



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



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :.....

Série :.....

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie Organique
Option : Substances Naturelles

Par

M^{me} HAMMOUD Leila épouse ZENIOU

Thème

**Isolement et Détermination Structurale de Métabolites
Secondaires de deux Plantes Sahariennes : *Asteriscus
graveolens* (Forsk.) DC. (Asteraceae) et *Crotalaria
vialattei* Batt. (Fabaceae)**

Devant le jury :

Pr. MECHEHOUD Youcef	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Président
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de Thèse Rapporteuse
Pr. BOUDJERDA Azzedine	Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examineur
Pr. KHELILI Smail,,	Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examineur
Pr. BENKINIOUAR Rachid	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examineur
MCA. ZAIDI Farouk	Université Ferhat Abbas Sétif 1	Examineur

Janvier 2023

Dédicaces

A mes chers parents et ma grand-mère

à la mémoire de mon grand père

à mon mari,

à mes chers enfants,

à ma sœur,

à mes frères,

à mes neveux et nièces,

à toute ma famille,

à mes amis et collègues

pour leur présence de tous les instants,

pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

avec toute mon affection et ma reconnaissance .

Je dédie ce modeste travail

Leïla

Remerciements

Ce travail a été réalisé 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 toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et dirigée tout au long de la réalisation de cette thèse et pour toute l'aide, la patience, la disponibilité, les conseils précieux, les critiques constructives et le soutien humain. Qu'elle reçoive ici l'expression de mon profond attachement, ma gratitude et ma sincère reconnaissance. Je la remercie pour tout et particulièrement pour ses efforts, ses compétences scientifiques et pour sa gentillesse et le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Samir. BENAYACHE, professeur à l'université Mentouri de Constantine 1, pour avoir mis à ma disposition deux plantes sahariennes endémiques, dont une n'avait jamais fait l'objet d'étude auparavant, pour m'avoir accordé deux stages dans le cadre de son projet PCI (Programme de Coopération Interuniversitaire Algéro-Espagnol) entre l'IPNA-CSIC, Tenerife, Espagne (responsable Dr. BROUARD Ignacio) et l'université Frères Mentouri, Constantine 1 (responsable Pr. BENAYACHE Samir). Je le remercie également pour ses précieux conseils, ses encouragements, l'intérêt scientifique qu'il a porté à mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier particulièrement le professeur MECHEHOUD Youcef de l'université Frères Mentouri, Constantine 1, pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je suis très honorée de la présence en tant qu'examineurs de Monsieur le Professeur, BOUDJERDA Azzedine de l'université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel, Monsieur le Professeur KHELILI Smail de l'université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel, Monsieur ZAIDI Farouk maître de Conférences, de l'université Ferhat Abbas Sétif 1 et monsieur le Professeur BENKINIOUAR Rachid de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je les en remercie sincèrement.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au docteur BROUARD Ignacio directeur de recherche et au professeur Jaime BERMEJO de « Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC, Instituto Universitario de Bioorgánica, Antonio Gonzalez. La

Laguna, Tenerife, Espagne » de m'avoir accueillie dans leur laboratoire durant mes séjours de stage, pour l'enregistrement des spectres de RMN et de masse, pour leur soutien et leurs encouragements.

Un grand remerciement particulier, au docteur LEÓN Francisco (Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC, Instituto Universitario de Bioorgánica, Antonio Gonzalez, la Laguna, Tenerife, Espagne) pour ses qualités humaines et scientifiques, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, pour sa gentillesse, et pour sa participation aux analyses structurales. Je le remercie également pour son aide lors de la rédaction de l'article. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et de ma sympathie.

Je remercie vivement monsieur la professeur P. MOSSET de l'école nationale de chimie de Rennes pour l'enregistrement des spectres IR et les mesures du pouvoir rotatoire des produits.

J'adresse mes plus vifs remerciements à tous les chercheurs de l'Unité de Recherche VARENBIOMOL pour leur aide, leurs conseils précieux et pour tout ce qu'ils m'ont appris.

Je voudrais également remercier les ingénieurs : monsieur Hichem HAZMOUNE et madame Naouel TEBBOUB pour leur aide, et leur disponibilité.

Un grand merci aux membres de ma famille qui m'ont toujours encouragée à terminer cette thèse, en particulier mes parents que Dieu les protège, ma sœur, mon mari, pour leur soutien constant.

Enfin, Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince

R_f : Facteur de retardement (retardation factor)

[α]_D: Pouvoir rotatoire

m/z : Masse / charge électrique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

¹³C : Carbone 13

¹H : Proton

ppm : Partie par million

δ : Déplacement chimique

J(Hz) : Constante de couplage exprimée en hertz

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

HSQC :Heteronuclear Simple Quantum Coherence

HMBC : Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

COSY : Correlated Spectroscopy

IR : infra-rouge

UV : ultra-violet

λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximale

nm : nanomètre

SMIE : Spectrométrie de masse en mode impact électronique

ESI : Ionisation par electospray (Electrospray Ionisation)

SMIE : Spectrométrie de masse en mode impact électronique

EI : impact électronique

HR : haute résolution

CHCl₃ : Chloroforme

Et₂O : Ether diéthylique

MeOH : Méthanol

AcOEt : Acétate d'éthyl

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

Me₂CO : Acétone

CDCl₃ : Chloroforme deutérié

MeOH-d₄ : Méthanol tétradeutérié

Me₂CO: Acétone deutérié

Me : Methyl (-CH₃)

Glc: Glucose

OCH₃ : méthoxyle

Rut : Rutinose

Rham : Rhamnose

Glu : Glucose

Gal : Galactose

Cq : carbone quaternaire

s : singulet

sl : singulet large

d : doublet

t : triplet

dd : doublet de doublets

m : multiplet

cm : centimètre

m : mètre

mL : millilitre

mn : minute

V : volume

% : Pourcentage

g : gramme

°C : température en degrés Celsius

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

Liste des figures

Figure I-1: Quelques photos d'espèces de la famille Asteraceae.....	7
Figure I-2 : Le capitule chez les Astéracées.....	8
Figure I-3 : Types de capitules des Astéracées.....	9
Figure I-4 : Photo d' <i>Asteriscus graveolens</i>	12
Figure I-5 : Lactones sesquiterpéniques isolées de <i>Nauplius graveolens</i> par Akssira <i>et al.</i> ...	15
Figure I-6 : Produits isolés de l'espèce <i>A. graveolens</i> par El Dahmy <i>et al.</i>	16
Figure I-7-: Flavonoïdes isolées de l'espèce <i>A. graveolens</i> par Ahmed <i>et al.</i>	17
Figure I-8 : Produits isolés de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i> subsp. <i>stenophyllus</i> par Triana <i>etal.</i>	19
Figure I-9 : Produits isolés de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i> par Achoub <i>et al.</i>	21
Figure I-10 : Exemple d'une légumineuse <i>Trifolium repens</i> (Le trèfle blanc).....	23
Figure I-11 : Quelques alcaloïdes pyrrolizidiniques rencontrés chez le genre <i>Crotalaria</i>	27
Figure I-12 : Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Crotalaria</i>	30
Figure I-13 : D'autres type de composés rencontrés au sein du genre <i>Crotalaria</i>	32
Figure I-14 : L'espèce <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	33
Figure II-1 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i>	44
Figure II-2 : Récapitulatif des étapes de séparation et purification des composés isolés de l'extrait chloroforme d' <i>Asteriscus graveolens</i>	48
Figure II-3 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	50
Figure II-4 : Récapitulatif des étapes de séparation des composés isolés de l'extrait chloroforme de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	53
Figure II-5 : Récapitulatif des étapes de séparation des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	58
Figure III-1 : Structure du β -sitostérol A1-a et stigmastérol A1-b	61
Figure III-2 : Structure finale du composé A2 , la vanilline	69
Figure III-3 : Entité-1 faisant partie de la structure du composé A3	71
Figure III-4 : Entité-2 faisant partie de la structure du composé A3	73
Figure III-5: Entité-3 faisant partie de la structure du composé A3	74
Figure III-6 : Entité-4 faisant partie de la structure du composé A3	78

Figure III-7 : Entité-5 faisant partie de la structure du composé A3	79
Figure III-8 : Structure partielle du composé A3	82
Figure III-9 : Structure plane du composé A3	83
Figure III-10 : Structure finale du composé A3 , (-)-(1 <i>S</i>)-(2 <i>Z</i> ,9 <i>E</i>) 8α-hydroxy-6α,7β-epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide ou (-)- asteriscunolide I	84
Figure III-11 : Structure du composé A3 établie par diffraction de rayons X, (-)-(1 <i>S</i>)-(2 <i>Z</i> ,9 <i>E</i>) 8α-hydroxy-6α,7β-epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide ou (-)- asteriscunolide I	85
Figure III-12 : Structure plane du composé A4	96
Figure III-13 : Structure finale du composé A4 , (-)- asteriscunolide J	98
Figure III-14 : Structure du composé A4 établie par diffraction de rayons X, dans les mêmes conditions que celle du composé A3	98
Figure III-15 : Structure plane du composé A6	110
Figure III-16 : Structure finale du composé A6 : (-)- asteriscunolide F	111
Figure III-17 : Structure finale du composé A5 , l'acide (-)-(2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>Z</i>)- 8-oxo-1α-acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque	121
Figure III-18 : Structure finale du composé A7 , (-) asteriscunolide A	132
Figure III-19 : Structure du composé A8 , (-)- asteriscunolide B	134
Figure III-20 : Structure finale du composé B1 , tectochrysin	141
Figure III-21 : Entité -1 présente dans le composé B2	144
Figure III-22 : Entité-2 présente dans le composé B2 (un groupement isopropényle).....	147
Figure III-23 : Squelettes de lupène (a) et hopène (b).....	148
Figure III-24 : Structure du composé B2 , lupéol	151
Figure III-25 : Structure finale du composé B3 : β-sitostérol	154
Figure III-26 : Entité-1 faisant partie de la structure du composé B4	155
Figure III-27 : Entité-2 faisant partie de la structure du composé B4	159
Figure III-28 : Entité-3 faisant partie de la structure du composé B4	161
Figure III-29 : Structure finale du composé B4 , 4''- hydroxy phenethyl cinnamate	162
Figure III-30 : Structure finale du composé B5 , vanilline	164
Figure III-31 : Structure finale du composé B6 , l' acétovanilline (acétovanillone)	170
Figure III-32 : Structure du composé B7 , para-hydroxy benzaldéhyde	173
Figure III-33 : Structure du composé B8 , bétuline	178
Figure III-34 : Structure du composé C1 : para-hydroxy benzaldéhyde	180
Figure III-35 : Structure partielle du composé C2	185

Figure III-36 : Structure du produit C2 : génistéine	189
Figure III-37 : Structure partielle du composé C3	191
Figure III-38 : Structure du produit C3 : hypolaétine 3'-methyl ether	194
Figure III-39 : Structure du produit C4 : Chrysoériol	200
Figure III-40 : Structure du composé C5 , isoliquiritigénine	206
Figure III-41 : Structure partielle du composé C6	210
Figure III-42 : Groupement prényle.....	212
Figure III-43 : Structure finale du produit C6 , 8-prenylapigénine	215
Figure III-44 : Structure partielle du composé C7	219
Figure III-45 : Structure finale du composé C7 : 8-prényl lutéoline	227
Figure III-46 : Structure du produit C8 : gerontoisoflavone A ou orobol 5,3'-dimethyl éther	235
Figure III-47 : Structure du composé C9 , isoprunétine	241

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Place dans la systématique de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i>	12
Tableau I-2 : Phylogénie de la famille Fabaceae (Leguminosae).....	24
Tableau I-3 : Place dans la systématique de l'espèce <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	33
Tableau II-1 : Les masses des extraits de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i>	43
Tableau II-2 : Le fractionnement de la phase chloroforme sur colonne de gel de silice normale	45
Tableau II-3 : Sous- fractionnement de la fraction F5 sur colonne de gel de silice normale.....	46
Tableau II-4 : Sous- fractionnement du filtrat de la fraction F8 sur colonne de gel de silice normale	47
Tableau II-5 : Le fractionnement de la phase chloroforme de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt. sur colonne de gel de silice normale.....	51
Tableau II-6 : Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt. sur colonne de gel de silice normale.....	54
Tableau III-1 : Données du spectre HR-ESIMS du composé A2	64

Tableau III-2 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé A2	69
Tableau III-3 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 Mz, MeOH- d_4) ; ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4) du composé A3	86
Tableau III-4 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) de A4 (MeOH- d_4).....	99
Tableau III-5 : Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) du composé A6 (CDCl_3).....	112
Tableau III-6 : Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de A5 (MeOH- d_4).....	122
Tableau III-7 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé A7	133
Tableau III-8 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé A8 (CDCl_3).....	136
Tableau III-9 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé B1	138
Tableau III-10 : Données de la RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) du composé B1	142
Tableau III-11 : Données RMN du composé B2	151
Tableau III-12 : Déplacements chimiques de RMN ^1H du composé B3 dans CDCl_3	155
Tableau III-13 : Déplacements chimiques de RMN ^1H et ^{13}C du composé B4 dans CDCl_3	162
Tableau III-14 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C du composé B5	165
Tableau III-15 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C du composé B6	170
Tableau III-16 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé B7 (MeOH- d_4).....	173
Tableau III-17 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J/Hz) du composé B8	178
Tableau III-18 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J/Hz) du composé B8	179
Tableau III-19 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé C1 (CDCl_3).....	183

Tableau III-20 : Comportement chromatographique du produit C2	184
Tableau III-21 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{\max} nm) du composé C2	186
Tableau III-22 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 Mz, MeOH- d_4) du produit C2	188
Tableau III-23 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (62,5 MHz, MeOH- d_4) du composé C2	189
Tableau III-24 : Comportement chromatographique du produit C3	190
Tableau III-25 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{\max} nm) du composé C3	192
Tableau III-26 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, MeOH- d_4) du produit C3	195
Tableau III-27 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé C4	197
Tableau III-28 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (Me $_2$ CO- d_6 , 500 MHz) du composé C4	200
Tableau III-29 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé du composé C5	202
Tableau III-30 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 MHz, Me $_2$ CO- d_6) du composé C5	205
Tableau III-31 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (125, MHz, Me $_2$ CO- d_6) du composé C5	207
Tableau III-32 : Comportement chromatographique du produit C6	209
Tableau III-33 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{\max} nm) du composé C6	211
Tableau III-34 : Déplacements chimiques δ (ppm), ^{13}C (62,5 MHz) et ^1H (250 MHz) de C6 (Me $_2$ CO- d_6).....	216
Tableau III-35 : Comportement chromatographique du produit C7	218
Tableau III-36 : Résultats de la série spectrale UV-Vis Pour C7	220
Tableau III-37 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé C7 (Me $_2$ CO- d_6).....	228
Tableau III-38 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé C8	230
Tableau III-39 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 MHz, CD $_3$ OD, δ ppm, J/Hz) du composé C8	235
Tableau III-40 : Données de la série spectrale UV du composé C9	237
Tableau III-41 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) de C9 (CD $_3$ OD).....	244

Liste des spectres

Spectre III-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1	61
Spectre III-2 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1	62
Spectre III-3 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1 (Etalement1)..	63
Spectre III-4 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1 (Etalement 2)..	63
Spectre III-5 : Spectre SMIE du composé A2	64
Spectre III-6 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2	65
Spectre III-7 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2	66
Spectre III-8 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2	66
Spectre III-9 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2 (Etalement)...	67
Spectre III-10 : Spectre HSQC (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2	68
Spectre III-11 : Spectre ROESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2	69
Spectre III-12 : Spectre (TOF-HRESI-MS(+)) du composé A3	70
Spectre III-13 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	71
Spectre III-14 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	72
Spectre III-15 : Spectre HSQC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	72
Spectre III-16 : Spectre COSY (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	73
Spectre III-17 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	75
Spectre III-18 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	75
Spectre III-19 : Spectre DEPT 90° (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3	76
Spectre III-20 : Spectre HSQC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement).....	77
Spectre III-21 : Spectre COSY (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement).....	77
Spectre III-22 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement 1).....	78
Spectre III-23 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement 2).....	79
Spectre III-24 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement 3).....	81
Spectre III-25 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A3 (Etalement 4).....	82

Spectre III-26 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A3	83
Spectre III-27 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé A4	87
Spectre III-28 : Spectre IR du composé A4	88
Spectre III-29 : Spectre RMN ¹ H (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	88
Spectre III-30 : Spectre RMN ¹³ C (125 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	89
Spectre III-31 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	89
Spectre III-32 : Spectre DEPT 90° (125 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	89
Spectre III-33 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	90
Spectre III-34 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	91
Spectre III-35 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	91
Spectre III-36 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement).....	92
Spectre III-37 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement 1).....	93
Spectre III-38 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement).....	94
Spectre III-39 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement 2).....	95
Spectre III-40 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement 3).....	96
Spectre III-41 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4 (Etalement 4).....	96
Spectre III-42 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé A4	97
Spectre III-43 : Spectre TOF-HRESI-MS(+) du composé A6	100
Spectre III-44 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	100
Spectre III-45 : Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	101
Spectre III-46 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	101
Spectre III-47 : Spectre DEPT 90° (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	102
Spectre III- 48 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	102
Spectre III- 49 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	103
Spectre III-50 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	103
Spectre III- 51 : Spectre NOESY (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé A6	111
Spectre III-52 : Spectre TOF-HRESI-MS(+) du composé A5	113
Spectre III-53 : Spectre IR du composé A5	113

Spectre III-54 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	114
Spectre III-55 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	114
Spectre III-56 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	115
Spectre III-57 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	115
Spectre III-58 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	116
Spectre III-59 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5 (Etalement 1).....	116
Spectre III-60 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5 (Etalement 2).....	117
Spectre III-61 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	118
Spectre III-62 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5 (Etalement).....	118
Spectre III-63 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5 (Etalement 3).....	119
Spectre III-64 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5	121
Spectre III-65 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	123
Spectre III-66 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	123
Spectre III-67 : Spectre DEPT 135° (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	124
Spectre III-68 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	124
Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	125
Spectre III-70 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	127
Spectre III-71 : Spectre ROESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7	132
Spectre III-72 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A8	135
Spectre III-73 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A8	135
Spectre III-74 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A8	136
Spectre III-75 : Série spectrale UV-Vis du composé B1	138
Spectre III-76 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B1	139
Spectre III-77 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B1 (Etalement).....	140
Spectre III-78 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B1	141
Spectre III-79 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B1 (Etalement).....	141
Spectre III-80 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B1	142
Spectre III-81 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2	144

Spectre III-82 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2 (Etalement).....	145
Spectre III-83 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2	145
Spectre III-84 : Spectre DEPT 90° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2	146
Spectre III-82-84 : Spectre RMN ^{13}C , DEPT 90° et DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2 (Etalement).....	146
Spectre III-85 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2	149
Spectre III-86 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2 (Etalement 1).....	149
Spectre III-87 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2 (Etalement 2).....	150
Spectre III-88 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B2 (Etalement 3).....	150
Spectre III-89 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B3	153
Spectre III-90 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B3 (Etalement 1).....	153
Spectre III-91 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B3 (Etalement 2)	154
Spectre III-92 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	156
Spectre III-93 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	156
Spectre III-94 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4 (Etalement)...	157
Spectre III-95 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	157
Spectre III-96 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	158
Spectre III-97 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	159
Spectre III-98 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4 (Etalement)...	160
Spectre III-99 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B4	160
Spectre III-100 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B5	164
Spectre III-101 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B5	165
Spectre III-102 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B6	167
Spectre III-103 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B6 (Etalement).....	167
Spectre III-104 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B6	168
Spectre III-105 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B6	168
Spectre III-106 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé B6	169

Spectre III-107 : Spectre NOESY (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B6	169
Spectre III-108 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé B7	171
Spectre III-109 : Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) de B7	172
Spectre III-110 : DEPT 135° (100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé B7	172
Spectre III-111 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8	175
Spectre III-112 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8 (Etalement 1).....	175
Spectre III-113 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8 (Etalement 2).....	176
Spectre III-114 : Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8	176
Spectre III-115 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8	177
Spectre III-116 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé B8 (Etalement).....	177
Spectre III-117 : RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé C1	180
Spectre III-118 : RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé C1	181
Spectre III-119 : Spectre HSQC (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé C1	181
Spectre III-120 : Spectre COSY (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé C1	182
Spectre III-121 : Spectre ROESY (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm) du composé C1	182
Spectre III-122 : DEPT 135° et DEPT 90° (CDCl ₃ , 125 MHz, δ ppm) du composé C1	183
Spectre III-123 : Série spectrale UV-Vis du composé C2	185
Spectre III-124 : Spectre RMN ¹ H (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé C2	187
Spectre III-125 : Spectre RMN ¹ H (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé C2 (Etalement).....	187
Spectre III-126 : Spectre RMN ¹³ C (62,5 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé C2	188
Spectre III-127 : Série spectrale UV-Vis du composé C3	192
Spectre III-128 : Spectre RMN ¹ H (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé C3	193
Spectre III-129 : Spectre RMN ¹ H (250 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ ppm) du composé C3 (Etalement).....	194
Spectre III-130 : Série spectrale UV-Vis du composé C4	196
Spectre III-131 : RMN ¹ H (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C4	198
Spectre III-132 : RMN ¹ H (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C4 (Etalement)....	198
Spectre III-133 : Spectre ROESY (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C4	199
Spectre III-134 : Spectre ROESY (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C4 (Etalement).....	199

Spectre III-135: Série spectrale UV-Vis du composé C5	201
Spectre III-136: Spectre RMN ¹ H (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5	203
Spectre III-137: Spectre RMN ¹ H (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5 (Etalement1)	204
Spectre III-138 : Spectre RMN ¹ H (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5 (Etalement 2).....	204
Spectre III-139: Spectre HSQC (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5	205
Spectre III-140 : Spectre ROESY (500 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5	206
Spectre III-141: Spectre RMN ¹³ C (125 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C5	207
Spectre III-142: Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé C6	208
Spectre III-143: Série spectrale UV-Vis du composé C6	210
Spectre III-144: Spectre RMN ¹ H (250 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6	212
Spectre III-145 : Spectre RMN ¹ H (250 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6 (Etalement).....	213
Spectre III-146 : Spectre COSY (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6	214
Spectre III-147 : Spectre HSQC (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6	214
Spectre III-148 : Spectre RMN ¹³ C (62,5 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6	215
Spectre III-149 : Spectre ROESY (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C6	216
Spectre III-150: Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé C7	218
Spectre III-151 : Série spectrale UV-Vis du composé C7	220
Spectre III-152 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	221
Spectre III-153 : Spectre HSQC (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	222
Spectre III-154 : Spectres RMN ¹³ C (100 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	223
Spectre III-155 : Spectres RMN ¹³ C, DEPT 135° et DEPT 90° (100 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	223
Spectre III-156 : Spectre HMBC (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	225
Spectre III-157: Spectre HMBC (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7 (Etalement 1).....	225
Spectre III-158 : Spectre HMBC (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7 (Etalement 2).....	226
Spectre III-159: Spectre ROESY (400 MHz, Me ₂ CO- <i>d</i> ₆ , δ ppm) du composé C7	227
Spectre III-160: Série spectrale UV-Vis du composé C8	229
Spectre III-161: Spectre RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD, δ ppm) du composé C8	231

Spectre III-162: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C8 (Etalement).....	232
Spectre III-163 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C8	232
Spectre III-164: Spectre ROESY (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C8	233
Spectre III-165 : Spectre RMN ^{13}C (125MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C8	234
Spectre III-166 : Série spectrale UV-Vis du composé C9	237
Spectre III-167: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	238
Spectre III-168: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9 (Etalement).....	239
Spectre III-169 : Spectre COSY (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	239
Spectre III-170 : Spectre HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	240
Spectre III-171 : Spectre HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	242
Spectre III-172 : Spectre HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9 (Etalement).....	242
Spectre III-173 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	243
Spectre III-174 : Spectre NOESY (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9	243
Spectre III-175 : Spectre ROESY (500 MHz, , δ ppm) du composé C9 (CD_3OD)	244

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Références bibliographiques.....	4

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1-La famille des Asteraceae.....	7
I-1-1- Généralités.....	7
I-1-2-Caractères botaniques de la famille.....	8
I-1-3- Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae.....	10
I-1-4- Le genre <i>Asteriscus</i>	11
I-1-5- L'espèce <i>Asteriscus graveolens</i>	11
I-1-5-a- Place dans la systématique.....	11
I-1-5-b- Description de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i>	12
I-1-5-c- Synonymes d' <i>Asteriscus graveolens</i> subsp. <i>Stenophyllus</i>	13
I-1-5-d- Usages en médecine traditionnelle.....	13
I-1-5-e- Travaux antérieurs.....	13
I-2- La famille des légumineuses.....	21
I-2-1- Généralités.....	21
I-2-2- Caractères botaniques de la famille.....	22
I-2-3- Phylogénie et Classification systématique	23
I-2-3 -a- Les Mimosoideae.....	24
I-2-3-b- Les Caesalpinoideae.....	24
I-2-3-c- Les Papilionoideae (Fabaceae).....	25
I-2-4- Intérêts économiques et médicaux des Fabacées.....	25
I-2-5- Le genre <i>Crotalaria</i>	26
I-2-6- Travaux antérieurs sur le genre <i>Crotalaria</i>	27
I-2-7- L'espèce <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.....	32
I-2-7-a-Place dans la systématique.....	32
I-2-7-b- Description de l'espèce <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.....	33
I-2-7-c-Usages traditionnels.....	34

Références bibliographiques.....	35
----------------------------------	----

Chapitre II : Partie expérimentale

II- 1-Etude phytochimique d' <i>Asteriscus graveolens</i>	43
II-1-1-Extraction du matériel végétal	43
II.-1-2-Fractionnement de l'extrait chloroforme	45
II-1-2-a-L'étude de la fraction F1.....	46
II-1-2-b -L'étude de la fraction F3.....	46
II-1-2-c -L'étude de la fraction F5.....	46
II-1-2-d -L'étude de la fraction F8.....	47
II-2-Etude phytochimique de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.....	49
II-2-1- Extraction de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.	49
II-2-2 -Fractionnement de l'extrait chloroforme	51
II-2-2-a-L'étude de la fraction F6.....	52
II-2-2-b-L'étude de la fraction F11.....	52
II-2-2-c-L'étude de la fraction F14.....	52
II-2-2-d-L'étude de la fraction F16.....	52
II-2-2-e-L'étude de la fraction F17.....	52
II-2-2-f-L'étude de la fraction F23.....	52
II-2-3- Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle	53
II-2-3-a-L'étude de la fraction F9.....	56
II-2-3-b-L'étude de la fraction F38.....	56
II-2-3-c-L'étude de la fraction F41.....	57
II-2-3-d-L'étude de la fraction F62.....	57
II-2-3-e-L'étude de la fraction F70.....	57
II-2-3-f-L'étude de la fraction F73.....	57
II-3-Conclusion.....	58

Chapitre III : Résultats et Discussion

III-1- Identification des produits isolés de <i>Asteriscus graveolens</i>	60
III-1-1- Elucidation structurale du composé A1.....	60
III-1-2- Elucidation structurale du composé A2.....	63
III-1-3- Elucidation structurale du composé A3.....	70
III-1-4- Elucidation structurale du composé A 4.....	86
III-1-5- Elucidation structurale du composé A6.....	99
III-1-6- Elucidation structurale du composé A5.....	112
III-1-7- Elucidation structurale du composé A 7.....	122
III-1-8- Elucidation structurale du composé A8.....	133
III-2-identification des produits isolés de <i>Crotalaria vialattei</i> Batt.....	137
III-2-1- Identification des produits isolés de la phase chloroforme.....	137
III-2-1-a- Elucidation structurale du composé B1.....	137
III-2-1-b- Elucidation structurale du composé B2.....	143
III-2-1-c- Elucidation structurale du composé B3.....	152
III-2-1-d-Elucidation structurale du composé B4.....	155
III-2-1-e-Elucidation structurale du composé B5.....	163
III-2-1-f- Elucidation structurale du composé B6.....	165
III-2-1-g- Elucidation structurale du composé B7.....	170
III-2-1-h-Elucidation structurale du composé B8.....	173
III-2-2- Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle.....	180
III-2-2-a- Elucidation structurale du composé C1.....	180
III-2-2-b- Elucidation structurale du composé C2.....	184
III-2-2-c- Elucidation structurale du composé C3.....	190
III-2-2-d-Elucidation structurale du composé C4.....	195
III-2-2-e- Elucidation structurale du composé C5.....	200
III-2-2-f- Elucidation structurale du composé C6.....	208
III-2-2-g- Elucidation structurale du composé C7.....	217
III-2-2-h- Elucidation structurale du composé C8.....	228
III-2-2-i- Elucidation structurale du composé C9.....	236
III-3-Conclusion	245
Références bibliographiques.....	246
Conclusion générale.....	256

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies [1]. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [2]. Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international. En effet, plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel [3]. Parmi les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 sont issus de produits naturels [4, 5]. Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur et plus facile d'accès à celui des produits issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament [6, 7]. Parmi les quelques 250 à 300 000 espèces de plantes inventoriées que l'on trouve sur la planète, seules 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives. Ce patrimoine représente donc un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels [8-10]. Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques [5].

La majorité des plantes dénombrées dans la banque de données NAPRALERT se retrouve dans les régions tropicales et subtropicales du globe et 58% de ces espèces n'ont pas encore fait l'objet d'études biologiques et chimiques approfondies [11]. Les investigations sur les espèces végétales peuvent être menées suivant différentes approches: chimiotaxonomique, ethnopharmacologique et pharmacologique. Une observation particulière et un choix judicieux des plantes permettent souvent d'aboutir à de nouvelles substances bioactives intéressantes, source de nombreux médicaments traitant diverses maladies.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la biotechnologie et la chimie computationnelle. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible au plus grand nombre, y compris dans les pays en voie de développement. De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation (méthodes préparatives et analytiques, tests de dépistage d'activité) et le développement de

l'accès à l'information scientifique. La pharmacognosie et la phytochimie sont donc en totale adéquation avec les objectifs d'une recherche moderne de composés à visée thérapeutique.

A l'heure actuelle, l'étude de la composition chimique des plantes n'a pas perdu de son intérêt, malgré l'avènement de domaines de plus en plus pointus dans la recherche de médicaments. En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. La mise au point continuelle de méthodes de criblage biochimiques et biologiques contribue à l'isolement de composés actifs à partir d'extraits végétaux. De plus, l'accès à des techniques analytiques et préparatives de plus en plus performantes, rend leur caractérisation plus aisée. Relevons cependant que l'approfondissement des connaissances des plantes reste un outil de pointe, afin d'optimiser leurs utilisations.

L'Algérie possède une grande richesse en biodiversité végétale, elle renferme environ 3139 espèces végétales comprenant 314 espèces assez rares, 30 espèces rares, 330 très rares et 600 endémiques, dont 64 sont typiquement sahariennes. Parmi elles, 226 espèces sont menacées d'extinction et que la loi protège [12]. Sa flore comporte des milliers d'espèces présentant, dans une certaine mesure, de grandes possibilités de découvertes potentielles en matière de recherche scientifique. C'est dans cette optique et depuis une trentaine d'années que les chercheurs de notre laboratoire se sont intéressés à la recherche de nouvelles molécules bioactives ou à activités biologiques potentielles. Parmi les familles ciblées, les Asteraceae, les Fabaceae, les Labiatae, les Cistaceae, les Myrtaceae ont permis d'aboutir à de bons résultats [13-21]. C'est dans la continuité de ces travaux et de bien d'autres non invoqués ici que nous avons entrepris cette étude consacrée à *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. de la famille Asteraceae et *Crotalaria vialattei* Batt. de la famille Fabaceae. Ces deux espèces sont endémiques au Sahara et sont utilisées en médecine traditionnelle. Si la première espèce a fait l'objet d'études auparavant, la seconde n'a jamais été étudiée à ce jour.

Les travaux que nous avons réalisés sont reportés dans ce manuscrit sous forme de trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, une étude botanique et générale des familles et des genres des deux espèces sélectionnées : *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. et *Crotalaria vialattei* Batt. avec notamment les résultats d'un survol bibliographique sur leurs métabolites secondaires les plus courants.

Le deuxième chapitre reporte la partie expérimentale relative à nos travaux avec en particulier, une présentation des techniques d'isolement et d'analyse utilisées. Ces travaux ont débuté par l'extraction des métabolites secondaires par macération à température

ambiante dans une solution d'éthanol à 70%, suivie de pré-séparations par épuisements successifs des extraits hydroalcooliques par des solvants de polarité croissante (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol). L'extrait chloroforme de *A. graveolens* et les extraits chloroforme et acétate d'éthyle de *C. vialattei* ont été soumis aux diverses techniques chromatographiques.

Le troisième chapitre reporte les résultats obtenus et les discussions les concernant avec, notamment les démarches suivies pour les déterminations de structures des composés isolés à l'état pur.

Le manuscrit est terminé par une conclusion générale rappelant et appuyant des différents résultats obtenus.

Références bibliographiques

- [1] Lee KH. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead, *Journal of Natural Products*. 2004. 67: 273-283.
- [2] World Health Organisation. A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine: Harmonizing two approaches, Beijing, China. 2000: 22-26.
- [3] Cordell GA, Colvard MD. Some thoughts on the futures of ethnopharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 100: 5-14.
- [4] Gordon M, Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.. Natural products in drug discovery and development, *Journal of Natural Products*. 1997.60: 52-60.
- [5] Rollinger JM, Haupt S, Stuppner H, Langer TJ. Combining ethnopharmacology and virtual screening for lead structure discovery: COX-inhibitors as application example, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 2004. 44: 480-488.
- [6] Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* .1998. 3: 232-238.
- [7] Adams C, Brantner VV. Estimating the costs of new drug development: is it really 802 million dollars? *Social Science Research Network*. 2004.
- [8] Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspective*. 2001. 109: 69-75.
- [9] Larsson J, Gottfries J, Bohlin L, Backlund A. Expanding the ChemGPS chemical space with natural products, *Journal of Natural Products*. 2005. 68: 985-991.
- [10] Cutler SJ, Cutler HG. *Biologically active natural products: Pharmaceuticals*. CRC Press, New-York: 2000. 277.
- [11] Cordel, G.A., Quinn-Beattie, M.L., Unpublished results from Napralert database, University of Illinois at Chigago. 2005.
- [12] Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Deuxième rapport national sur l'état des ressources, Algérie INRAA Juin 2006 ; 12- 18.

- [13] Benyahia S, Benayache S, Benayache F, León F, Quintana J, López M, Hernández J C, Estévez F, Bermejo J. Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 2005, 66, 627-632.
- [14] Mekkiou R, Touahar H, Dijoux-franca M G, Mariotte A M, Benayache S, Benayache F. A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, 33 (6) : 635-638.
- [15] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J and Benayache F. A Flavonoid with Cytotoxic Activity and other constituents from *Centaurea africana*, *Phytochemistry Letters*. 2009. 2: 114-118.
- [16] Hammoud L, Seghiri R, Benayache S, Mosset P, Lobstein A, Chaabi M, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M., *Natural product Research*. 2012. 26 (3) : 203-208.
- [17] Kolli E H, León F, Benayache F, Estévez S, Quintana J, Estévez F, Brouard I, Bermejo J, Benayache S. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012. 235: 977-983.
- [18] Boussaha S, Bekhouche K, Boudjerda A, León F, Koldaş S, Yaglioglu A S, Demirtas I, Brouard I, Marchioni E, Zama D, Benayache S and Benayache F. Chemical constituents, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. extract (2015). *Records of Natural Products*. 2015. 9(3): 312-322.
- [19] Mohamadi S, Zhao M, Amrani A, Marchioni E, Zama D, Benayache F and Benayache S. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. (2015), *Industrial Crops and Products*., 2015. 76: 910-919.
- [20] Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, Stévigny C, Duez P, Benayache F. Chemical constituents, Cytotoxic, antifungal and Antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.). Maire. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016. 9(6): 554-561
- [21] Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, Zhao M, Mosset P and Benayache F. On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules*. 2017, 22, 239; doi:10.3390/molecules220202.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

I-1-La famille des Asteraceae

I-1-1- Généralités

La famille des Astéracées (Asteraceae), également appelées Composées (Compositae), est la plus grande famille de plantes dicotylédones, avec celle des Orchidées. Elle est représentée par 25000 espèces connues, groupées en 1500 genres environ réparties en 17 tribus [1-3]. Le plus grand genre est *Senecio* (1500 espèces) suivi de *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). En Algérie et d'après Quezel et Santa, il en existe 109 genres et 408 espèces [4].

Les astéracées connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la Toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Moins fréquentes dans les forêts tropicales humides [2,5], ce sont principalement des herbes vivaces, bisannuelles et annuelles, des arbustes ou sous-arbrisseaux, rarement des plantes aquatiques ou grimpantes [3]. La figure I-1 montre quelques photos d'espèces de la famille Astéracées (Asteraceae).



Cirsium acaulon (L.) Scop.



Santolina chamaecyparissus L.



Crepis pygmaea L.



Inula spiraeifolia L.



Pulicaria odora (L.) Rchb.



Centaurea solstitialis L.



Pulicaria vulgaris Gaertn.



Artemisia verlotiorum Lamotte



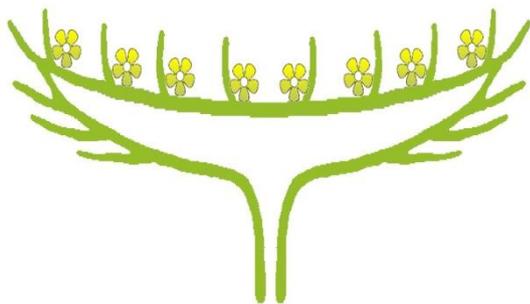
Achillea ptarmica L.

Figure I-1: Quelques photos d'espèces de la famille Asteraceae

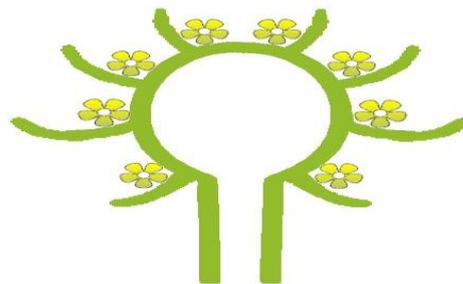
I-1-2-Caractères botaniques de la famille

Etymologiquement, le terme Asteraceae vient du genre type *Aster*, mot latin signifiant étoile, en référence aux capitules étoilés des fleurs.

❖ L'inflorescence en capitule est le trait le plus caractéristique des Astéracées. Le capitule est formé de fleurs sans pédoncules disposées côte à côte sur un plateau souvent bombé appelé réceptacle. Ce capitule possède une symétrie axiale lui donnant un aspect rayonnant en étoile d'où le nom « Astéracées » de la famille. Le capitule est entouré par des bractées dont l'ensemble forme l'involucre (Figure I-2). Dans chaque involucre, les fleurs sont juxtaposées mais ne possèdent pas la même forme. La partie libre des pétales est représentée par un tube appelé corolle [6]. Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de marguerite, de pissenlit,..... n'est en réalité pas une fleur mais un capitule de fleurs entouré de bractées blanches ou jaunes (Figure I-2).



Capitule avec réceptacle floral concave



Capitule avec réceptacle convexe

Figure I-2 : Le capitule chez les Astéracées

❖ Pour identifier la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défleuris, portant des fruits mûrs ou, au moins, déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante. On peut diviser les capitules des Astéracées en quatre groupes [7] (Figure I-3) :

- Les **liguliflores** (chicorée, pissenlit, laitue, etc.), où le capitule est composé uniquement de fleurs ligulées (parfois appelées demi-fleurons). Celles-ci présentent chacune une languette, ou ligule ; les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq,

parfois par trois, reconnaissables seulement aux dents de la languette, et où un pétale prédomine (fleur irrégulière).

- Les **tubuliflores** (chardon, cirse, centaurée, etc.), dont le capitule n'est composé que de fleurs régulières, tubulées (ou fleurs tubulaires parfois appelées fleurons). Elles présentent chacune un tube terminé par des lèvres imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes.
- Les **labiatiflores** (ligneuses tropicales telles que *Mutisia*) composées uniquement de fleurs zygomorphes bilabiées.
- Les **radiés**, aux fleurs périphériques ligulées entourant un disque de fleurs tubulées (marguerite, aster, séneçon, etc.).

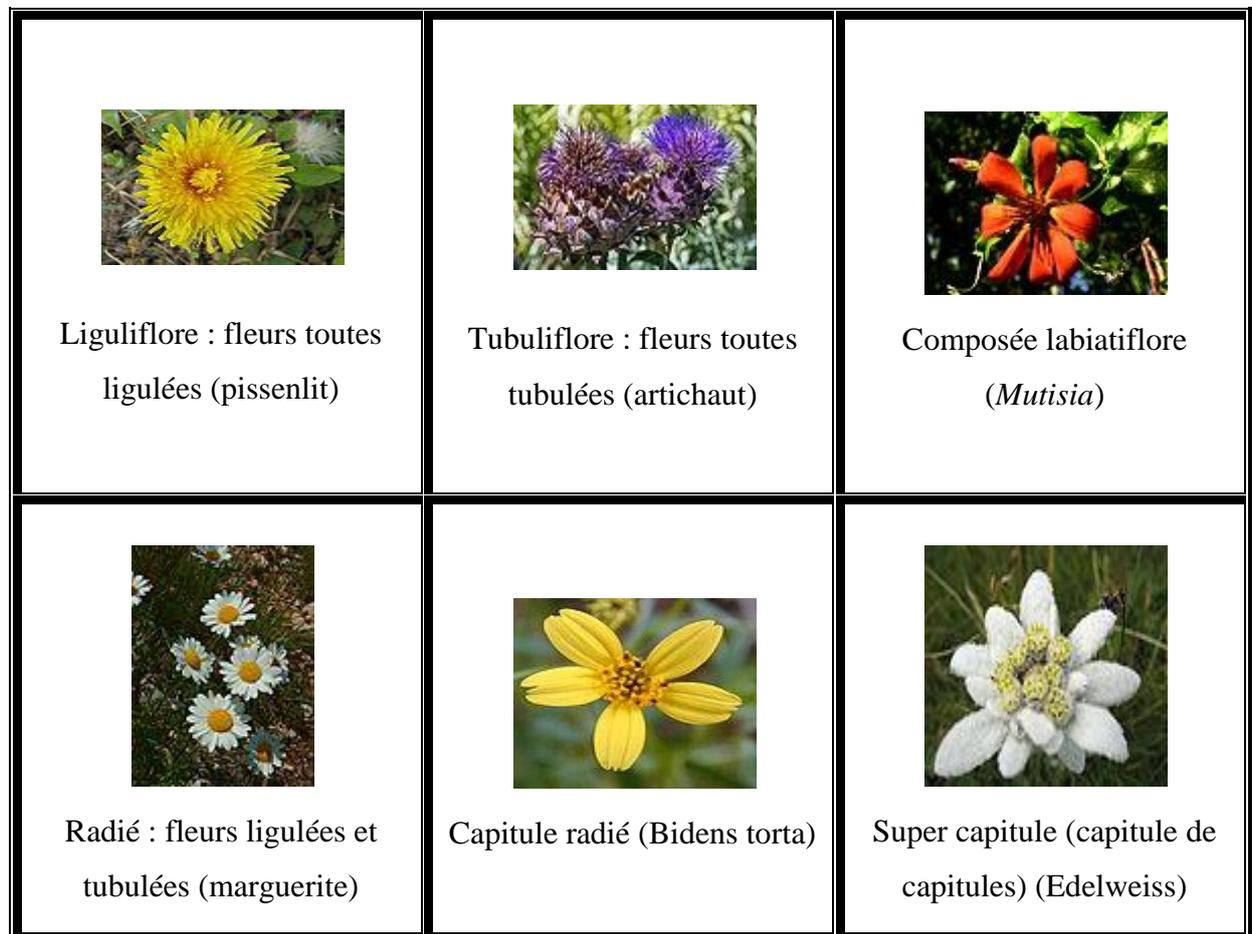


Figure I-3 : Types de capitules des Astéracées

❖ Elles se caractérisent par leurs feuilles qui sont toujours sans stipules, le plus souvent alternes mais parfois opposées rarement verticillées, ou regroupées en rosettes,

simples, entières ou découpées, parfois composées, elles contiennent de la résine ou du latex [5,8].

- ❖ Leurs fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée pappus qui favorise la dispersion des graines par le vent. Les caractères du fruit sont généralement identiques pour les diverses espèces du même genre [5,9].

I-1-3-Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae

Les utilisations médicinales des Asteraceae sont multiples, et plusieurs espèces sont utilisées traditionnellement et en pharmacie : l'Arnica (*Arnica montana* L.), le pied de chat (*Antennaria Djioca* Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.) etc... [10-13].

Certaines espèces d'Asteraceae sont à l'origine de boissons de types très différents [14] : des infusions, en particulier avec la grande camomille (*Tanacetum parthenium*), la matricaire camomille (*Matricaria recutita*), la camomille romaine (*Chamaemelum nobile*) ; la chicorée, substitut du café produit à partir des racines torréfiées de la chicorée à café (*Cichorium intybus*) et également comme des liqueurs : l'absinthe, produit de la grande absinthe (*Artemisia absinthium*), et le génépi, produit à partir de plusieurs espèces du genre *Artemisia*.

De nombreuses espèces de cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires : La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon. Elles fournissent également des graines oléagineuses : graines de tournesol (*Helianthus*) et de carthame (*Carthamus*) dont on extrait de l'huile. Le tourteau de tournesol, coproduit de la trituration des graines, est utilisé en alimentation animale. Moins riche en protéines que le tourteau de soja, il a une teneur élevée en acides aminés soufrés, particulièrement en méthionine. On extrait des graines de cardon (*Cynara cardunculus* var. *altilis*) une huile de cardon similaire dans sa composition aux précédentes. Les graines de tournesol sont parfois consommées entières, grillées et salées, comme friandises, ou décortiquées comme ingrédient de cuisine. Elles sont aussi appréciées comme aliment pour de nombreuses espèces d'oiseaux de cage.

Les Asteraceae fournissent aussi des racines et tubercules comestibles : salsifis (*Tragopogon porrifolius*) et scorsonères (*Scorzonera hispanica*), topinambour (*Helianthus annuus*), hélianthe (*Helianthus strumosus*) et poire de terre (*Smallanthus sonchifolius*).

De nombreuses espèces de composées sont utilisées comme plantes ornementales, pour la fleur coupée, ou comme plantes en pot ou plantes à massifs. Plus de 200 genres sont cultivés à cet effet, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster [14].

Les *Asteraceae* renferment relativement peu d'espèces toxiques, qui sont souvent à l'origine d'empoisonnements du bétail. Les principales sont celles qui synthétisent des alcaloïdes pyrrolizidiniques ou des lactones sesquiterpéniques, ainsi que d'autres molécules mono-, di- ou triterpéniques [15] et certaines espèces sont des mauvaises herbes de l'agriculture [14]. Quelques Composées fournissent des produits variés : caoutchouc naturel (*Taraxacum*), colorants, insecticides à base de pyréthrin.

I-1-4- Le genre *Asteriscus*

Asteriscus est un genre de plantes à fleurs de la famille des Astéracées. Le genre est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord, de Macaronésie et du Moyen-Orient.

La plante caractérisant le genre *Asteriscus* est un Arbuste bas de 20-50 cm à écorce blanche et crevassée dans les parties âgées, à rameaux très étalés naissant peu au dessous des capitules, feuilles d'un vert pâle, étroites et profondément découpées, très velues, les supérieures presque entières et entourant le capitule qu'elles dépassent longuement, involucre à bractées coriaces, indurées à maturité. Les fleurs sont jaunes, écailles du réceptacle allongées et dures, dépassent longuement les achaines, ceux-ci en cône renversé, arqués, velus, à quatre côtes très saillantes, tronqués au sommet et à aigrette remplacée par une couronne de quatre écailles membraneuses déchiquetées.

C'est une herbe très commune dans tous le Sahara de l'Algerie, surtout dans les dépressions argilo-sablonneuses. Cette espèce saharo-sindienne, est commune dans le Sud marocain, en particulier dans les dépressions argilo-sablonneuses [16].

I-1-5- Espèce *Asteriscus graveolens*

I-1-5-a- Place dans la systématique

Son classement dans la systématique est comme suit (Tableau I-1) [17] :

Tableau I-1 : Place dans la systématique de l'espèce *Asteriscus graveolens*

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Asteriscus, Nauplius, Bubonium</i>
Espèce	<i>graveolens</i>

I-1-5-b- Description de l'espèce *Asteriscus graveolens*

C'est un sous arbrisseau vivace, touffu qui peut atteindre jusqu'au 50 centimètres de haut (Figure 2), pour les Touaregs, elle forme un couple masculin – féminin (*amayut-tamayut*) avec *Pulicaria incisa*. Les rameaux blanchâtres se divisent en dessous des capitules jaune d'or, les feuilles étroites et profondément découpées, très velues, les fleurs sont jaunes [18, 19].

Cette espèce est fréquente au Sahara central, en Egypte et dans le Sud Est du Maroc, en Ahaggar (Hoggar), elle est fréquente dans les savanes désertiques, les lits d'oueds limoneux sablonneux et pierreux et sur la rocaille des montagnes jusqu'à 2800 mètres d'altitude [20,21].

**Figure I-4** : Photo d'*Asteriscus graveolens*

I-1-5-c- Synonymes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Stenophyllus*

Cette espèce admet les synonymes suivants [22] : *Bubonium graveolens* (Forsk.) Maire ; *Buphtalmum stenophyllum* (Link) ; *Nauplius graveolens* subsp. *Stenophyllus* (Link), *Asteriscus graveolens* (Forssk) DC ; *Bubonium odorum* (Schoub).

Nom arabe : Tafss [23].

Nom tamahaq : Amayou [19,21].

I-1-5-d- Usages en médecine traditionnelle

A Tissint, l'infusion (une poignée de plante dans un verre d'eau) de la plante entière est utilisée, en gargarisme, pour calmer les maux de dents et de gencives, dans le même but, on mastique des feuilles fraîches. La poudre de feuilles, prisee par le nez, est indiquée contre les migraines. La décoction (une poignée de plante dans une théière) de la plante est employée par les femmes pour combattre la stérilité [24].

Cette plante a été utilisée dans la médecine traditionnelle au Sahara pour traiter la fièvre, les déséquilibres des tractus gastro-intestinaux, les douleurs céphaliques, la bronchite et comme anti-inflammatoire [25]. Selon Le Floch (1983), cette plante est utilisée au Sahara occidental et à Tindouf, dans le traitement de la blennorragie et dans le traitement des coliques et des gastralgies. Cette espèce est très appréciée des ovins et des dromadaires.

Etant très parfumée et considérée comme un très bon remède [18], elle est utilisée contre les vomissements [19], pour le traitement des affections respiratoires (sinusites) et la migraine, on peut en faire des cataplasmes ou l'utiliser sous forme d'infusion [18] contre le diabète et les infections microbiennes [21]. Dans le traitement du rhumatisme, contraction des muscles et la fatigue [26]. Au Maroc le broyat des feuilles de *Bubonium graveolens* associé à l'huile d'olive est appliqué, en cataplasme, contre la déchirure des muscles. Les feuilles fraîches mastiquées sont utilisées pour traiter les douleurs des dents et de la gingivite. La tige fraîche mâchée est utilisée pour brosser les dents (meswak). Les racines mâchées sont employées également contre les douleurs des dents et les maladies buccales [27].

I-1-5-e- Travaux antérieurs

Le genre *Asteriscus*, comme les autres genres de la famille Asteraceae, a fait l'objet d'investigations chimiques qui ont abouti à la mise en évidence d'un nombre non négligeable

de métabolites secondaires. Ces derniers constitués principalement de flavonoïdes, lactones sesquiterpéniques et triterpènes, sont considérés comme composés typiques de la famille Asteraceae en général. Concernant les études chimiques antérieures menées sur l'espèce *Asteriscus graveolens*, on peut citer les travaux suivants :

➤ L'étude de Cheriti *et al.* (2007) [23], qui a porté sur la composition des huiles essentielles de *Nauplius graveolens* du Sahara algérien par GC-FID et GC-MS où 43 composés ont été identifiés dans les feuilles et les fleurs représentant 97% et 97,6% des huiles totales des feuilles et des fleurs respectivement. Les composés majoritaires de ces huiles sont : le 1,8 cinéol (21,5% dans les feuilles, 16,5% dans les fleurs) et le δ -cadinol (19,1% dans les feuilles, 13,9% dans les fleurs).

➤ L'étude de Znini *et al.* (2011) [28] qui a porté sur l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens* contre les champignons phytopathogènes post-récolte dans les pommes. Cette étude a été menée sur les parties aériennes de cette espèce, cueillies de 6 régions différentes du Maroc. Les huiles de ces échantillons ont été analysées par GC-FID et GC-MS, 28 composés représentant 94,9% de l'huile totale ont été identifiés. Les huiles des différents échantillons ont montré des profils chromatographiques similaires et ont été caractérisé par une teneur élevée en sesquiterpènes oxygénés avec le 6-oxocyclonerolidol (66,7% \pm 5,5) et le 6-hydroxycyclonerolidol (8,8 % \pm 1,2) comme principaux composants. L'effet antifongique de l'huile essentielle de *A. graveolens* a été évalué *in vitro* contre trois champignons phytopathogènes du pommier (*Alternaria sp.*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*). Les résultats suggèrent que cette huile essentielle s'est avérée être un antifongique efficace contre *Alternaria sp.*, *P. expansum* et *R. stolonifer* et, par conséquent, peuvent être exploités pour un traitement idéal contre la pourriture des pommes ou comme nouvelle source potentielle d'additifs naturels pour l'industrie alimentaire et/ou pharmaceutique.

➤ Une étude chimique réalisée par Akssira *et al.* (2006) [21], sur l'extrait chloroforme de *Nauplius graveolens* qui a permis l'identification de six lactones sesquiterpéniques dont quatre asteriscunolides à squelette humulène. Il s'agit de : naupliolide (**1**) ; 6,7,9,10-tetrahydroasteriscanolide (**2**) ; 8-oxo-humula-6Z,9Z-dièn-12,1-olide (Asteriscunolide A) (**3**) ; 8-oxo-humula-6E,9Z-dièn-12,1-olide (Asteriscunolide B) (**4**) ; 8-oxo-humula-6Z,9E-dièn-12,1-olide (Asteriscunolide C) (**5**) et 8-oxo-humula-6E,9E-dièn-12,1-olide (Asteriscunolide D) (**6**) (Figure I-5).

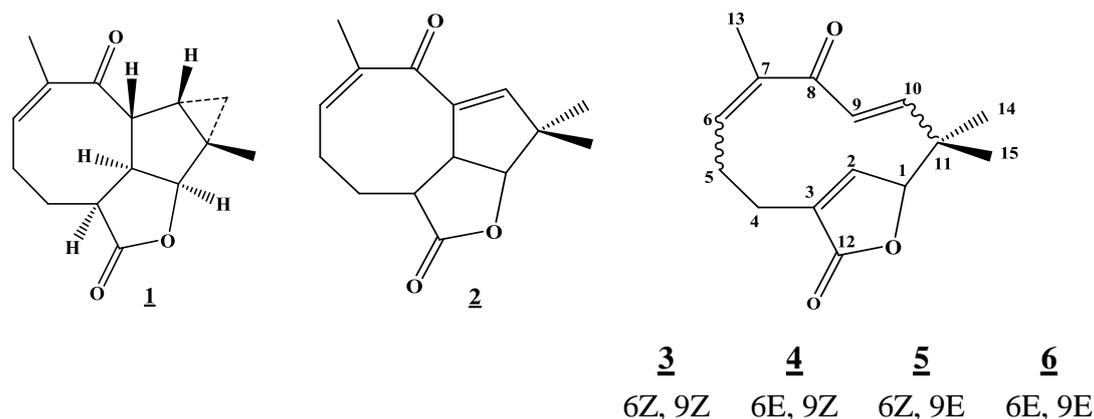
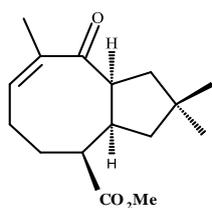
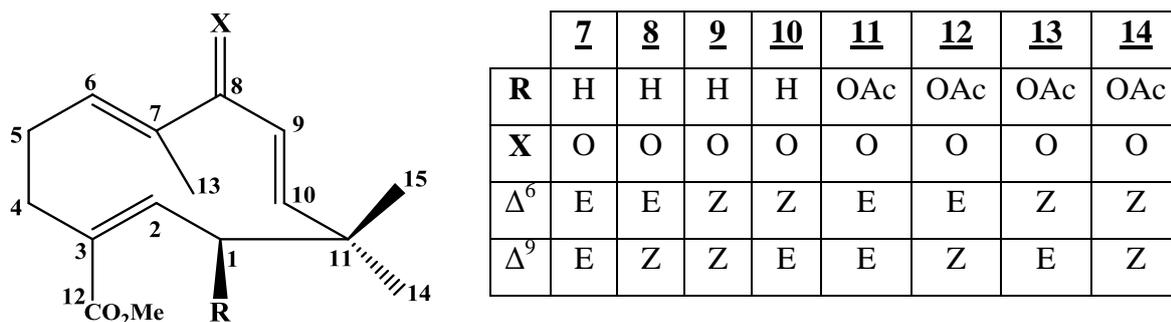
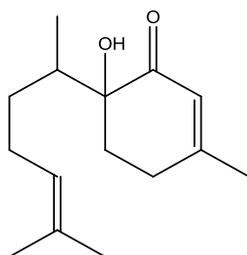
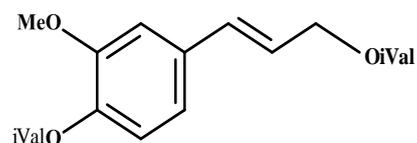
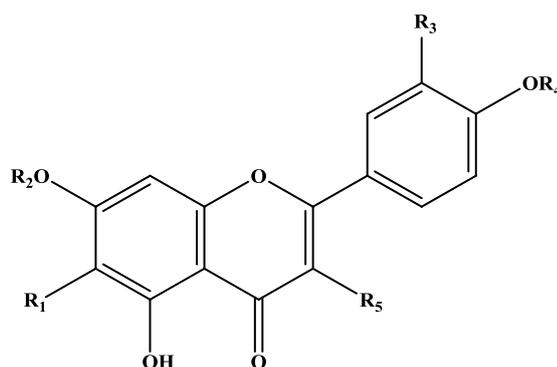


Figure I-5 : Lactones sesquiterpéniques isolées de *Nauplius graveolens* par Akssira *et al.*

➤ l'étude chimique de l'espèce *A. graveolens* réalisée par El Dahmy *et al.* (1985) [29] qui a abouti à l'isolement et la caractérisation de **quatre** lactones sesquiterpéniques à squelette humulène : asteriscunolide A (**3**), asteriscunolide B (**4**), asteriscunolide C (**5**) et asteriscunolide D (**6**); **huit** autres dérivés de l'humulène : methyl-9-oxo-1(10)E,7E- α -humulene-15-oate (**7**), methyl-9-oxo-1(10)E,7Z- α -humulene-15-oate (**8**), methyl-9-oxo-1(10)Z,7Z- α -humulene-15-oate (**9**), methyl-9-oxo-1(10)Z,7E- α -humulene-15-oate (**10**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)E,7E- α -humulene-15-oate (**11**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)E,7Z- α -humulene-15-oate (**12**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)Z,7E- α -humulene-15-oate (**13**), methyl-6-acetoxy-9-oxo-1(10)Z,7Z- α -humulene-15-oate (**14**), deux composés bicycliques également dérivés de l'humulène : 6,7,9,10-tétrahydroasteriscanolid (2) et methyl-2 α -3 α ,9 α H-asteriscan-12-oate (**15**); le 6-hydroxybisabol-2-èn-1-one (**16**) et le diisovalérate de l'alcool coniférylique (**17**) (Figure I-6).

**15****16****17****Figure I-6** : Produits isolés de l'espèce *A. graveolens* par El Dahmy *et al.*

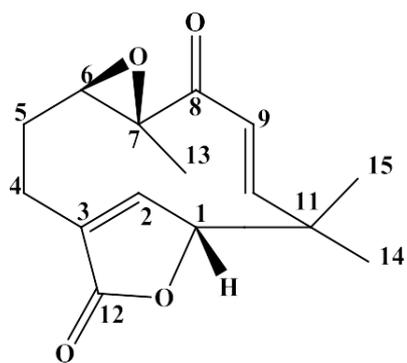
➤ Les travaux réalisés par Ahmed *et al.* (1991) [30], qui ont reporté l'isolement et la détermination structurale des parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens* poussant en Egypte, de onze flavonoïdes il s'agit de : lutéoline 7-*O*- β -D-glucoside (**18**), quercétine 3-*O*- β -D-glucoside (**19**), quercétine 3-*O*-galactoside (**20**), quercétine 7-*O*- β -D-glucoside (**21**), kaempférol 3-*O*- β -D-glucoside (**22**), kaempférol 3-*O*-galactoside (**23**), kaempférol 7-*O*- β -D-glucoside (**24**), quercétine (**25**), quercétine 3,4'-dimethyl ether (**26**), quercétagétine 3,6,3'-trimethyl ether (**27**), tamarixétine 3-*O*- β -D-robinobioside (**28**) (Figure I-7).



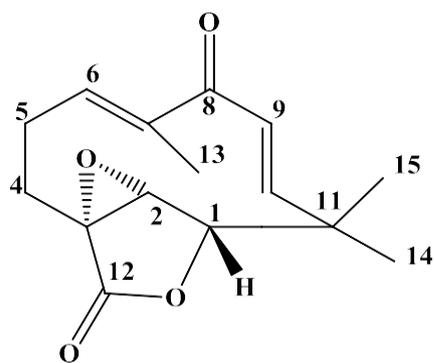
Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>18</u>	H	Glu	OH	H	H
<u>19</u>	H	H	OH	H	<i>O</i> -Glu
<u>20</u>	H	H	OH	H	<i>O</i> -Gala
<u>21</u>	H	Glu	OH	H	OH
<u>22</u>	H	H	H	H	<i>O</i> -Glu
<u>23</u>	H	H	H	H	<i>O</i> -Gala
<u>24</u>	H	Glu	H	H	OH
<u>25</u>	H	H	OH	H	OH
<u>26</u>	H	H	OH	Me	OMe
<u>27</u>	OMe	H	OMe	H	OMe
<u>28</u>	H	H	H	Me	<i>O</i> -Rham (1-6)- <i>O</i> -gal

Figure I-7-: Flavonoides isolées de l'espèce *A. graveolens* par Ahmed *et al.*

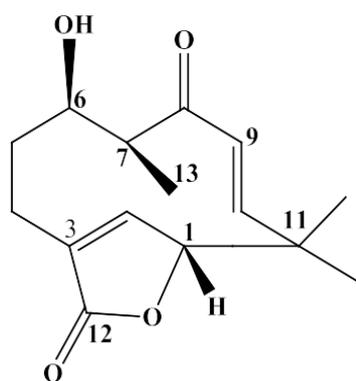
➤ L'investigation phytochimique de l'extrait éthanol de l'espèce *Asteriscus graveolens* subsp. *stenophyllus* réalisée par Triana *et al.*(2016) [31] qui a conduit à l'isolement et l'identification de neuf lactones sesquiterpéniques : 6β, 7β-epoxyasteriscunolide A (29), 2α, 3α- epoxyasteriscunolide C (30), 6β-hydroxyasteriscunolide A (31), 6β-ethoxyasteriscunolide A (32), asteriscanolidenol (33) ; asteriscunolide A (3), asteriscunolide C (5), 8-oxo-6,7,9,10-tetrahydrohumulen-1,12-olide (34), asteriscanolide (35) ; un acide sesquiterpénique à squelette humulène : acide 8-oxo-α-humula-6E,9Z-dièn-12-oïque (36) avec la vanilline (37), le stigmastérol (38) et la tricine (39) (Figure I-8).



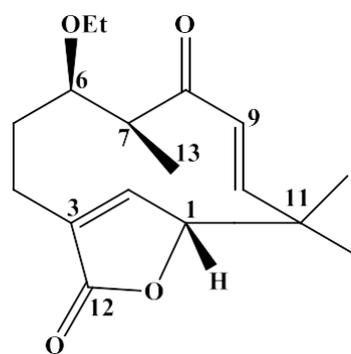
29



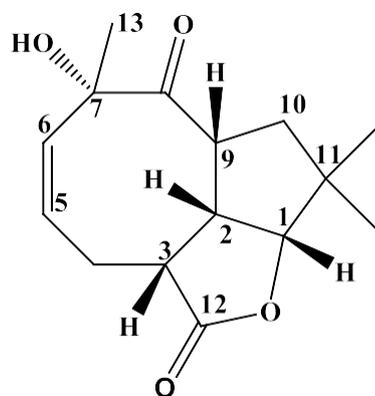
30



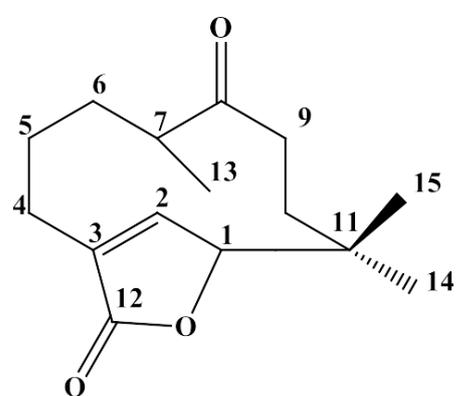
31



32



33



34

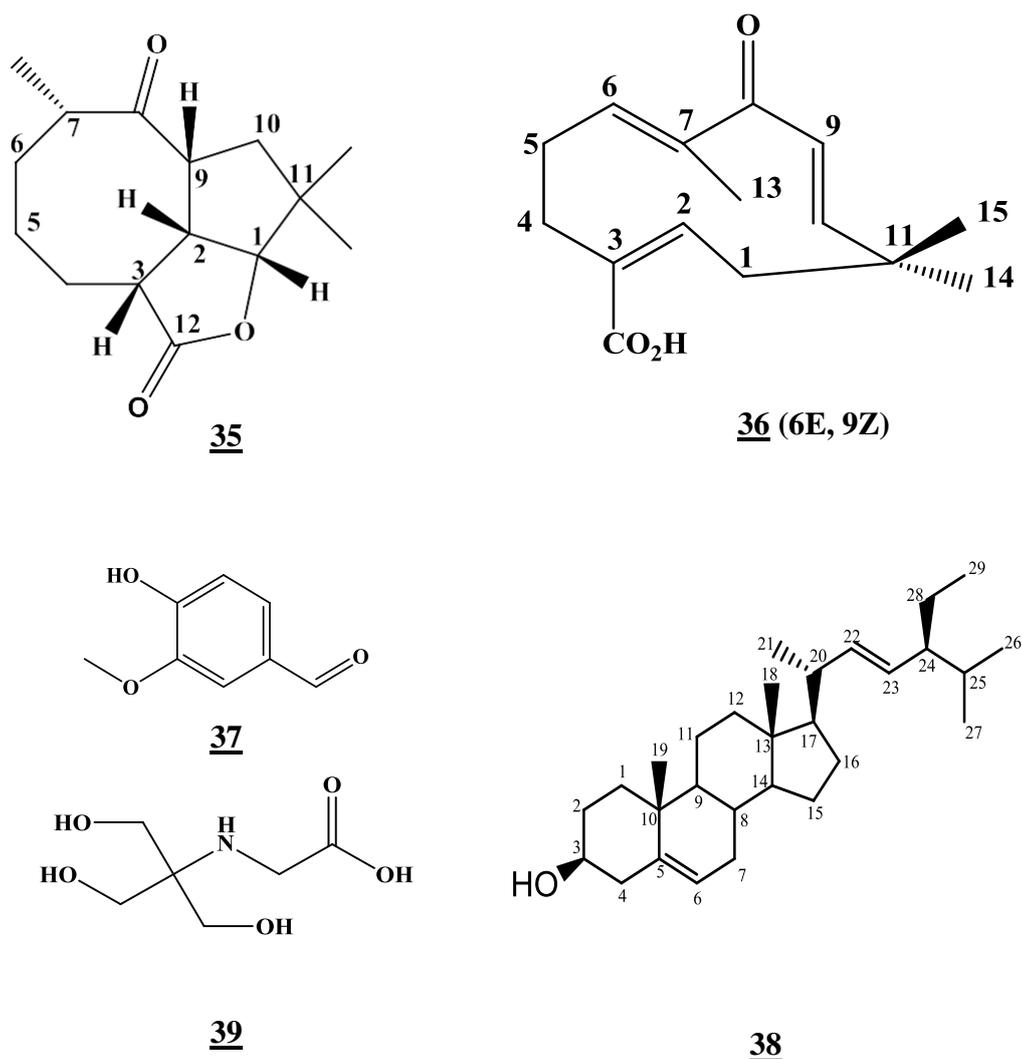
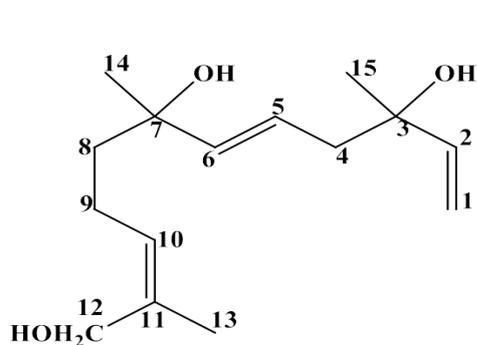
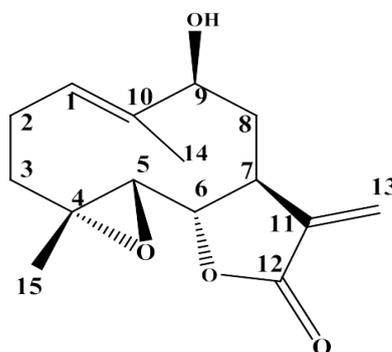
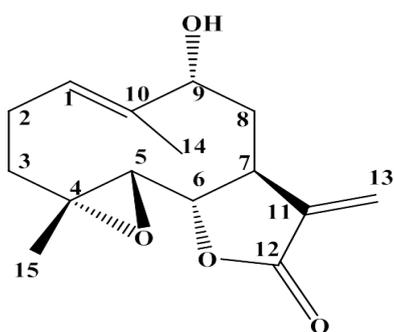
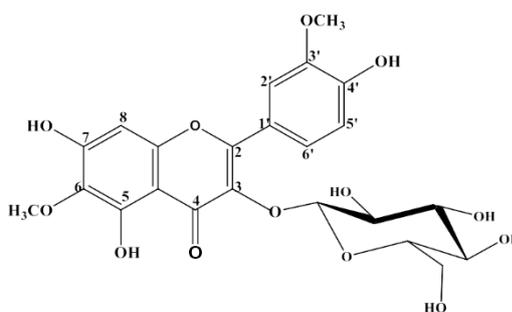
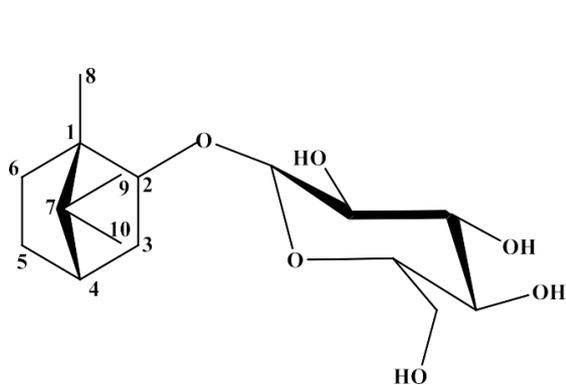
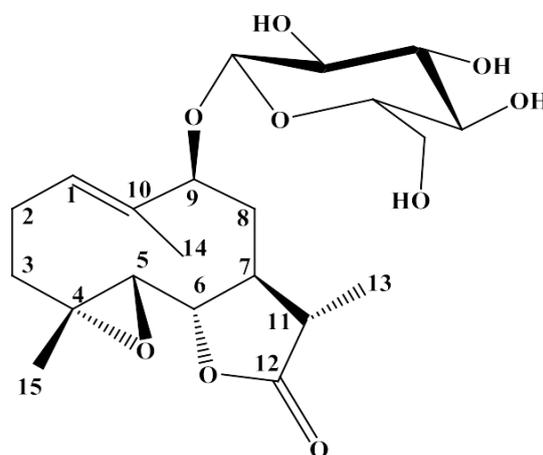


Figure I-8 : Produits isolés de l'espèce *Asteriscus graveolens* subsp. *stenophyllus* par Triana et al.

➤ L'investigation phytochimique menée sur les extraits chloroforme et acétate d'éthyle les parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens* par Achoub et al. (2019) [32] qui a conduit à l'isolement et l'identification de dix composés dont cinq de l'extrait chloroforme : Un sesquiterpène acyclique : 7,12- dihydroxy-6,7-dihydro-5,(6) E-dehydronerolidol (**40**) ; deux lactone sesquiterpéniques de type germacranolide : 9 β – hydroxyparthenolide (**41**) et 9 α -hydroxyparthenolide (**42**) ; un flavonoïde : spinacétin 3-O- β glucopyranoside (**43**) et le bornéol 2-O- β -D-glucopyranoside (**44**). 'extrait acétate d'éthyle a permis l'isolement de deux lactones sesquiterpéniques de type germacranolide : 9 β - hydroxy-11 β , 13-dihydroparthenolide-9-O- β -D-glucopyranoside (**45**) et 9 α - hydroxy-11 β , 13-dihydroparthenolide-9-O- β -D-glucopyranoside (**46**) ; un flavonoïde : spinacétine 3-O-

rutinoïde (**47**); un mégastigmane glucoside : (6*S*, 9*R*)-roseoside (**48**) et l'acide 5-*O*-fêruloylquinique (**49**) (Figure I-9).

**40****41****42****43****44****45**

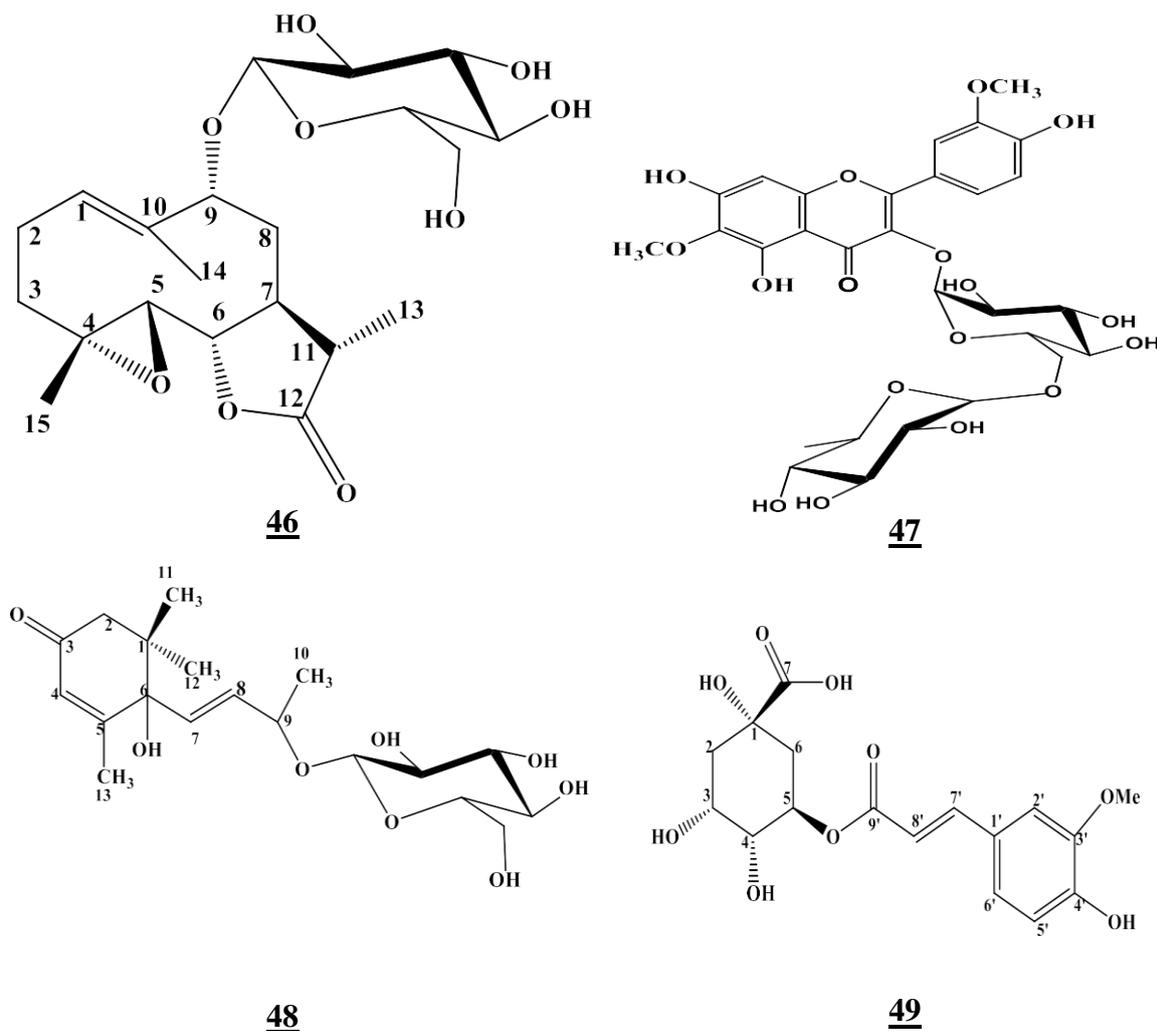


Figure I-9 : Produits isolés de l'espèce *Asteriscus graveolens* par Achoub et al.

I-2- La famille des légumineuses

I-2-1- Généralités

L'origine de cette famille se trouve chez les rosacées à gousse appelées par les premiers botanistes « **légume** » d'où le nom donné à la famille [2]. Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme des synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) [33,34].

Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae), avec plus de 730 genres et près de 20 000 espèces, réparties

aussi bien en milieu tempéré que tropical [35,36], les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales [37]. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds, les formes herbacées dans les régions tempérées [8]. Elles sont extrêmement diversifiées, cependant elles présentent un point commun, est de produire des ayant un ovaire libre, constitué par un seul carpelle qui donne un fruit d'un type particulier appelé *légume* et que l'on désigne plutôt actuellement sous le nom de gousse [38].

Cette famille se divise en plusieurs tribus dans lesquelles les genres sont groupés selon le port de la plante, la forme des feuilles et le degré de fusion des étamines. Les genres les plus importants sont les suivants : *Astragalus* (plus de 2 400 espèces), *Acacia* (plus de 950 espèces), *Indigofera* (environ 700 espèces), *Crotalaria* (environ 700 espèces) et *Mimosa* (environ 500 espèces).

Sur le plan économique, les Fabaceae sont la deuxième famille en importance après les Poaceae et constituent une source de protéines végétales indispensable pour l'alimentation humaine et animale. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour la consommation humaine en raison de leur huile (arachide, soja) et leurs fibres. Elles sont aussi utilisées comme combustible pour leur bois et remèdes en médecine traditionnelle (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) [36].

I.2-2- Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique. Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à *rhizobium* qui se forment si le sol est pauvre en azote [8].

Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier, faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin).

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une réduction du nombre d'étamines à 10 et la fleur devient zygomorphe. La préfloraison est imbriquée, descendante ou vexillaire.

Toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations. Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscente), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres. Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, ex albuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja). La figure I-10 montre comme exemple de légumineuse le *Trifolium repens*



Figure I-10 : Exemple d'une légumineuse *Trifolium repens* (Le trèfle blanc)

I-2-3- Phylogénie et classification systématique

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL* (gène chloroplastique codant pour la sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) [36], est également attesté par de nombreux caractères morphologiques. Selon le système de classification en vigueur (APG II, 1998), les espèces de la famille des Fabaceae sont distribuées en trois sous-familles : Caesalpinioideae,

Mimosoideae et Faboideae. La position systématique de cette famille est présentée dans le tableau I-2.

Tableau I-2 : Phylogénie de la famille Fabaceae (Leguminosae)

Classification	APGII (1998)
Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophyta
Sous embranchement :	Angiospermae
Classe :	Eudicotyledonae
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Eurosidae I
Sous-ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille :	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae

La superfamille des Légumineuses (ou Fabacées) se subdivise en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (Papilionoideae, Mimosoideae) très regroupées et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae), plus dispersées [17].

I-2-3 –a- Les Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur [37].

I-2-3-b- Les Caesalpinoideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement [37].

I-2-3-c- Les Papilionoideae (Fabaceae)

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » [17]. La sous-famille monophylétique des Papilionoideae renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes, elle est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille, 476 genres et 13 860 espèces [36].

Elle est cosmopolite et la majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène [37].

I-2-4- Intérêts économiques et médicaux des Fabacées

La vaste sous famille des fabacées regroupe de nombreuses plantes utiles recevant des applications industrielles, alimentaires ou encore ornementales.

L'intérêt agronomique des fabacées provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* », pour former des organes symbiotiques racinaires « nodules » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, les fabacées peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont dites plantes améliorantes [39, 40].

L'intérêt alimentaire découle du fait que les fabacées constituent une source très importante de protéines et lipides et rentrent dans l'alimentation humaine et animale [2, 41] :

- Protéagineux tels que le Pois (*Pisum*), la Féverole (*Faba*), le Haricot (*Phoscolus*), le Pois chiche (*Cicer*) et les Lentilles (*Ervum*).
- Oléo protéagineux comme le Soja (*Soja*) et l'Arachide (*Arachis*).
- Fourrages tels que les Luzernes (*Medicago*), le Sainfoin (*Onobrychis*) et le Trèfle(*Trifolium*).

L'intérêt industriel résulte du fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le Soja qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides [2].

On peut citer comme exemple les *Derris*, dont l'espèce *Derris elliptica* Benth est utilisée contre les parasites des animaux domestiques, des habitations et des végétaux [42].

D'autres espèces produisent des substances colorantes, et d'autres sont utilisées en parfumerie

comme *Pterocarpus santalinus* [43]. Certaines espèces sont ornementales tels que le Robinier, faux Acacia, Cytise, Glycine, ... etc [44].

L'intérêt pharmaceutique des fabacées est à son tour très important vu le nombre élevé d'espèces figurant dans les pharmacopées et donnant de nombreux produits utilisables en thérapeutique [42, 45]. Par contre, un nombre non négligeable de fabacées est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses [46].

I-2-5- Le genre *Crotalaria*

Le genre *Crotalaria* appartient à la sous famille des papilionoideae tribu des Crotalarieae, compte environ 600 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales [47-48].

Les plantes du genre *Crotalaria* constituent le plus vaste genre de légumineuses en Afrique avec plus de 500 espèces réparties dans diverses zones climatiques, allant des zones semi-désertiques aux forêts tropicales humides [47,49].

Les *Crotalaria* sont des herbacées pérennes ou annuelles, parfois des arbustes, les feuilles simples ou composées palmées à 3-7 folioles, stipulées ou non. Les fleurs ordinairement jaunes en grappes terminales ou oppositifoliées, ou rarement solitaires ; les gousses subglobuleuse ou oblongue, très renflée vésiculeuse, non septé, déhiscente. Les graines sans arille, à funicule filiforme [50,51].

Plusieurs espèces sont utilisées pour leur intérêt agronomique, pour leurs qualités fourragères et pour de nombreux autres usages. En effet grâce leur potentiel fixateur d'azote, de nombreuses espèces du genre *Crotalaria* peuvent être utilisées comme engrais vert ou comme plantes de couverture [52-55]. Les propriétés nématicides de certaines espèces constituent également un usage agronomique important des *Crotalaria*. En effet, des espèces comme *C. pallida*, *C. jimcea*, *C. retisn* et *C. spectabilis* permettent de réduire considérablement les populations de nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*, *Pratylenchus* ou *Rotylenchulus* [56-58]. Les *Crotalaria* peuvent également être utilisées comme fourrage, mais de nombreuses espèces sont toxiques pour le bétail, leur ingestion conduisant à une maladie appelée le crotalisme [47,59]. Cette toxicité est liée à la présence d'alcaloïdes de type pyrrolizidine.

Si les *Crotalaria* ont surtout été étudiées pour leur intérêt agronomique et leurs propriétés toxiques, très peu d'études ont porté sur leurs partenaires symbiotiques, et on considérait jusqu'à présent que les *Crotalaria* étaient toutes nodulées par des rhizobiums non spécifiques

et qu'elles appartenait donc au vaste groupe des légumineuses tropicales de type << cowpea >> [60,61].

I-2-6- Travaux antérieurs sur le genre *Crotalaria*

Les différentes études phytochimiques réalisées sur le genre *Crotalaria* ont mis en évidence la présence caractéristique des métabolites secondaires azotés plus que les autres familles de plantes. Ces métabolites comprennent des alcaloïdes pyrrolizidiniques. La Monocrotaline (**54**) est le premier alcaloïde pyrrolizidine isolé en 1935 de *C. spectabilis* [62], le plus connu et le constituant principale du genre *Crotalaria*. Quelques alcaloïdes pyrrolizidiniques rencontrés chez le genre *Crotalaria* sont reportés dans la figure I-11.

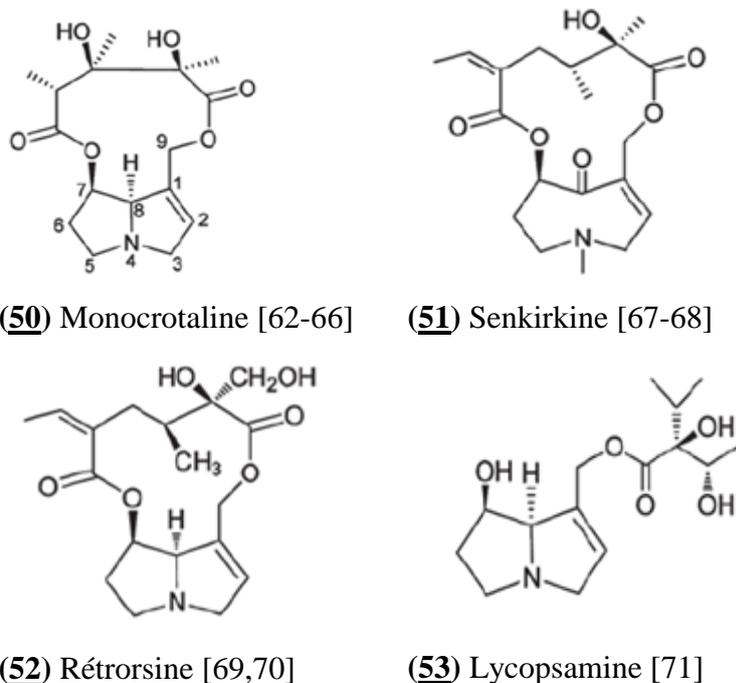
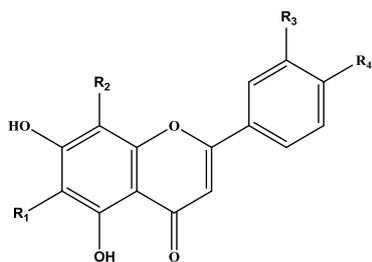


Figure I-11 : Quelques alcaloïdes pyrrolizidiniques rencontrés chez le genre *Crotalaria*.

➤ Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Crotalaria* ont relevé également une richesse en composés flavononiques : flavones, isoflavones, chalcones...etc. quelques exemples sont reportés dans la figure I-12.



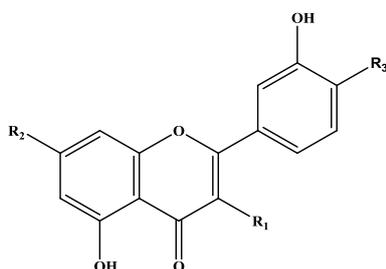
54 Vitexine, ($R_1=H$, $R_2=Glu$, $R_3=H$, $R_4=OH$) [72]

55 Orientine, ($R_1=H$, $R_2=Glu$, $R_3=OH$, $R_4=OH$) [72,73]

56 Isovetexine ($R_1=Glu$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OH$) [74,75]

57 Apigénine ($R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OH$) [76-77]

58 Diosmétine ($R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=OH$, $R_4=OCH_3$) [78]

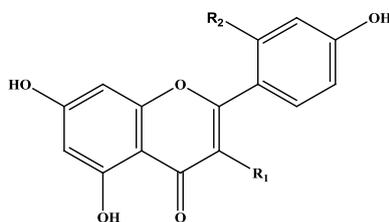


25 Quercétine ($R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=OH$) [79]

21 Quercétine 7-*O*- β -D-glucoside ($R_1=OH$, $R_2=OGlu$, $R_3=OH$) [77]

59 Luteoline 7-*O*- α -L-rhamnoside ($R_1=H$, $R_2=ORha$, $R_3=OH$) [80]

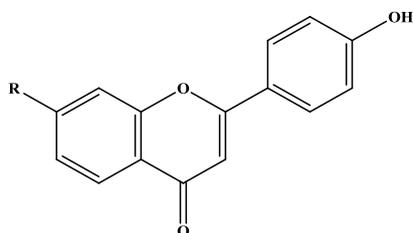
60 Diosmine ($R_1=H$, $R_2=O-Glu-O-Rham$, $R_3=OCH_3$) [78]



61 Kaempférole ($R_1=OH$, $R_2=H$) [79]

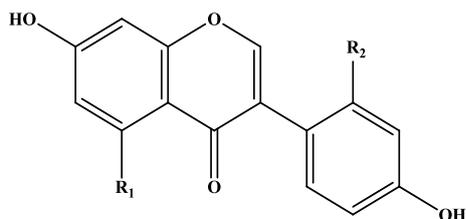
62 4',5,7-trihydroxy-3-méthoxyflavone ($R_1=OCH_3$, $R_2=H$) [81]

63 Morine ($R_1=OH$, $R_2=OH$) [77]



64 4',7-Dihydroxyflavone ($R=OH$) [74,82]

65 4'-hydroxy flavone 7-*O*- rhamnoside ($R=O-Rha$) [82]



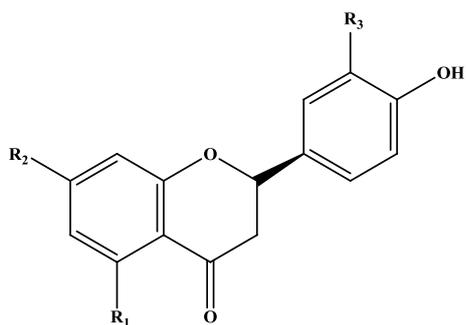
66 2'-hydroxygenisteine ($R_1=OH$, $R_2=OH$) [74,77,80]

67 5,7,4'-trihydroxy-2'-methoxyisoflavone ($R_1=OH$, $R_2=OCH_3$) [77]

68 Daidzeine ($R_1=H$, $R_2=H$) [77]

69 2'-hydroxydaidzeine ($R_1=H$, $R_2=OH$) [74,77]

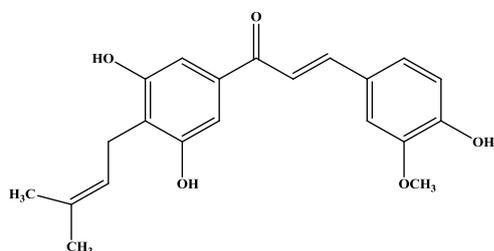
70 Genisteine ($R_1=OH$, $R_2=H$) [83]



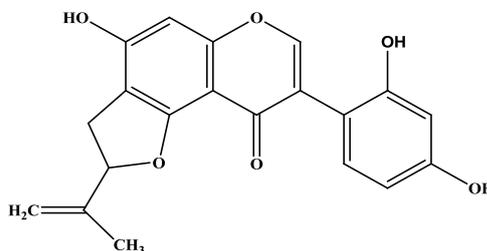
71 Naringenine ($R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=H$) [77]

72 Naringenin-7-O- β -D-glucoside ($R_1=OH$, $R_2=O-Glu$, $R_3=H$) [77]

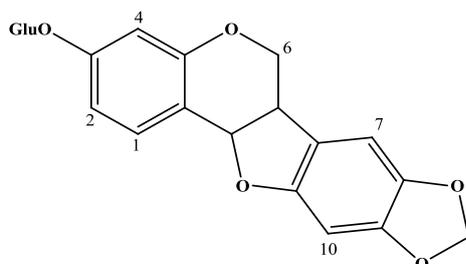
73 (2R)-Eriodictylone-7-O- β -D-glucoside ($R_1=H$, $R_2=O-Glu$, $R_3=OH$) [72]



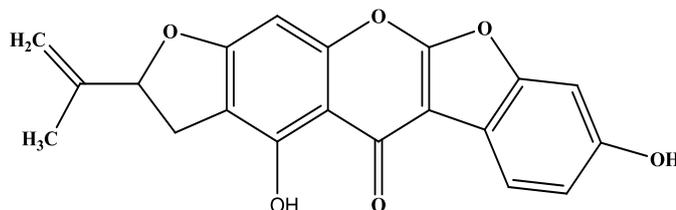
74 Crotaorixine [84]



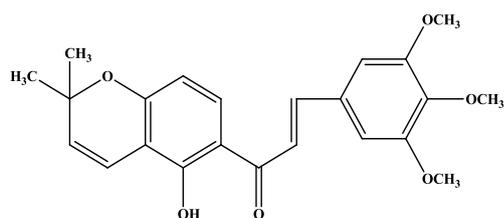
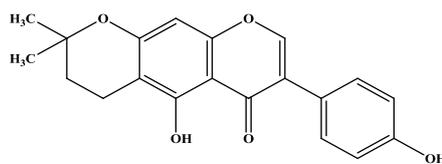
75 Lachnoisoflavone A [80]



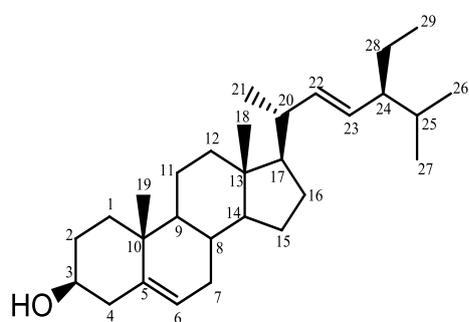
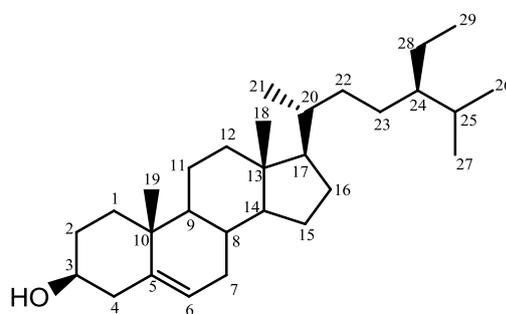
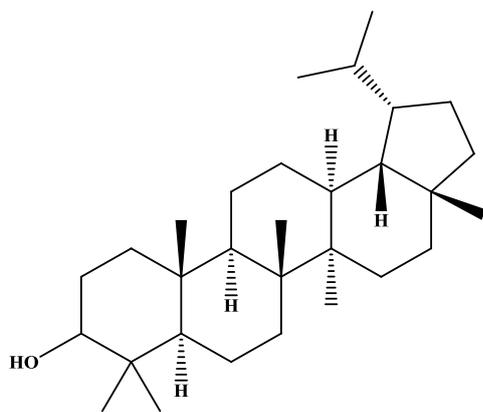
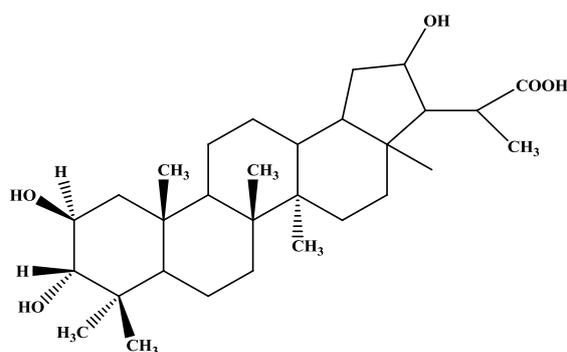
76 Trifolirhizin [78]

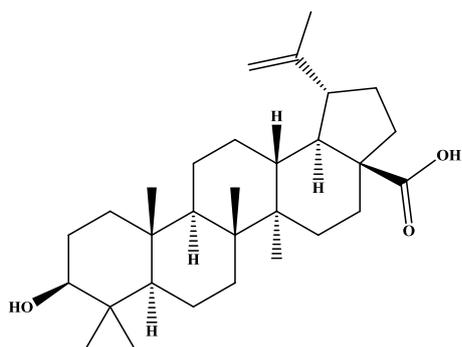
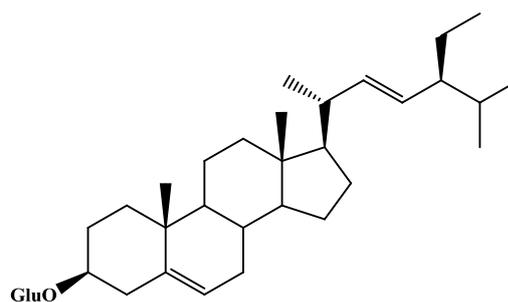
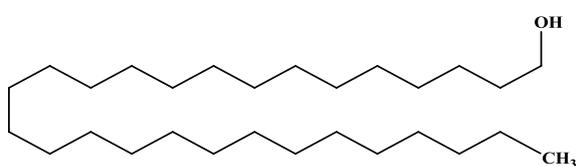
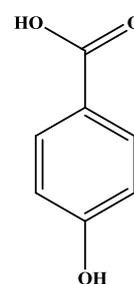
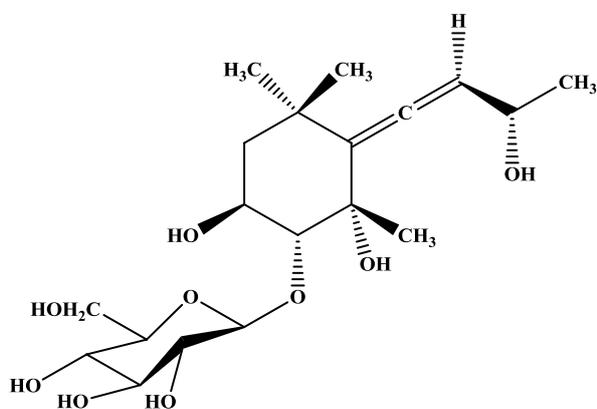
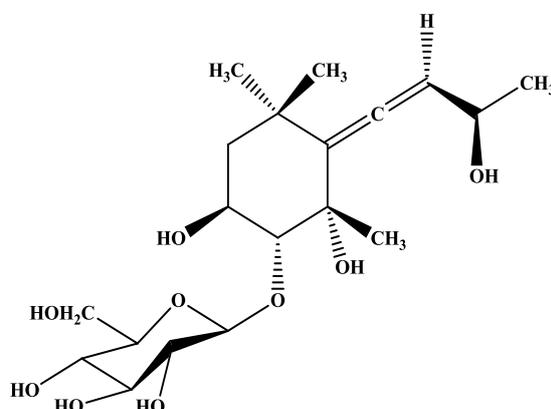


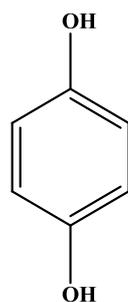
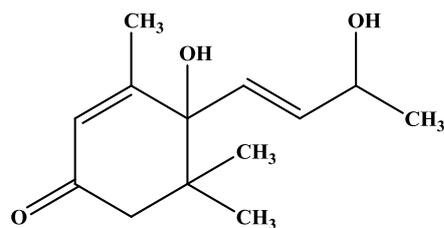
77 Lachnoisoflavone B [80]

**78** Triméthoxychalcone [85]**79** Dihydroalpinumisoflavone [81]**Figure I-12** : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Crotalaria*.

➤ D'autres type de composés moins dominants ont été isolés et identifiés dans le genre *Crotalaria*. Un certain nombre est cité dans la figure I-13.

**38** stigmasterol [78,83]**80** β -sitostérol [77,83]**81** Lupeol [77]**82** L'acide crotalique [86]

**83** L'acide butilinique [87]**84** Daucostérol [78]**85** Octacosanol [83]**86** L'acide p-hydroxybenzoïque [83]**87** Crotalionoside A [88]**88** Crotalionoside B [88]

**89** Hydroquinone [72]**90** Vomifoliol [83]**Figure I-13** : D'autres type de composés rencontrés au sein du genre *Crotalaria*

I-2-7- L'espèce *Crotalaria vialattei* Batt.

Le critère principal de notre choix de cette espèce repose sur le fait que cette plante est originaire du sud algérien. Notre choix est guidé par le fait que les plantes sahariennes algériennes, sont des plantes d'origine terrestre qui au cours de leur évolution se sont adaptées aux écosystèmes du sud algérien. Par leur position écologique et évolutive particulière, il est possible que ces plantes souvent endémiques aient également accumulé des métabolites secondaires spécifiques aux caractéristiques chimiques et biologiques originales.

Sur la base de cette hypothèse, notre étude s'est attelée à l'investigation phytochimique de cette plante présente dans les régions sahariennes de l'Algérie.

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent également donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires (substances chimiques synthétisées par les plantes) qui lui permettent de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, antiparasitaire ou antioxydant par exemple).

I-2-7-a- Place dans la systématique

La classification botanique de cette plante peut être résumée de la façon suivante (Tableau I-3) [89] :

Tableau I-3 : Place dans la systématique de l'espèce *Crotalaria vialattei* Batt.

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-Classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Faboideae
Tribu	Crotalarieae
Genre	<i>Crotalaria</i>
Espèce	<i>Crotalaria vialattei</i> Batt

I-2-7-b- Description de l'espèce *Crotalaria vialattei* Batt.

Crotalaria vialattei Batt. est un arbrisseau dressé, pouvant atteindre 1 m de hauteur, vilieux-soyeux, argenté, pluri caule, buissonnant (Figure I-14). Tiges robustes, dressées, rameuses, cylindriques, très densément vêtues de poils simples. Feuilles toutes trifoliolées, brièvement pétiolées ; pétiole 5-7 mm long., cylindrique, densément vilieux-soyeux, folioles brièvement pétiolulées, oblongues, un peu atténuées à la base. Inflorescences en grappe lâche à fleurs jaunes en entier, longues de 12-14 mm. Gousse immature oblongue, renflée, densément vilieuse soyeuse, bien plus longue que le calice marcescent. Graines inconnues. Floraison : février-mars. Rocailles ensablées [16,90].

**Figure I-14** : L'espèce *Crotalaria vialattei* Batt.

Crotalaria vialattei Batt. a une aire plus réduite : c'est une endémique des confins algéro-marocains où il occupe une aire très restreinte dans la région de : Tebelbala [16].

I-2-7-c-Usages traditionnels

Crotalaria vialattei est considérée en pâturage comme un bon galactogène, elle doit être broutée fraîche et modérément. Partout dans les régions sahariennes, la crotalaire est appliquée en cataplasmes sur les morsures de scorpion, la plante est connue par sa toxicité. Cette plante consommée en excès et à l'état sec peut provoquer la mort [24].

A notre connaissance, aucune étude de recherche de la composition chimique de cette espèce n'est reportée dans la littérature. Il existe très peu de données pharmacologiques concernant l'utilisation de cette espèce.

Références bibliographiques

- [1] Gaussen H, Leroy F. Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2^{ème} édition. 1982, 424-426.
- [2] Guignard J L. Abrégé botanique, 9^{ème} édition Masson. Paris. 1994 (9): 203-204.
- [3] Bremer K. Asteraceae, Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, Oregon, 1994. 752 p
- [4] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, CNRS. Paris. 1963.
- [5] Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat-Hug M, Jeanmonod D. Botanique systématique des plantes à fleurs . 3^{ème} édition. Presses polytechniques et universitaires romandes. 413 pages, 2002 (3): 348-349
- [6] Barkely TM, Brouillet L, Strother JL. Flora of North America-Asteraceae. 2006, 19, 3-69.
- [7] Boulard B. Dictionnaire de botanique, Paris, Ellipse, 1988, 398 p. (ISBN 97827298-8845-9, BNF 34955567), p 171
- [8] Dupont F, Guignard J L. Botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée. Elsevier Masson SAS. 2007. 14: 249-257.
- [9] Pijl L. *Principles of dispersal in higher plants*, Springer-Verlag. 1969, p 91
- [10] Arasan S, Kaya I. Some important Plants belonging to Asteraceae family used in folkloric medicine in Savur (Mardin/Turkey) Area and their application areas. Journal of Food and Nutrition Research. 2015, 3(5) : 337-340.
- [11] Alaniz F S, Mazzarini L A, M S Demo M S, L I Sabini L I , Maldonado A M . Derivated products from *Achyrocline satureioides* and *Arnica montana*, with immunomodulating effects. Molecular Medicinal Chemistry.2010, 20 :121-123.
- [12] Li ZY, Zhi HJ, Xue SY, Sun HF, Zhang FS, Jia JP, Xing J, Zhang LZ, Qin XM. Metabolomic profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfara* with antitussive and expectorant effects on mice. Journal of Ethnopharmacology. 2012, 140(1):83-90.
- [13] Chethan J, Pradeep Kumar PM and Prakash HS. Antidiabetic and antihypertensive potential of selected Asteraceae plant species. American Journal of Advanced Drug Delivery. 2014, 2 (3) : 355-363.

- [14] Vicki A. Funk, Alfonso Susanna, Tod F. Stuessy, Randall J. Bayer. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*, Vienne (Autriche), International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009, 965 p.
- [15] Bruneton J. *Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux*, Paris/Cachan, Tec & Doc Lavoisier, 2005, 3^e éd., 618 p. (ISBN 2-7430-0806-7), p. 183-208.
- [16] Ozenda P. Flore du Sahara septentrional et central. Paris: CNRS; 1958: 450-454.
- [17] Guignard J L, Dupont F. 2005. Botanique systématique moléculaire. 13 ed. Masson. Paris: 247-249.
- [18] Benchalah A C, Bouziane H, Maka M. Fleur du Sahara arbres et arbustes voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*. 2004, 6: 191-197.
- [19] Sahki A, Sahki- Boutamine R. Le Hoggar- promenade botanique. Atelier Ésope. Lyon. 2004, 233-234.
- [20] Maire, R. Etude sur la flore et la végétation du Sahara central. *Mémoire de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord*. 1933, 57-58.
- [21] Akssira M, Mellouki F, Salhi A, Alilou H, Saouf A, EL Hanbali F, Arteaga J F, Barrero A F. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* susp *odorus*. *Tetrahedron letters*. 2006, 47: 6719-6721.
- [22] Greuter W. Flora Mediterranea. International Foundation pro Herbario Mediterraneo. 1991, 7: 41-48.
- [23] Cheriti A, Saad A, Belboukher N, Ghezali S. The essential oil composition of *Bubonium graveolens* Maire from the Algerian Sahara. *Journal of Flavour and Fragrance*. 2007, 22 (4): 286-288.
- [24] Bellakhdar J. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir. Thèse de doctorat : Science de la vie. Université de Metz, (1997). 234 p.
- [25] Cheriti A, 2000. Plantes médicinales de la région de Bechar, sud ouest Algérie : Etude Ethnopharmacologique. Rapport CRSTRA, Algérie. 2000.
- [26] Hammiche, V., Maisa K.. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 105: 358-367.
- [27] Ghourri M, Zidane L, El Yacoubi H, Rochdi A, Fadli, Douira A. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc saharien). *Journal of Forestry Faculty*. 2012 , 12(2) : 218-235.

- [28] Znini M, Cristofari G, Majidi L, Mazouz H, Tomi P, Paolini J, Costa J. Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Natural products communications*, 2011, 6 (11): 1763 – 1768.
- [29] El Dahmy S, Jakupovic J, Bohlmann, F, Sarg T M. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*, 1985, 41, 309–316.
- [30] Ahmed AA, Ishak MS, Micheal HN, El-Ansari MA, El-Sissi HI. Flavonoids of *Asteriscus graveolens*. *Journal of Natural Products*. 1991, 54:1092–1093.
- [31] Triana J, Eiroa JL, Morales M, J. Pérez FJ, Brouard I, Quintana J, Estévez MR, Estévez F, León F. Sesquiterpenoids isolated from two species of the *Asteriscus* alliance. *Journal of Natural Products*. . 2016, 79:1292 –1297.
- [32] Achoub H, Mencherini T, Esposito T, Luca R, Aquino R, Gazzero P, Zaiter L, Benayache F, Benayache S. New sesquiterpenes from *Asteriscus graveolens*. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1666390>.
- [33] Judd WS, Campbell CS , Kellogg E A, Stevens P. *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. 1ère édition, DeBoeck Université, Paris, 2002, 283-288, 292-299.
- [34] Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat M, Jeanmonod D. *Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales*. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2004, pp. 202-211.
- [35] Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT. *Legume comparative genomics*. 2006, progress
- [36] Wojciechowski M F, Lavin M, Sanderson MJ. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. 2004, 91(11), 1846–1862.
- [37] Judd WS, Campbell CS, Jules Bouharmont, Kellogg EA, Stevens P. *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*. 2001.
- [38] Caratini R. *Les plantes*. Bordas, Paris. 1984.
- [39] Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*. 1995, 869-885.
- [40] Echevin R. *Angiospermes I. Apétales et dialypétales*. Editeur Doin, 1964 ; p 496.
- [41] Journet EP, Carreau V, Gouzy J, Thoquet P, Rosenberg C, Barker D, Huguet T, Denarie J, Gamas P. *La légumineuse modèle Medicago truncatula : approches génomiques et perspectives*. Ecole thématique Biologie végétale. 2001.

- [42] Bézanger-beauquesne L. Pinkas M , Torck M, Les plantes dans la thérapeutique moderne, 1986; p 469.
- [43] Arnone A, Camarda L, Merlini L, Nasini G, Taylor, DAH. Colouring matters of the West Africa red woods *Pterocarpus osun* and *P. santalinus*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I, 1977; 19, 2116-2118.
- [44] Guignard J.L, Botanique systématique moléculaire, 13ème édition, éditeur Masson, 2004, p 284.
- [45] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technologie Doc. 2^{ème} édition , 1993 ; p 915.
- [46] Bruneton J. Plantes toxiques et végétaux dangereux pour l’homme et les animaux. 2^{ème} édition, Paris. Editions médicales internationales. 576 pages ; 2001.
- [47] Polhill, R.M. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. Dans Royal Botanic Gardens, Kew. Publisher A.A. Balkema, Rotterdam. 1982.
- [48] Van Wyk, BE, Schutte, AL. In Advances in legume systematics; Crisp M, Doyle JJ. Eds.; Royal Botanic Gardens: Kew: UK, 1995; pp 283-308.
- [49] Thulin M. Leguminosae of Ethiopia; Opera Botanica: Copenhagen, 1983; Vol. 68, pp 1-223.
- [50] Rakoto-Ratsimamanga A, Boiteau P, Mouton M. 1969 ; Eléments de pharmacopée malagasy ; Société pour la promotion de la pharmacopée malagasy ; Tananarive ; 308 pages
- [51] Maire R. Flore de l’Afrique du Nord. Editions Lechevalier – Paris .1987. 300 pages
- [52] Sandanam S, Jayasooriya SG, Somaratne A. Effect of soil reconditioning on organic matter and nutrient status of tea soils and yield of replanted tea. Journal of Plantation Crops. 1976 ; 4 : 60-67.
- [53] Mwambazi TN, Mwakalombe B, Aune JB, Berland TA. Turnover of green manure and effect on bean yield in Northern Zambia. Advances in Geocology. 1998, 31 : 1247-1254.
- [54] Becker M, Johnson D E. The role of legume fallows in intensified upland rice-based systems of West Africa. Nutrient Cycling in Agroecosystems.1999. 53 : 71-81.
- [55] Fisher M, Wortmann CS, Feil B. *Crotalaria* (*C. ochroleuca* G. Don) as a green manure in maize-bean cropping systems in Uganda. Field Crops Research.1999, 61 : 97-107.
- [56] Silva GSD, Ferraz S, Santos JMD.. Resistance of *Crotalaria* species to *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae*. Nematologia Brasileira.1989a .13 : 81-86.
- [57] Silva GSD, Ferraz S, Santos JMD. Attraction, penetration and developement of *Meloidogyne javnnica* larvae in *Crotalaria* roots. Nematologia Brasileira. 1989b. 13 : 151-163.

- [58] Sundararaj P, Mehta UK. Host status of some economic crops to *Pratylenchus zae* and their influence on subsequent sugarcane crops. *Indian Journal of Nematology*. 1990. 20 : 165-169.
- [59] Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2nd ed. Livingstone, Edinbourg, Ecosse. 1962.
- [60] Wilson JK. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell University Agriculture Experimental Station Memoir 221. 1939.
- [61] Burton J. Host specificities among certain plants in the cowpea cross-inoculation group. *Soil Science Society of America Journal*. 1952. 16 (4): 356-358.
- [62] Neal WM, Rusoff LL, Ahmann CF. The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. *Journal of American Chemical Society*. 1935, 57 (12), 2560–2561.
- [63] Adams R, Rogers EF. The Structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. *Journal of American Chemical Society*. 1939, 61(10), 2815–2819.
- [64] Crout DHG. Pyrrolizidine alkaloids. The co-occurrence of monocrotaline and trichodesmine in *Crotalaria recta* steud. ex A. rich. *Phytochemistry*. 1968. 7(8):1425-1427.
- [65] Atal CK, Culvenor CCJ, Sawhney RS, Smith LW, The alkaloids of *Crotalaria grahamiana*. Grahamine, the 30-[-2-methylbutyryl] ester of monocrotaline. *Australian journal of Chemistry*. 1969. 22, 1773–1777.
- [66] Roeder E, Sarg T, El-Dahmy S, Ghani AA. Pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria aegyptiaca*. *Phytochemistry*. 1993, 34 (5), 1421–1423.
- [67] Crout DHG. Pyrrolizidine and seco-pyrrolizidine alkaloids of *Crotalaria laburnifolia* L. *subspecies* . *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1972. 1602-1607.
- [68] Asres K, Sporer F, Wink M. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004, 32, 915–930.
- [69] Culvenor CCJ, Smith LW. Usaramine, a new pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria usaramoensis*. 1966. *Australian Journal of Chemistry*. 1966, 19, 2127–2137.
- [70] Mattocks AR, Nwude N. Pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria lachnosema* and *Crotalaria naragutensis*. *Phytochemistry*. 1988, 27(10) :3288-3292.
- [71] Colegate SM, Gardner DR, Joy RJ, Betz JM, Panter KE. Dehydropyrrolizidine Alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv.'Tropic Sun'). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60 (14) : 3541–3550.

- [72] Mun'im A, Negishi O, Ozawa T. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003, 67 (2): 410- 414.
- [73] Subramanian SS, Nagarajan S. Orientin and iso-orientin from the seeds of *Crotalaria laburnifolia* Linn. *Current Science*.1967, 36(14): 364-365.
- [74] Yoo HS, Lee JS, Kim CY, Kim J. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. *Archives of Pharmacal Research*. 2004, 27(5): 544-546.
- [75]Subramanian SS, Nagarajan S. Isovitexin from the seeds of *Crotalaria anagyroides*. *Current Science*. 1967. 36 (15): 403.
- [76] Subramanian SS, Nagarajan S. Flavonoids of three *Crotalaria* species. *Phytochemistry*. 1970. 9: 2581-2584.
- [77] Ko HH, Weng JR, Tsao LT, Yen MH, Wang JP, Lin CN. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004, 14 (4) : 1011-1014.
- [78] Aissaoui M, León F, Brouard I , Benayache F, Benayache S. Secondary metabolites from *Crotalaria saharae* (Fabaceae). *Der Pharmacia Lettre*, 2014, 6 (1):186-189.
- [79] Naidu KC, Aruna V, Satyanarayana T. Phytoconstituents from leaves of *Crotalaria verrucosa* Linn. *Indian Journal of Natural Products*.1998, 14(1): 17-19.
- [80] Awouafac MD, Spitelier P, Lamshöf TM, Kusari S, Ivanova B, Tane P, Spiteller M. Antimicrobial Isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. *Journal of Natural Products*. 2011,74(2): 272-278.
- [81] Bhakuni DS, Chaturvedi R. Chemical constituents of *Crotalaria madurensis*. *Journal of Natural Products*. 1984, 47(4): 585–591.
- [82] Vanitha P, Valliappan R, Charles A, Sukumar D. Isolation of flavonoids and biological activities of *Crotalaria Grahamiana*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012, 4(7):3665-3671.
- [83] Zhang X, Long F, DengY, Peng T, Li Y, Dong XP, Hu XM.Chemical constituents of *Crotalaria ferruginea*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2008, 39(2):176-178.
- [84] Narender T, Shweta, Tanvir K, Rao MS, Srivastava K, Puri SK. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005, 15(10):2453-2455.
- [85] Rao MS, Narukulla RA. New trimethoxychalcone from *Crotalaria ramosissima*. *Fitoterapia*. 2007, 78:446–447

- [86] Ahmed BA, Al-Howiriny T, Mossa JS. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. *Phytochemistry*. 2006, 67(10) :956-964.
- [87] Rao MS, Kumar JK, Rao PS, Toth G, Simon A, Balazs B, Duddeck H. Constituents of *Crotalaria trifoliastrum* roots. *Fitoterapia*. 1999, 70: 200-202.
- [88] Shitamoto J, Matsunami K, Otsuka H, Shinzato T, Takeda Y. Crotalionosides A-C, three new megastigmane glucosides, two new pterocarpan glucosides and a chalcone C-glucoside from the whole plants of *Crotalaria zanzibarica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2010, 58(8):1026-1032.
- [89] Dobignard A, Chatelain C. Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord (Dicotyledoneae : Fabaceae – Nymphaeaceae). 2012, Volume 4.
- [90] Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, CNRS. Paris. 1962. Page 476.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE II

II-1-Etude phytochimique d' *Asteriscus graveolens*

II- 1-1-Extraction du matériel végétal

La plante a été récoltée de la région de Bechar. Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires, les différents organes des parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) sont séparés, séchés et pesés.

Le matériel végétal a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau) dans les proportions (70/30; v/v) pendant 24 heures. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les 3 extraits hydroéthanoliques sont réunis, concentrés sous pression réduite à une température n'excédant pas environ 35 °C.

La solution obtenue diluée avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, est additionnée d'acétate de plomb [(CH₃COO)₄Pb] pour éliminer les chlorophylles par précipitation. Après filtration, la solution devenue rouge-brune, subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), puis filtrées, concentrées à sec sous pression réduite à une température n'excédant pas 35°C, donnant les extraits correspondants dont les masses sont reportées dans tableau II-1. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure II-1.

Tableau II-1 : Les masses des extraits de l'espèce *Asteriscus graveolens*

Les différents organes	extrait Chloroforme m (g)	extrait Acétate d'éthyle m (g)	extrait <i>n</i> -butanol m (g)
Feuilles (1000 g)	4,16	3,29	8,38
Fleurs (580 g)	3,51	2,85	6,8
Tiges (970 g)	2,71	2,78	6,72

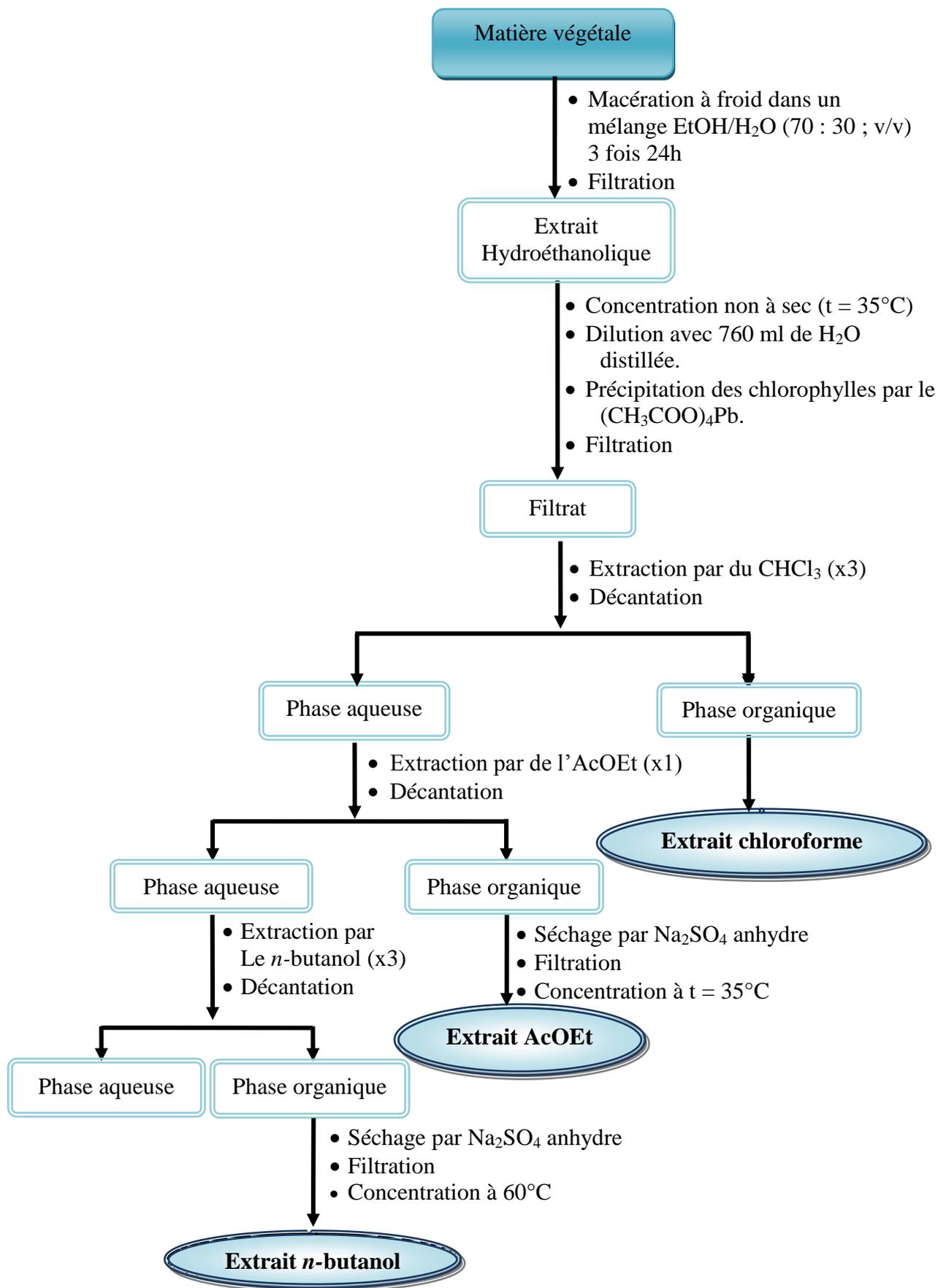


Figure II-1 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens*.

Chaque extrait subit une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur l'éluant ou le système d'éluion qui donnerait les meilleurs résultats lors de la séparation. Les plaques CCM analytique réalisées sur tous les extraits dans différents systèmes de solvants, montrent bien que la composition de l'extrait chloroforme est plus riche en produits. Une grande similitude est observée entre le profil CCM de l'extrait chloroforme des feuilles et celui de l'extrait chloroforme des fleurs, nous les avons réunis en un seul extrait de 7,67 g.

II-1-2-Fractionnement de l'extrait chloroforme

Un premier fractionnement de l'extrait chloroforme (feuilles + fleurs) de *Asteriscus graveolens* a été réalisé par chromatographie sur une colonne de gel de silice 60 (230-400 mesh, Merck) préparée dans l'éther de pétrole. L'éluion est réalisée par un gradient de polarité croissante du système éther de pétrole- éther diéthylique. 9 fractions sont obtenues. Les résultats de cette opération sont regroupés dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Le fractionnement de la phase chloroforme sur colonne de gel de silice normale .

Les fractions	Les lots (250 ml)	Système d'éluion		Les masses (mg)
		Ether de pétrole	Ether diéthylique	
F1	1-9	100	0	120
	10-11	95	5	
F2	12-18			90
	19-21			
F3	22-27	85	15	237
	28-41			
F4	42-54	80	20	431,2
	55-63			
F5	64-81	75	25	556
	82			
F6	83-106	70	30	906,21
F7	107-108			
	109-135	65	35	1402,13
136-137				
F8	138-162	40	60	559
F9	163-198			2983

II-1-2-a-L'étude de la fraction F1

L'ajout du méthanol à cette fraction a permis la cristallisation d'un produit majoritaire dans la fraction HLBG-F1 (10,8 mg) qui est soluble dans le chloroforme et que nous notons **A1**.

II-1-2-b -L'étude de la fraction F3

Environ 100 mg de la fraction F3 ont subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système dichlorométhane /acétone dans les proportions 19/1 avec double migration. Pour donner le produit FB 3-3 (5,7 mg). Nous reportons ce composé sous le code **A2**.

II-1-2-c -L'étude de la fraction F5

La fraction F5 est rechromatographiée sur une colonne de gel de silice normale avec un gradient d'éluion hexane-éther diéthylique pour donner 57 lots. Les lots 49 et 55 contenant les produits purs F5-49 (3,4 mg) et F5-55 (2,1 mg) sont notés **A3** et **A4**, respectivement (Tableau II-3).

Tableau II-3 : Sous- fractionnement de la fraction F5 sur colonne de gel de silice normale

Les lots (100 ml)	Système d'éluion		Observations
	hexane	éther diéthylique	
1-3	100	0	/
4-6	98	2	Des traces
7-12	90	10	Mélange de faible quantité
13-15	80	20	Mélange séparable
16-21	60	40	Mélange séparable
22	60	40	Produit pur
24-29	50	50	Mélange séparable
30-35	40	60	Mélange séparable
36-41	30	70	Mélange séparable
42-48	20	80	Mélange séparable
49	20	80	Produit pur
50-51	20	80	Mélange séparable
52-54	10	90	Mélange séparable
55	10	90	Produit pur
56-57	0	100	Mélange séparable

II-1-2-d -L'étude de la fraction F8

Dans la fraction F8, on remarque la formation d'un précipité blanc que nous avons filtré et rincé au chloroforme obtenant ainsi un produit sous forme de cristaux blancs FB-LH-F143 (39,6 mg). Déposé sur plaques CCM analytiques et élué par plusieurs systèmes de solvants, ses profils chromatographiques révèlent un seul spot et donc la pureté de ce composé. Nous le reportons alors ce composé sous le code **A5**. Le filtrat de la fraction F8 est concentré et déposé sur une colonne de gel de silice normale, l'éluion est effectuée par des systèmes de solvants hexane-éther diéthylique de polarité croissante donnant 24 sous-fractions. Les seules sous fractions étudiées sont F8-11 et F8-14 (Tableau II-4).

Tableau II-4 : Sous- fractionnement du filtrat de la fraction F8 sur colonne de gel de silice normale

Les sous fractions	Les los (50 ml)	Système d'éluion		Les masses(mg)
		Ether	Ether diéthylique	
F8-1	1-7	100	0	0,8
F8-2	8-9			1,3
F8-3	10-13			2,9
F8-4	14-16	98	2	2,6
F8-5	17-19			1,7
F8-6	20-21			3,3
F8-7	21-27			9,4
F8-8	28-32	70	30	16,0
F8-9	33-35			4,9
F8-10	36--38	60	40	15,1
F8-11	39-41			77,6
F8-12	42-45			9,3
F8-13	46-54	40	60	8,9
F8-14	55-59			37,0
F8-15	60-62	30	70	32,1
F8-16	63--65			19,6
F8-17	66-73			5,3
F8-18	74-84	25	75	17,1
F8-19	85--91			29,3
F8-20	92-97	20	80	9,7
F8-21	98-108	15	80	21,5
F8-22	109-113	10	90	57,4
F8-23	114-120	5	95	39,1
F8-24	121-123	0	100	79,6

La sous fraction F8-11 est soumise à une purification sur des plaques préparatives de gel de silice HF254 en utilisant comme éluant hexane-éther diéthylique dans les proportions 1:2, avec double migration, fournissant ainsi les composés F8-11-2 (4,3 mg) que nous avons noté **A6** et F8-11-3 (5,2 mg) que nous avons noté **A7**.

La sous fraction F8-14 est purifiée à son tour par le même système des solvants mais dans les proportions 1:3 donnant le composé F8-14 -3 (6,5 mg) noté **A8**.

L'étude de la phase chloroforme nous a permis d'isoler **huit** produits. La figure II-2 résume les différents étapes de séparation et purification des composés isolés de cette phase.

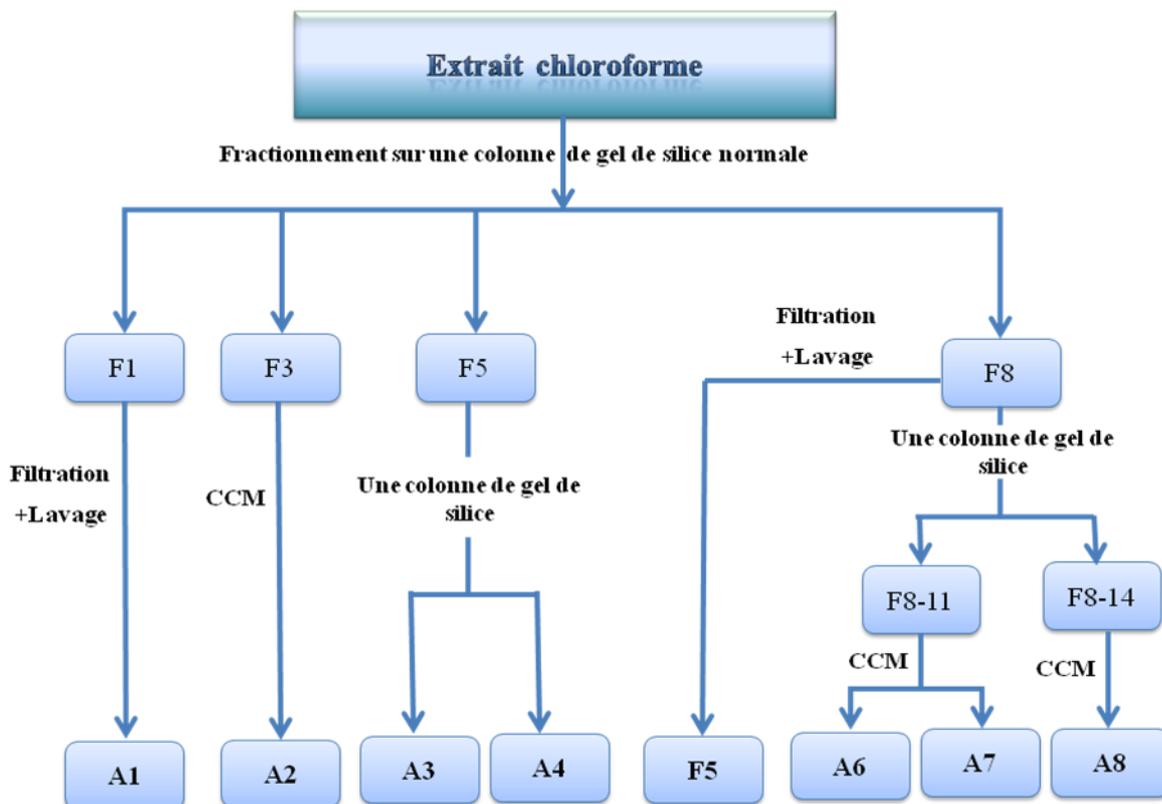


Figure II-2 : Récapitulatif des étapes de séparation et purification des composés isolés de l'extrait chloroforme d'*Asteriscus graveolens*

II-2-Etude phytochimique de *Crotalaria vialattei* Batt.

II-2-1- Extraction de *Crotalaria vialattei* Batt.

La plante a été récoltée de la région de Bechar. Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (feuilles et fruits) sont séparées et broyées. Le quantité des fruits était de 519 g et la quantité des feuilles était de 2100 g. Dans le cadre de cette étude, nous avons opté pour l'investigation phytochimique des feuilles.

Le matériel végétal a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau) dans les proportions (70/30; v/v) pendant 24 heures. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les 3 extraits hydroéthanoliques sont réunis et concentrés sous pression réduite à une température n'excédant pas environ 35 °C.

La solution obtenue diluée avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, est additionnée d'acétate de plomb [(CH₃COO)₄Pb] pour éliminer les chlorophylles par précipitation. Après filtration, la solution devenue rouge brun, subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite à une température n'excédant pas 35°C.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure II-3 avec les masses obtenues de chaque extrait.

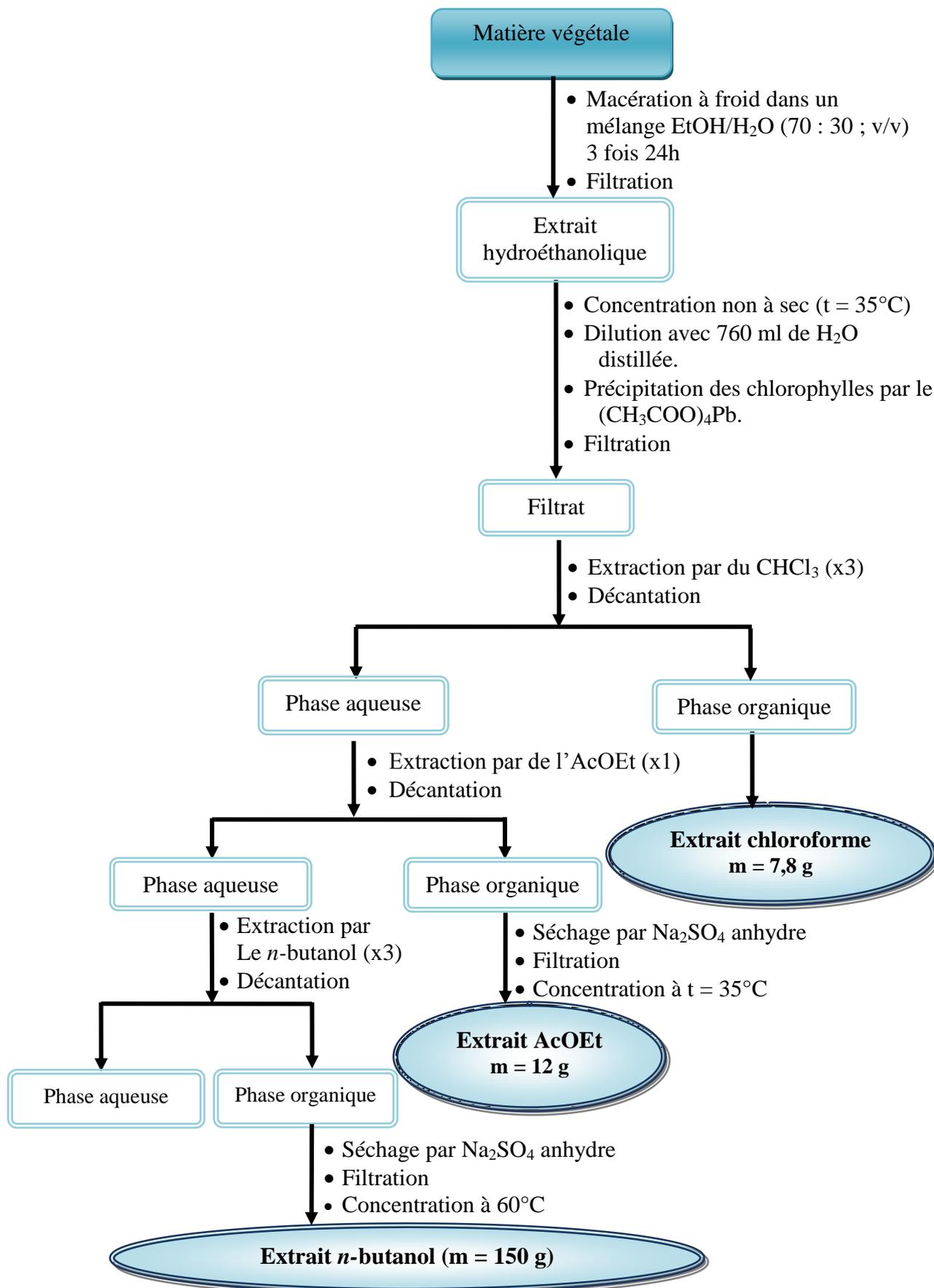


Figure II-3 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Crotalaria vialattei* Batt.

II-2-2-Fractionnement de l'extrait chloroforme

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 déposé sur une feuille d'Aluminium. Plusieurs tests ont été effectués pour rechercher le système de séparation optimale de l'extrait chloroforme. La meilleure séparation a été obtenue avec le système : Hexane/ether diéthylique. Ainsi une masse d'environ 7,50 g de l'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans l'hexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système par l'éther diéthylique. 24 fractions sont obtenues. Les résultats de cette opération sont regroupés dans le tableau II-5.

Tableau II-5 : Le fractionnement de la phase chloroforme de *Crotalaria vialattei*
Batt.sur colonne de gel de silice normale

Les fractions	Les los (100 ml)	Système d'élution		Observations	Les masses (mg)
		Hexane	Ether diéthylique		
F1	1-5	100	0	/	/
F2	6-15			Mélange de faible quantité	2,9
F3	16-21	95	5	Mélange séparable	7,45
F4	22-31			//	29,6
F5	32-44	80	20	//	44,09
F6	45-66			//	54,17
F7	67-74			Mélange complexe	409
F8	75-83	70	30	//	257
F9	84-91			//	503,12
F10	92-103	60	40	Mélange séparable	167
F11	104-115			//	305,12
F12	116-135	45	55	//	102,89
F13	136-144	40	60	//	497,12
F14	145-157			//	459,42
F15	158-162	30	70	//	54,45
F16	163-177			//	79,25
F17	178-193			//	390,07
F18	194-211	25	75	//	602,31
F19	212-227			//	245,37
F20	228-231	20	80	//	178,74
F21	232-247	15	80	//	423,15
F22	248-258	10	90	//	369,73

F23	259-270	5	95	//	201,34
F24	271-299	0	100	Mélange complexe	992,02

Les fractions les moins complexes avec des masses importantes ont été sélectionnées pour l'étude. Sur cette base, les fractions F6, F11, F14, F16, F17 et F23 ont été choisies.

II-2-2-a-L'étude de la fraction F6

La fraction F6 a été soumise à une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 5/1. Pour donner les produits : F6-1 (5,7 mg), que nous reportons sous le code **B1** et le produit F6-2, noté **B2**.

II-2-2-b-L'étude de la fraction F11

La fraction F11 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 5/1 avec deux éluions, donnant le produit F11-2 (3,5 mg). Nous reportons ce composé sous le code **B3**.

II-2-2-c-L'étude de la fraction F14

La fraction F14 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 4/1 avec deux éluions, donnant le produit F14-5 (4,1 mg). Nous reportons ce composé sous le code **B4**.

II-2-2-d-L'étude de la fraction F16

La fraction F16 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 4/1 avec deux éluions, donnant le produit F16-3 (3,0 mg). Nous reportons ce composé sous le code **B5**.

II-2-2-e-L'étude de la fraction F17

La fraction F17 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 3/1 avec deux éluions, donnant le produits F17-4 (3,4 mg) que nous reportons sous le code **B6** et le produit F17-6, noté **B7**.

II-2-2-f-L'étude de la fraction F23

Cette fraction a été soumise à une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 2/1, donnant le produit F23-1 (2,1 mg) noté **B8**.

L'organigramme de séparation de ces huit produits isolés de la phase chloroforme de *Crotalaria vialattei* Batt. est représenté dans la figure II-4.

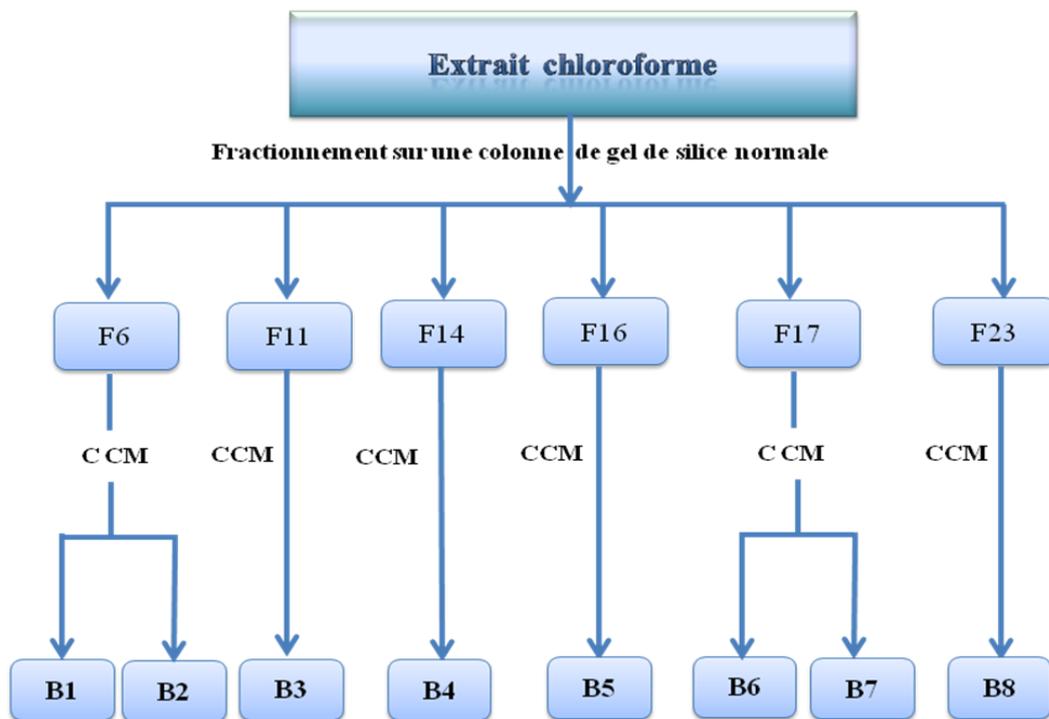


Figure II-4 : Récapitulatif des étapes de séparation des composés isolés de l'extrait chloroforme de *Crotalaria vialattei* Batt.

II-2-3- Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

La séparation sur colonne a débuté par une recherche sur plaques analytiques de gel de silice 60, du meilleur système d'éluion. Les tests effectués ont montré que la meilleure séparation est obtenue avec le système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}$) dans les proportions (8/2).

Ainsi, cette étude a débuté sur une colonne de gel de silice préparée dans le dichlorométhane où environ 11,5 g de l'extrait acétate d'éthyle y ont été déposés.

L'éluion a été faite par le dichlorométhane enrichi progressivement d'acétone et un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'acide sulfurique et chauffées à 100 °C pendant 3 min. Les pots de même composition sont

rassemblés, on obtient ainsi 84 fractions, le tableau II- 6 rassemble les résultats de ce fractionnement.

Tableau II-6 : Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Crotalaria vialattei* Batt. sur colonne de gel de silice normale.

Les fractions	Les los (50 ml)	Système d'éluion		Observations	Les masses (mg)
		CH ₂ Cl ₂ %	Me ₂ CO %		
F1	1-28			/	/
F2	29-40	100	0	Des traces	0,11
F3	41-50	98	2	Des traces	0,09
F4	51-61			Des traces	0,45
F5	62-73	97	3	Mélange séparable avec une quantité faible	7,13
F6	74-80			//	18,87
F7	81-88			//	8,20
F8	89-99	96	4	//	4,39
F9	100-115			//	37,13
F10	116-121			//	10,45
F11	122-130			//	6,07
F12	131-140	95	5	//	17,96
F13	141-155			//	20,94
F14	156-161			//	15,28
F15	162-171			//	23,63
F16	172-181	92	8	//	14,29
F17	182-192			//	19,03
F18	193-204			//	5,43
F19	205-210			//	4,97
F20	211-222	90	10	//	5,00
F21	223-230			//	3,75
F22	231-240			//	2,87
F23	241-250	85	15	//	15,09
F24	251-260			//	14,22
F25	261-270			//	33,26
F26	271-282			//	45,87
F27	283-292			//	66,00

F28	293-300	80	20	//	84,26
F29	301-322			Mélange séparable	104,40
F30	323-331			Mélange séparable	110,23
F31	332-340	78	22	//	99,01
F32	341-350			//	102,91
F33	351-361			//	241,57
F34	362-375			//	307,11
F35	376-382			//	512,07
F36	383-401	75	25	//	120,42
F37	402-420			//	345,11
F38	421-461			Mélange séparable de quatre produits majoritaires	364,41
F39	462-471	72	28	Mélange séparable	124,58
F40	472-491			//	546,47
F41	492-520	70	30	Mélange séparable de quatre produits	87,39
F42	521-531			Mélange séparable	103,06
F43	532-545			//	87,94
F44	546-557			//	324,45
F45	558-561			//	240,41
F46	562-571			//	141,13
F47	572-588			//	84,88
F48	589-599			//	87,51
F49	600-618			//	68,44
F50	619-630			65	35
F51	631-644	//	107,49		
F52	645-657	//	75,98		
F53	658-672	//	45,47		
F54	673-680	//	57,42		
F55	681-691	//	67,77		
F56	692-710	//	172,09		
F57	711-722	62	38	//	132,71
F58	723-751			//	250,12
F59	752-770			Mélange séparable	177,27
F60	771-788	60	40	//	96,79
F61	789-796			//	123,48
F62	797-809	55	45	//	94,75
F63	810-830			Mélange séparable avec un produit majoritaire //	231,44

F64	831-844			//	100,93
F65	885-899	45	55	//	185,11
F66	900-911			//	91,70
F67	912-923	30	70	//	188,03
F68	924-931			//	201,47
F69	932-941	25	75	//	66,47
F70	942-950			//	172,62
F71	951-966	10	90	//	135,14
F72	967-975			//	64,39
F73	976-989	5	95	//	64,21
F74	990-1004			//	82,40
F75	1005-1014			//	63,78
F76	1015-1031	2	98	//	197,33
F77	1032-1046			//	45,47
F78	1047-1054			//	63,11
F79	1055-1071	1	99	//	126,48
F80	1072-1088			//	133,58
F81	1089-1099			//	37,57
F82	1100-1115	0	100	//	169,05
F83	1116-1132			//	702,76
F84	1133-1166			Mélange complexe	1031,13

Les fractions concernées par notre étude sont choisies soit pour leur simplicité, soit pour leur poids important. Il s'agit des fractions F9, F38, F41, F62, F70, F73.

II-2-3-a-L'étude de la fraction F9

Montrant une tache intense par rapport aux autres taches après analyse sur plaque CCM, la fraction F9 a été soumise à une purification par CCM sur gel de silice normale avec le système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$, (9:1, v/v ; deux éluions), menant à l'obtention du composé C1 sous forme de précipité blanc soluble dans le chloroforme (4,0 mg).

II-2-3-b-L'étude de la fraction F38

La fraction F38 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice normale en utilisant comme système éluant : hexane/ether diéthylique dans les proportions respectives

(1:2 ; trois éluions successives). Les plaques sont contrôlées sous UV pour séparer 4 bandes intenses. Après filtration et concentration sous vide les produits sont récupérés dans le méthanol et testés sur plaques analytiques dans différents systèmes avec différentes proportions, ces tests nous ont permis de confirmer qu'ils sont purs. Il s'agit des composés **C2**, **C3**, **C4** et **C5**.

II-2-3-c-L'étude de la fraction F41

La fraction F41 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions (1:3 ; deux éluions). La séparation de cette fraction a permis d'obtenir les produits F41-1, F41-2, F41-3 et F41-4. Nous n'avons pu nous intéresser qu'au produit F41-3 noté **C6** (4,1 mg), vu les quantités faibles obtenues des autres bandes.

II-2-3-d-L'étude de la fraction F62

La fraction F62 de masse 94,75 mg a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice normale en utilisant comme système éluant : hexane/éther diéthylique dans les proportions respectives (1:3). Après trois éluions successives, les plaques sont contrôlées sous UV pour séparer 3 bandes. Vu les quantités faibles des 2 premières bandes, nous n'avons pu nous intéresser qu'au produit F62-3 (5,0 mg) noté **C7**. Ce produit est encore testé sur plaque analytique de gel de silice 60 dans différents systèmes. Ces tests nous ont permis de confirmer que ce produit est pur.

II-2-3-e-L'étude de la fraction F70

La fraction F70 a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 éluées par le système hexane/éther diéthylique dans les proportions 1/4 ; deux éluions, donnant le produit **C8** (4,3 mg).

II-2-3-f-L'étude de la fraction F73

La fraction F73 contient un précipité blanc, que nous avons filtré et purifié après plusieurs lavages par chloroforme, c'est le composé **C9** (6,7 mg).

La figure II-5 résume les travaux chromatographiques effectués sur l'extrait acétate d'éthyle de *Crotalaria vialattei* Batt.

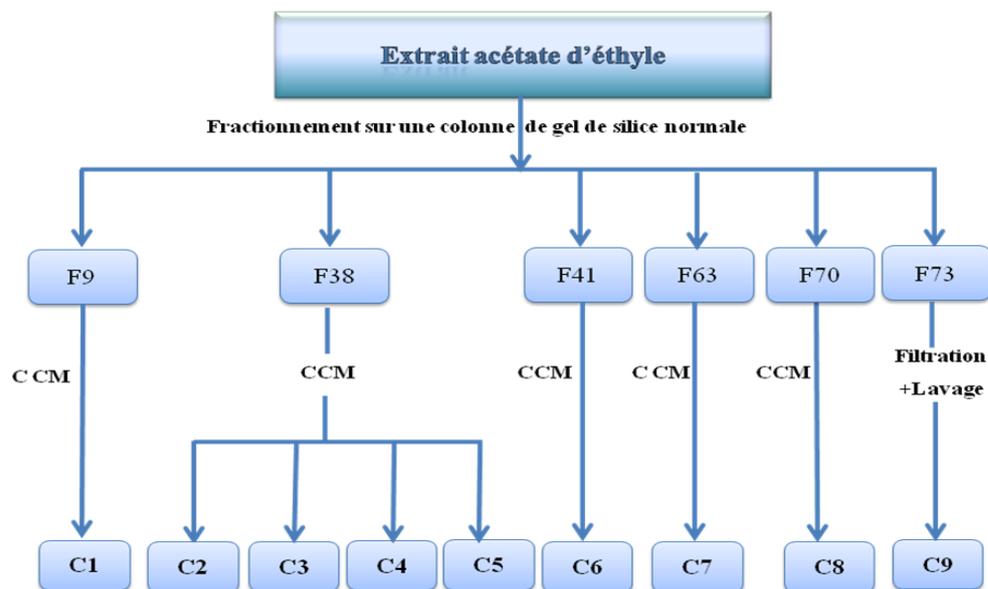


Figure II-5 : Récapitulatif des étapes de séparation des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle de *Crotalaria vialattei* Batt.

II-3-Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes issues des colonnes de gel de silice 60, de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) et des phases chloroforme et acétate d'éthyle de *Crotalaria vialattei* Batt. a mené à la séparation et la purification de **25 produits**. Tous ces produits ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et discussions de ces analyses seront développés au chapitre III.

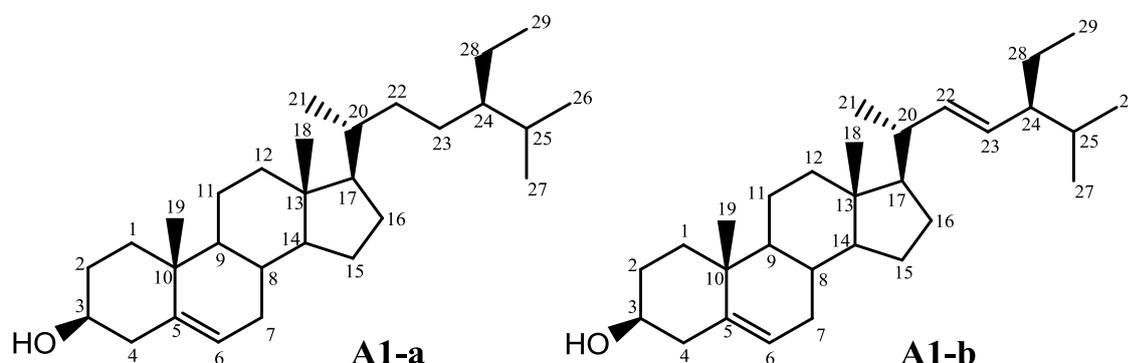
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE III

III-1- Identification des produits isolés de *Asteriscus graveolens*

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, diffraction de rayons X et par comparaison avec les données de la littérature.

III-1-1- Elucidation structurale du composé A1 (A1-a et A-1b)



Le composé **A1** est un mélange de deux produits **A1-a** et **A1-b**, il a été isolé à partir de la phase chloroforme sous-forme des cristaux (aiguilles blanches) de la fraction F1, ce mélange absorbe peu sous UV à 254 nm et à 365 nm. La première analyse a été réalisée par le test de Liebermann-Burchard relatif à la mise en évidence des stérols et des triterpènes. En effet, après addition de CHCl_3 et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore a viré brutalement au vert attestant la présence d'un stérol [1].

Le spectre RMN du proton ^1H enregistré dans le CDCl_3 (Spectre III-1) présente des signaux allant de 0,60 à 5,4 ppm. On peut distinguer une série de pics très denses dans l'intervalle 0,60 ppm à 2,30 ppm. Ceci suppose la présence d'un nombre élevé de groupements méthyles, méthylènes et méthynes (CH_3 , CH_2 et CH) dans le squelette carboné de la molécule. Ce spectre est caractéristique des dérivés stéroïdiques.

Dans la région éthylénique du spectre RMN ^1H (Spectre III-1) on relève un multiplet résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm caractéristique du proton géminé à un groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 des stérols et un signal sous forme de doublet large à $\delta_{\text{H}} = 5,27$ ($J = 6,4$ Hz)

d'intégration similaire à celle du H-3, attribuable au proton oléfinique H-6 des stérols. Par ailleurs on observe deux doublets de doublets à $\delta_H = 5,10$ ppm ($J = 15,1$ Hz, $J = 8,5$ Hz) et à $\delta_H = 4,95$ 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 III-1), montre que si H-3 et H-6 ont une intégrale d'environ 1,4 chacun, H-22 et H-23 donnent une intégrale d'environ 1,60 (les deux protons ensemble). Cette observation oriente vers la présence d'un mélange de β -sitostérol (composé **A1-a**, figure III-1) [2,3] et de son correspondant déshydrogéné en positions C-22 et C-23, le **stigmastérol** (composé **A1-b**, figure III-1) [3,4]. Un dosage par RMN ^1H Permet de conclure que cet échantillon renferme environ 57 % de **stigmastérol** et 43 % de β -sitostérol dans ce mélange.

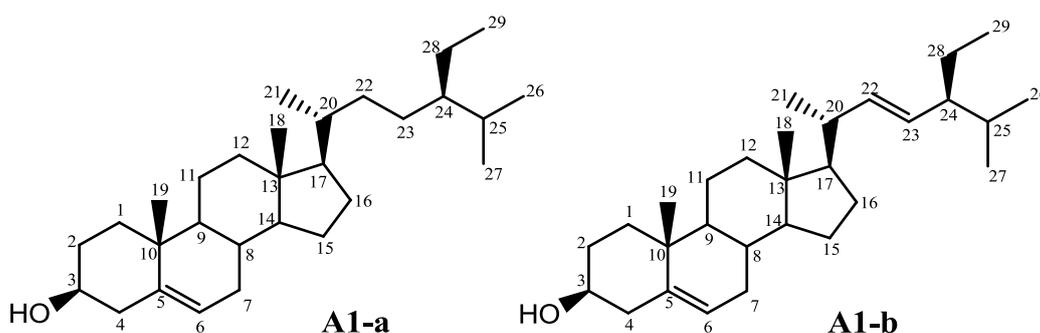
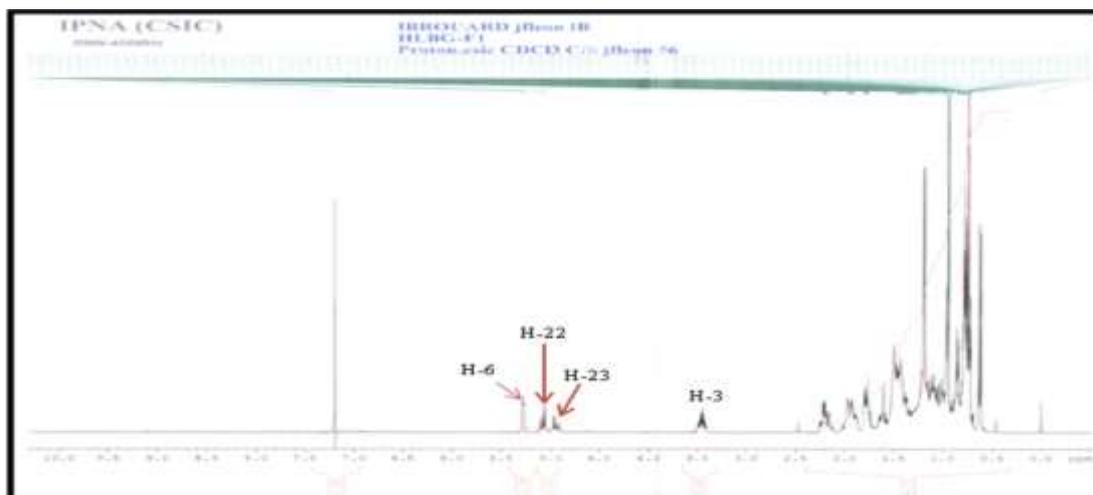


Figure III-1 : Structure du β -sitostérol **A1-a** et stigmastérol **A1-b**



Spectre III-1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange **A1**.

En étudiant le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-2) de ce composé on s'aperçoit que la plupart des signaux sont dédoublés, confirmant la présence de deux composés de structures très proches en mélange.

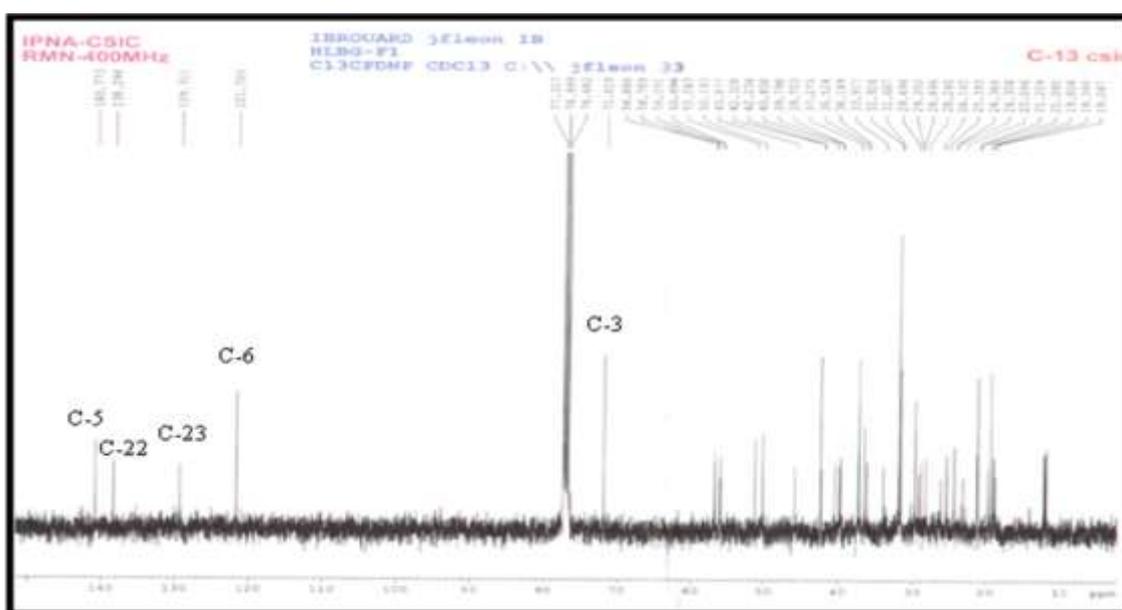
Le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-2) et ses étalements (Spectre III-3, Spectre III-4) confirme la présence de la double liaison trisubstituée par les signaux à $\delta=121,70$ ppm, relatif à un carbone éthylénique quaternaire C-6 et à $\delta=140,77$ ppm relatif à un CH éthylénique C-5, ainsi que la présence d'une autre double liaison de configuration *trans* comportant deux CH éthyléniques à $\delta=138,30$ ppm et $\delta=129,31$ ppm attribuables respectivement au C-22 et C-23. Le même spectre montre aussi la présence d'un CH oxygéné à $\delta=71,81$ ppm relatif à C-3 portant la fonction alcool.

Des mélanges de ces deux produits ont été isolés de nombreuses espèces végétales notamment de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) et *Rubus suavissimus* [5,6].

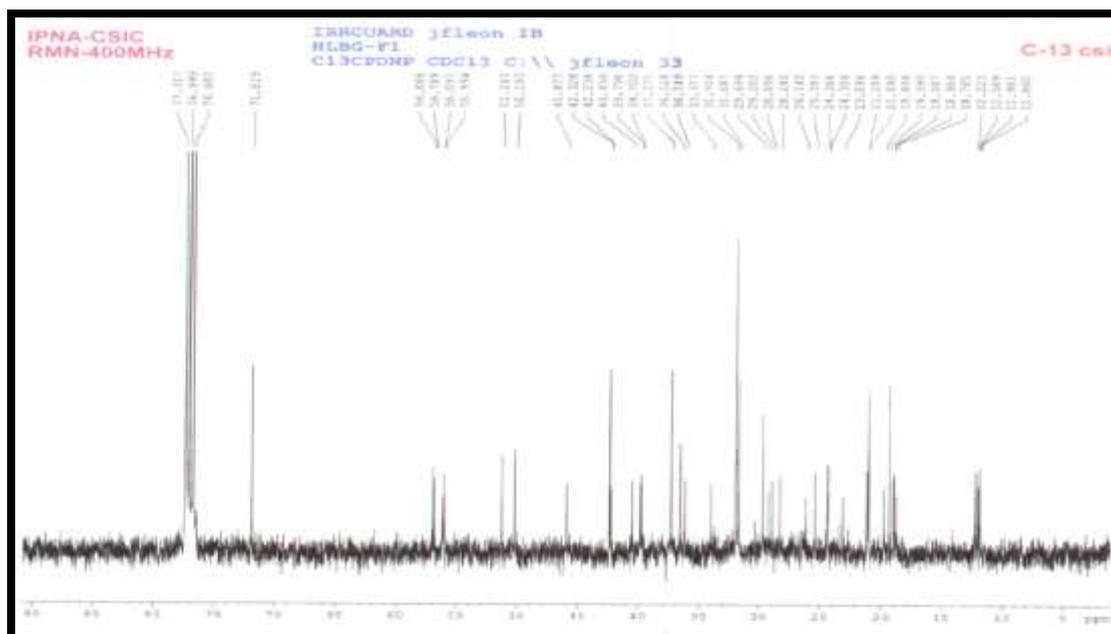
Le β -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés immunomodulatrice, anti-inflammatoire, hypocholestérolémiante, anthelminthique et antimutagène [7-11] et anti-oxydante [12]. Ce composé a été isolé auparavant du genre *Asteriscus* (*Asteriscus maritimus* (L.) Less (Asteraceae) [13].

De même, le stigmastérol est également très connu pour ses nombreuses propriétés biologiques et pharmacologique [14-20], il a été isolé du genre *Asteriscus* notamment *Asteriscus graveolens* subsp. *Stenophyllus* et *Asteriscus schultzi* [21].

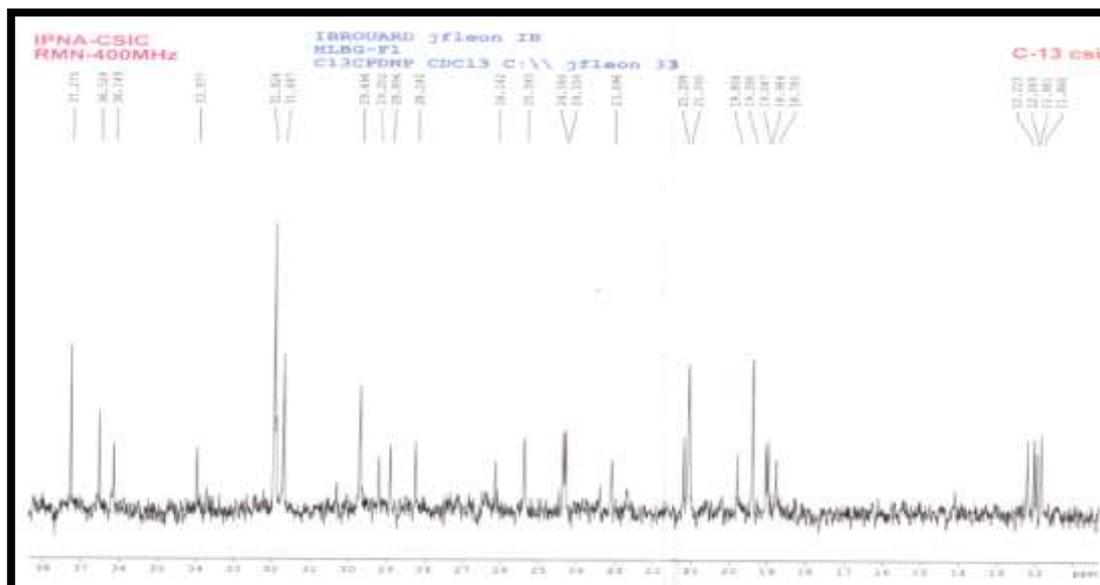
Mais le mélange de ces deux produits est cité à notre connaissance pour la première fois dans l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.).



Spectre III-2: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1

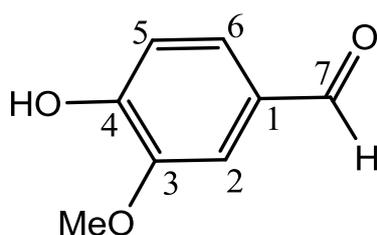


Spectre III-3 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1 (Etalement1)



Spectre III-4: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du mélange A1 (Etalement 2)

III-1-2- Elucidation structurale du composé A2



A2

L'analyse du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode impact électronique (HR-SMIE) du composé **A2** (Spectre III-5 et tableau III-1) du pic moléculaire comme pic de base (100%) à $m/z = 152,0688$ correspondant à la formule brute $C_8H_8O_3$ pour cette molécule qui doit par conséquent comporter cinq insaturations. Ce même spectre montre un ion à $m/z = 151,0359$ (91,32 %) et un autre à $m/z = 123,0445$ (14,05 %), ces deux fragments correspondant à la perte d'un H et du radical COH[•] indiquant la formation des ions $[M-1]^+$ et $[M-29]^+$ sont caractéristiques d'un groupement formyle dans cette molécule.



Spectre III-5 : Spectre SMIE du composé **A2**

Tableau III-1: Données du spectre HR-ESIMS du composé **A2**

Spectrum Report

Data File: C:\MassSpec\Default\profdata\131016-Francisco (FB 3-3) E/I 70 ev Temp F 250 C 09-Dec-2010 13:11:05

Scan: 63 (1.071)

Process: C:\DCM\2. 90.00, 011/ Sm Sm, 2x1.00

Function: Magnet (50.000) L1+

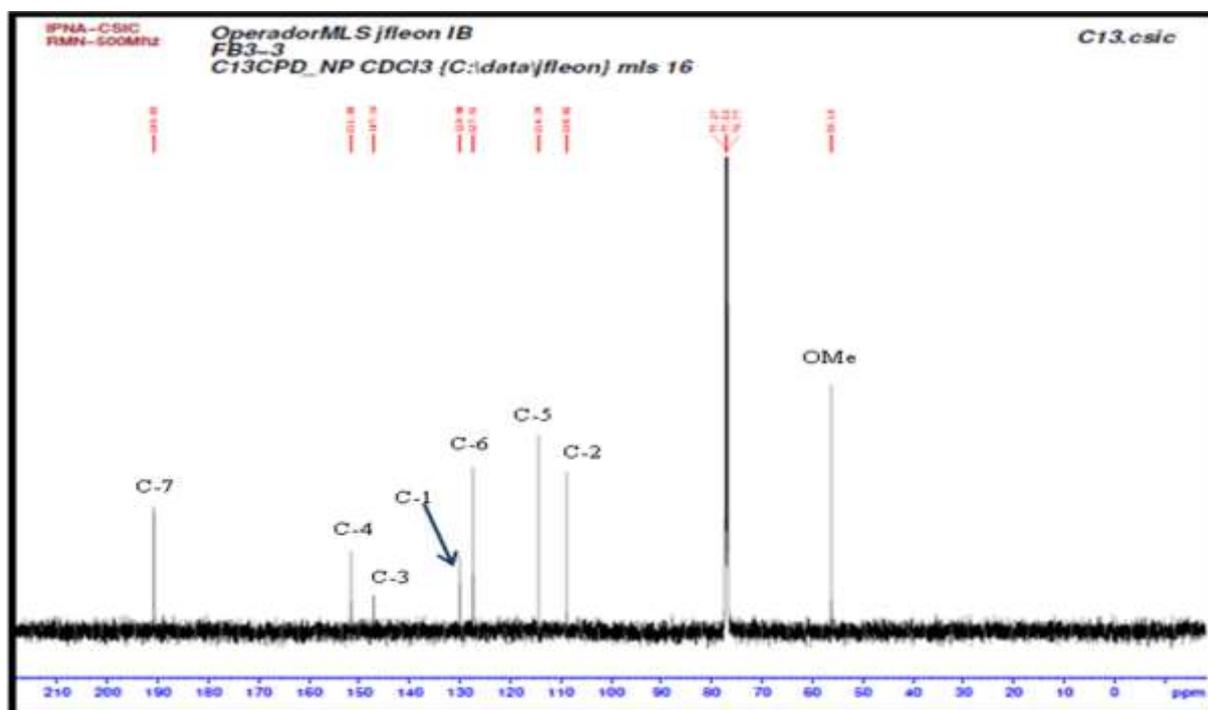
Description: Francisco (FB 3-3) E/I 70 ev Temp F 250 C

Printed: Thu Dec 09 13:11:01 2010

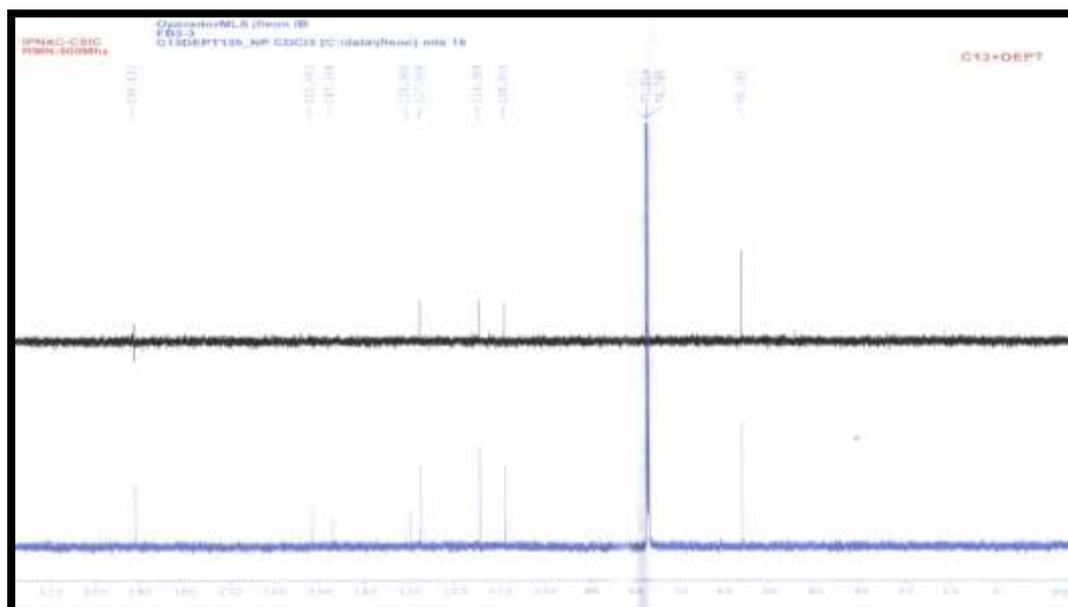
No	Mass	SP2	No	Mass	SP2	IS	Mass	SP2
17	51.0293	24.16	301	91.0446	1.81	681	152.0688	1.00
21	52.0347	16.39	331	92.0225	1.89	691	152.0688	100.00
31	53.0242	6.43	321	93.0220	2.08	611	151.0359	91.32
41	53.0597	9.63	331	95.0435	4.41	621	154.0455	1.10
51	54.0381	3.23	341	97.0137	1.07			
61	55.0482	4.44	351	107.0833	1.29			
71	55.0759	1.82	341	108.0047	6.29			
81	55.0870	1.24	371	109.0349	24.72			
91	57.0367	1.61	381	110.0227	2.03			
101	61.0267	2.62	391	110.0387	1.09			
111	62.0362	4.04	401	121.0342	1.31			
121	63.0375	6.49	411	122.0509	1.14			
131	64.0294	1.91	421	123.0445	14.05			
141	65.0398	6.47	431	123.0685	24.05			
151	66.0358	1.66	441	123.0817	19.20			
161	66.0555	3.37	451	128.0459	2.44			
171	67.0427	3.41	461	128.0661	2.29			
181	68.0433	1.46	471	135.0831	1.43			
191	69.0499	1.19	481	135.1079	1.24			
201	69.0627	1.69	491	136.0273	2.36			
211	74.0370	1.22	501	137.0132	6.61			
221	75.0348	1.67	511	150.1060	1.40			
231	77.0296	1.53	521	150.1142	1.46			
241	79.0372	7.15	531	150.4121	1.00			
251	79.0447	1.10	541	150.4396	1.05			
261	80.0305	4.80	551	150.4484	1.04			
271	81.0308	35.37	561	150.4332	1.04			
281	82.0411	2.92	571	150.4734	1.03			
291	91.0193	1.38	581	151.0359	91.32			

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-6), confirme la présence de 8 atomes de carbones dont 1 carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 190,84$ ppm attribuable sans ambiguïté à la fonction aldéhyde. Ce spectre montre également des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique trisubstitué d'après les données du spectre DEPT 135° (Spectre III-7) qui montre en effet la présence de 3 groupements CH à $\delta_{\text{C}} = 108,82$; $114,40$ et $127,51$ ppm. On relève ainsi la présence de 3 carbones quaternaires aromatiques à $\delta_{\text{C}} = 129,98$; $147,17$ et $151,68$ ppm. Il apparaît clairement d'après les valeurs des déplacements chimiques que les deux derniers carbones quaternaires sont oxygénés.

Les spectres RMN ^{13}C (Spectre III-6) et DEPT 135° (Spectre III-7) montrent un signal à $\delta_{\text{C}} = 56,16$ ppm attribuable à un groupement méthoxyle, comme tous les carbones de la molécule sont tous consommés il est évident que ce méthoxyle constitue un des substituants de noyau aromatique, il en est de même pour le groupement formyle précédemment signalé. La combinaison de l'ensemble de ces résultats additionnés à ceux de la spectrométrie de masse permet de déduire un groupement hydroxyle comme un 3^{ème} substituant sur ce noyau aromatique.

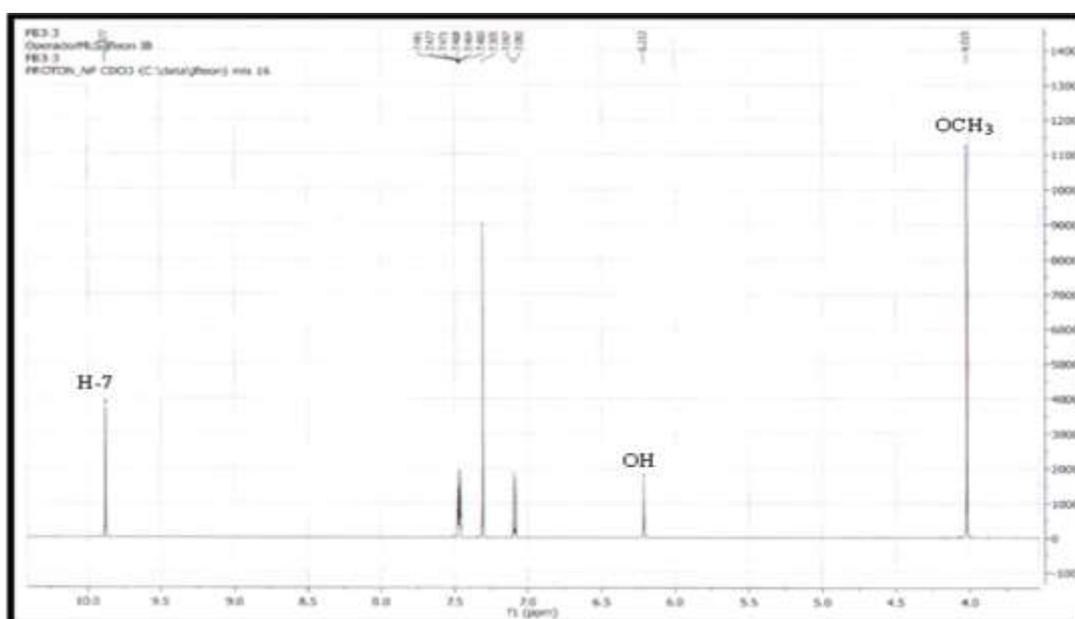


Spectre III-6 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A2



Spectre III-7 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A2**

En effet l'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-8) permet de relever un signal sous forme de singulet large d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,19$ ppm que nous attribuons à ce groupement hydroxyle vu l'absence de corrélation entre son proton et les carbones de la molécule sur le spectre HSQC (Spectre III-10).

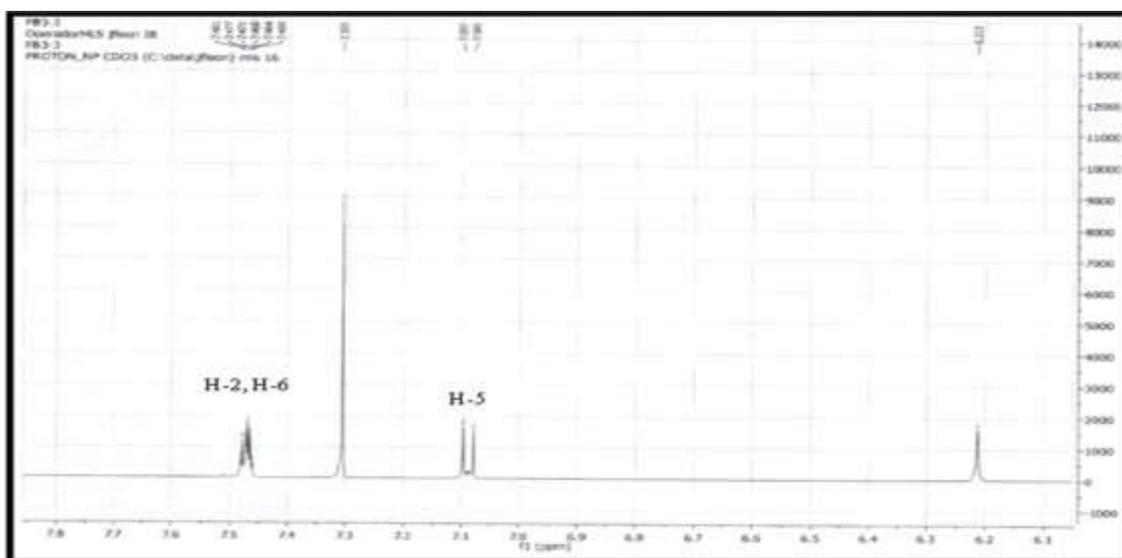


Spectre III-8 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A2**

L'analyse du spectre RMN ^1H (Spectre III-8), et son étalement (Spectre III-9), permet de placer les trois substituants dans les positions C-1, C-3 et C-4 grâce à la multiplicité des signaux du spectre. En effet, on relève :

- ✓ Un signal d'intégration 2H composé de : un doublet à $\delta_{\text{H}} = 7,46$ ppm ($J = 1,6$ Hz), que nous pouvons attribuer au proton H-2 et d'un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 7,46$ ppm ($J = 8,5 ; 1,8$ Hz) que nous pouvons attribuer au H-6.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,09$ ($J = 8,5$ Hz) ppm attribuable à H-5.

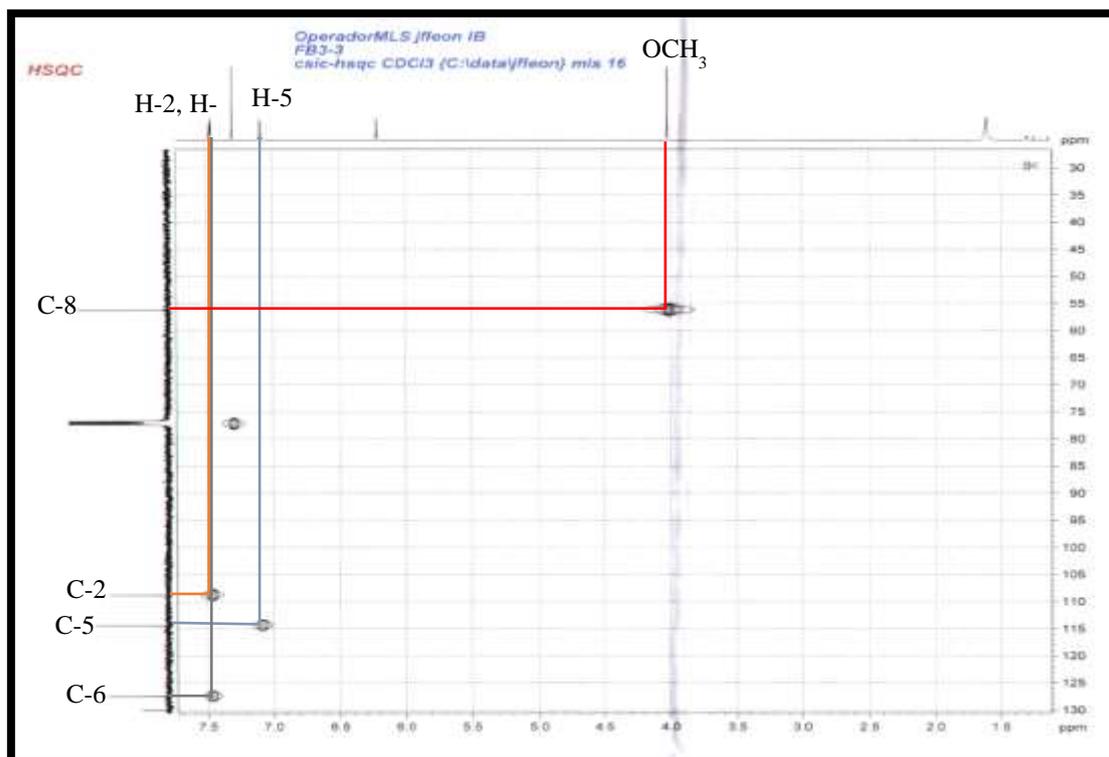
Ce spectre comporte également le signal à $\delta_{\text{H}} = 9,88$ ppm caractéristique du groupe formyle et le singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 4,02$ ppm du groupement méthoxyle (OCH_3) précédemment signalé.



Spectre III-9 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A2** (Etalement)

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre III-10) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondant ainsi :

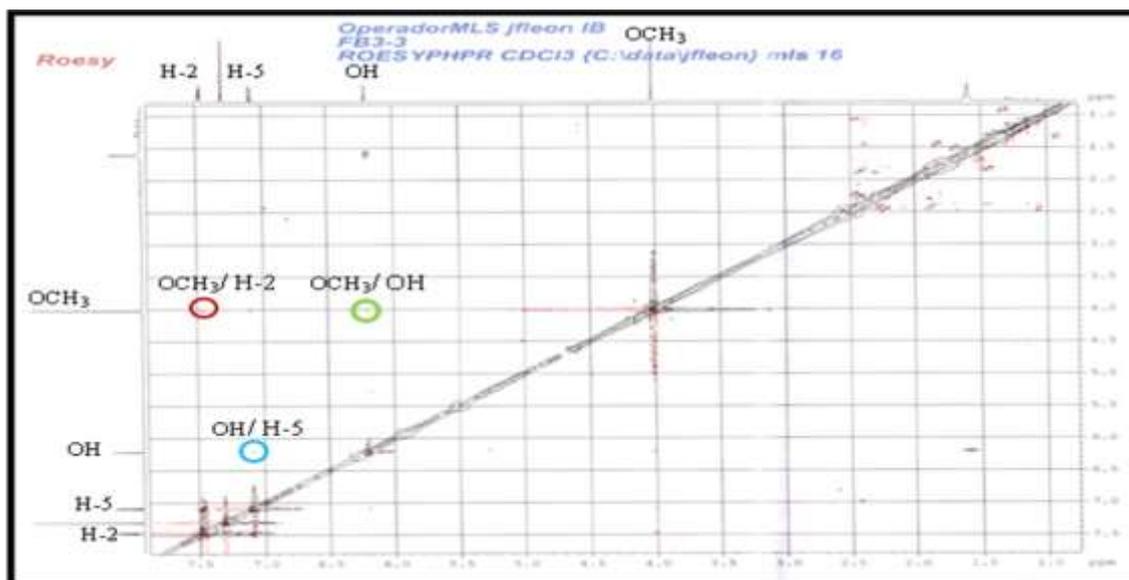
- ✓ Le H-5 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 115,82$ ppm à l'atome de carbone C-5.
- ✓ Le H-6 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 128,06$ ppm à l'atome de carbone C-6.
- ✓ Le H-2 permet l'attribution du signal à $\delta_{\text{C}} = 110,53$ ppm à l'atome de carbone 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.



Spectre III-10 : Spectre HSQC (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A2**

Vu cette analyse de cette molécule, il est évident qu'il s'agit d'un benzaldéhyde substitué par un groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle. L'emplacement de ces trois substituants à leurs positions respectives grâce à l'analyse du spectre ROESY (Spectre III-11), sur lequel on observe :

- ✓ Une tâche corrélation entre les protons du méthoxyle et celui du hydroxyle indiquant que ces deux substituants sont voisins, ce qui permet alors de positionner le groupement formyle (son carbone est numéroté C-7) en C-1.
- ✓ Une tâche de corrélation entre le proton de l'hydroxyle et le proton H-5, indiquant sans ambiguïté que cet hydroxyle est en C-4. Ceci est d'ailleurs confirmé par la tâche corrélation relevé entre H-2 et les protons du méthoxyle.



Spectre III-11: Spectre ROESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A2**

La combinaison de l'ensemble de ces résultats mène au **4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde** connu sous le nom de **vanilline** (Figure III-2) [22-24]. Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Asteriscus graveolens subsp. Stenophyllus* [21].

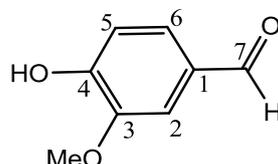


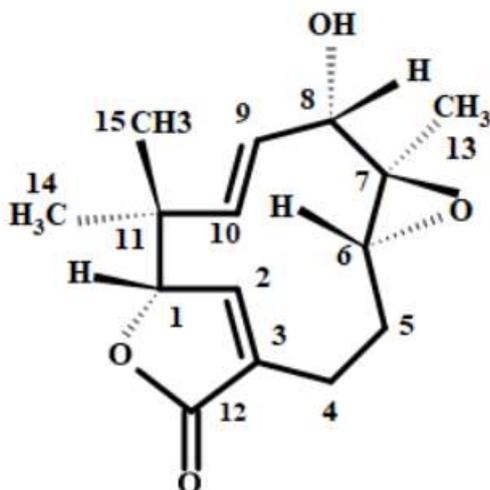
Figure III-2 : Structure finale du composé **A2**, la **vanilline**

Les données de la RMN ^1H et ^{13}C en accord avec celles de la littérature sont rassemblées dans le tableau III- 2.

Tableau III-2 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **A2**

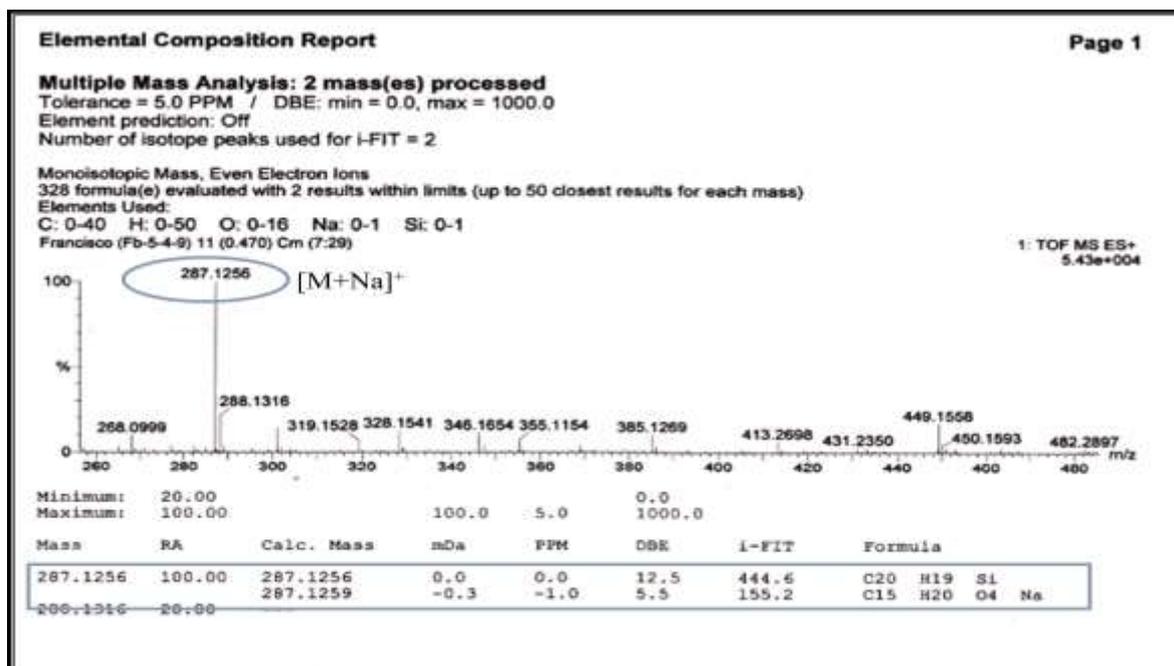
Position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	129,98	-	-	-	-
2	108,82	7,46	1H	d	1,6
3	147,17	-	-	-	-
4	151,68	-	-	-	-
5	114,40	7,09	1H	d	8,5
s	127,06	7,46	1H	dd	8,5 ; 1,8
7	190,84	9,88	1H	s	-
OMe-3	56,16	4,02	3H	s	-

III-1-3- Elucidation structurale du composé A3



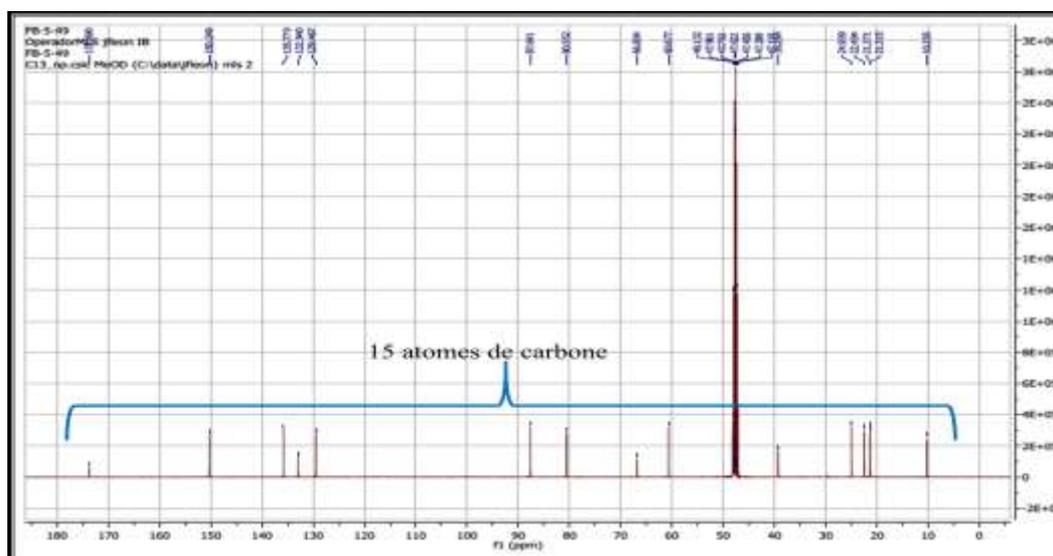
A3

Le spectre de masse à haute résolution avec ionisation par électrospray en mode positif [TOF-HRESI-MS(+)] de ce composé (Spectre III-12), indique un pic quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 287,1256$ Th correspondant à la formule $C_{15}H_{20}O_4Na$ (calculée 287,1259), indiquant une formule brute $C_{15}H_{20}O_4$ pour cette molécule soit une structure de masse de 264 Da comportant six insaturations.



Spectre III-12: Spectre (TOF-HRESI-MS(+)) du composé A3

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-13) de ce composé met en évidence la présence des 15 atomes de carbone.



Spectre III-13 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**

L'examen simultané des spectres proton RMN ^1H (Spectre III-14), HSQC (Spectre III-15) et COSY (Spectre III-16) permet de relever la présence de deux groupements méthines éthyléniques vicinaux résonnant à $\delta_{\text{H}} = 5,12$ ppm (d ; $J = 16,1\text{Hz}$; $\delta_{\text{C}} = 137,20$ ppm) et à $\delta_{\text{H}} = 5,28$ ppm (dd ; ($J = 16,1$; $8,5$ Hz) ; $\delta_{\text{C}} = 130,84$ ppm). La valeur $16,1$ Hz de l'interaction de couplage de ces deux protons indique que ces deux méthines délimitent une double liaison de configuration *trans*. Quant à la multiplicité des signaux de ces deux protons, elle indique que le premier est substitué par un carbone quaternaire et le second par un groupement CH. Ces données permettent à ce stade de proposer la présence de l'entité-1, dans cette molécule (Figure III-3).

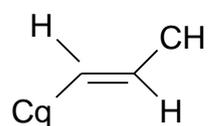
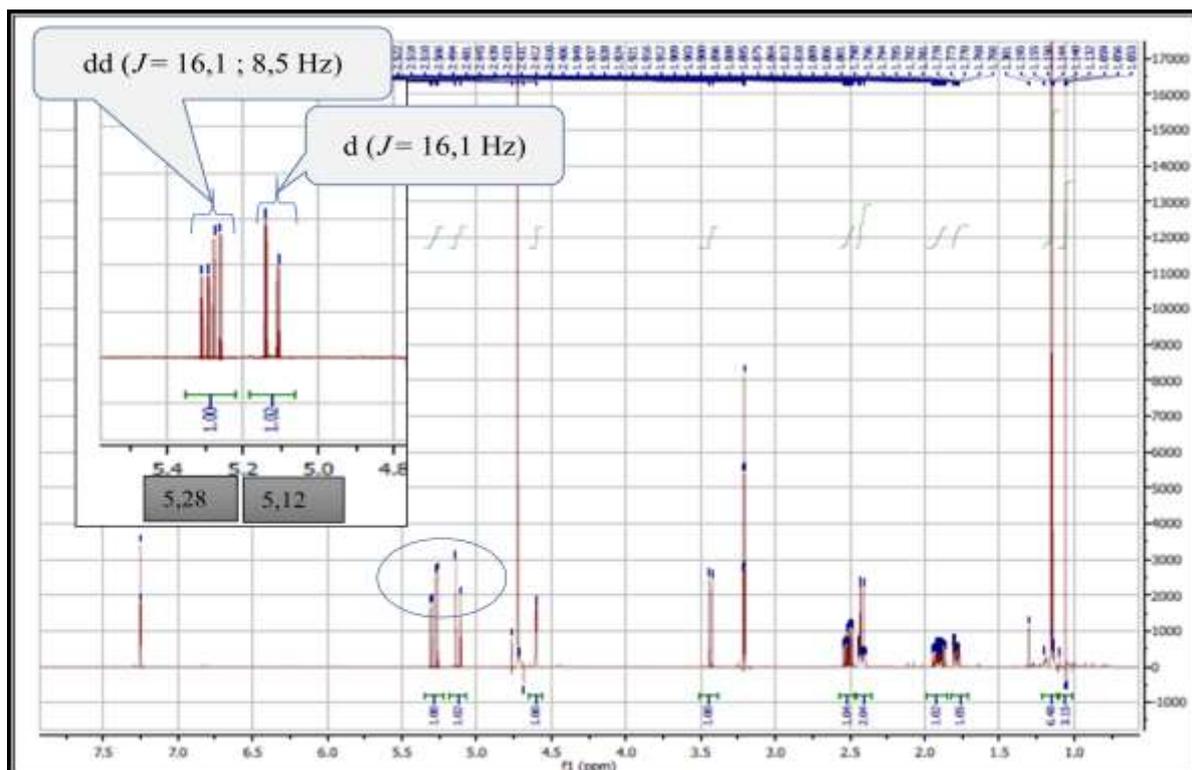
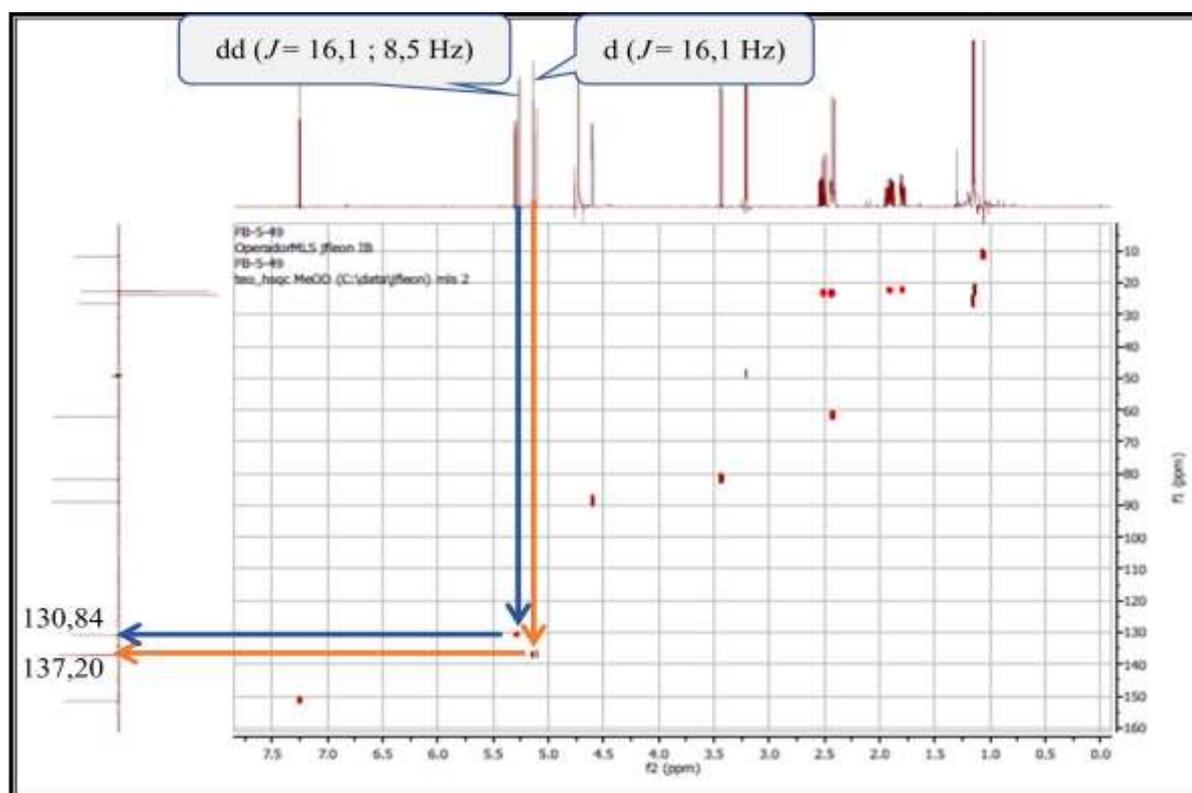


Figure III-3 : Entité-1 faisant partie de la structure du composé **A3**



Spectre III-14: Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**



Spectre III-15 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**

Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre III-16), le proton résonant à $\delta_{\text{H}} = 5,28$ ppm corrèle avec le proton d'un groupement méthine résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm (d ; J

= 8,5 Hz ; $\delta_C = 81,93$ ppm). Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur indiquent qu'il est oxygéné, quant à la multiplicité du signal « doublet » de ce proton, elle indique qu'il est voisin d'un carbone quaternaire. Ces données permettent d'avancer dans la recherche de la structure de notre composé et proposer la présence de l'entité-2 dans le composé **A3** (Figure III-4).

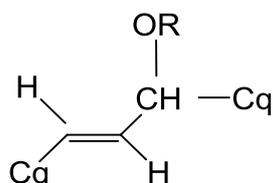
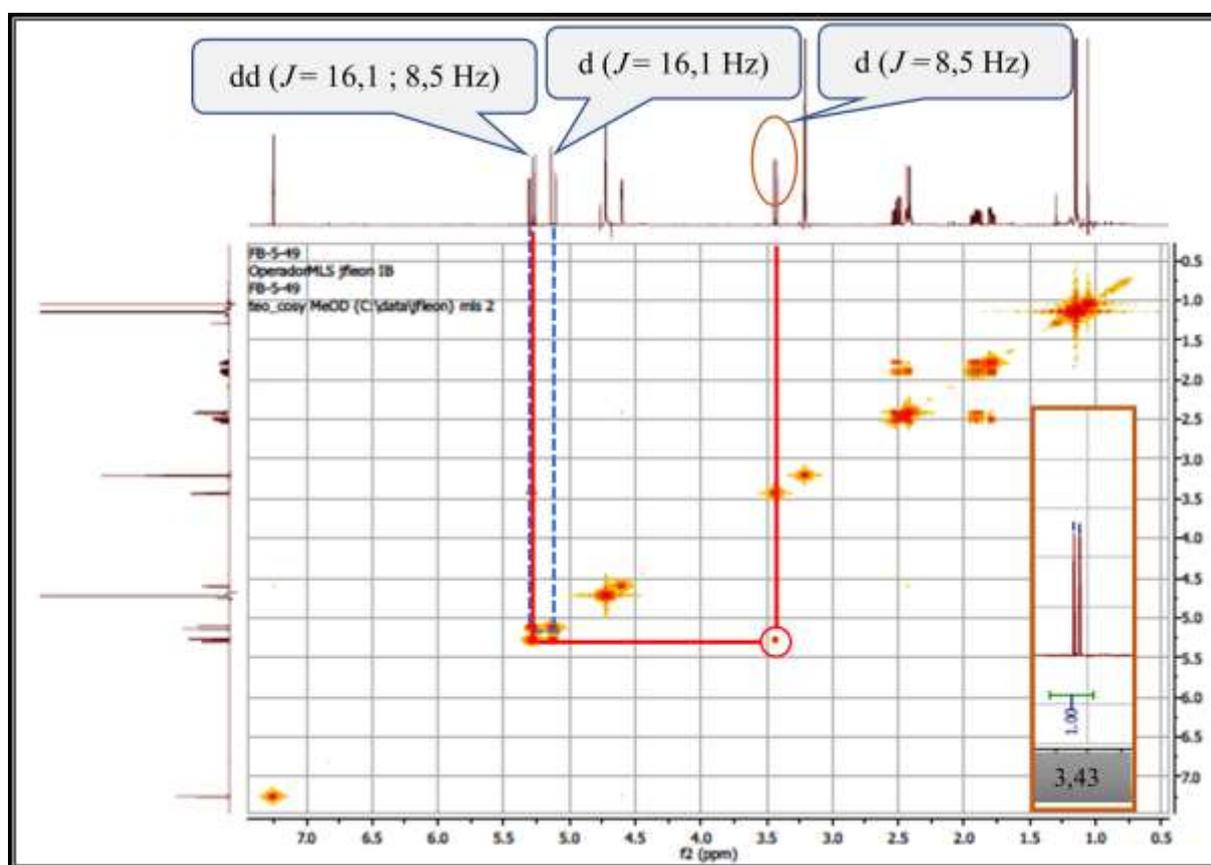


Figure III-4 : Entité-2 faisant partie de la structure du composé **A3**



Spectre III-16 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**

Sur le spectre HMBC (Spectre III-17) ce dernier proton ($\delta_H = 3,43$ ppm (d ; $J = 8,5$ Hz ; $\delta_C = 81,93$ ppm) montre une tache de corrélation avec le carbone d'un groupement méthyle [d'après le spectre DEPT 135° (Spectre III-18)] résonnant à $\delta_C = 11,63$ ppm ($\delta_H = 1,05$; singulet). Cette observation permet de placer ce méthyle sur le dernier carbone quaternaire

évoqué. La résonance de ce carbone quaternaire est relevée à $\delta_C = 68,20$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons de ce méthyle et le proton du méthine (précédemment évoqué) résonnant à $\delta_H = 3,43$ ppm, observées sur le spectre HMBC (Spectre III-17). Le déplacement chimique de ce carbone quaternaire lui confère un état d'hybridation sp^3 et une oxygénation. Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-17) ce proton ($\delta_H = 3,43$ ppm) montre une autre tache de corrélation avec le carbone d'un autre groupement méthine [d'après le spectre DEPT 90° (Spectre III-19)] résonnant à $\delta_C = 62,05$ ppm. Il est évident que cet autre groupement CH est lié au carbone quaternaire précédent (également porteur du groupement méthyle). Le spectre HSQC (Spectre III-15) permet la localisation du signal du proton de ce méthine à $\delta_H = 2,42$ (dd ; $J = 10,5 ; 1,1$ Hz). Ces données supplémentaires permettent de proposer la présence de l'entité-3 dans le composé **A3** (Figure III-5).

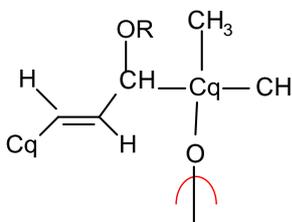
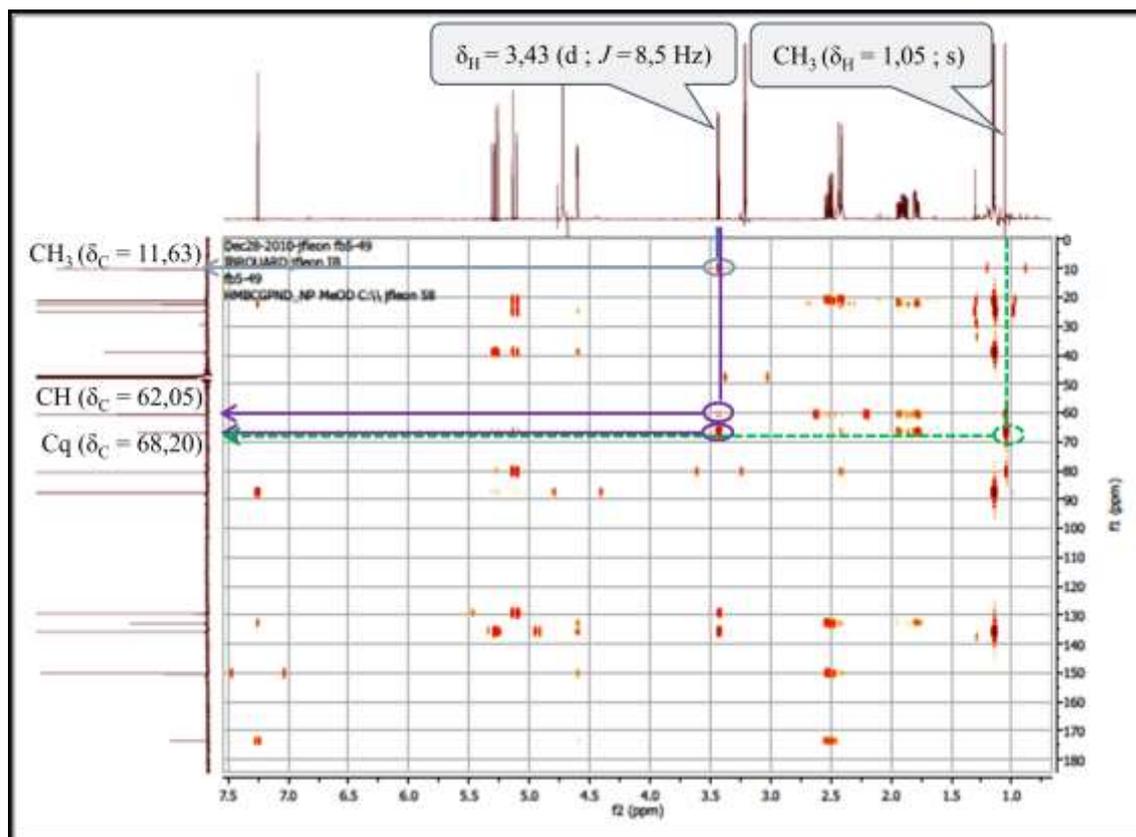
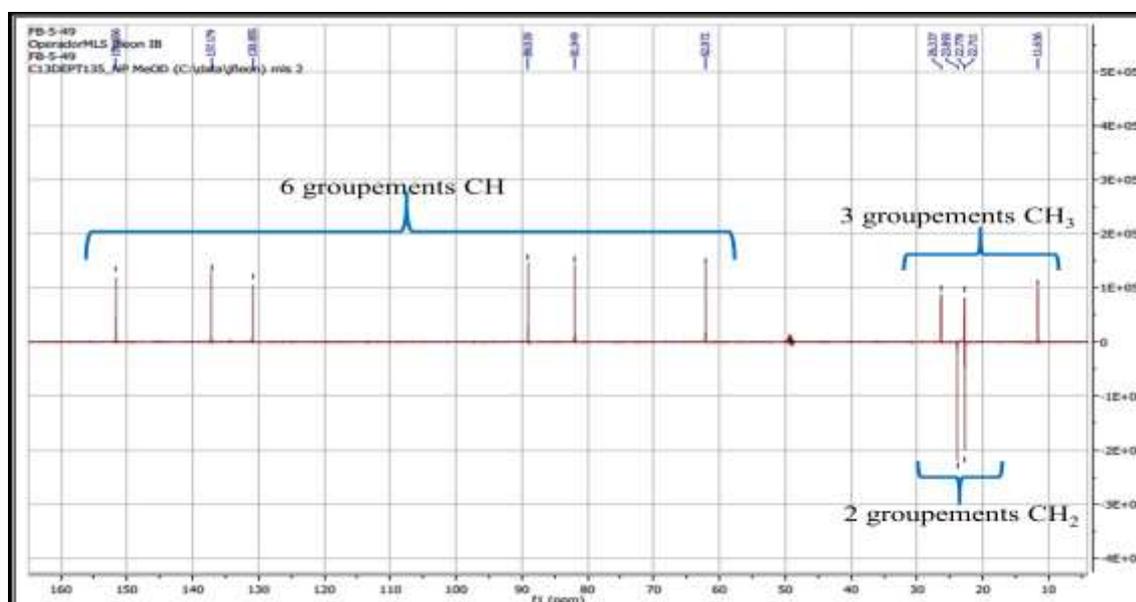


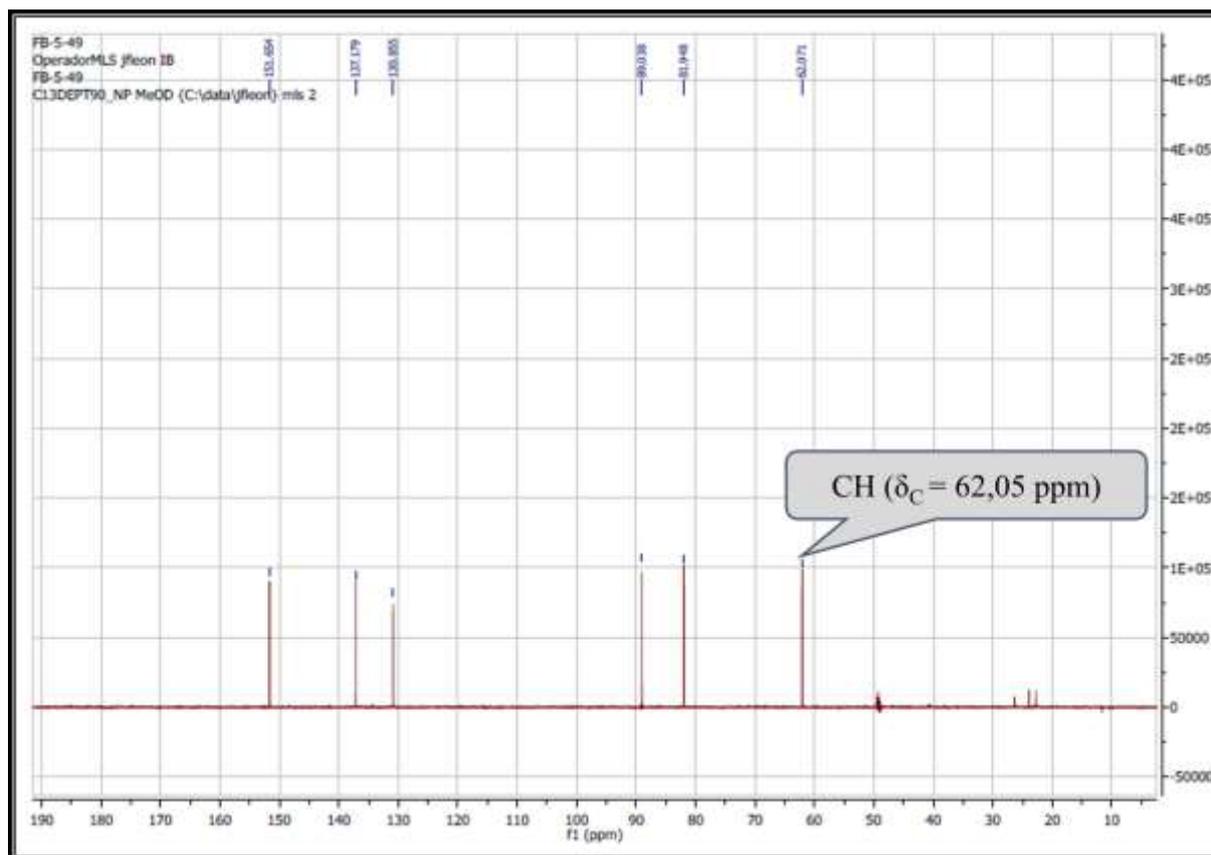
Figure III-5: Entité-3 faisant partie de la structure du composé **A3**



Spectre III-17 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3

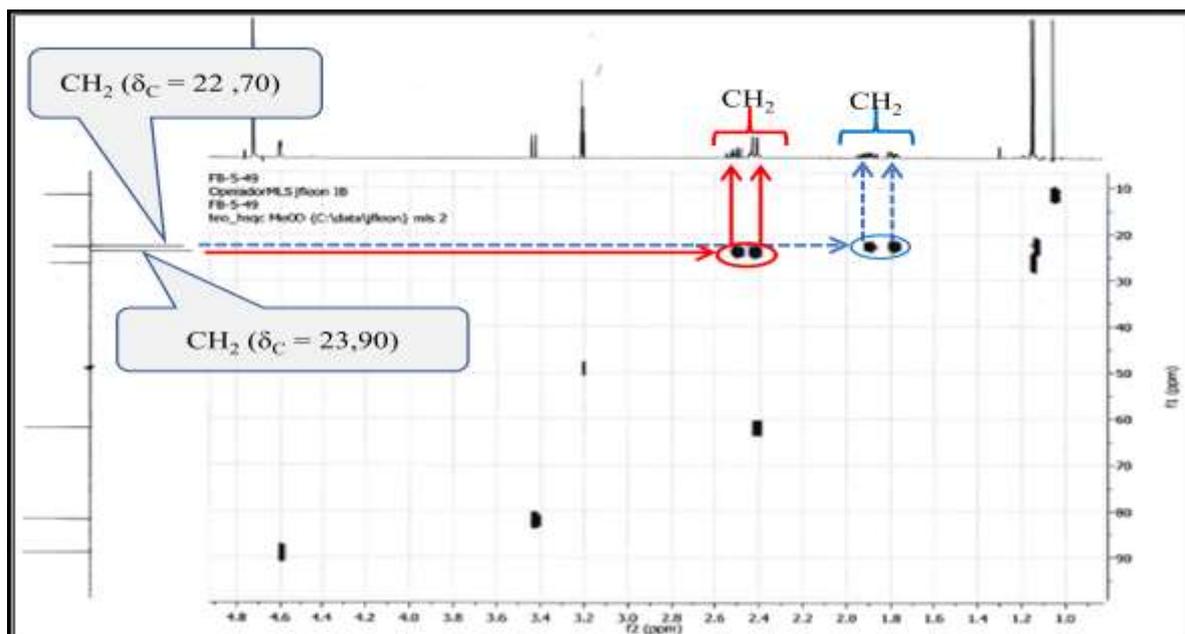


Spectre III-18 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3

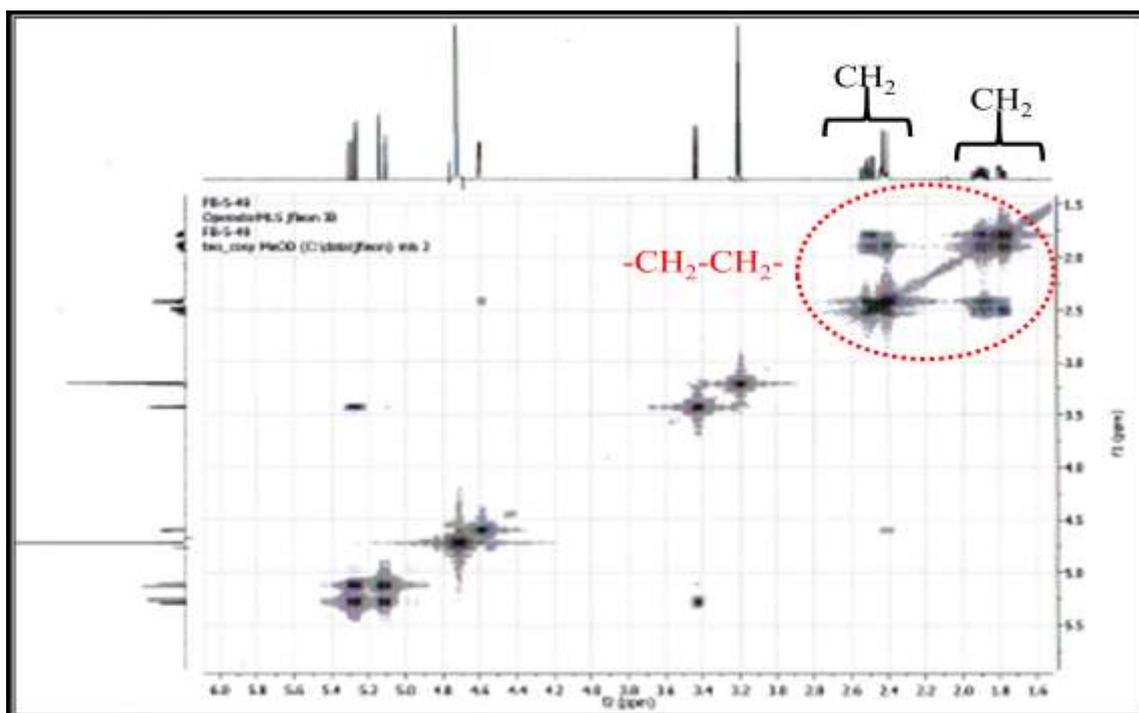


Spectre III-19: Spectre DEPT 90° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3**

Sur les spectre DEPT 135° (Spectre III-18) et HSQC (Spectre III-20), on relève la présence de deux groupements méthylènes dont les carbones résonnent à $\delta_C = 22,70$ et $\delta_C = 23,90$ ppm. Les protons du premier méthylène résonnent à $\delta_H = 1,79$ (multiplet) et $\delta_H = 1,90$ (multiplet) et ceux du second à $\delta_H = 2,40$ et $\delta_H = 2,50$ ppm, tous deux sous forme de mutiplets. Sur le spectre COSY (Spectre III-21), on relève en plus des couplages entre les protons géminés de chacun des deux méthylènes du fait de leur inéquivalence magnétique car protons diastéréotopiques, des couplages vicinaux entre les protons des deux méthylènes. Ces observations permettent de déduire la présence de l'enchaînement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ dans cette molécule.



Spectre III-20: Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3** (Etalement)



Spectre III-21: Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3** (Etalement)

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III-22), le carbone quaternaire et le carbone du groupement CH précédemment cités montrent des taches de corrélations avec les deux protons du premier groupement CH₂ (celui à $\delta_C = 22,70$ ppm, $\delta_H = 1,79 ; 1,90$ ppm), ce qui place l'enchaînement -CH₂-CH₂- en position vicinale par rapport à ce CH.

A ce stade de cette analyse, on peut avancer dans la structure de la molécule **A3** et proposer la présence de l'entité-4 dans ce composé (Figure III-6).

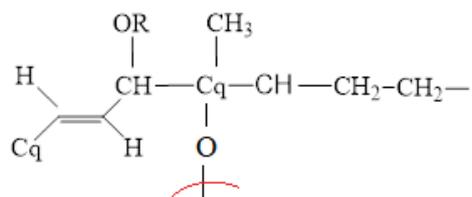
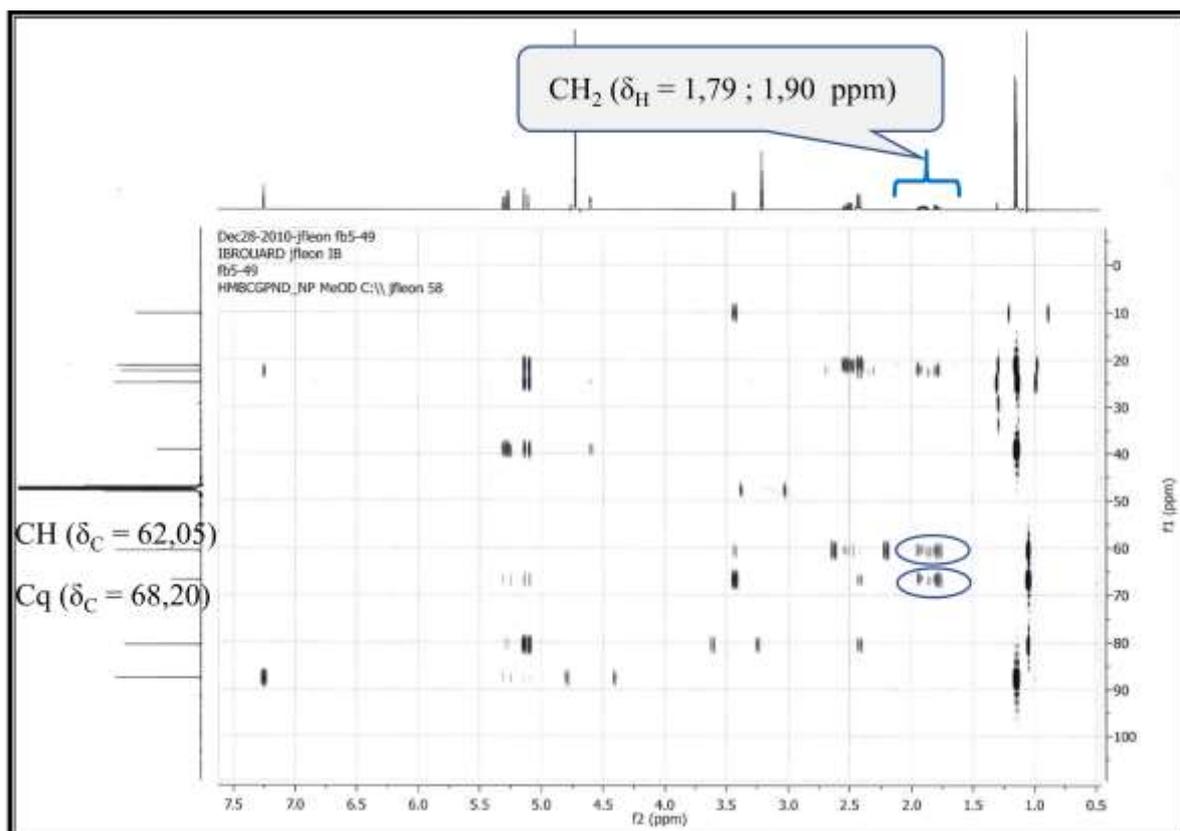


Figure III-6 : Entité-4 faisant partie de la structure du composé **A3**



Spectre III-22 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A3** (Etalement 1)

Par ailleurs, le spectre ^{13}C (Spectre III-13) montre la présence d'un carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_{\text{C}} = 134,31$ ppm et corrélant sur le spectre HMBC (Spectre III-23) à 1 proton de chaque groupement CH_2 de l'échainement $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ précédemment signalé. On relève également grâce aux spectres HSQC (Spectre III-15), DEPT 90° (Spectre III-19) et proton (Spectre III-14), la présence d'un troisième groupement CH éthylénique résonnant à $\delta_{\text{C}} = 151,62$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm ; t ; $J = 1,6$ Hz) dont le carbone corrèle sur le spectre HMBC (Spectre III-23) uniquement avec le proton du groupement CH_2 résonnant à $\delta_{\text{H}} 2,50$ ppm ; sur le même spectre (HMBC), le proton de ce CH éthylénique, montre une corrélation avec le carbone quaternaire éthylénique ($\delta_{\text{C}} = 134,31$). Ces observations indiquent à ce stade de notre

analyse, la présence d'une deuxième double liaison dans cette molécule, attachée au dernier CH_2 de la chaîne en cours d'établissement, par le biais du carbone quaternaire éthylénique. Ceci est amplement justifié et consolidé la valeur (1,6 Hz) de l'interaction de couplage entre le proton du CH éthylénique et les protons du groupement CH_2 ($\delta_{\text{H}} = 2,40 ; 2,50$ ppm) qui correspond à un couplage allylique et non pas vicinal.

Ces observations mènent à la présence de l'entité-5 dans notre molécule (Figure III-7).

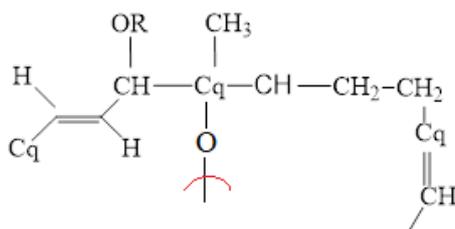
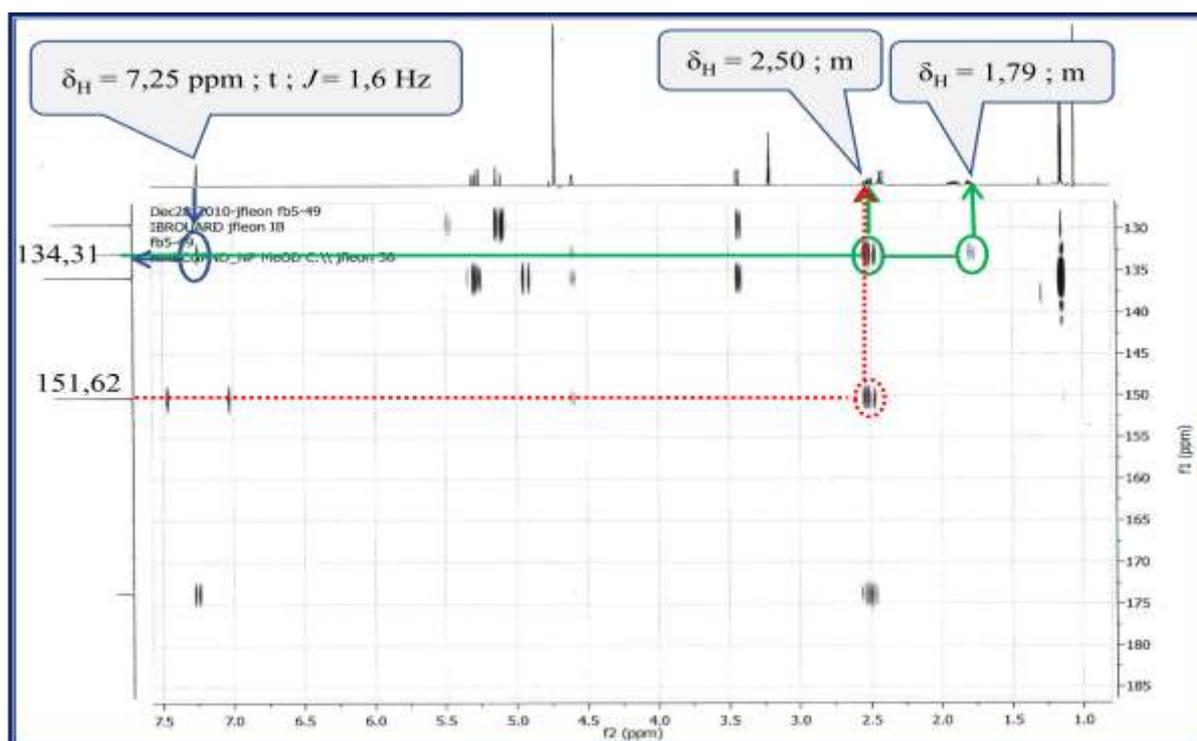


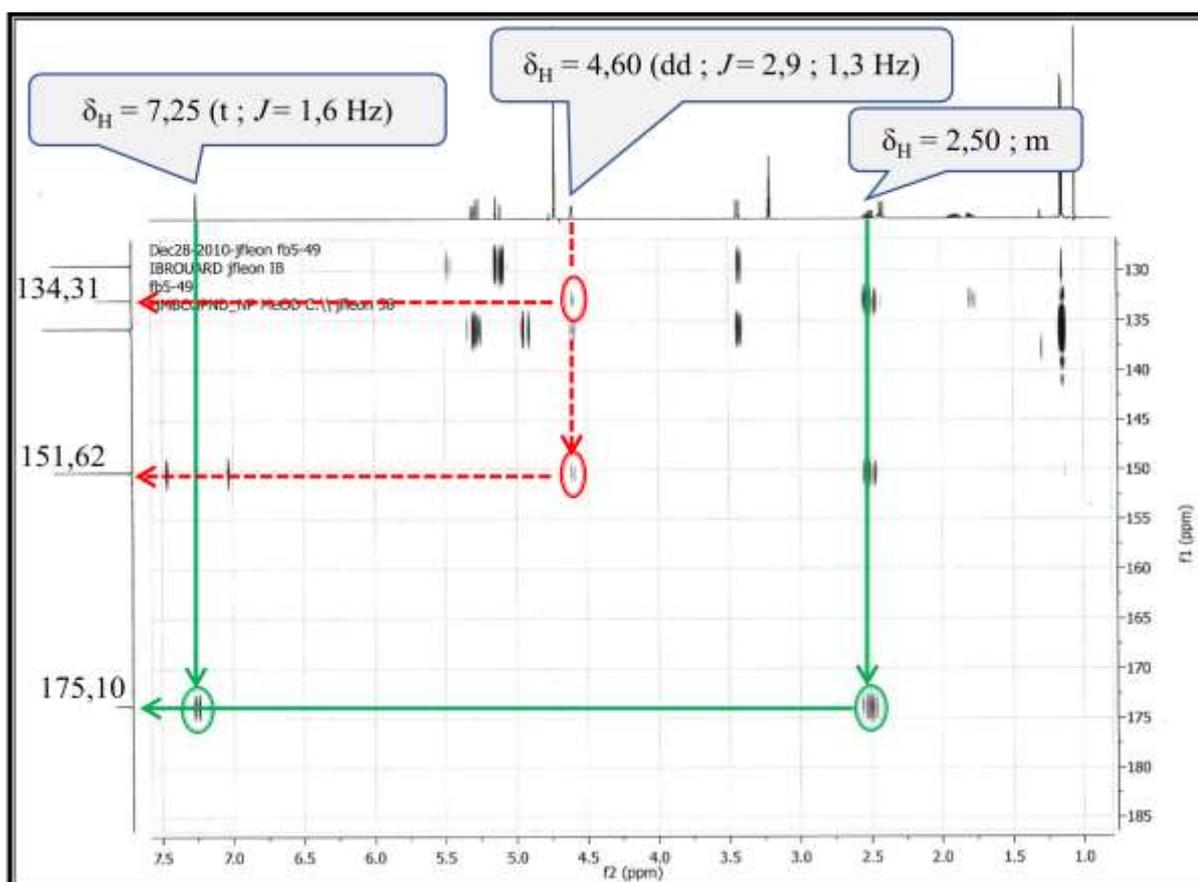
Figure III-7 : Entité-5 faisant partie de la structure du composé **A3**



Spectre III-23 : Spectre HMBC (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **A3** (Etalement 2)

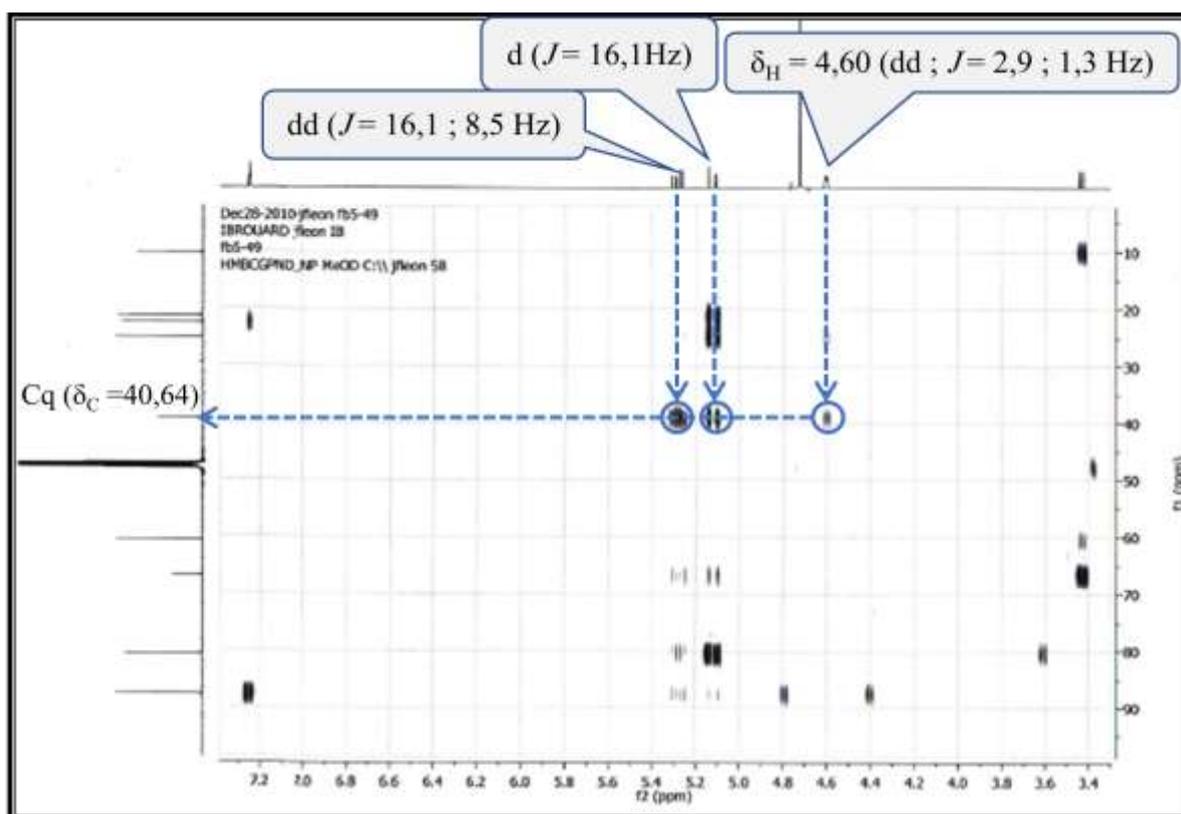
Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-23), le proton du groupement CH éthylénique précédemment évoqué résonnant à $\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm (t ; $J = 1,6$ Hz) et un des proton du groupement CH_2 (celui résonnant à $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm), montrent des taches de corrélation avec le carbone résonnant à $\delta_{\text{C}} = 175,10$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone

est caractéristique d'un carbonyle d'une δ -lactone sesquiterpénique α,β insaturée. Cette hypothèse est confortée par la présence d'un CH oxygéné résonnant à $\delta_{\text{H}} = 4,60$ ppm (dd ; $J = 2,9 ; 1,3$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 89,01$ ppm) dont la valeur du déplacement chimique de son carbone est caractéristique d'un méthine de fermeture d'une δ -lactone. L'attribution de ce dernier est également vérifiée par les corrélations observées entre ce proton et les carbones formant le cycle lactonique notamment le carbone du CH éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 151,62$ ppm et le carbone quaternaire éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 134,31$ ppm.



Spectre III-23: Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A3** (Etalement 2)

Un réexamen du spectre HMBC (Spectre III-24) , montre que le proton du CH de fermeture de la γ -lactone montre une tache de corrélation avec le carbone quaternaire résonnant à $\delta_{\text{C}} = 40,64$ ppm, qui à son tour, montre des tâches de corrélations nettes avec les protons éthyléniques résonnant, respectivement, dans le spectre RMN ^1H à $\delta_{\text{H}} = 5,12$ ppm (d ; $J = 16,1$ Hz) et à $\delta_{\text{H}} = 5,28$ ppm (dd ; $J = 16,1 ; 8,5$ Hz) et déjà signalés plus haut. Cette observation implique la présence d'une liaison entre ce CH et le carbone quaternaire placé en position vicinale par rapport à cette double liaison.



Spectre III-24 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A3** (Etalement 3)

Un réexamen des spectres à notre disposition, permet de relever la présence de deux groupements méthyles non encore attribués. Les signaux de ces deux méthyles apparaissent sous forme d'un singulet chacun à $\delta_{\text{H}} = 1,15$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 26,31$ ppm) et $\delta_{\text{H}} = 1,14$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 22,80$ ppm). Concernant ces deux méthyles, on relève sur le spectre HMBC (Spectre III-25) que les protons de l'un corrélient avec le carbone de l'autre et vice-vers-ça, cela suppose qu'ils sont portés tous les deux par le même carbone quaternaire. En effet, et toujours sur le spectre HMBC, les protons de ces deux méthyles corrélient avec le carbone quaternaire résonnant à $\delta_{\text{C}} = 40,64$ ppm et voisin du carbone de fermeture de cette lactone sesquiterpénique. Cette étude structurale mène à l'obtention d'une lactone sesquiterpénique dont le squelette sesquiterpénique est monocyclique et renferme onze chaînons. On note au passage que ce cycle renferme des doubles liaisons endocycliques mais pas de double liaison exocyclique. Ce type de squelette est connu sous le nom de squelette de type α -humulène. En adoptant la numérotation connue pour ce genre de squelette, nous pouvons proposer à ce stade de notre analyse la structure partielle reportée dans la figure III-8.

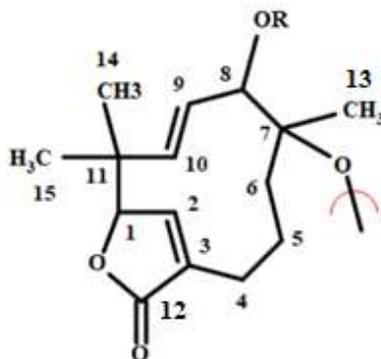
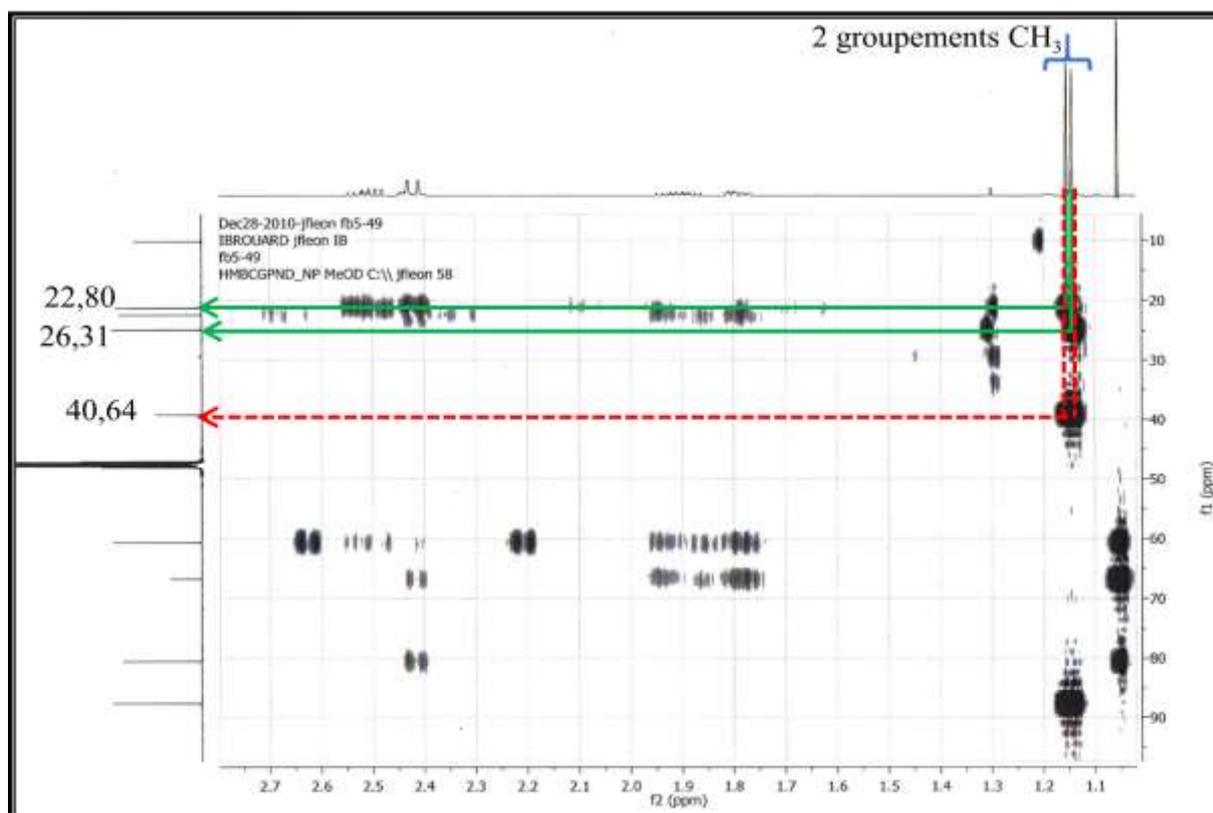


Figure III-8: Structure partielle du composé A3



Spectre III-25 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A3 (Etalement 4) Connaissant la formule brute de cette molécule ($C_{15}H_{20}O_4$), il est clair que le groupement OR en C-8 est un hydroxyle vu que tous les carbones et tous les oxygènes sont consommés. Par ailleurs, sachant que la position C-6 est un oxyméthine ($\delta_{C-6} = 62,05$ ppm), il est évident que nous avons une fonction époxyde entre C-6 et C-7. La présence de cette fonction époxyde complète le nombre de degrés d'insaturations (six) attendus dans cette molécule (Figure III-9).

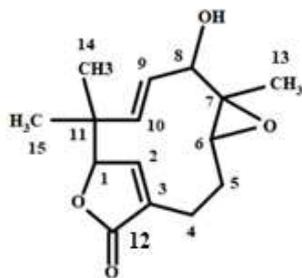
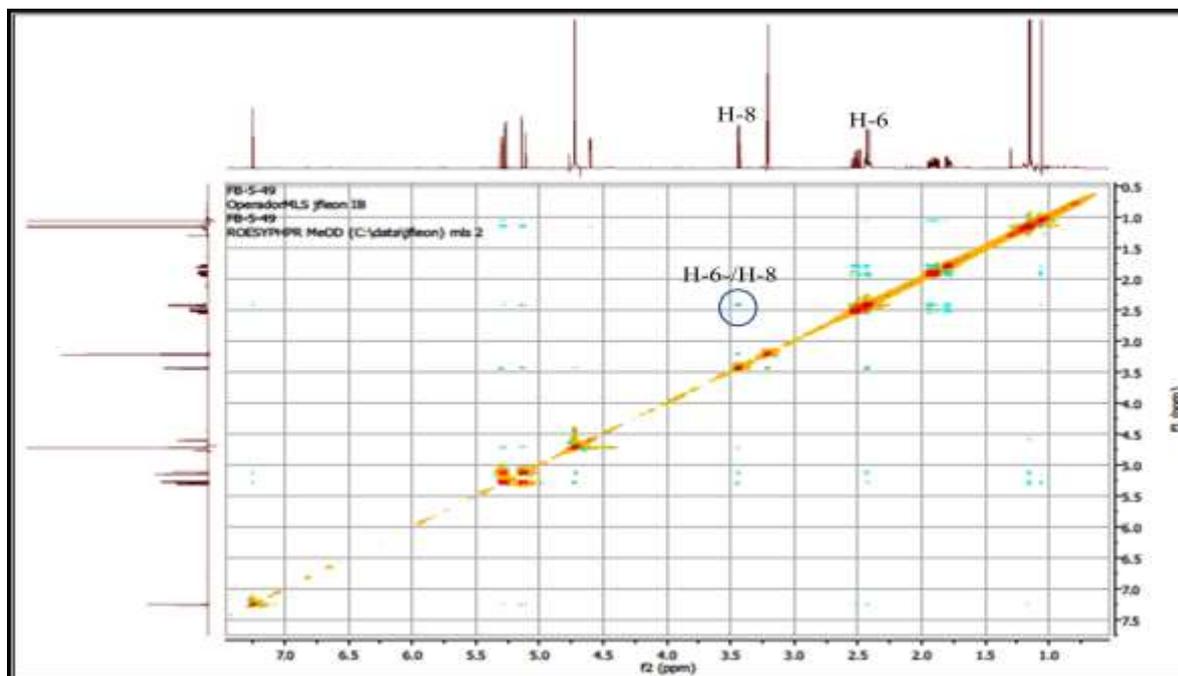


Figure III-9 : Structure plane du composé **A3**

Une étude stéréochimique complémentaire a été effectuée sur ce composé et a montré que la double liaison entre C-2 et C-3 est de configuration (*Z*), vu qu'elle est dans un cycle à 5 chaînons, par contre celle entre C-9 et C-10 admet une configuration (*E*), indiquée par la valeur de la constante de couplage (16,1 Hz) entre les protons H-9 et H-10 ceci d'une part. D'autre part, cette molécule renferme 4 centres asymétriques qui sont : C-1, C-6, C-7 et C-8. La stéréochimie relative a été déduite de l'analyse du spectre relatif à l'expérience ROESY (Spectre III-26) où l'on relève une corrélation entre H-8 et H-6 indiquant que ces deux noyaux sont orientés *cis*, nous les reportons β dans la suite de notre analyse. Par contre, on relève une absence de corrélation entre les protons du méthyle-13 et les protons H-6 ou H-8 en faveur d'une disposition *trans* de H₃-13/H-6 et H₃-13/H-8. Le CH₃ aura donc une orientation α dans notre représentation.



Spectre III-26 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A3**

Le pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule (a été mesuré avec un polarimètre de type PerkinElmer (modèle 341)) a donné : $[\alpha]_D^{21} = -138^\circ$ ($c = 0,018$ g/mL ; MeOH). Cela suppose que notre molécule est lévogyre (-). D'après des travaux bibliographiques effectués sur des molécules similaires notamment les asteriscunolides isolés pour la toute première fois par San Feliciano et al. de *Asteriscus aquaticus* [25-27] puis retrouvés plus tard dans différentes espèces appartenant aux deux genres synonymes *Asteriscus* et *Nauplius* [28-33], la valeur négative de la rotation optique est en accord avec la configuration (S) du centre chiral C-1. La stéréochimie, définie, de ce composé naturel a été comparée également avec les asteriscunolides synthétisés et décrits dans la littérature [34-37] qui ont fait l'objet, en particulier, d'études de synthèses stéréospécifiques. Sur la base de l'ensemble de ces données, on déduit une orientation β H-1. Ce produit est donc identifié comme :

(-)-(1S)-(2Z,9E) 8 α -hydroxy-6 α ,7 β -epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide. Cette molécule est nouvelle, nous l'avons reportée pour la première fois dans la littérature sous le nom de : (-)-asteriscunolide I qui n'était autre que la prochaine désignation consécutive dans cette nomenclature (Figure III-10) [38].

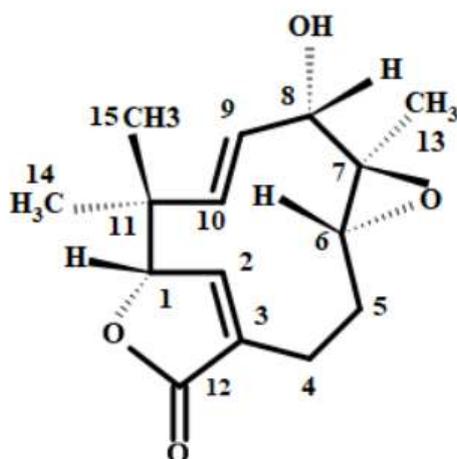


Figure III-10 : Structure finale du composé **A3**, **(-)-(1S)-(2Z,9E) 8 α -hydroxy-6 α ,7 β -epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide** ou **(-)-asteriscunolide I**

La structure du composé **A3** ainsi établie a été confirmée par une analyse de diffraction de rayons X (Figure III-11), est décrite pour la première fois dans la littérature .

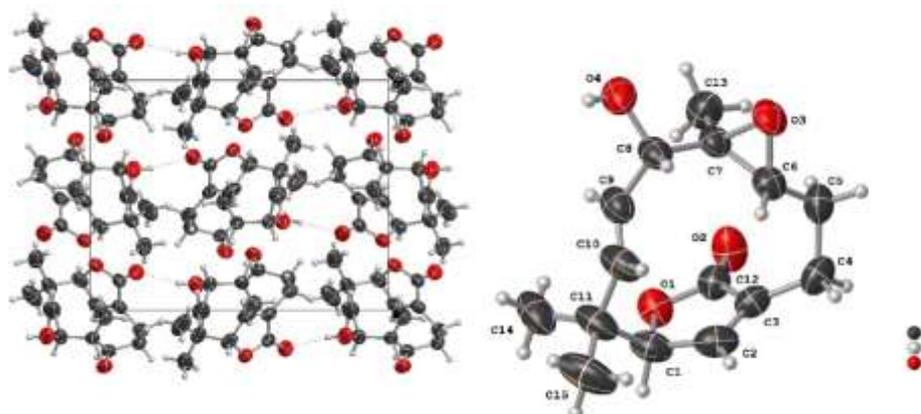


Figure III-11 : Structure du composé **A3** établie par diffraction de rayons X, (-)-(1S)-(2Z,9E) 8 α -hydroxy-6 α ,7 β -epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide ou (-)-asteriscunolide I

Dans cette étude, le monocristal a été collecté avec un Diffractomètre Rigaku, SuperNOVA avec rayons X microfocus utilisant la radiation Cu K α ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$). Le logiciel CrysAlisPro a été utilisé pour collecter, indexer, mettre à l'échelle et appliquer une correction d'absorption numérique basée sur l'intégration gaussienne sur un modèle cristallin à multiples facettes et correction d'absorption empirique utilisant des harmoniques sphériques, implémentées dans l'algorithme de mise à l'échelle SCALE3 ABSPACK dans CrysAlisPro. La structure a été résolue en appliquant le nouvel algorithme à double espace mis en œuvre dans le programme SHELXT. Le recyclage de Fourier et le raffinement des moindres carrés ont été utilisés pour la complétion du modèle avec SHELXL-2017. L'analyse géométrique des interactions dans la structure a été réalisée avec le programme OLEX2.

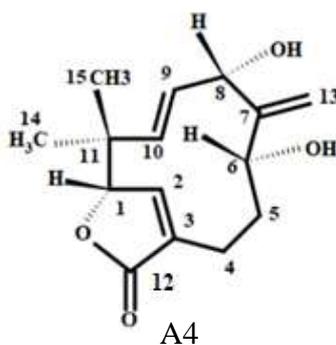
Les données cristallographiques des structures rapportées dans cette contribution ont été déposées auprès du « Cambridge Crystallographic Data Center » comme publication supplémentaire sous le numéro 1840628.

Toutes les données de la RMN ^1H et ^{13}C , de ce nouveau composé, sont reportées dans le tableau III-3.

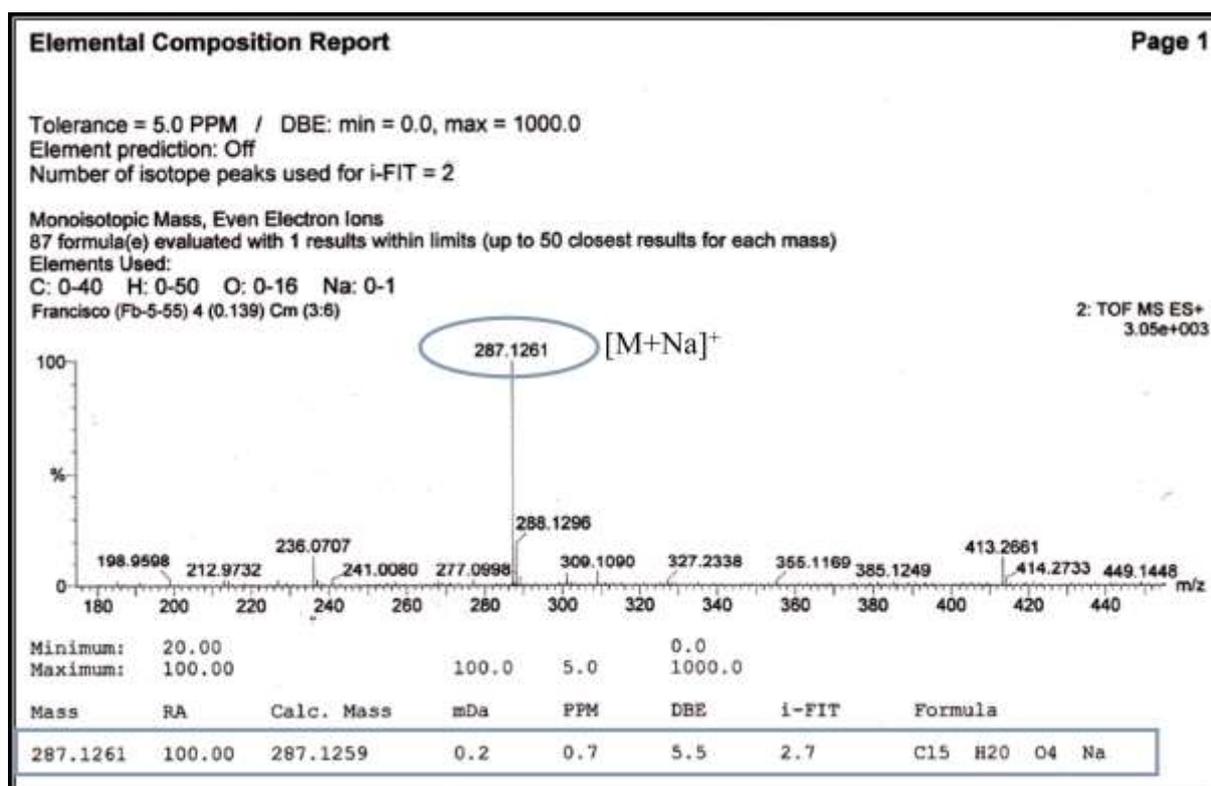
Tableau III-3 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 Mz, MeOH- d_4) ; ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4) du composé **A3**.

Position	δ_{C} DEPT	δ_{H} mult. (J , Hz)
1	89,01 (CH)	4,60 ; dd (2,9 ; 1,3)
2	151,62 (CH)	7,25 ; t (1,6)
3	134,31 (C)	/
4a	23,90 (CH ₂)	2,50 ; m
4b		2,40 ; m
5a	22,70 (CH ₂)	1,90 ; m
5b		1,79 ; m
6	62,05 (CH)	2,42 ; dd (10,5 ; 1,1)
7	68,20 (C)	/
8	81,93 (CH)	3,43 ; d (8,5)
9	130,84 (CH)	5,28 ; dd (16,1 ; 8,5)
10	137,20 (CH)	5,12 ; d (16,1)
11	40,64 (C)	/
12	175,10 (C)	/
13	11,63 (CH ₃)	1,05
14	26,31 (CH ₃)	1,15
15	22,80 (CH ₃)	1,14

III-1-4- Elucidation structurale du composé A4

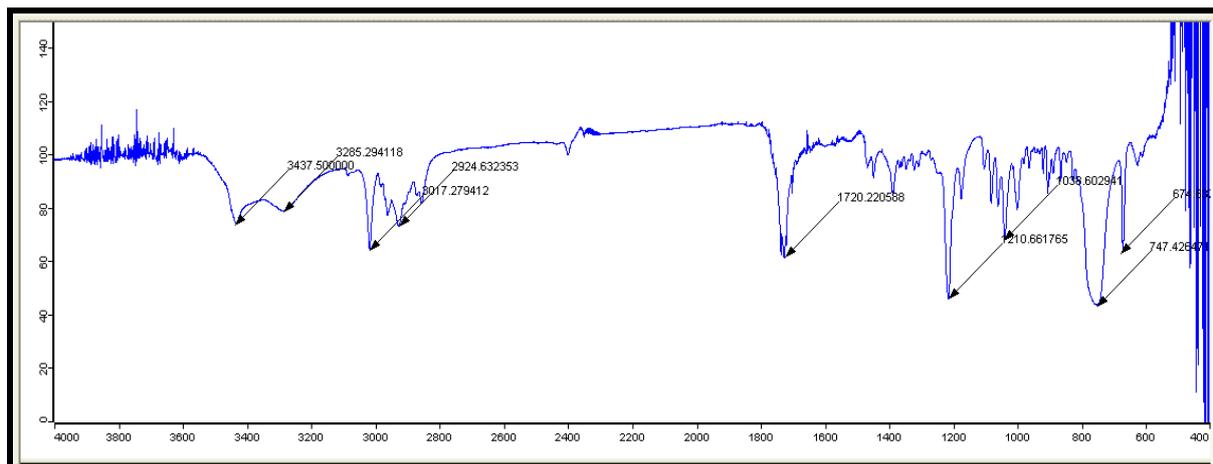


Le spectre de masse à haute résolution (TOF-HRESI-MS(+)) de ce composé (Spectre III-27), montre un pic quasi-moléculaire à $m/z = 287,1261$ Th, correspondant d'après la recherche de la composition élémentaire (haute résolution) à la formule brute $C_{15}H_{20}O_4Na$ (calculée pour $C_{15}H_{20}O_4Na$, 287,1259 Da) et montrant que ce composé **A4** admet la même formule brute $C_{15}H_{20}O_4$ que le composé **A3**. Ces données orientent donc vers une structure de masse de 264 Da comportant six degrés d'insaturation.



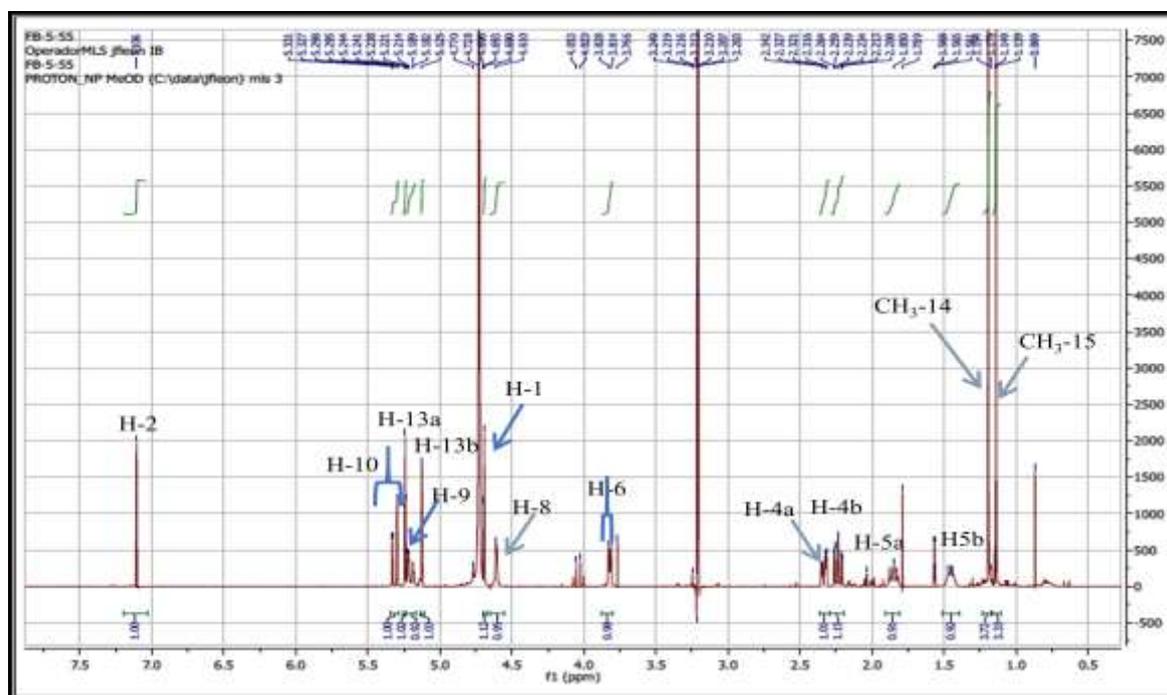
Spectre III-27 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé **A4**

Le spectre IR du composé **A4** (Spectre III-28) montre des bandes d'absorption à 3437, 3285 cm^{-1} caractéristiques des groupements hydroxyles, et à 1720 cm^{-1} caractéristiques d'un carbonyle d'une γ -lactone sesquiterpénique α,β -insaturée. Ces données sont donc en faveur d'une γ -lactone sesquiterpénique portant entre autres au moins un groupement hydroxyle.

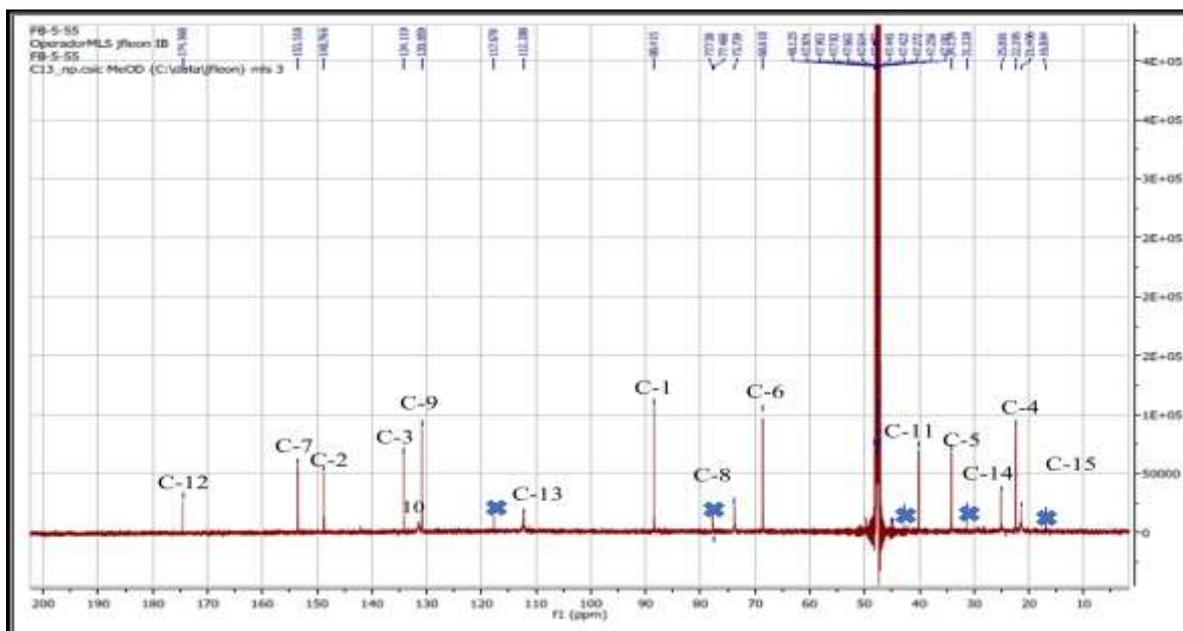


Spectre III-28 : Spectre IR du composé **A4**

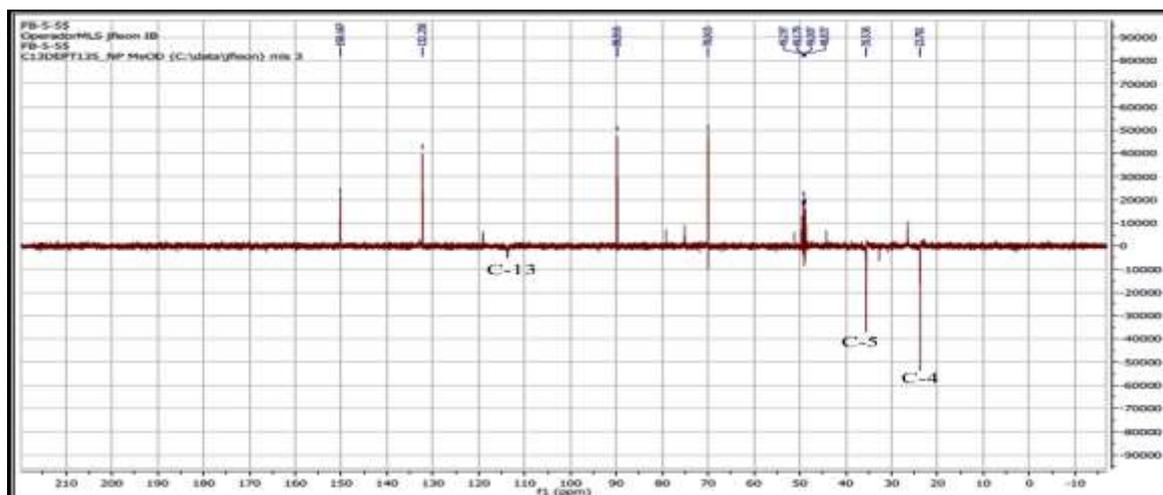
Les spectres de RMN ^1H (Spectre III-29), RMN ^{13}C (Spectre III-30), DEPT 135° (Spectre III-31), DEPT 90° (Spectre III-32) et HSQC (Spectre III-33) de ce composé sont très proches de celui du composé **A3** dont la structure a été discutée précédemment et permettent d'affirmer que le composé **A4** est également une lactone sesquiterpénique de type humélène à structure très voisine de celle du composé **A3**.



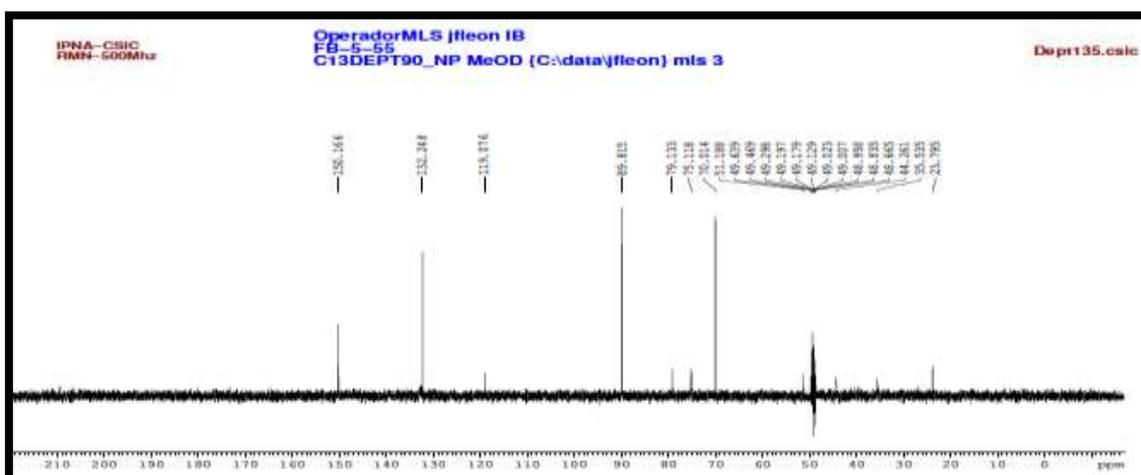
Spectre III-29 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **A4**



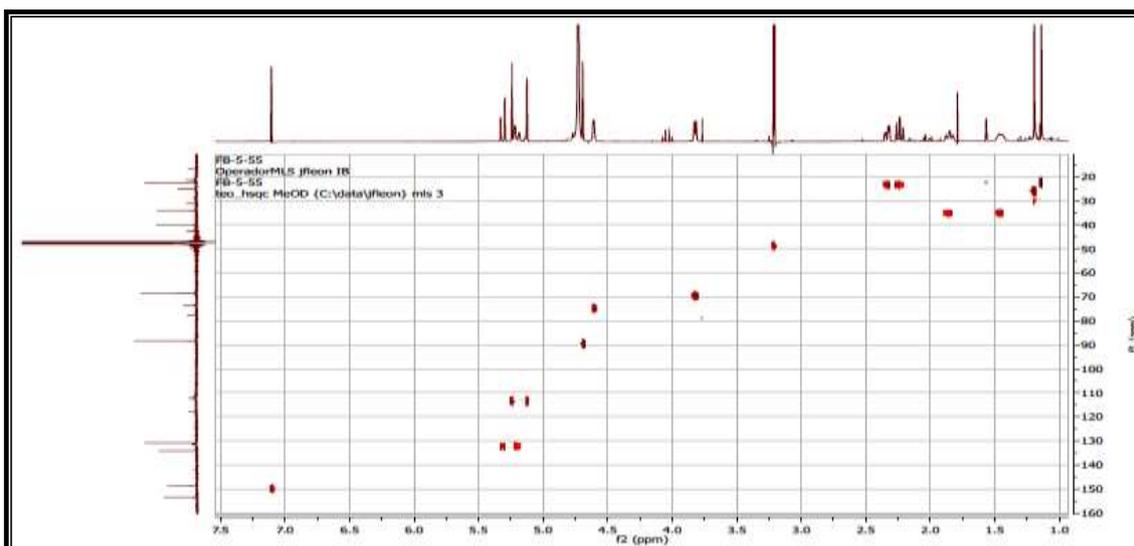
Spectre III-30 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4



Spectre III-31 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4



Spectre III-32 : Spectre DEPT 90° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4



Spectre III-33 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A4**

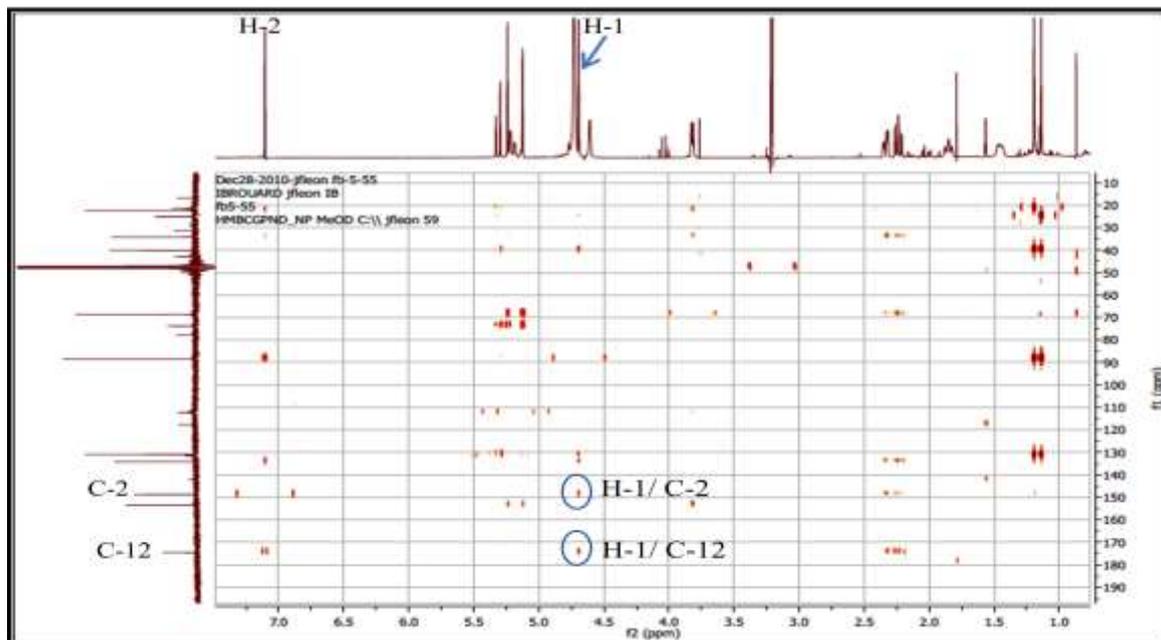
L'analyse simultanée de ces spectres permet de retrouver tous les signaux des protons et les 15 carbones constituant le composé **A4**. On reconnaît en particulier :

- Un singlet large à $\delta_H = 7,20$ ppm attribuable à H-2. La résonance du carbone C-2 est relevée à $\delta_C = 150,15$ ppm, les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur, confirment bien leur nature éthylénique ;
- Un doublet de doublets à $\delta_H = 5,41$ ppm ($J = 16,2 ; 1,6$ Hz) attribuable à H-10. La résonance du carbone C-10 est relevée à $\delta_C = 132,80$ ppm ;
- Un doublet de doublets à $\delta_H = 5,30$ ppm ($J = 16,2 ; 3,5$ Hz) attribuable à H-9. La résonance du carbone C-9 est relevée à $\delta_C = 132,24$ ppm.

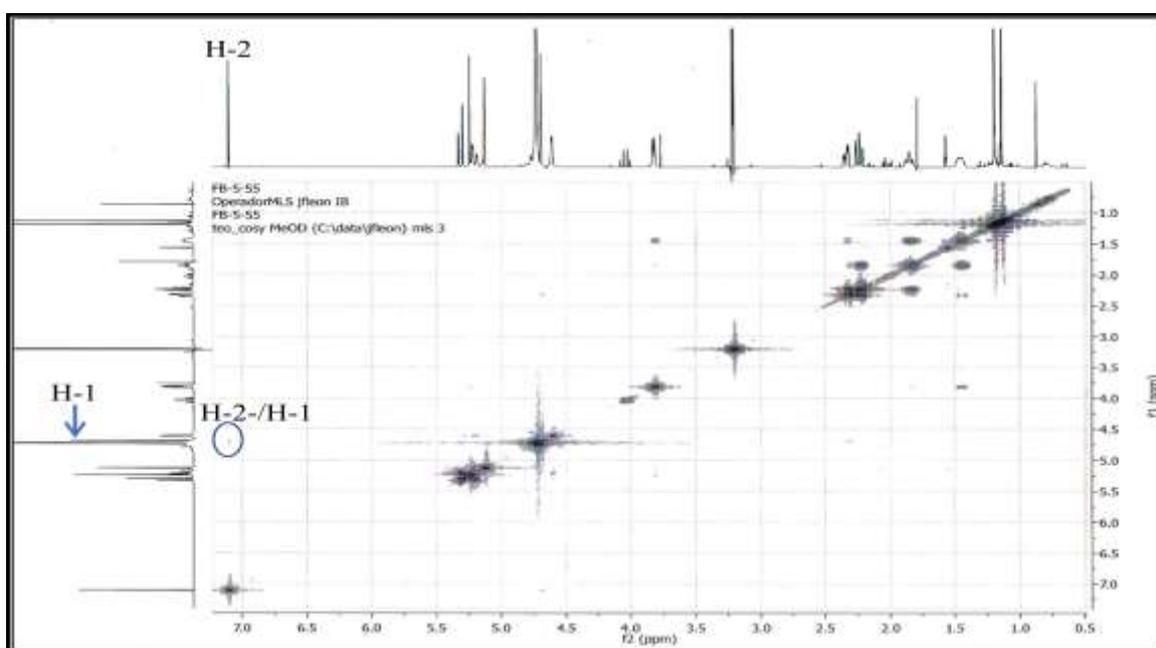
Ces deux groupements méthine éthyléniques sont indicatifs de la double liaison endocyclique entre C-10 et C-9 de configuration *trans*, vu la valeur 16,2 Hz de l'interaction de couplage entre leurs deux protons.

- Un signal à $\delta_H = 4,79$ ppm recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol- d_4 attribuable à H-1. La résonance du carbone C-1 est relevée à $\delta_C = 89,80$ ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces noyaux sont caractéristiques d'un méthine de fermeture d'une γ -lactone sesquiterpénique. Cette hypothèse est largement confortée par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Spectre III-34), entre ce proton et le carbone du carbonyle résonnant à $\delta_C = 176,00$ ppm dont la valeur du déplacement chimique (comme nous l'avons reporté précédemment) est en très bon accord avec le carbonyle d'une γ -lactone α, β -insaturée. De ce fait, le carbone de ce carbonyle est attribué au C-12 de ce squelette sesquiterpénique ceci d'une part. D'autre part et toujours sur le spectre HMBC, on relève une corrélation nette entre ce proton H-1 et la carbone C-2 ; on relève également une

tache de corrélation entre ce proton H-1 et le proton H-2 sur le spectre COSY (Spectre III-35)



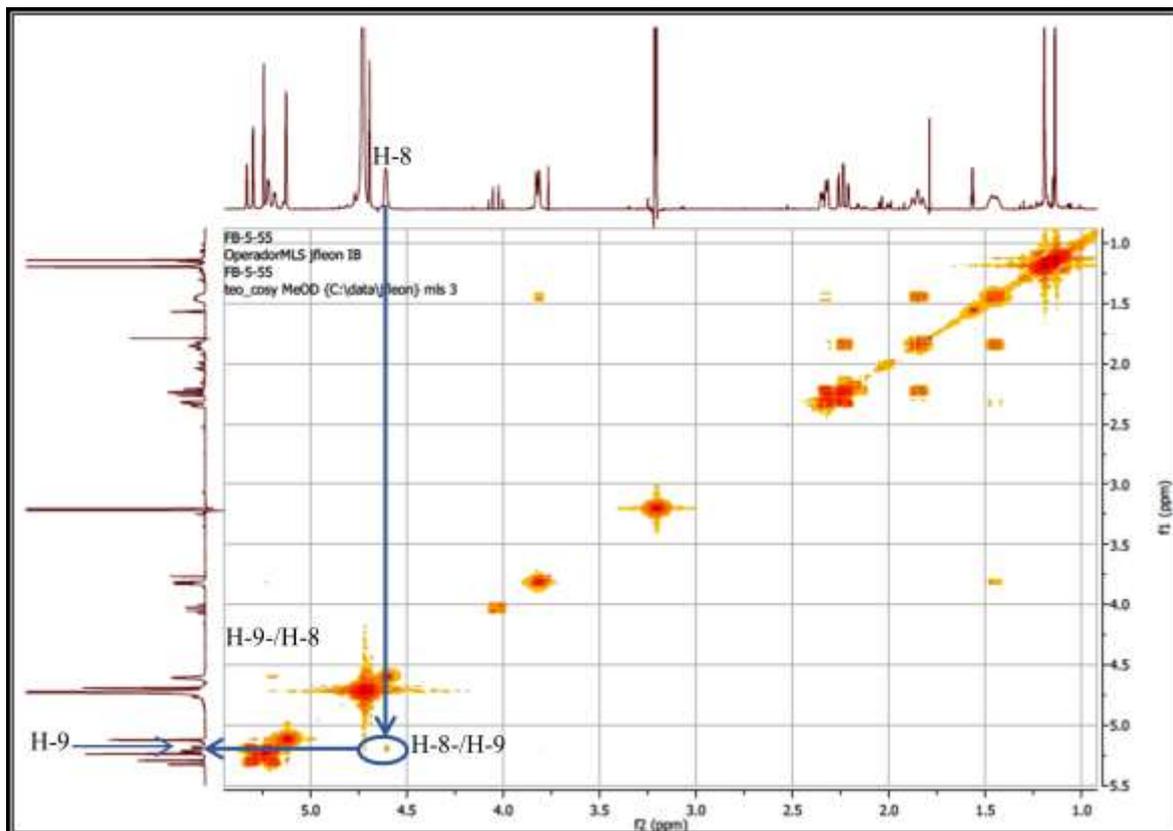
Spectre III-34 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A4



Spectre III-35 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH-d₄, δ ppm) du composé A4

- Un singulet large à $\delta_H = 4,71$ ppm attribuable à H-8. La résonance du carbone C-8 est relevée à $\delta_C = 75,12$ ppm. Cette attribution est confirmée par le spectre COSY (Spectre III-36) qui montre une tache de corrélation entre ce proton (H-8) et le proton éthylénique H-9

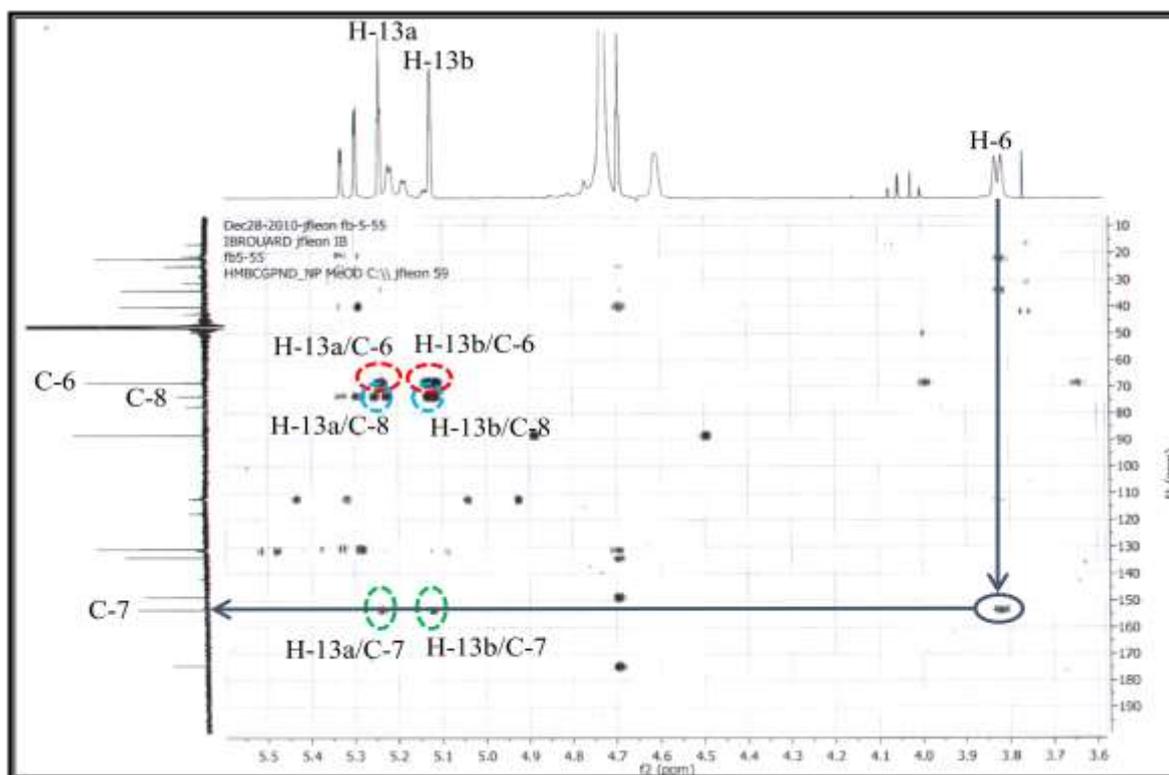
déjà attribué. Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur, indiquent qu'il s'agit d'un groupement oxyméthine.



Spectre III-36 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A4** (Etalement)

- Deux signaux d'un groupement exométhylène, le premier à $\delta_H = 5,22$ ppm (singulet) et le second à $\delta_H = 5,34$ ppm (triplet ($J = 1,5$ Hz)) portés par le carbone résonnant à $\delta_C = 113,70$ ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre III-37), les deux protons de ce groupement exométhylène montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C = 154,90$ ppm. Il est évident que ce groupement exométhylène et ce carbone quaternaire éthylénique délimitent une double exocyclique dans cette molécule. Un réexamen du spectre HMBC (Spectre III-37) permet de relever des corrélations entre les 2 protons de l'exométhylène et le carbone C-8 ($\delta_C = 75,12$). Ces données permettent alors d'attribuer le carbone quaternaire éthylénique ($\delta_C = 154,90$) au C-7, les protons de l'exométhylène aux H-13a ($\delta_H = 5,34$) et H-13b ($\delta_H = 5,22$) ; leur carbone porteur sera attribué au C-13 ($\delta_C = 113,70$). La nature carbone quaternaire éthylénique de C-7, permet de revenir en arrière et placer un groupement hydroxyle en C-8 car la présence d'un groupement C-8/C-7 époxyde n'est pas possible. Le fait que le groupement oxygéné porté par le CH-8 soit un hydroxyle est justifié par la formule brute de notre composé.

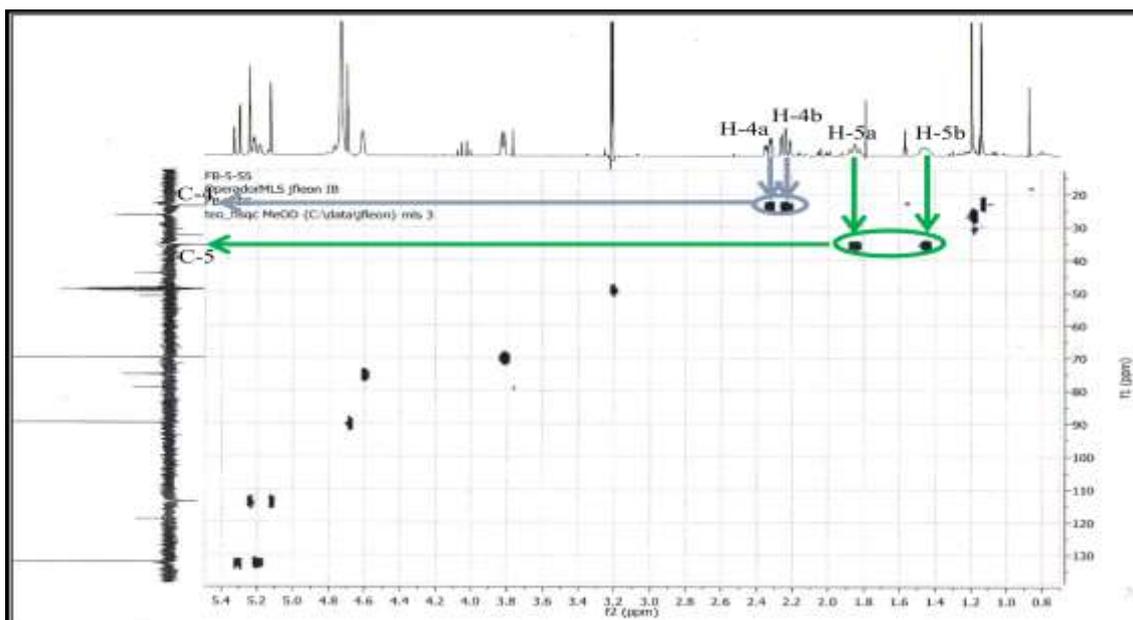
- Un doublet à $\delta_H = 3,92$ ppm ($J = 7,1$ Hz) attribuable à H-6. La résonance du carbone C-6 est relevée à $\delta_C = 70,00$ ppm et confirmée par ses corrélations avec H-13a et H-13b sur le spectre HMBC. On relève également sur le même spectre une tache de corrélation entre H-6 et C-7. Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur, indiquent qu'il s'agit d'un groupement oxym



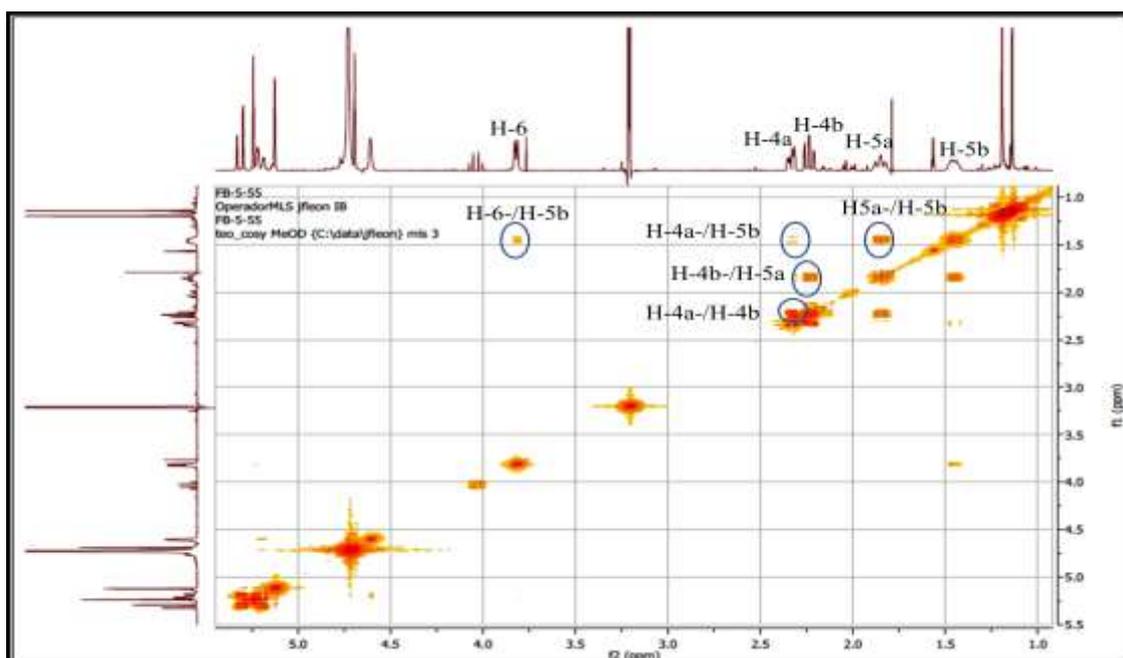
Spectre III-37 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé A4 (Etalement 1)

- Des signaux correspondant à deux groupements méthylènes, dont les carbones résonnent à $\delta_C = 35,52$ et $\delta_C = 23,80$ ppm [d'après le Spectre HSQC (Spectre III-38)]. Les protons du premier résonnent à $\delta_H = 1,95$ (tl ; 13,5 Hz) et $\delta_H = 1,55$ (multiplet) ; ceux du second résonnent à $\delta_H = 2,43$ (multiplet) et $\delta_H = 2,33$ ppm (td ; 12,5 ; 2,3 Hz). Sur le spectre COSY (Spectre III-36), on relève en plus des couplages entre les protons géminés de chacun des deux méthylènes du fait de leur inéquivalence magnétique car protons diastéréotopiques, des couplages vicinaux entre les protons des deux méthylènes. Ces observations permettent de déduire la présence de l'enchaînement -CH₂-CH₂- dans cette molécule comme dans le composé A3. Toujours sur le spectre COSY (Spectre III-36), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec le proton résonnant à $\delta_H = 1,55$ ppm porté par le carbone résonnant à $\delta_C = 35,52$ ppm. Cette observation permet de placer ce méthylène en position vicinale par rapport au C-6. Nous lui attribuons alors, la position C-5. Ses protons seront notés H-5a ($\delta_H = 1,95$

ppm) et H-5b ($\delta_H = 1,55$ ppm). Le deuxième groupement méthylène ($\delta_C = 23,80$ ppm) sera attribué au carbone C-4 et ses protons H-4a ($\delta_H = 2,43$ ppm) et H-4b ($\delta_H = 2,33$ ppm). A ce stade de notre analyse nous pouvons revenir en arrière et confirmer que l'oxyméthine-6 est un hydroxyméthine vu que la position C-5 est un CH_2 et que par conséquent la présence d'un groupement C-6/C-5 époxyde n'est pas possible. De plus, d'après le spectre d'absorption IR des groupements hydroxyles étaient attendus dans cette molécule.

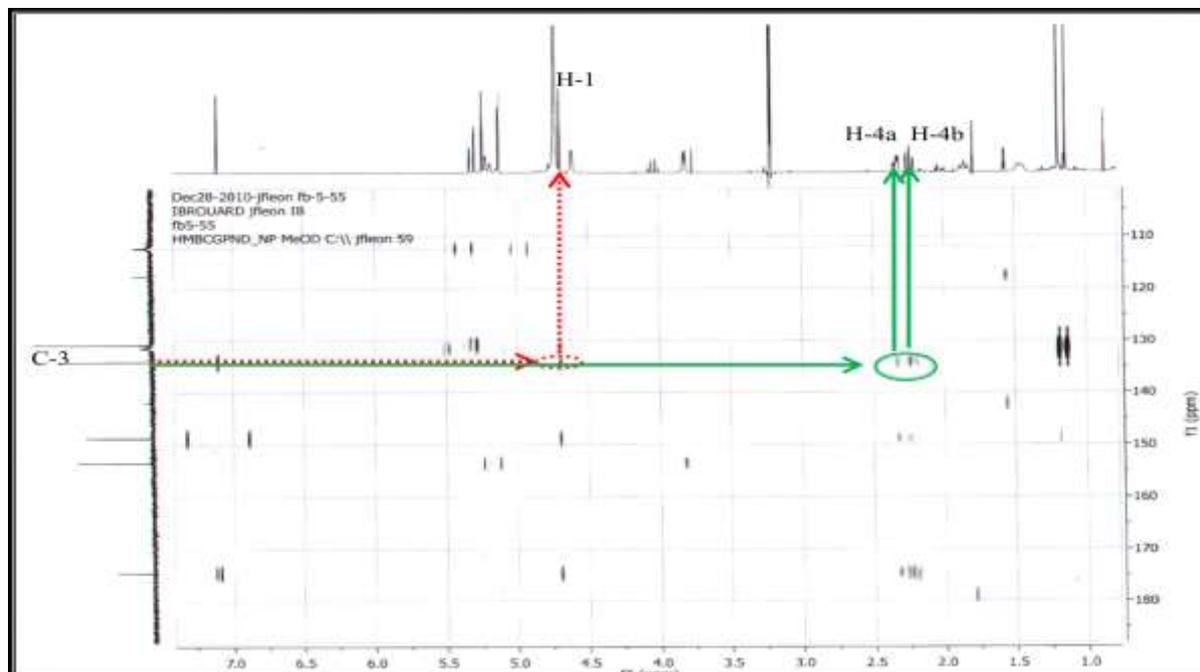


Spectre III-38 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4 (Etalement)



Spectre III-36 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4 (Etalement)

- Sur le spectre RMN ^{13}C , on relève la présence d'un autre carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_{\text{C}} = 135,50$ ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre III-39), ce carbone montre des taches avec les protons H-4a, H-4b et H-1 ; ces observations permettent d'attribuer ce carbone au C-3 de cette lactone sesquiterpénique.



Spectre III-39 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A4** (Etalement 2)

- Sur les spectres proton (Spectre III-29) et HSQC (Spectre III-33), on relève la présence de deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 1,29$ ($\delta_{\text{C}} = 26,50$ ppm) et $\delta_{\text{H}} = 1,23$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 22,80$ ppm). Concernant ces deux méthyles, on relève sur le spectre HMBC (Spectre III-40) que les protons de l'un corrèlent avec le carbone de l'autre et vice-vers-ça, cela suppose qu'ils sont portés tous les deux par le même carbone quaternaire. En effet, et toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-40), les protons de ces deux méthyles corrèlent avec le carbone quaternaire résonnant à $\delta_{\text{C}} = 41,52$ ppm et voisin du carbone de fermeture de cette lactone sesquiterpénique vu sa corrélation avec H-1 et les corrélations des protons de ces deux méthyles avec C-1, C-9 et C-10 sur le spectre HMBC (Spectre III-40) et HMBC (Spectre III-41). Ces deux groupements méthyles sont attribués aux CH_3 -14 et CH_3 -15. De ce fait, le carbone quaternaire porteur de ces deux méthyles n'est autre que le C-11 du squelette sesquiterpénique. L'ensemble des résultats de cette analyse structurale mène à la structure plane représentée dans la figure III-12.

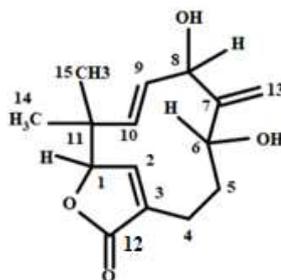
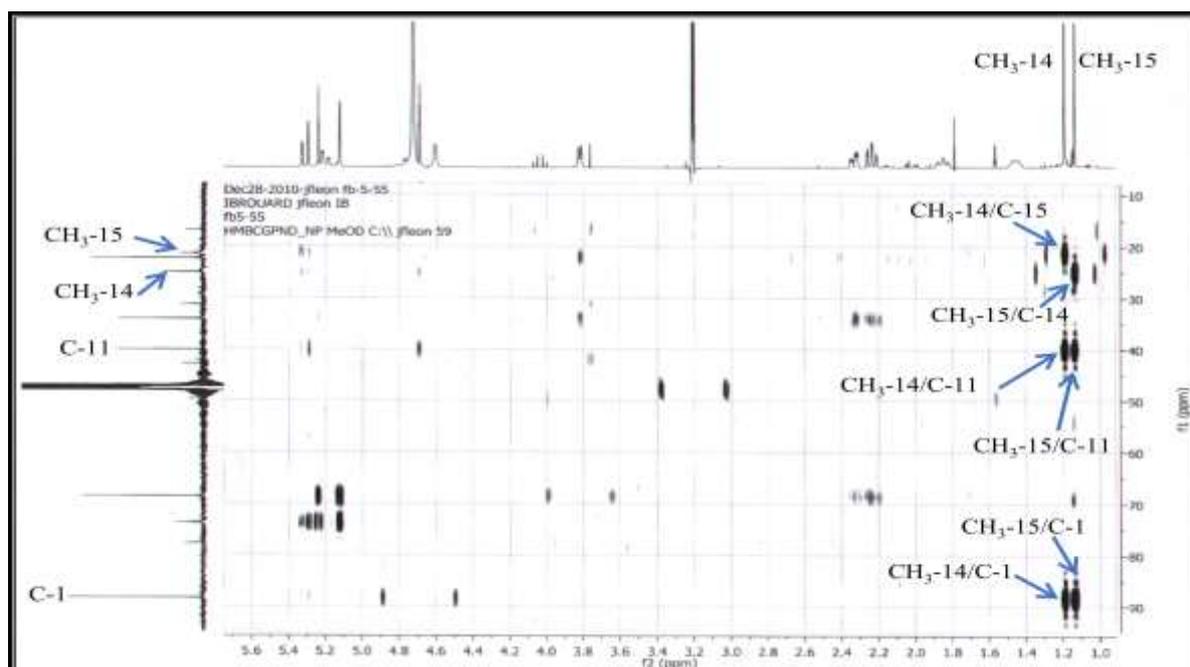
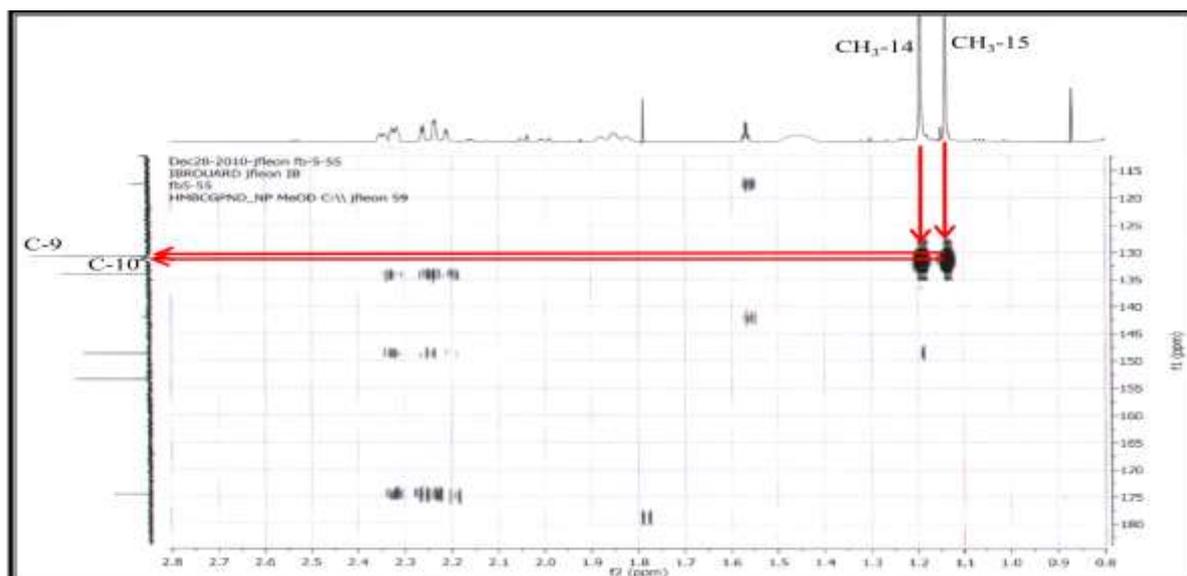
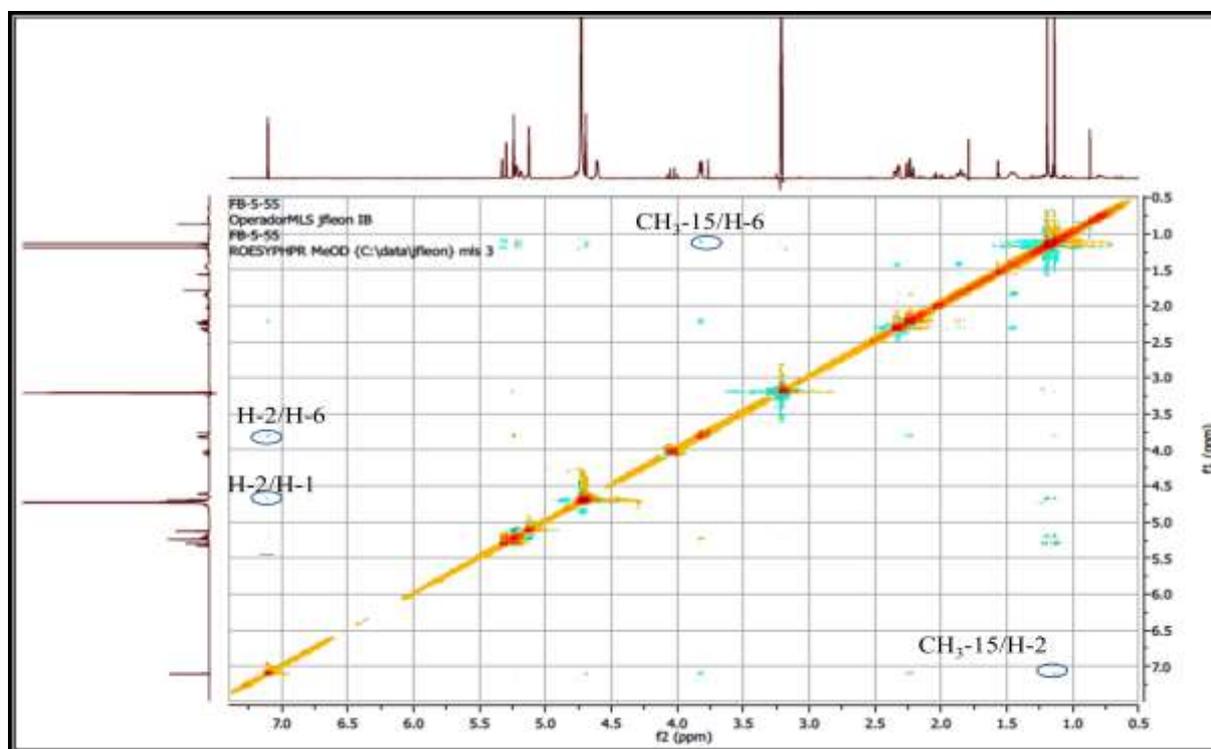


Figure III-12: Structure plane du composé A4

Spectre III-40 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4 (Etalement 3)Spectre III-41: Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A4 (Etalement 4)

Ainsi, on se retrouve avec une lactone sesquiterpénique dont le squelette est de type β -humulène.

En matière de stéréochimie de ce composé on relève que la double liaison entre C-2 et C-3 est de configuration (Z), vu qu'elle est dans un cycle à 5 chaînons, par contre celle entre C-9 et C-10 admet une configuration (E), indiquée par la valeur de la constante de couplage (16,2 Hz) entre les protons H-9 et H-10 ceci d'une part. D'autre part, Il est d'usage de représenter le CH₃-15 avec une orientation β et le CH₃-14 avec une orientation α . Par ailleurs, cette molécule renferme 3 centres asymétriques qui sont : C-1, C-6 et C-8. La stéréochimie relative de ces centres chiraux a été déduite de l'analyse du spectre relatif à l'expérience ROESY (Spectre III-42) où l'on relève des corrélations entre H-2, H-8 et H-6 indiquant que H-8 et H-6 ont la même orientation, nous les reportons β dans la suite de notre analyse. Toujours sur le spectre ROESY, le protons H-8 et H-1 montrent des corrélations mutuelles impliquant une même orientation pour ces deux noyaux. Ces observations indiquent que les trois noyaux H-1, H-6 et H-8 admettent la même orientation. Toujours sur le spectre ROESY les protons du groupement méthyle résonnant à $\delta_H = 1,23$ ppm montrent des corrélations avec H-6 et H-8, indiquant que H-1, H-6, H-8 et CH₃-15 admettent la même orientation β .



Spectre III-42 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A4**

Le pouvoir rotatoire spécifique de ce composé, mesuré dans le méthanol a donné $[\alpha]_D^{21} = -49^\circ$ ($C = 0,334 \text{ g/mL}$; MeOH) indiquant que cette molécule est le (-)-(2Z, 9E) **6a**, **8a**-dihydroxy-2,9,7(13)-humulatrien-1(12)-olide (Figure III-13). Cette molécule est nouvelle, nous l'avons reportée pour la première fois dans la littérature sous le nom de (-)-**asteriscunolide J** (désignation consécutive dans cette nomenclature) [38].

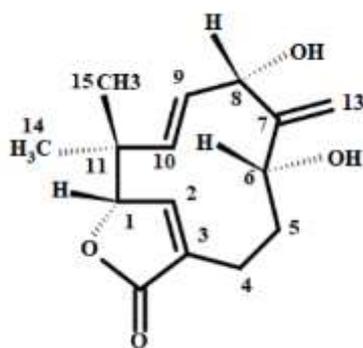


Figure III-13 : Structure finale du composé **A4**, (-)-**asteriscunolide J**.

La structure du composé **A4** ainsi établie a été confirmée par une analyse de diffraction de rayons X (Figure III-14), est décrite pour la première fois dans la littérature.

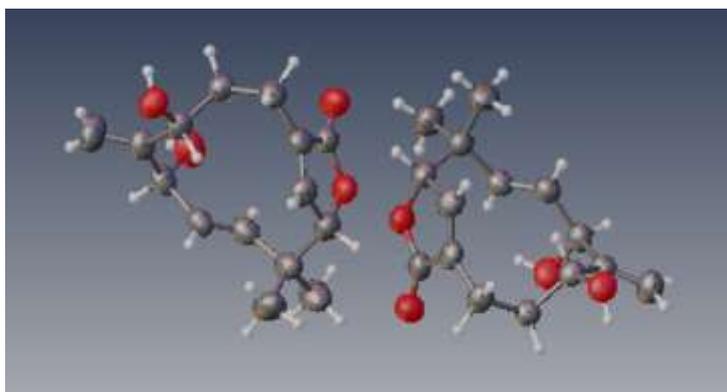


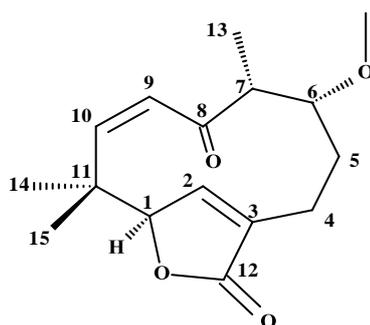
Figure III-14 : Structure du composé **A4** établie par diffraction de rayons X, dans les mêmes conditions que celle du composé **A3**

Toutes les données de la RMN ^1H et ^{13}C , de ce nouveau composé, sont reportées dans le tableau III-4.

Tableau III-4 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) de **A4** (MeOH- d_4)

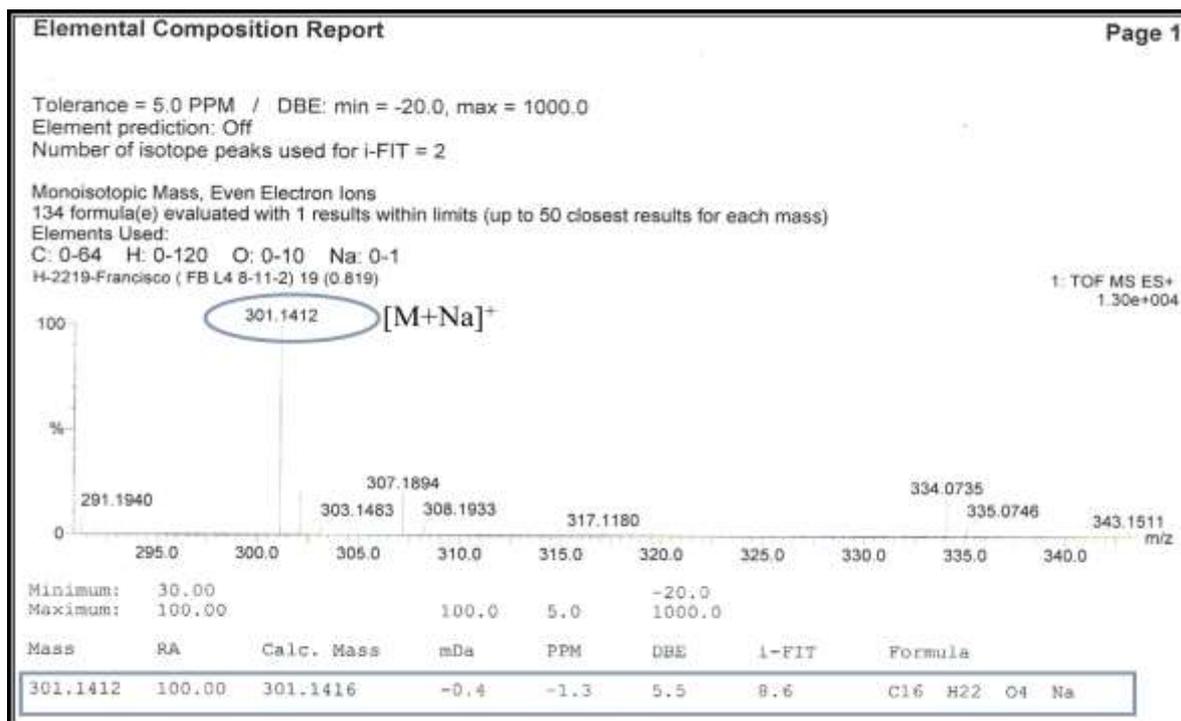
Position	δ_{C} DEPT	δ_{H} mult. (<i>J</i> , Hz)
1	89,80 (CH)	4,79 ; t (1,4)
2	150,15 (CH)	7,20 ; s
3	135,50 (C)	/
4a	23,80 (CH ₂)	2,43 ; m
4b		2,33, td (12,5 ; 2,3)
5a	35,52 (CH ₂)	1,95 ; tl (13,5)
5b		1,55 ; m
6	70,00 (CH)	3,92 ; d (7,1)
7	154,90 (C)	/
8	75,12 (CH)	4,71 ; sl
9	132,24 (CH)	5,30 ; dd (16,2 ; 3,5)
10	132,80 (CH)	5,41 ; dd (16,2 ; 1,6)
11	41,52 (C)	/
12	176,00 (C)	/
13a	113,70 (CH ₂)	5,22 ; s
13b		5,34 ; t (1,5)
14	26,50 (CH ₃)	1,29 ; s
15	22,80 (CH ₃)	1,23 ; s

III-1-5- Elucidation structurale du composé A6



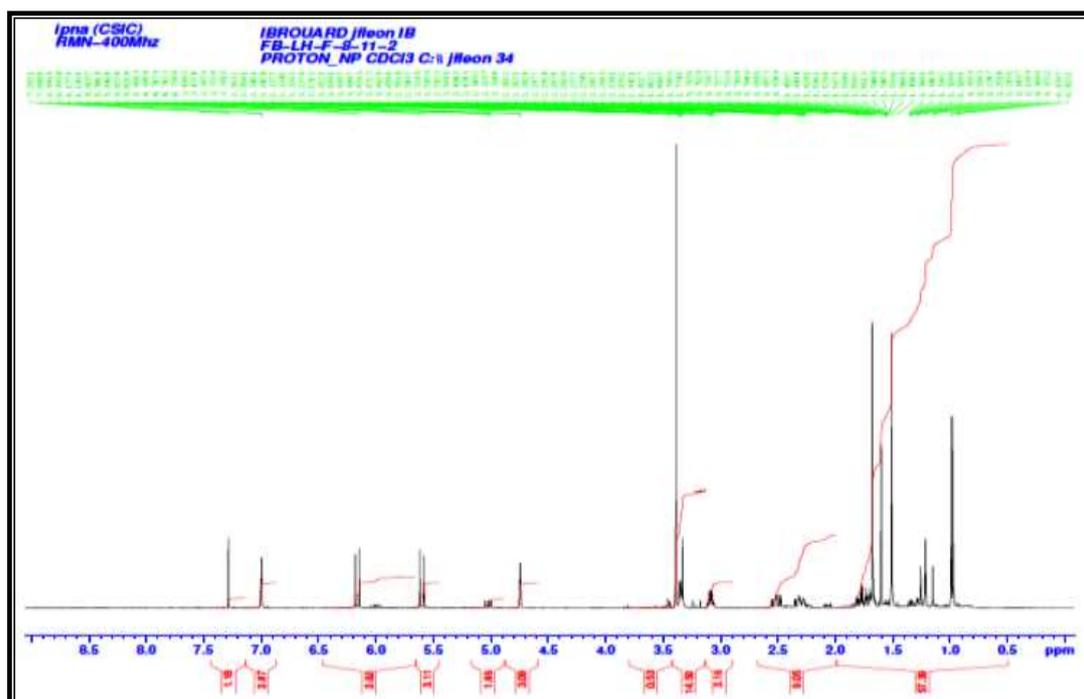
A6

Le spectre de masse à haute résolution (TOF-HRESI-MS(+)) du composé **A6** (Spectre III-43), indique la présence d'un pic quasi-moléculaire à $m/z = 301,1412$ Th orientant vers la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ qui correspond à une structure de masse de 278 Da comportant six degrés d'insaturation.

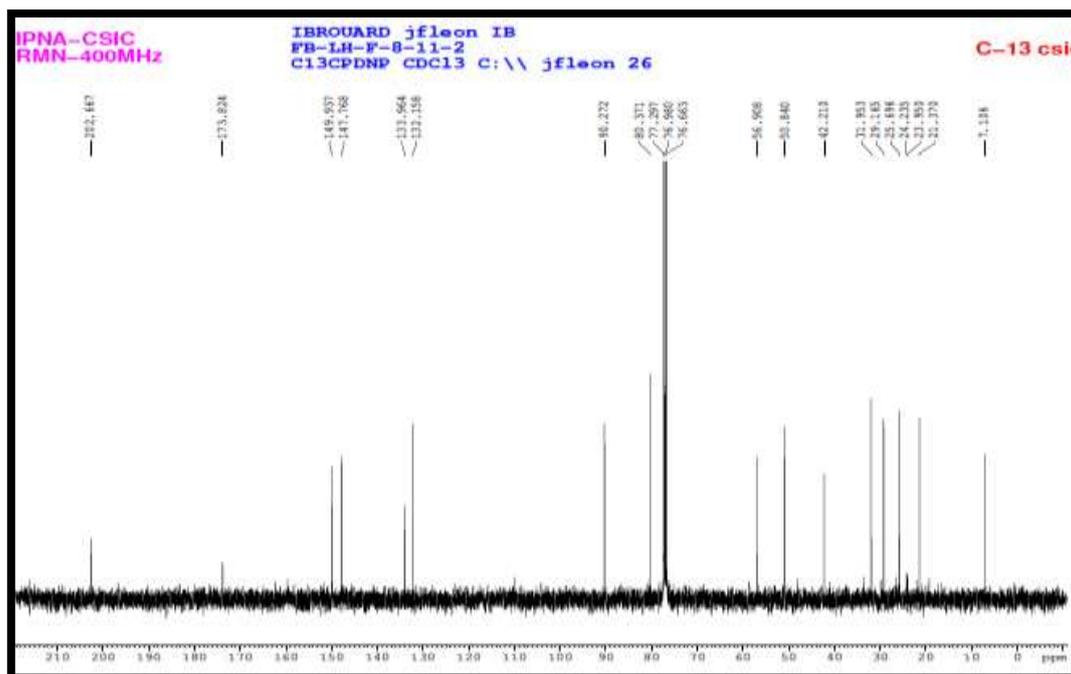


Spectre III-43 : Spectre TOF-HRESI-MS(+) du composé **A6**

L'analyse simultanée du spectre RMN ^1H (Spectre III-44) et ^{13}C (Spectre III-45), indiquent clairement que ce composé est de type astérisculolide et par conséquent une lactone sesquiterpénique dont le squelette est de type humulène.

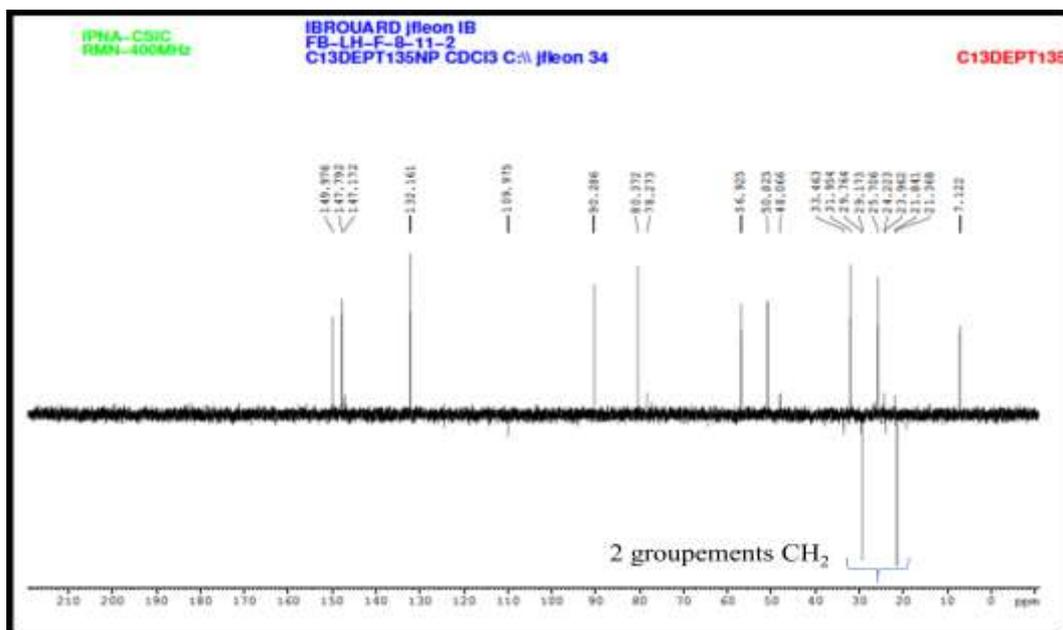


Spectre III- 44 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

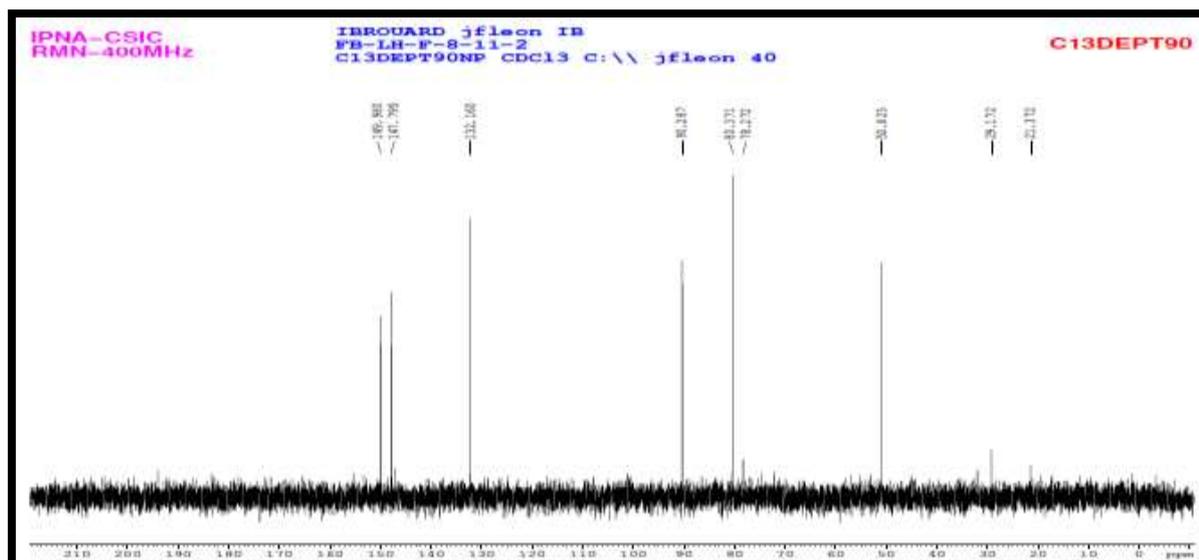


Spectre III-45 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

En effet, les spectres RMN ^{13}C (Spectre III-45), DEPT 135° (Spectre III-46) et DEPT 90° (Spectre III-47) permettent de relever la présence d'un groupement carbonyle dont le carbone résonnant à $\delta_{\text{C}} = 173,81$ ppm est caractéristique d'une γ -lactone sesquiterpénique α,β insaturée. Ce carbone est alors attribué au C-12.

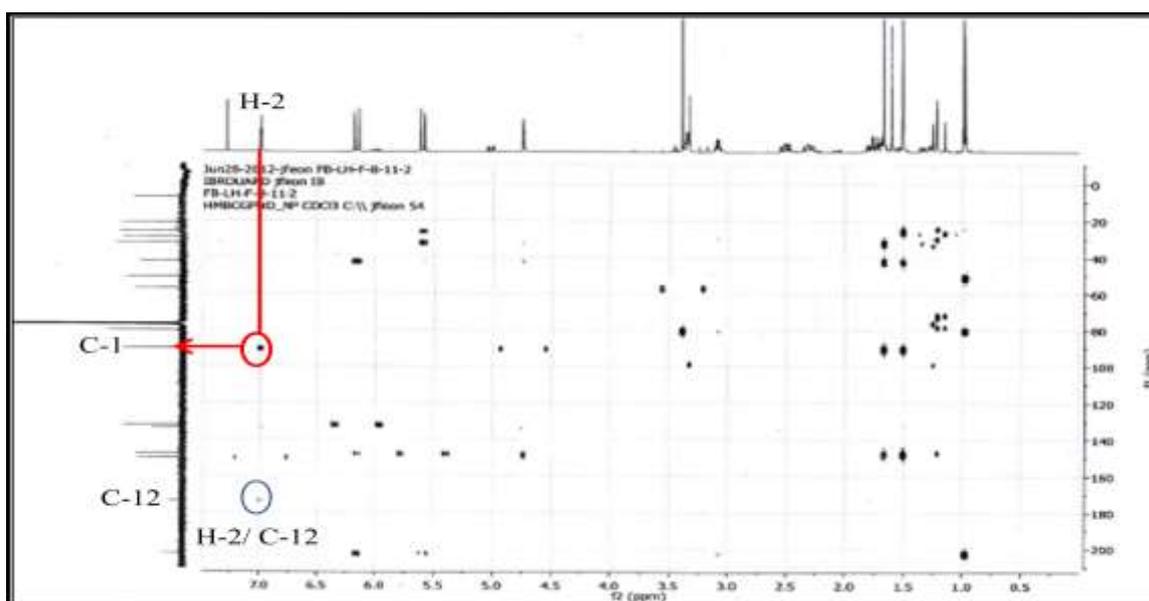


Spectre III-46 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

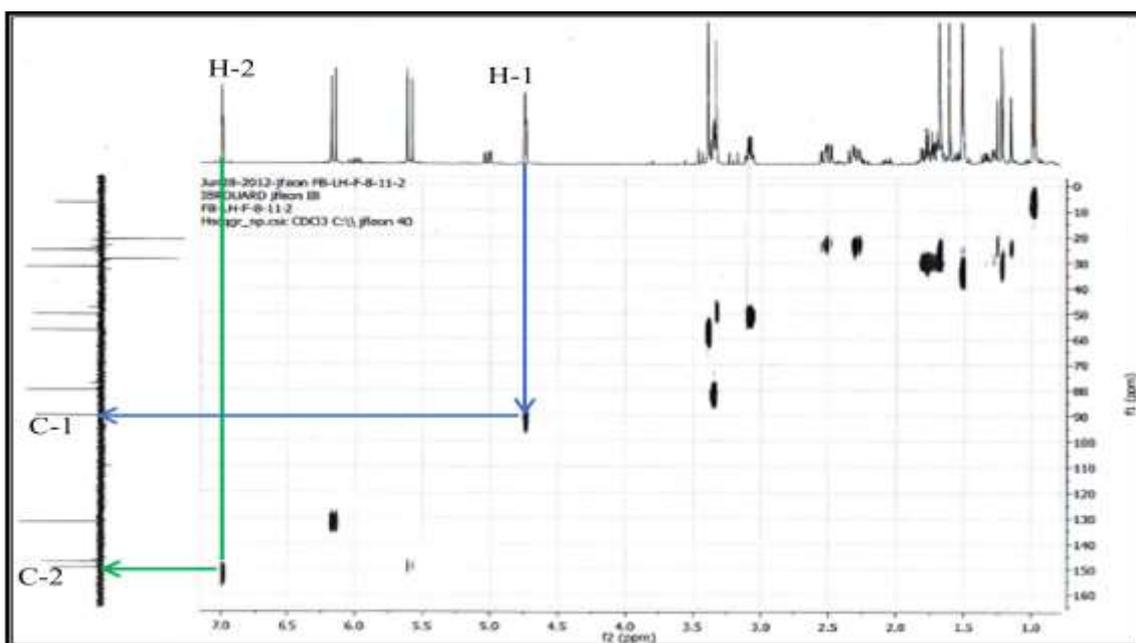


Spectre III-47: Spectre DEPT 90° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **A6**

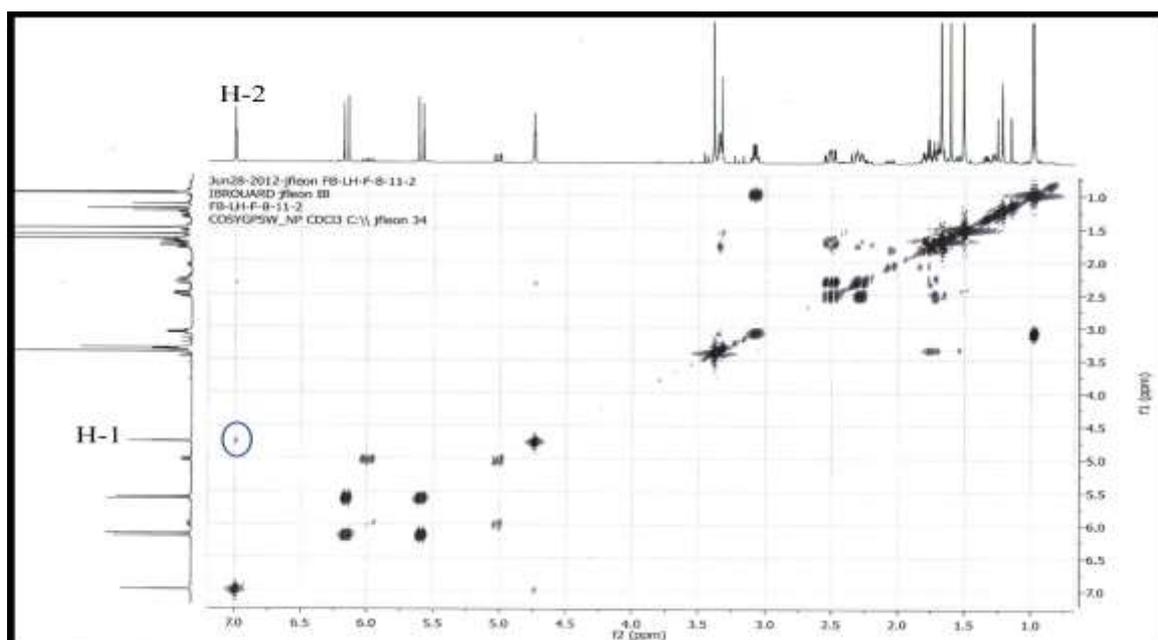
Sur le spectre HMBC (Spectre III-48), on relève une corrélation nette entre ce carbone ($\delta_C = 173,81$ ppm) et le proton résonnant à $\delta_H = 7,00$ ppm (sl) attribuable par conséquent à H-2. Grâce au spectre HSQC (Spectre III-49) la résonance du carbone C-2 est relevée à $\delta_C = 149,93$ ppm. Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-48), le proton H-2 montre une tache de corrélation avec le carbone du méthine résonnant à $\delta_C = 90,27$; $\delta_H = 4,75$; sl). Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux noyaux sont caractéristiques d'un méthine de fermeture d'une γ -lactone sesquiterpénique soit la position C-1. Cette hypothèse est largement confortée par les corrélations observées sur le spectre COSY (Spectre III-50) entre ces deux protons (H-2 et H-1).



Spectre III- 48 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **A6**

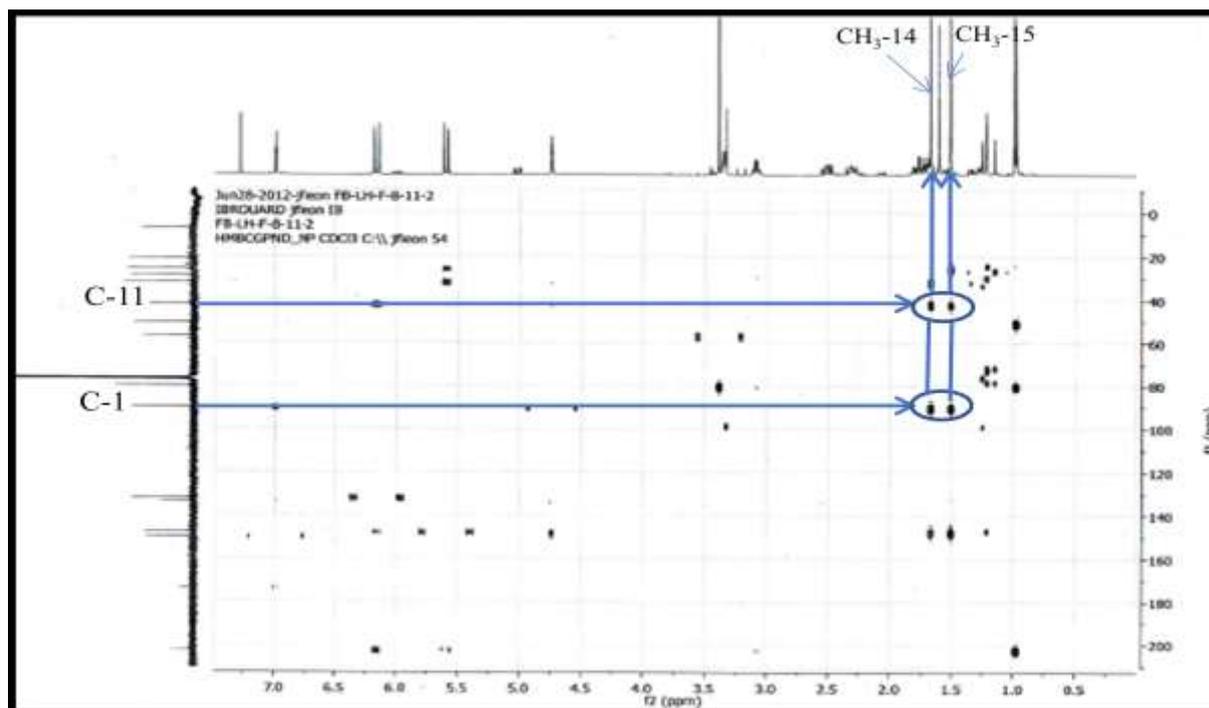


Spectre III- 49 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**



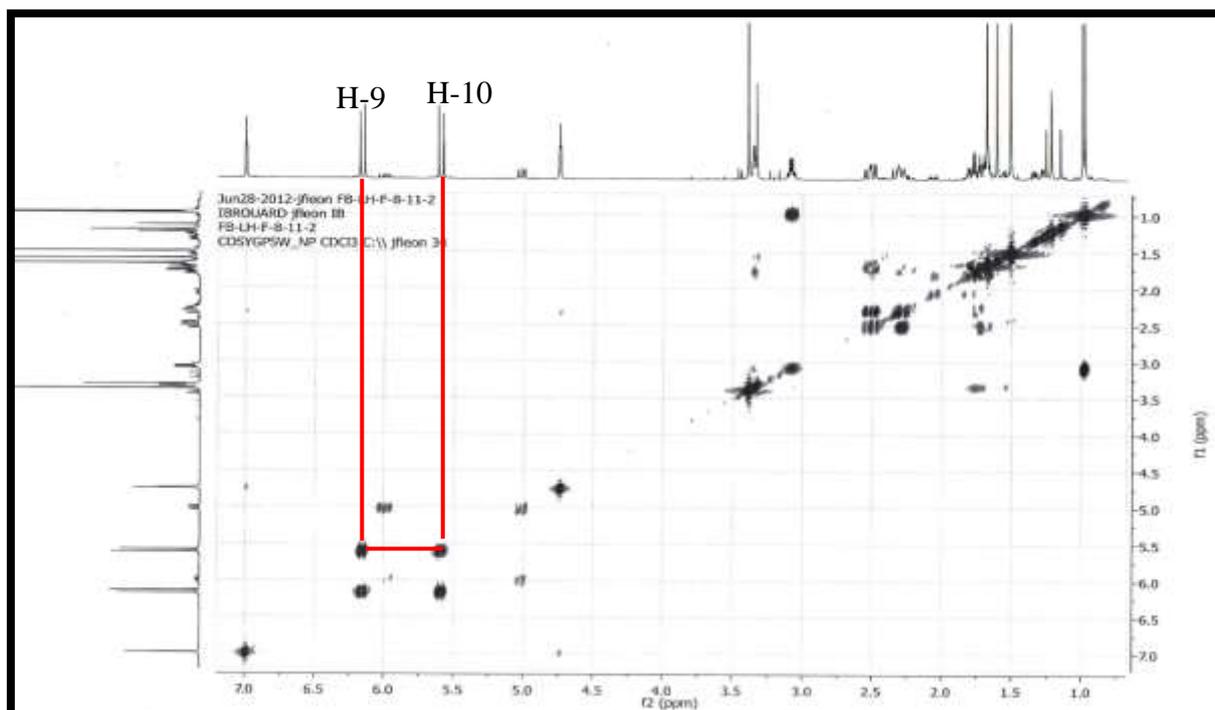
Spectre III-50 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

Par ailleurs sur le spectre HMBC (Spectre III-48), le carbone C-1 et le carbone quaternaire résonnant à $\delta_{\text{C}} = 42,52$ corrélient avec les protons des deux méthyles résonnant sous forme de singlets à $\delta_{\text{H}} = 1,69$ et $1,51$ ppm. Ces observations permettent d'attribuer ce carbone quaternaire au C-11 et les deux méthyles aux positions 14 et 15. Les résonances des carbones C-14 et C-15 sont relevés à $\delta_{\text{C}} = 25,70$ et $31,95$ ppm, respectivement.

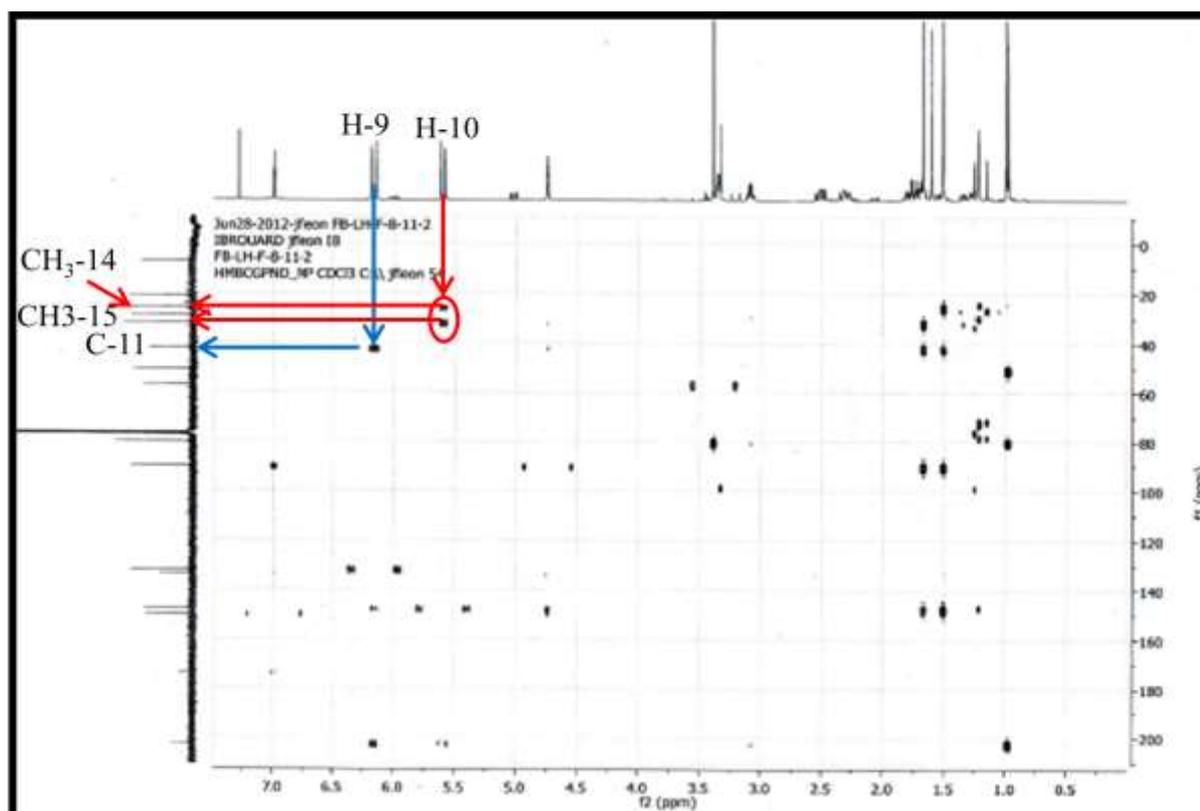


Spectre III- 48 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

Sur le spectre proton (Spectre III- 44) on relève la présence de deux protons éthyléniques couplant entre eux d'après le spectre COSY (Spectre III-50) et résonnant sous forme d'un doublet chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,16$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 5,60$ ppm ($J = 13,6$ Hz). La valeur de la constante de couplage entre ces deux protons indique que cette double liaison est de configuration (**Z**). Sur le spectre HMBC (Spectre III-48), le proton résonnant à $\delta_{\text{H}} = 5,60$ ppm montre des taches de corrélation avec les carbones C-14 et C-15 et le proton résonnant à $\delta_{\text{H}} = 6,16$ montre des taches de corrélation avec le C-11. Ces observations permettent de placer cette double liaison entre C-9 et C-10. On reportera alors $\delta_{\text{H-9}} = 6,16$ ppm ($\delta_{\text{C-9}} = 132,15$ ppm) et $\delta_{\text{H-10}} = 5,60$ ppm ($\delta_{\text{C-10}} = 147,76$ ppm).

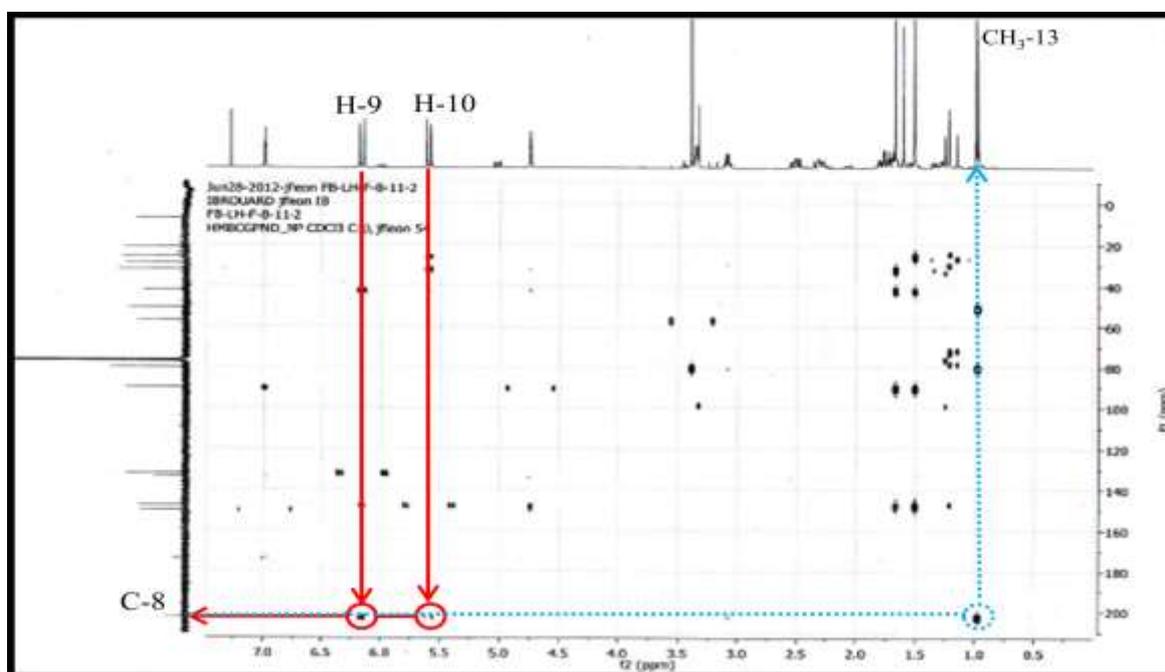


Spectre III- 50: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A6

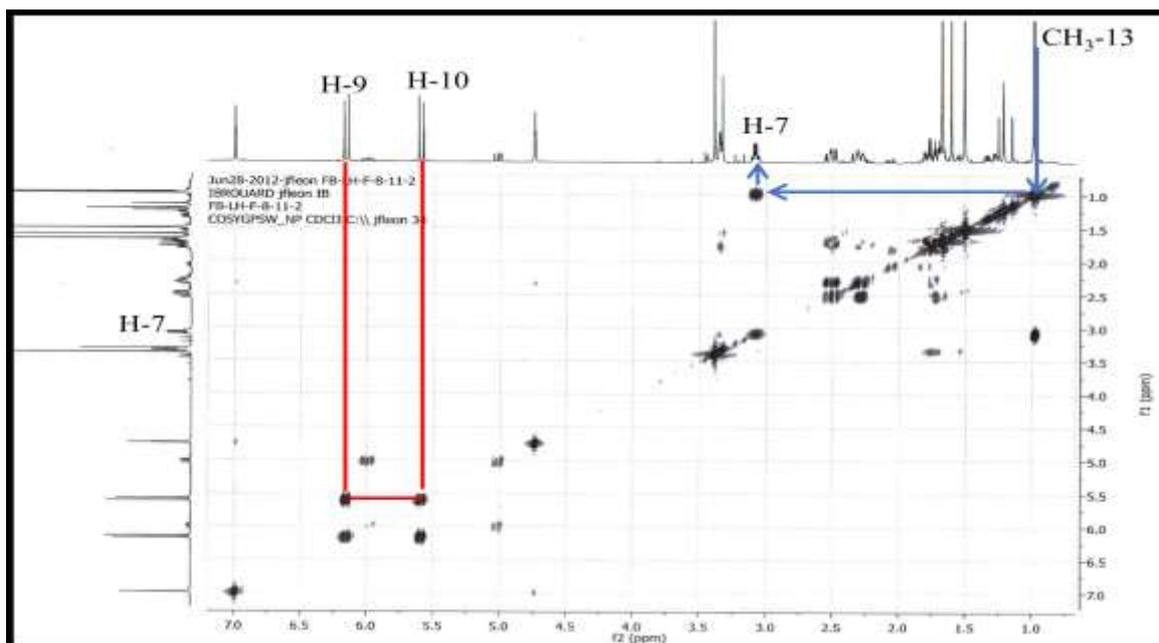


Spectre III- 48 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A6

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre III-48), permet de relever des corrélations entre les deux protons de la double liaison entre C-10 et C-9 et le carbone du carbonyle dont la résonance apparaît à $\delta_C = 202,55$ ppm. Vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone et vu ses corrélations avec H-10 et H-9, il est évident que ce carbonyle est une cétone conjuguée avec la double liaison entre C-10 et C-9, son carbone sera donc numéroté C-8. Toujours sur le spectre HMBC, le carbone C-8 montre une tache de corrélation avec les protons d'un méthyle dont le signal est relevé à $\delta_H = 0,98$ ppm (d ; $J = 6,4$ Hz). Sachant que le squelette de cette lactone sesquiterpénique est de type humulène, il est clair que ce méthyle représente la position C-13 et sera placé sur le C-7. La multiplicité (d ; $J = 6,4$ Hz) du signal des protons de ce méthyle, impose la présence d'un proton en C-7. En effet, grâce au spectre COSY (Spectre III-50), le signal de H-7 est relevé à $\delta_H = 3,09$ ppm (multiplet). La résonance du C-7 est relevée à $\delta_C = 50,84$ ppm.

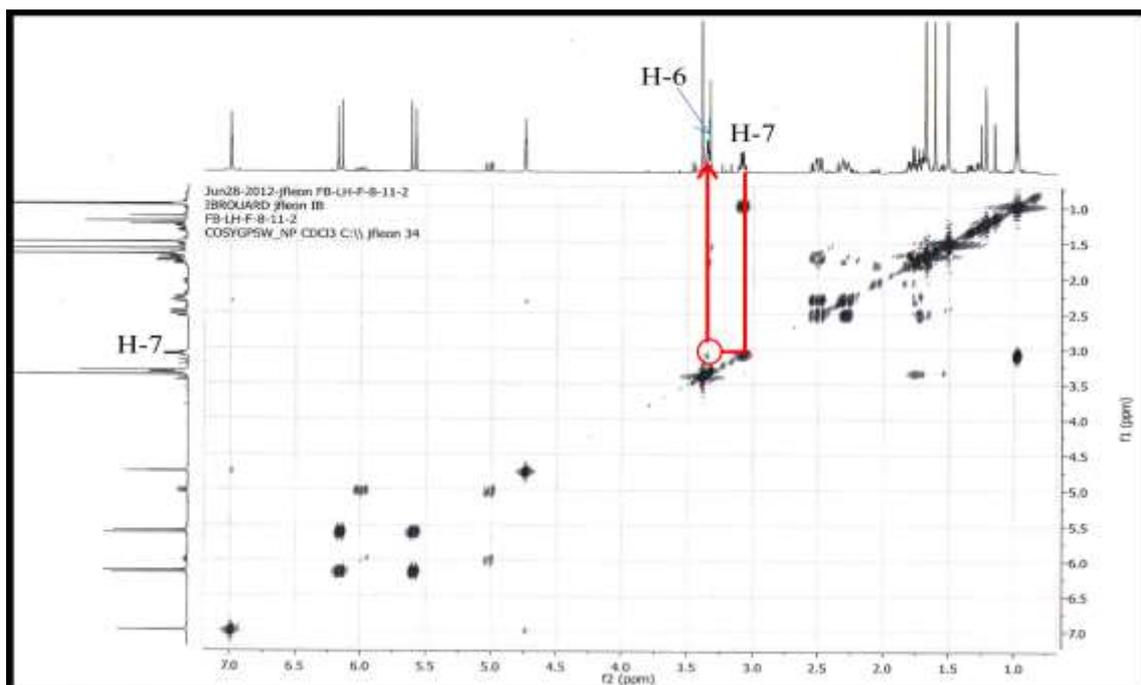


Spectre III-48: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A6

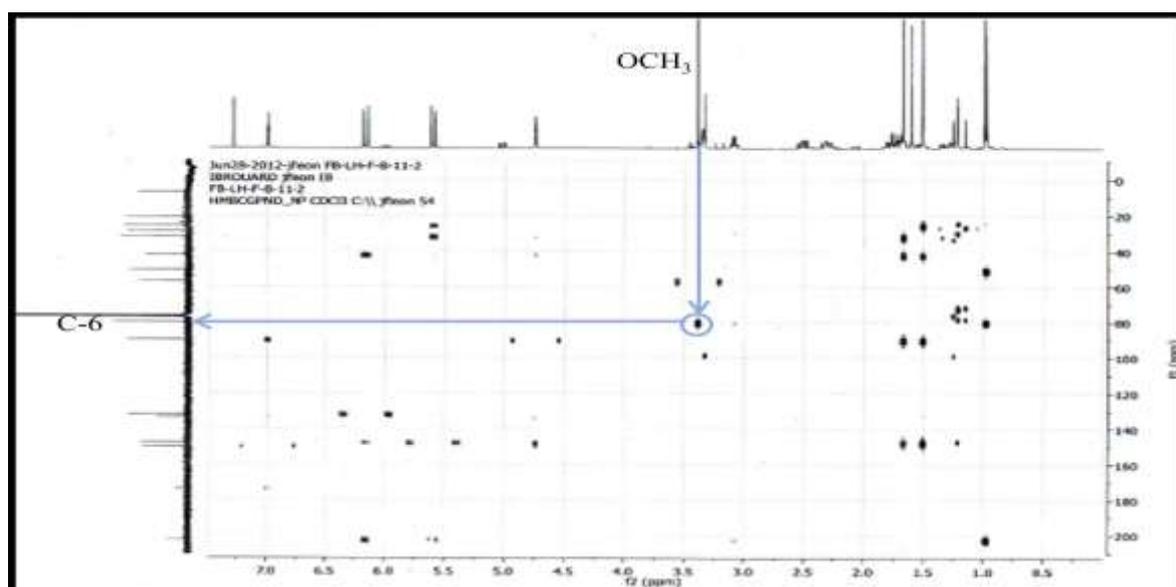


Spectre III-50 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

Un réexamen du spectre COSY (Spectre III-50) permet de relever une tache de corrélation entre H-7 et un proton résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,35$ ppm (multiplet) dont la résonance de son carbone porteur apparait à $\delta_{\text{C}} = 80,37$ ppm. Ce proton est attribué au H-6 et son carbone au C-6. La valeur du déplacement chimique de C-6 ($\delta_{\text{C}} = 80,37$) impose sa substitution par un groupement oxygéné. En effet, sur les spectres RMN ^{13}C (Spectre III-45), DEPT 135° (Spectre III-46) et HSQC (Spectre III-49), on relève la présence d'un groupement méthoxyle dont les protons résonnent à $\delta_{\text{H}} = 3,39$ (singulet) et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 56,91$ ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre III-48), les protons de ce méthoxyle corréllent avec le carbone C-6, confirmant ainsi l'oxygénation de ce carbone et justifiant la présence du 16^{ème} atome de carbone dans cette lactone sesquiterpénique.



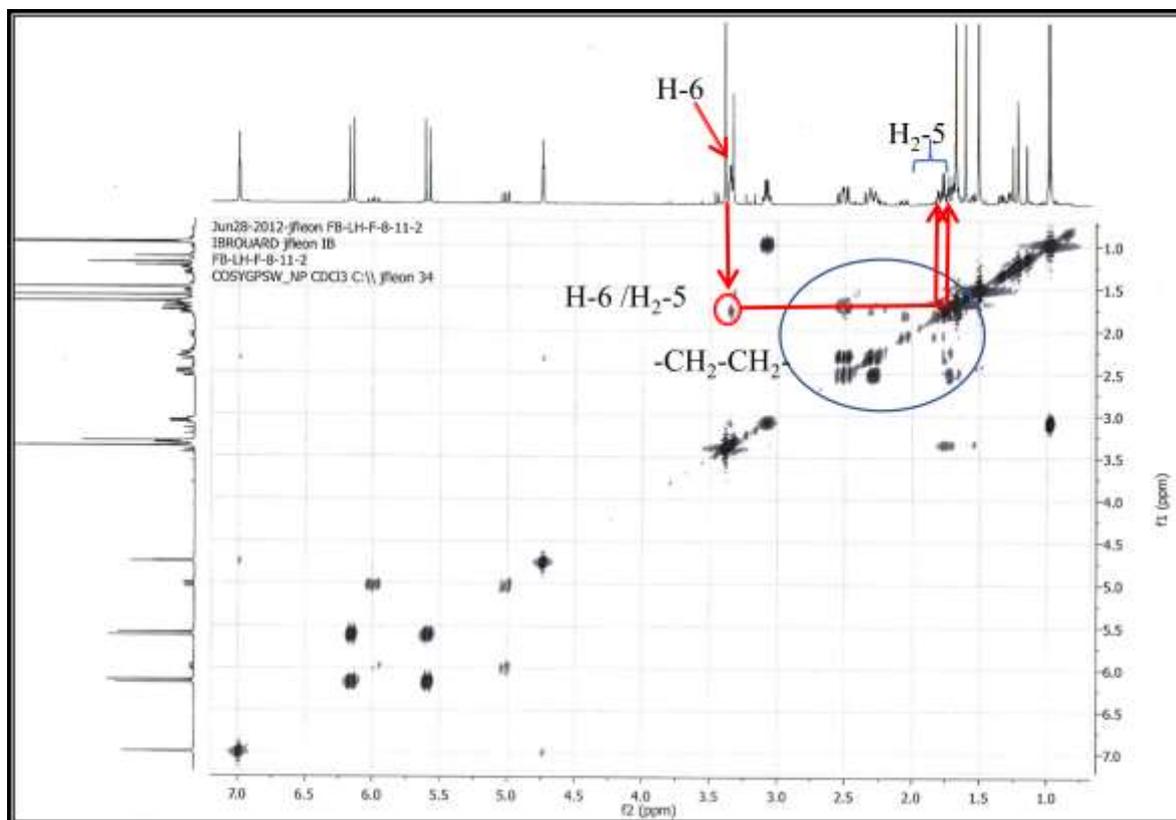
Spectre III- 50: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**



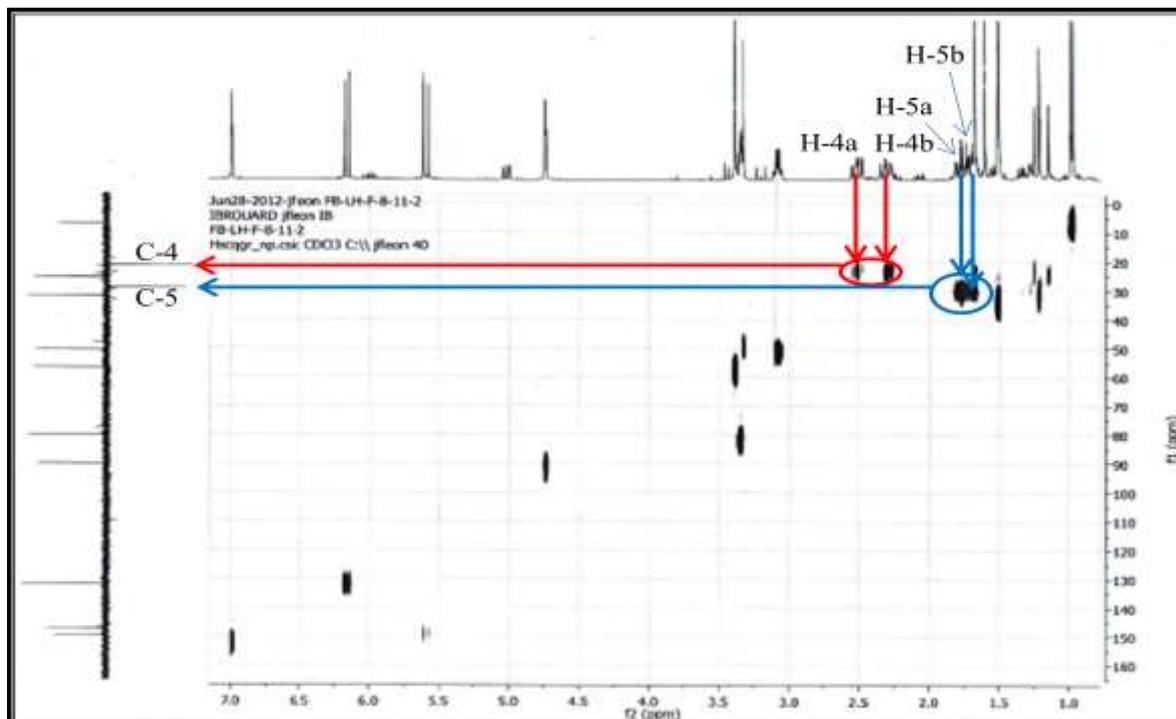
Spectre III-48: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

L'examen du spectre DEPT 135° (Spectre III-46) montre clairement la présence de deux groupements CH_2 , montrant des corrélations entre leurs quatre protons sur le spectre COSY (Spectre III-50), indiquant la présence d'un système de spins $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, attribuables aux protons H_2-5 et H_2-4 . Les carbones de ces deux groupements méthylènes résonnent à $\delta_{\text{C}} = 29,17$ et $\delta_{\text{C}} = 21,37$ ppm, respectivement. Ces attributions sont justifiées par les corrélations relevées entre H-6 et les protons H_2-5 sur le spectre relatif à l'expérience COSY. On relève à

cet effet, le signal de H-5a à $\delta_H = 1,76$ ppm (multiplet), le signal de H-5b à $\delta_H = 1,71$ ppm (multiplet), le signal de H-4a à $\delta_H = 2,51$ ppm (multiplet) et le signal de H-4b à $\delta_H = 2,31$ ppm (multiplet).



Spectre III- 50 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A6



Spectre III- 49 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A6

Un réexamen de l'ensemble des spectres à notre disposition permet de relever la présence d'un carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C = 133,95$ ppm, il est évident que ce carbone n'est autre que le C-3 car c'est la seule position de ce squelette sesquiterpénique que nous n'avons pas encore évoquée à ce stade de notre analyse ; cependant, un dernier examen du spectre HMBC (Spectre III-48) permet de relever des petites taches de corrélation entre ce carbone et les protons H-1 et H-2, confirmant ainsi son attribution à C-3.

A ce stade de notre analyse structurale, nos résultats mènent à la structure plane reportée dans la figure III-15.

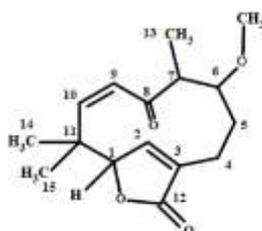
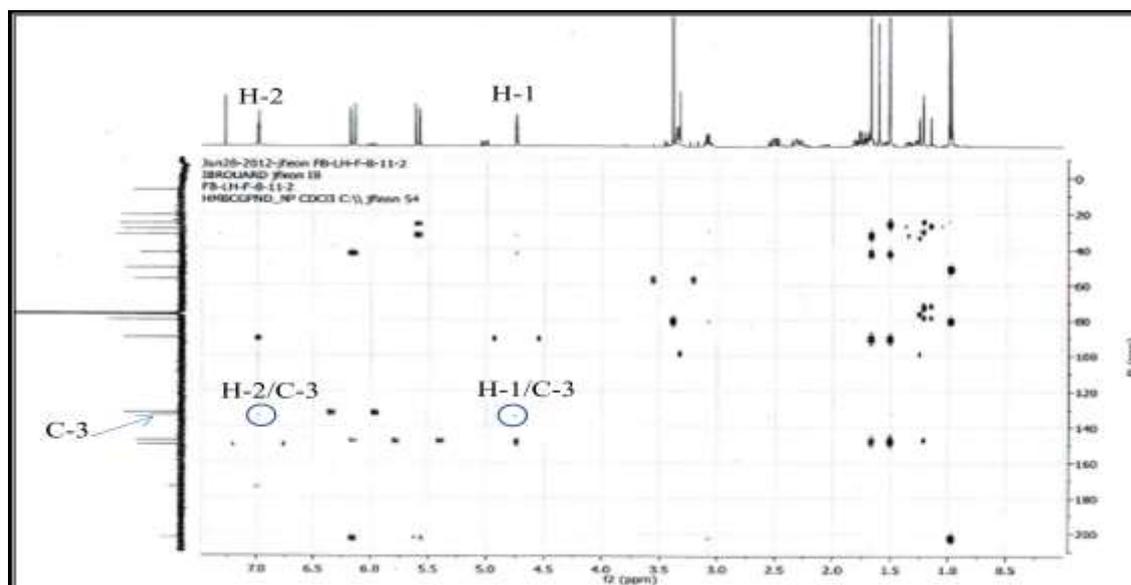


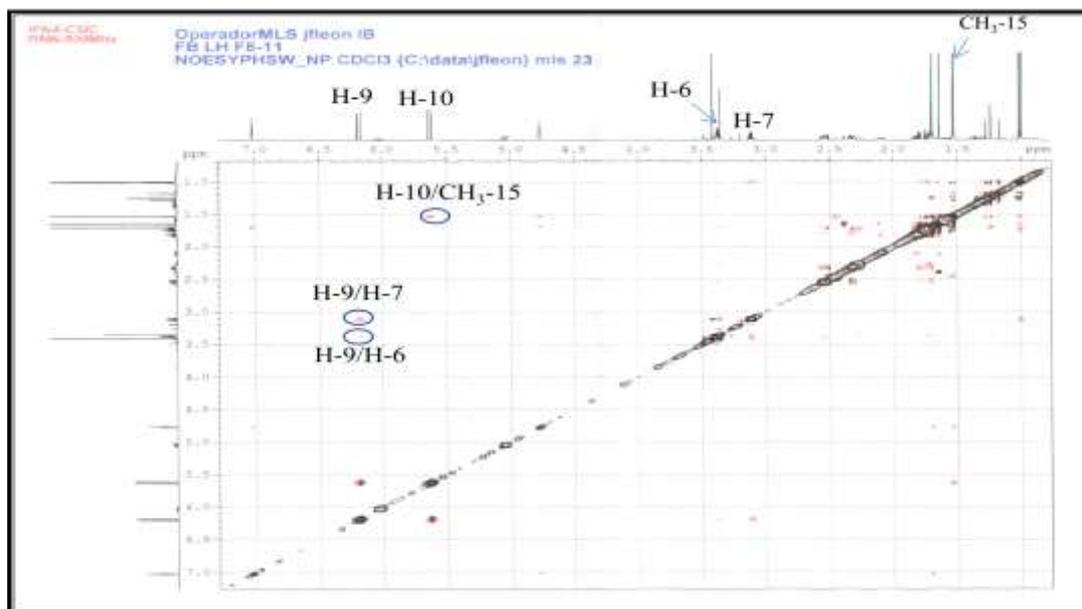
Figure III-15: Structure plane du composé A6



Spectre III-48 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A6

Sur le spectre NOESY (Spectre III-51), on relève une corrélation entre H-10 et les protons du méthyle-15, ce qui confirme notre attribution quant à ce méthyle ($\delta_H = 1,51$ ppm) car dans ce type de squelette sesquiterpénique le méthyle-15 est toujours représenté avec une orientation β et le méthyle-14 avec une orientation α . Le spectre NOESY montre également des

corrélations entre H-9/H-7 et H-9/H-6 indiquant que ces trois noyaux sont du même côté de la molécule et donc du côté de H-9 soit une orientation β .



Spectre III- 51: Spectre NOESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A6**

Dans ce travail, la mesure du pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a été effectuée et a montré qu'elle est lévogyre avec $[\alpha]_D^{21} = -66^\circ$ ($c = 0,009$ g/mL ; MeOH).

L'ensemble de ces données oriente vers la structure finale du composé **A6** reportée dans la figure III-16. L'orientation α de de H-1 repose sur les résultats de Boumaraf et *al.* (2017) [39] Il s'agit du (-)-(2Z, 9Z) 6 α -methoxy-8-oxo-2,9-humuladien-1(12)-olide connu sous le nom de (-)-asteriscunolide **F**.

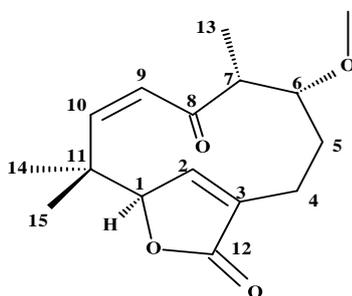


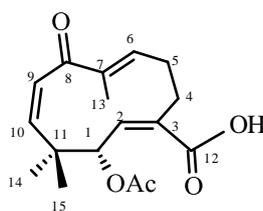
Figure III-16 : Structure finale du composé **A6** : (-)-asteriscunolide **F**

Les déplacements chimiques de notre composé **A6** relevés sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C , sont reportés dans le tableau III-5.

Tableau III-5 : Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) du composé **A6** (CDCl_3)

Position	δ_{C} DEPT	δ_{H} mult. (J , Hz)
1	90,27 (CH)	4,75 ; sl
2	149,93 (CH)	7,00 ; sl
3	133,95 (C)	/
4a	21,37 (CH_2)	2,51 ; m
4b		2,31 ; m
5a	29,17 (CH_2)	1,76 ; m
5b		1,71 ; m
6	80,37 (CH)	3,35 ; m
7	50,84 (CH)	3,09 ; m
8	202,55 (C)	/
9	132,15 (CH)	6,16 ; d (13,6)
10	147,76 (CH)	5,60 ; d (13,6)
11	42,52 (C)	/
12	173,81 (C)	/
13	7,11 (CH_3)	0,98 ; d (6,4)
14	25,70 (CH_3)	1,69 ; s
15	31,95 (CH_3)	1,51 ; s
16 (OMe)	56,91 (CH_3)	3,39 ; s

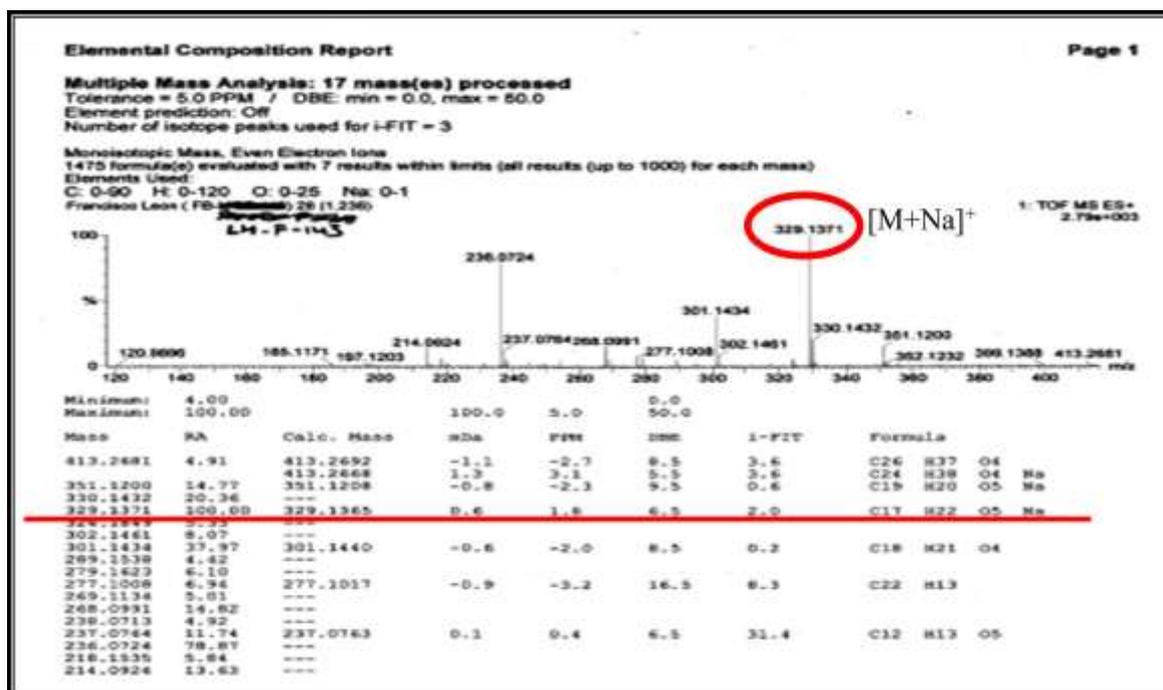
III-1-6- Elucidation structurale du composé A5



A5

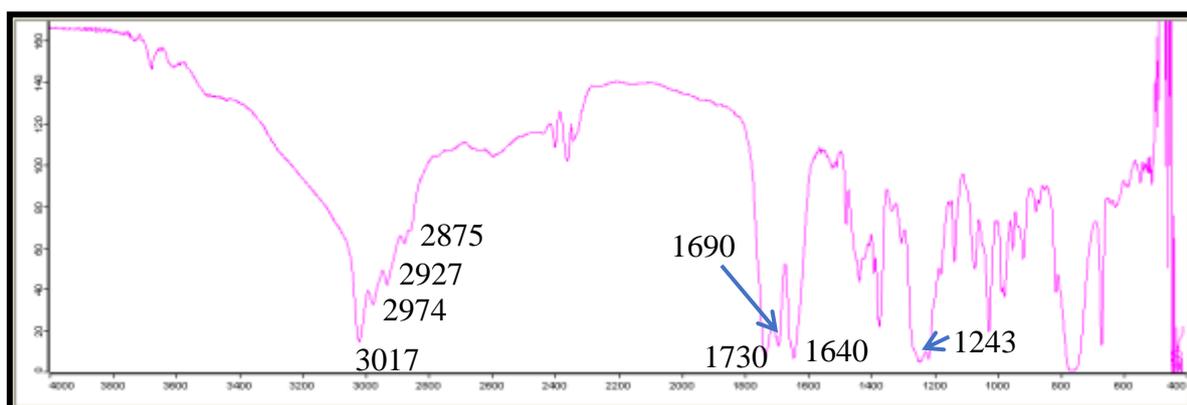
Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux blancs (point de fusion 180°C). L'examen de son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation positive [TOF-HRESI-MS (+)] (Spectre III-52) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 329,1371$ Th, correspondant à la formule $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$ (calculée 329,1365

Da), indiquant une formule brute $C_{17}H_{22}O_5$ pour cette molécule soit une structure de masse 306 Da comportant sept insaturations.



Spectre III-52 : Spectre TOF-HRESI-MS(+) du composé A5

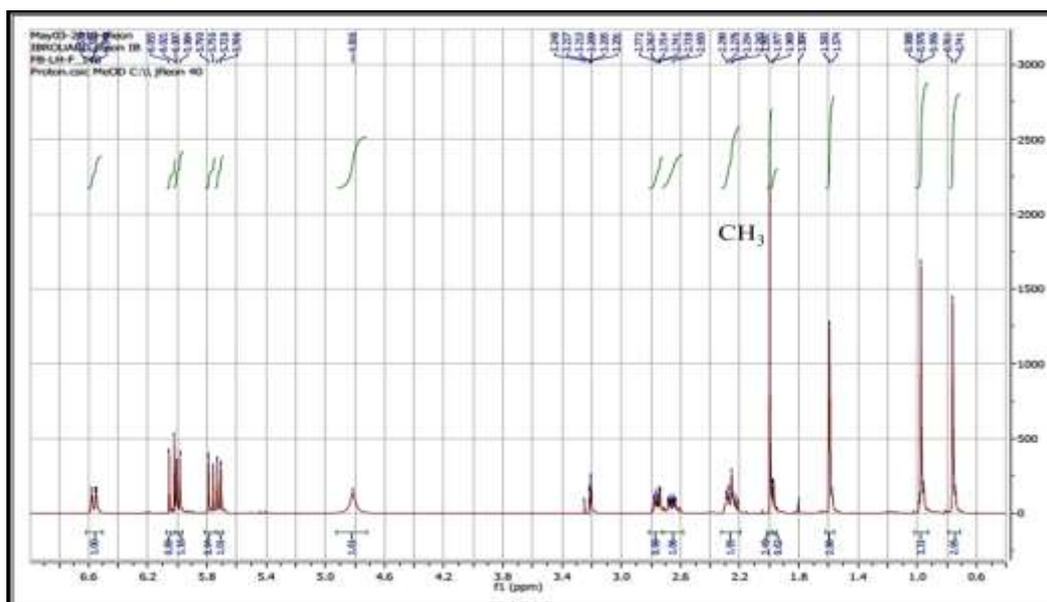
Le spectre IR de ce composé A5 (Spectre III-53) montre des bandes d'absorption d'un acide carboxylique à 3017- 2875 et 1730 cm^{-1} , ainsi qu'un groupement carbonyle de cétone conjuguée à 1690 cm^{-1} , une double liaison conjuguée à 1640 cm^{-1} et une bande d'absorption caractéristique d'un groupement acétate à 1243 cm^{-1} .



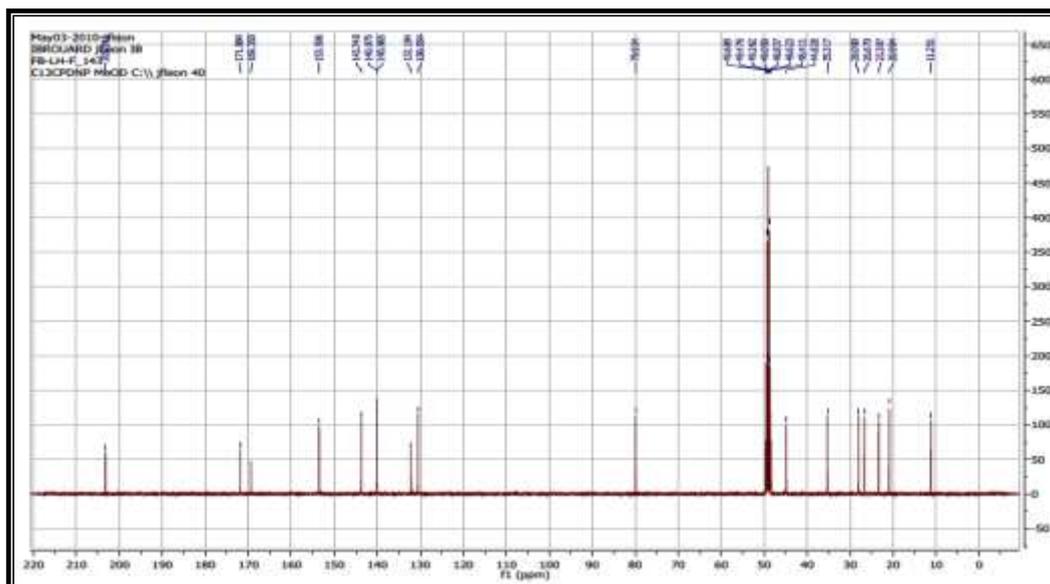
Spectre III-53 : Spectre IR du composé A5

L'examen des spectres proton (Spectre III-54), DEPT 135° (Spectre III-55) et ^{13}C (Spectre III-56) et HSQC (Spectre III-57), de cette molécule permet de relever en premier

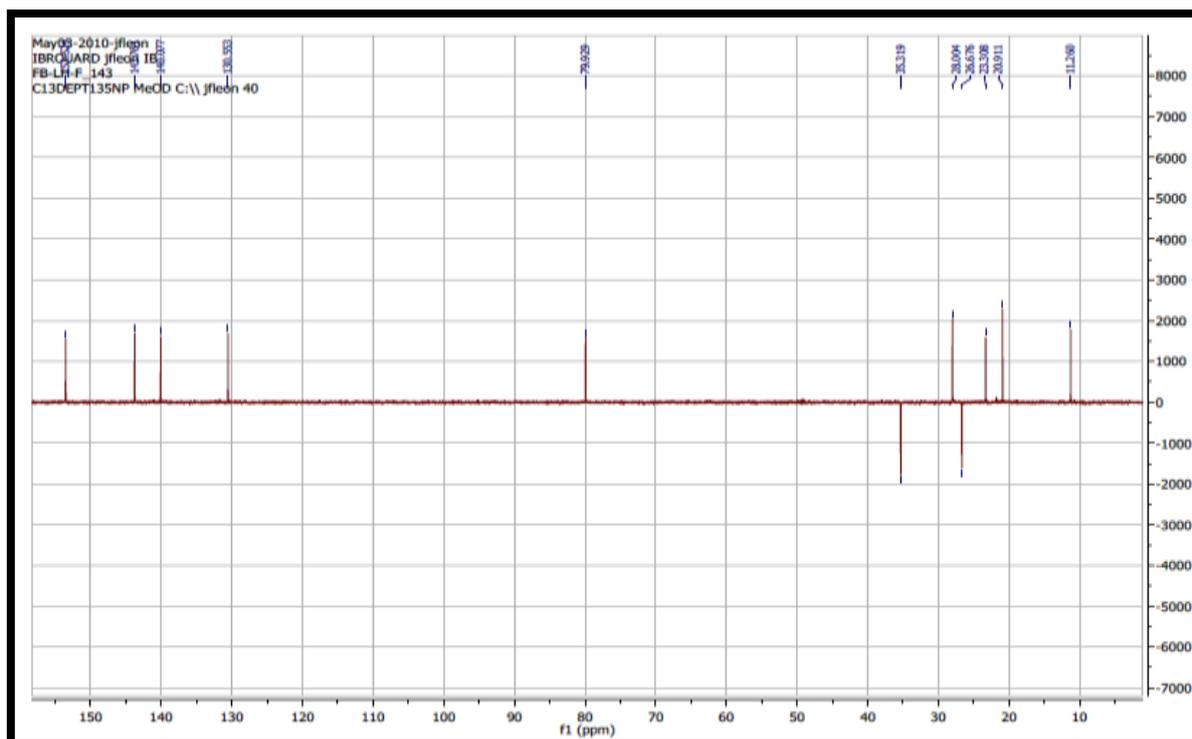
lieu la présence d'un groupement CH_3 résonnant sous forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}} = 2,09$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 20,85$ ppm) corrélant sur le spectre HMBC (Spectre III-58) avec un groupement carbonyle résonnant à $\delta_{\text{C}} = 171,90$ ppm en faveur de la présence d'un groupement acétate dans cette molécule comme indiqué par le spectre d'absorption infrarouge. Sur le spectre HMBC (Spectre III-58), le carbone de ce carbonyle montre une tache de corrélation avec le proton d'un groupement méthine résonnant à $\delta_{\text{H}} = 6,09$ (d ; $J = 9,1$ Hz) indiquant que ce groupement acétate est porté par le carbone de ce méthine ($\delta_{\text{C}} = 79,88$ ppm).



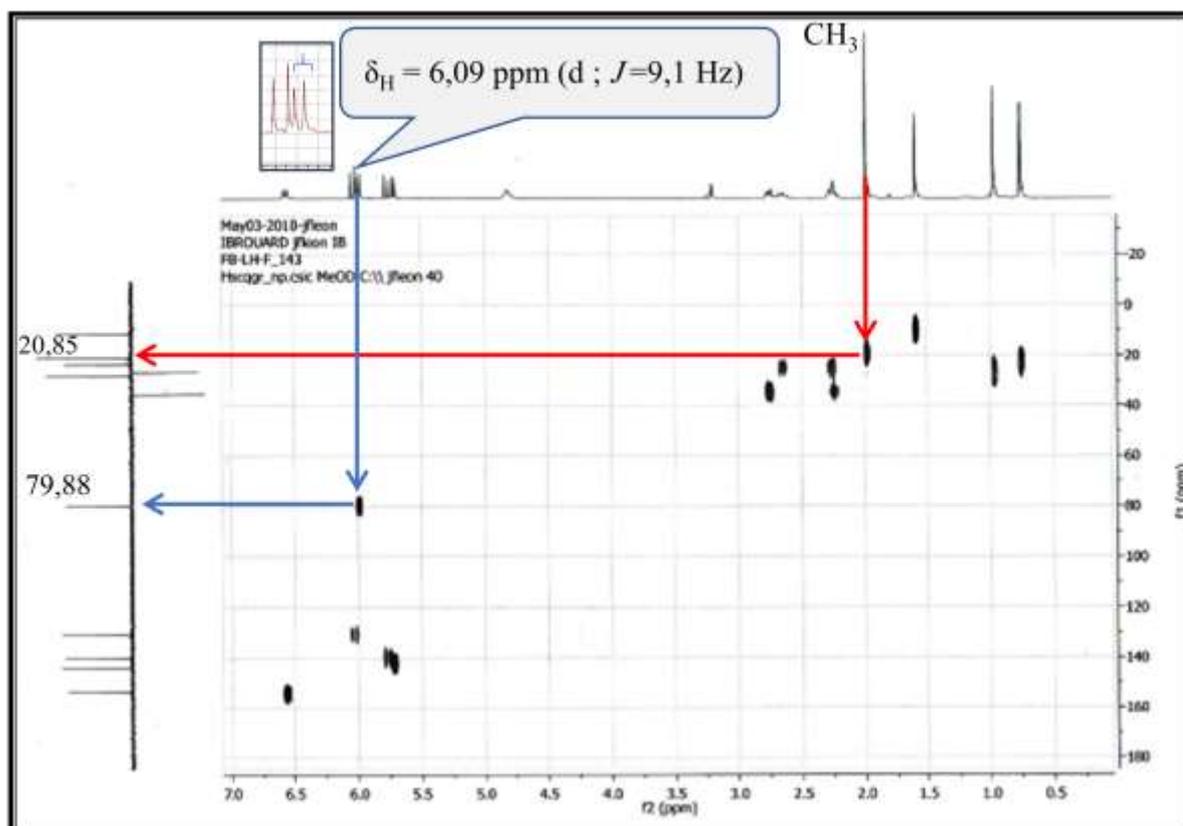
Spectre III-54 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A5



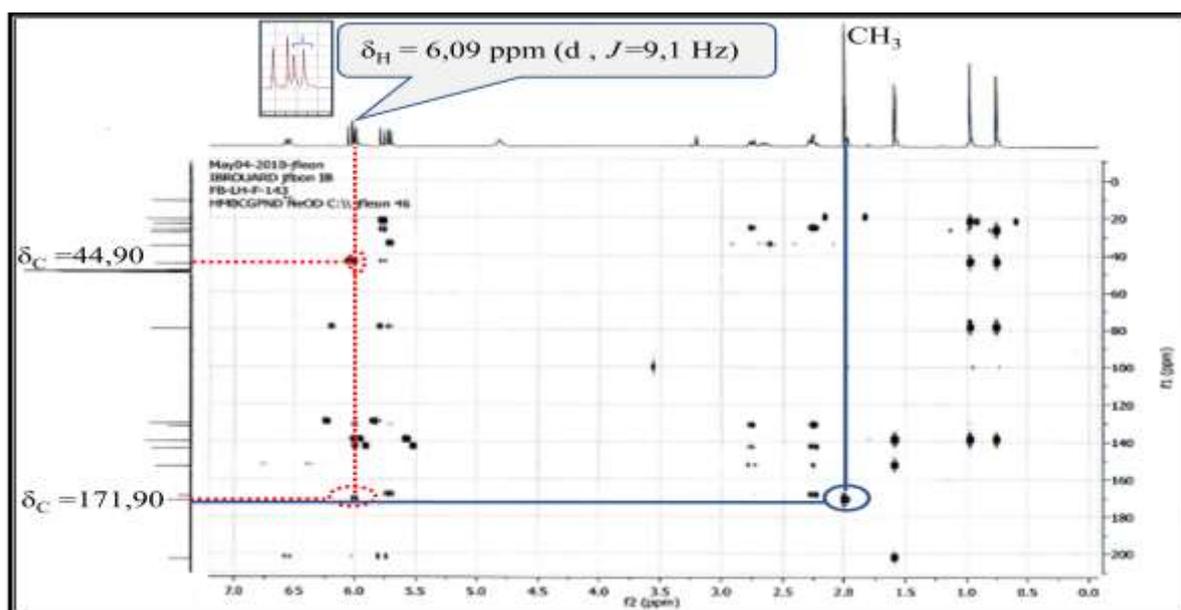
Spectre III-55 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé A5



Spectre III-56 : Spectre DEPT 135° (125 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5

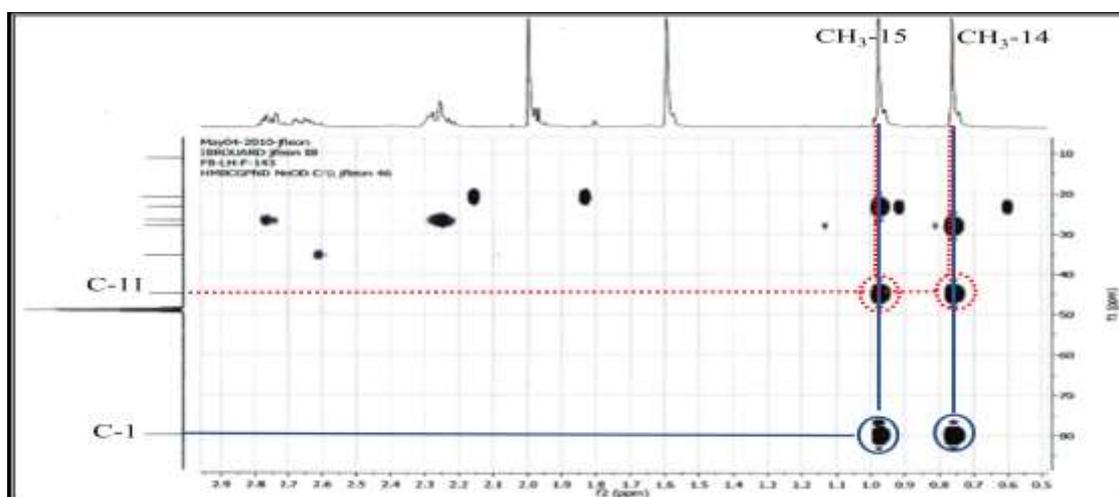


Spectre III-57 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé A5



Spectre III-58 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5**

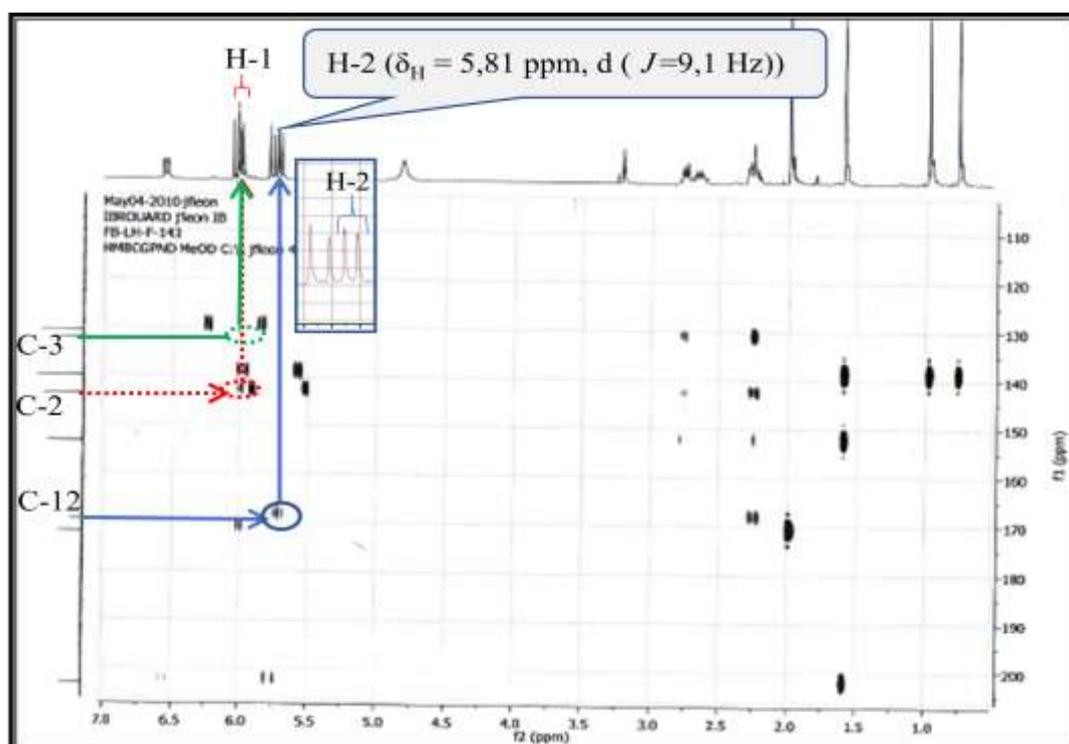
En faisant abstraction des signaux de ce groupement acétate, on relève que les spectres de ce composé sont très similaires à ceux du composé **A6**. Ceci implique que ce composé admet un squelette sesquiterpénique du même type que celui du composé **A6**. On relève en effet, sur le spectre HMBC (Spectre III-59), des corrélations entre le carbone porteur du groupement acétate et les protons des deux méthyles résonnant sous forme de singulets, CH₃-14 à $\delta_H = 0,86$ ($\delta_C = 23,25$ ppm) et CH₃-15 à $\delta_H = 1,07$ ($\delta_C = 27,95$ ppm) ainsi qu'une corrélation entre le carbone C-11 porteur de ces deux méthyles et le proton du méthine porteur du groupement acétate. Cette observation permet de placer le groupement acétate en C-1 du squelette sesquiterpénique de cette molécule et oriente alors vers le fait que ce composé n'est pas lactonisé et qu'il s'agit plutôt d'un acide sesquiterpénique, ce qui était attendu d'après les données du spectre IR.



Spectre III-59 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5** (Etalement 1)

En effet, sur le spectre ^{13}C (Spectre III-55), on relève la présence d'un groupement carbonyle dont le carbone résonne à $\delta_{\text{C}} = 169,30$ ppm, vu cette valeur du déplacement chimique, il est clair que ce carbonyle d'acide doit bénéficier d'une conjugaison. Cette idée est vite vérifiée car le carbone de ce carbonyle montre sur le spectre HMBC (Spectre III-60), une tache de corrélation avec le proton éthylénique résonnant sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5,81$; ($J = 9,1$ Hz ; $\delta_{\text{C}} = 143,69$ ppm).

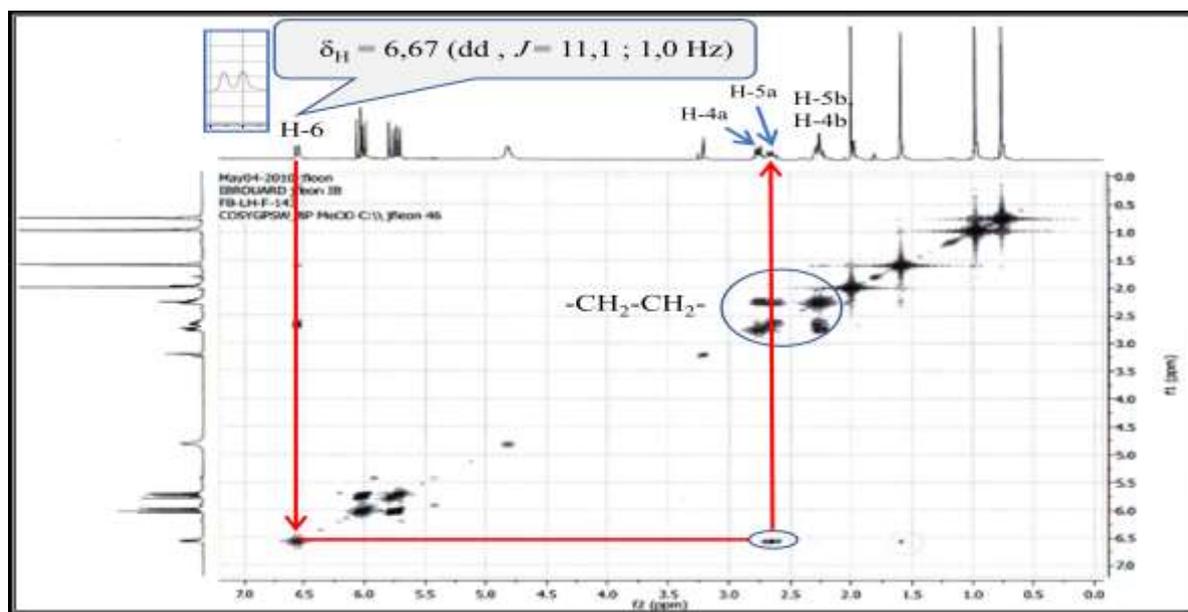
Toujours sur le même spectre (Spectre III-60), ce carbone éthylénique montre une tache de corrélation avec le proton H-1 ($\delta_{\text{H}} = 6,09$). Cette donnée permet d'attribuer le méthine [$\delta_{\text{H}} = 5,81$; ($J = 9,1$ Hz ; $\delta_{\text{C}} = 143,691$ ppm)] à la position C-2, et le carbone du carbonyle de l'acide à la position C-12. La résonance du carbone C-3 délimitant la double liaison conjuguée avec le carbonyle de l'acide est relevée à $\delta_{\text{C}} = 132,13$ ppm (carbone quaternaire éthylénique) grâce à sa corrélation avec H-1.



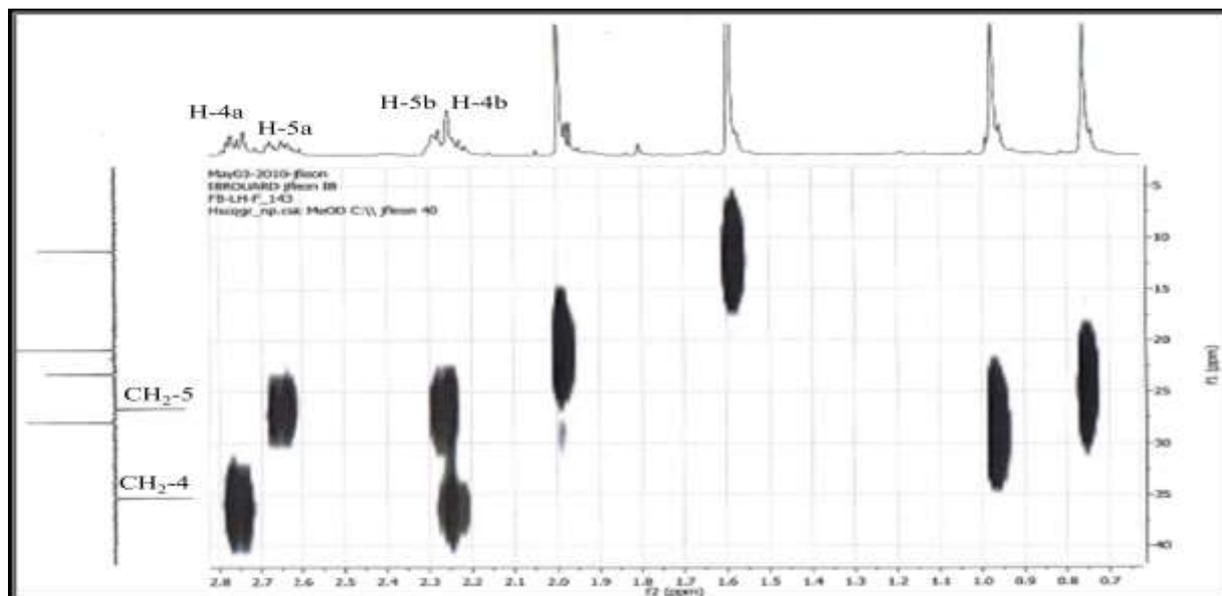
Spectre III-60 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5** (Étalement 2)

L'association des données des spectres COSY (Spectre III-61), HSQC (Spectre III-62) et HMBC (Spectre III-63), permet d'attribuer les noyaux de la position C-4 aux résonances à $\delta_{\text{H}} = 2,83$ (H-4a ; m), $\delta_{\text{H}} = 2,35$ (H-4b ; m), $\delta_{\text{C}} = 35,30$ ppm (C-4) ; les noyaux de la position C-5 aux résonances à $\delta_{\text{H}} = 2,76$ (H-5a ; m), $\delta_{\text{H}} = 2,35$ (H-5b ; m), $\delta_{\text{C}} = 26,62$ ppm (C-5) et les noyaux de la position C-6 aux résonances à $\delta_{\text{H}} = 6,67$ (H-6 ; dd ; $J = 11,1$; 1,0 Hz), $\delta_{\text{C}} = 153,50$

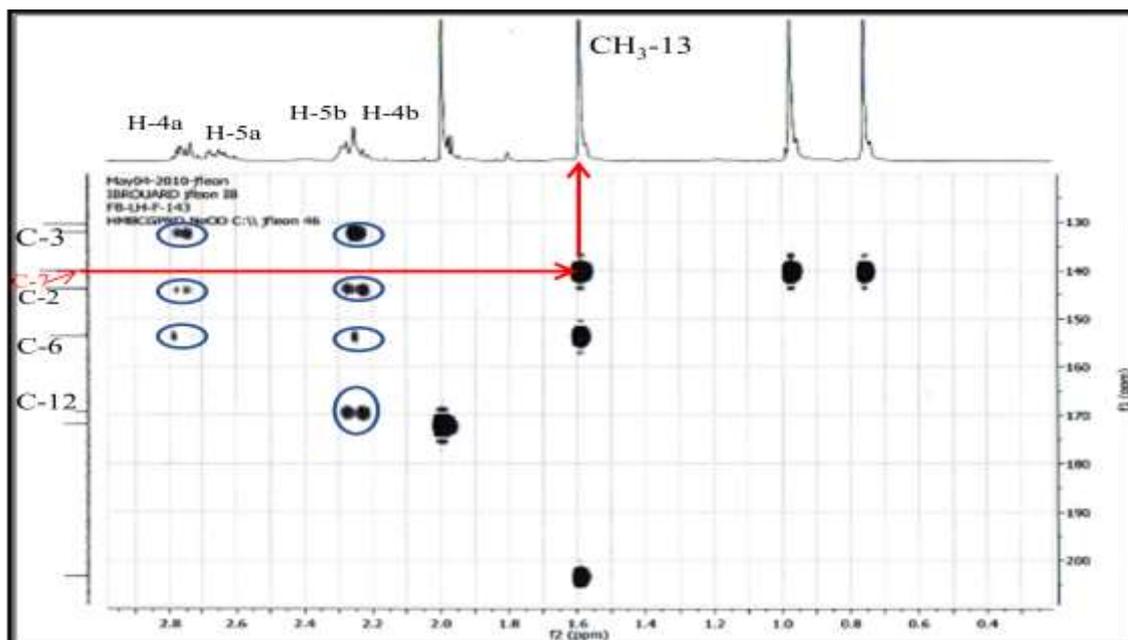
ppm (C-6). Cette dernière donnée indique la présence d'une double liaison entre C-6 et C-7. On relève à cet effet, une corrélation entre le carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C = 140,02$ ppm et les protons du méthyle résonnant sous forme d'un singulet à $\delta_H = 1,69$ ppm et qui ne peut être que le méthyle-13. La résonance du C-13 est relevée à $\delta_C = 11,20$ ppm. De ce fait, ce carbone quaternaire éthylénique est attribué au C-7.



Spectre III-61 : Spectre COSY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5**



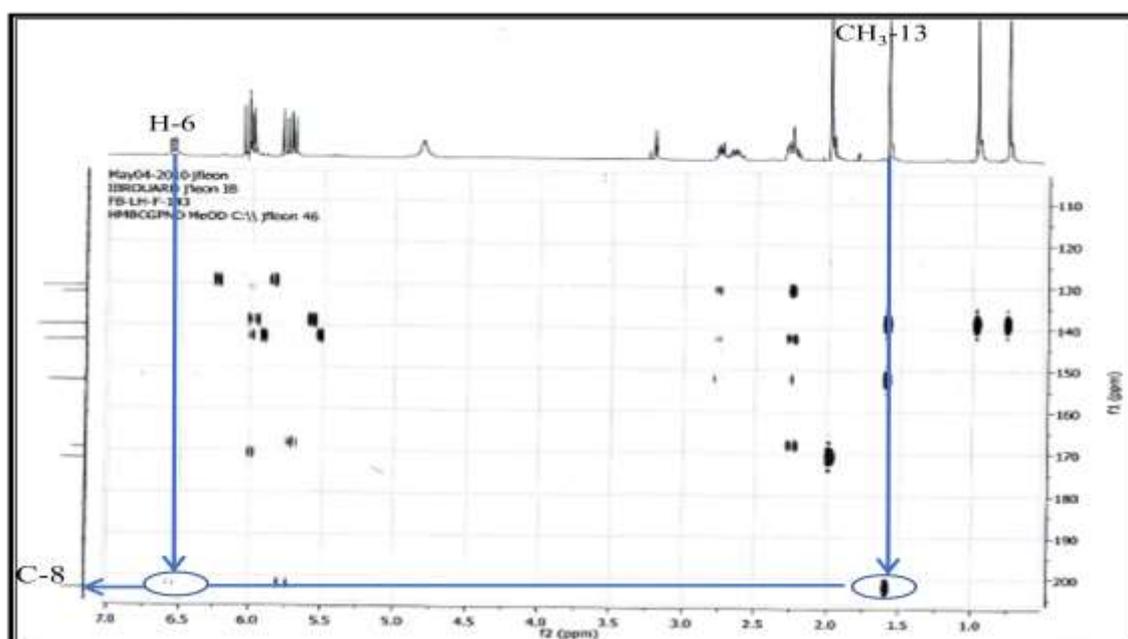
Spectre III-62 : Spectre HSQC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5** (Etalement)



Spectre III-63 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5**

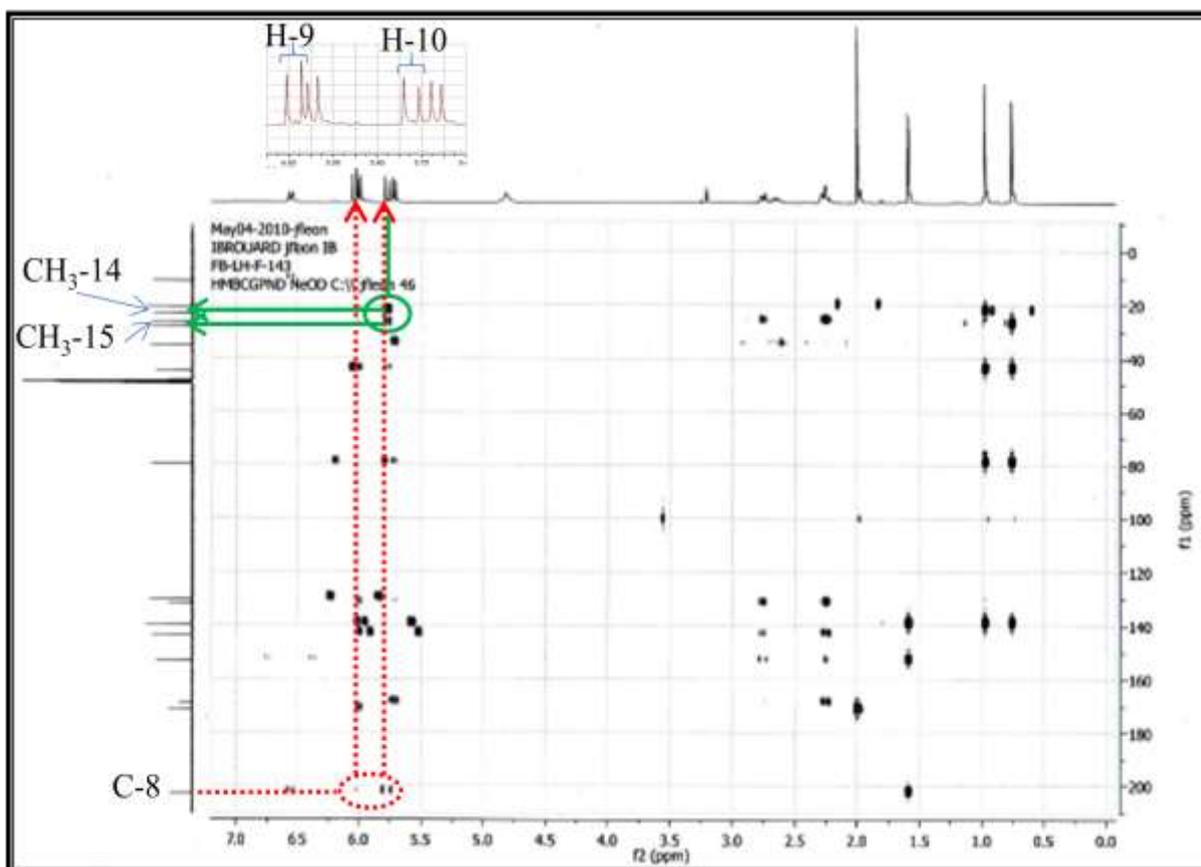
(Etalement 3)

Un réexamen du spectre HMBC (Spectre III-60), permet de relever des corrélations entre H-6, les protons H₃-13 et le carbone d'un carbonyle résonnant à $\delta_C = 203,20$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone correspond à celui d'une cétone conjuguée et indique donc, la présence d'un groupement oxo en C-8.

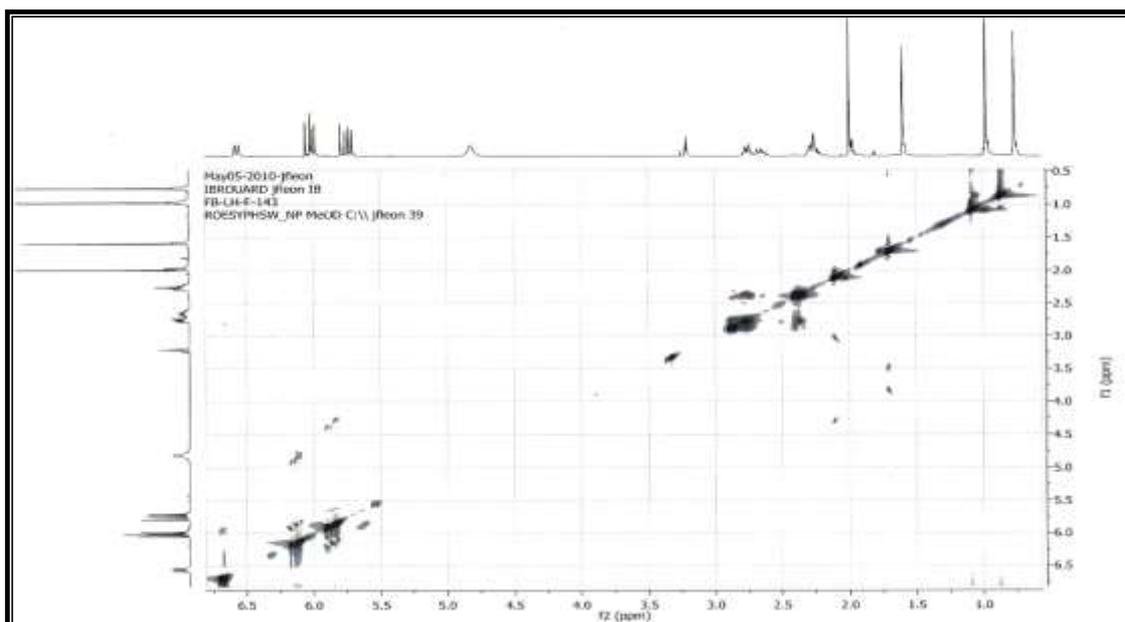


Spectre III-60 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5** (Etalement 2)

En fait ce groupement carbonyle (C-8) est doublement conjugué car on relève également sur le spectre HMBC (Spectre III-58), deux taches de corrélation avec deux protons éthyléniques résonnant dans le spectre RMN¹ H à $\delta_H = 6,14$ (d ; $J = 13,5$ Hz) et $\delta_H = 5,88$ ppm (d ; $J = 13,5$ Hz). Il est évident que ces deux protons soient attribués à H-9 et H-10, respectivement, vu les corrélations observées (spectre HMBC) entre le proton résonnant à $\delta_H = 5,88$ ppm (H-10) et les carbones C-14 et C-15. Les résonances des carbones C-9 et C-10, sont relevées à $\delta_C = 130,50$ ppm et $\delta_C = 140,01$ ppm, respectivement. On note au passage que la double liaison entre C-9 et C-10 admet une configuration (Z) suite à la valeur de l'interaction de couplage 13,5 Hz entre H-9 et H-10 ; par contre, la double liaison entre C-6 et C-7 est de configuration (E) vu l'absence de corrélation entre H-6 et H₃-13 sur le spectres ROESY (Spectre III-64).



Spectre III-58 : Spectre HMBC (500 MHz, MeOH-*d*₄, δ ppm) du composé **A5**



Spectre III-64 : Spectre ROESY (500 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **A5**

A ce stade de notre analyse et tenant compte de la formule brute $C_{17}H_{22}O_5$ de cette molécule, il apparait clairement que le composé **A5** est un acide sesquiterpénique à squelette humulène. Les travaux que nous avons effectués en polarimétrie ont montré que ce composé **A5**, admet un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{21} = -19,4^\circ$ ($c = 0.7578$ g/mL ; MeOH). L'étude minutieuse des spectres de RMN 2D et la comparaison avec les données rapportées sur l'ester méthylique isolé par El Dahmny et al. (1985) [28], nous nous ont conduits à la conclusion que le composé **A5** pouvait être identifié comme étant l'acide (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque (Figure III-17).

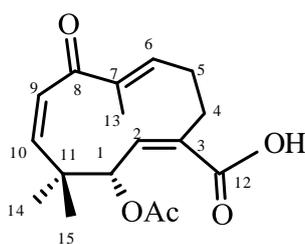


Figure III-17 : Structure finale du composé **A5**, l'acide (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque

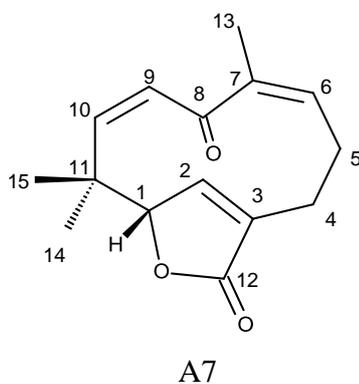
Il faut noter que cette molécule est nouvelle et que nous la décrivons pour la première fois dans la littérature [38].

Les données de la spectroscopie RMN relatives à cette molécule sont résumées dans le tableau III-6.

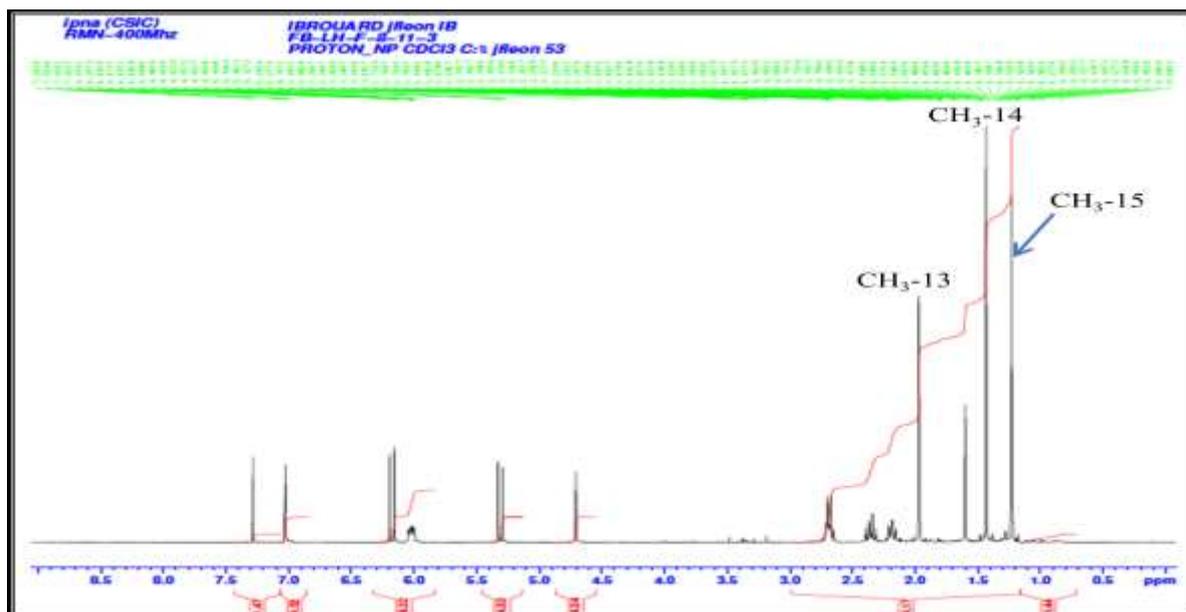
Tableau III-6: Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de **A5** (MeOH- d_4)

Position	δ_{C} DEPT	δ_{H} mult. (J, Hz)
1	79,88 (CH)	6,09 ; d (9,1)
2	143,69 (CH)	5,81; d (9,1)
3	132,13 (C)	/
4a	35,30 (CH ₂)	2,83; m
4b		2,35 ; m
5a	26,62 (CH ₂)	2,76 ; m
5b		2,35; m
6	153,50(CH)	6,67; dd (11,1; 1,0)
7	140,02 (C)	/
8	203,20 (C)	/
9	130,50 (CH)	6,14; d (13,5)
10	140,01 (CH)	5,88; d (13,5)
11	44.,80 (C)	/
12	169.,30 (C)	/
13	11,20 (CH ₃)	1,69 ; s
14	23,25(CH ₃)	0,86 ; s
15	27,95(CH ₃)	1,07 ; s
16	171,90 (C)	/
17(OAc)	20,85 (CH ₃)	2,09 ; s

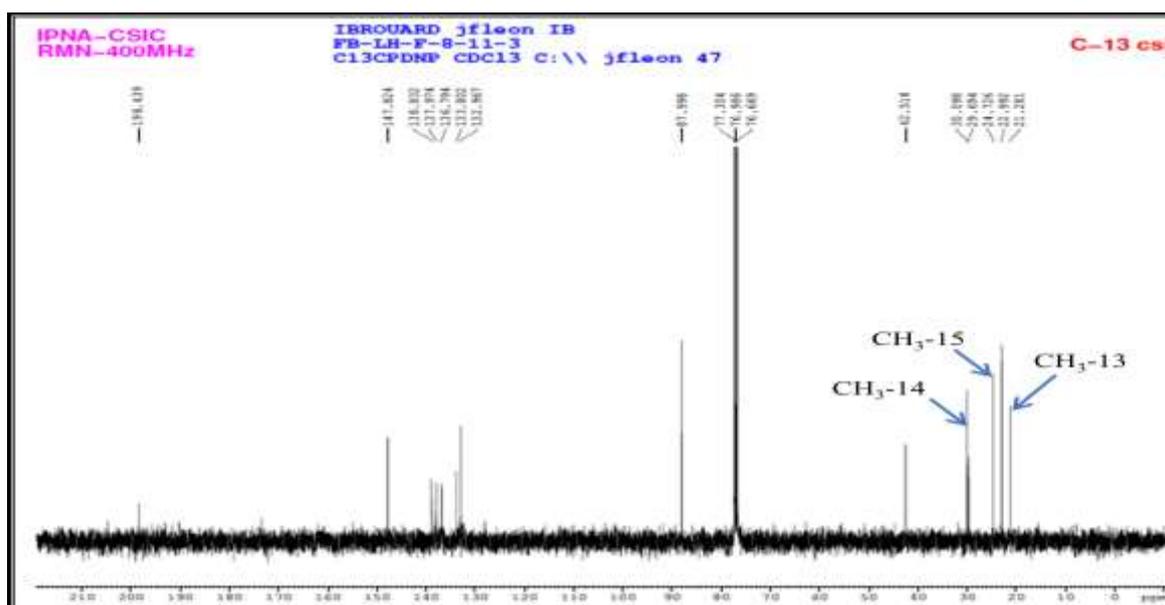
III-1-7- Elucidation structurale du composé A 7



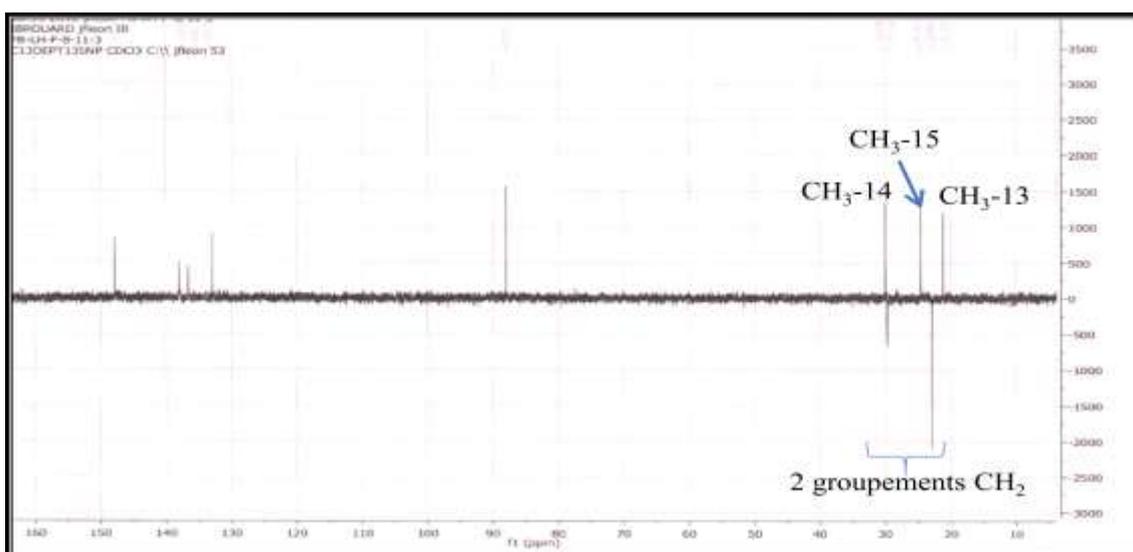
L'examen simultané des spectres de RMN ^1H (Spectre III-65) RMN ^{13}C (Spectre III-66), DEPT 135° (Spectre III-67) et HSQC (Spectre III-68), montre que ce composé admet un squelette sesquiterpénique très similaire à celui du composé **A5**. On y retrouve en effet les trois groupements méthyles : le CH₃-14 résonnant à $\delta_{\text{C}} = 30,10$ ppm ($\delta_{\text{H}} 1,34$ ppm ; s) ; le CH₃-15 résonnant à $\delta_{\text{C}} = 24,73$ ppm ($\delta_{\text{H}} 1,14$ ppm ; s) et le CH₃-13 résonnant à $\delta_{\text{C}} = 21,28$ ppm ($\delta_{\text{H}} 1,88$ ppm ; s).



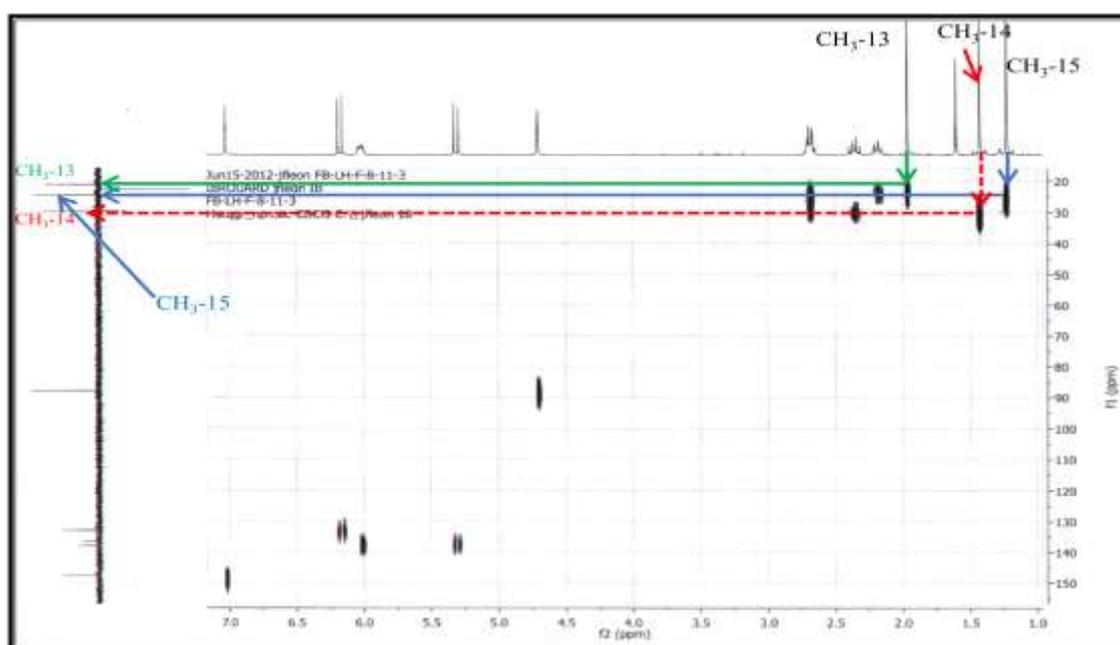
Spectre III-65 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7



Spectre III-66 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7.

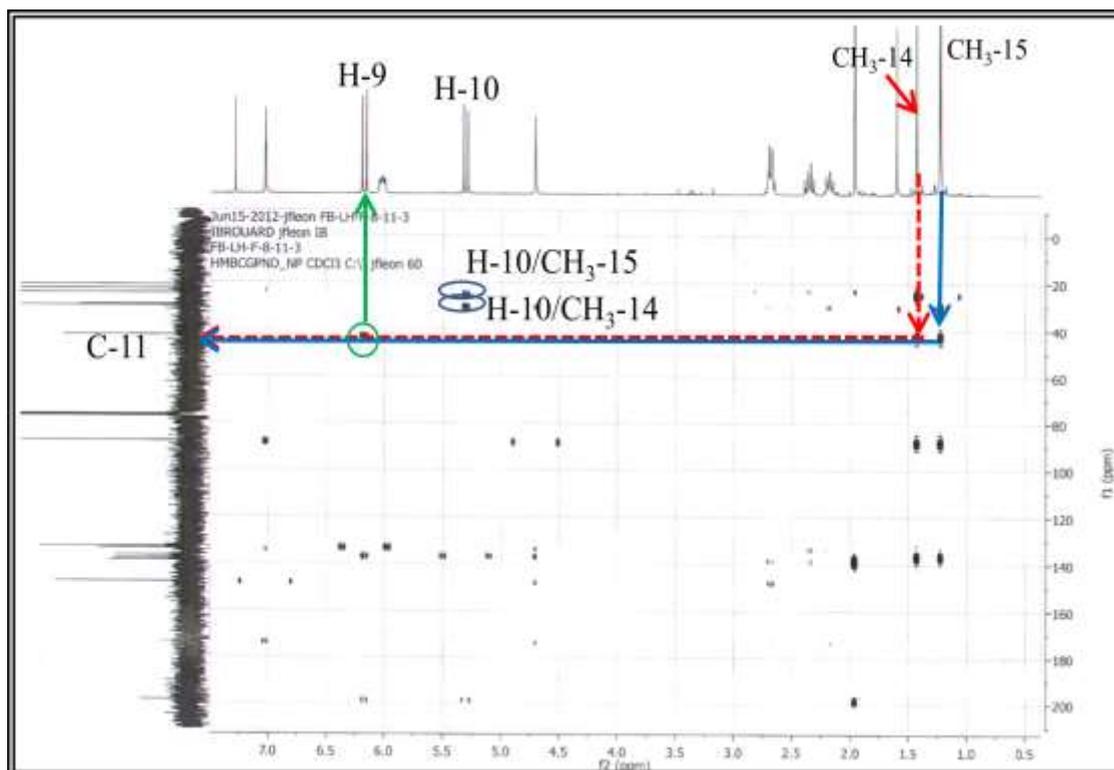


Spectre III-67 : Spectre DEPT 135° (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7



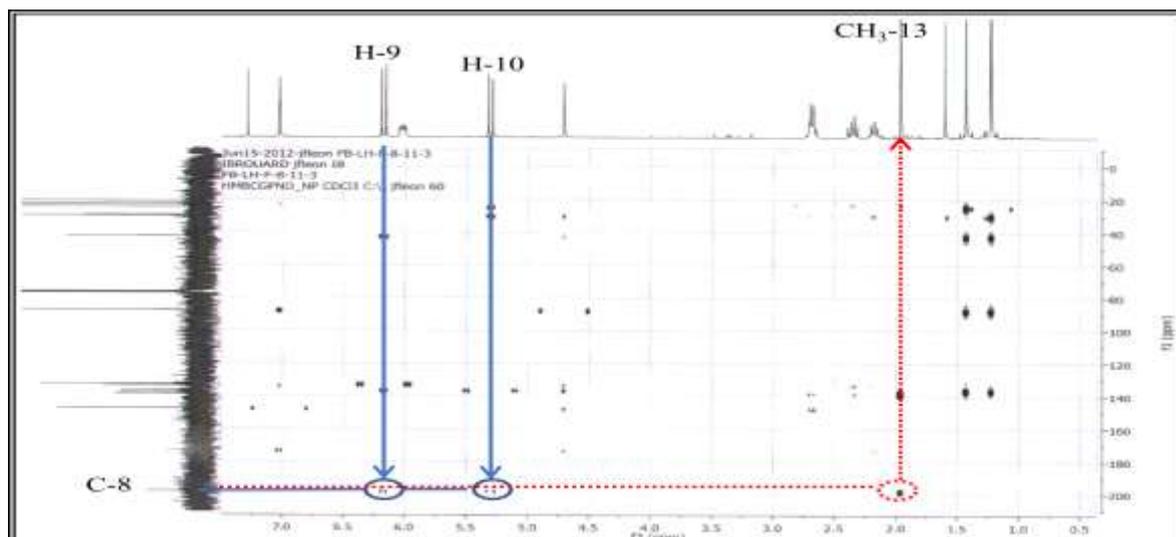
Spectre III-68 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7

Les attributions de CH₃-14 et CH₃-15 sont confirmées par leur corrélation sur le spectre HMBC (Spectre III-69) avec le carbone quaternaire hybridé sp³ et résonnant à $\delta_C = 42,52$ ppm attribuable au C-11. Grâce au même spectre et grâce à ces trois attributions le carbone et le proton du méthine résonnant à $\delta_C = 132,96$ et $\delta_H = 6,08$ (d ; $J = 13,5$ Hz) sont attribués aux C-9 et H-9, respectivement, de même le carbone et le proton du méthine résonnant à $\delta_C = 136,78$ et $\delta_H = 5,22$ (d ; $J = 13,5$ Hz) sont attribués aux C-10 et H-10, respectivement. On relève au passage la présence d'une double liaison entre C-9 et C-10 de configuration (Z), vu les valeurs des déplacements chimiques et la valeur de l'interaction de couplage H-9/H-10.



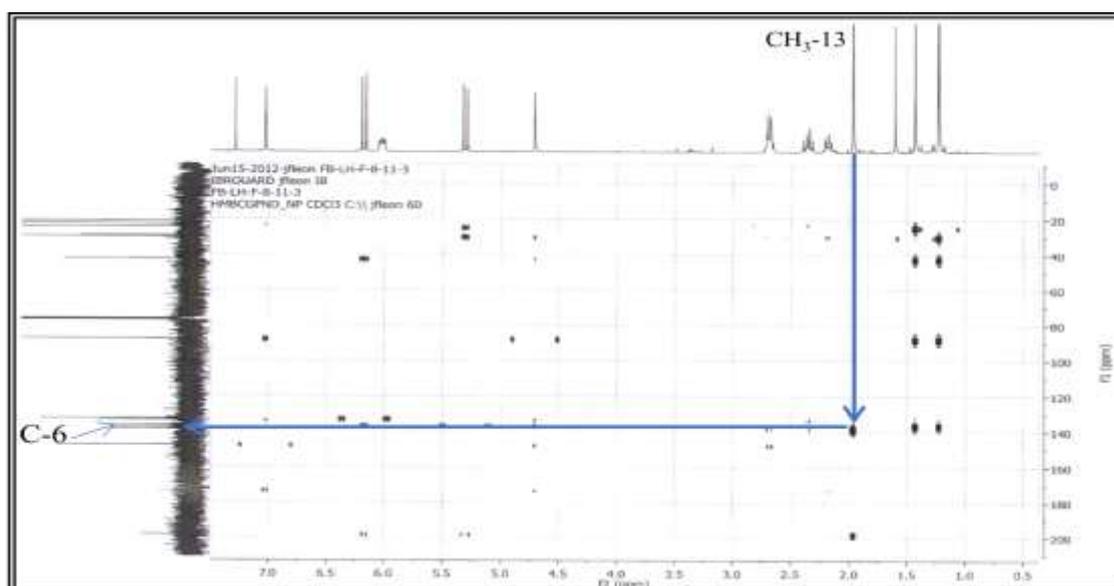
Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A7**

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-69), les deux protons éthyléniques H-9 et H-10 montrent des taches de corrélation avec le carbone d'un carbonyle résonnant à $\delta_{\text{C}} = 198,42$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone et le fait que ce carbonyle soit conjugué avec la double liaison entre C-9 et C-10, indiquent qu'il s'agit d'une cétone et qu'elle occupe la position C-8. On relève et toujours sur le spectre HMBC (Spectre III-69), une tache de corrélation entre le carbone de cette fonction cétone c'est-à-dire le C-8 et les protons du méthyle résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,88$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 21,28$ ppm). Ce méthyle est de ce fait, attribuable à la position C-13, confirmant ainsi notre attribution précédente.



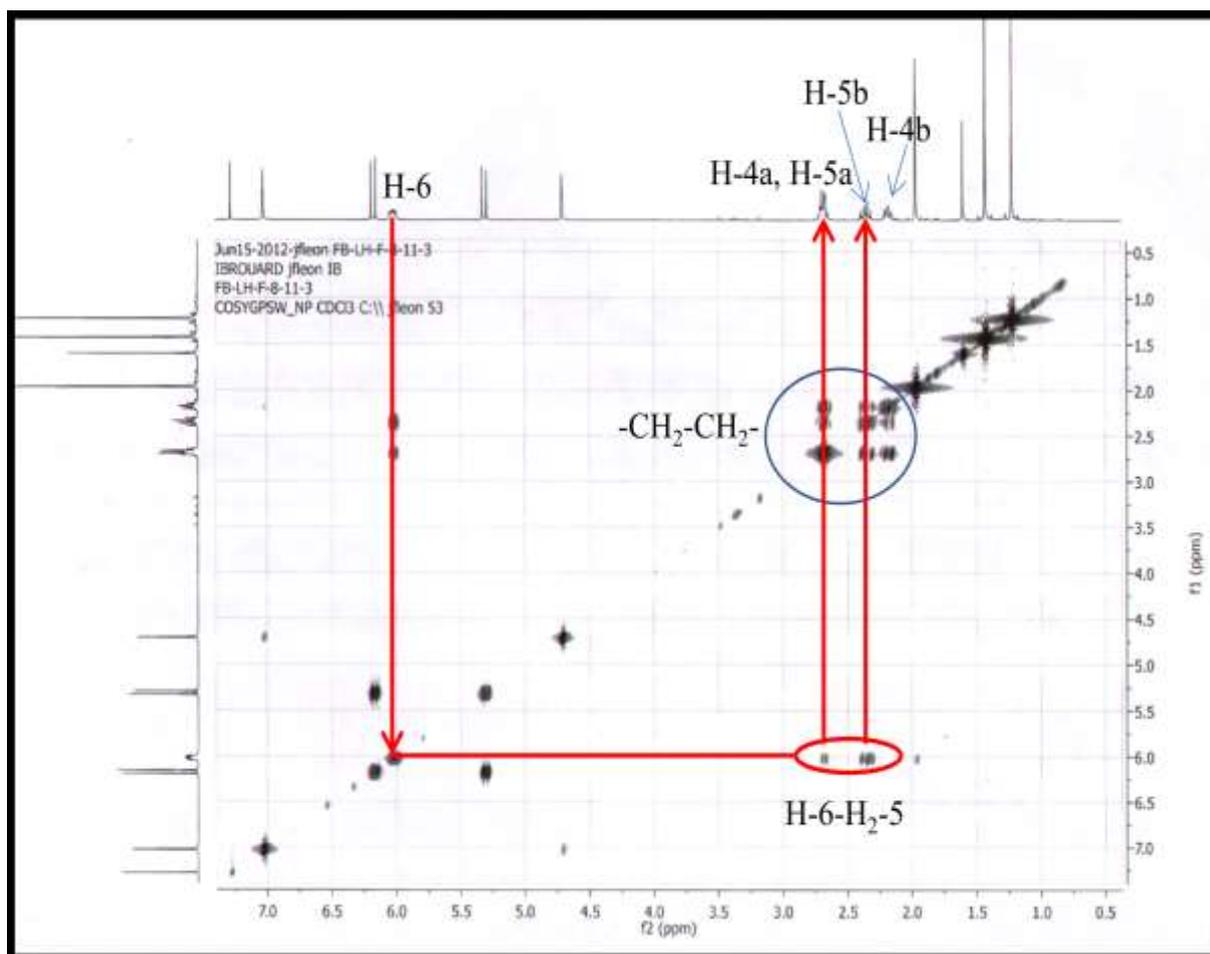
Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7

La multiplicité (singulet) du signal des protons de ce méthyle (CH₃-13) indique que son carbone porteur soit le que C-7 est quaternaire, quant à la valeur de son déplacement chimique (1,88 ppm), elle laisse envisager que le C-7 est éthylénique. En effet et toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC, les protons H₃-13 montrent une tache de corrélation avec le carbone du méthine résonnant à $\delta_C = 137,5$. Il est évident que le carbone de ce groupement méthine ne peut être que le C-6. La valeur de son déplacement chimique indiquant qu'il est éthylénique laisse donc envisager la présence d'une double liaison entre C-6 et C-7 confirmant ainsi la nature éthylénique de C-7. Grâce aux spectres HSQC et proton, la résonance du proton H-6 est relevée à $\delta_H = 5,93$ (ddd ; 10,8 ; 7,2 ; 1,6 Hz).

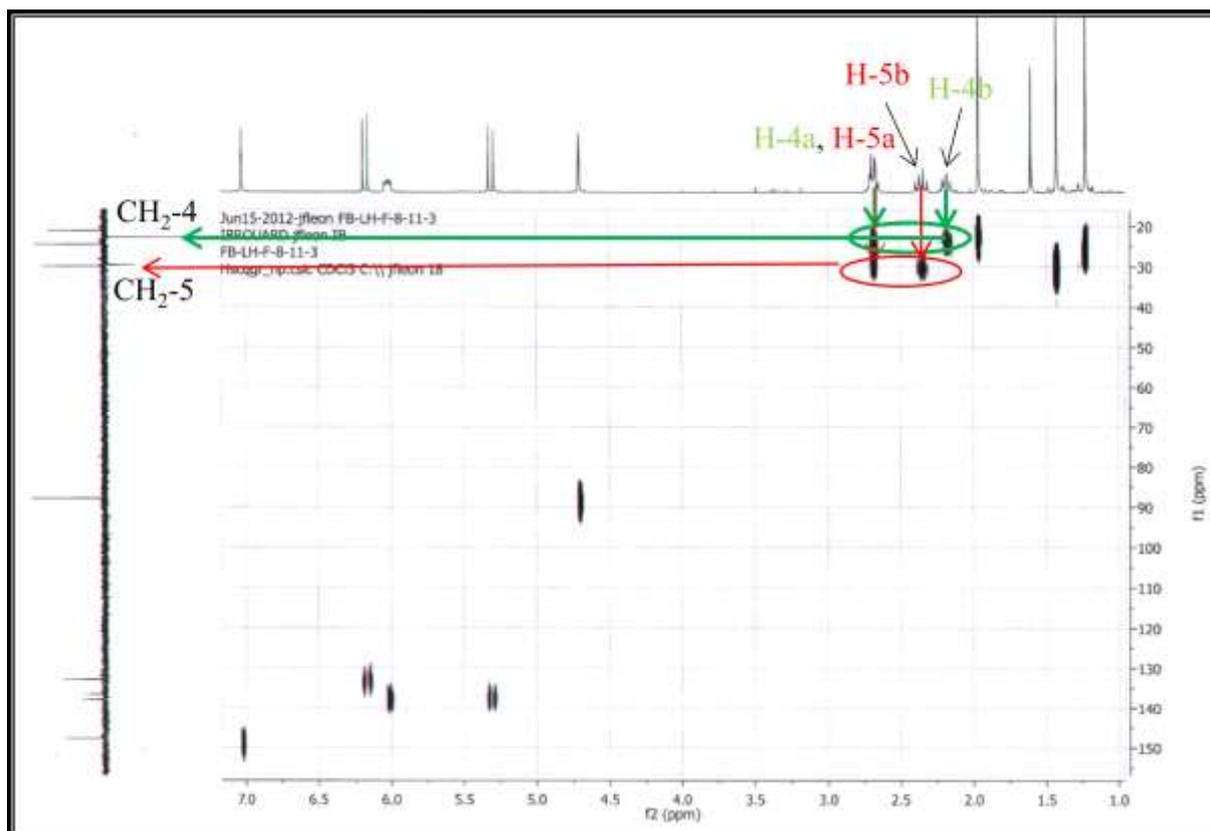


Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7

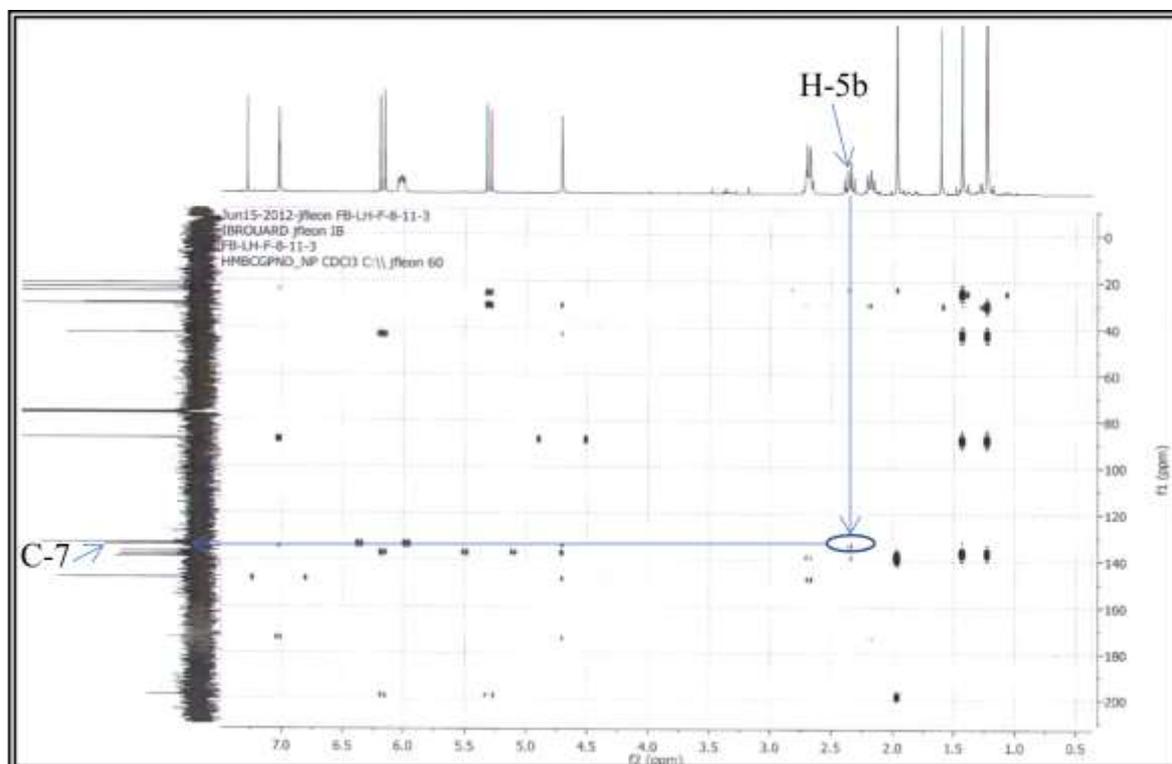
L'association des données des spectres COSY (Spectre III-70), HSQC (Spectre III-68) et HMBC (Spectre III-69), permet d'attribuer les noyaux de la position C-5 aux résonances à $\delta_H = 2,59$ (H-5a ; m), $\delta_H = 2,27$ (H-5b ; m), $\delta_C = 29,69$ ppm (C-5) ; les noyaux de la position C-4 aux résonances à $\delta_H = 2,59$ (H-4a ; m), $\delta_H = 2,11$ (H-4b ; m), $\delta_C = 22,99$ ppm (C-4). Un retour vers le spectre HMBC, permet de relever une corrélation entre le proton H-5b et le carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C = 133,79$ ppm, il est évident que ce carbone ne peut être attribué qu'au carbone C-7.



Spectre III-70 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7

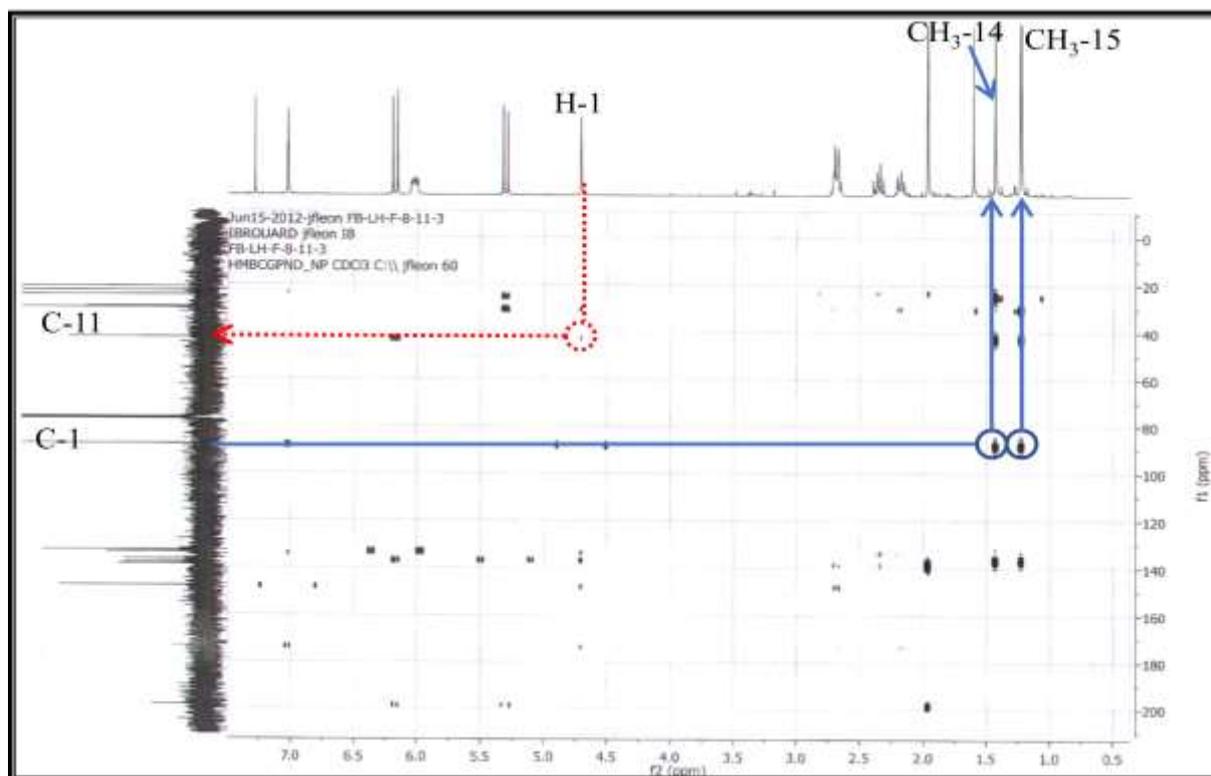


Spectre III-68 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7



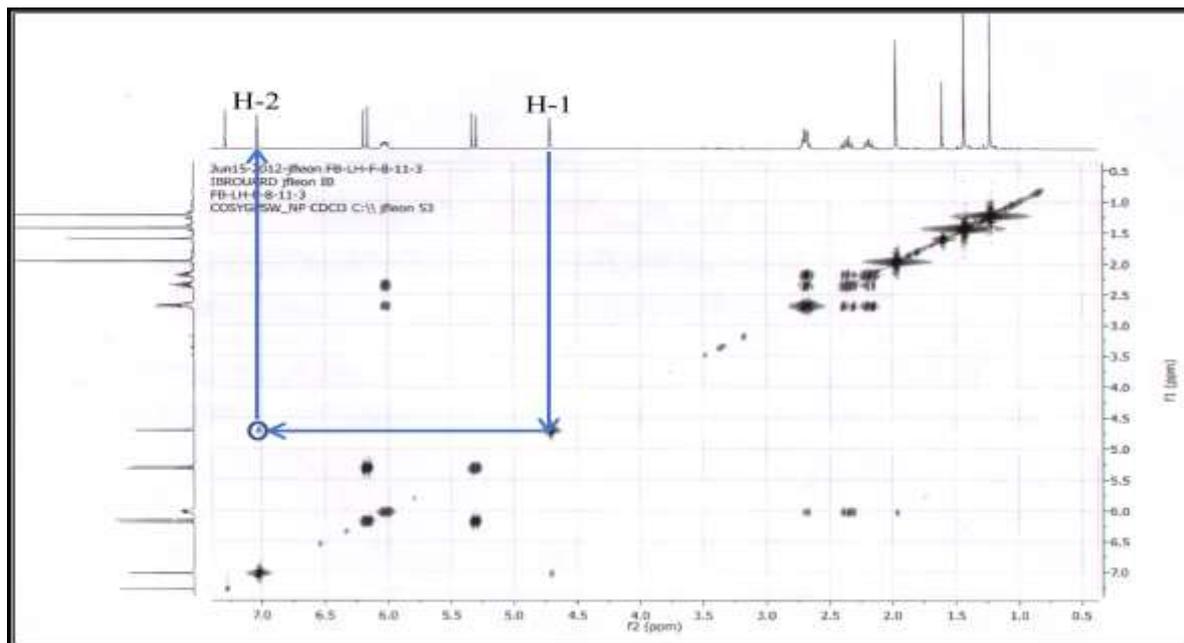
Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé A7

Sur le spectre DEPT 135°, on relève la présence d'un groupement méthine dont le signal est localisé à $\delta_C = 87,99$ ppm, grâce au spectre HSQC, le signal de son proton est relevé à $\delta_H = 4,62$ ppm. Sur le spectre HMBC, ce carbone montre des corrélations avec les protons H₃-14 et H₃-15 et son proton montre une corrélation avec le C-11. Ces observations suffisent pour attribuer le carbone de ce méthine au C-1 et son proton au H-1 ; les valeurs des déplacements chimiques de ces deux noyaux indiquent bien une oxygénation de cette position C-1 du squelette sesquiterpénique de cette molécule.



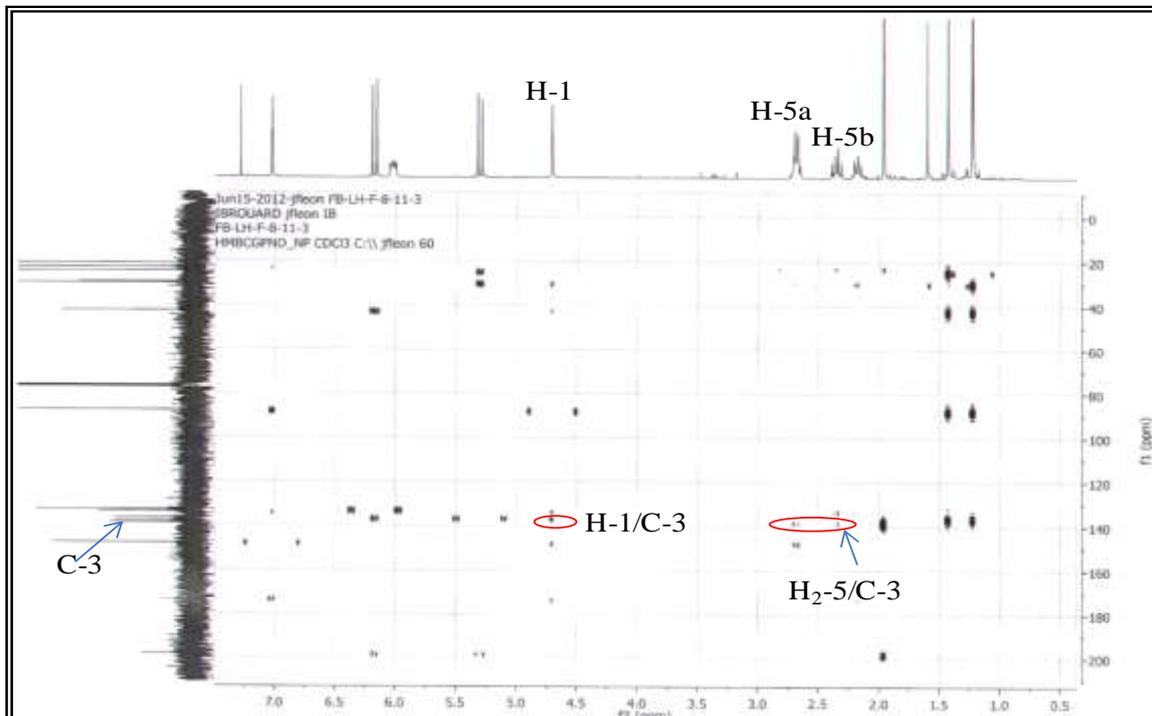
Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A7

Sur le spectre COSY (Spectre III-70), le proton H-1 corrèle avec le proton du groupement CH éthylénique résonnant à $\delta_H = 6,94$ ppm ($\delta_C = 147,81$ ppm). Ainsi, ce proton éthylénique sera attribué à H-2 et son carbone sera attribué au C-2.



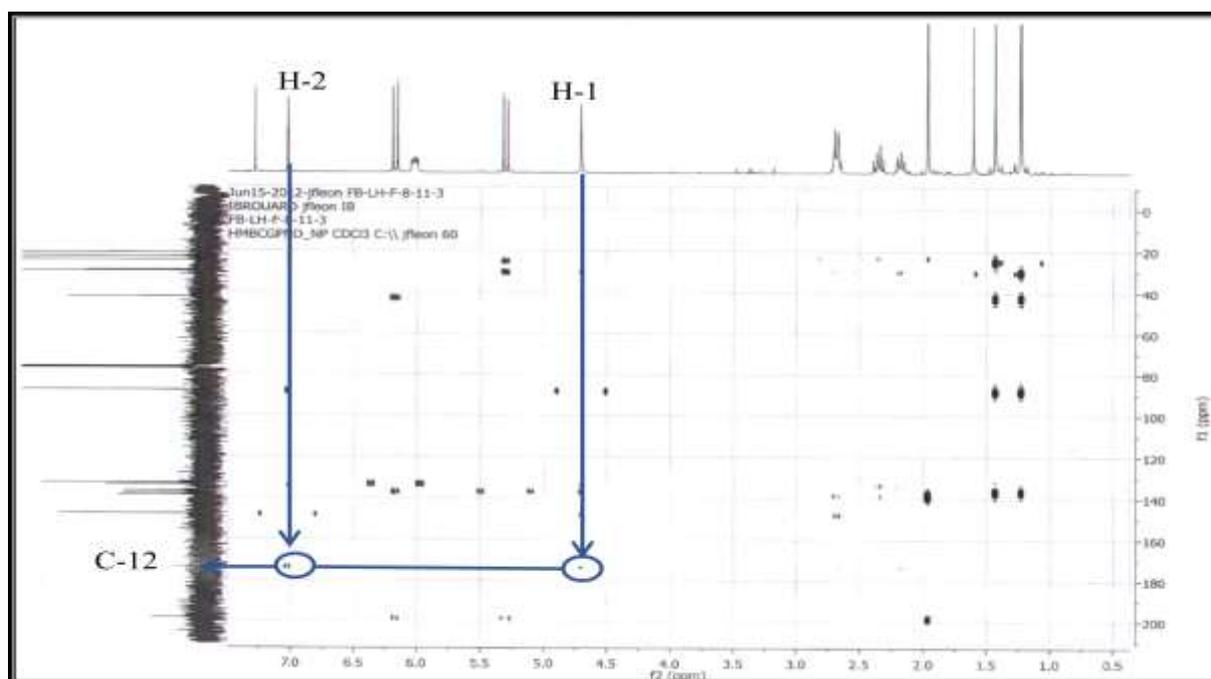
Spectre III-70 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A7**

Toujours sur le spectre HMBC, les protons H-1 et H₂-5, montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire éthylénique dont la résonance est relevée $\delta_{\text{C}} = 138,82$ ppm. Il est évident que ce carbone soit attribué au C-3.



Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A7**

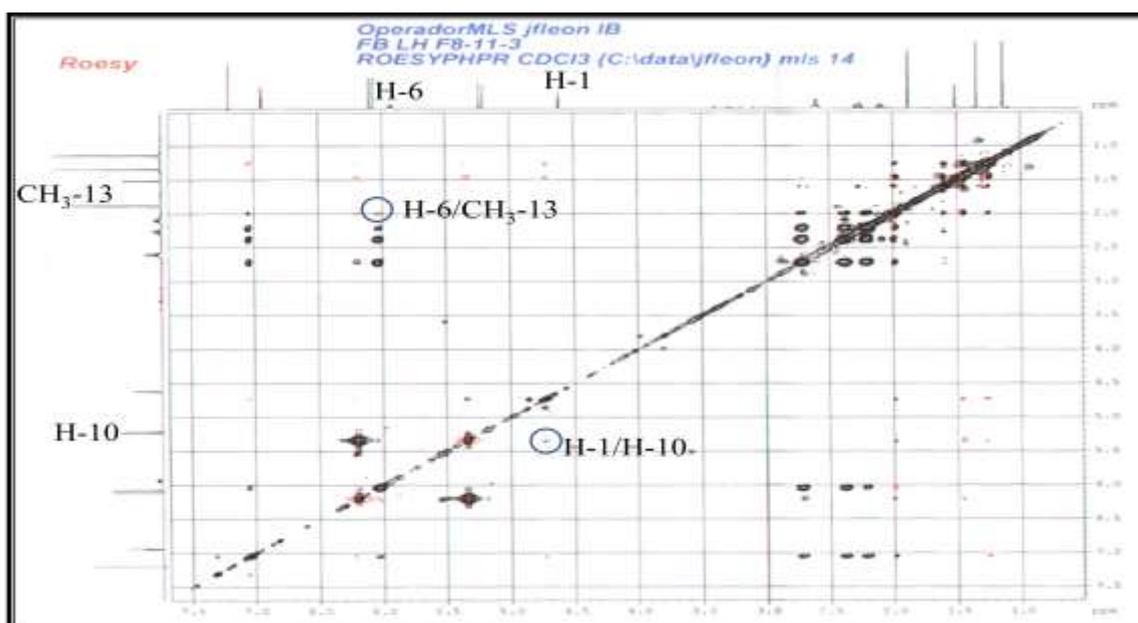
Un dernier examen du spectre HMBC, permet de relever des corrélations entre H-1, H-2 et le carbone du carbonyle résonnant à $\delta_c = 172,18$ ppm. La valeur du déplacement chimique du carbone de ce carbonyle correspond bien à celle du carbone d'une γ -lactone α,β -insaturée (C-12), ceci d'une part. D'autre part, cette idée est confortée par la présence de la corrélation observée entre H-1 et ce carbone qui n'existerait pas si la lactonisation n'a pas lieu.



Spectre III-69 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A7**

A ce stade de notre analyse, il apparait clairement que cette molécule **A7** est une lactone sesquiterpénique de type humulène ayant un squelette sesquiterpénique très similaire à celui du composé **A5**.

Concernant les configurations des doubles liaisons engagées dans ce cycle, Il est évident que celle entre C-2 et C-3 est de configuration (*Z*), vu sa présence dans un cycle à 5 chaînons. La double liaison entre C-9 et C-10 a été annoncée plus haut (*Z*) vu la valeur de l'interaction de couplage (13,5 Hz) entre H-9 et H-10. Concernant la double liaison entre C-6 et C-7, nous avons examiné le spectre ROESY (Spectre III-71) sur lequel on relève une corrélation ROESY entre le proton H-6 et les protons du méthyle-13, orientant vers une configuration (*Z*) de cette double liaison. On relève également une corrélation ROESY entre H-1 et H-10 indiquant que ces deux protons sont situés dans le même demi espace. On en déduit alors que H-1 admet une orientation β . Il faut noter que ce spectre montre un décalage.



Spectre III-71: Spectre ROESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A7**

Nos travaux de polarimétrie ont montré qu'il s'agit d'un composé lévogyre avec un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{21} = -274^\circ$ ($c = 0,5921$ g/mL ; MeOH).

L'ensemble de toutes nos données nous a conduit à la structure du composé **A7**, comme représenté dans la figure III-18. Il s'agit du (-)-(2Z,6Z,9Z)-8-oxo- 2,6,9-humulatrien-1(12)-olide, Cette molécule est connue sous le nom de (-) **asteriscunolide A**. Elle a été isolée pour la première fois par San Feliciano et al. (1982) de l'*Asteriscus aquaticus* [26], puis retrouvée plus tard dans les espèces *Asteriscus graveolens* [28], *Nauplius aquaticus* [33], *Asteriscus vogelii* [31], *Nauplius graveolens* subsp. *odorus* [32] et *Asteriscus graveolens* subsp. *stenophylus* [21].

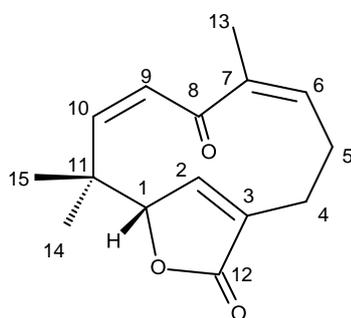


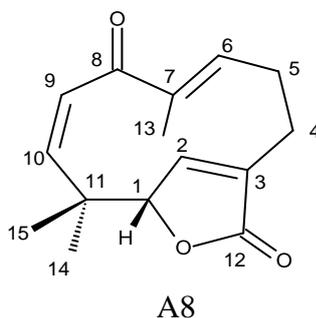
Figure III-18 : Structure finale du composé **A7**, (-) **asteriscunolide A**

Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont rassemblées dans le tableau III-7

Tableau III-7 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé **A7**

Position	δ_{C}	DEPT	δ_{H} mult. (J, Hz)
1	87,99(CH)		4,62 ; s
2	147,81(CH)		6,94 ; sl
3	138,82(C)		/
4a	22,99(CH_2)		2,59 ; m
4b			2,11 ; m
5a	29,69(CH_2)		2,59 ; m
5b			2,27 ; m
6	137,96(CH)		5,93 ; ddd (10,8 ; 7,2 ; 1,6)
7	133,79 (C)		/
8	198,42(C)		/
9	132,96(CH)		5,22 ; d (13,5)
10	136,78(CH)		6,08 ; d (13,5)
11	42,52(C)		/
12	172,18(C)		/
13	21,28(CH_3)		1,88 ; s
14	30,10 (CH_3)		1,34 ; s
15	24,73 (CH_3)		1,14 ; s

III-1-8- Elucidation structurale du composé **A8**



Une analyse comparative entre les données spectrales de la RMN-1D et 2D des composés **A7** (le composé précédent) et **A8**, montre qu'il s'agit de deux structures identiques qui ne diffèrent que par la géométrie de la double liaison trisubstituée $\Delta 6$, où l'on relève en effet, un déblindage marqué du carbone C-6 avec un déplacement chimique $\delta_{\text{C}} = 151,42$ ppm, nettement plus élevé que celui de son correspondant dans le composé **A7** ($\delta_{\text{C}-6} = 137,96$). Ceci

est dû à la perte de l'effet du cycle de ce carbone par rapport à son correspondant dans le composé **A7**. Contrairement au carbone C-6, on relève une diminution du déplacement chimique du carbone C-13 ($\delta_C = 10,8$ ppm) dans ce composé, indiquant un blindage de ce carbone. Ceci est parfaitement attendu du fait que si la double liaison entre C-6 et C-7 est de configuration (E), le méthyle 13 se retrouve dans la zone d'anisotropie du cycle sesquiterpénique et bénéficie ainsi d'une densité électronique par rapport à son correspondant dans le composé **A7** ($\delta_{C-13} = 21,28$ ppm). Ces observations indiquent clairement que le composé **A8** est l'isomère (6E) du composé **A7**.

Ces résultats sont en bon accord avec l'expérience NOESY (Spectre III-74), qui montre l'absence de corrélation entre H-6 et H₃-13.

Nos travaux de polarimétrie ont montré qu'il s'agit d'un composé lévogyre avec un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{21} = -173^\circ$ ($c = 0,6031$ g/mL ; MeOH).

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature la structure du composé **A8** a pu être établie et correspond au (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo- 2,6,9-humulatrien-1(12)-olide, Cette molécule est connue sous le nom de (-)-asteriscunolide **B** (Figure 19). Elle a été isolée par San Feliciano et al.,(1984) d'*Asteriscus aquaticus* [25], puis plus tard des espèces *Asteriscus graveolens* [28], *Nauplius aquaticus* [33] et *Nauplius graveolens* subsp. *odorus* [32].

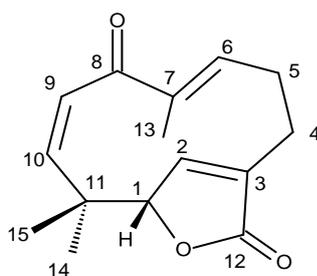
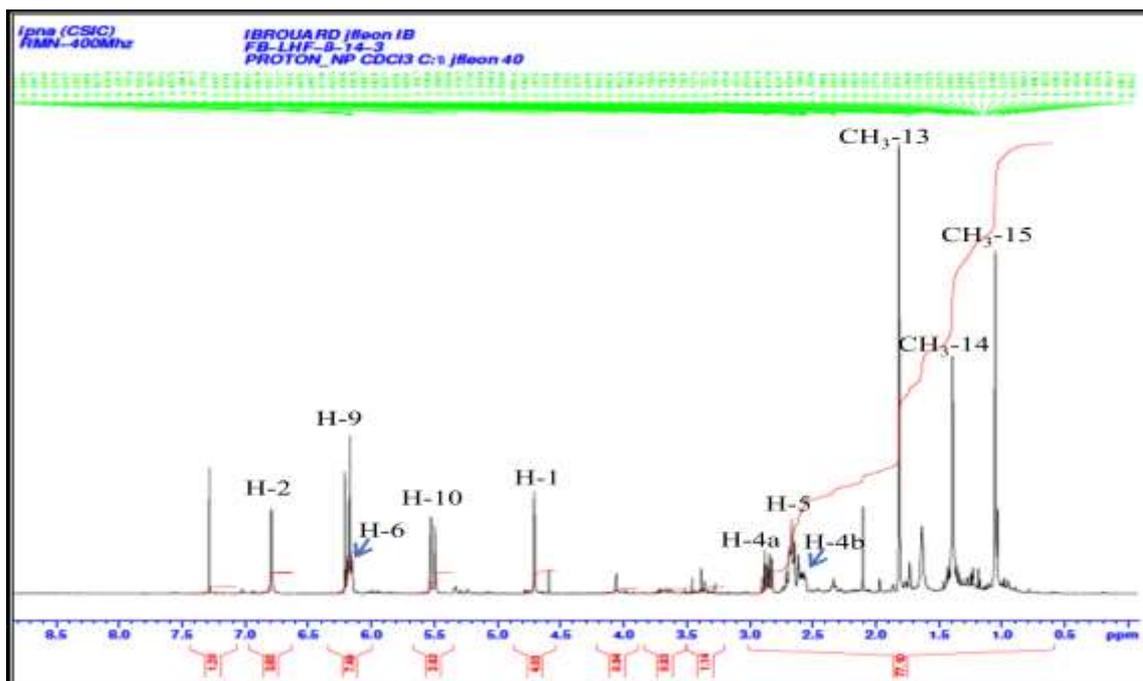
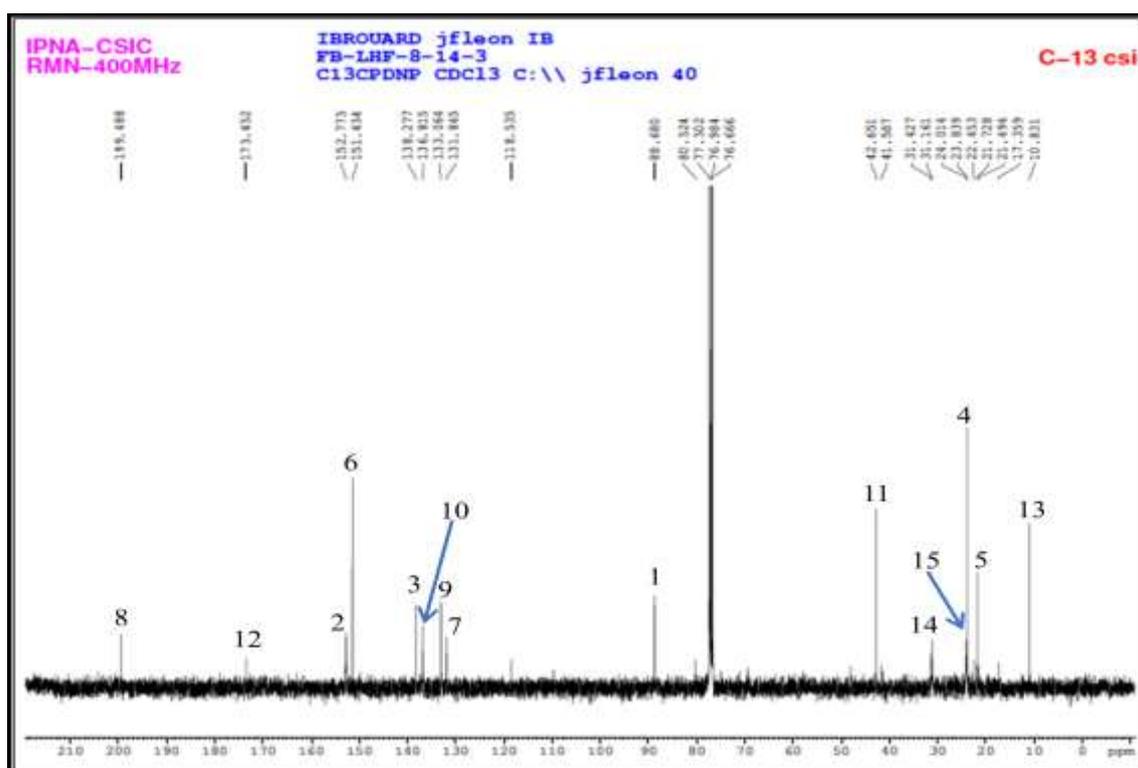


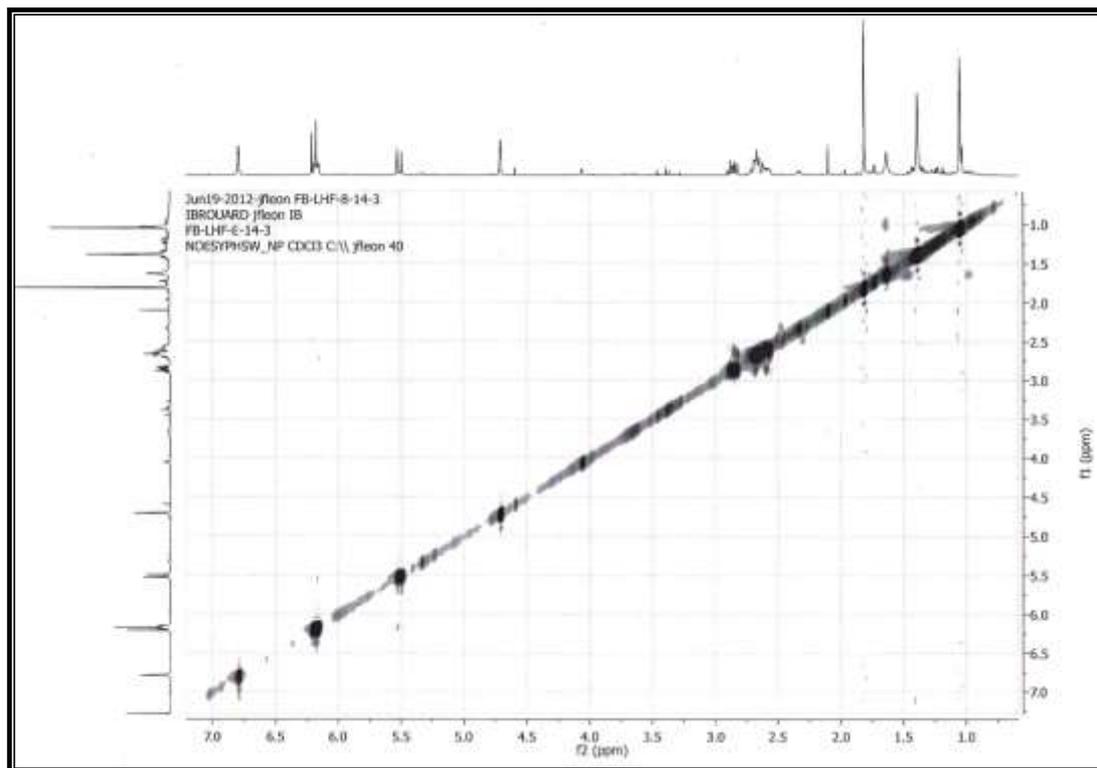
Figure III-19 :Structure du composé **A8**, (-)-asteriscunolide **B**



Spectre III-72 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A8



Spectre III-73 : Spectre RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé A8



Spectre III-74 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **A8**

Les données de la RMN ^{13}C et ^1H sont rassemblées dans le tableau III-8.

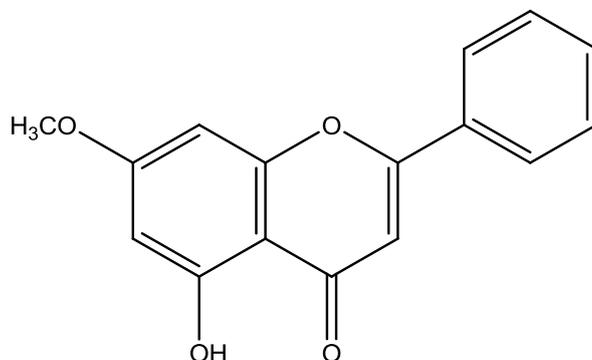
Tableau III-8: Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé **A8** (CDCl_3)

Position	δ_{C}	DEPT	δ_{H} mult. (<i>J</i> , Hz)
1	88,67 (CH)		4,71 ; s
2	152,76 (CH)		6,79 ; s
3	138,27 (C)		/
4a	23,84 (CH_2)		2,84 ; m
4b			2,56 ; m
5a	21;73 (CH_2)		2,65 ; m
5b			2,65 ; m
6	151,42 (CH)		6,17 ; m
7	131,84 (C)		/
8	199,47 (C)		/
9	133,05 (CH)		6,18 ; d (13,5)
10	136,80 (CH)		5,51 ; d (13,5)
11	42,65 (C)		/
12	173,36 (C)		/
13	10,83 (CH_3)		1,81; s
14	31,16 (CH_3)		1,39 ; s
15	23,84 (CH_3)		1,05 ; s

III-2- Identification des produits isolés de *Crotalaria vialattei* Batt.

III-2-1- Identification des produits isolés de la phase chloroforme

III-2-1-a- Elucidation structurale du composé B1



B1

Ce composé se présente sous la forme de cristaux blancs. Il donne une fluorescence noir violet sous la lumière UV (365 nm) et se révèle en jaune par une solution acide et chauffage à 100°C, indiquant une structure de type flavonoïdique.

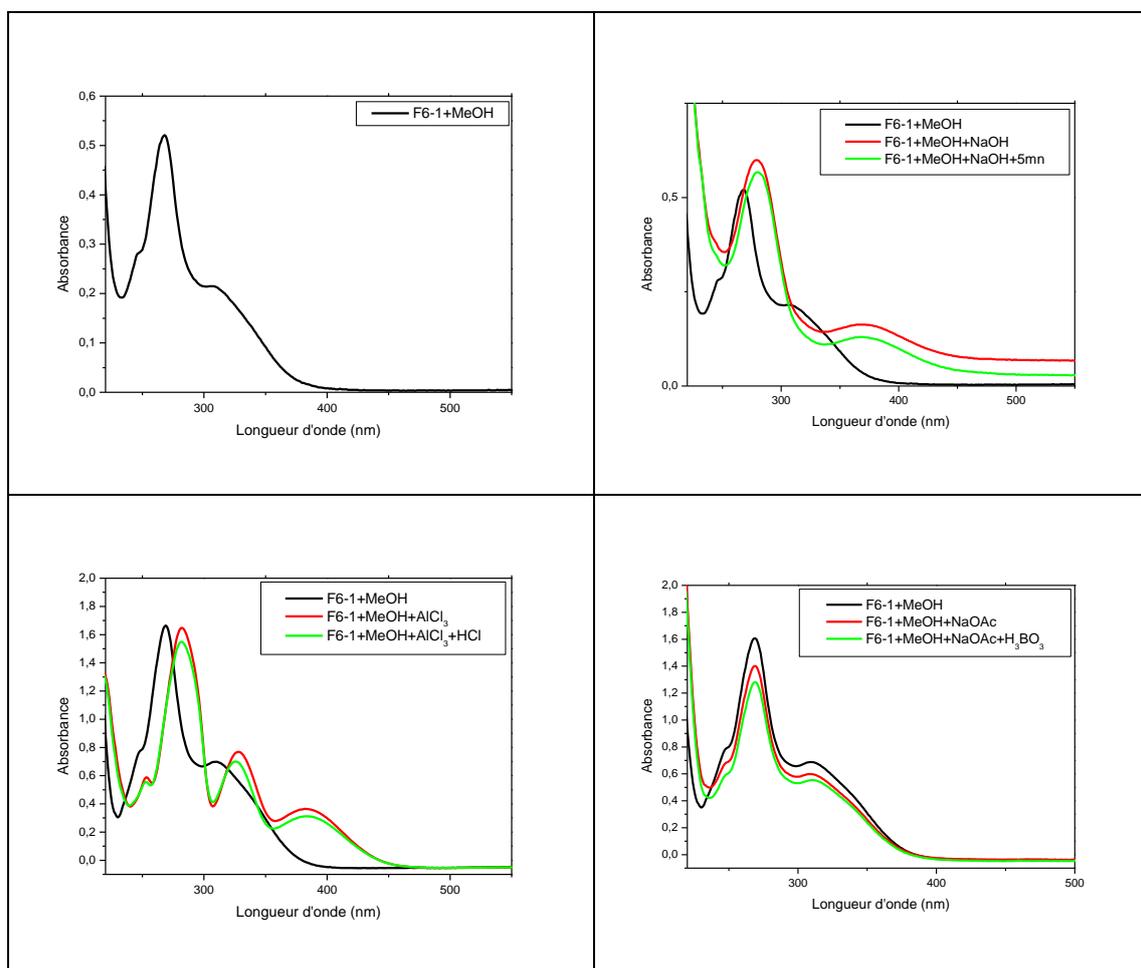
La fluorescence noir violet et la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I dans le méthanol ($\lambda = 310$ nm), sur le spectre UV (Spectre III-75) sont en faveur d'une flavone.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +59$ nm) avec une diminution de l'intensité comparativement à celui enregistré dans le méthanol laisse supposer l'absence d'un OH libre en 4'. L'absence d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle l'absence d'un OH libre en position 7. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de déplacement bathochrome de la bande II après addition de la base faible NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol.

La comparaison du spectre enregistré en présence de HCl + AlCl₃ par rapport au spectre dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +75$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 5.

Aucun effet bathochrome de la bande I n'est observé après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre dans le méthanol, ce qui indique l'absence de systèmes ortho

di-OH sur le noyau A et le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par l'étude du spectre en présence de AlCl_3 qui reste inchangé après addition de HCl .



Spectre III-75 : Série spectrale UV-Vis du composé B1

Les données de la série spectrale UV-Vis sont représentées dans le tableau III-9 .

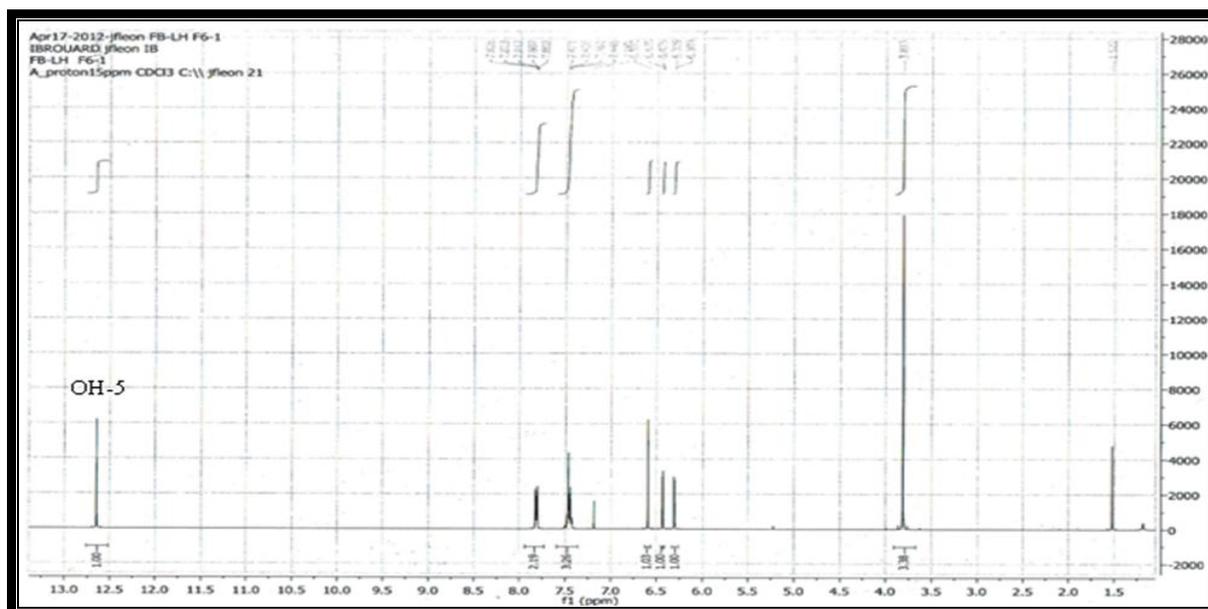
Tableau III-9 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé B1

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes
MeOH	310	268	-
+ NaOH	369	280	-
+ AlCl_3	382	282	328
+ AlCl_3/HCl	385	282	326
+NaOAc	310	269	-
+NaOAc/ H_3BO_3	310	269	-
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

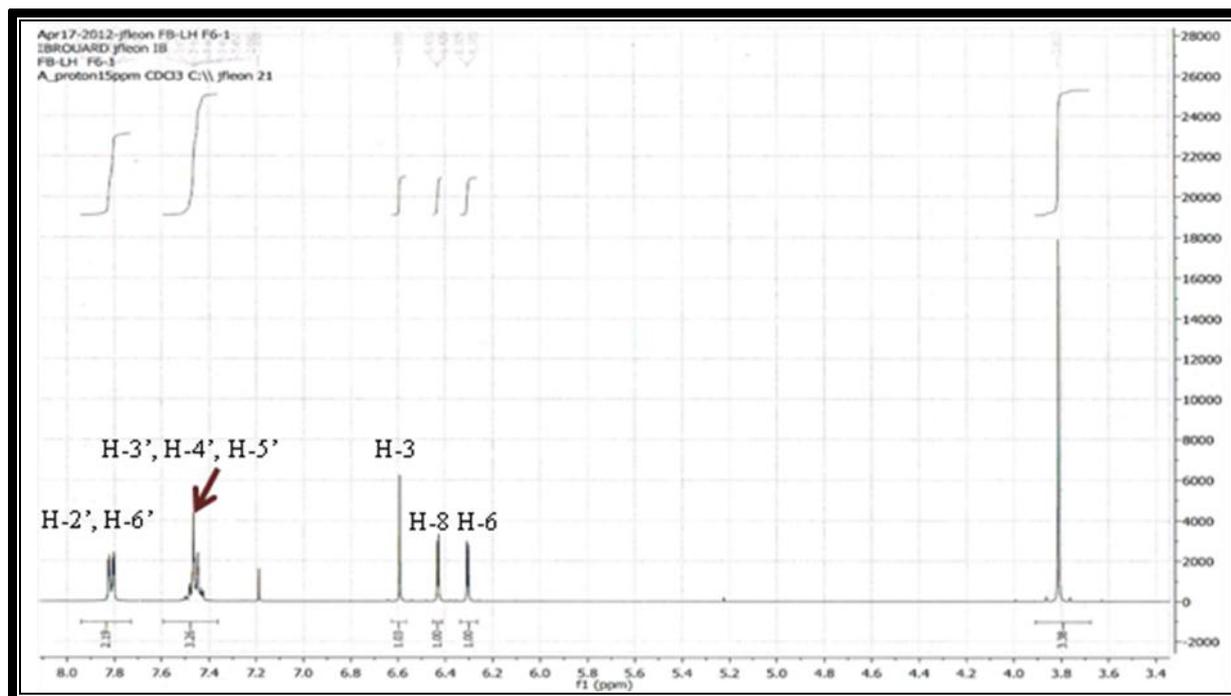
L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-76) enregistré dans le CDCl_3 ainsi que son spectre étalé (Spectre III-77) montre la présence de:

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 12,65$ ppm, attribuable à un OH en C-5.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, à $\delta_{\text{H}} = 6,43$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,30$ ppm, ($J = 2,4$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.
- Un signal à $\delta_{\text{H}} = 6,59$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone.
- Un ensemble de signaux caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué dont : un signal d'intégration 3H sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 7,45$ ppm attribuables aux protons H-3', H-4' et H-5' ainsi qu'un autre d'intégration 2H sous forme également, d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 7,81$ ppm attribuables aux protons H-2' et H-6'.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,81$ ppm attribuable à un groupement méthoxyle dans cette flavone.

L'ensemble de ces informations indique que le composé est une flavone dont le cycle B est non substitué et le cycle A substitué par un groupement méthoxyle. Vu la présence d'un OH en position C-5, il apparaît clairement que le groupement méthoxyle ne peut être placé qu'en position C-7.



Spectre III-76: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B1**



Spectre III-77 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B1**(Étalement)

Les spectres RMN ^{13}C (Spectre III-78), son étalement (Spectre III-79) et DEPT 135° (Spectre III-80) confirment bien les données des analyses précédentes. En particulier, la résonance à $\delta_{\text{C}} = 55,78$ ppm attribuable au groupement méthoxy, et la présence de 7 carbones quaternaires et 8 groupements CH.

Ainsi la comparaison de nos données à celle de la littérature [40] a permis d'attribuer sur le spectre RMN ^{13}C tous les carbones correspondant à la flavone : 5 hydroxy-7 methoxy flavone ou Chrysin 7-méthyl éther (tectochrysin) (Figure III-20). Cette molécule a été précédemment isolée d'*Ononis angustissima* (Fabaceae) [41], de *Polygonum senegalense* (Polygonaceae) [42] et de *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae) [43], elle est connue pour ses activités anticancéreuses [44]. Cette molécule est signalée pour la première fois dans cette espèce.

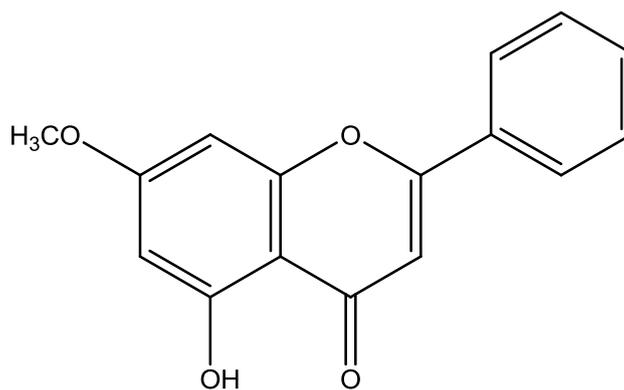
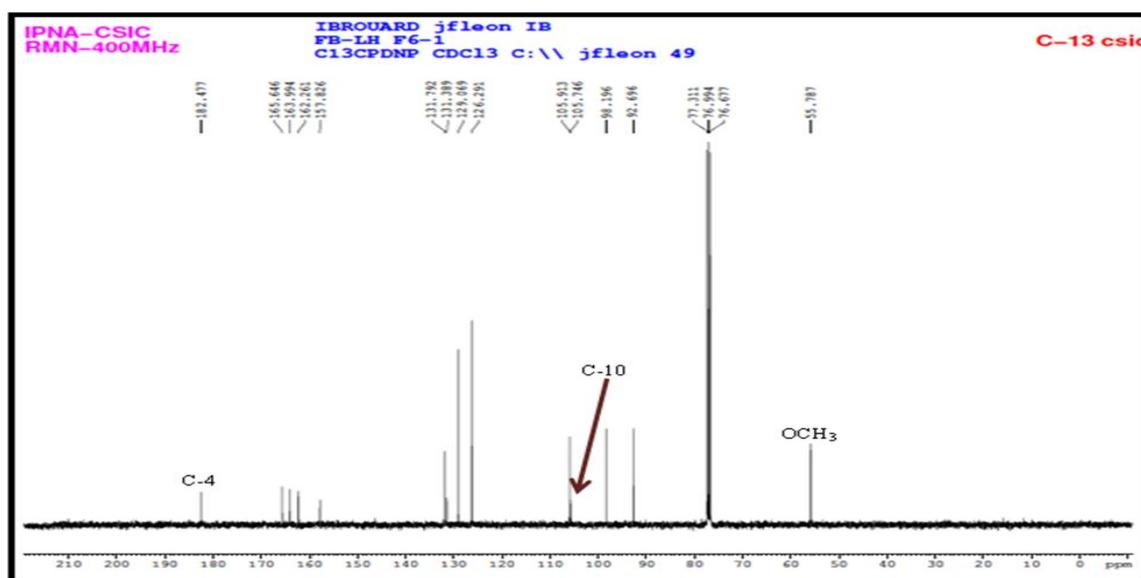
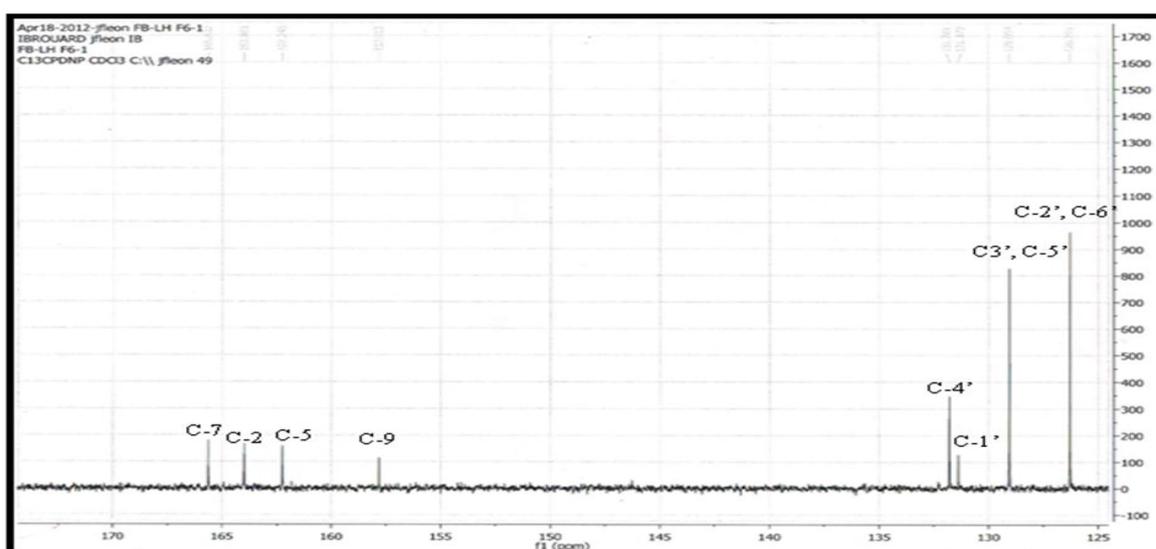


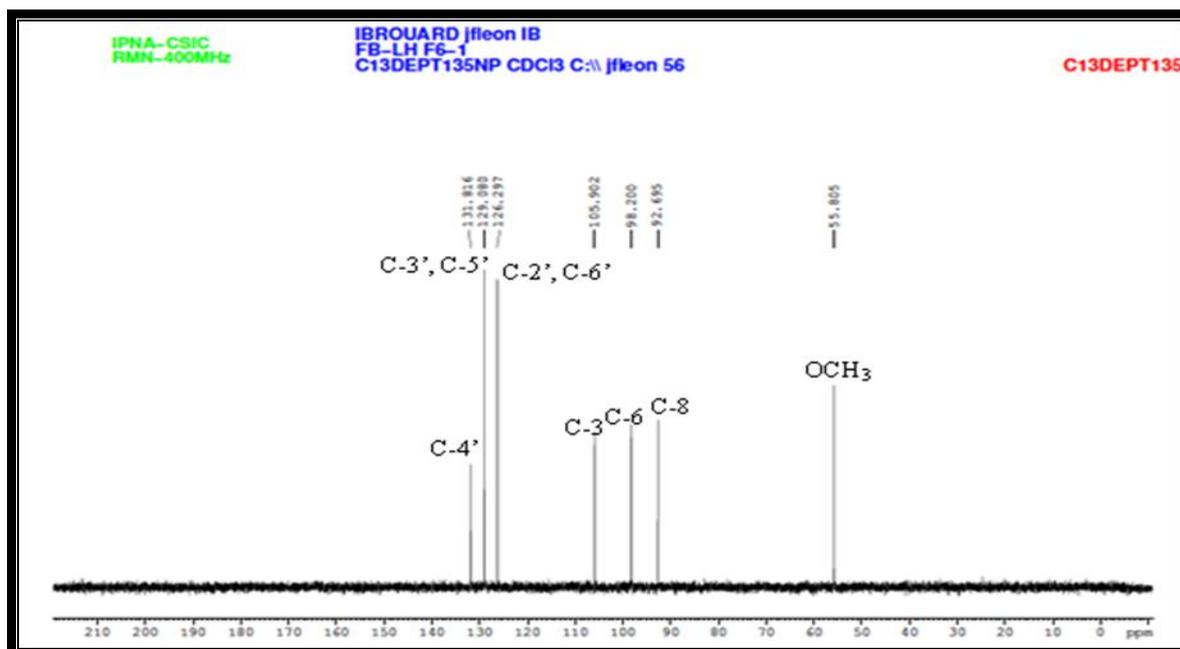
Figure III-20 : Structure finale du composé **B1**, tectochrysin



Spectre III-78: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B1**



Spectre III-79 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B1** (Etalement)



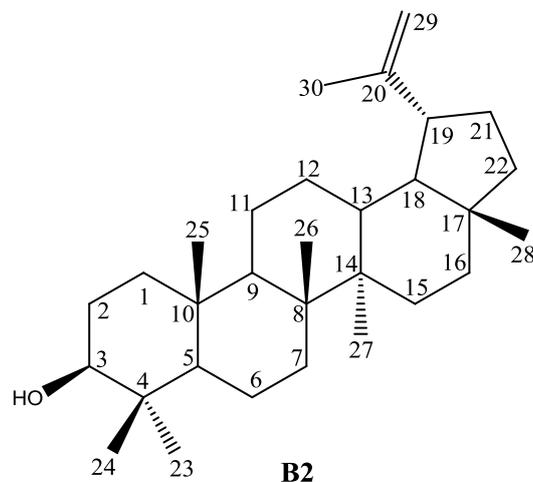
Spectre III-80 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B1**

Les résultats de la RMN ¹H et RMN ¹³C sont rassemblés dans le tableau III-10 .

Tableau III-10 : Données de la RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C(100 MHz) du composé **B1**

Position	¹³ C DEPT	¹ H	Multiplicité (Hz)
2	163,98 (C)	-	-
3	105,90 (CH)	6,59	s
4	182,46 (C)	-	-
5	162,24 (C)	-	-
6	98,19 (CH)	6,30	d (2,4)
7	165,63 (C)	-	-
8	92,69 (CH)	6,43	d (2,4)
9	157,81 (C)	-	-
10	105,73 (C)	-	-
1'	131,37 (C)	-	-
2'	126,28 (CH)	7,81	m
3'	129,05 (CH)	7,45	m
4'	131,78 (CH)	7,45	m
5'	129,05 (CH)	7,45	m
6'	126,28 (CH)	7,81	m
OMe-7	55,78 (CH ₃)	3,81	s
OH-5	-	12,65	s

III-2-1-b- Elucidation structurale du composé **B2**



Le composé **B2** se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme et dans les solvants apolaires. Il prend une coloration rouge-violet à rose au réactif de Liebermann-Burchard suggérant un composé de type triterpénique.

L'étude simultanée des spectres de RMN ^{13}C (Spectre III-81), son étalement (Spectre III-82), DEPT 135° (Spectre III-83) et DEPT 90° (Spectre III-84) du composé **B2** montre la présence de 30 atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit:

- 6 carbones quaternaires dont: 1 à $\delta_{\text{C}} = 150,93$ ppm attribuable à un carbone éthylénique et 5 à $\delta_{\text{C}} = 37,19$; 38,86 ; 40,86 ; 42,85 et 43,00 ppm attribuables à des carbones hybridés sp^3 et non oxygénés.
- 6 groupements CH dont 1 oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 79,00$ ppm caractéristique du méthine oxygéné de la position 3 des triterpènes et 5 non oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 38,09$; 47,99 ; 48,34 ; 50,47 et 55,34 ppm.
- 11 groupements CH_2 dont : 1 éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 109,29$ ppm et 10 hybridés sp^3 et non oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 18,33$; 20,95 ; 25,19 ; 27,44 (2 groupements CH_2 superposés); 29,88 ; 34,32 ; 35,60 ; 38,74 et 40,00 ppm.
- 7 groupements CH_3 à $\delta_{\text{C}} = 14,55$; 15,35 ; 15,99 ; 16,10 ; 18,00 ; 19,31 et 27,99 ppm.

Un décompte de l'ensemble des noyaux formant ces groupements mène à une formule brute partielle de $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}$. Comme cette molécule ne comporte que 30 atomes de carbone, cela

suppose qu'ils sont tous engagés dans le squelette triterpénique, par conséquent, le groupement CH oxygéné précédemment signalé, est porteur d'un groupement hydroxyle. Cette observation mène à une molécule de formule brute totale $C_{30}H_{50}O$ comportant 6 degrés d'insaturations.

Parmi les groupements CH_2 signalés plus haut, celui dont le carbone résonne à $\delta_C = 109,29$ ppm et qui ne peut donc être qu'éthylénique est délimité par le carbone quaternaire éthylénique résonnant à $\delta_C = 150,93$ ppm, vu l'absence d'autres carbones éthyléniques et montre donc la présence d'une double liaison dans cette molécule. Il en résulte que ce triterpène admet un squelette pentacyclique ne comportant que le groupement hydroxyle en C-3 comme substituant et renfermant l'entité reportée dans la Figure III-21.

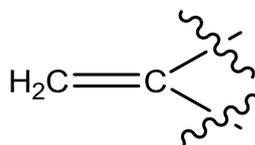
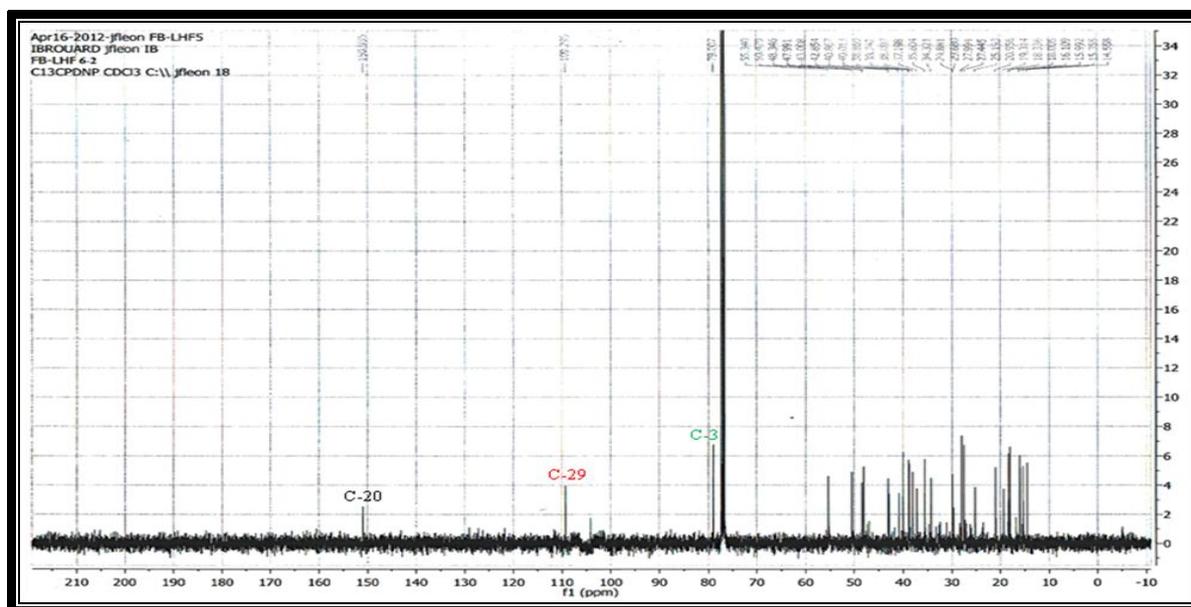
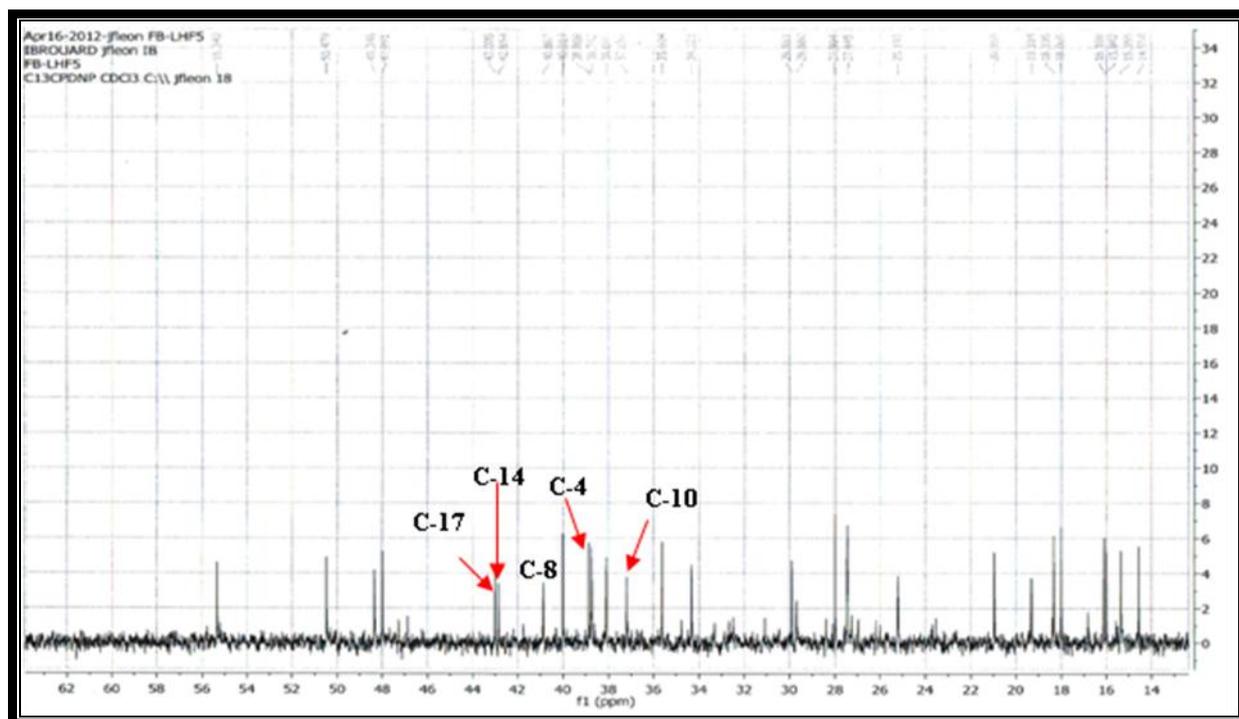


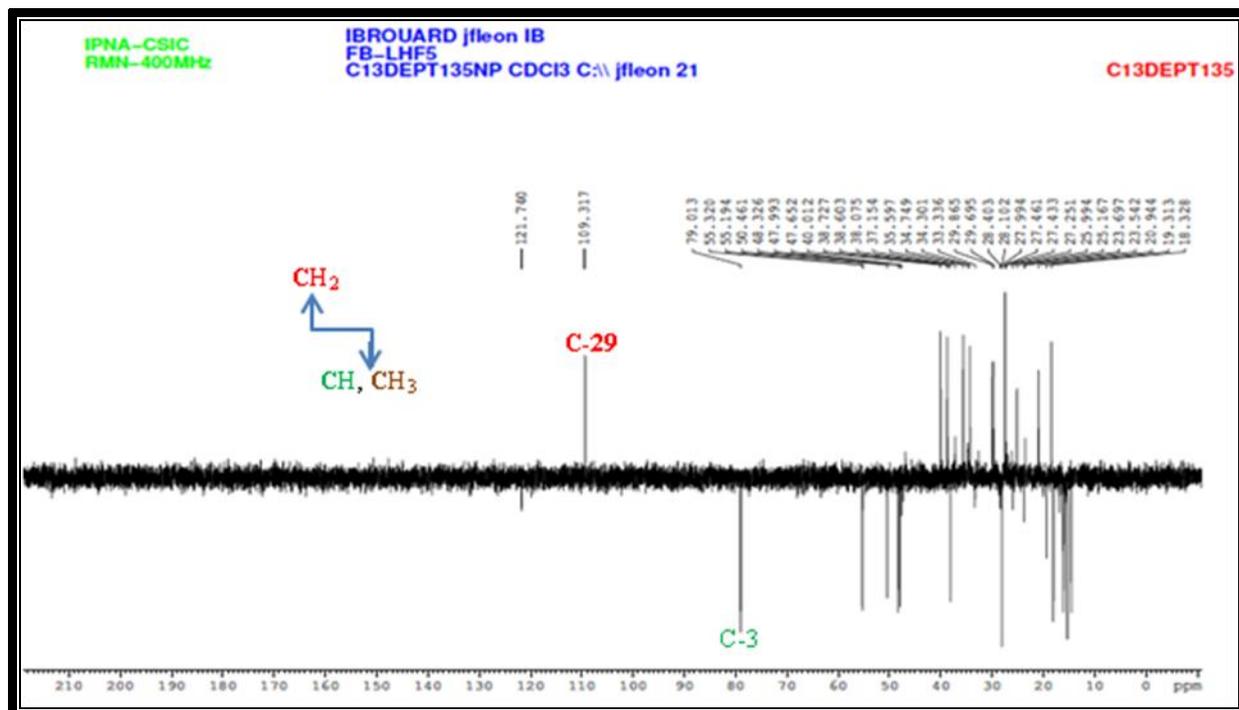
Figure III-21 : Entité -1 présente dans le composé **B2**.



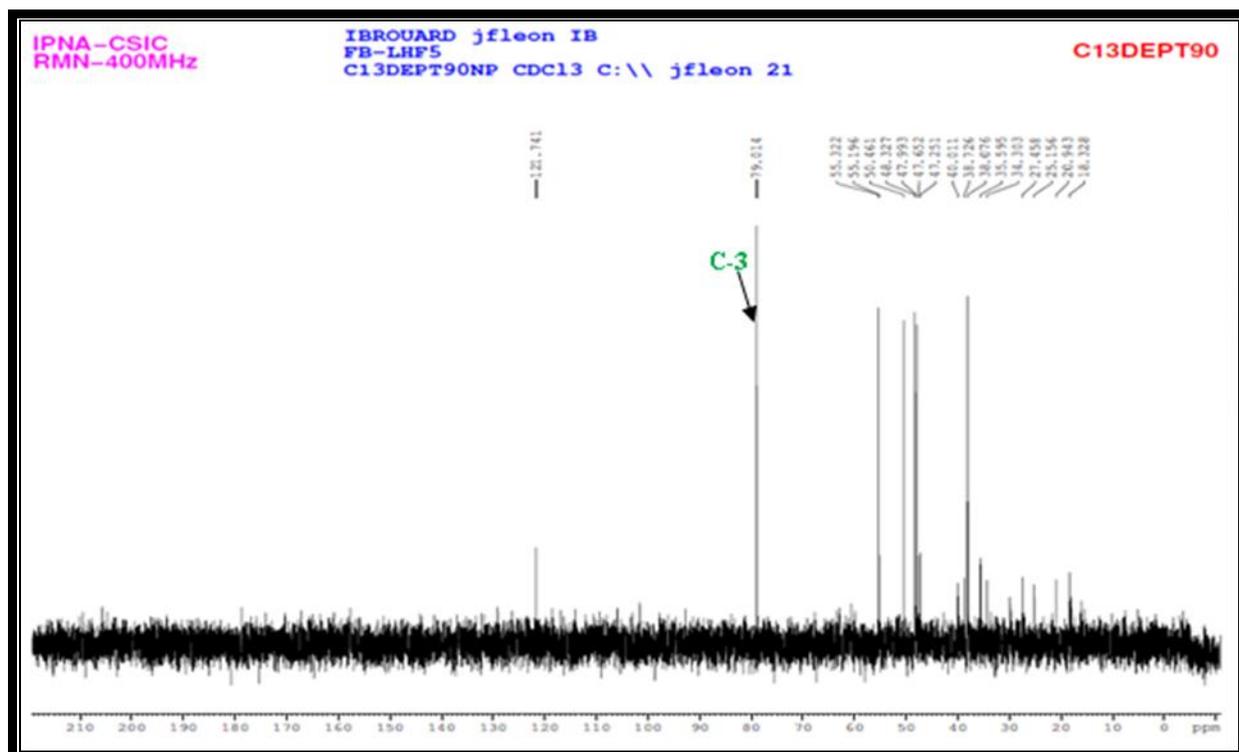
Spectre III-81 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) du composé **B2**



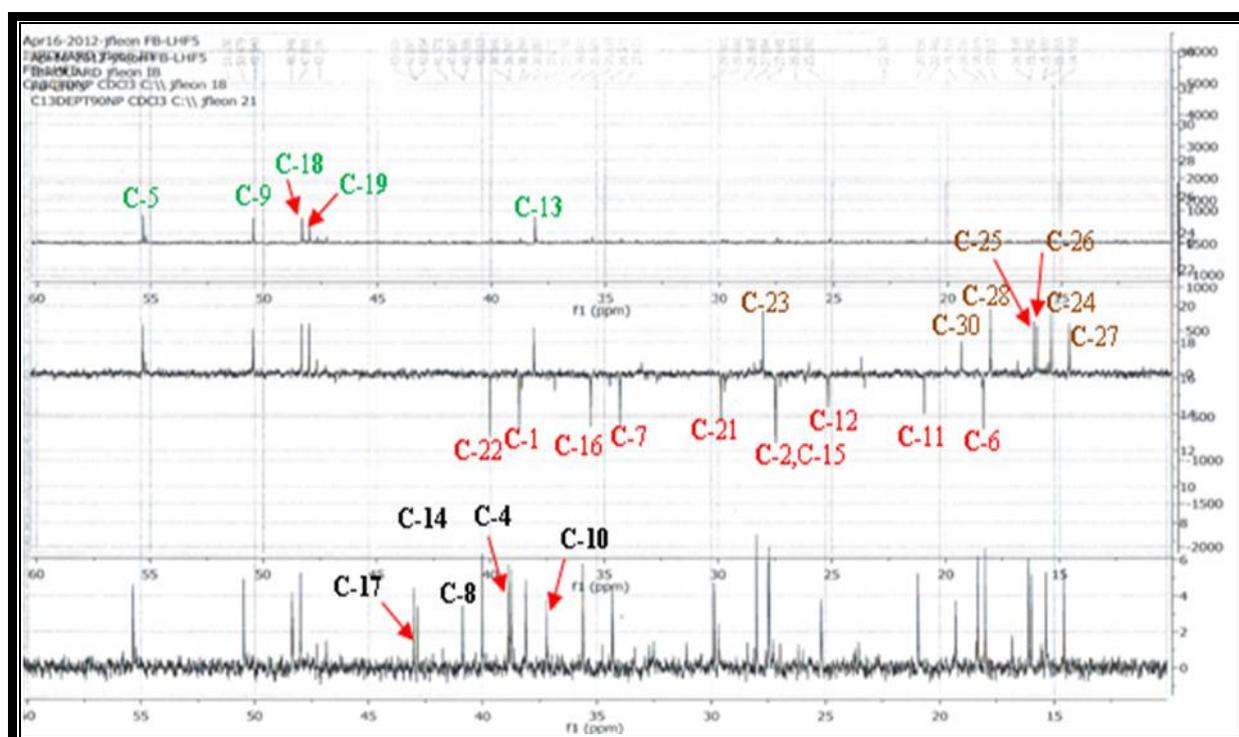
Spectre III-82 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B2** (Etalement)



Spectre III-83 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B2**



Spectre III-84 : Spectre DEPT 90° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B2**



Spectre III-82-84 : Spectre RMN ¹³C, DEPT 90° et DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B2** (Etalement)

Les signaux du spectre RMN ^1H du composé **B2** (Spectre III-85) et ses étalements (Spectre III-86, spectre III-87 et spectre III-88) indiquent dans la région des hauts champs des résonances relatives à des protons aliphatiques montrant un profil typique de triterpène. On relève en effet, la présence de sept groupements méthyles dont six sous forme de singulets (fins) reflétant des méthyles angulaires à $\delta_{\text{H}} = 0,77 ; 0,81 ; 0,84 ; 0,96 ; 0,98 ; 1,05$, et un sous forme de singulet large à $\delta_{\text{H}} = 1,70$ ppm. La valeur assez élevée du déplacement chimique des protons de ce dernier et le couplage lointain que montre leur signal indiquent qu'il est placé sur une double liaison [45] en l'occurrence celle précédemment signalée car elle est unique dans cette molécule. Cette observation oriente vers la présence d'un groupement isopropényle dans cette molécule (Figure III-22).

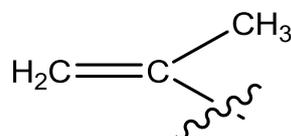


Figure III-22 : Entité-2 présente dans le composé **B2** (un groupement isopropényle).

L'observation conjointe des spectres de RMN ^1H et ^{13}C confirme la présence des signaux caractéristiques du groupement isopropényle. En effet, les deux protons du CH_2 oléfinique ($\delta_{\text{C}} = 109,29$ ppm / $\delta_{\text{H}} = 4,70$ ppm (*d*) et 4,58 ppm (*dd*)) couplent entre eux en formant un doublet ($J = 2,4$ Hz) et couplent également avec les protons du méthyle résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,70$ ppm comme signalé plus haut, les constantes de couplage engendrées sont faibles de l'ordre 1,3 Hz comme celle relevée dans le signal à $\delta_{\text{H}} = 4,58$ ppm.

L'unique groupement hydroxyméthine signalé plus haut à $\delta_{\text{C}} = 79,00$ ppm est associé au proton résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,21$ ppm et caractérise bien la position 3 de ce triterpène.

Le CH résonnant à $\delta_{\text{C}} = 55,34$ ppm / $\delta_{\text{H}} = 0,70$ ppm (*d*, $J = 9,2$ Hz) est caractéristique du CH-5 d'une *trans*-décaline [46] soit donc une jonction *trans* des cycles A et B de ce triterpène.

A ce stade de notre analyse, nous pouvons retenir que le composé **B2** est un triterpène pentacyclique portant six groupements méthyles angulaires et un groupement isopropényle. La présence de ce groupement isopropényle oriente vers le fait que le cycle E de ce triterpène est à 5 chaînons. Ce composé est donc de type lupène (**a**) ou de type hopène (**b**) (Figure III-23) [46].

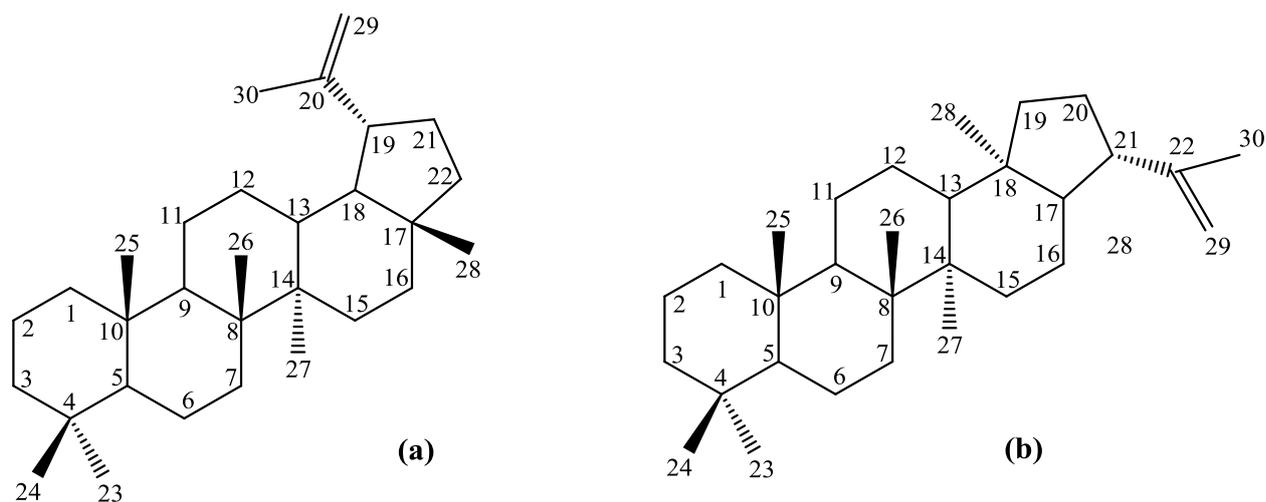


Figure III-23 : Squelettes de lupène (a) et hopène (b)

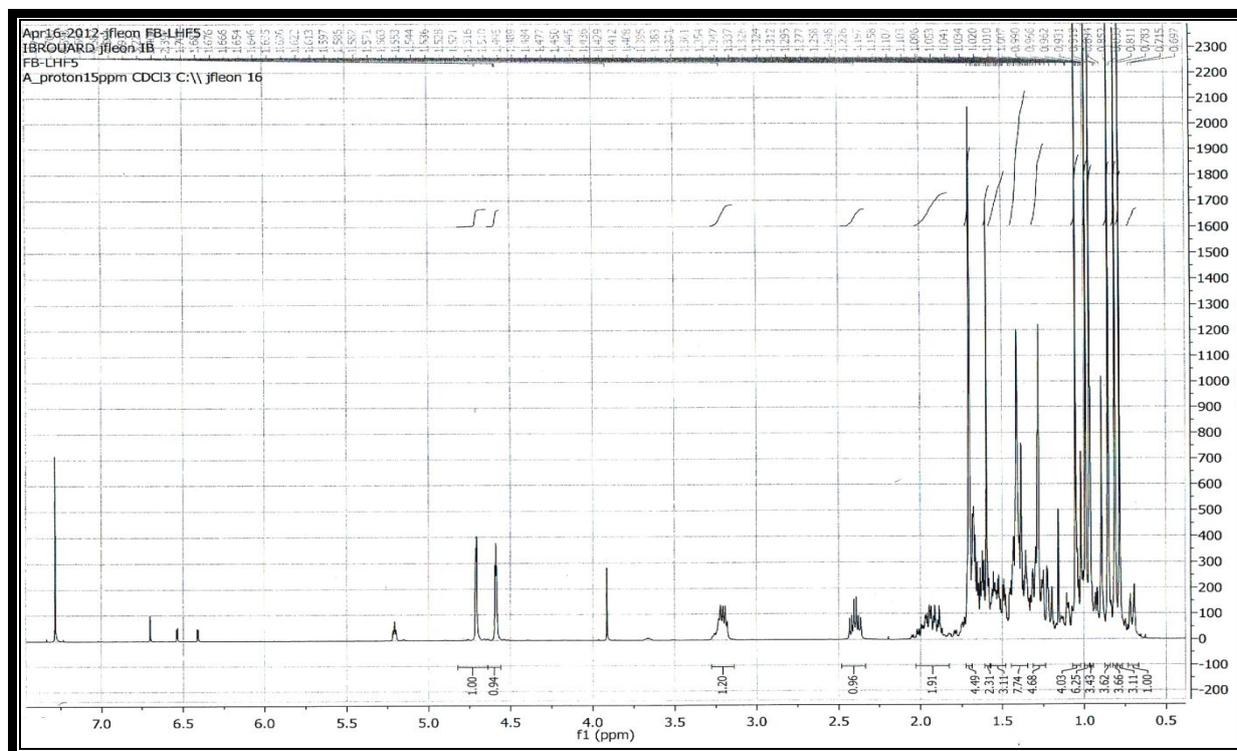
Pour trancher entre ces deux squelettes, il va donc s'agir de placer le groupement isopropényle soit sur le carbone voisin du C-18, c'est-à-dire en C-19 (squelette lupane); soit sur le carbone voisin du C-17 c'est-à-dire en C-21 (squelette hopane). Dans les deux cas le CH₂ éthylénique de ce groupement isopropényle, correspond à la position C-29 et le méthyle à la position C-30.

L'examen attentif du spectre proton révèle la présence d'un signal d'intégration 1H sous forme d'un triplet de doublets ($J = 11,2 ; 5,6$ Hz) à $\delta_H = 2,40$ ppm relatif à un groupement méthine ($\delta_C = 47,99$ ppm). La multiplicité du signal de ce proton, son déplacement chimique et celui de son carbone porteur sont caractéristiques de la position 19 d'un lupène [47]. Ceci permet donc de placer le groupement isopropényle sur le carbone C-19.

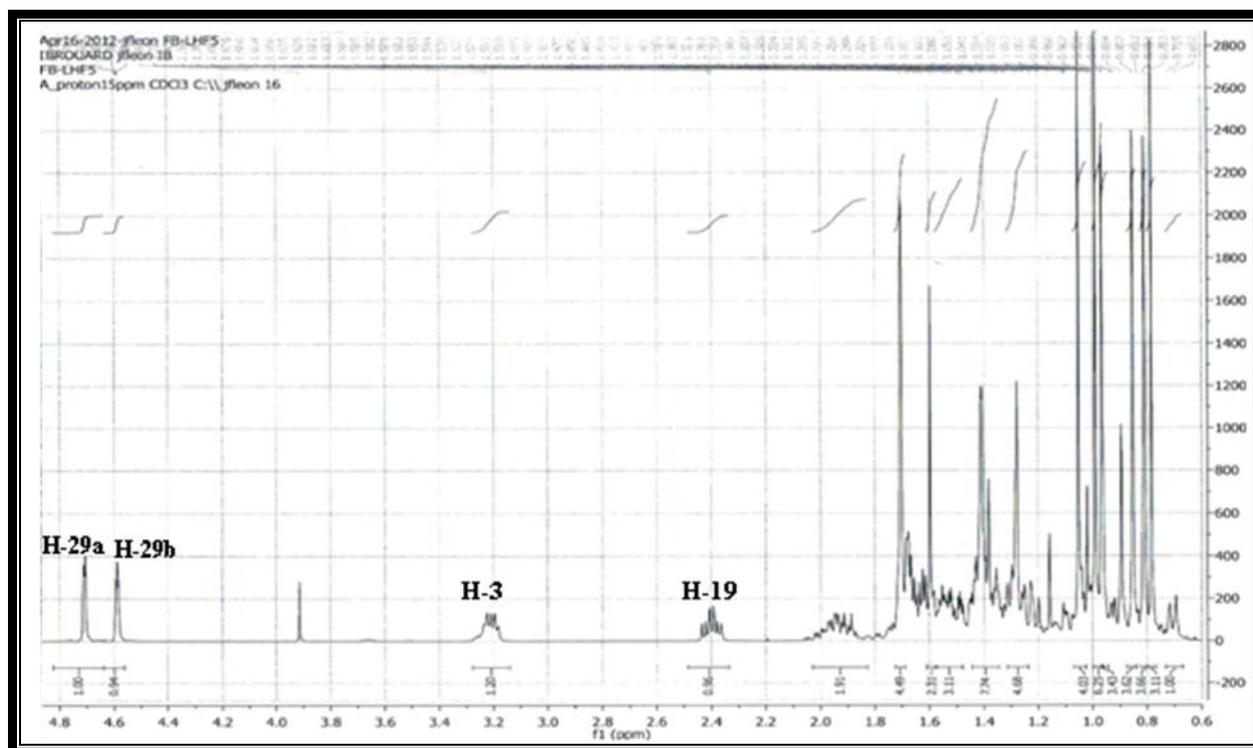
Par ailleurs, les valeurs des déplacements chimiques des autres protons et carbones concordent bien avec une structure de type lupène. En effet, en raison de l'éloignement de la chaîne latérale à trois carbones dans le squelette hopène, les CH-13 et CH₃-27 sont beaucoup plus déblindés que dans le squelette lupène. Concernant le composé **B2**, le déplacement chimique du C-13 est de $\delta_C = 38,1$ ppm alors qu'on observerait une valeur d'environ 50 ppm dans le cas d'un hopène ; de la même manière, le CH₃-27 à $\delta_C = 14,6$ ppm dans le composé **B2** serait plus déblindé ($\delta_C \sim 18$ ppm) dans une structure de type hopène [48,49].

Les valeurs des constantes de couplage relevées dans le signal du proton H-3 (*dt*, $J = 11,2 ; 5,2$ Hz) impliquent une interaction de couplage *trans-diaxial* entre H-3 et le proton H-2 *axial* permettant de placer le groupement hydroxyle OH-3 en position β *équatoriale*. L'orientation

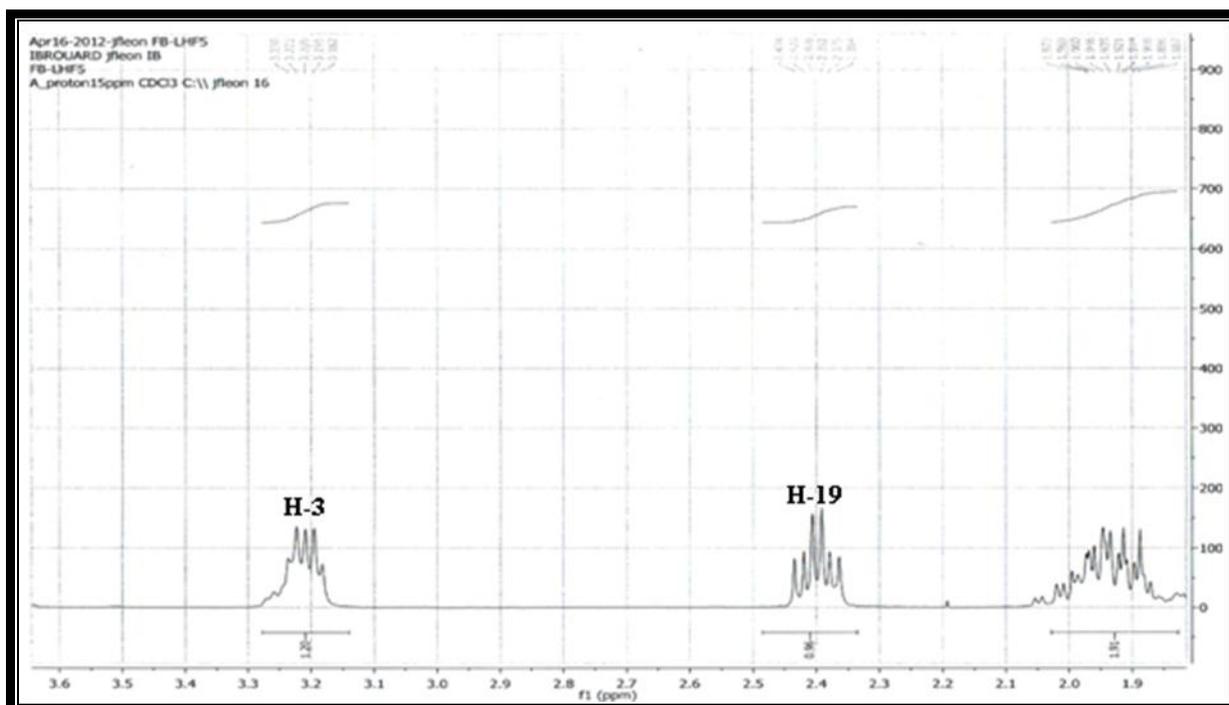
β de ce groupement hydroxyle est appuyée par la valeur du déplacement chimique du C-3 dont la résonance apparaît à $\delta_C = 79,00$ ppm, alors qu'elle serait proche de 76 ppm dans le cas d'une orientation α [46].



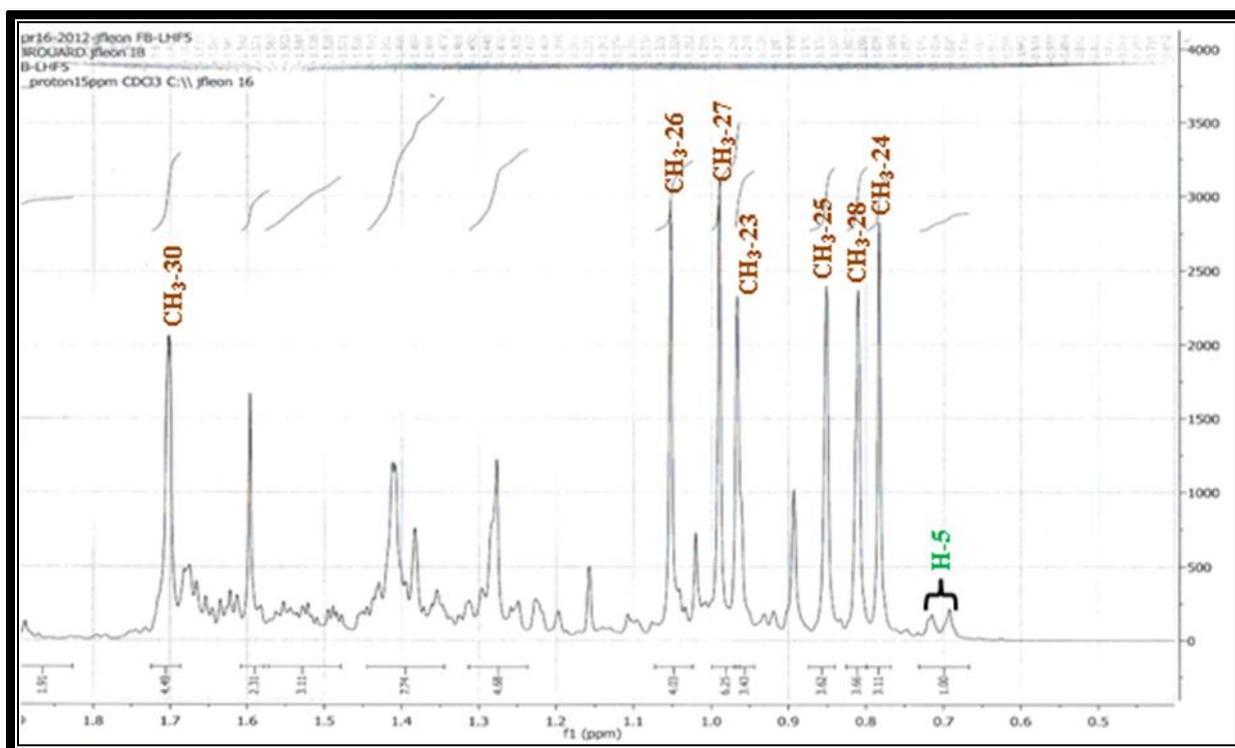
Spectre III-85 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B2**.



Spectre III-86: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B2** (Etagement 1)



Spectre III-87 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B2** (Etalement 2)



Spectre III-88 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B2** (Etalement 3)

Ces données en parfait accord avec celles de la littérature, nous ont permis d'identifier le composé **B2** au (20)29-lupén-3β-ol ou lupéol [50-52] (Figure III- 24). Ce composé est isolé et décrit pour la première fois dans cette espèce.

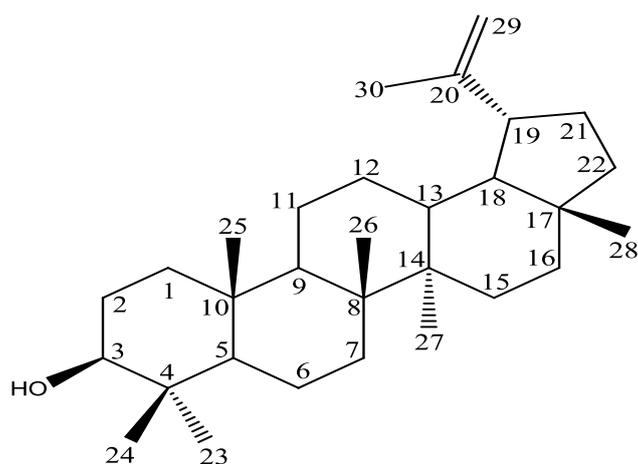


Figure III-24 : Structure du composé **B2**, lupéol

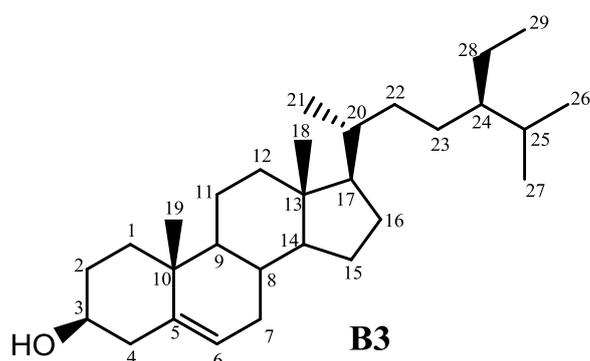
Les données relatives à ce composé sont regroupées dans le tableau III-11

Tableau III-11 : Données RMN du composé **B2**

position	δ_C	δ_H	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	38,74	-	-	-	-
2	27,44	-	-	-	-
3	79,00	3,21	1H	dt	11,2 ; 5,2
4	38,86	-	-	-	-
5	55,34	0,70	1H	d	9,2
6	18,33	-	-	-	-
7	34,32	-	-	-	-
8	40,86	-	-	-	-
9	50,47	-	-	-	-
10	37,19	-	-	-	-
11	20,95	-	-	-	-
12	25,19	-	-	-	-
13	38,09	-	-	-	-
14	42,85	-	-	-	-
15	27,44	-	-	-	-
16	35,60	-	-	-	-
17	43,00	-	-	-	-
18	48,34	-	-	-	-
19	47,99	2,40	1H	td	11,2 ; 5,6
20	150,93	-	-	-	-
21	29,88	-	-	-	-
22	40,00	-	-	-	-
23	27,99	0,98	3H	s	-
24	15,35	0,77	3H	s	-

25	16,10	0,84	3H	s	-
26	15,99	1,05	3H	s	-
27	14,55	0,96	3H	s	-
28	18,00	0,81	3H	s	-
29	109,29	4,70		d	2,4
		4,58		dd	2,4 ; 1,3
30	19,31	1,70	3H	sl	-

III-2-1-c- Elucidation structurale du composé B3

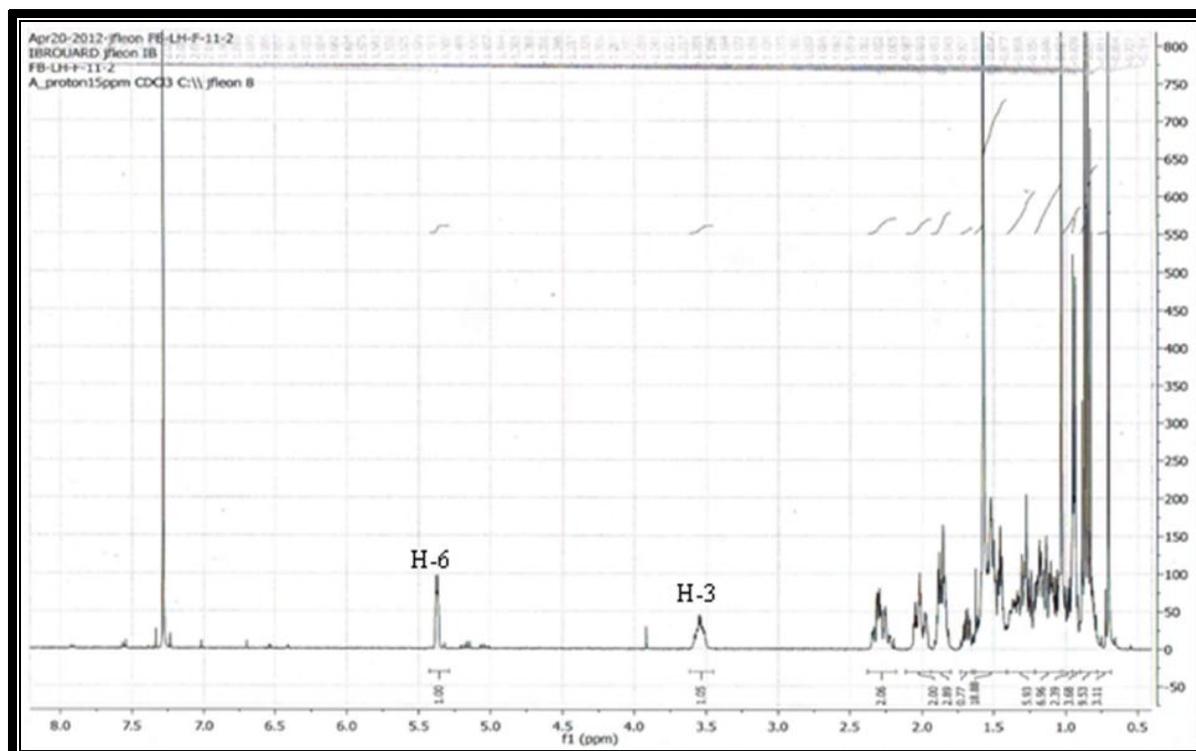


Le composé B3 a été obtenu sous forme de cristaux blancs invisible sous la lumière UV et donne une coloration violette après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 mn. Soluble dans le chloroforme et dans les solvants apolaires.

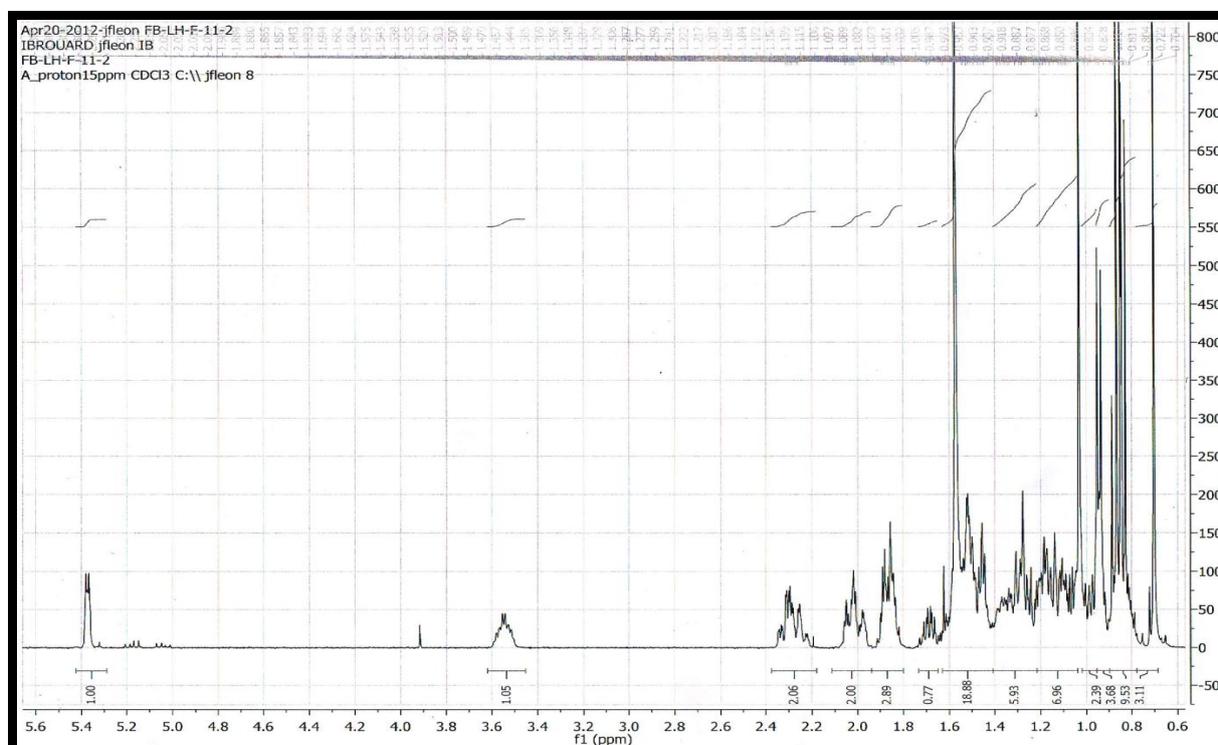
L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-89) enregistré dans le CDCl_3 ainsi que ses spectres étalés (Spectre III-90 et spectre III-91) montre la présence des signaux caractéristique d'un stérol, sur lequel on distingue :

- ✓ Un multiplet d'intégration 1H résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,53$ 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 $\delta_{\text{H}} = 5,37$ ppm ($J = 5,6$ Hz) d'intégration similaire à celle du H-3, attribuable au proton oléfinique H-6 des stérols.
- ✓ Six signaux à haut champ correspondant à six groupements méthyliques dont deux sous forme de singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 1,03$ et $0,70$ ppm, attribuables aux protons des méthyles CH_3 -19 et CH_3 -18 respectivement, trois doublets à $\delta_{\text{H}} = 0,94$ ppm ($J = 6,4$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 0,85$ ppm ($J = 7,2$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 0,83$ ppm ($J = 7,2$ Hz) correspondent respectivement aux protons des méthyles CH_3 -21, CH_3 -26, et CH_3 -27

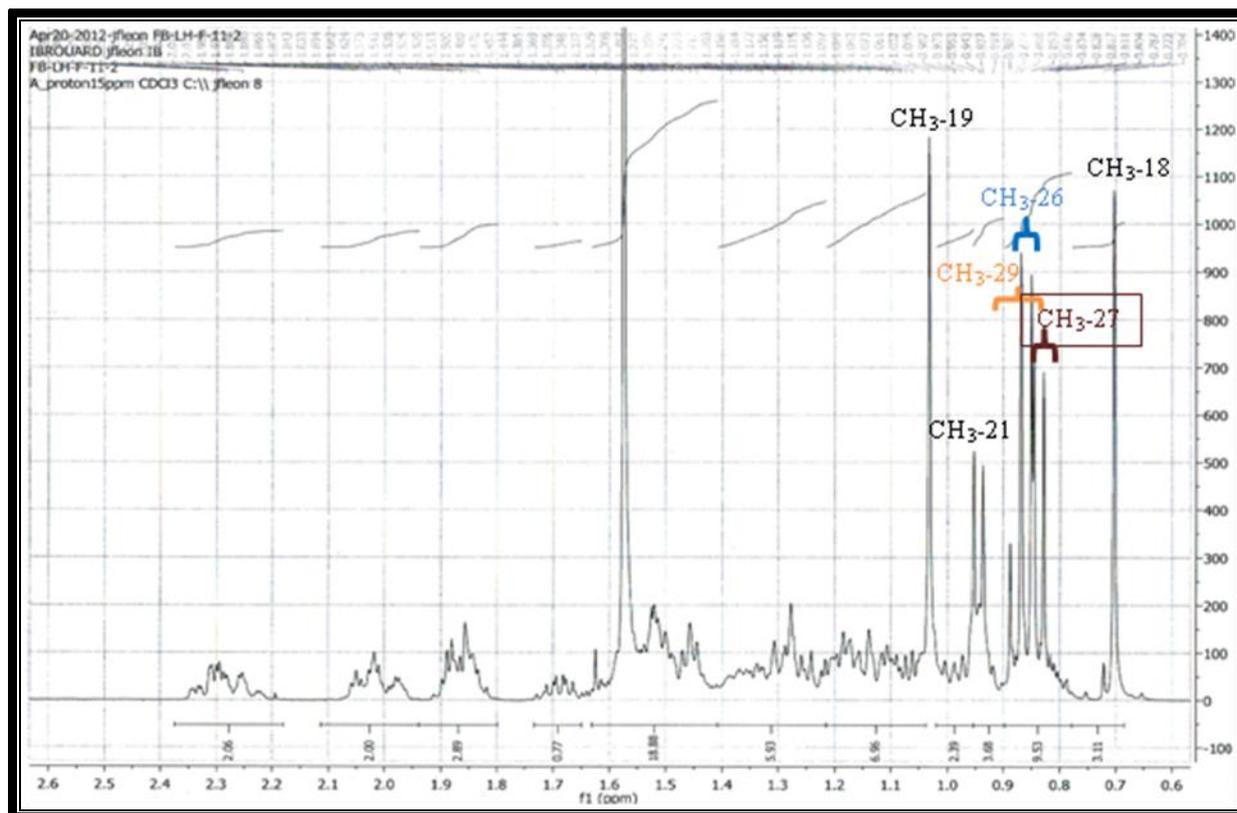
et un signal sous forme de triplet à $\delta_{\text{H}} = 0,86$ ppm ($J = 7,6$ Hz) attribuable aux protons du méthyle CH₃-29.



Spectre III-89 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B3**



Spectre III-90: Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B3** (Etalement 1)



Spectre III-91 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B3** (Etalemen 2)

L'ensemble de ces données comparées aux résultats de la littérature [53] ainsi que la co-chromatographie avec un échantillon authentique mène au β -sitostérol (Figure III-25). D'où la structure suivante :

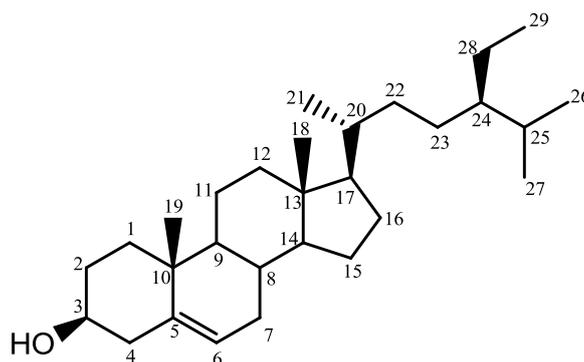


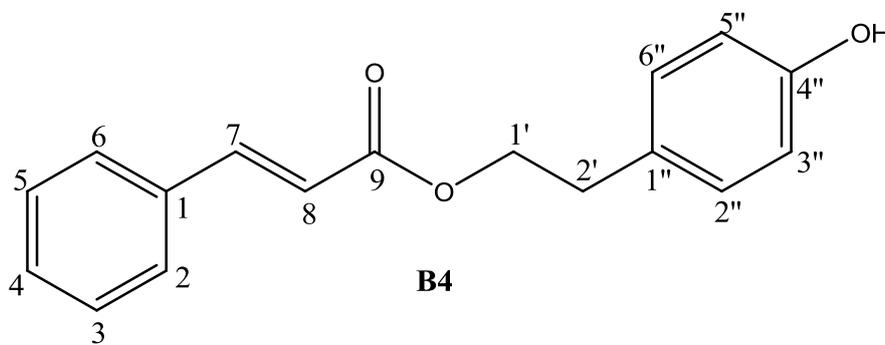
Figure III-25 : Structure finale du composé **B3** : β -sitostérol

Ce produit commun à toutes les plantes, a été isolés de plusieurs espèces du genre *crotalaria* [54]. Le β -sitostérol possède des propriétés anti bactérienne, antitumorale [55-57], antipyrétique, immunomodulatrice et anti inflammatoire [58].

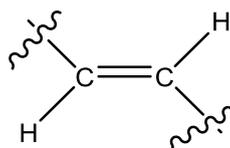
Le tableau III-12 rassemble les données de la RMN ^1H du composé **B3**.

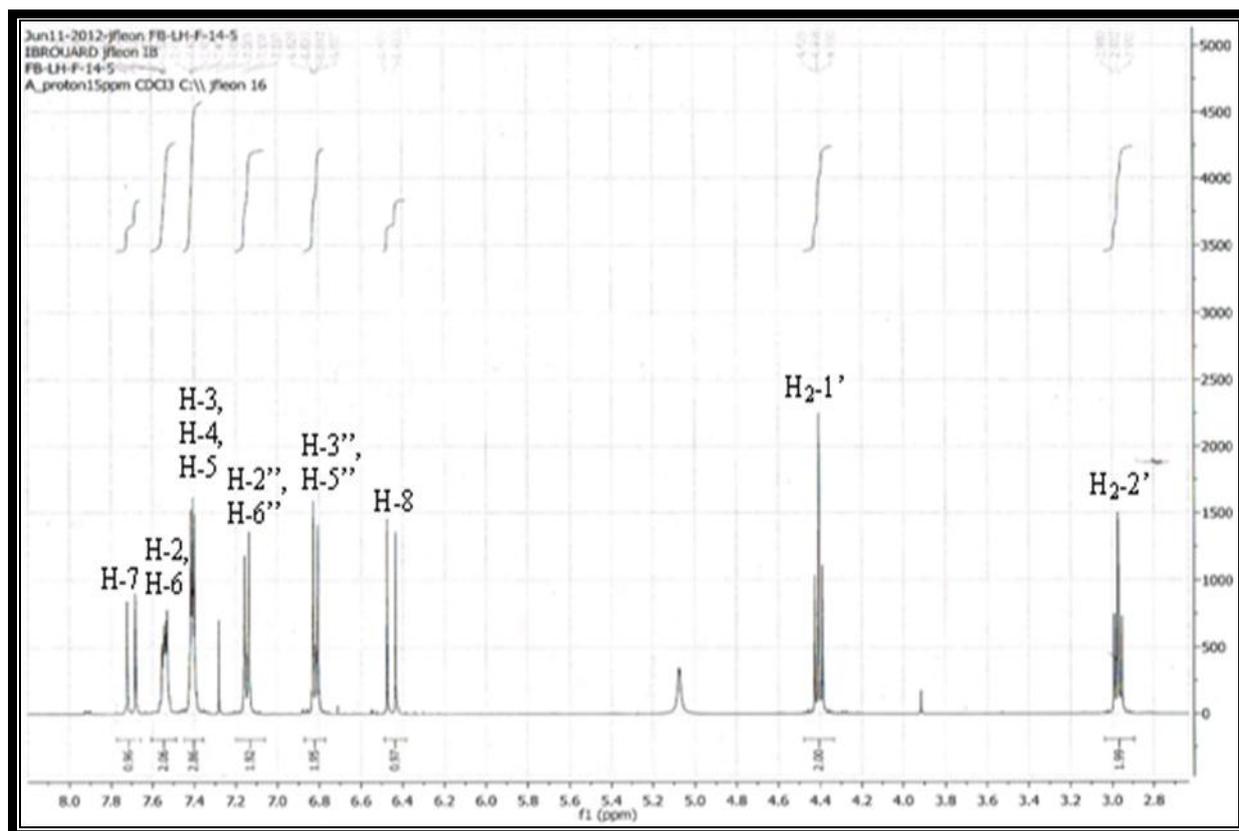
Tableau III-12 : Déplacements chimiques de RMN ^1H du composé **B3** dans CDCl_3

position	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
3	3,53	1H	m	-
6	5,37	1H	dl	5,6
18	0,70	3H	s	-
19	1,03	3H	s	-
21	0,94	3H	d	6,4
26	0,85	3H	d	7,2
27	0,83	3H	d	7,2
29	0,86	3H	t	7,6

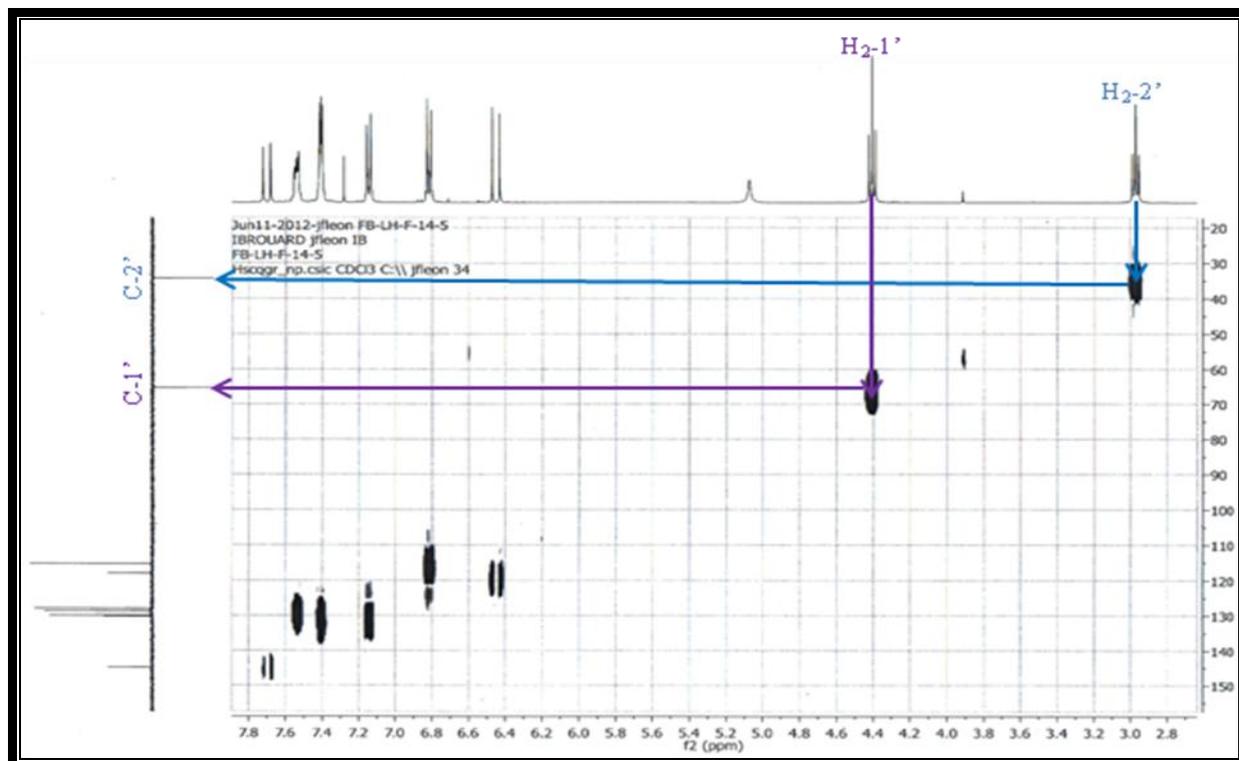
III-2-1-d-Elucidation structurale du composé B4

Ce composé se présente sous forme des cristaux blancs solubles dans le chloroforme. L'étude simultanée des spectres, RMN ^1H (Spectre III-92), HSQC (Spectre III-93) et son étalement Spectre III-94) et COSY (Spectre III-95) du composé **B4**, montre la présence de deux doublet d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7,70$ et $6,45$ ppm ($J = 16,0$ Hz), correspondant à deux protons d'une double liaison éthylénique de configuration *trans*. Cette observation est confirmée par l'analyse du spectre COSY (Spectre III-95) qui montre une corrélation nette entre ces deux noyaux. Le spectre HSQC permet de localiser leurs carbones à $\delta_{\text{C}} = 144,91$ et $118,07$ ppm, respectivement et qui mène à construire la première entité suivante (Figure III-26) :

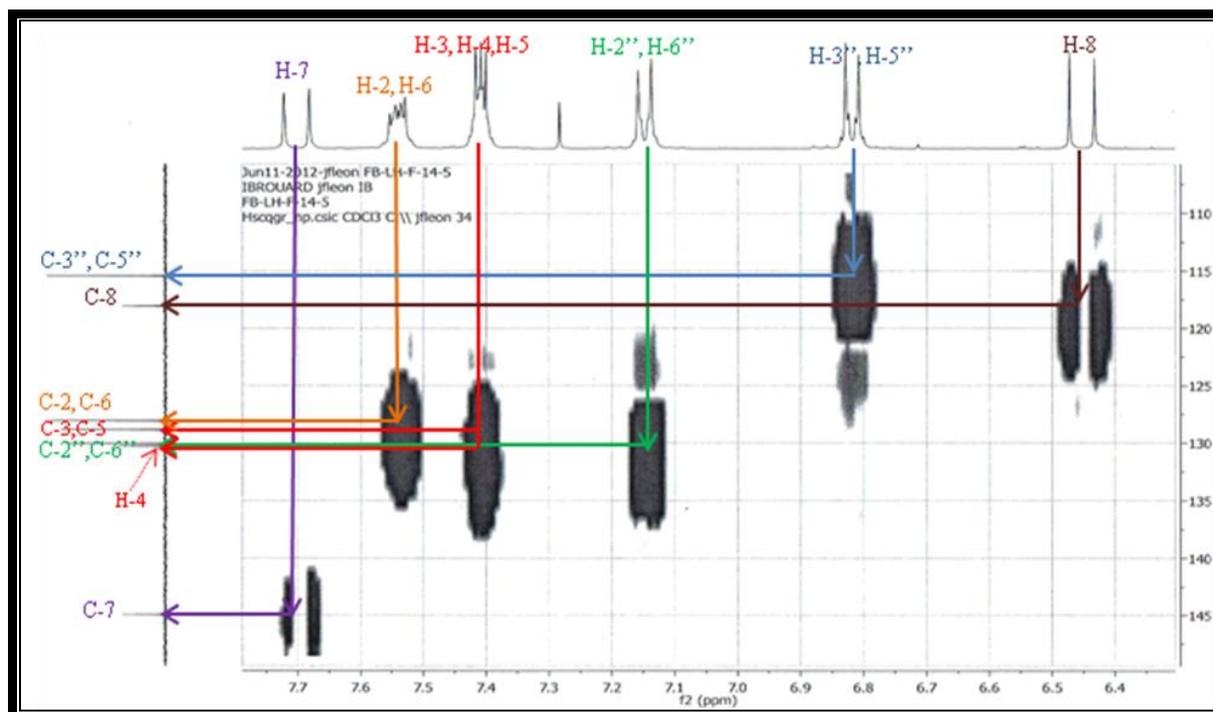
**Figure III-26** : Entité-1 faisant partie de la structure du composé **B4**.



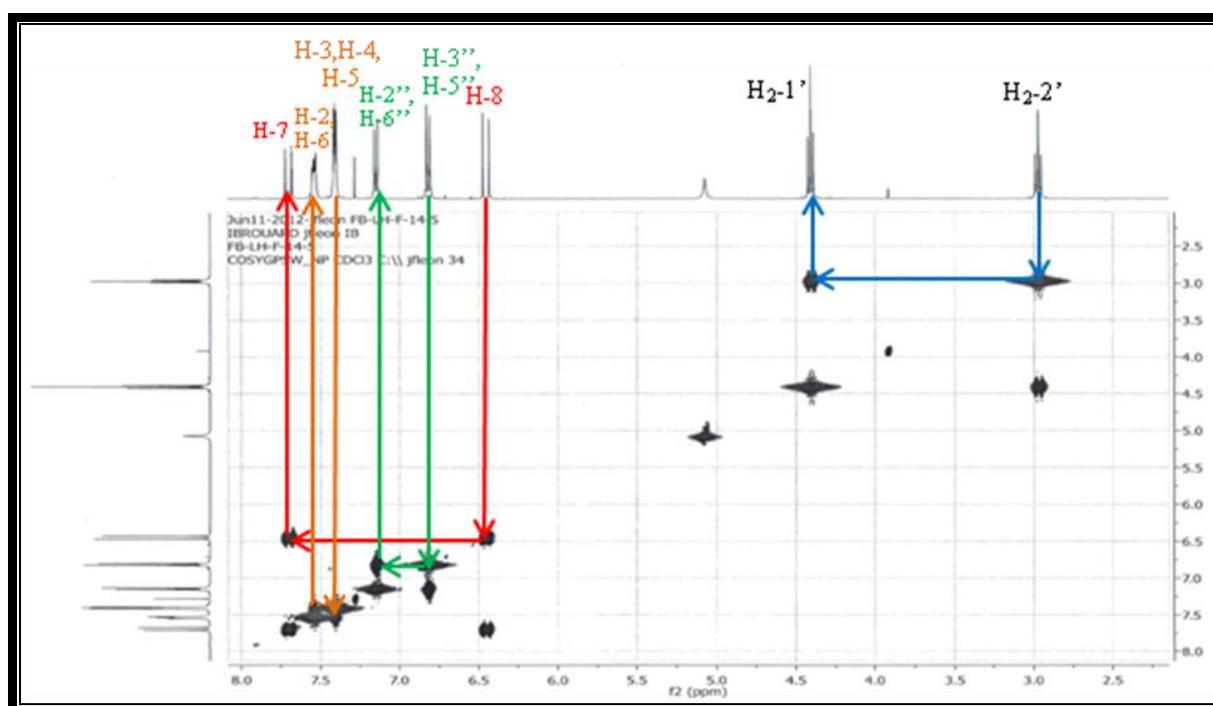
Spectre III-92 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4**



Spectre III-93: Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4**

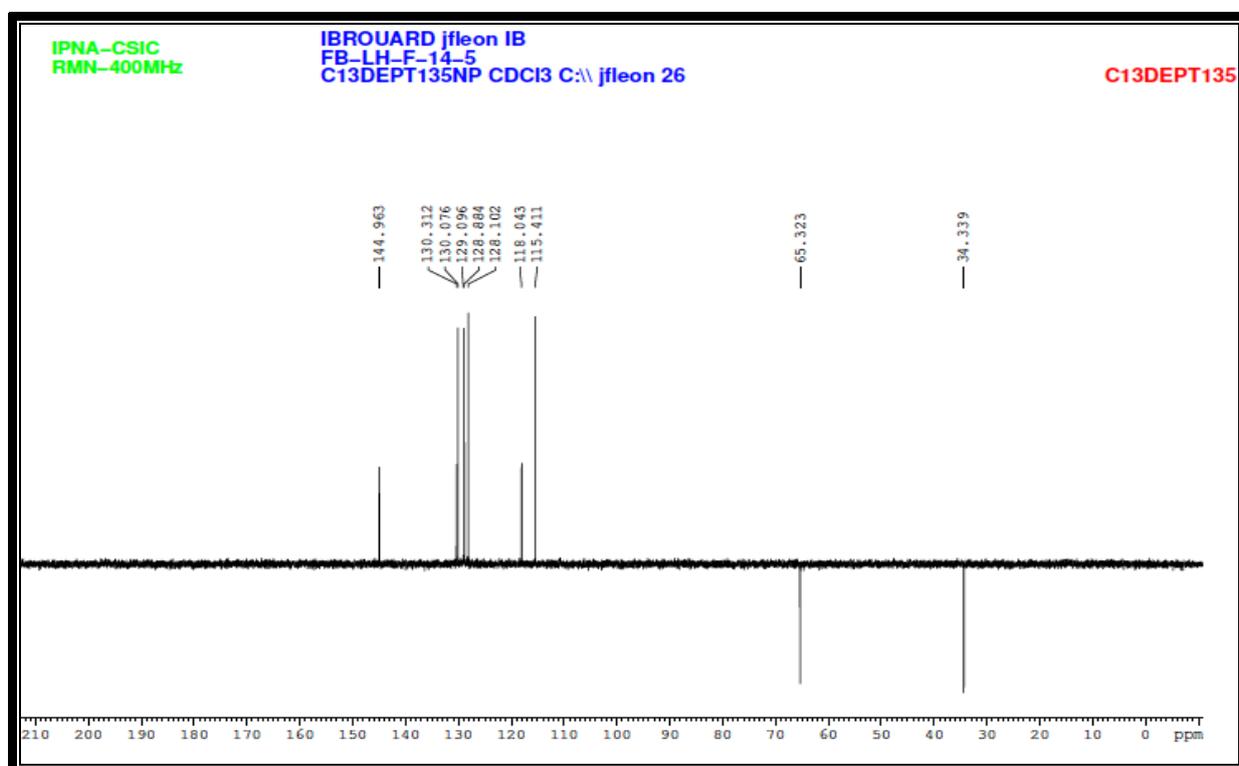


Spectre III-94 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4** «(Etalement)



Spectre III-95: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4**

Le spectre RMN ^1H montre également deux signaux caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué dont le premier signal d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,54$ ppm apparaissant sous forme d'un multiplet, ces deux protons sont magnétiquement équivalents vu leurs corrélations avec leurs carbones porteurs résonnant tous les deux à $\delta_{\text{C}} = 128,07$ ppm, nous pouvons alors dès à présent numéroter ces deux protons H-2 et H-6. Vu d'une part leur équivalence magnétique et d'autre part le fait que ce noyau aromatique est monosubstitué. Le deuxième signal d'intégration 3H sous forme également, d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 7,40$ ppm est attribué par conséquent aux protons H-3, H-4 et H-5. Cette attribution est confortée par le spectre COSY qui montre des taches de corrélations entre ces noyaux. L'examen des spectres HSQC et DEPT 135° (Spectre III-96) permet sans ambiguïté d'attribuer C-3 et C-5 au signal à $\delta_{\text{C}} = 128,86$ ppm et C-4 à $\delta_{\text{C}} = 130,27$ ppm, vu l'intensité apparante de leurs signaux.



Spectre III-96: Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé B4

Sur le spectre HMBC (Spectre III-97) et son étalement (Spectre III-98) les protons H-3 et H-5 permettent de localiser le carbone C-1 du noyau aromatique à $\delta_{\text{C}} = 134,42$ ppm, ce carbone quaternaire ne peut être que le point de substitution du noyau aromatique, en effet et toujours sur le spectre HMBC on observe : une tache de corrélation entre les carbones C-2, C-6 et le proton de la double liaison résonnant à $\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 144,91$ ppm) et également une

tache de corrélation entre C-1 et le deuxième proton de la double liaison résonnant à $\delta_H = 6,45$ ppm. Ces deux observations indiquent que cette double liaison est liée au noyau aromatique en C-1, nous pouvons dès lors numéroter ces protons de la double liaison H-7 et H-8 respectivement, leurs carbones respectifs seront donc numérotés C-7 et C-8. Le spectre RMN ^{13}C (Sspectre III-99) permet de relever aisément la présence d'un carbonyle d'ester conjugué $\delta_C = 167,00$ ppm. Cette conjugaison est claire sur le spectre HMBC où l'on relève des corrélations entre les protons de la double liaison, H-7 ($\delta_C = 144,91$ ppm) et H-8 ($\delta_C = 118,07$ ppm) et le carbone de ce carbonyle que nous pouvons donc numéroté C-9. Ces observations indiquent que le composé **B4** est un dérivé d'acide phénolique dont le noyau aromatique est non substitué, il s'agit donc un dérivé d'acide cinnamique.

A ce stade de notre analyse nous somme en mesure d'attendre la présence de l'entité reporté dans la figure III-27 dans cette molécule.

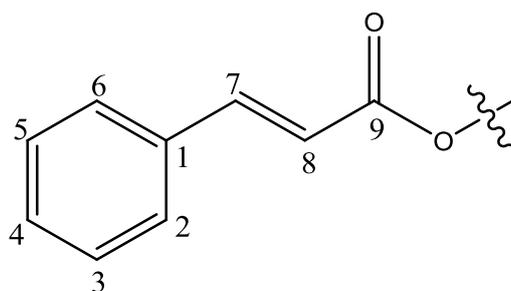
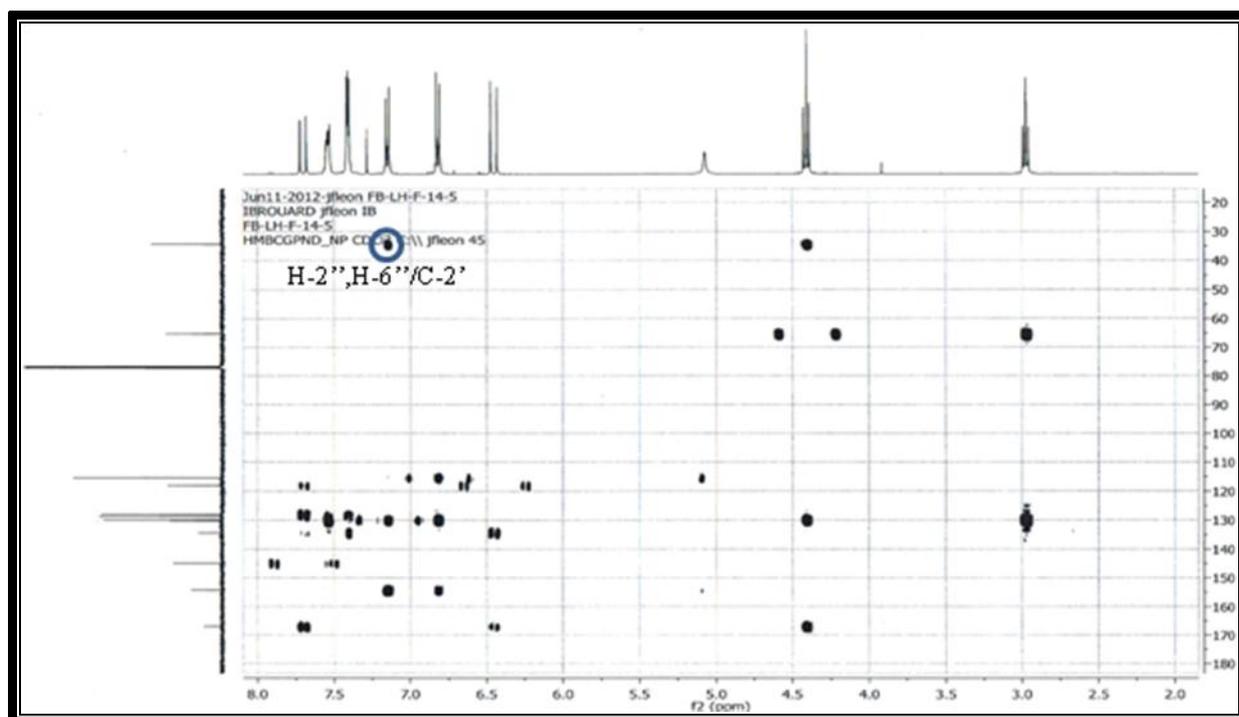
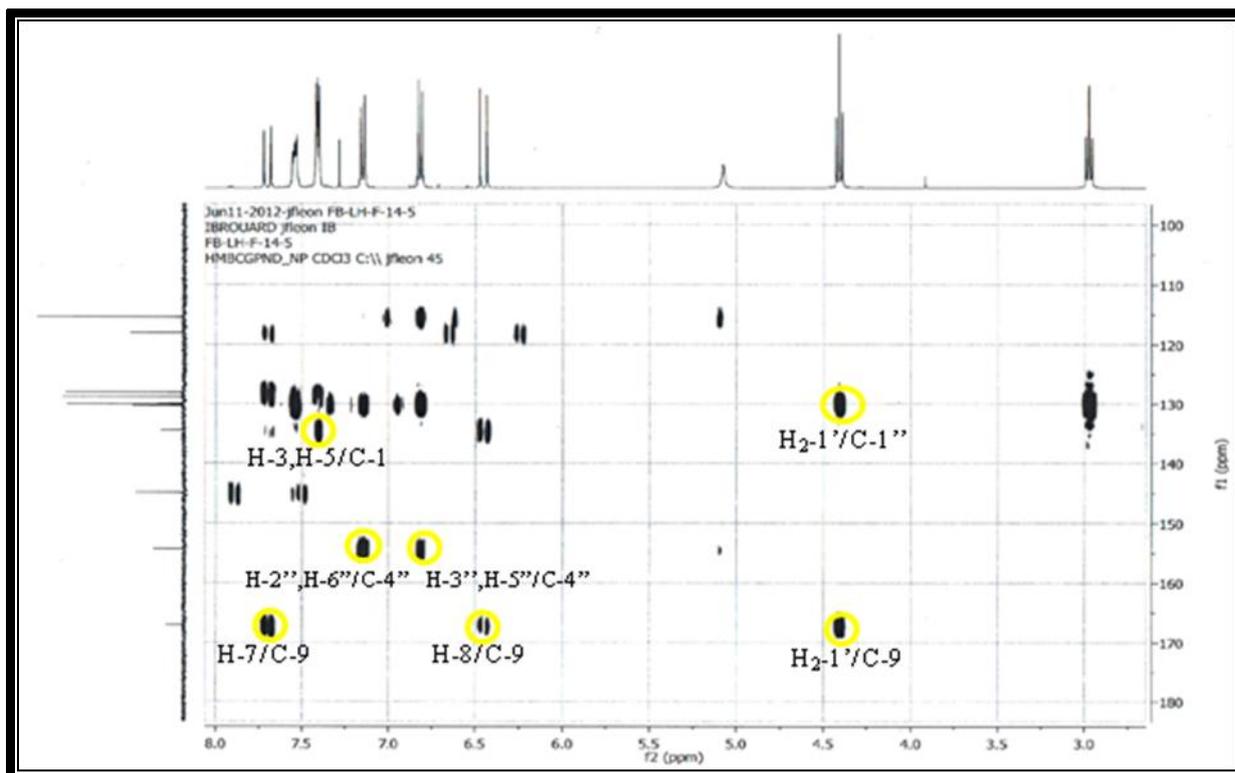


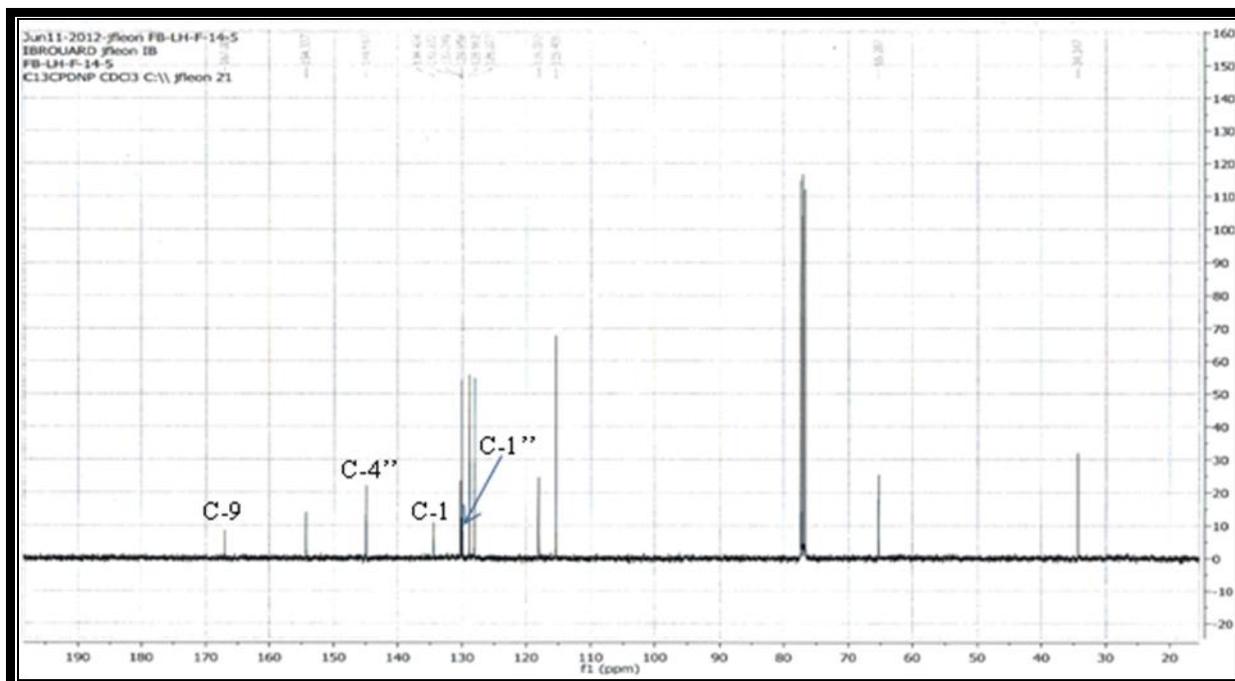
Figure III-27: Entité-2 faisant partie de la structure du composé **B4**.



Spectre III-97 : Spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) du composé **B4**



Spectre III-98: Spectre HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4** (Etalement)



Spectre III-99 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B4**

Le spectre RMN ^1H montre également, deux triplets d'intégration 2H chacun, le premier à $\delta_{\text{H}} = 2,97$ ppm ($J = 7,2$ Hz) correspondant d'après les spectres HSQC et DEPT 135° à un

méthylène dont le carbone résonne à $\delta_c = 34,34$ ppm, le deuxième à $\delta_H = 4,40$ ppm ($J = 7,2$ Hz) correspondant également à un groupement méthylène dont le carbone résonne à $\delta_c = 65,28$ ppm. D'après les constantes de couplage relevées, ces deux groupements méthylènes sont contigus, ce qui est confirmé par leurs corrélations sur le spectre COSY. Comme attendu, d'après la multiplicité de leurs signaux, ces deux groupements méthylènes ne sont pas liés à des positions permettant d'autres couplages. On peut dès à présent signaler que celui à $\delta_H = 4,40$ ppm ($\delta_c = 65,28$ ppm) est lié d'un atome d'oxygène. En effet sur le spectre HMBC les protons de ce méthylène que nous numérotions C-1', montre une tache de corrélation nette avec le carbonyle de l'ester précédemment décrit dans cette molécule. A ce stade de notre analyse nous pouvons attendre une molécule de type cinnamate d'éthyle substitué en 2' (Figure III-28).

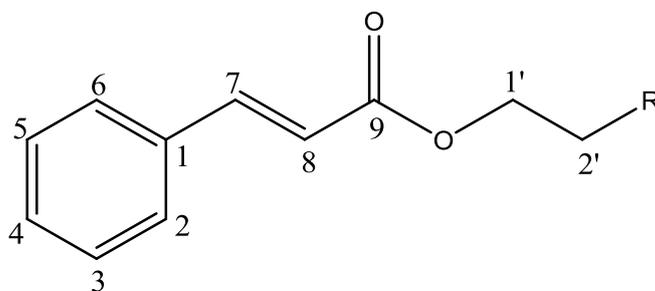


Figure III-28 : Entité-3 faisant partie de la structure du composé **B4**.

Pour déterminer le substituant R attaché en position 2', nous avons réexaminé le spectre RMN ^1H sur lequel on relève un système AM relatif à un noyau aromatique *para*-substitué correspondant de deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta_H = 7,14$ ppm et $\delta_H = 6,81$ ppm ($J = 8,4$ Hz). Ceci est d'ailleurs vérifié sur le spectre COSY qui montre une corrélation nette entre eux. Le spectre HSQC permet de relever les carbones porteurs de ces protons $\delta_c = 130,04$ ppm et $\delta_c = 115,40$ ppm, que nous pouvons numéroté C-2'' et C-6'' pour la première paire et C-3'' et C-5'' pour la deuxième paire.

Sur le spectre HMBC, les protons H-2'' et H-6'' montre une corrélation avec le carbone C-2' déjà signalé à $\delta_c = 34,34$ ppm, ce qui permet de relier ce noyau aromatique *para*-substitué au carbone C-2' de l'éthyle comme attendu. La résonance du carbone C-1'' de ce noyau aromatique est localisé à $\delta_c = 129,95$ ppm grâce à sa corrélation avec les protons H₂-1', ceci est très claire sur le spectre HMBC.

La résonance du carbone C-4'' est repérée à $\delta_c = 154,33$ ppm grâce à sa corrélation avec les quatre protons du noyau aromatique *para*-substitué, d'après la valeur de son déplacement chimique il apparait clairement qu'il est oxygéné. Ceci est appuyé par le spectre RMN ^1H qui

montre un signal sous forme de singulet large à $\delta_H = 5,09$ ppm ; dont le proton ne corrèle avec aucun atome de carbone sur le spectre HSQC, mais montre des corrélations nettes avec C-3'', C-5'' et C-4'', attribuable par conséquent à un groupement hydroxyle ne pouvant être qu'en position C-4''.

Sur la base de ces résultats, la structure du composé **B4** a pu être établie en tant que le **4''-hydroxy phenethyl cinnamate** (Figure III-29).

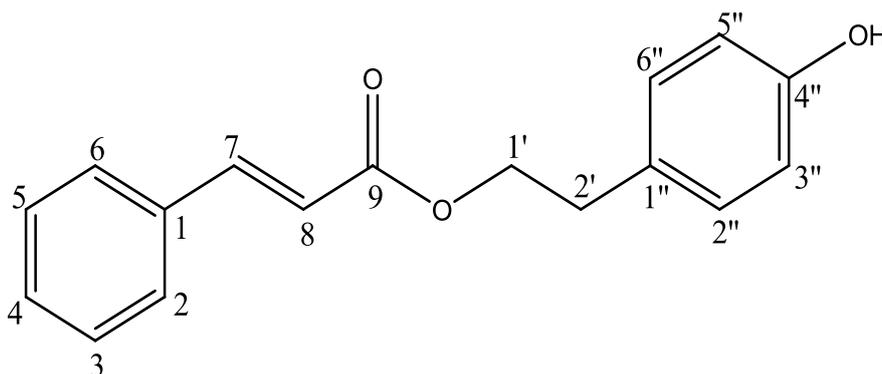


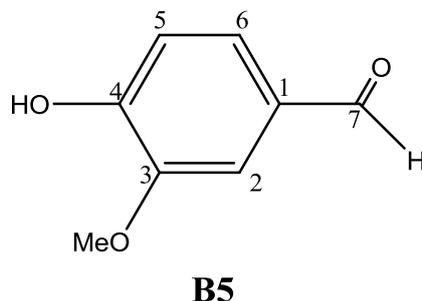
Figure III-29: Structure finale du composé **B4**, **4''-hydroxy phenethyl cinnamate**.

Les déplacements chimiques des noyaux caractérisant ce produit, les attributions des signaux et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau III-13.

Tableau III-13 : Déplacements chimiques de RMN ^1H et ^{13}C du composé **B4** dans CDCl_3 .

position	δ_C	δ_H	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	134,42	-	-	-	-
2, 6	128,07	7,54	2H	m	-
3, 5	128,86	7,40	3H	m	-
4	130,27				
7	144,91	7,40	1H	d	16,0
8	118,07	6,45	1H	d	16,0
9	167,00	-	-	-	-
1'	65,28	4,40	2H	t	7,2
2'	34,34	2,97	2H	t	7,2
1''	129,95	-	-	-	-
2'', 6''	130,04	7,14	2H	d	8,4
3'', 5''	115,40	6,81	2H	d	8,4
4''	154,33	-	-	-	-
OH-4''	-	5,09	1H	s	-

III-2-1-e-Elucidation structurale du composé B5

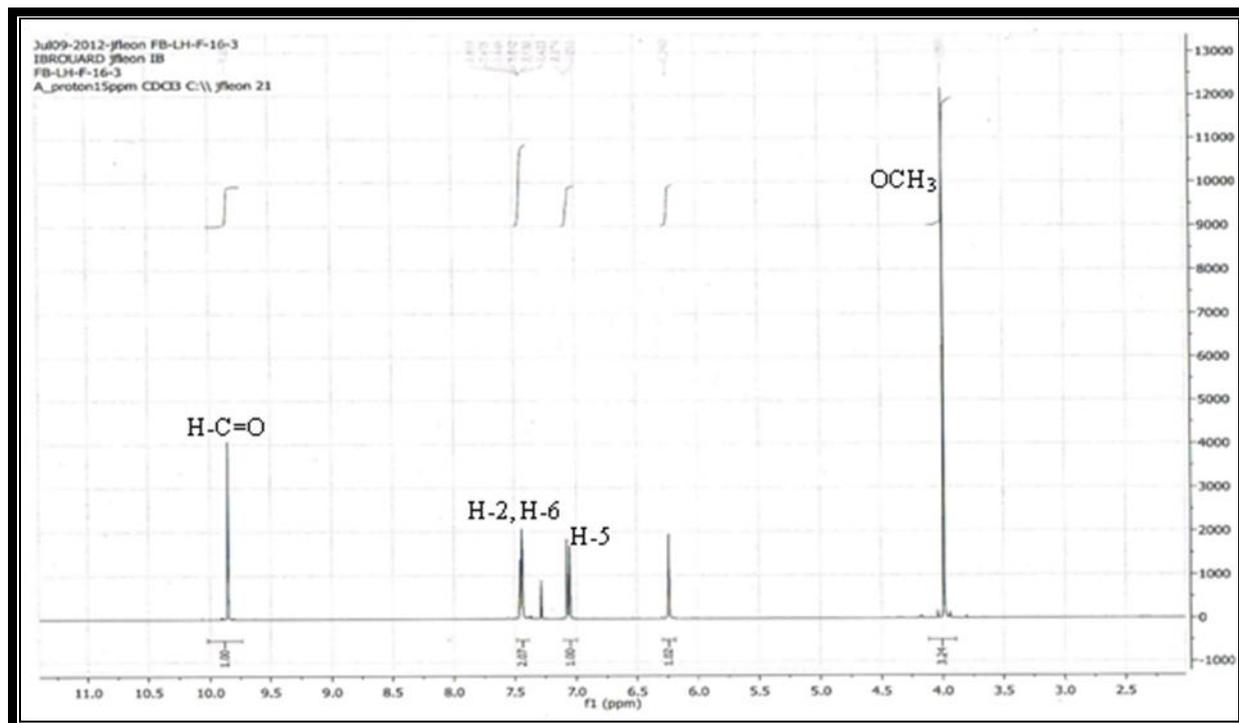


Après analyse des spectres RMN ^1H (Spectre III-100) et RMN ^{13}C (Spectre III-101) de ce composé nous avons constaté une ressemblance totale avec le composé **A2** issu de la phase chloroformique de la plante *Asteriscus graveolens* et dont la détermination structurale a été effectuée précédemment. La co-chromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes des deux composés a permis de conclure qu'il s'agissait du même produit, **la vanilline**.

L'étude du spectre RMN ^1H de ce composé a permis de mettre en évidence dans la région aromatique la présence de trois protons résonnant à $\delta_{\text{H}} = 7,45$; $7,44$ et $7,06$ ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J = 8,4$; $1,6$ Hz), d'un doublet ($J = 1,6$ Hz) et d'un doublet ($J = 8,4$ Hz), respectivement. Ces constantes de couplage sont en faveur d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4. De ce fait le premier signal est attribuable à H-6, le deuxième attribuable à H-2 et le troisième est attribuable à H-5.

Ce spectre montre également un signal d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,99$ ppm attribuable à un groupement méthoxyle et un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 9,85$ ppm caractéristique d'un groupement formyle.

En tenant compte des résultats de RMN ^1H , il apparaît clairement que cette molécule n'est autre que le benzaldéhyde substitué par un groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle. La présence de ce groupement hydroxyle est d'ailleurs claire sur le spectre RMN ^1H qui montre la présence d'un singulet large d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,24$ ppm. Le carbone du groupement formyle sera numéroté C-7, quant à celui qui le porte, il sera numéroté C-1.



Spectre III-100 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B5**

L'examen du spectre RMN ^{13}C (Spectre III-101) et la comparaison avec les données de la littérature [22] permettent de localiser le carbone C-7 à 190,73 ppm, C-1 à 129,96 ppm, C-2 à 108,85 ppm, C-3 à 147,15 ppm, C-4 à 151,66 ppm, C-5 à 114,37 ppm, C-6 à 127,41 ppm, OCH_3 à 56,13 ppm. Cette analyse a permis également de conclure qu'il s'agit de **la vanilline** plutôt que l'isovanilline (Figure III-30).

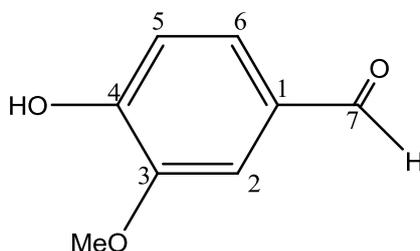
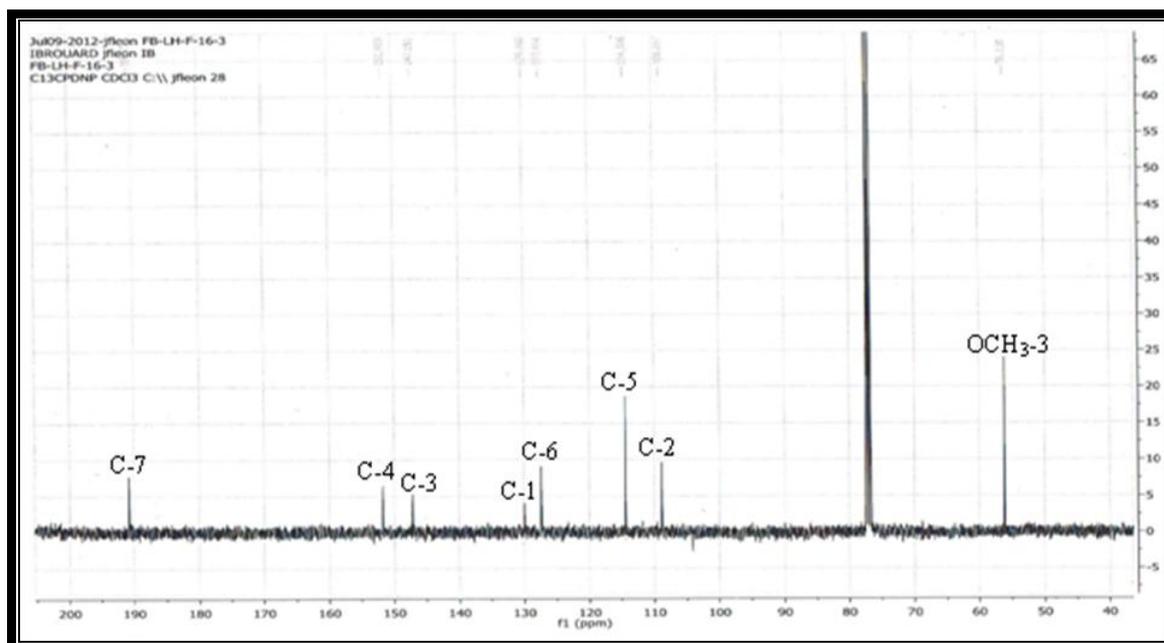


Figure III-30: Structure finale du composé **B5**, **vanilline**

Cette molécule a été aussi isolé de : *Zingiber zerumbet* [59], *Saccocalyx satuireioides* Coss. & Dur. [60], *Thymelaea microphylla* [23] et de *Centaurea diluta* [61].



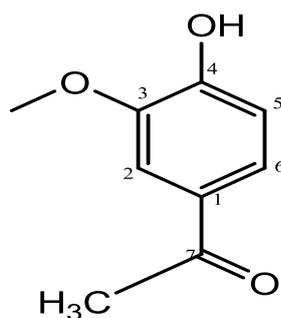
Spectre III-101 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B5**

Toutes les données de RMN ^1H et ^{13}C sont reportées dans le tableau III-14 .

Tableau III-14 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C du composé **B5**

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	129,96	-	-	-	-
2	108,85	7,44	1H	d	1,6
3	147,15	-	-	-	-
4	151,66	-	-	-	-
5	114,37	7,06	1H	d	8,4
6	127,41	7,45	1H	dd	8,4 ; 1,6
7	190,73	9,85	1H	s	-
OMe-3	56,13	3,99	3H	s	-
OH	-	6,24	1H	s	-

III-2-1-f- Elucidation structurale du composé **B6**



B6

Le composé **B6** se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans le chloroforme et le dichlorométhane.

Les spectres RMN ^1H (Spectre III-102) et son étalement (Spectre III-103) et RMN ^{13}C (Spectre III-104) enregistrés dans le CDCl_3 de ce composé montrent une ressemblance avec ceux du composé **B5**.

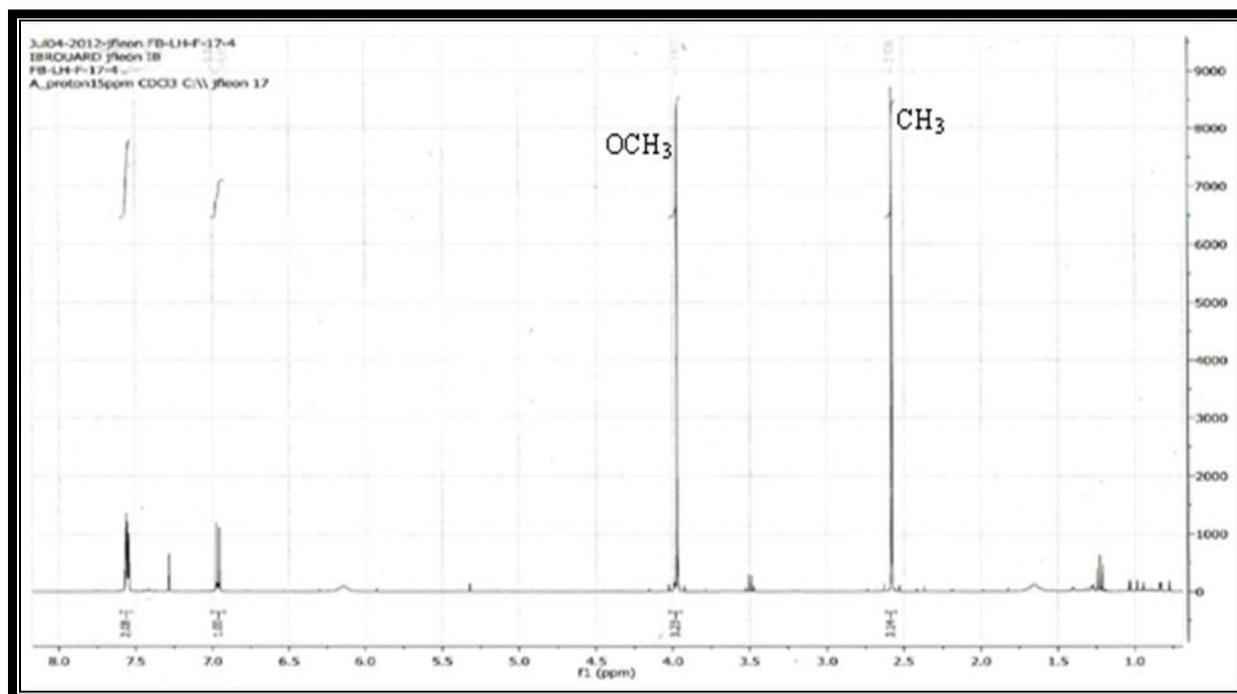
L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-102) de ce composé montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique trisubstitué dans les positions C-1, C-3 et C-4. En effet, on observe :

- Un doublet ($J = 2,0$ Hz) et un doublet de doublets ($J = 8,8, 2,0$ Hz) d'intégration commune 2H chevauchant et centrés à environ $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm, accordés à H-6 et H-2. Ces protons corrélient sur le spectre HSQC (Spectre III-105) aux carbones à $\delta_{\text{C}} = 109,79$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 123,95$ ppm attribuables à C-2 et C-6 respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,96$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-5. Le signal du carbone C-5 est localisé à $\delta_{\text{C}} = 113,77$ ppm grâce au spectre HSQC.

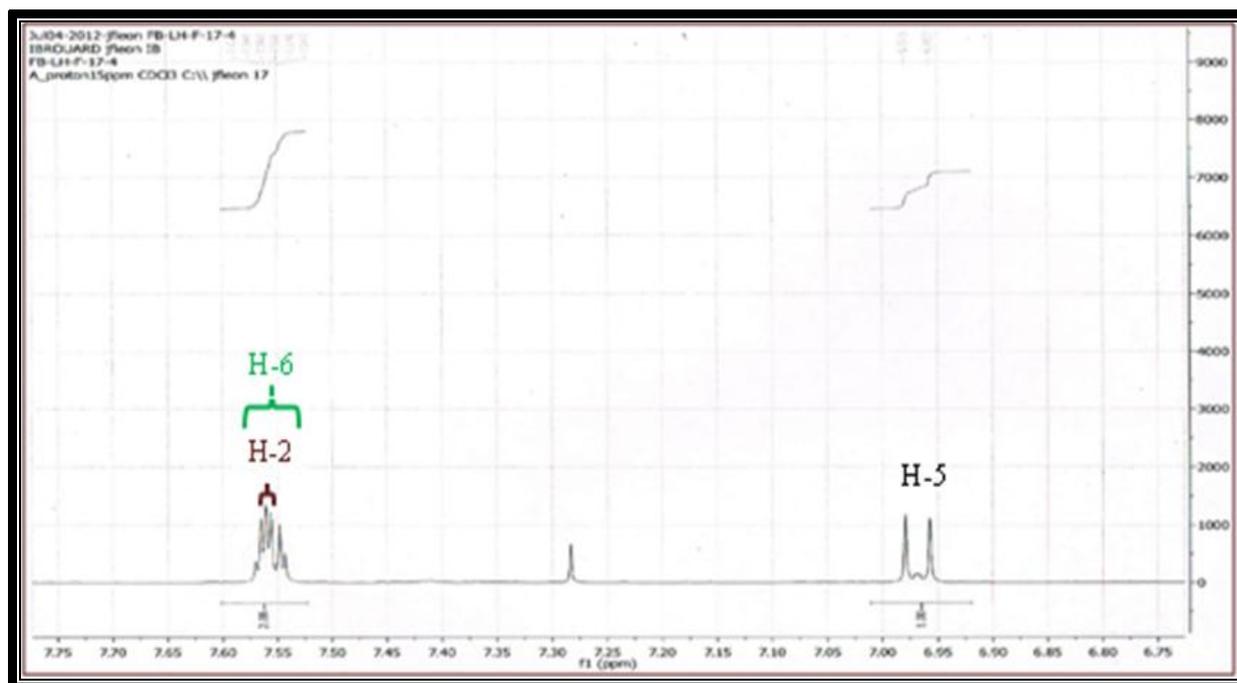
Le spectre RMN ^1H montre par ailleurs :

- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,97$ ppm corrélant sur le spectre HSQC au carbone à $\delta_{\text{C}} = 56,07$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 2,57$ ppm corrélant sur le spectre HSQC au carbone à $\delta_{\text{C}} = 26,10$ ppm.

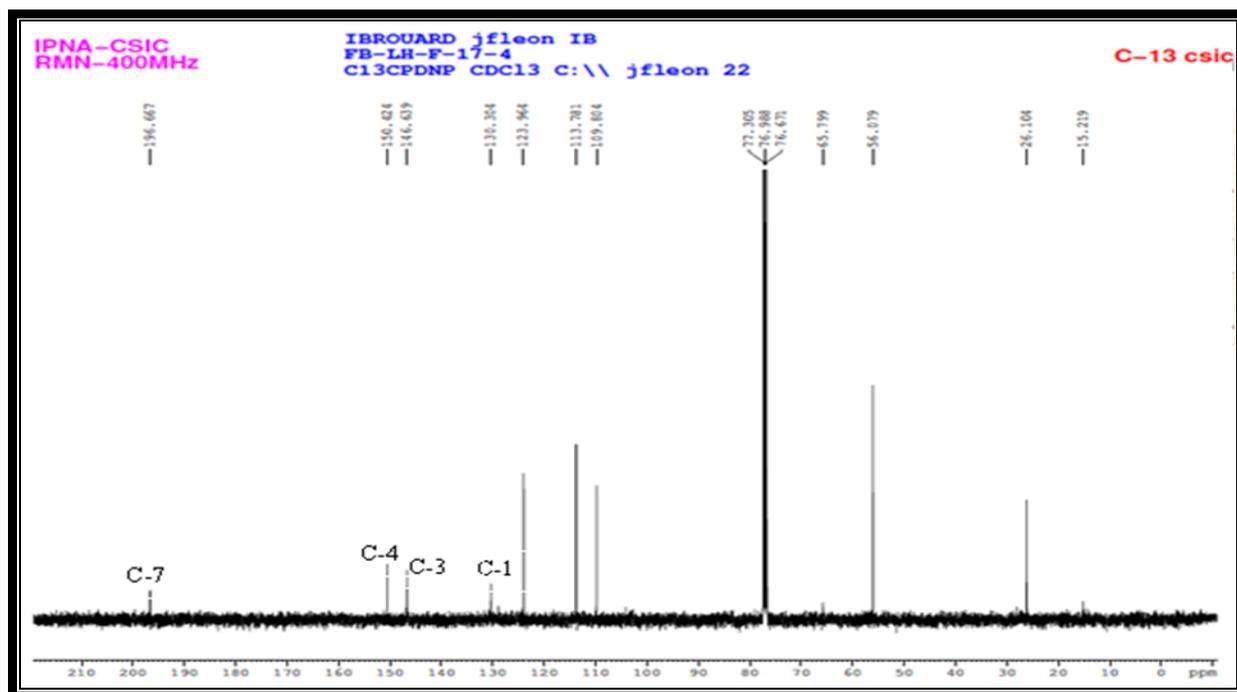
L'examen simultané des spectres RMN ^{13}C et DEPT 135° (Spectre III-106) montre en plus des carbones signalés, quatre signaux relatifs à des carbones quaternaires à $\delta_{\text{C}} = 130,29$; $146,62$; $150,41$ et $196,65$ ppm. Ces valeurs des déplacements chimiques de ces carbones permettent de déduire la présence d'un carbonyle de cétone conjuguée ($\delta_{\text{C}} = 196,65$ ppm) qui doit être lié au noyau aromatique pour assurer cette conjugaison. De ce fait le carbonyle doit être lié au carbone à $\delta_{\text{C}} = 130,29$ ppm, vu la valeur de leur déplacement chimique, car les deux autres ($\delta_{\text{C}} = 146,62$ et $150,41$ ppm) doivent être obligatoirement oxygénés. Ainsi et vu l'absence d'autres signaux sur le spectre RMN ^1H , le groupement méthoxyle est directement lié au noyau aromatique, l'autre carbone oxygéné de ce noyau aromatique ne peut être substitué par un groupement hydroxyle. A ce stade, il apparaît évident vu les valeurs des déplacements chimiques que le CH_3 précédemment signalé ($\delta_{\text{H}} = 2,57$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 26,10$ ppm) est placé sur le carbonyle de cétone, formant ainsi un groupement acétyle, substituant le noyau aromatique



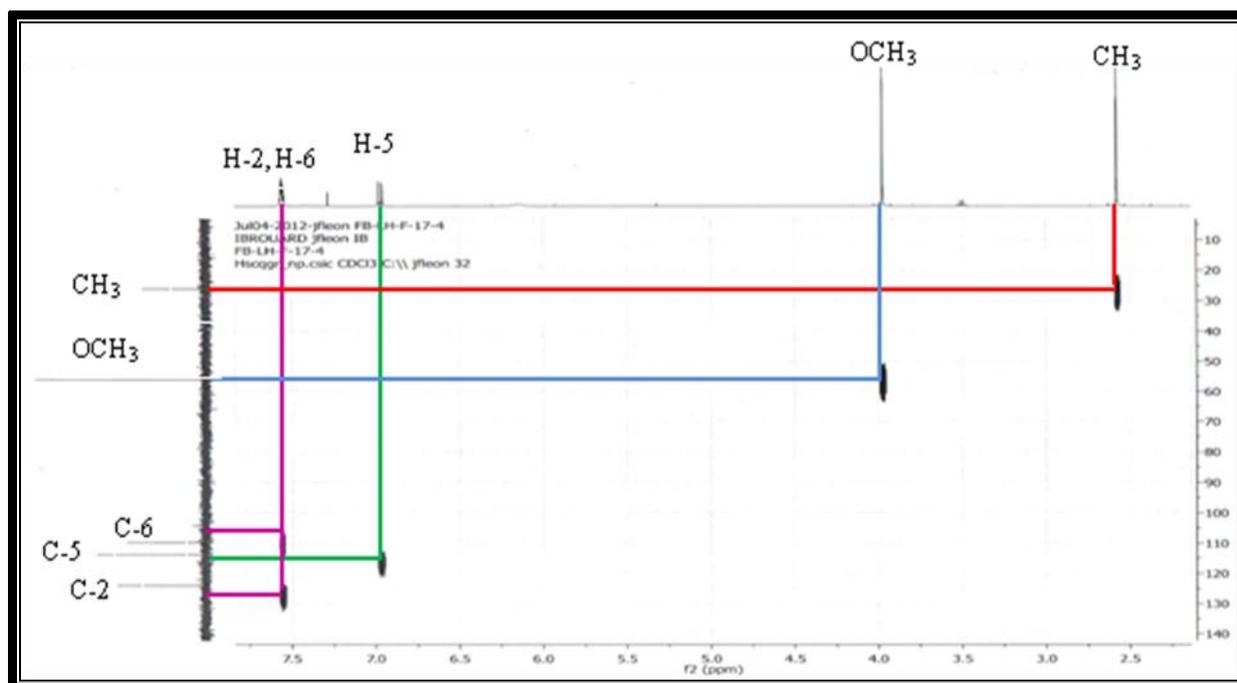
Spectre III-102 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé B6



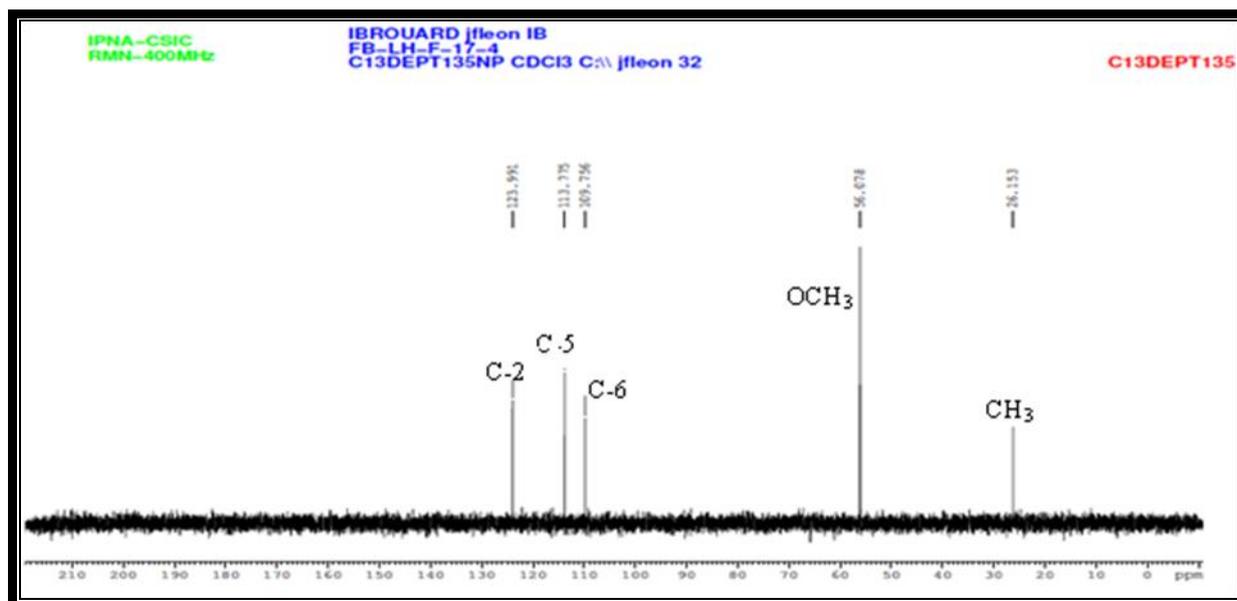
Spectre III-103 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé B6 (Etalement)



Spectre III-104 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B6**



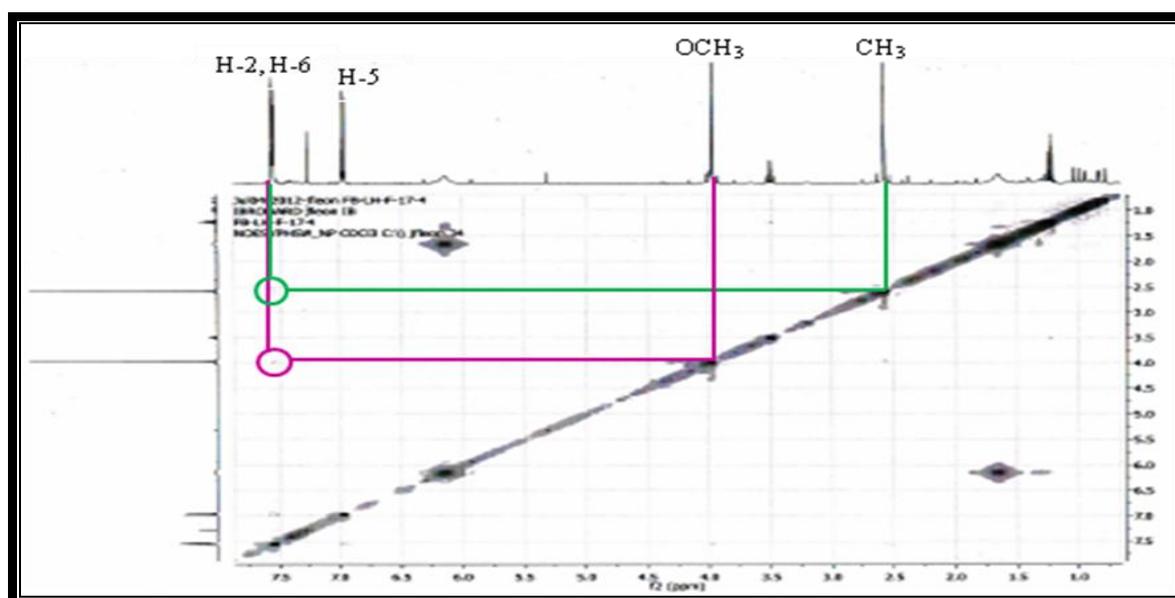
Spectre III-105 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B6**



Spectre III-106 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé B6

L'examen du spectre NOESY (Spectre III-107) permet de placer le groupement acétyle en C-1 ($\delta_C = 130,29$ ppm) grâce à la corrélation observée entre les protons du CH₃ et les deux protons H-2 et H-6, et permet également de placer le groupement méthoxyle en C-3 grâce à la corrélation relevée entre les protons de ce méthoxyle et le proton H-2. De ces faits, le groupement hydroxyle est en position C-4.

La différence notable entre ce composé et le composé B5 concerne le substituant lié au carbone C-1 et elle a trait particulièrement à la disparition du groupement formyle et l'apparition d'un groupement acétyle.



Spectre III-107 : Spectre NOESY (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé B6

L'ensemble de ces données cumulées regroupées dans le tableau III-15, et complétées par celles de la littérature [62,63] ont permis de conclure que le composé **B6** ne peut être que **4-hydroxy-3-methoxyacetophenone** (l'**acétovanilline**) (Figure III-31). Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Apocynum cannabinum* [64]. Elle a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques [65, 66].

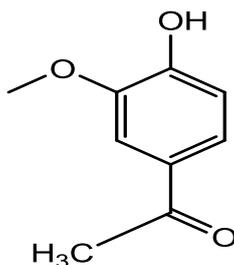
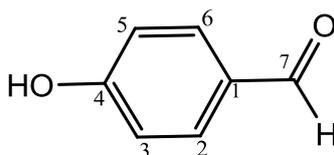


Figure III-31 : Structure finale du composé **B6**, l'**acétovanilline** (**acétovanillone**)

Tableau III-15: Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C du composé **B6**

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	130,29	-	-	-	-
2	123,95	7,55	1H	d	2,0
3	146,62	-	-	-	-
4	150,41	-	-	-	-
5	113,77	6,96	1H	d	8,8
6	109,79	7,55	1H	dd	8,8 ; 2,0
7(CO)	196,65	-	-	-	-
CH ₃ -7	26,10	2,57	3H	s	
OMe-3	56,07	3,99	3H	s	-

III-2-1-g- Elucidation structurale du composé **B7**

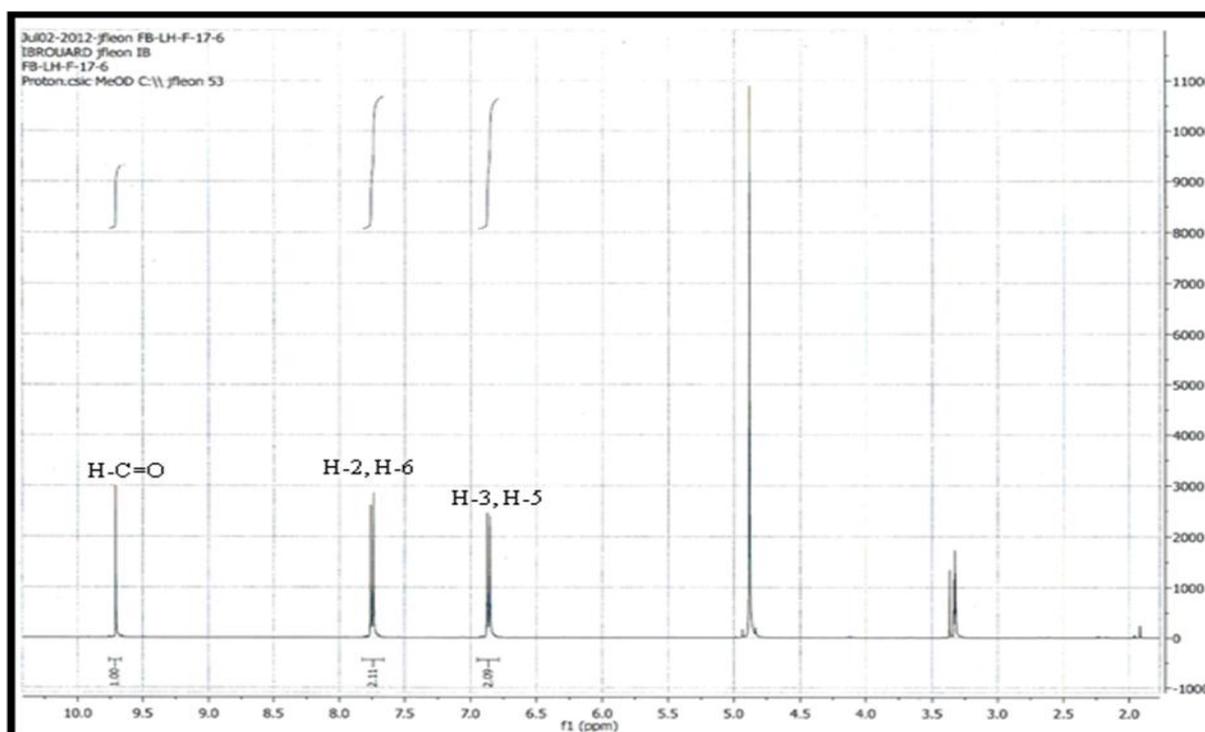


B7

Le spectre RMN ^1H (Spectre III-108) de ce composé indique sa simplicité par le nombre des signaux qu'il présente dans la zone aromatique. Il révèle clairement qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique *para*-substitué par deux groupements différents, est caractérisé par deux doublet d'intégration 2H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm (H-3 et H-5) et $\delta_{\text{H}} = 7,85$ ppm (H-2 et H-6) ($J = 8,6$ Hz) correspondant à un couplage ortho.

Ce spectre montre également un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 9,87$ caractéristique du CH d'un groupement formyle.

Vu l'absence d'autre groupements hydrocarbonés, donc le deuxième substituant ne peut être qu'un hydroxyle. Ce composé est donc le benzaldéhyde substitué par un groupement hydroxyle.

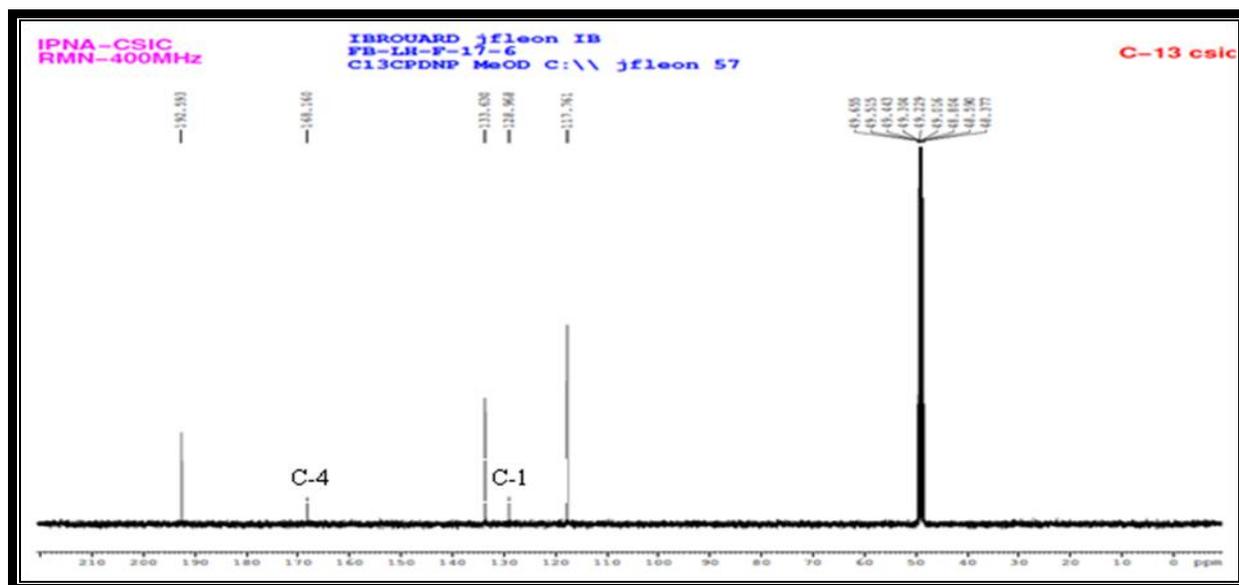


Spectre III-108: Spectre RMN ^1H (400 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé B7

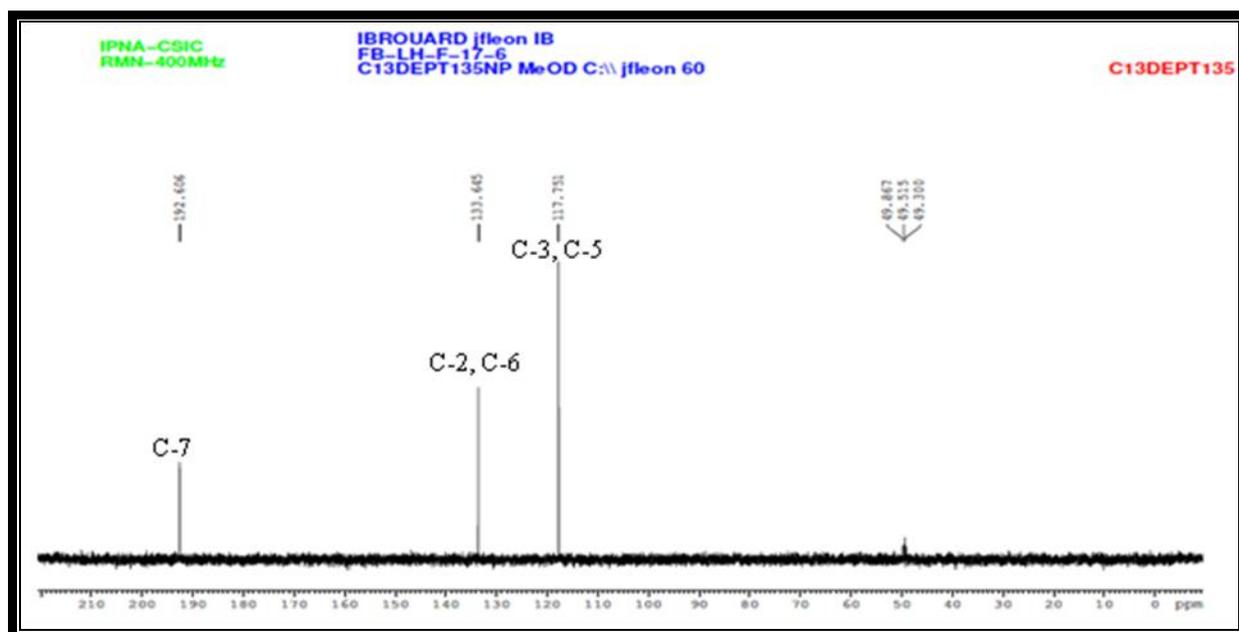
Ceci est clairement confirmé par l'observation des spectre RMN ^{13}C (Spectre III-109) et DEPT 135° (Spectre III-110) qui montrent la présence de sept atomes de carbones dans la zone aromatique confirmant le squelette d'un noyau aromatique, notamment les deux signaux caractérisant le noyau aromatique *para*-substitué à $\delta_{\text{C}} = 133,62$ ppm (C-2, C-6) et $\delta_{\text{C}} = 117,75$ ppm (C-3, C-5), ainsi que le carbone aldéhydique à 192,59 ppm. Vu la présence du groupement formyle précédemment signalé et l'absence d'autre groupements hydrocarbonés, il est clair que cette molécule est un benzaldéhyde substitué par un groupement hydroxyle. Le

spectre montre également, un carbone aromatique quaternaire à $\delta_c = 168,14$ ppm, d'après la valeur de son déplacement chimique, il est clair qu'il est oxygéné, ce carbone ne peut donc être porteur que du groupement hydroxyle précédemment signalé, il sera donc numéroté C-4. On relève également un autre carbone aromatique quaternaire à $\delta_c = 128,95$ ppm ne pouvant être que le C-1.

Tenant compte de la numérotation usuelle de ce type de composé le carbone du carbonyle de la fonction aldéhyde sera numéroté C-7.

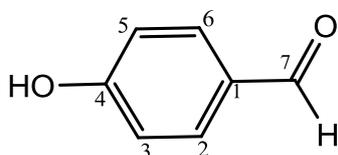


Spectre III-109 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) de B7



Spectre III-110 : DEPT 135° (100 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé B7

Le *para*-hydroxy benzaldéhyde (Figure III-32) a été isolé auparavant de *Aster indicus* [67] et de *Abutilon indicum* [68].



B7

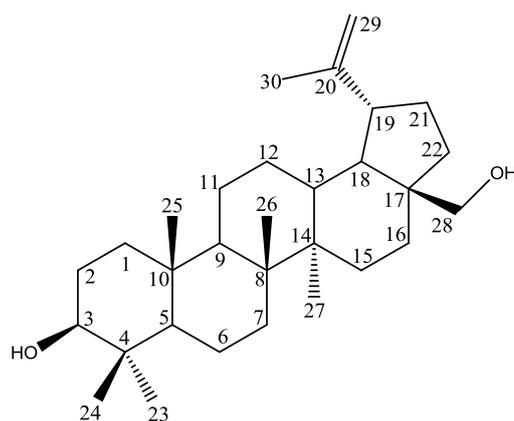
Figure III-32 : Structure du composé **B7**, *para*-hydroxy benzaldéhyde

Les données de la RMN ^{13}C et ^1H sont rassemblées dans le tableau III-16 .

Tableau III-16 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé **B7** (MeOH- d_4)

position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	128,95	-	-	-	-
2, 6	133,62	7,81	2H	d	8,6
3, 5	117,75	6,96	2H	d	8,6
4	168,14	-	-	-	-
7	192,57	9,87	1H	s	-

III-2-1-h-Elucidation structurale du composé B8



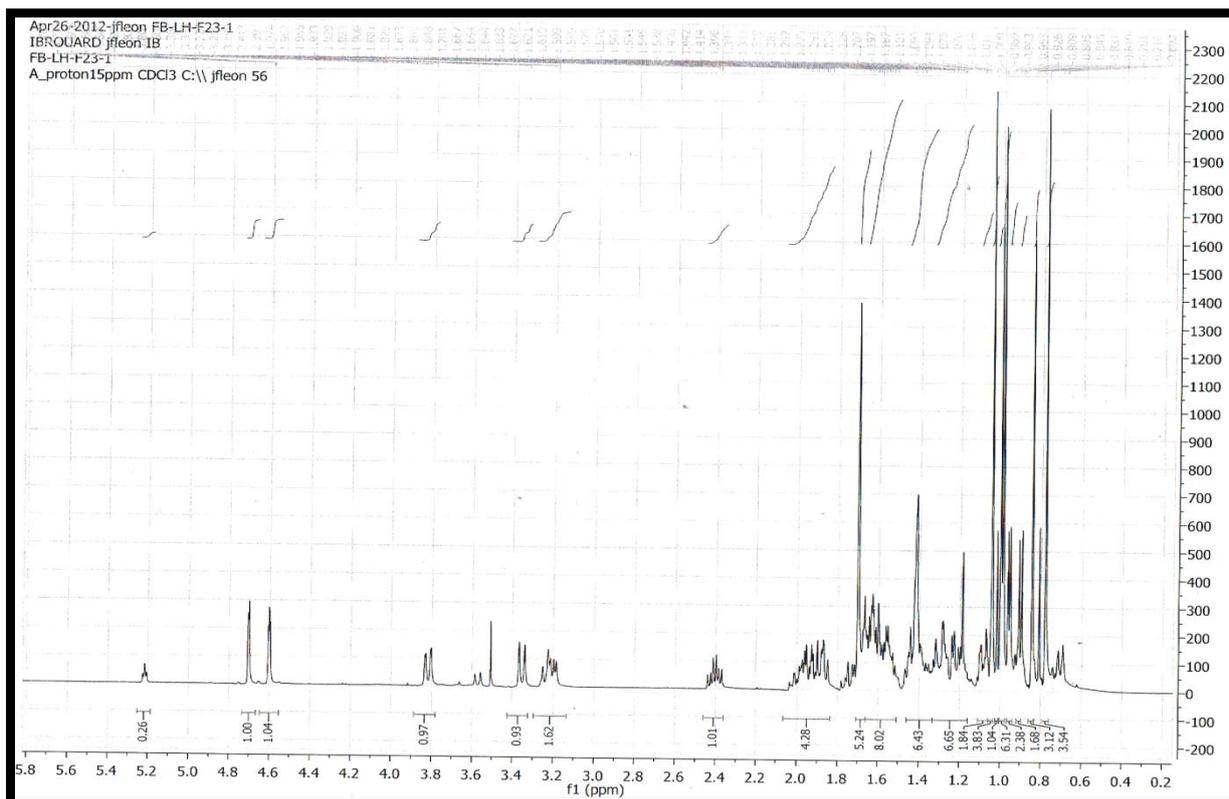
B8

Les spectre RMN ^1H (Spectre III-111), ses étalements (Spectre III-112 et spectre III-113) et RMN ^{13}C (Spectre III-114) de ce composé sont très similaires de ceux du composé décrit précédemment, à savoir le lupéol (**B2**). En effet, l'analyse combinée des spectres RMN ^1H , ^{13}C et DEPT 135°(Spectre III-115 et son étalement (Spectre III-116)) montre la présence de

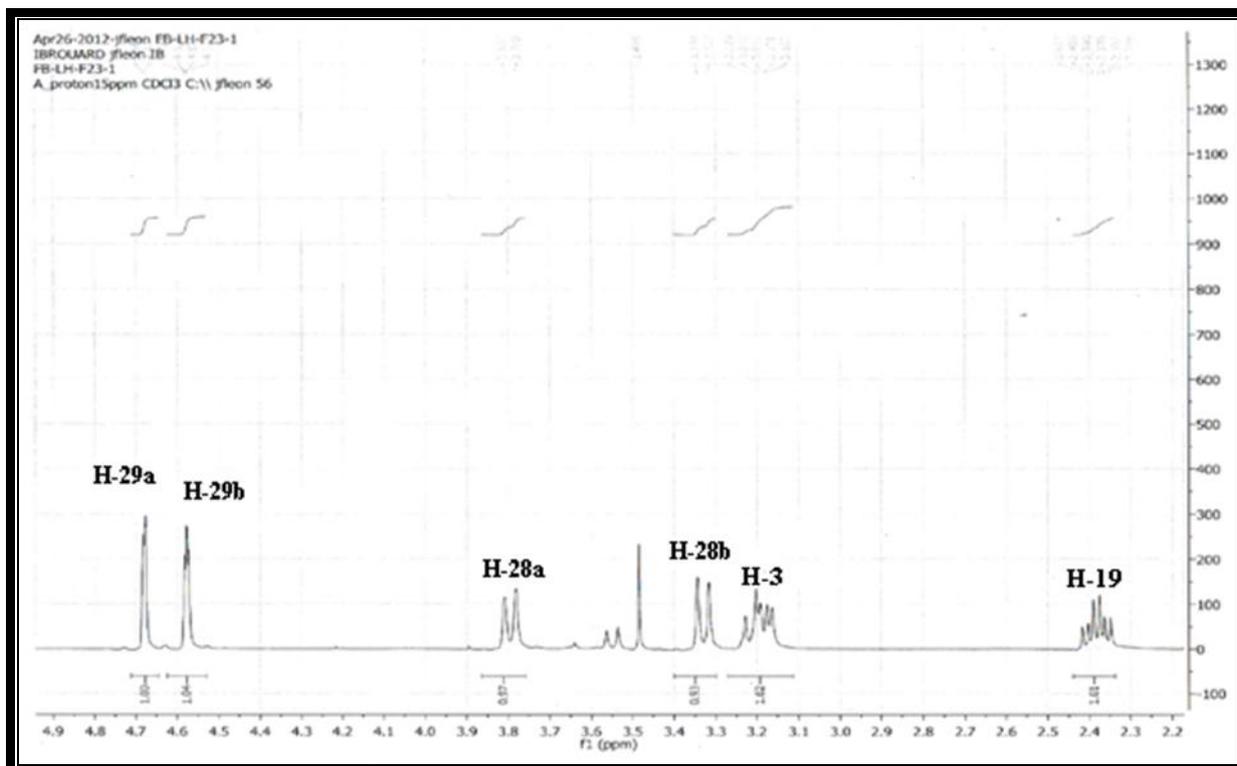
six méthyles, douze méthylènes dont un oléfinique et un oxygéné, six méthines dont un oxygéné et six atomes de carbone quaternaires, confirmant la nature triterpénique du composé **B8**.

Une comparaison avec les données spectrales du composé **B2** décrit précédemment, montre que le méthine oxygéné ($\delta_C = 78,98$ ppm et $\delta_H = 3,20$ ppm, *dt*, 11,2 ; 5,2 Hz) ne peut être attribué qu'à la position C-3 du squelette triterpénique et que cette position est hydroxylée vu les valeurs des déplacements chimiques de son carbone et son hydrogène. De même le CH résonnant à $\delta_C = 55,33$ ppm dont le proton se trouve très blindé ($\delta_H = 0,68$ ppm) est caractéristique du CH-5 d'une *trans*-décaline et donc en faveur d'une jonction *trans* entre les cycles A et B de ce triterpène [46]. On note également la présence du groupement isopropényle et par conséquent la présence du CH₃-30 à $\delta_H = 1,67$ ppm résonnant sous forme d'un singulet large ($\delta_C = 19,08$ ppm) et du CH₂-29 à $\delta_H = 4,68$ (1H, *m*, H-29a) et 4,58 (1H, *m*, H-29b). Ce groupement isopropényle est en position C-19 vu la présence du méthine dont la résonance de son carbone est relevée à $\delta_C = 48,78$ ppm et celle de son proton à $\delta_H = 2,38$ ppm (*td*, 11,2 ; 5,6 Hz) caractéristiques de cette position [47], orientant donc vers un squelette de type lupène. Cette hypothèse est confortée par la présence de la résonance à $\delta_C = 37,32$ ppm attribuable au carbone de la position C-13. Comme différence notable entre les spectres du composé **B8** et les spectres du composé **B2**, on relève la disparition du signal relatif au méthyle angulaire résonnant à $\delta_C = 18,00$ ppm ($\delta_H = 0,81$ ppm) caractérisant la position CH₃-28 du lupéol et l'apparition d'un système AM à $\delta_H = 3,79$ et 3,33 ppm ($J = 10,8$ Hz) typique de deux protons diastéréotopiques d'un groupement hydroxyméthylène (vu le nombre d'atomes de carbone dans ce triterpène) et porté par un carbone quaternaire asymétrique en l'occurrence le carbone C-17. Le carbone de cet hydroxyméthylène résonnant à $\delta_C = 60,56$ ppm est par conséquent attribué au C-28 et ses protons aux H-28a et H-28b. La présence du groupement hydroxyle en C-28 justifie l'élévation du déplacement chimique du carbone C-17 dans le composé **B8** par rapport au lupéol et l'abaissement des déplacements chimiques des carbones voisins C-16 et C-22.

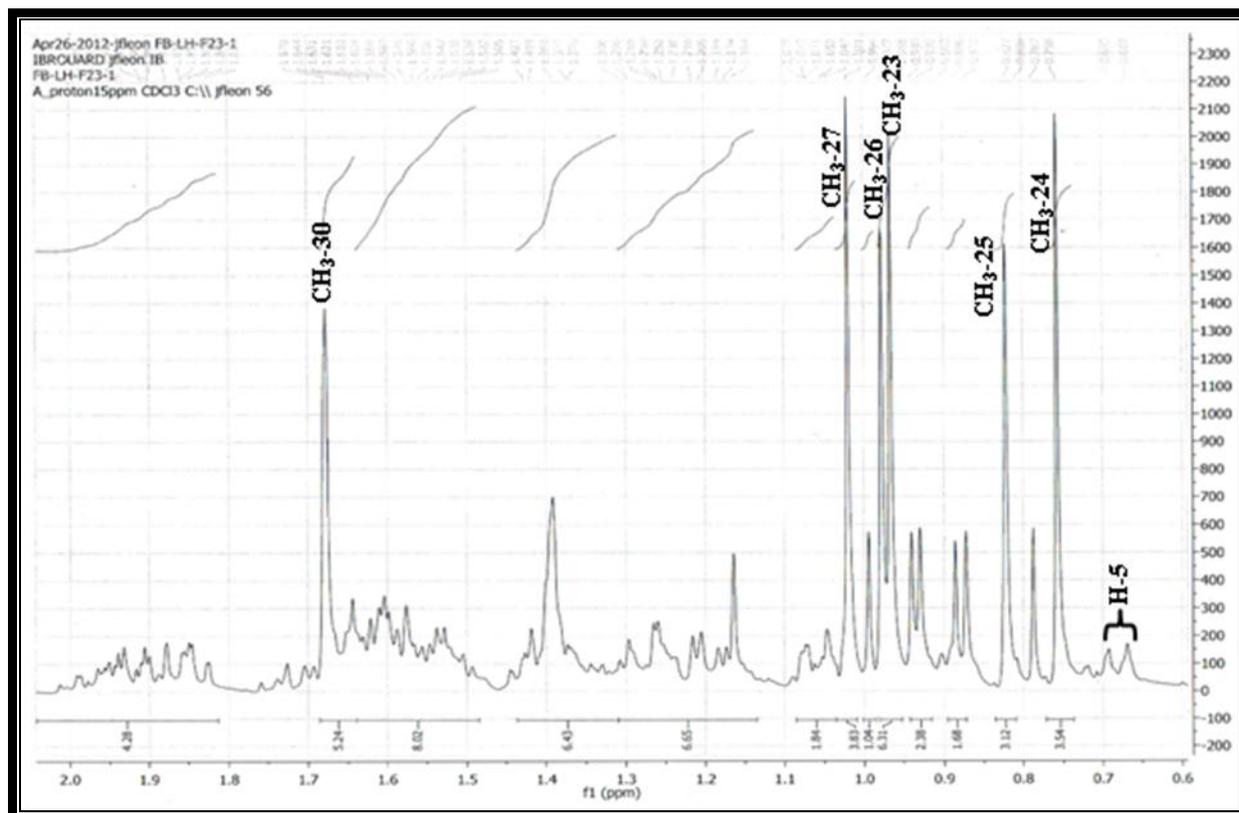
Sur la base des données de la littérature [69] et suite à la comparaison avec les données de la molécule précédente le lupéol, les cinq groupements méthyles relevés sur le spectre proton en plus des deux précédemment indiqués peuvent être attribués comme suit : à $\delta_H = 0,75$ (*s*, H₃-24), 0,82 (*s*, H₃-25), 0,96 (*s*, H₃-23), 0,97 (*s*, H₃-26) et 1,02 (*s*, H₃-27).



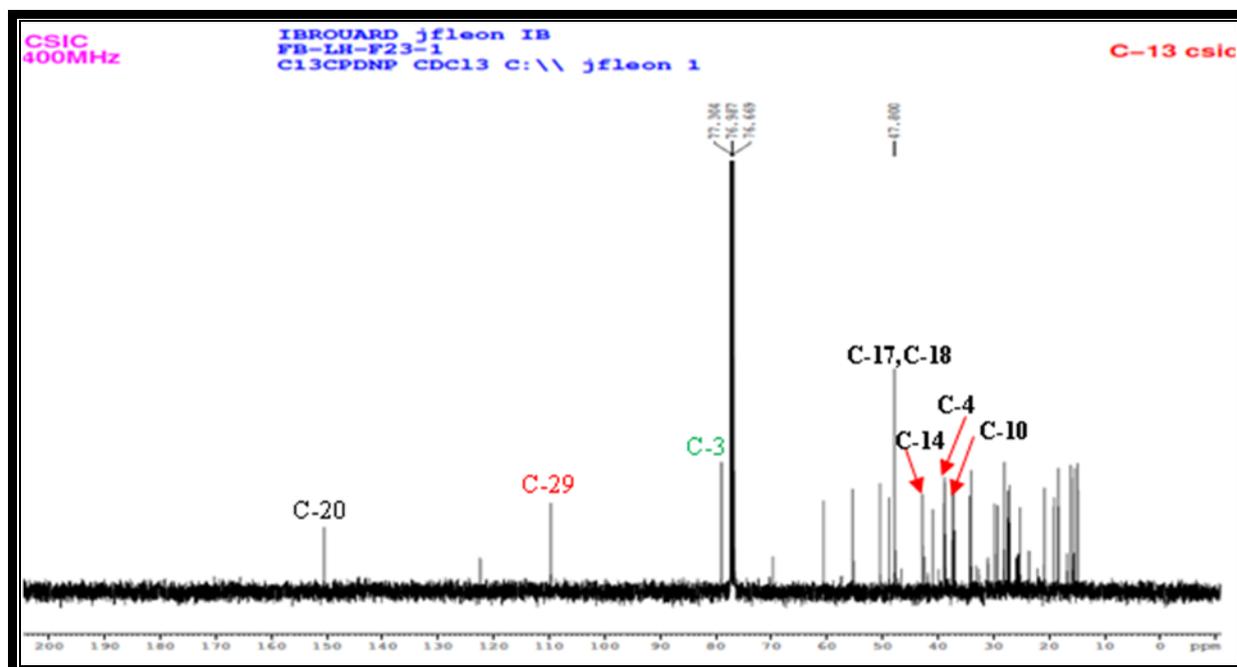
Spectre III-111: Spectre RMN 1H (400 MHz, CDC13, δ ppm) du composé B8.



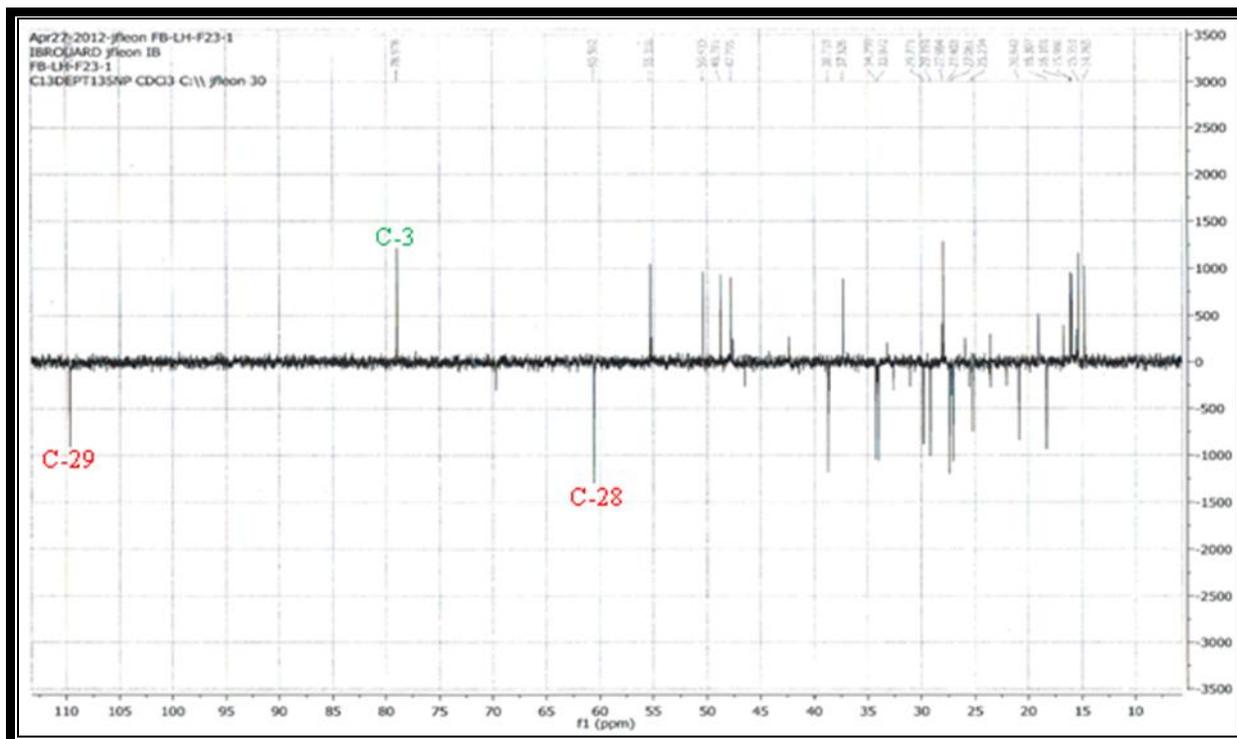
Spectre III-112 : Spectre RMN 1H (400 MHz, CDC13, δ ppm) du composé B8 (Etalement 1)



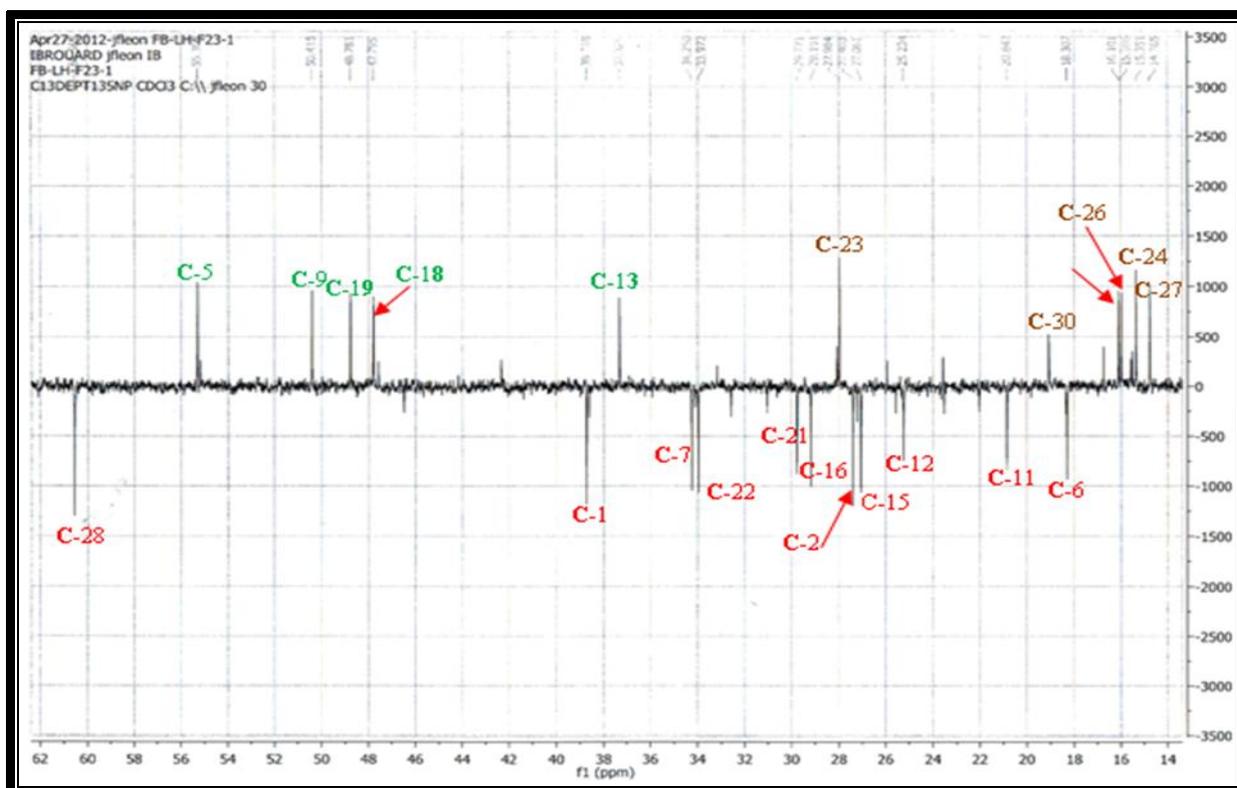
Spectre III-113 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B8** (Etalement 2)



Spectre III-114 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé **B8**.



Spectre III-115 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B8**.



Spectre III-116 : Spectre DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé **B8** (Etalement)

Toutes ces données spectroscopiques reportées dans les Tableaux III-17 et III-18 convergent donc vers le **28-hydroxylupéol** connu sous le nom de **bétuline** (Figure III-33). De même, il apparaît d'après notre étude bibliographique que ce composé est décrit pour la première fois dans la famille Fabaceae.

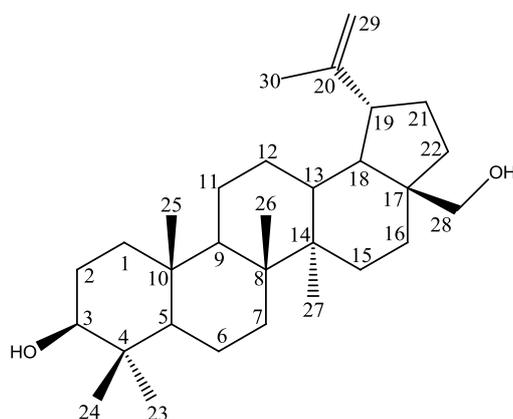


Figure III-33 : Structure du composé **B8**, **bétuline**.

Tableau III-17: Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J/Hz) du composé **B8**.

Position	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
3	3.20	1H	dt	11.2, 5.2
5	0.68	1H	d	9.6
19	2.38	1H	td	11.2, 5.6
23	0.96	3H	s	-
24	0,75	3H	s	-
25	0.82	3H	d	6,4
26	0,97	3H	t	6
27	1.02			
28	3.79	1H	d	10.8
	3.33	1H	d	10.8
29	4.68	1H	d	2.4
	4.58	1H	dd	2.5, 1.6
30	1.67	3H	sl	-

Tableau III-18 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J/Hz) du composé **B8**.

Position de ^{13}C	Composé B8 δ (ppm)	Lupéol
1	38,71	38,74
2	27,40	27,44
3	78,98	79,00
4	38,73	38,86
5	55,33	55,34
6	18,30	18,33
7	34,25	34,32
8	40,80	40,86
9	50,43	50,47
10	37,34	37,19
11	20,84	20,95
12	25,23	25,19
13	37,32	38,09
14	42,73	42,85
15	27,06	27,44
16	29,16	35,60
17	47,79	43,00
18	47,79	48,34
19	48,78	47,99
20	15,44	15,44
21	29,77	29,88
22	33,97	40,00
23	27,98	27,99
24	15,35	15,35
25	16,10	16,10
26	15,98	15,99
27	14,76	14,55
28	60,56	18,00
29	10,64	109,89
30	19,08	19,31

III-2-2- Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle

III-2-2-a- Elucidation structurale du composé C1

Après avoir examiné les spectres RMN ^1H (Spectre III-117) et RMN ^{13}C (Spectre III-118), HSQC (Spectre III-119), COSY (Spectre III-120), ROESY (Spectre III-121), les deux séquences DEPT (Spectre III-122), de ce composé, nous avons constaté une ressemblance totale avec le composé **B7** isolé de la phase chloroforme de la même plante dont l'interprétation est donnée précédemment, nous avons alors procédé à une cochromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes pour les deux composés, et il s'est avéré que c'est bien le même produit connu sous le nom de *para*-hydroxy benzaldéhyde dont la structure est représentée dans la figure III-34

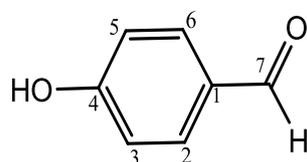
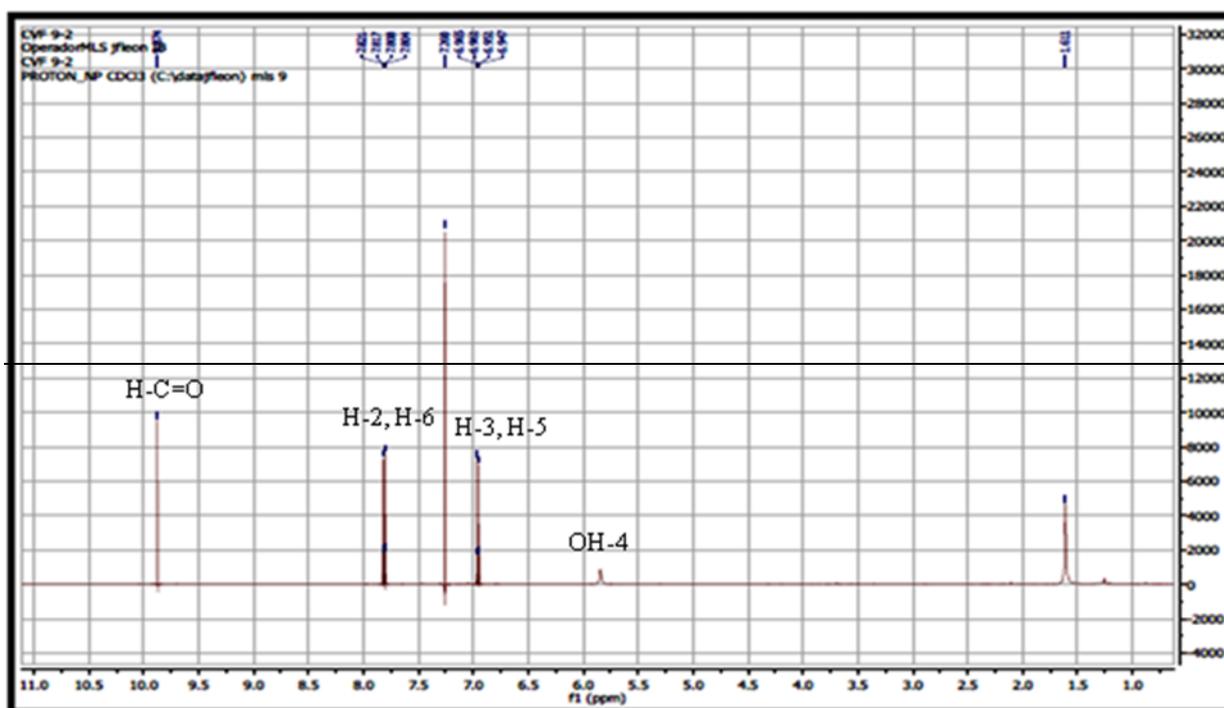
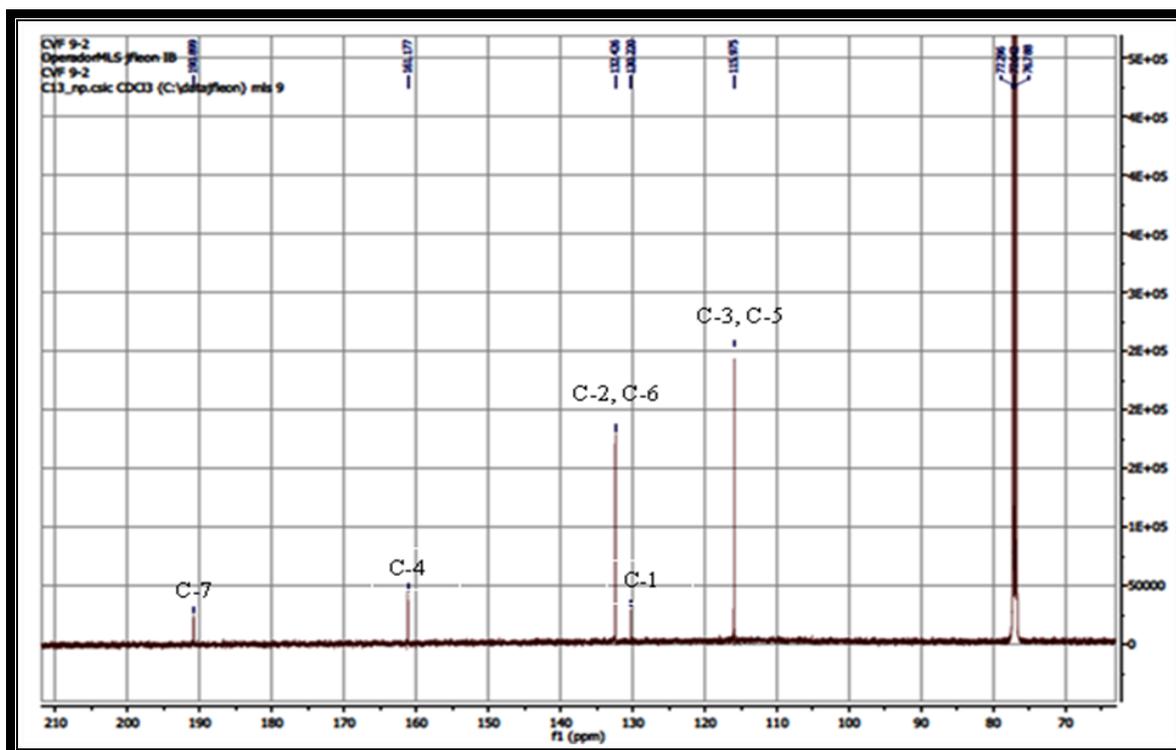


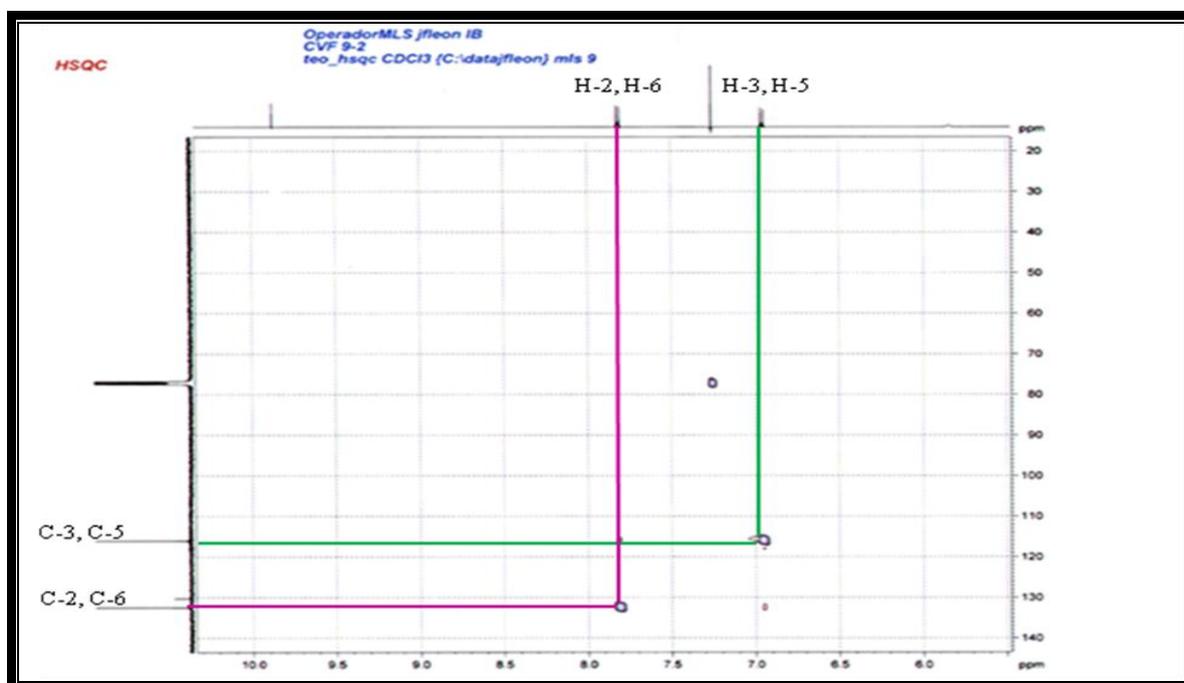
Figure III-34 : Structure du composé C1 : *para*-hydroxy benzaldéhyde



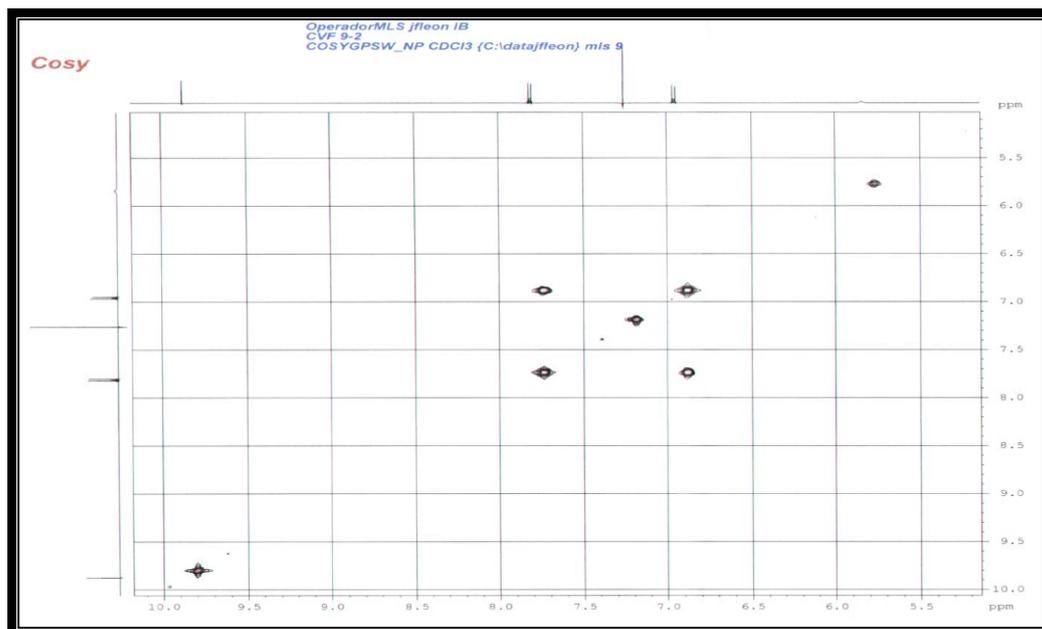
Spectre III-117: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C1.



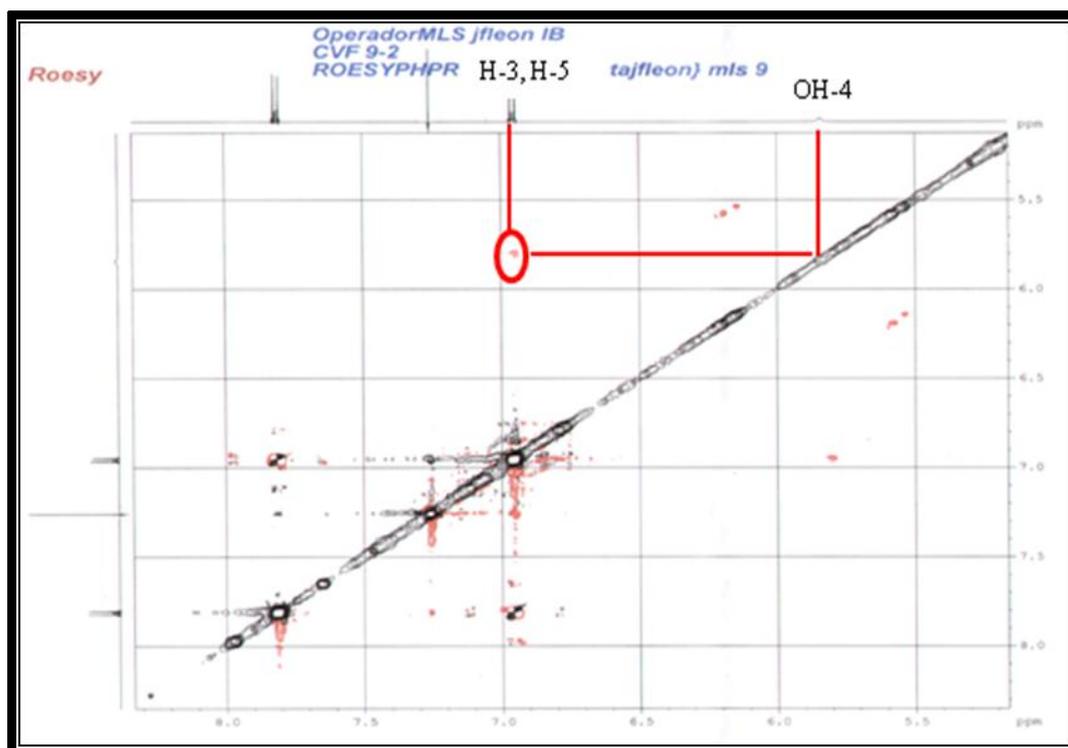
Spectre III-118: RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C1.



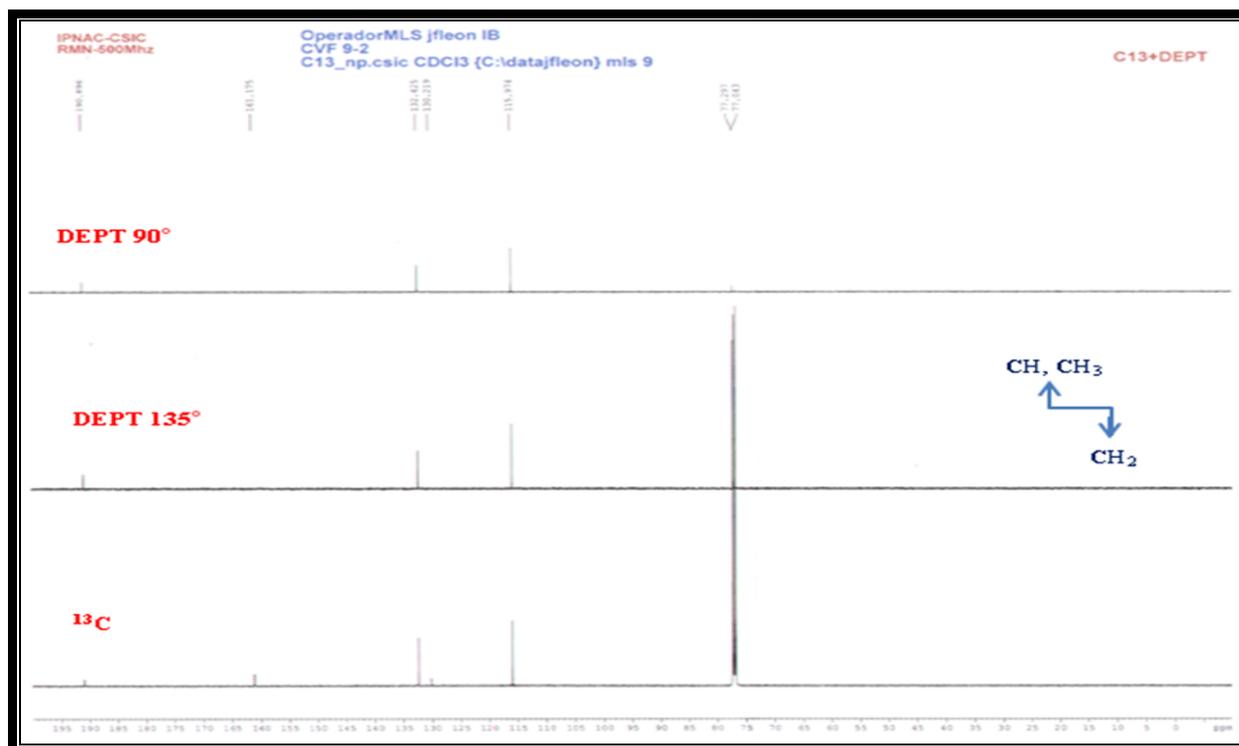
Spectre III-119: Spectre HSQC (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C1.



Spectre III-120: Spectre COSY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C1.



Spectre III-121 : Spectre ROESY (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé C1.



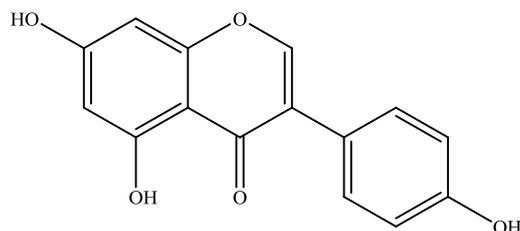
Spectre III-122: DEPT 135° et DEPT 90° (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm) du composé **C1**.

Les données de la RMN ^1H et ^{13}C sont rassemblées dans le tableau III-19.

Tableau III-19 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **C1** (CDCl_3)

Position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	130,21	-	-	-	-
2, 6	132,42	7,81	2H	dd	8,6 ; 2,0
3, 5	115,97	6,95	2H	dd	8,6 ; 2,0
4	161,17	-	-	-	-
7	190,89	9,81	1H	s	-
OH-4	-	5,84	1H	s	-

III-2-2-b- Elucidation structurale du composé C2



C2

C'est un produit sous forme de cristaux bruns. La fluorescence orange sous la lumière de Wood laisse envisager une structure de type isoflavone.

Le comportement chromatographique indique par les valeurs du R_f dans les deux systèmes **SI** et **SII** que le composé **C2** est un aglycone (Tableau III-20).

SI : Toluène / Méthanol / Méthyléthylcétone (4:3:3)

SII : H₂O / MeOH / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13:3:3:1)

Tableau III-20 : Comportement chromatographique du produit **C2**

Système	SI	SII
R_f	0,71	0,07

Les données de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-123) montrent :

❖ La bande I sous forme d'un épaulement à environ 324 nm et la bande II à 262 nm ainsi que la fluorescence Orange sous lumière de Wood orientent vers la structure d'une isoflavone.

❖ La stabilité avec le temps, du spectre enregistré après addition de NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

❖ L'effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +10$ nm) après addition de AlCl₃+HCl par rapport au spectre du méthanol, confirme la présence d'un OH libre en position 5.

❖ La comparaison du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +7$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 7.

Ces résultats rassemblés dans le tableau III-21 mènent à la structure partielle reportée dans la figure III-35 .

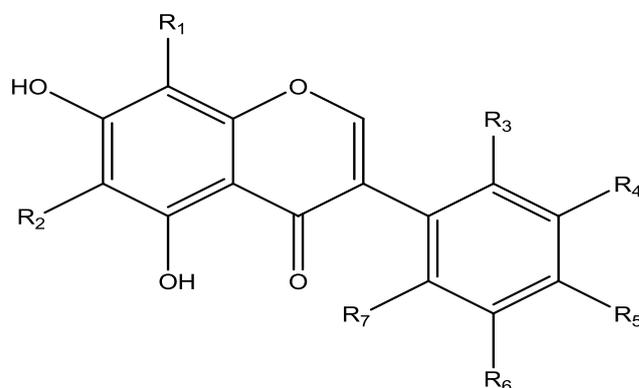
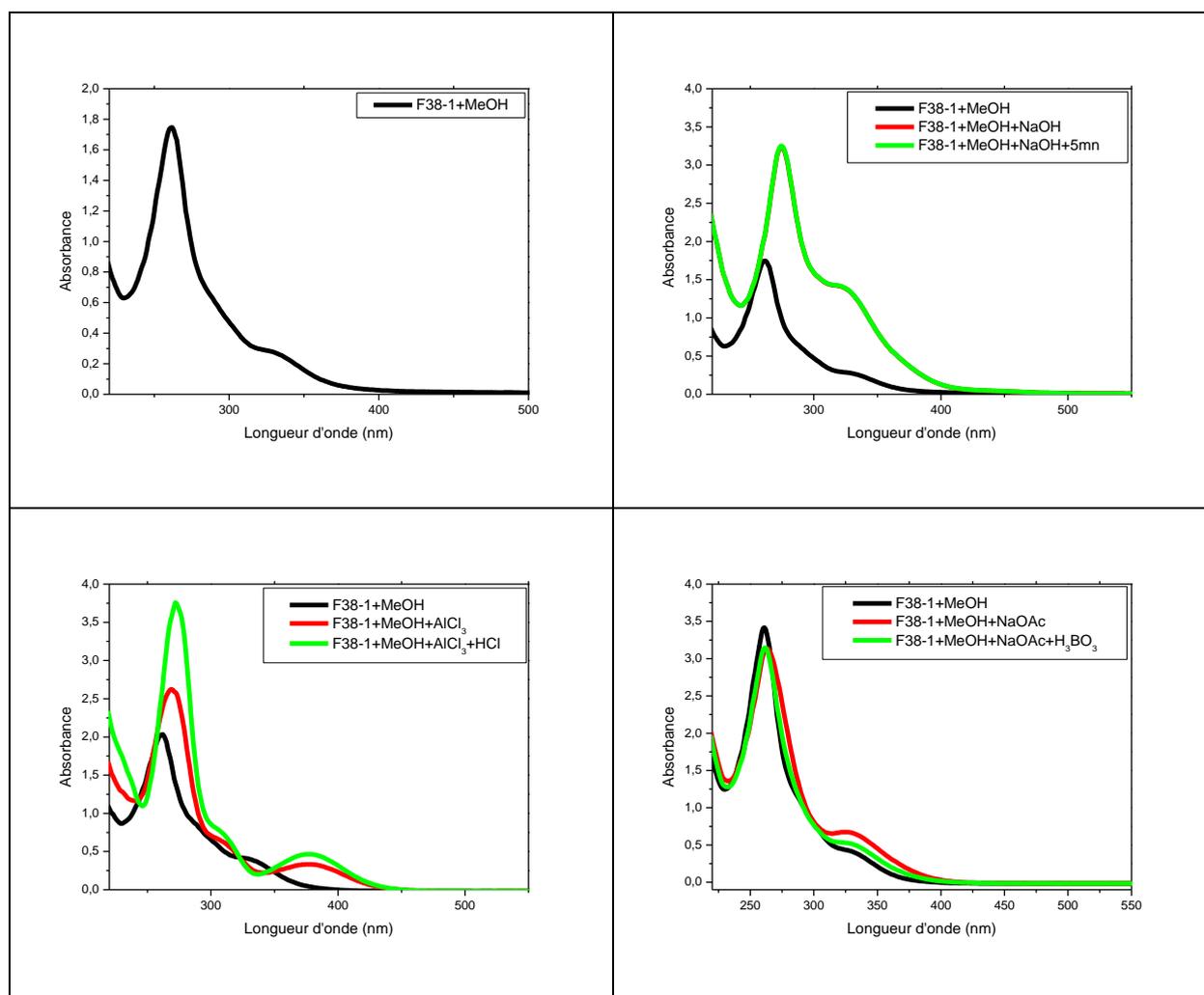


Figure III-35 : Structure partielle du composé C2.



Spectre III-123 : Série spectrale UV-Vis du composé C2.

Tableau III-21 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{\max} nm) du composé **C2**.

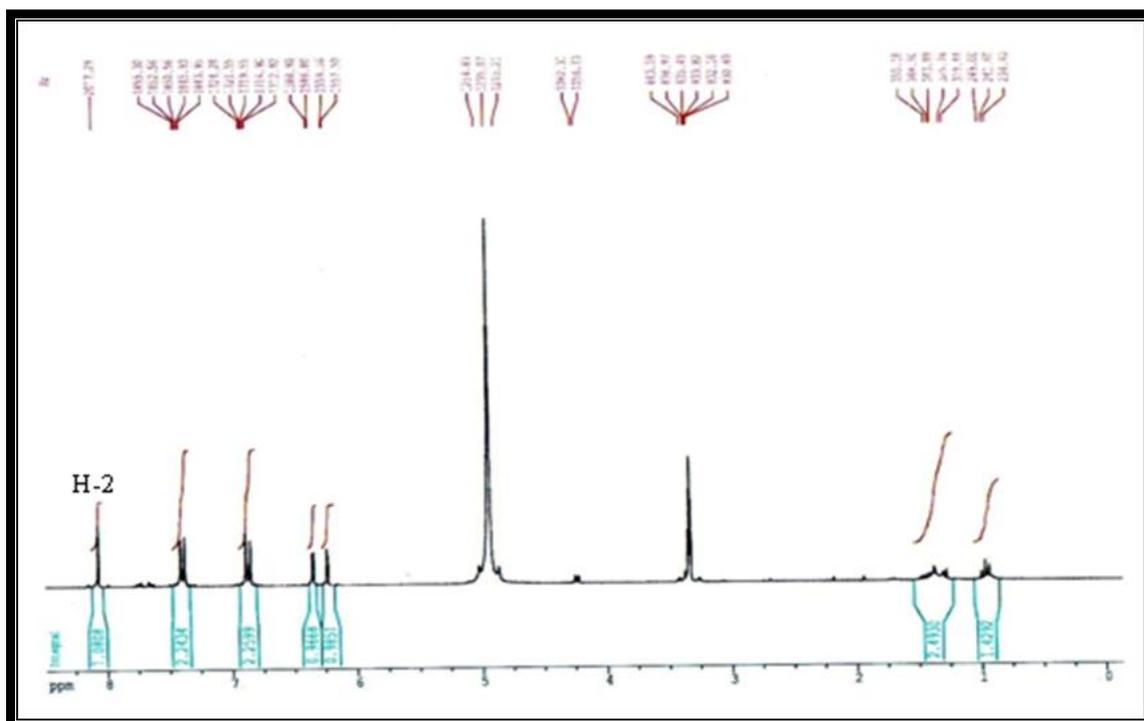
Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes
MeOH	324 Ep	262	-
+NaOH	323 Ep	274	-
+AlCl ₃	376	269	305
+AlCl ₃ +HCl	377	272	305
+NaOAc	327 Ep	269	-
+NaOAc+H ₃ BO ₃	323 Ep	262	-
Spectre stable avec NaOH après 5mn			

L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre III-124) enregistré dans le MeOH-*d*₄, ainsi que son spectre étalé (Spectre III-125) montre :

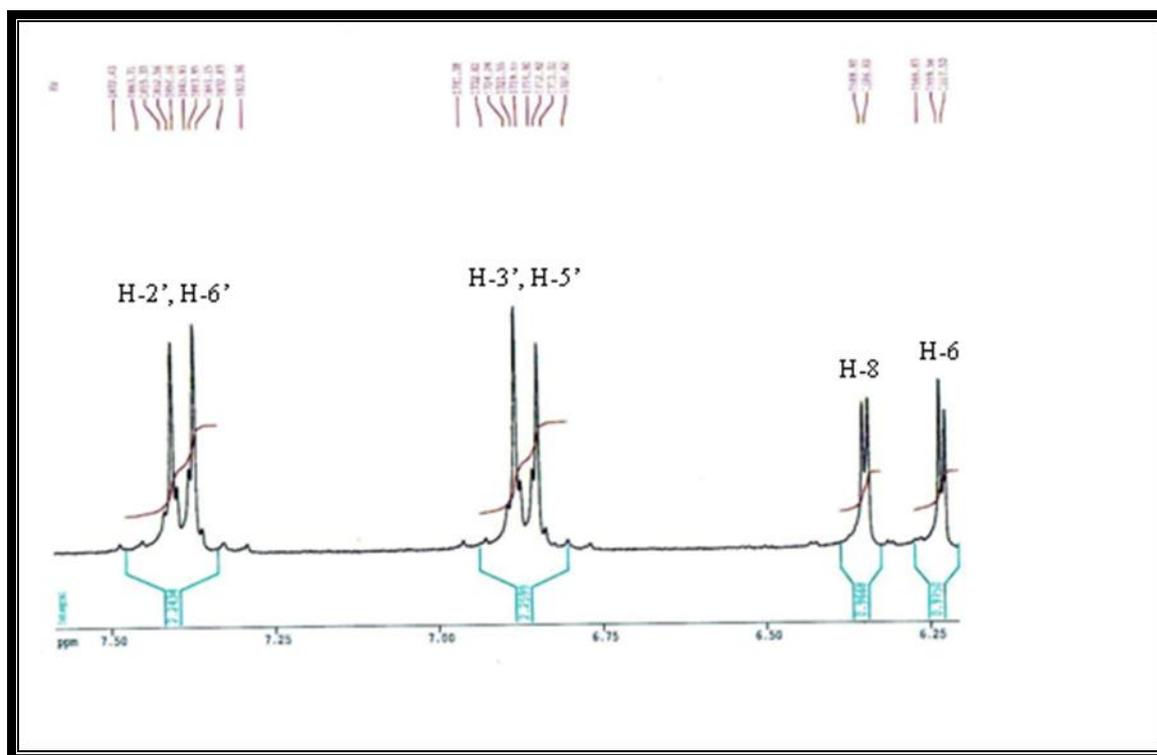
❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 8,07$ ppm caractéristique du proton H-2, d'une isoflavone.

❖ Deux protons aromatiques couplant entre eux formant deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 6,23$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,35$ ppm ($J = 2,1$ Hz), typiques d'un couplage en *mé*ta sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'une isoflavone substituée en C-5 et C-7. Ces noyaux sont attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.

❖ Le spectre montre également la présence de deux doublets de doublets ($J=8,6 ; 2,1$ Hz) d'intégration 2H chacun, caractéristique d'un noyau B ayant une oxygénation en position 4'. Le premier à $\delta_{\text{H}} = 7,40$ ppm est attribué aux protons H-2' et H-6', le second à $\delta_{\text{H}} = 6,86$ ppm est attribué aux noyaux H-3' et H-5'. L'absence d'autres signaux sur le spectre RMN ¹H laisse supposer la présence d'un OH libre en position 4'.



Spectre III-124 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C2**.



Spectre III-125: Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C2** (Étalement)

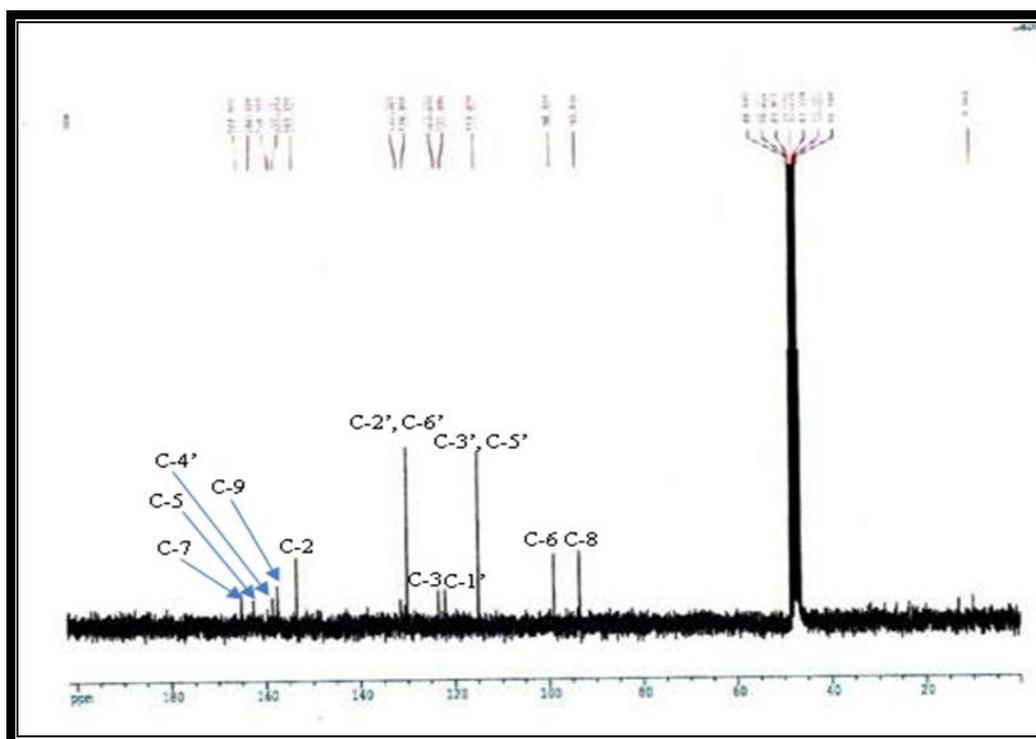
Les données de la RMN ^1H de ce composé sont rassemblées dans le tableau III-22.

Tableau III-22 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 Mz, MeOH- d_4) du produit **C2**.

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
8,07	1H	s	/	H-2
7,40	2H	dd	8,6 ; 2,1	H-2', H-6'
6,86	2H	dd	8,6 ; 2,1	H-3', H-5'
6,35	1H	d	2,1	H-8
6,23	1H	d	2,1	H-6

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-126) confirme les données des analyses précédentes par les signaux à $\delta_{\text{C}} = 164,96$ ppm (C-7), 162,39 ppm (C-5), 158,31 ppm (C-4'), 157,37 ppm (C-9), 153,32 ppm (C-2), 129,95 ppm (C-2' ; C-6'), 123,25 ppm (C-3), 121,89 ppm (C-1'), 114,82 ppm (C-3' ; C-5'), 98,82 ppm (C-6) et à $\delta_{\text{C}} = 93,45$ ppm (C-8).

Ces données complétées par celles de la littérature [70] sont reportées dans le tableau III-23 .

**Spectre III-126** : Spectre RMN ^{13}C (62,5 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C2**.

L'ensemble de ces données est en faveur de la structure du composé qui est le : **4', 5, 7-trihydroxyisoflavone** connue sous le nom de la **génistéine** reportée dans la figure III-36. Cette molécule est commune dans la famille des Fabaceae, son nom évoque le genre *Genista*,

genre important de cette famille. Elle a été isolée pour la première fois de *Genista tinctoria* en 1899 par Perkin et Newbury [71]. Elle a été rencontrée dans plusieurs espèces de la famille Fabaceae comme *Bolusanthus speciosus* (Bolus) Harms [72], *Genista quadriflora munby* [73], *Genista ferox* [74], *Pueraria lobata* [75], *Lupinus texensis* [76], et d'espèces d'autres familles [77-80]. Elle est connue pour ses activités anticancéreuse, anti-inflammatoire et antioxydante [81-83].

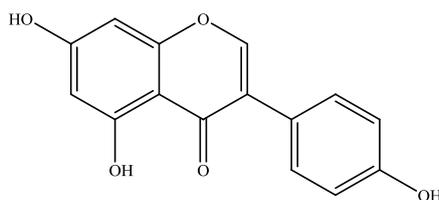


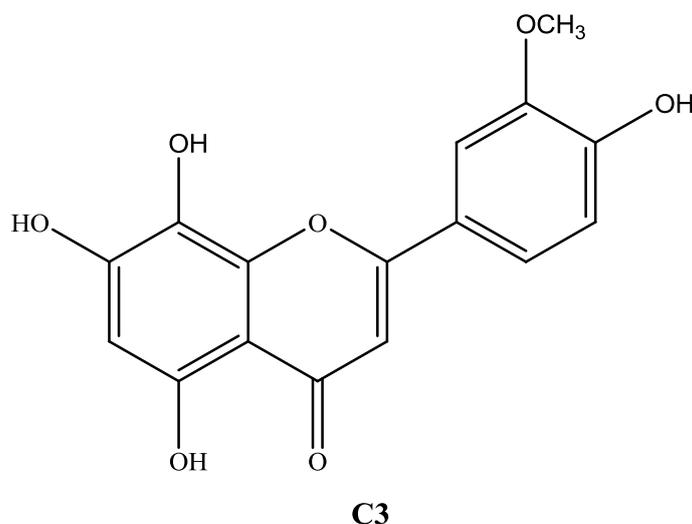
Figure III-36 : Structure du produit **C2** : **génistéine**.

Tableau III-23 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (62,5 MHz, MeOH- d_4) du composé

C2

δ (ppm)	Attribution
153,32	C-2
123,25	C-3
162,39	C-5
98,82	C-6
164,96	C-7
93,45	C-8
157,37	C-9
121,89	C-1'
129,95	C-2', C-6'
114,82	C-3', C-5'
158,31	C-4'

III-2-2-c- Elucidation structurale du composé C3



Ce produit a été isolé sous forme d'une poudre jaune. La fluorescence noir violet de ce produit sous la lumière ultra-violette (365 nm) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 3.

Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f dans les deux systèmes **SI** et **SII** indique que le composé **C3** est un aglycone (Tableau III-24).

SI : Toluène / Méthanol / Méthyléthylcétone (4:3:3)

SII : H₂O / MeOH / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13:3:3:1)

Tableau III-24 : Comportement chromatographique du produit **C3**.

Systèmes	SI	SII
R_f	0,61	0,04

Les données de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-127) montrent :

❖ La fluorescence noir violet et la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I dans le méthanol ($\lambda_{\max} = 345$ nm), sur le spectre UV-Vis sont caractéristiques d'une flavone.

❖ L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +61$ nm) après addition de NaOH par rapport au spectre enregistré dans le méthanol avec une augmentation de l'intensité d'absorption, oriente vers la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda = 332$ nm indique la présence d'un OH libre en position 7. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +6$ nm) observé sur le spectre après addition de NaOAc par rapport au spectre pris dans le MeOH.

❖ La comparaison du spectre enregistré en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +40$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 5 et l'absence d'oxygénation en C-6.

❖ L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +5$ nm) après addition de NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre du méthanol indique la présence d'un système ortho di-OH sur le noyau A qui ne peut être qu'en 7 et 8. Ces résultats rassemblés dans le tableau III-25 mènent à la structure partielle reportée dans la figure III-37 avec R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et R_5 différents de OH.

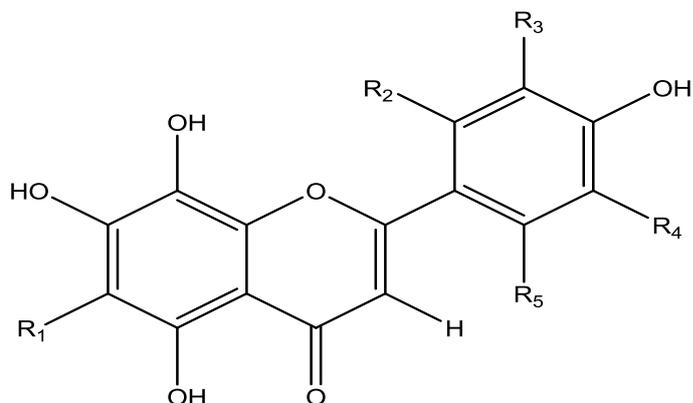
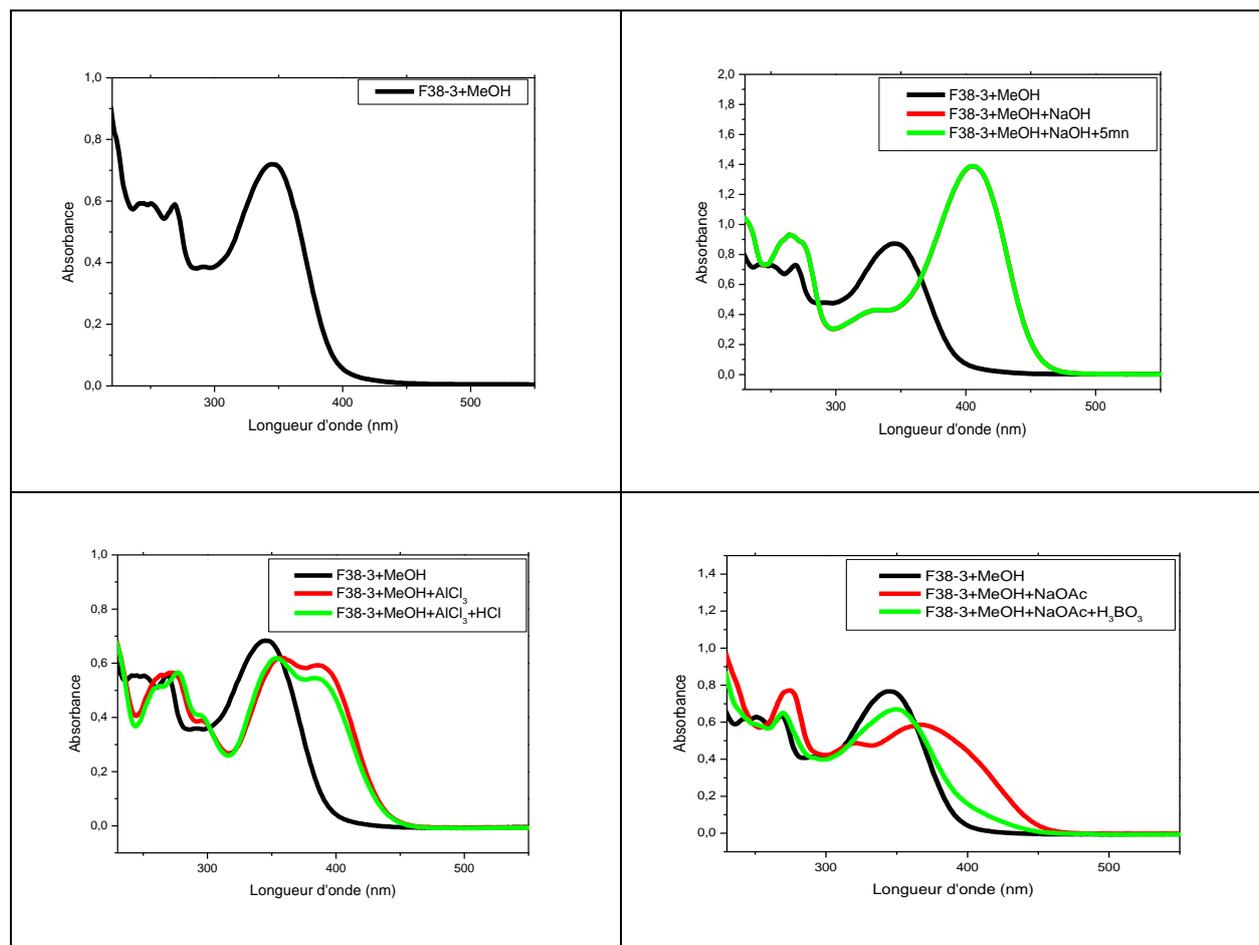


Figure III-37 : Structure partielle du composé **C3**.



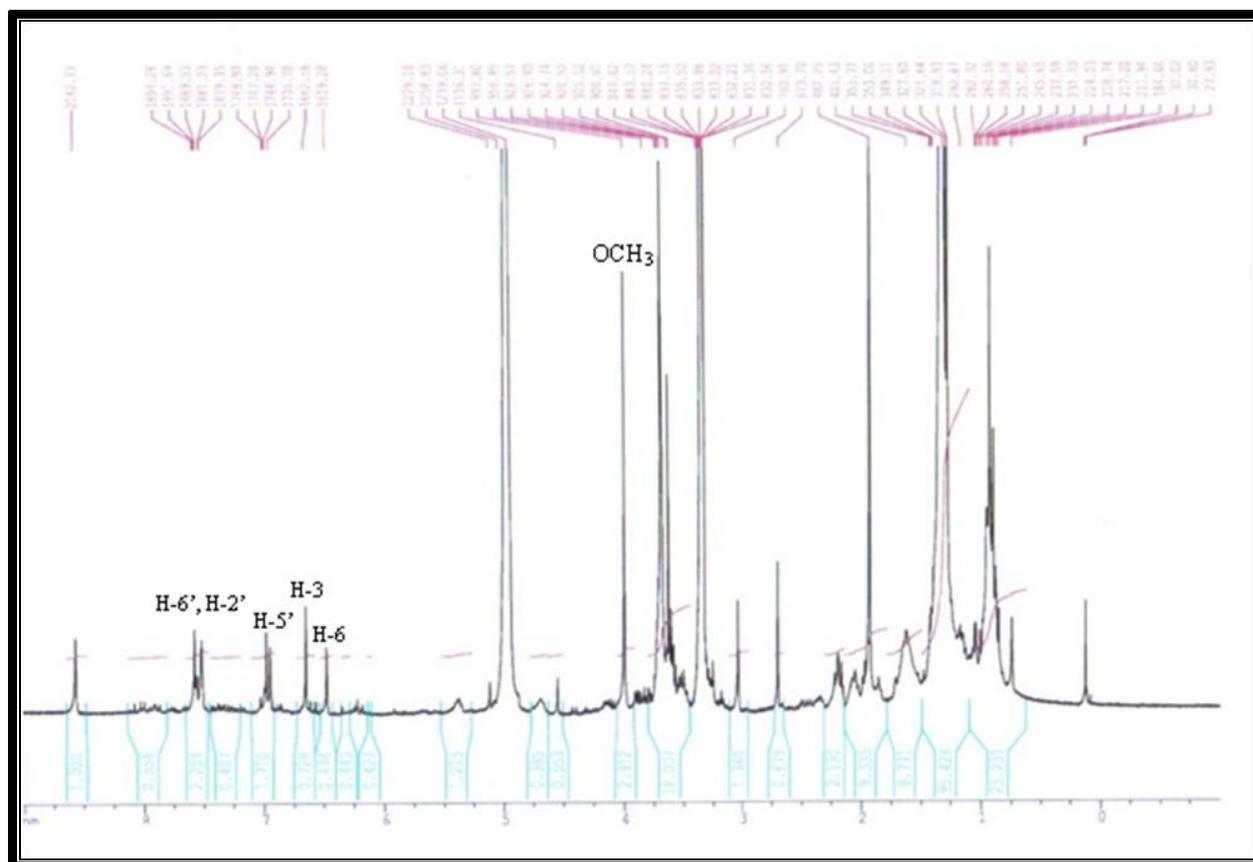
Spectre III-127 : Série spectrale UV-Vis du composé **C3**.

Tableau III-25 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{\max} nm) du composé **C3**.

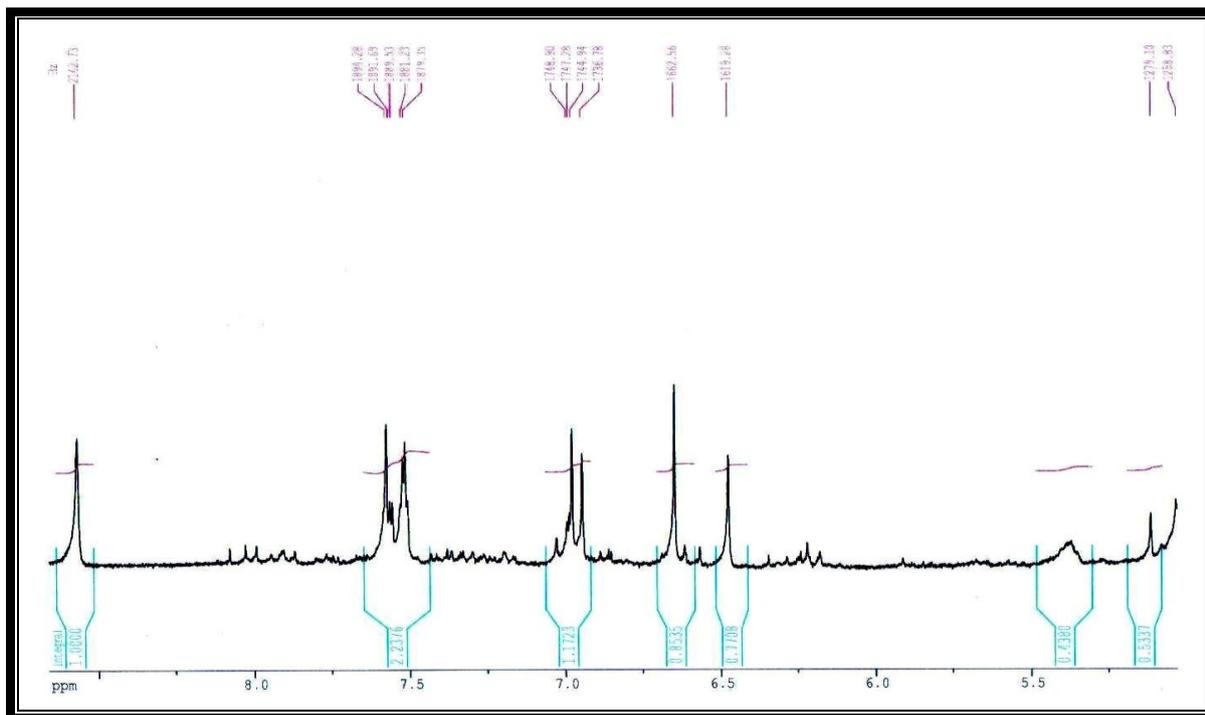
Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	345	/	269
+NaOH	406	332	264
+AlCl ₃	386	354	271
+AlCl ₃ + HCl	385	354	277
+NaOAc	367	321	275
+NaOAc+H ₃ BO ₃	350	/	270
Spectre stable avec NaOH après 5mn			

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-128) et son étalement (Spectre III-129) de ce produit montre :

- ❖ Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,52$ ppm ($J = 8,3 ; 1,9$ Hz) attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,48$ ppm ($J = 1,9$ Hz) attribuable à H-2'
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,96$ ppm ($J = 8,3$ Hz) attribuable à H-5'
- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,65$ ppm attribuable à H-3.
- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,48$ ppm attribuable à H-6.
- ❖ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,99$ ppm correspondant à un méthoxyle. D'après les résultats de la série spectrale de ce composé, nous pouvons le placer en position C-3'.



Spectre III-128 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, MeOH- d_4 , δ ppm) du composé **C3**.



Spectre III-129 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ ppm) du composé **C3**
(Etalement).

Ces données consignées dans le tableau III-26 mènent à la structure finale reportée dans la figure III-38. Cette molécule est connue sous le nom de **hypolaétine 3'-methyl éther**. Elle a été isolée d'espèces du genre *Sideritis*. [84,85]

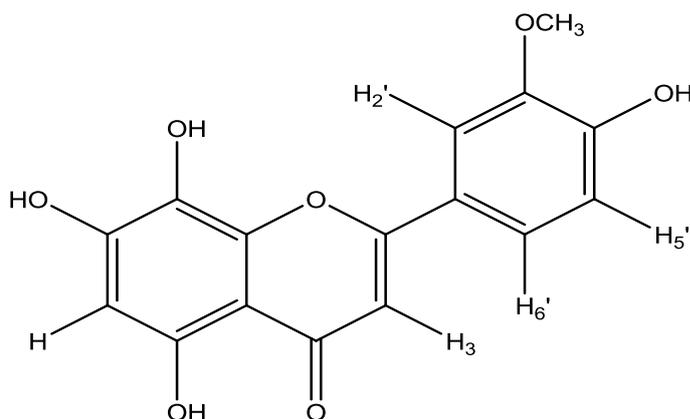
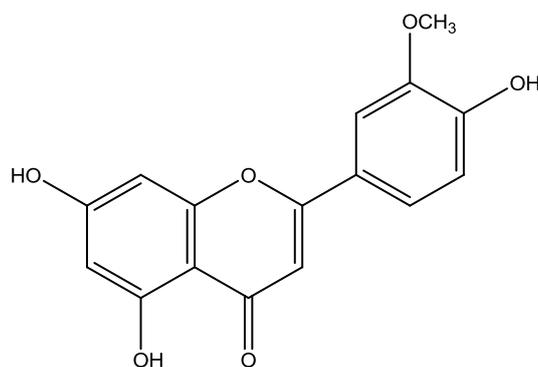


Figure III-38 : Structure du produit **C3** : **hypolaétine 3'-methyl éther**

Tableau III-26 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du produit **C3**.

$\delta(\text{ppm})$	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
7,54	1H	dd	8,1 ; 1,9	H-6'
7,52	1H	d	1,9	H-2'
6,96	1H	d	8,1	H-5'
6,65	1H	s	/	H-3
6,48	1H	s	/	H-6
3,99	3H	s	/	OCH_3

III-2-2-d-Elucidation structurale du composé **C4**

**C4**

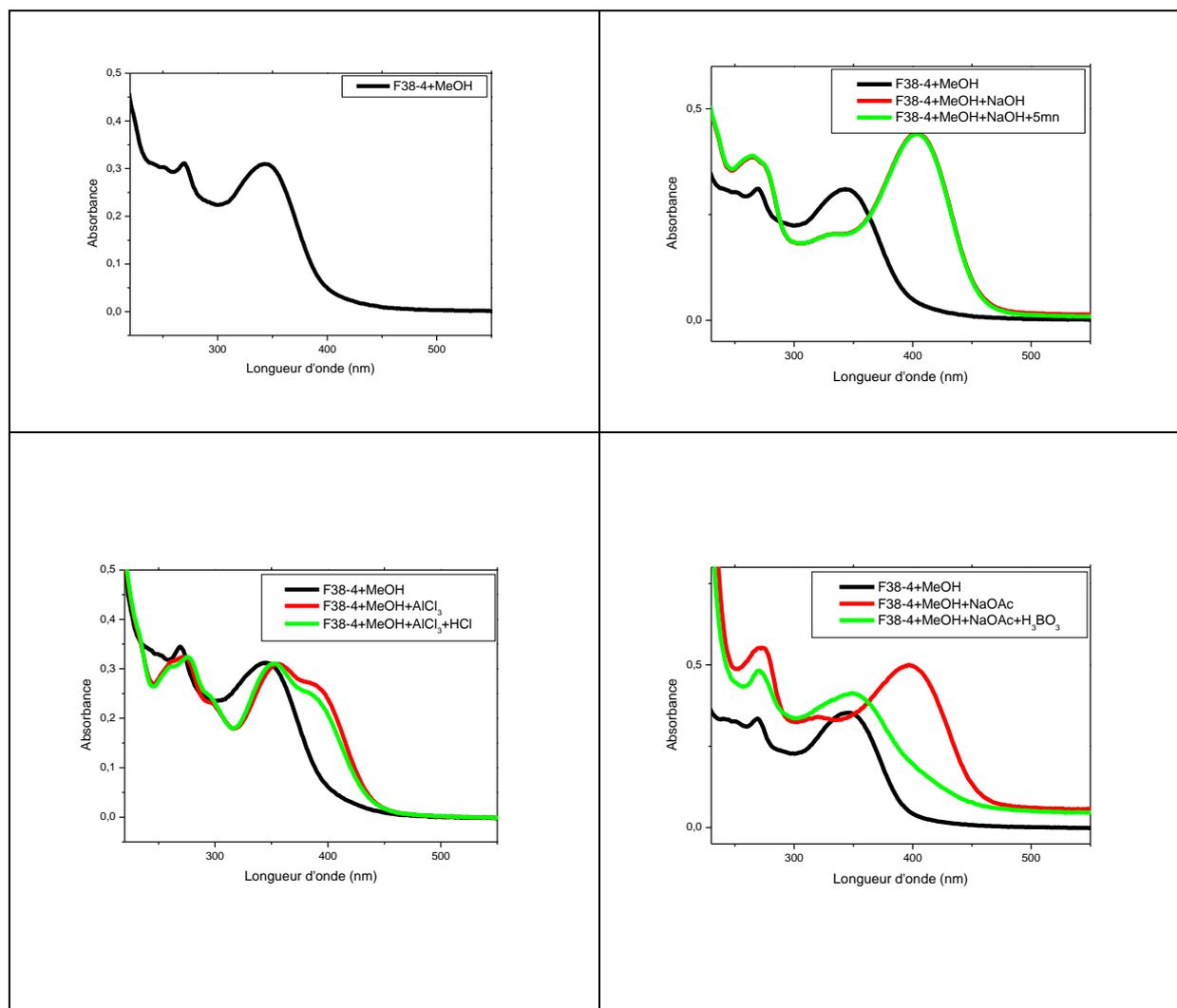
La fluorescence sous la lumière UV (365 nm) de ce composé est noir violet, indiquant une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3. L'étude de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-130) donne les indications suivantes :

- ❖ Le spectre d'absorption UV-Vis enregistré dans le méthanol montre deux bandes. La première ayant un maximum d'absorption à $\lambda_{\text{max}} = 343$ nm et la 2^{ème} ayant un maximum d'absorption à $\lambda_{\text{max}} = 269$ nm, sont caractéristiques des bandes I et II d'un flavonoïde de type flavone.
- ❖ L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +61$ 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 $\lambda = 334$ nm laisse supposer la présence d'un OH libre en

position C-7 , ceci est confirmé par le spectre enregistré en présence de NaOAc, où la bande II subit un déplacement bathochrome de $\Delta\lambda = +5$ nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH.

- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +43$ nm) enregistré après addition de AlCl_3+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH libre en C-5.

Les données relatives à cette série spectrale sont rassemblées dans le tableau III-27.



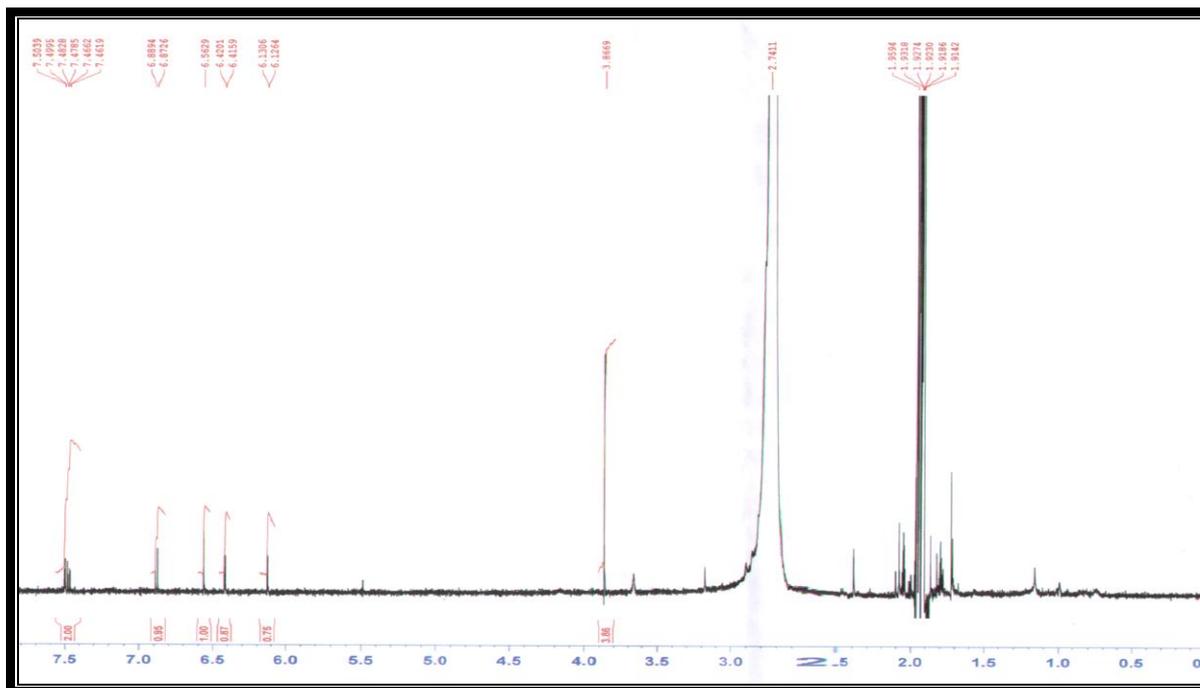
Spectre III-130 : Série spectrale UV-Vis du composé **C4**

Tableau III-27: Données de la série spectrale UV-Vis du composé **C4**

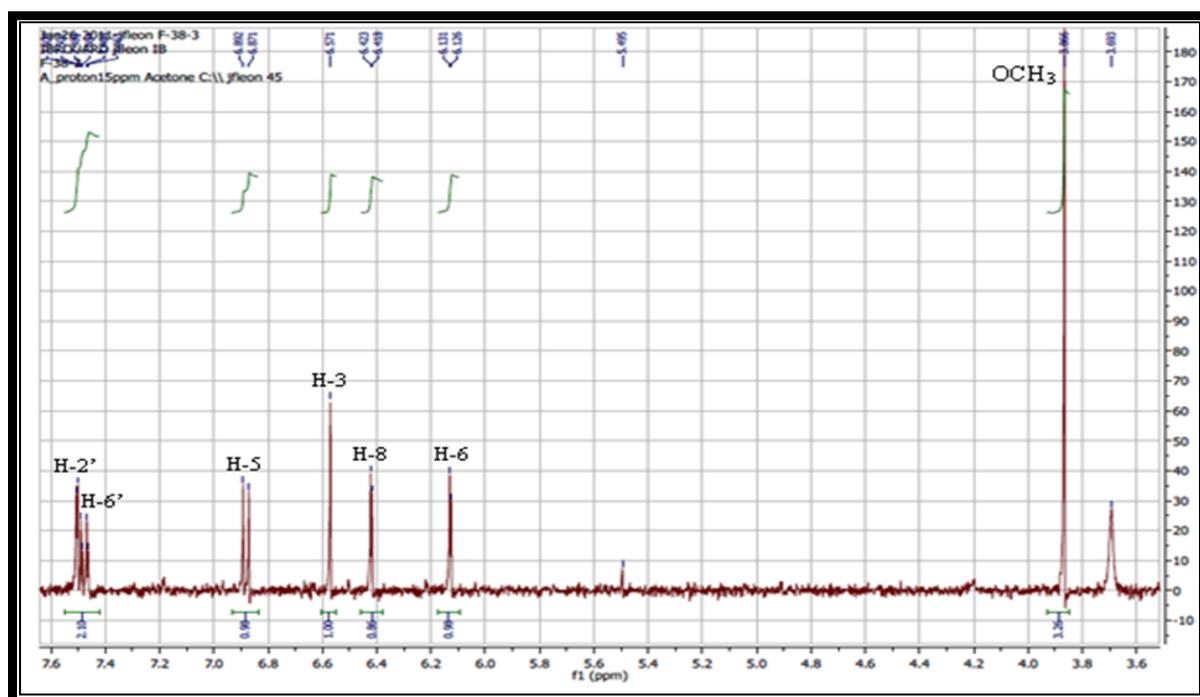
Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	343	/	269
NaOH	404	334	265
AlCl ₃	384	352	273
AlCl ₃ + HCl	386	352	275
NaOAc	397	320	274
NaOAc+H ₃ BO ₃	348	/	271
Spectre stable avec NaOH après 5mn			

L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre III-131) et son étalement (Spectre III-132) confirme la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier par:

- Un signal à $\delta_H = 7,49$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un signal à $\delta_H = 7,47$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublets ($J = 8,4 ; 2,1$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un signal à $\delta_H = 6,88$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- Deux doublets formant un système AB à $\delta_H = 6,41$ ppm et $\delta_H = 6,12$ ppm, ($J = 2,1$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde, indiquant une disubstitution du cycle A dans les positions 5 et 7.
- Un signal à $\delta_H = 6,56$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable au H-3 d'une flavone.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3,86$ ppm révélant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

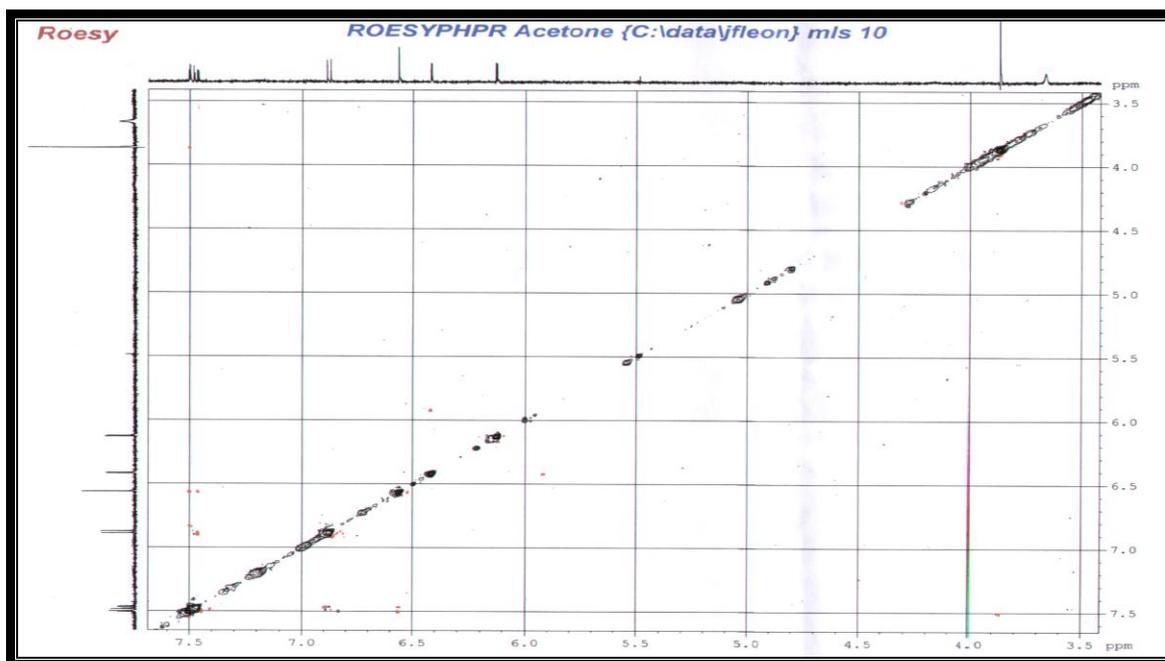


Spectre III-131: RMN ^1H (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C4**

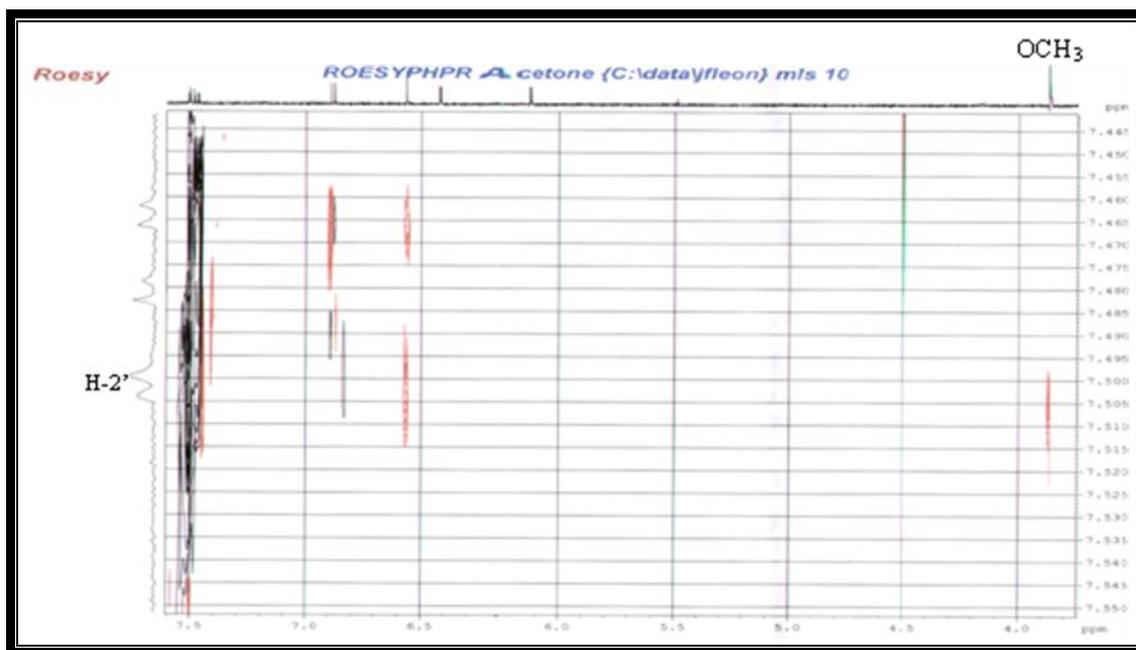


Spectre III-132 : RMN ^1H (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C4** (Étalement)

L'emplacement du méthoxyle est établi par analyse des corrélations homonucléaires observées sur le spectre ROESY (Spectre III-133) et son étalement (Spectre III-134) entre le signal du méthoxyle et le proton H-2', confirmant bien la substitution du carbone C-3' par le méthoxyle.



Spectre III-133: Spectre ROESY (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C4**.



Spectre III-134: Spectre ROESY (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C4** (Étalement).

Les données de la spectroscopie RMN ^1H complétées par celle de la spectrophotométrie UV sont en accord avec la littérature [86,87] et permettent d'identifier le composé **C4** comme étant le **4', 5, 7-trihydroxy-3'-methoxyflavone**, connu sous le nom de **Chrysoériol** (Figure III-39). Elle est douée d'activité antimicrobienne [88].

Le tableau III-28 rassemble les résultats de la RMN ^1H .

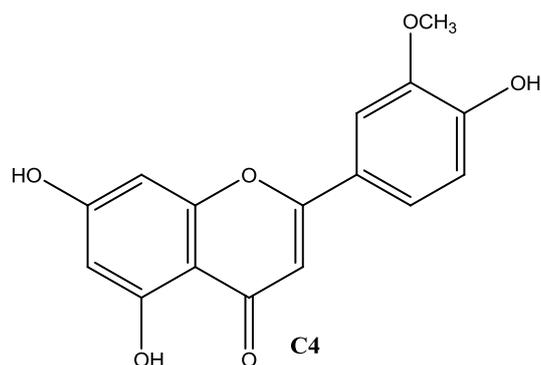
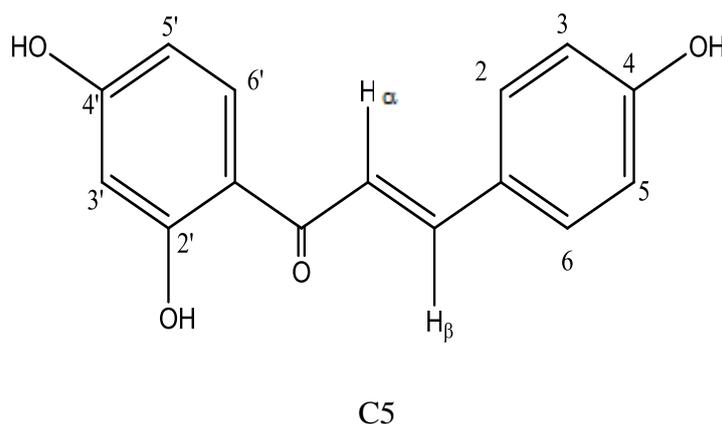


Figure III-39: Structure du produit **C4** : **Chrysoériol**

Tableau III-28: Données de la spectroscopie de RMN ^1H ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, 500 MHz) du composé **C4**.

δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
7,49	1H	d	2,1	H-2'
7,47	1H	dd	8,4 ; 2,1	H-6'
6,88	1H	d	8,4	H-5'
6,56	1H	s	-	H-3
6,41	1H	d	2,1	H-8
6,12	1H	d	2,1	H-6
3,86	3H	s	-	O-CH ₃

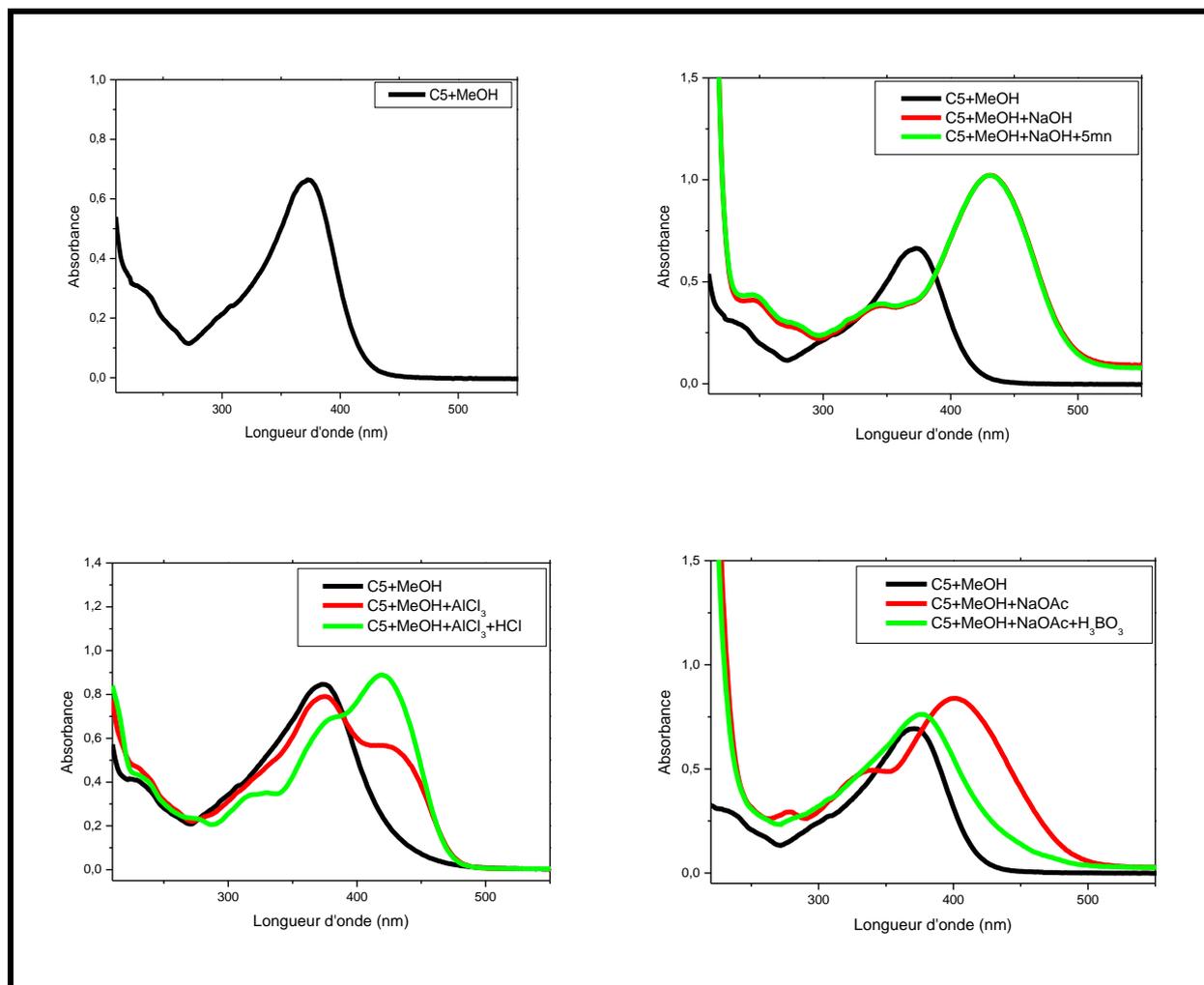
III-2-2-e- Elucidation structurale du composé C5



Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre orange. L'élucidation structurale de ce composé a débuté par l'enregistrement du spectre UV-Vis (Spectre III-135) qui présente deux maxima d'absorption à 228 nm (faible absorption) et 373 nm (maxima absorption). Ces deux absorptions correspondent aux absorptions des cycles A et B d'un flavonoïde où le cycle B est

conjugué avec une double liaison C=C. Ces premières informations indiquent que nous sommes en présence d'un flavonoïde de type chalcone.

L'effet bathochrome de la bande I (+58 nm) après addition de NaOH par rapport au spectre méthanolique avec une augmentation de l'intensité d'absorption, oriente vers la présence d'un OH libre en position 4. La comparaison du spectre enregistré en présence de HCl + AlCl₃ par rapport au spectre dans le MeOH montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +47$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en position 2'. L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +28$ nm) en présence de NaOAc par rapport au spectre dans le méthanol oriente vers un OH en position 4'. L'addition de H₃BO₃ ne provoquant aucun déplacement bathochromique de la bande I, indique l'absence de systèmes ortho di-OH sur le noyau A et le noyau B dans cette molécule.



Spectre III-135: Série spectrale UV-Vis du composé C5.

Les résultats de la série spectrale UV-Vis du composé **C5** sont rassemblés dans le tableau III-29.

Tableau III-29: Données de la série spectrale UV-Vis du composé du composé **C5**

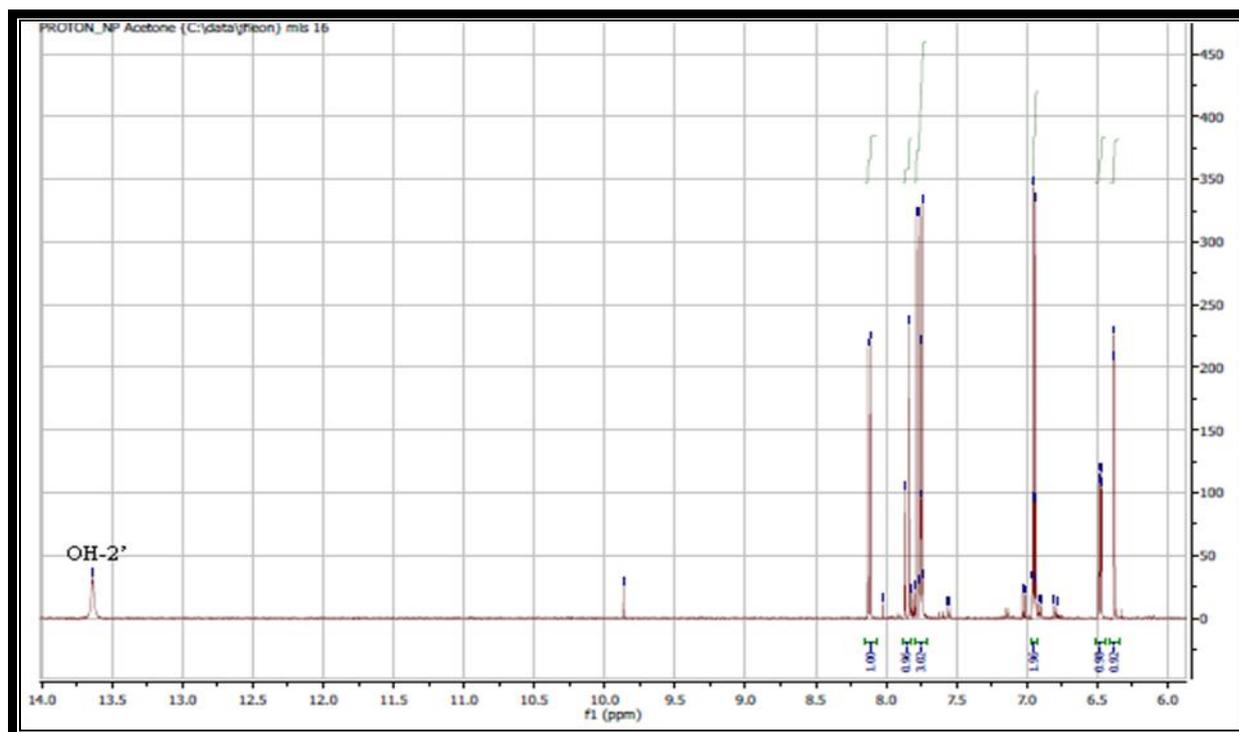
Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes
MeOH	373	228	309 Ep
+ NaOH	431	244	Ep : 274, 318, 347
+AlCl ₃	375	228	419 Ep
+AlCl ₃ /HCl	420	228	274,322,385
+NaOAc	401	279	341
+NaOAc/H ₃ BO ₃	376	-	-
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

L'analyse du spectre RMN ¹H (Spectre III-136), ses étalements (Spectre III-137, spectre III-138) et le spectre HSQC (Spectre III-139) de ce composé confirme la nature chalcone de ce composé en montrant les signaux caractéristiques suivants :

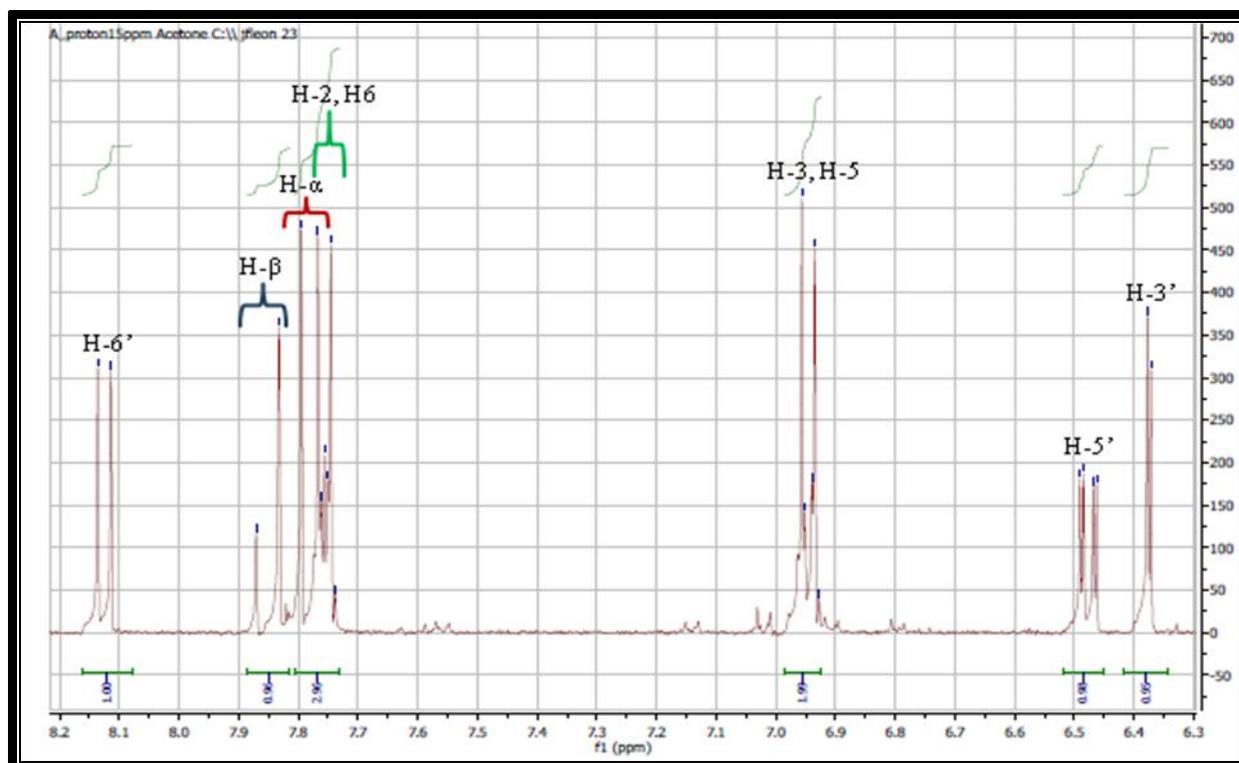
- Un signal sous forme de singulet d'intensité 1H à $\delta_H = 13,65$ ppm attribué à OH-2' caractéristique d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre un groupement phénol et une fonction carbonyle [89].
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,85$ ppm ($J = 15,3$ Hz) attribué à H- β [89]. Ce proton corrèle avec le carbone qui le porte, C- β résonnant à $\delta_C = 144,18$ ppm.
- Un doublet d'intensité 1H à $\delta_H = 7,77$ ppm ($J = 15,3$ Hz) attribué à H- α . Une corrélation entre ce proton et le carbone à $\delta_C = 117,49$ ppm attribuable par conséquent à C- α [89]. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux carbones indiquent d'une part qu'ils sont éthyléniques et d'autre part confirment la nature chalcone de cette molécule.

De plus, le spectre de RMN ¹H présente :

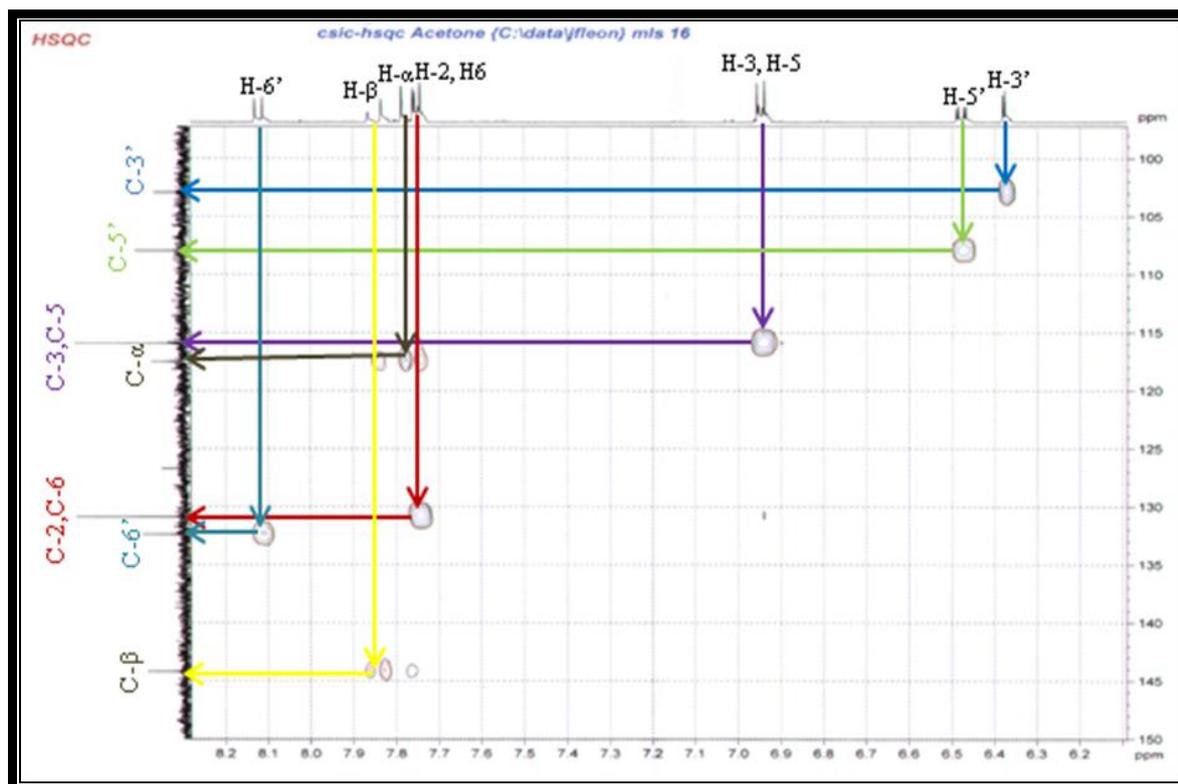
- Deux signaux sous forme de doublet de doublets ($J = 8,6 ; 2,6$ Hz) d'intégration 2H chacun, caractéristiques d'un noyau B oxygéné en position 4. Le premier à $\delta_H = 7,75$ ppm partiellement recouvert par le signal précédemment signalé et correspondant au proton H- α , est attribué aux noyaux H-2 et H-6, le second à $\delta_H = 6,94$ ppm est attribué aux noyaux H-3 et H-5.
- Un signal à $\delta_H = 8,12$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 8,9$ Hz) attribuable à H-6' du cycle A.
- Un doublet de doublets (dd) d'intégration 1H à $\delta_H = 6,47$ ppm ($J = 8,9 ; 2,4$ Hz) attribuable à H-5'



Spectre III-137: Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C5**
(Etalement 1)



Spectre III-138 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C5**
(Etalement 2)



Spectre III-139: Spectre HSQC (500 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C5**.

Les données relatives à la RMN ¹H sont représentées dans le tableau III-30.

Tableau III-30 : Données de la spectroscopie RMN ¹H (500 MHz, Me₂CO-*d*₆) du composé **C5**

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité <i>J</i> (Hz)	Attribution
6,37	1H	d (2,4)	H-3'
6,47	1H	dd (8,9 ; 2,4)	H-5'
8,12	1H	d (8,9)	H-6'
7,77	1H	d (15,3)	H-α
7,85	1H	d (15,3)	H-β
7,75	2H	dd (8,6 ; 2,6)	H-2, H-6
6,94	2H	dd (8,6 ; 2,6)	H-3, H-5
13,65	1H	s	OH-2'

Ces résultats reportés dans le tableau III-30 et additionnés aux résultats des spectres d'absorption ultraviolette donnent la structure : **2', 4, 4'-trihydroxychalcone**. Elle est également connue sous le nom de : **isoliquiritigénine** (Figure III-40).

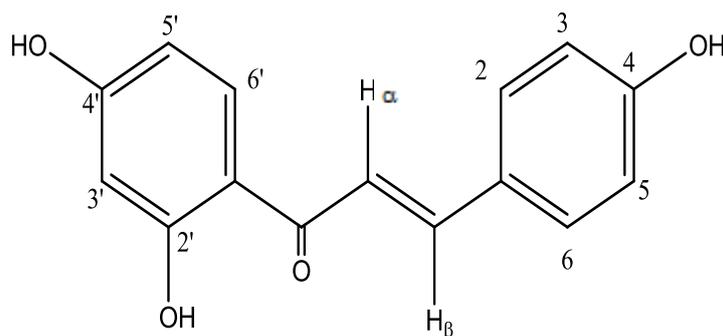
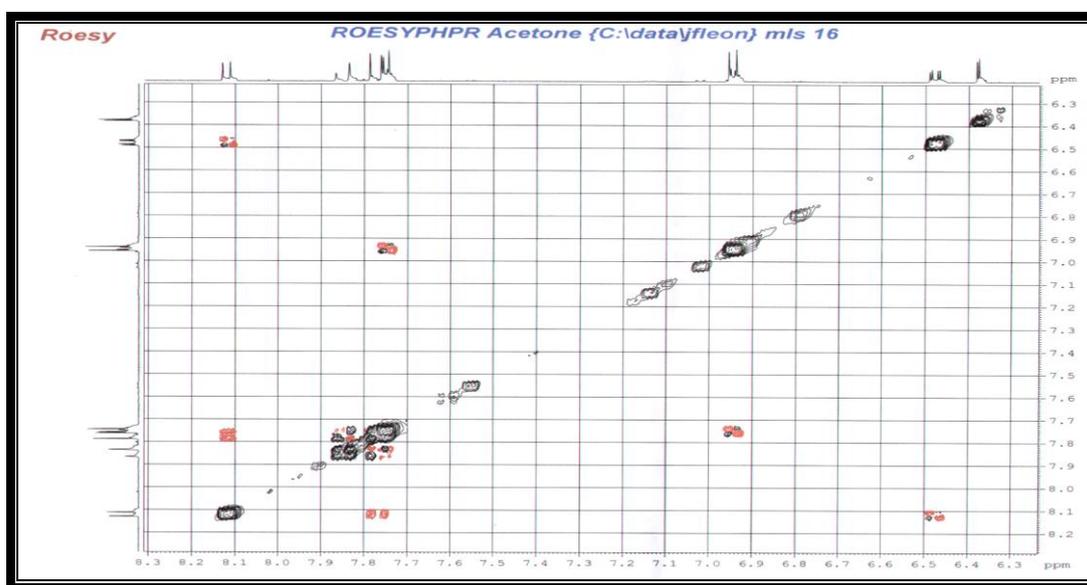


Figure III-40 : Structure du composé **C5**, isoliquiritigénine.

Cette structure est consolidée par l'étude de son spectre ROESY (Spectre III-140) qui montre les interactions ROESY suivantes :

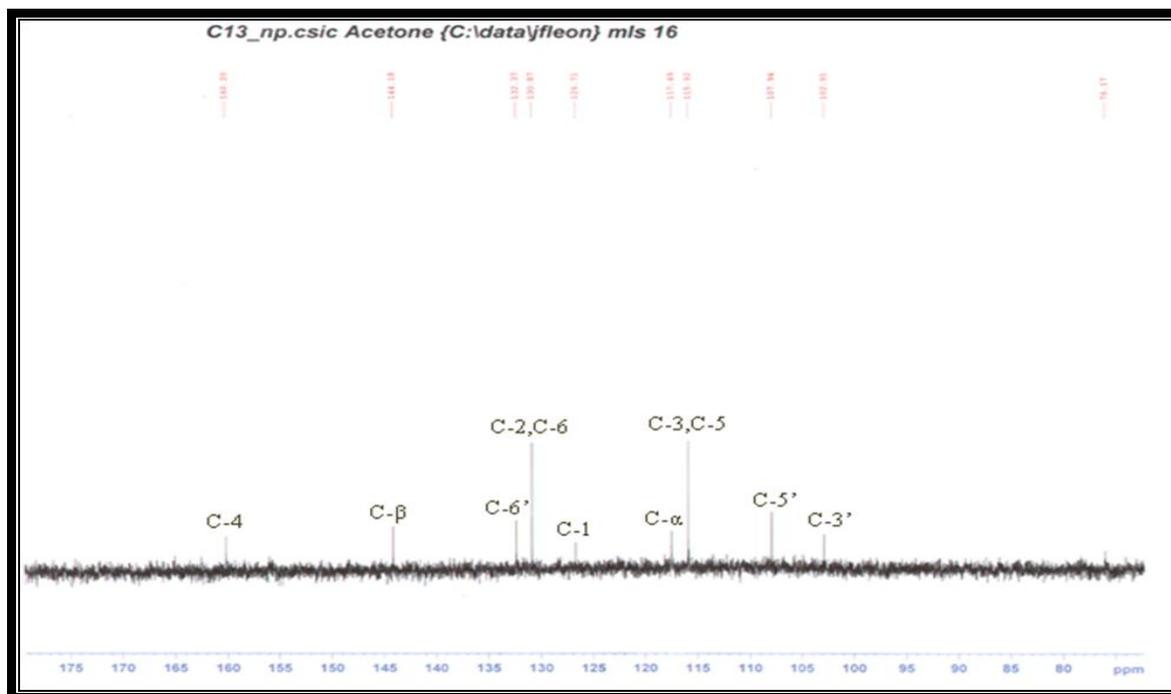
- Une tache de corrélation entre le proton H-6' (d) et le proton H-5' (dd) confirmant le couplage ortho ainsi la substitution du noyau A en positions 2' et 4'.
- Des interactions entre les protons H-2, H-6 et H-3, H-5 confirmant la para-substitution du noyau B.
- Des interactions entre les protons H- α avec le proton H-6' et H- β avec H-2, H-6. (Ceci est en parfait accord avec les déplacements chimiques des protons H- α et H- β).



Spectre III-140 : Spectre ROESY (500 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C5**.

Le spectre RMN ¹³C (Spectre III-141) de ce produit est comparé avec celui de la littérature [90,91]. L'attribution des atomes de carbone a été réalisée en se basant sur l'expérience

HSQC et les résultats de la littérature. Les données de la spectroscopie RMN ^{13}C sont regroupées dans le tableau III-31. Elle a été isolée de plusieurs espèces de la famille fabacée [75, 91, 92] et d'espèces d'autres familles [90,93]. Nous l'identifions pour la première fois dans le genre *Crotalaria*. Elle est douée d'activités antioxydante et antimicrobienne [90], elle est actuellement testée comme traitement contre le cancer [93-95].

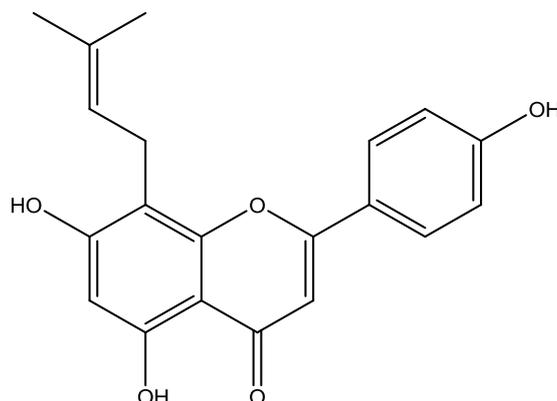


Spectre III-141: Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé C5.

Tableau III-31: Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (125, MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) du composé C5.

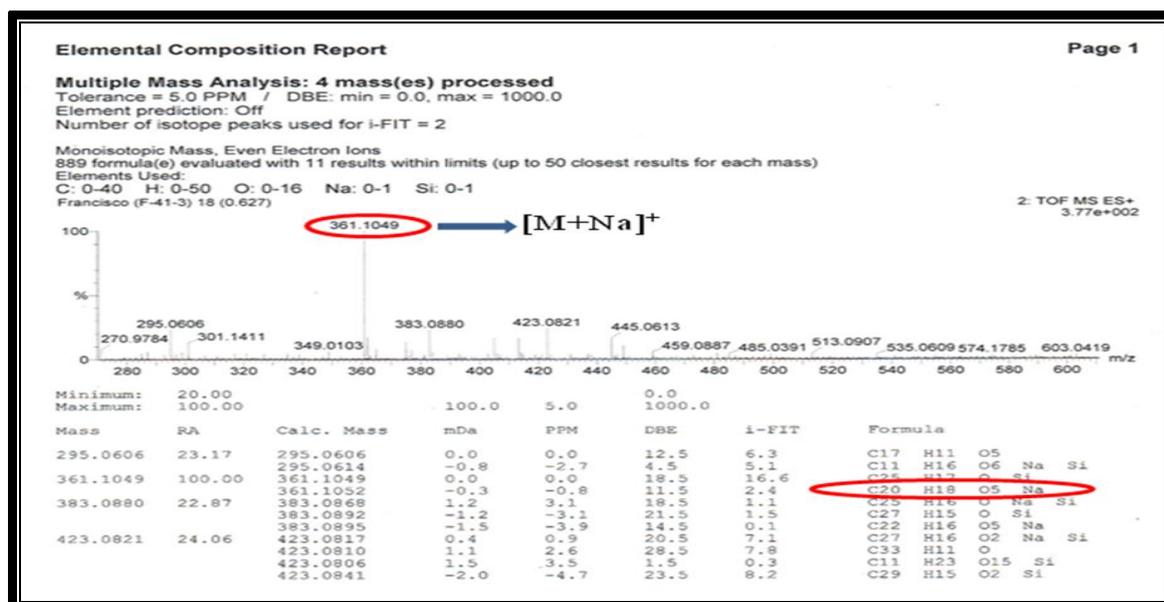
Position de ^{13}C	Composé C5 δ (ppm)	Isoliquiritigénine
1	126,71	126,7
2, 6	130,87	131,5
3, 5	115,92	117,0
4	160,20	161,9
α	117,49	117,9
β	144,18	144,9
C=O	-	192,5
1'	-	114,2
2'	-	166,7
3'	102,91	104,0
4'	-	167,5
5'	107,94	109,1
6'	132,37	132,9

III-2-2-f- Elucidation structurale du composé C6



C6

Le composé **C6** se présente sous forme d'une poudre jaune et soluble dans l'acétone. L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode électrospray positif (Spectre III-142) du composé **C6** montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 361,1049$ correspondant à $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{18}O_5Na$: 361,1052), indiquant une formule brute $C_{20}H_{18}O_5$, soit une molécule renfermant 12 degrés d'insaturation. Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365$ nm), ce composé montre une fluorescence noir violet orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol substitué en position 3. Cette donnée additionnée aux résultats de la spectrométrie de masse indique un flavonoïde comportant un substituant renfermant une insaturation.



Spectre III-142: Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé C6

Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f dans les deux systèmes **SI** et **SII** indique que le composé est un aglycone (Tableau III-32).

SI : Toluène / Méthanol / Méthyléthylcétone (4:3:3)

SII : H₂O / MeOH / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13:3:3:1)

Tableau III-32: Comportement chromatographique du produit **C6**

Systèmes	SI	SII
R_f	0.84	0.04

L'examen de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-143) montre :

❖ La fluorescence noir violet et la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I dans le méthanol ($\lambda_{\max} = 326$ nm), sur le spectre UV-Vis (Spectre III-143) sont caractéristiques d'une flavone.

❖ L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +73$ nm) après addition de NaOH par rapport au spectre enregistré dans le méthanol avec une augmentation de l'intensité d'absorption, oriente vers la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda = 332$ nm indique la présence d'un OH libre en position 7.

❖ Aucun effet bathochrome de la bande I n'est pas observé après addition de H₃BO₃ en présence de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le MeOH ce qui indique l'absence du systèmes ortho di-OH sur le noyau A et le noyau B.

Cette hypothèse est confirmée par l'étude du spectre en présence d'AlCl₃ où les longueurs d'onde d'absorption maximale de la bande I ne montrent pas de changement notable, après addition de HCl (395 et 392 nm respectivement). Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +66$ nm) dans le spectre AlCl₃ + HCl, indique la présence d'un OH libre en 5 et l'absence d'oxygénation en C-6.

Ces résultats rassemblés dans le tableau III-33 mènent à la structure partielle représentée dans la figure III-41 avec R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ différents de OH.

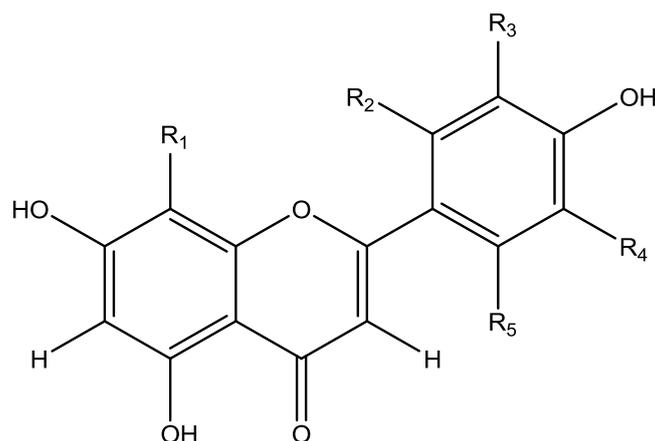
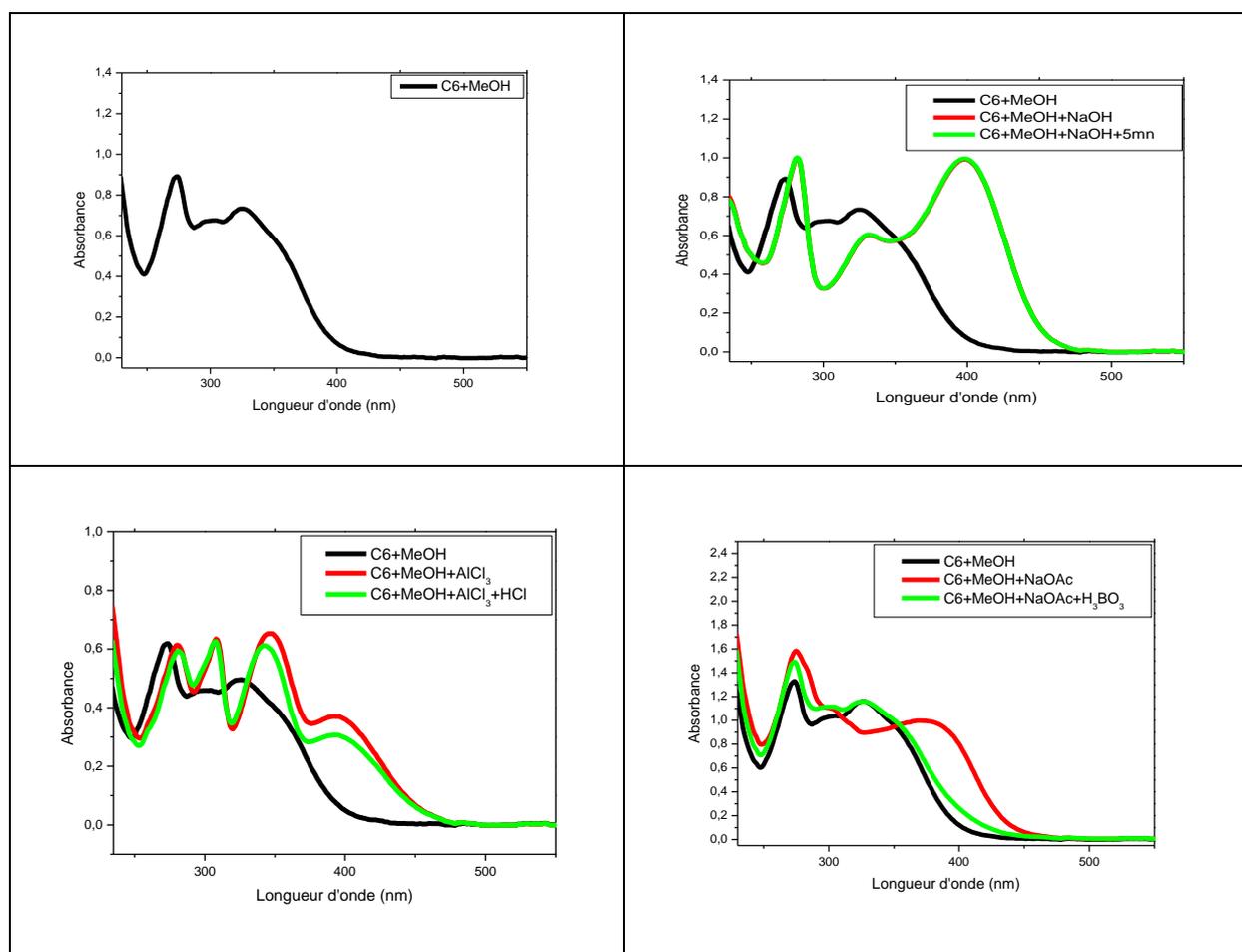


Figure III-41 : Structure partielle du composé C6.



Spectre III-143: Série spectrale UV-Vis du composé C6.

Tableau III-33 : Données de la série spectrale UV-Vis (λ_{max} nm) du composé **C6**.

Réactifs	Bande I	Autres bandes		Bande II
MeOH	326	/		274
NaOH	399	332		282
AlCl ₃	395	348	308	280
AlCl ₃ +HCl	392	342	308	281
NaOAc	371	/		275
NaOAc+H ₃ BO ₃	327	/		274
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre III-144) et son étalement (Spectre III-145) de ce produit montre :

❖ Un signal sous forme de singulet à $\delta_{\text{H}} = 13,00$ ppm attribuable au proton d'un groupement OH en position 5 confirmant également nos données de la série spectrale UV-Vis.

❖ La présence de deux doublets de doublets ($J = 8,9 ; 2,1$ Hz) d'intégration 2H chacun, caractéristique d'un noyau B ayant une oxygénation en position 4'. Le premier à $\delta_{\text{H}} = 7,99$ ppm est attribué aux protons H-2' et H-6', le second à $\delta_{\text{H}} = 7,07$ ppm est attribué aux noyaux H-3' et H-5'. Ceci est d'ailleurs clair sur le spectre COSY (Spectre III-146). Le spectre HSQC (Spectre III-147) permet de localiser leurs carbones porteurs à $\delta_{\text{C}} = 128,28$ ppm (C-2', C-6') et à $\delta_{\text{C}} = 115,93$ ppm (C-3', C-5')

❖ Le spectre RMN ¹H renferme également un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,65$ ppm attribuable au proton en position C-3, cette attribution est en parfait accord avec la valeur du déplacement chimique de C-3 que l'on relève à $\delta_{\text{C}} = 102,90$ ppm sur le spectre HSQC (Spectre III-147).

❖ Un autre singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,36$ ppm attribuable au proton H-6 du squelette flavonique. Cette attribution est consolidée par la corrélation observée sur le spectre HSQC entre ce proton et le carbone résonnant à $\delta_{\text{C}} = 98,36$ ppm dont la valeur du déplacement chimique est en parfait accord avec celle généralement observée pour le C-6 des flavonoïdes. A ce stade, nous pouvons attendre une flavone substituée entre autre en C-8. Ainsi ce résultat confirme nos données de la série spectrale UV-Vis.

❖ Ce spectre présente également deux autres doublets d'intégration 3H chacun, le premier à $\delta_{\text{H}} = 1,84$ ppm ($J = 0,9$ Hz, couplage allylique) et l'autre à $\delta_{\text{H}} = 1,68$ ppm ($J = 1,1$ Hz,

couplage allylique). La multiplicité et les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplages relevées dans les signaux relatifs à ces deux groupements méthyles indiquent qu'ils sont portés par un carbone quaternaire éthylénique dont la double liaison doit être délimitée par un CH. Cette hypothèse est appuyée par le signal d'intégration 1H à $\delta_H = 5,31$ ppm résonnant sous forme d'un triplet de multiplets dont la valeur du déplacement chimique confirme sa nature éthylénique. Quant à sa multiplicité, elle confirme son couplage allylique avec les méthyles précédemment décrits et indique qu'il est lié à un groupement CH_2 . Cette observation est justifiée par le signal d'intégration 2H apparaissant sous forme d'un doublet à $\delta_H = 3,58$ ppm ($J=6,9$ Hz). Toutes ces attributions sont appuyées par le spectre COSY (Spectre III-147) qui montre des corrélations nettes entre le proton éthylénique et les protons du groupement CH_2 .

Un récapitulatif de ces dernières données mène à la présence d'un groupement prényle dans cette structure (Figure III-42) :

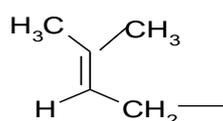
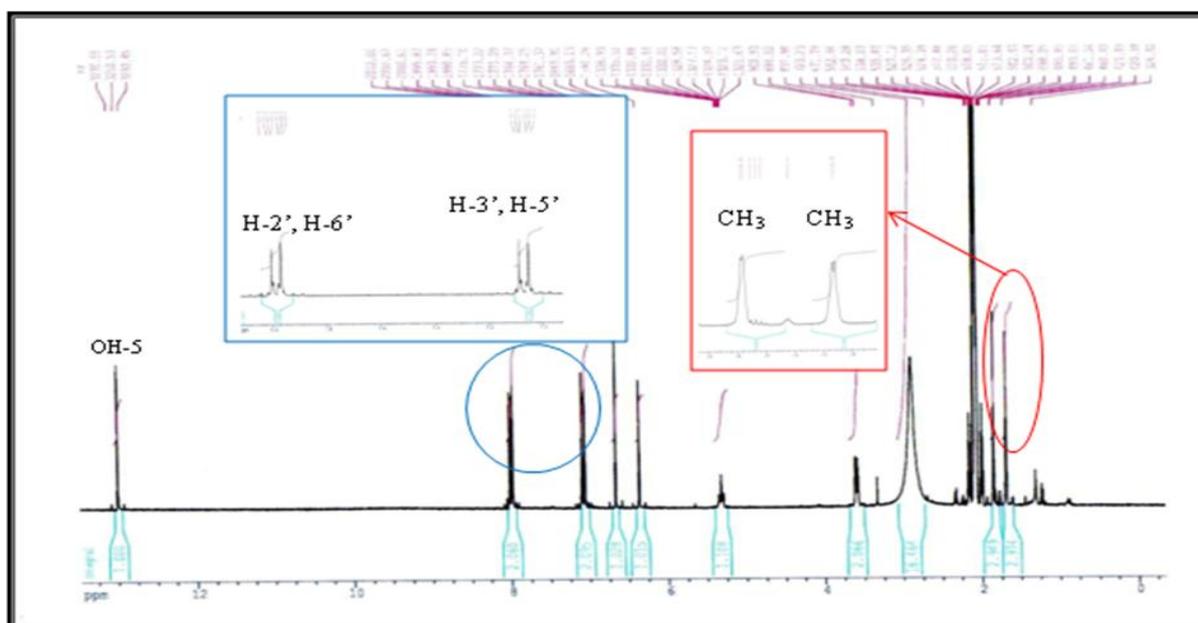
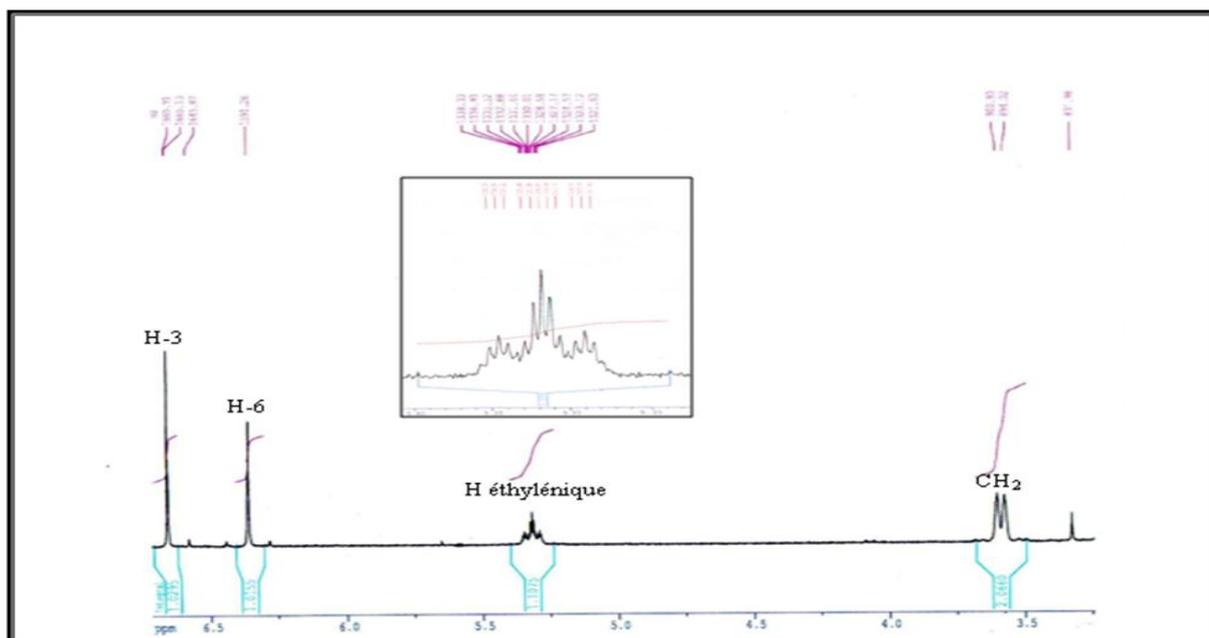


Figure III-42 : Groupement prényle



Spectre III-144: Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C6**.

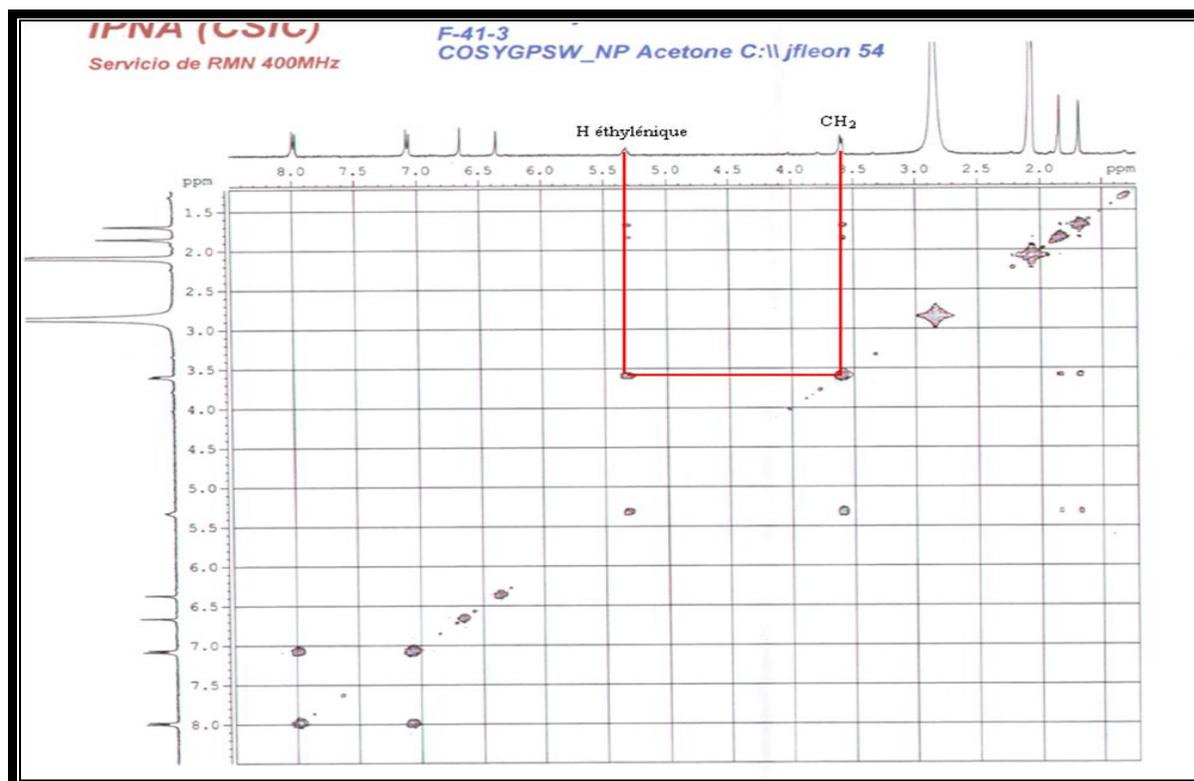


Spectre III-145 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C6**
(Etalement).

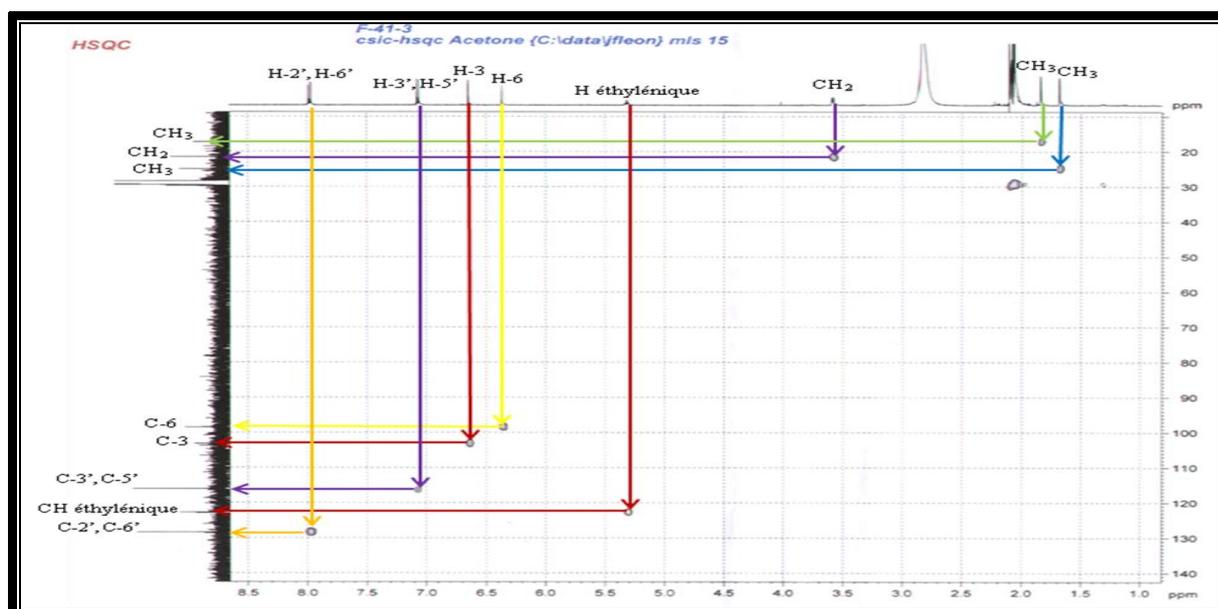
Le spectre HSQC (Spectre III-147) permet l'attribution des atomes de carbones de ce groupement prényle, grâce aux taches de corrélation entre les protons et les carbones qui les portent :

- Une tache de corrélation entre les protons du groupement méthyle résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,84$ ppm et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 17,21$ ppm et ceux du méthyle résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,68$ ppm et le carbone dont le signal apparait à $\delta_{\text{C}} = 24,94$ ppm.
- Une tache de corrélation entre le proton éthylénique et le CH éthylénique résonnant à $\delta_{\text{C}} = 122,73$ ppm
- Une tache de corrélation entre les proton du groupement CH_2 et le carbone résonnant à $\delta_{\text{C}} = 21,45$ ppm .

Le fait que le déplacement chimique des protons du groupement CH_2 soit uniquement de 3,58 ppm suppose que ce groupement est lié au squelette flavonique non pas par un atome d'oxygène mais par l'intermédiaire du carbone du groupement CH_2 . Le carbone de ce méthylène résonne à $\delta_{\text{C}} = 21,45$ ppm est numéroté C-1''.



Spectre III-146 : Spectre COSY (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C6**

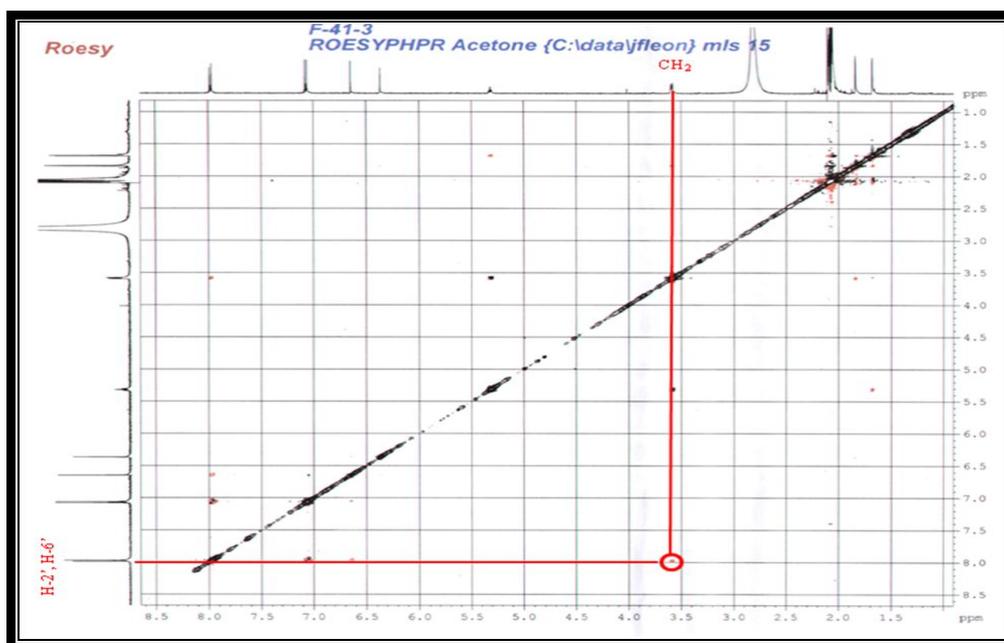


Spectre III-147 : Spectre HSQC (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C6**.

Après combinaison de l'ensemble des résultats obtenus par l'analyse de la série spectrale UV-Vis et du spectre de RMN du proton, il apparaît que nous avons une apigénine prénylée en C-8.

Ces données consignées dans le tableau III-34 mènent à la structure finale reportée dans La figure III-43 soit la **4',5,7-trihydroxy-8-prénylflavone** ou **8-prénylapigénine** (Licoflavone

Ces données de RMN du carbone ont permis de prouver que le groupement prényle est bien lié au squelette flavonique par l'intermédiaire du groupement CH₂ vu la valeur du déplacement chimique de ce dernier. Le positionnement de ce groupement a été confirmé en se basant sur le spectre de l'expérience ROESY (Spectre III-149) où le groupement CH₂ montre une tache de corrélation avec les protons H-2' et H-6' du cycle B.



Spectre III-149 : Spectre ROESY (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé C6.

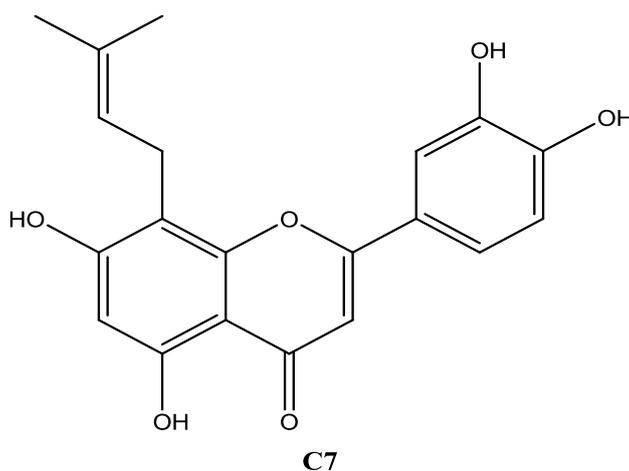
Les données de la spectroscopie RMN relatives à cette molécule sont résumées dans le tableau III-34

Tableau III-34 : Déplacements chimiques δ (ppm), ¹³C (62,5 MHz) et ¹H (250 MHz) de C6 (Me₂CO-*d*₆)

Position	δ _C	δ _H	Intégration	Multiplicité	J(Hz)
Flavonoïde					
2	164,02	-	-	-	-
3	102,90	6,65	1H	s	-
4	182,39	-	-	-	-
5	159,73	13,00	1H	s	-
6	98,36	6,36	1H	s	-
7	161,69	-	-	-	-
8	106,47	-	-	-	-
9	155,07	-	-	-	-
10	ND	-	-	-	-
1'	122,51	-	-	-	-
2',6'	128,28	7,99	2H	dd	8,9 ; 2,1
3',5'	115,93	7,10	2H	dd	8,9 ; 2,1
4'	161,12	-	-	-	-

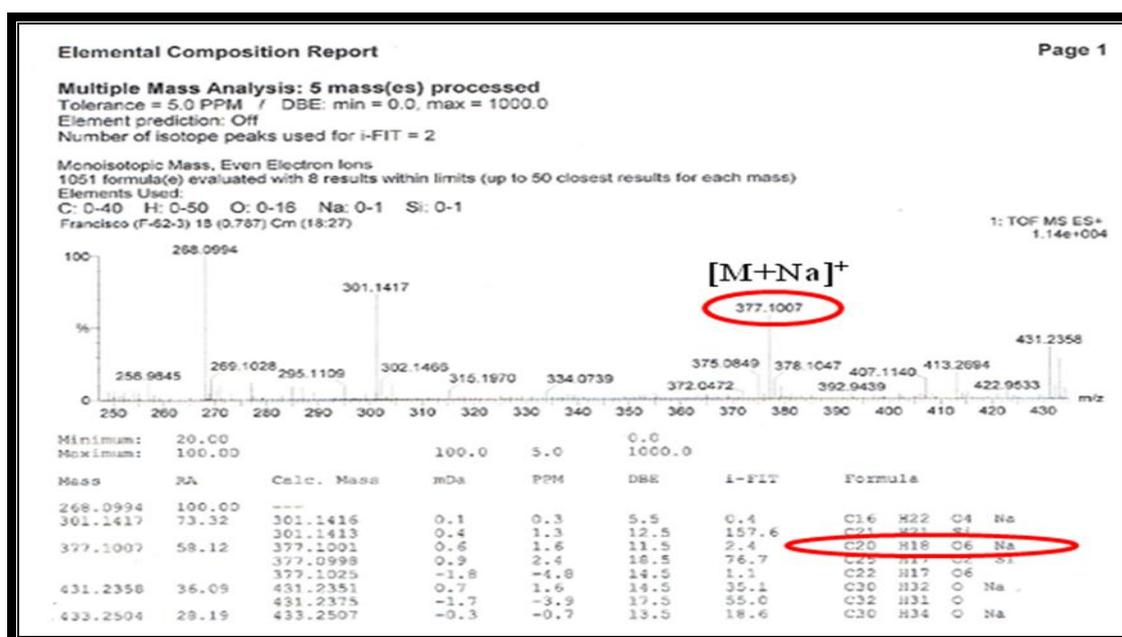
groupement prenyle					
Cq	131,03	-	-	-	-
CH	122,73	5,31	1H	tm	-
CH ₂	21,45	3,58	2H	d	6,9
CH ₃	24,94	1,84	3H	d	0,9
CH ₃	17,21	1,68	3H	d	1,1

III-2-2-g- Elucidation structurale du composé C7



Le composé **C7** se présente, comme le composé **C6**, sous forme d'une poudre jaune intense soluble dans l'acétone. L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre III-150) de ce composé montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 377,1007$ correspondant à $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{18}O_6Na$: 377,1001), indiquant une formule brute $C_{20}H_{18}O_6$, soit une molécule comportant 12 degrés d'insaturation.

La différence de 16 uma par rapport au composé **C6**, laisse suggérer que la structure du composé **C7** ne diffère de celle de **C6** que par la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire au niveau du squelette flavonique au lieu du noyau H.



Spectre III-150: Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé **C7**.

Ce composé de fluorescence noir violet sous la lumière de Wood (365 nm) laisse envisager une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3. Cette donnée additionnée aux résultats de la spectrométrie de masse indique un flavonoïde substitué par un groupement comportant un degrés d'insaturation.

Ce produit a été élué sur plaque chromatographique polyamide DC6.6 dans deux systèmes de solvant, l'un organique **SI** et l'autre aqueux **SII**, et a donné les résultats consignés dans le tableau III-35.

SI : Toluène / Méthanol / Méthyléthylcétone (4:3:3)

SII : H₂O / MeOH / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13:3:3:1)

Tableau III-35 : Comportement chromatographique du produit **C7**

Systèmes	SI	SII
R _f	0,56	0,02

Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f dans les deux systèmes **SI** et **SII** indique que ce composé est un aglycone.

L'étude de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-151) donne les indications suivantes :

❖ Le spectre d'absorption UV-Vis enregistré dans le méthanol montre deux maxima à $\lambda = 264$ nm et $\lambda = 348$ nm, caractéristiques des bandes II et I, respectivement d'une flavone.

❖ L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +59$ nm) avec une augmentation de l'intensité d'absorption comparativement à celui enregistré dans le méthanol suppose la présence d'un OH en 4'.

❖ L'ajout de NaOAc, provoque un déplacement de la bande II ($\Delta\lambda = +9$ nm) révélant la présence d'un OH libre sur C-7.

❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +42$ 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 5, la comparaison de ce spectre avec celui enregistré dans le méthanol en présence de AlCl_3 avant addition de HCl montre un effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -18$ nm) indiquant la présence d'un système ortho di OH sur le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par le spectre enregistré en présence de $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ qui montre un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +29$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le méthanol. Ces résultats permettent de proposer la structure partielle suivante avec R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et R_5 différents de OH :

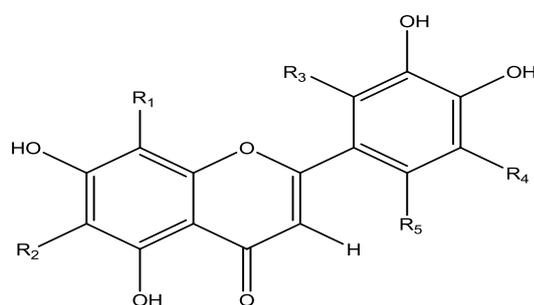
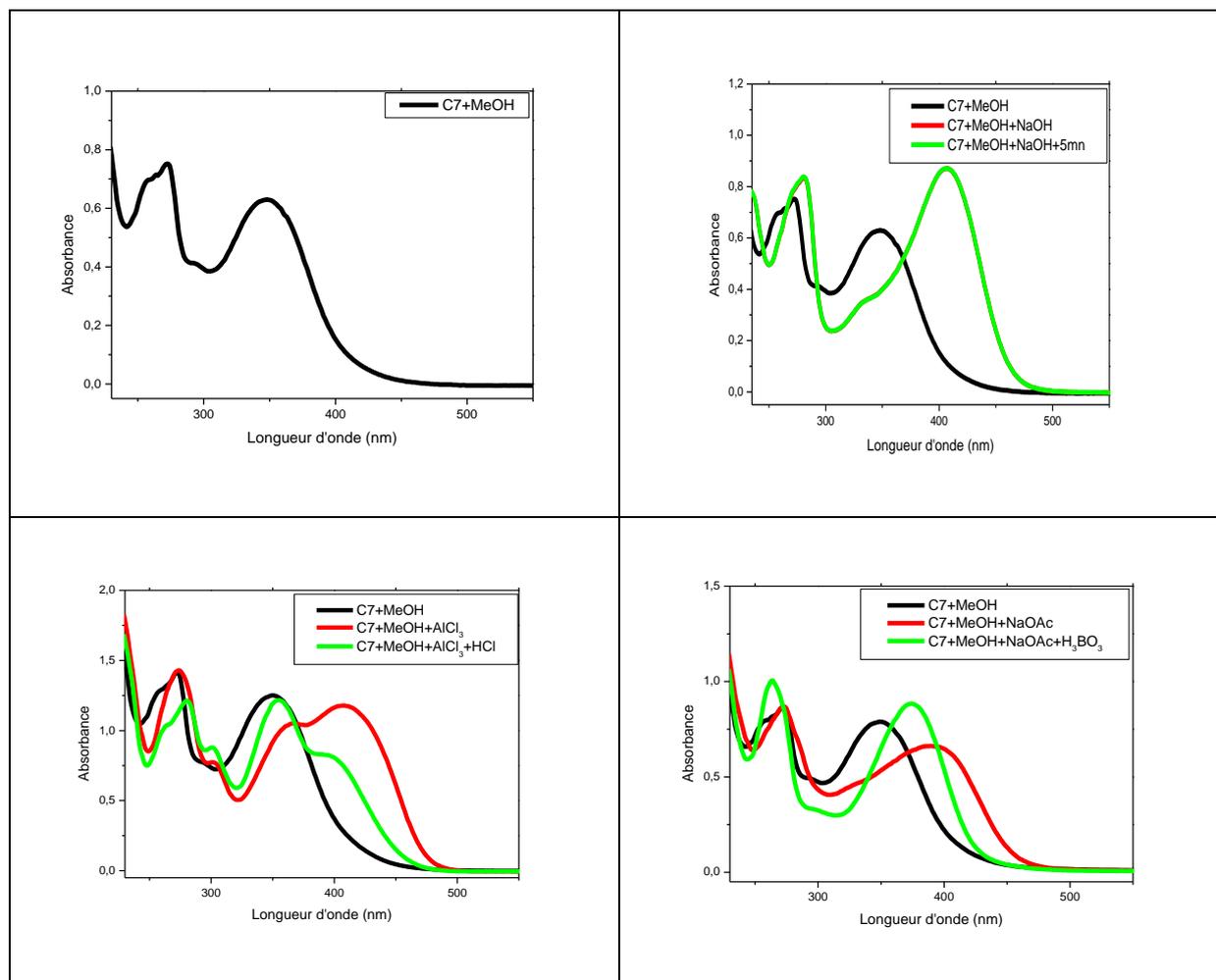


Figure III-44: Structure partielle du composé C7.



Spectre III-151 : Série spectrale UV-Vis du composé **C7**.

Les résultats relatifs à cette série spectrale UV-Vis sont rassemblés dans le tableau III-36

Tableau III-36: Résultats de la série spectrale UV-Vis Pour **C7**.

Réactifs	Bande I	Autres bandes		Bande II
MeOH	348	/		264
NaOH	407	/		281
AlCl ₃	408	301	367	274
AlCl ₃ + HCl	390	301	355	280
NaOAc	392	/		273
NaOAc+H ₃ BO ₃	374	/		264
Spectre stable avec NaOH après 5mn				

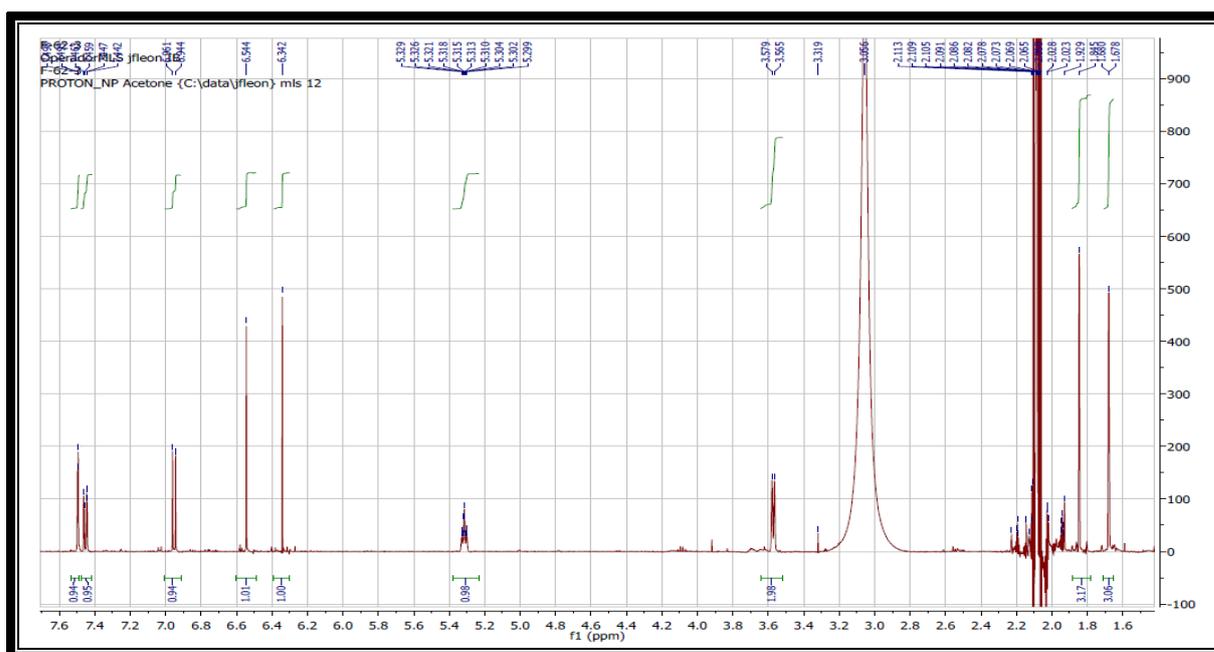
L'examen du spectre RMN ^1H du composé **C7** (Spectre III-152), enregistré dans l'acétone- d_6 montre :

❖ La présence de trois signaux relatifs à trois protons aromatiques à $\delta_{\text{H}} = 7,49$ ppm sous forme de doublet ($J = 2,0$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 7,45$ ppm sous forme de doublet de doublets ($J = 6,8 ; 2,0$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 6,95$ ppm sous forme de doublet ($J = 6,8$ Hz) dont les constantes de couplages indiquent que le cycle B est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.

Ce spectre reste par ailleurs très similaire à celui du composé précédent (**C6**) en montrant notamment :

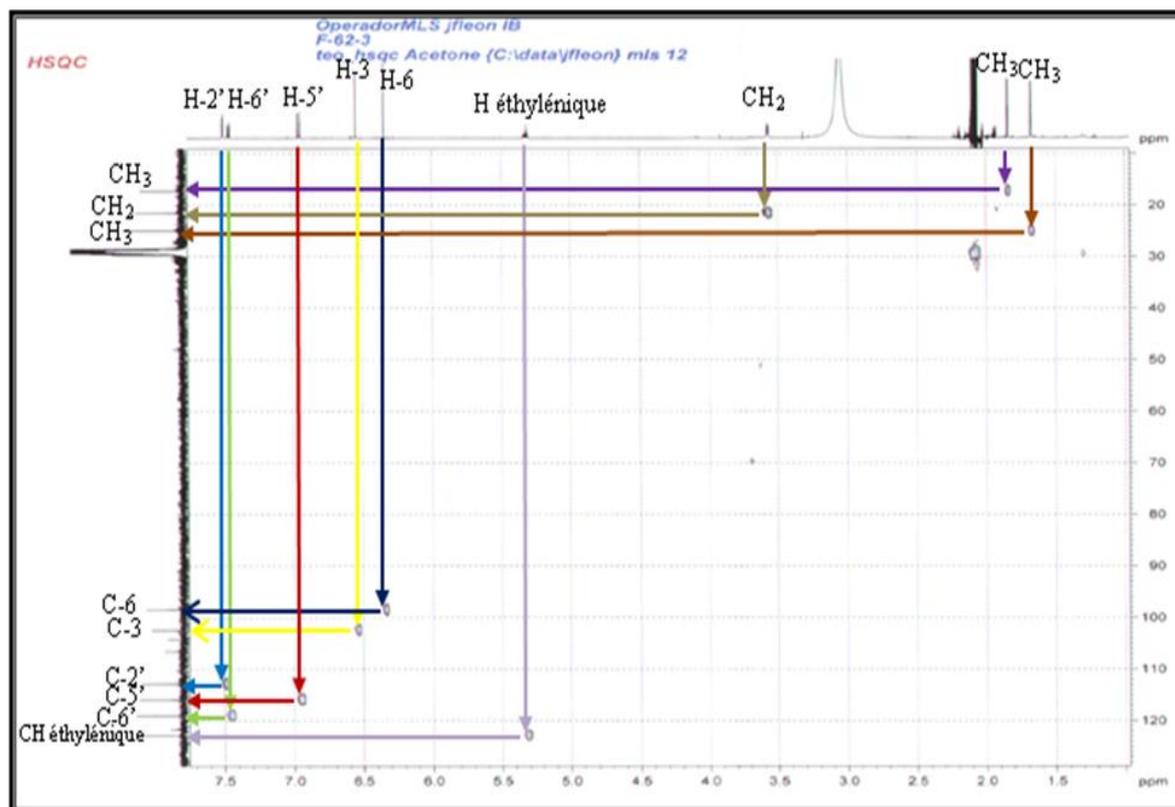
❖ Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,34$ ppm attribuable au proton en position C-6 et un autre singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,54$ ppm attribuable à H-3, ce résultat est conforté par les données de la série spectrale UV-Vis. Ces deux signaux nous orientent vers une substitution similaire au niveau de cycle A du squelette flavonique par rapport au composé **C6**.

❖ Le reste des signaux montre la présence d'une prénylation linéaire de type 3,3-DMA (3,3- diméthylallyl) avec un doublet à $\delta_{\text{H}} = 3,57$ ppm (2H ; d ; $J = 5,6$ Hz) ppm couplant en 3J avec un proton éthylénique résonnant à $\delta_{\text{H}} = 5,31$ ppm sous forme d'un triplet de multiplets suite à son couplage en 4J avec les protons des deux méthyles résonnant à $\delta_{\text{H}} = 1,67$ ppm ($d ; J = 0,8$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 1,84$ ppm (singulet large).



Spectre III-152 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé **C7**

L'examen du spectre HSQC (Spectre III-153) permet d'attribuer tous les carbones porteurs de ces protons grâce à leurs corrélations hétéronucléaires respectives, en effet le C-2' à $\delta_C = 112,82$ ppm ; C-6' à $\delta_C = 119,00$ ppm; C-5' à $\delta_C = 115,90$ ppm; C-3 à $\delta_C = 102,42$ ppm; C-6 à $\delta_C = 98,45$ ppm et les carbones composant le groupement prényle : les deux méthyles à $\delta_C = 17,27$ ppm et $\delta_C = 24,97$ ppm , le groupement CH₂ à $\delta_C = 21,53$ ppm, le groupement CH éthylénique à $\delta = 122,83$ ppm.



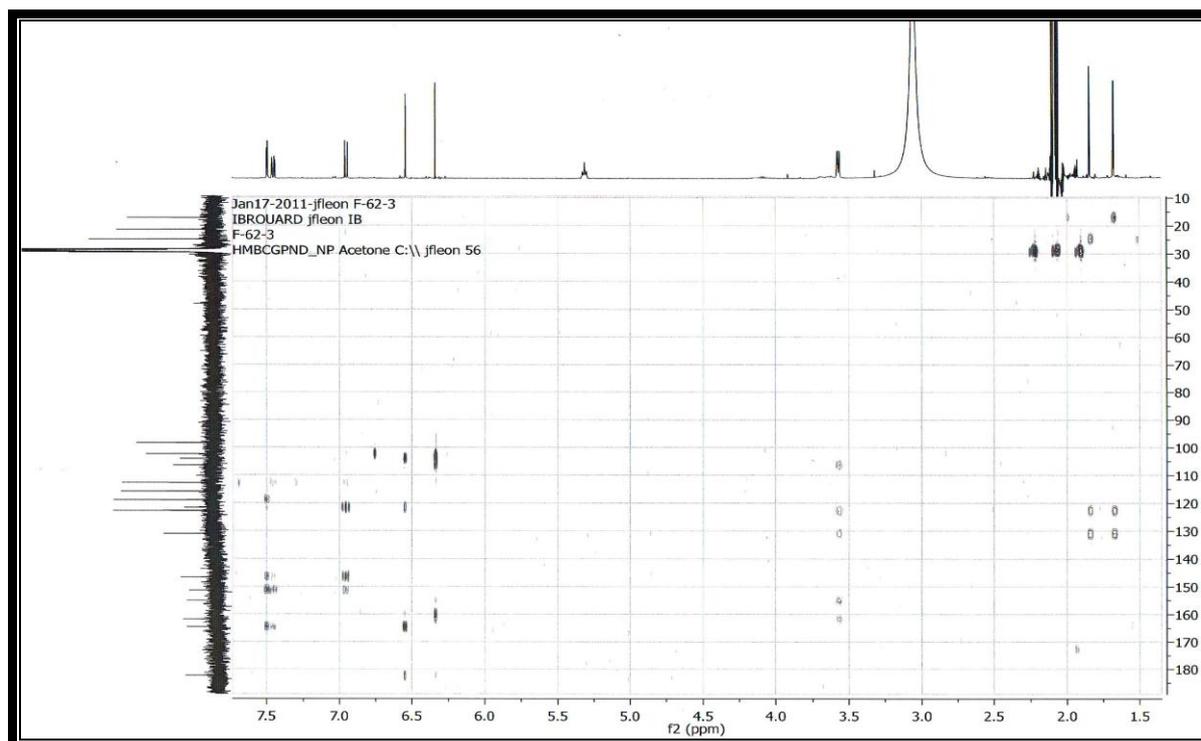
Spectre III-153 : Spectre HSQC (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C7**.

Les spectres RMN ¹³C (Spectre III-154) et ses séquences DEPT 135° + DEPT 90° (Spectre III-155) permettent de mettre en évidence la présence de ces éléments et montrent également un carbone quaternaire éthylénique à $\delta_C = 131,10$ ppm correspondant au carbone porteur de deux méthyles.

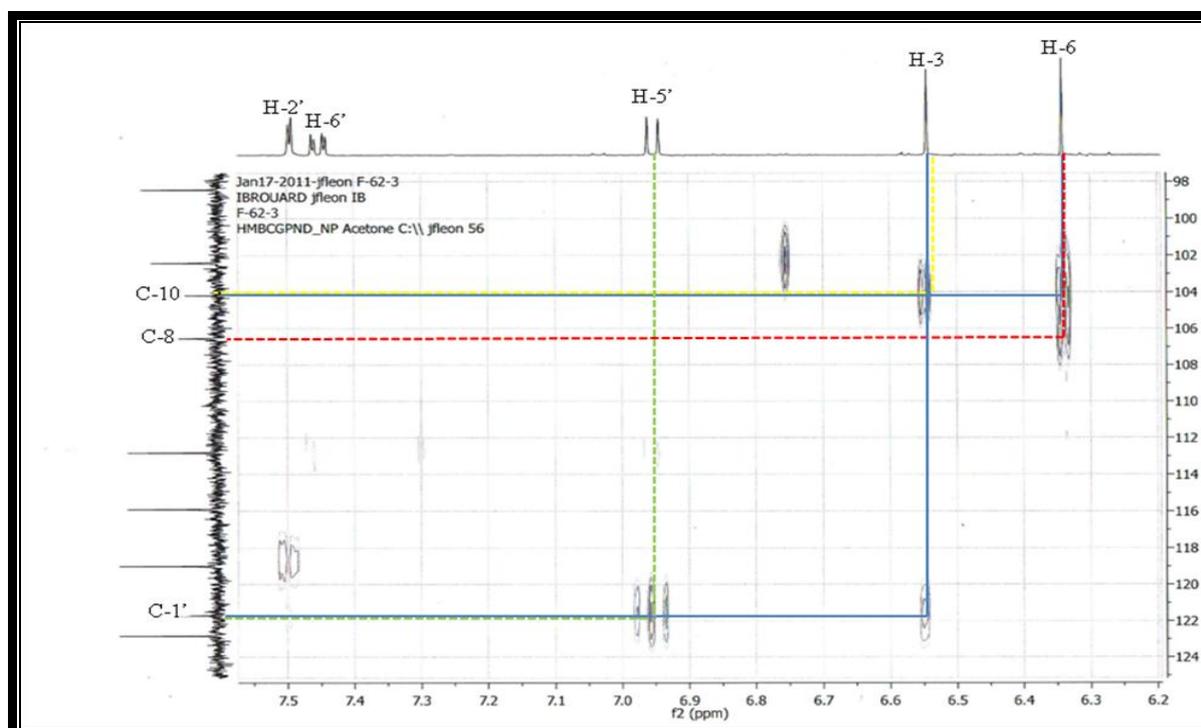
La détermination des carbones quaternaires du squelette de l'aglycone est réalisée par une analyse minutieuse du spectre de l'expérience HMBC (Spectre III-156), ainsi que ses spectre étalés (Spectre III-157) et (Spectre III-158), où l'on relève en effet :

- Une corrélation observée entre H-3, H-6 et le carbone résonnant à $\delta_C = 104,24$ ppm permettant son attribution à C-10.
- Des corrélations entre H-3, H-5' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 121,76$ ppm permettant l'attribution de ce carbone au C-1'.
- Les protons H-5', H-2' montrant des corrélations avec le carbone résonnant à $\delta_C = 146,74$ ppm permettent son attribution au C-3'.
- Les protons H-5', H-2', H-6' montrant des corrélations avec le carbone résonnant à $\delta_C = 151,42$ ppm permettent son attribution au C-4'.
- Les protons H-3, H-2', H-6' montrant des corrélations avec le carbone résonnant à $\delta_C = 164,67$ ppm permettent son attribution au C-2.
- Comme signalé précédemment, le singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6,95$ ppm est attribué au proton H-3 vu la valeur du déplacement chimique de son carbone porteur relevée grâce à l'analyse du spectre HSQC (Spectre III-153). Cette attribution est également consolidée par la corrélation observée dans le spectre HMBC entre ce proton et le carbone résonnant à $\delta = 182,39$ ppm attribuable sans ambiguïté au carbone C-4.
- Le singulet attribuable au proton H-6 montre une tache de corrélation avec le carbone quaternaire résonnant à $\delta_C = 106,54$ ppm et qui ne peut être que le carbone C-8.

A l'issue de toutes ces attributions, il reste sur le spectre RMN ^{13}C , deux signaux non attribués à $\delta_C = 155,14$ ppm et $\delta_C = 161,87$ ppm, les valeurs de leur déplacement chimique indiquant qu'ils sont oxygénés font qu'ils ne peuvent être assignés qu'aux carbones quaternaires C-9 et C-7 respectivement. Ceci est vérifié par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le méthylène du groupement prényle et ces deux carbones. Par ailleurs et toujours sur le même spectre les protons de ce méthylène montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire signalé précédemment résonnant à $\delta_C = 106,54$ ppm correspondant au carbone C-8. Cette observation confirme la position en C-8 du groupement prényle.

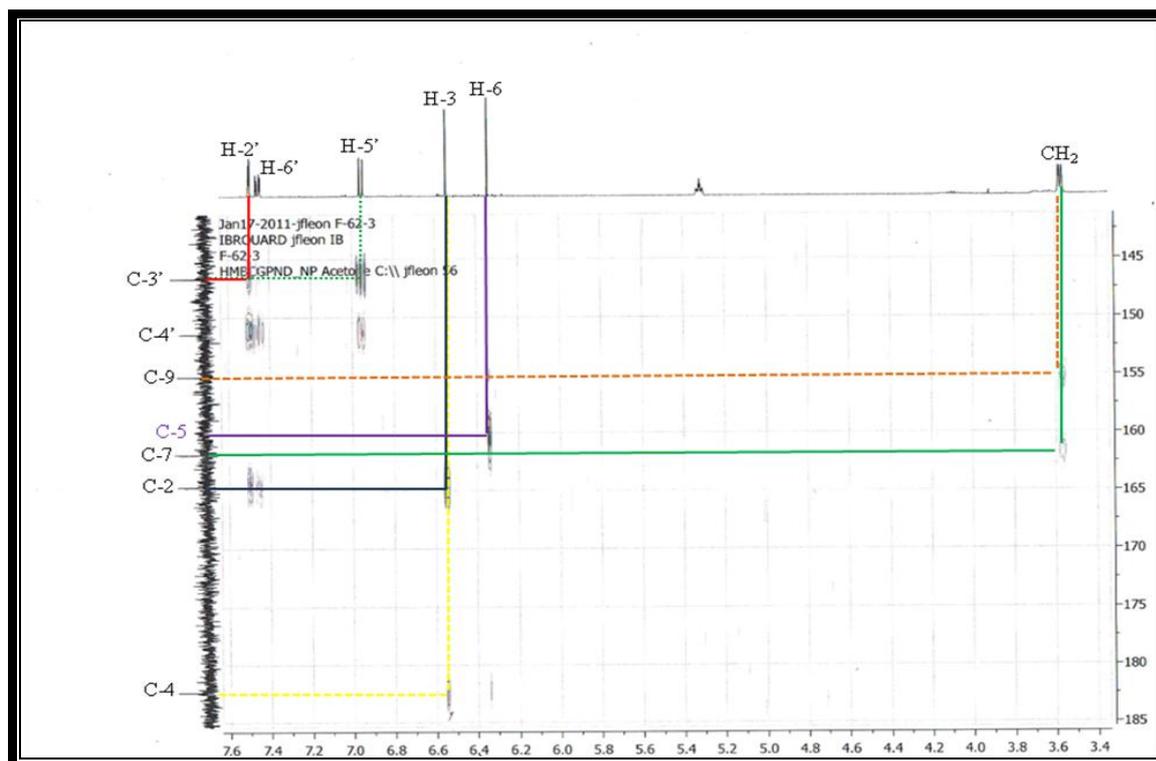


Spectre III-156 : Spectre HMBC (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé C7.



Spectre III-157 : Spectre HMBC (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, δ ppm) du composé C7 (Etalement

1).



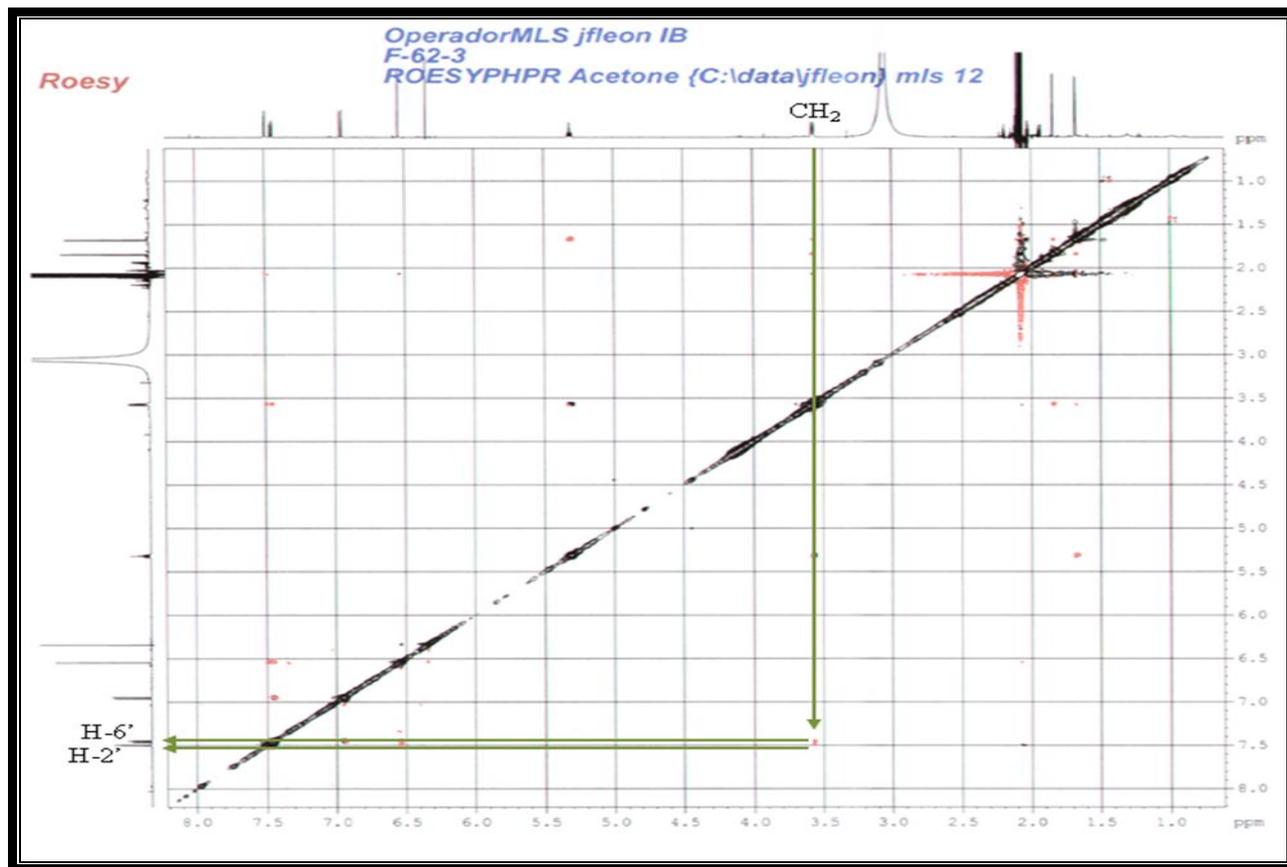
Spectre III-158 : Spectre HMBC (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C7**
(Étalement 2).

Un examen du spectre ROESY (Spectre III-159) permet également de consolider cette observation par les corrélations observées entre le méthylène et les protons H-2', H-6'.

L'examen du spectre RMN ¹³C montre la présence de 19 atomes de carbone au lieu de 20. En effet, à ce stade de notre analyse, le signal de C-5 n'apparaît pas sur ce spectre. Dans ce sens, nous avons réexaminé le spectre HMBC où l'on relève une tache de corrélation entre le proton H-6 et un carbone dont la résonance très faible apparaît à δ_C=159,73 ppm. Cette observation nous a permis d'attribuer le carbone C-5.

Après combinaison des résultats obtenus par l'analyse de la série spectrale UV-Vis et les spectres de RMN, il apparaît que nous avons la lutéoline prénylée en C-8.

Le fait que le déplacement chimique des protons du groupement CH₂ soit uniquement de 3,57 ppm suppose que ce groupement est lié au squelette flavonique non pas par un atome d'oxygène mais par l'intermédiaire du carbone du groupement CH₂.



Spectre III-159: Spectre ROESY (400 MHz, Me₂CO-*d*₆, δ ppm) du composé **C7**.

Ces données consignées dans le tableau III-37 mènent à la structure finale **5,7,3',4'-Tetrahydroxy-8-prenylflavone** soit la **8-prényl lutéoline**, reportée dans la figure III-45 . Elle a été isolée auparavant de l'espèce *Artocarpus chama* [100]. Nous l'identifions pour la première fois dans le genre *Crotalaria*.

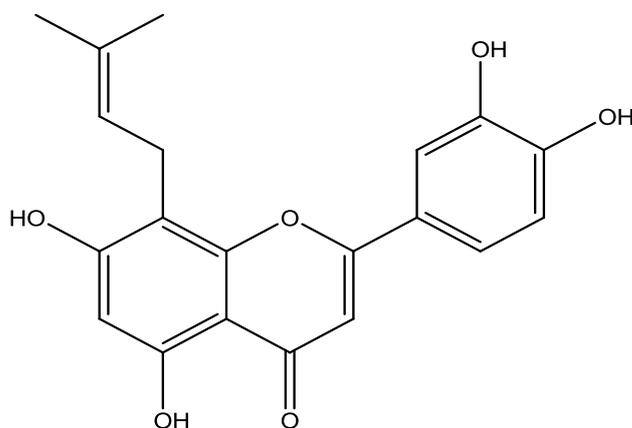
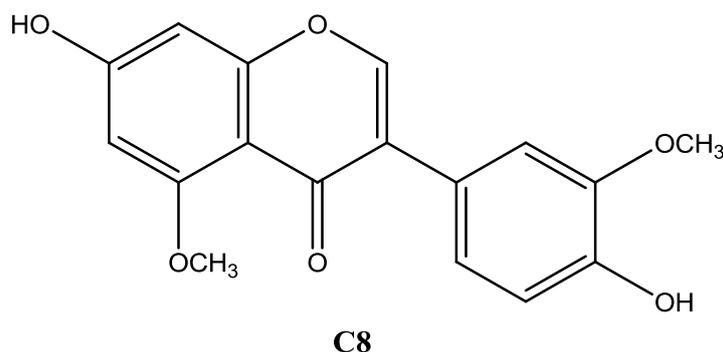


Figure III-45 : Structure finale du composé **C7** : **8-prényl lutéoline**

Tableau III-37 : Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) du composé **C7** ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$)

Position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
Flavonoïde					
2	164,67	-	-	-	-
3	102,42	6,54	1H	s	-
4	182,39	-	-	-	-
5	159,73	-	1H	s	-
6	98,45	6,34	1H	s	-
7	161,87	-	-	-	-
8	106,54	-	-	-	-
9	155,14	-	-	-	-
10	104,24	-	-	-	-
1'	121,76	-	-	-	-
2'	112,82	7,49	1H	d	2,0
3'	146,74	-	-	-	-
4'	151,42	-	-	-	-
5'	115,90	6,95	1H	d	6,8
6'	119,00	7,45	1H	dd	6,8 ; 2,0
groupement prényle					
Cq	131,10	-	-	-	-
CH	122,83	5,31	1H	tm	-
CH ₂	21,53	3,57	2H	d	5,6
CH ₃	24,97	1,67	3H	sl	-
CH ₃	17,27	1,84	3H	d	0,8

III-2-2-h- Elucidation structurale du composé **C8**

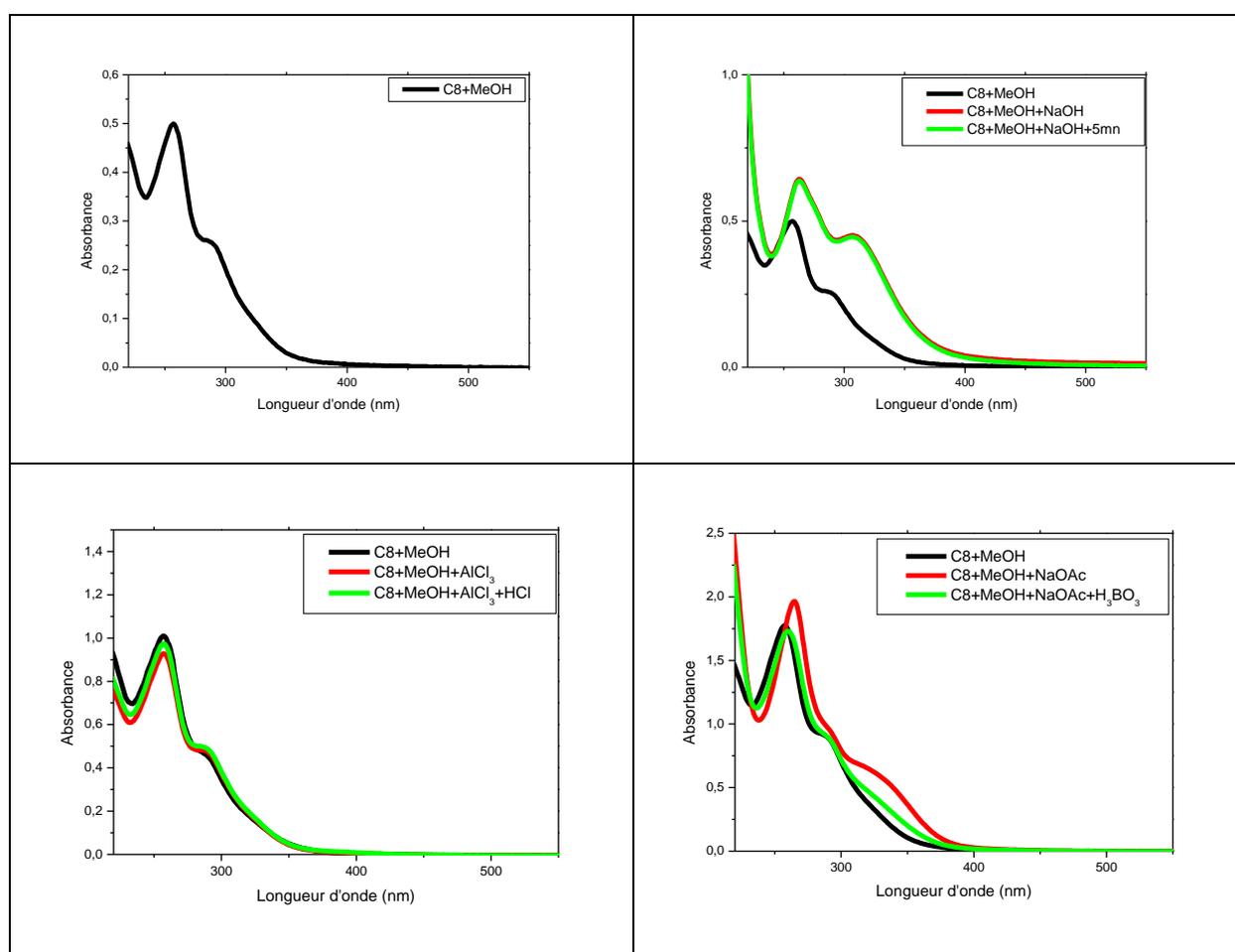


Le composé **C8** se présente sous forme d'une poudre blanche. Les données de la série spectrale UV-Vis (Spectre III-160) montrent :

- Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 286 nm sous forme d'un épaulement et une bande II à 257 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 ($\Delta\lambda = +8$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH nous oriente vers la présence d'un OH libre en position 7.
- Le spectre enregistré en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ne montre aucun changement significatif comparativement à celui enregistré dans le méthanol, révélant ainsi l'absence d'un OH libre en position 5 et également l'absence d'un système orthodihydroxylé dans la structure.



Spectre III-160: Série spectrale UV-Vis du composé **C8**

Les données de la série spectrale UV-Vis sont représentées dans le tableau III-38 .

Tableau III-38 : Données de la série spectrale UV-Vis du composé **C8**

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes (nm)	Bande II (nm)
MeOH	286	-	257
+ NaOH	307	-	263
+ AlCl ₃	287	-	257
+ AlCl ₃ +HCl	284	-	257
NaOAc	315	292 Ep	265
NaOAc+H ₃ BO ₃	286	-	260
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

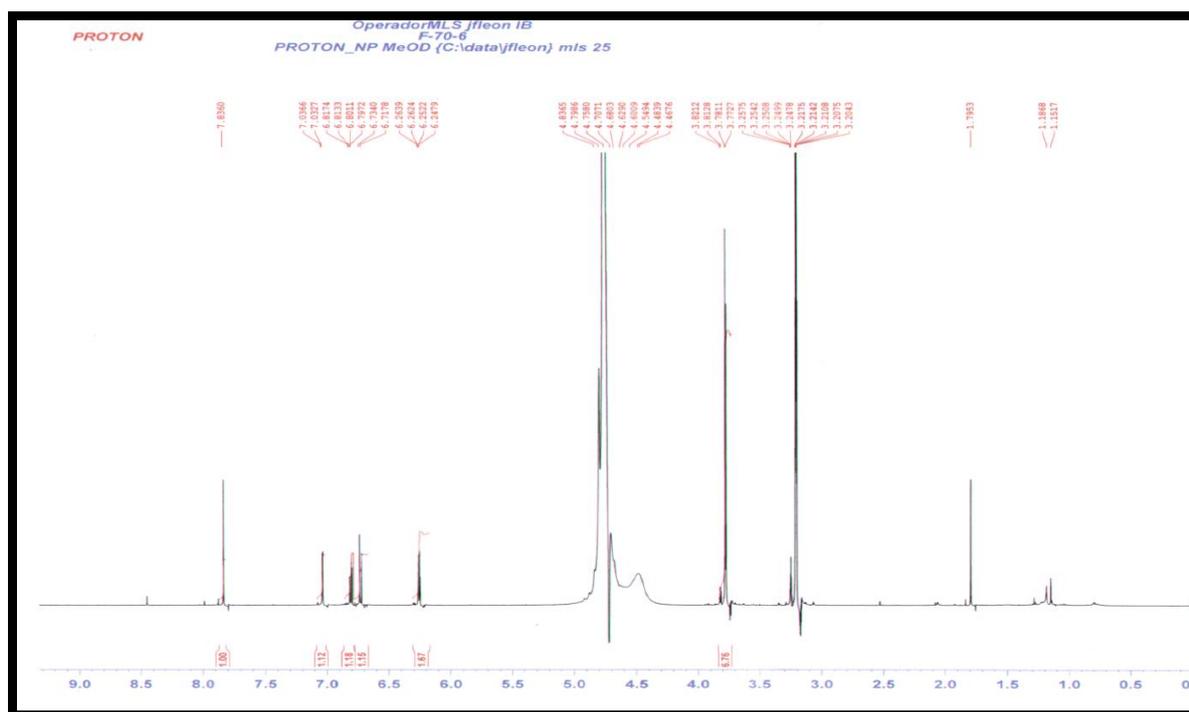
L'analyse du spectre de RMN ¹H (Spectre III-161) et son étalement (Spectre III-162) de ce composé enregistrés dans le CD₃OD montre la présence de :

- ✓ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,83$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- ✓ Un signal à $\delta_H = 7,03$ ppm, d'intégration 1H sous forme de doublet ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-2'.
- ✓ Un signal à $\delta_H = 6,72$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet large ($J = 8,1$ Hz) attribuable à H-5'.
- ✓ Un signal à $\delta_H = 6,80$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublets ($J = 8,1 ; 2,0$ Hz) attribuable à H-6'. Ces signaux indiquent une substitution du cycle B en positions 3' et 4'.
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 6,25$ et $6,26$ ppm, montrant un effet de toit, sont attribuables aux deux protons du cycle A indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7. Sur le spectre HSQC (Spectre III-163), le proton résonnant à $\delta_H = 6,25$ ppm sous forme de doublet avec une constante de couplage de type *mé*ta ($J = 2,1$ Hz) montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 95,47$ ppm, la valeur du déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du C-8. De ce fait le proton résonnant à $\delta_H = 6,25$ ppm sera attribué au H-8 et le proton résonnant à $\delta_H = 6,26$ ppm sera attribué au H-6. Cette donnée est en parfait accord avec la valeur du déplacement chimique de C-6 que l'on relève à $\delta_C = 97,29$ ppm sur le spectre HSQC (Spectre III-163). A ce stade de notre analyse il faut noter que les valeurs des déplacement chimiques des protons sont inversées par rapport à celles connues pour la plupart de composés flavoniques, cependant, ce cas n'est pas exceptionnel. Ces attributions sont confortées

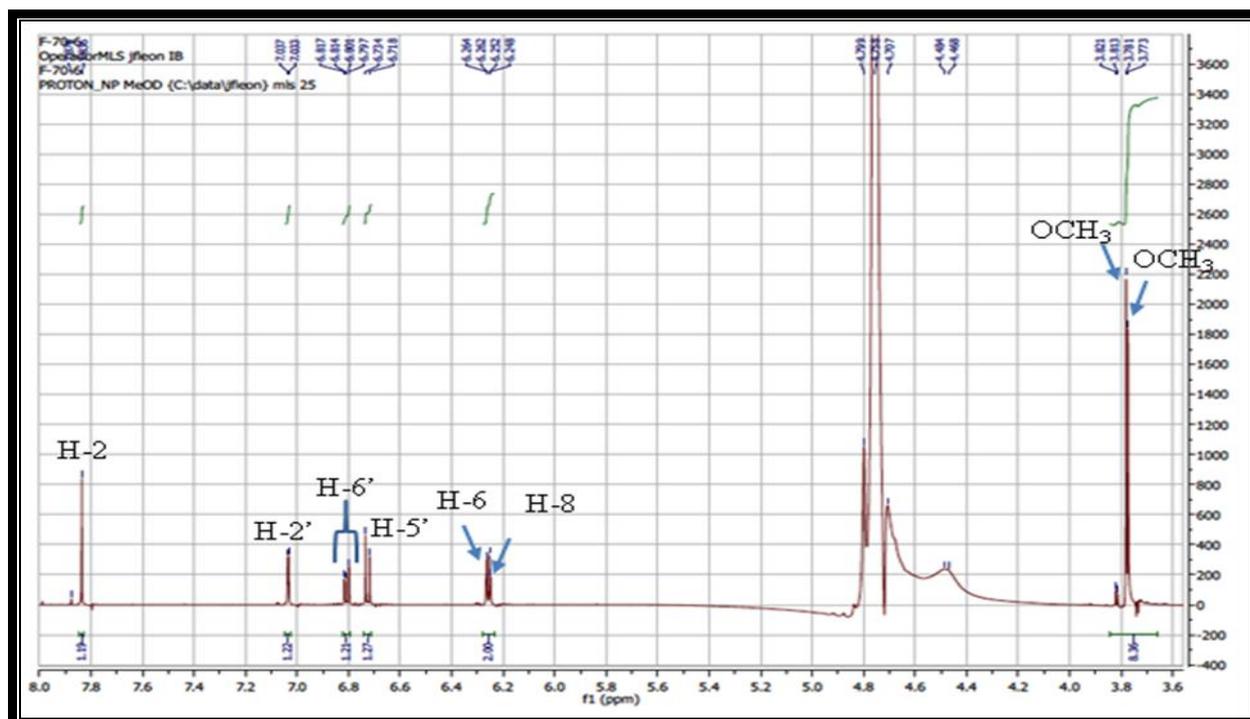
par le spectre ROESY (Spectre III-164) où le proton H-2 montre des interactions d'une part avec le proton H-8 et des interactions avec les protons H-2', H-5' et H-6' d'autre part.

- Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 3,77$ ppm et $\delta_H = 3,78$ ppm correspondant à des groupements méthoxyles (OCH_3).

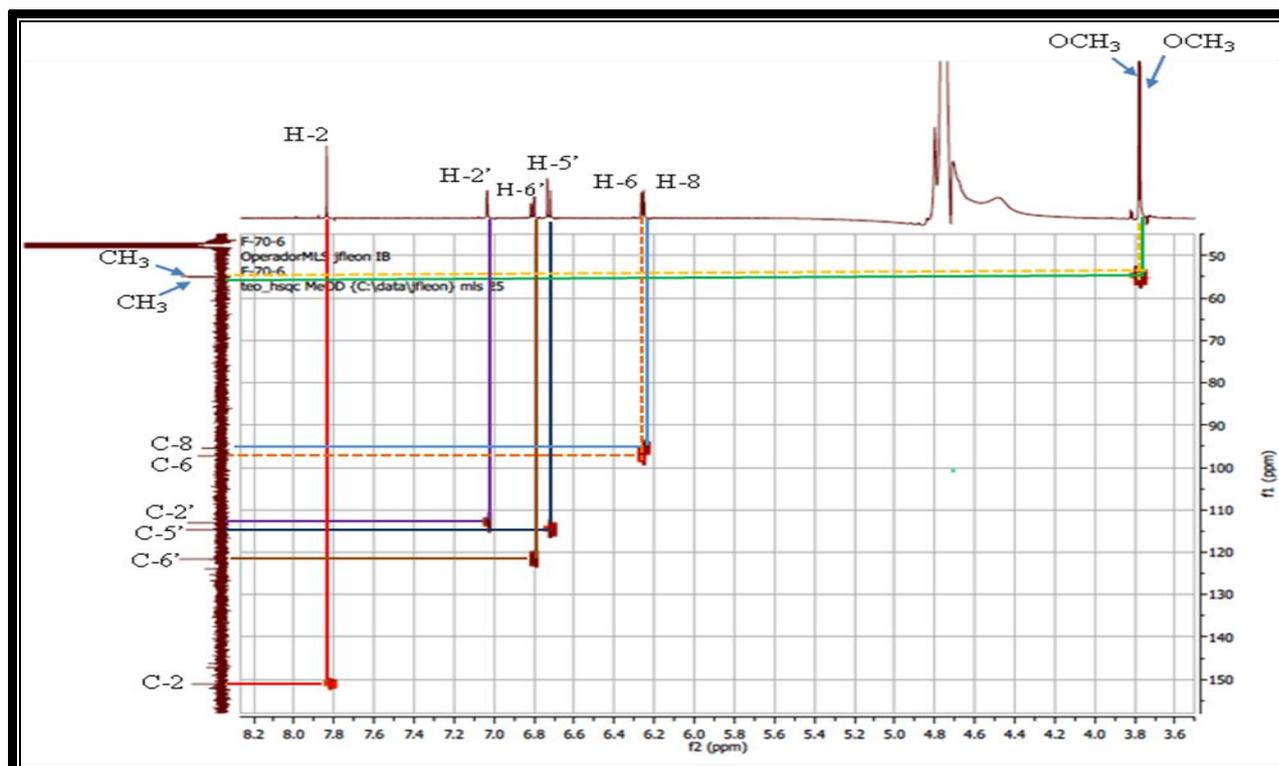
Les signaux de l'ensemble des protons de cette molécule sont très bien résolus sur le spectre proton (Spectre III-162).



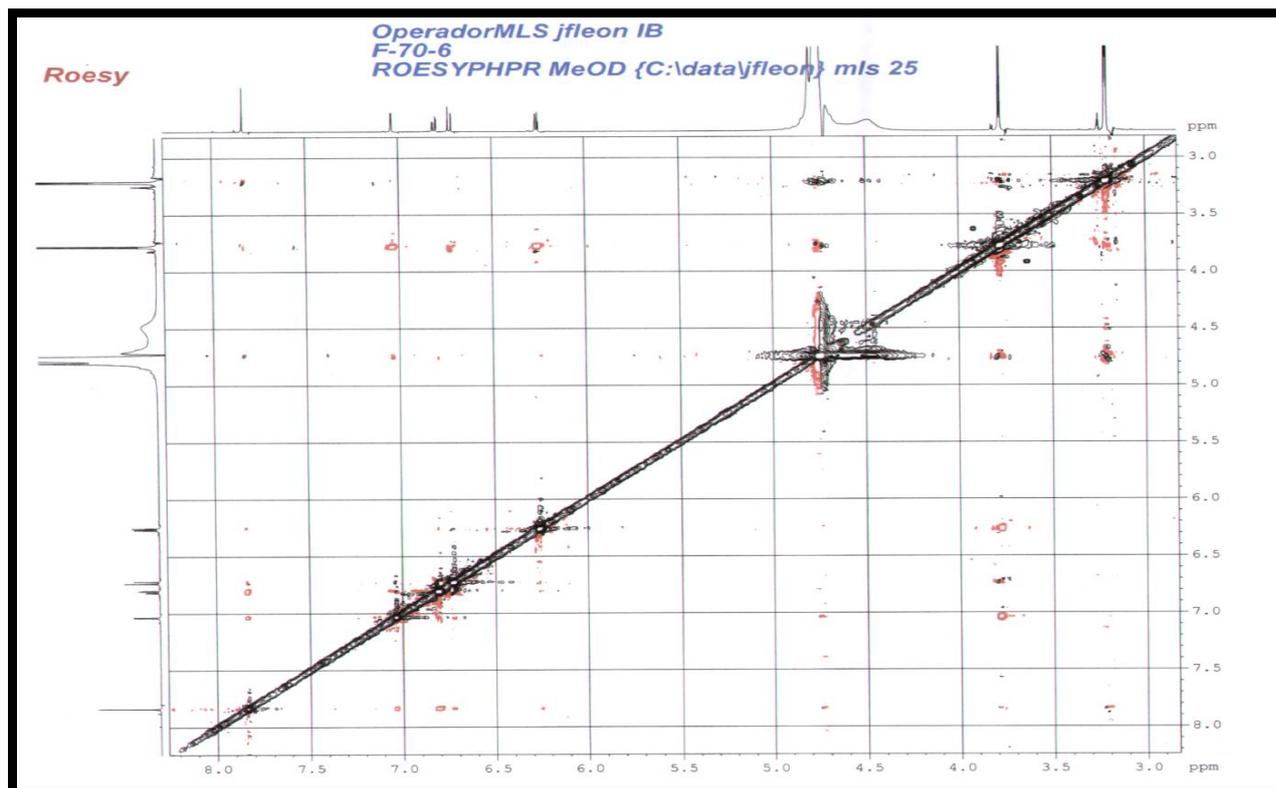
Spectre III-161: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C8**



Spectre III-162: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C8** (Etalement).



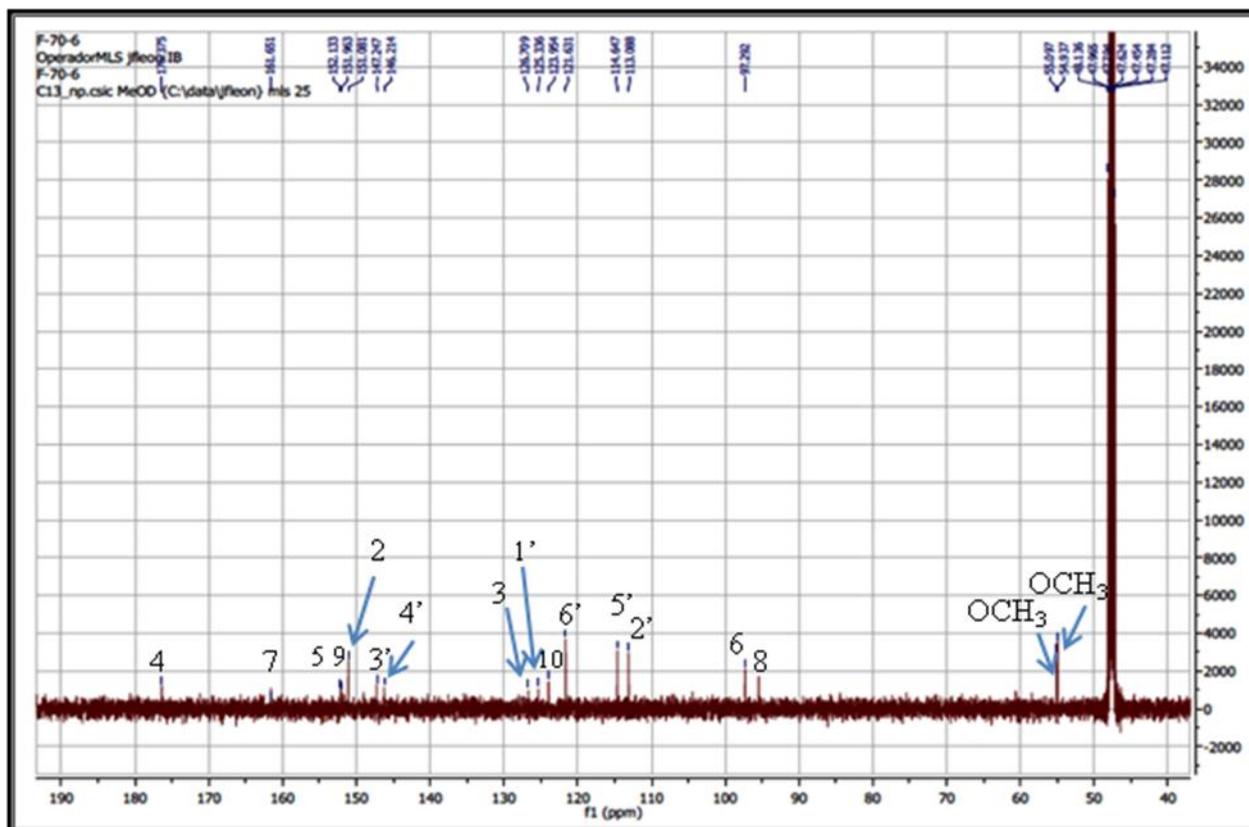
Spectre III-163 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C8**.



Spectre III-164: Spectre ROESY (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé **C8**.

Le spectre RMN ¹³C (Spectre III-165) révèle la présence de 17 signaux correspondant aux 15 atomes de carbones du squelette flavonique comportant deux groupements méthoxyles. L'analyse du spectre HSQC (Spectre III-163) de ce composé nous a également permis d'attribuer les carbones des groupements méthines et les groupements méthoxyles du squelette isoflavone notamment :

- Le signal à $\delta_C = 151,08$ ppm au carbone C-2 grâce à sa corrélation avec le proton H-2.
- Le proton H-2' permet la localisation du signal du C-2' à $\delta_C = 113,09$ ppm.
- Le proton H-5' permet la localisation de la résonance du C-5' à $\delta_C = 114,65$ ppm.
- Une corrélation entre le H-6' et le carbone à $\delta_C = 121,63$ ppm attribuable donc à C-6'.
- Les protons du groupement méthoxyyle résonnant à $\delta_H = 3,77$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 55,10$ ppm et ceux du méthoxyyle résonnant à $\delta_H = 3,78$ ppm corrélient avec le carbone à $\delta_C = 54,94$ ppm.



Spectre III-165 : Spectre RMN ^{13}C (125MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C8**.

Comme le spectre RMN du proton ne montre pas d'autres groupements nous pouvons donc placer les deux méthoxyles grâce au spectre relatif à l'expérience ROESY (Spectre III-164). En effet, les deux méthoxyles peuvent être localisés sur le squelette flavonique comme suit:

- Celui résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,77$ ppm en C-5 grâce à ses interactions ROESY avec H-6.
- Celui résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3,78$ ppm en C-3' grâce à son interaction ROESY avec le H-2'.

L'ensemble de ces données est en faveur de la structure du composé C-8 qui est le : **7, 4'-dihydroxy-5, 3'-méthoxy isoflavone**. Ce composé connu sous le nom de **gerontoisoflavone A** ou **orobol 5, 3'-dimethyl éther** (Figure III-46), a été isolé de *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontoea* (Moraceae) [97]. Il a été rencontré dans l'espèce *Hypericum oblongifolium* de la famille Hypericaceae [101]. C'est la première fois qu'il est isolé du genre *Crotalaria*.

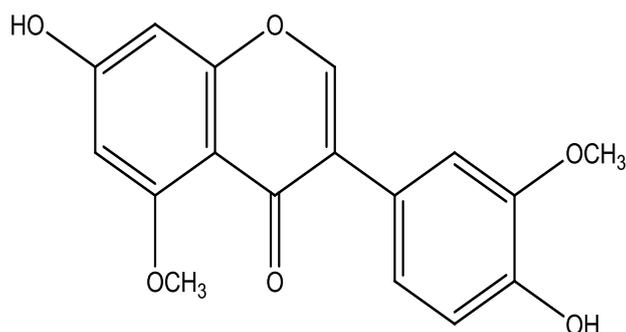
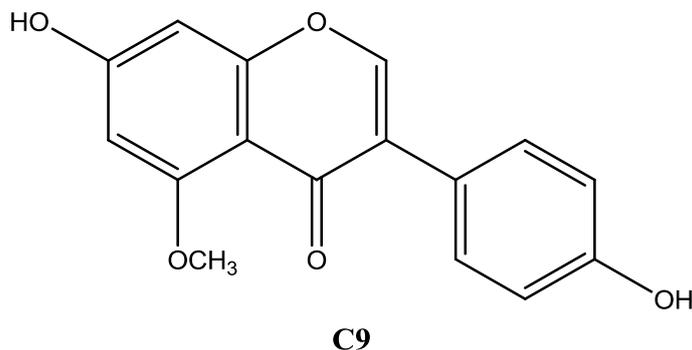


Figure III-46 : Structure du produit **C8** : gerontoisoflavone **A** ou orobol 5,3'-dimethyl éther

Les données relatives à la RMN ^1H et RMN ^{13}C complétées par celles de la littérature sont représentées dans le tableau III-39.

Tableau III-39: Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ ppm, J/Hz) du composé **C8**

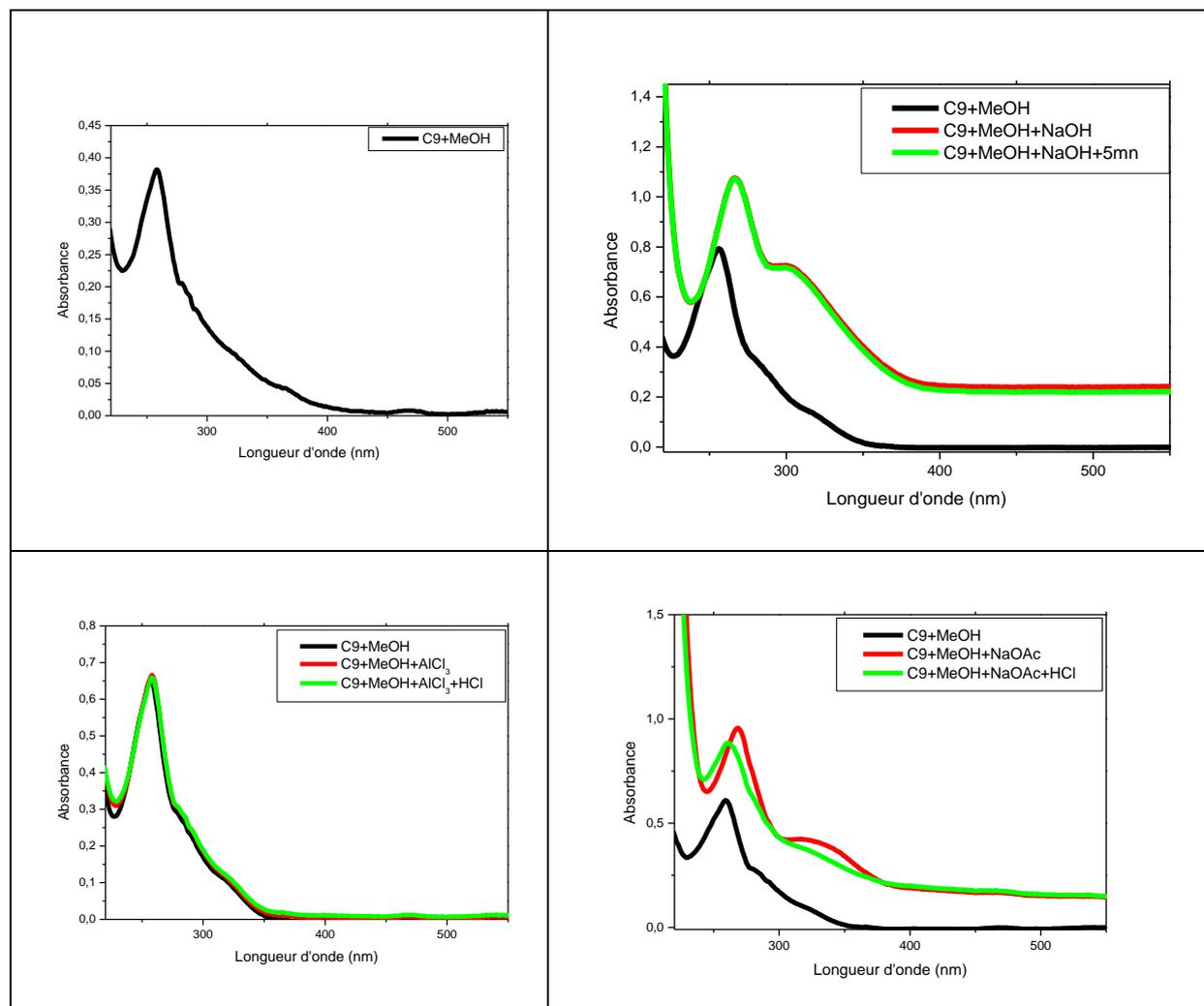
Position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	151,08	7,83	1H	s	-
3	126,70	-	-	-	-
4	176,37	-	-	-	-
5	152,13	-	-	-	-
6	97, 29	6,26	1H	d	2,0
7	161,65	-	-	-	-
8	95,47	6,25	1H	d	2,0
9	151,96	-	-	-	-
10	123,95	-	-	-	-
1'	125,33	-	-	-	-
2'	113,08	7,03	1H	d	2,0
3'	147,24	-	-	-	-
4'	146,21	-	-	-	-
5'	114,64	6,72	1H	d	8,1
6'	121,63	6,80	1H	dd	8,1 ; 2,0
$\text{OCH}_3\text{-5}$	55,09	3,77	3H	s	-
$\text{OCH}_3\text{-3'}$	54,93	3,78	3H	s	-

III-2-2-i- Elucidation structurale du composé C9

Le composé **C9** se présente également, comme le composé **C8**, sous forme d'une poudre amorphe blanche. La totale similitude de son spectres UV-Vis (Spectre III-166) avec celui du composé **C8** discuté précédemment permet d'affirmer que le composé **C9** est également un isoflavone.

Les données de la série spectrales UV-Vis (Spectre III-166) de ce composé montrent :

- Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, une bande I à environ 279 nm sous forme d'un épaulement et une bande II à 258 nm confirmant la structure d'une isoflavone qui est caractérisée par une couleur orange sous lumière de Wood.
- L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +11$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.
- Le spectre enregistré en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ne montre aucun changement significatif comparativement à celui enregistré dans le MeOH révélant ainsi la présence d'un O-R en position 5.



Spectre III-166 : Série spectrale UV-Vis du composé C9

Les données relatives de la série spectrale UV-Vis de ce composé, sont regroupées dans le tableau III-40 .

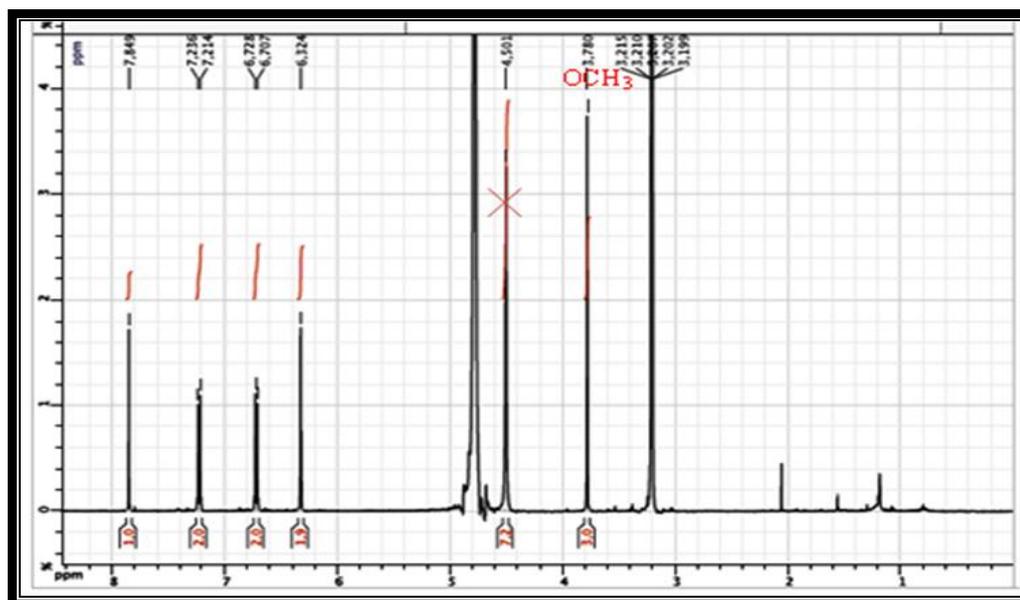
Tableau III-40: Données de la série spectrale UV du composé C9

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bandes (nm)	Bande II (nm)
MeOH	279 Ep.	-	258
NaOH	299	-	266
AlCl ₃	280	-	258
AlCl ₃ +HCl	280	-	258
NaOAc	325	-	269
NaOAc+H ₃ BO ₃	308	-	261
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

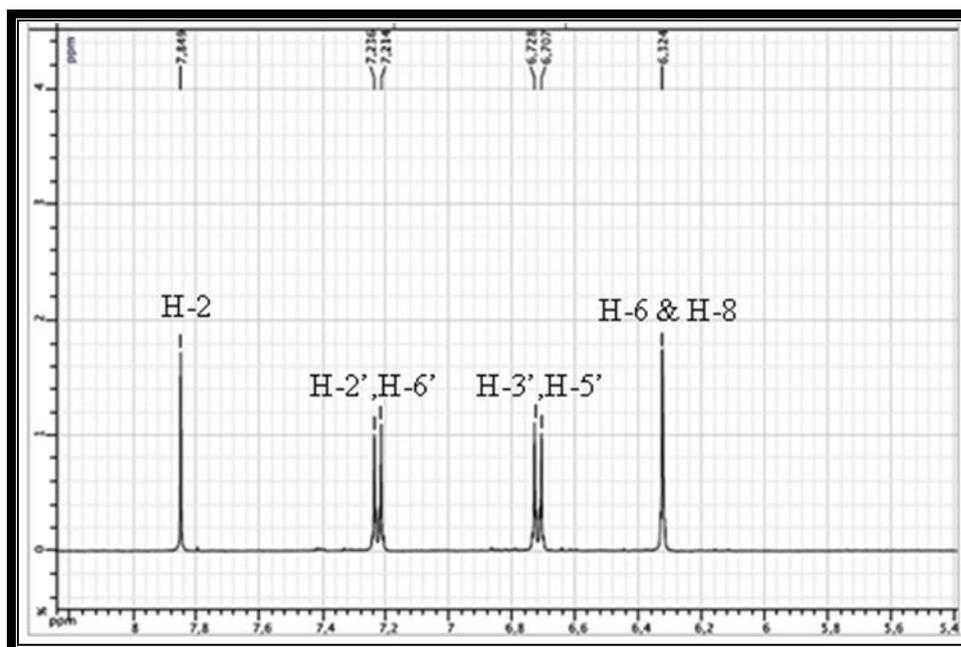
L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre III-167) et son étalement (Spectre III-168) montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone.

On reconnaît :

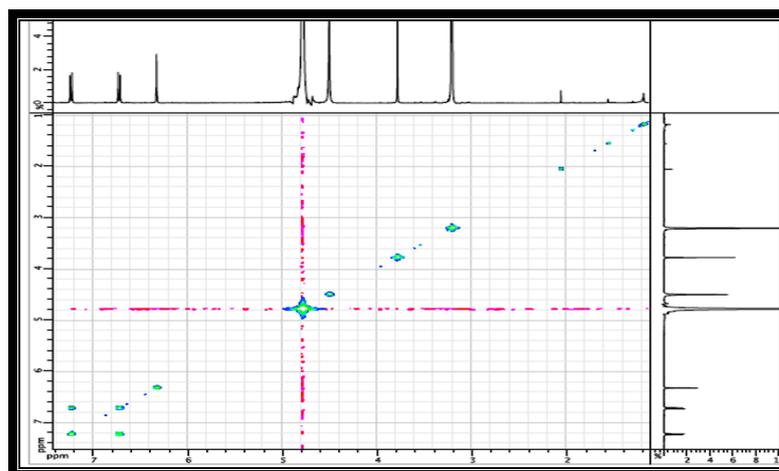
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 7,85$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.
- Deux doublets à $\delta = 7,22$ et $6,71$ ppm ($J = 8,8$ Hz), d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'. Ceci est confirmé par les taches de corrélations observées entre ces protons dans le spectre COSY (Spectre III-169) confirmant le couplage ortho.
- Un singulet large à $\delta = 6,32$ ppm intégrant pour 2 protons du cycle A : il s'agit en fait les protons H-6 et H-8, indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.
- Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,78$ ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.



Spectre III-167: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé C9



Spectre III-168: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C9** (Etalement).

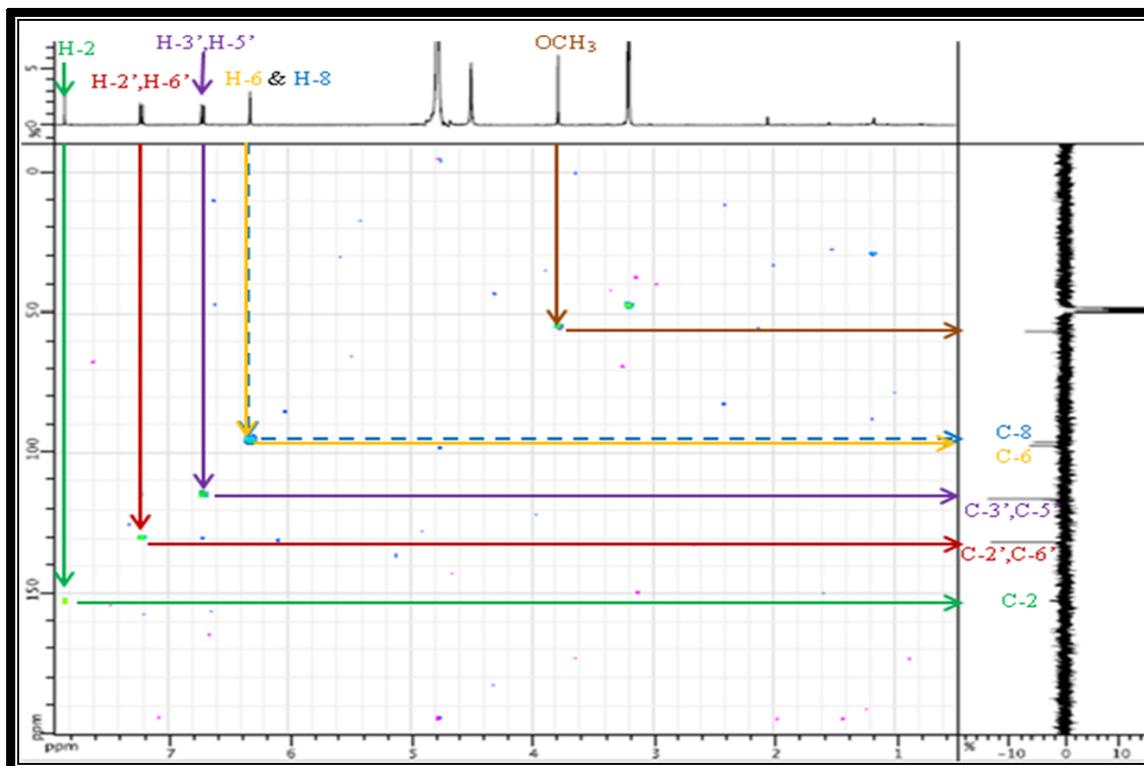


Spectre III-169 : Spectre COSY (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C9**

L'étude du spectre de corrélation HSQC (Spectre III-170) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-2 et C-2 à $\delta_{\text{C}} = 152,45$ ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2'et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta_{\text{C}} = 131,57$ ppm. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta_{\text{C}} = 116,08$ ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta_{\text{C}} = 97,55$ ppm qui est le C-6.

- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à $\delta_C = 96,20$ ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et leur atome de carbone à $\delta_C = 56,47$ ppm.



Spectre III-170 : Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé **C9**

L'absence d'autres signaux correspondant aux groupements hydrocarbonés sur le spectre RMN ¹H laisse supposer la présence d'un OH libre en position 4'. La combinaison des résultats de la RMN ¹H ainsi que ceux la série spectrale UV-Vis permet de localiser le groupement méthoxyle en position C-5. Ce qui mène à la structure reportée dans la figure III-47, c'est la **Génistéine 5-méthyl éther**. Elle est également connue sous le nom d'**Isoprunétine**. Cette molécule est très commune dans la famille des Fabaceae et surtout dans le genre *Genista* comme : *Genista ephedroides*[70], *Genista aspalathoides* Lamk ssp. *aspalathoides* M. [102] et *Genista quadriflora munby* [73] et dans d'autres genres comme *Ulex europaeus* [103]. Elle a été rencontré également dans d'autres espèces de la famille Moraceae comme *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontooea* [97].

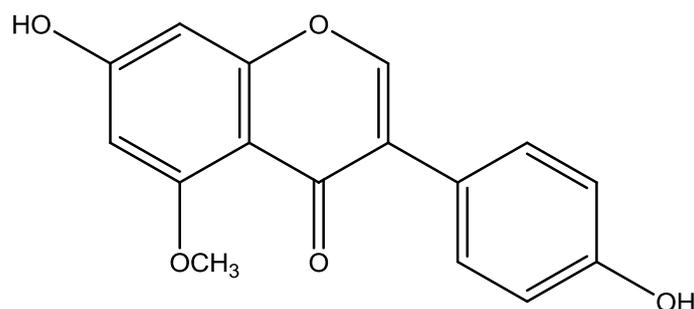
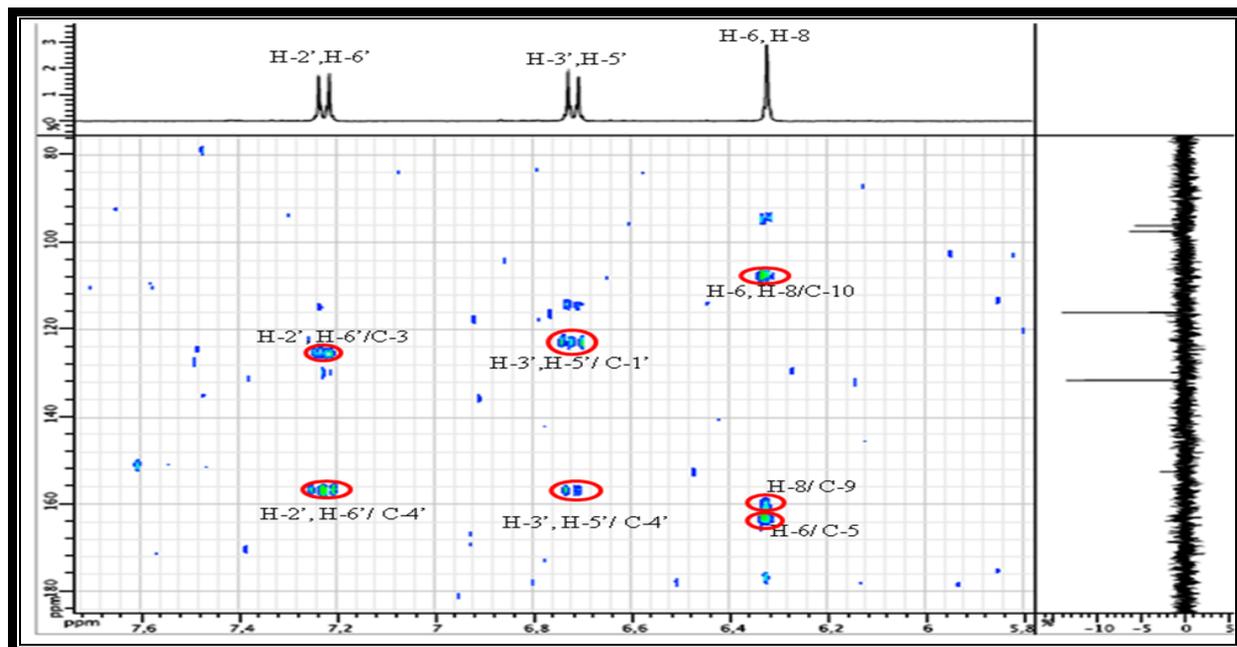


Figure III-47 : Structure du composé **C9**, isoprunétine.

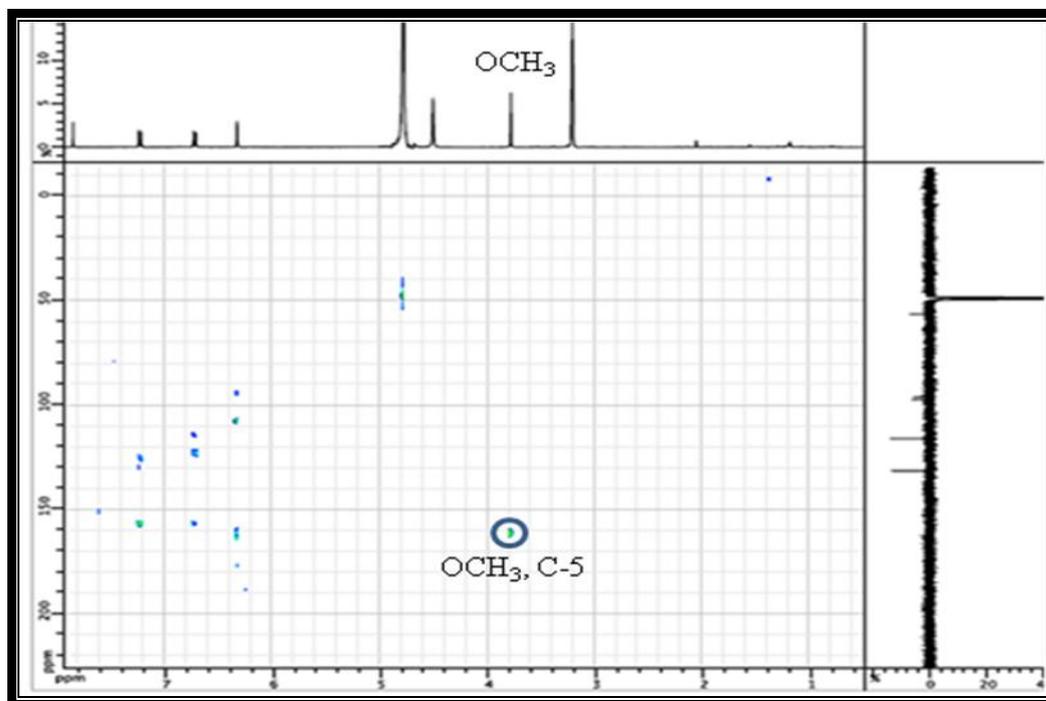
Les attributions des carbones restants sont complétées suite à leurs corrélations avec les protons situés à deux et trois liaisons de ces carbones sur le spectre HMBC (Spectre III-171 et son étalement spectre III-172). En effet, le proton H-6 permet la localisation des carbones C-10 et C-5 respectivement à $\delta_C = 109,41$ ppm et $163,05$ ppm. Le proton H-8 permet la localisation du signal C-9 à $\delta_C = 161,48$ ppm. Les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' permettent aisément de confirmer l'attribution du C-4' à $\delta_C = 158,52$ ppm. Les protons H-2', H-6' permettent la localisation du signal du C-3 à $\delta_C = 124,57$ ppm. Les protons H-3', H-5' permettent l'attribution du C-1' à $\delta_C = 127,02$ ppm. On note enfin la corrélation entre le proton H-8 et le carbonyle C-4 résonnant à $\delta_C = 177,78$ ppm.

Suite à toutes ces attributions, le signal à $\delta_C = 164,77$ ppm et restant non attribué sur le spectre RMN ^{13}C (Spectre III-173), la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné, comme tous les carbones du spectre ont été identifiés sauf le C-7, il est évident que ce carbone est assigné au C-7 (noyau A) du squelette flavonique.



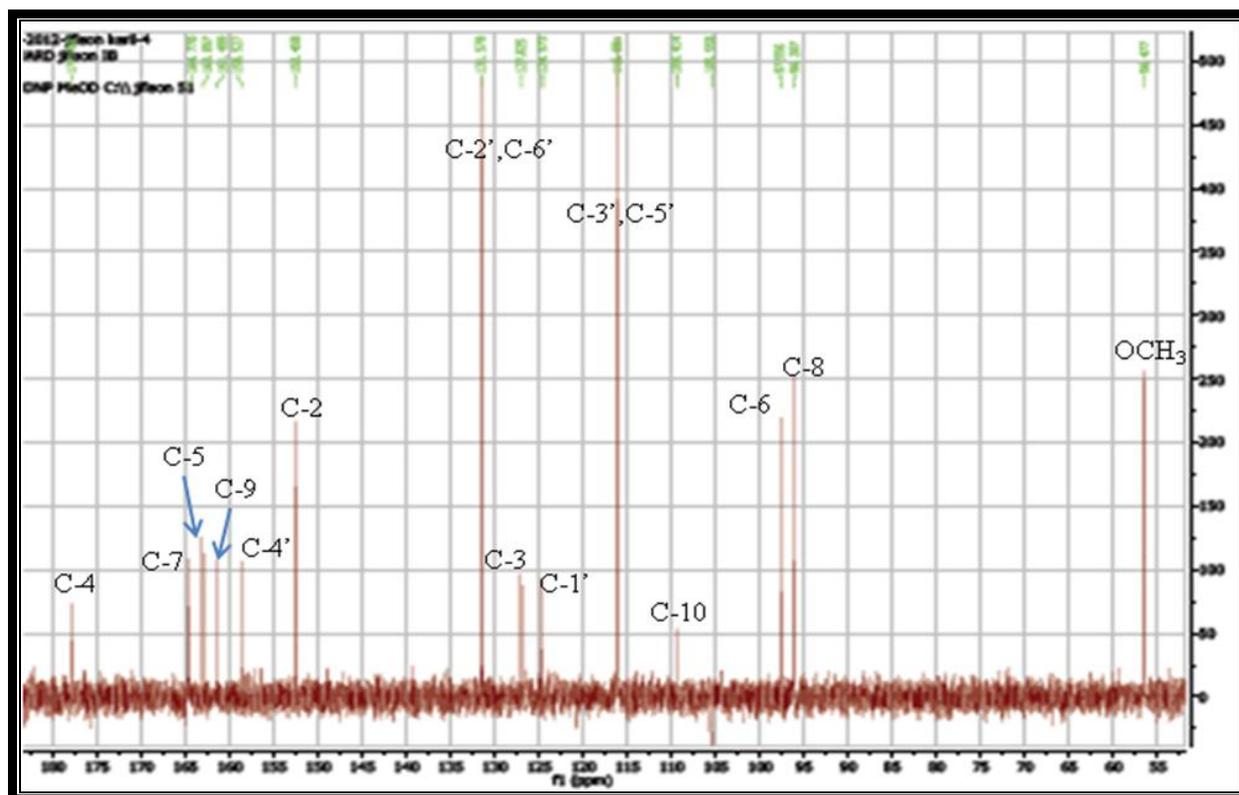
Spectre III-171 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé **C9**

Le positionnement du groupement méthoxyle est également consolidé par la tache de corrélation observée dans le spectre de l'expérience HMBC (Spectre III-173) entre les protons de ce méthoxyle et le carbone résonnant à $\delta = 163,05$ ppm. La valeur de ce déplacement chimique est en faveur de son attribution au C-5.



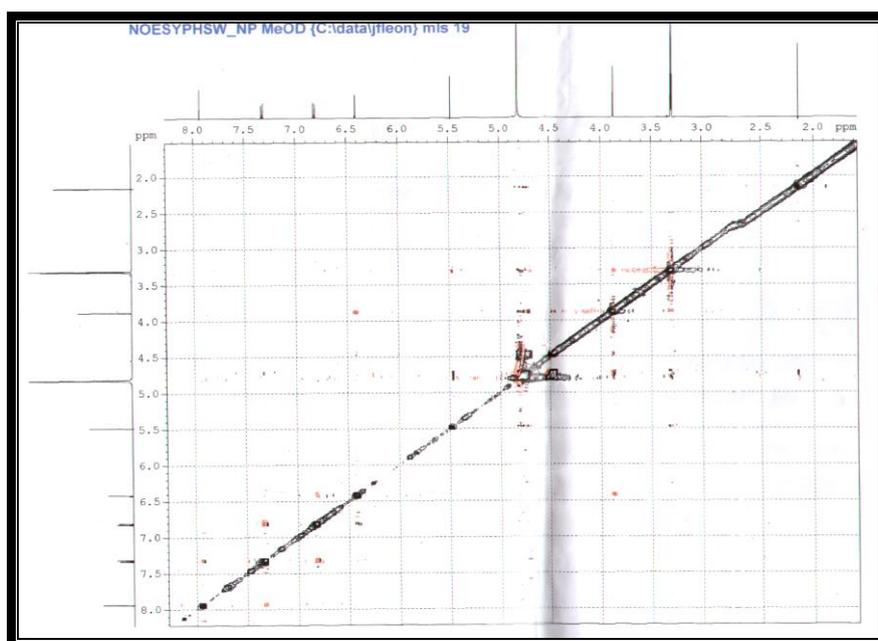
Spectre III-172 : Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé **C9** (Etalement).

L'attribution des carbones de la molécule est représentée dans le spectre RMN ¹³C.

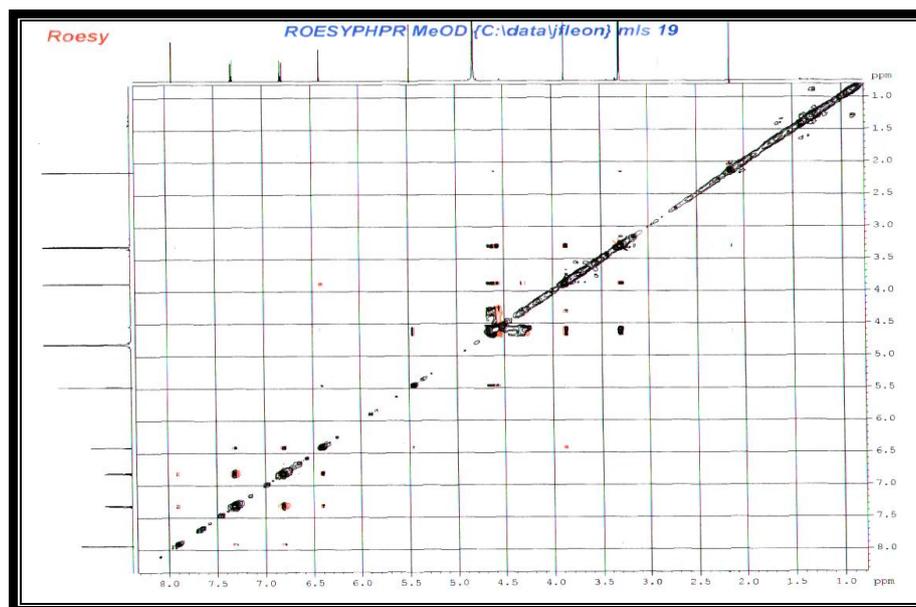


Spectre III-173 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C9**

Cette structure est appuyée par le fait que l'on observe sur le spectre relatif à l'expérience NOESY (Spectre III-174) et ROESY (Spectre III-175), que les protons du groupement méthoxyle montrent une tache de corrélation avec le proton H-6 confirmant ainsi la position de OMe en C-5.



Spectre III-174 : Spectre NOESY (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé **C9**



Spectre III-175 : Spectre ROESY (500 MHz, δ ppm) du composé **C9**

Les données relatives à la RMN ^1H et RMN ^{13}C comparées à celles de la littérature sont regroupées dans le tableau III-41.

Tableau III-41: Déplacements chimiques δ (ppm) ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) de **C9** (CD_3OD)

Position	δ_{C}	δ_{H}	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	152,45	7,85	1H	s	-
3	127,03	-	-	-	-
4	177,78	-	-	-	-
5	163,05	-	-	-	-
6	97,55	6,32	1H	sl	-
7	164,77	-	-	-	-
8	96,20	6,32	1H	sl	-
9	161,48	-	-	-	-
10	109,41	-	-	-	-
1'	124,57	-	-	-	-
2',6'	131,57	7,22	2H	d	8,8
3',5'	116,08	6,71	2H	d	8,8
4'	158,52	-	-	-	-

III-3- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait chloroforme des parties aériennes de *Asteriscus graveolens* a conduit à l'isolement et l'identification de 9 produits dont 3 nouveaux, il s'agit de : le stigmasterol et le β -sitosterol en mélange 57:43%, respectivement. La vanilline. (-)-asteriscunolides A, B, F, I et J. Ainsi l'acide (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque

L'étude de la composition chimique de *C. viallatei*, a concerné les extraits chloroforme et acétate d'éthyle et a conduit à l'isolement et l'identification de 15 produits dont **huit composés** ont été isolés de l'extrait chloroforme : le β -sitostérol, le lupéol et la bétuline, la vanilline, l'acétovanilline, le 4 hydroxy phenethyl cinnamate, le *p*-hydroxy benzaldéhyde et la tectochrysin. L'étude de l'extrait acétate d'éthyle a permis l'isolement et la détermination structurale de **neuf composés** qui sont : le *p*-hydroxybenzaldéhyde (isolé également de l'extrait chloroforme), l'isoliquiritigénine, le chrysoériol, la 8- prényl apigénine, l'hypolaétine 3'-methyl éther, la 8-prényl lutéoline, la génistéine, la gerontoisoflavone ou orobol 5,3'-dimethyl éther et l'isoprunétine.

Références bibliographiques

- [1] Harborne J B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd Edn., Chapman and Hall, London, 1998, 302:129-138.
- [2] Saloufou K I, Boyode P B, Simalou O, Eloho K, Melila M, Kpegba K, Novidzro KM, Gaslonde T, Michel S. Identification de deux phytostérols biologiquement actifs de l'extrait cyclohexanique des feuilles de *Ficus sur* (Moraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2017, 11(5): 2510-2520.
- [3] Ahmed Y, Rahman S, Akhtar P, Islam F, Rahman M and Yaakob Z. Isolation of steroids from *n*-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. *International Food Research Journal*. 2013, 20(5): 2939-2943.
- [4] Khatun M, Billah M, Quade MA. Sterols and sterol glucoside from *Phyllanthus* species. *The Dhaka University Journal of Science (Dhaka Univ. J. Sci.)* 2012, 60(1) : 5-10.
- [5] Kamboj A, Saluja AK. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011, 3(1) : 94-96.
- [6] Chaturvedula V S P, Prakash I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2012, 1(9): 239-242.
- [7] Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001 ; 281(1): 11-17.
- [8] Villaseñor IM, Angelada J, Canlas AP, Echegoyen D. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytotherapy Research*. 2002, 16 (5): 417-421.
- [9] Prieto JM, Recio MC, Giner RM. Antiinflammatory activity of beta-sitosterol in a model of oxazolone-induced contact delayed type hypersensitivity. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants)*. 2006, 5(3): 57- 62.
- [10] Desai F, Ramanathan M, Fink CS, Wilding GE, Weinstock-Guttman B, Awad AB. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol β -sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *International Immunopharmacology*. 2009, 9(1): 153-157.

- [11] Loizou S, Lekakis I, Chrousos G, Moutsatsou P. Beta-sitosterol exhibits antiinflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2010, 54(4): 551-558.
- [12] Baskar A A, Numair K S A, Paulraj MG, Alsaif MA, Muamar MA, Ignacimuthu S. β -Sitosterol Prevents Lipid Peroxidation and Improves Antioxidant Status and Histoarchitecture in Rats with 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer. *Journal of Medicinal Food*. 2012, 15(4): 335-343.
- [13] Ezzat MI, Ezzat SM, El Deeb KS, El Fishawy AM, El-Toumy SA. A new acylated flavonol from the aerial parts of *Asteriscus maritimus* (L.) Less (Asteraceae). *Natural Product Research*. 2016. Volume 30, pp 1753-1761; <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1138298>.
- [14] Kaur N, Chaudhary J, Jain A, Kishore L. Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* . 2011, 2(9): 2259-2265.
- [15] Yusuf A J, Abdullahi M I, Aleku G A, Ibrahim I A A, Alebiosu I O, Yahaya M, Adamu H W, Sanusi A, Mailafiya M M , Abubakar H. Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*. *Journal of Medicinal Plants For Economic Development*. 2018, 2(1) : 1-5.
- [16] Bakrim S, Benkhaira N, Bourais I, Benali T, Lee LH, El Omari N, Sheikh R A , Goh K W, Ming L C, Bouyahya A. Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol. *Antioxidants*. 2022, 11, 1912-1943.
- [17] Lifsey H C, Kaur R, Thompson B H, Bennett L, Temel R E, Graf G A. Stigmasterol stimulates transintestinal cholesterol excretion independent of liver X receptor activation in the small intestine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2020, 76:108263.
- [18] Yenn T W, Khan M A , Syuhada N A , Ring L C, Ibrahim D, Tan W N. Stigmasterol: An adjuvant for beta lactam antibiotics against beta-lactamase positive clinical isolates. *Steroids* .2017, 128: 68-71.
- [19] Pratiwi R, Nantasenamat C, Ruankham W, Suwanjang W, Prachayasittikul V, Prachayasittikul S and Phopin K. Mechanisms and neuroprotective activities of stigmasterol against oxidative stress-induced neuronal cell death via Sirtuin family. *Frontiers in Nutrition*. 2021, 8: 648995.1-12.
- [20] Sultana N, Khalid A. Phytochemical and enzyme inhibitory studies on indigenous medicinal plant *Rhazya stricta*. *Natural Product Research*. 2010, 24(4):305–314.
- [21] Triana J, Eiroa JL, Morales M, J. Pérez FJ, Brouard I, Quintana J, Estévez MR, Estévez F, León F. Sesquiterpenoids isolated from two species of the *Asteriscus* Alliance. *Journal of Natural Products*. 2016, 79:1292 –1297.

- [22] Kwon HC, Lee KR. Phytochemical constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. Archives of Pharmacal Research. 2001, 24 (3): 194-197.
- [23] Mekhelfi T, Kerbab K, Guella G, Zaiter L, Benayache S and Benayache F. Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. Der Pharmacia Lettre. 2014, 6 (1):152-156.
- [24] Youssef D, Frahm A. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; III. Phenolic constituents of the aerial parts. Planta Medica. 1995, 61(6): 570-573.
- [25] San Feliciano A, Barrero A F, Medarde M, Miguel del Corral, J M., Aramburu Aizpiri A, Sánchez-Ferrando F, Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron*. 1984, 40 : 873–878.
- [26] San Feliciano, A, Barrero, A F, Medarde M, Miguel del Corral, J M, Ledesma E, Sánchez-Ferrando F. Asteriscunolide A: humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. *Tetrahedron Letters*. 1982, 23 : 3097–3100.
- [27] San Feliciano A, Barrero A F, Medarde M., Miguel Del Corral J M, Aramburu A, Perales A, Fayos J, Sánchez-Ferrando F., The stereochemistry of asteriscunolides: an Xray based correction. *Tetrahedron*. 1985, 41 : 5711–5717.
- [28] El Dahmy S, Jakupovic J, Bohlmann, F, Sarg T M. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*, 1985, 41 : 309–316.
- [29] Jakupovic J, Lehmann L, Bohlmann F, Arroyo Hogdson A. Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. *Phytochemistry*. 1987, 26(10): 2854–2855.
- [30] Bohlmann F, Pauls A. Humulane derivatives from *Nauplius intermedius*. *Phytochemistry*, 1992, 31 : 1663–1665.
- [31] Rauter A P, Branco I, Bermejo J, González A G, García-Grávalos M D, San Feliciano A, Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochemistry*. 2001, 56 : 167–171.
- [32] Akssira, M, Mellouki F, Salhi A, Alilou H, Saouf A, El Hanbali F, Arteaga J F, Barrero A F. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* subsp. *odorus*. *Tetrahedron Letters*, 2006, 47 : 6719–6721.
- [33] Chaari A, Jannet H B, Mighri Z, Robinot C, Kunesch N. Isolation and structure determination of a new sesquiterpene lactone from *Nauplius aquaticus*. *Natural Product Letters*, 2001, 15(6):419-23. doi: 10.1080/10575630108041312.
- [34] Trost B M, Burns AC, Bartlett M J, Tautz T, Weiss A H. Thionium ion initiated medium-sized ring formation: the total synthesis of asteriscunolide D. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, 134 : 1474–1477.

- [35] Fernandes R A, Chavan V P. A 12-membered to a strained 11-membered ring: first stereoselective total synthesis of (-)-asteriscunolide C. *Chemical Communications*. 2013, 49 (32) : 3354–3356.
- [36] Liang Y, Jiang X, Fu X F, Ye S, Wang T, Yuan J, Wang Y, Yu Z X. Total Synthesis of (+)-Asteriscanolide: Further Exploration of the Rhodium(I)-Catalyzed [(5+2)+1] Reaction of Ene-Vinylcyclopropanes and CO. *Chemistry—An Asian Journal*. 2012, 7(3) : 593–604.
- [37] Han J C, Li F, Li C C. Collective synthesis of humulanolides using a metathesis cascade reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2014 ; 136 : 13610–13613.
- [38] Hammoud L, León F, Brouard I, Gonzalez-Platas J, Benayache S, Mosset P, Benayache F. Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron Letters*. 2018, 59 (27) : 2668–2670.
- [39] Boumaraf M, Carbone M, Ciavatta ML, Benyahia S, Ameddah S, Menad A, Benayache S, Benayache F, Gavagnin M. Exploring the Bioactive Terpenoid Content of an Algerian Plant of the Genus *Pulicaria*: The *ent*-Series of Asteriscunolides. *Journal of Natural Products*. 2017, 80 (1) : 82–89.
- [40] Wang B, Hu H. Flavonoids from *Tartary Buckwheat* Seeds. *Asian Journal of Chemistry*. 2013 ; 25 (4) : 2012-2014.
- [41] Benabderahmane W, Mezrag A, Bouheroum M, Benayache F, Mosset P. The chemical investigation of the chloroformic extract of *Ononis angustissima* Lam. species. *Der Pharmacia Lettre*. 2014, 6 (3): 88-91.
- [42] Ogweno Midiwo J, Owino N O, Dagne E. Flavonoids of *Polygonum senegalense* part III : Isolation of dihydrochalcone glucoside and quercetin glucosides. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 1994, 8(2) : 79-84.
- [43] Jaipetch T, Reutrakul V, Tuntiwachwuttikul P, Santisuk T, Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry*. 1983, 22(2) : 625–626.
- [44] Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Muñoz-Martínez F, Bates S E, Castanys S, Gamarro F, Pietro A D, Pérez-Victoria J M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Research*. 2005, 65 (11):4852-4860.
- [45] Karliner J, Djerassi C. Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbon. *The Journal of Organic Chemistry*. 1966, 31(6) :1945-1956.

- [46] Mahato S B, Kundu A P. ¹³C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 1994, 37(6) : 1517-1575.
- [47] Culioli G, Mathe C, Archier P, and Vieillescazes C. A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp, *Burseraceae*). *Phytochemistry*. 2003, 62 (4) : 537-541.
- [48] Meselhy M R, and Aboutabl E S A. Hopane-type saponins from *Polycarpon succulentum* growing in Egypt. *Phytochemistry*. 1997, 44 (5) : 925-929.
- [49] Endale A, Wray V, Murillo R, Schmidt P C, and Merfort I. Hopane-type saponins from the seeds of *Glinus lotoides*. *Journal of Natural Products*.2005, 68 (3): 443-446.
- [50] Pereira F B M, Domingues F M J, and Silva A M S. Triterpenes from *Acacia dealbata*. *Natural Product Letters*.1996, 8 : 97-104.
- [51] Ali M, Heaton A, and Leach D. Triterpene Esters from Australian Acacia. *Journal of Natural Products*.1997 ; 60 : 1150-1156.
- [52] Mutai C, Abatis D, Vagias C, Moreau D, Roussakis C, and Roussis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry* .2004, 65(8) : 1159-1164.
- [53] Habib M R, Nikkon F, Rahman M, Haque M E, Karim M R. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from methanolic extract of root bark of *Calotropis gigantean* (Linn). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007 ; 10 (22): 4174-4176.
- [54] Ko H H, Weng J R, Tsao LT, Yen M H, Wang J P, Lin C N. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004; 14 (4) : 1011-1014.
- [55] Singh, B, Dubey M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen ex. Retz. *in vivo* and *in vitro*. I. Antimicrobial screening. *Phytotherapy Research*.2001; 15 (3) : 231–234.
- [56] Villarreal M L, Alvarez L, Alonso D, Navarro V., Garcia P, Delgado G. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*.1994 ; 42 (1) : 25-29.
- [57] Singh B, Sahuand P M, Sharma M K. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. *Phytomedicine*. 2002 ; 9(4) : 355–359.
- [58] Dae-sup P, Choi S Z, Ran K K, Mee LS , Ro L K. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. *Journal of applied Pharmacology*. 2004 ;11(4) : 1-4.
- [59] Jang D S- J, Han A-R , ParkG, Jhon G-J , Seo E-K. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. *Archives of Pharmacal Research*. 2004; 27 (4): 386-389.

- [60] Mohamadi S, Zhao M, Amrania A, Marchioni E, Zama D, Benayache F, Benayache S. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. & Dur. *Industrial Crops and Products*. 2015; 76:910-919.
- [61] Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, St'évigny C, Duez P, Benayache F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016; 9(6): 554–561.
- [62] Syeda F. Asghar , Shahid Aziz, Habib-ur-Rehman, Ishtiaq Ahmed , Hidayat Hussain , Atta-ur-Rahman and Muhammad I. Choudhary. Secondary Metabolites Isolated from *Iris germanica*. *Records of Natural Products*. 2009 ; 3(3) :139-152.
- [63] Dominguez X A and Pugliese O. A chemical study of *Mammillaria runyoni*: The isolation of acetovanillone and a new triterpenoid, mamillarol. *Planta Medica*. 1967; 15(4):401-403.
- [64] Finnemore H. The Constituents of Canadian Hemp. Part I. Apocynin. *Journal of the Chemical Society*. 1908 ; 93 (2): 1513–1519.
- [65] Petrônio M S, Zeraik M L, Luiz Marcos da Fonseca and Valdecir F. Ximenes. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. *Molecules* 2013 ; 18 : 2821-2839.
- [66] Palmen M J H J, Beukelman C J , Mooij R G M, Pena A S, van Rees, E.P. Anti-inflammatory effect of apocynin, a plant-derived NADPH oxidase antagonist, in acute experimental colitis. *The Netherlands Journal of Medicine*. 1995 ; 47 (2): 41.
- [67] Chwan-Fwu Lin, Chien-Chang Shen, Chien-Chih Chen, Shuenn-Jyi Sheu, Yu-Ling Huang. Phenolic derivatives from *Aster indicus*. *Phytochemistry*. 2007 ; 68 :2450–2454.
- [68] Kuo P.-C., Yang M.-L., Wu P.-L., Shih H.-N., Thang T.D., Dung N.X., Wu T.-S. Chemical constituents from *Abutilon indicum*. *Journal of Asian Natural Products Research* . 2008 ; 10(7): 689-693.
- [69] Tijjani A, Ndukwe I G and Ayo RG. Isolation and Characterization of Lup-20(29)-ene-3, 28- diol (Betulin) from the Stem-Bark of *Adenium obesum* (*Apocynaceae*) .*Tropical Journal of Pharmaceutical Research* . 2012; 11 (2): 259-262.
- [70] Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Manunta A. Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products*. 1998; 61(11) :1404-1406.
- [71] Perkin A.G and Newbury FG. LXXIX.—The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). *Journal of the Chemical Society*. 1899; 75 : 830-839.

- [72] Asres K, Mascagni P, O'Neill M J, and Phillipson J D. Isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus* (Bolus) Harms Leguminosae. Z. Naturforsch. 1985 ; 40 c : 617-620.
- [73] Boukaabache R, Boubekri N, Boumaza O, Mekkiou R , Seghiri R, Sarri D, Zama D, Benayache F and Benayache S. Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genista quadriflora munby* (Fabaceae). Der Pharmacia Lettre. 2013 ; 5 (6):56-59.
- [74] Mekkiou R, Seghiri R, Boumaza O, Chebbah K, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. Secondary metabolites from *Genista ferox*. Chemistry of Natural Compounds . 2012 ; 48 (4) : 710-711.
- [75] Morgan A M A, Jeon M N, Jeong M H, Yang S Y, and Kim Y H. Chemical components from the stems of *Pueraria lobata* and their tyrosinase inhibitory activity . Natural Product Sciences. 2016 : 22(2) : 111-116.
- [76] Zhang Z, Yuan W, Wang P, Grant G. Li S. Flavonoids from *Lupinus texensis* and their free radical scavenging activity. Natural Product Research. 2011 ; 25(17) : 1641-1649.
- [77] He J, Fan P , Feng S, Shao P , Sun P . Isolation and purification of two isoflavones from *Hericium erinaceum* mycelium by high-speed counter-current chromatography. Molecules. 2018, 23(3):560-569.
- [78] Almahy H A and Alhassan N I. Studies on the chemical constituents of the leaves of *Ficus bengalensis* and their antimicrobial activity. Journal of Science and Technology. 2011 ; 12 (01) : 111-116
- [79] Wang F, Jiang K and Li Z. Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract. Chinese Journal of Chromatography. 2007 ; 25 (4): 509-513.
- [80] Reynaud J, Guilet D, Terreux R, Lussignol M and Walchshofer N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. Natural Product Reports. 2005 ; 22(4) : 504 – 515.
- [81] Tidke S A, Mahajankatti A, Devasurmurt Y, Devappa R, Vasist K S, Kosturkova G P and Gokare R A. Assessment of anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties of isoflavones present in soybean research. Journal of Phytochemistry. 2018, 12 (1): 35-42.
- [82] Mukund V , Mukund D, Sharma V, Mannarapu M, Alam A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. Critical Reviews in Oncology / Hematology. 2017 ;119 : 13-22.
- [83] Jiang Z Y, Jiang S Q, Lin Y C, Ma X Y, Xi P B, Cao T and Wang X Q. Effect of genistein on antioxidative defence system and membrane fluidity in chick skeletal muscle cells. Asian Australasian Journal of Animal Sciences. 2008 ; 21(8) : 1220 – 1225.

- [84] Janeska B, Stefova M, Alipieva K. Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. *Acta Pharmaceutica*. 2007; 57 (3) : 371- 377.
- [85] Tomás-Lorente F, Ferreres F, Tomás-Barberán F A, Rivera D and Obon C. Some flavonoids and the diterpene borjatriol from some spanish *Sideritis* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1988 ; 16(1) : 33-42.
- [86] Hartwig U A, Maxwell C A, Joseph C M, and Phillips D A. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant physiology*.1990 ; 92(1):116-222.
- [87] Liu Y L, Mabry T J. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry*. 1982 ; 21(1):209- 214.
- [88] Bashyal P, Parajuli P, Pandey R P and Sohng J K. Microbial biosynthesis of antibacterial chrysoeriol in recombinant *Escherichia coli* and bioactivity assessment. *Catalysts*. 2019; 9(2):112-126.
- [89] Harborne J B, 1993. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman &Hall/CRC, London.
- [90] Prachayasittikul S, Buraparuangsang P, Worachartcheewan A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Ruchirawat S and Prachayasittikul V. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules*. 2008 ; 13(4) : 904-921.
- [91] Ma C J, Li G S, Zhang D L, Liu K, Fan X. One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005;1078 (1-2) : 188–192.
- [92] Veitch N C, Sutton P S E, Kite G C, and Ireland H E. Six new isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleia herbert-smithii*. *Journal of Natural Products*. 2003; 66 (2): 210–216.
- [93] Khamsan S, Liawruangrath S, Teerawutkulrag A, Pyne S G ,Garson M J , Liawruangrath B. The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. ssp. *rhombofolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. *Acta Pharmaceutica*. 2012 ; 62(2) : 181–190.

- [94] Lin P H, Chiang Y F , Shieh T M, Chen H Y, Shih C K, Wang T H, Wang K L , Huang T C, Hong Y H, Li S C and Hsia S M. Dietary compound isoliquiritigenin, an antioxidant from licorice, suppresses triple-negative breast tumor growth via apoptotic death program activation in cell and xenograft animal models. *Antioxidants*. 2020 ; 9(3) : 228-243.
- [95] Si L, Yang X, Yan X, Wang Y, and Zheng Q. Isoliquiritigenin induces apoptosis of human bladder cancer T24 cells via a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *Oncology Letters*. 2017;14 (1): 241-249.
- [96] Kajiyana K, Demizu S ; Hiraga Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Tamura Y, Okada K, and Kinoshita T. New prenylflavones and dibenzoylmethane from *Glycyrrhiza inflata*. *Journal of Natural Products*. 1992 ; 55, 9, 1197–1203.
- [97] Chang C H, Lin C C, Kadota S, Hattori M, and Namba T. Flavonoids and a prenylated xanthone from *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontogea* *Phytochemistry*. 1995 ; 40(3) : 945-947.
- [98] Paoletti T, Fallarini S, Gugliesi F, Minassi A, Appendino G, Lombardi G. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *European Journal of Pharmacology*. 2009 ; 620(1-3):120-130.
- [99] Edziri H, Mastouri M, Mahjoub M A, Mighri Z, Mahjoub A. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* Flowers. *Molecules*. 2012; 17(6): 7284-7293.
- [100] Wang Y H, Hou A J, Chen L, Chen D F, Sun H D, Zhao Q S, Bastow K F, Nakanish Y, Wang X H and Lee K H. New isoprenylated flavones, artochamins A–E, and cytotoxic ; principles from *Artocarpus chama*. *Journal of Natural Products*. 2004 ; 67(5) : 757–761.
- [101] Ferheen S, Ahmed E, Afza N, and Malik A. Phytochemical investigations on *Hypericum oblongifolium*. *Journal of Chemical Society of Pakistan*. 2005 ; 27(5):533-537.
- [102] Kerkatou M, Menad A, Sarri D, León F, Brouard I, Bouldjedj R, Chalard P, Ameddah S, Benayache S, Benayache F . Secondary metabolites from *Genista aspalathoides Lamk ssp. aspalathoides M.* *Der Pharmacia Lettre*. 2013 ; 5 (5):285-289.
- [103] Russell G B, Sirat H M, Sutherland O R W, Isoflavones from root bark of gorse *Phytochemistry*. 1990 ; 29(4) : 1287-1291.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Les travaux que nous avons développés dans le cadre de cette thèse ont porté sur l'investigation phytochimique de deux plantes endémiques sahariennes. La première *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. Synonyme : *Bubonium graveolens* (Forsk.) Maire, *Bupthalmum graveolens* (Forsk.), de la famille Asteraceae et la seconde, *Crotalaria viallatei* Batt. de la famille Fabaceae. Les parties aériennes des deux plantes ont été récoltées en période de floraison optimale, après séchage dans un endroit aéré à l'abri des rayons solaires et de l'humidité, les feuilles et fleurs de *A. graveolens* et les feuilles de *C. viallatei* sont mises à macérer séparément dans des mélanges EtOH-H₂O trois fois avec renouvellement du solvant et à température ambiante. Après filtration et concentration sous pression réduite, les extraits hydroalcooliques sont dilués dans de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière végétale sous agitation magnétique et laissés reposer pendant une nuit à 4°C pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, les deux solutions obtenues subissent des affrontements avec des solvants de polarité croissante en particulier le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol pour obtenir les extraits correspondants.

Pour *A. graveolens* les travaux d'isolement de métabolites secondaires ont concerné l'extrait chloroforme. En effet, après fractionnement sur colonne de gel de silice normale suivi de séparations et de purifications sur colonnes et/ou plaques préparatives de gel de silice 60, **neuf composés** ont été isolés et déterminés. Les structures ont été élucidées par la combinaison des différentes méthodes spectrales notamment la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle (¹H, ¹³C et DEPT) et bidimensionnelle (HSQC, COSY, HMBC NOESY et ROESY), ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution en modes d'ionisation sous impact électronique (HR-EI-MS) et par électronebulisation (HRESI-MS). En plus des données de l'expérience ROESY, la stéréochimie des centres chiraux pour les molécules concernées, a été établie par diffraction des rayons X et par la mesure des pouvoirs rotatoires. Les molécules obtenues sont :

- 2 stérols : le stigmasterol et le β-sitosterol en mélange 57 et 43%, respectivement.
- 1 composé phénolique : la vanilline
- 5 lactones sesquiterpéniques de type humulanolide : (-)-asteriscunolides A, B, F, I et J.
- 1 acide sesquiterpénique à squelette humulène : l'acide (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1α-acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque

Il faut noter que les trois molécules : (-)-asteriscunolide I, (-)-asteriscunolide J et l'acide (-)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oïque sont nouvelles et que nous les décrivons pour la première fois dans la littérature.

Pour *C. viallatei*, la recherche de la composition chimique a concerné les extraits chloroforme et acétate d'éthyle. En adoptant les mêmes stratégies de séparation, de purification et d'analyse structurale que précédemment, **huit composés** ont été isolés de l'extrait chloroforme, il s'agit de :

- La tectochrysin,
- Le lupéol
- Le β -sitostérol
- Le 4-hydroxy phényl cinnamate
- La vanilline
- L'acétovanilline
- Le *p*-hydroxy benzaldéhyde
- La bétuline

A partir de la phase acétate d'éthyle **9 composés** ont été obtenus. Il s'agit de :

- Un composé phénolique le *p*-hydroxy benzaldéhyde (isolé également de la phase chloroforme)
- une chalcone : l'isoliquiritigénine
- 4 flavones dont deux prénylées : le chrysoériol, la 8-prényl apigénine, l'Hypolaetine 3'-methyl ether, 8-prényl lutéoline.
- 3 isoflavones : la génistéine, le 5,3'-di-*O*-méthyl orobol et l'isoprunétine

L'attention que nous avons donnée à l'espèce *Crotalaria viallattei* Batt. est justifiée par le fait qu'elle n'a jamais été étudiée et que par conséquent tous ces composés sont isolés pour la première fois de cette plante.

Les déterminations structurales ont été réalisées grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D (¹H, ¹³C), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse, la spectrophotométrie UV-Vis et IR, en plus de la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

La composition chimique des espèces étudiées est en parfait accord avec celle des plantes de la même famille. Pour la famille Asteraceae (le genre *Asteriscus*) les humélènes sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques spécifiques. Quant à la famille Fabaceae, sa réputation en matière d'accumulation de flavonoïdes, de triterpènes et de stéroïdes est bien connue.



Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*

Leila Hammoud^a, Francisco León^{b,c,*}, Ignacio Brouard^b, Javier Gonzalez-Platas^d,
Samir Benayache^a, Paul Mosset^e, Fadila Benayache^{a,*}

^aUnité 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, Algeria

^bInstituto de Productos Naturales y Agrobiología-C.S.I.C., Av. Astrofísico F. Sánchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

^cDepartment of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, University of Florida, 1345 Center Dr, MSB P6-07, Gainesville 32610, FL, USA

^dDepartamento de Física, Universidad de La Laguna, Av. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, E-38204 La Laguna, Tenerife, Spain

^eUniversité de Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes), UMR 6226, F-35700 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2018

Accepted 27 May 2018

Available online 28 May 2018

Keywords:

Humulanolides

Asteriscus graveolens

Sahara medicinal plants

Asteraceae

ABSTRACT

Three new sesquiterpene-humulenes, (–)- asteriscunolides I (**1**), J (**2**) and (–)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oic acid (**3**) were isolated from the leaves-flowers of the Saharan medicinal plant *Asteriscus graveolens* along with six known compounds. The structures of the compounds were determined on the basis of spectroscopic mono and bidimensional NMR, mass spectrometry and by single-crystal X-ray diffraction. Compounds **1–3** were evaluated for cytotoxic assay, no significant activity was detected.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Asteriscus graveolens (Forsk.) DC. syn. *Bubonium graveolens* (Forsk.) M., *Bupththalmum graveolens* (Forsk.) from Asteraceae family, is a medicinal plant found widely distributed in the Macaronesia region, Mediterranean basin and North Africa including Saharan desert.¹ It is used to treat fever, cephalic pain, gastrointestinal disorders, vomiting.² It has been also reported as antioxidant agent,³ and to protect the skin tissues from damages caused by toxins present in the environmental pollution.⁴ *A. graveolens* is characterized by high content of monoterpenes,⁵ sesquiterpenes,⁶ and flavonoids.⁷

Humulene skeleton is an essential scaffold involved in the sesquiterpene biosynthesis, humulyl cation is considered to be the biogenetic precursor of other important sesquiterpene skeletons,⁸ and have been also inspire the synthesis of terpenoid-alkaloids.⁹ Humulanolides are the predominant sesquiterpene lactones isolated from *A. graveolens*, which also include the asteriscanolide and aquatolide skeletons with a distinctive γ -lactone moiety.¹⁰ These compounds show potential pharmacological activities, display intriguing chemical structures and serve as a

precursor of more complex structures, eliciting the interest for synthetic chemist.¹¹

In our continued examination of the North African-Macaronesia Asteraceae plants^{6a} and as a part of our ongoing search of bioactive secondary metabolites from Algerian medicinal plants,¹² we were able to isolate three new sesquiterpenes, two new humulanolides (**1–2**) and one humulene derivative (**3**), which was previously isolated as methyl ester¹³ (Fig. 1) along with six known compounds. The chemical structures of the previous reported compounds were confirmed by comparing the NMR spectra with published data.

The ethanol-aqueous extract of *A. graveolens* was investigated, leading to the isolation of two new humulanolides, (–)-asteriscunolides I (**1**) and J (**2**); one new humulene derivative (–)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-humulatrien-12-oic acid (**3**) and six known compounds, stigmasterol¹⁴ and β -sitosterol¹⁵ as a mixture, vanillin¹⁶ and the (–)-asteriscunolides A,¹⁷ B,¹⁷ and F.¹²

Compound **1** was purified as a white crystals by recrystallization from methanol and dichloromethane, and with $[\alpha]_D^{21} -138^\circ$ (c 0.018, MeOH). The molecular formula of C₁₅H₂₀O₄ was determined according to its pseudo-molecular peak at m/z 287.1256 [M+Na]⁺ (calcd. for m/z 287.1259), on the basis of its (+) HRESIMS. The ¹H NMR (Table 1) spectrum of **1** exhibited the presence of three tertiary methyl carbons at δ_H 1.05 (3H, s), 1.14 (3H, s), and 1.15 (3H, s), a vinyl proton at δ_H 7.25 (1H, t, $J = 1.6$ Hz), the protons of a disubstituted double bond at δ_H 5.12 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), and 5.28 (1H, dd, $J = 8.5, 16.1$ Hz), and the signals for three oxygenated methines at

* Corresponding authors at: Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, University of Florida, 1345 Center Dr, MSB P6-07, Gainesville 32610, FL, USA (F. León).

E-mail addresses: jleonoyola@cop.ufl.edu (F. León), fbenayache@yahoo.fr (F. Benayache).

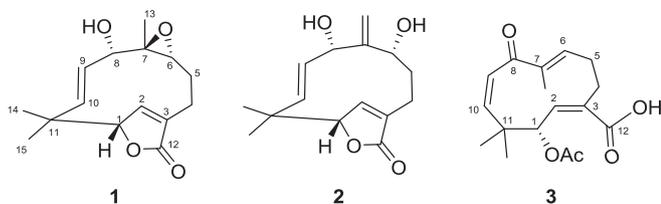


Fig. 1. Chemical structures of compounds **1–3** from *A. graveolens*.

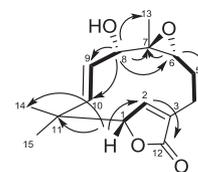


Fig. 2. Selected COSY (bold bond) and HMBC (H → C) correlations for compound **1**.

δ_{H} 2.42 (1H, dd, $J = 1.1, 10.5$ Hz), 3.43 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), and 4.60 (1H, dd, $J = 1.3, 2.9$ Hz). The relationships between the proton signals in **1** were established from the ^1H - ^1H COSY experiment (Fig. 2), which disclosed the following connectivities: H-1/H-2, H-4/H-5/H-6, H-8/H-9/H-10. The ^{13}C NMR (Table 1) and DEPT spectral data indicated the presence of a γ -lactone, as well as four olefinic carbons, three methylenes, two methylenes, three methines and two quaternary carbons. The ^1H , ^{13}C , and DEPT NMR spectral data suggested that **1** has a humulanolide skeleton, the HMBC experiments (Fig. 2) established the following connectivities: H-8/ C-6, C-7, C-9, C-10 and C-13; H-1/ C-2, C-11, and C-14; H-6/ C-5, C-7, and C-8, the above data and the presence of a quaternary oxygenated carbon C-7, revealed that **1** possess a methyl-bearing trisubstituted epoxide between C-6/C-7. The presence of the epoxide was confirmed by the up-field chemical shifts of the CH_3 -13 and H-6 signals observed in the ^1H NMR spectrum (Table 1).

The relative stereochemistry of **1** was deduced from a 2D ROESY experiment, which indicated correlations of H-8 and H-6, clearly showing that these protons were on the same side. The absence of the correlation between the methyl C-13 and the protons H-6 or H-8 indicate that the epoxide ring was in *trans* form. The structural model of compound **1** (Fig. 3) was confirmed by X-ray diffraction analysis. Thus, single crystal was collected with a Rigaku SuperNOVA diffractometer with microfocus X-ray using Cu K α radiation ($\lambda = 1.54184$ Å). CrysAlisPro¹⁸ software was used to collect, index, scale and apply numerical absorption correction based on gaussian integration over a multifaceted crystal model and empirical absorption correction using spherical harmonics, implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm into CrysAlisPro. The structure was solved applying the novel dual-space algorithm implemented in SHELXT program.¹⁹ Fourier recycling and

least-squares refinement were used for the model completion with SHELXL-2017.²⁰ All non-hydrogen atoms have been refined anisotropically, and all hydrogen atoms have been placed in geometrically suitable positions and refined riding with isotropic thermal parameter related to the equivalent isotropic thermal parameter of the parent atom. The geometrical analysis of interactions in the structure was performed with OLEX2 program.²¹ The hydrogen atoms were geometrically positioned with C–H=0.93 Å and Uiso(H) = 1.2 Ueq(C). Crystal data, collection procedures and refinement results are summarized in Supplementary information. Crystallographic data for the structures reported in this contribution have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication with number 1840628. Upon consideration of all the above data, **1** was identified as (–)-(2*Z*,9*E*) 8 α -hydroxy-6 α ,7 β -epoxy-2,9-humuladien-1(12)-olide and was named (–)-asteriscunolide I, the next consecutive designation in this nomenclature.

(–)-Asteriscunolide J (**2**) was isolated as white crystals with $[\alpha]_{\text{D}}^{21} -49^\circ$ (c 0.334, MeOH). Its molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ was established by (+) HRESIMS based on its $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion at m/z 287.1261 (calcd. for 287.1259). Its IR spectrum showed the presence of a hydroxyl groups (3437, 3285 cm^{-1}), an α, β unsaturated γ -lactone (1736 and 1720 cm^{-1}). The ^1H NMR spectrum of **2** (Table 1) exhibited the presence of two tertiary methyl carbons at δ_{H} 1.23 (3H, s), and 1.29 (3H, s), a vinyl proton at δ_{H} 7.20 (1H, s), the protons of a disubstituted double bond at δ_{H} 5.30 (1H, dd, $J = 3.5, 16.2$ Hz), and 5.41 (1H, dd, $J = 1.6, 16.2$ Hz), the signals for three oxygenated methines at δ_{H} 3.92 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 4.71 (1H, br s), and 4.79 (1H, t, $J = 1.4$ Hz) and exocyclic methylene protons at δ_{H} 5.22 (1H, s), and 5.34 (1H, t, $J = 1.5$ Hz). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **2** and **1** (Table 1) were similar with regard to their functional group analysis. However, compound **2** has three double bonds one of them

Table 1
NMR spectroscopic data of compounds **1–3** in CD_3OD .^a

Compounds	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H} mult. (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J, Hz) ^a	δ_{C}	δ_{H} mult. (J, Hz)
1	89.0	4.60, dd (1.3, 2.9)	89.8	4.79, dd (1.4)	79.8	6.09, d (9.1)
2	151.6	7.25, t (1.6)	150.1	7.20, s	143.6	5.81, d (9.1)
3	134.3		135.5		132.1	
4a	23.9	2.50, m	23.8	2.43, m	35.3	2.83, m
4b		2.40, m		2.33, td (2.3, 12.5)		2.35, m
5a	22.7	1.90, m	35.5	1.95, br t (13.5)	26.6	2.76, m
5b		1.79, m		1.55, m		2.35, m
6	62.0	2.42, dd (1.1, 10.5)	70.0	3.92, d (7.1)	153.5	6.67, dd (1.0, 11.1)
7	68.2		154.9		140.0	
8	81.9	3.43, d (8.5)	75.1	4.71 br s	203.2	
9	130.8	5.28, dd (8.5, 16.1)	132.2	5.30, dd (3.5, 16.2)	130.5	6.14, d (13.5)
10	137.2	5.12, d (16.1)	132.8	5.41, dd (1.6, 16.2)	140.0	5.88, d (13.5)
11	40.6		41.5		44.8	
12	175.1		176.0		169.3	
13	11.6	1.05, s	113.7	5.22, s	11.2	1.69, s
				5.34, t (1.5)		
14	26.3	1.15, s	26.5	1.29, s	23.2	0.86, s
15	22.8	1.14, s	22.8	1.23, s	27.9	1.07, s
OAc					20.8	2.09, s
					171.9	

^a Spectra measured at 500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR.

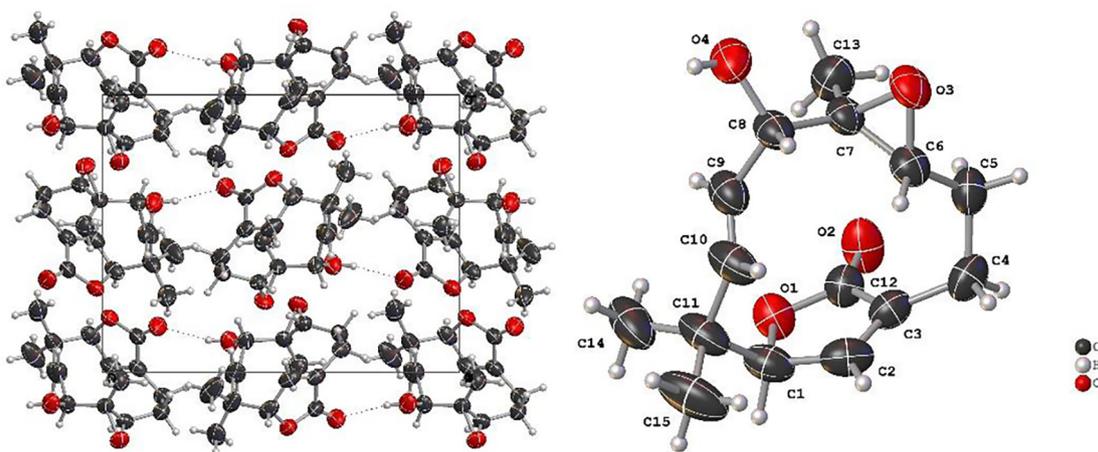


Fig. 3. Crystal packing and X ray structure for compound 1.

exocyclic methylene assigned to C-13, led us to conclude that the epoxide is open in **2**. The above data was confirmed with the HMBC experiment, thus the protons at C-13 showed correlations with C-7, C-6 and C-8. The ROESY experiment showed analog correlations than compound **1**. Therefore, the chemical structure of **2** was elucidated as (–)-(2Z, 9E) 6 α ,8 α -dihydroxy-2,9,7(13)-humulatrien-1(12)-olide.

Compound **3**, was isolated as white crystals with mp 180 °C. Its (+) HRESIMS spectrum showed a pseudomolecular ion m/z 329.1371 [M+Na]⁺, compatible with the molecular formula C₁₇H₂₂O₅ (calcd. for C₁₇H₂₂O₅Na: 329.1365). The IR spectrum showed the presence of carboxylic acid absorptions at 3017–2875 and 1730 cm⁻¹, as well as a conjugated carbonyl group absorbing at 1690 cm⁻¹ and acetyloxy group at 1243 cm⁻¹. The ¹H NMR of **3** showed the presence of three double bonds, two three substituted at δ_H 5.81 (1H, d, J = 9.1 Hz), and 6.67 (1H, dd, J = 1.0, 11.1 Hz), and one disubstituted at δ_H 5.88 (1H, d, J = 13.5 Hz), and 6.14 (1H, d, J = 13.5 Hz), one oxygenated methine at δ_H 6.09 (1H, d, J = 9.1 Hz) and four tertiary methyls at δ_H 0.86, 1.07, 1.69, and 2.09 ppm. The ¹³C NMR and DEPT data indicated the presence of three carbonyl groups corresponding to an α , β unsaturated ketone, an acetyl group and an acid group, two aliphatic methylenes, six olefinic signals, four methyls, one methine, and one quaternary carbon. Carefully study of the 2D NMR and comparison with the reported data of the methyl ester isolated by El Dahmny et al.,¹³ led us to the conclusion that compound **3** could be identified as (–)-(2Z,6E,9Z)-8-oxo-1 α -acetoxy-2,6,9-humulatrien-12-oic acid.

In summary, three new compounds were isolated from *A. graveolens*, to the best of our knowledge, compound **1** and **2** are the first example of humulanolides with C-8 reduced to hydroxyl. Compounds **1–3** were also tested against cancer cell lines HL-60, but compounds **1–3** did not show significant activity.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the NATO Public Diplomacy Division (Science for Peace and Security Section) CBP.MD.CLG 983840 and MAEC-Agencia Española de Cooperación

y Desarrollo PCI (A1/035449/11) The authors thank DGRSDT, MESRS and ATRSS, Algeria.

A. Supplementary data

Supplementary data (Experimental procedures, X-ray detailed ¹H and ¹³C NMR spectrum and 2D spectrum of compounds **1–3**) associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.079>.

References

- Greuter W. *Fl Medit.* 1997;7:41–48.
- Ramdane F, Essid R, Mkadimi K, et al. *Process Biochem.* 2017;56:186–192.
- Haddouchi F, Chaouche TM, Halla N. *Phytotherapie.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1086-8> [in press].
- Ramot O, Havas F, Kalo E, et al. International Patent Application WO2016/125146 A1; 2016.
- (a) Triana J, Eiroa JL, Morales M, et al. *J Nat Prod.* 2016;79:1292–1297; (b) Chaib F, Allali H, Bennaceur M, Flamini G. *Chem Biodiversity.* 2017;14:e1700092.
- (a) Triana J, Eiroa JL, Morales M, et al. *J Nat Prod.* 2016;79:1292–1297; (b) Sarg TM, El-Dahmy SI, Ateya AM, Abdel-Fattah HA. *Fitoterapia.* 1994;65:241–244.
- Ahmed AA, Ishak MS, Micheal HN, El-Ansari MA, El-Sissi HI. *J Nat Prod.* 1991;54:1092–1093.
- Hamlin TA, Hamann CS, Tantillo DJ. *J Org Chem.* 2015;80:4046–4053.
- Kikuchi H, Nishimura T, Kwon E, Kawai J, Oshima Y. *Chem Eur J.* 2016;22:15819–15825.
- Han JC, Li F, Li CC. *J Am Chem Soc.* 2014;136:13610–13613.
- Han JC, Liu X, Zhao J, Li S, Li CC. *Tetrahedron.* 2017;73:3289–3303.
- Boumaraf M, Carbone M, Ciavatta ML, et al. *J Nat Prod.* 2017;80:82–89.
- El Dahmy S, Jakupovic J, Bohlmann F, Sarg TM. *Tetrahedron.* 1985;41:309–316.
- Ezzat MI, Ezzat SM, El Deeb KS, El Fishawy AM, El Toumy SA. *Nat Prod Res.* 2016;30:1753–1761.
- Wilkomirski B, Kucharska E. *Phytochemistry.* 1992;31:3915–3916.
- Youssef D, Frahm AW. *Planta Med.* 1995;61:570–573.
- San Feliciano A, Barrero AF, Medarde M, Miguel del Corral JM, Aramburu Aizpiri F, SanchezFerrando F. *Tetrahedron.* 1984;40:873–878.
- Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlisPro Software System, Version 1.171.39.33c. Oxford, UK: Rigaku Corporation; 2017.
- Sheldrick GM. *Acta Crystallogr Sect A Found Adv.* 2015;71:3–8.
- Sheldrick GM. *Acta Crystallogr Sect A Found Adv.* 2008;64:112–122.
- Dolomanov OV, Bourhis LJ, Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H. *J Appl Crystallogr.* 2009;42:339–341.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes endémiques sahariennes, *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. et *Crotalaria vialattei* Batt. appartenant respectivement aux familles Asteraceae et Fabaceae. Ces deux familles, sont réputées pour leur richesse en métabolites secondaires bioactifs. Cette étude a permis d'isoler et d'identifier 25 composés naturels.

Parmi ces 25 composés, 9 composés naturels ont été isolés de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Asteriscus graveolens* : un mélange de deux stérols, un composé phénolique et 6 sesquiterpènes de type humélène dont 3 nouveaux produits naturels que nous reportons pour la première fois dans la littérature. Ce type de molécules s'impose comme des composés typiques de la famille Asteraceae et le genre *Asteriscus*.

A partir des extraits chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes (feuilles) de l'espèce *Crotalaria vialattei* Batt. 16 métabolites secondaires en majorité de type flavonoïdes et de composés phénoliques, ont été identifiés. Parmi ces composés, 5 flavones dont deux prénylées et 3 isoflavones, en plus d'une chalcone, 2 triterpènes pentacycliques à squelette lupane, 1 stérol et 4 composés phénoliques. Tous ces composés sont isolés pour la première fois de cette espèce.

L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de masse haute résolution utilisant le mode d'ionisation electrospray (HRESI-MS), RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY), de la spectrophotométrie UV-Vis et IR, diffraction de rayons X, en plus de la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

Ce travail a fait l'objet d'un article paru et de deux autres en cours de publication.

Mot clés : Asteraceae, Fabaceae, *Asteriscus graveolens*, *Crotalaria vialattei*, asteriscunolides, flavonoïdes, stérols, triterpènes, composés phénoliques, RMN 1D et 2D.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical study of two endemic Saharan plants, *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. and *Crotalaria vialattei* Batt. belonging respectively, to the Asteraceae and Fabaceae families. These two families are renowned for their richness in bioactive secondary metabolites. This study led to the isolation and identification of 25 natural compounds, among which, 9 were isolated from the chloroform phase of the hydroalcoholic extract of the aerial parts (leaves and flowers) of *Asteriscus graveolens*: 6 sesquiterpenes of the humelene type, among which 3 were new natural products, that we report for the first time in the literature. This type of molecule stands out as typical compounds of the Asteraceae family and the *Asteriscus* genus.

From chloroform and ethyl acetate extracts of the aerial parts (leaves) of the species *Crotalaria vialattei* Batt. 16 secondary metabolites, mostly flavonoids and phenolic compounds, have been identified. Among these compounds, 5 flavones including two prenylated and 3 isoflavones, in addition to a chalcone, 2 pentacyclic triterpenes with a lupane skeleton, 1 sterol and 4 phenolic compounds. All of these compounds are isolated for the first time from this species.

The structural elucidation of the isolated compounds was achieved through the analysis of high resolution mass spectra using the electrospray ionization mode (HRESI-MS), 1D NMR (^1H , ^{13}C and DEPT) and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY and ROESY), UV-Vis and IR spectrophotometry, single-crystal X-ray diffraction, in addition to the optical rotation measurements and comparison with data from the literature.

This work has been the subject of a published article and two other publications in progress.

Keywords: Asteraceae, Fabaceae, *Asteriscus graveolens*, *Crotalaria vialattei*, asteriscunolides, flavonoids, sterols, triterpenes, phenolic compounds, 1D and 2D NMR.

ملخص:

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية لنبتتين أصيلتين صحراوييتين وهما: *Asteriscus graveolens* و *Crotalaria vialattei* (Batt). والمنتيميتين للعائلتين Asteraceae و Fabaceae على التوالي و المعروفتان بغناهما بمختلف أنواع منتجات الأيض الثانوي الفعالة بيولوجيا. سمحت هذه الدراسة بفصل وتحديد بنية 25 مركبا من بينهم 3 مركبات جديدة.

من بين الـ 25 مركب المعزول 9 مركبات طبيعية فصلت من الطور الكلوروفورمي للمستخلص الكحولي للأجزاء الهوائية (أوراق و أزهار) للنبتة *Asteriscus graveolens* تتمثل في: مزيج من مركبين ستيروليين، مركب فينولي و 6 مركبات سيسكويترپينية من نوع Humulène، من بينها 3 مركبات طبيعية جديدة تم ذكرها لأول مرة في البيبليوغرافيا. هذا النوع من المركبات يعتبر خاص و مميز للعائلة Asteraceae و كذا للنوع *Asteriscus*.

إنطلاقا من دراسة الطورين الكلوروفورمي و خلات الإيثيل للمستخلص الكحولي للأجزاء الهوائية (أوراق) للنبتة *Crotalaria vialattei* (Batt) تم التعرف على 16 مركبا أغلبها فلافونيدات و مركبات فينولية، منها 5 فلافونيدات من نوع فلافون، 3 من نوع إيزوفلافون، مركب من نوع شالكون، مركبين تريپنين خماسيي الحلقة لهما هيكل لبيان، مركب ستيرولي و 4 مركبات فينولية، وقد تم فصل جميع هذه المركبات لأول مرة من هذا النوع.

التحليل البنوي لهذه المركبات المفصولة تم اعتمادا على تجميع معطيات مطيافية الكتلة عالية الكفاءة تحت الصدم الالكتروني (HRESI-MS)، أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون أحادية البعد (^1H , ^{13}C , DEPT) وثنائية البعد (COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY) بالإضافة إلى أطياف الأشعة فوق البنفسجية- المرئية، الأشعة تحت الحمراء، الأشعة السينية، قياس زاوية التدوير النوعي والمقارنة مع البيبليوغرافيا.

توج هذا العمل بمنشور علمي ونحن بصدد عمل منشورين آخرين.

الكلمات المفتاحية: *Crotalaria vialattei* ، *Asteriscus graveolens* ، Fabaceae ، Asteraceae ،

، asteriscunolides ، فلافونيدات، ستيرول، تربينات، مركبات فينولية، RMN 1D et 2D .

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes endémiques sahariennes, *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC. et *Crotalaria vialattei* Batt. appartenant respectivement aux familles Asteraceae et Fabaceae. Ces deux familles, sont réputées pour leur richesse en métabolites secondaires bioactifs. Cette étude a permis d'isoler et d'identifier 25 composés naturels.

Parmi ces 25 composés, 9 composés naturels ont été isolés de la phase chloroforme de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Asteriscus graveolens* : un mélange de deux stérols, un composé phénolique et 6 sesquiterpènes de type humélène dont 3 nouveaux produits naturels que nous reportons pour la première fois dans la littérature. Ce type de molécules s'impose comme des composés typiques de la famille Asteraceae et le genre *Asteriscus*.

A partir des extraits chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes (feuilles) de l'espèce *Crotalaria vialattei* Batt. 16 métabolites secondaires en majorité de type flavonoïdes et de composés phénoliques, ont été identifiés. Parmi ces composés, 5 flavones dont deux prénylées et 3 isoflavones, en plus d'une chalcone, 2 triterpènes pentacycliques à squelette lupane, 1 stérol et 4 composés phénoliques. Tous ces composés sont isolés pour la première fois de cette espèce.

L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de masse haute résolution utilisant le mode d'ionisation electrospray (HRESI-MS), RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY), de la spectrophotométrie UV-Vis et IR, diffraction de rayons X, en plus de la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

Ce travail a fait l'objet d'un article paru et de deux autres en cours de publication.

Mot clés : Asteraceae, Fabaceae, *Asteriscus graveolens*, *Crotalaria vialattei*, asteriscunolides, flavonoïdes, stérols, triterpènes, composés phénoliques, RMN 1D et 2D.