

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR BATNA**

**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE**

**FILIERE CHIMIE**

## **Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

SPECIALITE : Chimie Organique

OPTION : Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

*Présentée par:*

**M<sup>me</sup> GHANEM HASNA**

***Thème***

**Constituants phytochimiques de l'espèce  
*Thymelaea microphylla***

***Soutenue publiquement le 24/02/2015***

***Devant le JURY***

**Mohammed BENKHALED**

**Hamada HABA**

**Mohamed EL HATTAB**

**Yassine BOUZAHER**

**Salah AKKAL**

**Abdelhamid BENKOUIDER**

Prof.- Université de Batna

MCA- Université de Batna

Prof.- Université de Blida

Prof.- Université de Batna

Prof.- Université de Constantine-1

MCA- Université de Batna

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

*Année Universitaire: 2014-2015*

## *Remerciements*

Les travaux décrits dans cette thèse de doctorat LMD en chimie organique, option Chimie des substances naturelles d'intérêt biologique ont été réalisés au sein du groupe de phytochimie du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des Sciences université de Batna, sous la direction du Docteur **HABA Hamada**, Maître de conférences au département des sciences de la matière - filière chimie.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Monsieur le Docteur **HABA Hamada** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir permis de faire mon travail de thèse dans un environnement stimulant et dynamique. Je tiens aussi à mentionner sans réserve le plaisir que j'ai eu la chance et l'opportunité d'être dirigée par lui et de m'avoir guidé, encouragé, profité de ses connaissances dans le domaine de la chimie des substances naturelles et conseillé tout au long de la réalisation de ma thèse de Doctorat et de m'avoir permis de présenter mes résultats scientifiques sous forme de cette thèse. J'aimerais aussi le remercier infiniment pour sa gentillesse et sa disponibilité durant toutes les étapes de ma préparation de cette thèse de Doctorat.

Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur le professeur **BENKALED Mohammed** de l'université de Batna, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle en chimie organique.

J'aimerais également remercier vivement messieurs les professeurs **EL HATTAB Mohamed** de l'université de Blida, **AKKAL Salah** de l'université de Constantine-1 et **BOUZAHER Yassine** de l'université de Batna pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de soutenance de thèse Doctorat.

Je tiens aussi à adresser tous mes vifs à Monsieur **BENKOUIDER Abdelhamid** Maître de conférences à l'université de Batna pour avoir accepté de juger mon travail de recherche.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur **Laurence Marcourt** et Professeur **Jean-Luc Wolfender** de l'université de Lausanne, Genève (Suisse), pour leur disponibilité et aide en me permettant la réalisation des spectres RMN 1D et 2D et Masse.

Un grand merci à Monsieur le professeur **KASSAH-LAOUAR Ahmed** du laboratoire de Bactériologie du CHU de Batna pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour la réalisation des tests de l'activité antibactérienne.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le professeur **BENDAIKHA Tahar**, doyen de la faculté des Sciences pour la réalisation des spectres infra-rouge.

Au terme de ce travail de recherche, je tiens à exprimer mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à ma formation et à la réalisation de ma thèse de Doctorat de près ou de loin.

J'exprime également mes remerciements à mes amies pour les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble, et je tiens aussi à associer à ce travail tous mes collègues de promotion (*Zina, Samira et Leila*) que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant la période de ma formation en Licence, Master et Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle.

Finalement, je remercie mes parents pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'apportent chaque jour, et je ne saurais oublier mon fils et mes frères qui ont cru à moi, m'avoir encouragé et donné la force d'aller jusqu'au bout de mes ambitions.

## *Dédicaces*

*Je remercie tout d'abord « ALLAH » tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser mes travaux de recherche.*

*Cette thèse qui est le résultat et le fruit d'un travail de longue haleine, de nuits interminables et d'une multitude de contacts sans relâche.*

*Je le dédie avec grand amour*

*A mon père et ma mère*

*A mon fils Nidhal*

*A mes frères Bilel, Ayoub et le petit Islam*

*Ces êtres chers qui m'ont tant aidé, orienté et conseillé et qui ont fait preuve d'une patience sans égal face à tous mes caprices d'étudiante exigeante, perfectionniste et infatigable.*

*Qui n'ont jamais douté de moi et encouragé tout au long de mes études et leur soutien pendant cette pénible épreuve que représente cette thèse de Doctorat.*

*Je leur dis tout simplement merci*

*Que dieu vous bénisse tous*

## ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AcOEt	acétate d'éthyle
ATCC	american type culture collection
<i>c</i>	concentration
CC	chromatographie sur colonne ouverte
CCM	chromatographie sur couche mince
CDCl <sub>3</sub>	chloroforme deutéré
CD <sub>3</sub> OD	méthanol deutéré
CHCl <sub>3</sub>	chloroforme
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane
COSY	correlated spectroscopy H-H
Cq	carbone quaternaire
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>dt</i>	doublet de triplets
<i>dtd</i>	doublet de triplets de doublets
1D	monodimensionnel
2D	bidimensionnel
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	diméthylsulfoxyde deutéré
E	<i>Escherichia</i>
Ep	éther de pétrole
EtOH	éthanol
ESI	spectrométrie de masse par ionisation douce
F	fraction
GMH	gélose Mueller Hinton
g	gramme
Hz	Hertz
h	heure
HMBC	heteronuclear multiple bonding connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum connectivity
HR	haute résolution

IR	infra-rouge
Kg	kilogramme
KBr	bromure de potassium
Me	méthyle
MeOH	méthanol
MeOD	méthanol deutéré
<i>m</i>	multiplet
ml	millilitre
mg	milligramme
MS	mass spectrometry
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
MHz	MégaHertz
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfate de sodium
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
N <sup>o</sup>	numéro
nm	nanometre
P	<i>Pseudomonas</i>
ppm	partie par million
<i>O</i> -Glc	- <i>O</i> -glucose
Réf	référence
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN <sup>13</sup> C	résonance magnétique nucléaire du carbone-13
RMN <sup>1</sup> H	résonance magnétique nucléaire du proton
RP-18	gel de silice greffée en C-18
Rf	facteur de retardement
SiO <sub>2</sub>	gel de silice normale
<i>sl</i>	singulet large
<i>s</i>	singulet
S	<i>Staphylococcus</i>
<i>t</i>	triplet
<i>td</i>	triplet de doublets
<i>tt</i>	triplet de triplets
UV	ultra-violet

uma	unité de masse atomique
VLC	chromatographie liquide sous vide
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
°C	degrés celsius
<i>J</i>	constante de couplage exprimée en Hz
$\delta$	déplacement chimique exprimé en ppm
(1), (2),...	désignations des composés mentionnés dans la littérature
<b>A, B,.....</b>	désigne les composés naturels isolés dans ce travail.
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire
$\mu\text{m}$	micromètre

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## Chapitre I-Rappels bibliographiques

<b>I-1-Description botanique.....</b>	<b>4</b>
I-1-1-Famille Thymelaeaceae.....	4
I-1-2-Genre <i>Thymelaea</i> .....	4
I-1-3-Espèce <i>Thymelaea microphylla</i> .....	4
I-1-4-Classification botanique.....	4
I-1-4-1-Classification de la famille Thymelaeaceae.....	4
I-1-4-2-Classification botanique de l'espèce <i>Thymelaea microphylla</i> .....	5
<b>I-2- Utilisation traditionnelle des Thymelaeaceae .....</b>	<b>7</b>
I-2-1-Utilisation non médicinale.....	7
I-2-2-Utilisation médicinale.....	8
<b>I-3-Usage traditionnel de l'espèce <i>T. microphylla</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>I-4-Toxicité des Thymelaeaceae.....</b>	<b>9</b>
<b>I-5-Etudes chimiques antérieures.....</b>	<b>9</b>
I-5-1-Famille Thymelaeaceae .....	9
I-5-2-Genre <i>Thymelaea</i> .....	9
I-5-2-1- <i>Thymelaea passerina</i> .....	10
I-5-2-2- <i>Thymelaea tartonraira</i> .....	11
I-5-2-3- <i>Thymelaea lythroides</i> .....	12
I-5-2-4- <i>Thymelaea hirsuta</i> .....	13

I-5-2-5- <i>Thymelaea microphylla</i> .....	17
---	----

## Chapitre II-Composés phénoliques et spiraniques

<b>II-1-Composés phénoliques</b> .....	<b>19</b>
II-1-1-Généralités.....	19
II-1-2-Coumarines.....	19
II-1-2-1-Classification des coumarines.....	19
II-1-2-2-Intérêts pharmacologiques des coumarines.....	23
II-1-3-Flavonoïdes.....	23
II-1-3-1-Classification des flavonoïdes.....	24
II-1-3-2-Intérêts pharmacologiques des flavonoïdes.....	27
II-1-4-Lignanes.....	27
II-1-4-1-Classification des lignanes.....	27
II-1-4-2-Intérêts pharmacologiques des lignanes.....	31
<b>II-2-Composés spiraniques</b> .....	<b>31</b>
II-2-1-Généralités.....	31
II-2-2-Nomenclature des spiranes.....	32
II-2-3-Distribution des composés spiraniques dans le règne végétal.....	33
II-2-4-Biosynthèse des spiranes.....	41
II-2-5-Intérêts des spiranes.....	43

## Chapitre III- Isolement des composés et Détermination de leurs structures

<b>III-1-Extraction</b> .....	<b>44</b>
-------------------------------	-----------

III-1-1-Extraction des parties aériennes.....	44
III-1-1-1-Séparation et purification des composants des parties aériennes des extraits AcOEt et EP .....	45
III-1-1-2-Fractionnement .....	45
III-1-1-2-1-Fractionnement de l'extrait AcOEt .....	45
III-1-1-2-2-Fractionnement de l'extrait EP .....	45
III-1-1-3-Purification.....	46
III-1-2-Extraction des racines.....	47
III-1-2-1-Séparation et purification des composants des racines de l'extrait AcOEt .....	48
III-1-2-2-Fractionnement.....	48
III-1-2-3-Purification .....	49
<b>III-2-Détermination des structures des composés isolés.....</b>	<b>50</b>
III-2-1-Produits nouveaux.....	50
III-2-2-Produits connus.....	50
III-2-3-Identification du composé <b>A</b> .....	52
III-2-4-Identification du composé <b>B</b> .....	69
III-2-5-Identification du composé <b>C</b> .....	80
III-2-6-Identification du composé <b>D</b> .....	91
III-2-7-Identification du composé <b>E</b> .....	100
III-2-8-Identification du composé <b>F</b> .....	115
III-2-9-Identification du composé <b>G</b> .....	129
III-2-10-Identification du composé <b>H</b> .....	140
III-2-11-Identification du composé <b>I</b> .....	152

III-2-12-Identification du composé <b>J</b> .....	<b>161</b>
III-2-13-Identification des composés <b>K</b> et <b>L</b> .....	<b>170</b>
III-2-13-1-Identification du composé <b>K</b> .....	<b>173</b>
III-2-13-2-Identification du composé <b>L</b> .....	<b>179</b>
III-2-14-Identification du composé <b>M</b> .....	<b>183</b>
III-2-15-Identification du composé <b>N</b> .....	<b>189</b>
III-2-16-Identification du composé <b>O</b> .....	<b>192</b>

## Chapitre IV-Test biologique (Activité antibactérienne)

<b>IV-1-Rappel microbiologique</b> .....	<b>195</b>
IV-1-1-Les bactéries.....	<b>195</b>
IV-1-2-Division des bactéries.....	<b>195</b>
IV-1-2-1- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>196</b>
IV-1-2-2- <i>Escherichia coli</i> .....	<b>196</b>
IV-1-2-3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>197</b>
<b>IV-2-Etude de l'activité antibactérienne</b> .....	<b>197</b>
IV-2-1-Préparation des solutions.....	<b>198</b>
IV-2-2-Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	<b>198</b>
IV-2-2-1-Repiquage des souches bactériennes.....	<b>198</b>
IV-2-2-2-Préparation de l'inoculum bactérien.....	<b>198</b>
IV-2-2-3-Ensemencement.....	<b>198</b>
IV-2-3-Principe.....	<b>198</b>

<b>IV-3-Exploitation des résultants.....</b>	<b>199</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>202</b>

## Chapitre V-Partie expérimentale

<b>V-1- Appareillage et matériels .....</b>	<b>208</b>
<b>V-1-1-Chimie extractive.....</b>	<b>208</b>
V-1-1-1-Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	208
V-1-1-2-Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	208
V-1-1-3-Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	208
<b>V-1-2-Chimie structurale.....</b>	<b>209</b>
V-1-2-1-Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	209
V-1-2-2-Spectroscopie de masse (SM).....	209
V-1-2-3-Pouvoir rotatoire.....	209
V-1-2-4-Spectrométrie UV-Visible .....	209
V-1-2-5- Spectrométrie Infra-Rouge (IR).....	209
<b>V-2-Récolte du matériel végétal .....</b>	<b>209</b>
<b>V-3-Extraction.....</b>	<b>210</b>
V-3-1-Extraction des parties aériennes.....	210
V-3-1-1-Contrôle chromatographique des extraits des parties aériennes.....	210
V-3-1-2-Etude de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes.....	211
V-3-1-3-Purification des produits de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes .....	212
V-3-1-4-Etude de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes.....	216

V-3-1-5-Purification des produits de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes .....	217
V-3-1-6-Composés isolés des parties aériennes de l'espèce <i>T. microphylla</i> .....	218
V-3-2-Extraction des racines.....	219
V-3-2-1-Contrôle chromatographique des extraits des racines.....	219
V-3-2-2-Etude de l'extrait acétate d'éthyle des racines.....	220
V-3-2-3-Purification des produits des racines.....	222
V-3-2-4-Composés isolés des racines de l'espèce <i>T. microphylla</i> .....	228
<b>Bibliographie.....</b>	<b>231</b>

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**



***INTRODUCTION***

## **INTRODUCTION**

De nos jours, plusieurs franges de populations des pays en voie de développement ont recours à la médecine traditionnelle, en utilisant des plantes médicinales de leur environnement, pour soigner diverses maladies telles que la toux, la fièvre, le cancer, le diabète, la stérilité,.....etc. D'autre part, les ressources naturelles offrent une matière première très importante pour la recherche de nouveaux principes actifs possédant des propriétés biologiques prometteuses. La valorisation des plantes médicinales passe notamment par l'extraction, l'isolement et l'identification de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. D'ailleurs, la phytochimie et la pharmacognosie sont en totale adéquation avec les objectifs d'une recherche rationnelle des composés d'origine végétale à visée thérapeutique.

Par sa biodiversité très marquée à l'échelle mondiale, sa grande superficie (Nord et Sahara) et ses différents climats, l'Algérie recèle dans sa flore un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques réputées pour leur utilisation en médecine traditionnelle, ou pour d'autres usages qui ne sont pas de moindre importance pour les populations locales. Ces plantes appartiennent à diverses familles botaniques reconnues comme étant une source importante de métabolites secondaires biologiquement actifs. Sur les 4000 espèces répertoriées en Algérie incluant plus d'une centaine de plantes endémiques, peu d'espèces ont été étudiées d'un point de vue chimique et biologique.

Le présent travail entrepris dans le cadre de cette thèse se propose d'approfondir les connaissances chimiques sur le genre *Thymelaea* de la famille des Thymelaeaceae d'une part, et d'autre part de mettre en évidence de nouvelles structures moléculaires à partir de l'espèce *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur., objet de cette investigation. Les études phytochimiques réalisées sur les plantes de la famille Thymelaeaceae révèlent leur richesse en substances naturelles d'intérêts biologiques remarquables [1]. Ces plantes sont réputées toxiques, ceci s'explique notamment par leur teneur en esters diterpéniques de types daphnane ou tigiane considérés comme les marqueurs chimiotaxonomiques les plus évidents de cette famille [2]. Les travaux de chimie portés sur le genre *Thymelaea* ont permis particulièrement l'isolement et la caractérisation de plusieurs métabolites secondaires de types flavonoïde, coumarine, diterpène, stéroïde et huile essentielle [3,4-7].

Les plantes de la famille Thymelaeaceae sont connues pour leur utilisation médicinale traditionnelle dans le traitement de maladies de la peau, la malaria, les piqûres de scorpions et les affections ophtalmiques [1]. Elles possèdent également des propriétés purgatives et émétiques. D'autres applications non médicinales ont été signalées pour de nombreuses espèces de cette famille telles que la fabrication de papiers, la parfumerie, l'obtention du bois odorant et la fabrication de cordes [1,8].

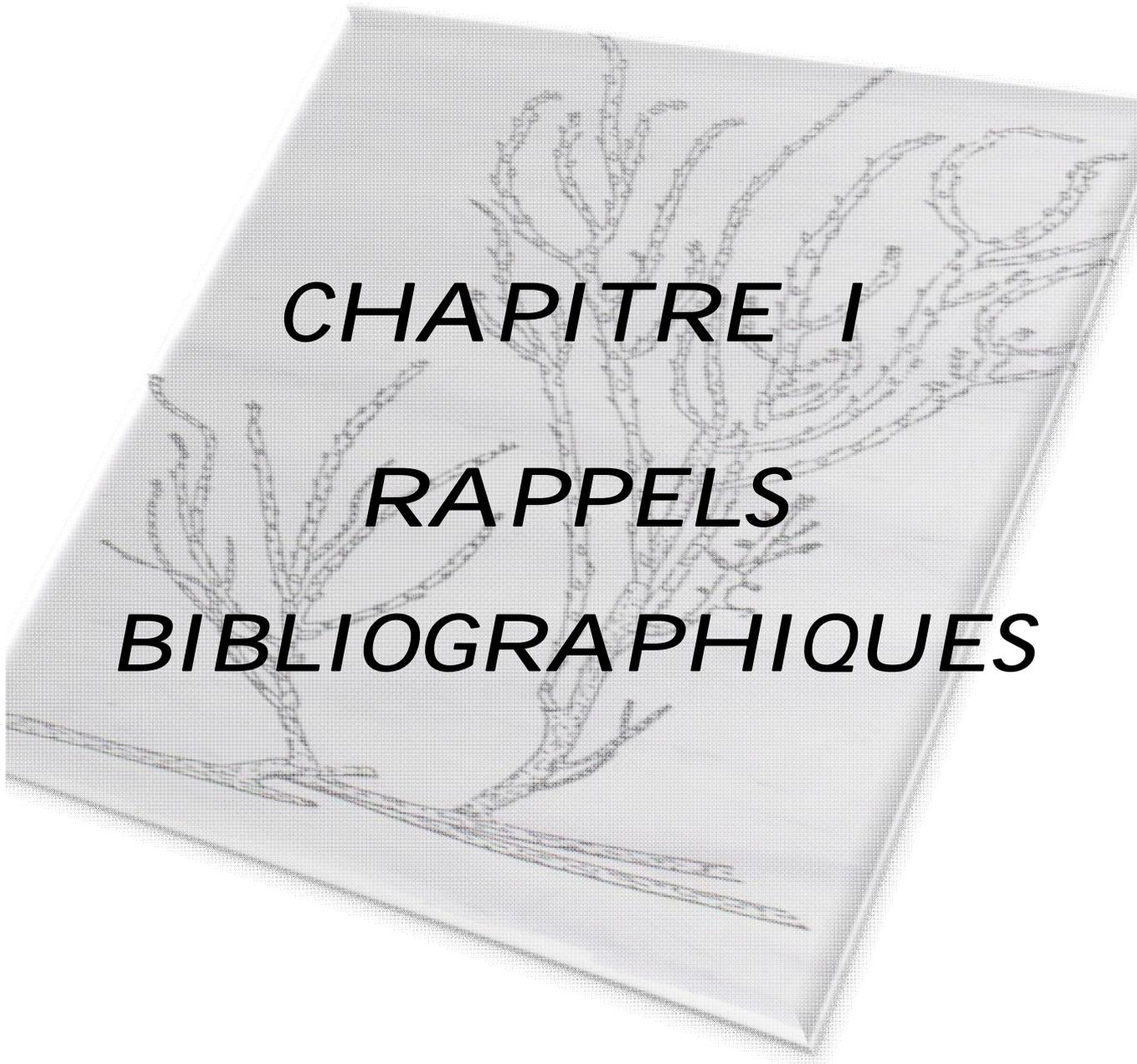
Dans ce contexte, notre choix s'est porté particulièrement sur l'investigation chimique et le screening biologique (Activité antibactérienne) d'une plante médicinale Saharienne appartenant à notre flore (Est Algérien) de la famille Thymelaeaceae nommée *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. Cette plante endémique à l'Afrique du Nord a été choisie pour son usage en médecine traditionnelle locale pour traiter la stérilité, le cancer de la peau, les boutons, les abcès et les blessures [9]. Egalement, la recherche bibliographique exhaustive effectuée sur cette espèce a montré qu'elle n'a pas fait l'objet d'études phytochimiques conséquentes [10-12]. Ceci constitue bien évidemment une motivation supplémentaire pour la réalisation de ce travail de recherche.

L'étude phytochimique proprement dite concerne les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle issus des parties aériennes, et l'extrait acétate d'éthyle obtenu à partir des racines de l'espèce *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. Ces investigations ont conduit à l'isolement et l'identification de 15 métabolites secondaires dont 2 produits nouveaux appartenant à une rare classe chimique de produits naturels, à savoir les dilaspirolactones ayant une distribution très restreinte dans le règne végétal [13-16]. Le test de l'activité antibactérienne a montré que les extraits végétaux de cette plante possèdent une activité antibactérienne modérée.

Ce travail s'articule particulièrement autour de cinq chapitres:

- ✓ Le premier chapitre est consacré aux rappels bibliographiques incluant les axes suivants :
  - Une description botanique de la famille des Thymelaeaceae
  - Utilisation traditionnelle des Thymelaeaceae
  - Usage traditionnel de l'espèce *Thymelaea microphylla*

- Toxicité des Thymelaeaceae
  - Etudes chimiques antérieures
- ✓ Le second chapitre décrit les composés phénoliques et spiraniques en présentant leurs structures chimiques, et leurs intérêts thérapeutiques notamment:
- Les coumarines
  - Les flavonoïdes
  - Les lignanes
  - Les spiranes
- ✓ Le troisième chapitre focalisé principalement sur l'interprétation et la discussion des résultats obtenus, englobe les points suivants:
- Extraction
  - Séparation et purification
  - Détermination des structures des molécules isolées
- ✓ Le quatrième chapitre de notre thèse concerne particulièrement le screening biologique. Dans cette partie, le test de l'activité antibactérienne des extraits végétaux préparés de la plante *T. microphylla* a été évalué.
- ✓ Le cinquième chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux réalisés dans le cadre de l'investigation phytochimique des extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle des parties aériennes et l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante étudiée.



**CHAPITRE I**  
**RAPPELS**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## I-1-Description botanique

### I-1-1-Famille Thymelaeaceae

La famille Thymelaeaceae est une famille de plantes dicotylédones, elle comprend environ 40 genres dont *Thymeleae* et plus de 360 espèces [17]. Cette famille est répandue dans les zones tropicales et tempérées de la planète et absente dans les régions les plus froides [1]. Les plantes constituant cette famille se trouvent sous plusieurs formes herbacées, lianes ou arbustes.

### I-1-2-Genre *Thymelaea*

Les plantes de ce genre sont originaires des îles Canaries, des régions méditerranéennes, du nord au centre de l'Europe et de l'est au centre de l'Asie [18]. Ce genre contient plus d'une trentaine de plantes [19] et il est représenté en Afrique du Nord par une dizaine d'espèces [20]. Ses plantes sont annuelles se présentant sous forme d'arbrisseaux à fleurs polygames ou dioïques. Le périanthe à 4-5 divisions généralement persistant, verdâtre ou jaunâtre. Les fruits sont des monospermes, secs ou des charnus [21].

En Algérie, le genre *Thymelaea* est représenté par 8 espèces: *T. velutina*, *T. virgata*, *T. nitida*, *T. virescens*, *T. microphylla*, *T. tartonraira*, *T. hirsuta* et *T. passerina* [20].

### I-1-3-Espèce *Thymelaea microphylla*

*T. microphylla* est une plante très rameuse, poussant sous forme d'arbrisseau de 30 cm à 1 mètre, à rameaux allongés, dressés et d'une coloration blanchâtres-soyeux (Figure I-1). Les feuilles sont très petites et espacées et les fleurs sont blanc-jaunâtres, en glomérules tels que les fleurs mâles à calice cylindrique de 4 à 6 mm et les fleurs femelles de 3 à 4 mm sur des pieds différents [7]. Cette espèce est très commune des Hauts-plateaux et des régions désertiques de l'Algérie (plante endémique de l'Afrique du Nord).

## I-1-4-Classification botanique

### I-1-4-1-Classification de la famille Thymelaeaceae

La famille Thymelaeaceae est classée comme suit [22,23]:

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement**: Spermatophyta
- **Sous-embranchement**: Angiospermae

- **Classe:** Eudicotyledonae
- **Sous-classe:** Rosidae
  - Eurosidae II
- **Ordre:** Malvales
- **Famille:** Thymelaeaceae
- **Sous-Famille:** Gonystyloideae
  - Thymelaeoideae
    - Aquilarioideae
      - Gilgiodaphnoideae
- **Tribu:** Dicranolepideae
  - Phalerieae
    - Gnidieae
      - Daphneae
- **Genre:** *Synaptolepis*
  - Gnidia*
    - Passerina*
      - Dais*
        - Wikstroemia*
          - Thymelaea*

#### I-1-4-2-Classification botanique de l'espèce *Thymelaea microphylla*

L'espèce *T. microphylla* peut être classée selon cette classification [19] :

- **Famille:** Thymelaeaceae
  - **Sous-famille:** Thymelaeoideae
    - **Tribu:** Gnidieae
      - **Genre:** *Thymelaea*
        - **Espèce:** *T. microphylla* Coss. et Dur.



**Figure I-1:** *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. [21]

## I-2-Utilisation traditionnelle des Thymelaeaceae

### I-2-1-Utilisation non médicinale

Les plantes Thymelaeaceae connues par leur toxicité du faite de leur richesse en diterpènes considérés comme poisons [1]. Plusieurs espèces de cette famille possèdent une écorce fibreuse utilisée pour la fabrication de cordes et de papier. Le bois de certaines espèces est vendu comme bois odorant et ainsi pour la décoration. Le tableau (I-1) ci-dessous résume quelques utilisations non-médicinales des plantes de cette famille [1,8].

**Tableau I-1: Utilisations non-médicinales répertoriées des Thymelaeaceae**

Plante	Partie	Utilisation	Régions
<i>Dais glaucescens</i> Decne.	Ecorce	Fabrication de ficelle	Afrique et Madagascar
<i>Daphne</i> spp.	Ecorce	Poisons de pêche, fabrication de papier et de corde	Afrique, Chine et Inde
<i>Daphne mezereum</i> L.	Fruit	Substitut au poivre rouge	Europe
<i>Daphnopsis brasiliensis</i> Mart. et Zucc.	Ecorce	Fabrication de papier	Brésil
<i>Dicranolepis persei</i> Cummins.	Fruit	Comestible	Ghana
<i>Edgeworthia</i> spp.	Ecorce	Fabrication de papier	Japon, Népal et Tchèque
<i>E. gardneri</i> Meissn.	Ecorce	Molluscicide	Inde
<i>Gnidia</i> spp.	Ecorce	Fabrication de papier et de corde	Madagascar et Ethiopie
<i>G. kraussiana</i> Meissn.	Racine, tige et feuilles	Molluscicide Poisons de flèche, de pêche et à usage criminel	Soudan et Afrique

<i>Lasiosiphon</i> spp.	Feuilles et racines	Extraits comme poisons de flèche et de pêche.	Afrique et Inde
<i>Lagetta linearia</i> Lam.	Ecorce	Décoration	Antilles
<i>Passerina</i> spp.	Ecorce	Fabrication de papier	Afrique
<i>P. fischeri</i> Engl.	Fruit	Comestible	Guinée
<i>Thymelaea</i> spp.	Ecorce	Fabrication de fibre, de papier et de teinture jaune	Afrique et Egypte
<i>Wikstroemia</i> spp.	Ecorce	Fabrication de fibre et de papier	Japon
<i>W. tenuiramis</i> Miq.	Bois	Bois odorant	Indonésie

### I-2-2-Utilisation médicinale

Les espèces de la famille Thymelaeaceae montrent une variété d'activités pharmacologiques telles que: anti-oxydante, anti-VIH, anti-dépresseur et anti-leucémique. La pharmacopée traditionnelle utilise les plantes de cette famille pour le traitement d'une gamme très étendue de troubles et indique les propriétés suivantes : émétique, purgative et vésicante, et ainsi pour le traitement de maladies de la peau. Ces plantes sont préconisées également comme remèdes contre les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, la malaria et les affections ophtalmiques [1].

En Afrique, les feuilles de l'espèce *Arthrosolen gymnostachys* C.A. Mey. sont employées contre les maux de tête. Les feuilles et les tiges de la plante *Craterosiphon quarrei* Staner sont utilisées pour le traitement de la tonique et de l'entorse. La décoction des racines de l'espèce *Gnidia buchananii* est recommandée contre la bronchite et les douleurs abdominales. La plante *Passerina hirsuta* L. est utilisée pour traiter les abcès et est employée aussi comme laxatif, tandis que l'espèce voisine *Passerina filiformis* L. possède des propriétés analgésiques [1,8,24,25].

En Tunisie, l'écorce de l'espèce *Daphne gnidium* L. est employée pour le traitement des hépatites [1,8,24,25].

### **I-3-Usage traditionnel de l'espèce *T. microphylla***

La plante *Thymelaea microphylla* est connue sous le nom vernaculaire "**Methnane**" en Algérie et "**la passerine à petites feuilles**" en Europe. En médecine traditionnelle populaire algérienne, cette espèce est utilisée dans le traitement des blessures et diverses dermatoses : érysipèle, cancer de peau, abcès et boutons. La décoction des feuilles passe pour être efficace dans les cas de stérilité et elle possède des effets purgatifs [20].

### **I-4-Toxicité des Thymelaeaceae**

Les plantes de la famille Thymelaeaceae sont réputées toxiques. Cette toxicité est bien établie aussi bien pour les êtres humains que pour de nombreuses espèces animales. Ceci s'explique par leur teneur en esters diterpéniques macrocycliques et polycycliques à squelettes tigliane ou daphnane. Ces derniers ont une distribution restreinte à deux grandes familles à savoir les Thymelaeaceae et Euphorbiaceae [25].

En effet, les diterpènes de type tigliane et daphnane sont des purgatifs violents qui déclenchent, par contact avec la peau ou les muqueuses, une réaction inflammatoire intense [26]. Les manifestations toxiques peuvent être séparées en deux catégories, selon que le matériel végétal ou les extraits sont pris par voie interne ou qu'il y a contact externe.

### **I-5-Etudes chimiques antérieures**

#### **I-5-1-Famille Thymelaeaceae**

Les principales recherches réalisées sur les plantes de la famille Thymelaeaceae montrent la variété des métabolites secondaires produits par cette famille. Parmi ceux-ci, on peut citer: les esters diterpéniques de types tigliane, daphnane et 1-alkyldaphnane, coumarine, biscoumarine, flavonoïde, biflavonoïde, lignane, huile essentielle, triterpène, diterpène, stéroïde et spiro- $\gamma$ -lactone glycoside [13,18,27-30]. L'intérêt initial de ces recherches revient à la toxicité remarquable de ces plantes chez les êtres humains et les espèces animales.

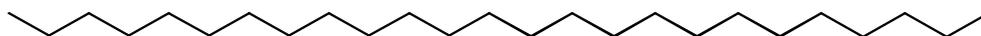
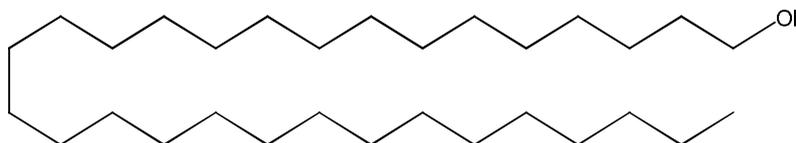
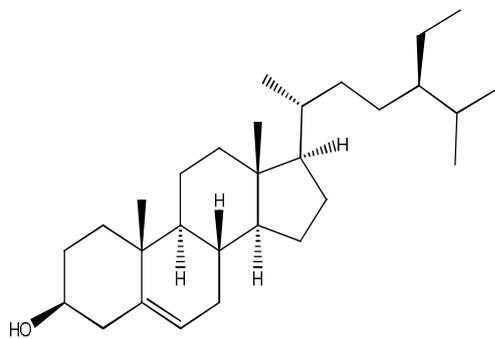
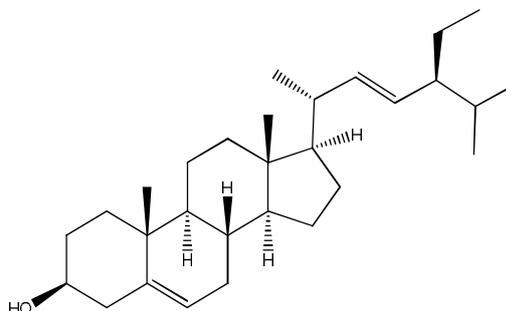
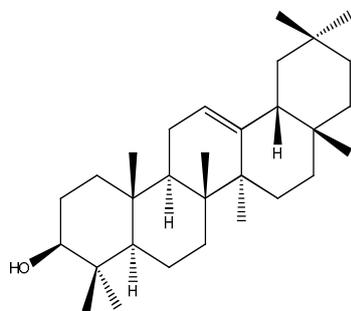
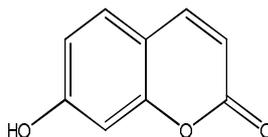
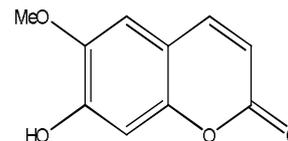
#### **I-5-2-Genre *Thymelaea***

Les travaux de recherche réalisés sur le genre *Thymelaea* ont conduit à l'isolement de plusieurs métabolites secondaires qui sont constitués de flavonoïdes, biflavonoïdes, coumarines, biscoumarines, phénoliques, diterpènes et des huiles essentielles. Les études

phytochimiques effectuées sur ce genre concernant principalement les espèces suivantes: *Thymelaea passerina*, *T. tartonraira*, *T. lythroides*, *T. hirsuta* et *T. microphylla*.

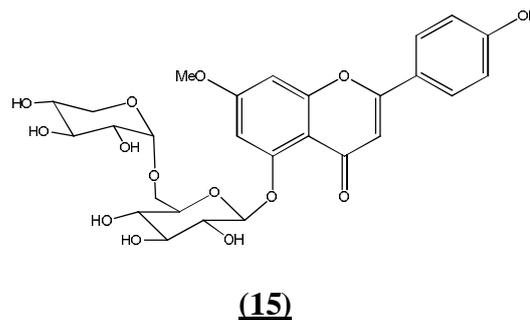
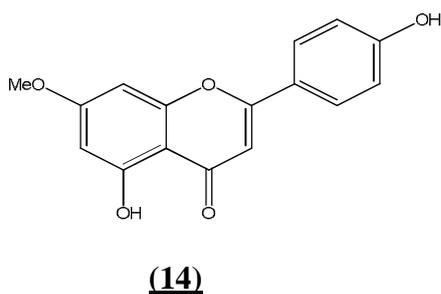
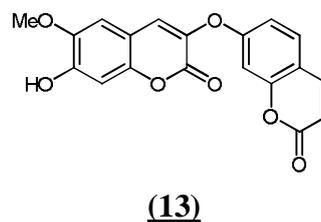
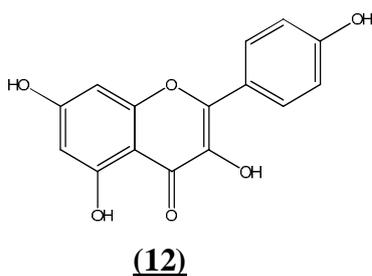
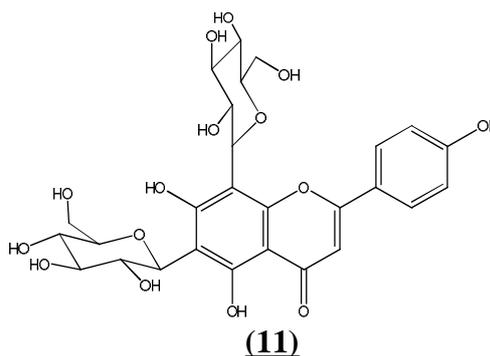
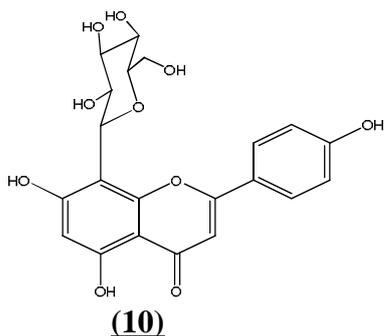
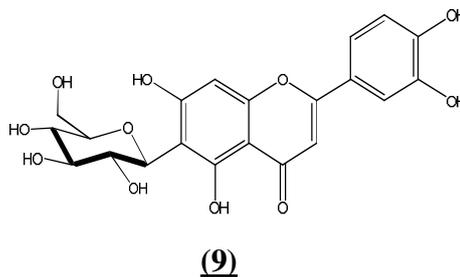
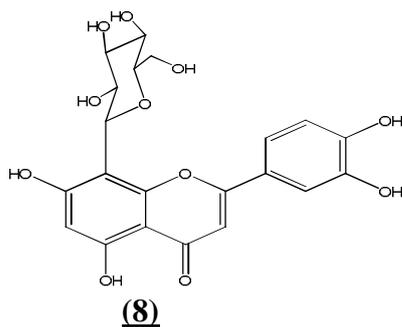
### I-5-2-1-*Thymelaea passerina*

En 1982, George et Rishi ont étudié les métabolites secondaires des parties aériennes de l'espèce *Thymelaea passerina* [3]. Cette étude a permis d'isoler les composés suivants : pentacosane **(1)**, triacontanol **(2)**,  $\beta$ -sitostérol **(3)**, stigmastérol **(4)**,  $\beta$ -amyrine **(5)**, ombelliférone **(6)** et scopolétine **(7)**.

**(1)****(2)****(3)****(4)****(5)****(6)****(7)**

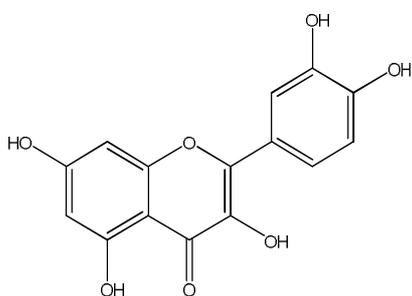
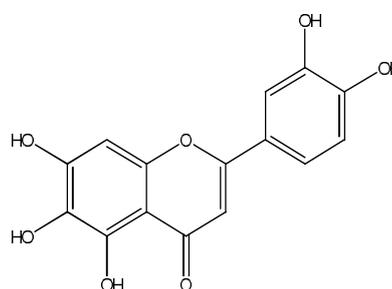
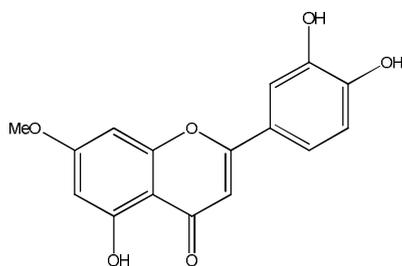
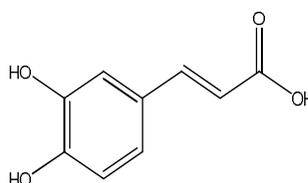
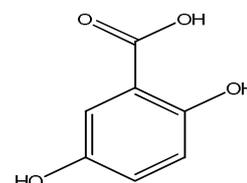
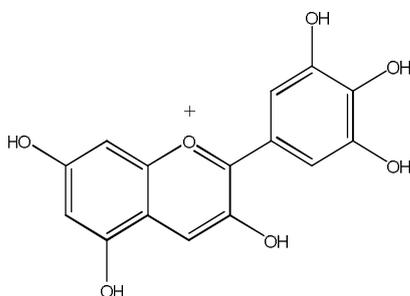
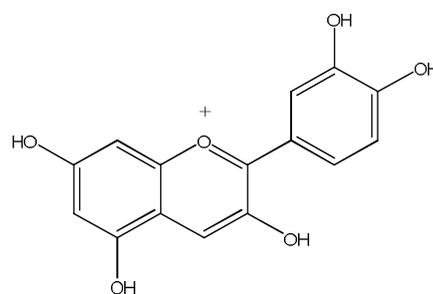
**I-5-2-2- *Thymelaea tartonraira***

En 1980, les chercheurs Garcia-Granados et Saenz de Buruaga ont effectué une étude phytochimique sur les parties aériennes de la plante *Thymelaea tartonraira* [4]. Cette étude a conduit à l'identification des composés suivants: orientine **(8)**, iso-orientine **(9)**, vitexine **(10)**, vicénine-2 **(11)**, kaempférol **(12)**, daphnorétine **(13)**, genkwanine **(14)**, 5-O-D-primevérosyl-genkwanine **(15)**. Une autre étude réalisée par Meletiou-Christou et al. sur les feuilles, tiges et racines de cette même espèce a permis d'isoler des lipides, des sucres libres et de l'amidon [5].



**I-5-2-3- *Thymelaea lythroides***

Une étude phytochimique a été faite sur les feuilles de la plante *Thymelaea lythroides* montrant l'existence des aglycones flavoniques et des anthocyanidines [6]. Les différentes molécules appartenant à la classe des flavonols dont le kaempférol **(12)**, et la quercétine **(16)**, deux flavones : hydroxy-6 lutéoline **(17)**, méthyle-7 lutéoline **(18)**, en plus de deux acides phénols identifiés comme l'acide caféique **(19)** et l'acide genticique **(20)**, et deux anthocyanidine: la delphinidine **(21)** et la cyanidine **(22)**, ont été isolées et caractérisées par les différentes méthodes spectroscopiques.

**(16)****(17)****(18)****(19)****(20)****(21)****(22)**

**I-5-2-4- *Thymelaea hirsuta***

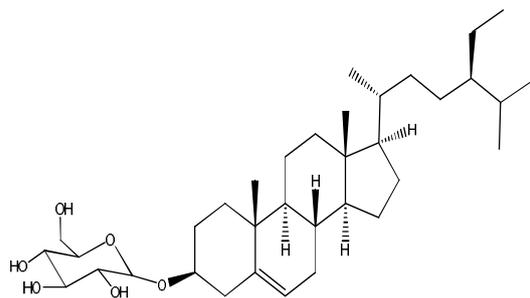
Plusieurs recherches ont été effectuées sur les feuilles, les racines, les brindilles et les graines de la plante *Thymelaea hirsuta*. L'intérêt initial de ce nombre de recherches est expliqué par la nature toxique de cette plante [31]. Les daphnanes connus par leurs propriétés antitumorales étaient considérés comme les principaux produits toxiques de cette espèce [32]. Le tableau (I-2) ci-dessous résume les résultats de ces travaux de recherche.

**Tableau I-2: Principales études réalisées sur l'espèce *Thymelaea hirsuta***

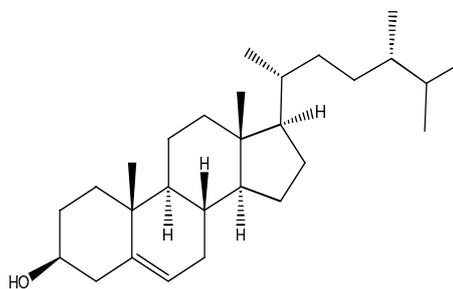
Année	Groupes de chercheurs	Parties étudiés	Molécules extraites
1965	Saleh et al. [33]	Feuilles	Thyméolol (C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>
1970	Gharbo et al. [34]	Feuilles	Stigmasterol ( <b>4</b> ), β-sitosterol ( <b>3</b> ), alcool aliphatique C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O et lactone C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
1972	Rizk et Rimpler [35]	*	Daphnorétine ( <b>13</b> ) et β-sitostérol-β-D-glucoside ( <b>23</b> )
1974	Rizk et al. [36]	*	Alcanes en C27 à 31, alcanols en C22, 24, 26 et 28, β-sitostérol ( <b>3</b> ) et campesterol ( <b>24</b> )
1975	Rizk et al. [37]	*	Daphnorine ( <b>25</b> ), daphnorétine ( <b>13</b> ), daphnine ( <b>26</b> ), Daphnéline ( <b>27</b> ), daphnéline-glucoside ( <b>28</b> ), ombelliférone ( <b>6</b> ), scopolétine ( <b>7</b> ) et esculétine ( <b>29</b> )
1977	Nawwar et al. [38]	Feuilles	Vicénine-2 ( <b>11</b> )
1978	Ismail [39]	Feuilles	<i>Trans</i> -tiliroside ( <b>30</b> )
1980	Garcia-Granados et Saenz de Buruaga [7]	Feuilles	Lupéol ( <b>31</b> ), β-sitostérol ( <b>3</b> ), phytol ( <b>32</b> ), β-amyrine ( <b>5</b> ), bétuline ( <b>33</b> ), erythrodiol ( <b>34</b> ), cholestérol ( <b>35</b> ) et lanostérol ( <b>36</b> )
1984	Rizk et al. [40]	Feuilles et Brindilles	5,12-dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol ( <b>37</b> )

1987	Yanze et Chunru [41]	*	Flavones, terpènes et autres
1988	Sammour et Sharaf [42]	Graines	Protéines
1990	Brooks et al. [43]	Feuilles et Brindilles	Gnidicine <b>(38)</b> , gniditrine <b>(39)</b> , genkwadaphnine <b>(40)</b> , 12- <i>O</i> -heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9,13,14-ortho-benzoate <b>(41)</b> et 12- <i>O</i> -butényl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9,13,14-ortho-benzoate <b>(42)</b>
1998	Abou-Karam et al. [44]	Racines	Daphnorétine <b>(13)</b>
2000	El-Beheiry [45]	Feuilles	Tanins

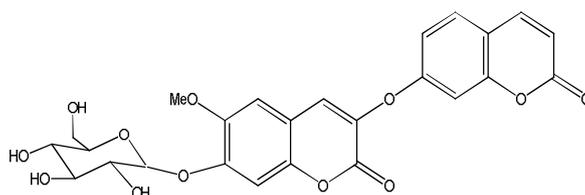
\* Non précisé



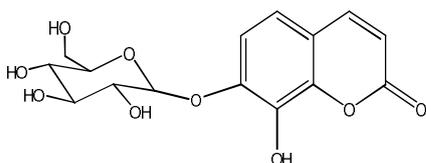
**(23)**



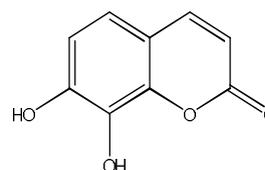
**(24)**



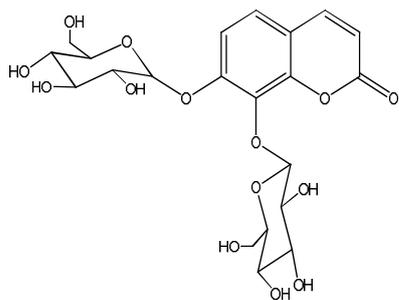
**(25)**



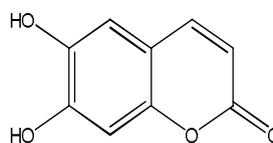
**(26)**



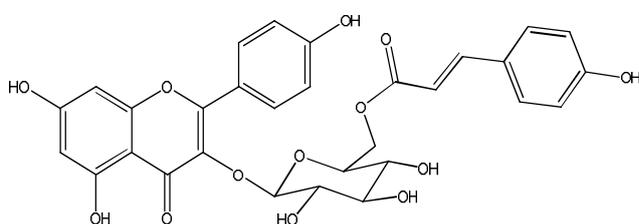
**(27)**



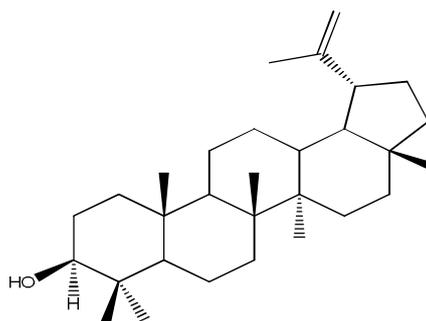
**(28)**



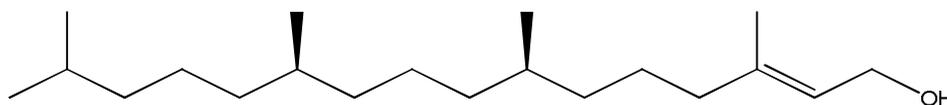
**(29)**



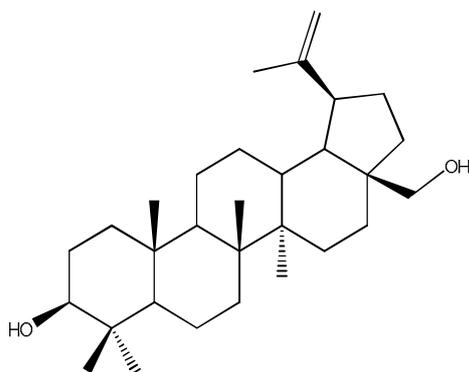
**(30)**



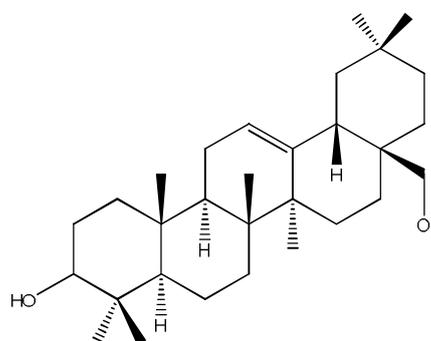
**(31)**



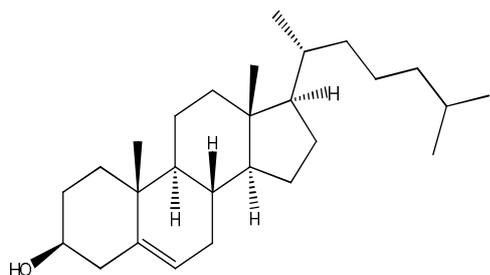
**(32)**



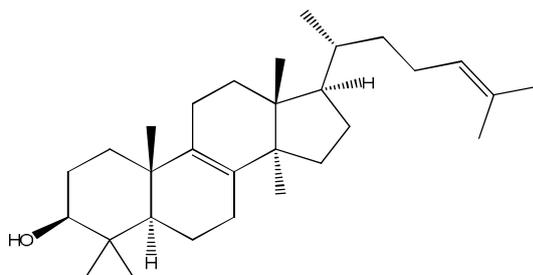
**(33)**



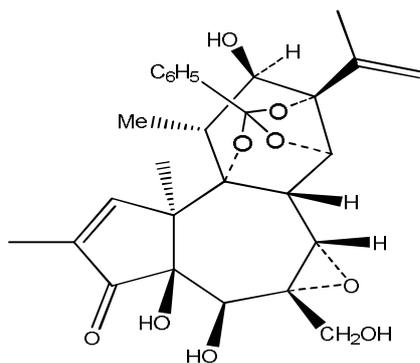
**(34)**



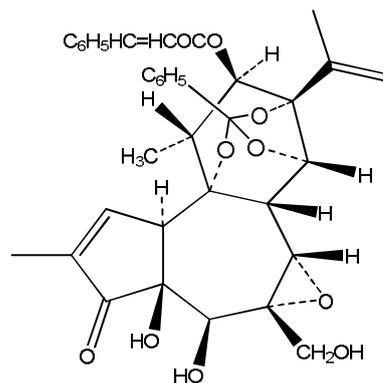
(35)



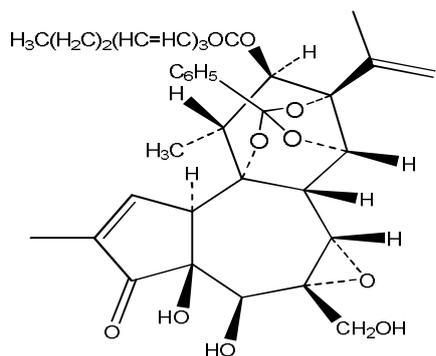
(36)



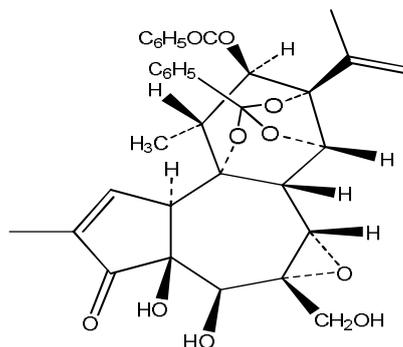
(37)



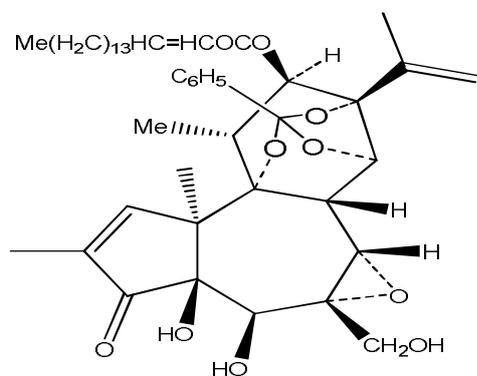
(38)



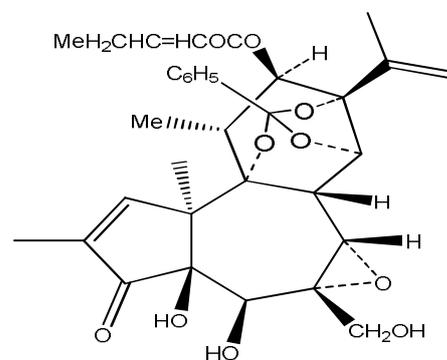
(39)



(40)



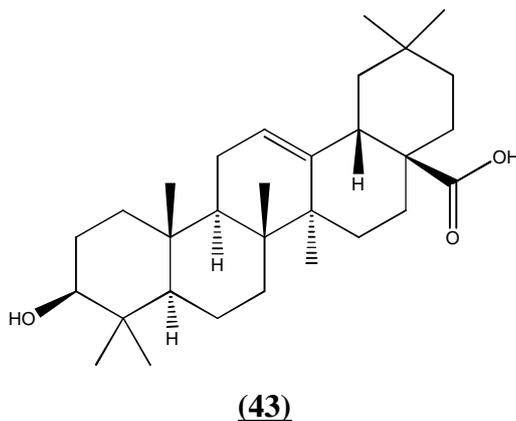
(41)



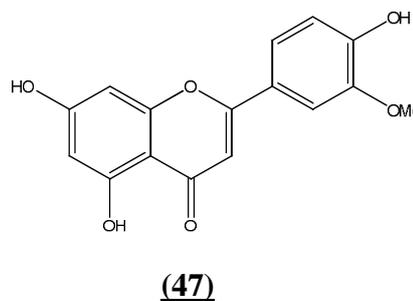
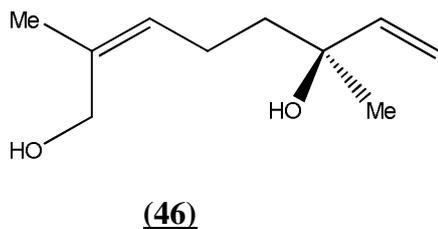
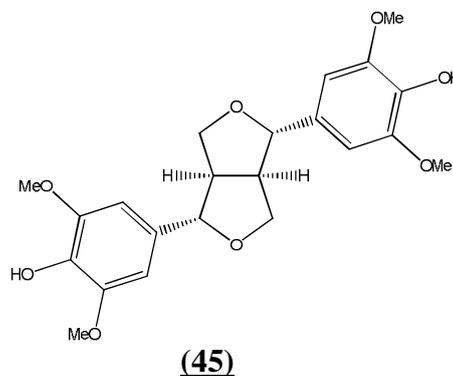
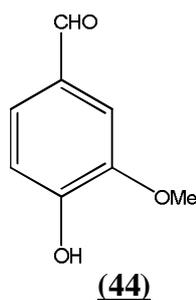
(42)

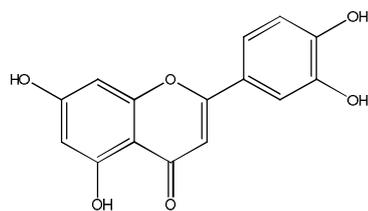
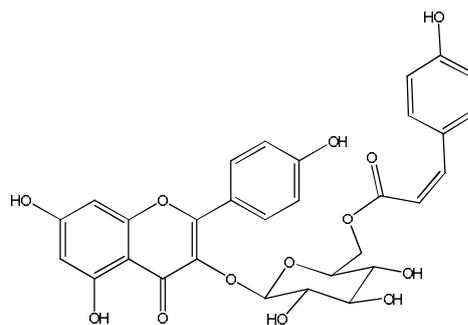
I-5-2-5- *Thymelaea microphylla*

Deux phytostérols nommés  $\beta$ -sitostérol (**3**) et  $\beta$ -sitostérol- $\beta$ -D-glucoside (**23**), en plus de l'acide oléanolique (**43**) ont été isolés des parties aériennes de la plante *T. microphylla* [10].

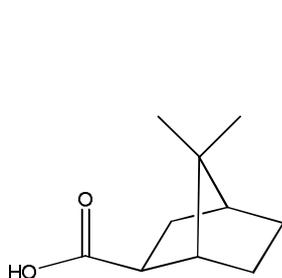
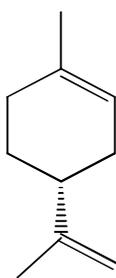
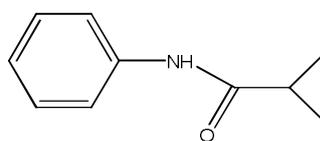
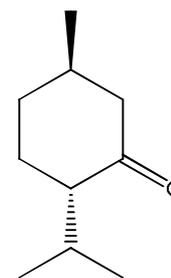
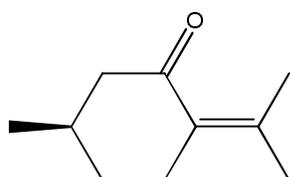
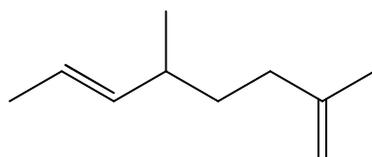
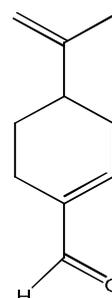
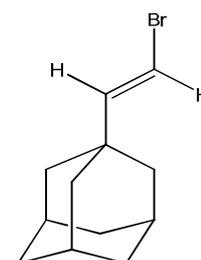
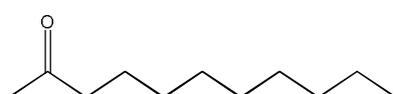
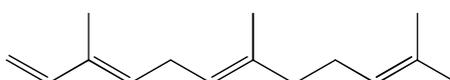
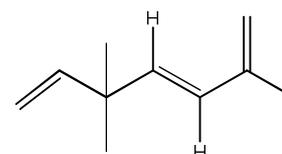


Récemment l'investigation phytochimique effectuée également sur les parties aériennes de cette espèce a permis d'identifier 8 métabolites secondaires : vanilline (**44**), (+)-syringarésinol (**45**), daphnorétine (**13**), (Z)-8-hydroxylinalool (**46**), chrysoeriol (**47**), lutéoline (**48**) et un mélange de *trans*-tiliroside (**30**) et *cis*-tiliroside (**49**) [11]. Les structures moléculaires de ces composés ont été caractérisées par la RMN multi-impulsionnelles et la spectrométrie de masse.



**(48)****(49)**

L'analyse des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de l'espèce *T. microphylla* par GC/MS a permis d'identifier les composés suivants: acide 1-carboxylique bornane **(50)**, limonène **(51)**, isobutyranilide **(52)**, menthone **(53)**, pulegone **(54)**, (6*E*)-2,5-diméthyl-1,6-octadiène **(55)**, perillal **(56)**, 1-(2-bromovinyl)-adamantane **(57)**, 2-undécaneone **(58)**,  $\alpha$ -farnésène **(59)** et artemesiatriène **(60)** [12].

**(50)****(51)****(52)****(53)****(54)****(55)****(56)****(57)****(58)****(59)****(60)**



**CHAPITRE II**  
**COMPOSES**  
**PHENOLIQUES**  
**ET SPIRANIQUES**

## II-1-Composés phénoliques

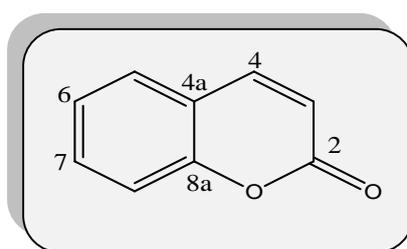
### II-1-1-Généralités

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes tels que: les terpènes, les stéroïdes, les composés azotés dont les alcaloïdes et les composés phénoliques. Ces derniers possèdent une très large gamme d'activités biologiques [46-48]. Les composés phénoliques forment un ensemble de substances caractérisé par la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle [49]. Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus dans la littérature, on peut évoquer: les coumarines, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes [50-52].

### II-1-2-Coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles tirant leur nom de "coumarou", nom vernaculaire de la fève tonka appelée *Dipterix odorata* Willd de la famille Fabaceae d'où ces molécules furent isolées pour la première fois en 1820 [53].

Les coumarines sont très largement distribuées dans le règne végétal. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits et les huiles essentielles des graines). Plusieurs études phytochimiques ont montré que les familles les plus riches en coumarines sont: Thymelaeacées, Légumineuses, Rutacées et Apiacées [54-56]. Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles aromatiques accolés avec neuf atomes de carbone (Figure II-1) [57].



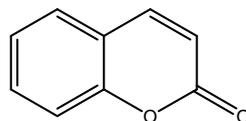
**Figure II-1:** Squelette de base des coumarines

#### II-1-2-1- Classification des coumarines

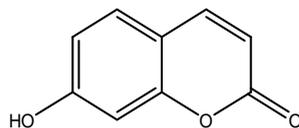
Les coumarines peuvent être classées selon la nature des substituants sur leurs structures en cinq catégories incluant: coumarines simples et prénylées, furanocoumarines et pyranocoumarines. Elles peuvent être également existées à l'état dimérique ou trimérique [54-56].

**A-Coumarines simples**

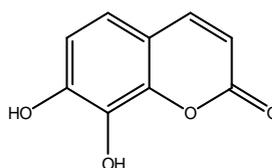
Coumarine (61)



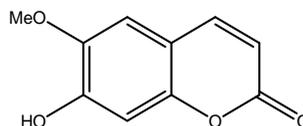
Ombelliférone (6)



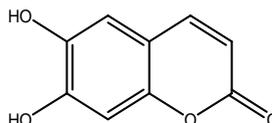
Daphnéline (27)



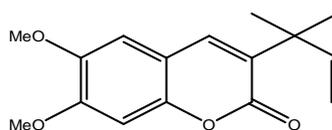
Scopolétine (7)



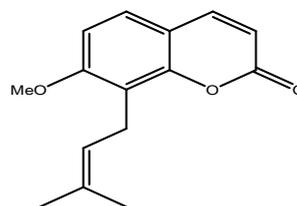
Esculétine (29)

**B-Coumarines prenylées**

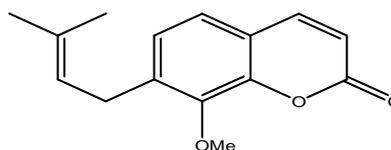
Rutacultine (62)



Osthol (63)

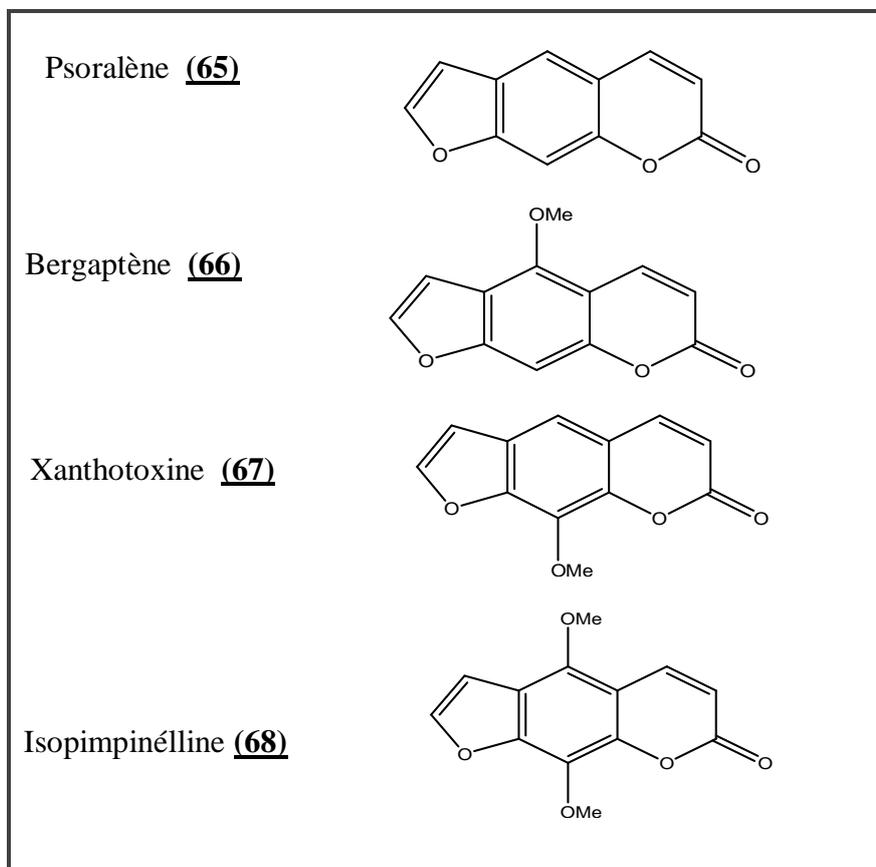


Subérosine (64)

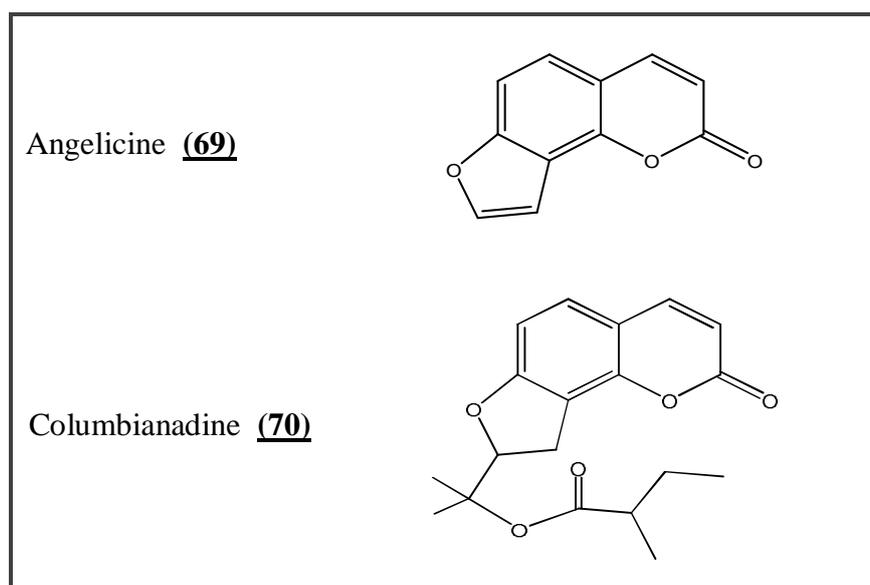


**C-Furanocoumarines**

## • C-1-Furanocoumarines linéaires

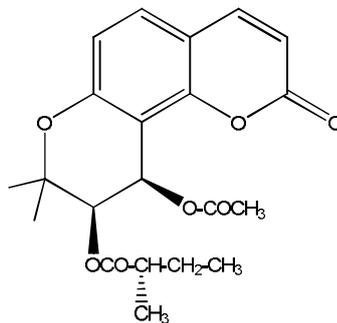


## • C-2-Furanocoumarines angulaires

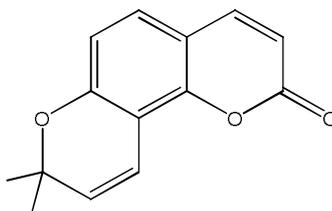


D-Pyranocoumarines

Visnadine (71)

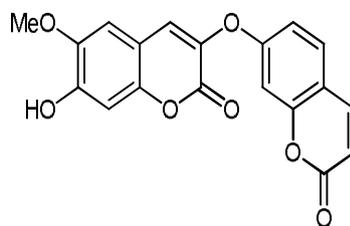


Séseline (72)

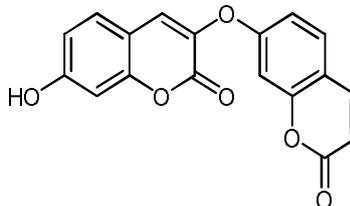
E-Coumarines à l'état dimerique et trimerique

## • E-1-Dicoumarine

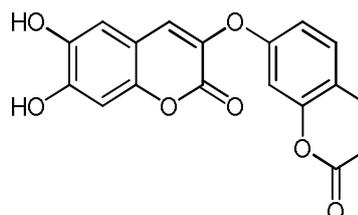
Daphnorétine (13)



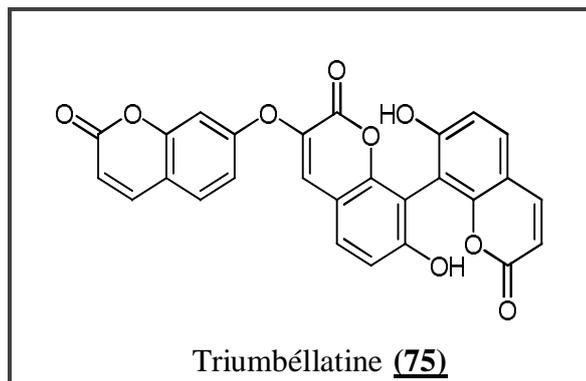
Edgeworine (73)



Edgeworthine (74)



- E-2-Tricoumarine



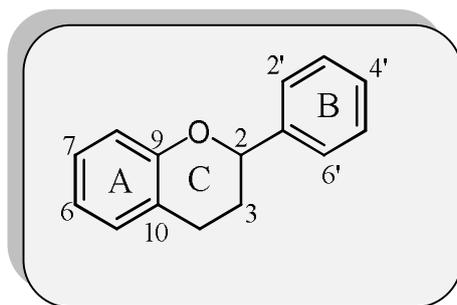
### II-1-2-2-Intérêts pharmacologiques des coumarines

Les coumarines possèdent diverses activités biologiques, elles sont donc des molécules biologiquement actives. Les principales activités attribuées aux coumarines sont: anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétique, antimicrobienne, analgésique et antivirale [58,59]. Certaines coumarines sont indiquées dans les cas de lymphoedème du membre supérieur après traitement radio chirurgicale du cancer du sein [59]. Plusieurs composés coumariniques des dérivés de la classe 3-(N-aryl)-carboxamide-coumarine possèdent des activités cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales et en plus ils empêchent d'une manière sélective la croissance des cellules cancéreuses [60].

### II-1-3-Flavonoïdes

Le terme "flavonoïde" désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont largement répandus dans le règne végétal et notamment dans les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes. Ils sont présents le plus souvent sous la forme soluble d'hétérosides [61].

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits de la plante. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Ils représentent une source importante d'anti-oxydants dans notre alimentation. Les familles les plus riches en flavonoïdes sont: Fabacées, Myrtacées et Polygonacées [62]. Ils existent plus de 6000 structures avec le même élément structural de base, le noyau flavane qui est constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C [25,63] (Figure II-2).



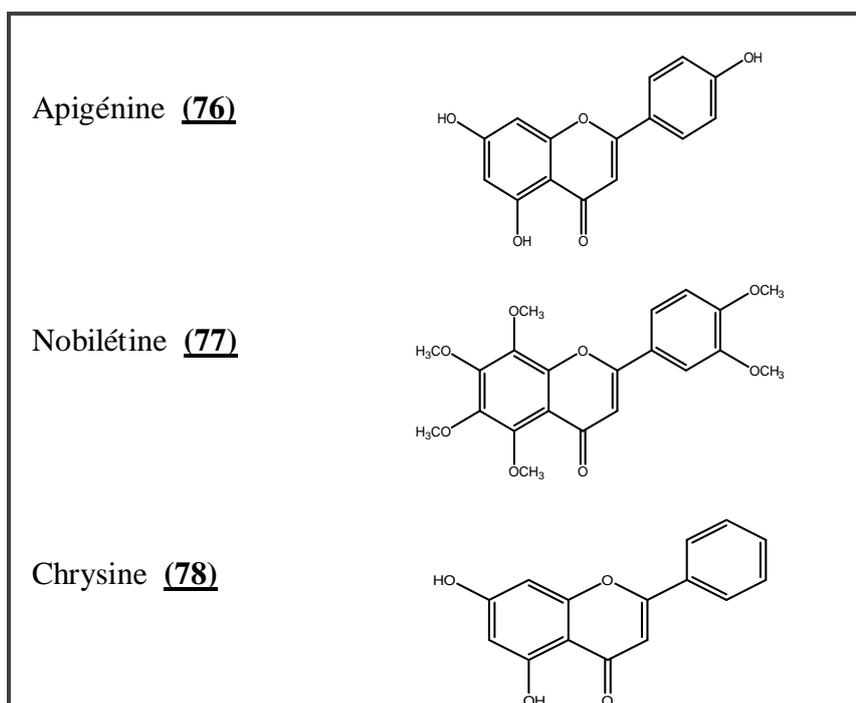
**Figure II-2:** Squelette de base des flavonoïdes

### II-1-3-1-Classification des flavonoïdes

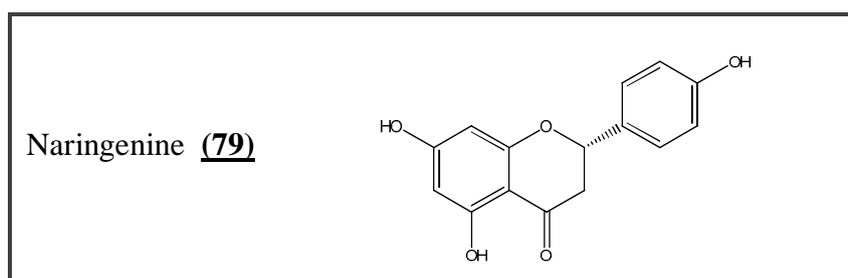
Les flavonoïdes se divisent en différents types à partir du squelette flavane: flavones, flavanones, chalcones, flavonols, flavane-3,4-diols, flavan-3-ols et anthocyanidines [64,65].

Les différentes classes de ces composés sont données ci-après :

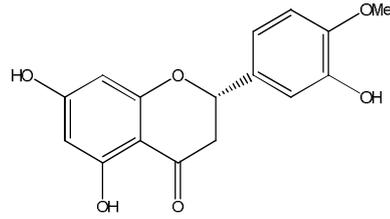
#### A-Flavones



#### B-Flavanones

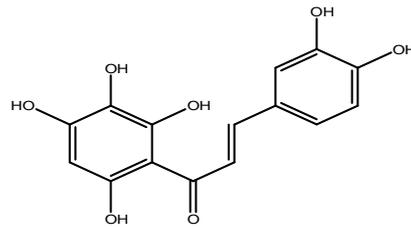


Hespérétine **(80)**

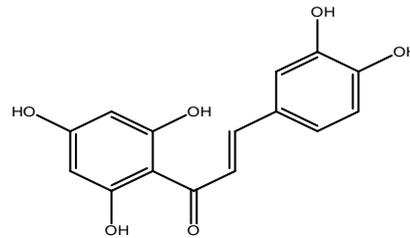


**C-Chalcones**

Okanine **(81)**

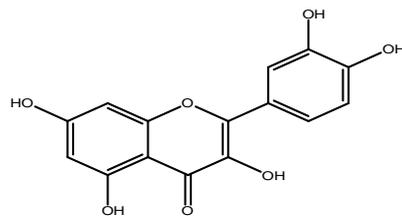


Butéine **(82)**

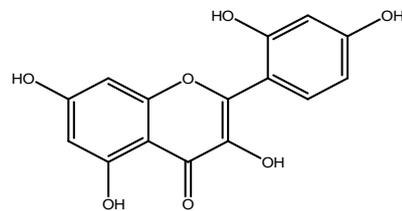


**D-Flavonols**

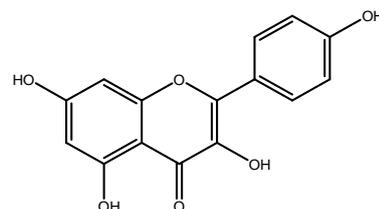
Quercétine **(16)**

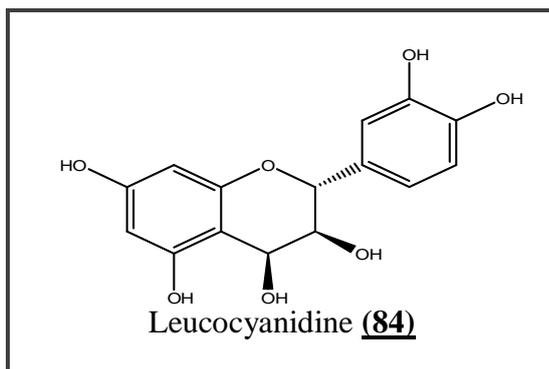
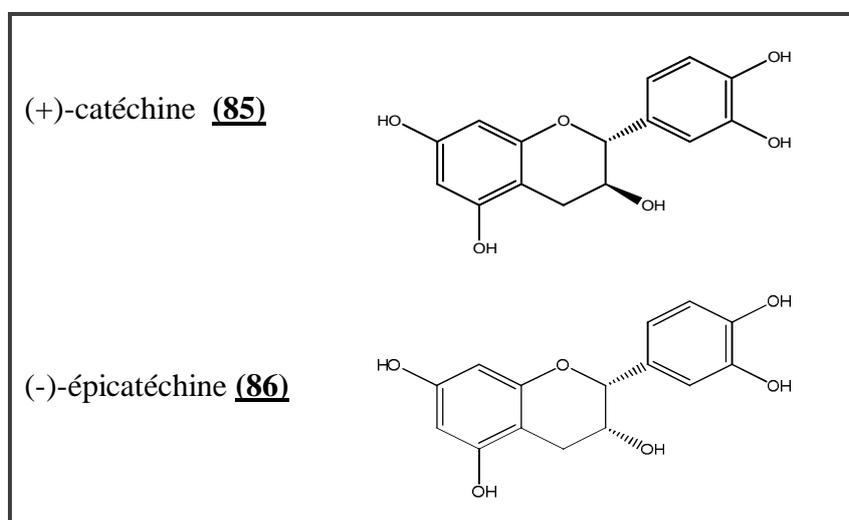
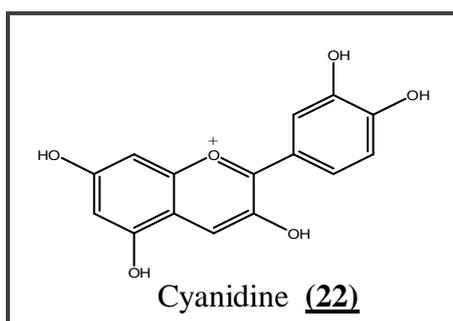


Morine **(83)**

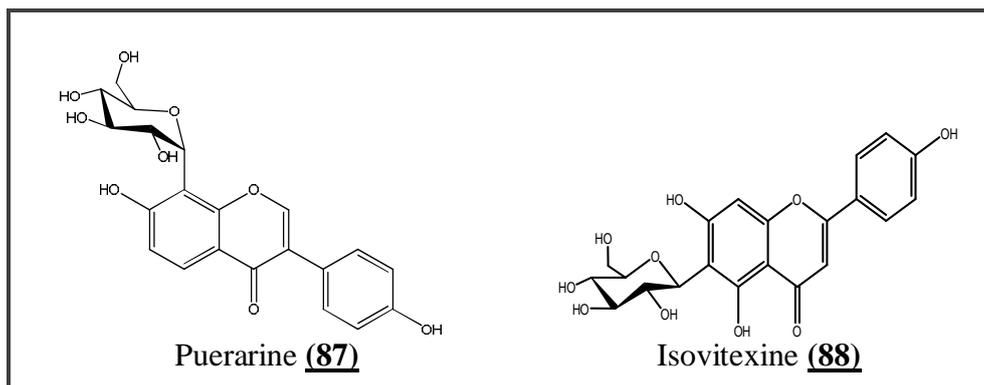


Kaempférol **(12)**



**E-Flavane-3,4-diols****F-Flavan-3-ols****G-Anthocyanidines**

Les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4', 5' ou 6'. Les principaux groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Les flavonoïdes ou isoflavonoïdes peuvent être aussi présents sous forme *O*-glycosylés (arabinose, galactose, glucose, rhamnose et xylose) ou *C*-glycosylés comme Puerarine **(87)** et isovitexine **(88)** .....etc.

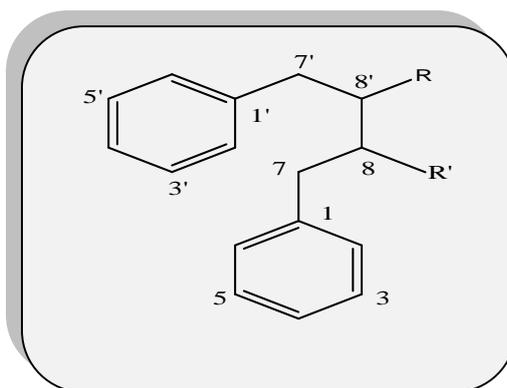


### II-1-3-2-Intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

Nombreux travaux ont porté sur l'intérêt pharmacologique des flavonoïdes indiquant qu'ils possèdent des propriétés anti-allergiques [67], anti-oxydantes [68,69], anti-inflammatoires [70,71], anti-VIH [72,73], antivirales [74] et antibactériennes [75]. Les flavonoïdes ont des activités anti-tumorales lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec d'autres agents chimiothérapeutiques [76,77].

### II-1-4-Lignanes

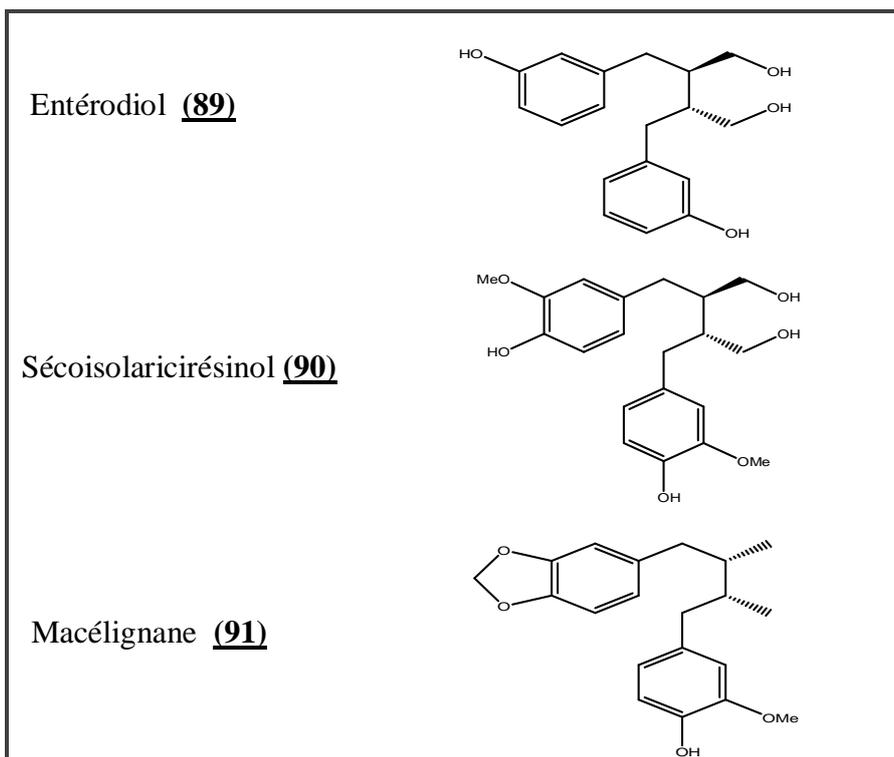
Ce sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones (8 et 8') des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane [78] (Figure II-3). Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal. Ils sont trouvés dans toutes les parties des plantes tels que: les tiges, les feuilles, les fruits, les grains et ainsi dans les racines [2]. Ces composés peuvent être qualifiés d'anti-oxydants [66].



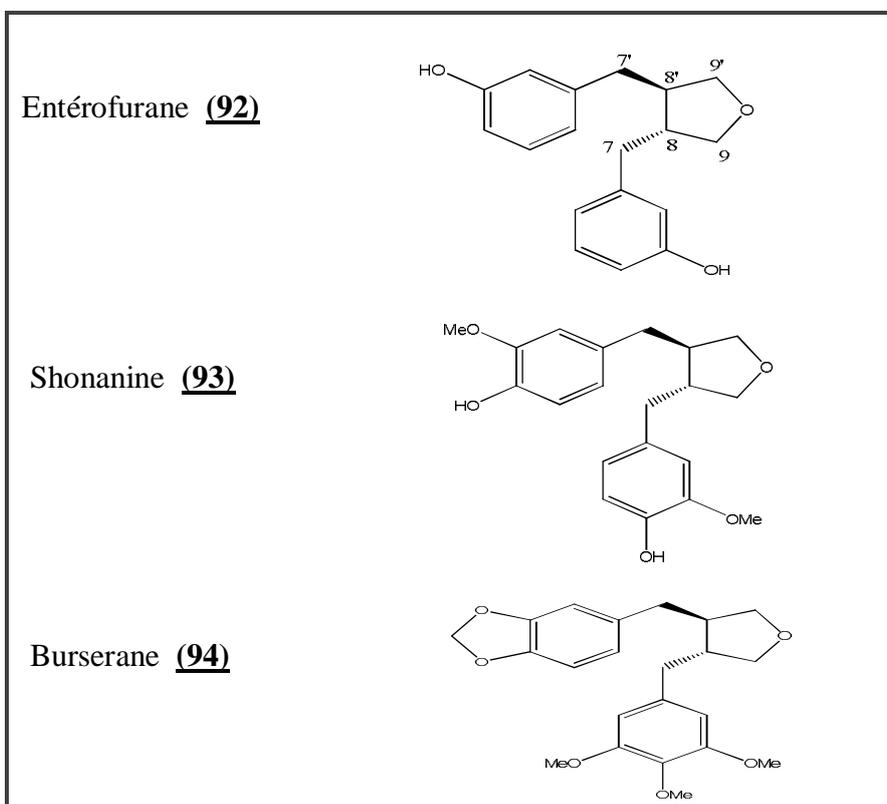
**Figure II-3: Squelette de base des lignanes**

#### II-1-4-1-Classification des lignanes

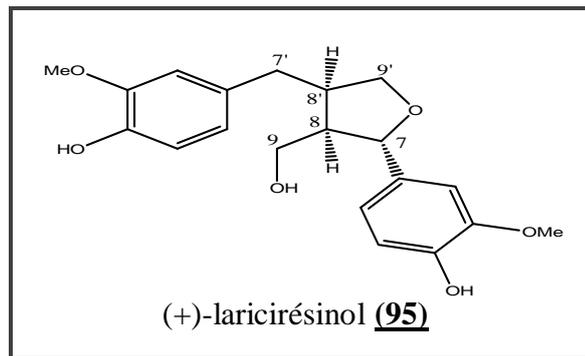
On peut classer les lignanes en six groupes structuraux fondamentaux. Nous résumons ci-dessous les principaux groupes des lignanes [53].

**A-Lignanes dibenzylbutanes****B-Lignanes monofuraniques**

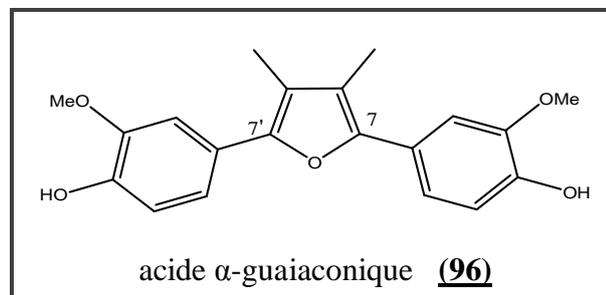
- B-1-monofuranique par la cyclisation 9-O-9'



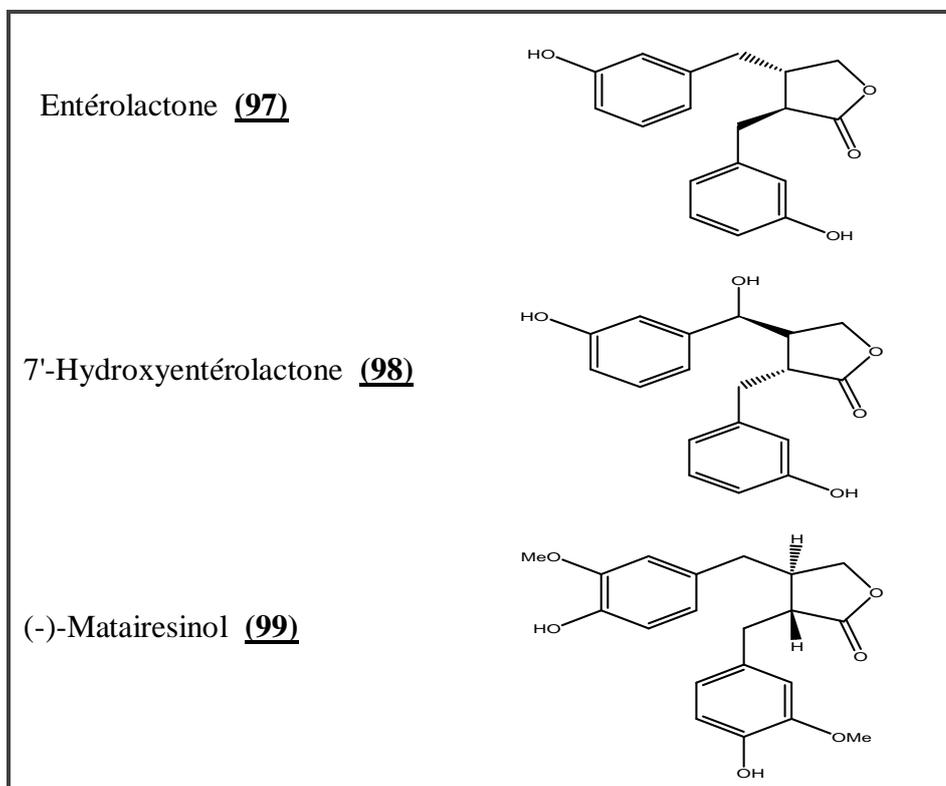
- B-2-monofuranique par la cyclisation 7-O-9'

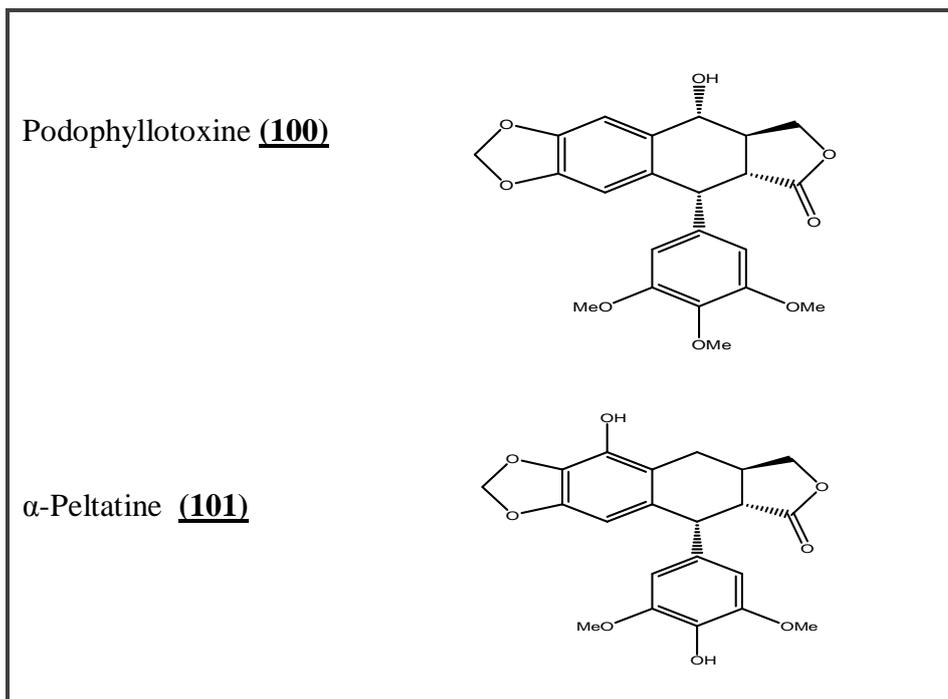
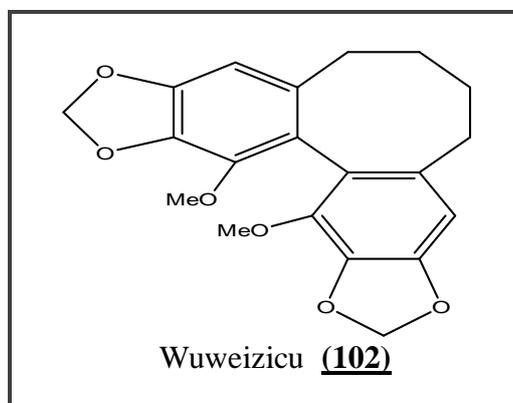
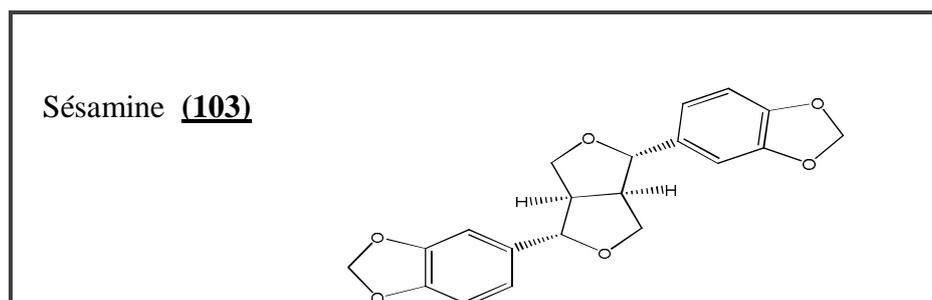


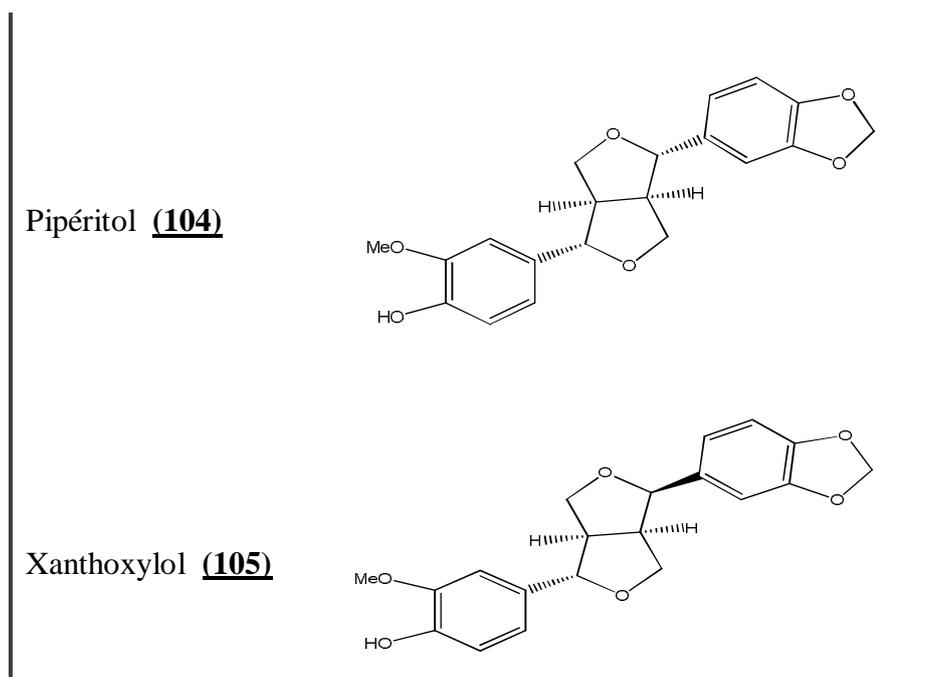
- B-3-monofuranique par la cyclisation 7-O-7'



### C-Lignanes butyrolactones



**D-Lignanes aryltéralines****E-Lignanes dibenzocycloctanes****F-Lignanes furanofuranique**



### II-1-4-2-Intérêts pharmacologiques des lignanes

Il a été établi que les plantes riches en lignanes sont utilisées pour traiter diverses maladies comme le cancer [79], l'arthrite, l'ulcère et les douleurs [80]. Ces composés possèdent une large gamme d'activités biologiques incluant: l'activité antitumorale, anti-oestrogénique, bactéricide, antifongique et ainsi anti-inflammatoire [66], cytotoxique [81], antinutritive [82], antivirale [83] et antimicrobienne [84].

Nombreuses recherches scientifiques ont aussi démontré que les lignanes sont transformés par les bactéries intestinales en composés qui protègent l'homme des maladies hormonales [80]. En plus, les lignanes sont des anti-oxydants spéciaux qui ont fait preuve de remarquables effets bénéfiques pour la santé humaine [85]. Ces composés agissent aussi contre les taux élevés de cholestérol, le lupus et le diabète [66].

## II-2-Composés spiraniques

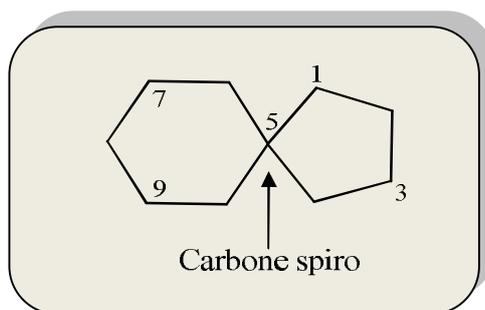
### II-2-1-Généralités

Les composés spiro sont des molécules organiques bicycliques ou polycycliques. Ce type de composés est constitué de cycles identiques (même nature) ou différents et qui sont connectés par un unique atome appelé atome spiro. L'atome de connexion ou l'atome spiro est

un atome de carbone quaternaire. Les cycles peuvent comporter des hétéroatomes tels que: l'oxygène, l'azote ou le soufre.

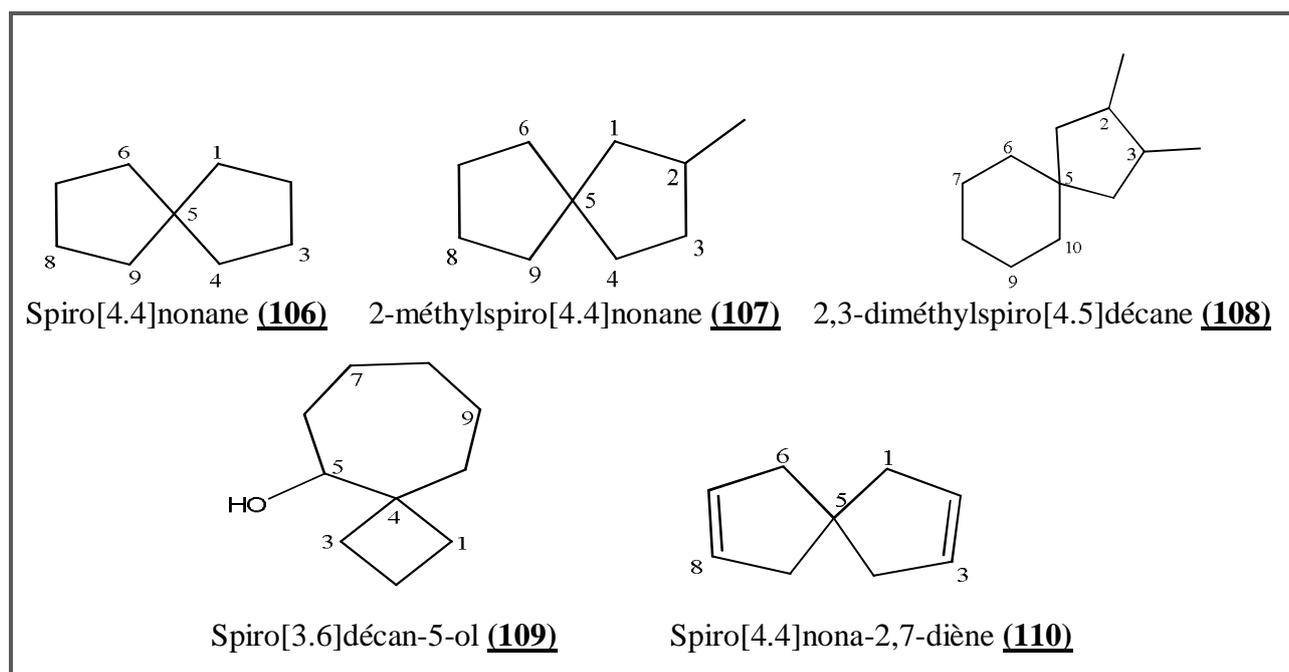
### II-2-2-Nomenclature des spiranes

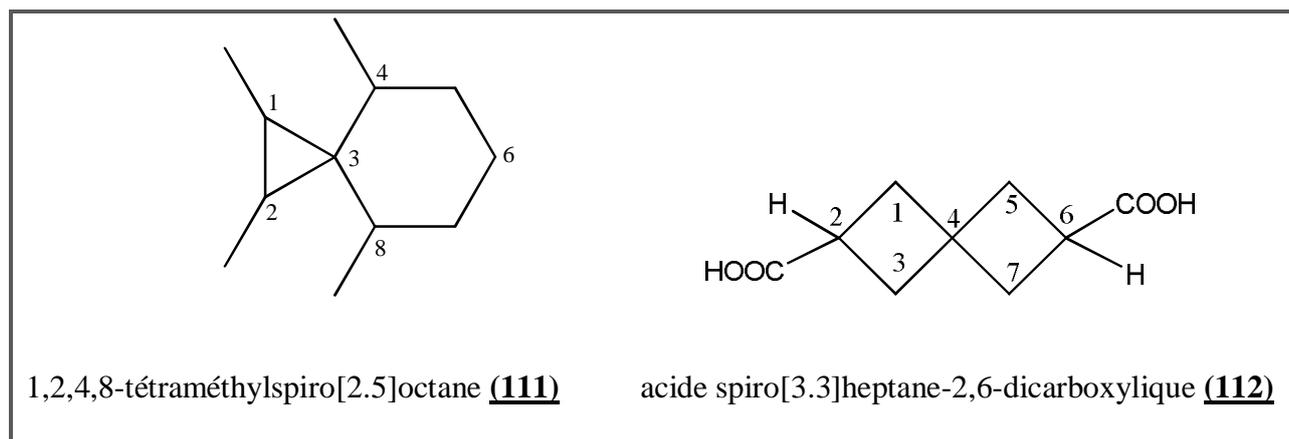
La nomenclature des composés spiraniques a été proposée en 1900 par le savant Adolf von Baeyer [86], à titre d'exemple une molécule spiro composée d'un cycle cyclohexane et d'un autre cyclopentane est appelée spiro[4.5]décane (Figure II-4).



**Figure II-4: Structure du spiro[4.5]décane**

Le nom de ces composés est constitué d'un préfixe "spiro", ce dernier est suivi d'un crochet contenant des chiffres séparés par un point, ces chiffres indiquent la taille des cycles. Pour la numérotation des cycles, le cycle le plus petit est numéroté en premier lieu puis l'atome spiranique et enfin le second cycle. Les atomes d'un hydrocarbure saturé monospiranique sont numérotés respectivement en commençant par un atome cyclique immédiatement voisin de l'atome de carbone spiranique. Nous exposons ci-dessous quelques squelettes de ces composés (Figure II-5).





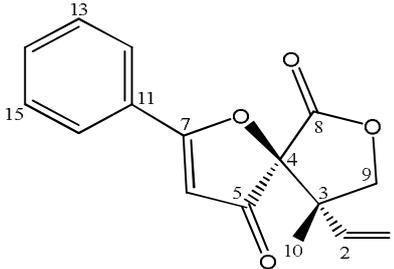
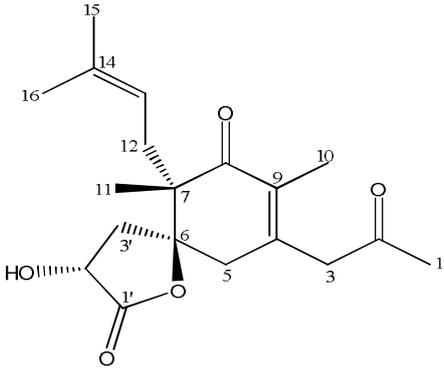
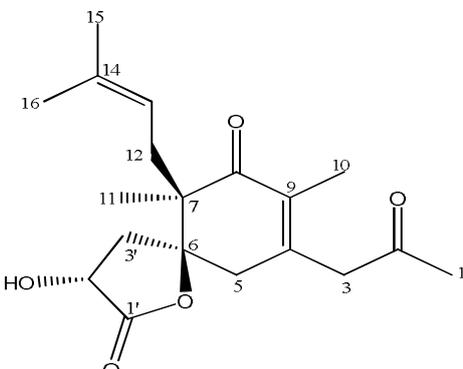
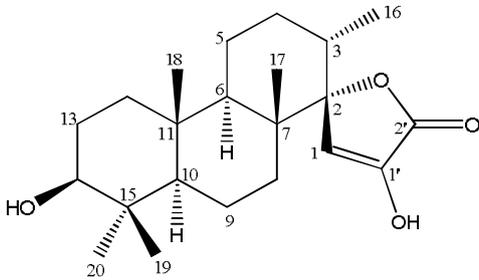
**Figure II-5:** Structures de quelques composés spiraniques

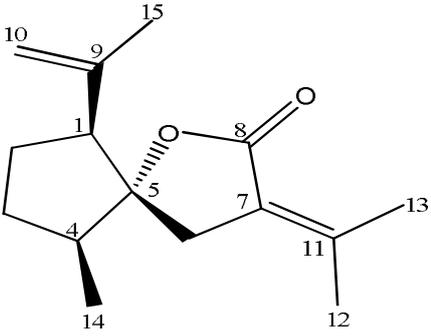
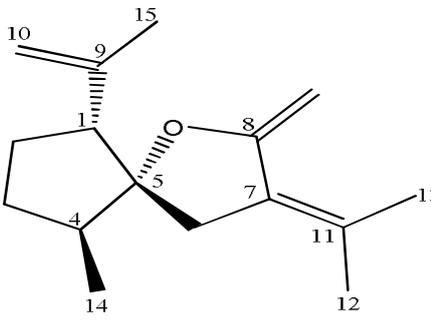
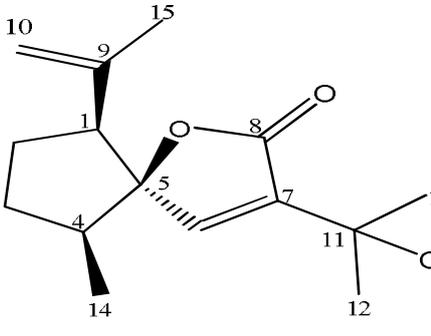
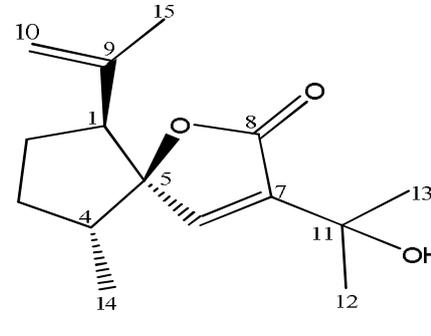
### II-2-3-Distribution des composés spiraniques dans le règne végétal

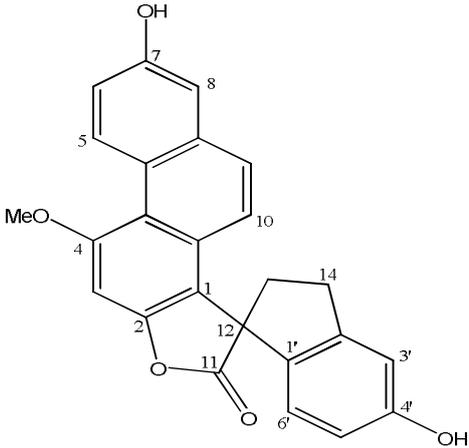
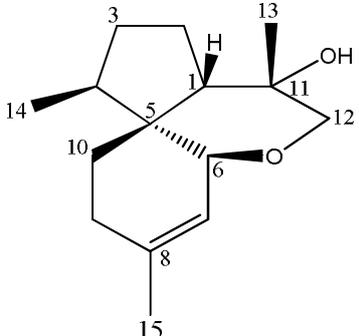
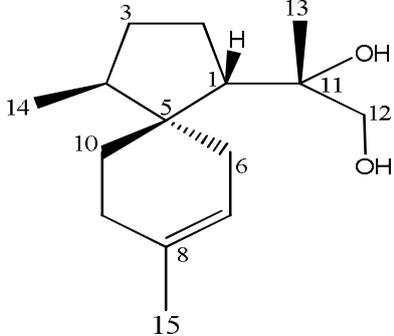
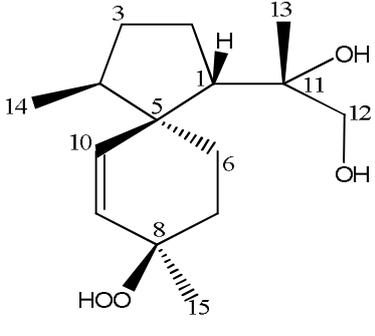
Les substances naturelles spiraniques forment une rare classe chimique de produits naturels et sont trouvées dans les plantes en faibles quantités. Ces molécules peuvent se localiser dans les différentes parties de la plante telles que: les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits, les écorces, les graines et les racines. Ces composés peuvent être biosynthétisés par les champignons et les algues. Cette catégorie de composés naturels possède divers intérêts thérapeutiques et sont connus en tant que: antibiotique [87], cytotoxique [88], antibactérienne et antipalludique [89], fongicide [87], anti-inflammatoire [90] et anti-VIH [91]. Les composés spiraniques cités dans le tableau (II-1) ont été isolés de certaines espèces végétales.

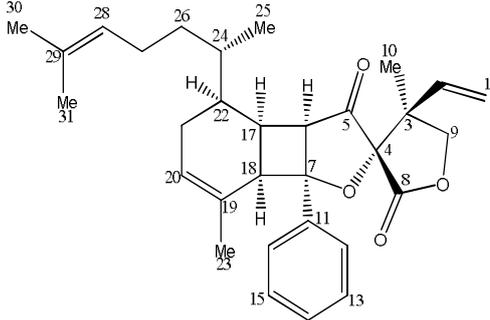
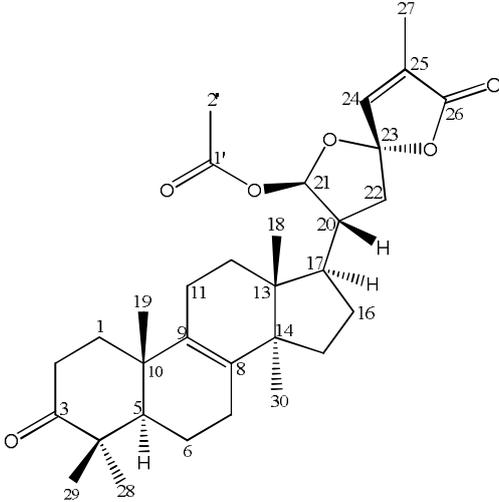
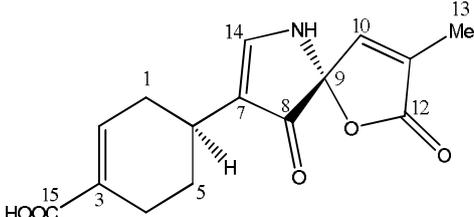
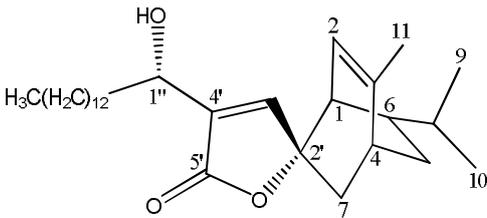
**Tableau II-1:** Composés spiraniques isolés

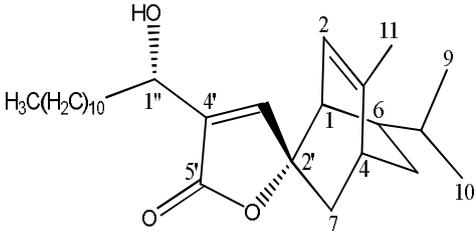
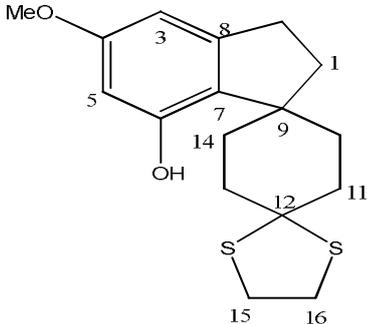
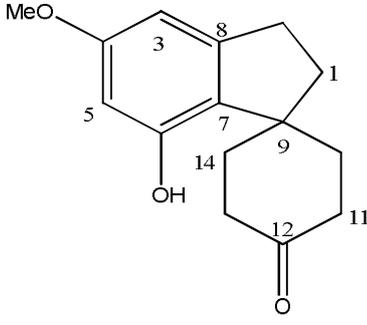
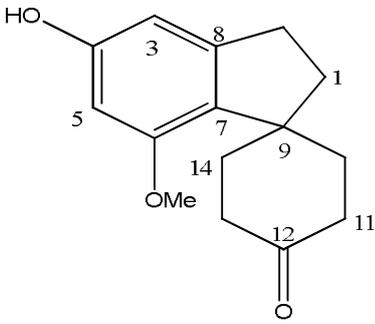
Nom du composé	Structure	Nom de l'espèce (Famille)	Réf
Hyperolactone A <b>(113)</b>			
Hyperolactone B <b>(114)</b>		<i>Hypericum chinense</i> (Guttiferae)	[92]

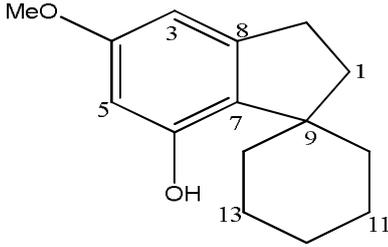
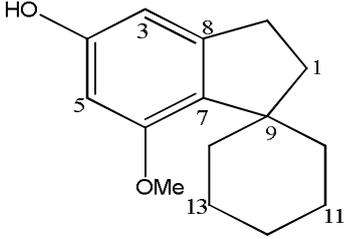
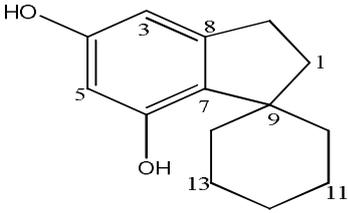
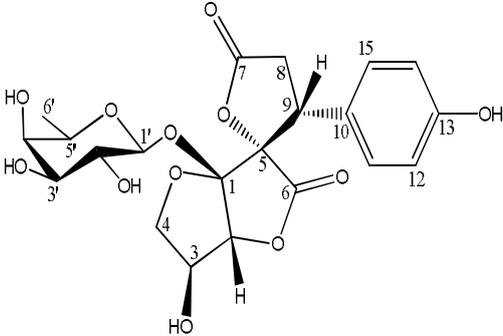
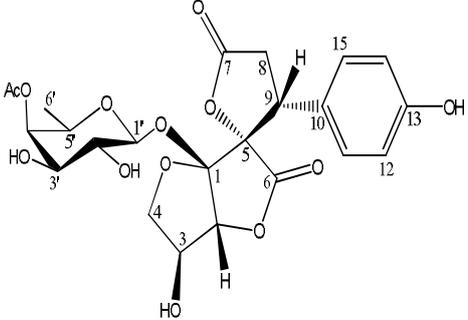
<p>Hyperolactone C <b>(115)</b></p>			
<p>Spiroindicumide A <b>(116)</b></p>		<p><i>Chaetomium indicum</i> (Chaetomiaceae)</p>	<p>[93]</p>
<p>Spiroindicumide B <b>(117)</b></p>		<p><i>Chaetomium indicum</i> (Chaetomiaceae)</p>	<p>[93]</p>
<p>Stypolactone <b>(118)</b></p>		<p><i>Stypopodium zonale</i> L. (Dictyotaceae)</p>	<p>[94]</p>

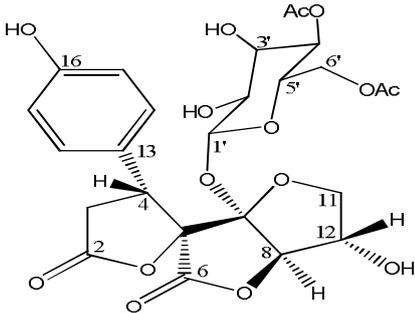
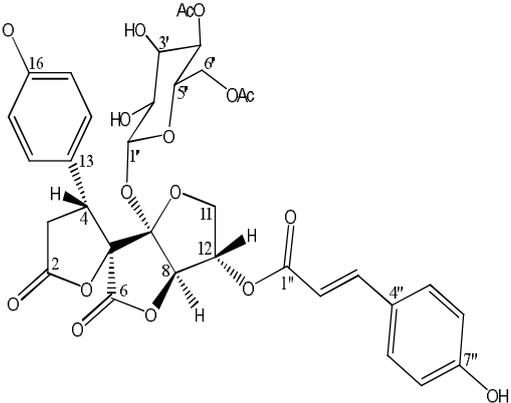
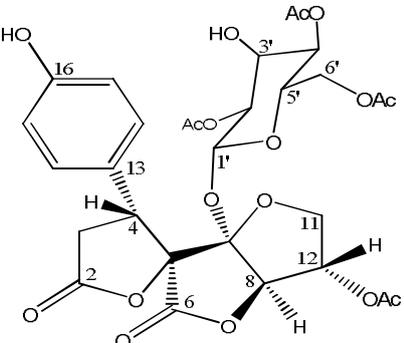
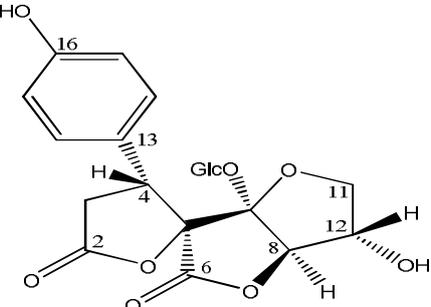
<p>Curcumanolide A <b>(119)</b></p>			
<p>Curcumanolide B <b>(120)</b></p>			
<p>Curcumanolide C <b>(121)</b></p>		<p><i>Curcuma heyneana</i> (Zingiberaceae)</p>	<p>[95]</p>
<p>Curcumanolide D <b>(122)</b></p>			

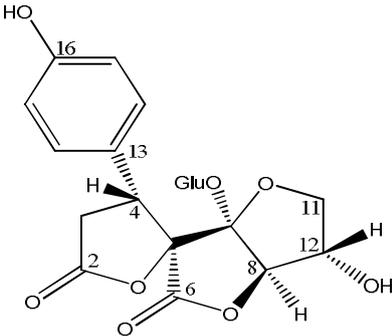
<p>Blespirol <u>(123)</u></p>		<p><i>Bletilla striata</i> (Orchidaceae)</p>	<p>[96]</p>
<p>Cordycepol A <u>(124)</u></p>			
<p>Cordycepol B <u>(125)</u></p>		<p><i>Cordyceps ophioglossoides</i> (Cordycipitaceae)</p>	<p>[97]</p>
<p>Cordycepol C <u>(126)</u></p>			

<p>Biyouyanagine A <b>(127)</b></p>		<p><i>Hypericum chinese L.</i> <i>var. salicifolium</i> (Hypericaceae)</p>	<p>[98]</p>
<p>Omphalocarpidone <b>(128)</b></p>		<p><i>Tridesmostemon omphalocarpoides</i> Engl. (Sapotaceae)</p>	<p>[99]</p>
<p>Acide anthracophyllique <b>(129)</b></p>		<p><i>Anthracophyllum</i> sp. (Marasmiaceae)</p>	<p>[89]</p>
<p>Yaoshanenolide A <b>(130)</b></p>		<p><i>Machilus yaoshansis</i> (Lauraceae)</p>	<p>[100]</p>

<p>Yaoshanenolide B <b>(131)</b></p>		<p><i>Machilus yaoshansis</i> (Lauraceae)</p>	
<p>Thioketal <b>(132)</b></p>		<p><i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae)</p>	
<p>Cannabispirane <b>(133)</b></p>		<p><i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae)</p>	<p>[101]</p>
<p>Iso-cannabispirane <b>(134)</b></p>			

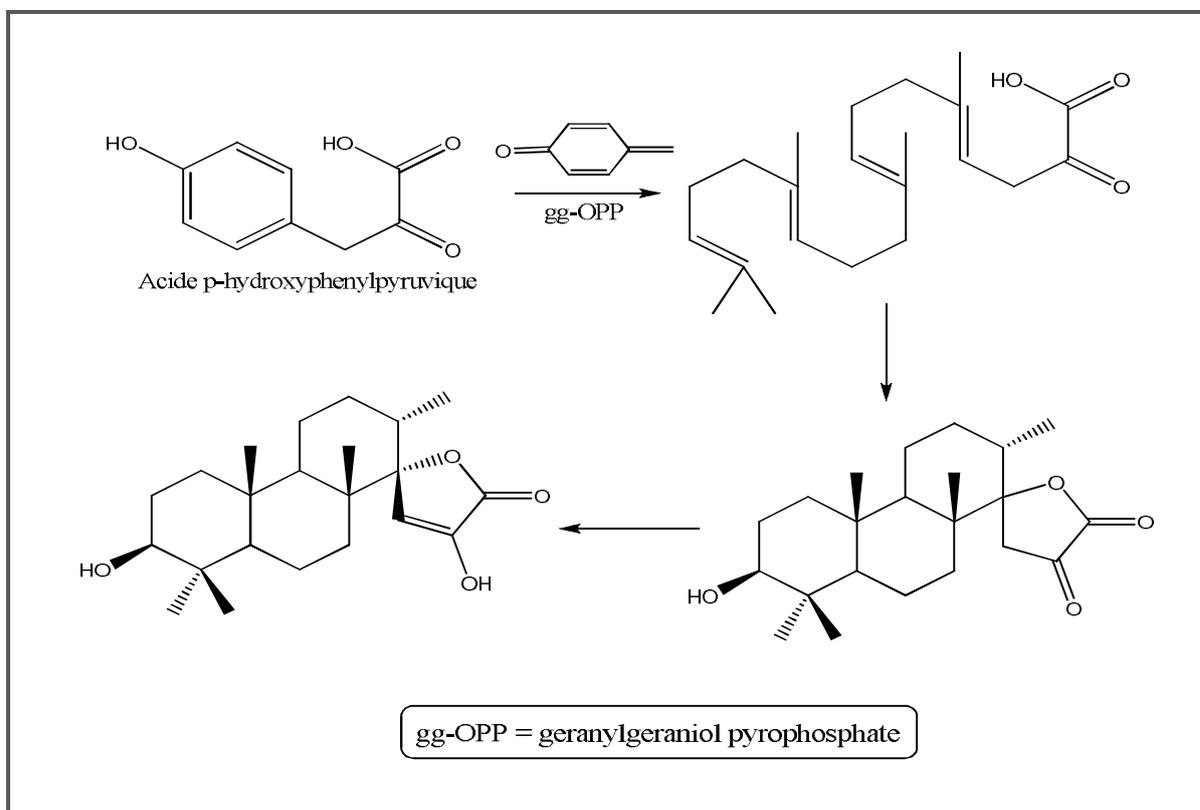
<p>Spiro-indane 2 <u>(135)</u></p>			
<p>Spiro-indane 3 <u>(136)</u></p>		<p><i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae)</p>	<p>[101]</p>
<p>Spiro-indane 4 <u>(137)</u></p>			
<p>Dichotomaine A <u>(138)</u></p>		<p><i>Dicranopteris dichotoma</i></p>	<p>[102]</p>
<p>Dichotomaine B <u>(139)</u></p>		<p>(Gleicheniaceae)</p>	

<p>4',6'-Diacetyl-viburnolide A <b>(140)</b></p>		<p><i>Gnidia socotrana</i> (Thymelaeaceae)</p>	<p>[13]</p>
<p>4',6'-Diacetyl-12-coumaroyl-viburnolide A <b>(141)</b></p>			
<p>Tetraacetylviburnolide A <b>(142)</b></p>			
<p>Viburnolide A <b>(143)</b></p>		<p><i>Viburnum wrightii</i> (Caprifoliaceae)</p>	<p>[103]</p>

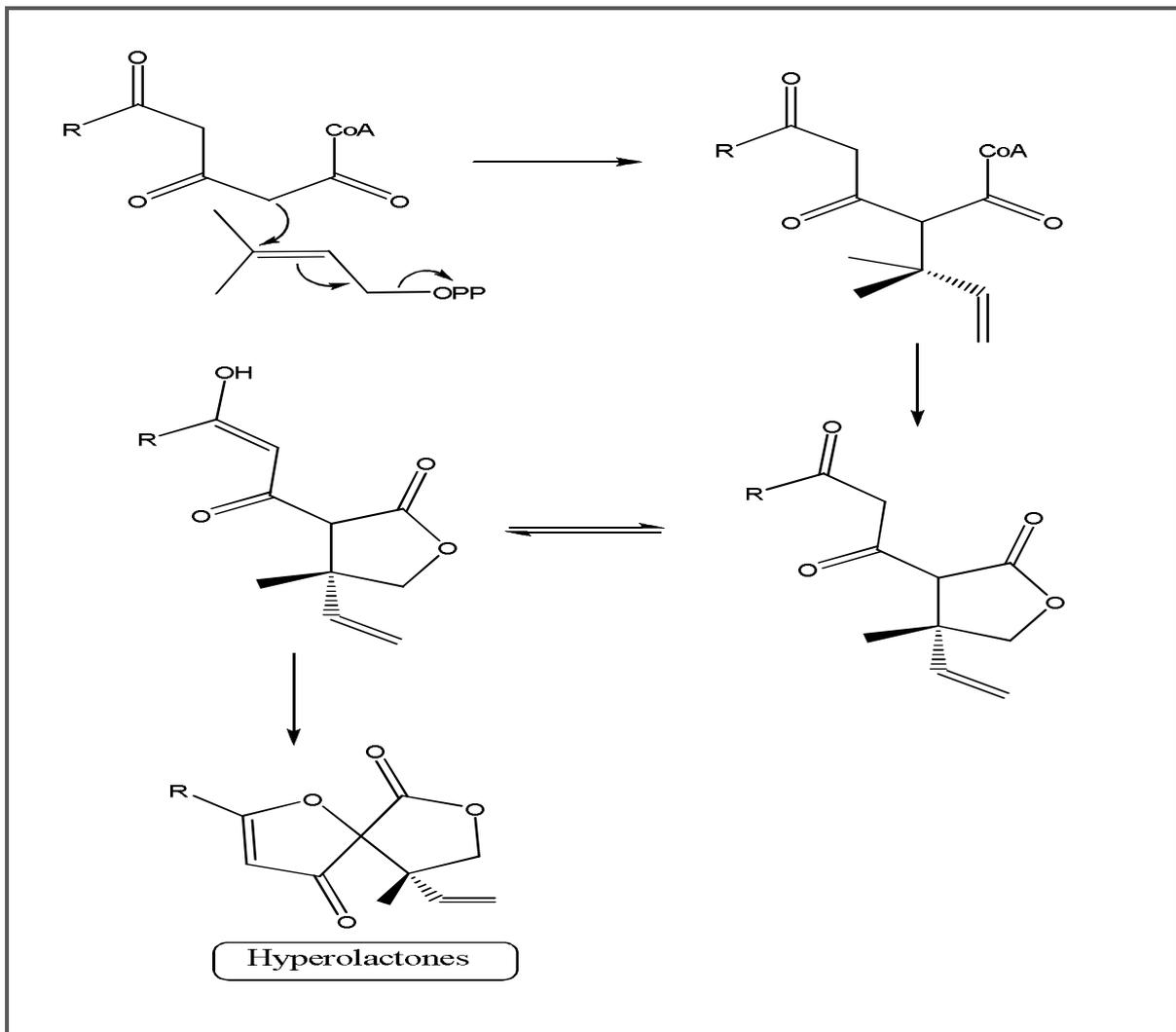
<p>Dilaspirolactone <b>(144)</b></p>		<p><i>Viburnum dilatatum</i> (Caprifoliaceae)</p>	<p>[104]</p>
--	---	---	--------------

### II-2-4-Biosynthèse des spiranes

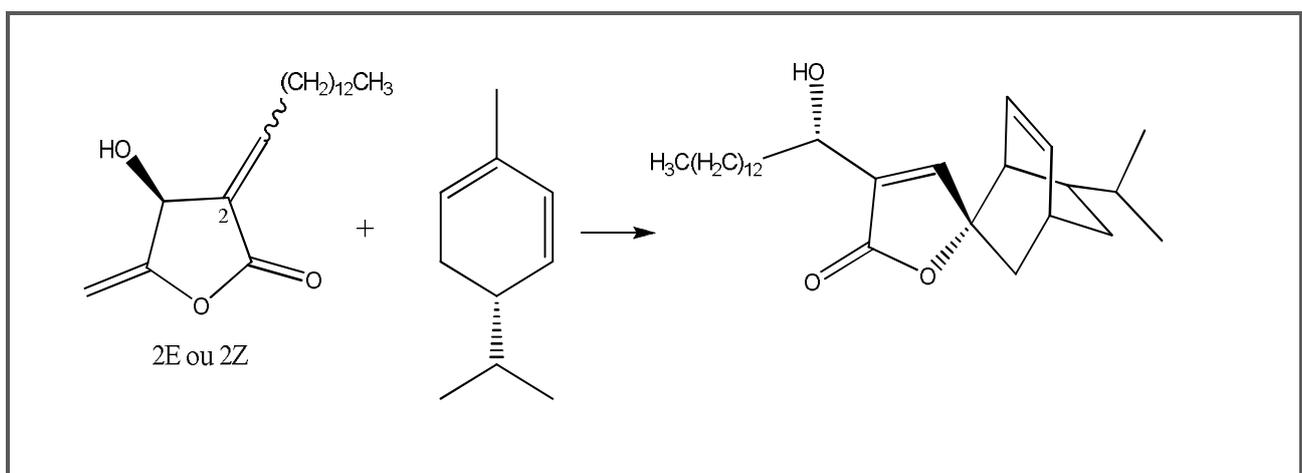
De nos jours, la biosynthèse des composés spiraniques n'est pas bien élucidée, cela est dû dans une certaine mesure à la distribution limitée de ces composés dans le règne végétal. En effet, un nombre plausible de voies de biosynthèses permettant d'accéder aux spiranes ont été élaborées. Dans les schemas (II-1, II-2 et II-3) ci-dessous nous représentons quelques approches de la biosynthèse menant à la formation de certains composés spiraniques.



**Schéma II-1:** Biosynthèse du styrolactone [94]



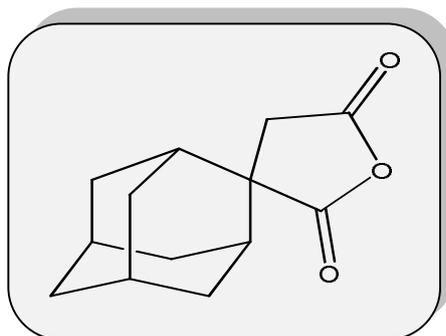
**Schéma II-2:** Biosynthèse des hyperolactones [92]



**Schéma II-3:** Biosynthèse d'un spiro lactone yaoshanenolide A [100]

### II-2-5-Intérêts des spiranes

Comme tous les métabolites secondaires, les composés spiraniques manifestent diverses activités biologiques. En outre des utilisations dans le domaine industriel [86], ces composés sont des produits intermédiaires dans la synthèse de la résine époxy rentrant dans la production de médicaments [86]. Une recherche scientifique a révélé que les composés spiro de type Adamantane (Figure II-6) et leurs analogues structuraux possèdent une activité antivirale [105].

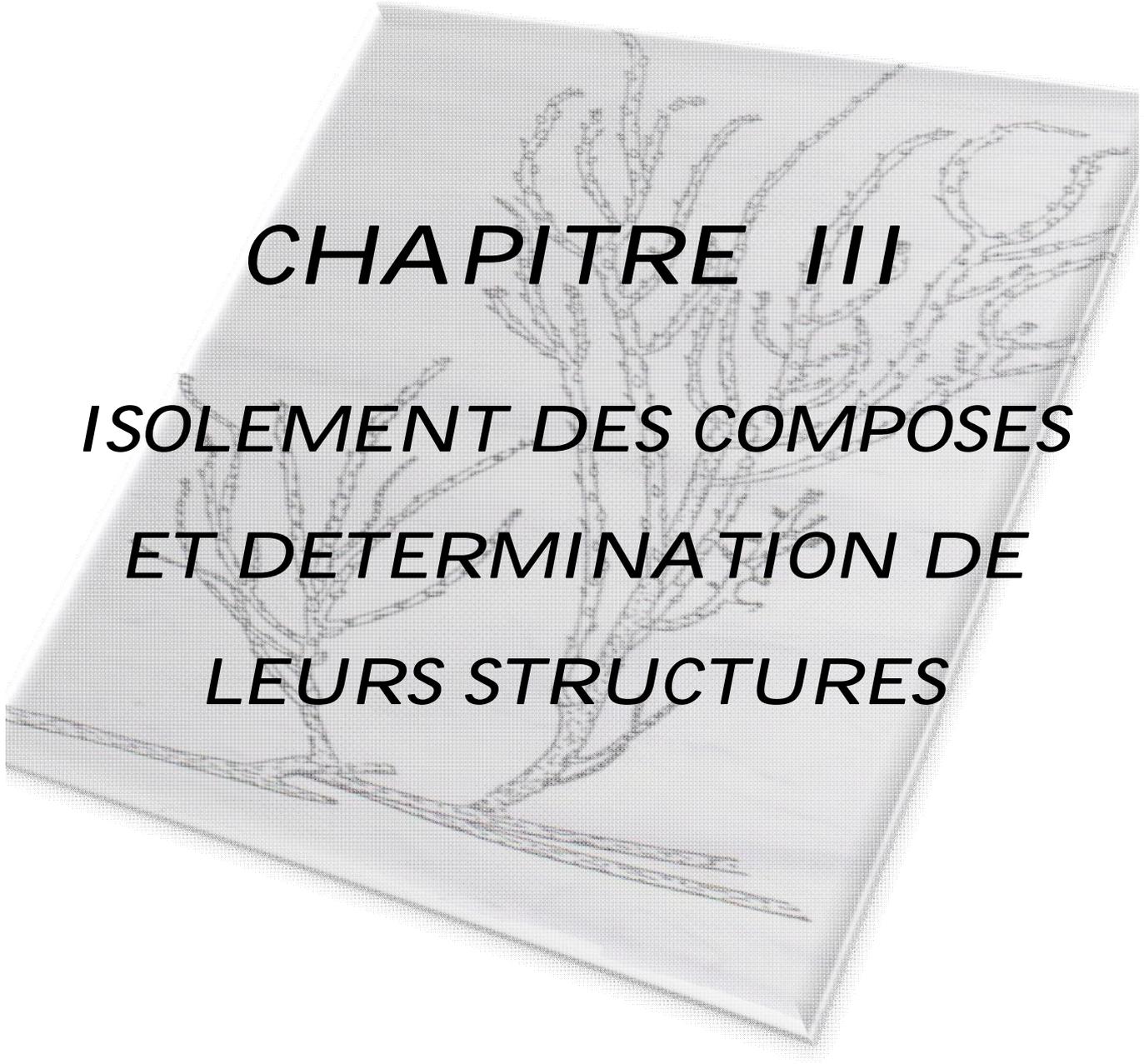


**Figure II-6:** Structure anhydride spiro-2'-succinique adamantane

Par ailleurs, le biyouyanagine A (**127**) isolé de l'espèce *Hypericum chinese* L. var. *salicifolium* (Hypericaceae) montre des propriétés anti-VIH et participe à l'inhibition de la production de cytokine induite par le lipopolysaccharide [98]. Il a été démontré que le stypolactone (**118**) présente une faible cytotoxicité *in vitro* contre les cancers du poumon et du colon [94]. D'autre part, le spiro[4.5]décane sesquiterpènes connu sous le nom de cordycepol C (**126**) possède des propriétés biologiques intéressantes à savoir: antitumorale, anti-oxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne [97].

Il est à signaler que deux nouveaux spirolactones tricycliques portant de longues chaînes alkyles linéaires yaoshanenolide A (**130**) et yaoshanenolide B (**131**) ont des activités cytotoxiques sélectives contre plusieurs lignées cellulaires du cancer humain [100]. L'acide anthracophyllique (**129**) a fait l'objet d'une étude pharmacologique indiquant qu'il possède des propriétés antipalludique, cytotoxique et antibactérienne [89].

Dans le domaine industriel, certains composés spiro sont utilisés en tant que plastifiants. Dans la parfumerie, plusieurs produits spiraniques sont employés comme des matériaux photochromiques [86].



***CHAPITRE III***

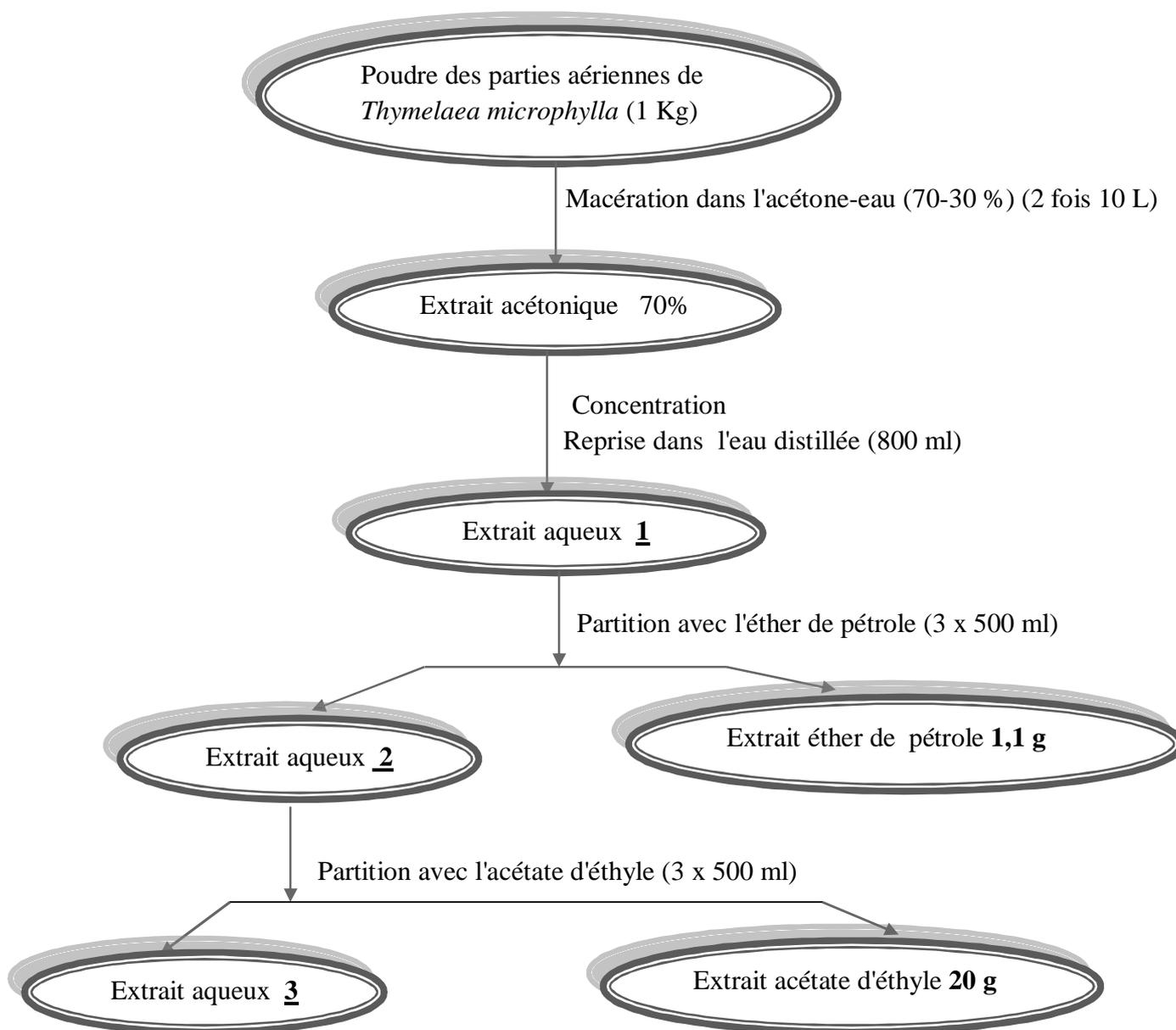
***ISOLEMENT DES COMPOSES  
ET DETERMINATION DE  
LEURS STRUCTURES***

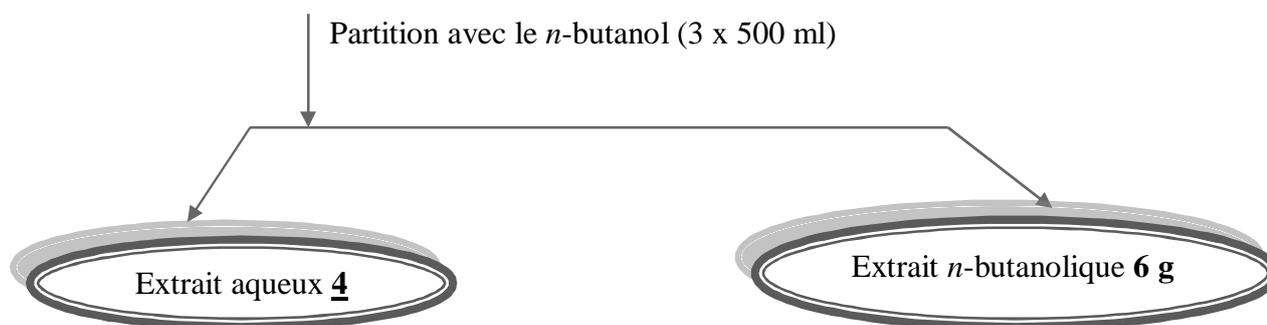
### III-1-Extraction

#### III-1-1-Extraction des parties aériennes

1 Kg de matière végétale sèche de la plante *Thymelaea microphylla* est mis à macérer dans un mélange acétone-eau (70-30: V-V) pendant 4 jours. Après filtration et concentration de l'extrait, une série d'extraction liquide-liquide a été appliquée sur la phase aqueuse par les solvants suivants: en premier lieu l'éther de pétrole, puis l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. Les phases organiques obtenues sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, suivies d'une filtration et évaporation à sec pour donner 1,1 g d'extrait éther de pétrole, 20 g d'extrait acétate d'éthyle et 6 g d'extrait *n*-butanolique.

Le schéma ci-après reproduit les différentes étapes d'extraction (Figure III-1).





**Figure III-1:** Schéma général d'extraction des parties aériennes de *T. microphylla*

### III-1-1-1-Séparation et purification des composants des parties aériennes des extraits AcOEt et EP

La chromatographie sur couche mince CCM en phase normale a été réalisée sur les trois extraits obtenus précédemment, en utilisant le système d'élution  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 90-10, 80-20 et 70-30. Notre travail d'investigation phytochimique a porté sur les extraits éthero-pétrolique et acétate d'éthyle des parties aériennes présentant sur CCM plusieurs taches intéressantes comparativement à l'extrait *n*-butanolique contenant particulièrement des sucres libres.

### III-1-1-2-Fractionnement

#### III-1-1-2-1-Fractionnement de l'extrait AcOEt

7 g de cet extrait sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice phase inverse RP-18 avec le gradient d'élution  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 80:20 à 0:100. 24 fractions ont été collectées.

L'examen sur CCM de ces fractions a été réalisé aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et la révélation à l'acide sulfurique puis chauffage à 100 °C indiquent un ressemblance entre plusieurs fractions. Après regroupement des fractions identiques, 18 fractions majoritaires ont été obtenues F1 à F18. Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification permettant de purifier 4 composés **A**, **B**, **D** et **O** (2 spiro- $\gamma$ -lactone glycosides, 1 biflavonoïde et 1 dissaccharide).

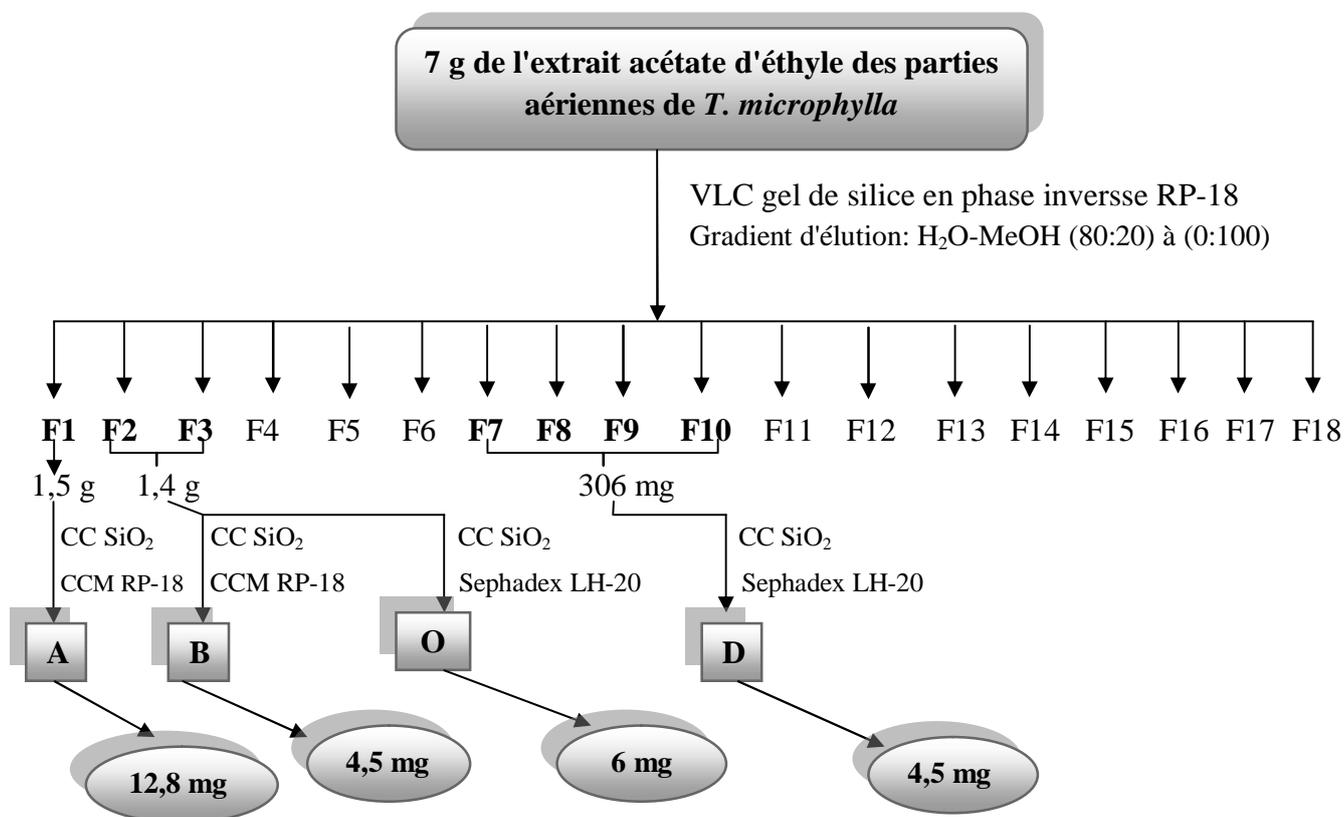
#### III-1-1-2-2-Fractionnement de l'extrait EP

1,1 g de cet extrait est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale  $\text{SiO}_2$ . L'élution est réalisée par un mélange de solvants hexane-acétate d'éthyle à polarité croissante 100:0 à 40:60. Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince CCM, visualisées à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et

révélées à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C conduisant à leur rassemblement en 10 fractions majoritaires F1-F10. La purification de ces fractions a nécessité plusieurs opérations chromatographiques pour obtenir 2 produits correspondant aux composés **I** et **J** (1 flavonoïde mono-glucosylé et 1 sinapyle alcool mono-glucosylé).

### III-1-1-3-Purification

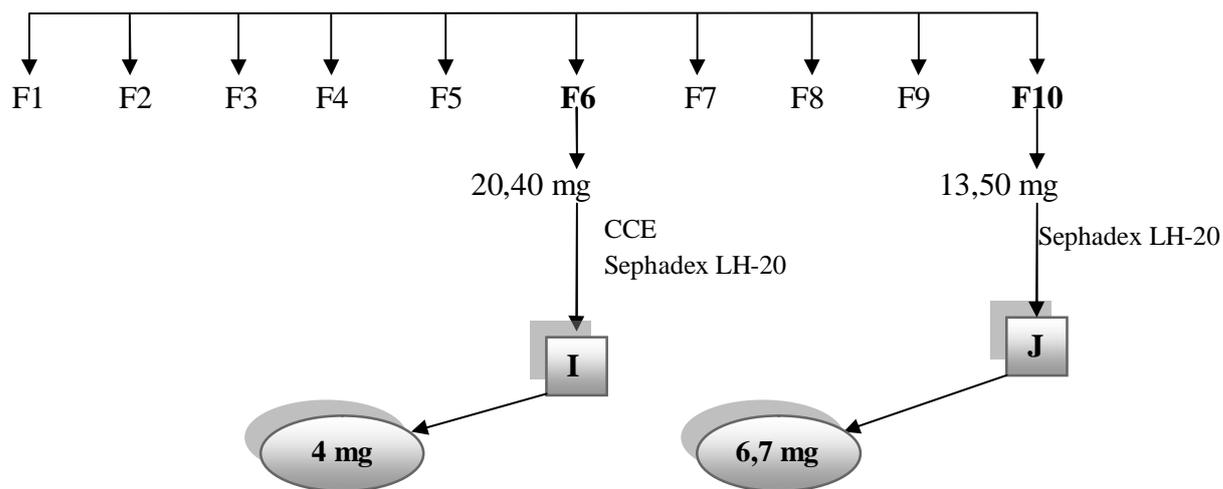
La purification des fractions obtenues a été faite grâce à l'utilisation de la chromatographie sur colonne de gel de silice normale SiO<sub>2</sub>, colonne de polyamide SC6 et Sephadex LH-20 et la chromatographie sur couche épaisse en phase normale et sur couche mince en RP-18. Les schémas ci-après résument les étapes de purification des l'extraits AcOEt et éthero-pétrolique des parties aériennes de la plante *T. microphylla* (Figures III-2 et III-3).



**Figure III-2:** Schéma de purification de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *T. microphylla*

1,1 g de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes de *T. microphylla*

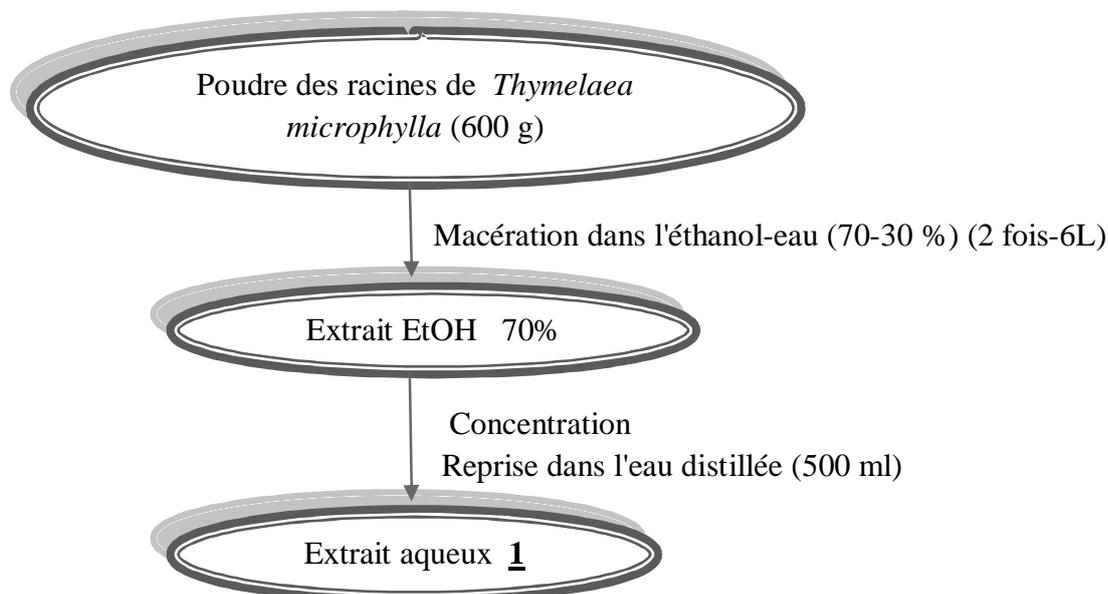
CC SiO<sub>2</sub>  
Gradient d'élution: hexane-AcOEt (100:0) à (40:60)

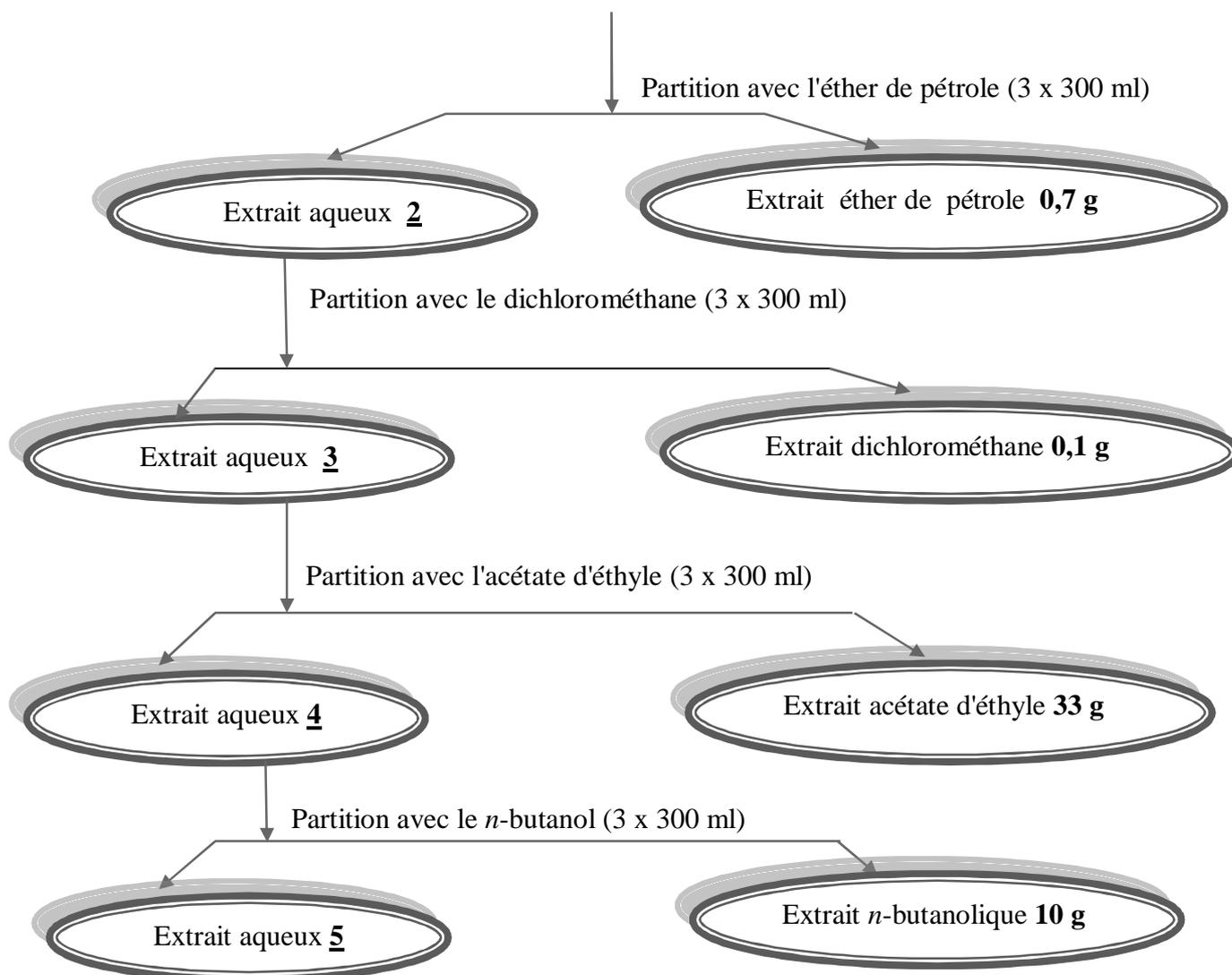


**Figure III-3:** Schéma de purification de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes de *T. microphylla*

### III-1-2-Extraction des racines

Les racines de la plante *T. microphylla* sont préalablement séchées et broyées finement (sous forme d'une poudre fine). 600 g de cette dernière sont mis à macérer pendant 4 jours dans un mélange éthanol-eau (70-30: V-V). Une série d'extraction liquide-liquide a été appliquée sur la phase aqueuse selon le même protocole décrit précédemment, en utilisant les solvants suivants: éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. 0,7 g de l'extrait éthero-pétrolique, 0,1 g de l'extrait dichlorométhane, 33 g de l'extrait acétate d'éthyle et 10 g de l'extrait *n*-butanolique ont été obtenus. L'ensemble de ces opérations d'extraction est représenté dans le protocole suivant (Figure III-4):





**Figure III-4:** Schéma général d'extraction des racines de *T. microphylla*

### III-1-2-1-Séparation et purification des composants des racines de l'extrait AcOEt

Une analyse par chromatographie sur couche mince CCM a été réalisée sur les quatre extraits préparés, en utilisant le système d'élution  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ : 80-20 et 70-30. L'intérêt porté à l'investigation chimique de l'extrait acétate d'éthyle est justifié par sa richesse en métabolites secondaires par rapport aux autres extraits.

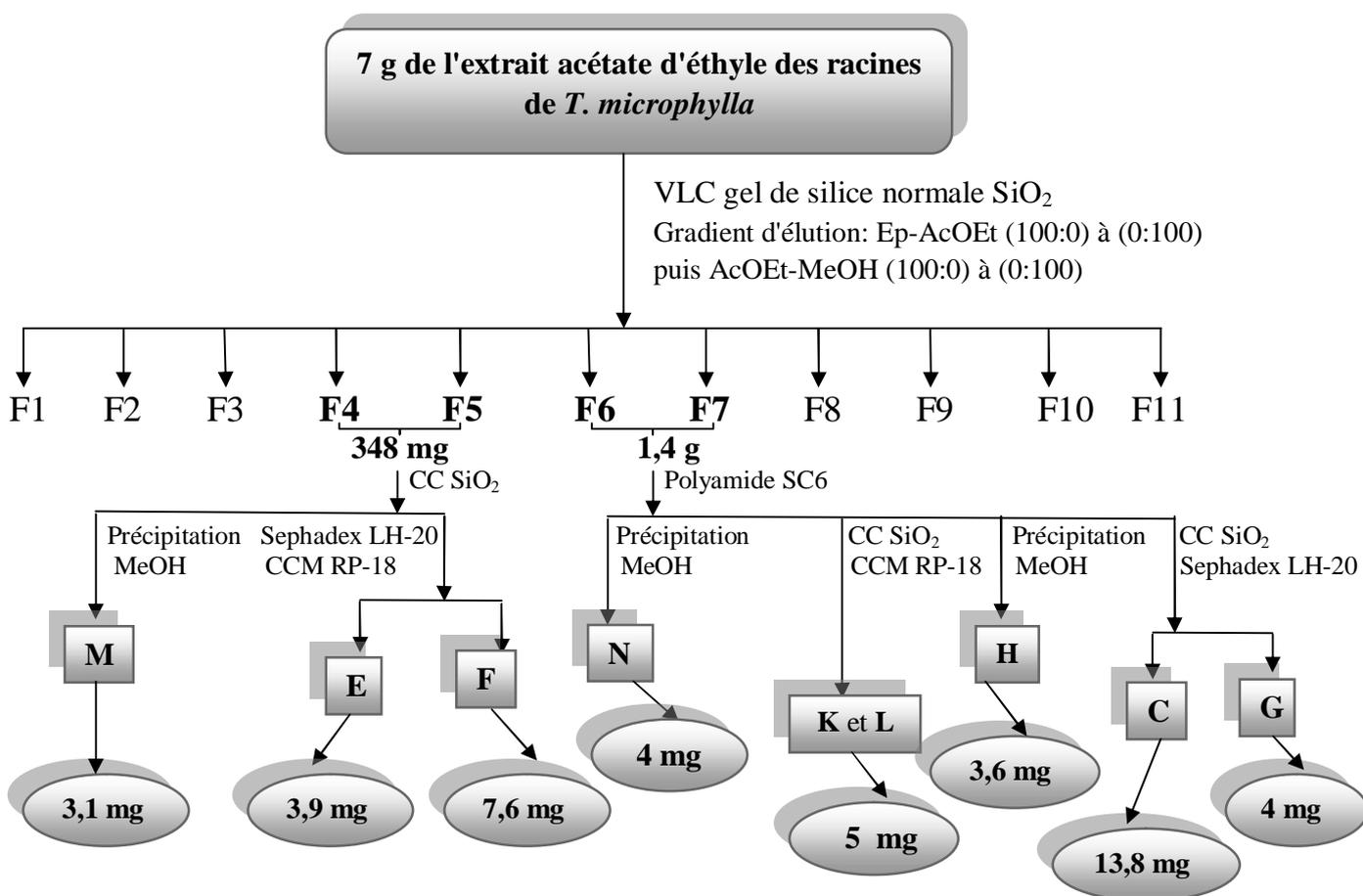
### III-1-2-2-Fractionnement

7 g de l'extrait AcOEt ont subi une VLC (chromatographie liquide sous vide) sur gel de silice en phase normale  $\text{SiO}_2$ . L'élution a été réalisée par le mélange de solvants suivants : Éther de petrol-AcOEt 100-0 à 0-100 puis AcOEt-MeOH 100-0 à 0-100 afin d'obtenir 25 fractions.

Les fractions collectées de 100 ml ont été examinées sur CCM aux longueurs d'onde 254 et 366 nm, éluées au moyen d'un mélange  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 80-20 et 70-30. La révélation des CCM obtenues a été faite par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Les fractions montrant le même profile ont été regroupées pour donner 11 fractions majoritaires (F1 à F11).

### III-1-2-3-Purification

Parmi les 11 fractions recueillies précédemment, quatre fractions sont jugées intéressantes (F4, F5, F6 et F7), car elles contiennent plusieurs taches intéressantes visibles et invisibles à l'UV et de diverses couleurs après révélation et chauffage. Plusieurs opérations de purification ont été utilisées pour obtenir 9 produits correspondant aux composés **C, E, F, G, H, K, L, M** et **N**. Le schéma suivant présente les étapes de purifications de l'extrait AcOEt des racines de la plante étudiée (Figure III-5).

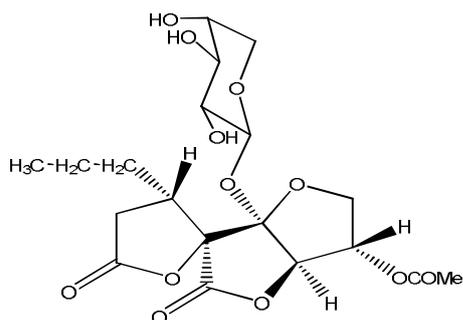


**Figure III-5:** Schéma de purification de l'extrait AcOEt des racines de *T. microphylla*

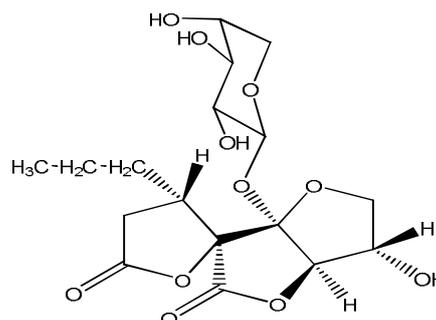
## III-2-Détermination des structures des composés isolés

Les produits isolés de la plante *T. microphylla* (1-15) ont été caractérisés par des différentes méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D du proton  $^1\text{H}$  et du carbone  $^{13}\text{C}$ , la RMN 2D (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $J$ -modulé, HMBC, NOESY et ROESY), la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, l'ultraviolet, l'infrarouge, la mesure du pouvoir rotatoire et aussi par comparaison avec les données de la littérature.

### III-2-1-Produits nouveaux

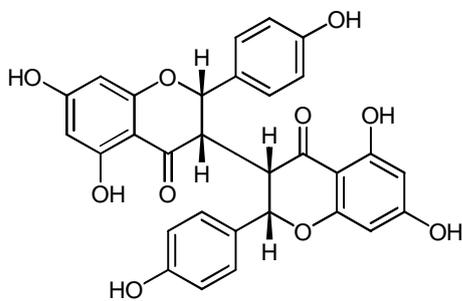


Microphynolide A

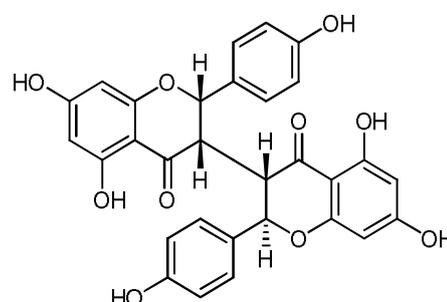


Microphynolide B

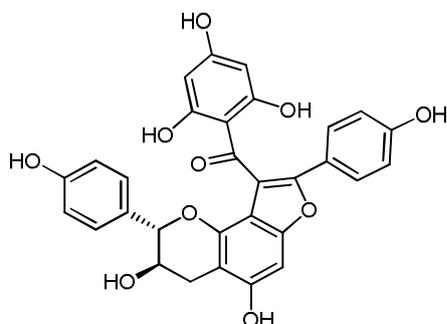
### III-2-2-Produits connus



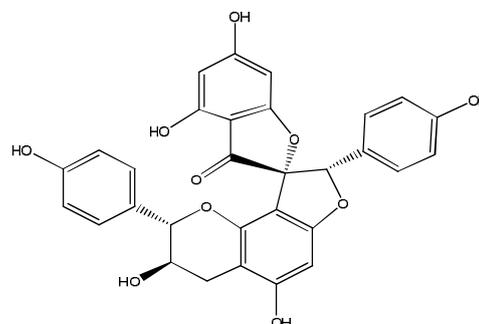
Néochamaejasmine A



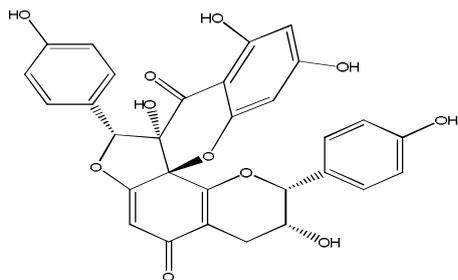
Néochamaejasmine B



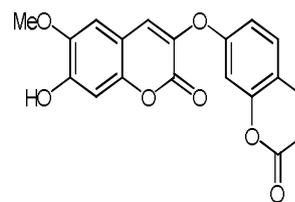
Daphnodorine B



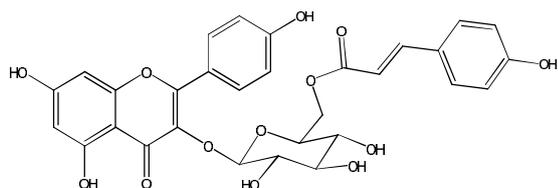
Genkwanol A



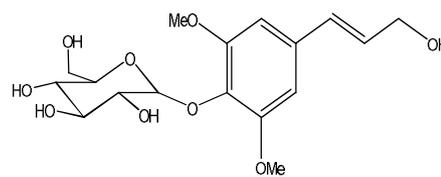
Stelléranol



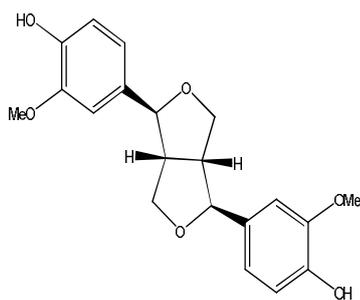
Daphnorétine



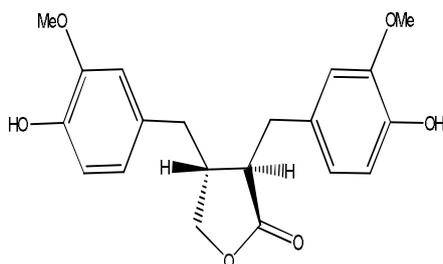
Tiliroside



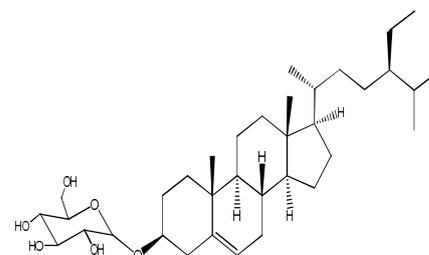
Syringine



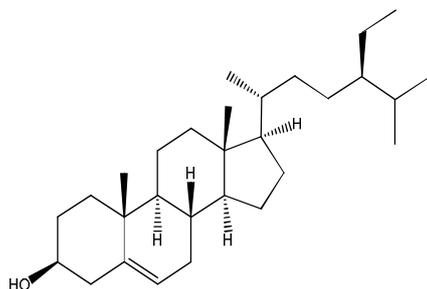
(-)-pinorésinol



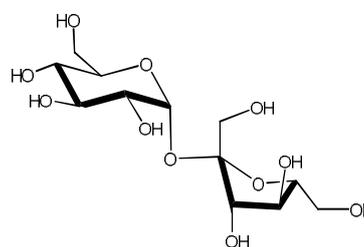
(+)-matairésinol



β-sitostérol-3-O-glucoside

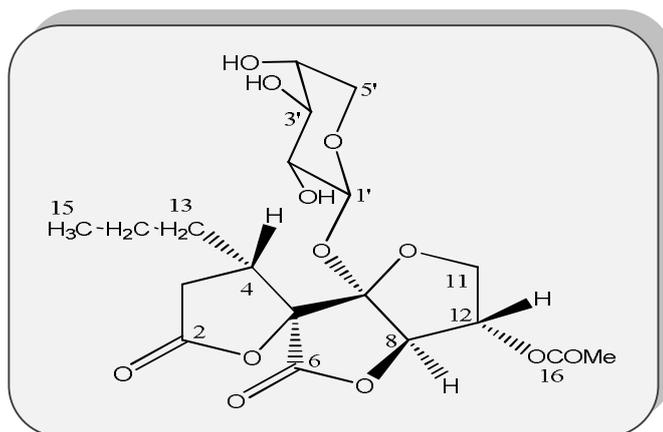


β-sitostérol



Saccharose

## III-2-3-Identification du composé A



Microphynolide A

Le composé **A** nommé microphynolide A se présente sous forme d'une huile jaunâtre soluble dans le méthanol. Ce composé est invisible à la lumière UV à 254 nm et se révèle en marron sur CCM après pulvérisation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse à haute résolution HR-ESI-MS enregistrés en modes positif (Figure III-6) et négatif (Figure III-7), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 469,1327$   $[M+Na]^+$  (calc.  $C_{19}H_{26}O_{12}Na$ , 469,1322), 915,2884  $[2M+Na]^+$  (calc.  $C_{38}H_{52}O_{24}Na$ , 915,2746) et 491,1473  $[(M+HCOOH)-H]^-$  (calc.  $C_{20}H_{27}O_{14}$ , 491,1401), soit une masse moléculaire égale à 446 uma correspondant à une formule brute en  $C_{19}H_{26}O_{12}$  indiquant 7 degrés d'insaturation.

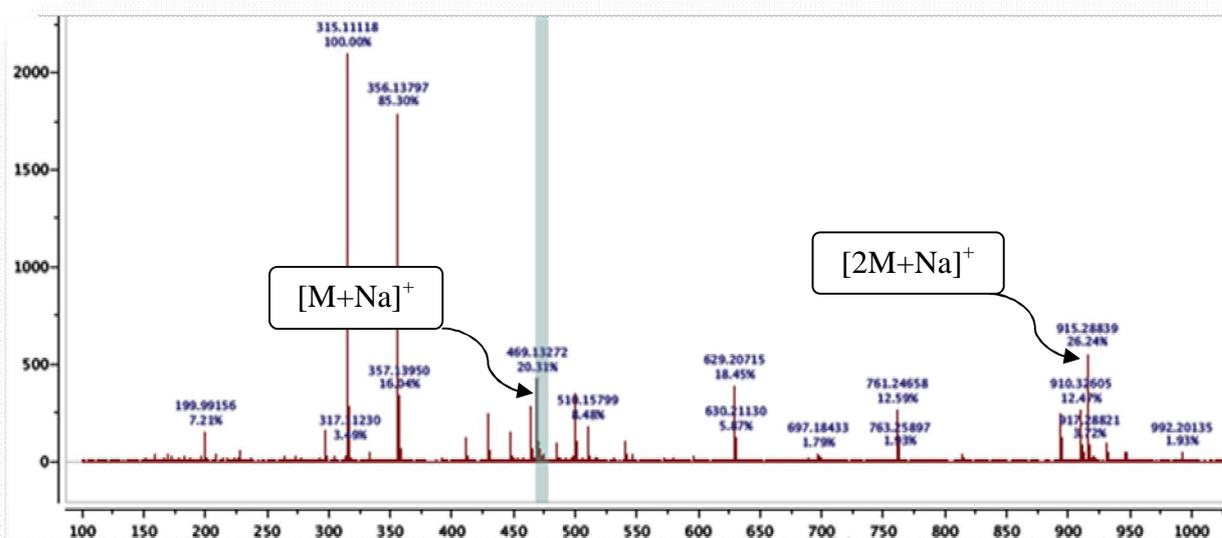
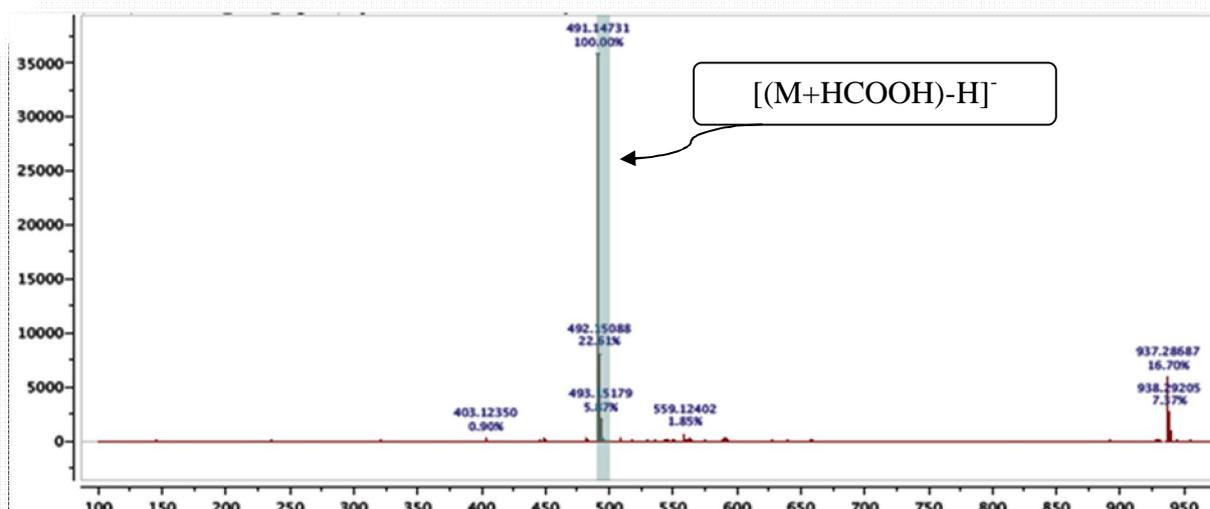
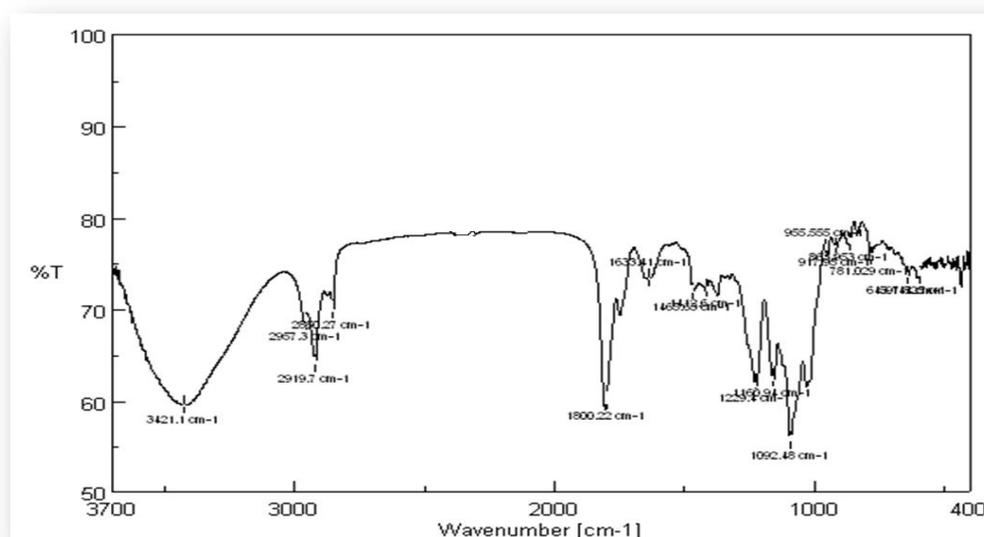


Figure III-6: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé A



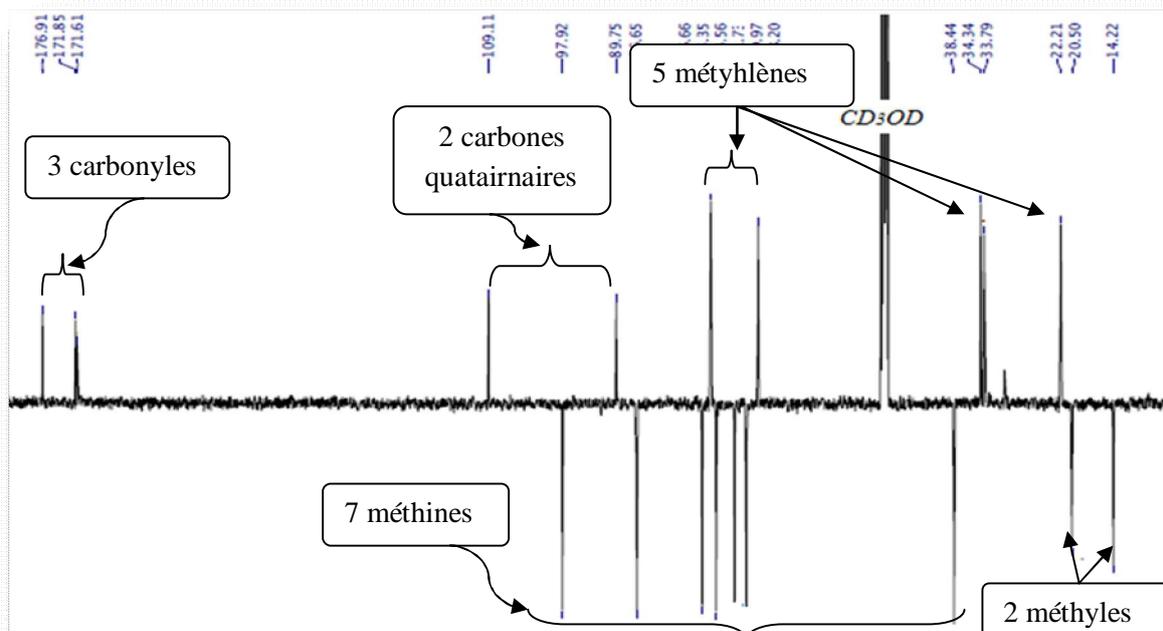
**Figure III-7:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé A

Sur le spectre IR (Figure III-8) apparaissent des bandes d'absorption attribuables à un groupement hydroxyl à  $3421\text{ cm}^{-1}$ , un groupe  $\gamma$ -lactone à  $1800\text{ cm}^{-1}$ , un carbonyle d'un ester à  $1723\text{ cm}^{-1}$  et des bandes d'absorption correspondant à un système aliphatique ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}$ ) à  $2919$  et  $2967\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure III-8:** Spectre IR du composé A

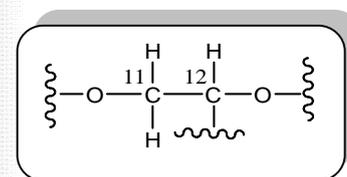
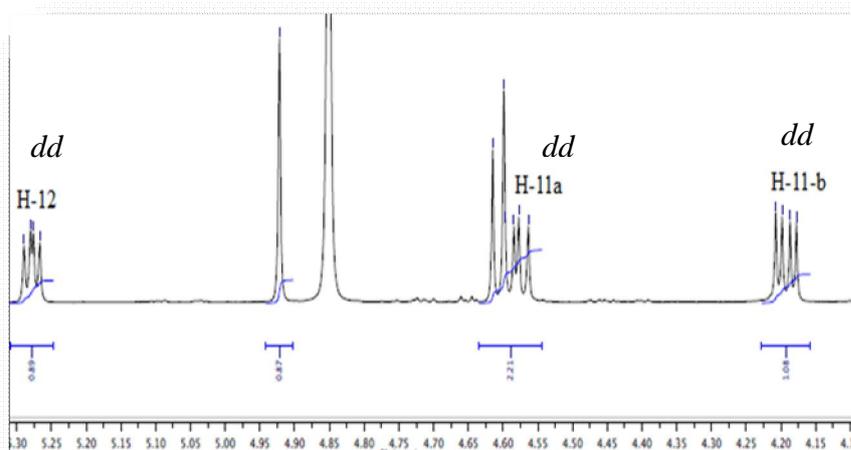
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-9) du composé A montre clairement la présence de 19 atomes de carbone dont trois carbonyles, deux carbones quaternaires, deux méthyles, sept méthines (incluant 6 oxyméthines) et cinq méthylènes (incluant 2 oxyméthylènes).



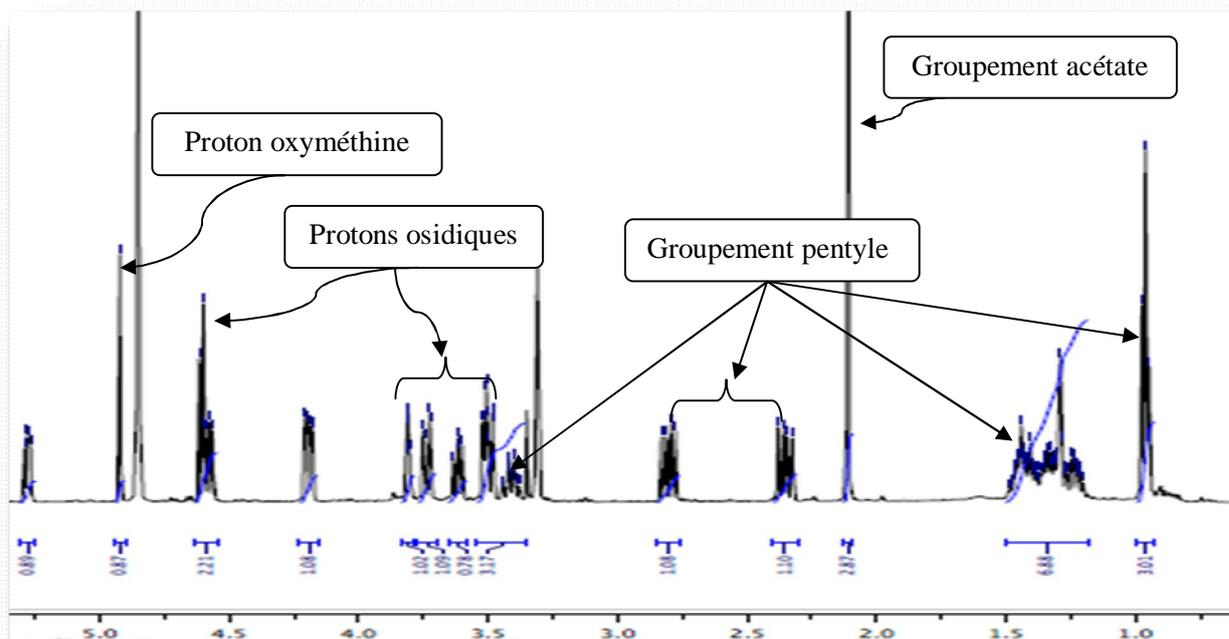
**Figure III-9:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (125 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé A

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figures III-10 et III-11), COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figures III-15 et III-17) et HSQC (Figure III-20) du composé A révèle la présence des systèmes de spins suivants:

- ✓ Trois protons résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,20 ( $dd$ ;  $J = 9,9$  et  $4,6$  Hz; H-11b), 4,58 ( $dd$ ;  $J = 9,9$  et  $6,8$  Hz; H-11a) et 5,28 ( $dd$ ;  $J = 6,8$  et  $4,6$  Hz; H-12) appartiennent à un même système de spins AMX (Figure III-10). Leurs carbones sont détectés à  $\delta_{\text{C}}$  75,3 (C-11) et 76,6 (C-12) selon l'expérience HSQC.

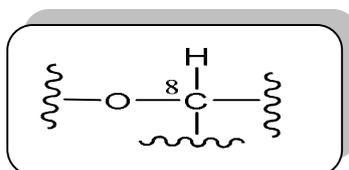


**Figure III-10:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du système AMX



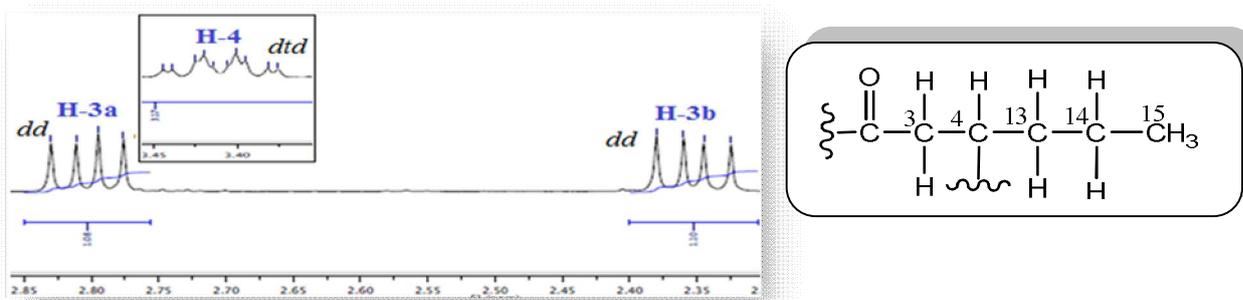
**Figure III-11:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé A

✓ Un signal sous forme d'un singulet s'intégrant pour 1 proton à  $\delta_{\text{H}} = 4,92$  ppm correspond à un proton oxyméthine H-8 (Figure III-12). Le spectre HSQC permet de repérer son carbone à  $\delta_{\text{C}} = 86,6$  ppm (C-8).



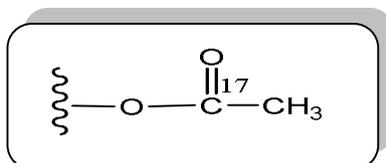
**Figure III-12:** Proton H-8

✓ Une série de signaux à  $\delta_{\text{H}}$  2,34 (*dd*;  $J = 17,6$  et  $11,4$  Hz; H-3b), 2,81 (*dd*;  $J = 17,6$  et  $9,5$  Hz; H-3a), 3,42 (*dtd*;  $J = 11,4$ ;  $9,5$  et  $2,9$  Hz; H-4), 1,46 (*m*; H-13a), 1,25 (*m*; H-13b), 1,44 (*m*; H-14a), 1,34 (*m*; H-14b), 0,96 (*t*;  $J = 7,0$  Hz; H<sub>3</sub>-15), appartenant à un même système de spins atteste de la présence d'une unité pentyle liée à un carbonyle (Figure III-13).

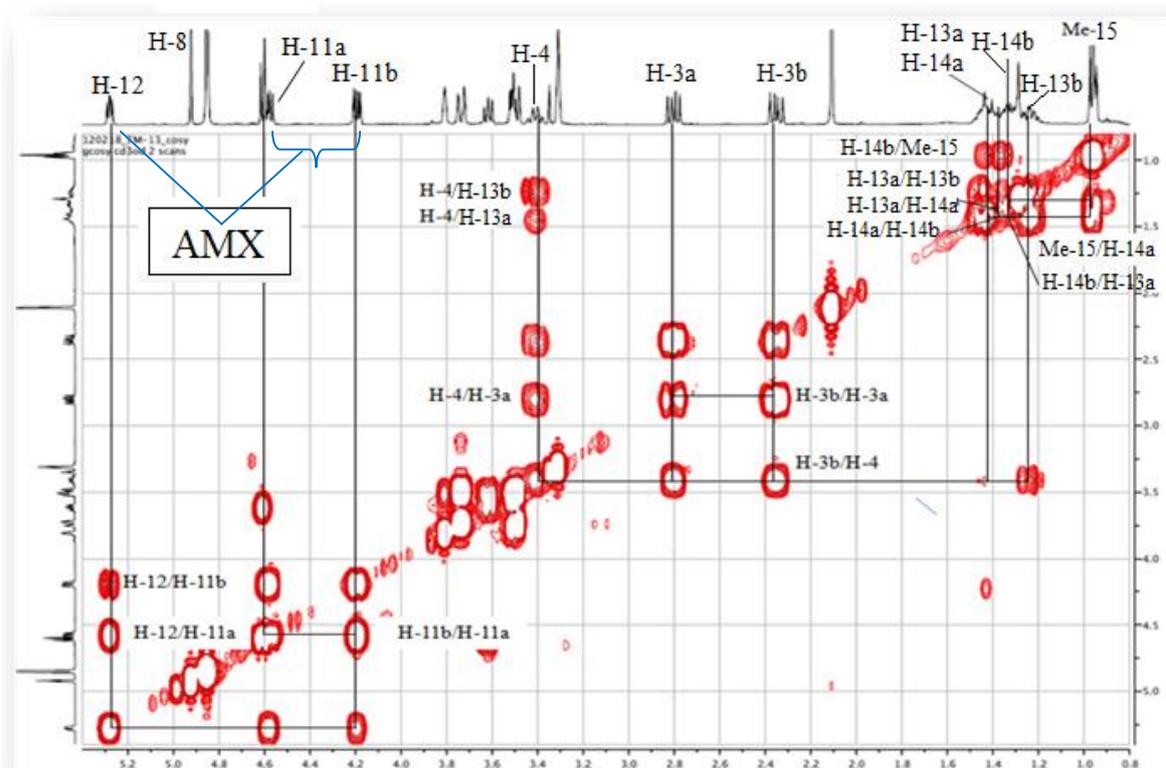


**Figure III-13:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) des protons de l'unité pentyle

- ✓ Les carbones de cette unité résonnent à  $\delta_C$  34,3 (C-3); 38,4 (C-4); 33,7 (C-13); 22,2 (C-14) et 14,2 (C-15) selon l'expérience HSQC.
- ✓ Un deuxième singulet localisé à  $\delta_H = 2,11$  s'intégrant 3 protons (Figure III-14). Son carbone apparaissant à  $\delta_C = 20,5$  est attribuable au groupement méthyle d'un groupement acétate.

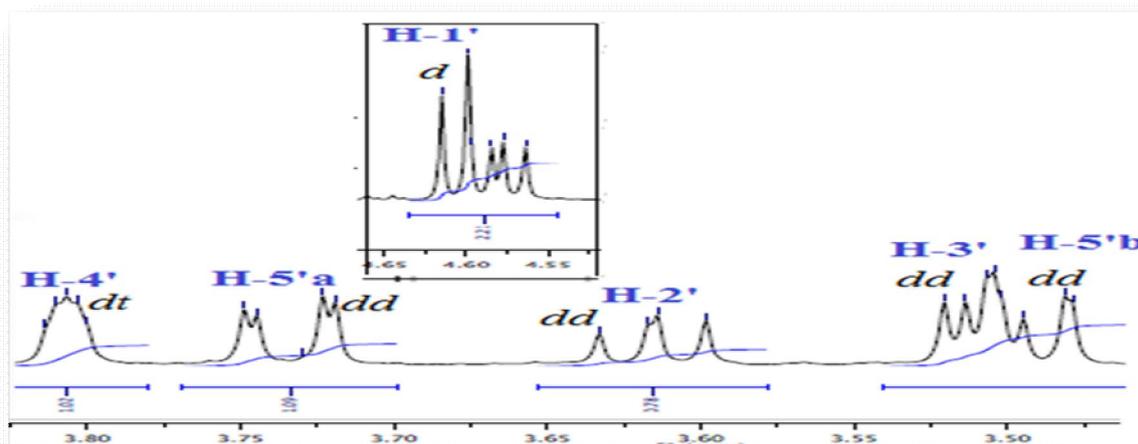


**Figure III-14:** Groupement acétate

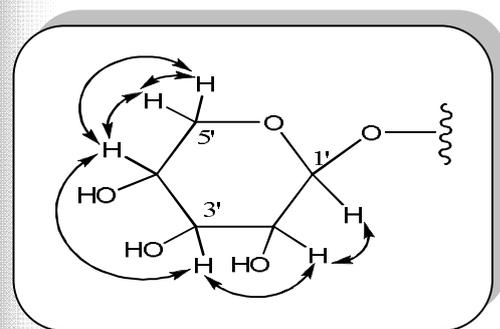
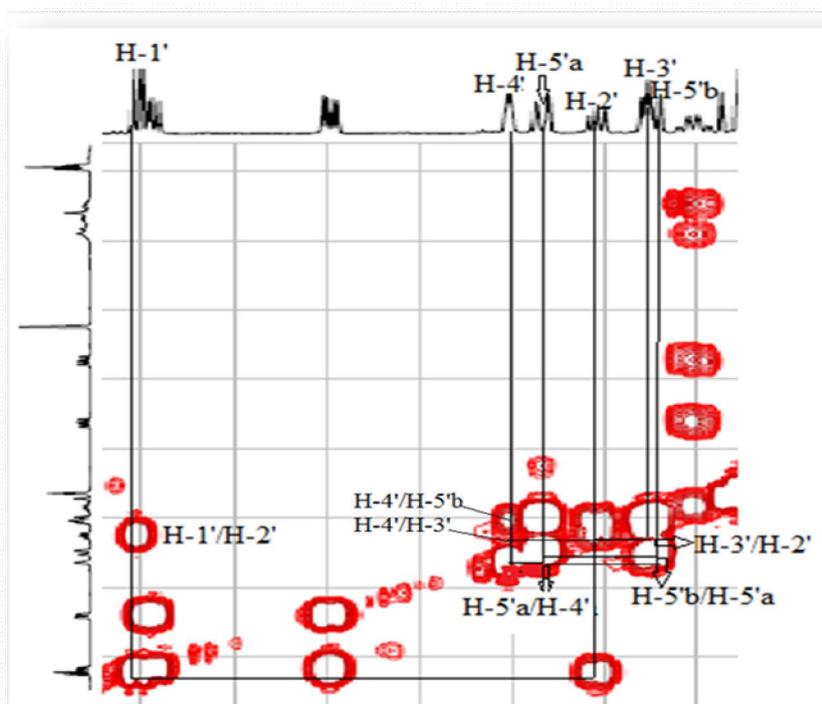


**Figure III-15:** Spectre COSY du composé A

- ✓ D'autres signaux observés dans la zone déblindée entre 3,49 et 4,60 ppm caractérisent la partie osidique (Figure III-16). En effet, l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-17) permet d'identifier 6 protons appartenant à un même système de spins d'un pentose. En partant du proton anomérique H-1' résonant à 4,60 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 8$  Hz), on relie à travers leurs taches de corrélation les protons H-2' ( $\delta_H$  3,62;  $dd$ ;  $J = 9,5$  et  $8,0$  Hz), H-3' ( $\delta_H$  3,51;  $dd$ ;  $J = 9,5$  et  $3,4$  Hz), H-4' ( $\delta_H$  3,81;  $dt$ ;  $J = 3,4$  et  $1,6$  Hz), H-5'a ( $\delta_H$  3,74;  $dd$ ;  $J = 12,8$  et  $1,6$  Hz) et H-5'b ( $\delta_H$  3,49;  $dd$ ;  $J = 12,8$  et  $1,6$  Hz) (Figure III-17).

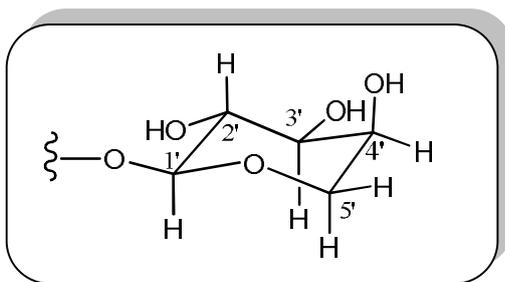


**Figure III-16 :** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) montrant la partie osidique



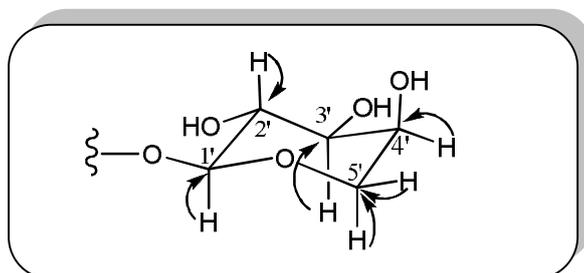
**Figure III-17:** Partie du spectre COSY montrant la zone osidique du composé A

Les grandes valeurs de constantes de couplage ( $J_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 8,0$ ; et  $J_{\text{H}2'-\text{H}3'} = 9,5$  Hz) indiquent que les protons H-1', H-2' et H-3' sont axiaux. La multiplicité du proton H-3' sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 9,5$  et  $3,4$  Hz) traduit un couplage axial – axial (H-3'/H-2') et axial – équatorial (H-3'/H-4') suggérant ainsi une orientation équatoriale du proton H-4'. Les deux protons H<sub>2</sub>-5' sous forme d'un doublet de doublets chacun avec des constantes de couplage ( $J = 12,8$  et  $1,6$  Hz) impliquent des couplages géminé (H-5'a/H-5'b), axial – équatorial et équatorial – équatorial (H<sub>2</sub>-5'/H-4'). Toutes ces données permettent d'identifier ce pentose à un arabinose de configuration  $\beta$  au regard des constantes de couplage  $J_{1'-2'} = 8,0$  Hz (Figure III-18).

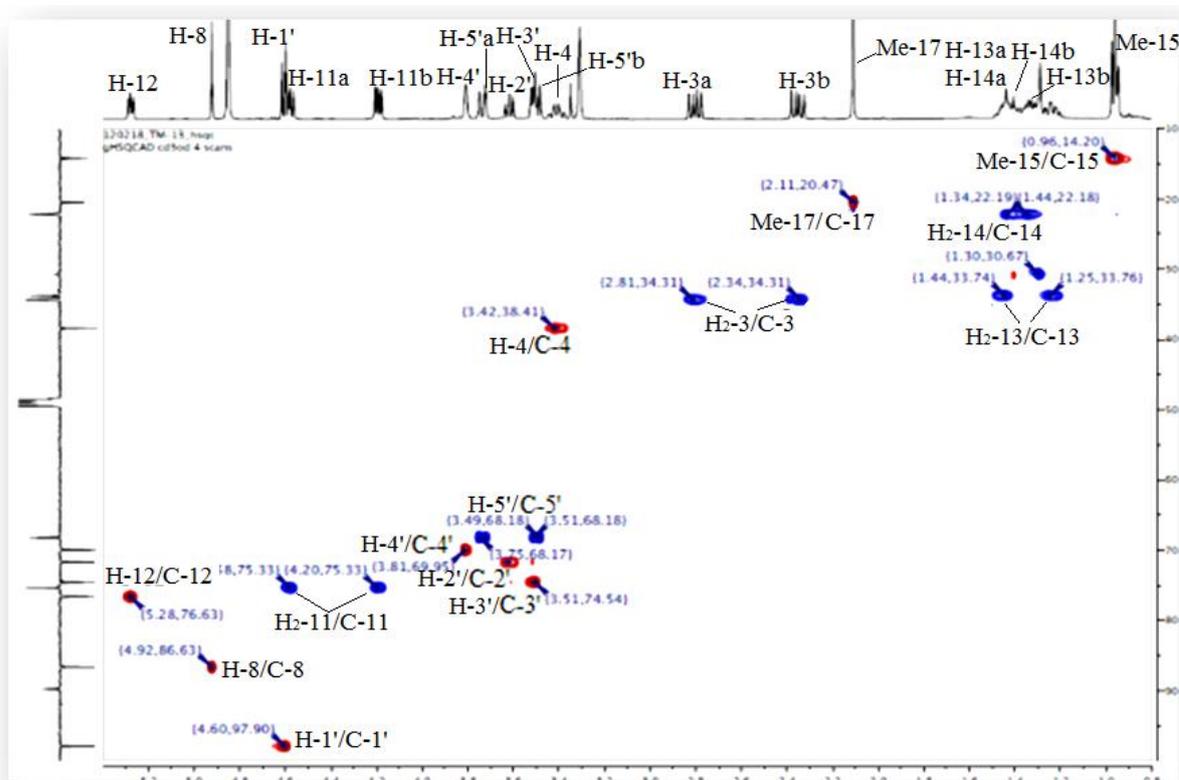


**Figure III-18:** Structure du  $\beta$ -arabinose

Les carbones de cet arabinopyranoside sont détectés à  $\delta_C$  97,9 (C-1'), 71,7 (C-2'), 74,5 (C-3'), 69,9 (C-4') et 68,2 ppm (C-5') selon l'expérience de corrélation hétéronucléaire directe HSQC (Figures III-19 et III-20).



**Figure III-19:** Corrélations HSQC du  $\beta$ -arabinose

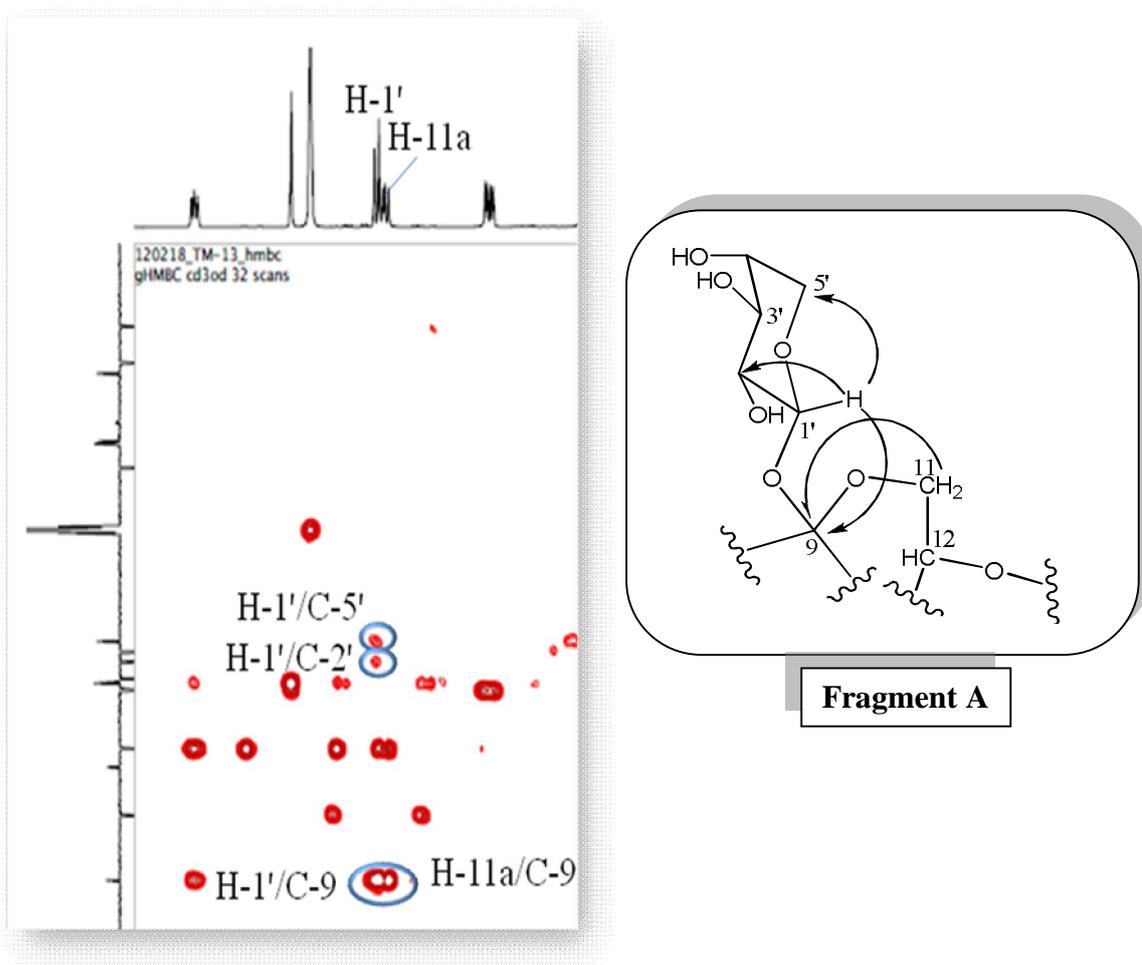


**Figure III-20:** Spectre HSQC du composé A

A ce stade d'analyse, tous les fragments structuraux de ce composé ont été identifiés. Il reste maintenant à établir les connections entre ces enchaînements carbonés. Pour cela, l'expérience hétéronucléaire H/C longue distance ou HMBC est la méthode de choix pour trouver les liaisons entre les différents fragments et élaborer la structure plane de cette molécule.

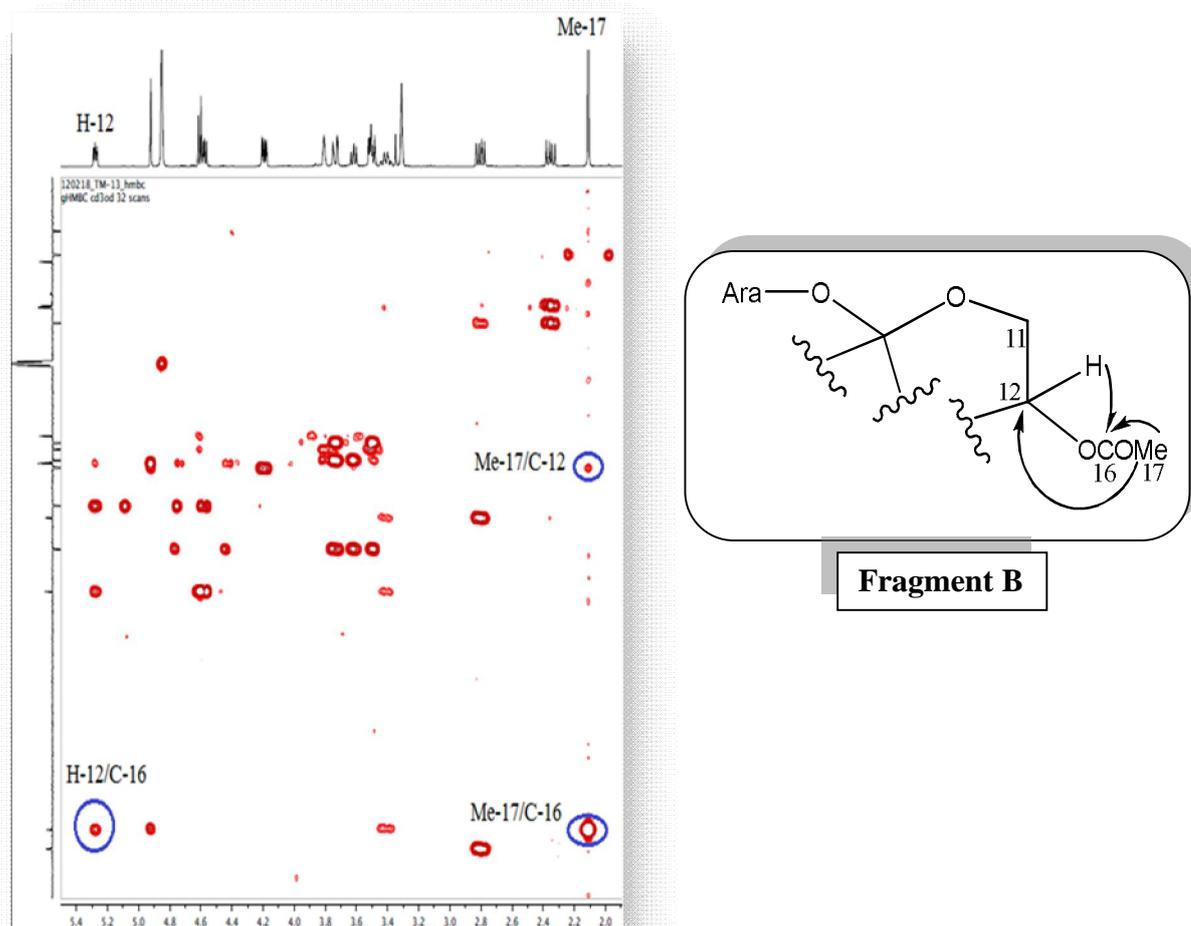
L'expérience de corrélation HMBC (Figure III-21) de ce composé conduit à l'établissement des principaux couplages hétéronucléaires H/C en  $^2J$  et  $^3J$  du composé A. En effet, le proton anomérique H-1' ( $\delta_H = 4,60$ ) corrèle avec un carbone quaternaire déblindé attribuable au carbone C-9 ( $\delta_C = 109,1$ ), assurant l'attachement de l'arabinopyranoside à ce carbone. Ce dernier présente une tache de corrélation avec le proton H-11a déjà identifié (Figure III-21).

Le déplacement chimique déblindé de ce carbone est justifié car il est lié à deux oxygènes [92]. D'autres corrélations ont été observées entre le proton anomère H-1' et les carbones C-2' et C-5' de l'arabinopyranoside. Ces corrélations permettent de proposer le fragment A (Figure III-21).



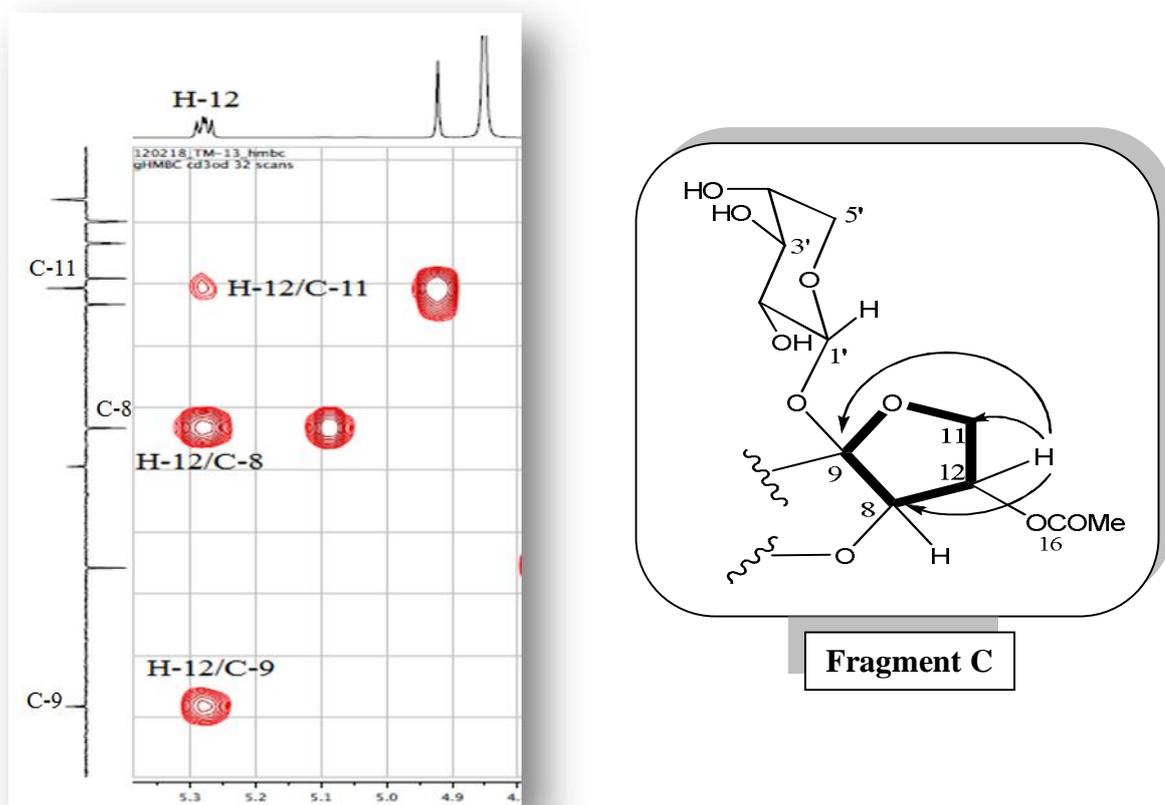
**Figure III-21:** Partie du spectre HMBC du composé A

Par ailleurs, les corrélations en  $^3J$  du proton H-12 et en  $^2J$  des protons Me-17 avec le carbone C-16 ( $\delta_C = 171,8$ ) révèlent la fixation du groupement acétate au carbone C-12 ( $\delta_C = 76,6$ ), en déduisant alors le fragment B (Figure III-22).



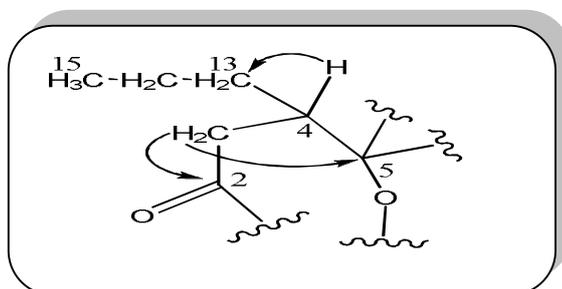
**Figure III-22: Corrélations HMBC du composé A**

D'autres corrélations ont été observées en  $^2J$  et  $^3J$  entre le proton H-12 et les carbones C-9 (109,1 ppm) et C-11 (75,3 ppm). Ce proton couple aussi sur le spectre HMBC en  $^2J$  avec un carbone oxyméthine résonant à 86,6 ppm ne pouvant être que le carbone C-8. La grande tache de corrélation en HMBC (Figure III-23) H-12/H-9 ne pouvant pas être une tache en  $^4J$ , mais plutôt une corrélation à travers trois liaisons ( $^3J$ ) permet de former un cycle à 5 chaînons constituant le fragment C (Figure III-23).



**Figure III-23: Correlations HMBC du composé A**

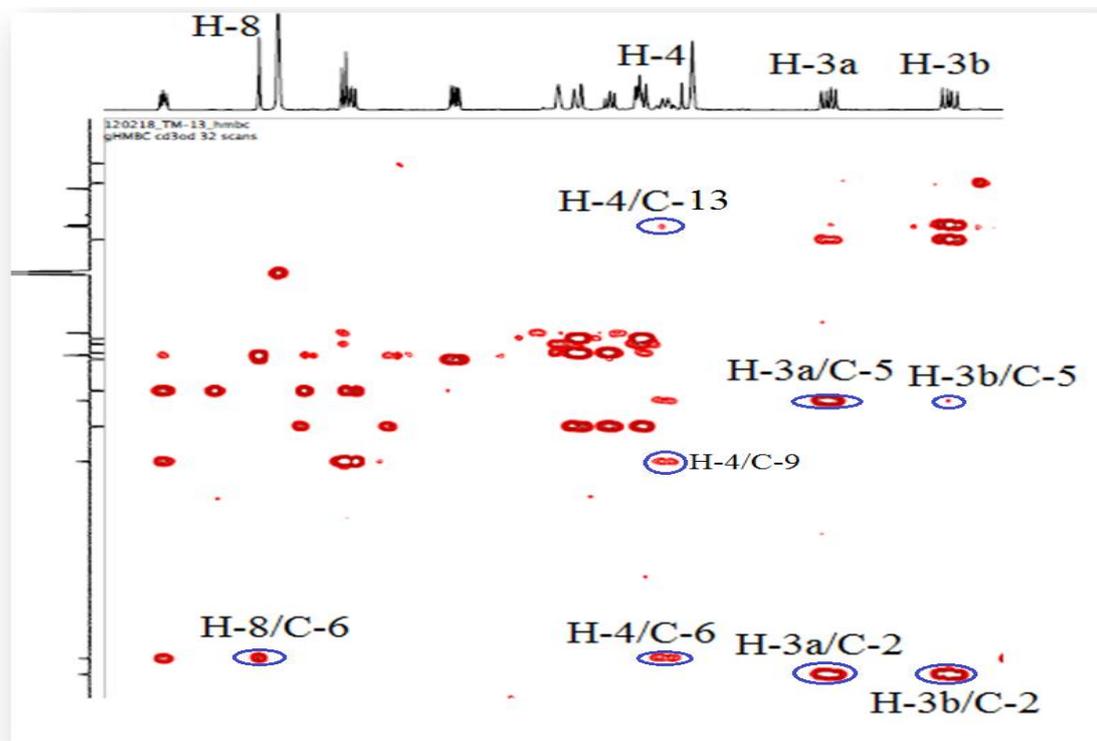
Les deux protons H<sub>2</sub>-3 présentent des taches de corrélation en  $^3J$  sur le spectre HMBC (Figure III-25) avec un carbone quaternaire oxygéné repéré à  $\delta_C = 89,7$  correspondant au carbone C-5 adjacent au carbone méthine C-4 déjà caractérisé. Le proton porté par ce dernier H-4 corrèle en  $^2J$  avec le carbone C-13 confirme que la chaîne *n*-propyle ( $-C^{13}H_2-C^{14}H_2-C^{15}H_3$ ) est liée au carbone C-4 (Figure III-24), ce qui permet de proposer le fragment structural D suivant:



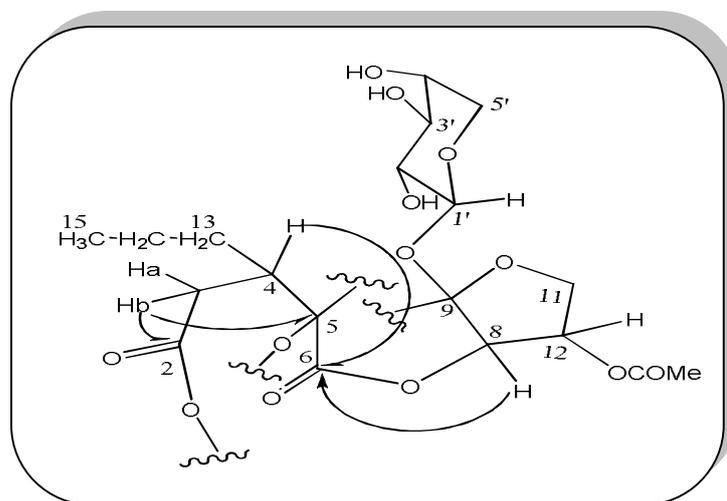
**Figure III-24: Correlations HMBC du composé A (Fragment D)**

Le carbone du deuxième carbonyle ester C-2 est localisé à  $\delta_C$  176,9 suite à sa corrélation en HMBC (Figure III-25) avec les protons H<sub>2</sub>-3. Les protons H-4 et H-8 corrélaient en  $^3J$  sur le spectre HMBC avec un carbone du troisième carbonyle ester résonant à  $\delta_C$  171,6, ne pouvant

être que le carbone C-6 (Figures III-25 et III-26), ceci conduit à établir l'enchaînement carboné ci-dessous (Fragment E).

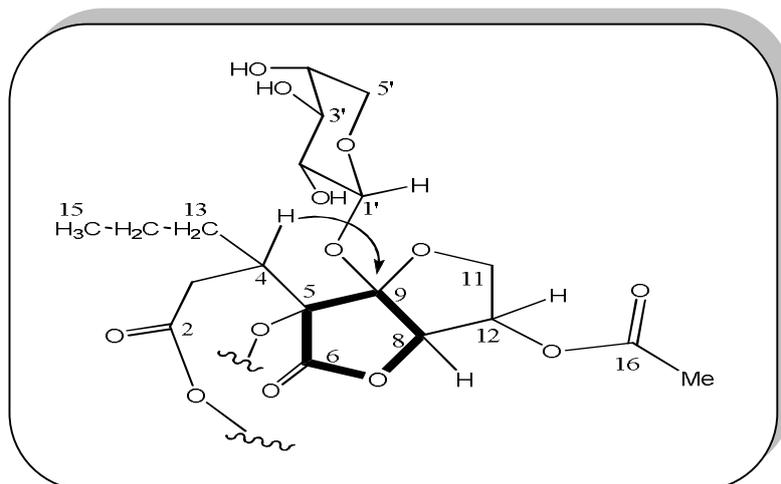


**Figure III-25:** Partie du spectre HMBC du composé A



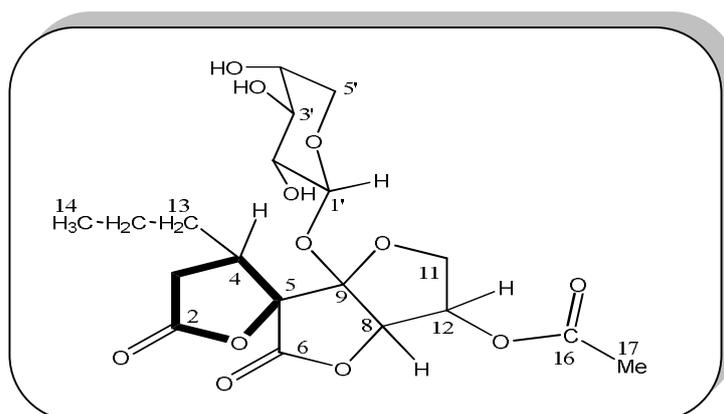
**Figure III-26:** Corrélations HMBC du composé A (Fragment E)

En plus, le proton H-4 présente une tache de en  $^3J$  sur le spectre HMBC (Figure III-27) avec le carbone C-9 déjà identifié, ceci conduit à élaborer une liaison entre les carbones quaternaires oxygénés C-5 et C-9 et de former le deuxième cycle aussi à 5 chaînons (Fragment F).



**Figure III-27:** Corrélation HMBC entre H-4 et C-9 (Fragment F)

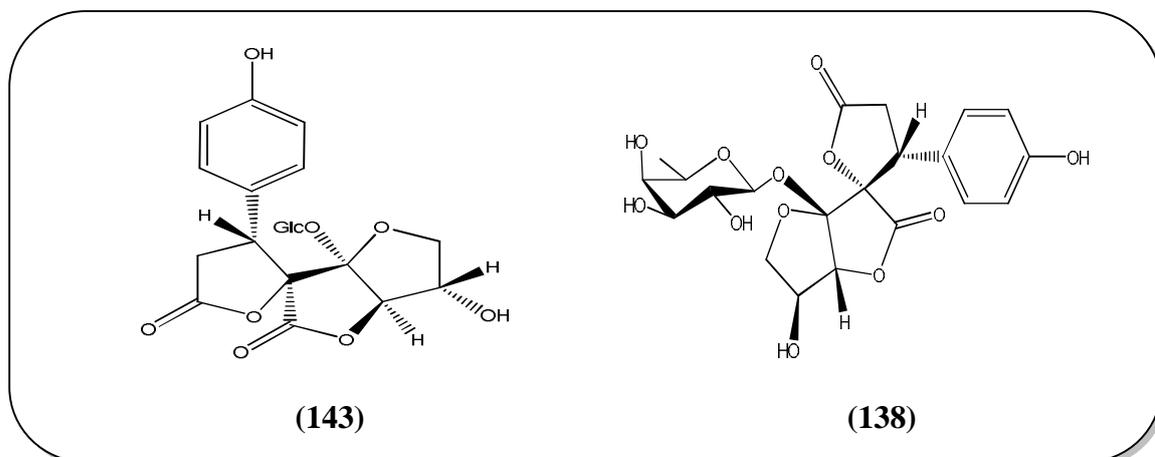
En tenant compte de la formule brute de ce composé  $C_{19}H_{26}O_{12}$  qui correspond à 7 degrés d'insaturation, le nombre de doubles liaisons égal à 3, en plus de l'arabinopyranoside et les deux cycles à 5 chaînons que nous avons déjà identifiés, il reste donc une seule insaturation à attribuer. Par comparaison avec les données spectroscopiques des dilaspirolactones comme le dichotomaine B isolé de l'espèce *Dicranopteris dichotoma* de la famille Gleicheniaceae [102], le déplacement chimique du carbone C-5 à 89,7 ppm est en faveur d'un carbone spiranique. Ce qui nous a permis de former la septième insaturation correspondant à une lactonisation entre les carbones C-5 et C-2. Il en résulte que le composé A possède une structure de type spiro- $\gamma$ -lactone glycoside à squelette 1,7-dioxa-2,6-dioxospiro[4,4]nonane (Figure III-28).



**Figure III-28:** Structure plane du composé A

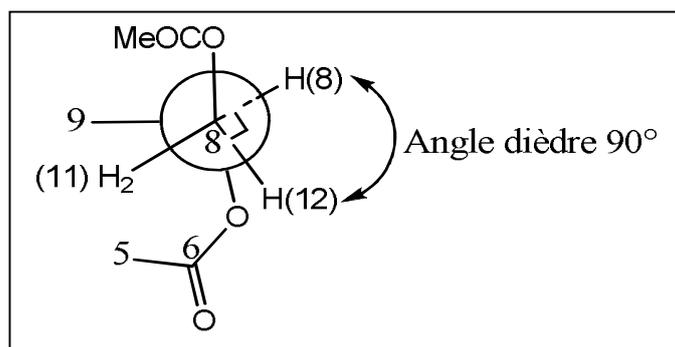
Toutes ces données spectrales montrent clairement que le composé A est très similaire aux composés viburnolide A (Figure III-29), 4',6'-diacetyl-viburnolide A et dichotomaines A (Figure III-29) et B isolés respectivement à partir des plantes *Viburnum wrightii* et *Viburnum*

*dilatatum* (Caprifoliaceae) [103,104], *Gnidia socotrana* (Thymelaeaceae) [13] et *Dicranopteris dichotoma* (Gleicheniaceae) [102].



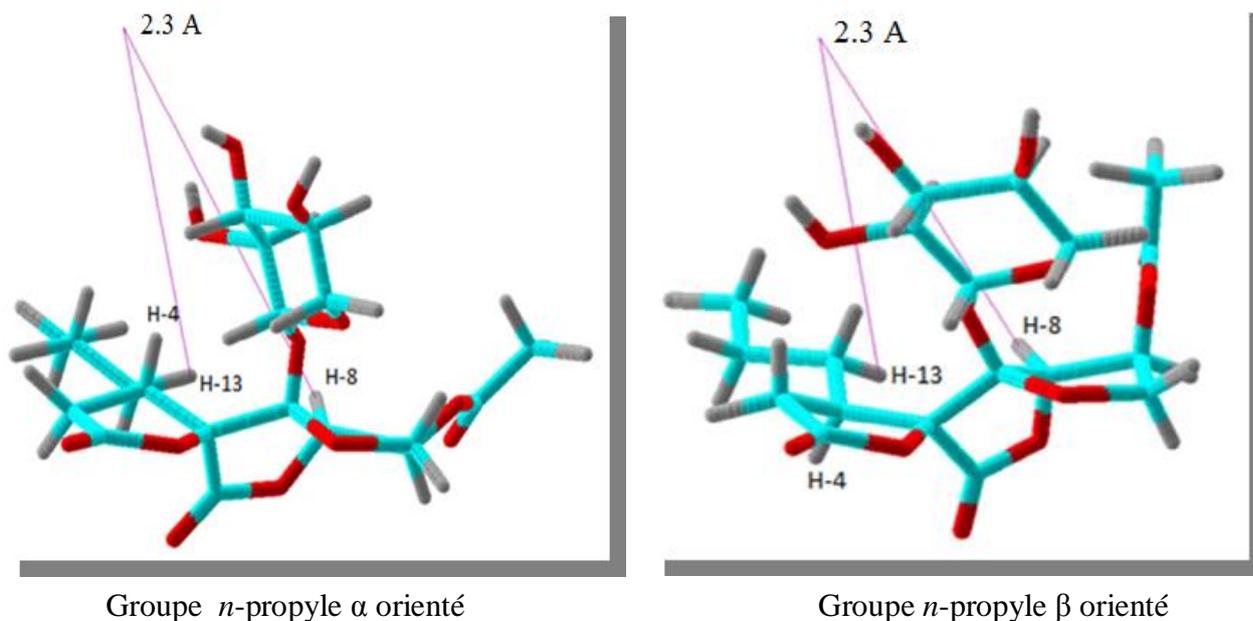
**Figure III-29:** Structures de viburnolide A (143) et dichotomaine A (138)

La stéréochimie relative du composé **A** au niveau des carbones chiraux C-4, C-5, C-8, C-9 et C-12 est établie par l'analyse du spectre NOESY (Figure III-33) et au vu des valeurs des constantes de couplage  $J$  et comparaison avec les données de la littérature. En effet, le signal du proton H-8 sous forme d'un singulet implique une constante de couplage nulle ( $J = 0$  Hz), traduisant alors un angle dièdre environ  $90^\circ$  entre les plans des protons vicinaux H-8 et H-12 (Figure III-30), comme il a été observé précédemment dans tous les spiro- $\gamma$ -lactone glycosides [102,103]. Par conséquent, les protons H-8 et H-12 possèdent des orientations  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement (H-8 $\alpha$  et H-12 $\beta$ ).



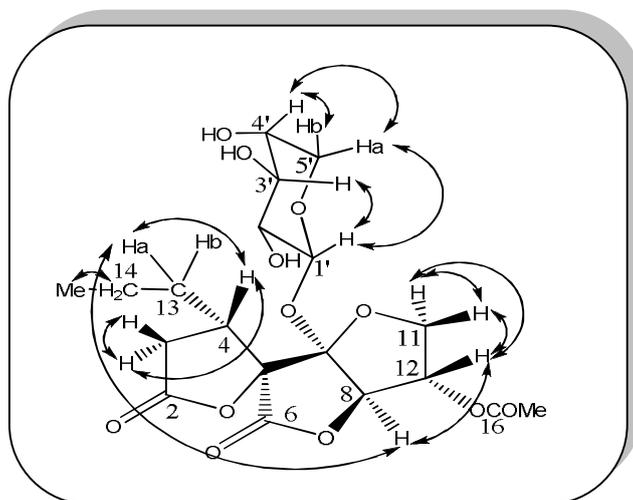
**Figure III-30:** Angle dièdre entre les plans des protons H-8 et H-12 du composé **A**

Le modèle moléculaire du composé **A** indique que la distance entre les protons H-8 $\alpha$  et H-13 de la chaîne  $n$ -propyle liée au carbone C-4 est la même dans les cas où le proton H-4 est  $\alpha$  ou  $\beta$  orienté (Figure III-31).

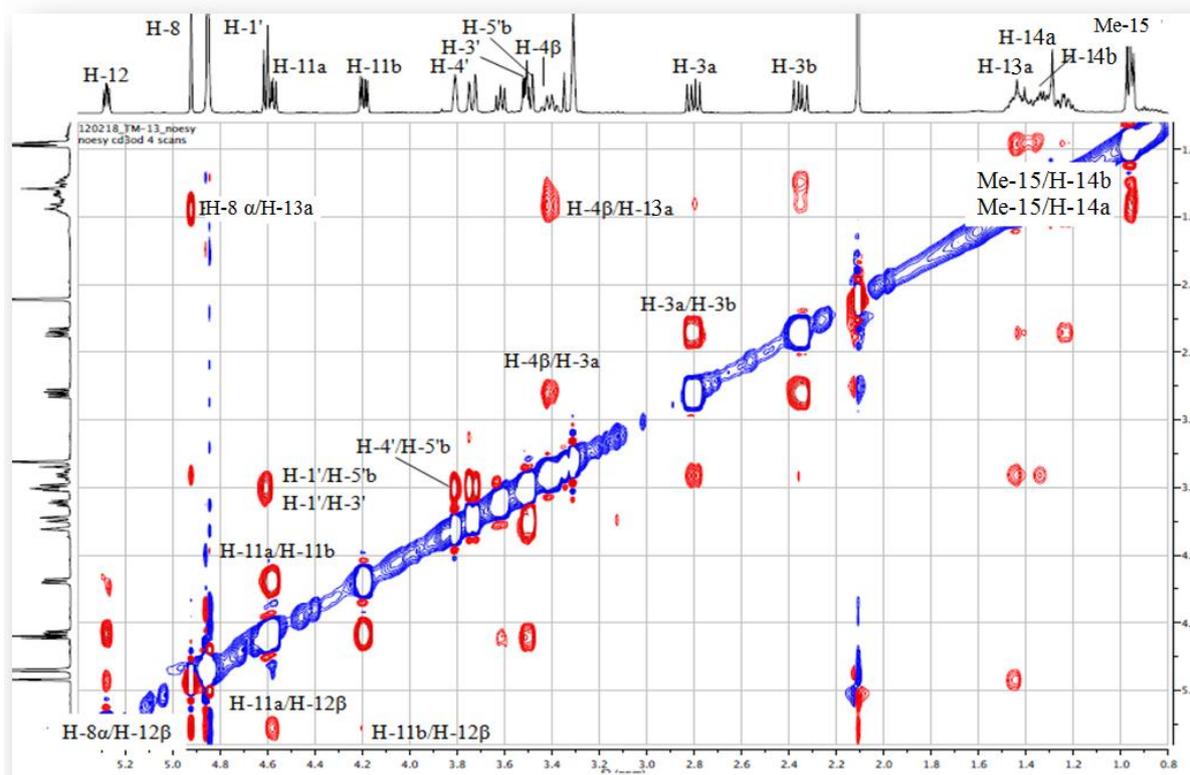


**Figure III-31:** Modèles moléculaires du composé A montrant le groupement *n*-propyle  $\alpha$  et  $\beta$  orienté

Le proton H-8  $\alpha$ -orienté, présente sur le spectre NOESY (Figures III-32 et III-33) une grande tache de corrélation avec le proton H-13a du groupement méthylène H<sub>2</sub>-13 permettant de confirmer leur proximité dans l'espace. L'orientation  $\alpha$  du groupement arabinopyranosyle est justifiée par l'absence de taches de corrélation NOESY entre le proton anomérique H-1' et les protons H-11 $\beta$  et H-12 $\beta$  (Figure III-33). Les valeurs de déplacements chimiques des carbones C-3 et C-5 adjacents au carbone chiral C-4 sont presque identiques à celles des mêmes carbones des composés similaires tels que: 4',6'-diacetyl-viburnolide A, dichotomaine B, viburnolide A [13,102,103], suggèrerait une même stéréochimie au niveau du carbone C-4. En conséquence, le proton H-4 est  $\beta$  orienté comme il a été observé d'ailleurs dans tous les spiro- $\gamma$ -lactones isolés du règne végétal [13,102,103].

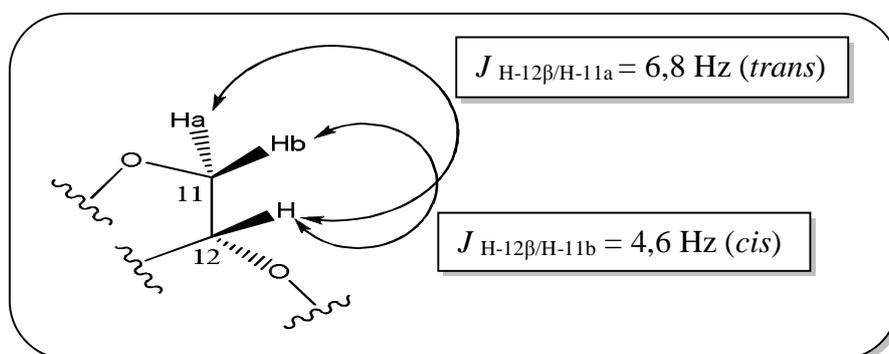


**Figure III-32:** Principales corrélations NOESY observées pour le composé A

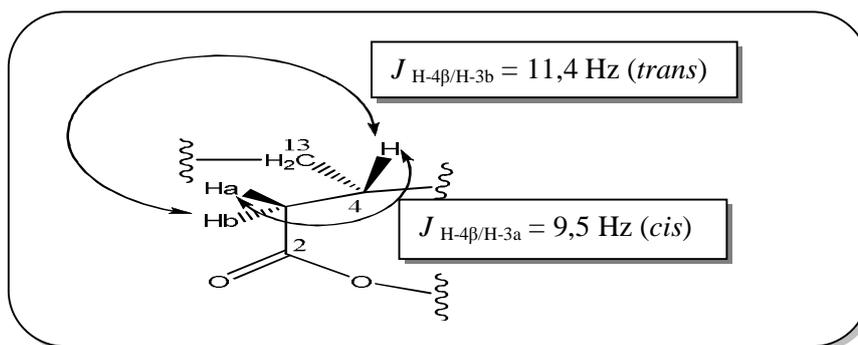


**Figure III-33:** Spectre NOESY du composé A

Les orientations des protons H<sub>2</sub>-11 ont été assignées en se basant particulièrement sur l'analyse des valeurs de constantes de couplage. En effet, le proton H-11a résonant à 4,58 ppm sous forme d'un doublet de doublets avec des constantes de couplage  $J = 9,9$  Hz (couplage géminé H-11a/H-11b) et  $J = 6,8$  Hz (couplage *trans* H-11a/H-12 $\beta$ ) est  $\alpha$  orienté, ce qui nous permet de déduire que le proton H-11b possède une orientation  $\beta$  ( $J_{\text{H-11b/H-12}\beta} = 4,6$  Hz, couplage *cis*) (Figure III-34). De la même façon, les configurations  $\alpha$  et  $\beta$  ont été attribuées aux protons H-3b et H-3a respectivement (Figure III-35).



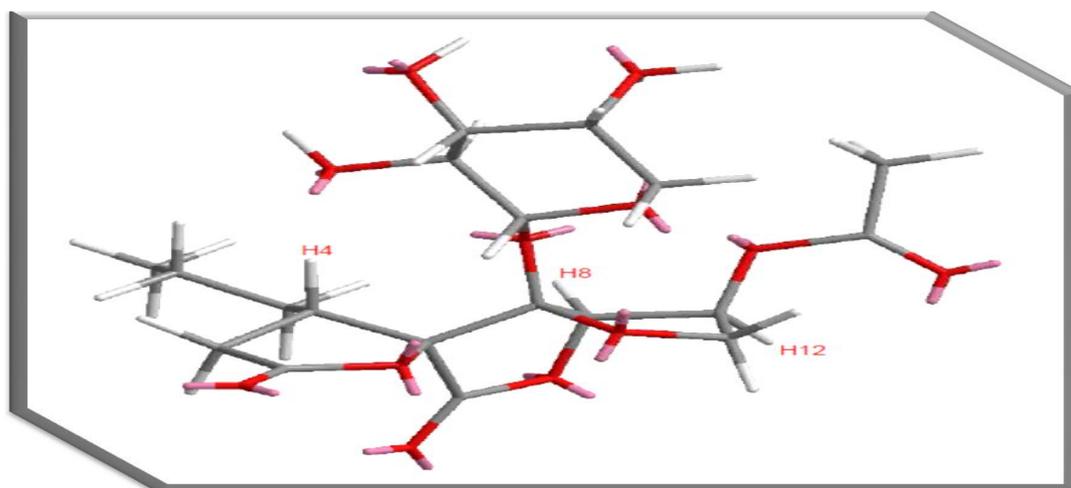
**Figure III-34:** Couplages COSY entre H<sub>2</sub>-11 et H-12 $\beta$  et valeurs de  $J$



**Figure III-35:** Couplages COSY entre H<sub>2</sub>-3 et H-4 $\beta$  et valeurs de  $J$

D'autres effets NOESY (Figures III-32 et III-33) ont été observés entre les protons H<sub>2</sub>-11/H-12 $\beta$ , H-8 $\alpha$ /H-12 $\beta$ , H-11 $\alpha$ /H-11 $\beta$ , H-4 $\beta$ /H-3 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ /H-3 $\beta$ , H-4 $\beta$ /H-13 $\alpha$ , Me-15/H-14 $\alpha$  et Me-15/H-14 $\beta$ . Aussi, le spectre NOESY permet de visualiser les corrélations entre les protons osidiques: H-1'/H-3', H-1'/H-5'a et H-4'/H-5'b confirmant les positions axiales des protons H-1', H-3' et H-5'a. L'absence d'effet NOESY entre H-2' et H-4' confirme l'orientation équatoriale du proton H-4'. En effet, toutes ces données confirment que l'unité osidique est un arabinose de configuration  $\beta$ . Par conséquent, l'ensemble de ces données spectrales, appuyé par les données de la littérature conduit à proposer sans ambiguïté pour le composé **A** la stéréochimie relative C-4 (4*R*), C-5 (5*S*), C-8 (8*R*), C-9 (9*R*) et C-12 (12*S*) [13,102,103].

Toutes ces corrélations ont été vérifiées par le modèle moléculaire (Figure III-36) qui confirme bien les orientations attribuées aux différents protons H-4, H-8 et H-12 ainsi qu'aux groupements arabinopyranosyle lié au carbone C-9 et *n*-propyle attaché au carbone C-4.



**Figure III-36:** Modèle moléculaire du composé **A**

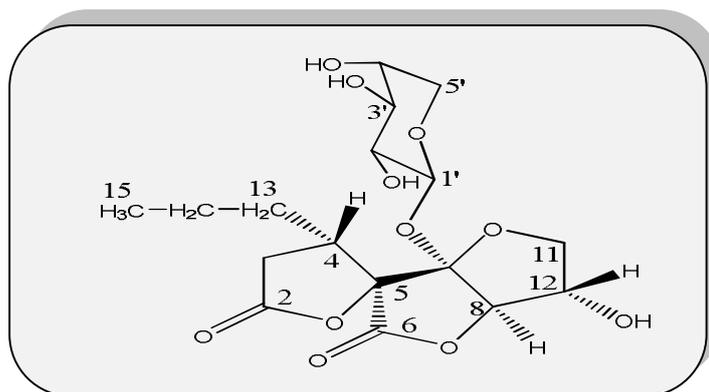
Tous ces résultats spectroscopiques et la mesure de la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = +37,8^\circ$  ( $c$  0,006, MeOH), nous permettent d'identifier le composé **A** comme étant un nouveau

spiro- $\gamma$ -lactone glycoside appartenant à la classe des dilaspirolactones nommé microphynolide A. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau (III-1) ci-dessous.

**Tableau III-1: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé A dans  $\text{CD}_3\text{OD}$**

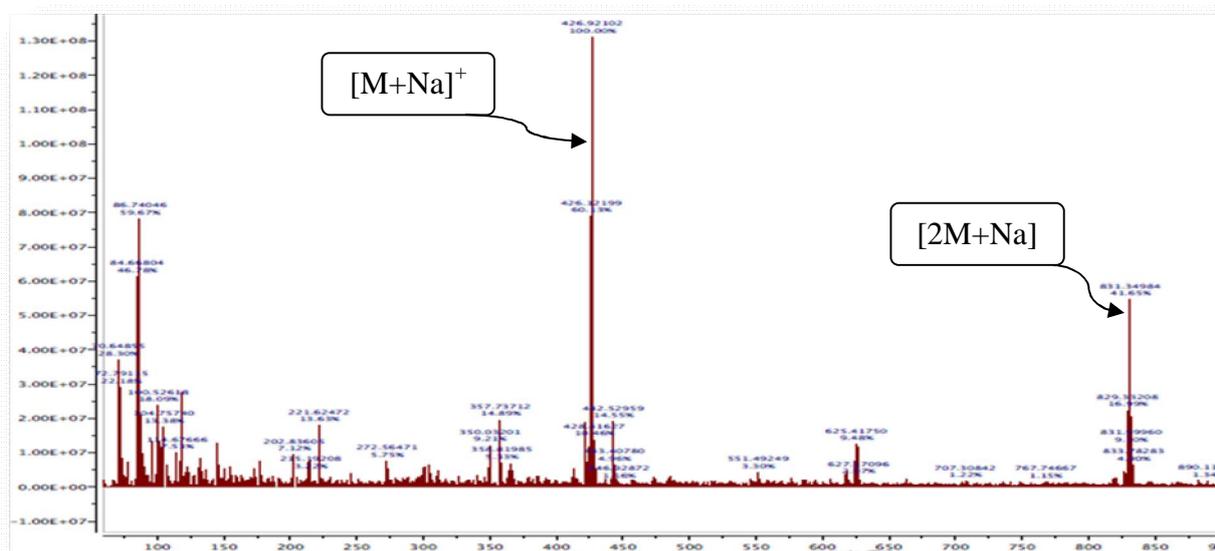
Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	-	176,9
3a	2,81 ( <i>dd</i> ; 17,6; 9,5) H-3 $\beta$	34,3
3b	2,34 ( <i>dd</i> ; 17,6; 11,4) H-3 $\alpha$	
4	3,42 ( <i>dtd</i> ; 11,4; 9,5; 2,9) H-4 $\beta$	38,4
5	-	89,7
6	-	171,6
8	4,92 ( <i>s</i> ) H-8 $\alpha$	86,6
9	-	109,1
11a	4,58 ( <i>dd</i> ; 9,9; 6,8) H-11 $\alpha$	75,3
11b	4,20 ( <i>dd</i> ; 9,9; 4,6) H-11 $\beta$	
12	5,28 ( <i>dd</i> ; 6,8; 4,6) H-12 $\beta$	76,6
16	-	171,8
17	2,11 ( <i>s</i> )	20,5
<b><u>n-propyle</u></b>		
13a	1,46 ( <i>m</i> )	33,7
13b	1,25 ( <i>m</i> )	
14a	1,44 ( <i>m</i> )	22,2
14b	1,34 ( <i>m</i> )	
15	0,96 ( <i>t</i> ; 7,0)	14,2
<b><u>arabinosyle</u></b>		
1'	4,60 ( <i>d</i> ; 8,0)	97,9
2'	3,62 ( <i>dd</i> ; 9,5; 8,0)	71,7
3'	3,51 ( <i>dd</i> ; 9,5; 3,4)	74,5
4'	3,81 ( <i>dt</i> ; 3,4; 1,6)	69,9
5'a	3,74 ( <i>dd</i> ; 12,8; 1,6)	68,2
5'b	3,49 ( <i>dd</i> ; 12,8; 1,6)	

## III-2-4-Identification du composé B

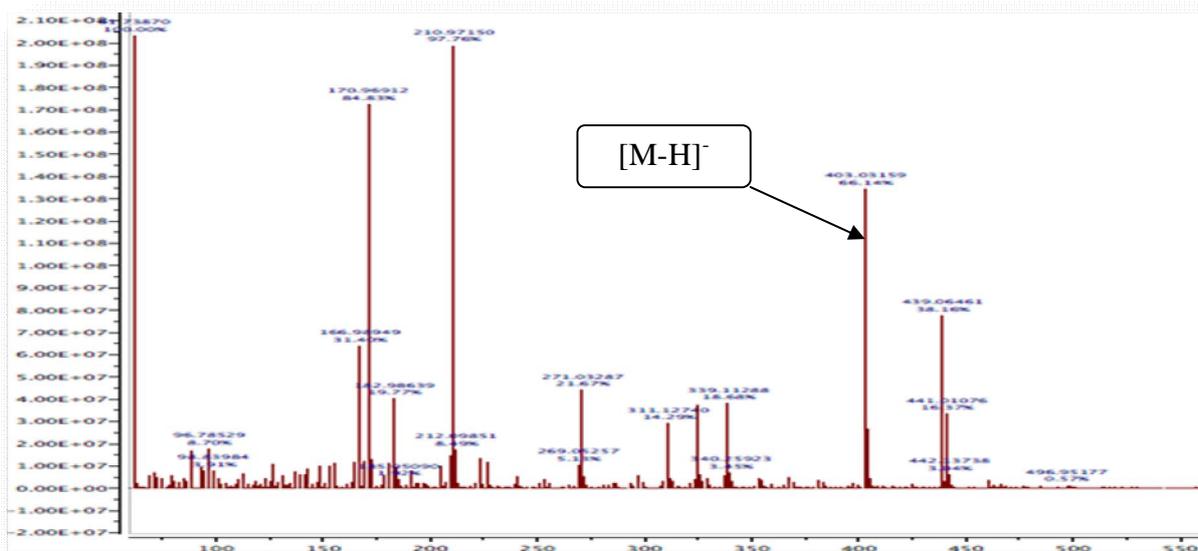
**Microphynolide B**

Ce composé a été obtenu également sous forme d'une huile jaunâtre, soluble dans le méthanol et se colore sur CCM en marron après révélation à l'acide sulfurique et chauffage.

Les données des spectres de masse HR-ESI-MS du composé B enregistrés en modes positif (Figure III-37) et négatif (Figure III-38), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 427,1227 [M+Na]^+$  (calc.  $C_{17}H_{24}O_{11}Na$ , 427,1209),  $831,2586 [2M+Na]^+$  (calc.  $C_{34}H_{48}O_{22}Na$ , 831,2521) et  $403,1216 [M-H]^-$  (calc.  $C_{17}H_{23}O_{11}$ , 403,1240) respectivement. Sa masse moléculaire égale à 404 uma suggère une formule brute en  $C_{17}H_{24}O_{11}$  (6 degrés d'insaturation).

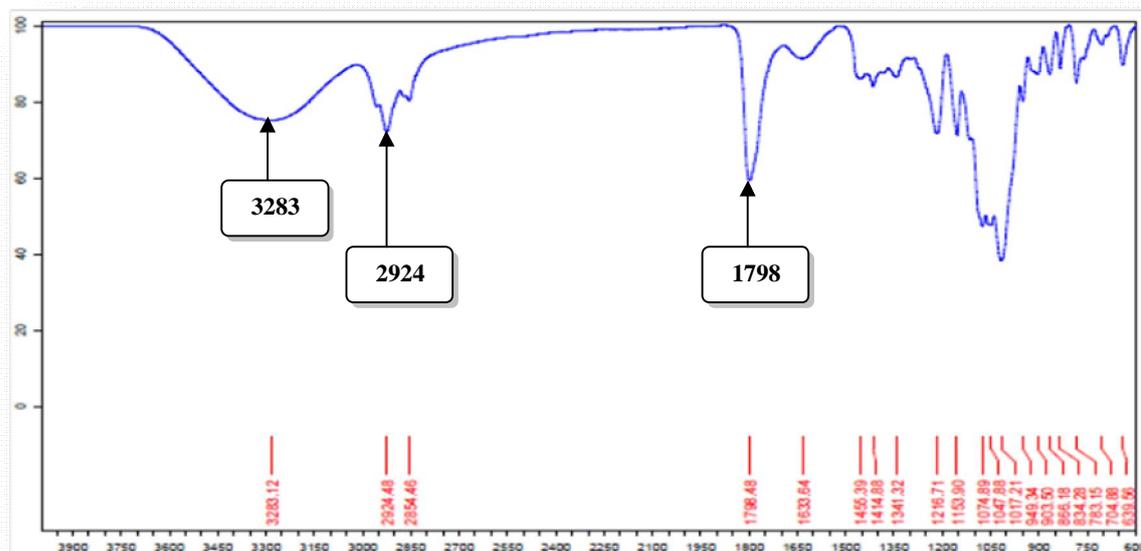


**Figure III-37:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé B



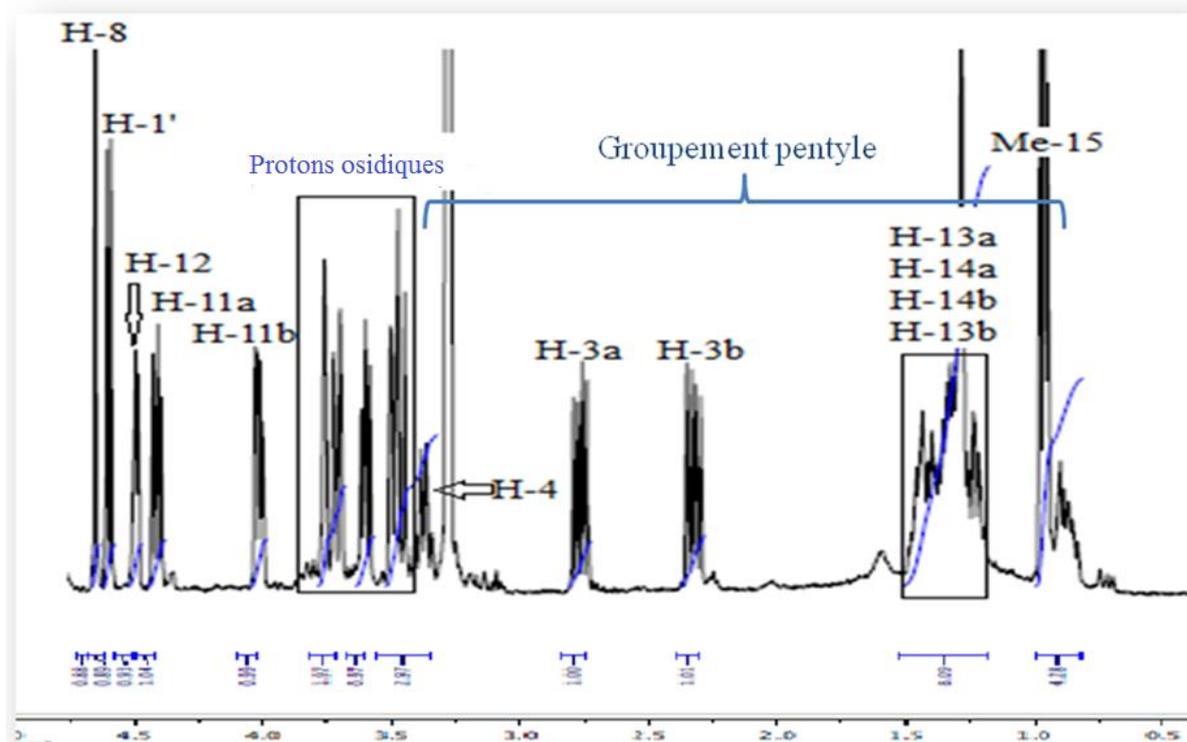
**Figure III-38:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **B**

Le spectre IR du composé **B** (Figure III-39) présente les bandes d'absorption correspondant à un hydroxyle à  $3283\text{ cm}^{-1}$ , un système aliphatique à  $2924$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$  (CH,  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ ) et un carbonyle  $\gamma$ -lactone à  $1798\text{ cm}^{-1}$ .

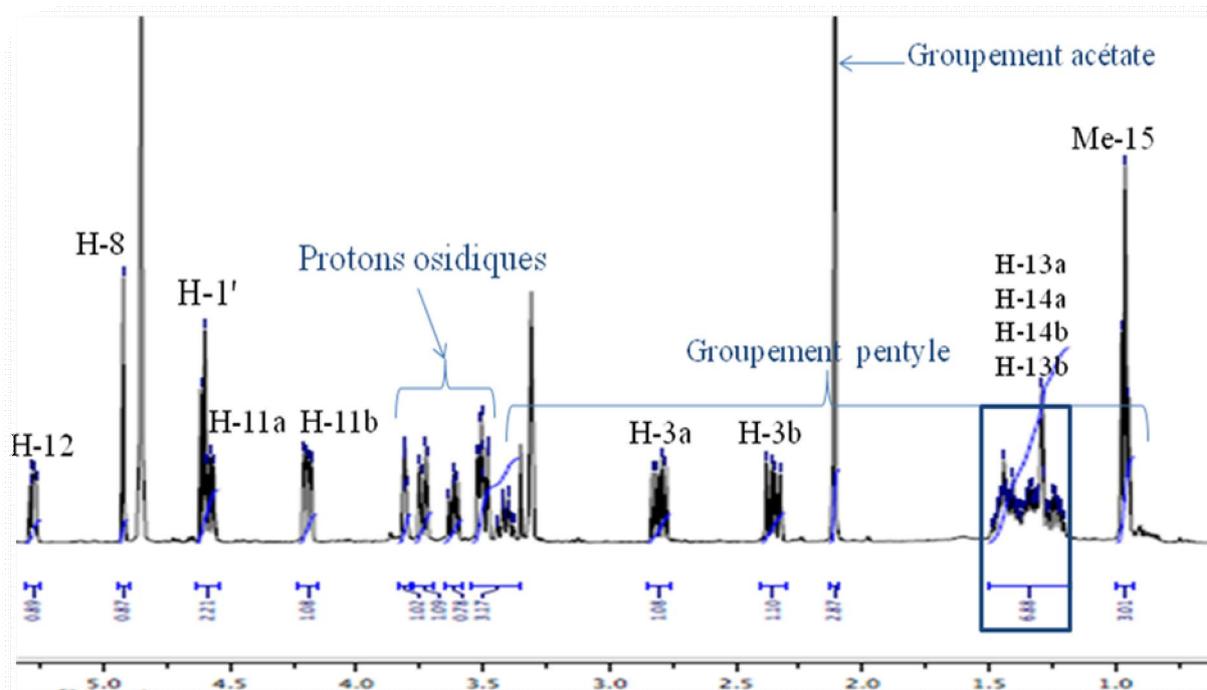


**Figure III-39:** Spectre IR du composé **B**

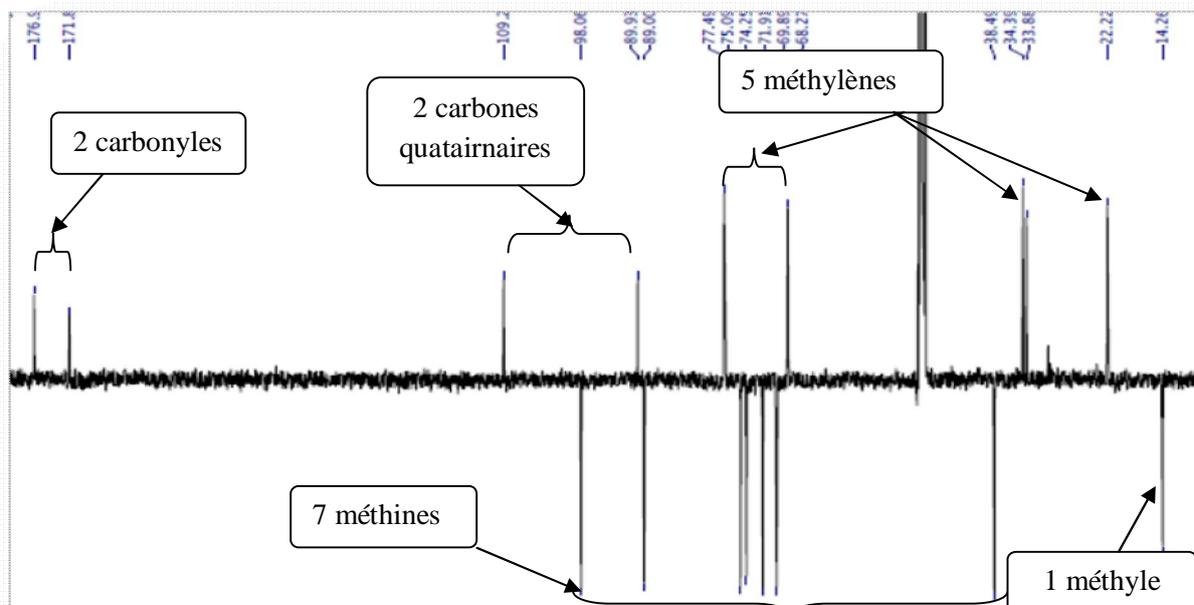
Par comparaison des spectres RMN du proton  $^1\text{H}$  (Figures III-40 et III-11) et du carbone  $^{13}\text{C}$  (Figures III-41 et III-9) des composés **A** et **B**, le composé **B** présente beaucoup de similitudes structurales avec le composé **A**, indiquant aussi la présence d'un squelette  $\gamma$ -spiro-lactone glycoside [13,102-104].



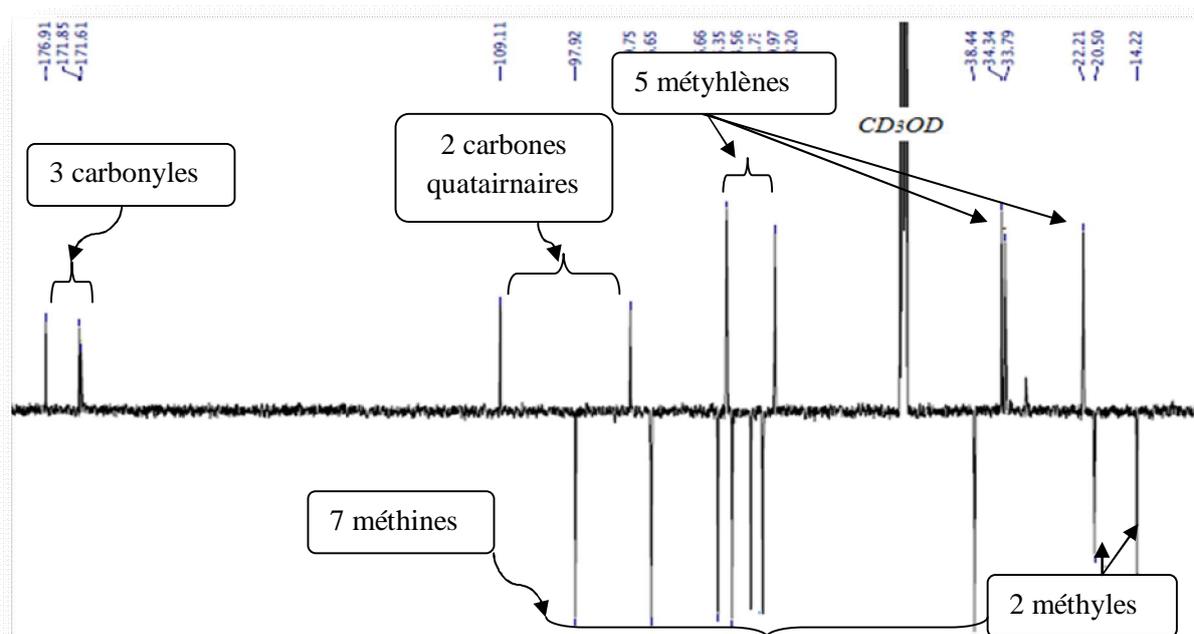
**Figure III-40:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé B



**Figure III-11:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé A



**Figure III-41:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé B



**Figure III-9:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  J-modulé (125 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé A

La seule différence entre les deux produits concerne la disparition des signaux du groupement acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ). En effet, l'analyse des specters RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-40) et  $^{13}\text{C}$  (Figure III-41) du composé B permet d'observer facilement tous les signaux du composé A, à l'exception des résonances à  $\delta_{\text{H}}$  2,11 (s,  $\text{CH}_3$ ) et  $\delta_{\text{C}}$  171,8 (C=O) et 20,5 ( $\text{CH}_3$ ) du groupement acétate lié au carbone C-12 dans le cas du composé A.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III-41) du composé **B** permet de compter 17 atomes de carbone se repertissant en:

- Deux carbonyles
- Deux carbones quaternaires
- Un méthyle
- Cinq méthylènes
- Sept méthines

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-40), il est détecté les signaux des protons correspondant aux enchaînements carbonés suivants:

✓ Les protons du fragment pentyle résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,79 (*dd*;  $J = 17,6$  et  $9,4$  Hz; H-3a), 2,35 (*dd*;  $J = 17,6$  et  $11,3$  Hz; H-3b), 3,41 (*dtd*;  $J = 11,3$ ;  $9,4$  et  $2,9$  Hz; H-4), 1,45 (*m*; H-13a), 1,23 (*m*; H-13b), 1,43 (*m*; H-14a), 1,36 (*m*; H-14b) et 0,96 (*t*;  $7,2$ ; H-15).

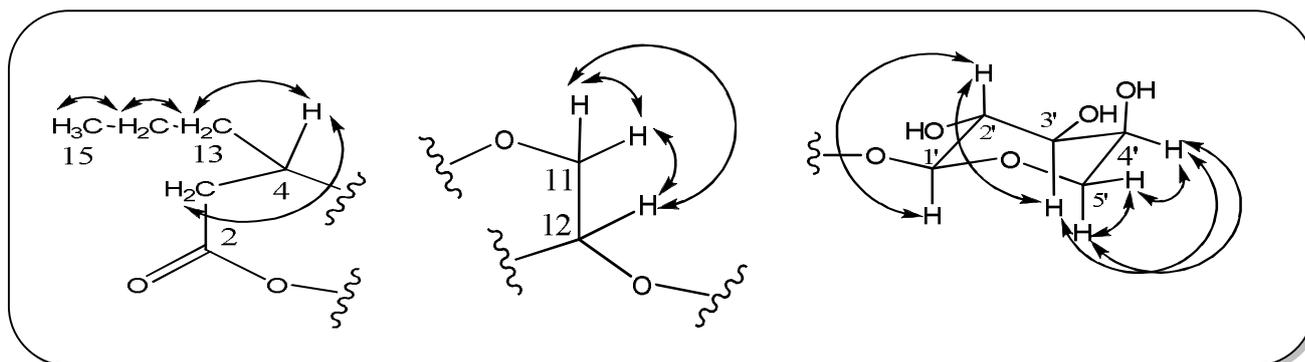
✓ Les protons du système AMX à  $\delta_{\text{H}}$  4,46 (*dd*;  $J = 9,8$  et  $6,6$  Hz; H-11a), 4,07 (*dd*;  $J = 9,8$  et  $4,3$  Hz; H-11b) et 4,54 (*dd*;  $J = 6,6$  et  $4,3$  Hz; H-12).

✓ Les protons osidiques de l'unité pentose identifiée à l'arabinopyranoside à  $\delta_{\text{H}}$  4,65 (*d*;  $J = 7,8$  Hz; H-1'), 3,63 (*dd*;  $J = 9,5$  et  $7,8$  Hz; H-2'), 3,51 (*dd*;  $J = 9,5$  et  $3,4$  Hz; H-3'), 3,81 (*m*; H-4'), 3,74 (*dd*;  $J = 12,8$  et  $2,0$  Hz; H-5'a) et 3,49 (*dd*;  $J = 12,8$  et  $1,4$  Hz; H-5'b).

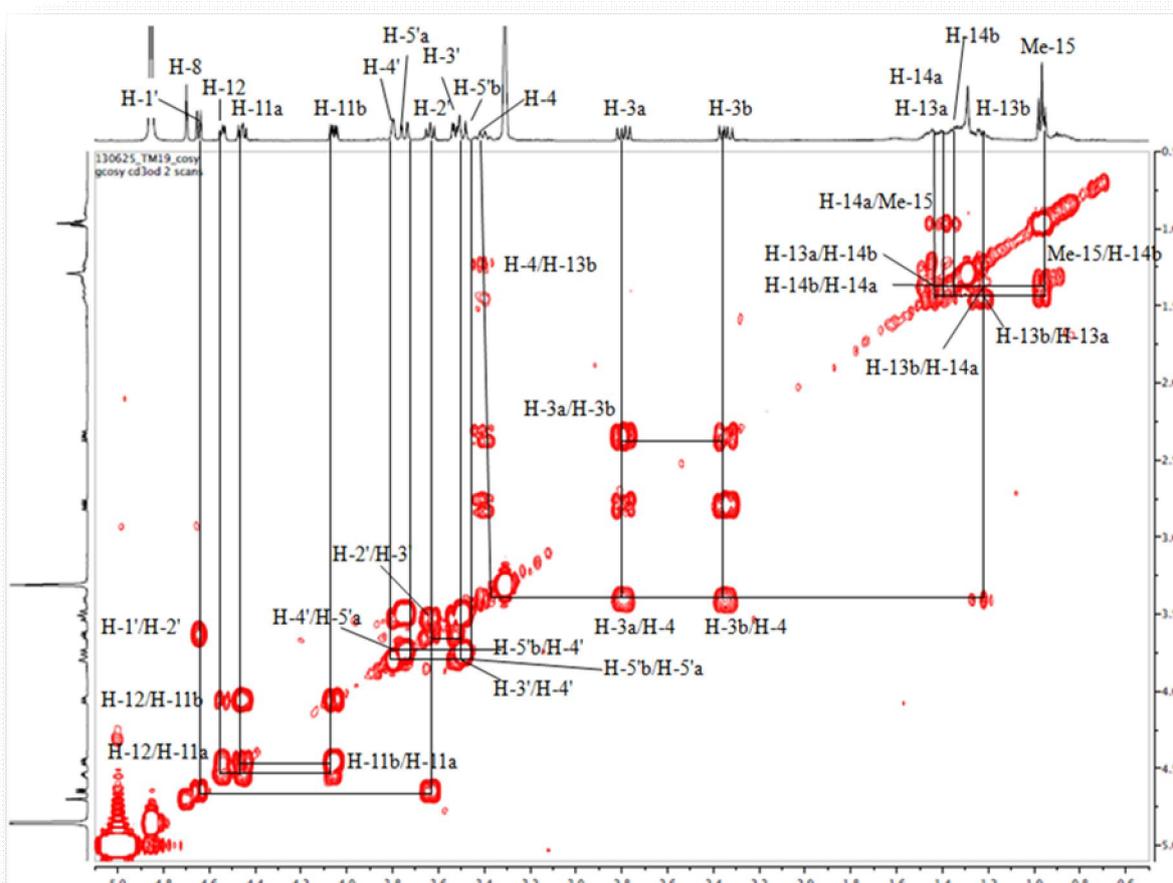
✓ Le proton H-8 à  $\delta_{\text{H}}$  4,70 (*s*; H-8).

L'expérience de corrélation homonucléaire COSY (Figures III-42 et III-43) révèle les couplages attendus entre les protons appartenant aux 4 systèmes de spins visualisés sur ce spectre à savoir:

- H-3a/H-3b, H<sub>2</sub>-3/H-4, H-4/H-13b, H<sub>2</sub>-13/H<sub>2</sub>-14 et H<sub>2</sub>-14/Me-15 pour le fragment pentyle.
- H<sub>2</sub>-11/H-12 et H-11a/H-11b pour le système de spins AMX.
- H-1'/H-2', H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-4'/H-5'a, H-4'/H-5'b et H-5'a/H-5'b correspondant à un système de spins à 6 protons de l'arabinopyranoside.
- H- 8 appartenant à un système de spin isolé.



**Figure III-42:** Corrélations COSY du composé B

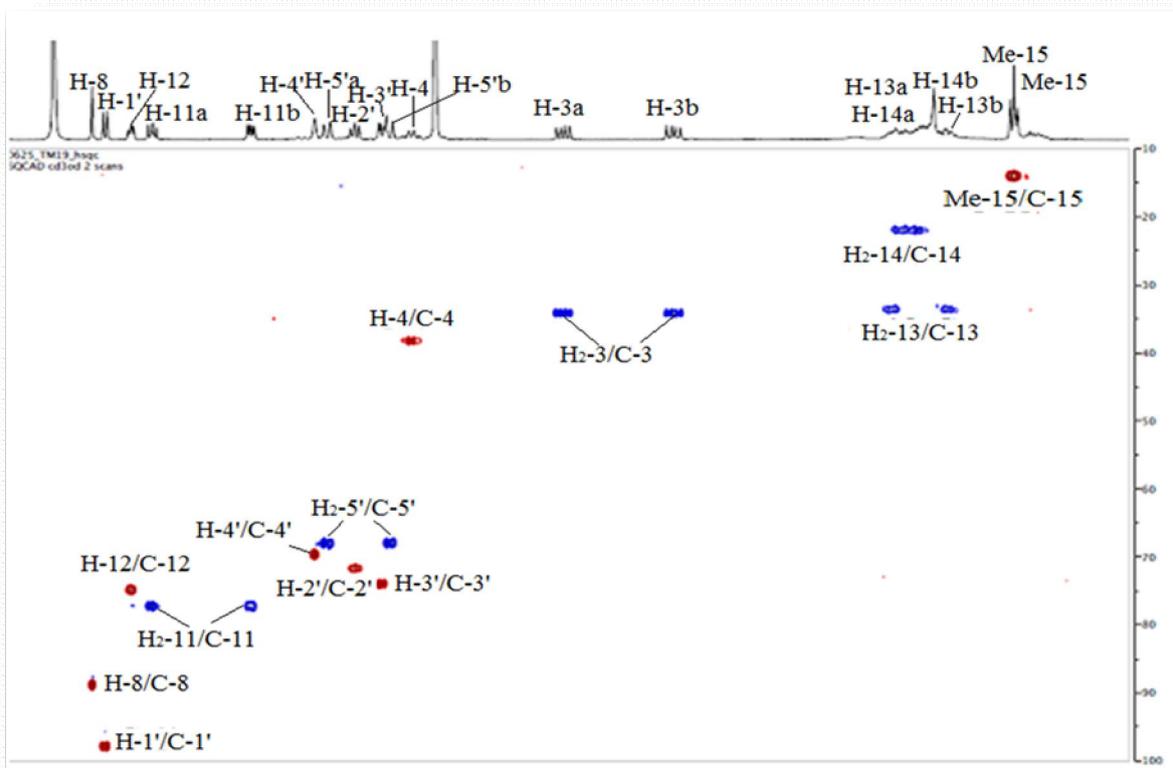


**Figure III-43:** Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé B

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-40) et HSQC (Figure III-44) conduit à assigner les déplacements chimiques des carbones porteurs de protons déjà identifiés tels que:

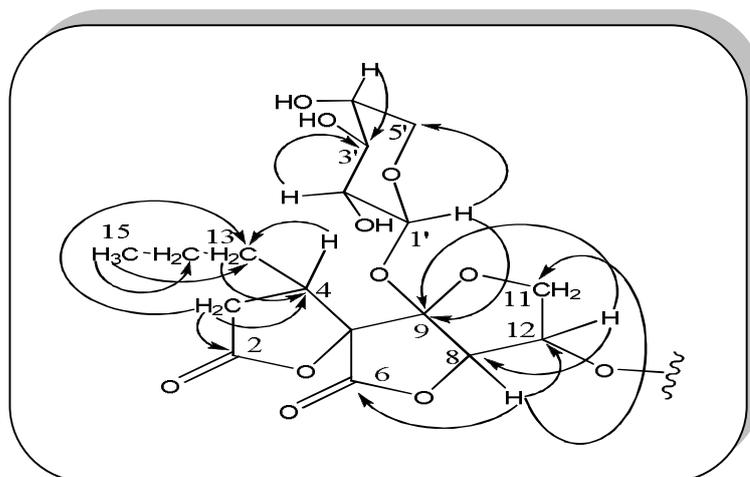
- Les carbones du fragment structural pentyle à  $\delta_{\text{C}}$  34,4 (C-3), 38,5 (C-4), 33,9 (C-13), 22,2 (C-14) et 14,3 (C-15).
- Les carbones de l'arabinopyranoside à  $\delta_{\text{C}}$  98,1 (C-1'), 71,9 (C-2'), 74,2 (C-3'), 69,9 (C-4') et 68,3 (C-5').

- Les carbones du fragment carboné du système AMX à  $\delta_C$  77,5 (C-11) et 75,1 (C-12).
- Le carbone C-8 à  $\delta_C$  89,0 ppm.

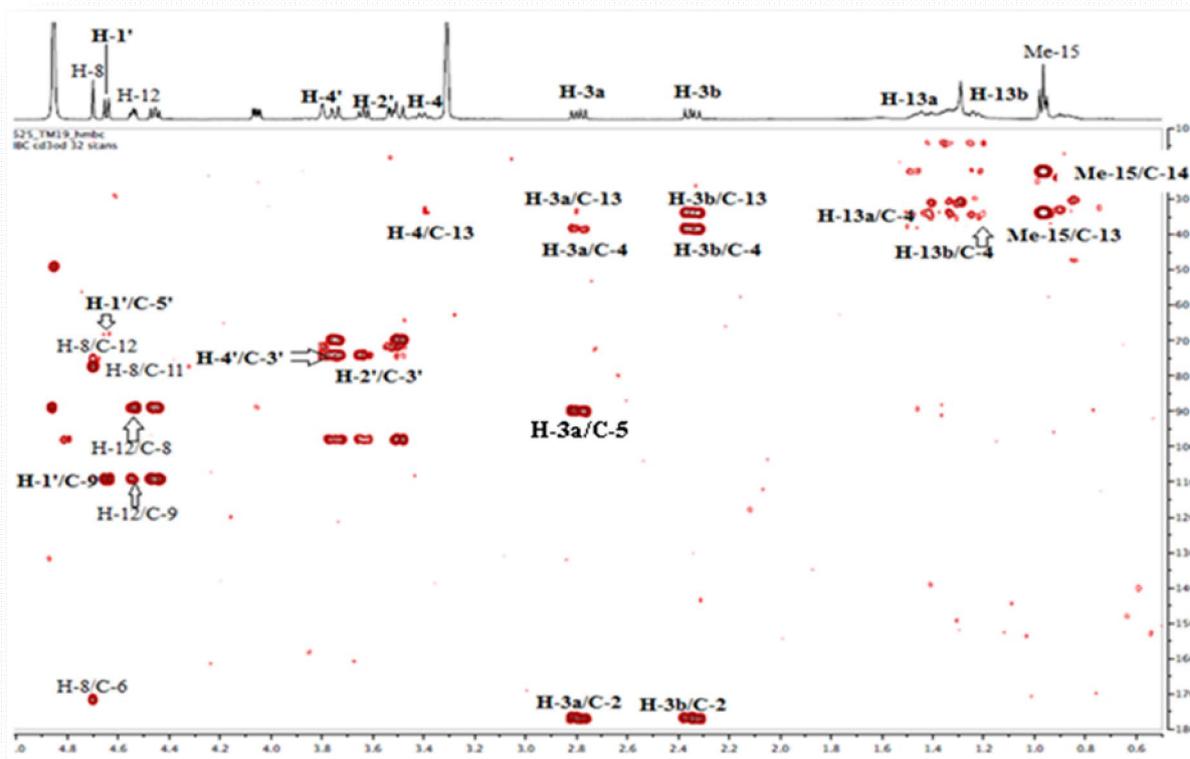


**Figure III-44:** Spectre HSQC du composé B

L'expérience de corrélation hétéronucléaire longue distance HMBC (Figure III-46) permet de repérer les corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  entre les protons des différents fragments structuraux de la molécule et les carbones avoisinants. Cette analyse conduit à relier les fragments et d'élaborer la structure plane de ce composé (Figure III-45).



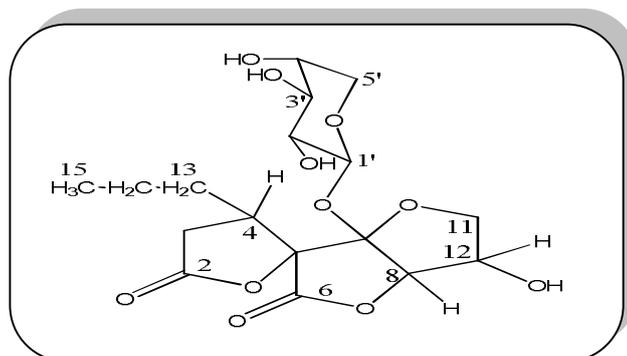
**Figure III-45:** Corrélations HMBC du composé B



**Figure III-46:** Spectre HMBC du composé **B**

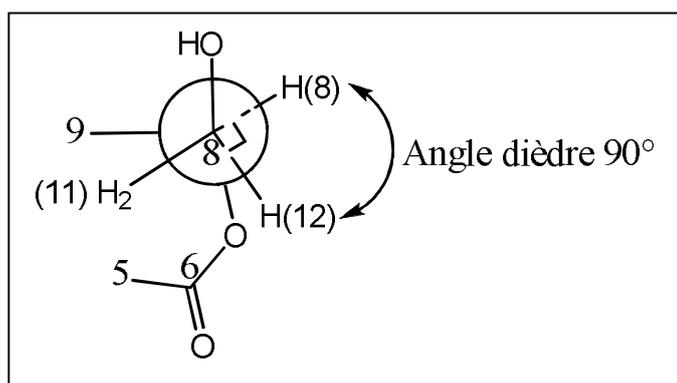
Le déplacement chimique blindé du proton H-12 (-0,74 ppm) en comparaison avec le même composé **A** déjà identifié et l'absence d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Figure III-46) de ce proton (H-12) avec un groupement carbonyle attestent de la déacétylation de ce composé. Le déplacement chimique du carbone C-12 (75,1 ppm) blindé de (-1,5 ppm) est également en faveur de la présence d'un OH libre en C-12.

Ces constatations sont d'ailleurs confirmées par le spectre de masse (HR-ESI-MS) qui indique une différence de masse moléculaire de -42 uma entre les composés **B** et **A** correspondant à l'absence du groupement acétate. En conséquence, la structure plane du composé **B** est présentée comme suit (Figure III-47):



**Figure III-47:** Structure plane du composé **B**

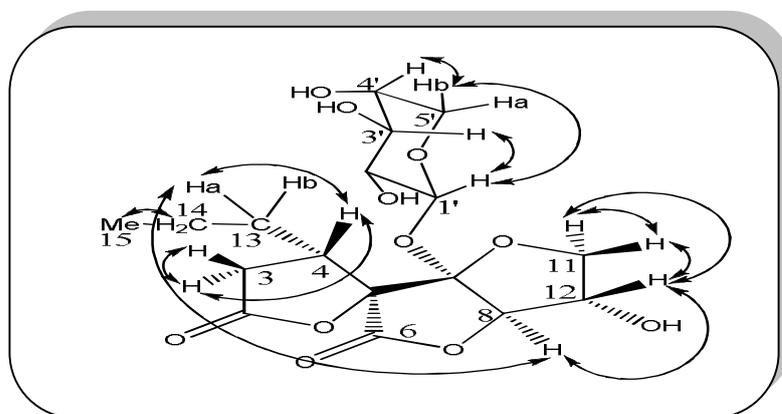
La stéréochimie relative du composé **B** est établie en tenant compte des données de la littérature [13,102], des valeurs des constantes de couplage et de l'analyse du spectre NOESY (Figure III-50). Le proton H-8 est pris comme un point de référence, sa valeur zéro de la constante de couplage dicte un angle dièdre environ  $90^\circ$  entre les plans des protons vicinaux H-8 et H-12, assignant par conséquent les orientations  $\alpha$  et  $\beta$  successivement pour ces protons (H-8 $\alpha$  et H-12 $\beta$ ) (Figure III-48) comme il a été signalé dans le cas du composé **A**.



**Figure III-48:** Angle dièdre entre les plans des protons H-8 et H-12 du composé **B**

En tenant compte des valeurs de déplacements chimiques des carbones C-3 (34,4 ppm) et C-5 (89,9 ppm) identiques à celles des mêmes carbones du composé **A**, la même stéréochimie 4*R* est attribuée au carbone C-4. Par conséquent, le proton H-4 est  $\beta$ -orienté.

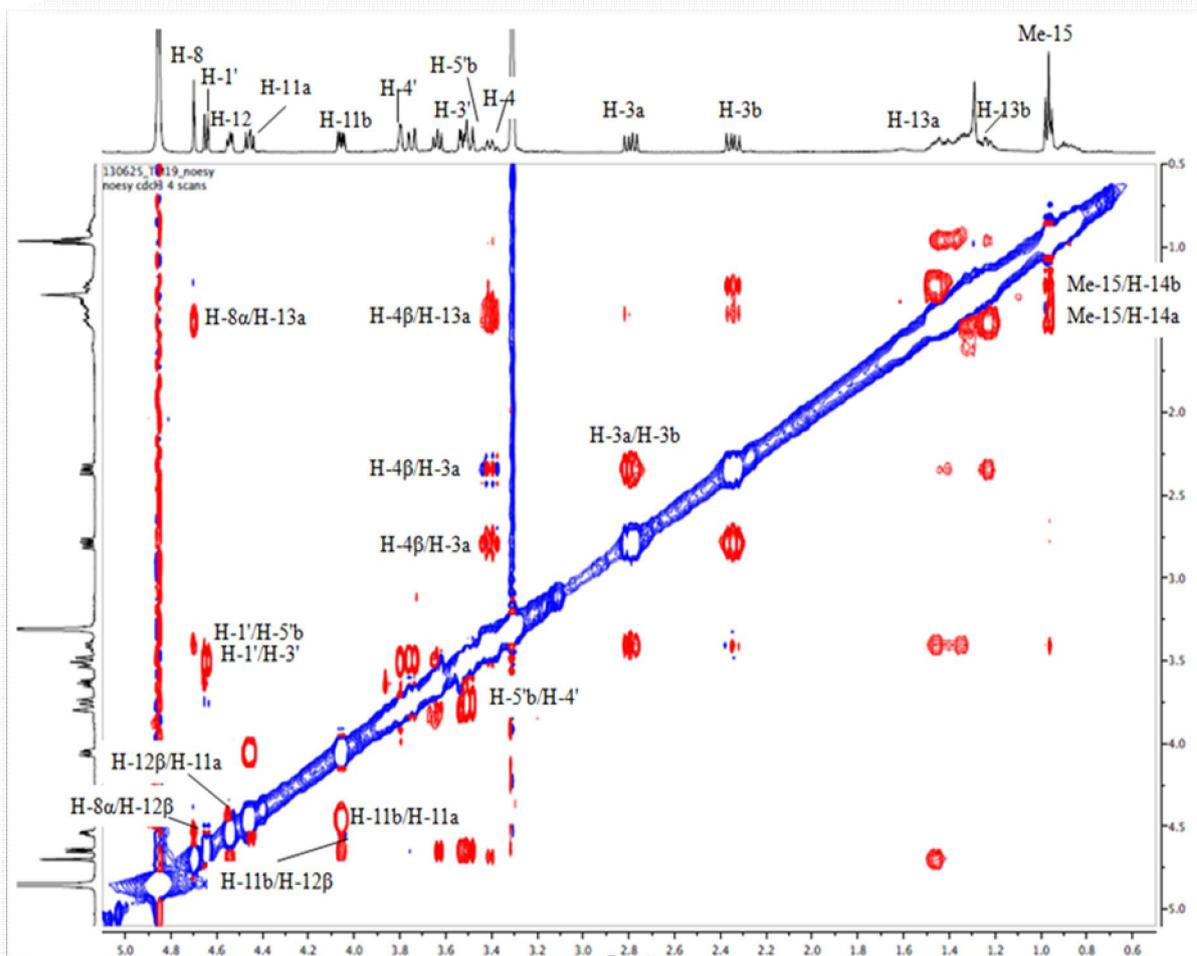
Le spectre NOESY (Figures III-49 et III-50) du composé **B** montre comme dans le composé **A** une corrélation entre le proton H-8 $\alpha$  et le proton H-13a. L'absence de corrélation sur le spectre NOESY entre le proton anomérique H-1' et le proton H-4 $\beta$  ou le proton H-12 $\beta$  indique que le groupement arabinopyranosyle est d'orientation  $\alpha$  comme il est observé pour le composé **A**.



**Figure III-49:** Principales corrélations NOESY observées pour le composé **B**

On observe d'autres corrélations sur le spectre NOESY (Figures III-49 et III-50) entre les protons: H<sub>2</sub>-11/H-12 $\beta$ , H-8 $\alpha$ /H-12 $\beta$ , H-11a/H-11b, H-4 $\beta$ /H-3a, H-3a/H-3b, H-4 $\beta$ /H-13a, Me-15/H-14a et Me-15/H-14b, ainsi des corrélations entre les protons osidiques: H-1'/H-3', H-1'/H-5'b et H-4'/H-5'b.

Il en résulte à l'issue de cette analyse que la stéréochimie relative du composé **B** est 4*R* (C-4), 5*S* (C-5), 8*R* (C-8), 9*R* (C-9) et 12*S* (C-12) [13,102,103].



**Figure III-50: Spectre NOESY du composé B**

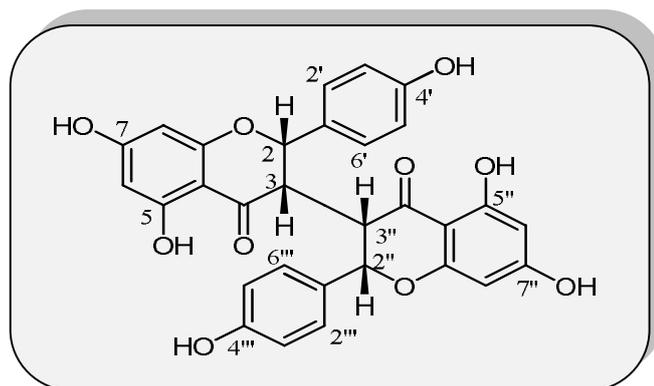
La valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = + 14,3^\circ$  (*c* 0,0028) mesurée dans le méthanol du composé **B**, et la comparaison avec la littérature, permettent d'identifier un deuxième composé nouveau de type spiro- $\gamma$ -lactone glycoside appelé microphynolide B.

Les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau (III-2) suivant:

**Tableau III-2:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé B dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	-	176,9
3a	2,79 ( <i>dd</i> ; 17,6; 9,4) H-3 $\beta$	34,4
3b	2,35 ( <i>dd</i> ; 17,6; 11,3) H-3 $\alpha$	
4	3,41 ( <i>dtd</i> ; 11,3; 9,4; 2,9) H-4 $\beta$	38,5
5	-	89,9
6	-	171,8
8	4,70 ( <i>s</i> ) H-8 $\alpha$	89,0
9	-	109,2
11a	4,46 ( <i>dd</i> ; 9,8; 6,6) H-11 $\alpha$	77,5
11b	4,07 ( <i>dd</i> ; 9,8; 4,3) H-11 $\beta$	
12	4,54 ( <i>dd</i> ; 6,6; 4,3) H-12 $\beta$	75,1
<b><u>n-propyle</u></b>		
13a	1,45 ( <i>m</i> )	33,9
13b	1,23 ( <i>m</i> )	
14a	1,43 ( <i>m</i> )	22,2
14b	1,36 ( <i>m</i> )	
15	0,96 ( <i>t</i> ; 7,2)	14,3
<b><u>arabinosyle</u></b>		
1'	4,65 ( <i>d</i> ; 7,8)	98,1
2'	3,63 ( <i>dd</i> ; 9,5; 7,8)	71,9
3'	3,51 ( <i>dd</i> ; 9,5; 3,4)	74,2
4'	3,81 ( <i>m</i> )	69,9
5'a	3,74 ( <i>dd</i> ; 12,8; 2,0)	68,3
5'b	3,49 ( <i>dd</i> ; 12,8; 1,4)	

## III-2-5-Identification du composé C



Néochamaejasmine A

Il s'agit de la 4',4'',5,5'',7,7''-hexahydroxy-3,3''-biflavanone appelée également néochamaejasmine A. Ce composé a été isolé sous forme d'une huile jaune soluble dans le méthanol et se révèle en jaune sur CCM à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Cette biflavanone est identifiée pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Elle a été isolée antérieurement des racines de l'espèce *Stellera chamaejasme* de la famille Thymelaeaceae [106,107]. Une étude biologique réalisée sur ce composé montre qu'il est utilisé pour traiter les cellules cancéreuses de la prostate [108]. En outre, il a été souligné que cette biflavanone est connue pour ses différentes activités biologiques à savoir: anti-inflammatoire, antivirale, cytotoxique et anti-oxydante [109,110].

Les spectres de masse ESI-MS du composé C (Figures III-51 et III-52) donnent en modes positif et négatif deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  543  $[M+H]^+$  et 541  $[M-H]^-$  respectivement, soit une masse moléculaire de 542 uma correspondant à une formule brute en  $C_{30}H_{22}O_{10}$  indiquant la présence de 20 degrés d'insaturation dans la structure moléculaire de ce composé.

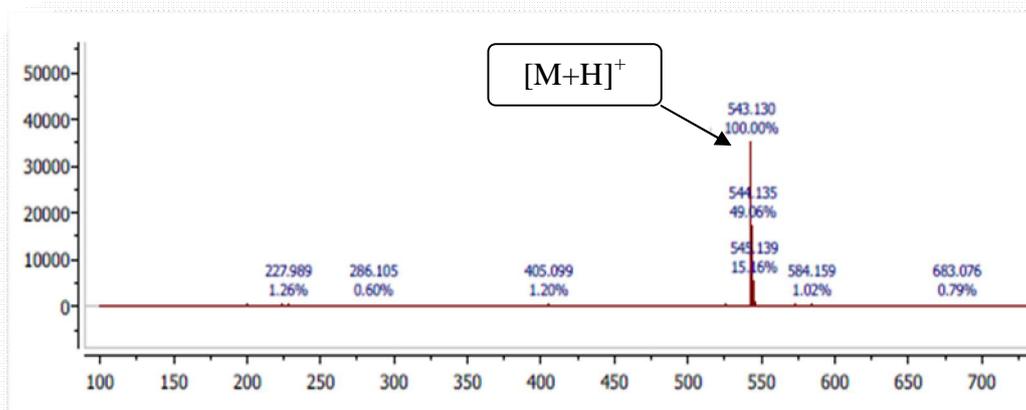
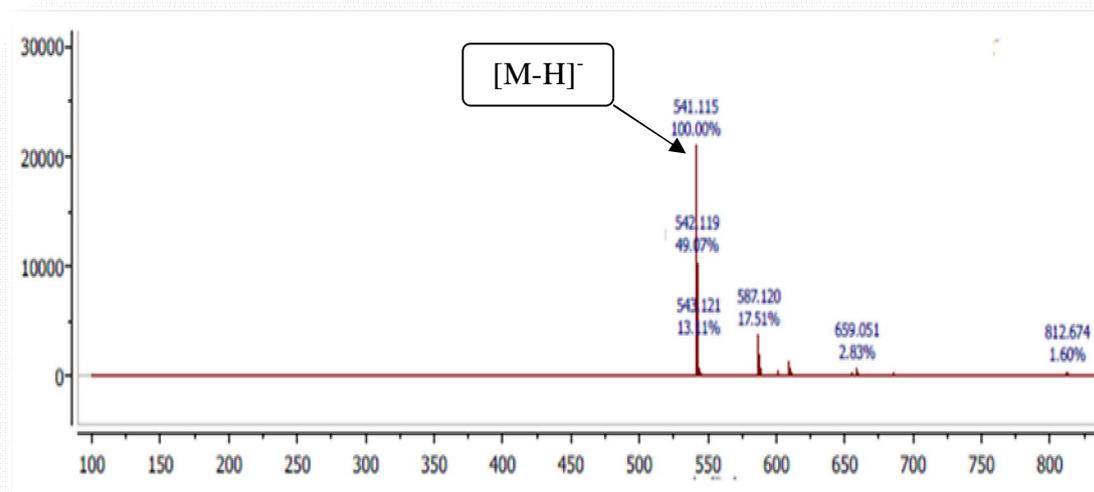
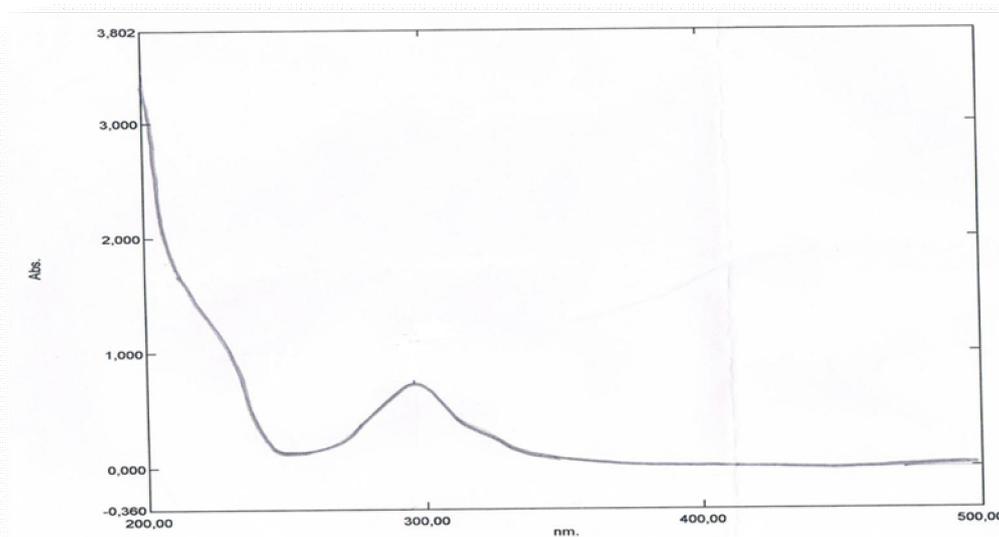


Figure III-51: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé C



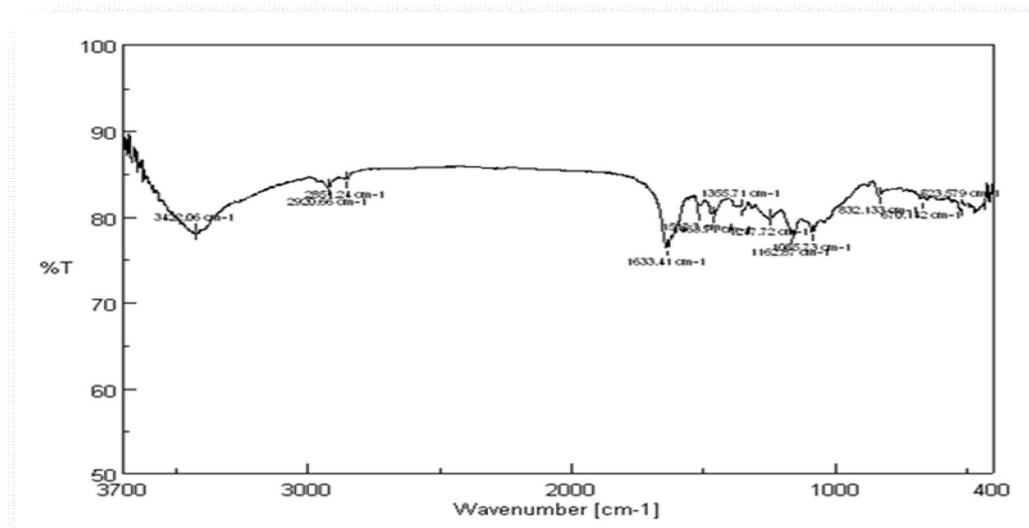
**Figure III-52:** Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé C

L'enregistrement du spectre UV du composé C (Figure III-53) est réalisé dans le MeOH. Ce spectre montre trois bandes d'absorption maximales à 230, 295 et 326 nm. Ces absorptions sont caractéristiques d'un système insaturé des flavonoïdes.



**Figure III-53:** Spectre UV du composé C

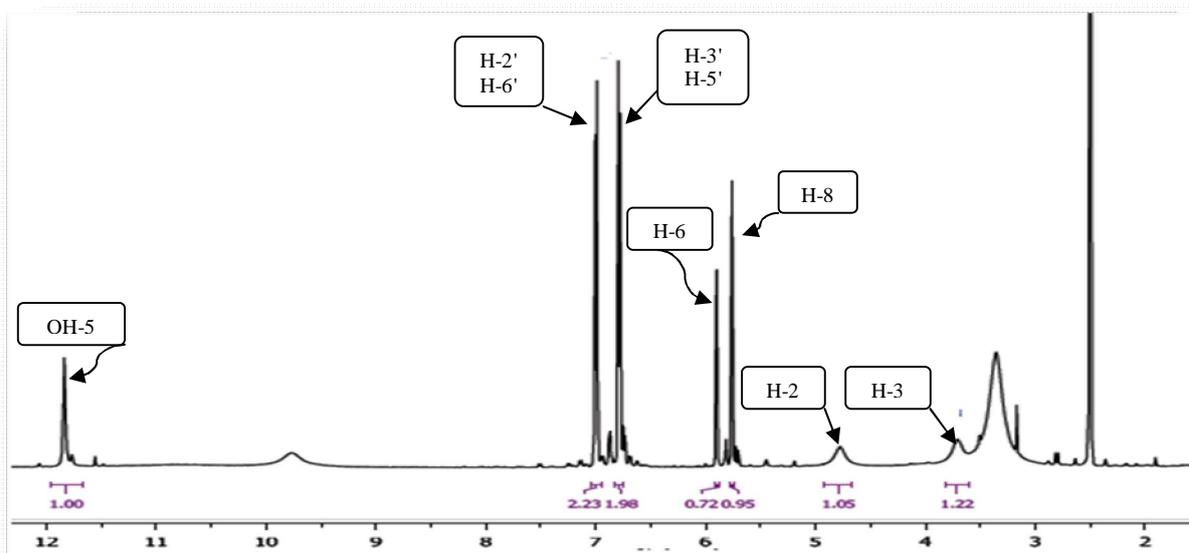
Son spectre IR (Figure III-54) montre des bandes d'absorption à  $3412\text{ cm}^{-1}$  d'un groupement hydroxyle,  $2930$  et  $2854$  (système aliphatique) et  $1633$ ,  $1590$  et  $1555\text{ cm}^{-1}$  d'un noyau aromatique.



**Figure III-54:** Spectre IR du composé C

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré dans le DMSO- $d_6$  (Figure III-55) de ce composé indique une allure différente par rapport aux composés **A** et **B** déjà identifiés. Ce spectre montre la présence de 7 signaux s'intégrant pour 9 protons se répartissant en:

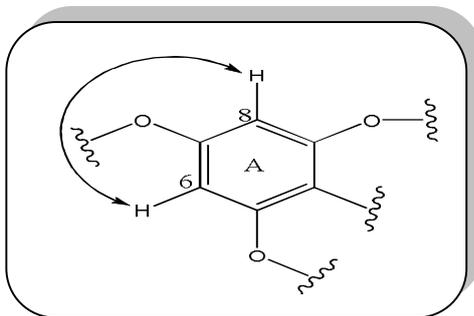
- ✓ Un proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  11,84 ppm (*s*) ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC correspondant à un groupement hydroxyle.
- ✓ Six protons aromatiques entre 5,70 et 7,00 ppm.
- ✓ Deux protons à  $\delta_{\text{H}}$  3,71 et 4,78 ppm.



**Figure III-55:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé C

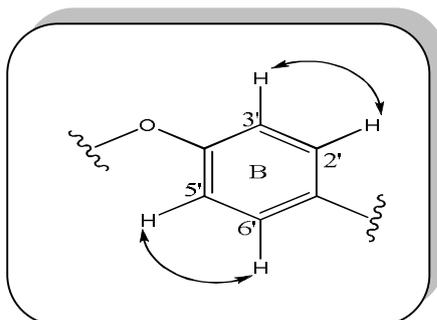
L'analyse du spectre COSY (Figure III-58) permet de visualiser les systèmes de pins suivants:

✓ Deux protons couplés appartenant à un même système de spins et situés en position meta d'un cycle aromatique tétrasubstitué (cycle A) sous forme de deux doublets à  $\delta_H$  5,90 et 5,76 ppm attribuables aux protons H-6 ( $J = 2,0$  Hz) et H-8 ( $J = 2,0$  Hz) respectivement (Figure III-56).

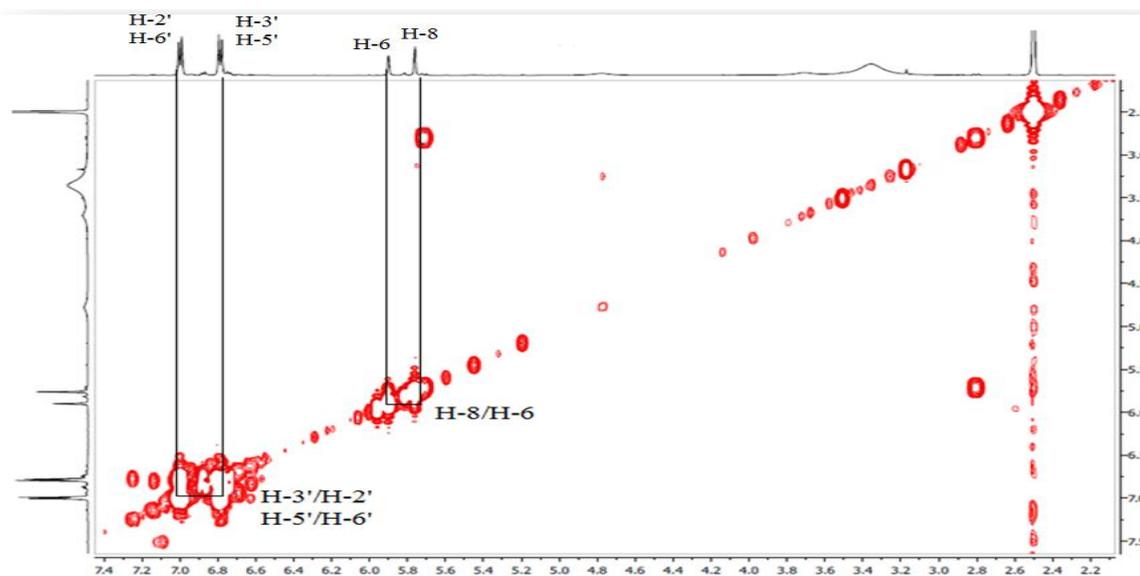


**Figure III-56: Corrélation COSY H-6/H-8**

✓ Quatre protons aromatiques équivalents deux à deux constituant un même système de spins  $A_2X_2$  résonnent à  $\delta_H$  7,00 ( $d; J = 8,2$  Hz; H-2' et H-6') et à  $\delta_H$  6,79 ( $d; J = 8,2$  Hz; H-3' et H-5'). Ces protons sont attribués à un noyau aromatique para disubstitué (cycle B) (Figure III-57).

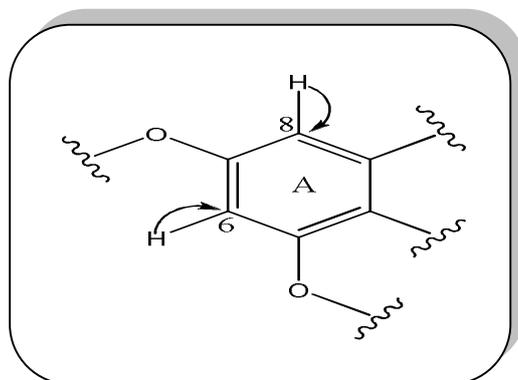


**Figure III-57: Couplages COSY H-2'/H-3' et H-5'/H-6'**



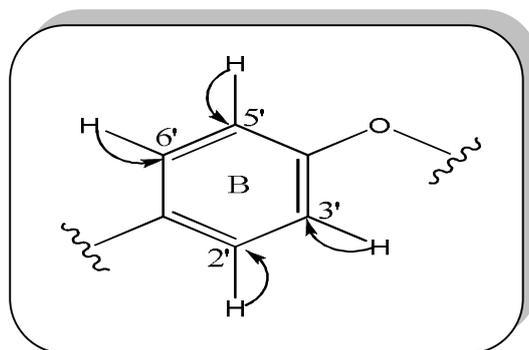
**Figure III-58: Spectre COSY du composé C**

Sur le spectre HSQC (Figure III-61) du composé **C** les protons H-6 et H-8 du noyau A corrélient avec les carbones résonant à  $\delta_C$  97,3 (C-6) et 96,0 (C-8) (Figure III-59).



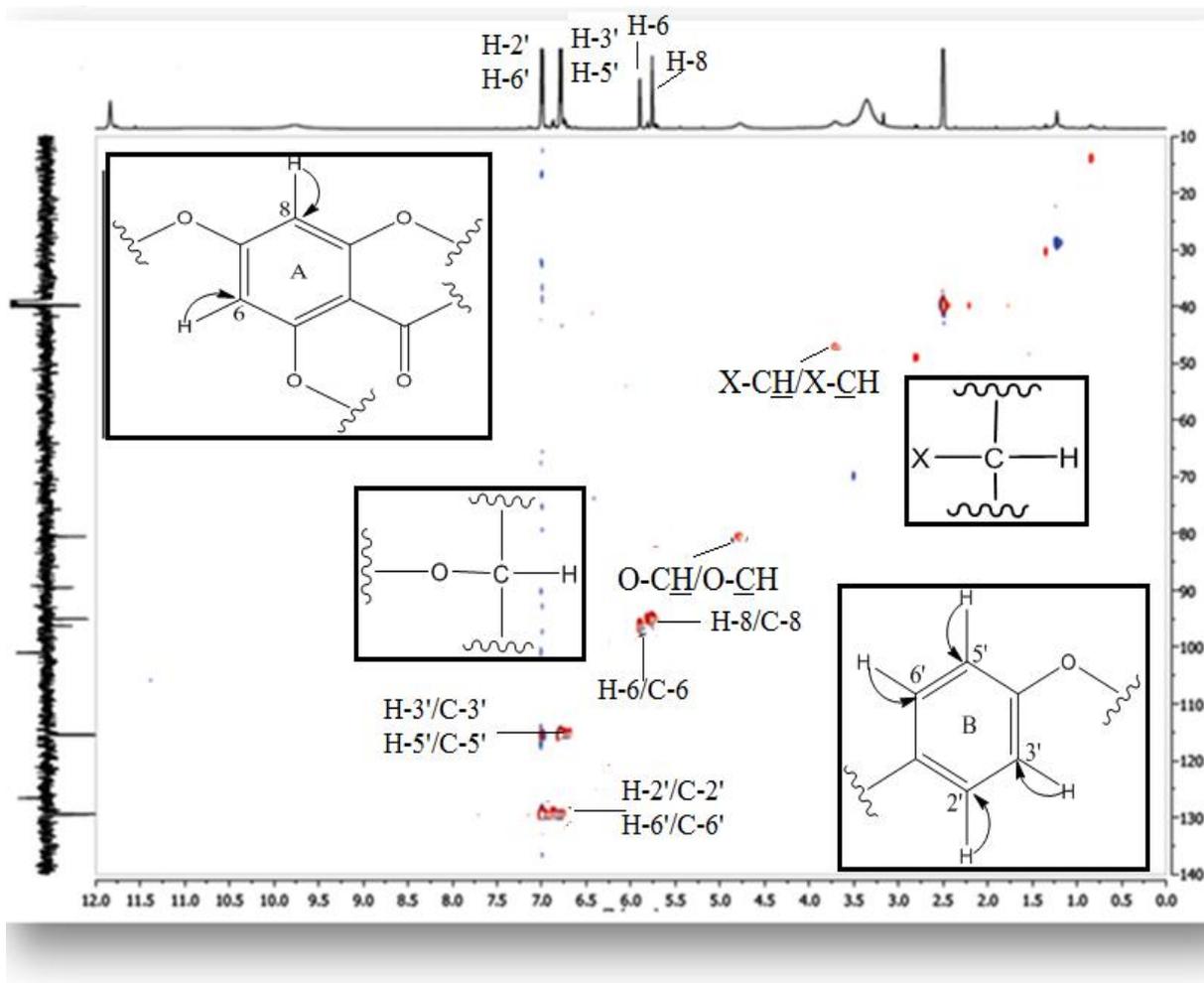
**Figure III-59:** Corrélations HSQC du cycle A

D'autre part, les signaux des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du noyau B présentent des couplages directs en  $^1J_{H-C}$  avec les carbones méthines apparaissant à  $\delta_C$  130,8 (C-2'/C-6') et 116,5 (C-3'/C-5') (Figure III-60).



**Figure III-60:** Corrélations HSQC du cycle B

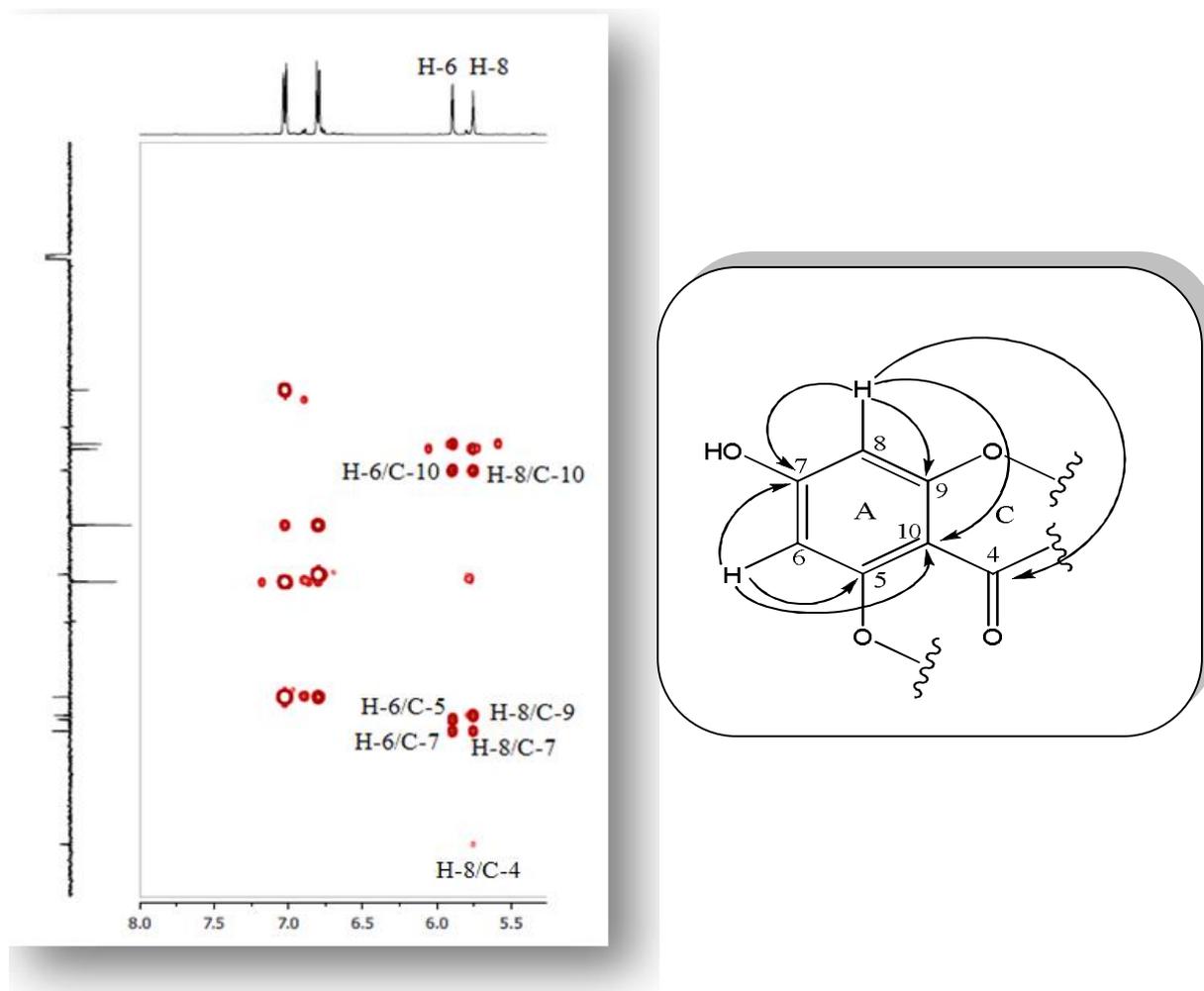
L'analyse du spectre HSQC (Figure III-61) permet également de détecter les déplacements chimiques de deux carbones méthines résonant à 82,4 et 47,5 ppm dont les protons sont localisés à 4,78 (*sl*) et 3,71 (*sl*) respectivement. Les déplacements chimiques déblindés du premier méthine  $\delta_H$  4,78/  $\delta_C$  82,4 indiquent qu'il s'agit d'un oxyméthine (O-CH-). Le deuxième CH résonant à  $\delta_H$  3,71/  $\delta_C$  47,5 correspond à un groupement méthine aliphatique lié à des groupements attracteurs (X).



**Figure III-61:** Spectre HSQC du composé C

L'élucidation structurale du composé C peut être débutée à partir des protons H-6 et H-8 déjà identifiés. Ces protons présentent une tache de corrélation en  $^3J$  sur le spectre HMBC (Figure III-62) avec un carbone aromatique quaternaire résonant à 102,7 ppm attribuable au carbone C-10 se trouvant au pied du carbonyle C-4.

Le spectre HMBC (Figure III-62) de ce composé montre également une corrélation en  $^2J$  entre les protons H-6, H-8 et un carbone quaternaire oxygéné repéré à 168,3 ppm qui ne peut être que le carbone C-7. Son déplacement chimique déblindé suggère qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle (OH). Les carbones oxygénés C-5 et C-9 présentent des taches de corrélations en  $^2J$  avec les protons H-6 et H-8 respectivement. Leur déplacement chimique est assigné à 165,4 ppm (C-5) et 164,2 ppm (C-9) (Figure III-62). Le proton H-8 corrèle aussi sur le spectre HMBC avec un carbone du carbonyle C-4 à  $\delta_C$  196,8.

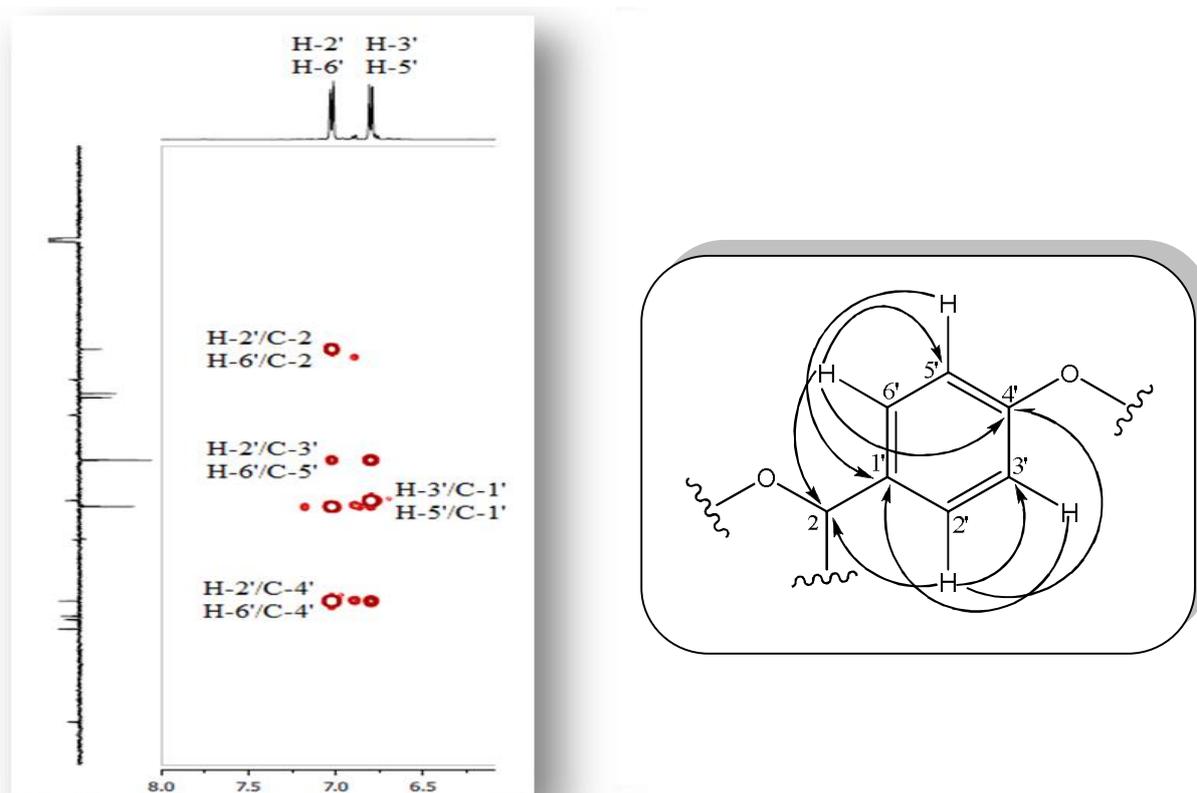


**Figure III-62: Correlations HMBC du composé C**

A ce niveau d'analyse, les déplacements chimiques des protons et carbones du noyau A ont été déterminés.

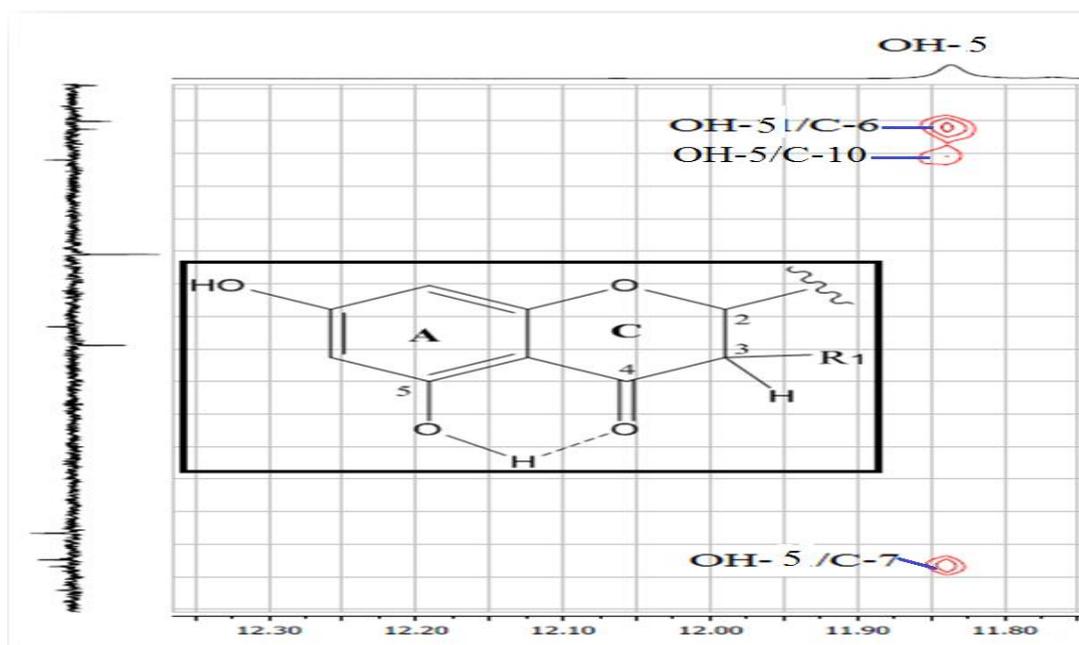
L'attribution des carbones quaternaires du noyau B peut se faire de la même manière, en commençant par les deux protons équivalents H-2' et H-6' qui corrélient en HMBC (Figure III-63) avec trois carbones du cycle B à 116,5 ppm (C-3' et C-5') et 159,7 ppm ne pouvant être que le carbone C-4'. En plus de ces corrélations ces protons présentent aussi une tache de corrélation avec un carbone résonant à 82,4 ppm correspondant au groupement oxyméthine (O-CH-) qui ne peut être que le carbone C-2 du squelette flavonoïdique de type flavanone [111] (Figure III-63).

Par ailleurs, les protons équivalents H-3' et H-5' du cycle B montrent une tache de corrélation avec un carbone quaternaire non oxygéné résonant à 128,9 ppm attribuable au carbone aromatique C-1' (Figure III-63).



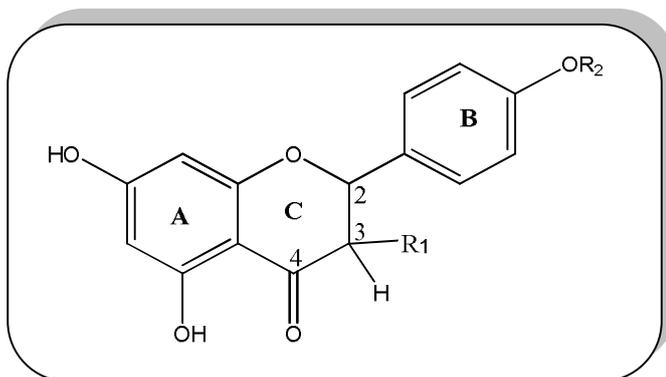
**Figure III-63:** Corrélations HMBC du composé C

En plus, le proton du groupement hydroxyle à  $\delta_H$  11,84 présente trois taches de corrélation sur le spectre HMBC (Figure III-64) en  $^3J$  et  $^4J$  avec les carbones résonant à  $\delta_C$  97,3 (C-6), 102,7 (C-10) et 168,3 (C-7) respectivement correspond au groupement OH en position C-5. Ce dernier forme des liaisons hydrogènes intramoléculaires avec le carbonyle en position C-4.

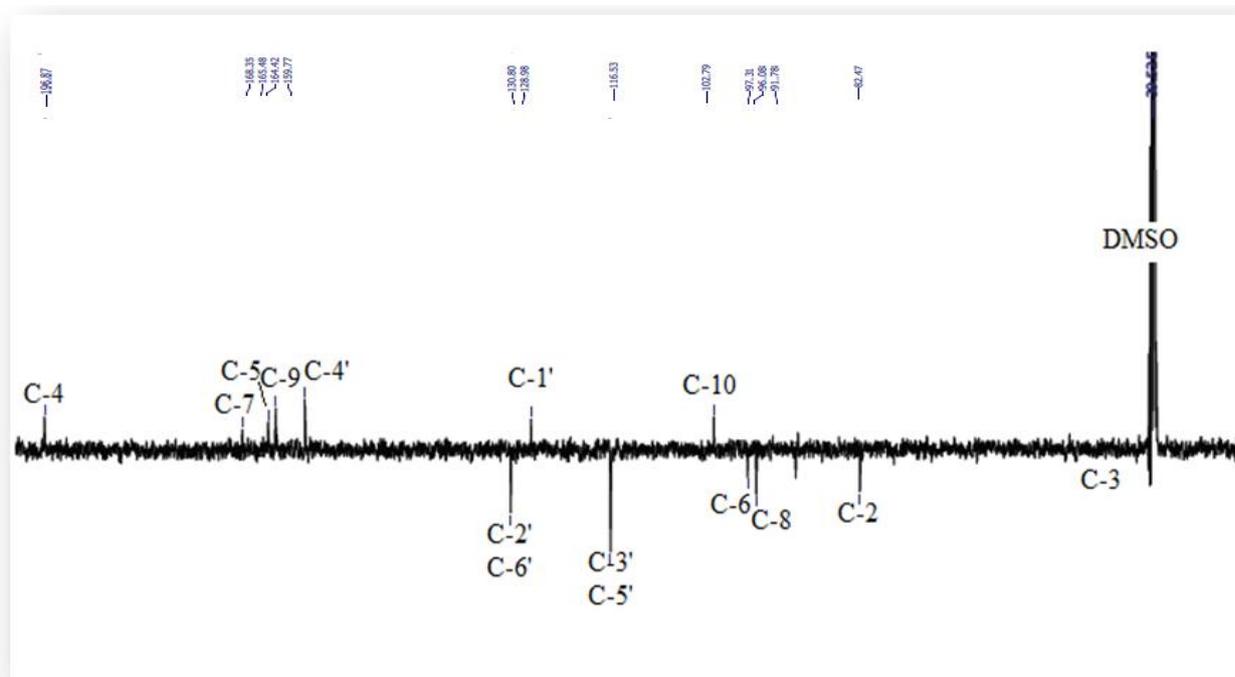


**Figure III-64:** Partie du spectre HMBC montrant les couplages OH-5/C-6 et OH-5/C-7

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en  $J$  modulé du composé **C** (Figure III-66) montre 15 signaux dont 12 signaux correspondent à des atomes de carbone des noyaux A et B des flavanones. Les atomes de carbone du cycle C sont assignés à C-2 (82,4 ppm), C-3 (47,5 ppm) et le C-4 à 196,8 ppm, suggérant à priori une structure de type flavanone (Figure III-65). Le signal à 196,8 est caractéristique d'un groupement carbonyle du cycle C des flavonoides de type flavanone. En plus, le déplacement chimique à 47,5 ppm est typique de C-3 des flavanones [112].



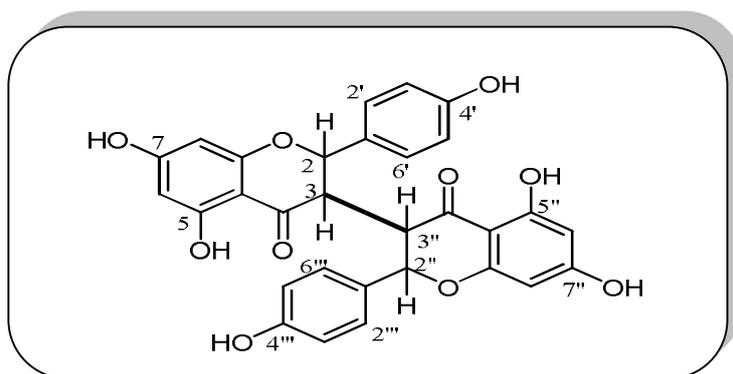
**Figure III-65:** Squelette d'une flavanone



**Figure III-66:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé **C**

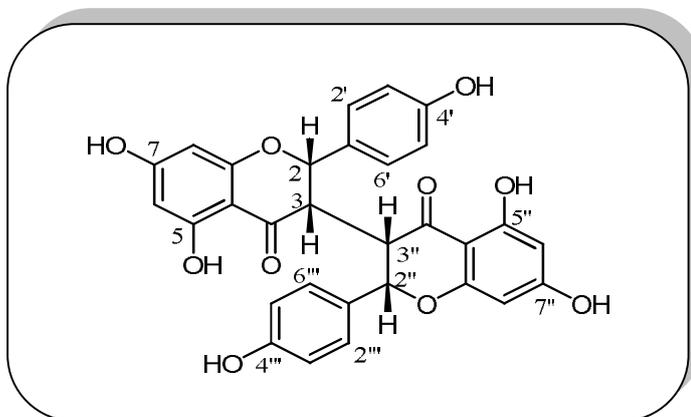
Pour une flavanone simple ( $R_1 = R_2 = \text{H}$ , naringénine), la masse moléculaire attendue est 272 uma, donc 10 insaturations. Les spectres de masse ESI du composé **C** indiquent une masse moléculaire de 542 uma correspondant à la formule brute  $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ , ce qui permet de déduire que ce composé possède 20 insaturations, soit le double trouvé dans le cas de la naringénine.

Ces constatations attestent de la présence d'un squelette biflavonoïdique symétrique constitué de deux unités flavanones identiques. Le déplacement chimique relativement blindé du carbone C-3 (47,5 ppm) indique qu'il est non oxygéné, suggérant ainsi que la liaison entre les deux unités flavanones est possible seulement en positions C-3 et C-3". La comparaison des caractéristiques spectrales (Tableau III-3) du composé **C** avec celles des composés 3,3"-biflavanones connues laisse supposer que ce composé est très similaire avec ces derniers [106,107]. Toutes ces données permettent de proposer la structure plane suivante au composé **C** (Figure III-67):



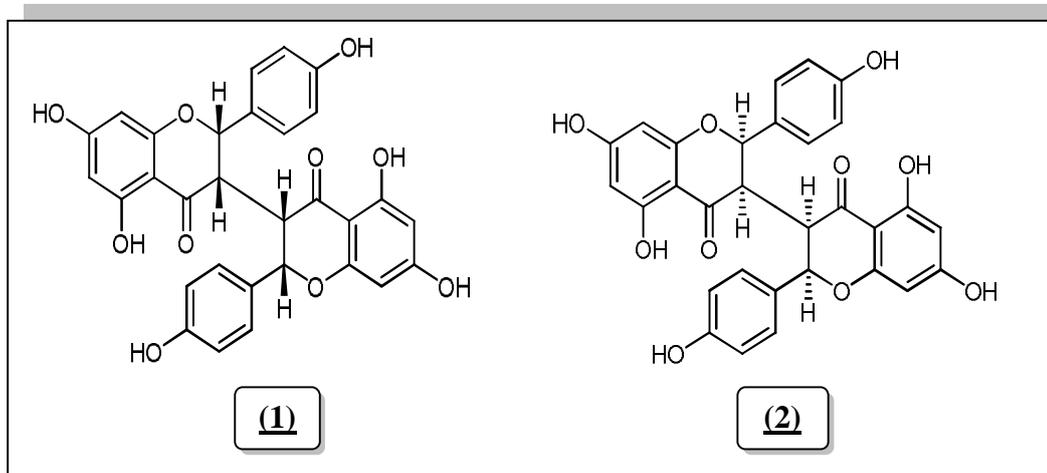
**Figure III-67:** Structure plane du composé **C**

La stéréochimie relative de ce composé au niveau des carbones chiraux C-2/C-3 et C-2''/C-3'' est établie au vu des valeurs de constantes de couplages. En effet, les protons H-2/H-2'' et H-3/H-3'' apparaissent sous formes de deux singulets larges sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-55), suggérant alors des constantes de couplage nulles ( $J = 0$  Hz). Cela signifie une stéréochimie *cis* au niveau des liaisons C-2/C-3 et C-2''/C-3'' (Figure III-68) car dans le cas d'une stéréochimie *trans* les protons H-2/H-3 et H-2''/H-3'' sont des doublets avec des constantes de couplage plus grandes [113]. Toutes ces données permettent d'attribuer sans équivoque pour ce composé la stéréochimie *cis/cis* (Figure III-68).



**Figure III-68:** Structure du composé **C**

La mesure du pouvoir rotatoire de ce composé dans le méthanol donnant une valeur égale à  $0^\circ$  ( $c$  0,0036), confirme bien la nature symétrique de ce composé. Ceci suggère la présence de l'un des deux antipodes **(1)** et **(2)** (Figure III-69). Ce composé est connu sous le nom de néochamaejasmine A [106,107,114].



**Figure III-69:** Structure de néochamaejasmine A

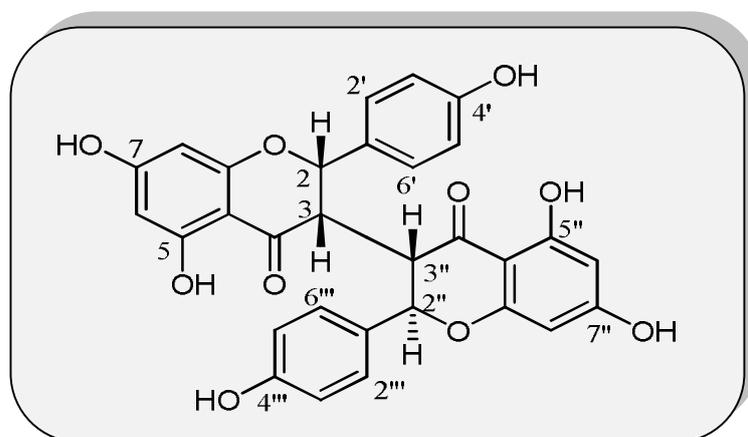
Tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **C** sont regroupés dans le tableau (III-3) ci-dessous.

**Tableau III-3:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **C** dans  $\text{DMSO-}d_6$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4,78 ( <i>sl</i> )	82,4
3	3,71 ( <i>sl</i> )	47,5
4	-	196,8
5	-	165,4
6	5,90 ( <i>d</i> ; 2,0)	97,3
7	-	168,3
8	5,76 ( <i>d</i> ; 2,0)	96,0
9	-	164,2
10	-	102,7
1'	-	128,9
2'	7,00 ( <i>d</i> ; 8,2)	130,8

3'	6,79 (d; 8,2)	116,5
4'	-	159,7
5'	6,79 (d; 8,2)	116,5
6'	7,00 (d; 8,2)	130,8
2''	4,78 (sl)	82,4
3''	3,71 (sl)	47,5
4''	-	196,8
5''	-	165,4
6''	5,90 (d; 2,0)	97,3
7''	-	168,3
8''	5,76 (d; 2,0)	96,0
9''	-	164,2
10''	-	102,0
1'''	-	128,9
2'''	7,00 (d; 8,2)	130,8
3'''	6,79 (d; 8,2)	116,5
4'''	-	159,7
5'''	6,79 (d; 8,2)	116,5
6'''	7,00 (d; 8,2)	130,8
OH-5	11,84 (s)	-
OH-5''	11,84 (s)	-

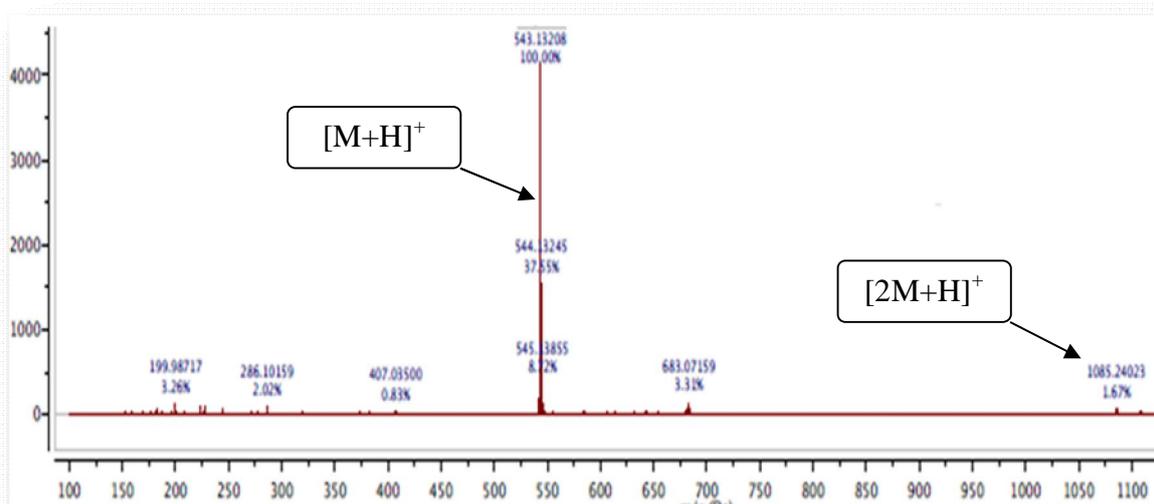
### III-2-6-Identification du composé D



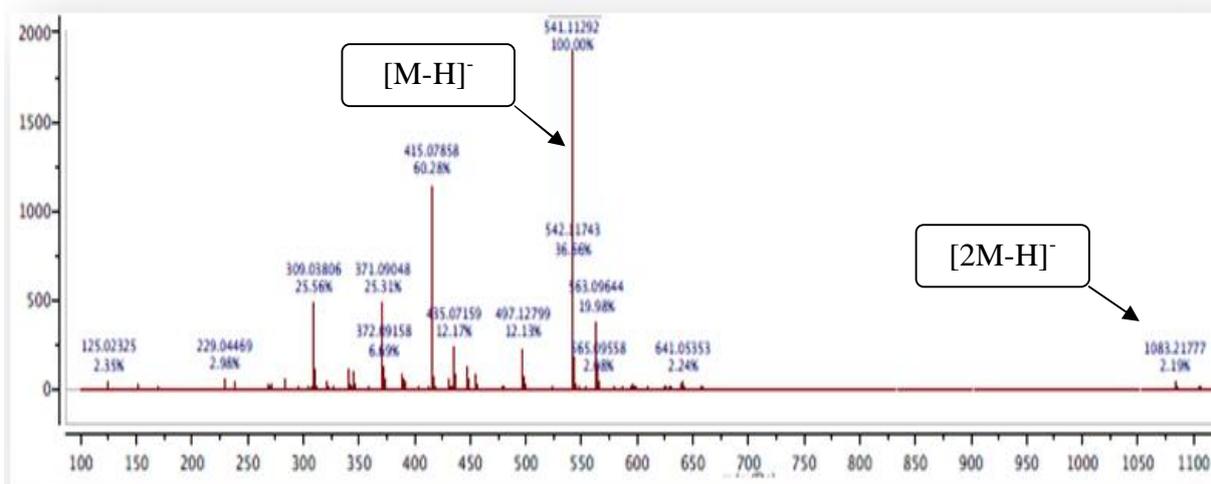
Néochamaejasmine B

Le composé **D** est la 4',4'',5,5'',7,7''-hexahydroxy-3,3''-biflavanone nommé néochamaejasmine B. Il est isolé également sous forme d'une huile jaunâtre soluble dans le MeOH. Cette biflavanone prend une coloration jaune après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage.

Les spectres de masse ESI-MS révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  543  $[M+H]^+$  et 1085  $[2M+H]^+$  en mode positif (Figure III-70) et à  $m/z$  541  $[M-H]^-$  et 1083  $[2M-H]^-$  en mode négatif (Figure III-71), correspondant à la formule brute en  $C_{30}H_{22}O_{10}$ , soit une masse moléculaire de 542 uma égale à celle du composé précédent **C**. Ceci suppose que les deux composés **C** et **D** sont des isomères.

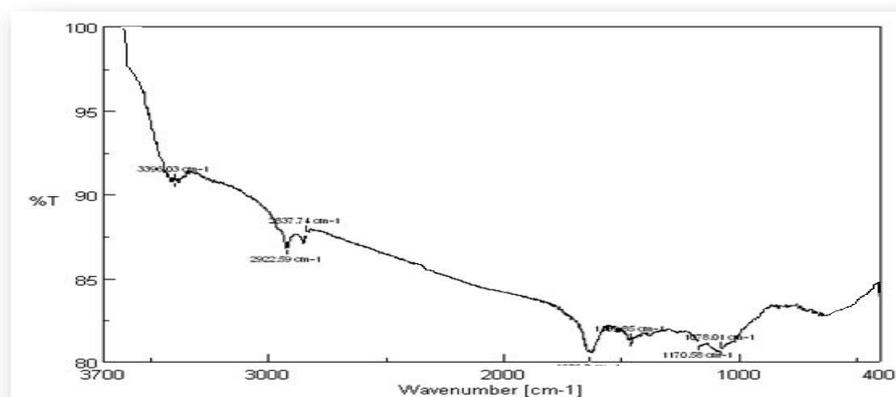


**Figure III-70:** Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **D**



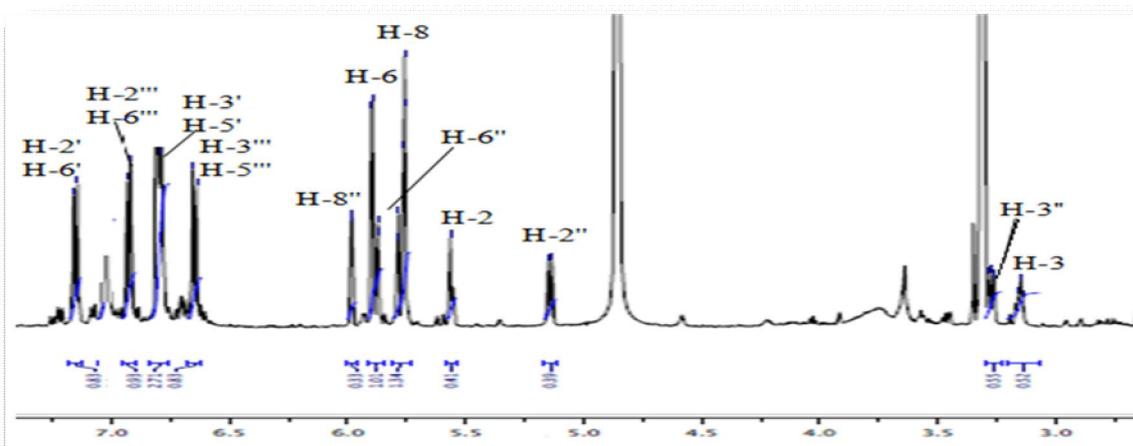
**Figure III-71:** Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **D**

Le spectre UV du composé **D** montre des absorptions maximales à 230, 295 et 326 nm attestant de la présence d'un système insaturé des flavonoïdes. Le spectre IR (Figure III-72) présente les bandes d'absorption à  $3396\text{ cm}^{-1}$ ,  $1670\text{ cm}^{-1}$ , ( $2922$  et  $2873$ ) et ( $1544\text{ cm}^{-1}$ ) suggérant la présence de groupements hydroxyles, de carbonyle, d'un système aliphatique et d'un noyau aromatique respectivement.

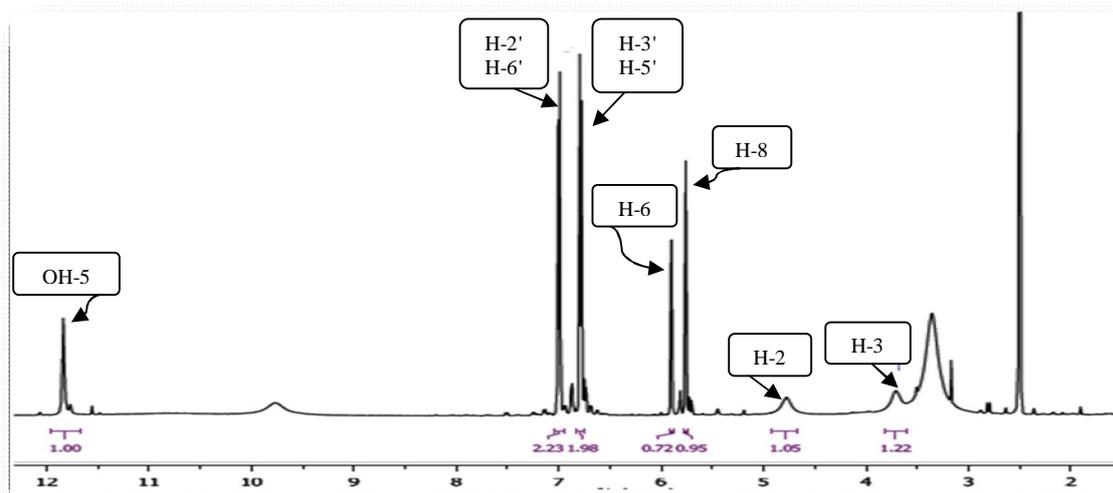


**Figure III-72: Spectre IR du composé D**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-73) enregistré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  présente à champ faible 12 signaux dont 8 résonant entre 5,74 et 7,15 ppm chacun sous forme de doublets attribuables aux protons aromatiques et 4 signaux s'intégrant 1H chacun sous forme de doublets résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,15, 3,28, 5,14 et 5,56. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-55) du composé précédent **C** indique quant à lui 6 résonances entre 3,50 et 7,50 se répartissant en 4 signaux de protons aromatiques et 2 signaux de protons aliphatiques. La comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  des deux composés **C** (Figure III-55) et **D** (Figure III-73) montre que le composé **D** présente des ressemblances avec le composé décrit précédemment, à savoir le néochamaejasmine A.



**Figure III-73: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé D**



**Figure III-55:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé C

Le dédoublement des signaux RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-73) du composé **D** par rapport à ceux observés dans le cas du néochamaejasmine A (**C**) laisse supposer la présence d'un squelette biflavonoïdique avec deux unités flavanones différentes. Ceci conduit à conclure que les composés **C** et **D** sont des stéréoisomères. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-73) du composé en question montre les signaux correspondant aux systèmes des spins suivants:

- ✓ Les protons aromatiques du noyau B résonant à  $\delta_{\text{H}}$  7,15 ( $d$ ;  $J = 8,5$  Hz) et 6,80 ( $d$ ;  $J = 8,5$  Hz) attribuables aux protons (H-2', H-6') et (H-3', H-5') respectivement.
- ✓ Les protons aromatiques du noyau B' à  $\delta_{\text{H}}$  6,93 ( $d$ ;  $J = 8,5$  Hz), 6,65 ( $d$ ;  $J = 8,5$  Hz) correspondant aux protons (H-2'', H-6'') et (H-3'', H-5'').
- ✓ Les protons aromatiques du cycle A à  $\delta_{\text{H}}$  5,89 ( $d$ ;  $J = 1,8$  Hz) et 5,74 ( $d$ ;  $J = 1,8$  Hz) caractéristiques des protons H-6 et H-8 successivement.
- ✓ Les protons aromatiques H-6''' et H-8''' du cycle A' à  $\delta_{\text{H}}$  5,77 ( $d$ ;  $J = 2,1$  Hz) et 5,99 ( $d$ ;  $J = 2,1$  Hz) ppm respectivement.
- ✓ Les protons du noyau C résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,56 ( $d$ ;  $J = 4,8$  Hz; H-2) et 3,15 ( $dd$ ;  $J = 4,8$ ; 3,6 Hz; H-3).
- ✓ Les protons du cycle C' à  $\delta_{\text{H}}$  5,14 ( $d$ ;  $J = 8,9$  Hz; H-2''') et 3,28 ( $dd$ ;  $J = 8,9$ ; 3,6 Hz; H-3''').

L'analyse du spectre COSY (Figures III-74 et III-75) permet de détecter les corrélations homonucléaire attendues entre les protons appartenant aux mêmes systèmes de spins tels que:

- H-2'/H-3' et H-5'/H-6' pour le noyau B
- H-2'''/H-3''' et H-5'''/H-6''' correspondant au noyau B'
- H-6/H-8 pour le noyau A
- H-6''/H-8'' appartenant au noyau A'
- H-2/H-3 pour le cycle C
- H-2''/H-3'' du cycle C'

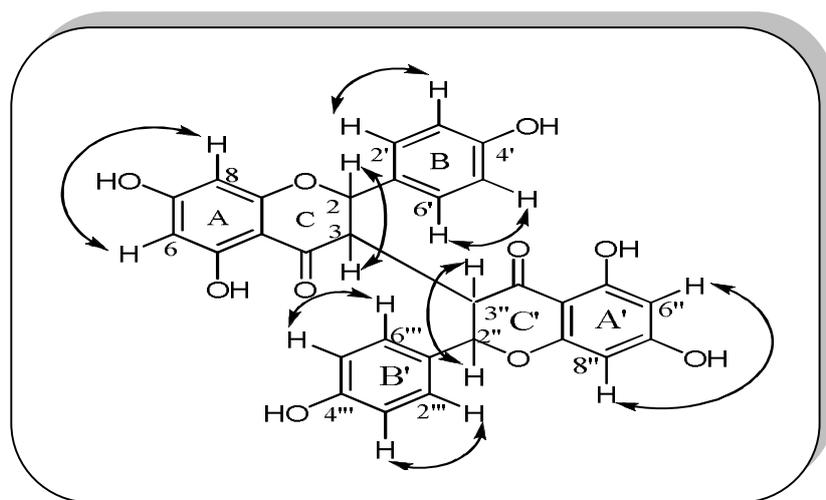


Figure III-74: Corrélations COSY du composé D

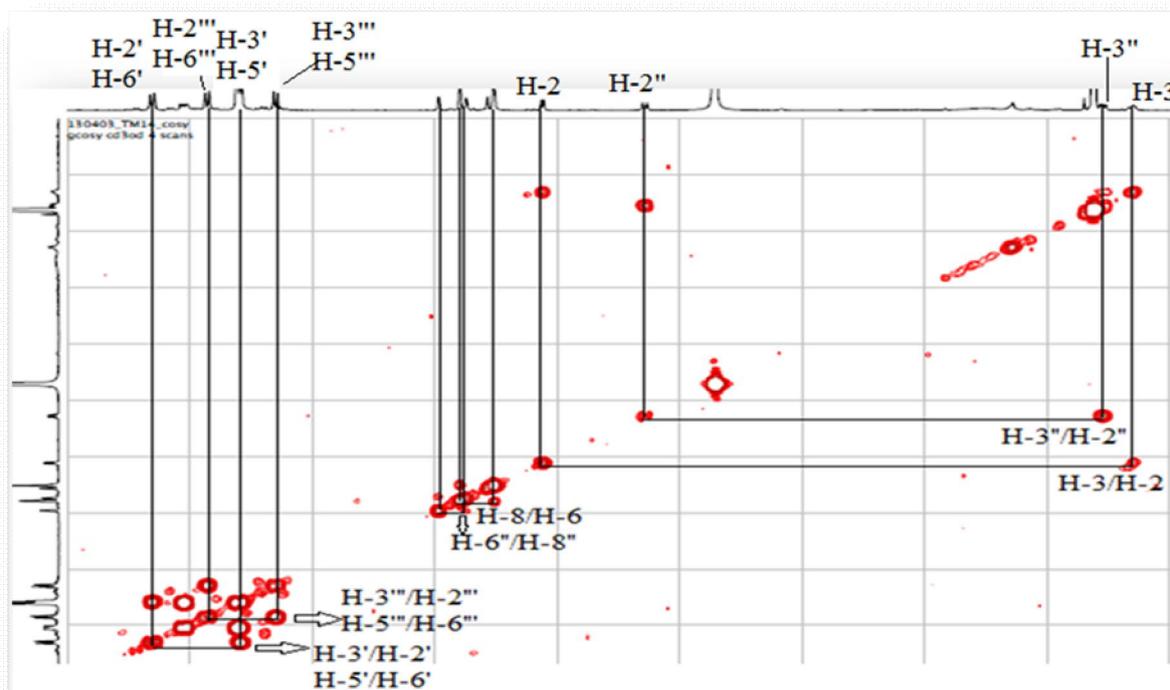
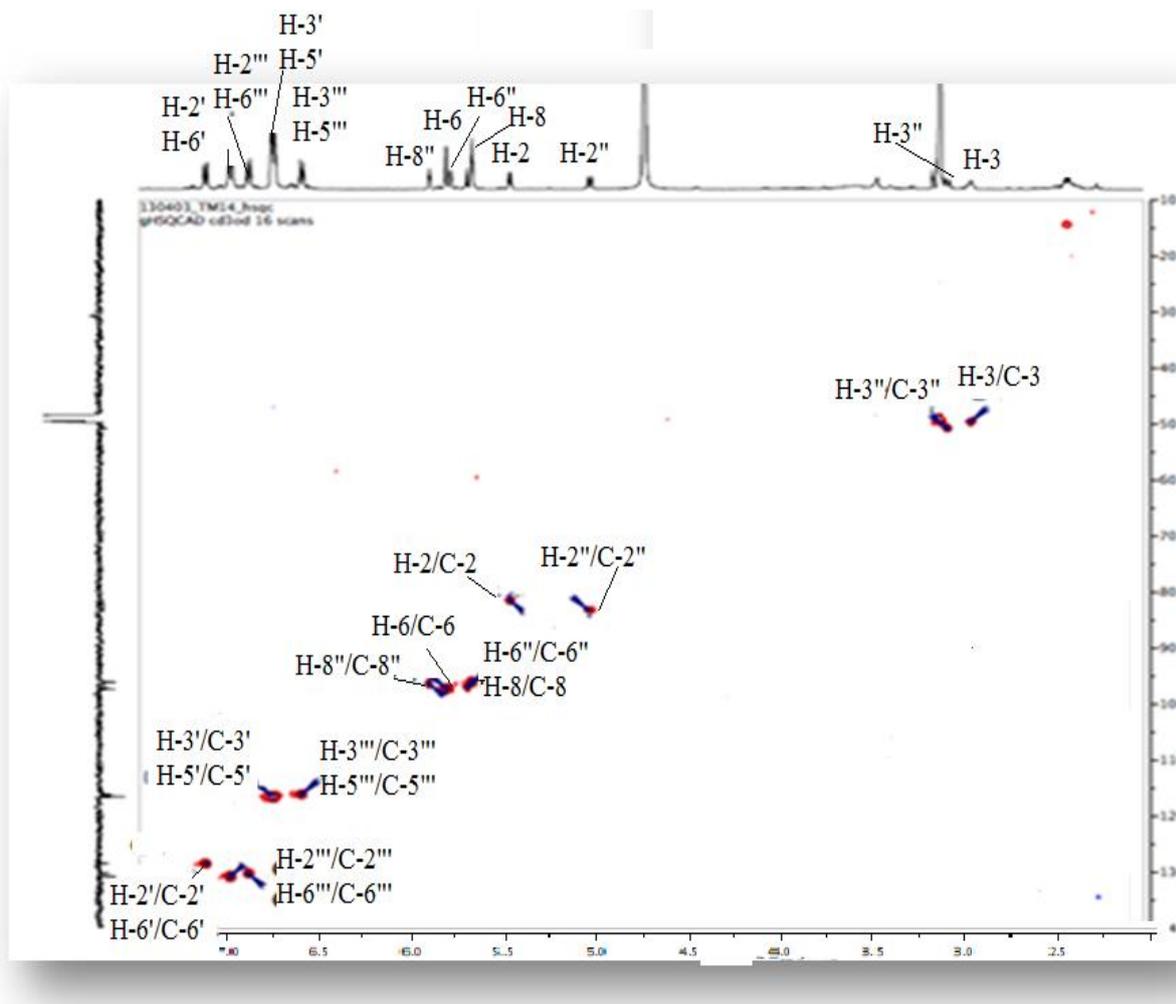


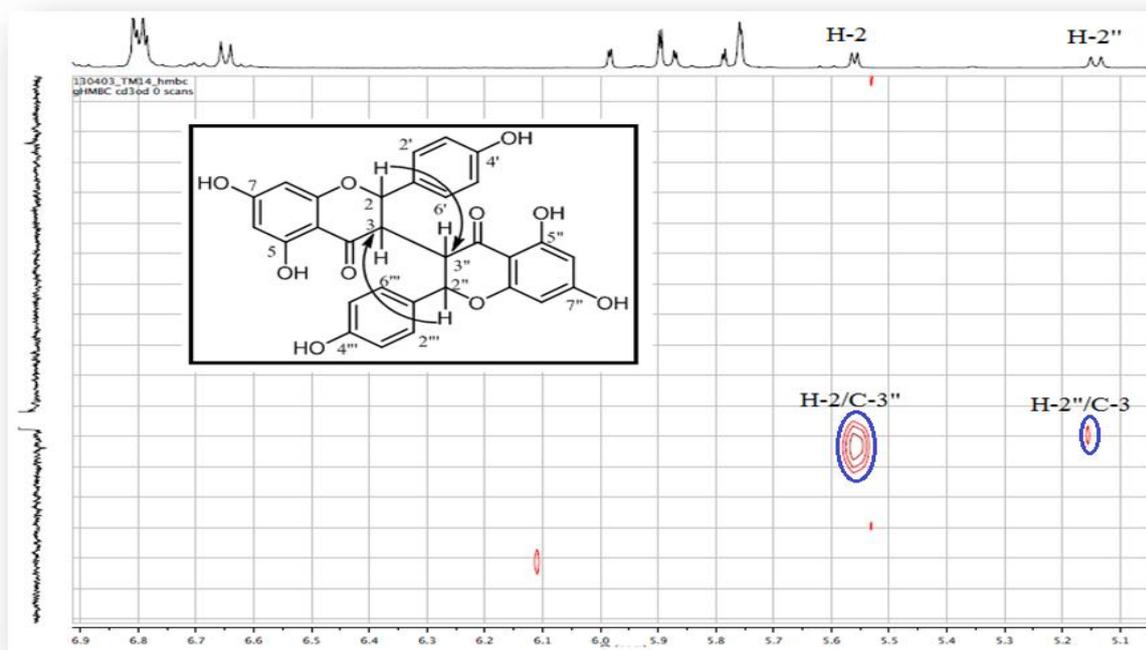
Figure III-75: Spectre COSY du composé D

L'analyse des couplages hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  visualisés sur le spectre HSQC  $J$ -modulé (Figure III-76) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent pour cette molécule à savoir: 128,4 (C-2' et C-6'), 130,2 (C-2''' et C-6'''), 116,5 (C-3' et C-5'), 116,1 (C-3''' et C-5'''), 96,0 (C-8), 96,3 (C-8''), 96,9 (C-6''), 97,3 (C-6), 81,4 (C-2), 83,2 (C-2''), 49,5 (C-3) et 50,7 (C-3'').



**Figure III-76:** Spectre HSQC du composé D

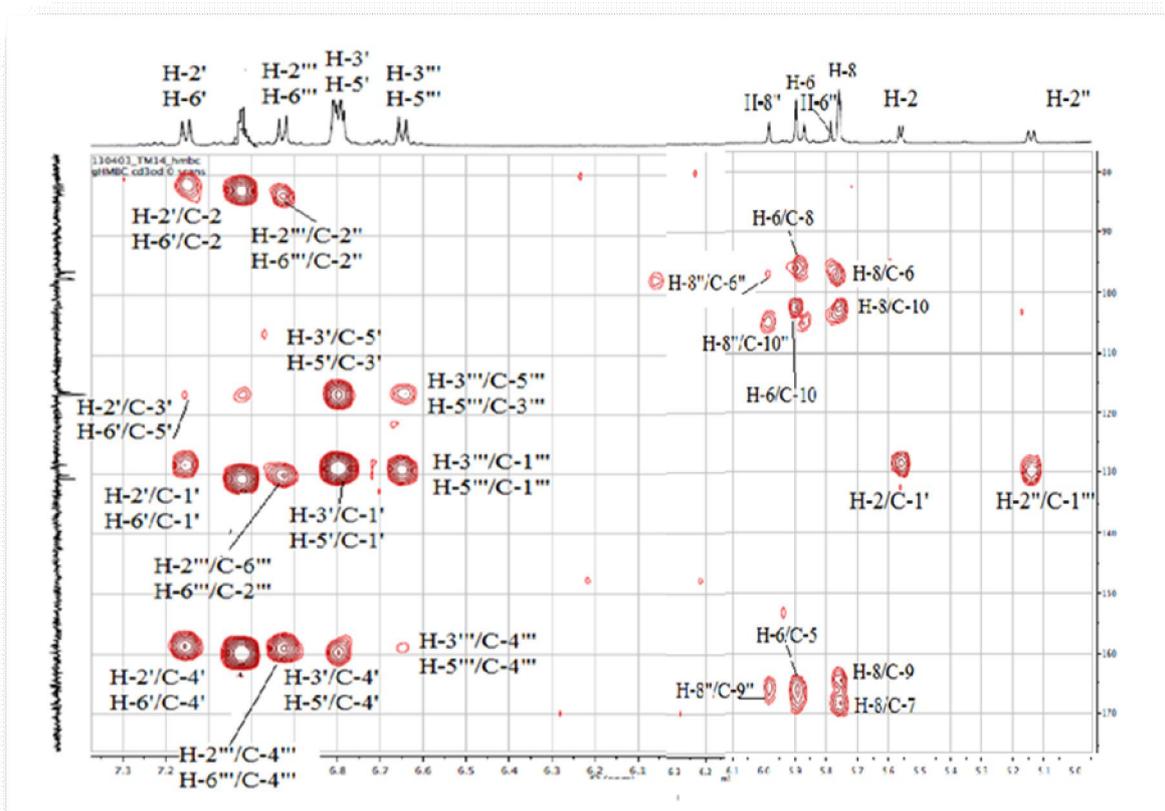
Les corrélations en  $^3J_{H-C}$  observées sur le spectre HMBC (Figure III-77) entre le proton H-2 du cycle C et le carbone C-3'' du cycle C', ainsi entre le proton H-2'' du cycle C' et le carbone C-3 du cycle C, montrent bien que les deux unités flavanones sont attachées en positions C-3, C-3''.



**Figure III-77: Partie du spectre HMBC du composé D**

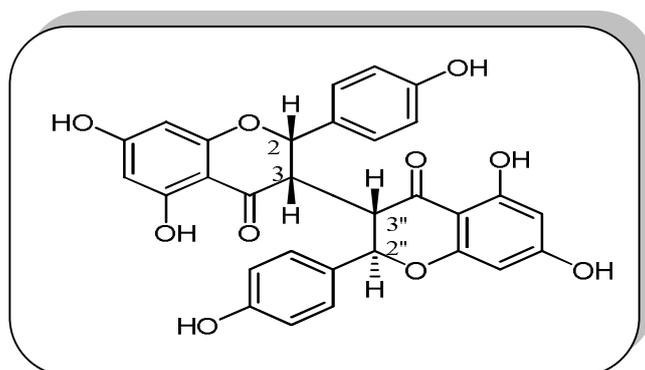
Dans cette expérience (Figure III-78), on rencontre d'autres corrélations entre:

- Les protons H-2' et H-6' avec les carbones résonant à  $\delta_C$  81,4 (C-2), 128,0 (C-1'), 116,5 (C-3' et C-5') et 159,0 (C-4').
- Les protons H-2''' et H-6''' avec les carbones à  $\delta_C$  83,2 (C-2''), 130,2 (C-2''' et C-6''') et 159,7 (C-4''').
- Les protons H-3' et H-5' avec les carbones résonant à  $\delta_C$  128,0 (C-1'), 116,5 (C-3' et C-5') et 159,0 (C-4').
- Les protons H-3''' et H-5''' avec les carbones à  $\delta_C$  128,6 (C-1'''), 116,1 (C-3''' et C-5''') et 159,7 (C-4''').
- Le proton H-8 corrèle avec C-6'' (69,9), C-9'' (164,9) et C-10'' (105,0).
- Le proton H-6 corrèle avec C-5 (165,1), C-8 (96,0) et C-10 (103,6).
- Le proton H-8 corrèle avec C-6 (96,0), C-7 (167,9), C-9 (164,0) et C-10 (103,6).
- Les protons H-2 et H-2'' avec les carbones résonant à  $\delta_C$  128,0 (C-1') et 128,6 (C-1''').

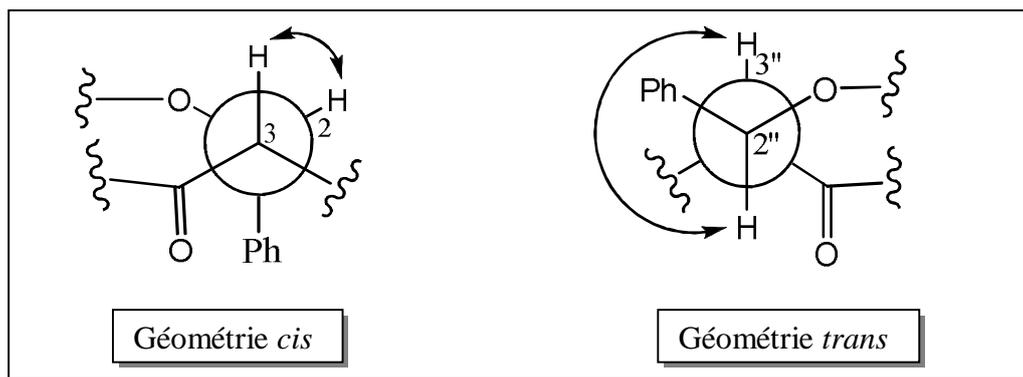


**Figure III-78:** Partie du spectre HMBC du composé D

La stéréochimie relative de ce composé peut être déduite des valeurs des constantes de couplage comme dans le cas du néochamaejasmine A (C). La petite valeur de la constante de couplage entre les protons H-2 et H-3 ( $J_{H_2-H_3} = 4,8$  Hz) implique une stéréochimie *cis* (Figure III-80). D'autre part, La grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-2'' et H-3'' ( $J_{H_2''-H_3''} = 8,9$  Hz) et leurs multiplicités doublet, et doublet de doublets respectivement sont significatives d'une stéréochimie *trans* (Figure III-80). D'après ces résultats la stéréochimie du composé D est déterminée *cis/trans* (Figure III-79) comme il a été trouvé pour des composés similaires [107,114].



**Figure III-79:** Structure du composé D



**Figure III-80:** Stéréochimies *cis* et *trans*

La comparaison entre le pouvoir rotatoire de ce composé mesuré dans le méthanol donnant une valeur de  $+194^\circ$ , ( $c$  0,085) et celui trouvé dans la littérature  $[\alpha]_D +200^\circ$ , ( $c$  0,1, MeOH) [115], confirme bien ces attributions.

Le néochamaejasmine B a été isolé antérieurement à partir des racines de la plante *Stellera chamaejasme* [106,107] et *Wikstroemia indica* [115] de la famille Thymelaeaceae, mais il est identifié pour la première fois dans le genre *Thymelaea*.

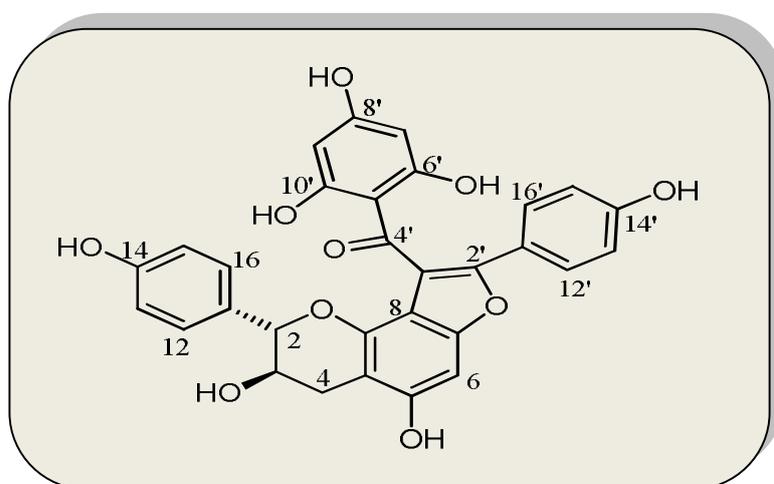
Le tableau (III-4) résume tous les déplacements chimiques des protons et carbones de cette molécule.

**Tableau III-4:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	5,56 ( $d$ ; 4,8)	81,4
3	3,15 ( $dd$ ; 4,8; 3,6)	49,5
4	-	196,1
5	-	165,1
6	5,89 ( $d$ ; 1,8)	97,3
7	-	167,9
8	5,74 ( $d$ ; 1,8)	96,0
9	-	164,0
10	-	103,6
1'	-	128,0
2'	7,15 ( $d$ ; 8,5)	128,4

3'	6,80 (d; 8,5)	116,5
4'	-	159,0
5'	6,80 (d; 8,5)	116,5
6'	7,15 (d; 8,5)	128,4
2"	5,14 (d; 8,9)	83,2
3"	3,28 (dd; 8,9; 3,6)	50,7
4"	-	198,4
5"	-	165,2
6"	5,77 (d; 2,1)	96,9
7"	-	168,0
8"	5,99 (d; 2,1)	96,3
9"	-	164,9
10"	-	105,0
1'''	-	128,6
2'''	6,93 (d; 8,5)	130,2
3'''	6,65 (d; 8,5)	116,1
4'''	-	159,7
5'''	6,65 (d; 8,5)	116,1
6'''	6,93 (d; 8,5)	130,2

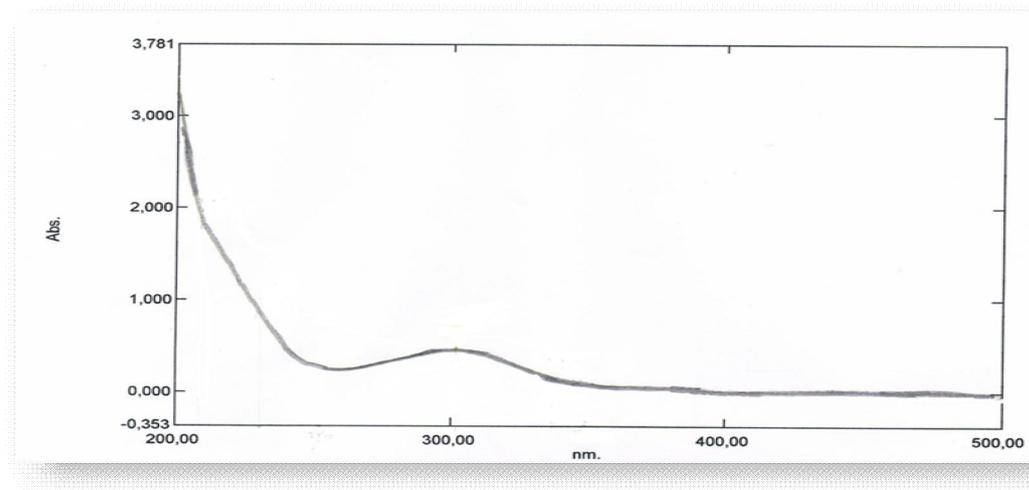
### III-2-7-Identification du composé E



**Daphnodorine B**

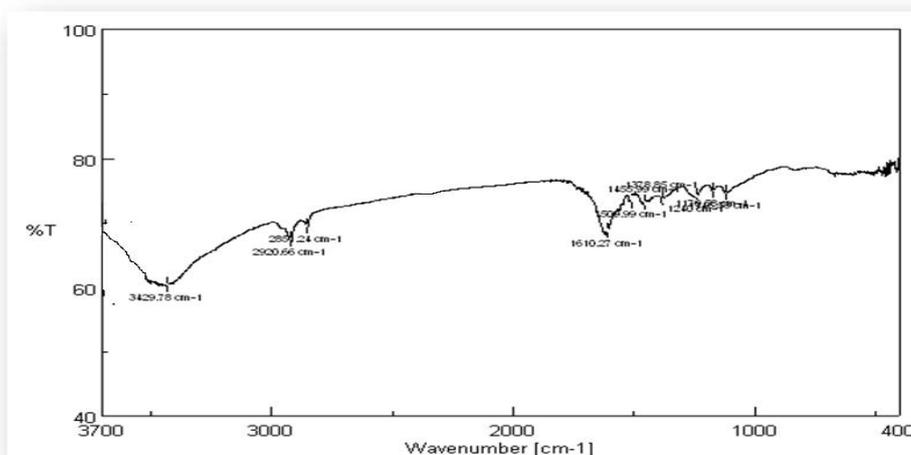
Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune foncée soluble dans le MeOH. Il se révèle en jaune sur CCM après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. En plus de cette coloration, la présence d'une série de signaux de protons sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-85) dans la zone allant de 5,68 à 7,48 ppm suggère que le composé **E** est aussi de nature flavonoïdique.

Le spectre UV (Figure III-81) du composé **E** révèle deux bandes d'absorption maximales à 260 et 302 nm attestant de la présence d'un système aromatique conjugué.



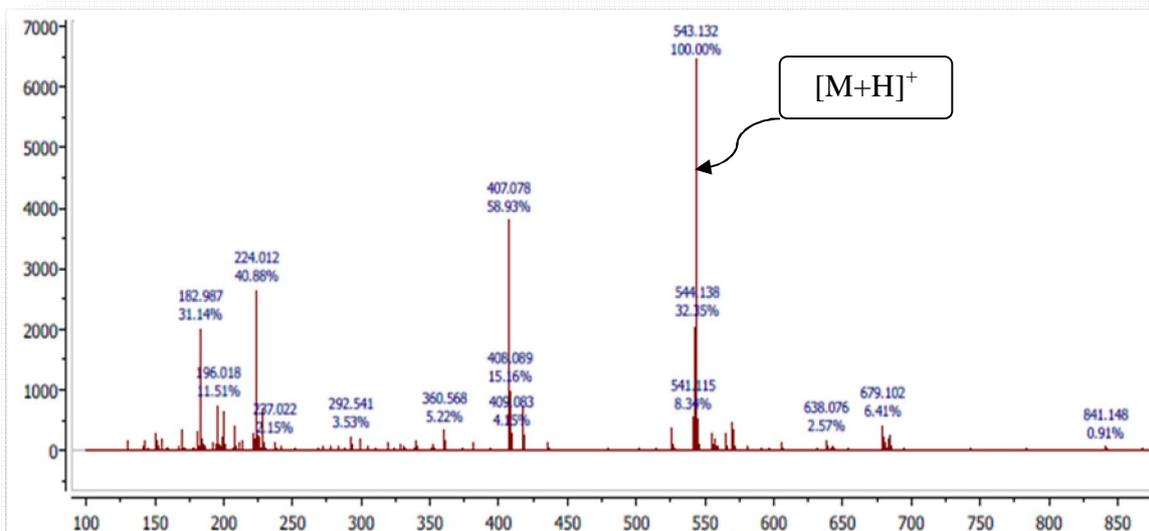
**Figure III-81: Spectre UV du composé E**

Son spectre IR (Figure III-82) présente des bandes d'absorption à 3429  $\text{cm}^{-1}$  d'un groupement hydroxyle, 2920 et 2890  $\text{cm}^{-1}$  d'un système aliphatique, 1650  $\text{cm}^{-1}$  d'un carbonyle et à 1610, 1509  $\text{cm}^{-1}$  d'un système aromatique.

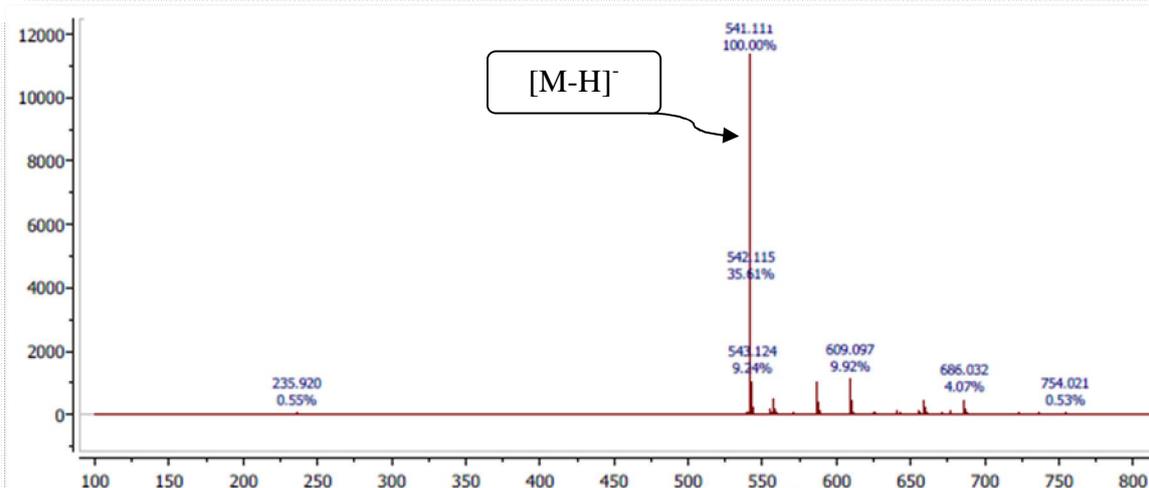


**Figure III-82: Spectre IR du composé E**

Les spectres de masse ESI-MS du composé **E** montrent des pics d'ions pseudomoléculaires en modes positif (Figure III-83) et négatif (Figure III-84) à  $m/z$  543  $[M+H]^+$  et 541  $[M-H]^-$  respectivement qui correspondent à la formule brute  $C_{30}H_{22}O_{10}$ , soit une masse moléculaire  $M = 542$  uma égale à celle des deux composés précédent **C** et **D**. Il s'agit donc de composés isomères.



**Figure III-83:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé **E**

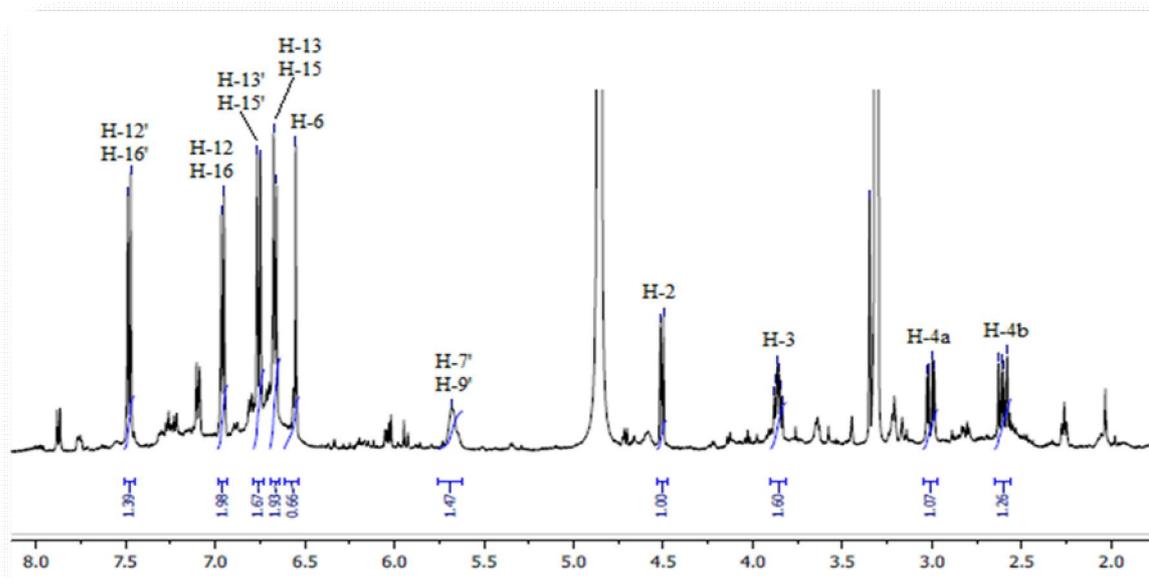


**Figure III-84:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé **E**

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III-85) du composé **E** enregistré dans le MeOD révèle la présence de 10 signaux se répartissant en:

- Quatre signaux déblindés sont détectés entre  $\delta_H$  6,60 et 7,50 sous forme de doublet s'intégrant à 2H chacun correspondant à 8 protons aromatiques.

- Deux singulets déblindés résonant à 6,55 et 5,68 ppm sont attribués aux autres protons aromatiques s'intégrant à 1H et 2H respectivement.
- Quatre signaux d'intégration 1H chacun résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  2,61, 3,01, 3,86 et 4,51 ppm.



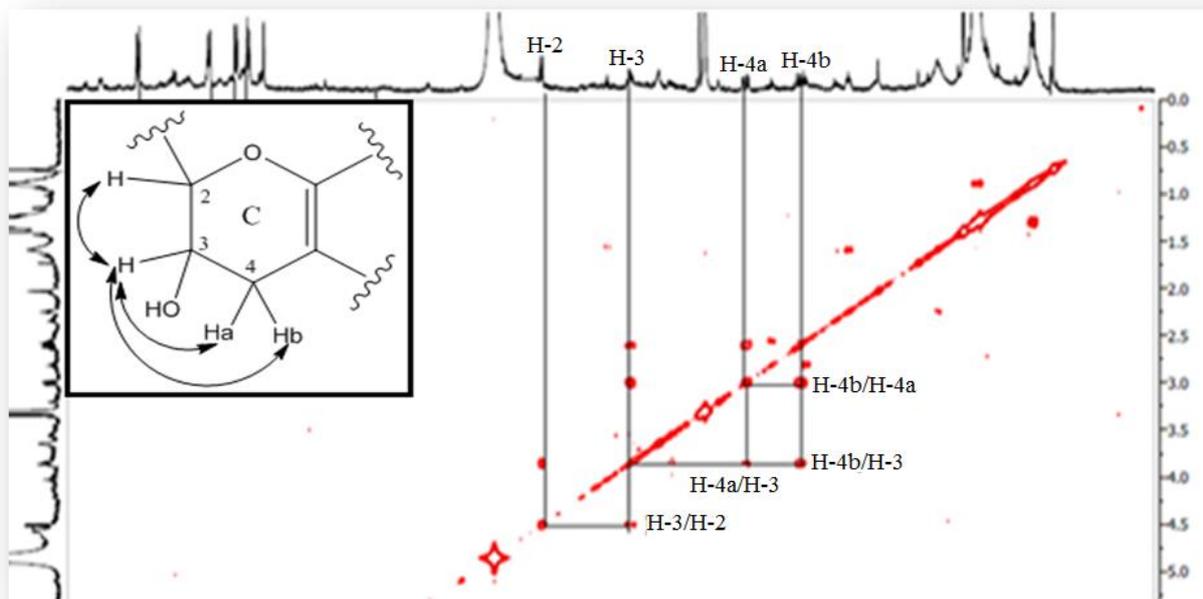
**Figure III-85:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du composé E

La comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-85) de ce produit avec ceux des deux composés néochamaejasmine A (**C**) et néochmaejasmine B (**D**) précédemment identifiés suggère la présence d'un squelette biflavonoïdique. Le nombre élevé de signaux qui apparaît dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-85) du composé **E** montre que ce biflavonoïde est constitué de deux unités structurales différentes.

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-85), COSY (Figures III-86, III-87 et III-91) et HSQC  $J$ -modulé (Figure III-92) permet d'identifier 5 systèmes de spins constituant les enchaînements carbonés suivants:

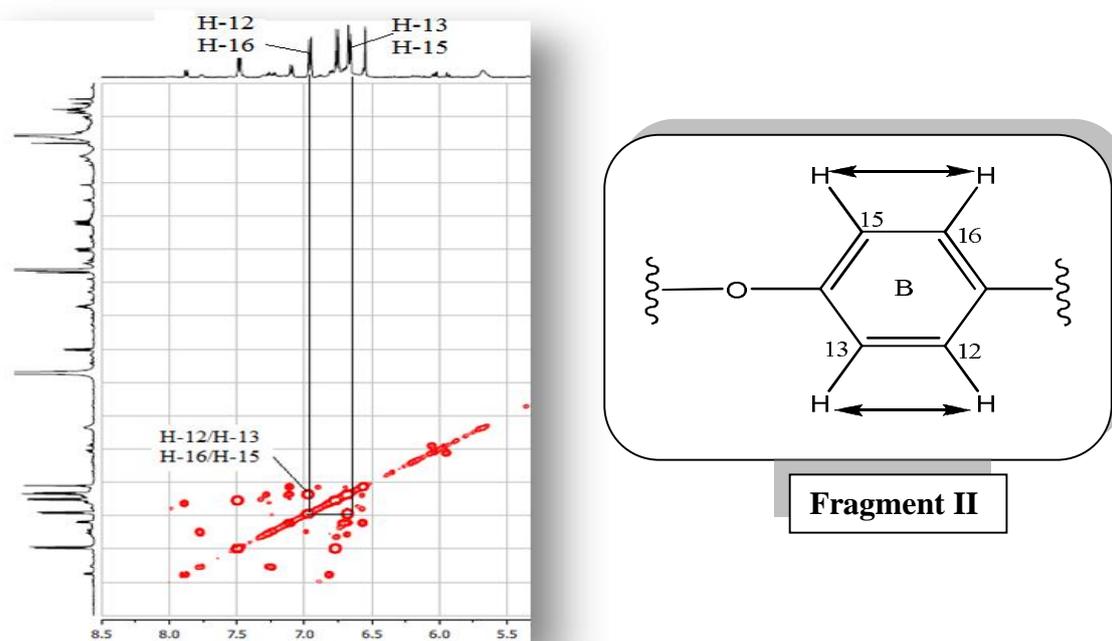
✓ Le proton oxyméthine H-2 résonant à 4,51 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 8,4$  Hz) couple avec le proton H-3 détecté à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 sous forme d'un triplet de doublets ( $J = 8,4$  et 5,6 Hz). Ce dernier corrèle à son tour avec deux autres protons géminés résonant à 3,01 ppm (H-4a) et 2,61 ppm (H-4b) chacun sous forme d'un doublet de doublets avec des constantes de couplage ( $J = 16,2$  et 5,6 Hz) et ( $J = 16,2$  et 8,4 Hz) seccessivement. Leurs carbones sont assignés par expérience HSQC à 82,4 (C-2), 68,7 (C-3) et 29,7 (C-4). Toutes ces caractéristiques spectrales indiquent que ce système de spins correspond au cycle C des

composés polyphénoliques de type catéchine [116], en déduisant alors le fragment structural I (Figure III-86).



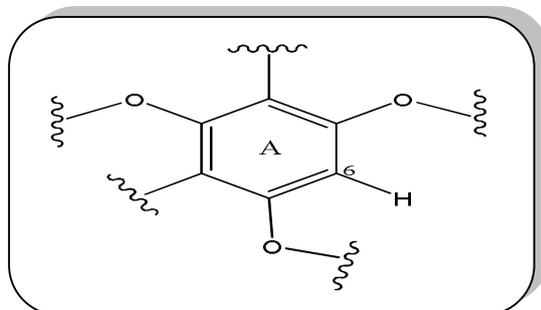
**Figure III-86:** Couplages COSY des protons au niveau du cycle C (Fragment I)

✓ Les protons aromatiques équivalents H-12/H-16 ( $\delta_{\text{H}}$  6,96;  $J = 8,5$  Hz) couplent sur le spectre COSY (Figure III-87) avec les protons H-13/H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  6,67;  $J = 8,5$  Hz) respectivement. Ces protons font partie d'un système  $A_2B_2$  témoignant de la présence d'un noyau aromatique para-substitué (Fragment II). L'expérience HSQC permet de localiser les carbones C-12 et C-16 à  $\delta_{\text{C}}$  128,7 et C-13 et C-15 à  $\delta_{\text{C}}$  115,4 du cycle B.



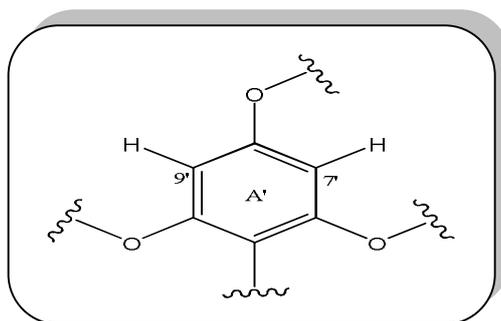
**Figure III-87:** Couplage COSY des protons aromatiques H-12, H-16/H-13, H-15

✓ Un proton aromatique résonant à 6,55 ppm sous forme d'un singlet appartenant à un système de spins isolé. Son carbone est déterminé par expérience HSQC à  $\delta_C$  90,4. Les valeurs de déplacements chimiques de ce groupement méthine révèlent qu'il s'agit de CH-6 du cycle A [103], ce qui permet de proposer le fragment III (Figure III-88).



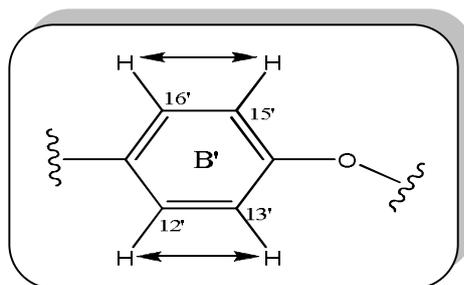
**Figure III-88: Fragment III**

✓ Un signal singlet d'intégration 2H repéré à  $\delta_H$  5,68 est attribué à deux protons aromatiques équivalents ne présentant aucun couplage sur le spectre COSY constituant le fragment IV (Figure III-89). Leurs carbones sont détectés sur le spectre HSQC à  $\delta_C$  95,4 (cycle A').

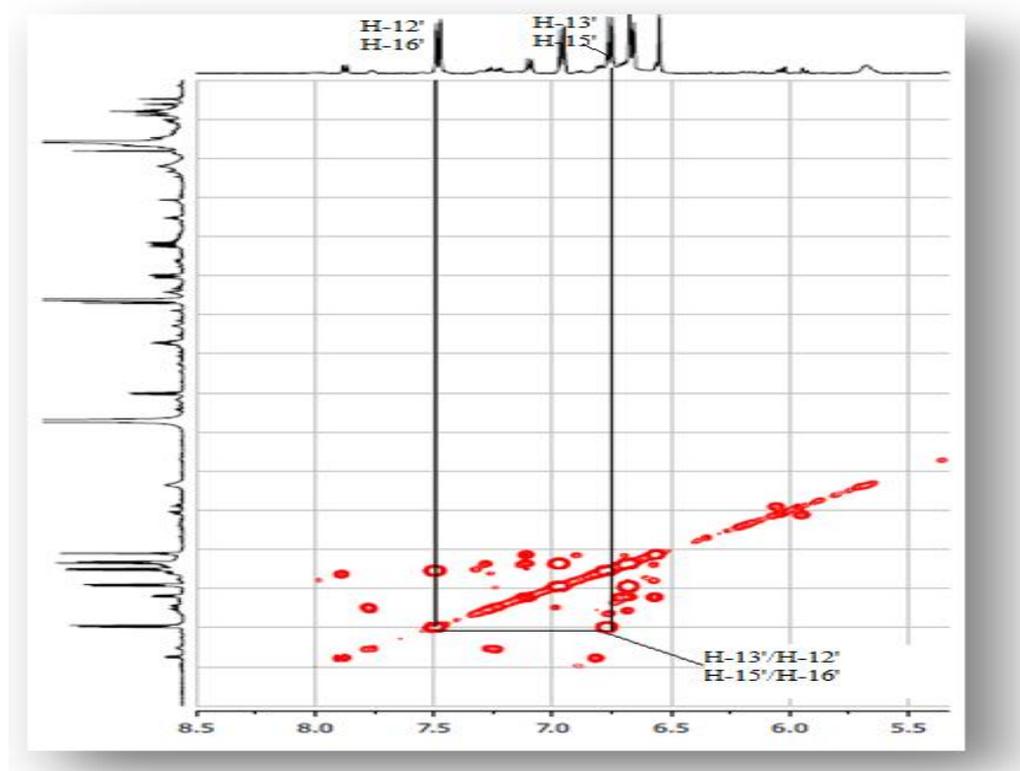


**Figure III-89: Fragment IV**

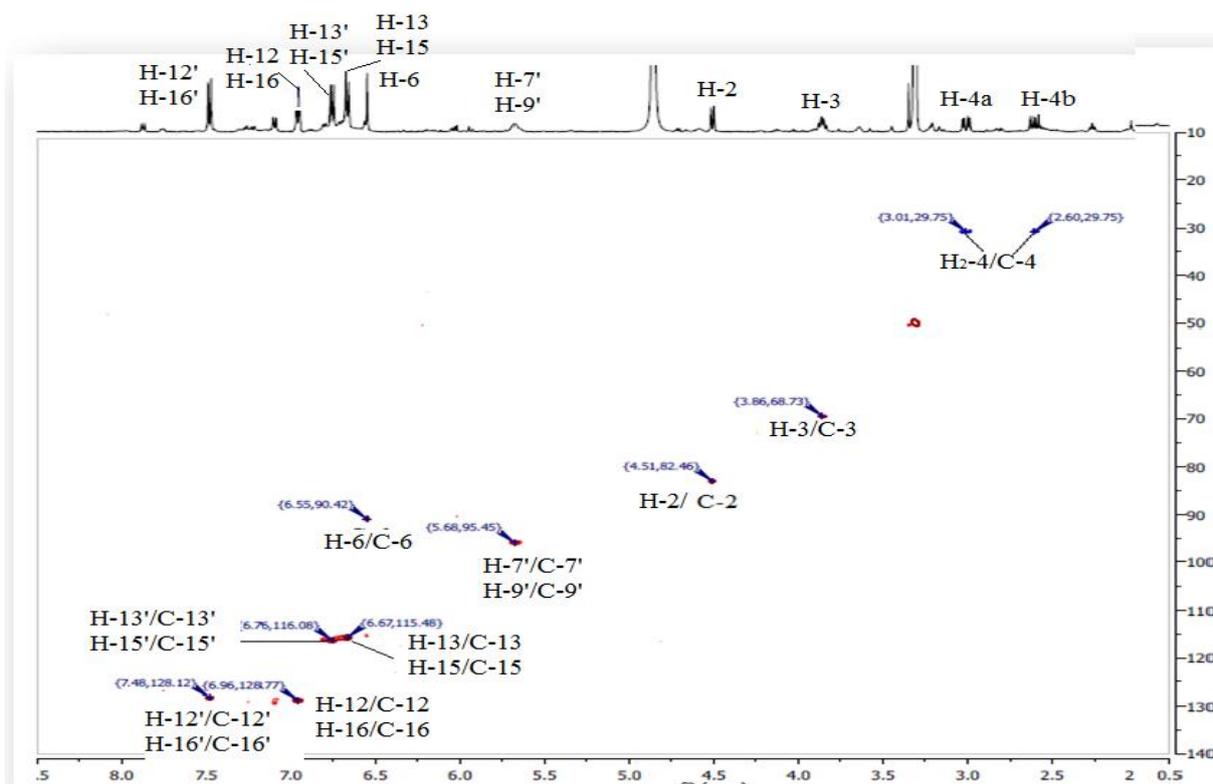
✓ Un deuxième système de spins  $A_2B_2$  composé des protons H-12'/H-16' à  $\delta_H$  7,48 ( $d, J = 8,8$  Hz) et H-13'/H-15' à  $\delta_H$  6,76 ( $d, J = 8,8$  Hz) est visualisé aussi sur le spectre COSY. Les carbones correspondant sont assignés par expérience HSQC à  $\delta_C$  128,1 (C-12' et C-16') et 116,0 (C-13' et C-15'), ce qui conduit au fragment V (cycle B') (Figures III-90 et III-91).



**Figure III-90: Fragment V**



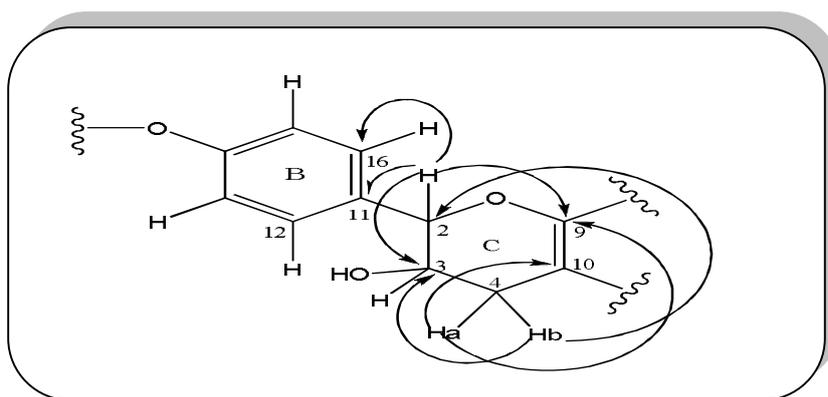
**Figure III-91:** Couplage COSY des protons aromatiques H-12', H-16'/H-13', H-15'



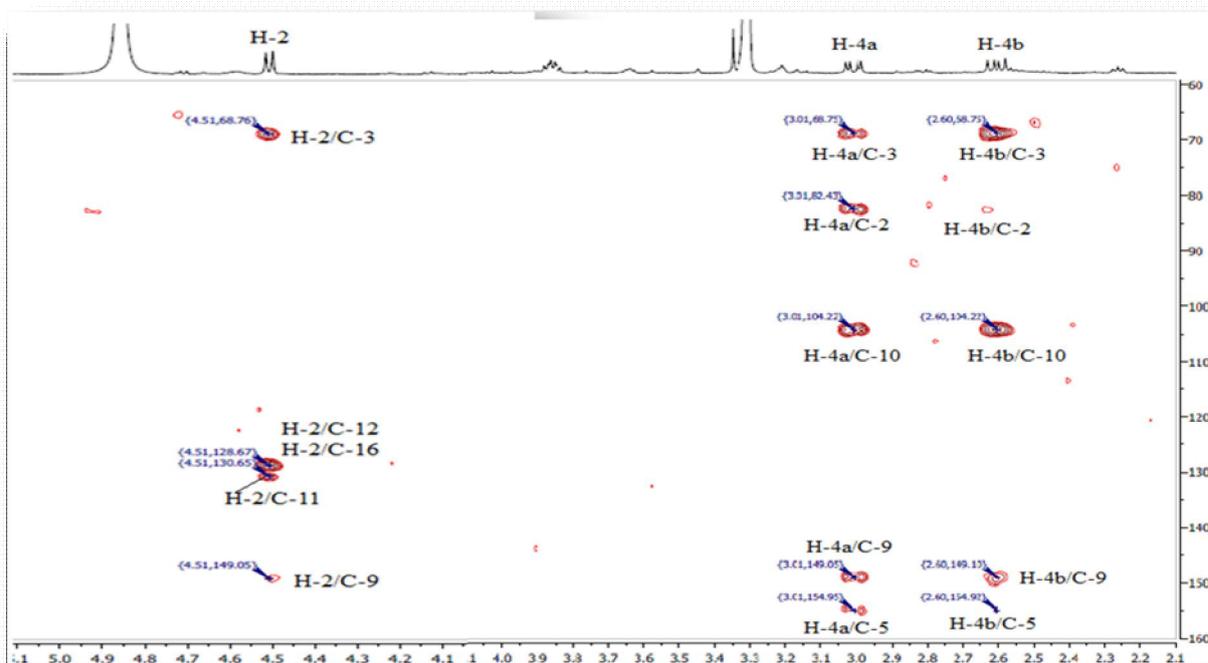
**Figure III-92:** Spectre HSQC du composé E

Ces éléments structuraux confirment bien que le composé **E** est un biflavonoïde comportant deux unités structurales différentes. Notre analyse va consister tout d'abord à caractériser ces

deux unités séparément. Pour cela l'expérience HMBC s'avère très utile pour l'élaboration structurale de ce composé. En effet, le proton H-2 ( $\delta_H = 4,51$ ) du cycle C corrèle en  $^2J$  sur le spectre HMBC (Figures III-93 et III-94) avec un carbone aromatique quaternaire attribuable au carbone C-11 ( $\delta_C 130,6$ ) et en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire oxygéné résonnant à  $\delta_C 149,0$  ne pouvant être que le carbone C-9. Ce proton présente d'autres corrélations avec les carbones C-12 et C-16 (128,7 ppm) et C-3 (68,7 ppm). Les protons géminés H<sub>2</sub>-4 ( $\delta_C 3,01$  et 2,61) présentent des taches de corrélation sur le spectre HMBC avec les carbones C-2 (82,4 ppm), C-3 (68,7 ppm), C-9 (149,0 ppm) et C-10 (104,0 ppm).



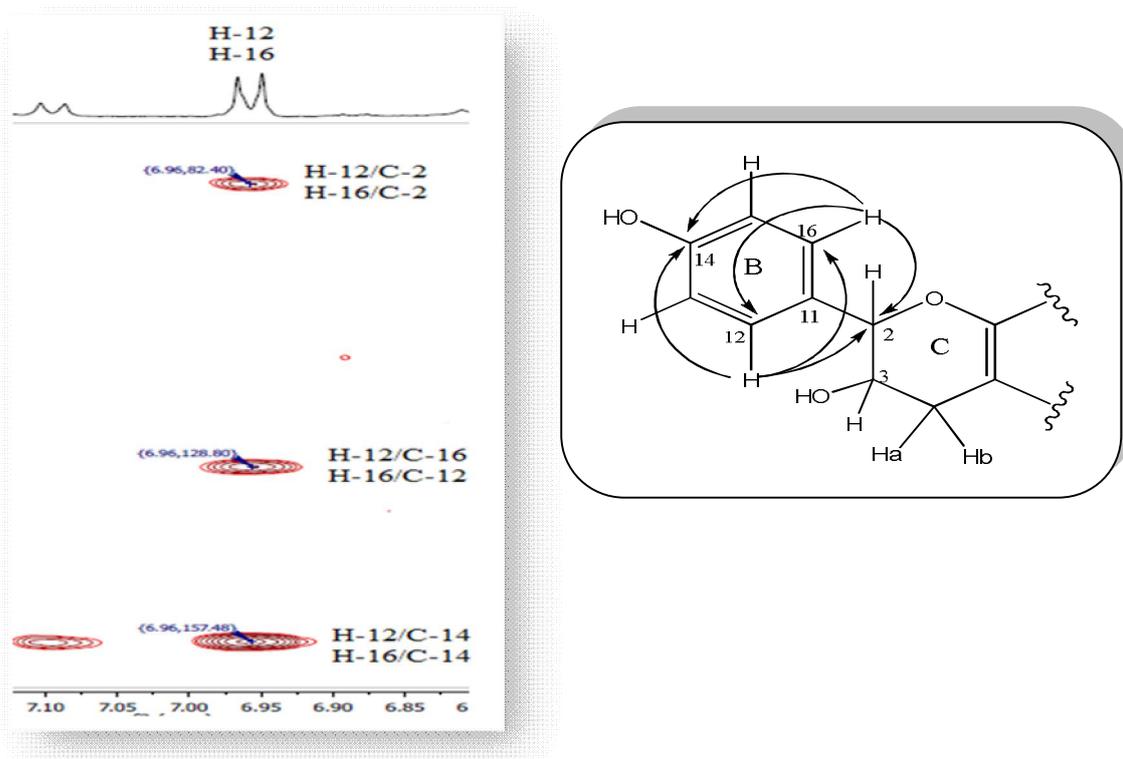
**Figure III-93: Corrélations HMBC du composé E**



**Figure III-94: Partie du spectre HMBC du composé E**

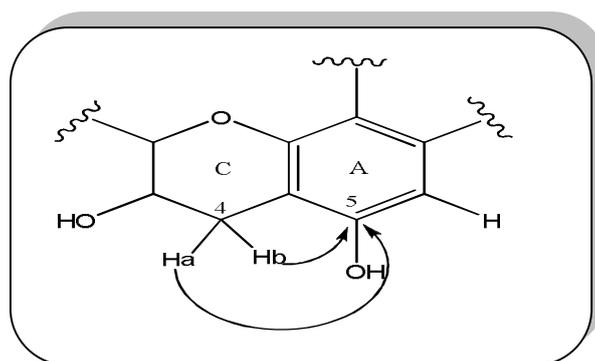
Les protons aromatiques H-12 et H-16 montrent des taches de corrélation avec les carbones C-2 et C-14 résonnant à  $\delta_C 82,4$  et 157,4 ppm respectivement. Le déplacement chimique

déblindé du carbone C-14 suggère qu'il est lié à un groupement OH libre (Figure III-95). Ceci permet de relier les deux fragments structuraux (I et II) correspondant aux cycles C et B.



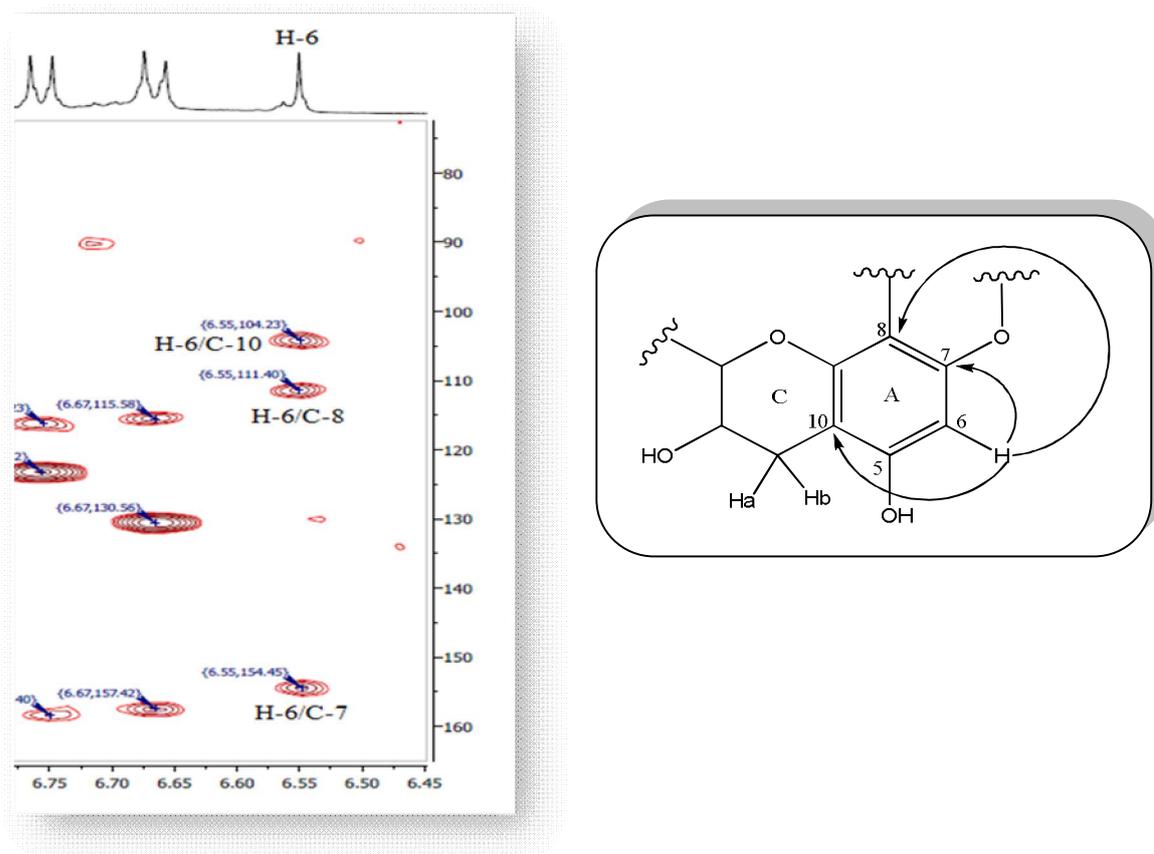
**Figure III-95:** Corrélations HMBC du composé E (Cycles B et C)

Les protons géminés H<sub>2</sub>-4 corrélerent en HMBC (Figures III-96) avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C$  154,9 (C-5), son déplacement chimique déblindé implique que ce carbone porte un groupement hydroxyle.



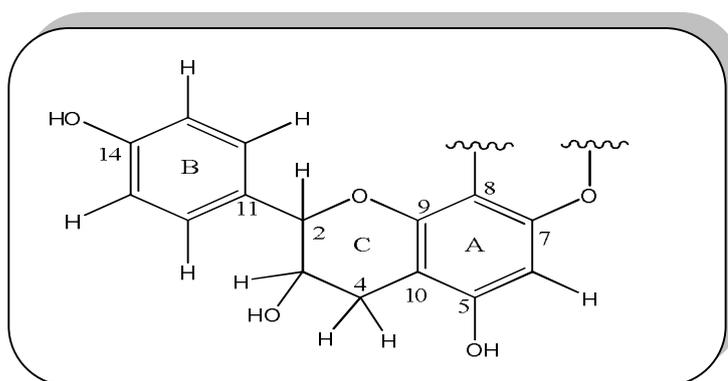
**Figure III-96:** Corrélations HMBC des protons H<sub>2</sub>-4 avec le C-5

Par ailleurs, le proton H-6 du cycle A présente des taches de corrélation en  $^3J$  avec les carbones C-8 (111,4 ppm) et C-10 (104,0 ppm) et en  $^2J$  avec le carbone C-7 (154,4 ppm) (Figure III-97). La valeur de déplacement chimique du carbone quaternaire C-8 (111,4 ppm) indique que ce dernier est engagé dans une liaison de type carbone-carbone.



**Figure III-97:** Correlations HMBC du composé E

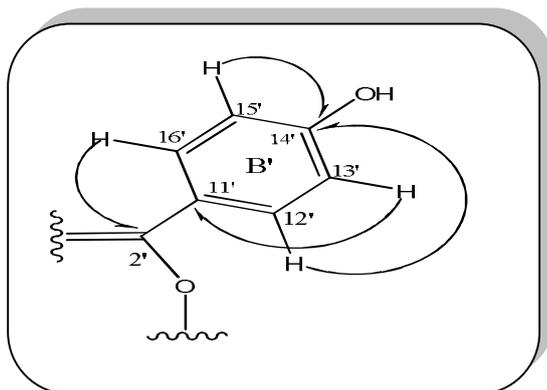
A ce stade d'analyse tous les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B et C ont été déterminés. Les corrélations HMBC ont permis de déduire la nouvelle unité structurale (Figure III-98) reliant les fragments I, II et III identifiés précédemment. Il s'agit bien d'un dérivé de la catéchine (Fragment VI) constituant la première unité de ce biflavonoïde.



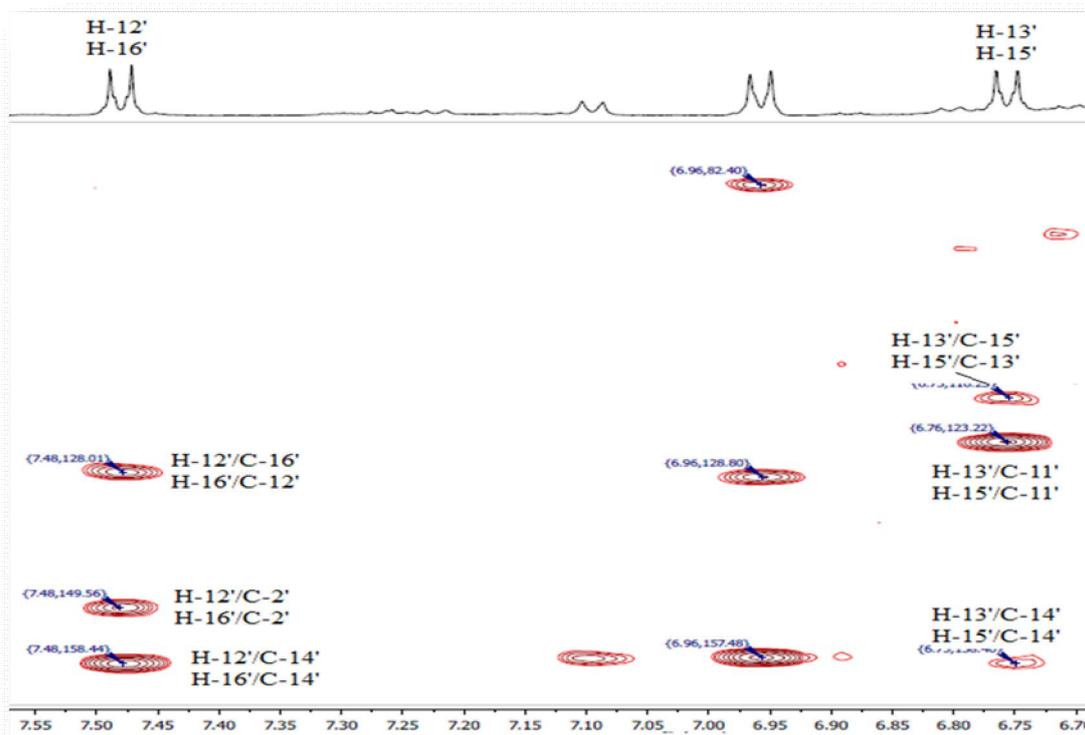
**Figure III-98:** Fragment VI

Les signaux restants en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  constituent la deuxième unité de ce biflavonoïde. L'élaboration structurale de cette unité se fait principalement par l'exploitation des spectres HMBC et masse et par comparaison avec les données de la littérature. En effet, l'expérience

HMBC (Figure III-99) montre une tache de corrélation en  $^3J$  entre les protons H-12' et H-16' du cycle B' (Fragment V) et un carbone aromatique oxygéné détecté à  $\delta_C$  158,4, ne pouvant être que le carbone C-14'. Ce dernier présente aussi une tache de corrélation avec les protons H-13' et H-15'. Ces protons corrélent à leur tour avec un carbone quaternaire non oxygéné à  $\delta_C$  123,2 ppm attribuable au carbone aromatique C-11'. En plus de ces corrélations, un carbone quaternaire oxygéné repéré à 149,5 ppm corréle en  $^3J$  avec les protons H-12' et H-16' attribuable au carbone C-2' (Figures III-99 et III-100).



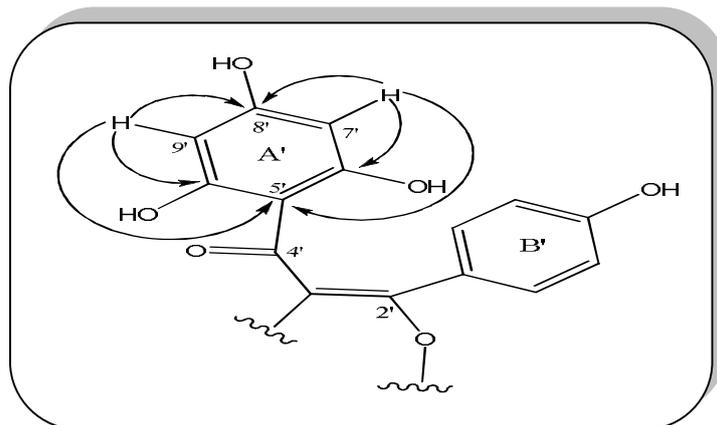
**Figure III-99:** Corrélations HMBC au niveau du cycle B'



**Figure III-100:** Partie du spectre HMBC du composé E

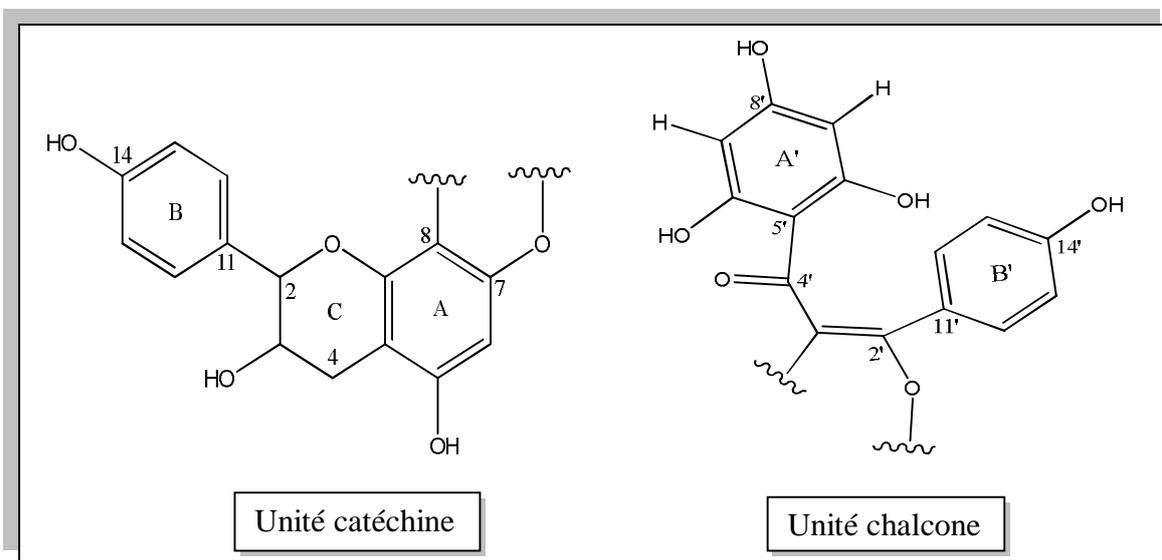
Le carbone C-2' fait partie d'une double liaison éthylénique (-C-2'=C-3'-). Le carbone C-3' résonne à  $\delta_C$  119,0. La différence de déplacement chimique de 30 ppm par rapport au carbone

C-2' indique l'existence d'un système énone  $-C^2=C^3-C^4=O$ . Le carbone C-4' est repéré à 197,2 ppm. La valeur de son déplacement chimique atteste que ce carbonyle est lié à un noyau aromatique [117] qui est le cycle A' déjà identifié (Fragment IV). Les carbones du cycle A' sont assignés à  $\delta_C$  168,3 (C-5'), 167,0 (C-6'), 168,0 (C-8') et 167,0 (C-10') par expérience HMBC, suite aux corrélations que présentent les protons H-7' et H-9' avec ces carbones (Figure III-101) et par comparaison avec des composés apparentés [118,119]. Ceci permet de former la 2<sup>ème</sup> unité structurale de ce biflavonoïde identifié à un dérivé de la chalcone (Fragment VII).



**Figure III-101:** Corrélations HMBC du composé E

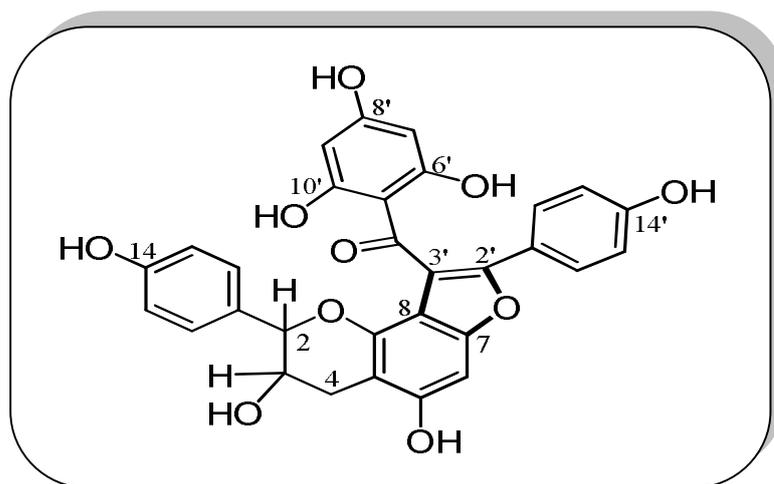
A l'issue de cette analyse, les deux unités structurales de ce biflavonoïde sont élaborées comme suit (Figure III-102):



**Figure III-102:** Squelette des deux unités structurales du composé E

En se basant sur la formule brute de ce composé  $C_{30}H_{22}O_{10}$  impliquant 20 degrés d'insaturation et comme nous avons déjà identifié 5 cycles à 6 chaînons et 14 doubles liaisons, il reste donc à attribuer 1 insaturation. Cette dernière correspondrait à un cycle

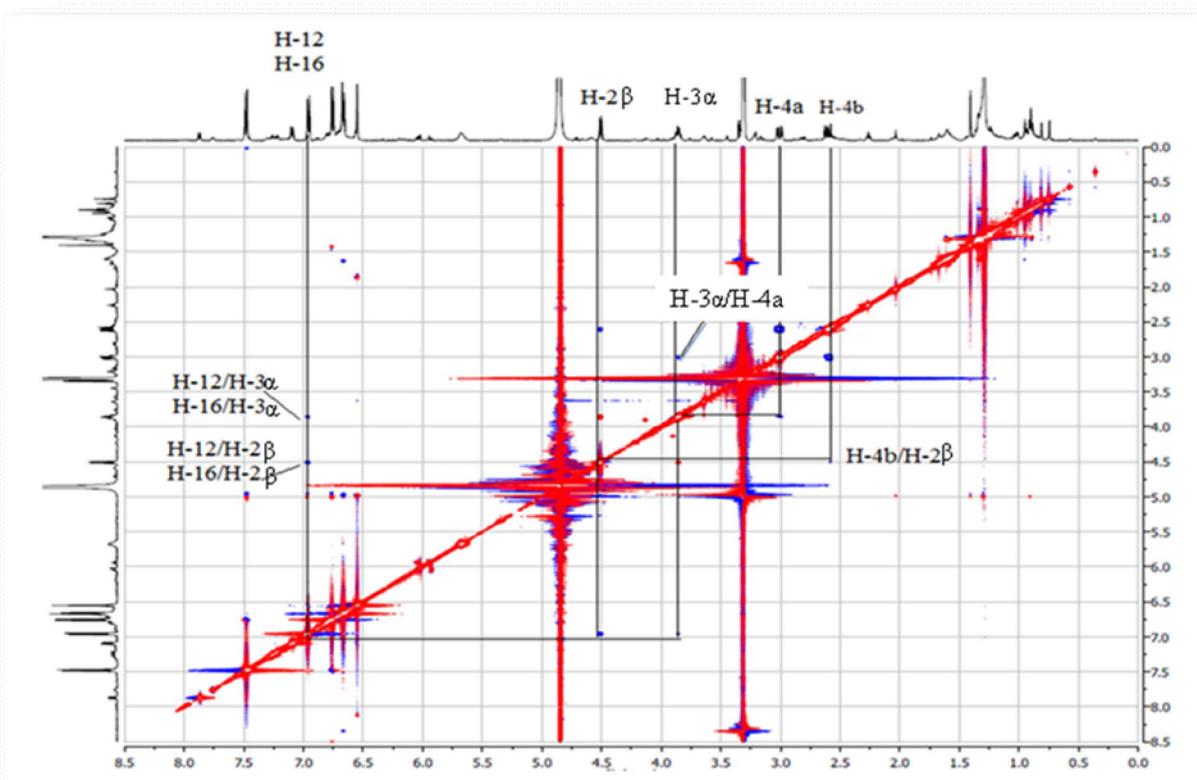
supplémentaire. En se référant aux données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des furanobiflavonoïdes qui ont été isolés à partir de l'espèce *Daphne odora* de la famille Thymelaeaceae à savoir le daphnodorine A [119], nous pouvons déduire que le composé **E** est très similaire à ces composés. Il en résulte que le composé **E** est un furanobiflavonoïde obtenu par la connection entre les deux unités catechine et chalcone par l'intermédiaire des carbones C-3'/C-8 et C-2'/C-7 (Figure III-103) menant à la formation d'un cycle furane.



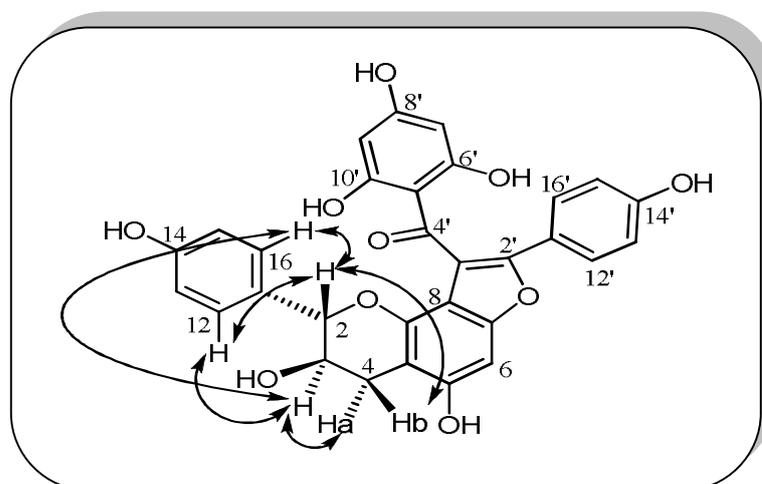
**Figure III-103:** Structure plane du composé **E**

La détermination de la configuration relative du composé en question au niveau des carbones chiraux C-2 et C-3 a été établie par des considérations biogénétiques ainsi que par l'analyse du spectre ROESY (Figures III-104 et III-105), et la mesure des valeurs des constantes de couplage. La configuration au niveau du carbone C-2 est déterminée ( $2R$ ) au regard des considérations de biogénèse comme il a été observé dans les composés de type flavanol [120]. Ceci permet d'attribuer une orientation  $\beta$  au proton H-2. La valeur de la constante de couplage du proton H-2 ( $J_{\text{H-2/H-3}} = 8,4$  Hz) indique une stéréochimie *trans* entre H-2/H-3 [121] traduisant alors une orientation  $\alpha$  du proton hydroxyméthine H-3. Par conséquent la configuration du carbone C-3 est ( $3S$ ).

Sur le spetre ROESY (Figure III-104) du composé **E**, le proton H-2  $\beta$ -orienté corrèle avec le proton H-4b ( $\delta_{\text{H}} 2,61$ ), ce qui permet de déduire que ce dernier est d'orientation  $\beta$ . La tache de corrélation entre H-3 $\alpha$  et H-4a ( $\delta_{\text{H}} 3,01$ ) implique une orientation  $\alpha$  pour le proton H-4a. En outre, les deux protons H-2 $\beta$  et H-3 $\alpha$  montrent également des taches de corrélations ROESY avec les protons aromatiques avoisinants H-12 et H-16 du cycle B.



**Figure III-104:** Spectre ROESY du composé E



**Figure III-105:** Principales corrélations ROESY observées pour le composé E

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III-5) et la mesure du pouvoir rotatoire dans le méthanol donnant une valeur de  $[\alpha]_D = -27,27^\circ$  confirme bien qu'il s'agit du daphnodorine B. Ce furanobiflavonoïde est isolé dans le genre *Thymelaea* pour la première fois. Il a été trouvé antérieurement dans trois espèces du genre *Daphne* à savoir : *D. genkwa* [118], *D. odora* [119] et *D. giraldii* [122] et *Edgeworthia chrysantha* [123] de la famille Thymelaeaceae.

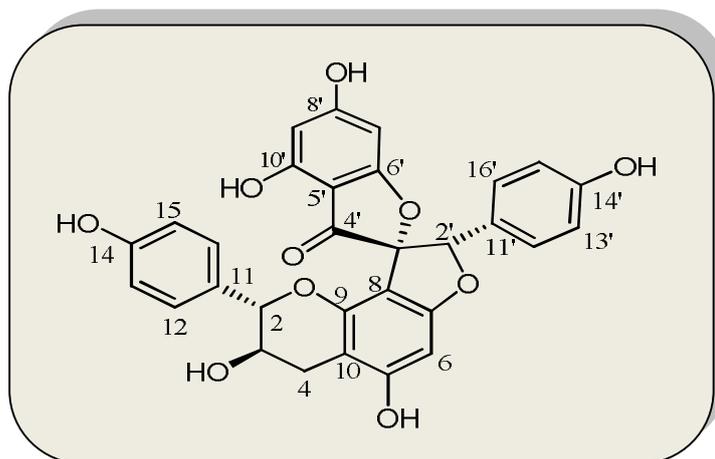
Le tableau (III-5) ci-dessous englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbonés de ce composé.

**Tableau III-5:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé E dans MeOD

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4,51 ( <i>d</i> ; 8,4)	82,4
3	3,86 ( <i>td</i> ; 8,4; 5,6)	68,7
4	3,01 ( <i>dd</i> ; 16,2; 5,6; H-4a), 2,61 ( <i>dd</i> ; 16,2; 8,4; H-4b)	29,7
5	-	154,9
6	6,55 ( <i>s</i> )	90,4
7	-	154,4
8	-	111,4
9	-	149,0
10	-	104,0
11	-	130,6
12	6,96 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,7
13	6,67 ( <i>d</i> ; 8,5)	115,4
14	-	157,4
15	6,67 ( <i>d</i> ; 8,5)	115,4
16	6,96 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,7
2'	-	149,5
3'	-	119,0
4'	-	197,2
5'	-	168,3
6'	-	167,0
7'	5,68 ( <i>s</i> )	95,4
8'	-	168,0
9'	5,68 ( <i>s</i> )	95,4
10'	-	167,0
11'	-	123,2
12'	7,48 ( <i>d</i> ; 8,8)	128,1
13'	6,76 ( <i>d</i> ; 8,8)	116,0

14'	-	158,4
15'	6,76 (d; 8,8)	116,0
16'	7,48 (d; 8,8)	128,1

### III-2-8-Identification du composé F



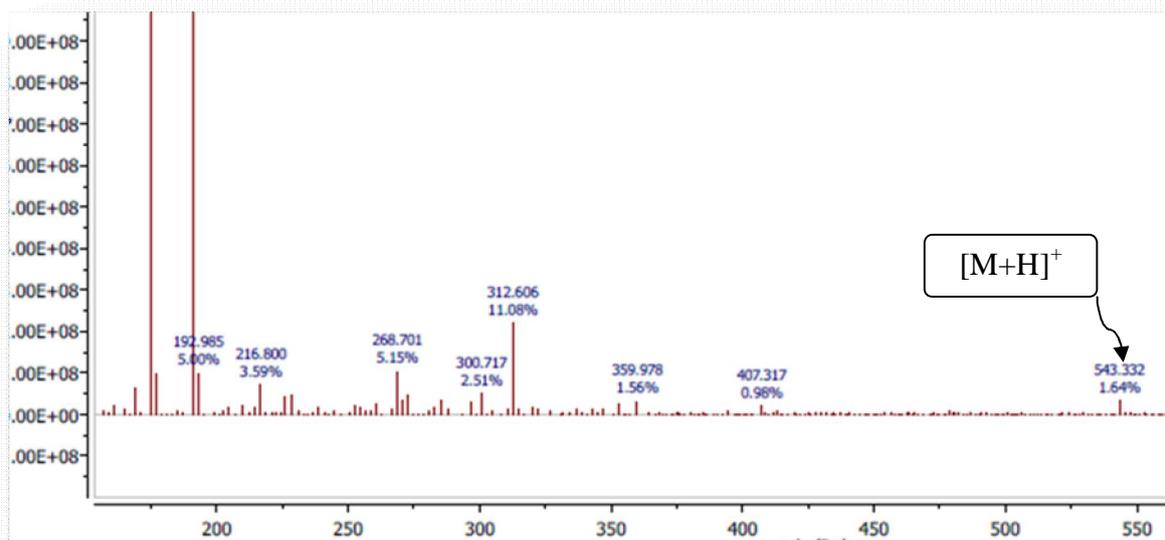
**Genkwanol A**

Le composé **F** est obtenu sous forme d'une poudre amorphe jaune pâle soluble dans le méthanol. Il montre sur CCM une tache visible à 254 et 366 nm et se colore en jaune après révélation par l'acide sulfurique et chauffage.

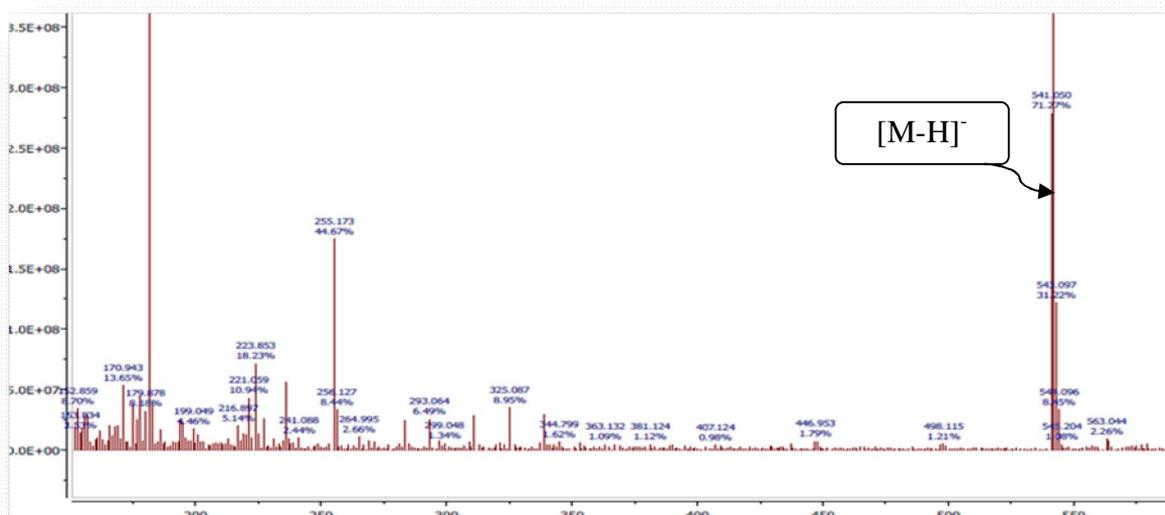
Ce spirobiflavonoïde est identifié aussi pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Il a été isolé antérieurement des racines de l'espèce *Daphne genkwa* de la famille Thymelaeaceae [124]. Une étude biologique réalisée sur les tiges de cette espèce a montré qu'elle présente une activité anti-inflammatoire remarquable [125].

Son spectre UV enregistré dans le méthanol présente deux bandes d'absorptions maximales à 216 et 294 nm caractéristiques d'un système aromatique conjugué. Le spectre IR de ce composé montre des bandes d'absorption à  $3300\text{ cm}^{-1}$  (groupement hydroxyle),  $1652\text{ cm}^{-1}$  (carbonyle) et  $1615$  et  $1520\text{ cm}^{-1}$  (système aromatique).

Les spectres de masse ESI-MS du composé **F** enregistrés en modes positif (Figure III-106) et négatif (Figure III-107), révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  543  $[M+H]^+$  et 541  $[M-H]^-$  respectivement, correspondant à une masse moléculaire de 542 uma et une formule brute en  $C_{30}H_{22}O_{10}$ . La masse moléculaire  $M = 542$  Da indique que ce composé est aussi un isomère aux composés identifiés précédemment **B**, **C**, **D** et **E**.

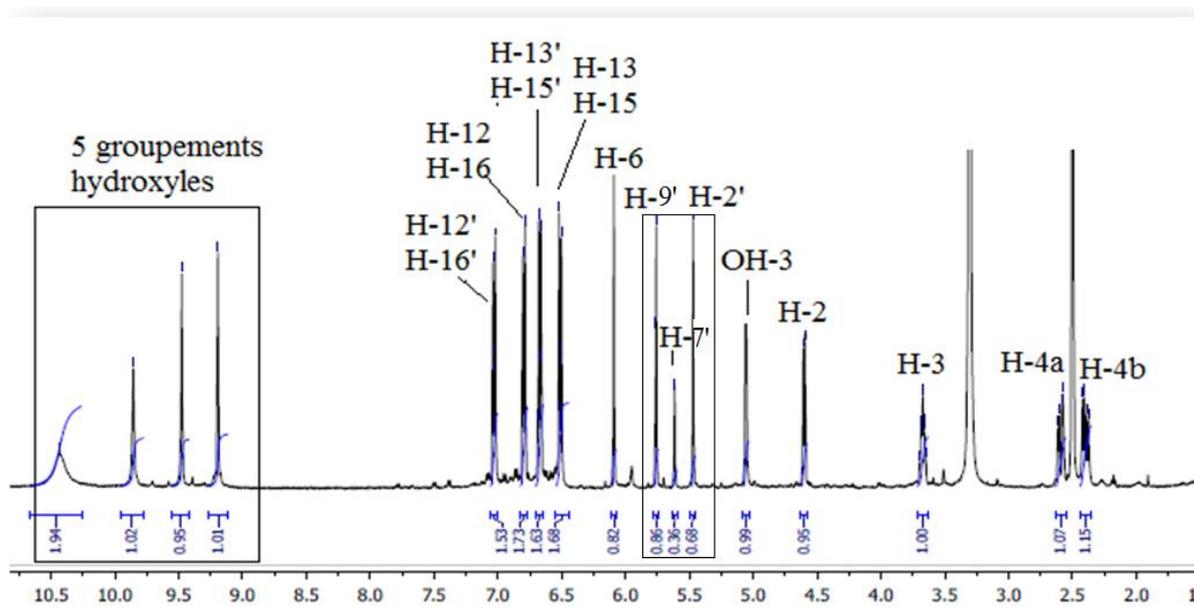


**Figure III-106:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé **F**

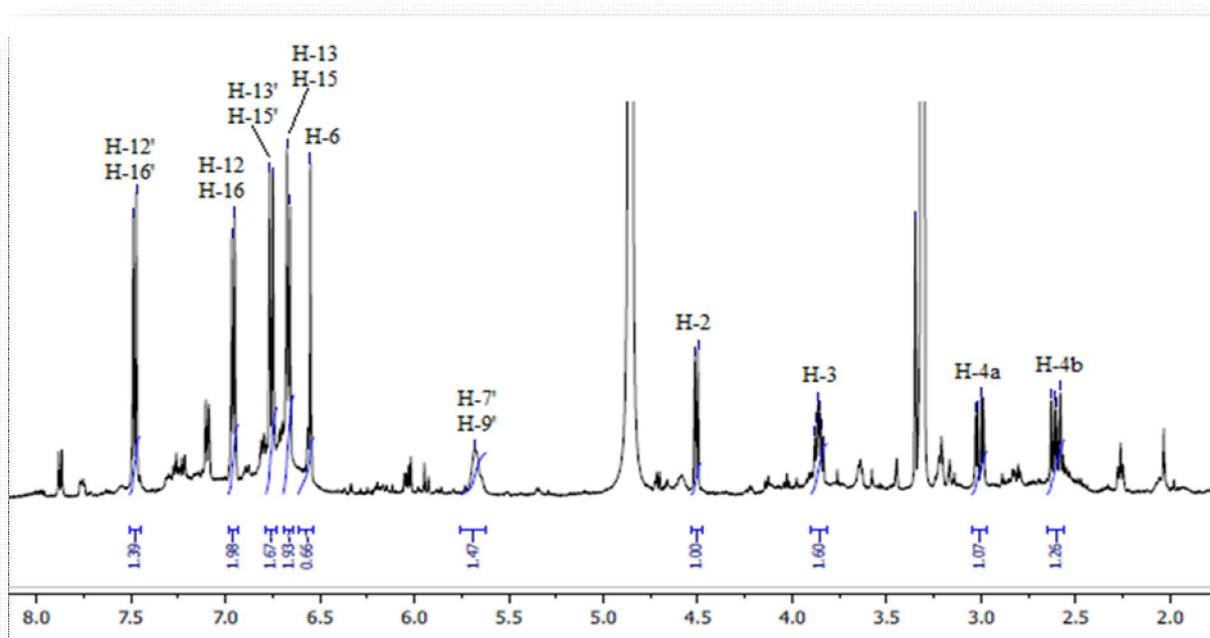


**Figure III-107:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé **F**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-108) du composé **F** enregistré dans le  $\text{DMSO}-d_6$  est presque similaire à celui du composé **E** (Figure III-85), ceci confirme bien que le composé **F** est un autre isomère du biflavonoïde **E**. Les différences majeures entre les deux composés résident dans la disparition du signal d'intégration 2H (5,68 ppm) correspondant aux protons aromatiques équivalents H-7' et H-9' du cycle A' dans le cas du composé **E** et l'apparition dans la région de 5,4-6,0 ppm de trois signaux s'intégrant pour 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (*s*), 5,62 (*d*,  $J = 1,7$  Hz) et 5,76 (*d*,  $J = 1,7$  Hz). Leurs carbones sont déterminés par expérience HSQC (Figure III-114) à  $\delta_{\text{C}}$  90,7, 89,0 et 96,0 respectivement. Ces constatations attestent de la disparition de la symétrie au niveau du cycle A' dans le composé **F**.

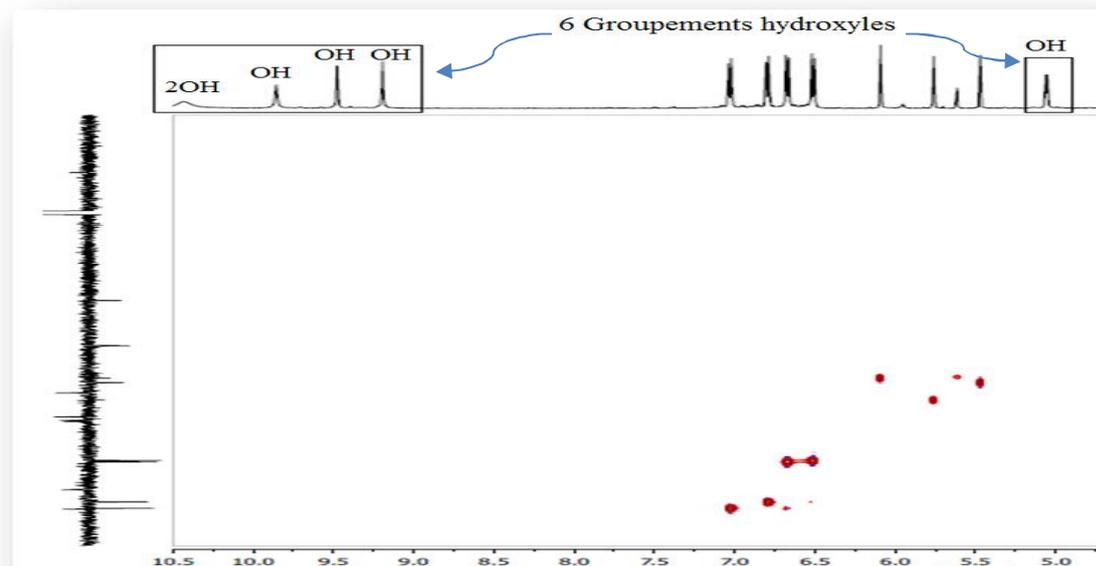


**Figure III-108:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé F



**Figure III-85:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du composé E

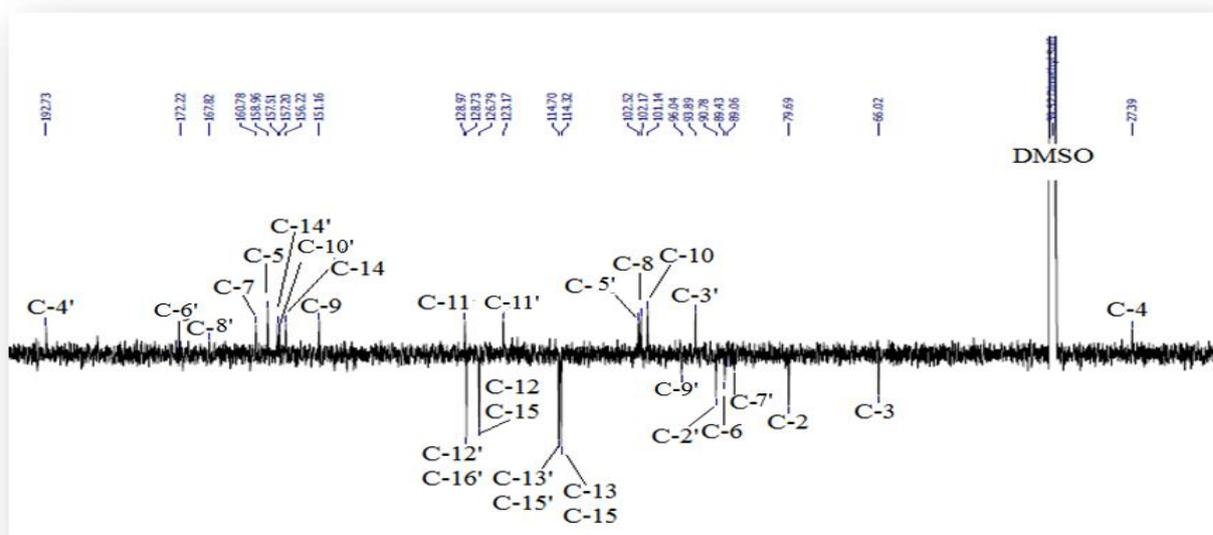
En plus de ces observations, la présence de cinq signaux d'intégration 6H déblindés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-108) du composé F ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC (Figure III-109) sont attribuables aux protons de 6 groupements hydroxyles.



**Figure III-109:** Partie du spectre HSQC du composé E

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-110) du composé F sont visualisés 25 signaux correspondant à 30 atomes de carbone. Ces derniers se répartissent comme suit:

- 1 carbonyle à 192,7 ppm.
- 8 carbones aromatiques oxygénés entre 150 et 173 ppm.
- 5 carbones aromatiques quaternaires non oxygénés allant de 101,1 à 128,9 ppm.
- 1 carbone quaternaire oxygéné résonant à 93,8 ppm.
- 11 CH aromatiques entre 88 et 129 ppm.
- 3 CH oxygénés à 66,0, 79,6 et 90,7 ppm.
- 1  $\text{CH}_2$  aliphatique résonant à 27,3 ppm.



**Figure III-110:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé F

Les signaux des protons correspondant aux différents enchaînements carbonés de cette molécule sont détectés sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-108) comme suit:

- ✓ Le proton aromatique du cycle A à  $\delta_{\text{H}}$  6,09 (s; H-6).
- ✓ Les protons aromatiques du cycle B résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (d;  $J = 8,4$  Hz; H-12 et H-16) et 6,51 (d;  $J = 8,4$  Hz; H-13 et H-15).
- ✓ Les protons aliphatiques du noyau C résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (d;  $J = 7,4$  Hz; H-2), 3,67 (tt;  $J = 7,4$  et 5,1 Hz; H-3), 2,59 (dd;  $J = 16,1$  et 5,1 Hz; H-4a) et 2,40 (dd;  $J = 16,1$  et 7,4 Hz; H-4b).

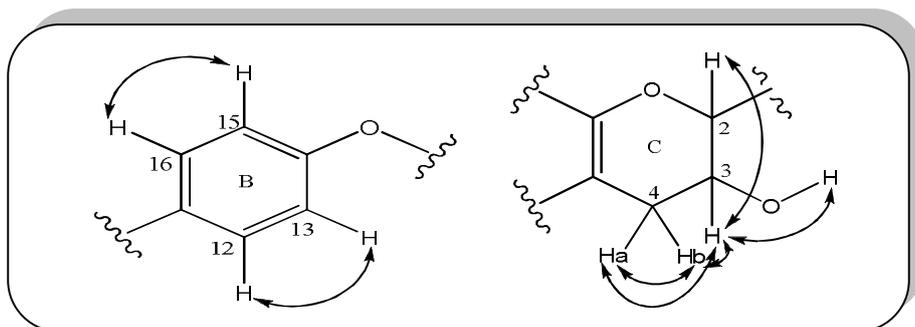
En plus de ces données et par comparaison avec le composé précédent **E** (Daphnodorine B), l'analyse des spectres HMBC, HSQC et COSY du composé **F** permet d'identifier la première unité structurale de ce biflavonoïde comme étant un dérivé de la catéchine trouvée également dans le cas du composé **E**.

En outre, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-108) révèle d'autres signaux à champ faible dont:

- ✓ Les signaux des deux protons aromatiques du noyau A' à  $\delta_{\text{H}}$  5,76 (d;  $J = 1,7$  Hz) et 5,62 (d;  $J = 1,7$  Hz).
- ✓ Les signaux des protons aromatiques du cycle B' à  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (d;  $J = 8,5$  Hz; H-12' et H-16') et 6,67 (d;  $J = 8,5$  Hz; H-13' et H-15').
- ✓ Le signal détecté à  $\delta_{\text{H}}$  5,47 sous forme d'un singulet correspondant à un groupement oxyméthine (-CHO-) engagé dans un environnement chimique composé de carbones quaternaires.
- ✓ Une série de signaux repérés à  $\delta_{\text{H}}$  10,43 (sl; 2-OH), 9,86 (s; OH), 9,48 (s; OH), 9,19 (s; OH) et 5,06 (d;  $J = 5,1$  Hz; OH-3).

L'expérience de corrélation homonucléaire COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (Figures III-111 et III-113) présente les couplages attendus entre les protons appartenant aux quatre systèmes de spins dont 2 formant l'unité catéchine:

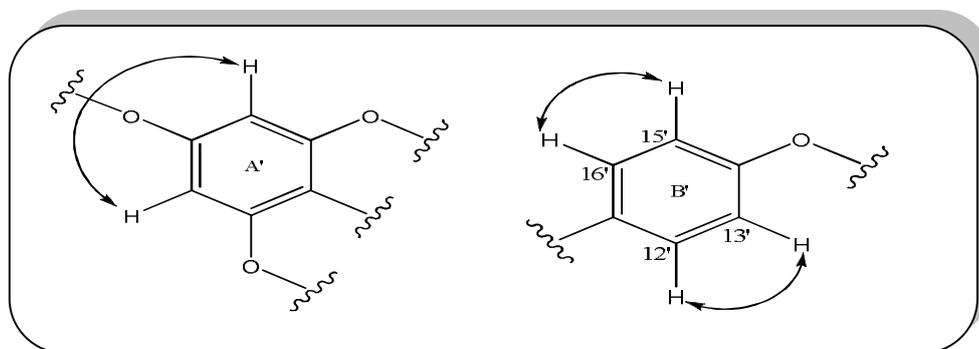
- H-12/H-13 et H-15/H-16 du noyau B.
- H-2/H-3, H-3/OH-3 (5,06 ppm), H-3/H-4a, H-3/H-4b et H-4a/H-4b pour le noyau C.



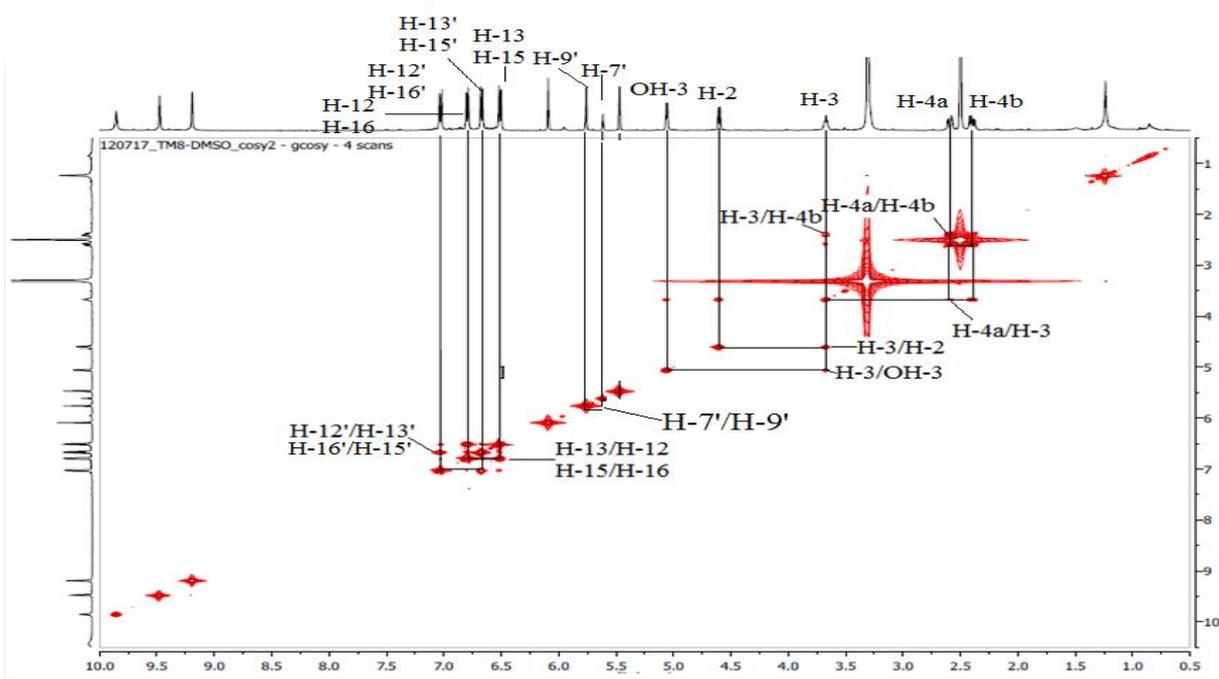
**Figure III-111:** Correlations COSY observées au niveau des noyaux B et C

Cette expérience montre aussi d'autres couplages (Figures III-112 et III-113) entre:

- Deux protons méta-couplés appartenant au cycle A' ( $\delta_H$  5,76;  $d$ ;  $J = 1,7$  Hz) et ( $\delta_H$  5,62;  $d$ ;  $J = 1,7$  Hz).
- Quatre protons ortho-couplés H-12'/H-16' et H13'/H-15' pour le noyau B'.

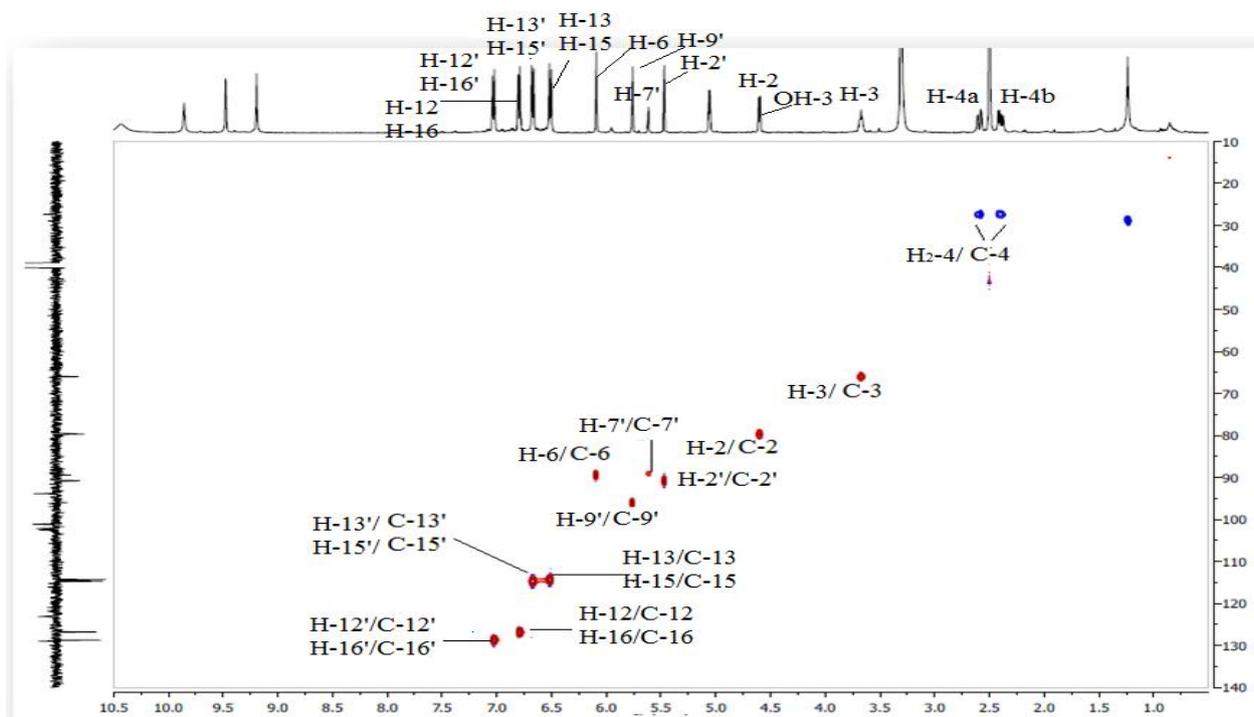


**Figure III-112:** Correlations COSY observées au niveau des noyaux A' et B'



**Figure III-113:** Spectre COSY du composé F

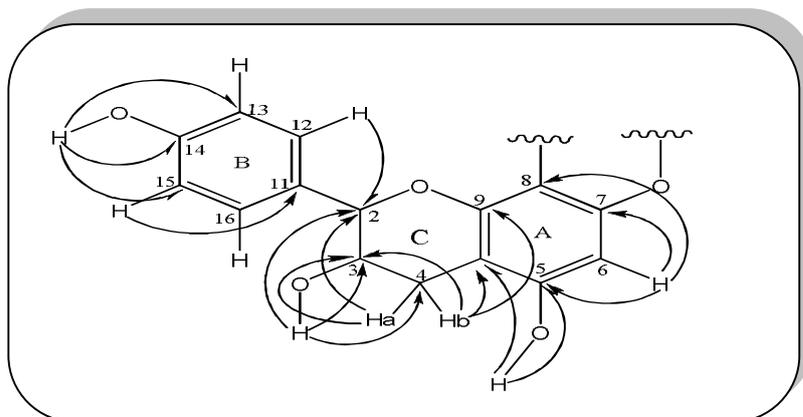
L'expérience HSQC  $J$ -modulé du composé **F** permet de visualiser les corrélations directes entre ces protons et leurs carbones. Ces corrélations sont représentées dans le spectre ci-dessous (Figure III-114).



**Figure III-114: Spectre HSQC du composé F**

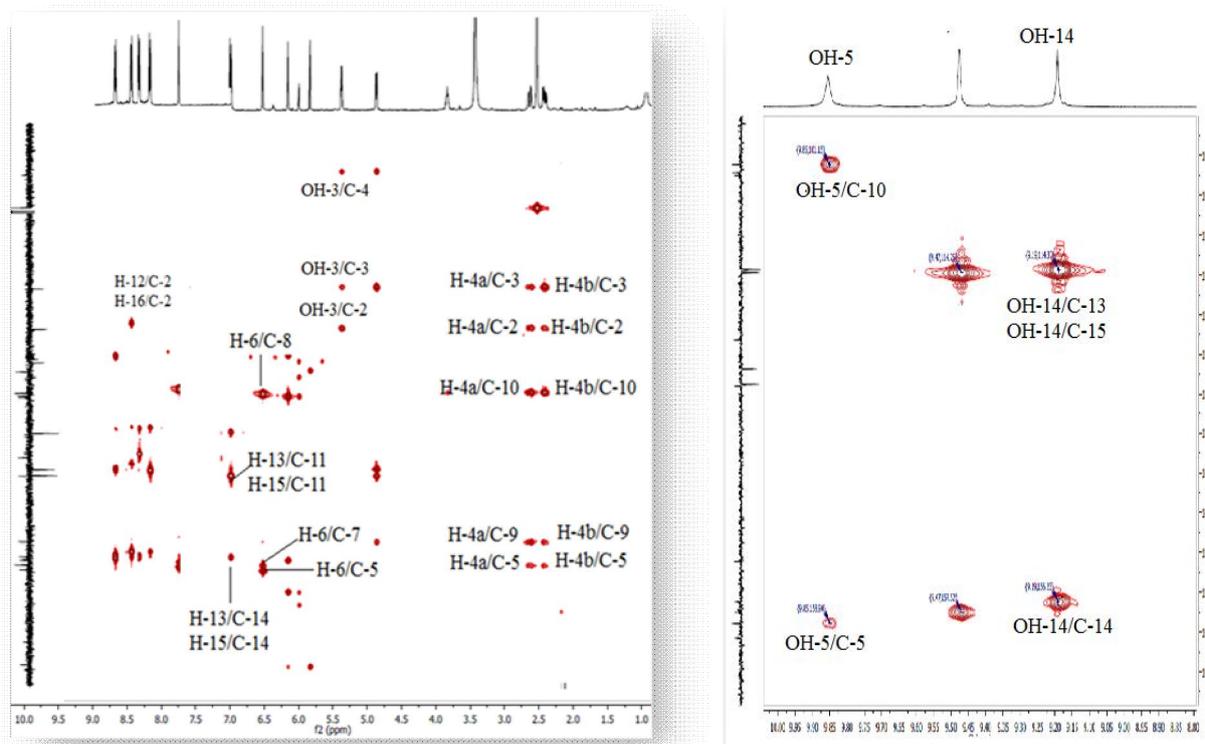
L'élucidation structurale du composé **F** a été établie comme dans le cas du composé **E** (Daphnodorine B) par analyse de son spectre HMBC. Cette analyse permet en premier lieu de déterminer tous les déplacements chimiques des carbones de la première unité constituant la catéchine. En effet, sur le spectre HMBC (Figures III-115 et III-116), le proton H-6 (6,09 ppm) du noyau A déjà identifié présente deux taches de corrélation en  $^2J$  avec deux carbones aromatiques oxygénés C-5 (158,9 ppm) et C-7 (160,7 ppm). Le carbone C-5 est porteur d'un groupement hydroxyle du fait qu'il corréle en HMBC en  $^2J$  avec un proton du groupement hydroxyle résonant à  $\delta_H$  9,86 (5-OH) ainsi qu'avec le carbone C-10 (101,1 ppm). Le proton H-6 corréle également avec un carbone aromatique quaternaire résonant à  $\delta_C$  101,7 (C-8). Le blindage du carbone C-8 (101,7 ppm) par rapport au même carbone (111,4 ppm) du composé **E** (Daphnodorine B) indique que le carbone C-8 est lié à un carbone  $sp^3$  au lieu d'un carbone  $sp^2$ . Les deux protons aromatiques H-13 et H-15 (6,51 ppm) du cycle B corrélent en  $^3J$  avec un carbone aromatique non oxygéné C-11 (128,9 ppm) et en  $^2J$  avec un carbone aromatique déblindé détecté à  $\delta_C$  156,2 ne pouvant être que le carbone C-14. Le déblindage de ce dernier suggère qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle. Le proton de ce dernier est repéré à 9,19

ppm (14-OH) suite aux couplages hétéronucléaires qu'il présente sur le spectre HMBC (Figures III-15 et III-16) avec les carbones C-13 et C-15 (114,3 ppm) ainsi qu'avec le carbone C-14.



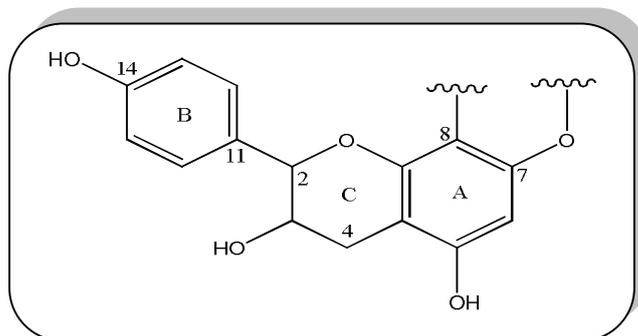
**Figure III-115:** Corrélations HMBC observées pour le composé F

En plus de ces corrélations, les deux protons H-12 et H-16 (6,80 ppm) montrent une tache de corrélation avec le carbone C-2 (79,6 ppm). Les protons géminés H<sub>2</sub>-4 corrént en HMBC (Figures III-115 et III-116) avec les carbones résonant à  $\delta_C$  79,6 (C-2), 66,0 (C-3), 158,9 (C-5), 151,1 (C-9) et 101,1 (C-10). La tache de corrélation observée en HMBC entre le carbone C-3 et le groupement hydroxyle ( $\delta_H$  5,06) confirme bien qu'il est lié à ce carbone. Le proton de cet hydroxyle (3-OH) corréle également avec les carbones C-2 (79,6 ppm) et C-4 (27,3 ppm) sur le spectre HMBC.



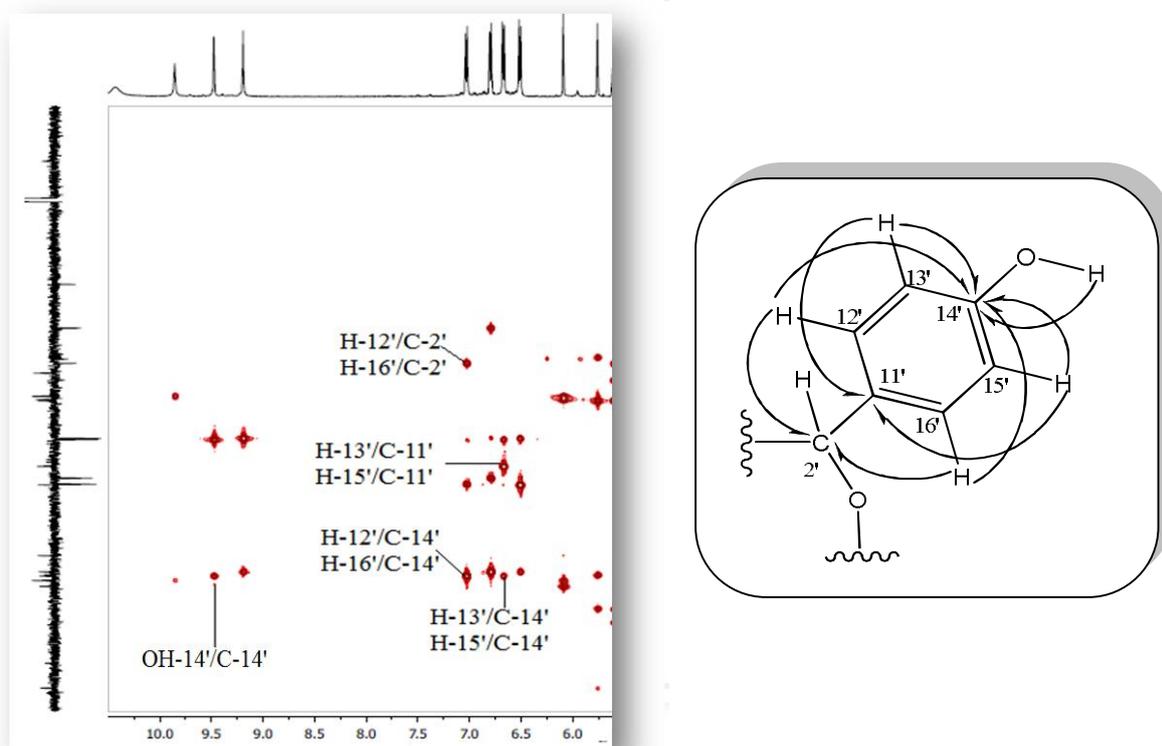
**Figure III-116:** Partie du spectre HMBC du composé F

A ce niveau d'analyse, les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de la 1<sup>ère</sup> unité structurale correspondant à la catéchine ont été déterminés (Figure III-117).



**Figure III-117:** Squelette de la première unité structurale (catéchine)

De la même façon, la 2<sup>ème</sup> unité structurale de ce biflavonoïde a été élaborée. En effet, les protons H-12' et H-16' ( $\delta_H$  7,03) du cycle B' corrélient en  $^3J$  avec un carbone oxyméthine C-2' ( $\delta_C$  90,7) et un carbone aromatique résonant à  $\delta_C$  157,2 qui ne peut être que la carbone C-14'. Sa valeur du déplacement chimique implique qu'il est attaché à un OH libre. Ce carbone montre également des taches de corrélations avec les protons H-13' et H-15' ( $\delta_H$  6,67) et le proton du groupement hydroxyle résonant à  $\delta_H$  9,48 (14'-OH). Les protons H-13' et H-15' présentent aussi une tache de corrélation avec un carbone aromatique quaternaire attribuable au carbone C-11' (123,1 ppm) (Figure III-118).



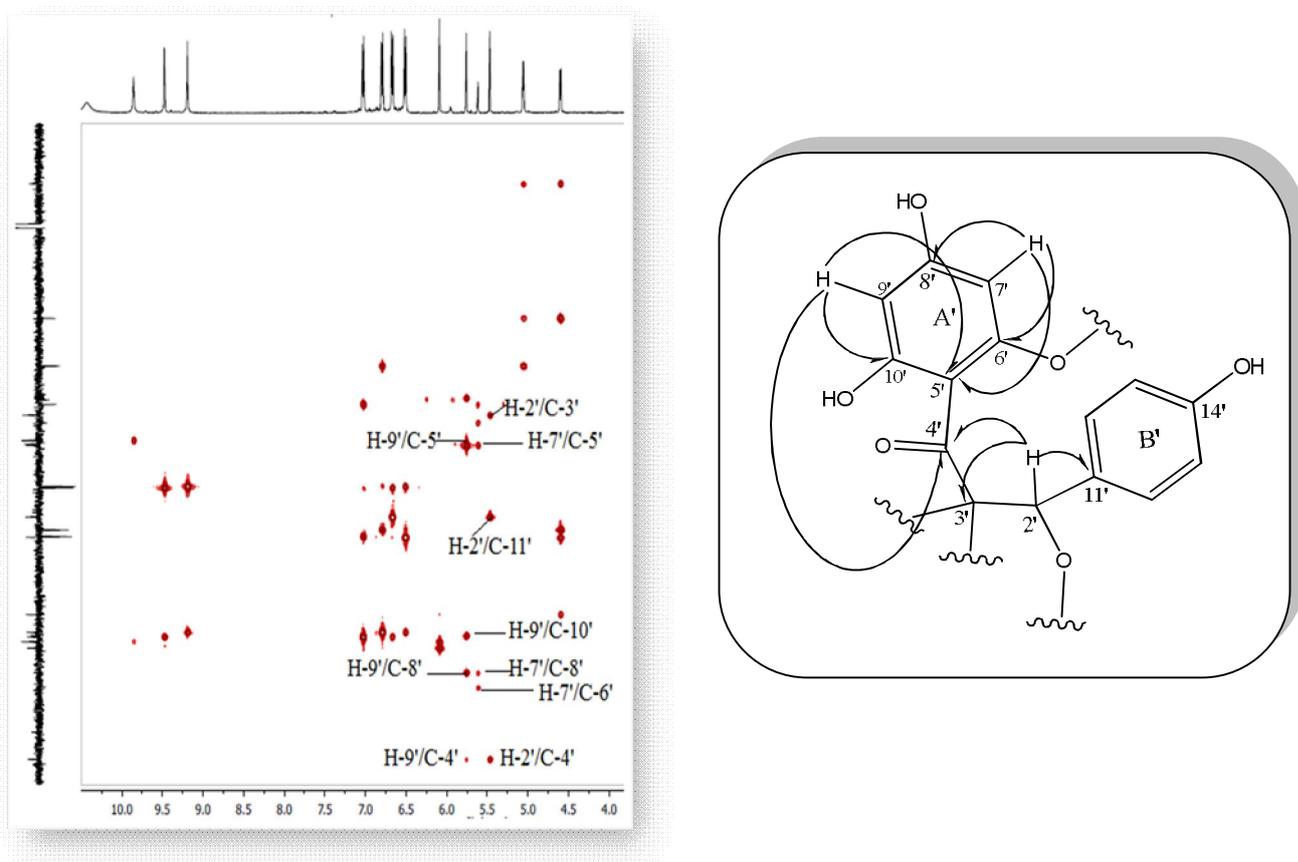
**Figure III-118:** Corrélations HMBC du composé F

En plus de ces corrélations, le proton H-2' (5,47 ppm) couple en HMBC (Figure III-119) avec trois carbones quaternaires C-3' (93,8 ppm), C-4' (192,7 ppm) et C-11' (123,1 ppm). Le carbone C-4' correspondant à un carbonyle cétone corrèle également en  $^4J$  avec un proton résonant à  $\delta_H$  5,76 appartenant au noyau A'. Ce proton correspond à l'un des deux protons H-7' ou H-9' (meta couplés) du noyau A'.

L'attribution de ces protons se fait par analyse HMBC (Figure III-119) et comparaison avec les données de la littérature [126,127]. En effet, les deux protons H-7' et H-9' couplent en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire résonant à  $\delta_C$  102,5 (C-5') et en  $^2J$  avec un carbone oxygéné à  $\delta_C$  167,8 (C-8'). Ils corrélient séparément en  $^2J$  avec deux carbones oxygénés distincts comme suit:

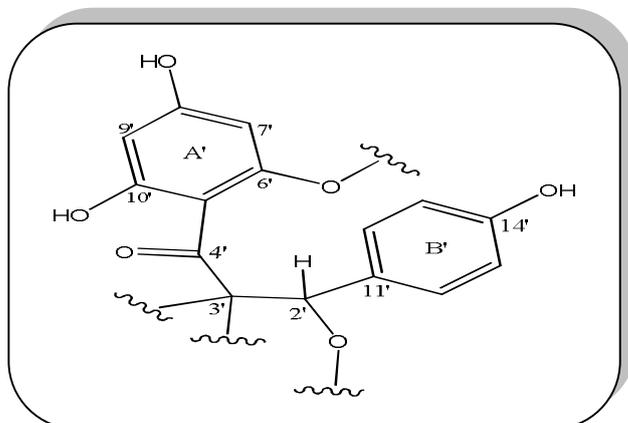
- H-7' (5,62 ppm) / C-6' (172,2 ppm).
- H-9' (5,76 ppm) / C-10' (157,2 ppm).

La différence de déplacements chimiques entre les carbones C-6' (plus déblindé) et C-10' suggère la présence d'une liaison éther au niveau de la position C-6' du cycle A'. Ces constatations indiquent que c'est le proton H-9' qui a corrélié en  $^4J$  en HMBC avec le carbonyle C-4' (Figure III-119).



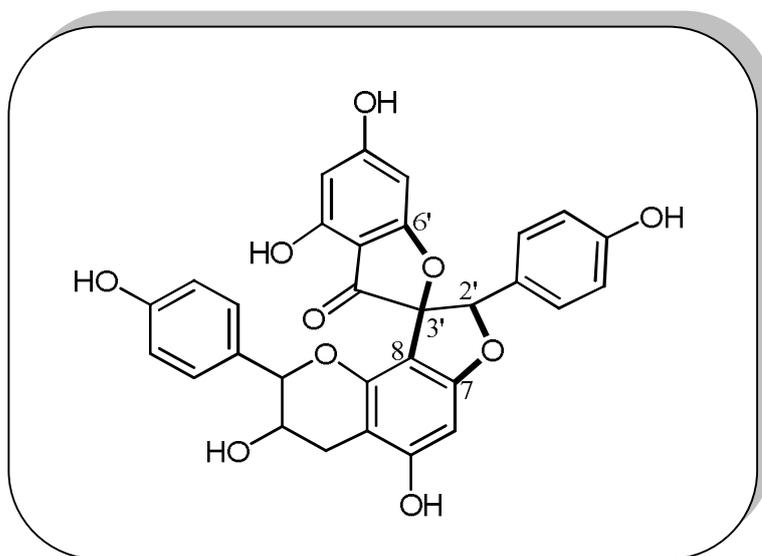
**Figure III-119: Principales corrélations HMBC observées du composé F**

Enfin, les deux groupements hydroxyles non attribués (10,43 ppm) résonant sous forme d'un singulet large correspondent automatiquement aux OH-8' et OH-10'. A l'issue de cette analyse, la deuxième unité structurale de ce biflavonoïde a été établie comme suit (Figure III-120):



**Figure III-120:** Squelette de la deuxième unité structurale du composé F

La formule brute du composé F  $C_{30}H_{22}O_{10}$  permet de compter  $30 - 22/2 + 1 = 20$  insaturations. Les éléments structuraux déjà identifiés indiquent l'existence de 18 insaturations correspondant à 5 cycles, 12 doubles liaisons et 1 carbonyle, alors il reste à former deux autres insaturations. Par comparaison avec le composé précédent Daphnodorine B, il est aisément de suggérer la formation d'un cycle furane impliquant les carbones C-3'/C-8 et C-2'/C-7. La deuxième insaturation est élaborée seulement par la cyclisation entre les carbones C-3' et C-6' pour former un autre hétérocycle à 5 chaînons. Les deux nouveaux cycles formés indiquent une structure spiranique dont le C-3' est un carbone spiro (Figure III-121).



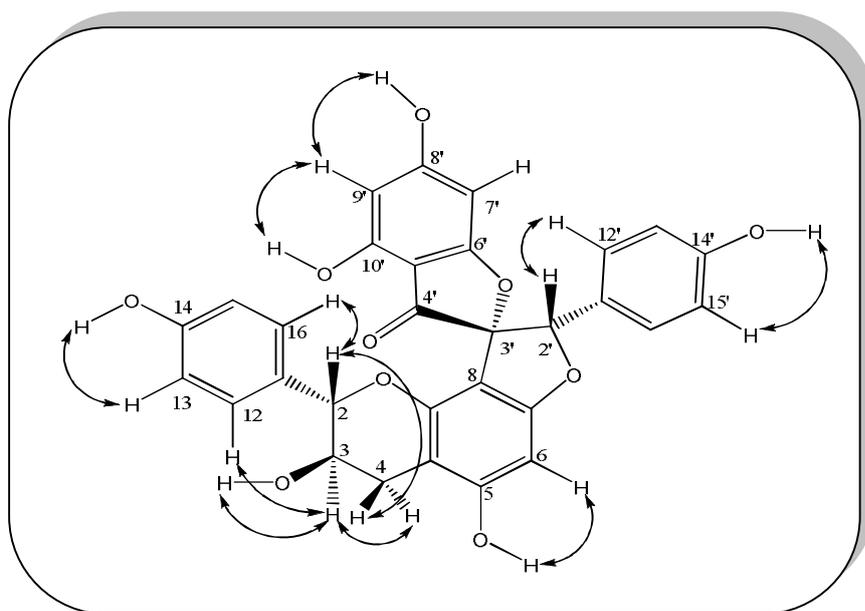
**Figure III-121:** Structure plane du composé F

La stéréochimie relative de ce composé au niveau des carbones C-2, C-3, C-2' et C-3' est établie au vu des valeurs des constantes de couplages et l'analyse des effets dipolaires (H-H) observés sur le spectre ROESY (Figures III-122 et III-123) ainsi que par des considérations biogénétiques. La stéréochimie des carbones C-2 et C-3 est déterminée 2*R* et 3*S* au regard des considérations de biogénèse et des valeurs de constantes de couplage H-2 (*d*;  $J = 7,4$  Hz) et H-3 (*tt*;  $J = 7,4; 5,1$  Hz), comme il a été constaté dans le cas du composé **E**, il en résulte que ces protons possèdent des orientations  $\beta$  et  $\alpha$  respectivement.

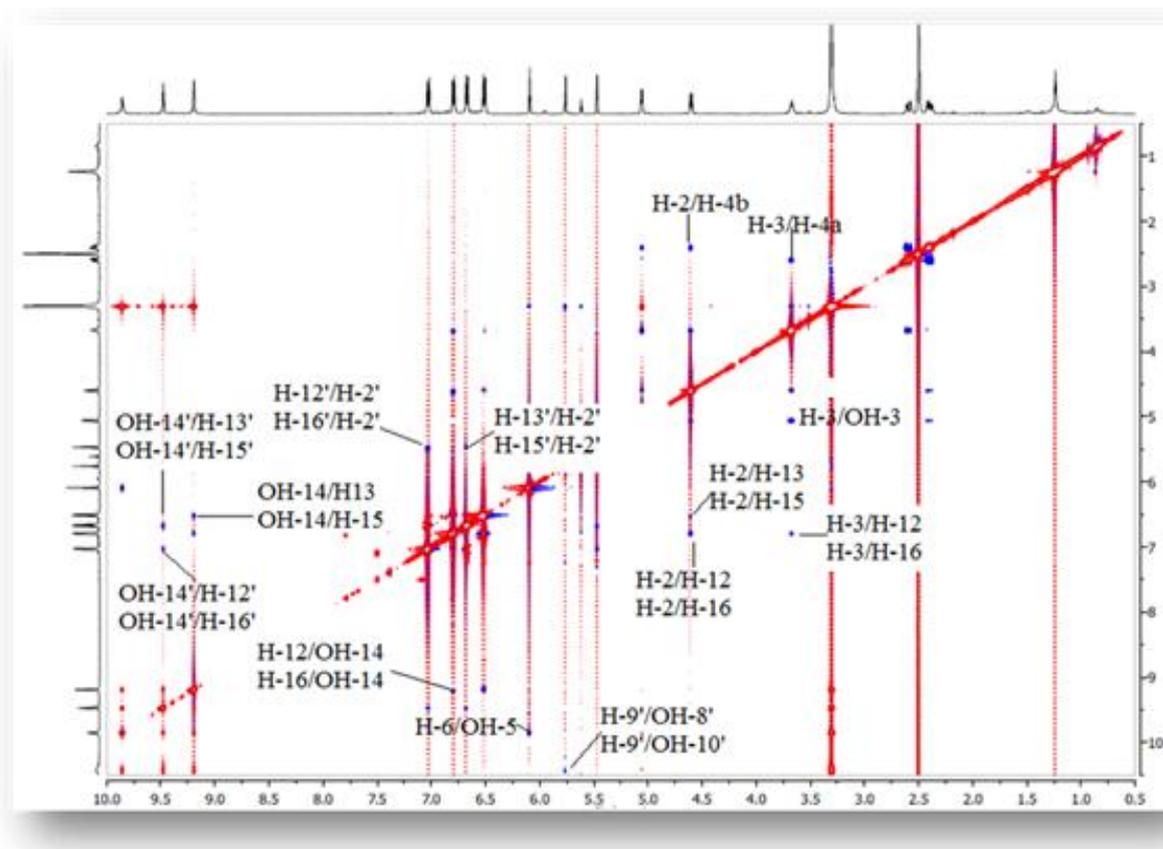
Le spectre ROESY (Figure III-123) du composé **F** permet de visualiser un effet ROE entre le proton H-2 $\beta$  et H-4b (2,40 ppm) indiquant que ce dernier est  $\beta$  orienté. Le proton H-3 $\alpha$  corrèle avec H-4a (2,59 ppm) traduisant une orientation  $\alpha$  pour le proton H-4a. Le proton H-3 $\alpha$  corrèle également sur le spectre ROESY (Figure III-123) avec OH-3 et H-12/H-16. Le proton H-2 $\beta$  corrèle à son tour avec les protons H-12/H-16. D'autres effets ROE ont été observés entre :

- H-2' (5,47 ppm) / H-12' et H-16'.
- H-9' (5,76 ppm) / OH-8' et OH-10'.
- OH-14' / H-13' et H-15'.
- H-6 / OH-5.
- OH-14/ H-13 et H-15.

Ces effets confirment bien les positions des différents groupements hydroxyles déjà attribués.



**Figure III-122:** Corrélations ROESY du composé **F**



**Figure III-123:** Spectre ROESY du composé F

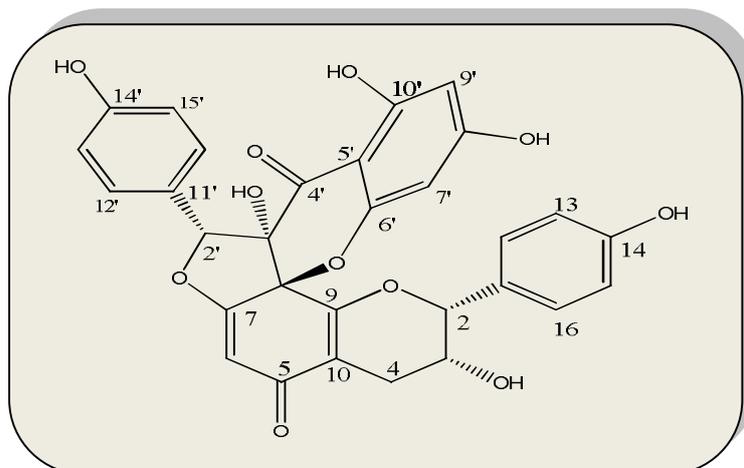
L'ensemble des données spectroscopiques (Tableau III-6) et la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -20^\circ$  (littérature  $-21,1^\circ$  ( $c$  0,57) [128]) permettent d'identifier le composé F au genkwanol A.

**Tableau III-6:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé F dans DMSO- $d_6$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4,60 ( $d$ ; 7,4)	79,6
3	3,67 ( $tt$ ; 7,4; 5,1)	66,0
4	2,59 ( $dd$ ; 16,1; 5,1; H-4a), 2,40 ( $dd$ ; 16,1; 7,4; H-4b)	27,3
5	-	158,9
6	6,09 ( $s$ )	89,4
7	-	160,7
8	-	101,7
9	-	151,1

10	-	101,1
11	-	128,9
12	6,80 ( <i>d</i> ; 8,4)	126,7
13	6,51 ( <i>d</i> ; 8,4)	114,3
14	-	156,2
15	6,51 ( <i>d</i> ; 8,4)	114,3
16	6,80 ( <i>d</i> ; 8,4)	126,7
2'	5,47 ( <i>s</i> )	90,7
3'	-	93,8
4'	-	192,7
5'	-	102,5
6'	-	172,2
7'	5,62 ( <i>d</i> ; 1,7)	89,0
8'	-	167,8
9'	5,76 ( <i>d</i> ; 1,7)	96,0
10'	-	157,2
11'	-	123,1
12'	7,03 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,7
13'	6,67 ( <i>d</i> ; 8,5)	114,7
14'	-	157,2
15'	6,67 ( <i>d</i> ; 8,5)	114,7
16'	7,03 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,7
OH-3	5,06 ( <i>d</i> ; 5,1)	-
OH-5	9,86 ( <i>s</i> )	-
OH-14	9,19 ( <i>s</i> )	-
OH-8'	10,43 ( <i>sl</i> )	-
OH-10'	10,43 ( <i>sl</i> )	-
OH-14'	9,48 ( <i>s</i> )	-

## III-2-9-Identification du composé G



Stelléranol

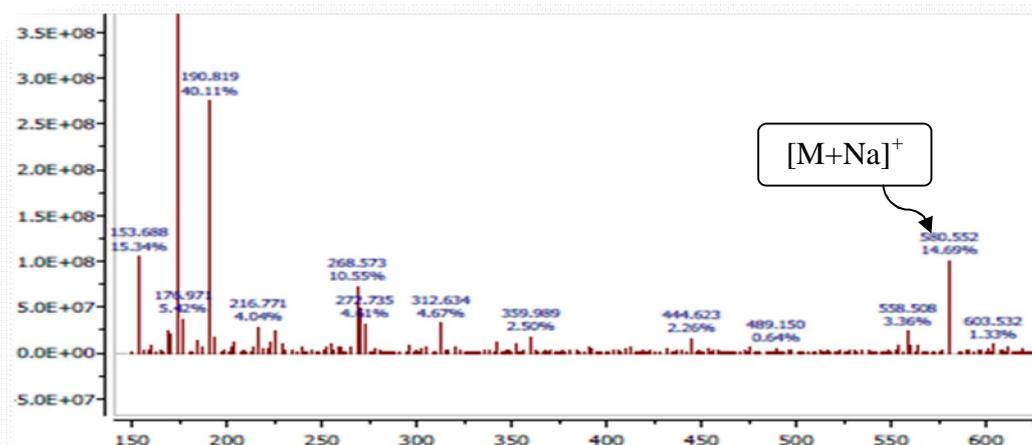
Le composé **G** appelé stelléranol, a été isolé sous forme d'une poudre jaune claire soluble dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache visible à 254 et 366 nm et se colore en jaune après révélation par l'acide sulfurique et chauffage.

Ce biflavonoïde a été antérieurement identifié dans les espèces *Stellera chamaejasme* [129] et *Wikstroemia indica* [115] (Thymelaeaceae), mais il est isolé pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Ce composé est connu pour son activité biologique antivirale [115], anti-inflammatoire, antipaludique et antitumorale [130].

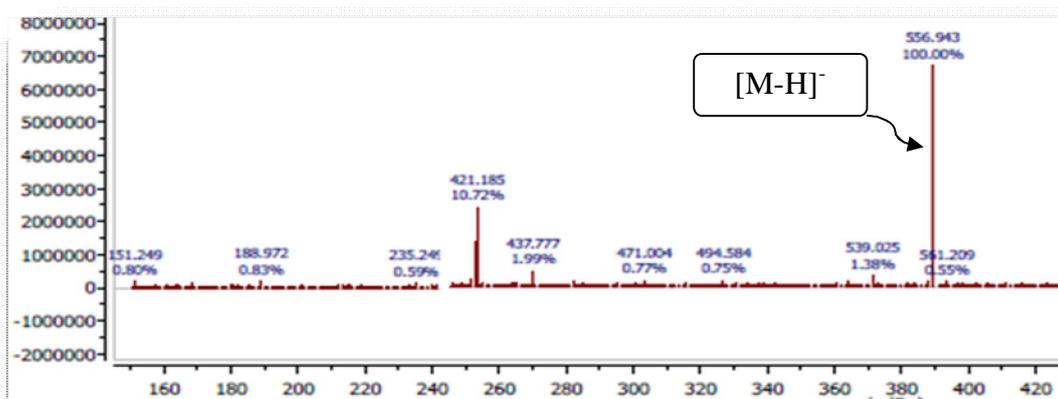
Le spectre UV du composé **G** enregistré dans le méthanol présente des bandes d'absorption maximales à 259, 305 et 342 nm, suggérant la présence d'un système aromatique conjugué.

Sur le spectre IR, des bandes d'absorption sont observées à 3389  $\text{cm}^{-1}$  (groupement hydroxyle), 1693  $\text{cm}^{-1}$  (carbonyle), 2915 et 2852  $\text{cm}^{-1}$  (CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>), 1636 et 1523  $\text{cm}^{-1}$  (système aromatique et doubles liaisons).

Les spectres de masse ESI-MS du composé **E** présentent en modes positif (Figure III-124) et négatif (Figure III-125) des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  581  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $m/z$  557  $[\text{M}-\text{H}]^-$  successivement. Ceci correspond à une masse moléculaire de 558 uma et une formule brute en  $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ , indiquant la présence de 20 degrés d'insaturation dans la structure moléculaire de ce composé.

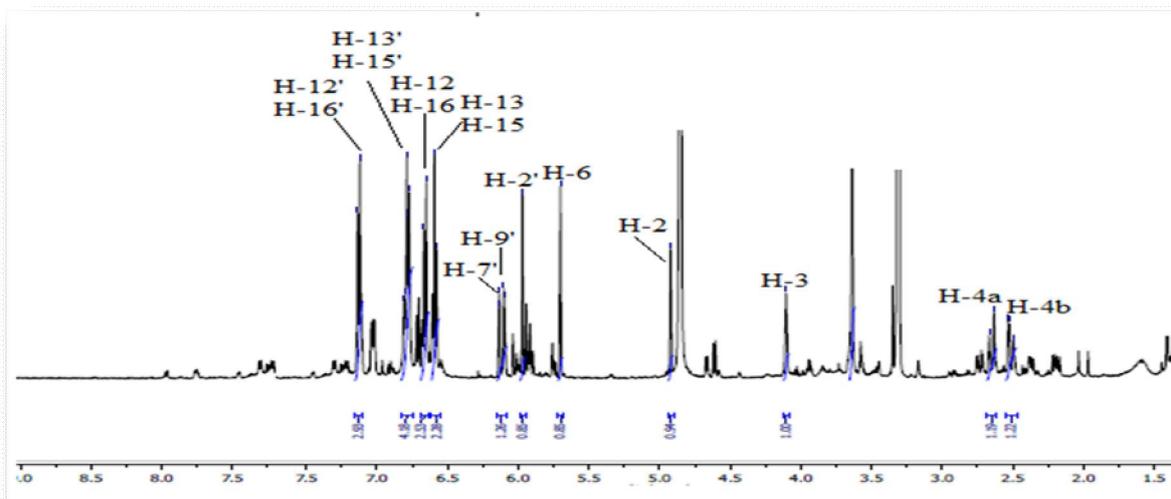


**Figure III-124:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé G



**Figure III-125:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé G

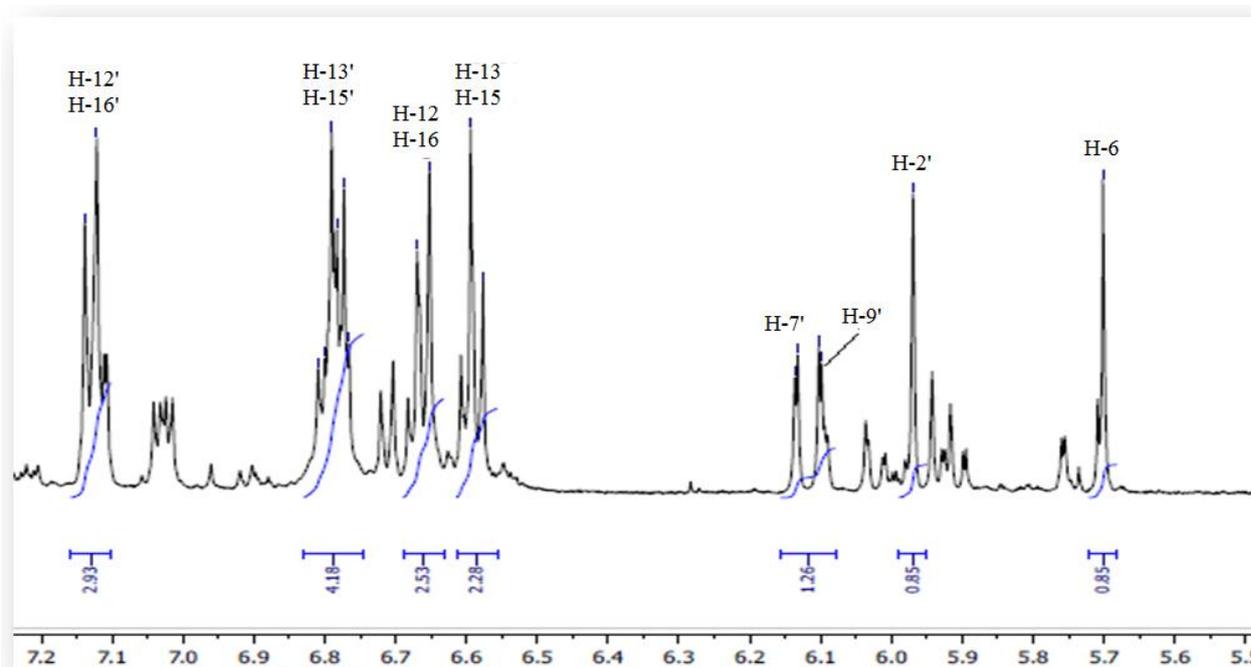
L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-126) du composé G enregistré dans le MeOD permet de visualiser 12 signaux à champ faible s'intégrant à 16 protons.



**Figure III-126:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du composé G

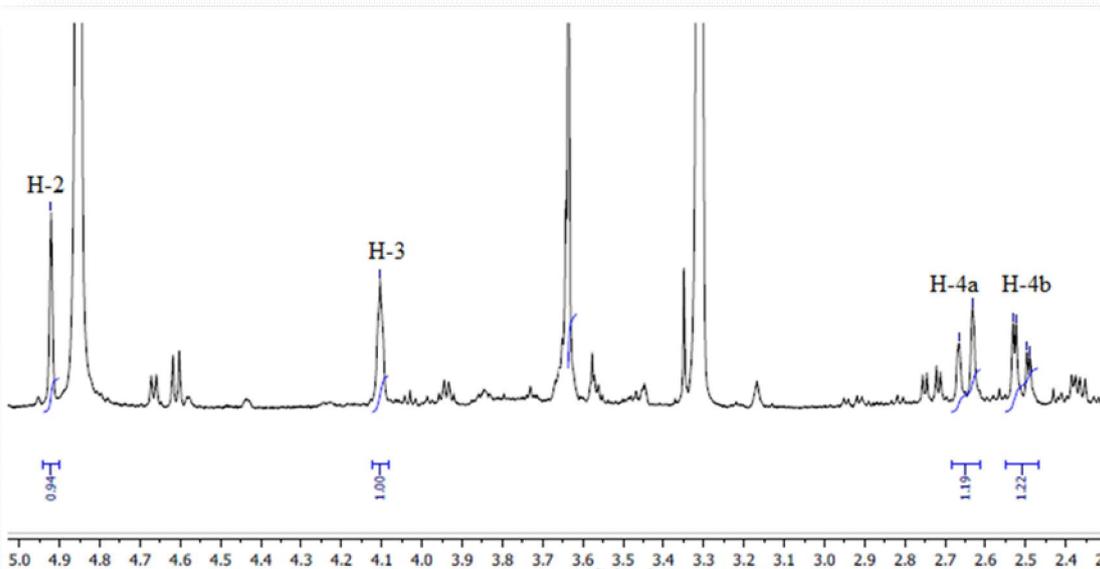
Ce spectre est similaire à ceux des deux composés **E** et **F** déjà identifiés. La différence de la masse moléculaire est de l'ordre de 16 uma par rapport aux composés **E** et **F** impliquant que le composé **G** est un biflavonoïde possédant un atome d'oxygène en plus comparativement aux deux composés à savoir daphnodorine B (**E**) et genkwanol A (**F**). En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-127) du composé **G** présente quatre signaux déblindés sous forme de doublet chacun à  $\delta_{\text{H}}$  7,13 (2H; *d*;  $J = 9,1$  Hz; H-12' et H-16'), 6,78 (2H; *d*;  $J = 9,1$  Hz; H-13' et H-15'), 6,65 (2H; *d*;  $J = 8,5$  Hz; H-12 et H-16) et 5,59 (2H; *d*;  $J = 8,5$  Hz; H-13 et H-15) typiques des protons équivalents de 3 noyaux aromatiques para-substitués.

En plus de ces résonances, quatre signaux sont également observés à champ faible à  $\delta_{\text{H}}$  6,13 (1H; *d*;  $J = 2,0$  Hz; H-7'), 6,10 (1H; *d*;  $J = 2,0$  Hz; H-9') et 5,97 (1H; *s*; H-2') et 5,70 (1H; *s*; H-6).



**Figure III-127: Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du composé G**

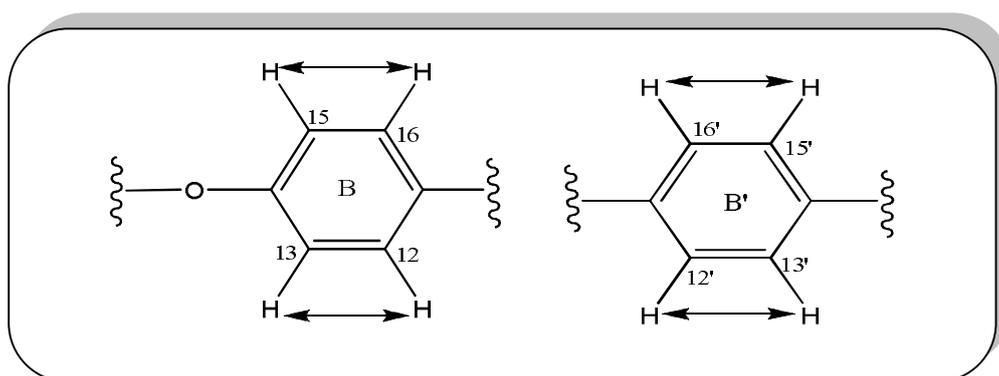
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-128) de ce composé montre également dans la région des champs moyens quatre signaux comprenant deux singulets attribuables aux protons oxyméthines résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,92 (1H; *s*; H-2) et 4,10 (1H; *sl*; H-3), un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  2,53 (1H; *d*;  $J = 16,4$  Hz; H-4a) et un doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  2,50 (1H; *dd*;  $J = 16,4; 3,9$  Hz; H-4b) correspondant aux protons géminés H<sub>2</sub>-4.



**Figure III-128:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du composé **G**

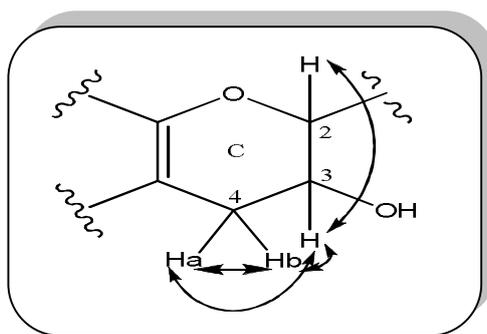
L'expérience de corrélation homonucléaire COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure III-132) du composé **G** permet de repérer facilement les couplages entre les protons constituant quatre systèmes de spins pour cette molécule tels que:

- Deux systèmes de spins  $\text{A}_2\text{B}_2$  entre les protons H-12'/H-13' et H-15'/H-16' appartenant au cycle B' (Fragmant I), ainsi entre les protons H-12/H-13, H-15/H-16 pour le cycle B (Fragmant II) (Figure III-129).



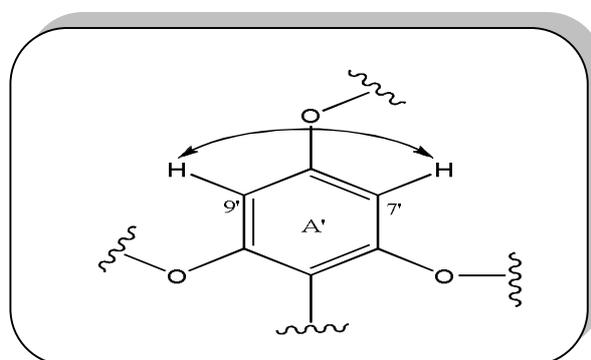
**Figure III-129:** Couplages COSY au niveau des cycles B' (Fragmant I) et B (Fragmant II)

- Un autre système de spins montrant les couplages entre les protons H-2/H-3, H-3/H-4a, H-3/H-4b et H-4a/H-4b formant le cycle C (Fragmant III) (Figure III-130).

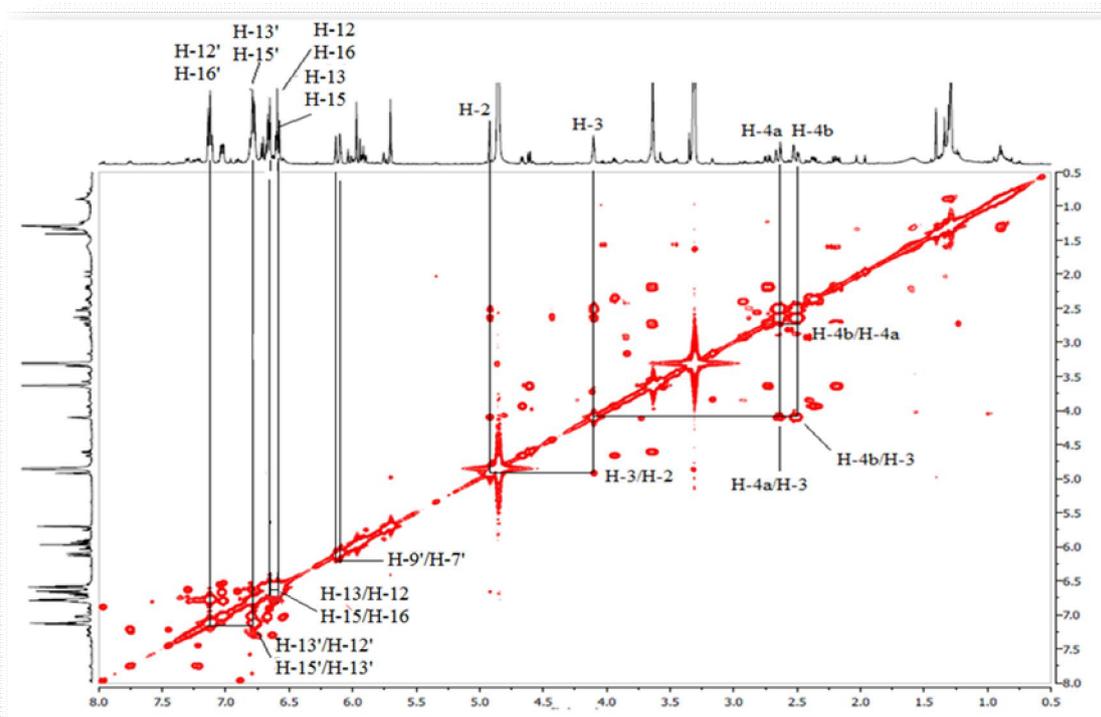


**Figure III-130:** Couplages COSY au niveau du cycle C (Fragment III)

- Un système de spins composé de deux protons H-7'/H-9' appartenant au noyau A' (Fragment IV) (Figure III-131).

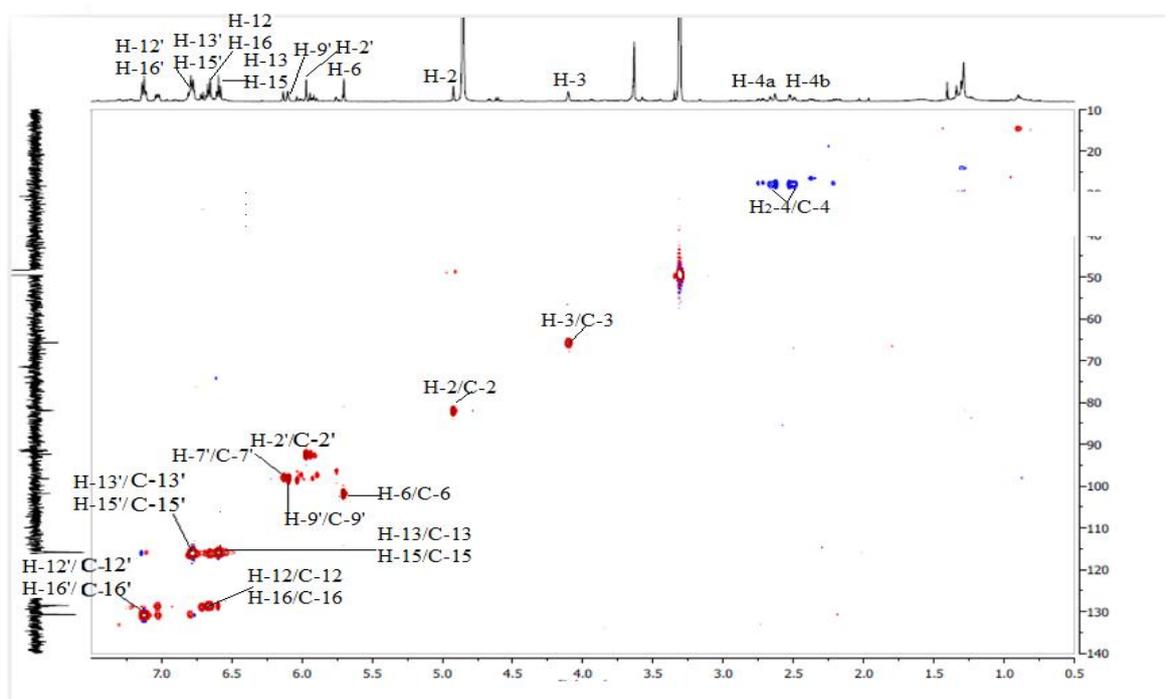


**Figure III-131:** Couplage COSY au niveau du cycle A' (Fragment IV)



**Figure III-132:** Spectre COSY du composé G

L'expérience HSQC (Figure III-133) indique les déplacements chimiques des carbones qui portent les protons déjà identifiés par analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  comme suit: C-12'/C-16' ( $\delta_{\text{C}}$  130,7), C-13'/C-15' ( $\delta_{\text{C}}$  115,8), C-12/C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  128,5), C-13/C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  115,7), C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  97,9), C-9' ( $\delta_{\text{C}}$  98,2), C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  92,3), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  101,7), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  81,9), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  65,7) et C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  27,8).

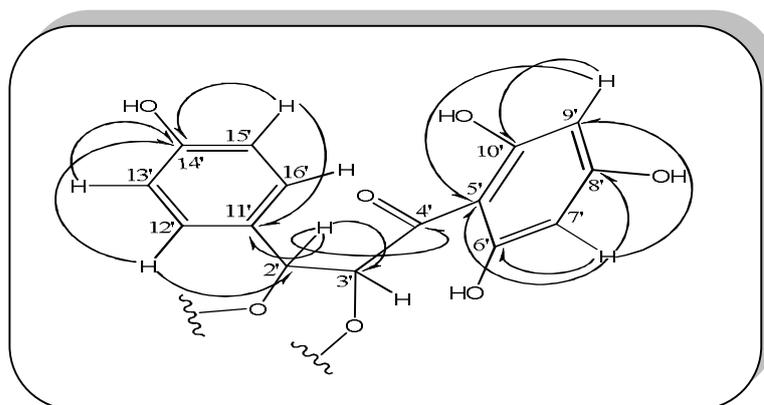


**Figure III-133:** Spectre HSQC du composé **G**

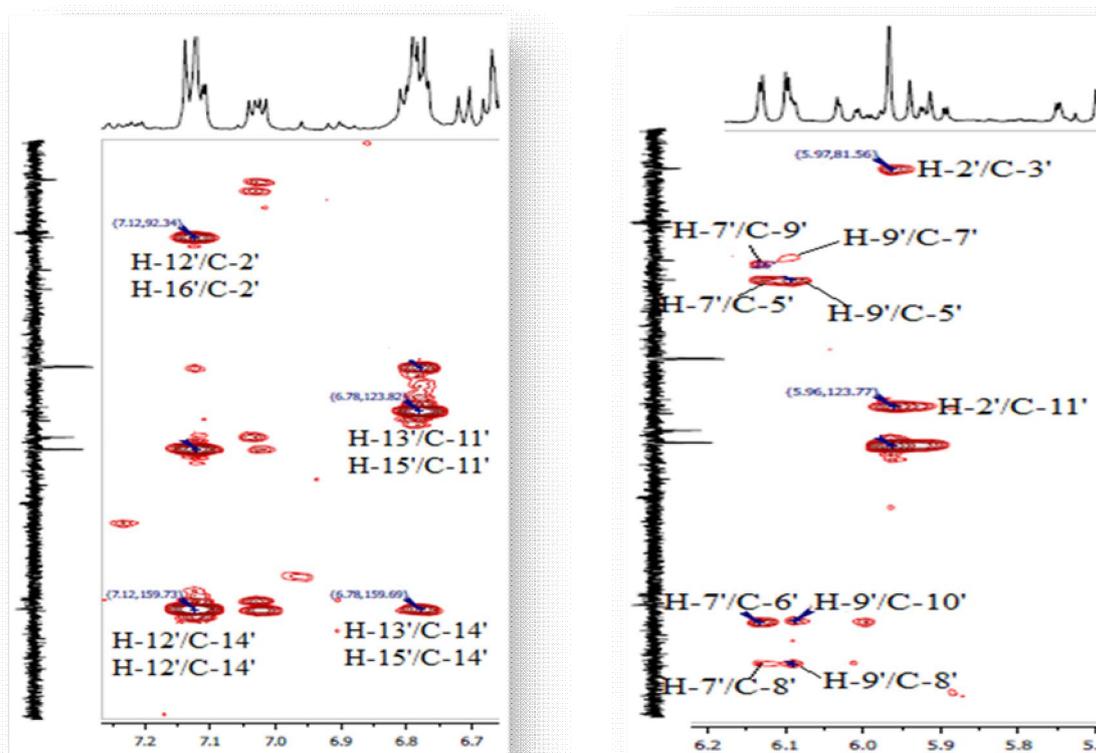
L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-126), COSY (Figure III-132) et HSQC (Figure III-133) du composé **G** montre clairement que ce biflavonoïde est constitué de deux unités structurales différentes comme dans le cas des composés **E** (Daphnodorine B) et **F** (Genkwanol A). Par comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ces derniers avec ceux du composé **G**, il en résulte que ce biflavonoïde contient dans son squelette deux unités dérivant de la chalcone et la catechine.

L'expérience de corrélations longue distance HMBC (Figures III-135 et III-136) permet de déterminer la majorité des carbones formant l'unité chalcone. Sur le spectre HMBC (Figures III-134 et III-135), les deux protons H-12' et H-16' ( $\delta_{\text{H}}$  7,13) corrélient en  $^3J$  avec le carbone C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  92,3) et avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  159,6 correspondant au carbone C-14'. Sa valeur déblindée suggère qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle. Ce carbone (C-14') présente une tache de corrélation en  $^2J$  avec les protons H-13' et H-15' ( $\delta_{\text{H}}$  6,78). Ces derniers corrélient également en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire repéré à  $\delta_{\text{C}}$  123,8 ne

pouvant être que le carbone C-11' (Figure III-134). En plus de ces corrélations, le proton H-9' (6,10 ppm) montre des taches de corrélation en  $^3J$  avec le carbone C-5' ( $\delta_C$  101,2) et  $^2J$  avec C-8' ( $\delta_C$  169,6) et C-10' ( $\delta_C$  161,9) (Figures III-134 et III-135). Le proton H-7' ( $\delta_H$  6,13) couple avec un carbone à  $\delta_C$  162,2 attribuable au carbone C-6' ainsi qu'avec C-8' et C-5'. D'autres corrélations ont été observées entre H-7'/C-9' et H-9'/C-7'. D'autre part, le proton H-2' (5,97 ppm) corrèle sur le spectre HMBC (Figures III-134 et III-135) avec un carbone quaternaire oxygéné C-3' ( $\delta_C$  81,5), un carbonyle C-4' ( $\delta_C$  190,3) et le C-11'. Comme il a été observé dans le cas du composé F (Genkwanol A), la valeur du déplacement chimique du carbone C-4' (190,3 ppm) est significative d'un carbonyle cétone (Figure III-134).



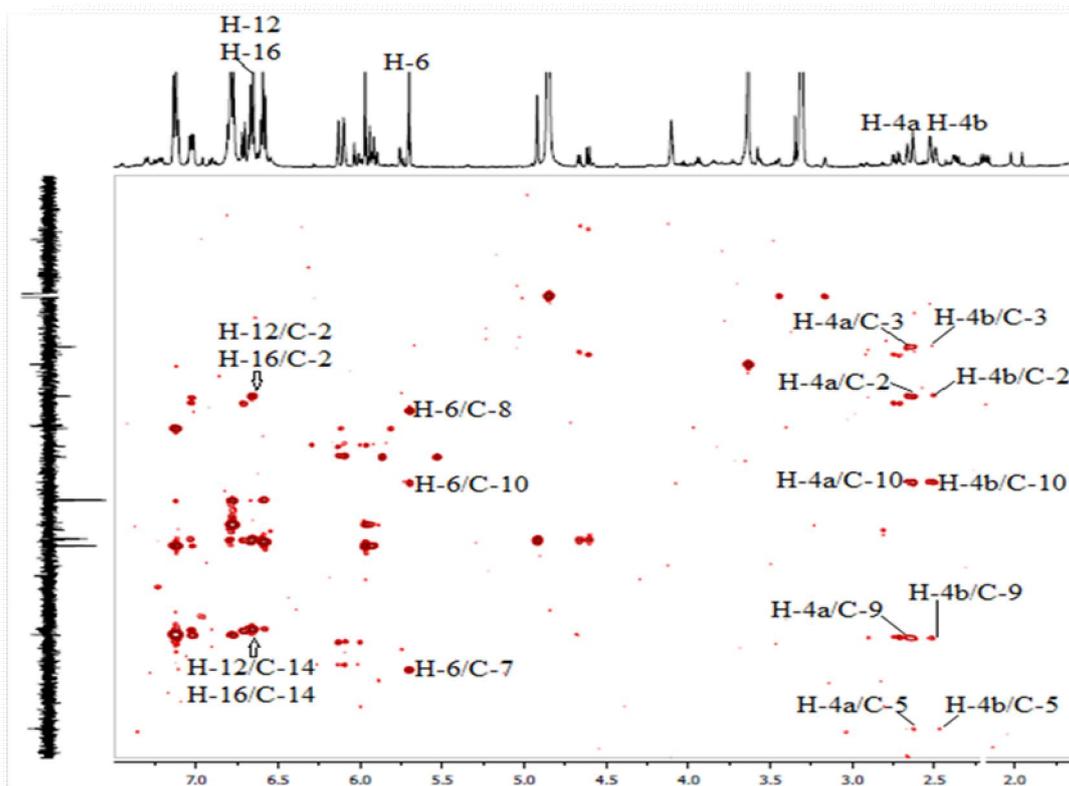
**Figure III-134:** Corrélations HMBC du composé G (unité chalcone)



**Figure III-135:** Partie du spectre HMBC du composé G (unité chalcone)

Au terme de ces constatations, les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de la première unité formant un dérivé de la chalcone ont été déterminés.

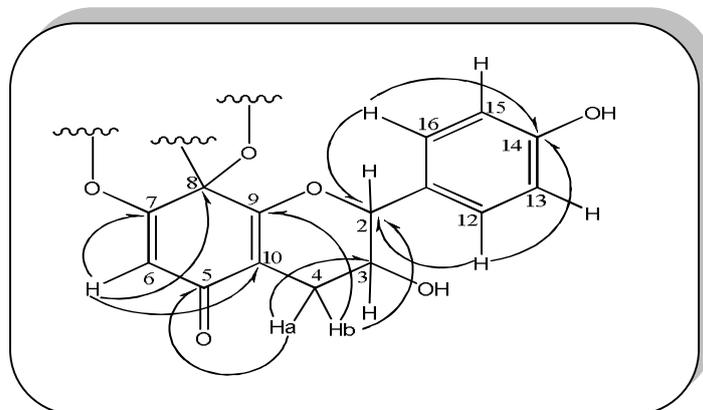
A propos de la 2<sup>ème</sup> unité structurale de ce biflavonoïde, elle a été élaborée de la même manière. Les protons géminés H<sub>2</sub>-4 corrélient en HMBC (Figures III-136 et III-137) avec les carbones C-2 ( $\delta_C$  81,9) et C-3 ( $\delta_C$  65,7) ainsi qu'avec un carbonyle résonant à  $\delta_C$  190,0 attribuable au carbone cétone C-5. Ces protons présentent également deux taches de corrélation avec deux carbones résonant à 160,7 et 110,0 ppm correspondant aux carbones C-9 et C-10 respectivement. En outre, les deux protons H-12 et H-16 couplent en HMBC (Figures III-136 et III-137) avec le C-2 et un autre carbone repéré à 158,0 attribuable au carbone C-14. Les deux protons H-13 et H-15 corrélient en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire C-11 résonant à 129,4 ppm et en  $^2J$  avec C-14 déjà identifié.



**Figure III-136: Partie du spectre HMBC du composé G (unité cathéchine)**

En plus de ces observations, le proton H-6 montre des taches de corrélation sur le spectre HMBC (Figures III-136 et III-137) en  $^3J$  et  $^2J$  avec deux carbones oxygénés détectés à  $\delta_C$  86,6 (C-8) et 171,2 (C-7) et ainsi avec le C-10. Le déblindage des carbones C-6 (101,7 ppm), C-7 (171,2 ppm), C-9 (160,7 ppm) et C-10 (110,0 ppm) qui est plus de 9 ppm comparativement aux mêmes carbones du composé F C-6 (89,4 ppm), C-7 (160,7 ppm), C-9 (151,1 ppm) et C-10

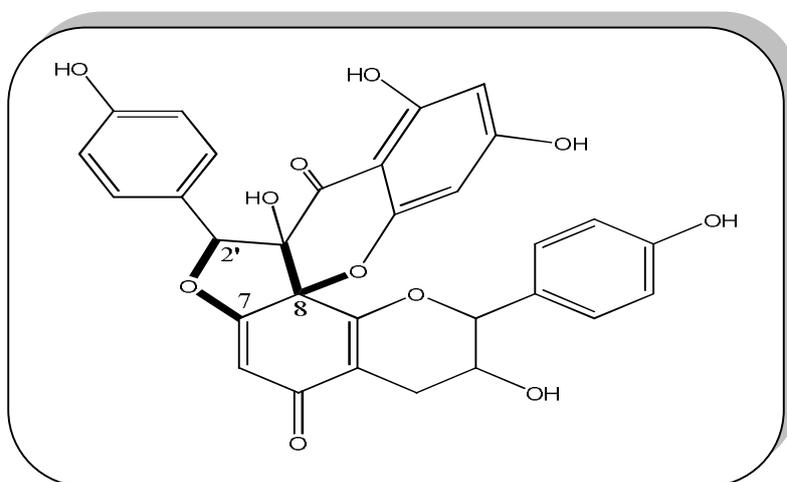
(101,1 ppm) suggère la présence de deux systèmes étones dans la 2<sup>ème</sup> unité de cette molécule. Le déplacement chimique du carbone C-5 ( $\delta_C$  190,0) atteste qu'il est engagé avec une double liaison conjuguée pour former deux fragments étones.



**Figure III-137: Principales corrélations HMBC observées pour le composé G (unité cathéchine)**

A ce stade d'analyse, l'élucidation structurale de la deuxième unité structurale a été faite entièrement.

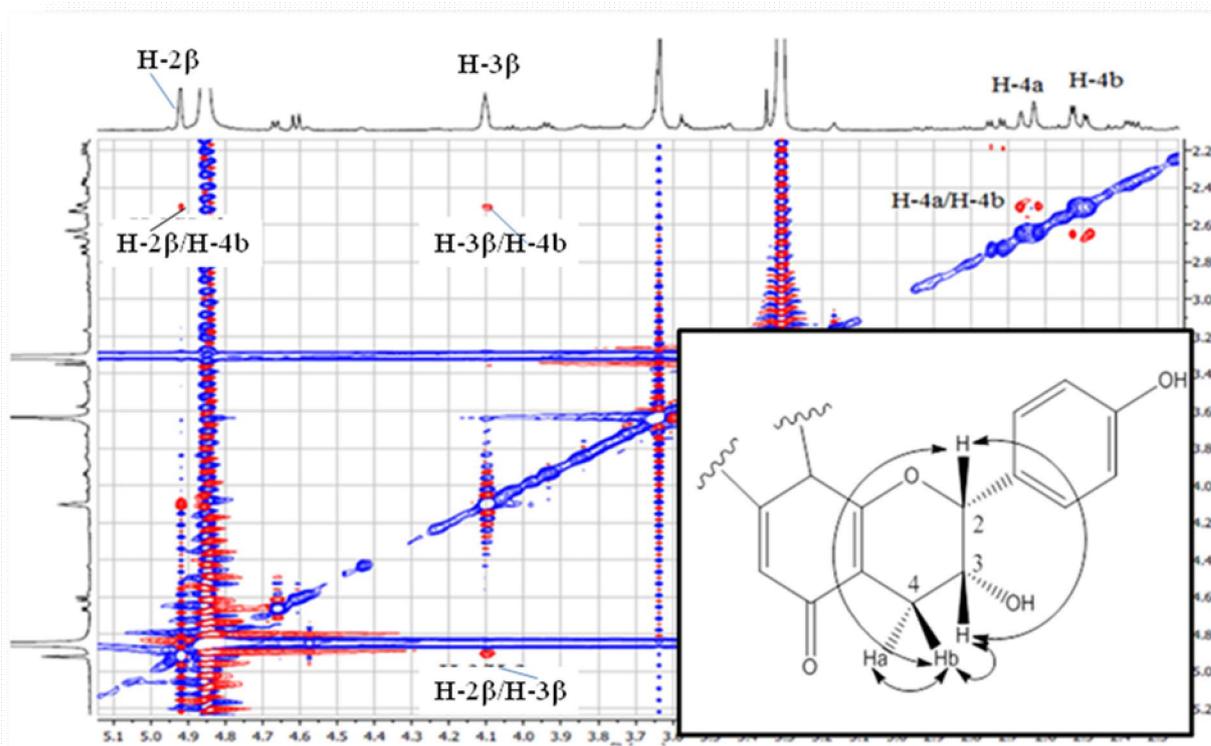
La formule brute de ce composé  $C_{30}H_{22}O_{11}$  indique la présence de 20 insaturations. Les deux unités déjà formées permettent de compter 18 insaturations (5 cycles et 13 doubles liaisons), soit deux insaturations en moins, qui ne peuvent être que des cycles. Les carbones C-2' (92,3 ppm), C-7 (171,2 ppm) et C-8 (86,6 ppm) sont les centres de cyclisation entre les deux unités structurales dérivant de la chalcone et la catéchine en conduisant à la formation de deux cycles supplémentaires à 5 et 6 chaînons. En conséquence, la structure plane du composé **G** est donnée comme suit (Figure III-138):



**Figure III-138: Structure plane du composé G**

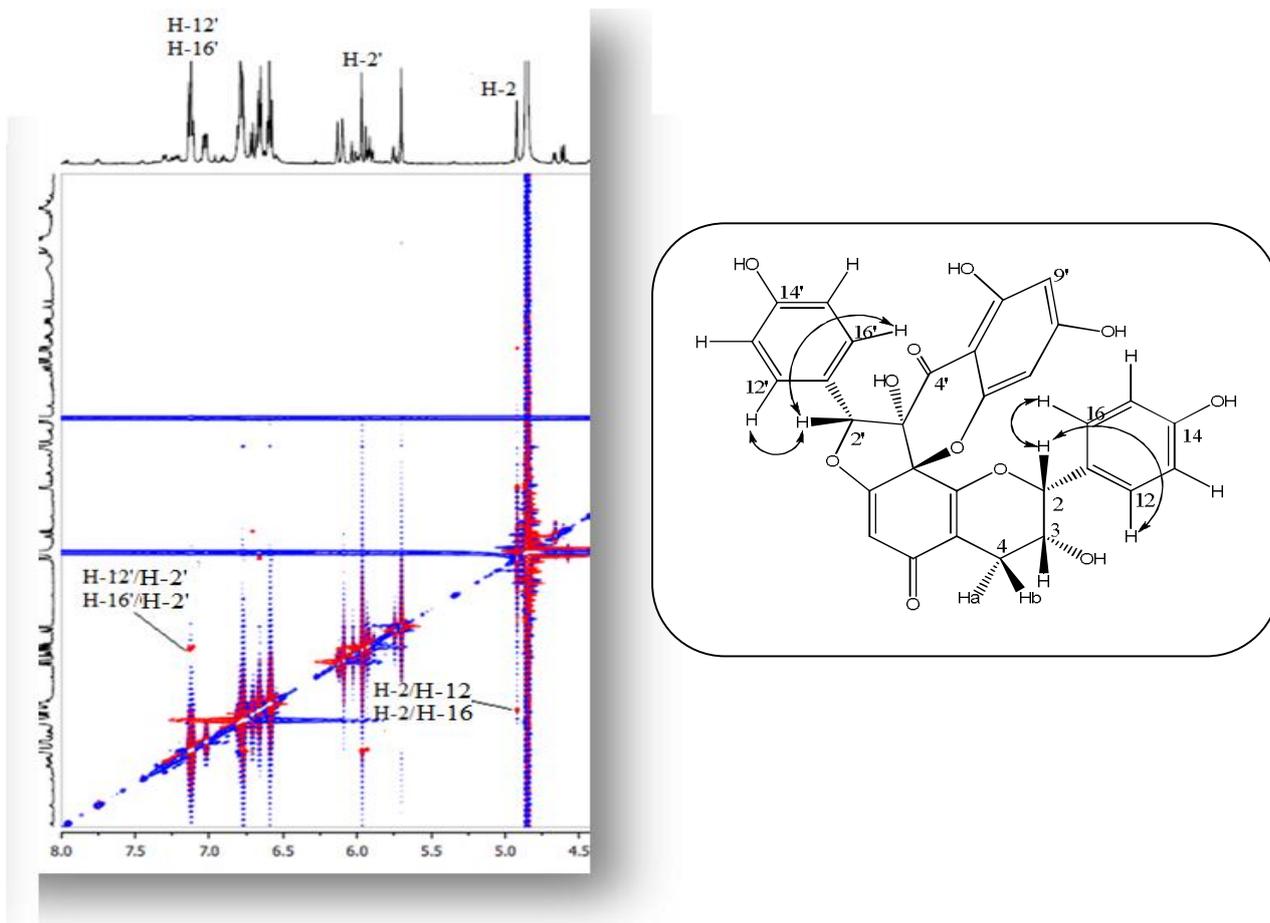
La stéréochimie relative de ce composé a été établie de la même façon que les autres biflavonoïdes. Eu égard aux multiplicités des protons H-2 (4,92 ppm) et H-3 (4,10 ppm) sous forme de singulet et singulet large respectivement impliquant une valeur nulle de la constante de couplage ( $J_{H-2/H-3} = 0$ ), ces deux protons disposent donc d'une orientation  $\beta$  (H-2 $\beta$  et H-3 $\beta$ ).

L'observation d'effet NOESY entre ces protons confirme qu'ils sont  $\beta$ -orientés. Les corrélations visualisées sur le spectre NOESY (Figure III-139) du composé **G** entre les protons H-2 $\beta$ /H-4b et H-3 $\beta$ /H-4b montrent que le proton H-4b ( $\delta_H$  2,50) est en position  $\beta$ . Par ailleurs, l'absence d'effet NOE entre les protons H-2 $\beta$  et H-3 $\beta$  et le proton H-4a ( $\delta_H$  2,53 ppm) prouve que ce dernier est  $\alpha$  orienté (Figure III-139).



**Figure III-139:** Corrélations NOESY observées pour les protons H-2, H-3, H-4a et H-4b

D'autres effets NOESY (Figure III-140) sont visualisés entre les protons H-12'/H-16' et le proton H-2' et entre H-12/H-16 et le proton H-2. La stéréochimie au niveau des carbones asymétriques C-2', C-3' et C-8 est déterminée 2'R, 3'S et 8R par comparaison avec les données de la littérature [129,130].



**Figure III-140:** Principales corrélations NOESY observées pour le composé **G**

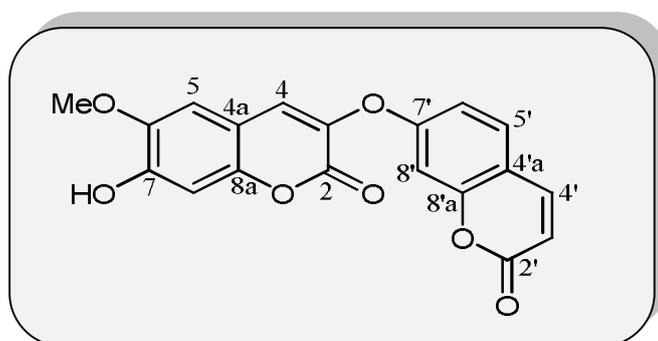
La mesure du pouvoir rotatoire dans le MeOH donne  $[\alpha]_D = -98^\circ$ , valeur qui concorde avec celle trouvée dans la littérature ( $-102^\circ$ ) [115]. Tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **G** sont rassemblés dans le tableau (III-7).

**Tableau III-7:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **G** dans MeOD

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4,92 ( <i>s</i> )	81,9
3	4,10 ( <i>sl</i> )	65,7
4	2,53 ( <i>d</i> ; 16,4; H-4a), 2,50 ( <i>dd</i> ; 16,4; 3,9; H-4b)	27,8
5	-	190,0
6	6,70 ( <i>s</i> )	101,7
7	-	171,2
8	-	86,6

9	-	160,7
10	-	110,0
11	-	129,4
12	6,65 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,5
13	5,59 ( <i>d</i> ; 8,5)	115,7
14	-	158,0
15	5,59 ( <i>d</i> ; 8,5)	115,7
16	6,65 ( <i>d</i> ; 8,5)	128,5
2'	5,97 ( <i>s</i> )	92,3
3'	-	81,5
4'	-	190,3
5'	-	101,2
6'	-	162,2
7'	6,13 ( <i>d</i> ; 2,0)	97,9
8'	-	169,6
9'	6,10 ( <i>d</i> ; 2,0)	98,2
10'	-	161,9
11'	-	123,8
12'	7,13 ( <i>d</i> ; 9,1)	130,7
13'	6,78 ( <i>d</i> ; 9,1)	115,8
14'	-	159,6
15'	6,78 ( <i>d</i> ; 9,1)	115,8
16'	7,13 ( <i>d</i> ; 9,1)	130,7

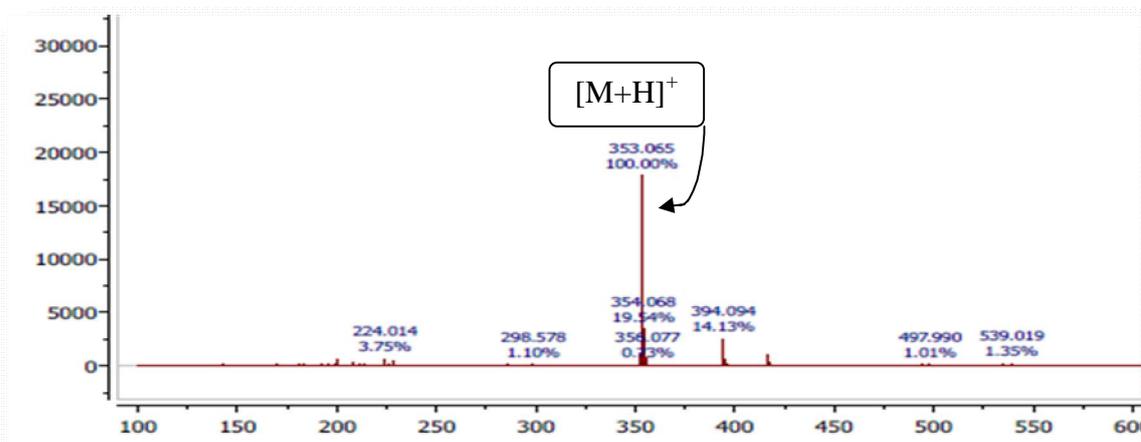
### III-2-10-Identification du composé H



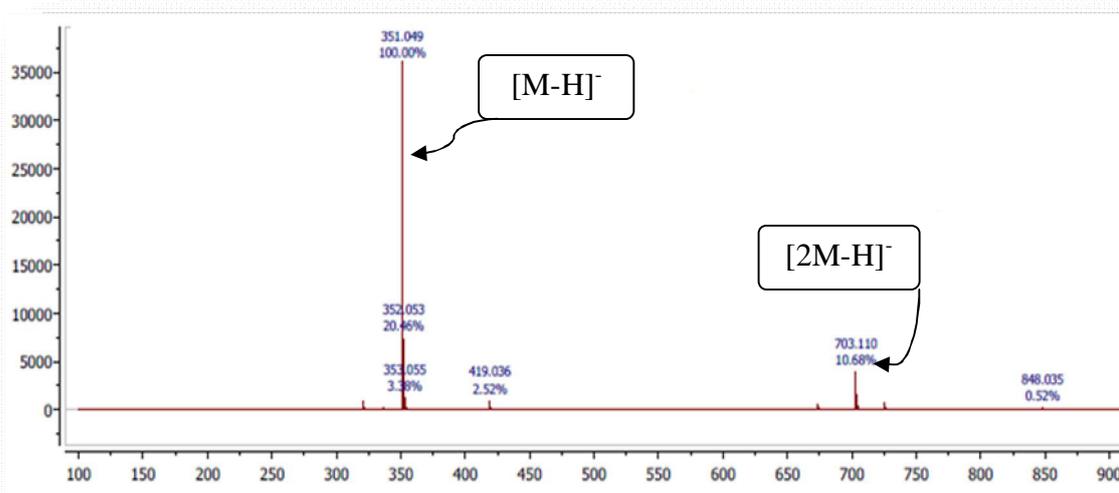
**Daphnorétine**

Le composé **H** est nommé daphnorétine ou 7-Hydroxy-6-méthoxy-3-(2'-oxochromen-7'-yl)-oxychromen-2-one. Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. Il montre une tache visible à la lumière UV à 254 et 366 nm sur CCM et ne se colore pas après révélation par l'acide sulfurique et chauffage. Par contre, il révèle une coloration jaune après exposition de sa CCM aux vapeurs d'iode. Ces constatations nous orientent à priori vers une structure coumarinique.

Les spectres de masse ESI-MS de ce composé indiquent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  353  $[M+H]^+$  en mode positif (Figure III-141) et à  $m/z$  351  $[M-H]^-$  et 703  $[2M-H]^-$  en mode négatif (Figure III-142), correspondant à une formule brute en  $C_{19}H_{12}O_7$ , soit une masse moléculaire de 352 uma impliquant 14 degrés d'insaturation.

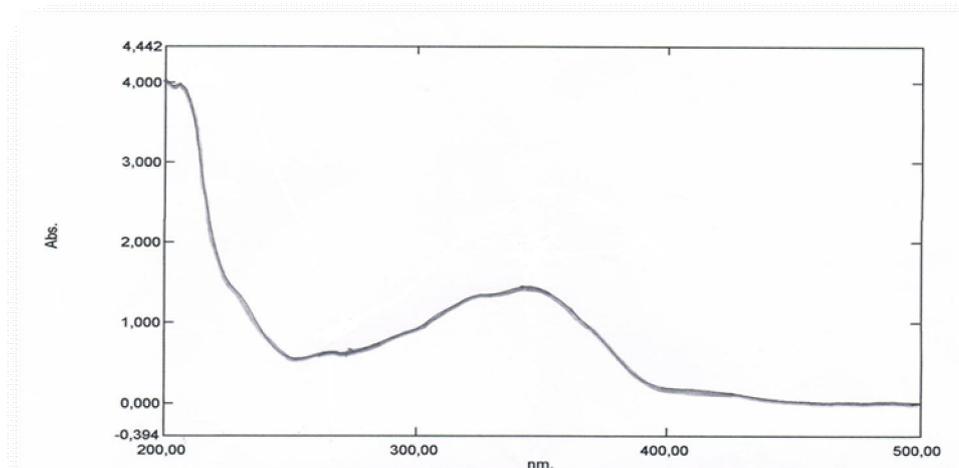


**Figure III-141:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé H



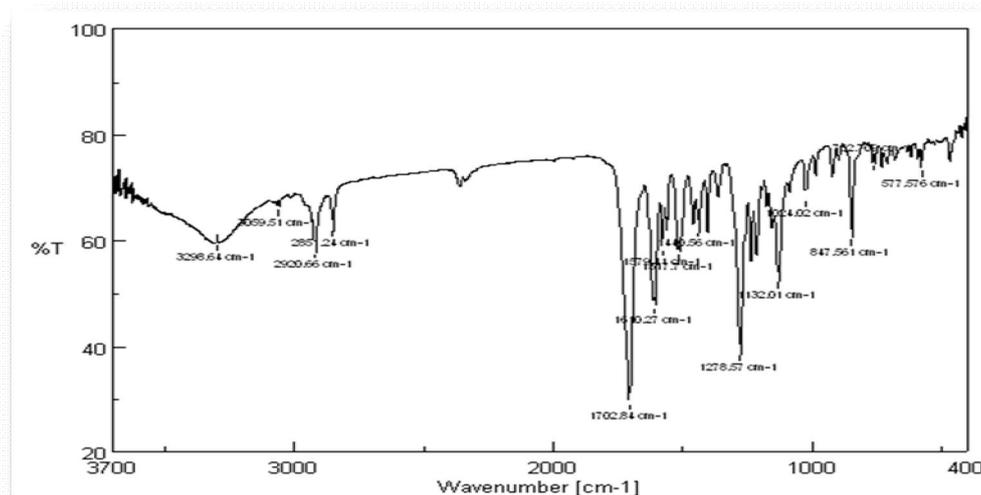
**Figure III-142:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé H

L'enregistrement du spectre UV (Figure III-143) du composé **H** est réalisé dans le MeOH. Ce spectre montre trois bandes d'absorption maximales à 228, 260 et 344 nm, ces absorptions sont typiques d'un dérivé 7-alkoxycoumarine [131].



**Figure III-143:** Spectre UV du composé **H**

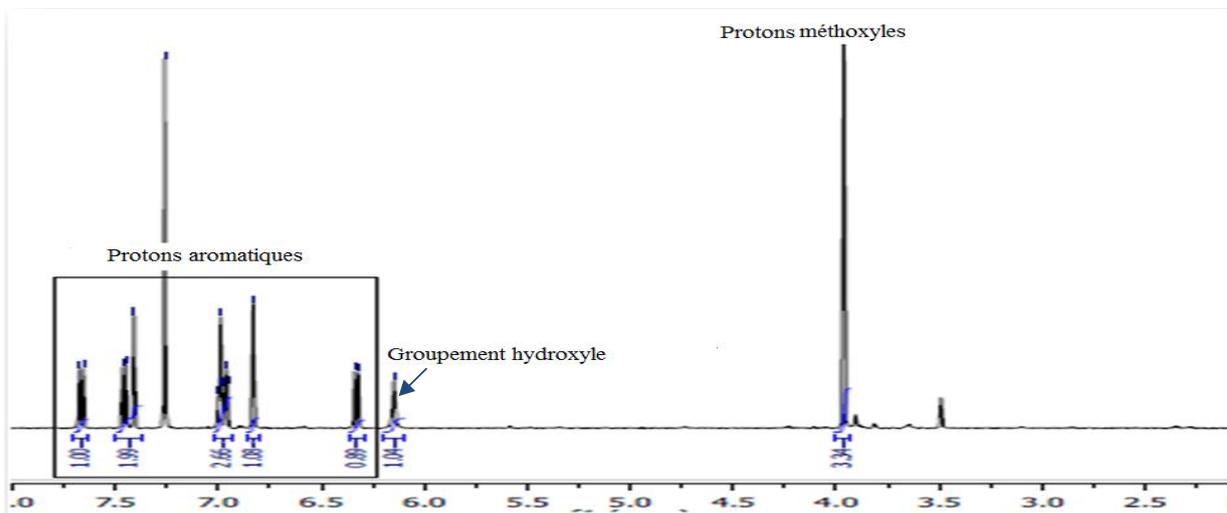
Son spectre IR (Figure III-144) permet de visualiser les bandes d'absorption d'un groupement hydroxyle à  $3290\text{ cm}^{-1}$ , d'un H-C aromatique à  $3059\text{ cm}^{-1}$ , d'un carbonyle à  $1702\text{ cm}^{-1}$ , d'une liaison ether à  $1278\text{ cm}^{-1}$ , d'un système aromatique à  $1620$ ,  $1519$  et  $1511\text{ cm}^{-1}$  et d'un système aliphatique à  $2900$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$ . L'ensemble de ces bandes d'absorption atteste de la nature coumarinique de ce composé [132].



**Figure III-144:** Spectre IR du composé **H**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-145) du composé **H** enregistré dans le  $\text{CDCl}_3$  montre clairement la présence de neuf signaux se répartissant comme suit:

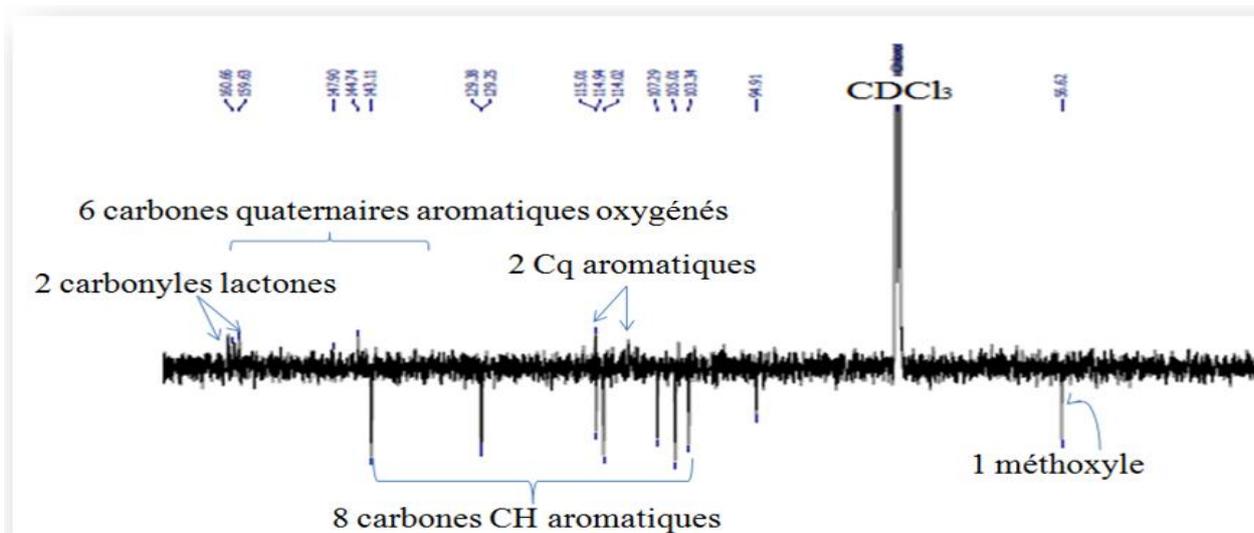
- ✓ Sept signaux dans la région aromatique allant de 6,33-7,66 ppm.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet s'intégrant à 1H résonant à  $\delta_H$  6,15.
- ✓ Un deuxième signal singulet d'intégration 3H à 3,96 ppm.



**Figure III-145:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CDCl}_3$ ) du composé H

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-146) du composé H permet d'observer 16 signaux correspondant à 19 atomes de carbone dont:

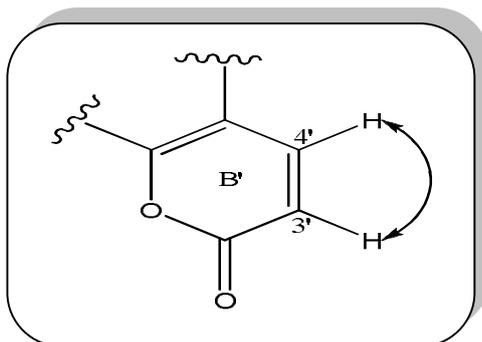
- 2 carbonyles lactones.
- 8 carbones CH aromatiques.
- 6 carbones quaternaires aromatiques oxygénés.
- 2 carbones quaternaires aromatiques.
- 1 méthoxyle.



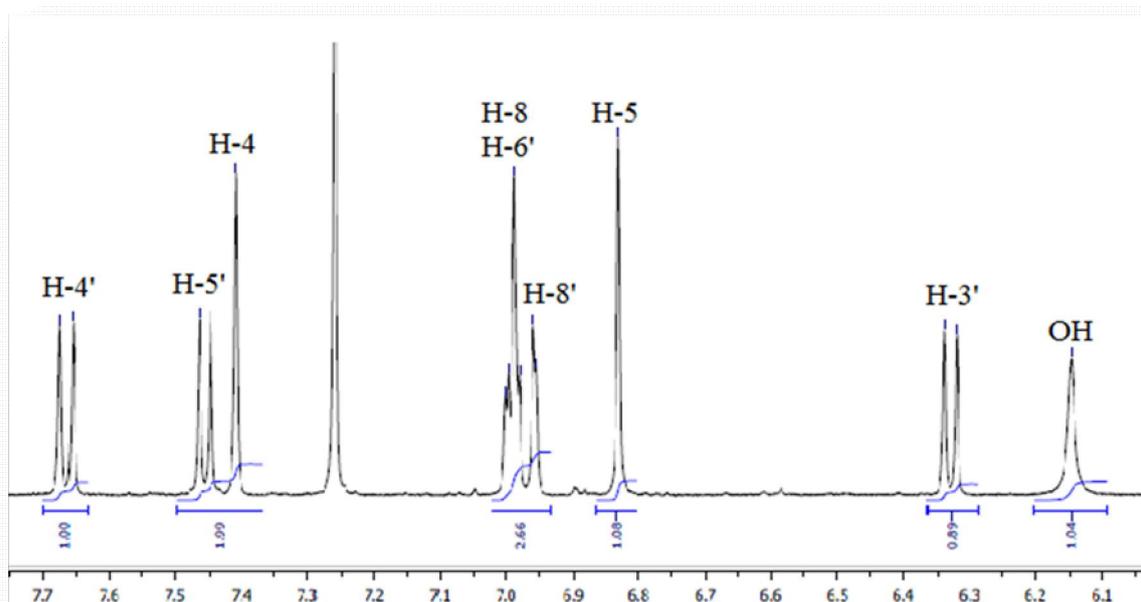
**Figure III-146:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz- $\text{CDCl}_3$ ) du composé H

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-148), COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure III-150) et HSQC (Figure III-151) du composé en question indique la présence de deux systèmes de spins à savoir:

- ✓ 2 protons résonant à  $\delta_{\text{H}}$  7,66 ( $d$ ;  $J = 9,5$ ; H-4') et 6,33 ( $d$ ;  $J = 9,5$ ; H-3') appartiennent au cycle B' (Fragment I) (Figure III-147). Leurs carbones sont détectés à  $\delta_{\text{C}}$  143,1 (C-4') et 114,9 (C-3').

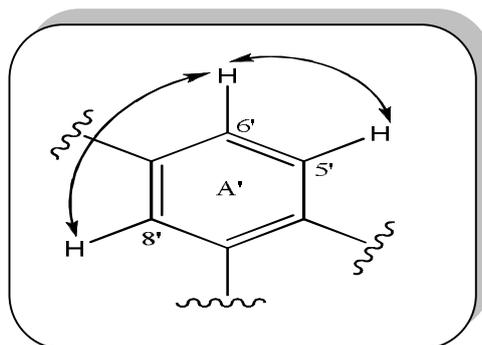


**Figure III-147: Fragment I**

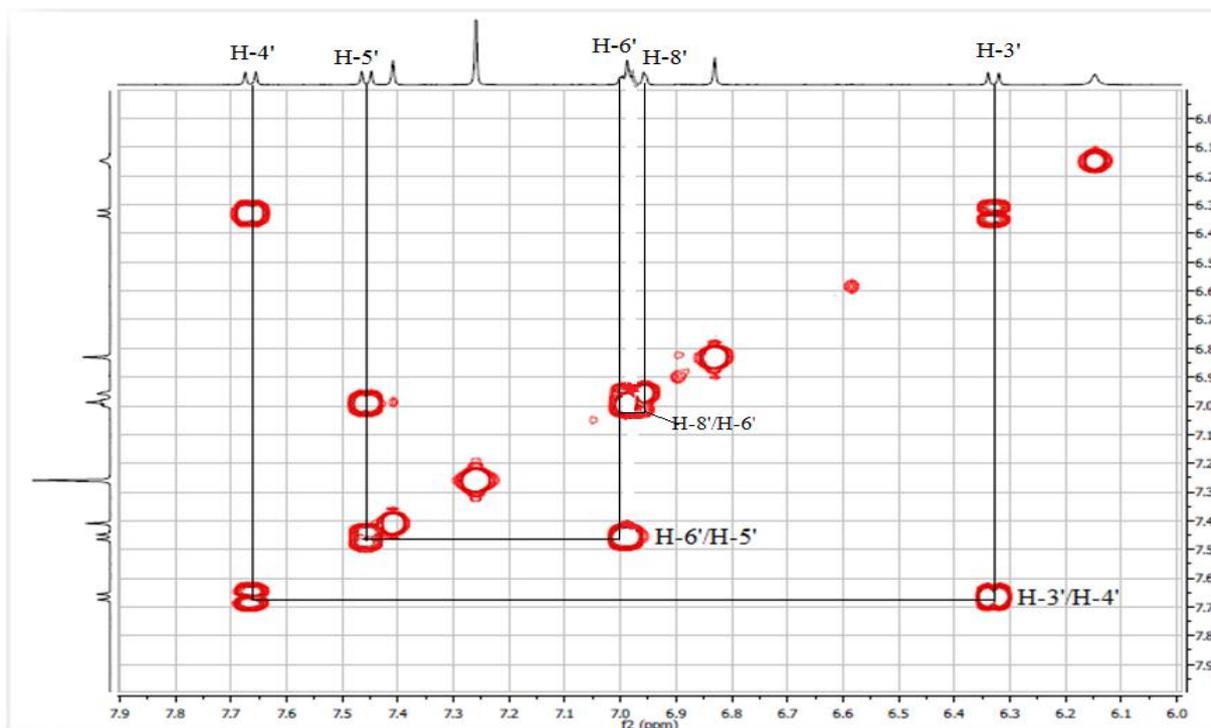


**Figure III-148: Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé H**

- ✓ 3 protons appartenant à un même système de spins ABM détectés à  $\delta_{\text{H}}$  7,45 ( $d$ ;  $J = 8,5$ ; H-5'), 6,99 ( $dd$ ;  $J = 8,5$ ; 2,4; H-6') et 6,96 ( $d$ ;  $J = 2,4$ ; H-8') correspondant aux protons du noyau aromatique A' 1,2,4-trisubstitué (Figure III-149). Le spectre HSQC permet de repérer leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  129,3, 114,0 et 105,0 ppm respectivement (Fragment II).



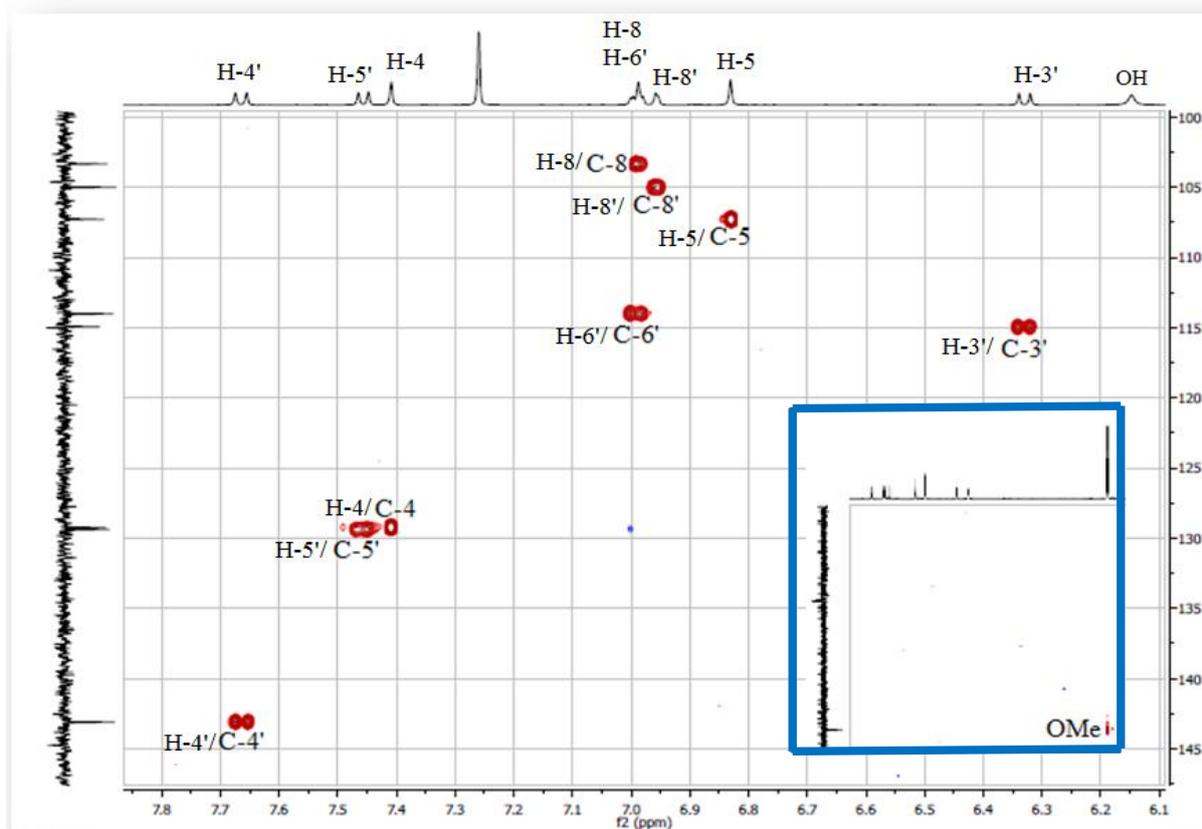
**Figure III-149: Fragment II**



**Figure III-150: Spectre COSY du composé H**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-145) et HSQC (Figure III-151) montrent également dans la région des champs faibles:

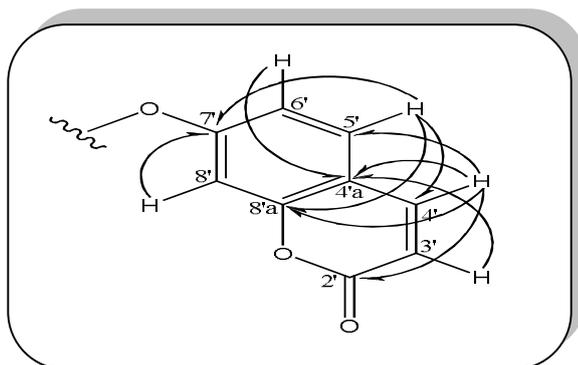
- ✓ 3 signaux sous forme de singlets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6,97; 6,83 et 7,41 ppm. L'expérience HSQC permet de détecter leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  103,3; 107,2 et 129,2 respectivement.
- ✓ 3 protons détectés à 3,96 ppm sous forme de singlet correspondent aux protons d'un groupement méthoxyle. Sur le spectre HSQC leur carbone résonne à  $\delta_{\text{C}}$  56,6.
- ✓ 1 proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,15 sous forme d'un singlet large (*sl*), ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC est attribué au proton d'un groupement hydroxyle.



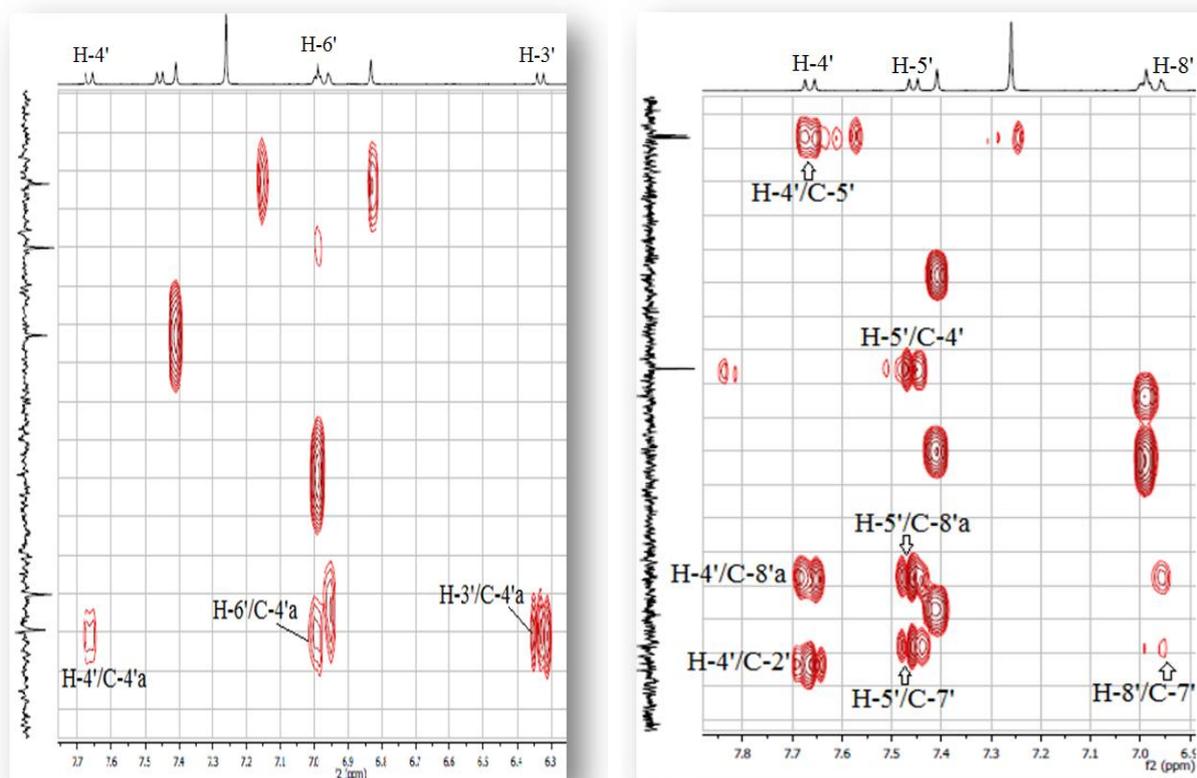
**Figure III-151:** Spectre HSQC du composé H

L'expérience de corrélation hétéronucléaire longue distance HMBC permet d'élaborer les éléments structuraux formant cette molécule. Cette expérience montre des corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  entre les protons des différents fragments structuraux de la molécule et les carbones avoisinants. En effet, le proton H-4' (7,66 ppm) corrèle en HMBC (Figures III-152 et III-153) avec un carbonyle repéré à  $\delta_C$  160,6 correspondant au carbone lactonique C-2'. Ce proton présente également trois taches de corrélation avec le carbone méthine C-5' (129,3 ppm) et avec deux carbones aromatiques quaternaires résonant à 115,0 et 155,0 ppm attribuables aux carbones C-4'a et C-8'a successivement.

L'expérience HSQC (Figure III-151) permet de localiser le proton H-5' à 7,45 ppm. Le carbone quaternaire C-4'a identifié précédemment corrèle en HMBC à son tour avec les protons H-3' ( $\delta_H$  6,33) et H-6' ( $\delta_H$  6,99). Les deux protons H-5' (7,45 ppm) et H-8' (6,96 ppm) montrent une tache de corrélation en HMBC (Figures III-152 et III-153) avec un carbone aromatique oxygéné détecté à  $\delta_C$  159,6 ne pouvant être que le carbone C-7'. Le proton H-5' corrèle en HMBC aussi avec les carbones C-4' ( $\delta_C$  143,1) et C-8'a.



**Figure III-152:** Corrélations HMBC observées pour le composé H



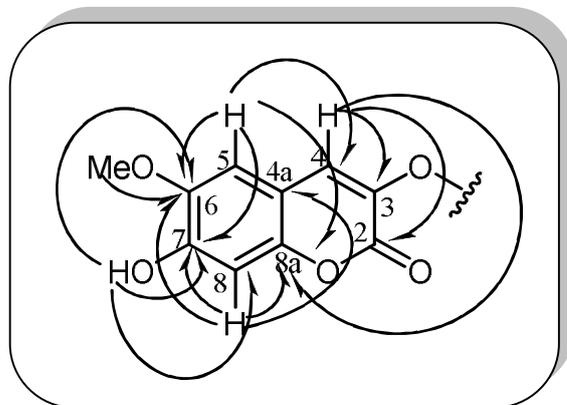
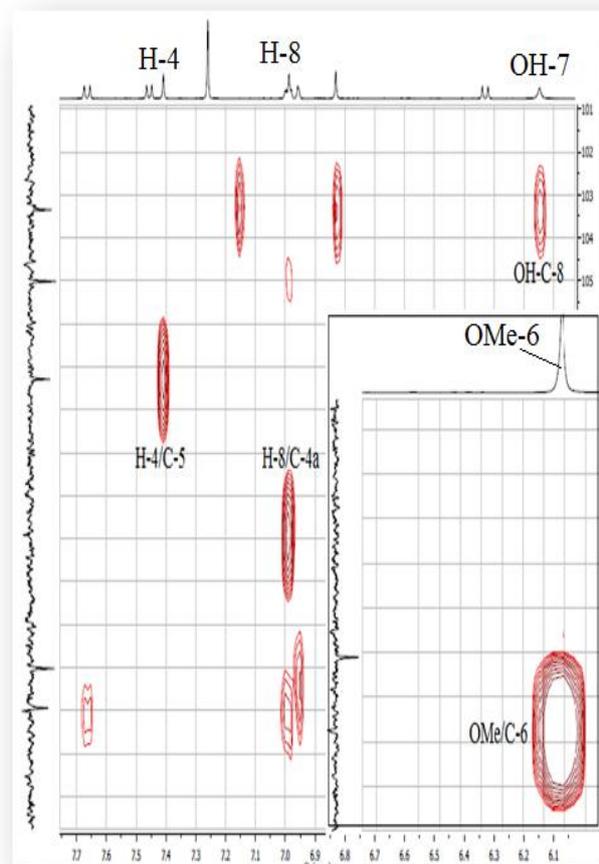
**Figure III-153:** Partie du spectre HMBC du composé H

Cette elucidation structurale conduit donc à l'identification d'une coumarine simple ayant une masse moléculaire égale à 162 uma qui est moins de la moitié de la masse moléculaire trouvée pour ce composé ( $352/2 = 176$ ). Au terme de ces constatations, il en résulte que la 2<sup>ème</sup> unité de cette molécule est constituée d'une coumarine substituée. En conséquence, ce composé contient deux unités coumariniques différentes.

La structure de la deuxième coumarine est élaborée en analysant les corrélations hétéronucléaires longue distance observées sur le spectre HMBC (Figure III-154). En effet, le

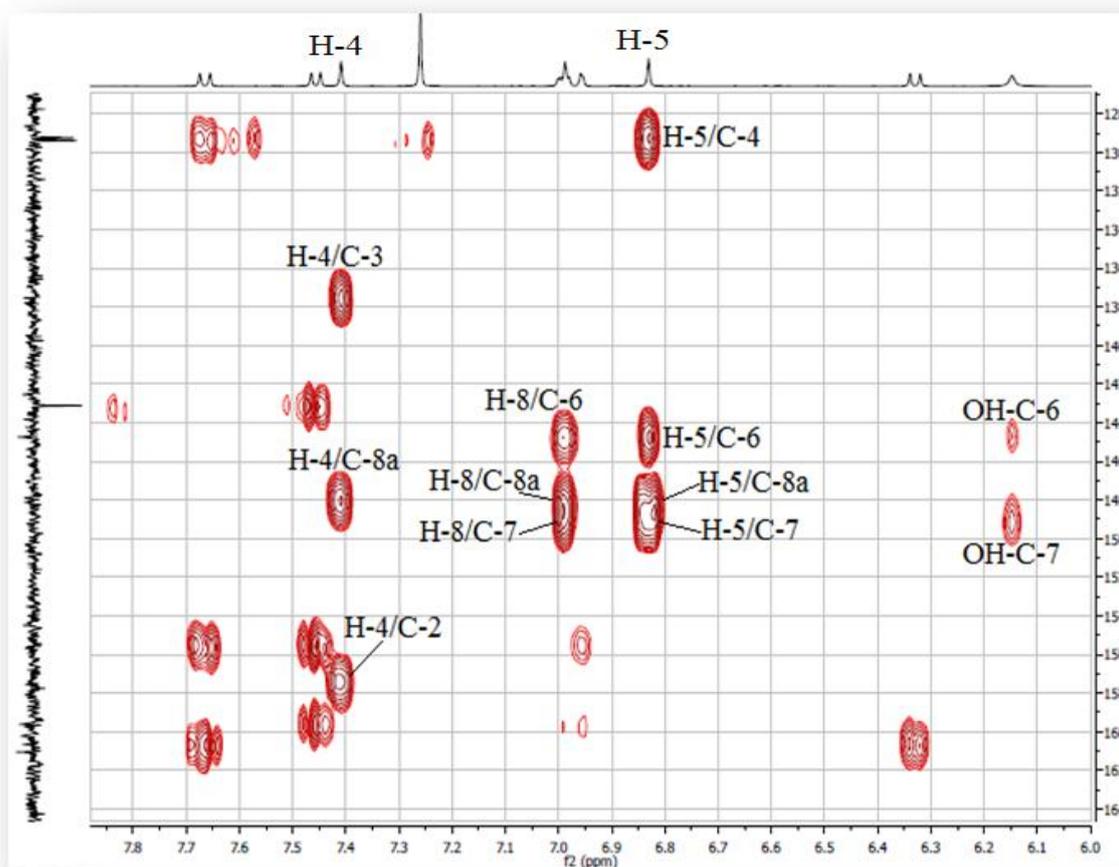
2<sup>ème</sup> carbonyle lactone résonant à  $\delta_C$  157,0 (C-2) corrèle en HMBC avec un proton singulet repéré à 7,41 ppm. Ce dernier couple en  $^3J$  à son tour avec un carbone aromatique méthine détecté à  $\delta_C$  107,2 ne pouvant être que la carbone C-5. Son proton (H-5; 6,83 ppm) corrèle avec le carbone C-4 (129,2 ppm). Le proton H-8 (6,97 ppm, *s*) couple en  $^3J$  avec un carbone aromatique quaternaire repéré à  $\delta_C$  111,0 attribuable au carbone C-4a.

En plus de ces corrélations, les protons H-5 (6,83 ppm) et H-8 (6,97 ppm) présentent des taches de corrélation sur le spectre HMBC (Figure III-155) avec les carbones C-6 ( $\delta_C$  144,7), C-7 ( $\delta_C$  149,0) et C-8a ( $\delta_C$  147,9). Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-6 et C-7 suggèrent qu'ils sont oxygénés car dans le cas des coumarines 6,7 dioxygénés les carbones C-6 et C-7 apparaissent dans les régions 143-146 ppm et 150-152 ppm respectivement [133]. Les taches de corrélation observées en  $^2J$  et  $^3J$  en HMBC (Figures III-154 et III-155) entre le proton du groupement hydroxyle ( $\delta_H$  6,15) et les carbones C-6, C-7 et C-8 ( $\delta_C$  103,3) indique que le OH est lié au carbone C-7. Le carbone C-6 corrèle ainsi avec les protons du groupement méthoxye ( $\delta_H$  3,96) suggérant qu'il est porté par ce carbone (C-6).



**Figure III-154:** Spectre et corrélations HMBC du composé H

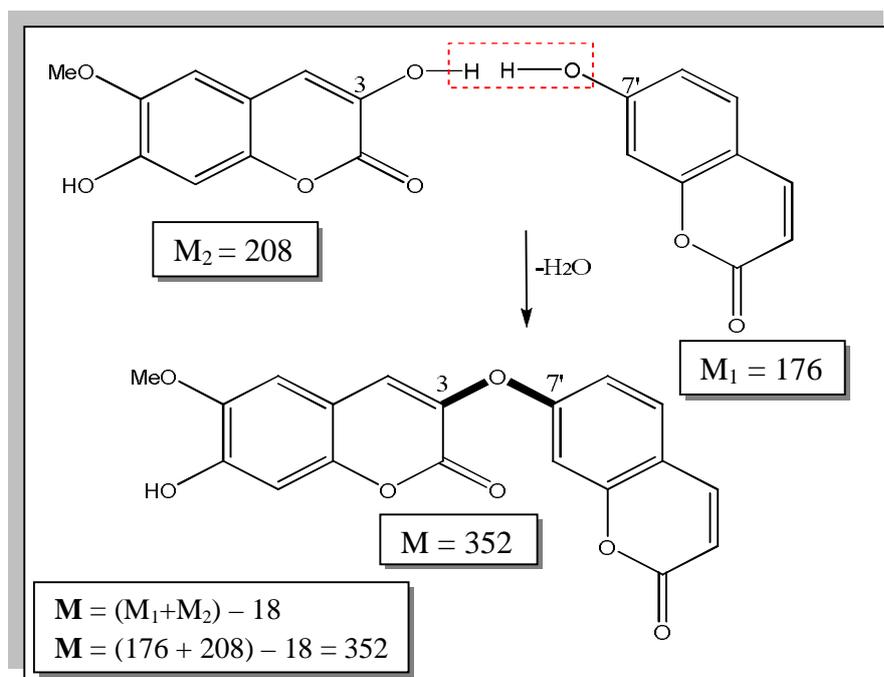
D'autre part, le proton H-4 (7,41 ppm) présente des taches de corrélation en HMBC (Figure III-155) avec le carbone C-8a ( $\delta_C$  147,9) et un carbone résonnant à 137,4 ppm correspondant au carbone C-3. La valeur du déplacement chimique de ce carbone ( $\delta_C$  137,4) indique bien qu'il est attaché à un atome d'oxygène.



**Figure III-155:** Partie du spectre HMBC du composé **H**

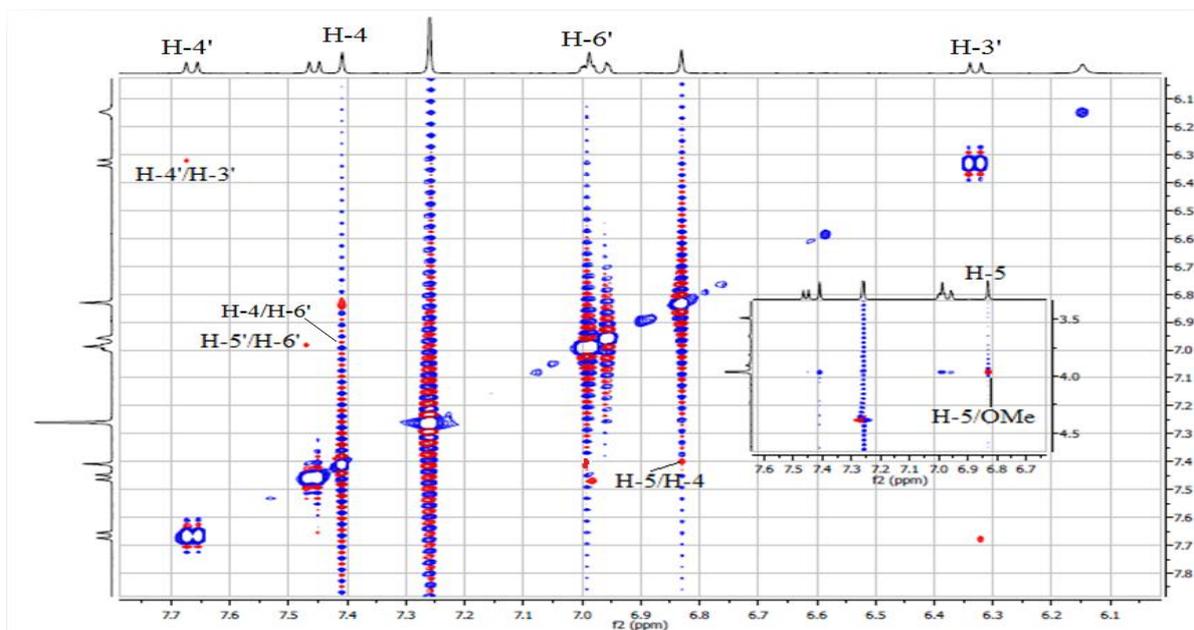
A l'issue de cette analyse, la deuxième unité coumarinique est identifiée. Sa masse moléculaire est 208 uma.

L'analyse des spectres de masse ESI-MS du composé **H** montrant une masse moléculaire de 352 uma correspondant à la formule brute  $C_{19}H_{12}O_7$  dont 14 degrés d'insaturation suggère la présence d'un squelette bis-coumarinique asymétrique. En effet, le nombre des cycles à 6 chaînons égale à 4 ainsi que les 10 doubles liaisons déjà identifiés, soit 14 insaturations, indiquent que la liaison entre les deux unités constituant cette bis-coumarine est possible seulement au niveau des carbones C-3 et C-7' (Figure III-156).

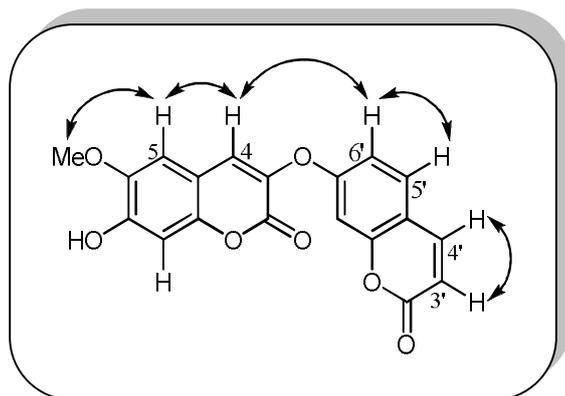


**Figure III-156:** Structure bis-coumarinique du composé H

La tache de corrélation NOESY observée sur le spectre NOESY (Figure III-157) entre les protons H-4 de l'unité coumarinique 3-hydroxyscopolétine et le proton H-6' de la 2<sup>ème</sup> unité coumarinique ombelliférone confirme la connexion entre ces deux unités coumariniques. L'analyse du spectre NOESY (Figure III-157) de ce composé révèle également une tache de corrélation entre le proton H-5 (6,83 ppm) et les protons du groupement méthoxyle (3,96 ppm), ce qui permet de confirmer que ce dernier est attaché au carbone C-6. D'autres effets NOESY entre H-5/H-4, H-5'/H-6' et H-3'/H-4' ont été aussi détectés (Figures III-157 et III-158).



**Figure III-157:** Spectre NOESY du composé H



**Figure III-158:** Principaux effets NOESY observés pour le composé H

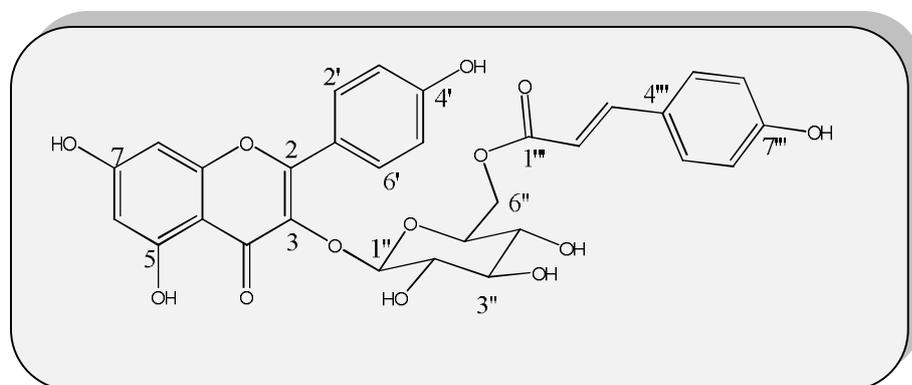
L'ensemble de ces données (Tableau III-8), appuyées par celles de la littérature [133] ont permis de conclure sans ambiguïté que la structure du composé **H** n'est autre que la daphnorétine. Ce composé a été déjà isolé des espèces du genre *Thymelaea* à savoir: *T. hirsuta* [35,37], *T. tartonraira* [4] et récemment de *T. microphylla* [11]. Il est à signaler que la daphnorétine possède un effet anxiolytique [134], en plus elle est considérée comme un antinéoplasique [135,136].

**Tableau III-8:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé H dans  $\text{CDCl}_3$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	-	157,0
3	-	137,4
4	7,41 ( <i>s</i> )	129,2
4a	-	111,0
5	6,83 ( <i>s</i> )	107,2
6	-	144,7
7	-	149,0
8	6,97 ( <i>s</i> )	103,3
8a	-	147,9
2'	-	160,6
3'	6,33 ( <i>d</i> ; 9,5)	114,9
4'	7,66 ( <i>d</i> ; 9,5)	143,1
4'a	-	115,0

5'	7,45 ( <i>d</i> ; 8,5)	129,3
6'	6,99 ( <i>dd</i> ; 8,5; 2,4)	114,0
7'	-	159,6
8'	6,96 ( <i>d</i> ; 2,4)	105,0
8'a	-	155,0
OH	6,15 ( <i>sl</i> )	-
OMe	3,96 ( <i>s</i> )	56,6

### III-2-11-Identification du composé I

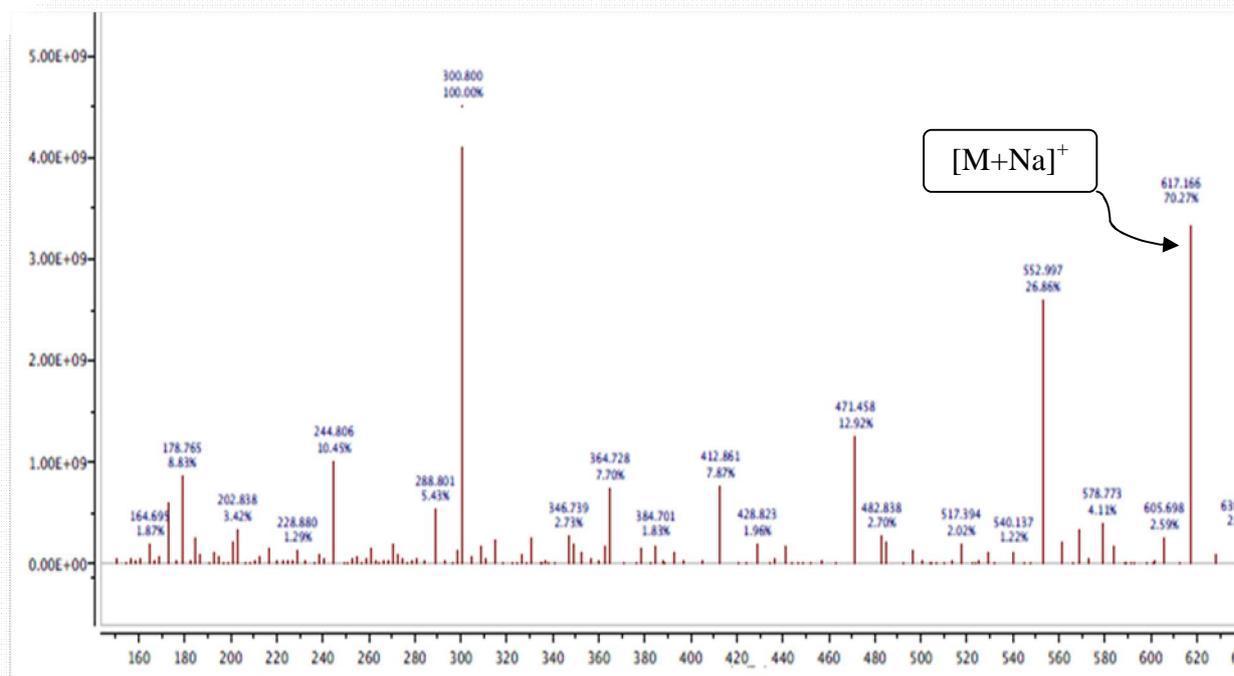


**Tiliroside**

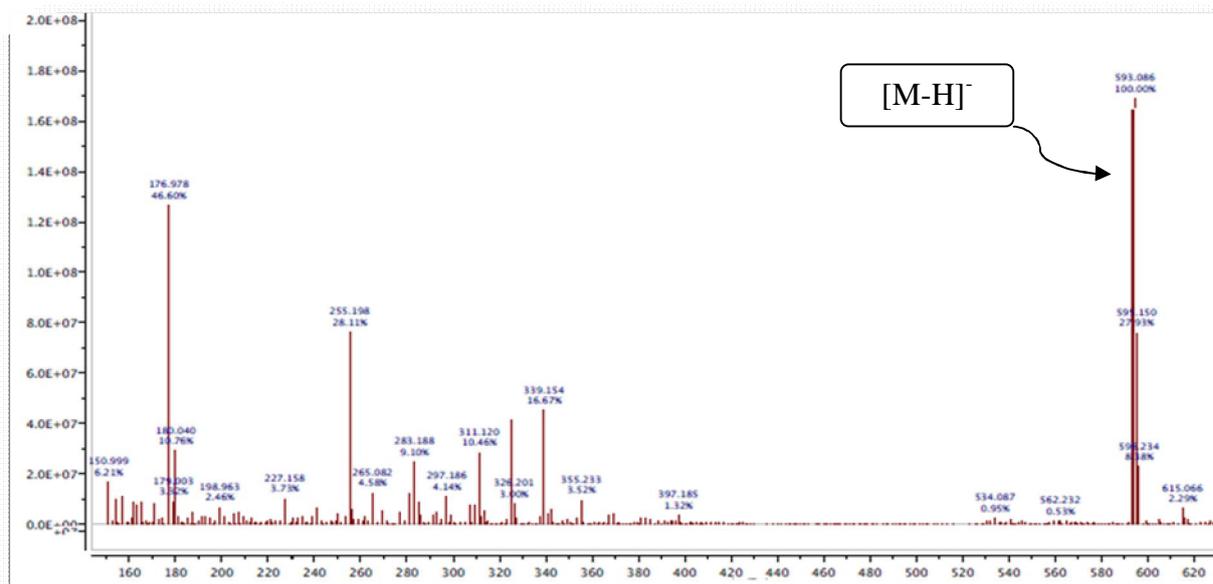
Il s'agit du Kaempférol 3-*O*- $\beta$ -6''-cafféoylglucopyranoside appelé encore tiliroside. Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache visible à la lumière UV à 254 et 366 nm. Ce composé prend une coloration jaune après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-162) du composé I révélant la présence de plusieurs signaux de protons aromatiques dans la zone allant de 5,50 à 7,90 ppm, ainsi que sa révélation en jaune traduisent sa nature flavonoïdique.

Les spectres de masse ESI-MS du composé I indiquent des pics d'ions pseudomoléculaires en modes positif (Figure III-159) et négatif (Figure III-160) à  $m/z$  617  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et 593  $[\text{M}-\text{H}]^-$  respectivement, donnant une masse moléculaire égale à 594 uma en accord avec la formule brute en  $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ .

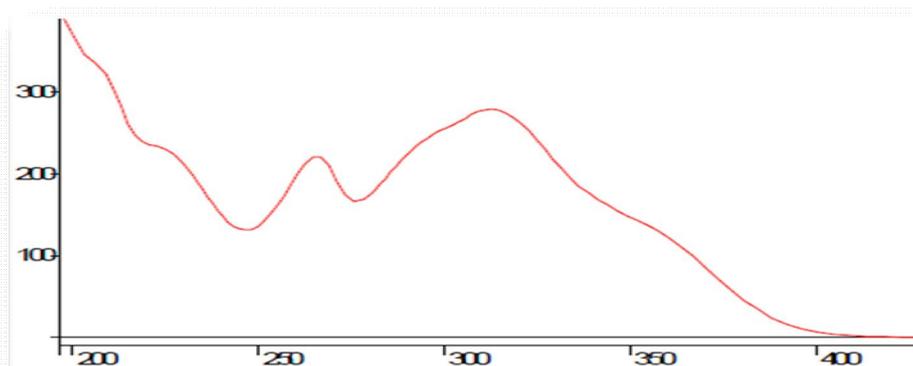


**Figure III-159:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé I



**Figure III-160:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé I

Le spectre UV (Figure III-161) de ce composé montre deux bandes d'absorption maximales à 266 et 314 nm. La fluorescence violette atteste de la présence d'un chromophore de type flavonol substitué en C-3 ou flavone.



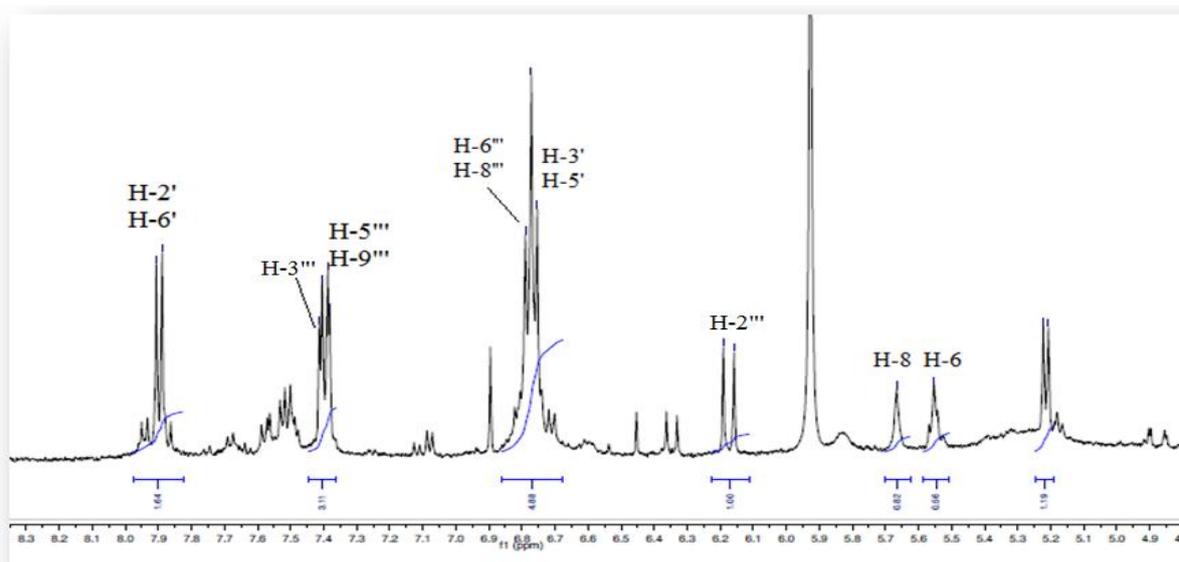
**Figure III-161:** Spectre UV du composé I

Son spectre IR présente des bandes d'absorption maximales à  $3402\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyle),  $1699$  et  $1657\text{ cm}^{-1}$  (carbonyle), à  $2929$  et  $2892$  (système aliphatique) et à  $1601$  et  $1516\text{ cm}^{-1}$  (système aromatique).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-162) du composé I enregistré dans le  $\text{DMSO-}d_6$  révèle la présence des signaux suivants:

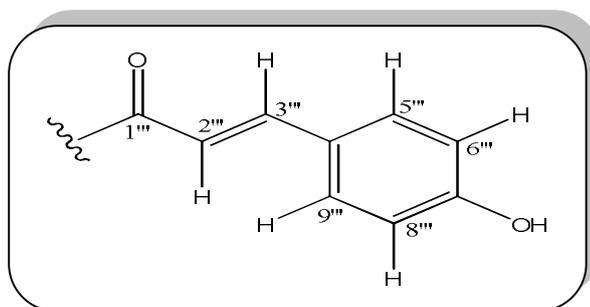
- ✓ Deux signaux doublets s'intégrant pour 2 protons chacun, résonant à  $7,89\text{ ppm}$  (H-2'/H-6';  $J = 8,8\text{ Hz}$ ) et  $6,76\text{ ppm}$  (H-3'/H-5';  $J = 8,8\text{ Hz}$ ) caractéristiques de protons aromatiques d'un noyau aromatique para-substituée (cycle B).
- ✓ Deux signaux doublets d'intégration 1H chacun apparaissant à  $\delta_{\text{H}} 5,67$  ( $J = 1,8\text{ Hz}$ ) et  $5,55$  ( $J = 1,8\text{ Hz}$ ) sont attribués respectivement aux protons H-8 et H-6 meta-couplés du cycle A.

L'ensemble de ces signaux nous oriente vers une génine de type Kaempférol.



**Figure III-162:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-DMSO- $d_6$ ) du composé I

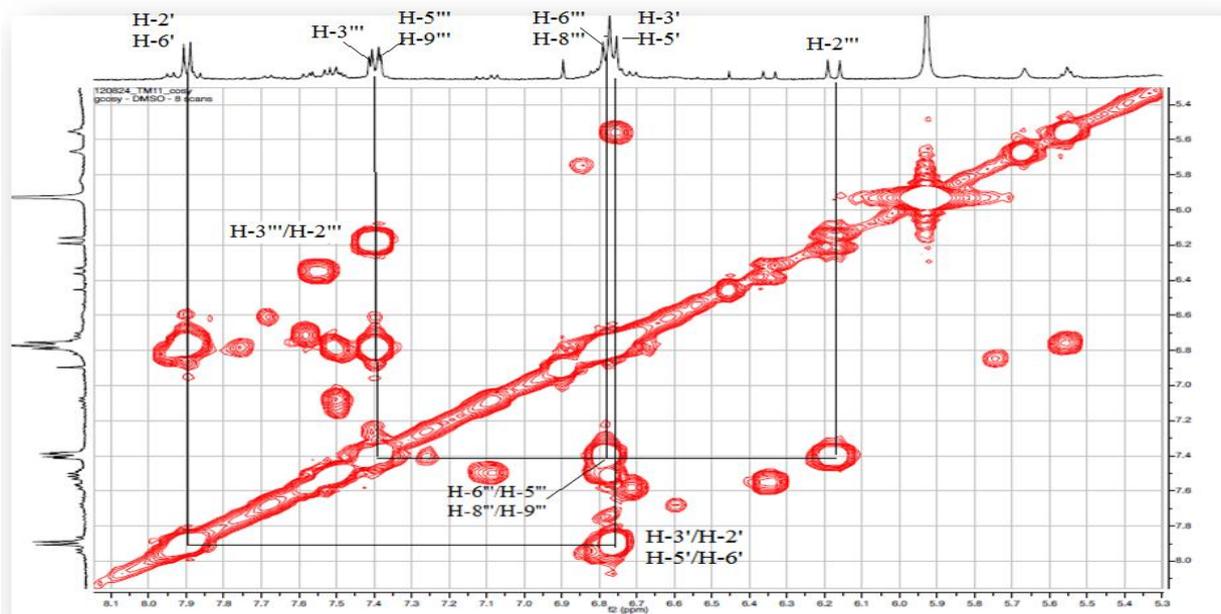
Ce spectre montre également d'autres signaux correspondant aux protons d'un autre cycle aromatique détectés à 6,78 ppm (H-6''' et H-8''',  $J = 8,6$  Hz) et à 7,39 ppm (H-5''' et H-9''',  $J = 8,6$  Hz) appartenant à un système  $A_2X_2$  des cycles aromatiques para-substitués. Deux signaux détectés à 6,16 et 7,40 ppm chacun sous forme de doublet correspondent respectivement aux protons en position  $\alpha$  (H-2''',  $J = 15,8$  Hz) et  $\beta$  (H-3''',  $J = 15,8$  Hz) d'un groupement carbonyle. Ceci pourrait correspondre à un dérivé cafféoyle (Figure III-163).



**Figure III-163: Structure d'un dérivé cafféoyle**

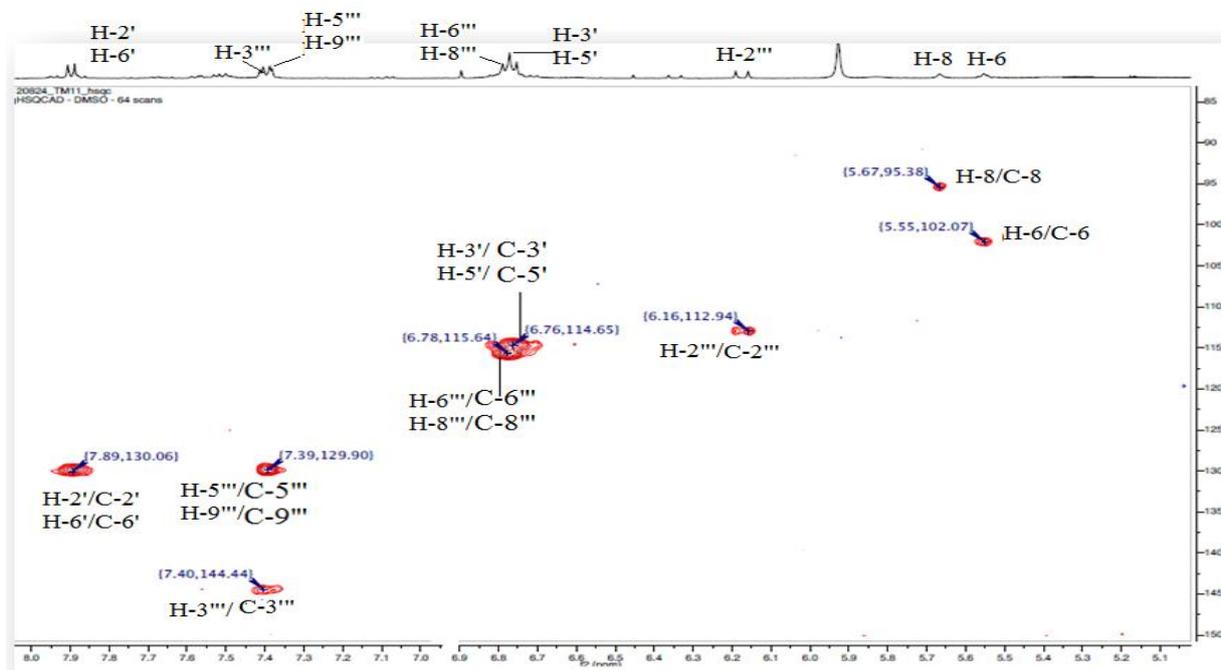
L'analyse du spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figures III-164) du composé **I** permet de repérer les corrélations homonucléaire attendues entre les protons appartenant aux mêmes systèmes de spins tels que:

- H-2'/H-3' et H-5'/H-6' du cycle B.
- H-6/H-8 du cycle A.
- H-2'''/H-3''' de la double liaison *trans*.
- H-5'''/H-6''' et H-8'''/H-9''' du noyau aromatique du groupement cafféoyle.



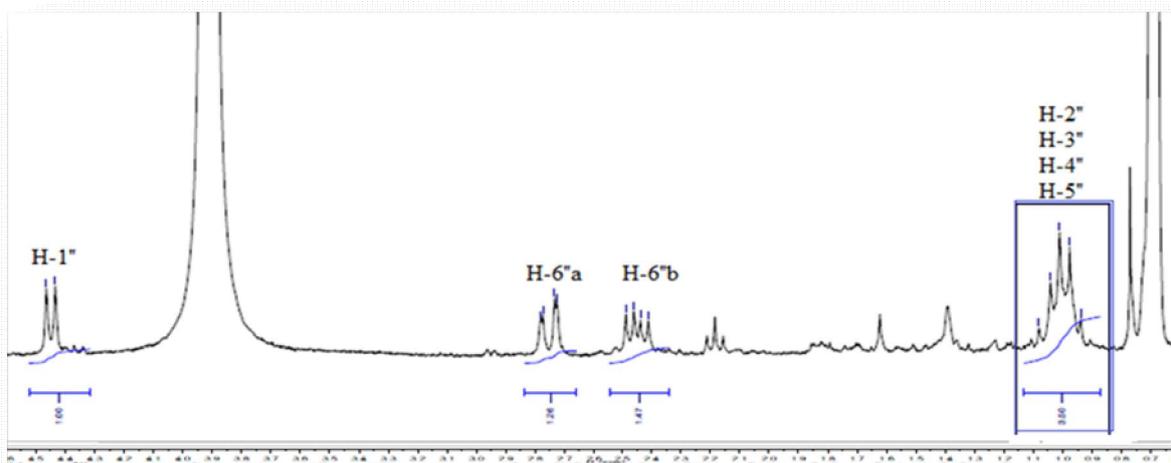
**Figure III-164: Partie du spectre COSY du composé I**

L'analyse du spectre HSQC (Figure III-165) conduit à déterminer les déplacements chimiques des carbones C-2'/C-6' ( $\delta_C$  130,0), C-3'/C-5' ( $\delta_C$  114,6), C-5'''/C-9''' ( $\delta_C$  129,9), C-6'''/C-8''' ( $\delta_C$  115,6), C-2''' ( $\delta_C$  112,9), C-3''' ( $\delta_C$  144,4), C-8 ( $\delta_C$  95,3) et C-6 ( $\delta_C$  102,0).



**Figure III-165:** Partie du spectre HSQC du composé I

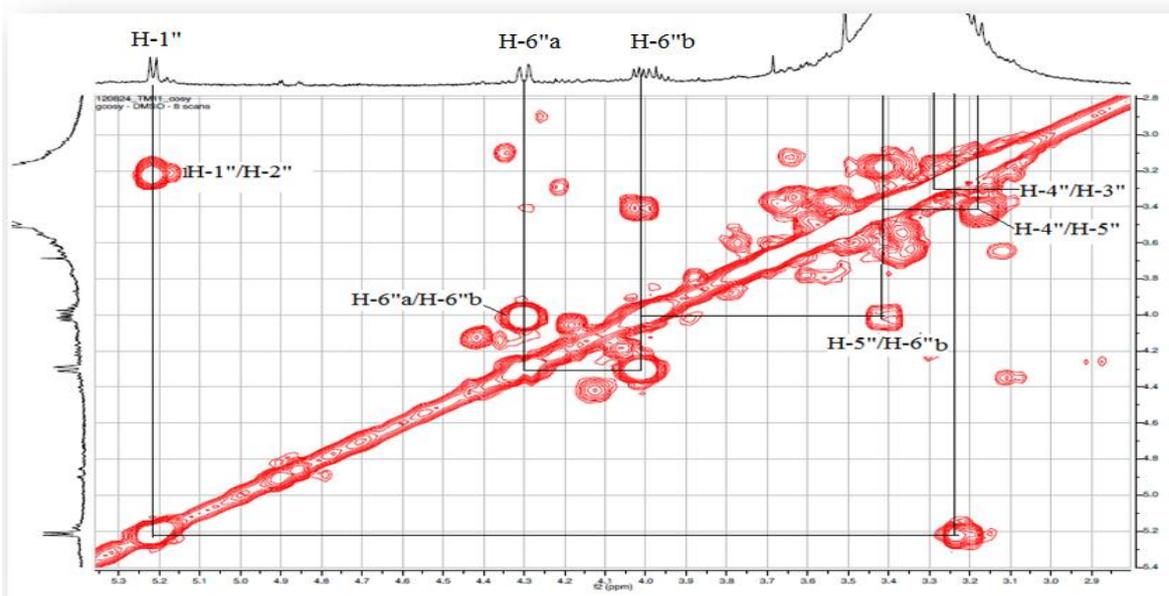
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-166) suggère aussi l'existence d'une unité osidique dont un doublet à 5,21 ppm (H-1'',  $J = 7,5$  Hz) qui correspond au proton anomérique, deux doublets de doublets à 4,30 et 4,01 ppm attribuables aux deux protons oxyméthyléniques H-6''a ( $J = 11,9$  et 2,2 Hz) et H-6''b ( $J = 11,9$  et 6,5 Hz), des multiplets entre 3,17 et 3,40 ppm attribués aux protons oxyméthines de l'unité osidique.



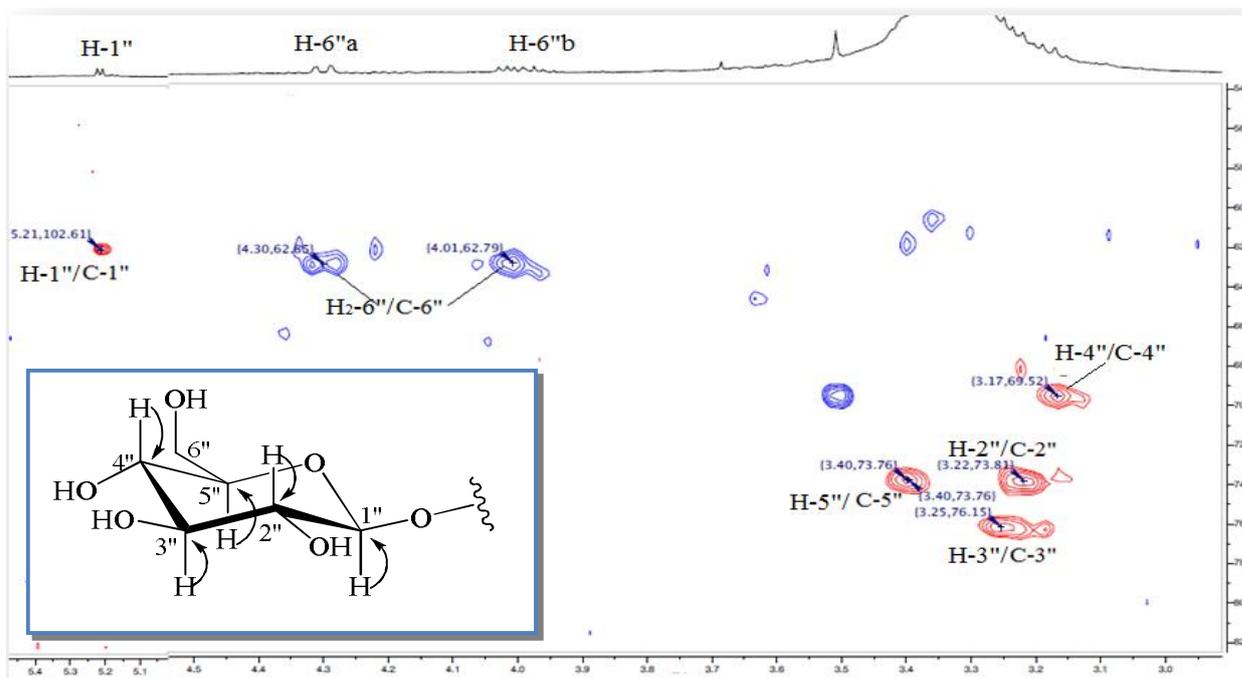
**Figure III-166:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-DMSO- $d_6$ ) de l'unité osidique

Le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure III-167) du composé **I** permet d'observer les corrélations entre les différents protons de cette unité osidique entre: H-1''/H-2'' (3,22 ppm), H-3'' (3,25 ppm)/H-4'' (3,17 ppm), H-4''/H-5'' (3,40 ppm), H-5''/H-6''b et H-6''a/H-6''b. Leurs carbones sont détectés par l'expérience HSQC (Figure III-168) à  $\delta_{\text{C}}$  102,6 (C-1''), 73,8 (C-2''), 76,1 (C-3''), 69,5 (C-4''), 73,7 (C-5''), 62,8 (C-6'').

L'ensemble de ces données spectroscopiques et la valeur de la constante de couplage  $J_{\text{H-1''/H-2''}} = 7,5$  Hz indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$ .

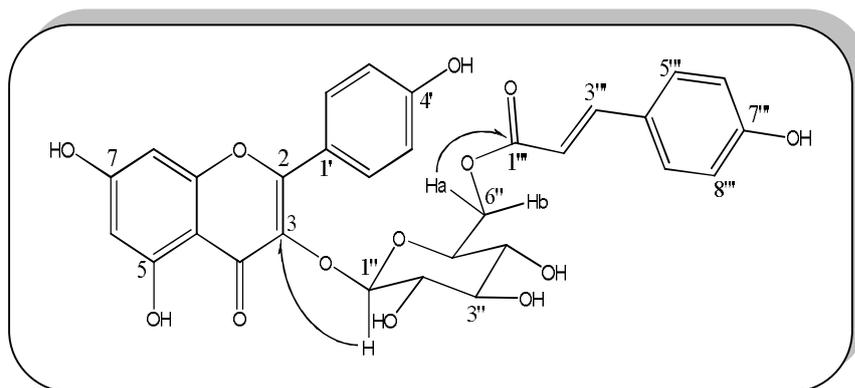


**Figure III-167:** Partie du spectre COSY de l'unité osidique du composé **I**



**Figure III-168:** Spectre HSQC montrant la partie glucose

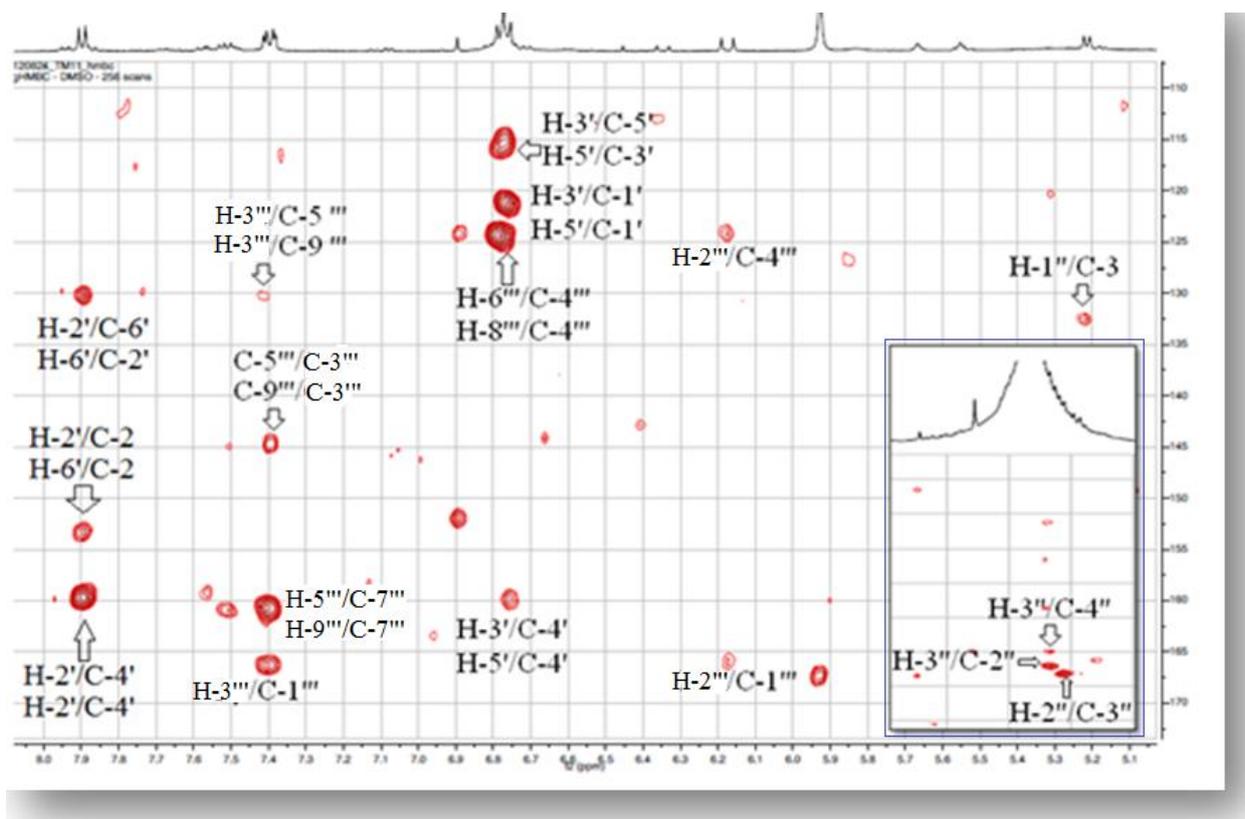
Le spectre HMBC (Figure III-170) de ce composé montrant des corrélations en  $^3J$  entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-3 de la génine résonnant à 132,5 ppm et entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et le carbone C-2 à 158 ppm, confirment que ce glucose est positionné en C-3. Le proton H-6''a du glucose corrélant en HMBC (Figures III-169 et III-170) avec un carbonyle repéré à 167,1 ppm (C-1''') indique que le glucose est attaché également au groupement cafféoyle.



**Figure III-169:** Corrélations HMBC montrant les différents points de branchement des unités du composé I

On reconnaît aussi d'autres corrélations (Figure III-170) entre:

- ✓ Les protons H-2'/H-6' ( $\delta_H$  7,89) et les carbones C-2' ( $\delta_C$  130,0), C-4' ( $\delta_C$  159,0), et C-6' ( $\delta_C$  130,0).
- ✓ Le proton H-3''' ( $\delta_H$  7,40) et les carbones C-1''' ( $\delta_C$  167,1), C-5''' ( $\delta_C$  129,9) et C-9''' ( $\delta_C$  129,9).
- ✓ Les protons H-5'''/H-9''' ( $\delta_H$  7,39) et les carbones C-3''' ( $\delta_C$  144,4) et C-7''' ( $\delta_C$  161,5).
- ✓ Les protons H-3'/H-5' ( $\delta_H$  6,76) et les carbones C-1' ( $\delta_C$  122,7), C-3' ( $\delta_C$  114,6), C-4' ( $\delta_C$  159,0), C-5' ( $\delta_C$  114,6).
- ✓ Le proton H-2''' ( $\delta_H$  6,16) et les carbones C1''' ( $\delta_C$  167,1), C-4''' ( $\delta_C$  124,0).
- ✓ Les protons H-6'''/H-8''' ( $\delta_H$  6,78) et le carbone C-4''' ( $\delta_C$  124,0).
- ✓ Le proton H-3'' ( $\delta_H$  3,25) et les carbones C-2'' ( $\delta_C$  73,8), C-4'' ( $\delta_C$  69,5).
- ✓ Le proton H-2'' ( $\delta_H$  3,22) et le carbone C-3'' ( $\delta_C$  76,1).



**Figure III-170:** Spectre HMBC du composé I

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -56^\circ$  ( $c$  0,1, MeOH) montrent que le composé I correspond effectivement au Kaempférol 3-*O*- $\beta$ -6"-cafféoylglucopyranoside. Cette molécule a été isolée antérieurement des espèces *Thymelaea hirsuta* [39] et *T. microphylla* [11] (Thymelaeaceae).

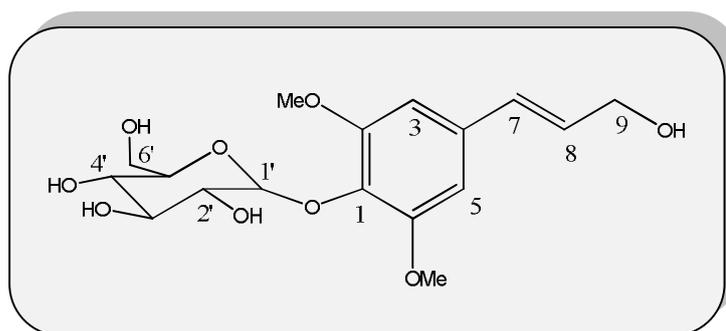
Le tableau (III-9) ci-dessous englobe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé.

**Tableau III-9:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé I dans DMSO- $d_6$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m; J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	-	158,4
3	-	132,5
4	-	178,8
5	-	162,9

6	5,55 ( <i>d</i> ; 1,8)	102,0
7	-	165,8
8	5,67 ( <i>d</i> ; 1,8)	95,3
9	-	161,5
10	-	105,6
1'	-	122,7
2'	7,89 ( <i>d</i> ; 8,8)	130,0
3'	6,76 ( <i>d</i> ; 8,8)	114,6
4'	-	159,0
5'	6,76 ( <i>d</i> ; 8,8)	114,6
6'	7,89 ( <i>d</i> ; 8,8)	130,0
1"	5,21 ( <i>d</i> ; 7,5)	102,6
2"	3,22 ( <i>m</i> )	73,8
3"	3,25 ( <i>m</i> )	76,1
4"	3,17 ( <i>m</i> )	69,5
5"	3,40 ( <i>m</i> )	73,7
6"	4,30 ( <i>dd</i> ; 11,9; 2,2) H-6a; 4,01( <i>dd</i> ; 11,9; 6,5) H-6b	62,8
1'''	-	167,1
2'''	6,16 ( <i>d</i> ; 15,8)	112,9
3'''	7,40 ( <i>d</i> ; 15,8)	144,4
4'''	-	124,0
5'''	7,39 ( <i>d</i> ; 8,6)	129,9
6'''	6,78 ( <i>d</i> ; 8,6)	115,6
7'''	-	161,5
8'''	6,78 ( <i>d</i> ; 8,6)	115,6
9'''	7,39 ( <i>d</i> ; 8,6)	129,9

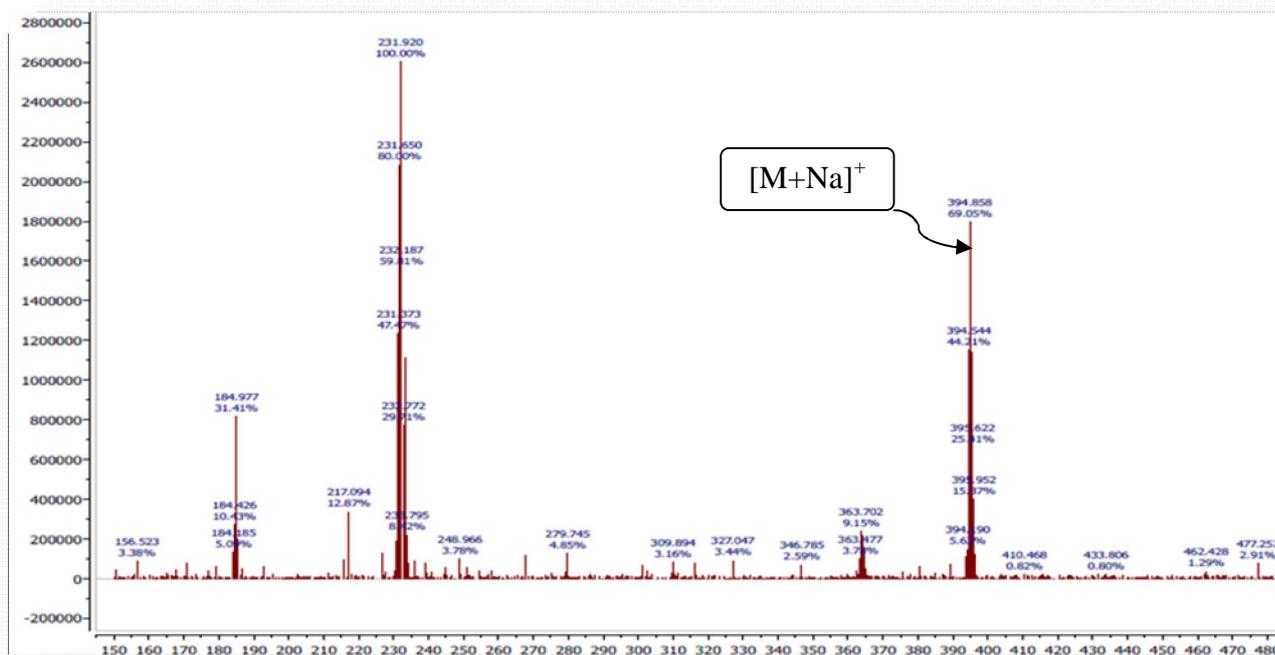
## III-2-12-Identification du composé J



Syringine

Il s'agit du 4-[(7E)-9-hydroxyprop-7-ène]-2,6-diméthoxyphenyl β-D-glucopyranoside appelé aussi syringine. Ce composé est obtenu sous forme de cristaux incolores solubles dans le méthanol. Il présente une tache bleue en CCM après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. La syringine est isolée pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Elle a été antérieurement identifiée dans quatre espèces de la famille Thymelaeaceae *Daphne genkwa* [125], *Daphne tangutica* [137], *Diplomorpha ganpi* [138] et *Wikstromia sikokiana* [139].

Le spectre de masse ESI-MS du composé **J** enregistré en mode positif (Figure III-171), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 395$   $[M+Na]^+$ . Ceci correspond à une masse moléculaire de 372 uma et une formule moléculaire en  $C_{17}H_{24}O_9$  (6 degrés d'insaturation).

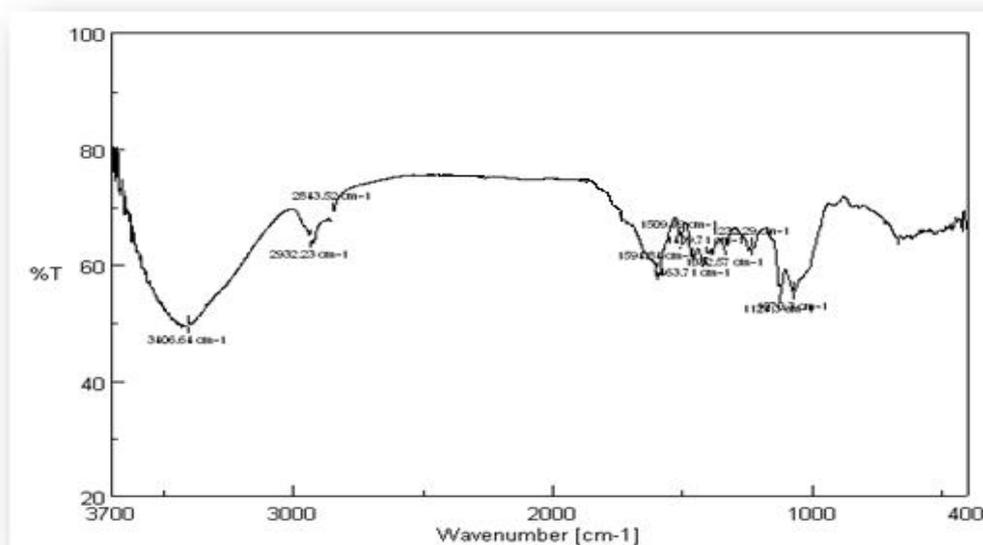


**Figure III-171:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé **J**

Le spectre UV enregistré dans le MeOH montre deux bandes d'absorption maximales à 222 et 265 nm, caractéristiques d'un système aromatique conjugué.

L'analyse du spectre IR (Figure III-172) de ce composé met en évidence la présence :

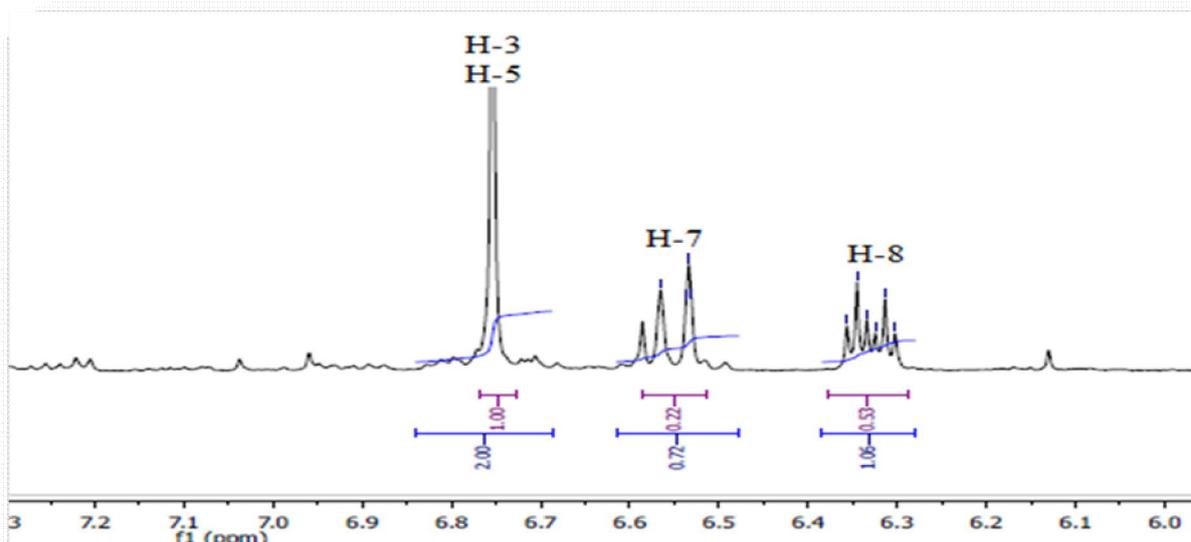
- D'un groupement hydroxyle ( $3405\text{ cm}^{-1}$ ).
- D'une double liaison ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ).
- D'un noyau aromatique ( $1594$  et  $1509\text{ cm}^{-1}$ ).
- D'un système aliphatique ( $2932$  et  $2843\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figure III-172: Spectre IR du composé J**

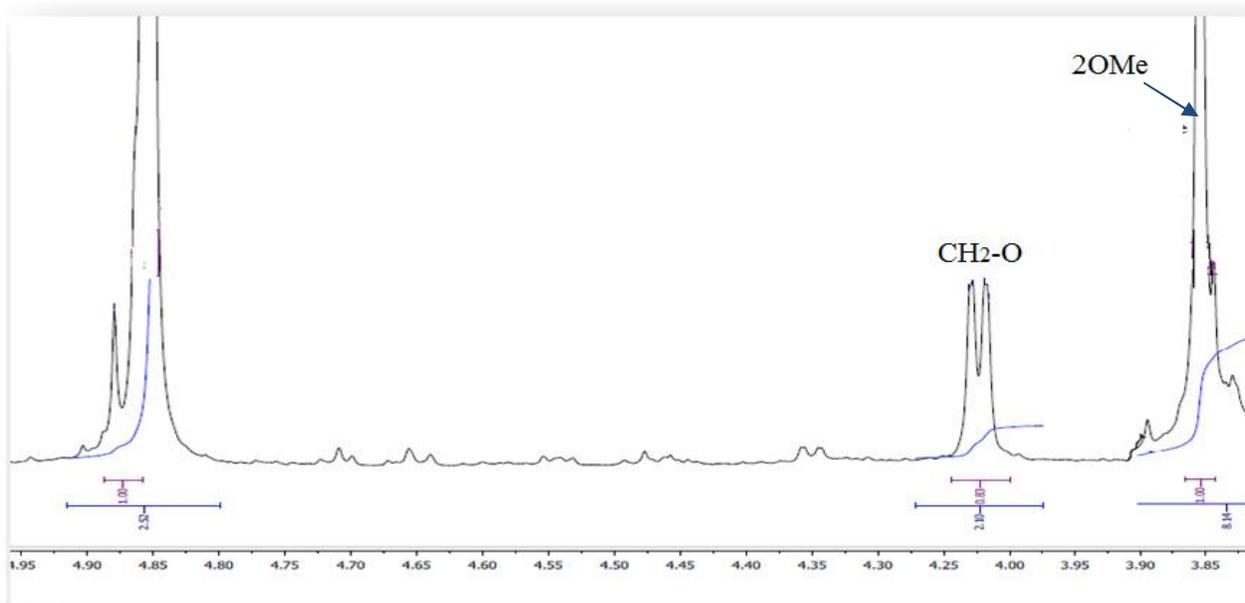
L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-173) et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure III-175) enregistrés dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  du composé **J** permet d'observer:

- ✓ Deux signaux à champs faibles sous forme de doublet de triplets s'intégrant chacun pour un proton à  $\delta_{\text{H}}$  6,55 (*dt*;  $J = 15,9$  et  $1,6$  Hz; H-7) et 6,33 (*dt*;  $J = 15,9$  et  $5,6$  Hz; H-8) respectivement, attribuables à deux protons éthyléniques appartenant à un même système de spins. Les grandes valeurs des constantes de couplage de ces protons indiquent une géométrie *trans* de la double liaison.
- ✓ Un signal singulet déblindé s'intégrant à 2H résonant à  $\delta_{\text{H}} = 6,75$  caractéristiques de deux protons identiques d'un noyau aromatique (H-3 et H-5).

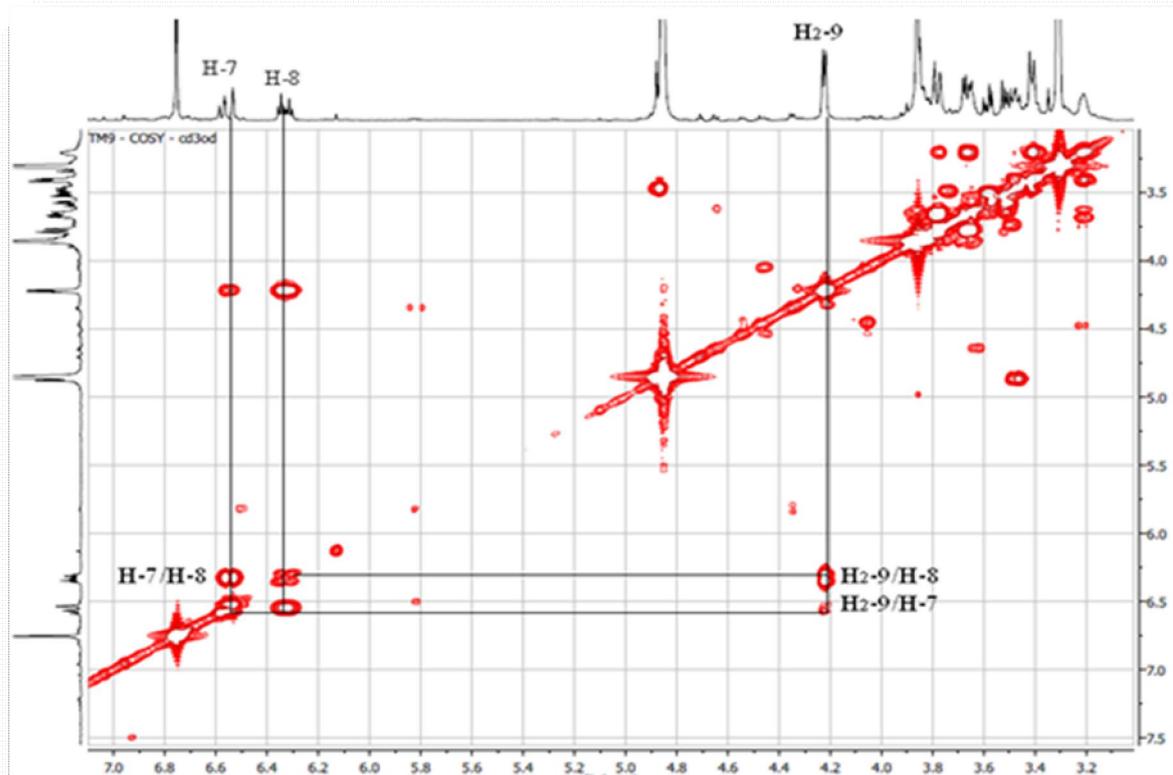


**Figure III-173:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé J

- ✓ Un autre signal singulet d'intégration 6H résonant à 3,85 ppm, correspondant aux protons de deux groupements méthoxyles (2-OMe) (Figure III-174).
- ✓ Un signal d'intégration 2H sous forme d'un doublet de doublets repéré à  $\delta_{\text{H}}$  4,22 ( $J = 5,6$  et 1,6 Hz) correspondant aux protons oxyméthylènes ( $\text{CH}_2\text{-O-9}$ ) (Figure III-174).

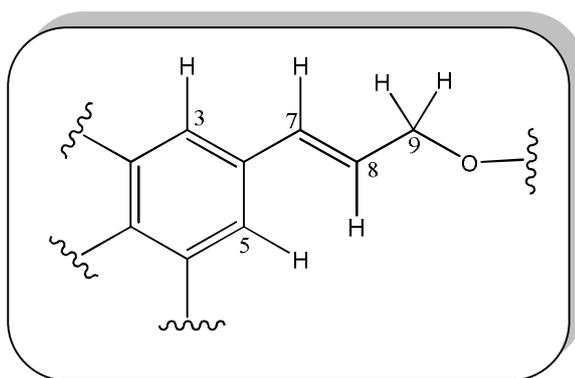


**Figure III-174:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé J



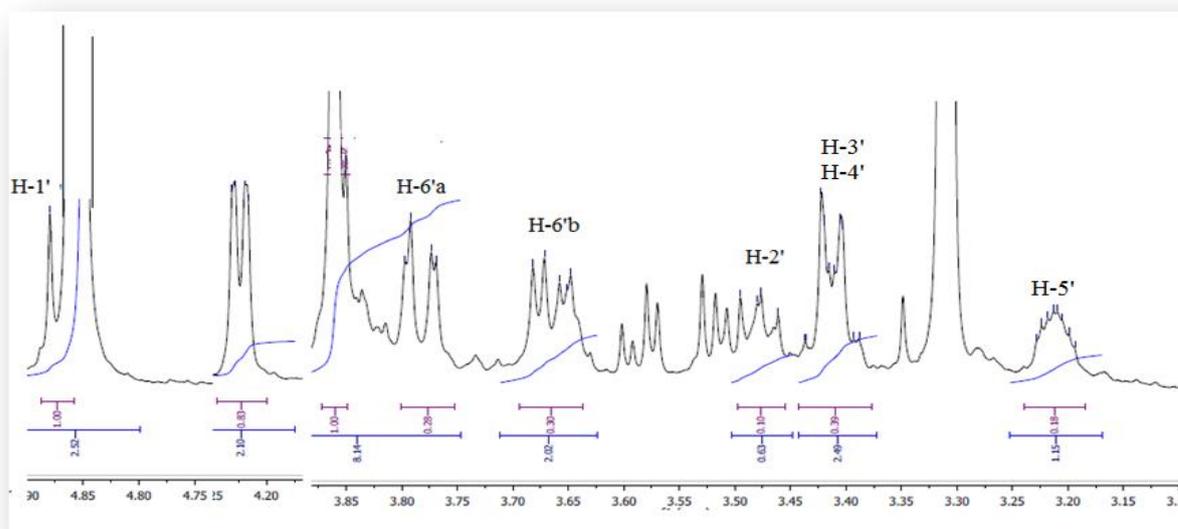
**Figure III-175:** Spectre COSY du composé J

La présence de deux protons éthyléniques (H-7 et H-8), deux protons oxyméthylènes (CH<sub>2</sub>-O-9) et deux protons aromatiques (H-3 et H-5), révèle que cette molécule contient un squelette de type cinnamyle alcool substitué (Figure III-176).



**Figure III-176:** Structure d'un cinnamyle alcool

Ces spectres suggèrent aussi l'existence d'une unité osidique en raison du nombre de signaux résonant dans la zone (3,21 à 3,78 ppm) et d'un signal localisé à 4,87 ppm sous forme d'un doublet (1H;  $J = 8,1$  Hz) caractéristique du proton anomère d'un sucre (Figure III-177).

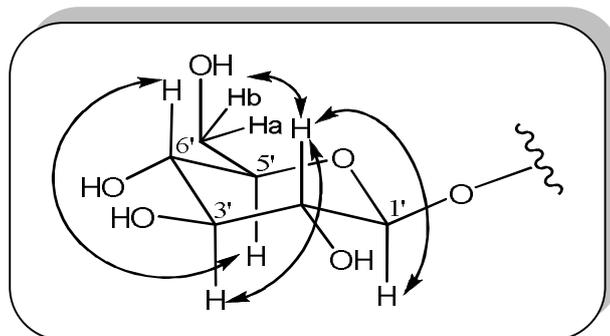


**Figure III-177:** Partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) mettant en évidence l'unité osidiques

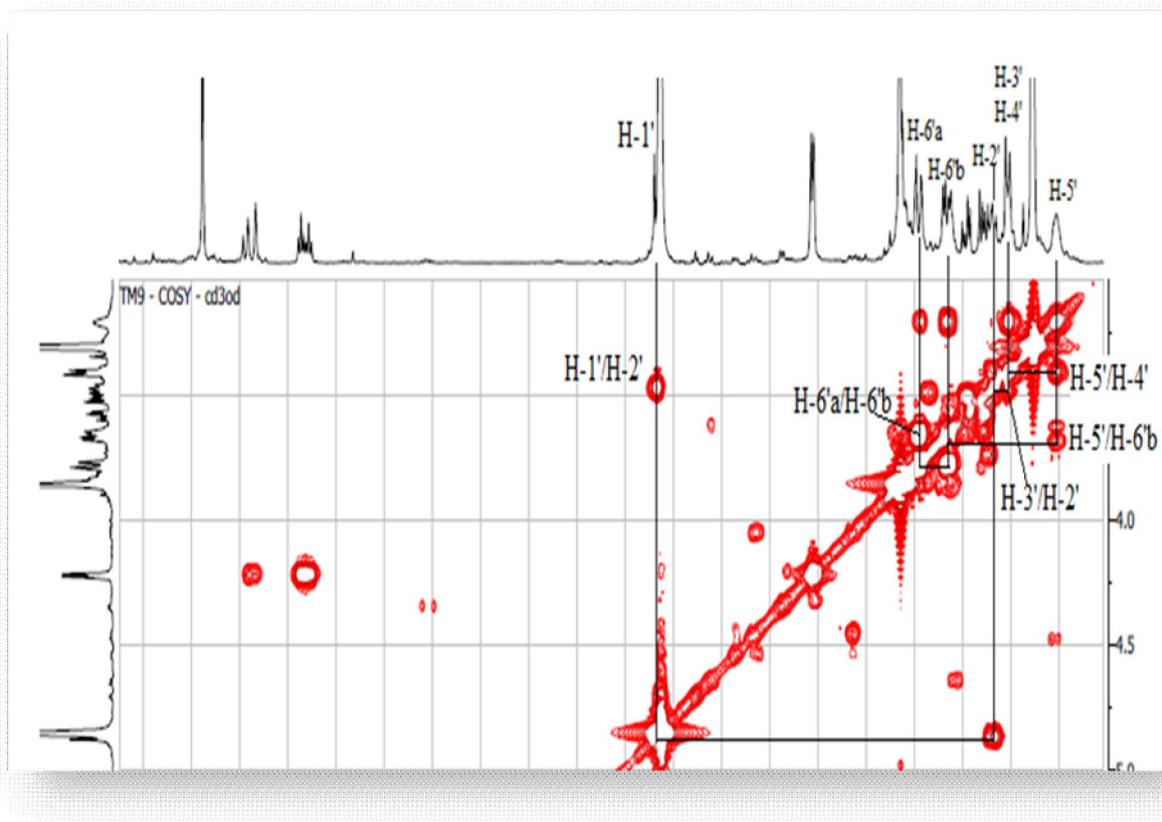
L'expérience de corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figures III-178 et III-179) permet l'identification de cette unité osidique par l'observation de couplages scalaires entre sept protons appartenant à un même système de spins correspondant à un hexose. Partant alors du proton anomère H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4,87; *d*;  $J = 8,1$  Hz), les corrélations suivantes ont été visualisées:

- H-1'/H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,48; *dd*;  $J = 9,4$  et  $8,1$  Hz)
- H-2'/H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  3,41; *m*)
- H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3,41; *m*)/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  3,21; *ddd*;  $J = 7,9$ ;  $5,1$  et  $2,0$ )
- H-5'/H-6'b ( $\delta_{\text{H}}$  3,66; *dd*;  $J = 11,9$  et  $5,1$  Hz)
- H-6'b'/H-6'a ( $\delta_{\text{H}}$  3,78; *dd*;  $J = 11,9$  et  $2,0$  Hz)

Les grandes valeurs de constantes de couplage ( $J_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 8,1$  Hz,  $J_{\text{H}2'-\text{H}3'} = 9,4$  Hz et  $J_{\text{H}4'-\text{H}5'} = 7,9$  Hz) indiquent que les protons de cette unité osidique sont axiaux. Il s'agit donc d'un glucose de configuration  $\beta$  au regard de la constante de couplage  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'}$  égale à  $8,1$  Hz (Figure III-178).



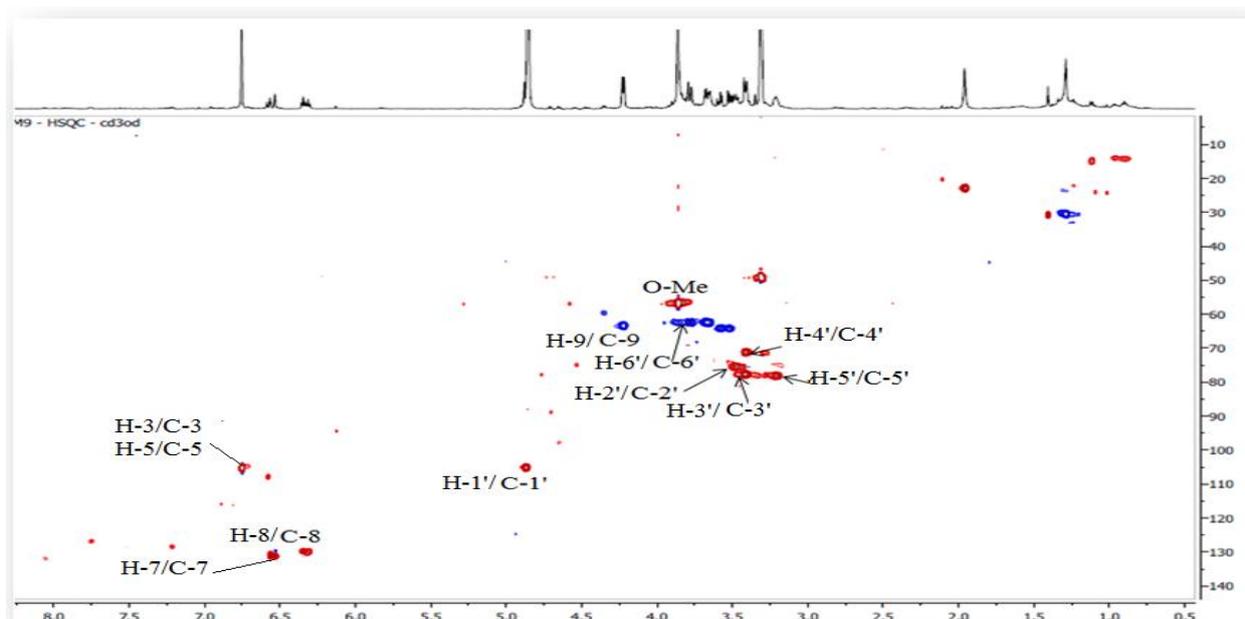
**Figure III-178:** Corrélations COSY du  $\beta$ -glucose



**Figure III-179:** Partie du spectre COSY de l'unité osidique du composé **J**

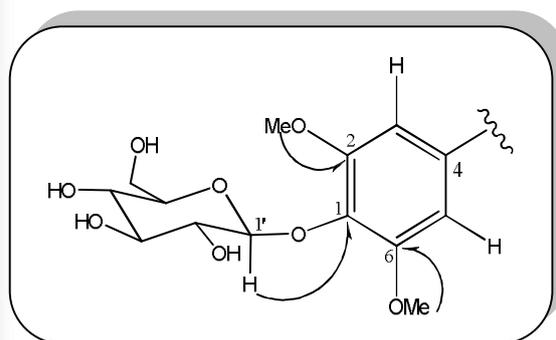
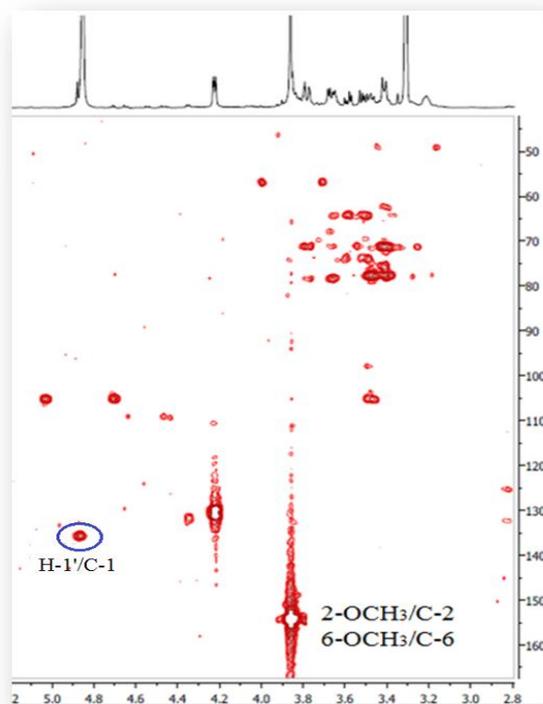
L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Tableau III-10) et HSQC (Figure III-180) du composé **J** permet d'attribuer les déplacements chimiques des signaux correspondant à:

- Deux carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  131,1 (C-7) et 129,9 (C-8).
- Deux CH aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  105,2 (C-3 et C-5).
- Quatre carbones aromatiques quaternaires résonant à  $\delta_{\text{C}}$  135,2; 135,7 et 154,2.
- Deux groupements méthoxyles à 56,8 ppm.
- Deux  $\text{CH}_2\text{-O}$  à 63,4 ppm (C-9) et 62,4 ppm (C-6').
- Un carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  105,1 (C-1').
- Quatre groupements oxyméthines  $\text{CH-O}$  à  $\delta_{\text{C}}$  75,6 (C-2'), 77,7 (C-3'), 71,1 (C-4') et 78,2 (C-5').



**Figure III-180:** Spectre HSQC du composé D

L'élaboration finale de la structure de ce composé est réalisée au moyen de l'expérience de corrélation hétéronucléaire longue distance HMBC. En effet, les corrélations en  $^2J$  et  $^3J$  observées sur le spectre HMBC (Figure III-181), permettent de localiser les différents substituants sur le noyau aromatique. Le proton anomère H-1' du glucose corrèle avec un carbone aromatique quaternaire résonant à 135,7 ppm attribuable au carbone C-1. Cette corrélation montre bien que ce sucre est attaché à ce carbone.



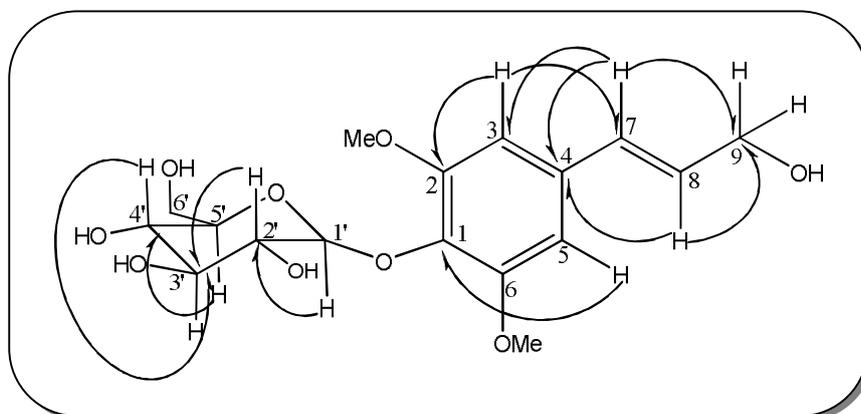
**Figure III-181:** Principales corrélations HMBC montrant l'attachement du  $\beta$ -glucose

Les protons des deux groupements méthoxyles (3,85 ppm) corrèlent en  $^3J$  avec deux carbones aromatiques déblindés C-2 et C-6 repérés à  $\delta_C$  154,2 permettant de placer ces deux groupements en positions C-2 et C-6 (Figure III-181).

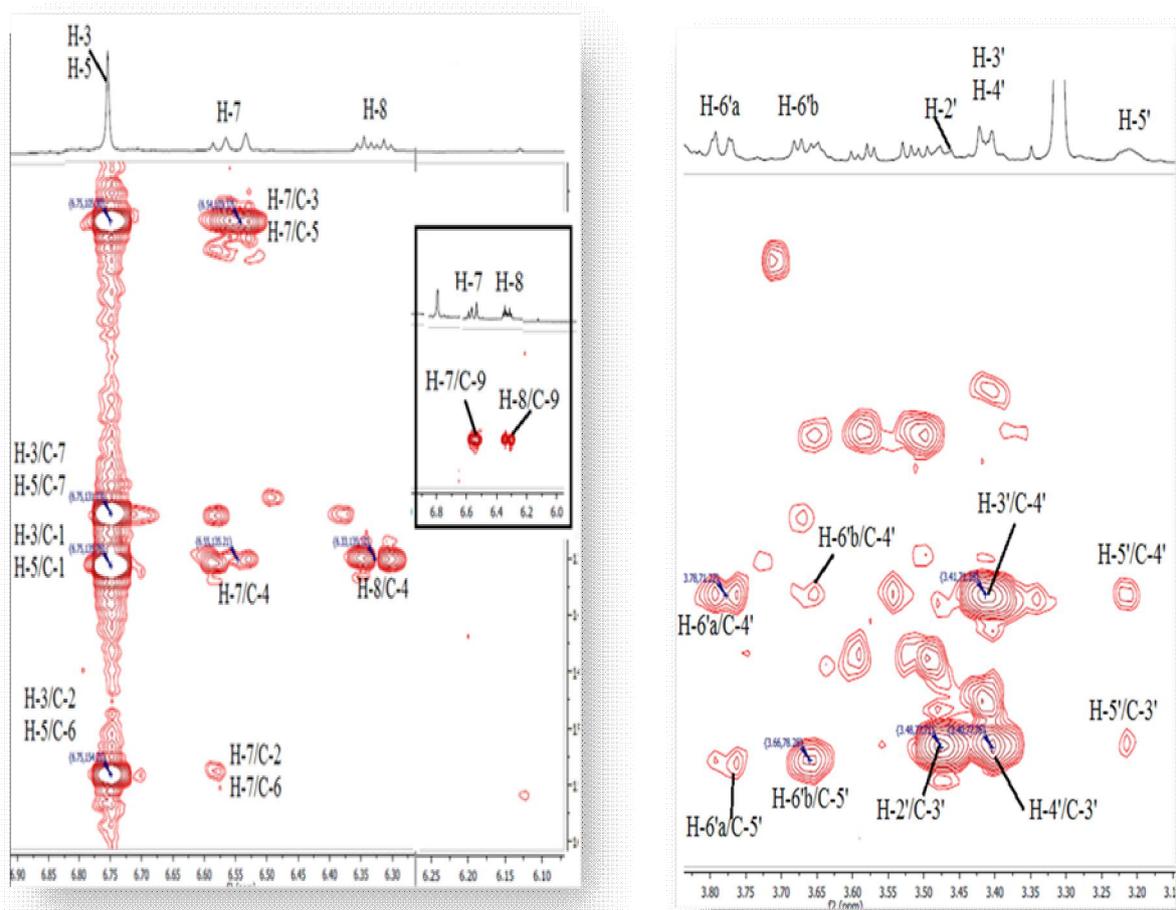
Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-183) entre les deux protons de la liaison éthylénique H-7 (6,55 ppm) et H-8 (6,33ppm) et le carbone aromatique C-4 résonant à  $\delta_C$  135,2 permet de lier la chaîne éthylénique en position C-4 au niveau du noyau aromatique.

Cette expérience (Figures III-182 et III-183) montre aussi d'autres corrélations entre:

- Les deux protons H-3 et H-5 et les carbones C-1 (135,7 ppm), C-2 (154,2 ppm), C-6 (154,2 ppm) et C-7 (131,1 ppm).
- Le proton H-7 et les carbones C-2, C-3 (105,2 ppm), C-5 (105,2 ppm), C-6 et C-9 (63,4 ppm).
- Le proton H-8 et le carbone C-9.
- Le proton anomérique H-1' et le carbone C-2' ( $\delta_C$  75,6).
- Le proton H-2' et les carbones C-1' ( $\delta_C$  105,1) et C-3' ( $\delta_C$  77,7).
- Le proton H-3' et le carbone C-4' ( $\delta_C$  71,1).
- Le proton H-4' et le carbone C-3'.
- Le proton H-5' et les carbones C-3' et C-4'.
- Les deux protons H<sub>2</sub>-6' et les carbones C-4' et C-5' (78,2 ppm).



**Figure III-182:** Corrélations HMBC du composé J



**Figure III-183:** Partie du HMBC du composé J

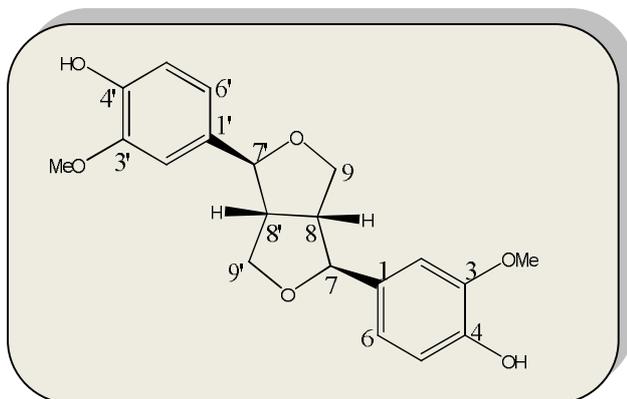
Toutes ces données spectroscopiques récapitulées dans le tableau (III-10), permettent d'attribuer sans ambiguïté pour cette molécule la structure suivante: 4-[(7*E*)-9-hydroxyprop-7-ène]-2,6-diméthoxyphenyl β-D-glucopyranoside nommé également syringine.

**Tableau III-10:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé J dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

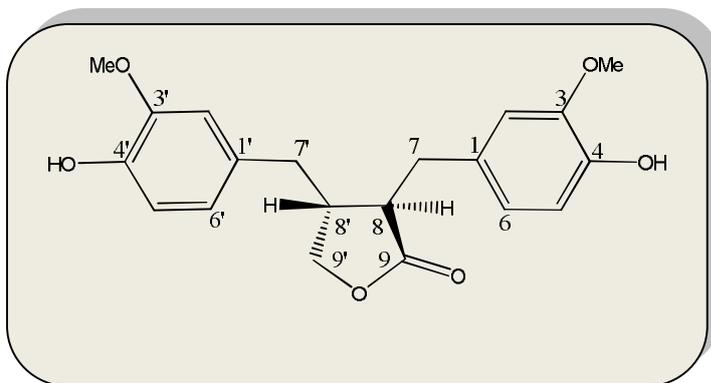
Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	135,7
2	-	154,2
3	6,75 ( <i>s</i> )	105,2
4	-	135,2

5	6,75 (s)	105,2
6	-	154,2
7	6,55 (dt; 15,9; 1,6)	131,1
8	6,33 (dt; 15,9; 5,6)	129,9
9	4,22 (dd; 5,6; 1,6)	63,4
1'	4,87 (d; 8,1)	105,1
2'	3,48 (dd; 9,4; 8,1)	75,6
3'	3,41 (m)	77,7
4'	3,41 (m)	71,1
5'	3,21 (ddd; 7,9; 5,1; 2,0)	78,2
6'a	3,78 (dd; 11,9; 2,0)	62,4
6'b	3,66 (dd; 11,9; 5,1)	
OMe	3,85 (s)	56,8

### III-2-13-Identification des composés K et L



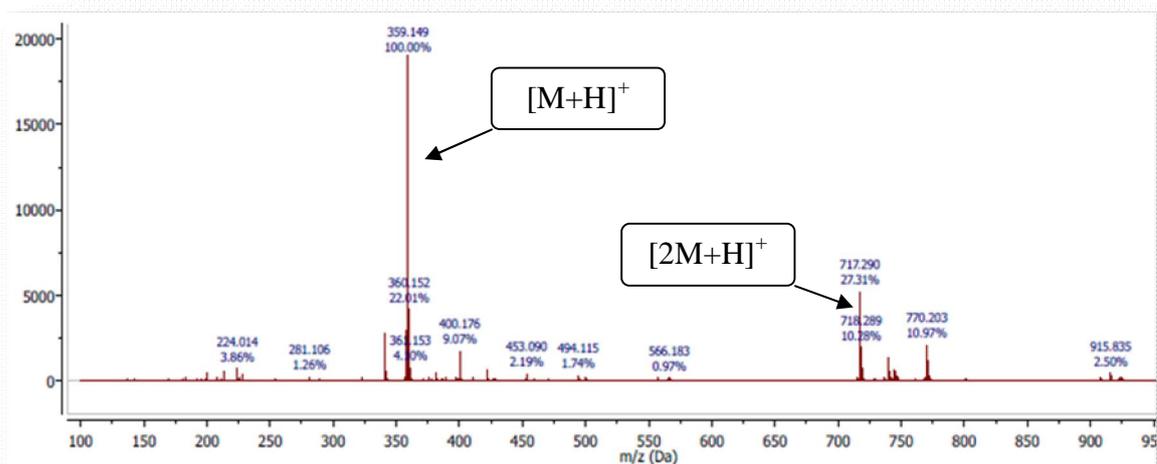
(-)-Pinorésinol



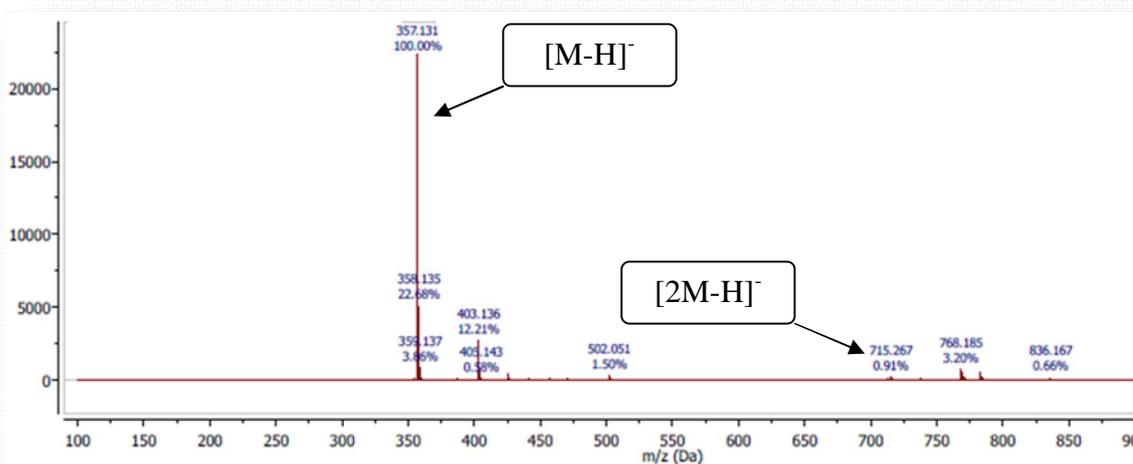
(+)-Matairésinol

Les composés **K** et **L** ont été obtenus en mélange sous forme d'une huile marron soluble dans le méthanol. Ils montrent sur CCM une seule tache visible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se colorent en mauve foncé après révélation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse obtenus par ESI<sup>+</sup>-MS (Figure III-184) et ESI<sup>-</sup>-MS (Figure III-185) de ce mélange indiquent respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  359 [M+H]<sup>+</sup>, 717 [2M+H]<sup>+</sup>, 357 [M-H]<sup>-</sup> et 715 [2M-H]<sup>-</sup>, soit une masse moléculaire de 358 uma et une formule brute en C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> impliquant dix degrés d'insaturation.



**Figure III-184:** Spectre de masse ESI<sup>+</sup>-MS du mélange des composés K et L



**Figure III-185:** Spectre de masse ESI<sup>-</sup>-MS du mélange des composés K et L

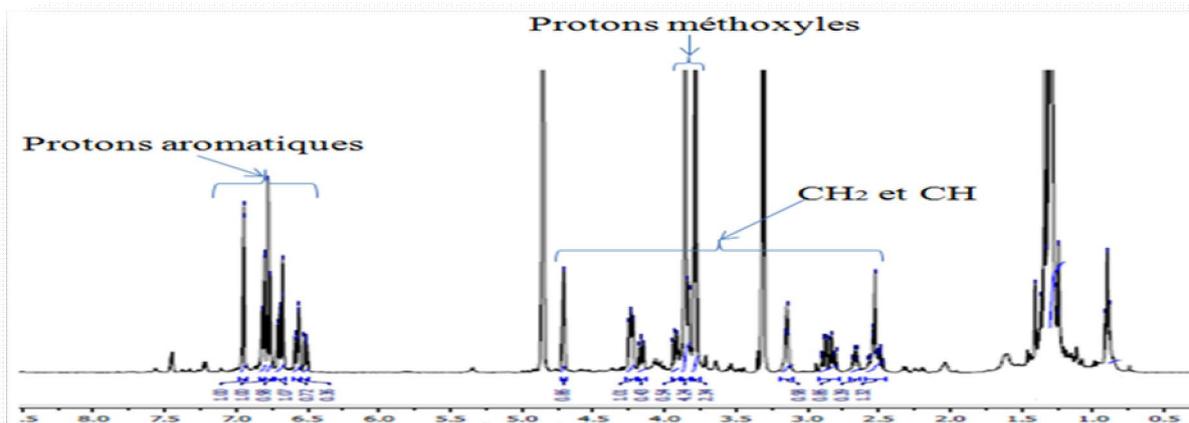
Le spectre IR de ce mélange révèle la présence des bandes d'absorption:

- D'un hydroxyle à 3381  $\text{cm}^{-1}$ .
- D'un carbonyle lactone à 1753  $\text{cm}^{-1}$ .
- D'un système aromatique à 1606 et 1516  $\text{cm}^{-1}$ .
- D'un système aliphatique (CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>) à 2919 et 2882  $\text{cm}^{-1}$ .

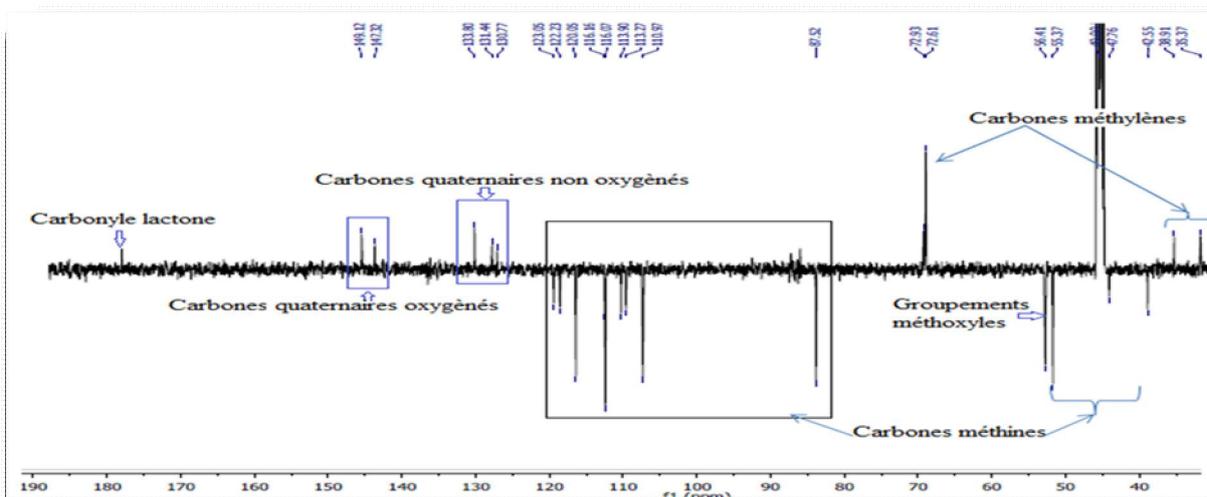
L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure III-186) des composés **K** et **L** permet d'observer dans la région des champs faibles une série de pics allant de 6,45 à 7,00 ppm avec des intégrations différentes attribuables aux protons aromatiques. On observe également sur le spectre HSQC (Figures III-191 et III-199) plus de 17 taches de corrélation. Le spectre RMN <sup>13</sup>C-*J*-modulé (Figure III-187) montre la présence de 21 carbones parmi eux, un à 181,8 ppm indiquant la

présence d'une fonction lactone. Ces constatations laissent soupçonner la présence d'un mélange de deux composés. D'autre part, la présence de plusieurs signaux des protons (intégrations différentes) méthines, oxyméthines, méthylènes et oxyméthylènes dans l'intervalle 2,50-4,75 ppm suggèrent que ces deux molécules (**K** et **L**) appartiennent à la classe des lignanes.

Sur la base de ces observations et en comparaison avec les données de la littérature [140-142], ce mélange contient deux lignanes à savoir (-)-pinorésinol (73,5%) (4,4'-dihydroxy-3,3'-diméthoxy-7,9':7',9'-diépoxy-lignane) et (+)-matairésinol (26,5%) 8-(4-hydroxy-3-méthoxybenzyl)-8'-(4'-hydroxy-3'-méthoxybenzyl) butrolactone). Le pouvoir rotatoire de ce mélange donne une valeur négative  $[\alpha]_D = -34^\circ$ , ce qui permet de déduire la prédominance du (-)-pinorésinol. Dans ce qui suit, nous procédons à l'élaboration structurale de ces composés d'une manière séparée.

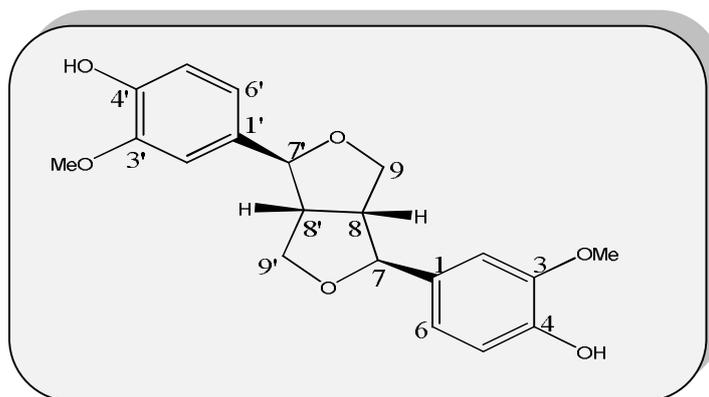


**Figure III-186:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz-MeOD) du mélange des composés **K** et **L**



**Figure III-187:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz-MeOD) du mélange des composés **K** et **L**

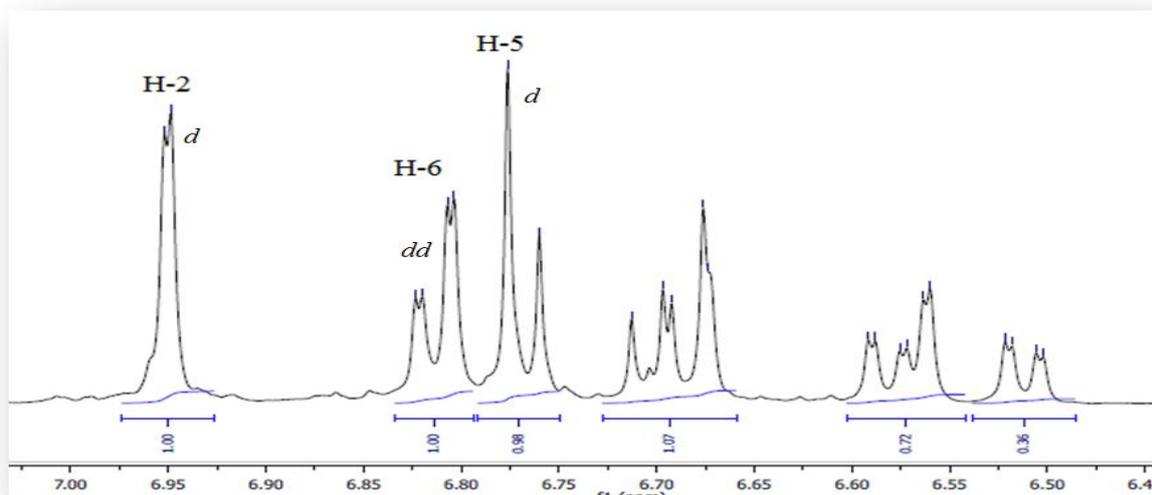
## III-2-13-1-Identification du composé K



(-)-Pinorésinol

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figures III-188 et 189), COSY (Figure III-190) et HSQC (Figure III-191) permet de visualiser les signaux suivants:

- ✓ Trois signaux résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,95 (*d*;  $J = 1,5$  Hz; H-2), 6,81 (*dd*;  $J = 8,5$  et 1,5 Hz; H-6) et 6,76 (*d*;  $J = 8,5$  Hz; H-5) sont attribués aux protons aromatiques appartenant à un même système de spins. L'expérience COSY montre les couplages entre: H-2/H-6 et H-6/H-5. Leurs carbones sont déterminés par expérience HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  110,9 (C-2), 116,1 (C-5) et 120,0 (C-6).

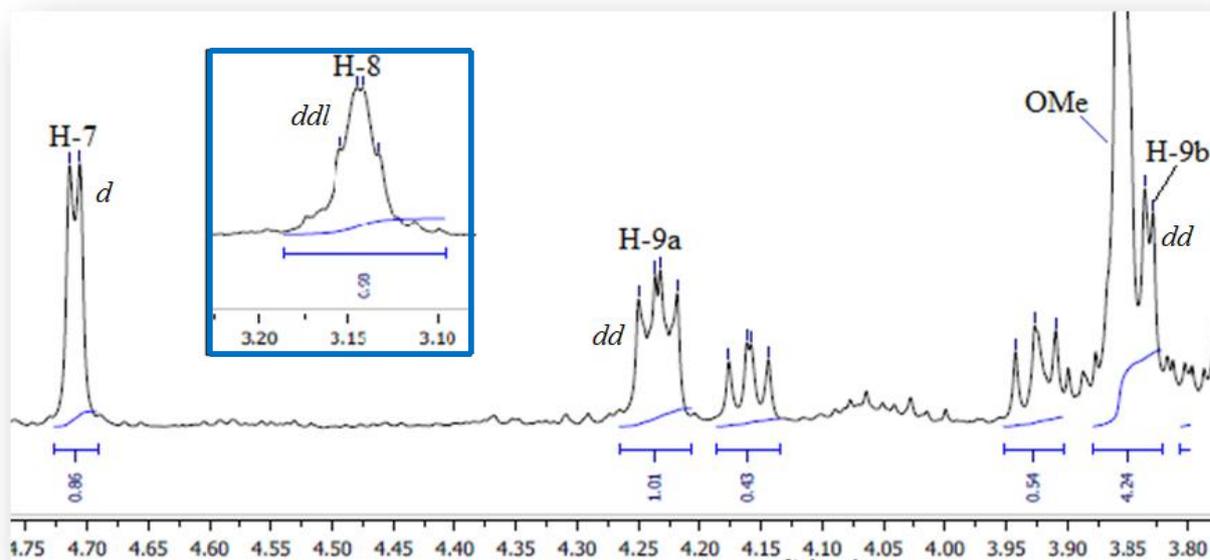


**Figure III-188:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé K (Champ faible)

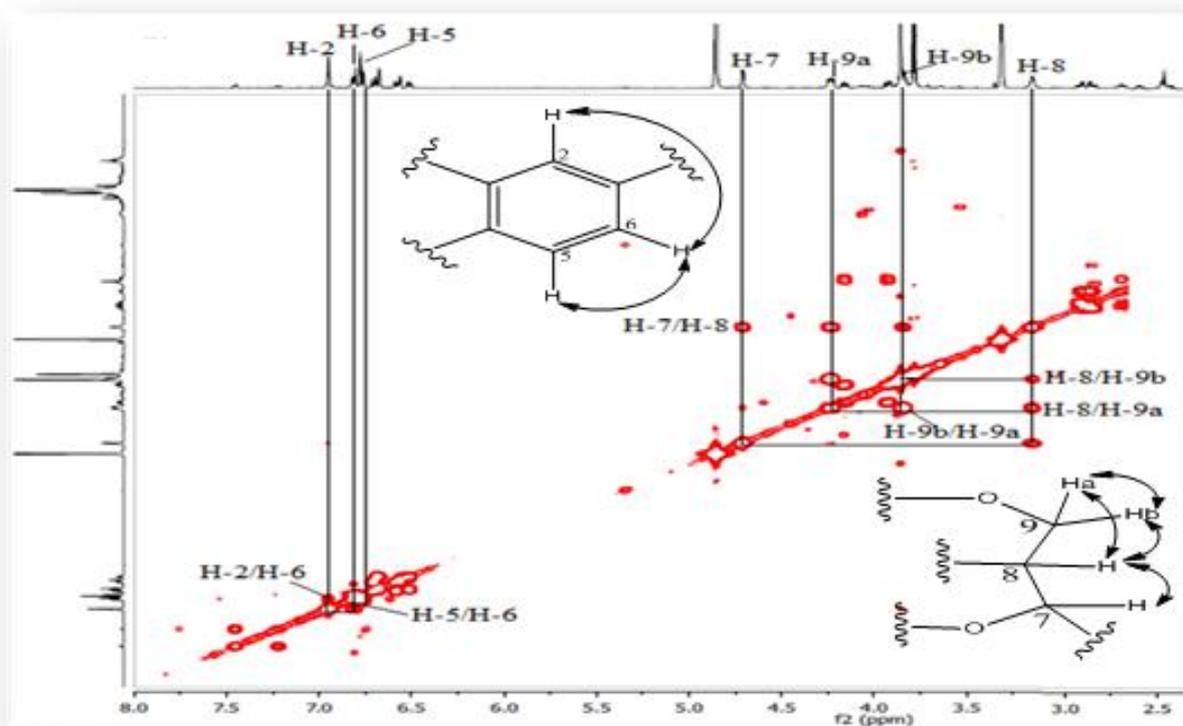
- ✓ Quatre signaux sont détecté à  $\delta_{\text{H}}$  4,70 (*d*;  $J = 4,5$  Hz; H-7), 3,15 (*ddl*;  $J = 6,8; 4,5$  Hz; H-8), 4,24 (*dd*;  $J = 8,8$  et 6,8 Hz; H-9a) et 3,84 (*dd*;  $J = 8,8; 3,3$  Hz; H-9b) (Figure III-189). Sur le spectre COSY, il est repéré les couplages attendus entre: H-7/H-8, H-

8/H-9a, H-8/H-9b et H-9a/H-9b. L'expérience HSQC permet de localiser leurs carbones à  $\delta_c$  87,5 (C-7), 55,3 (C-8) et 72,6 (C-9).

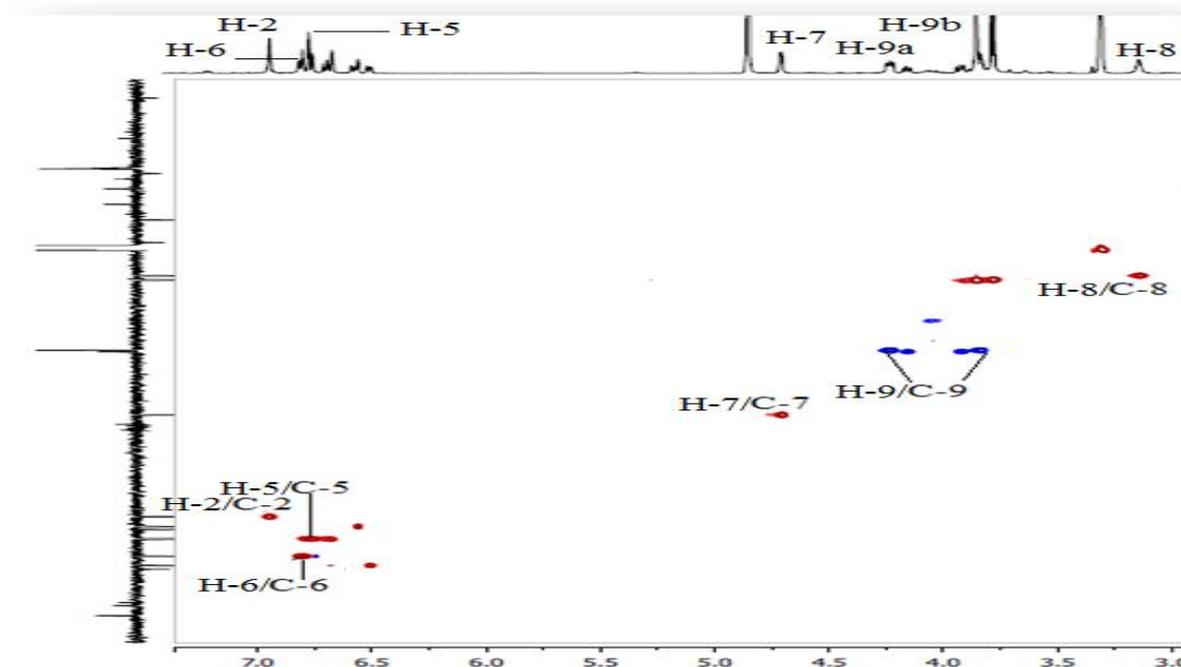
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet repéré à 3,85 ppm correspond à un groupement méthoxyle (Figure III-189).



**Figure III-189:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé K (Champ moyen)

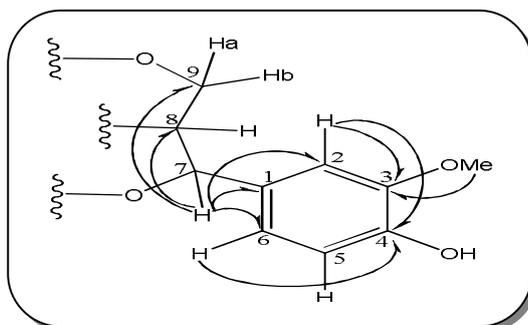


**Figure III-190:** Partie du spectre COSY du composé K

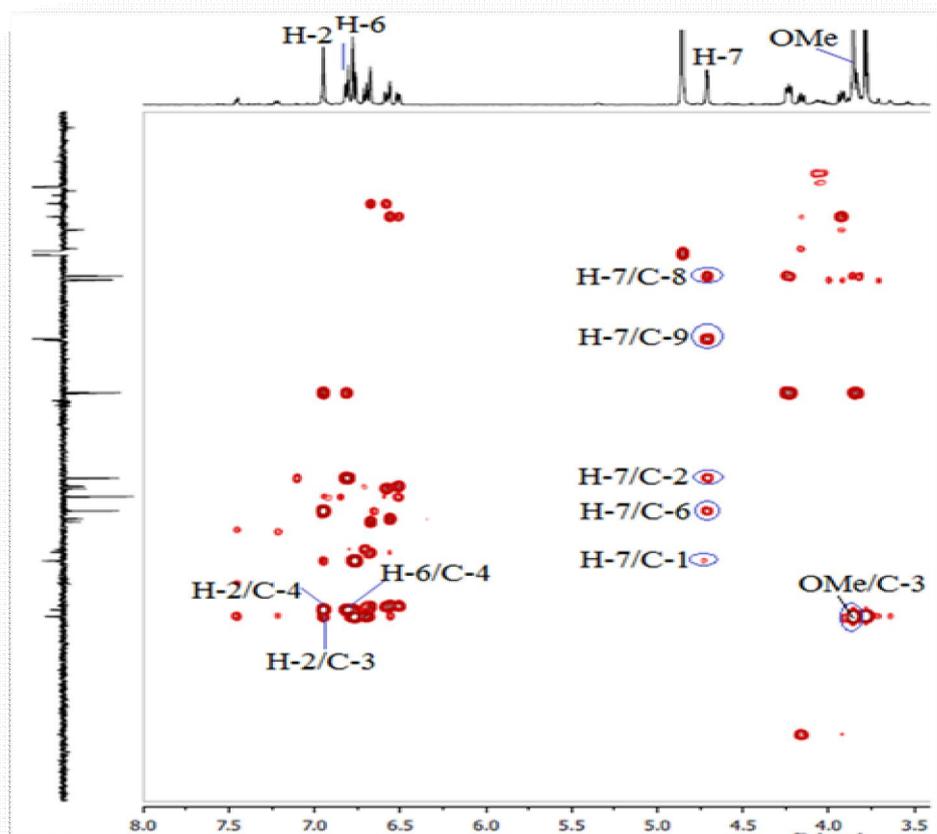


**Figure III-191:** Partie du spectre HSQC du composé K

L'élucidation structurale de ce composé peut être débutée à partir du proton H-7 ( $\delta_H$  4,70) déjà identifié. Ce dernier montre des taches de corrélations sur le spectre HMBC (Figures III-192 et III-193) avec deux carbones aromatiques C-2 ( $\delta_C$  110,9) et C-6 (C-120,0), ainsi qu'avec un carbone aromatique quaternaire résonant à  $\delta_C$  133,8 ne pouvant être que le carbone C-1. Le proton H-7 présente aussi des corrélations en HMBC avec les carbones C-8 (55,3 ppm; CH) et C-9 (72,6 ppm; CH<sub>2</sub>-O). En plus de ces corrélations, les deux protons H-2 (6,95 ppm) et H-6 (6,81 ppm) corrélerent en  $^3J$  avec un carbone aromatique oxygéné détecté à  $\delta_C$  147,3 attribuable au carbone C-4. Le proton H-2 montre également une tache de corrélation avec un carbone résonant à 149,1 ppm correspondant au carbone C-3. Sa valeur déblindée indique qu'il est attaché à un atome d'oxygène. La tache de corrélation observée en HMBC entre les protons du groupement méthoxyle (3,85 ppm) et le carbone C-3 montre clairement que ce groupement est attaché à ce carbone (Figure III-192).

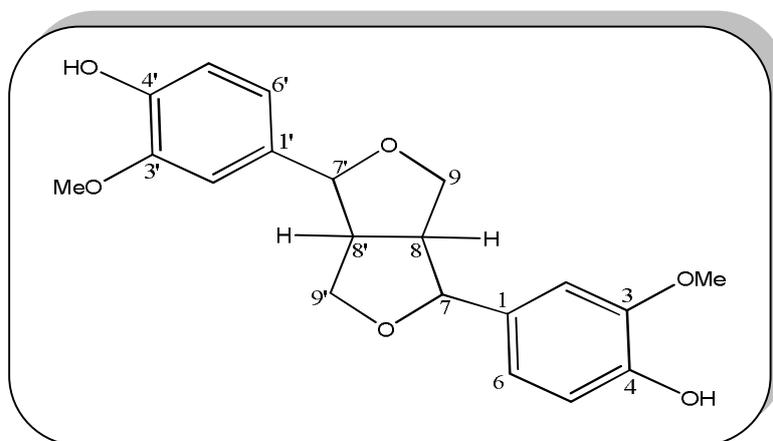


**Figure III-192:** Principales corrélations HMBC du composé K



**Figure III-193:** Partie du spectre HMBC du composé K

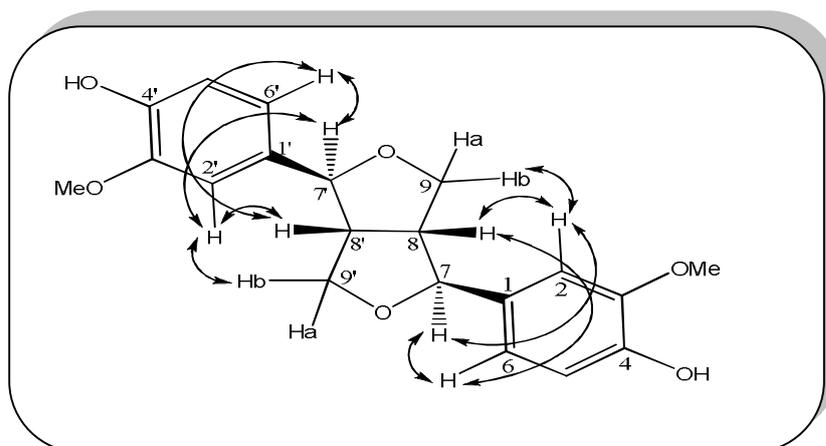
Toutes ces données spectrales donnent une masse moléculaire égale à 195 uma correspondant à 4 insaturations, mais dans le cas de notre composé la masse moléculaire est 358 uma donc soit la double avec 10 degrés d'insaturation. Ceci implique la présence d'un squelette symétrique pour cette molécule (Figure III-194) correspondant au pinorésinol.



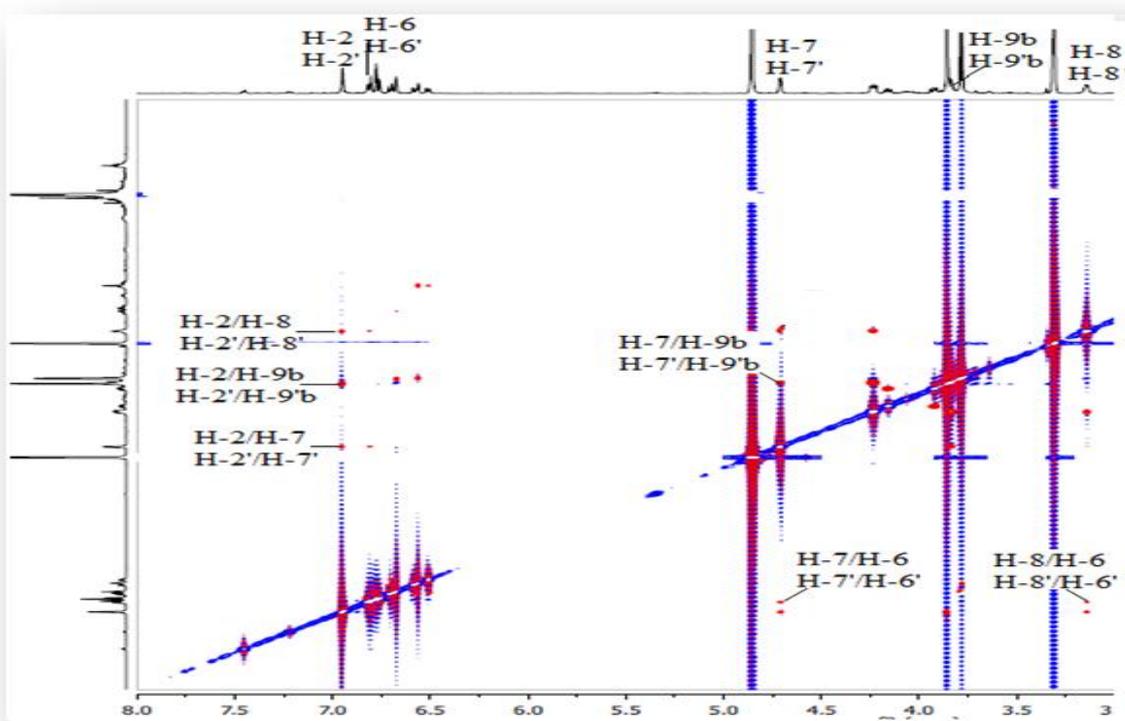
**Figure III-194:** Structure plane du composé K

La stéréochimie du composé **K** au niveau des carbones asymétriques C-7, C-7', C-8 et C-8' est déterminée 7*S*, 7'*S*, 8*R* et 8'*R* par comparaison avec les données de la littérature [141]. Cette molécule est plus présente dans les plantes sous la forme (-) que la forme (+) [140], il s'agit donc du (-)-pinorésinol. Des effets NOE ont été observés sur le spectre NOESY (Figures III-195 et III-196) entre les protons:

- H-2/H-7, H-2/H-8, H-2/H-9b, H-2'/H-7', H-2'/H-8' et H-2'/H-9'b
- H-6/H-7, H-6/H-8, H-6'/H-7' et H-6'/H-8'.
- H-7/H-9b et H-7'/H-9'b.



**Figure III-195:** Principales corrélations NOESY observées pour le composé **K**



**Figure III-196:** Partie du spectre NOESY du composé **K**

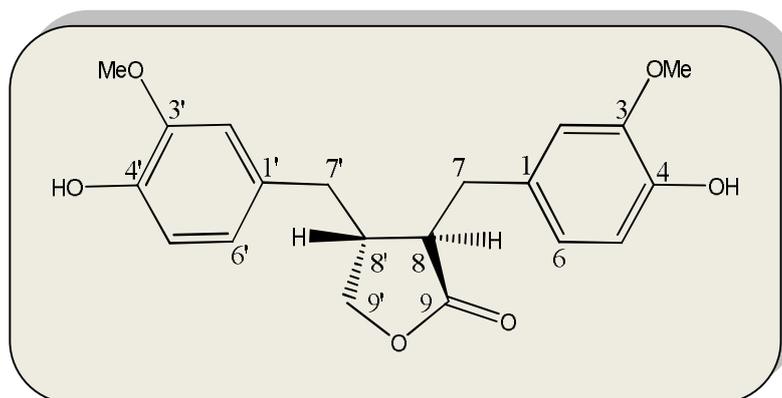
Il est à signaler que cette molécule est identifiée pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Elle a été antérieurement isolée des espèces *Daphne tangutica* Maxim [137,140], *D. odora* et *D. genkwa* [143] de la famille Thymelaeaceae.

Le tableau (III-11) englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **K**.

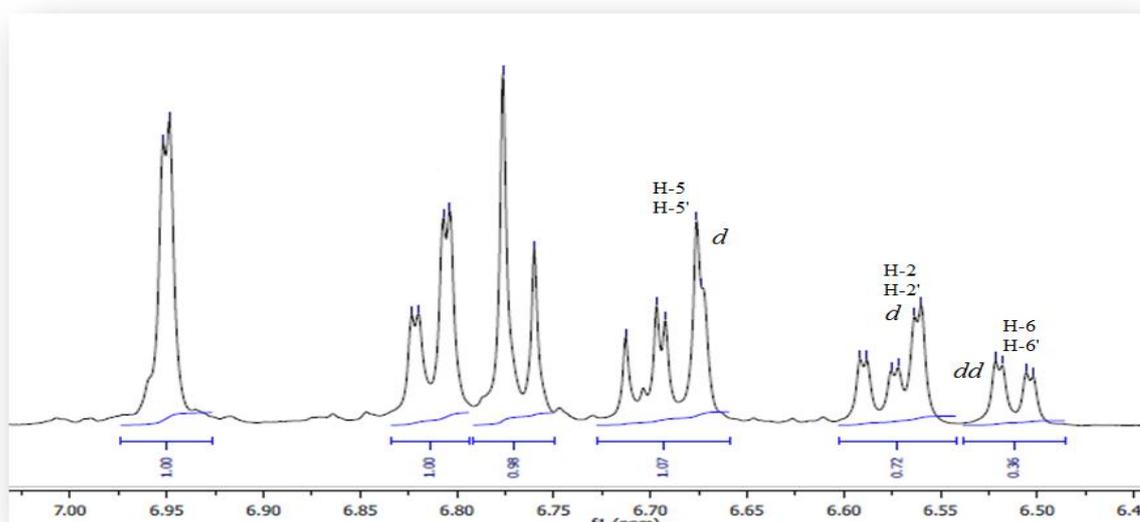
**Tableau III-11:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **K** dans MeOD

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	133,8
2	6,95 ( $d$ ; 1,5)	110,9
3	-	149,1
4	-	147,3
5	6,76 ( $d$ ; 8,5)	116,1
6	6,81 ( $dd$ ; 8,5; 1,5)	120,0
7	4,70 ( $d$ ; 4,5)	87,5
8	3,15 ( $ddl$ ; 6,8; 4,5)	55,3
9	4,24 ( $dd$ ; 8,8; 6,8) H-9a; 3,84 ( $dd$ ; 8,8; 3,3) H-9b	72,6
1'	-	133,8
2'	6,95 ( $d$ ; 1,5)	110,9
3'	-	149,1
4'	-	147,3
5'	6,76 ( $d$ ; 8,5)	116,1
6'	6,81 ( $dd$ ; 8,5; 1,5)	120,0
7'	4,70 ( $d$ ; 4,5)	87,5
8'	3,15 ( $ddl$ ; 6,8; 4,5)	55,3
9'	4,24 ( $dd$ ; 8,8; 6,8) H-9'a; 3,84 ( $dd$ ; 8,8; 3,3) H-9'b	72,6
O-Me	3,85 ( $s$ )	56,4

## III-2-13-2-Identification du composé L

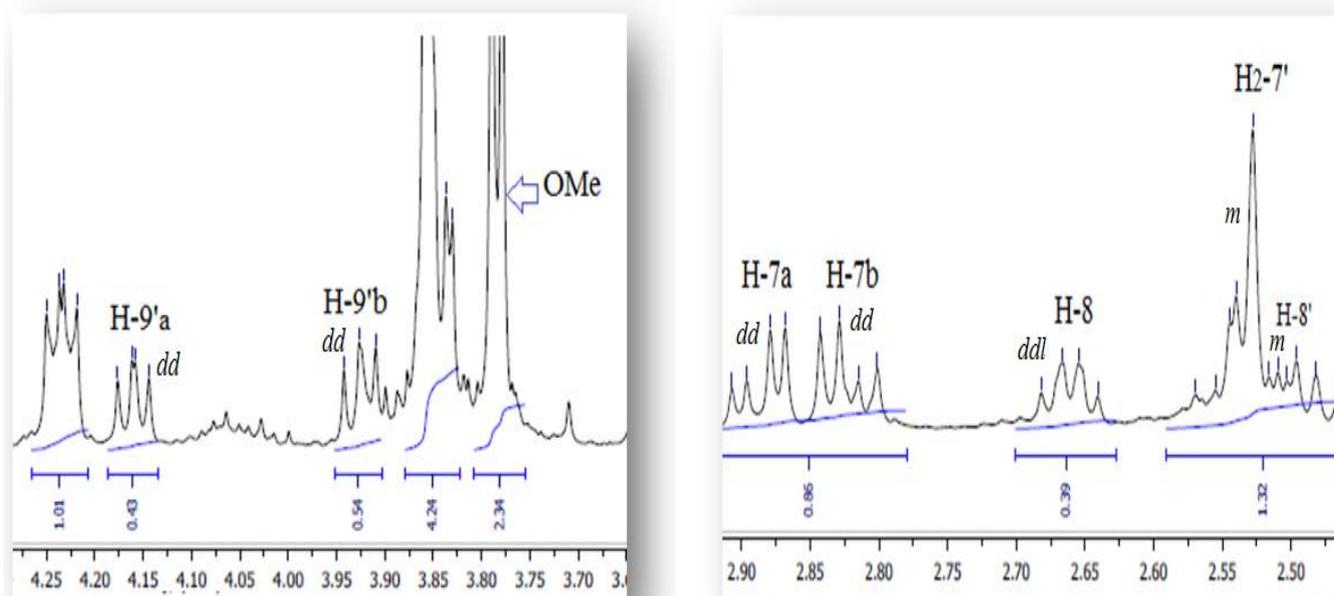
**(+)-matairesinol**

L'elucidation structurale du composé **L** a été faite de la même façon que le composé **K**. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-197) présente à champ faible des signaux attribuables aux protons aromatiques résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 (*d*;  $J = 8,5$ ; H-5 et H-5'), 6,57 (*d*;  $J = 1,7$ ; H-2 et H-2'), 6,52 (*dd*;  $J = 8,5$  et  $1,7$ ; H-6 et H-6'). L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III-199) permet d'identifier les carbones qui les portent. Ils résonnent respectivement à  $\delta_{\text{C}}$  116,0; 113,2 et 122,2.

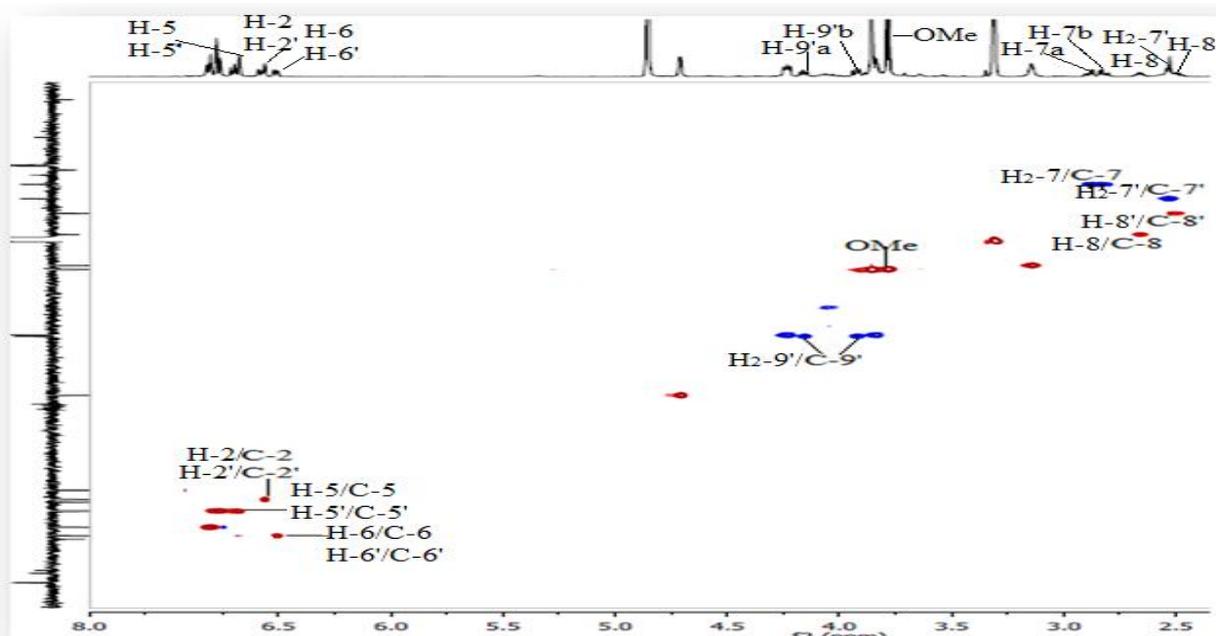
**Figure III-197:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **L** (Champ faible)

Ce spectre (Figure III-198) montre également à champ moyen une série de signaux détectés à  $\delta_{\text{H}}$  4,16 (*dd*;  $J = 8,9$  et  $7,3$ ; H-9'a), 3,91 (*dd*;  $J = 8,9$  et  $7,8$ ; H-9'b), 2,87 (*dd*;  $J = 14,1$  et  $5,6$ ; H-7a), 2,83 (*dd*;  $J = 14,1$  et  $6,7$ ; H-7b), 2,66 (*ddl*;  $J = 14,1$ ;  $7,8$ ; H-8), 2,54 (*m*;  $J = \text{H-7'a et H-7'b}$ ), 2,52 (*m*; H-8'), 3,77 (*s*; OMe). Leurs carbones ont été déterminés par l'analyse du spectre

HSQC  $J$ -modulé (Figure III-199) à  $\delta_C$  35,3 (C-7), 47,7 (C-8), 38,9 (C-7'), C-8' (42,5), 72,9 (C-9') et 55,3 (OMe).



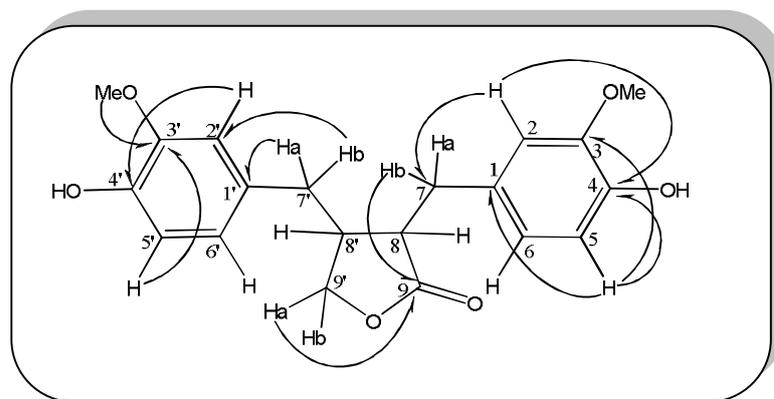
**Figure III-198:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé L (Champ moyen)



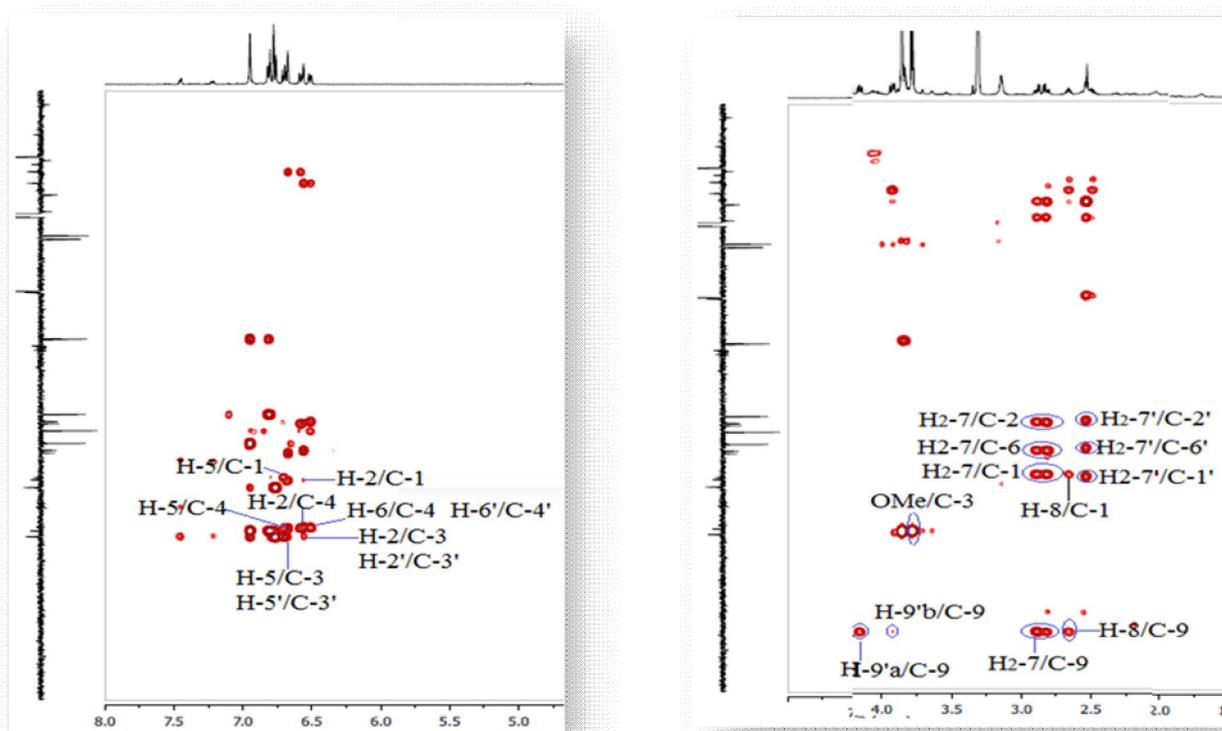
**Figure III-199:** Spectre HSQC du composé L

Il est à noter que les intégrations des différents signaux de ce composé sont très faibles par rapport à ceux du composé **K** ((-)-pinorésinol). Ceci conduit à conclure que le composé **L** est minoritaire. L'attribution des carbones quaternaires constituant ce composé est établie en analysant le spectre HMBC (Figure III-201). En effet, les protons H<sub>2</sub>-7' (2,54 ppm) corrélient en HMBC avec les carbones C-2' (113,2 ppm), C-6' (122,2 ppm) et avec un carbone résonant à

131,4 attribuable au carbone C-1'. Les protons H-2' (6,57 ppm) et H-6' (6,52 ppm) montrent des taches de corrélations en  $^3J$  avec un carbone aromatique oxygéné à  $\delta_C$  147,3 (C-4') (Figure III-200). Le proton H-2' corrèle également en  $^2J$  avec C-3' (149,1 ppm). Ce dernier corrèle avec le proton H-5' ainsi qu'avec les protons du groupement méthoxyle ( $\delta_C$  3,77). En outre, les protons H<sub>2</sub>-9' présentent des taches de corrélation avec un carbonyle détecté à  $\delta_C$  181,8 correspond au carbonyle lactone C-9. Ce dernier montre aussi deux taches de corrélation avec les protons H<sub>2</sub>-7 et H-8. Cette expérience montre aussi d'autres corrélations à titre d'exemple, les protons H-2 et H-5 corrélient avec C-1 (130,7 ppm), C-3 (149,1 ppm), C-4 (147,3 ppm) et C-7 (35,3 ppm), ainsi entre H<sub>2</sub>-7/C-2, H<sub>2</sub>-7/C-6, H<sub>2</sub>-7/C-1 et H-8/C-1 (Figures III-200 et III-201).



**Figure III-200:** Principales corrélations HMBC observées pour le composé L



**Figure III-201:** Principales corrélations HMBC observées pour le composé L

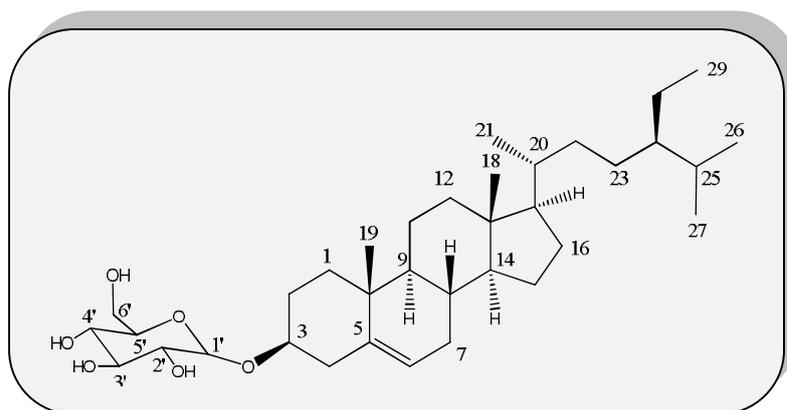
Par comparaison avec les données de la littérature [141,144] la stéréochimie du composé **L** est déterminée 8*S* et 8'*R*.

Ce composé a été antérieurement isolé des espèces *Stellera chamaejasme* L. [145], *Daphne genkwa* et *D. odora* [143] (Thymelaeaceae), mais il est identifié pour la 1<sup>ère</sup> fois dans le genre *Thymelaea*.

**Tableau III-12: Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **L** dans MeOD**

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	130,7
2	6,57 ( <i>d</i> ; 1,7)	113,2
3	-	149,1
4	-	147,3
5	6,68 ( <i>d</i> ; 8,5)	116,0
6	6,52 ( <i>dd</i> ; 8,5; 1,7)	122,2
7	2,87 ( <i>dd</i> ; 14,1; 5,6) H-7a; 2,83 ( <i>dd</i> ; 14,1; 6,7) H-7b	35,3
8	2,66 ( <i>ddl</i> ; 14,1; 7,8)	47,7
9	-	181,8
1'	-	131,4
2'	6,57 ( <i>d</i> ; 1,7)	113,2
3'	-	149,1
4'	-	147,3
5'	6,68 ( <i>d</i> ; 8,5)	116,0
6'	6,52 ( <i>dd</i> ; 8,5; 1,7)	122,2
7'	2,54 ( <i>m</i> ) H-7'a; 2,54 ( <i>m</i> ) H-7'b	38,9
8'	2,52 ( <i>m</i> )	42,5
9'	4,16 ( <i>dd</i> ; 8,9; 7,3) H-9'a; 3,84 ( <i>dd</i> ; 8,9; 7,8) H-9'b	72,9
O-Me	3,77 ( <i>s</i> )	55,3

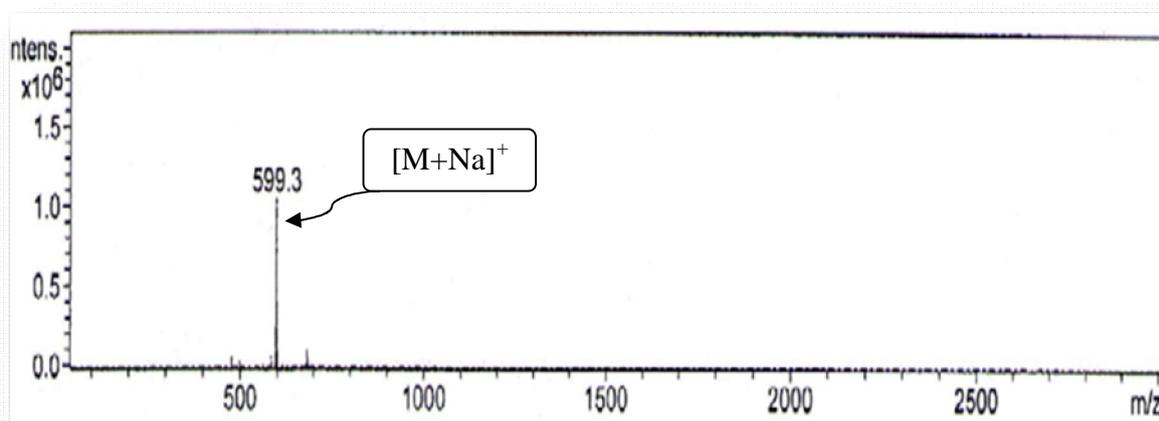
## III-2-14-Identification du composé M

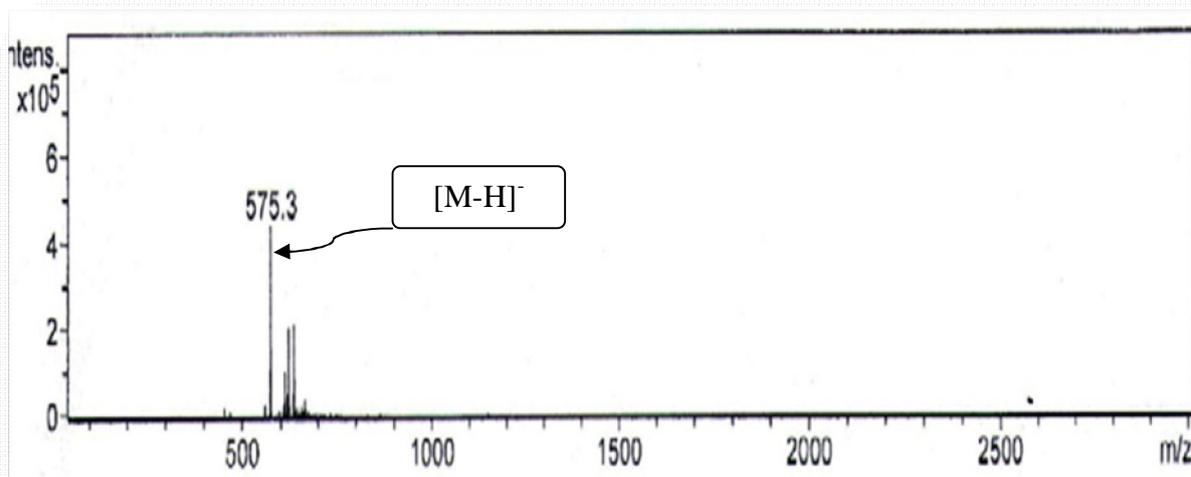
**3β-D-glucopyranosyl β-sitostérol**

Ce composé est identifié au 3β-D-glucopyranosyl β-sitostérol, connu sous le nom Daucostérol. Ce dérivé se présente sous forme d'une poudre amorphe blanche, soluble dans un mélange chloroforme-méthanol. Il se révèle en mauve sur CCM après révélation par l'acide sulfurique et chauffage.

Cette molécule a été isolée antérieurement des feuilles de l'espèce *Thymelaea hirsuta* [23] et des parties aériennes de *T. microphylla* [10] (Thymelaeaceae). Nombreuses études biologiques ont été réalisées sur ce composé montrant qu'il est utilisé dans le cas du traitement de l'hyperplasie de la prostate [146]. Par ailleurs, il possède également des propriétés immunomodulatrice [147], anti-cholestérol et anti-inflammatoire [148].

Les spectres de masse ESI-MS de ce composé, enregistrés en modes positif (Figure III-202) et négatif (Figure III-203), montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  599  $[M+Na]^+$  et 575  $[M-H]^-$  respectivement, correspondant à une masse moléculaire égale à 576 uma et une formule brute en  $C_{35}H_{60}O_6$  donnant 6 degrés d'insaturation.

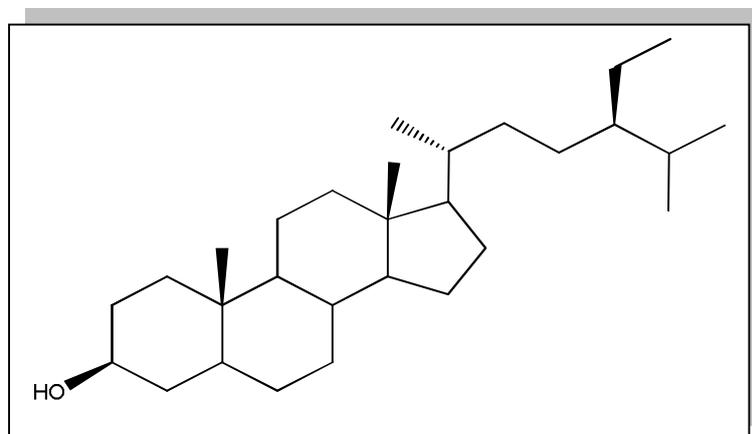
**Figure III-202:** Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé M



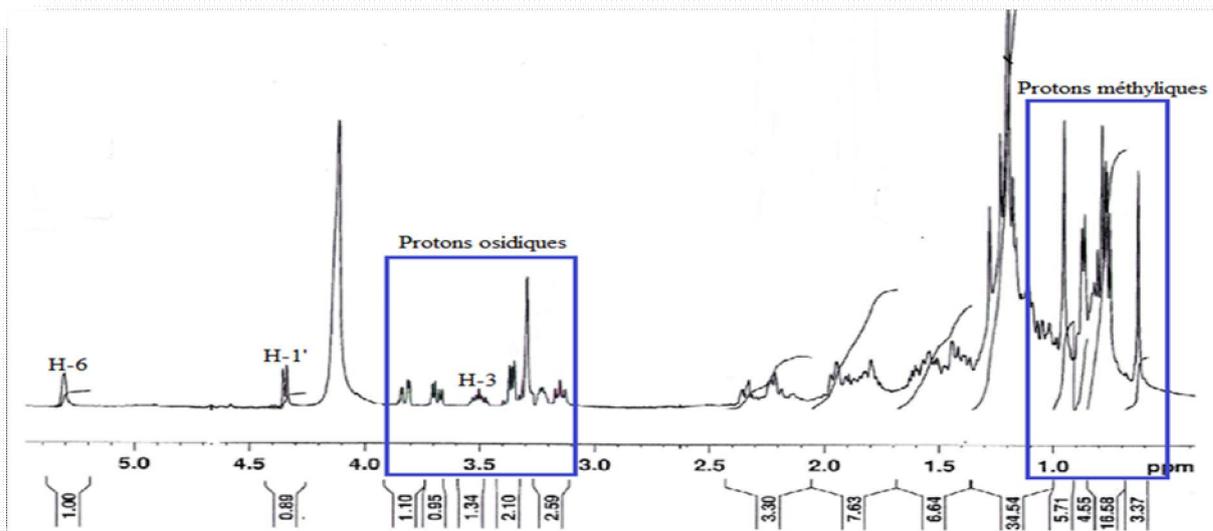
**Figure III-203:** Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé M

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-205) du composé M enregistré dans le ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ) permet d'observer une série de signaux incluant un signal multiplet résonant à 3,53 ppm correspond à un proton oxyméthine, un signal de proton oléfinique repéré à 5,30 ppm sous forme d'un doublet large (*dl*;  $J = 5,0$  Hz), six signaux à haut champ d'intégration 3H chacun attribuables aux groupements méthyliques détectés à 0,61 (s), 0,95 (s), 0,75 (*d*;  $J = 6,7$  Hz), 0,76 (*d*;  $J = 6,7$  Hz), 0,85 (*d*;  $J = 6,0$  Hz) et 0,80 ppm (*t*;  $J = 7,5$  Hz).

Ces observations indiquent clairement que ce composé fait partie de la classe des phytostérols (Figure III-204). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre également un signal résonant à 4,35 ppm (1H, *d*,  $J = 7,8$  Hz) caractéristique d'un proton anomérique H-1' et plusieurs signaux dans la zone allant de 3,00 à 4,00 ppm suggérant la présence d'une unité osidique.



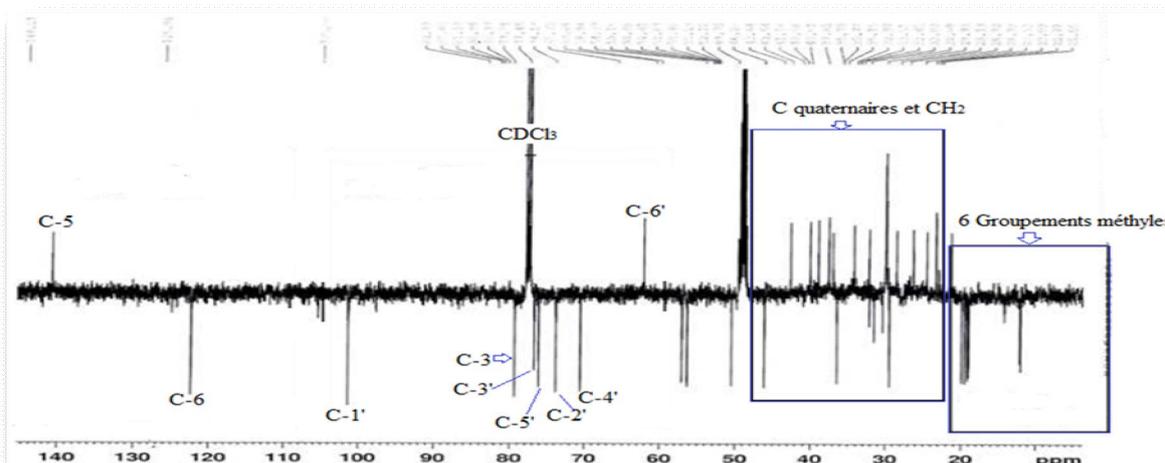
**Figure III-204:** Structure de base des stérols



**Figure III-205:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé M

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-206) permet de visualiser la présence des signaux concernant la génine et l'unité osidique à savoir:

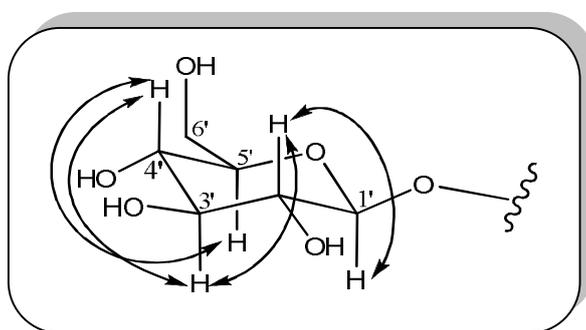
- 6 carbones méthyliques à  $\delta_{\text{C}}$  12,0; 12,1; 18,9; 19,1; 19,4 et 19,9.
- 2 carbones oléfiniques dont un carbone CH et un quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}}$  122,3 et 140,8 respectivement.
- 1 carbone oxyméthine à 79,3 ppm (C-3). Sa valeur du déplacement chimique vers les champs faibles en comparaison avec le même carbone du  $\beta$ -sitostérol (71,8 ppm) indique qu'il est le point de branchement de la génine avec l'unité osidique.
- 1 carbone anomérique détecté à 101,3 ppm (C-1').
- 4 groupements CH à  $\delta_{\text{C}}$  70,5 (C-4'); 73,8 (C-2'); 76,1 (C-5') et 76,7 (C-3').
- 1 carbone oxyméthylène ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) à 62,0 ppm (C-6').



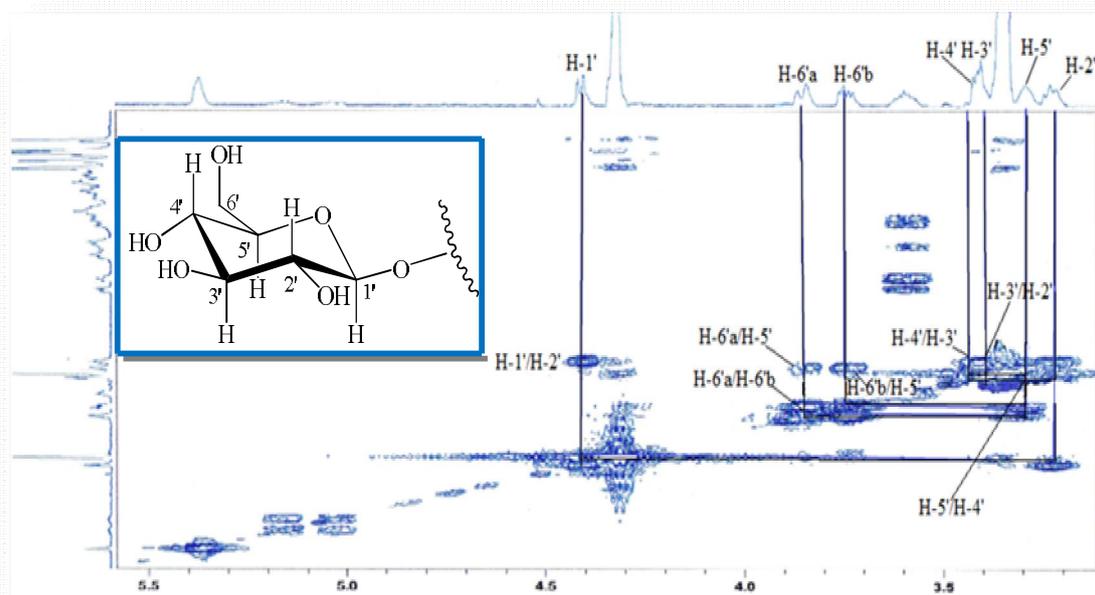
**Figure III-206:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz- $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé M

L'expérience de corrélations homonucléaires COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figures III-207 et III-208) appliquée sur le composé en question atteste de la présence d'un hexose formé de 7 protons. Pour l'identification de cette unité osidique, en partant alors du proton anomérique H-1' résonant à 4,35 ppm (1H; *d*;  $J = 7,8$  Hz), on relie à travers leurs taches de corrélation, les protons H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,19; *t*;  $J = 7,8$  Hz), H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  3,38; *t*;  $J = 7,8$  Hz), H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3,35; *t*;  $J = 7,8$  Hz), H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  3,23; *m*) et enfin les deux protons H-6'a ( $\delta_{\text{H}}$  3,81; *dd*;  $J = 11,9$  et 2,9 Hz) et H-6'b ( $\delta_{\text{H}}$  3,70; *dd*;  $J = 11,9$  et 4,9 Hz).

Au terme de ces résultats, les grandes valeurs de constantes de couplage suggèrent qu'il s'agit d'un glucose de configuration  $\beta$  ( $J_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 7,8$  Hz).



**Figure III-207: Corrélations COSY du  $\beta$ -glucose**

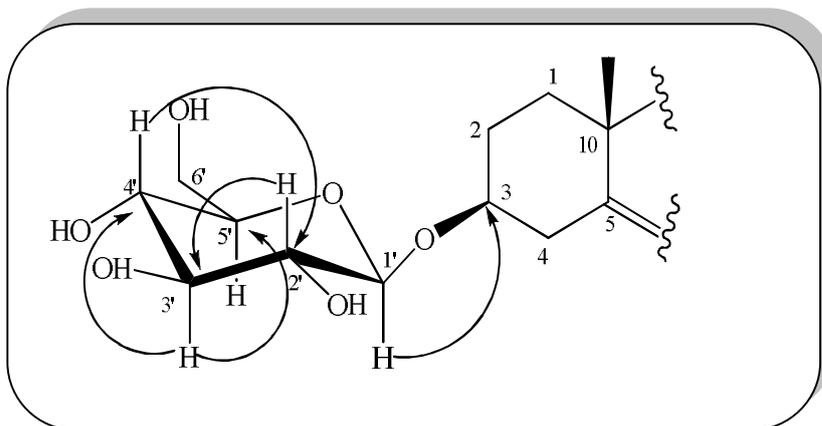


**Figure III-208: Partie du spectre COSY montrant la zone osidique du composé M**

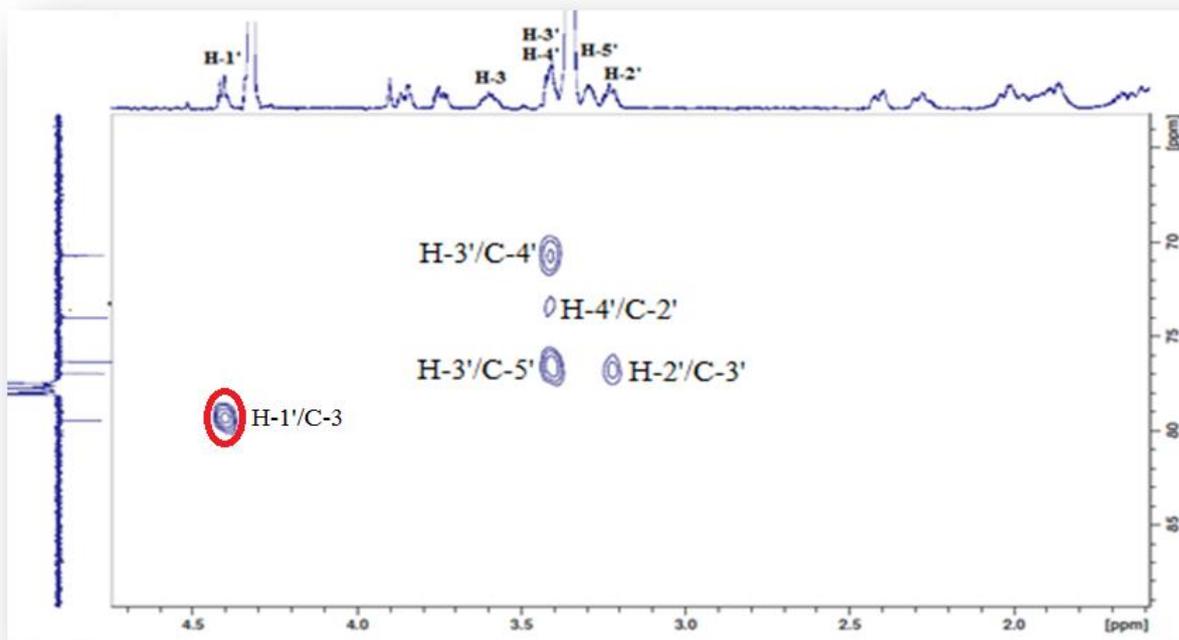
L'expérience de corrélations longue distance HMBC (Figures III-209 et III-210) permet d'identifier les corrélations H/C en  $^2J$  et  $^3J$ . Ce spectre présente une tache de corrélation en  $^3J$

entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3. Cette corrélation confirme l'attachement de l'unité osidique en position C-3 de la génine. D'autres corrélations ont été observées entre:

- ✓ H-2' et le carbone C-3' (76,7 ppm).
- ✓ H-3' et les carbone C-4' (70,5 ppm) et C-5'(76,1 ppm).
- ✓ H-4' et le carbone C-2' (73,8 ppm).



**Figure III-209:** Principales corrélations HMBC de la partie osidique du composé M



**Figure III-210:** Partie étalée du spectre HMBC montrant l'attachement du  $\beta$ -glucose à la génine

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé, COSY, HSQC et HMBC permettent de caractériser tous les protons et carbones constituant la génine (Tableau III-13).

En conséquence, le composé **M** a été identifié sans ambiguïté au 3 $\beta$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -sitostérol. La valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -43^\circ$  ( $c$  0,019,  $\text{CHCl}_3$ ), en apporte la confirmation [149,150].

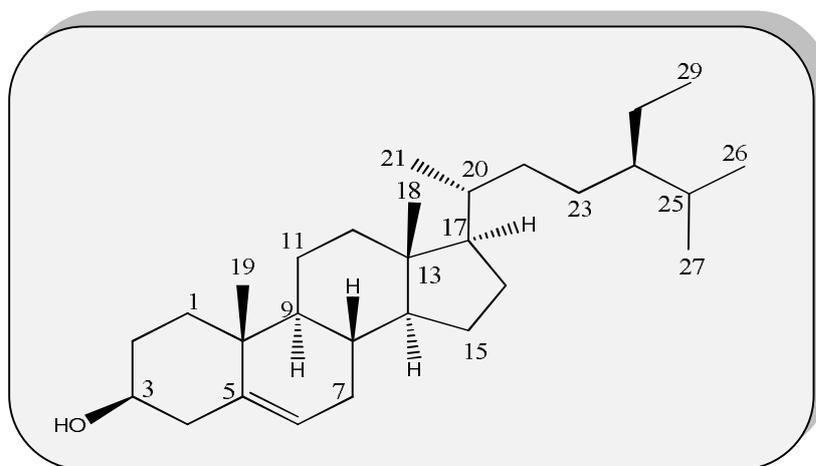
Le tableau (III-13) ci-dessous englobe les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones constituant cette molécule.

**Tableau III-13: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé M dans  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$**

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>Génine</b>		
1	1,86 ( $m$ ) H-1a; 1,09 ( $m$ ) H-1b	37,5
2	1,91 ( $m$ ) H-2a; 1,36 ( $m$ ) H-2b	29,8
3	3,53 ( $m$ )	79,3
4	2,37 ( $dd$ ; 10; 5) H-4a; 2,29 ( $t$ ; 10,0) H-4b	38,3
5	-	140,8
6	5,30 ( $dl$ ; 5,0)	122,3
7	1,96 ( $m$ ) H-7a; 1,56 ( $m$ ) H-7b	32,1
8	1,45 ( $m$ )	32,1
9	0,95 ( $m$ )	50,4
10	-	36,9
11	1,53 ( $m$ ) H-11a; 1,48 ( $m$ ) H-11b	21,2
12	2,10 ( $m$ ) H-12a; 1,17 ( $m$ ) H-12b	40,0
13	-	42,5
14	1,01 ( $m$ )	57,0
15	1,59 ( $m$ ) H-15a; 1,10 ( $tm$ ; 11,2) H-15b	24,5
16	1,85 ( $m$ )	28,4
17	1,15 ( $m$ )	56,3
18	0,61 ( $s$ )	12,0
19	0,95 ( $s$ )	19,4
20	1,36 ( $m$ )	36,3
21	0,85 ( $d$ , 6,0)	18,9
22	1,35 ( $m$ ) H-22a; 1,04 ( $m$ ) H-22b	34,1
23	1,12 ( $m$ )	26,3

24	0,98 (m)	46,1
25	1,67 (m)	29,3
26	0,75 (d; 6,7)	19,1
27	0,76 (d; 6,7)	19,9
28	1,28 (m); 1,23 (m)	23,2
29	0,80 (t; 7,5)	12,1
<b><u>β-D-glucose</u></b>		
1'	4,35 (d; 7,8)	101,3
2'	3,19 (t; 7,8)	73,8
3'	3,38 (t; 7,8)	76,7
4'	3,35 (t; 7,8)	70,5
5'	3,23 (m)	76,1
6'	3,81 (dd; 11,9; 2,9) H-6'a; 3,70 (dd; 11,9; 4,9) H-6'b	62,0

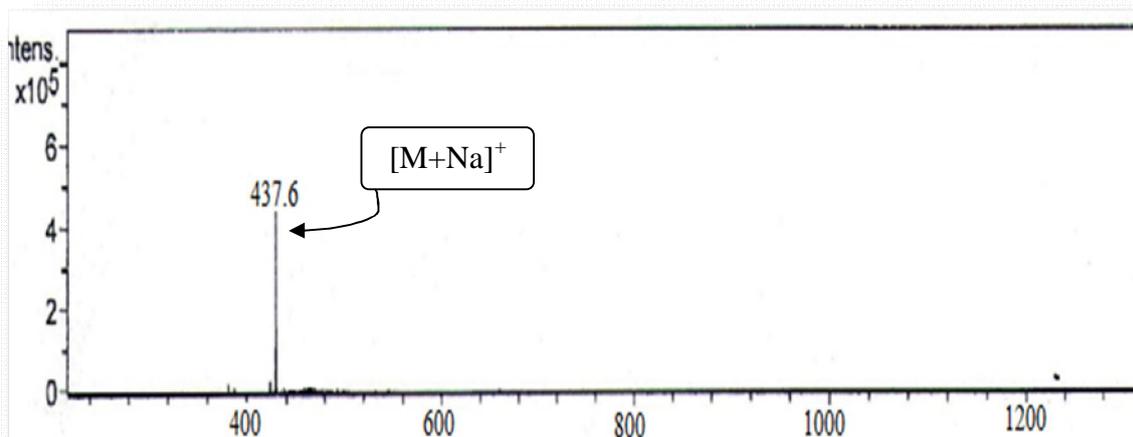
### III-2-15-Identification du composé N



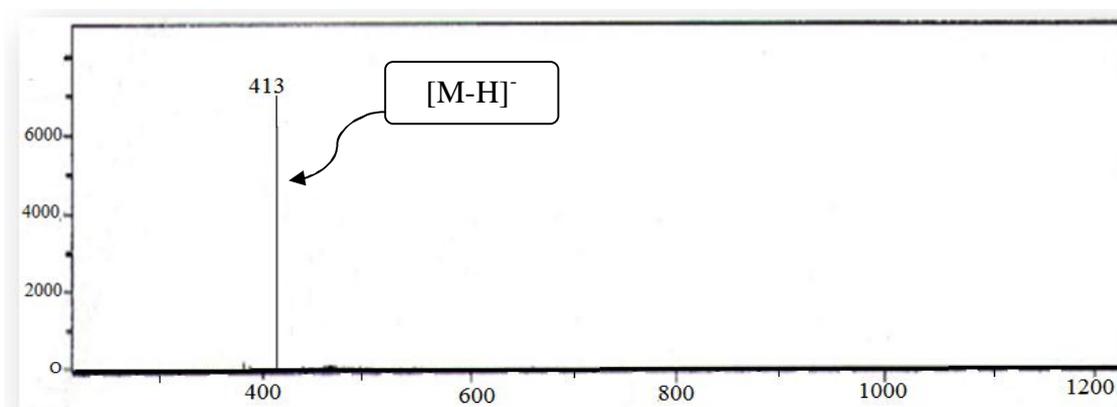
**β-sitostérol**

Il s'agit du 24-éthylcholest-5-èn-3-ol appelé encore β-sitostérol. Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. Il prend une coloration rose après révélation en CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse du composé N obtenus en ionisation douce par ESI-MS (Electrospray) en mode positif (Figure III-211) à  $m/z = 437 [M+Na]^+$  et en mode négatif (Figure III-212) à  $m/z = 413 [M-H]^-$ , donnent une masse moléculaire égale à 414 uma en accord avec une formule brute  $C_{29}H_{50}O$  et un nombre d'insaturation égale à 5 degrés.



**Figure III-211:** Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé N



**Figure III-212:** Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé N

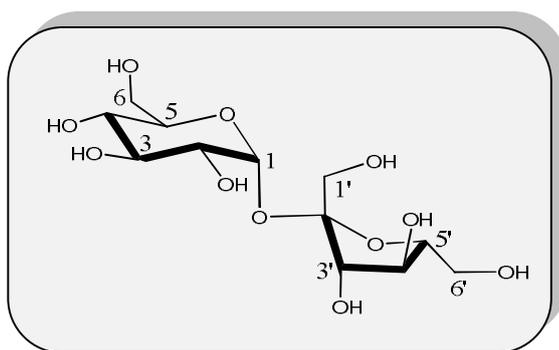
Par comparaison avec un échantillon témoin, les données spectroscopiques (RMN et Masse) et la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = -30^\circ$  ( $c$  0,008,  $\text{CHCl}_3$ ) de ce composé sont identiques à celles du 24-éthylcholest-5-èn-3-ol ou  $\beta$ -sitostérol isolé antérieurement à partir des feuilles de *T. hirsuta* [7,34] et des parties aériennes de *T. passerina* [3] et *T. microphylla* [10]. Ces données sont conformes à celles de la littérature [51].

Ce composé est considéré comme un métabolite secondaire commun dans toutes les plantes supérieures du règne végétal. Plusieurs études ont été réalisées sur l'intérêt pharmacologique du  $\beta$ -sitostérol, elles ont montré qu'il présente des propriétés très variés en citant: anti-néoplasique, anti-inflammatoire et anti-pyrétique [152].

Le tableau (III-14) résume les déplacements chimiques des signaux observés en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé N.

**Tableau III-14: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé N dans  $\text{CDCl}_3$** 

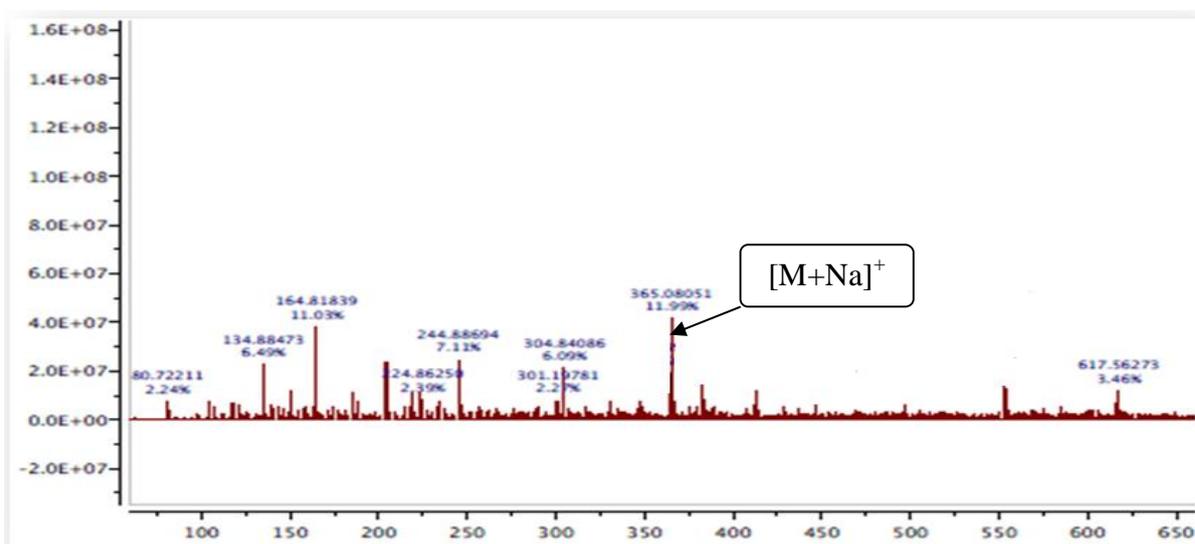
Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,90 ( <i>m</i> ) H-1a; 1,13 ( <i>m</i> ) H-1b	37,2
2	1,88 ( <i>m</i> ) H-2a; 1,56 ( <i>m</i> ) H-2b	31,6
3	3,58 ( <i>tt</i> ; 11,3; 5,3)	71,8
4	2,34 ( <i>ddd</i> ; 13,0; 5,0; 2,0) H-4a; 2,30 ( <i>td</i> ; 11,0; 2,0) H-4b	42,3
5	-	140,7
6	5,40 ( <i>dd</i> ; 5,2; 2,3)	121,7
7	1,50 ( <i>m</i> )	31,9
8	2,03 ( <i>td</i> ; 12,1; 2,4)	31,8
9	0,98 ( <i>m</i> )	50,1
10	-	36,5
11	1,55 ( <i>m</i> ) H-11a; 1,50 ( <i>qd</i> ; 10,8; 4,6) H-11b	21,1
12	2,06 ( <i>dt</i> , 12,8; 3,6) H-12a; 1,21 ( <i>m</i> ) H-12b	39,7
13	-	42,3
14	1,04 ( <i>m</i> )	56,7
15	1,63 ( <i>m</i> ) H-15a; 1,11 ( <i>tm</i> ; 11,2) H-15b	24,3
16	1,89 ( <i>m</i> ) H-16a; 1,30 ( <i>m</i> ) H-16b	28,2
17	1,16 ( <i>t</i> ; 10,0)	56,0
18	0,74 ( <i>s</i> )	11,8
19	1,06 ( <i>s</i> )	19,4
20	1,40 ( <i>m</i> )	36,1
21	0,93 ( <i>d</i> , 6,5)	18,8
22	1,36 ( <i>m</i> ) H-22a; 1,07 ( <i>m</i> ) H-22b	33,9
23	1,21 ( <i>m</i> )	26,0
24	0,97 ( <i>m</i> )	45,8
25	1,71 ( <i>m</i> )	29,1
26	0,88 ( <i>d</i> ; 6,9)	19,8
27	0,87 ( <i>d</i> , 6,9)	19,0
28	1,31 ( <i>m</i> )	23,0
29	0,89 ( <i>t</i> ; 7,4)	12,0

III-2-16-Identification du composé **O**

Saccharose

Le composé **O** a été isolé sous forme d'une huile marron soluble dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache invisible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se colore en noir après révélation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

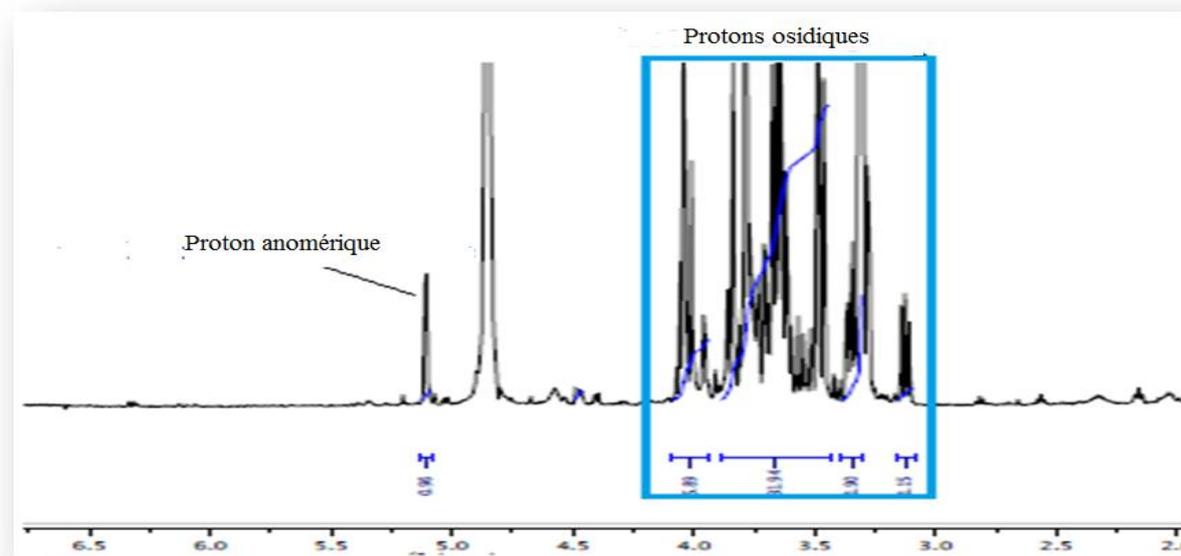
Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif (Figure III-213) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  365  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 342 uma correspondant à une formule brute en  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .



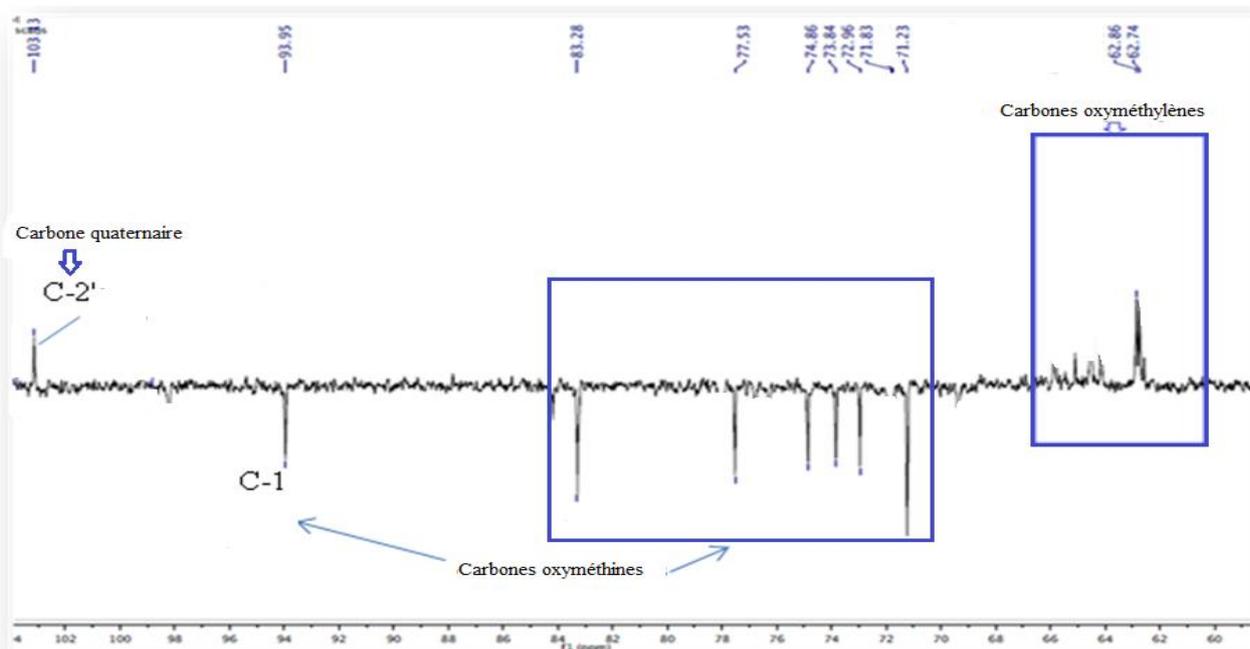
**Figure III-213:** Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **O**

L'analyse du spectre RMN  $^1H$  (Figure III-214) de ce composé permet d'observer des signaux dans la région moyenne des champs 3,00-5,20 ppm dont un signal attribuable au proton anomérique à  $\delta_H$  5,13 ( $d$ ;  $J = 3,7$  Hz; H-1). La valeur de la constante de couplage de ce proton traduit une configuration  $\alpha$ . D'autre part, son spectre RMN  $^{13}C$   $J$ -modulé (Figure III-215)

montre 12 atomes de carbone se répartissant en 8 oxyméthines dont 1 carbone anomère résonnant à 93,2 ppm (C-1), 3 oxyméthylènes et 1 carbone quaternaire d'oxygéné repéré à 103,7 ppm (C-2'). Ces observations indiquent la présence d'un disaccharide connu sous le nom du saccharose. Une CCM comparative avec un échantillon témoin supporte cette attribution. Sa structure moléculaire établie par analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-214),  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-215) et de masse ESI-MS (Figure III-213) a été confirmée par comparaison avec les données de la littérature [153].



**Figure III-214:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé O

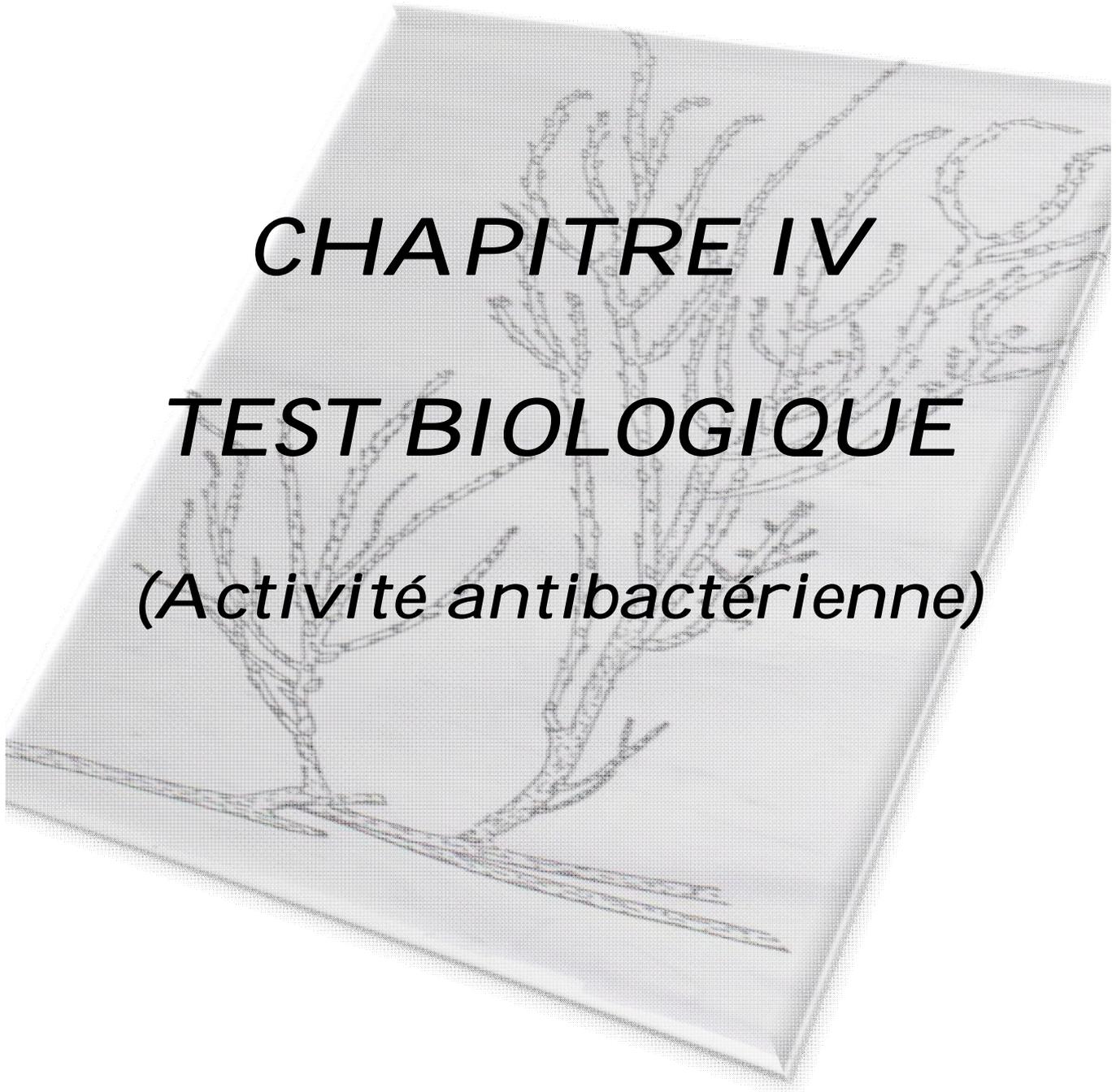
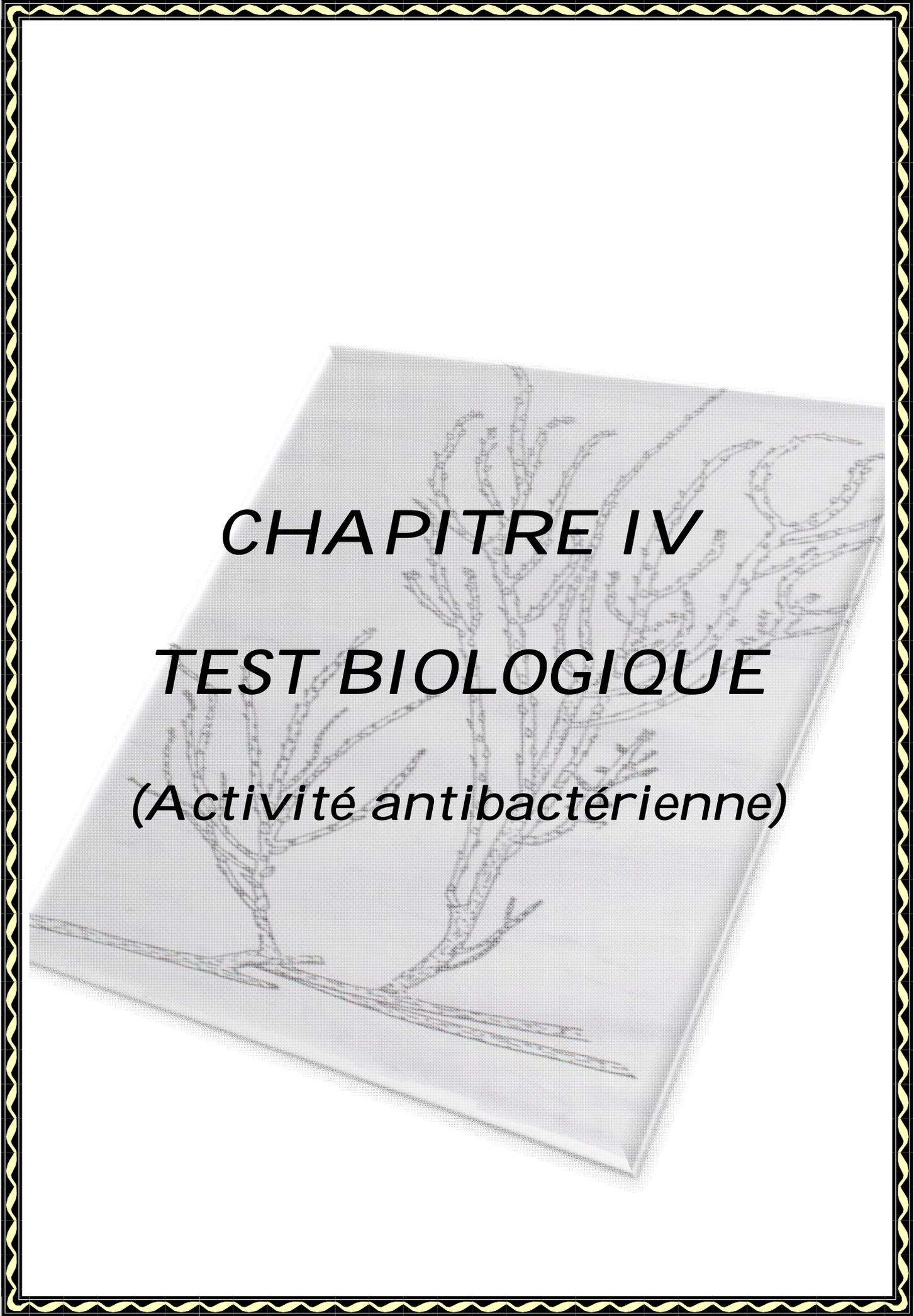


**Figure III-215:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz- $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé O

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **O** sont rassemblés dans le tableau (III-15).

**Tableau III-15:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **O** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Positions	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,13 ( <i>d</i> ; 3,7)	93,2
2	3,45 ( <i>t</i> ; 3,7)	73,8
3	3,79 ( <i>m</i> )	72,9
4	3,80 ( <i>m</i> )	71,2
5	3,66 ( <i>m</i> )	71,8
6	3,83 ( <i>m</i> ) H-6a; 3,81 ( <i>m</i> ) H-6b	60,7
1'	3,64 ( <i>m</i> ) H-1'a; 3,62 ( <i>m</i> ) H-1'b	62,8
2'	-	103,7
3'	4,10 ( <i>d</i> ; 2,5)	83,2
4'	3,97 ( <i>d</i> ; 2,5)	77,5
5'	3,78 ( <i>m</i> )	74,8
6'	3,77 ( <i>m</i> ) H-6'a; 3,75 ( <i>m</i> )	62,7



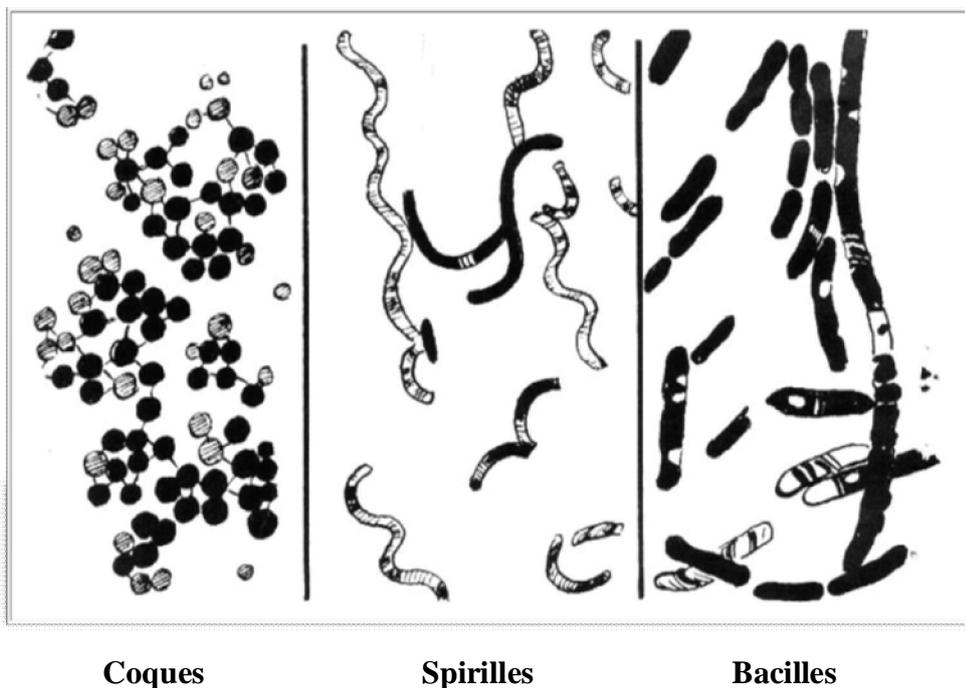
**CHAPITRE IV**  
**TEST BIOLOGIQUE**  
*(Activité antibactérienne)*

## IV-1-Rappel microbiologique

### IV-1-1-Les bactéries

En général, Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes. Elles sont présentes dans tous les milieux. Les bactéries étant microscopiques, leur taille est de (0,2 à 2  $\mu\text{m}$ ). Elles se présentent sous plusieurs formes telles que: sphériques (coques), spiralées (spirilles) et allongées ou en bâtonnets (bacilles) (Figure IV-1).

La majorité des bactéries possèdent une paroi glucidique, le peptidoglycane. Il est formé d'une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique [154].



**Figure IV-1:** Différentes formes des bactéries

### IV-1-2-Division des bactéries

En effet, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes à Gram positif et Gram négatif. Cette division est basée sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire des bactéries.

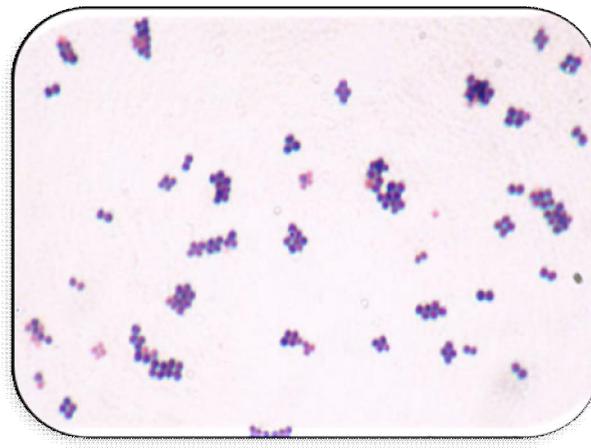
Parmi les Grams négatifs, on rencontre les deux espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Pour les Grams positifs, une espèce *Staphylococcus aureus* tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [154].

Catégorie des bactéries	Espèces
• Grams négatifs	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>
• Grams positifs	<i>Staphylococcus aureus</i>

**Tableau IV-1: Principaux groupes de bactéries**

#### IV-1-2-1-*Staphylococcus aureus*

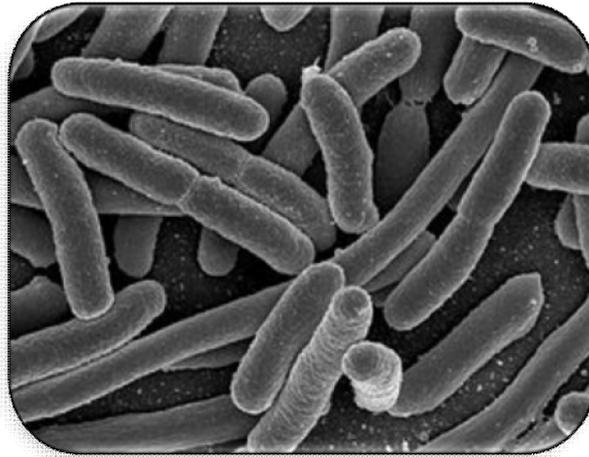
*Staphylococcus aureus* ou le staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus* (Figure IV-2). Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif. Elles sont responsables des intoxications alimentaires, des infections suppurées et dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques [155].



**Figure IV-2: *Staphylococcus aureus* au microscope électronique**

#### IV-1-2-2-*Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une bactérie intestinale à Gram négatif (Figure IV-3). Cette bactérie est la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [156].



**Figure IV-3:** *Escherichia coli* au microscope électronique

#### IV-1-2-3-*Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif du genre *Pseudomona* (Figure IV-4). C'est une bactérie résistante à de nombreux antibiotiques [157] et qui se caractérise par la pigmentation bleu verte de ses colonies [154].



**Figure IV-4:** *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique

#### IV-2-Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits acétate d'éthyle des parties aériennes et des racines est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [158]. Dans le présent travail, les souches microbiennes utilisées sont trois espèces bactériennes de référence ATCC, provenant du laboratoire de Bactériologie du CHU de Batna.

- Une souche bactérienne Gram positif: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

- Deux souches bactériennes à Gram négatif: *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

### IV-2-1-Préparation des solutions

Après extraction, les extraits acétate d'éthyle des parties aériennes et des racines ont été repris avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration de 1 g/ml. Une série de dilutions a été réalisée de 1/2 à 1/8 pour avoir les concentrations de 500 mg/ml à 125 mg/ml.

### IV-2-2-Méthode de diffusion en milieu gélosé

#### IV-2-2-1-Repiquage des souches bactériennes

Le support bactérien utilisé est composé de trois souches différentes qui sont décrites précédemment. Ces dernières ont étéensemencées dans un bouillon nutritif pendant 24 heures dans l'étuve à une température de 37 °C pour la réalisation de l'activité antibactérienne.

Nous prenons quelques gouttes du bouillon nutritif contenant les souches bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur, puis nous les mettons sur gélose nutritive dans une boîte de pétri, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont été utilisées pour la préparation de l'inoculum.

#### IV-2-2-2-Préparation de l'inoculum bactérien

Après incubation de 24 heures à une température de 37 °C, nous avons choisi des colonies bien isolées avec une anse de platine, puis elles ont été transférées dans un tube de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale.

#### IV-2-2-3-Ensemencement

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, nous avons trempé un écouvillon dans la suspension, puis nous avons étalé la surface entière de la gélose Mueller Hinton à trois reprises.

En tournant la boîte de petri à environ 60° après chaque application, ceci nous permet d'avoir une distribution égale et homogène de l'inoculum. Enfin, nous avons écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

### IV-2-3-Principe

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés de chaque dilution (1 à 1/8) préparées à partir des extraits acétate d'éthyle des parties aériennes et racines de la plante *Thymelaea microphylla*. A l'aide

d'une pince, ces disques ont été placés sur la surface du milieu GMH. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Par ailleurs, des témoins imbibés par le DMSO pour les deux extraits ont été préparés.

### IV-3-Exploitation des résultats

En mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre pour les différentes concentrations des différents extraits (Figures IV-5, IV-6, IV-7 et IV-8) autour des disques, les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux (IV-2 et IV-3) suivants:

Souches	Extrait acétate d'éthyle des racines			
	1/1	1/2	1/4	1/8
	(1 g/ml)	(500 mg/ml)	(250 mg/ml)	(125 mg/ml)
<i>S. aureus</i>	16,5	14,5	11,5	≤ 6
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-

**Tableau IV-2:** Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle des racines.

Souches	Extrait acétate d'éthyle des parties aériennes			
	1/1	1/2	1/4	1/8
	(1 g/ml)	(500 mg/ml)	(250 mg/ml)	(125 mg/ml)
<i>S. aureus</i>	14,5	13	≤ 6	≤ 6
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-

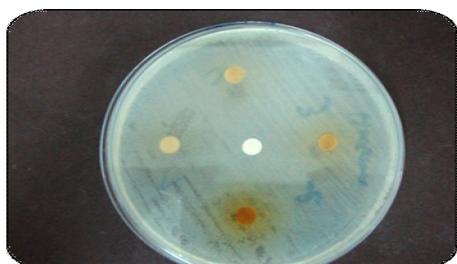
**Tableau IV-3:** Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les extraits acétate d'éthyle des deux parties (aériennes et racines) sont inactifs contre les deux souches à Grams négatifs *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et ceci quelque soit le dosage. Ces extraits sont

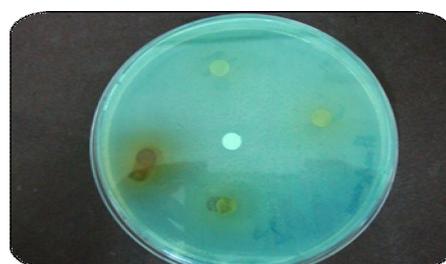
actifs à l'égard de la souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* pour les dilutions (1 à 1/4), mais cette activité disparaît avec le dosage 1/8 (125 mg/ml).

En conclusion, les deux extraits étudiés possèdent une activité antibactérienne modérée contre *S. aureus*. L'activité antibactérienne sur *S. aureus* de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants phytochimiques de nature polyphénolique, notamment: les flavonoïdes, biflavonoïdes, coumarines, biscoumarines et lignanes.

*Escherichia coli*

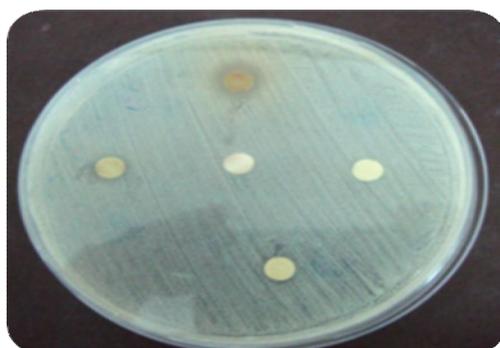


*Pseudomonas aeruginosa*



**Figure IV-5:** Zones d'inhibition de l'extrait AcOEt sur *P. aeruginosa* et *E. coli* des parties aériennes

*Staphylococcus aureus*



**Figure IV-6:** Zones d'inhibition de l'extrait AcOEt sur *S. aureus* des parties aériennes.

*Escherichia coli*

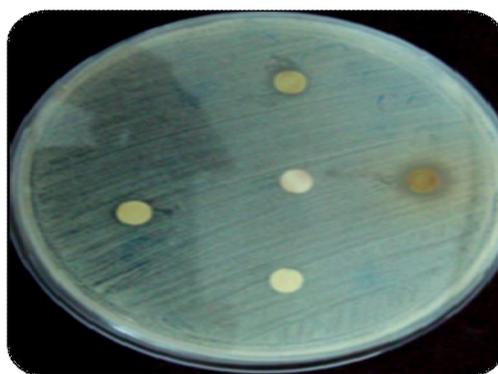


*Pseudomonas aeruginosa*



**Figure IV-7:** Zones d'inhibition de l'extrait AcOEt sur *P. aeruginosa* et *E. coli* des racines

*Staphylococcus aureus*



**Figure IV-8:** Zones d'inhibition de l'extrait AcOEt sur *S. aureus* des racines.



***CONCLUSION***  
***GENERALE***

## Conclusion générale

Ce travail de recherche est destiné à étudier les métabolites secondaires et évaluer l'activité antibactérienne de l'espèce *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. appartenant à la famille Thymelaeaceae. Cette plante endémique à l'Afrique du Nord, est utilisée en médecine traditionnelle en Algérie pour le traitement des blessures et diverses dermatoses à savoir l'érysipèle, le cancer de peau, les abcès et les boutons. Il est à signaler que cette espèce n'a pas fait l'objet d'études chimiques conséquentes.

L'étude phytochimique réalisée sur les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle des parties aériennes et racines de l'espèce *T. microphylla* a abouti à l'isolement et la caractérisation de deux métabolites secondaires nouveaux d'une rare classe chimique à savoir les dilaspirolactones, en plus de 13 composés naturels connus appartenant à six classes de métabolites secondaires incluant les biflavonoïdes, biscoumarines, lignanes, flavonoïdes glucosylés, phenylpropanoïde glucosylés et phytostérols.

Les composés identifiés **A-O** à partir des différents extraits végétaux de la plante *T. microphylla* se répartissent comme suit :

- Deux rares spiro- $\gamma$ -lactones glycosides nouveaux à squelette 1,7-dioxa-2,6-dioxospiro [4,4] nonane nommés microphynolides A et B.
- Cinq biflavonoïdes : 2 biflavanones et 3 biflavanols.
- Une biscoumarine.
- Deux lignanes de type pinorésinol et matairésinol
- Un flavonoïde glucosylé.
- Un phenylpropanoïde glucosylé de type sinapyle alcool glucoside.
- Deux stéroïdes de type phytostérol.
- Un disaccharide.

L'obtention de ces métabolites secondaires a été faite par des méthodes chromatographiques de séparation et de purification des substances naturelles, employées dans notre laboratoire telles que la chromatographie sur colonne de gel de silice normale (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck), la chromatographie sur colonne de polyamide SC6, la chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20, la chromatographie préparative sur couche épaisse en phase normale et la chromatographie sur couche mince en phase inverse (RP-18).

Les structures moléculaires des composés isolés (**A-O**) ont été identifiées principalement par analyse combinée des différentes méthodes d'analyse spectrales à savoir la RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, NOESY et ROESY), la spectrométrie de masse (HR-ESI-MS, ESI-MS), l'UV, l'IR, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$  et ainsi par la comparaison avec les données de la littérature.

Les divers extraits végétaux obtenus de la plante médicinale *T. microphylla* ont été soumis aux tests de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé, ceci a été réalisé sur trois souches bactériennes de références à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) avec des différentes concentrations. Cette évaluation indiquant des zones d'inhibition moyennes montre bien que cette plante possède une activité antibactérienne modérée.

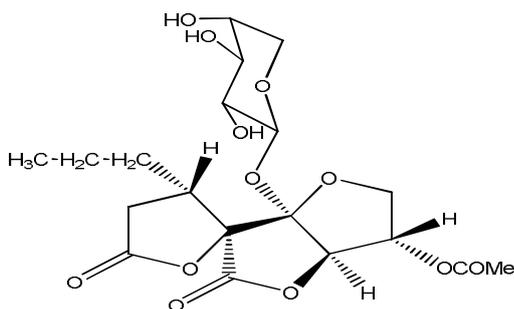
Il est important de mentionner que des composés similaires, aux composés nouveaux de type spiro- $\gamma$ -lactone glycosides **A** et **B** isolés dans le cadre de ce travail, ont été identifiés dans une espèce du genre *Gnidia* de la famille des Thymelaeaceae (*Gnidia socotrana*). Cette étude constitue le second rapport scientifique indiquant la présence de ce type de composés dans les plantes de la famille Thymelaeaceae.

Les métabolites secondaires isolés dans cette étude et connus dans la littérature consistent notamment en cinq biflavonoïdes néochamaejasmine A, néochamaejasmine B, daphnodorine B, genkwanol A et stelleranol, une bis-coumarine daphnorétine, un flavonoïde glucosylé appelé tiliroside, deux lignanes nommés pinorésinol et matairésinol et un phénylpropanoïde glucoside connu sous le nom syringine. Il est à noter que les biflavonoïdes et phénylpropanoïde glucosylé ont été identifiés pour la première fois dans le genre *Thymelaea*.

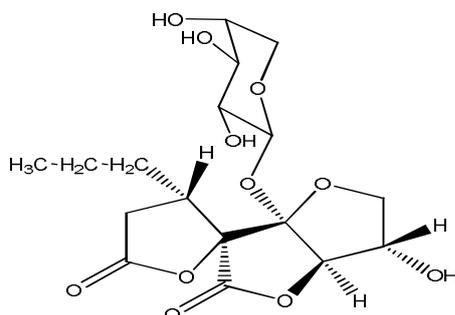
La présence de biflavonoïdes et bis-coumarines dans *T. microphylla* est en bon accord avec les études antérieures révélant que les biflavonoïdes et bis-coumarines sont les constituants caractéristiques de la famille Thymelaeaceae et pourraient être considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

En conclusion, ce travail de recherche a permis une meilleure connaissance de la composition chimique de la plante médicinale *Thymelaea microphylla* et a mis en évidence les structures moléculaires de 15 composés naturels:

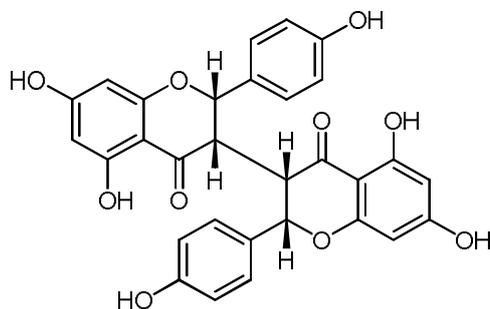
✓ Le composé A: microphynolide A



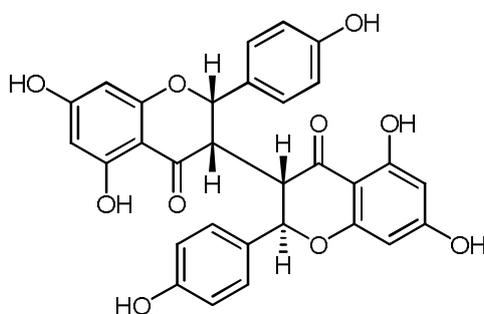
✓ Le composé B: microphynolide B



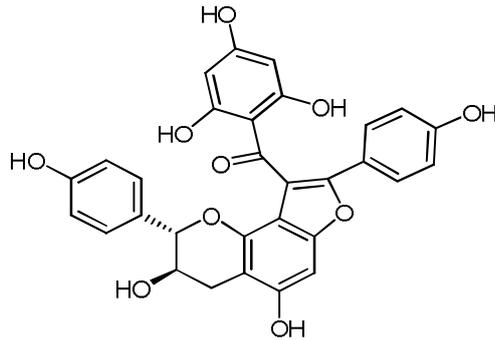
✓ Le composé C: néochamaejasmine A



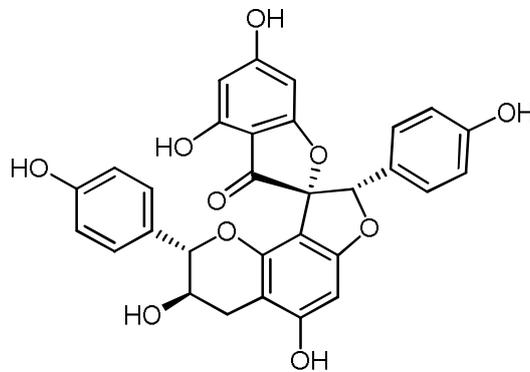
✓ Le composé D: néochamaejasmine B



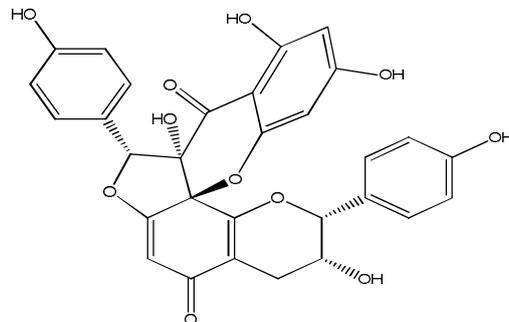
✓ Le composé E: daphnodorine B



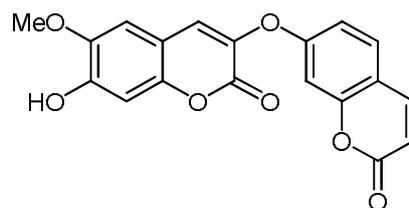
✓ Le composé F: genkwanol A



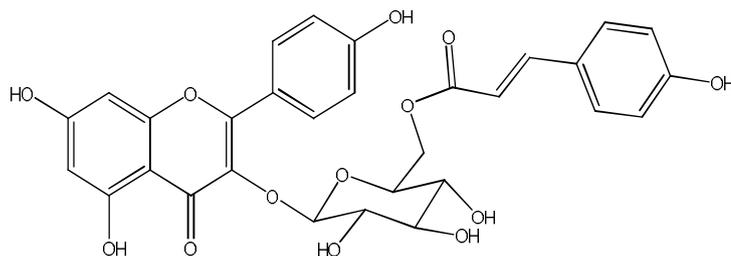
✓ Le composé G: stelléranol



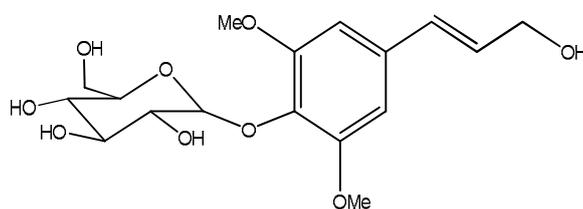
✓ Le composé H: daphnorétine



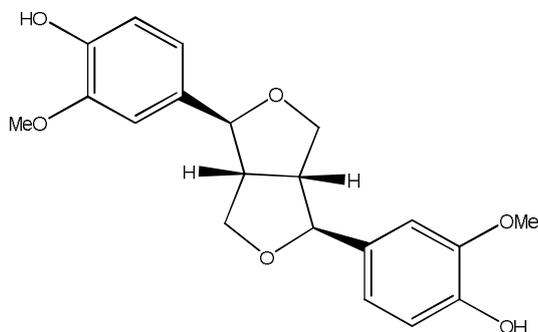
✓ Le composé I: tiliroside



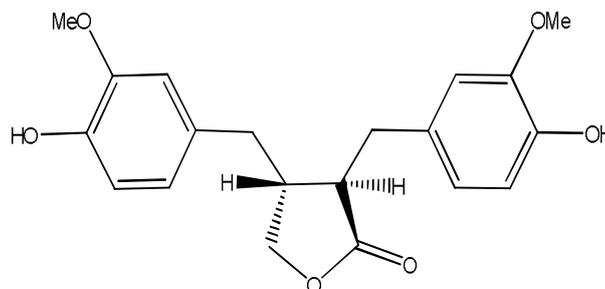
✓ Le composé J: syringine



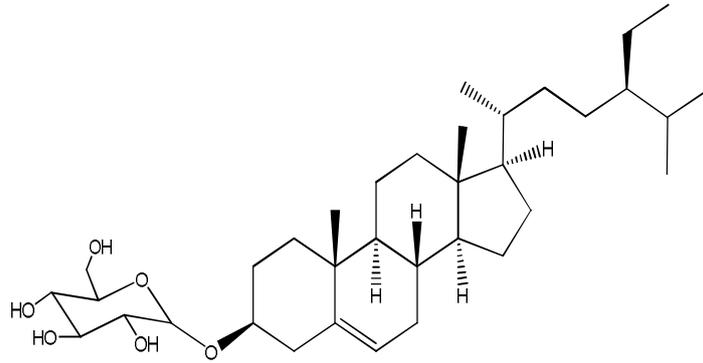
✓ Le composé K: (-)-pinorésinol



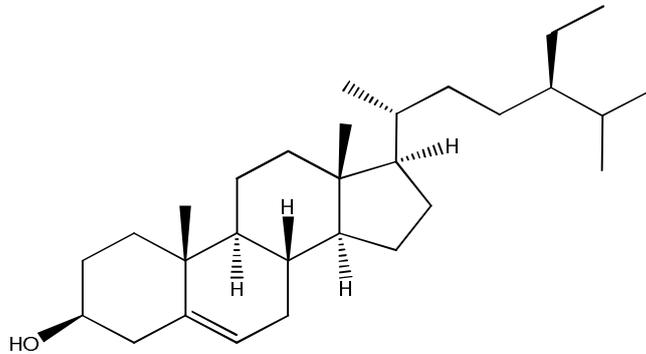
✓ Le composé L: (+)-matairésinol



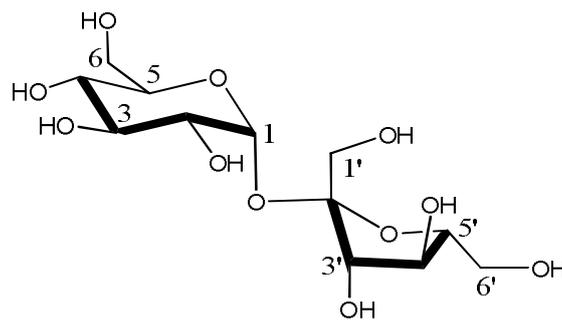
- ✓ Le composé M:  $\beta$ -sitostérol-3-O-glucoside



- ✓ Le composé N:  $\beta$ -sitostérol



- ✓ Le composé O: saccharose





**CHAPITRE V**  
**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## V-1- Appareillage et matériels

### V-1-1-Chimie extractive

#### V-1-1-1-Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couche mince CCM ont été effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes de silice ou des plaques en verre.

- Support aluminium:
  - ✓ En phase normale, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm).
  - ✓ En phase inverse, RP-18 F<sub>254S</sub>, 200 µm Merck (5 x 10, 10 x 20 cm et 20 x 20 cm).
- Support verre: en phase normale, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (10 ou 20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Les plaques CCM ou CCE ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm puis révélées à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

#### V-1-1-2-Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

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

- Une silice Kieselgel Merck (230-400 Mesh), en phase normale.
- Le polyamide SC6.
- Le Sephadex LH-20, en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon à purifier.

Les quantités de la silice et du polyamide utilisées sont généralement 30 fois supérieures à la quantité déposée de l'extrait.

#### V-1-1-3-Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La VLC est une technique très rapide, elle est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut de la plante. Son avantage est de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques.

La silice Kieselgel Merck (230-400 Mesh) et la silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63 µm) sont mises dans un entonnoir cylindrique filtrant sur un verre fritté (n° 4), en utilisant 10 fois le poids de l'extrait à fractionner.

## V-1-2-Chimie structurale

### V-1-2-1-Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont enregistrés sur un appareil Varian/Agilent Inova spectrometer à 500 MHz pour  $^1\text{H}$  et 125 MHz pour  $^{13}\text{C}$ , de l'Université de Lausanne, Genève (Suisse). Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont indiqués dans chaque cas ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , MeOD et  $\text{DMSO}-d_6$ ).

### V-1-2-2-Spectroscopie de masse (SM)

Les spectres de masse des composés isolés ont été enregistrés en HR-ESI-MS et ESI-MS sur un Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer de l'Université de Lausanne, Genève (Suisse).

### V-1-2-3-Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques des composés isolés 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 précisés à chaque fois.

### V-1-2-4-Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre UV KONTRON Logiciel UVS900Lite. Les différentes mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de la solution.

### V-1-2-5- Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres IR ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr ou de film de  $\text{CHCl}_3$ , sur un appareil à transformée de Fourier Nicolet Avatar 320 FT-IR piloté par un logiciel E2 Ommic ESP 5.2a et sur un autre appareil Shimadzu model IR-470 Spectrometer.

## V-2-Récolte du matériel végétal

L'espèce étudiée *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. a été récoltée dans la région de Biskra (Sud-Est Algérien), au mois de Mai 2009. La plante est identifiée par le Pr. Bachir Oudjehih du département d'Agronomie, Institut des sciences vétérinaires et agronomiques de

l'université de Batna. Après séchage à l'air libre, les parties aériennes (feuilles et tiges) et les racines ont été coupées puis broyées pour donner des poudres fines de masses 1 Kg et 600 g respectivement.

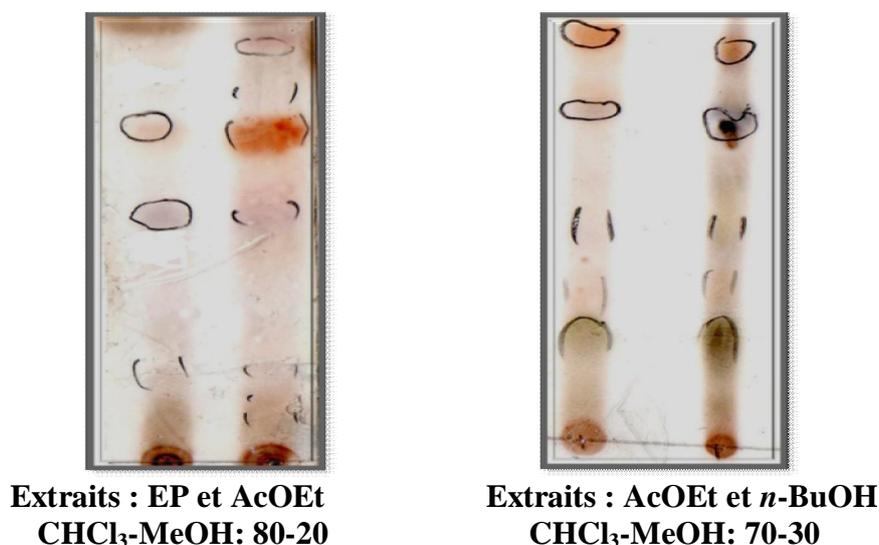
### V-3-Extraction

#### V-3-1-Extraction des parties aériennes

1 Kg des parties aériennes de la plante *T. microphylla* est mis à macérer dans un mélange acétone-eau (70-30) durant quatre jours (96 h) à la température ambiante. Après filtration et concentration de la phase hydro-acétonique, la phase aqueuse obtenue est extraite 3 fois par l'éther de pétrole. La phase organique récupérée est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  puis évaporée à sec. 1,1 g de l'extrait éthero-pétrolique a été obtenu. La phase aqueuse restante est épuisée par l'acétate d'éthyle selon le même protocole pour donner 20 g d'extrait acétate d'éthyle et enfin par le *n*-butanol. Après séchage, filtration et évaporation à sec, 6 g de l'extrait *n*-butanolique ont été obtenus.

#### V-3-1-1-Contrôle chromatographique des extraits des parties aériennes

Une analyse chromatographique sur couche mince CCM a été réalisée sur les trois extraits obtenus précédemment, en utilisant les deux systèmes d'élution suivants: ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH : 80-20 et 70-30) (Figure V-1). Les profils CCM de ces extraits montrent que l'extrait acétate d'éthyle est riche en produits comparativement aux deux autres extraits. La présence de deux taches visibles et séparables pour l'extrait éthero-pétrolique rend aussi ce dernier intéressant, ce qui nous a motivé à leur investigation phytochimique.



**Figure V-1** : CCM des extraits des parties aériennes de la plante *T. microphylla*

### V-3-1-2-Etude de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes

7 g de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase inverse RP-18 comme phase stationnaire. L'élution a été réalisée au moyen d'un mélange H<sub>2</sub>O-MeOH selon le tableau (V-1) ci-dessous. Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche CCM, visualisées à la lumière UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et révélées à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Le tableau (V-1) rassemble les différentes fractions obtenues.

Fractions	Eluant de la colonne	Poids en mg	Observation sur CCM
1	H <sub>2</sub> O-MeOH	1,5 g	Plusieurs taches + une trainée
	80%-20%		
2	//	1,1 g	Plusieurs taches
3	//	345	//
4	60%-40%	141,6	//
5	//	191	//
6	//	67,1	//
7	40%-60%	134	2 taches
8	//	71,6	//
9	//	69,4	//
10	//	31,2	Plusieurs taches
11	20%-80%	90,9	//
12	//	306	//
13	//	18,7	//
14	//	23,6	//
15	MeOH	69,6	2 taches
16	//	94,4	Plusieurs taches + une trainée
17	//	22	//
18	//	20	//

**Tableau V-1: Rassemblement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle**

### V-3-1-3-Purification des produits de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes

La fraction F1 (1,5 g) est séparée sur une colonne de gel de silice normale. L'élution est effectuée par le mélange de solvants  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100-0 à 80-20, pour conduire à 6 sous fractions (Tableau V-2).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	20	Tache + trainée
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	26	//
3	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 3%	116	2 taches + trainée
4	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 5 %	80,4	//
5	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 10%	56,6	Plusieurs taches
6	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 20%	33,2	//

**Tableau V-2 : Rassemblement des sous fractions de F1**

La fraction F3 (116 mg) éluee par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 97-3 est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale, éluee avec un mélange de solvants  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100-0 à 90-10 pour donner 5 sous fractions (Tableau V-3).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	29,3	Néant
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	21	Tache + trainée
3	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 3%	28	2 taches + trainée
4	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 5 %	20,3	//
5	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 10%	16,6	Trainée

**Tableau V-3 : Rassemblement des sous fractions de F3**

La fraction F3 (28 mg) obtenue à partir de la dernière colonne éluée par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 97-3 est purifiée sur CCM RP-18 dans le solvant MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ : 60-40, puis soumise à une purification sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant le méthanol, conduisant au composé **A** (12,8 mg) (Tableau V-4). Sa CCM montre la présence d'une tache invisible à 254 nm se révélant en marron à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

N° de faction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant $\text{CHCl}_3$ -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
3	12,8	$\text{CHCl}_3$ -MeOH: 80-20	Marron
Poids: 28 mg		Composé <b>A</b> Rf = 0,56	

**Tableau V-4 : Composé A**

Les fractions F2 et F3 (1,4 g) de la VLC éluées par  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH: 80-20 sont regroupées, puis fractionnées sur une colonne de gel de silice normale  $\text{SiO}_2$  avec un gradient d'éluion  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100-0 à 60-40 afin d'obtenir 11 sous fractions (Tableau V-5).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	13	Néant
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	22	Tache + trainée
3	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 3%	16	//
4	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 5%	37,6	//
5	//	54	Plusieurs taches
6	//	64,5	//
7	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 10%	57	2 taches + trainée
8	//	73	//
9	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 20%	59,8	//
10	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 30%	50,6	Plusieurs taches
11	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 40%	133	//

**Tableau V-5 : Rassemblement des sous fractions de F2 et F3**

La fraction F7 (57 mg) éluée par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 90-10 est chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale avec l'éluant  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100-0 à 97-3 pour donner 5 sous fractions (Tableau V-6).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	3,2	Néant
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	9	Tache + trainée
3	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 3%	10	//
4	//	6,4	//
5	//	1,6	//

**Tableau V-6 : Rassemblement des sous fractions de F7**

Les fractions F2, F3, F4 et F5 (27 mg) du dernier fractionnement éluées par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 99-1 et 97-3 sont réunies puis purifiées sur CCM RP-18 en utilisant comme solvants de migration MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ : 40-60, pour fournir le composé **B** (4,5 mg) (Tableau V-7). Il présente sur CCM une tache invisible à 254 nm et se révèle en marron à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

N° de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant $\text{CHCl}_3$ -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
2, 3, 4 et 5	4,5	$\text{CHCl}_3$ -MeOH: 80-20	Marron
Poids: 27 mg		Composé <b>B</b> Rf = 0,53	

**Tableau V-7 : Composé B**

La fraction F11 (133 mg) éluée par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 60-40 est fractionnée sur une colonne de gel de silice  $\text{SiO}_2$ . L'éluion est effectuée par le mélange de solvants  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100-0 à 95-5 pour obtenir 7 sous fractions (Tableau V-8).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	6	Néant
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	14,3	Plusieurs taches

3	CHCl <sub>3</sub> -MeOH 3%	24	//
4	//	21	//
5	CHCl <sub>3</sub> -MeOH 5%	19	//
6	//	24	1 tache + trainée
7	//	7	Trainée

**Tableau V-8 : Rassemblement des sous fractions de F11**

La fraction F6 (24 mg) éluée par CHCl<sub>3</sub>-MeOH: 95-5 est filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 par le méthanol pour conduire le composé **O** (6 mg). La CCM de ce produit indique la présence d'une tache invisible à 254 nm se révélant en noir à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-9).

N <sup>o</sup> de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
6	6	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 70-30	Noir
Poids: 24 mg		Composé <b>O</b> Rf = 0,21	

**Tableau V-9 : Composé O**

Les fractions F7, F8, F9 et F10 de la VLC éluées par H<sub>2</sub>O-MeOH: 40-60 sont réunies (306 mg) puis chromatographiées sur une colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub> préparée dans le dichlorométhane. L'éluion est réalisée initialement par le dichlorométhane puis par un gradient de MeOH dans le dichlorométhane: 100-0 à 95-5, pour conduire à 7 sous fractions (Tableau V-10). Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince CCM, visualisées à la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique et chauffage.

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	CHCl <sub>3</sub> 100%	9	Néant
2	//	18	//
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 1%	6,5	1 taches + trainée
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 3%	30	Plusieurs taches
5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 5%	34	//

6	//	22	Trainée
7	//	8,6	//

**Tableau V-10 : Regroupement des sous fractions de F7-F10**

La fraction F3 d'une masse égale à 6,5 mg éluée par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH: 99-1, montre une tache visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm et une trainée. La purification de cette fraction a été réalisée sur une colonne de Sephadex LH-20, en utilisant le MeOH comme éluant pour obtenir le composé **D** avec une masse de 4,5 mg (Tableau V-11). Sa CCM montre la présence d'une tache visible à 254 et 366 nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

N° de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
3	4,5	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 80-20	Jaune
Poids: 6,5 mg		Composé <b>D</b> Rf = 0,60	

**Tableau V-11 : Composé D**

### V-3-1-4-Etude de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes

1,1 g de l'extrait éthero-pétrolique est chromatographié sur une colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub>. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange hexane-AcOEt. Les fractions obtenues sont rassemblées dans le tableau (V-12) ci-dessous:

Fractions	Eluant de la colonne	Poids en mg	Observation sur CCM
1	Hexane	68,8	Tache
2	Hexane-AcOEt 1%	37,2	//
3	97%-3%	26,4	2 taches
4	95%-5%	37,7	Plusieurs taches
5	90%-10%	30	//
6	80%-20%	20,4	1 tache + une trainée
7	70%-30%	28,4	Plusieurs taches+ une trainée

<b>8</b>	50%-50%	12,4	//
<b>9</b>	40%-60%	18	//
<b>10</b>	//	13,5	1 tache + trainée

**Tableau V-12 :** Rassemblement des fractions de l'extrait éthero-pétrolique

### V-3-1-5-Purification des produits de l'extrait éthero-pétrolique des parties aériennes

La dernière fraction F10 avec une masse de 13,5 mg est chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH-20. L'éluion est effectuée par le méthanol en conduisant au composé **J** à l'état pur d'une masse de 6,7 mg (Tableau V-13). Il présente sur CCM une tache visible à 254 nm et se révèle en bleu à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

N <sup>o</sup> de faction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
<b>10</b>	6,7	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 80-20	Bleu
Poids: 13,5 mg		Composé <b>J</b> Rf = 0,39	

**Tableau V-13 :** Composé J

La fraction F6 (20,4 mg) est chromatographiée sur CCE, en utilisant le mélange de solvants suivant : CHCl<sub>3</sub>-MeOH: 85-15 comme éluant, puis purifiée sur colonne de Sephadex LH-20 élue par le MeOH pour donner le composé **I** à l'état pur avec une masse de 4 mg. La CCM de ce composé montre également la présence d'une tache visible à 254 nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-14).

N <sup>o</sup> de faction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
<b>6</b>	4	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 80-20	Jaune
Poids: 20,4 mg		Composé <b>I</b> Rf = 0,48	

**Tableau V-14 :** Composé I

### V-3-1-6-Composés isolés des parties aériennes de l'espèce *T. microphylla*

#### V-3-1-6-1-Composé A

Microphynolide A

Formule brute :  $C_{19}H_{26}O_{12}$

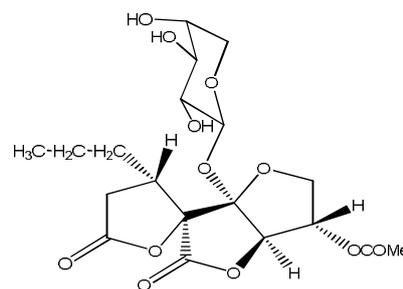
$[\alpha]_D^{20} = + 37,8^\circ$  ( $c$  0,006, MeOH)

MS: HR-ESI (mode positif)  $m/z$  : 469,1327  $[M+Na]^+$

915,2884  $[2M+Na]^+$

(mode négatif)  $m/z$  : 491,1473  $[(M+HCOOH)-H]^-$

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans ( $CD_3OD$ ) (Tableau III-1, page 68)



#### V-3-1-6-2-Composé B

Microphynolide B

Formule brute:  $C_{17}H_{24}O_{11}$

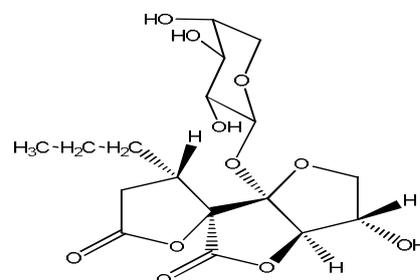
$[\alpha]_D^{20} = + 14,3^\circ$  ( $c$  0,0028, MeOH)

MS: HR-ESI (mode positif)  $m/z$  : 427,1227  $[M+Na]^+$

831,2586  $[2M+Na]^+$

(mode négatif)  $m/z$  : 403,1216  $[M-H]^-$

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans ( $CD_3OD$ ) (Tableau III-2, page 79)



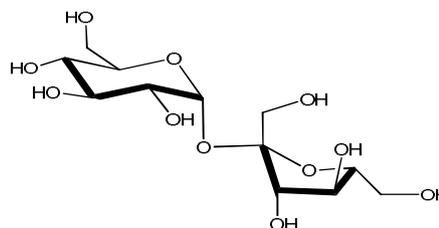
#### V-3-1-6-3-Composé O

Saccharose

Formule brute:  $C_{12}H_{22}O_{11}$

MS : ESI (mode positif)  $m/z$  : 365  $[M+Na]^+$

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans ( $CD_3OD$ ) (Tableau III-15, page 194)



#### V-3-1-6-5-Composé D

Néochamaejasmine B

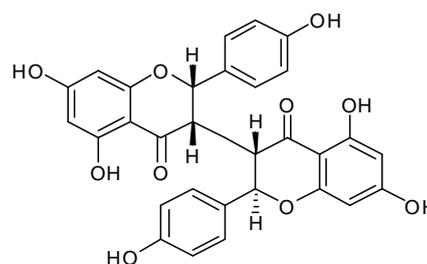
Formule brute:  $C_{30}H_{22}O_{10}$

$[\alpha]_D = + 194^\circ$  ( $c$  0,085, MeOH)

MS : ESI (mode positif)  $m/z$  : 543  $[M+H]^+$

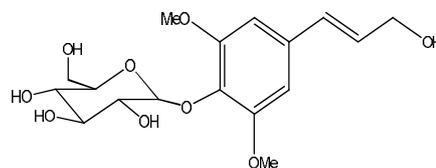
1085  $[2M+H]^+$

(mode négatif)  $m/z$  : 541  $[M-H]^-$

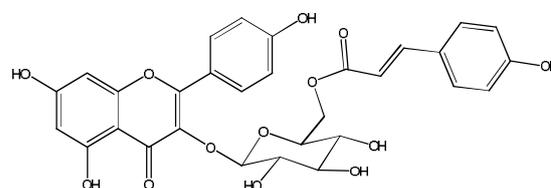


1083 [2M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III-4, page 99)**V-3-1-6-6-Composé J**

Syringine

**Formule brute:** C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 395 [M+Na]<sup>+</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans  
(CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III-10, page 169)**V-3-1-6-7-Composé I**

Tiliroside

**Formule brute:** C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>**[α]<sub>D</sub>** = - 56 ° (c 0,1, MeOH)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 617 [M+Na]<sup>+</sup>(mode négatif) *m/z* : 593 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Tableau III-9, page 159)**V-3-2-Extraction des racines**

600 g des racines de la plante sont séchés et broyés sous forme d'une poudre fine puis mis à macérer pendant 4 jours dans un mélange éthanol-eau (70-30). La solution aqueuse concentrée est épuisée successivement 3 fois par l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. Les quatre phases organiques récupérées sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre puis filtrées et concentrées à sec pour obtenir 0,7 g de l'extrait éthero-pétrolique, 0,1 g d'extrait dichlorométhane, 33 g d'extrait acétate d'éthyle et 10 g de l'extrait *n*-butanolique.

**V-3-2-1-Contrôle chromatographique des extraits des racines**

Les CCM réalisées sur les quatre extraits obtenus dans différents systèmes de solvants, montrent bien que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en produits comparativement aux autres extraits (Figure V-2).



**Extraits: EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AcOEt  
CHCl<sub>3</sub>-MeOH : 80-20**



**Extraits: AcOEt et *n*-Butanol  
CHCl<sub>3</sub>-MeOH : 70-30**

**Figure V-2 : CCM des extraits des racines de la plante *T. microphylla***

### V-3-2-2-Etude de l'extrait acétate d'éthyle des racines

7 g de l'extrait acétate d'éthyle sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale comme phase stationnaire. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange éther de pétrole-AcOEt puis AcOEt-MeOH en récupérant des fractions de 100 ml. Les fractions obtenues sont rassemblées dans le tableau (V-15) suivant :

Fractions	Eluant de la colonne	Observation sur CCM
1	Ether de pétrole pur	Néant
2	Ep-AcOEt 97%-3%	1 tache + trainée
3	95%-5%	//
4	90%-10%	//
5	80%-20%	//
6	70%-30%	//
7	60%-40%	//
8	50%-50	//

9	40%-60%	//
10	30%-70%	//
11	20%-80%	//
12	10%-90%	2 taches + trainée
13	AcOEt 100 %	Plusieurs taches + trainée
14	AcOEt-MeOH 99%-1%	//
15	97%-3%	//
16	95%-5%	//
17	90%-10%	//
18	80%-20%	//
19	70%-30%	//
20	60%-40%	//
21	50%-50%	//
22	40%-60%	//
23	30%-70%	2 taches + trainée
24	20%-80%	//
25	MeOH 100%	Néant

**Tableau V-15 : Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des racines**

Ces fractions ont fait l'objet d'une chromatographie sur CCM avec les systèmes d'élution suivants: CHCl<sub>3</sub>-MeOH: 90-10 pour les fractions 1 à 11, et 80-20 pour les fractions restantes. Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 et 366 nm, puis révélées par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 11 fractions majoritaires (F1 à F11) selon le tableau (V-16):

N° des Fractions	Fractions	Poids en mg	Observation sur CCM
F1	1-6	26,9	1 tache
F2	7-9	60,6	2 taches
F3	10	46,1	plusieurs taches + une traînée

<b>F4</b>	11	74,8	//
<b>F5</b>	12-13	273,8	//
<b>F6</b>	14-15	650,1	//
<b>F7</b>	16	784,9	//
<b>F8</b>	17-18	1500	//
<b>F9</b>	19-20	1800	//
<b>F10</b>	21-24	893	//
<b>F11</b>	25	15,6	Néant

**Tableau V-16: Rassemblement des fractions de l'extrait acétate d'éthyle des racines**

### V-3-2-3-Purification des produits des racines

Les fractions F4 et F5 regroupées (348,6 mg), éluées par le mélange de solvants éther de pétrole-AcOEt: 20-80, 10-90, 0-100, sont chromatographiées sur une colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub>. L'éluion est réalisée initialement par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La polarité de l'éluant est ensuite augmentée par addition graduelle du méthanol (100-0 à 90-10). Les fractions semblables récupérées sont regroupées en 15 sous fractions (Tableau V-17).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
<b>1</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	9	Néant
<b>2</b>	//	9,8	2 taches
<b>3</b>	//	1,3	Tache
<b>4</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 3%	22,5	//
<b>5</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 5%	24	Plusieurs taches
<b>6</b>	//	24,5	//
<b>7</b>	//	15	//
<b>8</b>	//	15	2 taches
<b>9</b>	//	4	//
<b>10</b>	//	16	Plusieurs taches
<b>11</b>	//	15	//
<b>12</b>	//	33	//

<b>13</b>	//	16,7	2 taches
<b>14</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 10%	4,2	//
<b>15</b>	//	49	3 taches + une traînée

**Tableau IV-17 : Rassemblement des sous fractions de F4 et F5**

Les deux fractions F8 et F9 obtenues à partir de la dernière colonne éluées par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH: 95-5 sont réunies (19 mg) puis précipitées dans le méthanol pour fournir le composé **M** (3,1 mg). Il présente sur la CCM une tache invisible à 254 et 366 nm qui se révèle en mauve à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-18).

N <sup>o</sup> de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
<b>8 et 9</b>	3,1	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 90-10	Mauve
Poids: 19 mg		Composé <b>M</b> R <sub>f</sub> = 0,65	

**Tableau V-18 : Composé M**

La dernière fraction F15 (49 mg) éluée par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH: 90-10 est chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH-20, en utilisant comme éluant le MeOH, pour donner 6 sous fractions (Tableau V-19).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
<b>1</b>	MeOH 100%	3	Néant
<b>2</b>	//	19	2 taches
<b>3</b>	//	1,3	Tache
<b>4</b>	//	2,1	//
<b>5</b>	//	1,9	Plusieurs taches
<b>6</b>	//	11	//

**Tableau IV-19 : Regroupement des sous fractions de F15**

La fraction F2 (19 mg) issue de cette colonne est purifiée à son tour sur CCM de silice gréffée en C-18 (CCM RP-18) dans le mélange de solvants MeOH-H<sub>2</sub>O: (50-50), fournissant

ainsi les composés **E** (3,9 mg) et **F** (7,6 mg) (Tableau V-20). La CCM de ces derniers montre la présence de deux taches visibles à 254 et 366 nm, se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Nº de faction	Bandes	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
2			CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 90-10	
Poids : 19 mg	1	3,9	Composé <b>E</b> Rf = 0,58	Jaune
	2	7,6	Composé <b>F</b> Rf = 0,60	Jaune

**Tableau V-20 : Composés E et F**

Les fractions F6 et F7 de la VLC éluées par AcOEt-MeOH: 99-1, 97-3 et 95-5 sont réunies (1,4 g), puis fractionnées sur une colonne de polyamide avec un gradient d'élution toluène-MeOH: 100-0 à 80-20, les fractions semblables récupérées sont regroupées en 20 sous fractions (Tableau V-21).

Sous fractions	Eluant da la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	Toluène 100%	7,4	Tache + trainée
2	//	61,8	Plusieurs taches
3	//	5,8	//
4	//	14	//
5	Toluène-MeOH 1%	35	//
6	//	8,7	//
7	Toluène-MeOH 3%	6	2 taches
8	//	3,4	//
9	//	4	//
10	//	8	Plusieurs taches
11	//	19	//
12	Toluène-MeOH 5%	10	//
13	//	13	//
14	Toluène-MeOH 10%	23	//

15	//	15,5	2 taches
16	Toluène-MeOH 20%	54	Plusieurs taches
17	//	39	//
18	//	65	//
19	//	529	2 taches
20	//	20	Plusieurs taches

**Tableau V-21 :** Rassemblement des sous fractions de F6 et F7

La fraction F1 (7,4 mg) éluée par toluène pur est précipitée dans le méthanol pour obtenir 4 mg du composé N. Il présente sur CCM une tache invisible à 254 et 366 nm se colorant en rose après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-22).

N° de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
1	4	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 90-10	Rose
Poids: 7,4 mg		Composé N Rf = 0,69	

**Tableau V-22 :** Composé N

Les fractions F5 et F6 (43,7 mg) éluées par toluène-MeOH: 99-1 sont chromatographiées sur une colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub>, avec l'éluant hexane-AcOEt: 100-0 à 80-20 pour conduire à 11 sous fractions (Tableau V-23).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	Hexane 100%	2	Néant
2	Hexane-AcOEt 1%	3,5	Tache
3	Hexane-AcOEt 3%	1,5	2 taches
4	Hexane-AcOEt 5%	4	//
5	Hexane-AcOEt 10%	2	Plusieurs taches
6	//	2,4	//
7	//	7	Tache

<b>8</b>	Hexane-AcOEt 20%	11	//
<b>9</b>	//	4	//
<b>10</b>	//	4,2	Plusieurs taches
<b>11</b>	//	15	//

**Tableau V-23 : Rassemblement des sous fractions de F5 et F6**

Les fractions F8 et F9 de ce dernier fractionnement éluées par hexane-AcOEt: 80-20 sont regroupées (15 mg) puis purifiées à leur tour par plaques préparatives de silice gréffée en C-18 (CCM RP-18). L'éluion a été réalisée par un mélange MeOH-H<sub>2</sub>O: 80-20 pour donner un mélange de deux composés **K** et **L** avec une masse de 5 mg.

Sur CCM une seule tache visible à 254 et 366 nm est observée. Elle se colore en mauve foncé après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-24).

N <sup>o</sup> de faction	Poids en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
<b>8 et 9</b>	5	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 95-5	Mauve foncé Mauve foncé
Poids: 15 mg		Composé <b>K</b> Rf = 0,67 Composé <b>L</b> Rf = 0,67	

**Tableau V-24 : Composés K et L**

Une précipitation dans le méthanol des fractions F7 et F8 (9,4 mg) éluées par le mélange toluène-MeOH: 97-3 permet de récupérer un solide blanc d'une masse de 3,6 mg constituant le composé **H** (Tableau V-25).

Il montre une tache visible à 254 et 366 nm ne se colorant pas après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il se révèle en jaune après exposition de sa CCM aux vapeurs d'iode.

N <sup>o</sup> de faction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
<b>7 et 8</b>	3,6	CHCl <sub>3</sub> -MeOH: 95-5	Aucune révélation
Poids: 9,4 mg		Composé <b>H</b> Rf = 0,63	

**Tableau V-25 : Composé H**

Les fractions F16 et F17 (93 mg) éluées par toluène-MeOH: 80-20 sont soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale et éluées avec un mélange de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 100:0 à 95:5 pour donner 8 sous fractions (Tableau V-26).

Sous fraction	Eluant de la colonne	Poids mg	Observation sur CCM
1	$\text{CHCl}_3$ 100%	2,8	Néant
2	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 1%	15	Tache + tarinée
3	//	15,4	//
4	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 3%	7,7	2 Taches
5	$\text{CHCl}_3$ -MeOH 5%	7	Tache + trainée
6	//	11,6	Trainée
7	//	11	//
8	//	15,9	//

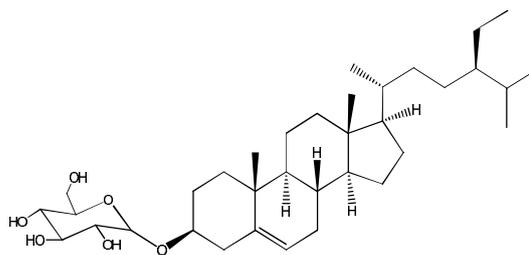
**Tableau V-26 : Regroupement des sous fractions de F16 et F17**

Les fractions F2 (15 mg) et F5 (7 mg) de ce dernier fractionnement éluées par  $\text{CHCl}_3$ -MeOH: 99-1 et 95-5 respectivement ont subi une ultime purification sur deux colonnes de Sephadex LH-20 par le méthanol, permettant l'isolement des composés **C** (13,8 mg) et **G** (4 mg) successivement.

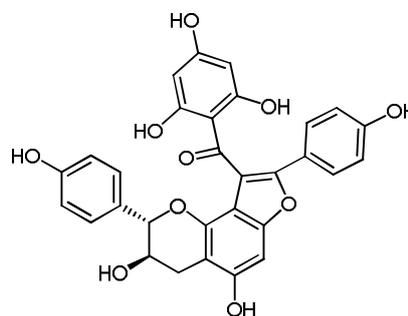
La CCM de ces derniers montre la présence de deux taches visibles à 254 nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V-27).

N° de fraction	Poids du produit en mg	Examen à la CCM Eluant $\text{CHCl}_3$ /MeOH	Révélation à l'acide sulfurique et chauffage
2 Poids : 15 mg	13,8	$\text{CHCl}_3$ /MeOH:80/20 Composé <b>C</b> Rf = 0,55	Jaune
5 Poids : 7 mg	4	Composé <b>G</b> Rf = 0,52	Jaune

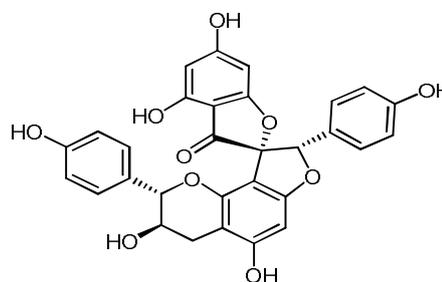
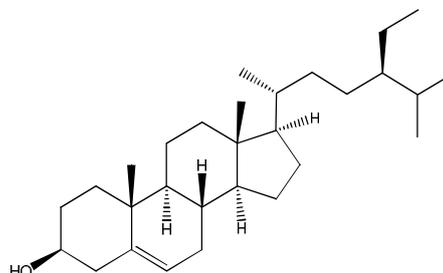
**Tableau V-27 : Composé C et G**

**V-3-2-4-Composés isolés des raciness de l'espèce *T. microphylla*****V-3-2-4-1-Composé M** $\beta$ -sitostérol-3-*O*-glucoside**Formule brute:** C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** = - 43° (*c* 0,019, CHCl<sub>3</sub>)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 599 [M+Na]<sup>+</sup>  
(mode négatif) *m/z* : 575 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD) (Tableau III-13, page 188)**V-3-2-4-2-Composé E**

Daphnodorine B

**Formule brute:** C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** = - 27,27° (*c* 0,0333, MeOH)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 543 [M+H]<sup>+</sup>  
(mode négatif) *m/z* : 541 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (MeOD) (Tableau III-5, page 114)**V-3-2-4-3-Composé F**

Genkwanol A

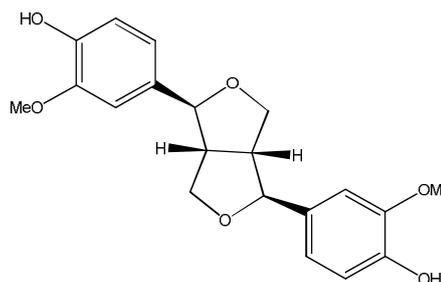
**Formule brute:** C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** = - 20° (*c* 0,57, MeOH)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 543 [M+H]<sup>+</sup>  
(mode négatif) *m/z* : 541 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Tableau III-6, page 127)**V-3-2-4-4-Composé N** $\beta$ -sitostérol**Formule brute:** C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** = - 30° (*c* 0,008, CHCl<sub>3</sub>)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 437 [M+Na]<sup>+</sup>  
(mode négatif) *m/z* : 413 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III-14, page 191)

**V-3-2-4-5-Composé K**

(-)-pinorésinol

**Formule brute:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>

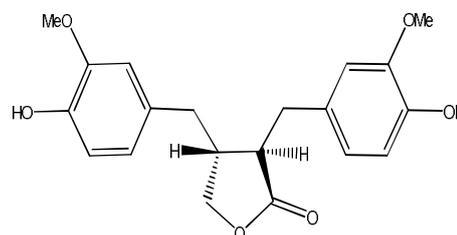
**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 359 [M+H]<sup>+</sup>  
 717 [2M+H]<sup>+</sup>  
 (mode négatif)  $m/z$  : 357 [M-H]<sup>-</sup>  
 715 [2M-H]<sup>-</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (MeOD) (Tableau III-11, page 178)**V-3-2-4-6-Composé L**

(+) -matairésinol

**Formule brute:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>

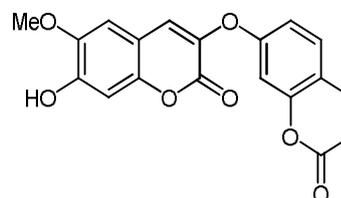
**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 359 [M+H]<sup>+</sup>  
 717 [2M+H]<sup>+</sup>  
 (mode négatif)  $m/z$  : 357 [M-H]<sup>-</sup>  
 715 [2M-H]<sup>-</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (MeOD) (Tableau III-12, page 182)**V-3-2-4-7-Composé H**

Daphnorétine

**Formule brute:** C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

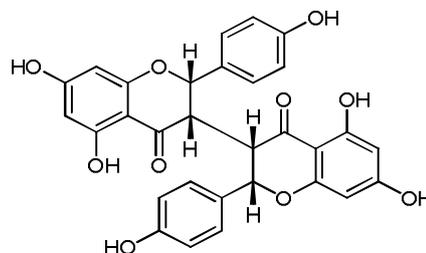
**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 353 [M+H]<sup>+</sup>  
 (mode négatif)  $m/z$  : 351 [M-H]<sup>-</sup>  
 703 [2M-H]<sup>-</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>) (Tableau III-8, page 151)**V-3-2-4-8-Composé C**

Néochamaejasmine A

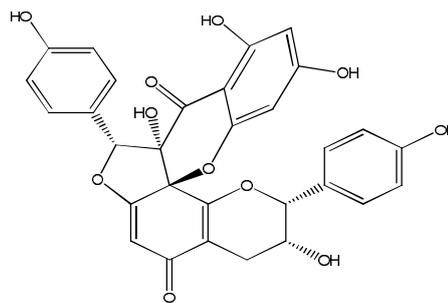
**Formule brute:** C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>**[α]<sub>D</sub>** = 0° (c 0,0036, MeOH)

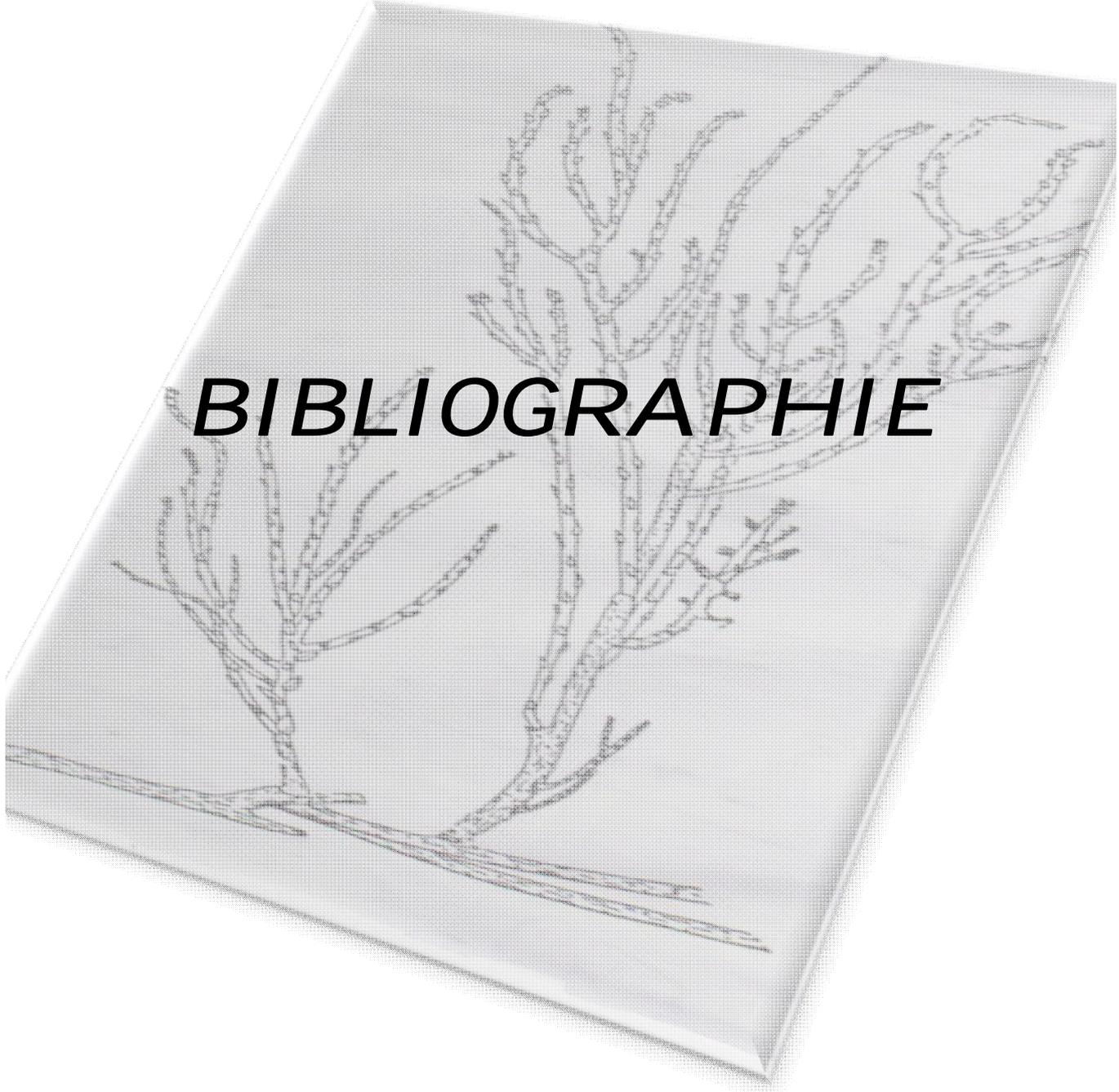
**MS :** ESI (mode positif)  $m/z$  : 543 [M+H]<sup>+</sup>  
 (mode négatif)  $m/z$  : 541 [M-H]<sup>-</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (tableau III-3, page 90)

**V-3-2-4-9-Composé G**

Stelléranol

**Formule brute:** C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>**[α]<sub>D</sub>** = - 98° (c 0,7, MeOH)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* : 581 [M+Na]<sup>+</sup>(mode négatif) *m/z*: 557 [M-H]<sup>-</sup>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (MeOD) (Tableau III-7, page 139).



**BIBLIOGRAPHIE**

**Bibliographie**

- [1]. Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A., (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* 24, 41-91.
- [2]. Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 3<sup>ème</sup> édition, Technique & Documentation, Paris, France.
- [3]. George, V., Rishi, A.K., (1982). Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia.* 53, 191-192.
- [4]. Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, J.M., (1980). Thymelaeaceae phytochemistry. II. Flavone and coumarin components of *Thymelea tartonraira* L. *An. Quim. Ser. C.* 76, 96-97.
- [5]. Meletiou-Christou, M. S., Banilas, G. P., Diamantoglou, S., (1998). Seasonaltrends in energy contents and storagesubstances of the Mediterranean species *Dittrichia viscosa* and *Thymelaea tartonraira*. *Environ. Expe. Bot.* 39, 21-32.
- [6]. Dohou, N., Yamani, K., Gmira, N., Idrissi Hassani, L. M., (2004). Polyphénols des *Thymelaea lythroides*. *Acta Bot. Malacitana.* 29, 233-239.
- [7]. Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, A., (1980). Thymelaeaceae phytochemistry. I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *An. Quim. Ser. C: Quim. Org. Bioquim.* 76, 94-95.
- [8]. Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R.B., Ndemera, B., (1985). The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe. Mambo Press, Gweru, Zimbabwe.
- [9]. Boukef, M.K., (1986). Agence de coopération culturelle et technique. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Les plantes dans la médecine traditionnelle Tunisienne, Paris, France.
- [10]. Cheriti, A., Sekkoum, K., (1995). Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* growing in Algeria. *Acta Chim. Sloven.* 42, 373-374.

- [11]. Tarak, M., Khawla, K., Graziano, G., Lahcene, Z., Samir B., Fadila B., (2014). Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. *Der Pharmacia Lettre* 6, 152-156.
- [12]. Said Noamane, L., Zellagui, A., Mesbah, K., Gherraf, N., Lahouel, M., Rhouati, S., (2010). Essential oil composition of *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur. *Der Pharmacia Lettre* 2, 428-431.
- [13]. Franke, K., Porzel, A., Schmidt, J., (2002). Flavone-coumarin hybrids from *Gnidia socotrana*. *Phytochemistry* 61, 873-878.
- [14]. Murray, A.W., Bradshaw, R.W., (1966). Leucoglycodrin, a glycoside from *Leucodendron adscendens*. *Tetrahedron Lett.* 31, 3773-3777.
- [15]. Kruger, P.E., Perold, G.W., (1970). Conocarpin, a leucodrin-type metabolite of *Leucospermum conocarpodendron* (L.). *Buek. J. Chem. Soc. (C)*. 2127-2133.
- [16]. Perold, G.W., Hodgkinson, A.J., Howard, A.S., (1972). Metabolites of Proteaceae: part V. Reflexin and conocarpic acid from *Leucospermum reflexum* Buek ex Meisner, and the phenol-dienone rearrangement of reflexin and conocarpin. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, 2450-2460.
- [17]. Robert, P.B., Gabor, B., Geofrey, A.C., (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* 24, 41-91.
- [18]. Kadri, A., Zarai, Z., Ben, C.I., Gharsallah, N., Damak, M., Békir, A., (2011). Chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil from Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2930-2935
- [19]. Royal, R., (2002). Botanic Garden Edinburgh, Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, United Kingdom.
- [20]. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol.1-2. CNRS, Paris, France.
- [21]. Ozenda, P., (1991). Flore et végétation du Sahara, 3<sup>ème</sup> édition. CNRS, Paris, France.

- [22]. APG, (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 85, 531-553.
- [23]. Gilg, E., (1984). Thymelaeaceae. In: Engler, A., Prantl, K. (eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil III, Abteilung 6a.* Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, German.
- [24]. Iwu, M.M., (1993). *Hand book of African Medicinal Plants.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- [25]. Kokwaro, J.O., (1993). *Medicinal Plants of East Africa.* 2<sup>nd</sup> edition, Kenya Literature Bureau, Nairobi, Kenya.
- [26]. Brooks, G.E., Evans, F.J., (1990). Toxic Hazards of Plants from the families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In: Rizk, A.M. (ed.), *Posionous Plant Contamination of Edible Plants.* CRC Press, Boca Raton. 27-63.
- [27]. Devkota, H.P., Watanabe, M., Watanabe, T., Yahara, S., (2013). Diplomorphanins A and B: New C-methyl flavonoids from *Diplomorpha canescens*. *Chem. Pharm. Bull.* 61, 242-244.
- [28]. Asada, Y., Sukemori, A., Watanabe, T., Malla, K.J., Yoshikawa, T., Li, W., Kuang, X., Koike, K., Chen, C.-H., Akiyama, T., Qian, K., Nakagawa-Goto, K., Morris-Natschke, S.L., Lu, Y., Lee, K.-H., (2013). Isolation, structure determination, and anti-HIV evaluation of tigliane-type diterpenes and biflavonoid from *Stellera chamaejasme*. *J. Nat. Prod.* 76, 852-857.
- [29]. Ramsewak, R.S., Nair, M.G., DeWitt, D.L., Mattson, W.G., Zasada, J., (1999). Phenolic Glycosides from *Dirca palustris*. *J. Nat. Prod.* 62, 1558-1561.
- [30]. Ferrari J., (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat, Lausanne, Suisse.
- [31]. Tackholm, Y., (1974). In *Students Flora of Egypt*, 2<sup>nd</sup> Edn, Cairo University Press, Beirut, Lebanon.
- [32]. Evans, F.J., Soper, C.J., (1978). The tigliane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 41, 193-233.

- [33]. Saleh, M.R.I., Hmladdad, D.Y., Sarg, T.M., (1965). Isolation of the crystalline principle, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. U. Arab Rep. J. Pharm. Sci. 4, 49-56.
- [34]. Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.M., (1970). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. U. Arab Rep. J. Pharm.Sci. 11, 101-106.
- [35]. Rizk, A.M., Rimpler, H., (1972). Isolation of daphnoretin and  $\beta$ -sitosterol-3-D-glucoside from *Thymelaea hirsuta*. Phytochemistry 11, 473-475.
- [36]. Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., (1974). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. Plant Med. 26, 346-358.
- [37]. Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Ismail, S. I., (1975). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, III, Coumarins. Acta Chim. Hung. 85, 107-115.
- [38]. Nawwar, M.A.M., Ishak, M.S., Sherbieny, A.D., Meshaal, S.A., (1977). Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. Phytochemistry 16, 1319-1320.
- [39]. Ismail, S.I., (1978). Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV. Fitoterapia 49, 156-159.
- [40]. Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.E., El-Missiry, M.M., Evans, F.J., (1984). Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. Experientia 40, 808-809.
- [41]. Yanze, L., Chunru, J., (1987). Chemical constituents and pharmacological actions of Thymelaeaceous plant. Zhongcaoyao 18, 80-89.
- [42]. Sammour, R.H., El-Din Sharaf, A., (1988). Qualitative study on seed proteins of *Thymelaea hirsuta* L. Populations. Delta J. Sci. 12, 290-312.
- [43]. Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F.J., Rizk, A.F.M., Hammouda F.M., El-Missiry, M.M., Ismail S.E., (1990). Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. Phytochemistry 29, 2235-2237.
- [44]. Abou-Karam, M., El-Shaer, N.S., Shier, W.T., (1998). Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosine-specific protein kinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. Phytother. Res. 12, 282-284.

- [45]. El-Beheiry, M.A.H., (2000). Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. Bull. Fac. Sci., Assiut Univ., D: Botany. 29, 375-383.
- [46]. Huang, M.T., Ferraw, T., (1992). Phenolic compound in food and cancer prevention. Am. Chem. Soc, Washington, DC. 8-34.
- [47]. Ali, N.A.A., Julish, W.D., Kusunick, C., Lindesquist, U., (2001). Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. J. Ethnopharmacol. 74, 173-179.
- [48]. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., chen, F., Tian, Y., (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. Food Chemistry. 102, 771-776.
- [49]. Chopra, R.N., Nayar, S.L., Chopra, I.C., (1986). Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India.
- [50]. Hu, S.G., Li, L., He, X.W., (2005). Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. J. Chromatography A. 1062, 31-37.
- [51]. Beta, T., Nam, S., Pexter, J.E., Sapirstein, H.D., (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller milled fractions. Cereal Chem. 82, 390-393.
- [52]. Luthria, D.L., Mukahapadhyay, S., (2006). Influence of sample preparation on Assay of phenolic acids from eggplant. J. Agric. Food. Chem. 54, 41-47.
- [53]. Bruneton, J., (1993). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition Tec et Doc (Ed). Paris, France.
- [54]. Guignard, J.L., (1998). Abrégé de botanique. Masson (Ed). Paris, France.
- [55]. Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L., (2003). Natural product: their chemistry and biological significance. J. Am. Oil Chem. Soc. 80, 65-70.

- [56]. Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E., (2004). New lanthanide complexes of 4-methyl 7-hydroxy-coumarin and their pharmacological activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50, 120-123.
- [57]. Ford, R.A., Hawkins, D.R., Mayo, B.C., Api, A.M., (2001). The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food Chem. Toxicol.* 39, 153-162.
- [58]. Maged, A.S., (2002). *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 67-69.
- [59]. Hostettmann, K., (1997). *Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes Sources de Médicaments.* Editions Favre, Lausanne. Suisse.
- [60]. Reddy, N.S., Mallireddigari, M.R., Cosenza, S., Gumireddy, K., Bell, S.C., Reddy, E. P., Reddy, M.V.R. (2005). Novel Coumarin-3-(N-aryl)-carboxamides Arrest Breast Cancer Cell Growth by Inhibiting ErbB-2 and ERK1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3141-3147.
- [61]. Fiorucci, S., (2006). *Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire.* Thèse de doctorat, Nice, France.
- [62]. Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., Orecchioni, A.M., (2001). *Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie.* Tec. et Doc. (Ed). France.
- [63]. Reynaud, J., Lussignol M., (2005). The flavonoides of *Lotus Corniculatus*. *Lotus Newsletter* 35, 75-82.
- [64]. Dacosta, Y., (2003). *Les phytonutriments bioactifs.* Yves Dacosta (Ed). Paris, France.
- [65]. Louis, S., (2004). *Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses.* Thèse de doctorat, Lyon, France.
- [66]. Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., Wähälä, K., (2002). Enterolignans. *J. Chromatogr. B*, 777, 29-43.
- [67]. Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A.M., (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of actions and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418.

- [68]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science* 2, 152-159.
- [69]. Van, D.B.R., Haenen, G., Van, D.B.H., Van, D.V.W., Bast, A., (2000). The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoides using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70, 391.
- [70]. Read, M.A., (1995). Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular. Am. J. Pathol.* 147, 235-237.
- [71]. Middleton, E., Kandaswami, C., (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem. Pharm.* 43, 1167-1179.
- [72]. Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S., Yoshikawa, M., (2002). Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 972-975.
- [73]. Hu, C.Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R.E., Cheng, Y.C., Lee, K.H., (1994). Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-*O*-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat. Prod.* 57, 42.
- [74]. Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., Gonçalves, J.L.S., Wigg, M.D., (1999). Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia* 70, 293-295.
- [75]. Mori, A., Nishiro, C., Tawata S., (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Protus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26, 2231-2234.
- [76]. Shi, R. X., Ong, C. N., Shen H. M., (2005). Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 65, 7815-7823.
- [77]. Shi, R. X., Ong C. N., Shen H. M., (2004), Luteolin sensitizes tumor necrosis factor-alpha apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* 23, 7712-7721.

- [78]. Chun, C., Ming-Hong, Y., Yen-Yin, C., Cheng-hsung, C., Tsumo, N., (1991). Am. J. Chin. Med. 17, 265-274.
- [79]. Pelucchi, C., Talamini, R., Galeone, C., Negri, E., Franceschi, S., Dal Maso, L., Montella, M., Conti, E., La Vecchia, C., (2004). Fibre intake and prostate cancer risk. Int. J. Cancer 109, 278.
- [80]. Chi, Y., (2001). Thesis Master of Science; atropisomerism and the synthesis of lignans, university of Manitoba Wininpeg, Manitoba, Canada.
- [81]. Tandon, S., Rastogi, R.P., (1976). Wikstromol, a new lignan from *Wikstroemia viridiflora*. Phytochemistry 15, 1789-1791.
- [82]. Ayres, D.C., Loike, J.D., (1990). Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties (1). Cambridge University Press, Cambridge, England.
- [83]. Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., L. Pieters, L., (2008). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection-an update (1998 - 2007). Planta Med. 74, 1323-1337.
- [84]. Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., (2005). An update on bioactive plant lignans. Nat. Prod. Rep. 22, 696-716.
- [85]. Abou-Gazar, H., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Khan, I.A., (2004). Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. Phytochemistry 65, 2499-2505.
- [86]. Baeyer, A., (1900). Systematik und Nomenclatur Bicyclischer Kohlenwasserstoffe, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 3771-3775.
- [87]. Amal Raj, A., Raghunathan, R., Sridevi umari, M.R., Raman, N., (2003). Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of a new class of spiro pyrrolidines. Bioorganic Medic. Chem. 11, 407-419.
- [88]. Ori, K., Kuroda, M., Mimaki, Y., Sakagami, H., Sashida, Y., (2003). Norlanostane and Lanostane Glycosides from the Bulbs of *Chionodoxa luciliae* and Their Cytotoxic Activity. Chem. Pharm. Bull. 51, 92-95.

- [89]. Intaraudom, C., Boonyuen, N., Supothina, S., Tobwor, P., Prabpai, S., Kongsaree, P., Pittayakhajonwut, P., (2013). Novel spiro-sesquiterpene from the *Mushroom Anthracophyllum* sp. BCC18695. *Phytochem. Lett.* 6, 345-349.
- [90]. Tanaka, K., Itazaki, H., Yoshida, T., (1992). Cinatrins, a novel family of phospholipase A2 inhibitors. II. Biological activities. *J. Antibiot.* 45, 50.
- [91]. Bennani, B., Baba, B.F., Kerbal, A., Al Houari, G., Daoudi, M., Ben Hadda, T., Mimouni, M., Jalbout, A.F., (2007). Pharmacomodulation de composés spiraniques à visée thérapeutique. *Ressources Naturelles et Antibiothérapie*. Kénitra, Maroc.
- [92]. Aramaki, Y., Chiba, K., Tada, M., (1994). Spiro-lactones, Hyperolactone A-D from *Hypericum chinense*. *Phytochemistry* 38, 1419-1421.
- [93]. Asai, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Monde, K., Oshima, Y., (2013). Structures of spiroindicumides A and B, unprecedented carbon skeletal spiro-lactones, and determination of the absolute configuration by vibrational circular dichroism exciton approach. *Org. Lett.* 15, 4320-4323.
- [94]. Dorta, E., Cueto, M., Ana R. Diaz-Marrero, A.R., Darias, J., (2002). Stypolactone, an interesting diterpenoid from the brown alga *Stypopodium zonale*. *Tetrahedron Lett.* 43, 9043-9046.
- [95]. Saifudin, A., Tanaka, K., Kadota, S., Tezuka, Y., (2013). Sesquiterpenes from the Rhizomes of *Curcuma heyneana*. *J. Nat. Prod.* 76, 223-229.
- [96]. Yamaki, M., Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Takagi, S., Yamagata, Y., Tomita, K.I., (1993). Blespirol, a phenanthrene with a spiro-lactone ring from *Bletilla striata*. *Phytochemistry* 33, 1497-1498.
- [97]. Sun, Y., Zhao, Z., Feng, Q., Xu, Q., Lii, L., Liuc, J.K., Ling Zhang, L., Bin Wu, B., Li, Y.Q., (2013). Unusual spirodecane sesquiterpenes and a fumagillol analogue *Cordyceps ophioglossoides*. *Helv. Chim. Acta* 96, 76-84.
- [98]. Nicolaou, K.C., Wu, T.R., Sarlah, D., Shaw, D.M., Eric Rowcliffe, E., Dennis R. Burton, D.R., (2008). Total synthesis, revised structure, and biological evaluation of biyouyanagin A and analogues thereof. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11114-11121.

- [99]. Fru, C.G., Sandjo, L.P., Kuete, V., Liermann, J.C., Schollmeyer, D., Yeboah, S.O., Mapitse, R., Abegaz, B.M., Ngadjui, B.T., Opatz, T., (2013). Omphalocarpoidone, a new lanostane-type furano-spiro- $\gamma$ -lactone from the wood of *Tridesmostemon omphalocarpoides* Engl. (Sapotaceae). *Phytochem. Lett.* 6, 676-680.
- [100]. Liu, M., Lin, S., Gan, M., Chen, M., Li, L., Wang, S., Zi, J., Fan, X., Liu, Y., Si, Y., Yang, Y., Chen, X., Jiangong Shi, J., (2012). Yaoshanenolides A and B: new spiro-lactones from the bark of *Machilus yaoshansis*. *Org. Lett.* 14, 1004-1007.
- [101]. El-Feraly, F.S., Eiaherei, M.M., Al-muhtadi, F.J., (1986). Spiro-indans from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry* 25, 1992-1994.
- [102]. Li, X.L., Cheng, X., Yang, L.M., Wang, R.R., Zheng, Y.T., Xiao, W.L., Zhao, Y., Xu, G., Lu, Y., Chang, Y., Zheng, Q.T., Zhao, Q.S., Sun, H.D., (2006). Dichotomains A and B: two new highly oxygenated phenolic derivatives from *Dicranopteris dichotoma*. *Org. Lett.* 8, 1937-1940.
- [103]. Machida, K., Kikuchi, M., (1994). Studies on the constituents of *Viburnum* species. VIII. <sup>1)</sup>  $\gamma$ -lactone glycosides from the leaves of *Viburnum wrightii* Miq. <sup>2)</sup> *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1388-1392.
- [104]. Iwagawa, T., Hase, T., (1984). A spiro-bis- $\gamma$ -lactone glucoside from *Viburnum dilatatum*. *Phytochemistry* 23, 2299-2301.
- [105]. Lundahl, K., Schut, J., Schlatmann, J.L.M.A., Paerels, G.B., Peters, A., (1972). Synthesis and antiviral activities of adamantane spiro compounds. 1. Adamantane and analogous spiro-3'-pyrrolidines. *J. Med. Chem.* 15, 129-132.
- [106]. Liu, G.-Q., Tatematsu, H., Kurokawa, M., Niwa, M., Hirata, Y., (1984). Novel C-3/C-3'' biflavanones from *Stellera chamaejasme* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 362-365.
- [107]. Niwa, M., Tatematsu, S., Liu, G.Q., Hirata, Y., (1984). Isolation and structure of two new C-3/C-3' biflavanones, neochamaejasmin A and neochamaejasmin B. *Chem. Lett.* 539-542.
- [108]. Liu, W.-K., Cheung, F.W.K., Liu, B.P.L., Li, C., Ye, W., Chun-Tao Che C.-T., (2008). Involvement of p21 and fasL in induction of cell cycle arrest and apoptosis by neochamaejasmin A in human prostate LNCaP cancer cells. *J. Nat. Prod.* 71, 842-846.

- [109]. Kim, H.K., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., (1998). Amentoflavone, a plant biflavone: A new potential anti-inflammatory agent. *Arch. Pharm. Res.* 21, 406-410.
- [110]. Farombi, E.O., Moller, P., Dragsted, L.O., (2004). Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. *Cell. Biol. Toxicol.* 20, 71-82.
- [111]. Cano, A., Espinoza, M., Ramos, C.H., Guillermo Delgado, G., (2006). New prenylated flavanones from *Esenbeckia berlandieri* ssp. *acapulcensis*. *J. Mex. Chem. Soc.* 50, 71-75.
- [112]. Markham, K.R., Chari, V.M., (1982). Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In : Harborne, J.B., Mabry, T.J. (eds.), *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman & Hall, London 19-134.
- [113]. Li, J., Zhao, W., Hu, J.-L., Cao, X., Yang, J., Li, X.-R., (2011). A new C-3/C-3"-Biflavanone from the roots of *Stellera chamaejasme* L. *Molecules* 16, 6465-6469.
- [114]. Niwa, M., Jiang, P.-F., Hirata, Y., (1986). Two new C-3/C-3"-biflavanones from *Wikstroemia sikokiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 3631-3634.
- [115]. Huang, W., Zhang, X., Wang, Y., Ye, W., Ooi, V. E., Chung, Y., Li, Y., (2010). Antiviral biflavonoids from *Radix Wikstroemiae* (Liaogewanggen). *Chin. Med.* 5, 1-6.
- [116]. Liua, X., Li, W., Hua, H., Li, W., Chen, F., Wu, L., (2006) An NMR study of a phenyl propanoid-substituted catechin from *Polygonum bistorta*. *Asian Journal of Traditional Medicines* 1, 73-75.
- [117]. Tanaka, T., Sueyasu, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I., (1984). Tannins and related compounds—XXI. Isolation and characterization of galloyl and *p*-hydroxybenzoyl esters of benzophenone and xanthone C-glucosides from *Mangifera indica* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2676-2686.
- [118]. Ma, T.B., Liu, S.Z., Xu, G.Y., Li, M.G., (1994). Chemical constituents of lilac daphne (*Daphne genkwa*). *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 25,7-9.

- [119]. Taniguchi, M., Fujiwara, A., Baba, K., (1997). Three flavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* 45, 183-188.
- [120]. Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H., Porter, L., (1980). Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2278-2286.
- [121]. Baba, K., Takeuchi, K., Doi, M., Inoue M., Kozawa, M., (1986). Chemical studies on the constituents of the thymelaeaceous plants. II: Stereochemistry of daphnodorin A and daphnodorin B. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 1540-1545.
- [122]. Zhang, Q., Ye, N., Sun, W.X., Zhang, K.M., Jiang, J.Q., (2008). Phytochemical investigation of *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 63-67.
- [123]. Zhou, T., Zhang, S.-W., Liu, S.-S., Cong, H.-J., Xuan, L.-J., (2010). Daphnodorin dimers from *Edgeworthia chrysantha* with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Phytochem. Lett.* 3, 242-247.
- [124]. Baba, K., Takeuchi, K., Tabata, Y., Taniguchi, M., Kozawa, M., (1987). Chemical studies on the constituents of the Thymelaeaceous plants. IV. Structure of a new spiro Biflavonoid, Genkwanol A, from *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* 107, 525-529.
- [125]. Lei, H., Qi-rong, S., Run-hui, L., Xi-ke, X., Yun-heng, S., Hui-liang, L., Wei-dong, Z., (2008). Anti-inflammatory constituents from the stems of *Daphne genkwa*. *Acad. J. Sec. Mil. Univ.* 29, 1221-1226.
- [126]. Taniguchi, M., Baba, K., (1996). Three biflavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* 42, 1447-1453.
- [127]. Taniguchi, M., Yoshikawa, M., Fujiwara, A., Baba, K., (1996). The structures of new biflavonoids from *Daphne odora*. *Chemistry of natural products* 38, 403-408.
- [128]. Taniguchi, M., Baba, K., Ohishi, H., Kozawa, M., (1992). The structure of new biflavonoids *Daphne genkwa*. *Chemistry of natural products* 34, 494-501.

- [129]. Feng, B.M., Pei, Y.H., Hua, H.M., (2004). A new biflavonoid from *Stellera chamaejasme* L. Chin. Chem. Lett. 15, 61-62.
- [130]. Xu, W.-C., Shen, J.-G., Jiang, J.-Q., (2011). Phytochemical and biological studies of the plants from the genus *Daphne*. Chem. Biodivers. 8, 1215.
- [131]. Chakrabarti, R., Das, B., Banerji, J., (1986). Bis-coumarins from *Edgeworthia gardneri*. Phytochemistry 25, 557-558.
- [132]. Kong, L.-Y., Li, Y., Min, Z.-D., Li, X., Zhu, T.-R., (1996). Coumarins from *Peucedanum praeruptorum*. Phytochemistry 41, 1423-1426.
- [133]. Cordell, G.A., (1984). Studies in the Thymelaeaceae I. NMR spectral assignments of Daphnoretin. J. Nat. Prod. 47, 84-88.
- [134]. Navarro-Garcia, V.M., Herrera-Ruiz, M., Rojas, G., Zepeda, L.G., (2007). Coumarin derivatives from *Loeselia mexicana*. Determination of the anxiolytic effect of daphnoretin on elevated plus-maze. J. Mex. Chem. Soc. 51, 193-197.
- [135]. Torrance, S.J., Hoffmann, J.J., Cole, J.R., (1979). Wikstromol, antitumor lignan from *Wikstroemia foetida* var. *oahuensis* gray and *Wikstroemia uva-ursi* gray (Thymelaeaceae). J. Pharm. Sci. 68, 664-665.
- [136]. Hall, I.H., Tagahara, K., Lee, K.-H., (1982). Antitumor agents LIII: The effects of daphnoretin on nucleic acid and protein synthesis of ehrlich ascites tumor cells. J. Pharm. Sci. 71, 741-744.
- [137]. Pan, L., Zhang, X.F., Deng, Y., Zhou, Y., Wang, H., Ding, L.S., (2010). Chemical constituents investigation of *Daphne tangutica*. Fitoterapia 81, 38-41.
- [138]. Devkota, H.P., Watanabe, M., Watanabe, T., Yahara, S., (2012). Diarylpentanoids from *Diplomorpha canescens* and *Diplomorpha ganpi*. Phytochem. Lett. 5, 284-286.
- [139]. Niwa, M., Iwadare, Y., Wu, Y.-C., (1988). Two new phenylpropanoid glycosides from *Wikstroemia sikokiana*. Chem. Pharm. Bull. 36, 1158-1161.
- [140]. Lin-gen, Z., Seligmann, O., Jurcic, K., Wagner, H., (1982). Inhaltstoffe von *Daphne tangutica*. Planta Med. 45, 172-176.

- [141]. Nishibe, S., Tsukamoto, H., Hisada, S., (1984). Effects of *O*-methylation and *O*-glucosylation on carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts of matairesinol, (+)-pinoresinol and (+)-epipinoresinol. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 4653-4657.
- [142]. Casabuono, A.C., Pomilio, A.B., (1994). Lignans and a stilbene from *Festuca argentina*. *Phytochemistry* 35, 479-83.
- [143]. Okunishi, T., Umezawa, T., Shimada, M., (2010). Isolation and enzymatic formation of lignans of *Daphne genkwa* and *Daphne odora*. *J. wood Sci.* 47, 383-388.
- [144]. Shoeb, M., Rahman, M., Nahar, I., Delazar, A., Jaspars, M., Macmanus, S.M., Sarker, S.D., (2004). Bioactive lignans from the seeds of *centaurea macrocephala*. *J. Tums. Ac. Ir.* 12, 87-93.
- [145]. Tatematsu, H., Kurokawa, M., Niwa, M., Hirata, Y., (1984). Piscicidal constituents of *Stellera chamaejasme* L. II. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1612-1613.
- [146]. Awad, A.B., Gan, Y., Fink, C.S., Effect of beta-sitosterol, a plant sterol, on growth protein phosphatase 2A, and phospholipase D in LNCaP cells. (2000). *Nutr. Cancer*, 36, 74-78.
- [147]. Kruger, P.-B., (1994). *Eur. Patent.* 58, 73-74.
- [148]. Wang, N., (2001). The beneficial effects of plant sterols on serum cholesterol. *Can. J. Cardiol.* 17, 715-721.
- [149]. Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Sévenet, T., Hadi H.A., 1999. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry* 50, 63-69.
- [150]. Flamini, G., Pardini, M., Moreilli, I., (2001). A flavonoid sulfate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. *Phytochemistry* 58, 1229-1233.
- [151]. David, W., Robert, A., Norton, C., Mabry, B., (1992). Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [13C] Mevalonates. *Phytochemistry* 31, 805-811.

- [152]. Dae-Sup, P., Choi, S.Z., Ran, K.K., Mee, L.S., Ro, L.K., Suhkneung, P., (2004). Immunomodulatory activity triterpens and phenolic compounds from *Album L.* Journal of applied pharmacology 11, 1-4.
- [153]. Junga, M.H., Kima, H.S., Ahna, S., Kimb, C.T., Jinb, M.H., Yima, Y.H., Kima, Y.K., Oka, J.H., (2000). Complete Assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of a Sucrose Ester from *Euphorbia Lathyris L.* J. Kor. Magn. Reson., 4, 125-132.
- [154]. Nauciel, C., (2000). Bactériologie medicale, Ed Masson.Paris. France.
- [155]. Chambers, H.F., (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 10, 781-791.
- [156]. Nataro, J.P., Kaper, J.B., (1998). Diarrheagenic *E. coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201.
- [157]. Philippon, A., (1995). Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. Lett. Infectiol. 10, 619-630.
- [158]. Treki, A.S., Merghem R., Dehimat L., (2009). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*. Sciences & Technologie 29, 25-29.



***RESUME***

## Résumé

Ce travail de recherche a porté essentiellement sur l'investigation phytochimique d'une plante médicinale Saharienne *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. appartenant à la famille des Thymelaeaceae. Cette dernière est connue pour sa richesse en divers métabolites secondaires possédant un grand intérêt thérapeutique comme les biflavonoïdes, coumarines, flavonoïdes, phénoliques, diterpènes et spiro biflavonoïdes. En outre, une partie de notre travail est consacrée aux tests biologiques visant plus particulièrement l'activité antibactérienne des extraits végétaux de la plante *T. microphylla*. Cette espèce endémique à l'Afrique du Nord, est connue localement sous le nom "**Methnane**". Elle est utilisée en médecine traditionnelle Algérienne pour le traitement des blessures et diverses dermatoses tels que : érysipèle, cancer de peau, abcès et les boutons.

Nos travaux d'investigation chimique ont été réalisés sur les parties aériennes et racines des extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de l'espèce *T. microphylla*. Ces travaux ont permis d'isoler, par les diverses méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE), 15 composés naturels dont deux nouveaux rares spiro- $\gamma$ -lactones glycosylés nommés microphynolide A et microphynolide B de la classe des dilaspirolactones. Les produits naturels connus mis en évidence dans le cadre de ce travail et appartenant à 6 classes de métabolites secondaires sont typiques de la famille Thymelaeaceae et du genre *Thymelaea* à savoir:

- 5 Biflavonoïdes: néochamaejasmine A, néochamaejasmine B, daphnodorine B, genkwanol A et stelléranol.
- 1 Biscoumarine: daphnorétine
- 2 Lignanes: pinorésinol et matairésinol
- 1 Flavonoïde glucosylé: tiliroside
- 1 Phenylpropanoïde glucosylé: syringine
- 2 Phytostérols:  $\beta$ -sitostérol et  $\beta$ -sitostérol-3-*O*- $\beta$ -glucoside

L'identification des métabolites secondaires isolés **1-15** est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, NOESY et ROESY), la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$ , l'ultraviolet et l'infra-rouge, et par comparaison avec les données de la littérature.

Les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de la plante *T. microphylla* révèlent une activité antibactérienne modérée contre la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Il est important de signaler que les spiro- $\gamma$ -lactones ont été détectés pour la première fois dans le genre *Thymelaea*. Ces composés sont des constituants typiques des plantes de la famille Proteaceae. D'un point de vue chimiotaxonomique, la présence de biflavonoïdes et bis-coumarines dans l'espèce étudiée est en bon accord avec les études antérieures révélant que les biflavonoïdes et bis-coumarines sont les constituants caractéristiques de la famille Thymelaeaceae. Ces métabolites secondaires pourraient être considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

### **Mots clés:**

Phytochimie, Thymelaeaceae, *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur., Dilaspirolactone, Biflavonoïde, Biscoumarine, RMN 1D et 2D, HR-ESI-MS, UV, Activité anti-bactérienne.

---



***ABSTRACT***

## Abstract

This work is focused on the phytochemical investigation of a medicinal Saharan plant *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur. belonging to the Thymelaeaceae family. The species of this family are known for their richness in secondary metabolites with interesting biological activities such as biflavonoids, coumarins, flavonoids, phenolics, diterpenes and spiro biflavonoids. In addition, this work deals with the biological assay of the antibacterial activity of extracts of the plant *T. microphylla*. This endemic species to North Africa, called locally "*Methnane*", is used in folk medicine in Algeria for the treatment of wounds and various cutaneous conditions such as erysipelas, skin cancer, abscess and pimples.

Our chemical investigation has been performed on petroleum ether and ethyl acetate extracts of the aerial parts and roots of *T. microphylla*. This study allowed the isolation by chromatographic methods (VLC, CC and TLC), and identification of fifteen natural compounds including two new rare spiro- $\gamma$ -lactone glycosides named microphynolide A and microphynolide B of the dilaspirolactone compounds. The known natural products isolated in this work belonging particularly to 6 classes of secondary metabolites that are typical of the family Thymelaeaceae and *Thymelaea* genus such as:

- 5 Biflavonoids: neochamaejasmin A, neochamaejasmin B, daphnodorin B, genkwanol A and stelleranol.
- 1 Bis-coumarin: daphnoretin
- 2 Lignans: pinoresinol and matairesinol
- 1 Flavonoide glucoside: tiliroside
- 1 Phenylpropanoide glucoside: syringin
- 2 Phytosterols:  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -glucoside

The identification of the isolated secondary metabolites **1-15** is made possible through the combined of different spectroscopic methods especially 1D NMR ( $^1\text{H}$ , *J*-modulated  $^{13}\text{C}$ ) and 2D NMR (COSY H-H, *J*-modulated HSQC, HMBC, NOESY and ROESY), high resolution mass spectrometry HR-ESI-MS, measurement of optical rotation  $[\alpha]_D$ , ultraviolet and infra red, and by comparison with literature data.

The petroleum ether and ethyl acetate extracts of the species *Thymelaea microphylla* show a moderate antibacterial activity against bacteria strains: *Staphylococcus aureus* by the diffusion method on agar medium.

To the best of our knowledge, this is the first report of such rare spiro- $\gamma$ -lactones in *Thymelaea* species. These compounds are typical constituents of species belonging to the Proteaceae family. The occurrence of biflavonoids and bis-coumarins in *T. microphylla* is in a good agreement with the previous studies indicating that biflavonoids and bis-coumarins are characteristic constituents of the family Thymelaeaceae.

**Keywords:** \_\_\_\_\_

Phytochemistry, Thymelaeaceae, *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur., Dilaspirolactone, Biflavonoid, Biscoumarin, 1D and 2D NMR, HR-ESI-MS, Ultraviolet, Antibacterial activity.

---

# مُلخَص



## ملخص

يتمحور الهدف الأساسي من بحثنا على الدراسة الفيتوكيميائية لنبته طبية صحراوية تعرف باسم *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. التي تنتمي إلى عائلة Thymelaeaceae. هذه الأخيرة معروفة بوفرته على مختلف أنواع نواتج الأيض الثانوي ذات فائدة بيولوجية كبيرة كالبيفلافونويدات, الكومارينات, الفلافونويدات, الفينوليك, الديتارينات و السبيروبيفلافونويدات. من ناحية أخرى جزء من عملنا تضمن اختبار بيولوجي للنشاط المثبط للبكتيريا لمستخلصات نبتة *T. microphylla*. هذه النبتة معروفة محليا باسم "مثنان" و تستعمل في الطب التقليدي الجزائري لمعالجة الجروح والأمراض الجلدية كالحمرة, سرطان الجلد, التعففات و الحبوب.

تركز عملنا على دراسة الجزء الهوائي و جذور نبتة *T. microphylla* لمستخلصات AcOEt و Ep وقد أدى هذا البحث إلى عزل خمسة عشر مركب طبيعي باستخدام تقنيات كروماتوغرافية مختلفة (CCE, CC, VLC) ومن بينها مركبين جديدين نادرين من نوع سبيرو- $\gamma$ -لكتون جليكوزيلي سمايا *microphynolide A* و *microphynolide B* الذين ينتميان إلى فئة ديلا سبيرو لكتون. أما بالنسبة للمركبات الطبيعية المعروفة المعزولة في إطار هذا العمل فهي تنتمي إلى 6 فئات من المركبات الثانوية والتي تعتبر نموذجية للعائلة Thymelaeaceae و للجنس *Thymelaea* معا وهي:

✓ 5 بيفلافونويدات: *daphnodorine B*, *néochamaejasmine B*, *néochamaejasmine A*,

*stelléranol*, *genkwanol A*

✓ 1 بيكومارين: *daphnorétine*

✓ 2 لينيان: *pinorésinol* و *matairésinol*

✓ 1 فلافونويد جليكوزيلي: *tiliroside*

✓ 1 فينيلبروبونويد جليكوزيلي: *syringine*

✓ 2 فيتوستيرول:  $\beta$ -sitostérol و  $\beta$ -sitostérol-3-O- $\beta$ -glucoside

تم التعرف على بنية المركبات المعزولة 1-15 باستعمال مختلف طرق التحليل الميظافية و بالأخص مطيافية الرنين النووي المغناطيسي بجميع أنواعها, مطيافية الكتلة, زاوية التدوير النوعي  $[\alpha]_D$ , و الأشعة فوق البنفسجية و تحت الحمراء بالإضافة إلى المقارنة مع الدراسات الفيتوكيميائية السابقة.

بينت مستخلصات AcOEt و Ep للنبته المدروسة نشاط مثبط للبكتيريا معتبر و ذلك عن طريق الانتشار في الوسط الصلب.

يجدر الذكر بأن المركبات من نوع سبيرو- $\gamma$ -لكتون أكتشف للمرة الأولى في نباتات *Thymelaeae*. هذه المركبات خاصة بالعائلة Proteaceae. من وجهة نظر الكيميو تصنيفية, إن وجود البيفلافونويدات و بيكومارينات في نبتة *T. microphylla* يعد مطابق لما أثبتته الدراسات الفيتوكيميائية السابقة و عليه فهذا النوع من المركبات يعتبر جد مميز لعائلة Thymelaeaceae.

### الكلمات المفتاحية:

فيتوكيمياء, Thymelaeaceae, *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur., ديلا سبيرو لكتون, بيفلافونويدات, بيكومارينات, مطيافية الرنين النووي المغناطيسي, مطيافية الكتلة, الأشعة فوق البنفسجية, نشاط مثبط للبكتيريا.



**COMMUNICATIONS  
SCIENTIFIQUES**

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de la faculté des Sciences université de Batna. Une partie des résultats obtenus a été présentée sous forme de communications orales et poster dans différents congrès, et a fait l'objet d'une publication scientifique internationale.

✓ **Publication (01)**

Hasna, G., Hamada, H., Laurence, M., Mohammed, B. and Jean-Luc, W., (2014). Microphynolides A and B, new spiro- $\gamma$ -lactone glycosides from *Thymelaea microphylla*. Natural Product Research. 28, 1732-1738.

✓ **Communication orales (03)**

Hasna, G., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Hamada, H. (2013). Polyphenols isolés de l'espèce *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae). Deuxièmes Journées Nationales De Chimie D'Annaba 09–11 Avril 2013.

Hasna, G., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Hamada, H. (2013). Chemical constituents of *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae). 5<sup>th</sup> International Colloquium of Heterocyclic Chemistry "CICH5-2013", at Oran, Algeria on 25<sup>th</sup> & 26<sup>th</sup> September 2013.

Hasna, G., Hamada, H., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W. (2014). Composition chimique d'une plante medicinale Algerienne *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. Quatrieme colloque international de chimie, CIC-4, Batna, le 25-27 Novembre 2014.

✓ **Poster (06)**

Hasna, G., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Hamada, H. (2013). Polyphenol compounds from *Thymelaea microphylla* and biological activities. First Seminar in Engineering, Health and Analysis Algiers, Algeria 05<sup>th</sup> May 2013.

Hasna, G., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Hamada, H. (2014). Isolation and structural elucidation of compounds from *Thymelaea microphylla* and

biological activities. 3<sup>ème</sup> Congrès International sur les Molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au stress oxydant, 21-23 Mars, Hammamet /Tunisie 2014.

Hasna, G., Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Hamada, H. (2014). Biological activities from medicinal plant *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae). 25<sup>ème</sup> forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, 24-27 Mars, Hammamet /Tunisie 2014.

Hamada, H., Hasna, G., Imane, B., Catherine, L., M., Dominique, H., Laurence, M., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Mohammed, B. (2014). Phenolics from Algerian medicinal plants *Helianthemum sessiliflorum* and *Thymelaea microphylla*. The 2<sup>nd</sup> International Congress of plant diversity, held à Marakech from 27<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> 2014.

Hamada, H., Imane, B., Hasna, G., Catherine, L., M., Dominique, H., Laurence, M., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L., Mohammed, B. (2014). Polyphenolics from medicinal plants *Helianthemum sessiliflorum* and *Thymelaea microphylla*. 1er Séminaire National Chimie verte et Environnement, 06-07 Mai 2014, Université de Souk Ahras.

Hasna, G., Hamada, H, Laurence, M., Mohammed, B., Jean-Luc, W., Ahmed, K.L. (2014). Biflavonoids isolated from the species *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae). The Second International Conference on “Natural Health” Mostaganem University, October 26<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> 2014.