

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

**UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :31/D3C/2018
Série :06/Ch/2018

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle (LMD)
Spécialité : Chimie Organique**

**Option : Analyses Physicochimiques, Contrôle de la Qualité et Synthèse de Substances
Bioactives**

Par

Chahrazed ESSEID Epouse REZKA

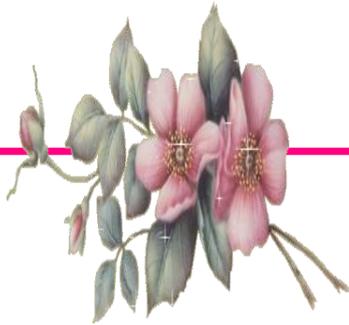
Thème

**ISOLEMENT ET DETERMINATION STRUCTURALE DE
METABOLITES SECONDAIRES DE PLANTES SAHARIENNES
- ACTIVITES BIOLOGIQUES**

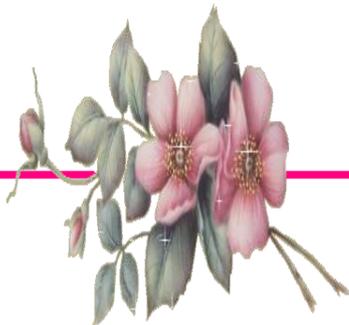
Devant le jury :

Pr. BOUMAZA Ouahiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse, Rapporteuse
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Mc. DRIDI Seloua	Université El Hadj Lakhdar Batna	Examinatrice

17 avril 2018



*Je Remercie Dieu
Le Tout Puissant Pour
Tout.....*



Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, et avec un vaste cœur plein de joie, je tiens à dédier ce modeste travail :

♥ *A mes très chers parents Salah eddine et Nadia, sans eux je n'aurais pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches.*

♥ *A mon très cher mari Tarek, que Dieu le protège, le garde pour moi et pour notre fille.*

♥ *A ma très chère fille Maram*

♥ *A mes chers frères et sœurs, Seif, Ammar, Amel, Assia ainsi qu'à leurs petites familles.*

♥ *A ma famille et ma belle famille pour leurs encouragements et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.*

♥ *A tous mes amis et collègues pour leur soutien moral.*

♥ *Mes enseignants qui ont enrichi ma mémoire tout au long de mes études.*

♥ *A tous ceux qui m'aiment*

♥ *A tous ceux que j'aime*

♥ *Chahrazed* ♥

Remerciements

Mes remerciements sont d'abord à Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail à l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (**VARENBIOMOL**), Faculté des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri, Constantine 1, sous la direction de madame la professeure **Fadila BENAYACHE**, à qui je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et particulièrement pour ses conseils précieux, ses efforts, ses critiques constructives sa compétences scientifique et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail, et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude. Je la remercie également pour son dynamisme dans la recherche des produits naturels, son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit surtout dans l'identification structurale des produits isolés.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à monsieur le professeur **Samir BENAYACHE**, Professeur à l'université Frères Mentouri, Constantine 1, pour avoir mis à ma disposition une plante saharienne endémique qui n'avait jamais fait l'objet d'étude auparavant, pour m'avoir accordé deux stages, le premier dans le cadre de son projet PCI (Programme de Coopération Interuniversitaire Algéro-Espagnole) entre l'IPNA-CSIC, Tenerife, Espagne (responsable Dr. **BROUARD Ignacio**) et l'université Frères Mentouri, Constantine 1 (responsable Pr. **BENAYACHE Samir**) et le second dans le cadre de son accord-programme Tassili 12 MDU 856 Code Égide : 27025YJ, titre : Valorisation des extraits végétaux, étude phytochimique et pharmacologique, applications socio-économiques, entre l'université Frères Mentouri Constantine 1 (responsable du projet Pr. **BENAYACHE Samir**) et l'université de Strasbourg (responsable du projet Pr. **MARCHIONI Eric**). Je le remercie également pour ses encouragements, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Mes vifs remerciements vont également au docteur **BROUARD Ignacio** directeur de recherche et au professeur **BERMEJO Jaime** de IPNA-CSIC, La Laguna, Tenerife, Espagne,

pour leur accueil et leur aide précieuse durant mon stage dans leur laboratoire et pour l'enregistrement des spectres de RMN mono et bidimensionnelle et les spectres de masse à haute résolution.

Je tiens aussi à remercier le docteur **LEÓN Francisco** de IPNA-CSIC, Laguna Tenerife, Espagne, pour ses qualités humaines et scientifiques, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail durant mon stage, pour sa gentillesse, et pour sa participation aux analyses structurales.

Ma gratitude et mes grands remerciements sont adressés au Pr. **MARCHIONI Eric** professeur à l'université de Strasbourg (France), pour son accueil et son aide durant mon stage dans son laboratoire.

Je remercie vivement madame **AMEDDAH Souad** et monsieur **MENAD Ahmed** professeurs à l'université Frères Mentouri, Constantine 1 et leurs équipes de recherche, pour la réalisation des essais biologiques.

Mes vifs remerciements s'adressent également, à madame la professeure **BOUMAZA Ouahiba** (Université Frères Mentouri, Constantine 1) pour ses conseils pertinents, sa gentillesse et son sourire permanent et pour le grand honneur qu'elle m'a faite en acceptant de présider le jury de ma thèse de doctorat.

Je remercie chaleureusement madame la professeure **MEKKIOU Ratiba** (Université Frères Mentouri, Constantine 1), pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance, tout le plaisir est pour moi ; je la remercie aussi pour sa grande gentillesse, sa disponibilité, sa présence au laboratoire et ses conseils judicieux.

Mes remerciements et ma reconnaissance vont particulièrement à monsieur **MOSSET Paul**, maître de conférences à l'université de Rennes 1 (France), pour les mesures du pouvoir rotatoire des molécules chirales isolées dans le cadre de ce travail, pour les multiples services rendus à notre équipe de recherche et pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de faire partie du jury de la soutenance de ma thèse même si cela, à notre grand regret, n'a pas été possible pour des raisons purement administratives.

Je suis également très honorée que la professeure **DRIDI Seloua** de l'université El Hadj Lakhdar de Batna ait accepté de juger ma thèse et de siéger dans le jury de sa soutenance. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Je ne peux, bien sûr, oublier tous mes enseignants dans le témoignage de ma reconnaissance pour m'avoir donné le bagage scientifique nécessaire pour mener à bien ce travail.

Je voudrais également remercier les ingénieurs de notre unité de recherche : monsieur **HAZMOUNE Hichem** et madame **TEBBOUB Naouel** pour leur aide et leur disponibilité.

Un merci tout particulier à toute l'équipe de chercheurs de notre unité de recherche **VARENBIOMOL** qui m'ont apporté tout au long de ma thèse, joie et sérénité. Je cite en particulier : **Widad, Hamama, Houria, Djihen, Tarek, Nihed, Nassima, Laila, Hanène, Halima, Imed, Thamere, Yasmine,.....**, merci à vous tous.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à **ma famille** dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Note : Les références bibliographiques sont placées à la fin de chaque chapitre

Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de la terminologie anglo-saxonne.

ACN :	acetonitrile
GC-SM :	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
VLC :	chromatographie liquide sous vide
SM :	spectrométrie de masse
CLHP (HPLC) :	chromatographie liquide haute performance
IR :	infra-rouge
UV :	ultra-violet
SMIE :	spectrométrie de masse en mode impact électronique
ESI :	ionisation par electrospray
EI :	impact électronique
HE :	huiles-essentiels
HR :	haute résolution
DEPT :	distorsionless enhancement by polarization transfer
δ (ppm) :	déplacement chimique en partie par million
J (Hz) :	constante de couplage exprimé en hertz
Cq :	carbone quaternaire
R_f :	facteur de retardement (retardation factor)
uma :	unité de masse atomique
Da :	dalton (unité de masse moléculaire)
m/z :	masse/charge électrique
IC₅₀ :	concentration inhibitrice à 50%
DPPH• :	radical 1,1-diphényl-2 picrylhydrazyl
OH• :	radical hydroxyl
ATP :	adénosine Triphosphate
NADP :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C :	température en degrés Celsius
cm :	centimètre
eV :	électron Volt
g :	gramme
h :	heure
Hz :	hertz
kg :	kilogramme
MHz :	mégahertz
mg :	milligramme
min :	minute
ml :	millilitre
m :	mètre
nm :	nanomètre
ppm :	partie par million
μg :	microgramme
λ_{max} :	longueur d'onde d'absorption maximale

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	5

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : La famille des Apiaceae et le genre *Pituranthos*

I-1- La famille des Apiaceae.....	6
I-1-1- Introduction.....	6
I-1-2- Historique.....	6
I-1-3- Classification de la famille des Apiaceae.....	7
I-1-4- Description de la famille des Apiaceae.....	8
I-1-4-1- Généralités sur la famille des Apiaceae.....	8
I-1-4-2- Identification botanique.....	8
I-1-5- Distribution.....	9
I-1-6- Utilisation.....	12
I-1-6-1- Intérêt économique.....	12
I-1-6-2- Utilisation en médecine traditionnelle.....	12
I-1-7- Caractéristiques chimiques des Apiaceae.....	13
I-1-7-1- Les métabolites primaires et secondaires.....	13
I-1-7-1-1- Composés du métabolisme primaire.....	13
I-1-7-1-2- Composés du métabolisme secondaire.....	13
A) Les coumarines.....	13
B) Les huiles essentielles.....	14
C) Les oléorésines.....	16
D) Les lactones sesquiterpéniques.....	16
E) Les saponosides.....	16
I-1-8- Toxicité de la famille des Apiaceae.....	16
A) Composés acétyléniques polyinsaturés : les polyines.....	16
B) les alcaloïdes.....	17
C) les coumarines.....	18

D) Les furanocoumarines.....	18
I-1-9- Etude chimiques antérieures.....	18
I-2- Le genre <i>Pituranthos</i>	19
I-2-1- Généralités.....	19
I-2-2- Usages traditionnels de la plante <i>Pituranthos</i>	21
I-2-3- Etude chimiques et biologiques antérieures.....	21
I-2-3-1- Composition chimique du genre <i>Pituranthos</i>	21
I-3- Conclusion.....	21
Références bibliographiques.....	22

CHAPITRE II : Les composés phénoliques et les coumarines

II- Généralités sur les métabolites secondaires.....	25
II-1- Les composés phénoliques.....	25
II-1-1- Définition.....	25
II-1-2- Classification.....	26
II-2- Les coumarines.....	28
II-2-1- Introduction.....	28
II-2-2- Définition.....	29
II-2-3- Les coumarines dans le règne végétal.....	29
II-2-4- Diversité structurale des coumarines.....	31
II-2-4-1- Coumarines simples.....	32
II-2-4-2- Coumarines prénylées.....	32
II-2-4-3- Furanocoumarines (linéaires et angulaires).....	32
II-2-4-4- Pyranocoumarines.....	34
II-2-4-5- Coumarines à l'état dimérique (bicoumarines).....	35
II-2-4-6- Coumarines à l'état trimérique (tricoumarines).....	35
II-2-5- Intérêt pharmacologique des coumarines.....	36
II-2-6- La toxicité des coumarines.....	38
II-3- Conclusion.....	38
Références bibliographiques.....	39

DESIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : Etude phytochimique et biologique

III- Etude phytochimique et biologique de l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	42
III-1- Etude bibliographique.....	42
III-2- Choix du matériel végétal.....	42
III-3- Place dans la systématique.....	42
III-4- Description botanique.....	43
III-5- Répartition géographique.....	43
III-6- Matériels et méthodes utilisés pour l'étude phytochimique.....	43
III-7- Etude phytochimique de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	44
III-7-1- Récolte du matériel végétal.....	44
III-7-2- Screening phytochimique.....	45
III-7-3- Extraction de la plante.....	46
III-7-4- Criblage chimique général et analyses LC-UV.....	49
III-7-5- Séparation chromatographique.....	56
A) Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme des parties aériennes.....	56
B) Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes.....	66
C) Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol des parties aériennes.....	72
III-8- Activités biologiques.....	77
III-8-1- Introduction.....	77
III-8-2- Activité antioxydante (<i>in vitro</i>) de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	78
III-8-2-1- Effet Scavenger du radical DPPH.....	78
III-8-2-2- Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	79
III-8-2-3- Propriété antihémolytique de BEPB.....	79
III-8-2-4- L'inhibition de la peroxydation lipidique du BEPB-thiocyanate d'ammonium.....	80
III-8-3- L'activité antibactérienne de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	80
III-8-3-1- Principe.....	80

III-8-3-2- Protocole.....	81
III-9- Conclusion.....	82
Références bibliographiques	83

CHAPITRE IV : Résultats et discussions

IV- Identification des produits isolés de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	87
IV-A- Identification des produits isolés de la phase chloroforme.....	87
IV-A-1- Elucidation structurale du composé C1	87
IV-A-2- Elucidation structurale du composé C2	90
IV-A-3- Elucidation structurale du composé C3	100
IV-A-4- Elucidation structurale du composé C4	110
IV-A-5- Elucidation structurale du composé C5	115
IV-A-6- Elucidation structurale du composé C6	122
IV-A-7- Elucidation structurale du composé C7	138
IV-A-8- Elucidation structurale du composé C8	155
IV-A-9- Elucidation structurale du composé C9	170
IV-A-10- Elucidation structurale du composé C10	181
IV-A-11- Elucidation structurale du composé C11	192
IV-A-12- Elucidation structurale du composé C12	199
IV-A-13- Elucidation structurale du composé C13	208
IV-A-14- Elucidation structurale du composé C14	220
IV-A-15- Conclusion.....	228
IV- B- Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle	229
IV-B-1- Elucidation structurale du composé A1	229
IV-B-2- Elucidation structurale du composé A2	235
IV-B-3- Elucidation structurale du composé A3	239
IV-B-4- Elucidation structurale du composé A4	246
IV-B-5- Elucidation structurale du composé A5	251
IV-B-6- Elucidation structurale du composé A6	262
IV-B-7- Elucidation structurale du composé A7	274
IV-B-8- Conclusion.....	279

IV-C- Identification des produits isolés de la phase <i>n</i> -butanolique	279
IV-C-1- Elucidation structurale du composé N1	279
IV-C-2- Elucidation structurale du composé N2	284
IV-C-3- Conclusion.....	290
IV-D- Résultats des activités biologiques.....	290
IV-D-1- Activité antioxydante (<i>in vitro</i>) de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	290
IV-D-1-1- Effet scavenger du radical DPPH•.....	290
IV-D-1-2- Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	291
IV-D-1-3- Propriété antihémolytique de BEPB.....	292
IV-D-1-4- L'inhibition de la peroxydation lipidique du BEPB- thiocyanate d'ammonium.....	293
IV-D-2- L'activité antibactérienne de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	296
IV-D-3- Conclusion.....	297
IV-E- Conclusion du chapitre.....	297
Références bibliographiques.....	303

CHAPITRE V : Les huiles essentielles

V-1- Définition.....	308
V-2- Propriétés physico-chimiques.....	308
V-3- Localisation et structure histologique des huiles essentielles.....	308
V-4- Rôle des huiles essentielles.....	309
V-5- Composition chimique des huiles essentielles.....	310
V-6- Principales structures chimiques terpéniques.....	310
V-7- Analyses chimiques des huiles essentielles	310
V-7-1- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	310
V-7-2- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).....	311
V-7-3- Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC/FID).....	313
V-8- Etablissement de structure des produits isolés.....	313
V-9- Travaux personnels.....	314
V-9-1- Etude de l'huile essentielle de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	314

V-9-1-1- Extraction de l'huile essentielle.....	314
V-9-1-2- Analyse GC et GC/MS des huiles essentielles.....	314
V-9-1-2a- Analyse GC-FID.....	314
V-9-1-2b- Analyse GC/MS.....	314
V-9-1-3- Résultats et discussion.....	315
V-10- Conclusion.....	318
Références bibliographiques.....	319

CONCLUSION GENERALE

RESUME

Les articles publiés

- 1-** Chemical Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Pituranthos battandieri* Maire. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. **2016** ; 8(10) : 1731-1734.
- 2-** Chemical constituents and antioxidant activity of a polar extract from *Pituranthos battandieri* Maire. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. **2017** ; 9(4) : 559-566.

Introduction générale

La phytothérapie ou l'art de soigner par les plantes est utilisée depuis la nuit des temps par les hommes ; les plantes constituant alors le seul remède pour traiter leurs maux. Voici un bref historique pour savoir comment la phytothérapie a traversé le temps [1,2].

Le plus ancien recueil de formules végétales est gravé en caractères cunéiformes sur des tablettes d'argiles et a été découvert en 1984 dans les ruines de Nippur situé dans l'Irak actuel. Il date de l'époque sumérienne il y a plus de 5.000 ans (soit – 3.000 ans avant J-C) [3].

Le célèbre papyrus d'Ebers datant des civilisations pharaonique a été découvert à Louksor et cite plusieurs centaines de plantes médicinales. On pense qu'il date de moins 1.500 avant J-C [3].

Hippocrate (460-377 avant J-C), célèbre médecin grec, est considéré comme le père de la médecine. Il a consacré toute sa vie aux plantes médicinales, notamment à étudier leurs effets thérapeutiques. Auteur de la théorie des humeurs (comprenant le sang, la lymphe, la bile jaune et noire), Hippocrate souligne que si celles-ci n'atteignent pas un état d'équilibre, la maladie s'établit. Il laissera une somme considérable de données publiées en 280 avant J-C dans le *Corpus Hippocraticum* qui traite d'environ 250 simples [4].

Pline l'Ancien (23-79 après J-C) a recensé dans ses encyclopédies nommées « Histoire naturelle » environ 900 plantes connues à son époque tant du point de vue botanique que médicinal [5,6].

Dioscoride (40-90 après J-C), médecin grec et successeur spirituel d'Hippocrate, a écrit le fameux « *De materiamedica* » qui traite de 600 simples. Cet ouvrage a été la principale source de connaissance en matière de plantes médicinales durant l'Antiquité [7].

Un autre médecin grec, Claude Galien (131-201 après J-C), est considéré comme l'un des pères de la pharmacie. Il a codifié l'emploi de très nombreuses plantes médicinales et inventé pratiquement toutes les formulations magistrales ; on dira de lui qu'il est l'inventeur de la pharmacie galénique [8].

Charlemagne (742-814 après J-C) a promulgué les « capitulaires » qui sont des ordonnances royales notamment le *De Villis* indiquant que les végétaux doivent être plantés dans les domaines royaux. Le capitulaire *De Villis* comprend une liste de 94

plantes médicinales, aromatiques et alimentaires devant être cultivées dans les monastères. Parmi ces plantes, 73 sont des herbes dont font partie quelques espèces de la famille des Apiacées, l'aneth (*Anethum graveolens* L.), l'anis (*Pimpinella anisum* L.), le carvi (*Carum carvi* L.), la coriandre (*Coriandrum sativum* L.), le cumin (*Cuminum cyminum* L.) et le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) [9].

Paracelse (1493-1541 après J-C), médecin et alchimiste suisse, est à l'origine de la théorie des signatures se basant sur l'analogie entre la morphologie de la plante médicinale et de l'organe à traiter. Il est aussi le précurseur de la toxicologie et de la pharmacologie. De lui vient cette célèbre citation : « tout est poison, rien n'est poison. La dose fait le poison » [10].

La médecine Arabe a eu son heure de gloire il y a plusieurs siècles. La civilisation arabo-islamique appartient aux grandes civilisations et la médecine arabe fait partie de ce patrimoine. La situation géographique du monde musulman, entre le monde méditerranéen et l'orient plus ou moins lointain, a favorisé le rayonnement de sa médecine grâce à la langue arabe commune de l'Andalousie à l'Asie centrale. Cette médecine s'inscrit dans une longue tradition scientifique qui remonte à la grèce classique, à la perse ancienne et à l'inde sanscrit [11].

A partir des ouvrages traduits grecs, perses et indiens, les savants musulmans ont assimilé la somme des traditions thérapeutiques gréco-romaines. Ils étaient encouragés en cela par les princes et califes arabes dont « Haroun Erashid ». Ils ont alors développé leur propre recherche, observations chimiques et expérimentations, dans les domaines de la médecine et de la pharmacie.

Des savants célèbres dans le monde entier témoignent de cet âge d'or de la médecine chez les musulmans. Parmi ceux qui influencèrent profondément le cours de la médecine arabe on cite :

-Al razi (Razes) : (864-932)

-Ibn Sina (Avicenne) : (980-1037) nommé le prince de la médecine avec son écrit KANOUN FI-ELTIB.

Mais le plus grand d'entre eux fut sans aucun doute Ibn Al Baytar : (1197-1248) qui émigra en orient où il rédigea le très complet SOMME DES SIMPLES [11].

Chaque culture a une histoire d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies. En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été faits au IX^{ème} siècle par Ishâ Ben Amran et Abdallah Ben Lounès né à Oran, et qui décrit l'usage de beaucoup de

plantes médicinales, mais la plus grande production de livres a été réalisée au dixseptième et au dix-huitième siècle.

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par Fourment et Roques où ils ont mentionné décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara. Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de Bloued (1998) [12] et Baba Aissa (1999) [13].

Cette étude s'intéresse à une famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence en forme d'ombelles et qui est aujourd'hui nommée Apiacées. Certaines plantes de cette famille sont en particulier utilisées lors de troubles digestifs de type dyspepsies, météorisme, ballonnements et douleurs intestinales [14-16].

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de notre équipe de recherche. Il a pour but l'étude d'une espèce endémique du Sahara algéro-marocain du genre *Pituranthos*, *Pituranthos battandieri* Maire qui n'a jamais fait l'objet d'étude auparavant. Il consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification structurale des métabolites secondaires de cette espèce, l'analyse par GC/MS de son huile essentielle ainsi que l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH de ses parties aériennes. La présentation de nos travaux est répartie comme suit :

Une première partie, bibliographique, comportant deux chapitres :

- Le premier est consacré à une présentation botanique de la famille des Apiaceae (Ombellifères), au genre *Pituranthos* et des résultats d'investigations phytochimiques antérieures reportant ses métabolites secondaires les plus courants.
- Le second chapitre débute par une synthèse bibliographique portant sur les métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, les coumarines et les différents squelettes coumariniques. Cette étude inclut la définition et la classification de ces derniers.

Une deuxième partie, expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels, répartie en trois chapitres (chapitres III, IV et V) :

- Le troisième chapitre comporte les études phytochimique et biologique de l'espèce sélectionnée (*Pituranthos battandieri* Maire). Elle est basée sur l'extraction de métabolites secondaires en débutant par le screening phytochimique, la macération, puis la séparation et la purification de différents produits ainsi que l'évaluation des l'activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH.
- Dans le quatrième chapitre, nous décrivons les identifications structurales des composés isolés. Celles combinent les résultats de la spectrométrie de masse à haute résolution obtenue par ionisation douce notamment, l'électronébulisation positive (positive electrospray), des expériences de RMN mono et bidimensionnelle et de la spectrophotométrie UV-Vis. Ce chapitre renferme également la discussion relative à l'évaluation des activités biologiques recherchées.
- Le cinquième et dernier chapitre, est réservé aux travaux consistant en l'extraction et l'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle par GC et GC-MS de l'espèce étudiée.

Nous finissons le tout par une conclusion générale à travers laquelle nous essayons de faire le point sur les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives que ce travail a permis d'entrevoir.

Références bibliographiques

- [1] Fauronr, Rouxd. La phytothérapie à l'officine (de la vitrine... au conseil), Du porphyre, Paris, 1989 ; 314 pp.
- [2] Lais E. L'ABC daire des plantes aromatiques et médicinales, Flammarion, Paris, 2001 ; 119 pp.
- [3] Anton R. Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinales, science et thérapeutique. 3^{ème} édition, Technique documentation, Paris, 1999, p 22, 30.
- [4] Adams F, The Genuine Works of Hippocrates, New York, William Wood and Company, 1891.
- [5] Valérie N, Le projet encyclopédique de Pline l'Ancien, Rome, École française de Rome, 2002.
- [6] Pline l'Ancien Stéphane S, Histoire naturelle, Gallimard, coll. La Pléiade, 2013.
- [7] Brunet F. « Les médecins grecs depuis la mort de Galien jusqu'à la fin de l'Empire d'Orient » in Laignel-lavastine, Histoire générale de la médecine, Paris, 1936. t.1, p. 433-463.
- [8] Bariéty M. Coury CH. Histoire de la Médecine. Librairie Arthème Fayard, 1963 ; 195-215.
- [9] Paris M, Hurabielle M. Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie). Tome 1 Masson, Paris 1981, p 1-3, 5-10.
- [10] Mazaheri A. Paracelse alchimiste. Notes critiques et positives. Annales. Économies, Sociétés, Civilisations. 1956 ; 11 : 183-193.
- [11] [http : // www.plantes médicinales](http://www.plantes_medicinales), ces « éternelle » amies de l'homme phytothérapie, une médecine ancienne toujours attrayante. htm.
- [12] Beloued A. Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publications Universitaires. 1998 ; 277.
- [13] Baba aissa F. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edas. 1999 ; 368.
- [14] Hammiche V, Maiza K. Traditionalmedicine in Central Sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105(3) : 358-67.
- [15] Boukef MK. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Cooperation Culturelle et Technique. 1986 ; 1 : 228-30.
- [16] Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. Fleurs du Sahara, Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili. Ibis Press, Paris. 2000.

Chapitre I

*La famille des Apiaceae et
le genre Pituranthos*

I-1- La famille des Apiaceae

I-1-1- Introduction

Il est généralement estimé qu'il y a environ 300.000 espèces de plantes supérieures [1], cependant certains reportent le nombre à 250.000. D'autres estiment que le nombre est aussi élevé que 500.000, cette disparité du nombre est particulièrement liée à la différence de philosophie systématique chez les botanistes et la grande diversité des environnements et les forêts tropicales où on peut rencontrer des espèces nouvelles de plantes, continuellement. Parmi ces 300.000 espèces de plantes, environ 1% ; soit 3000 ont été utilisées comme nourriture, dont environ 150 ont été commercialement cultivées. D'autre part, à peu près 10.000 de ces plantes ont été documentées pour l'usage médicinal ; elles sont beaucoup plus que celles utilisées dans l'alimentation, mais le pourcentage par rapport au nombre des plantes supérieures est encore un très faible [2]. Ces espèces sont décrites et nommées suivant la nomenclature introduite en 1753 par Karl Von Linné, elles sont regroupées dans 300 familles différentes.

La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques [3], reste très peu explorée sur les plans phytochimique et pharmacologique. Dans ce qui suit, nous allons nous intéresser à la famille des Apiaceae.

I-1-2- Historique

Lors de l'apparition de l'homme, les Ombellifères (Apiaceae) sont déjà bien diversifiées et vraisemblablement très nombreuses. Alimentaires ou toxiques, elles ne manquent pas de se faire remarquer puis utiliser dès les premiers âges. Elles figurent en effet, parmi les premiers écrits de l'humanité. Lorsque le fameux manuscrit du linéaire B fut déchiffré en 1952 par Michael Ventis et John Chadwick, les chercheurs ont dû se rendre à l'évidence qu'il s'agissait d'un inventaire. Parmi les produits végétaux de cet antique dénombrement, trois Ombellifères puissamment aromatiques étaient citées : la coriandre (*Coriandrum sativum* L.), le cumin (*Cuminum cyminum* L.) et le fenouil (*Foeniculum vulgare* Miller).

Dans la flore pharaonique de Loret [4] en 1892, différents végétaux restes provenant des tombes égyptiennes ont été identifiés. Ainsi du céleri (*Apium graveolens* L.) a été retrouvé sous forme d'un collier constitué avec ses rameaux et des

pétales de lotus bleu et un buplèvre (*Bupleurum*) dans une brique funéraire. L'aneth (*Anethum graveolens* L.) était utilisé pour ses vertus médicinales. On y a également retrouvé les trois Ombellifères citées dans le linéaire B (coriandre, fenouil, cumin). D'autres civilisations connaissaient et employaient également les Ombellifères. Ainsi les ouvrages médicaux chinois du 2^{ème} et du 3^{ème} siècle avant J-C. font état de neuf Ombellifères au moins. Quelques noms sanscrits désignent des Ombellifères et, avant l'arrivée des conquistadors au Mexique, les Indiens avaient déjà établi des classifications botaniques utilitaires comprenant également des Ombellifères.

I-1-3- Classification de la famille des Apiaceae

Les plantes de la famille des Apiaceae appartiennent à l'embranchement des spermatophytes ou phanérogames car ce sont des plantes à graines. Les spermatophytes sont classées en deux catégories :

- les gymnospermes qui sont des plantes à ovules nus.
- les angiospermes qui par évolution ont des ovules protégés par des ovaires.

Parmi les angiospermes, on distingue les monocots et par évolution les eudicots suivant la structure de l'embryon contenu dans la graine. En effet, l'embryon des monocots ne contient qu'un seul cotylédon qui sert de réserve d'énergie alors que les eudicots en possèdent deux.

La classification APG pour *Angiosperms Phylogeny Group* est probablement la classification botanique la plus importante aujourd'hui [5,6]. Elle s'appuie sur des caractères phylogénétiques et permet la classification botanique des angiospermes. La version 2003 ci dessous est une modification de la classification de 1998. D'après cette classification, on voit que la famille des Apiaceae est une des plus évoluées de la catégorie des angiospermes.

Pour résumer, on peut situer la famille des Apiaceae comme suit :

- Embranchement des spermatophytes (plantes à graine)
- Sous embranchement des angiospermes (plantes à ovaire)
- Eudicots (embryon à deux cotylédons)
- Eudicots évolués
- Classe des Astéridées
- Sous classe des euastéridées II
- Ordre des Apiales
- Famille des Apiaceae (ex-Ombellifères) (Tableau I.1)

Tableau I.1 : Position de la famille Apiaceae dans les systèmes de classifications évolutives

Auteur	Engler	Cronquist	Thorne	Dahlgren	Takhtajan	APG II
Super-classe						Tricolpées (Eudicotylédones)
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsidae				Tricolpées évoluées
Sous-Classe	Archichlamydae	Rosidae	Magnoliidae	Cornidae		Asteridae
Super-ordre			Cornanae	Aralianae		Euastéridées II ou Campanulidées
Ordre	Umbelliflorae	Apiales	Araliales			Apiales
Famille	Umbelliferae	Apiaceae				

I-1-4- Description de la famille des Apiaceae

I-1-4-1- Généralités sur la famille des Apiaceae

La famille des Apiacées (Apiaceae), appelées anciennement Ombellifères (Umbelliferae), est une famille de plantes dicotylédones. Selon Watson & Dallwitz, elle comprend environ 3000 espèces réparties en 469 genres distribués dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord [7]. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle (Figure I.1). Une seule espèce a une importance économique notable, la carotte, plusieurs fournissent des condiments appréciés, certaines sont toxiques comme la grande ciguë.



Figure I.1 : Plante des Apiaceae

I-1-4-2- Identification botanique

Les Apiaceae sont généralement des plantes herbacées annuelles, parfois bisannuelles ou vivaces. La famille compte aussi des arbres et arbustes, comme le

buplèvre. Cette importante famille est très mal représentée au Sahara, notamment dans sa partie centrale. En revanche, Les Ombellifères sahariennes sont différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile [8]. En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule [9].

I-1-5- Distribution

La famille des Apiaceae est une famille cosmopolite, Elle est très commune en montagne mais toutefois assez rare dans les régions tropicales. Elle est présente dans tous les continents habités, mais surtout dans les régions tempérées, avec, toute fois, une prédilection pour l'hémisphère Nord (Figure I.2).

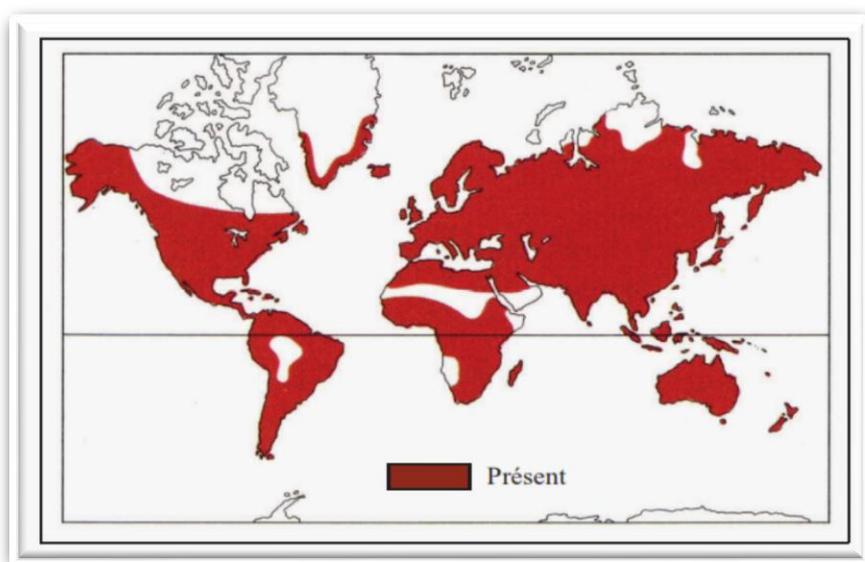


Figure I.2 : Répartition géographique mondiale des Apiaceae

Les genres se répartissent entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique (Tableau I.2) [10].

Tableau I.2 : Répartition mondiale des genres des Apiaceae

Continent	Genres	Endémiques
Afrique	126	50
Amérique	197	52
Asie	265	159
Australie	36	11
Europe	139	29

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces (Tableau I.3) [4].

Tableau I.3 : Genres des Apiaceae rencontrés en Algérie

N°	Genre	Nombre d'espèces	Nombre de sous espèces	Espèces endémiques
1	<i>Ammi</i>	2		
2	<i>Ammiopsis</i>	1		
3	<i>Ammodaucus</i>	1		
4	<i>Ammoides</i>	2		1 (<i>A. atlantica</i>)
5	<i>Anethum</i>	1		
6	<i>Anthriscus</i>	2		
7	<i>Apium</i>	1		
8	<i>Balansaea</i>	1		1 (<i>B. glaberrima</i>)
9	<i>Bifora</i>	1		
10	<i>Brachyapium</i>	2		
11	<i>Bunium</i>	7		4 (<i>B. fontanesii</i> , <i>B. chaberti</i> , <i>B. elatum</i> , <i>B. crassifolium</i>)
12	<i>Bupleurum</i>	14		5 (<i>B. plantagineum</i> , <i>B. atlanticum</i> , <i>B. montanum</i> , <i>B. balansae</i> , <i>B. oligactis</i>)
13	<i>Capnophyllum</i>	1		
14	<i>Carum</i>	2		2 (<i>C. montanum</i> , <i>C. foetidum</i>)
15	<i>Caucalis</i>	4		1 (<i>C. bifrons</i>)
16	<i>Chaerophyllum</i>	1		
17	<i>Conium</i>	1		
18	<i>Conopodium</i>	1		
19	<i>Coriandrum</i>	1		
20	<i>Crithmum</i>	1		
21	<i>Cuminum</i>	1		
22	<i>Danaa</i>	1		
23	<i>Daucus</i>	11	8	1 (<i>D. reboudii</i>)
24	<i>Echinophora</i>	1		
25	<i>Elaeoselinum</i>	2		
26	<i>Eryngium</i>	7		

Tableau I.3 : Genres des Apiaceae rencontrés en Algérie (Suite)

N°	Genre	Nombre d'espèces	Nombre de sous espèces	Espèces endémiques
27	<i>Ferula</i>	5		2 (<i>F. Cossoniana</i> , <i>F. vesceritensis</i>)
28	<i>Foeniculum</i>	1	3	
29	<i>Helosciadium</i>	3		
30	<i>Heracleum</i>	1	2	
31	<i>Hippomarathrum</i>	1	2	
32	<i>Hohenackeria</i>	2		
33	<i>Hydrocotyle</i>	1		
34	<i>Kundmannia</i>	1		
35	<i>Magydaris</i>	2		
36	<i>Malabaila</i>	1	1	
37	<i>Margotia</i>	1		
38	<i>Oenanthe</i>	6		1 (<i>Oe. Virgata</i>)
39	<i>Orlaya</i>	3		
40	<i>Petroselinum</i>	1		
41	<i>Peucedanum</i>	3		1 (<i>P. munbyi</i>)
42	<i>Physocaulos</i>			1
43	<i>Pimpinella</i>	2		
44	<i>Pituranthos</i>	4	5	4 (<i>P. reboudii</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>P. battandieri</i> , <i>P. chloranthus</i>)
45	<i>Reutera</i>	1		
46	<i>Ridolfla</i>	1		
47	<i>Sanicula</i>	1		
48	<i>Scandix</i>	3	2	
49	<i>Seseli</i>	4		
50	<i>Sison</i>	1		
51	<i>Smyrniium</i>	2		
52	<i>Thapsia</i>	3		
53	<i>Tinguarra</i>	1		
54	<i>Tordylium</i>	1		
55	<i>Torilis</i>	2	3	
56	<i>Turgenia</i>	1		

Un simple regard du contenu de cette liste permet de constater la diversité générique algérienne de cette famille. Les genres *Bupleurum* et *Daucus* sont les plus

riches au niveau spécifique avec respectivement 14 et 11 espèces, alors que la majorité est représentée par une ou deux espèces.

I-1-6- Utilisation

La famille des Apiacées (Apiaceae), anciennement Ombellifères (Umbelliferae), regroupe de nombreuses espèces de plantes dont certaines sont comestibles (carotte, fenouil...) et d'autres sont toxiques (ciguë).

I-1-6-1- Intérêt économique

Les Apiaceae renferment de nombreuses plantes alimentaires et aromatiques [10] : *Anethum graveolens* L. (l'aneth), *Apium graveolens* L. (le céleri), *Coriandrum sativum* (le coriandre), *Cuminum_cyminum* (le cumin), *Foeniculum vulgare* (le fenouil), *Pastina casativa* L. (le panais), et *Pimpinella anisum* L. (l'anis).

D'autres Apiaceae sont utilisées comme additifs naturels dans l'industrie alimentaire, certaines espèces sont comestibles, telles que : *Daucus carota* (carotte), *Pastina casativa* (panais), *Foeniculum vulgare*, etc. Certaines espèces sont utilisées comme condiments ou épices, comme *Carum carvi* (cumin), *Pimpinella anisum* (anis), *Foeniculum vulgare* var. (fenouil) et *Coriandrum sativum* (coriandre). D'autres sont utilisées comme arômes pour les boissons, tel est le cas d'*Angelica archangelica* (angélique), *Laserpitium gallicum* et plusieurs espèces d'*Heracleum* [11,12]. Certains genres sont cependant très toxiques, comme *Conium* (la grande ciguë, dont on dit qu'elle a été utilisée pour le suicide de Socrate), et *Cicuta* (la ciguë vireuse).

I-1-6-2- Utilisation en médecine traditionnelle

Ammi majus : le fruit est utilisé dans le traitement du psoriasis et pour pigmenter les taches blanches apparaissant sur l'épiderme dans le vitiligo. Son action photosensibilisatrice est due à la présence de nombreuses furocoumarines dérivées du psoralène et dont l'une des plus connues est le bergaptène [13].

Ammi visnaga : les graines sont une source de khelline et de visnagine, furochromones à activités spasmolytiques et vasodilatatrices de la circulation coronarienne, et de flavonoïdes, diurétiques et emménagogues. Les pédicelles sont vendus comme cure-dents au Maghreb. Elle est utilisée en Irak comme source de colorant rouge [13].

Anethum graveolens (aneth) : propriétés analogues à celle de l'anis et du fenouil autrement dit antispasmodique digestif, eupeptique, carminatif et diurétique [14].

Angelica archangelica (angélique) : la racine contient une furocoumarine, l'angélicine qui possède une activité sédative. L'angélique doit à son essence ses propriétés stomachiques, eupeptiques et carminatives [13].

I-1-7- Caractéristiques chimiques des Apiaceae

I-1-7-1- Les métabolites primaires et secondaires

I-1-7-1-1- Composés du métabolisme primaire

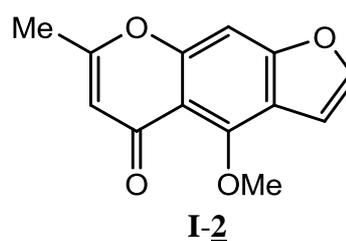
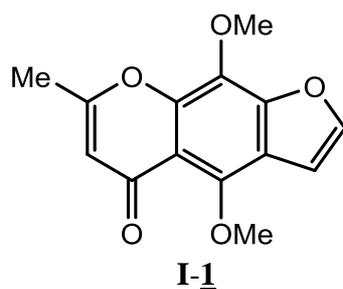
Certaines plantes de la famille des Apiaceae peuvent être utilisées comme aliments. Les racines de la carotte (*Daucus carota* L.), du panais (*Pastina casativa* L.), du maceron (*Smyrniium olusatrum* L.) et du céleri (*Apium graveolens* L.) peuvent être consommées ainsi que les feuilles de persil (*Petroselinum crispum* L.) et de céleri. Le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* L.) est utilisé en tant que condiment. Les souches et le pétiole d'angélique (*Angelica archangelica* L.) sont utilisés en confiserie (sous forme confite) car riches en glucides [7].

I-1-7-1-2- Composés du métabolisme secondaire

A) Les coumarines

Les coumarines sont des molécules dérivées du phénylpropane, très répandues chez les Apiaceae. On rencontre majoritairement des furanocoumarines, linéaires ou angulaires, dont le noyau de base est le psoralène. Les coumarines simples sont moins répandues, de même que les pyranocoumarines, dont la forme linéaire est absente chez les Apiaceae [15].

Le khella (*Ammi visnaga* L.) contient des furanochromones dont la khelline **I-1** et la visnadine **I-2** ainsi que des pyranocoumarines dont la visnagine **I-3** (Figure I.3). La khelline est la chromone la plus active présentant des propriétés spasmolytiques. La visnadine a des propriétés antispasmodique et vasodilatatrice des coronaires [16].



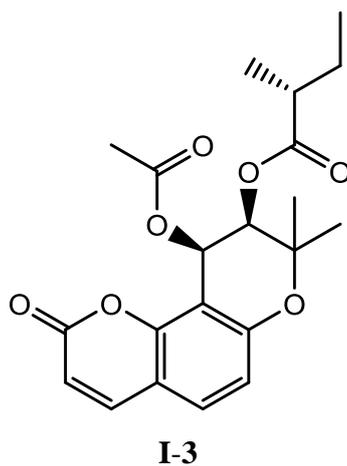


Figure I.3 : Formules chimiques de la khelline **I-1**, visnagine **I-2** et visnadine **I-3**

L'angélique officinale (*Angelica archangelica* L.) est un des constituants de l'eau de Mélisse des Carmes.

B) Les huiles essentielles

Les Apiaceae se distinguent par de forts arômes et saveurs dus à la présence de canaux sécréteurs d'essences ou de gommés-résines. Ces propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments.

Les fruits d'anis vert (*Pimpinella anisum* L.) contiennent de l'huile essentielle. Celle-ci renferme de l'anéthol **I-4** (90%) et de l'estragol **I-5** (Figure I.4) ayant des propriétés stomachiques, carminatives et antispasmodiques. Les fruits d'anis vert entrent dans la composition de liqueurs : « les anisettes » ; ils sont également utilisés en confiserie et en parfumerie pour leur rôle d'aromatisant. C'était le cas de la spécialité « l'élixir parégorique » (ancien médicament antidiarrhéique à base d'opium). Il est à souligner que la délivrance de l'huile essentielle d'anis est réglementée [17].

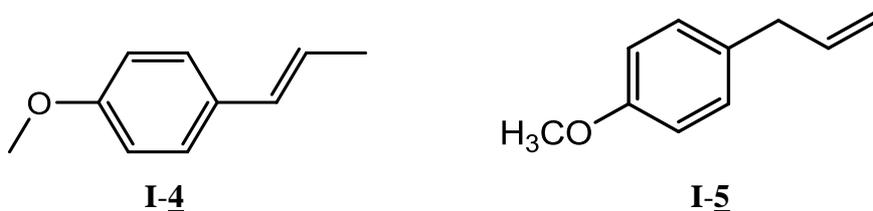
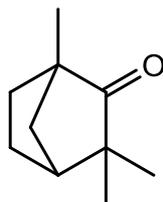


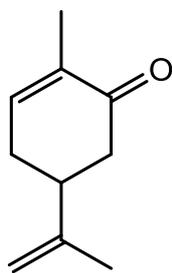
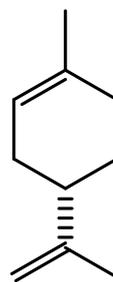
Figure I.4 : Formules chimiques de l'anéthol **I-4** et de l'estragol **I-5**

Les fruits de fenouil doux (*Foeniculum vulgare* Millvar. *dulce*) contiennent une huile essentielle riche en anéthol (80%) et en estragol ayant des propriétés

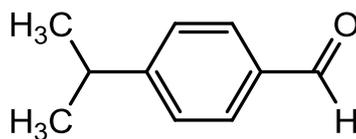
antispasmodiques et carminatives. Sa commercialisation suit les mêmes restrictions que l'huile essentielle d'anis. Les racines du fenouil doux ont des propriétés diurétiques et entrent avec le persil dans la composition du « sirop des cinq racines ». Les fruits du fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Millvar. *vulgare*) contiennent jusqu'à 20% d'une cétone terpénique toxique : la fenchone **I-6** (Figure I.5) alors que les fruits du fenouil doux n'en contiennent que 2%. Cela explique pourquoi on utilise le fenouil doux par rapport au fenouil amer [17].

**I-6****Figure I.5 :** Formule chimique de la fenchone **I-6**

Les fruits de l'aneth (*Anethum graveolens* L.) renferment une huile essentielle riche en carvone **I-7** (50 à 60%) et en limonène **I-8** (Figure I.6) ayant des propriétés stomachiques, carminatives et diurétiques [17].

**I-7****I-8****Figure I.6 :** Formule chimique de la carvone **I-7** et du limonène **I-8**

Les fruits du cumin (*Cuminum cyminum* L.) renferment une huile essentielle riche en aldéhyde cuminique **I-9** (25 à 35%) (Figure I.7) [17].

**I-9****Figure I.7 :** Formule chimique de l'aldéhyde cuminique **I-9**

Les fruits de la coriandre (*Coriandrum sativum* L.) contiennent une huile essentielle ayant des propriétés stomachiques et carminatives. Cette plante entre dans la composition de l'eau de mélisse.

C) Les oléorésines

Les espèces du genre *Ferula* et surtout *Ferulagum mosa* Boiss, 1856 (= *Ferula galbaniflua*) sécrètent une substance par incision de la racine : le galbanum qui entre autre fois dans la composition de l'alcoolat de Fioraventi. On l'utilise aujourd'hui en parfumerie comme fixateur.

La *Ferula asa foetida* était employée comme antispasmodique, emménagogue et anthelminthique. Aujourd'hui, elle est employée en homéopathie.

La gomme ammoniac extraite de la *Dorema ammoniacum* D. Don, 1831 servait autre fois dans la confection d'emplâtres.

D) Les lactones sesquiterpéniques

La *Thapsia garganica* est une plante africaine d'où l'on extrait la thapsigargine **I-10** (Figure I.8) de la racine, molécule ayant des propriétés vésicantes.

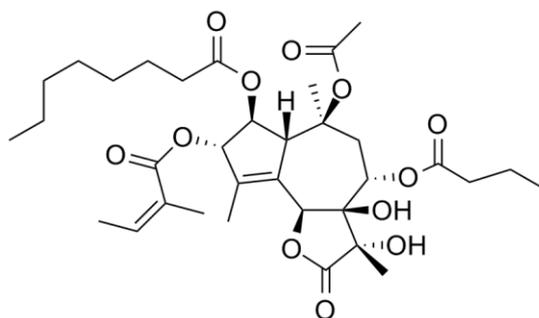


Figure I.8 : Formule chimique de la thapsigargine **I-10**

E) Les saponosides

Bupleurum chinense DC (= *Bupleurum falcatum* L.), connu pour sa richesse en saponosides, est utilisé en médecine traditionnelle chinoise comme antipyrétique et antigripale [18].

I-1-8- Toxicité de la famille des Apiaceae

A) Composés acétyléniques polyinsaturés : les polyynes

La cigüe aquatique (*Cicuta virosa* L.) est une plante très toxique pouvant entraîner la mort par ingestion. En effet, toute la plante est toxique et renferme de la cicutoxine **I-11**. Les symptômes sont : salivation, vertige, brûlure de la bouche, vomissement, convulsion et arrêt respiratoire [7]. De même, l'oenanthe safranée

(*Oenanthe crocata* L.) est aussi une plante très toxique pouvant entraîner la mort par ingestion. Toute la plante est toxique, elle renferme un isomère de la cicutoxine : l'oenantothoxine **I-12** (Figure I.9). Les symptômes sont identiques à ceux lors de l'ingestion de la cigüe vireuse. Les racines d'oënanthe safranée peuvent être confondues avec les racines de céleri, navet et radis. Les feuilles quant à elles peuvent être confondues avec le persil.

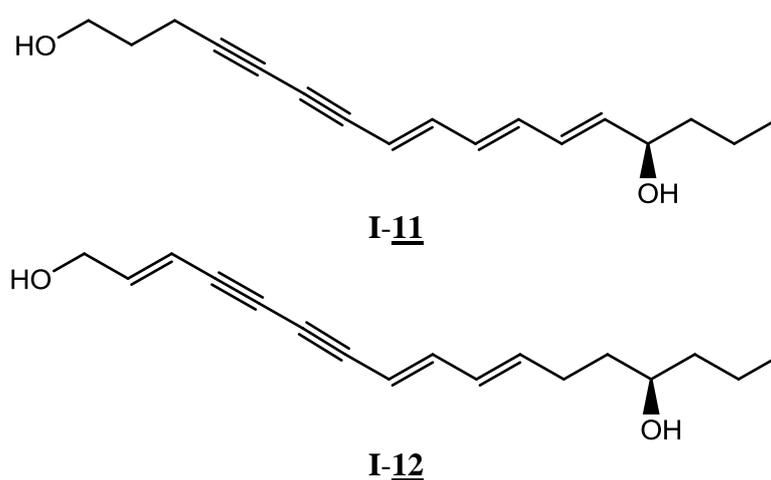


Figure I.9 : Formule chimique de la cicutoxine **I-11** et de l'oenantothoxine **I-12**

La petite cigüe (*Aethusa cynapium* L.) est moins toxique que les deux premières. Les racines renferment des polyynes.

B) les alcaloïdes

La grande cigüe (*Conium maculatum* L.) est une plante extrêmement toxique. Elle contient des alcaloïdes dérivés de la pipéridine. Les fruits sont riches en γ -coniine **I-13** tandis que l'appareil végétatif est riche en γ -conicéine **I-14** (Figure I.10). Les symptômes liés à l'intoxication sont : éblouissement, mydriase, vertige, soif intense, sensation de refroidissement progressif, baisse de la sensibilité et de la mobilité, paralysie du diaphragme provoquant l'arrêt respiratoire. La grande cigüe peut être confondue avec la carotte sauvage ou le persil.

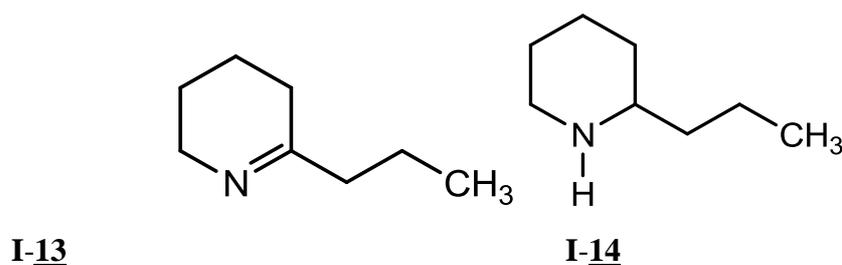


Figure I.10 : Formule chimique de la γ -coniine **I-13** et de la γ -conicéine **I-14**

C) les coumarines

La fêrule (*Ferula* sp.) est surtout toxique pour le bétail. Elle contient des gommes et résines d'hydroxy coumarines ayant des propriétés anticoagulantes provoquant des diarrhées hémorragiques, des hématuries et des dyspnées pouvant conduire au décès.

D) Les furanocoumarines

De nombreuses plantes alimentaires de la famille des Apiaceae comme l'angélique (*Angelica archangelica* L.), le céleri (*Apium graveolens* L.), le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le persil (*Petroselinum crispum* L.), la livèche (*Levisticum officinale* L.), la grande berce (*Heracleum sphondylium* L.), le panais (*Pastinaca sativa* L.) ainsi que la fêrule (*Ferula* sp.) contiennent des furanocoumarines telles que le psoralène, le bergaptène et la xanthotoxine qui sont des agents photosensibilisants pouvant entraîner une phototoxicité après exposition solaire. Ces plantes peuvent déclencher une dermatite des prés s'il y a contact avec la plante puis exposition aux ultraviolets (UV). Celle-ci est favorisée par l'humidité de la peau. Les symptômes sont de type érythème, brûlures, bulles, vésicules et peuvent être accompagnés de maux de tête voire de fièvre. Elles peuvent aussi entraîner une Phytodermatose alimentaire lorsque la plante est ingérée et qu'il y a ensuite exposition solaire. Dans de nombreux cas, s'ensuit une hyperpigmentation de la peau qui peut persister longtemps [19].

I-1-9- Etudes chimiques antérieures

Des extraits éthanoliques de 23 espèces de la famille Apiaceae ont été analysés pour évaluer leur contenu en flavonoïdes et en isoflavonoïdes par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). En premier lieu, par la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) et en second lieu, par la CLHP semi-préparative avec des dosages immuno-enzymatiques (ELISA-HPLC). La rutine, la quercétine-3-glucoside et l'apigénine ont été les flavonoïdes les plus abondants. La génistéine, la sissotrine et la formononetine sont les isoflavones identifiées [20].

Trois saponines triterpéniques isolées à partir des racines de *Physospermum verticillatum* : saikosaponine **I-15**, buddlejasaponine IV **I-16**, et songarosaponine D **I-17** ont été étudiées *in vitro* pour leur activité cytotoxique contre des différents types cellulaires cancéreux. L'hydrolyse de l'unité sucre a été effectuée sur la saikosaponine

afin d'obtenir une saikosapogénine **I-18** (Figure I.11). Toutes les saponines isolées présentaient une forte activité cytotoxique [21].

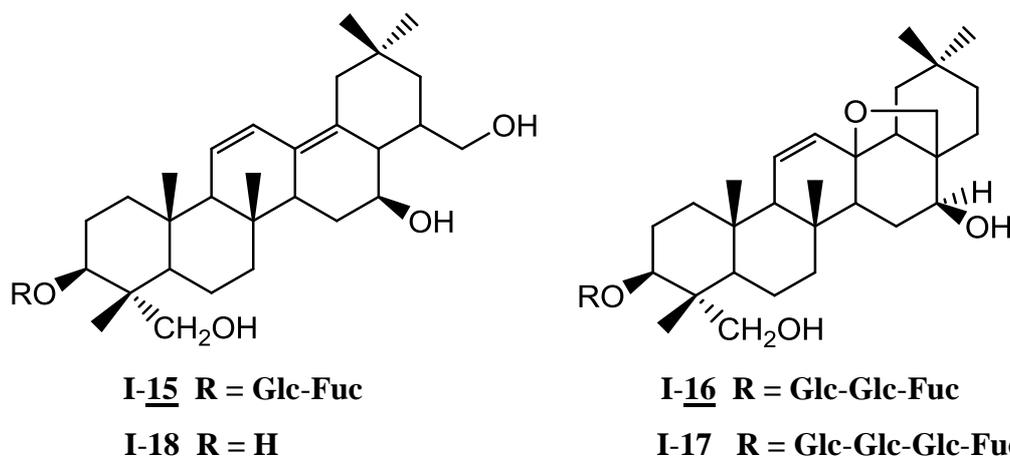


Figure I.11 : Structures des saponines triterpéniques de *Physospermum verticillatum*

Trois diterpènes : l'acide anisotoménique **I-19**, l'anisotomène-1-ol **I-20** et l'acide 16-acétoxy anisotoménique **I-21** (Figure I.12) ont été identifiés et quantifiés dans les extraits méthanoliques obtenus à partir de *Anisitone flexuosa* [22].

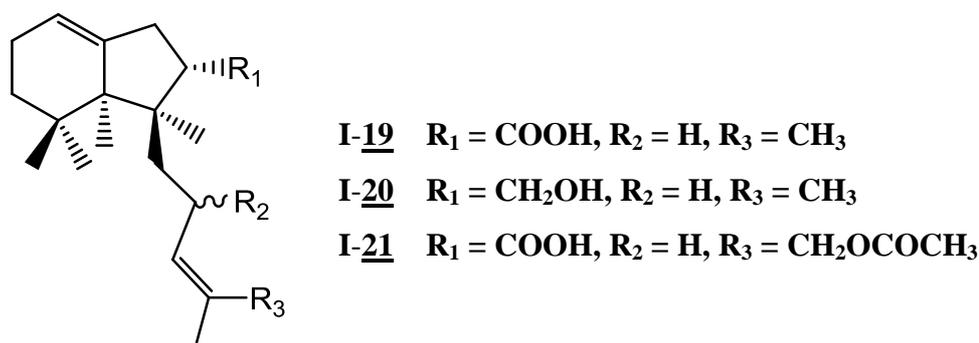


Figure I.12 : Structures des diterpènes isolés à partir de l'extrait méthanolique de *Anisitone flexuosa*

I-2- Le genre *Pituranthos*

I-2-1- Généralités

Le genre *Pituranthos* possède plus de 20 espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord [23-25], et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

Le potentiel floristique Algérien de ce genre (nommé « Guezzah ») comporte quatre espèces endémiques : *P. reboudii*, *P. scoparius*, *P. battandieri* et *P. chloranthus*.

- *Pituranthos reboudii* (Cosset Dur) Benth et Hook : Tiges longues de 10-20 cm. Souche ligneuse ramifiée émettant de nombreuses rosettes de feuilles 1-2 fois triséquées, longues de 1-3 cm. Feuilles caulinaires supérieures linéaires. Ombelles terminales et latérales courtement pédonculées, larges de 2-3 cm à 2-7 rayons, se localise dans les pâturages arides [23].
- *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur) Benth et Hook : Appelé aussi *Deverra scoparia* Coss. & Dur (nom arabe : guezzah) est une espèce endémique d'Afrique du nord et est très répandue en Algérie, surtout dans les hauts plateaux et dans la majeure partie du Sahara (pâturages arides rocaillieux) difficile à distinguer de l'espèce *P. chloranthus*, *P. scoparius* est une plante vivace, aphyllé ; les feuilles supérieures sont réduites à leur gaine, les tiges sont dressées, de 40 à 80 cm de haut, formant des touffes denses qui envoient latéralement de courts rameaux rigides, avec des fleurs blanches et des petits fruits [23].
- *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook : Espèce particulièrement peu présente. Maire avec trois sous-espèces [23] :
 - ssp. *cossonianus* Maire : Fruits de 1-1,5 mm, tiges florifères très ramifiées.
 - ssp. *Robustus* Maire : Ombelles à pédoncules robustes, longues de 2-5 cm ; fruits de 2mm, tiges ramifiées seulement dans le haut.
 - ssp. *Intermedius* Maire : Ombelles à pédoncules grêles et bien plus allongés.
- *Pituranthos battandieri* : L'objet de notre travail, Endémique au Sahara marocain et l'oranie [26]. Feuilles basales toujours persistantes sous les tiges. Tiges grêles à ramification plus ou moins étalées, développées et persistantes 1-3 séquées. Plante d'un vert glauque. Stigmates pourpres. Se localise dans les rocailles, pâturages désertiques. Maire avec deux sous espèces [23] :
 - ssp. *abreviathus* Maire ;
 - ssp. *leptactis* Maire.

Quezel [23] a décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, a tiges très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles est des percarpes ovoïdes à 6 bandelettes.

I-2-2- Usages traditionnels du genre *Pituranthos*

Le genre *Pituranthos* (*Deverra*) est très utilisé en pharmacopée traditionnelle dans de nombreuses régions et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été validées par les tests appropriés [26-28].

I-2-3- Etude chimiques et biologiques antérieures

Les plantes du genre *Pituranthos* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Elles ont permis l'identification d'un nombre important de métabolites secondaires validés par des tests biologiques *in vivo* et *in vitro* [29,30].

I-2-3-1- Composition chimique du genre *Pituranthos*

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Pituranthos* d'après des données bibliographiques ont montré la richesse des espèces de ce genre en flavonoïdes, coumarines, isocoumarines, composés polyacéthyléniques et acides gras [26,31-39]. Les espèces de ce genre sont également connues pour leur richesse en huiles essentielles [29,40-42].

I-3- Conclusion

Les Apiaceae sont l'une des familles les plus connues parmi les plantes à fleurs. Ils ont été largement étudiés, en raison notamment de leur importance économique, Ils sont aussi largement utilisés en médecine traditionnelle pour certaines propriétés thérapeutiques.

La synthèse des connaissances bibliographiques à la fois botanique et phytochimique de la famille Apeaceae, confirme bien la richesse des espèces de cette famille en métabolites secondaires, notamment de type coumarine et de type flavonoïde, ce qui ont en fait des marqueurs chimiotaxonomiques intéressants.

D'après les recherches bibliographiques effectuées sur le genre *Pituranthos*, aucune investigation Phytochimique ni biologique n'a été abordée sur l'espèce *battandieri* Maire jusqu'à ce jour. Elle n'a été étudiée que dans le cadre de notre travail.

Références bibliographiques

- [1] Lawrence GHM. The taxonomy of vascular plants. The macmillan company, New York. 1951.
- [2] James DM, Sylesh KV, John TH. Plant natural products : Back to the future or into extinction. *Phytochemistry* 2007 ; 68 : 2015-2022.
- [3] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Editions du centre national de la recherche scientifique : Paris. 1963.
- [4] Loret V. La flore pharaonique d'après les documents hiéroglyphiques et les spécimens découverts dans les tombes, Edition Ernest Leroux. Paris. 1892.
- [5] Deysson G, Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris. 1979 ; 529 pp.
- [6] Dupont F, Guignard JL. Systématique moléculaire, Abrégé de botanique, 14^{ième} édition, Masson, Issy-les-moulineaux. 2007 ; 285 pp.
- [7] Boitineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier, Tec & Doc, Paris. 2010 ; 1335 pp.
- [8] Ozenda P. Flore du Sahara septentrional et central. CNRS. 1958 ; p. 356.
- [9] Haba H. Thèse de magister, Université El-hadj Lakhdar-Batna, 2002.
- [10] Heywood VH. Les plantes à fleurs, 306 familles de la flore mondiale, Nathan, Paris, 1996 ; 335 p.
- [11] Doneanu C, Anitescu G. Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, *J. Supercrit. Fluids*. 1998 ; (12) : 59-67.
- [12] Olle M, Bender I. The content of oils in umbelliferous crops and its formation, *Agron. Res.* (Special Issue III). 2010 ; (8) : 687-696.
- [13] Sofowara A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Edition Karthala. 2010.
- [14] Boullard B. Plantes médicinales du monde, réalités et croyances, Editions ESTEM. 2001.
- [15] Murray RDH, Méndez J, Brown SA. The natural coumarins : occurrence, chemistry and biochemistry, John Wiley & Sons. 1982 ; 702 p.
- [16] Pubchem substance : www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance (dernière consultation août 2012).

- [17] Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc, Paris, 2005 ; 522 pp.
- [18] Cheung CS, Belluomini J, Traditional and new interpretation of prescriptions : the harmonizing group, Journal of the American College of Traditional Chinese Medicine, 1984 ; (1) : 3-15.
- [19] Murry RDH, Mendez J, Brown SA. The natural coumarins, occurrence, chemistry and biochemistry, John Wiley & Sons Ltd : Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1982.
- [20] Abdulmanea AK, Prokudina EA, Lankova AP, Vani-Ckova AL, Koblovska AR, Zeleny BV, Lapcik O. Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. Biochem. Syst. Ecol. 2012 ; 45 : 237-243.
- [21] Tundis R, Bonesi M, Deguin B, Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, Tillequin F. Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit) (Apiaceae). Bioorg. Med. Chem. 2009 ; 17 : 4542-4547.
- [22] Zidorn C, Sturm S, Dawson JW, Klink JW, Syppner H, Perry NB. Chemosystematic investigations of irregular diterpenes in anisotome and related new Zealand Apiaceae. Phytochemistry 2002 ; 59 : 293-304.
- [23] Quezel P et Santa S. Nouvelle fleur de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol.1-2 Ed. CNRS, Paris, France. 1962, 1963.
- [24] Néger R. Petit flore des régions arides du Maroc occidental, Tome 2 Ed. CNRS, Paris France. 1962.
- [25] Kaabeche M. Les groupements végétaux de la région de Bousaada, université Paris Sud. 1990.
- [26] Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ed. Ibis Press, Paris. 1997 ; 764p.
- [27] Al kadi AA. Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libie Vol 1-2. 1989.
- [28] Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central Sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105(3) : 358-367.
- [29] Abdallah HM, Ezzat SM. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. Z. Naturforsch. C. 2011 ; 66 : 143-148.

- [30] Djeridane A, Brunel JM, Vidal N, Yousfi M, Ajandouz EH, Stocker P. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavones glucoside isolated from *Deverra scoparia*. Chem. Biol. Interact. 2008 ; 172 : 22-26
- [31] Singab AN, Khalifa T, Mahran GH, Okada Y, Matsumaru Y, Nishino H, Okuyama T. A new flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus* Desf, Benth & Hook. Natural medicines (Tokyo). 1998 ; 52(2) : 191-194.
- [32] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*. Phytochemistry 1995 ; 40(3) : 927-929.
- [33] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. 37 th. Annual congress of the society for medicinal plant research, Braunschweig Germany, 5-9 Septembre, 1989.
- [34] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Coumarins of roots of *Pituranthos triradiatus* growing in Egypt, Mans. J. Pharm. Sci. 1991 ; 7, p : 402.
- [35] Ashkenazy D, Friedmann J, Kashman Y. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. Planta med. 1983 ; 47(4) : 218-220.
- [36] Haba H, Benkhalel M, Massiot G, Long C, Lavaud C. Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. Nat. Prod. Res. 2004 ; 18(5) : 409-413.
- [37] Touil A, Rhouati S, J. Creche. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. Chem. Nat. Compd. 2006 ; 42(1) : 104-105.
- [38] Dahia M, Laouer H, Chaker AN, Prado S, Meierhenrich UJ, Baldovini N. Chemical composition and antibacterial activity of *Pituranthos chloranthus* volatile oil. Nat. Prod. Commun. 2007 ; 2(11) : 1159-1162.
- [39] Abdel-Kader MS. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. J. Braz. Chem. Soc. 2003 ; 14(1) : 48-51.
- [40] Abdelwahad A, Hayder N, Hilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hmami M, Chekir-Gherdira L, Ghedira K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss). Mair, Flavour Fragr, J. 2006 ; 21(01) : 129-133.
- [41] Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook. from Algeria. J. Ess. Oil Res. 1999 ; 11(6) : 673-676.
- [42] Gourine N, Merrad B, Yousfi M, Stocker P, Gaydou EM. Chemical composition of the essential oil of *Pituranthos scoparius*. Nat. Prod. Commun. 2011 ; 6(8) : 1151-1154.

Chapitre II

*Les composés phénoliques
et les coumarines*

II- Généralités sur les métabolites secondaires

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides) [1]. Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés : métabolites secondaires. Ils constituent un groupe de produits naturels qui sont explorés pour des propriétés très diverses : antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses etc... [2].

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité [3]. Ils sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont : les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes [4,5].

II-1- Les composés phénoliques

II-1-1- Définition

Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate [6]. Plusieurs milliers ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques, portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, auxquelles est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside [7,8]. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) à des proportions variables. Les plus représentés sont les acides phénoliques [9]. Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus ; les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthonés, les coumarines et d'autres classes existent en nombres considérables [10].

Les composés phénoliques font l'objet de nombreuses recherches en général et les flavonoïdes en particulier sont très étudiés en raison de leurs diverses propriétés et rôles biologiques :

- Chez les végétaux : Les composés phénoliques participent à deux principaux processus de l'activité des plantes : la photosynthèse et la respiration. De plus, ils interviennent dans d'autres processus tels que : la croissance, la germination, la morphogénèse des tiges et dans le processus de lignification [11]. Ils jouent un

rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, les attaques microbiennes, lutte contre les prédateurs [12].

- Chez l'homme : Les polyphénols présents dans les aliments consommés sont en effet, capables d'abaisser la pression artérielle, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire et de stabiliser les cellules immunitaires [13]. Ils ont été décrits comme étant des antioxydants, des anti-allergènes, des anti-inflammatoires, des anti-thrombotiques et des antitumoraux [14].

II-1-2- Classification

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base. Les différentes classes principales de ces composés phénoliques isolés des plantes sont illustrées dans le tableau II.1. Quelques exemples sont reportés dans la figure II.1.

Tableau II.1 : Les principales classes des composés phénoliques

Nombre de C	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C ₆	Phénols simples	Catéchol II-1
7	C ₁ -C ₆	Acides phénoliques	Acide salicylique II-2
8	C ₆ -C ₂	Acétophénones	3-Acetyl-6-méthoxy benzaldéhyde II-3
9	C ₆ -C ₃	-Acide hydroxycinnamique -Phénylpropènes -Coumarines -Isocoumarines - Chromones	-Acide caféique II-4 -Eugénol II-5 -Ombelliférone II-6 -6,7-Diméthoxy 8-hydroxy 3-méthyl isocoumarine II-7 -Eugénine II-8
10	C ₆ -C ₄	-Naphtoquinones	-Juglone II-9
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	-Xanthonés	-1,2,3,7-tétraméthoxy xanthone II-10
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	-Stilbènes -Anthraquinones	-Acide hunularique II-11 -Emodine II-12
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	-Flavonoïdes -Isoflavonoïdes	-Quercétine II-13 -Génistéine II-14
18	(C ₆ -C ₃) ₂	-Lignanes	-Podophyllotoxine II-15

Tableau II.1: Les principales classes des composés phénoliques (Suite)

Nombre de C	Squelette de base	Classe	Exemple
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	-Biflavonoïdes	-Kayaflavone II-16
n	$(C_6-C_3)_n$	-Lignines	-
	$(C_6)_n$	- Catéchol mélanines	-
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	-Flavolanes (Tannins condensés)	-

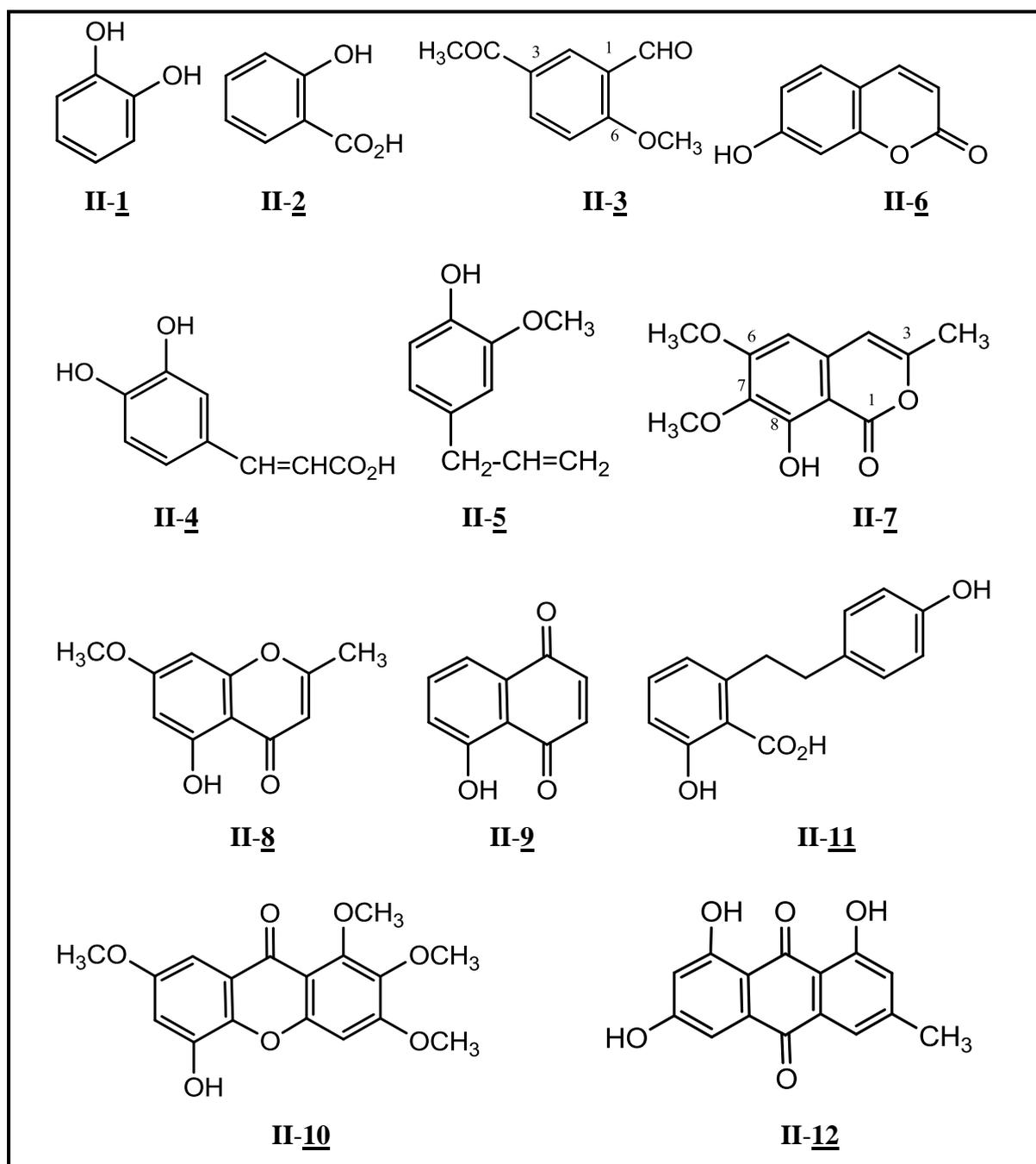


Figure II.1 : Structures chimiques de quelques composés phénoliques

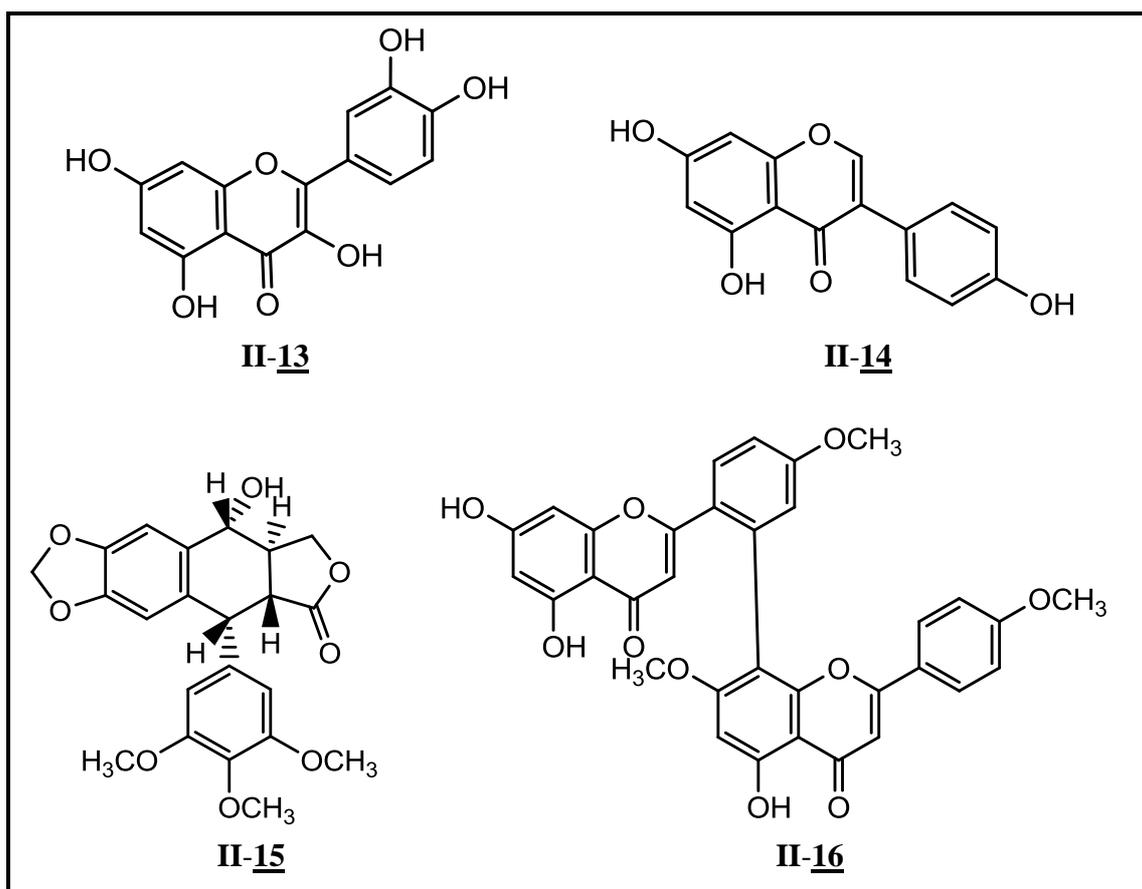


Figure II.1 : Structures chimiques de quelques composés phénoliques (Suite)

Notre intérêt est essentiellement localisé sur les coumarines, substances que nous avons pu isoler de l'espèce du genre *Pituranthos* que nous avons sélectionnée pour cette étude.

II-2- Les coumarines

II-2-1- Introduction

Les coumarines constituent l'une des grandes classes de composés d'origine naturelle, leur intérêt est grandissant en raison de leur utilité en tant qu'agents biologiquement actifs. Le squelette de la coumarine représente également la structure de base de plusieurs molécules de produits pharmaceutiques de grande importance.

La coumarine s'est avérée être un agent antibactérien, antioxydant, anti-inflammatoire, anticoagulant et antitumeur. Les propriétés pharmacologiques de la coumarine ont suscité notre intérêt vu les résultats obtenus lors de l'investigation phytochimique que nous avons menée sur l'espèce *P. battandieri* Maire que nous avons sélectionnée pour cette étude.

II-2-2- Définition

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryxo dorata* Willd., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine.

Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 [7]. Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclarée et la lavande. Les coumarines sont des composés phénoliques des végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure [15], Ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques [7].

II-2-3- Les coumarines dans le règne végétal

La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, sont accumulés par plus de 70 familles de dicotylédones et 9 familles de monocotylédones. Ils sont présents sous forme libre ou hétérosides dans la plupart des familles de dicotylédones incluant Apiaceae, Asteraceae, Fabiaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae. Le tableau II.2 rassemble quelques coumarines et leur localisation dans les espèces d'où elles ont été extraites.

Tableau II.2 : Quelques coumarines et leur localisation dans des espèces étudiées

Coumarines	Plantes	Localisation	Références
Esculétine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	[16]
Angélicine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	[17]
2'-Angéloyl-3'-isovaléryl	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
Aptérine	<i>Aegopodium podagraria</i>	racines	[19]
"	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
"	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	[20]
Archangélicine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[17]
Archangéline	<i>Angelica archangelica</i>	racines	"
Bergapténe	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	[16]
"	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	[17]
"	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	[20]
"	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et feuilles	[21]
(-)-Byakangélicine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Byakangélicine-2'-O- isovalérate	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[16]
Chalepensine	"	"	"
Columbianadine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]
Columbianadinoxide	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	[20]
Daphnorétine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	"
Daphnorétine méthyl éther	<i>Ruta graveolens</i>	parties aériennes	[21]
Dophnorine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Gravélliférone	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Gravélliférone méthyl éther	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Gravéolone	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Héracléol	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Héracléol-2'-O- isovalérate	<i>Anethum graveolens</i>	parties aériennes	[16]
Héracléol-2'-O- sénéciote	<i>Petroselinum crispum</i>	tiges	[20]
Hérniarine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
8-Hydroxybergapténe	"	"	"
Impératorine	"	"	"
"	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]
Isobérgapténe	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	[17]
Isobyakangélicine angélate	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	"
Isoimpératorine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	[20]
"	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
"	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	[20]
Isooxypeucédanine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	[17]
Isopeulustrine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	[20]
Isopimpinélline	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et racines	[21]
Isorutarine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	[20]

Tableau II.2 : Quelques coumarines et leur localisation dans des espèces étudiées

(Suite)

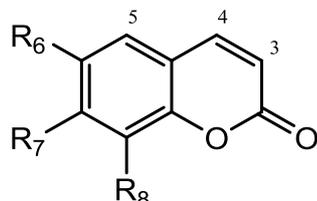
Coumarines	Plantes	Localisation	Références
Marmésine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	[20]
Marmésinine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	[17]
5-Méthoxy-héraclenol	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
Orosélonge	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	[17]
Osthénol	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	"
Osthol	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	"
(+)-Oxypeucedanine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	[18]
Pangéline	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]
Peucedanine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	[22]
Phélloptérine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	[17]
Pimpinélline	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	"
Psoraléne	<i>Angelica archangelica</i>	racines	"
"	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et racines	[21]
Rutacultine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	"
Rutamarine	<i>Ruta graveolens</i>	parties aériennes + racines	"
Scopolétine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits, feuille et racines	[16]
Subérénone	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]
Umbélliférone	<i>Anethum graveolens</i>	fruits et racines	[16]
"	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	[17]
"	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]
Umbéllipréline	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	[16]
"	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	[17]
"	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	[20]
Xanthotoxine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	[16]
"	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	[17]
"	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et feuilles	[21]
Xanthotoxol	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	[17]
Xanthylétine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	[21]

II-2-4- Diversité structurale des coumarines

Les coumarines constituent une famille de composés naturels. Selon la nature des substituants présents sur le squelette coumarinique, on peut les classer en plusieurs catégories.

II-2-4-1- Coumarines simples

Ce sont les coumarines les plus répandues dans le règne végétal. Plusieurs d'entre elles possèdent des substituants OH (*O*-Glc) et/ou OCH₃ en 6 en 7 et /ou en 8 [23]. Quelques exemples sont reportés dans la figure II-2.

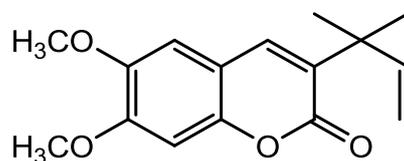


<u>Composés</u>	<u>R₆</u>	<u>R₇</u>	<u>R₈</u>	<u>N°</u>
Daphnétine	H	OH	OH	II-17
Erioside	OH	OH	<i>O</i> -Glc	II-18
Esculétine	OH	H	OH	II-19
Esculine	<i>O</i> -Glc	H	OH	II-20
Fraxétine	OCH ₃	OH	OH	II-21
Scopolétine	OCH ₃	H	OH	II-22
Umbélliférone	H	H	OH	II-6

Figure II.2 : Structures chimiques de quelques coumarines simples

II-2-4-2- Coumarines prénylées

Ce sont des coumarines portant une unité isoprène, comme la rutacultine **II-23**, figure II.3.



II-23

Figure II.3 : Structure chimique de rutacultine **II-23**

II-2-4-3- Furanocoumarines (linéaires et angulaires)

Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs. La structure chimique des furanocoumarines est constituée d'un cycle furane fusionné avec la coumarine. L'association peut se faire soit dans le prolongement de la coumarine (forme linéaire), comme le psoralène **II-24** et la xanthotoxine **II-25** ; soit sur le côté (forme angulaire) comme l'angélicine **II-26** et la pimpinelline **II-27**. Ainsi on peut distinguer deux types de furanocoumarines : les furanocoumarines linéaires et furanocoumarines angulaires. De nombreux dérivés de ces structures de base existent avec des ajouts de résidus sur les carbones des positions 5 et/ou 8 pour les linéaires et

5 et/ou 6 pour les angulaires. Ces résidus peuvent être assez simples, comme dans les cas des hydroxypsoralènes comme le xanthotoxol **II-28** et le bergaptol **II-29** ; des méthoxypsoralènes comme la xanthotoxine **II-25**, l'isopimpinelline **II-30** et le bergaptène **II-31** pour les furanocoumarines linéaires ou pour les furanocoumarines angulaires le cas des hydroxy- et des méthoxyangélicines comme la sphondine **II-32**, la pimpinelline **II-27** ou l'isobergaptène **II-33** (Figure II.4). Le cycle furane peut être réduit dans les positions C-9 et C-10 donnant ainsi des dihydrofuranocoumarines comme l'athamantine **II-34** ou la columbianadine **II-35** (Figure II.5).

La plupart des furocoumarines ont cependant des dénominations reprenant le nom des plantes dans lesquelles elles ont été décrites pour la première fois (le bergaptène **II-31** présent dans *Citrus bergamia*, la rutarétine **II-36** et la rutarine **II-37** de *Ruta graveolens*, ou bien encore liées à leurs propriétés, comme la xanthotoxine **II-25** pour sa couleur et son activité biologique. On désigne dans certains cas l'isomère linéaire ou angulaire d'une molécule par le préfixe iso- comme par exemple dans le cas de l'isopimpinelline **II-30** [23].

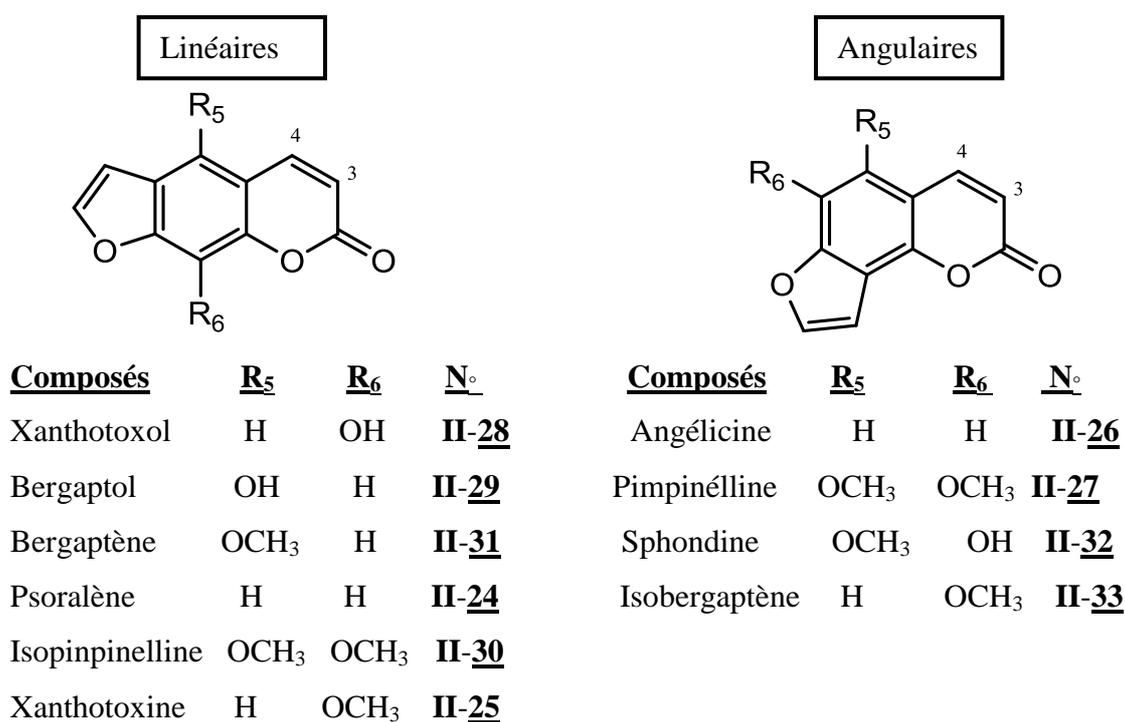


Figure II.4 : Structures chimiques de quelques furanocoumarines (linéaires et angulaires)

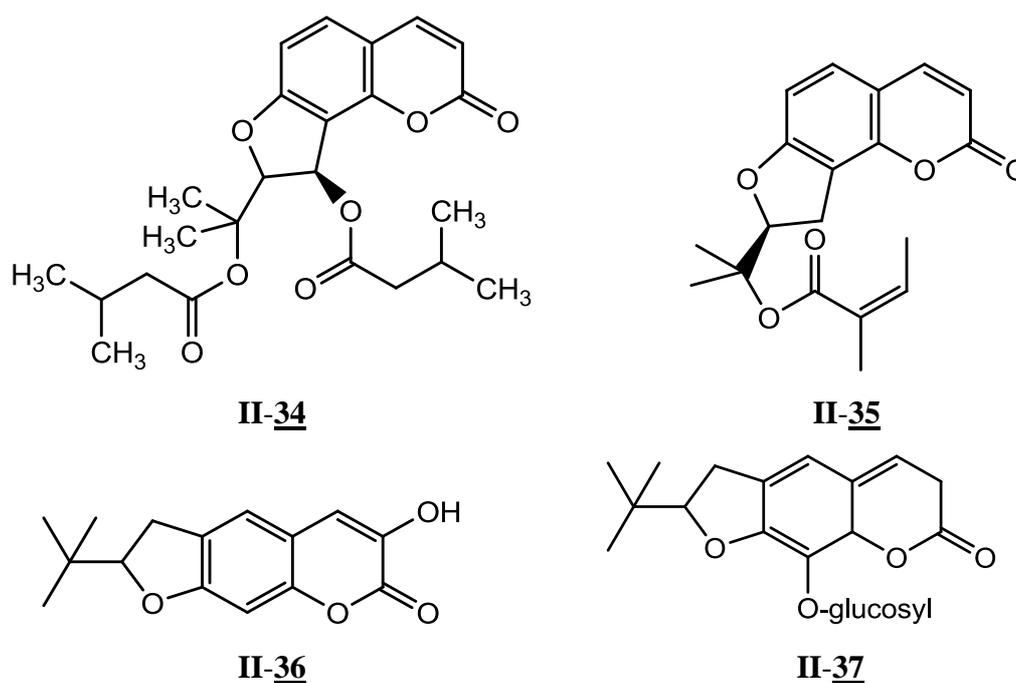


Figure II.5 : Structures chimiques de l'athamantine **II-34**, la columbianadine **II-35**, la rutarétine **II-36** et la rutarine **II-37**

II-2-4-4- Pyranocoumarines

Les pyranocoumarines contenant un seul cycle pyranique sont dites « pyranocoumarines simples », ce sont des composés formés par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine soit dans le prolongement (forme linéaire), soit latéralement (forme angulaire) [23]. Elles présentent des structures parfois assez attrayantes pour un chimiste grâce à leur substitution comme la 2',3'-dihydro jatamansine **II-38** et l'anomaline **II-39** (Figure II.6).

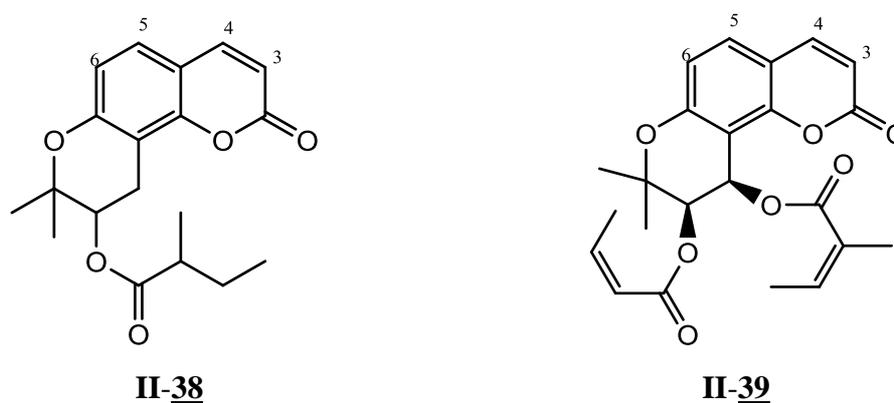
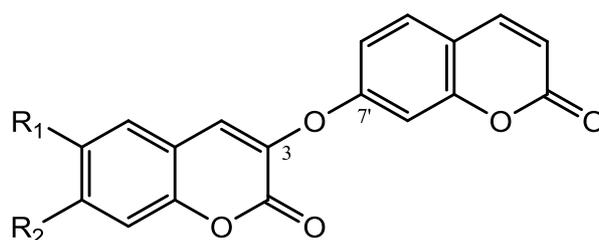


Figure II.6 : Structures chimiques de la 2',3'-dihydro jatamansine **II-38** et l'anomaline **II-39**

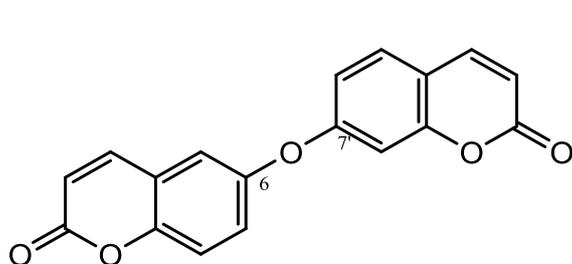
Les coumarines comportant deux cycles pyraniques sont connues sous le nom de dipyranocoumarines. La diversification de leurs structures provenant de la nature des substituants du squelette coumarinique notamment la position C-4 a fait qu'elles sont divisées en séries et chaque série en groupes [23].

II-2-4-5- Coumarines à l'état dimérique (bicoumarines)

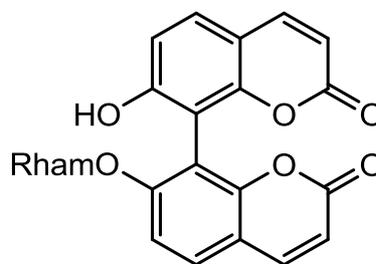
Les bicoumarines sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariniques simples [23]. Quelques molécules de ce type sont reportées dans la figure II.7.



<u>Composés</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>N°</u>
Daphnorétine	OCH ₃	OH	II-40
Rutamontine	OH	OCH ₃	II-41
Daphnorine	OCH ₃	<i>O</i> -Glu	II-42
Edgeworine	H	OH	II-43



Lasiocéphaline **II-44**

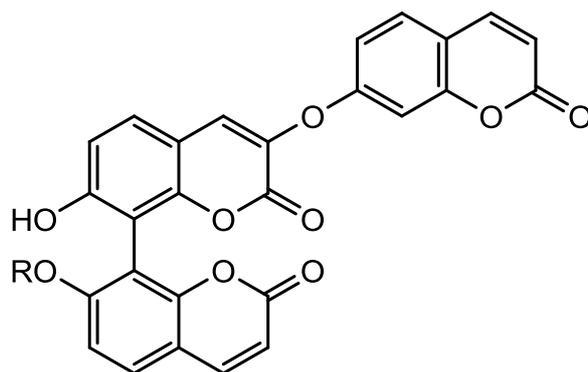
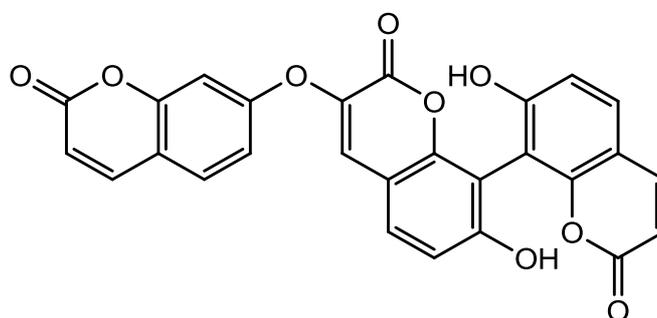


Edgeworoside C **II-45**

Figure II.7 : Structures chimiques de quelques bicoumarines

II-2-4-6- Coumarines à l'état trimérique (tricoumarines)

Ce sont des composés issus de l'union de trois unités coumariques, figure II.8.

Edgeworoside A **II-46**, (R=Rhamnosyle)Edgeworoside B **II-47**, (R=Glucosyle)Triumbellatine **II-48****Figure II.8** : Structures chimiques de quelques tricoumarines

II-2-5- Intérêt pharmacologique des coumarines

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone [24,16,19,25].

Les coumarines simples contribuent généralement à fluidifier le sang par leur activité veinotonique et vasculoprotecteur, c'est le cas de l'esculoside du marronnier d'Inde, ou le dicoumarol, un anticoagulant produit par le mélilot (*Melilotus officinalis*). L'intérêt des furanocoumarines a été signalé dans le cas du traitement des spasmes néphrétiques, de l'angine de poitrine. La capacité que possèdent diverses structures furanocoumariniques à provoquer une hyperpigmentation cutanée transitoire est bien connue. Ces propriétés photodynamisantes sont mises à profit dans le traitement des manifestations du vitiligo, du psoriasis et d'autres affections dermatologiques. Elles peuvent aussi être utiles dans les cures de bronzage (crèmes à base de psoralène, bergaptène). La visnadine, une pyranocoumarine, est douée de propriétés vasodilatatrices coronariennes et présentée comme ayant une action

favorable sur les troubles de la sénescence cérébrale. Le tableau II.3 rassemble quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines.

Tableau II.3 : Quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines

L'activité	Coumarines	Information	Références
anti-inflammatoire	Angelicine Athamantine Bergaptène Herniarine Impératorine Ledebouviellole Psoralène Scopoletine	Cette activité dépend de la nature des substituants des coumarines, Plus intéressant, les coumarines peuvent posséder des effets pro-inflammatoires : Le psoralène et impératorine à une faible dose possède une activité anti-inflammatoire, mais à une forte dose et un effet pro-inflammatoire.	[26]
Antimicrobienne	Angalicine Cichoriine Ciichoriine acétate Herniarine Umbelliprenine	ils sont montres que le groupe hydroxyle libre en position 6 des coumarines est très important pour l'activité antifongique, tandis que le même groupe libre en position 7 est important pour l'activité antibactérienne.	
Phototoxicité	Bergaptène Isopimpinelline Peucedanine Psoralène Umbélliférone Xanthotoxine	typiques sont des photosensibilisateurs dans la gamme de 320-380 nm, une gamme où les acides nucléiques et les protéines cellulaires montrent les bandes d'adsorption faible.	[27]
Cytotoxicité	Niffcoumarine Paepalantine Seseline 5-methoxy Seseline Suberosin Xanthyletine Xanthoxyletine	Cette activité est basée sur les Substituants ortho-dihydroxyles, en plus le groupe phényle peut avoir un rôle très important dans cette activité.	[16]

Inhibiteurs de HIV	(+)-Calanolide A	Quelques coumarines inhibent différents stages du cycle de réplication de HIV.	[25]
	(-)-Calanolide B		[28]
	Cordatolite A		[29]
	Cordatolite B		
	Coriandrine		
	Imperatorine Suksdorfine		

II-2-6- La toxicité des coumarines

Le jus de *l'Ammivisnaga* L. (Apiaceae), ainsi que les graines de *Psoralea* (Fabaceae), ont été utilisées par les égyptiens pour les manifestations du vitiligo [7]. Les constituants phototoxiques, communs à toutes ces espèces, sont des furanocoumarines linéaires : psoralène, bergaptène et xanthotoxine ; les furanocoumarines angulaires ne sont que faiblement phototoxiques (angélicine, pimpinelline). Il a été démontré que les furanocoumarines peuvent donner lieu à des cycloadditions sur les carbones (C₃, C₄) et/ou (C_{4'}, C_{5'}) avec les bases pyrimidiques de l'ADN. Ces cyclo additions peuvent être mono ou bifonctionnelles et, dans ce dernier cas, elles établissent des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques et induisent des liaisons du génome. Il est possible que ces propriétés aient un rapport avec la phototoxicité dont le mécanisme reste à élucider. Elles expliquent mieux les propriétés mutagènes et cancérogènes [7].

En 1941, le dicoumarol s'est avéré être le composé responsable de la morrhémorragique du bétail après la consommation du foin de Melilot blanc (*Melilotus alba*) de la famille Fabaceae [30].

II-3- Conclusion

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement.

A l'issue de cet inventaire des métabolites secondaires et principalement des composés phénoliques, il faut souligner la grande variété structurale des coumarines. Environ 1300 coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires dans des plantes vertes, mais aussi dans les champignons et les bactéries. Cette classe renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques.

Références bibliographiques

- [1] Ferrari J. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle : *Gnidia involucrata* Steud. A. Rich, Thèse de doctorat de l'université de Lausanne. 2002.
- [2] Epifano F, Genovese S, Menghini L, Curini M. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, Review, *Phytochemistry* 2007 ; 68 : 939- 953.
- [3] Hartman T. From waste products to ecochemicals, Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 2007 ; 68 : 2831-2846.
- [4] Cuendet M. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'indonésie, *fagraea blumel* (L loganiaceae) et de trois plantes d'altitude, *Bartsia alpina* (Scrophlariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula barbata* (Campanulaceae), Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'université de Lausanne. 1999 ; p, 24.
- [5] Vermerris W, Nicholson R. Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht, ISBN. 2006 ; 1001-4020-5163-8.
- [6] Hennebelle T. Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants, *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat chimie organique et macromoléculaire, Université des sciences et technologique de Lille, Lille 1, Ecole doctorale sciences de la matière du rayonnement et de l'environnement, France. 2006.
- [7] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales, 3^{ème} édition, Tec et Doc, Paris. 1999.
- [8] Macheix JJ, Fleuriet A, Jay Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques. 2005 ; 192-1.
- [9] Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Actabiologica szegedensis*. 2003 ; 1-4,125-119.
- [10] Mann J, Daridson RS, Hobbs JB, Banthorope DV, Harborne JB. Their chemistry and biological significance, Natural product 1^{ière} Edition. 1994.

- [11] Merghem R. *Eléments de biochimie végétale*, Edition bahaeddine. 2009 ; 107-133.
- [12] Moheb A, Ibrahim RK, Roy R, Sarhan F. Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry* 2011 ; 72 : 2294- 2307.
- [13] Martin S, Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann cardiologieol.* 2002 ; 51 : 304-315.
- [14] Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykknen H, Poutanen H. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism, *Int. J. Mol. Sci.* 2010 ; 11 : 1365-1402.
- [15] Alignan M. Thèse de doctorat, Phoma du tournesol, déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse. 2006.
- [16] Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *curr. Med. Chem.-Anticancer agents.* 2005 ; 5 : 29-46.
- [17] Steck W, Bailey KB. Leaf coumarins of *angelica archangelica*, *Can. J. Chem.* 1969 ; 47 : 2425-2430.
- [18] Mulier M, Byres M, Jaspars M, Kumarasamy Y, Middleton M, Nahar L, Shoeb M, Sarker SD. 2D NMR spectroscopic analyses of Archangelicin from the seeds of *Angelica archangelica*. *Acta Pharm.* 2004 ; 54 : 277-285.
- [19] Sarker SD, Nahar L, Rahman MN, Siakalima M, Kumarasamy Y. Bioactivity of Umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*, *Ars Pharm.* 2005 ; 46 : 35-41.
- [20] Shults EE, Petrova TN, Shakirov MM, Chernyak EI, Pokrovskiy LM, Nekhoroshev SA, Tolstikov GA. Coumarin compounds from roots of peucedanum (*Peucedanum morisonii* Bess.). *Chemistry for sustainable development.* 2003 ; 11 : 649-654.
- [21] Lièvre K. Thèse de doctorat, Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique, Strasbourg. 2004.
- [22] Hehn A. Thèse de doctorat, Métabolisme secondaire, les cytochromes P 450 s acteurs de l'adaptation des plantes à leur environnement, Strasbourg. 2007.
- [23] Harkati B. valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae, *Scorzonera undulata*, thèse de doctorat Université Mentouri Constantine. 2011.

- [24] Barnard DL, Xu ZQ, Stowell VD, Yuan H, Smee DF, Samy R, Sidwell RW, Nielsen MK, Sun L, Cao H, Li A, Quint C, Deignan J, Crabb J, Flavin MT. Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002 ; 13 : 39-59.
- [25] Kostova I, Raleva S, Genova P, Argirova R. Structure-Activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2006 ; 68274 : 1-9.
- [26] Rouxel T. Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie.* 1989 ; 9 : 529-545.
- [27] Crépy MN. Dermatoses professionnelles aux végétaux. *Méd Trav.* 2006 ; 105 : 77-90.
- [28] Spino C, Dodier M, Sotheeswara S. Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seedoil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998 ; 8 : 3474-3478.
- [29] Singh IP, Bharate BS, Bhutani KK. Anti-HIV natural products. *Curr. sci.* 2005 ; 89 : 269-290.
- [30] Booth NL, Dejan N, Richard B, Stacie E. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004 ; 76 : 511-516.

Chapitre III

*Etude phytochimique et
biologique*

III- Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

III-1- Etude bibliographique

Parmi les plantes du genre *Pituranthos* (Apiaceae), *P. battandieri* Maire ssp. *abbreviatus* Maire, est une plante endémique du Sahara algéro-marocain. Cette espèce n'a jamais fait l'objet d'étude phytochimique ni biologique.

III-2- Choix du matériel végétal

Le choix de cette espèce, repose sur quatre critères essentiels :

- L'endémisme, l'origine saharienne et la rareté de cette espèce qui nous ont poussés à explorer et à rechercher la nature de ses métabolites secondaires.
- Les résultats des études phytochimiques obtenus des autres espèces du même genre notamment la richesse en métabolites secondaires de types furanocoumarine, flavonoïde et saponine [1-16].
- Notre intérêt prononcé pour la famille des Apiaceae, famille connue pour sa richesse en huiles essentielles.
- Les activités biologiques attribuées aux plantes de cette famille notamment Antidiabétiques, antioxydantes, antifongiques, antimicrobiennes, antivirales, anti-HIV, antitumorales et cytotoxiques [17-21] ; nous ont encouragées à rechercher et à isoler les métabolites secondaires de cette espèce.

III-3- Place dans la systématique

D'après, Quézel et Santa, 1963, *Pituranthos battandieri* Maire ssp. *abbreviatus* Maire, synonyme : *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek. est classé comme suit :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Tracheophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Araliales
- Famille : Apiaceae
- Genre : *Pituranthos* (*Deverra*)
- Espèce : *Pituranthos battandieri*

Nom botanique : *Pituranthos battandieri* Maire

Synonyme : *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek

III-4- Description botanique

Plante à feuilles de la base persistantes, d'un vert glauque, à tiges plus courtes (10-40 cm) blanchâtres, La tige est généralement creuse. Les feuilles sont alternes, et ont souvent un aspect finement découpé en folioles, les fleurs à stigmate pourpre, les pétioles sont élargis à leur base en engainant souvent la tige [22].

III-5- Répartition géographique

Elle est commune au Sahara algérien, Sahara marocain et l'Oranie (Figure III.1).

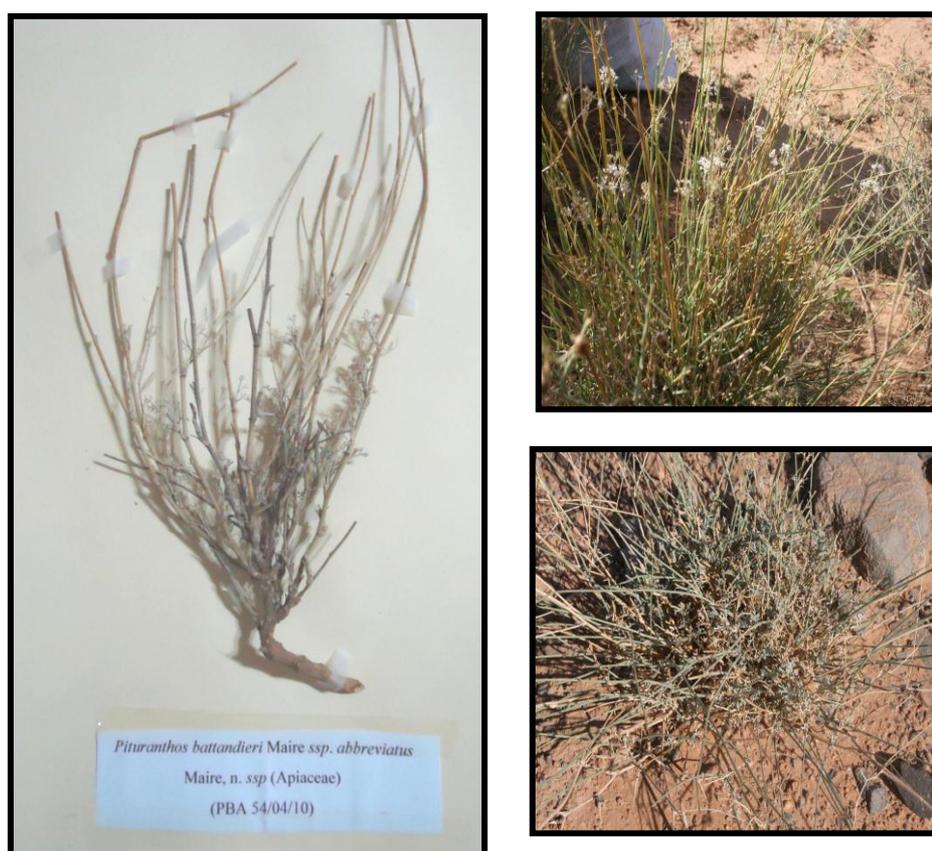


Figure III.1 : Photo de *Pituranthos battandieri* Maire *ssp. abbreviatus* Maire (Samir Benayache, avril 2010)

III-6- Matériels et méthodes utilisés pour l'étude phytochimique

➤ Solvants utilisés et réactifs

Le *n*-hexane, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme, le *n*-butanol, le méthanol, l'acétonitrile, l'acide sulfurique, l'anhydride acétique, l'acide acétique, l'acide chlorhydrique, le chlorure ferrique, l'ammoniaque, l'acide formique et l'eau sont de grade analytique.

➤ **Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)**

Les analyses des extraits, des fractions et des produits séparés, ont été faites sur plaques CCM avec le gel de silice 60 comme phase stationnaire, le type de plaques est GF₂₅₄ Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium.

➤ **Révélation**

Après élution par le système de solvants approprié, la révélation des plaques CCM analytiques est faite en premier lieu par un examen sous UV 254 et 365 nm, après délimitation des spots, la révélation est réalisée avec une solution à base d'anisaldéhyde préparée comme suit :

On mélange 0,5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxy benzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 85 ml de méthanol et on termine par 5 ml d'acide sulfurique concentré. La solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 04 °C pendant toute la durée d'utilisation. On pulvérise alors la plaque analytique puis on la chauffe à 100 °C pendant 3 à 5 minutes.

➤ **Chromatographie d'adsorption sur colonne (CC)**

Une colonne (1200×40 mm), le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0.063-0.200 mm (230-400 mesh), Merck HF₆₀.

➤ **Chromatographie sur plaques préparatives**

Les chromatographies sur plaques préparatives sont effectuées sur des plaques en verre (20×20 cm) pré-étalées avec du gel de silice Merck 60 F₂₅₄ de 0,3 ou 0,5 mm d'épaisseur.

➤ **HPLC-UV**

HPLC (Beckman). Colonne Nucleosil C18 HD, 100x5 mm, 23°C. Phase : H₂O + 0,1 % d'acide formique-ACN. Débit : 1 ml/min. Volume d'injection : 20 µl, pression = 5545 psi.

III-7- Etude phytochimique de *Pituranthos battandieri* Maire

III-7-1- Récolte du matériel végétal

La plante *Pituranthos battandieri* Maire, a été récoltée durant le mois d'avril 2010 de la région de Béchar (Sud algérien) et authentifié par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de la préservation de la nature, de Béchar. La détermination botanique a été effectuée sans équivoque et un voucher (PBA 54/04/10) a été conservé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine 1. Un pied entier comportant l'intégralité de la plante y

compris les racines a été placé dans du papier journal pour sécher et servir comme voucher. Les parties aériennes ont été débarrassées des contaminants végétaux, provenant d'autres espèces et des contaminants non végétaux (sable, cailloux, insectes) puis mises à sécher dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires en prenant le soin de les retourner régulièrement. Après séchage, elles ont été pulvérisées et pesés, le poids était de 3350 g.

III-7-2- Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet de détecter la présence ou l'absence des familles chimiques essentiellement telles que les composés phénoliques, les hétérosides notamment les saponosides, les composés azotés en particulier les alcaloïdes, les isoprénoïdes qui renferment les stéroïdes, et les composés terpéniques et triterpéniques. Il est basé sur :

- Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente.
- Des réactions de coloration et de précipitation.
- L'examen sous la lumière ultraviolette.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé le screening phytochimique des parties aériennes de l'espèce sélectionnée *Pituranthos battandieri* Maire. Il est connu que les plantes du genre *Pituranthos* contiennent des coumarines et en particulier des furanocoumarines [23]. Ces molécules sont considérées comme responsables de nombreuses activités biologiques observées chez les plantes du même genre à titre d'exemple, *Pituranthos triradiatus* [24].

Les résultats de l'ensemble de nos expérimentations de screening phytochimique sont résumés dans le tableau III.1. Dans ce tableau les signe (+) et (-) indiquent la présence et l'absence de la classe de substances naturelles recherchées.

Tableau III.1: Résultat du screening phytochimique sur les différents métabolites secondaires de *P. battandieri* Maire

Classe de substances naturelles recherchée	Interprétation
Alcaloïdes	–
Coumarines	+
Stérols	–
Triterpènes	+
Terpènes	–
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	–
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	–
Quinones	–
Saponines	+

Ces travaux de screening phytochimique ont montré que les parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire objet de notre étude accumulent les métabolites secondaires de type coumarine, triterpène, tanin catéchique, flavonoïde et saponine.

III-7-3- Extraction de la plante

➤ Pour les parties aériennes

Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri de la lumière du soleil, les parties aériennes de la plante sont broyées entièrement, puis pesées (M = 3350 g). Le matériel végétal a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau) dans les proportions (80/20 ; v/v) pendant 24 heures. Cette macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant. Les 4 extraits hydro-méthanoliques sont réunis puis concentrés à 1 litre environ sous pression réduite, à une température n'excédant pas 35°C. La solution ainsi obtenue est diluée sous agitation magnétique avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière sèche. Après un repos d'une nuit à 4°C et filtration, la solution subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois.

Les quatre phases organiques ainsi obtenues (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre

(Na₂SO₄), puis filtrées et concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Durant la concentration de la phase *n*-butanol, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons récupéré par filtration (2,5 g). Nous reportons ce composé sous le code N-1.

➤ **Pour les racines**

Les racines ont subi les mêmes étapes d'extraction que celles utilisées pour les parties aériennes reportées précédemment.

Calcul du rendement

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal sec utilisé pour l'extraction en gramme. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{M_0}{M_1} \times 100$$

M₀ : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé

M₁ : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Masses et rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Les parties aériennes de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire (3350 g)	éther de pétrole	0,9	0,03 %
	chloroforme	17,5	0,52 %
	acétate d'éthyle	10,11	0,30 %
	<i>n</i> -butanol	71,21	2,13 %
Les racines de la plante <i>Pituranthos battandieri</i> Maire (500 g)	éther de pétrole	2,83	0,57 %
	chloroforme	4,27	0,85 %
	acétate d'éthyle	2,9	0,58 %
	<i>n</i> -butanol	12	3 %

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme (Figure III.2) montrant les différentes étapes du processus d'extraction.

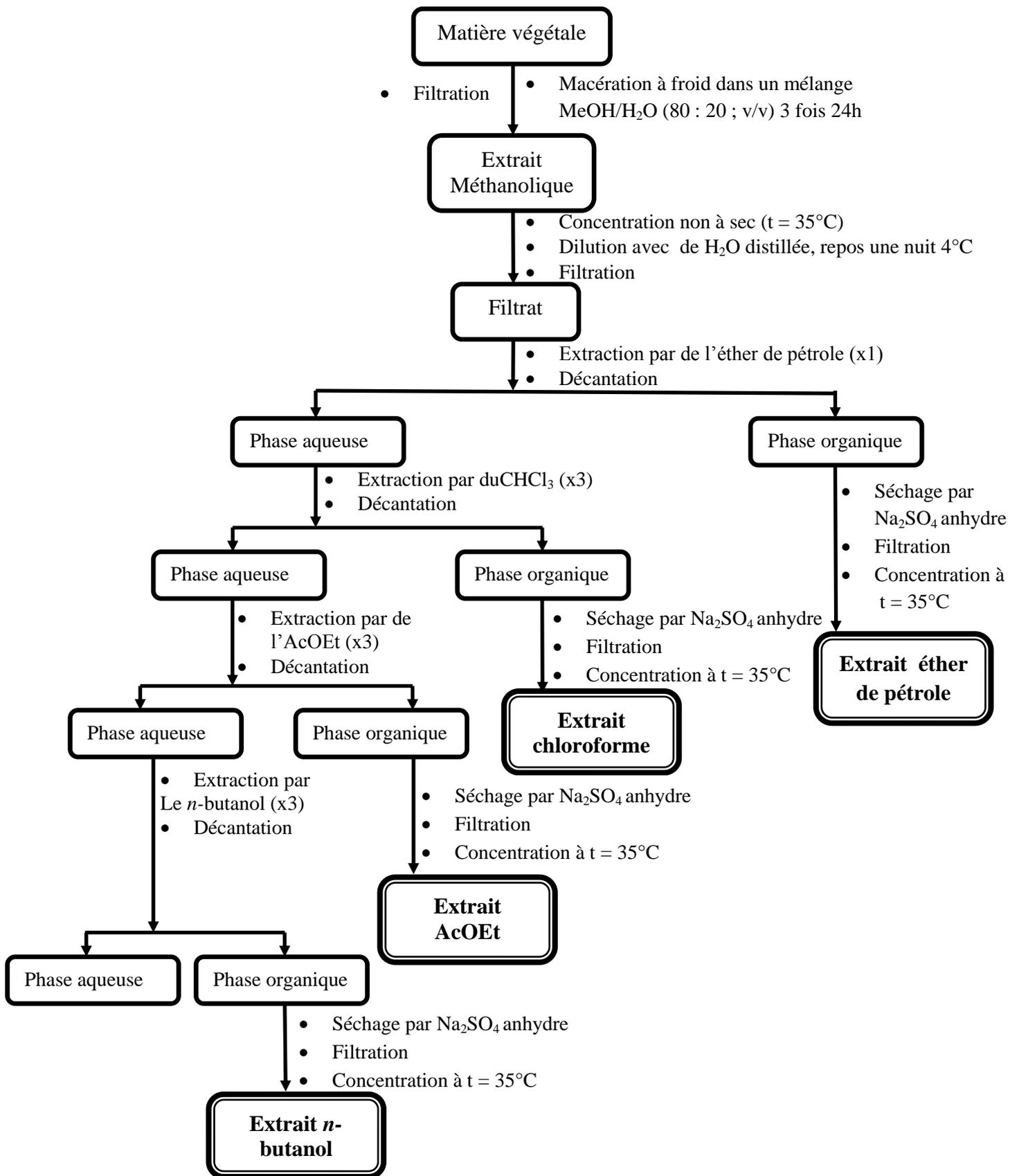


Figure III.2 : protocole d'extraction de *Pituranthos battandieri* Maire

III-7-4- Criblage chimique général et analyses LC-UV

Le criblage chimique sur plaques analytiques a permis de mettre en évidence la présence de coumarines (vertes sous la lumière UV 365 nm) et de flavonoïdes (colorées à 365 nm) dans tous les extraits bruts moyennement polaires étudiés. Dans les extraits bruts polaires, de nombreux glycosides de flavonoïdes ont été détectés.

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur la nature des principaux constituants de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire par le screening phytochimique, les différents extraits des parties aériennes et des racines de cette plante ont été analysés par CLHP couplée à un détecteur UV.

Pour les analyses CL/UV, les échantillons ont été solubilisés à raison de 10 mg/ml dans un solvant approprié : l'acétonitrile additionné de tétrahydrofurane (THF) pour les extraits apolaires (extraits CHCl₃ des parties aériennes et des racines) et le méthanol pour les extraits polaires (extraits AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes et des racines). Après centrifugation et décantation, pour éliminer les particules en suspension, les solutions obtenues sont injectées dans un système CLHP.

Les résultats des analyses CL-UV de ces extraits sont présentés dans les figures III.3, III.4, III.5, III.6, III.7 et III.8.

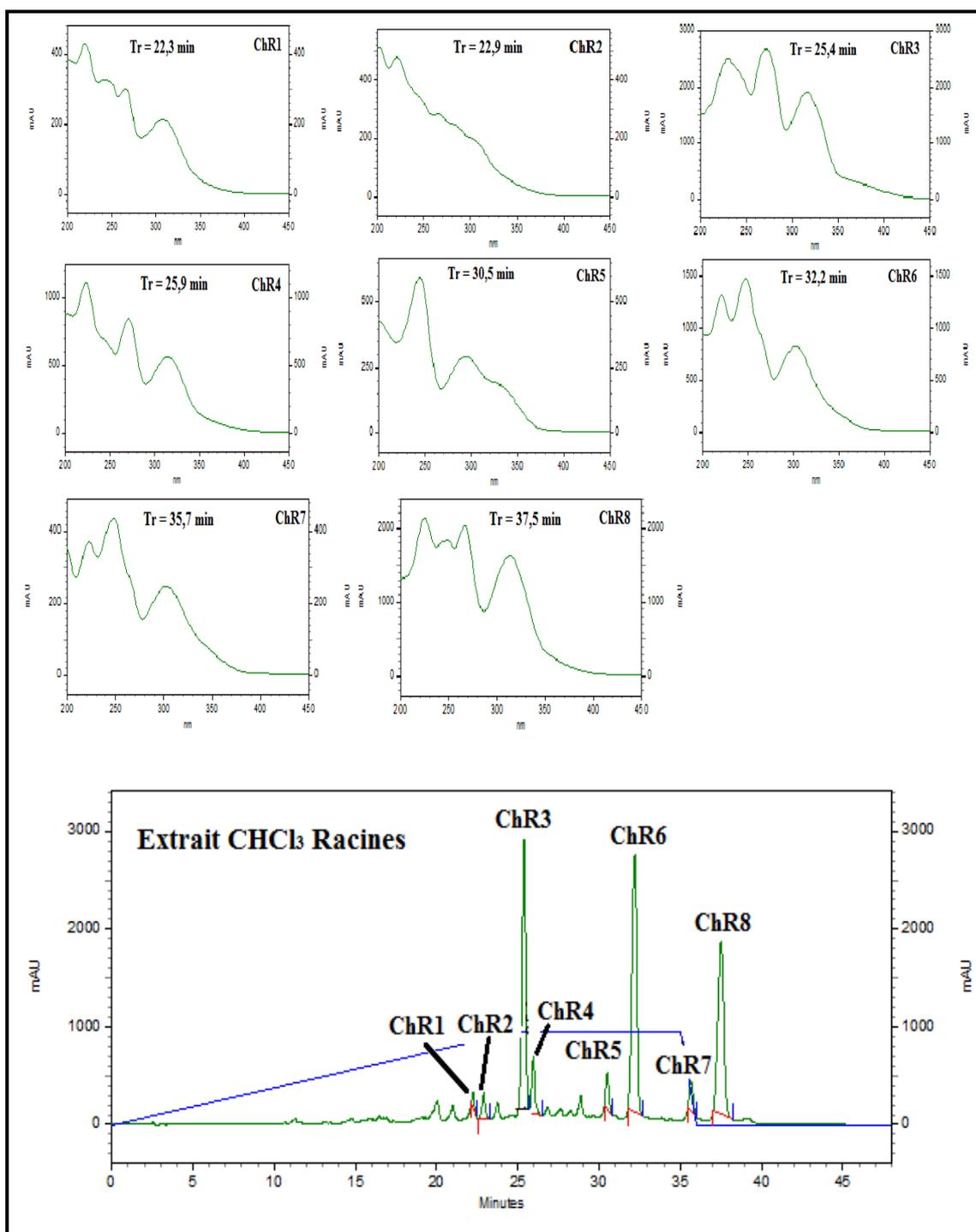


Figure III.3 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait chloroforme des racines de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants ChR1 à ChR8. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm x 5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10% ACN) (0-25-35-36-48 min). Débit 1 ml.min⁻¹

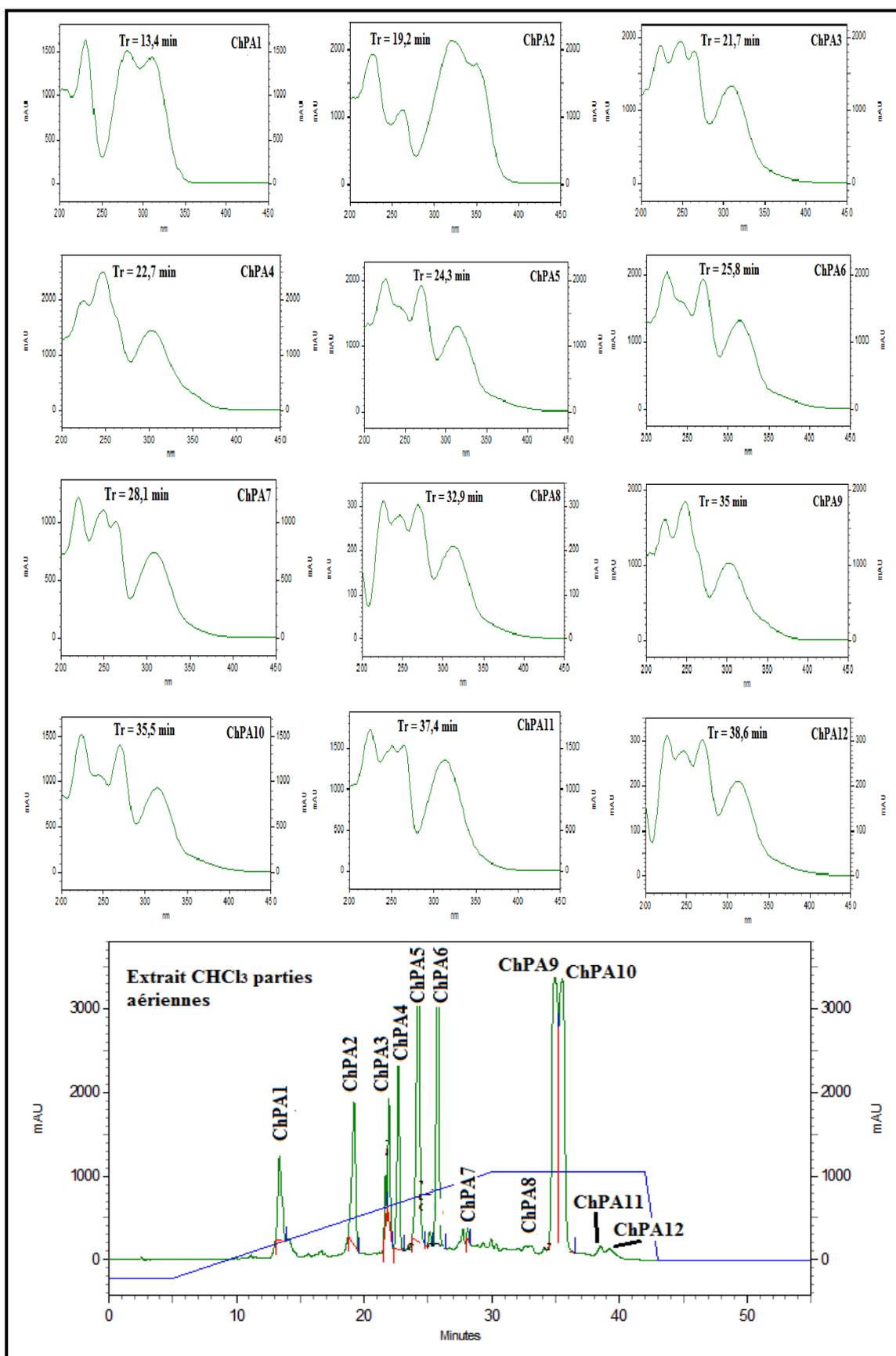


Figure III.4 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait chloroforme des parties aériennes de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants ChPA1

à ChPA12. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm x 5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10 % ACN) (0-5-30-42-43-55 min). Débit 1 ml.min⁻¹

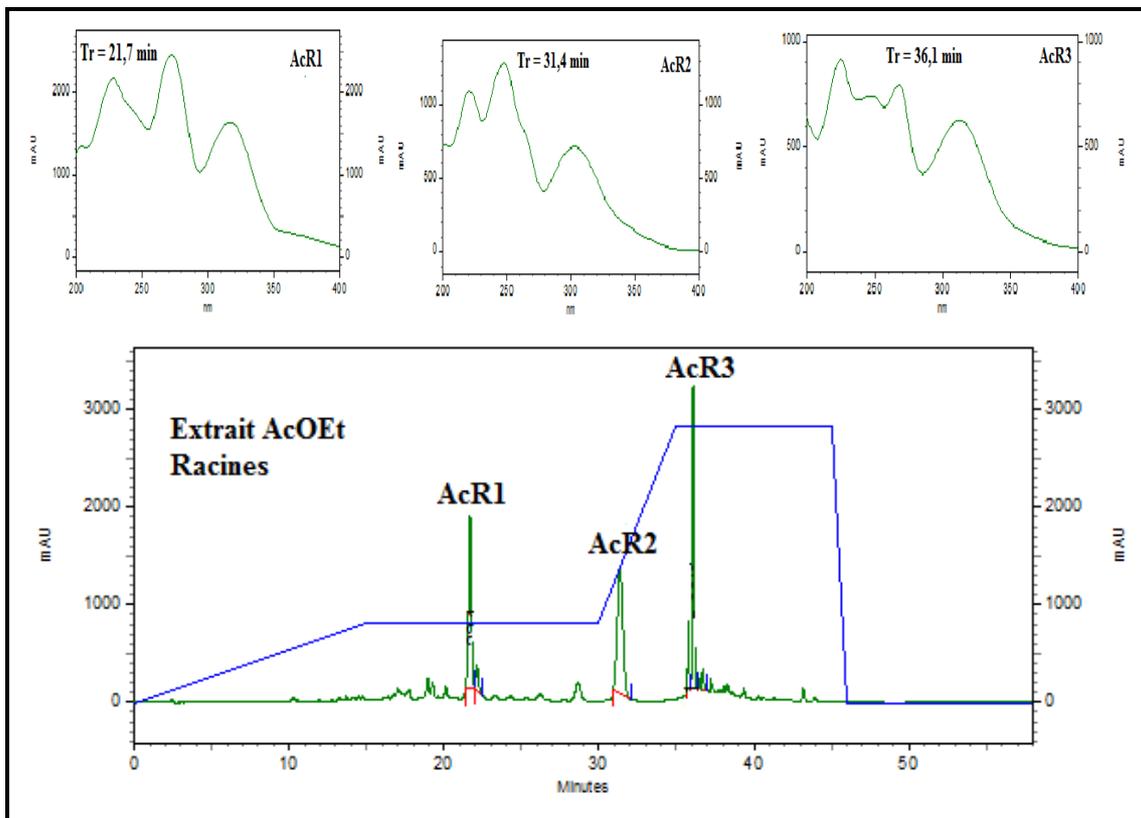


Figure III.5 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait acétate d'éthyle des racines de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants AcR1 à AcR3. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm x 5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (10-30-30-80-80-10% ACN) (0-15-30-35-46-58 min). Débit 1 ml.min⁻¹

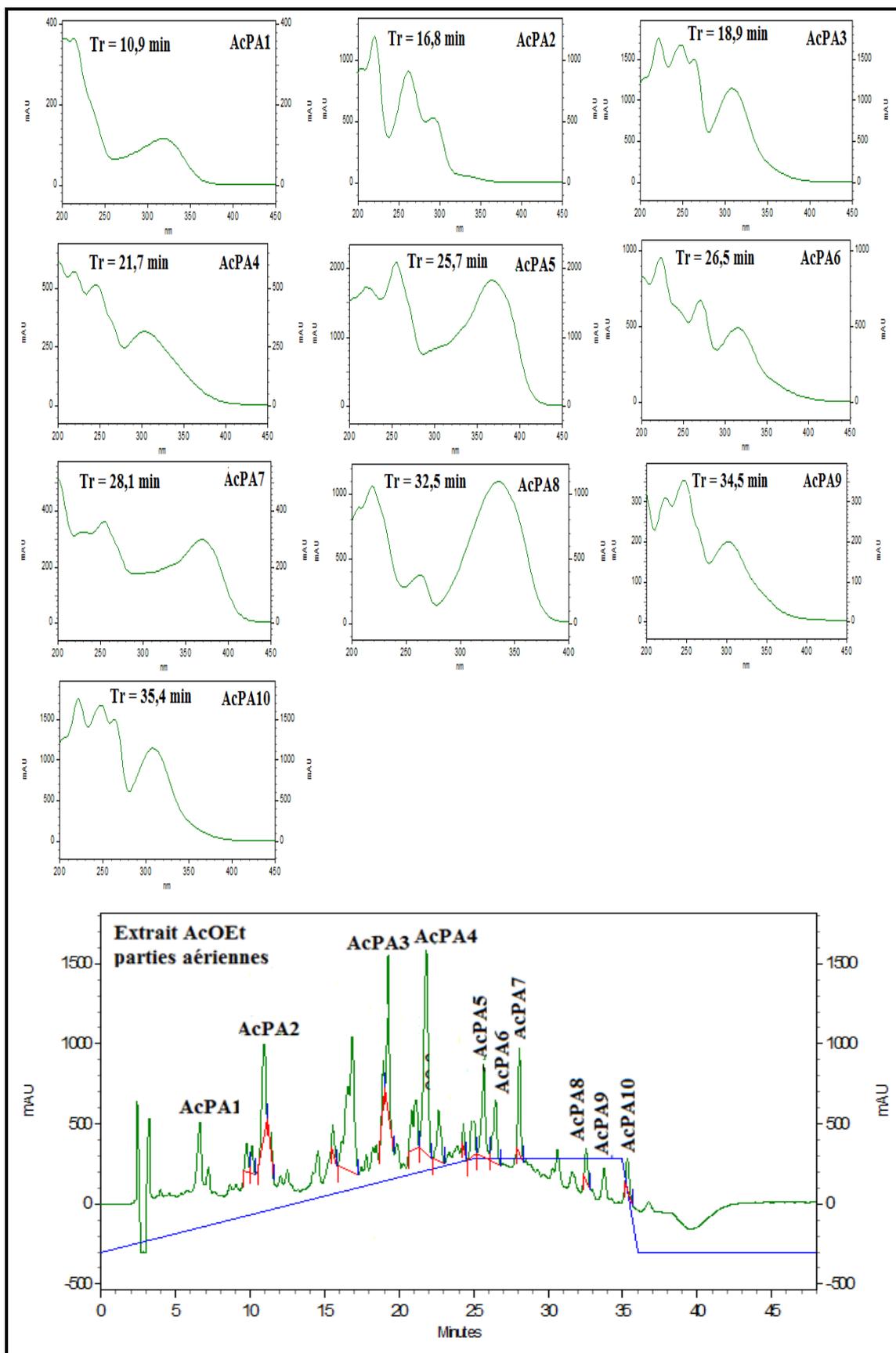


Figure III.6 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants

AcPA1 à AcPA10. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm/5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10% ACN) (0-25-35-36-48 min). Débit 1 ml.min⁻¹

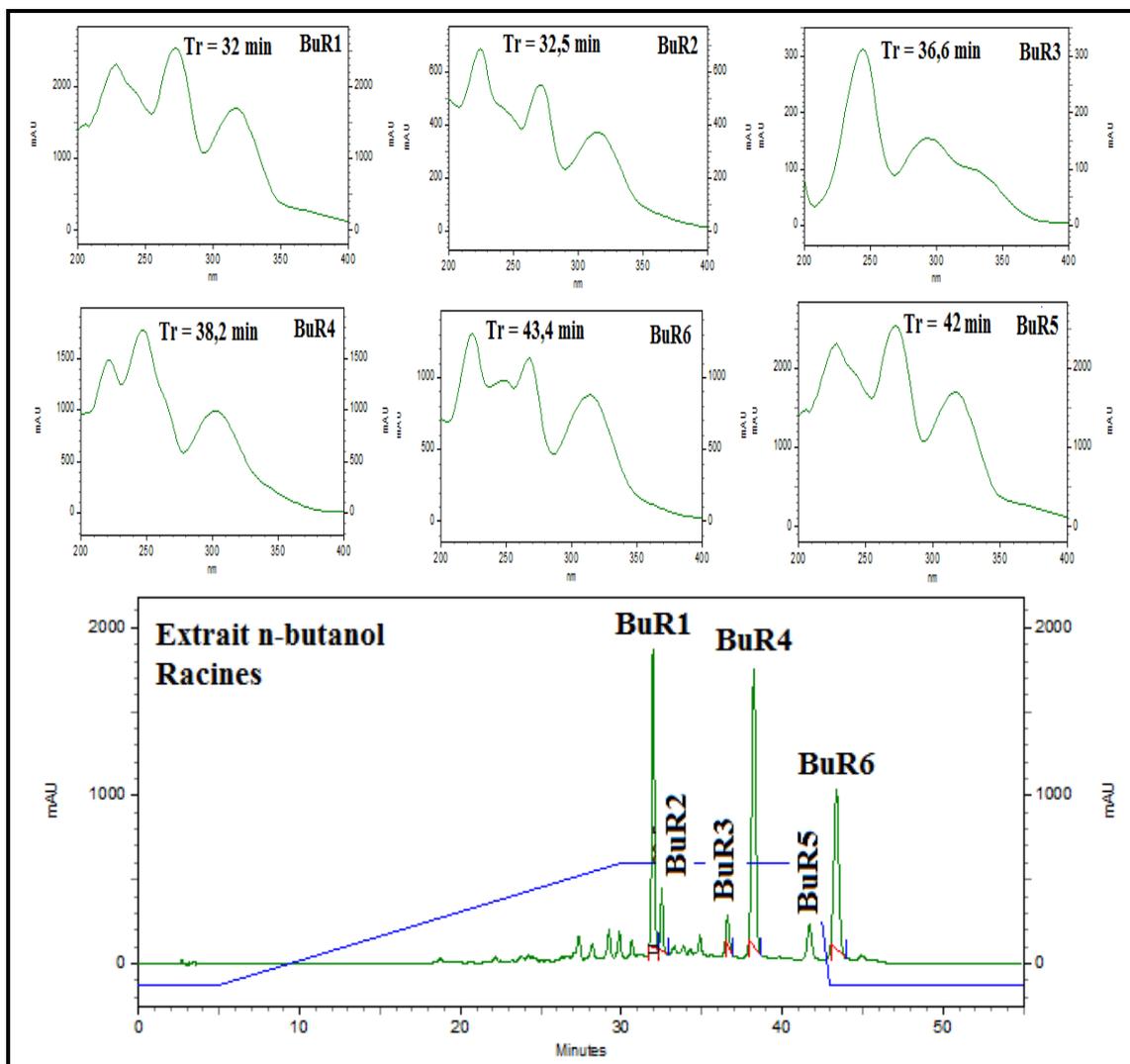


Figure III.7 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait *n*-butanol des racines de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants BuR1 à BuR6. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm/5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (5-35-35-5-5% ACN) (0-5-30-42-43-55 min). Débit 1 ml.min⁻¹

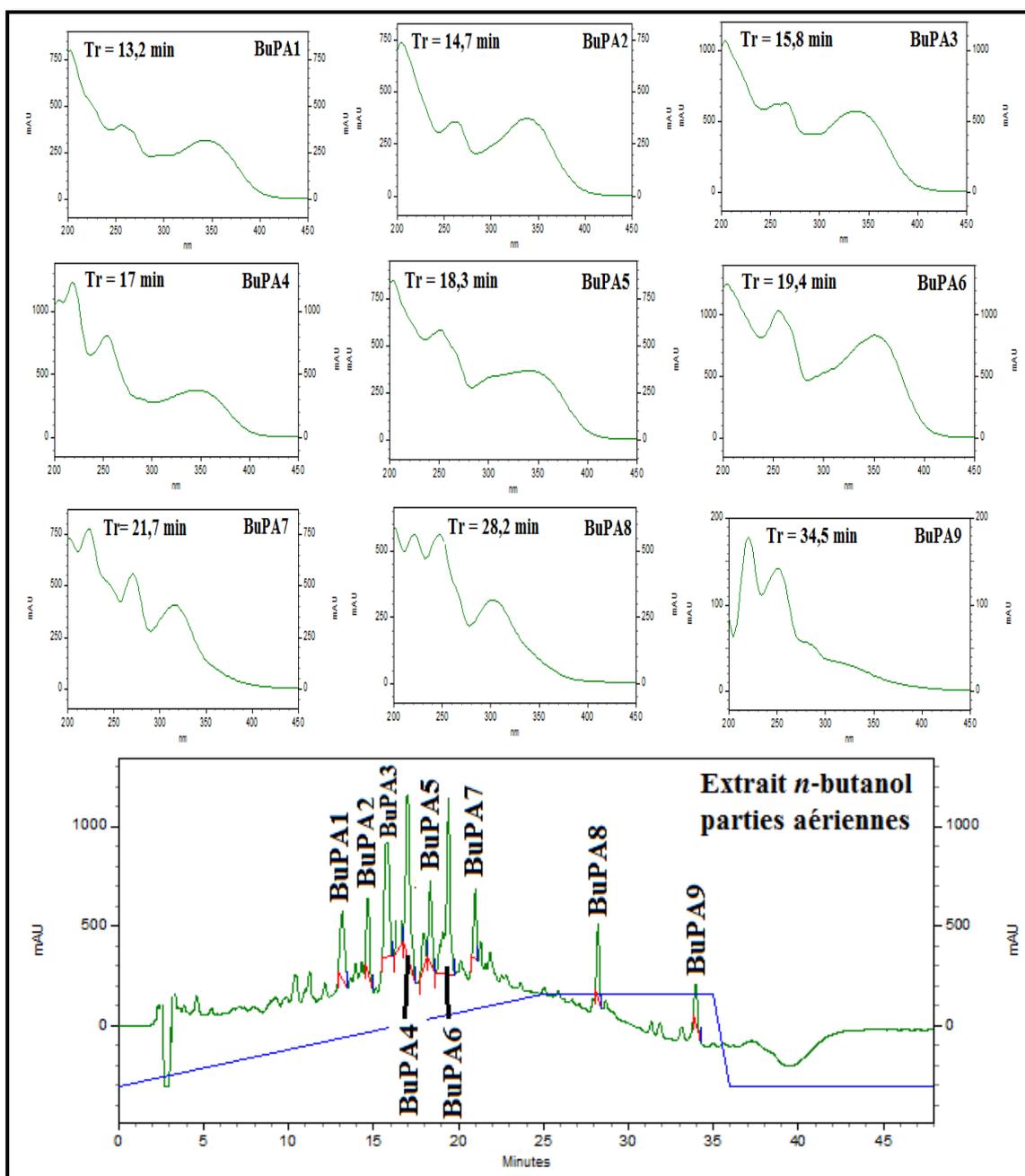


Figure III.8 : Profil chromatographique CLHP-UV à 280 nm de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *P. battandieri* Maire et spectres UV des constituants BuPA1 à BuPA9. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm/5 mm). Phase : H₂O milliQ et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10% ACN) (0-25-35-36-48 min). Débit 1 ml.min⁻¹

Comme on peut le voir sur ces figures, de nombreux composés présentent des spectres caractéristiques de flavonoïdes, et de coumarines.

Les chromatogrammes des différents extraits de la plante étudiée présentent quelques pics chromatographiques paraissant être identiques vu l'allure de leurs spectres UV.

La comparaison des pics majoritaires présents dans les extraits des parties aériennes par rapport à ceux des extraits des racines montre que ces pics sont présents dans ce dernier mais en quantité moindre.

Les profils CLHP-UV des extraits des parties aériennes de la plante étudiée indiquent des compositions légèrement différentes par rapport aux extraits des racines.

En ce qui concerne la phase CHCl_3 , nous constatons en premier lieu qu'elle est plus riche en composés coumariniques que les phases AcOEt et *n*-BuOH. Un pic majoritaire observé dans l'extrait CHCl_3 présentant un $\text{Tr} = 21,7$ min, est retrouvé également dans les phases AcOEt et *n*-BuOH et leurs spectres UV sont identiques. Un autre pic UV observé dans l'extrait AcOEt présentant un $\text{Tr} = 34,5$ min, est retrouvé également dans la phase *n*-BuOH et leurs spectres UV sont également identiques.

Le choix de l'échantillon à étudier dans le cadre de ce travail a donc été guidé par l'apparence du tracé LC-UV qui montre le nombre et la quantité des produits phénoliques existants. Tous ces critères réunis nous ont amenés à choisir les extraits CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de l'espèce sélectionnée (*P. battandieri*). Nous rappelons que cette espèce n'a jamais été étudiée jusqu'ici.

III-7-5- Séparation chromatographique

A) Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme des parties aériennes

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant hexane/acétate d'éthyle (7:3).

➤ Séparation sur colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduits à utiliser comme système d'élution hexane/acétate d'éthyle/acétone en gradient de polarité. Une masse d'environ 15 g d'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'hexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système hexane/acétate d'éthyle/acétone en commençant par le mélange hexane/acétate d'éthyle (95:5) et en terminant par de l'acétone pur

avec un fractionnement tous les 25 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *P. battandieri* Maire

LOT DE FRACTIONS	N° DE LA FRACTION	SYSTÈME D'ÉLUTION			
		%Hexane	%AcOEt	%Acetone	Poids de la fraction (mg)
1-45	CF1	95	5	0	4
46-97	CF2	90	10	0	120,7
98-116	CF3	88	12	0	150,4
117-128	CF4	88	12	0	50,7
129-135	CF5	88	12	0	21,4
136-152	CF6	85	15	0	87,7
153-156	CF7	85	15	0	86,8
157-168	CF8	85	15	0	160,3
169-227	CF9	80	20	0	276,8
228-233	CF10	78	22	0	7,9
234-256	CF11	78	22	0	75,1
257-312	CF12	75	25	0	73,3
313-346	CF13	70	30	0	280,8
347-397	CF14	67	33	0	270,6
398-426	CF15	64	36	0	223,3
427-455	CF16	60	40	0	312,7
456-476	CF17	55	45	0	346,9
477-486	CF18	50	50	0	1478,3
487-516	CF19	50	50	0	657,5
517-530	CF20	45	55	0	765,6
531-542	CF21	40	60	0	657,8
543-558	CF22	30	70	0	564,3
559-589	CF23	25	75	0	752,1
590-603	CF24	20	80	0	184,5
604-613	CF25	15	85	0	542,8
614-661	CF26	10	90	0	343,8
662-681	CF27	5	95	0	596,2
682-687	CF28	0	95	5	243,9
688-697	CF29	0	50	50	345,1
698-710	CF30	0	0	100	456,2
711-740	CF31	0	0	100	265,3

Parmi les 31 fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des fractions CF3, CF9, CF11, CF13, CF18, CF20, CF24 et CF25 à cause soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important.

Pour les fractions CF11, CF13 et CF24 la séparation a été effectuée sur couche mince quant aux fractions CF9 et CF18, nous avons procédé à une autre séparation sur colonne suivie de purification sur couche mince, alors que les fractions CF3, CF20 et CF25 contiennent un précipité.

➤ Séparation sur couche mince

• Etude de la fraction CF3

Montrant un spot unique après élution sur une plaque analytique de gel de silice normale, la fraction CF3 (150,4 mg) recristallisée dans du MeOH a mené à l'obtention du composé **FB-CE-F3** sous forme de cristaux blancs (27 mg). Nous reportons ce composé sous le code **C1**.

• Etude de la fraction CF9

La fraction CF9 de masse 276,8 mg a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) éluée par le système hexane/AcOEt (7:3) en mode isocratique pour donner quinze fractions. La onzième fraction (50 mg), moins complexe et plus abondante que les autres, a été chromatographiée sur plaques de gel de silice normale HF₂₅₄ éluées par le système CHCl₃ à 100%. Après deux éluions, cinq bandes ont été obtenues. Eluée et purifiée sur plaque de gel de silice par le même système, cette étude a permis l'obtention de cinq produits purs. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultat de séparation de la fraction CF9

Sous fraction	Remarques
CF9-11-1	(4 mg), produit pur de fluorescence jaune sous 365 nm
CF9-11-2	(5 mg), produit pur de fluorescence orange sous 365 nm
CF9-11-3	(8 mg), produit pur de fluorescence noire sous 365 nm
CF9-11-4	(0,8 mg), produit pur
F9-11-5	(1,2 mg), produit pur

Nous reportons ces composés **CF9-11-1**, **CF9-11-2** et **CF9-11-3** sous les codes **C2**, **C3** et **C4** respectivement.

- **Etude de la fraction CF11**

La fraction CF11 (75,1 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système chloroforme/acétone (19:1), pour donner le produit **FB-CE-F11-1** (30,8 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **C5**.

- **Etude de la fraction CF13**

Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice, la fraction CF13 (280,8 mg) a subit une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ avec Le système chloroforme/acétone (19:1), pour donner quatre bandes avec une intensité plus marquée pour la première bande. La purification de cette bande dans le même système a permis l'obtention du produit **FB-CE-F13-1** (7 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **C6**.

- **Etude de la fraction CF18**

C'est la fraction la plus importante du point de vue masse (1,5 g), c'est la raison pour laquelle nous avons procédé directement à une deuxième séparation sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) avec le système éluant hexane/AcOEt en gradient de polarité. Le tableau III.5 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Tableau III.5 : Résultat de la séparation de la fraction CF18

Lot	Nom de la fraction	Système éluant		Observations
		% Hexane	% AcOEt	
1-2	CF18-1	100	0	Mélange de produits en très faible quantité
3-10	CF18-2	97	3	
11-17	CF18-3	95	5	Mélange de deux produits (non traité car en quantité faible)
18-25	CF18-4	90	10	Mélange séparable (non traité car en quantité faible)
26-33	CF18-5	87	13	
34-51	CF18-6	85	15	Mélange séparable
52-58	CF18-7	85	15	Mélange complexe
59-65	CF18-8			
66-71	CF18-9			
71-86	CF18-10			
87-96	CF18-11	82	18	
97-107	CF18-12			
108-117	CF18-13			
118-124	CF18-14	82	18	Mélange séparable
125-144	CF18-15	80	20	Mélange séparable
145-158	CF18-16	78	22	Mélange complexe
159-167	CF18-17	70	30	
168-180	CF18-18	60	40	
181-203	CF18-19			
204-209	CF18-20	60	40	
210-219	CF18-21	50	50	Mélange séparable
220-228	CF18-22	45	55	
229-237	CF18-23	40	60	
238-241	CF18-24	30	70	
242-252	CF18-25	20	80	Mélange complexe
253-260	CF18-26	10	90	
261-280	CF18-27	0	100	

- **Etude de la sous fraction CF18-6**

Cette sous fraction (62 mg) a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système CHCl₃/acétone (9,8:0,2) pour donner le composé **FB-CE-F6-1** (8 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **C7**.

- **Etude de la sous fraction CF18-14**

Cette sous fraction a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice normale en utilisant comme système éluant : CHCl₃/acétone (9:1). Cette étude a mené à 3 sous sous-fractions. Vu les quantités faibles obtenues, nous n'avons pu nous

intéresser qu'à la purification de la sous sous-fraction **CF18-14-3**. Cette sous fraction, testée sur plaque analytique de gel de silice 60 révélée par de l'acide sulfurique a montré deux taches dont une très minoritaire. Ainsi, cette sous fraction jugée intéressante a subi une purification par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice normale éluées par le même système. Pour donner le produit **CF18-14-3** (8 mg) sous forme des cristaux blancs.

-Après analyse le **CF18-14-3** produit pur était identique au produit **FB-CE-F11-1** et que nous avons codé **C5**.

- **Etude de la sous fraction CF18-21**

La séparation a été faite sur plaques préparatives de gel de silice avec le système d'éluant CHCl_3 /acétone (9:1) pour donner quatre produits purs : **CF18-21-1** (6 mg), **CF18-21-2** (9 mg), **CF18-21-4** (11 mg) et **CF18-21-5** (8 mg).

- Après analyse le **CF18-21-1** était identique au composé **FB-CE-F6-1** que nous avons codé **C7**.

Nous reportons les produits **CF18-21-2**, **CF18-21-4** et **CF18-21-5** sous les codes **C8**, **C9** et **C10** respectivement.

- **Etude de la sous fraction CF18-22**

La purification a été faite sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant CHCl_3 /acétone (9:1) pour donner le produit pur : **CF18-22-2** (13 mg).

- Après analyse ce composé **CF18-22-2** était identique aux composés **CF18-14-3** et **FB-CE-F11-1** que nous avons reporté sous le code **C5**.

- **Etude de la sous fraction CF18-24 \equiv CF18-23+CF18-24**

Les sous fractions **CF18-23** et **CF18-24** étaient assez similaires, nous les avons rassemblées. L'ensemble de ces deux sous fractions (32 mg) a donné un produit majoritaire par une simple recristallisation avec du méthanol, c'est le produit **CF18-24-2** (10 mg) que nous notons **C11**.

- **Etude de la fraction CF20**

La recristallisation de la fraction **CF20** (766 mg) dans un mélange $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, a permis d'isoler un produit sous forme de cristaux (aiguilles jaunes). Après plusieurs lavages avec le MeOH , la masse du produit pur **FB-CE-F20** obtenu

est de 536,5 mg, sa coloration sur plaque CCM après révélation par l'anisaldéhyde est verte.

Après analyse des fractions **CF19**, **CF20**, **CF21** et **CF22**, le produit **FB-CE-F20** s'est révélé majoritaire, nous reportons ce composé sous le code **C12**.

- **Etude de la fraction CF24**

Après analyse sur plaque analytique, environ 184,5 mg de la fraction **CF24** sont déposés sur des plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système chloroforme/acétone (9:1), pour donner cinq bandes. La purification de la troisième bande dans le même système après trois migrations, a permis l'obtention du produit **FB-CE-F24-3** (7 mg) à l'état pur, que nous notons **C13**.

- **Etude de la fraction CF25**

Cette fraction de masse 542,8 mg, contient un produit majoritaire qui a précipité dans le mélange (CHCl₃/MeOH). Ce précipité filtré, lavé au méthanol et en suite dissout dans la pyridine puis soumis à une analyse par CCM sur une plaque analytique de gel de silice, élué avec le système CHCl₃/AcOEt/MeOH (6:2:1), donne un spot unique de fluorescence noire sous la lampe UV 365 nm ; ce qui indique la présence d'un produit unique et mène alors au composé **FB-CE-F25** que nous reportons sous le code **C14** (158 mg).

- **Etude des fractions CF26, CF27 et CF28**

Après analyse de ces trois fractions **CF26**, **CF27** et **CF28** le produit **C14** s'est révélé majoritaire dans ces trois fractions.

En résumé, la séparation et la purification des fractions issues du fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice normale de l'extrait chloroforme des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a permis la séparation et la purification de **quatorze produits (C1 à C14)**.

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des fractions de la phase chloroforme de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire est représenté dans la figure III.9.

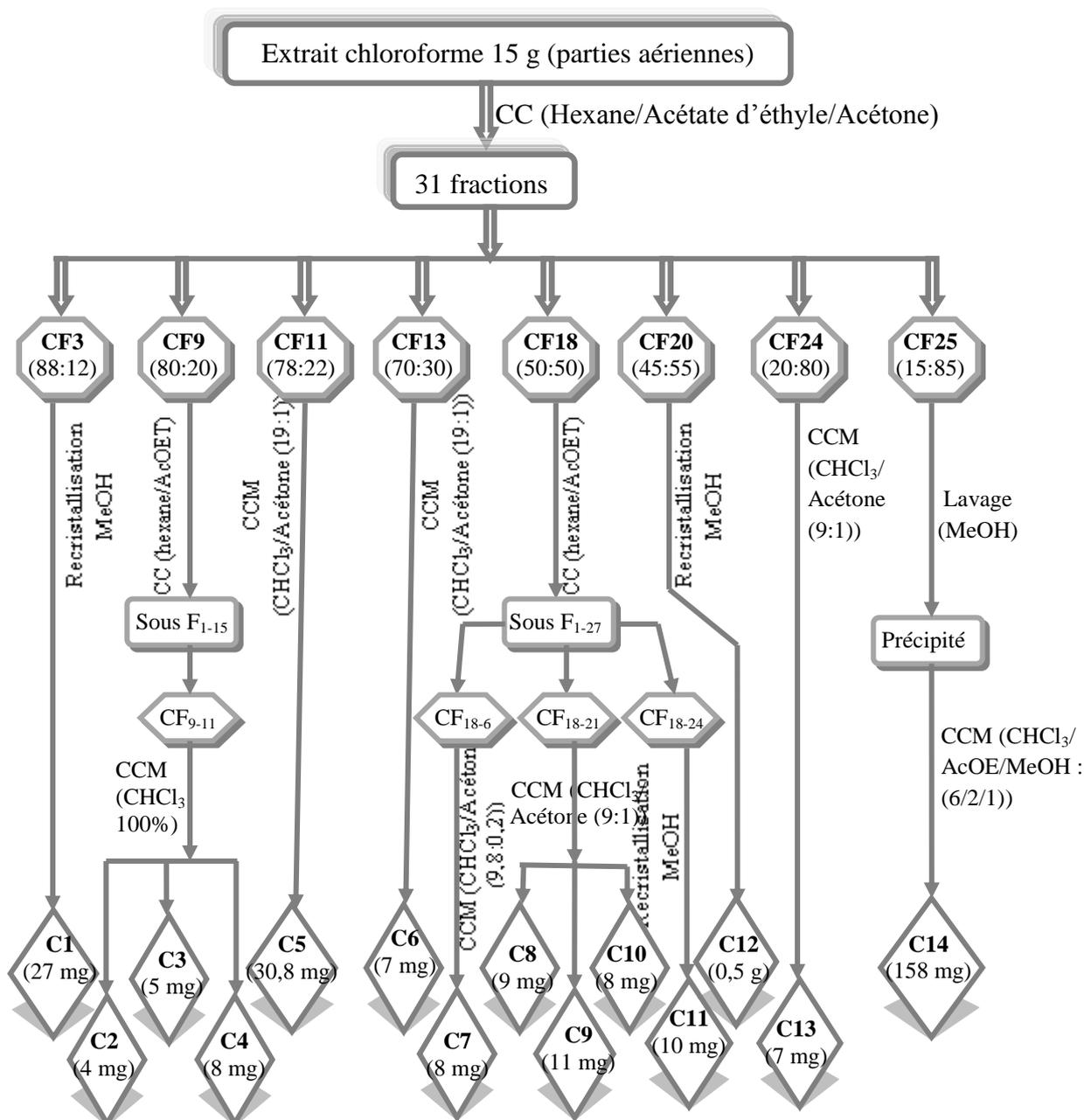


Figure III.9 : Schéma de purification des fractions de l'extrait chloroforme des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

Après séparation et purification, les constituants C1 à C14 de la partie soluble dans le chloroforme de l'extrait hydro-méthanolique des parties aériennes de *P. battandieri* ont été localisés sur le chromatogramme CLHP correspondants en les réinjectant un à un dans les mêmes conditions que pour l'extrait. Ce travail nous a permis d'avoir une idée sur la structure de ces constituants grâce à leurs spectres UV obtenus lors de l'analyse par LC-UV. En effet, l'enregistrement des spectres UV de quelques pics du chromatogramme notamment les pics : C10 (tr = 19,2 min), C5 (tr = 21,7 min), C9 (tr = 22,7 min), C3 (tr = 24,3 min), C12 (tr = 25,8 min), C6 (tr = 28,1

min), C8 (tr = 32,9 min), C11 (tr = 35 min), C7 (tr = 35,5 min), C2 (tr = 37,4 min) et C13 (tr = 38,6 min) montrent que tous ces produits sont du type coumarinique. Le chromatogramme et les spectres UV comportant ces données sont reportés dans les figures III.10 et III.11.

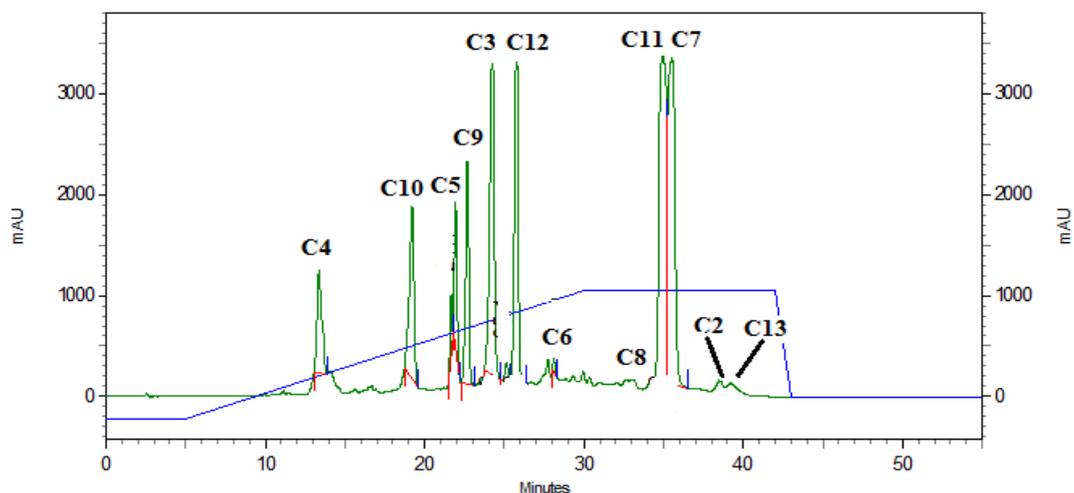


Figure III.10 : Chromatogramme LC-UV à 280 nm de l'extrait CHCl₃ des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* [Conditions chromatographiques : Système d'élution, acétonitrile/eau, gradient : (10-35-35-10-10% ACN) (0-5-30-42-43-55 min)] comportant la localisation des composés isolés et identifiés dans cette étude

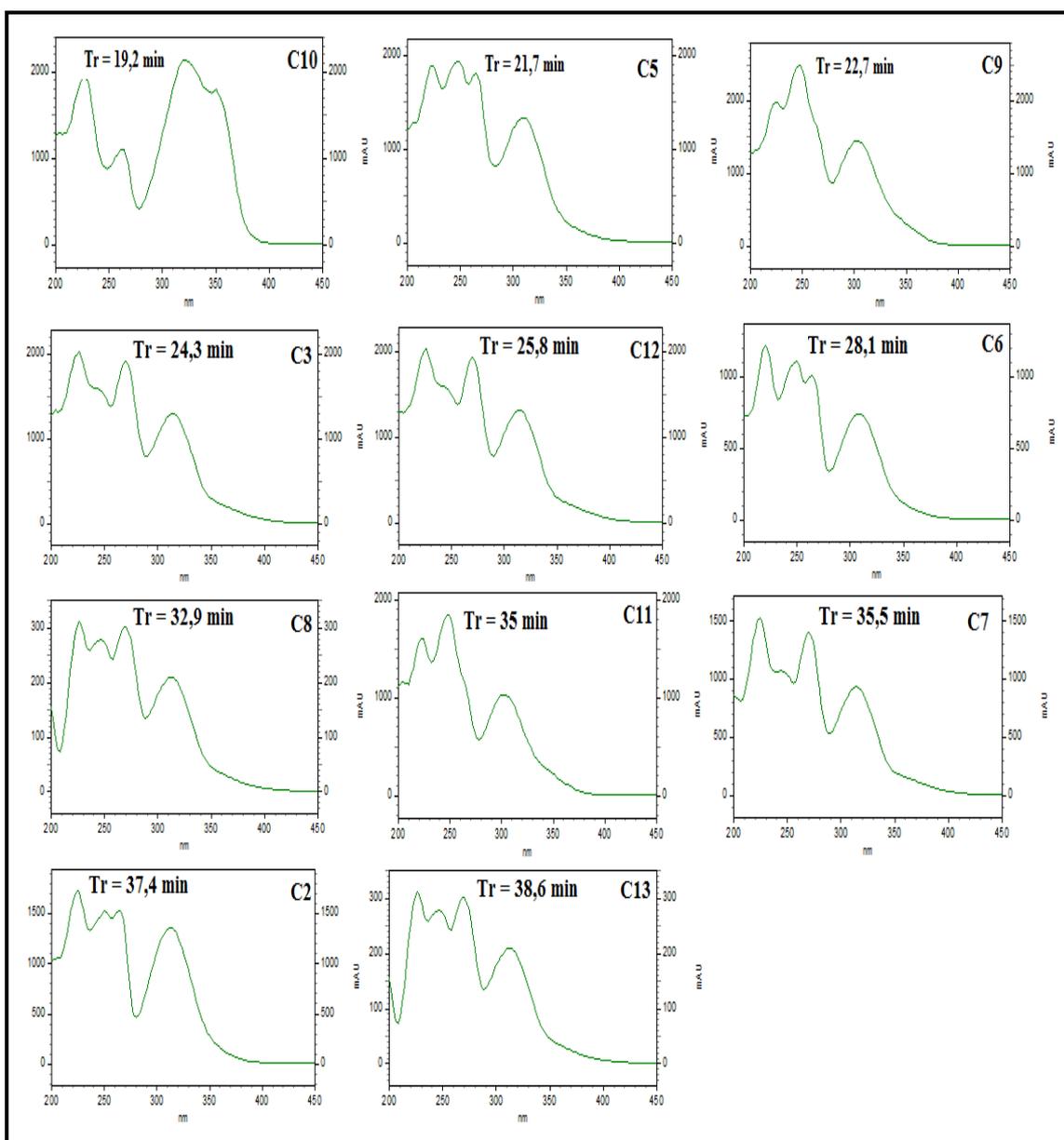


Figure III.11 : Spectres UV de quelques pics du chromatogramme de l'extract CHCl_3 des parties aériennes de *P. battandieri* Maire et leur attribution aux constituants isolés de cet extract

B) Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant chloroforme/acétone dans les proportions (8:2).

➤ Séparation sur colonne

Environ 10g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissous dans du méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 300g de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans du chloroforme. L'élution débute avec la même polarité (CHCl_3) puis elle sera augmentée par addition d'acétone. Des fractions de 25 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées à l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C, pendant quelques minutes. Les pots présentant la même composition sont réunis donnant ainsi 43 fractions. Les résultats de l'opération sont regroupés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *P. battandieri* Maire

LOT DE FRACTIONS	N° DE LA FRACTION	SYSTÈME D'ÉLUTION		
		% CHCl ₃	% Acétone	Poids de la fraction (mg)
1-10	AF1	100	0	96,4
11-18	AF2	100	0	19,6
19-24	AF3	98	2	16,4
25-27	AF4	98	2	100,1
28-29	AF5	98	2	109,9
30-31	AF6	98	2	26,3
32-35	AF7	98	2	32,6
36-39	AF8	98	2	39,1
40-44	AF9	95	5	98,8
45-46	AF10	95	5	56,6
47-53	AF11	93	7	173
54-58	AF12	93	7	98,5
59-61	AF13	93	7	124,1
62-67	AF14	90	10	148,1
68-69	AF15	90	10	53,1
70-75	AF16	90	10	168,7
76-79	AF17	88	12	89,9
80-83	AF18	88	12	71,1
84-89	AF19	88	12	115,5
90-93	AF20	88	12	55,5
94-101	AF21	85	15	118
102-107	AF22	85	15	89,4
108-117	AF23	83	17	153,6
118-125	AF24	80	20	98,3
126-133	AF25	80	20	105,7
134-139	AF26	77	23	65,2
140-149	AF27	77	23	196,2
150-157	AF28	75	25	143,9
158-169	AF29	70	30	145,1
170-193	AF30	68	32	256,2
194-209	AF31	65	35	365,3
210-221	AF32	60	40	125,6
222-235	AF33	55	45	257,9
236-249	AF34	50	50	567,3
250-262	AF35	45	55	532,7
263-272	AF36	40	60	358,3
273-280	AF37	35	65	237,4

➤ Séparation sur couche mince

• Etude de la fraction AF5

Cette fraction (m = 109,9 mg) contient un précipité qui a été lavé plusieurs fois avec le chloroforme et récupéré sous forme des cristaux blancs. L'examen par chromatographie sur couche mince et l'analyse par RMN de ce produit majoritaire **AF5** (14 mg) montrent qu'il est identique à **C5** isolé déjà à partir de la phase chloroforme.

• Etude de la fraction AF9

Cette fraction a été chromatographiée sur plaques préparatives de gel de silice normale éluées 2 fois par le système CHCl_3 /acétone (9:1) pour donner le produit **AF9** (20 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **A1**.

• Etude de la fraction AF11

Une quantité de cette fraction de masse 173 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'élution : CHCl_3 /acétone (9:1), les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : Résultat de séparation de la fraction AF11

Sous fraction	Remarques
AF11-1	(15 mg), mélange
AF11-2	(10 mg), mélange de deux produits
AF11-3	(4,5 mg), produit pur de fluorescence noire violette sous 365 nm

La sous fraction AF11-1a subi une purification sur colonne de gel de Séphadex LH-20 pour donner le produit **AF11-1c** (7 mg) à l'état pur, que nous notons **A2**.

- Nous reportons le produit **AF11-3** sous le code **A3**.

• Etude de la fraction AF14

La fraction AF14 (148,1 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système chloroforme/acétone (9:1), pour donner le produit **AF14-PK** (10 mg) à l'état pur, que nous notons **A4**.

• Etude de la fraction AF17

Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice, la fraction AF17 (71 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ avec le

système chloroforme/acétone (9:1), pour donner quatre bandes avec une intensité plus marquée pour la quatrième bande. La purification du produit récupéré de cette quatrième bande par le même système a permis l'obtention de deux produits purs ; Le premier **AF17-4a** (9 mg) que nous notons **A5** et le deuxième **AF17-4b** (5 mg) que nous notons **A6**.

- **Etude de la fraction AF21**

La fraction AF21 (123,5 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système chloroforme/acétone (8:2), pour donner le produit **AF21-4** (10 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **A7**.

En résumé, l'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *P. battandieri* Maire a permis l'obtention de **sept produits purs A1 à A7** ainsi que le produit **C5** purifié de la fraction **AF5** et également de l'extrait chloroforme.

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des fractions de la phase acétate d'éthyle de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire est représenté dans la figure III.12.

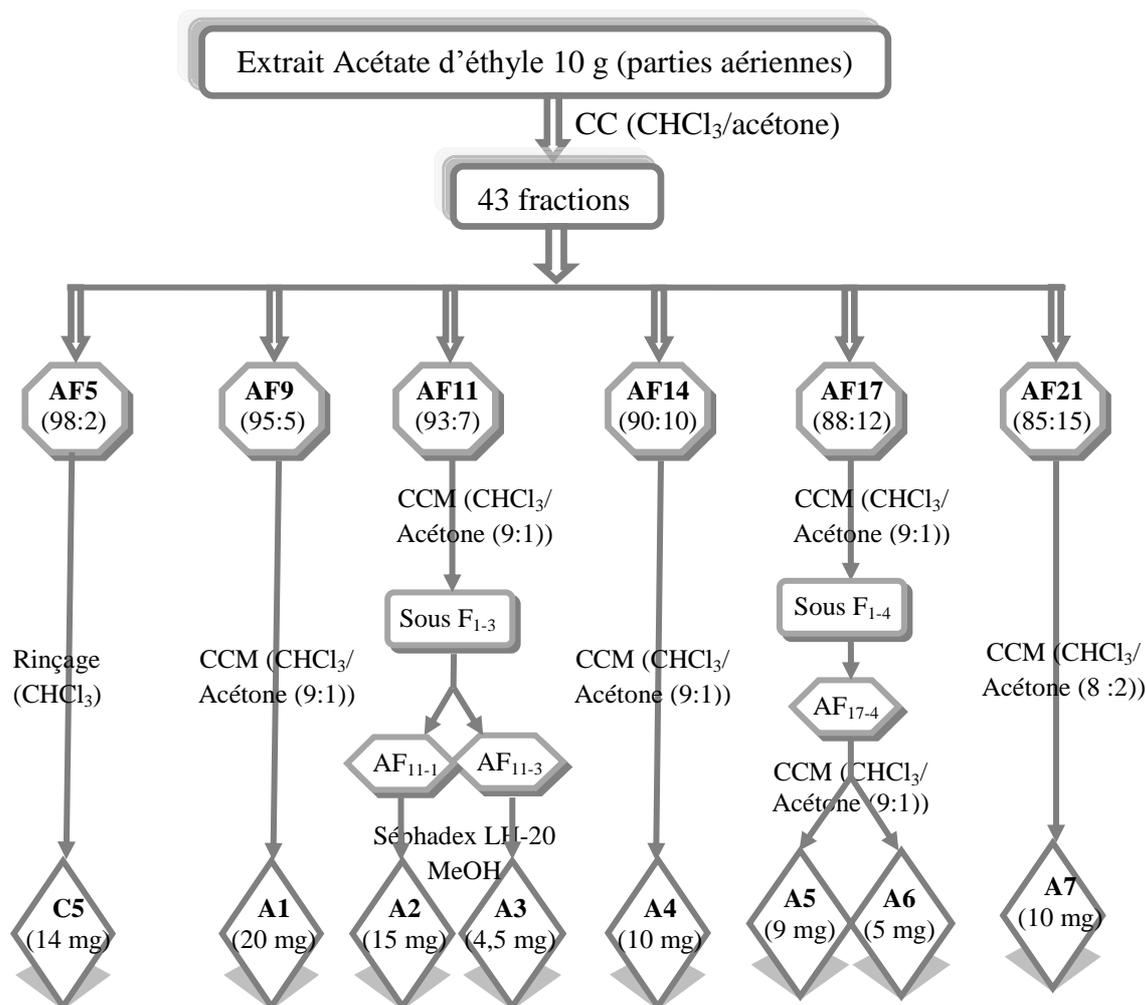


Figure III.12 : Schéma de purification des fractions de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

Après séparation et purification, les constituants **A1** à **A7** ainsi que **C5** de la partie soluble dans l'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-méthanolique des parties aériennes de *P. battandieri* ont été localisés sur le chromatogramme CLHP correspondants en les réinjectant un à un dans les mêmes conditions que pour l'extrait. Ce travail nous a permis d'avoir une idée sur la structure de ces constituants grâce à leurs spectres d'absorption UV obtenus lors de l'analyse par LC-UV. En effet l'enregistrement des spectres UV de quelques pics du chromatogramme notamment les pics : C5 ($t_r = 21,7$ min), A6 ($t_r = 28,1$ min) et A5 ($t_r = 34,5$ min) montrent que tous ces produits sont du type coumarinique. Tandis que les pics : A7 ($t_r = 25,7$ min), A1 ($t_r = 32,5$ min) et A4 ($t_r = 35,4$ min) sont du type flavonique. Le chromatogramme et les spectres UV comportant ces données sont reportés dans les figures III.13 et III.14.

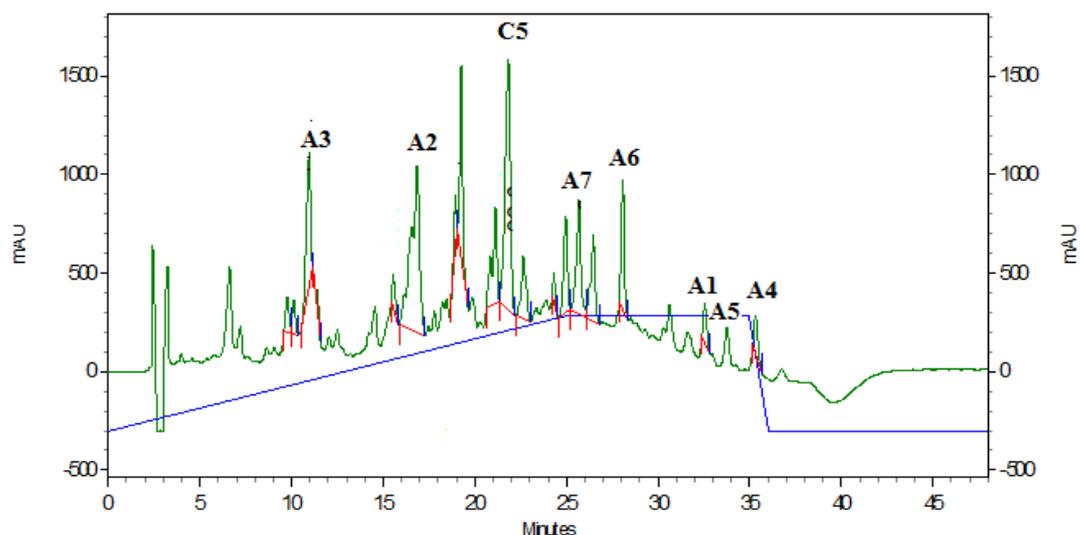


Figure III.13 : Chromatogramme LC-UV à 280 nm de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. (Conditions chromatographiques : Système d'élution acétonitrile/eau. Gradient : (10-35-35-10-10 % ACN) (0-25-35-36-48 min))

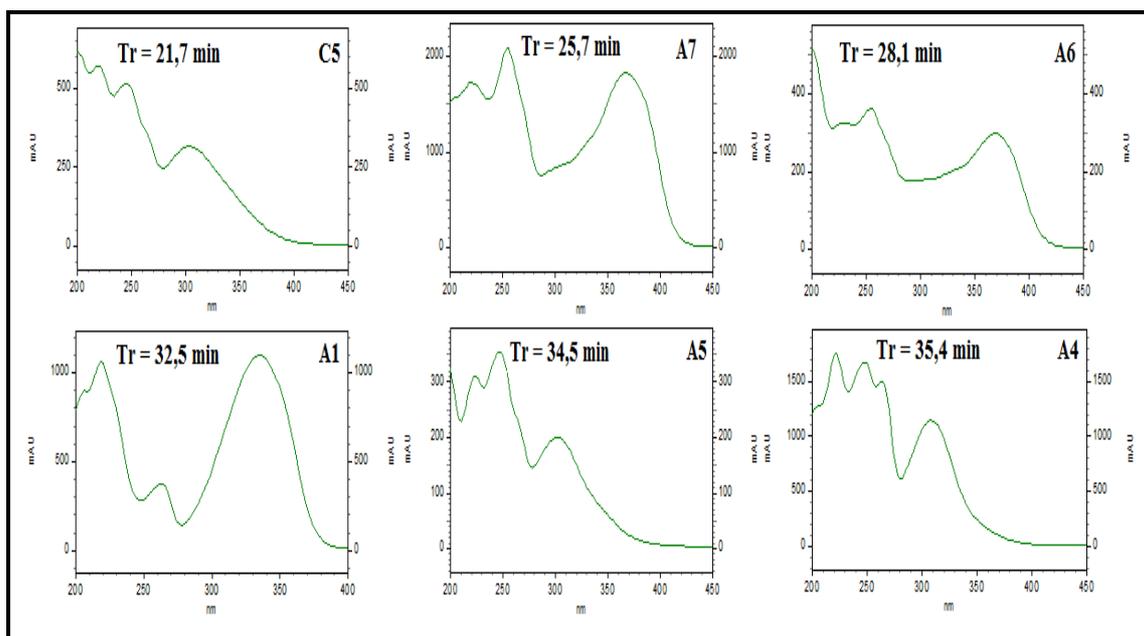


Figure III.14 : Spectres UV de quelques produits du chromatogramme de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *P. battandieri* Maire

C) Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes

De même que pour les extraits chloroforme et acétate d'éthyle, nous avons, avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant chloroforme/méthanol (9:1).

➤ Séparation sur colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Les résultats des tests chromatographiques obtenu sur plaques analytiques nous ont conduits à utiliser comme système d'élution le système chloroforme/méthanol en gradient de polarité. Une masse d'environ 20 g d'extrait *n*-butanol est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans du chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme/méthanol en commençant par du chloroforme pur et en terminant par du méthanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. Les résultats de la progression de cette colonne sont rassemblés dans le tableau III.8.

Tableau III.8 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol

Lots de tubes rassemblés	N° de la fraction	Système d'élution		
		% CHCl ₃	% MeOH	Poids de la fraction (mg)
1-5	NF1	100	0	32,7
6-17	NF2	100	0	50,4
18-23	NF3	100	0	40,6
24-27	NF4	100	0	22,7
28-39	NF5	99	1	66,4
40-49	NF6	99	1	27,7
50-55	NF7	99	1	36,8
56-63	NF8	99	1	30,3
64-69	NF9	99	1	10,1
70-73	NF10	98	2	41,9
74-79	NF11	98	2	45,1
80-84	NF12	98	2	33,3
85-90	NF13	98	2	40,8
91-95	NF14	98	2	32,6
96-105	NF15	95	5	42,1
106-111	NF16	95	5	120
112-119	NF17	93	7	180,9
120-128	NF18	93	7	190,3
129-136	NF19	90	10	241,6
137-145	NF20	90	10	615,6
146-152	NF21	90	10	1254,9
153-174	NF22	87	13	2815,8
175-200	NF23	80	20	2265,2
201-221	NF24	70	30	2251,5
222-239	NF25	65	35	1027,4
240-269	NF26	60	40	1324,4
270-290	NF27	50	50	2583,6
291-350	NF28	50-0	50-100	3587,2

Comme signalé précédemment, au cours de la concentration de la phase *n*-butanol, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons immédiatement récupéré, filtré et rincé au chloroforme additionné de quelques gouttes de méthanol pour obtenir un produit pur **N1** sous forme d'une poudre blanche (2,5 g).

➤ **Séparation sur couche mince**

• **Etude de la fraction NF5**

La fraction NF5 (66,4 mg) montrant deux spots sous la lampe UV (254 et 365 nm) sur une plaque analytique de gel de silice normale avec une intensité plus marquée pour le spot N°2, a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système CHCl₃/acétone (9:1), pour donner après purification dans le même système (deux éluions), le composé **NF5-2** (20,6 mg) à l'état pur. L'examen par chromatographie sur couche mince et l'analyse par RMN de ce produit majoritaire **NF5-2** montrent qu'il est identique à **C5** déjà isolé à partir des phases chloroforme et acétate d'éthyle.

• **Etude de la fraction NF11**

Après analyse sur plaque analytique, environ 45,1 mg de la fraction NF11 sont déposés sur des plaques préparatives de gel de silice HF₂₅₄ éluées par le système chloroforme/acétone (9:1) après deux migrations, deux bandes ont été observées sur les plaques. Les deux bandes ont été séparément récupérées. La première a subi une purification sur colonne de gel Sephadex LH-20 pour donner le produit **NF11-1** (11 mg) à l'état pur. On note que le produit **NF11-1** est identique à **A5** déjà isolé de l'extrait acétate d'éthyle après l'analyse par RMN. La deuxième bande a mené à un produit qui n'a donné aucun signal en RMN du proton.

• **Etude de la fraction NF21**

Nous avons remarqué que notre fraction renferme un composé majoritaire facilement séparable. Nous avons alors retenu le système d'éluion AcOEt/MeOH/H₂O (8:1:1) pour une séparation sur colonne gel de silice avec une éluion isocratique. Ainsi, une masse de 1,2 g de la fraction NF21 est déposée sur une colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merck), préparée avec 45 g de gel de silice dans le mélange d'éluion. L'éluion est réalisée avec un fractionnement tous les 25 ml. Le suivi de l'évolution de cette colonne est effectué par une étude sur des plaques CCM analytiques. Ces plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées pendant trois minutes à 100°C. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III.9.

Tableau III.9 : Regroupements des sous fractions issues de la colonne chromatographique de la fraction **NF21**

N° des sous-fractions	Masse (mg)	Observations
F21-1 (pot 1 à pot 14)	25,2	Mélange séparable (fluorescence violette sombre)
F21-2 (pot 15 à pot 27)	33,7	Mélange séparable
F21-3 (pot 28 à pot 36)	45,4	Mélange séparable

Après étude de la composition des trois sous-fractions par CCM sur plaque analytique, nous nous sommes intéressés à la sous-fraction F21-1 à cause de la simplicité de sa composition. En effet, le profil chromatographique de F21-1 montre deux taches uniquement. Ainsi, cette dernière a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:1). Après trois éluations successives, le produit **NF21-1** a été obtenu. Ce dernier a subi une purification ultime sur gel Sephadex LH-20 pour donner le composé **NF21-1** (18 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **N2**.

En résumé, l'étude phytochimique de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *P. battandieri* Maire. A permis l'obtention de deux produits purs **N1** et **N2** ainsi que les composés **C5** (isolé de la phase chloroforme et également de la phase acétate d'éthyle) et **A5** (isolé de la phase acétate d'éthyle). Parmi ces produits, le **N1** se trouve être le mieux accumulé par cette espèce, en effet, il faut noter l'obtention d'une quantité d'environ 2,5 g.

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des fractions de la phase *n*-butanol de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire est représenté dans la figure III.15.

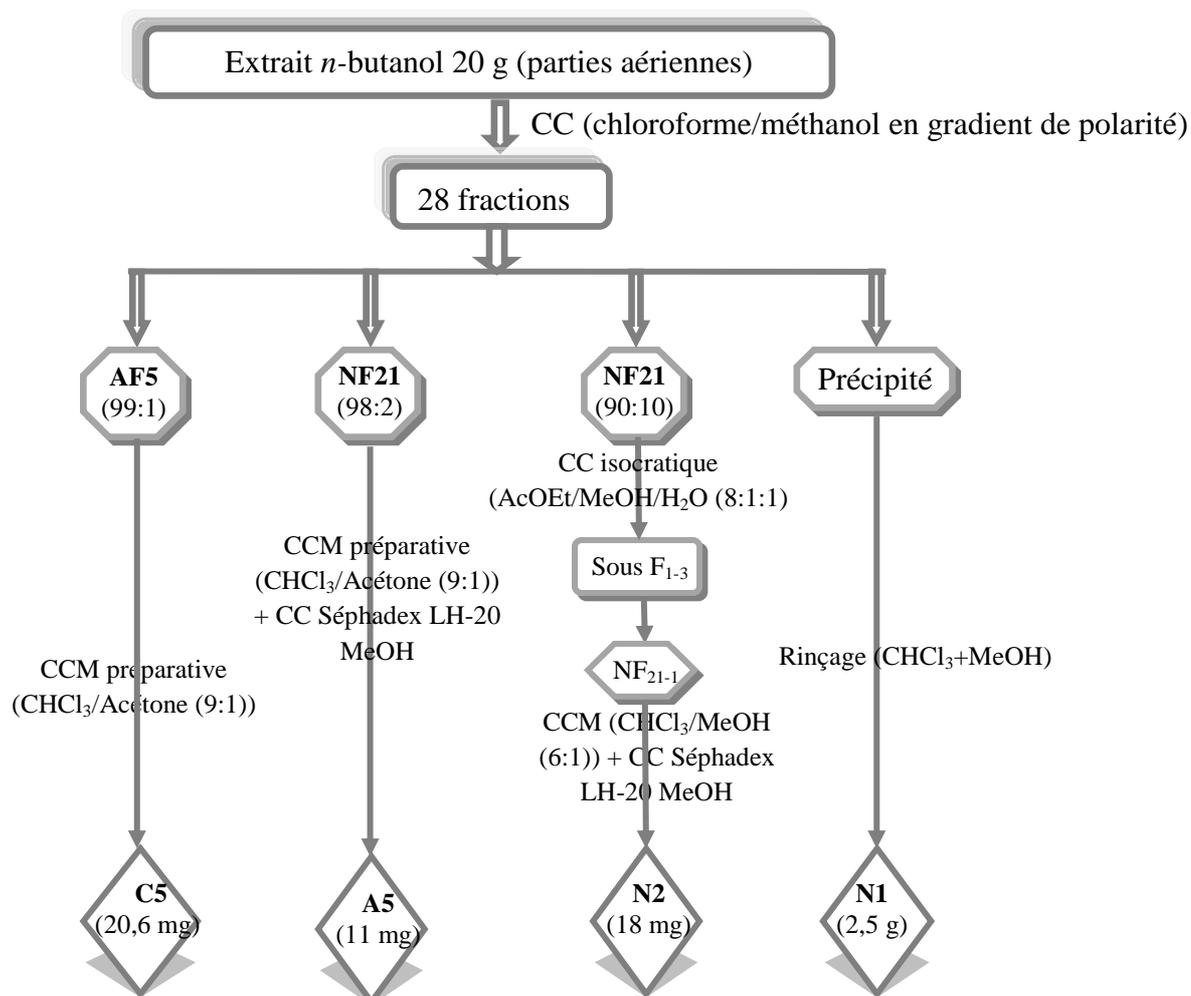


Figure III.15 : Schéma de purification des fractions de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

Après séparation et purification, les constituants **C5**, **A5** et **N2** isolée de l'extrait *n*-BuOH sont localisés sur le chromatogramme de cet extrait après leur injection dans les mêmes conditions que l'extrait (Figure III.16). On remarque que le composé **N1** n'apparaît pas sur le chromatogramme ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'un composé phénolique vu la longueur d'onde de détection choisie. On remarque par contre que le composé **N2** est de type flavonique vu l'allure de son spectre d'absorption UV (Figure III.17).

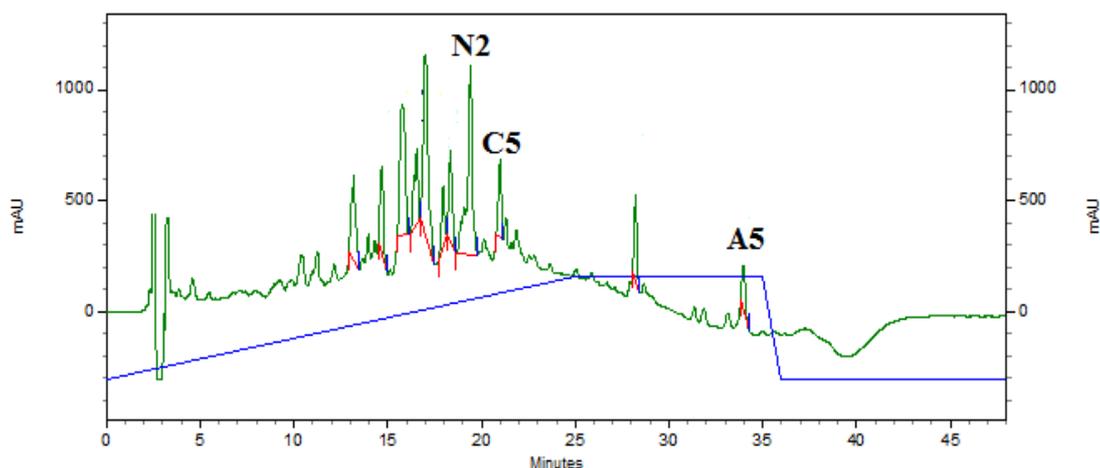


Figure III.16 : Chromatogramme de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *P. battandieri* Maire comportant les produits isolés (Conditions chromatographiques : Système d'élution acétonitrile/eau. Gradient : (10-35-35-10-10% ACN) (0-25-35-36-48 min) ; Détection à $\lambda = 280$ nm)

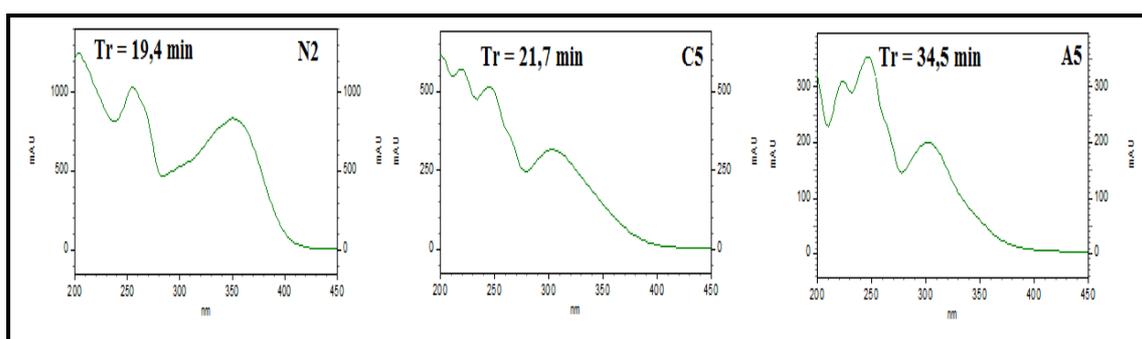


Figure III.17 : Spectres UV des composés N2, C5 et A5. Colonne nucleosil HD-18 (100 mm/5 mm). Phase : H₂O milli-Q et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10 % ACN) (0-25-35-36-48 min). Débit 1 ml.min⁻¹

III-8- Activités biologiques

La présente étude a porté sur l'évaluation des activités biologiques de l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire qui appartient à la famille des Apiacées, une des familles les plus importantes de la flore saharienne algérienne, une espèce que nous avons sélectionnée pour étude.

III-8-1- Introduction

Les espèces réactives oxygénées (ROS) produites en continu dans des cellules humaines pourraient induire un stress oxydatif provoquant la mort cellulaire par un dommage macromoléculaire [25,29]. Les acides gras polyinsaturés sont les plus

sensibles aux ROS, conduisant à la peroxydation lipidique qui est probablement une étape cruciale dans la pathogenèse de plusieurs états pathologiques [27,28]. La peroxydation des lipides pourrait conduire à la perte de structure et au fonctionnement des membranes et à la génération de produits finis cytotoxiques et mutagènes qui peuvent étaler les réactions oxydatives et causer des dégâts supplémentaires [29,30]. Les globules rouges (RBCs) sont considérés comme des cibles principales pour l'attaque de radicaux libres en raison de la présence d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés, le stress oxydatif sur le RBC est impliqué dans l'hémolyse qui se manifeste dans une variété de pathologie [31,32]. L'hémolyse qui se réfère à la destruction d'érythrocytes avec libération de l'hémoglobine dans le plasma, se produit dans diverses conditions pathologiques [33]. Un certain nombre de plantes, telles que *Hibiscus esculentus* [34], *Allium paradoxum* [35], *Ugnimolinae Turcz* [36], *Wrightia tinctoria* [37] ont montré des propriétés anti-anémiques en raison de la présence de divers flavonoïdes. Les composés antioxydants naturels comme les flavonoïdes et les coumarines ont été proposés comme une approche efficace pour la prévention et le traitement de multiples troubles de la RBC par des radicaux libres ou d'un effet de lubrification des peroxydes lipidiques [38-40]. Sachant que des espèces du genre *Pituranthos* sont connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle [41,42], notre étude est orientée sur la recherche de sources naturelles algériennes d'antioxydants et notamment l'étude de *Pituranthos battandieri* Maire.

Dans ce sens, nos travaux ont porté sur la recherche des activités antibactérienne et antioxydante *in vitro* de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire (BEPB). Les travaux de recherche de l'activité antioxydante ont été effectués par trois méthodes : l'effet scavenger du radical DPPH, le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les propriétés antihémolytiques et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

III-8-2- Activité antioxydante (*in vitro*) de l'extrait *n*-BuOH

III-8-2-1- Effet Scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait *n*-BuOH de *Pituranthos battandieri* (BEPB) a été évaluée par le test de DPPH• (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) on se basant sur la méthode de Magalhaes *et al.* (2006) [43]. Des solutions de BEBP à différentes concentrations dans le méthanol ont été mélangées avec 1 ml de DPPH• en solution dans le méthanol (0,2 mM), après 30 minutes, les lectures ont été effectuées à

517 nm. Une solution de DPPH• (1 ml, 0,2 mM) dans du méthanol a été utilisée comme témoin négatif, l'acide ascorbique et le trolox ont été utilisés comme témoins positifs.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I %) a été calculé selon l'équation (1). (1) : $I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$.

Où A_0 est l'absorbance de la solution DPPH• seule, A_1 est l'absorbance de la solution DPPH• + l'extrait / l'acide ascorbique / le trolox.

L'expérience a été faite en triplicata et les données exprimées en moyenne \pm écart-type (SD), $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III-8-2-2- Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de l'extrait BEPB a été examinée selon Gulcin et al., 2003 [44] ; avec de légères modifications. A 3,4 mL de BEPB (100-1200 μ g/mL) dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,4), on ajoute 0,6 mL de H₂O₂ et on incube à température ambiante pendant 10 minutes. La diminution de l'absorbance du H₂O₂ lors de l'oxydation a été contrôlée à 230 nm par spectrophotométrie contre un blanc approprié (tampon phosphate seul). Trolox a été utilisé comme antioxydant standard et le témoin (tampon phosphate et H₂O₂) a été préparé, le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation (1) précédente.

L'expérience a été faite en triplicata et les données exprimées en moyenne \pm écart-type (SD), $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III-8-2-3- Propriété antihémolytique de BEPB

L'activité inhibitrice de l'altération des globules rouges induite par H₂O₂ a été évaluée par la méthode décrite par Ebrahimzadeh et al. [34,35]. A 100 μ L de suspensions à 5% (v/v) d'érythrocytes dans du tampon phosphate salin (PBS), on ajoute 50 μ L de BEPB (100-1200 μ g) dans du PBS pH (7,4) ; À cela, 100 μ L de H₂O₂ 100 mM sont ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité doucement tout en étant incubé à 37°C pendant 3 h. Le mélange réactionnel a été dilué avec 8 mL de PBS et centrifugé à 2000 xg pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant résultant a été mesurée à 540 nm par spectrophotomètre pour déterminer l'hémolyse. De même, les érythrocytes ont été traités avec 100 μ M de H₂O₂ et sans inhibiteurs pour obtenir une hémolyse complète. L'absorbance du surnageant a été mesurée dans

la même condition. L'effet inhibiteur de l'extrait a été comparé avec le trolox standard. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé en utilisant l'équation (2).

$$(2) : \% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Lorsque A_0 est l'absorbance des H_2O_2 -érythrocytes, A_1 est l'absorbance des H_2O_2 -érythrocytes + BEPB / trolox.

L'expérience a été faite en triplicata et les données exprimées en moyenne \pm écart-type (SD), $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III-8-2-4- L'inhibition de la peroxydation lipidique du BEPB-thiocyanate d'ammonium

L'inhibition des activités de la peroxydation lipidique a été estimée par la méthode du thiocyanate en utilisant l'acide linoléique comme source de peroxyde [45]. Le peroxyde généré réagit avec le chlorure ferreux (Fe^{2+}) pour donner des ions ferriques (Fe^{3+}) d'un complexe de thiocyanate. L'émulsion d'acide linoléique a été préparée par homogénéisation de l'acide linoléique avec du Tween-40 émulsifié dans du tampon phosphate (0,2 M, pH 7). Les échantillons ont été préparés dans un mélange MeOH/eau et les concentrations sélectionnées pour l'étude étaient de 500, 600 et 700 $\mu\text{g/mL}$. Après incubation à 37°C , on ajoute le thiocyanate d'ammonium et le chlorure ferreux. Le mélange préparé par la même procédure a été utilisé comme témoin. Le trolox a été utilisé comme référence. La coloration a été mesurée à 500 nm pendant 4 jours successifs. Les résultats ont été calculés selon l'équation (1).

$$(1) : I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

L'expérience a été faite en trois temps et les données exprimées en moyenne \pm écart-type (SD), $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III-8-3- L'activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH

III-8-3-1- Principe

C'est une technique basée sur l'application des disques, imprégnés des extraits à tester, sur la surface de gélose préalablementensemencée par les bactéries choisies. L'activité antibactérienne se manifeste alors par des zones d'inhibition autour des disques.

- Les travaux concernant la recherche de l'activité antibactérienne ont concerné la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de la plante *Pituranthos battandieri* Maire.

- Les souches bactériennes utilisées sont des souches cliniques provenant du CHU de Constantine : *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
- Les antibiotiques utilisés comme références pour chaque souche bactérienne sont :
 - Cefoxitine pour *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
 - Imipénème pour *Escherichia coli* (*E. coli*).
 - Ticarcilline pour *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

III-8-3-2- Protocole

Une masse de 30 mg de l'extrait *n*-butanol est dissoute dans 10 mL d'un mélange Eau/MeOH (80/20), cette solution constitue la solution mère (SM). De la solution mère on prélève 6,4 mL aux quels on ajoute 3,6 mL d'eau pour obtenir la solution → D1

Les autres solutions d'étude sont réalisées comme suit :

2 mL de D₁ + 2 mL d'eau → D₂

1 mL de D₂ + 3 mL d'eau → D₃

0,5 mL de D₃ + 3,5 mL d'eau → D₄

0,5 mL de D₄ + 7,5 mL d'eau → D₅

2 mL de D₅ + 2 mL d'eau → D₆

1 mL de D₆ + 3 mL d'eau → D₇

✓ Préparation des milieux de culture

On prend 3 tubes à essai et on met 5 mL d'eau physiologique dans chacun. Avec une lance, on place dans chaque tube une souche bactérienne. Ces trois tubes sont placés dans l'étuve à 37 °C pendant 15 min. Pendant ce temps, on procède à la préparation des milieux gélosés Mueller-Hinton (MH).

✓ Préparation des disques

Après les 15 min dans l'étuve, à l'aide d'écouvillons on prélève de chacun des trois tubes la bactérie correspondante que l'on ensemence sur le milieu gélosé placé dans des boîtes de Pétri. Dans chacune des trois boîtes de Pétri ainsi préparées on place 8 disques préalablement stérilisés. Chacun des disques est imbibé à l'aide d'une micropipette de 20 µL d'une des 8 solutions SM, D-1 à D-7 ainsi qu'un 9^{ème} disque placé au centre de la boîte contenant l'antibiotique correspondant à la bactérie

utilisée. Les 3 boîtes de Pétri sont alors placées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures.

✓ **La lecture**

Après les 24 heures d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'une règle. La valeur de ce diamètre détermine l'efficacité de la matière active.

III-9- Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes issues des colonnes de gel de silice 60, des phases chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. A mené à la séparation et la purification de 23 produits en quantité appréciable. Tous ces produits ont été soumis aux analyses physicochimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et discussions de ces analyses avec les résultats de l'activité biologique seront développés au chapitre IV.

Références bibliographiques

- [1] Nait Said N. Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes : *Pituranthos chluranthos* et *Marrubium vulgare*. Mémoire de magister. Université El-HadjLakhdar-Batna. 2007.
- [2] Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central sahara : Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105 : 358-367.
- [3] Singab AN, Khalifa T, Mahran GH, Okada Y, Matsumaru Y, Nishino H, Okuyama T. A new flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus* Desf, Benth & Hook. Natural medicines. (Tokyo). 1998 ; 52 (2) : 191-194.
- [4] Abdelwahad A, Hayder N, Hilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hmami M, L Chekir-Gherdira, K, Ghedira. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tourtuosud* (Coss). Maire. Flavour. Fragr. J, 2006 ; 21 : 129-133.
- [5] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*. Phytochemistry 1995 ; 40 (3) : 927-929.
- [6] Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Coumarins of *Pituranthos triradiatus* growing in Egypt, 37 th. Annual congress of the society for medicinal plant research. Braunschweig Germany, Planta Medica. 5-9. Septembre. 1989.
- [7] Halim AF. Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Coumarins of Roots of *Pituranthos triradiatus* growing in Egypt. Mans. J. Pharm. Sci. 1991 ; 7 (3) : 402.
- [8] Ashkenazy D, Friedman J, Kashman Y. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. Planta med. 1983 ; 47(4) : 218-220.
- [9] Haba H, Benkhaled M, Massiot G, Log C, Lavaud C. Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. Nat. Prod. Res. 2004 ; 18(5) : 409-413.
- [10] Vernin G, Zamkotsian RM, Verbin G, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. Abstracts of papers american chemical society. 1999 ; 217 (1-2) : AGFD.
- [11] Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook. from Algeria. J. Ess. Oil Res. 1999 ; 11(6) : 673-676.
- [12] Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ed. Ibis Press, Paris, 1997 ; 764p.

- [13] Touil A, Rhouati S, Creche J. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*, Chem. Nat. Compd. 2006 ; 42(1) : 104-105.
- [14] Shalaby N. Modelling, measurement and control, C : Energetics, chemistry and engineering, Earth, Resources, Environment, Biomedical problems. 1998 ; 57 (1) : 17-35.
- [15] Atmani G, Benayache S, Benayache F, Dendougui H, Jay M. Métabolisme flavonique de *Centaurea nicaensis* All, Journal of society algerein chimistry 1998 ; 8, N° 1,29.
- [16] Benakcha R. Thèse de magister chimie, Université de Mentouri de Constantine. 2001.
- [17] Krifa M, Gharad T, Haouala R. Biological activities of essential oil, aqueous and organic extracts of *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. Sci. Hort. 2011 ; 128 (1) : 61-67.
- [18] Abdallah HM, Ezzat SM. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. Z. Naturforsch. C 2011 ; 66 : 143-148.
- [19] Mighri H, Sabri K, Eljeni H, Neffati M, Akrouit A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pituranthos chloranthus* (Benth.) Hook and *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire essential oils from Southern Tunisia. Adv. Biol. Chem. 2015 ; 5 : 273-278.
- [20] Neffati A, Limem I, Kilani S, Bouhleb I, Skandrani I, Bhourri W, Ben Sghaier M, Boubaker J, Ledauphin J, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. A comparative evaluation of mutagenic, antimutagenic, radical scavenging and antibacterial activities of essential oils of *Pituranthos chloranthus* (Coss. Et Dur.). Drug Chem. Toxicol. 2009 ; 32(4) : 372-380.
- [21] Krifa M, El Mekdad H, Bentouati N, Pizzi A, Ghedira K, Hammami M, El eshri SE, Chekir-Ghedira L. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. Tumor Biol. 2015 ; 36 : 5165-5170.
- [22] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S . Paris. 1963.
- [23] Nielsen BE. Coumarins of umbelliferous plants. Dan. Tidskr. Farm. 1970 ; 44 : 111-286.

- [24] Novak I, Buzas G, Minker E, Kolfai M, Szendrei K. Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*, Natural product research, *Planta med.* 1966 ; 14 : 57-61.
- [25] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact.* 2006 ; 160 : 1-40.
- [26] Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress : Adaptation, damage, repair, senescence and death. In free radicals in biology and medicine, 4 th ed. London : Oxford, university press. 2007 ; pp. 187-267.
- [27] Bakirel T, Bakirel U, Keles OU, Ulgen SG, Yardibi H. In vivo assessment of anti-diabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in all oxalan-induced diabetic rabbits. *J. Ethno pharmacol.* 2008 ; 116 (1) : 64-73.
- [28] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008 ; 4(2) : 89-96.
- [29] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an over view. *Methods Enzymol.* 1990 ; 186 : 1-85.
- [30] Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int.* 2006 ; 30 : 376-380.
- [31] Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.* 2008 ; 390(1) : 1-11.
- [32] Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 1986 ; 107 : 401-404.
- [33] Hatherill JR, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions.* 1991 ; 32 : 351-358.
- [34] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* leaves. *Pharmacology online (PhOL).* 2009 ; 2 : 1097-1105.
- [35] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Cent Eur J Biol.* 2010 ; 5 : 338-345.
- [36] Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. Protective effect of *Ugnimolinae Turcz* against oxidative damage of human erythrocytes. *Food chem. toxicol.* 2007 ; 45 : 130-135.

- [37] Bigoniya P, Singh S, Singh CS, Shukla A. Anti-anemic potential estimation on mice and characterization of flavonoids using high performance thin layer chromatography in *Wrightia tinctoria* bark fraction. J. Nat. Pharm. 2013 ; 4 : 47-56.
- [38] Asgary S, Naderi GH, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals, Exp. Clin. Cardiol. 2005 ; 10 (2), 88.
- [39] Singh N, Rajini PS. Antioxidant in erythrocytes against oxidative damage, Chem. Biol. Interact. 2008 ; 173 : 97-104.
- [40] Girish TK, Vasudevaraju PU, Prasada Rao J. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. Food Chem Toxicol. 2012 ; 50 (5) : 1690-16962.
- [41] Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central sahara : Pharmacopoeia of Tassili n'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006 ; 105 (3) : 358-367.
- [42] Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. Fleurs du sahara. Voyage ethnobotanique avec les touaregs du Tassili. Ed. Ibis press, Paris ; 2000.
- [43] Magalhães LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. Anal. Chim. Acta. 2006 ; 558 : 310-318.
- [44] Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. J. Pineal. Res. 2003 ; 34 : 278-281.
- [45] Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. J. Agric. Food Chem. 1998 ; 46(10) : pp 3952-3957.

Chapitre IV

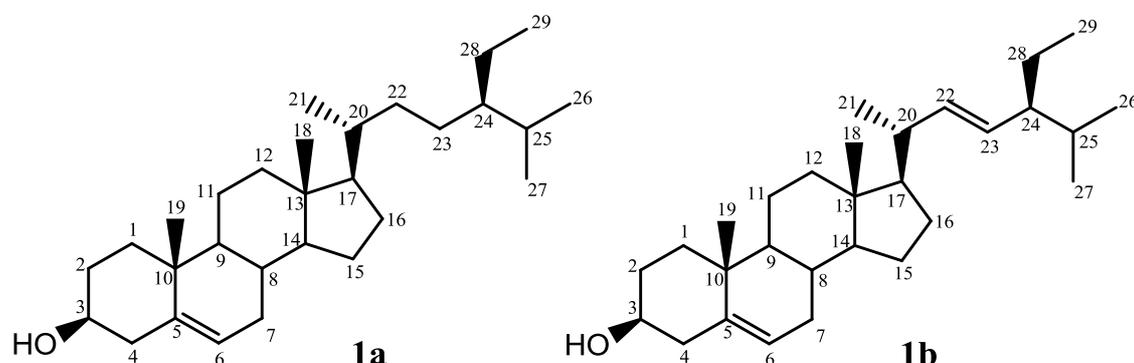
Résultats et discussions

IV- Identification des produits isolés de *Pituranthos battandieri* Maire

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone ^{13}C à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, et hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, et également par spectrométrie de masse à haute résolution utilisant le mode d'ionisation par électrospray (electrospray) (HR-ESIMS), par la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.

IV-A- Identification des produits isolés de la phase chloroforme

IV-A-1- Elucidation structurale du composé C1



Le composé **C1** est un mélange de deux produits **C1a** et **C1b**, il a été isolé à partir de la phase chloroforme sous-forme des cristaux (aiguilles blanches) de la fraction CF3, ce mélange absorbe peu sous UV à 254 nm et à 365 nm. La coloration violette de ce composé, après révélation à l'aide d'un révélateur à base d'acide sulfurique oriente vers une structure de type triterpène ou de type stérol [1].

Le spectre RMN du proton ^1H enregistré dans le CDCl_3 (Spectre IV.1-1) présente des signaux allant de 0,68 à 5,4 ppm. On peut distinguer une série de pics très denses dans l'intervalle 0,68 ppm à 2,38 ppm. Ceci suppose la présence d'un nombre élevé de carbones primaires, secondaire et tertiaires (CH_3 , CH_2 et CH) dans la chaîne carbonée de la molécule. Ce spectre est caractéristique des dérivés stéroïdiques. En effet la région méthylique du spectre RMN ^1H enregistré à 400 MHz (Spectre IV.1-2) permet d'observer :

- ✓ Trois doublets à δ_{H} 0,84 ppm ($J = 6,5$ Hz), δ_{H} 0,76 ppm ($J = 6,4$ Hz) et δ_{H} 0,63 ppm ($J = 6,4$ Hz) correspondent respectivement aux protons des méthyles CH_3 -21, CH_3 - 26, et CH_3 -27.

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H chacun à δ_H 0,93 et 0,61 ppm, attribuables aux protons des méthyles CH_3 -18 et CH_3 -19 respectivement. Ces valeurs sont en faveur d'une insaturation en position Δ^5 [2].

La région éthylénique du spectre RMN 1H (Spectre IV.1-3) permet d'observer :

- ✓ Un multiplet résonnant à δ_H 3,45 ppm caractéristique du proton géminé à un groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 des stérols.
- ✓ un signal sous forme de doublet large à δ_H 5,27 ($J = 6,4$ Hz) d'intégration similaire à celle du H-3, attribuable au proton oléfinique H-6 des stérols.
- ✓ Par ailleurs on observe deux doublet de doublet à δ_H 5,10 ppm ($J = 15,1$ Hz, $J = 8,5$ Hz) et à δ_H 4,95 ppm ($J = 15,1$ Hz, $J = 8,6$ Hz) attribuables aux protons oléfiniques de la chaîne latérale en C-17 du stigmastérol (protons éthyléniques des positions C-23 et C-22 respectivement).

Une comparaison des intégrales des signaux relatifs à H-3, H-6, H-22 et H-23 dans le spectre proton (Spectre IV.1-3), montre que si H-3 et H-6 ont une intégrale d'environ 1 chacun, H-22 et H-23 donnent une intégrale d'environ 0,5 chacun. Cette observation oriente vers la présence d'un mélange de **β -sitostérol** (composé **C1a**) et de son correspondant déshydrogéné en positions C-22 et C-23, le **Stigmastérol** (composé **C1b**). Un dosage par RMN 1H Permet de conclure que cet échantillon renferme environ 50% de stigmastérol et 50% de β -sitostérol (Figure IV.1). Des mélanges de ces deux produits ont été isolés de nombreuses espèces végétales notamment de *Rubus suavissimus* et *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) [3].

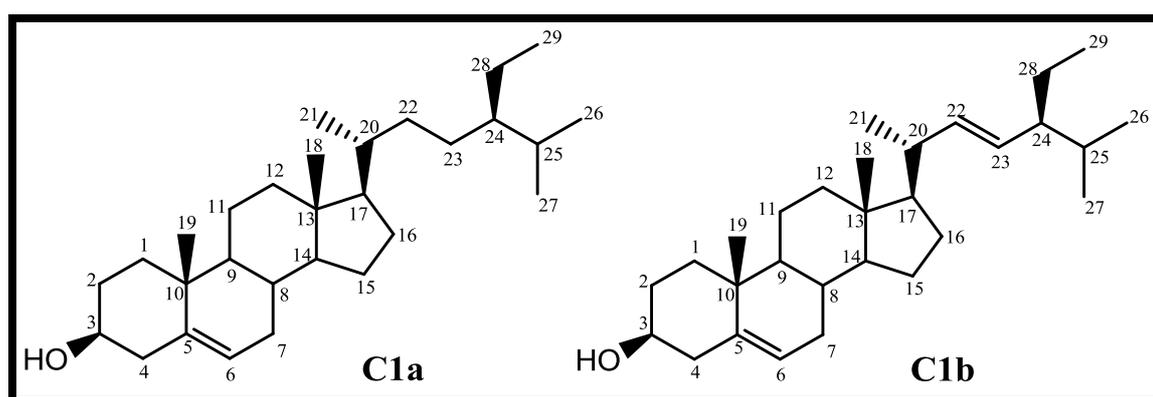
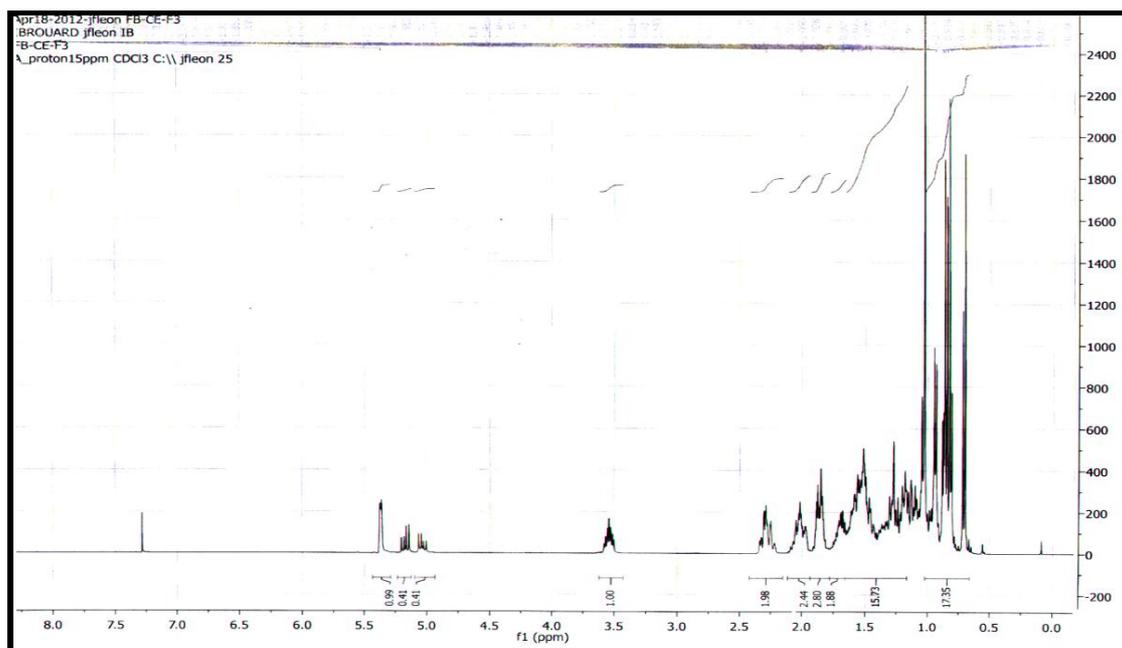
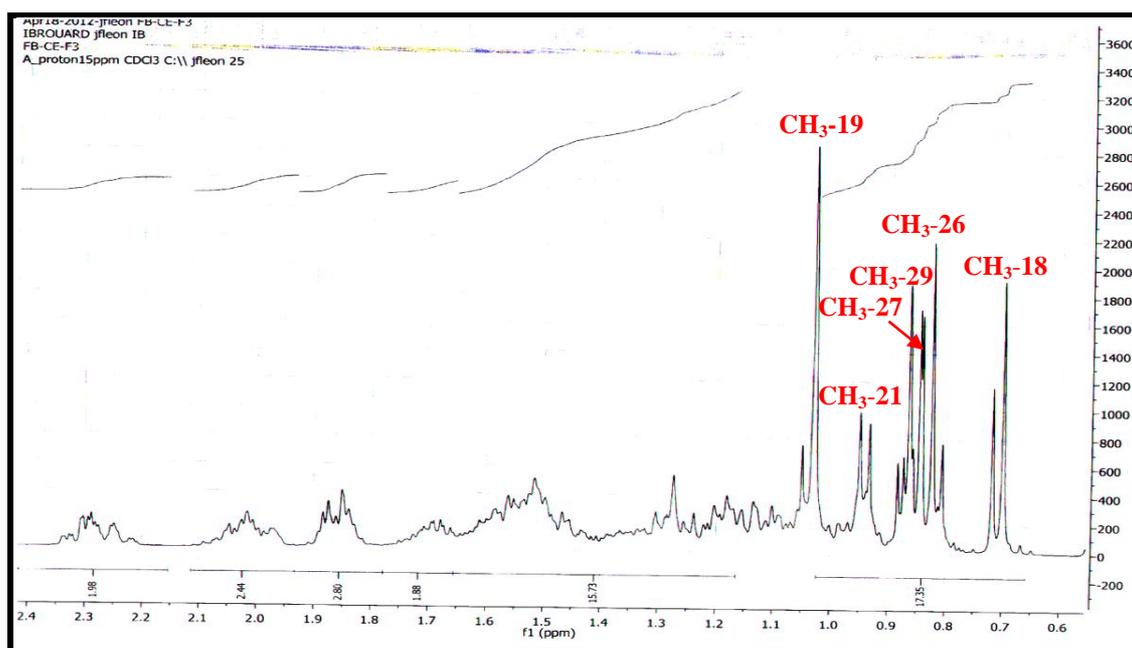


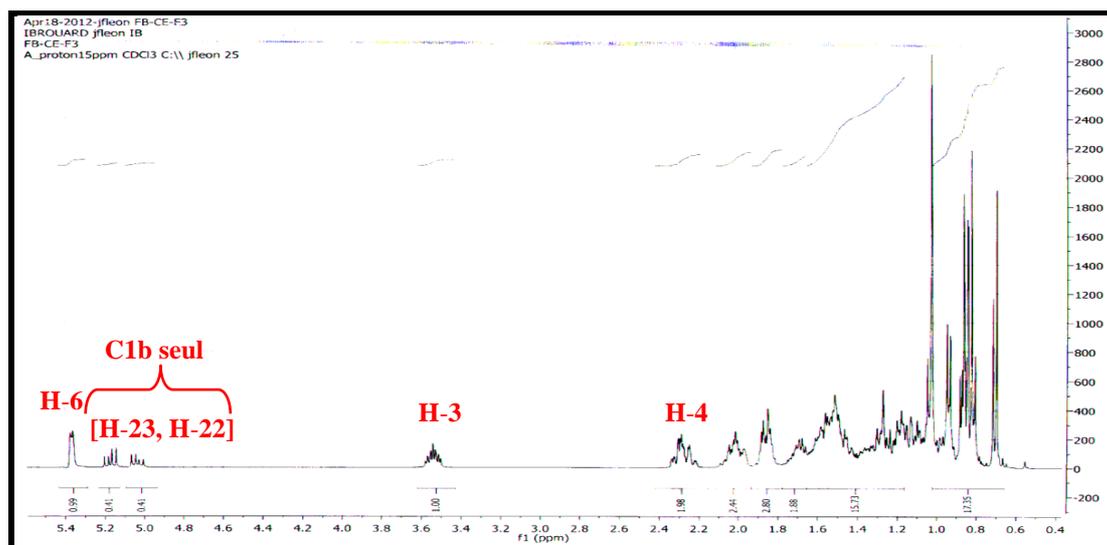
Figure IV.1 : Structure du β -sitostérol C1a et Stigmastérol C1b



Spectre IV.1-1 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du mélange C1



Spectre IV.1-2 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du mélange C1, étaiement



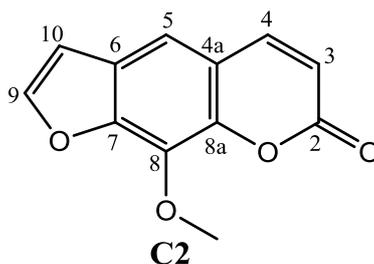
Spectre IV.1-3 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange C1

Les déplacements chimiques des noyaux caractérisant ces deux produits (C1a et C1b), les attributions des signaux et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Déplacements chimiques de RMN ^1H du mélange C1 dans CDCl_3

position	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
3	3,45	1H	<i>m</i>	-
6	5,27	1H	<i>dl</i>	6,4
18	0,93	3H	<i>s</i>	-
19	0,61	3H	<i>s</i>	-
21	0,84	3H	<i>d</i>	6,5
22	5,10	1H	<i>dd</i>	15,1 ; 8,5
23	4,95	1H	<i>dd</i>	15,1 ; 8,6
26	0,76	3H	<i>d</i>	6,4
27	0,63	3H	<i>d</i>	6,4
29	0,85	3H	<i>t</i>	6

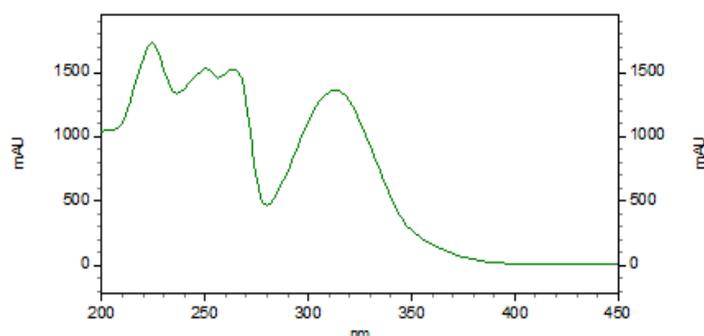
IV-A-2- Elucidation structurale du composé C2



Le composé C2 se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le

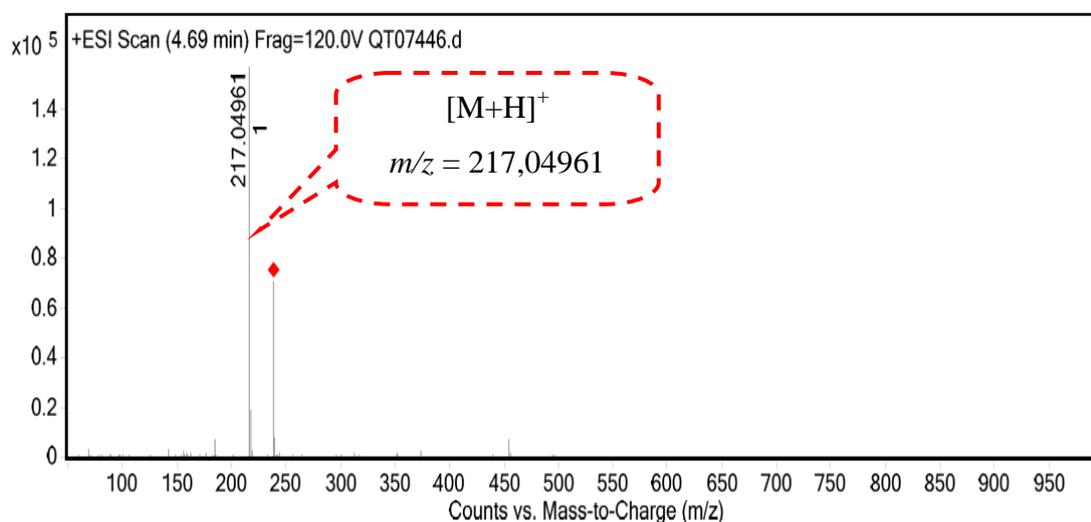
chloroforme et le dichlorométhane.

Le spectre d'absorption UV (Spectre IV.2) montre trois maxima à 217, 260 et 320 nm caractéristique d'une furanocoumarine linéaire [4,5].



Spectre IV.2 : Spectre UV-Visible du composé **C2**

L'analyse du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.3 et Tableau IV.2), montre la présence d'ions adduits correspondant à $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ à $m/z = 217,04961$ et $m/z = 239,0316$, respectivement orientant vers la formule brute $C_{12}H_8O_4$ pour cette molécule qui doit contenir ainsi neuf insaturations.

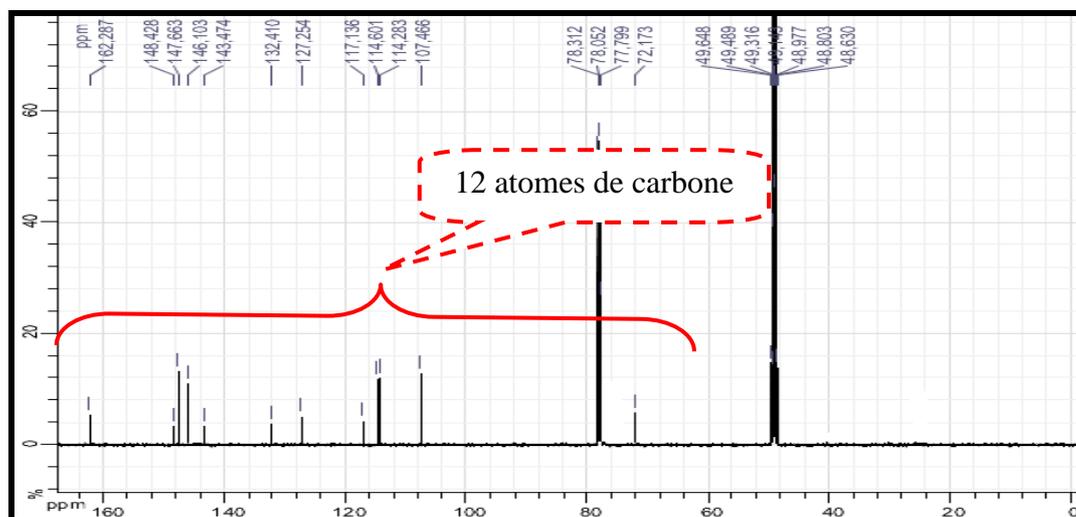


Spectre IV.3 : Spectre HR-ESI-MS du composé **C2**

Tableau IV.2 : Données du spectre HR-ESIMS du composé **C2**

m/z	z	Abund	Formula	Ion
217.04961	1	162048.3	$C_{12}H_9O_4$	$(M+H)^+$
218.05281	1	18655.2	$C_{12}H_9O_4$	$(M+H)^+$
239.0316		71440.2	$C_{12}H_8NaO_4$	$(M+Na)^+$

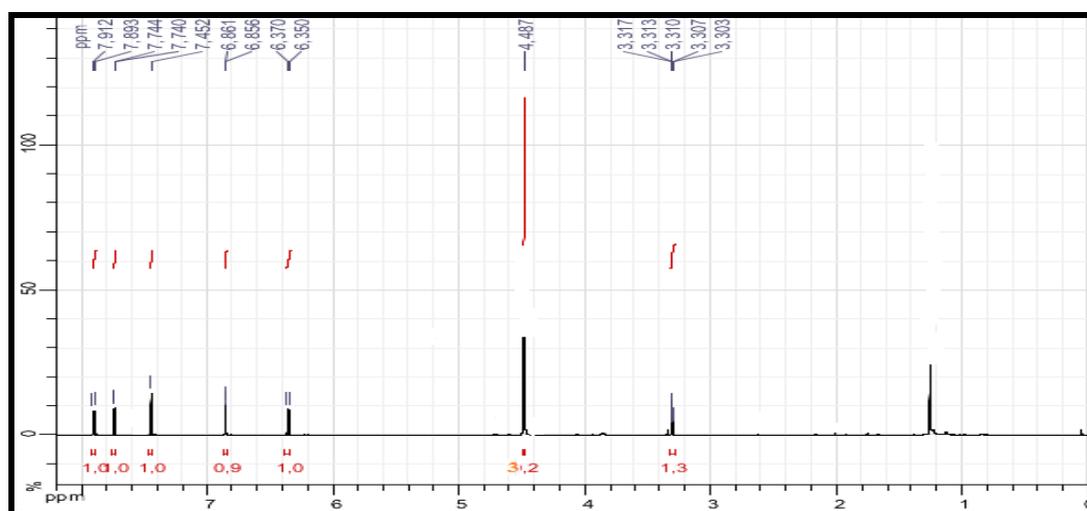
Le spectre RMN ^{13}C (125 MHz dans le mélange $\text{MeOH-}d_4$ et CDCl_3), (Spectre IV.4-1), met en évidence la présence des 12 atomes de carbone.



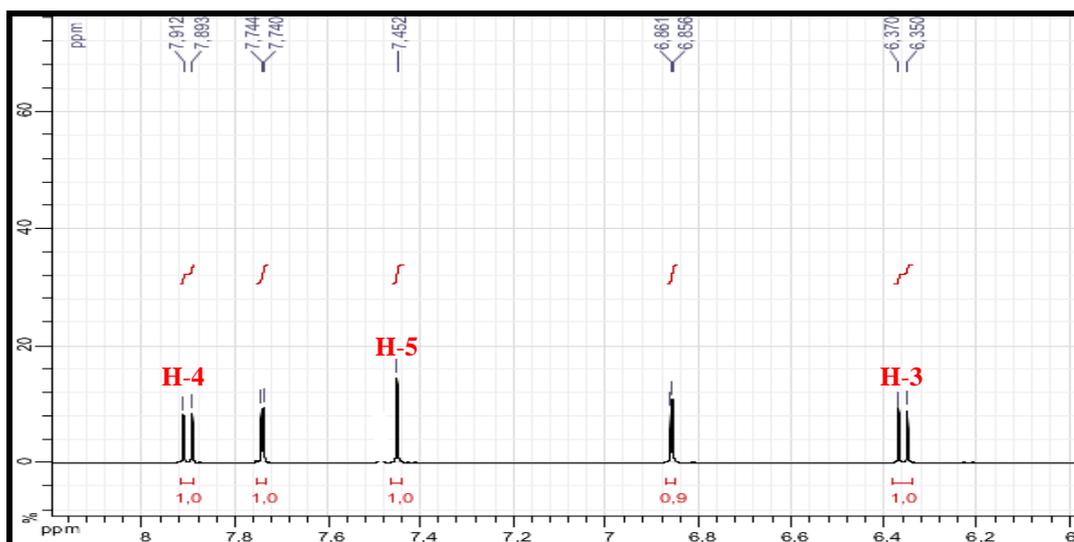
Spectre IV.4-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4+\text{CDCl}_3$, δ ppm) de C2

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.5-1) et son étalement (Spectre IV.5-2) montrent des signaux caractéristiques d'une furanocoumarine qui sont :

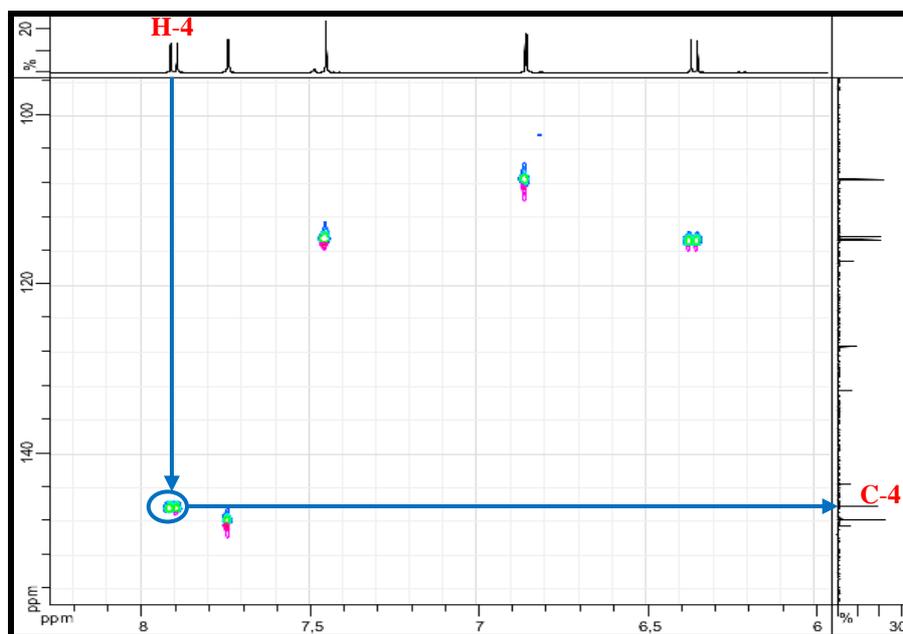
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,36$ ppm avec une constante de couplage $J = 9,4$ Hz attribuable au H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,90$ ppm avec une constante de couplage $J = 9,4$ Hz attribuable au H-4. Le C-4 est repéré à $\delta_{\text{C}} = 146,10$ ppm grâce à l'analyse du spectre HSQC (Spectre IV.6-1 et Figure IV.2).
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 7,45$ ppm attribuable à H-5 vu sa corrélation avec C-4 observée sur le spectre HMBC (Spectre IV.7-1 et Figure IV.2).



Spectre IV.5-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4+\text{CDCl}_3$, δ ppm) de C2



Spectre IV.5-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$, δ ppm) du composé **C2**



Spectre IV.6-1 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$, δ ppm) de **C2**

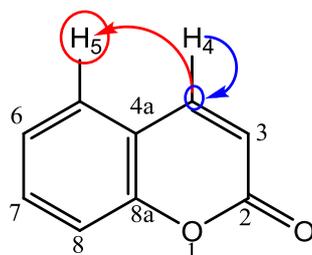
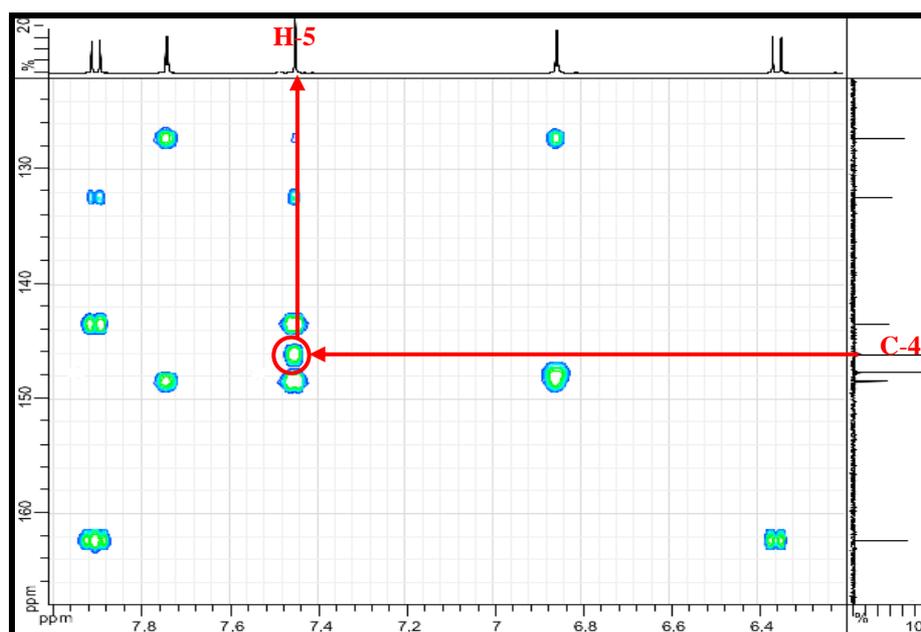
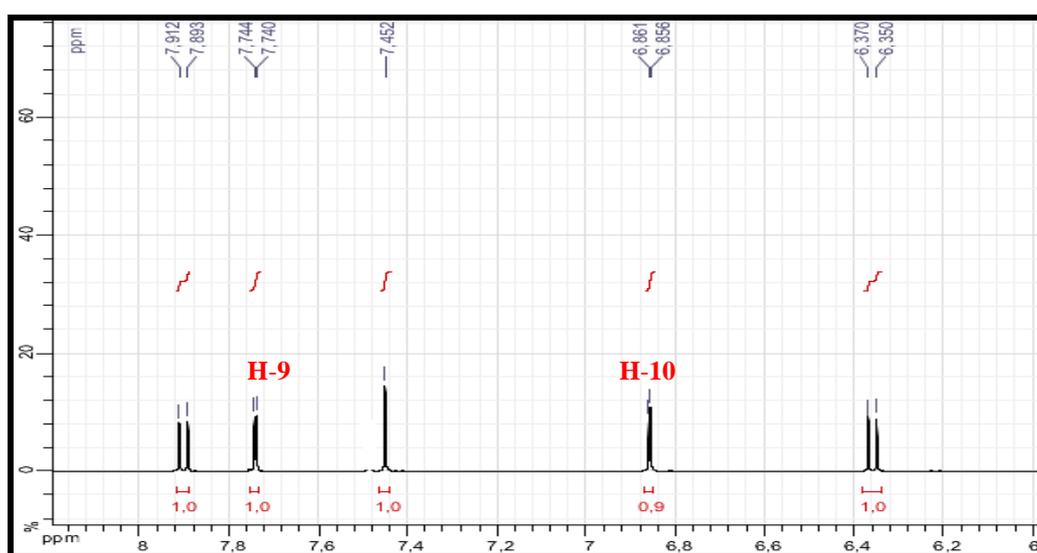


Figure IV.2 : Interaction HSQC (flèche bleue) et HMBC (flèche rouge) observées pour la molécule **C2**



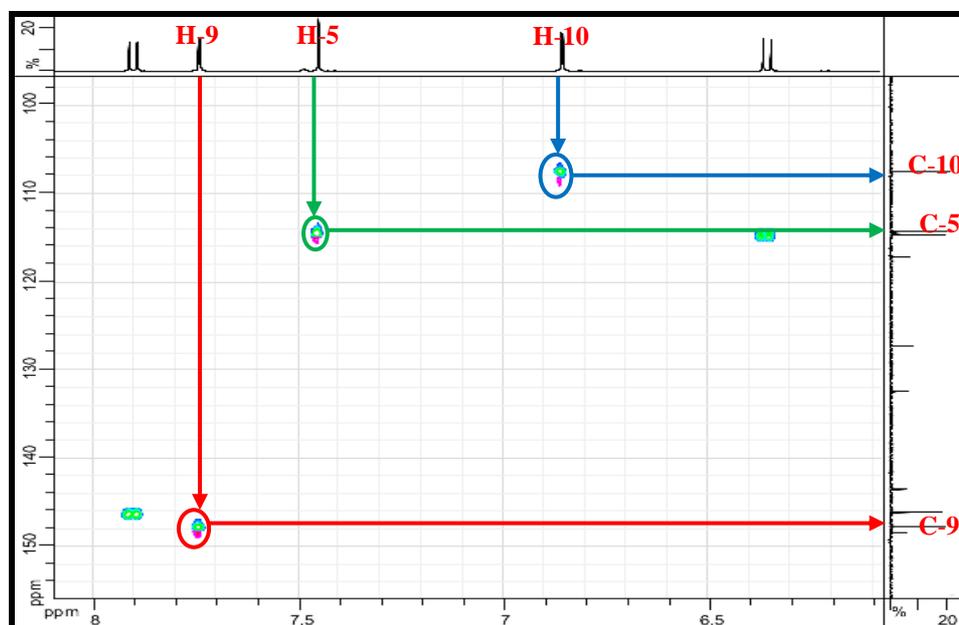
Spectre IV.7-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl $_3$, δ ppm) du composé **C2**

La multiplicité de H-5 (singulet) suppose une substitution des positions C-6 et C-7. En effet, le spectre proton (Spectre IV.5-3) montre par ailleurs un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,86$ ppm ($J = 2,3$ Hz) attribuable à H-10 de la furanocoumarine et un autre doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,74$ ppm ($J = 2,3$ Hz) attribuable à H-9 de cette furanocoumarine.



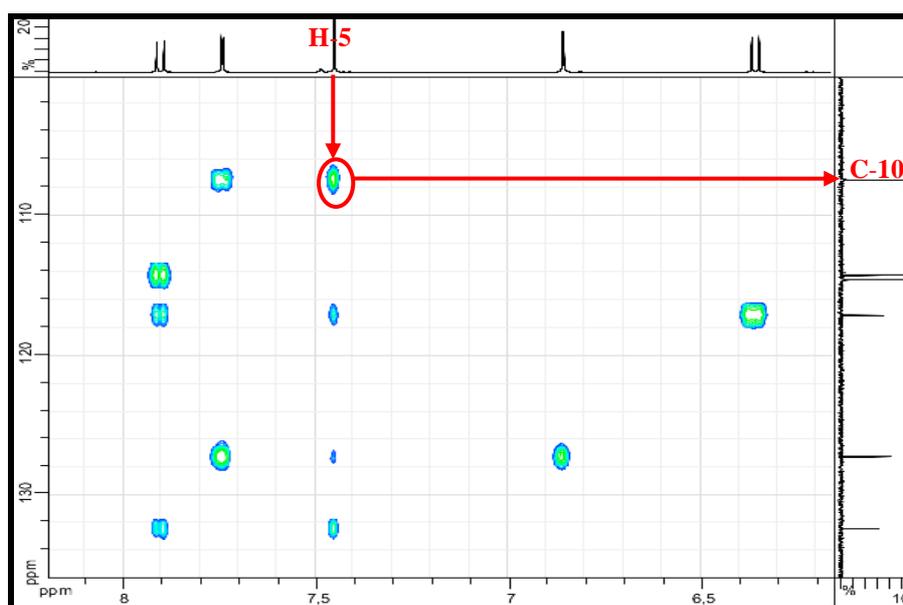
Spectre IV.5-3 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl $_3$, δ ppm) du composé **C2**

Le spectre HSQC (Spectre IV.6-2) permet d'attribuer le C-5 au signal à $\delta_C = 114,28$ ppm, le C-9 au signal à $\delta_C = 147,66$ ppm et le C-10 au signal à $\delta_C = 107,46$ ppm.



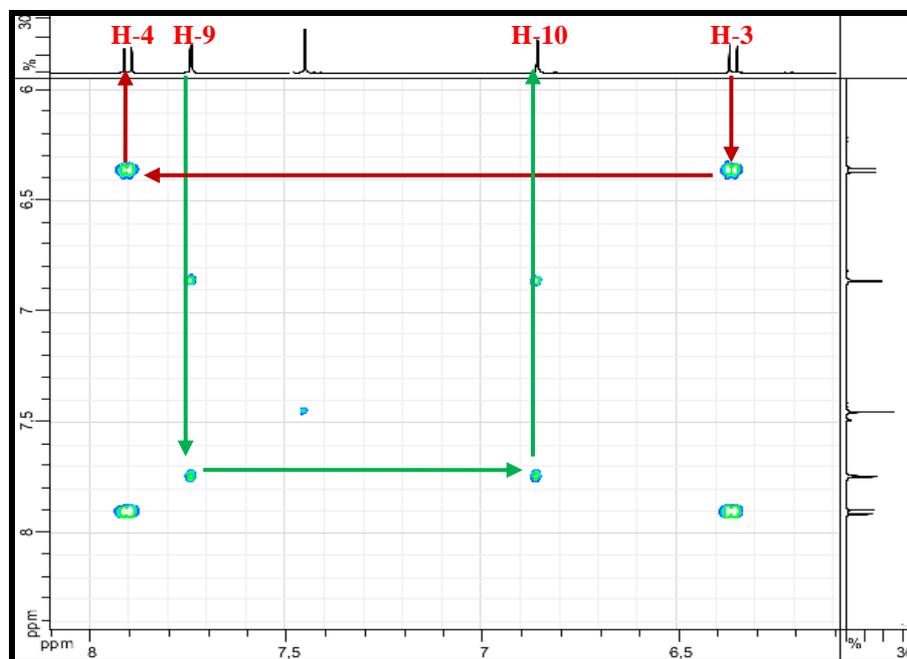
Spectre IV.6-2 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl $_3$, δ ppm) du composé **C2**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.7-2) on relève une corrélation nette entre le H-5 et le C-10, cette observation en faveur d'une coumarine linéaire, confirme les données du spectre d'absorption ultraviolette.



Spectre IV.7-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl $_3$, δ ppm) de **C2**

De même, ces résultats sont en bon accord avec l'expérience COSY, (Spectre IV.8), qui montre des taches de corrélations entre les protons concernés par les couplages scalaires de la furanocoumarine.



Spectre IV.8 : Spectre COSY étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl $_3$, δ ppm) du composé **C2**

Les carbones quaternaires du squelette furanocoumarine peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.7-3). En effet, le carbone C-2 sera attribué au signal à $\delta_C = 162,29$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3, H-4. Aussi le carbone C-4a sera attribué au signal à $\delta_C = 117,13$ ppm grâce à sa corrélation avec les protons H-3 et H-4. Toujours sur le spectre HMBC, les protons H-4 et H-5 corréleront tous les deux avec le carbone aromatique oxygéné ($\delta_C = 143,47$ ppm), ce carbone ne peut être que le C-8a. Le même spectre (Spectre IV.7-3), montre également des taches de corrélations entre les protons H-5, H-10 et le carbone aromatique oxygéné à $\delta_C = 148,43$ ppm attribuable à C-7. Ce spectre montre aussi des corrélations entre les protons H-9, H-10 et le carbone quaternaire aromatique résonant à $\delta_C = 127,25$ ppm attribuable à C-6. Ces corrélations sont représentées dans la figure IV.3.

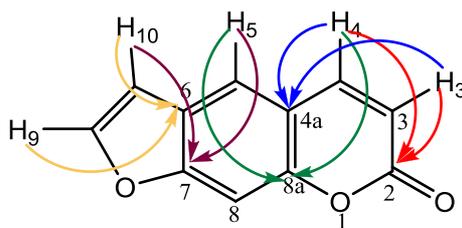
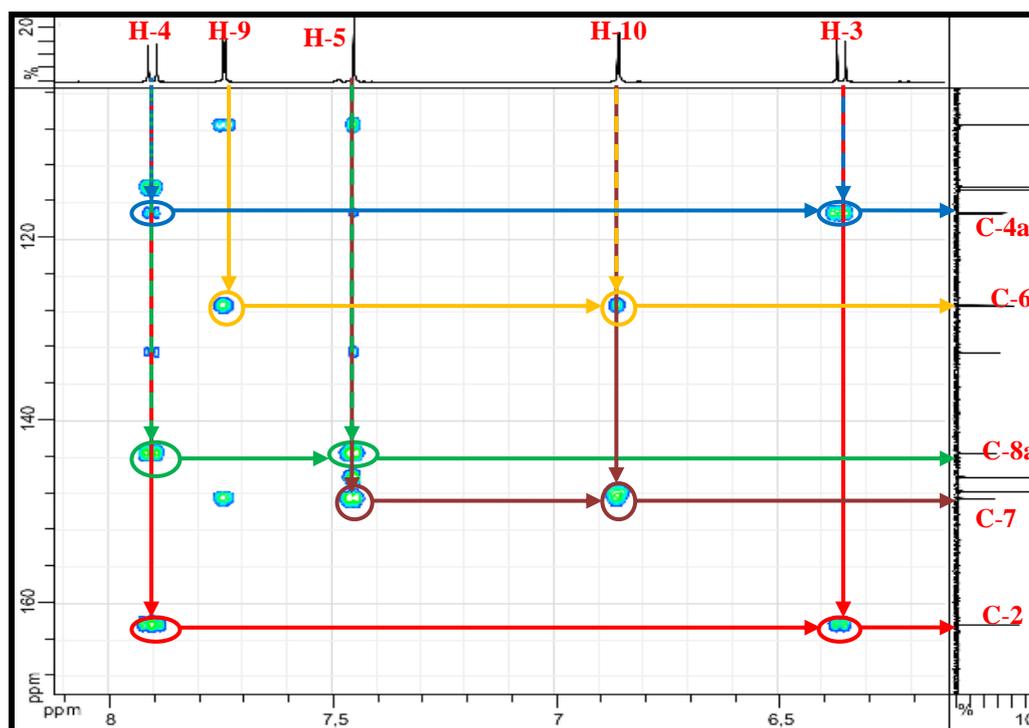
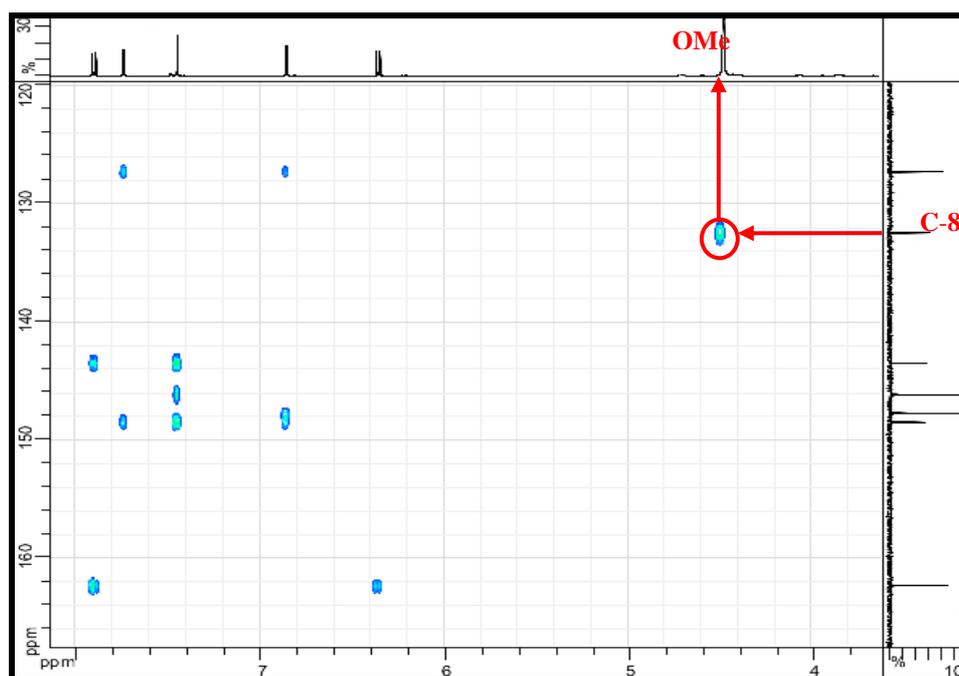


Figure IV.3 : Corrélations HMBC observées pour la molécule C2



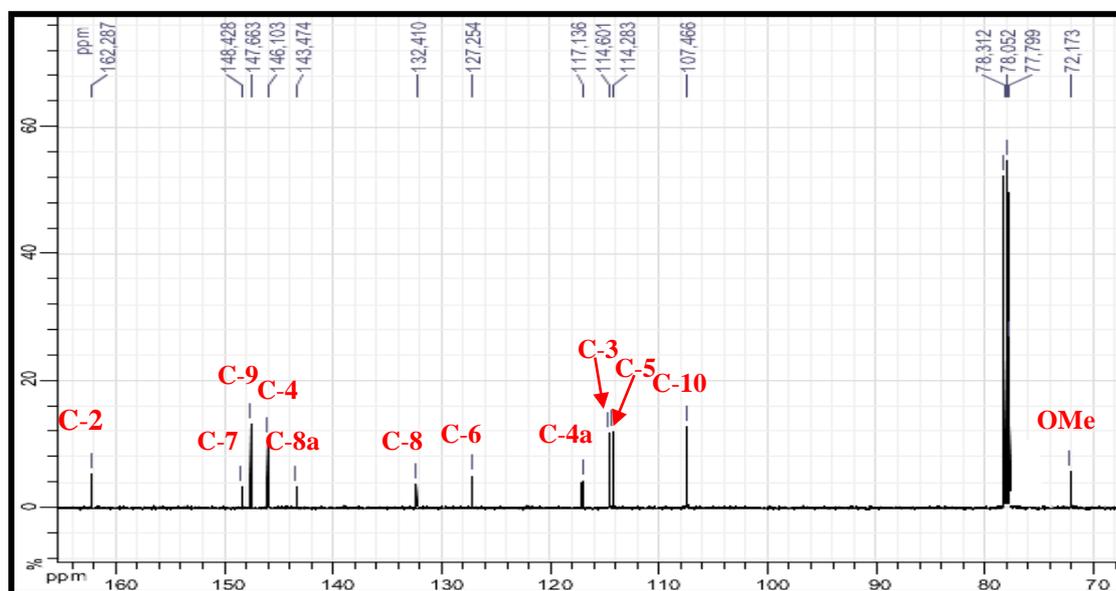
Spectre IV.7-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 +CDCl₃, δ ppm) du composé C2

L'analyse combinée des spectres proton, HSQC et HMBC permet d'attribuer l'ensemble des signaux aux noyaux respectifs comme reporté dans le Tableau IV.3, on relève en particulier la présence d'un signal relatif à un C_q aromatique oxygéné (d'après la valeur de son déplacement chimique) à $\delta_C = 132,41$ ppm, qui ne peut être attribué qu'au C-8 de la furanocoumarine. Ce carbone montre par ailleurs sur le spectre HMBC (Spectre IV.7-4), une corrélation avec les protons du méthyle d'un groupement méthoxyle, dont le signal est localisé à $\delta_H = 4,48$ ppm. Ces observations additionnées aux données de la spectrométrie de masse, permettent de placer ce groupement méthoxyle sur le carbone C-8.



Spectre IV.7-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4+\text{CDCl}_3$, δ ppm) du composé **C2**

Les données de la RMN ^{13}C et ^1H sont rassemblées dans le tableau IV.3 et le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.4-2).



Spectre IV.4-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4+\text{CDCl}_3$, δ ppm) du composé **C2** avec toutes les indications

Tableau IV.3 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) du composé **C2** (MeOH- d_4 +CDCl $_3$)

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	162,29	-	-	-	-
3	114,60	6,36	1H	<i>d</i>	9,4
4	146,10	7,90	1H	<i>d</i>	9,4
4a	117,13	-	-	-	-
5	114,28	7,45	1H	<i>s</i>	-
6	127,25	-	-	-	-
7	148,43	-	-	-	-
8	132,41	-	-	-	-
8a	143,47	-	-	-	-
9	147,66	7,74	1H	<i>d</i>	2,3
10	107,46	6,86	1H	<i>d</i>	2,3
OMe	72,17	4,48	3H	<i>s</i>	-

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature [6], la structure du composé **C2** a pu être établie en tant que **8-méthoxy-psoralène** connue également sous le nom de **xanthotoxine**. Cette molécule est connue pour ses activités antifongiques [7], elle s'est révélée efficace dans le traitement des maladies de la peau ; psoriasis et vitiligo lorsque combinée à la technique de photothérapie.

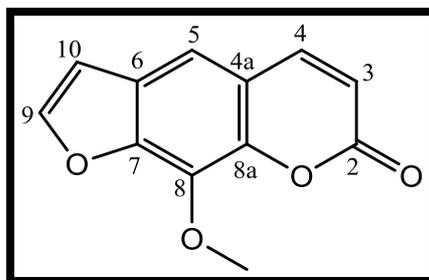
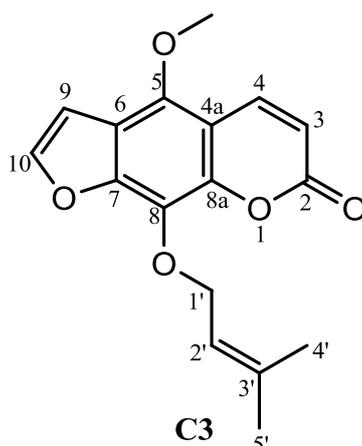
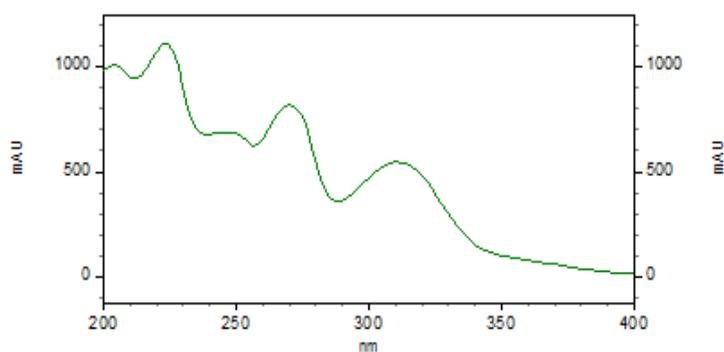


Figure IV.4 : Structure du composé **C2**, xanthotoxine

IV-A-3- Elucidation structurale du composé C3

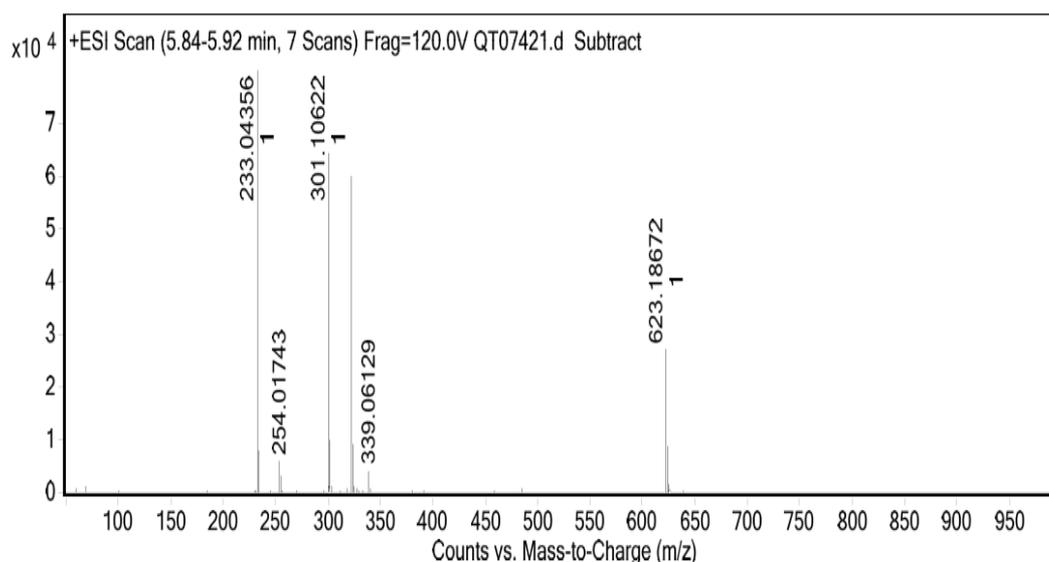


Le composé **C3** se présente sous forme de fines aiguilles incolores. Le spectre UV (Spectre IV.9) de ce produit est compatible avec une structure de type furanocoumarine linéaire.



Spectre IV.9 : Spectres UV-Visible du composé **C3**

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.10 et Tableau IV.4), montre la présence d'ions adduits à $m/z = 301,10622$; $323,08807$; $339,06129$ et $623,18672$ correspondant respectivement à $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[2M+Na]^+$ et orientant alors vers la formule brute $C_{17}H_{16}O_5$ et une molécule comportant 10 degrés d'insaturation.

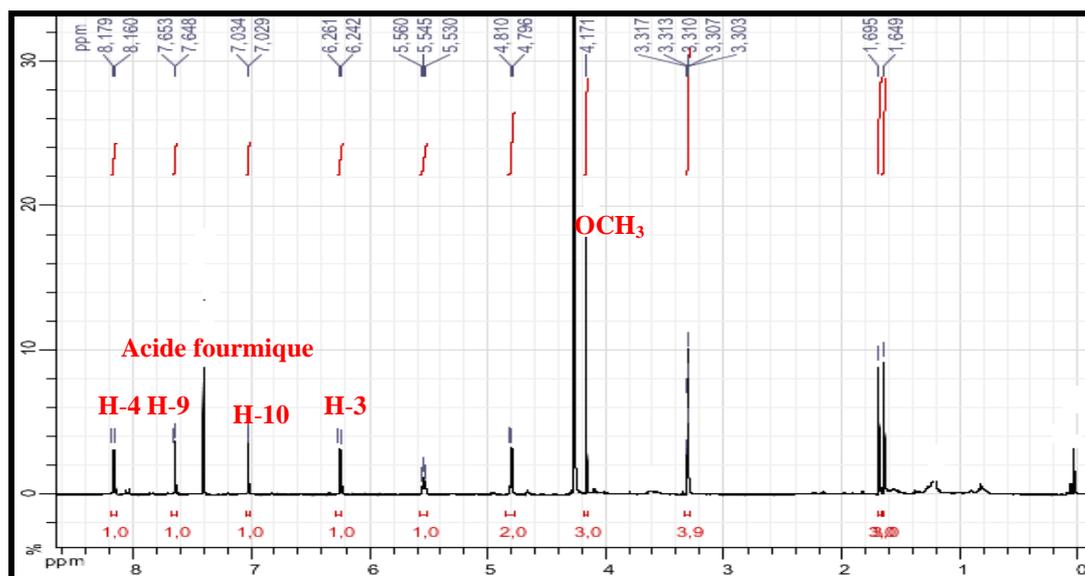


Spectre IV.10 : Spectre HR-ESI-MS du composé **C3**

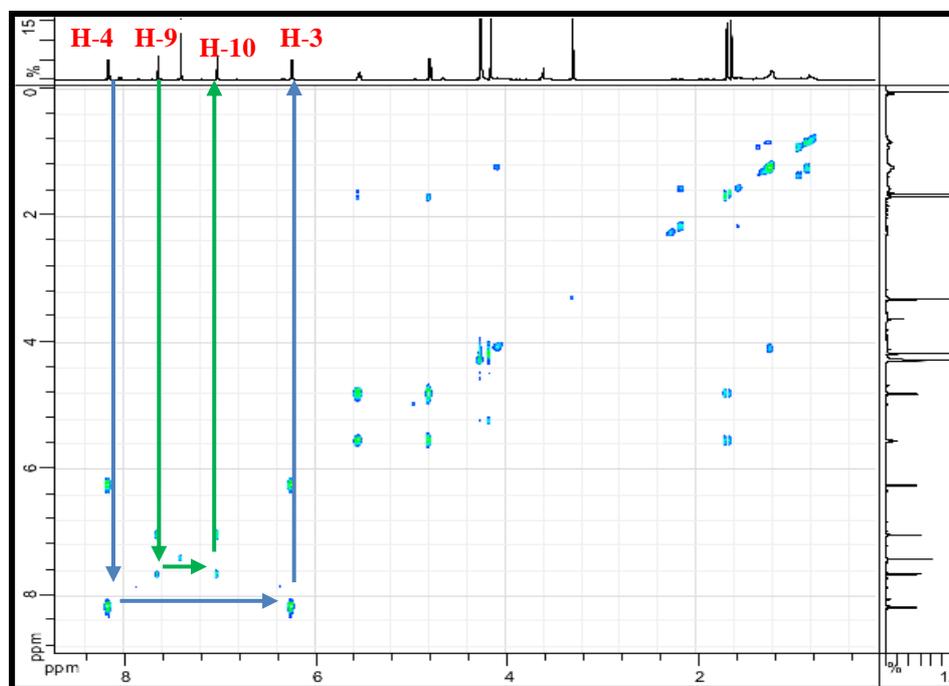
Tableau IV.4 : Données du spectre HR-ESIMS du composé **C3**

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
233.04356	1	80564.6	C12 H9 O5	(M+H) ⁺
234.04676	1	8002.1	C12 H9 O5	(M+H) ⁺
254.01743		5895.9		
301.10622	1	64159	C17 H17 O5	(M+H) ⁺
302.10954	1	9992.1	C17 H17 O5	(M+H) ⁺
323.08807	1	60424.2	C17 H16 Na O5	(M+Na) ⁺
324.09125	1	9030.1	C17 H16 Na O5	(M+Na) ⁺
339.06129		4158.8		
623.18672	1	27006.5	C34 H32 Na O10	(M+Na) ⁺
624.19005	1	8774.2	C34 H32 Na O10	(M+Na) ⁺

Le spectre RMN du proton (Spectre IV.11-1) montre des signaux caractéristiques du noyau psoralène, notamment un système AX à δ_{H} 8,17 et 6,25 ppm ($J = 9,8$ Hz) correspondant aux protons H-4 et H-3, respectivement. Un autre système AX à δ_{H} 7,64 et 7,03 ppm ($J = 2,2$ Hz) correspondant aux protons du noyau furane H-9 et H-10, respectivement. Ces résultats sont en bon accord avec le spectre relatif à l'expérience COSY, (Spectre IV.12-1), qui confirme les interactions de coupage scalaire entre les protons de ces deux systèmes en montrant des taches de corrélations nettes entre eux (Figure IV. 5). Ce spectre montre également la présence d'un singulet de trois protons, à δ_{H} 4,17 ppm correspondant à un groupement méthoxyle.



Spectre IV.11-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C3



Spectre IV.12-1 : Spectre COSY (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C3

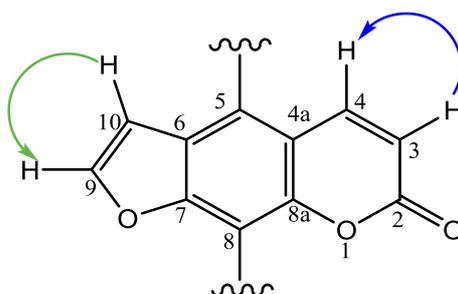
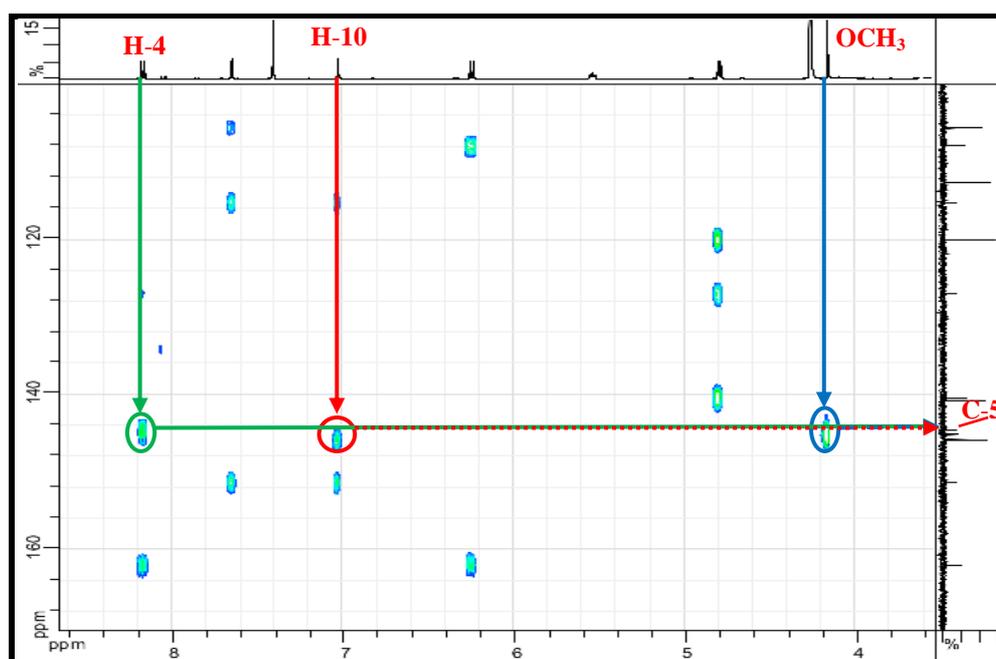


Figure IV.5 : Corrélations COSY observées pour la molécule C3

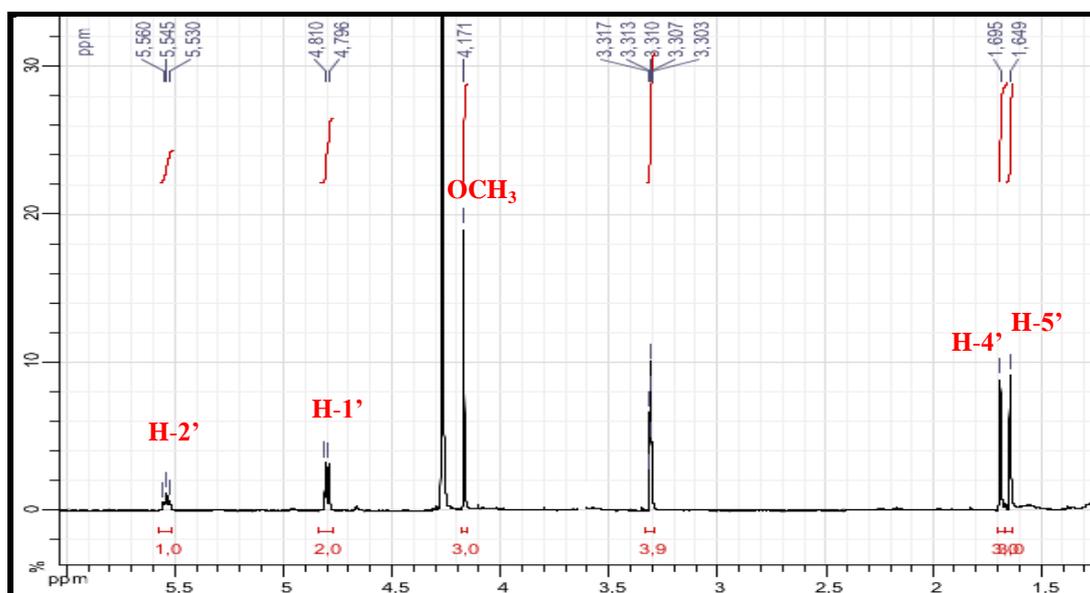
L'examen du spectre HMBC (Spectre IV.13-1) permet de localiser le carbone porteur de ce groupement méthoxyle à δ_C 145,16 ppm grâce à la corrélation nette observée entre les protons de ce méthoxyle et ce carbone. Sur ce même spectre (HMBC) on relève la présence de taches de corrélation entre ce carbone et les protons du squelette furanocoumarique H-4 et H-10. Ces observations permettent alors d'attribuer ce carbone à δ_C 145,16 ppm à la position C-5 de cette furanocoumarine.



Spectre IV.13-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C3

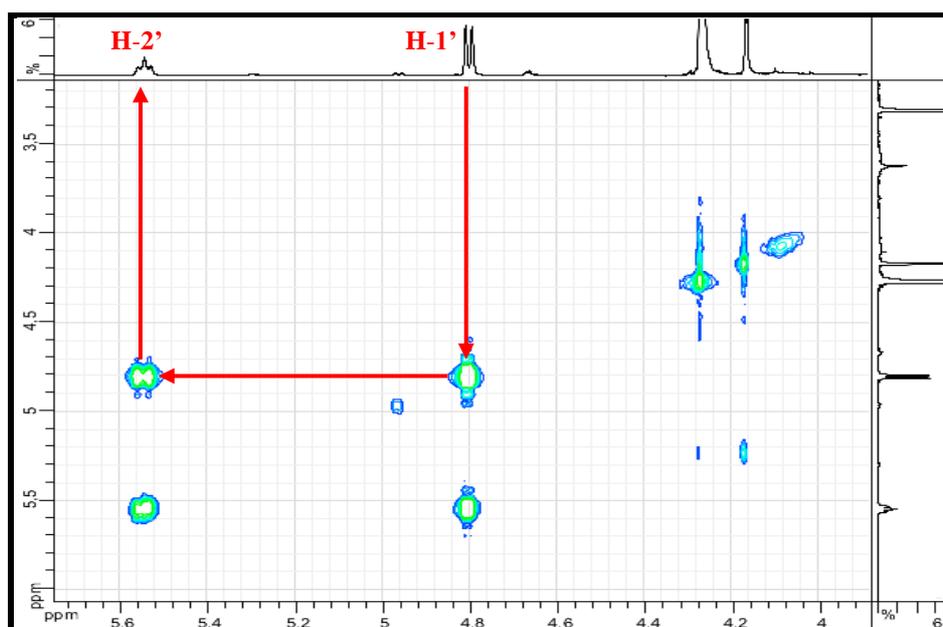
A ce stade de notre analyse, il apparaît clairement en nous aidant des données de la spectrométrie de masse, que nous sommes en présence d'une furanocoumarine linéaire substituée en position C-5 par un méthoxyle et obligatoirement en C-8 par un groupement ayant pour formule C_5H_9O . D'après les données du spectre de masse et notamment la présence de l'ion à m/z 233,04356 résultant de la perte de l'entité C_5H_8 de l'ion quasi-moléculaire $[M+H]^+$, il est clair que la position C-8 est obligatoirement oxygénée. Par ailleurs, le spectre RMN 1H (Spectre IV.11-2), montre un doublet relatif à un groupement méthylène à δ_H 4,80 ppm ($J = 7,1$ Hz), un triplet relatif à un groupement méthyne à δ_H 5,54 ppm ($J = 7,1$ Hz) et deux singulets relatifs à deux méthyles à δ_H 1,69 et 1,65 ppm. Le déplacement chimique du groupement méthylène indique qu'il est lié à un atome d'oxygène (obligatoirement celui en position C-8 de la furanocoumarine) quant à la multiplicité de son signal et notamment la valeur de la constante de couplage, elles indiquent un couplage vicinal avec le proton du

groupement méthyne dont la valeur du déplacement chimique (5,54 ppm) indique qu'il est éthylénique. Ceci est d'ailleurs clair sur le spectre COSY (Spectre IV.12-2), qui montre des corrélations entre les protons de ces deux groupes de noyaux. Suite à ces observations, nous pouvons attribuer les numérotations C-1' au carbone du méthylène et C-2' au carbone du méthyne. De plus et vu la multiplicité du signal de H-2', il est évident que le deuxième carbone de cette double liaison est quaternaire, nous le numérotions C-3'. Il suffira alors de placer sur ce carbone, les deux méthyles résonant sous forme de singulets à δ_H 1,69 et 1,65 ppm. Il est à noter que les valeurs de leur déplacement chimique sont en parfait accord avec cette hypothèse. Nous numérotions les carbones de ces deux groupements méthyles C-4' et C-5', respectivement. Ainsi et en conformité avec les données de la spectrométrie de masse, cette molécule porte un groupement prényloxy en position C-8 (Figure IV.6).



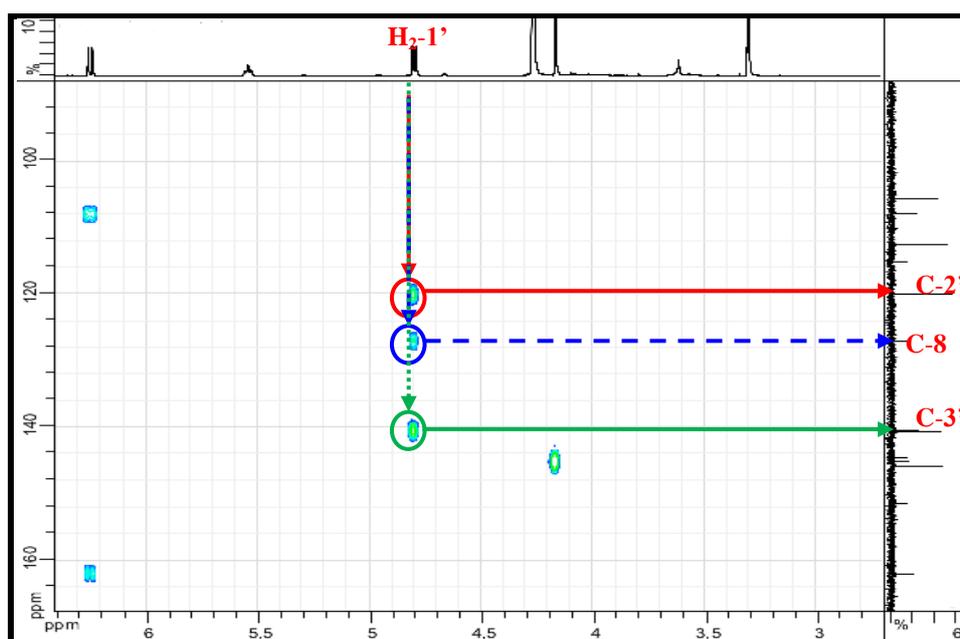
Spectre IV.11-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé

C3



Spectre IV.12-2 : Spectre COSY étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C3

Le spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC (Spectre IV.13-2), confirme cette analyse en montrant en plus des taches de corrélations attendues, des taches de corrélations nettes entre les protons $H_{2-1'}$ et les carbones éthyléniques à δ_C 120,03 et δ_C 140,44 ppm ; permettant ainsi leur attribution à C-2' et C-3', respectivement. Ces deux protons $H_{2-1'}$ permettent également l'attribution du signal à δ_C 127,03 ppm au C-8 de cette furanocoumarine grâce à la tache de corrélation observée entre ces protons et ce carbone.



Spectre IV.13-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C3

En parfaite compatibilité avec les résultats de la spectrométrie de masse, le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.14-1) montre 17 signaux. Grâce au spectre DEPT 135 (Spectre IV.15), et aux analyses complètes des spectres HSQC (Spectre IV.16) et HMBC (Spectre IV.13-3 et Spectre IV.13-4), les attributions suivantes des atomes de carbone ont été réalisées sans aucune ambiguïté.

C-4 à δ_{C} 140,74 ppm grâce à sa corrélation avec H-4 sur le spectre HSQC.

C-3 à δ_{C} 112,63 ppm grâce à sa corrélation avec H-3 sur le spectre HSQC.

C-9 à δ_{C} 145,83 ppm grâce à sa corrélation avec H-9 sur le spectre HSQC.

C-10 à δ_{C} 105,64 ppm grâce à sa corrélation avec H-10 sur le spectre HSQC.

C-1' à δ_{C} 70,86 ppm grâce à sa corrélation avec H₂-1' sur le spectre HSQC.

C-2' à δ_{C} 120,03 ppm grâce à sa corrélation avec H-2' sur le spectre HSQC.

C-4' à δ_{C} 26,01 ppm grâce à sa corrélation avec H₃-4' sur le spectre HSQC.

C-5' à δ_{C} 18,23 ppm grâce à sa corrélation avec H₃-5' sur le spectre HSQC.

OCH₃ à δ_{C} 61,12 ppm grâce à sa corrélation avec les protons du OCH₃ sur le spectre HSQC.

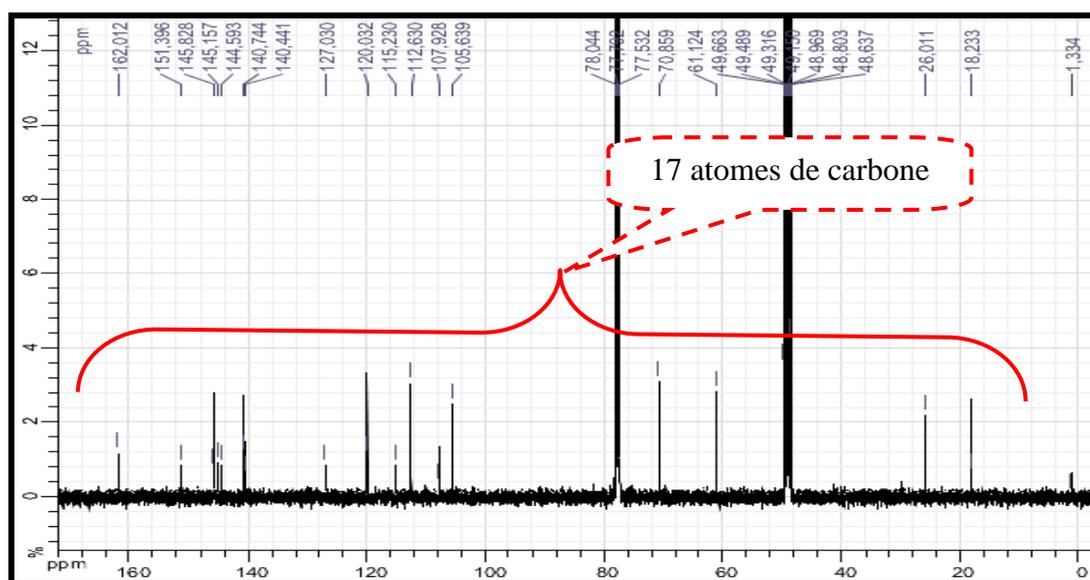
C-2 à δ_{C} 162,01 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-3 et H-4 sur le spectre HMBC.

C-4a à δ_{C} 107,93 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à sa corrélation avec H-3 sur le spectre HMBC.

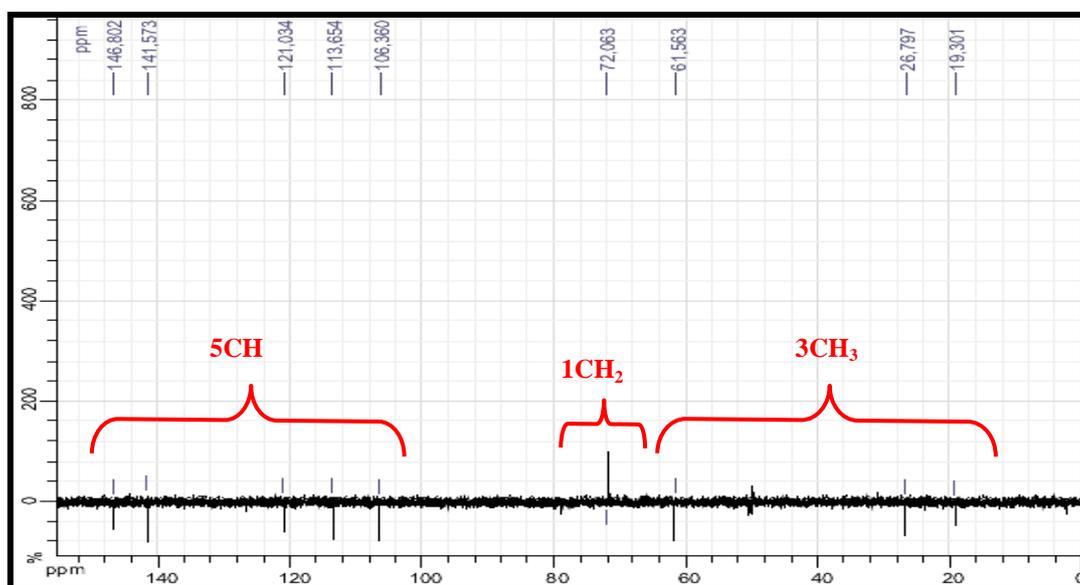
C-6 à δ_{C} 115,23 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-10 et H-9 sur le spectre HMBC.

C-7 à δ_{C} 151,40 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-10 et H-9 sur le spectre HMBC.

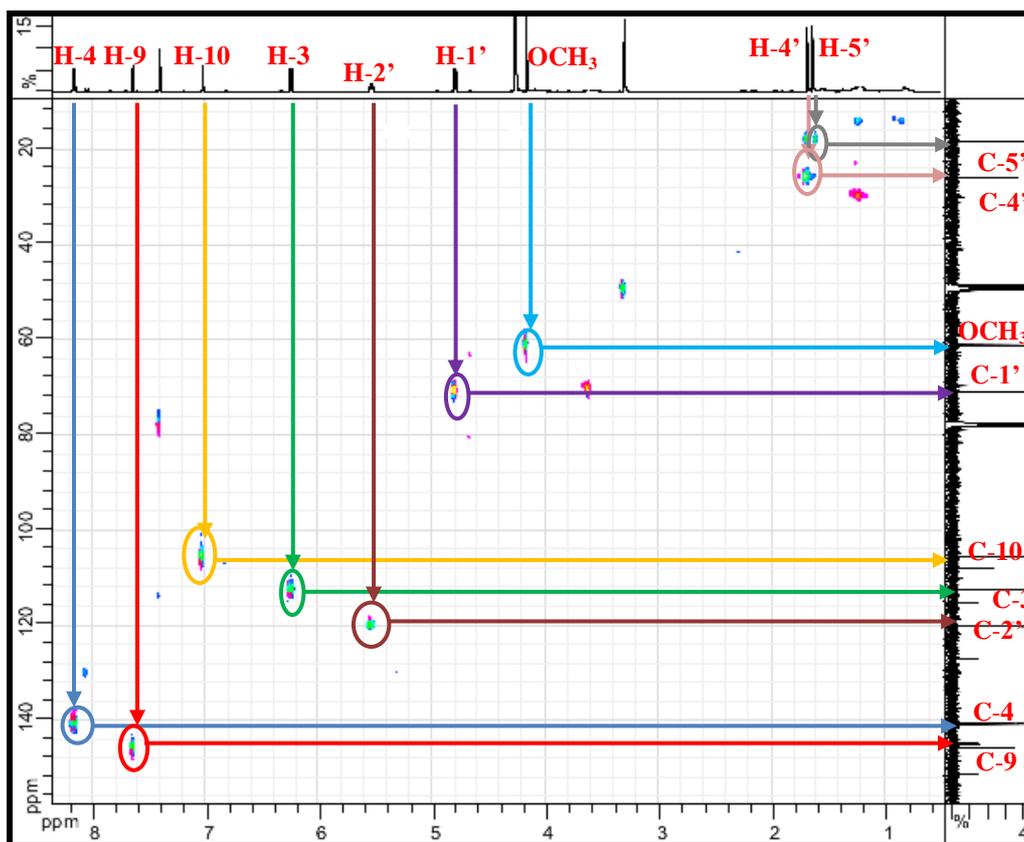
C-8a à δ_{C} 144,60 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à sa corrélation avec H-4 sur le spectre HMBC.



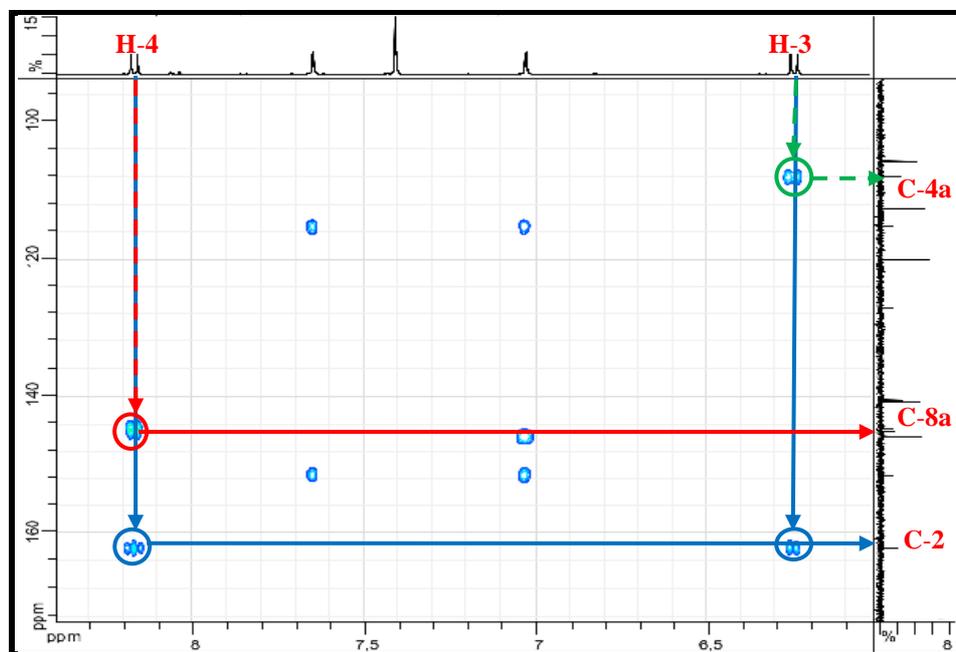
Spectre IV.14-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C3



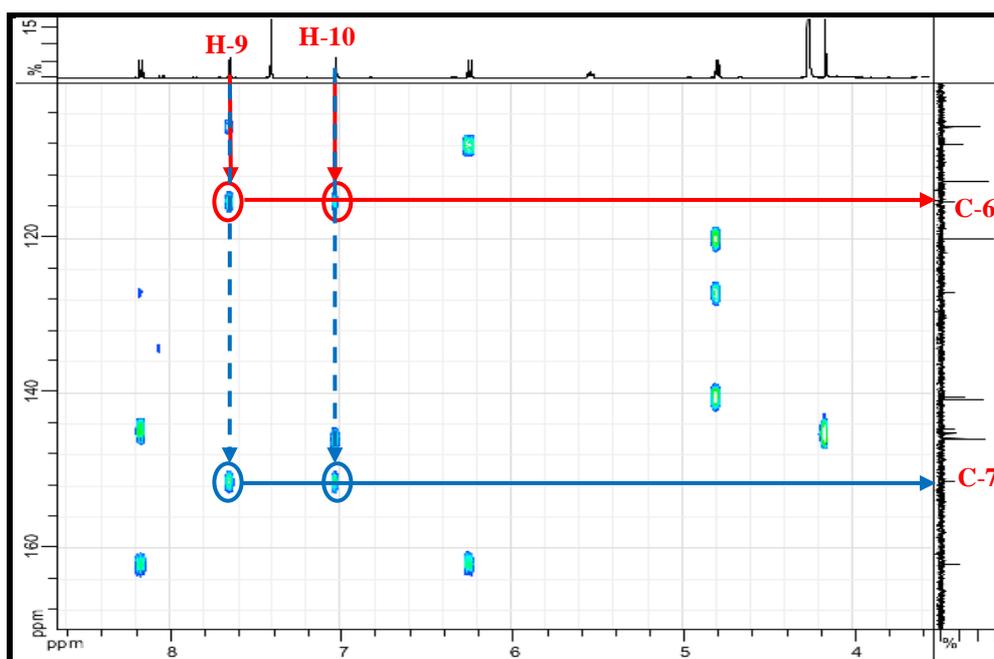
Spectre IV.15 : Spectre DEPT 135 (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C3



Spectre IV.16 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C3



Spectre IV.13-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C3



Spectre IV.13-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C3**

L'ensemble de ces données regroupées dans le tableau IV.5, et appuyées avec celles de la littérature [8] ont permis de conclure que le composé **C3** ne peut être que la **5-méthoxyimpératorine** connue sous le nom de **phelloptérine** (Figure IV.6).

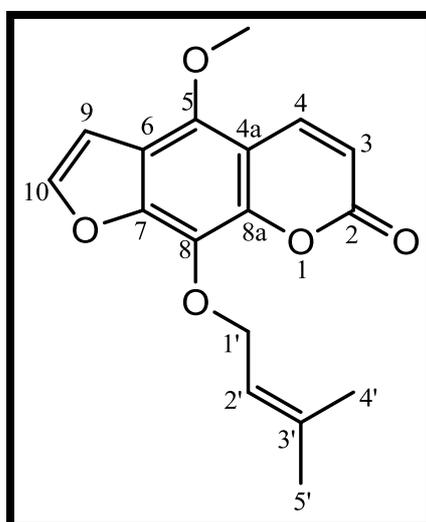
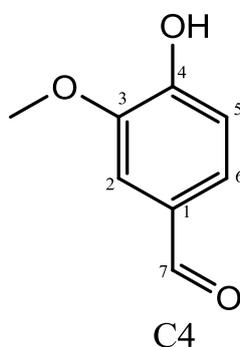


Figure IV.6 : Structure du composé **C3**, **phelloptérine**

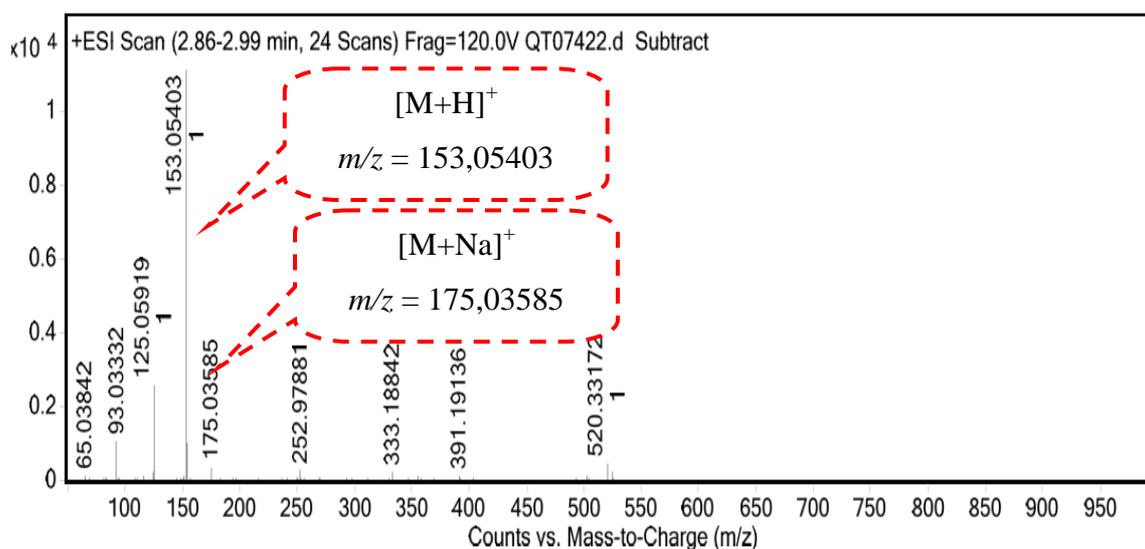
Tableau IV.5 : Donnés RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **C3**

position	δ_C	δ_H	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	162,01	-	-	-	-
3	112,63	6,25	1H	<i>d</i>	9,8
4	140,74	8,17	1H	<i>d</i>	9,8
4a	107,93	-	-	-	-
5	145,16	-	-	-	-
6	115,23	-	-	-	-
7	151,40	-	-	-	-
8	127,03	-	-	-	-
8a	144,60	-	-	-	-
9	145,83	7,64	1H	<i>d</i>	2,2
10	105,64	7,03	1H	<i>d</i>	2,2
1'	70,86	4,80	2H	<i>d</i>	7,1
2'	120,03	5,54	1H	<i>t</i>	7,1
3'	140,44	-	-	-	-
4'	26,01	1,69	3H	<i>s</i>	-
5'	18,23	1,65	3H	<i>s</i>	-
OCH ₃	61,12	4,17	3H	<i>s</i>	-

IV-A-4- Elucidation structurale du composé C4



L'analyse du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.17 et Tableau IV.6), a indiqué la présence d'ions adduits à m/z 153,05403 $[M+H]^+$ et m/z 175,03585 $[M+Na]^+$ indiquant une formule brute **C₈H₈O₃** pour cette molécule qui doit par conséquent comporter cinq insaturations.



Spectre IV.17 : Spectre HR-ESI-MS du composé C4

Tableau IV.6 : Données du spectre HR-ESIMS du composé C4

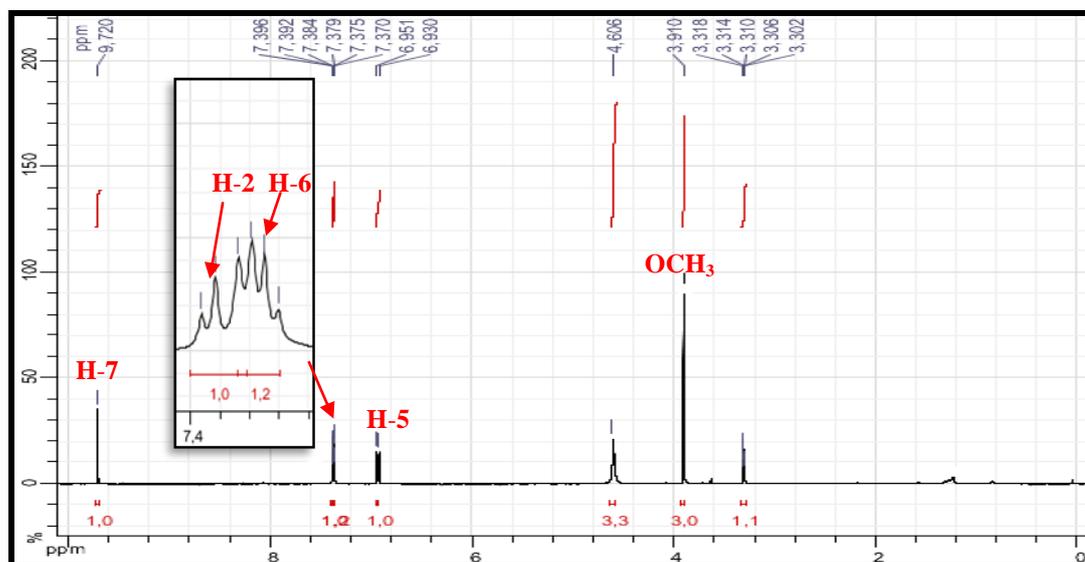
<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
93.03332		1085.6		
125.05919	1	2647.7		
153.05403	1	11205.7	C8 H9 O3	(M+H)+
153.08705		626.7		
154.05755	1	979.4	C8 H9 O3	(M+H)+
175.03585		367.2		
251.97125		236.1		
252.97881		276.6		
520.33172	1	463.7	C22 H50 N O12	(M+NH4)+
525.28729		220.1	C22 H46 Na O12	(M+Na)+

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.18), et son étalement, montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique trisubstitué dans les positions C-1, C-3 et C-4 est caractérisé par :

- ✓ Un doublet d'intégration 1H ($J = 8,5$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6,94$ ppm, correspondant un couplage ortho attribuable alors à H-5.
- ✓ Un doublet de doublets d'intégration 1H ($J = 8,5 ; 2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 7,37$ ppm attribuable à H-6.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H ($J = 2$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 7,39$ ppm, indiquant un couplage en méta et attribuable alors à H-2.

Ce spectre comporte également un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 9,72$ ppm caractéristique d'un groupe formyle et un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm, indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH_3). Vu la formule brute de

cette molécule, il est évident qu'il s'agit d'un benzaldéhyde substitué par un groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle.

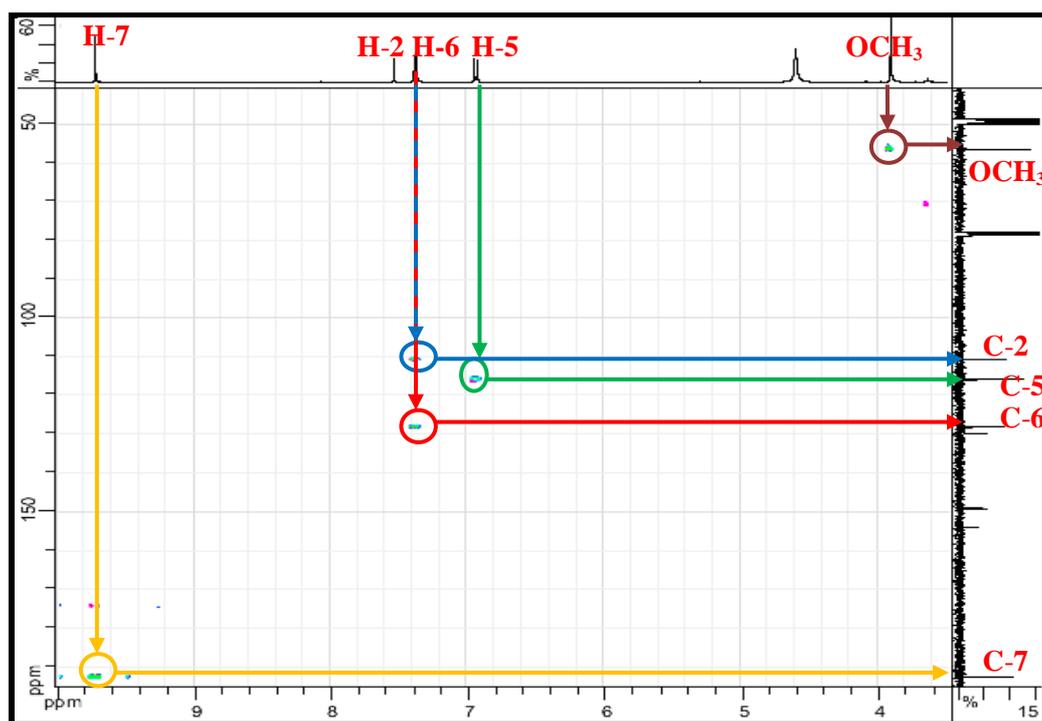


Spectre IV.18 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C4

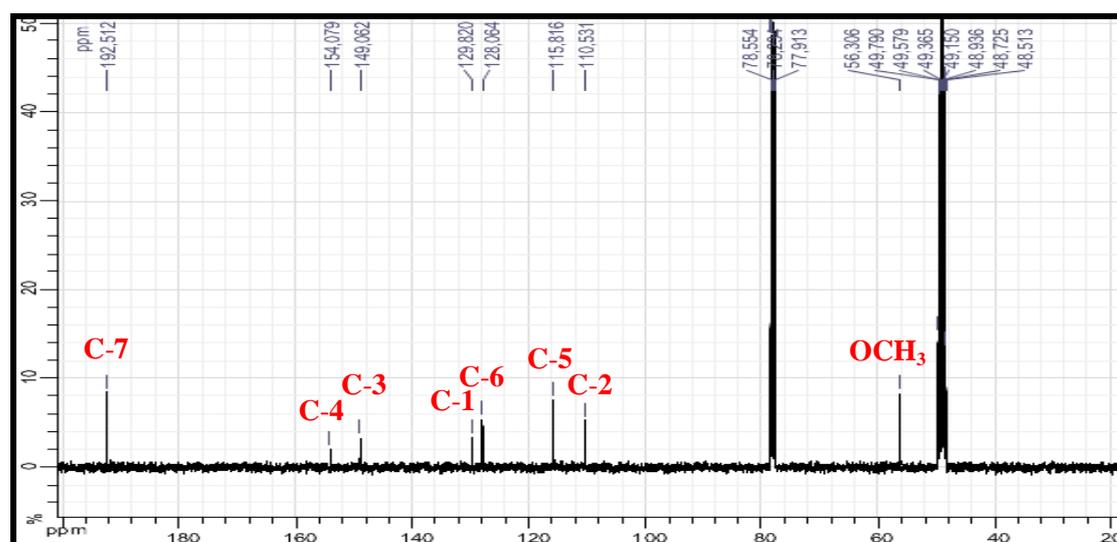
L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre IV.19) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondant ainsi :

- ✓ Le H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 115,82$ ppm à l'atome de carbone C-5.
- ✓ Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 128,06$ ppm à l'atome de carbone C-6.
- ✓ Le H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 110,53$ ppm à l'atome de carbone C-2.
- ✓ Les protons du groupement méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm permettent l'attribution de leur atome de carbone au signal à $\delta_{\text{C}} = 56,31$ ppm.
- ✓ Le proton aldéhydique à $\delta_{\text{H}} = 9,72$ ppm permet l'attribution de son carbonyle au carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 192,51$ ppm que nous pouvons numéroter C-7.

En plus des signaux relatifs à ces carbones, le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.20) confirme les résultats de la spectrométrie de masse par la présence de trois autres signaux relatifs à aux trois carbones quaternaires attendus. Le premier à $\delta_{\text{C}} = 129,82$ ppm sera attribué d'après la valeur de son déplacement chimique au carbone porteur du groupe formyle. Les deux signaux à $\delta_{\text{C}} = 149,06$ et $154,08$ ppm seront attribués aux deux carbones oxygénés porteurs des groupements Hydroxyle et méthoxyle.

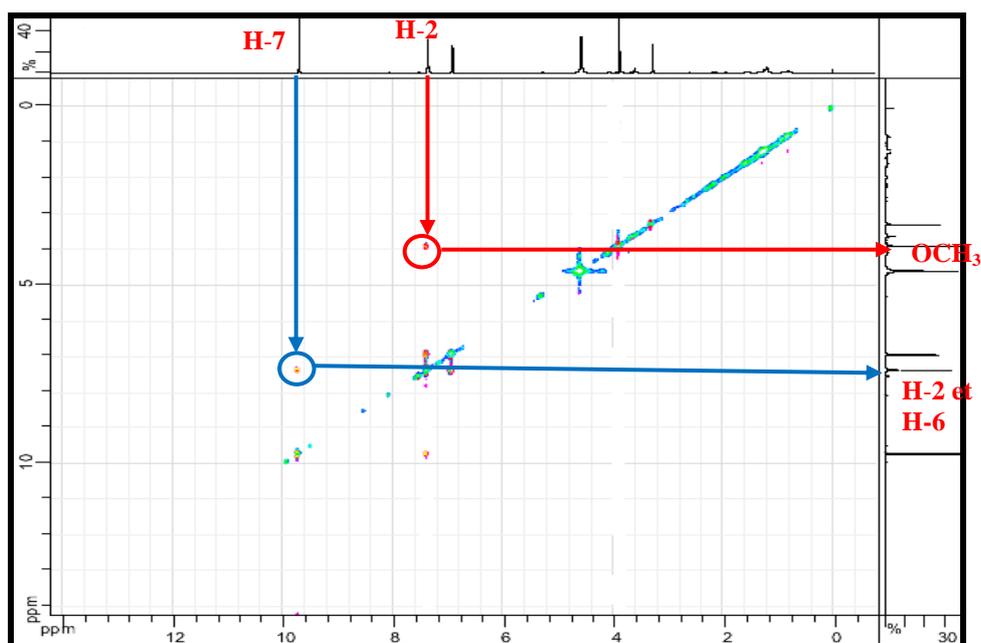


Spectre IV.19 : Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C4



Spectre IV.20 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C4

La numérotation de ces carbones quaternaires a été effectuée sur la base des données du spectre NOESY (Spectre IV-21). En effet, sur ce spectre, le proton aldéhydique H-7 montre des corrélations NOE avec les protons H-2 et H-6 ce qui permet alors de placer le groupement formyle sur le carbone C-1 du noyau aromatique. Ce spectre montre également une corrélation NOE entre les protons du groupement méthoxyle et le proton H-2, indiquant que le groupement méthoxyle est localisé en C-3. De ce fait le groupement hydroxyle est en position C-4.



Spectre IV.21 : Spectre NOESY (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C4

La combinaison de l'ensemble de ces résultats mène au **4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde** connu sous le nom de **vanilline** [9] (Figure IV.7).

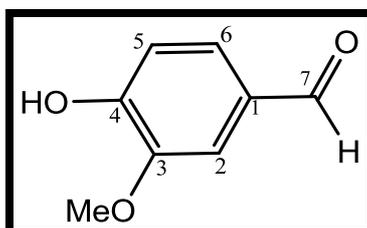


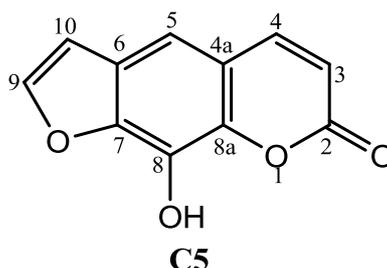
Figure IV.7 : Structure finale du composé C4, vanilline

Les données de la RMN ^1H , ^{13}C en accord avec celles de la littérature sont rassemblées dans le tableau IV.7.

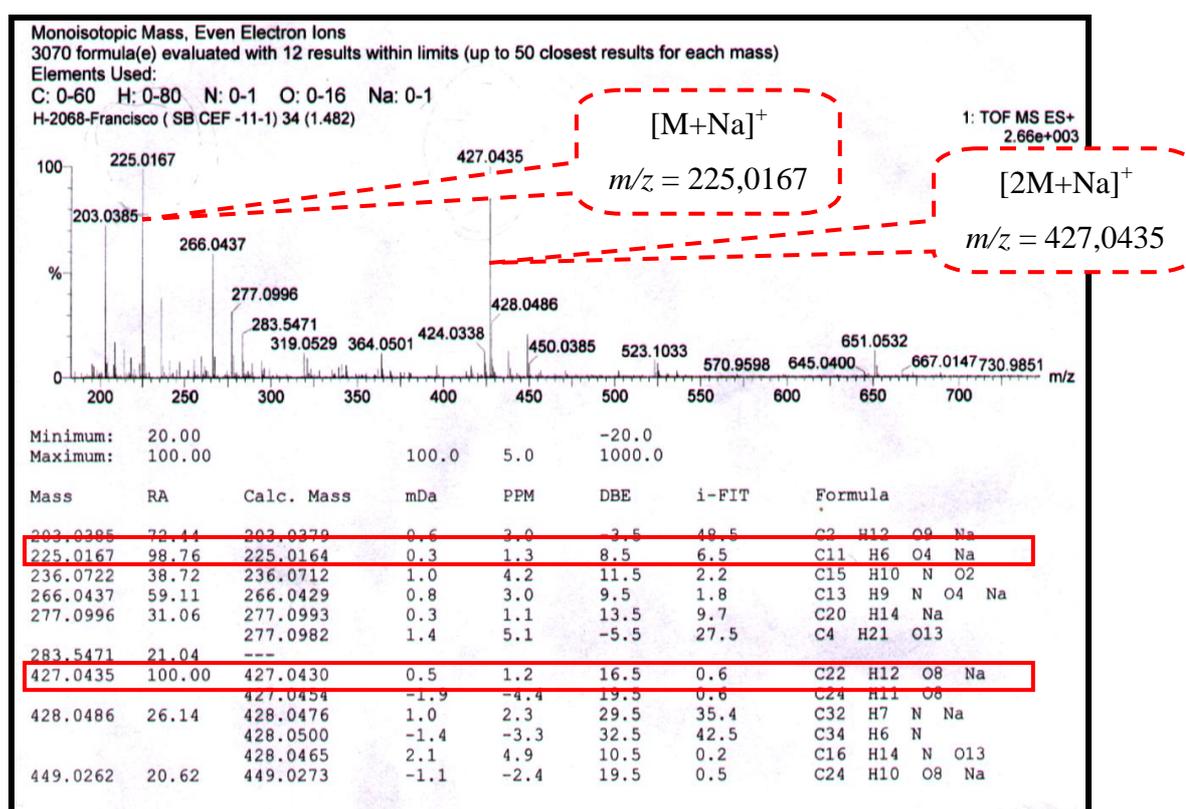
Tableau IV.7 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C du composé C4

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	129,82	-	-	-	-
2	110,53	7,39	1H	<i>d</i>	2
3	149,06	-	-	-	-
4	154,08	-	-	-	-
5	115,82	6,94	1H	<i>d</i>	8,5
6	128,06	7,37	1H	<i>dd</i>	8,5 ; 2
7	192,51	9,72	1H	<i>s</i>	-
OMe-3	56,31	3,91	3H	<i>s</i>	-

IV-A-5- Elucidation structurale du composé C5

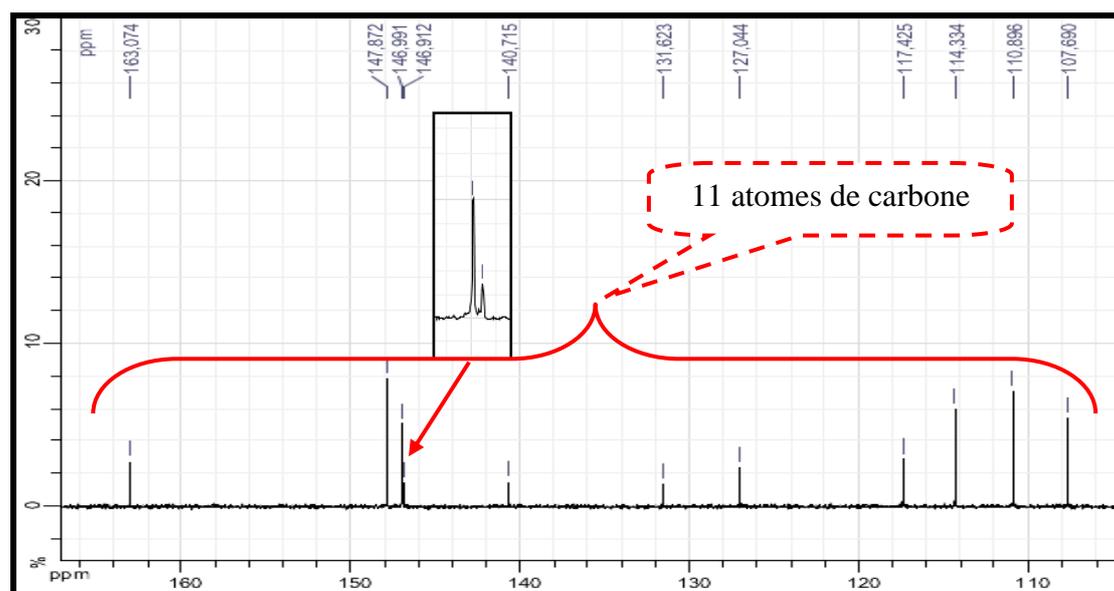


L'examen du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation positive [TOF-HRESI-MS(+)] (Spectre IV.22) de ce composé **C5**, montre la présence des ions adduits à m/z 225,0167 $[M+Na]^+$ (98,76 % correspondant à $C_{11}H_6O_4Na$ (calculée pour 225,0164) et m/z 427,0435 $[2M+Na]^+$ (100 %) correspondant à $C_{22}H_{12}O_8Na$ (calculée pour 427,0430) indiquant une formule brute $C_{11}H_6O_4$ soit une structure comportant neuf insaturations.



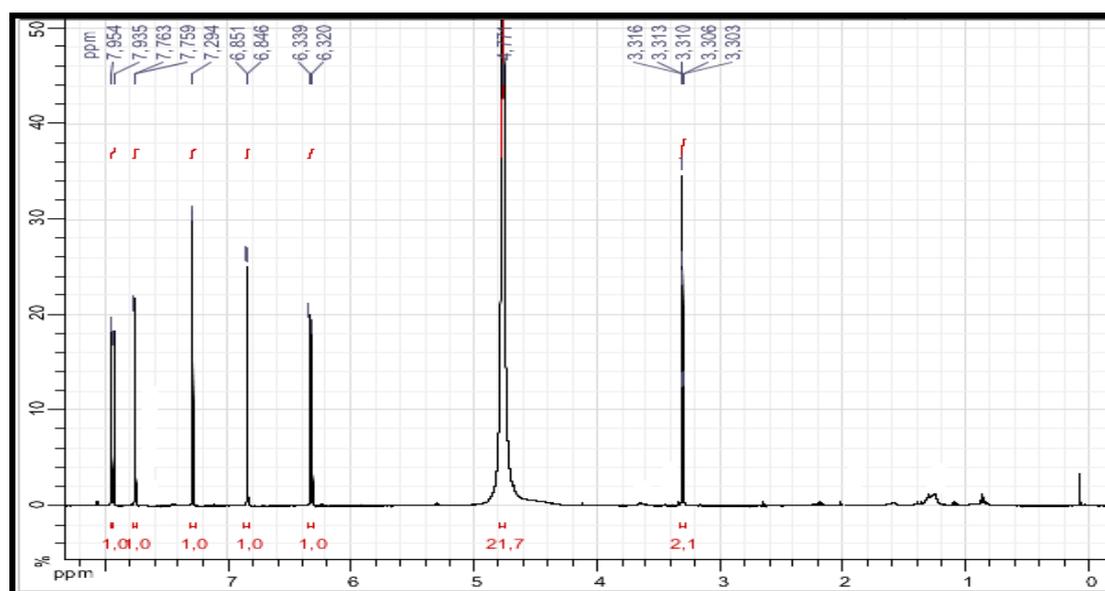
Spectre IV.22 : Données de la HR-ESI-MS (+) relatives du composé **C5**

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.23-1) confirme la présence de 11 atomes de carbone. Ces carbones admettent tous un déplacement chimique supérieur à 100 ppm.

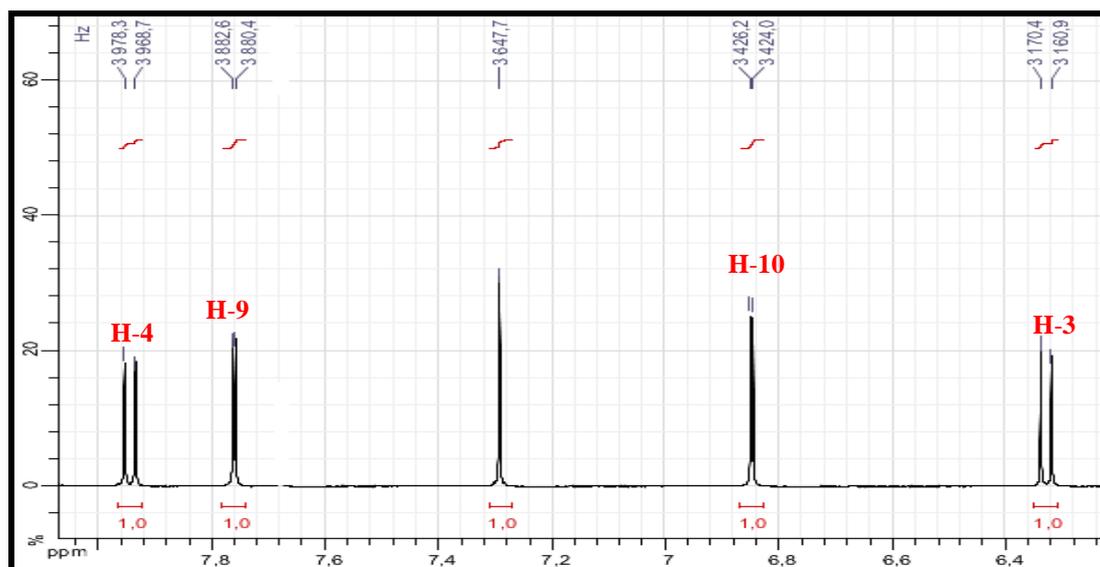


Spectre IV.23-1 : Spectre RMN ^{13}C étalé (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C5**

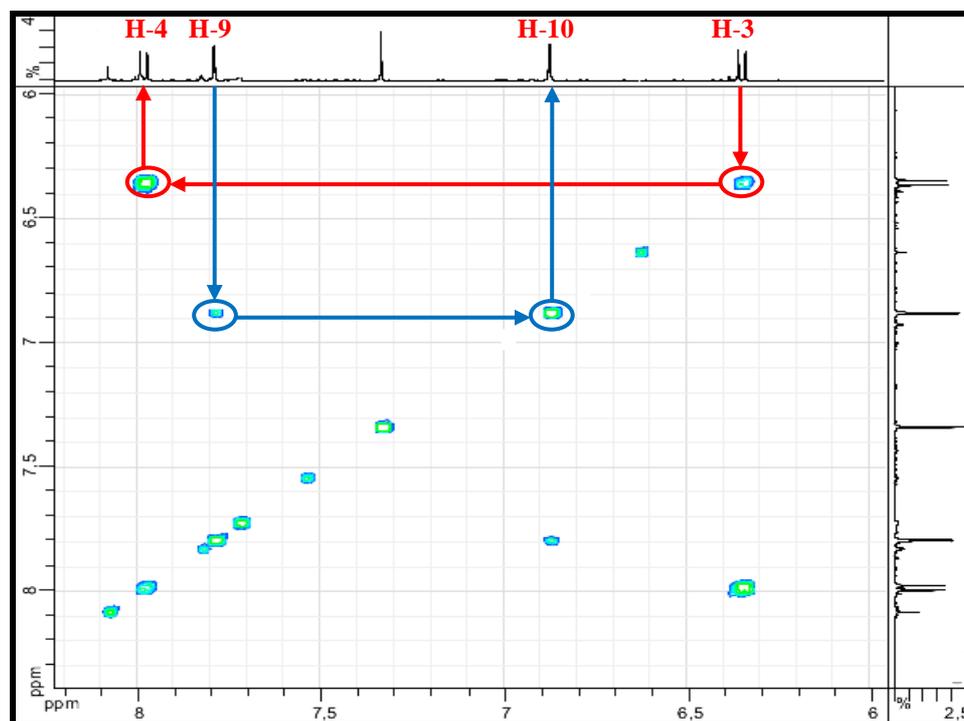
Le spectre proton (Spectre IV.24-2), montre la présence de deux systèmes AX caractéristiques d'un squelette de type furanocoumarine. Le premier à $\delta_{\text{H}} = 6,32$ et 7,94 ppm ($J = 9,6$ Hz), couplage confirmé par le spectre COSY (Spectre IV.25-1) est attribuable à H-3 et H-4, respectivement. Le deuxième à $\delta_{\text{H}} = 6,84$ et 7,76 ppm ($J = 2,2$ Hz) est attribuable à H-10 et H-9, respectivement. Le couplage vicinal de ces deux noyaux est également confirmé par le spectre COSY (Spectre IV.25-1 et Figure IV.8).



Spectre IV.24-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C5**



Spectre IV. 24-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C5



Spectre IV.25-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C5

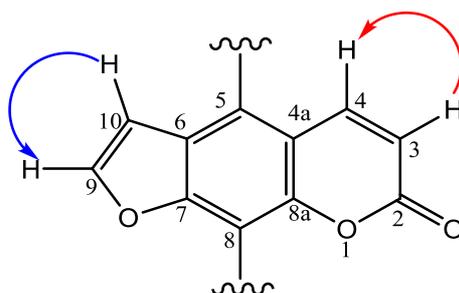
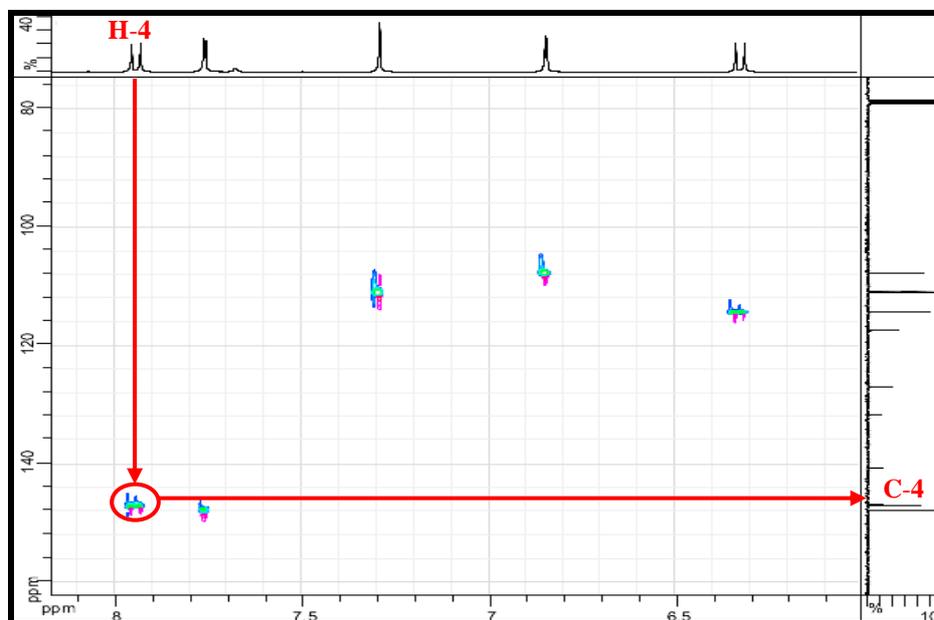
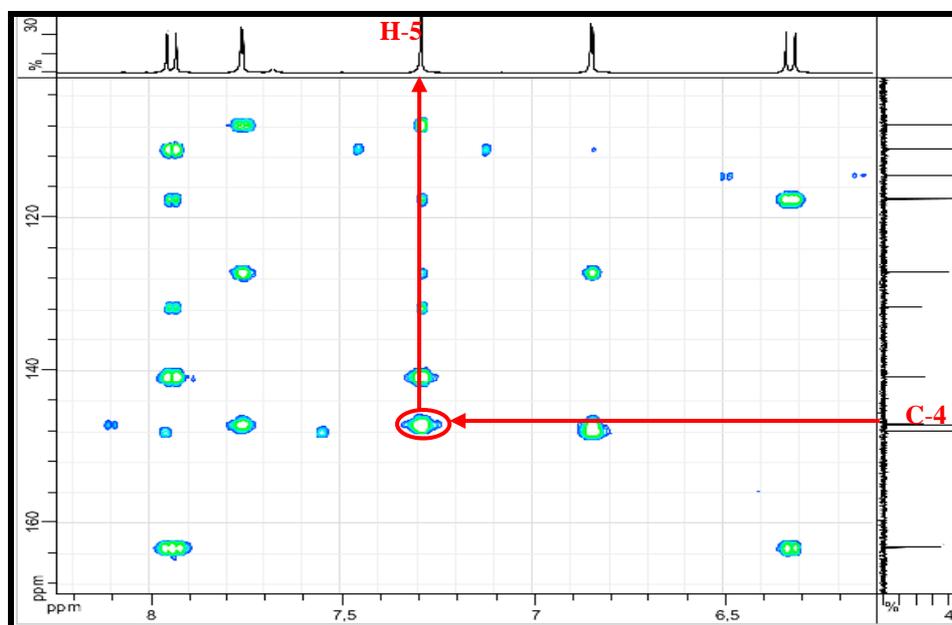


Figure IV.8 : Corrélations COSY observées pour la molécule C5

Le spectre HSQC (Spectre IV.26-1) permet de localiser le carbone C-4 à $\delta_C = 146,99$ ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre IV.27-1), ce carbone C-4 montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un singulet à $\delta_H = 7,29$ ppm, ce proton ne peut donc être qu'en position C-5.



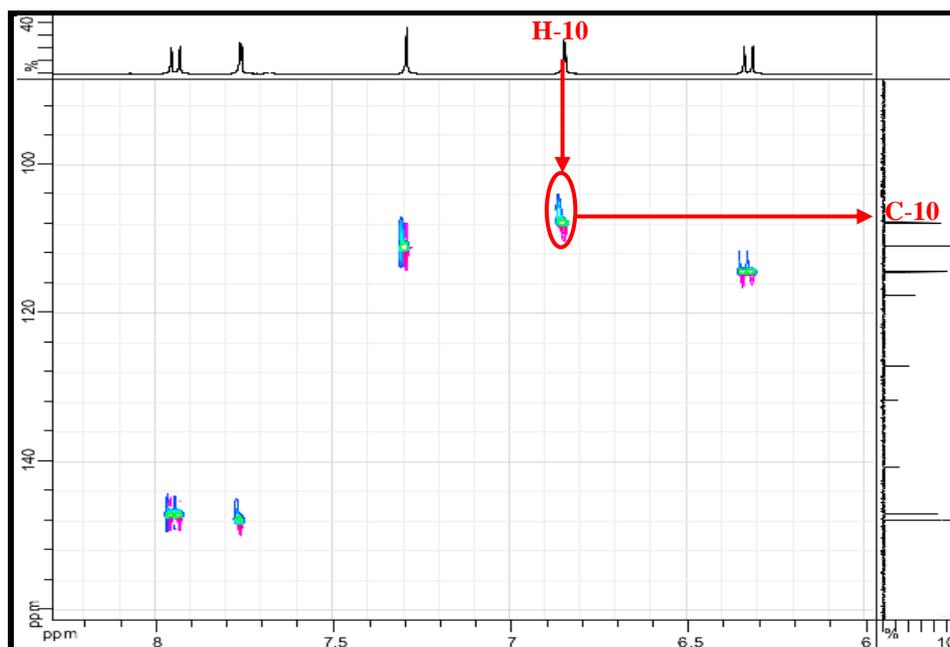
Spectre IV.26-1 : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de C5



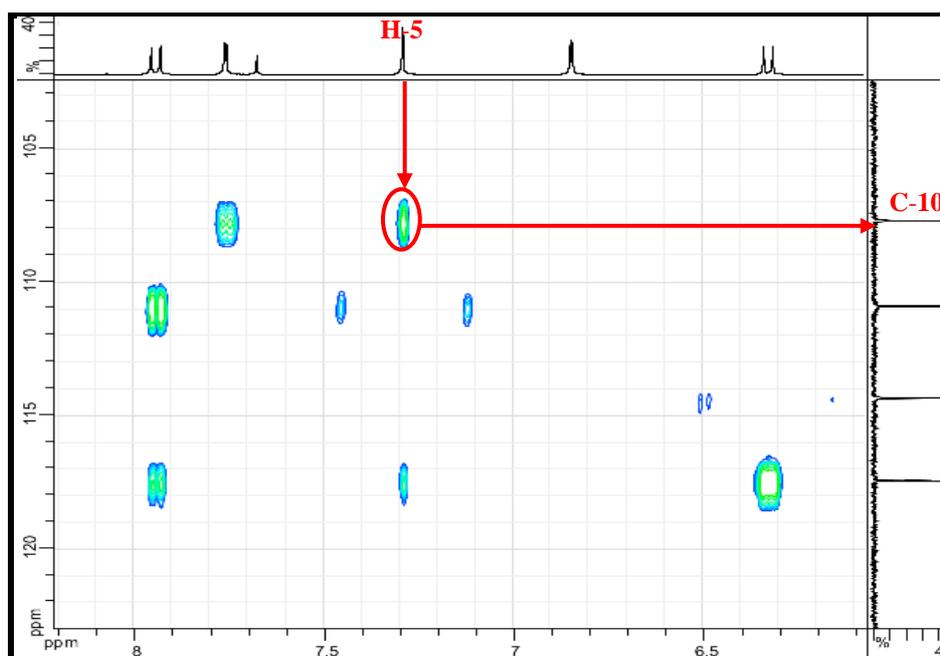
Spectre IV.27-1: Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C5

L'examen du spectre HSQC (Spectre IV.26-2), permet la localisation de C-10 à $\delta_C = 107,69$ ppm grâce à la corrélation observée entre ce carbone et le doublet à $\delta_H = 6,84$ ppm (H-10). Sur le spectre HMBC (Spectre IV.27-2), ce carbone montre une

tache de corrélation avec le proton H-5, ceci signifie que le carbone de ce CH se trouve à 3 liaisons de H-5. Cette donnée oriente donc vers une furanocoumarine linéaire soit un psoralène substitué en C-8. Sachant que d'après les données de la spectrométrie de masse, cette molécule admet une formule brute $C_{11}H_6O_4$ il est donc évident que le substituant porté par le psoralène n'est autre qu'un groupement hydroxyle.

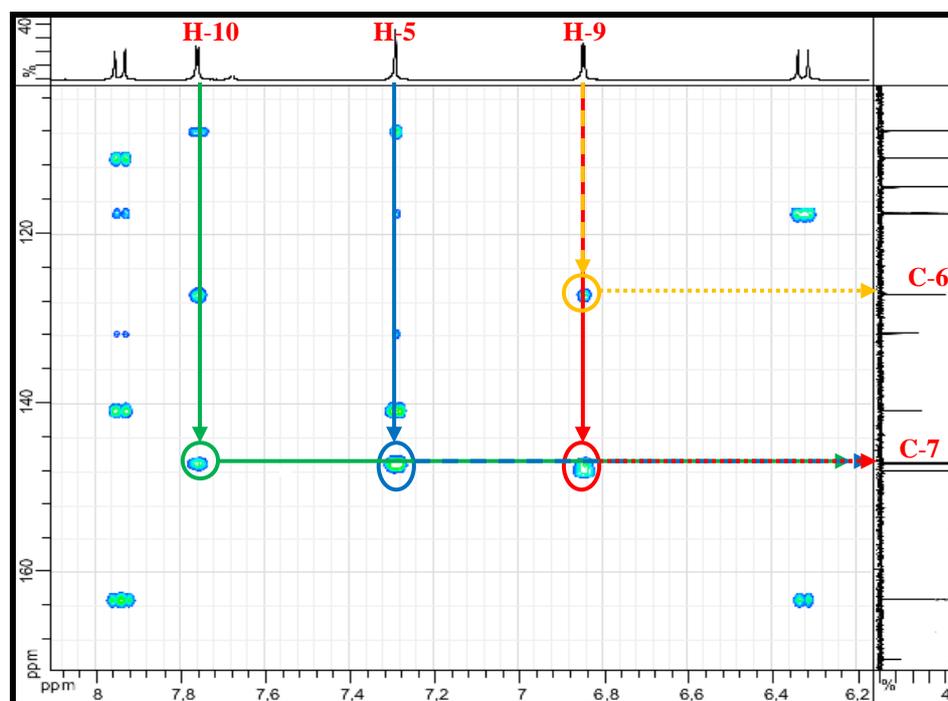


Spectre IV.26-2 : Spectre de HSQC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du produit C5



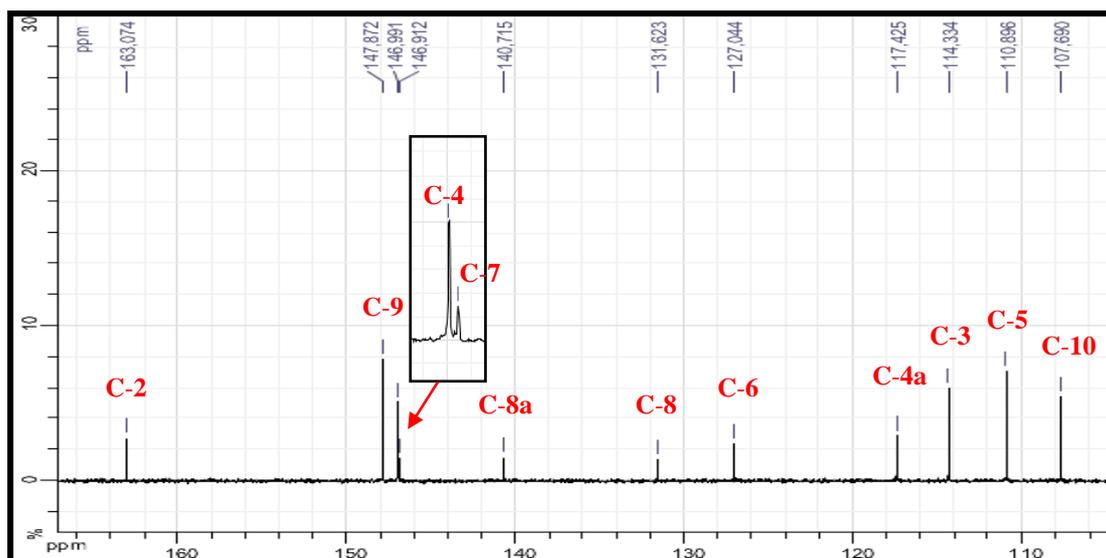
Spectre IV.27-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C5

L'analyse combinée des spectres proton, HSQC et HMBC permet d'attribuer l'ensemble des signaux aux noyaux respectifs comme reporté dans le tableau IV.8 ; on relève en particulier sur le spectre HMBC (Spectre IV.27-3) que les protons H-5 et H-10 corrélient tous les deux avec le carbone aromatique oxygéné ($\delta_C = 146,91\text{ppm}$), ce carbone ne peut être que le C-7. Sur le même spectre HMBC, le proton H-9 permet la localisation de C-6 à $\delta_C = 127,04\text{ ppm}$ et montre une corrélation avec C-7, ceci n'est possible que si on a une liaison entre l'oxygène et le C-9 et donc un cycle furanique. Après attribution de l'ensemble des signaux du spectre carbone treize (Spectre IV.23-2), sur la base des analyses des spectres HSQC et HMBC (Tableau IV.8), il reste un carbone aromatique quaternaire résonant à $\delta_C = 131,74\text{ ppm}$ que nous pouvons attribuer sans ambiguïté au carbone de la position C-8 de la furanocoumarine. La valeur de son déplacement chimique est bien en faveur de son oxygénation.



Spectre IV.27-3: Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C5

Ainsi, cette molécule reportée dans la figure IV.9 est connue sous le nom de **xanthotoxol (8-hydroxypsoralène)**. Elle a été isolée auparavant d'espèces de plusieurs familles [10].



Spectre IV.23-2 : Spectre RMN ^{13}C étalé (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C5

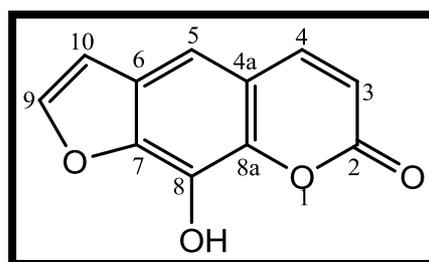


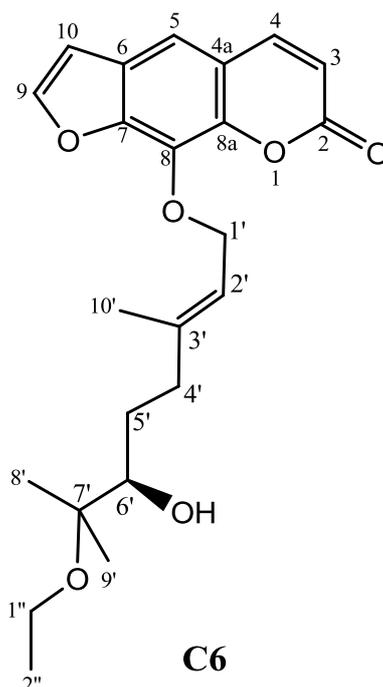
Figure IV.9 : Structure finale du composé C5, xanthotoxol

Les données de la RMN ^1H , ^{13}C sont rassemblées dans le tableau IV.8.

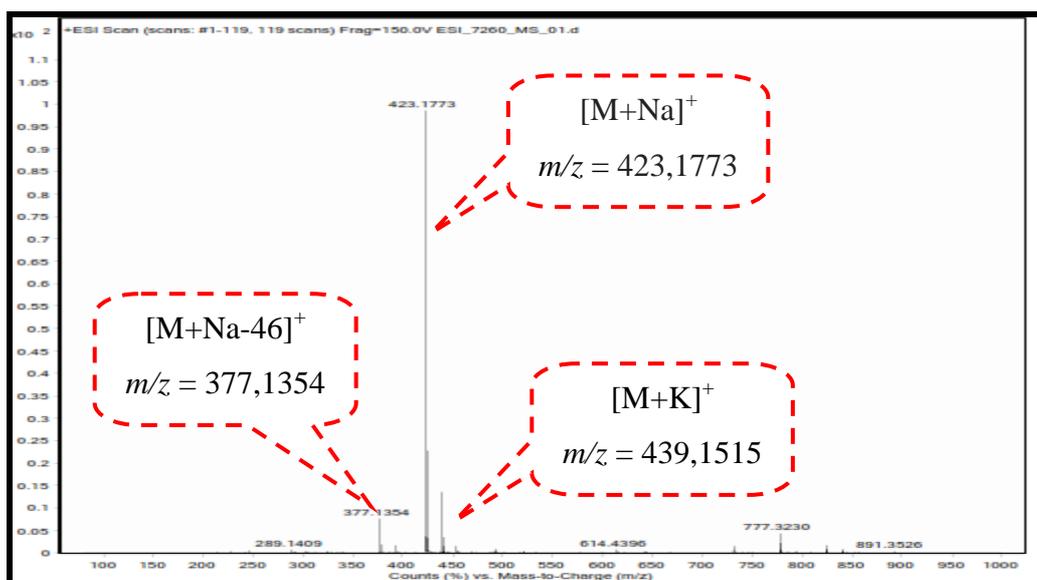
Tableau IV.8 : données des spectres RMN du composé C5

Position	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	163,07
3	6,32 ($J = 9,6$ 1H d)	114,33
4	7,94 ($J = 9,6$ 1H d)	146,99
4a	-	117,42
5	7,29 (s)	110,89
6	-	127,04
7	-	146,91
8	-	131,74
8a	-	141,02
9	7,76 ($J = 2,2$ Hz 1H d)	147,87
10	6,84 ($J = 2,2$ Hz 1H d)	107,69

IV-A-6- Elucidation structurale du composé C6

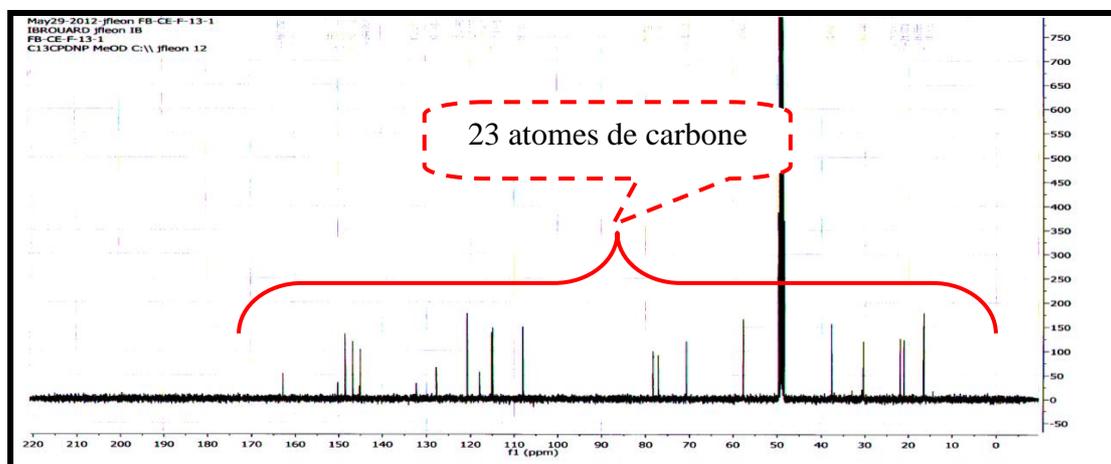


Le composé **C6** a donné une formule moléculaire $C_{23}H_{28}O_6$ à partir de son spectre HR-ESIMS (Spectre IV.28), ce dernier montre la présence des ions adduits à m/z 423,1773 $[M+Na]^+$ (calculer pour $C_{23}H_{28}O_6Na$: 423,17781) et à m/z 439,1515 $[M+K]^+$ (calculer pour $C_{23}H_{28}O_6K$: 439,15175). Le spectre HR-ESIMS montre également la présence d'un ion adduit à m/z 377,1354 $[M+Na-46]^+$ correspond à la perte d'une molécule d'éthanol (EtOH) en faveur donc, de la présence d'un groupement éthoxyle dans cette molécule qui comporte dix degrés d'insaturation.

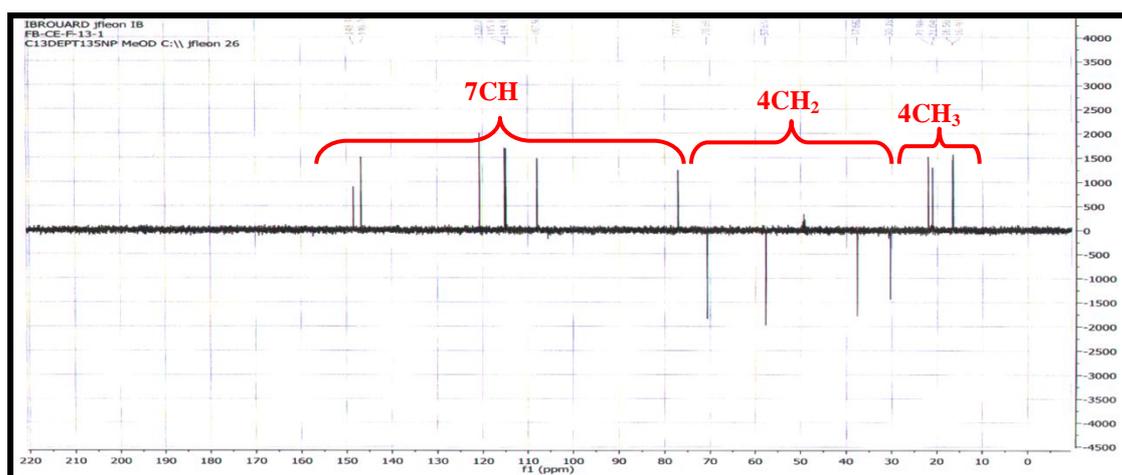


Spectre IV.28 : Spectre HR-ESIMS du composé C6

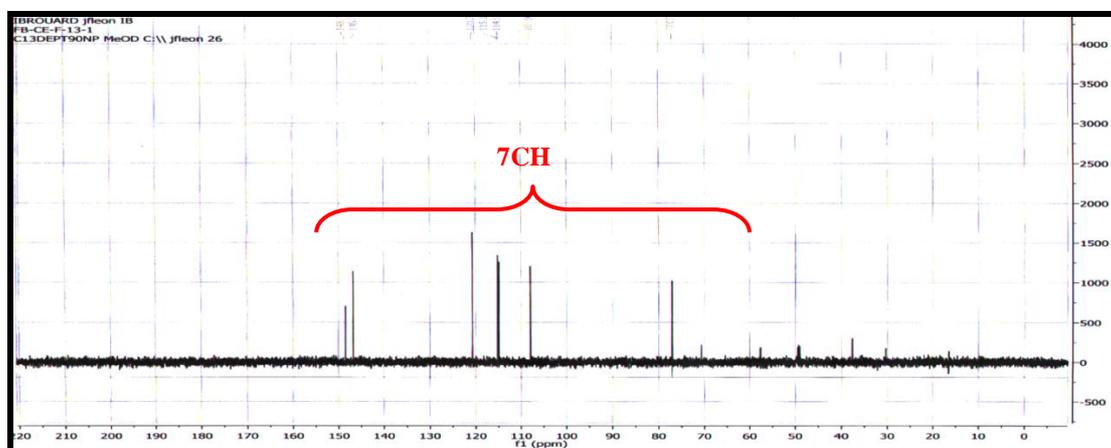
Les spectres de RMN ^{13}C (Spectre IV.29), DEPT 135° (Spectre IV.30) et DEPT 90° (Spectre IV.31) montrent la présence des 23 atomes de carbone de cette molécule et permettent de les répartir en : 4CH₃, 4CH₂, 7CH et 8C_q.



Spectre IV.29 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6



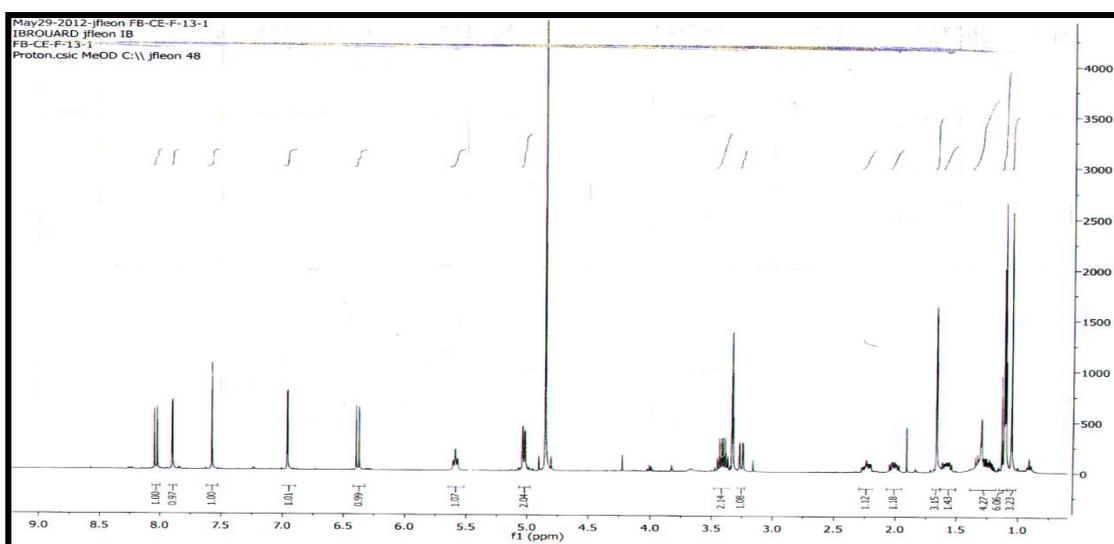
Spectre IV.30 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6



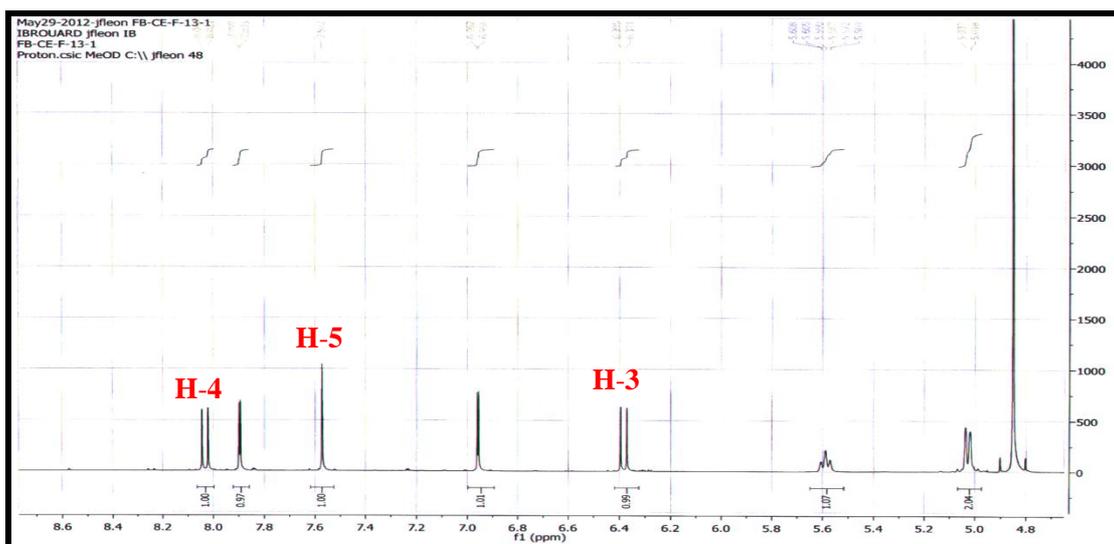
Spectre IV.31 : Spectre DEPT 90° (100 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6

Le spectre proton (Spectre IV.32-2) est similaire à celui du composé précédent **C5** en ce qui concerne les signaux relatifs au squelette de la furanocoumarine, on observe en effet :

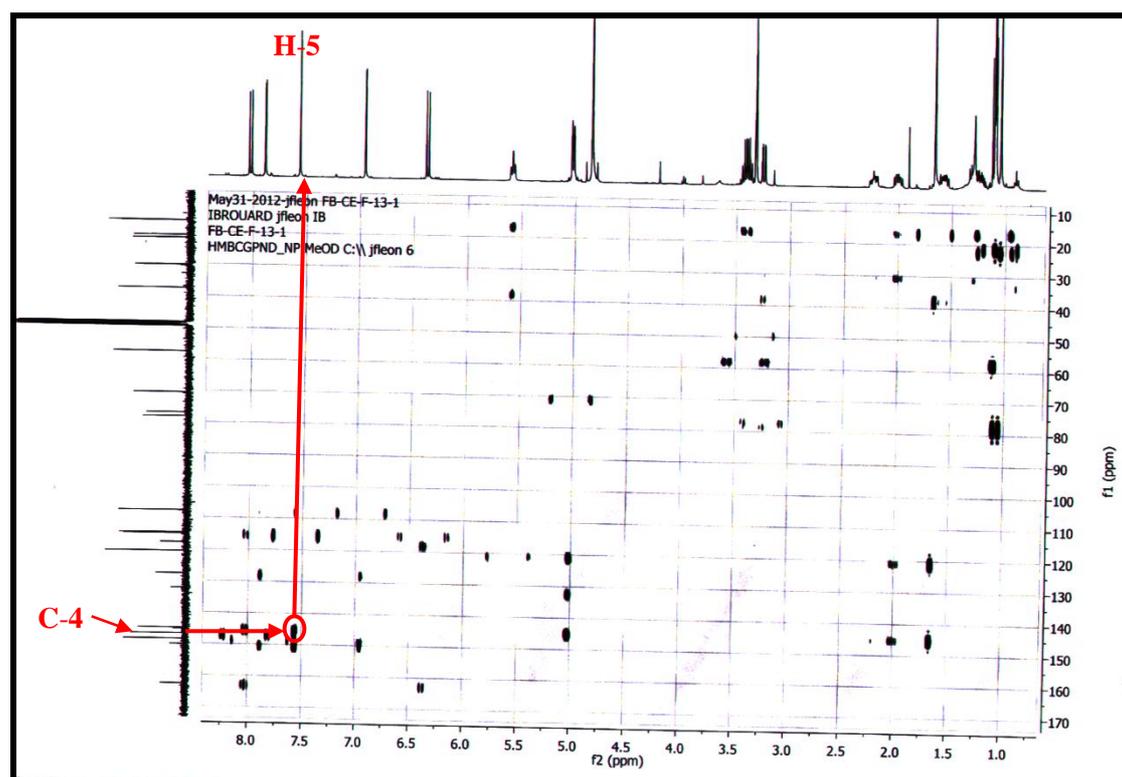
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,38$ ppm avec un constante de couplage $J = 9,6$ Hz attribuable au H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 8,03$ ppm avec un constante de couplage $J = 9,6$ Hz attribuable au H-4.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 7,57$ ppm attribuable au H-5 vu sa corrélation avec C-4 ($\delta_{\text{C}} 146,75$ ppm) observé sur le spectre HMBC (Spectre IV.33-1).



Spectre IV.32-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C6**

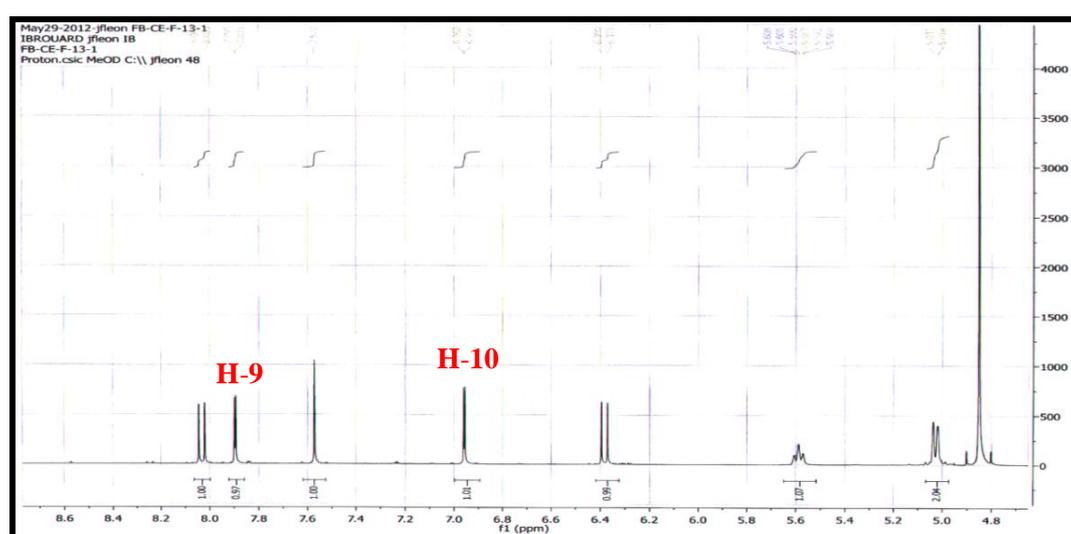


Spectre IV.32-2 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C6**



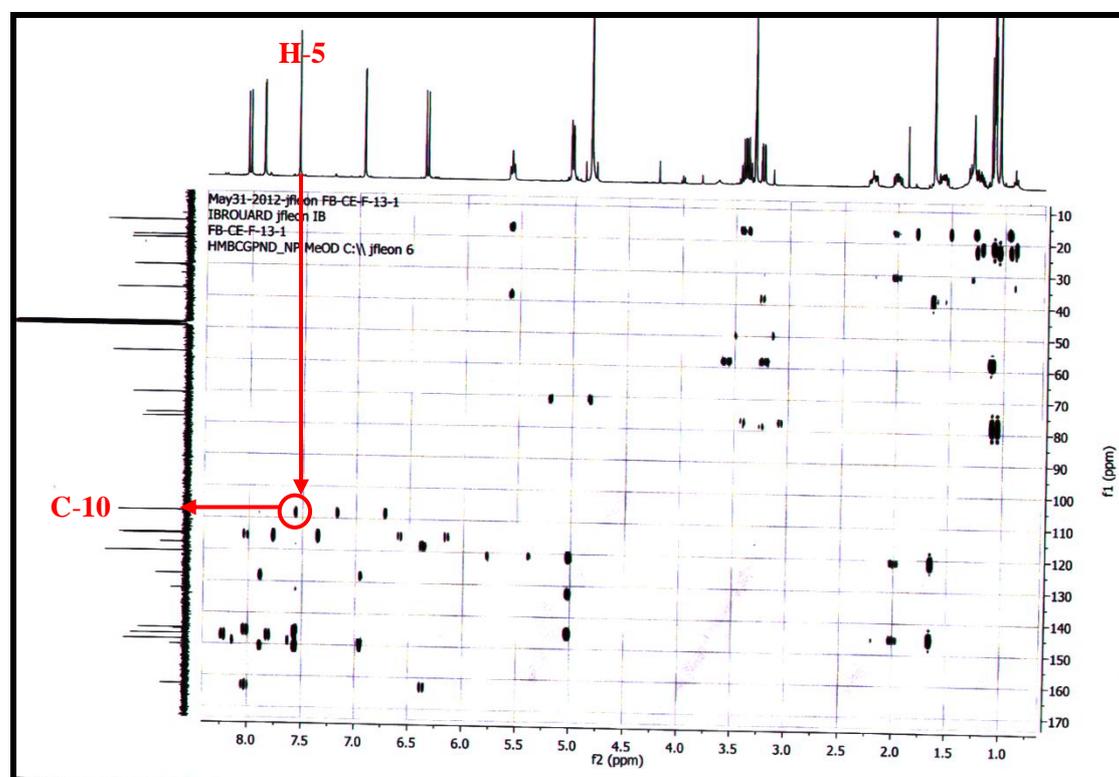
Spectre IV.33-1 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C6**

La multiplicité de H-5 (singulet) supposant une substitution des positions C-6 et C-7, confirme bien le squelette furanocoumarine. En effet le spectre proton (Spectre IV.32-3) montre par ailleurs un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,95$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable au H-10 et un autre doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,89$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable au H-9 de cette furanocoumarine.



Spectre IV.32-3 : Spectre de RMN ^1H étalé (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C6**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.33-2), on relève une corrélation nette entre le H-5 et le C-10 (δ_C 107, 96 ppm), cette observation est bien en faveur d'une coumarine linéaire.

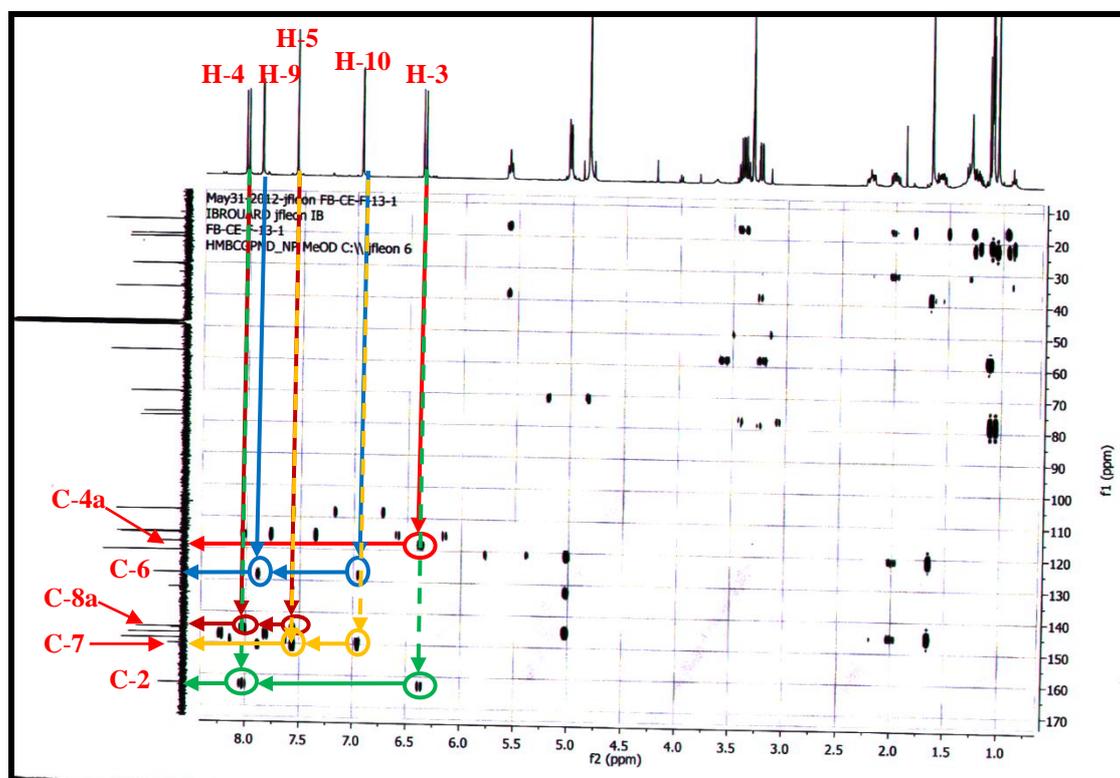


Spectre IV.33-2 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C6

Les carbones quaternaires du squelette furanocoumarine peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.33-3 et Figure IV.10). En effet, ce spectre montre également des taches de corrélation entre :

- Le proton H-3 et le carbone quaternaire situé à δ_C 117,94 ppm, attribuable au C-4a.
- Les protons H-3, H-4 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 162,75 ppm, vu la valeur de son déplacement chimique, ce carbone ne peut être attribué qu'à celui de la position C-2.
- Les protons H-4, H-5 et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 144,98 ppm, permettant alors l'attribution de ce noyau au carbone de la position C-8a.
- Les protons H-5, H-10 et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 150,21 ppm, permettant l'attribution de ce carbone à celui de la position C-7.
- Les protons H-9, H-10 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 127,72 ppm, attribué alors au C-6.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-7 et C-6 sont bien en accord avec une furanocoumarine linéaire.



Spectre IV.33-3 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C6

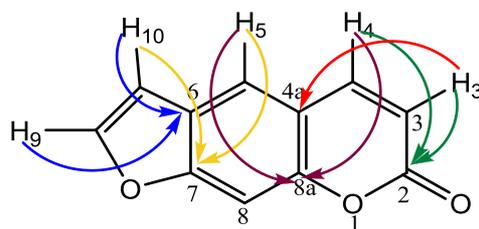
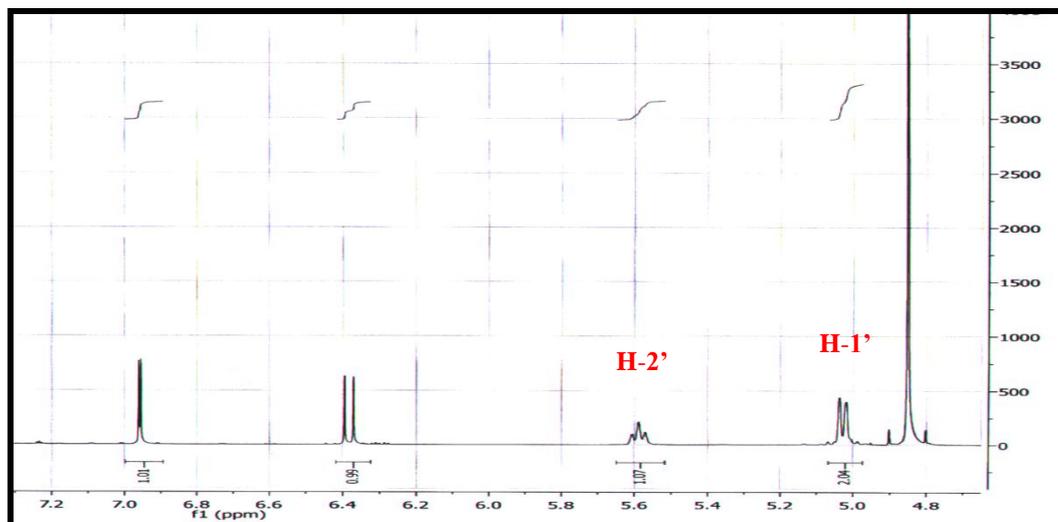


Figure IV.10 : Corrélations HMBC observées pour la molécule C6

Vu la présence d'autres signaux dans l'ensemble des spectres de cette molécule, la présence du proton H-5 oriente vers une coumarine linéaire substituée en C-8. On retrouve en particulier sur le spectre proton (Spectre IV.32-4) :

- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H, $J = 6,9$ Hz à $\delta_H = 5,03$ ppm attribuable à un CH₂ oxygéné ($\delta_C = 70,22$ ppm). Sur le spectre COSY (Spectre IV.34-1), les protons de ce CH₂ montrent une tache de corrélation avec le proton d'un CH résonant sous forme d'un triplet ($J = 6,9$ Hz) à $\delta_H = 5,59$ ppm ($\delta_C = 120,74$ ppm). D'après les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur, il est évident que ce groupement méthyne est éthylénique. La multiplicité du

signal du proton de ce groupement CH indique que le carbone éthylénique délimitant cette double liaison est quaternaire.



Spectre IV.32-4 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C6

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la figure IV.11 dans notre molécule. Nous numérotons les carbones de cette entité 1', 2' et 3'.

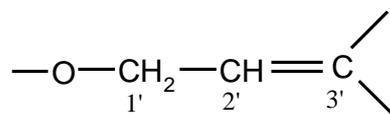
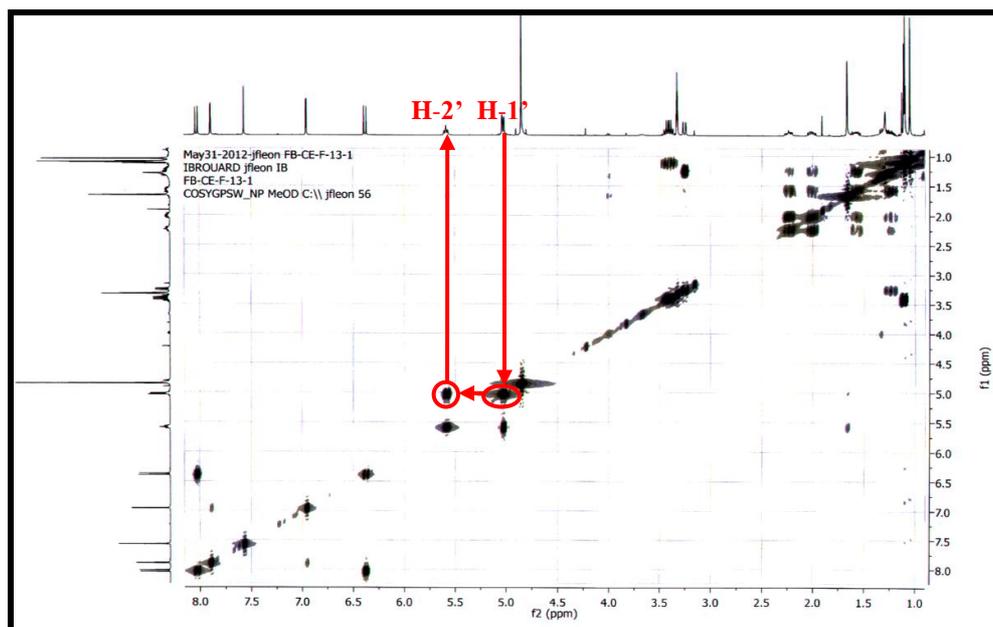


Figure IV.11 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine



Spectre IV.34-1 : Spectre COSY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C6

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.33-4), le carbone C-2' montre des taches de corrélation avec les protons du CH₃ résonant sous forme d'un singulet à δ_H 1,66 ppm (δ_C 16,46 ppm) et également avec un des protons du groupement CH₂ résonant sous forme de deux multiplés à $\delta_H = 2,23$ ppm et $\delta_H = 2,01$ ppm ($\delta_C = 37,66$ ppm) ; cette corrélation est observée avec le proton résonant à $\delta_H = 2,01$ ppm. On peut signaler par ailleurs que le caractère diastéréotopique de ces deux protons est en faveur de la présence d'au moins un carbone asymétrique dans cette molécule. Nous pouvons alors numéroter le carbone de ce groupement méthylène C-4' (Figure IV.12) et ses protons H-4'a ($\delta_H = 2,23$ ppm) et H-4'b ($\delta_H = 2,01$ ppm). Un examen attentif de ce spectre HMBC permet de localiser le signal du carbone éthylénique quaternaire C-3' à $\delta_C = 144,95$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H₂-1', les protons du méthyle résonant à δ_H 1,66 ppm et le proton H-4'b (Figure IV.13).

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure IV.12 dans le substituant de notre furanocoumarine.

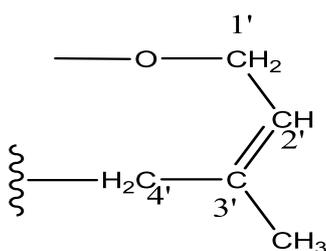
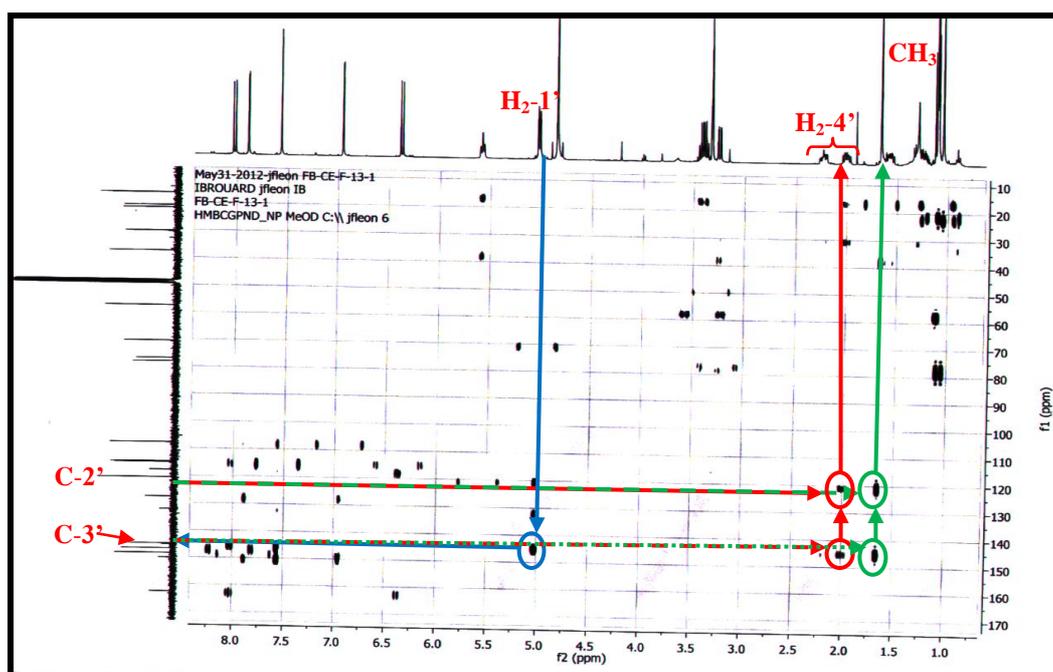


Figure IV.12 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine



Spectre IV.33-4 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6

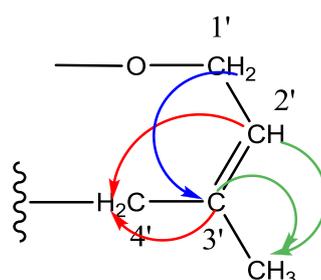
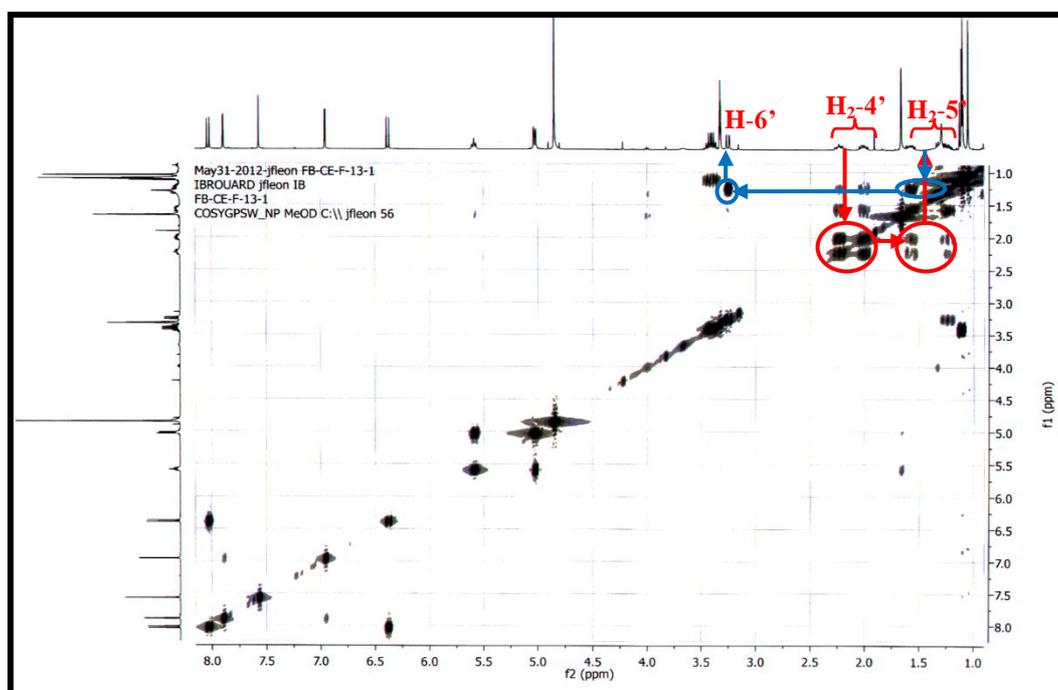


Figure IV.13 : Corrélations HMBC observées pour la molécule C6

Sur le spectre COSY (Spectre IV.34-2), les protons H₂-4' montrent des taches de corrélation avec les protons du troisième groupement CH₂ signalé dans cette molécule. Ces deux protons que nous pouvons numérotés H-5'a et H-5'b résonnent sous forme de deux multiplets à $\delta_{\text{H}} = 1,56$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,28$ ppm respectivement, grâce au spectre HSQC on relève $\delta_{\text{C-5}}$ à 30,37 ppm (Figure IV.14).



Spectre 34-2 : Spectre COSY (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6

Un retour vers le spectre COSY (Spectre 34-2) permet de relever un couplage net entre les deux protons H-5'a et H-5'b et le proton du groupement CH résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,27$ ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J = 9,7 ; 3,2$ Hz). Ce couplage permet d'attribuer ce groupement CH à la position C-6' de cette chaîne (Figure IV.14).

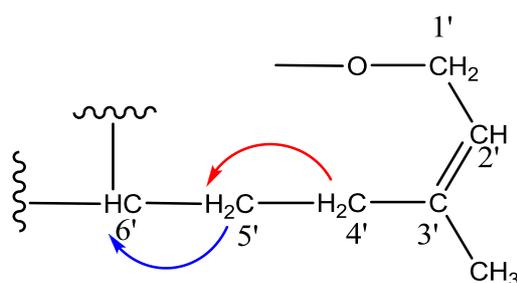
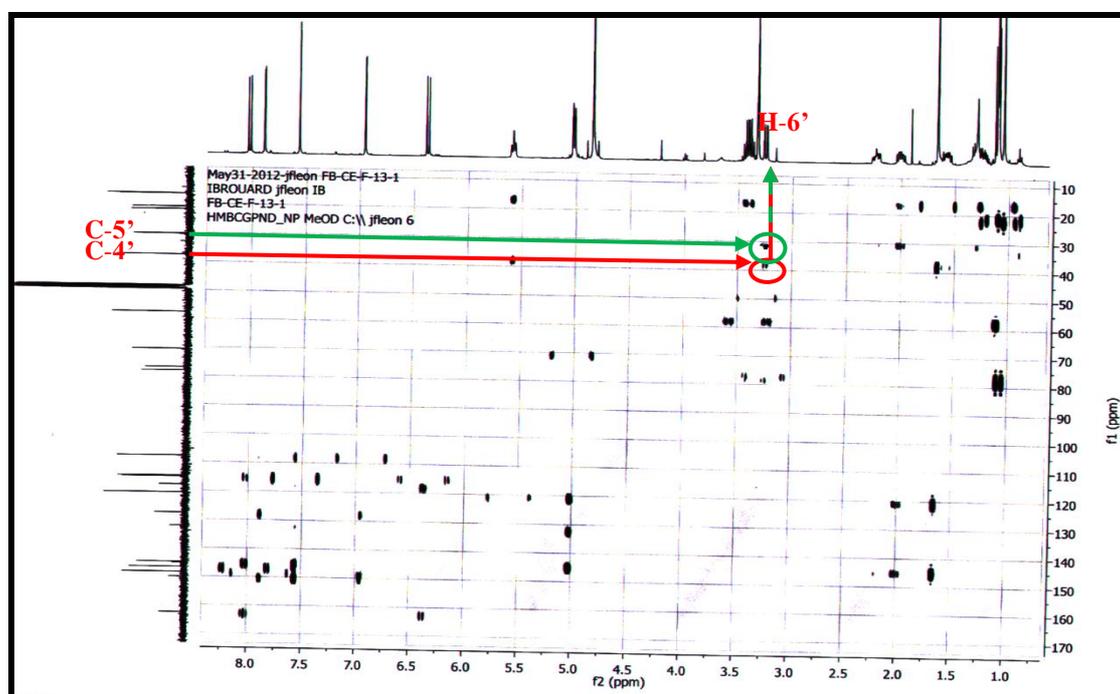


Figure IV.14 : Corrélations COSY observées pour la molécule C6

La présence de ce CH en cette position est d'ailleurs confirmée par les taches de corrélation entre les carbones C-4' et C-5' et le proton de ce groupement (H-6') observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.33-5).



Spectre IV.33-5 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C6

La multiplicité de H-6' (doublet de doublets) et la valeur du déplacement de son carbone C-6' à δ_C 77,07 ppm orientent d'une part vers une oxygénation à ce niveau et d'autre part vers la présence d'un carbone quaternaire en position C-7'. En effet, le spectre HMBC (Spectre IV.33-6) montre des taches de corrélation entre H-6' et le carbone quaternaire à δ_C 78,32 ppm que nous pouvons alors attribuer à C-7'. La valeur du déplacement chimique de C-7' est en faveur d'une oxygénation à ce niveau. Sur le même spectre HMBC (Spectre IV.33-6), ce carbone C-7' montre également des corrélations avec les protons des deux méthyles à δ_H 1,10 ppm (δ_C 21,98) et 1,05 ppm

(δ_C 21,04 ppm) orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par ce carbone quaternaire C-7' (Figure IV.15).

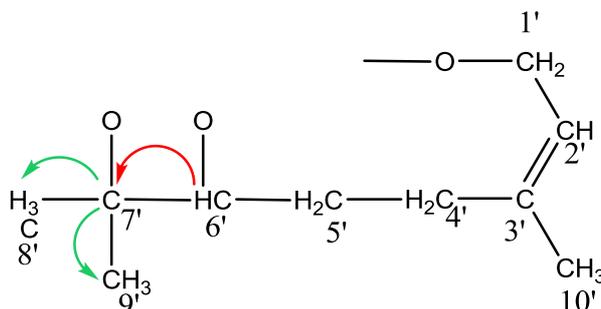
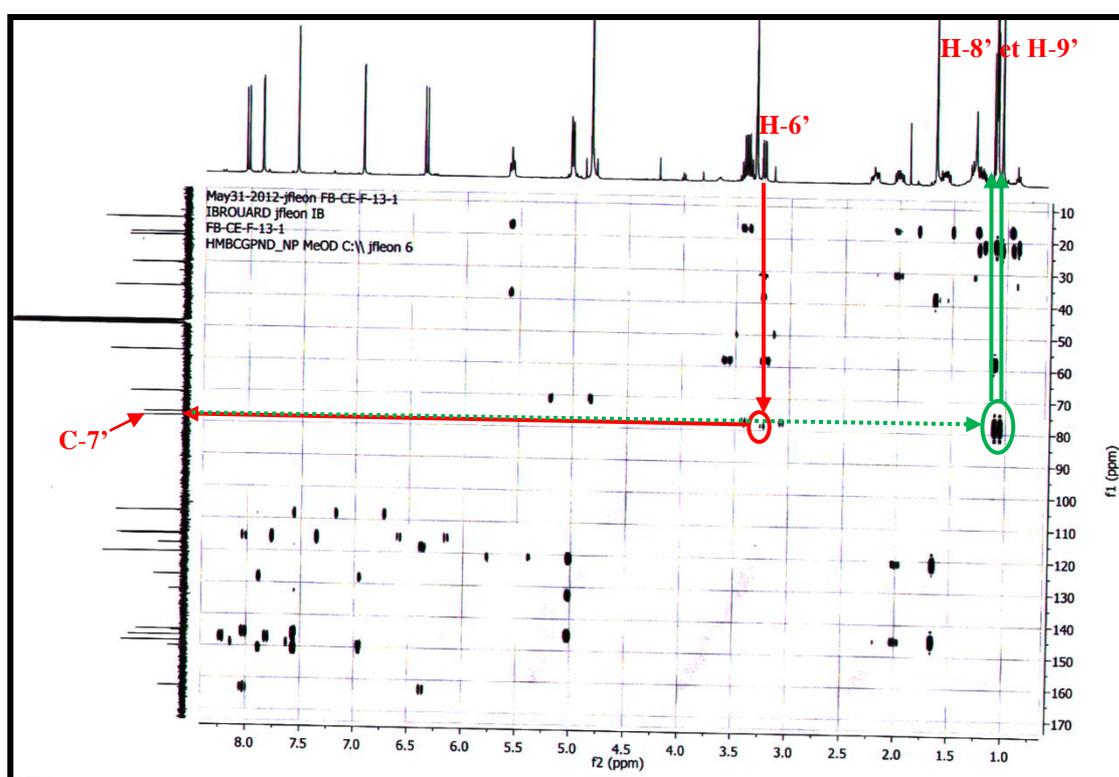


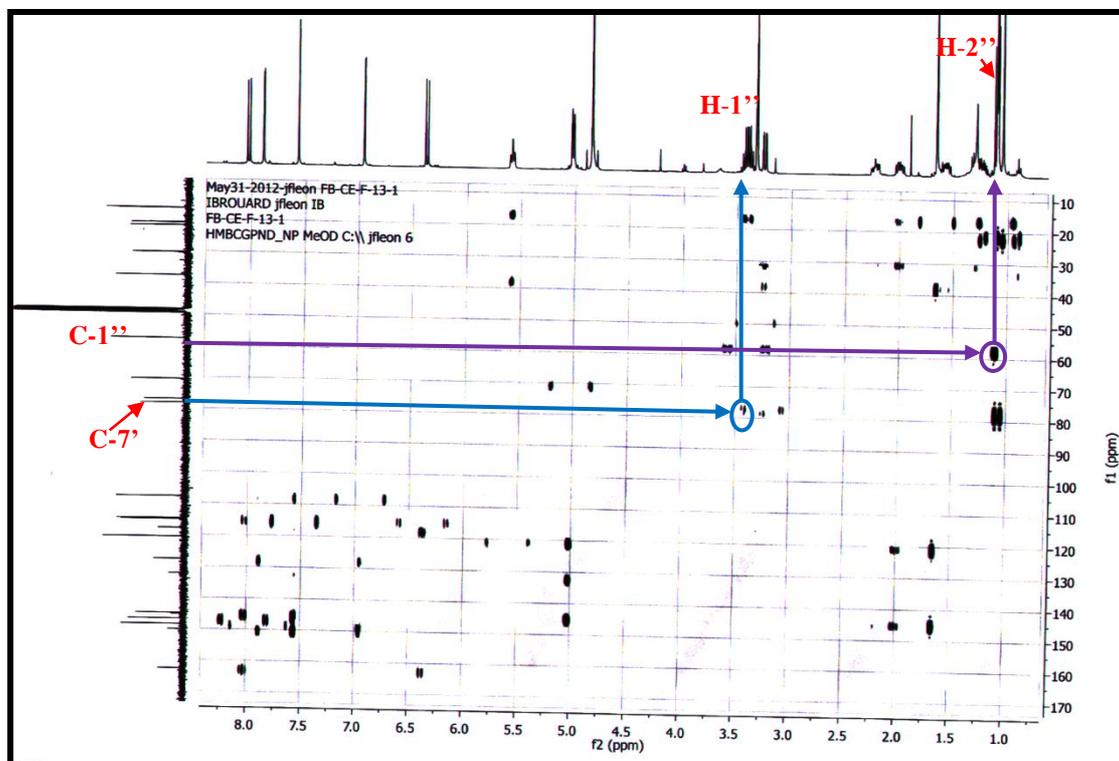
Figure IV.15 : Corrélations HMBC observées pour la molécule C6



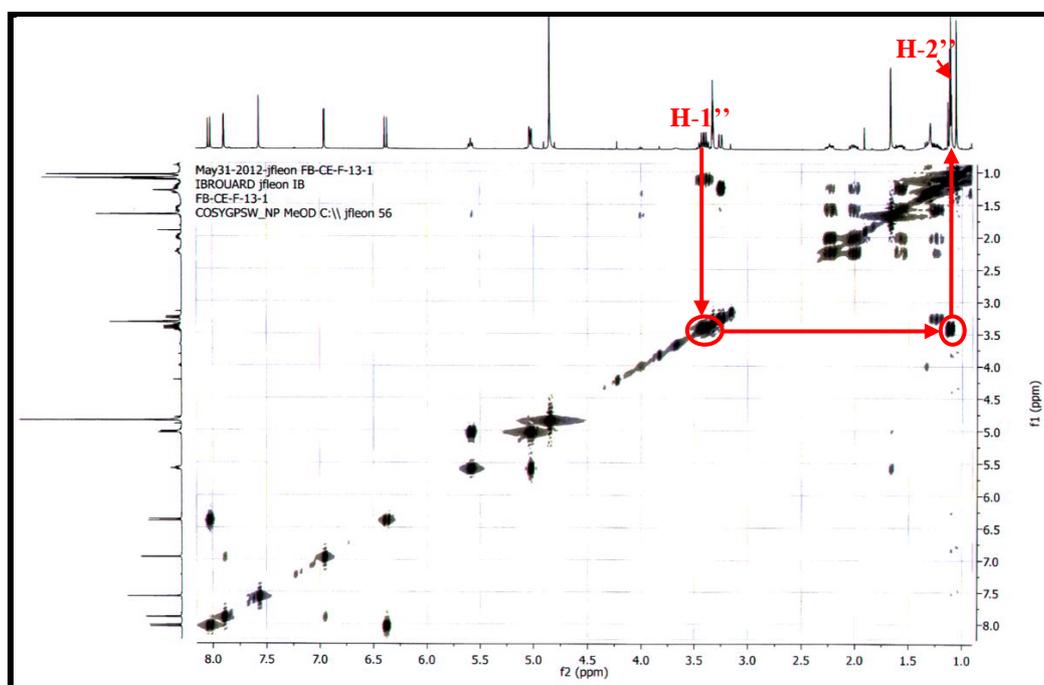
Spectre IV.33-6 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C6

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.33-7), le carbone quaternaire oxygéné C-7' montre des taches de corrélation avec les protons du groupement CH₂ résonant sous forme d'un multiplet à δ_H 3,40 ppm, que nous pouvons alors numéroter H-1'' (δ_C 57,67 ppm). Les valeurs des déplacements chimiques des protons et du carbone de ce CH₂ oriente vers une oxygénation à ce niveau. Sur le même spectre HMBC (Spectre IV.33-7), le carbone oxygéné C-1'' montre bien une corrélation avec les protons du CH₃ résonant sous forme d'un triplet à δ_H 1,11 ppm ($J = 6,4$ Hz, δ_C 16,56 ppm) formant ainsi un groupement éthoxyle attaché au carbone quaternaire C-

7'. La présence de ce groupement éthoxyle est d'ailleurs claire sur le spectre COSY (Spectre IV.34-3), où l'on relève un couplage scalaire vicinal net entre ces groupements CH₂ et CH₃.



Spectre IV.33-7 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6



Spectre 34-3 : Spectre COSY (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C6

L'ensemble de nos observations mène à la présence de l'entité reportée dans la figure IV.16 dans le substituant de notre furanocoumarine.

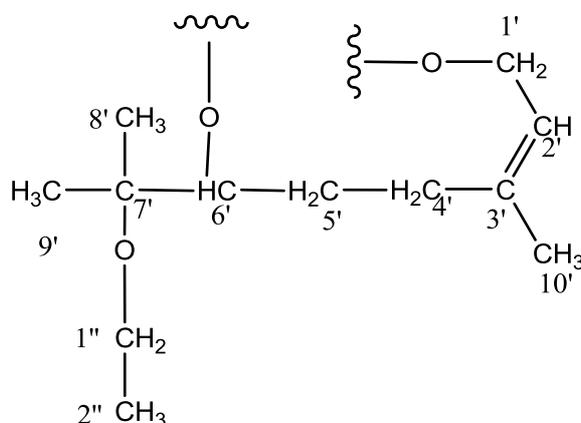
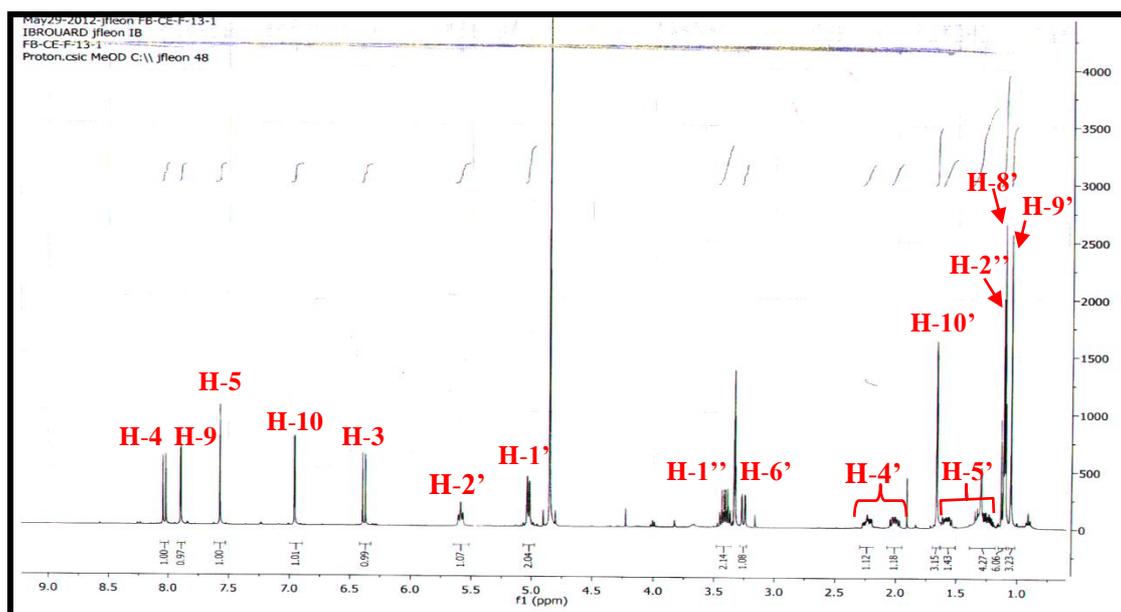


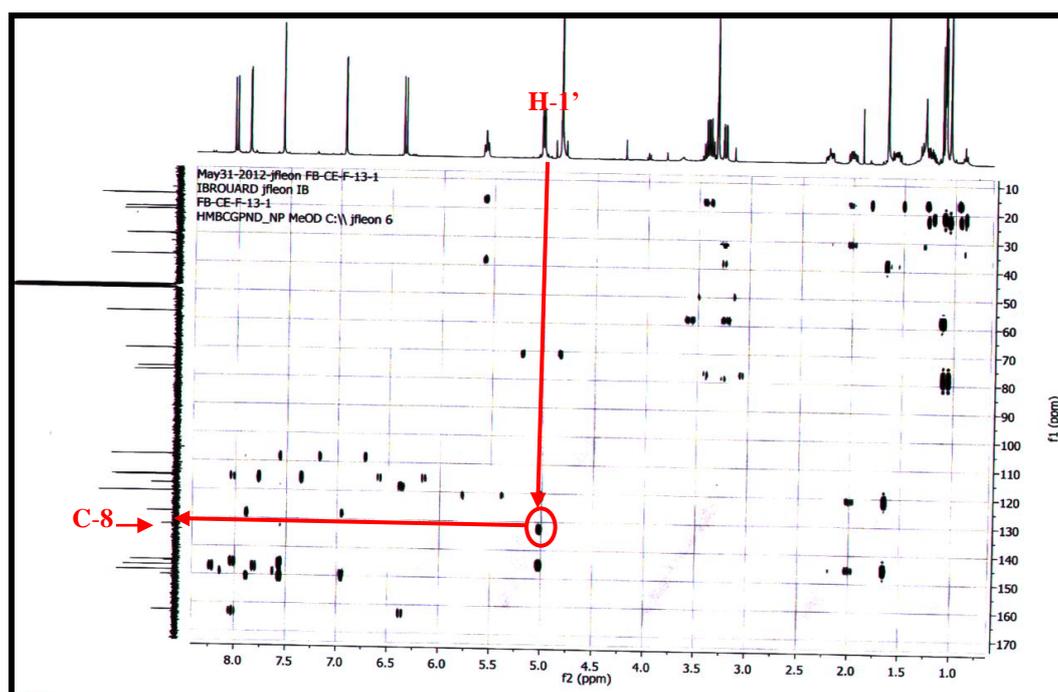
Figure IV.16 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine

Les attributions de l'ensemble des protons de cette molécule sont indiquées sur le spectre RMN ^1H (Spectre IV.32-5).



Spectre IV.32-5 : Spectre RMN ^1H du composé **C6** avec toutes les indications

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre IV.33-8), permet de repérer une tache de corrélation entre les protons du carbone oxygéné C-1' et le carbone aromatique oxygéné (d'après la valeur de son déplacement chimique) à δ_{C} 132,29 ppm. Ce carbone ne peut être que le C-8 de la furocoumarine car il ne corrèle avec aucun autre proton de la chaîne.



Spectre IV.33-8 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C6

Un retour vers notre formule brute $C_{23}H_{28}O_6$ montre que nous avons utilisé l'ensemble de nos atomes de carbone, d'oxygène et d'insaturations. Il reste à placer un atome d'hydrogène sur le substituant. Cet hydrogène ne peut être porté par l'atome d'oxygène lié à C-6' pour former un groupement hydroxyle sur ce carbone.

Cette analyse structurale permet d'identifier ce composé comme un produit nouveau le **8-[6'-hydroxy,7'-ethoxy geranyloxy]psoralène** (Figure IV.17).

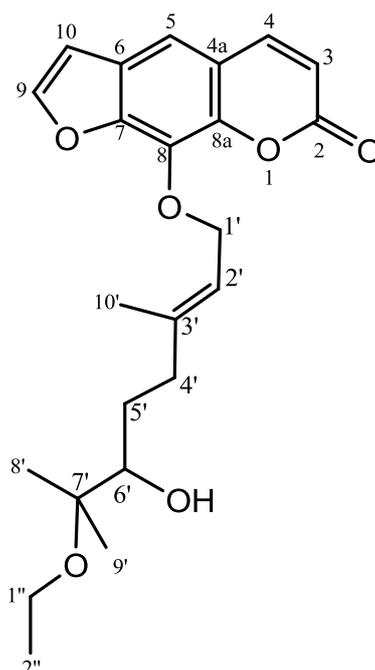


Figure IV.17 : Structure plane du composé C6

A ce stade de notre analyse structurale, il reste à rechercher la configuration de la double liaison et celle du centre chiral C-6'. Pour cela nous avons fait appel aux résultats bibliographiques connus sur ce type de molécules. En effet, concernant la double liaison il est connu (biogénèse) que le groupement géranyle admet une double liaison C-2' = C-3' avec une configuration (E) [11]. Concernant le centre chiral, ce composé a été trouvé optiquement actif avec $[\alpha]_D^{20} = +8,8$; $[\alpha]_{578}^{20} = +9,7$; $[\alpha]_{546}^{20} = +10,3$ (C 1,365 g/100 ml ; MeOH), cela suppose que notre molécule est dextrogyre. D'après les résultats de travaux bibliographiques menés sur ce type de molécules [11], la valeur positive de la rotation optique indique une configuration (R) du centre chiral C-6'. Par conséquent, le composé **C6** a été identifié comme étant le **8-[(R)-6'-hydroxy-7'-éthoxygényloxy]psoralène**. Nous la décrivons pour la première fois dans la littérature, et nous proposons de la nommer **(R)-pituranthosine A** (Figure IV.18).

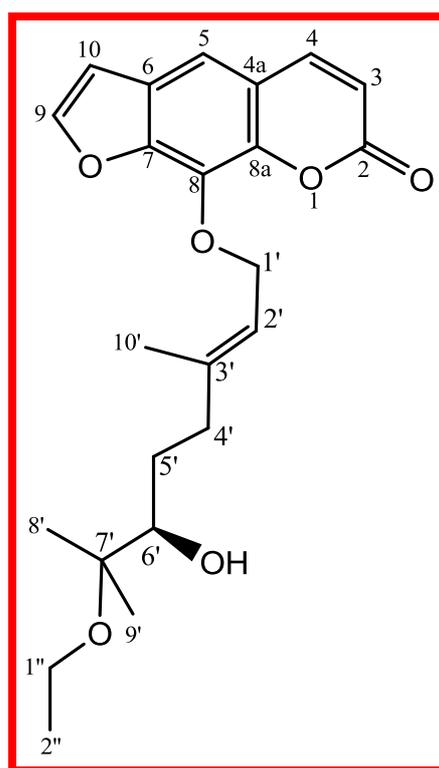


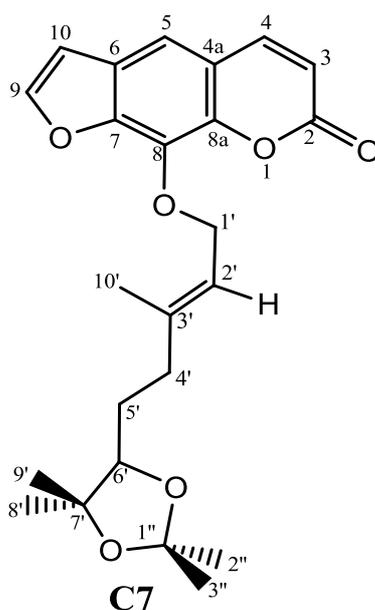
Figure IV.18 : Structure finale du composé **C6**, **(R)-pituranthosine A**

Les données des spectres RMN sont reportées dans le tableau IV.9.

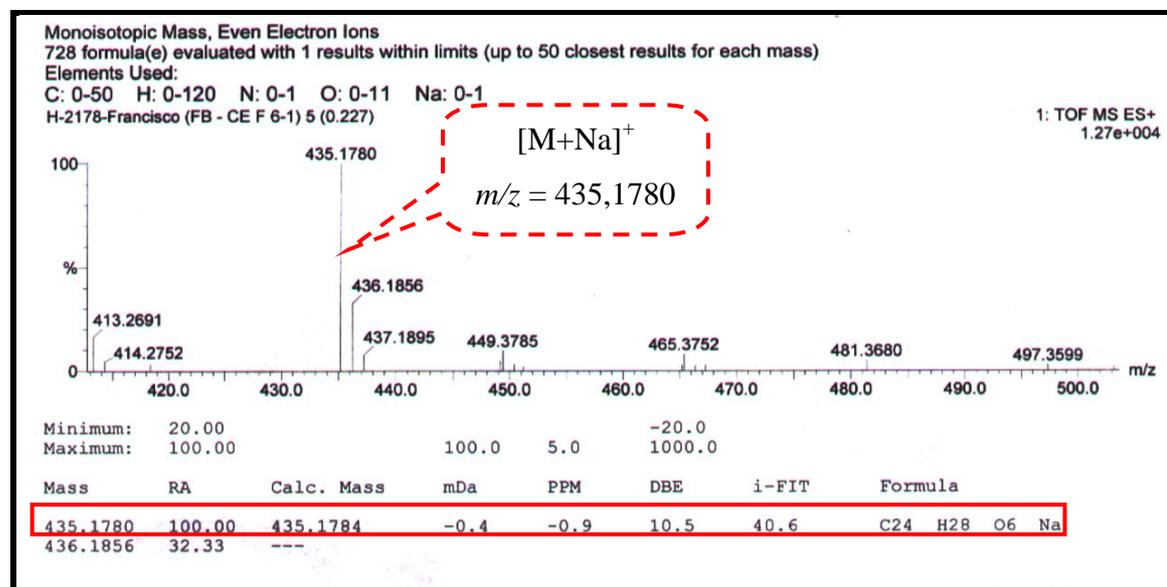
Tableau IV.9 : Données des spectres RMN du composé C6

Position	δ_{H} (ppm), $J(\text{Hz})$	δ_{C} (ppm)
2	-	162,75
3	6,38 1H <i>d</i> (9,6)	114,93
4	8,03 1H <i>d</i> (9,6)	146,75
4a	-	117,94
5	7,57 1H <i>s</i>	115,19
6	-	127,72
7	-	150,21
8	-	132,29
8a	-	144,98
9	7,89 1H <i>d</i> (2,2)	148,48
10	6,95 1H <i>d</i> (2,2)	107,96
1'	5,03 2H <i>d</i> (6,9)	70,22
2'	5,59 1H <i>t</i> (6,9)	120,74
3'	-	144,95
4'	4'a 2,23 1H <i>m</i>	37,66
	4'b 2,01 1H <i>m</i>	
5'	5'a 1,56 1H <i>m</i>	30,37
	5'b 1,25 1H <i>m</i>	
6'	3,27 1H <i>dd</i> (9,7 ; 3,2)	77,07
7'	-	78,32
8'	1,10 3H <i>s</i>	21,98
9'	1,05 3H <i>s</i>	21,04
10'	1,66 3H <i>s</i>	16,46
1''	3,40 2H <i>m</i>	57,67
2''	1,11 3H <i>t</i> (6,4)	16,56

V-A-7- Elucidation structurale du composé C7

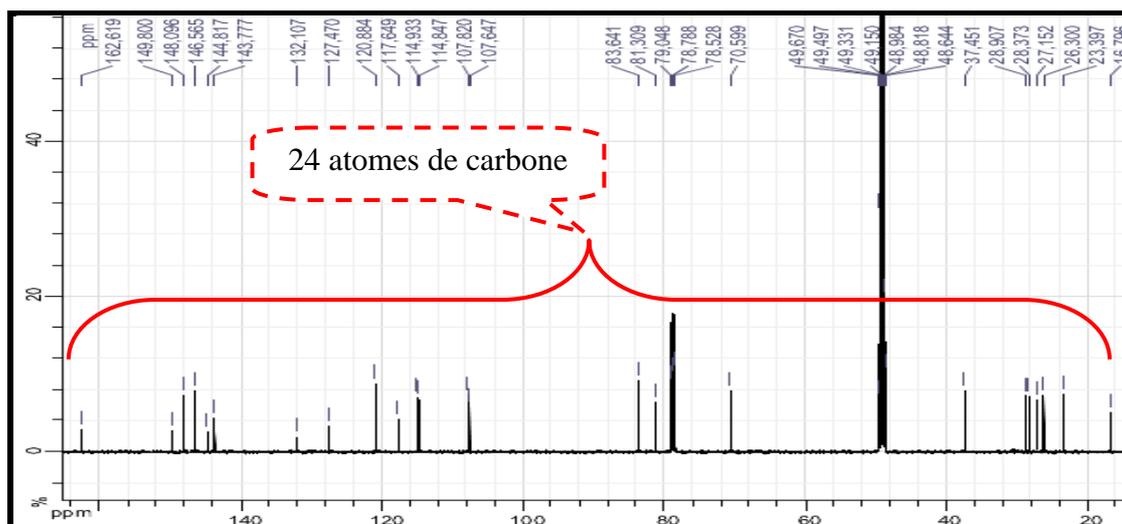


Le spectre de masse en mode HR-ESI (+) (Spectre IV.35) montre un pic quasi-moléculaire à $m/z = 435,1780$ correspondant à la forme $C_{24}H_{28}O_6Na$ (calculée pour 435,1784) indiquant une formule brute $C_{24}H_{28}O_6$ pour cette molécule qui doit contenir onze insaturations.

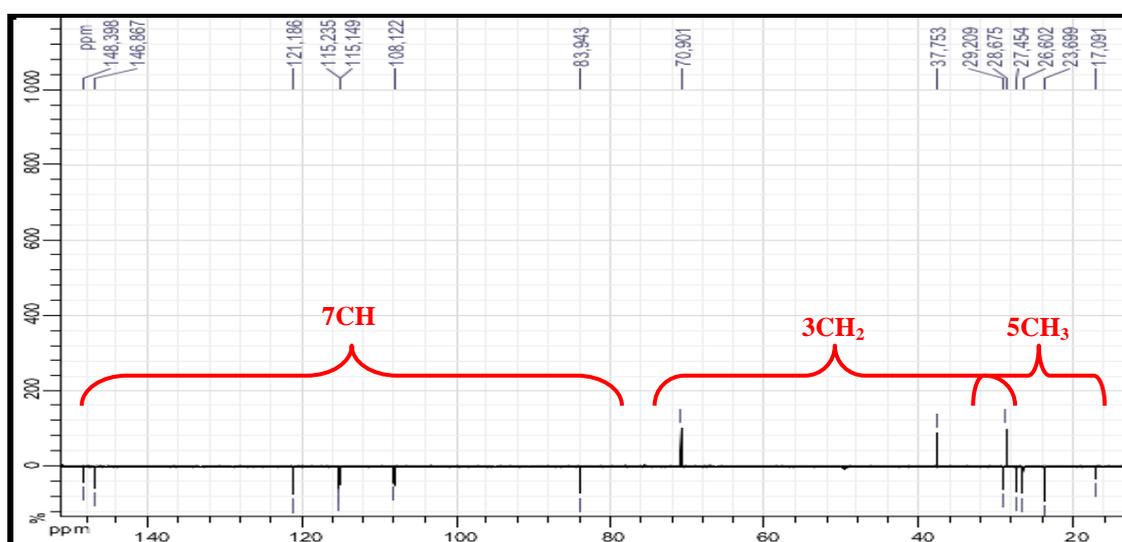


Spectre IV.35 : Données de la HR-ESI-MS relatives du composé C7

Les spectres de RMN ^{13}C (Spectre IV.36) et DEPT 135° (Spectre IV.37) confirment la présence de 24 atomes de carbone de cette molécule et permettent de les répartir en : 5 CH_3 , 3 CH_2 , 7 CH et 9 C_q .



Spectre IV.36 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7



Spectre IV.37 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7

L'examen approfondi du spectre RMN ^1H (Spectre IV.38-2) montre des signaux similaires à ceux de la molécule précédente (composé C6) caractéristiques d'une furanocoumarine qui sont :

- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,36$ ppm ($J = 9,4$ Hz) attribuable à H-3.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,97$ ppm ($J = 9,5$ Hz) attribuable à H-4.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,90$ ppm ($J = 2,5$ Hz) attribuable à H-10.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,81$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-9.
- Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 7,51$ ppm attribuable à H-5 ou à H-8 : dans le cas d'un furanocoumarine linéaire, ou à H-5 ou H-6 dans le cas d'une furanocoumarine

angulaire. Ces hypothèses supposent une mono-substitution du squelette furanocoumarine (Figure IV.19).

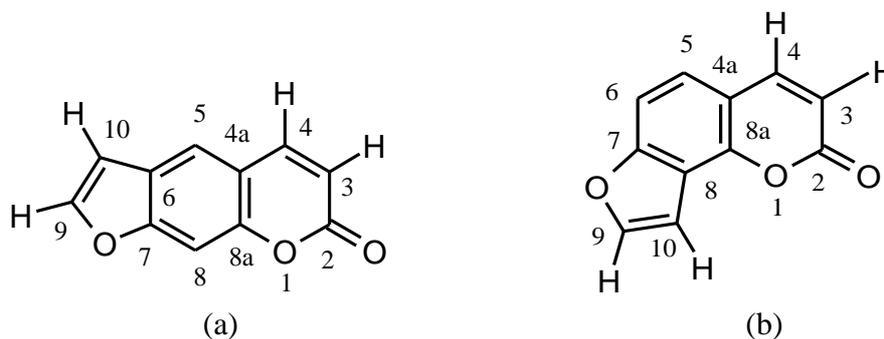
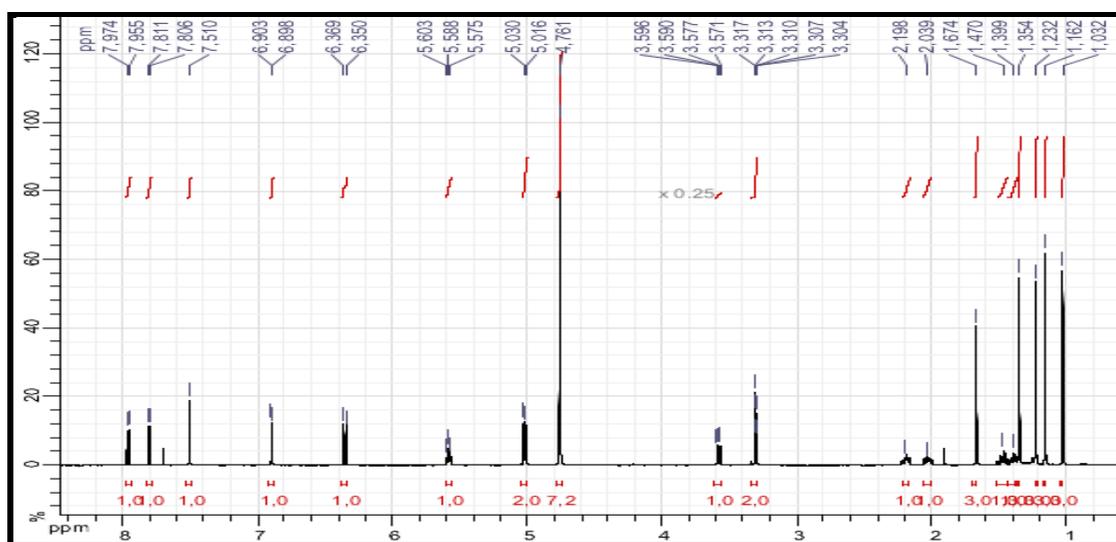
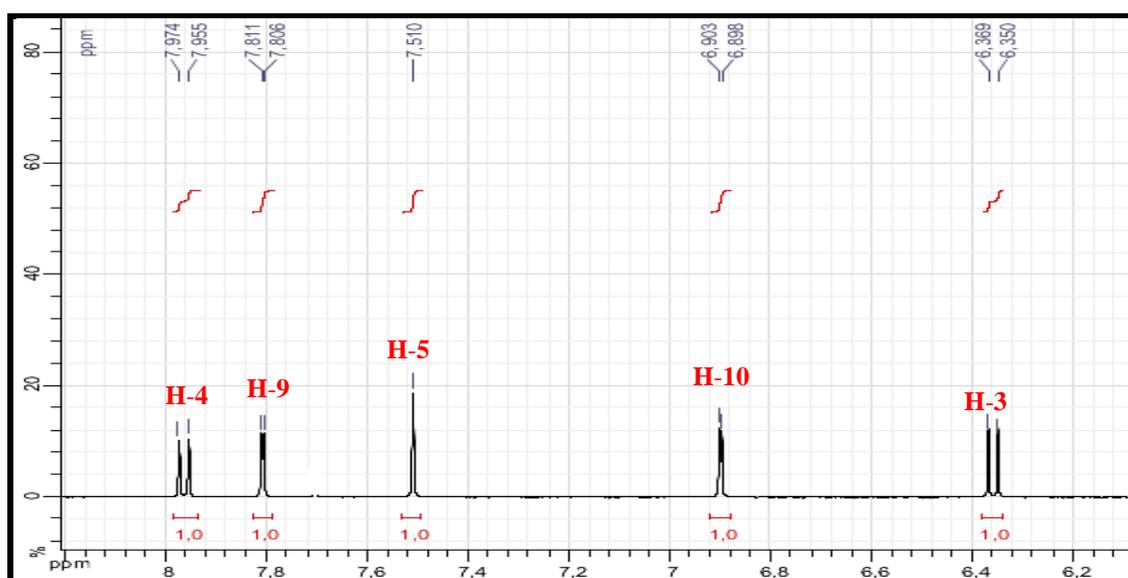


Figure IV.19 : Furanocoumarine linéaire (a) et furanocoumarine angulaire (b)



Spectre IV.38-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7



Spectre IV.38-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de C7

Par ailleurs l'examen du spectre NOESY (Spectre IV.39-1) montre une tache de corrélation entre H-4 et le singulet à 7,51 ppm permettant ainsi son attribution à H-5 (Figure IV.20).

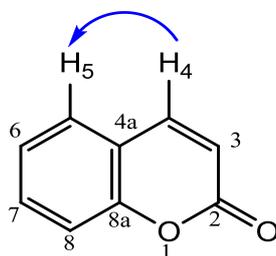
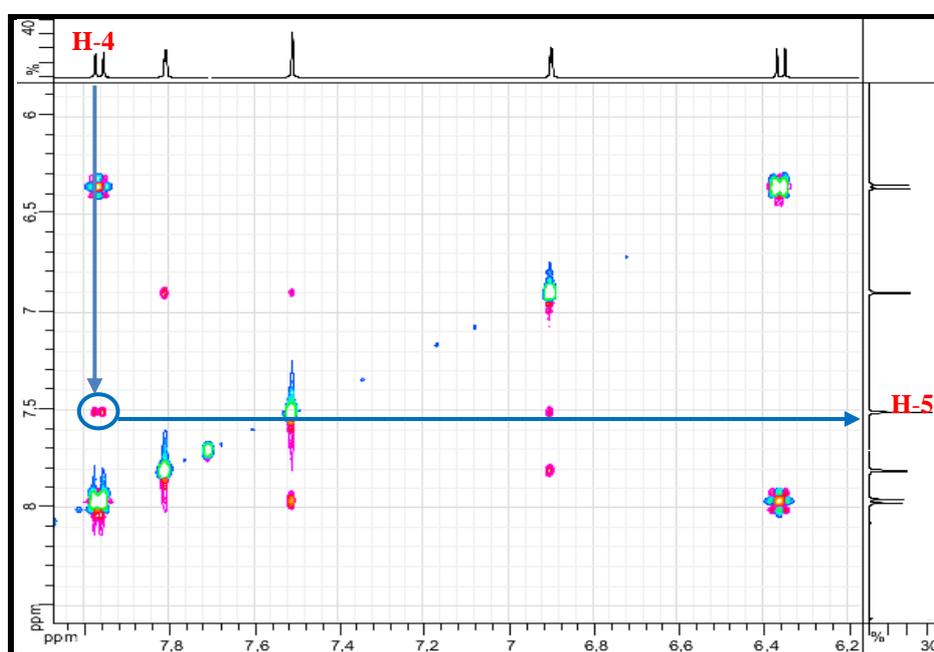


Figure IV.20 : Interaction NOESY observée pour la molécule C7



Spectre IV.39-1 : Spectre NOESY étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de C7

L'attribution de ce signal à H-5 est toute indiquée sur le spectre HMBC. En effet, le spectre HSQC (Spectre IV.40-1) permet de localiser le signal de C-4 à $\delta_C = 146,56$ ppm ; sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-1), ce carbone C-4 montre clairement une tache de corrélation avec le proton relatif au singulet à 7,51 ppm permettant son attribution à H-5 sans aucune ambiguïté (Figure IV.21).

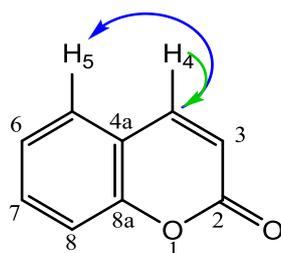
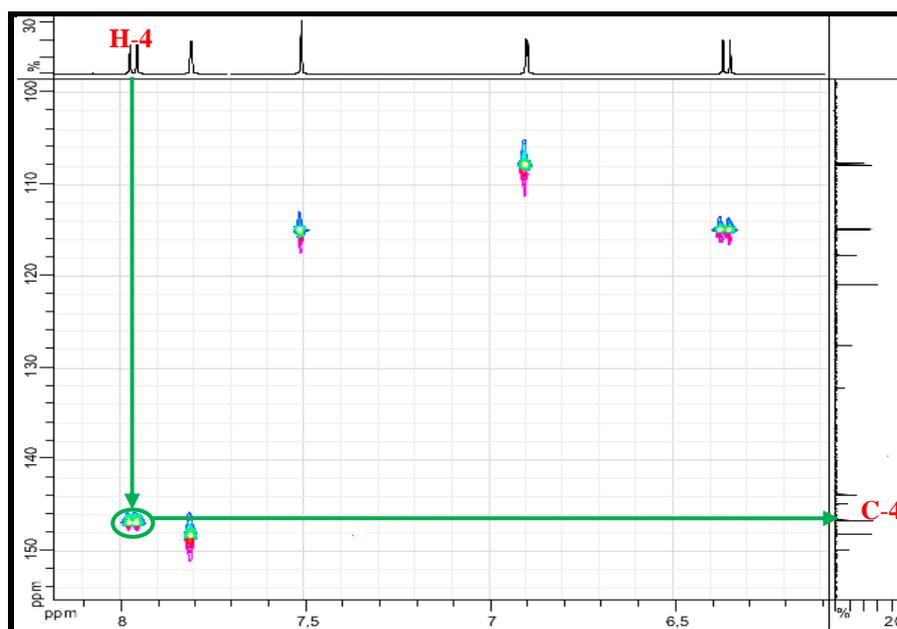
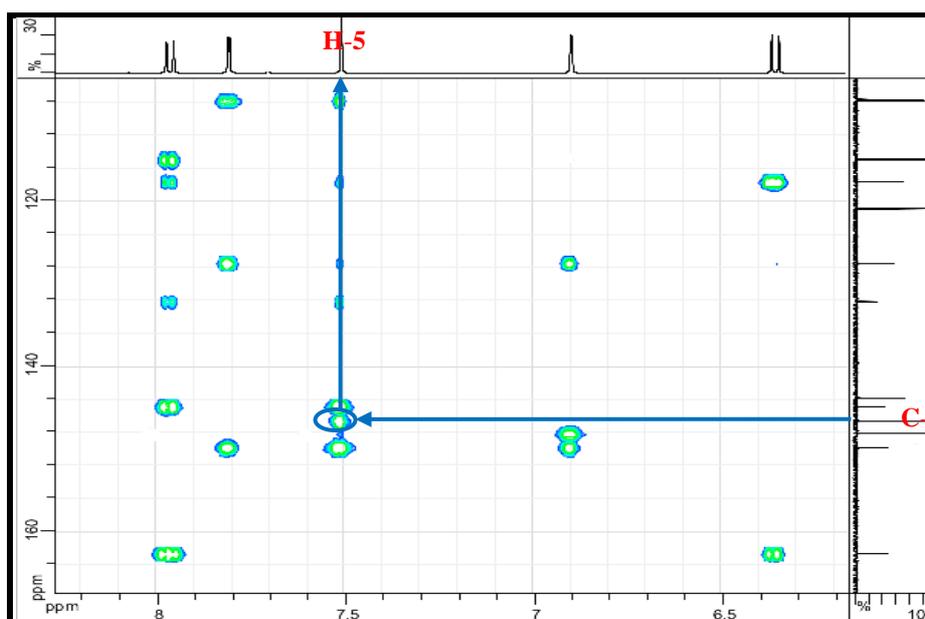


Figure IV.21 : Interactions HSQC (flèche verte) et HMBC (flèche bleue) observées pour la molécule C7



Spectre IV.40-1 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7

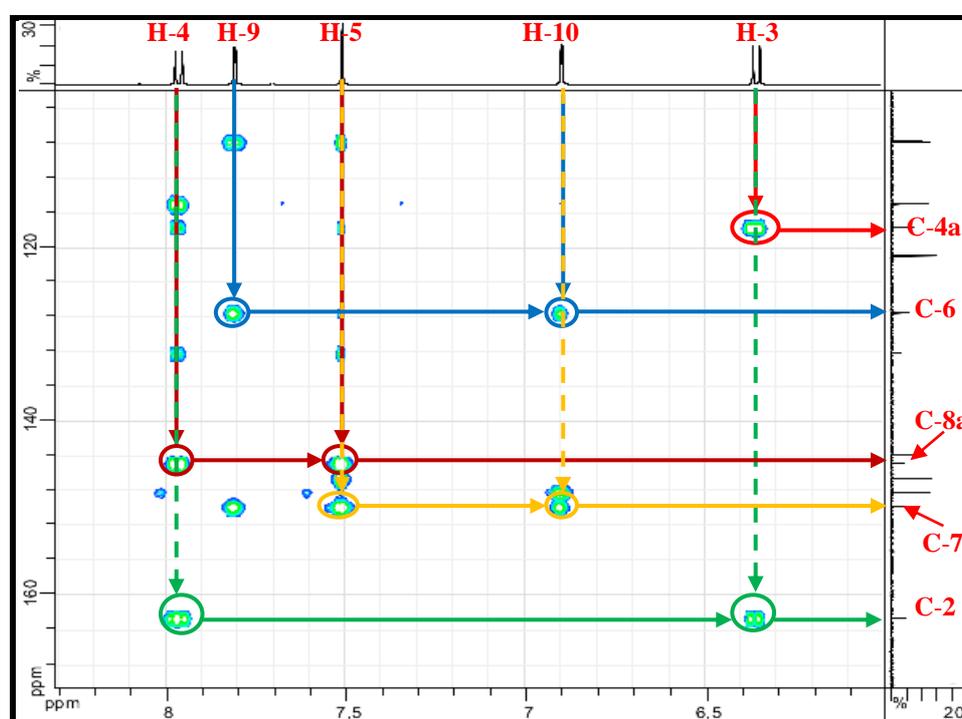


Spectre IV.41-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7

Comme pour la molécule **C6**, l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.41-2), permet d'attribuer les carbones quaternaires du squelette furanocoumarine. En effet, ce spectre montre des taches de corrélation entre :

- Le proton H-3 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 117,64 ppm, ne pouvant être que le C-4a.
- Les protons H-3, H-4 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 162,62 ppm, vu la valeur de son déplacement chimique, ce carbone est caractéristique du carbonyle de la fonction lactone des coumarines. Il ne peut donc être que le C-2.
- Les protons H-4, H-5 et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 144,81 ppm, attribuable alors au C-8a.
- Les protons H-5, H-10 et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 149,80 ppm, attribuable alors au C-7.
- Les protons H-9, H-10 et le carbone quaternaire situé à δ_C 127,47 ppm, attribuable alors au C-6.

Ces corrélations sont représentées dans la figure IV.22.



Spectre IV.41-2 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C7**
(Étalement)

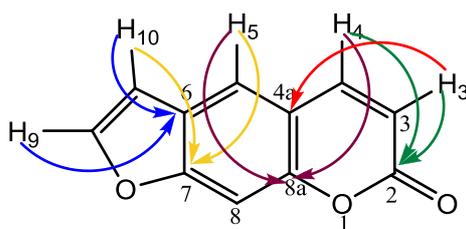


Figure IV.22 : Corrélations HMBC observées pour la molécule **C7**

Comme dans le cas de la molécule **C6**, la présence du proton H-5 sous forme de singulet orienté vers une furanocoumarine linéaire substituée en C-8, vu la présence d'autres signaux sur l'ensemble de ces spectres. En effet, en faisant abstraction des signaux du squelette furanocoumarine, on remarque sur le spectre proton (Spectre IV.38-3) que ce substituant montre des signaux très similaires à ceux de celui de la molécule **C6**, notamment :

- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H, $J = 6,9$ Hz à $\delta_H = 5,03$ ppm attribuable à un CH_2 oxygéné ($\delta_C = 70,59$ ppm). Sur le spectre COSY (Spectre IV.42-1), les protons de ce CH_2 montrent une tache de corrélation avec un CH éthylénique résonant sous forme d'un triplet ($J = 6,7$ Hz) à $\delta_H = 5,58$ ppm ($\delta_C = 120,88$ ppm). La multiplicité du signal de ce groupement CH indique que le carbone éthylénique délimitant sa double liaison est quaternaire.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer comme dans le cas précédent, la présence de l'entité reportée dans la figure IV.23 dans notre molécule. Nous numérotons les carbones de cette entité 1', 2' et 3'.

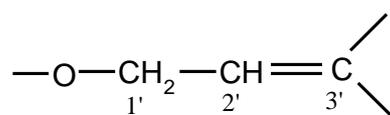
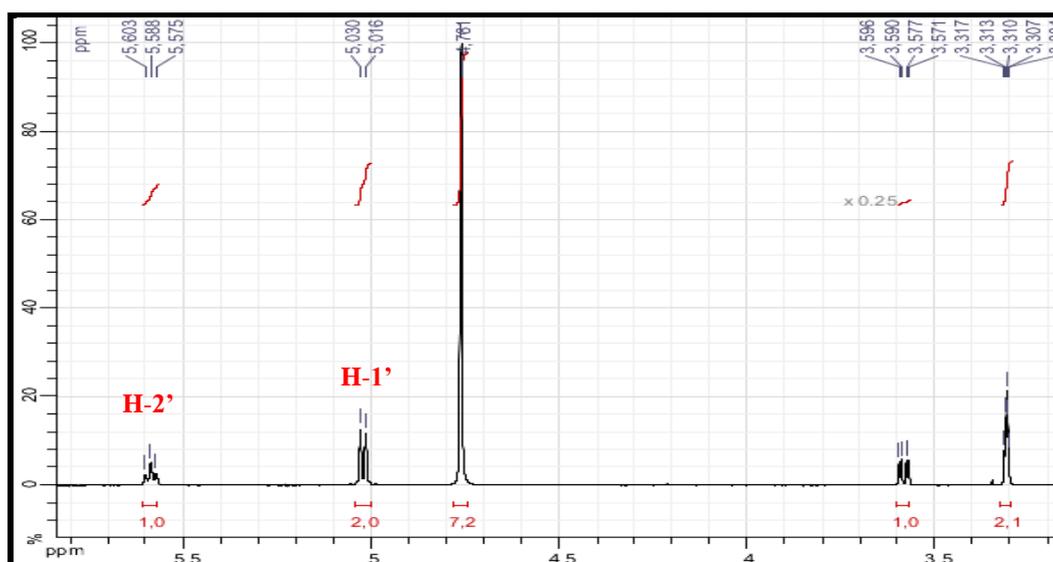
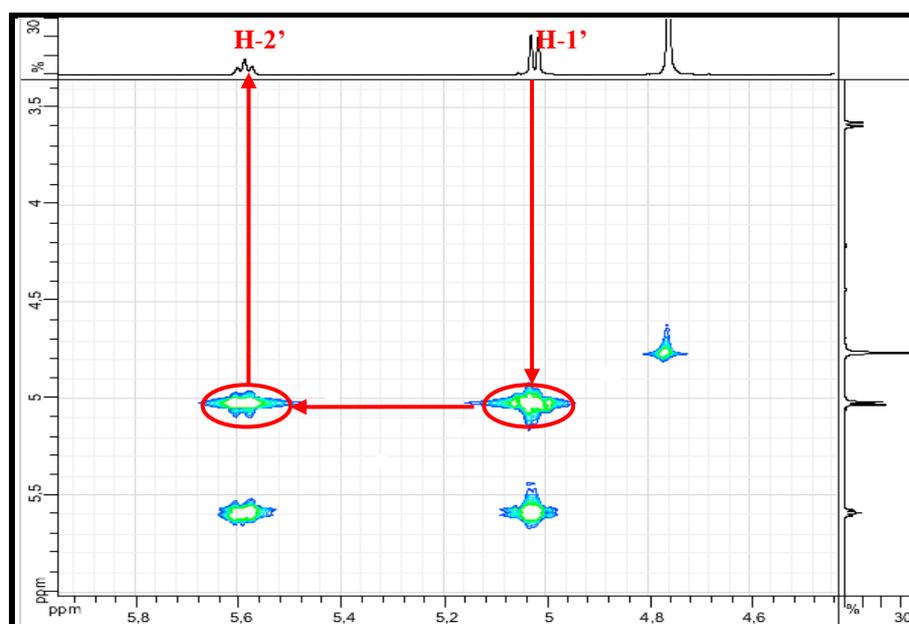


Figure IV.23 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine

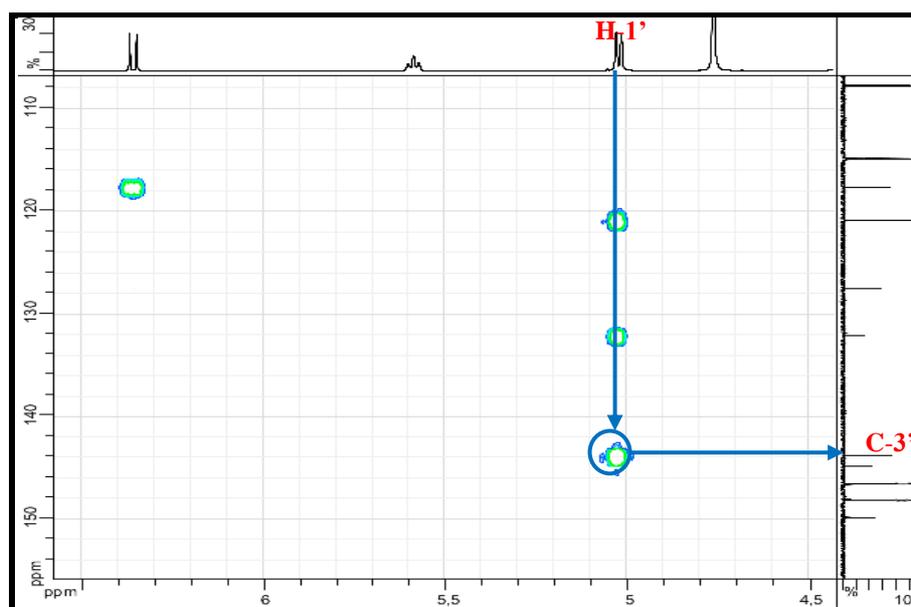


Spectre IV.38-3 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C7**
(Étalement)



Spectre IV.42-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C7**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-3 et Figure IV.24), le $\text{C}_q\text{-3'}$ éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 143,77$ ppm montre bien une corrélation avec le CH_2 oxygéné précédent confirmant ainsi notre proposition de la figure IV.23.



Spectre IV.41-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C7**

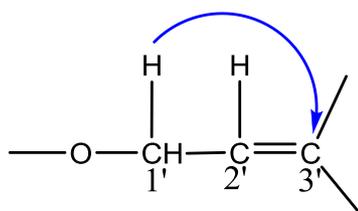


Figure IV.24 : Corrélations HMBC observées pour la molécule **C7**

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-4), aussi bien le carbone C-2' que le carbone C-3' montrent des taches de corrélation avec les protons du CH_3 résonant sous forme de singulet à $\delta_{\text{H}} = 1,67$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 16,79$ ppm) et également avec les protons du groupement CH_2 résonant sous forme de deux multiplets à $\delta_{\text{H}} = 2,19$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 2,03$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 37,45$ ppm). On peut remarquer en premier lieu que le caractère diastéréotopique de ces deux protons annonce la chiralité de cette molécule.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure IV.25 dans le substituant de notre furanocoumarine.

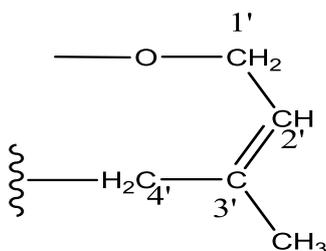
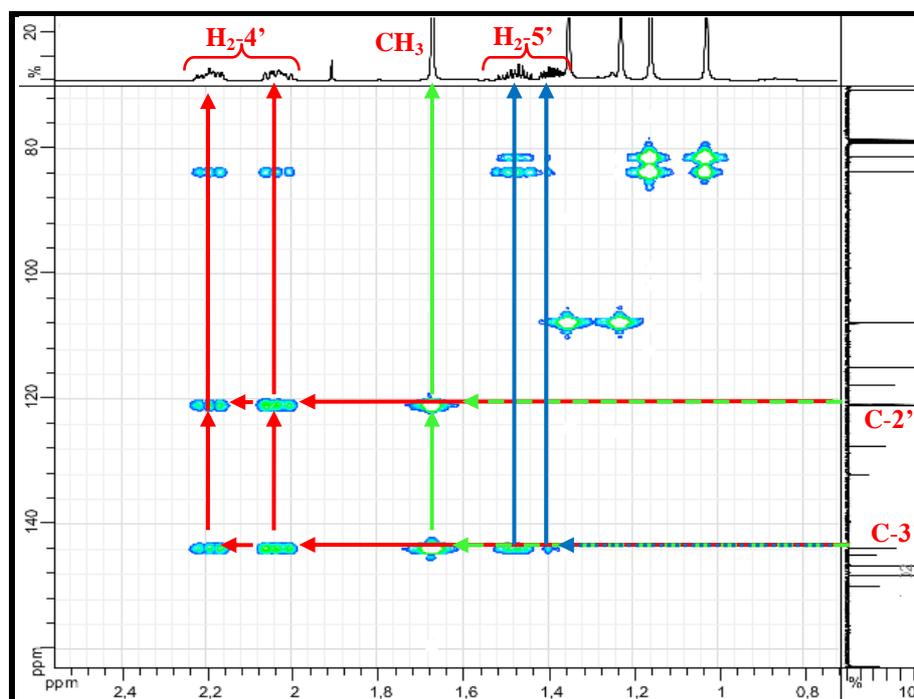


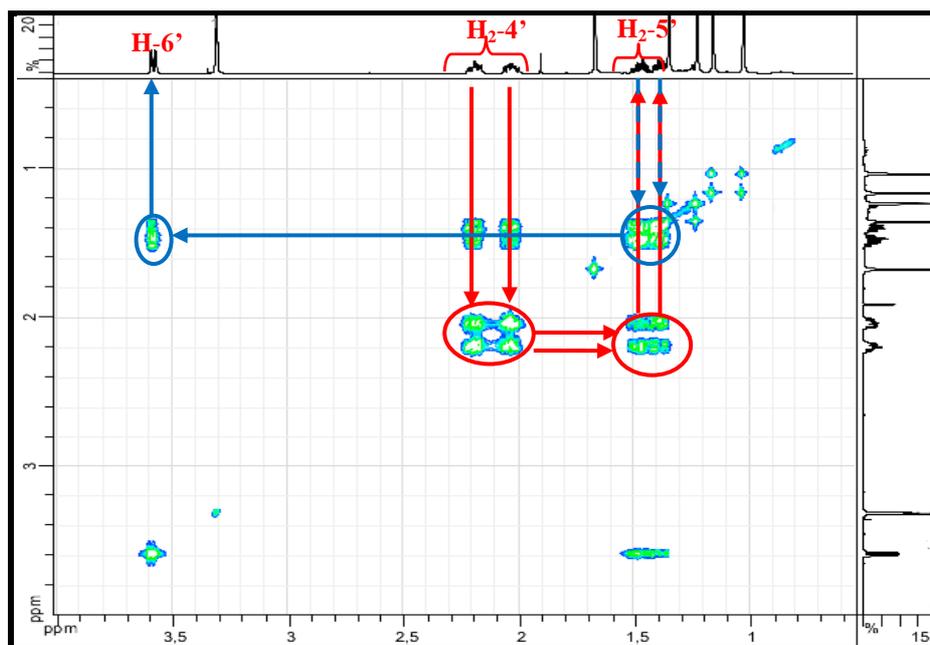
Figure IV.25 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine

Sur le spectre COSY (Spectre IV.42-2) les protons H_2-4' montrent des taches de corrélation avec les protons du troisième groupement CH_2 présent dans cette molécule. Ces deux protons que nous pouvons numérotés $H-5'a$ et $H-5'b$ résonnent sous forme de deux multiplets à $\delta_H = 1,47$ ppm et $\delta_H = 1,39$ ppm respectivement (Figure IV.26). Grâce au spectre HSQC on relève $\delta_{C-5'}$ à 28,37 ppm. La présence de ce CH_2 en position vicinale par rapport au précédent est confirmée par les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-4) entre les protons de ce CH_2 (H_2-5') et le carbone $C-3'$.

Un retour vers le spectre COSY (Spectre IV.42-2) permet de relever un couplage net entre les deux protons $H-5'a$ et $H-5'b$ et le proton du groupement CH à $\delta_H = 3,59$ ppm résonant sous forme d'un doublet de doublets ($J = 9,6 ; 3$ Hz). Ce couplage permet d'attribuer ce groupement méthyne à la position $C-6'$ de cette chaîne (Figure IV.26). La présence de ce CH en cette position est d'ailleurs confirmée par les taches de corrélation entre les carbones $C-4'$ et $C-5'$ et le proton de ce groupement ($H-6'$) observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-5).



Spectre IV.41-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $MeOH-d_4$, δ ppm) du composé **C7**



Spectre IV.42-2 : Spectre COSY étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7

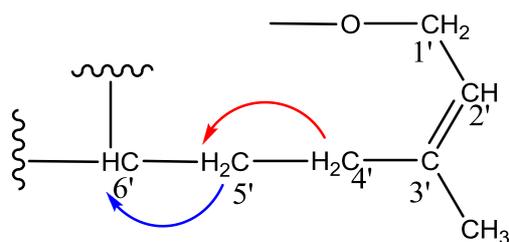
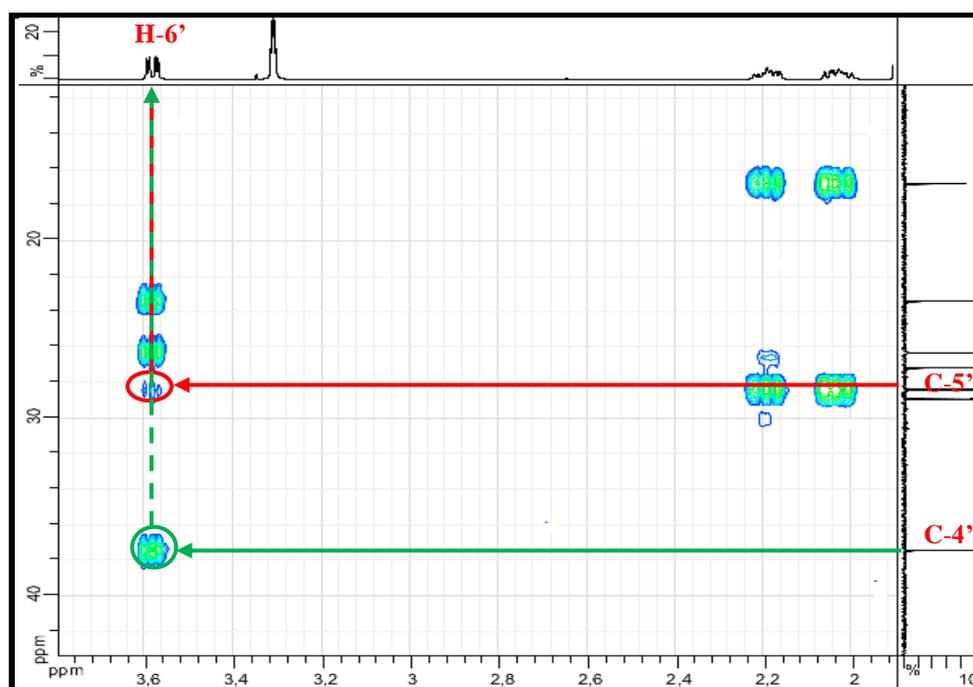


Figure IV.26 : Corrélations COSY observées pour la molécule C7



Spectre IV.41-5 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C7

La multiplicité de H-6' (doublet de doublets) et la valeur du déplacement de son carbone C-6' à $\delta_C = 83,64$ ppm orientent d'une part vers une oxygénation à ce niveau et d'autre part vers la présence d'un carbone quaternaire en position C-7'. En effet, le spectre HMBC (Spectre IV.41-6 et Figure IV.27) montre des taches de corrélation entre H-6' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 81,30$ ppm que nous pouvons alors numéroter C-7'. La valeur du déplacement chimique de C-7' est en faveur d'une oxygénation à ce niveau.

Le spectre HMBC (Spectre IV.41-6) montre également des corrélations entre ce carbone C-7' et les protons des deux méthyles à $\delta_H = 1,16$ ppm et $1,03$ ppm orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par ce carbone quaternaire C-7' (Figure IV.27). Ceci est appuyé par les corrélations que nous avons observées entre les protons H₂-4', H-5'a et les protons de ces deux méthyles avec le carbone C-6'.

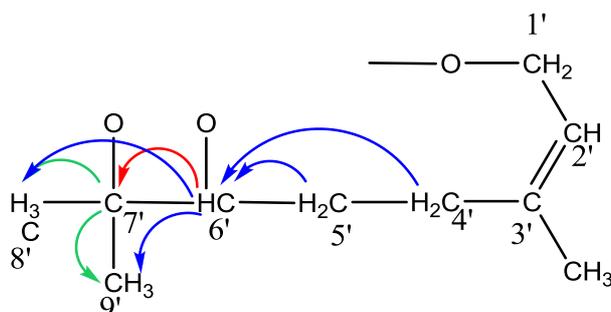
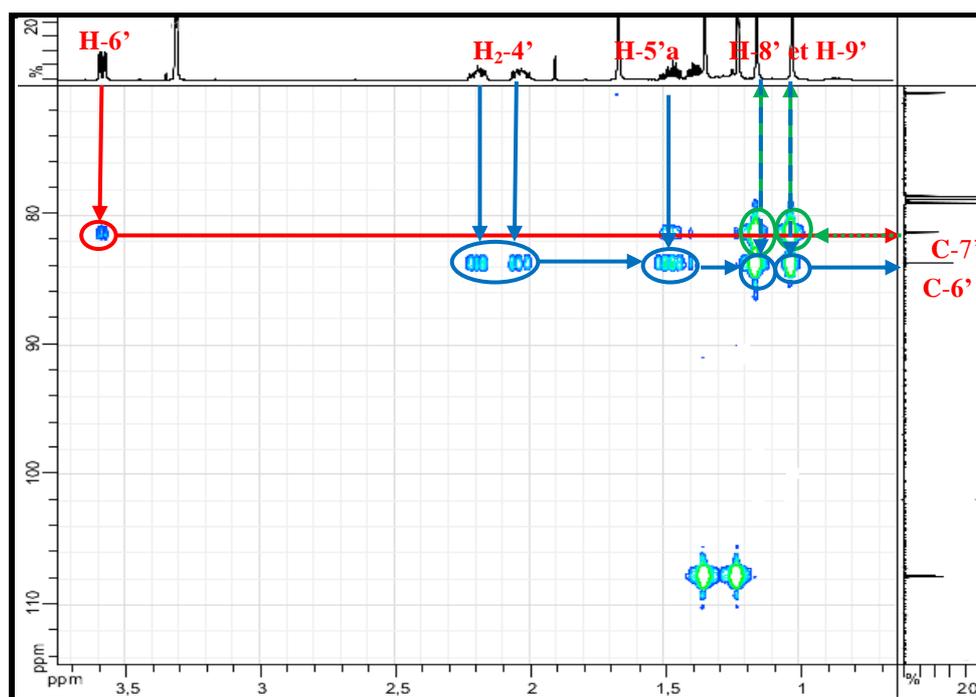
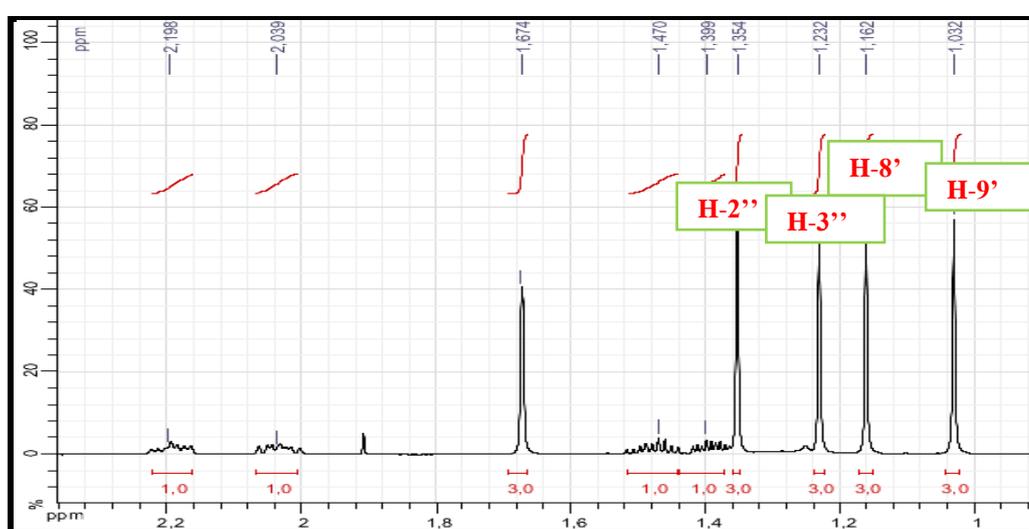


Figure IV.27 : Corrélations HMBC observées pour la molécule C7

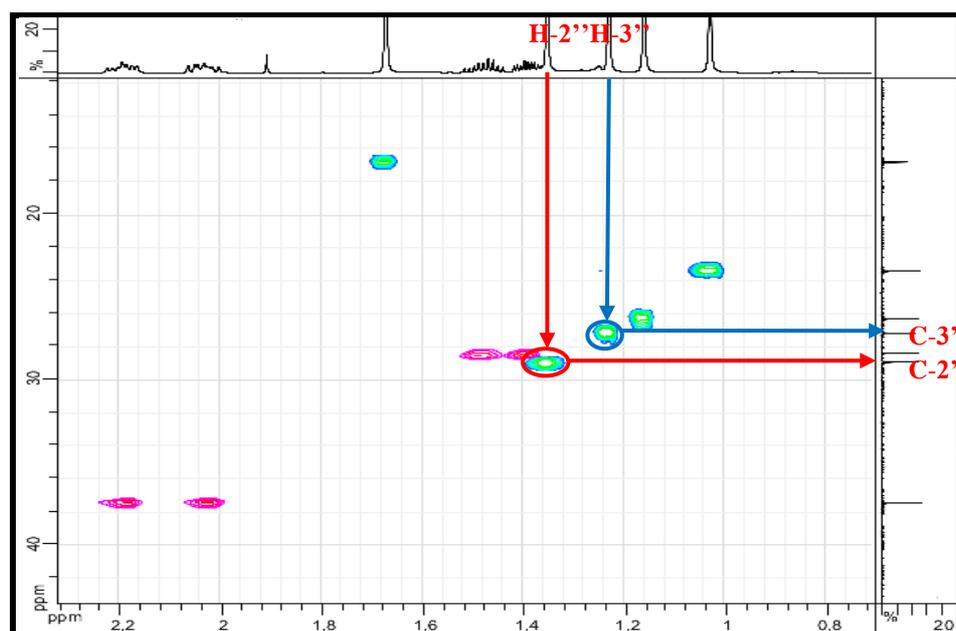


Spectre IV.41-6 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C7

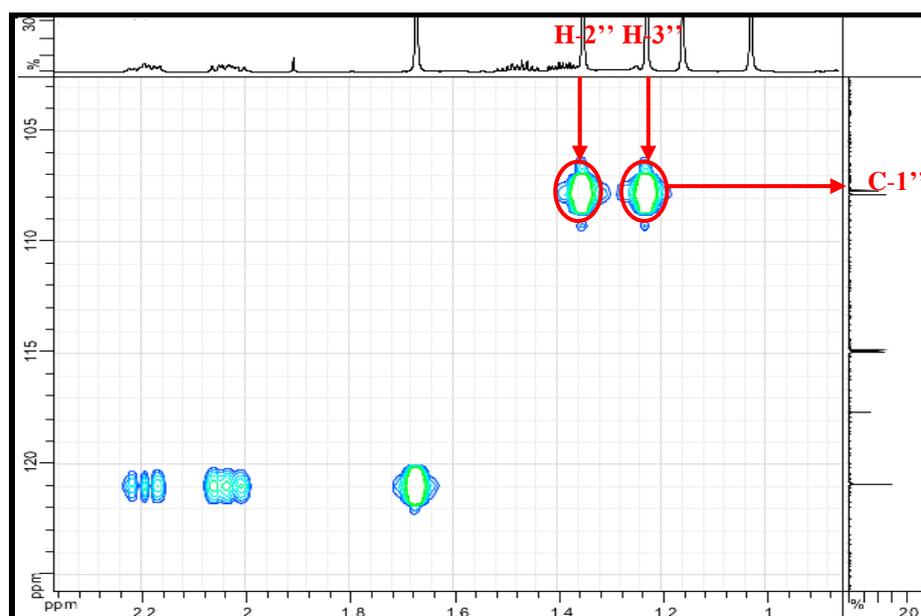
Le spectre RMN ^1H (Spectre IV.38-3), montre également deux signaux d'intégration 3H chacun caractéristiques de deux groupements méthyles à δ_{H} 1,36 et δ_{H} 1,23 ppm. Le spectre HSQC (Spectre IV.40-2), permet de localiser les signaux des carbones de ces deux méthyles à δ_{C} 28,90 et δ_{C} 27,15 ppm respectivement. Sur le spectre HMBC (Spectre IV.41-7), les protons de ces deux méthyles montrent clairement des corrélations avec un carbone résonant à δ_{C} 107,64 ppm, orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par ce carbone quaternaire que nous numérotions C-1''. La valeur de son déplacement chimique indique qu'il est hybridé sp^3 et dioxycéné.



Spectre IV.38-3 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C7



Spectre IV.40-2 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé C7



Spectre IV.41-7 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C7**

En tenant compte du fait que les carbones C-6' (δ_C 83,64) et C-7' (δ_C 81,30) sont oxygénés et que C-1'' (δ_C 107,64) est dioxygéné et sachant que la formule brute de cette molécule est $C_{24}H_{28}O_6$ et sachant que trois atomes d'oxygène ont été consommés par le squelette furanocoumarine et un par le carbone C-1' du substituant, il est évident que les deux atomes reliés au C-1'' sont ceux reliés à C-6' et C-7' formant ainsi une fonction acétonide. Il est à noter que tous les atomes de carbone et d'hydrogène ont été utilisés et que le nombre de degrés d'insaturation est bien respecté.

L'ensemble de nos observations mène à la présence de l'entité reportée dans la figure IV.28 comme substituant du squelette furanocoumarine.

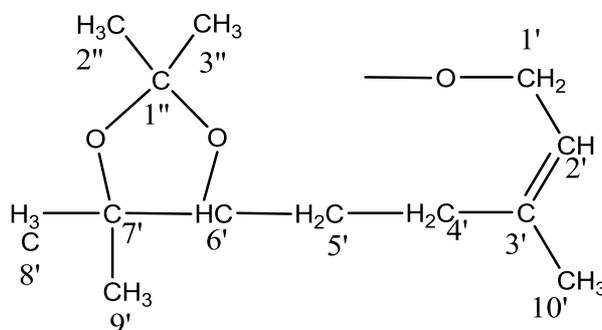
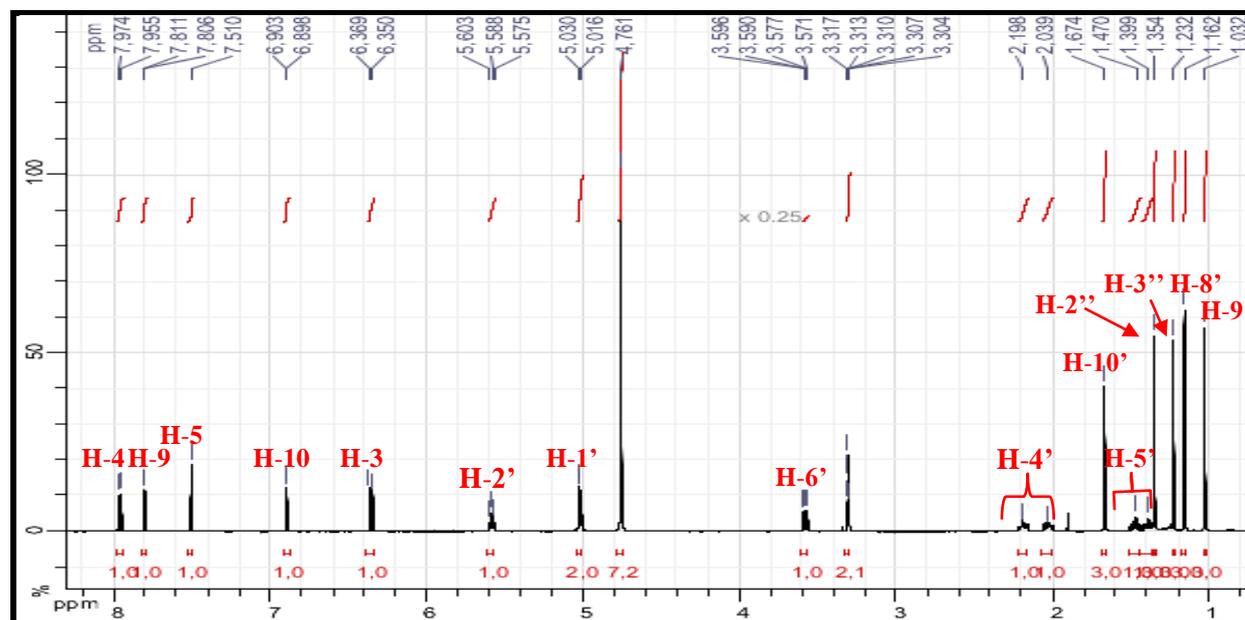


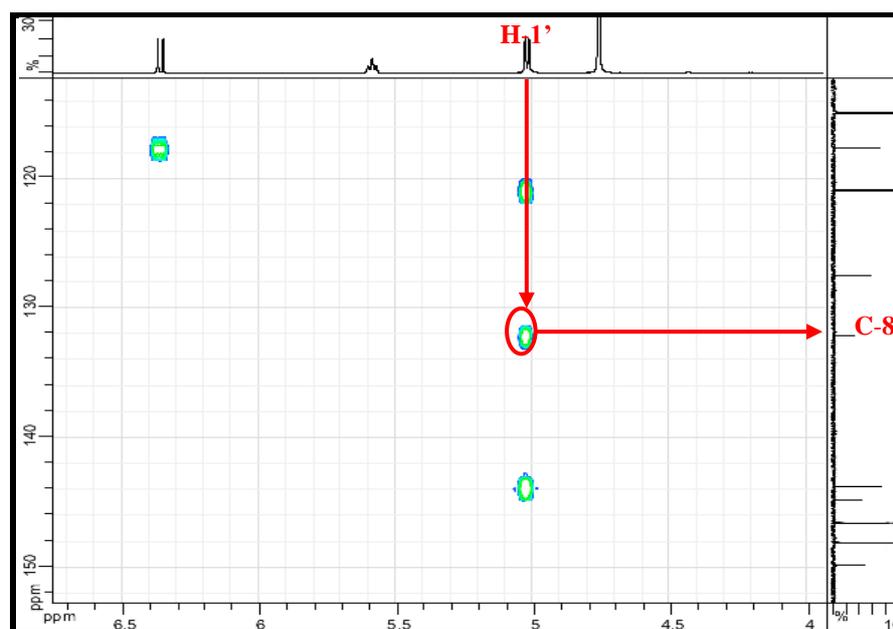
Figure IV.28 : Substituant du squelette furanocoumarine dans le composé **C7**

Les résultats de nos études spectrales nous ont permis d'attribuer tous les signaux du spectre proton (Spectre IV.38-4).



Spectre IV.38-4 : Spectre RMN ^1H du composé **C7** avec toutes les indications

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre IV.41-8), permet de repérer une tache de corrélation entre les protons du carbone oxygéné C-1' et le carbone aromatique oxygéné résonant à $\delta_{\text{C}} = 132,10$ ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique, ce carbone ne peut être que le C-8 de la furanocoumarine car il ne corrèle avec aucun autre proton de la chaîne.



Spectre IV.40-8: Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C7**

Ce composé est donc : l'**acétonide du 8-[6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène** (Figure 29). Nous le décrivons pour la première fois dans la littérature. Les données complètes de ses spectres RMN ^1H et ^{13}C sont reportées dans le tableau IV.10.

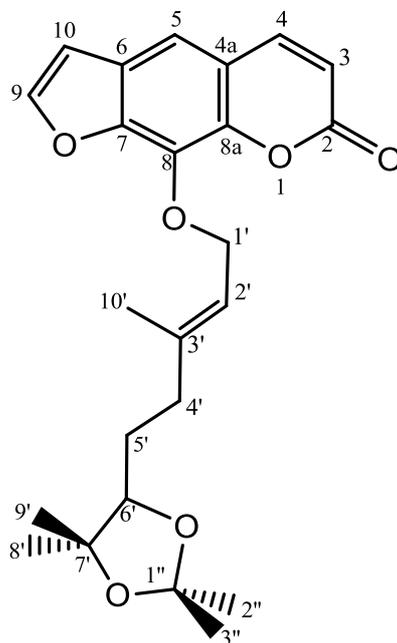
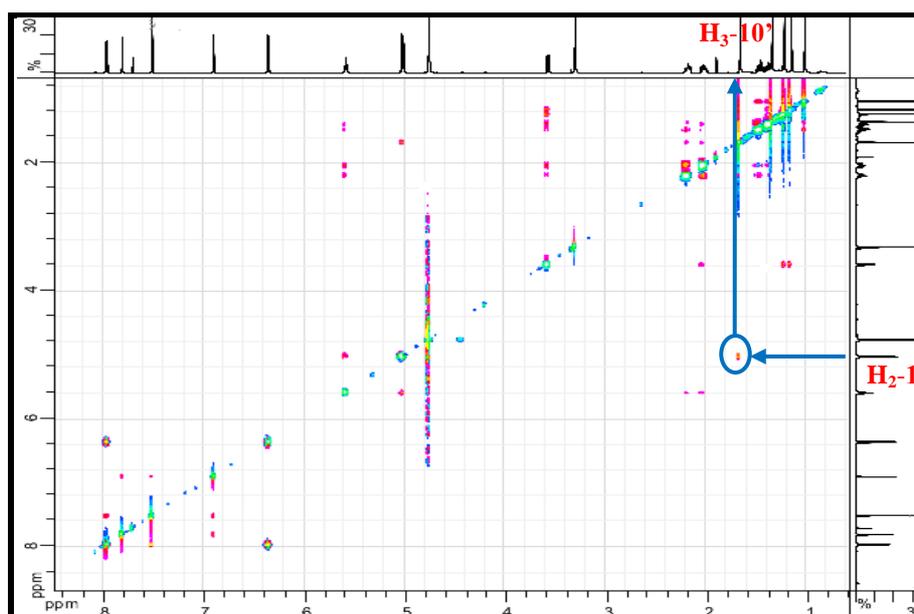


Figure IV.29 : Structure du composé **C7**

Cette molécule renferme dans la chaîne latérale une double liaison C-2' = C-3' que nous avons représentée avec une configuration *trans* grâce d'une part aux données de la bibliographie relatives aux schémas de biogenèse de ce type de molécule [11] et d'autre part grâce à l'analyse du spectre NOESY (Spectre IV.39-2) qui montre en effet, une corrélation nette entre les protons H₃-10' et les protons H₂-1' signifiant une disposition « *cis* » de ces deux groupements et par conséquent une stéréochimie « *trans* » ou « *E* » de la double liaison.



Spectre IV.39-2 : Spectre NOESY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C7**

Cette molécule **C7** admet un centre asymétrique (C-6'). De ce fait, nous nous sommes intéressés à la mesure de son pouvoir rotatoire spécifique. Cette molécule s'est avérée optiquement inactive [pouvoir rotatoire spécifique nul (C 0,5 g/100 ml ; CH₂Cl₂) aux longueurs d'onde (589, 578, 546, 436, 365 nm)], cela suppose que ce composé **C7** est racémique. Il est donc identifié comme étant l'**acétonide du 8-[(R,S)-6',7'-dihydroxygénanyloxy]psoralène**. Cette molécule est nouvelle, nous l'avons nommée **(R,S)-pituranthosine B** (Figure 30).

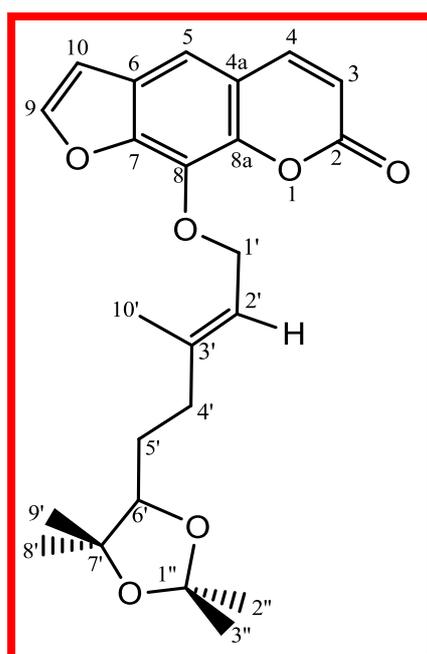
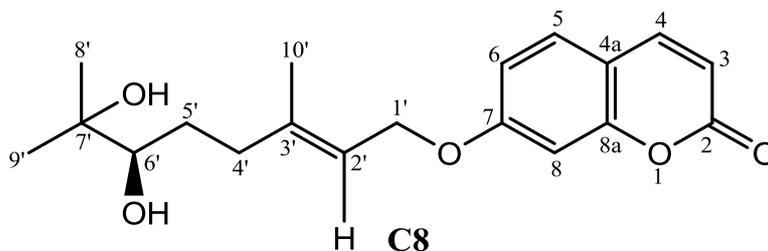


Figure IV.30 : Structure finale du composé **C7**, **(R,S)-pituranthosine B**

Tableau IV.10 : données des spectres RMN du composé C7

Position	δ_H (ppm), J (Hz)	δ_C (ppm)
2	-	162,67
3	6,36 1H <i>d</i> (9,4)	114,84
4	7,97 1H <i>d</i> (9,5)	146,56
4a	-	117,64
5	7,51 1H <i>s</i>	114,93
6	-	127,47
7	-	149,80
8	-	132,10
8a	-	144,81
9	7,81 1H <i>d</i> (2,2)	148,09
10	6,90 1H <i>d</i> (2,5)	107,82
1'	5,03 2H <i>d</i> (6,9)	70,59
2'	5,58 1H <i>t</i> (6,7)	120,88
3'	-	143,77
4'	4'a 2,19 1H <i>m</i>	37,45
	4'b 2,03 1H <i>m</i>	
5'	5'a 1,47 1H <i>m</i>	28,37
	5'b 1,39 1H <i>m</i>	
6'	3,59 1H <i>dd</i> (9,6 ; 3)	83,64
7'	-	81,30
8'	1,16 3H	26,30
9'	1,03 3H <i>s s</i>	23,39
10'	1,67 3H <i>s</i>	16,79
1''	-	107,64
2''	1,36 3H <i>s</i>	28,90
3''	1,23 3H <i>s</i>	27,15

IV-A-8- Elucidation structurale du composé C8

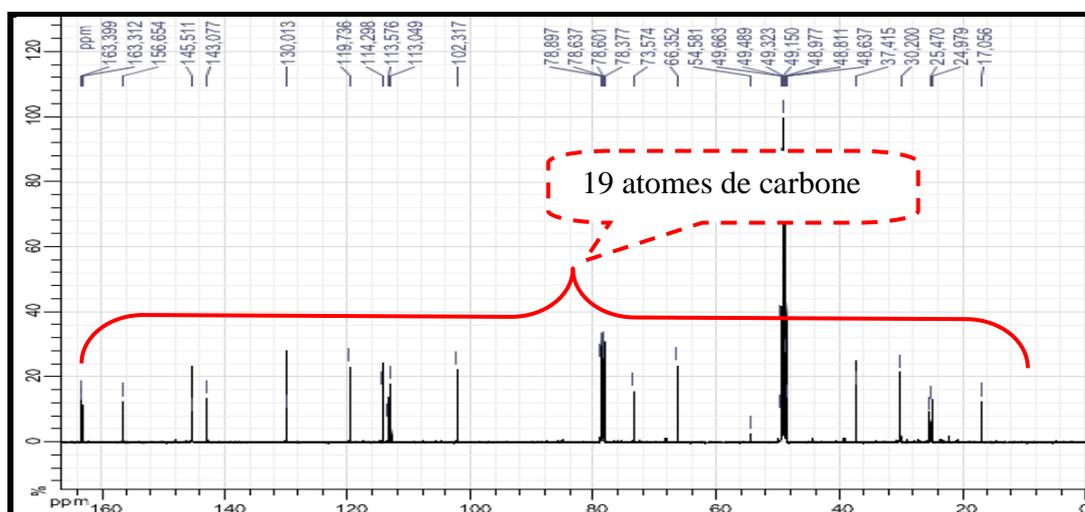


Le spectre de masse enregistré en mode ESI (+) donne un pic quasi-moléculaire à $m/z = 355,1517$ $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{19}H_{24}O_5Na$: 355,15159) correspondant à

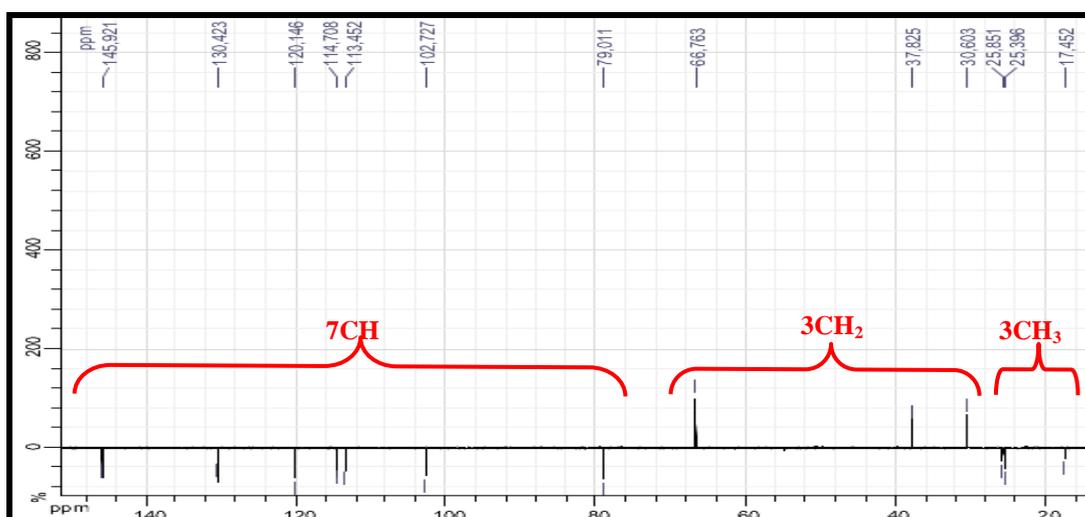
une formule brute $C_{19}H_{24}O_5$, ce qui indique la présence de huit degrés d'insaturation dans cette molécule. Cette analyse a été effectuée sur le Maxi 4G (CRMPO Université de Rennes 1) le 03/02/2017 sous le code CF 18-21-2 (6443).

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.42-1) et la séquence DEPT 135° (Spectre IV.43) confirment les données de la spectrométrie de masse par la présence de 19 résonances, incluant :

- Six carbones quaternaires dont cinq de type sp^2 et un de type sp^3 et oxygéné.
- Sept groupements CH dont six de type sp^2 et de un type sp^3 et oxygéné.
- Trois groupements méthyles tous liés à des carbones quaternaires d'après la multiplicité de leurs signaux sur le spectre proton.
- Trois groupements CH_2 de type sp^3 dont un oxygéné.



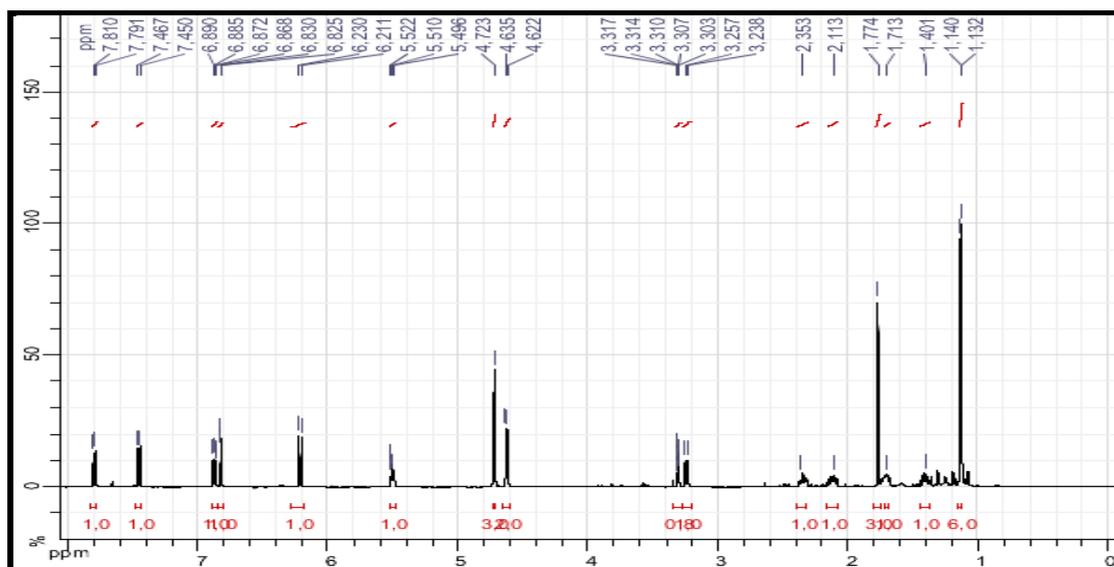
Spectre IV.42-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3+MeOH-d_4$, δ ppm) de C8



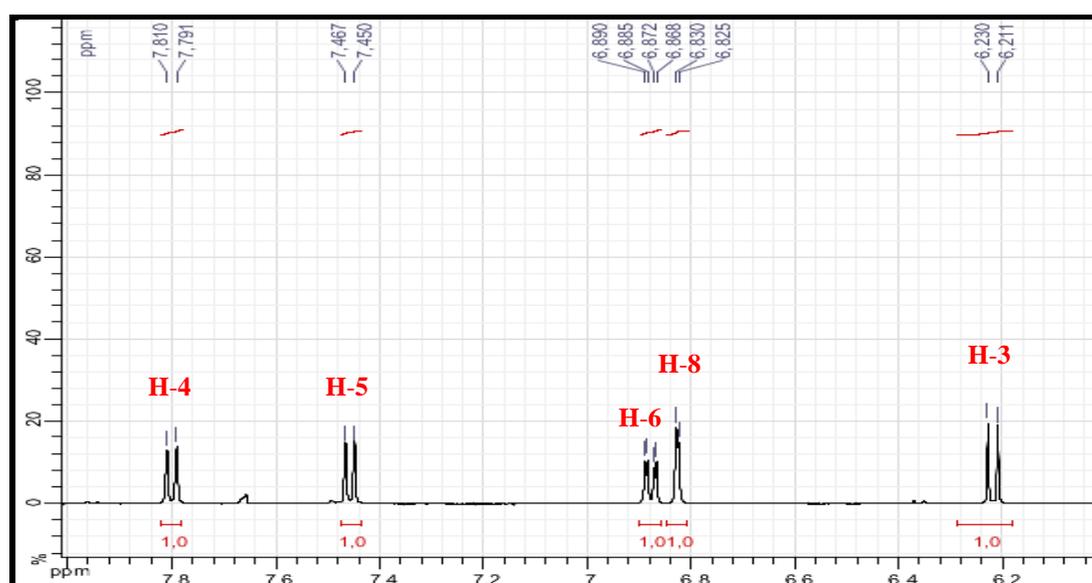
Spectre IV.43 : Spectre DEPT 135 (125 MHz, $CDCl_3+MeOH-d_4$, δ ppm) de C8

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.44-1) et son étalement (Spectre IV.44-2) montre des signaux caractéristiques d'une coumarine qui sont :

- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,22$ ppm ($J = 9,4$ Hz) attribuable à H-3.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,80$ ppm ($J = 9,4$ Hz) attribuable à H-4.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,46$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5.
- Un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 6,88$ ppm ($J = 8,5; 2,2$ Hz) attribuable à H-6.
- Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,83$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-8.

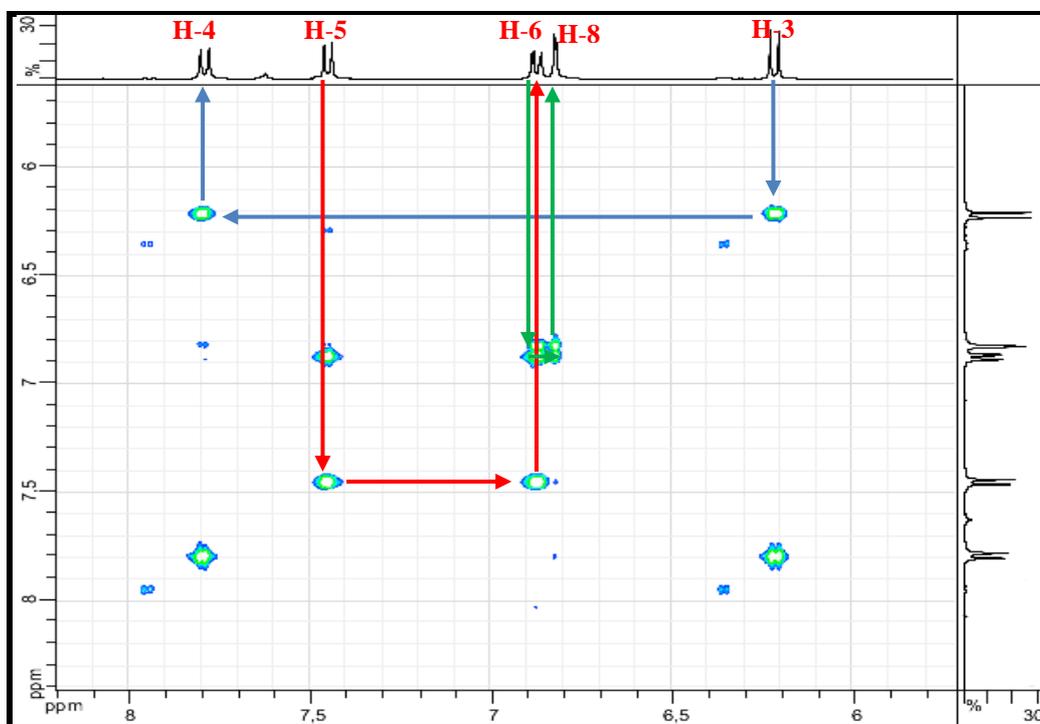


Spectre IV.44-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de C8



Spectre IV.44-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de C8

Ces résultats sont en bon accord avec le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre IV.45-1), qui montre des taches de corrélations entre ces protons que nous schématisons dans la figure IV.31.



Spectre IV.45-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C8**

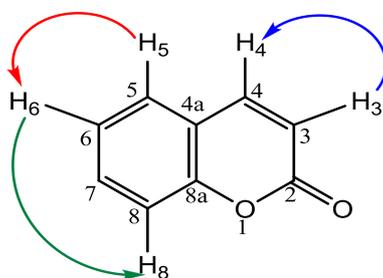


Figure IV.31 : Interactions de couplage observées dans le spectre COSY de **C8**

Par ailleurs la corrélation observée sur le spectre NOESY (Spectre IV.46-1) entre H-4 et H-5 consolide ces hypothèses (Figure IV.32).

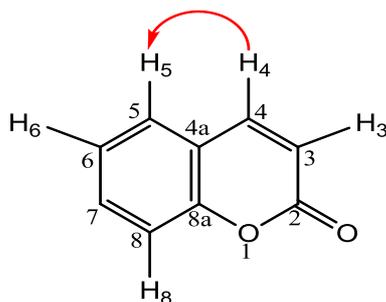
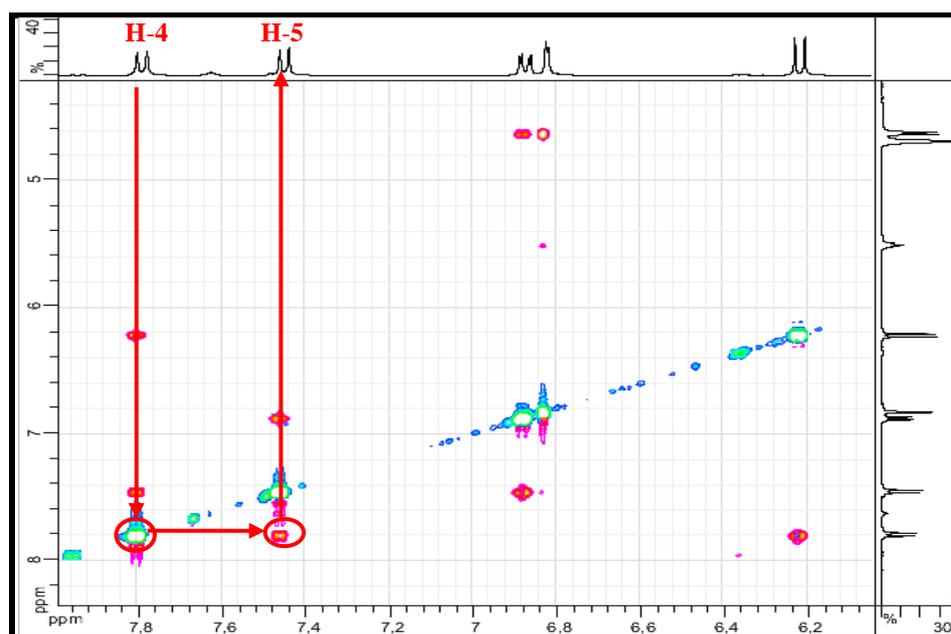


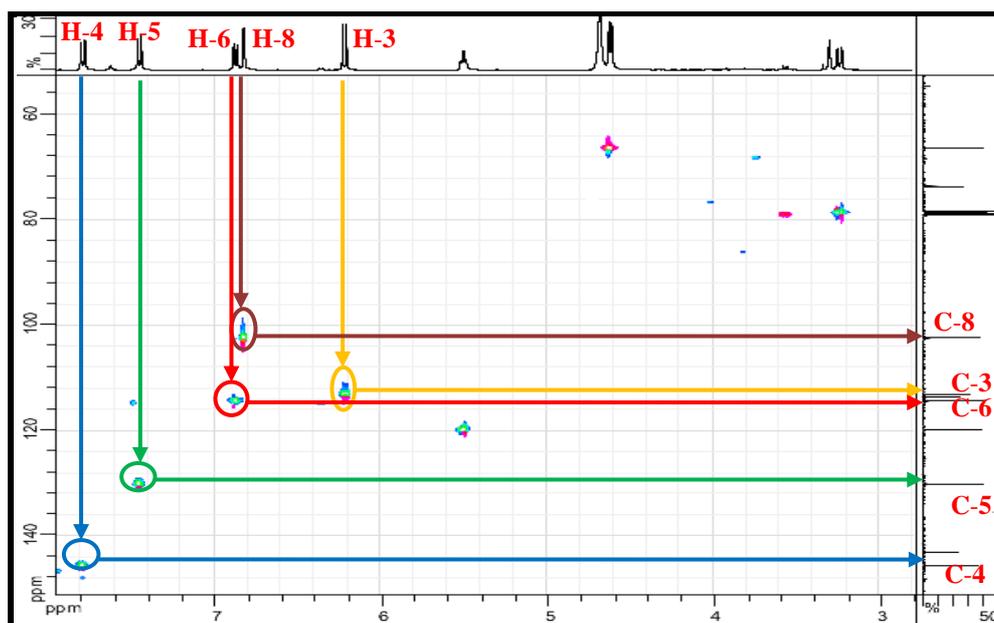
Figure IV.32 : Corrélation NOESY observée pour le composé **C8**



Spectre IV.46-1 : Spectre NOESY (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C8

Les carbones porteurs des protons du squelette coumarine ont été attribués grâce à l'analyse du spectre HSQC (Spectre IV.47-1) notamment :

- le carbone C-4 à δ_C 145,51 ppm (δ_H 7,80 ppm)
- le carbone C-3 à δ_C 113,05ppm (δ_H 6,22 ppm)
- le carbone C-5 à δ_C 130,01ppm (δ_H 7,46 ppm)
- le carbone C-6 à δ_C 114,30 ppm (δ_H 6,88 ppm)
- le carbone C-8 à δ_C 102,32 ppm (δ_H 6,83 ppm)



Spectre IV.47-1 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C8

Les carbones quaternaires de cette coumarine seront attribués grâce à leurs corrélations sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-1), avec les protons décrits précédemment. Ainsi, le carbone C-2 sera associé au signal à $\delta_C = 163,31$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3 et H-4 ; de même le carbone quaternaire C-4a sera attribué au signal à $\delta_C = 113,56$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3, H-6. Les protons H-4, H-5 et H-8 corréleront tous les trois avec un carbone aromatique oxygéné ($\delta_C = 156,65$ ppm), qui ne peut être que le C-8a et les protons H-5, H-6 et H-8 corréleront tous les trois avec un carbone aromatique oxygéné ($\delta_C = 163,40$ ppm), qui ne peut être que le C-7 (Figure IV.33). La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique qu'est oxygéné.

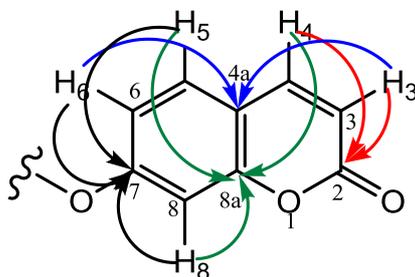
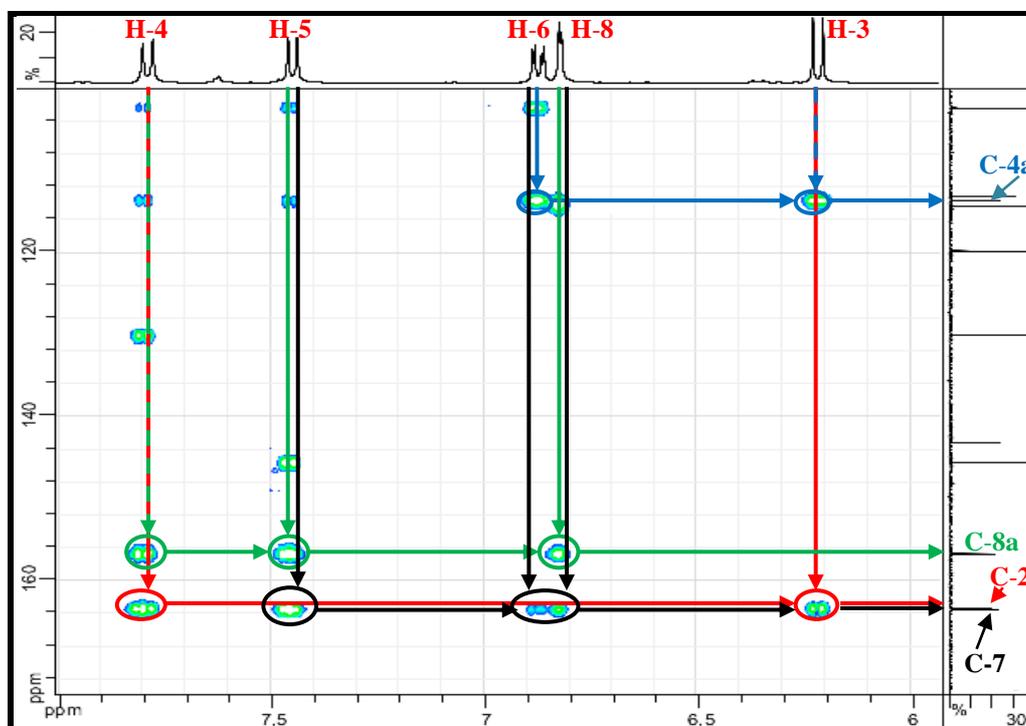
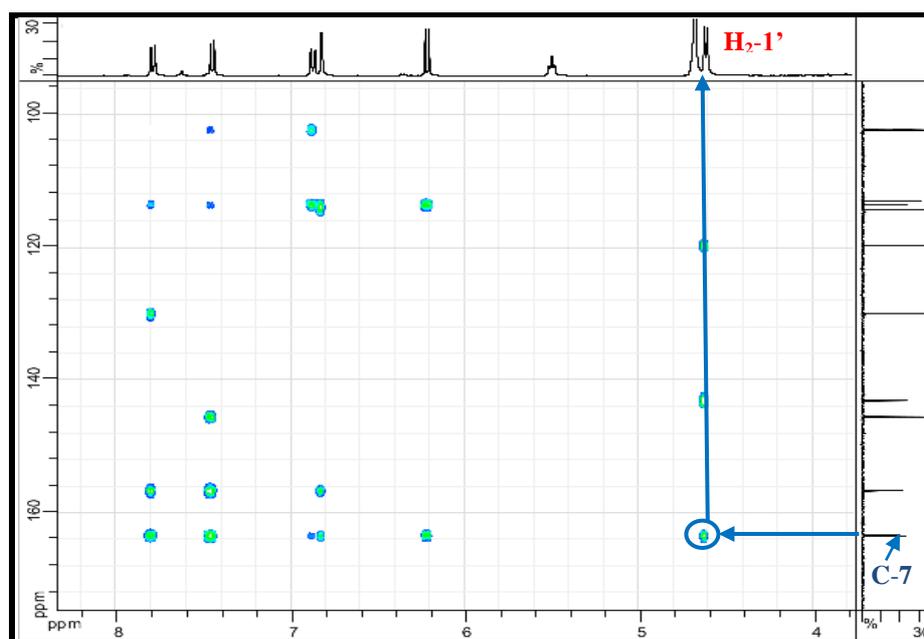


Figure IV.33 : Corrélations HMBC des protons et carbones du squelette coumarine



Spectre IV.48-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de C8

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-1) de cette molécule, on relève aisément la présence d'une tache de corrélation entre le carbone C-7 et les protons d'un groupement méthylène résonant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,63$ ppm ($J = 6,6$ Hz). La valeur du déplacement chimique des protons de ce CH₂ et celle de leur carbone porteur ($\delta_{\text{C}} = 66,35$ ppm, relevé du spectre HSQC) confirment bien qu'ils sont portés par un carbone oxygéné. Nous numérotions ces protons H₂-1' et leur carbone porteur C-1'.

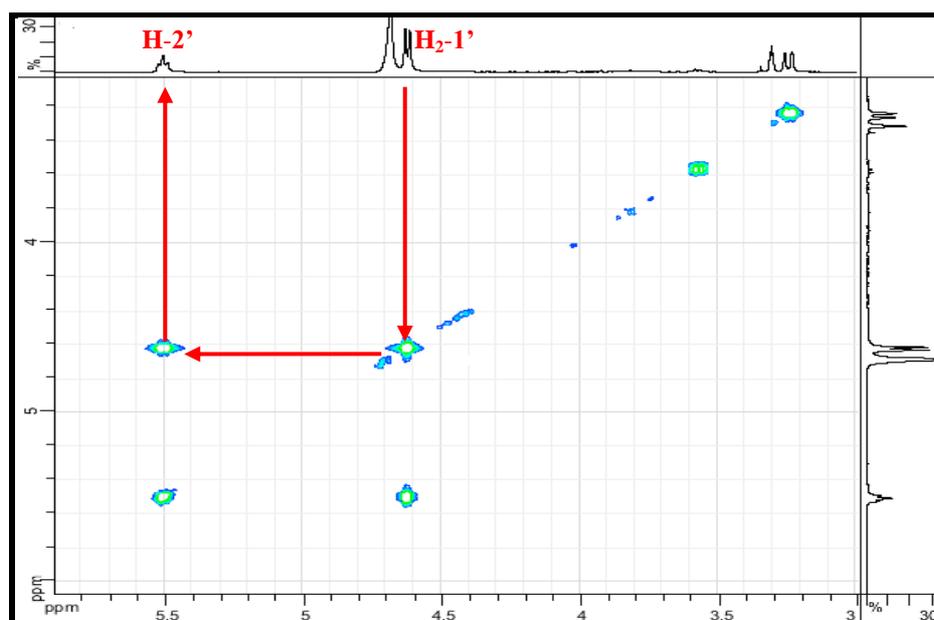


Spectre IV.48-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de **C8**

L'examen de l'ensemble des spectres de cette molécule (¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC) et la comparaison avec les données des molécules **C6** et **C7** permettent de relever la présence du groupement géranyloxy oxygéné dans ses positions 6 et 7 que nous numérotions dans cette molécule C-6' et C-7'. Il est bien évident que ce groupement est localisé sur le carbone C-7 du squelette de la coumarine.

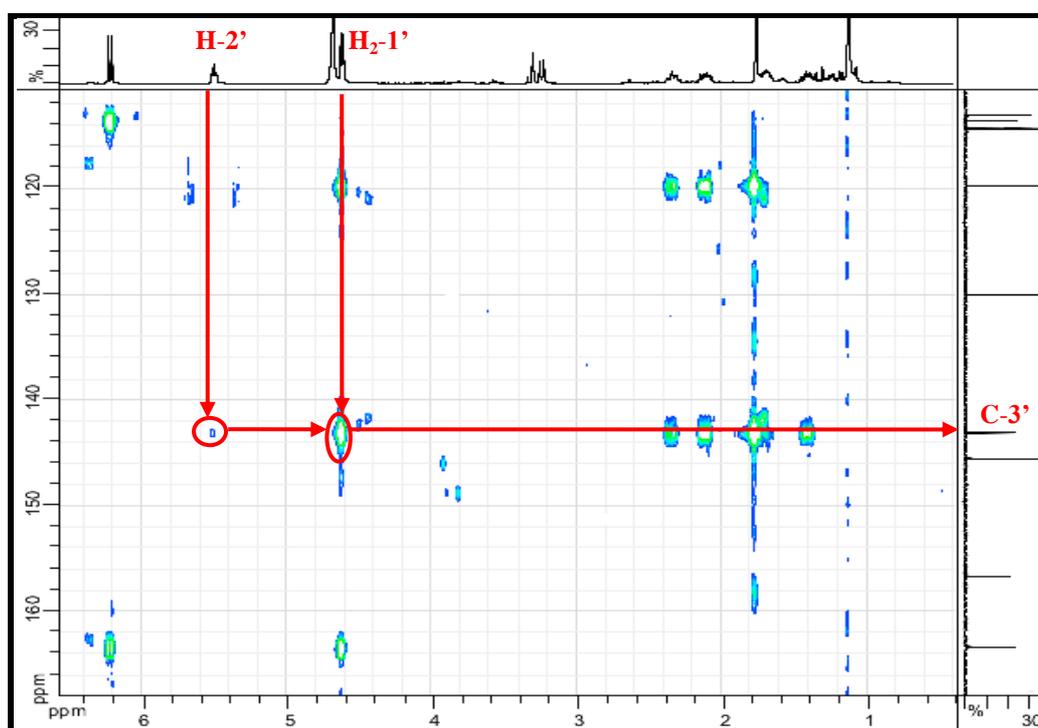
Ainsi en faisant abstraction des signaux attribués à la coumarine, et ceux attribués aux noyaux de la position C-1', les signaux restants sont bien compatibles avec notre déduction. Il s'agit de :

- un CH éthylénique résonant à $\delta_{\text{H}} 5,51$ ppm (t, $J = 6,8$ Hz, $\delta_{\text{C}} 119,74$ ppm) couplant sur le spectre COSY (Spectre IV.45-2) aux protons H₂-1', nous le numérotions donc C-2'.



Spectre IV.45-2 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C8**

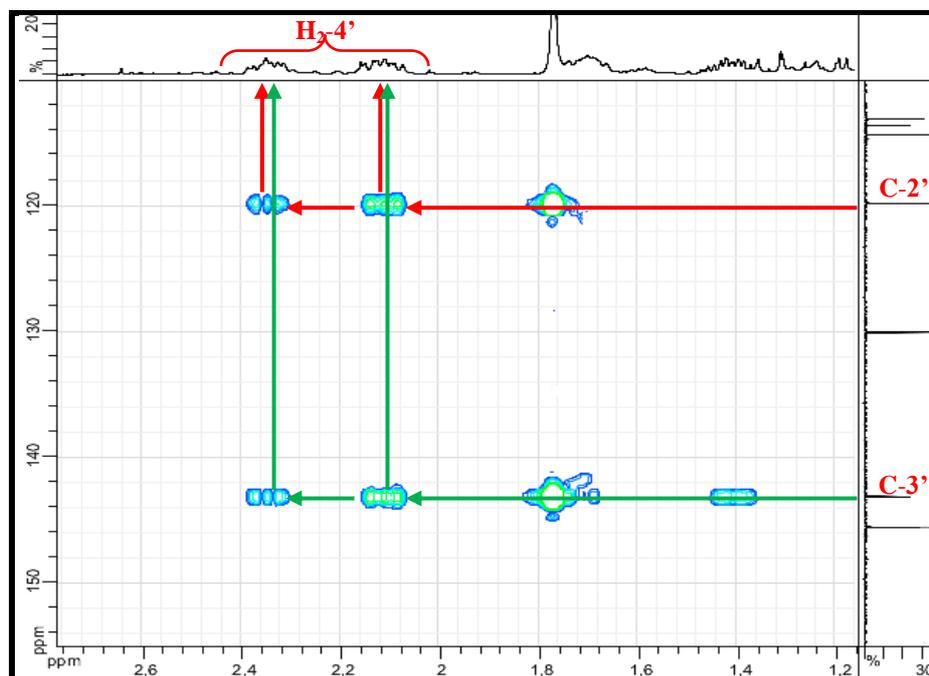
- un C_q résonnant à δ_{C} 143,08 ppm montrant des taches de corrélation avec H_2-1' et $\text{H}-2'$ sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-3), nous le numérotions $\text{C}-3'$.



Spectre IV. 48-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C8**

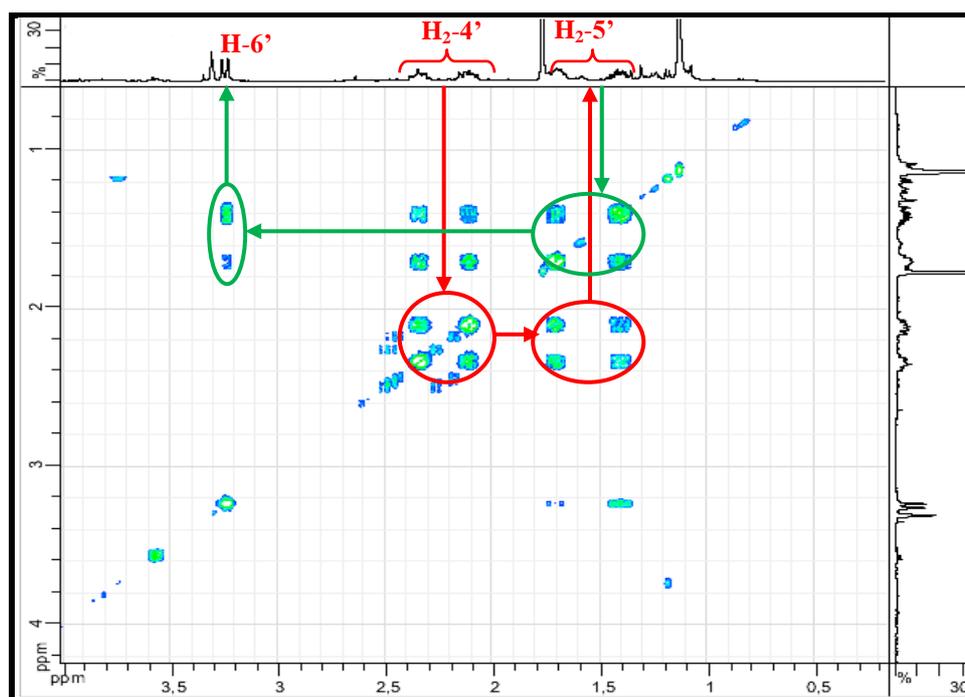
- Un CH_2 dont les protons sont diastéréotopiques car ils résonnent sous forme de deux multiplets, le premier à $\delta_{\text{H}} = 2,35$ ppm et le second à $\delta_{\text{H}} = 2,11$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 37,41$ ppm). Ces deux protons montrent des taches de corrélation nettes avec les

carbones C-2' et C-3' (Spectre IV.48-4), ce qui nous permet de les placer en position C-4'.

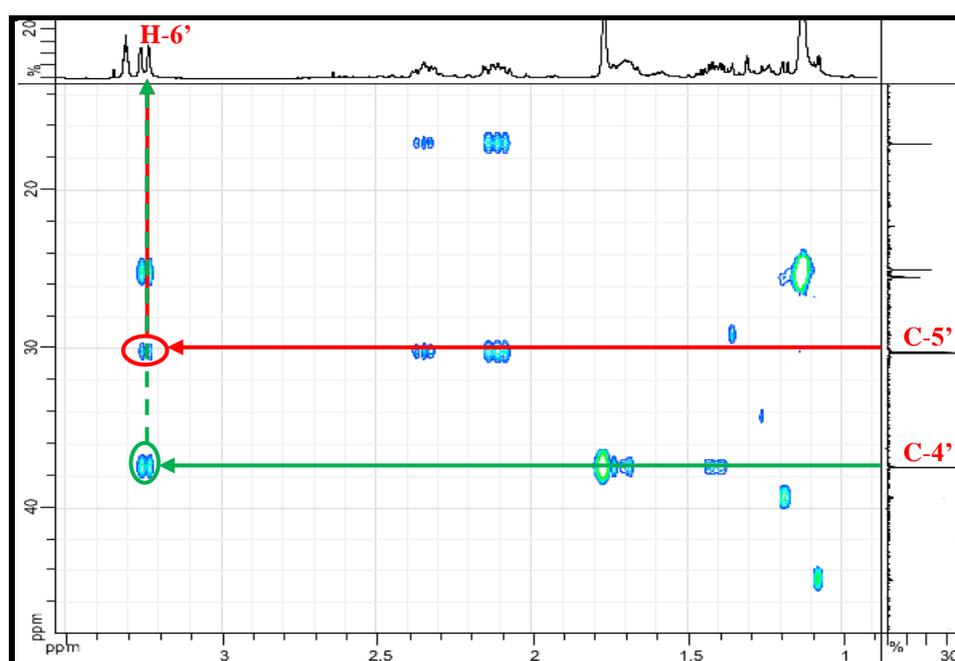


Spectre IV.48-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C8**

- Un autre CH_2 dont les protons sont également diastéréotopiques car ils résonnent sous forme de deux multiplets, le premier à $\delta_{\text{H}} = 1,71$ ppm et le second à $\delta_{\text{H}} = 1,40$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 30,20$ ppm). Ces deux protons montrent des taches de corrélation avec les protons $\text{H}_2\text{-}4'$ sur le spectre COSY (Spectre IV.45-3), permettant ainsi leur positionnement sur le carbone C-5' du groupement géranyle.
- Un CH résonant sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 3,25$ ($J = 10,6$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 78,60$ ppm). La valeur des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur indiquent bien l'oxygénation de cette position. Le proton de ce méthyne montre bien des taches de corrélation avec les protons $\text{H}_2\text{-}5'$ sur le spectre COSY (Spectre IV.45-3), et des corrélations avec les carbones C-4' et C-5' sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-5), permettant ainsi son attribution à la position C-6' de ce groupement géranyle.



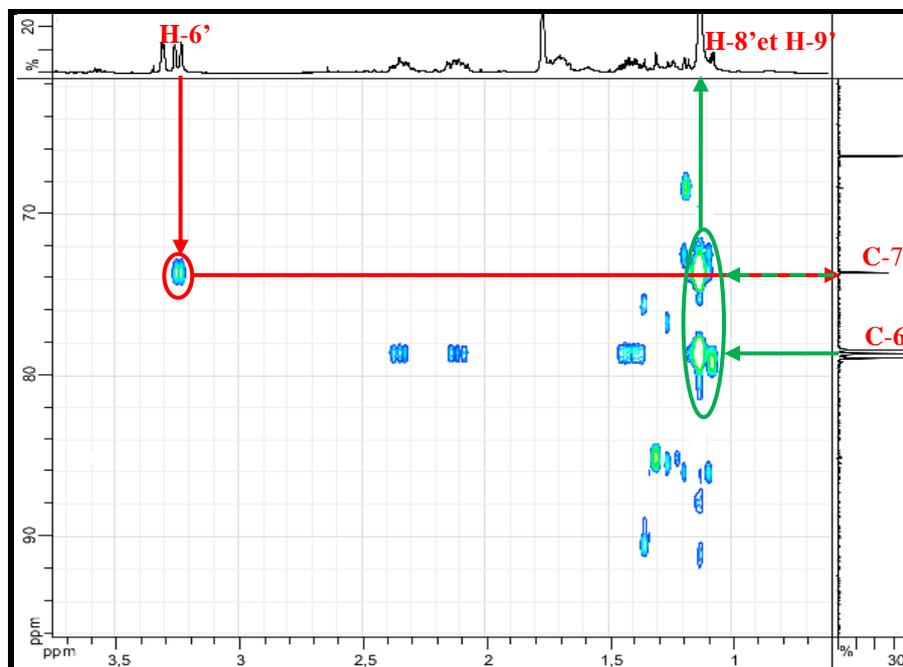
Spectre IV.45-3 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C8



Spectre IV.48-5 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C8

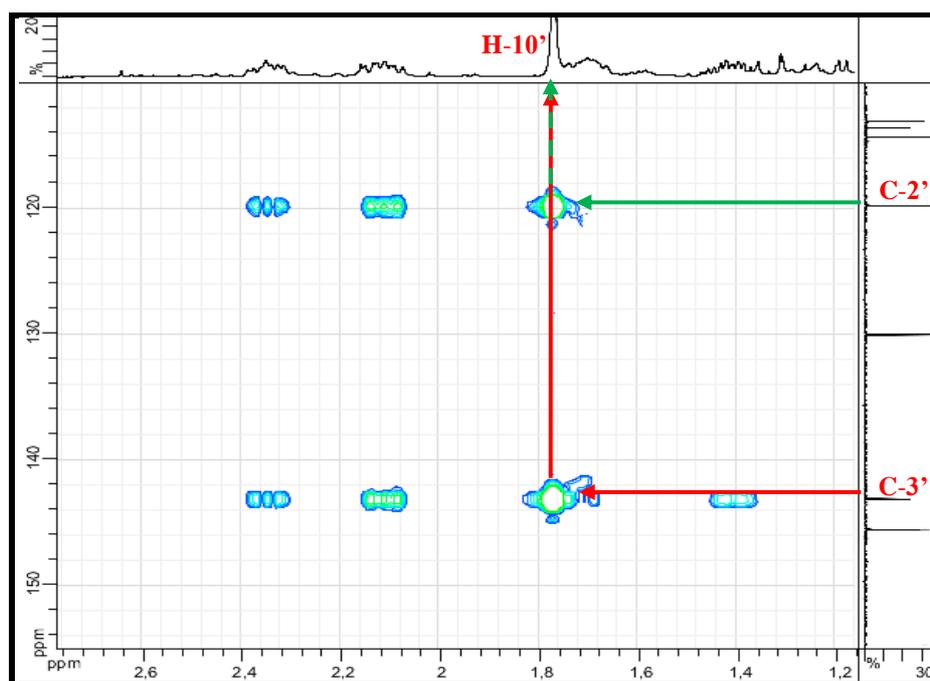
- Un Cq résonant à $\delta_C = 73,57$ ppm montrant une tache de corrélation avec H-6' sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-6), nous le numérotions C-7'. La valeur du déplacement chimique de C-7' est en faveur d'une oxygénation à ce niveau.
- Deux méthyles résonant sous forme de singulets à $\delta_H = 1,14$ ppm ($\delta_C = 25,47$ ppm) et 1,13 ppm ($\delta_C = 24,98$ ppm) dont les corrélations sur le spectre HMBC

(Spectre IV.48-6), de leurs protons avec C-7' et C-6' orientent vers le fait que ces deux méthyles sont portés par le carbone C-7'. Nous les numérotions alors C-8' et C-9'.



Spectre IV.48-6 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de **C8**

- Un groupement méthyle résonant sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}} = 1,77$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 17,06$ ppm) dont les corrélations des protons observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.48-7), avec les carbones C-2' et C-3' indiquent qu'il est en position C-3'. Ceci est appuyé par la multiplicité du signal de ses protons. Nous les numérotions le carbone de ce méthyle C-10'.



Spectre IV.48-7 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de **C8**

La combinaison des résultats de cette analyse structurale reportés sur les spectres proton (Spectre 44-3) et carbone treize (Spectre 42-2) mène à la présence de l'entité reportée dans la figure IV.34 dans le substituant de notre coumarine. Il est à noter que cette entité est reliée au carbone C-7 du squelette coumarinique par le biais de l'atome d'oxygène en C-1'.

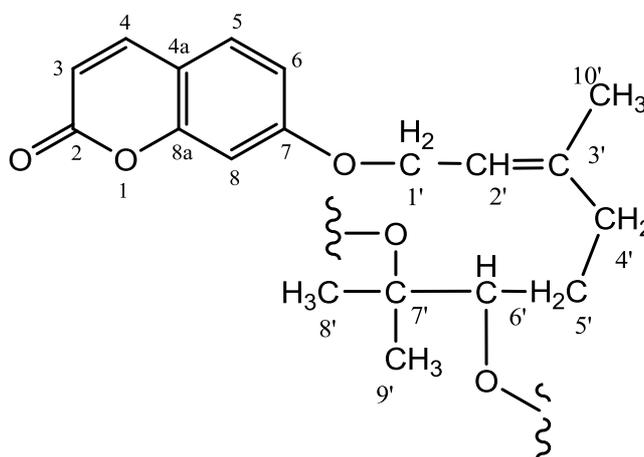
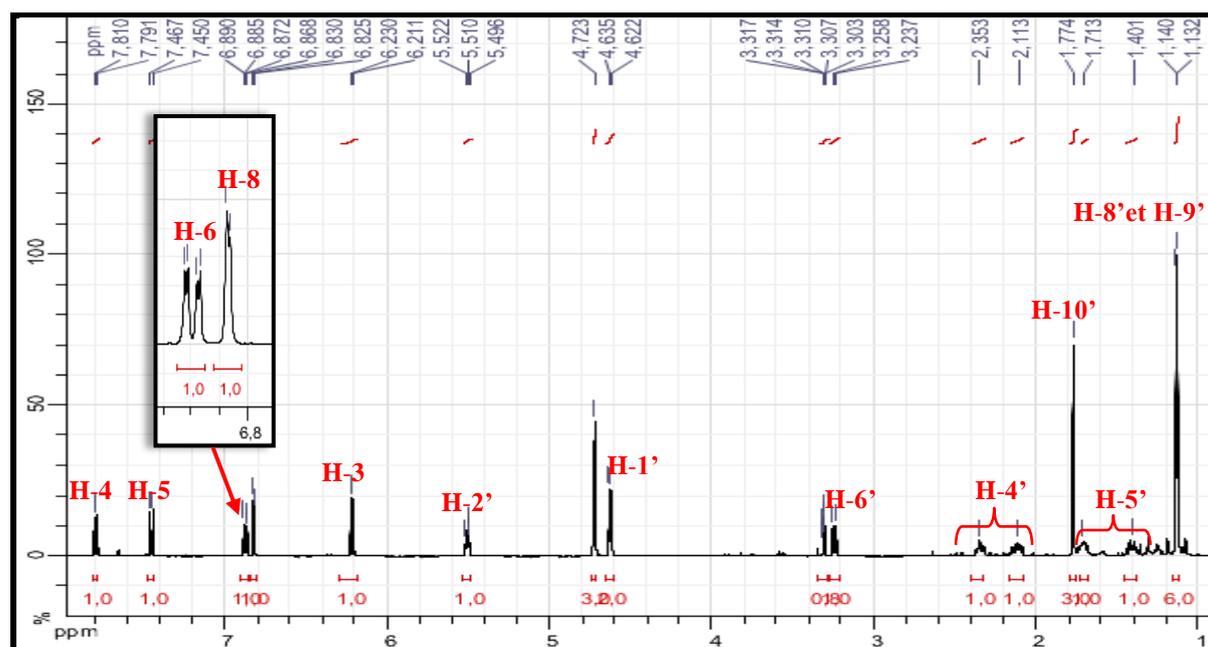
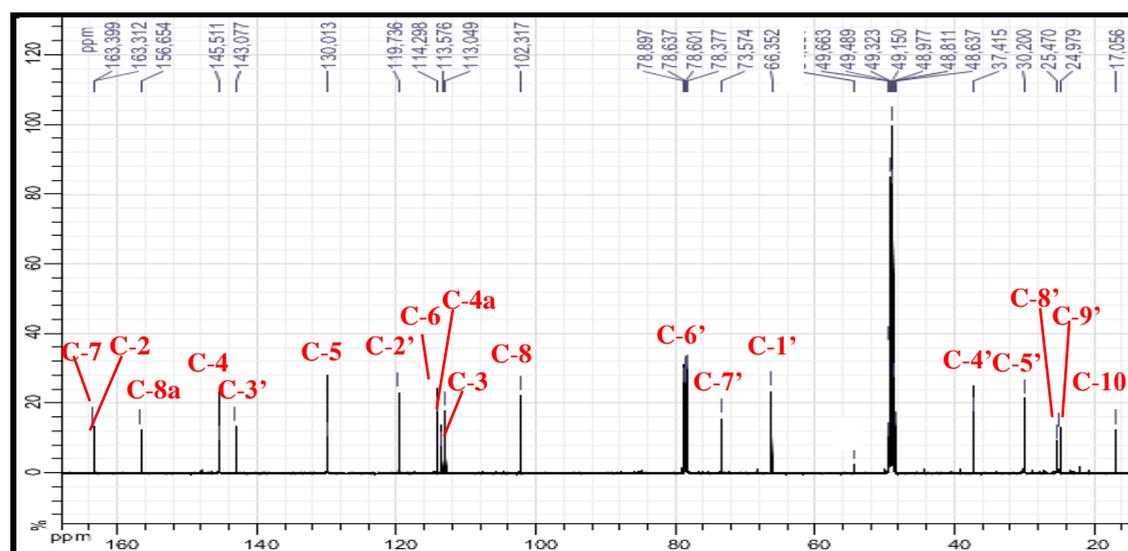


Figure IV.34 : Entité faisant partie du substituant en C-7 du squelette coumarinique



Spectre IV.44-3 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de **C8** avec toutes les indications

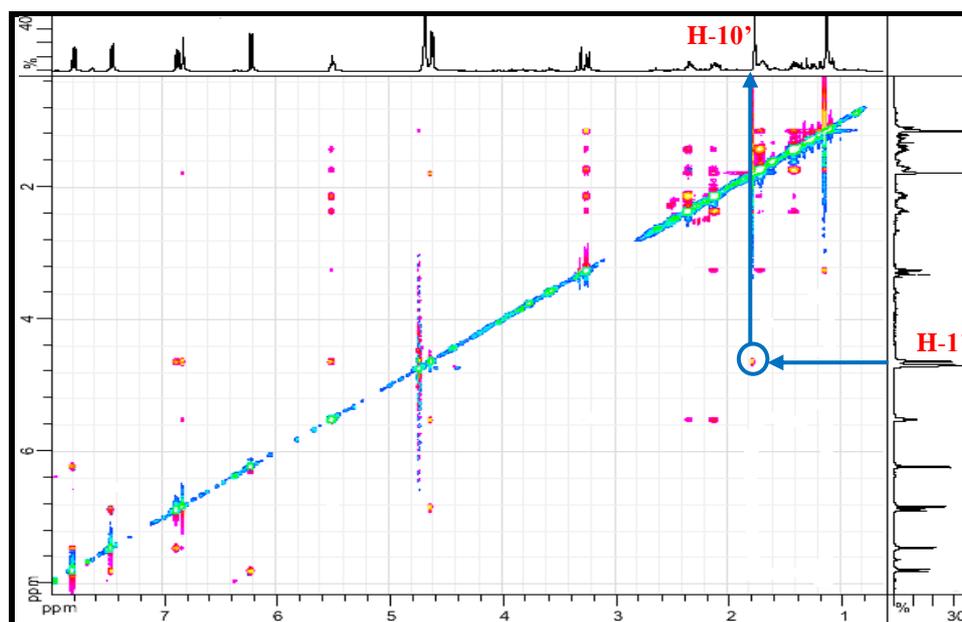


Spectre IV.42-2 : Spectre RMN ^{13}C étalé (125 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de **C8** avec toutes les indications

Un retour vers la formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5$ de cette molécule montre que nous avons utilisé l'ensemble de nos atomes de carbone et d'oxygène et l'ensemble de nos insaturations. Il reste à placer deux atomes d'hydrogène sur ce substituant ce qui mène à la présence de deux hydroxyles ; un en C-6' et l'autre en C-7'.

Cette molécule est donc la **7-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)coumarine**. Pour confirmer la configuration E de la double liaison C-2' = C-3', nous avons eu recours à

l'examen du spectre NOESY (Spectre IV.46-2). Sur ce spectre le groupement CH₃ (10') montre une corrélation nette avec les protons H₂-1' signifiant une orientation « *cis* » de ce groupement CH₃ et de ce groupement CH₂, de ce fait les groupements CH₂-4' et CH₂-1' admettent une disposition « *trans* » par rapport à la double liaison. On peut donc noter que la configuration de cette double liaison est bien E. Ceci est donc en accord avec les données de la biogenèse concernant le groupement géranyle où la double liaison est reportée de configuration E [11]. Cette molécule est connue sous le nom de **marmine** [12].



Spectre IV.46-2 : Spectre NOESY (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de **C8**

Dans cette analyse, il reste à rechercher la configuration de centre chiral C-6', en effet, la mesure du pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a donné : $[\alpha]_D^{20} = +9,8$ (c 0,9 g/100 ml ; CH₂Cl₂), cela suppose que notre molécule est dextrogyre et que nous avons par conséquent la (+)-marmine. D'après des travaux bibliographiques effectués sur des molécules similaires, la valeur positive de la rotation optique est en accord avec la configuration (R) du centre chiral C-6' [13]. Par conséquent, le composé **C8** est donc la **R-(+)-marmine** (Figure IV.35).

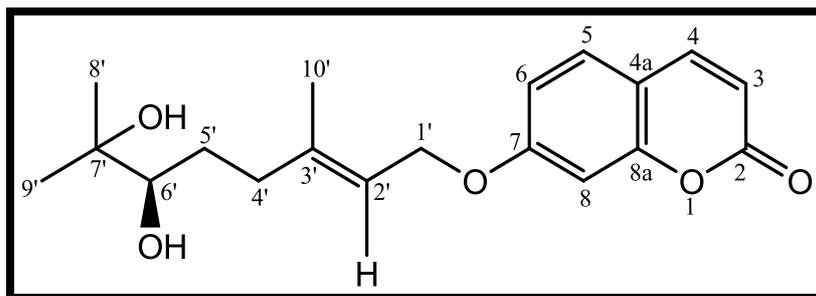


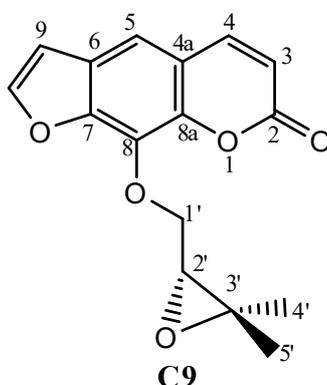
Figure IV.35 : Structure du composé C8, R-(+)-marmine

Les données de la spectroscopie RMN relatives à cette molécule sont résumées dans le tableau IV.11.

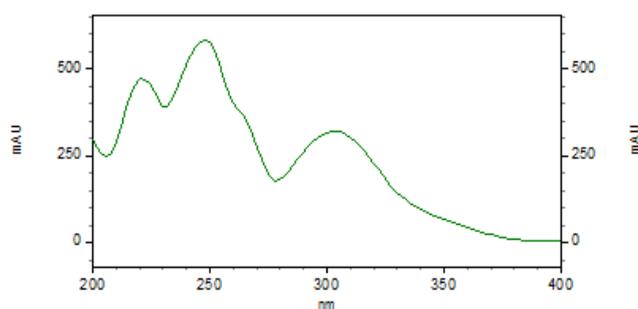
Tableau IV.11 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) de C8 ($\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$)

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	
2	-	163,31	
3	6,22 ($J = 9,4$ Hz 1H <i>d</i>)	113,05	
4	7,80 ($J = 9,4$ Hz 1H <i>d</i>)	145,51	
4a	-	113,56	
5	7,46 ($J = 8,5$ Hz 1H <i>d</i>)	130,01	
6	6,88 ($J = 8,5 ; 2,2$ Hz 1H <i>dd</i>)	114,30	
7	-	163,40	
8	6,83 ($J = 2,1$ Hz 1H <i>d</i>)	102,32	
8a	-	156,65	
1'	4,63 ($J = 6,6$ Hz 2H <i>d</i>)	66,35	
2'	5,51 ($J = 6,8$ Hz 1H <i>t</i>)	119,74	
3'	-	143,08	
4'	4'a	2,11 (1H <i>m</i>)	37,41
	4'b	2,35 (1H <i>m</i>)	
5'	5'a	1,40 (1H <i>m</i>)	30,20
	5'b	1,71 (1H <i>m</i>)	
6'	3,25 ($J = 10,6$ Hz 1H <i>dl</i>)	78,60	
7'	-	73,57	
8'	1,14 (3H <i>s</i>)	25,47	
9'	1,13 (3H <i>s</i>)	24,98	
10'	1,77 (3H <i>s</i>)	17,06	

IV-A-9- Elucidation structurale du composé C9

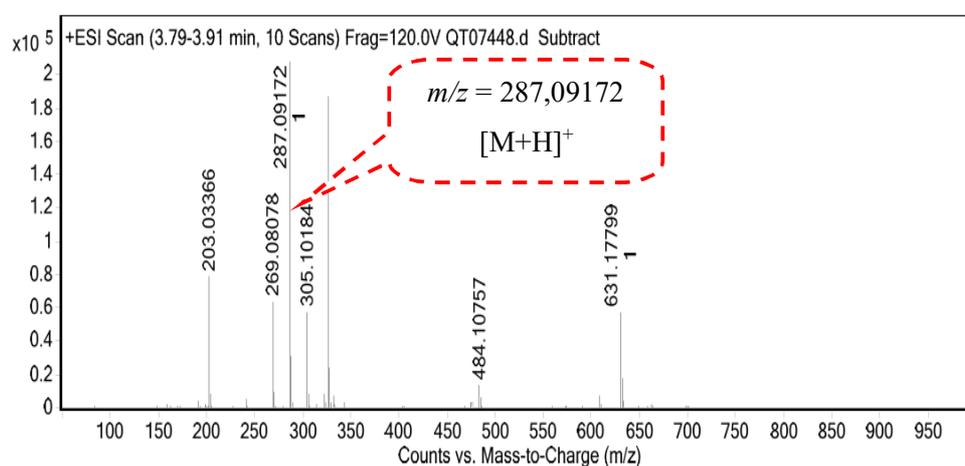


Le spectre d'absorption UV (Spectre IV.49) de ce produit est caractéristique d'une furanocoumarine linéaire.



Spectre IV.49 : Spectres UV-Visible du composé C9

L'étude du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.50 et Tableau IV.12), indique la présence d'ions adduits à m/z 287,09172 $[M+H]^+$, permettant de déduire une formule brute $C_{16}H_{14}O_5$ pour cette molécule qui doit donc comporter dix degrés d'insaturations.



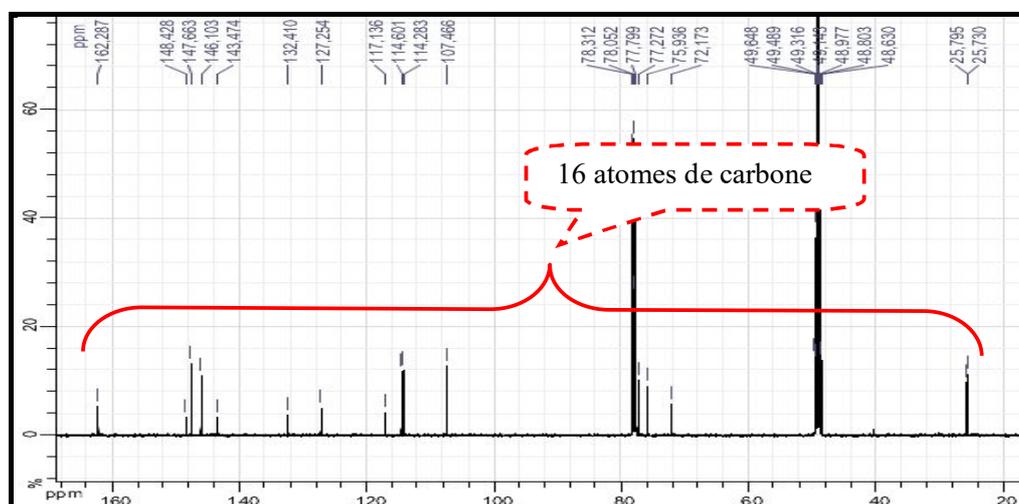
Spectre IV.50 : Spectre HR-ESI-MS du composé C9

Tableau IV.12 : Données du spectre HR-ESIMS du composé C9

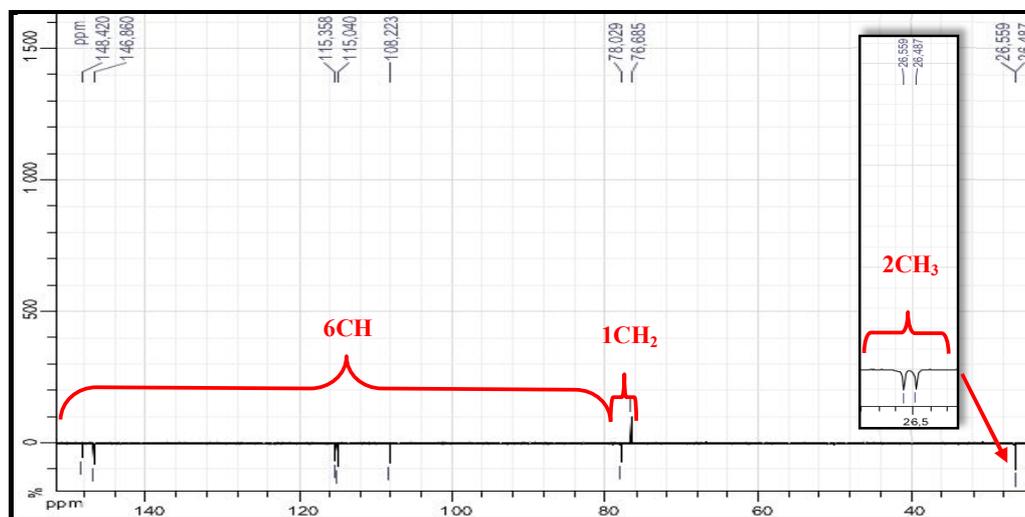
m/z	z	Abund	Formula	Ion
203.03366		80424.9		
269.08078		64124.4		
287.09172	1	213747.5	C16 H15 O5	(M+H)+
288.09455	1	30790.3	C16 H15 O5	(M+H)+
305.10184		57739.3		
327.08417	1	187265.5	C16 H16 Na O6	(M+Na)+
328.08694	1	24968.2	C16 H16 Na O6	(M+Na)+
484.10757		13457.9		
631.17799	1	57823.2		
632.18136	1	17511.3		

Les spectres RMN ^{13}C (Spectre IV.51-1) et DEPT 135° (Spectre IV.52) confirment la présence de 16 atomes de carbone, incluant :

- Sept carbones quaternaires dont 6 hybridés sp^2 et 1 hybridé sp^3 et oxygéné.
- Six groupements CH dont 6 hybridés sp^2 et 1 hybridé sp^3 et oxygéné.
- Un groupement CH_2 hybridé sp^3 et oxygéné.
- Deux groupements méthyles

Spectre IV.51-1 : Spectre RMN ^{13}C étalé (125 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOH}-d_4$, δ ppm) de

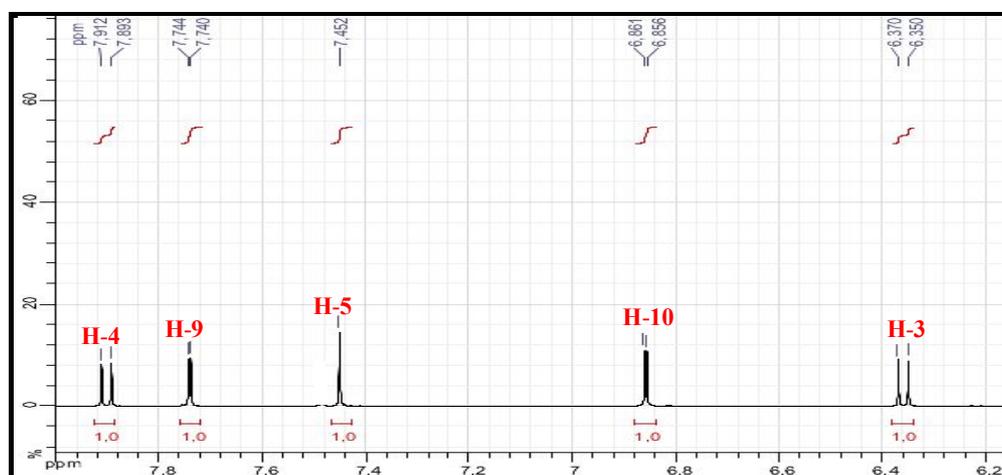
C9



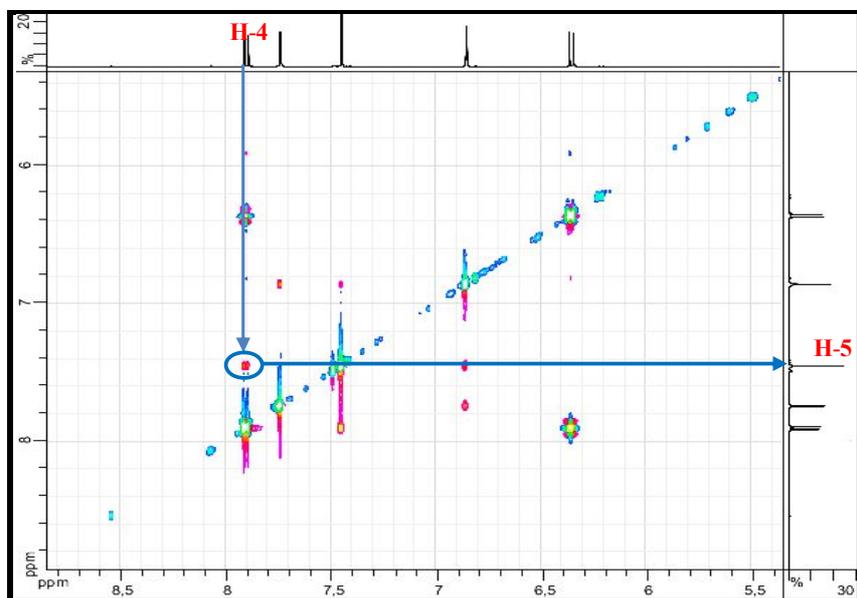
Spectre IV.52 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de C9

L'examen approfondi des spectres RMN ¹H (Spectre IV.53-1), RMN ¹³C (Spectre IV.51-1), NOESY (Spectre IV.54), HSQC (Spectre IV.55-1), HMBC (Spectre IV.56-1) et COSY (Spectre IV.57-1), et leur comparaison avec leurs correspondants relatifs aux composés décrits précédemment (C2, C3, C5, C6 et C7) montrent des signaux caractéristiques d'une furanocoumarine linéaire qui sont :

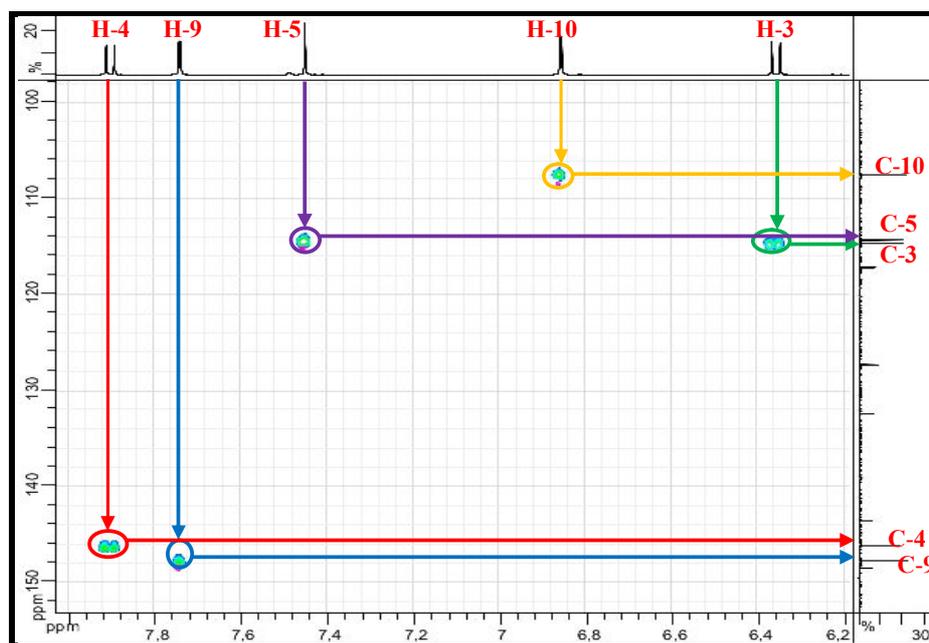
- Un doublet à δ_H = 6,36 ppm (*J* = 9,8 Hz) attribuable à H-3 (δ_{C-3} = 114,60 ppm).
- Un doublet à δ_H = 7,90 ppm (*J* = 9,4 Hz) attribuable à H-4 (δ_{C-4} = 146,10 ppm).
- Un doublet à δ_H = 6,86 ppm (*J* = 2,4 Hz) attribuable à H-10 (δ_{C-10} = 107,46 ppm).
- Un doublet à δ_H = 7,74 ppm (*J* = 2,2 Hz) attribuable à H-9 (δ_{C-9} = 147,66 ppm).
- Un singulet à δ_H = 7,45 ppm attribuable à H-5 (δ_{C-5} = 114,28 ppm).



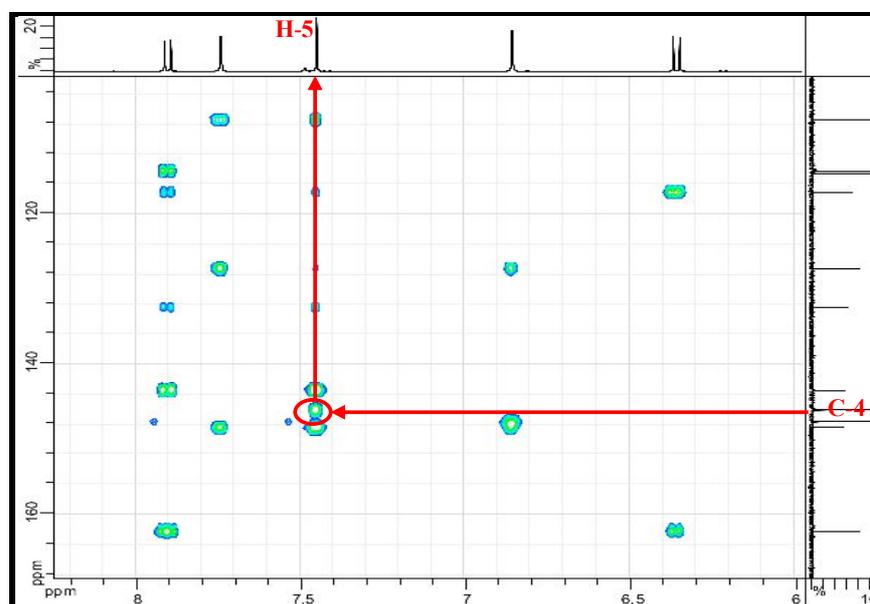
Spectre IV.53-1 : Spectre RMN ¹H étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de C9



Spectre IV.54 : Spectre NOESY étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH, δ ppm) de C9



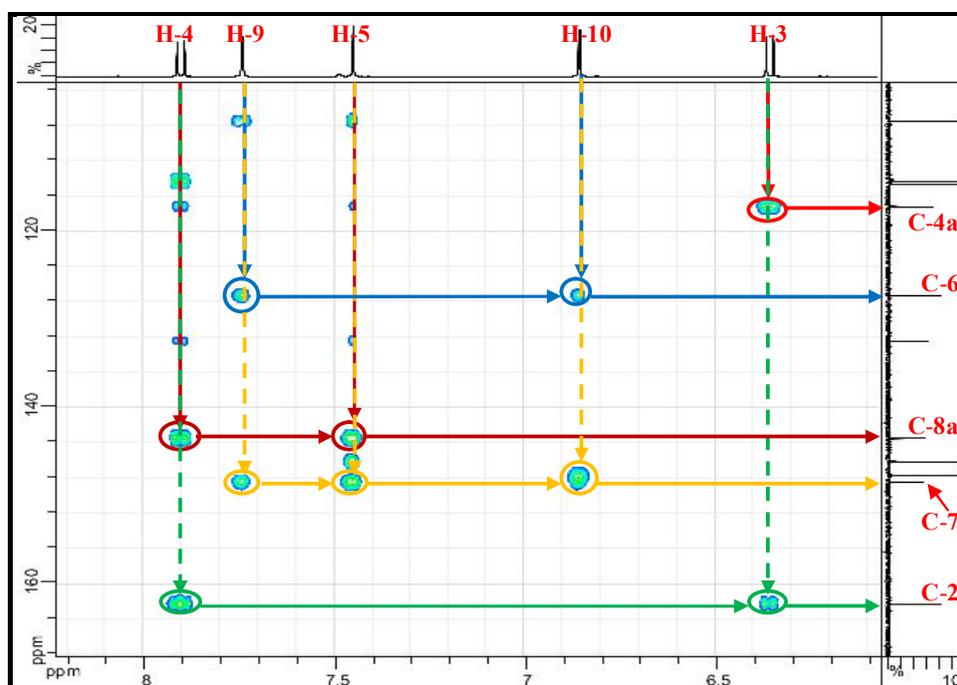
Spectre IV.55-1 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH, δ ppm) de C9



Spectre IV.56-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de C₉

Les carbones quaternaires de cette furanocoumarine seront attribués à leurs signaux respectifs grâce à leurs corrélations sur le spectre HMBC (Spectre IV.56-2) avec les protons décrits précédemment, notamment :

- Le carbone C-2 sera attribué au signal à $\delta_C = 162,29$ ppm (corrélations avec les protons H-3 et H-4).
- Le carbone C-4a sera attribué au signal à $\delta_C = 117,13$ ppm (corrélations avec le proton H-3).
- Le carbone C-8a sera attribué au signal à $\delta_C = 143,47$ ppm (corrélations avec les protons H-4 et H-5).
- Le carbone C-6 sera attribué au signal à $\delta_C = 127,25$ ppm (corrélations avec les protons H-10 et H-9).
- Le carbone C-7 sera attribué au signal à $\delta_C = 148,43$ ppm (corrélations avec les protons H-5, H-10 et H-9 ainsi que la valeur de son déplacement chimique).



Spectre IV.56-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C9**

A ce stade de notre analyse et tenant compte de la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ de cette molécule, il apparaît clairement que le composé **C9** est un psoralène substitué en C-8 par un groupement de formule $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2$. Ce substituant doit comporter un degré d'insaturation car le squelette psoralène en comporte Neuf des dix attendues (Figure IV.36).

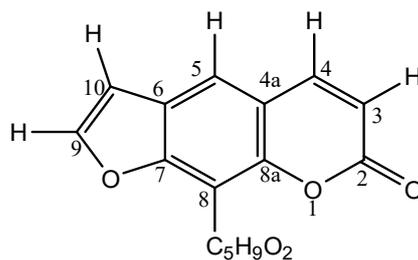
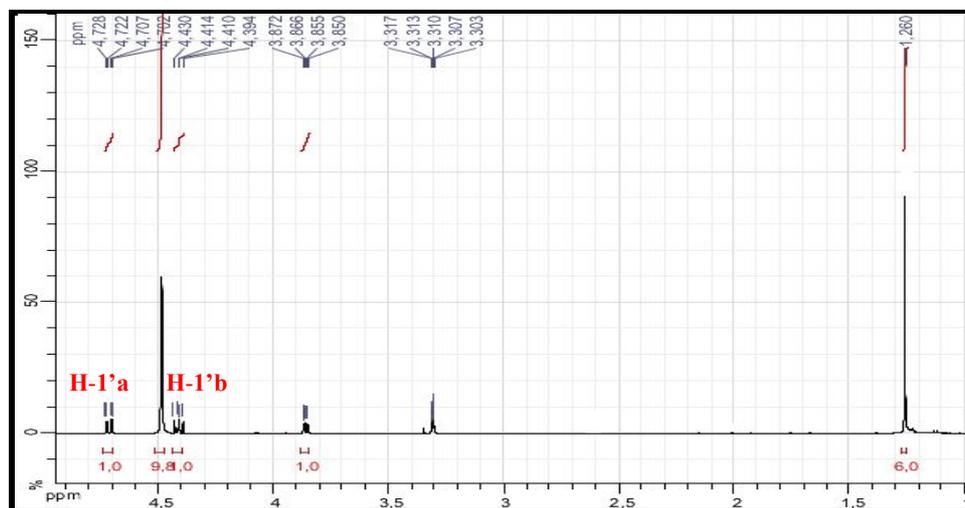


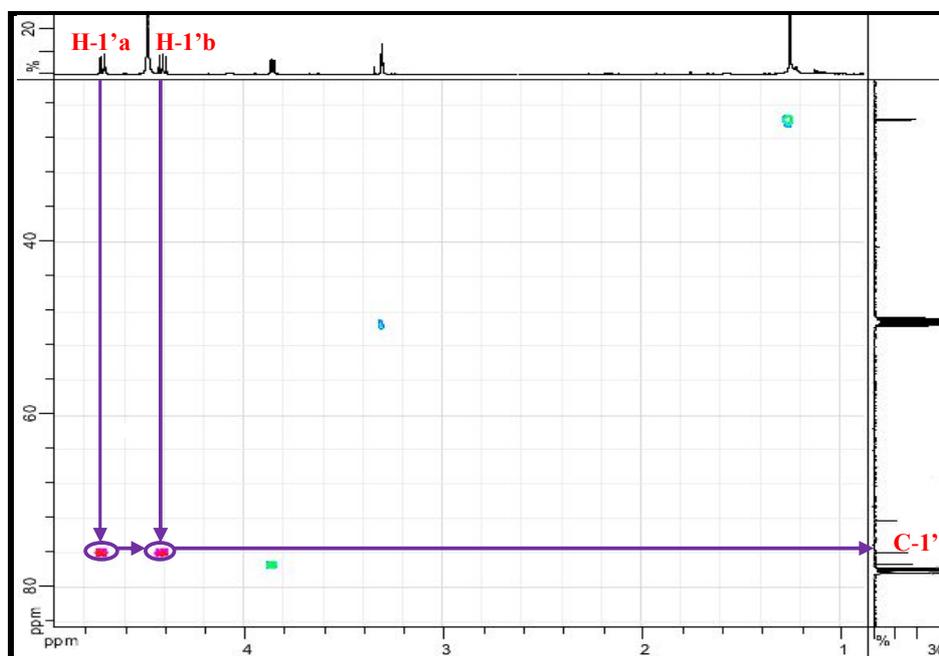
Figure IV.36 : Structure partielle du composé **C9**

Outre les signaux attribués à l'entité psoralène, le spectre RMN ^1H étalé (Spectre IV.53-2), montre deux signaux sous forme de deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à δ_{H} 4,72 ($J = 10,1 ; 2,8$ Hz) et 4,42 ppm ($J = 10,1 ; 8,2$ Hz) et corrélant sur le spectre HSQC (Spectre IV.55-2) au carbone résonant à δ_{C} 75,94. D'après les valeurs des déplacements chimiques de ces protons et de leur carbone, ce

groupe ment CH_2 est oxygéné. Nous numérotions le carbone de ce méthylène C-1' et ses protons H-1'a et H-1'b.

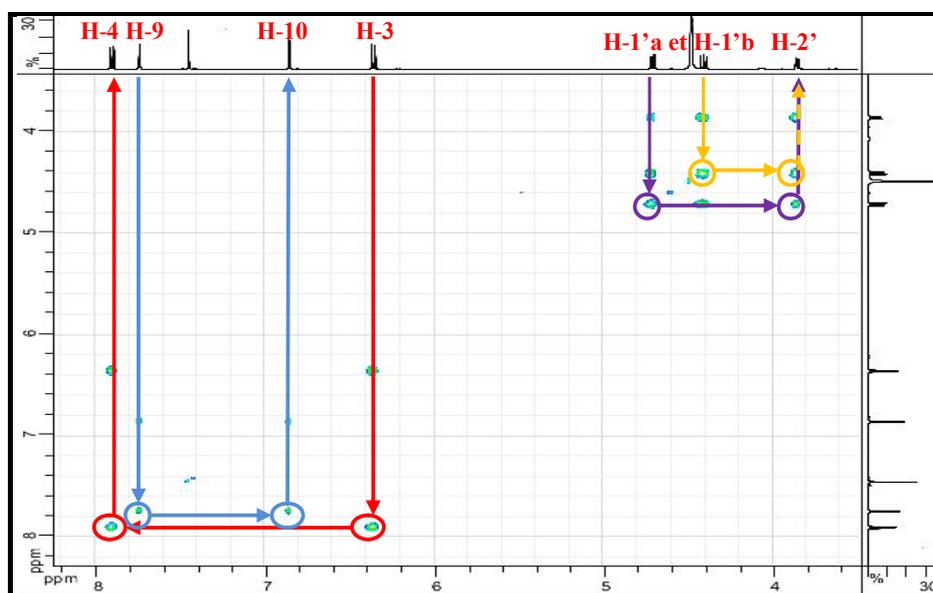


Spectre IV.53-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C9



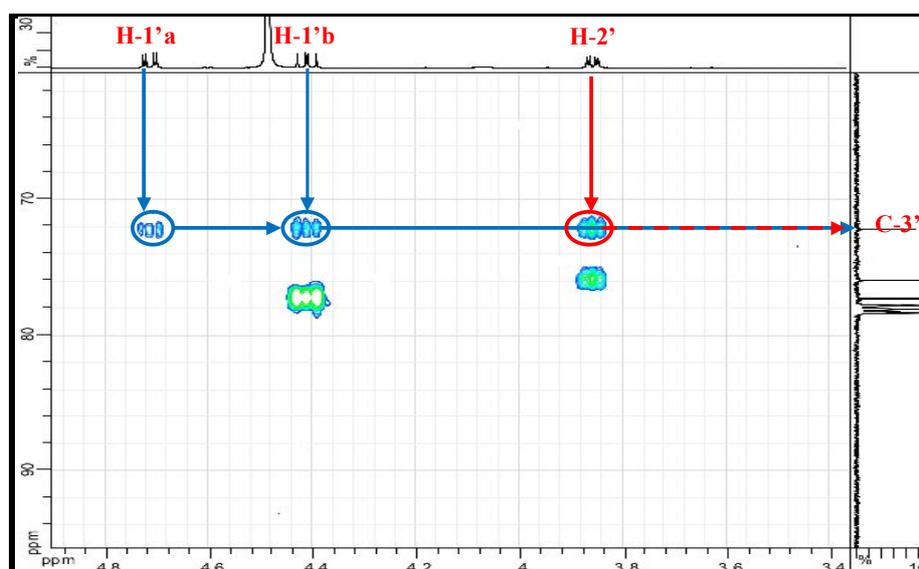
Spectre IV.55-2 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C9

Sur le spectre COSY (Spectre IV.57-1), les protons H-1'a et H-1'b montrent des taches de corrélation avec le proton du CH oxygéné résonant sous forme d'un doublet de doublets ($J = 8,2 ; 2,8$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 3,86$ ppm ($\delta_{\text{C}} 77,79$ ppm). Ce proton sera numéroté H-2' et son carbone C-2'.



Spectre IV.57-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de **C9**

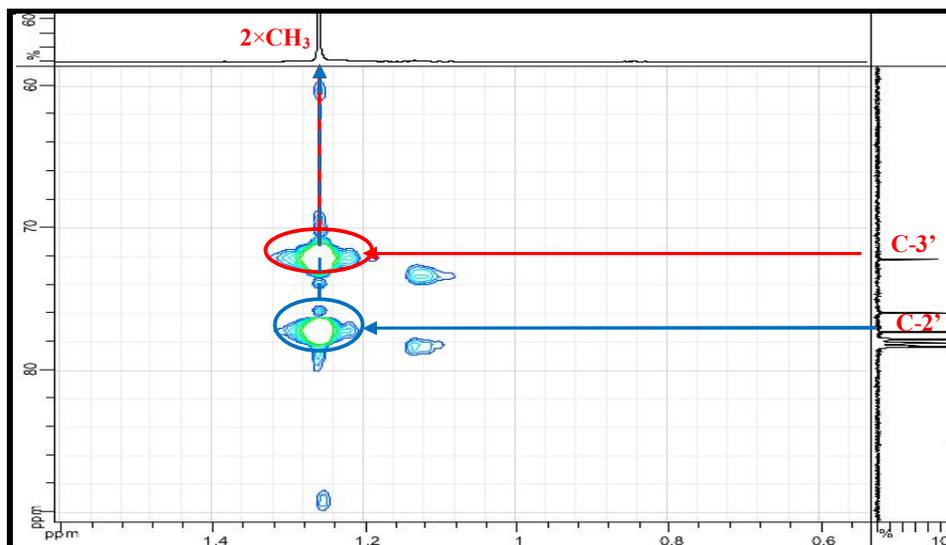
Sur le spectre HMBC (Spectre IV.56-3), les protons H-1'a, H-1'b et H-2' montrent des corrélations avec le carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 72,17$ ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique et la formule brute de cette molécule ce C_q est oxygéné. Nous le numérotions C-3'.



Spectre IV.56-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) de **C9**

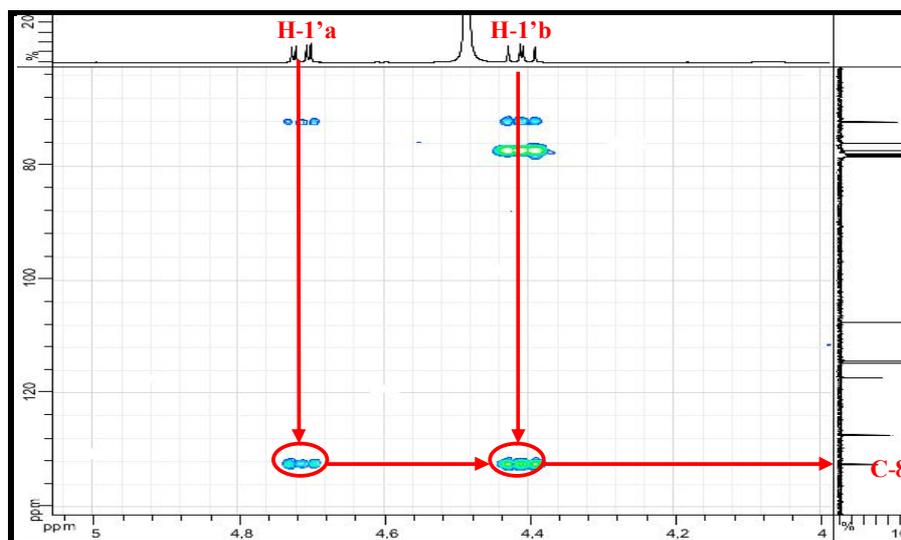
Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.56-4), le carbone C-2' et le carbone C-3' montrent des taches de corrélation avec les protons des deux méthyles résonant

sous forme de deux singulets superposés à δ_H 1,26 ppm (δ_C 25,79 et δ_C 25,73 ppm) orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par le carbone quaternaire C-3'.



Spectre IV.56-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $CDCl_3+MeOH-d_4$, δ ppm) de C9

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre IV.56-5), permet de repérer des taches de corrélation entre les protons du carbone oxygéné C-1' et le carbone aromatique oxygéné (d'après la valeur de son déplacement chimique) résonant à $\delta_C = 132,41$ ppm. Ce carbone ne peut être que le C-8 de la furanocoumarine car c'est le seul carbone de cette molécule qui reste non attribué.



Spectre IV.56-5 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $CDCl_3+MeOH-d_4$, δ ppm) de C9

Comme le carbone C-1' est oxygéné, il est clair que ce carbone et le carbone C-8 sont reliés par le biais d'un atome d'oxygène. Cette observation, la formule brute $C_{16}H_{14}O_5$ de cette molécule notamment le nombre d'atomes d'oxygène et le degré d'insaturations attendu dans le substituant du squelette psoralène indiquent la présence d'une fonction époxyde entre C-2' et C-3' menant ainsi au groupement 2',3'-époxyprényloxy (Figure IV.37).

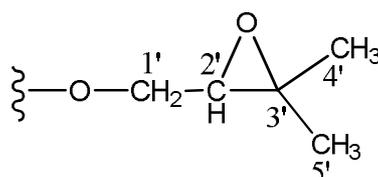


Figure IV.37 : Substituant 2',3'-époxyprényloxy

Le composé **C9** est donc le 8-(2',3'-époxyprényloxy)psoralène connu sous le nom de **oxympératorine** ou **héraclénine** [14]. Cette molécule admet une rotation optique positive. D'après les travaux de Nielsen et Lemmich 1969 [15], la configuration du centre chiral C-2' est par conséquent (R). Ce composé C-9 est donc le (R)-héraclénine ou la (+)-héraclénine (Figure IV.38) [15].

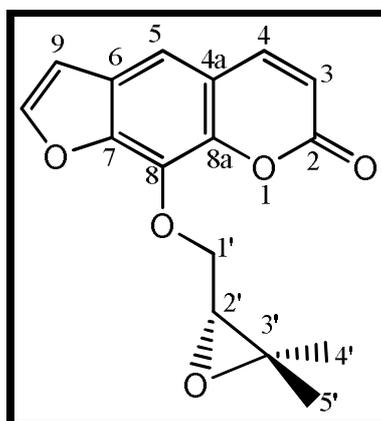
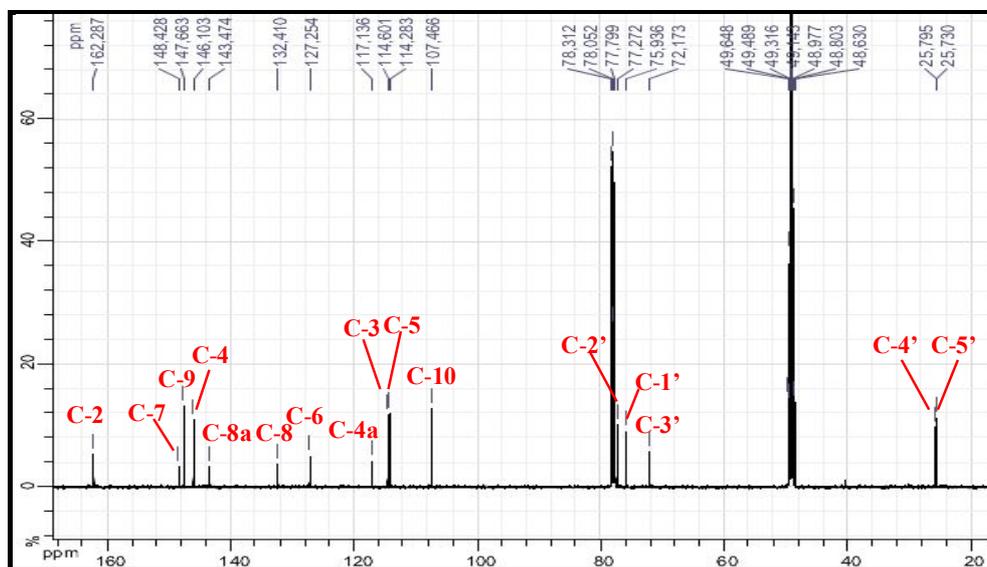


Figure IV.38 : Structure du composé **C9**, (R)-(+)-héraclénine

Les attributions des tous les atomes de carbone de cette molécule sont reportées sur le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.51-2).



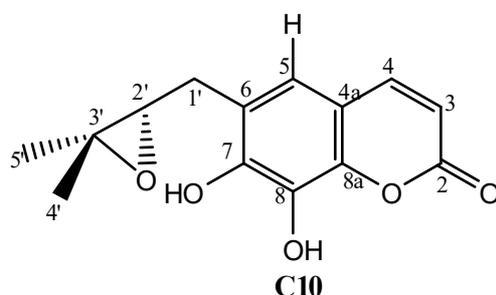
Spectre IV.51-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C9** avec toutes les indications

Toutes les données de la spectroscopie RMN sont rassemblées dans le tableau IV.13.

Tableau IV.13 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) du composé **C9** ($\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$)

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$	
2	162,29	-	-	-	-	
3	114,60	6,36	1H	<i>d</i>	9,8	
4	146,10	7,90	1H	<i>d</i>	9,4	
4a	117,13	-	-	-	-	
5	114,28	7,45	1H	<i>s</i>	-	
6	127,25	-	-	-	-	
7	148,43	-	-	-	-	
8	132,41	-	-	-	-	
8a	143,47	-	-	-	-	
9	147,66	7,74	1H	<i>d</i>	2,2	
10	107,46	6,86	1H	<i>d</i>	2,4	
1'	1'a	75,94	4,72	1H	<i>dd</i>	10,1 ; 2,8
	1'b		4,42	1H	<i>dd</i>	10,1 ; 8,2
2'	77,79	3,86	1H	<i>dd</i>	8,2 ; 2,8	
3'	72,17	-	-	-	-	
4'	25,79	1,26	3H	<i>s</i>	-	
5'	25,73	1,26	3H	<i>s</i>	-	

IV-A-10- Elucidation structurale du composé C10



Le composé **C10** se présente sous forme de cristaux blanc-crème. Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.58 et Tableau IV.14), montre des ions adduits à $m/z = 263,09210$; $285,07369$; $547,15787$ correspondant à $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, respectivement ; la masse exacte de cette molécule est trouvée à $m/z 262,08483$ (calculée pour $C_{14}H_{14}O_5$: $262,08412$). Toutes ces données convergent vers une molécule de formule brute **C₁₄H₁₄O₅** et contenant donc huit degrés d'insaturations.

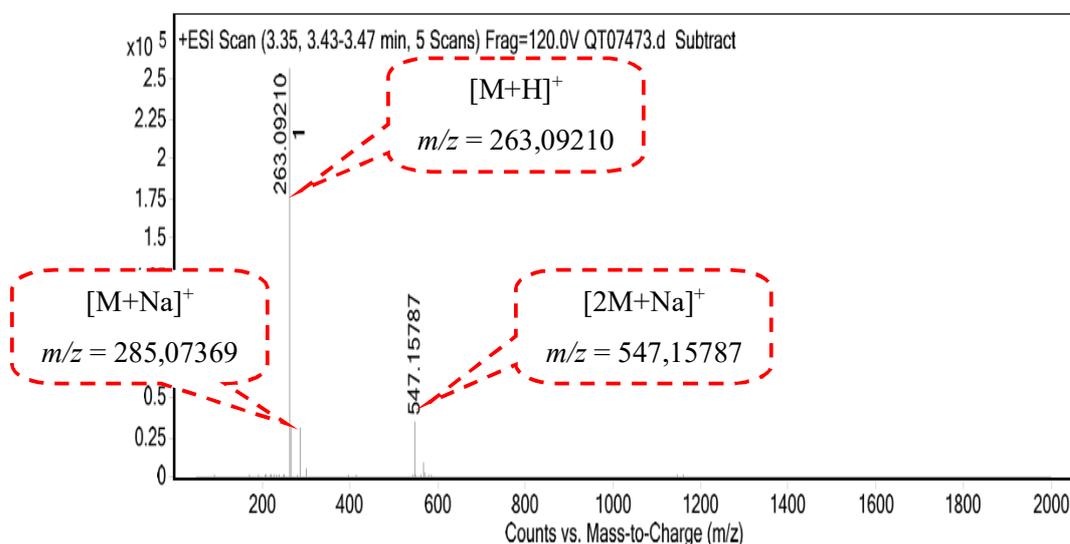
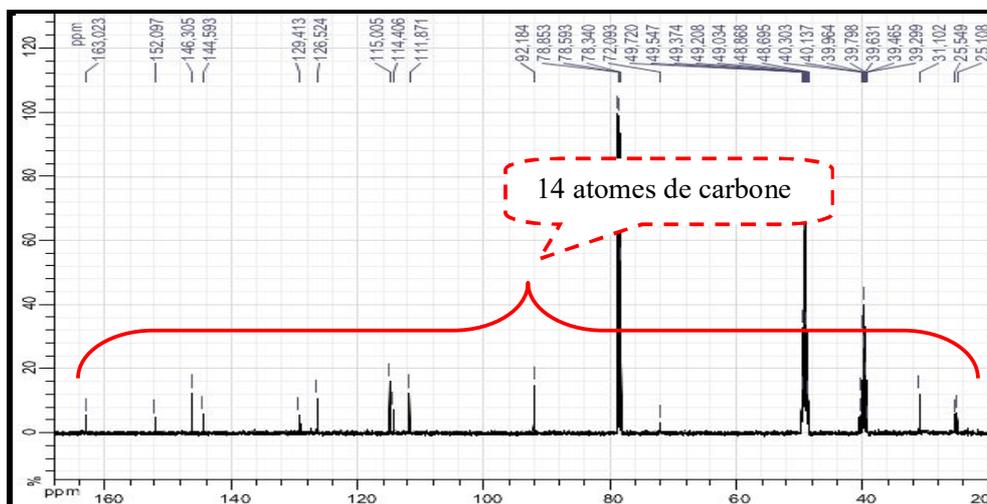


Tableau IV.14 : Données du spectre HR-ESIMS du composé C10

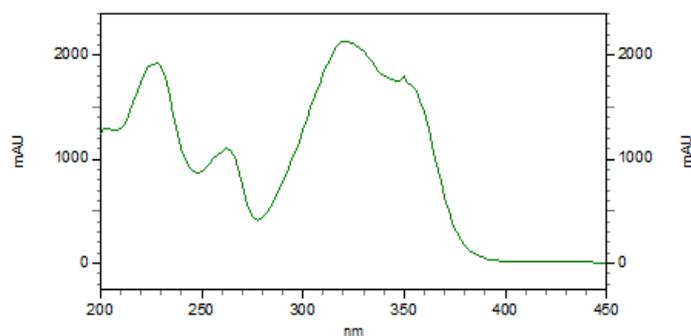
m/z	z	Abund	Formula	Ion
263.0921	1	262947.8	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	(M+H) ⁺
264.09508	1	32173.8	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	(M+H) ⁺
285.07369		30582.9		
547.15787		34926.7		

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.59-1) confirme les données de la spectrométrie de masse par la présence de 14 résonances.



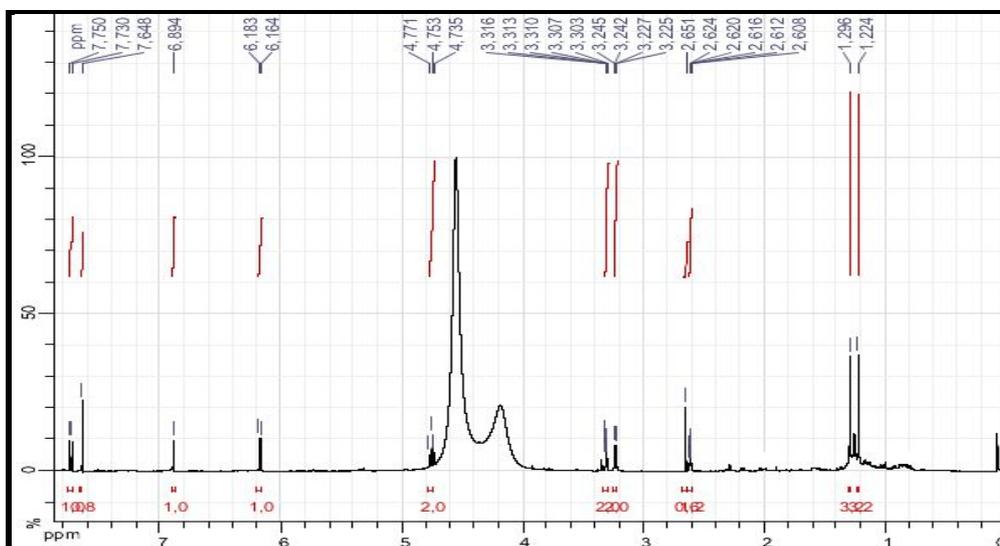
Spectre IV.59-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C10**

Le spectre UV (Spectre IV.60) de ce composé **C10** renferme des bandes d'absorption rappelant celui d'une coumarine simple.

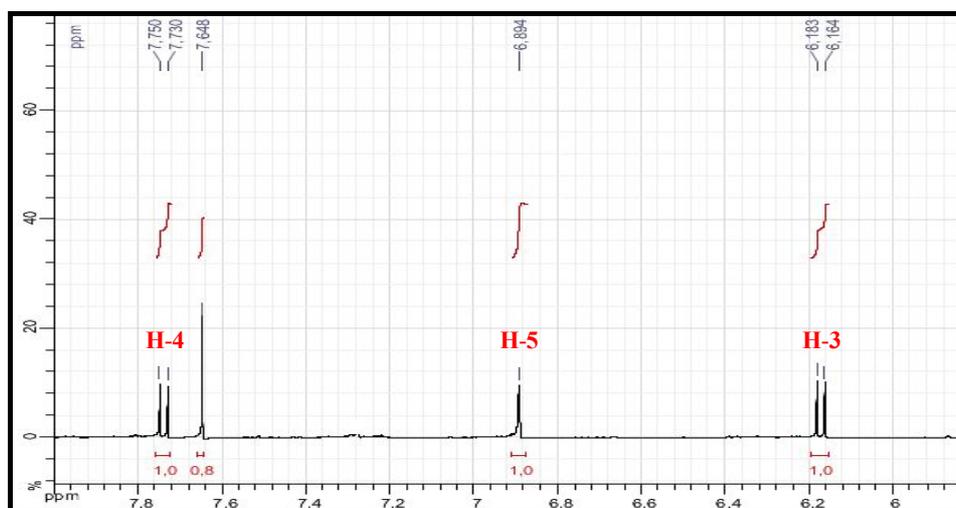


Spectre IV.60 : Spectre UV du composé **C10**

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.61-2) consolide l'idée d'une coumarine simple par la présence de signaux caractéristiques de ce type de squelette. En effet, on retrouve bien un système AX à δ_{H} 6,17 ppm (δ_{C} 111,87) et 7,74 ppm (δ_{C} 146,30), ($J = 9,4$ Hz) assignés à H-3 et H-4, respectivement en raison de leur corrélation dans l'expérience du spectre COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (Spectre IV.62-1) ; un singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 6,89 (δ_{C} 115,01) attribué à H-5 en raison de sa corrélation avec le proton H-4 sur le spectre NOESY (Spectre IV.63) (Figure IV.39).



Spectre IV.61-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C10**



Spectre IV.61-2 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C10**

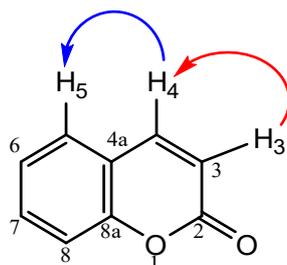
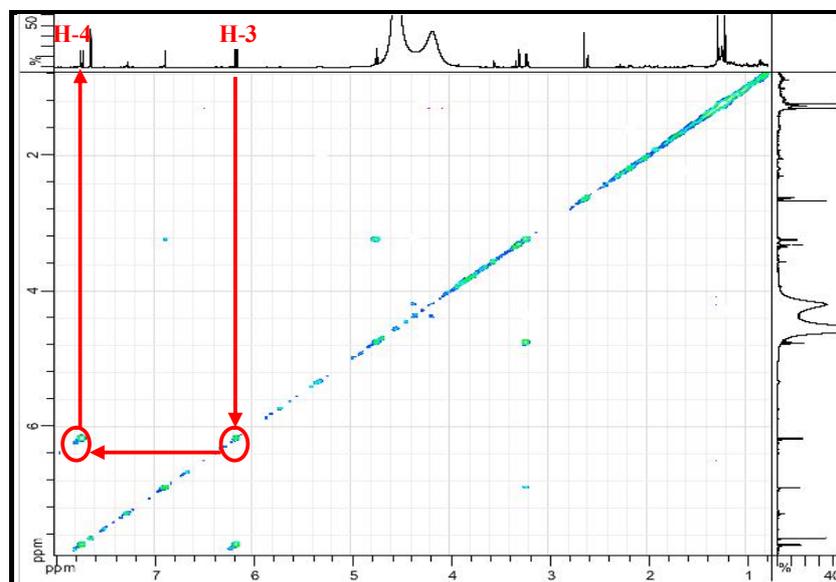
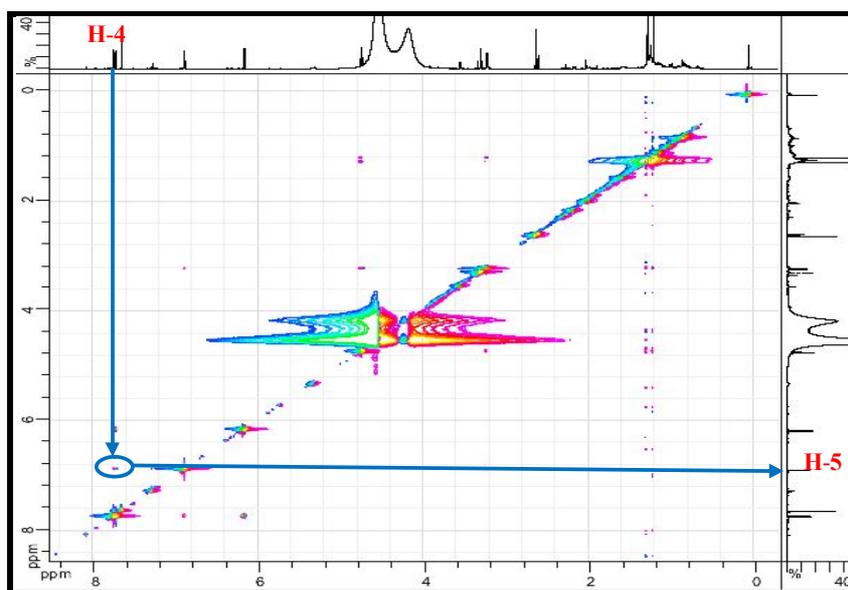


Figure IV.39 : Corrélations COSY (Flèche rouge) et NOESY (Flèche bleue) entre H-3, H-4 et H-5

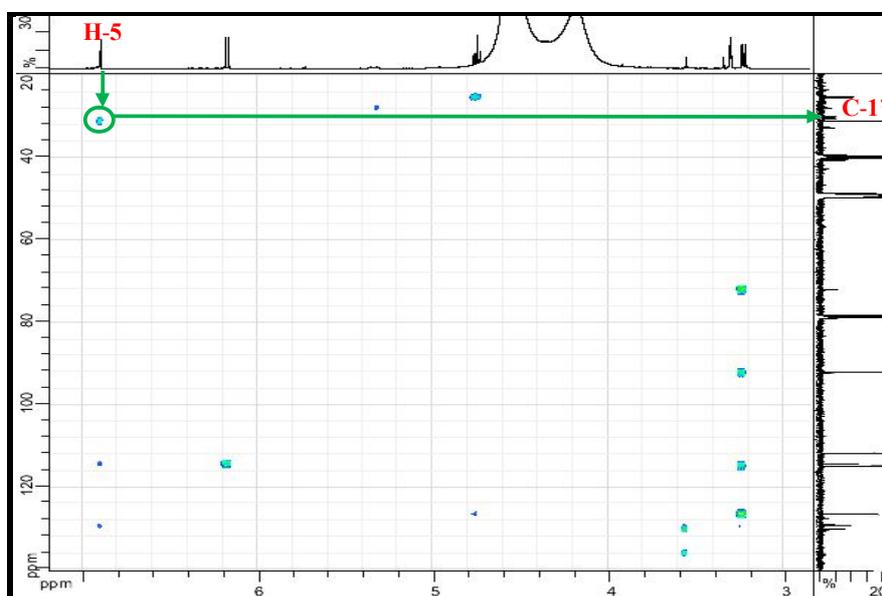


Spectre IV.62-1 : Spectre COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C10



Spectre IV.63 : Spectre NOESY étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de C10

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.64-1), le proton H-5 montre une corrélation avec le carbone d'un groupement méthylène à δ_{C} 31,10 ppm. Cette observation indique que ce groupement méthylène est placé sur le carbone C-6 du squelette coumarinique ; nous numérotions ce carbone C-1' (Figure IV.40). Les deux protons de ce méthylène soient donc H₂-1', résonnent sur le spectre RMN ¹H (Spectre IV.61-3) sous forme d'un doublet large à δ_{H} 3,23 ppm ($J = 8,6$ Hz).



Spectre IV.64-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C10**

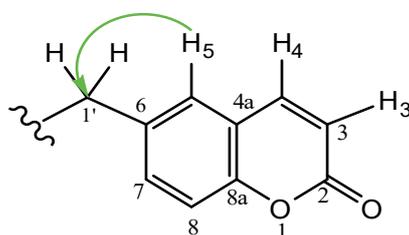


Figure IV.40 : Corrélations HMBC entre H-5 et C-1'

Sur le spectre COSY (Spectre IV.62-2), les protons de ce groupement méthylène ($\text{H}_2\text{-1}'$) montrent clairement une tache de corrélation avec le proton du groupement méthyne résonant sous forme d'un triplet à δ_{H} 4,75 ppm ($J = 8,6$ Hz ; δ_{C} 92,18 ppm) assigné à H-2', de plus, sur le spectre HMBC (Spectre IV.64-2), les protons $\text{H}_2\text{-1}'$ montrent des corrélations avec C-2' et le carbone quaternaire à δ_{C} 72,09 qui ne peut être qu'un autre carbone de cette chaîne en C-6. Comme il doit être à trois liaisons au plus des protons $\text{H}_2\text{-1}'$, il ne peut être que le C-3'. Sur le même spectre, les carbones C-2' et C-3' montrent des corrélations avec les protons des deux groupements méthyles résonant sous forme de deux singulets à δ_{H} 1,29 ppm (δ_{C} 25,55 ppm) et δ_{H} 1,22 ppm (δ_{C} 25,11 ppm) orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par le même carbone quaternaire C-3'. Cette hypothèse est confirmée par les

corrélations observées entre les protons de l'un de ces deux méthyles avec le carbone de l'autre et *vice versa* dans le spectre HMBC (Spectre IV.64-3) (Figure IV.41).

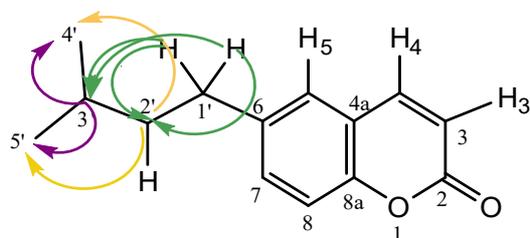
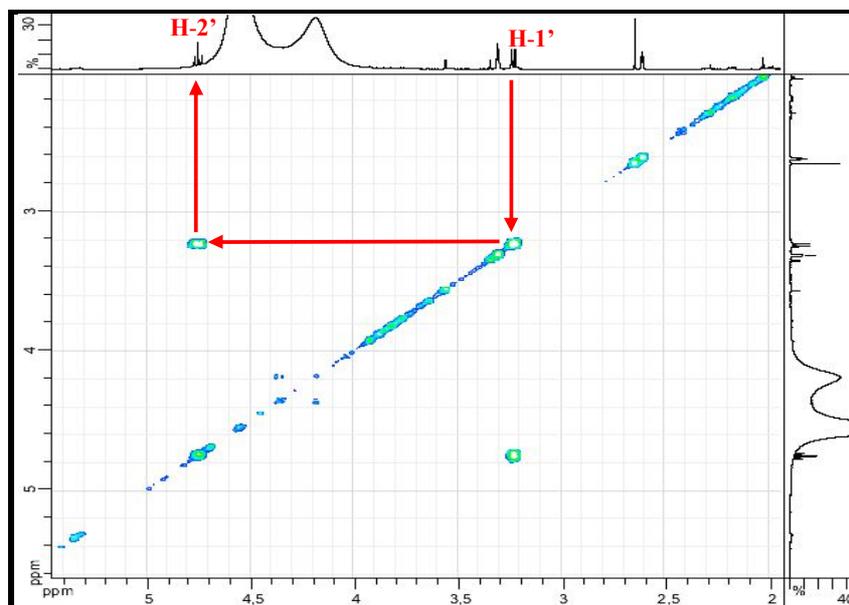
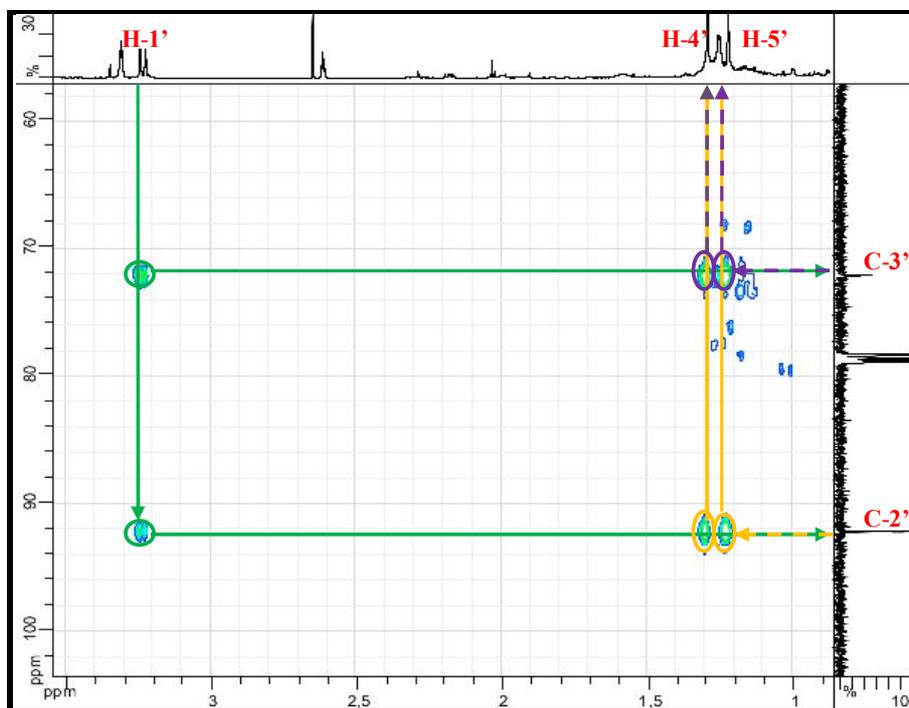


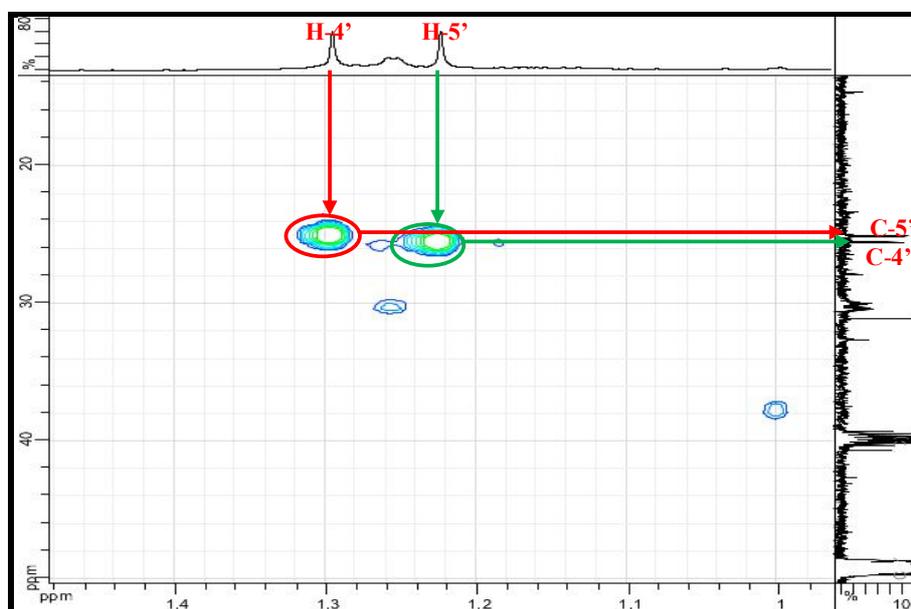
Figure IV.41 : Corrélations HMBC observées entre les protons et les carbones de la chaîne en C-6



Spectre IV.62-2 : Spectre COSY étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C10



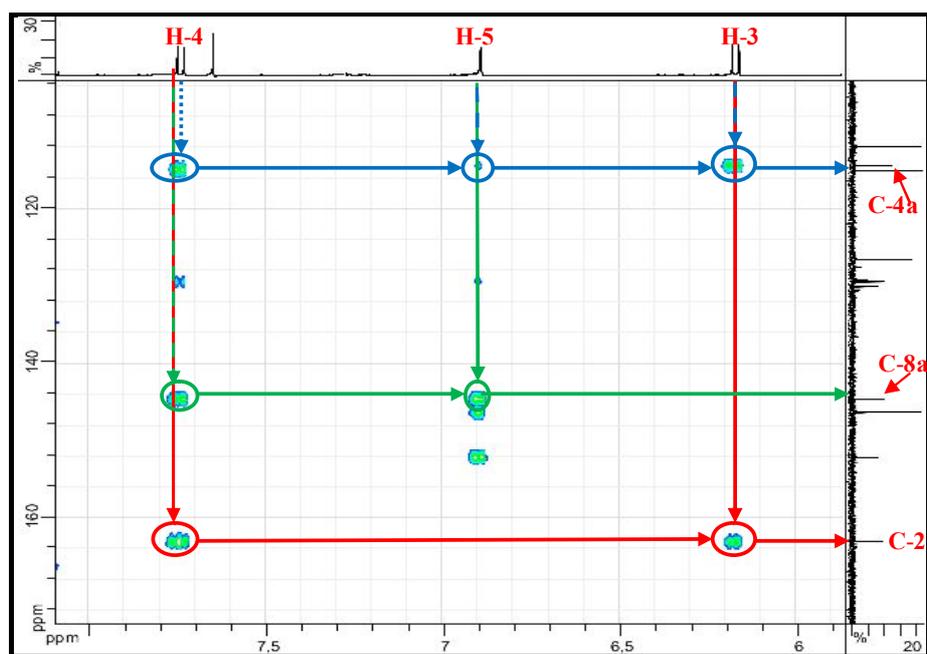
Spectre IV.64-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C10



Spectre IV.64-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, CDCl₃+MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C10

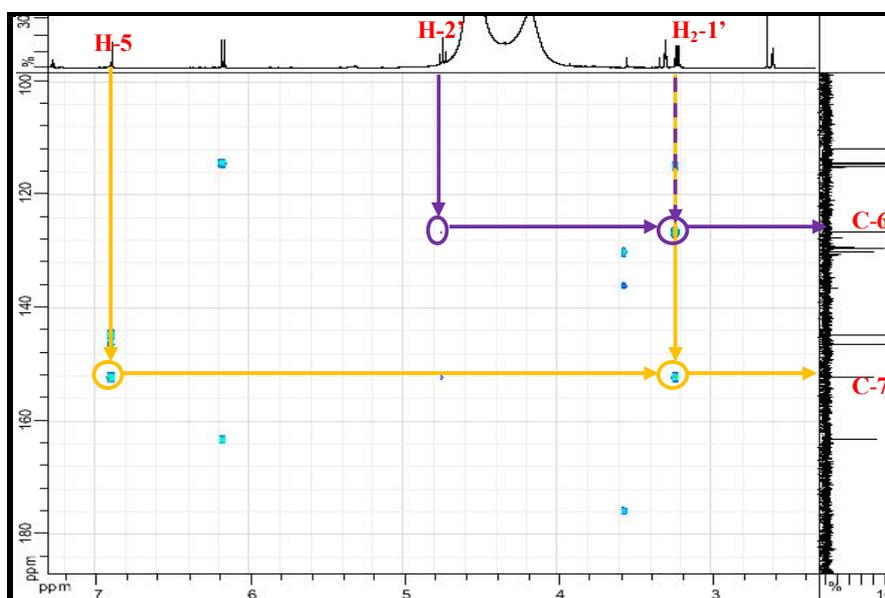
Les autres carbones quaternaires du squelette coumarinique peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.64-4). En effet, ce spectre montre également :

- ✓ Une tache de corrélation entre les protons H-3, H-4, H-5 et le carbone quaternaire situé à δ_C 114,41 ppm, ce carbone ne peut être que le C-4a.
- ✓ Des taches de corrélation entre les protons H-3, H-4 et le carbone quaternaire situé à δ_C 163,02 ppm, vu la valeur de son déplacement chimique, ce carbone est oxygéné et ne peut être que le C-2.
- ✓ Des taches de corrélation entre les protons H-4, H-5 et le carbone quaternaire oxygéné situé à δ_C 144,59 ppm, attribuable au C-8a.



Spectre IV.64-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $CDCl_3+MeOH-d_4$, δ ppm) du composé **C10**

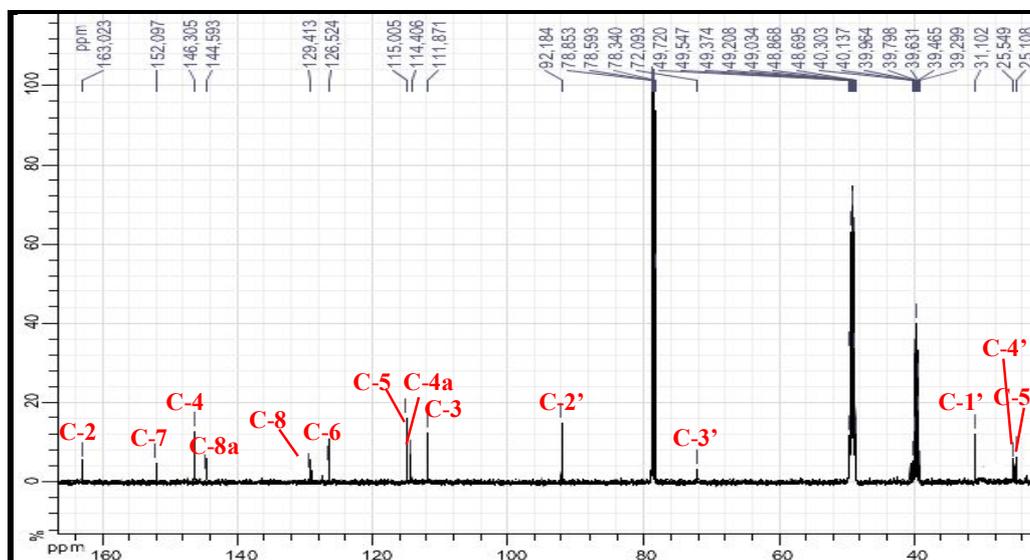
Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.64-5), les protons H-5 et H₂-1' montrent des corrélations avec le carbone situé à δ_C 152,10 permettant son attribution à C-7, alors que la résonance à δ_C 126,52 est attribuée à C-6 en raison de ses corrélations avec H₂-1' et H-2' sur le spectre HMBC (Spectre IV.64-5). La résonance restante à δ_C 129,41 a été attribuée à C-8.



Spectre IV.64-5 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C10**

Les valeurs des déplacements chimiques de C-7 et C-8 indiquent leur substitution par des groupements oxygénés. Sachant que la formule moléculaire de ce composé est $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$, il est évident que ces deux carbones sont hydroxylés. Puisque sept des huit insaturations et quatre des cinq atomes d'oxygène étaient alors pris en compte dans le noyau de coumarine, on en conclut à la présence d'un groupement 2', 3'-époxyprényle en C-6. Cette hypothèse est consolidée par les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-2' et C-3'. Le spectre de RMN ^{13}C (Spectre IV.59-2) comporte les attributions de tous les atomes de carbone.

Ainsi, le composé **C10** a été identifié comme étant la **7,8-dihydroxy-6-(2',3'-époxyprényle)coumarine** (Figure IV.42).



Spectre IV.59-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$, δ ppm) du composé **C10** avec toutes les indications

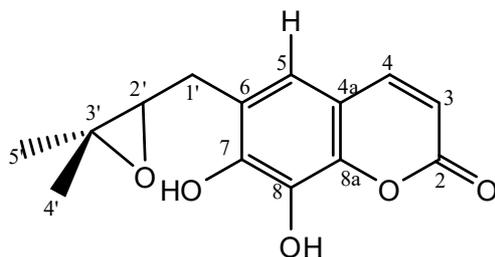


Figure IV.42 : Structure du composé **C10**

La structure du composé **C10** ainsi établie, est décrite pour la première fois dans la littérature, nous proposons de la nommer **pituranthosine C**.

En ce qui concerne la stéréochimie de C-2', ce composé a été trouvé optiquement actif avec $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,6$; $[\alpha]_{578}^{20} = -7,1$; $[\alpha]_{546}^{20} = -9,5$; $[\alpha]_{436}^{20} = -36,4$ (C 0,211 g/100 ml, MeOH), cela suppose que notre molécule est lévogyre. D'après les travaux de (Nielsen et Lemmich 1969) [15], la valeur négative de la rotation optique est en accord avec la configuration (S) du centre chiral C-2'. Ainsi, le composé **C10** a été caractérisé en tant que **(S)-(-)-7,8-dihydroxy-6-(2',3'-époxyprényl)coumarine**, nous l'avons nommée **(S)-(-)-pituranthosine C** (Figure IV.43).

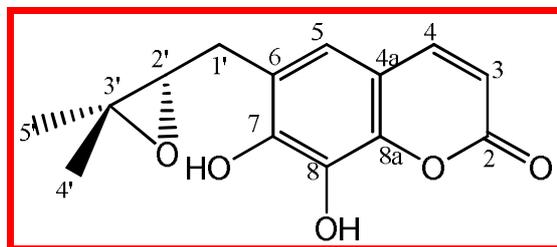


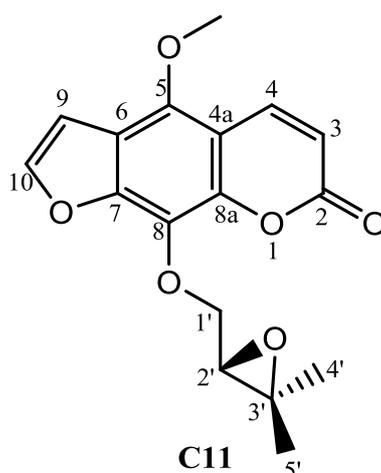
Figure IV.43 : Structure finale du composé **C10**, (S)-(-)-pituranthosine **C**

Toutes les données de la RMN ^1H et ^{13}C , de ce nouveau composé, sont reportées dans le tableau IV.15.

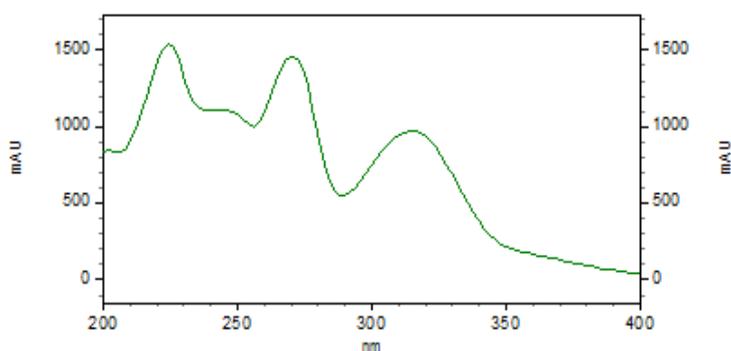
Tableau IV.15 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) du composé **C10** ($\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$)

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	163,02
3	6,17 <i>d</i> ($J = 9,4$ Hz ; 1H)	111,87
4	7,74 <i>d</i> ($J = 9,4$ Hz ; 1H)	146,30
4a	-	114,41
5	6,89 <i>s</i> (1H)	115,01
6	-	126,52
7	-	152,07
8	-	129,41
8a	-	144,59
1'	3,23 <i>dl</i> ($J = 8,6$ Hz ; 2H)	31,10
2'	4,75 <i>t</i> ($J = 8,6$ Hz ; 1H)	92,18
3'	-	72,09
4'	1,29 <i>s</i> (3H)	25,55
5'	1,22 <i>s</i> (3H)	25,11

IV-A-11- Elucidation structurale du composé C11

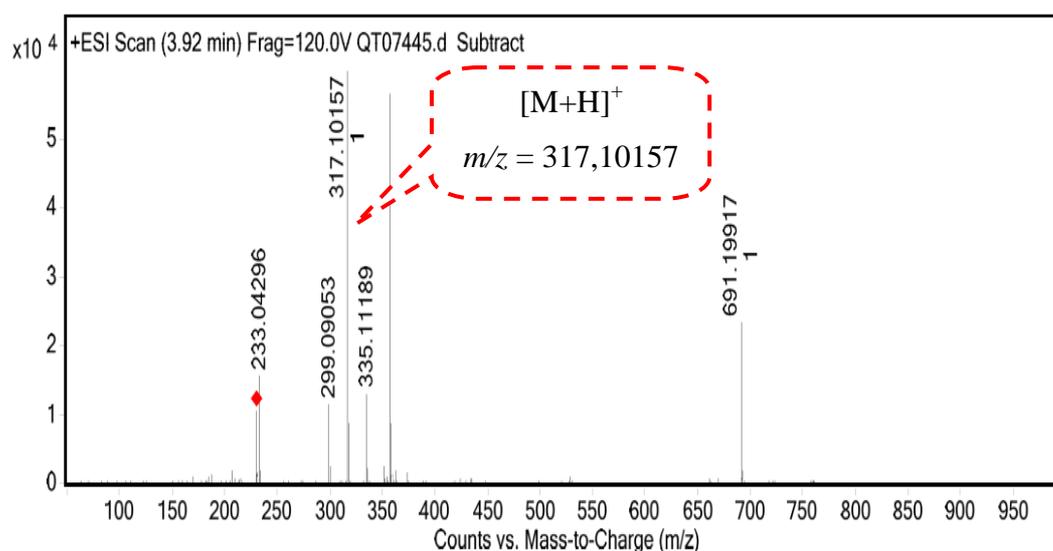


Le spectre d'absorption UV (Spectre IV.65) montre trois maxima à 220, 267 et 320 nm caractéristiques d'une furanocoumarine linéaire [4,5].



Spectre IV.65 : Spectres UV-Visible du composé **C11**

L'étude du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.66 et Tableau IV.16), montre la présence d'un pic quasi-moléculaire à $m/z = 317,10157 [M+H]^+$. La recherche de la masse exacte donne un ion à $m/z 316,09429$ correspondant à la formule brute $C_{17}H_{16}O_6$ (calculée pour $C_{17}H_{16}O_6$: 316,09469). Ces données indiquent bien cette formule brute et orientent vers une molécule comportant dix insaturations.



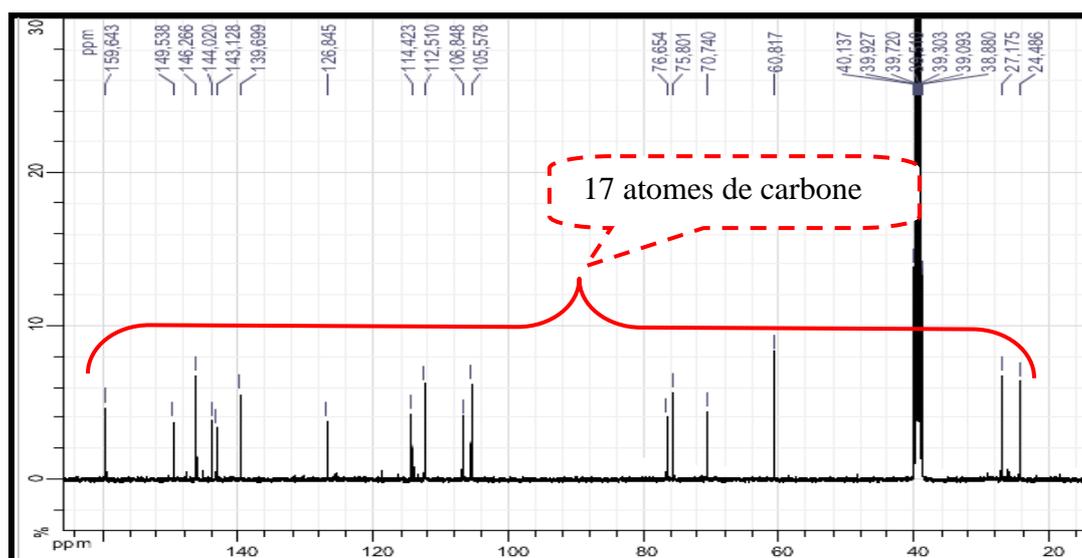
Spectre IV.66 : Spectre HR-ESI-MS du composé C11

Tableau IV.16 : Données du spectre HR-ESIMS du composé C11

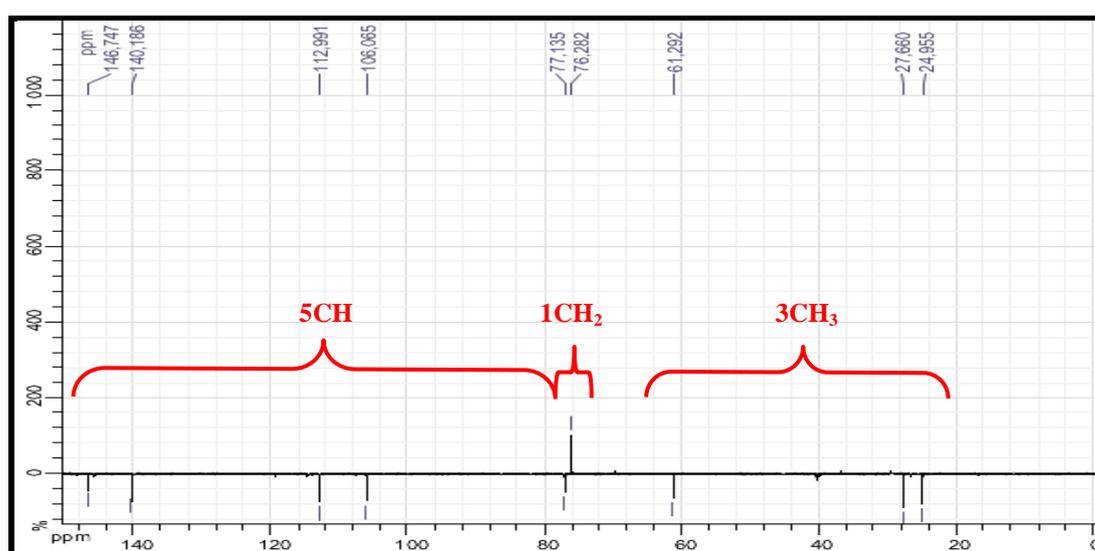
<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
231.0278		10505		
233.04296		15660.1		
299.09053		11405.6		
317.10157	1	60848.8	C17 H17 O6	(M+H)+
318.10472	1	8713.3	C17 H17 O6	(M+H)+
335.11189		12897		
357.09449	1	56608.4	C17 H18 Na O7	(M+Na)+
358.09766	1	8865.1	C17 H18 Na O7	(M+Na)+
691.19917	1	23370.9		
692.20135	1	7822.7		

Les spectres RMN ^{13}C (Spectre IV.67-1) et la séquence DEPT 135° (Spectre IV.68) confirment les données de la masse par la présence de 17 résonances, incluant :

- Huit carbones quaternaires dont 7 hybridés sp² et 1 hybridé sp³ et oxygéné.
- Cinq groupements CH dont 4 hybridés sp² et 1 hybridé sp³ et oxygéné.
- Un groupement CH₂ hybridé sp³ et oxygéné.
- Trois groupements méthyles dont un méthoxyle.

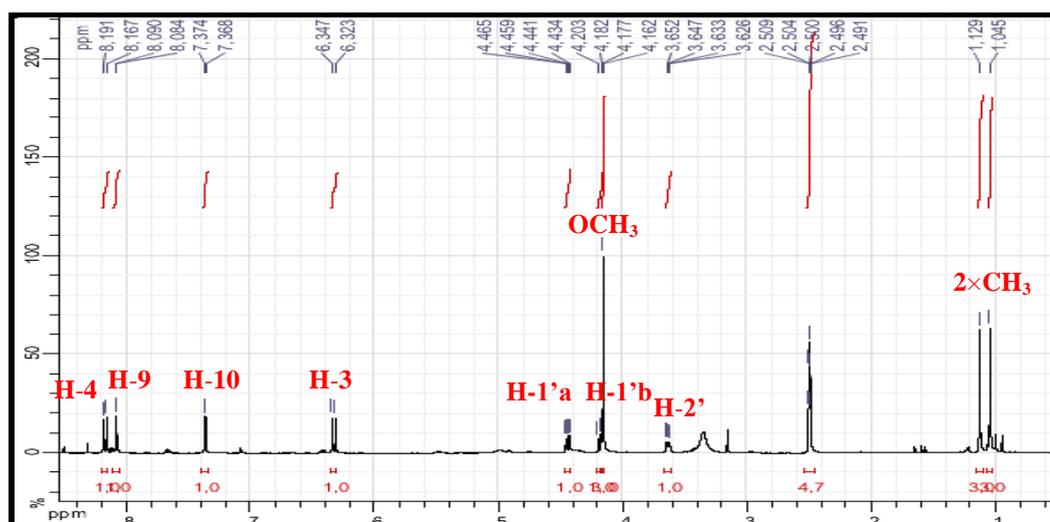


Spectre IV.67-1 : Spectre RMN ^{13}C étalé (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **C11**

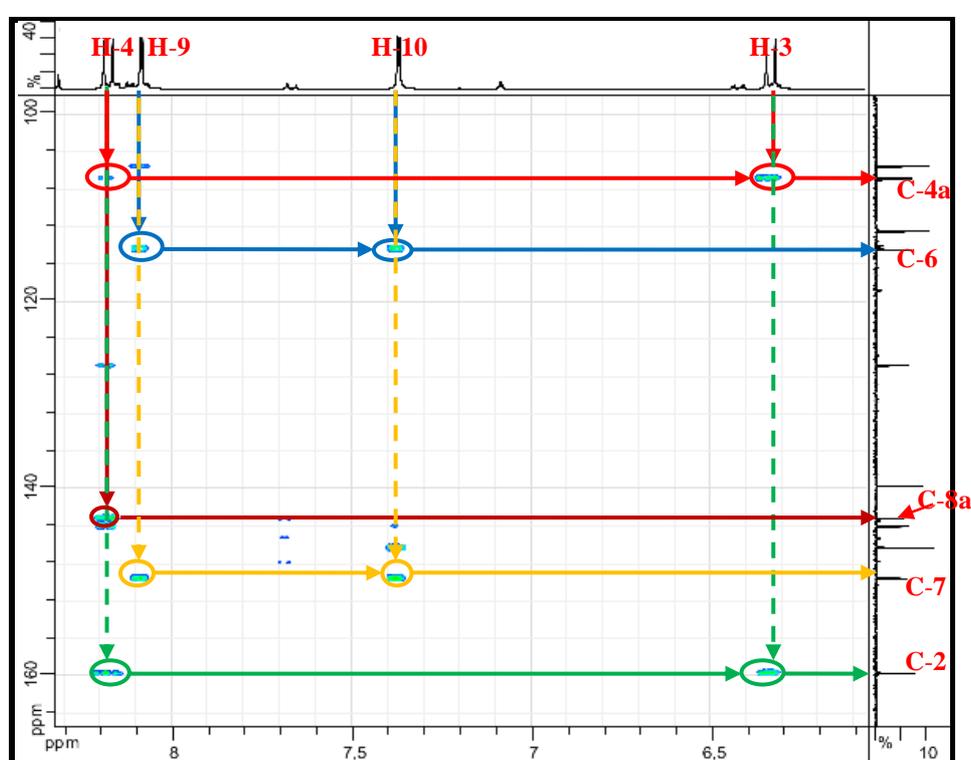


Spectre IV.68 : Spectre DEPT 135 (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **C11**

La comparaison des spectres RMN du proton (Spectre IV.69), HMBC (Spectre IV.70-1), carbone 13 et DEPT 135 (Tableau IV.17) de ce composé avec ceux du composé **C9** permet de constater une forte similitude entre les structures de ces deux produits. En effet la différence relevée entre leurs spectres concerne l'absence du signal du proton H-5 et la présence d'un signal relatif à un groupement méthoxyle (s , 3H, δ_{H} 4,16, δ_{C} 61,29) dans les spectres de **C11** par rapport à ceux de **C9**. Cette observation permet donc de conclure, la présence d'un substituant méthoxyle sur le squelette furanocoumarine de **C11** en plus du 2',3'-époxyprényle.

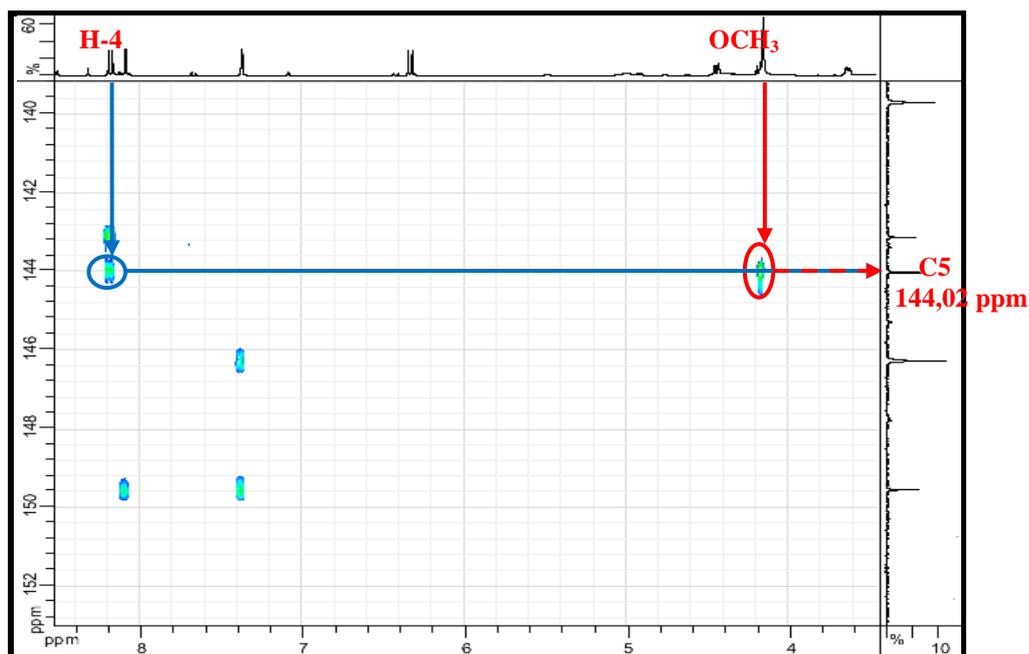


Spectre IV.69 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé C11

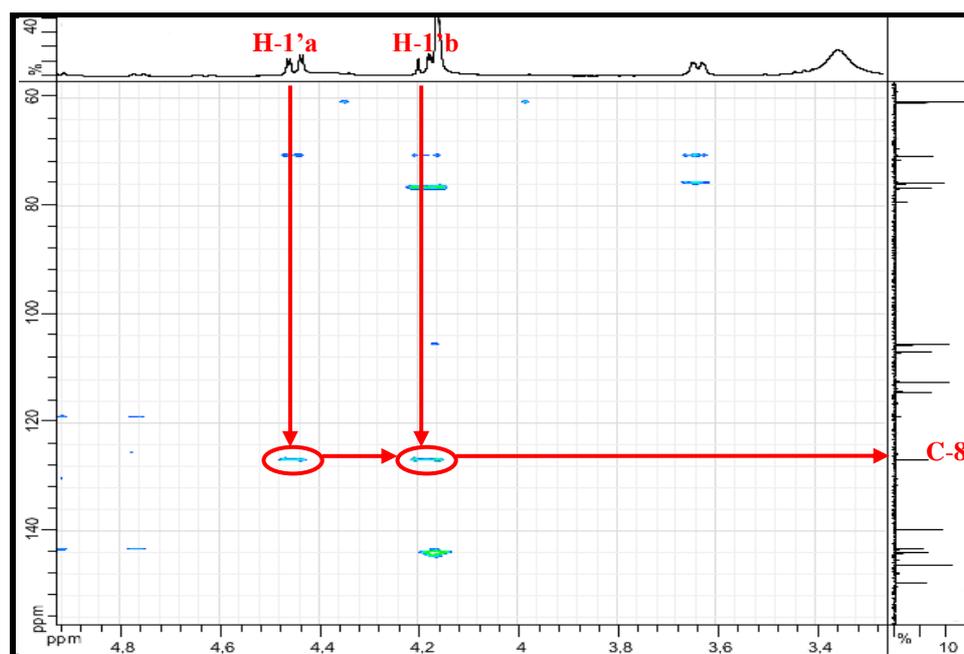


Spectre IV.70-1 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de C11

Le spectre HMBC (Spectre IV.70-2), permet de localiser le carbone porteur de ce groupement méthoxyle, à δ_{C} 144,02 ppm grâce à la corrélation de ce carbone et les protons de ce groupement. Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.70-2), ce carbone (δ_{C} 144,02 ppm) montre une corrélation avec H-4. Cette observation suffit pour attribuer ce carbone au C-5 du squelette coumarinique. De ce fait le groupement 2',3'-epoxyprényle est localisé en C-8 (δ_{C} = 126,84). Cette hypothèse est bien confirmée par le spectre HMBC (Spectre IV.70-3).

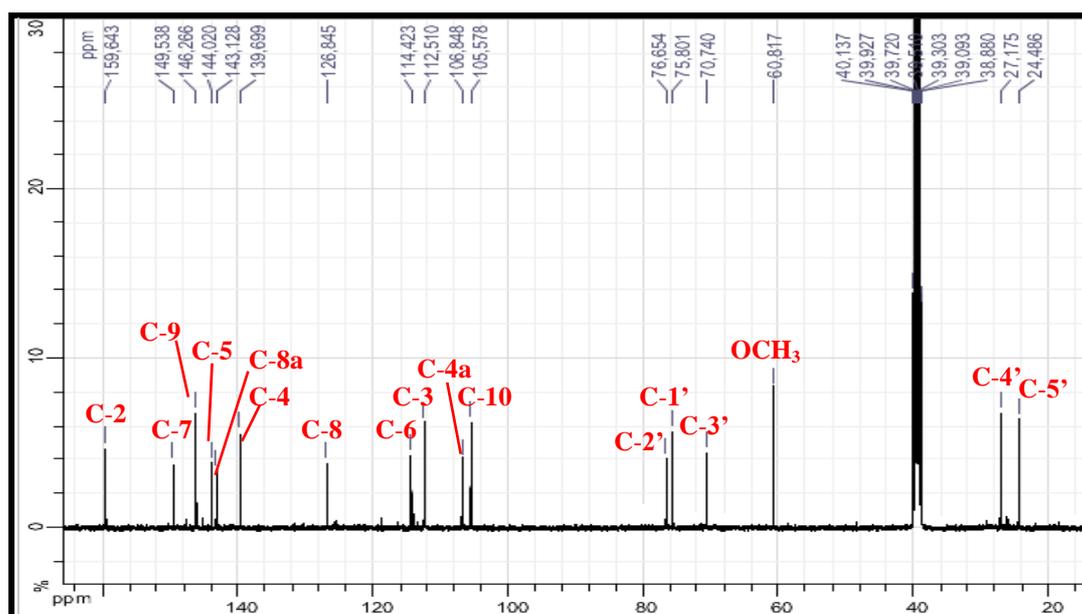


Spectre IV.70-2 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) de C11



Spectre IV.70-3 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) de C11

L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC et la comparaison avec les données de la littérature [16-18] ont permis d'attribuer sur le spectre RMN ¹³C (Spectre IV.67-2) tous les carbones correspondant à la **5-methoxy oxyimperatorine** connue sous le nom de **byakangelicol** (Figure IV.44).



Spectre IV.67-2 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **C11** avec toutes les indications

Toutes ces données rassemblées dans le tableau IV.17.

Tableau IV.17 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé **C11** (DMSO- d_6)

position	δ_{C}	δ_{H}	Integration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$	
2	159,64	-	-	-	-	
3	112,51	6,33	1H	<i>d</i>	9,8	
4	139,69	8,18	1H	<i>d</i>	9,8	
4a	106,84	-	-	-	-	
5	144,02	-	-	-	-	
6	114,42	-	-	-	-	
7	149,53	-	-	-	-	
8	126,84	-	-	-	-	
8a	143,12	-	-	-	-	
9	146,74	8,08	1H	<i>d</i>	2,4	
10	105,57	7,37	1H	<i>d</i>	2,4	
1'	1'a	75,80	4,45	1H	<i>dd</i>	9,8 ; 2,1
	1'b		4,18	1H	<i>dd</i>	9,8 ; 8,6
2'	76,65	3,64	1H	<i>dd</i>	8,6 ; 2,1	
3'	70,74	-	-	-	-	
4'	27,66	1,13	3H	<i>s</i>	-	
5'	24,95	1,04	3H	<i>s</i>	-	
OCH ₃	61,29	4,16	3H	<i>s</i>	-	

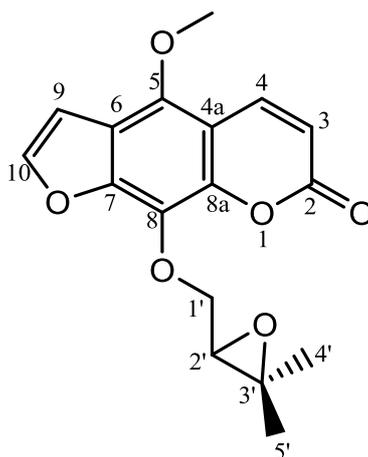


Figure IV.44 : Structure du composé **C11**

Pour cette molécule, la mesure du pouvoir rotatoire a donné : $[\alpha]_D^{20} = +14,0$; $[\alpha]_{578}^{20} = +14,7$; $[\alpha]_{546}^{20} = +16,7$ (c 0,95 g/100 ml, pyridine), donc le signe de ce dernier est positif (même signe que la littérature), cela suppose que notre molécule est dextrogyre et que nous avons par conséquent le (+)-byakangelicol. D'après les travaux de Nielsen et Lemmich (1969) [15]. La valeur positive de la rotation optique est en accord avec la configuration (R) du centre chiral C-2', par conséquent le composé **C11** est le **(R)-(+)-byakangelicol** (Figure IV.45).

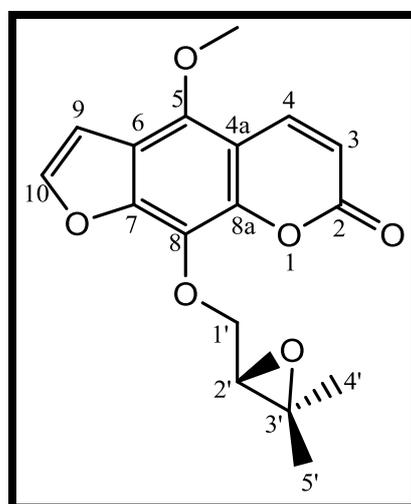
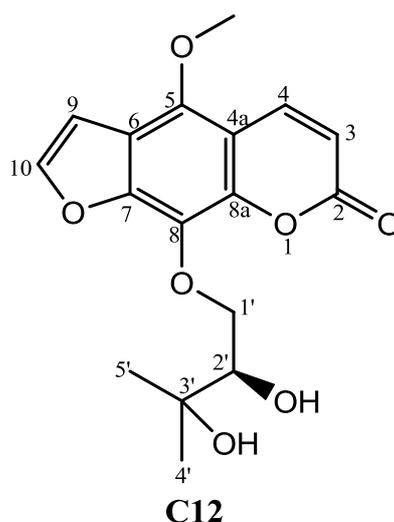
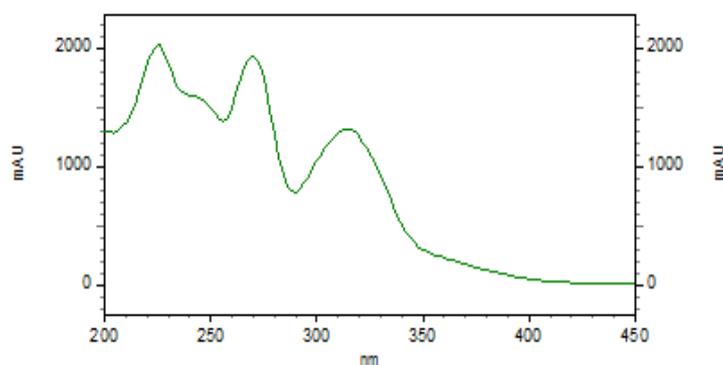


Figure IV.45 : Structure finale du composé **C11**, **(R)-(+)-byakangelicol**

IV-A-12- Elucidation structurale du composé C12



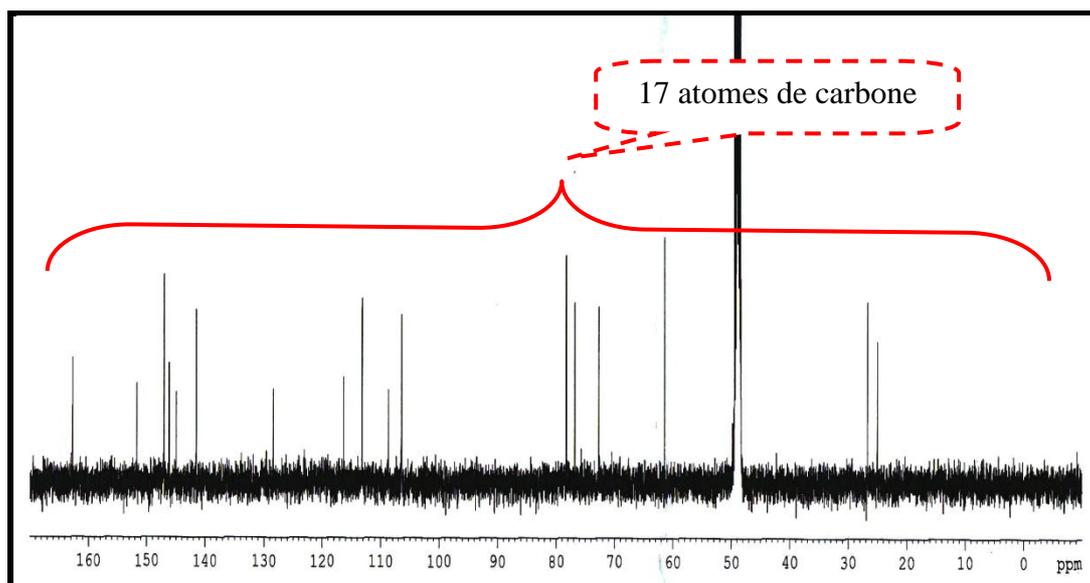
Le composé **C12** a été obtenu sous forme de cristaux jaunes. L'allure de son spectre UV (Spectre IV.71) est en faveur d'une furanocoumarine linéaire.



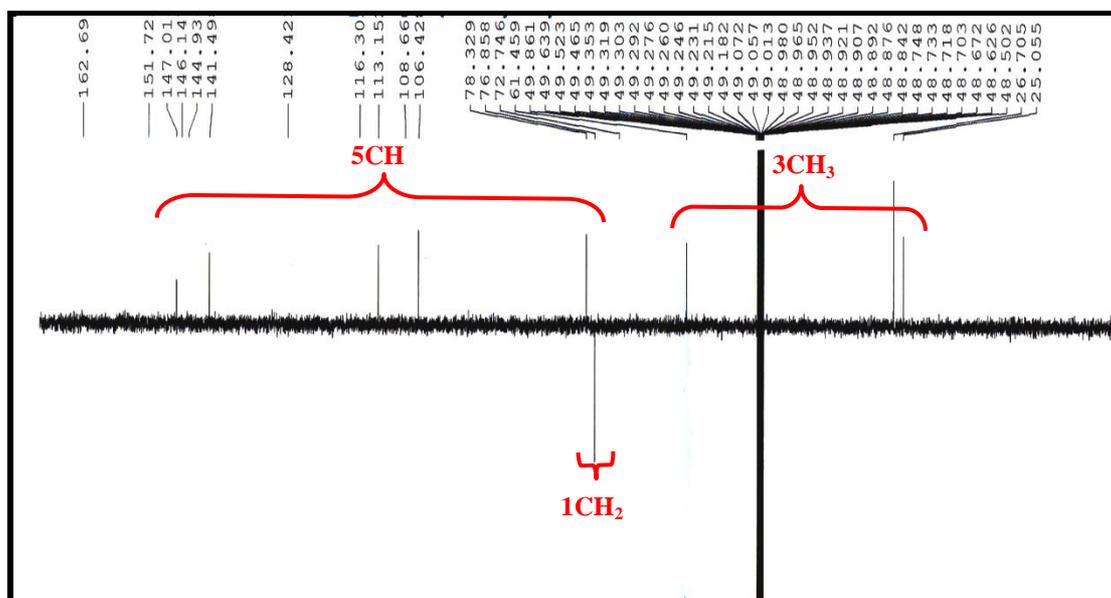
Spectre IV.71 : Spectre UV du composé **C12**

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.72-1), met en évidence la présence de 17 atomes de carbone. L'analyse de ce spectre et celle du spectre DEPT 135° (Spectre IV.73), nous ont permis de distinguer :

- Huit carbones quaternaires dont 7 hybridés sp² et 1 hybridé sp³ et oxygéné.
- Cinq groupements CH dont 4 hybridés sp² et 1 hybridé sp³ et oxygéné.
- Un groupement CH₂ hybridé sp³ et oxygéné.
- Trois groupements méthyles dont un méthoxyle.

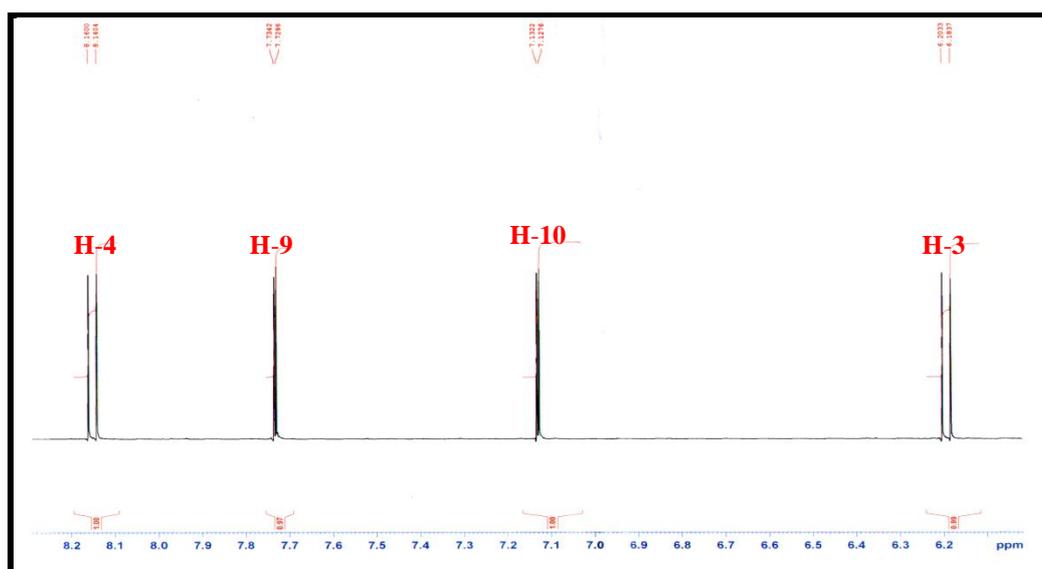


Spectre IV.72-1 : Spectre RMN ^{13}C étalé (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C12**

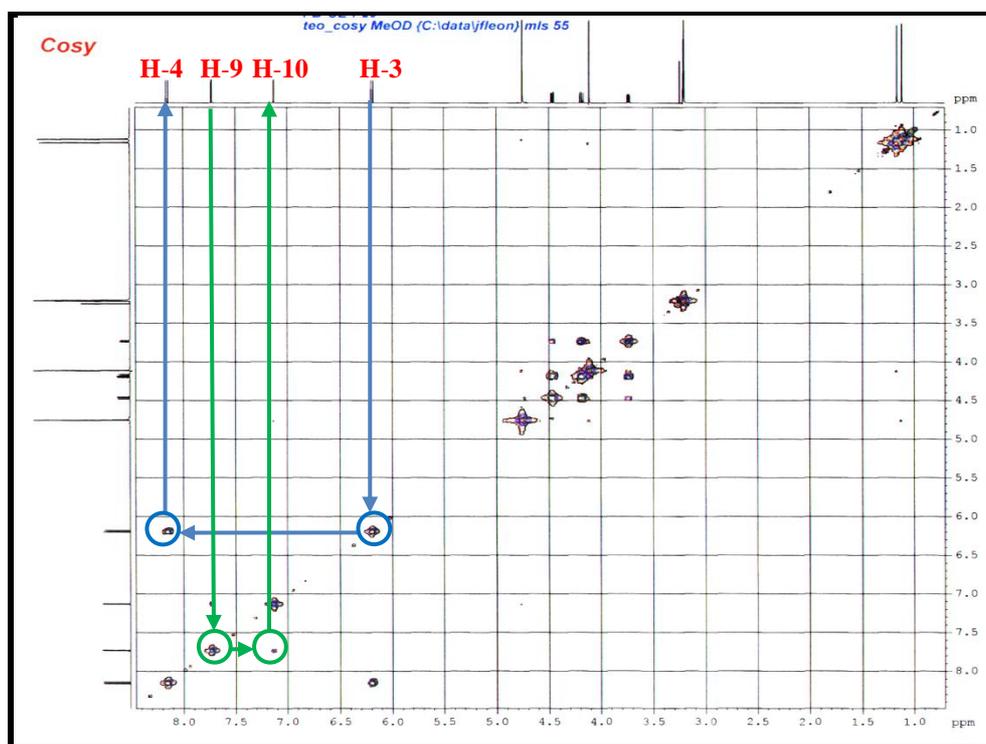


Spectre IV.73 : Spectre DEPT 135° étalé (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) de **C12**

Tout comme le cas du composé **C11**, le spectre RMN du proton (Spectre IV.74-1), et le spectre COSY (Spectre IV.75-1), de ce composé montrent des signaux caractéristiques du noyau psoralène (Tableau IV.18) disubstitué dans les positions C-5 et C-8.

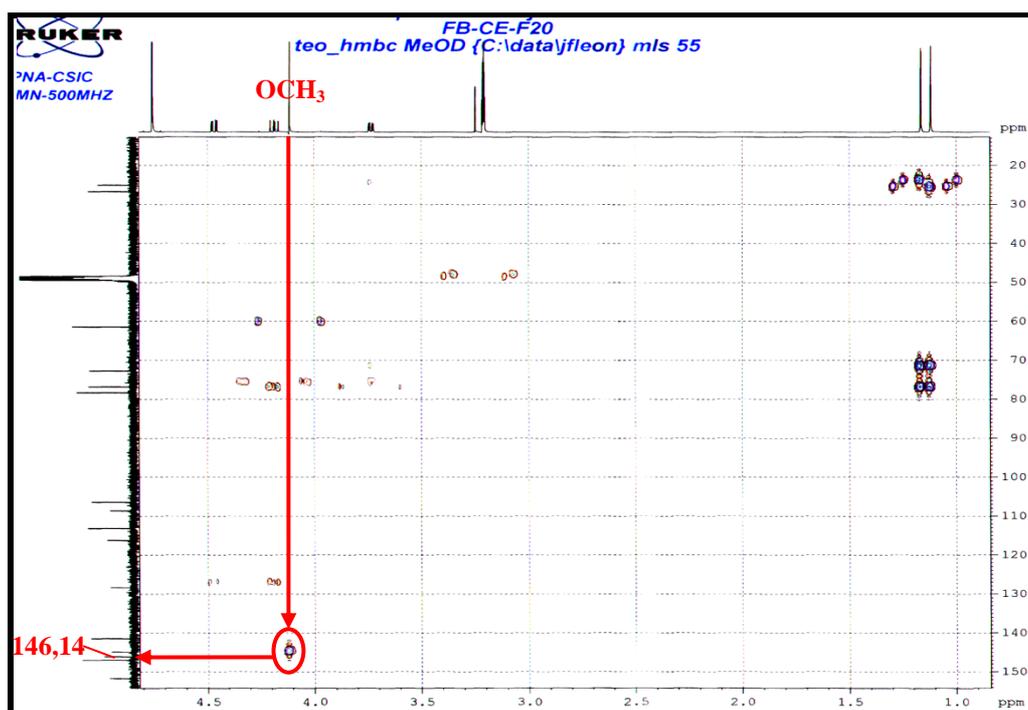


Spectre IV.74-1 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C12**



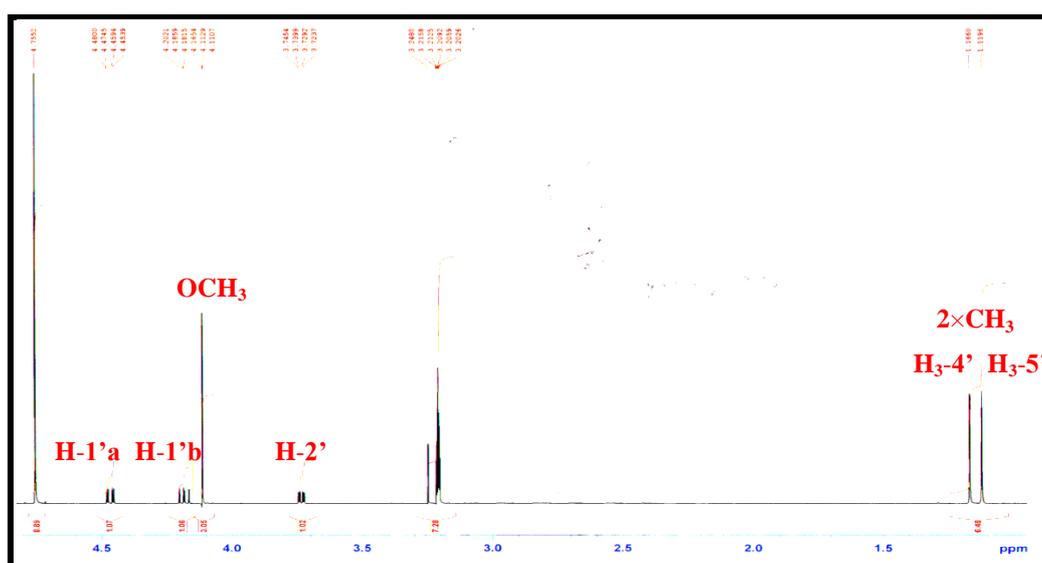
Spectre IV.75-1 : Spectre COSY (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C12**

Les autres signaux de ce spectre proton (Spectre IV.74-2), sont également très similaires à ceux du spectre proton du composé **C11**. On relève en premier lieu le groupement méthoxyle résonant à δ_{H} 4,11 ppm (δ_{C} 61,46 ppm) dont les protons corrélient sur le spectre HMBC (Spectre IV.76-1), au carbone quaternaire résonant à δ_{C} 146,14 ppm signifiant que ce méthoxyle est porté par ce carbone quaternaire.



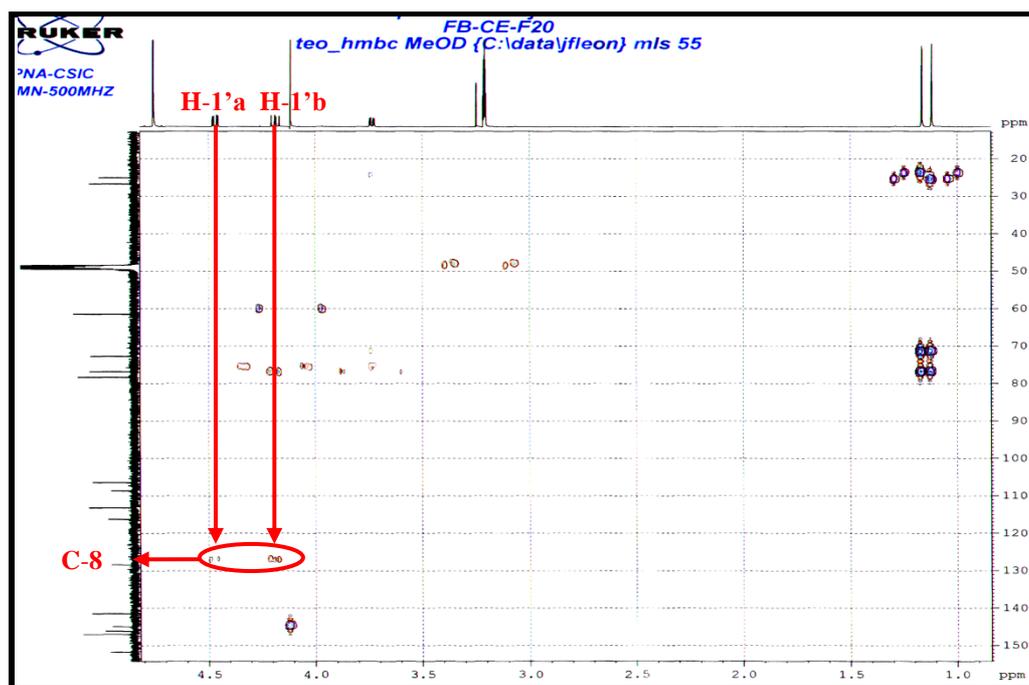
Spectre IV.76-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de **C12**

Concernant le deuxième substituant les résultats de l'analyse de l'ensemble des spectres de ce composé **C12** et la comparaison avec ceux du composé **C11** indiquent sans aucune ambiguïté la présence d'un groupement prényloxy dioxygéné dans ses positions C-2 et C-3 que nous numérotions dans cette molécule C-2' et C-3'. Le carbone du groupement CH₂ de ce prényloxy sera numéroté C-1' et ses protons H-1'a et H-1'b.



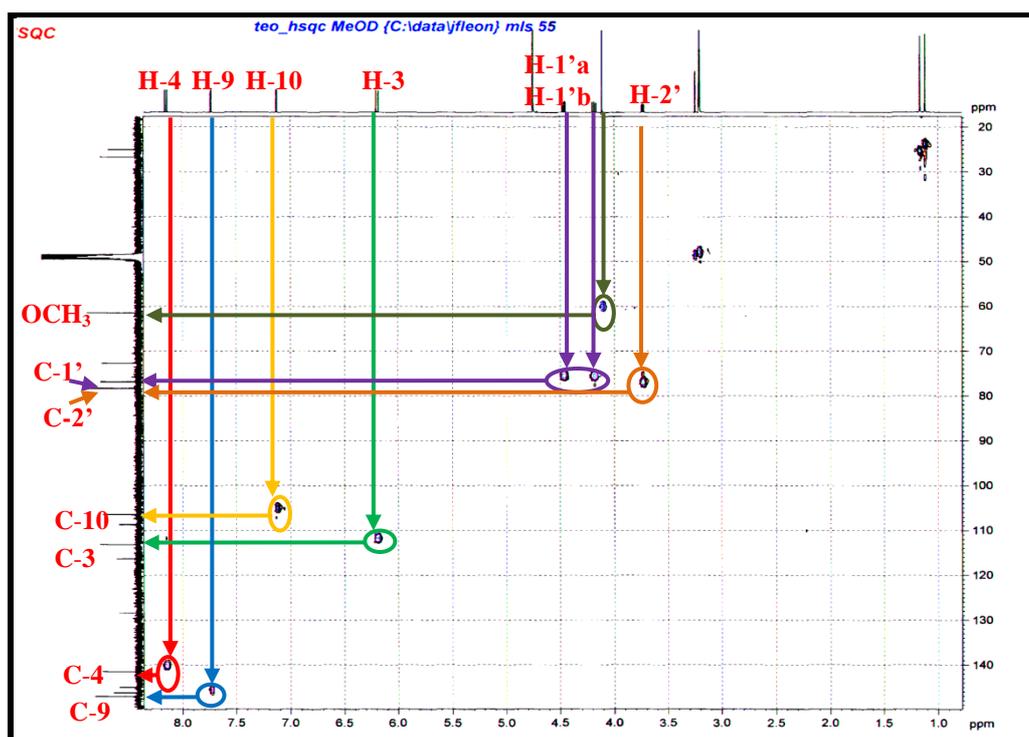
Spectre IV.74-2 : Spectre RMN ¹H étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de **C12**

Les protons H-1'a et H-1'b résonant sous forme de deux doublets dédoublés à δ_H 4,47 ($J = 10,3 ; 2,8$ Hz) et δ_H 4,19 ppm ($J = 10,3 ; 8,1$ Hz) (δ_C 76,86 ppm) corrélient sur le spectre HMBC (Spectre IV.76-2), avec le carbone obligatoirement porteur du groupement prényloxy dont le déplacement chimique est δ_C 128,42 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique bien qu'il s'agit de la position C-8 du noyau psoralène.



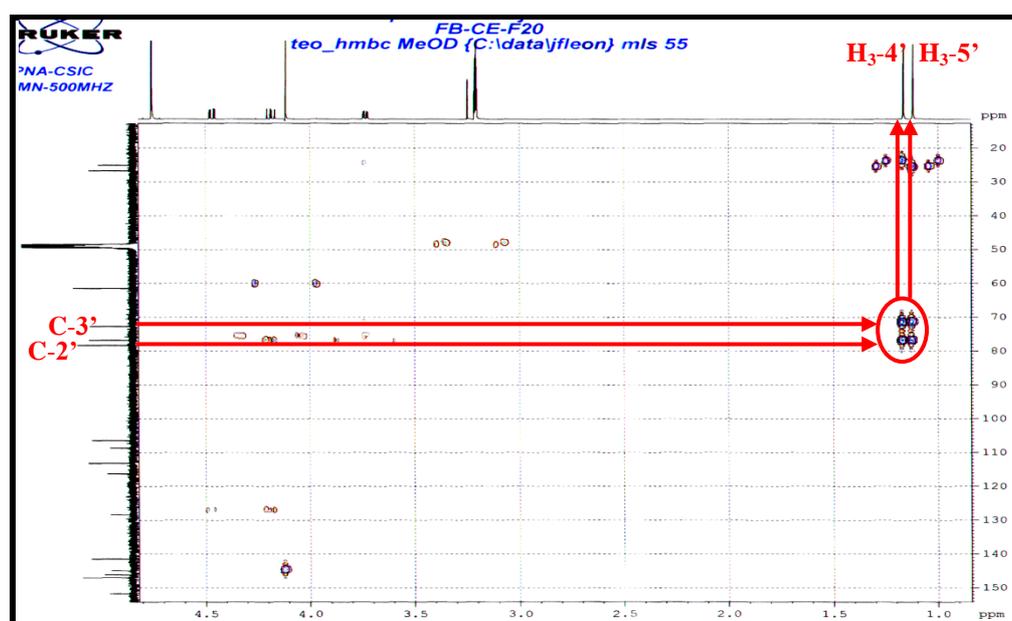
Spectre IV.76-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C12**

Ainsi, on peut donc placer comme dans le cas du composé **C11**, le groupement méthoxyle décrit précédemment en position C-5 et par conséquent attribuer le carbone résonant à δ_C 146,14 ppm au C-5 du noyau psoralène. On peut signaler par ailleurs que H-2' résonne à δ_H 3,73 ppm ($dd ; J = 8,1 ; 2,8$ Hz ; δ_C 78,33 ppm) et C-3' à δ_C 72,75 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux carbones confirment bien leur oxygénation.



Spectre IV.77 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C12**

Bien entendu comme dans le cas du composé **C11**, les carbones C-2' et C-3' corrèlent sur le spectre HMBC (Spectre IV.76-3), avec les protons des deux méthyles résonant sous forme de deux singulets à δ_H 1,17 ppm (δ_C 26,70 ppm) et δ_H 1,12 ppm (δ_C 26,70 ppm) confirmant l'idée que ces méthyles sont portés par le carbone C-3'.



Spectre IV.76-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé

C12

A ce stade de notre analyse, il est clair que nous avons utilisé tous les atomes de carbone (17 carbones car 17 signaux trouvés sur le spectre ^{13}C totalement découplé), tous les atomes d'hydrogène déduits des intégrales des signaux et/ou du type des groupements hydrocarbonés présents dans la molécule (16 protons). Nous avons également 4 atomes d'oxygène dans le noyau psoralène en tenant compte de celui en C-8 et un autre ou deux autres selon que l'on a une fonction époxyde entre C-2' et C-3' ou deux fonctions hydroxyles en ces positions. Il est évident que la présence d'une fonction époxyde est exclue car on se retrouvera avec le composé **C-11** dont le temps de rétention en CLHP-UV à 280 nm dans une colonne nucleosil HD-18 (100 mm x 5 mm). Phase : H_2O milli-Q et ACN. Gradient : (10-35-35-10-10 % ACN) (0-5-30-42-43-55 min). Débit $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ était de 35 min alors que celui de **C12** était de 25,8 min (voir chapitre III, chromatogramme LC-UV de l'extrait chloroforme). Ceci indique que le composé **C12** est plus polaire que le composé **C11** et que le composé **C12** ne peut être l'énantiomère de **C11** car la phase stationnaire de la colonne utilisée est achirale. Ces remarques permettent donc de conclure que les positions C-2' et C-3' de cette molécule sont hydroxylées, que **C12** est un diol et qu'il admet comme formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_7$. Les résultats de cette analyse structurale convergent vers la 5-méthoxy-8-(2',3'-dihydroxyprényloxy)psoralène (Figure IV.46). Cette molécule est connue sous le nom de byakangelicine [19-21].

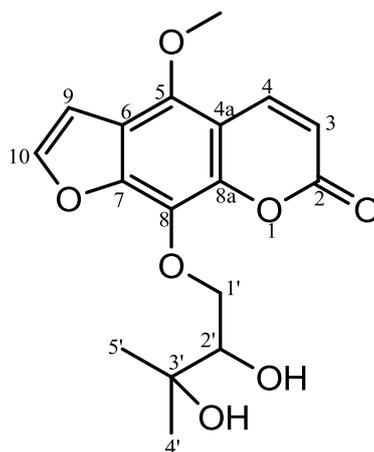


Figure IV.46 : Structure plane du composé **C12**

En complément à cette étude, ce composé a montré un pouvoir rotatoire spécifique positif, avec $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 18,6$ (c 2,5 g/100 ml, MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{100} = + 18,5$ (c 1,11 g/100 ml, MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 20,7$ (c 1,2 g/100 ml, EtOH), cela suppose que notre molécule est dextrogyre et que nous avons par conséquent la (+)-

byakangelicine. La valeur positive de la rotation optique est en accord avec la configuration (R) du centre chiral C-2' pour cette molécule [22], par conséquent le composé **C12** est donc la **R-(+)-byakangelicine** (Figure IV.47).

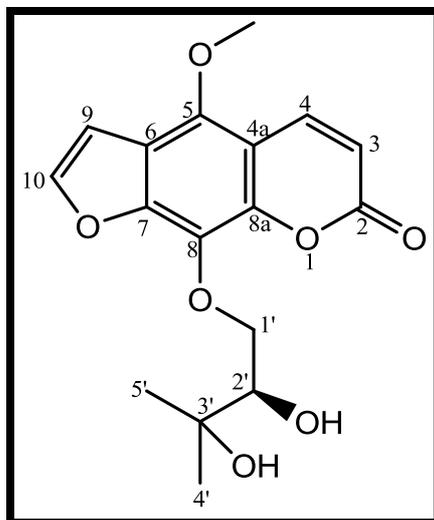
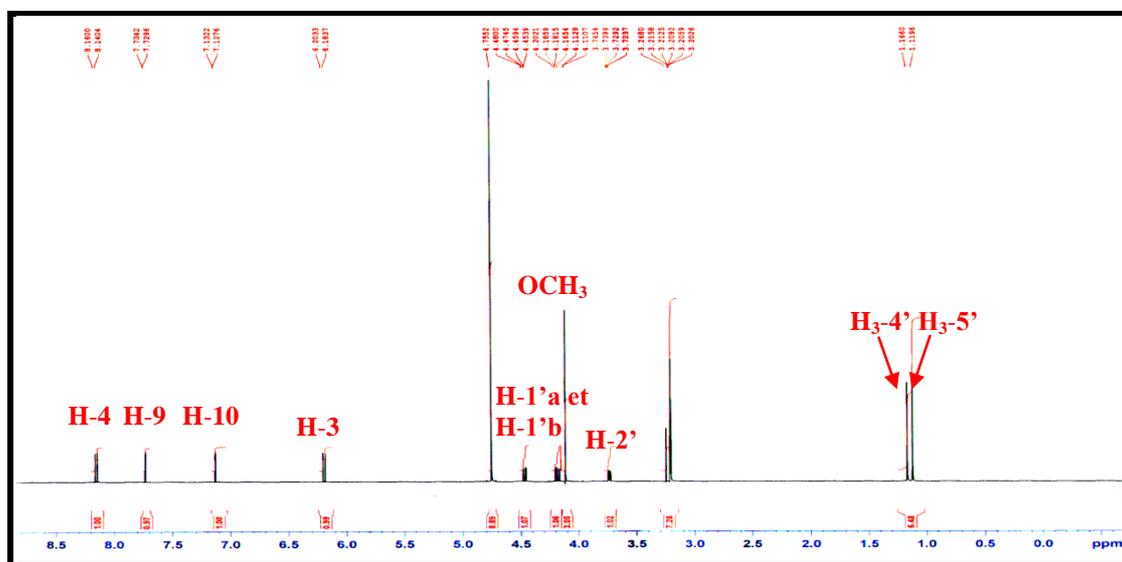
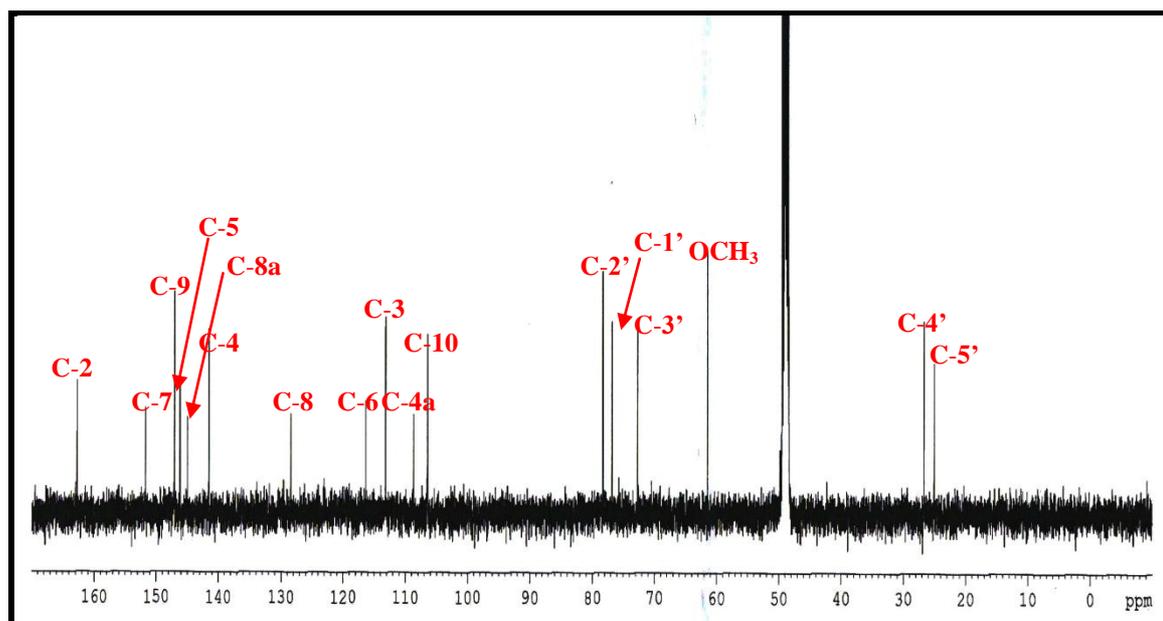


Figure IV.47 : Structure finale du composé **C12**, **R-(+)-byakangelicine**

Les données RMN de cette molécule sont reportées sur les RMN proton (Spectre IV.74-3) et carbone treize (Spectre IV.72-2) et l'ensemble dans le tableau IV.18.



Spectre IV.74-3 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C12** avec toutes les indications

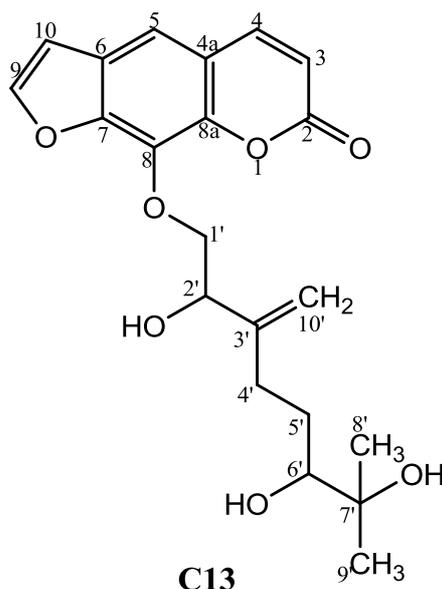


Spectre IV.72-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C12**
avec toutes les indications

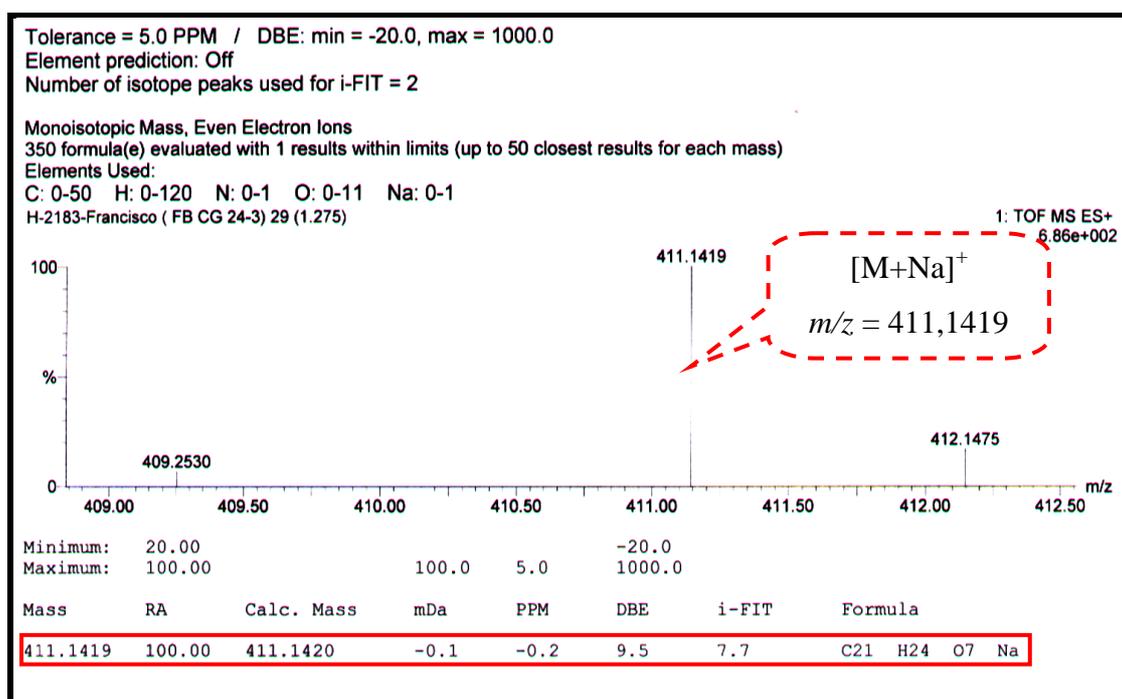
Tableau IV.18 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz)
du composé **C12** (MeOH)

position	δ_{C}	δ_{H}	Integration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$	
2	162,69	-	-	-	-	
3	113,15	6,19	1H	<i>d</i>	9,8	
4	141,49	8,15	1H	<i>d</i>	9,8	
4a	108,66	-	-	-	-	
5	146,14	-	-	-	-	
6	116,30	-	-	-	-	
7	151,72	-	-	-	-	
8	128,42	-	-	-	-	
8a	144,49	-	-	-	-	
9	147,01	7,73	1H	<i>d</i>	2,2	
10	106,43	7,13	1H	<i>d</i>	2,2	
1'	1'a	76,86	4,47	1H	<i>dd</i>	10,3 ; 2,8
	1'b		4,19	1H	<i>dd</i>	10,3 ; 8,1
2'	78,33	3,73	1H	<i>dd</i>	8,1 ; 2,8	
3'	72,74	-	-	-	-	
4'	26,70	1,17	3H	<i>s</i>	-	
5'	25,05	1,12	3H	<i>s</i>	-	
OCH ₃	61,46	4,11	3H	<i>s</i>	-	

IV-A-13- Elucidation structurale du composé C13

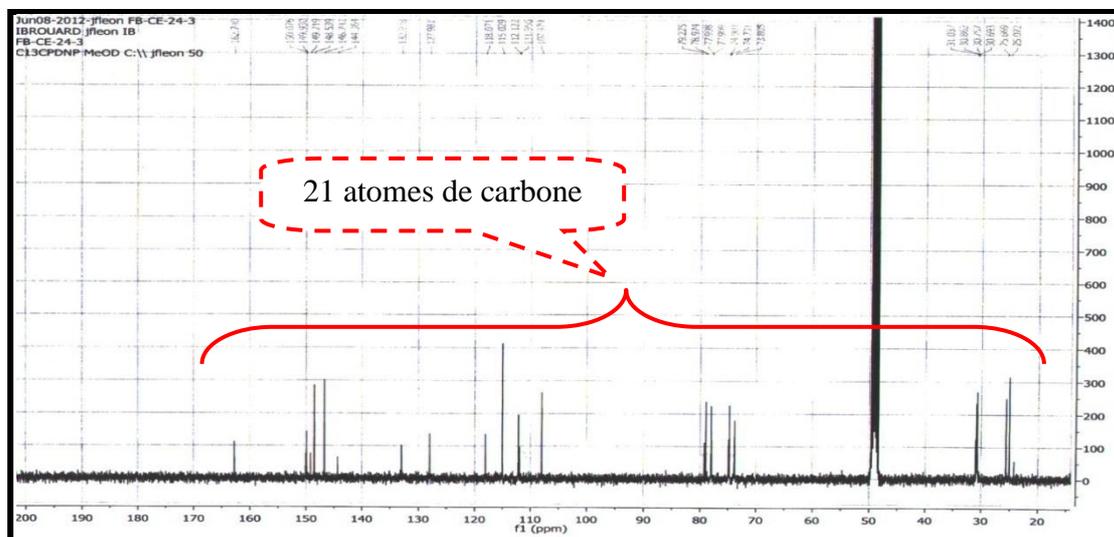


Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre jaune. L'examen de son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronebulisation positive [Q-TOF-ESI- HRMS (+)] (Spectre IV.78), montre la présence d'un ion adduit à $m/z = 411,1419$ (100%) correspondant à la formule $C_{21}H_{24}O_7Na$ (Calculé pour $C_{21}H_{24}O_7Na$: 411,1420) et donc indiquant une formule brute $C_{21}H_{24}O_7$ soit une structure de masse 388 Da comportant 10 insaturations.

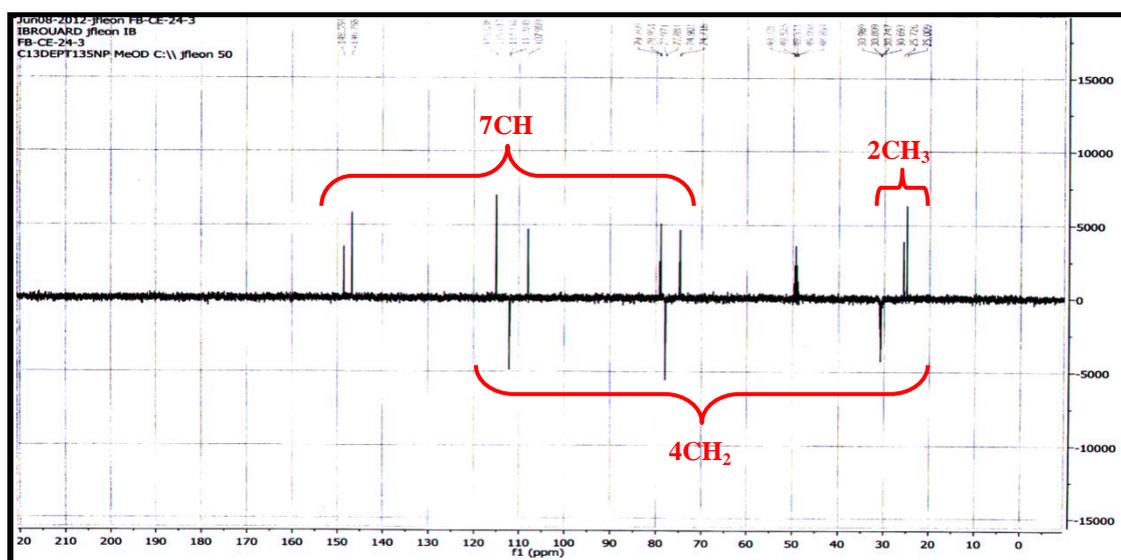


Spectre IV.78 : Données de la HR-ESI-MS relatives au composé C13

Les spectres de RMN ^{13}C (Spectre IV.79) et DEPT 135° (Spectre IV.80) confirment la présence de 21 atomes de carbone de cette molécule et permettent de les répartir en : 2CH_3 , 4CH_2 , 7CH et 8C_q .



Spectre IV.79 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C13**

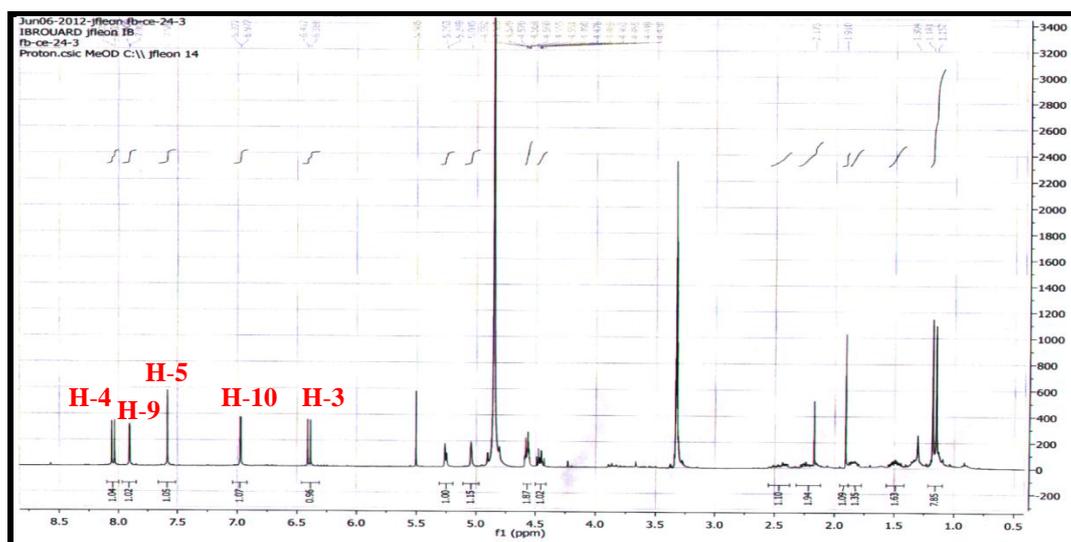


Spectre IV.80 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C13**

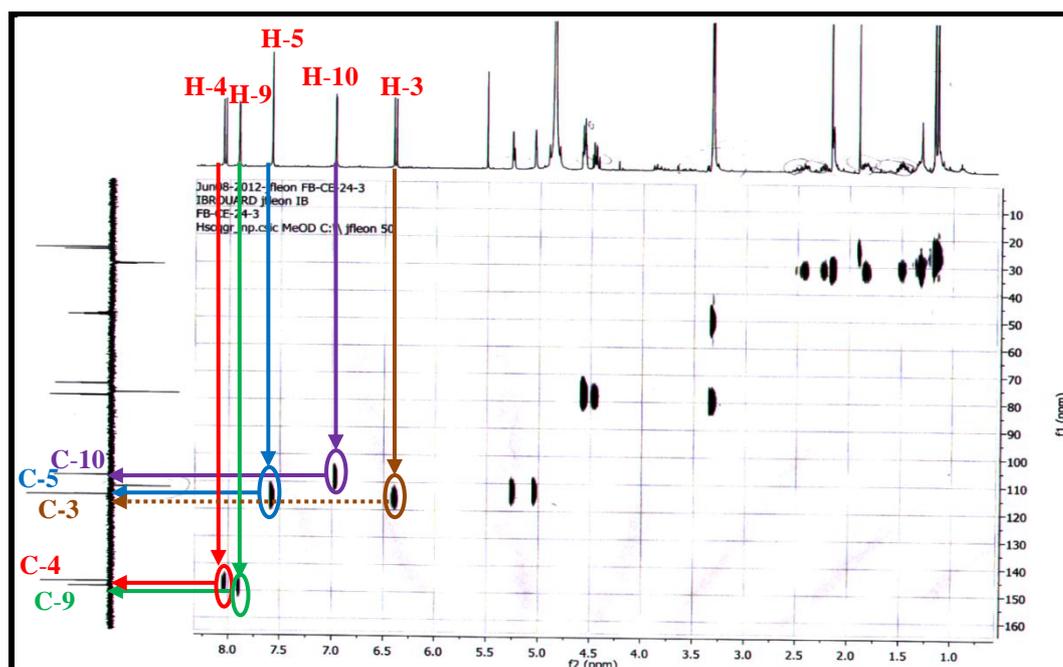
L'examen approfondi des spectres RMN ^1H (Spectre IV.81-1) RMN ^{13}C (Spectre IV.79), DEPT (Spectre IV.80), HSQC (Spectre IV.82), COSY (Spectre IV.84) et HMBC (Spectre IV.83-1), montre des signaux caractéristiques d'un psoralène substitué en C-8. De ces spectres on relève en effet :

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,41$ ppm ($J = 9,6$ Hz) attribuable au H-3 ($\delta_{\text{C}} 115,04$ ppm).

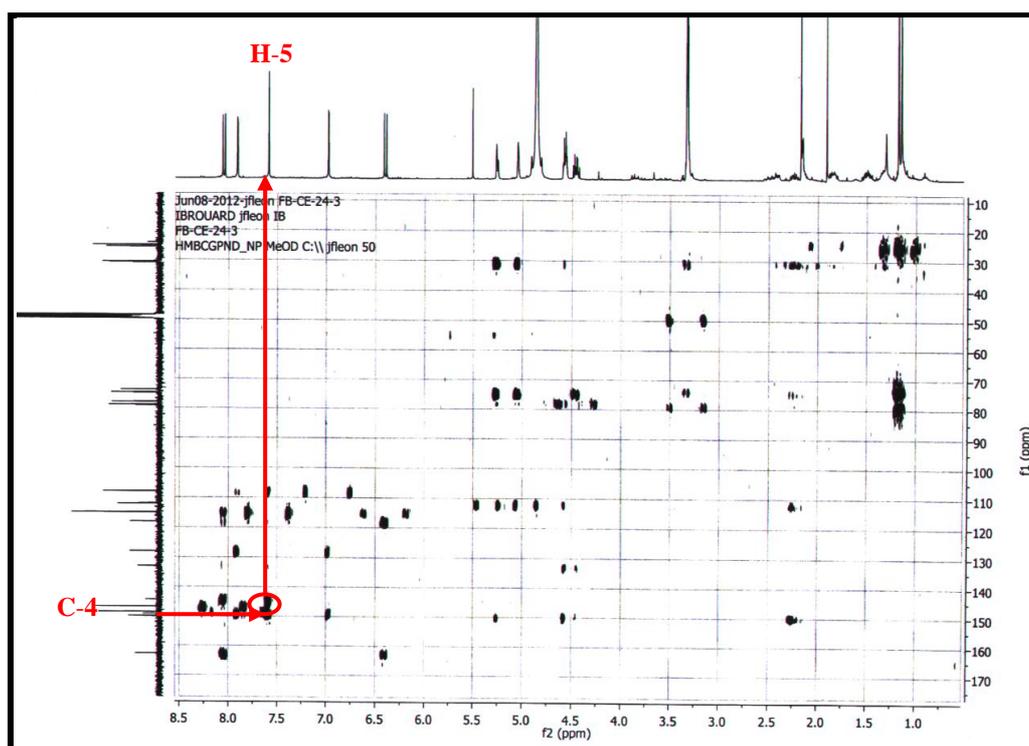
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 8,10$ ppm ($J = 9,6$ Hz) attribuable au H-4 (δ_C 146,75 ppm).
- Un singulet à $\delta_H = 7,58$ ppm que nous avons attribué à H-5 ($\delta_C = 115,01$ ppm), vu sa corrélation avec C-4 observée sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-1).
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,97$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-10 (δ_C 107,98 ppm).
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,90$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable au H-9 (δ_C 148,55 ppm).



Spectre IV.81-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C13



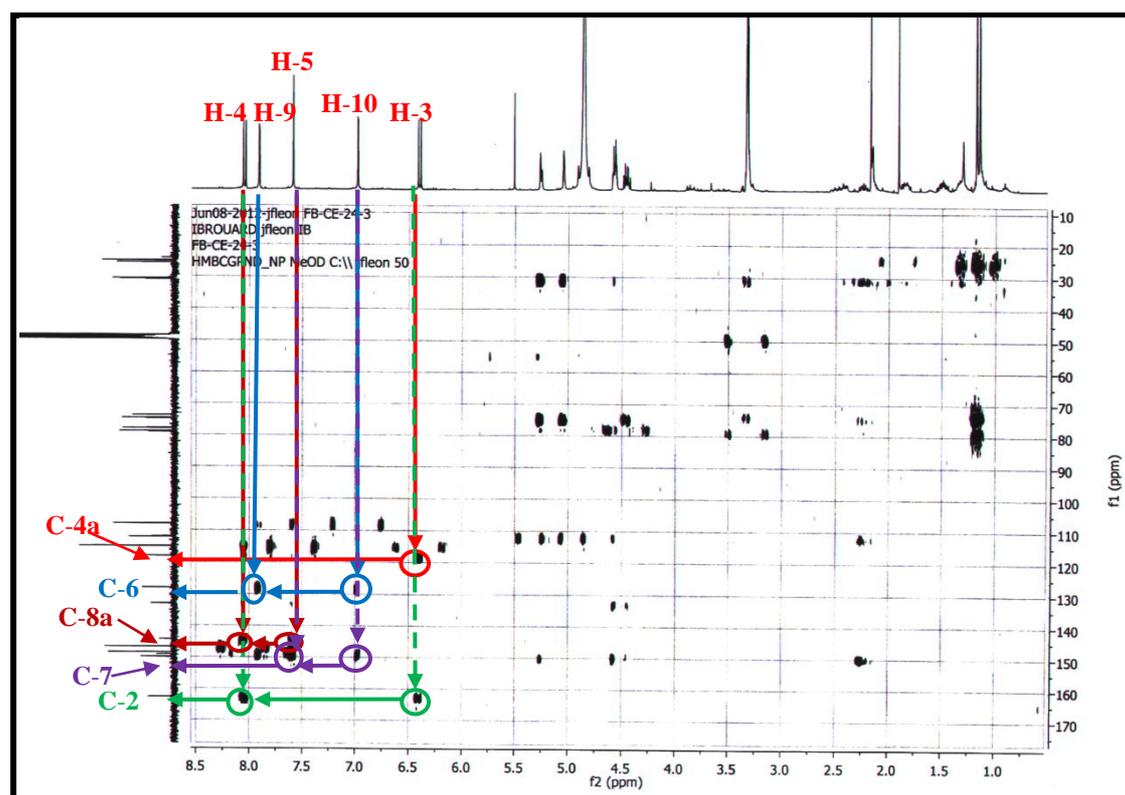
Spectre IV.82 : Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C13



Spectre IV.83-1 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C13

Les carbones quaternaires du squelette furocoumarinique peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.83-2 et Tableau IV.19). En effet, ce spectre montre des taches de corrélation entre :

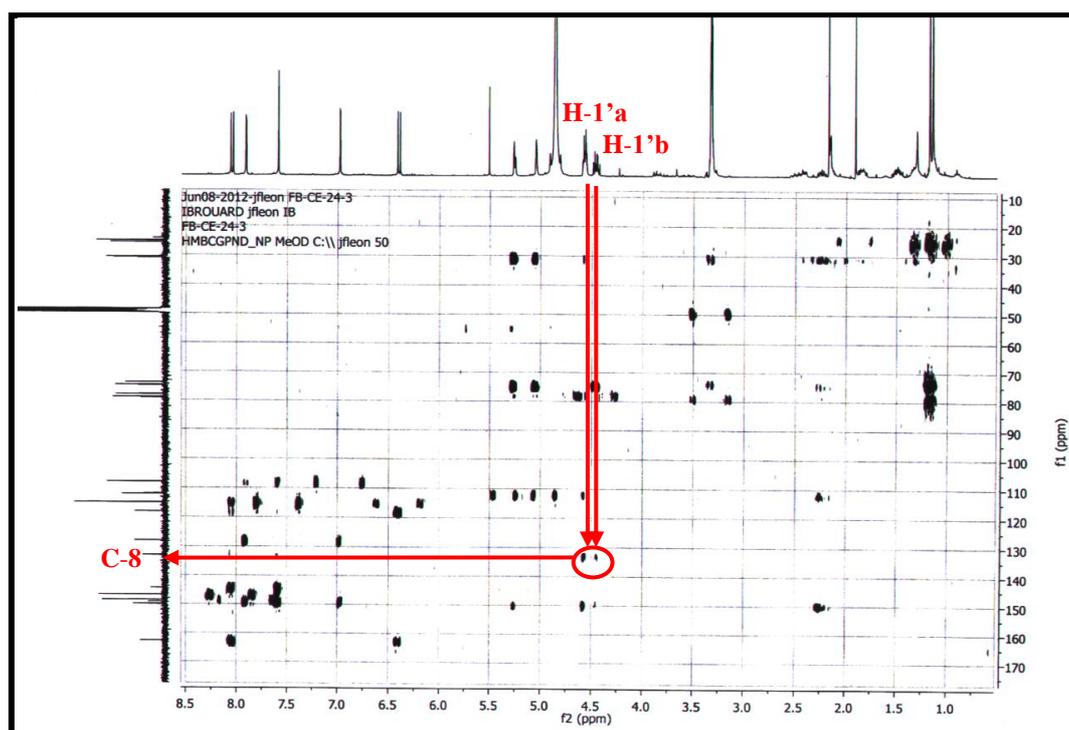
- Le proton H-3 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 118,07 ppm, ce carbone ne peut être que le C-4a.
- Les protons H-3, H-4 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 162,74 ppm, vu la valeur de son déplacement chimique, ce carbone est oxygéné et ne peut être que le C-2.
- Les protons H-4, H-5 et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 144,36 ppm, attribuable au C-8a.
- Les protons H-5, H-10 et le carbone quaternaire oxygéné situé à δ_C 150,07 ppm, permettant son attribution à C-7.
- Les protons H-9, H-10 et le carbone quaternaire résonant à δ_C 127,98 ppm, attribuable alors à C-6.



Spectre IV.83-2 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C13**

La mise en évidence de l'entité psoralène substituée en C-8, dans cette molécule, permet de déduire que le substituant en question admet comme formule brute $C_{10}H_{19}O_4$. En faisant abstraction des signaux de l'entité psoralène, on relève, d'après l'analyse des différents spectres de RMN :

- Deux multiplets relatifs aux protons d'un méthylène oxygéné à δ_H 4,56 ppm et δ_H 4,45 ppm (δ_C 77,88 ppm). Nous numérotions le carbone de ce méthylène C-1' et ses protons H-1'a et H-1'b, respectivement car sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-3) les protons H-1'a et H-1'b corrélaient avec un carbone quaternaire résonant à δ_C 132,97 ppm qui, d'après nos analyses structurales précédentes (composés **C2**, **C3**, **C5**, **C6**, **C7**, **C9**, **C11** et **C12**) est attribuable à la position C-8 du psoralène. Nous confirmerons cette attribution un peu plus loin.



Spectre IV.83-3 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **C13**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-4), le proton H-1'b montre une tache de corrélation avec le carbone d'un CH oxygéné résonant $\delta_C = 74,90$ ppm et dont le proton résonne sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 4,56$ ppm et donc superposé au signal de H-1'a. Sur le même spectre H-1'a et H-1'b montrent des taches de corrélations avec un carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 149,93$ ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique et d'après le fait que ce substituant doit comporter une insaturation car le noyau psoralène en a consommé neuf des dix attendues, il est évident que ce carbone est éthylénique. Ces corrélations indiquent que le H-1'b est situé à deux ou trois liaisons de ces atomes de carbone. Par ailleurs et sachant donc que ce substituant ne comporte qu'une seule insaturation, il est clair que le carbone délimitant la double liaison n'est autre que le CH₂ résonant à $\delta_C = 112,11$ ppm et dont les protons résonnent à $\delta_H = 5,04$ ppm (*sl*) et à $\delta_H = 5,26$ ppm (*s*). Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-4), les deux protons du CH₂ éthylénique montrent des corrélations nettes avec le carbone du CH oxygéné précédemment invoqué ($\delta_C = 74,90$ ppm) mais ne montrent que des taches à peine détectables avec le C-1'. Cette observation suffit pour placer le carbone oxygéné en position vicinale par rapport à C-1', c'est-à-dire lui attribuer la position C-2' et attribuer la position C-3' au carbone quaternaire éthylénique. Ainsi les protons du CH₂ éthylénique seront à trois liaisons du C-2' et à quatre liaisons du C-1', ce qui explique l'intensité des taches de

corrélation observées sur le spectre HMBC. Cette analyse permet de proposer l'entité reportée dans la figure IV.48 comme partie du substituant attendu.

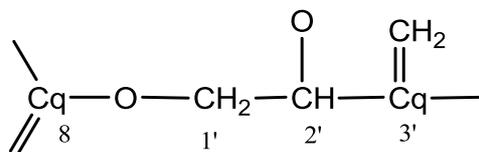
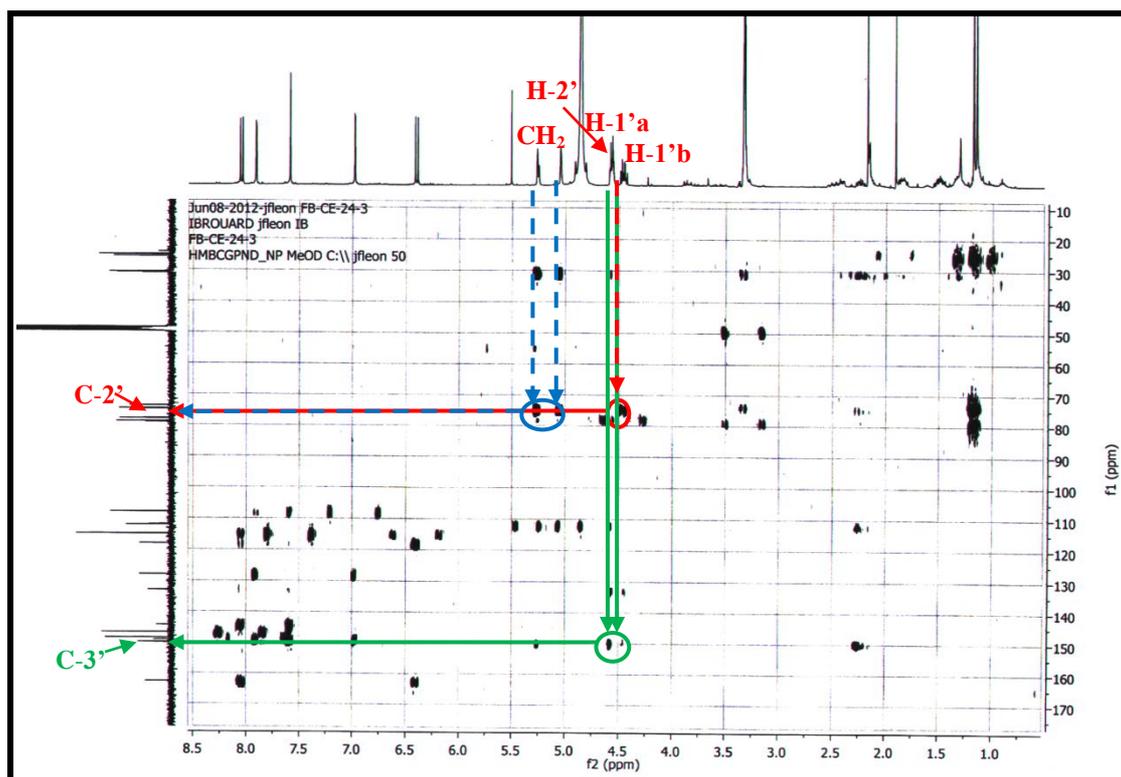
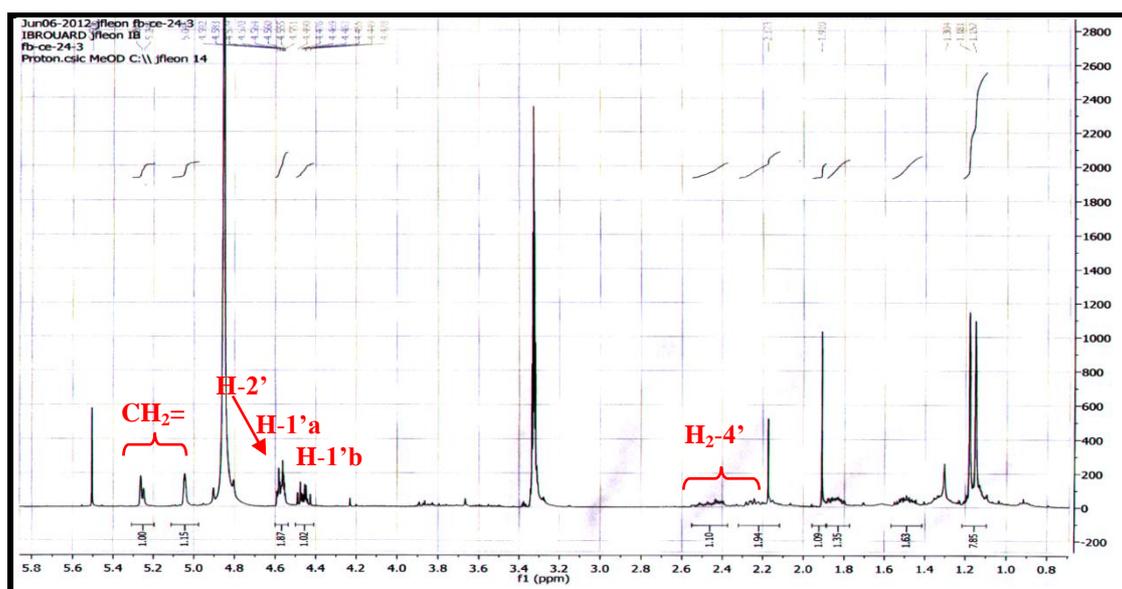


Figure IV.48 : Entité faisant partie du substituant du squelette psoralène

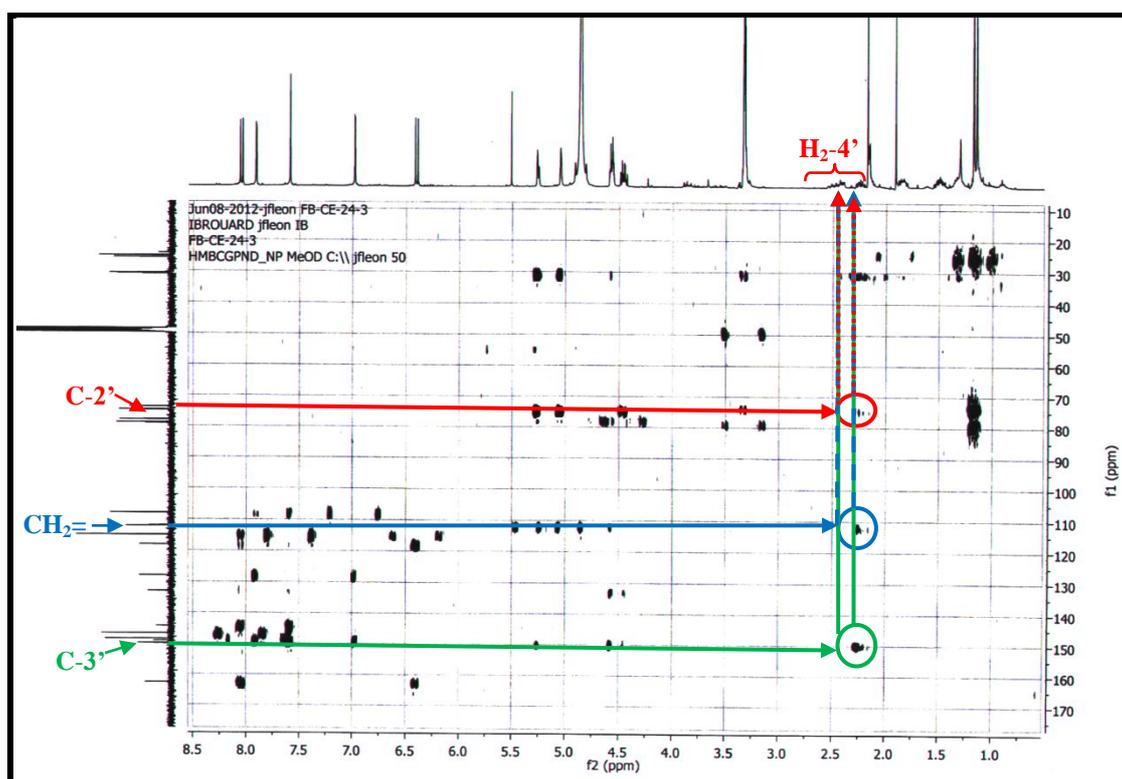


Spectre IV.83-4 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé C13

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-5), le carbone C_q-3' éthylénique, le carbone du CH_2 éthylénique et le carbone $C-2'$ montrent des taches de corrélation avec les protons d'un autre groupement CH_2 résonant sur le spectre proton (Spectre IV.81-2) sous forme de deux multiplets à $\delta_H = 2,50$ ppm et $\delta_H = 2,25$ ppm ($\delta_C = 30,69$ ppm). Ces corrélations font que nous ne pouvons attribuer ce méthylène qu'à la position $C-4'$; ses protons seront numérotés $H-4'a$ et $H-4'b$, respectivement.



Spectre IV.81-2 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C13**



Spectre IV.83-5 : Spectre HMBC (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C13**

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la figure IV.49 dans le substituant de notre furanocoumarine.

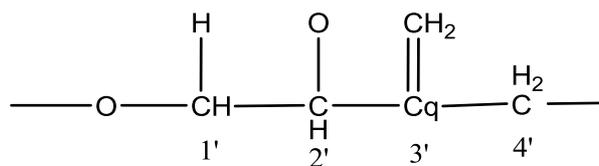
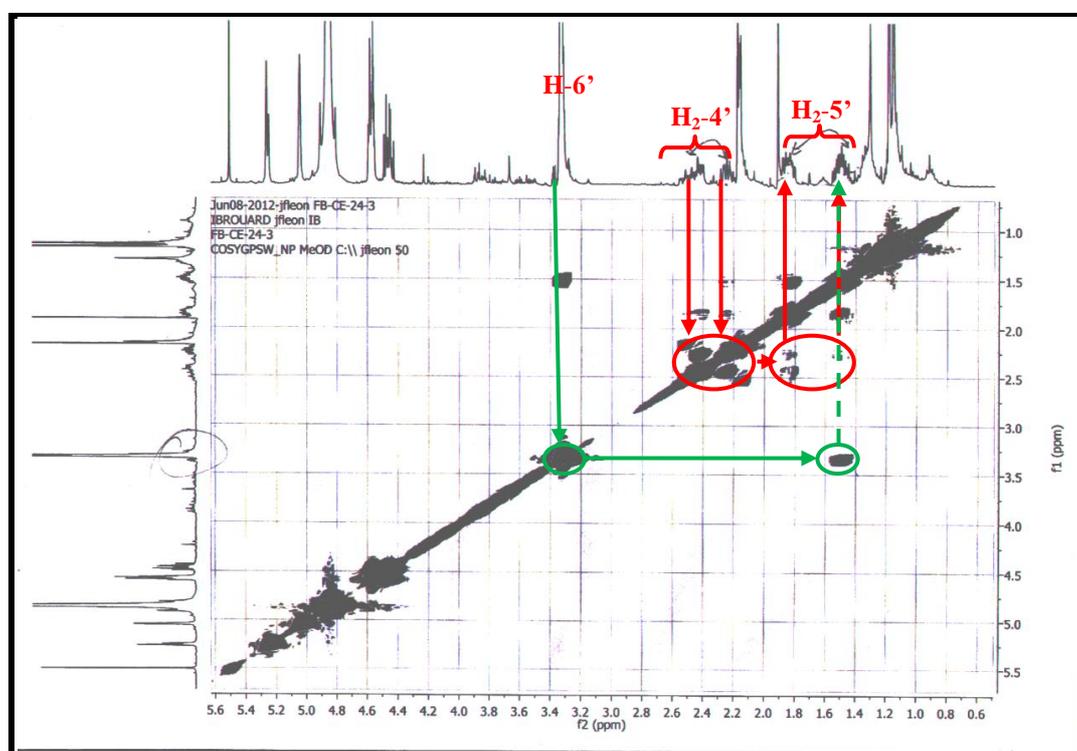


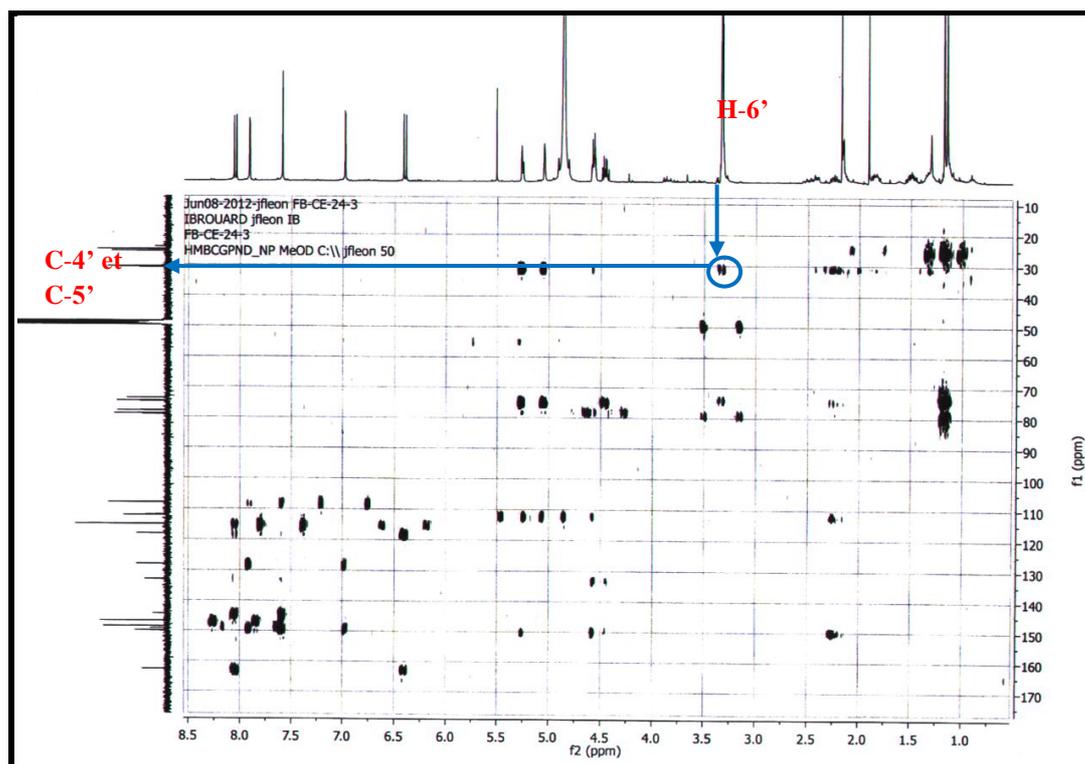
Figure IV.49 : Entité faisant partie du substituant en C-8 du squelette furanocoumarine

Sur le spectre COSY (Spectre IV.84), les protons H₂-4' montrent des taches de corrélation avec les protons du dernier méthylène attendu dans cette molécule. Ses protons diastéréotopiques résonnent sous forme de deux multiplets à $\delta_{\text{H}} = 1,84$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,50$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 30,80$ ppm). Nous pouvons numérotés ces deux protons H-5'a et H-5'b respectivement et leur carbone C-5'.

On relève sur le même spectre un couplage net entre le proton H-5'b et le proton du groupement CH résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ppm et dont le signal est recouvert par celui du méthanol résiduel. Ce couplage permet d'attribuer ce groupement méthyne à la position C-6' de cette chaîne. La présence de ce CH en cette position est d'ailleurs confirmée par les taches de corrélation entre les carbones C-4' et C-5' et le proton de ce groupement (H-6') observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.83-6).



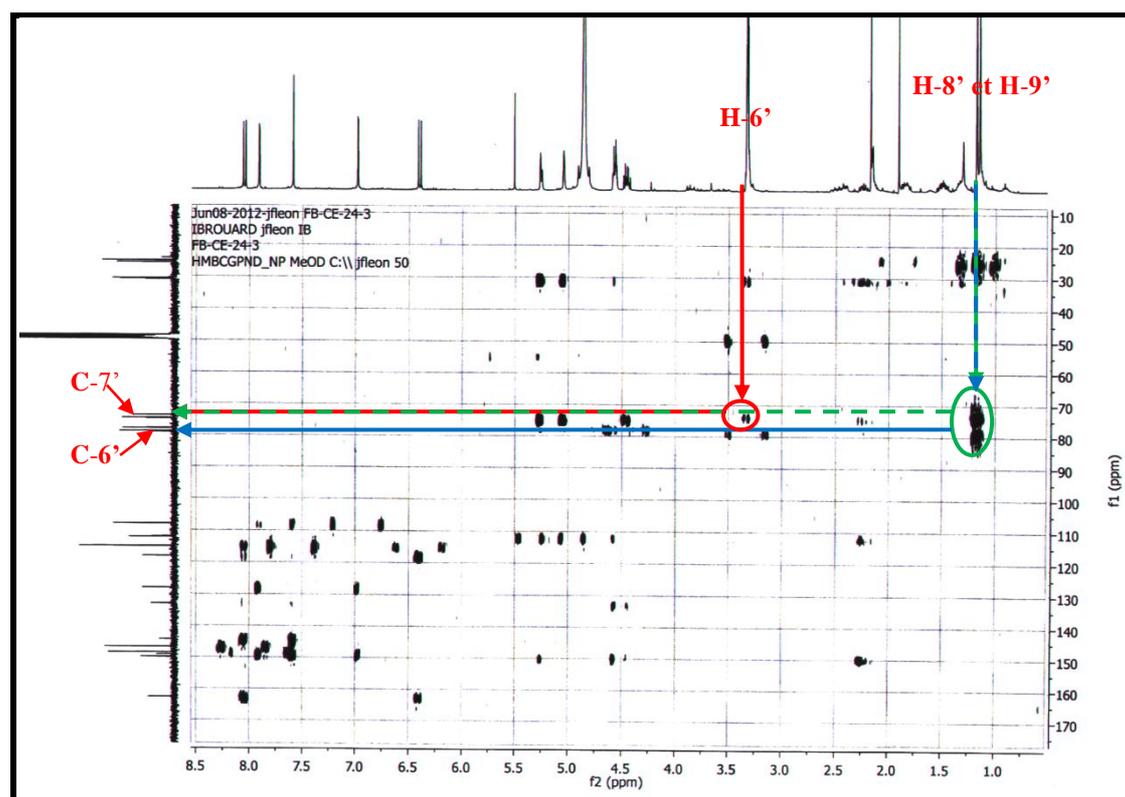
Spectre IV.84 : Spectre COSY (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé C13



Spectre IV.83-6 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C13**

La valeur du déplacement de C-6' ($\delta_C = 79,20$ ppm) oriente vers une oxygénation à ce niveau. Le spectre HMBC (Spectre IV.83-7), montre des taches de corrélation entre H-6' et le carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 73,80$ ppm que nous pouvons alors attribuer à C-7' car d'après la répartition de nos atomes de carbone, il ne nous reste plus que deux méthyles à placer sur ce substituant comme groupements hydrocarbonés. En effet, le spectre proton montre deux méthyles résonant sous forme de deux singulets à $\delta_H = 1,18$ ppm et 1,15 ppm. La multiplicité de leurs signaux indique bien qu'ils sont portés par un carbone quaternaire. Nous numérotions les protons de ces méthyles H₃-8' et H₃-9', respectivement. Leur carbone C-8' et C-9' résonnent à $\delta_C = 25,00$ ppm et $\delta_C = 25,72$ ppm, respectivement. Cette hypothèse est confirmée par le spectre HMBC (Spectre IV.83-7) qui montre des corrélations entre ce carbone C-7', le carbone C-6' et les protons H₃-8' et H₃-9'.

Le carbone du groupement CH₂ éthylénique porté par le C-3', sera numéroté C-10'.



Spectre IV.85-8 : Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C13**

Un retour vers la formule brute $C_{21}H_{24}O_6$ montre que nous avons utilisé l'ensemble des atomes de carbone et d'oxygène et l'ensemble des insaturations. Il reste à placer trois atomes d'hydrogène sur le substituant ce qui mène à la présence de trois hydroxyles sur les trois carbones $C-2'$, $C-6'$ et $C-7'$.

Il est à signaler à ce niveau que le carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 132,97$ n'a pas été rencontré lors de l'établissement de la structure du substituant, il appartient donc bel et bien au noyau psoralène et peut être aisément attribué au $C-8$ comme proposé plus haut.

Le composé **C13** a été caractérisé comme étant le **8-[(2,6,7-trihydroxy-7-méthyl-3(10)-octényl)oxy]psoralène** (Figure IV.50) que nous avons nommé **pituranthosine D**. Cette molécule est nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature et ses données complètes de la RMN 1H et ^{13}C sont reportées dans le tableau IV.19. La stéréochimie des deux centres chiraux $C-2'$ et $C-6'$ reste à déterminer.

Tableau IV.19 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé **C13** (MeOH)

position	δ_{C}	δ_{H}	Integration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$	
2	162,74	-	-	-	-	
3	115,04	6,41	1H	<i>d</i>	9,6	
4	146,75	7,10	1H	<i>d</i>	9,6	
4a	118,07	-	-	-	-	
5	115,01	7,58	1H	<i>s</i>	-	
6	127,98	-	-	-	-	
7	150,07	-	-	-	-	
8	132,97	-	-	-	-	
8a	144,36	-	-	-	-	
9	148,55	7,90	1H	<i>d</i>	2,2	
10	107,98	6,97	1H	<i>d</i>	2,2	
1'	1'a	77,88	4,56	1H	<i>m</i>	-
	1'b		4,45	1H	<i>m</i>	-
2'	74,90	4,56	1H	<i>m</i>	-	
3'	149,93	-	-	-	-	
4'	4'a	30,69	1,50	1H	<i>m</i>	-
	4'b		1,84	1H	<i>m</i>	-
5'	5'a	30,80	2,24	1H	<i>m</i>	-
	5'b		2,45	1H	<i>m</i>	-
6'	79,20	3,75	1H	<i>m</i> *	-	
7'	73,80	-	-	-	-	
8'	25,00	1,18	3H	<i>s</i>	-	
9'	25,72	1,15	3H	<i>s</i>	-	
10'	10'a	112,11	5,04	1H	<i>sl</i>	-
	10'b		5,26	1H	<i>s</i>	-

*signal recouvert par celui du solvant

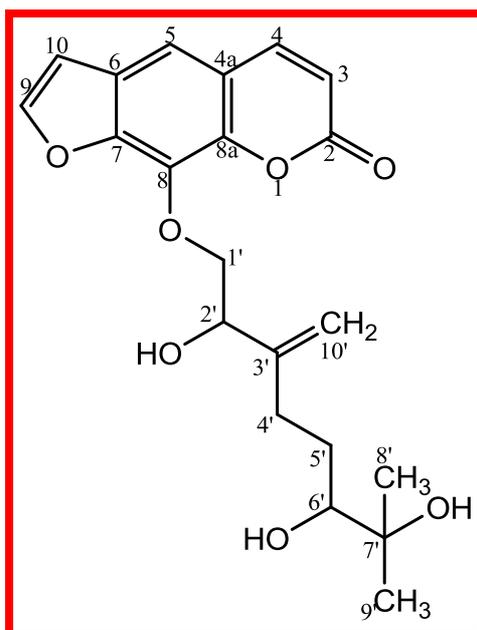
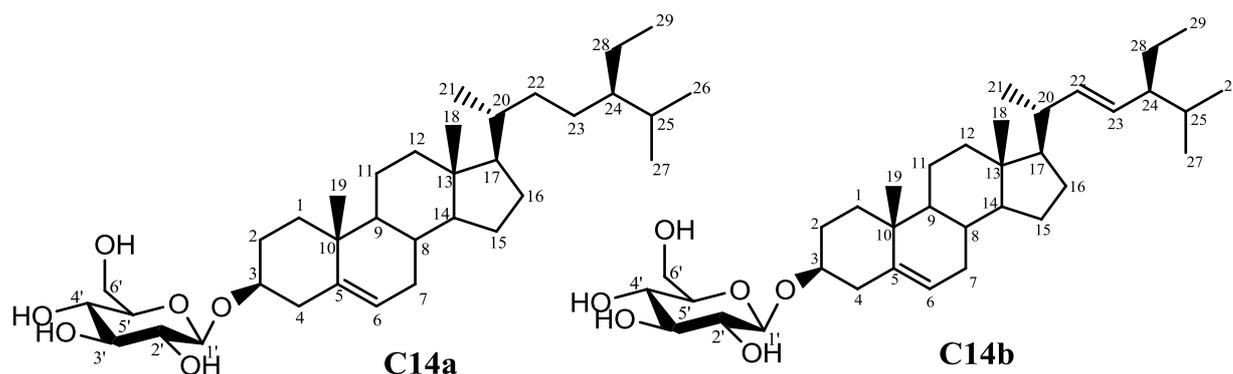
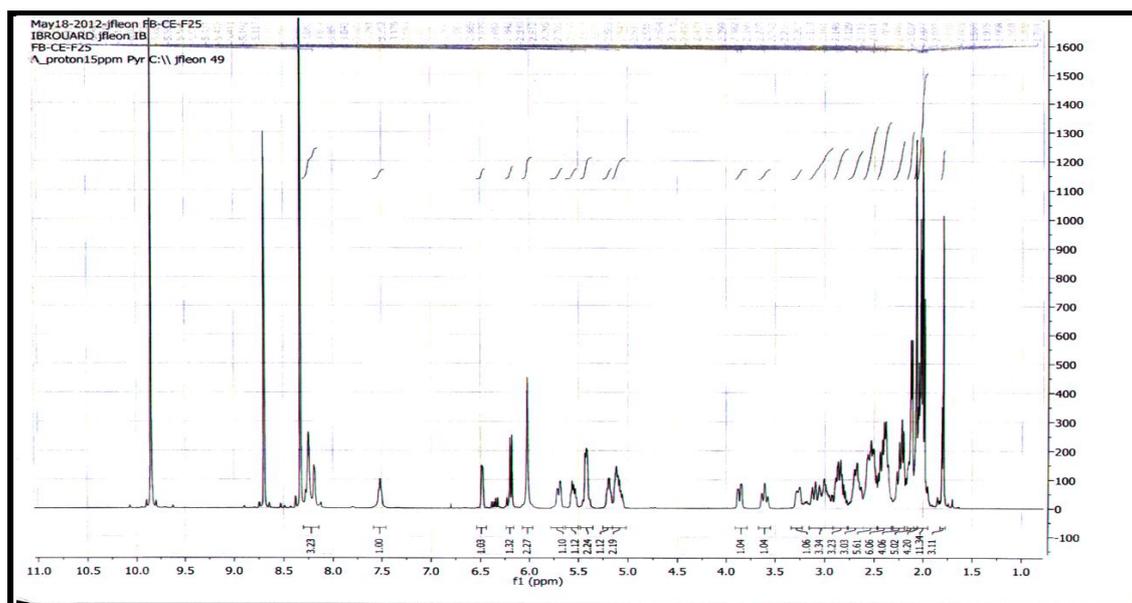


Figure IV.50 : Structure finale du composé **C13**, pituranthosine **D**

IV-A-14- Elucidation structurale du composé **C14**

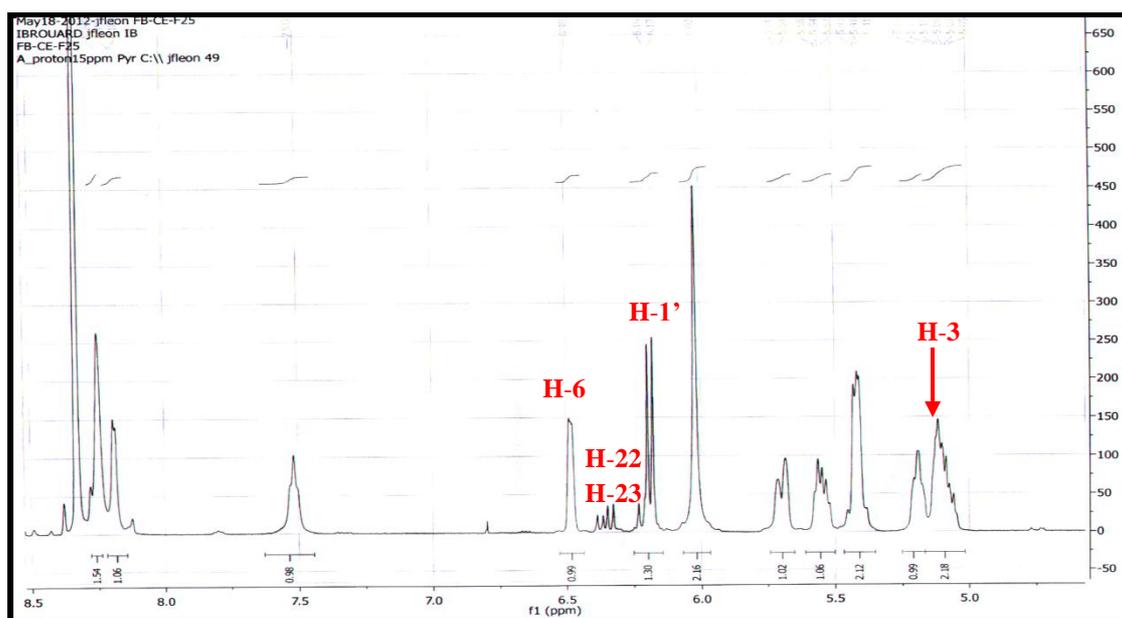


Après analyse des spectres de RMN, le composé **C14** s'est avéré être un mélange de deux composés **C14a** et **C14b**. Ce mélange est obtenu sous forme d'un précipité blanc, invisible sous la lampe UV (radiations 254 et 365 nm), soluble dans la pyridine. Il montre une coloration violette après révélation à l'anisaldéhyde suivie de chauffage à 100°C. Les spectres de RMN de ce mélange montrent la présence d'une partie osidique reconnaissable en premier lieu, sur le spectre proton (Spectre IV.85-2 décalé vers les champs faibles de 1,15 ppm, par mégarde lors de son enregistrement) à un signal sous forme de doublet à δ_{H} 5,03 ppm ($J = 6,1$ Hz) caractéristique du proton anomérique H-1' d'un sucre de configuration β .



Spectre IV.85-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange C14

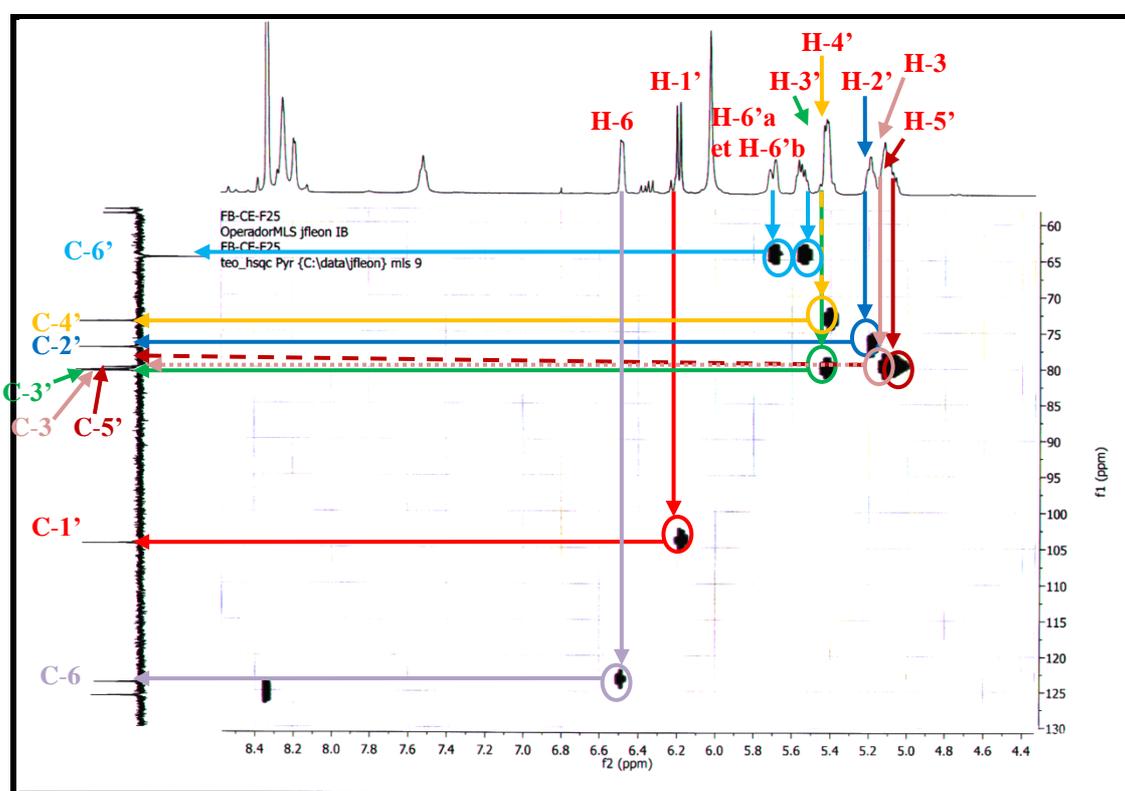
Note : ce spectre est décalé vers les champs faibles de 1,15 ppm.



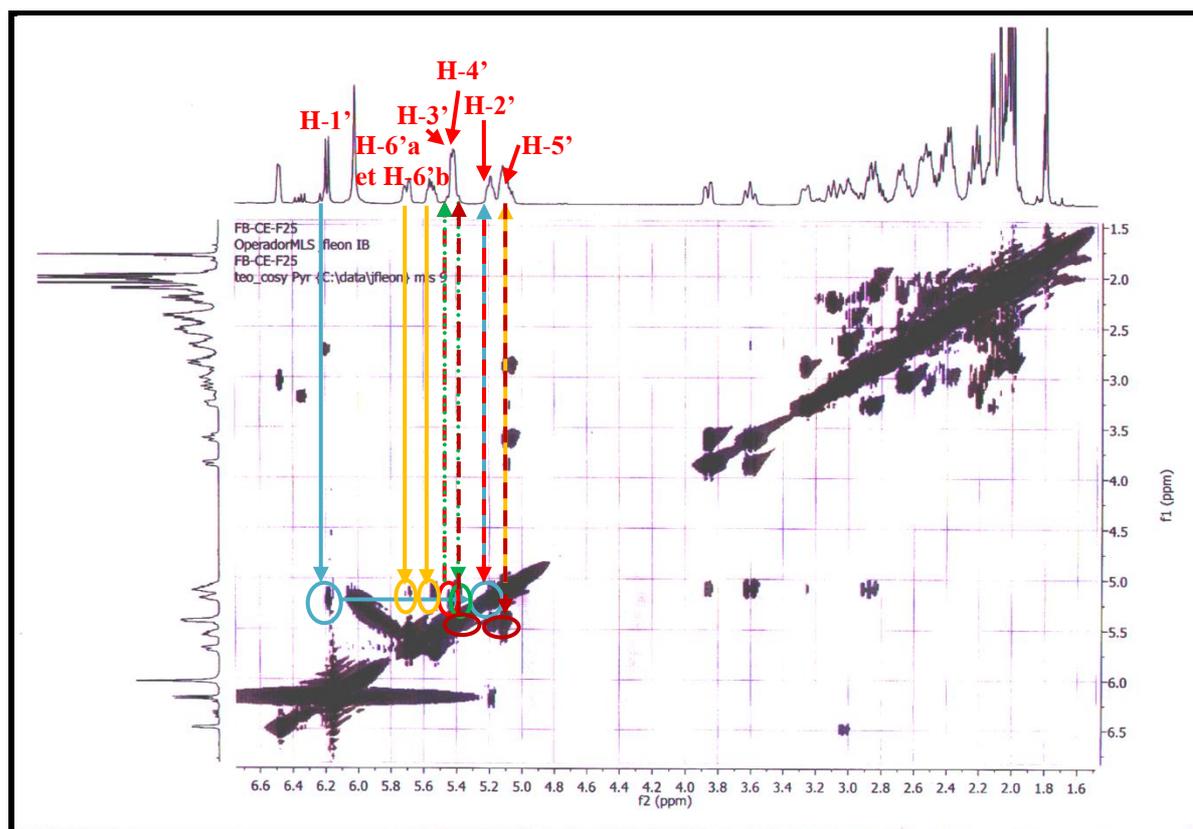
Spectre IV.85-2 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange C14

Sur le spectre HSQC (Spectre IV.86), le carbone anomérique correspondant est alors relevé à δ_{C} 104,56 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone et celle de l'hydrogène qu'il porte indiquent que cette partie osidique est reliée à l'aglycone par un pont oxygène.

Sur le spectre COSY (Spectre IV.87-1), H-1' permet l'attribution du H-2' au triplet à δ_{H} 4,04 ppm ($J = 6,2$ Hz) correspondant sur le spectre HSQC (Spectre IV.86), au carbone à δ_{C} 77,32 ppm. Le proton H-2' permet à son tour l'attribution de H-3' au multiplet à δ_{H} 4,26 ppm dont l'intégration indique la présence d'un autre proton résonant à ce déplacement chimique. Ce proton dont le signal est très proche de celui de H-3' ne peut être attribué qu'au H-4' de ce sucre car sur le spectre COSY, cet autre proton (H-4') corrèle avec un autre proton dont le signal est localisé à δ_{H} 3,91 ppm. Ce dernier proton ne peut donc être que H-5'. Cette hypothèse est appuyée par l'étude du spectre HSQC, qui permet dans ce cas, la localisation du C-3' à $\delta_{\text{C}} = 80,40$ ppm, le C-4' à $\delta_{\text{C}} = 73,78$ ppm et le C-5' à $\delta_{\text{C}} = 80,16$ ppm. Un retour vers le spectre COSY confirme bien les attributions de H-4' et H-5' car sur ce spectre le proton H-5' corrèle avec les protons diastéréotopiques du groupement CH_2 résonant sous forme d'un doublet large à δ_{H} 4,53 ppm ($J = 11,6$ Hz, H-6'a) et d'un doublet de doublets à δ_{H} 4,26 ppm ($J = 11,6 ; 5,3$ Hz, H-6'b) correspondant sur le spectre HSQC au carbone à δ_{C} 64,83 ppm. Ces résultats sont en parfait accord avec une entité *O*- β -D-glucopyranosyle.



Spectre IV.86 : Spectre HSQC (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange C14



Spectre IV.87-1 : Spectre COSY (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange **C14**

Les signaux restant sur le spectre RMN ^1H (Spectre IV.85-3) relatif à ce composé constituent une série de pics très dense dans l'intervalle 0,64 ppm à 2,65 ppm, supposant la présence d'un nombre élevé de groupements méthyles, méthylènes et méthynes. Parmi les signaux relatifs aux groupements méthyles on distingue aisément des singulets, des doublets et même des triplets. Ce spectre (Spectre IV.85-3) montre que ce composé fait partie de la classe des phytostérols, notamment en raison de la présence de six signaux à haut champ, d'intégration 3H, chacun correspondant à des groupements méthyliques, repérés à :

$\delta_{\text{H}} = 0,64$ ppm, *s*, attribuable au H₃-18

$\delta_{\text{H}} = 0,83$ ppm, *d*, $J = 6,5$ Hz, attribuable au H₃-27

$\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm, *t*, $J = 6,1$ Hz, attribuable au H₃-29

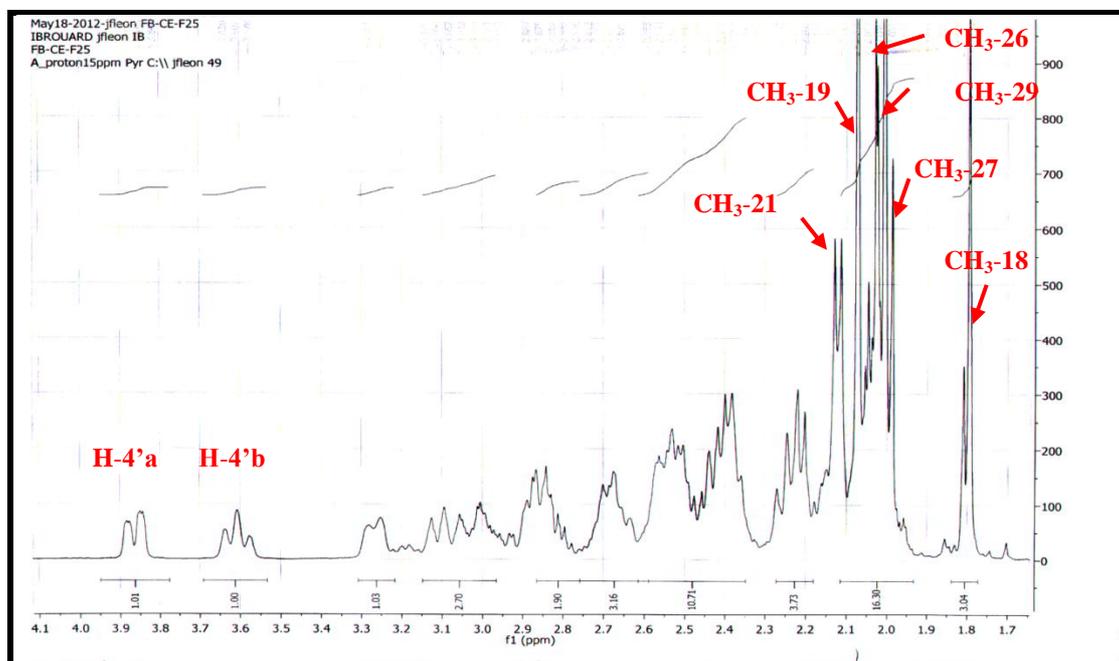
$\delta_{\text{H}} = 0,89$ ppm, *d*, $J = 6,0$ Hz, attribuable au H₃-26

$\delta_{\text{H}} = 0,92$ ppm, *s*, attribuable au H₃-19

$\delta_{\text{H}} = 0,97$ ppm, *d*, $J = 6,5$ Hz, attribuable au H₃-21

Ainsi par la présence de ces groupements l'appartenance de ces composés à la famille des stérols est bien confirmée.

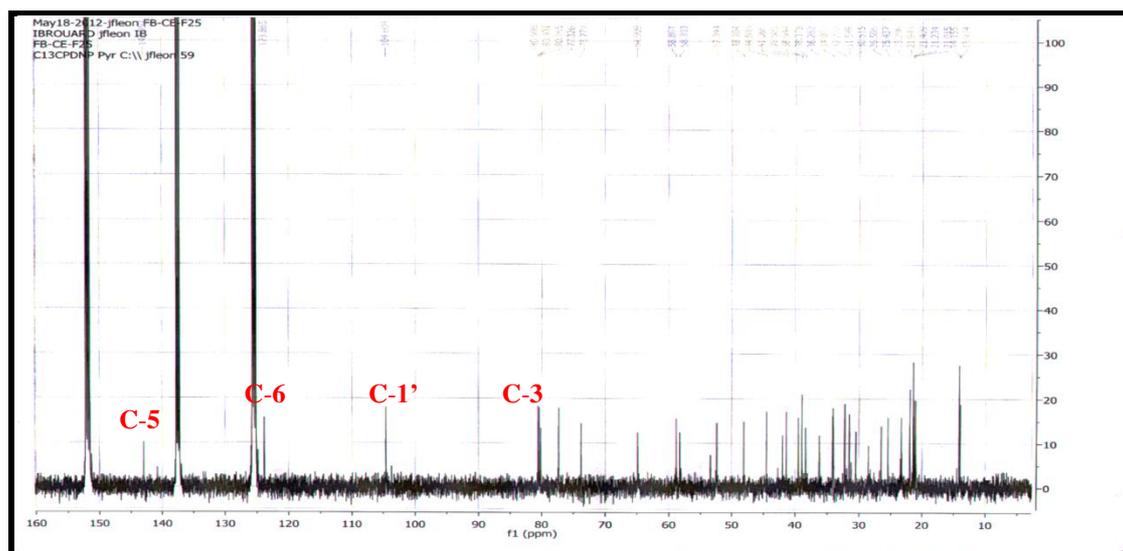
Dans la zone des champs plus faibles, on relève sur le spectre proton (Spectre IV.85-2) un multiplet collé au signal de H-5' du groupement glucopyranosyle à $\delta_H = 3,94$ ppm et un doublet large à $\delta_H = 5,33$ ppm ($J = 6,4$ Hz) caractéristiques respectivement, du H-3 et du proton oléfinique H-6 des stérols.



Spectre IV.85-3 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange **C14**

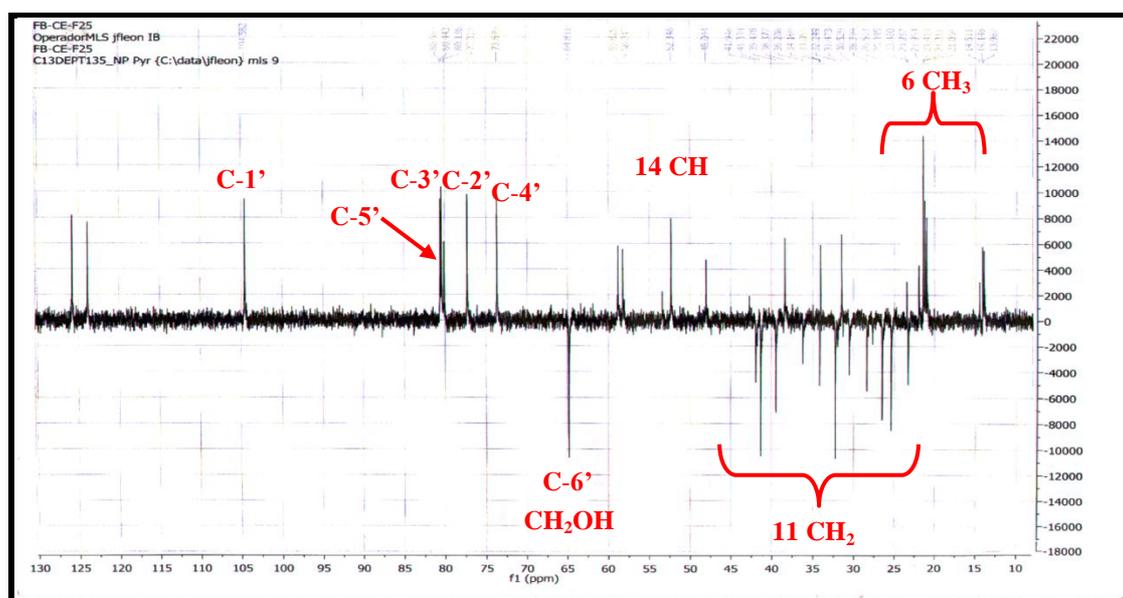
Cette observation est confortée par l'examen des spectres de RMN ^{13}C (Spectre IV.88) et DEPT 135° (Spectre IV.89) qui montrent la présence d'un groupement CH oxygéné à $\delta_C = 80,44$ ppm et d'un CH éthylénique ($\delta_C = 123,86$ ppm) corrélant respectivement, sur le spectre HSQC (Spectre IV.86) avec le proton H-3 et le proton H-6. Ces spectres montrent également la présence des signaux concernant la génine et l'unité osidique à savoir :

- ✓ 6 carbones méthyliques à δ_C 13,97 (C-18) ; 14,15 (C-29) ; 21,00 (C-21) ; 21,21(C-19) ; 21,41 (C-27) ; et 21,96 ppm (C-19).
- ✓ 2 carbones oléfiniques dont un CH et un quaternaire résonant à δ_C 123,86 ppm (C-6) et 143,95 ppm (C-5) respectivement.
- ✓ 1 carbone oxyméthine à 80,60 ppm (C-3). Sa valeur du déplacement chimique vers les champs faibles en comparaison avec le même carbone du β -sitostérol (71,8 ppm) indique qu'il est le point de branchement de la génine avec l'unité osidique.



Spectre IV.88: Spectre RMN ^{13}C étalé (100 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du mélange

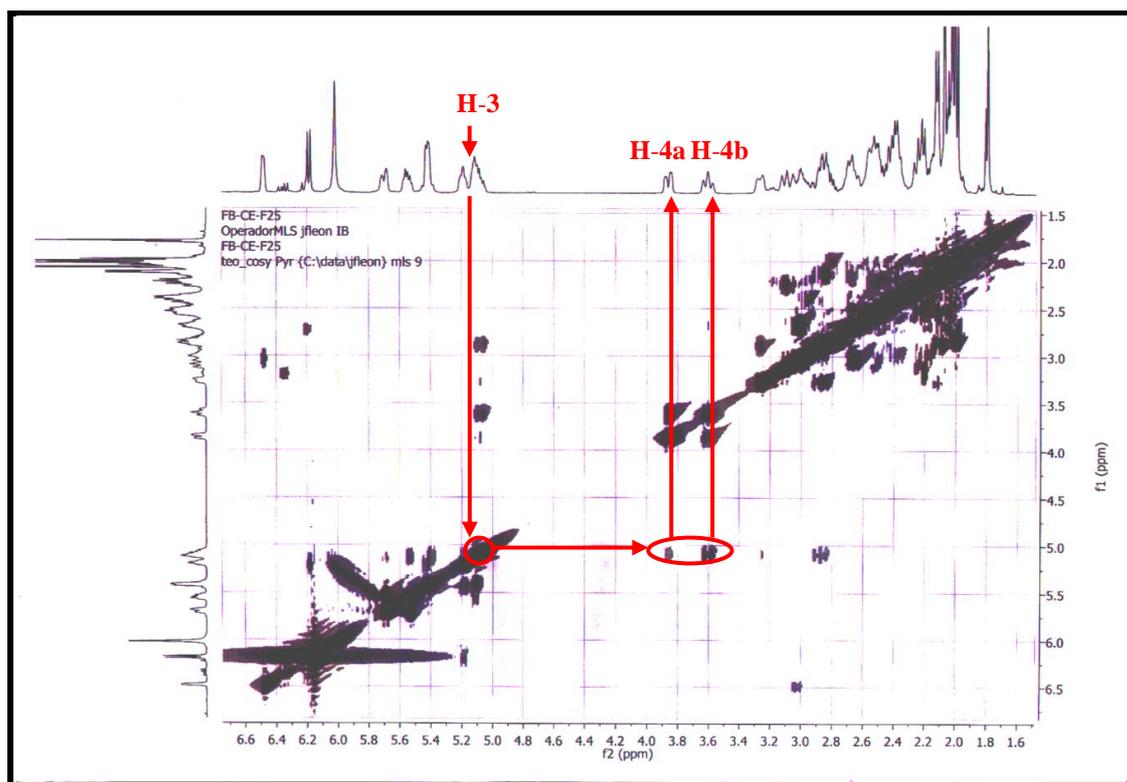
C14



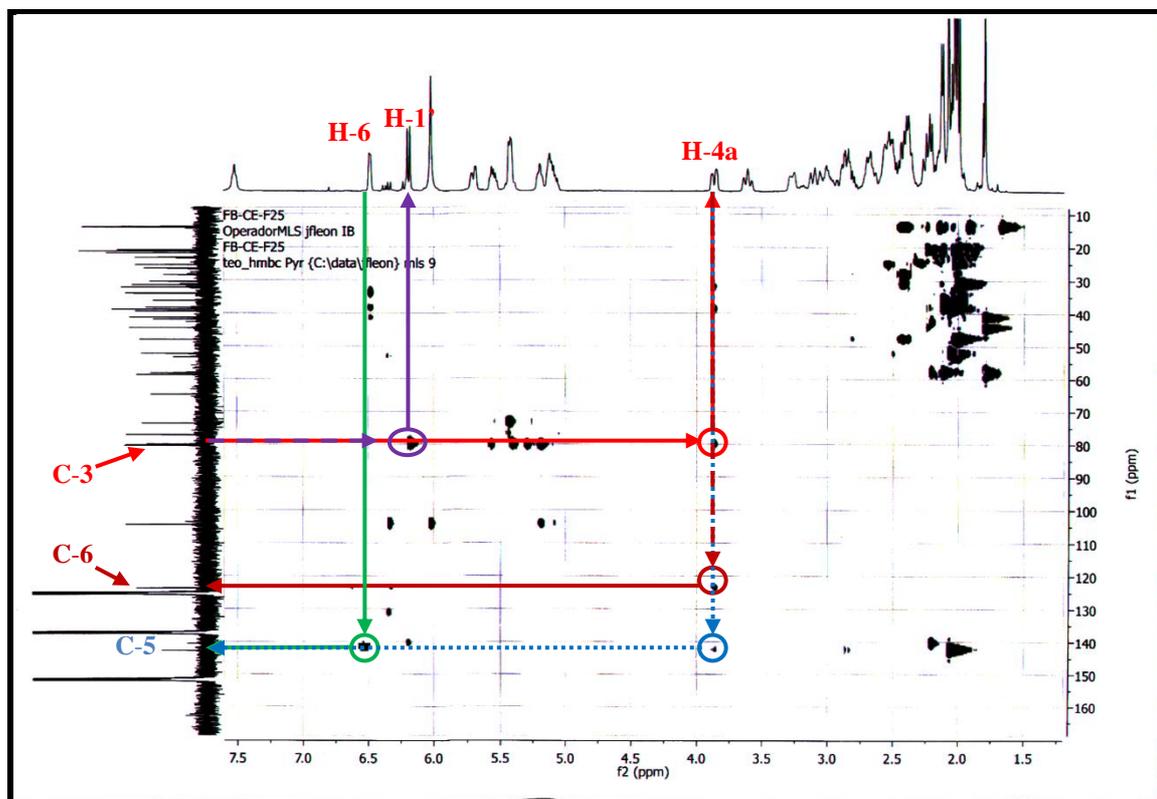
Spectre IV.89 : Spectre DEPT 135° étalé (100 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du composé

C14

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.90), H-6 montre une tache de corrélation avec un carbone éthylénique quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 143,95$) attribuable alors à la position C-5 d'un stérol. Sur le spectre COSY (Spectre IV.87-2), H-3 montre des taches de corrélation avec les deux protons d'un groupement méthylène ($\delta_{\text{H}} = 2,72$ ppm, *dd*, $J = 11,3 ; 2,4$ Hz) et ($\delta_{\text{H}} = 2,45$ ppm, *t*, $J = 11,3$ Hz) ($\delta_{\text{C}} = 38,47$ ppm) attribuables aux proton H-4a et H-4b respectivement, car sur le spectre HMBC (Spectre IV.90) les carbone C-3, C-5 et C-6 montrent des taches de corrélations nettes avec H-4a.



Spectre IV.87-2 : Spectre COSY (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du composé C14



Spectre IV.90 : Spectre HMBC (400 MHz, pyridine- d_5 , δ ppm) du composé C14

Cette observation confirme l'idée d'un stérol et éloigne définitivement celle d'un triterpène. Une analyse approfondie des spectres RMN de ce composé montre la présence de deux doublets de doublets sur le spectre proton dont un malheureusement partiellement recouvert par le signal du proton anomérique. Le premier à δ_H 5,27 ppm ($J = 15,2 ; 8,7$ Hz) et le second à δ_H 4,98 ppm ($J = 15,2 ; 8,8$ Hz). Les valeurs de leurs déplacements chimiques indiquent qu'ils sont éthyléniques. D'après le spectre COSY, ces deux protons couplent entre eux ; Ils sont donc vicinaux. La valeur de leur constante de couplage indique une configuration *trans* de cette double liaison. L'interaction de couplage de ces deux protons montre qu'ils couplent avec un autre proton chacun de son côté. Les signaux des carbones porteurs de ces deux protons éthyléniques sont détectés grâce à l'étude du spectre HMBC qui montrent une tache de corrélation du proton résonant à δ_H 5,27 ppm avec le carbone dont le signal n'est pas détecté et devrait être vers δ_C 131 ppm et une tache de corrélation du proton résonant à δ_H 4,98 ppm avec le carbone à δ_C 140,10 ppm. La présence de ces corrélations indique que le proton résonant à δ_H 5,27 ppm est porté par le carbone résonant à δ_C 140,10 ppm et que le proton résonant à δ_H 4,98 ppm est porté par le carbone résonant vers δ_C 131 ppm.

Ces données sont caractéristiques des positions C-22 et C-23 respectivement, de la chaîne latérale en C-17 du stigmastérol, qui est ici glucosylé en C-3. Sur le spectre proton, l'intégration totale des signaux des protons H-23 et H-1' donne une intensité de 1,32 contre 1,03 pour H-6 seul. Cette observation indique que l'intégrale de H-23 n'est pas égale à celle de H-6 et donc ce composé n'est pas le stigmastérol seul, mais un mélange stigmastérol et son correspondant C-22–C-23 dihydrogéné, le β -sitostérol. Il faut noter que les deux entités β -sitostérol et stigmastérol sont toutes les deux glucosylées car l'intégrale du signal d'un proton du sucre est à peu près égale à celle par exemple de H-6 ou de H-4a qui caractérisent en fait les deux génines.

Il est connu en effet, que dans ces deux molécules les protons H-6 et même les autres protons respectifs admettent des déplacements chimiques très proches. Un calcul mené sur les intégrales des signaux de ces protons indique que nous sommes en présence d'un mélange 72% et 28% de β -sitostérol 3-*O*- β -glucopyranoside (daucostérol) et de stigmastérol 3-*O*- β -glucopyranoside. La présence d'un mélange de deux produits dans cet échantillon était attendue vu le dédoublement des signaux de plusieurs atomes de carbone.

La position de l'entité sucre en C-3 des deux aglycones est confirmée le spectre HMBC (Spectre IV.90) où l'on relève une tache de corrélation entre le carbone anomérique C-1' et le proton H-3.

A l'issue de ces résultats spectraux et de la comparaison avec les données de la littérature [23] le mélange **C14** est identifié comme le **daucostérol** et le **stigmastérol 3-O-β-glucopyranoside** (72 - 28%) (Figure IV.51) [24]. Des mélanges de ce type ont antérieurement isolés de nombreuses espèces végétales.

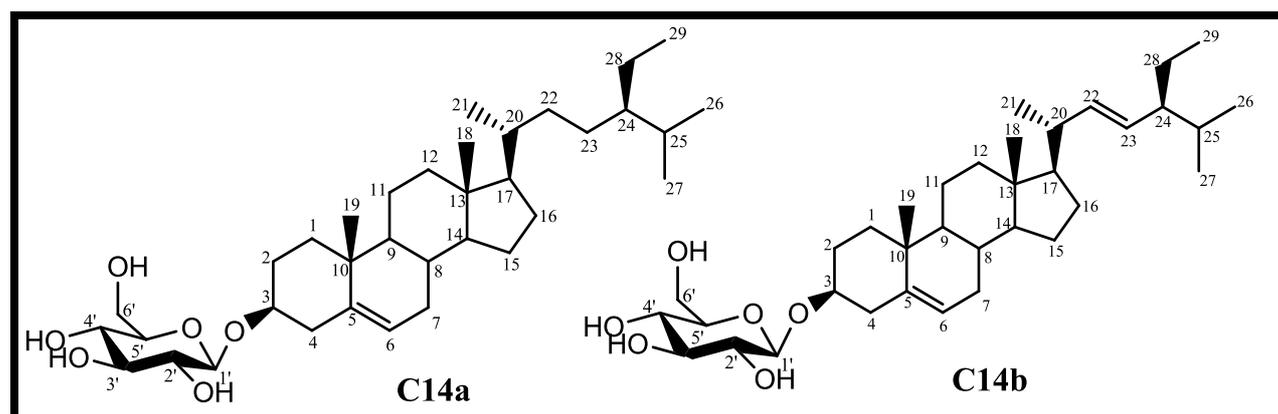


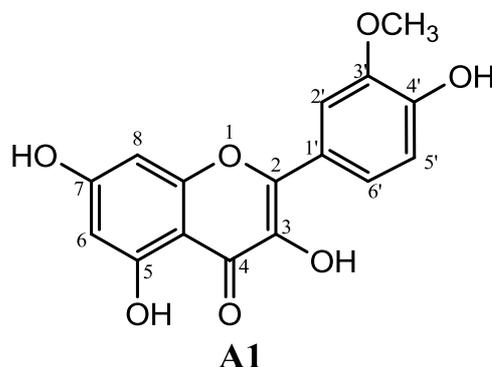
Figure IV.51 : daucostérol C14a et stigmastérol 3-O-β-glucopyranoside C14b

IV-A-15- Conclusion

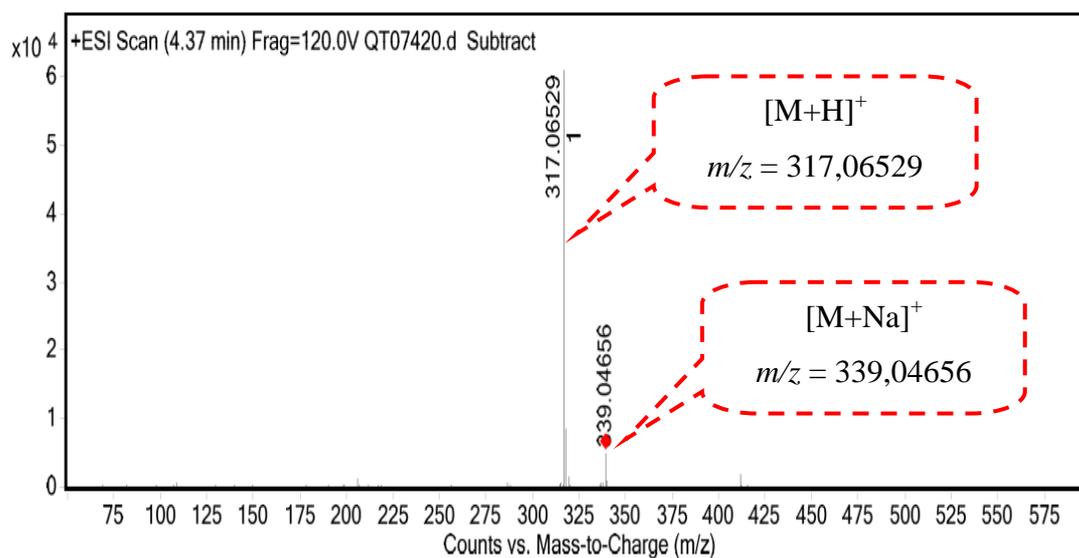
L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait chloroforme des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a conduit à l'isolement et l'identification de 14 produits dont 4 nouveaux, il s'agit de : mélange de β-sitosterol et stigmastérol (50-50%) (**C1**), xanthotoxine (**C2**), phellopterine (**C3**), vanilline (**C4**), xanthotoxol (**C5**), (R)-pituranthosine A (**C6**), (R,S)-pituranthosine B (**C7**), R-(+)-marmine (**C8**), (R)-(+)-héraclénine (**C9**), (S)-(-)-pituranthosine C (**C10**), R-(+)-byakangelicol (**C11**), R-(+)-byakangélicine (**C12**), pituranthosine D (**C13**), et mélange de daucostérol et stigmastérol 3-O-β-glucopyranoside (72-28%) (**C14**).

IV-B- Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle

IV-B-1- Elucidation structurale du composé A1



Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) obtenu pour le produit **A1** (Spectre IV.91 et Tableau IV.20), donne les ions adduits $[M+H]^+$ à $m/z = 317,06529$ correspondant à la formule $C_{16}H_{13}O_7$ et $[M+Na]^+$ à $m/z = 339,04656$ correspondant à la formule $C_{16}H_{12}O_7Na$, permettant de déduire une formule brute $C_{16}H_{12}O_7$ pour cette molécule ayant une masse de 316 Da, et contenant onze insaturations.



Spectre IV.91 : Spectre HR-ESI-MS du composé A1

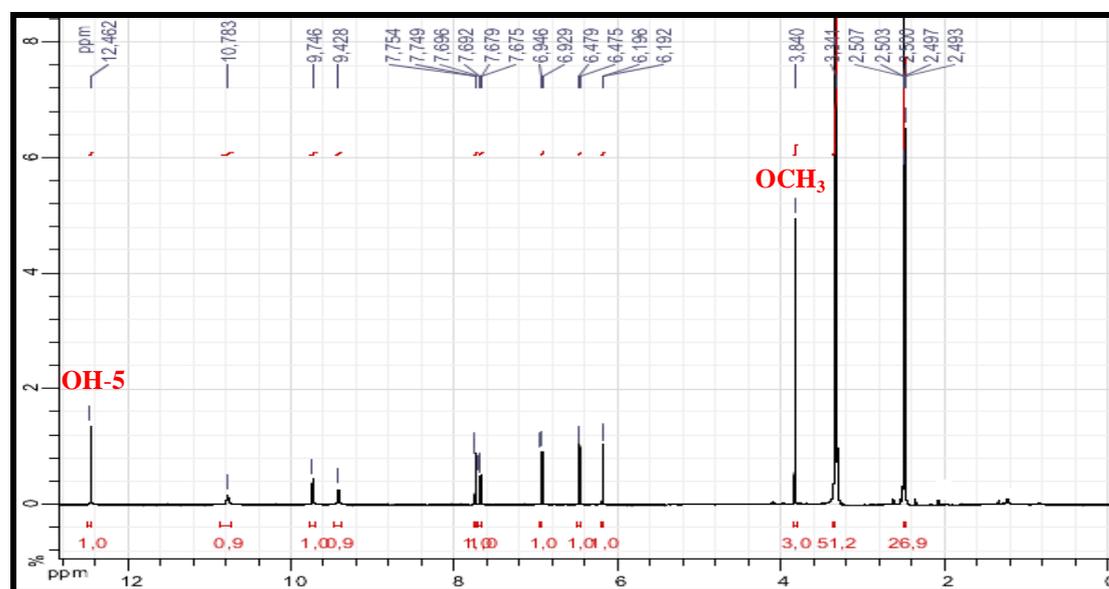
Tableau IV.20 : Données du spectre HR-ESIMS du composé A1

m/z	z	Abund	Formula	Ion
317.06529	1	62866.3	$C_{16}H_{13}O_7$	$(M+H)^+$
318.06788	1	8497.8	$C_{16}H_{13}O_7$	$(M+H)^+$
339.04656		4879.2	$C_{16}H_{12}NaO_7$	$(M+Na)^+$

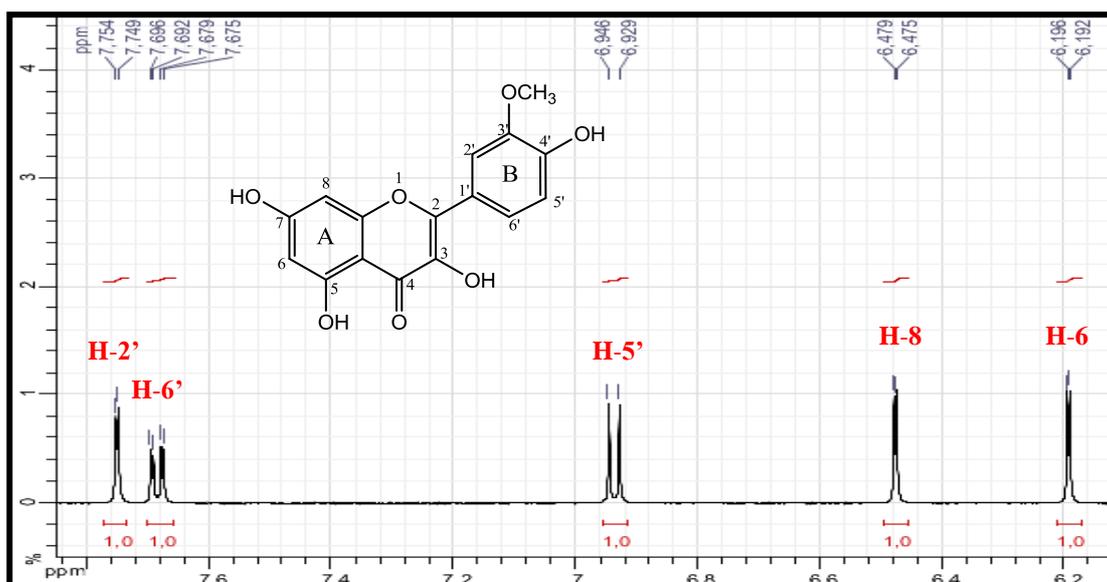
La fluorescence jaune de ce produit sous la lumière de Wood (365 nm) est caractéristique d'un flavonol (3-OH libre).

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.92-1) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ ainsi que son spectre étalé (Spectre IV.92-2) montre :

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12,46$ ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- ✓ Une tri-substitution du noyau B déduite de l'existence d'un doublet dédoublé ($J = 8,5 ; 2,2$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,69$ ppm et deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7,75$ ($J = 2,2$ Hz) et $6,94$ ppm ($J = 8,5$ Hz), attribuables aux protons H-6', H-2' et H-5' respectivement.
- ✓ Une substitution du noyau A en position 7 déduite de la présence du OH-5 et deux doublets d'intégration 1H chacun avec la même constante de couplage ($J = 2,1$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6,47$ et $6,19$ ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.
- ✓ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,84$ ppm, attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle.

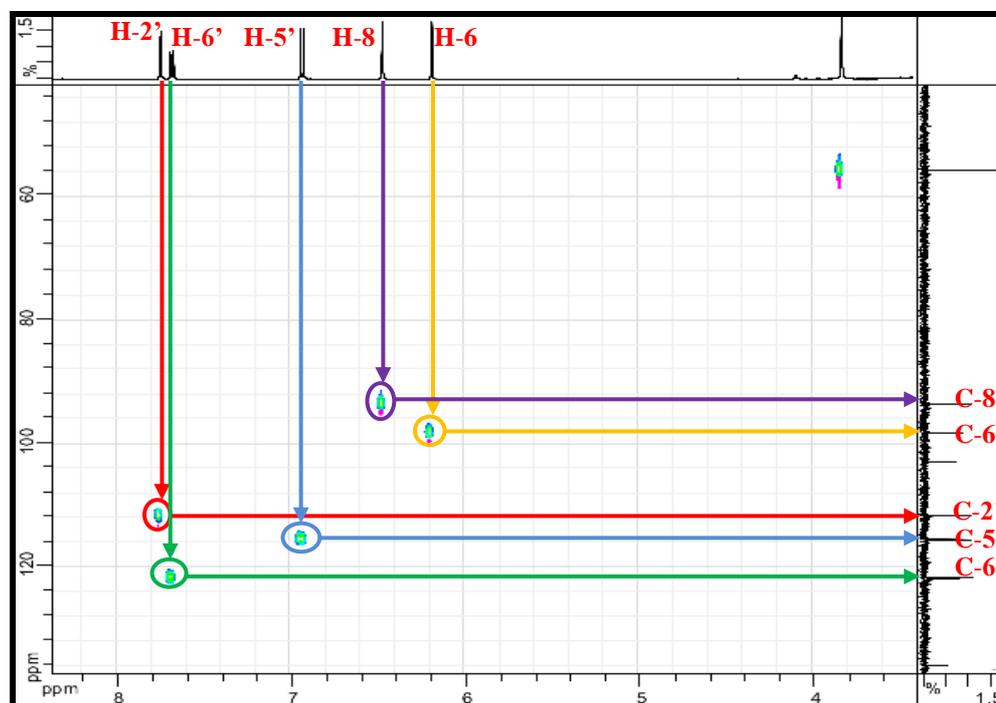


Spectre IV.92-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A1



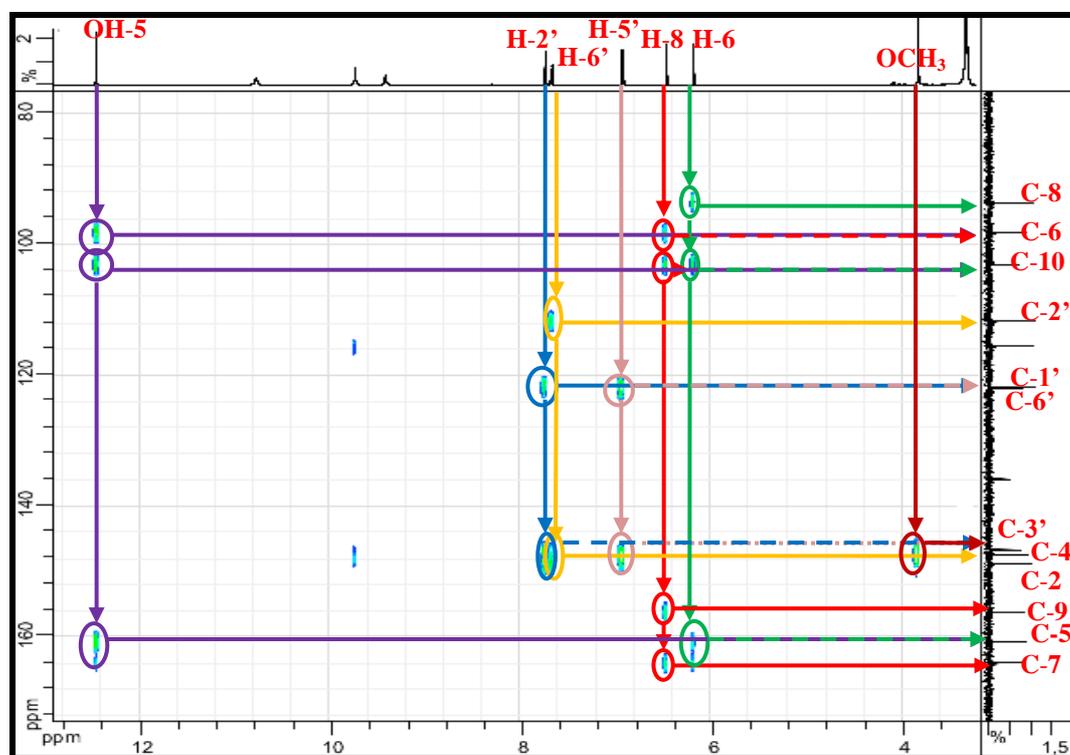
Spectre IV.92-2 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A1, étalement

L'examen du spectre HSQC (Spectre IV.93) permet de localiser C-2' à $\delta_{\text{C}} = 111,66$ ppm ; C-6' à $\delta_{\text{C}} = 121,67$ ppm ; C-5' à $\delta_{\text{C}} = 115,50$ ppm ; C-8 à $\delta_{\text{C}} = 93,56$ ppm et C-6 à $\delta_{\text{C}} = 98,17$ ppm.



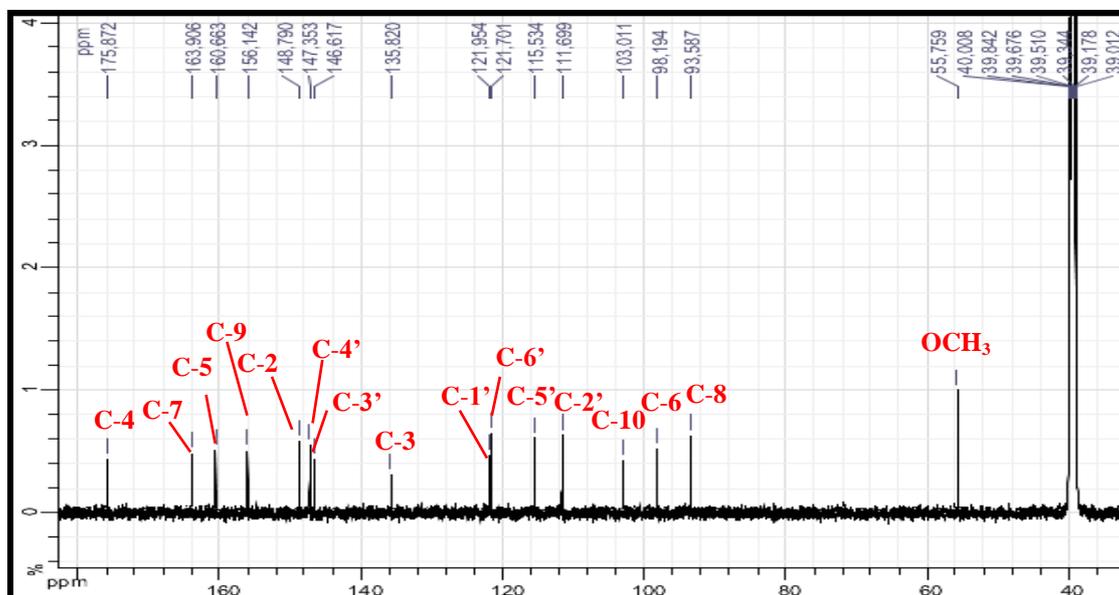
Spectre IV.93 : Spectre HSQC (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A1, étalement

L'examen du spectre HMBC (Spectre IV.94) montre une tache de corrélation du proton H-8 avec le carbone quaternaire oxygéné résonant à $\delta_C = 163,90$ ppm, permettant son attribution au C-7. Le même proton montre une tache de corrélation avec le carbone résonant à $\delta_C = 98,19$ ppm confirmant ainsi l'attribution du C-6 lequel corrèle également avec le proton du OH-5. Le proton H-8 montre une autre tache de corrélation avec le carbone oxygéné résonant à $\delta_C = 156,14$ ppm permettant ainsi son attribution à C-9. Par ailleurs le proton H-6 confirme l'attribution de C-8 à la résonance à $\delta_C = 93,58$ ppm et les deux protons H-6 et H-8 et le proton du OH-5 permettent l'attribution de C-10 à la résonance à $\delta_C = 103,01$ ppm. Par contre H-6 et le proton du OH-5 mènent sans ambiguïté à l'attribution du C-5 au signal à $\delta_C = 160,66$ ppm. De même les protons H-5', H-6' et H-2' mènent à la localisation du signal de C-2 à $\delta_C = 148,79$ ppm et les protons H-2' et H-5' mènent à la localisation du signal de C-1' à $\delta_C = 121,95$ ppm. Ces deux protons mènent également à l'attribution de C-4' à la résonance à $\delta_C = 147,35$. Le carbone C-3 est alors attribué au signal à $\delta_C = 135,82$ et le carbone C-3' au signal à $\delta_C = 146,61$ ppm car il corrèle à H-5' et H-2'. Ce dernier carbone C-3' montre une corrélation avec les protons du groupement OCH₃, cette observation permet de placer ce méthoxyle en cette position.

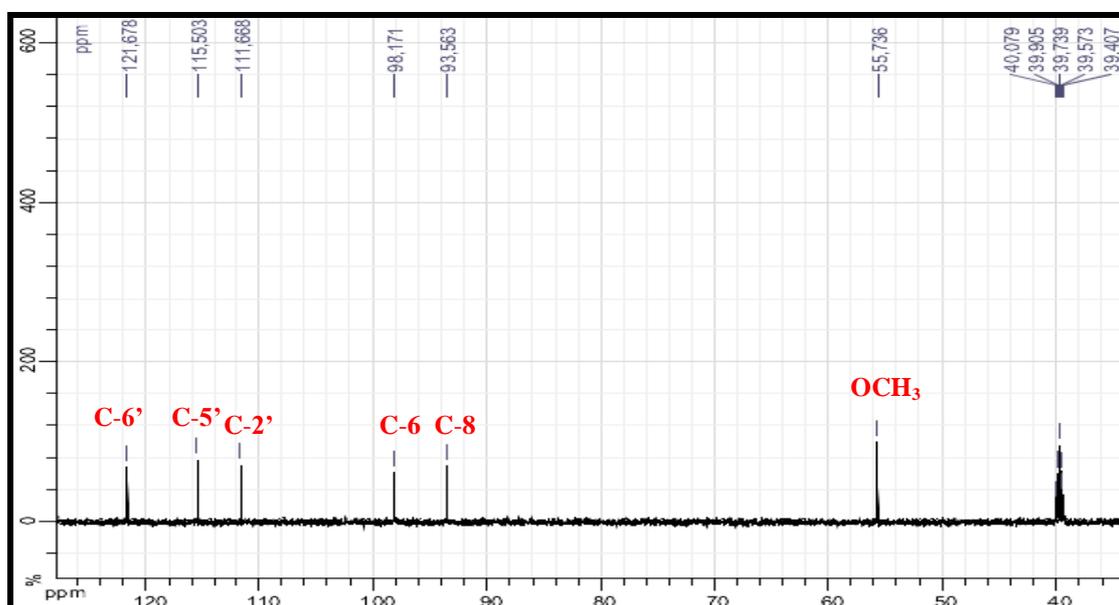


Spectre IV.94 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé **A1**

L'analyse des spectres RMN ^{13}C (Spectre IV.95) et DEPT 135° (Spectre IV.96) consolide ces propositions. En particulier, la résonance à δ_{C} 55,73 ppm attribuable au groupement méthoxyle, et la présence de dix carbones quaternaires et cinq groupements CH.

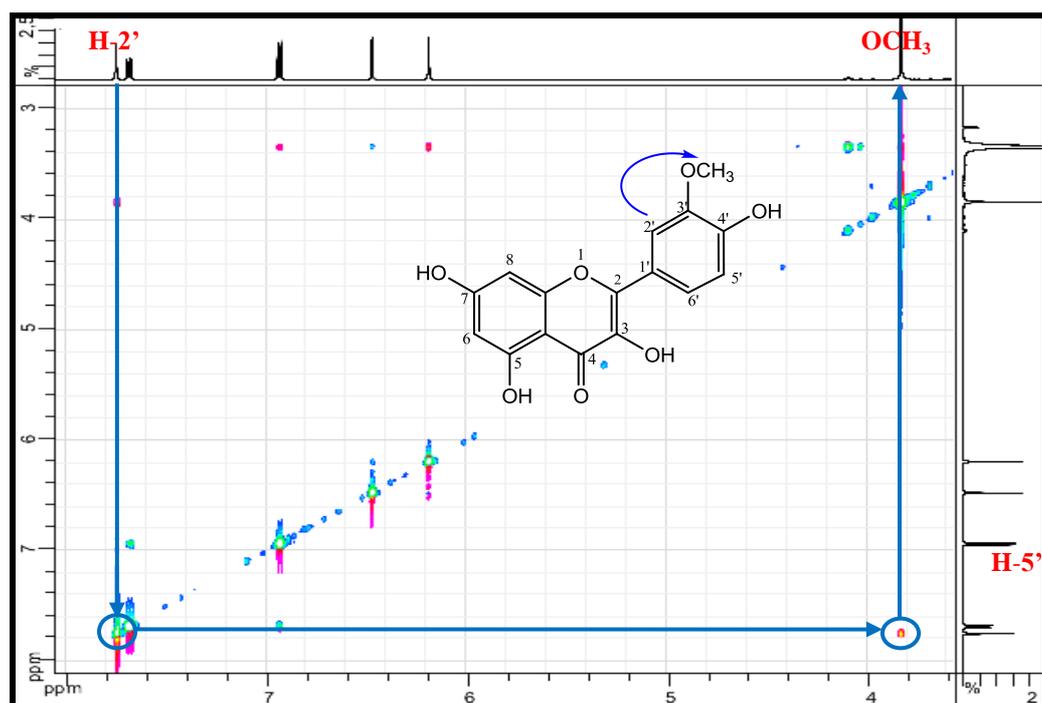


Spectre IV.95 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A1



Spectre IV.96 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A1

L'examen du spectre NOESY (Spectre IV.97) montre une corrélation NOE entre le proton H-2' avec les protons du groupement OCH₃ (δ_{H} = 3,84 ppm), confirmant ainsi la position de ce méthoxyle en C-3'.



Spectre IV.97 : Spectre NOESY (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A1**,
étalement

Ces données mènent à la structure : **5,7,4',3-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone** ou **quercétine 3'-methyl ether** connue sous le nom **isorhamnétine** [25] (Figure IV.52). Cette molécule est bien entendu signalée pour la première fois dans cette espèce.

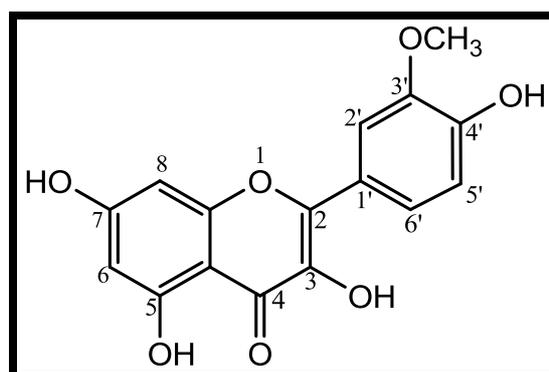


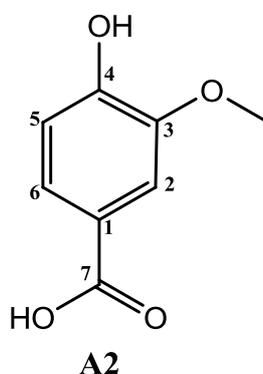
Figure IV.52 : Structure finale du composé **A1**, isorhamnétine

Les résultats de la RMN ^1H et RMN ^{13}C sont rassemblés dans le tableau IV.21.

Tableau IV.21 : Données de la RMN ^1H et ^{13}C du composé A1

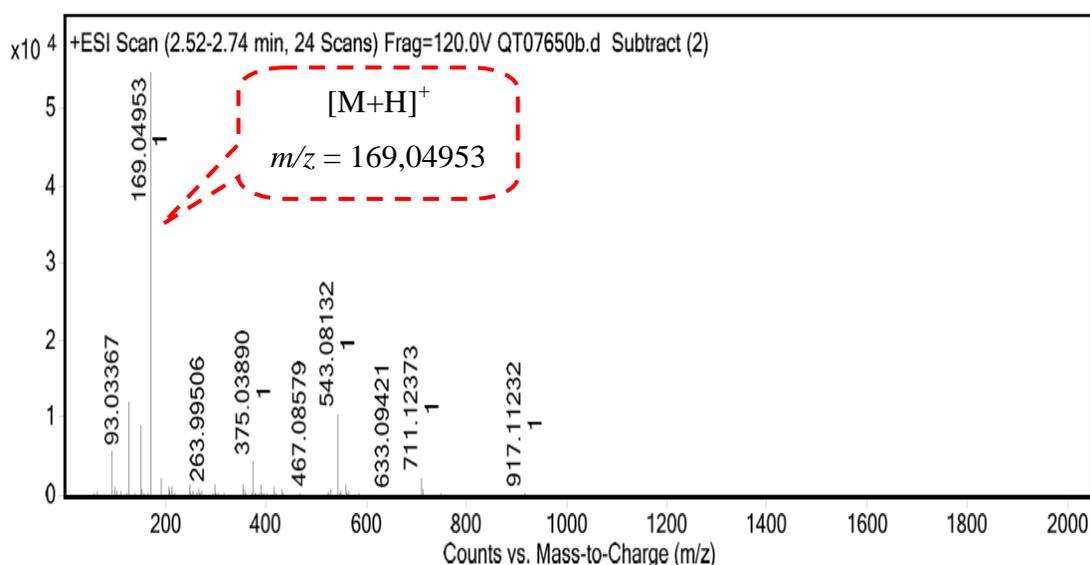
Position	^{13}C	^1H	Multiplicité (Hz)
2	148,79 (C)	-	-
3	135,82 (C)	-	-
4	175,87 (C)	-	-
5	160,66 (C)	-	-
6	98,19 (CH)	6,19	(d, 2,1)
7	163,90 (C)	-	-
8	93,58 (CH)	6,47	(d, 2,1)
9	156,14 (C)	-	-
10	103,01 (C)	-	-
1'	121,95 (C)	-	-
2'	111,69 (CH)	7,75	(d, 2,2)
3'	146,61 (C)	-	-
4'	147,35 (C)	-	-
5'	115,53 (CH)	6,94	(d, 8,3)
6'	121,70 (CH)	7,69	(dd, 8,5 ; 2,2)
OMe-3'	55,75 (CH ₃)	3,84	(s)
OH-5	-	12,46	(s)

IV-B-2- Elucidation structurale du composé A2



Le composé **A2** se présente sous la forme de cristaux beiges solubles dans l'acétone et le méthanol. Il est visible en UV 254 nm sur plaque CCM.

L'examen du spectre de masse à haute résolution (Spectre IV.98 et Tableau IV.22) ESI/MS en mode positif montre un pic à $m/z = 169,04953$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ correspondant à la formule $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4$ indiquant une molécule de formule brute $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ contenant cinq insaturations.

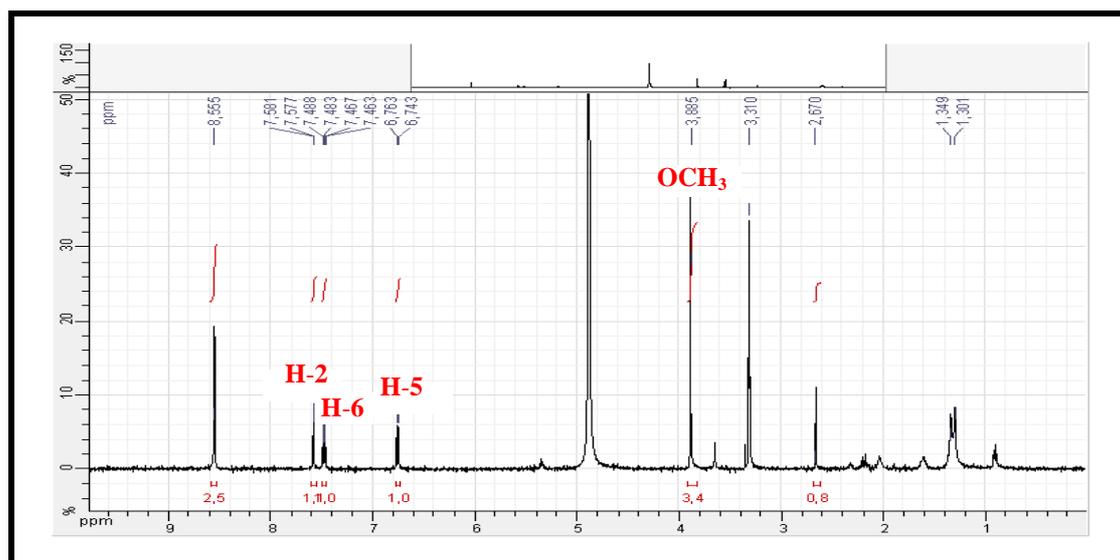


Spectre IV.98 : Spectre de masse ESI/MS (+) du composé A2

Tableau IV.22 : Données du spectre HR-ESIMS du composé A2

m/z	z	Abund	Formula	Ion
93.03367		5740.7		
125.05951	1	12530.7		
151.03878	1	9172.7		
169.04953	1	56929.2	C8 H9 O4	(M+H)+
170.05252	1	4004	C8 H9 O4	(M+H)+
191.03112		2301.1		
375.0389	1	4307.8		
543.08132	1	10536.5	C18 H23 O19	(M+H)+
544.08491	1	2503	C18 H23 O19	(M+H)+
711.12373	1	2348.8		

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.99) montre la présence d'un noyau aromatique trisubstitué dans les positions 1, 3 et 4. En effet, les trois protons de ce cycle aromatique résonnent sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,57$ ppm ($J = 2$ Hz), un autre doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,75$ ppm ($J = 8$ Hz) et un signal sous forme de doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 7,47$ ppm ($J = 8; 2$ Hz). Ce spectre montre également un singulet d'intégration de 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,88$ ppm correspondant à un groupement O-CH₃. Ces protons peuvent être attribués à H-2, H-5 et H-6.



Spectre IV.99 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A2**

Le spectre RMN ¹³C (Spectre IV.100) confirme la présence d'un signal relatif à un groupement OCH₃ à δ_C = 56,38 ppm et montre un carbonyle (C=O) résonant à δ_C = 170,67 ppm attribuable au carbonyle d'un acide du fait que, vu la formule brute (C₈H₉O₄) de cette molécule il doit être conjugué avec le noyau aromatique. Ce spectre montre également les six autres atomes de carbone attendus et résonant dans la zone des aromatiques confirmant ainsi la présence d'un cycle benzylique. De ces données, on peut déduire que cette molécule est un acide benzoïque substitué par le groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle.

Ces atomes de carbone du noyau aromatique peuvent être répartis comme suit :

- ✓ Trois groupements CH à δ_C 114,13 ; 115,25 et 124,25 ppm.
- ✓ Trois carbones quaternaires à δ_C 130,88 ; 148,17 et 150,02 ppm.

Il est clair d'après les valeurs des déplacement chimiques de ces trois carbones quaternaires que le groupement carboxyle est porté par celui résonant à δ_C 130,88 ppm, les deux substituants oxygénés sont portés les deux autres. Ces résultats sont typiques de structures de type acide vanillique ou acide isovanillique (Figure IV.53).

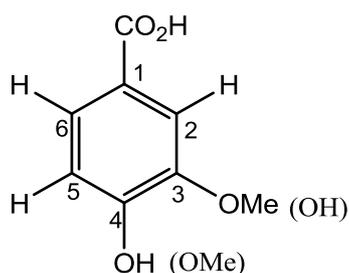
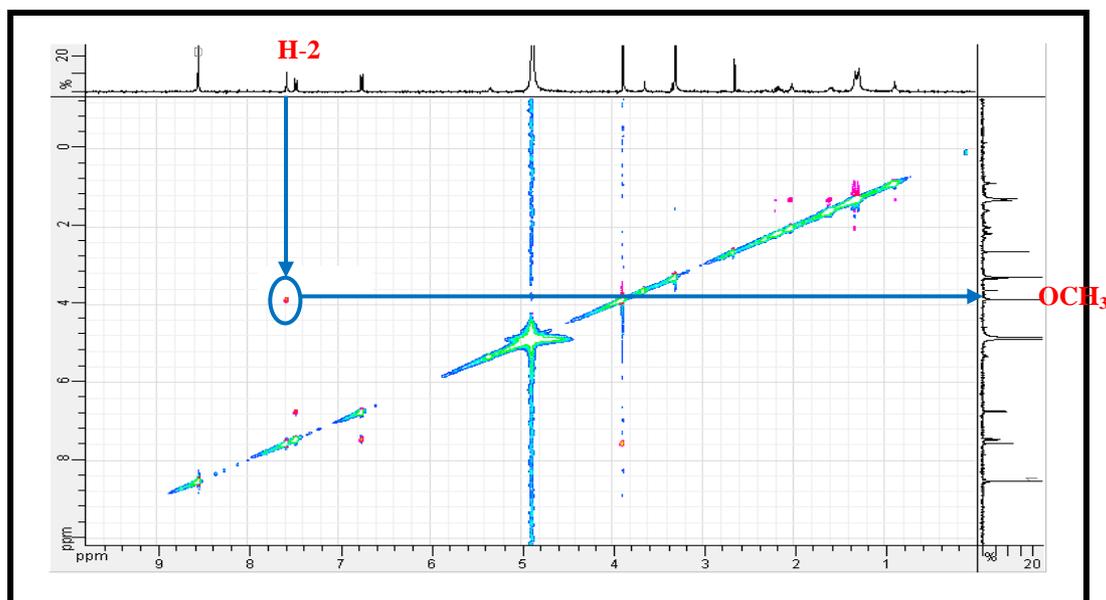


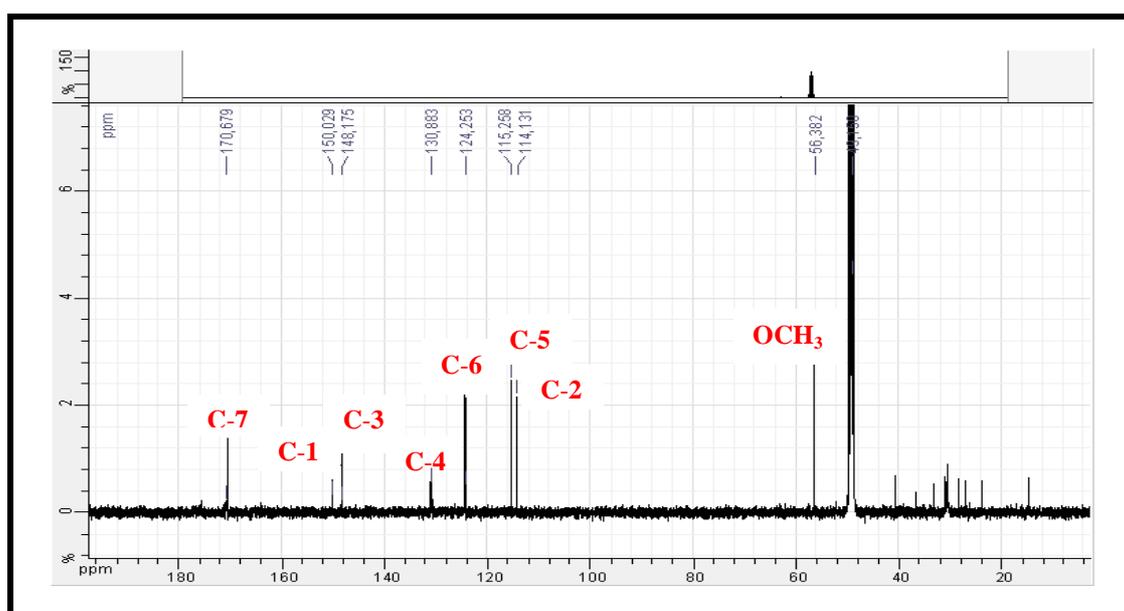
Figure IV.53 : Structure partielle du composé **A2**

Pour trancher entre les deux structures, nous avons examiné le spectre NOESY (Spectre IV.101), celui-ci montre une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le proton H-2 ($\delta_{\text{H}} = 7,58$ ppm), ceci indique que le méthoxyle est porté par le carbone C-3. En conséquence le groupement hydroxyle est placé sur le carbone C-4.



Spectre IV.101 : Spectre NOESY (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A2

Les données de RMN ^{13}C sont reportées sur le spectre IV.100.



Spectre IV.100 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A2

Toutes les données des spectres RMN de ce composé sont reportées dans le tableau IV.23.

Tableau IV.23 : Données de la RMN ^1H et ^{13}C du composé **A2**

Position	^{13}C	^1H	Multiplicité (Hz)
1	130,88 (C)	-	-
2	114,13 (CH)	7,57	(d, 2)
3	148,17 (C)	-	-
4	150,02 (C)	-	-
5	115,25 (CH)	6,75	(d, 8)
6	124,25 (CH)	7,47	(dd, 8 ; 2)
7	170,67 (C)	-	-
OMe-3	56,38 (CH ₃)	3,88	(s)

L'ensemble de ces données est en accord avec la littérature [26] et mène à l'**acide 4-hydroxy-3-methoxybenzoïque** connue sous le nom de l'**acide vanillique**.

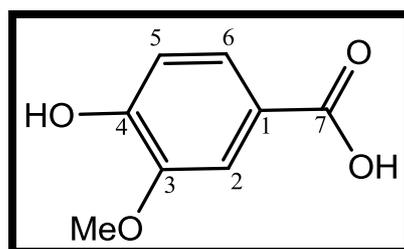
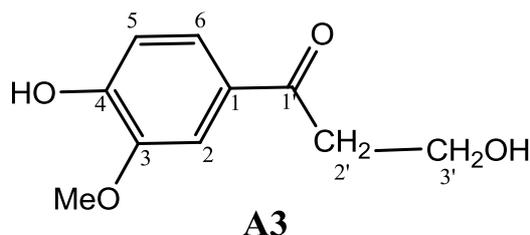


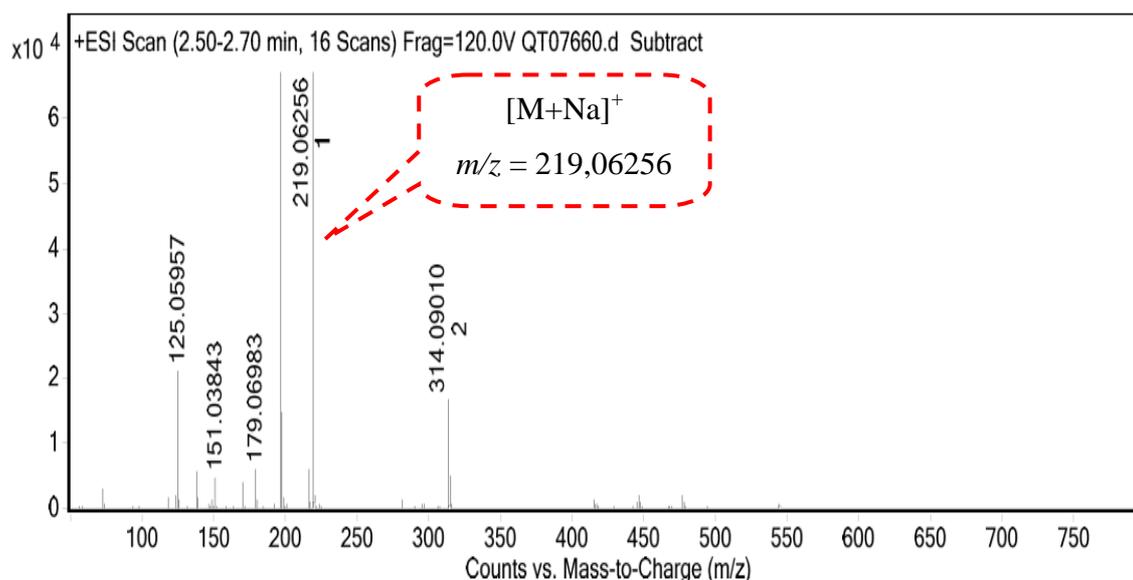
Figure IV.54 : Structure du composé **A2**, **Acide vanillique**

Ce composé a été identifié de *Melittis melissophyllum* par Skrzypczak-Pietraszek et al. [27] et isolé des racines de *Cynanchum paniculatum* par Weon et al. [28]. Il a été aussi obtenu par conversion de l'acide trans-férulique dans les cellules *Rhodotorula rubra* [29].

IV-B-3- Elucidation structurale du composé **A3**



L'examen du spectre de masse à haute résolution (Spectre IV.102 et Tableau IV.24) ESI-MS en mode positif montre des ions adduits à $m/z = 197,08057$ et $m/z = 219,06256$ correspondant à $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$. La recherche de la masse exacte donne $m/z = 196,07336$ en accord avec la formule brute $C_{10}H_{12}O_4$ (calculée pour $C_{10}H_{12}O_4$: 196,07356) orientant alors vers la formule brute $C_{10}H_{12}O_4$. Cette molécule doit donc contenir 5 insaturations.

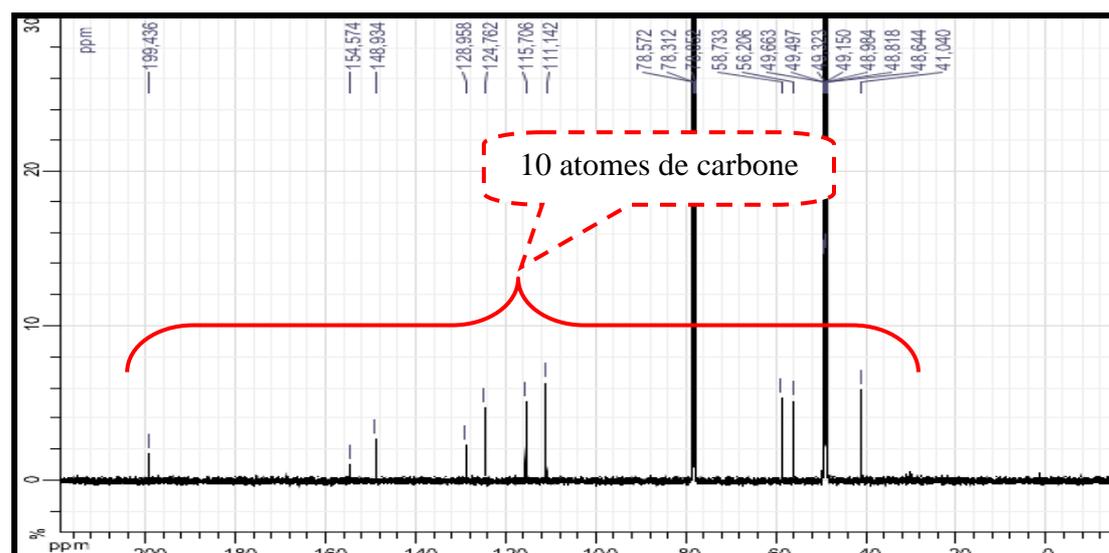


Spectre IV.102 : Spectre de masse ESI/MS (+) du composé **A3**

Tableau IV.24 : Données du spectre HR-ESIMS du composé **A3**

m/z	z	Abund	Formula	Ion
125.05957		21593.7		
138.53055		5627.3		
179.06983		5930.9		
197.08057	1	67396	$C_{10}H_{13}O_4$	$(M+H)^+$
198.08551	1	14936.7	$C_{10}H_{13}O_4$	$(M+H)^+$
216.05336		6136.7		
219.06256	1	67875.9	$C_{10}H_{12}NaO_4$	$(M+Na)^+$
220.06734	1	14984.1	$C_{10}H_{12}NaO_4$	$(M+Na)^+$
314.0901	2	16731.8		
314.59256	2	12752.3		

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.103-1), confirme la présence de 10 atomes de carbone.

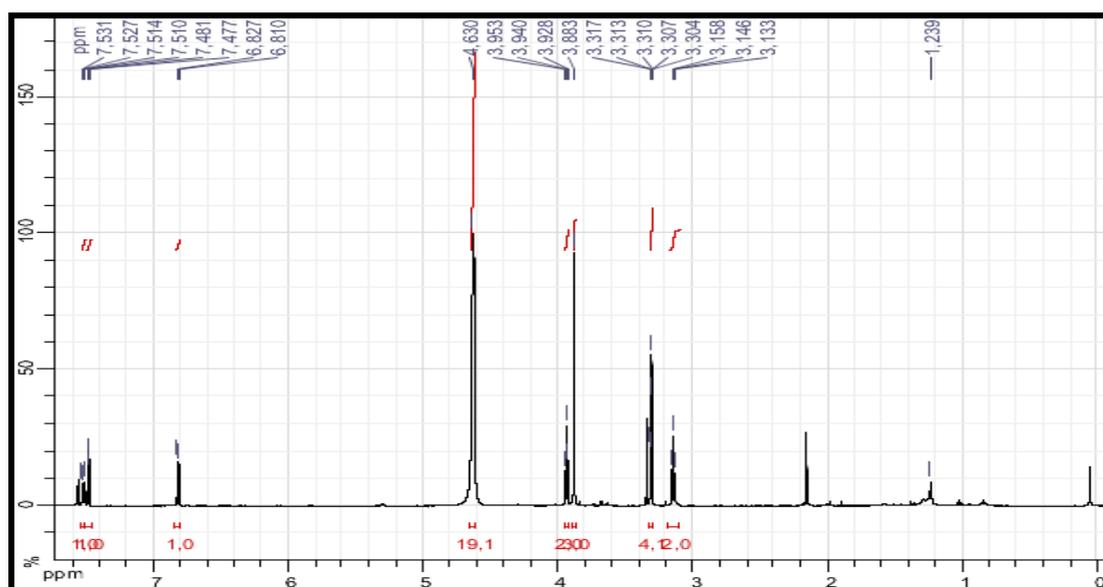


Spectre IV.103-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**

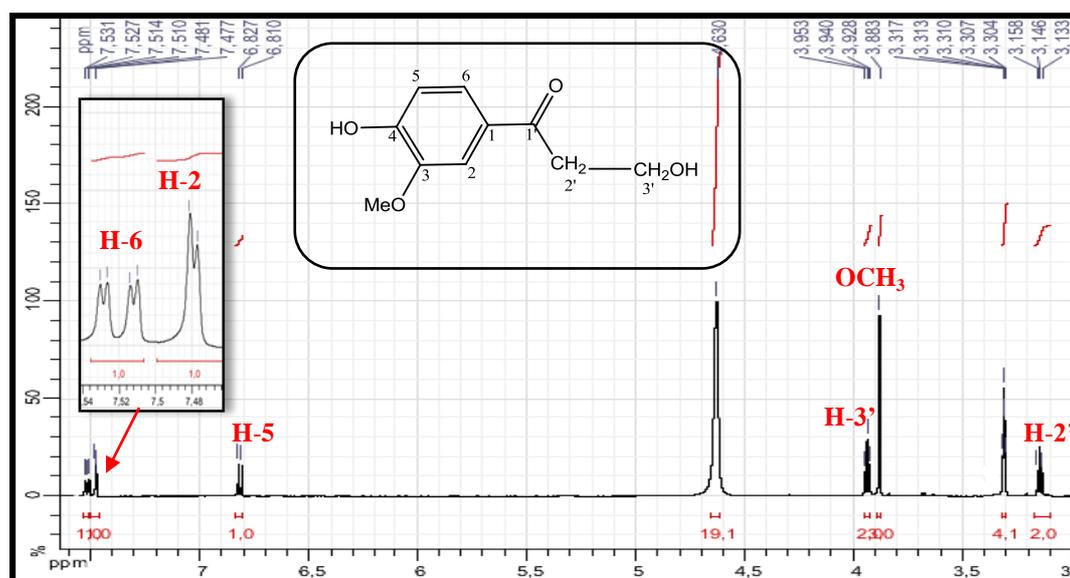
L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.104-1) et son étalement (Spectre IV.104-2) montre la présence d'un noyau aromatique trisubstitué dans les positions 1, 3 et 4. En effet, les trois protons de ce cycle aromatique résonnent sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,48$ ppm ($J = 2,2$ Hz) indiquant un couplage en méta (H-2), un autre doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,82$ ppm ($J = 8,3$ Hz) correspondant à H-5, et un signal sous forme de doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 7,53$ ppm ($J = 8,3 ; 2,2$ Hz) attribuable à H-6. Ce spectre montre également :

- ✓ Un singulet d'intégration de 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,88$ ppm correspondant à un groupement méthoxyle (OCH_3).
- ✓ Un triplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3,94$ ppm ($J = 6,1$ Hz) attribuable à un groupement CH_2 oxygéné.
- ✓ Un triplet d'intégration 2H à $\delta = 3,15$ ppm ($J = 6,1$ Hz) attribuable à un autre groupement CH_2 .

La multiplicité des deux derniers signaux oriente vers la présence d'un enchaînement $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ avec absence de noyaux couplants sur l'atome voisin du premier CH_2 .



Spectre IV.104-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3

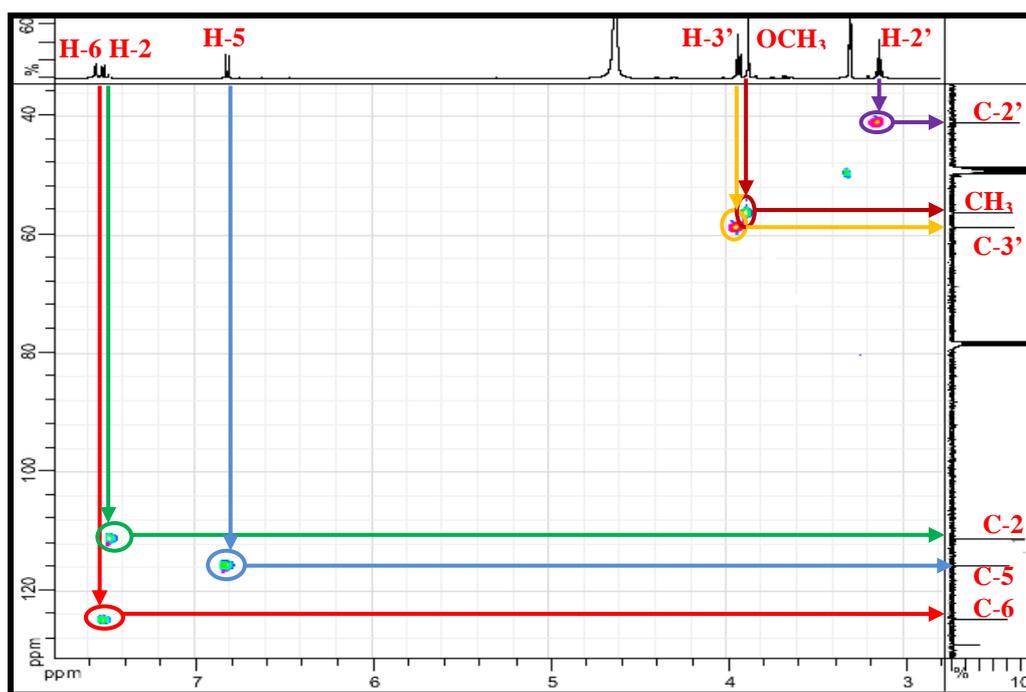


Spectre IV.104-2 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3
(Étalement)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre IV.105), permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

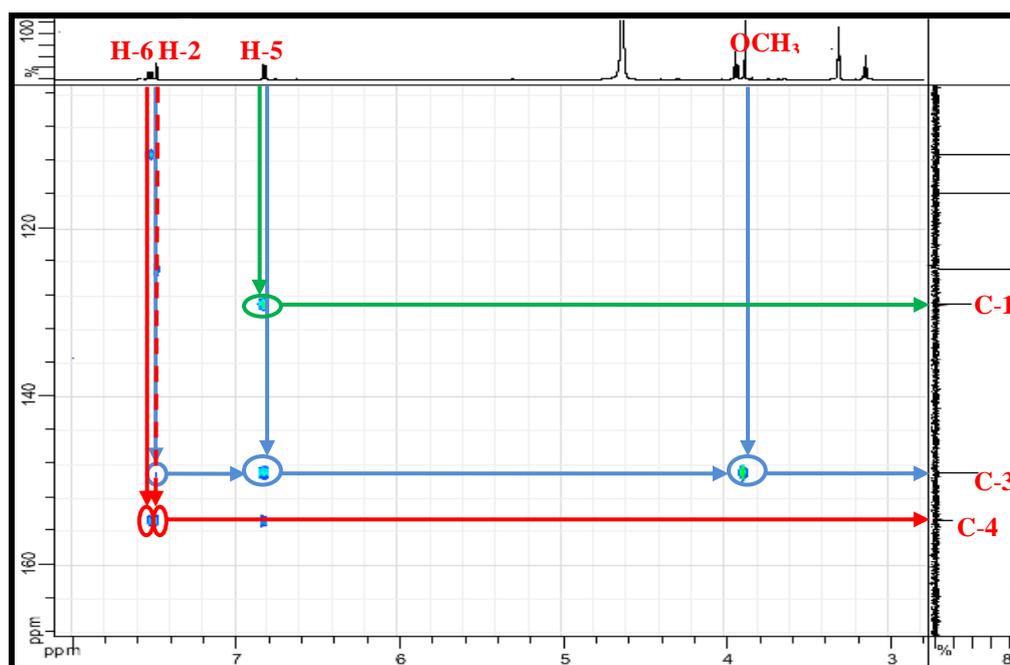
- ✓ Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 124,76$ ppm à l'atome de carbone C-6.
- ✓ Le H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 111,14$ ppm à l'atome de carbone C-2.
- ✓ Le H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 115,71$ ppm à l'atome de carbone C-5.

- ✓ Le groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,88$ ppm permet l'attribution de son atome de carbone au signal à $\delta_C = 56,21$ ppm.
- ✓ Le groupement CH_2 résonant à $\delta_H = 3,15$ ppm permet l'attribution de son atome de carbone au signal à $\delta_C = 41,04$ ppm.
- ✓ L'autre groupement CH_2 résonant à $\delta_H = 3,94$ ppm permet l'attribution de son atome de carbone au signal à $\delta = 58,73$ ppm.



Spectre IV.105 : Spectre HSQC étalé (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A3**

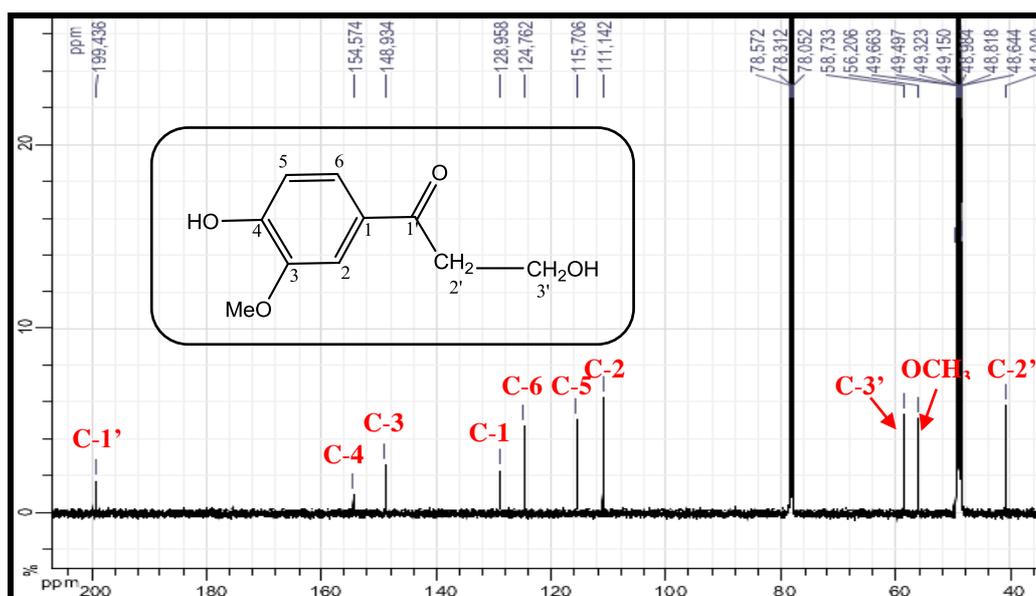
L'examen de spectre HMBC (Spectre IV.106-1) nous a permis d'observer que le groupement méthoxyle ainsi que le proton H-2 ont des connectivités avec le carbone à $\delta_C = 148,93$ ppm. Ce carbone corrèle également avec le proton H-5 ceci indique que le groupement méthoxyle est placé en position C-3. Les autres corrélations observées dans ce spectre confirment ces indications. De même, le proton H-5 montre une tache de corrélation avec l'atome de carbone à $\delta_C = 128,96$ ppm qui ne peut alors être attribué qu'au carbone C-1. Par ailleurs, les protons H-6 et H-2 corrélient avec le même atome de carbone résonant à $\delta = 154,57$ ppm, attribuable par conséquent au carbone C-4. La valeur du déplacement chimique de ce carbone C-4 impose une oxygénation de ce noyau.



Spectre IV.106-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé

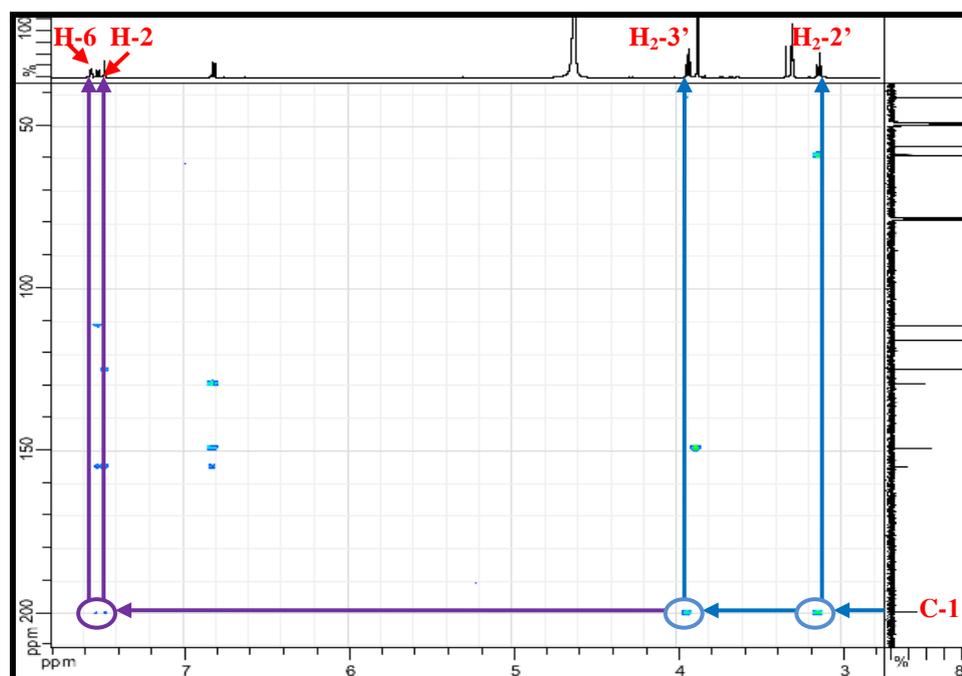
A3

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.103-2) permet de relever en plus des signaux des carbones invoqués, un signal à $\delta_{\text{C}} = 199,43$ attribuable à un carbonyle d'une cétone conjuguée, vu la formule brute et de cette molécule et le nombre d'insaturations qu'elle contient, il est évident que cette conjugaison ne peut avoir lieu qu'avec le noyau aromatique. De cette observation, on peut conclure que ce carbonyle appartient au substituant en C-1 et qu'il est directement lié à ce C-1. La valeur du déplacement chimique de C-1 étant en accord avec cette hypothèse, on peut donc lui attribuer la numérotation C-1'. Outre sa jonction avec le noyau aromatique, ce carbonyle qui est un carbonyle de cétone doit être lié à un autre atome de carbone ; cet atome de carbone ne peut être que celui du CH_2 résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,15$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 41,04$ ppm). Suite à cette analyse et vu la formule brute de cette molécule et le nombre d'insaturations qu'elle renferme, il apparaît clairement que le substituant en C-4 est un hydroxyle et que le CH_2 en β de la fonction cétone soit le carbone C-3', comporte également un groupement hydroxyle.



Spectre IV.103-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **A3** avec toutes les indications

L'emplacement de la fonction cétone entre le noyau aromatique et la chaîne hydrocarbonnée est bien confirmé par le spectre HMBC (Spectre IV.106-2) qui montre des corrélations entre le carbone du carbonyle et les protons H-2 et H-6 du noyau aromatique et également des corrélations de ce carbonyle et les protons des deux méthylènes de la chaîne.



Spectre IV.106-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé

A3

L'ensemble de ces données nous a conduits à la structure reportée dans la figure IV.55.

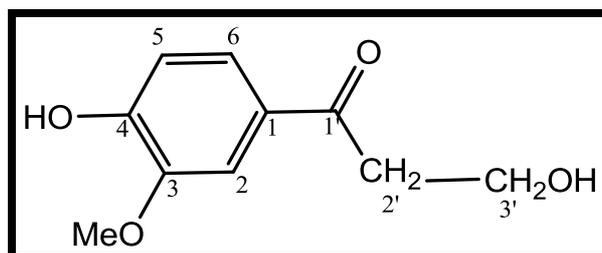


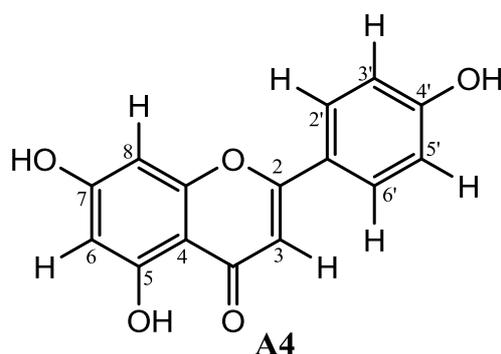
Figure IV.55 : Structure du composé A3, β -hydroxy propiovanillone [30]

Les données des spectres RMN sont reportées dans le tableau IV.25.

Tableau IV.25 : Données de la RMN ^1H et ^{13}C du composé A3

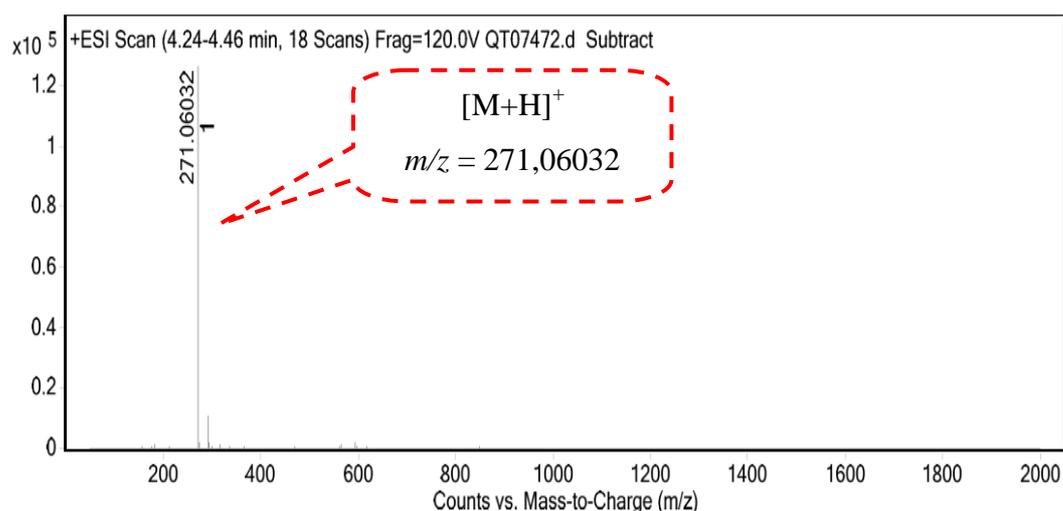
Position	^{13}C	^1H	Multiplicité (Hz)
1	128,96 (C)	-	-
2	111,14 (CH)	7,48	(d ; 2,2)
3	148,93 (C)	-	-
4	154,57 (C)	-	-
5	115,71 (CH)	6,82	(d ; 8,3)
6	124,76 (CH)	7,53	(dd ; 8,3 ; 2,2)
1'	199,44 (C)	-	-
OMe-3	56,21 (CH ₃)	3,88	(s)
2'	41,04 (CH ₂)	3,15	(t ; 6,1)
3'	58,73 (CH ₂)	3,94	(t ; 6,1)

IV-B-4- Elucidation structurale du composé A4



Déposé une petite feuille de papier Watman, ce composé montre une fluorescence violette sombre sous la lumière de Wood orientant vers une molécule flavone ou flavonol substitué en position C-3.

L'examen du spectre de masse à haute résolution (Spectre IV.107 et Tableau IV.26) ESI-MS en mode positif montre la présence d'ions adduits à $m/z = 271,06032$ et $m/z = 293,04178$ correspondant à $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$, respectivement et indiquant une formule brute $C_{15}H_{10}O_5$ pour cette molécule qui doit comporter 11 insaturations. Cette formule brute et ce nombre d'insaturations consolident l'idée d'un flavonoïde et en particulier celle d'une flavone aglycone trihydroxylée.



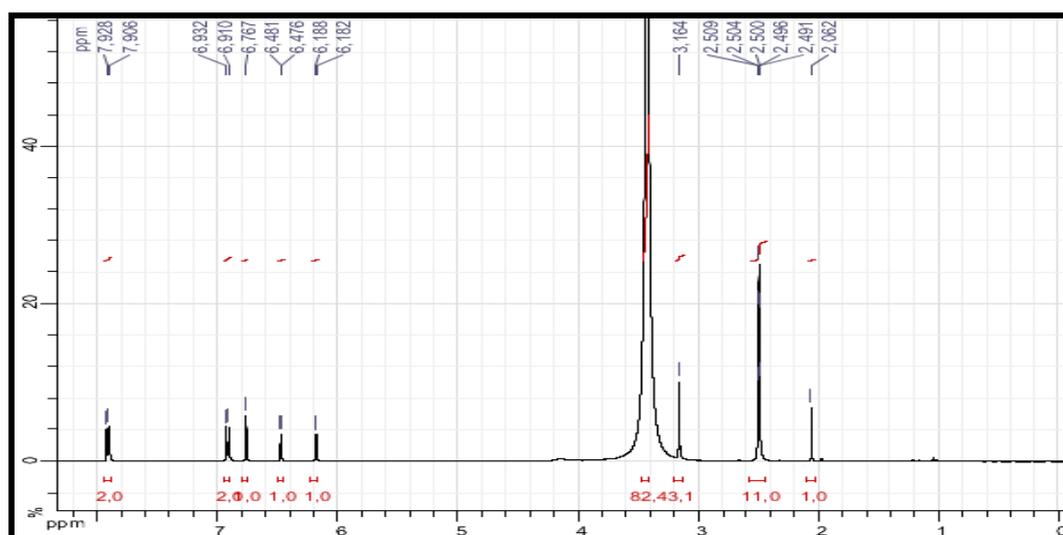
Spectre IV.107 : Spectre de masse ESI-MS (+) du composé **A4**

Tableau IV.26 : Données du spectre HR-ESI-MS du composé **A4**

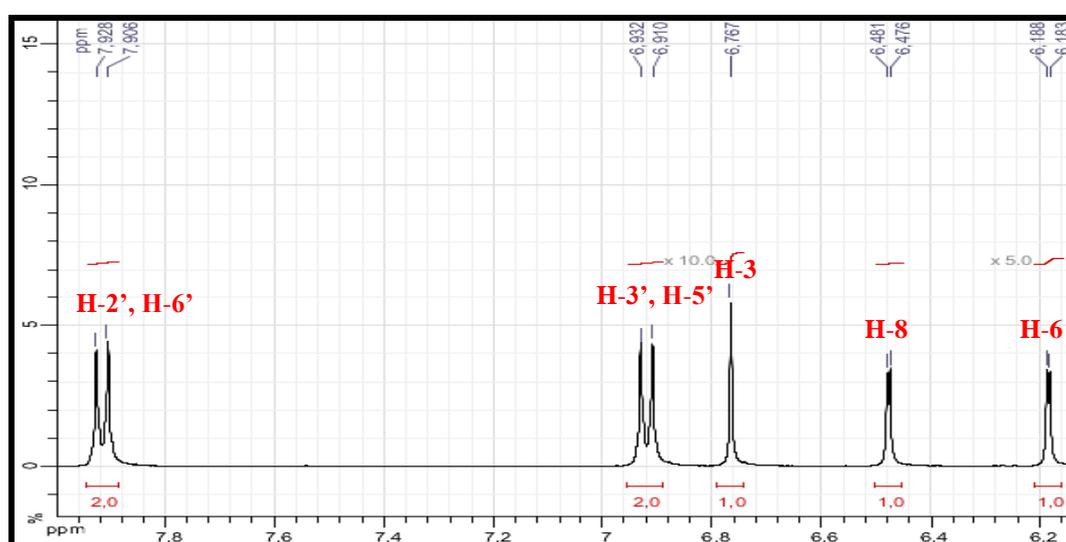
m/z	z	Abund	Formula	Ion
271.06032	1	130990.4	$C_{15}H_{11}O_5$	$(M+H)^+$
272.06327	1	16776	$C_{15}H_{11}O_5$	$(M+H)^+$
293.04178		11328.3		

L'examen du spectre RMN 1H étalée enregistré dans le DMSO- d_6 (Spectre IV.108-2) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavone que l'on peut identifier par :

- ✓ Une para substitution du noyau B (OR-4') déduite de l'existence à $\delta_H = 7,91$ ppm d'un doublet ($J = 8,8$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration à $\delta_H = 6,92$ ppm, attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,76$ ppm, attribuable à H-3.
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H formant un système AM ($J = 2$ Hz) à $\delta_H = 6,48$ et $\delta_H = 6,18$ ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.



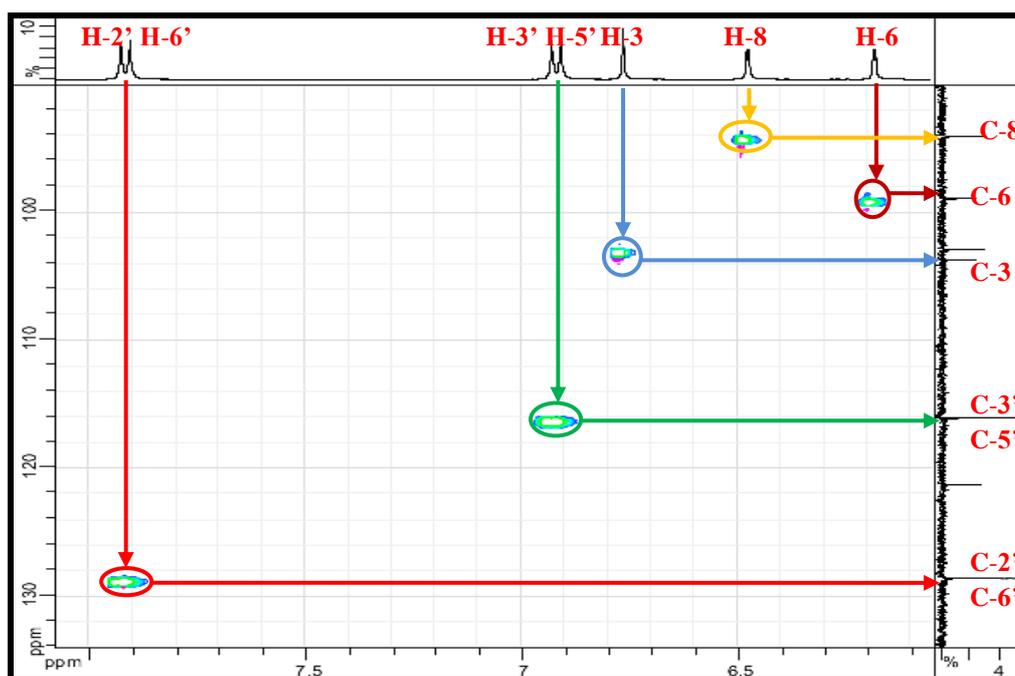
Spectre IV.108-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A4



Spectre IV.108-2 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) de A4, étalement

L'examen du spectre de l'expérience HSQC (Spectre IV.109) enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ montre la présence de taches de corrélation identifiées comme suit :

- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent une corrélation avec les carbones C-2' et C-6' à $\delta_{\text{C}} = 128,5$ ppm.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' montrent une corrélation avec les carbones C-3' et C-5' à $\delta_{\text{C}} = 116,1$ ppm.
- ✓ Les protons H-3, H-8 et H-6 corrélient avec les carbones C-3, C-8 et C-6 résonant à $\delta_{\text{C}} = 102,9 ; 94,1$ et $98,9$ ppm respectivement.

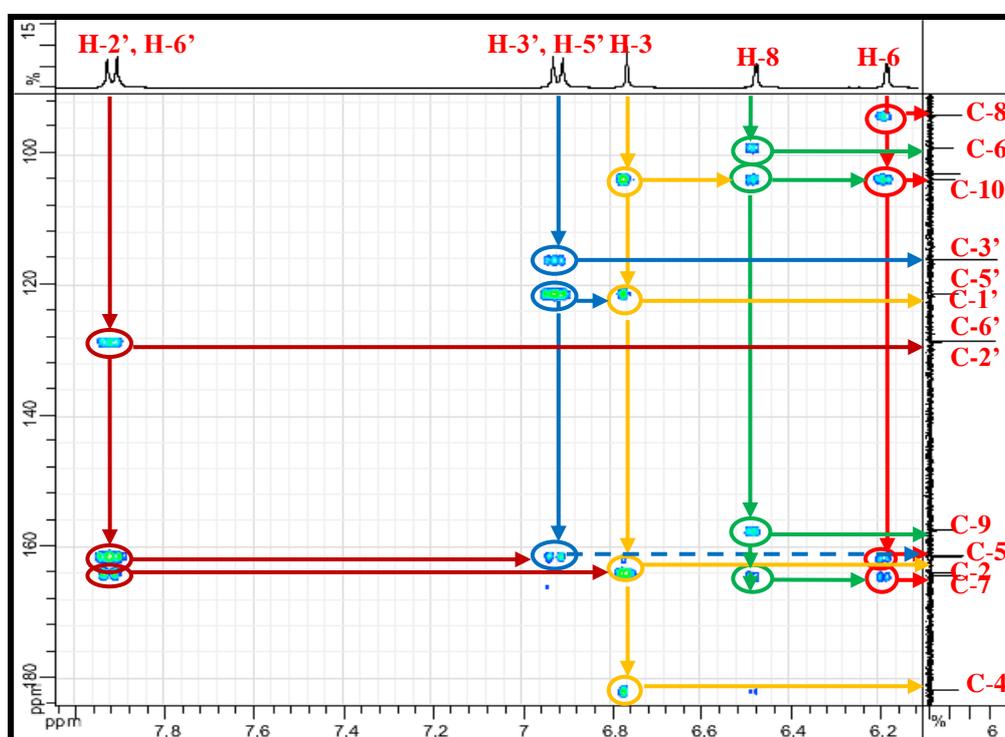


Spectre IV.109 : Spectre HSQC étalé (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé A4

L'examen du spectre de l'expérience HMBC (Spectre IV.110), enregistré dans le DMSO-*d*₆ montre la présence de taches de corrélation identifiées comme suit :

- ✓ Le proton H-6 montre quatre taches de corrélation :
 - La première est avec le carbone résonant à $\delta_C = 94,1$ ppm, attribuable à C-8.
 - La seconde est avec un carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 103,7$ ppm, ce dernier montre deux autres taches de corrélation avec les protons H-8 et H-3, donc ce carbone ne peut être que le C-10.
 - La troisième est avec le carbone résonant à $\delta_C = 161,5$ ppm, l'absence d'une corrélation de ce dernier avec le H-8, indique que ce carbone est le C-5.
 - La dernière est avec le carbone résonant à $\delta_C = 164,3$ ppm, attribuable à C-7.
- ✓ Le proton H-8 montre quatre taches de corrélation :
 - La première est avec le carbone C-6 à $\delta_C = 98,9$ ppm.
 - La seconde est avec le carbone C-10 à $\delta_C = 103,7$ ppm.
 - La troisième est avec un carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 157,4$ ppm, attribuable à C-9.
 - La dernière est avec le C-7 à $\delta_C = 164,3$ ppm.

- ✓ Le proton H-3 montre quatre taches de corrélation:
 - La première avec le C-10 à $\delta_C = 103,7$ ppm.
 - La seconde et la troisième sont avec deux carbones quaternaire résonant à $\delta_C = 121,2$ et $163,8$ ppm, attribuables aux carbones C-1' et C-2 respectivement.
 - La dernière est avec le carbone résonant à $\delta_C = 181,8$ ppm, qui ne peut être que le C-4.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' montrent trois tâches de corrélation :
 - la première représente des corrélations mutuelles entre H-3' et C-5' et entre H-5' et C-3'.
 - la seconde avec le C-1' à $\delta_C = 121,2$ ppm.
 - la troisième avec le C-4' à $\delta_C = 161,2$ ppm.
- ✓ Les protons H-2' et H-6' montrent trois tâches de corrélation :
 - la première représente des corrélations mutuelles entre H-2' et C-6' et entre H-6' et C-2'.
 - la seconde avec le C-4' à $\delta_C = 161,2$ ppm.
 - la dernière avec le C-2 à $\delta_C = 163,8$ ppm.



Spectre IV.110 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A4

Les données des spectres RMN sont reportées dans le tableau IV.27.

Tableau IV.27 : Résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du composé **A4**

position	δ_{H}	δ_{C}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	-	163,8	-	-	-
3	6,76	102,9	1H	<i>s</i>	-
4	-	181,8	-	-	-
5	-	161,5	-	-	-
6	6,18	98,9	1H	<i>d</i>	2
7	-	164,3	-	-	-
8	6,48	94,1	1H	<i>d</i>	2
9	-	157,4	-	-	-
10	-	103,7	-	-	-
1'	-	121,2	-	-	-
2'-6'	7,91	128,5	2H	<i>d</i>	8,8
3'-5'	6,92	116,1	2H	<i>d</i>	8,8
4'	-	161,2	-	-	-

Les données spectroscopiques de RMN 1D et 2D ainsi que celles de la spectrométrie de masse montrent que notre produit est une flavone et mène ainsi à la **4',5,7-trihydroxyflavone** connue sous le nom **apigénine** [31] (Figure IV.56).

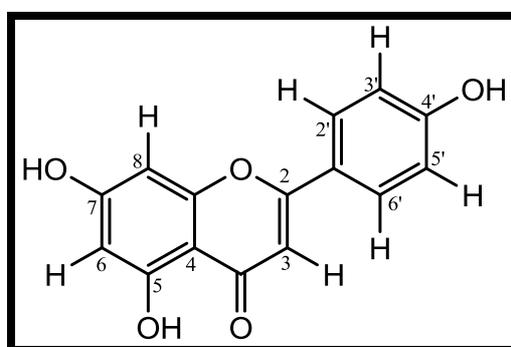
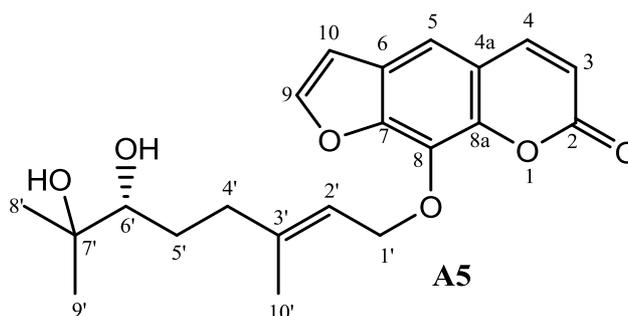
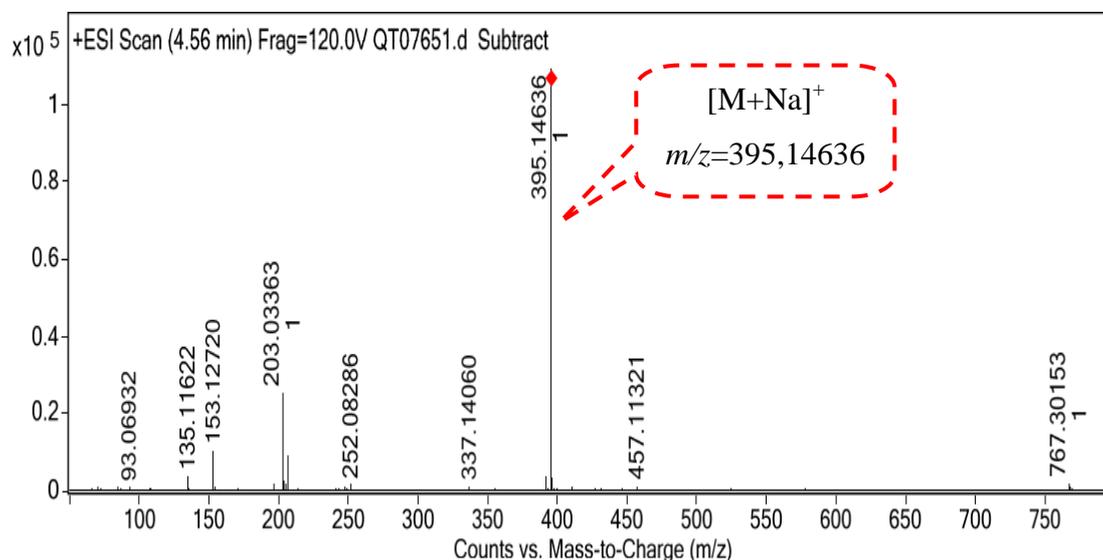


Figure IV.56 : Structure finale du composé **A4**, **apigénine**

IV-B-5- Elucidation structurale du composé **A5**



Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.111 et Tableau IV.28), montre un pic quasi-moléculaire à $m/z = 395,14636$ correspondant à la formule $C_{21}H_{24}O_6Na$ donnant une molécule de formule brute $C_{21}H_{24}O_6$ contenant dix insaturations.

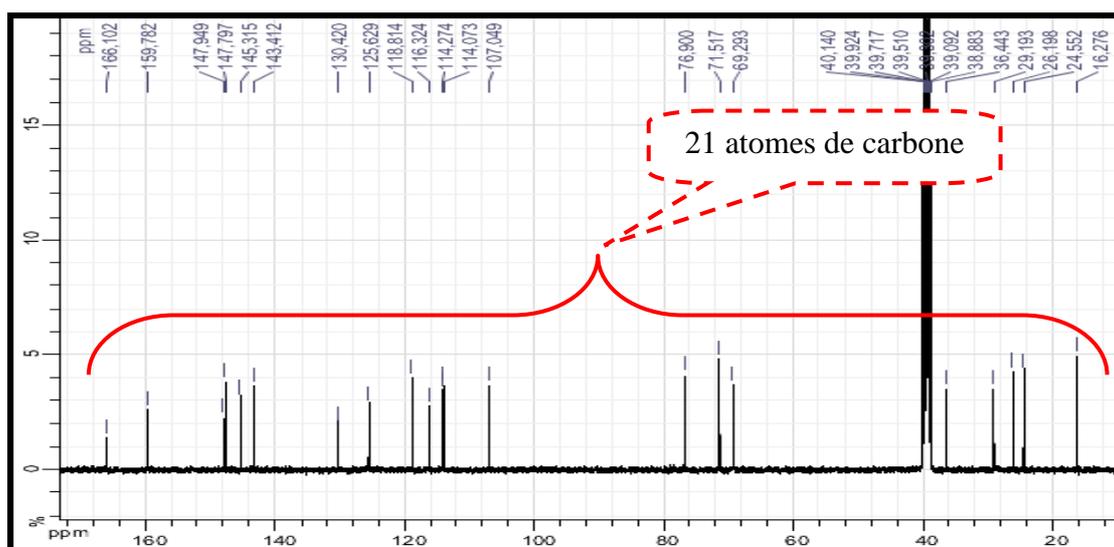


Spectre IV.111 : Données de la HR-ESI-MS du composé **A5**

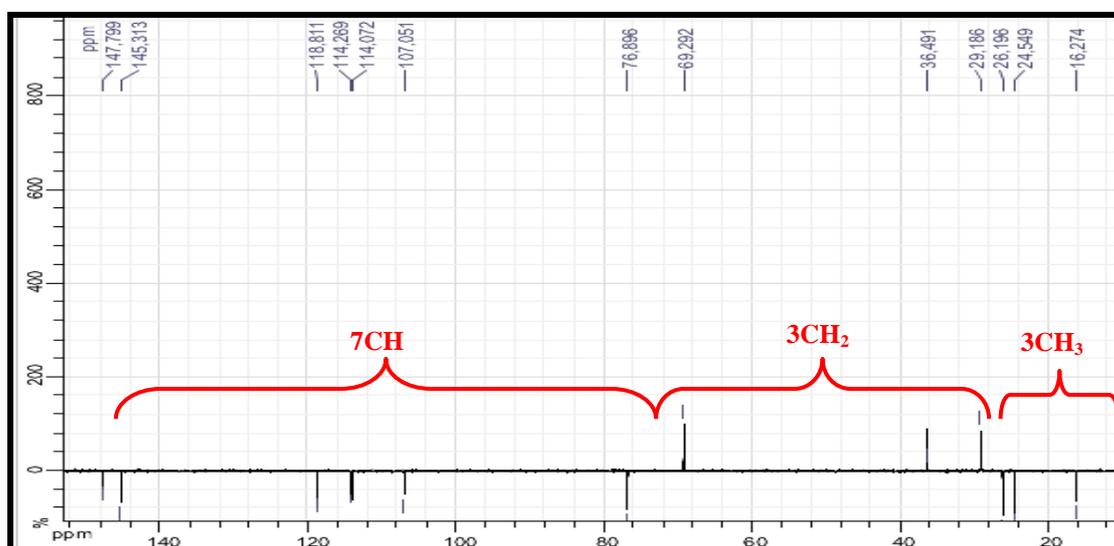
Tableau IV.28 : Données du spectre HR-ESIMS du composé **A5**

m/z	z	Abund	Formula	Ion
135.11622		3753.3		
153.1272		10362.8		
203.03363	1	25517.1	C11 H7 O4	(M+H)+
204.03731	1	2873.4	C11 H7 O4	(M+H)+
206.0588	2	9464		
392.13547	2	3977		
395.14636	1	109623.4	C21 H24 Na O6	(M+Na)+
395.23966		3197.4		
396.14961	1	19649.6	C21 H24 Na O6	(M+Na)+
397.1528	1	3113.4	C21 H24 Na O6	(M+Na)+

Les spectres de RMN ^{13}C (Spectre IV.112) et DEPT 135° (Spectre IV.113), confirment la présence de 21 atomes de carbone de cette molécule et permettent de les répartir en : $3CH_3$, $3CH_2$, $7CH$ et $8C_q$.

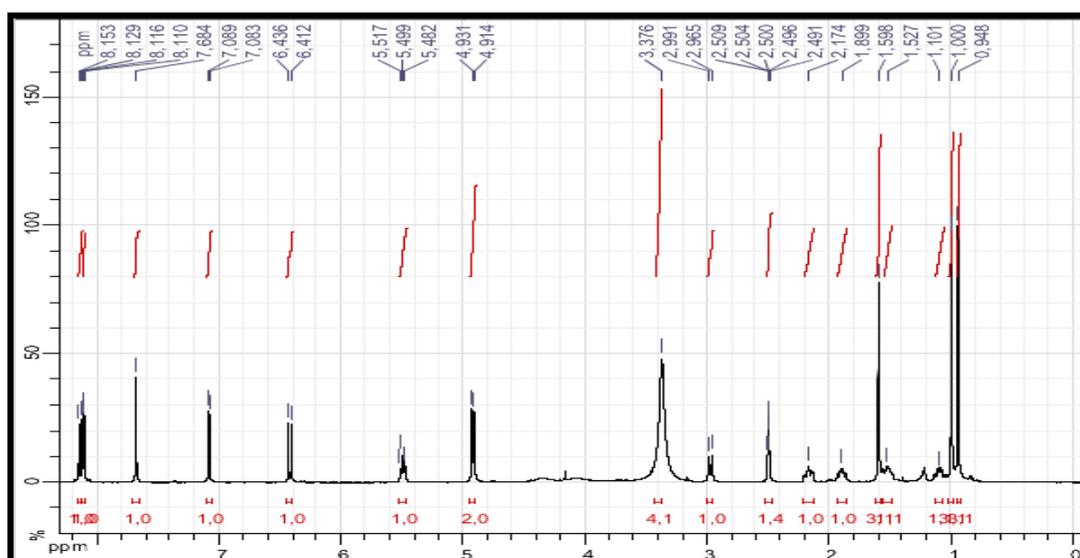


Spectre IV.112 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A5**

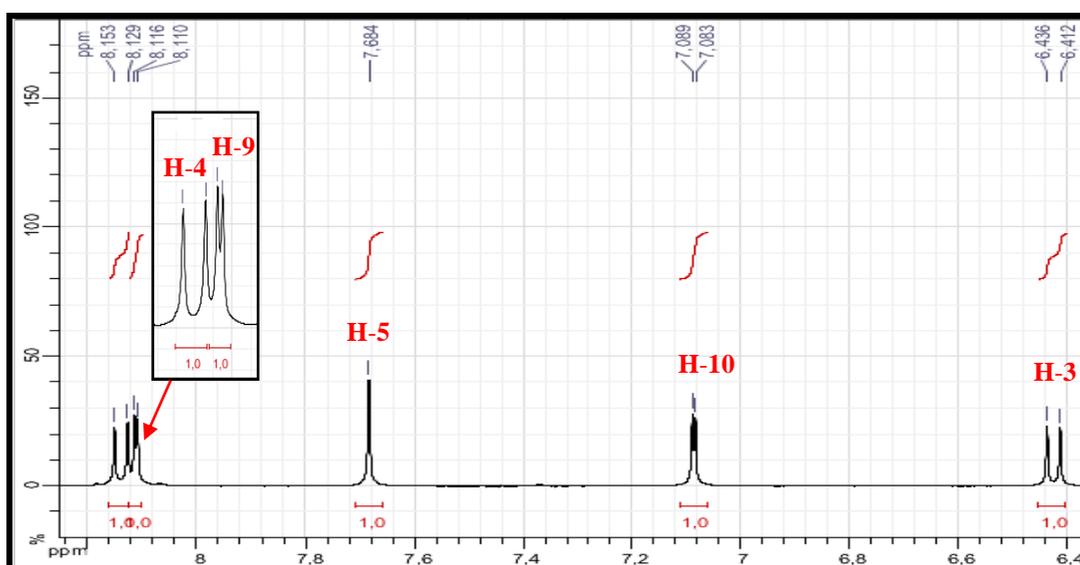


Spectre IV.113 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A5**

L'examen approfondi du spectre RMN ^1H (Spectre IV.114-2), montre des signaux caractéristiques d'une furocoumarine de type psoralène (Tableau IV.29) monosubstitué.

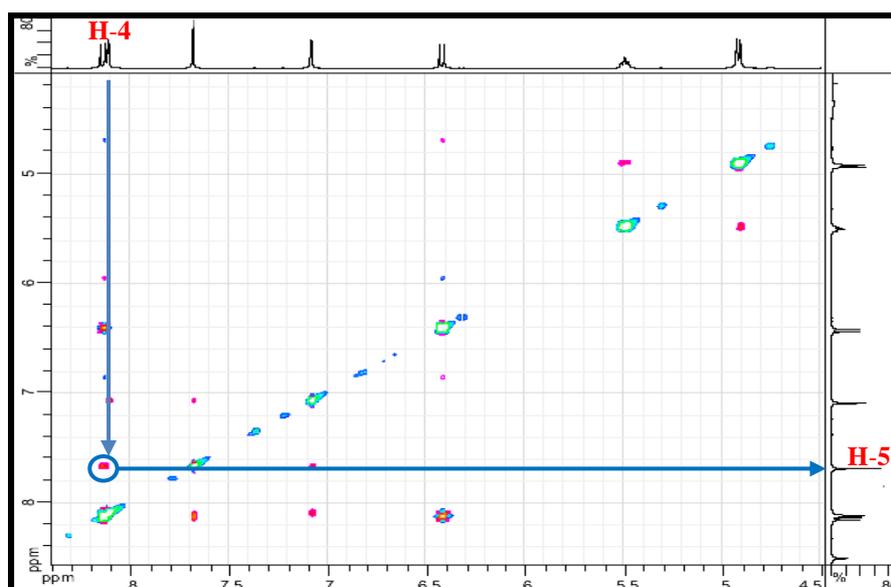


Spectre IV.114-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A5**



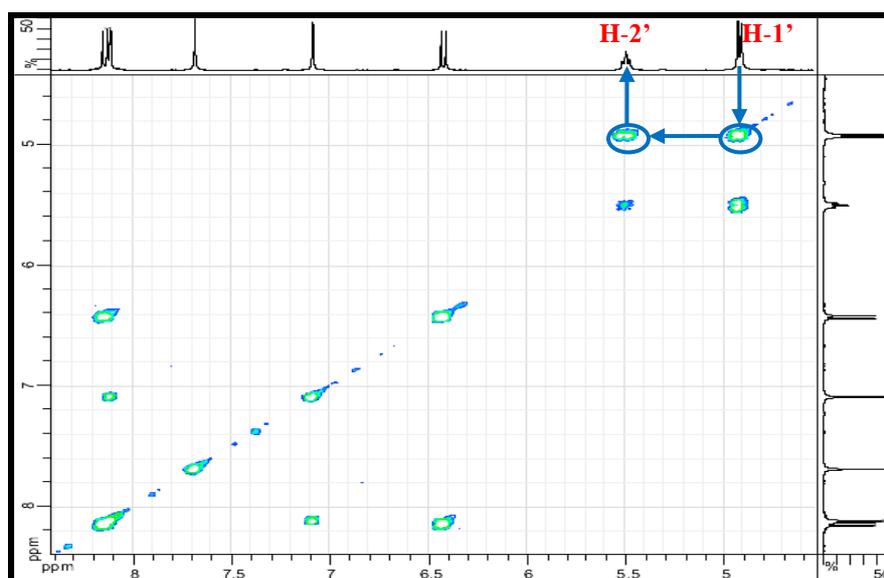
Spectre IV.114-2 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de **A5**

La monosubstitution de ce psoralène a été établie en C-8 grâce à la corrélation observée sur le spectre NOESY (Spectre IV.115-1), entre H-4 et le proton résonant à $\delta_{\text{H}} = 7,68$ ppm et par conséquent attribué à H-5. L'attribution de H-5 a également été confirmée par la corrélation entre ce proton et le carbone C-4 sur le spectre HMBC. Bien entendu le C-4 a été déterminé *via* le spectre HSQC.



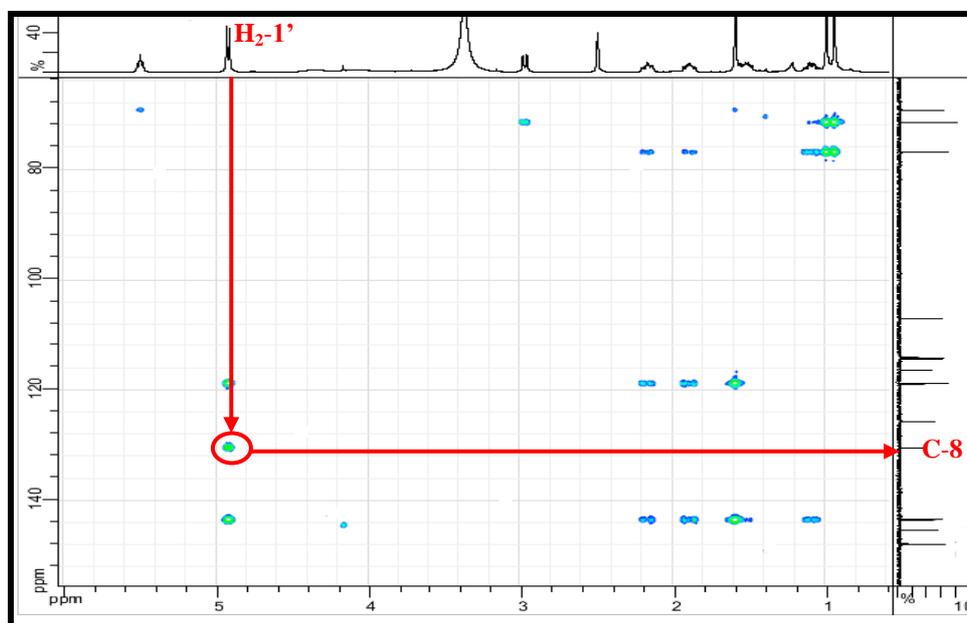
Spectre IV.115-1 : Spectre NOESY étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de **A5**

En faisant abstraction des signaux de l'entité psoralène, on trouve sur le spectre proton des signaux caractéristiques d'un groupement 6,7-dihydroxygéranyloxy tout comme dans le cas du composé **C6** [la (R)-marmine]. On trouve en effet, sur ce spectre un doublet d'intégration 2H, $J = 6,8$ Hz à $\delta = 4,92$ ppm attribuable aux $H_{2-1'}$ ($\delta_C = 69,29$ ppm). Sur le spectre COSY (Spectre IV.116-1), les protons de ce CH_2 montrent une tache de corrélation avec le proton H éthylénique $H_{-2'}$ résonant sous forme d'un triplet ($J = 7,00$ Hz) à $\delta_H = 5,50$ ppm ($\delta_C = 118,81$ ppm). La multiplicité du signal de ce groupement CH indique que le carbone éthylénique délimitant sa double liaison soit le $C_{-3'}$, est quaternaire. On relève en effet, $\delta_{C_{-3'}} = 143,37$ ppm.



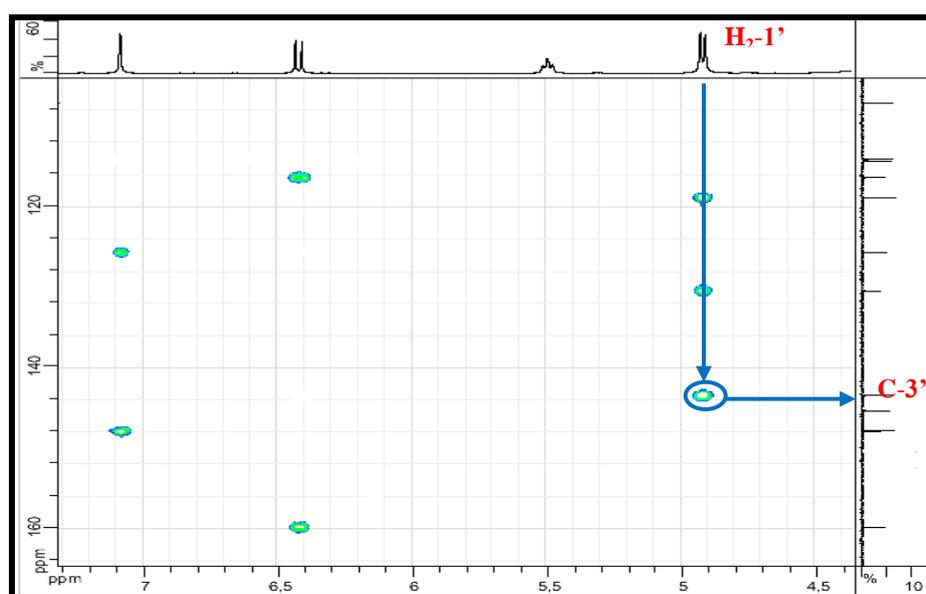
Spectre IV.116-1 : Spectre COSY étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit **A5**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.117-1), les protons $H_{2-1'}$ corrèlent au carbone quaternaire aromatique résonant à $\delta_C = 130,42$. Il est évident que ce carbone n'est autre que le C-8 du noyau psoralène dont la jonction avec cette chaîne est réalisée par le biais d'un atome d'oxygène.



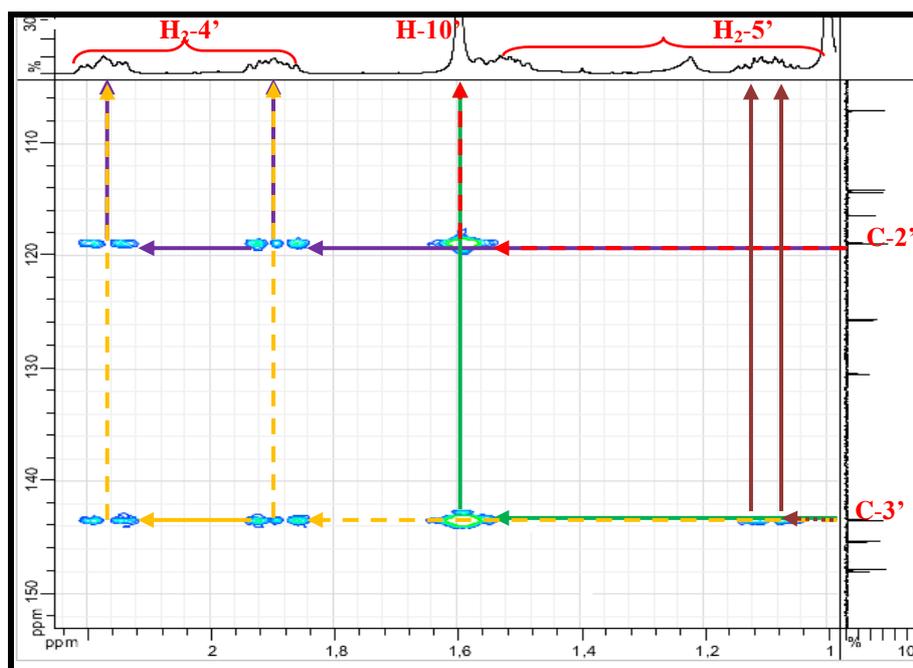
Spectre IV.117-1 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A5**

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.117-2), on relève également que le $C_{q-3'}$ éthylénique ($\delta_C = 143,37$ ppm) montre bien une corrélation avec le CH_2 oxygéné précédent confirmant ainsi notre proposition.



Spectre IV.117-2 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de **A5**

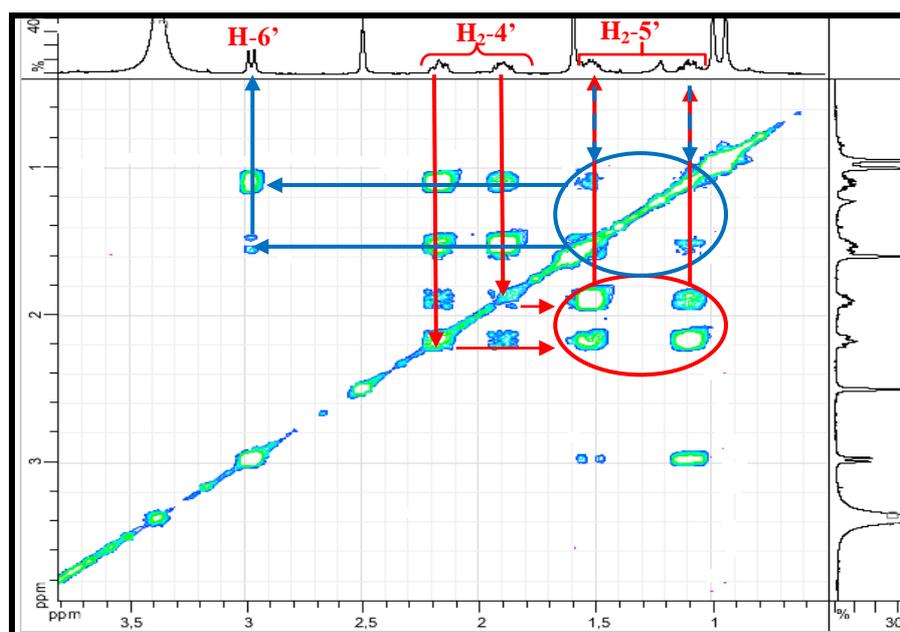
Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.117-3), le carbone C-2' et le carbone C-3' montrent des taches de corrélation avec les protons du CH₃ (numérotés dans cette chaîne H₃-10') et résonant sous forme de singulet à $\delta_H = 1,60$ ppm ($\delta_C = 16,28$ ppm) et également avec les protons du groupement CH₂ (H₂-4') résonant sous forme de deux multiplés à $\delta_H = 1,89$ ppm (H-4'b) et $\delta_H = 2,17$ ppm (H-4'a), ($\delta_{C-4'} = 36,44$ ppm).



Spectre IV.117-3 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé **A5**

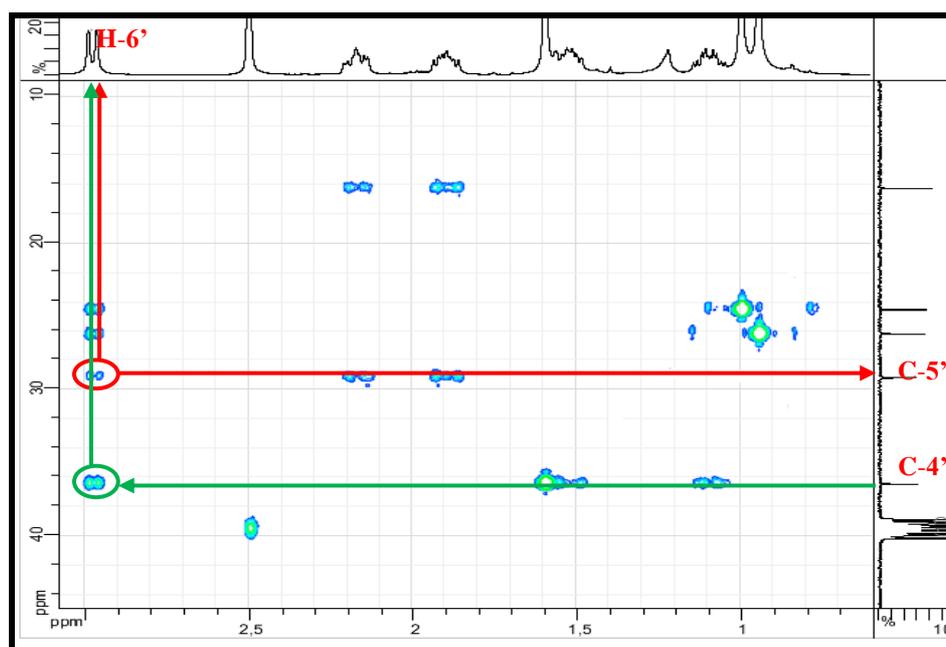
Sur le spectre COSY (Spectre IV.116-2), les protons H₂-4' montrent des taches de corrélation avec les protons du troisième groupement CH₂ signalé dans cette molécule. Ces deux protons qui sont H-5'a et H-5'b résonnent sous forme de deux multiplés à $\delta_H = 1,53$ ppm et $\delta_H = 1,10$ ppm, respectivement.

Grâce au spectre HSQC on relève $\delta_{C-5'}$ à 29,19 ppm. La présence de ce CH₂ en position vicinale par rapport au précédent est confirmée par les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.117-3), entre les protons de ce CH₂ et le carbone C-3'.



Spectre IV.116-2 : Spectre COSY étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A5

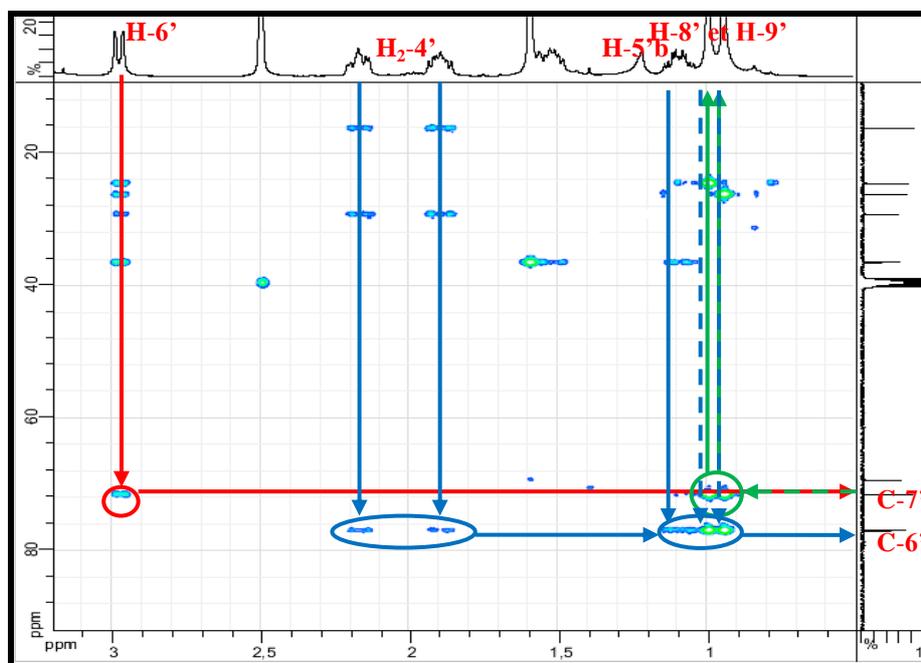
Le spectre COSY (Spectre IV.116-2), permet de relever un couplage net entre les deux protons H-5'a et H-5'b et le proton du groupement CH à $\delta_H = 2,98$ ppm résonant sous forme d'un doublet large ($J = 10,4$ Hz). Ce couplage permet d'attribuer ce groupement méthyne à la position C-6' de cette chaîne. La présence de ce CH en cette position est d'ailleurs confirmée par les taches de corrélation entre les carbones C-4' et C-5' et le proton de ce groupement (H-6') observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.117-4).



Spectre IV.117-4 : Spectre HMBC étalé (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de A5

La multiplicité de H-6' (doublet large) et la valeur du déplacement de son carbone C-6' ($\delta_C = 76,90$ ppm) orientent bien vers une oxygénation à ce niveau et d'autre part vers la présence d'un carbone quaternaire en position vicinale soit en position C-7'. En effet, le spectre HMBC (Spectre IV.117-5), montre des taches de corrélation entre H-6' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 71,52$ ppm que nous pouvons alors attribuer à C-7'. La valeur du déplacement chimique de C-7 est en faveur d'une oxygénation à ce niveau.

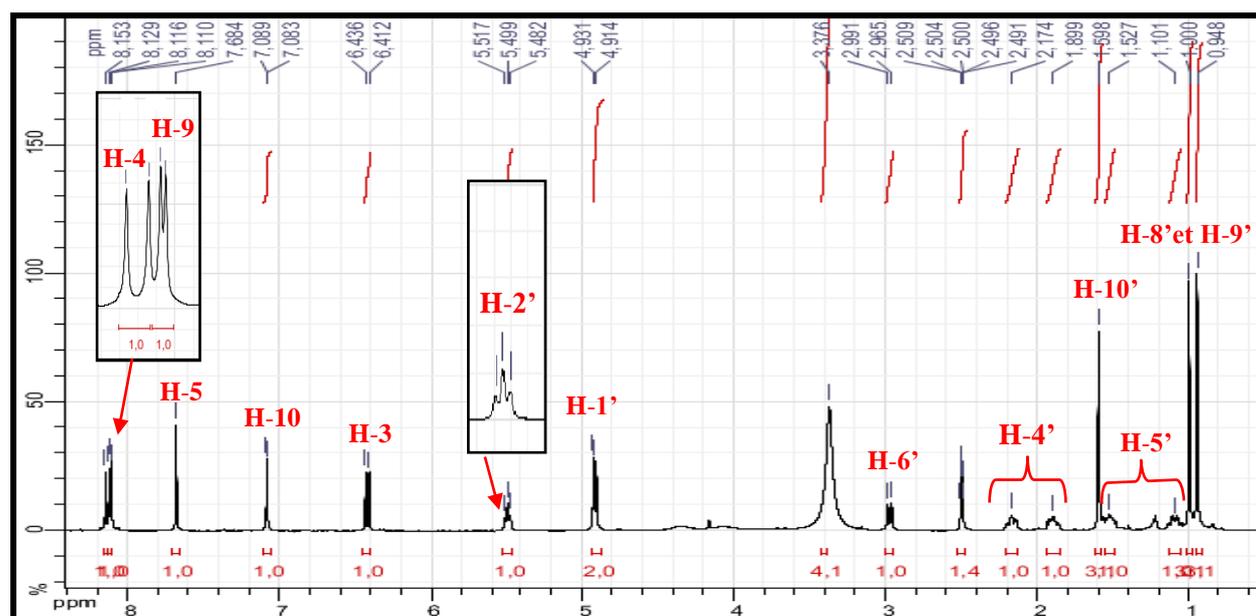
Le spectre HMBC (Spectre IV.117-5), montre également des corrélations entre ce carbone C-7' et les protons des deux méthyles résonant à $\delta_H = 1,00$ ppm et $0,95$ ppm orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par ce carbone quaternaire C-7'. Ceci est appuyé par les corrélations que nous avons observées entre les protons H₂-4', H-5'b et les protons des deux méthyles avec le carbone C-6'.



Spectre IV.117-5 : Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du composé **A5**
(Étalement)

Un retour vers notre formule brute $C_{21}H_{24}O_6$ montre que nous avons utilisé l'ensemble de nos atomes de carbone et d'oxygène et l'ensemble de nos insaturations. Il reste à placer deux atomes d'hydrogène sur le substituant ce qui mène à la présence de deux hydroxyles sur ce substituant, un sur le C-6' et l'autre sur le C-7'.

Les données de RMN ¹H sont reportées sur le spectre IV.114-3.



Spectre IV.114-3 : Spectre RMN ^1H du composé **A5** avec toutes les indications.

Cette analyse structurale mène à une furocoumarine connue sous le nom de **8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy) psoralène** comme reporté dans la figure IV.57 [32,33].

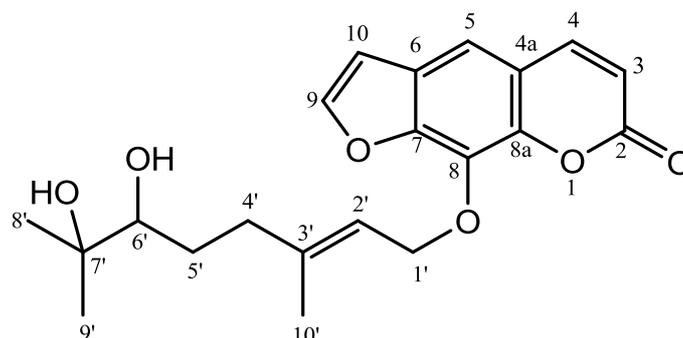
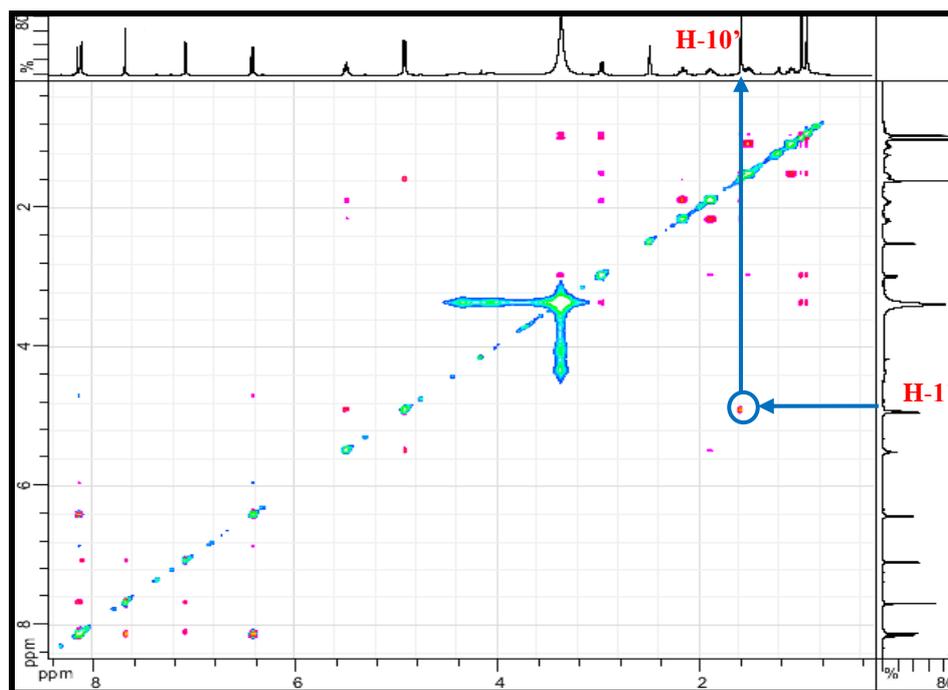


Figure IV.57 : Structure plane du composé **A5**, **8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy) psoralène**

Cette molécule renferme dans la chaîne latérale une double liaison $\text{C-2}' = \text{C-3}'$ dont la configuration sera établit grâce à l'examen du spectre NOESY (Spectre IV.115-2). Sur ce spectre le groupement CH_3 ($10'$) montre une corrélation nette avec les protons H_2-1' signifiant une orientation « *cis* » de ce groupement CH_3 par rapport à ce groupement CH_2 , de ce fait les groupements CH_2-4' et CH_2-1' admettent une disposition « *trans* » par rapport a la double liaison. En peut donc noter que notre double liaison est (*E*). Ceci est ont accord avec les données de la biogenèse concernant le groupement géranyle où la double liaison est reportée de configuration (*E*) [11].



Spectre IV.115-2 : Spectre NOESY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **A5**

En complément à cette étude, ce composé a été trouvé optiquement actif avec un pouvoir rotatoire spécifique positif. $[\alpha]_D^{20} = +4,1$; $[\alpha]_{578}^{20} = +4,4$; $[\alpha]_{546}^{20} = +5,0$ (c 0,339 g/100 ml, MeOH). Ainsi cette molécule est le (+)-**8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène**. D'après des résultats de travaux bibliographiques effectués sur ce genre de molécule, la valeur positive de la rotation optique est en accord avec la configuration (R) du centre chiral C-6' [11], Donc le composé **A5** est de configuration (R) et correspond au **8-[(R)-6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène** (Figure IV.58).

Les données des spectres RMN sont reportées dans le tableau IV.29.

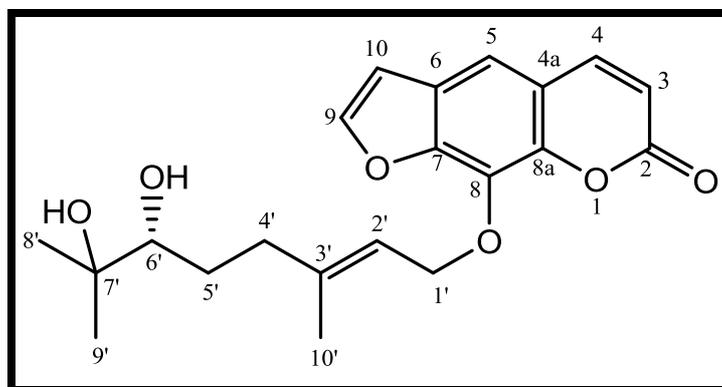
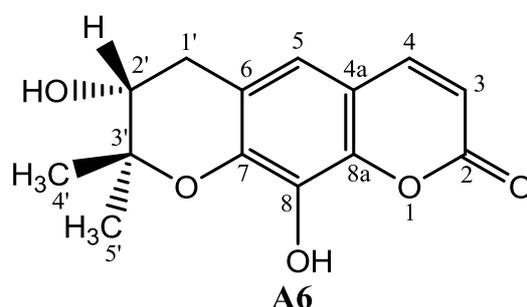


Figure IV.58 : Structure finale du composé **A5**, **8-[(R)-6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène**

Tableau IV.29 : données des spectres RMN du composé A5

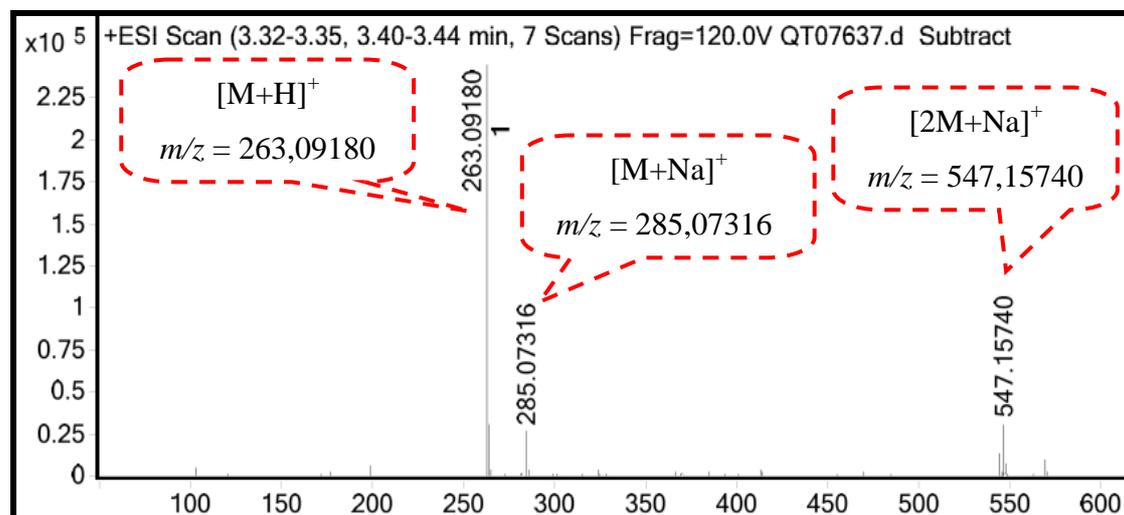
Position	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)	
2	-	166,10	
3	6,42 1H <i>d</i> (9,6)	114,27	
4	8,14 1H <i>d</i> (9,6)	145,31	
4a	-	116,32	
5	7,68 1H <i>s</i>	118,81	
6	-	127,36	
7	-	147,95	
8	-	130,42	
8a	-	143,41	
9	8,11 1H <i>d</i> (2,4)	147,80	
10	7,08 1H <i>d</i> (2,4)	107,05	
1'	4,92 2H <i>d</i> (6,8)	69,29	
2'	5,50 1H <i>t</i> (7,0)	118,81	
3'	-	143,37	
4	4'a	1,89 1H <i>m</i>	36,44
	4'b	2,17 1H <i>m</i>	
5	5'a	1,53 1H <i>m</i>	29,18
	5'b	1,10 1H <i>m</i>	
6'	2,98 1H <i>dl</i> (10,4)	76,90	
7'	-	71,52	
8'	1,00 3H <i>s</i>	26,19	
9'	0,95 3H <i>s</i>	24,56	
10'	1,60 3H <i>s</i>	16,28	

IV-B-6- Elucidation structurale du composé A6



Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (Spectre IV.118 et Tableau IV.30) montre des ions adduits à $m/z = 263,09180$; $285,07316$; $547,15740$ correspondant à $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$, respectivement. La recherche de la masse exacte donne $m/z = 262,08453$ en accord avec la formule brute

$C_{14}H_{14}O_5$ (calculée pour $C_{14}H_{14}O_5$: 262,08412) orientant alors vers la formule brute $C_{14}H_{14}O_5$, soit une molécule comportant huit degrés d'insaturations.



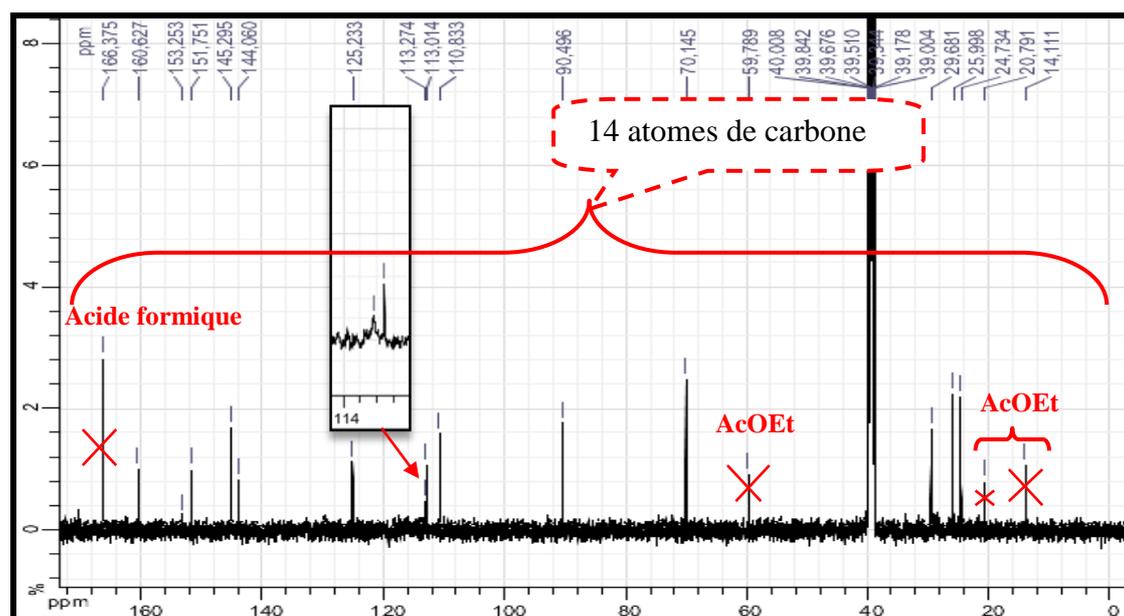
Spectre IV.118 : Spectre de masse en ESI+ du composé A6

Tableau IV.30 : Données du spectre HR-ESIMS du composé A6

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
263.0918	1	253445.2	C14 H15 O5	(M+H)+
264.09485	1	30316.5	C14 H15 O5	(M+H)+
285.07316		27172		
544.14824		13037.9		
547.1574		31186.4		

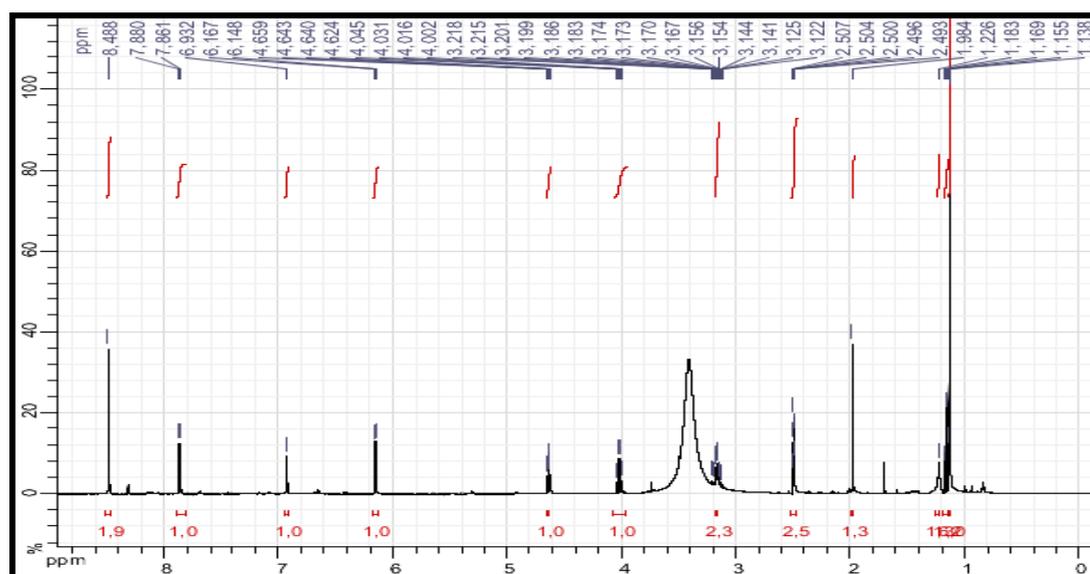
Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.119-1), confirme les données de la masse par la présence de 14 résonances, ce spectre montre la présence de :

- Deux méthyles
- Quatre méthynes dont trois hybridés sp² et un hybridé sp³ et oxygéné.
- sept carbones quaternaires dont six hybridés sp² et un hybridé sp³.
- Un méthylène

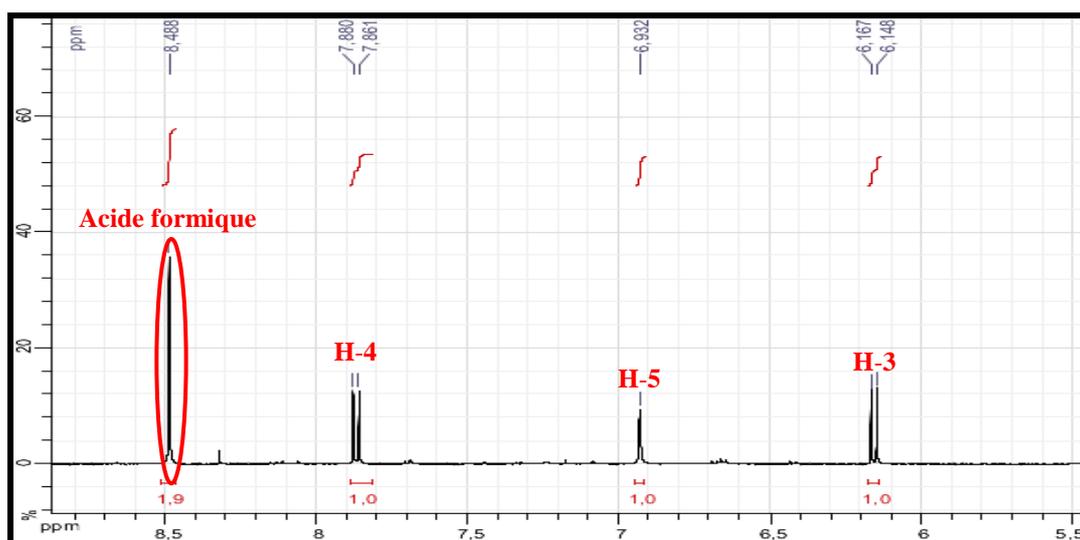


Spectre IV.119-1 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A6

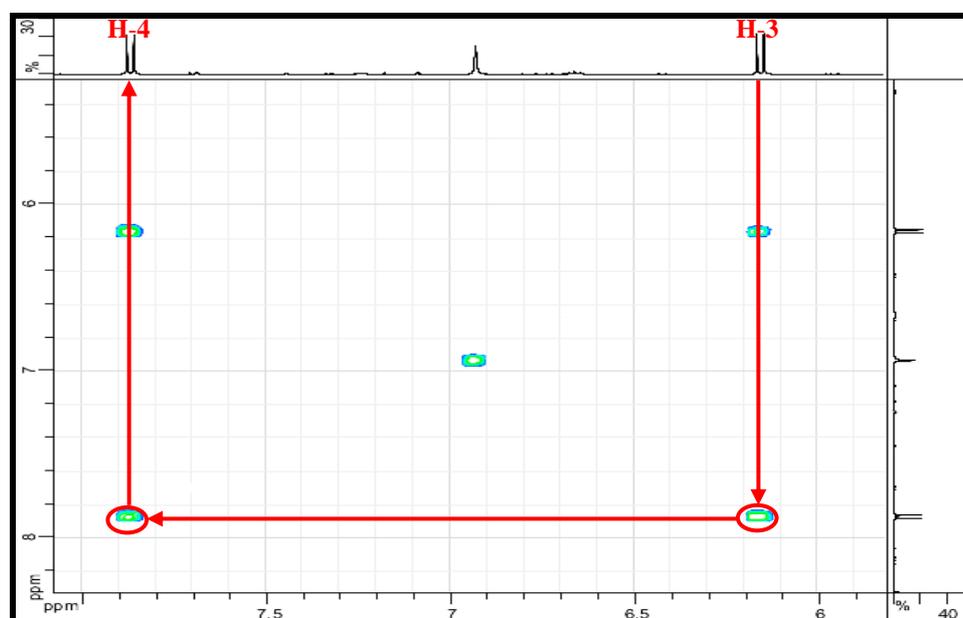
Le spectre RMN ^1H (Spectre IV.120-1) et son étalement (Spectre IV.120-2) de ce composé met en évidence des protons caractéristiques d'une coumarine, notamment le H-3 à δ_{H} 6,15 ppm (d , $J = 9,5$ Hz) (δ_{C} 110,83) et le H-4 à δ_{H} 7,87 ppm (d , $J = 9,5$ Hz) (δ_{C} 145,29). Ces attributions sont confirmées par le spectre COSY (Spectre IV.121-1) qui montre à cet effet une tache de corrélation entre ces deux noyaux. Ce spectre montre également un singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 6,93 ppm.



Spectre IV.120-1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A6

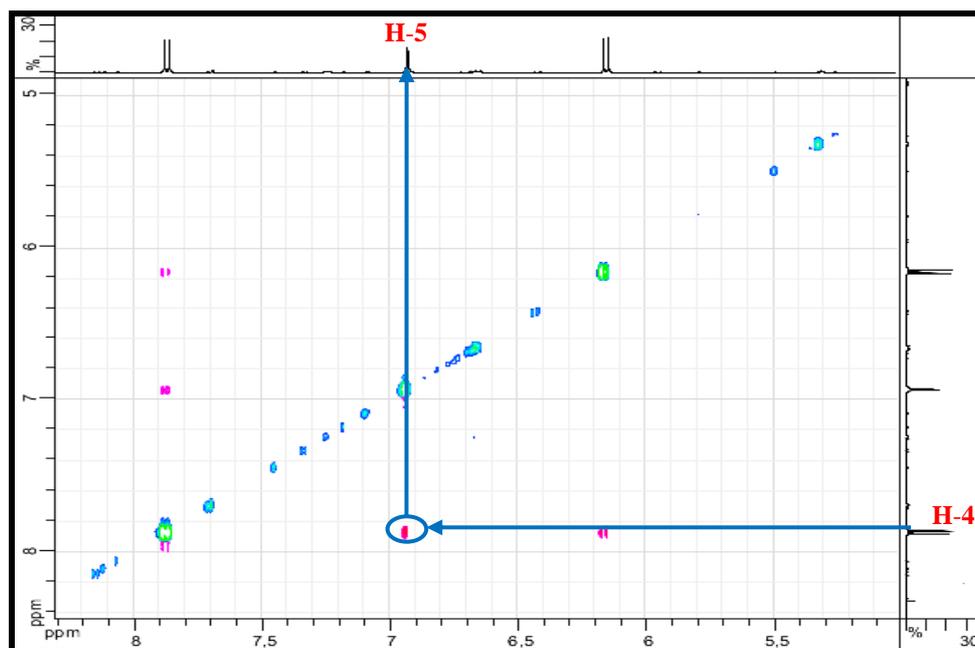


Spectre IV.120-2: Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A6



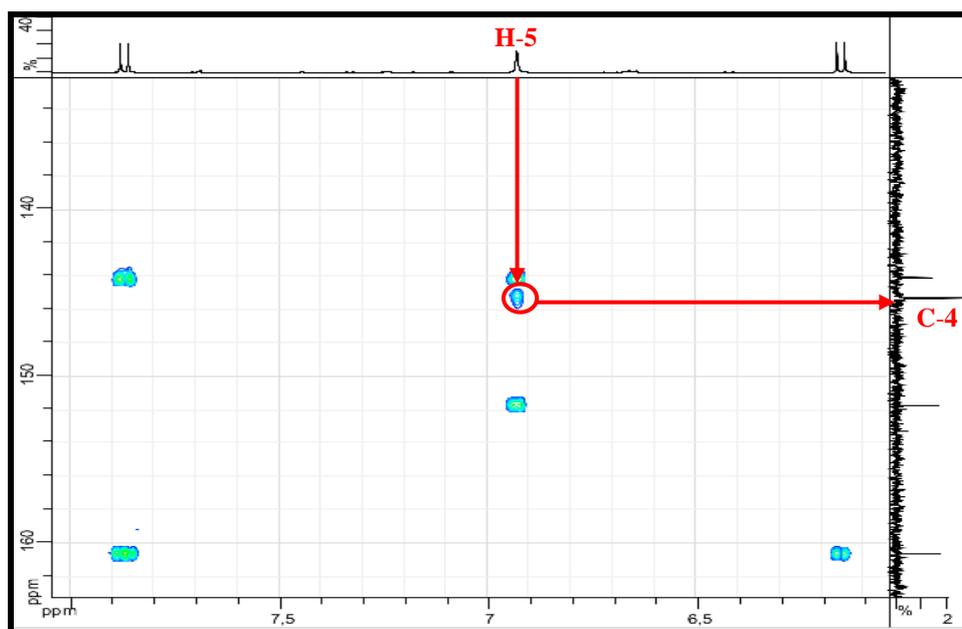
Spectre IV.121-1 : Spectre COSY étalé (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé A6

L'examen de spectre NOESY (Spectre IV.122-1) montre une tache de corrélation entre H-4 et le proton relatif au singulet à 6,93 ppm (δ_{C} 113,27) préalablement évoqué, permettant ainsi son attribution à H-5. Ceci est confirmé par la corrélation de ce proton avec le carbone C-4 sur le spectre HMBC (Spectre IV.123-1) (Figure IV.59). La multiplicité de H-5 et l'absence d'autres signaux dans la zone des aromatiques sont alors en faveur d'une trisubstitution dans les positions C-6, C-7 et C-8.



Spectre IV.122-1 : Spectre NOESY étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit

A6



Spectre IV.123-1 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit A6

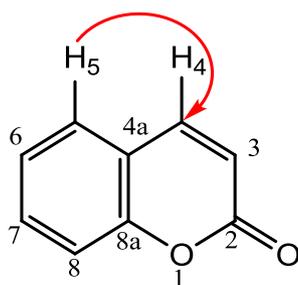
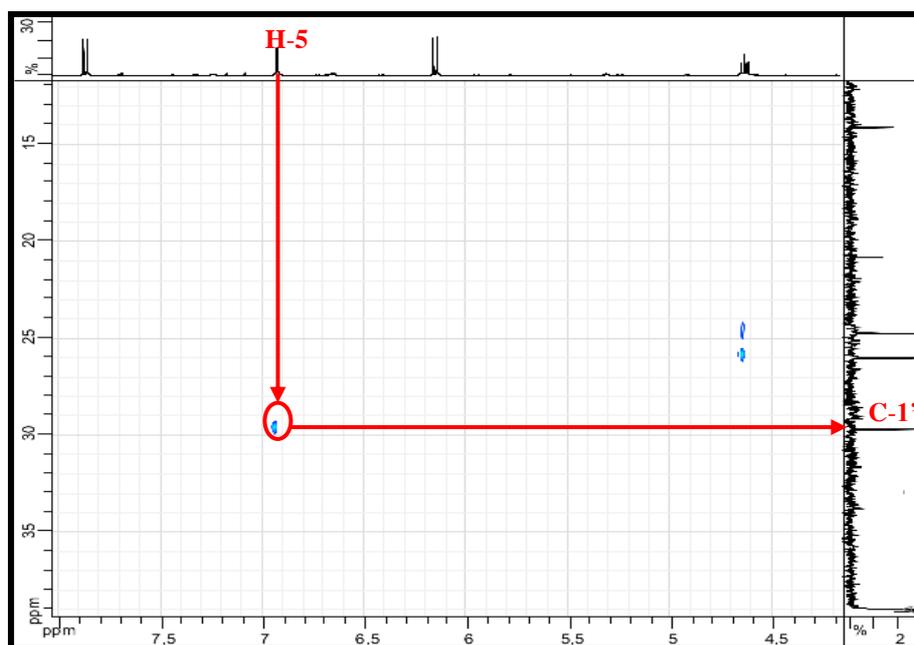


Figure IV.59 : Corrélation HMBC H-5/C-4

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.123-2), le proton H-5 montre une corrélation avec le carbone d'un groupement méthylène résonnant à δ_C 29,68 ppm que l'on peut attribuer à la position C-1' et placer en position C-6 du squelette coumarinique. Les protons portés par ce carbone résonnent (Spectre IV.120-3) sous forme de deux doublets de doublets de doublets à δ_H 3,18 ppm (1H, *ddd*, $J = 13,4 ; 8,3 ; 1,4$ Hz, H-1'a) et à δ_H 3,16 ppm (1H, *ddd*, $J = 13,4 ; 9,3 ; 1,4$ Hz, H-1'b). Cette hypothèse est confirmée par les corrélations observées sur le spectre NOESY (Spectre IV.122-2), entre le H-5 et les deux protons (H-1'a, H-1'b) de ce méthylène (Figure IV.60).



Spectre IV.123-2 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit A6

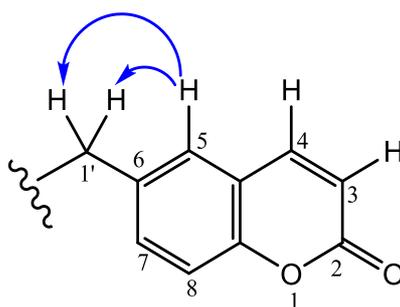
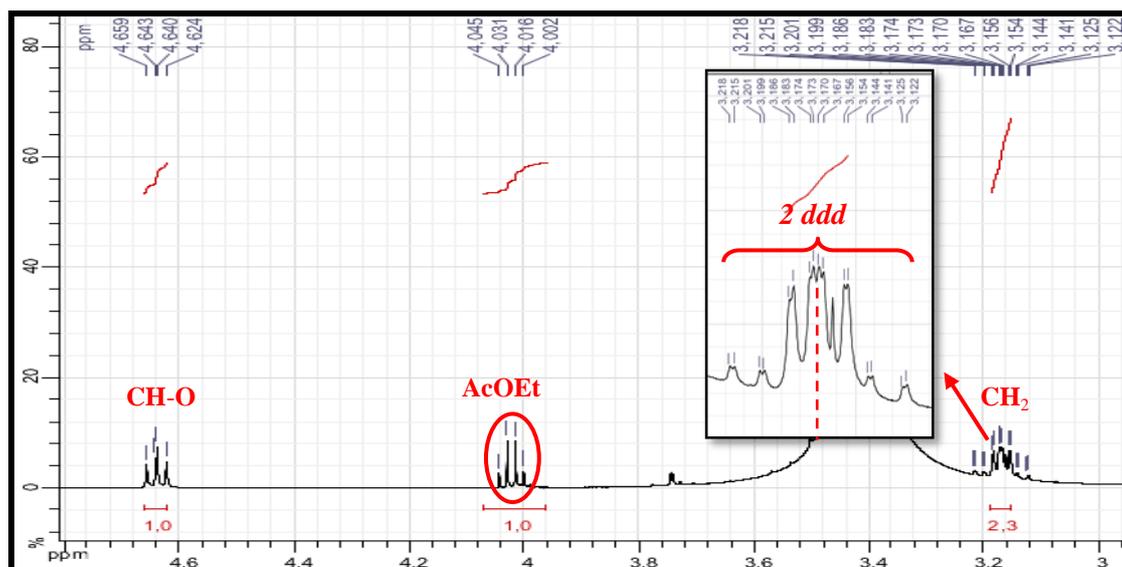
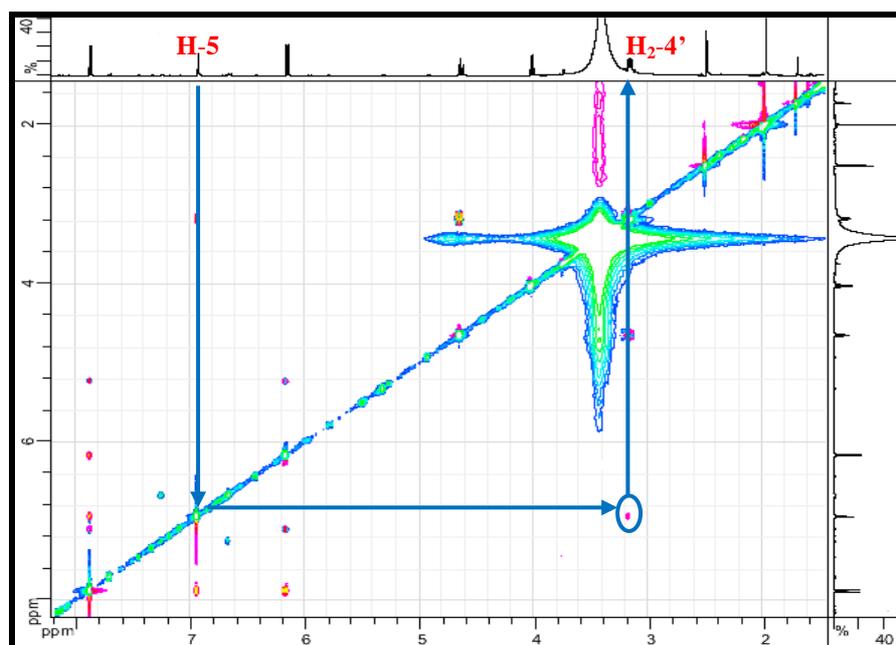


Figure IV.60 : Corrélations NOESY entre H₂-1' et H-5



Spectre IV.120-3 : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé

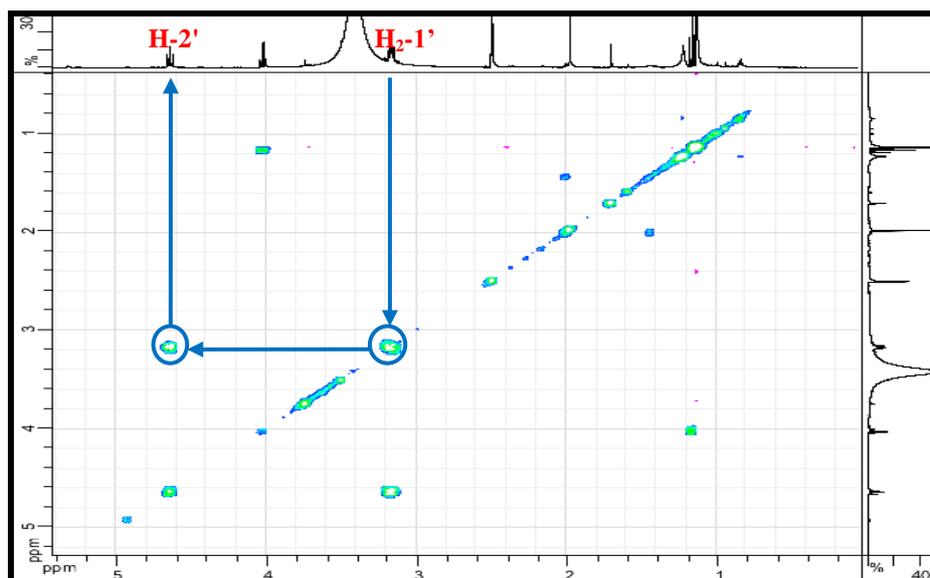
A6



Spectre IV.122-2 : Spectre NOESY étalé (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) du composé

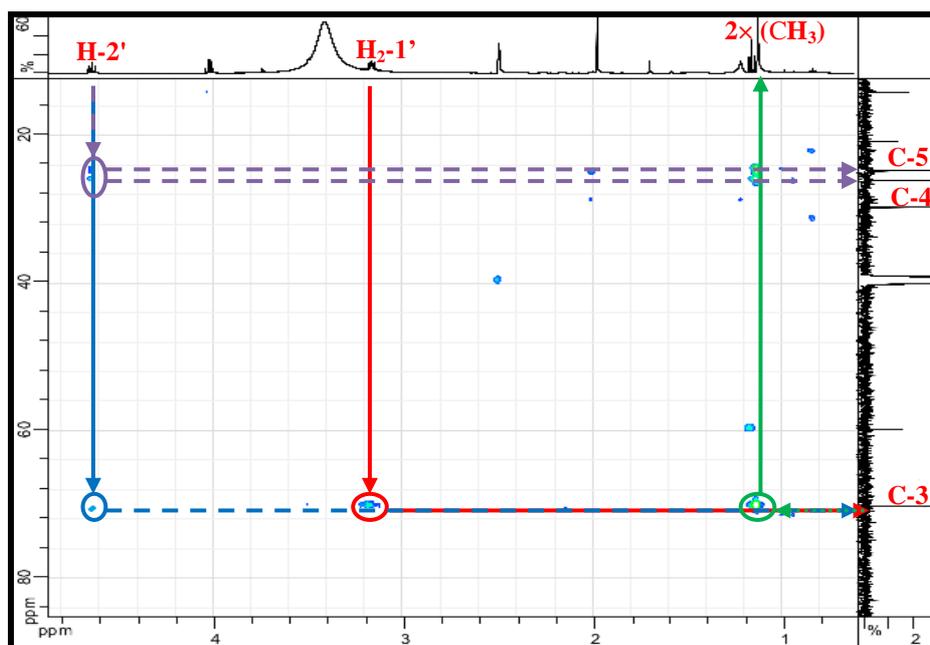
A6

Sur le spectre COSY (Spectre IV.121-2), les protons de ce CH_2 ($\text{H}_2\text{-1}'$) montrent des corrélations avec le proton d'un méthyne résonant sous forme d'un doublet de doublets à δ_{H} 4,64 ppm (1H, *dd*, $J = 9,3 ; 8,3$ Hz) (δ_{C} 90,49). Les valeurs du déplacement chimique de H-2' et de son carbone (C-2') indiquant l'oxygénation de cette position.



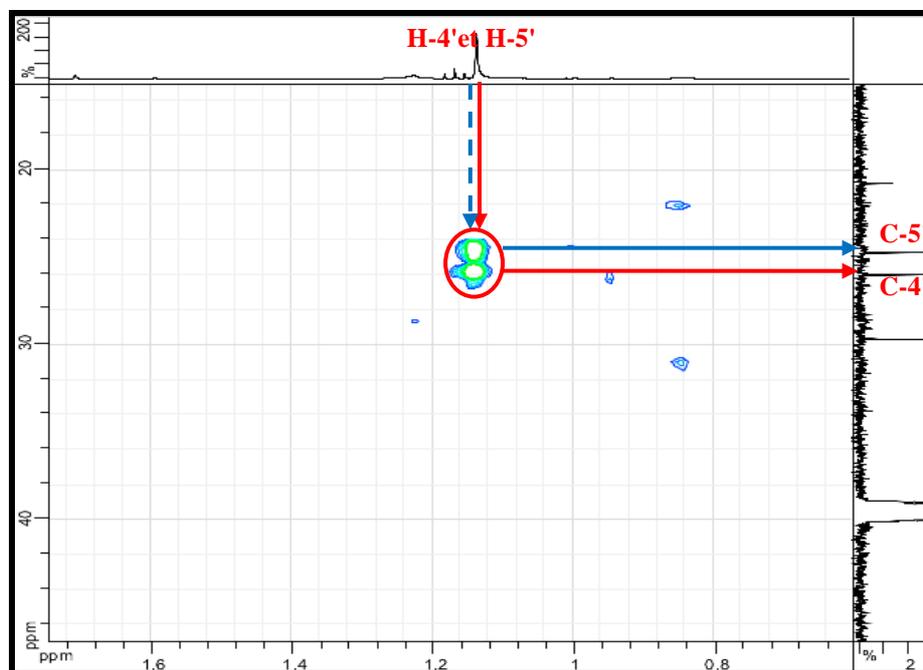
Spectre IV.121-2 : Spectre COSY étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) de A6

Sur le spectre HMBC (Spectre IV.123-3), les protons H₂-1' et H-2' montrent des corrélations avec le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 70,14 ppm indiquant que ce carbone est attaché à C-2', nous numérotons alors cette position C-3'. Cet atome de carbone montre une corrélation avec les protons du singulet d'intégration 6H à δ_H 1,14 (δ_C 25,99 et 24,73) indiquant la présence de deux groupements méthyles en C-3'. Cette hypothèse est confirmée dans le spectre HMBC (Spectre IV.123-3), par les corrélations observées entre les carbones de ces deux groupements méthyles (C-4' et C-5') et H-2'.



Spectre IV.123-3 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit A6

Le fait que ces deux groupements méthyles soient attachés au même carbone quaternaire (C-3') est consolidé par les corrélations observées entre les protons de l'un avec le carbone de l'autre et *vice versa*, sur le spectre HMBC (Spectre IV.123-4).



Spectre IV.123-4 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit **A6**

Le spectre HMBC (Spectre IV.123-5), montre également des taches de corrélations entre les protons H_2-1' , H-5 et le carbone aromatique situé à δ_C 151,75 ppm attribuable à C-7 du squelette coumarine. Ces corrélations confirment la jonction entre les carbones C-1' et C-6. Le carbone aromatique C-7 est oxygéné d'après la valeur de son déplacement chimique, donc ; ce carbone est attaché au carbone quaternaire C-3' par l'oxygène pour former un squelette pyranocoumarine linéaire (Figure IV.61).

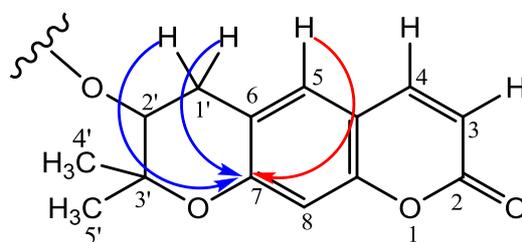
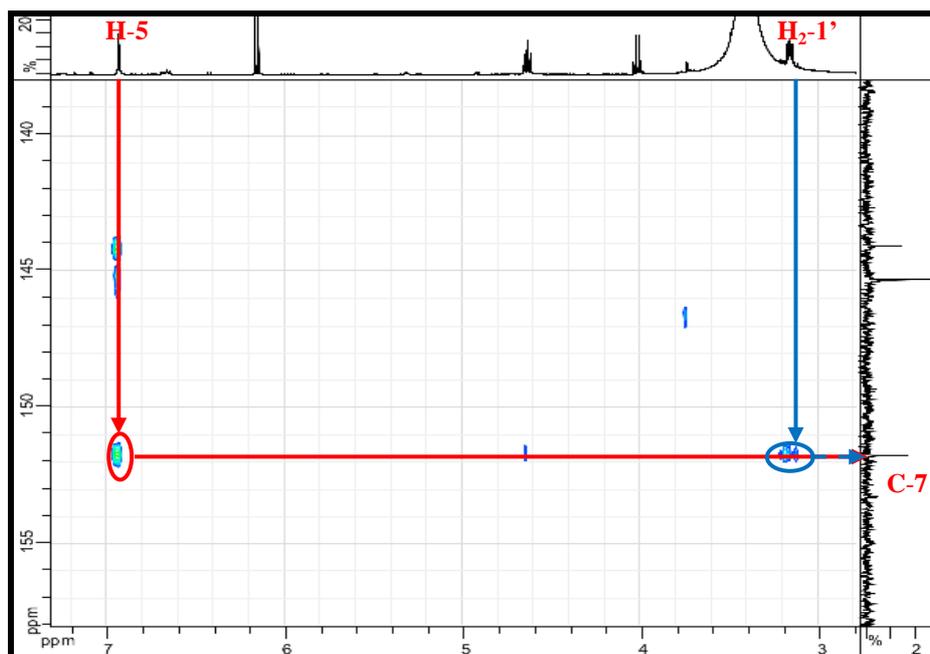


Figure IV.61 : Structure partielle du composé **A6** et corrélations HMBC H-5/C-7 et $H_2-1'/C-7$



Spectre IV.123-5 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) du produit **A6**

Les carbones quaternaires de ce composé peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV.123-6). En effet, le carbone C-2 sera attribué au signal à δ_C 160,62 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et ses corrélations avec les protons H-3, H-4. Le carbone C-4a sera attribué au signal à δ_C 113,01 ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3, H-4. Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.128-6), les protons H-4 et H-5 corréleront tous les deux avec le carbone aromatique oxygéné (δ_C 144,06 ppm), ce carbone ne peut être que le C-8a. Ce spectre montre aussi des corrélations entre les 2 protons H-1'a, H-1'b et le carbone quaternaire aromatique résonant à δ_C 125,23 ppm, attribuable à C-6.

Sachant que la formule moléculaire de ce composé est C₁₄H₁₄O₅, il est évident que C-2' et C-8 sont hydroxylés. L'analyse complète du spectre HMBC a permis l'attribution de C-8 à la résonance à δ_C 153,25 ppm (Figure IV.62).

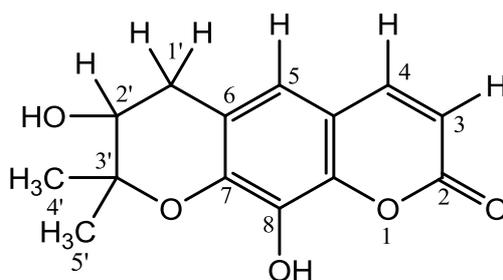
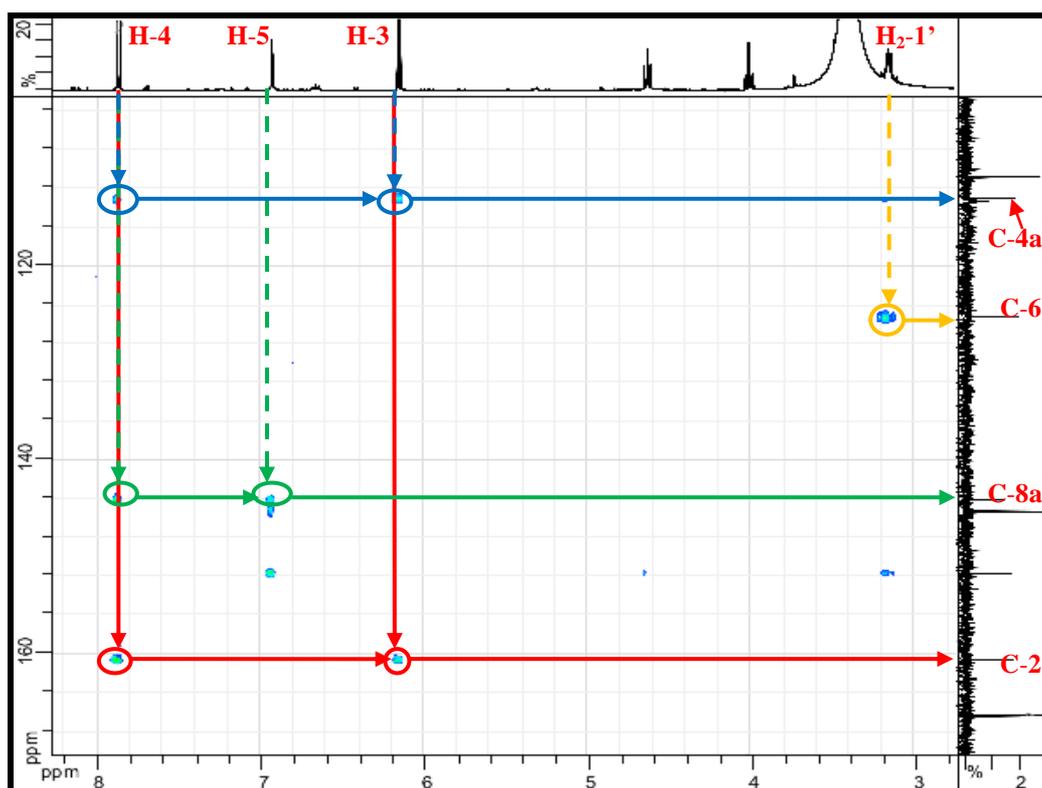
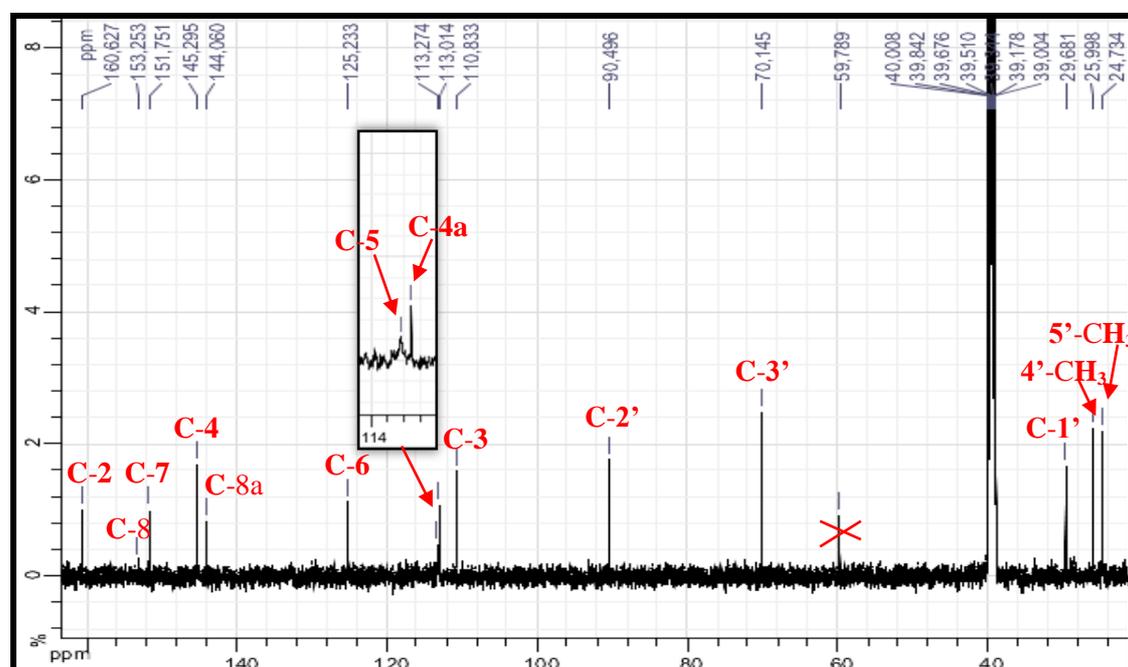


Figure IV.62 : Structure finale plane du composé **A6**



Spectre IV.123-6 : Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du produit A6

Les données de la RMN ^{13}C sont reportées sur le spectre IV.119-2. Les données de RMN ^1H et de RMN ^{13}C sont reportées dans le tableau IV.31.



Spectre IV.119-2 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé A6 avec toutes indications

Tableau IV.31 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) du composé **A6** (DMSO-*d*6)

Position	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	160,62
3	6,15 (1H, <i>d</i> , 9,5)	110,83
4	7,87 (1H, <i>d</i> , 9,5)	145,29
4a	-	113,01
5	6,93 (1H, <i>sl</i>)	113,27
6	-	125,23
7	-	151,75
8	-	153,25
8a	-	144,06
1'	1'a 3,18 (1H, <i>ddd</i> , 13,4 ; 8,3 ; 1,4)	29,68
	1'b 3,16 (1H, <i>ddd</i> , 13,4 ; 9,3 ; 1,4)	29,68
2'	4,64 (1H, <i>dd</i> , 9,3 ; 8,3)	90,49
3'	-	70,14
4'-CH ₃	1,14 (3H, <i>s</i>)	25,99
5'-CH ₃	1,14 (3H, <i>s</i>)	24,73

L'ensemble de ces données (tableau IV.31), associées à celles obtenues par spectrométrie de masse, nous a permis d'identifier le composé **A6**. Ce composé est nouveau, nous lui avons attribué le nom de **8-hydroxyaegelinol** (Figure IV.63).

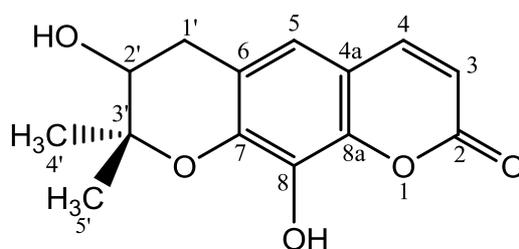


Figure IV.63 : Structure du composé **A6** (**8-hydroxyaegelinol**)

La détermination de la stéréochimie du carbone C-2' a pu être réalisée grâce au signal du H-2'. La constante de couplage 9,3 Hz relevée dans ce signal et représentant l'interaction de couplage entre H-1' pseudo axiale et H-2' est en faveur d'une orientation axiale de ce dernier soit donc une orientation β -H-2' et par conséquent une orientation α -OH-2' (Figure IV.41). Ainsi on peut donc attribuer la configuration absolue (R) à ce centre asymétrique C-2' et donc à cette molécule. Ces données sont en accord avec ceux de la littérature concernant la molécule aegelinol [34]. Notre

molécule diffère de l'aegelinol par la présence du OH en C-8, il s'agit donc du (R)-8-hydroxyaegelinol (Figure IV.64). Cette molécule est nouvelle nous la reportons dans la première fois dans la littérature.

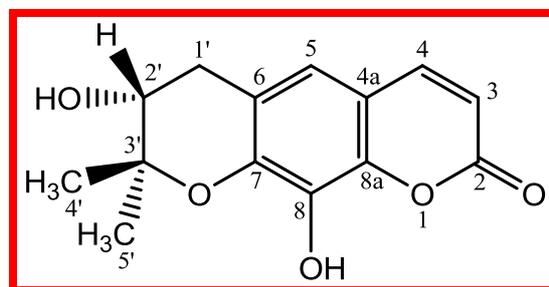
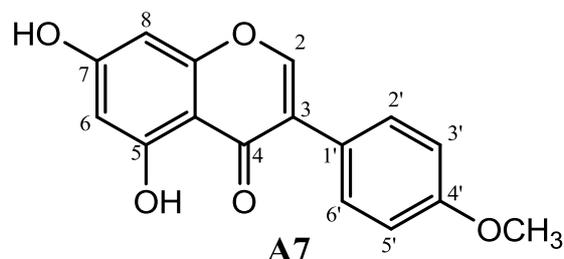


Figure IV.64 : Structure finale du composé A6, (R)-8-hydroxyaegelinol

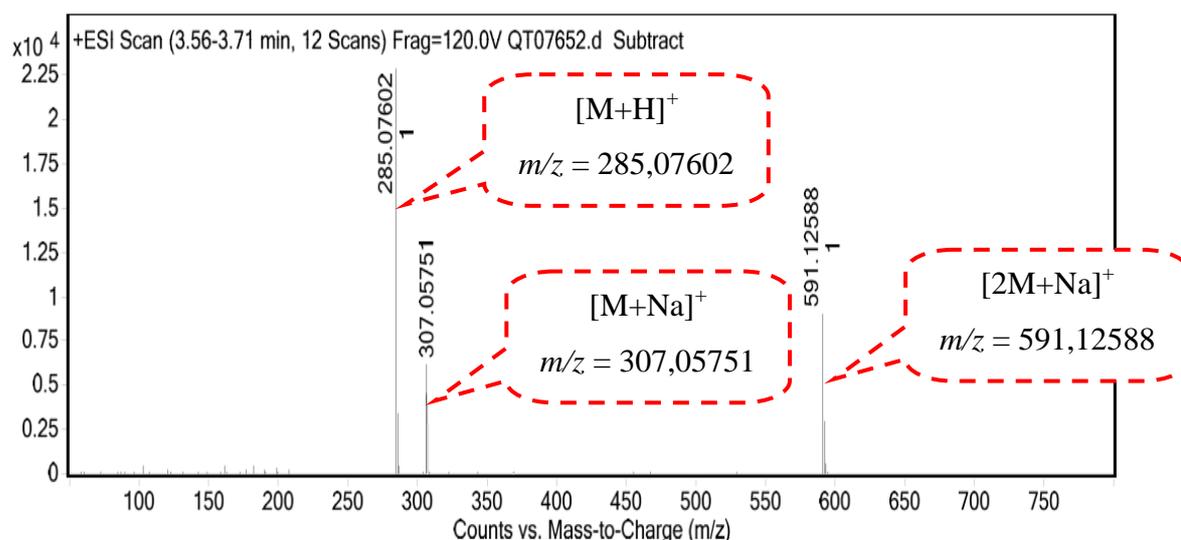
IV-B-7- Elucidation structurale du composé A7



Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) positif obtenu pour le produit A7 (Spectre IV.124 et Tableau IV.32), montre des ions adduits à $m/z = 285,07602$; $m/z = 307,05751$ et $m/z = 591,12588$ correspondant à $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{13}O_5$) ; $[M+Na]^+$ ($C_{16}H_{12}O_5Na$) et $[2M+Na]^+$ ($C_{32}H_{24}O_{10}Na$) permettant de déduire une formule brute $C_{16}H_{12}O_5$ pour cette molécule qui doit contenir onze insaturations.

Tableau IV.32 : Données du spectre HR-ESIMS du composé A7

m/z	z	Abund	Formula	Ion
285.07602	1	22898.5	C16 H13 O5	(M+H)+
285.12307		1266.4		
286.07942	1	3509.2	C16 H13 O5	(M+H)+
307.05751		6321.9	C16 H12 Na O5	(M+Na)+
591.12588	1	9053.2	C32 H24 Na O10	(M+Na)+
592.12903	1	2937	C32 H24 Na O10	(M+Na)+



Spectre IV.124 : Spectre HR-ESI-MS du composé **A7**

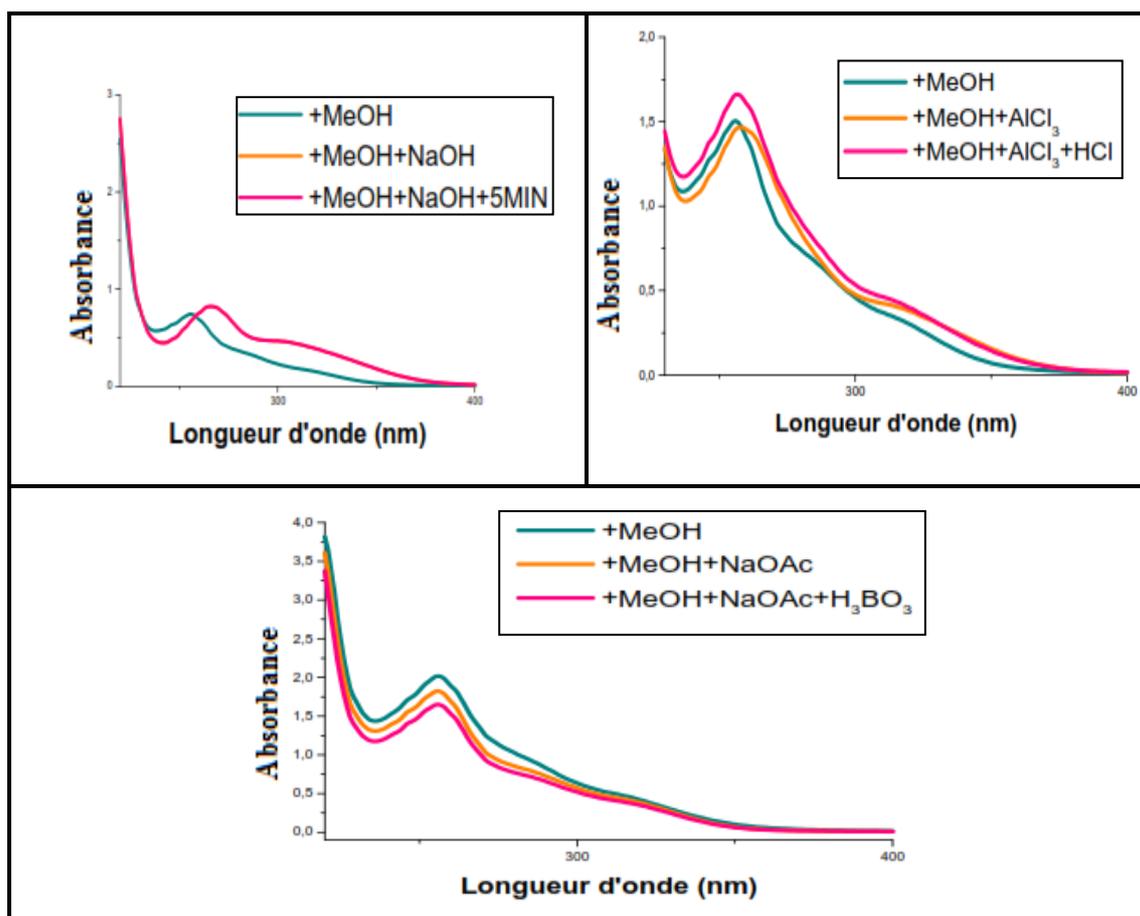
Les données de la série spectrale UV (Spectre IV.125) montrent :

- Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 318 nm sous forme d'un épaulement et une bande II à 256 nm laissant présager la structure d'une isoflavone. Ce squelette est confirmé par la couleur orange de ce produit sous lumière de Wood.
- Le déplacement bathochrome de la bande II après l'addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +5$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH nous oriente vers la présence d'un OH libre en position 7.
- Le fait que le spectre enregistré en présence de AlCl_3 subit un déplacement bathochromique au niveau de la bande II implique la présence d'un OH libre en position C-5.

Les données de la série spectrale UV sont représentées dans le tableau IV.33.

Tableau IV.33 : Données de la série spectrale UV du composé **A7**

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes
MeOH	318	256	-
+ NaOH	318	258	-
+ AlCl_3	318	253	-
+ AlCl_3/HCl	318	258	-
+ NaOAc	318	261	-
+ NaOAc/ H_3BO_3	318	257	-
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			



Spectre IV.125 : Série spectrale UV du composé **A7**

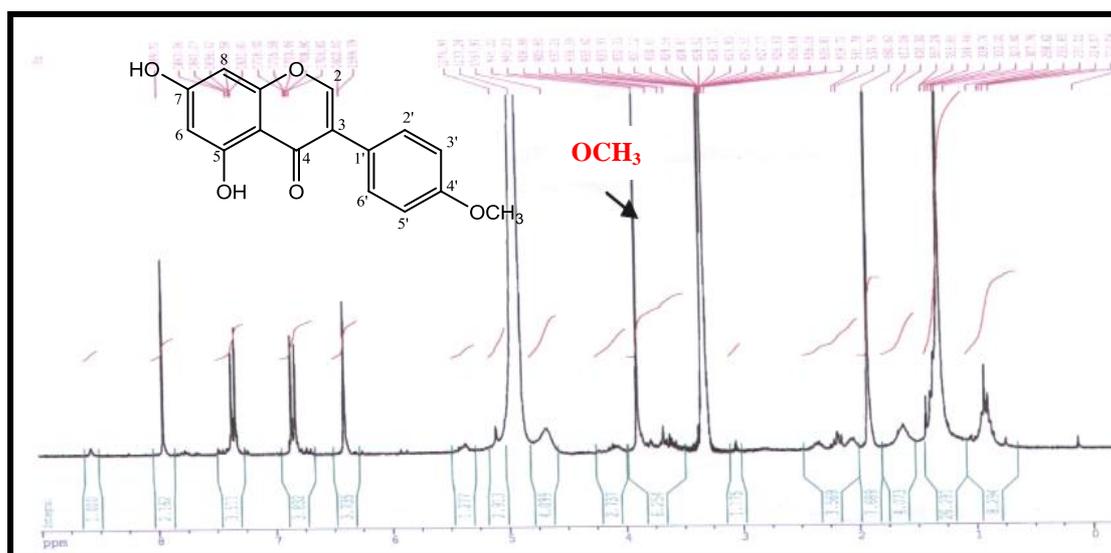
L'analyse du spectre de RMN ^1H (Spectre IV.126-1) et son étalement (Spectre IV.126-2) du composé **A7** montre la présence de :

- ✓ un singulet d'intégration 1H à $\delta = 7,98$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- ✓ deux doublets à $\delta = 6,85$ et $7,36$ ppm, chacun intégrant pour 2H, avec une constante de couplage $J = 8,7$ Hz chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- ✓ un doublet d'intégration 2H à $\delta = 6,45$ ppm $J = 2,2$ Hz attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.
- ✓ un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,90$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle (OCH_3).

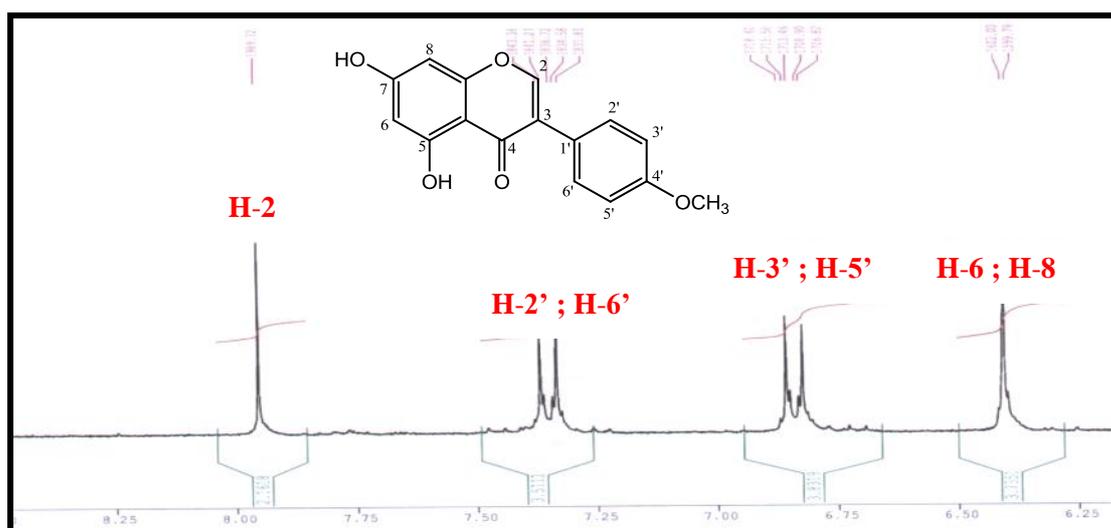
Les données relatives à la RMN ^1H sont représentées dans le tableau IV.34.

Tableau IV.34 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ ppm, J/Hz) du composé A7

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7,98	1H	<i>s</i>	H-2
7,36	2H	<i>d</i> (8,7)	H-2', H-6'
6,85	2H	<i>d</i> (8,7)	H-3', H-5'
6,45	2H	<i>d</i> (2,2)	H-6, H-8
3,90	3H	<i>s</i>	OCH_3



Spectre IV.126-1 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé A7



Spectre IV.126-2 : RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) étalé (6 à 9 ppm) du composé A7

La combinaison des résultats de la RMN ^1H ainsi que ceux du spectre UV permet de localiser le groupement méthoxyle en position C-4'. Ce qui mène à la structure suivante : **Génistéine 4'-méthyle éther (biochanine A)** [35] (figure IV.65).

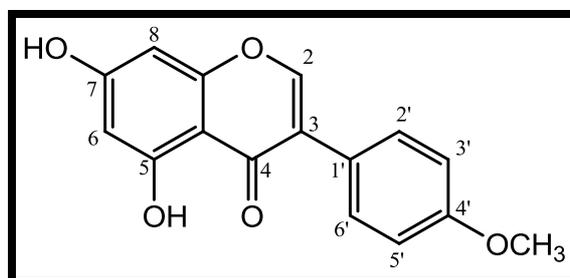
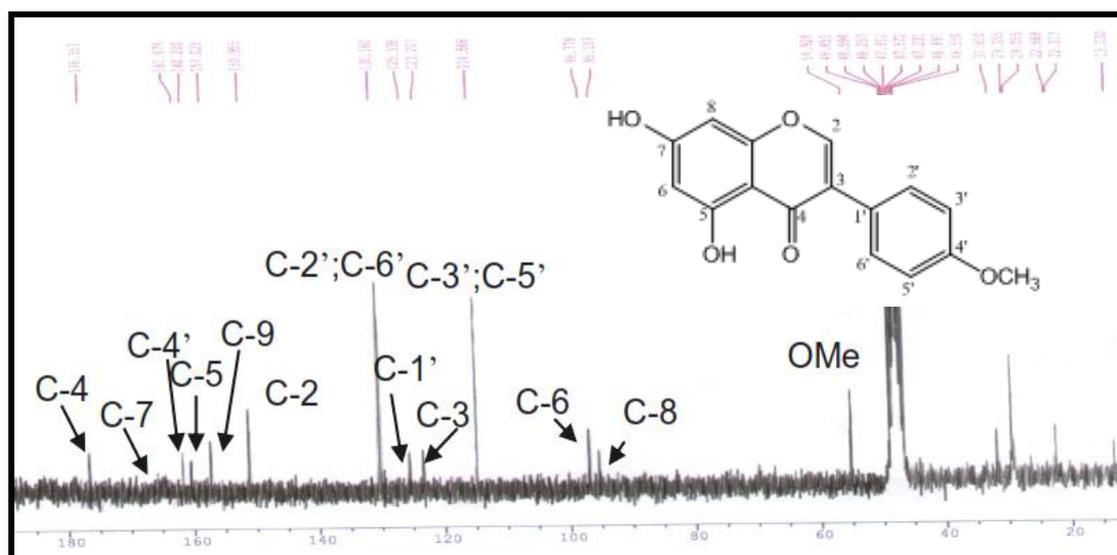


Figure IV.65 : Structure du composé A7, biochanine A

Cette structure est confirmée par la comparaison du spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.127) de ce produit avec celui de la littérature [36]. Les données de la spectroscopie RMN ^{13}C sont regroupées dans le tableau IV.36.



Spectre IV.127 : Spectre RMN ^{13}C (62,5 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé A7

Tableau IV.35 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (63, MHz, CD_3OD , δ ppm, J/Hz) du composé **A7**

Position de ^{13}C	Composé A7 δ (ppm)	Biochanine A
2	150,95	154,50
3	123,20	124,10
4	176,35	181,60
5	160,20	163,90
6	96,77	99,90
7	165,00	165,00
8	95,15	94,50
9	157,02	159,00
10	-	106,20
1'	125,33	123,80
2'	130,16	131,10
3'	114,58	114,50
4'	161,47	161,70
5'	114,58	114,50
6'	130,16	131,10
OMe	54,92	55,60

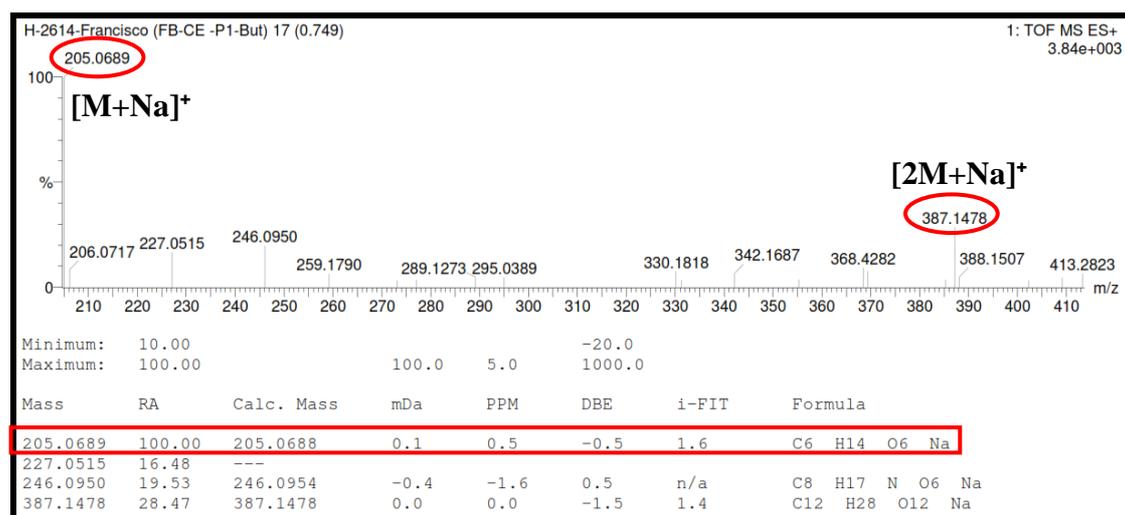
IV-B-8- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a conduit à l'isolement et l'identification de 7 produits parmi lesquels 1 est de structure originale, il s'agit de : isorhamnétine (**A1**), acide vanillique (**A2**), β -hydroxy propiovanillone (**A3**), apigénine (**A4**), 8-[(R) 6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène (**A5**), (R)-8-hydroxyaegelinol (**A6**), biochanine A (**A7**) et du composé **C5** isolé et identifié également de l'extrait chloroforme.

IV-C- Identification des produits isolés de la phase *n*-butanolique

IV-C-1- Elucidation structurale du composé **N1**

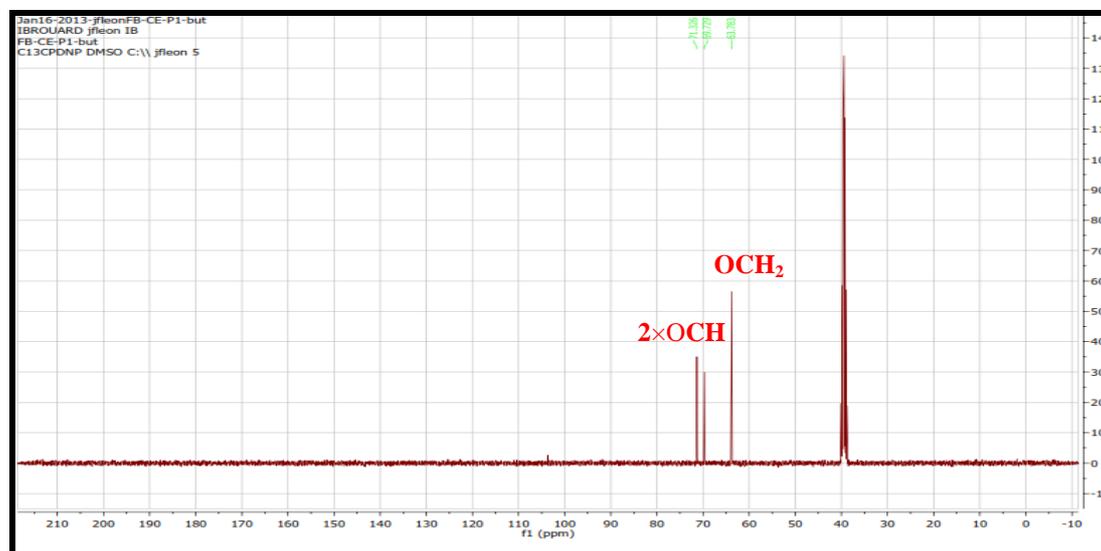
Le composé **N1**, invisible sous UV (254 et 365 nm) se présente sous forme de cristaux blancs. Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électrobulbion positive (TOF -HRESI-MS (+)) (Spectre IV.128), présente deux pics, le premier à $m/z = 205,0689$ correspond à $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et le deuxième à $m/z = 387,1478$ correspond à $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui oriente vers une masse moléculaire de 182 Da correspondant à la formule brute $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$. Cette molécule ne comporte aucune insaturation.



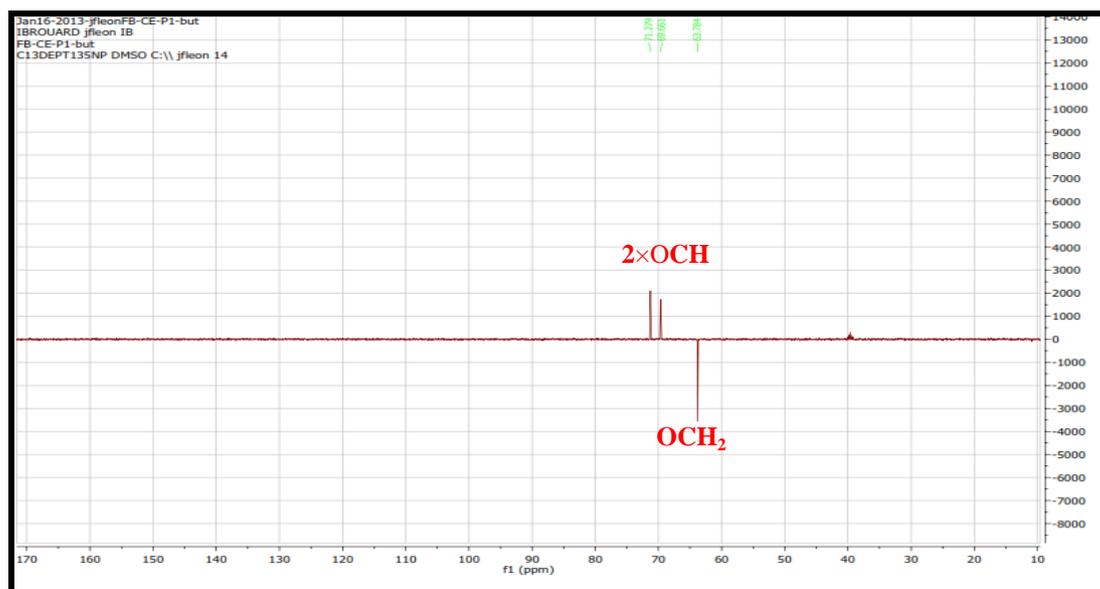
Spectre IV.128 : Spectre de masse HR-EI relatives du composé N1

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.129) et DEPT 135° (Spectre IV.130) enregistré dans le DMSO- d_6 , montre la présence de trois signaux que l'on peut identifier comme suit :

- ✓ Le premier signal à $\delta_{\text{C}} = 63,78$ ppm attribuable à un CH_2 oxygéné.
- ✓ Les deux autres signaux à $\delta_{\text{C}} = 69,72$ et $71,32$ ppm sont attribuables à deux CH oxygénés.



Spectre IV.129 : Spectre RMN ^{13}C du composé N1 (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)



Spectre IV.130 : Spectre DEPT 135° du composé **N1** (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

La formule brute de ce composé $C_6H_{14}O_6$ ainsi que la présence de trois signaux de carbone dans le spectre RMN ^{13}C , orientent vers une symétrie dans cette structure. On peut alors dire que nous avons 2 groupements CH_2 oxygénés et 4 groupements CH oxygénés dans cette molécule. A ce stade de notre analyse nous pouvons déduire que nous sommes en présence d'un alditol en C_6 et donc un composé de formule générale $HOCH_2-(CHOH)_4-CH_2OH$.

L'examen du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre IV.131) enregistré dans le DMSO- d_6 montre trois signaux d'intégration 2H chacun ne présentant aucune corrélation avec les carbones de la molécule et de ce fait attribués aux 6 groupements OH qui sont donc magnétiquement équivalents deux à deux. Ces trois groupes de protons résonnent comme suit :

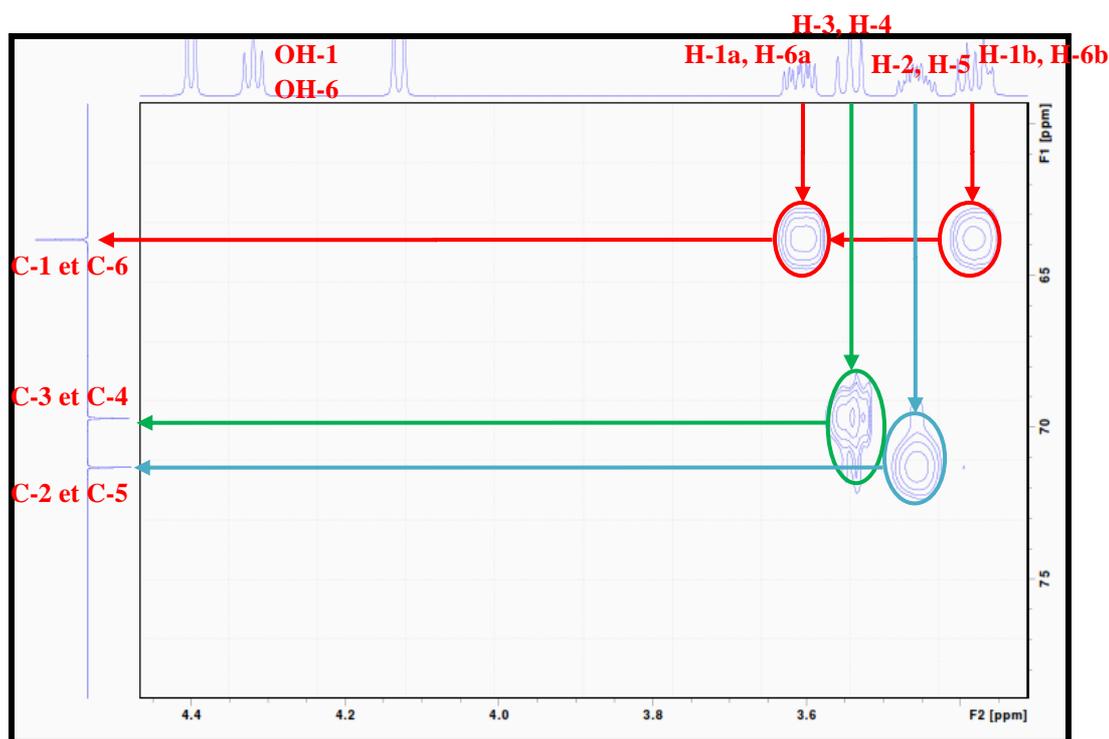
- un triplet à $\delta_H = 4,31$ ppm ($J = 5,6$ Hz) attribuable aux protons des hydroxyles en C-1 et en C-6, vu la multiplicité de leur signal ;
- deux doublets, le premier à $\delta_H = 4,40$ ppm ($J = 5,4$ Hz) et le second à $\delta_H = 4,12$ ppm ($J = 6,9$ Hz) que nous attribuerons un peu plus tard.

Le spectre HSQC montre également :

- deux taches de corrélation entre les carbones des deux CH_2 oxygénés (CH_2-1 et CH_2-6 résonant tous les deux à $\delta_C = 63,78$ ppm et deux types de protons résonant sous forme de deux multiplets à $\delta_H = 3,61$ ppm et $\delta_H = 3,38$ ppm et d'intégration 2H chacun. Ces signaux correspondent à H-1a et H-6a pour le

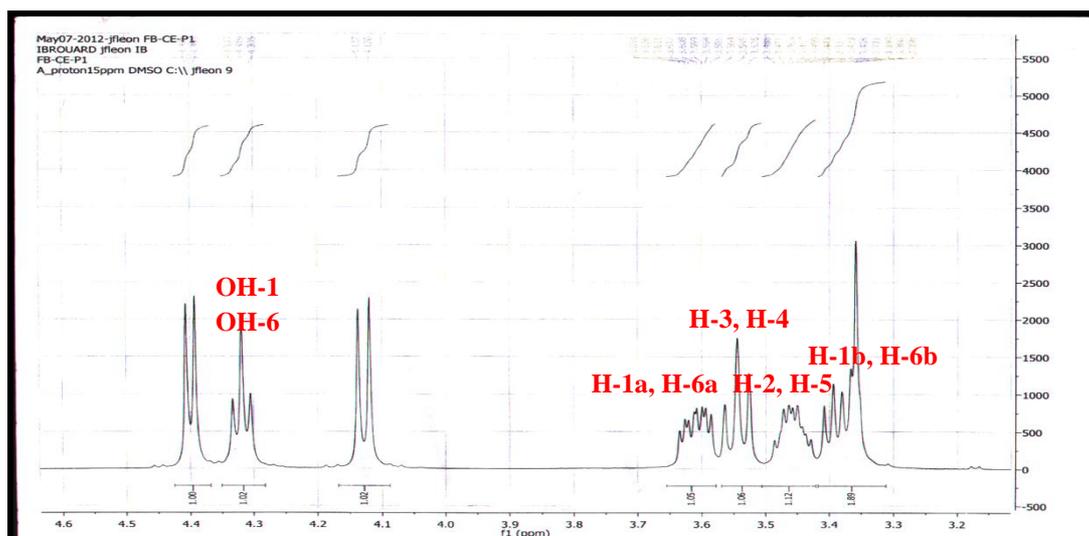
premier et H-1b et H-6b pour le second. Le signal à $\delta_C = 63,78$ ppm sera donc attribué aux carbones C-1 et C-6.

- une tâche de corrélation entre les carbones des deux CH résonant tous les deux à $\delta_C = 69,72$ ppm et dont les protons résonnent sous forme d'un triplet à $\delta_H = 3,54$ ppm ($J = 6,9$ Hz). La multiplicité de ce signal indique deux interactions de couplage uniquement comme l'une d'elle résulte du couplage avec le proton d'un hydroxyle, il n'en reste plus qu'une seule. Cette situation n'est possible que pour le proton H-3 et le proton H-4 qui sont magnétiquement équivalents et de ce fait ne couplent pas. Ainsi ce signal sera attribué aux protons H-3 et H-4. De ce fait, le signal à $69,72$ ppm sera attribué aux carbones C-3 et C-4.
- une tâche de corrélation entre les carbones du dernier signal à $\delta_C = 71,32$ ppm et les deux protons du signal sous forme de multiplet à $\delta_H = 3,45$ ppm. Ces protons sont donc attribués aux H-2 et H-5 et le signal à $\delta_C = 71,32$ ppm aux carbones C-2 et C-5.



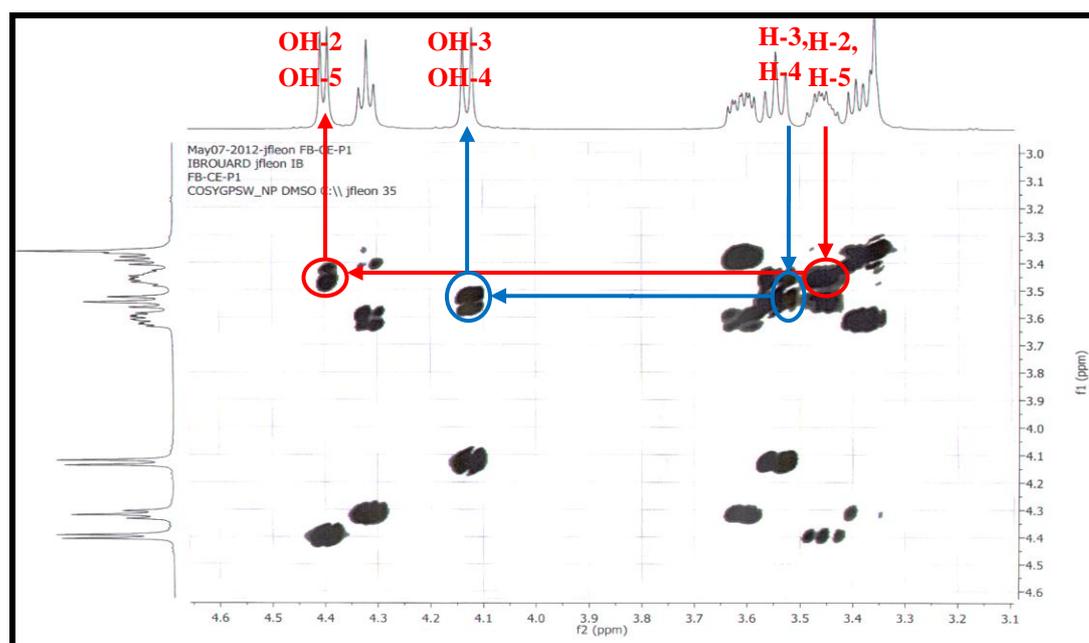
Spectre IV.131 : Spectre HSQC étalé du composé N1 (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)

Les signaux de l'ensemble des protons de cette molécule sont très bien résolus sur le spectre proton (Spectre IV.132).



Spectre IV.132 : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé **N1**

L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre IV.133) confirme les attributions précédentes et permet de terminer les attributions des hydroxyles à leur position respective. En effet, ce spectre enregistré dans le $\text{DMSO}-d_6$ montre la présence de taches de corrélation notamment entre les deux protons des deux hydroxyles résonant à $\delta_{\text{H}} = 4,40$ ppm et les deux protons résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm (H-2 et H-5) permettant donc de placer ces hydroxyles dans les positions C-2 et C-5. On en déduit donc, que les hydroxyles résonant à $\delta_{\text{H}} 4,12$ ppm sont dans les positions C-3 et C-4. Ceci est d'ailleurs bien confirmé sur le spectre COSY où la corrélation entre les protons H-3 et H-4 ($\delta_{\text{H}} 3,54$) et les protons de ces hydroxyles est nette.



Spectre IV.133 : Spectre COSY (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm) du composé **N1**

Les données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C relatives à ce composé sont présentés dans le tableau IV.36.

Tableau IV.36 : Les résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du composé **N1** (400 MHz; DMSO- d_6)

N°	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicités	$J(\text{Hz})$
CH ₂ -1 et CH ₂ -6	63,78	Ha 3,61	<i>m</i>	-
		Hb 3,38	<i>m</i>	-
CH-2 et CH-5	71,32	3,45	<i>m</i>	-
CH-3 et CH-4	69,72	3,54	<i>t</i>	6,9
OH-1 et OH-6	-	4,31	<i>t</i>	5,6
OH-2 et OH-5	-	4,40	<i>d</i>	5,4
OH-3 et OH-4	-	4,12	<i>d</i>	6,9

D'après la littérature [37] et Toutes les données qui viennent d'être exposées, se sont avérées identiques à celles d'un sucre réduit connu sous le nom **D-mannitol** (Figure IV.66).

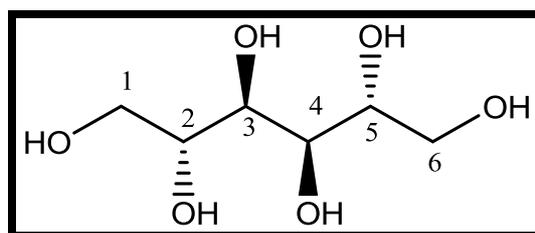


Figure IV.66 : Structure du composé **N1**, **D-mannitol**

IV-C-2- Elucidation structurale du composé **N2**

Le composé **N2** se présente sous forme d'une poudre soluble dans le méthanol. Ce composé de fluorescence violette sombre sous la lumière de Wood laisse envisager une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3 [38].

L'étude de la série spectrale UV-Vis donne les indications suivantes :

- ✓ Le spectre d'absorption UV-Vis (Spectre IV.134) enregistré dans le méthanol montre deux bandes. La première ayant un maximum d'absorption à $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm et la 2^{ème} ayant un maximum d'absorption à $\lambda_{\text{max}} = 253$ nm, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol substitué en position 3, vu sa fluorescence violette sombre [39].

- ✓ L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +60$ nm) avec une augmentation de l'intensité d'absorption comparativement à celui enregistré dans le méthanol suppose la présence d'un OH libre en C-4', l'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda = 325$ nm laisse supposer la présence d'un OH libre en position C-7.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +50$ nm) enregistré après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH libre en C-5.
- ✓ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +20$ nm) confirme la présence d'un OH en position C-7.

Ces résultats permettent de proposer la structure partielle reportée dans la figure IV.67.

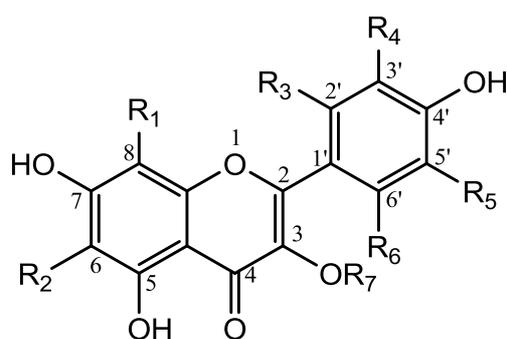
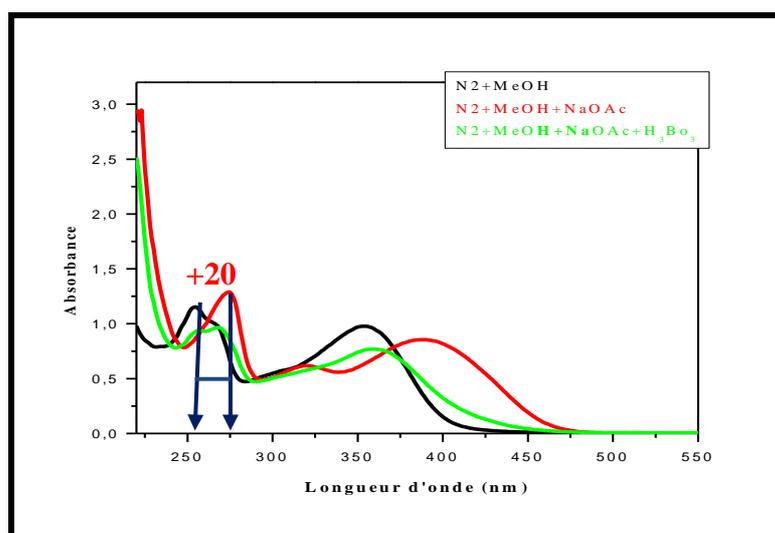
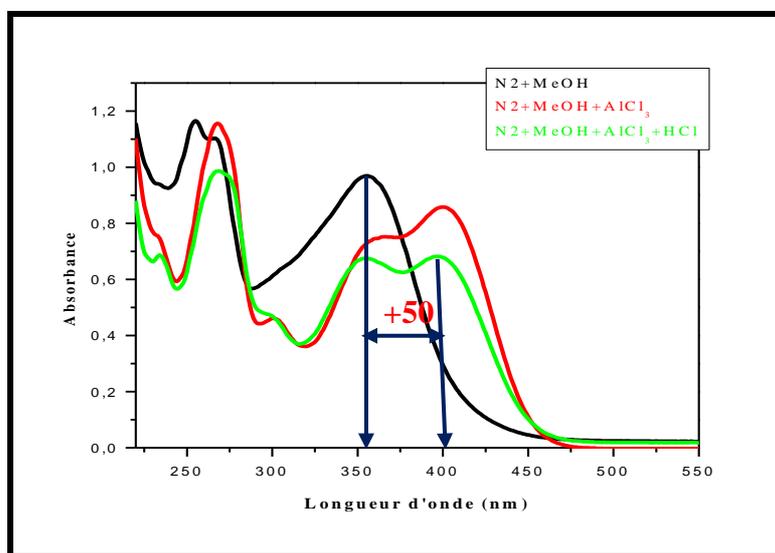
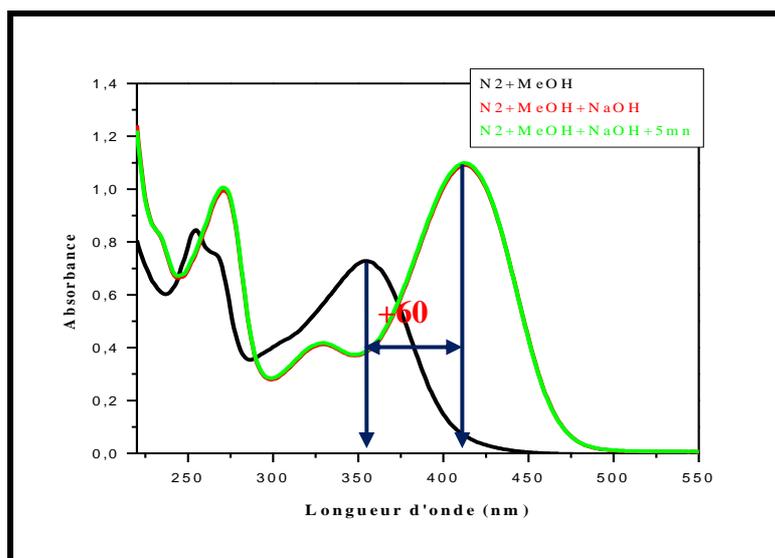


Figure IV.67 : Structure partielle du composé **N2**

Les résultats de la spectrophotométrie UV-Vis sont reportés dans le tableau IV.37.

Tableau IV.37 : Données de la série spectrale UV-Visible du composé **N2**

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Nouvelle bande (nm)	commentaires
MeOH	350	253	-	flavonol substitué en C-3
+NaOH	410	273	325	OH en C-4' OH en C-7
+AlCl ₃	403	253	-	OH libre en C-5
+AlCl ₃ /HCl	400	253	-	
+NaOAc	395	273	-	OH en C-7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	351	253	-	Pas de systèmes ortho-di-OH
Spectre stable avec NaOH après 5min				



Spectre IV.134 : Série spectrale UV-visible du composé N2

L'examen du spectre de RMN ^1H (Spectre IV.135-1), montre la présence de signaux caractéristiques d'un squelette flavonique, il s'agit de :

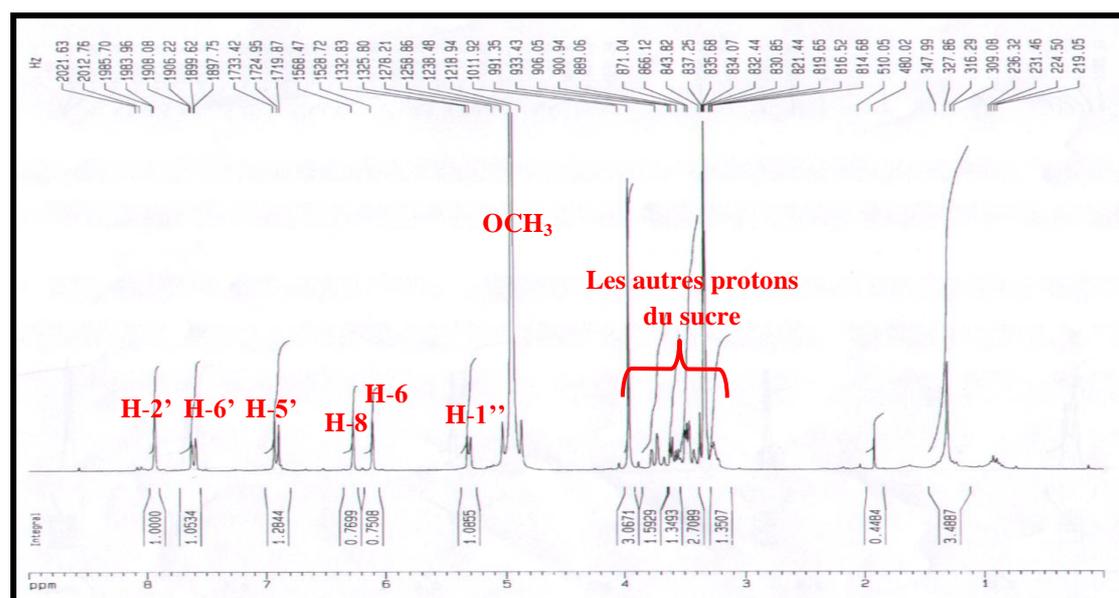
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,95$ ppm avec une constante de couplage $J = 1,9$ Hz attribuable à H-2' du noyau B d'un flavonoïde
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,61$ ppm $J = 8,5 ; 1,9$ Hz attribuable à H-6' du noyau B.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,92$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,5$ ppm attribuable à H-5' du noyau B.

Ces trois signaux sont caractéristiques d'un cycle B substitué en C-3' et C-4'.

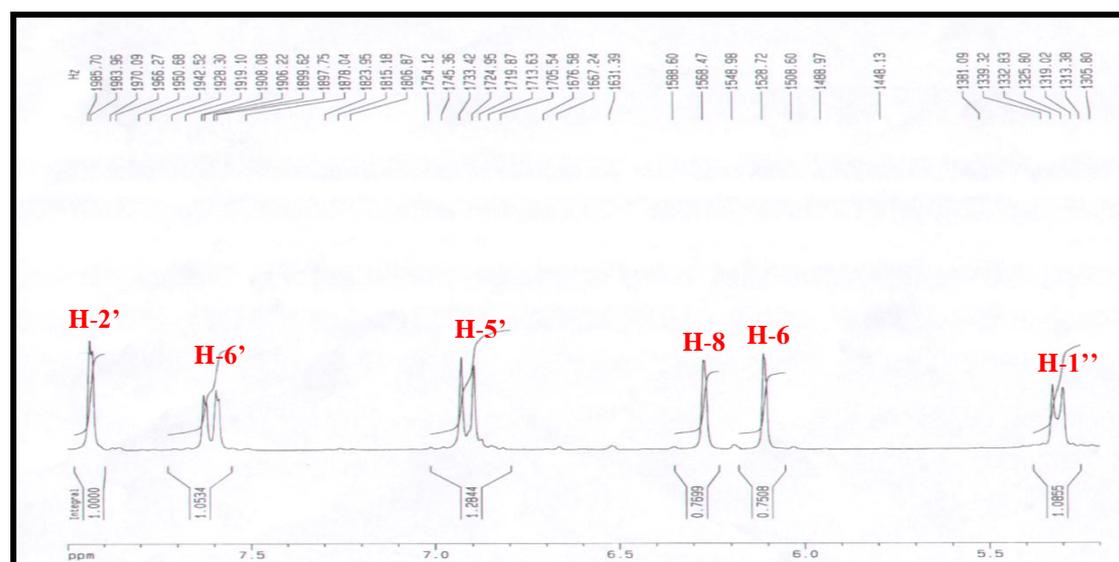
- ✓ Deux signaux sous forme de singulets larges d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,30$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,10$ ppm attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement du noyau A.

Ces deux signaux indiquent la disubstitution du cycle A en C-5 et en C-7.

- ✓ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule qui peut être d'après les résultats de la spectrophotométrie UV-Vis, soit en position C-3 du cycle C soit en position C-3' du cycle B.
- ✓ L'examen de l'ensemble du spectre de RMN ^1H (Spectre IV.135-2), montre la présence d'un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 5,30$ ppm caractéristique du proton anomérique d'un groupement glycosyle relié à l'aglycone par un pont oxygéné vu la valeur de son déplacement chimique. Vu la valeur de sa constante de couplage $J = 7,30$ Hz, relevée dans le signal de ce proton anomérique, le carbone anomérique de ce sucre admet une configuration β . Nous numéroterons ce proton anomérique H-1''.
- ✓ Les autres protons du sucre résonnent entre $\delta_{\text{H}} = 3,1-3,9$ ppm.



Spectre IV.135-1 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé N2



Spectre IV.135-2 : Spectre RMN ^1H zone étalée 5 à 8 ppm (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé N2

Il nous reste à déterminer la nature et la position du sucre. Pour cela nous avons procédé à l'hydrolyse acide de notre produit. En effet, après la réaction d'hydrolyse acide et refroidissement du produit, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide par de l'acétate d'éthyle pour récupérer l'aglycone. Après séchage avec un grain de sulfate de sodium de la phase organique et évaporation, nous avons déposé une goutte de cet extrait sur papier Watman N°3 et nous l'avons soumise à la lumière de Wood. Cette aglycone montre une fluorescence jaune (Figure IV.68). La couleur de cette fluorescence indique que notre produit natif était 3-*O*-glycosylé.

A ce stade on peut alors dire que le groupement méthoxyle précédemment signalé est en position C-3' du cycle B.



Figure IV.68 : Aglycone sur papier Watman sous UV 365 nm

Par ailleurs nous avons concentré au maximum la phase aqueuse et nous l'avons co-chromatographiée en présence de sucres témoins (Figure IV.69).

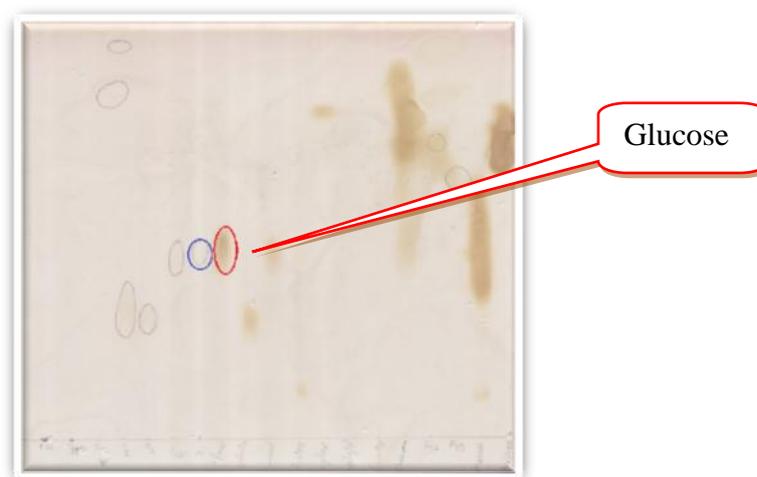


Figure IV.69 : Co-chromatographie avec des sucres témoins de la partie osidique obtenue après hydrolyse acide

Après élution de la plaque et chauffage à l'étuve pendant 5 min, on relève clairement que l'entité sucre est le glucose.

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ^1H et de la série spectrale UV mène à la structure reportée dans la figure IV.70. Il s'agit de la **5, 7, 4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-O-glucosylflavone** ou bien **isorhamnétine-3-O- β -glucopyranoside (cacticine)** [40].

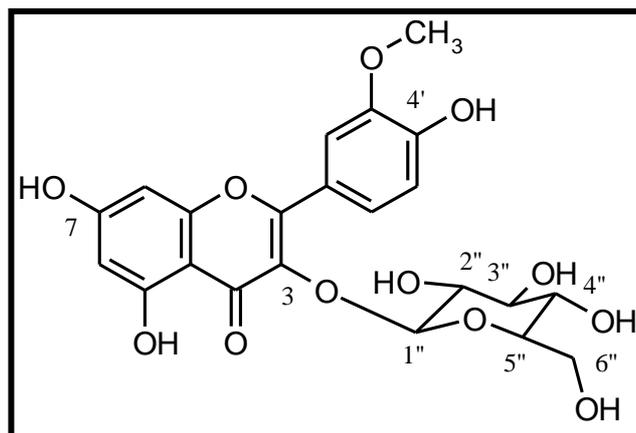


Figure IV.70 : Structure finale du composé N2, cacticine

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau IV.38.

Tableau IV.38 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H du composé N2

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
7,95	1H	<i>d</i>	1,9	H-2'
7,61	1H	<i>dd</i>	8,5 ; 1,9	H-6'
6,92	1H	<i>d</i>	8,5	H-5'
6,30	1H	<i>s</i>	-	H-8
6,10	1H	<i>s</i>	-	H-6
5,30	1H	<i>d</i>	7,3	H-1''
3,90	3H	<i>s</i>	-	O-CH ₃

IV-C-3- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur la fraction *n*-butanol des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a conduit à l'isolement et l'identification de 4 produits il s'agit de : mannitol (N1), cacticine (N2) ainsi que les composés C5 (isolé de la phase chloroforme et également de la phase acétate d'éthyle) et A5 (isolé de la phase acétate d'éthyle).

IV-D- Résultats des activités biologiques

IV-D-1- Activité antioxydante (*in vitro*) de l'extrait *n*-BuOH

IV-D-1-1- Effet scavenger du radical DPPH•

Nos résultats ont révélé que l'extrait *n*-butanol (BEPB) présentait un effet scavenger du radical DPPH• maximum 59,86-78,40 % à la concentration comprise entre 1000 et 1200 $\mu\text{g/mL}$, ce qui représente une activité faible par rapport aux

standards utilisés. En effet, le trolox a donné 83,36 % à la concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$ et l'acide ascorbique 98 % à 200 $\mu\text{g/mL}$. L'activité anti-radicalaire de l'extrait BEPB était beaucoup plus faible (IC_{50} : $876,16 \pm 7,96 \mu\text{g/mL}$) que celles des deux références standard (trolox IC_{50} : $30,08 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$, acide ascorbique IC_{50} : $6,41 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$), ce qui suggère que l'effet antioxydant de l'extrait BEPB était modéré et nécessitait une concentration élevée pour avoir un effet significatif (Figure IV.71).

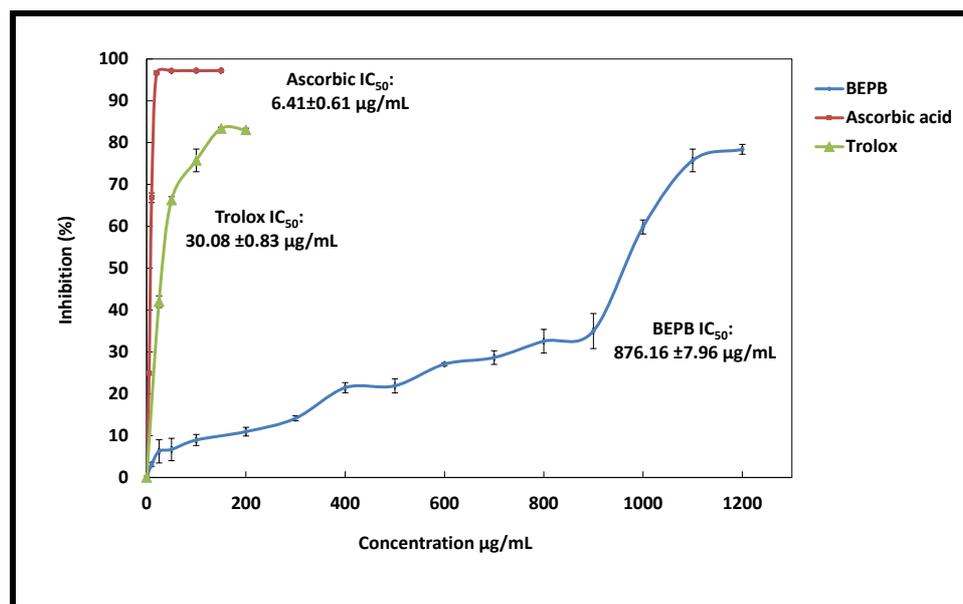


Figure IV.71 : Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait *n*-BuOH de *Pituranthos battandieri* (BEPB), de l'acide ascorbique et du trolox. Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart type ($n = 3$), $P < 0,05$.

IV-D-1-2- Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Malgré que le H_2O_2 ait été considéré comme peu réactif en raison de ses capacités d'oxydation plus faibles, il peut produire une cytotoxicité en générant un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) qui peut initier une peroxydation lipidique [41,42]. L'activité de piégeage de H_2O_2 du BEPB est également dépendante de la concentration, le BEPB possède également une capacité significative à éteindre le peroxyde d'hydrogène, l'activité de piégeage de H_2O_2 s'est révélée être maximale (66,81 à 75,60 %) à une concentration comprise entre 1000-1200 $\mu\text{g/mL}$ avec IC_{50} : $603,8 \pm 71,06 \mu\text{g/mL}$. Le trolox qui a été pris comme référence présente une inhibition de 81,21 % de H_2O_2 à une concentration de 400 $\mu\text{g/mL}$ avec IC_{50} : $92,5 \pm 8,90 \mu\text{g/mL}$ (Figure IV.72).

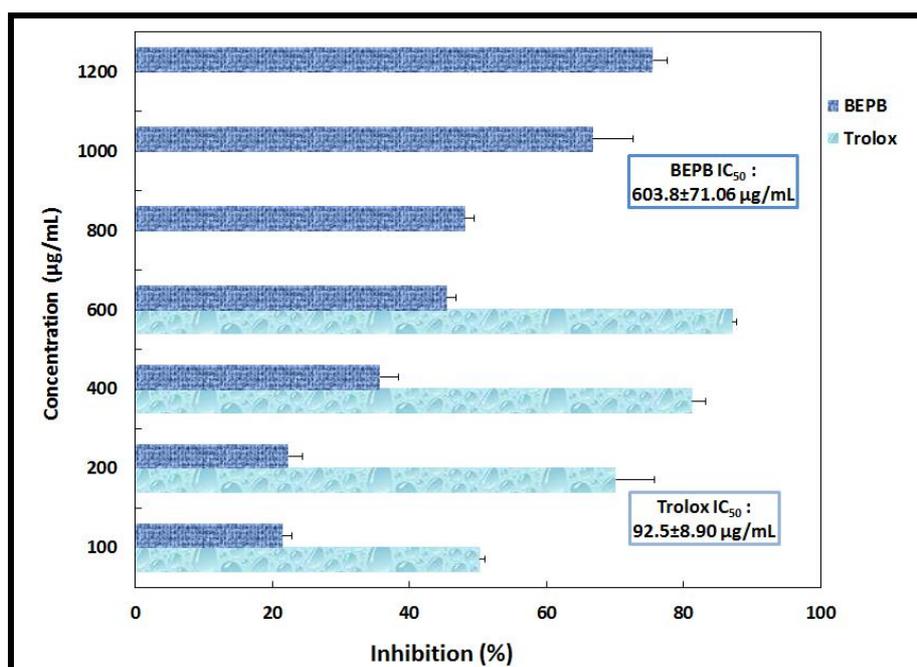


Figure IV.72 : Capacité du piégeage du H_2O_2 de l'extrait BEPB et du trolox .

Chaque valeur représente une moyenne \pm SD (n = 3), P < 0,05.

IV-D-1-3- Propriété antihémolytique de BEPB

L'hémolyse est la rupture de la membrane des globules rouges, provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants dans le liquide extra-cellulaire [43]. Le processus hémolytique des érythrocytes H_2O_2 peut être expliqué par la pénétration du H_2O_2 dans les membranes cellulaires qui déclenche la formation de radicaux hydroxyle ($OH\cdot$) en présence d'ions métalliques [44], les radicaux hydroxyles qui éliminent les atomes d'hydrogène des lipides membranaires conduisent à une peroxydation lipidique et à une fuite d'hémoglobine [45]. Les résultats de la présente étude indiquent clairement que le BEPB a inhibé l'hémolyse des érythrocytes de rat induite par H_2O_2 d'une manière dépendante de la dose. Le pourcentage maximal d'inhibition (61,58 %) présenté par BEPB était à une concentration de 1000-1200 $\mu\text{g/mL}$, avec une valeur de IC_{50} : $782,38 \pm 89,97 \mu\text{g/mL}$ (Figure IV.73), la référence standard, trolox a présenté 87,85 % d'inhibition de l'hémolyse à 700 $\mu\text{g/mL}$ avec une valeur de IC_{50} : $36,18 \pm 3,51 \mu\text{g/mL}$ (Figure IV.73).

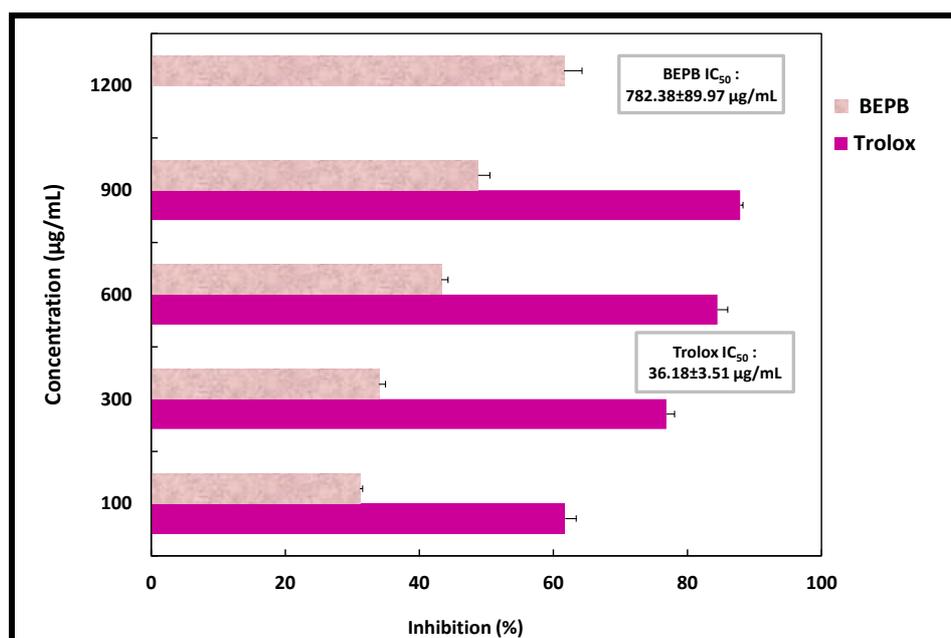


Figure IV.73 : Propriétés antihémolytiques du BEPB et du trolox (standard). Chaque valeur représente une moyenne \pm SD (n = 3), P < 0,05.

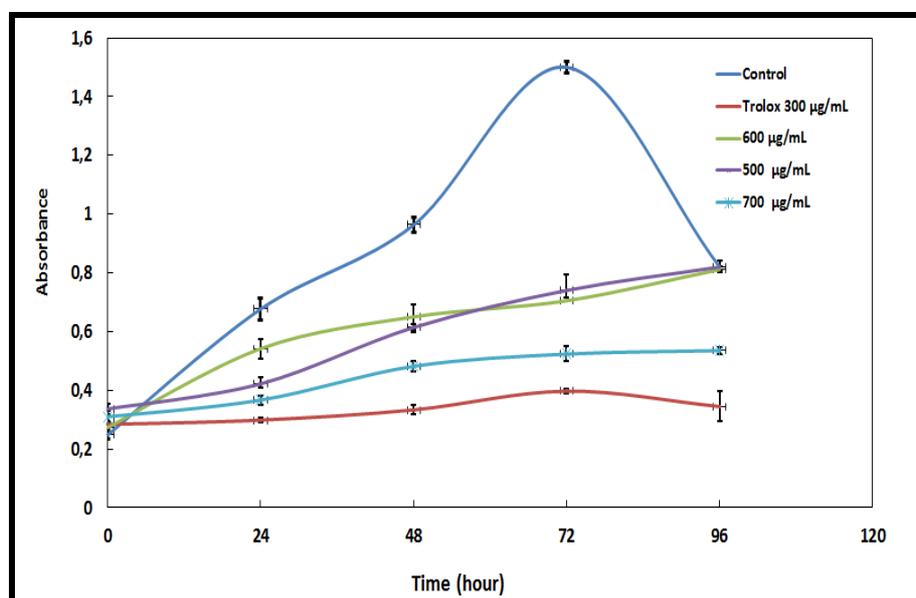
IV-D-1-4- L'inhibition de la peroxydation lipidique du BEPB-thiocyanate d'ammonium

Un des dommages au stress oxydatif est la peroxydation lipidique qui produit des peroxydes lipidiques [46]. La peroxydation lipidique se déroule habituellement sous la forme d'une réaction en chaîne ; suivie dans la phase de propagation par la formation d'espèces réactives et se terminant par la formation d'hydroperoxyde de lipide (ROOH) [47,48]. Dans notre étude, l'inhibition des activités de peroxydation lipidique de BEPB a été estimée par la méthode du thiocyanate en utilisant l'acide linoléique comme source de peroxyde [49]. Le peroxyde généré réagit avec le chlorure ferreux (Fe^{2+}) pour donner les ions ferriques (Fe^{3+}) qui forment un complexe coloré avec les ions SCN^- . L'acide linoléique, un acide gras insaturé, peut être facilement peroxydé et produit divers composés tels que les aldéhydes et les époxydes. La présente étude a suivi la quantité de peroxyde de lipide formé toutes les 24 heures, sur une période de 4 jours, en surveillant le complexe coloré du peroxyde de lipide qui absorbe la lumière à 500 nm. Nous avons constaté qu'au cours du troisième jour, l'absorbance de la solution de contrôle atteignait un maximum indiquant la formation maximale de peroxydes lipidiques. La faible valeur d'absorbance à 500 nm indiquait un niveau élevé d'inhibition de la peroxydation

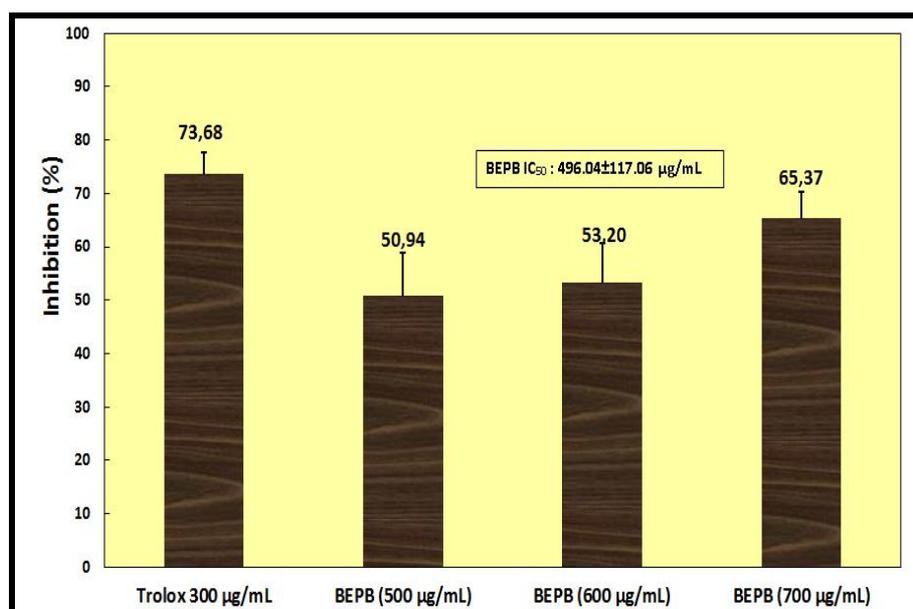
lipidique et donc une activité antioxydante élevée. La figure IV.74 montre que la DO du témoin a augmenté jusqu'à $1,50 \pm 0,03$ en 72 h, puis elle a diminué ; en même temps la DO du BEPB à $700 \mu\text{g/mL}$ a été enregistré à $0,52 \pm 0,03$, tandis que le trolox en tant qu'antiperoxydant standard a montré une valeur de la DO de seulement $0,40 \pm 0,01$ à $300 \mu\text{g/mL}$. Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par le BEPB aux concentrations 500 , 600 , $700 \mu\text{g/mL}$ étaient de $50,94 \%$, $53,20 \%$ et $65,37 \%$, respectivement avec une valeur de l' IC_{50} : $496,04 \pm 117,06 \mu\text{g/mL}$ comparé au trolox ($73,68 \%$) à $300 \mu\text{g/mL}$ avec une valeur de IC_{50} : $125,69 \pm 16,40 \mu\text{g/mL}$ (Figure IV.74 a et b) (Tableau IV.39).

Tableau IV-39 : Valeurs des IC_{50} des activités antioxydantes de l'extrait BEPB, de l'acide ascorbique et du trolox. Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart type ($n = 3$), $P < 0,05$

	DPPH•	LPO
Extrait <i>n</i> -BuOH	$1501,00 \pm 100,71$	$496,04 \pm 117,06$
Acide ascorbique	$6,44 \pm 0,61$	-
Trolox	-	$125,69 \pm 16,40$



(a)



(b)

Figure IV.74 : L'activité antipéroxydative de l'extrait BEPB et du trolox (a), pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (b). Chaque valeur représente une moyenne \pm SD (n = 3), P <0,05

Nos résultats actuels ont révélé que la BEPB exerce un effet antioxydant sur la piégeage des radicaux libres (DPPH, H_2O_2), l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'inhibition de l'hémolyse. Ces propriétés peuvent être dues à l'activité combinée des composants bioactifs plus particulièrement les furanocoumarines et les flavonoïdes, qui sont reconnus comme antioxydants et sont capables de donner de l'hydrogène à un radical libre (DPPH• et H_2O_2) pour les convertir en espèces non réactives [50-53]. L'étude de la structure-activité a montré que l'activité antioxydante des dérivés de la coumarine pouvait être attribuée à la nature donneuse d'électrons des substituants tels que -OH, -CH₃ et -Cl sur le squelette coumarine pour réduire les radicaux libres et prévenir les dommages cellulaires [54-56]. De nombreux chercheurs ont reporté que les flavonoïdes jouent un rôle important dans le traitement de l'anémie. En effet, la liaison des flavonoïdes aux membranes RBC inhibe de manière significative la peroxydation lipidique et en même temps améliore leur intégrité contre la lyse [43,57,58].

IV-D-2- L'activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH

Les figures IV-75 et IV-76 montrent les boîtes de Pétri avant et après incubation.

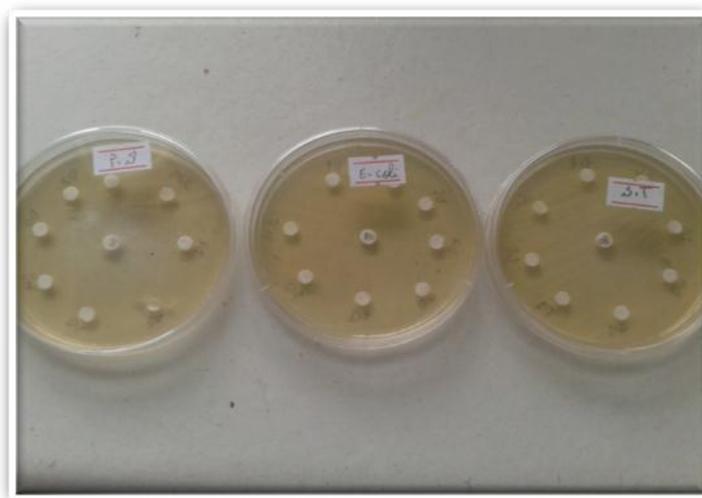


Figure IV-75 : Boîtes de Pétri des trois souches bactériennes utilisées, avant incubation

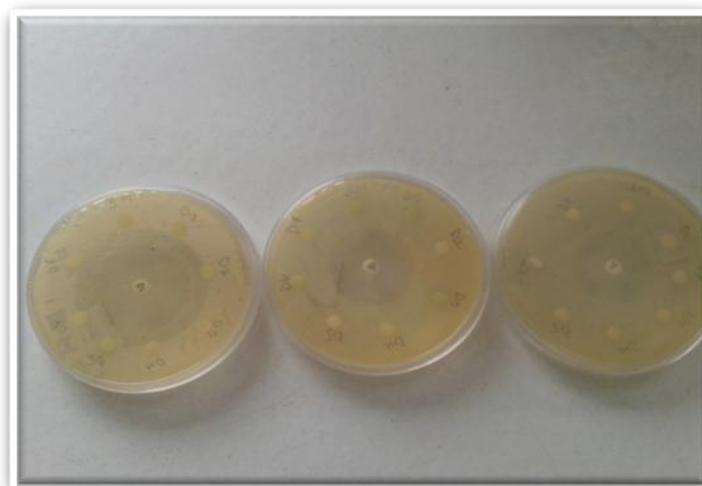


Figure IV-76 : Boîtes de Pétri des trois souches bactériennes utilisées après incubation

Pour les trois souches on relève que les trois antibiotiques qui sont utilisés comme référence ont un diamètre d'inhibition de :

- D = 27 mm pour Cefoxine
- D = 24 mm pour Imipénème
- D = 18 mm pour Ticarcilline

Par contre les trois souches testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) ont été résistantes vis-à-vis de l'extrait *n*-butanol de *Pituranthos battandieri* Maire aux concentrations utilisées.

IV-D-3- Conclusion

Sur la base des résultats obtenus dans la présente étude, nous concluons que l'extrait *n*-BuOH de *P. battandieri* possède des propriétés antioxydantes dans tous les modèles d'oxydation (DPPH•, H₂O₂, hémolyse de H₂O₂-rats, LPO-thiocyanate/acide linoléique), le dommage anti oxydatif prouvé par *P. battandieri* apparaît comme conséquence d'interactions synergiques entre un certain nombre de constituants actifs. Par contre cet extrait ne possède pas d'activité antibactérienne sur les souches bactériennes testées.

IV-E- Conclusion du chapitre

A l'issue de l'étude de la composition chimique des trois extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire, vingt trois composés ont été isolés dont treize de type coumarine, parmi lesquels cinq sont nouveaux et n'ont jamais été décrits dans la littérature. Il s'agit de quatre flavonoïdes, deux stéroïdes, trois composés phénoliques et un sucre réduit ; ces molécules sont :

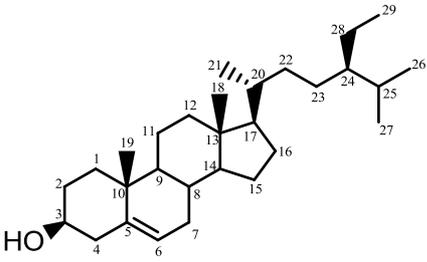
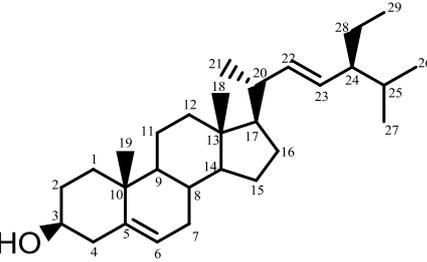
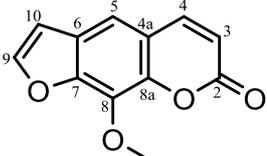
- **C1** : mélange de β -sitosterol et stigmasterol (50-50%) ;
- **C2** : xanthoxine ;
- **C3** : phellopterine ;
- **C4** : vanilline ;
- **C5** : xanthoxol ;
- **C6** : (R)-pituranthosine A ;
- **C7** : (R,S)-pituranthosine B ;
- **C8** : R-(+)-marmine ;
- **C9** : (R)-(+)-héraclénine ;
- **C10** : (S)-(-)-pituranthosine C ;
- **C11** : R-(+)-byakangelicol ;
- **C12** : R-(+)-byakangelicine ;
- **C13** : pituranthosine D
- **C14** : mélange de daucostérol et stignastérol 3-*O*- β -glucopyranoside (72-28%)

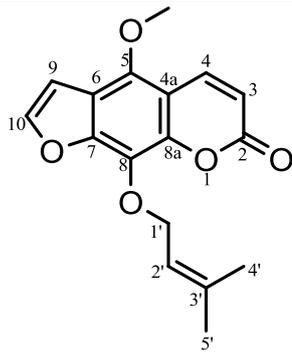
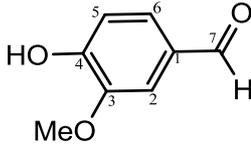
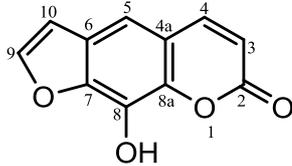
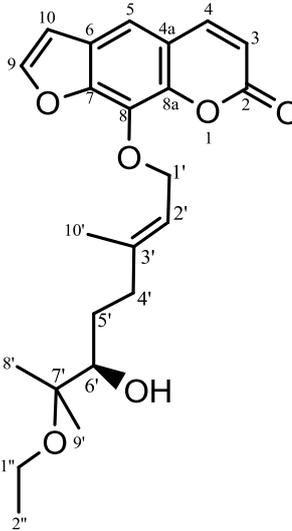
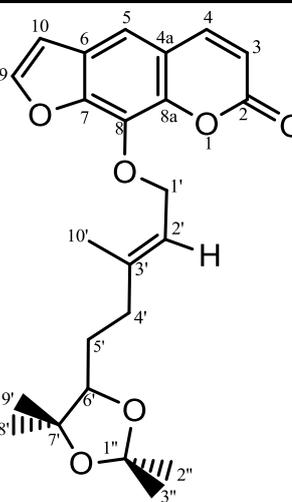
- **A1** : isorhamnétine ;
- **A2** : acide vanillique ;
- **A3** : β -hydroxypropiovanillone ;
- **A4** : apigénine ;
- **A5** : 8-[(R) 6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène ;
- **A6** : (R)-8-hydroxyaegelinol ;
- **A7** : biochanine A ;
- **N1** : mannitol ;
- **N2** : cacticine.

Tous ces composés naturels ont été identifiés pour la première fois dans l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire, les cinq produits **C6**, **C7**, **C10**, **C13** et **A6** sont été isolés pour la première fois dans la littérature.

Le tableau IV.40, rassemble l'ensemble de ces structures qui ont fait l'objet de deux publications internationales et une troisième en cours de soumission.

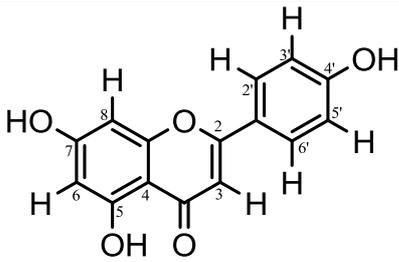
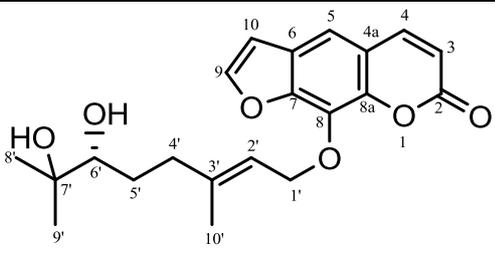
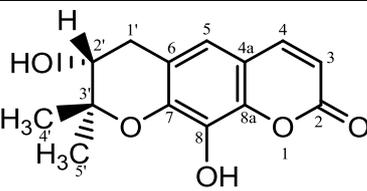
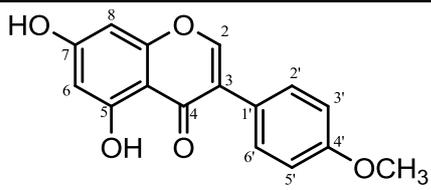
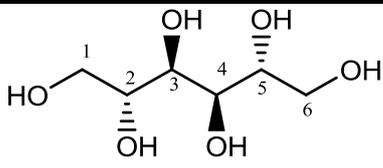
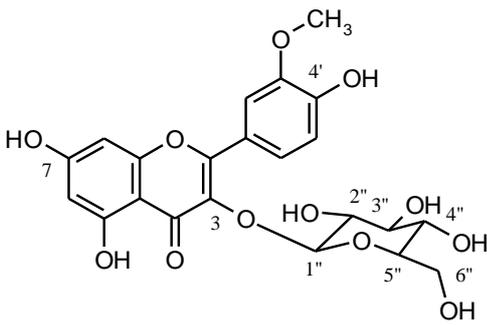
Tableau IV.40 : Les différents composés isolés de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

Extraits	Composés	Formule brute	Structure du composé	Références
CHCl ₃	C1a	C ₂₉ H ₄₈ O		[3]
	C1b	C ₂₉ H ₄₆ O		[3]
	C2	C ₁₂ H ₈ O ₄		[6]

CHCl₃	C3	$C_{17}H_{16}O_5$		[8]
	C4	$C_8H_8O_3$		[9]
	C5	$C_{11}H_6O_4$		[10]
	C6	$C_{23}H_{28}O_6$		Nouvelle
	C7	$C_{24}H_{28}O_6$		Nouvelle

CHCl₃	C8	$C_{19}H_{24}O_5$		[12]
	C9	$C_{16}H_{14}O_5$		[14]
	C10	$C_{14}H_{15}O_5$		Nouvelle
	C11	$C_{17}H_{16}O_6$		[16-18]
	C12	$C_{16}H_{16}O_6$		[19-21]

CHCl ₃	C13	C ₂₁ H ₂₄ O ₇		Nouvelle
	C14a	C ₃₅ H ₆₀ O ₆		[23, 24]
	C14b	C ₃₅ H ₅₈ O ₆		
AcOEt	A1	C ₁₆ H ₁₂ O ₇		[25]
	A2	C ₈ H ₈ O ₄		[26]
	A3	C ₁₀ H ₁₂ O ₄		[30]

AcOEt	A4	$C_{15}H_{10}O_5$		[31]
	A5	$C_{21}H_{24}O_6$		[32,33]
	A6	$C_{14}H_{14}O_5$		Nouvelle
	A7	$C_{16}H_{12}O_5$		[35]
n-BuOH	N1	$C_6H_{14}O_6$		[37]
	N2			[40]

Références bibliographiques

- [1] Souri N. Thèse de magister. « Etude Phytochimique de l'extrait chloroformique De *Pseudeumcaria Teretifolia* », Université El Hadj Lakhdar Batna. 2003.
- [2] Chaturvedula VSP, Prakash I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Int. Curr. Pharm. J. 2012 ; 1 : 239-242.
- [3] Kamboj A, Saluja AK. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). International journal of Pharmaceutical Sciences. 2011 ; 3 : 94-96.
- [4] Chatterjee J, Banerji and SC. Basu. Tetrahedron, 1972 ; 5 : 175.
- [5] Nielsen BE, and. Tidsskr. Farm. Chem. Abstr. 1970 ; 74, 20314.
- [6] Finkelstein N, Albrecht CF and van Jaarsveld PP. Isolation and structure elucidation of xanthotoxin, a phototoxic furanocoumarin, from *Peucedanum galbanum*. S.Afr.J.Bot. 1993 ; 59(1) : 81-84.
- [7] Al-Barwani FM, Eltayeb EA. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. Biochem. Syst. Ecol. 2004 ; 32: 1097-1108.
- [8] Zhao AH, Yang XW. New natural product from lipophilic parts in roots of *Angelica dahurica*. Chin Tradit Herb Drugs. 2014 ; 45(13) : 1820-8.
- [9] Kwon HC, Lee KR. Phytochemical constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. Arch. Pharm. Res. 2001; 24 (3): 194-197.
- [10] He W, Zhang BL, Zhou SY, Sun XL, Zhang SY. Facial total synthesis of xanthotoxol. Synth Commun. 2007 ; 37(3) : 361-367
- [11] Tomihisa O, Minoru N, Shinzo H, Sachiko T. Dihydroxy bergamottin Caproate as a Potent and Stable CYP3A4 Inhibitor. Bioorg. Med. Chem. 2002 ; 969-973p
- [12] Coates RM, Melvin LS. Total synthesis of (+)-marmin and related coumarin monoterpenes, Tetrahedron Lett. 1970 ; 26: 5699-5706
- [13] Shun-ichi Y, Naohito Oh-h, Kazuo A. Synthetic studies on optically active epoxyterpenes from L-glutamic acid-I. Syntheses of R-(+)-Epoxygermoil, R-(+)-Marmin and R-(+)-Epoxyaurapten. Tetrahedron Lett. 1976 ; 29 : 2557-2560.
- [14] Bogucka-Kocka A. The analysis of furanocoumarins in fruits of *Heracleum sibiricum* L. Natural drugs. 1999 ; 56(5) : 399-401.
- [15] Nielsen BE, Lemmich J. Constituents of Umbelliferous Plants. Acta Chem Scand. 1969 ; 23 : 962-966.

- [16] Zhou A, Li Q, Lei H. The studies of chemical constituents from *Angelica dahurica*, Chin. Tradit. Herb. Drugs. 2010 ; 41 : 1081-1083.
- [17] Zhang Y, Jiang S, Xu K, Shi H, Zhou Y, Deng W, Ding L, Peng S. Chemical constituents contained in seeds of *Notopterygium franchetii*. Chin. J. Chin. Mater. Med. 2012 ; 37 : 941-945.
- [18] Lu J, Jin L, Jin YS, Chen HS. Chemical constituents in roots of *Angelica dahurica* var. *formosana*. Acad. J. Mil. Med. Univ. 2007 ; 28 : 294-298
- [19] Liu DP, Luo Q, Wang GH, Xu Y, Zhang XK, Chen QC. Furocoumarin derivatives from radix *Angelicae dahuricae* and their effects on RXRa transcriptional regulation. Molecules 2011 ; 16 : 6339-6348
- [20] Wang LH, Mei YH, Wang F, Liu XS, Chen Y. A novel and efficient method combining SFE and liquid-liquid extraction for separation of coumarins from *Angelica dahuricae*. Separation and Purification Technology. 2011 ; 77 : 397-401.
- [21] Zheng X, Zhang X, Sheng X, Yuan Z, Yang W, Wang Q. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix *Angelicae dahuricae* by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis 2010 ; 51 : 599-605.
- [22] Thastrup O, Lemmich J. Furocoumarin glucosides of *Angelica archangelica* Subspecies *Litoralis*. Phytochemistry 1983 ; 22 : 2035-2037.
- [23] Yili D, Yuting L. Lipid soluble components of *Zhungaerdaiji* (*Euphorbia soongarica*). Zhongcaoyao, 1992 ; 23 : 570-572.
- [24] Voutquene L, Lavaud C. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. Phytochemistry 1999 ; 50 : 63-69.
- [25] SIvancheva, Rtsvetkova. Distribution of flavonoid aglycones in tribe Anthemideae (Asteraceae) Advances in Phytochemistry, Edited By : Imperato, Filippo, 2003 ; 85-95.
- [26] Kwon HC, Lee KR. Phytochemical Constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. Arch. Pharm. Res, 2001 ; 24 (3) : 194-197.
- [27] Skrzypczak-Pietraszek E, Pietraszek J. Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2012 ; 66 : 154-161.

- [28] Weon JB, Kim CY, Yang HJ, Ma CJ. Neuroprotective compounds isolated from *Cynanchum paniculatum*. Arch. Pharmacol Res, 2012 ; 35(4) : p. 617-621.
- [29] Huang Z, L Dostal, Rosazza JPN, Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by *Rhodotorula rubra*. J. Biol. Chem. 1993 ; 268(32) : p. 23954-23958.
- [30] Karonen M, Nieminen R, Klika KD, Lojonen J, Ovcharenko VV, Moilanen E, Pihlaja K. Phenolic extractives from the Bark of *Pinus Sylvestris L.* and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2, J. Agric. Food Chem, 2004 ; 52 : 7532-7540.
- [31] Kouichi M, Takashi T, Isao K, Toshihiro F, Yuki Y, Kanji I. New iridoid diesters of glucopyranose from *Linaria canadensis (L.)*Dum. J. Nat. Med. 2011 ; 65 : 172-175.
- [32] Ito A, Shamon LA, YuB, Mata-Greenwood E, Lee SK, Van Breemen RB, Mehta RG, Farnsworth NR, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. J. Agric. Food Chem. 1998 ; 46(9) : 3509-3516.
- [33] Row EC, Brown SA, Stachulskib AV, Lennarda MS. Synthesis of 8-geranyloxypsoralen analogues and their evaluation as inhibitors of CYP3A4. Bioorg. Med. Chem. 2006 ; 14 : 3865-3871.
- [34] Elasaad K, Alkhatib R, Hennebelle T, Norberg B, Wouters J. Determination of the Absolute Configuration of Aegelinol by Crystallization of Its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. Crystals. 2012 ; 2 : 1441-1454
- [35] Perkin AG, Newbury FG. The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). J. Chem. Soc, 1899 ; 75 : pp 830-839.
- [36] Agrawal PK, Bansal MC. Isoflavonoids in Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier, Amsterdam, 1989 ; p 183.
- [37] Wayne Schnarr G, Vyas DM, Szarek WA. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of acyclic carbohydrate derivatives: alditols, 1,2-bis(phenylhydrazones), and dithioacetals J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1979 ; 496-503.
- [38] Shahidi F, Wanasundara, PKJPD. phenolic antioxidants, Crit. Rev. Food Sci. Nutr, 1992 ; 32p

- [39] Markham KR. Technique of flavonoids identification, Academic prss, London, 1982.
- [40] Lee YS, Lee S, Lee HS, Kim BK, Ohuchi K, Shin KH. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat Lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 2005 ; 28(5) : 916-918.
- [41] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* leaves. *Pharmacology online (PhOL)*. 2009 ; 2 : 1097-1105.
- [42] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Cent Eur J Biol.* 2010 ; 5 : 338-345.
- [43] Singh N, Rajini PS. Antioxidant in erythrocytes against oxidative damage. *Chem. Biol. Interact.* 2008 ; 173 : 97-104.
- [44] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990 ; 186 : 1-85.
- [45] Ernster L. Lipid peroxidation in biological membranes: Mechanisms and implications. In K. Yagi, (Ed.), *Active oxygens, lipid peroxides and antioxidants*. Tokyo, Japan : Japan Scientific Societies Press. 1993V ; 1-38.
- [46] Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int.* 2006 ; 30 : 376-380.
- [47] Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000 ; 59 : 163-70.
- [48] Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 1982 ; 44 : 227-253.
- [49] Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 1998 ; 46(10) : pp 3952-3957.
- [50] He W1, Chen W, Zhou Y, Tian Y, Liao F. Xanthotoxol exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 ; 33(5) : 715-22.
- [51] Chang-Suk K. Antiadipogenic activity of isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*. *Immunopharm. Immunot.* 2012 ; 34(6) : 907-911.

- [52] England MD, Cavarocchi NC, O'Brien JF, Solis E, Pluth JR, Orszulak TA, Kaye MP, Schaff HV. Influence of antioxidants (mannitol and allopurinol) on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1986 ; 74(5 Pt 2) : III 134-7.
- [53] Hany S, Mei-Mei W, Andrew M. Mannitol: a review of its clinical uses. *Contin Educ Anaesth Crit, Care Pain*. 2012 ; 12(2) : 82-85.
- [54] Thuong PT, Tran MH, Tran MN, Do TH, Byung SM, Seung JK, Kang TS, Choi JS, Kihwan B. Antioxidant activities of coumarins from korean medicinal plants and their astructure-activity relationships. *Phytother. Res*. 2010 ; 24 : 101-106.
- [55] Kancheva VD, Boranova PV, Nechev JT. Manolov II : Structure-activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain breaking antioxidants. *Biochimie*. 2010 ; 92 : 1138-1146.
- [56] Isihara M, Yoshiko Y, Sakagami H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semiempirical molecular orbital method. *Anticancer Res*. 2006 ; 26 : 2883-2886.
- [57] Dai F, Miao Q, Zhou B, et al. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radic al-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci*. 2006 ; 78(21) : 2488-2493.
- [58] Asgary S, Naderi G, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol*. 2005 ; 10(2) : 88-90.

Chapitre V

Les huiles essentielles

V- Les huiles essentielles

V-1- Définition

La Pharmacopée Européenne, 7^{ème} édition définit l'huile essentielle comme un produit odorant et volatil généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

V-2- Propriétés physico-chimiques

Ce sont des liquides rarement visqueux ou cristallisés à température ambiante. Elles sont volatiles, ce qui les oppose aux huiles grasses (huile de noisette, huile d'avocat, huile d'olive, etc...). Cette volatilité leur confère leur caractère odorant et est à la base d'un de leur mode d'obtention à partir du végétal (l'entraînement à la vapeur d'eau). Elles sont pour la plupart, plus légères que l'eau et non miscibles, très peu solubles et pour la plupart insolubles dans l'eau. Elles sont actives sur la lumière polarisée et ont un indice de réfraction élevé. Elles sont totalement solubles dans les huiles grasses, particulièrement solubles dans les alcools à titres élevés et les solvants organiques. Elles ne sont que très rarement colorées [1].

V-3- Localisation et structure histologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont presque exclusives de l'embranchement des spermatophytes, elles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres qui sont capables d'élaborer ces principes volatils sont répartis sur presque une soixantaine de familles [2]. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Labiateae [3-5], les Asteraceae [6], les Myrtaceae [7], les Lauraceae [8] et les Apiaceae [9,10].

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle [11].

Les fleurs bien sûr, exemples : orange, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang). Les feuilles le plus souvent, exemples : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin, de sapin.

- Les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore)
- Les fruits, exemples : fenouil, anis, épicarpes des Citrus.

Les graines : noix de mescalade, coriandre. Le bois et les écorces, exemple : cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables.

- Les poils sécréteurs épidermiques sont rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées. Ils produisent les essences dites superficielles.

Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtacées, Rutacées, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées.

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement : Dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois). Dans l'année selon la saison pour une même plante. Selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol). Selon les races chimiques (ou chemotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec 7 races chimiques).

V-4- Rôle des huiles essentielles

Les terpènes avec les flavonoïdes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux [1]. Les huiles essentielles qui sont principalement composées de terpènes, n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et sont stockées dans toutes les parties (fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, fruits et graines).

Les rôles biologiques des terpènes et des huiles essentielles sont souvent obscurs. Il est toutefois vraisemblable qu'ils jouent un rôle écologique dans les interactions : végétal-végétal, végétal-animal et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs [1].

En effet, les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et les insectes responsables de la pollinisation [12], protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes.

Pour les plantes désertiques, l'utilité des huiles essentielles a été rattachée à la conservation de l'humidité indispensable à la vie des plantes. Exposées à des climats désertiques, les vapeurs aromatiques ont pour propriété de saturer l'air autour de la

plante, empêchant le jour la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive.

Elles peuvent aussi servir de solvants bioactifs pour les composés lipophiles [13].

V-5- Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvés en tant que composés majoritaires dans quelques-unes. Divers autres constituants minoritaires leur sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions chimiques variées sont également considérés comme des composés terpéniques.

V-6- Principales structures chimiques terpéniques

Le mot «terpène» tire son origine du mot térébenthine. En 1818, la térébenthine a été découverte comme étant un mélange d'hydrocarbures avec un ratiocarbone/hydrogène de 5/8. Les isoprénoides ont une structure plus ou moins complexe issue de la condensation de molécules à chaîne carbonée linéaire à 5 atomes de carbone qui dérivent du 2-méthylbutadiène (isoprène). Le chimiste Ruzicka proposa une nomenclature pour les dérivés isopréniques en fonction du nombre d'unités d'isoprène qui les constituent : monoterpène C₁₀, sesquiterpènes C₁₅, diterpènes C₂₀, sesterpènes C₂₅, triterpènes C₃₀ et caroténoïdes C₄₀ [14-16].

V-7- Analyses chimiques des huiles essentielles

V-7-1- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle pour l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'obtenir la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et l'analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit [17]. Pour chacun des composés, des indices de rétention expérimentaux peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir du temps de rétention du composé, encadré dans une gamme étalon d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kovàts) ou en programmation de température (indice de rétention) [18]. Ces indices sont ensuite

comparés avec ceux des produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois l'identification peut être incertaine car il est fréquent d'observer des variations expérimentales, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux phases stationnaires de polarité différente est nécessaire. On mesure deux indices : l'un sur phase apolaire, l'autre sur phase polaire. Malgré tout, ceci ne peut suffire à une identification complète, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse (CPG/SM).

V-7-2- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage CPG/SM peut être utilisé avec divers types d'analyseurs de masses et selon plusieurs modes d'ionisation. Le mode d'ionisation par impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée en routine et notamment dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de ses fragmentations assez reproductibles et donc utilisables dans une banque de données [19]. Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation d'ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers l'analyseur de l'appareil. Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse dont les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le «quadrupôle» et le «piège à ions» (ou «ion trap» en anglais). Le quadrupôle ainsi que l'«ion trap» utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z).

En ce qui concerne l'«ion trap» (ou quistor), il est constitué d'une électrode circulaire, couverte de deux calottes sphériques. Conceptuellement, on peut voir cet appareillage comme un quadripôle circulaire [20]. La superposition des tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de «quadrupôle à trois dimensions» dans lequel les ions sont gardés captifs «piégés» sur une trajectoire formant une sorte de huit à trois dimensions. Les ions de différentes masses sont présents simultanément dans la trappe, et on cherchera à les expulser en fonction de leur masse pour obtenir le spectre. Cette technique consiste donc à produire des ions directement dans la trappe par impact électronique. Il n'y a pas de source séparée. Les

ions sont formés par un flux d'électrons de courte durée et piégés au moyen de radiofréquences [21].

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois, les détecteurs les plus courants sont les multicapteurs d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté.

Finalement, l'outil informatique enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités de pics puis en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation: spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc....

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles commerciales NIST/EPA/NIH mass spectral library, Wiley Registry of mass spectral data, contenant plusieurs milliers de spectres. En plus de leurs spectres de masse, les composés sont parfois recensés dans les banques de données ou la littérature, en fonction soit de leur indice de rétention soit de l'indice de Kovats (IK). Après comparaison avec l'analyse d'un mélange d'alcane réalisés dans les mêmes conditions chromatographiques, en mode isotherme, l'indice de rétention spécifique (IR) pour chaque composé peut être calculé au moyen de la formule suivante :

$$IR = 100 \left[n + \frac{t_r - t_{r_n}}{t_{r_{n+1}} - t_{r_n}} \right]$$

n = nombre de carbones de l'alcane dont le temps de rétention précède celui du composé dont on veut déterminer l'indice.

t_r = temps de rétention réduit du composé ($t_r = t_r - t_0$ avec t_r temps de rétention du composé et t_0 temps de rétention d'un composé non retenu) en minutes.

t_0 = temps de rétention d'un composé non retenu en minutes.

t_{r_n} = temps de rétention réduit de l'alcane dont le temps de rétention précède celui du composé (en minutes).

$t_{r_{n+1}}$ = temps de rétention réduit de l'alcane dont le temps de rétention suit celui du composé (en minute).

V-7-3- Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC/FID)

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) est le plus populaire des détecteurs. Son principe de fonctionnement est le suivant. Lorsque le soluté est brûlé dans une flamme d'hydrogène, il se forme par combustion du CO et CO₂ qui sont ensuite ionisés en CO⁺, CO²⁺. Ces ions sont collectés par une électrode, souvent en forme de grille cylindrique centrée autour de l'axe de la flamme et portée à un potentiel variant entre 100 et 300 V. Le courant ionique est ensuite amplifié et enregistré. C'est un détecteur universel qui répond à tout composé organique: (il ne répond pas aux gaz permanents ainsi qu'à un certain nombre de gaz minéraux et organiques : CO, CO₂, COS, CS₂, SO₂, H₂O, NH₃, NO, N₂O, HCOOH, HCHO, SiCl₄). Ce détecteur est très sensible mais nécessite des débits gazeux très stables. Le courant très faible qui résulte de la détection est fortement amplifié et transformé en une tension mesurable par un électromètre. L'aire du pic varie selon la quantité de composé élué dans une relation linéaire sur un très large domaine de concentrations. Comme par ailleurs la réponse (signal/masse) du détecteur FID est assez comparable pour de nombreux composés organiques (contrairement au cas de la détection en SM où les réponses peuvent être très différentes), la GC/FID est très utile pour l'analyse quantitative et notamment pour l'analyse semi-quantitative des huiles essentielles (par normalisation directe des aires du chromatogramme sans aucun étalonnage préalable).

V-8- Etablissement de structure des produits isolés

La stratégie de l'analyse d'une huile essentielle commence par une étude de GC-MS, qui permet l'identification des composants de l'huile par la comparaison des spectres de masse de l'échantillon avec celles d'une bibliothèque de spectre. Pour certains cas douteux et/ou pour les molécules non identifiées dans les bibliothèques de spectres, on peut avoir besoin d'isoler les produits et d'étudier leurs spectres RMN.

Un composé inconnu a besoin d'une élucidation complète de sa structure. Pour cela la spectroscopie RMN est toujours la meilleure méthode pour la détermination de la structure. L'interprétation des spectres ¹H, ¹³C, DEPT (90-135°), COSY, HMQC, HSQC, HMBC et NOESY conduit généralement non seulement à la détermination de la structure de la molécule, mais aussi à la détermination de sa configuration relative [22].

V-9- Travaux personnels

Ce travail présente pour la première fois une étude chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de l'espèce endémique *Pituranthos battandieri* Maire.

V-9-1- Etude de l'huile essentielle de *Pituranthos battandieri* Maire

V-9-1-1- Extraction de l'huile essentielle

Les parties aériennes de la plante sont soumises à la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau dans un appareil de Kaiser Lang, en se servant d'un dispositif d'extraction type Clevenger. L'huile essentielle obtenue de couleur jaune et à odeur très agréable, est séchée sur du sulfate de sodium anhydre, filtrée puis conservée à +4 °C jusqu'à son analyse par GC et GC/MS. Le rendement de l'huile a été calculé en fonction du poids sec de la plante.

V-9-1-2- Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle

V-9-1-2a- Analyse GC-FID

L'huile essentielle a été analysée sur un appareil de type Agilent (GC-FID) Modèle 6890 A, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (5% -diphényle- 95%-diméthyl polysiloxane (longueur : 25 m, et de 0,25 mm de diamètre intérieur. L'épaisseur du film est 0,25 µm)), programmé de 50°C (5 min) à 250°C à 3°C/min et maintenue pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme étaient de 280 et 300°C, respectivement. L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone à 3,5% (v/v) et 1 µl a été injecté en mode split (1/60), l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1,0 ml/min). Les solutions des alcanes standards (C₈ à C₂₀) ont été analysées dans les mêmes conditions pour le calcul des indices de rétention (IR) avec l'équation de Van del Dool et Kratz.

V-9-1-2b- Analyse GC/MS

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un ensemble chromatographe phase gazeuse – spectromètre de masse Agilent (CG-SM) Modèle 7890/5975, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (25 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm) programmé avec les mêmes conditions que pour GC-FID. Le spectromètre de masse (MS) est en mode d'ionisation impact électronique, énergie 70 eV et le multiplicateur d'électrons à 2200 V, la source d'ions et le quadripôle du SM étaient à 230 et 180 °C, respectivement. Les données spectrales de masse ont été acquises en mode balayage

dans la gamme des m/z 33-450 Da. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leur indices de rétention (RI) avec ceux des composés de référence des banques de données telles que : Adams [23] et Mc Lafferty et Stauffer [24]. Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

V-9-1-3- Résultats et discussion

L'huile essentielle des parties aériennes de *P. battandieri* Maire est obtenue par entraînement à la vapeur, avec un rendement de 0,95% (masse/masse, par rapport à la matière végétale sèche). C'est une huile jaunâtre avec une odeur parfumée. Cette analyse a mené à l'identification de 64 constituants représentant 94,7% de l'huile essentielle totale. La composition et les pourcentages des composants identifiés sont reportés dans le tableau V.1. Les composés sont classés par ordre de leur temps de rétention expérimental et de leurs indices de rétention (IR).

Les principaux constituants de cette huile sont le myrcène (8,9%), α -phéllandrène (17,5%), α -terpinène (14%), *o*-cymène (11,6%), β -phéllandrène (3,5%), oxyde de *cis*-linalol (furanoïde) (5,9%) et le *trans*- β -caryophyllène (3,4%). Les autres constituants sont le α -pinène (1,8%), β -pinène (1,5%), limonène (1,9%), oxyde de *trans*-linalol (furanoïde) (2,6%), α -phéllandrène époxyde (1,3%), acétate de *cis*-chrysanthényle (1,1%), α -bulnésène (1,9%), δ -cadinène (2,1%), spathuléol (1,0%) et l'oxyde de caryophyllène (1,1%).

On relève que les composés hydrocarbonés constituent une partie importante de la composition chimique de cette huile essentielle, 75,5 % par rapport aux composés oxygénés (18,4%). Nous pouvons également noter une forte prédominance de la fraction monoterpénique (77,4%), par rapport à la fraction sesquiterpénique (16,5 %). Comme les autres espèces du genre *Pituranthos* [25,26], cette huile essentielle est dominée par une grande quantité de monoterpènes ; en effet, sur un total de 94,7% de composés identifiés, 77,4% correspondent à des monoterpènes, dont 62,1% sont des hydrocarbures monoterpéniques et 15,3% des monoterpènes oxygénés. Les principaux composés monoterpéniques sont le myrcène (8,9%), α -phéllandrène (17,5%), α -terpinène (14%), *o*-cymène (11,6%), et le β -phéllandrène (3,5%). Pour les monoterpènes oxygénés, l'oxyde de *cis*-linalol (furanoïde) (5,9%), oxyde de *trans*-linalol (furanoïde) (2,6%), *p*-cymène-8-ol (0,6%), et l'oxyde de caryophyllène (1,1%), représentent les principaux constituants. À notre connaissance, l'étude de la

composition chimique de l'huile essentielle de *Pituranthos battandieri* n'a jamais été reportée auparavant.

Tableau V.1 : Composition de l'huile essentielle de *Pituranthos battandieri* Maire

Pic N°	TR	^b IR	^a Composant	%
1	5,765	924	α -Thujène	tr
2	5,900	932	α -Pinène	1,8
3	6,405	957	Camphène	0,3
4	6,680	971	Sabinène	tr
5	6,773	976	β -Pinène	1,5
6	7,018	988	β -Myrcène	8,9
7	7,262	1001	Mentha-1(7).8-diène	0,7
8	7,335	1005	α -Phéllandrène	17,5
9	7,543	1016	α -Terpinène	14
10	7,674	1024	<i>O</i> -Cymène	11,6
11	7,745	1028	Limonène	1,9
12	7,775	1029	β -Phéllandrène	3,5
13	7,853	1034	(<i>Z</i>)- β -Ocimène	tr
14	8,495	1070	Oxyde de <i>Cis</i> -Linalol (furanolide)	5,9
15	8,761	1085	Oxyde de <i>Trans</i> -Linalol (furanolide)	2,6
16	8,806	1088	<i>p</i> -Cyménène	0,4
17	8,968	1097	Linalol	0,2
18	9,384	1124	(<i>Z</i>)- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,4
19	9,671	1143	(<i>E</i>)- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,3
20	10,091	1171	Terpinén-4-ol	0,6
21	10,358	1188	<i>p</i> -Cymène-8-ol	0,6
22	10,487	1197	α -Terpinéol	0,5
23	10,543	1198	<i>cis</i> -Pipéritole	tr
24	10,609	1205	α -Phéllandrène époxyde	1,3
25	10,684	1211	<i>trans</i> -Pipéritol	tr
26	11,178	1245	Cuminaldéhyde	0,4
27	11,262	1252	Carvotanacétone	tr
28	11,365	1259	Acétate de <i>Cis</i> -Chrysanthényle	1,1
29	11,472	1266	Acide nonanoïque	tr
30	11,655	1279	Acétate de bornyle	0,9
31	11,826	1291	Dihydroéudulane-I	tr
32	11,925	1298	Carvacrol	0,5
33	12,087	1311	<i>p</i> -Vinylguaiacol	tr
34	12,772	1363	Acide décanoïque	tr
35	12,983	1379	α -Copaène	0,3

Tableau V.1 : Composition de l'huile essentielle de *P. battandieri* Maire (Suite)

Pic N°	TR	^b IR	^a Composant	%
36	13,002	1381	Daucène	-
37	13,093	1387	β -Bourbonène	0,4
38	13,149	1391	β -Elémène	0,6
39	13,561	1424	<i>trans</i> - β -Caryophyllène	3,4
40	13,645	1431	δ -Elémène	0,5
41	13,729	1438	α -Guaiène	0,7
42	13,809	1444	6,9-Guaiadiène	0,3
43	13,903	1453	β -Sesquifenchène	tr
44	14,004	1460	α -Humulène	0,5
45	14,226	1478	α -Neocallitropsène	0,9
46	14,310	1485	Germacrène D	0,7
47	14,412	1493	β - Sélinène	0,2
48	14,486	1499	Bicyclogérmacrène	0,5
49	14,548	1504	α -Bulnésène	1,9
50	14,732	1520	δ -Cadinène	2,1
51	15,014	1545	α -Calacorène	tr
52	15,082	1551	Elémol	tr
53	15,174	1559	Acide dodécanoïque	tr
54	15,371	1563	Germacrène B	0,4
55	15,440	1581	Spathulénol	1
56	15,515	1587	Oxyde de Caryophyllène	1,1
57	15,871	1620	Eléma-1,11-dien-15-al	tr
58	15,981	1626	<i>trans</i> -Muurulol	0,3
59	16,052	1636	Cyclomylytayne	tr
60	16,328	1660	β -Eudésmol	0,3
61	16,676	1691	Acorénone	0,4
62	16,923	1694	β -Sinensal	tr
63	17,340	1763	Unidentified	0,2
64	17,779	1797	Unidentified	0,5
65	18,206	1840	2-Pentadécane-6, 10, 14-triméthyle	0,7
66	19,171	1956	Acide hexadécanoïque	0,1

Tr : trace < 0,1 %

TR : Temps de rétention

IR : Indice de rétention

a : Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur IR

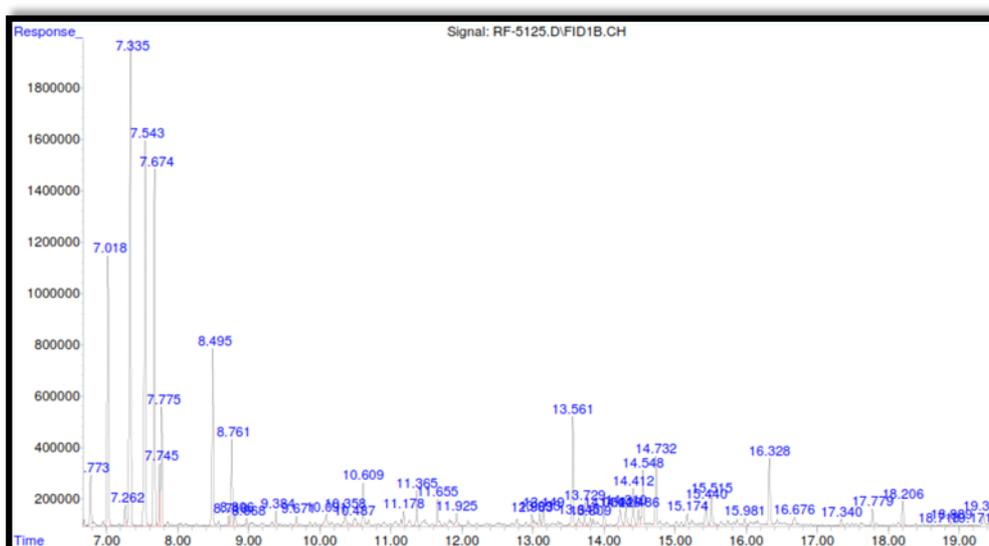
b : IR mesuré par rapport à *n*-alcane (C₈ à C₂₀) (colonne HP-5 MS)

Tableau V.2 : Résultats d'analyse selon les familles des terpènes du *P. battandieri*

Maire

Monoterpènes	Monoterpènes hydrocarbonés (%)	62,1	77,4
	Monoterpènes oxygénés (%)	15,3	
Sesquiterpènes	Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)	13,4	16,5
	Sesquiterpènes oxygénés (%)	3,1	
Autres (%)		0,8	
Non identifiés (%)		0,7	
Totale (%)		94,7	

Le chromatogramme de l'huile extraite de la plante est présenté dans la figure V.1.

Figure V-1 : Chromatogramme de l'huile essentielle *P. battandieri* Maire

V-10- Conclusion

Cette recherche a porté sur l'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. La composition chimique de cette huile est décrite pour la première fois. Soixante-quatre (64) composantes, représentant 94,7% de l'huile essentielle, ont été identifiées (Figure V.1). Cette huile est majoritairement composée de α -phéllandrène (17,5%), α -terpinène (14%), *o*-cymène (11,6%), myrcène (8,9%), oxyde de *cis*-linalol (furanolide) (5,9%), β -phéllandrène (3,5%) et de *trans*- β -caryophyllène (3,4%).

Références bibliographiques

- [1] Bruneton J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales, 4^{ème} édition, Lavoisier: Tec & Doc : paris. 2009.
- [2] Benyahia S. Recherche des métabolites secondaires terpéniques et phénoliques d'espèces d'*Eucalyptus Algériens*. Détermination structurale et activité biologique, Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri, Constantine. 2006.
- [3] Katsiotis ST, Chatzopoulou P, Svendsen AB. The essential oil of *Thymus sibthorpii* Benth. Growing wild in greece, Sci. Pharm, 1990; 58, 303-306.
- [4] Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El ajjour M, Chaouch A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2010 ; 14, 141-148.
- [5] Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Canigueral S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay, Braz. Arch. Biol. Techn. 2002 ; 45, 519-524.
- [6] Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. Braz. J. Microbiol. 2008 ; 39, 61-63.
- [7] Benayache S, Benayache F, Benyahia S, Chalchat JC, Garry RP. Leaf oils of some *Eucalyptus* species growing in Algeria. J. Essent. Oil Res. 2001 ; 13, 210-213.
- [8] Chaverri C, Ciccio JF. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in costa rica. I. *Ocotea brenesii*. Int. J. Trop. Biol. 2005 ; 53, 431-436.
- [9] Djarri L, Medjroubi K, Akkal S, Elomri A, Seguin E, Verite P. Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. Flavour Fragr. J. 2006 ; 21, 647-649.
- [10] Oroojaliana F, Kasra-kermanshahia R, Azizic M, Bassamid MR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food chem. 2010 ; 120, 765-770.
- [11] Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques, Epices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc : Paris. 2005.
- [12] Ricciardelli D'albore GC. Les insectes pollinisateurs de quelques ombellifères d'intérêt agricole et condimentaire (*Angelica archangelica* L., *Carum carvi* L.,

- Petroselinum crispum* A.W. Hill., *Apium graveolens* L., *Pinpinella anisum* L., *Daucus carota* L., *Foeniculum vulgare* Miller V. *Azoricum* Thell.), *Apidologie*. 1986 ; 17, 107-124.
- [13] Hay Robert KM, Waterman PG. Volatile oil crops, Their biology, biochemistry and production, John Wiley and Sons Inc. New York. 1993.
- [14] Knoss W, Reuter B. Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: Occurrence and future prospects. *Pharm Acta Helv*. 1998 ; 73, 45.
- [15] Lamati A, Badoc A, Deffieux G, Carde J-P. Biogenèse des monoterpènes II- La chaîne isoprénique, *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*. 1994 ; 133, 79.
- [16] Theis N, Lerdau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant. Sci*. 2003 ; 164, 93.
- [17] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured, Carol Stream IL : USA. 2001.
- [18] Souici ML, Lourici L, Messadi D. Relation structure/retention chromatographique de treize alkylnaphtalènes. *Lebanese Science Journal* 2007 ; 8, 63.
- [19] Bouchonnet, S. Comparaison des performances des analyseurs quadripolaires en spectrométrie de masse: trappes ioniques versus quadripôles. *Spectra analyse*. 2001 ; 222, 11.
- [20] March RE. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. mass spectrometry*. 1997 ; 32, 351.
- [21] Bouchonnet S, Hoppilliard Y, Kargar-Grisel T. Les différents types de spectromètres de masses utilisées pour l'analyse des composés organiques et bioorganiques. *Spectra Analyse*. 1999 ; 207, 11.
- [22] Djarri L, Thèse de doctorat en science université de Constantine, Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille des Apiaceae. 2011.
- [23] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.
- [24] Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York. 1991.

- [25] Abdelwahed A, Hayder N, Kilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hammami M, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. *Flavour Fragr. J.* 2006 ; 21, 129-133.
- [26] Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook. from Algeria. *J. Ess. Oil Res.* 1999 ; 11(6), 673-676.

Conclusion générale

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation des ressources naturelles de l'Algérie.

Le but principal de ce travail est de déterminer la composition chimique et les effets biologiques des extraits de la plante *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae) ; espèce endémique au Sahara algéro-marocain. Nos critères de sélection de cette espèce sont en premier lieu son endémisme puis les faits qu'elle n'ait jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques et que les espèces du genre *Pituranthos* sont reconnues pour accumuler des métabolites secondaires présentant diverses activités biologiques.

Dans le cadre de ce travail nous avons tout d'abord effectué le screening phytochimique des parties aériennes de cette espèce pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. Cette étude a montré essentiellement la présence de coumarines, triterpènes, tanins catéchiques, flavonoïdes et saponines.

L'investigation phytochimique a débuté par l'extraction hydroalcoolique des parties aériennes et des racines pris séparément, suivie par la concentration des extraits obtenus et leurs affrontements successifs, par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Des analyses effectués par chromatographie sur couches minces (CCM) avec révélation chimique, ainsi que des expériences LC/UV, ont permis de mettre en évidence la présence de coumarines et de flavonoïdes dans les extraits polaires et moyennement polaires. Sur la base des résultats de ces analyses préliminaires, nous avons soumis les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de cette plante à diverses techniques de chromatographie liquide. Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle (^1H , ^{13}C et DEPT) et bidimensionnelle (HSQC, COSY, HMBC et NOESY), ainsi que la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS et HR-EI-MS).

Ces travaux ont permis l'isolement et l'identification de 23 composés naturels majoritairement de type coumarine, parmi lesquels cinq ont des structures nouvelles qui n'ont jamais été décrites dans la littérature.

Les composés isolés et déterminés sont :

- ✓ Dix furanocoumarines linéaires : la xanthotoxine, la phellopterine, le xanthotoxol, la (R)-(+)-héraclénine, le R-(+)-byakangelicol, la R-(+)-byakangelicine, le 8-[(R) 6',7'-dihydroxygeranyloxy]psoralène et trois nouvelles molécules ; la (R)-pituranthosine A, la (R,S)-pituranthosine B, et la pituranthosine D.
- ✓ Deux coumarines : la R-(+)-marmine et une nouvelle structure la (S)-(-)-pituranthosine C.
- ✓ Une nouvelle pyranocoumarine : le (R)-8-hydroxyaegelinol.
- ✓ quatre flavonoïdes : l'isorhamnetine, l'apigénine, la biochanine A et la cacticine.
- ✓ Deux mélanges de stéroïdes : un mélange de β -sitostérol et stigmastérol (50-50%) et l'autre de daucostérol et stigmastérol 3-O- β -glucopyranoside (72-28%).
- ✓ Trois composés phénoliques : La vanilline, l'acide vanillique et la β -hydroxy propiovanillone.
- ✓ Un sucre réduit, le mannitol.

Tous ces composés sont isolés pour la première fois de cette plante parmi eux cinq sont nouveaux dans la littérature, ce qui constitue un élément d'originalité remarquable et un apport chimiotaxonomique qui souligne la contribution de ce travail à une meilleure connaissance phytochimique du genre *Pituranthos*, de la famille Apiaceae et de la flore algérienne.

Nous avons également soumis l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes à des tests de recherche des activités antioxydantes (DPPH[•], H₂O₂) et antibactérienne. Cet extrait a montré un effet modéré concernant l'activité antioxydante vis-à-vis du DPPH[•] et un effet important concernant l'activité antipéroxydative. Par contre cet extrait n'a pas manifesté d'activité antibactérienne sur les souches bactériennes testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*).

Nos travaux ont également porté sur l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. battandieri* Maire. La détermination de cette composition a nécessité l'utilisation de différentes méthodes d'analyse, en particulier la chromatographie en phase gazeuse (CG/ FID) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/ MS). Cette étude révèle la présence de 64 composés représentant 94,7% de la composition globale de l'huile

essentielle de cette espèce. Le myrcène (8,9%), le α -phéllandrène (17,5%), le α -terpinène (14%), l'*o*-cymène (11,6%), le β -phéllandrène (3,5%), l'oxyde de *cis*-linalol (furanoïde) (5,9%) et le *trans*- β -caryophyllène (3,4%) sont les composants majoritaires de cette huile essentielle.

Les huiles essentielles d'une part et les coumarines d'autre part sont des composants fréquemment présents dans les plantes de la famille des Apiacées ainsi que dans celles appartenant au genre *Pituranthos*. Les résultats obtenus lors de notre étude phytochimique des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire sont donc tout à fait en accord avec les travaux antérieurement publiés sur cette famille et sur ce genre.

Ces travaux ont fait l'objet de deux publications internationales, une autre en cours de soumission, trois communications internationales et une nationale dans des congrès de spécialité.

Résumé

Le présent travail a consisté en une étude phytochimique et biologique de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire, variété Algérienne de la famille des Apiacées endémique au Sahara algéro-marocain et qui n'a jamais fait l'objet d'études auparavant, ainsi que l'analyse par GC et GC/MS de son huile essentielle. L'endémisme de cette espèce nous a encouragés à entamer ce travail.

Notre expérimentation a permis la séparation et la purification de 23 composés grâce à l'utilisation de diverses techniques chromatographiques (CCM, CC). Toutes les structures ont été élucidées par la combinaison des méthodes spectroscopiques : (UV-Vis), RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT), et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), par la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-EI-MS et HR-ESIMS) et par la comparaison avec les données de la littérature. Parmi les composés isolés, 13 coumarines dont 5 nouvelles, 4 flavonoïdes, 2 stéroïdes, 3 composés phénoliques et 1 sucre réduit.

Par ailleurs, une valorisation biologique par la recherche de l'activité antioxydante a été effectuée sur l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. Cette étude a montré cette espèce a une efficacité biologique. Au cours de cette étude nous avons également réalisé un test antibactérien vis-à-vis de quelques germes pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que cet extrait butanolique n'a pas manifesté d'activité.

L'analyse GC-FID et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a montré que cette huile est majoritairement composée de myrcène (8,9%), α -phéllandrène (17,5%), α -terpinène (14%), *o*-cymène (11,6%), β -phéllandrène (3,5%), oxyde de *cis*-linalol (furanolide) (5,9%) et *trans*- β -caryophyllène (3,4%).

Mots clés : *Pituranthos battandieri* Maire ; Apiaceae ; Coumarines ; flavonoïdes ; Huile essentielle ; Activité antioxydante ; Activité antibactérienne.

Abstract

The present work consisted on a phytochemical and biological study of the species *Pituranthos battandieri* Maire, Algerian variety from the Apiaceae family, endemic to the Algerian and Moroccan Sahara. To the best of our knowledge this species has never been studied before. This reason and the endemism of this rare species encouraged us to undertake this work in which we also reported the chemical composition of the essential oil of its aerial parts performed by GC and GC/MS analyses.

Our experimentation allowed the separation and purification of 23 compounds through the use of various chromatographic techniques (CCM, CC). All these structures have been elucidated by the combination of spectroscopic methods mainly: (UV-Vis), 1D NMR (^1H , ^{13}C , DEPT), and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), We also used high resolution mass spectrometry methods (HR-EI-MS and HR-ESI-MS) and comparison with literature data. Among the isolated compounds, 13 coumarins from which 5 were new, 4 flavonoids, 2 steroids, 3 phenolic compounds and 1 reduced sugar.

In addition, a biological valorization consisting in the evaluation of the antioxidant activity was carried out on the *n*-BuOH extract of the aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire. This study showed that this species has a biological efficiency. In this study we also carried out an antibacterial assay against some pathogenic organisms, the microbiological results showed that this butanolic extract did not show antibacterial activity.

The GC-FID and GC/MS analyses of the essential oil of *Pituranthos battandieri* Maire showed that this oil is mainly composed of myrcene (8.9%), α -phellandrene (17.5%), α -terpinene (14%), *o*-cymene (11.6%), β -phellandrene (3.5%), *cis*-linalol oxide (furanide) (5.9%) and *trans*- β -caryophyllene (3.4%).

Keywords: *Pituranthos battandieri* Maire; Apiaceae; Coumarins; flavonoïds; Essential oil; Antioxidant activity; Antibacterial Activity.

ملخص

يتمحور هذا العمل حول الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية للنبتة *Pituranthos battandieri* Maire، هته النباتة محلية تنتمي الى العائلة الخيمية لم تدرس من قبل الشيء الذي شجعنا على دراستها ، بلاضافة الى تحليل زيتها العطري باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي GC و كروماتوغرافيا الطور الغازي بالتزواج مع مطيافية الكتلة GC/MS.

سمحت لنا تجربتنا بفصل وتنقية 23 مركب باستعمال مختلف تقنيات الكروماتوغرافيا (TLC، CC). تم تحديد بنية كل هذه المركبات من خلال تجميع المعلومات المتحصل عليها بطرق التحليل الفيزيو- كيميائية. تتمثل هذه الطرق أساسا في التحليل الطيفي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية والرنين النووي المغناطيسي أحادي البعد (البروتون و الكربون 13) و ثنائي البعد (HMBC، HSQC، COSY، NOESY) ومطيافية الكتلة بتقنيات التابن المختلفة و بمقارنة مع المعطيات البيولوجية. من بين هته المركبات المفصلة تم عزل 13 كومارين 5 منها جديدة، 4 فلافونويدات، 2 ستيرويدات، 3 مركبات فينولية و 1 سكر مرجع.

وعلاوة على ذلك، تم إجراء دراسة بيولوجية على المستخلص *n*-BuOH للأجزاء الهوائية للنبتة *P. battandieri*. وتبين هذه الدراسة ان هذه النباتة لديها الكفاءة البيولوجية. كما اجرينا اختبارات للفعالية المضادة للبكتيريا على هذا المستخلص البيتانولي ضد سلالات مرجعية اظهرت نتائج سلبية ضد انواع البكتيريا المختبرة. بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي GC و كروماتوغرافيا الطور الغازي بالتزواج مع مطيافية الكتلة GC/MS للزيت الطيار للنبتة المحلية *Pituranthos battandieri* Maire بلن هذا الزيت يتكون أساسا من myrcène (8.9%)، α -phéllandrène (17.5%)، α -terpinène (14%)، (11.6%) β -phéllandrène، *o*-cymène (3.5%)، oxyde de cis-linalol (furanoïde) (5.9%) و *trans*- β - (3.4%) caryophyllène.

الكلمات المفتاحية : *Pituranthos battandieri* Maire ؛ الخيمية ؛ كومارين ؛ فلافونويد ؛ الزيت الطيار ؛ الفعالية المضادة للبكتيريا.

Articles

Chemical Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Pituranthos battandieri* Maire

Esseid Chahrazed¹, Mechehoud Youcef¹, Chalchat Jean-Claude², Figueredo Gilles³, Chalard Pierre², Benayache Samir¹, Benayache Fadila^{1*}

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174, Clermont-Ferrand, France.

³Laboratoire d'Analyses des Extraits Végétaux et des Arômes (LEXVA Analytique), 460 Rue du Montant, Beaumont, France.

Available Online: 15th October, 2016

ABSTRACT

The essential oil of the aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae), synonym: *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek., was obtained by steam distillation and analyzed by GC and GC-MS. 64 components were identified constituting 94.7% of the oil. Among the identified compounds, monoterpenes represented 77.4% among which 15.3% were oxygenated. The sesquiterpene fractions represented 16.5% among which 3.1% were oxygenated. The major constituents were myrcene (8.9%), α -phellandrene (17.5%), α -terpinene (14%), *o*-cymene (11.6%), β -phellandrene (3.5%), cis-linalool oxide (furanoid) (5.9%) and *trans*- β -caryophyllene (3.4%). This is the first report on the study of the chemical composition of the essential oil of this species.

Keywords : *Pituranthos battandieri* Maire, *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek., Apiaceae, Essential oil.

INTRODUCTION

The genus *Pituranthos* Viv. (*Deverra* DC.) of the family Apiaceae includes more than 20 species¹ among which four are present in Algeria^{2,3}. Many *Pituranthos* species are used in folk medicine^{4,7} and are rich sources of bioactive compounds^{1,8-13}. The essential oils of this genus are reported to possess antifungal, antimicrobial, immunomodulatory, anticancer and antioxidant activities¹⁴⁻¹⁷. Given the interest of *Pituranthos* pharmacology and phytochemistry, the present paper concentrates on a relatively rare species, *Pituranthos battandieri* Maire, Synonym: *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek. endemic to the Algerian and Moroccan Sahara^{3,18}. To the best of our knowledge, this species has not been previously investigated. In this paper as a continuation of our works on Saharan species¹⁹⁻²³, we report our results concerning the chemical composition of the essential oil of the aerial parts of this species collected from Bechar area in the southwest of Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire^{2,3} were collected on April 2010 from the area of Bechar in the southwest of Algeria and authenticated by M. Mohamed Benabdelhakem, director of the nature preservation agency, Bechar. A Voucher specimen (PBA 54/04/10) has been deposited in the Herbarium of the research unit

VARENBIOMOL, University Frères Mentouri Constantine 1.

Extraction of the essential oil

The aerial parts (300 g) of *Pituranthos battandieri* Maire, were steam distilled in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oil was collected and dried over anhydrous sodium sulfate and kept at 4°C until analysis. The yield of the oil was calculated in relation of the dry weight of the plant.

GC-FID Analysis

The essential oils were analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5MS fused silica capillary column (5%-diphenyl-95%-dimethylpolysiloxane (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m), programmed from 50 °C (5 min) to 250 °C at 3 °/min and held for 10 min. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300 °C, respectively. The essential oils were diluted in acetone (3.5%, v/v) and injected in split mode (1/60), helium was used as a carrier gas (1.0 mL/min). Solutions of standard alkanes (C₈-C₂₀) were analyzed under the same conditions to calculate retention indices (RI) with Van del Dool and Kratz equation.

GC-MS Analysis

Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) Model 7890/5975, equipped with HP-5MS capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) programmed with

*Author for Correspondence: fbenayache@yahoo.fr

Table 1: Composition of the essential oil of *Pituranthos battandieri* Maire with retention times, retention indices and percentages

Peak N°	RT	^b RI	^a Components	%
1.	5.765	924	α -thujene	tr
2.	5.900	932	α -Pinene	1.8
3.	6.405	957	Camphene	0.3
4.	6.680	971	Sabinene	tr
5.	6.773	976	β -Pinene	1.5
6.	7.018	988	β -Myrcene	8.9
7.	7.262	1001	Mentha-1(7).8-diene	0.7
8.	7.335	1005	α -Phellandrene	17.5
9.	7.543	1016	α -Terpinene	14.0
10.	7.674	1024	<i>o</i> -Cymene	11.6
11.	7.745	1028	Limonene	1.9
12.	7.775	1029	β -Phellandrene	3.5
13.	7.853	1034	(Z)- β -Ocimene	tr
14.	8.495	1070	<i>cis</i> -Linalool oxide (furanoid)	5.9
15.	8.761	1085	<i>trans</i> -Linalool oxide (furanoid)	2.6
16.	8.806	1088	<i>p</i> -Cymenene	0.4
17.	8.968	1097	Linalool	0.2
18.	9.384	1124	(Z)- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	0.4
19.	9.671	1143	(E)- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	0.3
20.	10.091	1171	Terpinen-4-ol	0.6
21.	10.358	1188	<i>p</i> -cymen-8-ol	0.6
22.	10.487	1197	α -Terpineol	0.5
23.	10.543	1198	<i>cis</i> -Piperitol	tr
24.	10.609	1205	α -phellandrene epoxyde	1.3
25.	10.684	1211	<i>trans</i> -Piperitol	tr
26.	11.178	1245	Cuminaldehyde	0.4
27.	11.262	1252	Carvotanacetone	tr
28.	11.365	1259	<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	1.1
29.	11.472	1266	Nonanoic acid	tr
30.	11.655	1279	Bornyl acetate	0.9
31.	11.826	1291	Dihydroedulane-I	tr
32.	11.925	1298	Carvacrol	0.5
33.	12.087	1311	<i>p</i> -Vinylguaiacol	tr
34.	12.772	1363	Decanoic acid	tr
35.	12.983	1379	α -Copaene	0.3
36.	13.002	1381	Daucene	tr
37.	13.093	1387	β -bourbonene	0.4
38.	13.149	1391	β -Elemene	0.6
39.	13.561	1424	<i>trans</i> - β -Caryophyllene	3.4
40.	13.645	1431	γ -elemene	0.5
41.	13.729	1438	α -Guaiene	0.7
42.	13.809	1444	6,9-Guaiadiene	0.3
43.	13.903	1453	β -sesquifenchene	tr
44.	14.004	1460	α -Humulene	0.5
45.	14.226	1478	α -Neocallitropsene	0.9
46.	14.310	1485	Germacrene D	0.7
47.	14.412	1493	β -Selinene	0.2
48.	14.486	1499	Bicyclogermacrene	0.5
49.	14.548	1504	α -Bulnesene	1.9
50.	14.732	1520	δ -Cadinene	2.1
51.	15.014	1545	α -Calacorene	tr
52.	15.082	1551	Elemol	tr
53.	15.174	1559	Dodecanoic acid	tr
54.	15.371	1563	Germacrene B	0.4
55.	15.440	1581	Spathulenol	1.0
56.	15.515	1587	Caryophyllene oxide	1.1

57.	15.871	1620	Elema-1,11-dien-15-al	tr
58.	15.981	1629	<i>trans</i> -Muurulol	0.3
59.	16.052	1636	Cyclomylytaylane	tr
60.	16.328	1660	β -Eudesmol	0.3
61.	16.676	1691	Acorenone	0.4
62.	16.923	1694	β -sinensal	tr
63.	17.340	1763	Unidentified	0.2
64.	17.779	1797	Unidentified	0.5
65.	18.206	1840	2-Pentadecanone-6,10,14-trimethyl	0.7
66.	19.171	1956	Hexadecanoic acid	0.1
Total identified				94,7
Grouped compounds				
Monoterpene hydrocarbons				62.1
Oxygenated monoterpenes				15.3
Sesquiterpene hydrocarbons				13.4
Oxygenated sesquiterpenes				3.1
Others				0.8
Unidentified				0.7

tr: trace < 0.1%

^aCompounds are listed in order of their RI

^bRI (retention index) measured relative to *n*-alkanes (C₈-C₂₀) using HP-5MS

the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) ionization was set in positive electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was set at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230 °C and 180 °C, respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the *m/z* range 33-450. The essential oil constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries such as Adams²⁴ and Mc Lafferty & Stauffer²⁵. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

RESULTS AND DISCUSSION

The yield of steam distillation was 0.95% (w/w) in relation to the dry weight of the plant. A total of 64 constituents were determined which account for about 94.7% of the essential oil of *Pituranthos battandieri* Maire. The identified components (Table 1) are listed in order of their experimental retention times and retention indices.

The major constituents of the oil were myrcene (8.9%), α -phellandrene (17.5%), α -terpinene (14%), *o*-cymene (11.6%), β -phellandrene (3.5%), *cis*-linalool oxide (furanoid) (5.9%) and *trans*- β -caryophyllene (3.4%). At less extent the other main constituents were α -pinene (1.8%), β -pinene (1.5%), limonene (1.9%), *trans*-linalool oxide (furanoid) (2.6%), α -phellandrene epoxyde (1.3%), *cis*-chrysanthenyl acetate (1.1%), α -bulnesene (1.9%), δ -cadinene (2.1%), spathulenol (1.0%) and caryophyllene oxide (1.1%).

The sesquiterpenic components were present at moderate proportion (16.5%) while the monoterpene components represented the major fraction 77.4% of the total oil composition. As other plant of the genus *Pituranthos*^{15,26}, this species is rich in monoterpene compounds: in our case α -phellandrene (17.5%), α -terpinene (14%), *o*-cymene (11.6%) and myrcene (8.9%), are the major constituents. To the best of our knowledge this is the first report on the

chemical composition of the essential oil of *Pituranthos battandieri* Maire.

CONCLUSION

The chemical composition of the essential oil of *Pituranthos battandieri* Maire was described for the first time. Sixty four components were determined. The oil was characterized by a high level of the monoterpene components and a moderate yield of the sesquiterpene fraction. The major compounds were myrcene (8.9%), α -phellandrene (17.5%), α -terpinene (14%), *o*-cymene (11.6%), β -phellandrene (3.5%), *cis*-linalool oxide (furanoid) (5.9%) and *trans*- β -caryophyllene (3.4%).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Mohamed Benabdelhakem, director of the nature preservation agency, Bechar, for the identification of the plant material and MESRS (DGRSDT) for financial support.

REFERENCES

1. Ashkenazy D, Friedmann J, Kashman Y. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. *Planta med.* 1983; 47(4), 218-220.
2. Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. CNRS Paris, edn. Vol. II, 1963. p. 666.
3. Ozenda P. Flore du Sahara Septentrional et Central. CNRS. 1958. p. 356.
4. Boukef MK. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne; Agence de Cooperation Culturelle et Technique. 1986.
5. Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 105(3), 358-367.
6. Benchelal AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. Fleurs du Sahara. Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili. Ed. Ibis Press, Paris; 2000.

7. Ould El Hadj M Didi, Hadj-Mahammed M, Zabeirou H. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du savoir* 2003; 3, 47-51.
8. Haba H, Benkhaled M, Massiot G, Long C, Lavaud C. Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. *Nat. Prod. Res.* 2004; 18(5), 409-413.
9. Touil A, Rhouati S, J. Creche. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. *Chem. Nat. Compd.* 2006; 42(1), 104-105.
10. Halim AF, Saad HEA, Lahloub MF, Ahmed AF. Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*. *Phytochemistry*. 1995; 40(3), 927-929.
11. Abdel-Kader MS. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003; 14(1), 48-51.
12. Singab AN, Khalifa T, Mahran GH, Okada Y, Matsumaru Y, Nishino H, Okuyama T. A new flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus* Desf, Benth & Hook. *Natural Medicines (Tokyo)*. 1998; 52(2), 191-194.
13. Abdel-Mogib M, Ayyad SN, Metwally MA, Dawidar AM. Lactones from *Pituranthos tortuosus*. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 1992; 35(3), 93.
14. Al-Gaby AM, Allam RF. Analysis, Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Some Wild Herbs in Egypt. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 2009; 7: 15-23.
15. Abdelwahed A, Hayder N, Kilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hammami M, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21, 129-133.
16. Neffati A, Limem I, Kilani S, Bouhlel I, Skandrani I, Bhourri W, Ben Sghaier M, Boubaker J, Ledauphin J, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. A comparative evaluation of mutagenic, antimutagenic, radical scavenging and antibacterial activities of essential oils of *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur.) *Drug Chem. Toxicol.* 2009; 32(4), 372-380.
17. Krifa M, El Mekdad H, Bentouati N, Pizzi A, Ghedira K, Hammami M, El Meshri SE, Chekir-Ghedira L. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. *Tumor Biol.* (2015) 36:5165-5170.
18. El Oualidi J, Khamar H, Fennane M, Ibn Tattou M, Chauvet S, Taleb MS. Checklist des endémiques et spécimens types de la flore vasculaire de l'Afrique du Nord. Document de l'Institut Scientifique. 2012; 25, p.10. Université Mohammed V-AGDAL, Rabat, Morocco.
19. Mezhoud S, Mekkiou R, Chalard P, Figuéredo G, Benayache S, Benayache F. Comparative essential oil composition of flowers and leaves of *Warionia saharae* Benth. & Coss. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014; 5(3), 1367-1372.
20. Boumaraf M, Mekkiou R, Benyahia S, Chalchat JC, Chalard P, Benayache F, Benayache S. Essential oil composition of *Pulicaria undulata* (L.) DC. (Asteraceae) growing in Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and phytochemical Research.* 2016; 8(5), 746-749.
21. Mohamadi S, Chalard P, Figuéredo G, Marchioni E, Zao M, Benayache F, Benayache S. Chemical Composition of the Essential Oil of *Salvia aegyptiaca* (L.) Res. *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014; 5(6), 207-210.
22. Belloum Z, Chalard P, Figuéredo G, Marchioni E, Zao M, Benayache F, Benayache S. Chemical Composition of the Essential Oil of *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *clandestina* (L.) Pugsl. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014; 5(6), 262-265.
23. Aissaoui M, Chalard P, Figuéredo G, Marchioni E, Zao M, Benayache F, Benayache S. Chemical Composition of the Essential Oil of *Salvia verbenaca* (L.) Briq. Ssp. *Pseudo-jaminiana* (Chev.) M. Res. *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014; 5(6), 368-372.
24. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.
25. Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York. 1991.
26. Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M, Parkanyi C. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook. from Algeria. *J. Ess. Oil Res.* 1999; 11(6), 673-676.

Chemical Constituents and Antioxidant Activity of a Polar Extract from *Pituranthos battandieri* Maire

Esseid Chahrazed¹, Hamadou Meriem Hadjer², Ameddah Souad², Ahmed Menad², León Francisco³, Brouard Ignacio³, Marchioni Eric⁴, Benayache Samir¹, Benayache Fadila^{1*}

¹Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Biologie et Environnement, Université Frères Mentouri, Route d'Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie.

³Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-C.S.I.C., Av. Astrofísico F. Sánchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain.

⁴Chimie Analytique des Molécules Bioactives, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR 7178 CNRS/UDS), 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France.

Received: 15th March, 17; Revised 27th March, 17, Accepted: 15th April, 17; Available Online: 25th April, 2017

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the *n*-butanol soluble part of the aqueous-MeOH extract of the aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire collected from the region of Bechar in the south-west of Algeria, led to the isolation and structural elucidation of mannitol **1**, xanthotoxol **2**, 8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen **3** and isorhamnetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (cacticin) **4**. The structures were established by spectral analyses, mainly ESI-HRMS, UV and NMR experiments (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC and HMBC) and comparison with literature data. All these compounds were described for the first time from this endemic species. The free radical scavenging activity of this extract was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity models. Antihemolytic property was performed using H₂O₂ induced red blood cell hemolysis model. Antiperoxidative effect was evaluated using lipid peroxidation-ammonium thiocyanate model. Both DPPH and H₂O₂ assays indicated antioxidant ability of *n*-BuOH extract of *P. battandieri* (BEPB), that were reflected by IC₅₀ values 876.16±7.96 μg/mL and 603.8±71.06 μg/mL, respectively. In addition, the results of the present study clearly indicated that BEPB inhibited rat erythrocytes hemolysis induced by H₂O₂ in a dose dependent way with IC₅₀ value 782.38±89.97 μg/mL. The inhibition of lipid peroxides generated from linoleic acid was recorded at IC₅₀: 496.04±117.06 μg/mL. The antiperoxidative and the antihemolytic activities of *P. battandieri* appear as a consequence of synergistic interactions between active constituents among them mannitol **1**, the furanocoumarins **2** and **3**, and the flavonoid **4**.

Keywords: *Pituranthos battandieri* Maire, *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek, Apiaceae, Antiperoxidative, Antihemolytic, Antioxidant.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) that were continuously produced in human cells could induced oxidative stress initiating cell death by macromolecules damage^{1,2}. The polyunsaturated fatty acids are the most susceptible to the ROS, leading to the lipid peroxidation which is probably a crucial step in the pathogenesis of several diseases states^{3,4}. Lipid peroxidation could lead to the loss of structure and function of membranes and generation of cytotoxic and mutagenic end products which can spread the oxidative reactions and cause further damage^{5,6}. Red blood cells (RBCs) are considered as prime targets for free radical attack owing to the presence of high membrane concentration of polyunsaturated fatty acids, the oxidative stress on RBC is implicated in hemolysis which occurs in a variety of pathological conditions^{7,8}. Hemolysis which refers to destruction of erythrocytes with liberation of

hemoglobin in the plasma, occurs in a variety of pathological conditions⁹. A number of plants such as *Hibiscus esculentus*¹⁰, *Allium paradoxum*¹¹, *Ugni molinae* Turcz¹², *Wrightia tinctoria*¹³ showed anti-anemic properties due to the presence of a variety of flavonoids. Natural antioxidant compounds like flavonoids and coumarins have been proposed as an effective approach for the prevention and treatment of multiple RBC disorders via scavenging free radicals or lipid peroxy inhibiting effect¹⁴⁻¹⁶. Focusing our attention on natural sources of antioxidants and taking in the consideration that many plants from Apiaceae family have been used in traditional medicine to treat various diseases, including asthma, gastrointestinal disorders, intestinal parasites, and have been known to possess antifungal, anti-diabetic, anti-inflammatory, antimutagenic and antiviral activities¹⁷, we investigated a species of this family from the genus

Pituranthos. From the chemical composition viewpoint, the members of this family are well known producers of coumarins and furanocoumarins¹⁸ which are known to exhibit valuable biological properties such as analgesic, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antiproliferative, in addition to their well known photosensitizing effect¹⁹⁻²⁵. The genus *Pituranthos* includes more than 20 species²⁶, some of them are used in traditional medicine for the treatment of asthma, rheumatism, digestive difficulties, urinary infections, and scorpions stings²⁷⁻²⁹. As a consequence, several *Pituranthos* species were investigated in terms of biological activities³⁰⁻³⁴. Most of the species of this genus are observed in North Africa. In Algeria, the genus *Pituranthos* Viv. (*Deverra* DC.) is represented by four species from which *Pituranthos battandieri* Maire, synonym: *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek. This plant is a rare endemic of Saharan areas of Morocco and Algeria^{35,36}. In Algeria it grows in the South of the country, especially in the area of Bechar. According to our previous studies on Saharan species which showed the presence of high content of bioactive compounds and positive antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties³⁷⁻⁴¹, we investigated this species on which we previously reported the chemical composition of the essential oil of its aerial parts⁴². In this paper we report for the first time, the chemical constituents of the *n*-butanol soluble part of the aqueous-MeOH extract (BEPB) of its aerial parts. BEPB was also investigated for antiperoxidative damage and antihemolytic properties using different *in vitro* model assays.

MATERIALS AND METHODS

Phytochemical studies

General Procedures

TLC: pre-coated aluminium foil silica gel 60F₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC): silica gel 60 (Merck 230-400 mesh). UV Spectra (MeOH): Shimadzu (190-3200 nm, UV-3101PC) spectrophotometer. NMR spectra: Bruker AMX-400 MHz, AMX-500 MHz and Avance DPX-250, 250 MHz spectrometers; chemical shifts (δ) are given in ppm using TMS as internal standard and coupling constants (J) are given in Hz. High resolution mass spectra (ESI-HRMS) were performed on a Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, USA) and a μ -QTOF spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

Plant material

The aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire, was collected from Bechar Southern Algeria in April 2010. The plant material was authenticated by M. Mohamed Benabdelhakem, director of the nature preservation agency, Bechar. A voucher specimen (PBA 54/04/10) was deposited at the Herbarium of the VARENBIOMOL Research unit, University Frères Mentouri Constantine 1.

Extraction and Isolation

Air-dried Aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire (3350 g) were macerated at room temperature with MeOH-H₂O (80:20, v/v) for 48 h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated (1100 mL) and dissolved in H₂O

(1300 mL). The resulting solution was extracted successively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. The organic layers were dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuum up to 35°C to obtain the following extracts: petroleum ether (0.9 g), CHCl₃ (17 g), EtOAc (12 g) and *n*-BuOH (70 g), respectively. During the concentration of the *n*-BuOH extract, a white precipitate was formed. This precipitate was filtered and washed with a solution of CHCl₃ and a little amount of MeOH to yield mannitol **1** (2.5 g)⁴³. Part of the *n*-BuOH extract (20 g) was fractionated by column chromatography (230-400 mesh silica gel; CHCl₃/MeOH with increasing polarity) to give 28 fractions (F₁-F₂₈) obtained by combining the eluates on the basis of TLC analysis. Fraction F₅ (66.4 mg) (CHCl₃/MeOH; 99:1) was submitted to preparative plates of silica gel 60, HF₂₅₄ (CHCl₃/Acetone; 9:1, two elutions) to give xanthotoxol **2** (20.6 mg)⁴⁴. Fraction F₁₁ (45.1 mg) (CHCl₃/MeOH; 98:2) was submitted to preparative plates of silica gel (CHCl₃/Acetone; 9:1, two elutions) and purified over Sephadex LH-20 column eluted with MeOH to afford 8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen **3** (11.0 mg)^{45,46}. Fraction F₂₁ (1254.9 mg) (CHCl₃/MeOH; 90:10) was rechromatographed on a silica gel column (AcOEt/MeOH/H₂O; 8:1:1) to yield 3 sub-fractions (subF₁-subF₃). SubF₁ (25.2 mg) was submitted to preparative plates of silica gel (CHCl₃/MeOH; 6:1) to give a compound which was purified on a Sephadex LH-20 column eluted with methanol, to obtain isorhamnetin 3-*O*- β -glucopyranoside (cacticin) **4** (18.0 mg)⁴⁷.

The structures of the isolated compounds were elucidated by UV, HR-ESIMS, ¹H and ¹³C NMR and 2D NMR experiments (COSY, NOESY, HSQC and HMBC) (Figure 1). All these results were in good agreement with the literature data.

Biological studies

DPPH[•] scavenging activity

The antioxidant activity was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH[•]⁴⁸. Different methanol dilutions of BEPB were mixed with 1 mL of DPPH[•] 0.2 mM methanol solution. After 30 minutes, the readings were made at 517 nm. A solution of DPPH[•] (1 mL, 0.2 mM) in methanol (1 mL) was used as a negative control, ascorbic acid and trolox were used as positive control. The percentage of DPPH[•] scavenging activity (I %) was calculated using the equation (1).

$$(1): \quad I\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Where A₀ is the absorbance of DPPH[•] solution alone, A₁ is the absorbance of BEPB / ascorbic acid / trolox.

Hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity

The H₂O₂ scavenging ability of the BEPB was examined according to Gulcin *et al.*, 2003⁴⁹ with minor modifications. To 3.4 mL of BEPB (100-1200 μ g/mL) in phosphate buffer 50 mM (pH 7.4), 0.6 mL of H₂O₂ was added and incubated at room temperature for 10 min. Decrease in the absorbance of H₂O₂ upon oxidation was monitored at 230 nm spectrophotometrically against suitable blank (phosphate buffer alone). Trolox was used as a standard antioxidant and control (phosphate buffer and

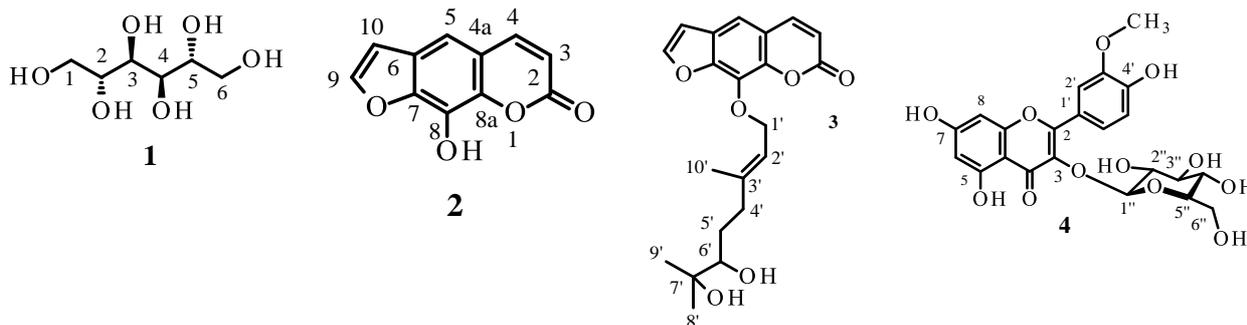


Figure 1: Structures of compounds 1 – 4.

H₂O₂) was prepared and the percentage inhibition was calculated using the above equation (1).

Anti-erythrocyte hemolysis

The inhibitory activity of H₂O₂ induced red blood cell damage was evaluated by the method described by Ebrahimzadeh *et al.*, 2009¹⁰. To 100 µL of 5% (v/v) suspensions of erythrocytes in phosphate buffer saline (PBS), 50 µL of BEPB (100-1200 µg) in PBS pH (7.4) was added; to this, 100 µL of 100 µM H₂O₂ was added. The reaction mixture was shaken gently while being incubated at 37°C for 3 hours. The reaction mixture was diluted with 8 mL of PBS and centrifuged at 2000 *x g* for 10 minutes. The absorbance of the resulting supernatant was measured at 540 nm by spectrophotometry to determine hemolysis. Likewise erythrocytes were treated with 100 µM H₂O₂ and without inhibitors to obtain complete hemolysis. The pourcentage of hemolysis inhibition was calculated using the equation (2).

(2): % hemolysis inhibition = [(A₀ - A₁) / A₀] × 100
Where A₀ is the absorbance of H₂O₂-erythrocytes, A₁ is the absorbance of H₂O₂-erythrocytes + BEPB / trolox.

Lipid peroxidation-ammonium thiocyanate.

The inhibition of lipid peroxidation by BEPB was estimated by the method of thiocyanate using linoleic acid as a source of peroxide⁵⁰. The generated peroxide reacted with the ferrous chloride (Fe²⁺) to form the ferric ion (Fe³⁺) monitor form of a thiocyanate complex. The emulsion of linoleic acid was prepared by homogenization of linoleic with Tween-40 emulsified in phosphate buffer (0.2 M, pH 7). The samples were prepared in MeOH/water and the selected concentrations for the study were 500, 600 and 700 µg/mL. After incubation at 37°C, the ammonium thiocyanate and ferrous chloride were added. The mixture prepared by the same procedure was used as control. Trolox was used as reference. Powered the coloration was measured at 500 nm for 4 successive days. Results were calculated according to the equation (1).

Statistical Analysis

All the experiments were done in triplicates and the data expressed as mean ± standard deviation (SD), p < 0.05 was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolated and identified compounds

The isolated and identified compounds are reported in Figure 1.

D-Mannitol (1): HRESI-MS (+): *m/z* 205.0689 [M+Na]⁺, calculated for C₆H₁₄O₆Na: 205.0688, formula: C₆H₁₄O₆; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm), *J*(Hz): 4.12 (2H, *d*, *J* = 6.9 Hz, 2OH), 4.31 (2H, *t*, *J* = 5.6, 2OH), 4.40 (2H, *d*, *J* = 5.4, 2OH), 3.61 (2H, *m*, H-1a, H-6a), 3.54 (2H, *t*, H-3, H-4), 3.45 (2H, *m*, H-2, H-5), 3.38 (2H, *m*, H-1b, H-6b); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 71.3 (C-2, C-5), 69.7 (C-3, C-4), 63.8 (C-1, C-6).

Xanthotoxol (2): HRESI-MS (+): *m/z* 225.0167 [M+Na]⁺, corresponding to C₁₁H₆O₄Na (calculated for C₁₁H₆O₄Na: 225.0164), Formula: C₁₁H₆O₄; ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm, *J*(Hz): 6.24 (1H, *d*, *J* = 9.6, H-3), 7.86 (1H, *d*, *J* = 9.6, H-4), 7.22 (1H, *s*, H-5), 7.69 (1H, *d*, *J* = 2.2, H-9), 6.77 (1H, *d*, *J* = 2.2, H-10); ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 125 MHz, δ ppm): 163.24 (C-2), 114.68 (C-3), 147.21 (C-4), 117.76 (C-4a), 111.32 (C-5), 127.36 (C-6), 147.15 (C-7), 131.74 (C-8), 141.02 (C-8a), 148.23 (C-9), 108.00 (C-10).

8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen (3): HRESI-MS (+): accurate mass 372.15713 (calculated for C₂₁H₂₄O₆: 372.15729), formula: C₂₁H₂₄O₆; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*(Hz): 6.42 (1H, *d*, *J* = 9.6, H-3), 8.14 (1H, *d*, *J* = 9.6, H-4), 7.68 (1H, *s*, H-5), 8.11 (1H, *d*, *J* = 2.4, H-9), 7.08 (1H, *d*, *J* = 2.4, H-10), 4.92 (2H, *d*, *J* = 6.8, H-1'), 5.50 (1H, *t*, *J* = 7.0, H-2'), 1.89 (1H, *m*, H-4'a), 2.17 (1H, *m*, H-4'b), 1.53 (1H, *m*, H-5'a), 1.10 (1H, *m*, H-5'b), 2.98 (1H, *d*, *J* = 10.4, H-6'), 0.95 (1H, *s*, H-8'), 1.00 (1H, *s*, H-9'), 1.60 (1H, *s*, H-10'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 166.10 (C-2), 114.27 (C-3), 145.31 (C-4), 116.32 (C-4a), 118.81 (C-5), 127.36 (C-6), 147.95 (C-7), 130.42 (C-8), 143.41 (C-8a), 147.80 (C-9), 107.05 (C-10), 69.29 (C-1'), 118.81 (C-2'), 143.37 (C-3'), 36.44 (C-4'), 29.18 (C-5'), 76.90 (C-6'), 71.52 (C-7'), 24.56 (C-8'), 26.19 (C-9'), 16.28 (C-10').

Cacticin (4): C₂₂H₂₂O₁₂, UV (MeOH, λ_{max}, nm): 350, 253; +NaOH: 410 (hyperchromic effect), 325, 273; +AlCl₃: 403, 253; + AlCl₃/HCl: 400, 253; +NaOAc: 395, 273; + NaOAc/H₃BO₃: 351, 253; ¹H-NMR (250 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm, *J*(Hz): 7.95 (1H, *d*, *J* = 1.9, H-2'), 7.61 (1H, *dd*, *J* = 8.5; 1.9, H-6'), 6.92 (1H, *d*, *J* = 8.5, H-5'), 6.30 (1H, *brs*, H-8), 6.10 (1H, *brs*, H-6), 5.30 (1H, *d*, *J* = 7.3, H-1' of glucose), 3.90 (3H, *s*, 3'-OCH₃).

DPPH[•] scavenging activity of BEPB

Our results revealed that BEPB exhibited a maximum (59.86-78.40%) DPPH[•] scavenging effect at the concentration ranging between 1000-1200 µg/mL. While the standard references, trolox and ascorbic acid needed

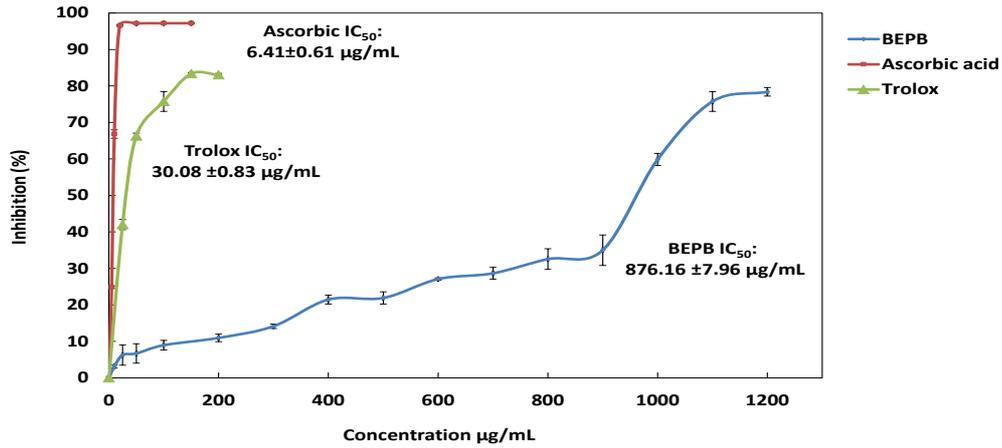


Figure 2: DPPH[•] scavenging activity of BEPB and standards. Values are means ± SD (n=3) P<0.05.

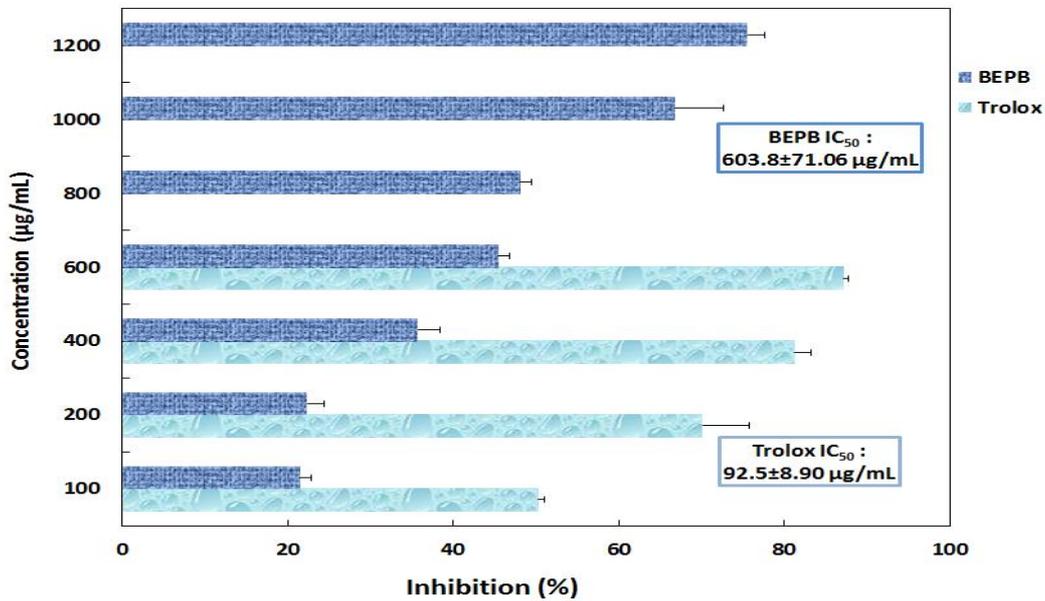


Figure 3: H₂O₂ scavenging ability of BEPB and trolox as standard. Each value represents a mean ± SD (n=3), P<0.05.

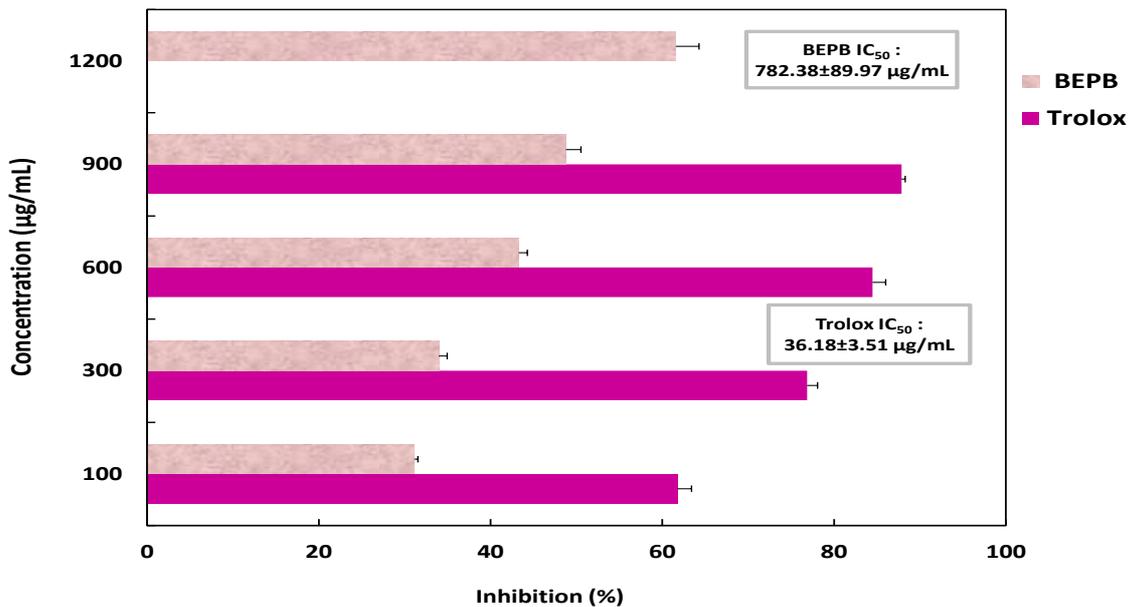


Figure 4: Antihemolytic property of BEPB and trolox as standard. Each value represents a mean ± SD (n=3), P<0.05.

only 300 µg/mL and 200 µg/mL for 83.36% and 98% DPPH[•] scavenging effect, respectively. The radical scavenging activity of BEPB was much lower (IC₅₀ 876.16±7.96 µg/mL) than those of both standard references (trolox IC₅₀: 30.08±0.83 µg/mL; ascorbic acid IC₅₀: 6.41±0.61 µg/mL), suggesting that the antioxidant effect of BEPB extract was moderate and required high concentration to have a significant effect (Figure 2).

H₂O₂ scavenging activity of BEPB

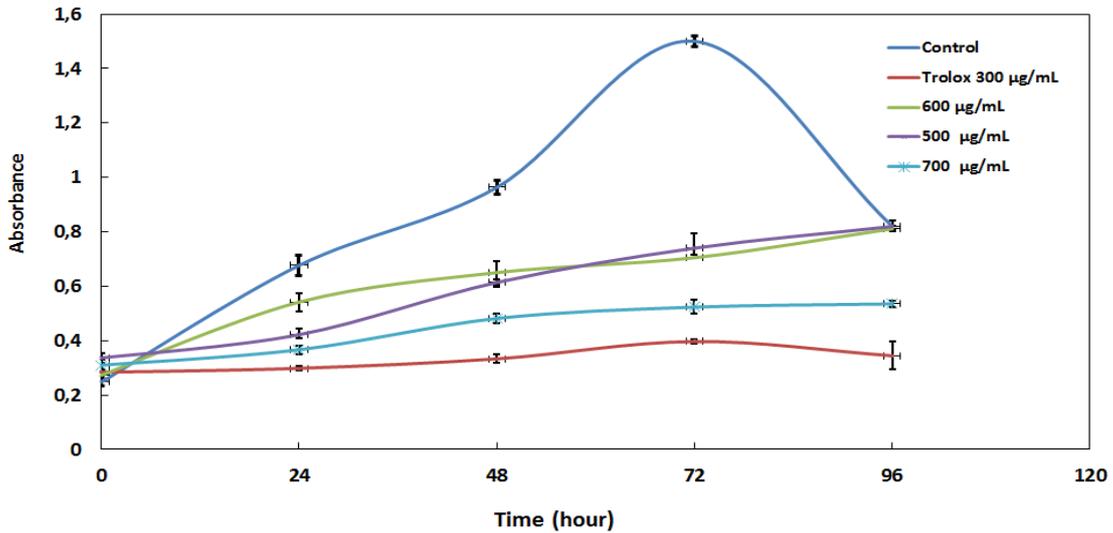
Despite that H₂O₂ was considered poorly reactive because of its weaker oxidizing capabilities, it can produce cytotoxicity by generating hydroxyl radical (OH[•]) that can initiate lipid peroxidation^{10,11}. H₂O₂ scavenging activity of the BEPB was also concentration dependent, BEPB also possess significant ability to quench the hydrogen peroxide, the H₂O₂ scavenging activity was found to be maximum (66.81-75.60%) at the concentration ranging between 1000-1200 µg/mL with IC₅₀: 603.8±71.06 µg/mL. Trolox which was taken as a reference compound shows 81.21% H₂O₂ inhibition at a concentration of 400 µg/mL with IC₅₀: 92.5±8.90 µg/mL (Figure 3).

Antihemolytic property of BEPB

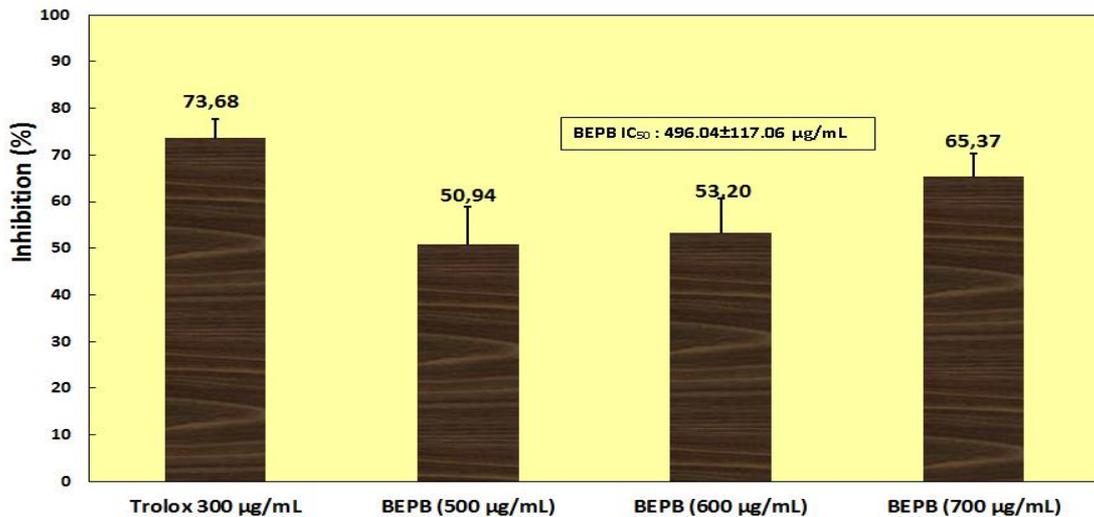
Hemolysis is the rupture of red blood cells membrane, causing the liberation of hemoglobin and other components into the extra cellular fluid¹⁵. The H₂O₂ erythrocyte hemolytic process may be explained by the penetrating of H₂O₂ in cellular membranes that triggers hydroxyl radical (OH[•]) formation in the presence of metal ions⁵, the Hydroxyl radicals which eliminate hydrogen atoms from the membrane lipids leads to lipid peroxidation and hemoglobin leakage⁵¹. The results of the present study clearly indicate that BEPB inhibited rat erythrocytes hemolysis induced by H₂O₂ in a dose dependent way. The maximum percentage inhibition (61.58 %) showed by BEPB was at a concentration of 1000-1200 µg/mL, with IC₅₀ value: 782.38±89.97 µg/mL (Figure 4), the standard reference, trolox exhibited 87.85% hemolysis inhibition at 700 µg/mL with IC₅₀ value: 36.18 ± 3.51 µg/mL (Figure 4).

Inhibition of lipid peroxidation of BEPB

One of oxidative stress damages is lipid peroxidation that produces lipid peroxides⁶. Lipid peroxidation usually proceed as a chain reaction; followed in the propagation



(a)



(b)

Figure 5: Antilipid peroxidation effect of BEPB and trolox as standard (a), inhibition percentage of antiperoxidative effect (b). Each value represents a mean ± SD (n=3), P<0.05.

phase, by the formation of reactive species, and terminating with the formation of lipid hydroperoxide (ROOH)^{52,53}. In our study, inhibition of lipid peroxidation activity of BEPB was estimated by the method of thiocyanate by using linoleic acid as a source of peroxide⁵⁰. The generated peroxide reacted with the ferrous chloride (Fe²⁺) to form the ferric ion (Fe³⁺) monitor form of a thiocyanate complex. Linoleic acid, an unsaturated fatty acid, can be easily peroxidized and produces various compounds such as aldehydes and epoxides. The present study monitored the amount of lipid peroxide formed every 24 hours, over a period of 4 days, by monitoring the colored complex of lipid peroxide which absorbs light at 500 nm. It was found that on the third day, the absorbance of the control solution reached a maximum indicating the maximum formation of lipid peroxides. Low absorbance value at 500 nm indicated high level of inhibition of lipid peroxidation and therefore high antioxidant activity. Figure 5, showed that the control OD has increased up to 1.50±0.03 at 72 hours, then it has decreased, at the same time the BEPB-OD at 700 µg/mL was recorded at 0.52±0.03, while the trolox as standard antiperoxidant exhibited only a 0.40±0.01 OD value at 300 µg/mL. The percentages of linoleic acid peroxidation inhibition for BEPB at all concentrations (500, 600, 700 µg/mL) were 50.94, 53.20, and 65.37%, respectively with IC₅₀ value: 496.04±117.06 µg/mL as compared to trolox (73.68%) at 300 µg/mL (Figure 5 a and b).

Recapitulated results revealed that BEPB carry the antioxidative effect for free radical scavenging (DPPH[•], H₂O₂), chain-breaking inhibition of lipid peroxidation and for hemolysis inhibition; these properties may be due to the combined activity of the above mentioned bioactive components with other components, most specifically, furanocoumarin (xanthotoxol), cacticin and mannitol, that have been previously reported to be responsible for the antioxidant and are proficient of donating hydrogen to a free radical (DPPH[•] and H₂O₂) to convert them to non reactive species⁵⁴⁻⁵⁷. The structure activity relationship study showed that the antioxidant activity of the coumarin derivatives could be attributed to electron donating nature of the substituents like -OH, -CH₃ and -Cl on coumarin scaffold, reduce free radical and prevent the damage of cell⁵⁸⁻⁶⁰. Flavonoids have been extensively reported by many researchers to play an important role in the treatment of anemia, the binding of the flavonoids to the RBC membranes significantly inhibits lipid peroxidation, and at the same time enhances their integrity against lysis^{15,61,62}. From our results it can be suggested that the antioxidant activity of BEPB might be due to synergy effect of the xanthotoxol, 8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen, cacticin and mannitol present in the *n*-BuOH extract of *P. battandieri*, that have been separately shown to possess different biological effects^{45,46,54-56}.

CONCLUSION

Four compounds namely mannitol **1**, xanthotoxol **2**, 8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen **3** and cacticin **4** have been isolated from the *n*-BuOH extract of *Pituranthos battandieri* Maire. These compounds are described for the

first time for this species. On the basis of the results obtained in the present study, we conclude that the *n*-BuOH extract of *P. battandieri* possess antioxidant properties in all oxidation tested models (DPPH[•], H₂O₂, H₂O₂-rat hemolysis, LPO-thiocyanate/linoleic acid) the antioxidative damage proved by of *P. battandieri* appears as a consequence of synergistic interactions among a number of active constituents (furanocoumarins: xanthotoxol and 8-(6',7'-dihydroxygeranyloxy)-psoralen, cacticin and mannitol).

REFERENCES

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress: Adaptation, damage, repair, senescence and death. In *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. London: Oxford, university press. 2007; pp.187-267.
- Bakirel T, Bakirel U, Keles OU, Ulgen SG, Yardibi H. *In vivo* assessment of anti-diabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan induced diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 116 (1): 64-73.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008; 4(2): 89-96.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
- Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int.* 2006; 30: 376-380.
- Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 390(1): 1-11.
- Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 1986; 107: 401-404.
- Hatherill JR, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions.* 1991; 32: 351-358.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* leaves. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 1097-1105.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Cent. Eur. J. Biol.* 2010; 5(3): 338-345.
- Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food chem. toxicol.* 2007; 45: 130-135.
- Bigoniya P, Singh S, Singh CS, Shukla A. Anti-anemic potential estimation on mice and characterization of flavonoids using high performance thin layer chromatography in *Wrightia tinctoria* bark fraction. *J. Nat. Pharm.* 2013; 4: 47-56.

14. Asgary S, Naderi GH, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals, *Exp. Clin. Cardiol.* 2005; 10(2): 88.
15. Singh N, Rajini PS. Antioxidant in erythrocytes against oxidative damage, *Chem. Biol. Interact.* 2008; 173: 97-104.
16. Girish TK, Vasudevaraju PU, Prasada Rao J. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50(5): 1690-1696.
17. Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin) a review. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 134(1): 1-10.
18. Murry RDH, Mendez J, Brown SA. The natural coumarins, occurrence, chemistry and biochemistry, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1982.
19. Okuyama E, Nishimura S, Ohmori S, Ozaki Y, Satake M, Yamazaki M. Analgesic component of *Notopterygium incisum* Ting. *Chem. Pharm. Bull.* 1993; 41: 926-929.
20. Ulate-Rodriguez J, Schafer HW, Zottola EA, Davidson PM. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157-H7, and *Micrococcus luteus* by linear furanocoumarins in culture media. *J. Food Prot.* 1997; 60(9): 1046-1049.
21. Bai Y, Li D, Zhou T, Quin N, Li Z, Yu Z, Hua H. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. *J. Funct. Foods* 2016 ; 20: 453-462.
22. Hudson JB. Antiviral compounds from plants. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 1990; p. 200.
23. Ngameni B, Touaibia M, Patnam R, Belkaid A, Sonna P, Ngadjui BT, Annabi B, Roy R. Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. *Phytochemistry* 2006; 67(23): 2573-2579.
24. Nivsarkar M, Desai A, Mokal R. Free radical induced biophysical modification of membrane lipids: a novel mechanism proposed for a haemorrhological alteration induced by 4,5' 8-trimethyl psoralen. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996; 38(3): 625-633.
25. Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *New Engl. J. Med.* 1974; 291(23): 1207-1211.
26. Ashkenazy D, Friedmann J, Kashman Y. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. *Planta med.* 1983; 47(4): 218-220.
27. Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 105(3): 358-367.
28. Boukef MK. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Cooperation Culturelle et Technique 1986; 1: 228-30.
29. Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahes C. *Fleurs du Sahara, Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili.* Ibis Press, Paris; 2000.
30. Krifa M, Gharad T, Haouala R. Biological activities of essential oil, aqueous and organic extracts of *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. *Sci. Hort.* 2011; 128(1): 61-67.
31. Abdallah HM, Ezzat SM. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. *Z. Naturforsch. C* 2011; 66: 143-148.
32. Mighri H, Sabri K, Eljeni H, Neffati M, Akrouf A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pituranthos chloranthus* (Benth.) Hook and *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire essential oils from Southern Tunisia. *Adv. Biol. Chem.* 2015; 5: 273-278.
33. Neffati A, Limem I, Kilani S, Bouhlel I, Skandrani I, Bhourri W, Ben Sghaier M, Boubaker J, Ledauphin J, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. A comparative evaluation of mutagenic, antimutagenic, radical scavenging and antibacterial activities of essential oils of *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur.). *Drug Chem. Toxicol.* 2009; 32(4): 372-380.
34. Krifa M, El Mekdad H, Bentouati N, Pizzi A, Ghedira K, Hammami M, El Meshri SE, Chekir-Ghedira L. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. *Tumor Biol.* 2015; 36: 5165-5170.
35. Ozenda P. *Flore du Sahara Septentrional et Central.* CNRS. 1958; p. 356.
36. El Oualidi J, Khamar H, Fennane M, Ibn Tattou M, Chauvet S, Taleb MS. Checklist des endémiques et spécimens types de la flore vasculaire de l'Afrique du Nord. Document de l'Institut Scientifique. 2012; 25, p.10. Université Mohammed V, AGDAL, Rabat, Morocco.
37. Mohamadi S, Zhao M, Amrani A, Marchioni E, Zama D, Benayache F, Benayache S. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Ind. Crop. Prod.* 2015; 76: 910-919.
38. Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, Zhao M, Mosset P, Benayache F. On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules* 2017; 22(2): 239; doi:10.3390/molecules22020239.
39. Bougandoura A, D'Abrosca B, Ameddah S, Scognamiglio M, Mekkiou R, Fiorentino A, Benayache S, Benayache F. Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia* 2016; 109: 248-253.
40. Boumaraf M, Carbone M, Ciavatta ML, Benyahia S, Ameddah S, Menad A, Benayache S, Benayache F, Gavagnin M. Exploring the bioactive terpene content of an Algerian plant of genus *Pulicaria*: first occurrence of the ent-series of asteriscunolides. *J. Nat. Prod.* 2017; 80 (1): 82-89.
41. Boussaha S, Bekhouche K, Boudjerda A, León F, Koldaş S, Yaglioglu AS, Demirtas I, Brouard I,

- Marchioni E, Zama D, Benayache S, Benayache F. Chemical constituents, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. extract. *Rec. Nat. Prod.* 2015; 9(3): 312-322.
42. Esseid C, Mechehoud Y, Chalchat JC, Figueredo G, Chalard P, Benayache S, Benayache F. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Pituranthos battandieri* Maire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2016; 8(10): 1731-1734.
43. Wayne Schnarr G, Vyas DM, Szarek WA. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of acyclic carbohydrate derivatives: alditols, 1,2-bis(phenylhydrazones), and dithioacetals. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1979: 496-503.
44. He W, Zhang BL, Zhou SY, Sun XL, Zhang SY. Facile total synthesis of xanthotoxol. *Synth. Commun.* 2007; 37(3): 361-367.
45. Ito A, Shamon LA, Yu B, Mata-Greenwood E, Lee SK, Van Breemen RB, Mehta RG, Farnsworth NR, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46(9): 3509-3516.
46. Row EC, Brown SA, Stachulskib AV, Lennarda MS. Synthesis of 8-geranyloxypсорalen analogues and their evaluation as inhibitors of CYP3A4. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 3865-3871.
47. Lee YS, Lee S, Lee HS, Kim BK, Ohuchi K, Shin KH. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28(5): 916-918.
48. Magalhães LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal. Chim. Acta.* 2006; 558: 310-318.
49. Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal. Res.* 2003; 34: 278-281.
50. Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46(10): 3952-3957.
51. Ernster L. Lipid peroxidation in biological membranes: Mechanisms and implications. In K. Yagi, (Ed.), *active oxygens, lipid peroxides and antioxidants*. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press 1993; 1-38.
52. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000; 59: 163-170.
53. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* 1982; 44: 227-253.
54. He W1, Chen W, Zhou Y, Tian Y, Liao F. Xanthotoxol exerts neuroprotective effects *via* suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2013; 33(5): 715-22.
55. Chang-Suk K. Antiadipogenic activity of isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*. *Immunopharm. Immunot.* 2012; 34(6): 907-911.
56. England MD, Cavarocchi NC, O'Brien JF, Solis E, Pluth JR, Orszulak TA, Kaye MP, Schaff HV. Influence of antioxidants (mannitol and allopurinol) on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1986; 74(5 Pt 2): III 134-137.
57. Hany S, Mei-Mei W, Andrew M. Mannitol: a review of its clinical uses. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 2012; 12(2): 82-85.
58. Thuong PT, Tran MH, Tran MN, Do TH, Byung SM, Seung JK, Kang TS, Choi JS, Kihwan B. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* 2010; 24: 101-106.
59. Kancheva VD, Boranova PV, Nechev JT. Manolov II: Structure-activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain breaking antioxidants. *Biochimie* 2010; 92: 1138-1146.
60. Isihara M, Yoshiko Y, Sakagami H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semi empirical molecular orbital method. *Anticancer Res.* 2006; 26: 2883-2886.
61. Dai F, Miao Q, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci.* 2006; 78(21): 2488-2493.
62. Asgary S, Naderi G, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol.* 2005; 10(2): 88-90.

Résumé

Le présent travail a consisté en une étude phytochimique et biologique de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire, variété Algérienne de la famille des Apiacées endémique au Sahara algéro-marocain et qui n'a jamais fait l'objet d'études auparavant, ainsi que l'analyse par GC et GC/MS de son huile essentielle. L'endémisme de cette espèce nous a encouragés à entamer ce travail.

Notre expérimentation a permis la séparation et la purification de 23 composés grâce à l'utilisation de diverses techniques chromatographiques (CCM, CC). Toutes les structures ont été élucidées par la combinaison des méthodes spectroscopiques : (UV-Vis), RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT), et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), par la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-EI-MS et HR-ESIMS) et par la comparaison avec les données de la littérature. Parmi les composés isolés, 13 coumarines dont 5 nouvelles, 4 flavonoïdes, 2 stéroïdes, 3 composés phénoliques et 1 sucre réduit.

Par ailleurs, une valorisation biologique par la recherche de l'activité antioxydante a été effectuée sur l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire. Cette étude a montré cette espèce a une efficacité biologique. Au cours de cette étude nous avons également réalisé un test antibactérien vis-à-vis de quelques germes pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que cet extrait butanolique n'a pas manifesté d'activité.

L'analyse GC-FID et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a montré que cette huile est majoritairement composée de myrcène (8,9%), α -phéllandrène (17,5%), α -terpinène (14%), *o*-cymène (11,6%), β -phéllandrène (3,5%), oxyde de *cis*-linalol (furanolide) (5,9%) et *trans*- β -caryophyllène (3,4%).

Mots clés : *Pituranthos battandieri* Maire ; Apiaceae ; Coumarines ; flavonoïdes ; Huile essentielle ; Activité antioxydante ; Activité antibactérienne.