifique appelée glycosyltransférase qui s'avère indispensable pour cette combinaison [43, 64, 67].

Chapitre III

Résultats et discussion

III-1 Extraction

III-1-1 Matériel végétal

930 g de matériel végétal constitué par les parties aériennes de *Odontospermum pygmaeum*, préalablement séchés et pulvérisés, sont mis à macérer dans de l'éther de pétrole (2x5L) pendant quatre jours. Après filtration et évaporation à sec du solvant, 15,5 g d'extrait étheropétrolique ont été obtenus (rdt 1,66 %). Le résidu obtenu est de nouveau mis à macérer dans de l'acétate d'éthyle (2x5L) pendant quatre jours. La filtration du mélange et l'évaporation totale du solvant ont donné 6 g d'extrait acétate d'éthyle (rdt 0,64%). Enfin la macération des résidus récupérés dans le méthanol (2x5L) pendant quatre jours, la filtration puis l'évaporation du solvant, ont permis d'obtenir 28 g d'extrait méthanolique (rdt 3,01%).

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma III. 1 ci-dessus.

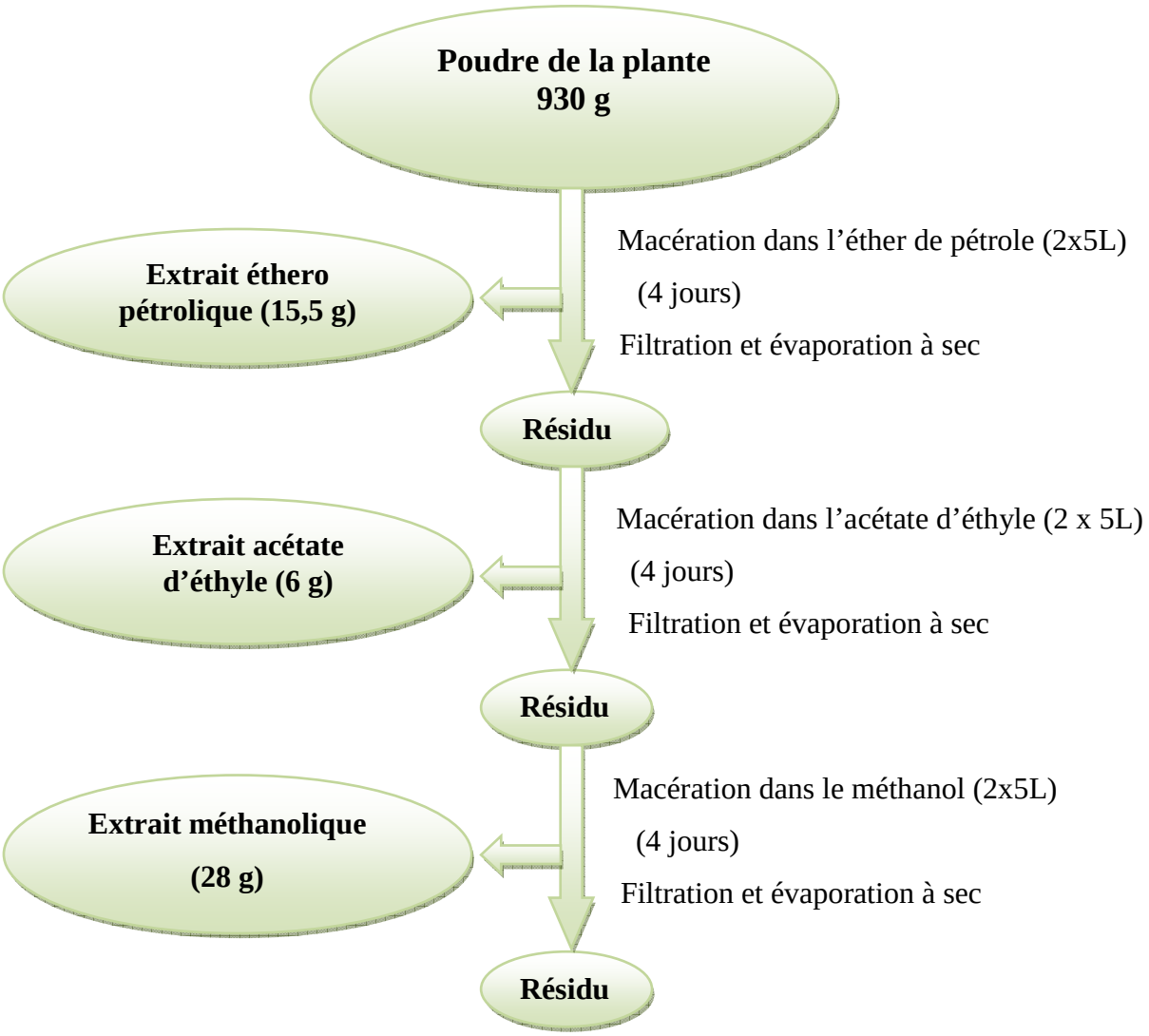


Schéma III.1 : Protocole d'extraction de *O. pygmaeum*

III-1-2 Séparation et purification

Les trois extraits obtenus ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques CCM ont été examinées sous la lumière UV (254 et 366 nm). La révélation a été réalisée au moyen d'une solution à l'acide sulfurique puis chauffage.

III-1-3 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

6 g de l'extrait acétate d'éthyle sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC), au moyen d'un mélange de solvants éther de pétrole/acétate d'éthyle à différents gradients (100/0 à 0/100), puis un mélange acétate d'éthyle/méthanol (99/1 à 0/100). Ceci a permis de collecter onze fractions allant de F1 à F11.

La fraction F9 d'une masse 457 mg est mise à chromatographie sur une colonne de gel de silice. L'élution est menée par un mélange $CHCl_3$/MeOH à différents gradients (100-0 à 97-03). 5 fractions sont ainsi récupérées allant de F'1 (1-45) à F'5 (100-133). La recristallisation de la fraction F'5 (100-133) d'une masse de 28 mg dans l'acétone, a permis d'obtenir le produit **OP4** à l'état pur (22 mg)

III-1-4 Fractionnement de l'extrait méthanolique

10 g de l'extrait méthanolique sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC), en utilisant un mélange eau/méthanol à différents gradients (90/10 à 0/90). 19 fractions de 100 ml ont été collectées.

L'examen en chromatographie sur couche mince CCM aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm puis révélation et chauffage, a permis de rassembler les fractions similaires. Cet examen a permis de recueillir 9 fractions (F1 à F9).

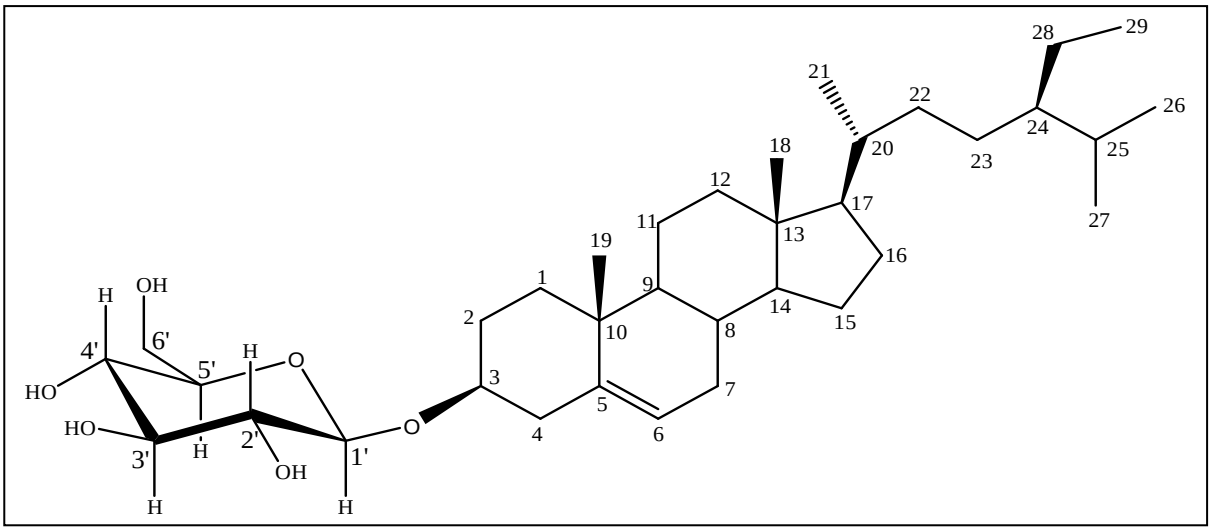
La recristallisation de 10 mg de la fraction F8 dans le méthanol a donné le produit **OP15** à l'état pur (6 mg).

La masse restante de la fraction F8 nommée F8' (160 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est menée dans un mélange chloroforme/méthanol à différents gradients (100-0 à 0-10), puis dans le méthanol pur. Ce fractionnement a donné 20 fractions allant de F1 (1-6) à F20 (149-155).

La fraction F5 (34-36) a permis d'obtenir le produit **OP16** à l'état pur (10 mg).

III-2 Détermination de structure des composés isolés

III-2-1 Elucidation structurale du composé OP4



3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol

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

Les spectres de masse ESI du composé **OP4** enregistrés en modes positif (Figure III.1) et négatif (Figure III.2), présentent respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à *m/z* = 599 $[M+Na]^+$ et 575 $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 576 uma et une formule brute en $C_{35}H_{60}O_6$.

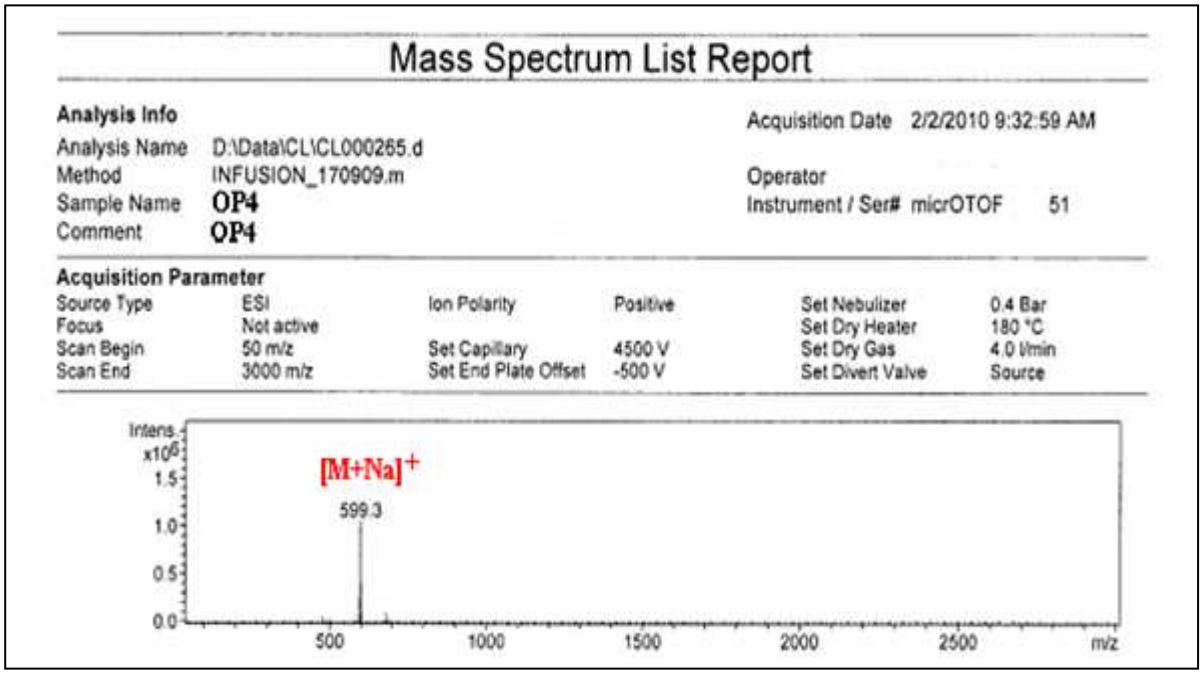


Figure III.1 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé OP4

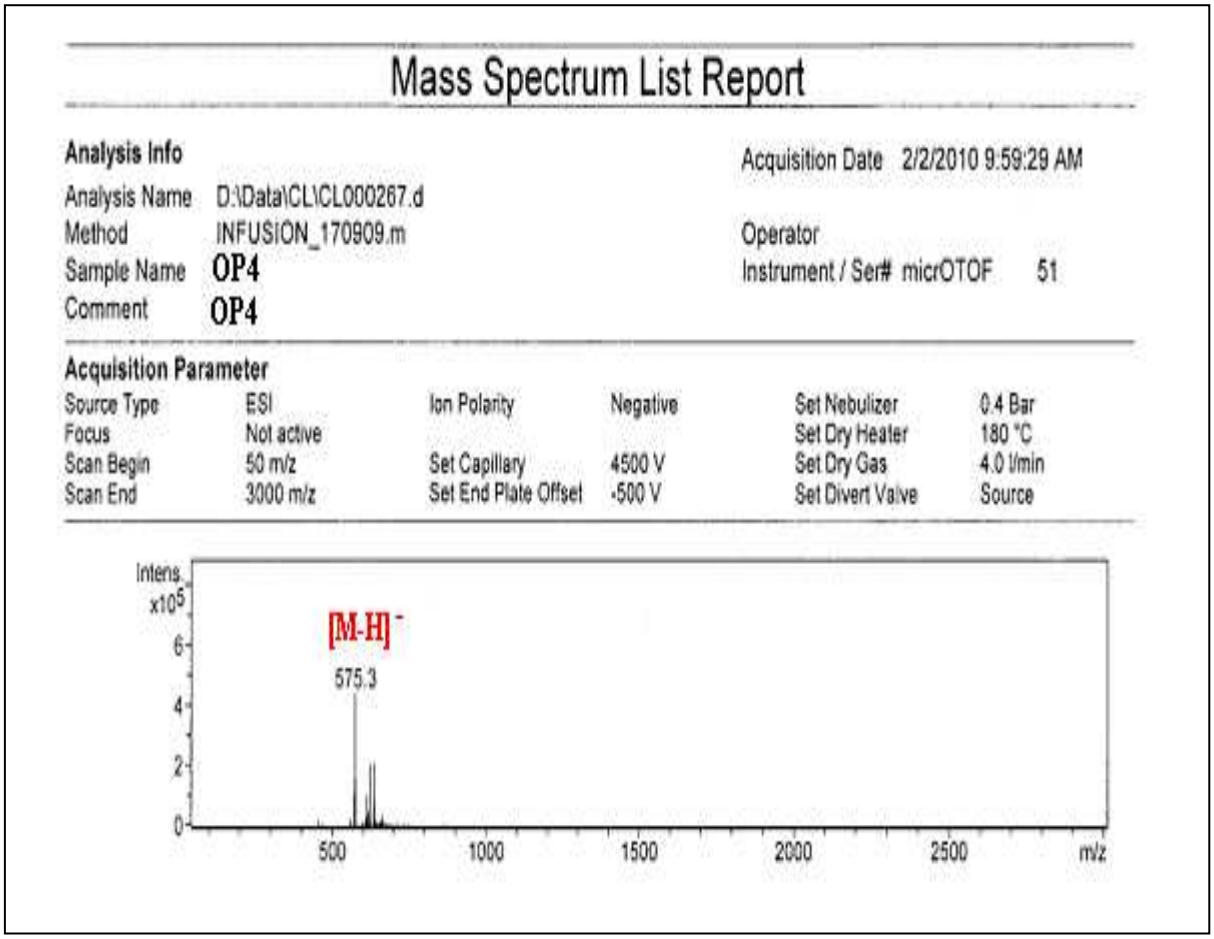


Figure III.2 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé OP4

Le spectre RMN ^{1}H de ce composé (Figure III.3) montre des signaux à champ fort sous forme multiplet, doublet et singulets d'intégration 3H chacun, résonant dans une région allant de 0,70 à 1,03 ppm, caractéristiques de protons méthyliques. Il montre aussi un signal sous forme doublet large d'intégration 1H à 5,37 ppm (J = 4,8 Hz) caractéristique d'un proton oléfinique, ainsi qu'un signal multiplet d'intégration 1H repéré à 3,59 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxydé. Ce premier constat permet d'avancer pour notre composé un squelette stéroïdique. L'observation de plusieurs signaux entre 3 et 4,5 ppm de protons osidiques ainsi que d'un signal doublet résonant à 4,41 ppm (d, J = 7,8 Hz, 1H) caractéristique d'un proton anomère de sucre, indique qu'on est en présence d'une saponine stéroïdique, plus exactement un stérol monoglycosilé.

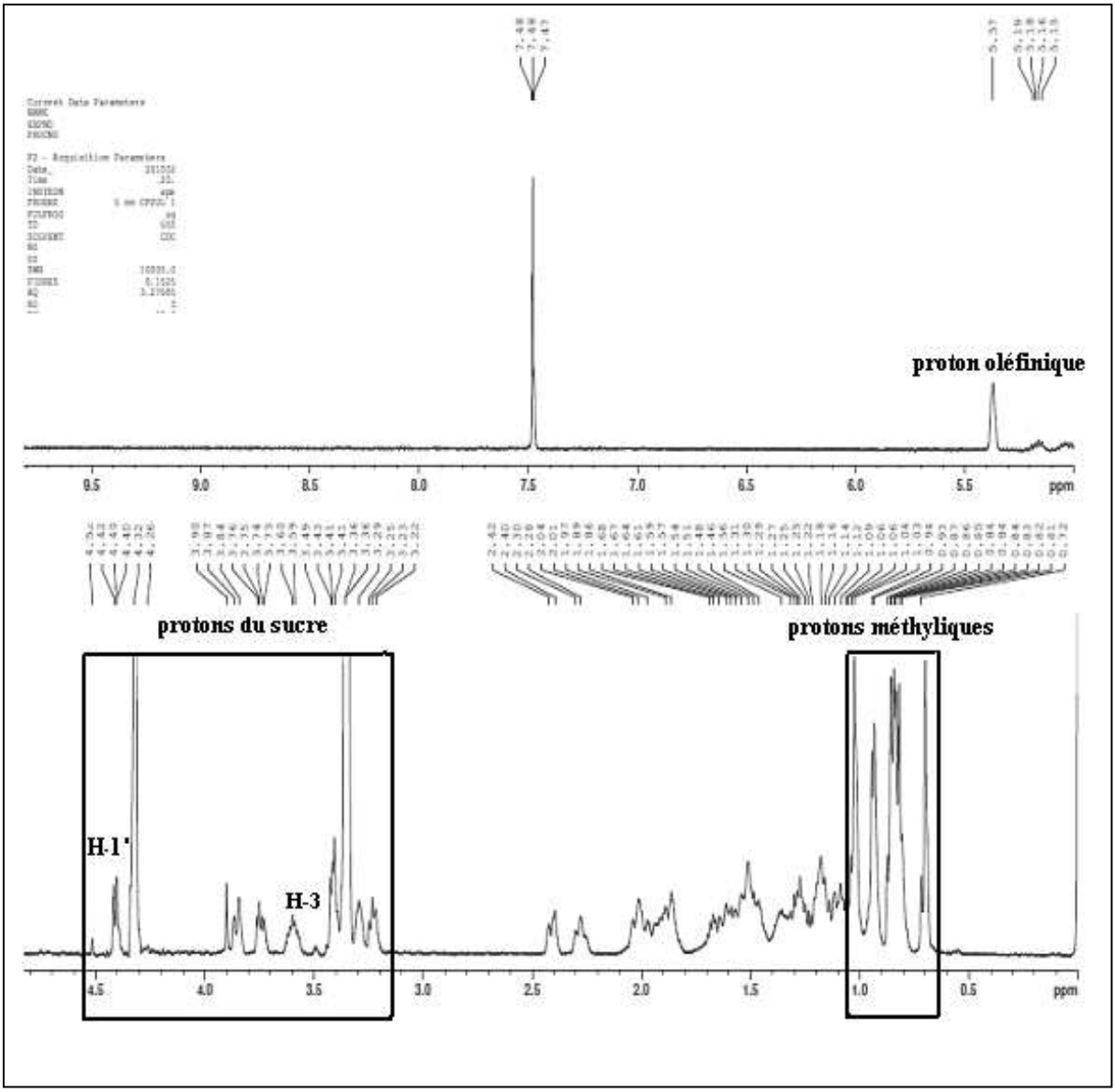


Figure III.3 : Spectre RMN ^{1}H du composé OP4

Le spectre RMN ^{13}C confirme cette hypothèse (Figure III.4). En effet, il est clairement observé les signaux des six groupements méthyles apparaissant dans la zone allant de 12,07 à 19,9 ppm, deux signaux résonant à 122,4 et 140,7 ppm correspondant aux 2 carbones (C-H et quaternaire) du système oléfinique et enfin un signal repéré à 79,4 ppm indiquant la présence d'un carbone oxydé (CH-O). Tous ces signaux sont très caractéristiques d'un stérol constituant la partie aglycone ou génine de notre composé. La partie monoglycosilée se trouve confirmée par la présence d'un seul signal de carbone anomère résonant à 101,5 ppm et de cinq signaux de carbones osidiques entre 60 et 76,9 ppm.

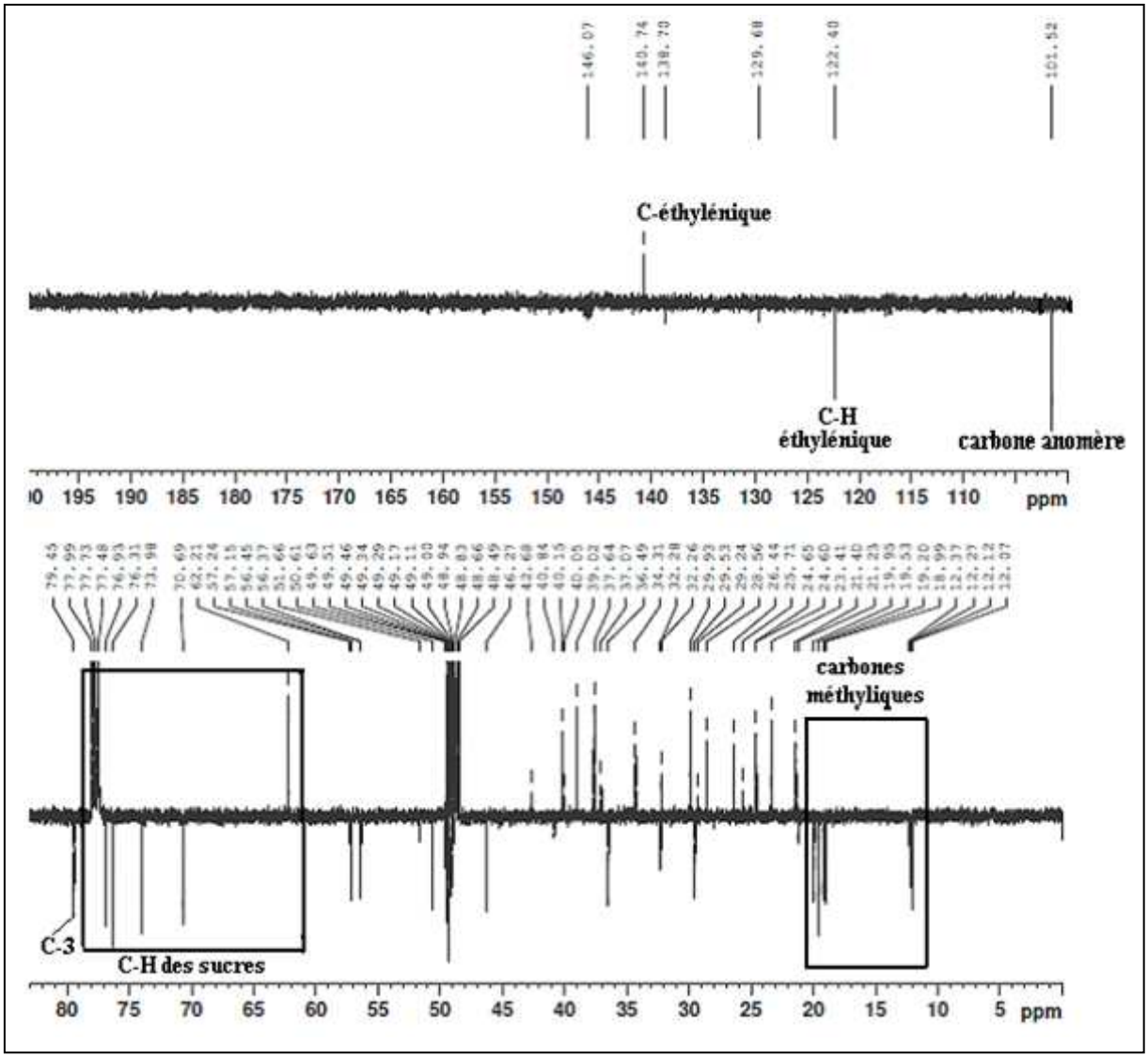
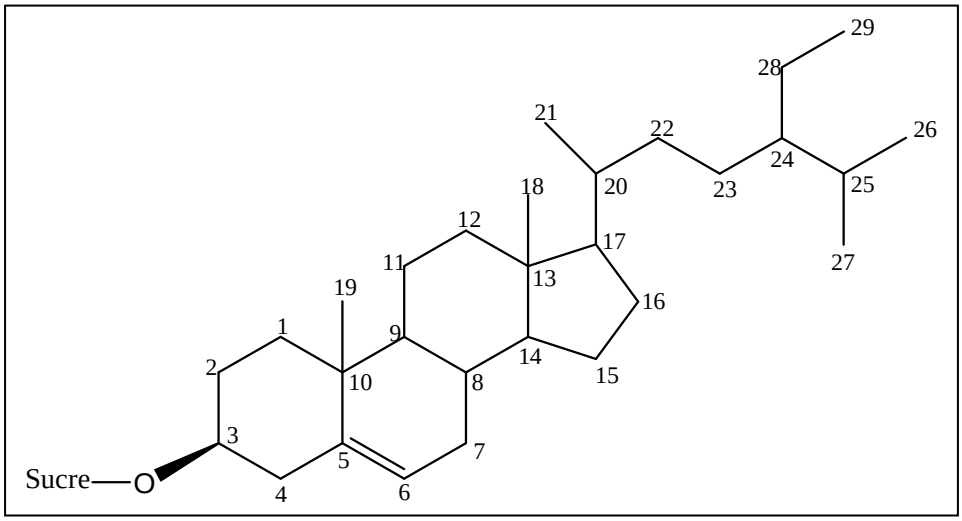


Figure III.4 : Spectre RMN ^{13}C en *J*-modulé du composé OP4



Squelette d'un stérol monoglycosylé

III-2-1-1 Identification de la partie aglycone

L'identification du stérol constituant la génine peut être réalisée par expérience HMBC (Figure III.5, III.5-1 et III.5-2) et cela par analyse des corrélations longue distance, notamment à partir des groupements méthyles. Ainsi le méthyle-19 apparaissant à 1,02 ppm (3H, *s*, H-19) est le seul à corréler avec le carbone oléfinique quaternaire résonant à 140,7 ppm ne pouvant être que le carbone C-5. Il couple également avec le carbone secondaire C-1 (δ_C 37,6), le carbone quaternaire C-10 (δ_C 37,07) et enfin le carbone méthine C-9 (δ_C 50,6).

Les groupements méthyles Me-26 et Me-27 sortant respectivement à δ_H 0,83 (3H, *m*, H-26) et δ_H 0,84 (3H, *m*, H-27) sont identifiés sur la base de leur corrélation commune avec les carbones méthines C-25 et C-24 repérés respectivement à 29,5 et 46,2 ppm. Ce dernier présente un couplage avec un signal multiplet résonant à 0,85 ppm attribué logiquement au groupement méthyle Me-29 du stérol. Partant des protons constituant ce dernier groupement, on identifie un carbone secondaire sortant à 23,4 ppm attribuable au carbone C-28.

Les signaux de protons méthyliques Me-18 résonant à 0,70 ppm (3H, *s*, H-18) corrèlent avec le carbone secondaire C-12 (δ_C 40,1), le carbone quaternaire C-13 (δ_C 42,6) et les carbones tertiaires C-14 (δ_C 57,1) et C-17 (δ_C 56,4). Ce dernier a été identifié sur la base de son couplage en $^3J_{C\text{-}H}$ aussi avec les protons méthyliques Me-21 repérés à 0,93 ppm (3H, *d*, *J* = 6,4 Hz). Ceux-ci couplent également avec les carbones C-20 (δ_C 36,4) et C-22 (δ_C 34,3).

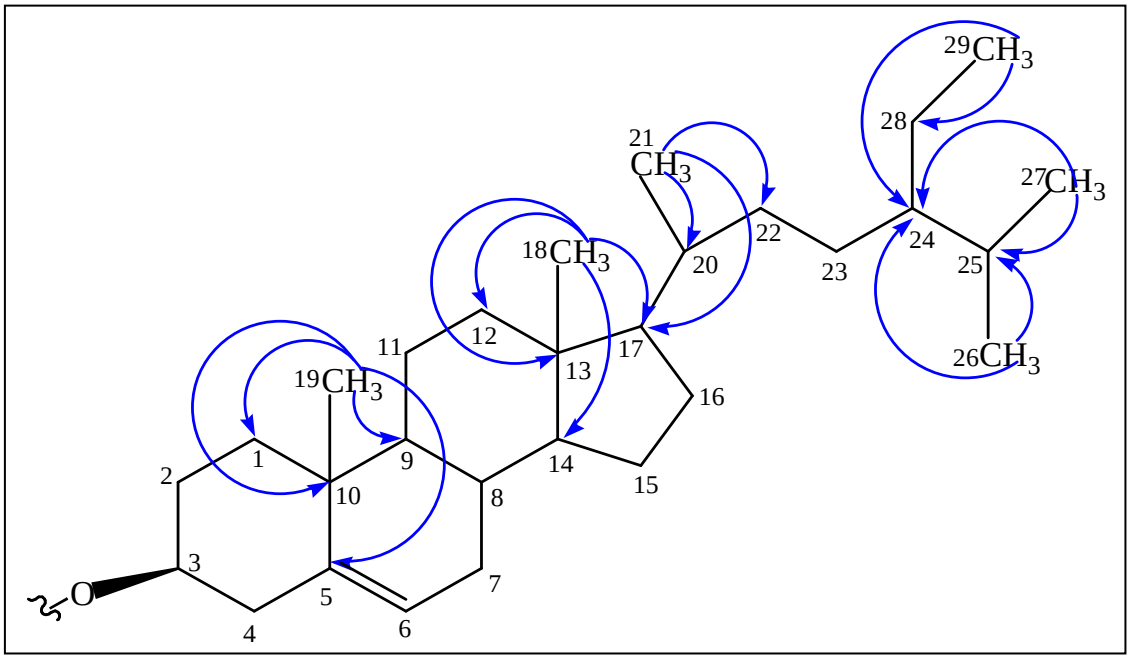


Figure III.5 : Principales corrélations HMBC observées pour la partie aglycone du composé OP4

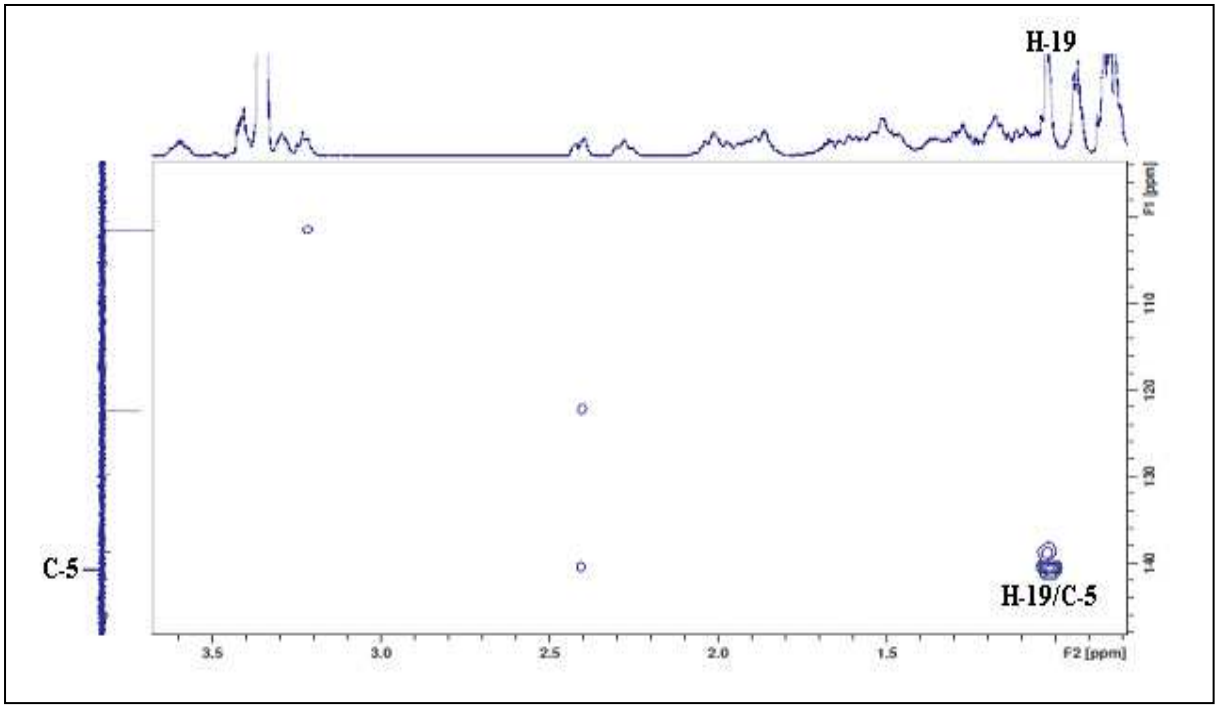


Figure III.5-1: Spectre HMBC du composé OP4

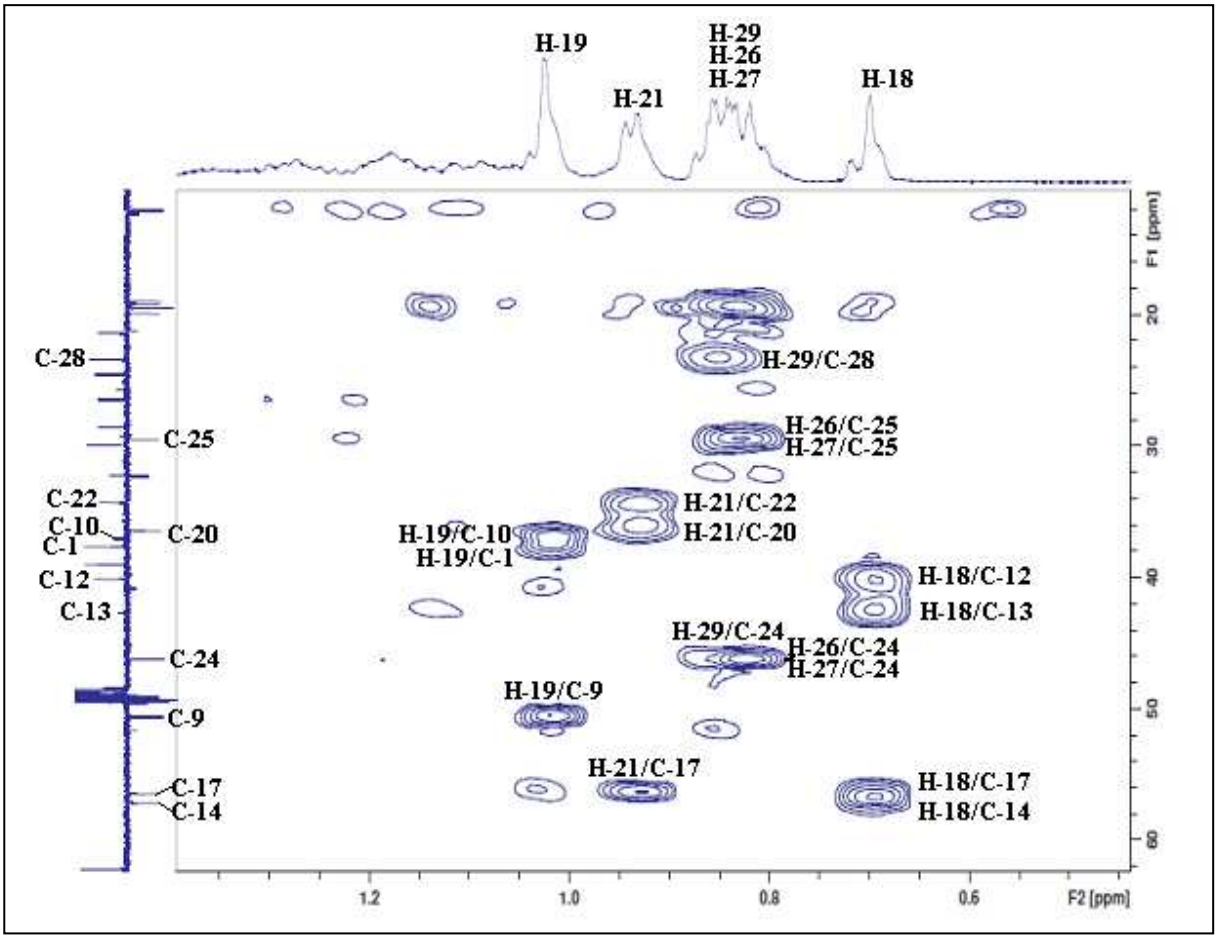


Figure III.5-2 : Spectre HMBC du composé OP4

Les autres carbones de la génine sont identifiés par l'analyse combinée des deux expériences COSY H-H et HSQC. En effet l'analyse COSY H-H permet d'abord de caractériser les protons de la génine et cela par l'observation de leurs corrélations avec les protons «espions» que sont particulièrement les protons H-3, H-6 ainsi que les groupements méthyles constituant la chaîne latérale. On identifie (Figure III.6) ainsi les deux protons H-2b et H-2a (δ_H 1,62 et1,92 ppm), H-4b (δ_H 2,29, *t*, *J* = 13 Hz) et H-4a (δ_H 2,41, *dd*, *J* = 13; 2 Hz) ainsi que H-7b et H-7a à (δ_H 1,57 et 2 ppm).

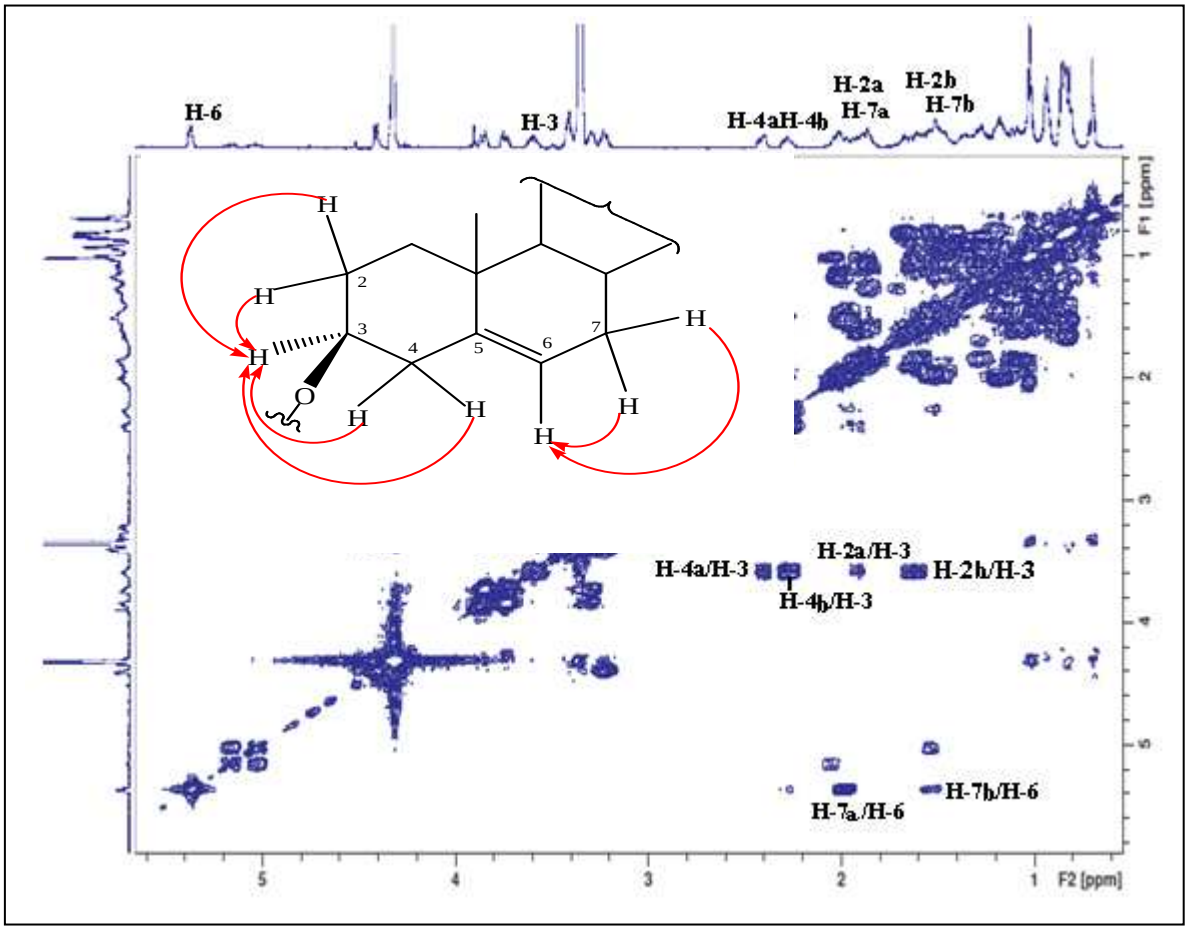


Figure III.6 : Spectre COSY H-H du composé OP4

D'autre corrélations (Figure III.6-1) sont également mises en évidence entre :

- le proton H-25 résonant à 1,67 ppm et les protons des méthyles Me-26 et Me-27.
- le proton H-28 résonant à 1,25 ppm et les protons du groupement méthylique Me-29.
- le proton H-20 repéré à 1,37 ppm et les protons du méthyle Me-21.
- le proton H-1b sortant à 1,07 ppm et les deux protons H-2a et H-2b.
- le proton H-2b sortant à 1,62 ppm et H-1a (δ_H 1,86).
- le proton H-8 résonant à 1,45 ppm et H-7a (δ_H 2).

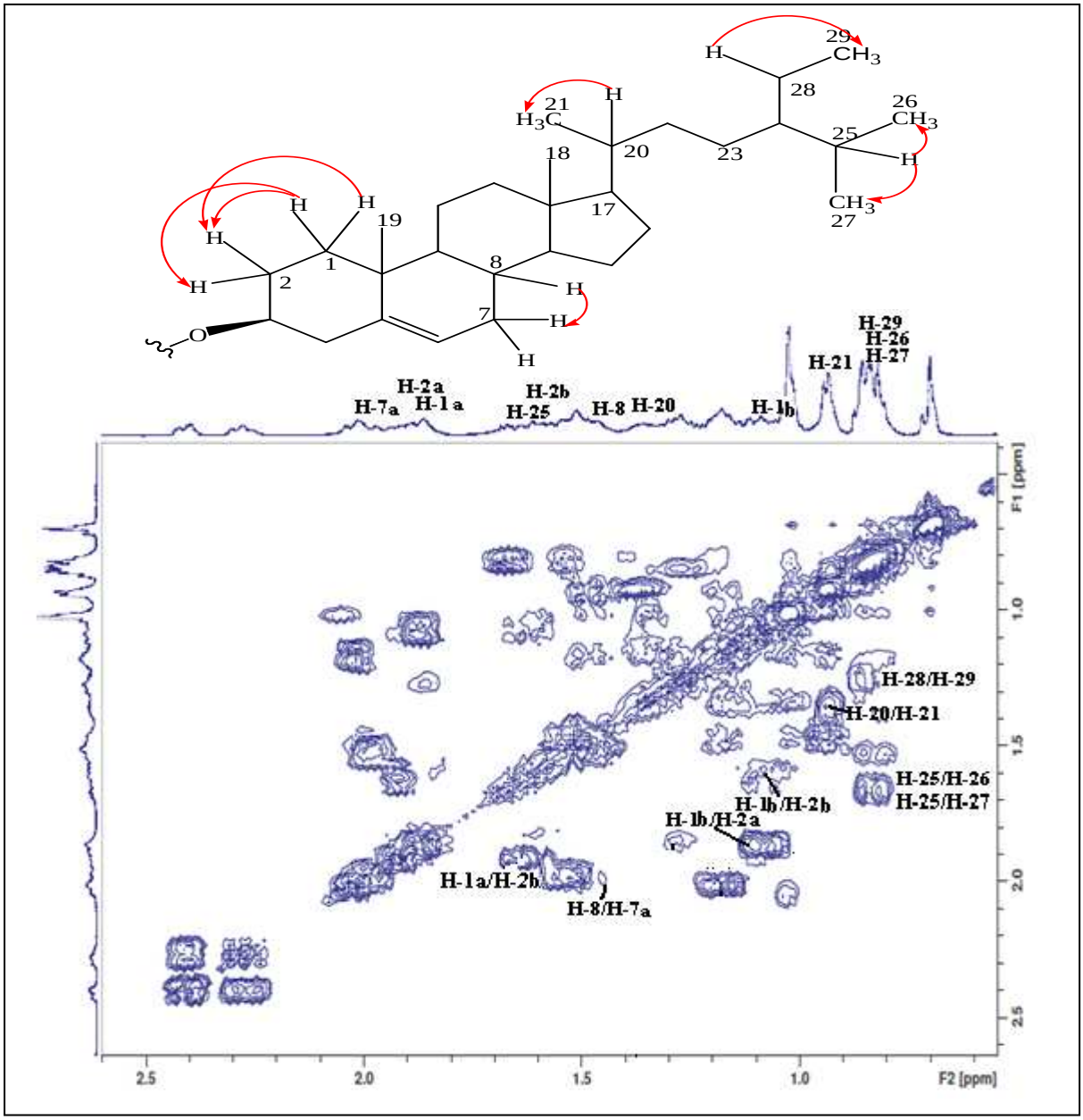


Figure III.6-1 : Spectre COSY H-H du composé OP4

A partir des protons caractérisés par expérience COSY H-H et ceux des groupements méthyles, l'expérience HSQC (Figure III.7 et III.7-1) permet l'identification directe des carbones qui les portent. Il est ainsi observé les différents couplages en $^{1}J_{C\text{-}H}$ entre :

- les protons méthyliques H-18 et son carbone C-18 (δ_C 12,07).
- les protons méthyliques H-29 et son carbone C-29 (δ_C 12,1).
- les protons méthyliques H-26 et son carbone C-26 (δ_C 19,2).
- les protons méthyliques H-27 et son carbone C-27 (δ_C 19,9).
- les protons méthyliques H-21 (J = 6,4 Hz) et son carbone C-21 (δ_C 18,9).

- les protons méthyliques H-19 et son carbone C-19 (δC 19,5).
- le proton H-3 et son carbone C-3 (δC 79,4).
- le proton oléfinique H-6 et son carbone C-6 (δC 122,4).

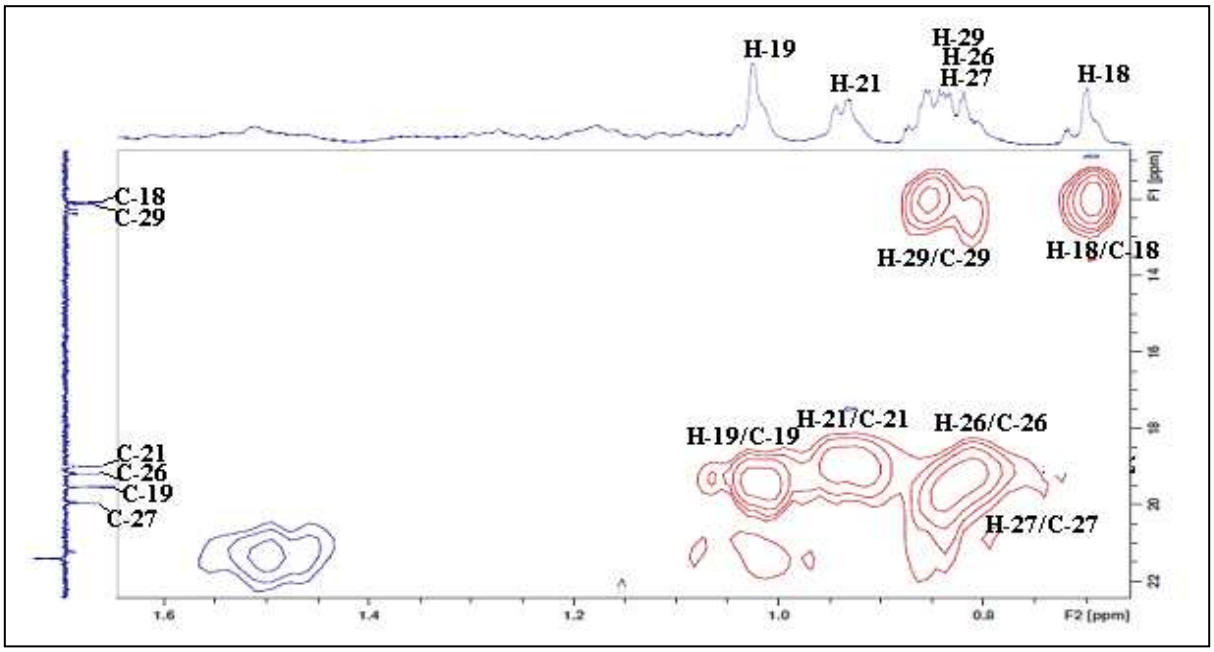


Figure III.7 : Spectre HSQC du composé OP4

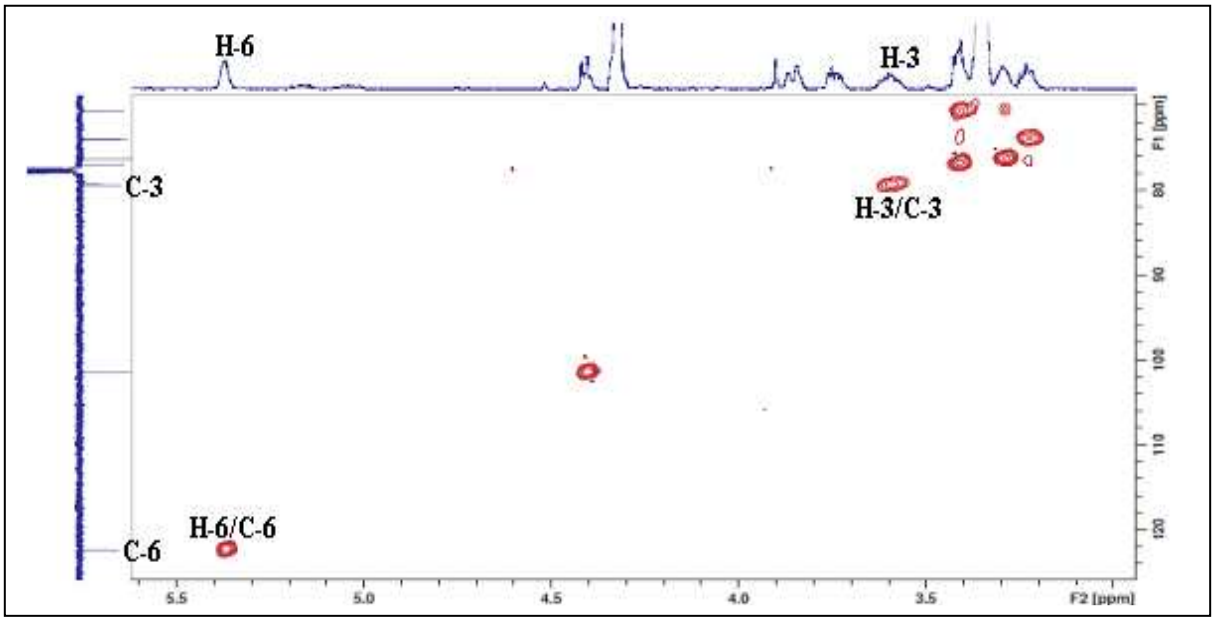
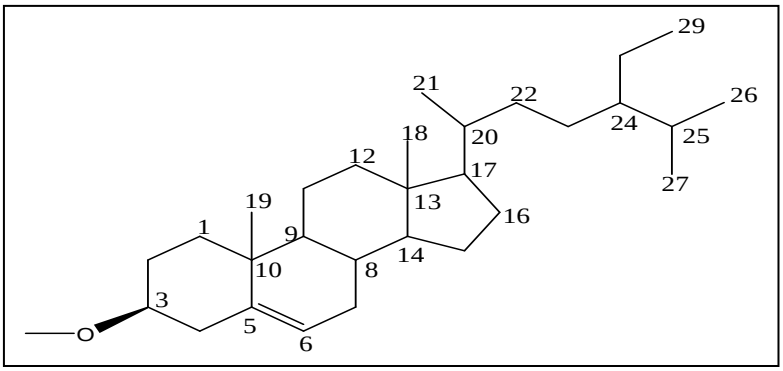


Figure III.7-1 : Spectre HSQC du composé OP4

Toutes ces données spectrales consacrées à la détermination de structure de la partie aglycone permettent d'identifier le β-sitostérol dans sa forme bidimensionnelle.



Le tableau III.1 ci-dessous illustre les déplacements chimiques des protons et carbones de la génine.

Position	δ_H *m J* Hz	δ_C
1	1,07-1,86 *m*	37,6
2	1,62-1,92 *m*	29,9
3	3,59 *m*	79,4
4	2,29 *t* 13 H-4b 2,41 *dd* 13; 2 H-4a	39,02
5	-	140,7
6	5,37 *dl* 4,8	122,4
7	1,57-2 *m*	32,28
8	1,45 *m*	32,26
9	0,94 *m*	50,6
10	-	37,07
11	1,49 *m*	21,4
12	1,17-2,01 *m*	40,1
13	-	42,6
14	1,01 *m*	57,1
15	1,09-1,59 *m*	24,6
16	1,27-1,85 *m*	28,5
17	1,11 *m*	56,4
18	0,70 *s*	12,07
19	1,02 *s*	19,5
20	1,37 *m*	36,4
21	0,93 *d* 6,4	18,9
22	1,04 -1,34 *m*	34,3
23	1,18 *m*	26,4
24	0,94 *m*	46,2
25	1,67 *m*	29,5
26	0,83 *m*	19,2
27	0,84 *m*	19,9
28	1,25 *m*	23,4
29	0,85 *m*	12,1

Tableau III.1 : Déplacements chimiques des protons et carbones de la génine OP4

III-2-1-2 Identification de la partie osidique

L'expérience COSY H-H constitue l'outil de choix pour l'identification des hétérosides et leur stéréochimie. Partant du proton anomère H-1' résonant à 4,41 ppm (1H, *d*, 7,8 Hz) cité précédemment, le spectre COSY H-H (Figure III.8) permet d'identifier un hexose et cela par l'observation des corrélations entre les protons H-1' et H-2' (1H, δ_H 3,23, *t*, *J* = 8 Hz), H-2'et H-3' (1H, δ_H 3,43, *t*, *J* = 8 Hz), H-5'et H-4' (1H, δ_H 3,41, *t*, *J* = 8 Hz), H-5'et H-6'b (1H, δ_H 3,74, *dd*, *J* = 11,9; 4,8 Hz), H-5'et H-6'a (1H, δ_H 3,85, *dd*, *J* = 11,9; 2,9 Hz), et enfin H-6'a et H-6'a (1H, δ_H 3,85, *dd*, *J* = 11,9; 2,9 Hz). Les grandes taches de corrélation traduisant de grandes constantes de couplage permettent ainsi d'identifier un glucose de configuration β ($J_{H1'-H2'}$ = 7,8 Hz).

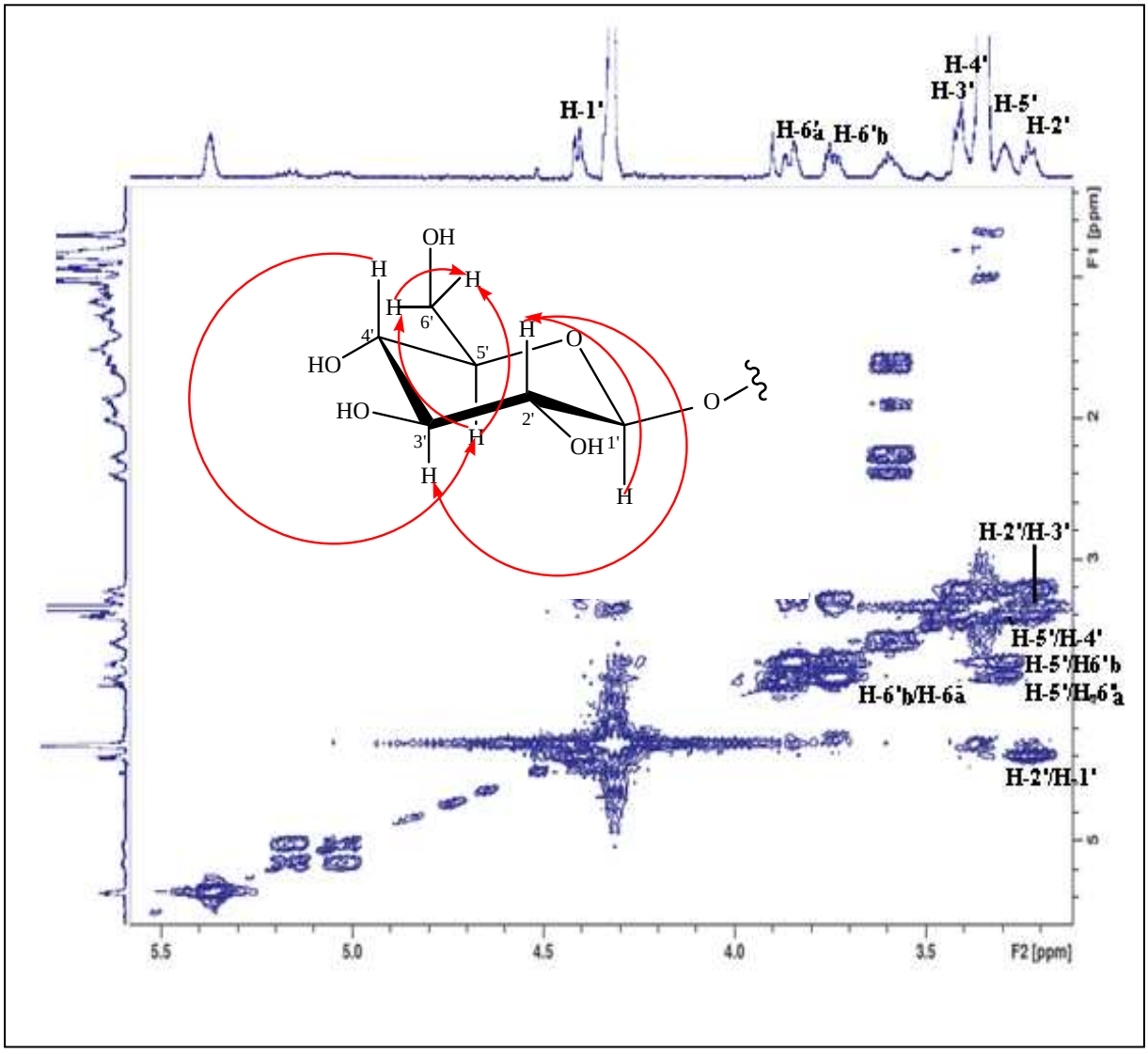


Figure III.8 : Spectre COSY H-H du sucre

L'expérience de corrélation hétéronucléaire directe C-H ou HSQC (Figure III.9) permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones constituant le sucre. Le spectre montre les couplages en $^{1}J_{C\text{-}H}$ entre :

- le proton H-1'et son carbone C-1' (δ_C 101,5).
- le proton H-2'et son carbone C-2' (δ_C 73,9).
- le proton H-3'et son carbone C-3' (δ_C 76,9).
- le proton H-4'et son carbone C-4' (δ_C 70,6).
- le proton H-5'et son carbone C-5' (δ_C 76,3).
- les deux protons H-6'a et H-6'b et leur carbone C-6' (δ_C 62,2).

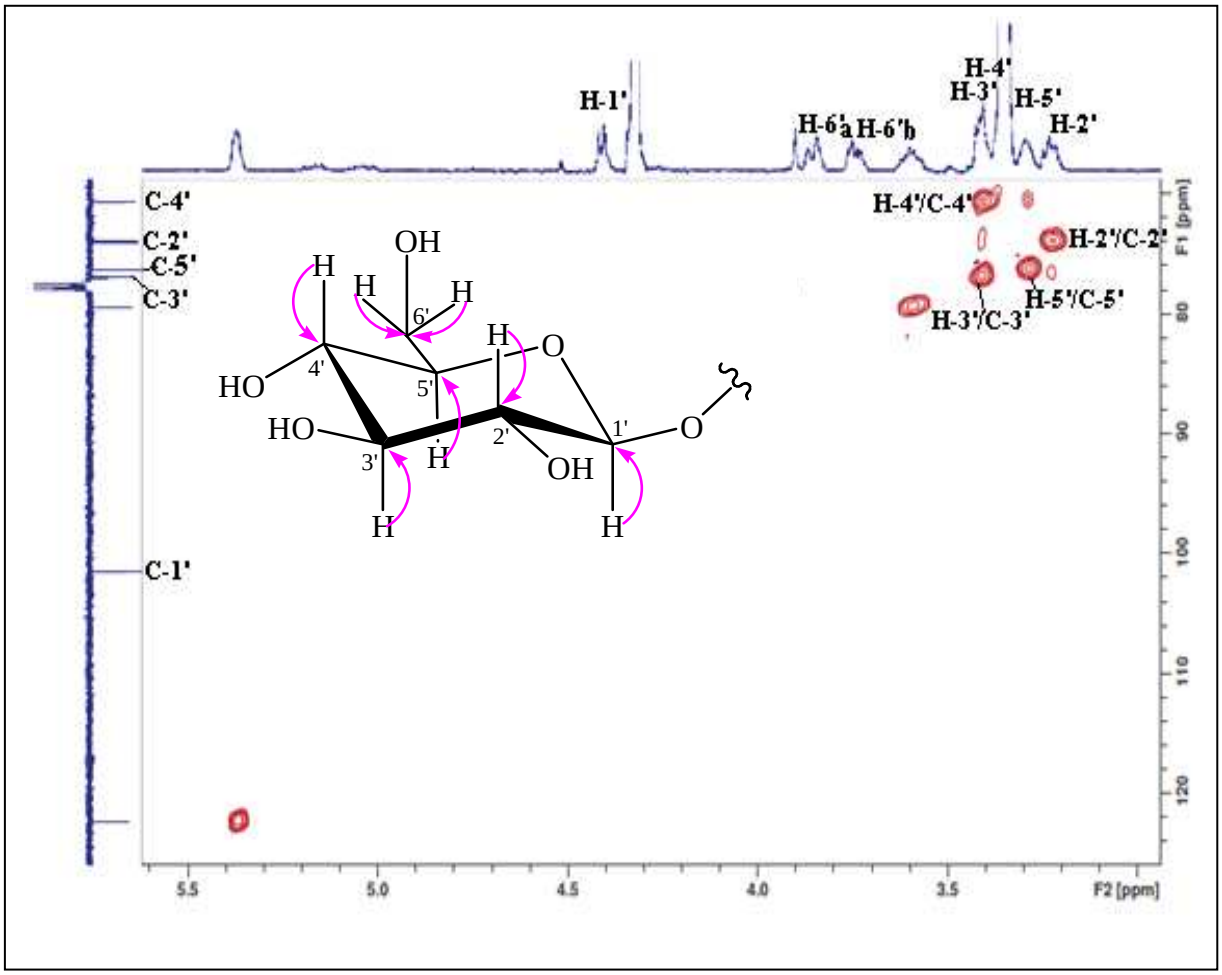


Figure III.9 : Spectre HSQC de la partie osidique

L'expérience HMBC (Figures III.10) de ce sucre montre les corrélations attendues pour cette partie osidique. De plus, la corrélation observée entre le proton H-1' et le carbone C-3 de la génine (δ_C 79,4) confirmant le branchement du glucose en cette position du triterpène.

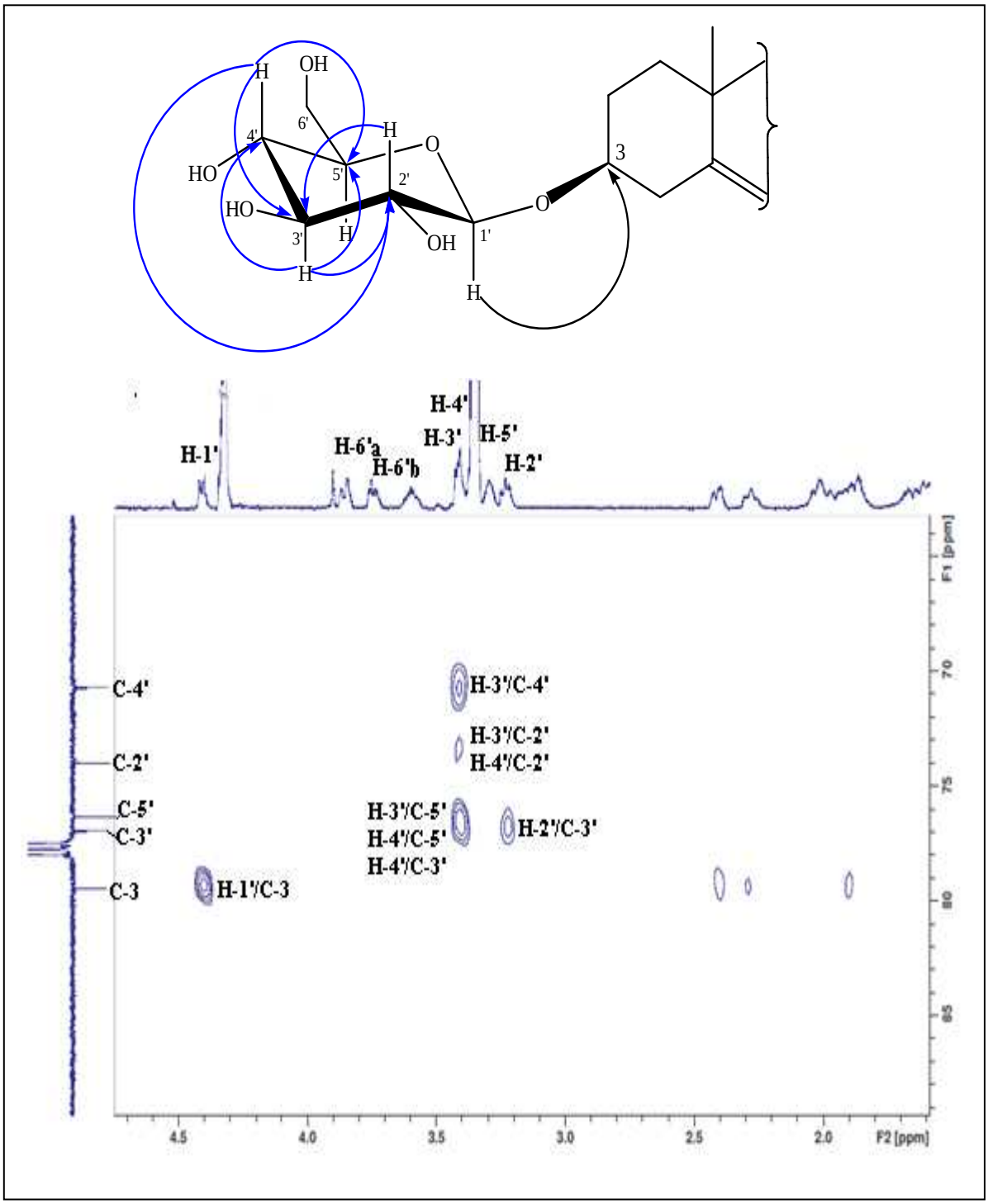


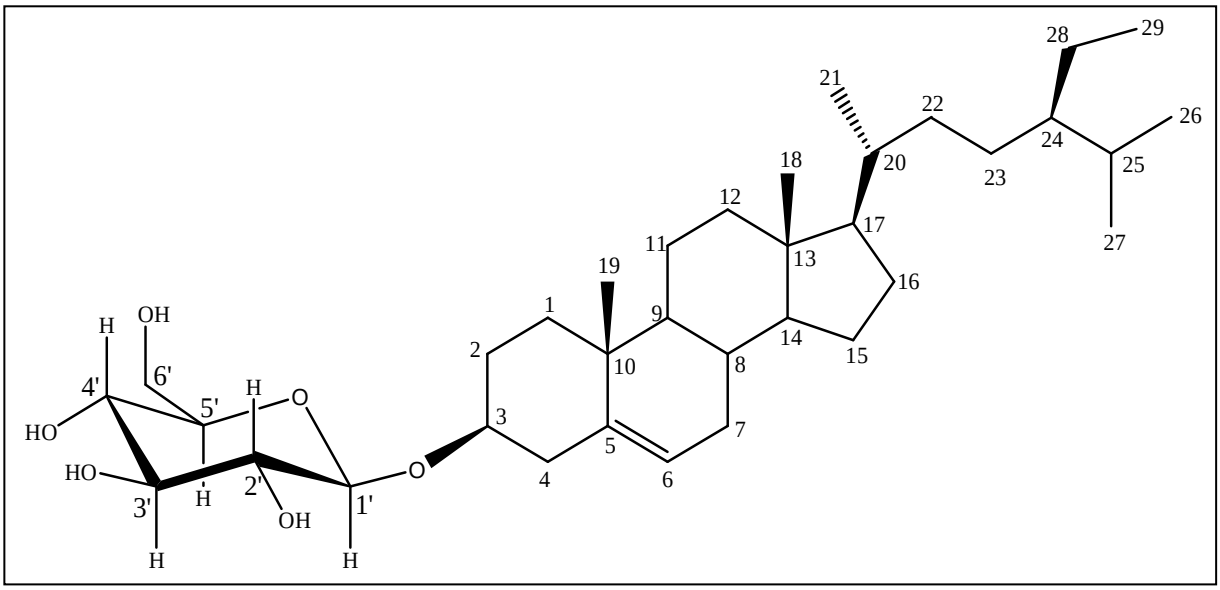
Figure III.10 : Spectre HMBC du sucre

Le tableau III.2 ci-dessous reproduit les déplacements chimiques des protons et carbones du β-glucose.

Position	δ_H *m J* Hz	δ_C
1’	4,41 *d* 7,8 H-1’	101,5
2’	3,23 *t* 8 H-2’	73,9
3’	3,43 *t* 8 H-3’	76,9
4’	3,41 *t* 8 H-4’	70,6
5’	3,29 *m* H-5’	76,3
6’	3,74 *dd* 11,9; 4,8 H-6’b 3,85 *dd* 11,9; 2,9 H-6’a	62,2

Tableau III.2 : Déplacements chimiques des protons et carbones du β-D-glucose

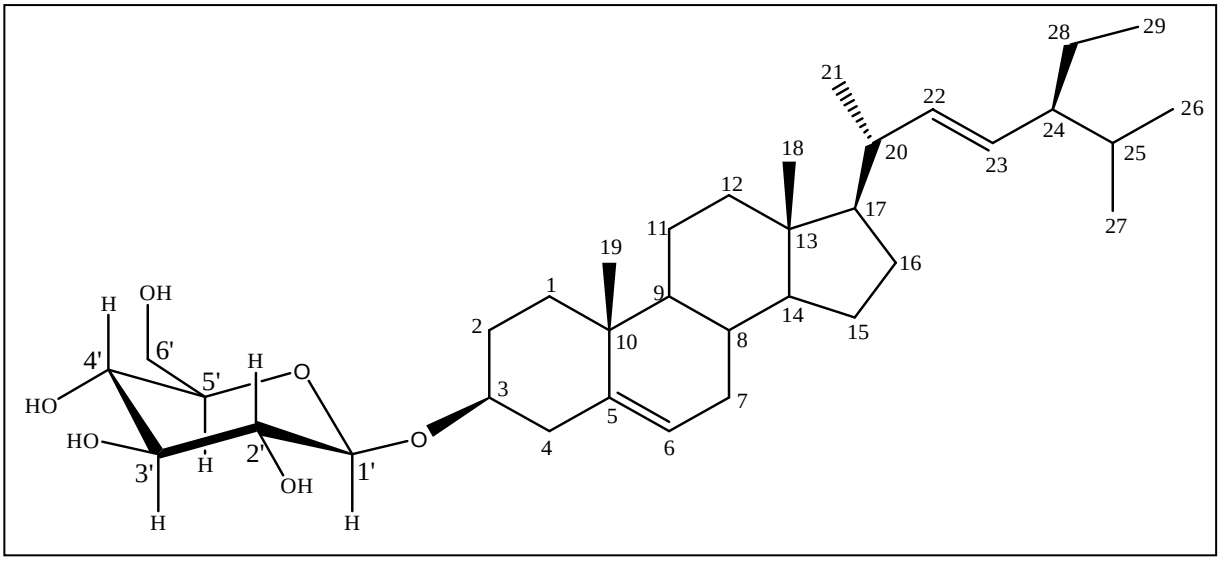
L’exploitation des différentes méthodes d’analyse spectroscopiques, à savoir RMN ^{1}H, RMN ^{13}C en *J*-modulé, COSY H-H, HSQC, HMBC, la spectrométrie de masse ainsi que le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$= -42,3° (C= 0,5 g/100 ml, $CHCl_3$) conduisent à attribuer sans ambiguïté la structure suivante pour le composé **OP4**.



3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol

Cette saponine stéroïdique appelée β-Sitostérol-β-D-glucose (3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol) a été antérieurement isolée de plantes appartenant à la famille Asteraceae comme *Centaurea africana* [15]. Il est cité à notre connaissance pour la première fois dans l’espèce *O.pygmaeum*.

III-2-2 Elucidation structurale du composé OP15



3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol

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

Le spectre de masse ESI-MS du composé **OP15** (Figure III.11) enregistré en mode positif, présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z = 597 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 574 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{35}H_{58}O_6$.

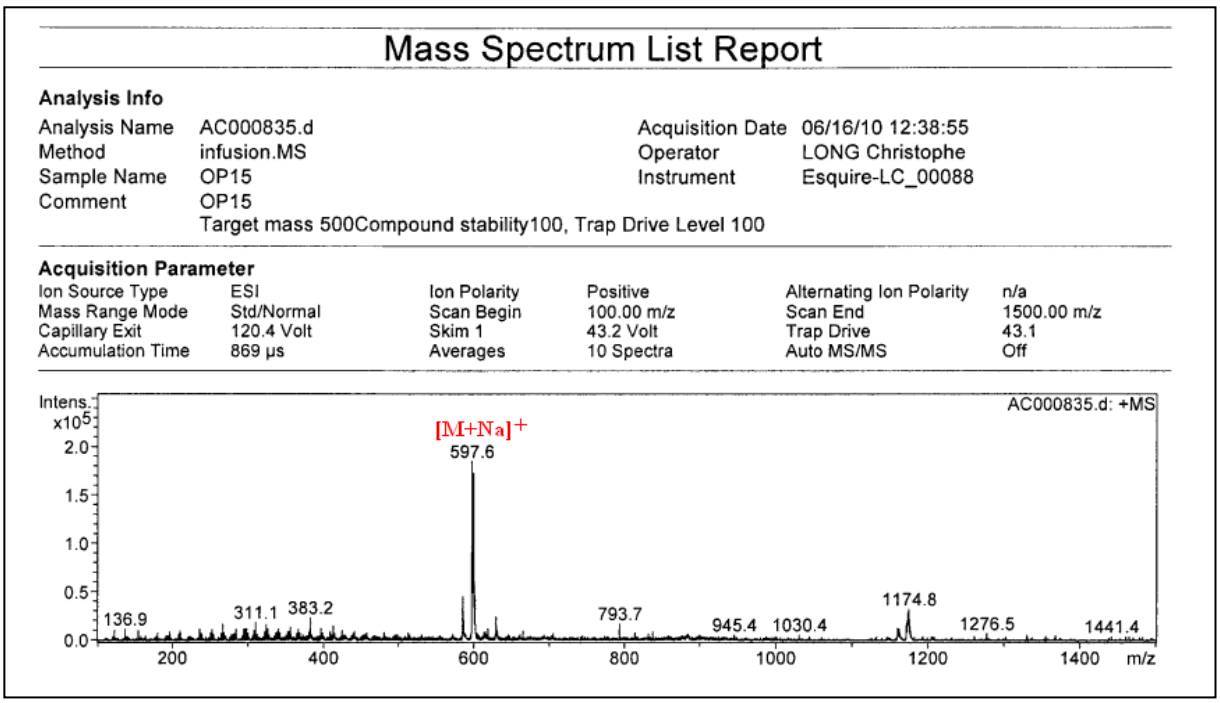


Figure III.11 : Spectre de masse ESI du composé OP15

Le spectre RMN ^{1}H de ce composé enregistré dans un mélange chloroforme/méthanol deutéré (Figure III.12) présente de grandes analogies avec le même spectre du composé **OP4** décrit précédemment. En effet, on reconnaît aisément les signaux résonants à champ fort dans l'intervalle 0,65-0,99 ppm, correspondant aux 6 groupements méthyles. Ces derniers sont les groupements Me-18, Me-29, Me-26, Me-27, Me-21et Me-19. On identifie également un signal sous forme de singulet large résonant à 5,32 ppm correspondant au proton oléfinique H-6, de même que le signal multiplet sortant à 3,55 ppm du proton oxyméthine H-3. On reconnait également le signal doublet sortant à δ_H 4,36 (J = 7,8 Hz) attribuable au proton anomérique H-1' d'un sucre. La seule différence notable se situe au niveau de la génine et se traduit par l'apparition de deux signaux résonant sous forme de doublet de doublets à 4,96 (1H, *dd*, J = 15; 8,6 Hz) et 5,13 ppm (1H, *dd*, J = 15; 8,7 Hz), caractéristiques de deux protons oléfiniques engagés dans une double liaison de configuration *trans*.

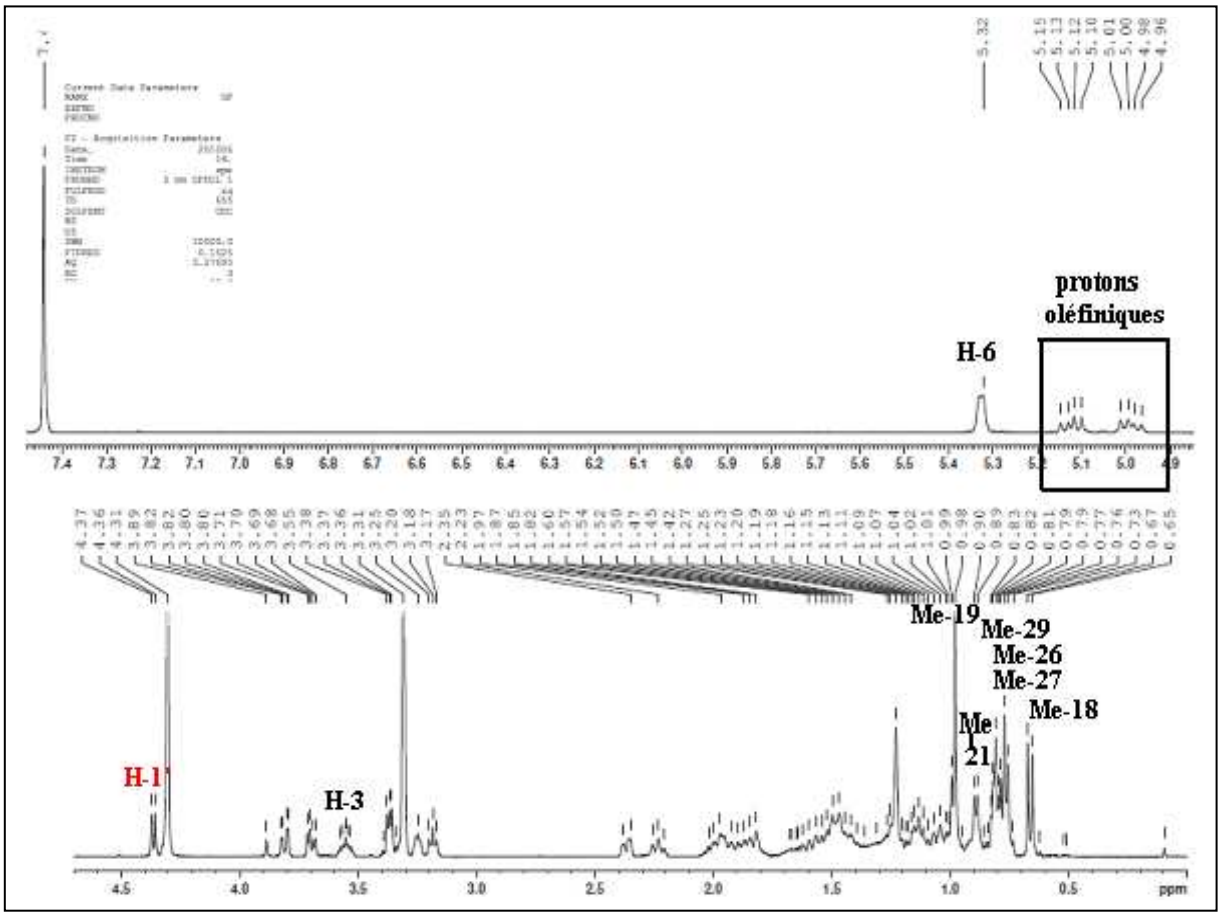


Figure III.12 : Spectre RMN ^{1}H du composé OP15

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.13) du composé **OP15** confirme sa grande analogie structurale avec le composé **OP4**, exclusivement dans la partie génine. La seule

différence étant l'apparition de deux signaux de deux carbones éthyléniques à 129,8 et 138,9 ppm.

Cette analyse, par comparaison avec le composé **OP4**, laisse indiquer que le composé en question est identifiable au stigmastérol (partie aglycone) porteur d'une unité osidique et dont il faut identifier clairement la nature.

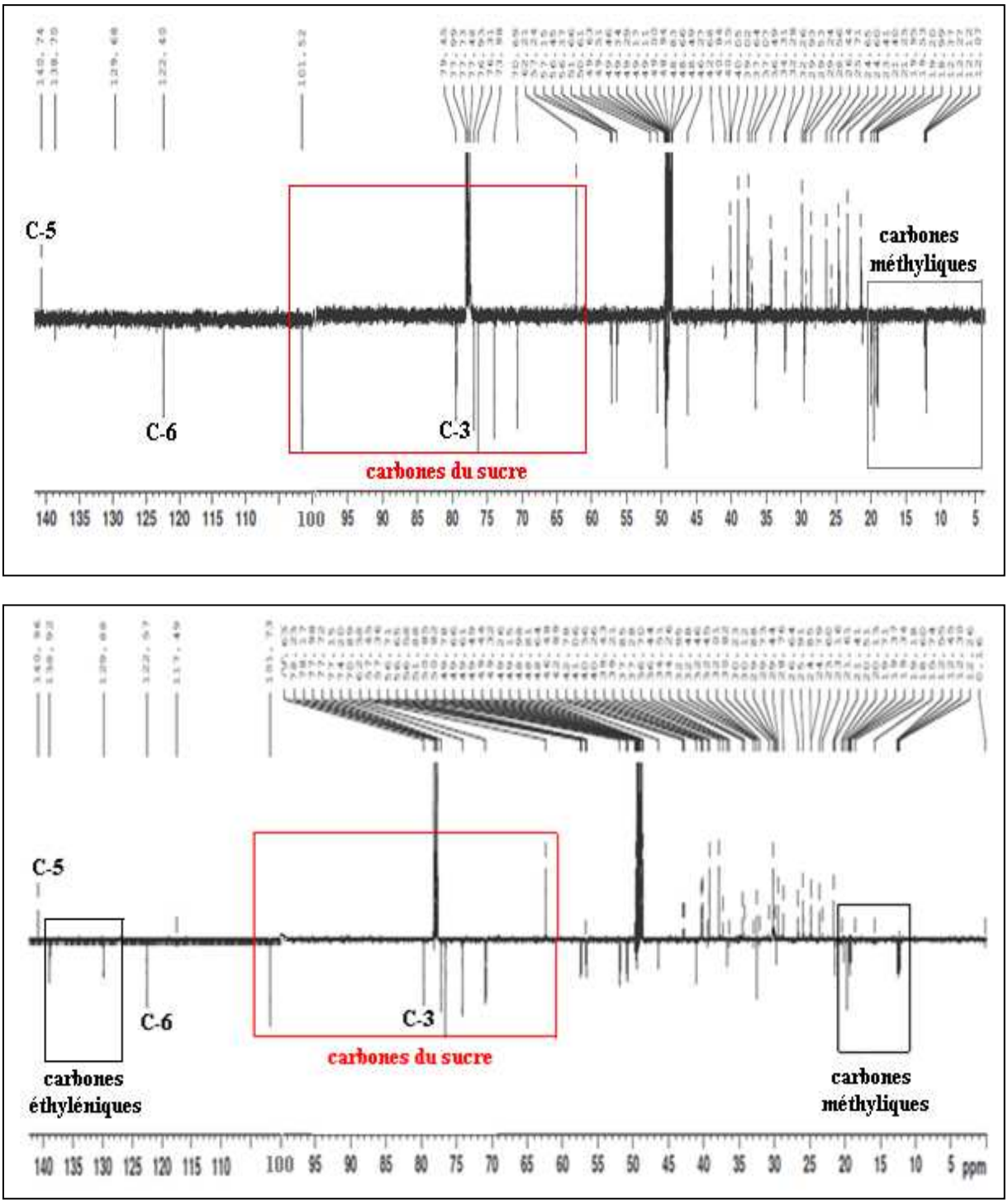


Figure III.13 : Spectres RMN ^{13}C en *J*-modulé des composés OP4 (haut) et OP15 (bas)

La structure de la génine a été confirmée, notamment dans sa différence avec le composé **OP4**, conjointement par l'analyse des spectres HMBC (Figure III.14), COSY H-H (Figure III.15) et HSQC *J*-modulé (Figure III.16 et III.16-1).

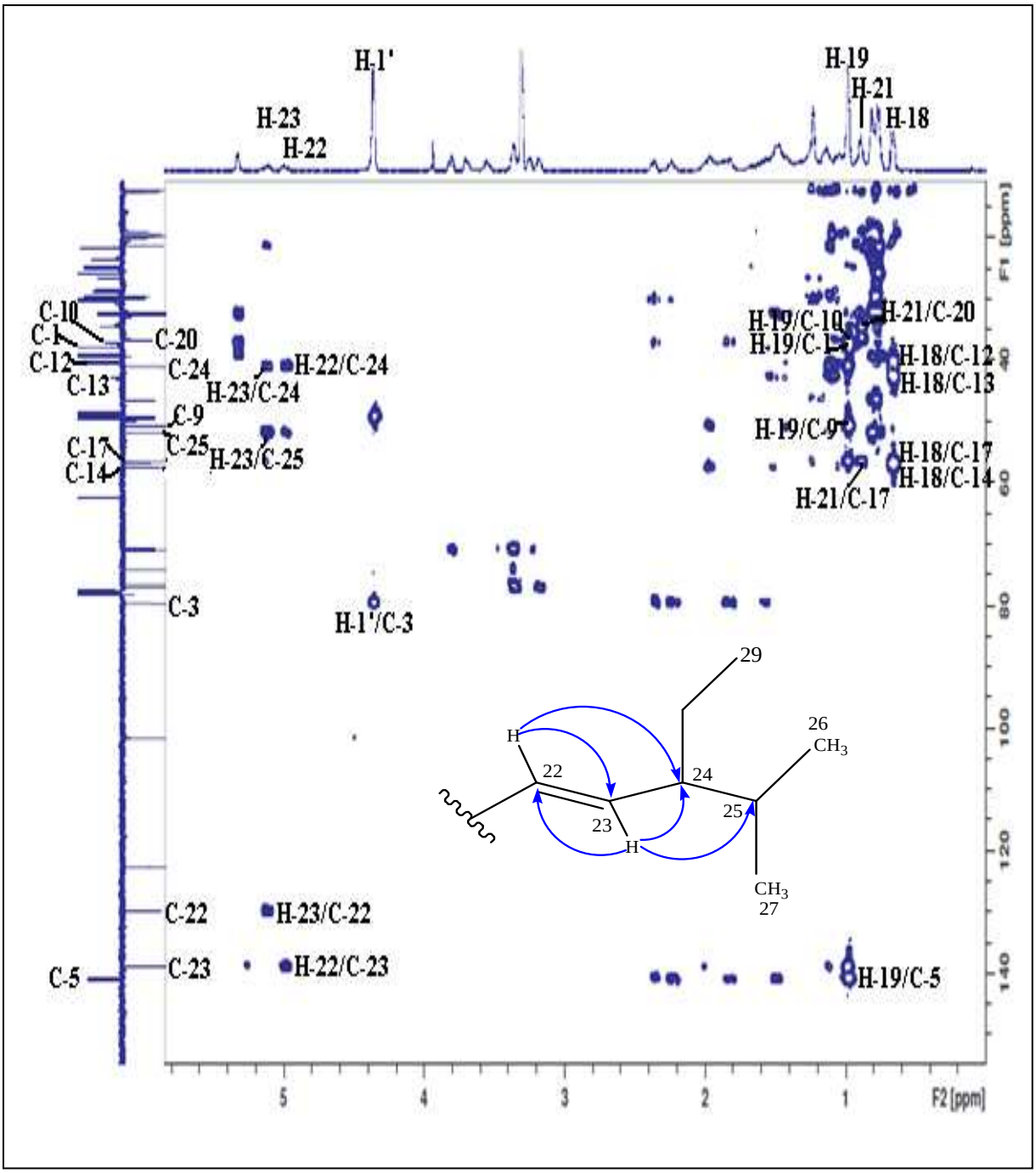


Figure III.14 : Spectre HMBC du composé OP15

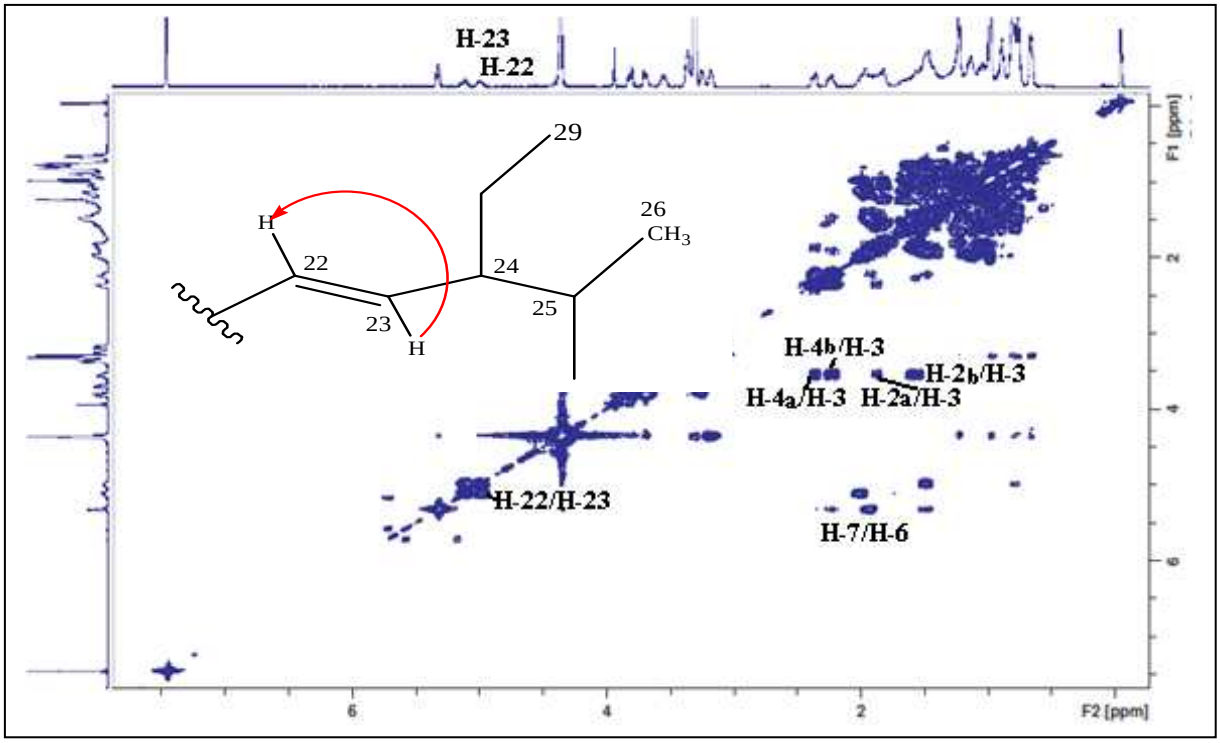


Figure III.15 : Spectre COSY H-H du composé OP15

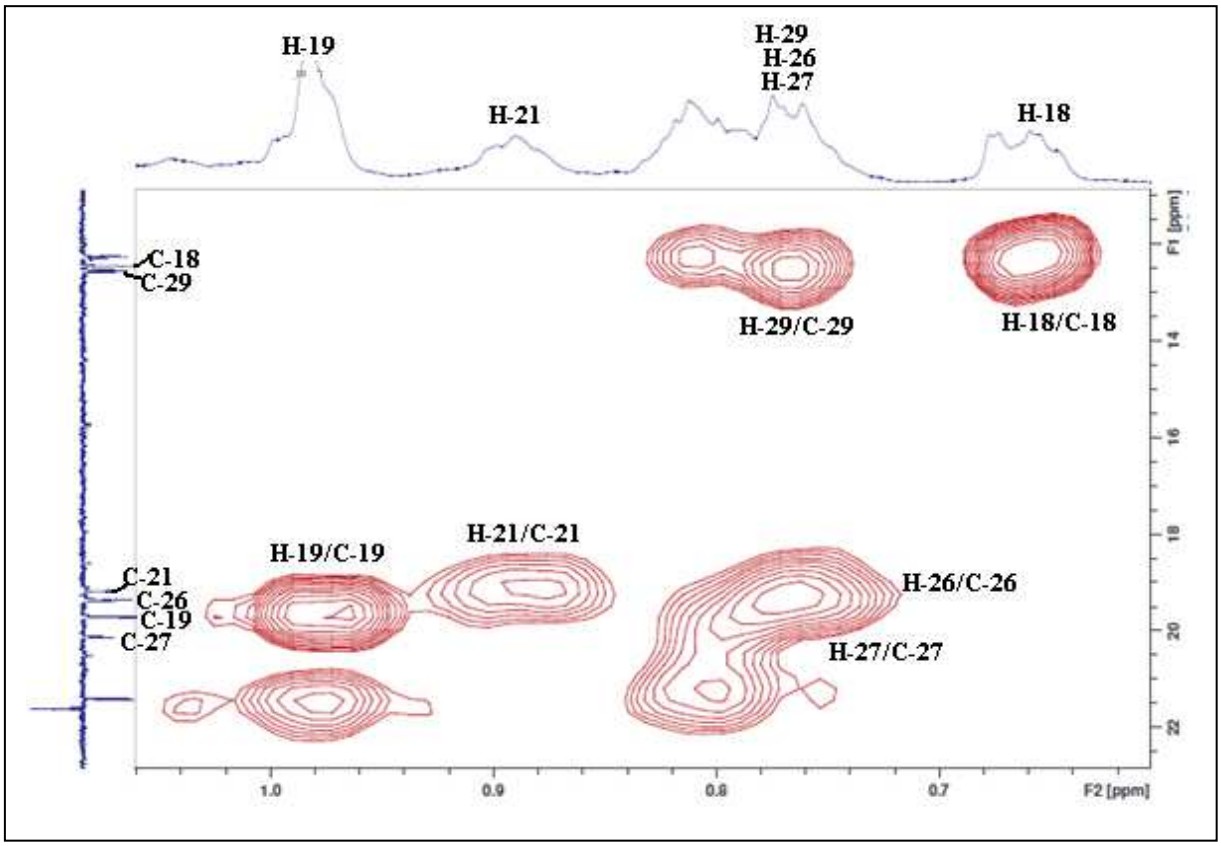


Figure III.16 : Spectre HSQC du composé OP15

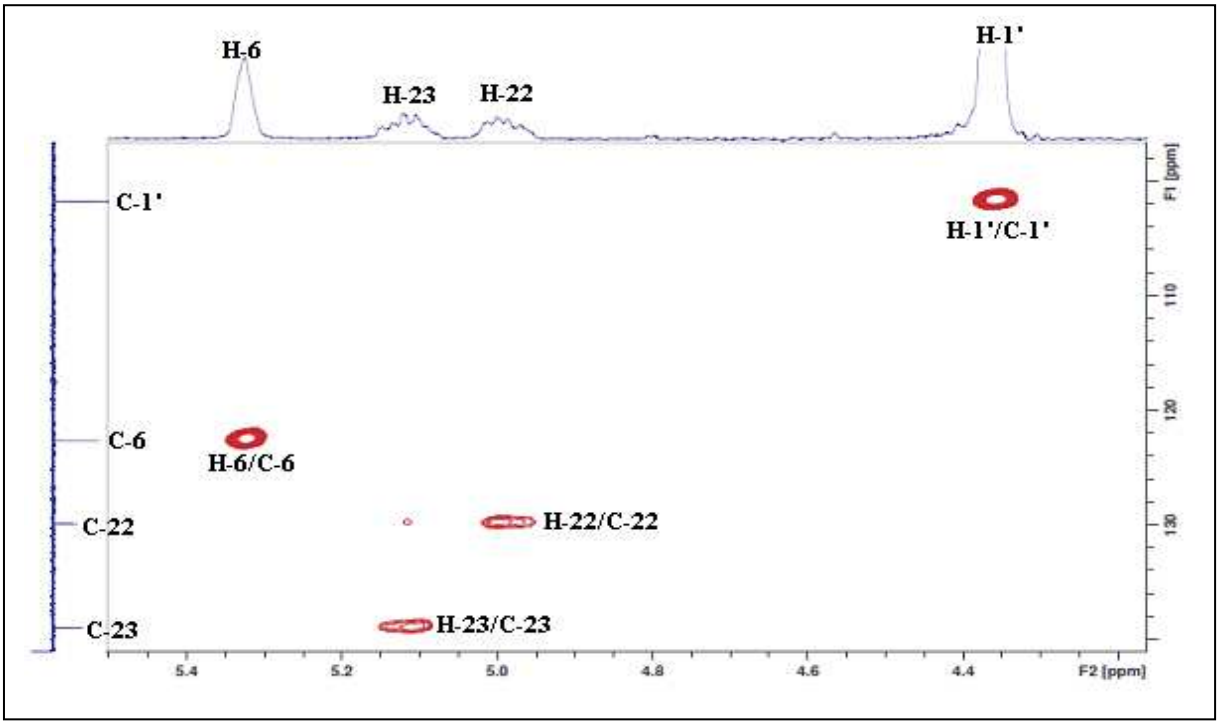
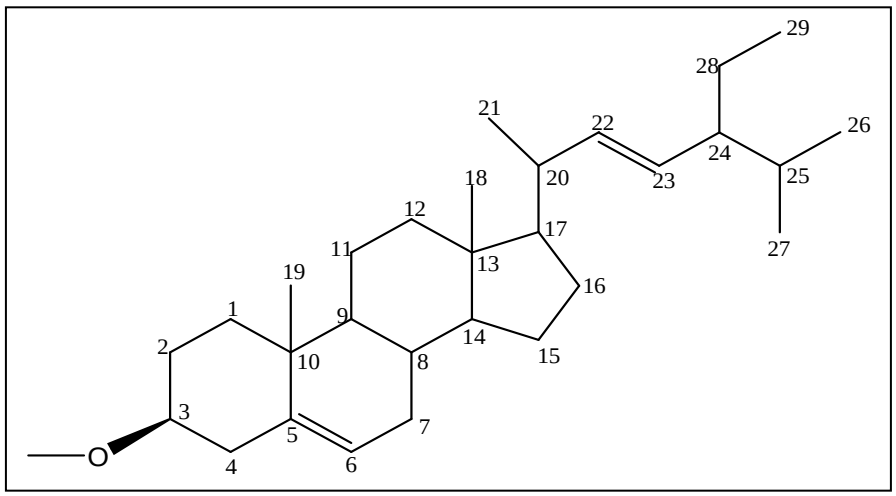
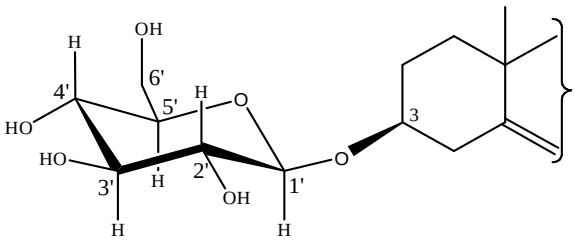


Figure III.16-1 : Spectre HSQC du composé OP15

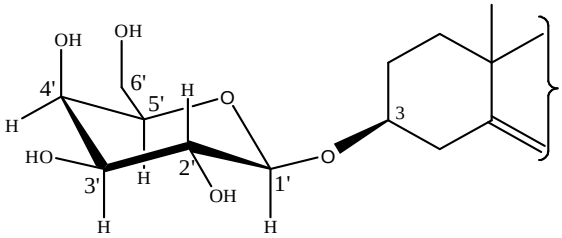
Toutes ces données spectrales consacrées à la détermination de structure de la partie aglycone permettent d'identifier le stigmastérol dans sa forme bidimensionnelle.



Comme il a été dit précédemment, il est indispensable maintenant d'identifier très précisément la structure de l'unité osidique. En effet, les spectres RMN ^{1}H et RMN ^{13}C laissent uniquement caractériser un hexose et ne permettent nullement de trancher entre les deux unités osidiques généralement rencontrées pour cette classe de composés, à savoir les β-D-glucose et β-D-galactose.



β-D-glucose



β-D-galactose

Pour cela, les expériences homonucléaires de types COSY H-H, COSY relayée, voire TOCSY constituent les méthodes de choix pour l'identification des hétérosides en général et surtout la détermination de leur stéréochimie. Dans notre cas et pour le composé **OP15**, l'analyse COSY H-H (Figure III.17) permet de relier sept protons d'un hexose. En effet et partant du proton anomérique H-1' (1H, δ_H 4,36, *d*, *J* = 7,8 Hz) et à travers leurs taches de corrélation, on relie les protons H-2' (1H, δ_H 3,18, *t*, *J* = 8 Hz), H-3' (1H, δ_H 3,37, *t*, *J* = 8 Hz), H-4' (1H, δ_H 3,36, *t*, *J* = 8 Hz), H-5' (1H, δ_H 3,25, *m*), H-6'b (1H, δ_H 3,70, *dd*, *J* = 11,9; 4,9 Hz) et H-6'a (1H, δ_H 3,81, *dd*, *J* = 11,9; 2,4 Hz). Les grandes taches de corrélations impliquant de grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'ils sont tous axiaux. Il s'agit donc d'un glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{H1'-H2'}$ = 7,8 Hz.

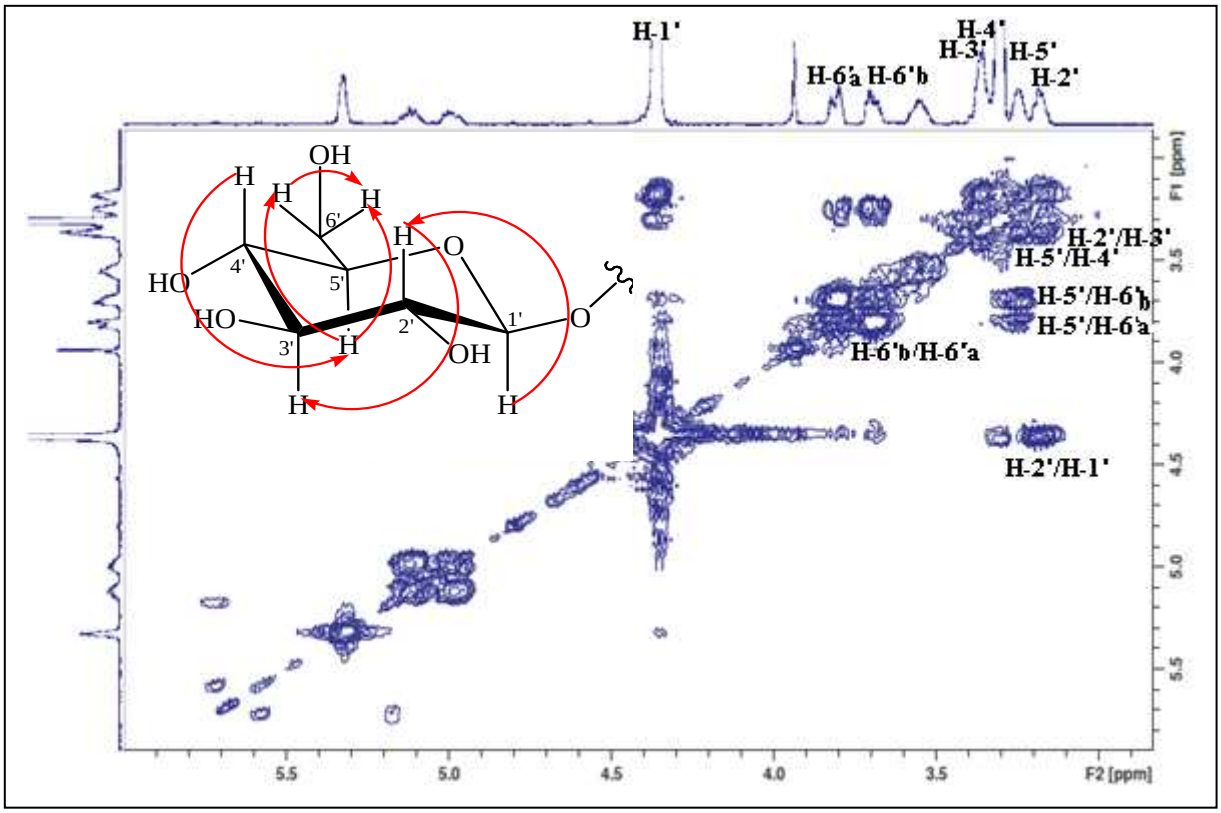


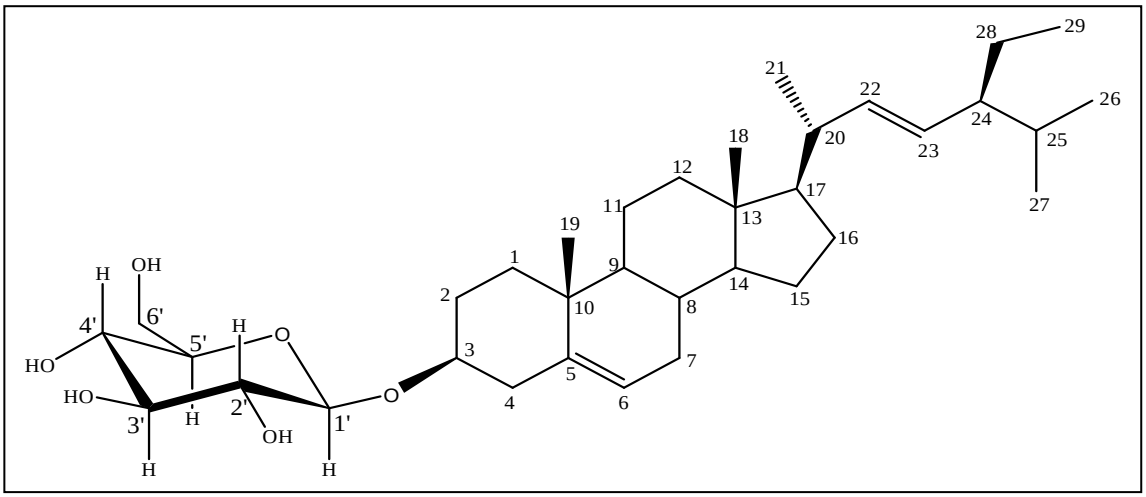
Figure III.17 : Spectre COSY de la partie osidique

Le tableau III.3 ci-dessous reproduit les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OP15**

Position	δ_H *m J* Hz	δ_C
1	1,04-1,82 *m*	37,8
2	1,57-1,87 *m*	30,1
3	3,55 *m*	79,6
4	2,23 *t* 11 H-4b	39,2
	2,35 *dd* 13; 2 H-4a	
5	-	140,9
6	5,32 *sl*	122,5
7	1,93-1,96 *m*	32,45
8	1,48 *m*	32,48
9	0,90 *m*	50,8
10	-	37,2
11	1,46 *m*	21,6
12	1,44-1,97 *m*	40,2
13	-	42,7
14	0,98 *m*	57,4
15	1.11 *m*	26,6
16	1,23-1,88 *m*	29,4
17	1,13 *m*	56,5
18	0,65 *s*	12,4
19	0,99 *s*	19,7
20	1,33 *m*	36,7
21	0,93 *d* 6,1	19,1
22	4,96 *dd* 15; 8,6 H-22	129,8
23	5,13 *dd* 15; 8,7 H-23	138,9
24	2,02 *m*	41,06
25	1,49 *m*	51,8
26	0,77 *m*	19,3
27	0,79 *m*	20,1
28	1,03-1,54 *m*	24,8
29	0,83 *m*	12,5
β-D-glucose		
1’	4,36 *d* 7,8 H-1’	101,7
2’	3,18 *t* 8 H-2’	74,2
3’	3,37 *t* 8 H-3’	77,1
4’	3,36 *t* 8 H-4’	70,8
5’	3,25 *m* H-5’	76,5
6’	3,70 *dd* 11,9; 4,9 H-6’b	62,3
	3,81 *dd* 11,9; 2,4 H-6’a	

Tableau III.3 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé OP15

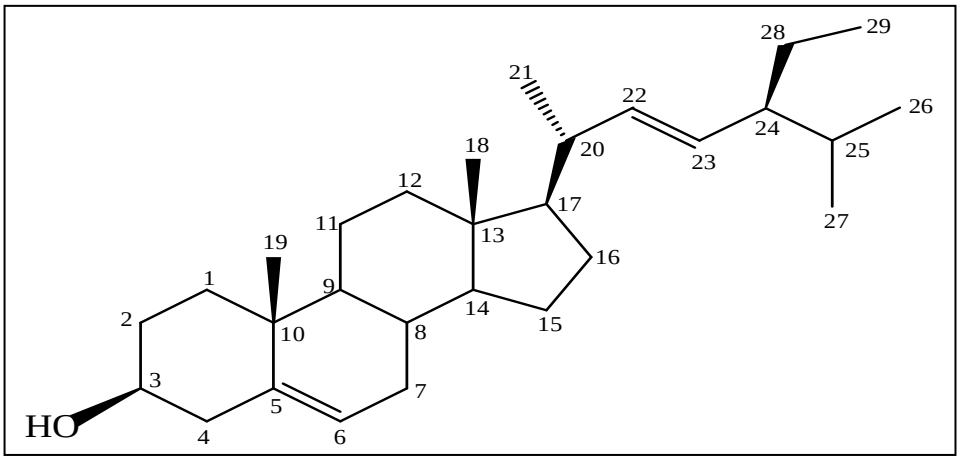
L'exploitation des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques, à savoir RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY H-H, HSQC, HMBC, la spectrométrie de masse ainsi que le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$= -6,5° (C= 0,6 g/100 ml, $CHCl_3$) conduisent à attribuer sans ambiguïté la structure suivante pour le composé **OP15**.



3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol

L'ensemble des données spectrales ainsi que la valeur du point de fusion de ce composé sont identiques à ceux d'une saponine antérieurement isolée également d'une espèce du genre *Odontospermum, O. sericum* [20]. Il s'agit donc de : 3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol.

II-2-3 Elucidation structurale du composé OP16



Stigmastérol

Ce composé se présente sous forme de cristaux blancs en aiguilles soluble dans le chloroforme.

Le spectre de masse obtenu par impact électronique EI du composé **OP16** (Figure III.18) montre un ion moléculaire à *m/z* 412,3737 $[M]^{+\cdot}$ correspondant à la formule brute $C_{29}H_{48}O$ et un fragment à *m/z* 370,3621 $[M-42]^{+\cdot}$ correspondant à la perte d'une molécule neutre CH_3-CH=CH_2.

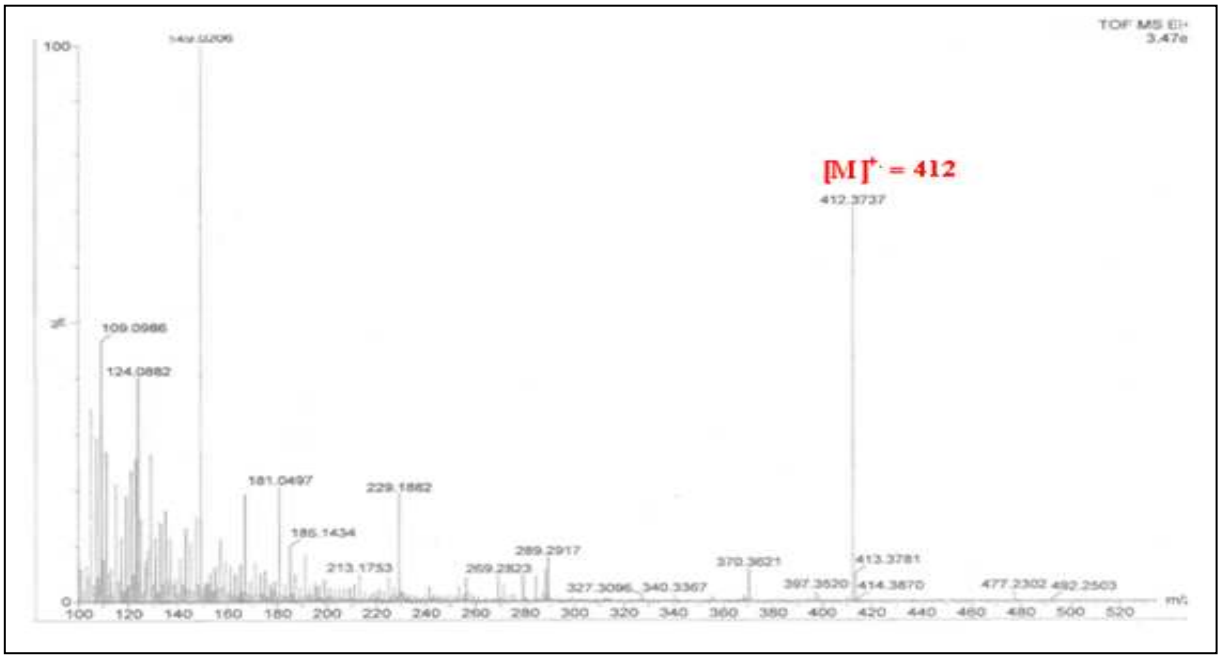
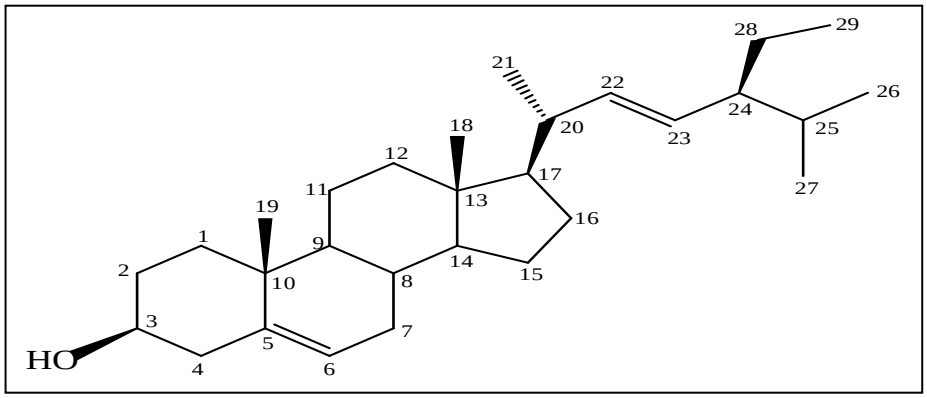


Figure III.18 : Spectre de masse EI du composé OP16

Les spectres RMN ^{1}H (Figure III.19) et RMN ^{13}C (Figure III.20) du composé **OP16** présentent de fortes similitudes avec celui du composé **OP15** précédent. La différence notable consiste en la disparition totale des signaux des protons et carbones de la partie osidique. Ceci permet d'identifier notre composé au stigmastérol. L'exploitation des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques, à savoir RMN ^{1}H, RMN ^{13}C en *J*-modulé, COSY H-H, HSQC, HMBC, la spectrométrie de masse ainsi que le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$= -59° (C= 0,2 g/100 ml, $CHCl_3$) conduisent à attribuer sans ambiguïté la structure suivante pour le composé **OP16**.



Ce composé largement distribué dans le monde végétal a été antérieurement isolée de plantes appartenant à la famille Asteraceae comme *Inula crithmoides* [14]. Il a été également identifié dans le genre *Odontospermum* au sein de l'espèce *O.pygmaeum*.

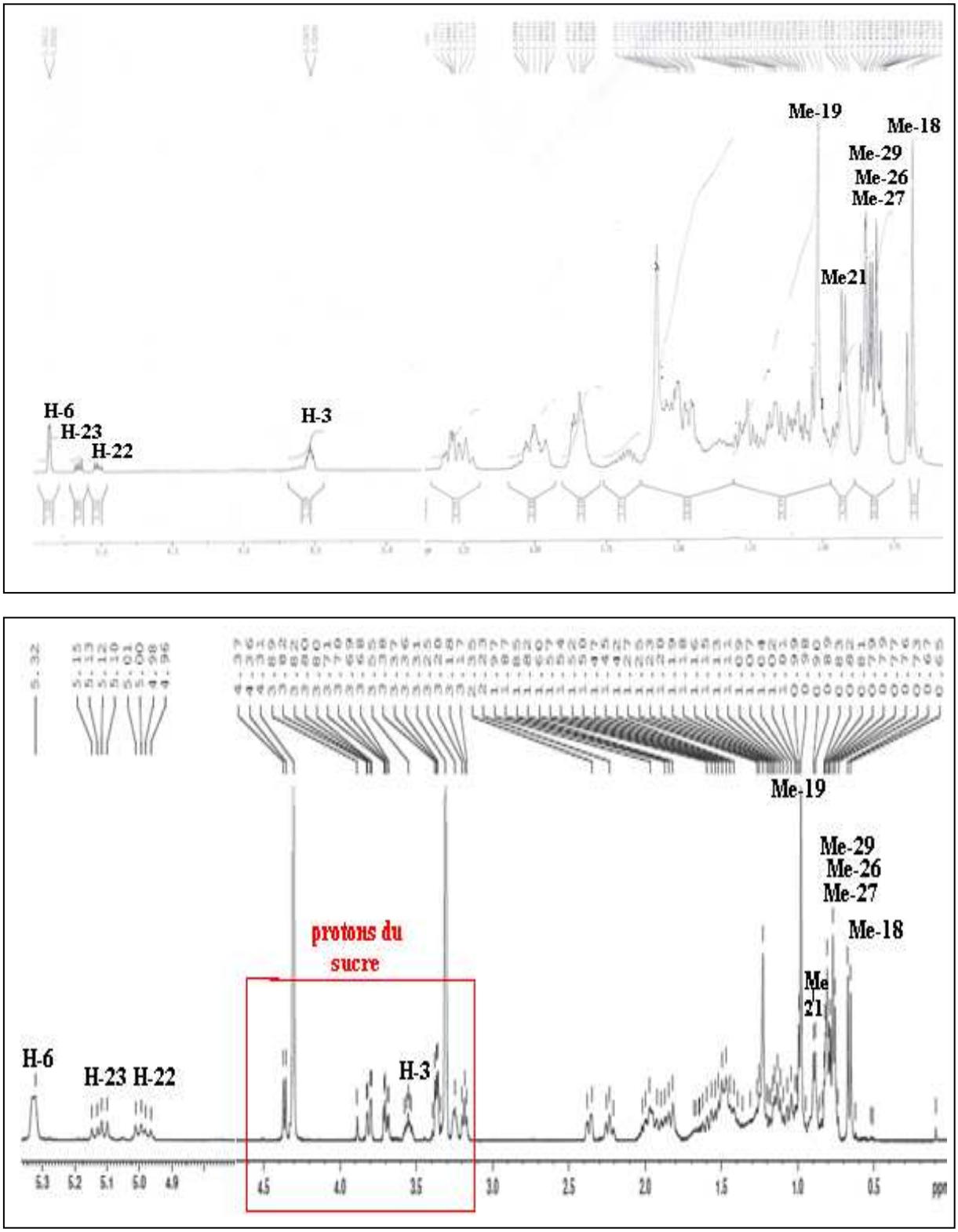
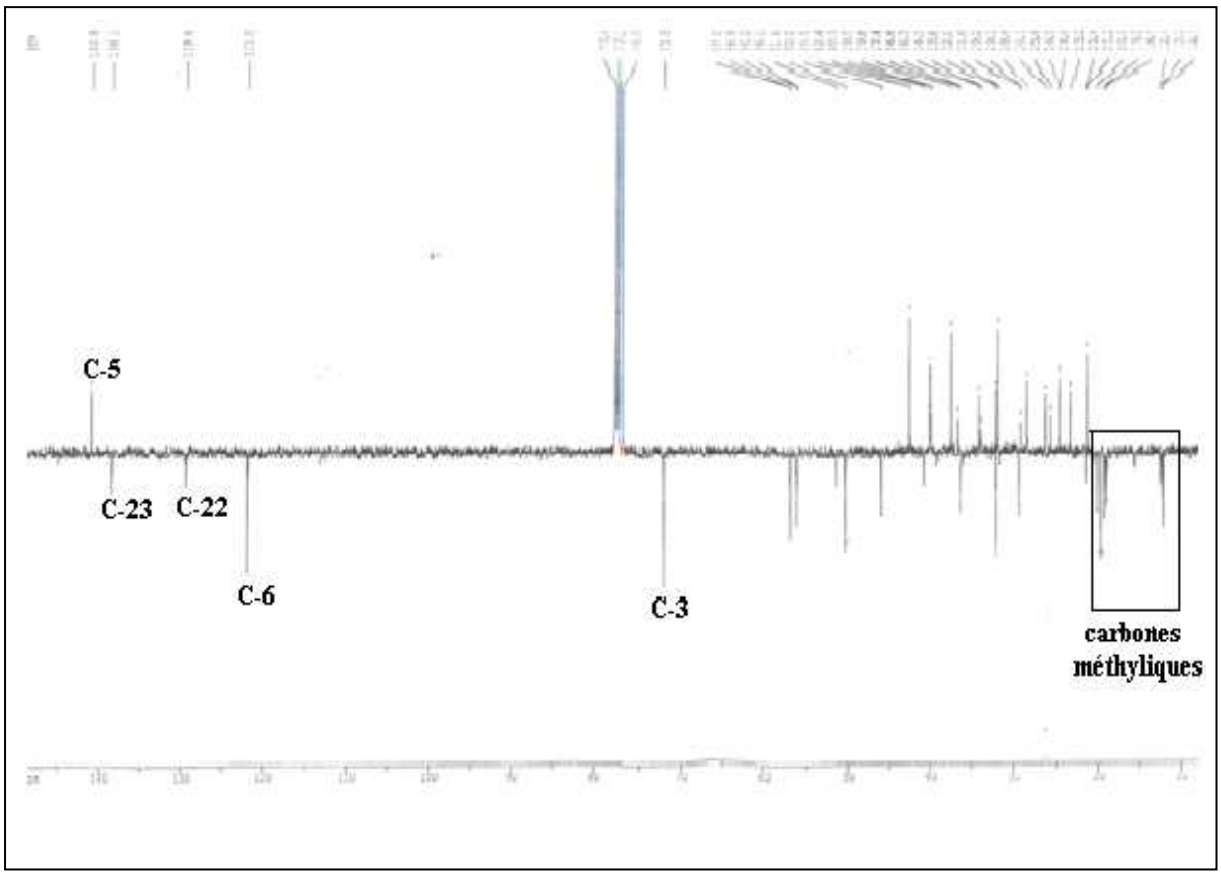


Figure III.19 : Spectres RMN ^{1}H des composés OP16 (haut) et OP15 (bas)



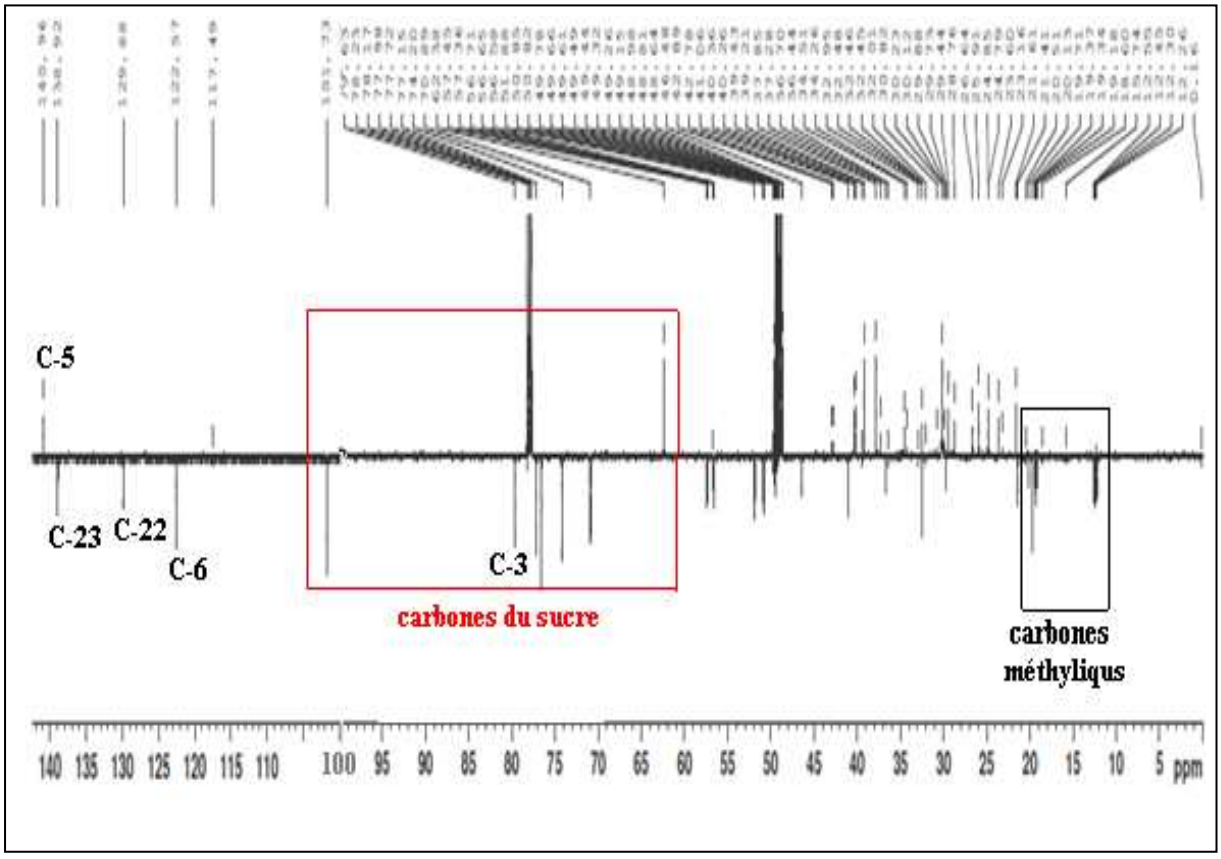


Figure III.20: Spectres RMN ^{13}C des composés OP16 (haut) et OP15 (bas)

Le tableau III.4 ci-dessous reproduit les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OP16**.

Position	δ_H *m J* Hz	δ_C
1	1,09 -1,86 *m*	37,4
2	1,50-1,84 *m*	31,8
3	3,52 *m*	71,9
4	2,27 *m*	42,4
5	-	140,9
6	5,35 *d* 5,1	121,9
7	1,43-1,98 *m*	32,09
8	2 *m*	32,06
9	0,95 *m*	50,2
10	-	36,6
11	1,03-1,51 *m*	21,2
12	1,18-2,031 *m*	39,9
13	-	42,47
14	1 *m*	56,9
15	1,07- 1,55 *m*	25,6
16	1,27-1,85 *m*	28,4
17	1,12 *m*	56,2
18	0,68 *s*	12,04
19	1,01 *s*	19,5
20	1,37 *m*	36,3
21	0,92 *d* 6,5	18,9
22	5,03 *dd* 15,2; 8,4	129,4
23	5,16 *dd* 15,1; 8,7	138,5
24	2,03 *m*	40,7
25	1,54 *m*	51,4
26	0,82 *m*	19,2
27	0,84 *m*	20,01
28	1,17-1,44 *m*	25,9
29	0,83 *m*	12,4

Tableau III.4 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé OP16.

CONCLUSION

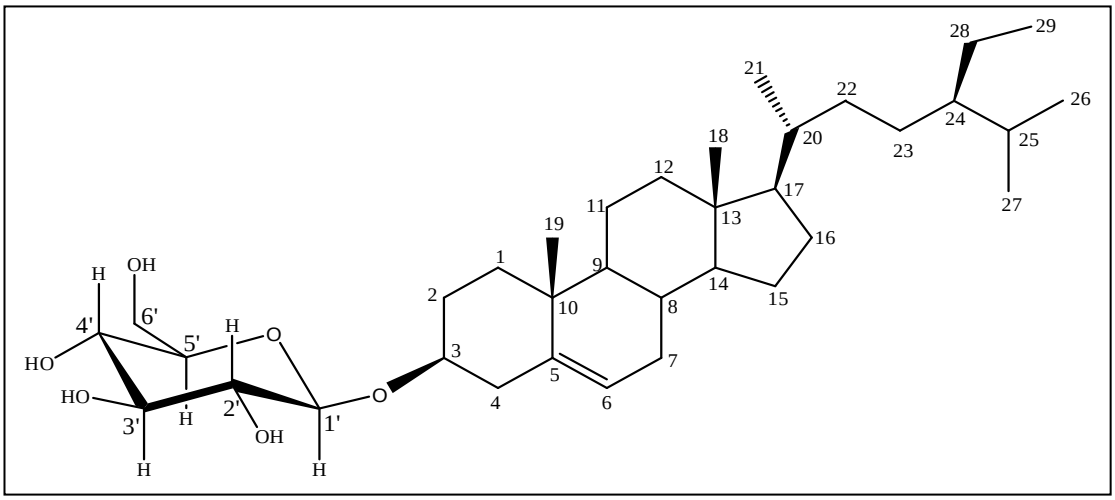
CONCLUSION

La présent travail reporte donc une étude phytochimique réalisée séparément sur les extraits acétate d'éthyle et méthanolique de *Odontospermum pygmaeum*, plante saharienne appartenant à la grande et diversifiée famille Asteraceae et utilisée traditionnellement pour calmer les maux d'estomac. La famille Asteraceae en général et le genre *Odontospermum* en particulier sont particulièrement bien fournis en métabolites secondaires connus pour leurs diverses et intéressantes activités biologiques. Ces derniers sont constitués quasi-exclusivement de flavonoïdes, sesquiterpènes et triterpénoïdes qui sont d'ailleurs considérés comme les composés typiques aussi bien de la famille que du genre. Cette seconde investigation chimique sur l'espèce *O. pygmaeum* qui constitue une modeste contribution dans la connaissance des constituants chimiques de la famille, du genre, voire de l'espèce, confirme les faits établis. En effet, trois triterpénoïdes (**OP4**, **OP15** et **OP16**) ont été isolés par différentes techniques chromatographiques et identifiés par les méthodes modernes d'analyse s'appuyant principalement sur la RMN mono- et bidimensionnelle.

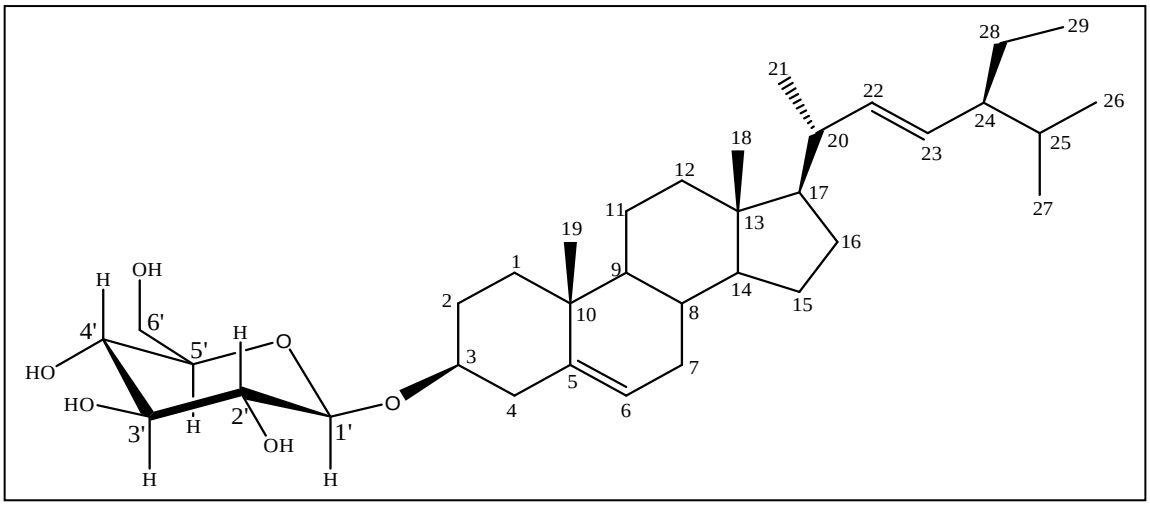
Les structures des produits isolés ont été donc établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D ^{1}H et ^{13}C *J*-modulé, RMN 2D (COSY H-H, HSQC et *J*-modulé, HMBC), spectrométrie de masse ESI-MS et EI-MS, par la mesure des pouvoirs rotatoires ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

En conclusion, notre travail a permis d'isoler et de déterminer les structures de trois composés nommés **OP4**, **OP15** et **OP16** et dont les structures sont reproduites ci-dessous.

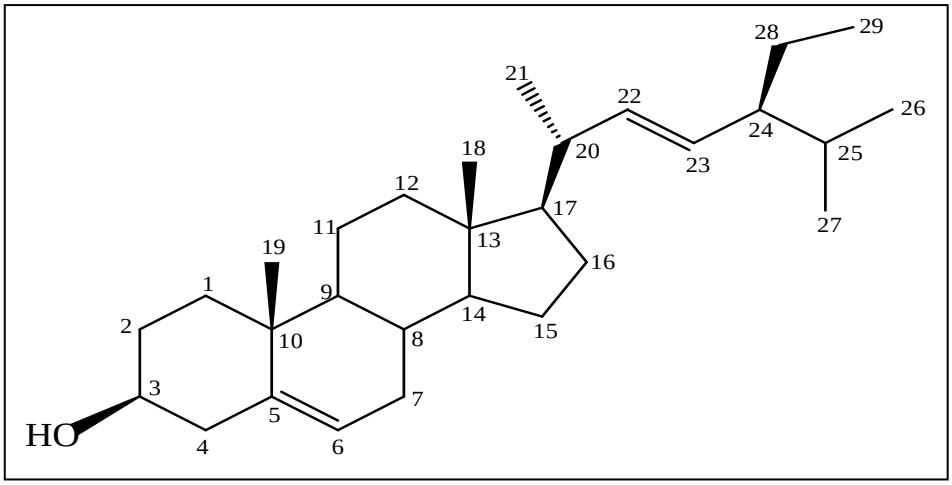
.



Composé OP4 : 3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol



Composé OP15 : 3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol



Copmposé OP16 : Stigmastérl

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

[1] Paris R. R., Moyse H., 1971, Précis de matière Médical, Tome III. Paris, 397.

[2] Paulian P., 1967, Guide pour l'Etude de quelques plantes Tropicales, Ed. Gauthier-Villards, Paris.

[3] Gaussen H., Leroy H. F., 1982, Précis de Botanique (végétaux supérieurs), 2^{éme} Ed.426.

[4] Guignard J.L., 1994, Abrégé Botanique, 9ème Ed. 204.

[5] Quezel F., Santa S., 1962-1963, Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.

[6] Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle, N°73, Documents pour le médecin du travail N°105 1er trimestre 2006.

[7] Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris.

[8] Meyers Konversations-Lexikon, 1888; Autorenkollektiv, Verlag des Bibliographischen Instituts, Leipzig und Wien, Vierte Auflage, 1885-1892;1. Band: A - Atlantiden, Seite 962.

[9] Die Rose von Jericho kann man im Bibelwerk Linz beziehen in 2 Größen: Normalgröße (Euro 5.) oder groß (Euro 6.). Seite 965.

[10] Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.

[11] Giovannia Ppendino, Jasminj Akuovic, and Svenj Akupovic, *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 6, pp. 1039 1043, 1997.

[12] Mohamed Akssira,a, Fouad Mellouki,a Ali Salhi,a Hakim Alilou,a Abderrahmane Saouf,a Fadwa El Hanbali,a Jesu´ s F. Arteagab and Alejandro F. Barrerob,Tetrahedron Letters 47 (2006) 6719-6721.

[13] Lahcene Zaiter, Mohamed Bouheroum,Samir Benayache, Fadila Benayache, Francisco Leon, Ignacio Brouard, José Quintana, Francisco Estévez, Jaime Bermejo, Biochemical Systematics and Ecology 35 (2007) 533-538.

[14] Belloum. Z, phytochimie, thése de magister, Université Constantine 2007.

[15] Seghiri R,. phytochimie, thése de doctorat, Université Constantine.

[16] S. Eldahmy, J. Jakupovic , F. Bohlmann and T.M. SARG, Tetrahedron, vol. 41.No. 2, pp.309 to 316, 1985.

[17] A. San Feliciano, A. F. Barrero, M. Medarde, J. M. Miguel del Corral, E. Tetrahedron Letters, vol. 23.No. 30, pp. 3097-3100,1982.

[18] A. San Feliciano, M. Medarde, J. M. Miguel del Corral, A. Aramburu, M. Gordaliza and A. F. Barrero, Tetrahedron Letters, vol. 30.No. 21, pp. 2851-2854,1989.

[19] AmeÂ lia P. Rauter, Isabel Branco, Jaime Bermejo, Antonio G. GonzaÂ lez, Maria D. GarcõÂa-GraÂ valos, Arturo San Feliciano, Phytochemistry 56 (2001) 167-171.

[20] J. Jakupovic, L. Lehmann, F. Bohlmann and A. Arroyo Hogdson, *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 10, pp. 2854-2855, 1987.

[21] Abdelaziz M. Dawidar, Seifeddin N. Ayyad, Mamdouh Abdel-Mogib and Walied M. Alarif, J. Saudi Chem. Soc., Vol. 9, No. 1, pp. 137-142, 2005.

[22] Ahmed A. Ahmed, Journal of Natural Products Vol. 53, No. 6. pp. 824-827. June 1992.

[23] Arnaud.P. Cour de chimie organique, Bordas, Paris, 441, 1985.

[24] Gaignault, J.C., Bidet. D., Gaillard. M., Perronnet. J. Stérols et steroïdes, Paris, 11-31, 1997.

[25] Lehinger.A. Principes de biochimie, Flammarion, 315, 1989.

[26] Mcmurry, J. Chimie organique-les grands principes Cours et exercices corrigés, 4éme édition, Paris, 515, 1998.

[27] Klyne, W., Tame, N.D. La chimie des stéroïdes, Paris, 13, 1966.

[28] Baker, R. A., Evans, D.A., Grayson, D.H., Jonenes, R.C.F., Lough, A.K., Moore, P.R., Thaller, V. Aliphatic and related natural product chemistry, 1979.

[29] Paul Mdeurick. Medicinal natural product, abiosynthetic approach. 2éme edition, Wiley, 2002.

[30] Barton, D.H.R The conformation of the steroid nucleus, Experientia, 6, 316-320, 1950.

[31] Moore, J.A., Alain, S. Chimie organique modern, Masson, Montréal, Tornoto, 335-343, 1975.

[32] Wilson, C.O., Gisvold, O., Doerge, R.F. Text book of organique medicinal and pharmaceutical chemistry, J.B., Lippincott 7éme édition, 734, 1977.

[33] Grahom-Solomons, T. W,. Fundamentals organic chemistry, United States of America, 951, 1994.

[34] Simmonds, R. J. Chemistry of biomolecules, 151, 1992.

[35] IKan, R. Natural products, 2éme edition, Academic Pres, New York, Boston, 127, 153, 1991.

[36] Hill, R. S., Making, H. L. J,. Kirk, D. N, Murphy, G. M,. Dictionary of steroids-chemical data-structures and bibliographies, London, Champan & Hall, 1991.

[37] Finar, I., Organic chemistry-stereochemistry and the chemistry of natural products, 5éme edition, Great Britain, 518, 1994.

[38] Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D. V., Harborne, J.B. Natural products: Their chemistry and biological significance, 1éré edition, Longman, England, 331-343, 1994.

[39] Courtios, J.E., Perlés, R. Précis de chimie biologique, 2éme édition, Masson et Cie, Paris, 424-437, 1971.

[40] Boulanger, P., Poonovski, J., Tayeau, F., Mandl, P., Biserte, G., Biochimie médicinale-les constituants des organismes vivants, Masson et Cie, Paris, 100, 1966.

[41] Grassé,P. P., Lavcolette, P., Holland, A.,Nigon, V., Wolf, E. Biologie général, Paris, 193, 1969.

[42] Shoppee, C.W., Shopper, E.Steroids-Sterols and bile acids-Chemistry of carbon compounds, New York, Elsevier, 17, 765-825, 1953.

[43] Heller, R. Biologie végétale II : Nutrition et metabolism, Paris, 1969.

[44] Bruneton, J. Pharmacognosie des plantes médicinales, 3éme édition, Tec & Doc, Paris, 1999.

[45] Bruneton, J. Pharmacognosie des plantes médicinales, 3éme édition, Tec & Doc, Paris, 387-402, 1993.

[46] Teisseire, P.J. Chimie des substances odorantes, Tec& Doc, Paris, 157-186, 1991.

[47] Briley.M., Carilla, E., Fauran.F. J.Pharmacol. 83, 328, 1979.

[48] Hostettamnn K, Marston A. Saponins : chemistry and pharmacology of natural products. Cambridg: University Press; 1955.

[49] J. Verauteren plan du cours de Pharmacognosie Spéciale-Drogues à Mévalonates-Drogues trepénoïdes, Drogues à saponosides stéroïdiques-Monographies, édition 2007.

[50] Iserin, P., Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, 2001.

[51] Xu, R., Fazio, G. C., Et Mtsuda, S. P. T., Phytochemistry, 65, 261-291, 2004.

[52] Park, S. Y., Chang, S. Y., Oh, O. J., Yook, C. S., Nohara, T. Phytochemistry, 59, 379-384, 2002.

[53] San Martin R. Use of Quillaja saponins to control namatodes developpement of a commercil product: QL AGRI®.

[54] L. Voutquenne, C. Lavaud, G. Massoit, L. Le Men-Olivier Pharmaceutical Biology, Vol. 40 (4), 253-262, 2002.

[55] John Mickael Berger Thése de doctorat Ph D, Virginia, 2001.

[56] Shao Y, Chin CK, Ho CT, Ma W, Garrion S, Huang MT Cancer Lett., Vol. 104 (1), 31-36, 1996.

[57] Ke Li, Yingwu wang, Jingkai Gu, Xiaoyan Chen, Dafang Zhong Journal of Chromatoraphy B, Vol. 817, 271-275, 2005.

[58] Pascale Pracos, Agronomie, Vol. 8 (9), 793-799, 1988.

[59] Schroepfer, G.Jr. Biochem, 54, 435-621, 1975.

[60] Roberts, J.D., Caserio, M.S., Conia, J.M., Chimie organique modern,Menlo & Park, Paris, 784-797, 1977.

[61] Murphy, V. Secondry metabolism, 2^{éme} édition, Clarendon press. Oxford, 1987.

[62] Richter, G. Métabolisme des végétaux-Physiologie et biochimie, Presses polytechniques, 300-302, 1993.

[63] Haralampidis, K, Trojanowska, M.Etosbown, A.E. Biotechnology, 75, 31-49, 2002.

[64] William, C.E Trease and Evans-Pharmacognosy, 15^{éme} édition, W.B.Saunnders, Company limited, London, 290-297, 2002.

[65] Herbert, R.G., The biosynthesis of secondary metabolism, Khapman & Hall, London, New York, 1989.

[66] Mahler, H.R.,Cordes, E..H. biology chemistry, 2^{éme} édition, Harper & Row, 748, 1971.

[67] Hosttman, K.A., Marston, A. Chemistry and Pharmacognosy of natural product, Cambridge University Press, Combridge, UK, 1995.

Chapitre IV

Partie expérimentale

IV-1 Matériels et appareillage

IV-1-1 Récolte de la plante *Odontospermum pygmaeum*

La plante *Odontospermum pygmaeum* a été récoltée dans la région de Biskra au mois de Mai 2008. Elle a été identifiée par le Professeur Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie, de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna. Elle a été séchée à l'abri du soleil, puis broyée finement pour présenter une grande surface de contact avec les solvants extracteurs.

IV-1-2 Chimie extractive

IV-1-2-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies par CCM analytique ont été effectuées sur des plaques en verre ou en aluminium recouvertes de silice.

Support aluminium: en phase normale, Kieselgel 60 F_{254} Merck, 250 µm (20x20 cm).

Support verre :

- en phase normale, Kieselgel 60 F_{254} Merck, 250 µm (10 ou 20x20 cm)
- en phase inverse, RP 18 F_{254S}, 200 µm Merck (5x10, 10x20 cm).

Le révélateur utilisé est l'acide sulfurique dilué à 10 % plus acide acétique à 10 % dans l'eau (25 %).

Les purifications par CCM préparative ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice Kieselgel 60 F_{254} Merck, 250 µm (20x20 cm).

IV-1-2-2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes chromatographiques classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

IV-1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les phases stationnaires utilisées au cours des différentes opérations de séparation et de purification sont énumérées ci-après :

- en phase normale, une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh), en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon, objet des procédures de purification.
- Sephadex LH-20, en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon à purifier.
- en phase inverse, une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63 μm), en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier.

L'élution peut être effectuée à pression atmosphérique ou bien à l'aide d'air comprimé dans le cas d'utilisation de silice greffée RP-18.

IV-1-2-4 Chromatographie sur plaque préparative (CCE)

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse ont été effectuées sur des plaques de silice normale Merck (70-230 mesh).

IV-1-3 Chimie structurale

IV-1-3-1 Spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonnance magnétique nucléaire RMN ^{1}H et RMN ^{13}C, mono et bidimensionnelle, ont été enregistrés sur un appareil Brucker à 500 MHz et 125 MHz respectivement, du centre de recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France) et du Laboratoire de Pharmacognosie CNRS-UMR 6013 Reims (France).

IV-1-3-2 Spectroscopie de masse (SM)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en ESI (Electro Spary Ionisation), sur un spectromètre de masse de type Brucker LC-MS/MS type esquire-LC, du centre de recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

IV-1-3-3 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm).

La cuve employée est de 1 ml et une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

IV-2 Etude de l'espèce *Odontospermum pygmaeum*

930 g de la plante réduite en poudre sont mis à macérer dans de l'éther de pétrole (10 litres) pendant quatre jours à température ambiante. Après filtration et évaporation à sec du solvant, 15,5 g de l'extrait étheropétrolique ont été obtenus. Le résidu de la filtration subit une extraction solide-liquide par l'acétate d'éthyle (10 litres) durant quatre jours à la température ambiante. La filtration et l'évaporation à sec de la solution a permis d'obtenir 6 g de l'extrait acétate d'éthyle. Enfin, la macération des marcs récupérés dans le méthanol dans les mêmes conditions, la filtration et enfin l'évaporation à sec du solvant, ont permis d'obtenir 28 g de l'extrait méthanolique.

IV-2-1 Fractionnement et purification

L'analyse des CCM des différents extraits a montré que les deux extraits acétate d'éthyle et méthanolique offrent une plus grande richesse en produits naturels, comparativement à l'extrait étheropétrolique. L'analyse CCM est effectuée pour l'extrait acétate d'éthyle dans un mélange chloroforme/méthanol à 5% et un mélange chloroforme/méthanol/eau (7/3/0,1) pour l'extrait méthanolique. Le profil CCM de différents extraits après révélation par à l'acide sulfurique puis chauffage, est illustré dans la figure ci-dessous.

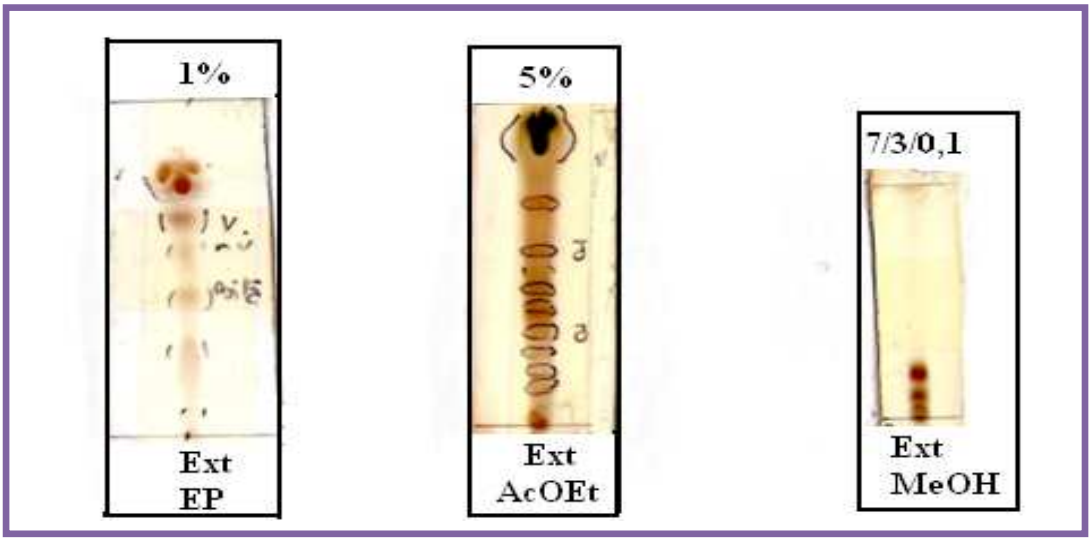


Figure IV.1 : Analyse CCM des extraits bruts de la plante

IV-2-2 Fractionnement et purification de l'extrait l'acétate d'éthyle

6 g de l'extrait acétate d'éthyle ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale (60 g). L'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par addition d'acétate d'éthyle (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (100-0 à 20-80). A l'issue de ce fractionnement, 44 fractions de 100 ml ont été recueillies (Tableau IV. 1).

Fractions récupérées	**Eluant de la colonne**	**Examen à la C.C.M**
	éther de pétrole	
1-2	100	néant
	éther de pétrole/acétate d'éthyle	
3-4	99/1	néant
5-6	97/3	néant
7-8	95/5	néant
9-10	90/10	néant
11-13	80/20	mélange de trois taches + traînée
14-15	70/30	mélange de plusieurs taches + traînée
16-17	60/40	mélange complexe
18-19	50/50	mélange de plusieurs taches
20-21	40/60	//
22-23	30/70	//
24-25	20/80	//
26-28	10/90	//
29-32	00/100	néant
	acétate d'éthyle/méthanol	
33-34	99/1	tache + traînée
35-36	97/3	deux taches + traînée
37-38	95/5	tache + traînée
39-40	90/10	//
41	80/20	//
42	60/40	//

43	20/80	//
44	00/100	néant

Tableau IV.1 : Fractionnement de l'extrait de l'acétate d'éthyle

L'examen CCM de ces fractions à la lumière UV (longueurs d'onde 254 et 366 nm) et révélation par à l'acide sulfurique puis chauffage, permettent de regrouper les fractions ayant la même constitution. Ceci a fourni 11 fractions allant de F1 à F11 (Tableau IV.2).

Fractions	**Sous - Fractions**	**Poids (mg)**	**Observation**
F1	1-5	00	néant
F2	6-9	764	néant
F3	10-13	1679	quatre taches + traînée
F4	14-16	454	plusieurs taches + traînée
F5	17-18	250	trois taches + traînée
F6	19-22	556	mélange complexe
F7	23-25	257	mélange de plusieurs taches
F8	26-28	129	deux taches + traînée
F9	29-36	457	plusieurs taches + traînée
F10	37-40	293	trois taches + traînée
F11	41-44	510	trois taches + traînée

Tableau IV.2 : Rassemblement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle

IV-2-2-1 Etude de la fraction F9

La fraction F9 (457 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale (20 g). L'élution est menée dans un mélange chloroforme-méthanol à différents gradients : 100-0 à 97-03. Des fractions de 50 ml sont collectées et réunies selon leur profil CCM (éluant : chloroforme-méthanol 90-10), donnant 5 sous fractions allant de F'1 à F'5 (Tableau IV.3).

Fractions	Sous - Fractions	Eluant de la colonne	Poids (mg)	Observation
F'1	1-45	chloroforme	49	traînée
F'2	46-54	99/1	20	//
F'3	55-85	97/3	134	mélange complexe
F'4	86-100	//	80	plusieurs taches + traînée
F'5	100-133	//	28	tache + traînée

Tableau IV.3 : Rassemblement de la fraction F9 de l'extrait acétate d'éthyle

La recristallisation de la fraction F'5 (100-133) d'un poids de 28 mg dans l'acétone a permis d'obtenir le produit **OP4** à l'état pur (22 mg) (Figure IV.2).

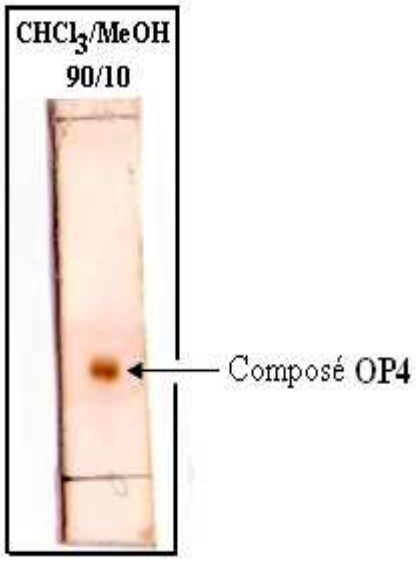


Figure IV.2 : Analyse CCM de la fraction F'5

IV-2-3 Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique

10 g de l'extrait méthanolique de cette plante ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice greffée Lichroprep RP-18 (30 g). L'élution est réalisée initialement par l'eau dont on augmente la polarité par l'addition de méthanol (90-10 à 0-

100). A l'issue de ce fractionnement 19 fractions de 100 et 200 ml ont été recueillies (Tableau IV.4).

Fractions récupérées	**Eluant de la colonne**	**Volume (ml)**	**Examen à la C.C.M**
	Eau/méthanol		
1	90/10	200	deux taches invisibles + traînée
2	90/10	//	mélange complexe + traînée
3	80/20	//	//
4	//	//	une tache + traînée
5	70/30	//	//
6	//	//	traînée
7	60/40	100	//
8	50/50	//	//
9	40/60	200	deux taches visibles + traînée
10	//	//	//
11	30/70	100	mélange complexe
12	20/80	200	//
13	//	//	//
14	10/90	//	//
15	//	//	//
16	00/100	//	//
17	//	//	tache invisible + deux taches visibles
18	//	//	//
19	//	//	néant

Tableau IV.4 : Fractionnement de l'extrait méthanolique

L'examen CCM à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm puis révélation et chauffage, a permis de regrouper les fractions similaires, fournissant ainsi 9 fractions (Tableau IV.5).

Fractions	Sous - Fractions	Observation
F1	1-2	traînée
F2	3-5	traînée
F3	6-8	mélange complexe
F4	9-10	plusieurs taches + traînée
F5	11-12	traînée
F6	13-14	//
F7	15-16	plusieurs taches + traînée
F8	17-18	plusieurs taches
F9	19	néant

Tableau IV.5 : rassemblement des fractions de l'extrait méthanol

IV-2-3-1 Etude de la fraction F8

La recristallisation de 10 mg de la fraction F8 dans le méthanol a donné le produit **OP15** à l'état pur (6 mg) (Figure IV.3).

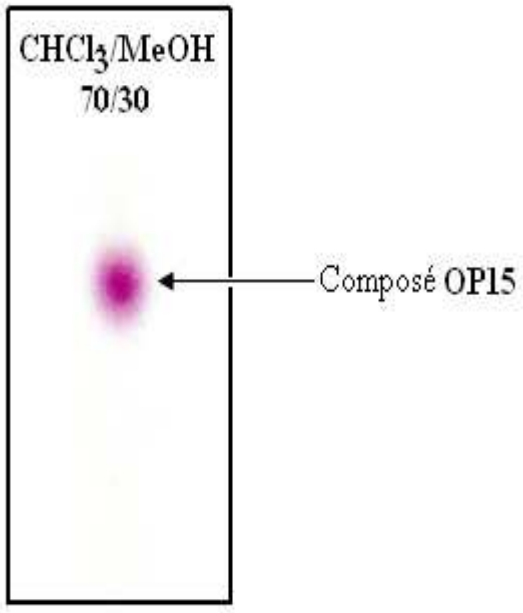


Figure IV.3 : Analyse CCM de la fraction F8

IV-2-3-2 Etude de la fraction F8'

La masse restante de la fraction F8 nommée F8' (160 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est menée dans un mélange chloroforme/méthanol à différents gradients allant de (100-0) à (0-10), puis dans le méthanol pur. Ce fractionnement a donné 20 fractions (Tableau IV.6).

Fractions	**Eluant de la colonne**	**Observation**
F1 (1-6)	$CHCl_3$	néant
	$CHCl_3$/MeOH	
F2 (7-20)	99/01	chlorophylle + petite tache
F3 (21-25)	97/03	//
F4 (26-33)	97/03	//
F5 (34-36)	//	tache invisible
F6 (37-44)	//	//
F7 (45-51)	//	tache invisible + petite tache
F8 (52-60)	//	//
F9 (61-70)	//	petite tache invisible
F10 (71-78)	95/05	néant
F11 (79-85)	//	tache invisible + traînée
F12 (86-100)	//	mélange de taches
F13 (101-106)	//	tache invisible
F14 (107-110)	//	tache invisible + traînée
F15 (111-112)	90/10	//
F16 (113-116)	//	trois taches
F17 (117-122)	//	deux taches + traînée
F18 (123-128)	//	//
F19 (129-148)	//	//
F-20 (149-155)	MeOH	néant

Tableau IV.6 : Rassemblement de la fraction F8' de l'extrait méthanolique

La fraction F5 (34-36) montrant une tache invisible en UV et mauve après révélation par une solution acide a fourni le composé **OP16** (10 mg) (Figure IV.4).

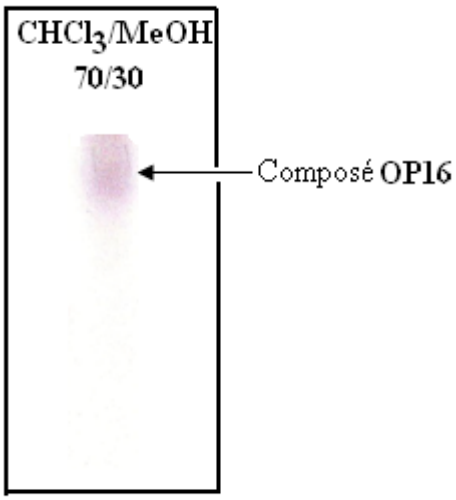
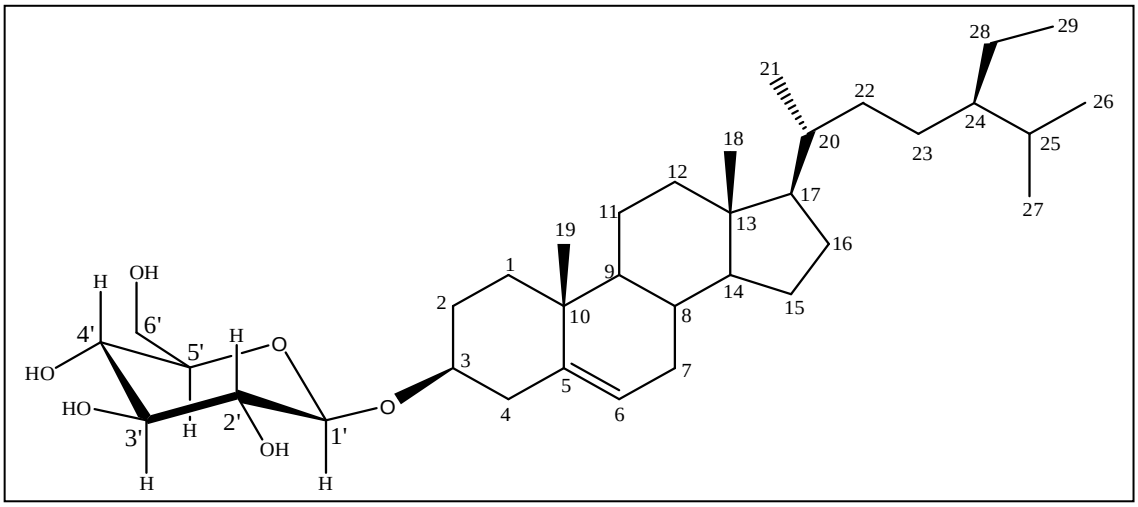


Figure IV.4 : Analyse CCM de la fraction F5 (34-36)

IV-3 Constantes physiques et données spectrales des composées isolées

IV-3-1 Composé OP4



Formule brute : $C_{35}H_{60}O_6$

Poids moléculaire : 576 $g.mol^{-1}$

Nom systématique : 24-éthyl-cholest-5-ène-3-*O*-β-D-glucopyranosyl

Nom trivial : 3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol

Quantité du produit : 22 mg

Aspect : poudre blanche

ESI-MS : mode positif 599 $[M+Na]^+$

mode négatif 575 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H : (500 MHz, CD_3OD, TMS)

Génine

1,07-1,86 (*m*, H-1)

1,62-1,92 (*m*, H-2)

3,59 (*m*, H-3)

2,29 (*t*, 1H, *J* = 13 Hz, H-4b)

2,41 (*dd*, 1H, *J* = 13; 2 Hz, H-4a)

5,37 (*dl*, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-6)

1,56-2 (*m*, H-7)

1,45 (*m*, H-8)

0,94 (*m*, H-9)

1,49 (*m*, H-11)

1,17-2,01 (*m*, H-12)

1,01 (*m*, H-14)

1,09-1,59 (*m*, H-15)

1,27-1,85 (*m*, H-16)

1,11 (*m*, H-17)

0,70 (*s*, 3H, H-18)

1,02 (*s*, 3H, H-19)

1,37 (*m*, H-20)

0,93 (*d*, 3H, *J* = 6,4 Hz, H-21)

1,04-1,34 (*m*, H-22)

1,18 (*m*, H-23)

0,94 (*m*, H-24)

1,67 (*m*, H-25)

0,83 (*m*, H-26)

0,84 (*m*, H-27)

1,25 (*m*, H-28)

0,85 (*m*, H-29)

β-D-glucopyranosyl

4,41 (*d*, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-1')

3,23 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-2')

3,43 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-3')

3,41 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-4')

3,29 (*m*, 1H, H-5')

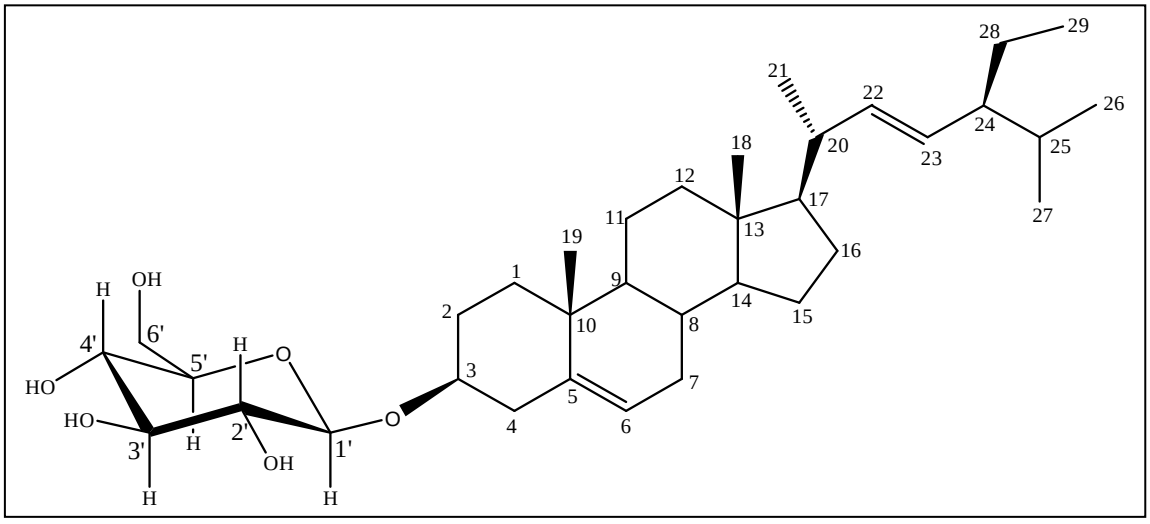
3,74 (*dd*, 1H, *J* = 11,9; 4,8 Hz, H-6'b), 3,85 (*dd*, 1H, *J* = 11,9; 2,9 Hz, H-6'a)

RMN ^{13}C : (125 MHz, CD_3OD, TMS)

Génine : δ 37,6 (CH_2-1), 29,9 (CH_2-2), 79,4 (CH-3), 39,02 (CH_2-4), 140,7 (C-5), 122,4 (CH-6), 32,28 (CH_2-7), 32,26 (CH-8), 50,6 (CH-9), 37,07 (C-10), 21,4 (CH_2-11), 40,1 (CH_2-12), 42,6 (C-13), 57,1 (CH_2-14), 24,6 (CH_2-15), 28,5 (CH_2-16), 56,4 (CH-17), 12,07 (CH_3-18), 19,5 (CH_3-19), 36,4 (CH-20), 18,9 (CH_3-21), 34,3 (CH_2-22), 26,4 (CH_2-23), 46,2 (CH-24), 29,5 (CH-25), 19,2 (CH_3-26), 19,9 (CH_3-27), 23,4 (CH_3-28), 12,1 (CH_3-29).

β-D-glucopyranosyl : δ 101,5 (CH-1'), 73,9 (CH-2'), 76,9 (CH-3'), 70,6 (CH-4'), 76,3 (CH-5'), 62,2 (CH-6').

IV-3-2 Composé OP15



Formule brute : $C_{35}H_{58}O_6$

Poids moléculaire : 574 $g.mol^{-1}$

Nom systématique : Stigmasta-5(6), 22(23)-diène-3-*O*-β-D-glucopyranosyl

Nom trivial : 3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol

Quantité du produit : 6 mg

Aspect : poudre blanche

ESI-MS : mode positif 597 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3$+CD_3OD, TMS)

1,04-1,82 (*m*, H-1)

1,57-1,87 (*m*, H-2)

3,55 (*m*, H-3)

2,23 (*t*, 1H, *J* = 11 Hz, H-4b)

2,35 (*dd*, 1H, *J* = 13; 2 Hz, H-4a)

5,32 (*sl*, 1H, H-6)

1,93-1,96 (*m*, H-7)

1,48 (*m*, H-8)

0,90 (*m*, H-9)

1,46 (*m*, H-11)

1,44-1,97 (*m*, H-12)

0,98 (*m*, H-14)

1,11 (*m*, H-15)

1,23-1,88 (*m*, H-16)

1,13 (*m*, H-17)

0,65 (*s*, 3H, H-18)

0,99 (*s*, 3H, H-19)

1,33 (*m*, H-20)

0,93 (*d*, 3H, *J* = 6,1 Hz, H-21)

4,96 (*dd*, 1H, *J* = 15; 8,6 Hz, H-22)

5,13 (*dd*, 1H, *J* = 15; 8,7 Hz, H-23)

2,02 (*m*, H-24)

1,49 (*m*, H-25)

0,77 (*m*, H-26)

0,79 (*m*, H-27)

1,03-1,54 (*m*, H-28)

0,83 (*m*, H-29)

β-D-glucopyranosyl

4,36 (*d*, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-1')

3,18 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-2')

3,37 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-3')

3,36 (*t*, 1H, *J* = 8 Hz, H-4')

3,25 (*m*, 1H, H-5')

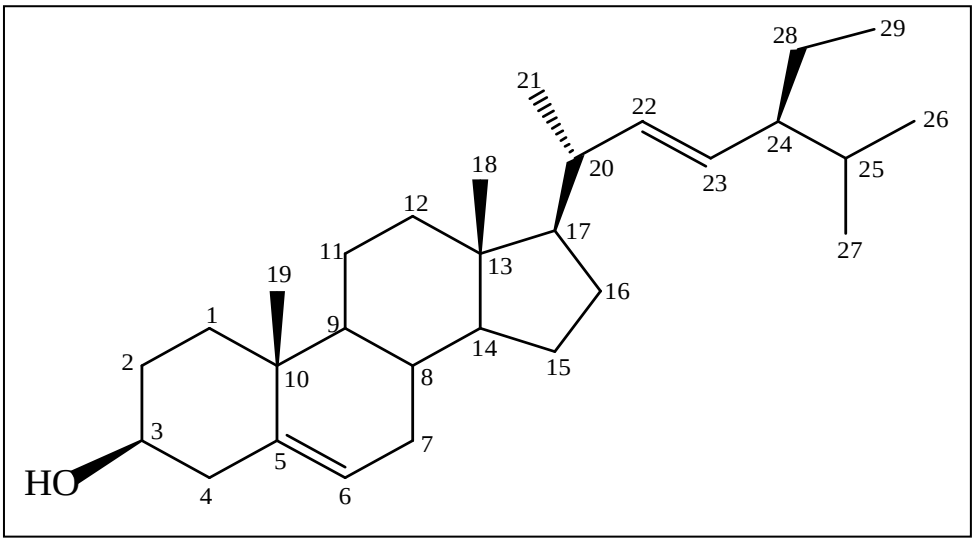
3,70 (*dd*, 1H, *J* = 11,9; 4,9 Hz, H-6'b), 3,81 (*dd*, 1H, *J* = 11,9; 2,4Hz, H-6'a)

RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3$+CD_3OD, TMS)

Génine : δ 37,8 (CH_2-1), 30,1 (CH_2-2), 79,6 (CH-3), 39,2 (CH_2-4), 140,9 (C-5), 122,5 (CH-6), 32,45 (CH_2-7), 32,48 (CH-8), 50,8 (CH-9), 37,2 (C-10), 21,6 (CH_2-11), 40,2 (CH_2-12), 42,7 (C-13), 57,4 (CH_2-14), 26,6 (CH_2-15), 29,4 (CH_2-16), 56,5 (CH-17), 12,4 (CH_3-18), 19,7 (CH_3-19), 36,7 (CH-20), 19,1 (CH_3-21), 129,8 (CH_2-22), 138,9 (CH_2-23), 41,06 (CH-24), 51,8 (CH-25), 19,3 (CH_3-26), 20,1 (CH_3-27), 24,8 (CH_3-28), 12,5 (CH_3-29).

β-D-glucopyranosyl : δ 101,7 (CH-1'), 74,2 (CH-2'), 77,1 (CH-3'), 70,8 (CH-4'), 76,5 (CH-5'), 62,3 (CH-6').

IV-3-3 Composé OP16



Formule brute : $C_{29}H_{48}O$

Poids moléculaire : 412 $g.mol^{-1}$

Nom systématique : Stigmasta-5(6), 22(23)-diène-3-ol

Nom trivial : Stigmastérol

Quantité du produit : 10 mg

Aspect : cristaux d'aiguilles blanches

RMN ^{1}H : (500 MHz, $CDCl_3$, TMS)

1,09-1,86 (*m*, H-1)

1,5-1,84 (*m*, H-2)

3,52 (*m*, H-3)

2,7 (*m*, H-4)

5,35 (*d*, 1H, *J* = 5,1 Hz, H-6)

1,43-1,98 (*m*, H-7)

2 (*m*, H-8)

0,95 (*m*, H-9)

1,03-1,51 (*m*, H-11)

1,18-2,031 (*m*, H-12)

1 (*m*, H-14)

1,07-1,55 (*m*, H-15)

1,27-1,85 (*m*, H-16)

1,12 (*m*, H-17)

0,68 (*s*, 3H, H-18)

1,01 (*s*, 3H, H-19)

1,37 (*m*, H-20)

0,92 (*d*, 3H, *J* = 6,5 Hz, H-21)

5,03 (*dd*, 1H, *J* = 15,2; 8,4 Hz, H-22)

5,16 (*dd*, 1H, *J* = 15,1; 8,7 Hz, H-23)

2,03 (*m*, H-24)

1,54 (*m*, H-25)

0,82 (*m*, H-26)

0,84 (*m*, H-27)

1,17-1,44 (*m*, H-28)

0,83 (*m*, H-29)

RMN ^{13}C : (125 MHz, $CDCl_3$, TMS)

δ 37,4 (CH_2-1), 31,8 (CH_2-2), 71,9 (CH-3), 42,4 (CH_2-4), 140,9 (C-5), 121,9 (CH-6), 32,09 (CH_2-7), 32,06 (CH-8), 50,2 (CH-9), 36,6 (C-10), 21,2 (CH_2-11), 39,9 (CH_2-12), 42,47 (C-13), 56,9 (CH_2-14), 25,6 (CH_2-15), 28,4 (CH_2-16), 56,2 (CH-17), 12,04 (CH_3-18), 19,5 (CH_3-19), 36,3 (CH-20), 18,9 (CH_3-21), 129,4 (CH_2-22), 138,5 (CH_2-23), 40,7 (CH-24), 51,4 (CH-25), 19,2 (CH_3-26), 20,01 (CH_3-27), 25,9 (CH_3-28), 12,4 (CH_3-29).

RESUME

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de la plante saharienne nommée *Odontospermum pygmaeum* (*Asteriscus pygmaeus* Coss. & Dur.), appartenant à la famille Asteraceae. Cette dernière largement distribuée dans le règne végétal, est connue pour sa richesse en métabolites secondaires biologiquement actifs comme les flavonoïdes, sesquiterpènes et triterpénoïdes qui s'imposent comme les composés typiques de la famille Asteraceae et du genre *Odontospermum*.

Cette étude chimique a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques axées essentiellement sur la RMN mutiimpulsionnelle, de 3 métabolites secondaires (**OP4**, **OP15** et **OP16**) de nature triterpénostéroïdique.

Le composé **OP4** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol) a été isolé de l'extrait acétate d'éthyle tandis que les composés **OP15** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol) et **OP16** (Stigmastérol) ont été mis en évidence au niveau de l'extrait méthanolique.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^{1}H, ^{13}C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, et HMBC), par la spectrométrie de masse (EI-MS et ESI-MS), par la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à un rappel bibliographique comprenant une description botanique de la famille, du genre et enfin de l'espèce de notre plante.
- Le deuxième chapitre est consacré à une étude des stéroïdes et saponosides.
- Les travaux personnels seront présentés dans le troisième chapitre.
- Le quatrième chapitre constitue la partie expérimentale.

ملخـــص

يتمثـــل مـــوضـــوع هـــذا البحث في دراســـة فيتو كيميـــائية لنبتة من الصحراء تـــسـمى *Asteriscus pygmaeus* (*DC.*) Coss.) *Odontospermum pygmaeum* تابعـــة لعـــائلـــة Asteracea. وتتوزع بكثرة في ممـــلكة النبـــاتات ومعـــروفة بغنـــاها بمنتـــوجات الأيض الثـــانوي الفعـــــالة بيولوجيـــا مثـــل الفـــلافونويـــدات، السيسكـــويتربينـــات والتربينـــويدات وهذه المركبـــات تتألـــف من نمـــاذج خـــاصـــة لهـــذه العائلـــة (Asteracea) والجنـــس *Odontospermum*.

هـــذه الـــدراسة الكيميائية تسمـــح بطـــرق الفصـــل على العمود الكروماتوغرافي، و بواسطة التقنية المطيافية العالية (RMN). ممـــا أدى إلى عـــزل 3 مركبات من الأيـــض الثـــانوي (**OP15**, **OP4** و **OP16**) ذات طبيـــــعة تريتربينـــات ستيرويد يـــكيـــة.

المركب **OP4** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol) تم فصله مـــن مستخلص الأسيتـــات دواثيـــل بينمـــا المركـــبين **OP15** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol) و **OP16** (Stigmastérol) تبينـــا على مستـــوى مستخلص الميثـــانوليـــك.

تم تحديد الصيغ الكيميائية للمركبات المعزولة من النبتة بواسطة التحاليل المطيافية المختلفة وخاصة مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الكتلة و المقارنة مع نتائج المنشورات العلمية.

نتـــائج هـــذا العمل ستوضـــح كما يلي :

الفصل الأول يختـــص بالدراســـة المرجعـــية للوصـــف النبـــاتي للعائلـــة والجنـــس وفي الأخيـــرنـــوع النبتـــة.

الفصل الثاني يضم الدراسة النظرية للستروييـــدات و الســـابونيزيدات.

الفصل الثالث يضم كل الأعـــمال الشخصية.

الفصل الرابع يخـــص الجـــزئ العملـــي.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de la plante saharienne nommée *Odontospermum pygmaeum* (*Asteriscus pygmaeus* Coss. & Dur.), appartenant à la famille Asteraceae. Cette dernière largement distribuée dans le règne végétal, est connue pour sa richesse en métabolites secondaires biologiquement actifs comme les flavonoïdes, sesquiterpènes et triterpénoïdes qui s'imposent comme les composés typiques de la famille Asteraceae et du genre *Odontospermum*.

Cette étude chimique a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques axées essentiellement sur la RMN mutiimpulsionnelle, de 3 métabolites secondaires (**OP4**, **OP15** et **OP16**) de nature triterpénostéroïdique.

Le composé **OP4** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl β-Sitostérol) a été isolé de l'extrait acétate d'éthyle tandis que les composés **OP15** (3-*O*-β-D-glucopyranosyl Stigmastérol) et **OP16** (Stigmastérol) ont été mis en évidence au niveau de l'extrait méthanolique.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^{1}H, ^{13}C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, et HMBC), par la spectrométrie de masse (EI-MS et ESI-MS), par la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à un rappel bibliographique comprenant une description botanique de la famille, du genre et enfin de l'espèce de notre plante.
- Le deuxième chapitre est consacré à une étude des stéroïdes et saponosides.
- Les travaux personnels seront présentés dans le troisième chapitre.
- Le quatrième chapitre constitue la partie expérimentale.