

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة منتوري – قسنطينة

UNIVERSITE MENTOURI – CONSTANTINE

N°:.....

THESE

Présenté à la faculté des Sciences exactes

Département de Chimie

Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

En Chimie Organique

Option : Phytochimie

Présentée par :

Mr. BANAHMED Merzoug

THEME

CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE DEUX

PLANTES DE LA FAMILLE DES APIACEAE : *Carum*

***montanum* Coss. & Dur. et *Bupleurum montanum* Coss.**

Mémoire soutenue publiquement le **5 Avril 2009** devant un jury composé de :

Kamel MEDJROUBI	Prof. U. Mentouri de Constantine	Président
Salah AKKAL	Prof. U. Mentouri de Constantine	Rapporteur
Elisabeth SEGUIN	Prof. U. de Rouen	Co-Encadreur
Hocine DENDOUGUI	M. C. U. de Ouargla	Examineur
Hocine LAOUER	M. C. U. de Sétif	Examineur

Table des matières

INTRODUCTION	1
Références	3
CHAPITRE I ETUDE BOTANIQUE	4
I. 1. ETUDE BOTANIQUE	4
I. 1. 1. La famille des Apiaceae	4
I. 1. 1. a. Généralités	4
I. 1. 1. b. Caractéristiques des Apiaceae	4
□ Distribution	5
□ Systématique	6
□ Caractères morphologiques et anatomiques	7
I. 1. 2. Le genre Carum	8
I. 1. 2. a Systématique	8
I. 1. 2. b. Caractéristiques botaniques	8
I. 1. 3. Le genre Bupleurum	8
I. 1. 3. a Systématique	9
I. 1. 3. b. Description générale	9
I. 1. 3. c. Utilisation en médecine traditionnelle	9
I. 1. 3. d. Autres utilisations	10
I. 2. Travaux antérieurs	11
I. 2. 1. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre Carum ...	11
I. 2. 1. a. Flavonoïdes	11
I. 2. 1. b. Coumarines	12
I. 2. 1. c. Huiles essentielles	14
I. 2. 1. d. Divers	16
I. 2. 2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre Bupleurum	19
I. 2. 2. a. Flavonoïdes	19
I. 2. 2. b. Coumarines	23
I. 2. 2. c. Saponosides	26
Références	30

II. 2. 3. 2. a. Cristallisation.....	66
II. 2. 3. 2. b. Colonne chromatographique.....	67
II. 2. 3. 2. c. Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC	67
II. 2. 4. Identification et détermination structurale des coumarines	67
II. 2. 4. 1. Méthodes chromatographiques d'identification	67
II. 2. 4. 1. a. Fluorescence sous la lumière UV	67
II. 2. 4. 1. b. Chromatographie sur papier	68
II. 2. 4. 1. c. Chromatographie sur couche mince	69
II. 2. 4. 2. Méthodes spectroscopiques	69
II. 2. 4. 2. a. Spectroscopie UV-Visible.....	69
II. 2. 4. 2. b. Spectroscopie Infra Rouge.....	71
II. 2. 4. 2. c. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (R. M. N).....	71
II. 2. 4. 2. d. Spectrométrie de masse.....	74
II. 2. 4. 2. e. Réactions chimiques.....	75
II. 2. 5. Quelques propriétés des coumarines.....	77
Références	79
CHAPITRE III PARTIE EXPERIMENTALE.....	85
III. 1. Étude chimique de <i>Carum montanum</i> Coss. & Dur.	85
III. 1. 1. Place dans la systématique	85
III. 1. 2. Description botanique.....	85
III. 1. 3. Répartition Géographique	86
III. 1. 4. Protocole expérimental :.....	87
III. 1. 4. 1. Récolte du matériel végétal :	87
III. 1. 4. 2. Extraction :	87
III. 1. 4. 3. Séparation chromatographique.....	89
III. 2. Étude chimique de <i>Bupleurum montanum</i> Coss. & Dur.	93
III. 2. 1. Place dans la systématique	93
III. 2. 2. Description botanique :.....	93
III. 2. 3. Répartition géographique	94
III. 2. 4. Protocole expérimental :.....	94
III. 2. 4. 1. Récolte du matériel végétal	94
III. 2. 4. 2. Extraction	95
III. 2. 4. 3. Fractionnement et purification	97

Références	104
CHAPITRE IV RESULTATS ET DISCUSSIONS	105
IV. 1. Identification des produits isolés de <i>Carum montanum</i> Coss. & Dur.....	105
IV. 1. 1. Le composé C1.....	105
IV. 1. 2. Le composé C2.....	113
IV. 1. 3. Le composé C3.....	119
IV. 1. 4. Le composé C4.....	124
IV. 1. 5. Le composé C5.....	129
IV. 1. 6. Le composé C6.....	136
IV. 1. 7. Le composé C7.....	138
IV. 1. 8. Le composé C8.....	143
IV. 2. Identification des produits isolés de <i>Bupleurum montanum</i> Coss.....	150
IV. 2. 1. Le composé B1.....	150
IV. 2. 2. Le composé B2.....	156
IV. 2. 3. Le composé B3.....	163
IV. 2. 4. Le composé B4.....	168
IV. 2. 5. Le composé B5.....	177
Références	185
CONCLUSION	187

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **AKKAL Salah**, pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et permis de réaliser cette thèse. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation. Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans différents congrès internationaux et dans des publications scientifiques.

Un grand merci à Madame le Professeur **Elisabeth SEGUIN**, Professeur de pharmacognosie à la faculté de médecine et pharmacie de l'université de Rouen de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté, pour son soutien et sa grande générosité. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Ses critiques constructives ont beaucoup contribué à l'amélioration du manuscrit.

Je remercie sincèrement Monsieur le Docteur **A. Hakim Elomri** Maître de conférences à la faculté de médecine et pharmacie de Rouen, qui m'a constamment guidé au cours de mon travail au laboratoire de pharmacognosie Rouen, aidé par ces connaissances, ces précieux conseils. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Kamel Medjroubi**, de l'Université Mentouri de constantine, pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de thèse.

J'aimerais également remercier Monsieur **Hocine Laouar** Maître de conférences à l'Université de Sétif pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'identification du matériel végétal.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Hocine Dendougui** Maître de conférences à l'Université de Ouargla pour avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais encore remercier Madame **Marie Laure Grouth** Maître de conférences à la faculté de médecine et pharmacie de Rouen pour son aide inestimable et pour sa gentillesse au cours de mon travail au laboratoire. Je remercie également Monsieur **Philippe Vérité** Maître

de conférences à la faculté de médecine et pharmacie de Rouen, pour la réalisation des spectres de masses.

Je tiens à remercier également toute l'équipe du laboratoire Pharmacognosie / UMR CNRS 6014, en particulier Mme *N. Languette* et Mme *B. Axelle*.

Bien que la thèse soit fondamentalement un travail individuel, elle n'aurait pu être menée à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et suggestions, et qui assurent une atmosphère de travail donnant envie de se lever chaque matin. Je remercie pour cela tous mes collègues : *L. Djarri, S. Louaer, H. Matouet, F. Ruben, J. O. Privat, J. B. Bongui* et *P. Celestin* pour leur agréable compagnie et leurs conseils.

A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma femme et nos enfants

A tous les membres de ma famille

Abréviations et symboles

1, 2, ...	Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature
C1, C2, et B1, B2...	Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude
MeOH	Méthanol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
CDCl ₃	Chloroforme deutérié
SM	Spectroscopie de masse
IE	Impact électronique
Uma	Unité de masse atomique
UV	Ultraviolet
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹ H	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN ¹³ C	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire de carbone 13
DEPT 135	Spectre de carbone 13 réalisé en Distortionless Enhancement by Polarisation transfer
HMQC	Heteronuclear multiple Quantum Corrélation
HMBC	Heteronuclear multiple Bond Connectivity
COSY	Spectroscopie de corrélation
TMS	Triméthylsilane
Et <i>al.</i>	Et autres auteurs
CCM	Chromatographie sur couche mince
°C	Degré celsius
ppm	Partie par million
δ	Déplacement chimique
nm	Nanomètre
Hz	Hertz
J	Constante de couplage
s	Singulet
d	Doublet
dd	Doublet des doublets
m	Multiplet
t	Triplet

INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris et également pour ses nécessités médicales. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

La majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi par ce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, les plantes réputées actives.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour pallier au problème d'insuffisances des traitements médicamenteux face aux fléaux tel que : malaria, cancer, infection virales et bactériennes. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires [1]. En effet, sur environ des milliers d'espèces végétales [2], seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

La flore Algérienne avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [3], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Le présent travail s'inscrit donc dans cette recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une utilisation en thérapeutique. Pour cela, deux plantes, de la famille Apiaceae, *Carum montanum* Coss. & Dur. (Syn. *Selinom montana* Coss. & Dur. et *Selinopsis Montana* Batt.) et *Bupleurum montanum* Coss., ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Ce travail sera présenté comme suit :

L'état des connaissances bibliographiques botaniques et phytochimiques sur les deux genres et leur famille botanique sera présenté dans un premier chapitre.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général sur les composés phénoliques, notamment, les coumarines et les flavonoïdes.

Le troisième chapitre sera consacré à la description du protocole expérimental et aussi un aperçu botanique sur chaque plante.

L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés seront détaillées dans le quatrième chapitre.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Références

1. Hostettmann, K. and Marston, A. (2002). *Phytochemistry Reviews* **1**: 275-285.
2. Principe, P.P. (1989). The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), *Economic and Medicinal Plant Research, Volume 3*. Academic Press, London.
3. Gaussen H., and Leroy H. F., (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2eme Ed., 426.

I. 1. ETUDE BOTANIQUE

I. 1. 1. La famille des Apiaceae

I. 1. 1. a. Généralités

Les Apiaceae ont été largement étudiées, en raison notamment de leur importance économique, de nombreuses espèces étant utilisées dans l'alimentation. Citons par exemple *Anethum graveolens*, *Anthriscus cerefolium*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Daucus carota*, *Foeniculum vulgare*, *Pastinaca sativa*, *Petroselinum crispum* ou encore *Pimpinella anisum*.

Les Apiaceae sont aussi largement utilisées en médecine traditionnelle pour certaines propriétés thérapeutiques comme le montre le **tableau I. 1**

Tableau I. 1 : Utilisation en médecine traditionnelle de quelques Apiaceae.

Espèce	Utilisation
<i>Ammi visnaga</i>	Diurétique, vermifuge, antiasthmatique
<i>Anethum graveolens</i> <i>Cuminum cyminum</i> (cumin)	Diurétique, carminatif, antispasmodique
<i>Pastinaca sativa</i>	Vasodilatateur coronaire
<i>Petroselinum crispum</i> <i>Petroselinum sativum</i>	Antispasmodique, diurétique

La diversité de leurs activités pharmacologiques, avec notamment une activité cytotoxique reconnue chez *Aethusa cynapium*, *Conium maculatum*, *Cicuta virosa* ou *Oenanthe crocata*, ont suscité des recherches phytochimiques intensives [1].

I. 1. 1. b. Caractéristiques des Apiaceae

Les Apiaceae étaient déjà connues des anciennes civilisations chinoise et indienne du Mexique, ainsi que des Grecs et des Romains. Elles semblent être la première famille de plantes à fleurs reconnue en tant que telle par les botanistes vers la fin du XVI^e siècle. Ce fut

aussi le premier groupe de plantes faisant l'objet d'une étude systématique publiée par Robert Morison en 1672 [2].

Distribution

Les Apiaceae renferment environ 300 genres pour 2500 à 3000 espèces. La famille est répartie sur la majeure partie du globe (figure I.1), plus commune dans les régions montagneuses tempérées et relativement rare en zone tropicale [2].



Figure I. 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae [3]

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

Tableau I. 2 : Répartition mondiale des genres d'Apiaceae [3]

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

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 55 genres [4].

Le paragraphe suivant énumère les genres rencontrés en Algérie associés à leurs espèces respectives [4].

Amми (2), *Amмиopsis* (1), *Ammodaucus* (1), *Ammoides* (2), *Anethum* (1), *Anthriscus* (2), *Apium* (1), *Balansaea* (1), *Bifora* (1), *Brachyapium* (2), *Bunium* (7), *Bupleurum* (14), *Capnophyllum* (1), *Carum* (2), *Caucalis* (4), *Chaerophyllum* (1), *Conium* (1), *Conopodium* (1), *Coriandrum* (1), *Crithmum* (1), *Cuminum* (1), *Daucus* (11), *Echinophora* (1), *Elaeoselinum* (2), *Eryngium* (7), *Ferula* (5), *Foeniculum* (1), *Helosciadium* (3), *Heracleum* (1), *Hippomarathrum* (1), *Hohenackeria* (2), *Hydrocotyle* (1), *Kundmannia* (1), *Magydaris* (2), *Malabaila* (1), *Margotia* (1), *Oenanthe* (6), *Orlaya* (3), *Peucedanum* (3), *Petroselinum* (1), *Physocaulos* (1), *Pimpinella* (2), *Pituranthos* (4), *Reutera* (1), *Ridolfia* (1), *Sanicula* (1), *Scandix* (3), *Seseli* (4), *Smyrniium* (2), *Sison* (1), *Thapsia* (3), *Tinguarra* (1), *Tordylium* (1), *Torilis* (2), et *Turgenia* (1).

Un simple regard du contenu de cette liste permet de constater la diversité génétique algérienne de cette famille. Les genres *Bupleurum* et *Daucus* sont les plus riches au niveau spécifique avec respectivement 14 et 11 espèces. D'autres genres renferment moins d'espèces ; comme *Bunium* (7), *Eryngium* (7), ou *Oenanthe* (6), alors que la majorité des genres sont représentés par une seule espèce.

Certains genres renferment des espèces endémiques : *Ammoides* (1), *Brachyapium* (1), *Bunium* (4), *Bupleurum* (5), *Caucalis* (1), *Daucus* (1), *Ferula* (2), *Peucedanum* (1), *Pimpinella* (1), *Pituranthos* (4), *Oenanthe* (1). D'autres genres ne sont représentés que par des espèces endémiques telles que *Amмиopsis*, *Balansaea* et *Carum*.

Systematique

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae

Caractères morphologiques et anatomiques

Les Apiaceae sont l'une des familles les plus connues parmi les plantes à fleurs. Il s'agit d'une famille homogène sur le plan morpho-anatomique, en ce qui concerne notamment leurs inflorescences en ombelles (simples ou composées), leurs tiges fistuleuses et cannelées, leurs fruits (akènes), et leur composition chimique particulière (huiles essentielles conférant odeur, goût et même toxicité à beaucoup de ses membres).

* **Habitus** : la plupart des Apiaceae sont des plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, aux entre-nœuds creux ; elles sont parfois rampantes (*Hydrocotyle*), stolonifères (*Schizeilema*), en forme de rosette (*Gingidia*) ou en forme de coussin (*Azorella*). Plusieurs espèces arbustives et même parfois des arbres se rencontrent également, par exemple au sein du genre *Eryngium* avec *E. bupleuroides* et *E. sarcophyllum*, et plusieurs espèces arbustives de *Bupleurum* (exemple *B. fruticosum*).

* **Feuilles** : elles sont alternes, sans stipules, et généralement découpées, parfois entières, notamment chez les genres *Hydrocotyle* et *Bupleurum*.

* **Fleurs** : le principal type d'inflorescence est une ombelle simple ou composée, parfois très modifiée et réduite à une fleur unique comme chez certaines espèces d'*Hydrocotyle* et d'*Azorella*. Les fleurs peuvent être également regroupées en capitules denses entourés de bractées épineuses. L'ombelle caractéristique est une inflorescence au sommet plat dans laquelle les pédicelles partent d'un même point sur les pédoncules et sont de différentes longueurs afin d'élever toutes les fleurs à la même hauteur. Une ombelle composée comporte des ombelles terminales qui sont elles-mêmes disposées en ombelles. Des bractées sont souvent présentes à la base des pédoncules d'une ombelle composée, formant un involucre.

La fleur des Apiaceae consiste en cinq pétales, cinq étamines libres, un calice très réduit, un ovaire infère avec deux carpelles et deux loges, et un stylopode soutenant les deux styles.

* **Fruit** : présente une grande diversité. Il s'agit à la base d'un fruit sec schizocarpe qui se fend à maturité le long d'un septum en deux méricarpes à une graine, restant généralement suspendus quelque temps au carpophore puis s'en détachant. La surface externe du méricarpe possède normalement cinq côtes primaires et entre celles-ci quatre côtes

valléculaires secondaires. Dans les sillons entre les côtes primaires, dans les côtes elles-mêmes ou sur tout le fruit, se trouvent fréquemment des canaux résinifères.

I. 1. 2. Le genre *Carum*

I. 1. 2. a *Systématique*

Le genre *Carum* appartient à la sous famille des *Apioideae*, tribu des *Apiaceae* [3].

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Sous famille	Apioideae
Tribu	Apiaceae (Ammineae)
Genre	<i>Carum</i>

I. 1. 2. b. Caractéristiques botaniques

Fruits globuleux de 1.5-2.5 mm, nettement comprimés latéralement. Tige bi à tétra pennée, sépales très petits ou comprimés latéralement [4, 5].

I. 1. 3. Le genre *Bupleurum*

Le terme *Bupleurum*, ou Buplèvre en français [6], provient du grec *bous* signifiant bœuf, ainsi que *pleuron*, plèvre : ces deux mots ont pour but de faire allusion à la rigidité des feuilles de ce genre.

I. 1. 3. a Systématique

Le genre *Bupleurum* appartient à la sous famille des *Apioideae*, tribu des *Apieae*, sous tribu des *Carinae* [3].

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Sous famille	Apioideae
Tribu	Apieae (Ammineae)
Genre	<i>Bupleurum</i>

I. 1. 3. b. Description générale

Les plantes du genre *Bupleurum* [7] possèdent des fleurs jaunes dont le calice n'a pas de dents au sommet et dont les pétales (légèrement épais) s'enroulent en dedans. Les étamines se développent avant les styles et stigmates ; les styles sont le plus souvent moins longs que le disque à partir duquel ils partent.

Les spécimens du genre *Bupleurum* ont une taille allant de quelques centimètres à plusieurs dizaines de centimètres. Ils sont totalement glabres avec des feuilles entières. Le fruit est un schizocarpe plus long que large, un peu comprimé perpendiculairement, et disposant sur chacune de ses moitiés de 5 côtes plus ou moins saillantes. Deux cotylédons étroits et amincis en pétiole à leur base, apparaissent lors de la germination de la graine.

I. 1. 3. c. Utilisation en médecine traditionnelle

Trois espèces sont particulièrement utilisées à des fins médicinales en Asie : *Bupleurum chinense* DC., *Bupleurum Scorzonerifolium* Willd. et *Bupleurum falcatum* L., plus communément rassemblées sous le terme *Bupleuri radix* [8].

La médecine traditionnelle chinoise utilise les racines de ces plantes pour leurs vertus sédatives, analgésiques et antipyrétiques, dans le traitement des fièvres et hépatites infectieuses [9].

Les espèces du genre *Bupleurum* peuvent être prescrites seules, ou en combinaison avec d'autres plantes, constituant ainsi une « formule herbale ».

* ***Bupleurum seule***

Au Japon, les racines de *B. falcatum* sont la source principale de *Bupleuri radix* [10]. Il s'agit de loin de la drogue la plus fréquemment prescrite dans la médecine orientale. Elle est indiquée dans de nombreux symptômes tels que : hépatites chroniques [11], traitement des fièvres [12], menstruations irrégulières [13, 17], cirrhose [14], syndromes néphrotiques [15], maladies inflammatoires [16], états grippaux [17], malaria [17]. Elle est également reconnue pour ses effets stimulant, diurétique [18], et analgésique [19], et protège dans une certaine mesure des effets de substances hépatotoxiques [12, 13].

Toutes ces activités sont dues aux nombreux saponosides contenues dans la racine, notamment les saikosaponines a et d, qui sont pharmacologiquement les plus importantes.

* ***Bupleurum en formule herbales***

Citons quelques formules dans lesquelles *Bupleurum* est le constituant principal [20].

- Les *Bupleurum* d'Asie entrent dans la composition de remèdes de la médecine Kampo (le sho- saiko- to), avec un extrait constitué d'un mélange de sept plantes qui retarderaient l'apparition d'hépatocarcinomes chez les patients atteints de cirrhose. Cette préparation est également utilisée en cas de pneumonie, bronchite et en cas de grippe.

- *Saiko-keishi-to* est constitué d'un mélange de neuf plantes. Cette formulation est utilisée pour le traitement des gastrites accompagnées de douleurs abdominales, et des états grippaux.

- *Saiboku-to* est constitué d'un mélange de dix plantes. Il est prescrit pour soulager la toux et l'asthme bronchique.

- *Shingyaku-san* est constitué d'un mélange de quatre plantes. Ce mélange est préconisé dans les cas de cholécystite, ulcère gastrique et gastrite.

- *Long-dan-tan* est constitué d'un mélange de cinq plantes. Il s'agit de la composition herbale chinoise la plus utilisée pour le traitement des hépatites chroniques.

I. 1. 3. d. *Autres utilisations*

On peut retrouver quelques espèces du genre *Bupleurum* cultivées à des fins ornementales dans les parcs et jardins (*Bupleurum fruticosum* L. [21]).

I. 2. Travaux antérieurs

Les espèces nord-africaines *Carum montanum* Coss. et Dur. et *Bupleurum montanum* Coss., famille des *Apiaceae*, sujets de notre recherche, n'ont jamais, jusqu'à présent, fait l'objet d'études chimique et biologique.

Avant de présenter nos travaux de recherche sur ces deux espèces, il convient de présenter quelques travaux chimiques antérieurs relatifs à ces deux genres.

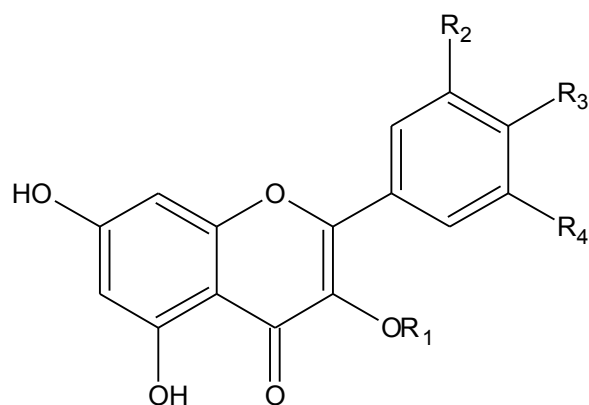
I. 2. 1. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre Carum

La majorité des travaux effectués sur le genre *Carum* a porté sur les huiles essentielles ainsi que les effets thérapeutiques de ces huiles [22-24]. D'autres travaux effectués sur les flavonoïdes simples et leurs hétérosides, ainsi que sur les coumarines sont plus limités.

I. 2. 1. a. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été les premiers composés étudiés dans ce genre. Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants. Ces métabolites secondaires sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques : antioxydante, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antivirale et antiallergique [25]. L'activité oestrogénique de certaines isoflavones a été mise en évidence [26].

Chez le genre *Carum*, les flavonoïdes sont représentés par des hétérosides et des aglycones. De l'espèce *Carum carvi* furent isolés et identifiés les flavonoïdes suivants : le quercétine-3-O- β -D-glucuronopyranoside **1**, quercétine-3-O- β -D-glucofuranoside **2**, kaempférol-3-O- β -D-glucoside **3**, quercétine-3-O- β -D-glucoside **4**, isorhamnétine **5** [27]. Les travaux de Crowden et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence du quercétine **6** et Kaempférol **7** dans l'espèce *C. rigidulum* et du kaempférol dans *C. verticillatum* [28].



N°	Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>1</u>	Quercétine-3-O-β-D-glucuronopyranoside	glucuronide	H	OH	OH
<u>2</u>	Quercétine-3-O-β-D-glucofuranoside	glucofuranoside	H	OH	OH
<u>3</u>	Kaempférol-3-O-β-D-glucoside	glucoside	H	OH	H
<u>4</u>	Quercétine-3-O-β-D-glucoside	glucoside	H	OH	OH
<u>5</u>	Isorhamnétine	H	OCH ₃	OH	H
<u>6</u>	Quercétine	H	H	OH	OH
<u>7</u>	Kaempférol	H	H	OH	H

Figure I. 2 : Structure chimique des flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Carum*.

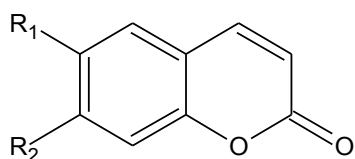
I. 2. 1. b. Coumarines

Les coumarines, et spécialement les furanocoumarines constituent un groupe de composés naturels ayant une large gamme d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés phototoxique, antibiotique, spasmolytique, antifongique et anticancéreuse [29].

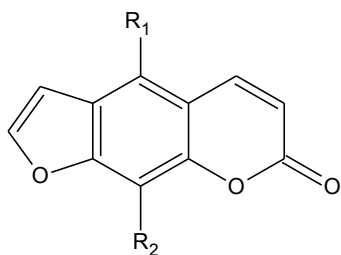
La présence des coumarines dans les graines de *Carum carvi* a été décrite la première fois par Nielsen (1970) [30], qui a mentionné l'identification de l'umbelliférone 8, de la coumarine 9 et de la scopolétine 10. Le tableau ci-dessous représente les dérivés coumariniques isolés de quelques espèces du genre *Carum*.

Espèce	Nom trivial	structure	référence
<i>C. appuanum</i>	Scopolétine	<u>10</u>	[31]
<i>C. carvi</i>	Herniarine	<u>11</u>	[32]
	Scopolétine	<u>10</u>	[33]
	Umbelliférone	<u>8</u>	[34]
	Coumarine	<u>9</u>	[35]
	Bergaptène	<u>12</u>	
	Xanthotoxine	<u>13</u>	
<i>C. roxburghianum</i>	Bergaptène	<u>12</u>	[36]
	Isopimpinélline	<u>14</u>	
	Seseline	<u>15</u>	
<i>C. verticillatum</i>	Coumarine	<u>9</u>	[28]

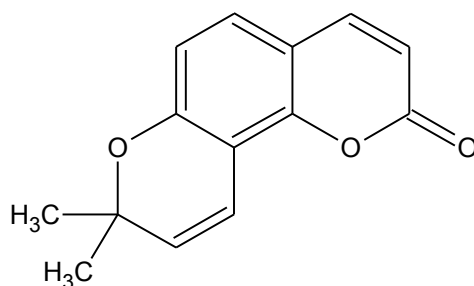
Tableau I. 3 : Les coumarines isolées de quelques espèces du genre *Carum*



	R ₁	R ₂
<u>8</u>	OH	H
<u>9</u>	H	H
<u>10</u>	OCH ₃	OH
<u>11</u>	H	OCH ₃



	R ₁	R ₂
<u>12</u>	OCH ₃	H
<u>13</u>	H	OCH ₃
<u>14</u>	OCH ₃	OCH ₃



15

Figure I. 3 : Structure chimique des coumarines isolées de quelques espèces du genre *Carum*.

I. 2. 1. c. Huiles essentielles

Avec le développement des techniques analytiques comme la GC/MS, des espèces du genre *Carum* ont été investiguées pour déterminer leur composition en huiles essentielles. Ces composants sont abondants dans les parties aériennes, mais aussi dans les racines. Pour une même plante, leur composition est différente pour chaque organe. Une variation dans la composition de cette huile essentielle est aussi possible pour la même espèce selon la saison et l'origine de la récolte de la plante, comme c'est le cas pour l'espèce *Carum copticum* Benth. & Hook., [24]. De plus les travaux effectués par El Wakiel et ses collaborateurs [22], sur l'espèce *Carum carvi* d'origine égyptienne et ceux de Pushmann (1992) [37], sur la même espèce cultivée en Europe, montrent bien la différence de la composition de l'huile essentielle.

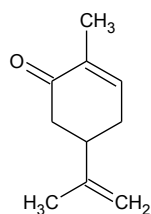
Le tableau suivant énumère les constituants des huiles issues des deux plantes.

Constituant	% des constituants de <i>Carum carvi</i> (Europe)	% des constituants de <i>Carum carvi</i> (Egypte)
S(+) carvone	50,46	80,17
R(+) limonene	47,66	9,75
Dihydrocarveols	0,56	0,04
Dihydrocarvones	0,18	0,70
Myrcen	0,35	0,06
Carvylacetate	0,16	Indet.
Carveols (cis et trans)	Indet.	0,24
Pinenes (α et β)	Indet.	0,06
Terpinolene	Indet.	0,20

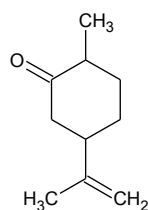
β -caryophyllene	Indet.	0,11
p-cymene	Indet.	0,06
Cumin aldehyde	Indet.	0,08
Cis-perillyl alcohol	Indet.	0,14
Cuminalcohol	Indet.	0,02
Composé indeterminer	Inferieur à 1%	8,17

Tableau I. 4 : Comparaison des constituants des huiles essentielles de *Carum carvi*

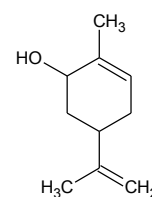
Les travaux de El Wakiel et son équipe ont permis de mettre en évidence dans les graines de *Carum carvi*, un composés majoritaire de cette huile essentielle le S (+) carvone, qui montre une activité biologique en tant qu'inducteur de détoxication d'activité enzymatique, et autre composés qui ont montré une activité antimicrobienne parmi lesquels, le limonène composé majoritaire, le dihydrocarvenes, le carveol, le myrcène, le terpinolene, le α -pinene, β -pinene, et le p-cymene.



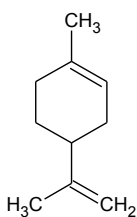
S (+) carvone



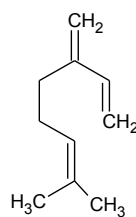
Dihydrocarvone



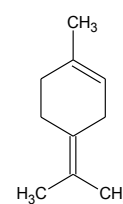
Carveol



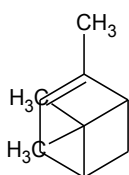
Limonene



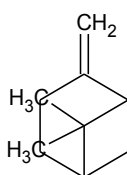
Myrcene



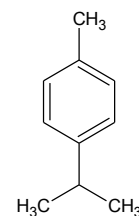
Terpinolene



α -pinene



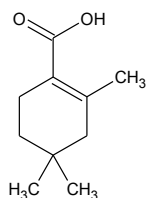
β -pinene



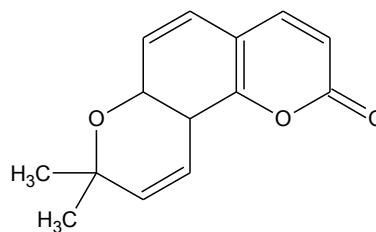
p-cymene

Figure I. 4 : Les constituants principaux de l'huile essentielle de *Carum carvi*

Les travaux de Sattar *et al.* [38], ont permis de mettre en évidence la présence de l'acide β -cyclolavandulic et de seselin dans l'huile essentielle des graines de *Carum roxburghianum*.



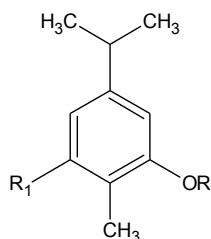
Acide β -cyclolavandulic



Seselin

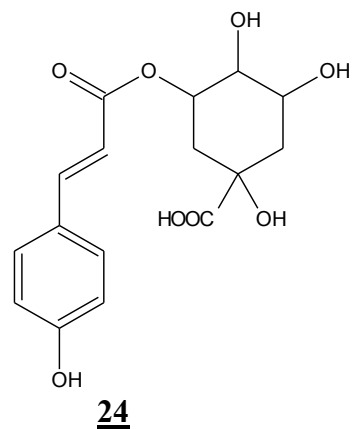
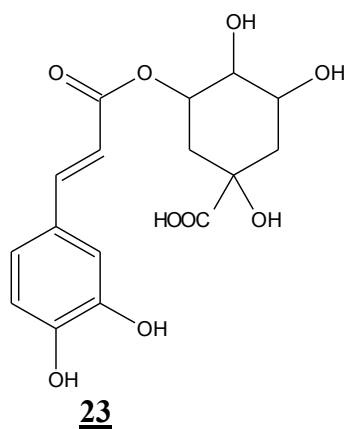
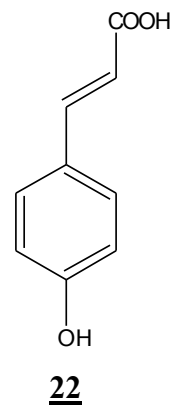
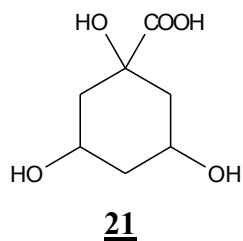
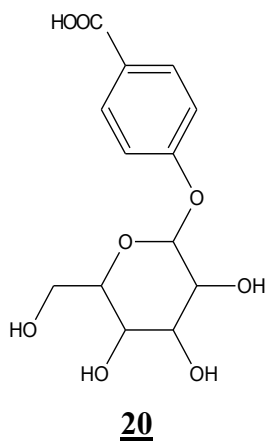
I. 2. 1. d. Divers

Les composés phénoliques ont été mis en évidence dans le genre *Carum*. Une étude effectuée par Garg et ses collaborateurs [39] sur les graines de *C. copticum* a révélé la présence de composés phénoliques simples **16**, **17** et **18** et sous la forme d'hétérosides **19**.

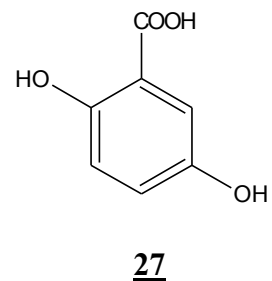
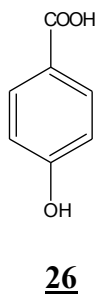
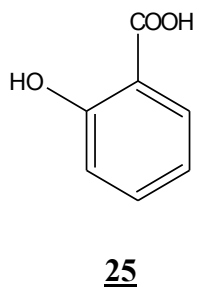


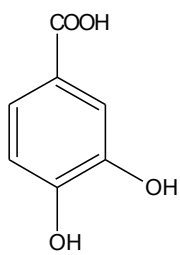
Structure	R	R ₁
16	Me	OH
17	H	OH
18	Me	H
19	H	OGlc

Dirks et Herrmann [40] ont identifié le 4-(β -D-glucopyranosyloxy) acide benzoïque **20** à partir de l'extrait aqueux des graines et des feuilles de *C. carvi*, ainsi que l'acide quinique **21**, l'acide p-coumaric **22**, l'acide 3-O-caffeoylquinic **23** et l'acide 3-O-coumaroylquinic **24**.

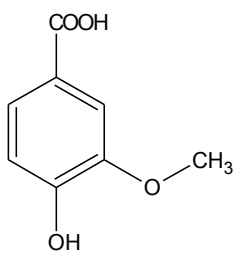


L'étude de Schultz et Herrmann [41] a montré la présence de six dérivés d'acides hydroxybenzoïques (**25** - **30**) et quatre dérivés hydroxycinnamiques (**31** - **34**) dans les graines de *C. carvi*

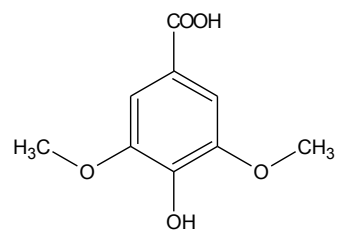




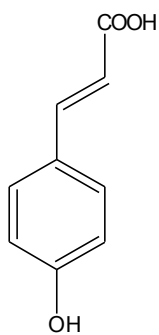
28



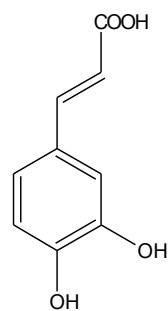
29



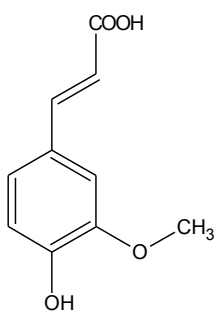
30



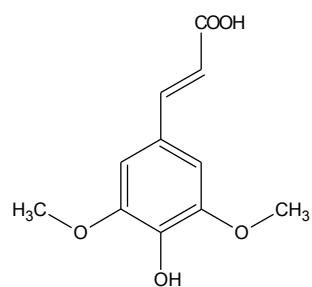
31



32



33



34

Figure I. 5 : Les composés phénoliques isolés du genre *Carum*.

I. 2. 2. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Bupleurum*

Le genre *Bupleurum*, du fait de sa grande diversité botanique, occupe au sein de la littérature phytochimique une place de choix.

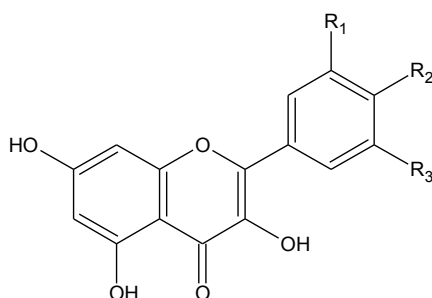
I. 2. 2. a. Flavonoïdes

Les travaux réalisés sur le genre *Bupleurum* ont permis de mettre en évidence la présence des flavonols tels que : Kaempférol, Quercétine et tamarixétine.

Le tableau suivant mentionne les flavonols aglycones isolés et identifiés chez le genre *Bupleurum*.

Espèce	Nom trivial	Structure	Référence
<i>B. angulosum</i>	Kaempférol	<u>35</u>	[28]
<i>B. chinense</i>	Quercétine	<u>36</u>	[42]
	Kaempférol	<u>35</u>	[43]
<i>B. tenue</i>	Kaempférol	<u>35</u>	[44]
<i>B. sibiricum</i>	Kaempférol	<u>35</u>	[45]
	Quercétine	<u>36</u>	
<i>B. polyclonum</i>	Quercétine	<u>36</u>	[46]
<i>B. spinosum</i>	Tamarixétine	<u>37</u>	[47]
<i>B. flavum</i>	Kaempférol	<u>35</u>	[48]
	Quercétine	<u>36</u>	
	Isorhamnétine	<u>38</u>	

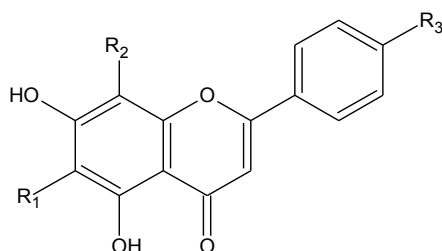
Tableau I. 5 : Les flavonols simples isolées de quelques espèces du genre *Bupleurum*



Structure	R ₁	R ₂	R ₃
<u>35</u>	H	OH	H
<u>36</u>	OH	OH	H
<u>37</u>	OH	OCH ₃	H
<u>38</u>	OCH ₃	OH	H

Figure I. 6 : Structure chimique des flavonols simples isolées de quelques espèces du genre *Bupleurum*.

Concernant les flavones aglycones du genre *Beupleurum*, très peu de publications mentionnent leurs présences. L'isoscutezarein-8-méthyl ether **39**, l'oroxylin **40** et la wogonin **41** chez l'espèce *B. scorzonifolium* ont été mises en évidence par Chang et son équipe [49].



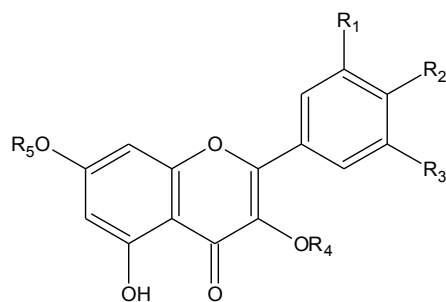
Structure	R ₁	R ₂	R ₃
<u>39</u>	H	OMe	OH
<u>40</u>	OMe	H	H
<u>41</u>	H	OMe	H

Figure I. 7 : Structure chimique des flavones simples isolées de quelques espèces du genre *Bupleurum*.

Comme pour les formes aglyconiques, la majorité des hétérosides identifiés sont des hétérosides de flavonols. Ceci étant, la position privilégiée pour la fixation de la partie osidique est souvent la position trois, alors que pour les autres positions, quelques hétérosides correspondants ont été signalés

Espèce	Nom trivial	Structure	Référence
<i>B. chinense</i>	Quercétine-3-glucoside	<u>42</u>	[50]
	Quercétine-3-rhamnoside.	<u>43</u>	[42]
	Quercétine-3-arabinoside.	<u>44</u>	
	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[51]
	Kaempférol-7-rhamnoside	<u>46</u>	[43]
	Kaempférol-3, 7-dirhamnoside	<u>47</u>	
	Kaempférol-3-O- α -L-arabinofuranoside	<u>48</u>	[52]
<i>B. langicaule</i>	Quercétine-3-glucoside	<u>42</u>	[46]
	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[53]
<i>B. sibiricum</i>	Quercétine-3-rhamnoside	<u>43</u>	[45]
	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	
<i>B. polyclonum</i>	Quercétine-3-arabinoside	<u>44</u>	[46]
<i>B. kunmingense</i>	Quercétine-3-arabinoside	<u>44</u>	[46]
<i>B. chaishoui</i>	Quercétine-3-arabinoside	<u>44</u>	[46]
<i>B. falcatum</i>	Quercétine-3-arabinoside	<u>44</u>	[54]
	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[28]
<i>B. scorzonerifolium</i>	Kaempférol-7-rhamnoside	<u>46</u>	[55]
	Kaempférol-3, 7-dirhamnoside	<u>47</u>	
<i>B. spinosum</i>	Tamarixetine-3-O- β -D-galactopyranoside	<u>49</u>	[47]
<i>B. angulosum</i>	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[28]
<i>B. dianthifolium</i>	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[28]
<i>B. gibraltarium</i>	Kaempférol-3-rutinoside	<u>50</u>	[28]
<i>B. flavum</i>	Kaempférol-3-rutinoside	<u>50</u>	[48]
	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	
	Isorhamnetine-3-rutinoside	<u>51</u>	
	Kaempférol-3-glucoside	<u>52</u>	
	Quercétine-3-glucoside	<u>42</u>	
<i>B. aureus</i>	Quercétine-3-rutinoside	<u>45</u>	[56]

Tableau I. 6 : Les hétérosides isolés de quelques espèces du genre *Bupleurum*

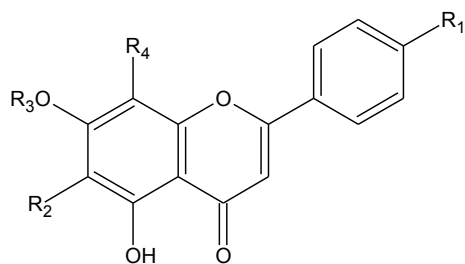


Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>42</u>	OH	OH	H	Glucoside	H
<u>43</u>	OH	OH	H	Rhamnoside	H
<u>44</u>	OH	OH	H	Arabinoside	H
<u>45</u>	OH	OH	H	Rutinoside	H
<u>46</u>	H	OH	H	H	Rhamnoside
<u>47</u>	H	OH	H	Rhamnoside	Rhamnoside
<u>48</u>	H	OH	H	Arabinofuranoside	H
<u>49</u>	OH	OCH ₃	H	Galactopyranose	H
<u>50</u>	H	OH	H	Rutinoside	H
<u>51</u>	OCH ₃	OH	H	Rutinoside	H
<u>52</u>	H	OH	H	Glucoside	H

Figure I. 8 : Structure chimique des hétérosides isolées de quelques espèces du genre *Bupleurum*.

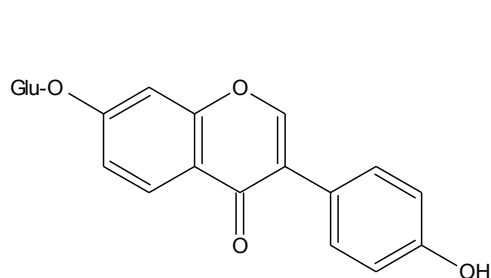
D'après la liste des produits à hétérosides de flavonols isolés chez le genre *Bupleurum*, on constate que l'hydroxyle en position cinq est toujours libre et que certains produits comme le tamarixetin-3-robinobioside a été cités comme produits nouveaux [47].

Le genre *Bupleurum* contient aussi des hétérosides à base de flavones tels que : Acacetin-7-rutinoside (linarin) **53** et 5,7,4'-trihydroxyflavone-6,8-di-C-glucoside (Vicenin) **54** ont été mises en évidence chez *B. chinense* [42].

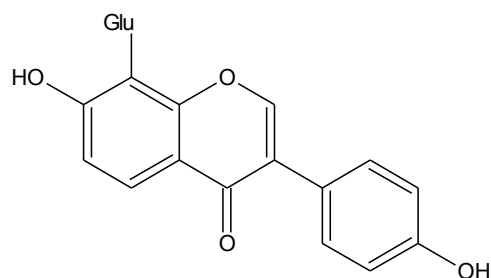


Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>53</u>	OCH ₃	H	Rutinoside	H
<u>54</u>	OH	Glucoside	H	Glucoside

La présence des isoflavones, comme le daidzin **55** et le Puerarin **56** chez quelques espèces du genre *Bupleurum* a été mise en évidence [57].



55



56

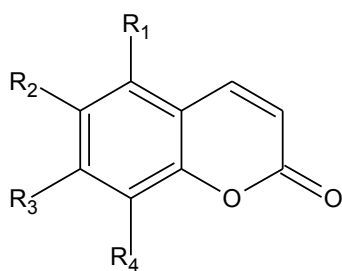
I. 2. 2. b. Coumarines

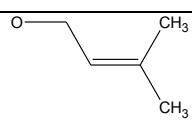
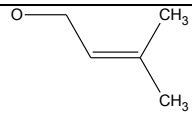
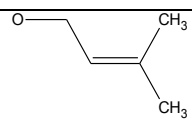
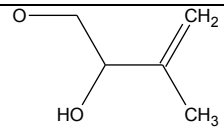
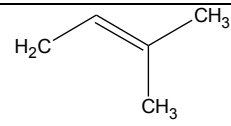
L. Pistelli et ses collaborateurs [58], dans une étude phytochimique menée sur les racines de l'espèce *B. fruticosum*, ont pu isoler neuf composés coumariniques (**57- 65**). Le composé 7-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyloxy)-6-methoxycoumarin **64** a été isolé pour la première fois de *Pterocaulon virgatum*, mais c'est sa première détection dans le genre *Bupleurum* et dans l'Apiaceae [58]. D'autres coumarines ont été isolées de différentes espèces. Ils sont surtout des coumarines simples ou prénylées. La présence de furanocoumarines et de pyranocoumarines a été également mise en évidence.

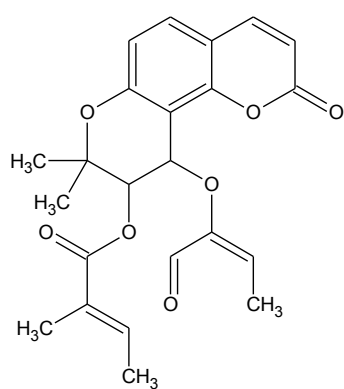
Le tableau I. 7 montre les composés coumariniques isolés et identifiés chez le genre *Bupleurum*.

Espèce	Nom	Structure	Référence
<i>B. fruticosum</i>	Scopoletine	<u>57</u>	[58]
	Scoparone	<u>58</u>	
	Prenyletine	<u>59</u>	
	Capensine	<u>60</u>	
	Fraxetine	<u>61</u>	
	Aesculetine	<u>62</u>	
	7-(3-methyl-2-butenyloxy)-6-methoxycoumarine	<u>63</u>	
<i>B. falcatum</i>	7-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyloxy)-6-methoxycoumarine	<u>64</u>	
	5,7-dihydroxy-6-methoxy-8-(3-methyl-2-butenyl) coumarine	<u>65</u>	
<i>B. fruticosum</i>	Anomaline	<u>66</u>	[59]
	Angelicine	<u>67</u>	[60]
<i>B. fruticescens</i>	Isoscopoletine	<u>68</u>	[61]
	Scoparone	<u>58</u>	
	6, 7, 8-Trimethoxycoumarine	<u>69</u>	

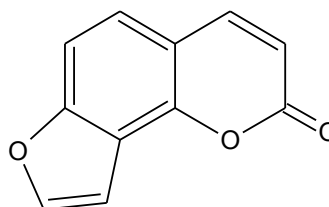
Tableau I. 7 : Les coumarines isolées chez quelques espèces du genre *Bupleurum*



Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>57</u>	H	OMe	OH	H
<u>58</u>	H	OMe	OMe	H
<u>59</u>	H	OH		H
<u>60</u>	H	OMe		OH
<u>61</u>	H	OMe	OH	OH
<u>62</u>	H	OH	OH	H
<u>63</u>	H	OMe		H
<u>64</u>	H	OMe		H
<u>65</u>	OH	OMe	OH	
<u>68</u>	H	OH	OMe	H
<u>69</u>	H	OMe	OMe	OMe



66



67

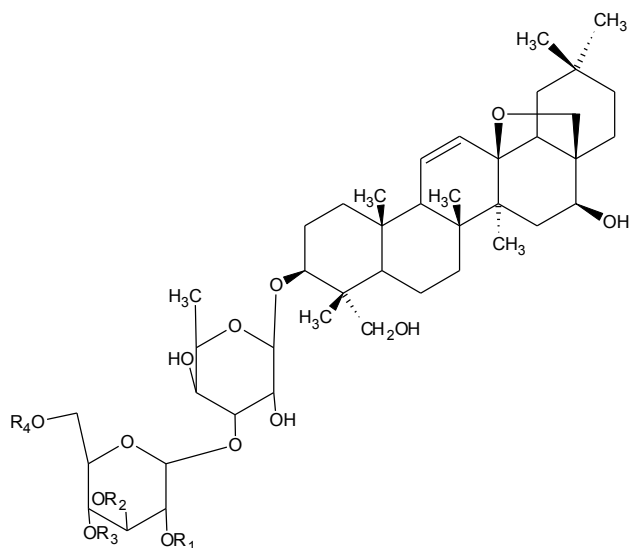
I. 2. 2. c. Saponosides

Les saponosides sont des saponines triterpéniques de la série oléane appelées aussi saikosaponines. Ces saikosaponines possèdent de nombreuses activités biologiques, antalgiques, anti-inflammatoires et anticoagulantes [62].

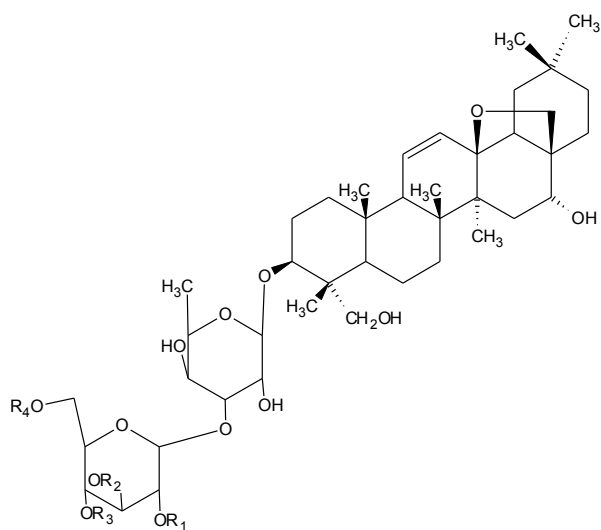
Les sucres habituellement attachés à la génine sont le glucose, le fucose, le rhamnose et rarement le xylose. De l'espèce *Bupleurum falcatum*, Ebata et son équipe ont pu isoler et identifier trois nouveaux produits **78**, **80** et **81** ainsi que d'autres saikosaponines [63].

Espèce	Nom	Structure	Référence
<i>B. falcatum</i>	6''-O-Malonyl saikosaponine a	70	[63]
	6''-O-Malonyl saikosaponine d	71	
	2''-O-Acétyl saikosaponine a	72	
	3''-O-Acétyl saikosaponine a	73	
	4''-O-Acétyl saikosaponine a	74	
	6''-O-Acétyl saikosaponine a	75	
	2''-O-Acétyl saikosaponine d	76	
	3''-O-Acétyl saikosaponine d	77	
	4''-O-Acétyl saikosaponine d	78	
	6''-O-Acétyl saikosaponine d	79	
	Hydroxysaikosaponine a	80	
11-hydroxysaikosaponine f	81		
<i>B. scorzonerifolium</i>	Saikosaponine u	82	[64]
	Saikosaponine v	83	
<i>B. smithii var. parvifolium</i>	Saikosaponine o	84	[65]

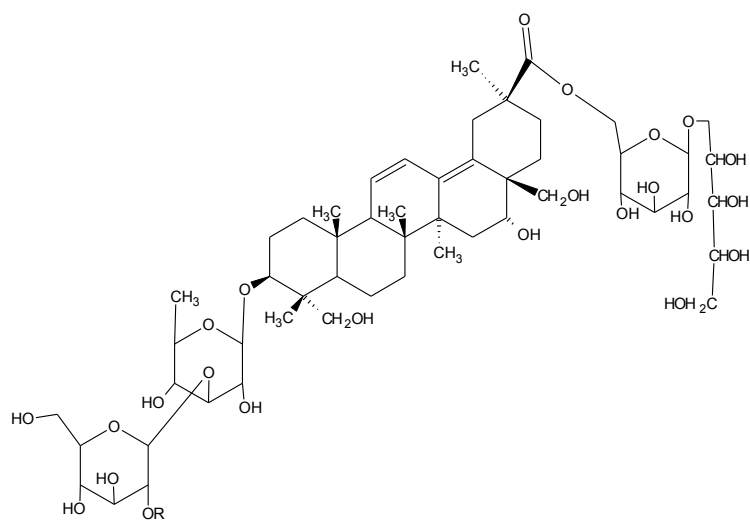
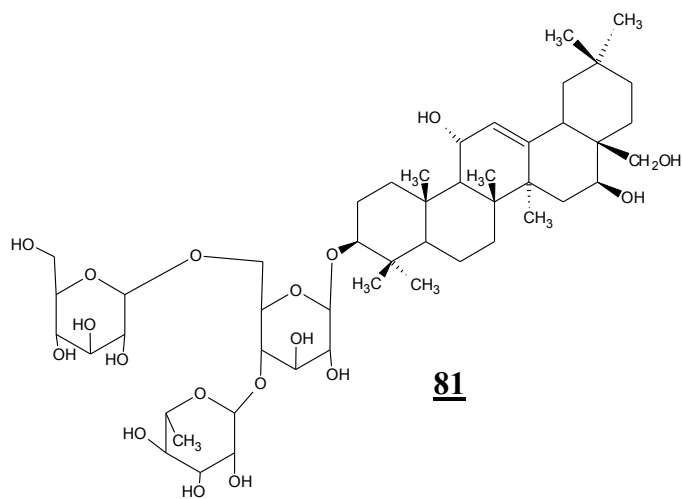
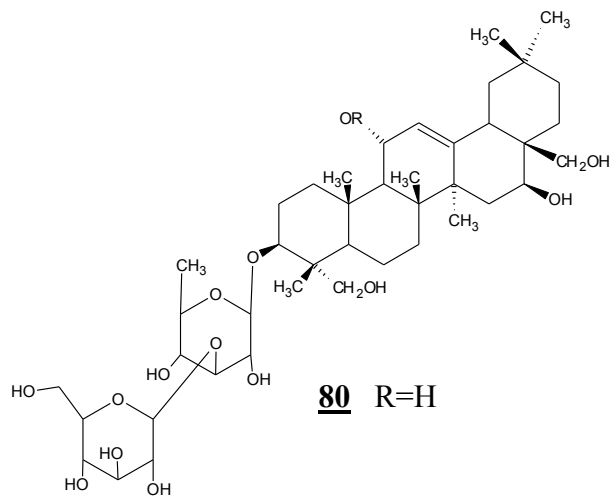
Tableau I. 8 : Les saponosides isolés de quelques espèces du genre *Bupleurum*

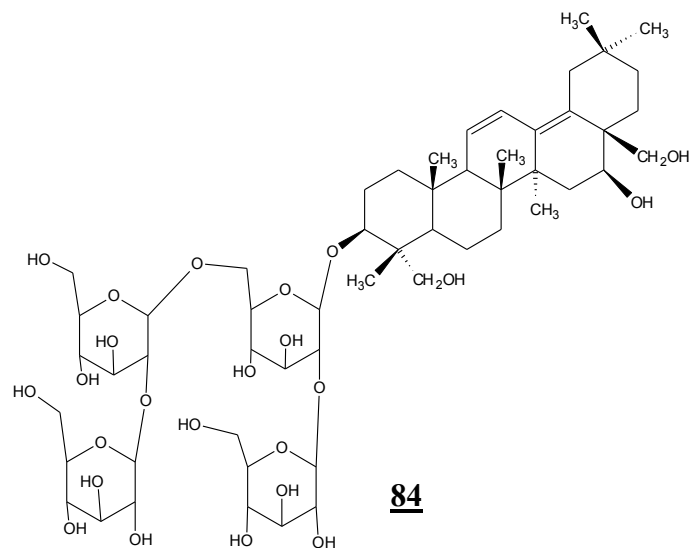


Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>70</u>	H	H	H	COCH ₂ CO ₂ H
<u>72</u>	Ac	H	H	H
<u>73</u>	H	Ac	H	H
<u>74</u>	H	H	Ac	H
<u>75</u>	H	H	H	Ac



Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>71</u>	H	H	H	COCH ₂ CO ₂ H
<u>76</u>	Ac	H	H	H
<u>77</u>	H	Ac	H	H
<u>78</u>	H	H	Ac	H
<u>79</u>	H	H	H	Ac





Références

1. Spichier R. E., Salvolainen V. V., Figeat M., Jeanmonod D., (2004) *Botanique systématique des plantes à fleurs Troisième édition revue et corrigée* P. 342.
2. Heywood V. H., Moore D. M., Richardson I. B. K. et Stearn W. T., (1996), *Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale* P. 218- 219.
3. Pimenov, M. G. and Leonov, M. V., (1993), *The genera of the Umbelliferae Nomenclature. Royal Botanic Gardens, Kew.*
4. Quezel P. et Santa S. (1963), *Nouvelle flore de l'Algérie et région désertiques Méridionales CNRS Paris*, Vol. 2 P. 676
5. Nemeth E., Tutin T. G., Heywood, V. H., Moore, D. M. Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A. (1978) *Caraway The Genus Carum Flora Europa Vol 2. Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press, Cambridge*
6. L'abbé H. Coste, (1985), *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes par l'abbé H. Coste*, tome II, Librairie scientifique et technique,.
7. Gaston Bonnier, (1990), *La Grande Flore en Couleurs de Gaston Bonnier*, France, Suisse, Belgique et Pays Voisins, Texte 3, Editions Belin.
8. Bruneton J, (1999), *Pharmacognosie (Phytochimie des plantes médicinales)*, 3ème édition, Editions TEC & DOC.
9. Fumio I., Yuichi F., Kazuhisa I. and Tesuo S. (2003), *Chemico-Biological Interactions*, 145, 235-250.
10. Masateru O., Aki Y., Yasuyuki I and Toshihuro N. (1999), *Phytochemistry*, 51, 819-823.
11. Li T., Yuying Z., Guanagzhong T., Bin W., Shoaging C. and Riuji Z. (1999), *Phytochemistry*, 50, 139-142.
12. Hisashi M., Toshiyuki M., Kiyofumi N., Masahio I., and Masayuki Y. (1997), *Bio organic and medicinal Chemistry Letters* 2193-2198.
13. Pistelli L., Bertoli A., Bilia A. R. and Morelli I., (1996), *Phytochemistry*, 41, 1579-1582.
14. Yaung-Leung C., Wen-Liang C. and Shin-Chun L., (2003), *Life sciences*, 73, 2383-2394.
15. Tsukasa M., Masumi H., Hiroki K. and Haruki Y., (1995), *Carbohydrate Research*, 270, 221-229.
16. Guo Y., Tsukasa M., Yuji K., Takashi I., Benxiang W. and Haruki Y., (2000), *Immunopharmacology*, 49, 307-316.
17. Chang W. L., Chiu L. W., Lai J. H. and Lin H. C., (2003), *Phytochemistry*, 64, 1375-1379.

18. Guillermo M. M., Francisco M. G., Zacarias D. J., and Luis G. C., (1997), *Phytochemistry*, 44, 173-177.
19. Mokoto M., Kaoru N., Yukinoba I. And Hiroshi M. (1991), *Phytochemistry*, 30, 1543-1545.
20. Chou C.C., Pan S. L., Teng C. M. And Guh J. H., (2003), *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 403-412.
21. Heywood V. H., (1996), *Les Plantes à Fleurs*, Editions Nathan, Paris.
22. El Wakeil F., Khairy M. M., Farag R. S., Shihata A. A., and Badei A. Z. N. A. (1986), *Seifen-Oele-Fette-Wachse*, 112, 77-80.
23. Borg-Karlson A. K., Valterova I., and Nilsson L. A., (1994), *Phytochemistry*, 35, 111-119.
24. Mohagheghzadeh A., Faridi P., and Ghasemi Y. (2007) *Food Chemistry* 100, 3, 1217-1219.
25. Andersson, C.M., Hallberg, A., Högberg, T. (1996). *Advances in Drug Research* 28, 65-180.
26. Harborne, J.B., Williams, C. A. (2000). *Phytochemistry* 55, 481 –504.
27. Kunzemann J. and Herrmann K., (1977), *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 164(3), 194-200.
28. Crowden R. K., Harborne J. B., and Heywood V. H., (1969), *Phytochemistry*, 8, 1963-1984.
29. Hagmar B., (1969), *Pathol. Europ.*, 4, 283.
30. Nielson B. E., (1970) Coumarins and Umbellifereae Plants. *The Royal Dunnish School of Pharmacy Copenhagen*.
31. Innocenti G., Pagni A. M., and Corsi G., (1990), *Fitoterapia*, 61(2), 190.
32. Kartnig, T., and Moeckel, H., (1973), *Sci. Pharm.*, 41, 102.
33. Kartnig, T., and Scholz, G., (1969), *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 71, 276; *Chem. Abstr.*, 71, 57561 (1969).
34. Krotova I. V., Efremov A. A., and Krasnoyarsk. Gos. Torgovo-Ekon. (2002), *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya* (3), 29-33.
35. Ceska O., Chaudhary S. K., Warrington P. J., and Ashwood-Smith M. J., (1987) *Phytochemistry*, 26, 1, 165-169.
36. Ashraf, M., Aziz, J., and Bhatti, M. K., (1977) *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 20, 48
37. Pushmann G., Stephani F., and Fritz D., (1992) *Gartenbauwissenschaft*, 57, 257-277.
38. Sattar A., Ashraf M., Bhatti M. K. and Chisti N. H., (1978) *Phytochemistry* 17, 559-560.
39. Garg S. K., Sharma N. D. and Gupta S. R. (1980) *Phytochemistry*, 19, 2215-2216.

40. Dirks U. and Herrmann K. (1984) *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 179, 12-16.
41. Shulz J. M. and Herrmann K. (1980) *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 171, 193-199.
42. Zhang T., Zhou J. and Wang Q. (2007) *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 801-804.
43. Luo, S.-Q., Jin, H.-F., (1988). *China J. Chin. Mater. Med.* 13, 36.
44. Li, H.-Y., Lu, C.-G., Li, X.-H., (1985). *J. Integr. Plant Biol.* 127, 75.
45. Song, Z.-Zh., Jia, Zh.-J., Zhu, Q.-X., (1992). *J. Lanzhou Univ.* 28, 99.
46. Luo, S.-Q., Jin, H.F., (1991). *China J. Chin. Mater. Med.* 16, 353.
47. Barrero, A.F., Haidour, A., Muqoz-Dorado, M., Akssira, M., Sedqui, A., Mansour, I., (1998). *Phytochemistry* 48, 1237.
48. Gevrenova R., Dimitrova B. and Asenov Iv. (1997), *Blug. Farmatsiya*, 44, 9-14.
49. Chang, W.-L., Chiu, L.-W., Lai, J.-H., Lin, H.-C., (2003), *Phytochemistry*, 64, 1375.
50. Li, H.-Y., Feng, X., (1987). *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 18, 9.
51. Liang, H., Zhao, Y.-Y., Cui, Y.-J., Liu, Q.-X., (2000). *J. Beijing Med. Univ.* 32, 223.
52. Wang, N., Wang, J.-H., Li, X., (2005). *J. Shenyang Pharm. Univ.* 22, 342.
53. Liu, Q.-G., Gao, Y.-J., Li, C.-F., (1990). *China J. Chin. Mater. Med.* 15, 358.
54. Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A., Morelli, I., (1993). *Phytochemistry* 33, 1537.
55. Shi, Y.-N., Xu, L., (1980). *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 11, 241.
56. D'yakonova L. N. (1960) *Aptechnoe Delo*, 9,12-15.
57. Liang, X.-T. and Zhao, Y.-Y., (2003). *Foundational Research of the Traditional Medicine in Common Use.* 467.
58. Pistelli L., Bertoli A., Bilia A. R. and Morelli I. (1996), *Phytochemistry*, 41, 1579-1582.
59. Banerji J., Rej R. N. and Handa K. L., (1977), *Indian J. Chem.*, 15B, 293.
60. Nakabayashi T., Kubo J., and Yoshimoto M., (1964), *Kagaku Zasshi*, 85, 558; *Chem. Abstr.*, 63, 3314 (1965).
61. Gonzalez A. G., Trujillo J. M., Estévez Reyes R. and Pérez J. P., (1975) *An. Quim.*, 71, 109
62. Namsoo K. and In-Seon P. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1648-1651.
63. Ebata N., Nakajima K., Hayashi K., Okada M. and Maruno M.,(1996) *Phytochemistry*,41, 895-901.
64. Tan L., Zhao Y., Tu G., Wang B., Cai S., and Zhang R., (1999) *Phytochemistry*, 50, 139-142.

65. Zhao Y. Y., Luo H., Wang B., Ma L. B., Tu G. Z., and Zang R. Y. (1996) *Phytochemistry*, 42, 1673-1685.

II. 1. Les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires issus des plantes. A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits [1, 2]. Ces flavonoïdes sont des pigments jaunes (dérivés du mot latin « flavus » qui veut dire jaune, ils sont présents dans toutes les organes des plantes : feuilles, fleurs, graines, racines, etc.

Flavonoïdes est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure II-1).

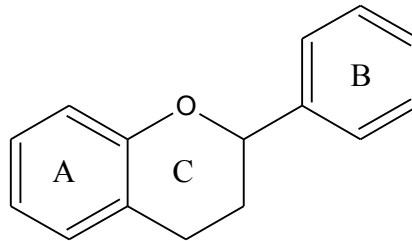


Figure II-1 : Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes se présentent souvent sous forme d'hétérosides, solubles dans l'eau (localisés généralement dans les vacuoles cellulaires) ou solubles dans les solvants apolaires (situés dans le cytoplasme) [3].

II. 1. 1. Biosynthèse des flavonoïdes

Dérivant d'une origine biosynthétique commune, les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

a. La voie de l'acide shikimique

Les travaux de Davis ont montré le rôle de l'acide shikimique dans la formation du noyau B et l'élément central C-3 à partir du glucose [4]. Le chemin général de la formation de l'acide coumarique est représenté sur la figure II-2.

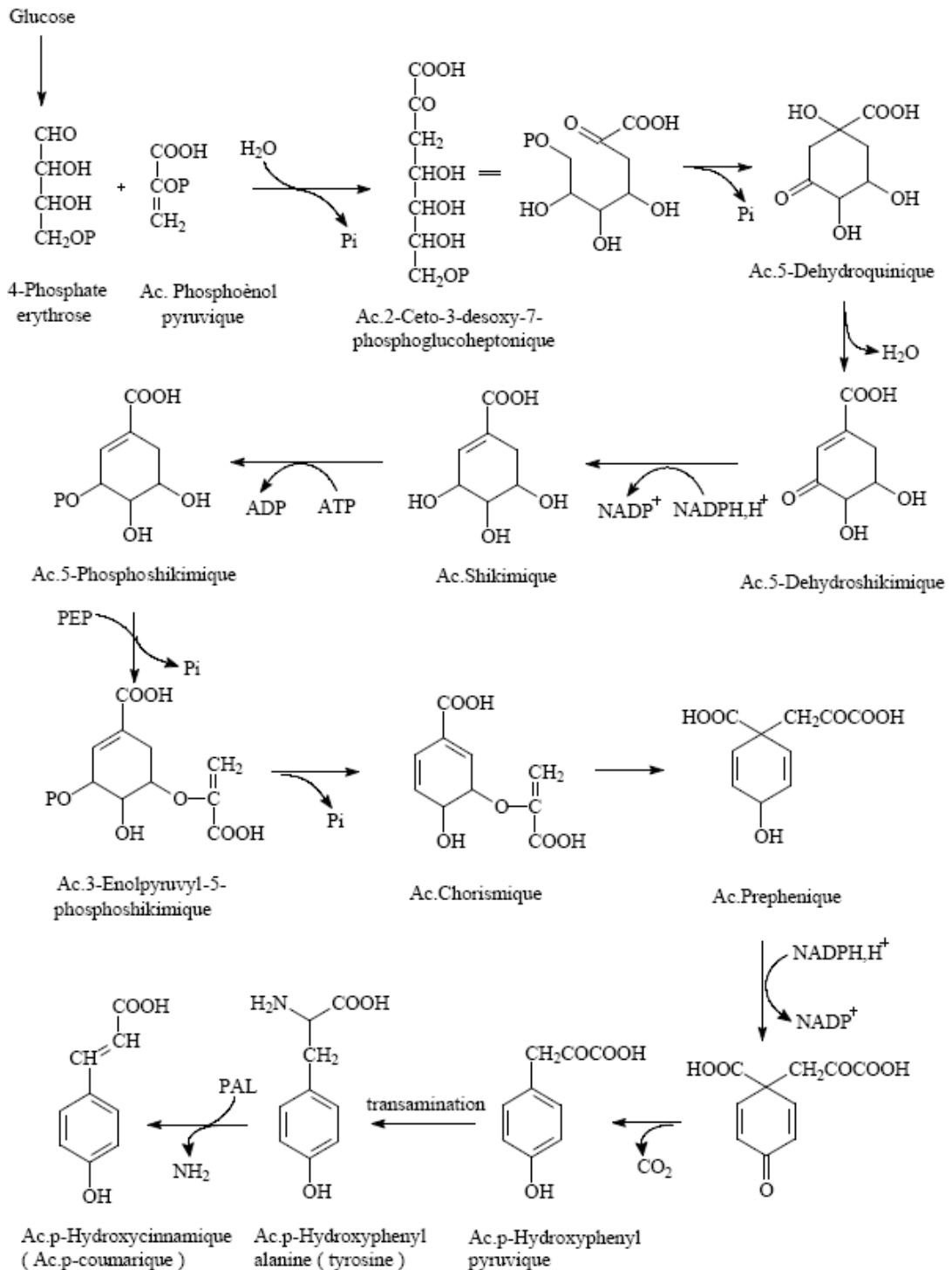
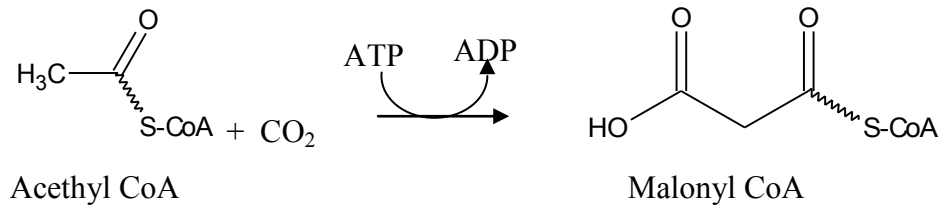


Figure II-2 : Chemin de formation de l'acide p-coumarique

b. La voie malonate :

A travers cette voie s'effectue la cyclisation de la chaîne poly-cétonique obtenue par condensation répétée d'unités acétates, et catalysée par l'acétyl-CoA.



Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase) [5]. Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(*S*)-flavanone : la naringénine. De ce précurseur, divergent les différentes classes de flavonoïdes (Figure II-4) [6, 7].

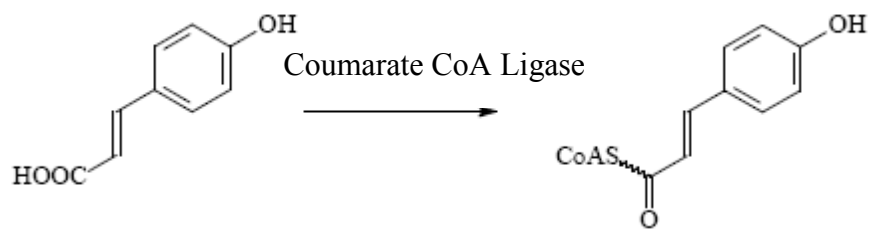


Figure II-3 Formation de *p*-Coumaroyl CoA

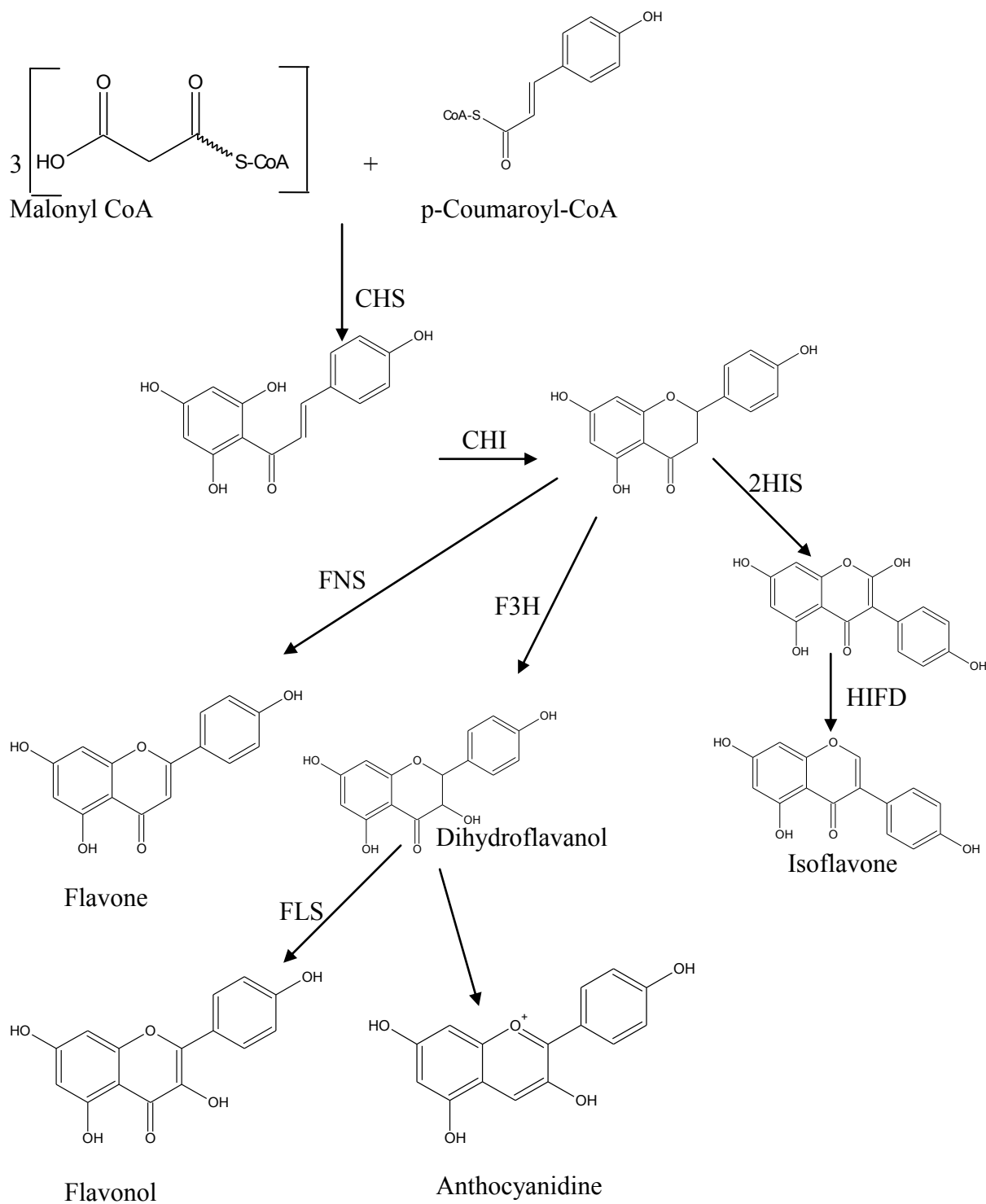


Figure II-4 : Les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes [6, 7].

Enzymes : CHS : Chalcone synthase., CHI : Chalcone isomérase., FNS : Flavone synthase., FLS : Flavonol synthase., HIFD : 2-Hydroxy isoflavanone déhydratase., 2HIS : 2-hydroxy isoflavone synthase. et F3H : (2S)flavanone-3-hydroxylase.

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. La figure II-5 représente quelques structures de flavonoïdes sous leurs différentes formes.

La substitution du groupement phényle en position 3, au lieu de la position 2, sur le cycle C, mène aux isoflavonoïdes (figure II-5).

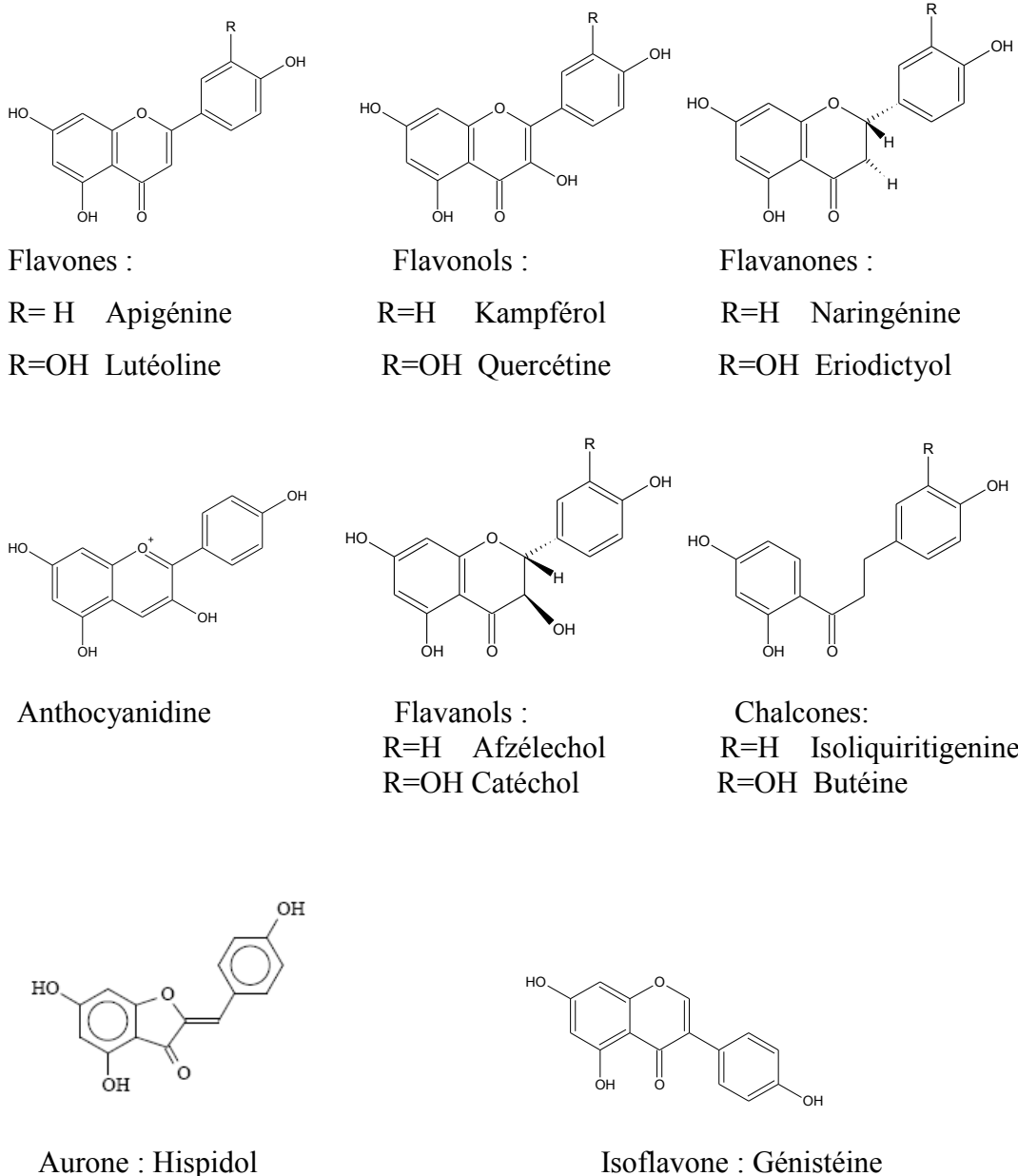


Figure II-5 : Structure de quelques classes des flavonoïdes

II. 1. 2. Substitution des flavonoïdes

II. 1. 2. 1. L'hydroxylation :

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Dans toutes les classes, la biosynthèse justifie la présence de deux hydroxyles en position C-5 et C-7 sur le noyau A et en position 4' sur le noyau B. Ces hydroxyles sont appelés des hydroxyles originaux. Ils sont introduits avant la formation du chalcone. La majorité des flavones et des flavonols, qui représentent 80% des flavonoïdes, sont hydroxylés en C-5, C-7 et C-4'. La dihydroxylation en C-3', C-4' et la trihydroxylation en C-3', C-4' et C-5' sont introduits après la formation du chalcone par l'intermédiaire des enzymes (hydroxylase) [8].

II. 1. 2. 2. Méthylation :

La méthylation des groupes hydroxyles portés par le squelette flavonique se fait sous l'action de l'enzyme O-méthyl-transférase en présence de S-Adenosyl Methionine comme donneur du groupement méthyle [9].

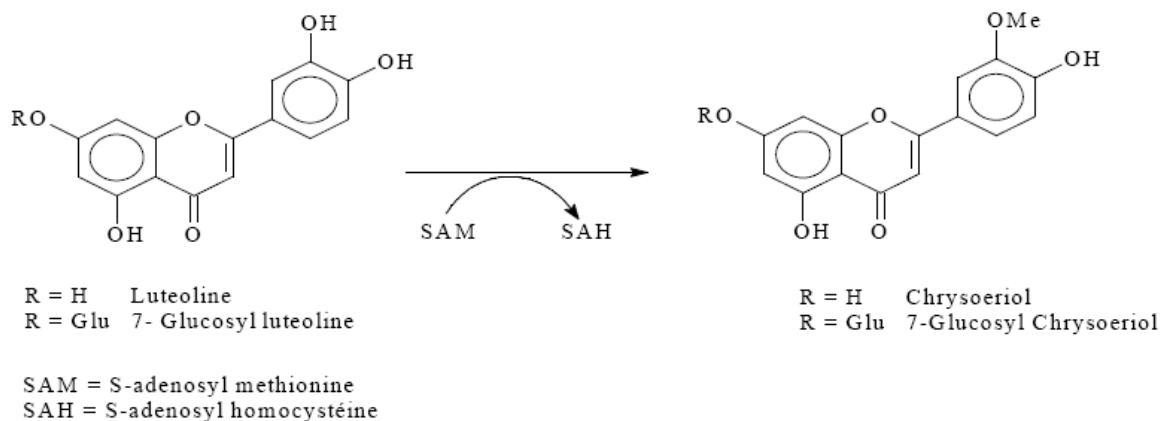


Figure II-6 : Transformation enzymatique du Luteoline au Chrysoeriol.

La fixation de plusieurs méthyles se fait sous l'action de différents enzymes. A titre d'exemple, le premier transforme la quercétine en 3-méthyl quercétine, le deuxième favorise la transformation du 3-méthyl quercétine en 3,7-diméthyl quercétine et le même protocole pour la formation du 3, 7, 3'-triméthyl quercétine.

Dans la C-méthylation, le méthyle se lie au noyau benzénique par une liaison carbone-carbone. Elle se fait généralement en C-6 et / ou C-8.

II. 1. 2. 3. Glycosylation :

Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine.

La partie osidique peut être mono, di ou trisaccharide. Les monosides sont formés avec le D-glucoside mais aussi avec le D-galactose, le D-glucose (de loin le monosaccharide le plus courant), avec des pentoses (D-xylose, le L-arabinose et le L-rhamnose) ou des acides uroniques (le plus souvent l'acide D glucuronique). Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate [10].

La glycosylation a pour effet de rendre les flavonoïdes moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules [8].

II. 1. 2. 3. a. O-glycosylation :

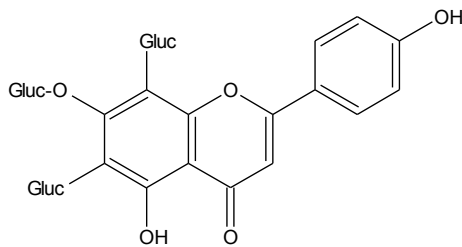
La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un quelconque des hydroxyles phénoliques de la génine mais, en règle général, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont impliqués [8]. La variabilité structurale des hétérosides de flavonols est de loin plus large que des hétérosides des flavones [11]. La liaison s'effectue entre l'hydroxyle phénolique et le sucre sous l'action de l'enzyme O-glucosyle transférase en présence d'un donneur du sucre comme le UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose) [12].



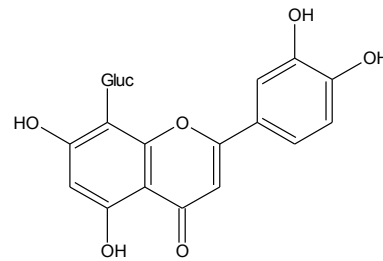
II. 1. 2. 3. b. C-Glycosylation

La liaison s'établit entre le carbone anomérique de l'ose et le carbone de la génine. Les positions 6 et 8 qui sont concernées par ce type de substitution [12]. On distingue plusieurs types de structures : mono-C-glycosylflavonoïdes, di-C-glycosylflavonoïdes, C-glycosyl-O-glycosylflavonoïdes.

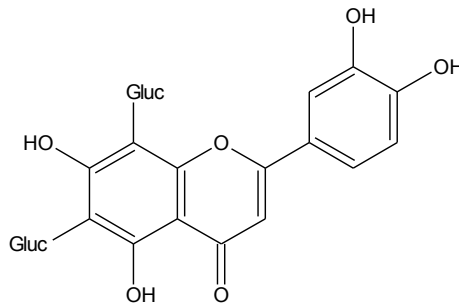
Exemple :



C-glycosyl-O-glycosylflavonoïdes
(7-O-glucoside de Vicénine)



mono-C-glycosylflavonoïdes
(Orientine)



di-C-glycosylflavonoïdes
(Vicénine)

II. 1. 3. Distribution et localisation

II. 1. 3. a. Distribution

La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes [13]. Les flavonoïdes sont des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale en raison de leur distribution *quasi* ubiquitaire dans les plantes, alliée à leurs relative stabilité et facilité d'identification ainsi que la production pour des individus taxonomiquement proches des mêmes types de flavonoïdes [14, 15].

II. 1. 3. b. Localisation

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [8].

II. 1. 4. Intérêt des flavonoïdes :

II. 1. 4. 1. Intérêt vis-à-vis des plantes :

Les flavonoïdes jouent principalement deux rôles pour la plante : l'un attractif et l'autre protecteur, comme exposés ci-dessous.

- Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs [16]. Par exemple, les couleurs orange, rouge et bleue des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines).

- Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Les flavonoïdes ont également des propriétés fongicides, bactériennes [17] et insecticides [18] et protègent les plantes contre les champignons et les insectes.

II. 1. 4. 2. Intérêt pharmacologique :

Les flavonoïdes présentent une activité antioxydante, protectrice contre les effets néfastes des entités radicalaires oxygénées. Les données de la littérature montrent une mise en évidence d'un rapport certain entre la structure flavonique et l'activité antioxydante.

- Nombre et position des groupes hydroxyles et particulièrement ceux substitués en position 3, ortho dihydroxyles sur le noyau B et en position 5 et 7 sur le noyau A.
- La présence du groupe hydroxyle en position 3 et de la double liaison en position $C_2=C_3$ conjuguée avec le groupement carbonyle en position 4 est exigée pour l'activité antioxydante [20].
- Les génines de flavonoïdes ont un pouvoir antioxydant plus puissant que celui des hétérosides [21].
- La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique annule l'activité anti-oxydante des flavonoïdes [22, 23].

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde (O_2^{\cdot}). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération des cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [19].

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH^{\cdot}). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer comme le montre le schéma [24].

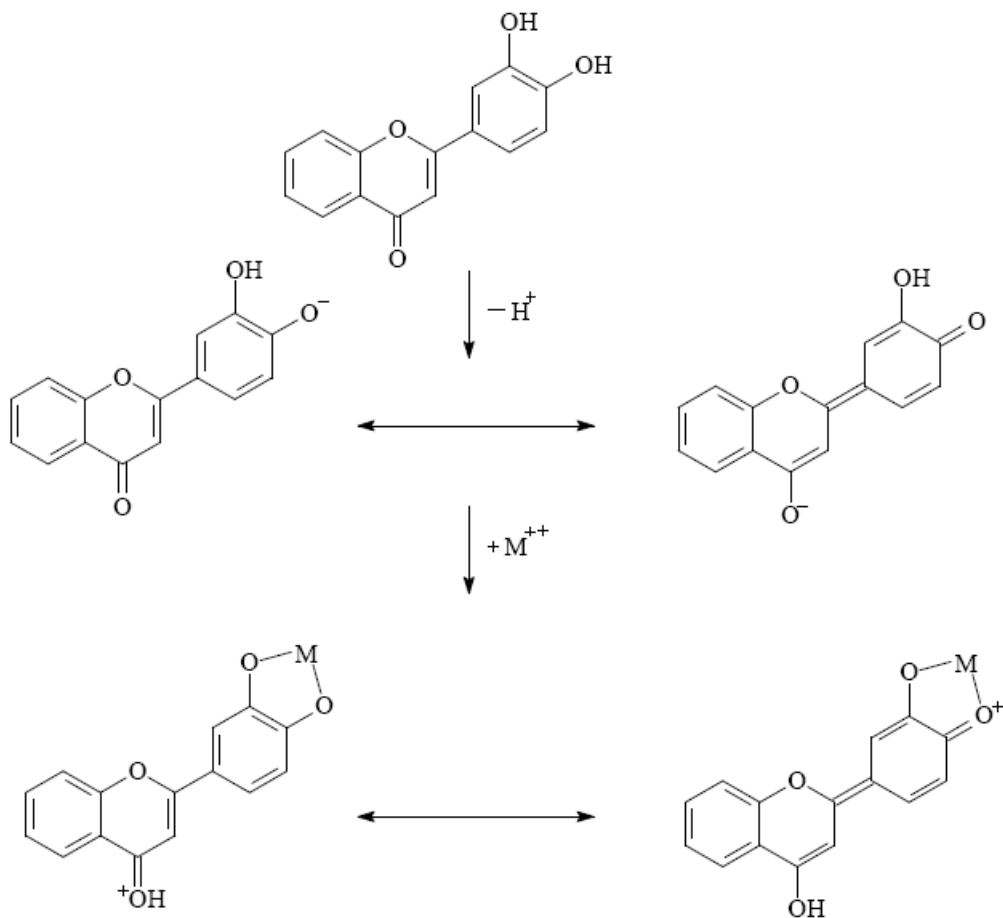


Figure II-7 : Action de chélation des métaux

Ainsi, leur propriété vitaminique P les rend potentiellement veino-actifs, en diminuant la perméabilité capillaire et en renforçant leur résistance [8]. De plus, les flavonoïdes sont antiviraux [25], antibactériens [26], antispasmodiques, antifongiques, anti-inflammatoires et antiallergiques [27].

II. 1. 5. Analyse structurale des flavonoïdes

Les méthodes d'analyse structurale comprennent des méthodes chimiques et physico-chimiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

II. 1. 5. 1. Fluorescence sous la lumière UV

La fluorescence d'un flavonoïde en UV (365 nm) est l'étape primaire et fondamentale de son analyse structurale. Chaque classe des flavonoïdes est caractérisée par une couleur qui oriente vers sa structure. Le tableau II-1 résume cette relation structure-fluorescence [28, 7].

Fluorescence	Type de flavonoïdes
Noir	5, 6, 7-trihydroxyflavonol 5, 7, 8-trihydroxyflavonol
Violet	Flavones Flavonols substitués en position 3 (3-OR)
Bleu	Flavones sans 5-OH libres Flavonols sans 5-OH libres avec 3-OH substitués
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre.

Tableau II-1 : Fluorescences des flavonoïdes sous la lumière UV

II. 1. 5. 2. Le rapport frontal R_f :

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = d/D$$

d : distance entre l'origine et la tache du produit après élution.

D : distance entre l'origine et le front du solvant.

Cette valeur permet d'avoir une idée du flavonoïde ainsi que de la nature et du nombre des substituants [29]. En effet, on peut différencier les aglycones des hétérosides. Il faut cependant signaler que les valeurs de R_f dépendent des conditions expérimentales telles que : la nature du solvant et la concentration de l'échantillon [30]. La valeur du R_f s'accroît avec l'augmentation du nombre des hydroxyles dans les systèmes de solvants aqueux.

II. 1. 5. 3. Spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est basée sur le principe suivant : en milieu alcoolique, chaque famille de flavonoïdes a un spectre d'absorption caractéristique,

susceptible d'être modifié par l'addition des réactifs. D'après Jurd [31] et Voirin [32], la nature du réactif et l'effet qu'il produit sur le spectre d'absorption apportent des indications sur la structure des flavonoïdes. Les étapes d'enregistrement des spectres en présence de réactif sont effectuées selon les étapes suivantes :

Première étape : On enregistre le spectre d'absorption dans le méthanol neutre puis immédiatement après l'ajout d'une goutte de NaOH (0,5 N), ensuite on enregistre après 5 minutes.

Deuxième étape : On enregistre une première fois le spectre d'absorption dans le méthanol, puis à cette solution on additionne d'AlCl₃ (1%) et on enregistre le spectre d'absorption. Après cette opération on rajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (6N) puis on enregistre le spectre de cette nouvelle solution.

Troisième étape : On enregistre dans la solution méthanolique puis on ajoute NaOAc (sec) et on enregistre le spectre, après cette opération on rajoute à cette solution quelques gouttes de solution saturée d'acide borique puis on enregistre le spectre d'absorption.

II. 1. 5. 3. 1. Absorption dans le Méthanol

Dans le méthanol les composés flavoniques (flavones et flavonols) présentent un spectre constitué de deux bandes.

- La bande I apparaissant entre 300 et 385 nm, correspond à l'absorption du système cinnamoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle C4 avec le noyau B.
- La bande II est comprise entre 250 et 290 nm et correspond à l'absorption du système benzoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A [33].

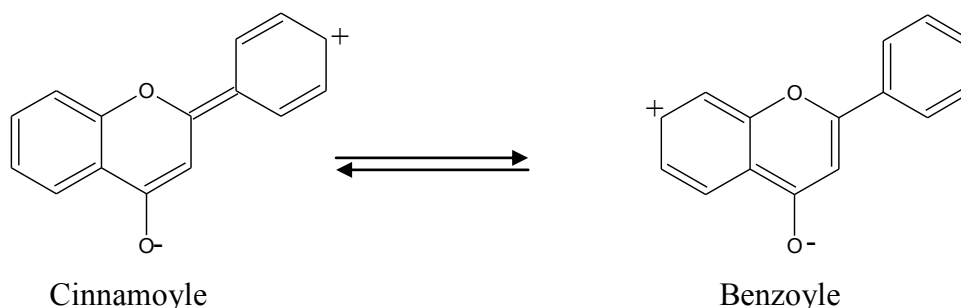


Figure II-8 : Forme limites de type cinnamoyle ou benzoyle

La bande I du spectre UV dans le méthanol neutre, nous permet de faire la distinction entre les flavones et les flavonols [34].

Les spectres UV sont influencés par la nature du sucre porté par l'aglycone sauf dans le cas du rhamnose [35].

II. 1. 5. 3. 2. Absorption en présence des réactifs

L'emploi de réactifs spécifiques permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur la molécule.

- **Spectre en présence de la soude**

La soude est une base forte, et ionise tous les hydroxyles phénoliques de la molécule, ce qui provoque un déplacement bathochrome des bandes I et II, surtout pour la bande I.

Les flavonoïdes présentent un déplacement bathochrome de la bande I de 45 à 65 nm, avec une intensité optique qui ne diminue pas possèdent un hydroxyle libre en position 4'. Si cette intensité optique diminue, ceci montre que l'hydroxyle en 4' est substitué. La présence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique la présence d'un hydroxyle en position 7, celui-ci sera confirmé par le spectre mesuré en présence d'acétate de sodium.

- **Spectre en présence de NaOAc et NaOAc + H₃ B₃**

L'acétate de sodium est faiblement basique, elle ionise les hydroxyles les plus acides en position : 7, 3' et 4'. L'ionisation de l'hydroxyle en 7 entraîne un effet bathochrome sur la bande II de l'ordre de 5 à 20 nm.

L'ajout de l'acide borique en présence de l'acétate de sodium chélate les groupements orthodihydroxyles. Cette chélation entraîne sur le spectre UV un déplacement bathochrome sur la bande I de 12 à 36 [27]

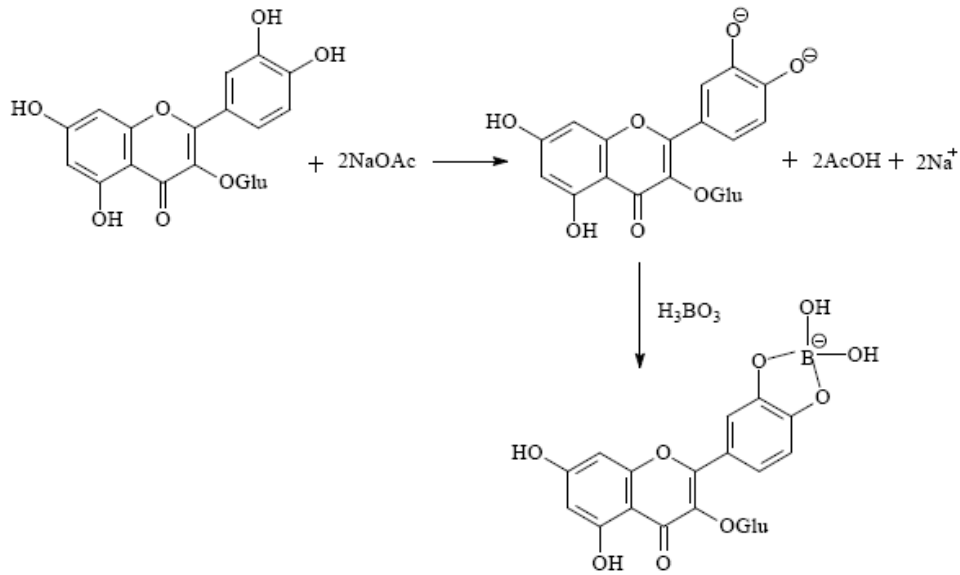


Figure II-9 : Formation de complexes en présence de H_3BO_3 et NaOAc

- **Spectre en présence de AlCl_3 et AlCl_3+HCl**

Le chlorure d'aluminium possède des propriétés chélatantes vis-à-vis des flavonoïdes avec formation d'un complexe labile avec deux hydroxyles libres en position ortho sur le phényle latéral et/ou 7, 8 ou 6, 7, et d'un complexe stable avec le carbonyle en position 4 et l'hydroxyle en position 5 ou en position 3.

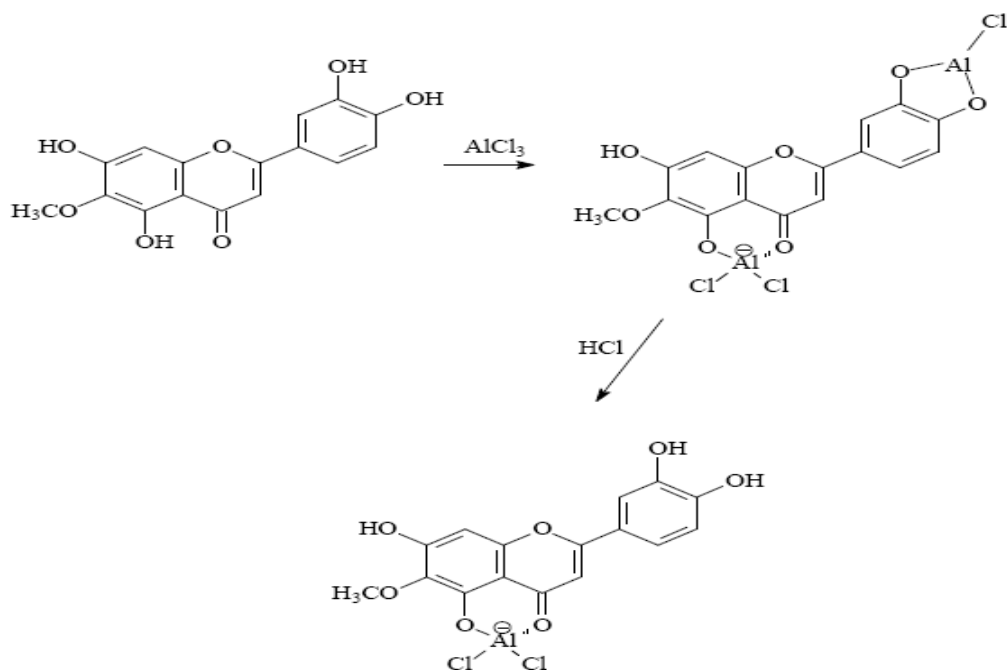


Figure II-10 : Les complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et AlCl_3 avant et après l'addition de HCl

L'addition de l'acide chlorhydrique permet de vérifier la labilité ou la stabilité du complexe formé.

Le tableau suivant représente les déplacements après addition des réactifs.

Réactifs	Déplacement nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310 -350	250-280	Flavone
	330-360	250-280	Falvonol (3-OR)
	350-385	250-280	Flavonol (3-OH)
NaOH	+45 à 60 sans diminution d'intensité optique.		4'-OH
	+45 à 60 avec diminution d'intensité optique.		3-OH, 4'-OR.
	Apparition d'une nouvelle bande entre 320-335 nm		7-OH
NaOAc	+5 à 20 de la bande II		7-OH
	Déplacement faible de la bande II		7-OH avec substituant en en C-6 ou C-8
NaOAc + H ₃ BO ₃	+12 à 36 de la bande I		3', 4' -diOH
	Faible déplacement bathochromique de la bande I		Orthodihydroxylé sur le noyau A
AlCl ₃	+30 à 40 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ +HCl		3', 4' di-OH
	+20 à 25 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ + HCl		6, 7 ou 7, 8 di - OH
AlCl ₃ + HCl	+35 à 55 de la bande I		5-OH
	+17 à 20 de la bande I		5-OH (avec 6-oxygénation)
	+50 à 60 de la bande I		3-OH ou 3-OH et 5-OH

Tableau II-2 : Interprétation des déplacements des maximums des bandes après addition des réactifs [28]

II. 1. 5. 4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique appliquée à la détermination structurale des composés organiques. Elle permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte des informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires engendrés [36].

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (MS) occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes et combinable à de nombreuses techniques chromatographiques.

Concernant les flavonoïdes, la spectrométrie de masse est surtout utilisée pour connaître leur masse moléculaire et la répartition des substituants entre le noyau A et le noyau B.

La technique la plus employée est la SM en impact électronique (SM-IE), qui permet d'obtenir un pic moléculaire le plus souvent majoritaire et des fragments simples à analyser. Les génines sont directement analysables par cette technique ; en revanche les hétérosides ne sont pas assez volatiles et nécessitent un prétraitement. Plus récemment se sont développés des techniques d'ionisation plus douces comme le F. A. B. (Fast Atom Bombardement), qui permet d'analyser directement les hétérosides.

II. 1. 5. 4. 1. Les différentes techniques d'ionisation en spectrométrie de masse

L'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI) ont apporté par le passé de nombreuses informations structurales, mais nécessitaient des traitements préalables des substances à étudier [37]. La désorption de champ a ensuite permis l'étude des flavonoïdes sans dérivation mais posait des problèmes relatifs à la préparation des échantillons qui restreignaient l'application. D'autres techniques telles que l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) et l'ionisation chimique directe (DCI) ont également été appliquées aux flavonoïdes [38].

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse des flavonoïdes s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités

- **Analyse des spectres réalisés en Impact Electronique**

L'ion moléculaire s'accompagne d'ions fils issus de sa fragmentation, notamment par la réaction de **retro-Diels-Alder**. Différents fragments sont générés selon la classe du flavonoïde analysé (figure II-11).

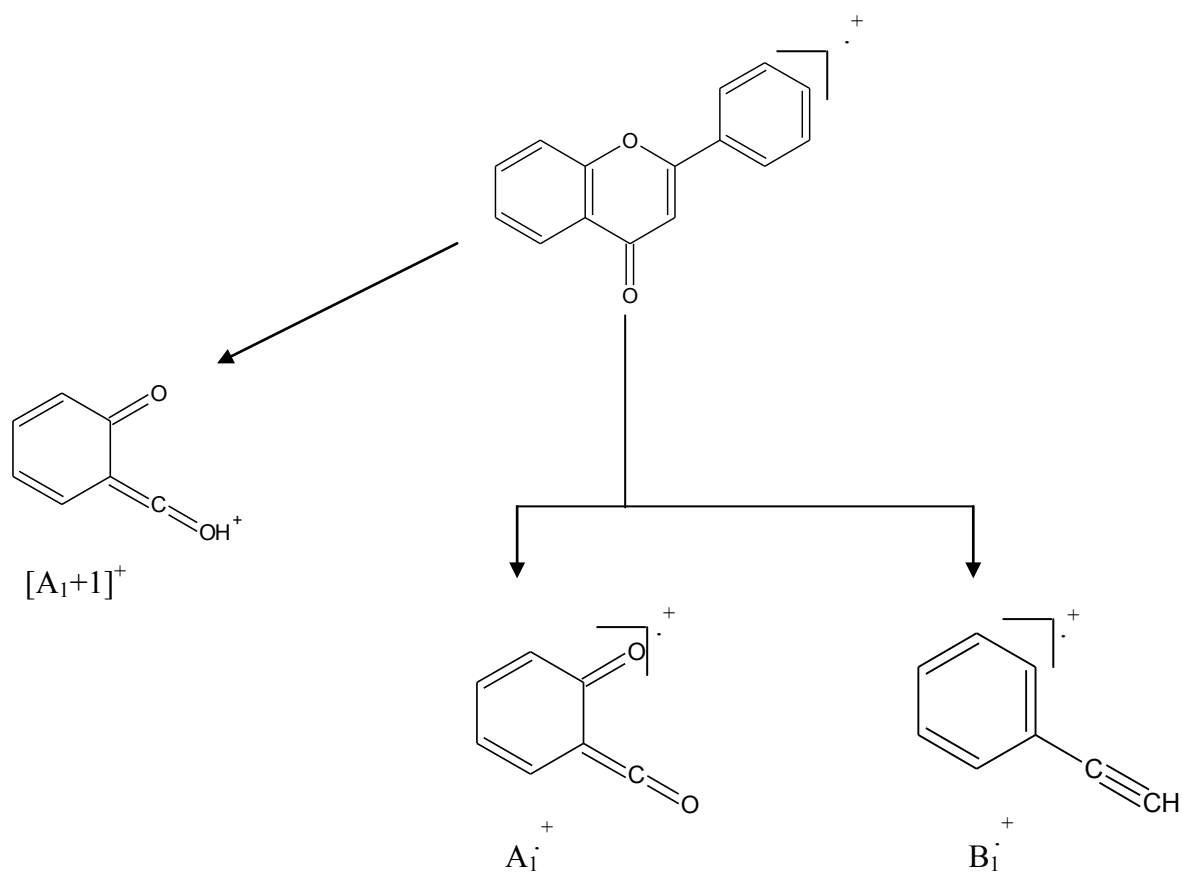


Figure II-11 : Principaux fragments générés lors de l'analyse d'une flavone en S. M.-I. E.

Comparés aux flavones, les spectres des flavonols sont beaucoup plus complexes car la présence d'un groupement OH en position 3 offre plus de possibilités de fragmentations [37].

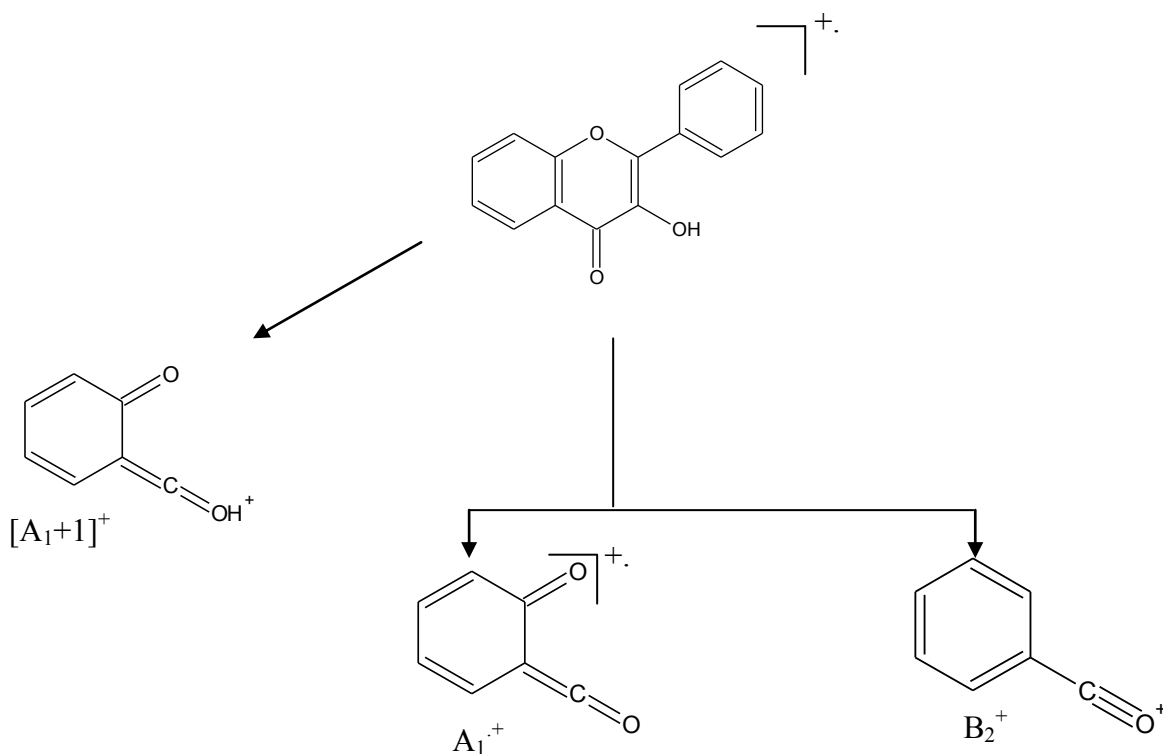


Figure II-12 : Principaux fragments générés lors de l'analyse d'une flavonol en S. M.-I. E.

En outre, certains ions sont fréquemment retrouvés et facilement interprétables (tableau II-3)

Ions	Interprétations
M^+	Ion moléculaire
$M^+ - 1$	Perte d'un H commune chez la plupart des flavonoïdes
$M^+ - 15$	Perte d'un CH_3 ; pic majoritaire dans le cas des 6 ou 8 methoxyflavonoïdes
$M^+ - 28$	Perte de la fonction cétone en 4
$M^+ - 43$	Perte de CO et CH_3 concomitante chez les flavonoïdes méthoxylés

Tableau II-3 : Principaux ions fréquemment retrouvés lors de l'analyse d'un spectre de masse en I E

- **Analyse des spectres réalisés en FAB**

Le spectre peut être compliqué par l'apparition d'ions supplémentaires provenant d'interactions avec la matrice ($[M + \text{glycerol}]^+$, par exemple).

Certains fragments apparaissant sur les spectres en Impact Electronique sont manquants en FAB, surtout lorsque sont analysées des molécules de haut poids moléculaire.

II. 1. 5. 5. Résonance Magnétique Nucléaire (R. M. N)

II. 1. 5. 5. 1. R. M. N du proton

Concernant l'analyse des flavonoïdes, la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) permet de visualiser les relations existant entre les protons des différents noyaux et déduire leur degré de substitution.

Elle permet également de repérer les groupements méthoxylés, de dénombrer les sucres et d'envisager leur mode de liaison à la génine.

Les spectres sont réalisés entre 0 et 14 ppm ; les déplacements chimiques des principaux types de protons retrouvés chez les flavonoïdes sont répertoriés sur la figure suivante.

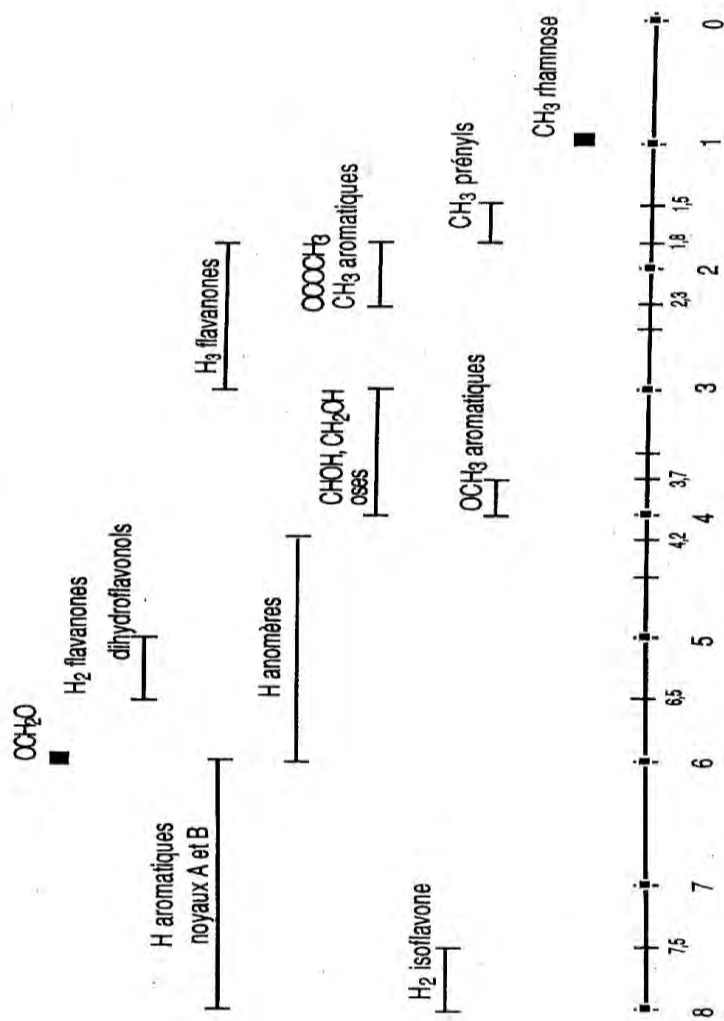


Figure II-13 : Echelle des déplacements chimiques des protons des flavonoïdes

a. Analyse des signaux provenant des protons de la génine.

Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

➤ **Protons du noyau A**

Lorsque le noyau A est disubstitué par des OH en 5 et 7, les protons H₆ et H₈ présentent deux doublet, respectivement, entre 6,16 et 6,25 ppm avec une constante de couplage $J = 2,5$ Hz et entre 6,39 et 6,56 ppm avec la même constante de couplage. La substitution des OH en positions 5 et/ou 7 provoquent un déblindage des deux protons voisins [39].

Le tableau suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau A.

Flavonoïde	H ₅	H ₆	H ₈
5, 7-OH	/	6 – 6,2 ppm d ($J=2,5$ Hz)	6,3 – 6,5 ppm d ($J=2,5$ Hz)
5-OH, 7-OR R=sucre	/	6,2 – 6,4 ppm d ($J=2,5$ Hz)	6,5 – 6,9 ppm d ($J=2,5$ Hz)
5, 6, 7-OR R= H ou sucre	/	/	S 6,3 ppm
5, 6, 8-OR R= H ou sucre	/	S 6,3 ppm	/
7-OR R=H ou sucre	8 ppm d ($J=9$ Hz)	6,7 – 7,1 ppm dd ($J=9$ Hz ; 2,5 Hz)	6,7- 7,0 ppm d ($J=2,5$ Hz)

Tableau II-4 : Déplacements chimiques des protons du noyau A.

➤ **Protons du noyau B**

Le déplacement chimique des protons du noyau B se trouve entre 6,7 – 7,9 ppm. Ce déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C.

Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8,5 Hz).

Les protons H-2' et H-6' résonnent toujours à des champs inférieurs à ceux des protons H-3' et H-5'.

Le tableau suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau B.

Flavonoïdes	H-2'	H-6'	H-3'	H-5'
Flavones (4'-OH)	7,7 – 7,9 ppm d ($J=8,5$ Hz)	7,7 – 7,9 ppm d ($J=8,5$ Hz)	6,5 – 7,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)	6,5 – 7,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)
Flavonols (4'-OH)	7,9 – 8,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)	7,9 – 8,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)	6,5 – 7,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)	6,5 – 7,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)
3', 4' di-OH	7,2 – 7,3 ppm d ($J=2,5$ Hz)	7,3 – 7,9 ppm dd ($J=8,5 ; 2,5$ Hz)	/	6,5 – 7,1 ppm d ($J=8,5$ Hz)
3', 4', 5' tri-OH	6,5 -7,5 ppm S	/	/	/

Tableau II-5 : Déplacements chimiques des protons du noyau B.

➤ Protons du cycle C

Le proton H-3 d'une structure flavone résonne entre 6 et 7 ppm sous forme d'un singulet [39], pouvant être confondu avec les protons H-6 et H-8.

b. Analyse des signaux provenant des protons de la partie osidique.

➤ Proton anomérique

Le proton anomérique apparaît sur le spectre sous forme d'un doublet déblindé par rapport aux autres protons osidiques. La valeur de la constante de couplage permet de distinguer les anomères β des anomères α .

- Quand les protons (H-1'') et (H-2'') du sucre sont di-axiaux la liaison devient β avec une constante de couplage de 7-8 Hz.
- Quand le proton (H-1'') est équatorial, le sucre forme une liaison α avec l'aglycone, avec une constante de couplage de 3 à 4 Hz [40].

Le proton anomère lié à un autre ose, devient relativement loin de l'influence du noyau flavonique, et résonne à champ plus fort que le proton anomérique lié à la génine. A titre

d'exemple dans le cas de *Kampférol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside* le proton H-1'' du rhamnose résonne à 4,54 ppm dans le méthanol deutérié [41] alors que dans le cas du *Kampférol-3-O-rhamnoside* le proton anomérique H-1'' résonne à 5,43 ppm avec une constante de couplage $J= 2,1$ Hz [42].

➤ Autre protons

Les autres protons osidiques résonnent entre 3 et 4 ppm ; ils apparaissent souvent sous forme de multiplets difficiles à interpréter.

II. 1. 5. 5. 2. R. M. N. du Carbone 13

Les spectres sont enregistrés entre 0 et 200 ppm. La figure II-14 répertorie plus précisément les déplacements chimiques des principaux types de carbone des flavonoïdes.

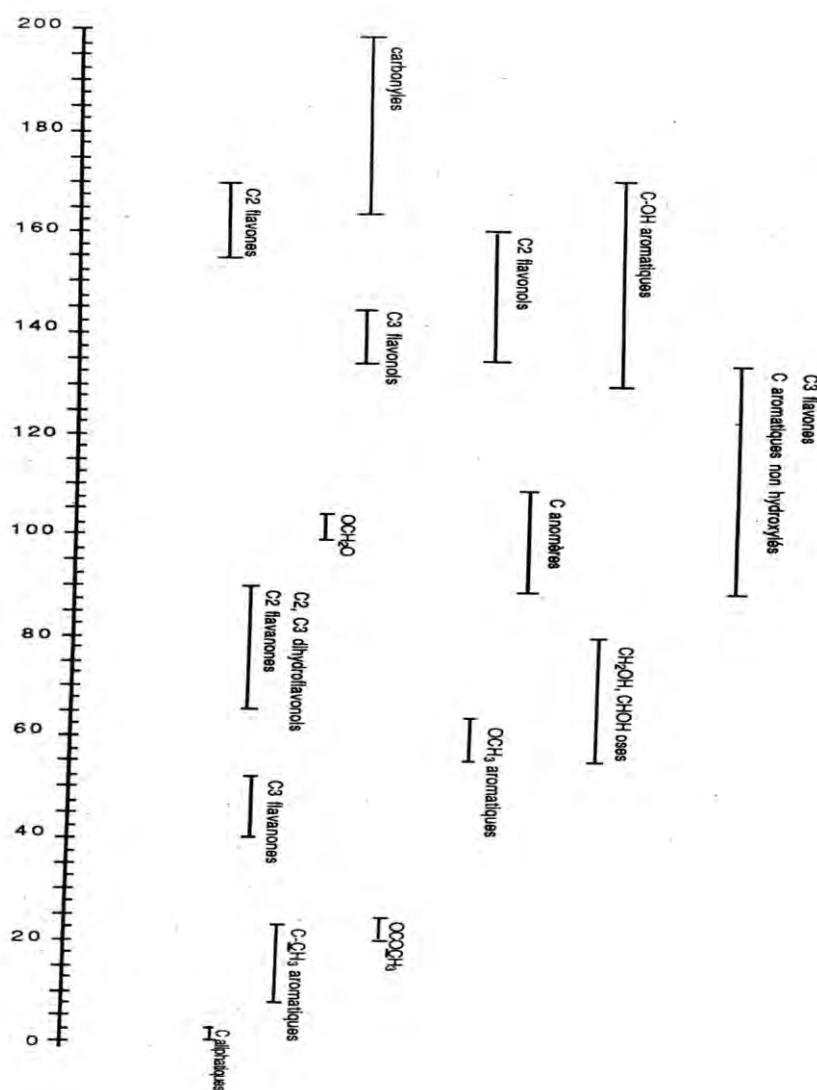


Figure II-14 : Echelle des déplacements chimiques des carbones des flavonoïdes

Le tableau II-6 présente les déplacements chimiques (en ppm) des carbones des génines de quelques composés flavoniques.

Composé	1	2	3	4	5	6	7
Solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C-2	165,5	164,1	146,8	156,3	146,9	156,5	156,2
C-3	104,3	103,0	135,6	133	135,5	133,7	133,4
C-4	183,2	181,7	175,9	177,4	175,8	177,6	177,5
C-5	162,0	161,2	160,7	161,1	160,7	161,3	161,3
C-6	100,3	97,8	98,2	98,7	98,2	98,8	98,8
C-7	164,9	165,1	163,9	164,1	163,9	164,2	164,2
C-8	95,6	92,6	93,5	93,6	93,3	93,6	93,7
C-9	158,7	157,2	156,2	156,3	156,2	156,5	156,4
C-10	105,1	104,7	103,1	104,1	103,1	104,2	104,2
C-1'	122,7	121,3	121,7	121,0	122,1	121,4	121,2
C-2'	129,8	128,2	129,5	130,7	115,3	115,3	113,9
C-3'	117,3	116,0	115,4	115,0	145,0	144,8	149,5
C-4'	161,8	161,1	159,2	159,8	147,6	148,5	147,1
C-5'	117,3	116,0	115,4	115,0	115,6	116,5	115,3
C-6'	129,8	128,2	129,5	130,7	120,0	121,6	122,1

Tableau II-6 : Déplacements chimiques des carbones des génines de quelques composés flavoniques [43].

1 : Apigénine, **2 :** Apigénine-7-OMe, **3 :** Kampférol, **4 :** Kampférol-3-O-glucoside, **5 :** Quercétine, **6 :** Quercétine-3-O-glucoside, **7 :** Quercétine-3'-OMe 3-O-glucoside.

Le déplacement chimique d'un carbone donné est le reflet direct de son environnement et dépend donc des groupements chimiques voisins. Un simple regard du contenu du tableau précédent permet de distinguer l'effet de substituant sur les déplacements chimiques des carbones aromatiques.

Le tableau suivant montre l'effet de quelques substituants sur les déplacements chimiques carbones aromatiques.

	C substitué	C en ortho	C en méta	C en para
OH	+ (20)	- (10)	+ (2)	-(5)
OCH ₃	+ (30)	- (14)	+ (1)	- (7)

Tableau II-7 : Effets des substituants sur les déplacements chimiques (δ en ppm) des carbones aromatiques [43, 45]

La glycosylation d'un oxygène blinde de 2 ppm le carbone adjacent et déblinde de 1 à 4 ppm les carbones en méta et para [44].

La plupart des oses peuvent être identifiés grâce aux déplacements chimiques caractéristiques de leurs carbones. Les éventuels substituants provoquent des déplacements des signaux qu'il faut prendre en compte :

- L'acylation d'un carbone le déblinde de 2 ppm et blinde les carbones adjacents de 1 à 3 ppm [46].
- La glycosilation déblinde le carbone adjacent d'environ 8 ppm et blinde les carbones voisins de 1 à 3 ppm [43].

II. 2. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka *Coumarouna odorata* encore appelée *Disteryx odorata Willd.* (Fabaceae) d'où elles furent isolées pour la première fois en 1820 [47]. Il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2 H)-1 pyranone-2. Ce composé dériverait de la cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C-2 [48]. Les coumarines dans leur grande majorité sont oxygénées en C-7, l'hydroxy-7 coumarine ou umbelliférone est très répandue dans les plantes et est souvent considérée comme le précurseur biogénétique d'un grand nombre de coumarines.

Certaines familles telles que les Fabaceae, les Asteraceae et surtout les Apiaceae et les Rutaceae, élaborent des structures très variées avec des molécules parmi les plus complexes [8].

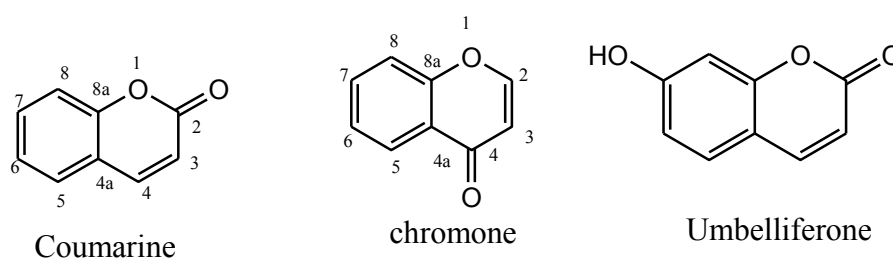


Figure II-15 : Squelette de base des coumarines et des chromones

II. 2. 1. Classification

En dehors de quelques rares cas, dont la coumarine elle-même et la 4-méthylthio-5-méthylcoumarine (figure II-16), isolée à partir d'*Onoseris hyssopifolia* [49], toutes les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'Umbelliférone est le précurseur des coumarines 6, 7-di- et 6,7,8-trihydroxylées.

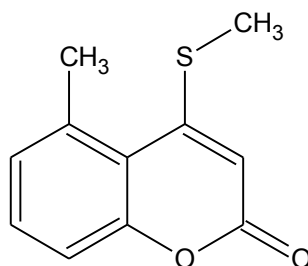


Figure II-16 : Structure de 4-méthylthio-5-méthylcoumarine

- Les coumarines monooxygénées en C-7,
- Les coumarines dioxygénées en C-5 et C-7 ; C-6 et C-7 ; C-7 et C-8.
- Les coumarines trioxygénées en C-5, C-6 et C-7 ; C-6, C-7 et C-8 ; C-5, C-7 et C-8.
- Les coumarines tétrasubstituées en C-5, C-6, C-7 et C-8.

Les hydroxyles de ces coumarines simples peuvent être méthylés, ou l'un d'eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. Un élément structural commun à beaucoup de coumarines est la prénylation : *O*-prénylation (cas le plus habituel), prénylation nucléaire en C-6 ou en C-8 de l'Umbelliférone ou de l'Herniarine (auraptène, suberozine, osthol). La prénylation est également à l'origine des coumarines polycycliques, comme les furano- et pyranocoumarines, linéaires (ex. psoralène, impéatorine, xanthylétine, chalepensine) et angulaires (ex. : angéciline, visnadine).

D'après la nature des substituants, plusieurs auteurs [50 - 58] ont classé les coumarines selon leurs structures en cinq catégories :

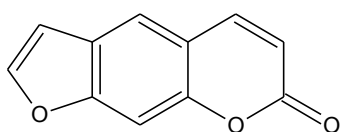
- **Coumarines simples :**

Coumarines hydroxylées, alkoxyées, et les dérivés alkylés et leurs glycosides.

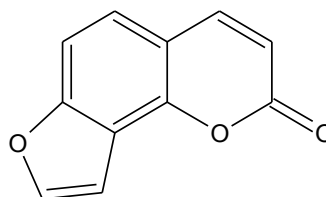
- **Furanocoumarines :**

Les furanocoumarines (appelées encore furocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs [59]. Ces molécules sont caractérisées par un squelette de base formé d'un noyau coumarine sur lequel est condensé un noyau furane. Selon la position du noyau furane, on distingue les furocoumarines linéaires (dérivant de la molécule de psoralène), et les furocoumarines angulaires, basées sur la structure de l'angéciline. De nombreux dérivés de ces structures de base existent avec des ajouts de résidus sur les carbones des positions 2, 5 et/ou 8 [60]. Ces résidus peuvent être assez simples, comme dans les cas des hydroxypsoralènes et des méthoxypsoralènes, ou bien plus complexes comme par exemple pour l'athamantine ou la columbianadine (figure II-17). Les molécules dérivées sont désignées en ajoutant au nom de la structure de base, les noms et

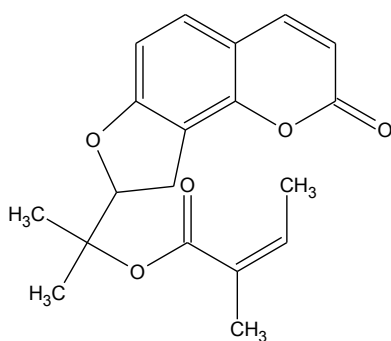
positions des résidus supplémentaires. La plupart des furocoumarines ont cependant des dénominations reprenant le nom des plantes dans lesquelles elles ont été décrites pour la première fois (le bergaptène présent dans *Citrus bergamia*, la rutarétine ou la rutarine dans *Ruta graveolens*), ou bien encore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



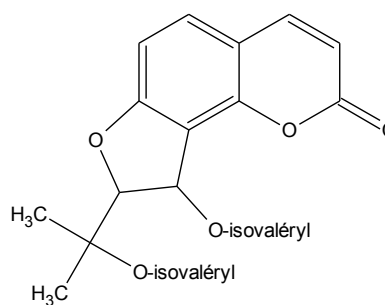
Linéaire (Psoralène)



Angulaire (Angélicine)



Columbianadine



Athamantine

Figure II-17 : Structure de quelques furanocoumarines linéaire et angulaire

- **Pyranocoumarines**
- **Dicoumarines (coumarines dimériques)**

Ce sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariques simples.

- **Tricoumarines (coumarines trimériques)**

Ce sont des composés issus de l'union de trois entités coumariques.

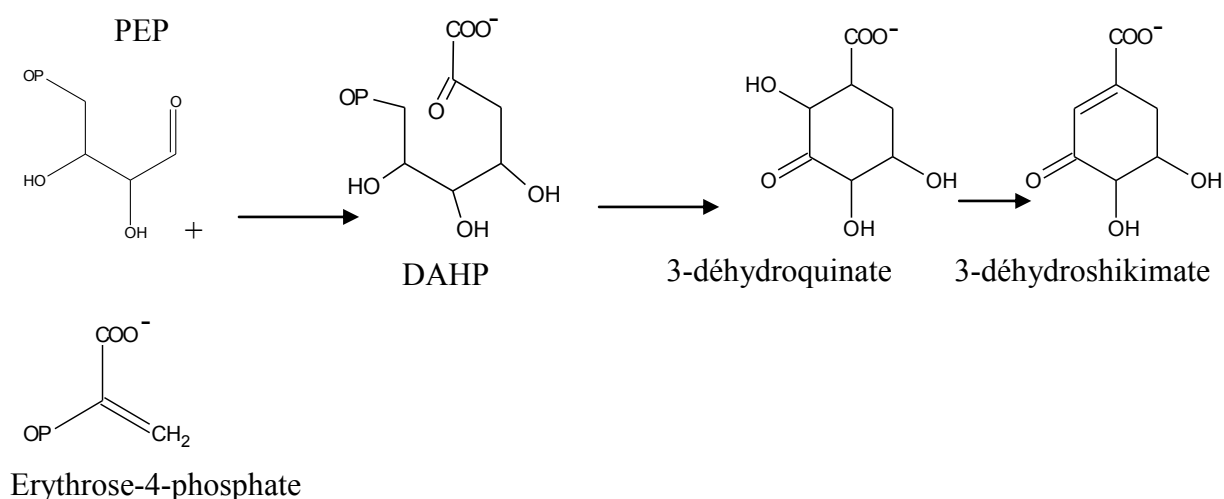
II. 2. 2 Biosynthèse

II. 2. 2. 1. Biosynthèse des coumarines

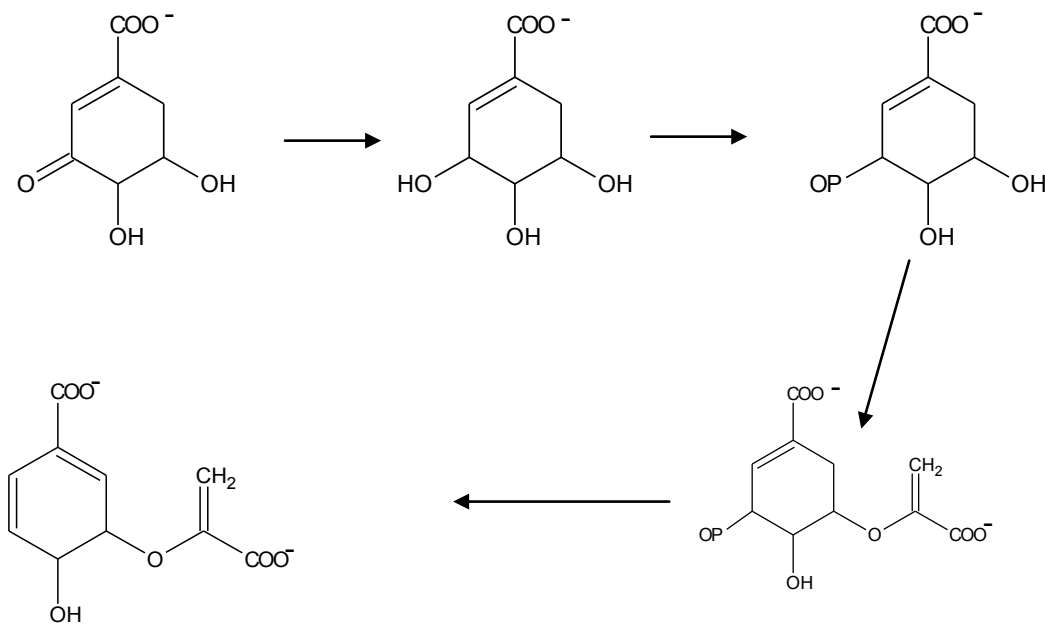
Les coumarines appartiennent à la classe des composés phénoliques. Elles constituent, avec les flavonoïdes, les chromones et les isocoumarines, un très vaste groupe de substances. L'élément structural qui les caractérise est la présence d'un noyau benzopyrane [61]. Les structures simples des coumarines dérivées de l'acide cinnamique *via* l'acide aminé phénylalanine, par exemple la coumarine et l'umbelliférone, sont trouvées dans plusieurs plantes [62]. L'hydroxylation en ortho de l'acide *trans*-cinnamique est la voie directe qui conduit aux coumarines simples.

D'autres coumarines qui ont subi un changement dans leurs structures de base, se rencontrent dans peu de familles. En effet, la participation du précurseur est possible pour donner des dérivés mixtes de l'acide chikimique et mévalonique que sont les furano et pyranocoumarines [63, 64].

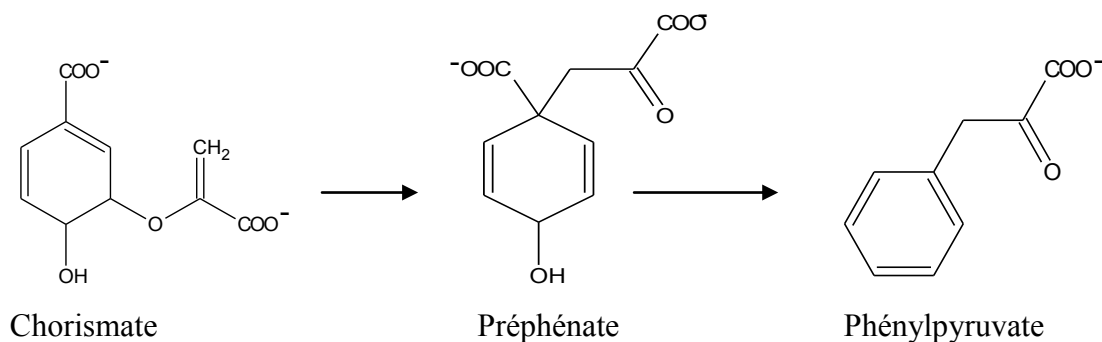
La première réaction est la condensation du phosphoénol pyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former un composé de sept carbones : le 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) [63]. La cyclisation du DAHP en 3-déhydroquinone met en jeu une condensation aldolique intramoléculaire intervenant après l'élimination du phosphate [65].



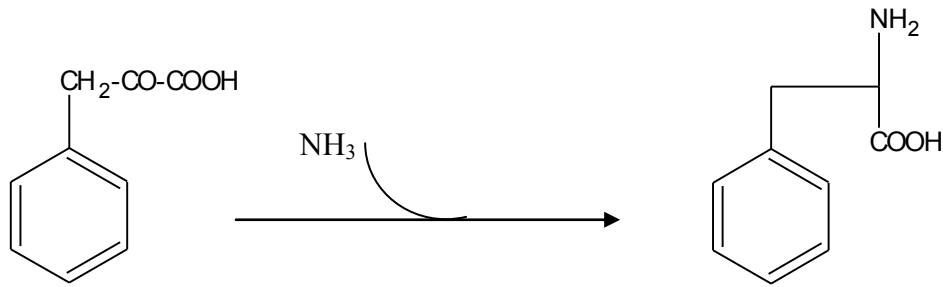
Une réduction du carbonyle du 3-déhydroshikimate se déroule pour donner le shikimate. Cette réduction se fait par l'intermédiaire du NADPH et de la shikimate oxydoréductase. Le shikimate résultant est ensuite phosphorylé par l'ATP, lui cédant un groupe phosphate pour former le shikimate 3-phosphate. Ce dernier, en présence d'une enzyme condensante, fixe une nouvelle molécule de PEP pour donner un ester d'énol, le 5-enolpyruvyl-shikimate3-phosphate (EPSP). Ce dernier conduit au chorismate, *via* une *trans* élimination.



Le réarrangement précyclique du chorismate donne le préphénate. Ce réarrangement est catalysé par une enzyme (chorismate mutase) capable de transférer la chaîne latérale dérivée du PEP pour qu'elle soit directement liée sur le cycle.



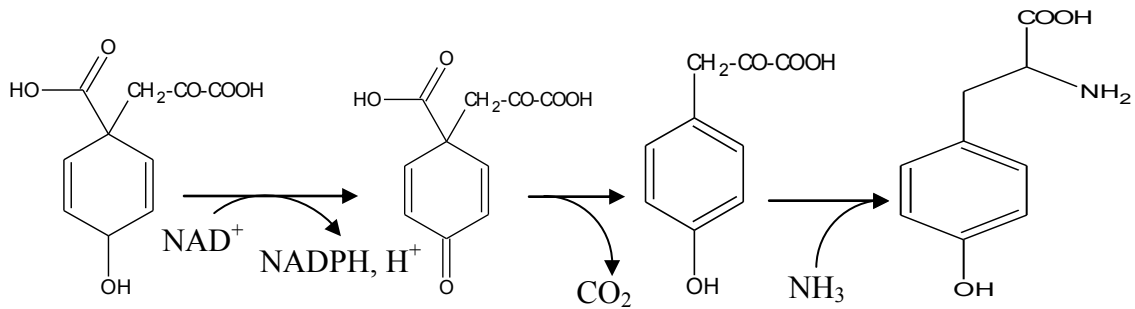
La transamination de l'acide phénylpyruvique conduit à la formation de la phénylalanine.



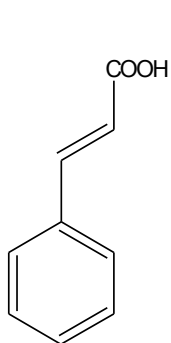
Ac. phénylpyruvique

phénylalanine

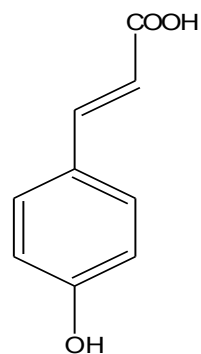
Par contre, la tyrosine se forme de l'acide préphénique.



Une désamination de la phénylalanine et de la tyrosine conduit respectivement à l'acide *trans* cinnamique et l'acide coumarique.



Ac. cinnamique



ac. *para*-coumarique

La formation de la phénylalanine à partir de l'acide chorismique implique un réarrangement de Calisen catalysé par l'enzyme, cet acide aminé est transformé en

intermédiaire phénylpropanoïque (acide coumarinique) qui donne la coumarine après une isomérisation et lactonisation.

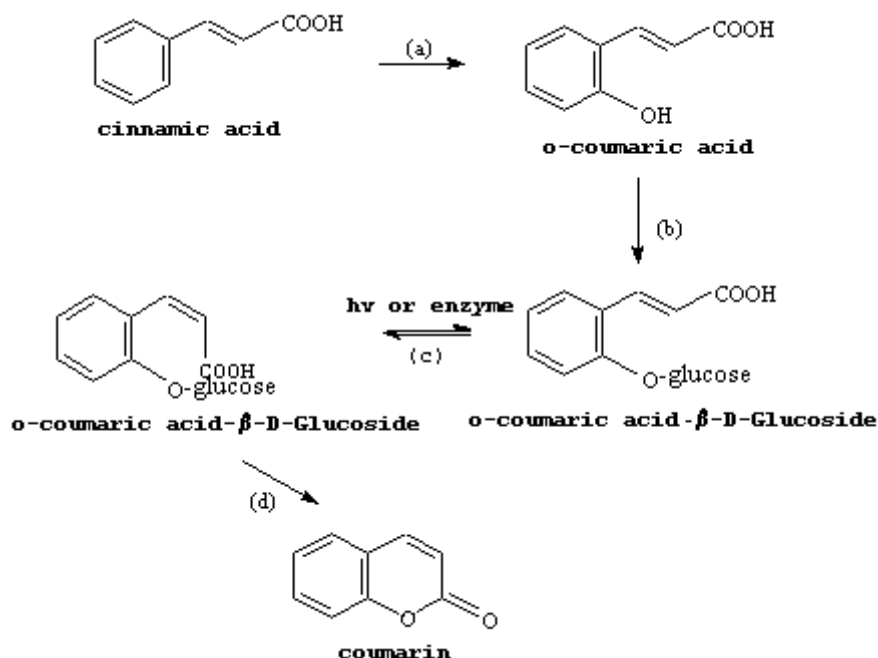


Figure II-18 : Formation de la coumarine a partir de l'acide cinnamique

La structure de coumarine est dérivée de l'acide cinnamique par l'intermédiaire de l'ortho-hydroxylation (a), de l'isomérisation trans-cis de la chaîne latérale (b) et (c), et de la lactonisation (d). La forme trans est stable et ne pourrait pas cycliser, donc, il devrait y avoir d'isomérisation d'une certaine sorte et l'isomérase d'enzymes est impliquée

II. 2. 2. 2. Biosynthèse des furano- et des pyranocoumarines

L'utilisation systématique des traceurs a permis de montrer que la prénylation du noyau benzénique, en C-6 ou en C-8 d'une 7-hydroxycoumarine, est à l'origine du cycle supplémentaire qui caractérise ces molécules [66]. La prénylation en C-6 conduit aux pyrano- et furanocoumarines dites « linéaires » ; lorsqu'elle intervient en C-8, elle induit la formation des homologues « angulaires ».

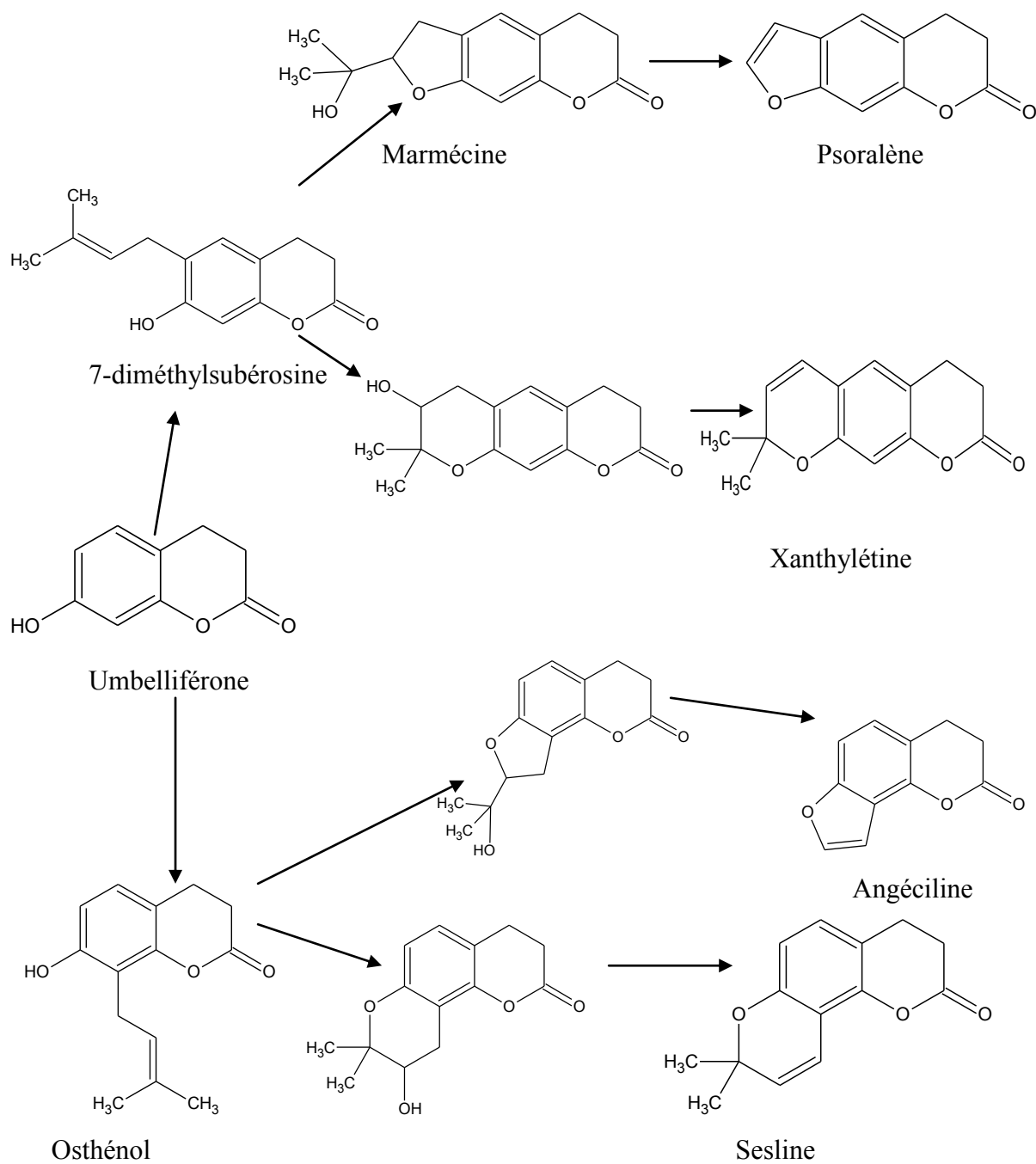


Figure II-19 : Schéma de formation des furano et pyranocoumarine a partir de l'umbelliférone

II. 2. 3. Méthode de séparation

La majorité des coumarines naturelles ont été isolées des plantes, particulièrement des familles Apiaceae et les Rutaceae. Ces constituants sont retrouvés au sein de toutes les parties végétales. Les coumarines peuvent être simples ou complexes en combinaison avec des sucres comme des glycosides.

En général, les procédures d'isolement consistent dans des extractions successives de la matière végétale fraîche ou sèche, avec des solvants de polarité croissante. L'éther de pétrole, le benzène, l'éther, l'acétone, et le méthanol sont généralement employés à cet effet. Il est recommandé vivement que le benzène ne soit plus utilisé pour des extractions ni pour des séparations chromatographiques, à cause de son danger pour la santé.

II. 2. 3. 1. Réaction sur la lactone

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Les travaux de Späth et Socias en 1934 [67] ont montré qu'il est possible, pour la purification, de jouer sur les propriétés spécifiques de la lactone : ouverture et solubilisation en milieu alcalin, fermeture en milieu acide. L'intérêt de cette méthode demeure toutefois limité en raison du risque de dénaturation de certains composés sensibles aux acides et aux bases.

II. 2. 3. 2. Fractionnement

D'après la littérature les méthodes chromatographiques et la cristallisation sont largement utilisées, seules ou en association.

II. 2. 3. 2. a. Cristallisation

La méthode proposée par Spath et Raschka [68] a été basée sur la solubilité épargnante de la plupart des coumarines oxygénées dans l'éther de pétrole. Quand une source naturelle élabore une coumarine particulière dans la quantité raisonnable, il est souvent possible de l'obtenir directement par cristallisation [69-72]. Quelques coumarines ont une tendance à Co-cristalliser dans des rapports fixes et peuvent donner l'aspect d'être les substances simples [73].

II. 2. 3. 2. b. Colonne chromatographique

L'évolution des méthodes chromatographiques séparatives a eu un impact important sur la chimie des produits naturels.

Pour la chromatographie d'adsorption sur colonne, l'alumine a été pendant plusieurs années l'adsorbant préféré. L'alumine acide [72, 74-76] et l'alumine neutre [77, 78] offrent souvent des résolutions satisfaisantes aux mélanges, qu'après la réchromatographie des fractions récupérées. L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans la dégradation et la perte étendues des coumarines [53, 79], ainsi que l'utilisation du benzène et du chloroforme comme éluants.

Pour pallier à cet inconvénient, beaucoup de chercheurs ont utilisé la chromatographie sur colonne de silice ou d'acide silicique pour réaliser des séparations des coumarines des extraits bruts. De bons résultats ont été obtenus en employant les combinaisons hexane- éther [80- 82], hexane - acétate d'éthyle [83- 85], ou encore le mélange dichlorométhane-tétrachlorométhane auquel des quantités croissantes d'acétate d'éthyle ont été ajoutées [86- 87].

La composition des fractions collectées est déterminée par chromatographie sur couche mince de silice, où les taches correspondant aux coumarines sont détectées par inspection de la plaque sous lumière UV.

II. 2. 3. 2. c. Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC

L'avantage de cette méthode est la séparation automatique avec une grande vitesse. Elle est utilisée initialement pour la séparation des furanocoumarines [88- 89]. Cette technique est efficace pour la séparation des coumarines instables [90, 91].

II. 2. 4. Identification et détermination structurale des coumarines

II. 2. 4. 1. Méthodes chromatographiques d'identification

II. 2. 4. 1. a. Fluorescence sous la lumière UV

La propriété physique la plus évidente de la plupart des coumarines est la fluorescence qu'ils montrent sous la lumière UV (365 nm). Cette caractéristique a été appliquée pour leur détection sur chromatographie papier [53, 92, 93] et sur chromatographie sur couche mince

[56, 79, 94, 95]. La fluorescence du produit soumis à la lumière UV représente l'étape primaire de l'analyse, et joue un rôle très important pour l'identification structurale.

Les différentes interprétations des fluorescences sous UV des coumarines sont résumées dans le tableau suivant :

Fluorescence	Type de coumarine
Bleu	7-Hydroxycoumarine 7-Hydroxy-6-alkoxycoumarine 6, 7,8-Trialkoxycoumarine Psoralène 6-Methoxyangélicine 7,8-Dihydroxycoumarine
Bleu clair	6,7-Dialkoxycoumarine
Rose	6-Hydroxy-7-glucosyloxy coumarine
Pourpre (Rouge)	Angélicine 8-Hydroxy-5-alkoxypsoralène
Vert	5-Methoxyangélicine 8-Hydroxy-6,7-diméthoxycoumarine 7,8-Dihydroxy-6-méthoxycoumarine
Jaune	7-Hydroxy-8-méthoxycoumarine 3,4,5-Triméthoxypsoralène 6-Hydroxy-5,7-diméthoxycoumarine 5-Hydroxy-6,7-diméthoxycoumarine 5-Hydroxypsoralène 5,6-Diméthoxyangélicine

Tableau II-8 : Fluorescence des coumarines sous lumière UV (365nm)

II. 2. 4. 1. b. Chromatographie sur papier

Avant l'arrivée d'autres techniques chromatographiques, la chromatographie sur papier a été utilisée intensivement pour la séparation et l'identification des coumarines [92, 96] Actuellement, la chromatographie sur papier est toujours une technique appréciée pour étudier les constituants mineurs. Le mélange toluène - acide acétique - eau (4:1:5) s'est avéré le plus satisfaisant pour séparer les mélanges complexes des coumarines [97]. Dans ce système de solvant, la valeur du rapport frontal montre une corrélation avec le nombre de

groupes d'hydroxyle libres (nombre croissant d'hydroxyles corrélé à une diminution de la valeur du R_f). La relation R_f - structure de quelques coumarines est illustrée dans le tableau suivant :

Composé	R_f
7-Hydroxycoumarine	0,10
7-Hydroxy-6-prenylcoumarine	0,78
7-Hydroxy-8-prenylcoumarine	0,93
7-Prenyloxycoumarine	0,95
6,7-Dihydroxycoumari	0,00

Tableau II-9 : Valeurs de R_f de quelques coumarines sur la chromatographie sur papier (Whatmann. N 1) dans le mélange toluène - acide acétique - eau (4 : 1 : 5)

II. 2. 4. 1. c. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est une méthode puissante pour la séparation des coumarines, et sert fréquemment à leur identification [94]. Un certain nombre d'hydroxycoumarines, de dihydroxycoumarines et de glycosides de coumarines ont été séparés sur des plaques de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme - acide-acétique - eau (4:1:1) comme éluant [98].

A titre d'exemple la chromatographie sur couche mince de gel de silice avec le mélange hexane - acétate -éthyle (3:1) a été employée pour séparer les composés suivants : 5-géranyloxy-psoralène, 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine, 5,7-diméthoxycoumarine et 5-méthoxy-psoralène de la bergamote. Les coumarines séparées ont été identifiées par leurs valeurs de R_f et leurs fluorescences caractéristiques sous la lumière UV qui sont, respectivement, (0,80 vert ; 0,71 bleu ; 0,41 bleu et 0,33 vert) [99].

II. 2. 4. 2. Méthodes spectroscopiques

II. 2. 4. 2. a. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorption UV sont généralement utilisés pour distinguer les coumarines des chromones. Les chromones ont une absorption forte entre 240-250 nm, à

l'inverse des coumarines pour cette même valeur. La coumarine montre des bandes d'absorption à 274 et à 311 nm, Figure II-20, qui ont été attribuées, respectivement, aux cycles benzène et pyranne [100].

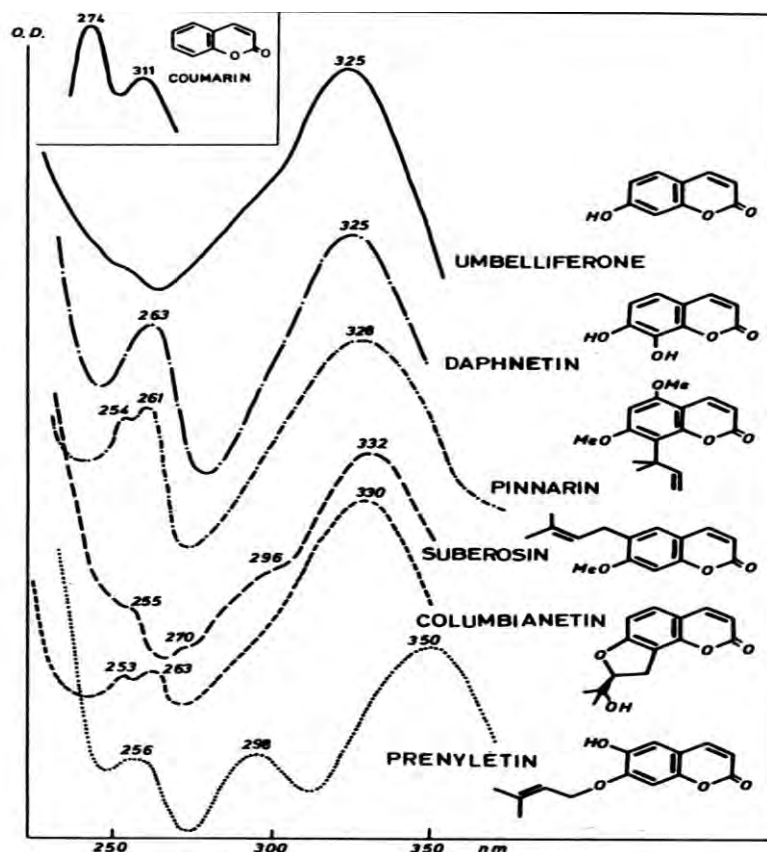


Figure II-20 : Domaines d'absorption des coumarines sous UV-Visible.

La substitution de la position C-3 par un méthyle provoque un léger déplacement hypsochromique de la bande à 311 nm, tandis que la substitution en C-5, C-7 ou C-8 par un méthyle provoque un léger déplacement bathochromique de la bande à 274 nm ; cependant, le maximum de 311 nm reste pratiquement sans changement [100]. L'introduction d'un groupe d'hydroxyle dans le noyau de coumarine provoque un déplacement bathochrome de la bande principale.

Grâce aux spectres UV, on peut distinguer les furanocoumarines linéaires des furanocoumarines angulaires. Les furanocoumarines linéaires (psoralènes) (figure II-21) montrent quatre zones d'absorption à 205-225 (log ϵ 4,0) ; 240-255, (4.06- 4.45) ; 260-270 (4.18-4.26) et 298-316 nm (3.85-4.13) [53]. Cependant, les furanocoumarines angulaires

(angélicines) ne présentent pas les maximums d'adsorption à 242 - 245 et à 260-270 nm, qui sont caractéristiques de la série linéaire [101].

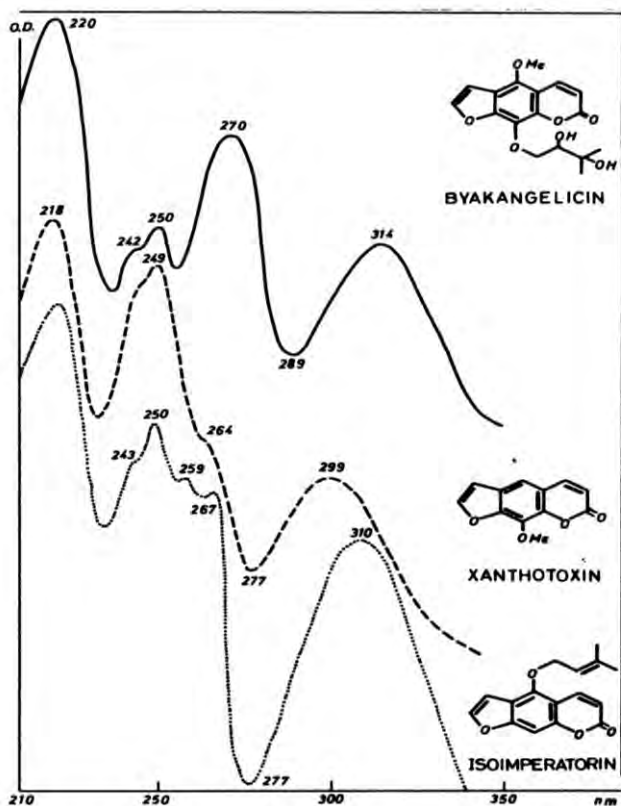


Figure II-21 : Domaines d'absorption des furanocoumarines linaires sous UV-Visible.

II. 2. 4. 2. b. Spectroscopie Infra Rouge

La spectroscopie infra rouge est utilisée pour la détermination des groupements fonctionnels. Cette méthode a ainsi permis de mettre en évidence la fonction conjuguée de lactone. Les coumarines sont isomériques avec des chromones mais les deux classes diffèrent considérablement dans leurs spectres IR. La fréquence de la vibration du carbonyle dans les coumarines est observée dans la région $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ tandis que dans les chromones elle est retrouvée vers 1650 cm^{-1} [101].

II. 2. 4. 2. c. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (R. M. N)

Les techniques RMN ont été appliquées à la détermination structurale des coumarines naturelles. Par conséquent, il y a eu une tendance croissante de justifier des arguments

structuraux, en utilisant en particulier les déplacements chimiques et les constantes de couplage, et plus récemment la spectroscopie ^{13}C RMN.

Steck et Mazurek, [102] 1972 ont élaboré des règles de corrélation spectre-structure, d'application simple et conduisant à une structure fiable pour pratiquement à n'importe quelle coumarine.

- **Résonance Magnétique Nucléaire du proton**

La RMN du proton est couramment utilisée dans la détermination des structures des coumarines. Elle peut permettre de localiser les substituants et leurs natures. Les protons H-3 et H-4 sont généralement sous forme de doublet avec une constante de couplage autour de 10 Hz et apparaissent dans le CDCl_3 , respectivement, entre 5,93 – 6,46 ppm et 7,5 – 7,9 ppm pour les coumarines sans oxygène en position cinq [102]. Cependant, la présence d'un oxygène ou d'un substituant alkyle à C-5, décale de façon caractéristique la résonance du H-4 à δ 7,9 - 8,2 ppm [103-106].

Le tableau suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau pyranne

	H-3 δ (ppm)	H-4 δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
Coumarine sans oxygène en 5	6,1-6,4	7,5-7,9	9,5
Coumarine avec oxygène en 5	6,1-6,4	7,9-8,2	9,5
Coumarine 8-substituée	6,6-6,9	7,1-7,5	8,5
Coumarine 5,7-disubstituée	Inférieure à 7	Inférieure à 7	2,5

Tableau II-9 : Déplacements chimiques des protons du noyau pyranne de quelques coumarines [102].

La présence d'un cycle furannique non substitué est identifiée par l'apparition d'une paire de doublet, avec une constante de couplage $J = 2.5$ Hz provenant des protons H-2' et H-3'. Ces derniers résonnent autour de 7,5 et 6,7 ppm en série linéaire et autour de 7 ppm en série angulaire, permettant ainsi de distinguer si la jonction du noyau furannique au squelette est linéaire ou angulaire [102], [107- 109].

- **Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13**

Avec l'apparition des transformez de Fourier et le développement de l'ordinateur, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 est devenu un outil sensible et puissant dans la détermination structurale des produits naturels. Ces dernières années, de nombreuses publications concernant les coumarines ont paru, dans lesquelles les déplacements chimiques des carbones ont été arborés [110 - 112]. Cette technique s'est avérée particulièrement valable pour identifier des glycosides de coumarines. Le déplacement chimique du carbone carbonyle s'est avéré approximativement le même, vers δ 160 ppm, pour la plupart des coumarines.

Le tableau suivant énumère les valeurs des déplacements chimiques des spectres ^{13}C RMN de quelques coumarines et furocoumarines.

N°	solvant	C-2	C-3	C-4	C-4a	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	C-9	C-10
1	CDCl_3	160,4	116,4	143,6	118,8	128,1	124,4	131,8	116,4	153,9	/	/
2	CDCl_3	160,4	114,4	144,4	116,5	113,1	126,2	147,6	132,7	142,9	146,6	106,8
3	DMSO	160,3	112,8	139,4	106,7	149,6	113,0	158,2	94,0	152,7	145,0	105,3
4	DMSO	160,0	113,9	144,7	115,2	120,4	124,4	155,6	99,1	151,4	147,7	106,5

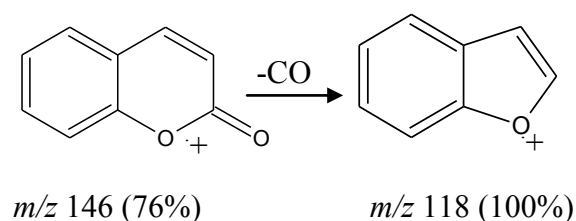
Tableau II-10 : Les déplacements chimiques (en ppm) des Carbones des furanocoumarines et coumarines

1 : Coumarine [113], 2 : Xanthotoxine [113], 3 : Bergaptène [114], 4 : Psoralène [113], les carbones des méthoxyles résonnent à δ 61 ppm.

Cette technique indispensable est cependant peu déterminante en raison des ressemblances avec les carbones d'autres composés aromatiques. L'établissement par l'intermédiaire de cette technique des spectres bidimensionnels permet de résoudre ces problèmes et s'avère indispensable pour la confirmation de certaines structures.

II. 2. 4. 2. d. Spectrométrie de masse

Barnes et Ocolowitz [115] ainsi que Vul'fsun et *al.* [116] ont montré que la coumarine donne un ion moléculaire fort (M^+ , m/z 146, 76%) en impact électronique ainsi qu'un pic de base (m/z 118, 100%). Ce dernier est formé directement par la perte du monoxyde de carbone (CO), une particule neutre fortement stable, du cycle pyranne [115, 116].



La présence d'un cycle furanne dans la furanocoumarine ne change pas le procédé fondamental de fragmentation observé pour les coumarines.

Le mode de fragmentation dépend en général de la nature des substituants sur le noyau benzopyrone. Cependant, dans les méthoxyfuranocoumarines telles que la xanthotoxine, où la perte du radical méthylique peut provoquer un ion conjugué oxonium (Figure II-22), ce processus est prédominant [115, 117, 118]. Encore, le spectre de 5,8-dihydroxypsoralen (Figure II-23) montre un ion $[M-2]^+$ qui provient de la perte de deux atomes d'hydrogène [118].

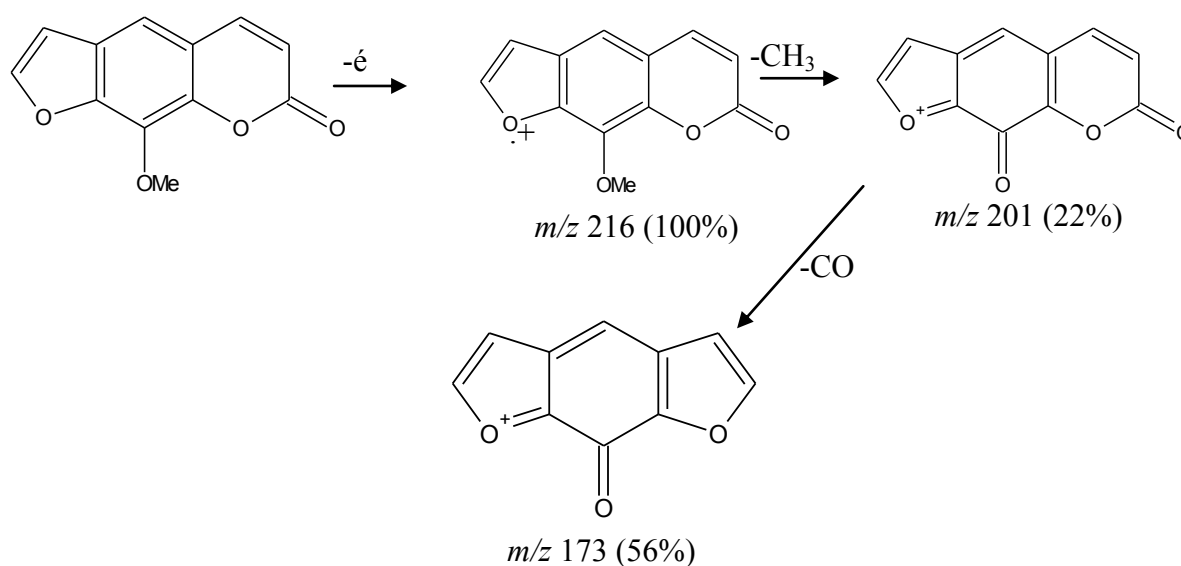


Figure II-22 : Fragmentation de la Xanthotoxine

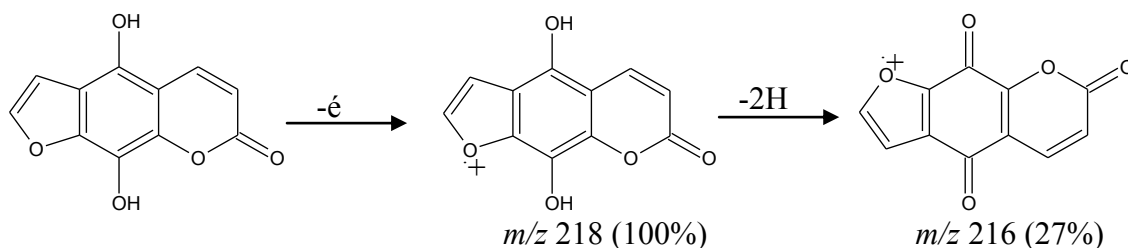
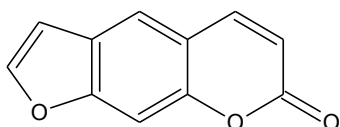
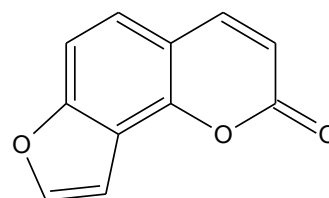


Figure II-23 : Fragmentation du 5, 8-dihydroxypsoralène

Dans certains cas, il a été possible de distinguer deux isomères grâce à la spectrométrie de masse. Le psoralène et son isomère l'angélicine sont des exemples. En impact électronique, le pic de l'ion moléculaire (m/z 186) correspond au pic de base pour le psoralène tandis que pour son isomère le pic de base correspond au fragment M-28 [119].



Psoralène



Angélicine

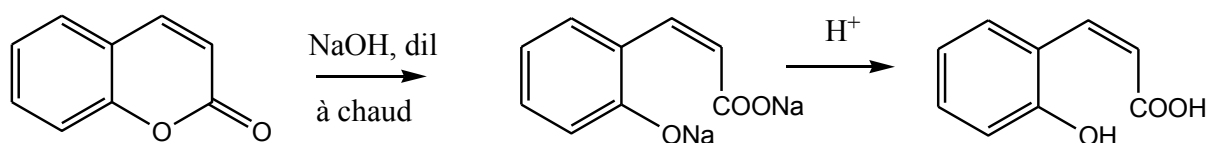
II. 2. 4. 2. e. Réactions chimiques

Peu d'études structurales des coumarines naturelles ont été jusqu'à ce jour décrites dans la littérature [50 – 52], [54], [57 -58]. La diversité des techniques spectroscopiques actuelles permet de déterminer une structure claire sur peu de matériel, et cela en l'absence complète d'études chimiques, mais certaines structures restent non élucidées. Pour résoudre ces problèmes les investigations chimiques sont complémentaires.

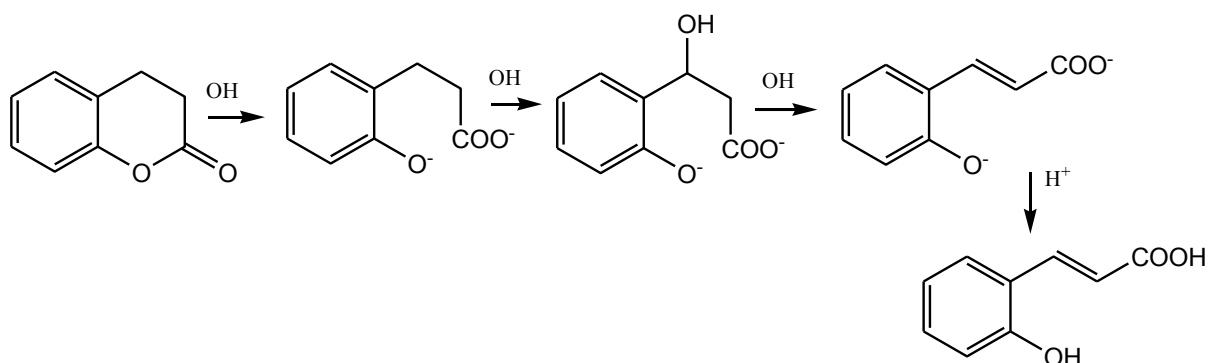
Il est ainsi possible, à partir des transformations chimiques, de distinguer les coumarines isomères, ou de confirmer certains squelettes. Les réactions chimiques peuvent se faire sur le noyau benzopyrone ou sur la chaîne latérale.

- **Réactions sur le noyau benzopyrone**

Les coumarines réagissent facilement avec les bases [120].



Un traitement prolongé de la coumarine avec le NAOH dilué et à chaud provoque l'inversion de la configuration cis en trans, comme ci-dessous indiqué [121]. Un traitement plus vigoureux avec les bases pourra conduire à l'acide acétique, les dérivés carbonylés et les acides phénoliques.

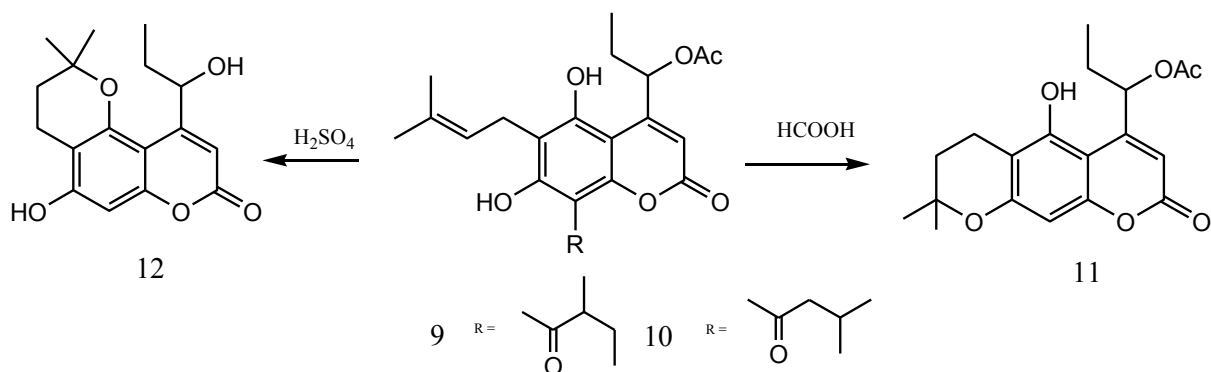


- **Réactions sur la chaîne latérale**

Les réactions les plus importantes sont celle conduisant à la cyclisation de la chaîne latérale avec un hydroxyle en ortho à cette chaîne [122].

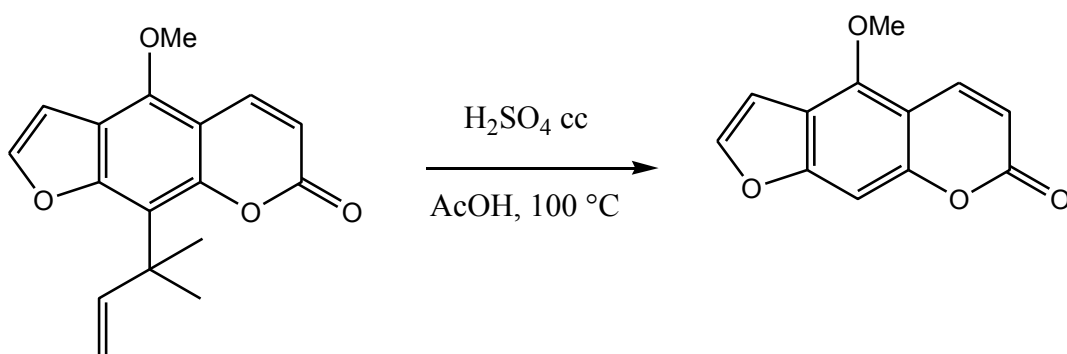
Les réactions de déacylation sont aussi très utilisées, elles gardent le squelette intact et conduisent soit à la C-déacylation ou à la O-déacylation [123].

Crombie et *al.*, [124] dans l'étude des constituants de *Mammea americana* isolent une substance insecticide sous forme de mélange de deux isomères, le méthyle-2 butanoyle (**9**) et le méthyle-3 butanoyle (**10**). Traité par l'acide formique ou l'acide trifluoroacétique, le mélange subit une C-déacylation suivie d'une cyclisation pour donner la dihydropyranocoumarine linéaire (**11**). Par contre lorsque le mélange est traité par l'acide sulfurique à 75 % une O-déacylation se produit, conduisant à la dihydropyranocoumarine angulaire (**12**).



La réaction de cyclisation est aussi utilisée pour montrer que deux groupements ne sont pas en ortho.

Des réactions de déalkylation, sont rencontrées comme ci-dessous [125].



Parmi les autres réactions des coumarines nous citons les réactions d'ouverture de l'époxyde en milieu acide, les réactions de déshydratation en milieu acide, les réactions d'hydratation des doubles liaisons oléfiniques, les réactions de réduction catalytiques des doubles liaisons. Les doubles liaisons de la chaîne latérale sont plus facilement réduites par l'hydrogène en présence de palladium désactivé (pd-c) [126].

II. 2. 5. Quelques propriétés des coumarines

Les coumarines sont connues pour leurs effets toxiques sur les animaux [127]. En effet, une étude a montré que certaines coumarines auraient des effets toxiques sur les troupeaux de dindons [128].

Les coumarines sont des protecteurs des capillaires utilisées dans certaines pathologies vasculaires [129]. L'hydroxy-4 coumarine a, quant à elle, des propriétés anticoagulantes [128]. Certaines coumarines présentent également des propriétés anticancéreuses [131], ou spasmolytiques [132]. D'autres sont utilisées comme antibactériens [130], telles la coumermycine A1 et la novobiocine [128].

Références

1. Harborne, J.B. (1988) « *The Flavonoids* ». Chapman and hall Ltd p.539.
2. Harborne, J.B. and William, C.A (1995) *Natural Product Report*, 639.
3. Harborne, J.B. (1973) In « *Phytochemistry* » (Lawrence,P.L.ed), *Vol.II*, p.334.
4. Davis, B.D. (1955) *Advanced in Enzymology*. 16, 227.
5. Haslam E.,(1993), *Shikimic acid, Metabolism and metabolites*, Edition John wiley.
6. Wong, E. (1976) In «*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* » (Goodwin,T.W.ed),. *Academic Press London* p.464.
7. Markham, K.R. (1982) «*Techniques of Flavonoids Identification* » *Academic Press London* p.2.
8. Brunton J., (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie, plante Médicinales*, 3^{eme} édition, *Lavoisier Paris*
9. Deluca V., et Brahim A., (1985) *Biochem., Biophys.*, 606, 238.
10. Hollman P.C.H., and Arts I.C.W. (2000) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7), 1081-1093.
11. Harborne, J.B. and Williams, C.A. (1988) In « *The Flavonoids* »(*Harborne, J.B ed*) p.303.Chapman and hall Ltd.
12. Dendougui H. (2002) *Thèse doctorat d'Etat en Chimie*, 41.
13. Markham K.R. (1988) In *The Flavonoids: Advances in research since 1980*. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 427-468.
14. Cooper-Driver G.A., and Bhattacharya M. (1998) *Phytochemistry* 49(5), 1165-1174.
15. Grayer R.J., Chase M.W., and Simmonds M.S.J. (1999) *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4), 369-393.
16. Takeda K., Kariuda M. and Itoi H. (1985). *Phytochemistry*, 24, 2251-2254.
17. Reinhold L., Harborne J. B. and Swain T. (1981), *Progress in Phytochemistry*, 7, 198.
18. Ress S. B. and Harborne J. B. (1985), *Phytochemistry*, 24, 2225-2231.
19. Pietta P. (2000). *Journal of Natural Products* 63(7), 1035-1042.
20. Pincemail, J., Debby, C., Lion.y., Braquet, P.,Hans.P., Drien, k.and Goutier, R.(1986) *Stud.Org.chem.*23,423.
21. Van Acker, S.A.B.E., De Groot, M.J., Van Den Berg, D.j., Tromp, M.N.J.L., Donné-OP Den Kelder, G., Van Der Vijch, W.J.F. and Bast, A. (1996) *Chem. Res.Toxicol.* 9,1305.

22. Yokozawa T., Dong E., Tanaka T., Nonaka G. I. and Nishioka I. (1998), *Biochem. Pharmacol.*, 56, (2), 213-222.
23. Cao G., Sofic E. and Prior R. L. (1997), *Biol. Med.*, 22 (5), 749-760.
24. Golbi M. R., Pay M. and Alcaraz M. J. (1991) *Experientia*. 47, 195.
25. Amaral A. C. F., Kuster R. M., Gonçalves J. L. S. and Wigg M. D. (1999), *Fitoterapia*, 70, 293-295.
26. Mori A., Nishiro C. and Tawata S., (1987), *Phytochemistry*, 18 (26), 2231-2234.
27. Benkiniouar R. (2007), *Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique* P17.
28. Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M. B., (1970), *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-verlag, New-York.
29. Bate-Smith E. C. and Westall R. G., (1950), *Biochem. Biophys. Acta*, 4, 427-440.
30. Berthillier A., (1970), *La Chromatographie et ses Applications*, Dunod, Paris.
31. Jurd L., (1969), *Phytochemistry*, 8, 445-462.
32. Voirin B., (1983), *Phytochemistry*, 22, 2107-2145.
33. Jurd L. (1962) In « *The Chemistry of Flavonoid compounds* » (Geissman, T. A ed), Pergamon Press, New York, 107.
34. Mabry T. J. (1969) In « *Perspective in Phytochemistry* » (Harborne J. B. ed) 13, Academic Press. London
35. Harborne J. B. (1975) « *The Flavonoids* » (Harborne J. B., Mabry T. J. and Mabry H. eds), 1016, Chapman and Hall. London.
36. Hoffmann E., Charette J., and Stroobant V. (1999) *Spectrométrie de masse*. Dunod. Paris.
37. Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H., and Claeys M. (1997). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(12), 1357-1364.
38. Stobiecki M. (2000). *Phytochemistry* 54(3), 237-256.
39. Markham K. R. and Geiger H., (1994), *The Flavonoids*, ed. Harborne J. B., Capman and Hall, London.
40. Markham K. R. and Mabry T. J. (1975) In *The Flavonoids*, (Harborne J. B., Mabry T., and Mabry H. eds) Chapman and Hall London, 45.
41. Sang S., Lasplesy K., Jeong W. S., Lachance P. A., Ho C. T. and Rosen R. T., (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2459-2463.
42. Bilia A. R., Ciampi L., Mendez J. and Morelli I., (1996), *Pharmaceutics Acta Helvetiae*, 71, 199-204.
43. Markham K. R., Ternail B., Stanley R., Geiger H. and Mabry T. J., (1978), *Tetrahedron*, 34, 1389-1397.

44. Markham K. R. and Ternail B., (1976), *Ibid.* 32, 2607.
45. Wagner H., Chari V. M. and Sonnenbichler J., (1976), *Tetrahedron Letters*, 21, 1799.
46. Vignon M. R. and Vottero Ph. J. A., (1976), *Tetrahedron Letters*, 28, 2445.
47. Murray R. D. H., (1978) *naturally occuring plants coumarines. Progress in the chemistry of organic natural products, Ed. Wien-Springer-Verlag, New york, 200.*
48. Gray A. I. and Waterman P. G., (1978), *Phytochemistry*, 17, 845.
49. Bohlmann, F., and Zedro, C., (1977), *Phytochemistry*, 16, 239.
50. Dean, F. M., (1952) *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 9, 225
51. Dean, F. M., (1963) *Naturally Occuring oxygen Ring Compounds*, Butterworth, London.
52. Kuznetsova, G. A., (1967) *Natural Coumarins and Furanocoumarins*, Nauka, Leningrad (1967); *Chem. Abstr.* , 67, 108551
53. Nielsen, B. E., *Dan.* (1971), *Tidsskr, Farm.*, 44, 111 (1970); *Chem. Abstr.*, 74, 20314
54. Reppel, L., (1954) *Pharmazie*, 9, 278.
55. Seshadri, T. R., and Vishwapaul, (1973), *J. Sci. Ind. Res.*, 32, 227.
56. Soine, T. O., (1964) *J. Pharm. Sci.*, 53, 231
57. Späth E., (1936) *Monatsh. Chem.*, 69, 75.
58. Späth E., (1937) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 70A, 83.
59. Bourgaud, F., Allard, N., Guckert, A., et Forlot, P. (1989). Natural sources of furocoumarins (psoralens). In *Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities*, T.B. Fitzpatrick, Forlot, P., Pathak, M.A., Urbach, F., ed (Paris: John Libbey Eurotext), pp. 219-230.
60. Matern, U., Strasser, H., Wendorff, H., et Hamerski, D. (1988). Coumarins and furanocoumarins. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Academic Press), pp. 3-20.
61. Waterman P. G. and Grundon M. F., (1983), *Chemistry, Chemical Taxonomy Of The Rutales*, Academic Press London-New york.
62. Murray R. D. H. (1963), *In Naturally Occuring Plants Coumarins*, Butterworth, London, 203.
63. Bernfled P., (1963), *Biogenesis Of Natural Compounds*, Ed. Pergamon Press, OsFord, New York, Paris 568.
64. Richter G., (1993), *Metabolisme des Végétaux, Physiologie et Biochimie* 5^{eme} ed. Lausanne 339.
65. Stewart A. B., (1979), *Planta. Med.*, 36 (4), 299.
66. Ellis B. E. and Brown S. A., (1974), *Can. J. Biochem.*, 52, 734.

67. Späth, E., and Socias, L., (1934). *Ber. Dtsh. Chem. Ges.*, 67B, 59.
68. Späth, E., and Raschka, S., (1934). *Ber. Dtsh. Chem. Ges.*, 67B, 62.
69. Campbell W. E. and Cragg G. M. L., (1979), *Phytochemistry*, 18, 688.
70. Chatterjee A., Banerji J. and Basa S. C., (1972), *Tetrahedron*, 28, 5175.
71. King F. E., Housley J. R. and King T. J., (1954) *Chem. Soc.*, 1392.
72. Seshadri T. R., Sood M. S., Handa K. L. and Vishwapaul, (1967), *Tetrahedron*, 23, 1883.
73. Sheichenko V. I., and Vandyshev V. V., (1971), *Khim. Prir. Soedin.*, 7, 368; *Chem. Abstr.*, 75, 110204 (1971).
74. Brooker R. M., Eble J. N. and Strakovsky N. A., (1967), *Lloydia*, 30, 73.
75. Dreyer D. L., (1966), *Tetrahedron*, 22, 2923.
76. Dreyer D. L. and Lee A., (1972), *Phytochemistry*, 11, 763.
77. Gupta B. D., Banerjee S. K., Handa K. L. and Atal C. K., (1978), *Indian J. Chem.*, 2, 464.
78. Tomimatsu T., Hashimoto M., Shingu T. and Tori K., (1972), *Tetrahedron*, 28, 2003.
79. Nielson B. E. and Lemmich J., (1964), *Acta Chem. Scand.*, 18, 932.
80. Smith E., Hosansky N., Bywater W. G. and Van Tamelen E. E., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 3534.
81. Steck W., (1973), *Phytochemistry*, 12, 2283.
82. Steck W. and Bailey B. K., (1969), *Can. J. Chem.*, 47, 2425.
83. Carpenter I. M., McGarry E. J. and Scheinmann F., (1971), *J. Chem. Soc.*, C, 3783.
84. Hata K. and Kozawa M., (1965), *Tetrahedron Lett.*, 4557.
85. Shimomura H., Sashida Y. And Ohshima Y., (1979), *Phytochemistry*, 18, 1761.
86. Lemmich J., Pedersen P. A., and Neilsen B. E., (1971), *Acta Chem. Scand.*, 25, 344.
87. Nielsen B. E., Larsen P. K., and Lemmich J., (1970), *Acta Chem. Scand.*, 24, 2863.
88. Stermitz F. D., and Thomas R. D., (1973), *J. Chromatogr.*, 77, 431.
89. Stermitz F. D., Thomas R. D. and Williams M. C., (1975), *Phytochemistry*, 14, 1681.
90. Shibata S. and Noguchi M., (1977), *Phytochemistry*, 16, 291.
91. Thompson C. J., (1974), *Alchemy-Source of Chemistry and Medicine*, Leon Amiel, New York 152.
92. Beyrich T., (1964), *J. Chromatogr.*, 13, 181.
93. Crosby D. J. and Berthold R. V., (1962), *Anal. Biochem.*, 4, 349.
94. Hörhammer L., Wagner H. and Kraemer-Heydweiller D., (1966), *Dtsch. Apoth. Zt.*, 106, 207; *Chem. Abstr.*, 65, 2065, (1966).
95. Seshardi T. R. and Vishwapaul, (1973), *J. Sci. Ind. Res.*, 32, 227.
96. Grujic-Vasic J., (1961), *Monatsh. Chem.*, 92, 236.

97. Stoll A., Pereira A. and Renz J., (1950), *Helv. Chim. Acta*, 33, 1637.
98. Van Sumere C. F., Wolf G., Teuchy H., and Kint J., (1965), *J. Chromatogr.*, 20, 48.
99. Cieri U. R., (1969), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52, 719.
100. Masrani K. V., Rama H. S. and Bafna S. L., (1974), *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 24, 331.
101. Lee K. H. and Soine T. O., (1969), *J. Pharm. Sci.*, 58, 681.
102. Steck W. and Mazurek M., (1972), *Lloydia*, 35, 418.
103. Fisher J. F. and Nordby H. E., (1965), *J. Food Sci.*, 30, 869.
104. Fisher J. F. and Nordby H. E., (1966), *Tetrahedron*, 22, 1489.
105. Gonzalez A. G., Breton J. L., Lopez Dorta H., Martinez Iñiguez M. A. and Rodríguez F., (1973), *An. Quim.*, 69, 1013.
106. Gonzalez A. G., Estévez Reyes R., and Jaraiz I., (1972), *An., Quim.*, 68, 425.
107. Batterham T. J., and Lambertson J. A., (1964), *Aust. J. Chem.*, 17, 1305.
108. Bhide K. S., Mujumdar R. B., and Rao A. V. R., (1977), *Indian J. Chem.*, 15B, 440.
109. Mujumdar R. B., Rao A. V. R., Rathi S. S., and Venkataraman K., (1975), *Tetrahedron Lett.*, 867.
110. Chan K. K., Giannini D. G., Cain A. H., Roberts J. D., Porter W., and Trager W. F., (1977), *Tetrahedron*, 33, 899.
111. Chang C. J., Floss H. G., and Steck W., (1977), *J. Org. Chem.*, 42, 1337.
112. Cussans N. J., and Huckerby T. N., (1975), *Tetrahedron*, 31, 2719.
113. Elgamal M. H. A., Elewa N. H., Elkhrisy E. A. M. and Duddeck H. (1979) *Phytochemistry*, 18, 139-143.
114. Ngwendson J. N., Bedir E., Efang S. M. N., Okunji C. O., Iwu M. M., Schuster B. G. and Khan I. A. (2003) *Pharmazie* 58, 587-589.
115. Barnes C. S., and Occolowitz J. L., (1964), *Aust. J. Chem.* 17, 975.
116. Vul'fson N. S., Zaretskii V. I., and Zaikin V. G., (1963), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 2215; *Chem. Abstr.*, 60, 10040 (1964).
117. Furuya T., and Kojima H., (1967), *J. Chromatogr.*, 29, 382.
118. Kutney J. P., Eigendorf G., Inaba T. and Dreyer D. L., (1971), *Org. Mass Spectrom.*, 5, 249.
119. Abdel Hey F. M., Abu Mustafa E.A., El Tawil B.A.H., Fayez M.B.E., Barnes C.S., and Occolowitz J.L., (1967), *Indian J. Chem.*, 5, 89-92.
120. Adityachaudurhy N. and Gupta P.K., (1973), *Phytochemistry*, 12, 425.
121. Tomimatsu T., Hashimoto M., Shingu T., and Tori K., (1969), *J. Chem. Soc. D*, 168.
122. Garg S.K., Gupta S.R. and Sharma N.D., (1979), *Phytochemistry*, 18, 1580.

123. Chakraborty D.P. and Chatterji D., (1969), *J. Org. Chem.*, 34, 3784.
124. Crombie L., Games D.E., Haskins N.J. and Reed G.F., (1970), *Tetrahedron Letters*, 251.
125. Gonzalez A.G., Estevez Reyes R. and Jaraiz I., (1971), *Phytochemistry* 10, 1621.
126. Atkinson E., Boyd D.R. and Grundon M.F., (1974), *Phytochemistry* 13, 853.
127. Feuer G., (1974), *Prog. Med. Chem.*, 10, 85.
128. Murray R.D.H., Mendez J., Brown S.A., (1982), *The Natural Coumarines Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, a Wiley Interscience Publication,
129. Gheysen U., Bellec A., (1990), *Acta. Pharm.*, 275, 68.
130. Wolters B., Erlert U., (1981), *Planta Med.*, 43 (2), 166.
131. Hagmar B., (1969), *Pathol. Europ.*, 4, 283.
132. Badhwar R. L., Chopra I. C., and Nayar S. L., (1946), *Ind. J. Agr. Sci.*, 16, 342.

III. 1. Étude chimique de *Carum montanum* Coss. & Dur.

III. 1. 1. Place dans la systématique

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Sous famille	Apioideae
Tribu	Apieae (Ammineae)
Genre	<i>Carum</i>
Espèce	<i>Carum montanum</i> Coss. & dur. (Benth. Et Hook.)

III. 1. 2. Description botanique

Cette espèce admet les synonymes suivants :

- *Selinom montana* Coss. & Dur.
- *Selinopsis Montana* Batt.

D'après Quezel et Santa (1963) [1], *Carum montanum* (Coss. & Dur.) Benth. et Hook. est une plante endémique de l'Afrique du nord. Plante des rochers calcaires à souche ligneuse épaisse. Feuilles bipennatiséquées à lobes cunéiformes. Tiges grêles de 10 à 15 cm de longueur, lisses. Ombelles à pédoncules et ramifications filiformes. Fruits oblongs de 2-2,5 mm.



Figure III-1 : Photo de *Carum montanum* Coss. & Dur.

III. 1. 3. Répartition Géographique

Cette espèce pousse en montagne du nord-ouest de l'Afrique (Algérie et Tunisie). La figure suivante illustre la répartition géographique de *Carum montanum* Coss. & Dur.

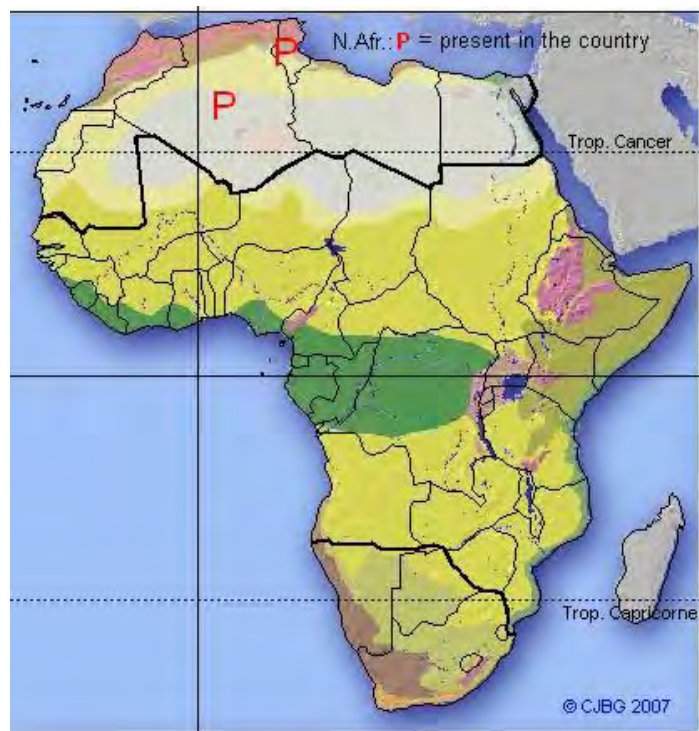


Figure III-2 : Répartition géographique de *Carum montanum* [2].

III. 1. 4. Protocole expérimental :

III. 1. 4. 1. Récolte du matériel végétal :

Les parties aériennes de *Carum montanum* ont été récoltées en Juin 2004 à Megress (altitude 1450- 1600m), localisé à une vingtaine de kilomètres au nord-ouest de Sétif, en Algérie. Un échantillon d'herbier a été déposé au musée d'histoire naturelle de la ville de Nice, en France, et enregistré sous le numéro B-6306.

III. 1. 4. 2. Extraction :

Le poids de la matière végétale séchée est de 300g. Les parties aériennes sont coupées en petits morceaux, elles sont ensuite extraites par macération dans un mélange Methanol-Eau à chaud (70 :30 V) pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois.

Les diverses fractions récupérées sont ensuite réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieure à 70 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. Ce dernier est repris par de l'eau bouillante, une décantation pendant trois nuits permet l'élimination de la chlorophylle.

Le mélange filtré est repris trois fois à la suite par l'acétate d'éthyle. Après concentration à sec sous vide on obtient un extrait acétate d'éthyle de 3,28 g. On extrait la phase aqueuse dans du *n*- butanol ; on obtient de ce fait, et après concentration à sec, un extrait *n*- butanol de 8,9 g.

Ces deux extraits Acétate et Butanol sont soumis à des tests chromatographiques : les résultats ont montrés que les composés présents dans la phase acétate étaient différents à ceux présents dans la phase butanolique. Ceci nous a donc amenés à étudier chaque extrait séparément.

Durant la dissolution de la phase acétate d'éthyle dans le méthanol, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons récupéré par filtration. Le filtrat est concentré pour donner un extrait acétate d'éthyle.

Les différentes étapes de l'extraction sont représentées sur la figure III-3.

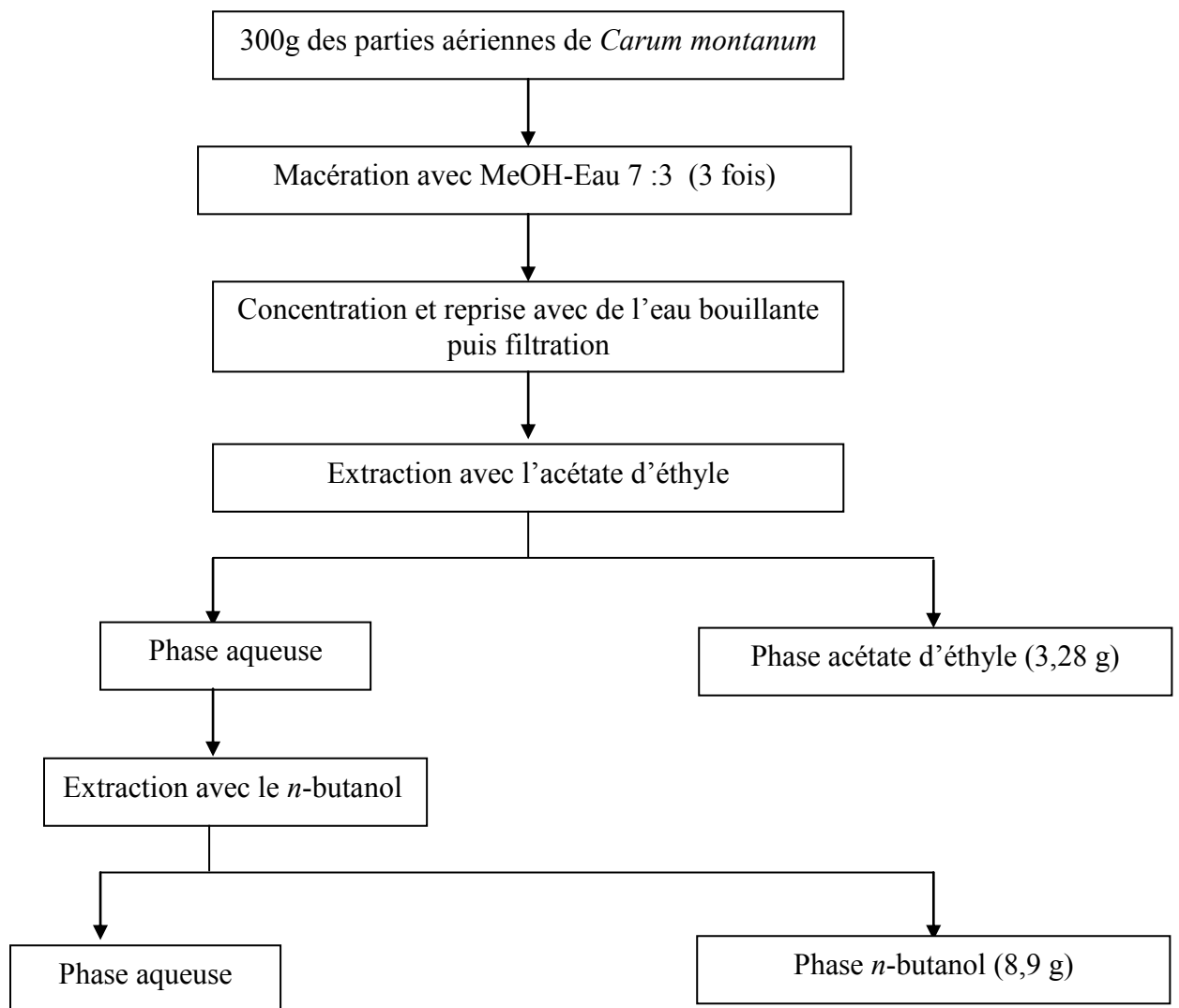


Figure III-3 : Schéma général de l'extraction

III. 1. 4. 3. Séparation chromatographique

III. 1. 4. 3. a. Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle :

Comme signalé précédemment, au cours de la dissolution de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons immédiatement récupéré, filtré et rincé au méthanol pour obtenir un produit pur sous forme d'une poudre blanche (C1).

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant Dichlorométhane-méthanol.

Séparation sur colonne :

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduits à utiliser comme système d'élution le Dichlorométhane-méthanol en gradient de polarité.

Une masse d'environ 3 g d'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (20-45 μ m, Merck) préparée dans de le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système Dichlorométhane-méthanol en commençant par le dichlorométhane pur avec un fractionnement tous les 20 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de la vanilline sulfurique et chauffées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-1.

Solvant d'élution	Fractions recueillies	Masse (mg)	Observation	
CH ₂ Cl ₂	1 à 14	F ₁	4	Mélange
CH ₂ Cl ₂	15 à 18	F ₂	21	Produit pur
CH ₂ Cl ₂	19 à 21	F ₃	4	Mélange
CH ₂ Cl ₂	22 à 26	F ₄	10	Mélange deux produits
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99-1	27 à 31	F ₅	118	Mélange deux produits
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99-1	32 à 33	F ₆	40	Mélange
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99-1	34 à 46	F ₇	86	Mélange complexe

CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99-1	47 à 49	F ₈	9	Mélange
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 98-2	50 à 59	F ₉	10	Mélange
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 98-2	60 à 75	F ₁₀	8	Mélange

Tableau III-1: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *C. montanum* Coss.& Dur.

Parmi les 10 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions F₄, F₅, F₆ et F₈ à cause soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important. Pour les fractions F₄ et F₈ la séparation a été effectuée sur couche mince quant aux fractions F₅ et F₆, nous avons procédé à une autre séparation sur colonne.

Fraction F₄ :

La fraction F₄ de masse 10 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'élution : CHCl₃-acétate d'éthyle (99-1), les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III-2.

Sous fraction	Remarque
F ₄₁	(7,3 mg), Produit pur
F ₄₂	(0,5 mg), Produit pur

Tableau III-2 : Résultat de séparation de la fraction F₄

Fraction F₅ :

C'est la fraction la plus importante du point de vue masse (118 mg), c'est la raison pour laquelle nous avons procédé directement à une deuxième séparation sur colonne de gel de silice (6-35 µm, Merck) avec le système éluant CHCl₃-acétate d'éthyle (99-1). Le tableau III-3 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Fractions recueillies		Masse (mg)	Observation
1 à 12	F ₅₁	6	Produit pur identique à F ₄₂
13 à 16	F ₅₂	7	Mélange
17 à 35	F ₅₃	78	Produit pur

Tableau III-3 : Résultat de la séparation de la fraction F₅

Fraction F₆ :

Environ 40 mg de la fraction F₆ a subi une autre séparation sur colonne de gel de silice (6-35 µm, Merck) avec le système éluant CHCl₃-Méthanol (99 :1), pour donner le F₆₁ (7 mg) produit pur et le F₆₂ (1mg) produit pur également.

Une co-chromatographie a montré que F₆₁ est identique à F₅₃.

Fraction F₈ :

La fraction F₈ de masse 9 mg a été purifiée sur plaque de gel de silice avec le système d'éluant CHCl₃-acétate d'éthyle (99-1), après deux éluations successives, nous avons obtenus 7,3 mg du produit F₈₁.

En conclusion, l'extrait acétate de l'espèce *C. montanum* Coss. & Dur. a permis l'obtention de 6 produits purs.

III. 1. 4. 3. b. Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol

Environ, 7 g de l'extrait butanolique sont déposés sur une colonne de polyamide SC6 (0,05-0,16 mm) réf. : 815620.1 préparé dans le toluène. L'éluion a été réalisé par un gradient de toluène-méthanol, commençant par le toluène pur. Des fractions de 200 millilitres ont été collectées.

Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées avec la vanilline sulfurique et chauffées. Les pots de même composition sont rassemblés.

La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-4.

Fractions	Observation
B ₁	Mélange complexe
B ₂	Mélange
B ₃	Mélange
B ₄	Mélange
B ₅	Mélange
B ₆	Mélange complexe
B ₇	Mélange complexe

Tableau III-4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *C. montanum* Coss.& Dur.

Fraction B₂

Environ 40 mg de la fraction B₂ a subi une autre séparation sur colonne de gel de silice (20-45 µm, Merck) avec le système éluant CH₂Cl₃-Méthanol (95 :5), pour donner le B₂₁ (14 mg) produit pur et un mélange B₂₂.

L'examen par chromatographie sur couche mince du produit B₂₁ montre qu'il est identique au composé C1 isolé déjà dans la phase acétate d'éthyle.

Sous fraction B₂₂

La sous fraction B₂₂ de masse 10 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : CH₂Cl₃-acétate d'éthyle (8-2), pour donner le B₂₂₁ composé pur en faible quantité.

Fraction B₅

Cette fraction a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (20-45 µm, Merck) éluées par le système CH₂Cl₂-Méthanol (9 :1) pour donner le composé B₅₁ (9 mg) à l'état pur et un mélange de trois produits en faible quantité.

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que l'espèce *C. montanum* est riche en métabolites secondaires. Son étude phytochimique a permis l'obtention de 09 produits purs. Parmi les produits isolés, le C1 se trouve être le mieux accumulé par cette espèce, en effet, il faut noter l'obtention d'une quantité importante.

III. 2. Étude chimique de *Bupleurum montanum* Coss. & Dur.

III. 2. 1. Place dans la systématique [3] :

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Sous famille	Apioideae
Tribu	Apieae (Ammineae)
Genre	<i>Bupleurum</i>
Espèce	<i>Bupleurum montanum</i>

III. 2. 2. Description botanique :

Ombelles principales de 8-15 mm de rayon. Pièces de l'involucre et de l'involucelle linéaires-lancéolées, longues de 2-3mm. Feuilles molles éparses le long de la tige n'individualisant pas de rosette basale.



Figure III-4 : Photo de *Bupleurum montanum* Coss. & Dur.

III. 2. 3. Répartition géographique

Bupleurum montanum Coss & Dur. est une espèce endémique de l'Afrique du nord. Elle pousse en Algérie et au Maroc. La figure suivante illustre la répartition géographique de cette espèce.

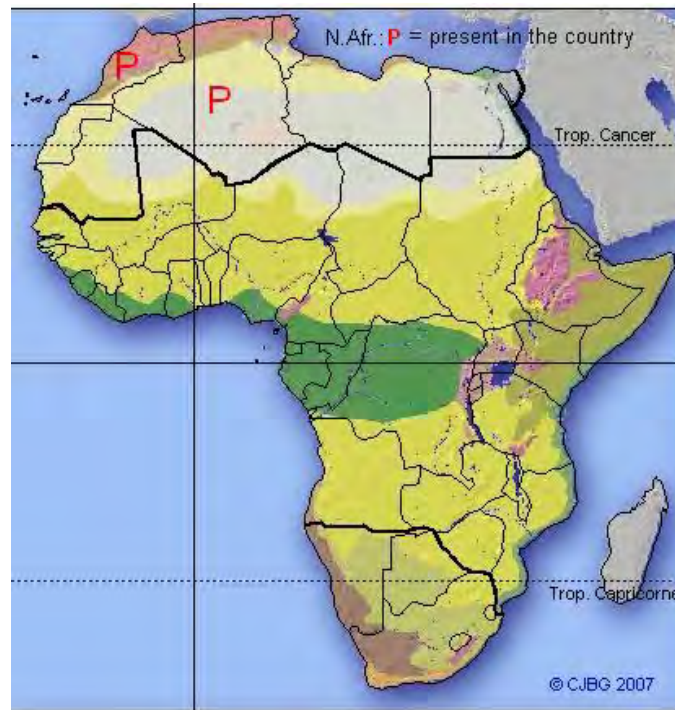


Figure III-5 : Répartition géographique de *Bupleurum montanum* Coss. et Dur. [4]

III. 2. 4. Protocole expérimental :

III. 2. 4. 1. Récolte du matériel végétal

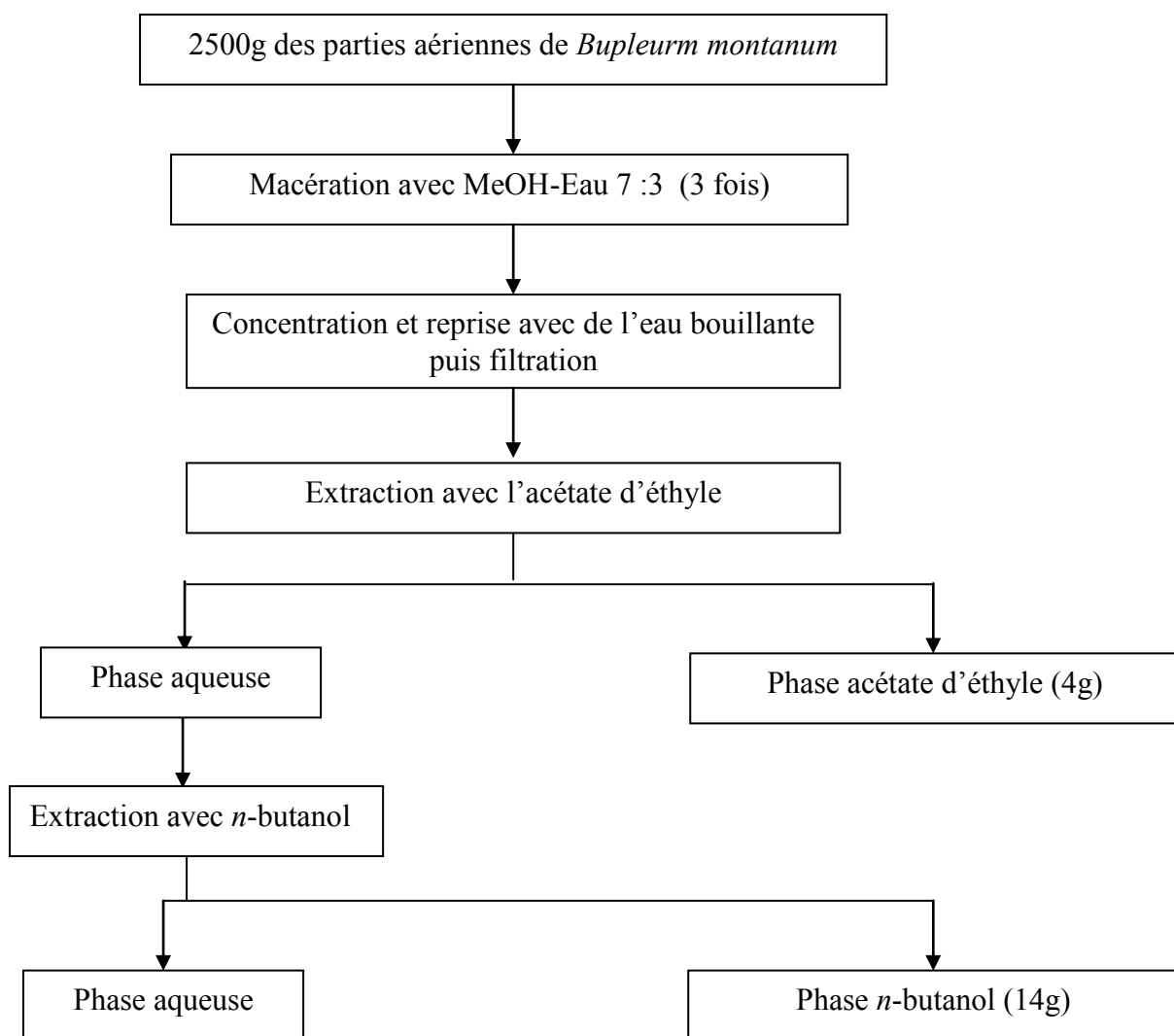
Les parties aériennes de *Bupleurum montanum* Coss. et Dur. ont été récoltées en Juin 2006 à Megress, Sétif, en Algérie. Un échantillon d'herbier a été déposé au musée d'histoire naturelle de la ville de Nice, en France, et enregistré sous le numéro B-6307.

III. 2. 4. 2. Extraction

Les parties aériennes de *B. montanum* Coss. (m=2500g) sont mises à macérer dans un mélange MeOH / H₂O (70 :30 ; v/v) pendant 3x48h. Après filtration et concentration à une température n'excédant pas 70°C, on ajoute de l'eau distillée ensuite le mélange a subit une filtration. Le filtrat ainsi obtenu formant la phase aqueuse est épuisé successivement par de l'acétate d'éthyle, puis le *n*-butanol. Les deux phases organiques sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées à sec donnant les extraits :

- acétate d'éthyle (4 g).
- *n*-butanol (14 g).

La figure III-6 montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *B. montanum* Coss.



**Figure III-6 : Schéma général de l'extraction des parties aériennes de *B. montanum*.
Coss.**

III. 2. 4. 3. Fractionnement et purification

III. 2. 4. 3. a. Étude de l'extrait acétate d'éthyle

Environ, 4 g de l'extrait acétate d'éthyle sont déposés sur une colonne de gel de silice (flash 35-70 μm) préparé dans le dichlorométhane. L'élution est réalisé par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$, commençant par le dichlorométhane pur. Ensuite en augmente la polarité par l'addition progressive du méthanol.

Des fractions de 50 millilitres ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince. Les fractions semblables sont regroupées.

Le tableau III-5, montre les fractions réunies :

Fractions recueillies	Masse (mg)
F ₁	11
F ₂	254
F ₃	60
F ₄	142
F ₅	120
F ₆	184
F ₇	212
F ₈	98
F ₉	342
F ₁₀	243
F ₁₁	531
F ₁₂	440
F ₁₃	621

Tableau III-5 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait

Acétate d'éthyle de *B. montanum* Coss.

Dans la majorité des fractions obtenues, la présence de la chlorophylle était prédominante par rapport aux produits existants c'est la raison pour laquelle la séparation était très délicate et on n'a pas pu aboutir à un nombre important de produits purs.

Malgré la présence signalée de la chlorophylle dans la majorité des fractions, nous avons entrepris l'investigation des fractions simples.

Fraction F₃

C'est la fraction la moins chargée en chlorophylle et la plus simple. Cette fraction a subi une séparation sur colonne chromatographique de gel de silice flash avec le système éluant CH₂Cl₂-Méthanol (95 : 5). Le tableau III-6 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Fractions recueillies	Masse (mg)	Observation	
1 à 17	F ₃₁	4	Mélange
18 à 27	F ₃₂	7	Mélange
28 à 40	F ₃₃	15	Produit pur majoritaire + Chlorophylle

Tableau III-6 : Résultat de la séparation de la fraction F₃

Sous fraction F₃₃

Cette fraction a donné un produit majoritaire par une simple recristallisation avec le méthanol, c'est le produit **B1**.

Fraction F₈

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur cet fraction, seul le système d'éluion CH₂Cl₂-MeOH (9 : 1) a donné une assez bonne séparation.

Environ 98 mg de cette fraction sont déposées sur une colonne de gel de silice (type Merck, 6-35 µm), préparée dans le dichlorométhane. Le fractionnement a été faite tous les 10 ml.

Le rassemblement des pots est effectué sur la base des données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par la vanilline sulfurique puis chauffées. Le tableau III-7 englobe les résultats obtenus.

Fractions recueillies	Observations
F ₈₁	Mélange complexe
F ₈₂	Produit pur (trace) (0,8 mg)
F ₈₃	Mélange

Tableau III-7 : Résultat de la séparation de la fraction F₈

Sous fraction F₈₃

Cette sous fraction a subi une séparation par chromatographie sur couche mince de gel de silice avec le système CH₂Cl₂ / MeOH (9 : 1) pour obtenir le produit majoritaire et à l'état pur **B2** (9,3 mg).

Fraction F₁₀

Cette fraction a subi une séparation sur colonne chromatographique de gel de silice (type Merck, 6-35 µm), avec le système éluant CH₂Cl₂-Méthanol (96 : 4). Le tableau III-8 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Fractions recueillies	Observations
F ₁₀₁	Mélange complexe
F ₁₀₂	Mélange
F ₁₀₃	Mélange
F ₁₀₄	Produit pur (2,1 mg)

Tableau III-8 : Résultat de la séparation de la fraction F₁₀

Sous fraction F₁₀₃

De masse 12 mg, la fraction F₁₀₃ a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec le même système d'élution que la fraction F₁₀ CH₂Cl₂-MeOH (96 : 4), les sous fractions obtenues sont données dans le tableau III-9:

Fractions recueillies	Observations
F _{103a}	Produit pur (6 mg)
F _{103b}	Mélange deux produits (2 mg)
F _{103c}	Mélange (0,5 mg)

Tableau III-9 : Résultat de la séparation de la sous fraction F₁₀₃

Une co-chromatographie sur couche mince de gel de silice a permis de constater que F_{103a} et F₁₀₄ sont identiques. C'est le produit **B3**

Concernant cette partie de l'extrait acétate d'éthyle de *B. montanum* Coss. & Dur., nous avons pu isoler à l'état pur trois produits qui sont **B1**, **B2** et **B3**.

III. 2. 4. 3. b. Étude de l'extrait *n*-butanol

Le résultat des tests chromatographiques obtenu en vue de la séparation sur colonne de l'extrait *n*-butanol ont conduit à l'utilisation du système d'élution CH₂Cl₂-MeOH en gradient de polarité.

Environ 14 g de l'extrait *n*-butanol sont déposés sur une colonne de gel de silice (type Merck, 35-70µm), préparé dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du type CH₂Cl₂-MeOH en commençant par de CH₂Cl₂-MeOH (95 :5). Le fractionnement a été fait tous les 200 ml. Le suivi des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par la vanilline sulfurique. Le rassemblement des pots effectué sur la base des données analytique des plaques a permis l'obtention de 9 fractions. Le tableau III-10 regroupe la progression de cette colonne.

Fractions recueillies	Masse (mg)
F ₁	40
F ₂	108
F ₃	83
F ₄	250 (Mélange complexe)
F ₅	2300
F ₆	245
F ₇	186
F ₈	200
F ₉	157

Tableau III-10 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *B. montanum* Coss.

Fraction $F_2 = F_2 + F_3$

L'ensemble de ces deux fractions a donné un produit majoritaire par une simple recristallisation avec le méthanol, c'est le produit **B6**.

Fraction F_5

Cette fraction a subi une séparation sur colonne chromatographique de gel de silice (20-45 μm), avec le mélange éluant Acétate d'éthyle-MeOH-Eau (25 : 3 : 1). Le fractionnement a été fait tous les 50 ml. Le tableau III-11 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Fractions	Masse (mg)	Observations
F ₅₁	43	Mélange
F ₅₂	200	Mélange complexe
F ₅₃	54	Produit majoritaire
F ₅₄	300	Mélange
F ₅₅	145	Mélange deux produits
F ₅₆	600	Mélange complexe

Tableau III-11 : Résultat de la séparation de la fraction F_5 .

La purification de la sous fraction F_{53} sur une petite colonne de silice avec le même mélange d'éluant donne un produit pur (40 mg) c'est le **B4**.

Sous fraction F_{55}

Cette fraction a subi une séparation sur colonne de gel de silice, avec le mélange éluant Acétate d'éthyle-MeOH- Eau (25-2-1), et a permis d'obtenir :

F₅₅₁ : 20 mg produit pur.

F₅₅₂ : 60 mg mélange deux produits.

Une co-chromatographie des produits issus de cette fraction a montré que F_{551} est le

même que F₅₃ (**B4**) par contre le produit F₅₅₂ contient toujours le F₅₅₁.

Fraction F₆

Environ, 240 mg sont déposés sur une colonne de gel silice (type Merck 20-45µm) préparé dans l'acétate d'éthyle. L'élution est réalisée par un mélange acétate d'éthyle-MeOH-eau (25-5-1). Le fractionnement a été fait tous les 20 ml. Le suivi des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le tableau III-12 regroupe la progression de cette colonne.

Fractions recueillies	Masse (mg)
F ₆₁	9
F ₆₂	15
F ₆₃	43
F ₆₄	78
F ₆₅	12
F ₆₆	38

Tableau III-12 : Résultat de la séparation de la fraction F₆

Sous fraction F₆₃

Cette sous fraction a subi une séparation sur colonne chromatographique de gel de silice (type Merck, 6-35 µm), avec le système éluant acétate d'éthyle-MeOH-eau (25-3-1). Le tableau III-13 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Fractions recueillies	Masse (mg)
F ₆₃₁	/
F ₆₃₂	15 (Produit majoritaire)
F ₆₃₃	20

Tableau III-13 : Résultat de la séparation de la sous fraction F₆₃

La fraction F₆₃₂ a subit une purification avec une petite colonne de gel de silice en utilisant le même système d'éluion suivit d'une autre purification par chromatographie sur couche mince de silice avec le même système d'éluion pour donner 8 mg du produit pur **B5**.

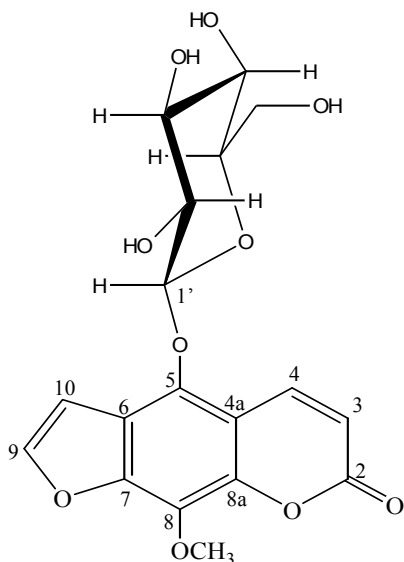
En conclusion, l'étude chimique de l'espèce *B. montanum* Coss. a permis l'obtention de 5 produits purs.

Références :

1. Quezel P. et Santa S. (1963) *Nouvelle flore de l'Algérie et région désertiques Méridionales CNRS Paris*, Vol. 2 P. 676.
2. Pottier-Alapetite G., (1979), *Flore de la Tunisie* Publier par les soins de A. Nabli. Ministère de l'enseignement sup. et de la rech. Scientifique et ministère de l'agric. Tunis, 1, 597.
3. Pimenov, M. G. and Leonov, M. V. (1993), *The genera of the Umbelliferae. Royal Botanic Gardens, Kew*.
4. Jahandiez, E. et Maire R., (1932), *Catalogue Des Plantes Du Maroc*. Minerva, Lechevalier Eds. , Alger. Vol.2 P.532

IV. 1. Identification des produits isolés de *Carum montanum* Coss. & Dur.

IV. 1. 1. Le composé C1



Le composé **C1** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le DMSO et l'acétone. Le spectre d'absorption UV (figure IV-1) montre trois maxima à 248, 265 et 307 nm caractéristiques d'une furanocoumarine linéaire [1, 2].

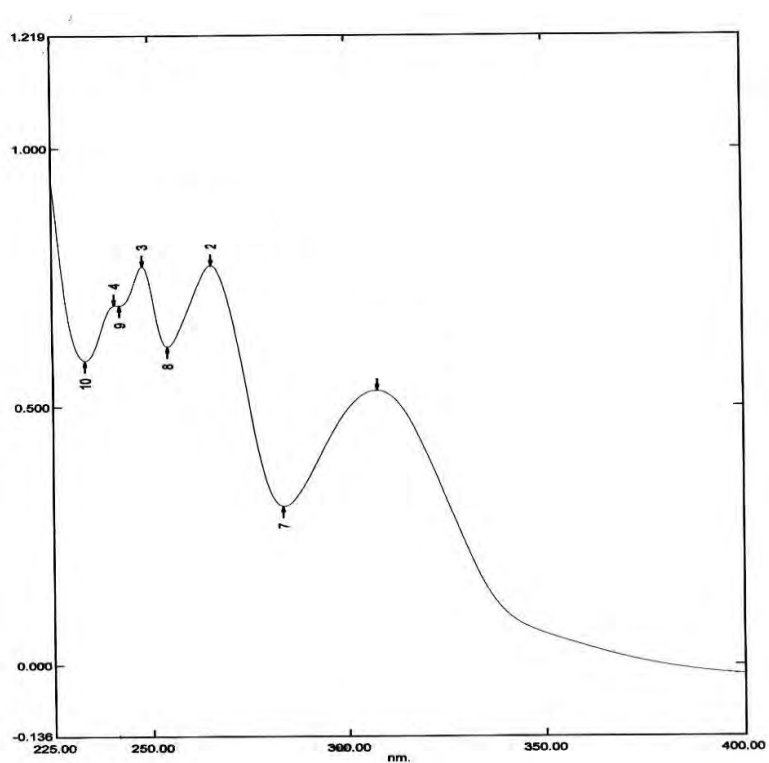


Figure IV-1 : Spectres UV-Visible du composé C1.

La mesure du spectre de masse FABMS, (figure IV-2), en mode positif du composé **C1** a indiqué la présence d'un ion quasi-moléculaire à m/z 395 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{18}H_{18}O_{10}$. Ce spectre montre aussi un fragment à m/z 233 $[M + H - 162]^+$ qui lui, représente $[aglycone + H]^+$.

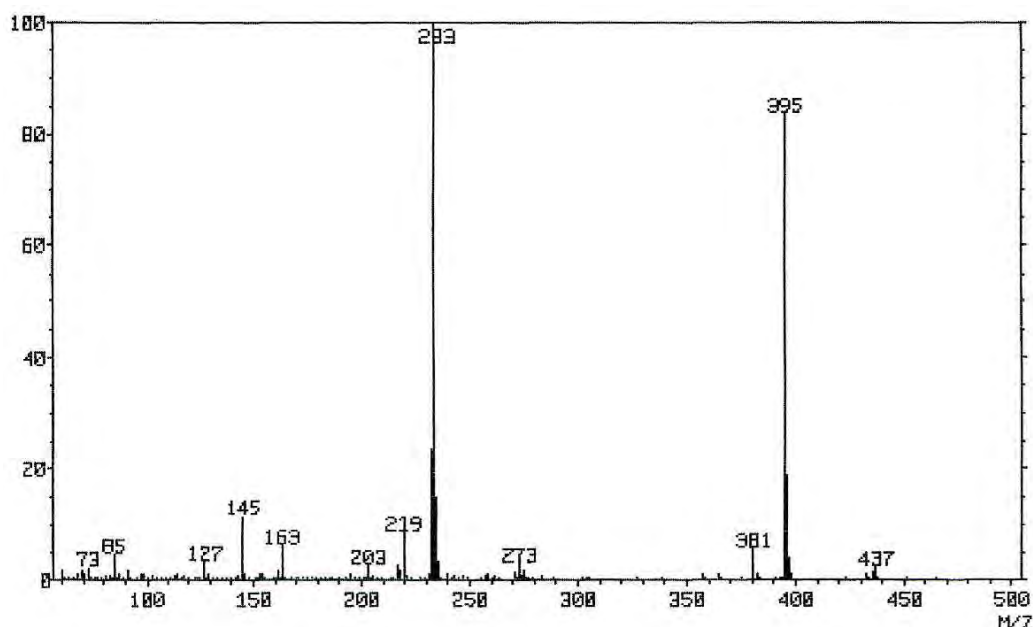


Figure IV-2 : Spectres de masse FAB-MS du composé C1.

L'analyse de spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans le DMSO- d_6) (Figure IV-4) révèle la présence de dix-huit atomes de carbone dans le composé **C1**. L'analyse du spectre DEPT 135 (Figure IV-5) a fourni plus d'indications, parmi ces atomes de carbone on en dénombre un CH_2 et par déduction sept carbones quaternaires. On y observe également un signal à δ 61,59 ppm relatif au groupement méthoxyle.

Par ailleurs, les 18 atomes de carbones dénombrés ont permis de déduire la formule brute $C_{18}H_{18}O_{10}$ correspond à un poids moléculaire de 394 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

Le spectre RMN 1H (300 MHz dans le DMSO- d_6) (Figure IV-3) permet de mettre en évidence la présence d'un groupement méthoxyle à 4,14 ppm caractérisé par un signal de trois protons sous forme d'un singulet. Les deux signaux qui apparaissent à δ 8,50 ppm (1H, d, $J=9,84$ Hz) et 6,35 ppm (1H, d, $J=9,84$ Hz) sont attribués aux protons du cycle pyranne H-4 et H-3. Deux autres signaux à δ 8,10 ppm (1H, d, $J=2,2$ Hz) et 7,25 ppm (1H, d, $J=2,2$ Hz) correspondent aux protons du cycle furanne H-9 et H-10. Ceci est confirmé par les résultats de l'expérience COSY (Figure IV-6) qui représente les points de corrélations entre les protons H-4 (8,50 ppm) et H-3 (6,35 ppm) ainsi qu'entre H-9 (8,02 ppm) et H-10 (7,33 ppm).

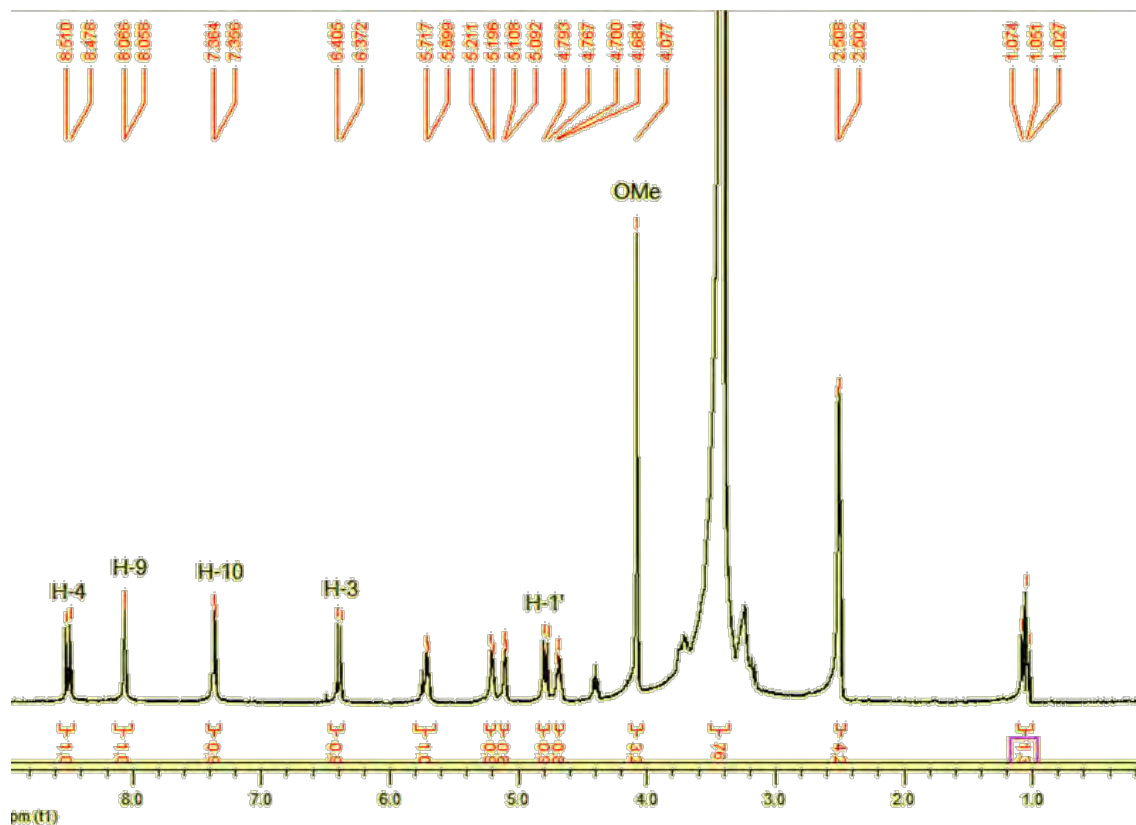


Figure IV-3 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d₆) du composé C1.

La partie osidique est représentée par le pic anomérique résonant à 4,75 ppm avec une constante de couplage de 7,6 Hz : ceci montre que le sucre est β lié à la génine. L'hydrolyse acide (HCl 6%) d'une petite quantité de C1 a donné le glucose, identifié par la chromatographie sur couche mince en gel de silice (Acétone-H₂O 9 :1) et par comparaison à un échantillon de référence ($R_f = 0.34$). La perte de masse de 162 et le signal du spectre RMN ^{13}C à $\delta = 60.57$ ppm, qui représente le groupe CH₂ d'après le DEPT135 (figure IV-5), confirme la présence du glucose.

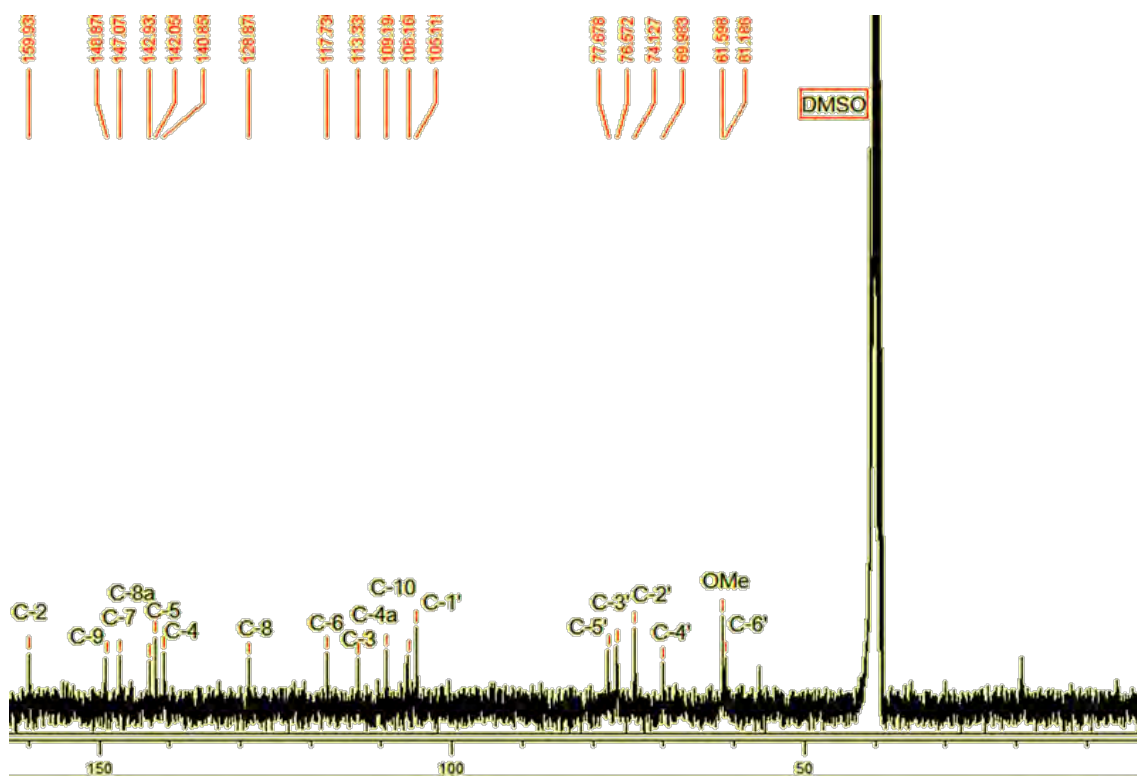


Figure IV-4 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, DMSO-d6) du composé C1.

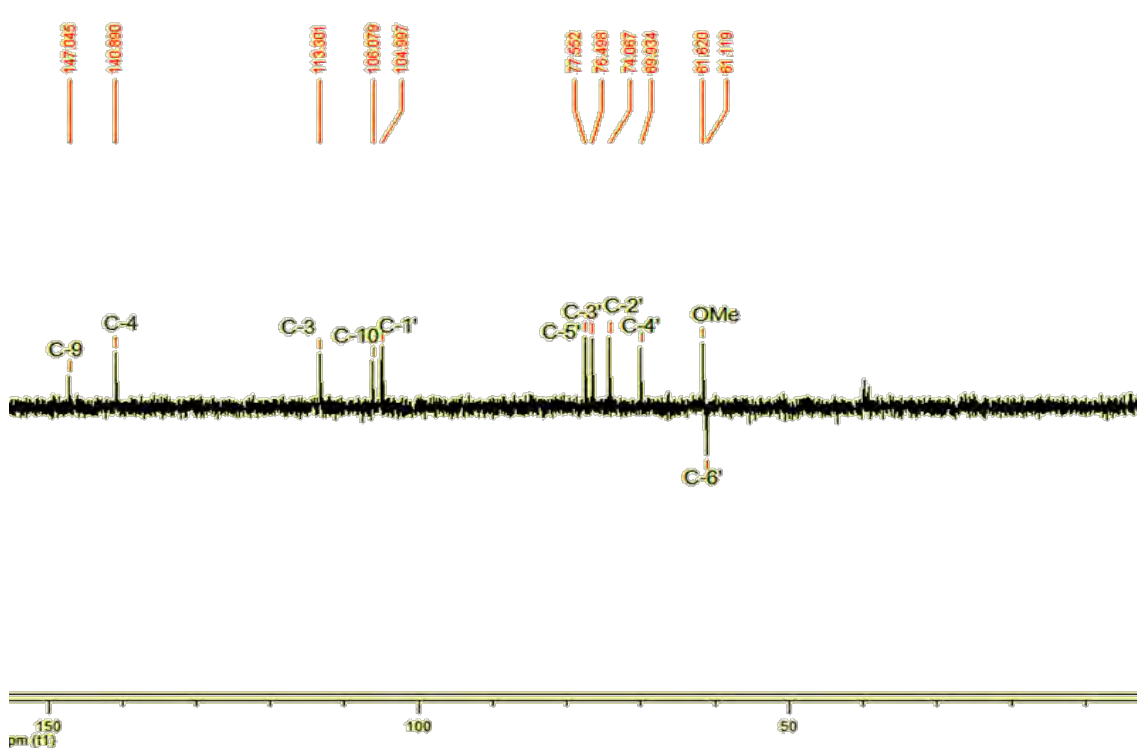


Figure IV-5 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, DMSO-d6) du composé C1.

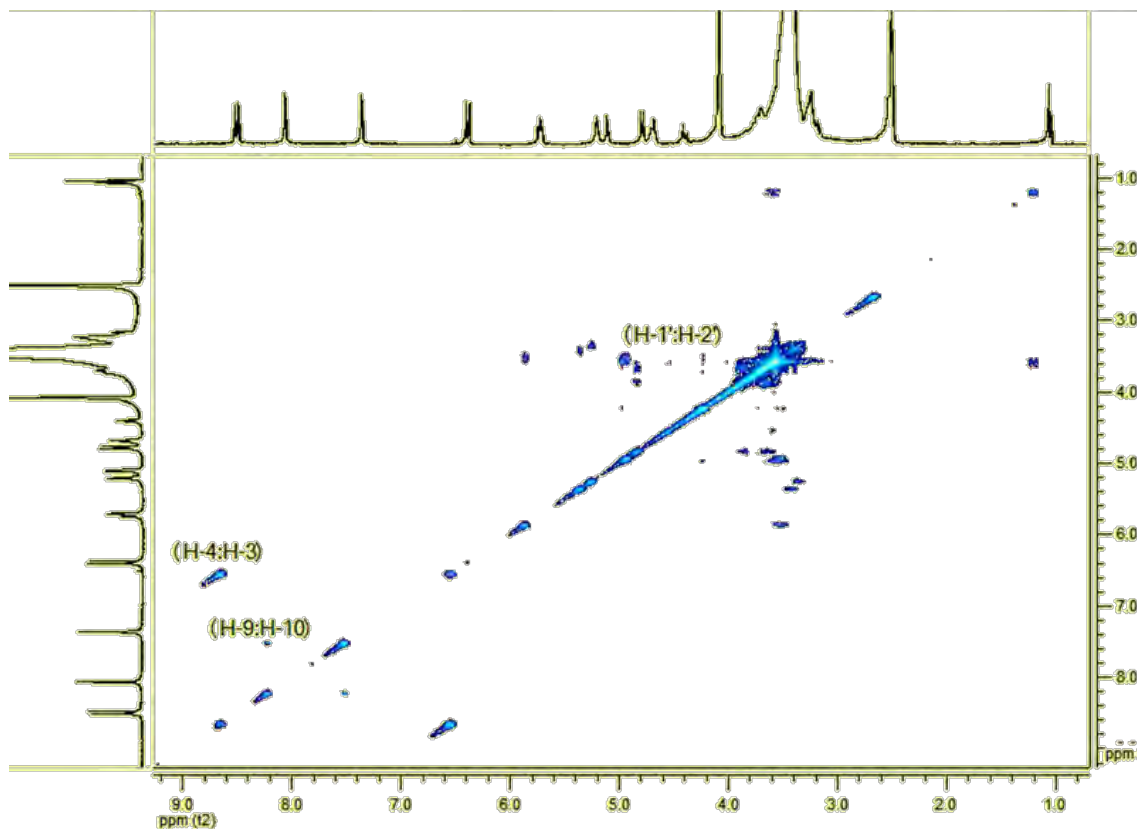


Figure IV-6 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C1.

Le spectre RMN ^{13}C montre bien la présence du sucre dont la majorité des carbones résonnent entre 61 et 78 ppm et dont le pic de carbone anomérique C1' sort à 104,7 ppm. Le proton anomérique corrèle avec le carbone situé 104,7 ppm en expérience HMQC (figure IV-7) ainsi qu'avec le carbone résonant à 141,6 ppm comme le montre la mesure du spectre HMBC (figure IV-8). Cette dernière expérience montre bien que le glucose est lié au carbone situé en position 5.

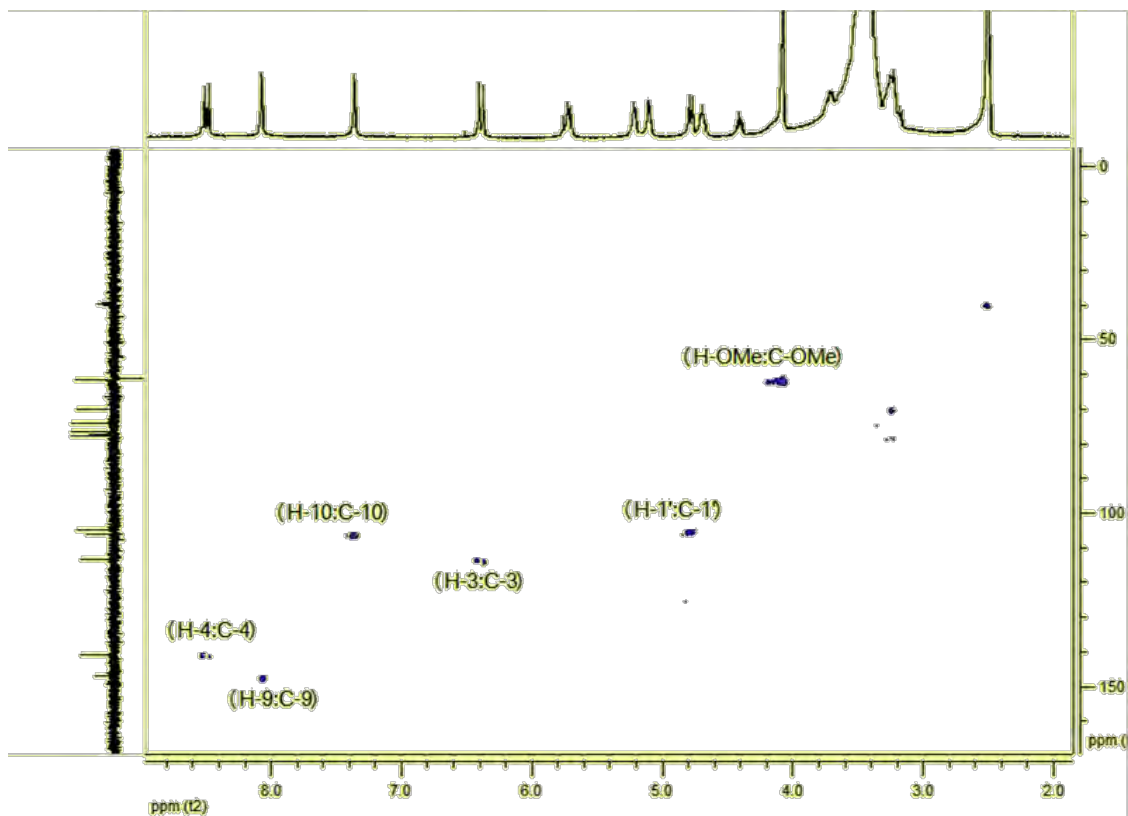


Figure IV-7 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé C1.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (Figure IV-7) a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé C1. Il a pu être démontré que les protons localisés à δ 8,50 ppm, δ 6,35 ppm, δ 8,10 et δ 7,25 ppm étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ 140,5 ppm, δ 112,9 ppm, δ 148,5 ppm et δ 105,1 ppm et que les protons du groupement méthoxyle étaient attachés au carbone situé à δ 61,2 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (Figure IV-8) a montré la corrélation entre les protons résonant à δ 4,20 ppm et le carbone situé à 128,5 ppm suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position 8. Cette expérience a montré aussi des crêtes de corrélation entre le carbone résonnant à δ 141,65 ppm et le proton anomérique résonnant à 4,75 ppm, en montrant clairement le couplage du proton anomérique du glucose (H-1'') avec le carbone C-5 de l'aglycone.

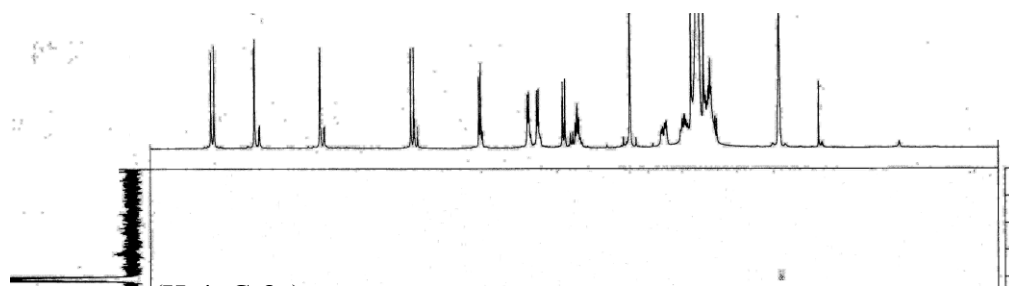


Figure IV-8 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C1.

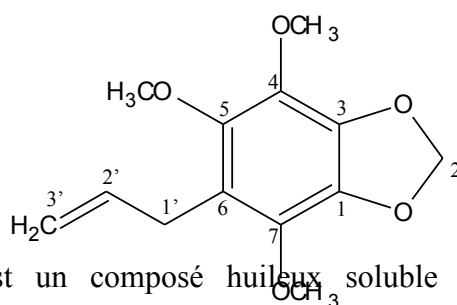
Position	δ_c	δ_H (integration, multi, <i>j</i> en Hz)	COSY	HMBC
2	159,50			
3	112,90	6,35 (1H, d, 9,84)	H-4	C-4a, C-2
4	144,84	8,51 (1H, d, 9,84)	H-3	C-8a, C-2
4a	108,82			
5	141,65			
6	117,36			
7	146,64			
8	128,50			
8a	142,54			
9	148,48	8,10 (1H, d, 2,2)	H-10	C-6, C-7
10	105,1	7,25 (1H, d, 2,2)	H-9	C-6, C-7
1'	104,74	4,75 (H, d, 7,6)		C-5
2'	73,74			
3'	76,21			
4'	69,61			
5'	77,29			
6'	60,8			
O-Me	61,2			C-8

Tableau IV-1 : Données spectrales du composé C1

Sur la base de ces résultats, la structure du composé **C1**, a pu être établie comme suit :
8-méthoxy-5-O- β -D-glucosylpsoralen ou **xanthotoxin-5-O- β -D-glucoside**.

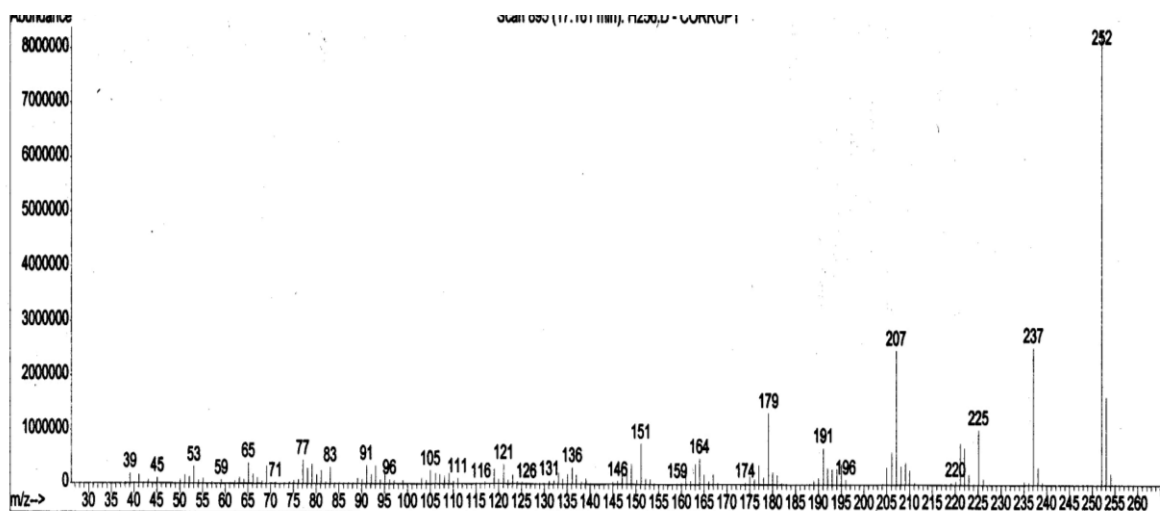
Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. Il s'agit donc d'un nouveau produit naturel [3].

IV. 1. 2. Le composé C2



Le composé **C2** est un composé huileux soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane.

La mesure du spectre de masse à impact électronique du composé **C2** (figure IV-9) à indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 252 [M]⁺, un ion à m/z 237 [$M-15$]⁺ qui résulte de la perte du groupe (CH₃), ainsi que divers ions à m/z 207, 179 et 151 résultant de la fragmentation de la molécule. Cette fragmentation est caractéristique du *Nothoapiole* [4].



singu

mettre en évidence trois groupements méthoxyles. On observe également un singulet integrant pour deux protons δ 5,82 ppm correspond au groupement méthylène. Par ailleurs, des signaux à δ 3,24 ppm (2H, dd, $J = 6,03$ et 1,68 Hz) et à δ 4,92 (2H, dd, $J=15,6$ et 1,53 Hz) sont attribués respectivement aux protons H-1' et H-3'. Le proton en position 2' apparaît au-delà de 5,84 ppm sous forme d'un multiplet difficile à interpréter.

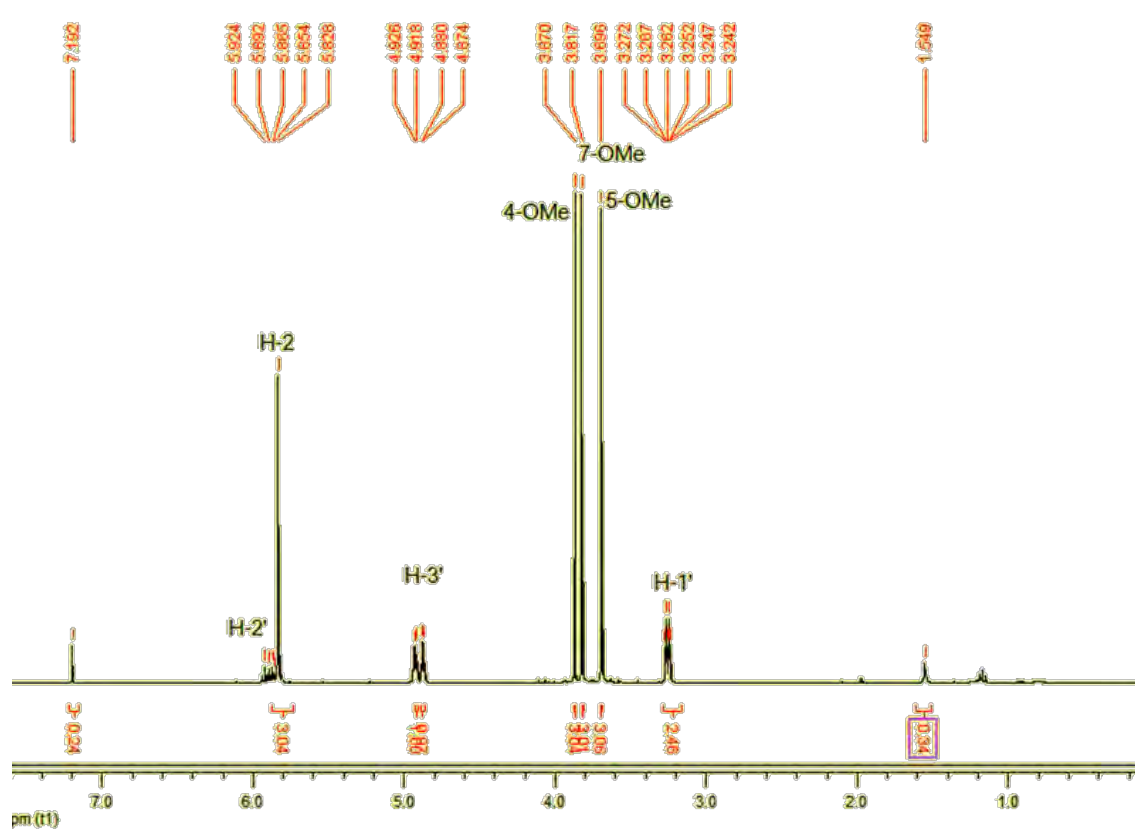


Figure IV-10 : Spectre ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) du composé C2.

La mesure de l'expérience COSY (Figure IV-11) représente des crêtes de corrélations entre les protons H-2' (5,84 ppm), H-3' (4,92 ppm) et H-1' (3,24 ppm).

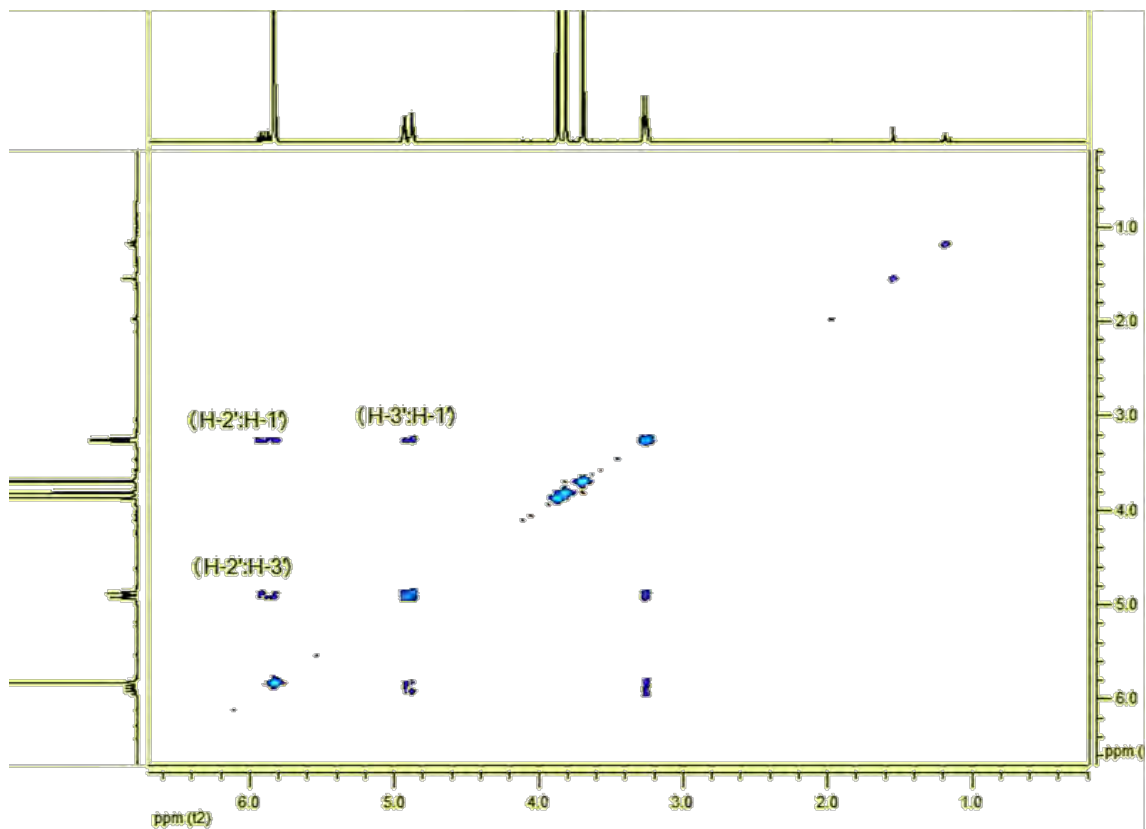


Figure IV-11 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C2.

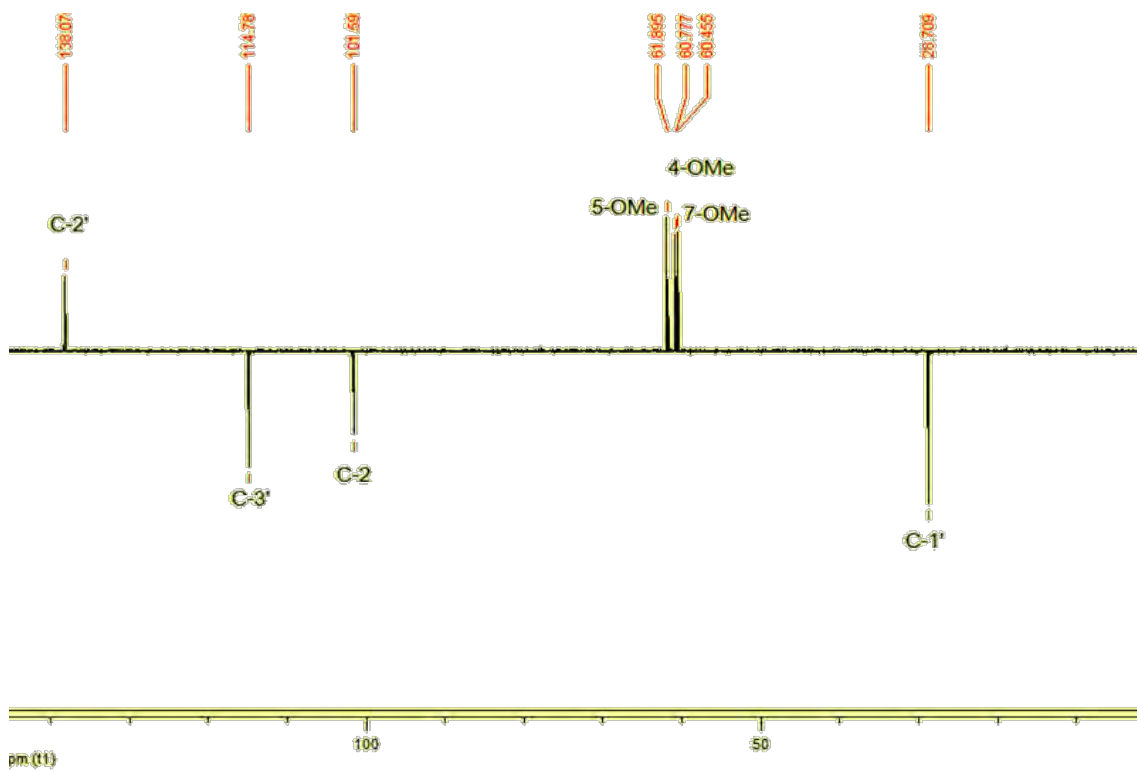


Figure IV-12 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃) du composé C2.

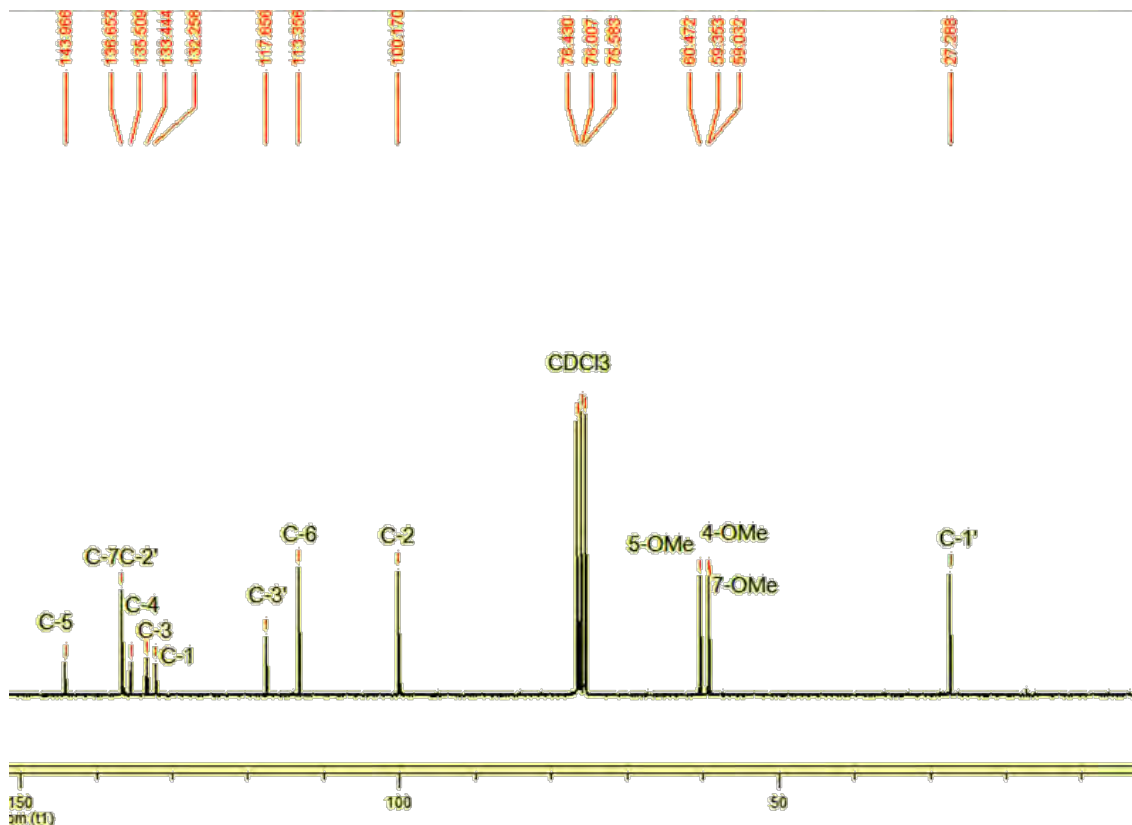


Figure IV-13 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé **C2.**

L'analyse des spectres RMN ^{13}C (300 MHz dans le CDCl_3) (Figure IV-13) et DEPT 135 (Figure IV-12) révèle la présence de treize atomes de carbone dans le composé **C2**. Parmi ces atomes de carbone on en dénombre trois carbones secondaires (CH_2), et par déduction six carbones quaternaires. On y observe également trois signaux à δ 59,03 ppm, δ 59,35 ppm et δ 60,47 ppm relatif aux groupements méthoxyles.

Par ailleurs, les 13 atomes de carbones dénombrés (Tableau IV-2) ont permis de déduire la formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$ correspondant à une masse moléculaire de 252 uma, ceci étant en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

L'attribution des déplacements chimiques RMN ^{13}C et ^1H est favorisée par l'étude du spectre HMQC (Figure IV-14), puis confirmée par les corrélations lointaines apportées par le spectre HMBC (Figure IV-15).

Le spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé **C2** (Figure IV-14) a montré des corrélations RMN ^1H - ^{13}C entre les protons résonant à δ 3,25 ppm et à δ 4,92 ppm; et les carbones respectivement situés à δ 27,28 ppm et à δ 117,65 ppm, ainsi que entre les protons apparaissant vers δ 5,82 ppm et les carbones localisés à δ 100,17 ppm et 133,44 ppm.

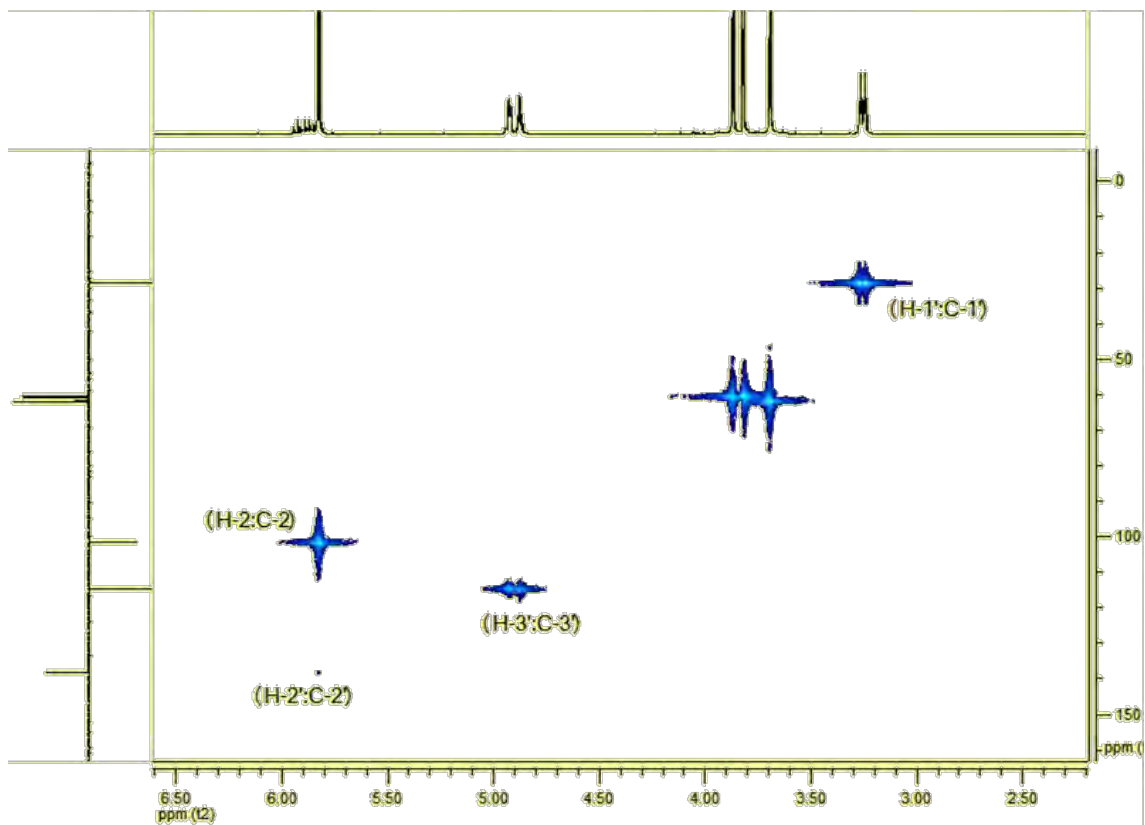


Figure IV-14 : Spectre de corrélation hétéronucléaires HMQC du composé C2

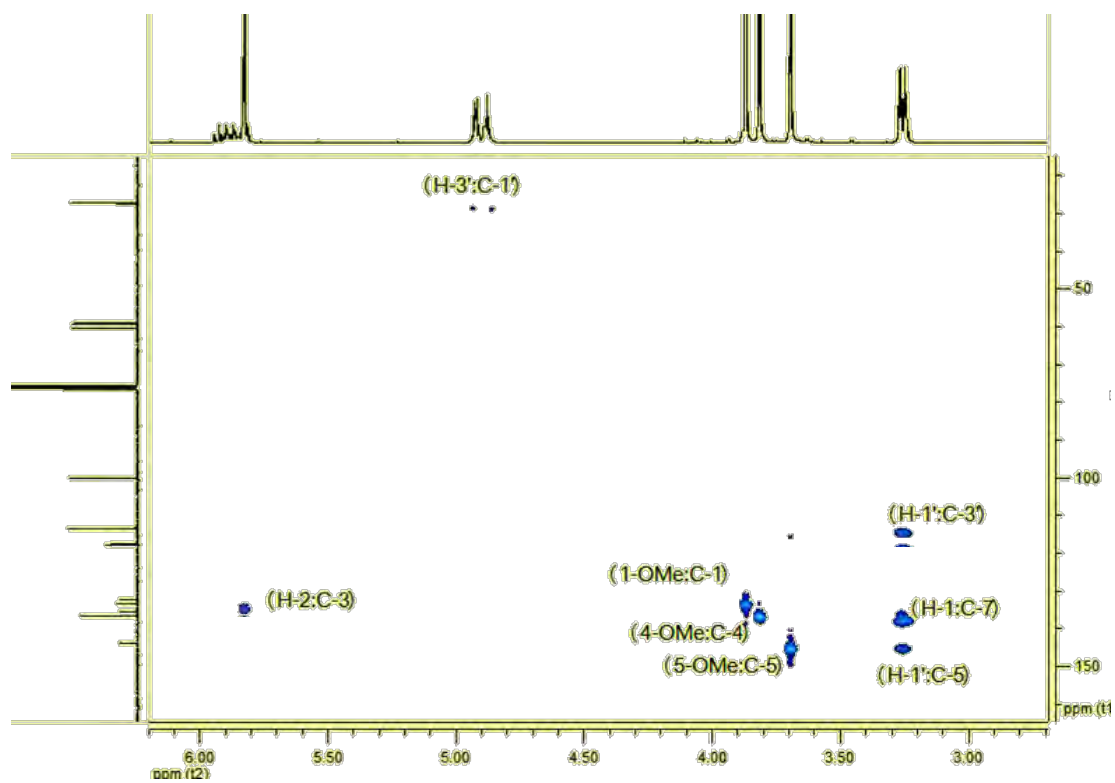


Figure IV-15 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C2.

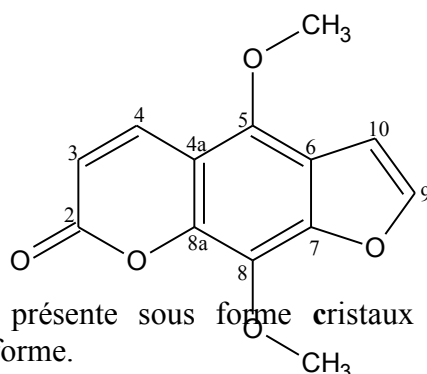
La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC de ce composé (Figure IV-15) a montré les corrélations entre les protons apparaissant à δ 3,25 ppm et les carbones situés à δ 113,35 ppm, 117,65 ppm, 143,96 ppm, et 136,68 ppm, ceci suggérant l'attachement de la chaîne aliphatique en position 6. Cette proposition est confirmée par la corrélation entre le proton résonant vers δ 5,85 ppm et le carbone qui apparaît à δ 113,35 ppm. L'étude de ce spectre a permis de déterminer les positions des groupements méthoxyles en observons les sommets de corrélations entre les protons résonants à δ 3,69 ppm, 3,81 ppm et 3,87 ppm, et les carbones respectivement situés à δ 143,96 ppm, 136,68 ppm et 135,50 ppm.

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (integ., multi., J (Hz))	COSY	HMBC
1	132,25			
2	100,17	5,82 (2H, S)		C-3
3	133,44			
4	135,50			
5	143,96			
6	113,35			
7	136,68			
1'	27,28	3,25 (2H, dd, $J = 6,03$ et $1,68$)	H-3', H-2'	C-3', C-5 et C-7
2'	136,65	Au delà de 5,82 (1H, m)	H-1', H-3'	
3'	117,65	4,92 (2H, dd, $J = 15,6$ et $1,53$)	H-2', H-1'	C-1'
7-OMe	59,03	3,81 (3H, S)		C-7
4-OMe	59,35	3,87 (3H, S)		C-4
5-OMe	60,47	3,69 (3H, S)		C-5

Tableau IV-2 : Données spectrales du composé C2

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales, et par comparaison avec les données de la littérature [4] la structure du composé **C2** a pu être établie comme étant le *Nothoapiole*.

IV. 1. 3. Le composé C3



Le composé **C3** se présente sous forme cristaux jaune pale, solubles dans le dichlorométhane et le chloroforme.

La mesure du spectre de masse en impact électronique du composé **C3** a montré un pic de base à m/z 246, un ion à m/z 231 $[M-15]^+$ qui résulte de la perte du groupe (CH_3) , ainsi que divers ions à m/z 203 $[M - CO - CH_3]$, m/z 188 $[M - CO - 2CH_3]$ et à m/z 175 résultant de la fragmentation de la molécule.

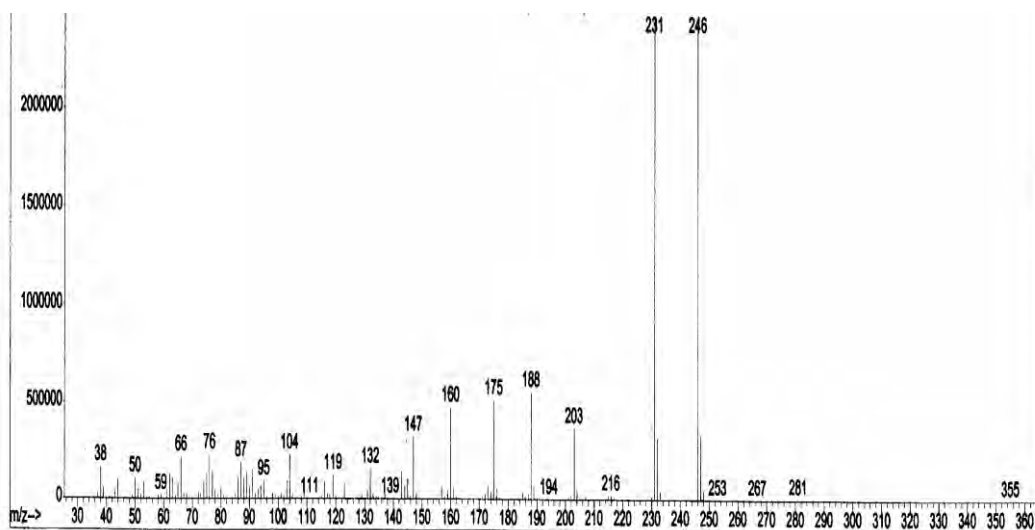


Figure IV-16 : Spectre de masse IE-MS du composé C3.

Le spectre RMN 1H (300 MHz dans le $CDCl_3$), (figure IV-17), présente des signaux caractéristiques des protons du cycle furanne et pyranne. Les protons à δ 8,07 ppm (1H, d, $J=9,79$) et 6,23 ppm (1H, d, $J=9.79$ Hz) sont attribués respectivement aux protons H-4 et H-3

du cycle pyranne. Les signaux à δ 7,56 ppm (1H, d, $J=2,26$ Hz, H-9) et à δ 6,93 ppm (1H, d, $J= 2,26$ Hz, H-10) indiquent la présence d'un cycle furane [5].

Le spectre RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3), (Figure IV-18), met en évidence 13 atomes de carbones. L'expérience DEPT 135 (Figure IV-19), nous a permis de distinguer, par déduction, sept carbones quaternaires.

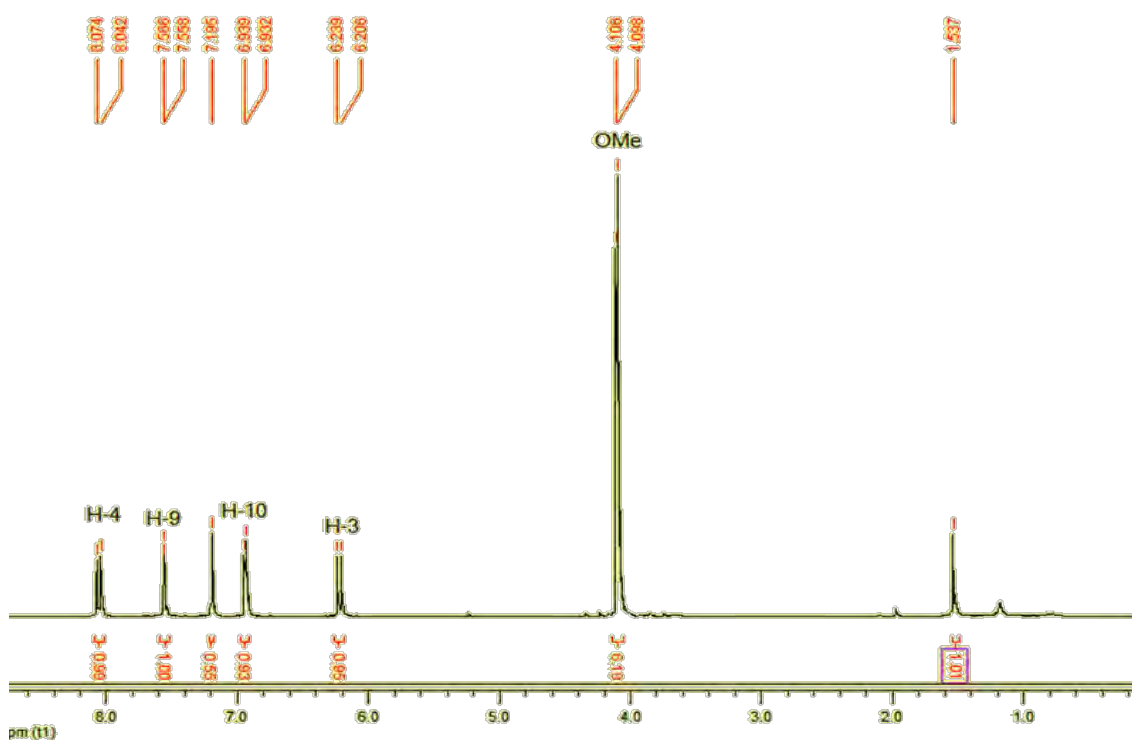


Figure IV-17 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C3.

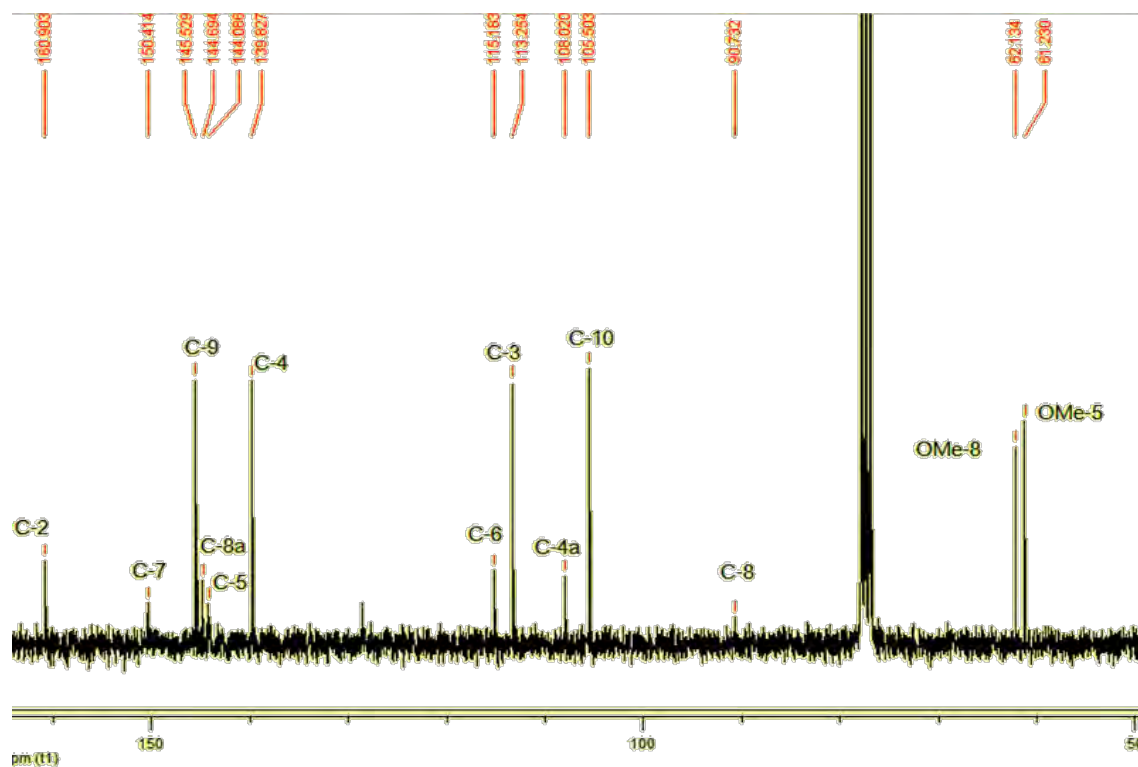


Figure IV-18 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C3.

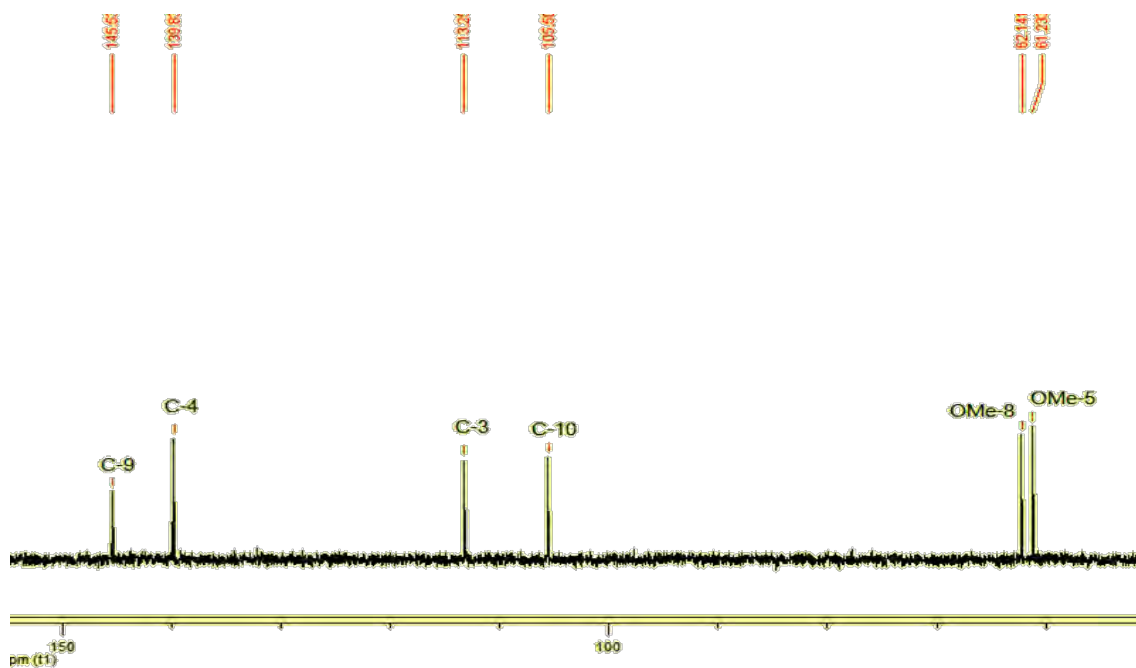


Figure IV-19 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3) du composé C3.

Grâce au spectre COSY (figure IV-20), nous avons pu déterminer deux corrélations entre les protons H-4 (8,07 ppm) et H-3 (6,23 ppm) ainsi que H-10 (7,56 ppm) et H-9 (6,93 ppm).

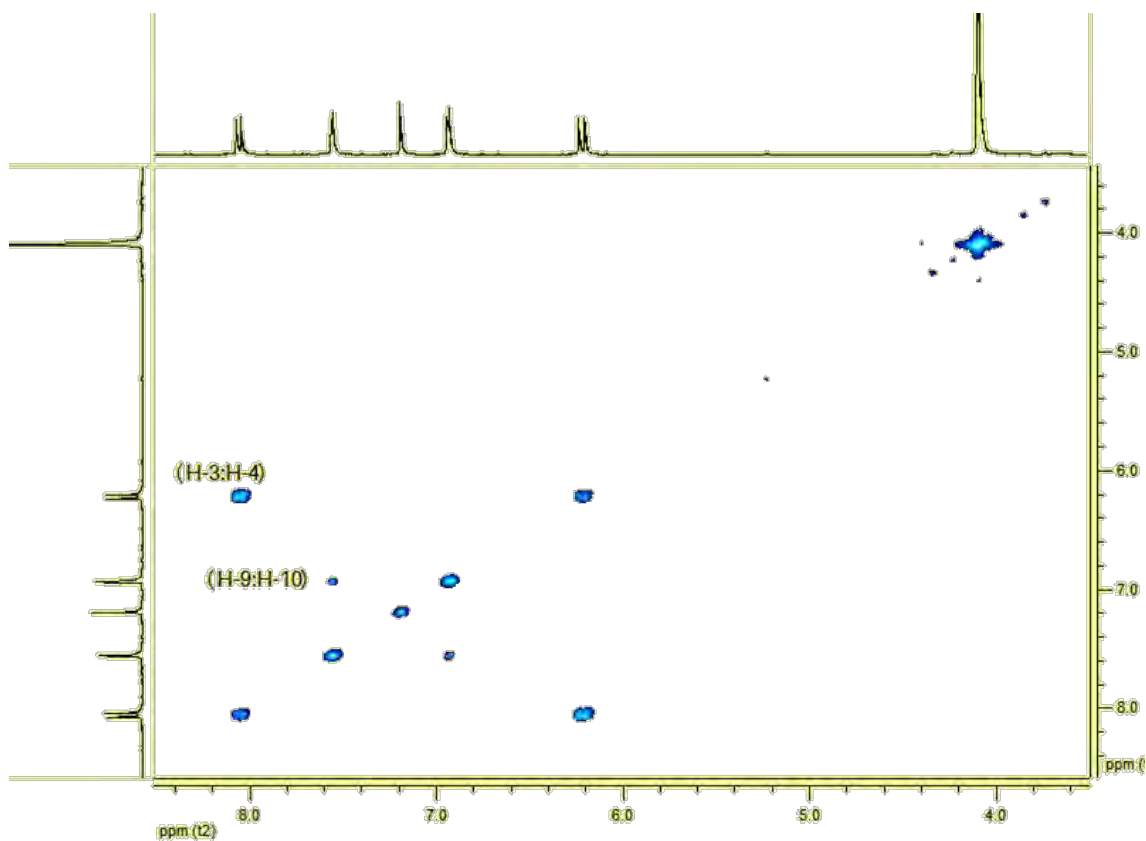


Figure IV-20 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C3.

L'expérience hétéronucléaire HMQC (figure IV-21), met en évidence des taches de corrélations, une entre le H-4 à δ 8,07 ppm et le carbone à δ 139,82 ppm et l'autre entre le H-3 à δ 6,23 ppm et le carbone apparaissant à δ 113,25 ppm. De plus on peut voir des corrélations entre le proton H-9 à δ 7,56 ppm et le carbone à δ 145,53 ppm, ainsi qu'entre le proton H-10 à δ 6,93 ppm et le carbone à δ 105,50 ppm. Cette expérience a montré de, ce fait, des crêtes de corrélation entre les protons apparaissant à δ 4,09 ppm et les carbones situés à 61,22 et 62,13 ppm.

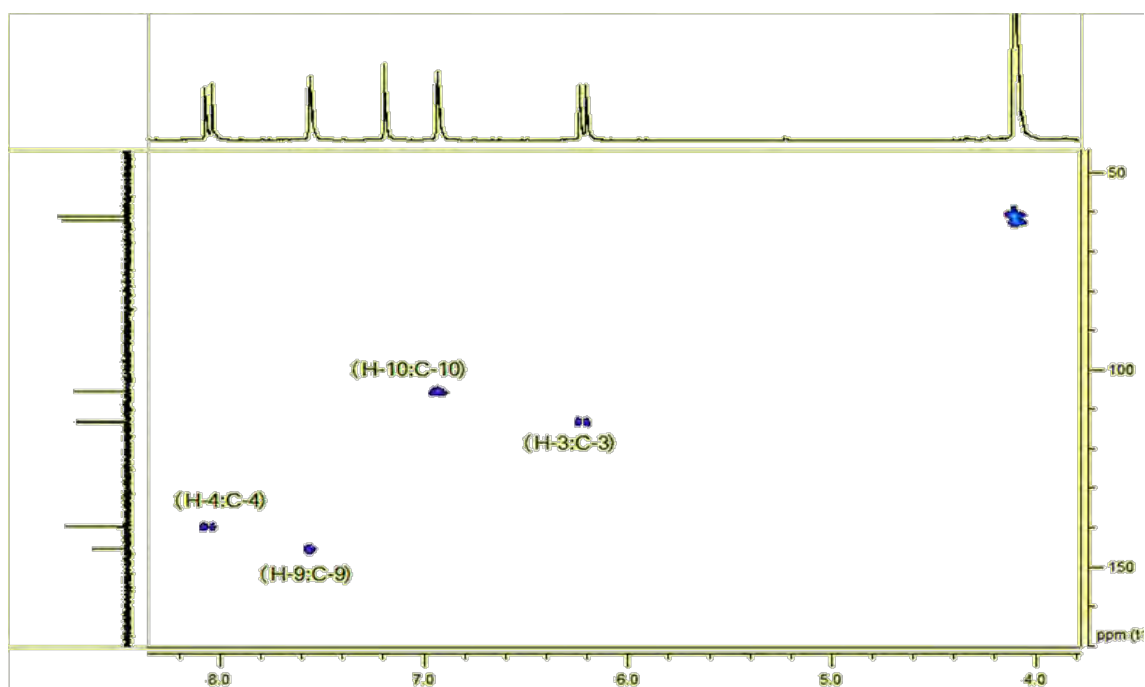


Figure IV-21 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé C3.

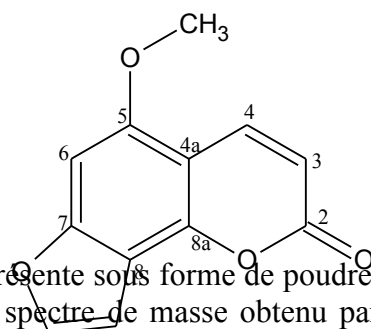
Position	δ_c	δ_H (integration, multi, j en Hz)	COSY
2	160,9		
3	113,25	6,20 (1H, d, 9,79)	H-4
4	139,82	8,07 (1H, d, 9,79)	H-3
4a	108,01		
5	144,08		
6	115,18		
7	150,41		
8	90,73		
8a	144,69		
9	145,53	7,56 (1H, d, 2,26)	H-10
10	105,50	6,93 (1H, d, 2,26)	H-9
1'	61,22	4,09 (3H, s)	
1''	62,13	4,09 (3H, s)	

Tableau IV-3 : Donnés spectrales du composé C3

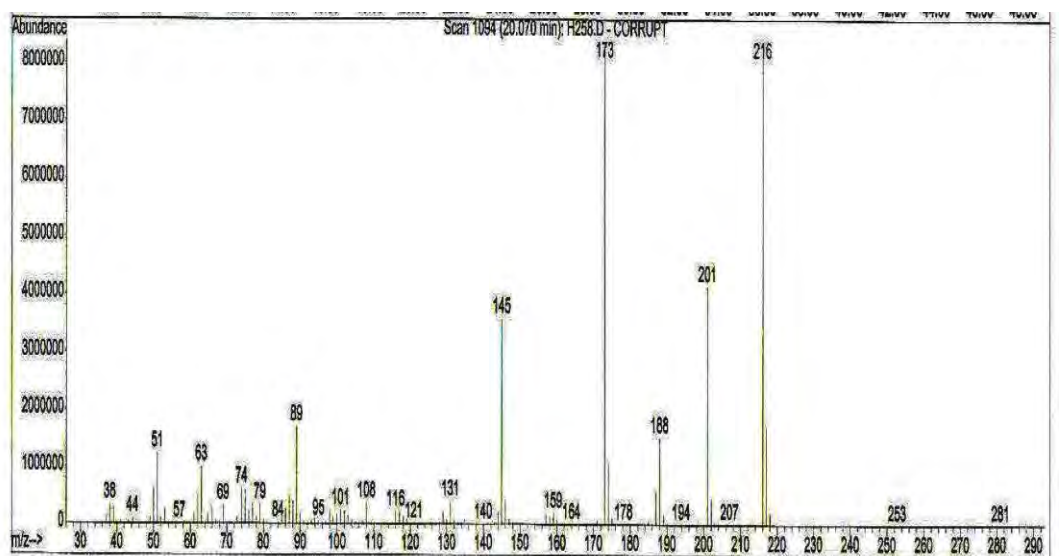
L'analyse de l'ensemble de ces donnés spectrales et par comparaison avec les données de la littérature [6, 7], on a pu établir la structure du composé en tant que **5, 8-Diméthoxyorsoralène** ou **Isopimpinelline**.

Ce composé est connu pour son activité antifongique [8] et photoréactive [9].

IV. 1. 4. Le composé C4



Le composé **C4** se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane. Son spectre de masse obtenu par impact électronique (figure IV-22) présente un pic moléculaire à m/z 216, ainsi que divers ions à m/z 201 $[M-CH_3]^+$, à m/z 188 $[M-CO]^+$ et à m/z 173 $[M-CO-CH_3]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule.



L'analyse par RMN ^{13}C (Figure IV-24) révèle la présence de douze atomes de carbones dans le composé **C4**. Parmi ces atomes de carbones on en dénombre six carbones quaternaires par déduction.

Par ailleurs, les 12 atomes de carbones dénombrés ont permis de déduire la formule brute $C_{12}H_8O_4$ correspondant à un poids moléculaire de 216 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

Le spectre RMN 1H (300 MHz dans le $CDCl_3$) (figure IV-25) permet de mettre en évidence la présence d'un groupement méthoxyle à 4,20 ppm caractérisé par un signal de trois protons sous forme de singulet. Les deux doublets apparaissant à δ 8,10 ppm (1H, d, $J=9,73$ Hz) et 6,21 ppm (1H, d, $J=9,73$ Hz), sont attribués aux protons H-4 et H-3 du cycle pyranne. Par ailleurs, les deux autres doublets à δ 7,52 ppm (1H, d, $J=2,3$ Hz) et 6,95 ppm (1H, d, $J=2,3$ Hz) correspondent aux protons H-9 et H-10 du cycle furanne. Ceci est en bon accord avec les résultats de l'expérience COSY (figure IV-26) qui représente les points de corrélations entre les protons H-4 (8,10 ppm) et H-3 (6,21 ppm) mais aussi entre H-9 (7,52 ppm) et H-10 (6,95).

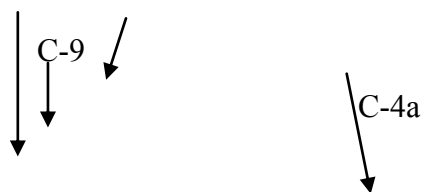


Figure IV-23 : Spectre ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) du composé C4.

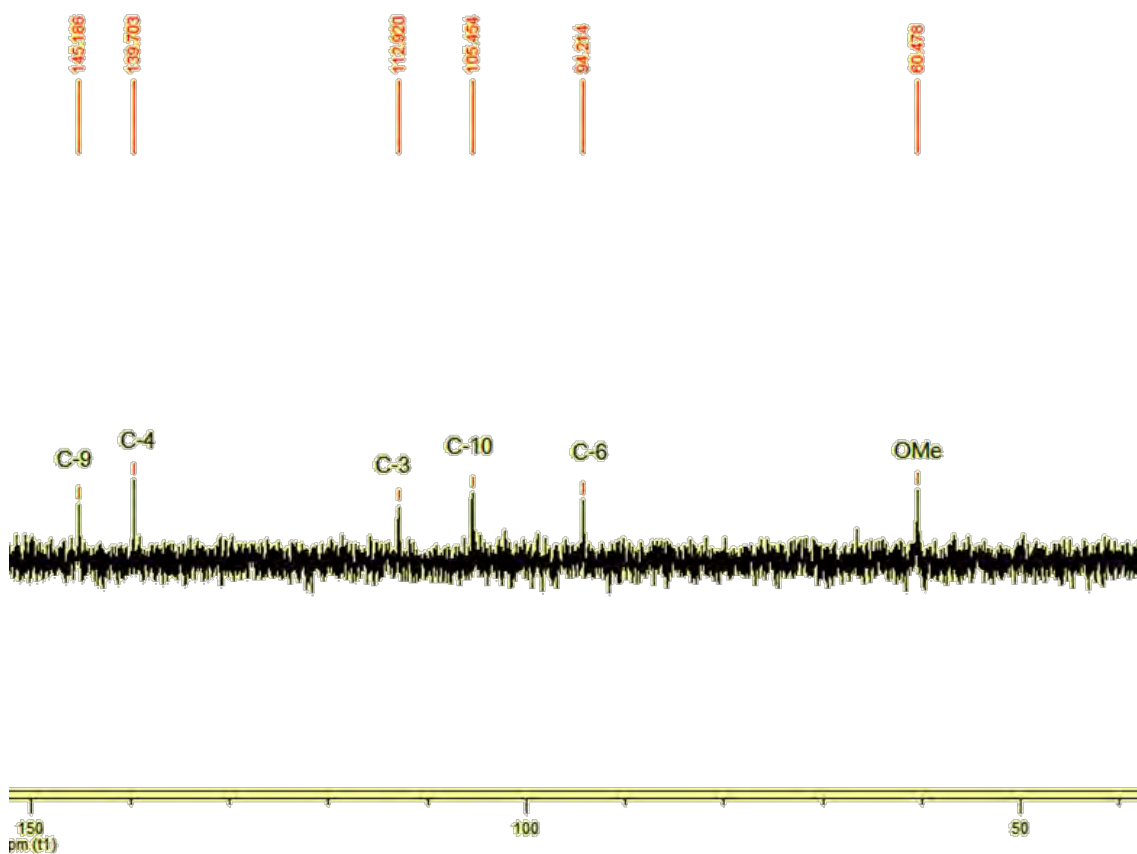


Figure IV-24 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3) du composé C4.

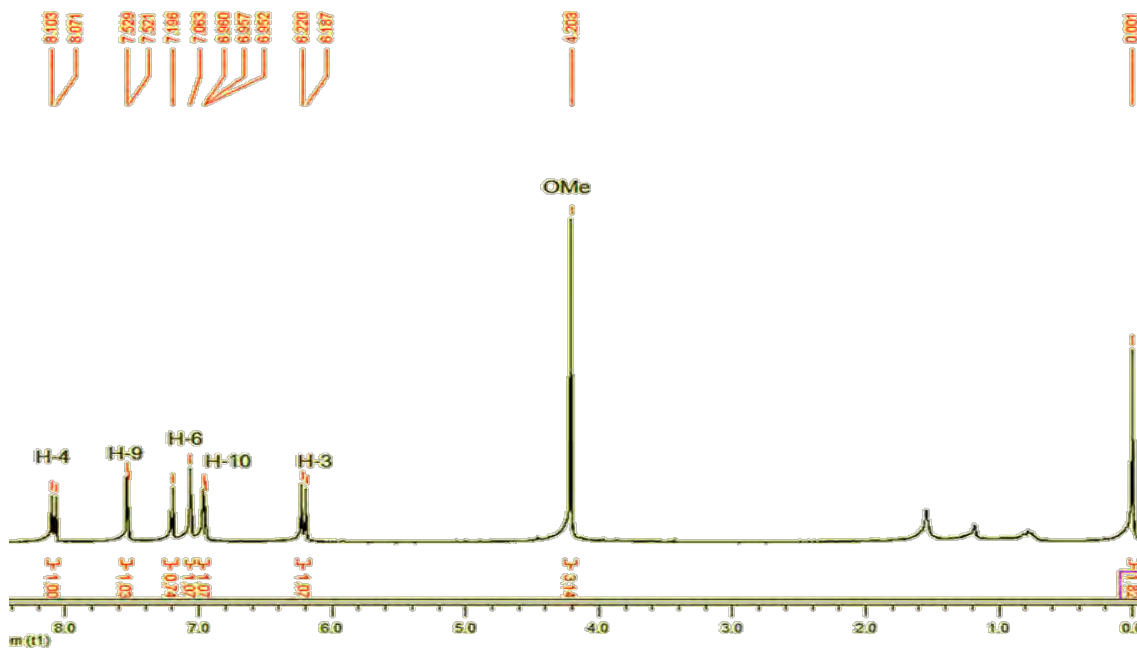


Figure IV-25 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C4.

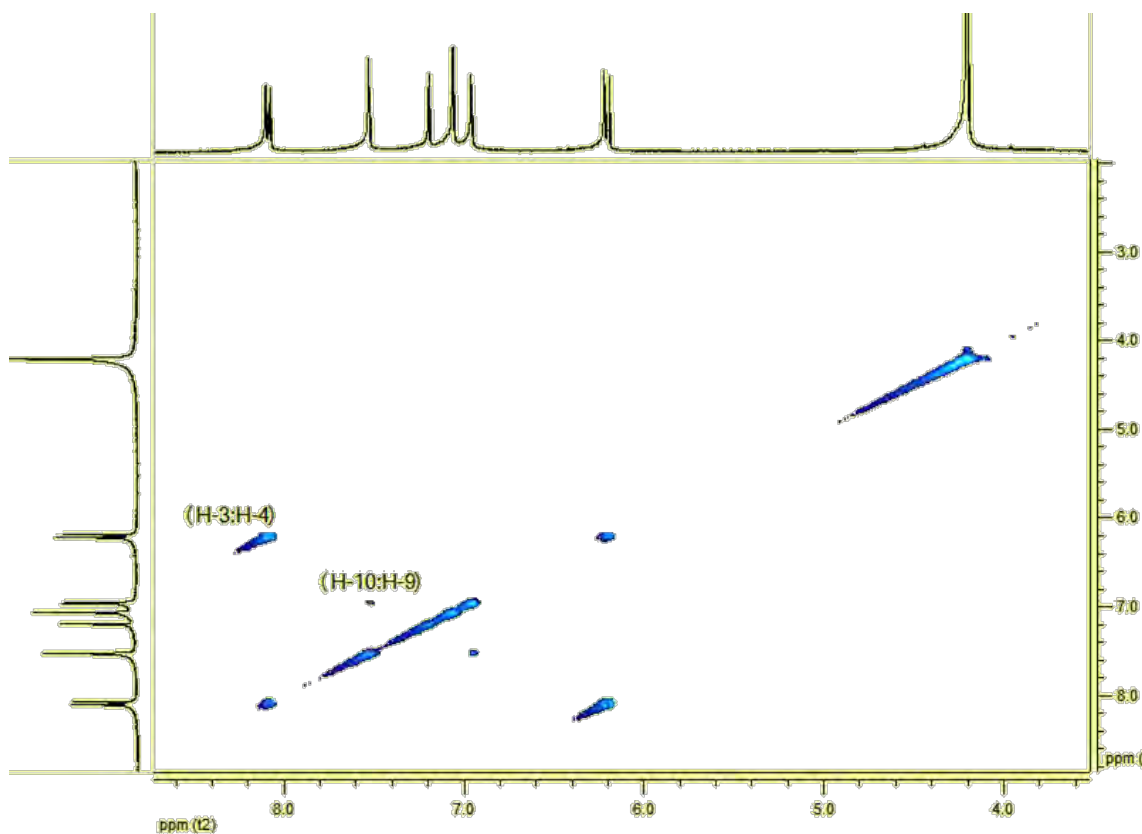


Figure IV-26 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C4.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (figure IV-27) a conduit à l'établissement des connexions géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé C4. Il a ainsi pu être démontré que les protons localisés à δ 6,21 ppm, δ 6,95 ppm, δ 7,06 ppm, δ 7,52 ppm et δ 8,10

ppm étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ 112,91 ppm, δ 105,45 ppm δ 94,21 ppm, δ 145,18 ppm et δ 139,70 ppm et que les protons du groupement méthoxyle était attachés au carbone résonant à δ 60,47 ppm. La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure IV-28) a montré une crête de corrélation entre les protons résonants à δ 4,20 ppm et le carbone situé à 156,1 ppm suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position C-5. Cette dernière expérience a permis de mettre en évidence la corrélation entre le proton H-6 résonnant à δ 6,95 ppm et le carbone situé à δ 105,1 ppm confirmant la position du proton aromatique en position 6.

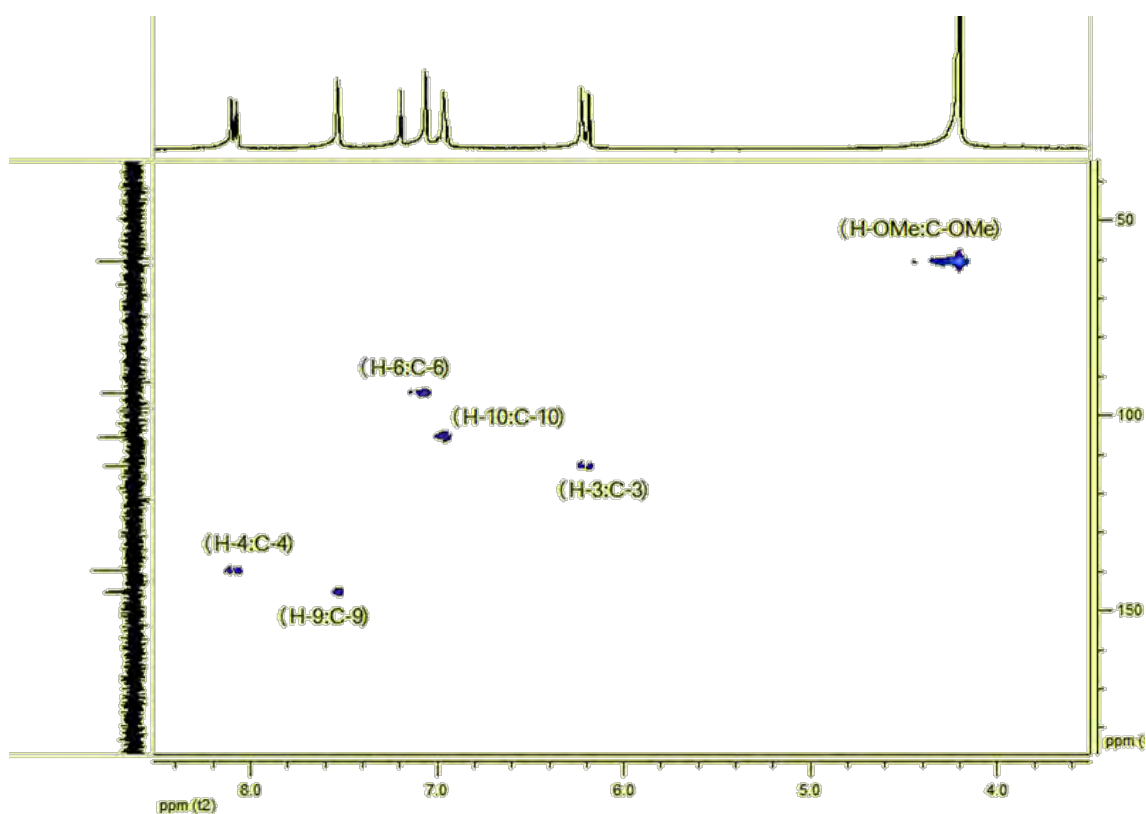


Figure IV-27 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé C4.

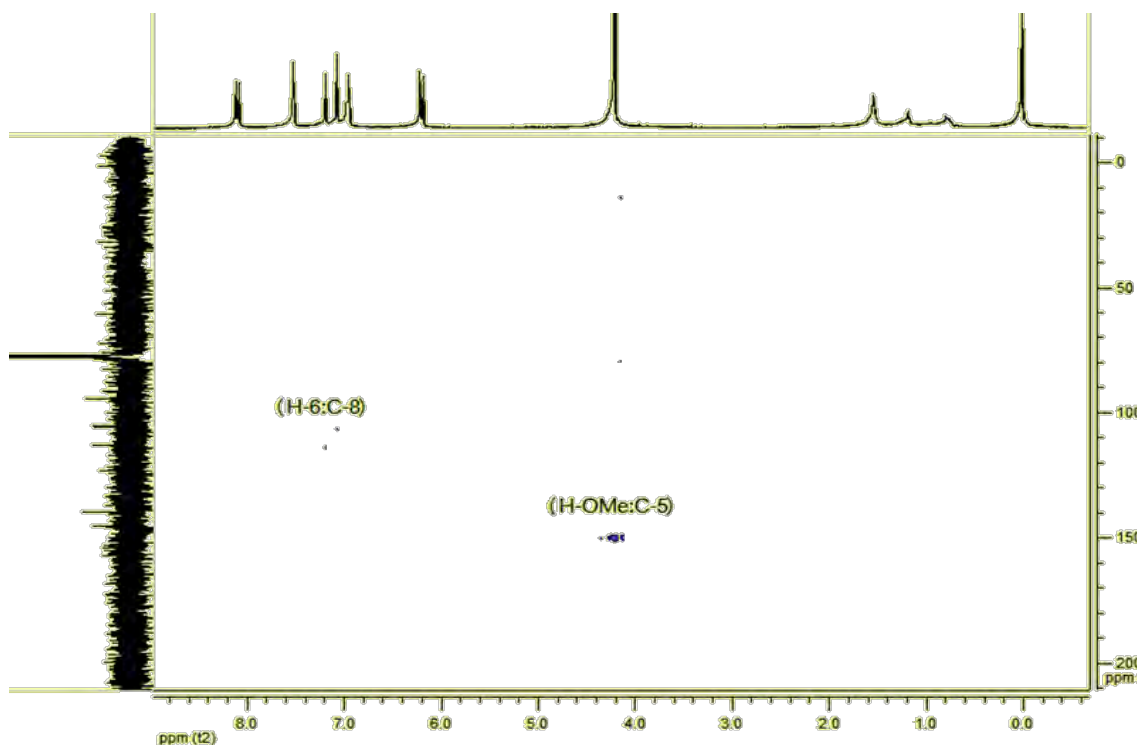


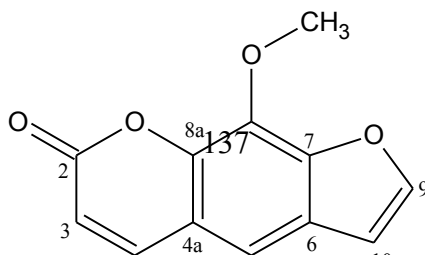
Figure IV-28 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C4.

Position	δ_C	δ_H (integration, multi, j en Hz)	COSY	HMBC
2	160,9			
3	112,91	6,21 (1H, d, 9,79)	H-4	
4	139,70	8,10 (1H, d, 9,79)	H-3	
4a	105,45			
5	156,11			
6	95,21	7,06 (1H, S)		C-8
7	156,41			
8	105,10			
8a	138,5			
9	145,19	7,52 (1H, d, 2,26)	H-10	
10	105,50	6,95 (1H, d, 2,26)	H-9	
1'	61,22	4,20 (3H, s)		C-5

Tableau IV-4 Données spectrales du composé C4

Sur la base de ces résultats, la structure du composé C4, a pu être établie comme *Isobergaptène*.

IV. 1. 5. Le composé C5



Le composé **C5** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane.

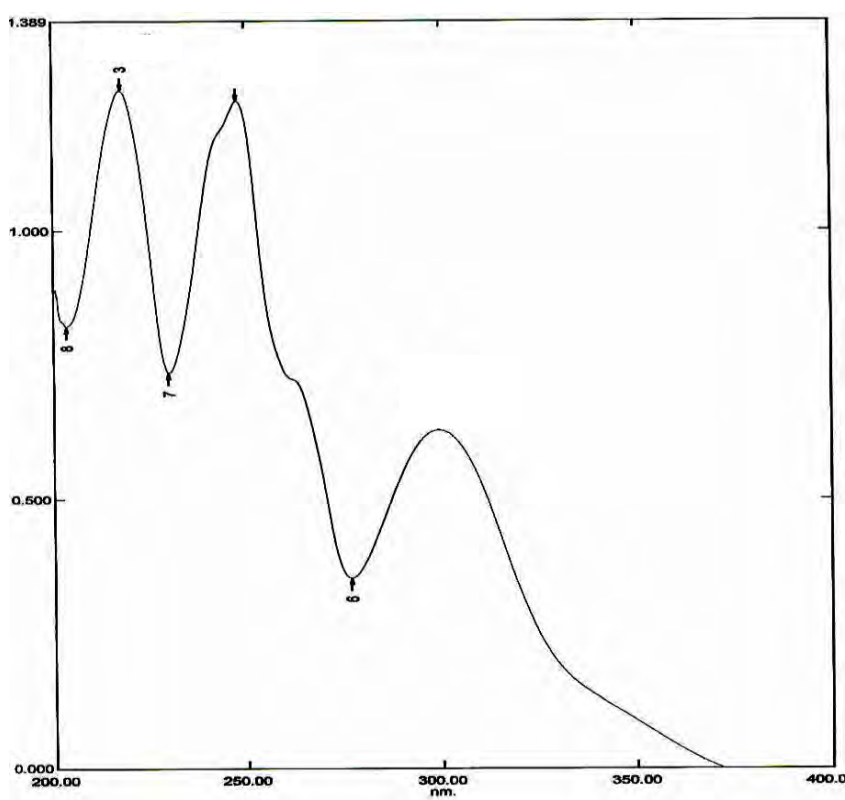


Figure IV-29 : Spectres UV-Visible du composé C5

Le spectre d'absorption UV (figure IV-29) montre trois maxima à 217, 247 et 300 nm caractéristique d'une furanocoumarine linéaire [1, 2].

La mesure du spectre de masse en impact électronique du composé **C5**, (figure IV-30), a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 216 $[M]^+$, correspondant à la formule brute $C_{12}H_8O_4$, ainsi que divers ions à m/z 201 $[M-CH_3]^+$, à m/z 173 $[M-CH_3 - CO]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ces pics de fragmentation sont caractéristiques d'une xanthotoxine [10, 11].

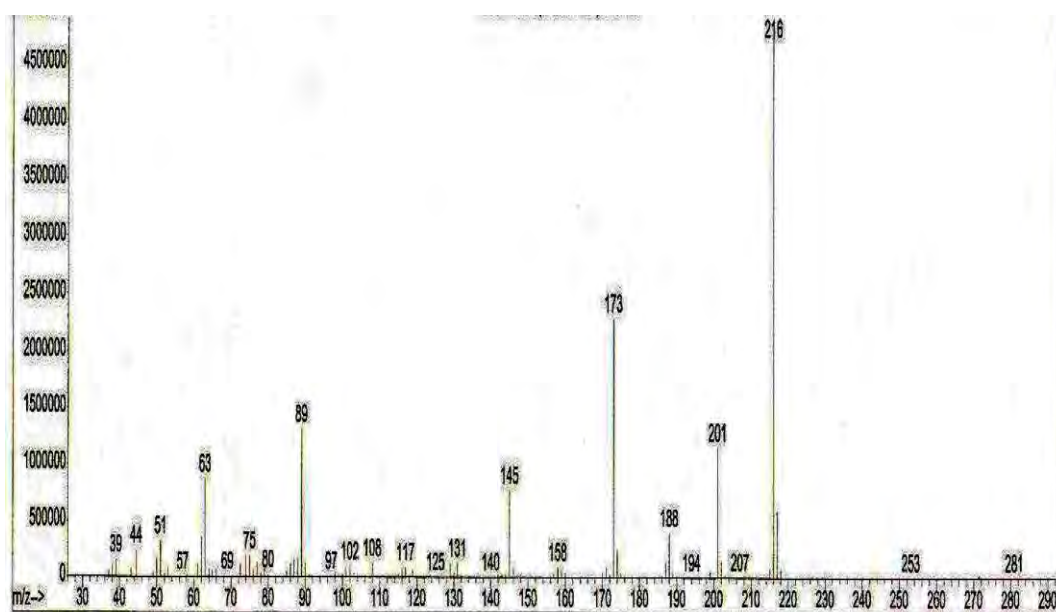


Figure IV-30 : Spectre de masse IE-MS du composé C5.

Le spectre RMN 1H (300 MHz dans le $CDCl_3$), (figure IV-31), révèle la présence d'un singulet, de trois protons, à δ 4,17 ppm correspondant à un méthyle isolé, ce qui nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'un groupement méthoxyle. Un proton aromatique est visible avec un singulet à 7,23 ppm. Ce spectre a ainsi permis de mettre en évidence la présence de: deux protons à δ 7,65 ppm (d, $J=9,6$ Hz, 1H) et δ 6,26 ppm (d, $J=9,6$ Hz, 1H) ainsi que deux autres à δ 7,58 ppm (d, $J=2,3$ Hz, 1H) et à δ 6,72 ppm (d, $J=2,3$ Hz, 1H) dans la région des bas champs : ces signaux sont caractéristiques respectivement des cycles pyranne et furanne.

Ces résultats sont en bon accord avec l'expérience COSY, (Figure IV-34), qui montre des crêtes de corrélations entre ces protons.

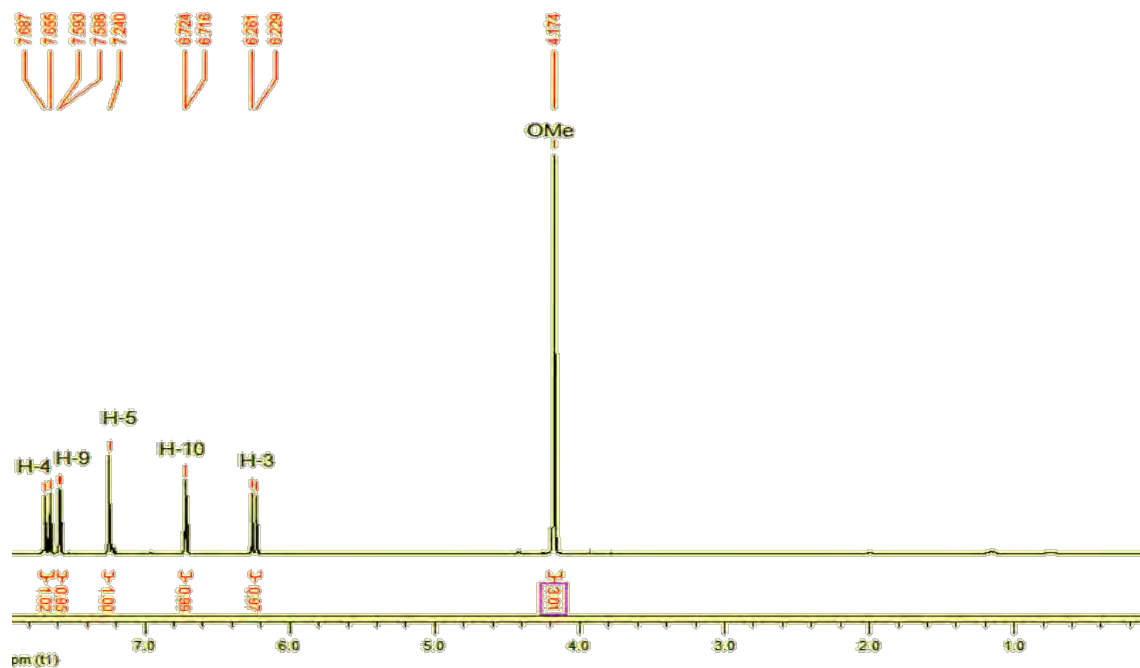


Figure IV-31 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C5.

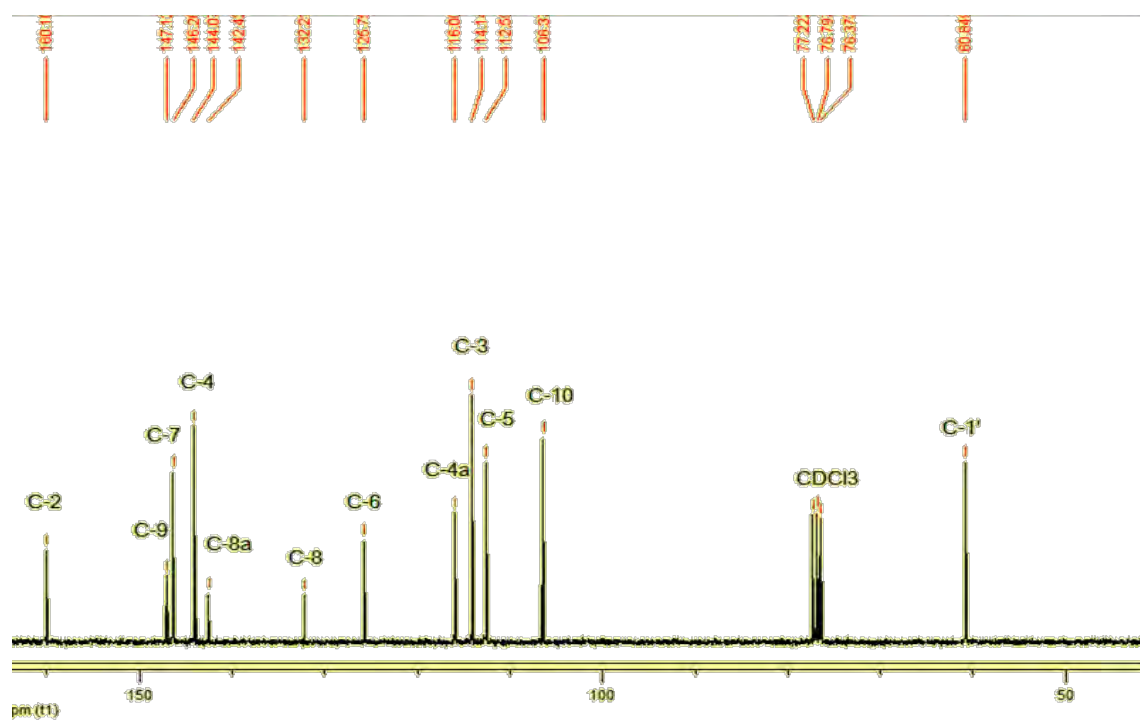


Figure IV-32 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C5.

Le spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans le CDCl_3), (figure IV-32), met en évidence la présence de 12 atomes de carbones. L'analyse du spectre DEPT 135, (figure IV-33), a fournit plus d'indications. Ce spectre nous a permis de distinguer par déduction six carbones quaternaires. Par ailleurs, les signaux dénombrés (Tableau IV-5) ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ correspondant à une masse moléculaire de 216 uma, ce qui est en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

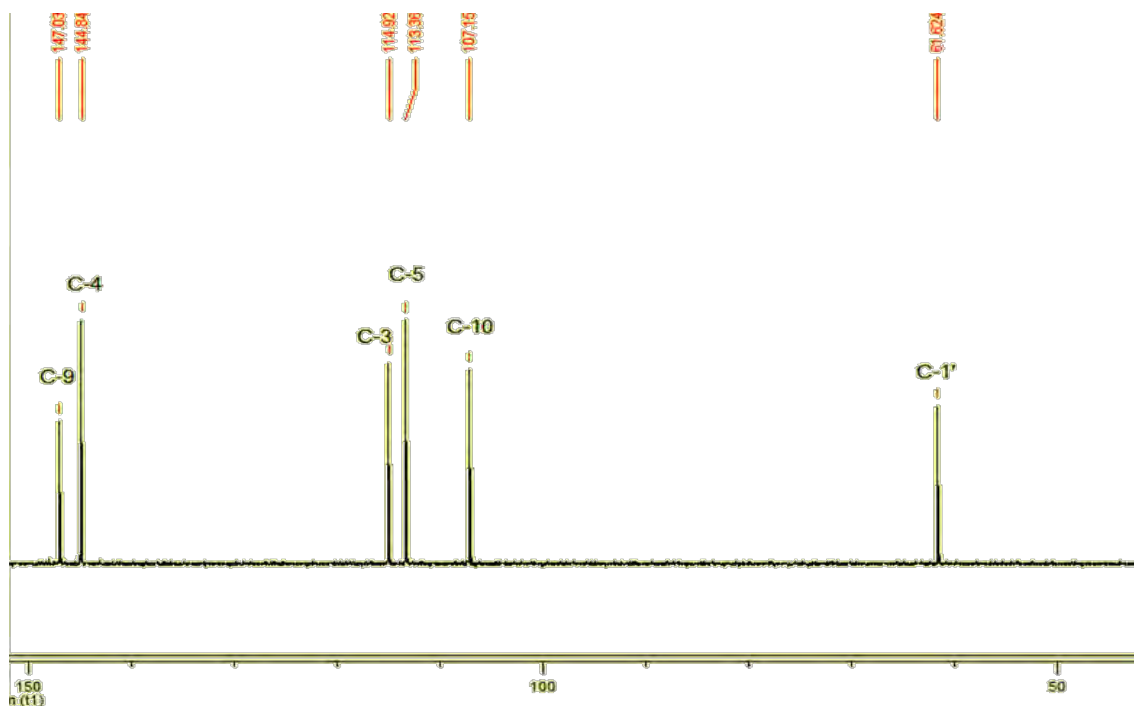


Figure IV-33 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3) du composé C5.

Comme pour le composé C4, l'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HMQC et HMBC et homonucléaire COSY.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (Figure IV-35) a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé C5. Il a ainsi pu être démontré que les protons localisés à δ 6,26; 6,72; 7,58 et 7,65 ppm étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ 194,92; 107,15; 147,03 et 144,84 ppm et que les protons du groupement méthoxyle étaient attachés au carbone apparaît à δ 61,62 ppm. Cette expérience a permis de mettre en évidence la corrélation entre le proton aromatique situé à δ 7,23 ppm et le carbone tertiaire localisé à δ 113,26 ppm (C-5).

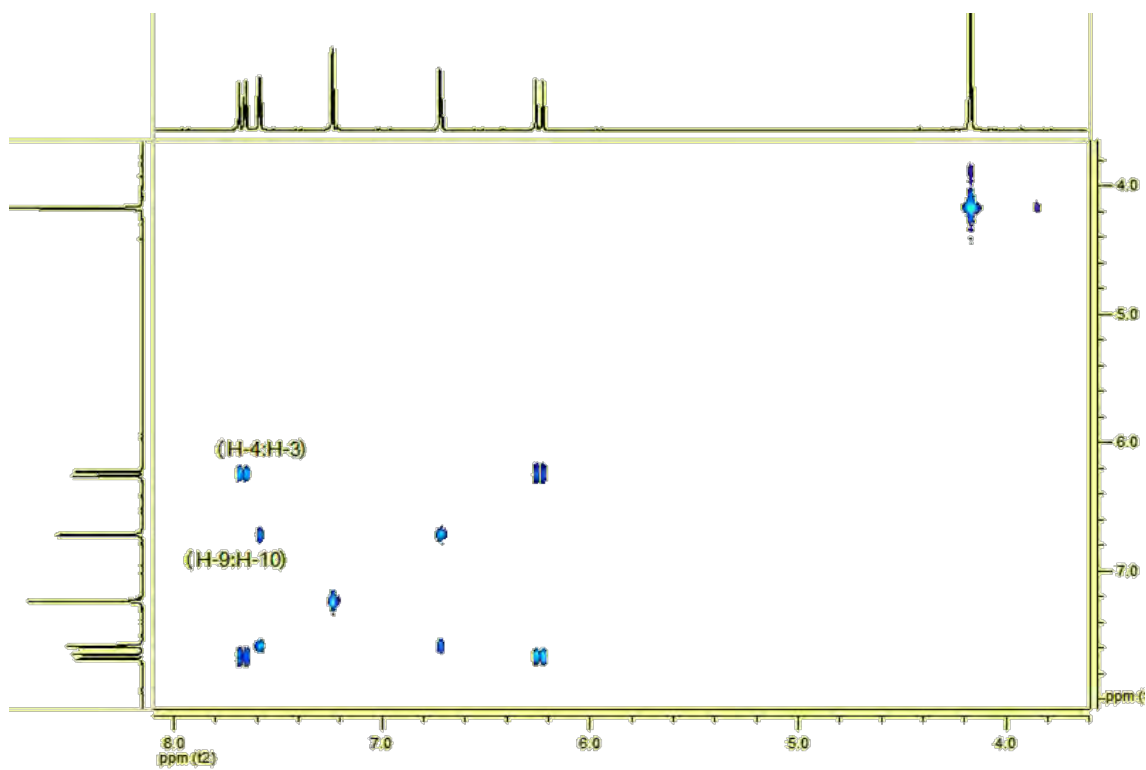


Figure IV-34 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C5.

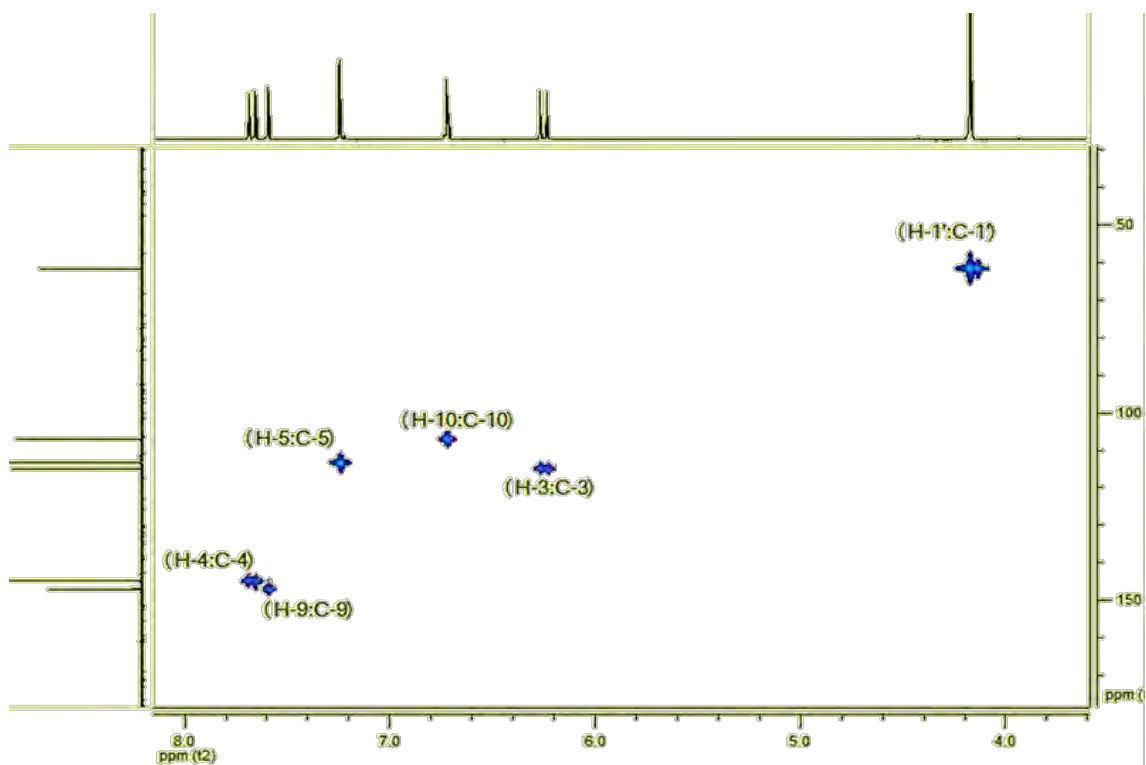


Figure IV-35 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C5.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC, (figure IV-36), a montré la corrélation entre le signal des trois protons localisé à δ 4,17 ppm et le carbone en position 8 à δ 132,21 ppm suggérant l'attachement du groupement méthoxyle en position C-8. De plus, ce spectre a aussi montré les corrélations entre les protons à δ 7,59 et à 6,72 ppm et les carbones C-6 situé à δ 116,00 ppm et C-5 situé à δ 113,36 ppm, confirmant la position du cycle furanne sur les positions 6 et 7 du cycle aromatique et alors la molécule est linéaire.

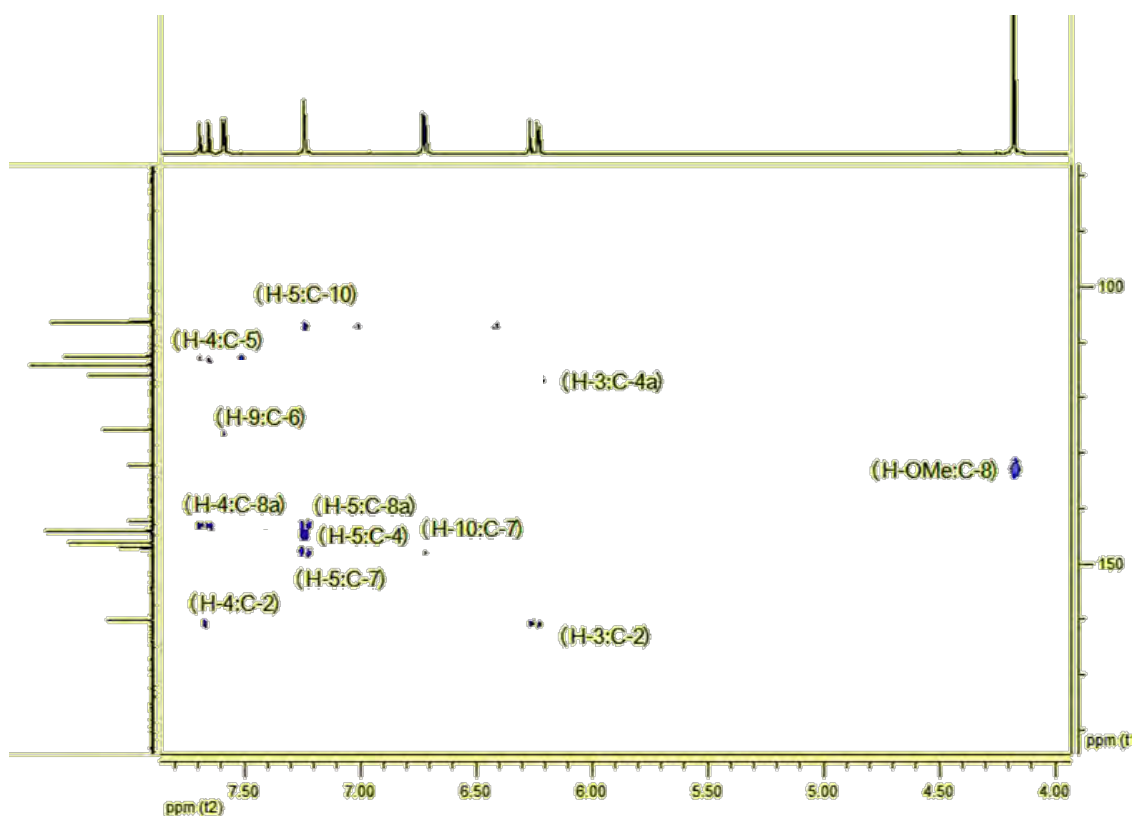


Figure IV-36 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C5.

Position	δ_c	δ_H (intégration, multi, j en Hz)	COSY	HMBC
2	160,09			
3	114,92	6,26 (1H, d, 9,6)	H-4	C-2, C-4a
4	144,84	7,65 (1H, d, 9,6)	H-3	C-5, C-2
4a	116,00			
5	113,36	7,23 (1H, s)		C-4, 8a, 10

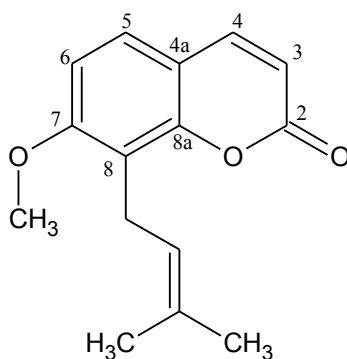
6	125,75			
7	146,26			
8	132,21			
8a	142,43			
9	147,03	7,59 (1H, d, 2,26)	H-10	C-6
10	107,15	6,72 (1H, d, 2,26)	H-9	C-6, C-7
1'	61,62	4,17 (3H, s)		C-8

Tableau IV-5 : Donnés spectrales du composé **C5**

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature [12], la structure du composé **C5** a pu être établie en tant que *Xanthotoxine*

Cette molécule est connue pour ses activités antifongiques [13].

IV. 1. 6. Le composé **C6**



Le composé **C6** se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane.

Le spectre de masse de ce composé, (figure IV-37), présente un pic moléculaire à m/z 244 correspondant à la formule brute $C_{15}H_{16}O_3$, ainsi que d'autres fragments à m/z 229, 213, 201, 189, 175, 159, 139, 131, 115, 103, 79, 63 et 51. Ces fragments sont caractéristiques de la fragmentation de *Osthol* [14].

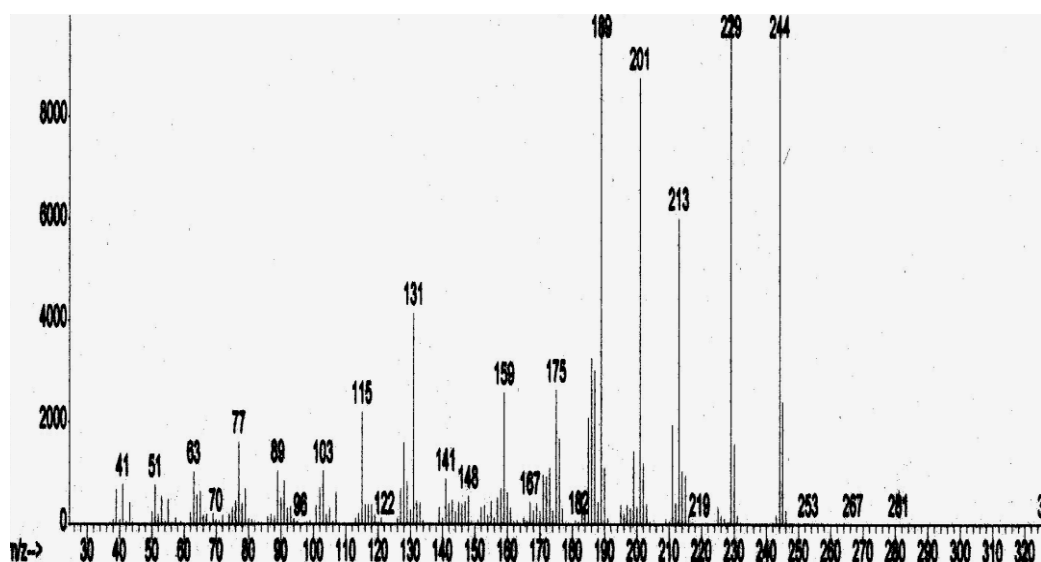
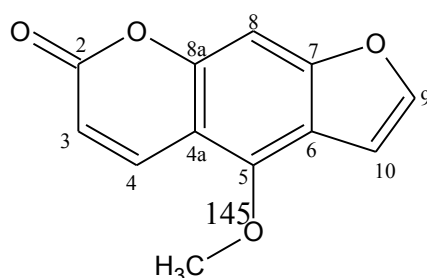


Figure IV 37 - Spectre de masse IE-MS du composé C6.

Sur la base des résultats de la spectrométrie de masse, et par comparaison avec ceux de la littérature [14], la structure du composé C6, a pu être établie en tant que *Osthol*.

Ce composé est connu pour son activité cytotoxique. L'étude de rapport de structure-activité indique que l'unité du prenyl (C5) attachée en position 8, augmente la cytotoxicité. Les analogues 7 et 8 qui ont une plus longue unité alcoxy en position 7 ont montré une cytotoxicité à dix fois plus élevée que l'*Osthol* [15].

IV. 1. 7. Le composé C7



Le composé **C7** se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane.

La mesure du spectre de masse en impact électronique, (figure IV-38), a montré un profil similaire à celui du composé **C5**. Ce spectre a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 216 $[M]^+$, correspondant à la formule brute $C_{12}H_8O_4$, ainsi que divers ions à m/z 201 $[M-CH_3]^+$, à m/z 188 $[M-CO]^+$ et à m/z 173 $[M-CO - CH_3]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule et qui sont caractéristiques du bergaptène [16].

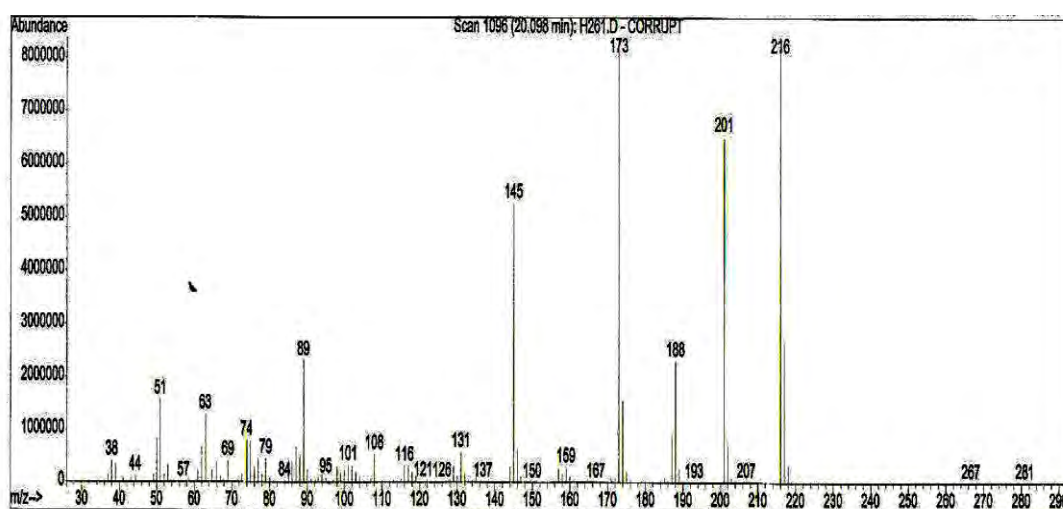


Figure IV-38 : Spectre de masse IE-MS du composé C7.

L'étude du spectre RMN 1H (300 MHz dans le $CDCl_3$) du composé **C7**, (figure IV-39), a présenté un profil relativement identique à celui du composé **C5**, et a permis de mettre en évidence la présence d'un singulet, de trois protons, à δ 4,20 ppm correspondant à un méthyle isolé, ce qui nous a permis d'affirmer qu'il s'agit d'un groupement méthoxyle. De plus, un proton sous forme d'un singulet à δ 7,05 ppm correspondant à un proton apparaissant sur un noyau aromatique tétra substitué. On observe également deux doublets, intégrant chacun pour un proton à δ 8,10 ppm (d, $J=9,79$ Hz, 1H) et δ 6,21 ppm (d, $J=9,79$ Hz, 1H) et deux autres à δ 7,52 ppm (d, $J=2,3$ Hz, 1H) et à δ 6,95 ppm (d, $J=2,3$ Hz, 1H) dans la région des bas champs : ces signaux sont attribués respectivement aux protons du cycle pyranne et aux protons du cycle furanne. Ces résultats sont justifiés par l'expérience COSY, (figure IV-40), où ils présentent entre eux des crêtes de corrélations.

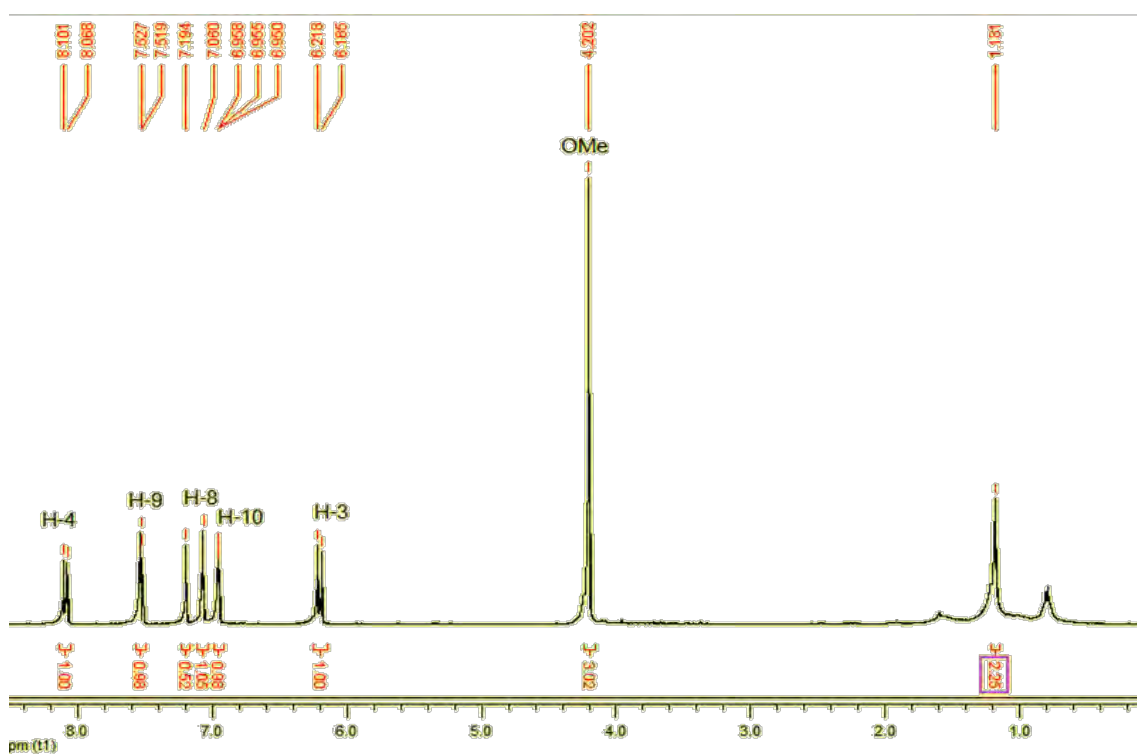


Figure IV-39 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C7.

L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT 135, (figure IV-41 et IV-42) ont permis de confirmer la présence du méthoxyle par son carbone situé à δ 60,46 ppm et aussi la présence de cinq carbones situés à δ 94,21, à δ 105,45; δ 112,91; δ 139,70 et δ 145,94 ppm, ainsi que six carbones quaternaires à δ 100,41; δ 102,79; δ 106,76; δ 151,58; δ 153,07 et à δ 160 ppm. Par ailleurs, les 12 signaux dénombrés ont permis la confirmation de la formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ correspondant à une masse moléculaire de 216 uma, ceci étant en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

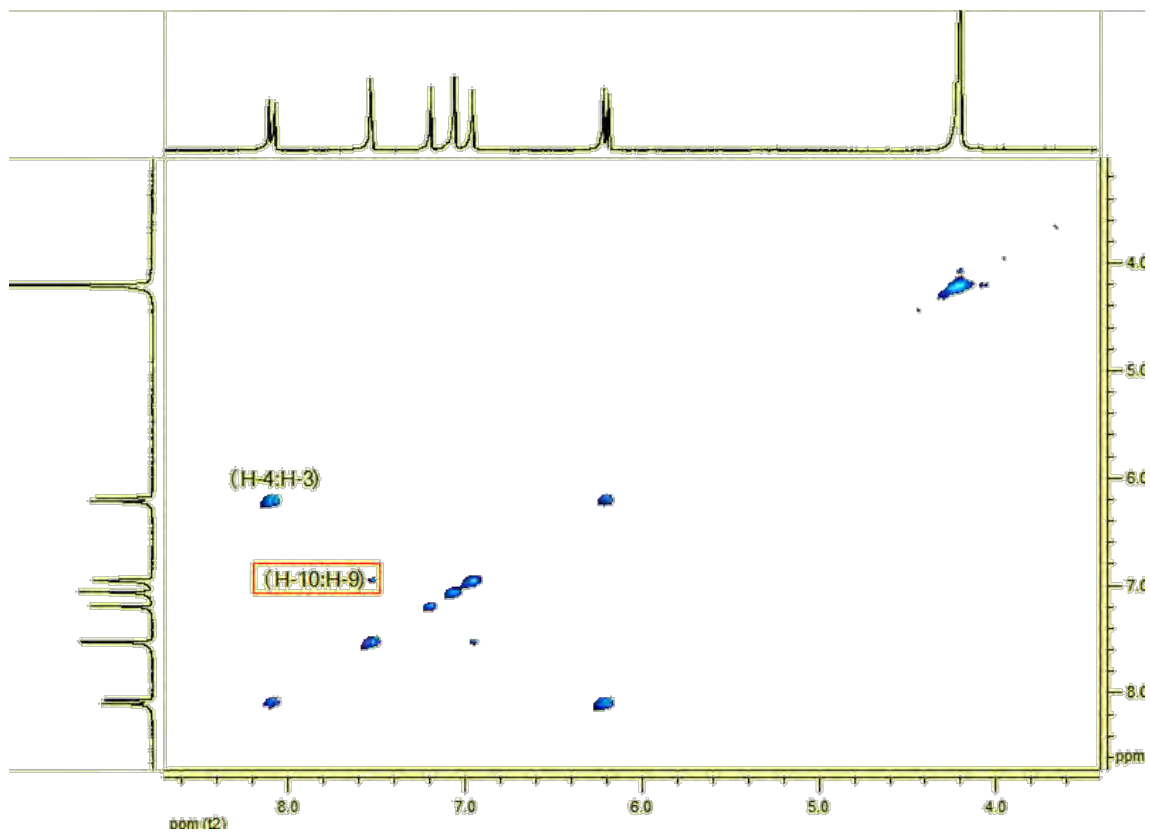


Figure IV-40 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C7.

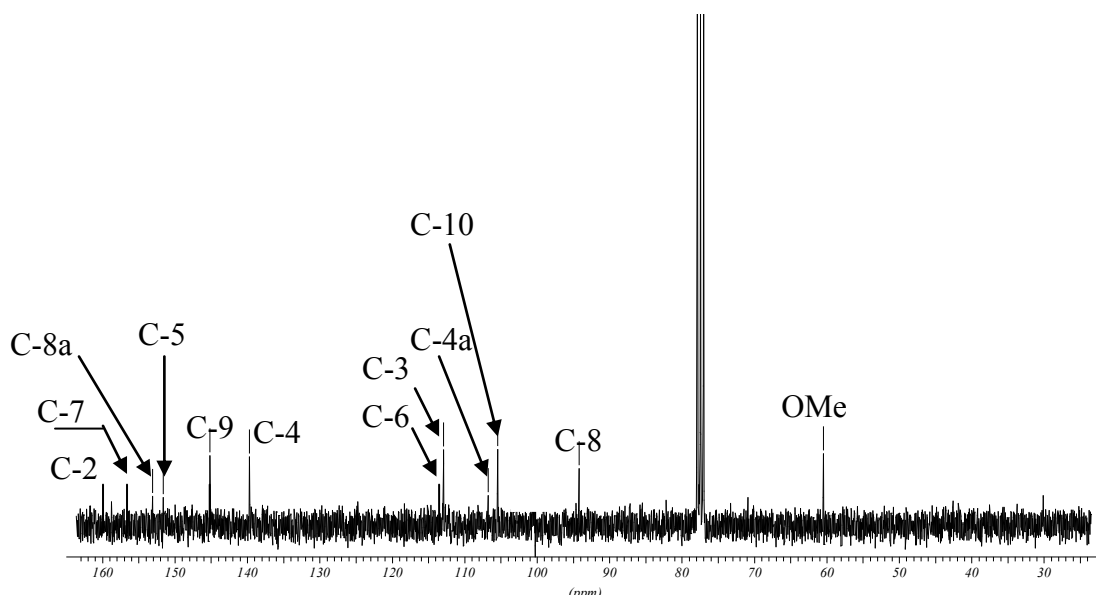


Figure IV-41 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C7.

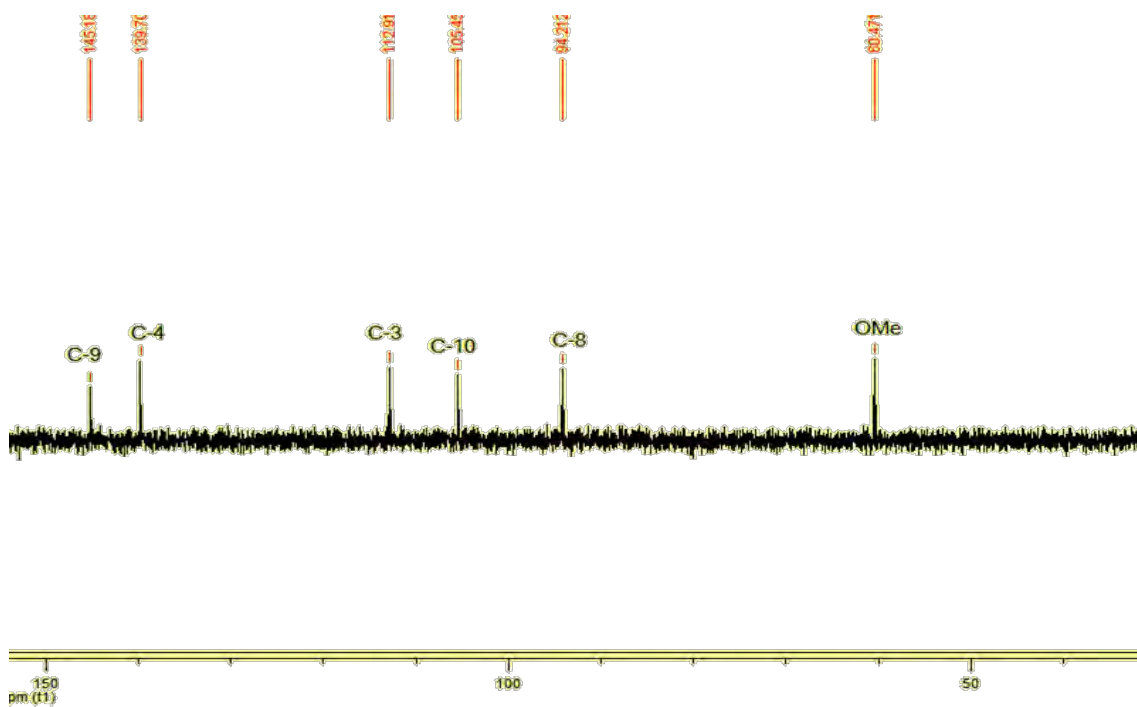


Figure IV-42 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃) du composé C7.

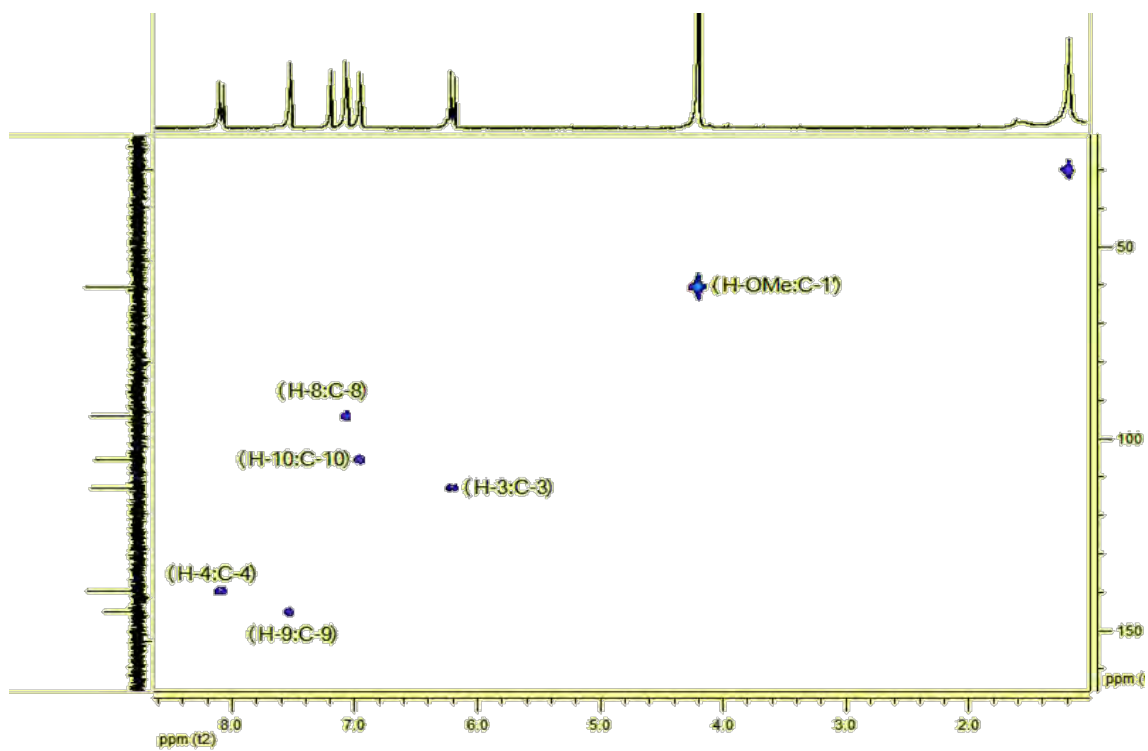


Figure IV-43 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé C7.

L'attribution des déplacements chimiques RMN ^{13}C et ^1H est favorisée par l'étude du spectre HMQC.

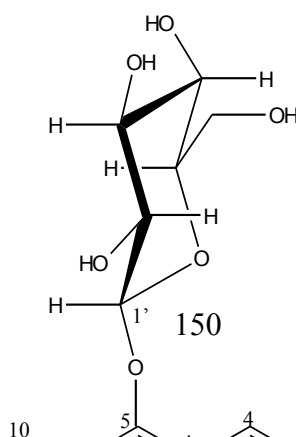
Le spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé **C7**, (figure IV-43), a montré des corrélations RMN ^1H - ^{13}C similaires à celles du composé **C5**, à l'exception du proton aromatique, qui dans le composé **C7**, (δ 7,05 ppm) a présenté une connections géminales avec le carbone situé en δ_c 94,21 ppm (C-8), alors qu'il présentait cette connection avec le carbone situé en δ_c 113,36 ppm (C-5) dans le composé **C5**. Ceci suggère l'attachement du groupement méthoxyle en C-5.

Position	δ_c	δ_H (integration, multi, j en Hz)	COSY
2	160,09		
3	112,91	6,21 (1H, d, 9,79)	H-4
4	139,70	8,10 (1H, d, 9,79)	H-3
4a	106,76		
5	149,60		
6	113,41		
7	158,17		
8	94,21	7,05 (1H, s)	
8a	153,07		
9	145,18	7,52 (1H, d, 2,31)	H-10
10	105,45	6,95 (1H, d, 2,31)	H-9
1'	60,46	4,20 (3H, s)	

Tableau IV-6 : Données spectrales du composé **C7**

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature [7, 16], la structure du composé **C7** a pu être établie en tant que *5-methoxy psoralène* ou *Bergaptène*.

IV. 1. 8. Le composé **C8**



Le composé **C8** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le DMSO. Le spectre de masse de ce produit obtenue en électro spray, (figure IV-44), présente un pic à $m/z = 403$ correspondant à $(M + Na)^+$. Ce qui montre que la masse moléculaire du composé est 380 Uma.

Le spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans le DMSO- d_6), (figure IV-45), indique 17 carbones. L'analyse du spectre DEPT 135 (figure IV-46) a fournit plus d'indications. Ce spectre nous a permet de distinguer par déduction sept carbones quaternaires. Par ailleurs, les 17 signaux dénombrés ont permis de confirmer la formule brute $C_{17}H_{16}O_{10}$ ceci est en accord avec les résultats fournis par les expériences MS

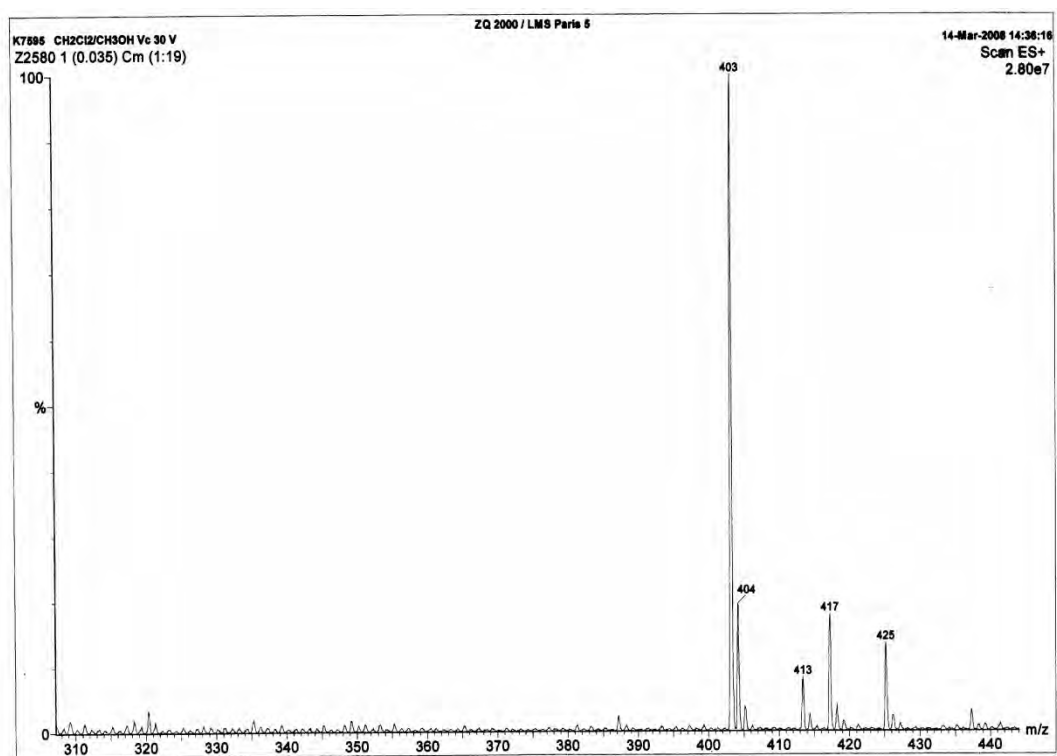


Figure IV-44 : Spectre de masse en Electrospray du composé C8.

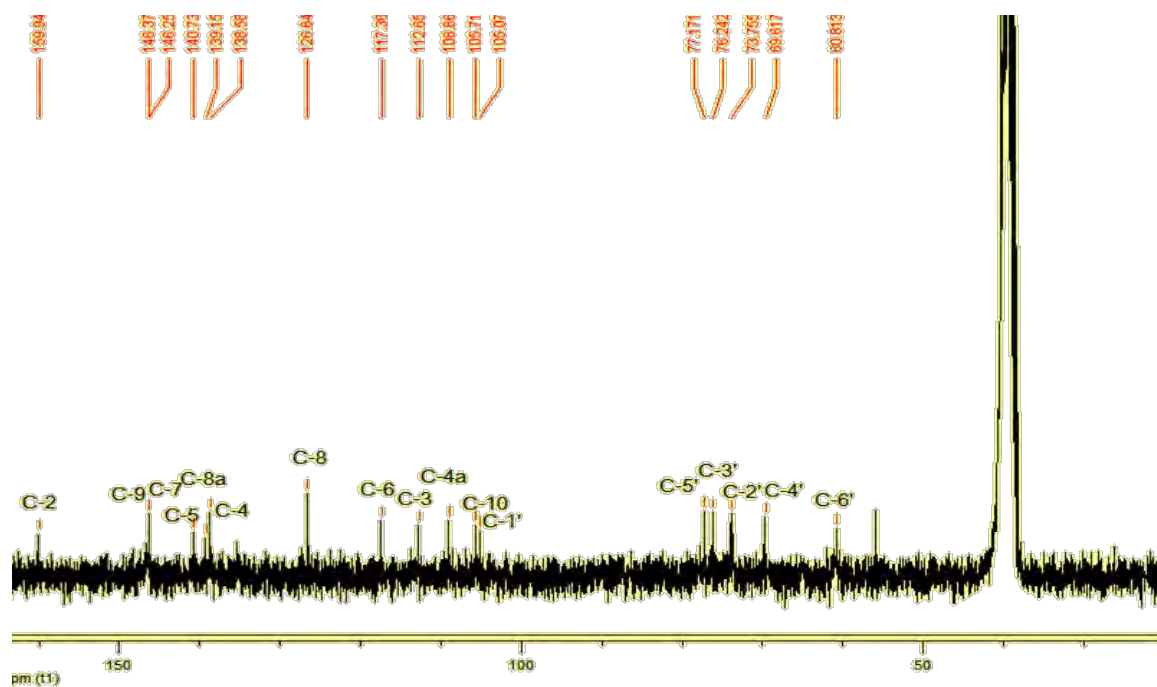


Figure IV-45 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) du composé C8.

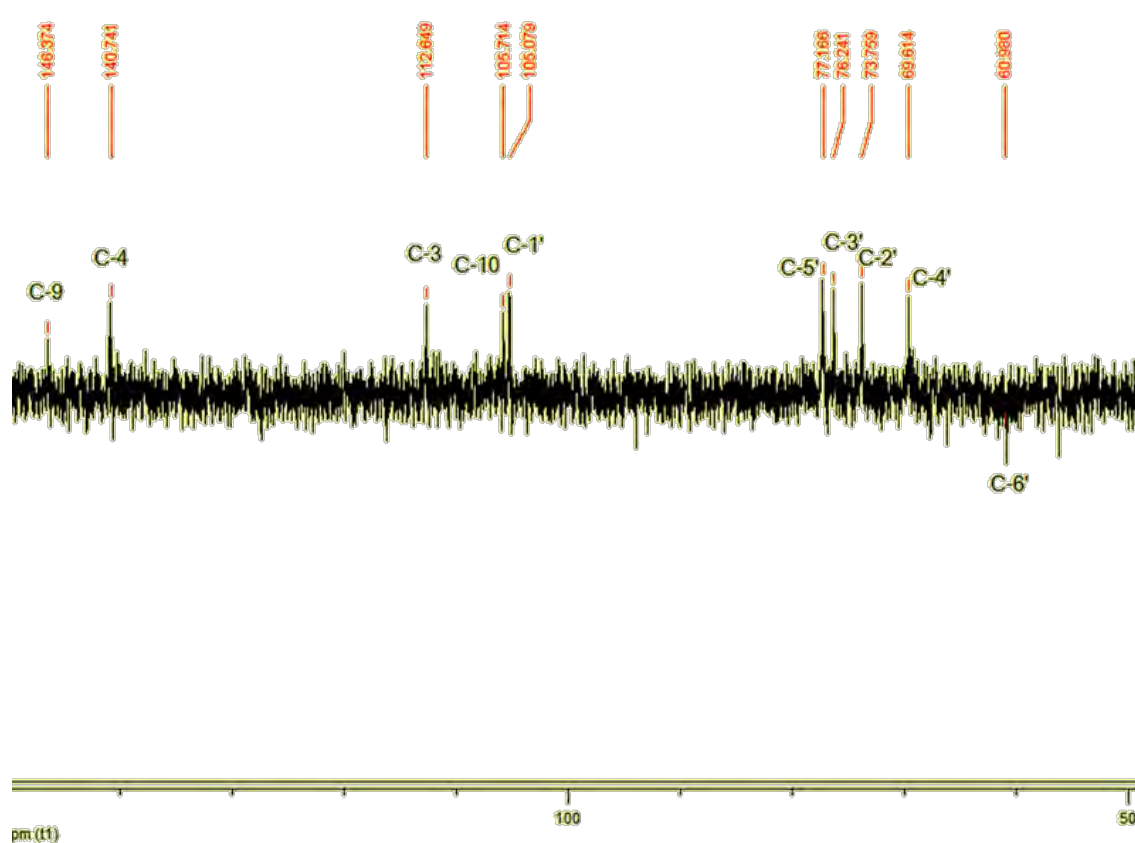


Figure IV-46 : Spectre DEPT 135 du composé C8.

Le spectre RMN ^1H (300 MHz dans le DMSO- d_6), (figure IV-47), de ce composé présente deux doublets à δ 8,50 ppm et δ 6,36 ppm caractéristique des protons du cycle pyranne H-4 et H-3 respectivement avec une constante de couplage de 9,9 Hz. Les protons du cycle furanne H-9 et H-10 présentent des déplacements chimiques de 8,00 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz) et de 7,31 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz) respectivement. Ces résultats sont en bon accord avec la mesure de l'expérience COSY, (figure IV-48), où elle montre des corrélations entre les protons H-4 à δ 8,50 ppm et H-3 à δ 6,36 ppm ainsi entre H-9 à δ 8,02 ppm et H-10 à δ 7,31 ppm.

La partie osidique est représentée par le pic anomérique résonant à 4,70 ppm avec une constante de couplage de 7,74 Hz qui montre que le sucre est β lié à l'aglycone.

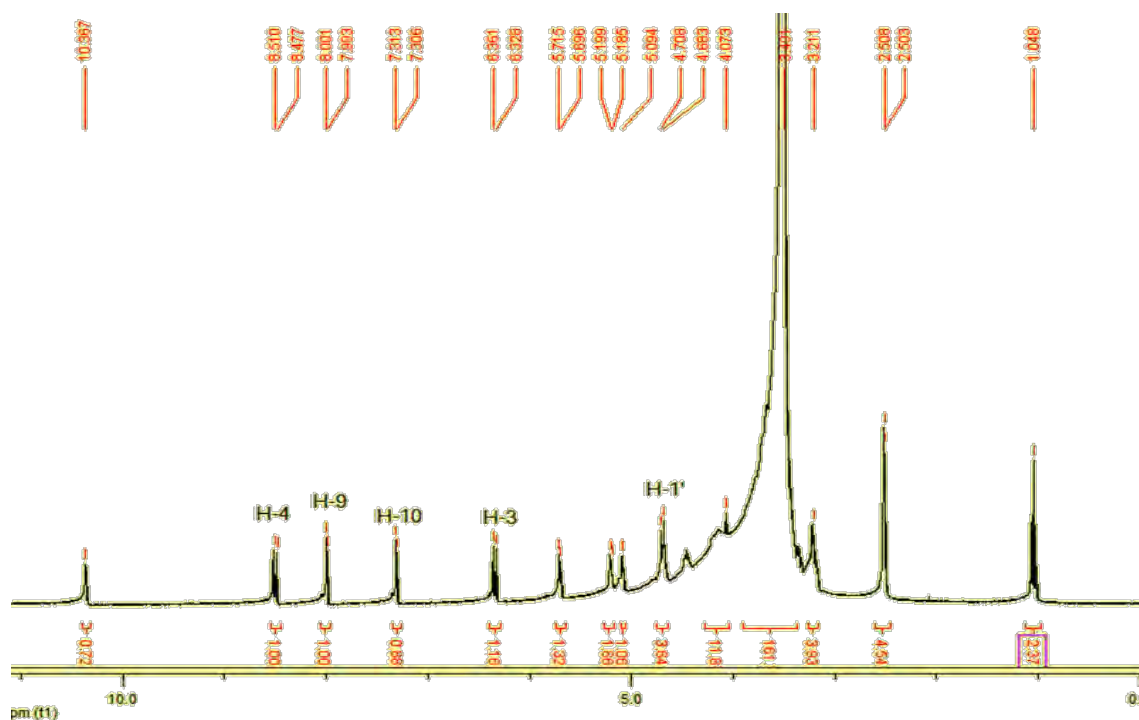


Figure IV-47 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz dans DMSO- d_6) du composé C8.

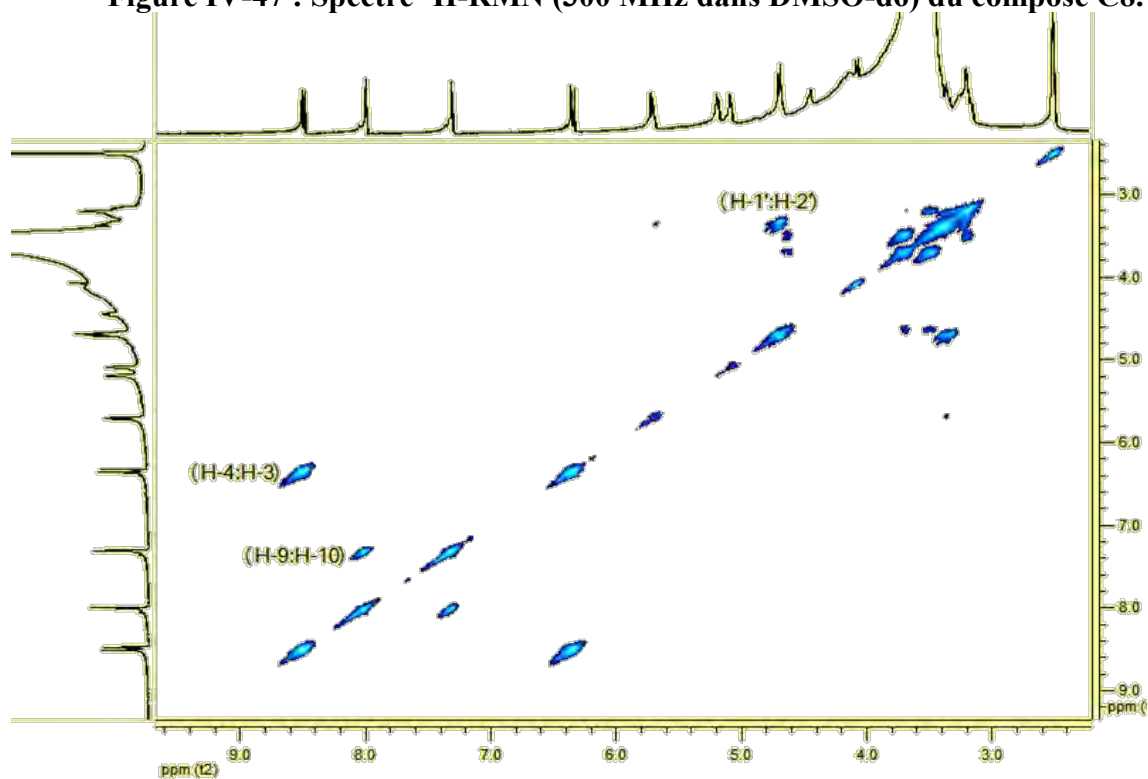


Figure IV-48 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé C8.

Le spectre RMN ^{13}C , (figure IV-45) montre bien la présence du sucre dont la majorité de ses carbones résonnent entre δ 60 et 78 ppm. L'hydrolyse acide d'une petite quantité de C8 a donné le glucose, qui était identifié par la chromatographie sur couche mince en gel de silice (Acétone- H_2O 9 : 1) et par comparaison à un échantillon de référence. L'étude de l'expérience

DEPT 135 confirme la présence du glucose, par son C6' situé à δ 60,61 ppm sous forme de CH₂, cependant que le pic du carbone anomérique C1' sort à δ 105,07 ppm, corrèle avec le proton anomérique comme le montre l'expérience HMQC (figure IV-50).

La mesure du spectre des corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC, (figure IV-49), montre bien que le glucose est lié au carbone (C-5) par la corrélation entre le proton et le carbone résonnant à δ 139,15 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC, (figure IV-50), a conduit à l'établissement des connections géminales ¹H-¹³C-RMN du composé C8. Il a pu être démontré que les protons localisés à δ 8,50 ppm, δ 6,36 ppm, δ 8,00 et δ 7,31 ppm étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ 140,5 ppm, δ 112,65 ppm, δ 148,5 ppm et δ 105,71 ppm

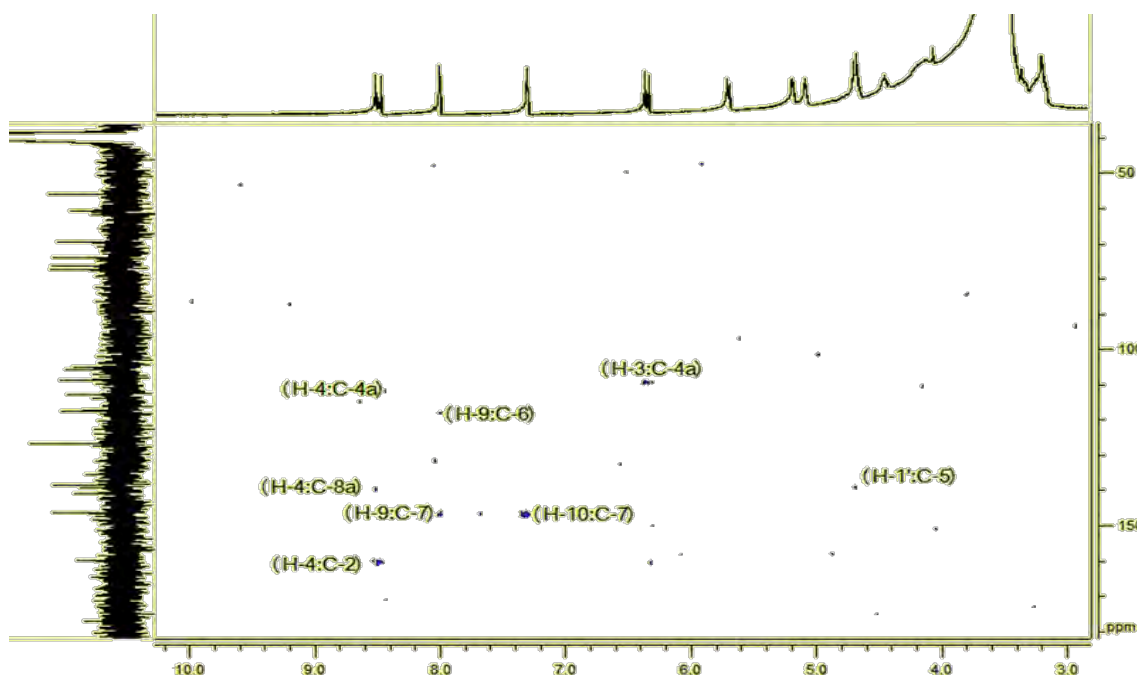


Figure IV-49 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé C8.

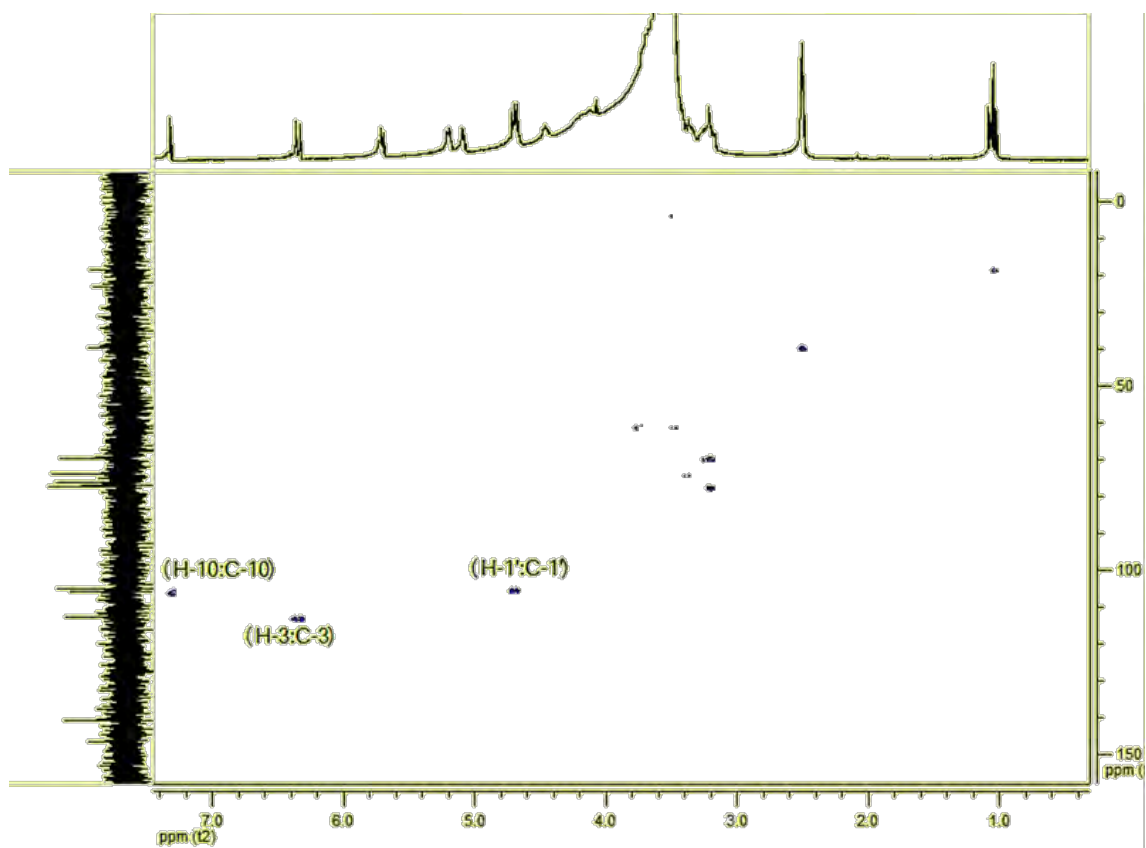


Figure IV-50 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMOC du composé C8.

Position	δ_c	δ_H (integration, multi, <i>j</i> en Hz)	COSY	HMBC
2	159,93			
3	112,65	6,36 (1H, d, 9,9)	H-4	C-4a
4	138,58	8,50 (1H, d, 9,9)	H-3	C-4a, C-2, C-8a
4a	108,86			
5	140,73			
6	117,36			
7	146,25			
8	126,64			
8a	139,15			
9	146,36	8,00 (1H, d, 2,1)	H-10	C-6, C-7
10	105,71	7,31 (1H, d, 2,1)	H-9	C-7
1'	105,07	4,70 (H, d, 7,74)	H-2'	C-5
2'	73,75			
3'	76,24			
4'	69,61			
5'	77,17			
6'	60,81			

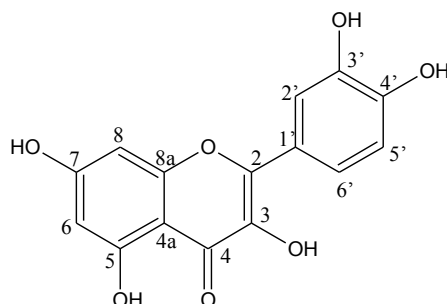
Tableau IV-7 : Donnés spectrales du composé **C8**

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé **C8**. Il s'agit du *8-hydroxy-5-O- β -D-glucosypsoralène*, ces résultats sont en accord avec les données connues dans la littérature [17].

Ce composé fut isolé qu'une seule fois des racines de *Heracleum rapula* [17]. Cette molécule est isolée ici pour la première fois dans le genre *Carum*.

IV. 2. Identification des produits isolés de *Bupleurum montanum* Coss.

IV. 2. 1. Le composé **B1**



La mesure du spectre de masse en impact électronique du composé **B1** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 302 $[M]^+$ ainsi que divers ions à m/z 273 $[M-CO]^+$, m/z 153 $[A_1+H]^+$ et à m/z 137 $[B_2]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule.

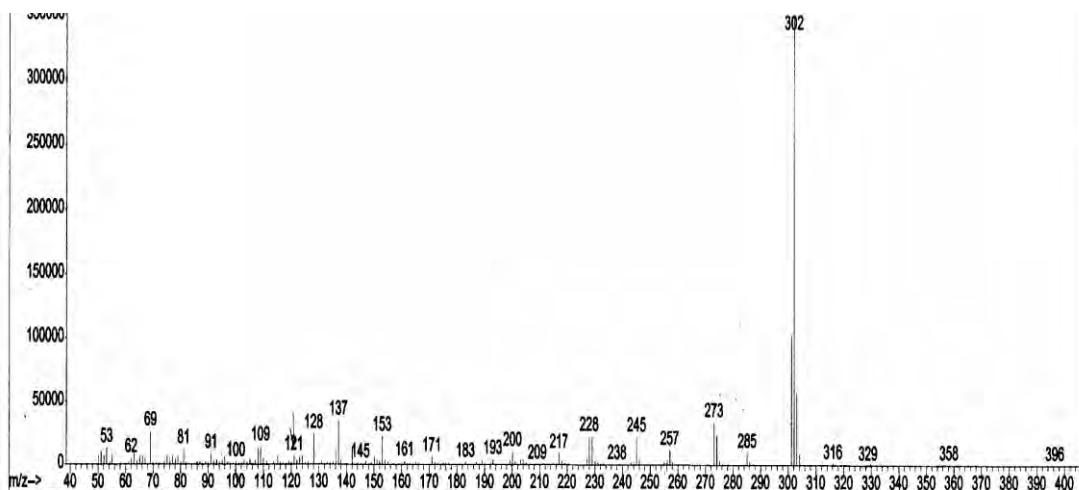


Figure IV-51 : Spectre de masse en IE du composé **B1**

Le spectre RMN 1H (300 MHz dans le DMSO- d_6) (figure IV-52) présente des signaux caractéristiques des protons aromatiques. Les protons à δ 6,04 ppm (1H, d, $J = 1,9$ Hz) et à δ 6,27 ppm (1H, d, $J = 1,9$ Hz) sont caractéristiques, respectivement, des protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes.

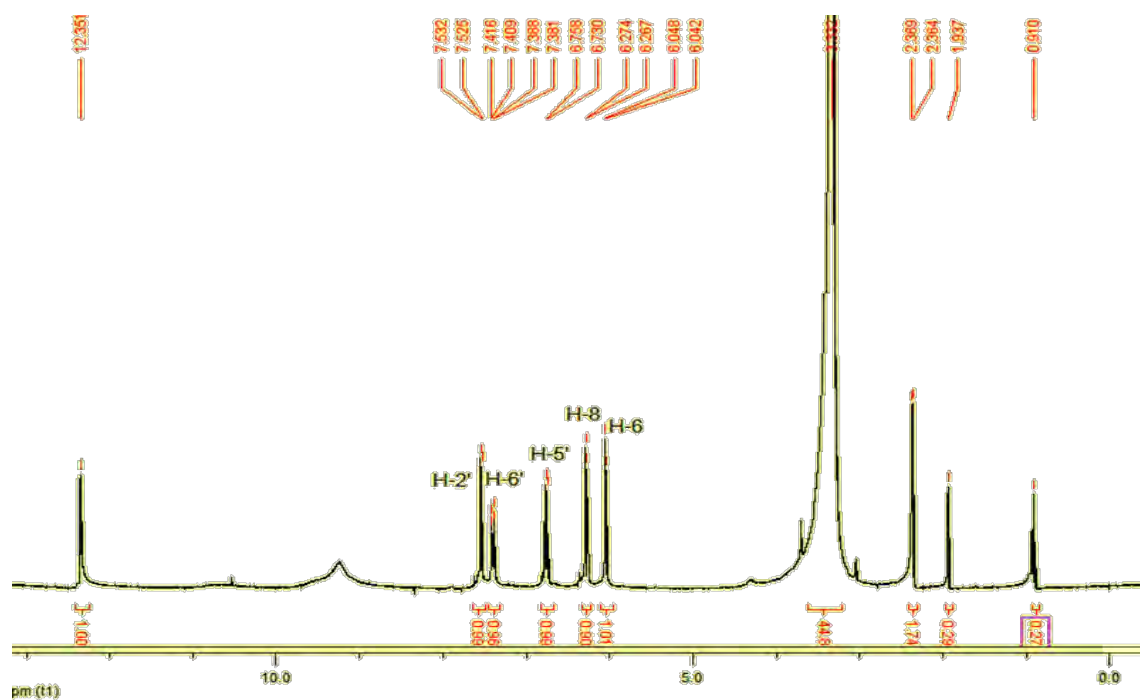


Figure IV-52 : Spectre RMN ^1H (300 MHz dans DMSO-d₆) du composé **B1**

Au niveau du cycle B, le signal du proton H-6' à δ 7,38 ppm est un doublet de doublet (dd, $J = 8,5$ Hz, 2,1 Hz) révélant un couplage en ortho avec le proton H-5' et un couplage en méta avec le proton H-2'. En effet, H-5' possède un signal à δ 6,75 ppm dont le signal est un doublet (d, $J = 8,5$ Hz) et le proton H-2', quant à lui, résonne à δ 7,53 ppm (d, $J = 2,1$ Hz).

Par ailleurs, on observe un pic sortant à δ 12,35 ppm: ceci est caractéristique d'une fonction OH en position 5, au voisinage d'un groupement carbonyle.

Le spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans le DMSO-d₆), (figure IV-53), indique la présence de 15 atomes de carbones. De plus, l'analyse du spectre DEPT 135, (figure IV-54), nous permet d'affirmer que la molécule **B1** possède 10 carbones quaternaires. Par ailleurs, le résultat du spectromètre de masse nous donne un poids moléculaire de 302 (pic moléculaire à m/z 302 $[\text{M}]^+$) pour cette molécule. Du fait des 15 atomes de carbones trouvés grâce au spectre RMN du ^{13}C , on peut déduire que notre flavonoïde a la formule brute suivante $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

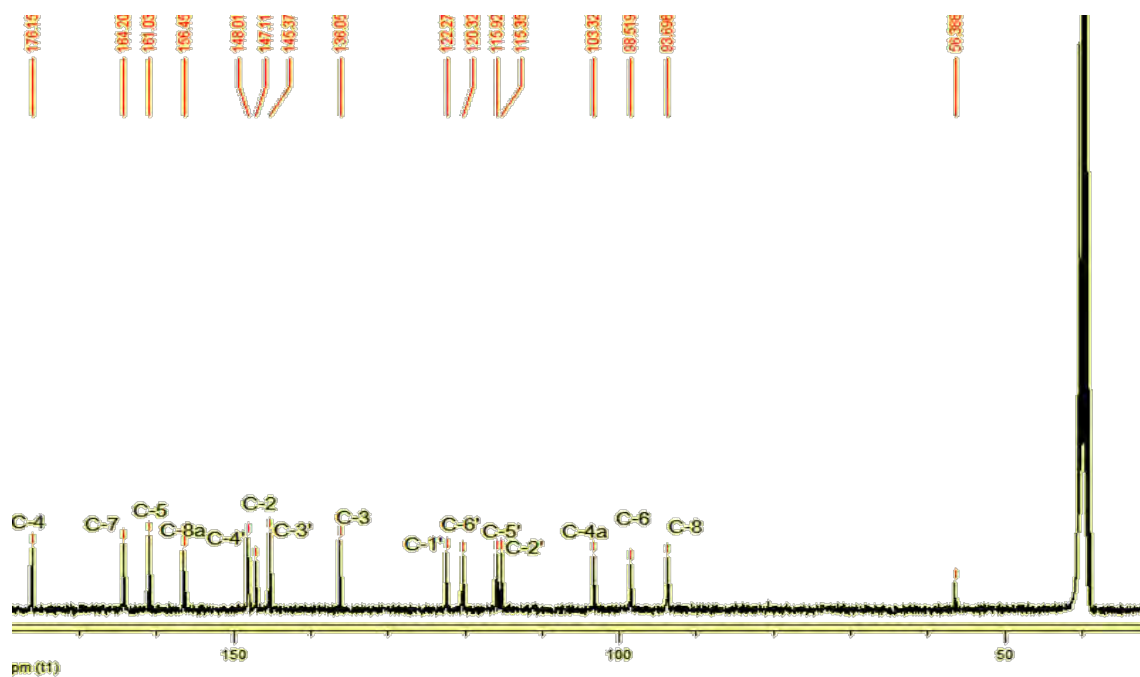


Figure IV-53 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans DMSO d-6) du composé B1.

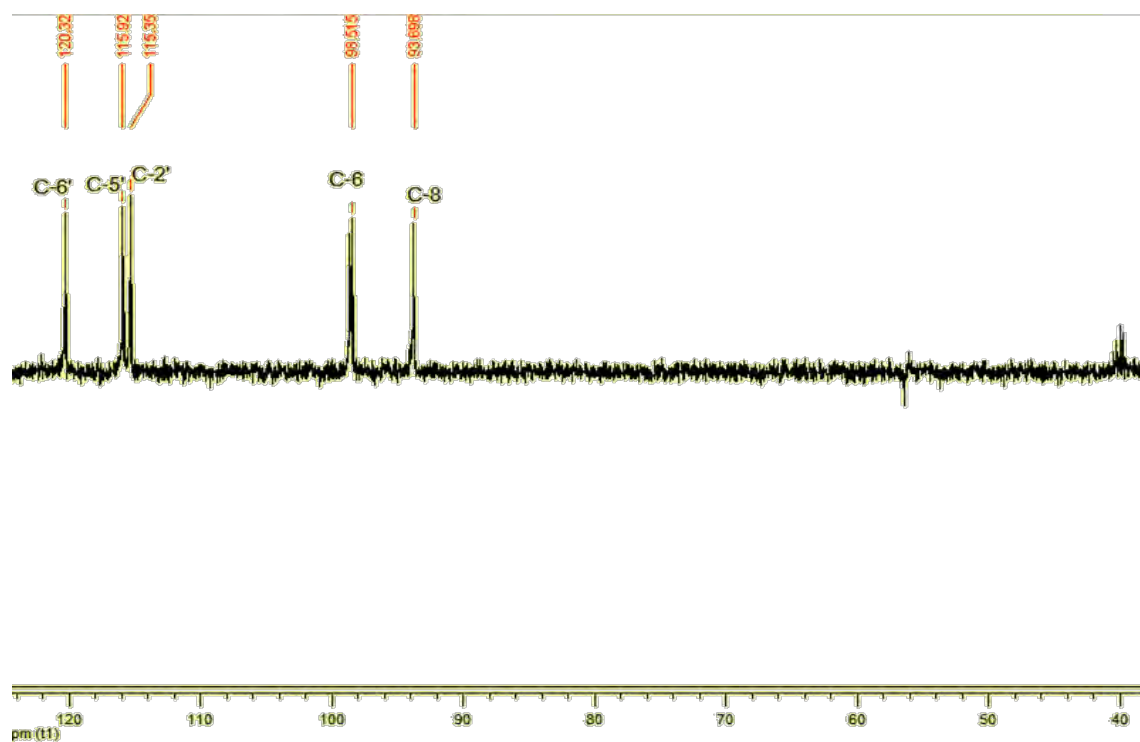


Figure IV-54 : Spectre DEPT 135 (300 MHz dans DMSO d-6) du composé B1.

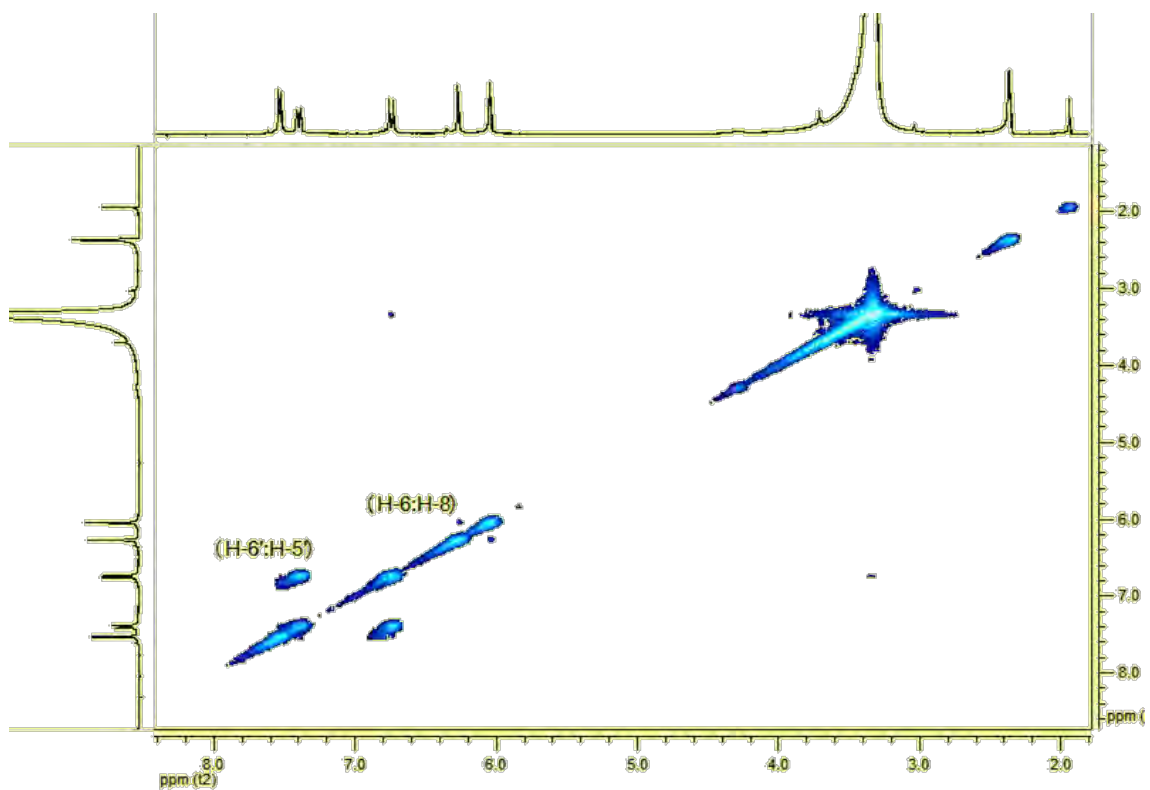


Figure IV-55 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé B1.

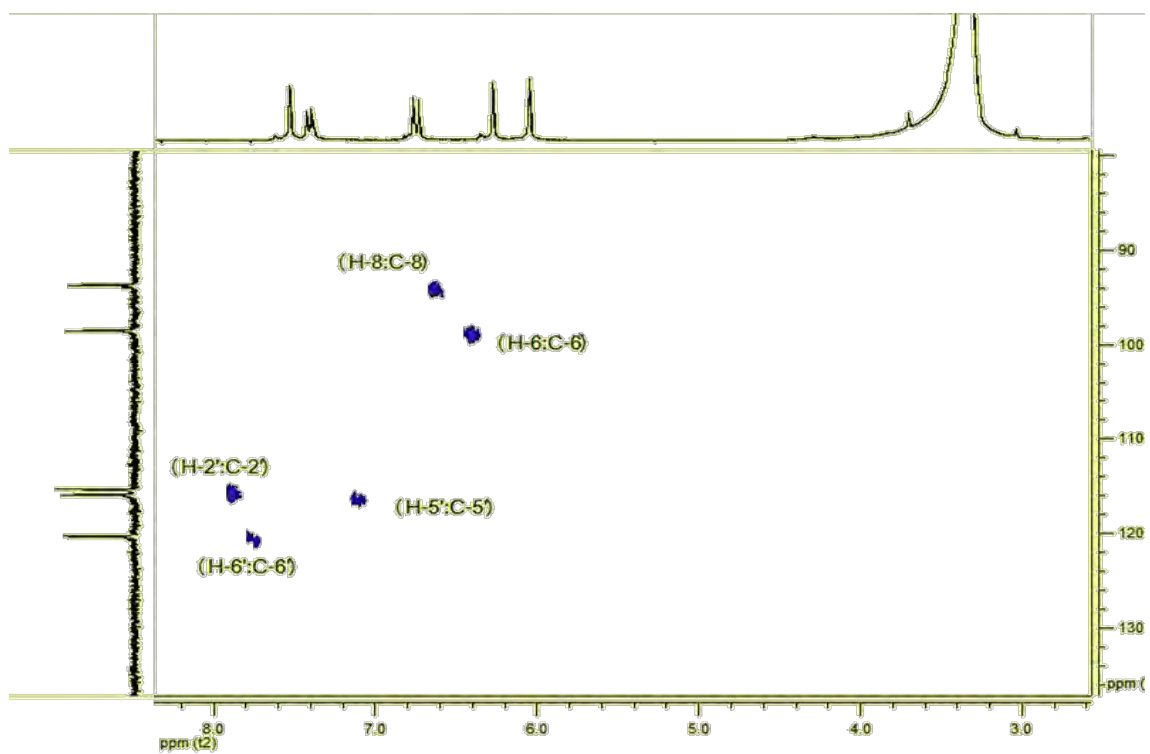


Figure IV-56 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMQC du composé B1.

L'attribution des déplacements chimiques des protons aromatiques est corroborée par les expériences homonucléaire COSY, hétéronucléaire HMQC et HMBC.

En cosy, (figure IV-55), le proton H-2' à δ 7,53 ppm est corrélé avec H-6' situé à δ 7,38 ppm, qui lui-même corrèle avec H-5' résonnant δ 6,75 ppm.

Sur le spectre de corrélation hétéronucléaire HMQC, (figure IV-56), le carbone (C-6) résonnant à δ 98,51 ppm est corrélé avec le proton (H-6) situé à δ 6,04 ppm, le carbone (C-8) localisé à 93,69 ppm avec (H-8) à δ H 6,27 ppm, δ C 115,35 ppm (C-2') avec δ H 7,53 ppm (H-2'), δ C 115,92 ppm (C-5') avec δ H 6,75 ppm (H-5') et δ C 120,32 ppm (C-6') avec δ H 7,38 ppm (H-6').

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC, (figure IV-57), a montré les corrélations entre le proton H-6 à 6,04 ppm et les carbones situés à 103,32 ppm (C-4a) et à 93,69 ppm (C-8), ainsi des corrélations entre le proton H-8 à 6,27 ppm et les carbones localisés à 103,32 ppm (C-4a) et à 98,51 ppm (C-6). Au niveau du noyau B le proton H-2' (7,53 ppm) est corrélé avec les carbones C-6' (120,32 ppm), C-4' (148,01 ppm) et C-2 (147,11 ppm). Cette expérience a permis de mettre en évidence des sommets de corrélation entre le proton H-5' (6,75 ppm) et les carbones C-1' (122,26 ppm) et C-3' (145,37 ppm), ainsi entre le proton H-6' et les carbones C-4' (148,01 ppm) et C-2' (115,35 ppm) confirmant la disubstitution du noyau B.

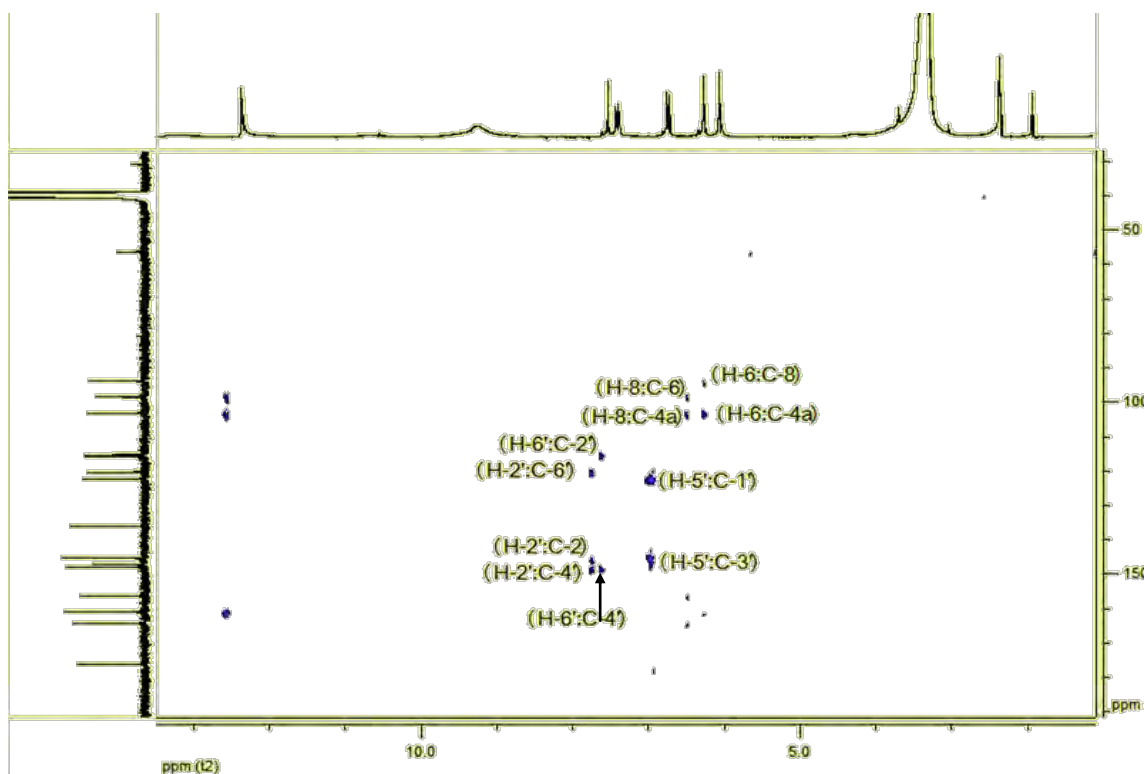


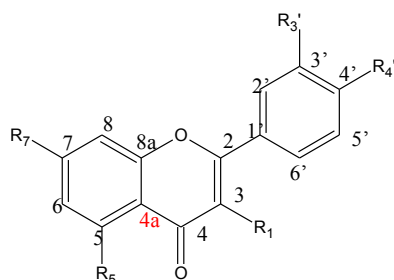
Figure IV-57 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC du composé B1.

Position	¹ H, δ (ppm), m	J (Hz)	¹³ C, δ (ppm)	HMBC	Cosy
2			147,11		
3			136,05		
4			176,15		
5			161,03		
6	6,04 (d)	1,9	98,51	C-4a, C-8	H-8
7			164,20		
8	6,27 (d)	1,9	93,69	C-4a, C-6	H-6
8a			156,45		
4a			103,32		
1'			122,26		
2'	7,53 (d)	2,1	115,35	C-6', C-4', C-2	H-6'
3'			145,37		
4'			148,01		
5'	6,75 (d)	8,5	115,92	C-1', C-3'	H-6'
6'	7,38 (dd)	8,5/2,1	120,32	C-4', C-2'	H-5', H-2'

Tableau IV-8 : Données spectrales du composé **B1**

Sur la base de ces données et par comparaison avec les données de la littérature [18], le composé **B1** est identifié comme étant la : *3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone* ou *Quercétine*

IV. 2. 2. Le composé B2



Réactif	Bande II	Bande I	
MeOH	254	371	
NaOH	274	411	322
AlCl ₃	264	428	
AlCl ₃ + HCl	263	427	
NaOH après 5 mn	Diminution de la densité optique		

Tableau IV-9 : Résultats de l'analyse des spectres UV avec les réactifs de déplacement du composé B2

Le spectre d'absorption UV montrait un maximum à 254 nm, relatif à la bande II, et un autre à 371 nm, relatif à la bande I, caractéristiques d'un flavonoïde.

Le spectre méthanol après addition de NaOH présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol (40 nm) avec diminution de la densité optique ce qui montre la substitution de la position 4', la présence d'une nouvelle bande à 322 nm montre la présence de l'hydroxyle en position 7.

Le spectre méthanol en présence de AlCl₃ présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol neutre de 57 nm ce qui montre la présence de l'hydroxyle libre en position 5.

Le spectre AlCl₃ + HCl ne s'accompagne pas d'un effet hypsochrome de la bande I par rapport au spectre AlCl₃ ce qui milite pour une absence d'un système orthodihydroxylé sur les noyaux A et B.

C'est grâce aux données spectrales RMN du ¹H et du ¹³C, (tableau IV-9), que l'on peut confirmer que le composé **B2** est un flavonoïde. Tout comme le composé précédent (B1), cette molécule a un spectre RMN ¹H (300 Hz dans le DMSO- d6), (figure IV-59) comporte des signaux à δ 6,25 (1H, d, $J = 1,79$ Hz) et à δ 6,54 (1H, d, $J = 1,79$ Hz), qui sont

caractéristiques des protons aromatiques. Ils correspondent respectivement à H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. D'autre part pour le cycle B du flavonoïde, on observe un signal de proton H-6' qui sort à δ 7,76 ppm sous forme d'un doublet de doublet (dd, $J = 7,54$ Hz et 1,54 Hz). Le premier doublet correspond à un couplage avec le proton H-5' en ortho qui lui, résonne à δ 7,01 ppm (d, $J = 7,54$ Hz). Le deuxième doublet, quant à lui, correspond à un couplage avec le proton H-2' en méta (d, $J = 1,79$ Hz) qui sort à δ 7,81 ppm. Ceci nous a permis de constater que le noyau B est trisubstitué. On observe aussi un pic sortant à δ 3,9 ppm, correspondant à trois protons sous forme de singulet : on peut de ce fait affirmer que l'on se trouve en présence d'un groupement méthoxyle.

La présence du groupement méthoxyle et les résultats de l'expérience UV, la présence d'un OR en position en 4', montre que ce dernier est lié en position 4'.

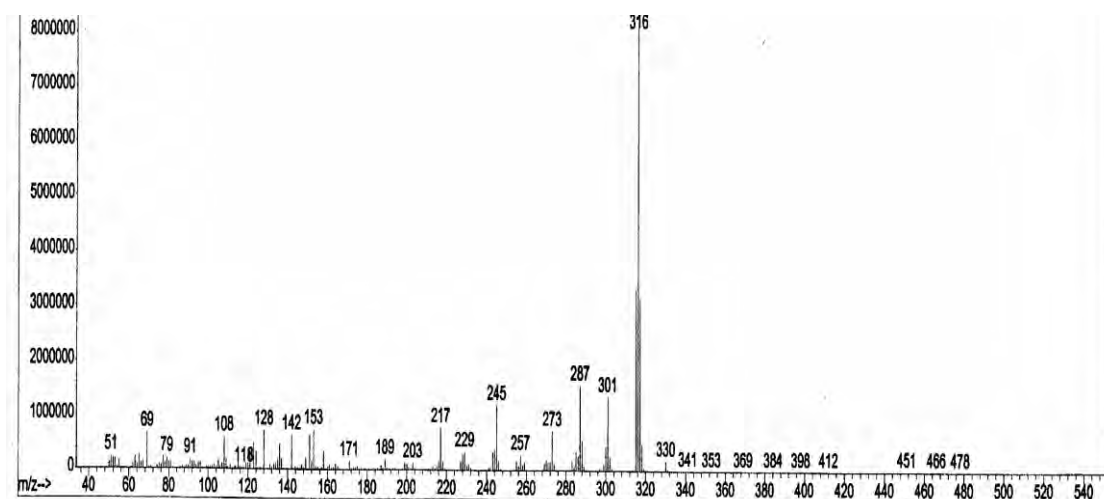


Figure IV-58 : Spectre de masse en IE du composé B2

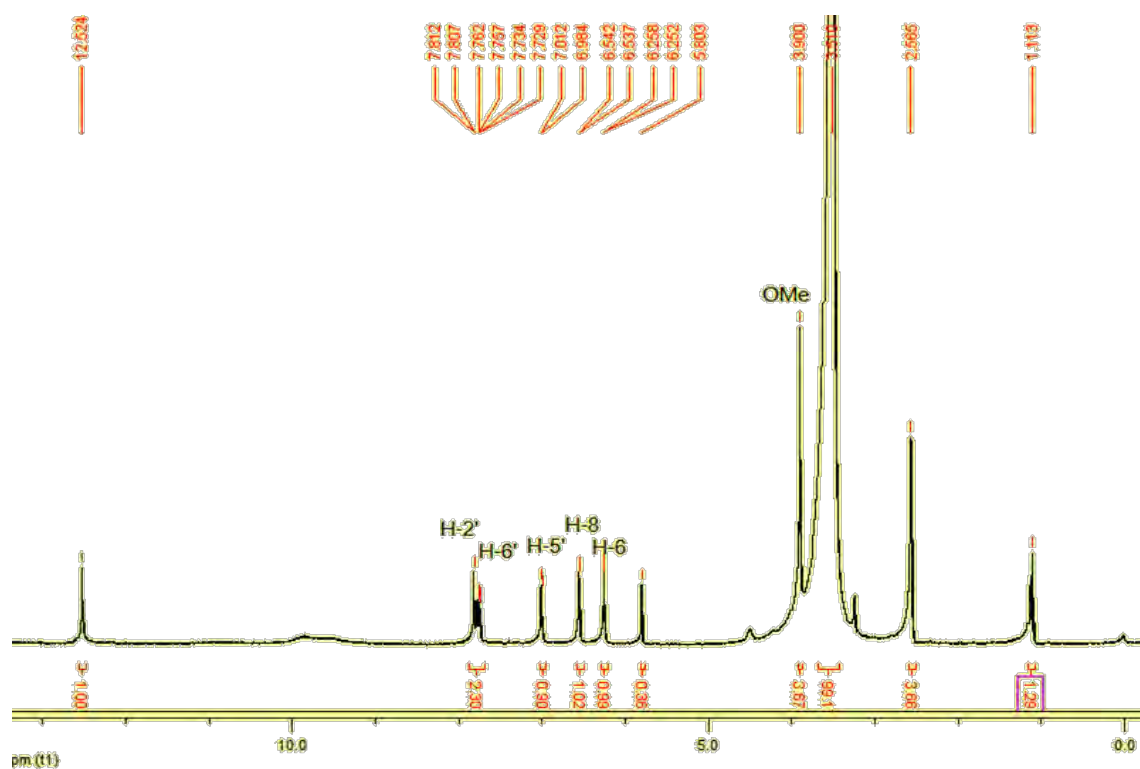


Figure IV-59 : Spectre RMN ^1H (300 MHz dans DMSO- d_6) du composé **B2**

Le spectre RMN du ^{13}C (300 Hz dans le DMSO- d_6), (figure IV-60), indique la présence de 16 carbones. Par ailleurs, le spectre DEPT 135, (figure IV-61), nous permet de dire que le composé **B2** possède 10 carbones quaternaires. De plus, le spectre de masse mesure en IE, (figure IV-58), présente un ion moléculaire à m/z 316 $[\text{M}]^+$ ainsi que divers ions à m/z 301 $[\text{M}-15]^+$ qui résulte de la perte du méthyle, à m/z 287 $[\text{M}-28]$ résultant de la perte du CO, à m/z 153 $[\text{A}_1 + \text{H}]$ et à m/z 128 $[\text{B}_2 - 15]$. On peut donc déduire la formule brute suivante de **B2** (pic moléculaire à m/z 316 $[\text{M}]^+$) : $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$.

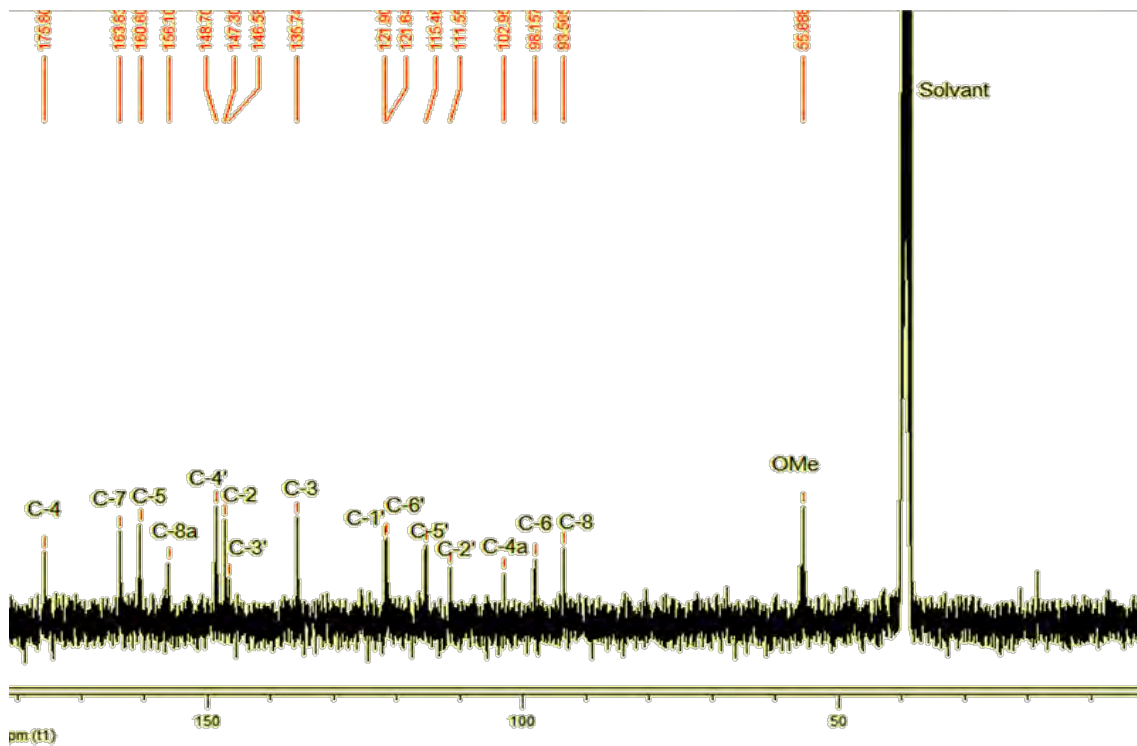


Figure IV-60 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans DMSO-d6) du composé B2

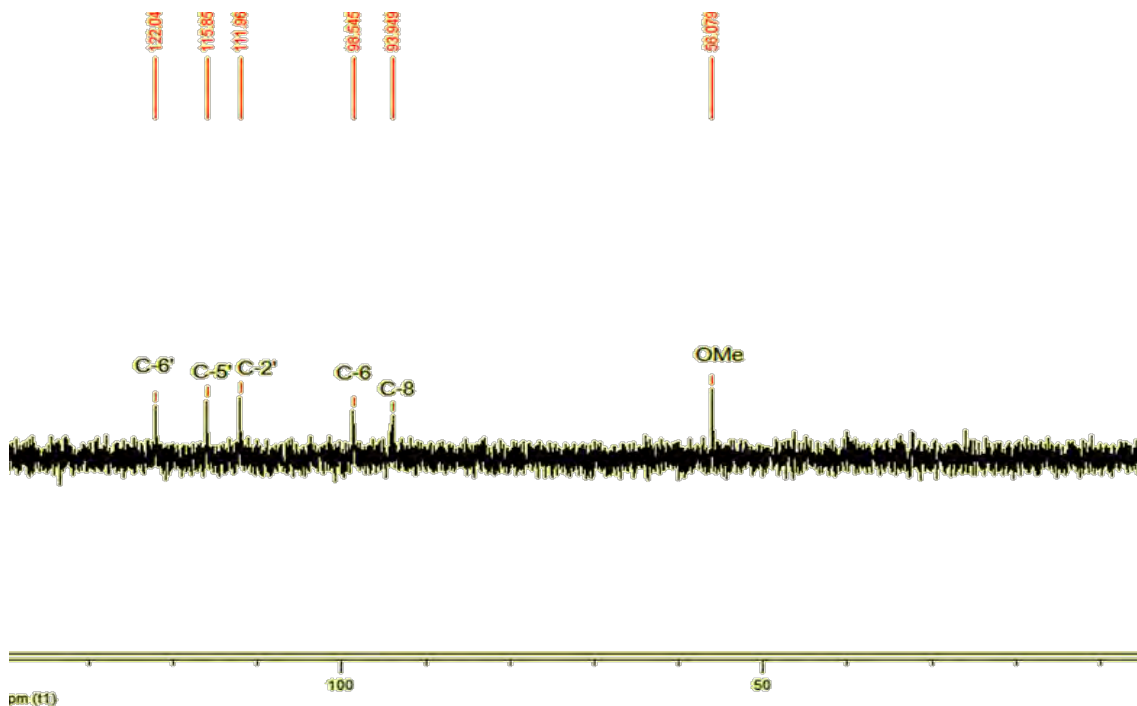


Figure IV-61 : Spectre DEPT 135 (300 MHz dans DMSO-d6) du composé B2

Comme pour tous les composés identifiés, l'attribution des déplacements chimiques des protons aromatiques est corroborée par les expériences homonucléaire COSY et hétéronucléaire HMQC.

La mesure de l'expérience COSY, (figure IV-62), présente les corrélations entre les protons H-5' et H-6' ainsi qu'entre H-6 et H-8.

Sur le spectre hétéronucléaire HMQC, (figure IV-63), les carbones situés (C-6) à δ 98,15 ppm, (C-8) à δ 93,56 ppm, (C-2') à δ 111,55 ppm, (C-5') à δ 115,45 ppm et (C-6') à 121,63 ppm sont corrélés, respectivement avec les protons résonnants à δ 6,25 ppm (H-6), δ 6,54 ppm (H-8), δ 7,81 ppm (H-2'), δ 7,01 ppm (H-5'), et à δ 7,76 ppm (H-6'). Ce spectre a ainsi montré la corrélation entre les trois protons apparaissent à δ 3,9 ppm et le carbone localisé à δ 56,68 ppm.

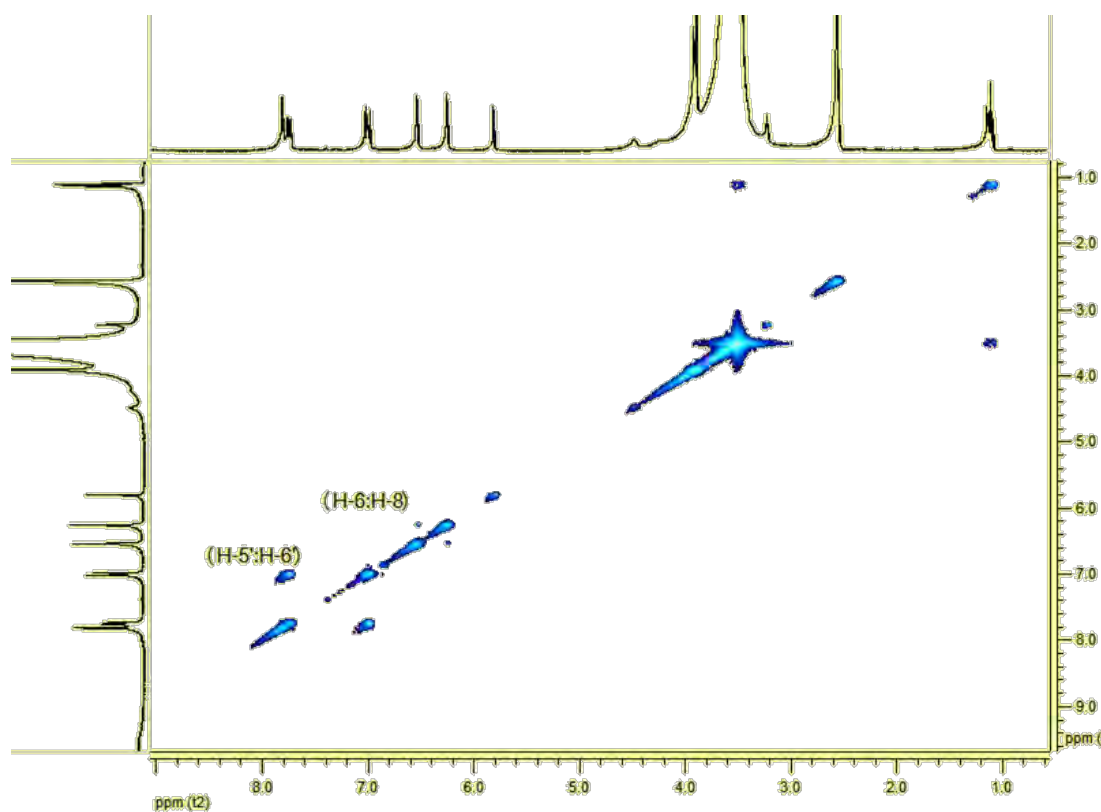


Figure IV-62 : Spectre de corrélation homonucléaire COSY du composé B2

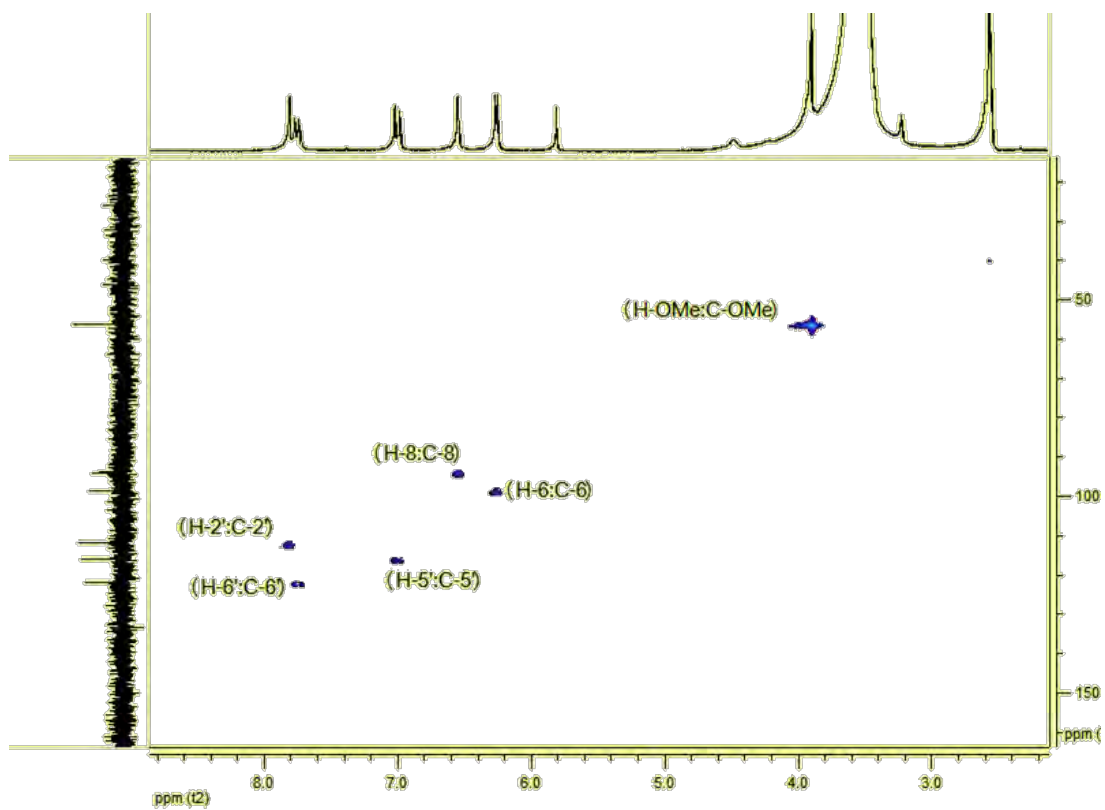


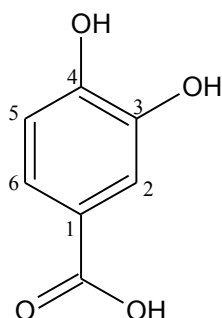
Figure IV-63 : Spectre de corrélation hétéronucléaire HMQC du composé B2

Position	¹ H, δ (ppm), m	J (Hz)	¹³ C, δ (ppm)	Cosy
2			146,57	
3			135,75	
4			175,80	
5			160,60	
6	6,25 (d)	1,79	98,15	H-8
7			163,83	
8	6,54 (d)	1,79	93,56	H-6
8a			156,10	
4a			102,95	
1'			121,90	
2'	7,81 (d)	1,54	111,55	H-6'
3'			146,57	
4'			148,70	
5'	7,01 (d)	7,54	115,45	H-6'
6'	7,76 (d)	7,54	121,63	H-5', H-2'
OMe	3,9 (s)		55,68	

Tableau IV-10 : Données spectrales du composé **B2**

Sur la base de ces données et par comparaison avec les données de la littérature [19], le composé **B2** est identifié comme étant la : *3,5,7,3'-tétrahydroxy-4'-méthoxyflavone* ou *Tamarixetine*.

IV. 2. 3. Le composé B3



Le spectre RMN ^1H (300 MHz dans le CD_3OD), (figure IV-64), montre bien la présence d'un noyau aromatique trisubstitué en position 1, 3 et 4. En effet, les trois protons aromatiques présentent : un doublet à δ 6,67 ppm correspondant à un couplage en ortho ($J = 8,05$ Hz), un deuxième doublet de doublet à δ 7,29 ppm correspondant à un double couplage en ortho ($J = 8,05$ Hz) et en méta ($J = 1,83$ Hz), ainsi qu'un troisième doublet résonnant à δ 7,33 ppm et correspondant à un couplage en méta ($J = 1,83$ Hz). Ces résultats sont confirmés par la mesure du spectre COSY, (figure IV-65), où l'on observe des crêtes de corrélation entre le proton situé δ 6,67 ppm et celui résonnant 7,29 ppm.

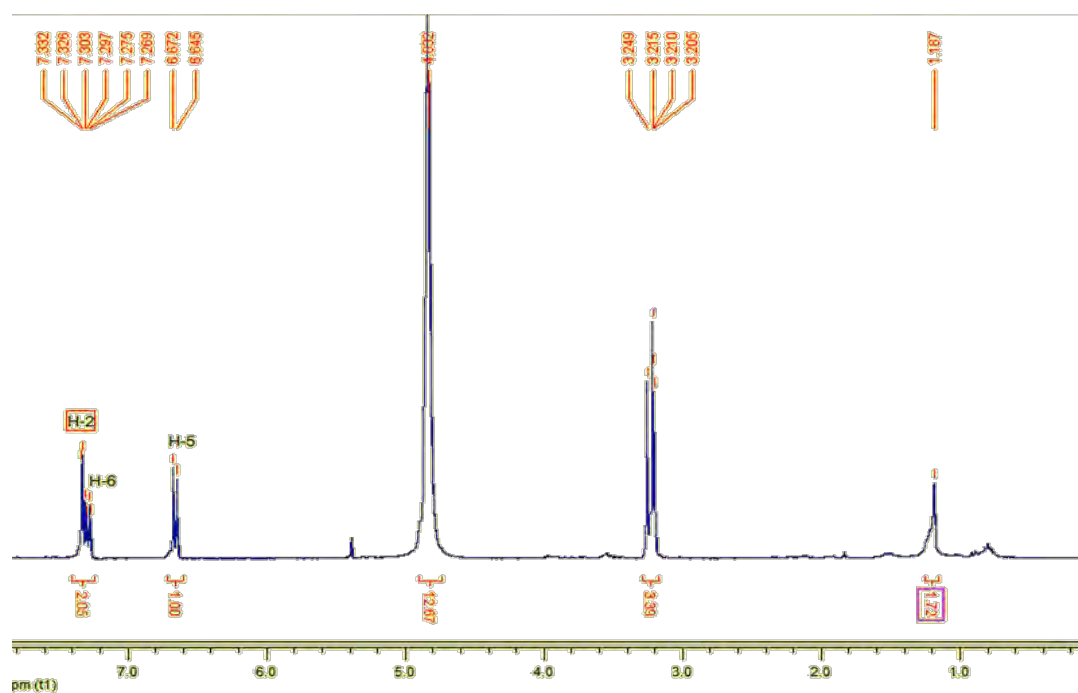


Figure IV-64 : Spectre ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) du composé B3.

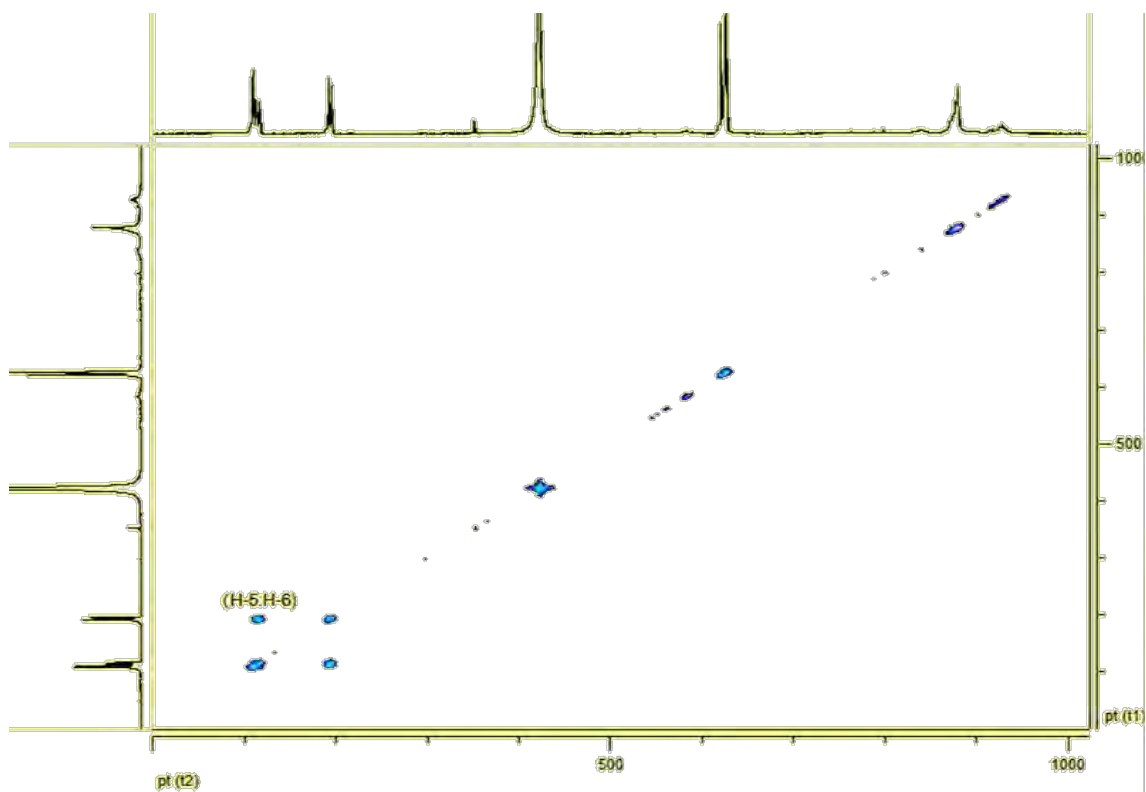


Figure IV-65 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé B3.

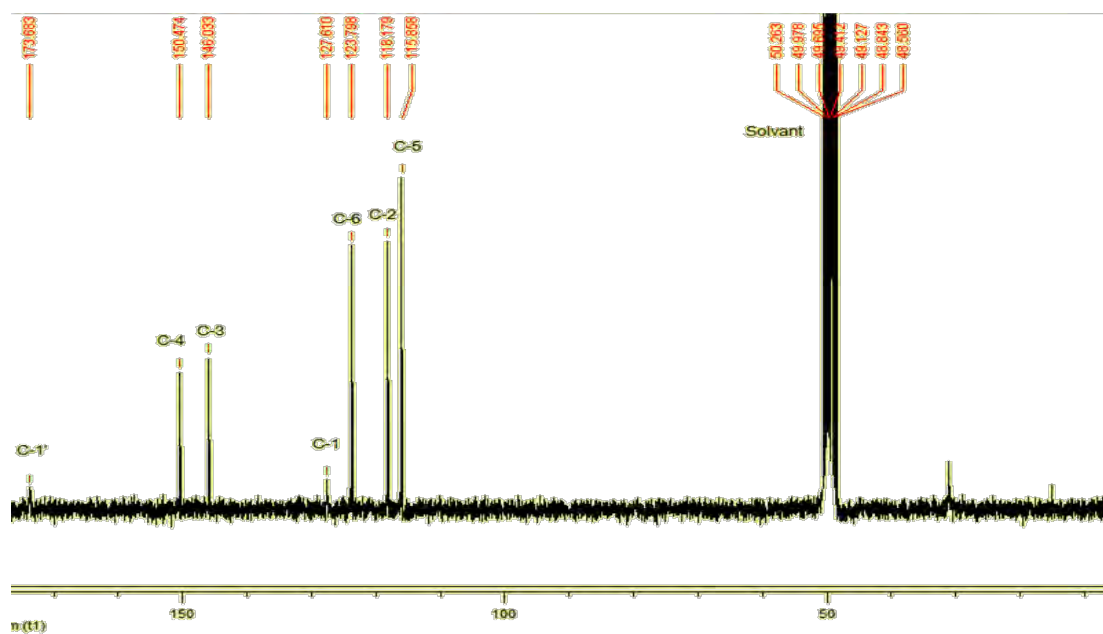


Figure IV-66 : Spectre ^{13}C -RMN (300 MHz, Méthanol-d₄) du composé B3.

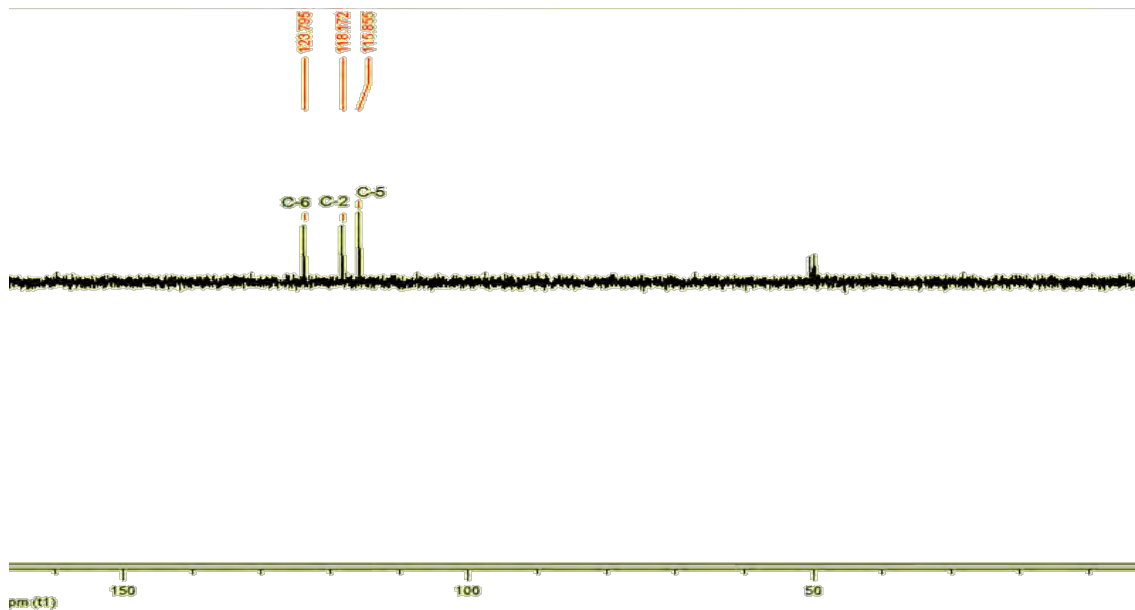


Figure IV-67 : Spectre DEPT 135 (300 MHz, CD₃OD) du composé B3.

Le spectre RMN ¹³C (300 MHz dans le CD₃OD), (figure IV-66), indique la présence de 7 carbones. De plus, l'analyse du spectre DEPT 135, (figure IV-67), nous permet d'affirmer que cette molécule possède 4 carbones quaternaires. Le spectre RMN ¹³C de ce composé montre bien la présence d'une fonction carbonyle.

Par ailleurs, le résultat du spectre de masse en EI du composé **B3** (figure IV-68) a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 154 [M]⁺, ainsi que divers ions à m/z 137 [M-OH]⁺, à m/z 110 [M - COOH + H]⁺ et à m/z 92 [M - COOH - OH]. Du fait des sept atomes de carbones trouvés grâce au spectre RMN du ¹³C, on peut déduire que ce composé a une formule brute C₇H₆O₄.

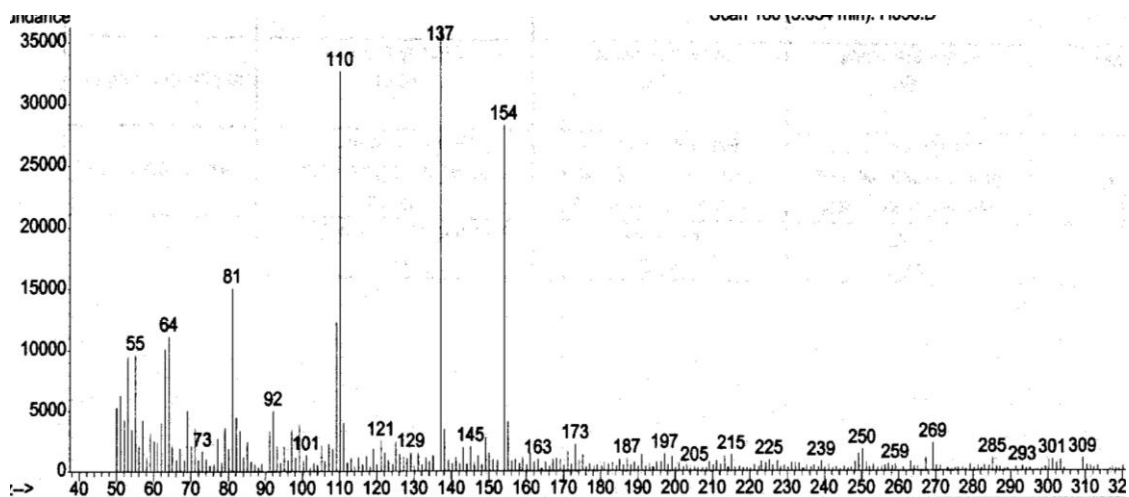


Figure IV-68: Spectre de masse I E du composé B3

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (figure IV-69) a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **B3**. Il a pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 7,33 ppm, δ 6,67 ppm et à δ 7,29 ppm étaient attachés aux carbones tertiaires respectivement situés à δ 118,17 ppm, δ 115,85 ppm, et δ 123,79 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC (figure IV-70) a montré la corrélation entre le proton résonant à δ 7,33 ppm et les carbones situés à δ 150,47 ppm, 123,79 ppm et 173,68 ppm. Cette expérience a ainsi montré des crêtes des corrélations entre le proton résonant δ 6,67 ppm et les carbones apparaissent à δ 127,60 ppm, 147,02 ppm et à 150,47 ppm.

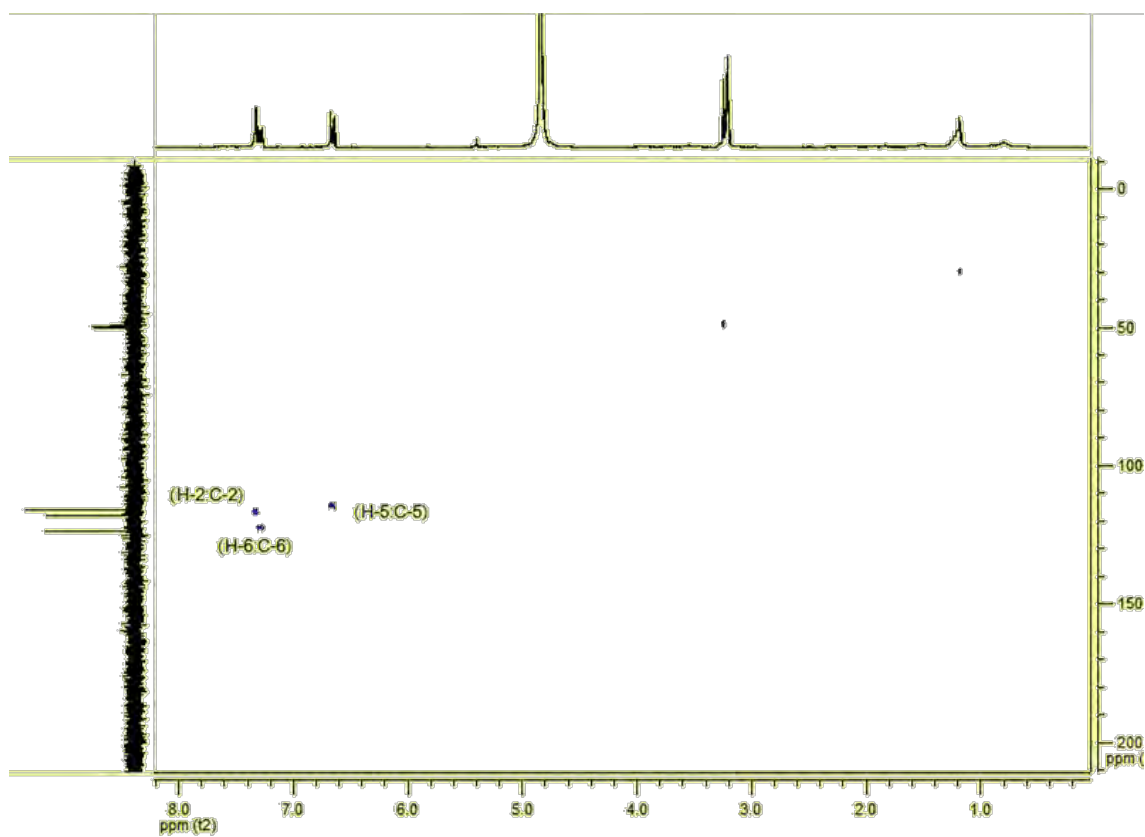


Figure IV-69 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé B3.

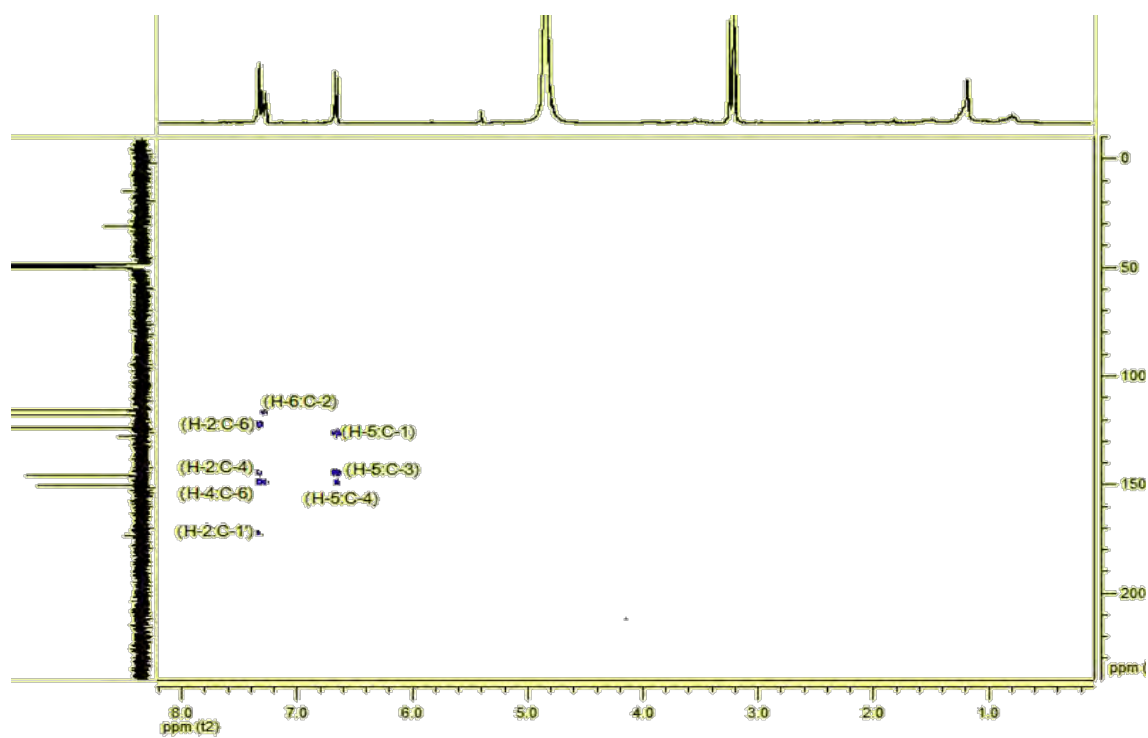


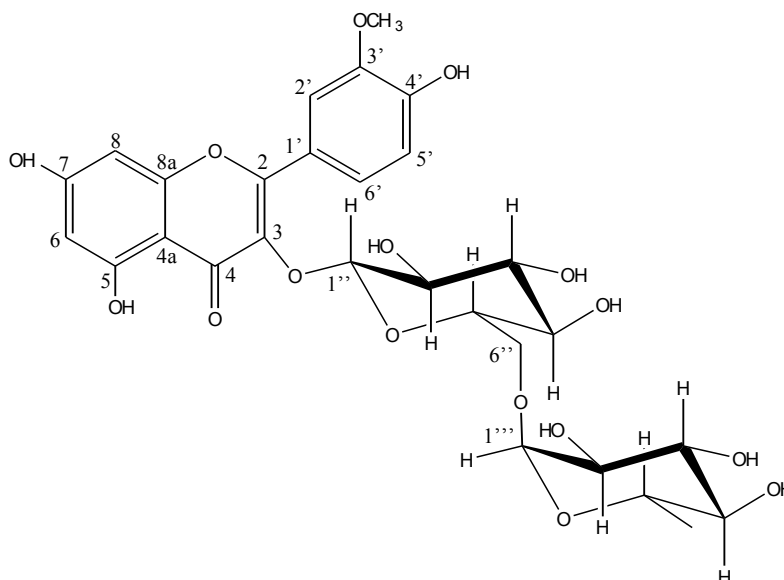
Figure IV-70 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé B3.

Position	^1H , δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C (ppm)	HMBC	COSY
1		127,60		
2	7,33(d, 1,83)	118,17	C-6, C-4, C-1'	H-6
3		147,02		
4		150,47		
5	6,67 (d, 8,05)	115,85	C-1, C-3, C-4	H-6
6	7,29 (dd, 8,05 et 1,83)	123,79	C-2, C-4	H-2, H-5
1'		173,68		

Tableau IV-11 : Donnés spectrales du composé B3

Sur la base de ces données le composé **B3** est identifié comme étant la : *acide-3, 4 dihydroxy benzoïque*.

IV. 2. 4. Le composé B4



Le spectre d'absorption UV montrait un maximum à 254 nm, relatif à la bande II, et un autre à 356 nm, relatif à la bande I, caractéristiques d'un flavonoïde.

Afin de déterminer la structure de ce composé, une analyse par spectrophotométrie UV à l'aide des réactifs de déplacement a été menée d'après Markham [20]. Le tableau IV-11 présente les résultats obtenus sur le composé **B4**.

Réactif	Bande II	Bande I	
MeOH	254	356	
NaOH	273	412	326
AlCl ₃	268	403	361
AlCl ₃ + HCl	268	403	361

Tableau IV-12 : Résultats de l'analyse des spectres UV avec les réactifs de déplacement du composé B4 d'après Markham [20].

La valeur du maximum d'adsorption de la bande I à 356 nm du spectre UV-Visible enregistré dans le méthanol montre qu'on est en présence d'un système OR en position 3.

Le spectre méthanol après addition de NaOH présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol (56 nm) sans diminution de la densité optique qui montre un hydroxyle libre en 4', la présence d'une nouvelle bande à 326 nm montre la présence de l'hydroxyle en position 7

Le spectre méthanol en présence de AlCl₃ présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol neutre de 47 nm ce qui montre la présence de l'hydroxyle libre en position 5.

Le spectre AlCl₃ +HCl ne s'accompagne pas d'un effet hypsochrome de la bande I par rapport au spectre AlCl₃ ce qui milite pour une absence d'un système orthodihydroxylé sur les noyaux A et B.

Le spectre de masse, obtenu à haute résolution en mode électrospray (ESI), (figure IV-71), a permis d'observer un ion pseudo-moléculaire à m/z 647 $[M+Na]^+$ ainsi que divers ions à m/z 331 $[M - \text{sucres} + Na - 6H]^+$. Le composé **B4** a donc un poids moléculaire de 624 Uma.

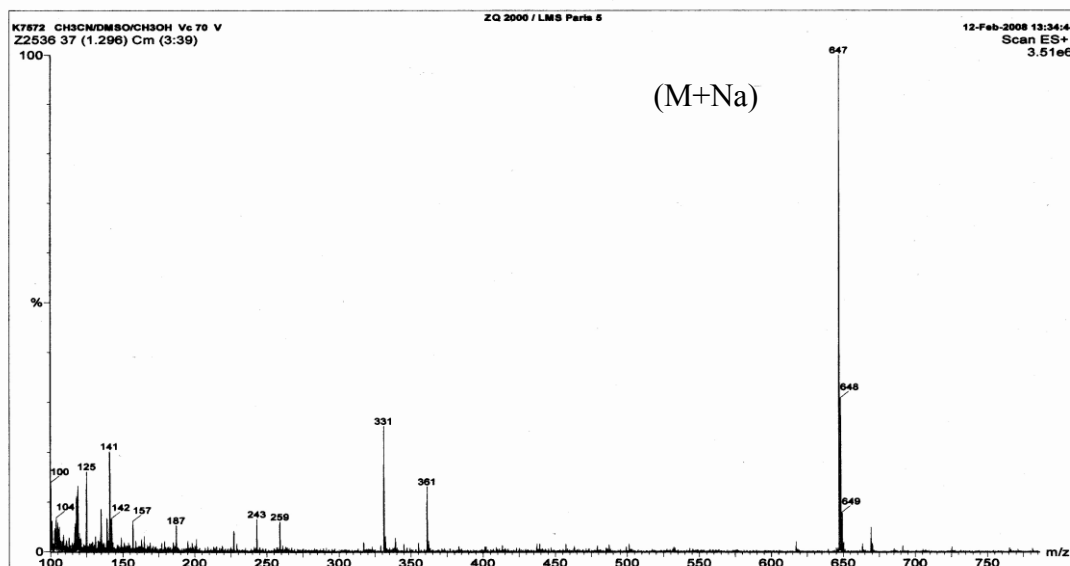


Figure IV-71 : Spectre de masse en mode Electrospray du composé B4

Les données des spectres RMN ^1H et ^{13}C , (Tableau IV-12), indique que le composé est une flavonoïde diglycosylé. En effet son spectre RMN ^1H (300 MHz dans le DMSO- d_6), (figure IV-72), présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons à δ 6,20 ppm (1H, d, $J = 1,38$ Hz) et à δ 6,43 ppm (1H, d, $J = 1,38$ Hz) caractéristique, respectivement, aux protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes.

Au niveau du cycle B le signal du proton H-6' à δ 7,53 ppm est un doublet de doublet ($J = 8,28$ Hz, 1,71 Hz) révélant le couplage en ortho avec le proton H-5' à δ 6,92 ppm dont le signal est un doublet ($J = 8,28$ Hz) et le couplage en méta avec le proton H-2' à δ 7,86 ppm (d, $J = 1,71$ Hz), ceci montre que le noyau B est disubstitué.

Afin de déterminer la nature de la partie osidique mise en évidence par l'analyse la spectrométrie de masse et des données spectrales, l'hydrolyse acide du composé **B4** a été entreprise. Cette dernière a donné le glucose et le rhamnose, identifié par la chromatographie sur couche mince en gel de silice et par comparaison à des échantillons de référence.

La partie osidique est représentée par les deux pics anomériques H-1'' et H-1'''. Les déplacements dans la région des sucres sont caractéristiques d'un glucose et d'un rhamnose. Pour le glucose, on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique H-1'' à δ 5,45 ppm (1H, d, $J = 7,17$ Hz) [21]. Le rhamnose est identifié par son proton anomérique qui résonne à δ 4,41 ppm avec une constante de couplage faible et le signal du méthyl situé à δ 0,98 ppm (3H, d, $J = 6$ Hz). Les autres protons des sucres sont situés entre 3,2 et 3,7 ppm. Le singulet résonnant à δ 3,83 ppm, intégrant pour trois protons, est typique d'un groupe méthoxyle.

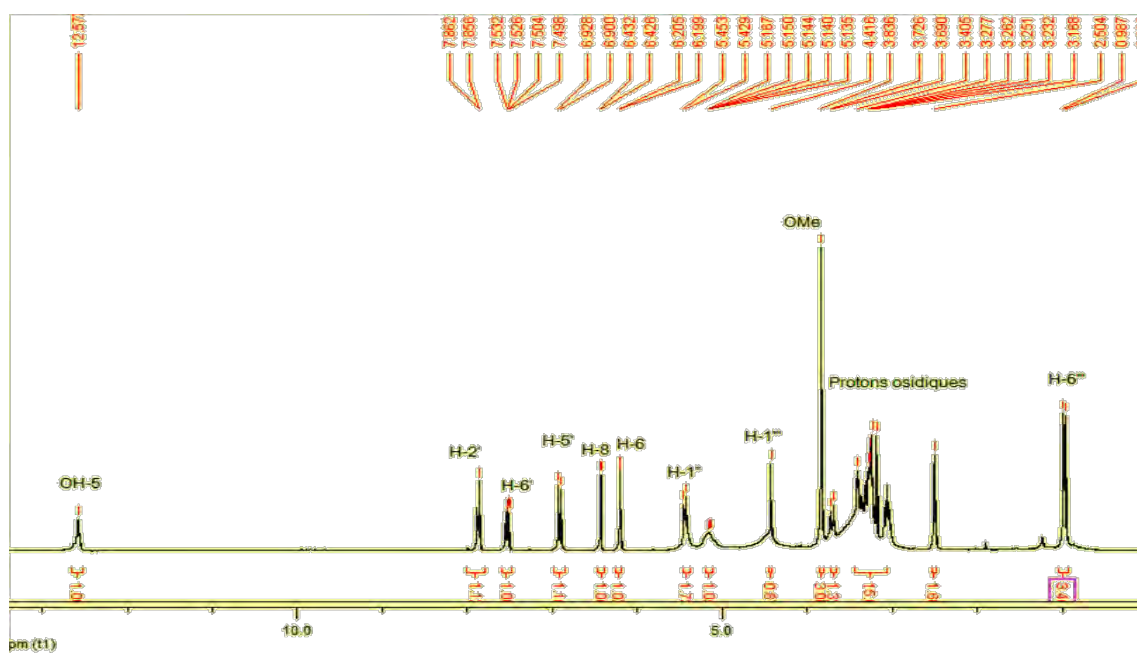


Figure IV-72 : Spectre RMN ^1H (300 MHz DMSO- d_6) du composé B4.

Le spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans DMSO- d_6), (figure IV-73), montre bien la présence d'un dioside dont la majorité de ses carbones résonne entre 65 et 78 ppm. Le carbone 6''' à δ 17,66 ppm est caractéristique du méthyle de rhamnose. Les pics des carbones anomériques C1'' et C1''' du glucose et du rhamnose sortent respectivement à δ 101,13 et δ 100,86 ppm. Le déplacement chimique vers les champs faibles du carbone C6'' à 66,77 ppm montre bien que la liaison glucose rhamnose est (1 \longrightarrow 6) [22].

L'analyse du spectre DEPT 135 (figure IV-74) a fourni plus d'indications. Ce spectre nous a permis de distinguer un CH_2 et par déduction dix carbones quaternaires. Par ailleurs, les 28 signaux dénombrés ont permis de confirmer la formule brute $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$, qui est en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

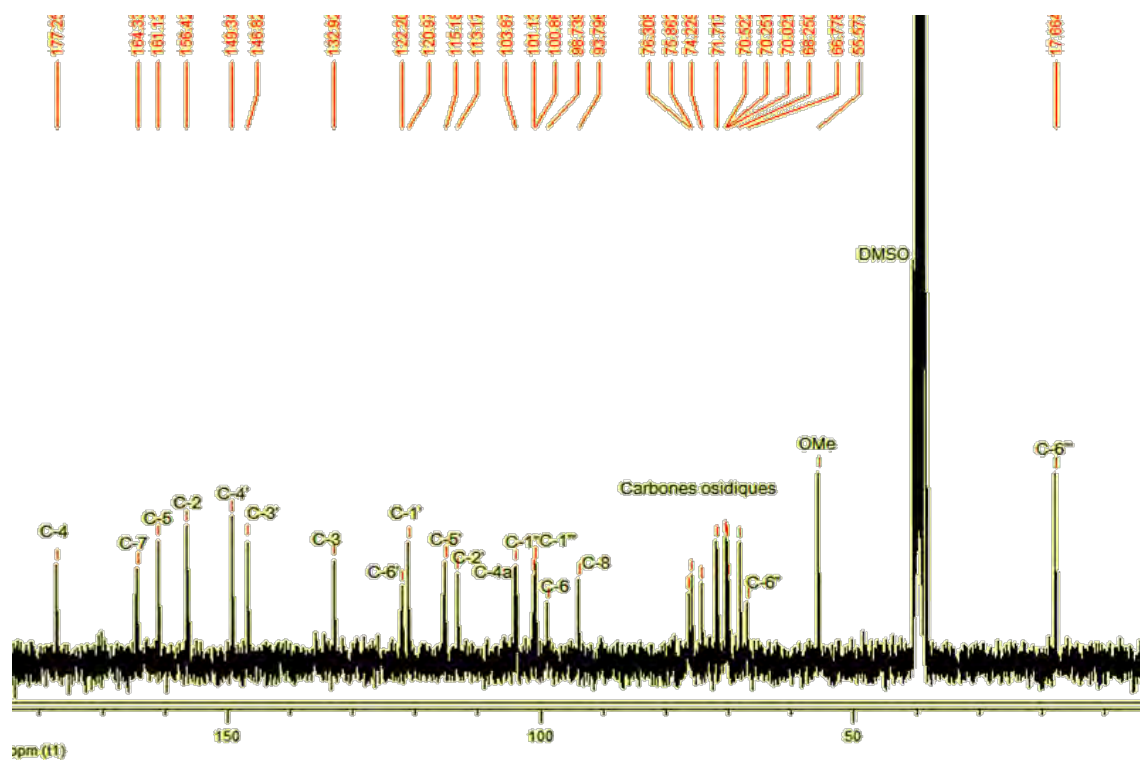


Figure IV-73 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz dans DMSO-d₆) du composé B4

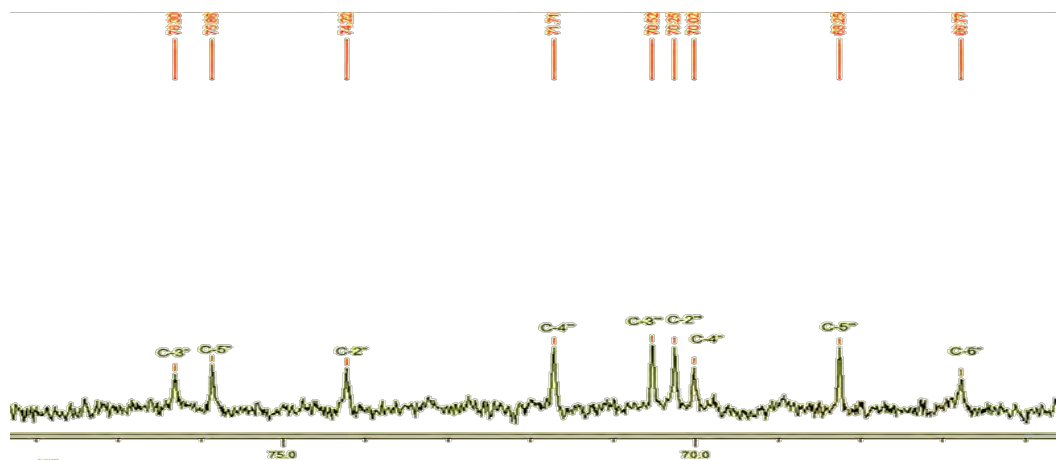


Figure IV-73 bis : Etalement de la partie des carbones osidiques.

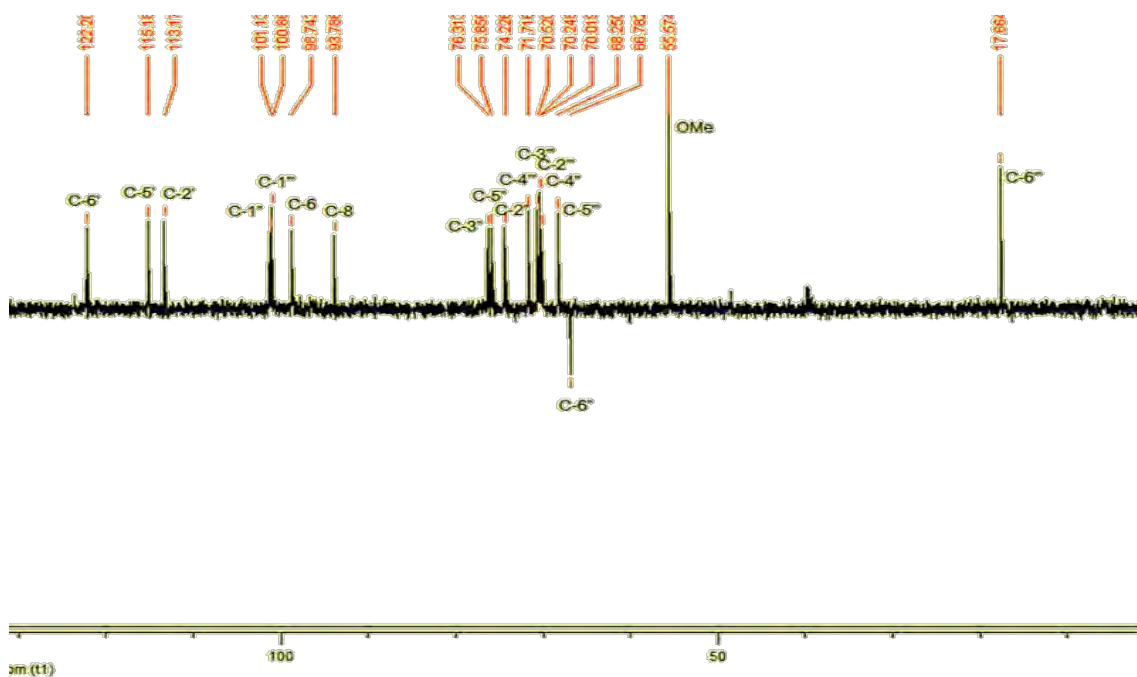


Figure IV-74 : Spectre DEPT 135 du composé B4.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY hétéronucléaires HMQC et HMBC.

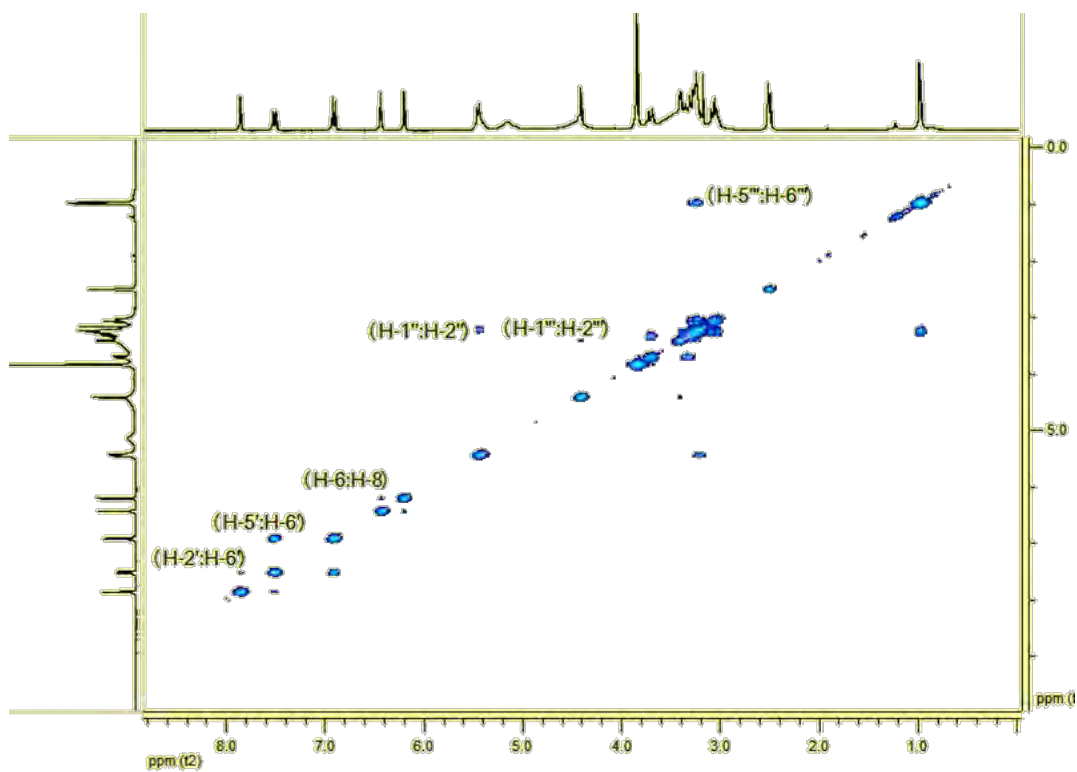


Figure IV-75 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé B4.

L'interprétation des taches de corrélation observées sur le spectre COSY, (figure IV-75), entre un proton du multiplet situés de δ 2,50-3,50 ppm et l'anomère à δ 5,45 ppm (d, $J=7,17$ Hz) permet de repérer le proton H-2'' confirme la présence du glucose. La corrélation observée entre le méthyle résonnant à δ 0,98 ppm (d, 6,03 Hz) et un proton du multiplet situé de δ 2,50-3,50 ppm traduit la présence du rhamnose. Ce spectre a ainsi montré que H-5' est corrélé avec H-6', qui lui-même corrèle avec H-2'. Cette expérience a aussi permis de mettre en évidence les corrélations entre H-6 et H-8.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC, (figure IV-76), a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **B4**. Il a ainsi pu être démontré que les protons localisés à δ 5,45 et δ 4,41 ppm corrélient aux carbones anomériques situés respectivement à δ 101,13 et δ 100,86 ppm, ce qui confirme la présence de deux sucres dans le composé **B4** [20]. Cette expérience a permis de mettre en évidence les corrélations (H-6 :C-6), (H-8 :C-8), (H-6' : C-6'), (H -5' :C-5') et (H-2' :C-2') pour l'aglycone.

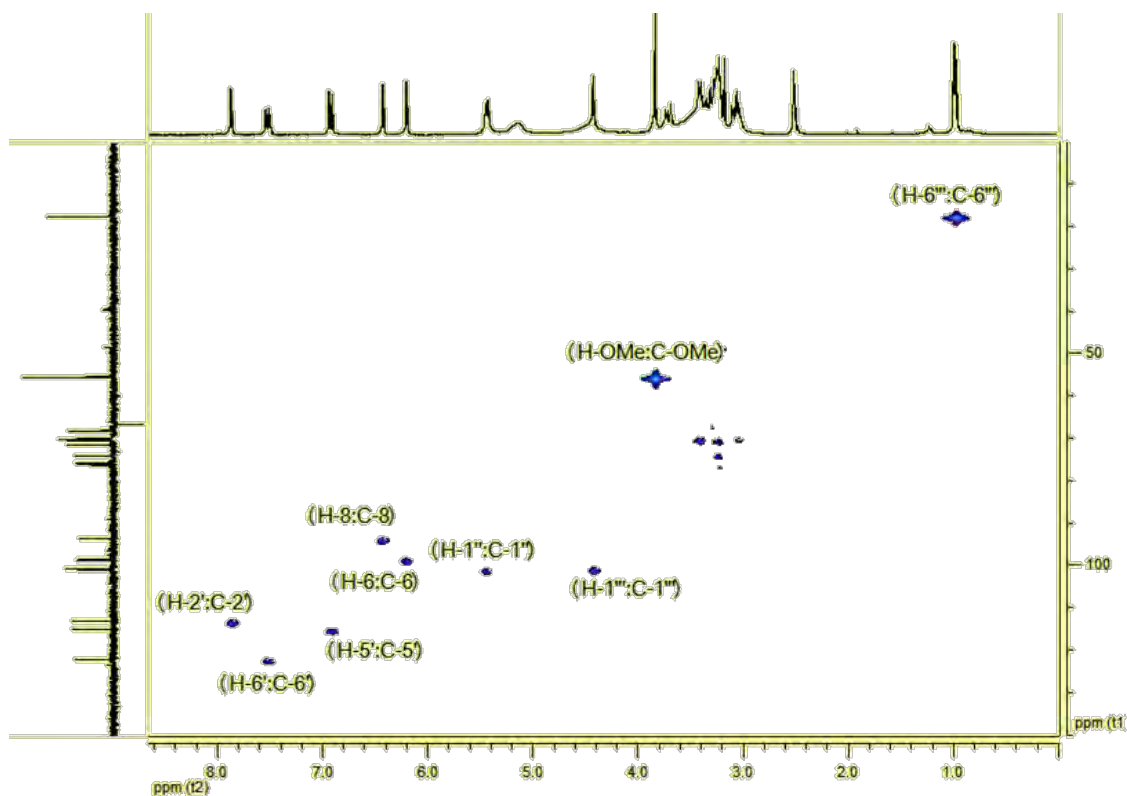


Figure IV-76 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé **B4**.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance HMBC, (figure IV-77), a permis la confirmation de la liaison du sucre à l'aglycone en montrant clairement le couplage du proton anomérique du glucose (H-1'') avec le carbone C-3 de l'aglycone. Par ailleurs, les corrélations observées entre les protons à δ 4,41 ppm (H-1''') et le carbone situé à δ 66,77 ppm (C-6'') ont permis de confirmer l'identification du diglycoside. Il s'agit du rutinose [rhamnosyl- α (1 \rightarrow 6)-glucose]. La localisation du méthoxy en C-3' a également été confirmée par cette expérience.

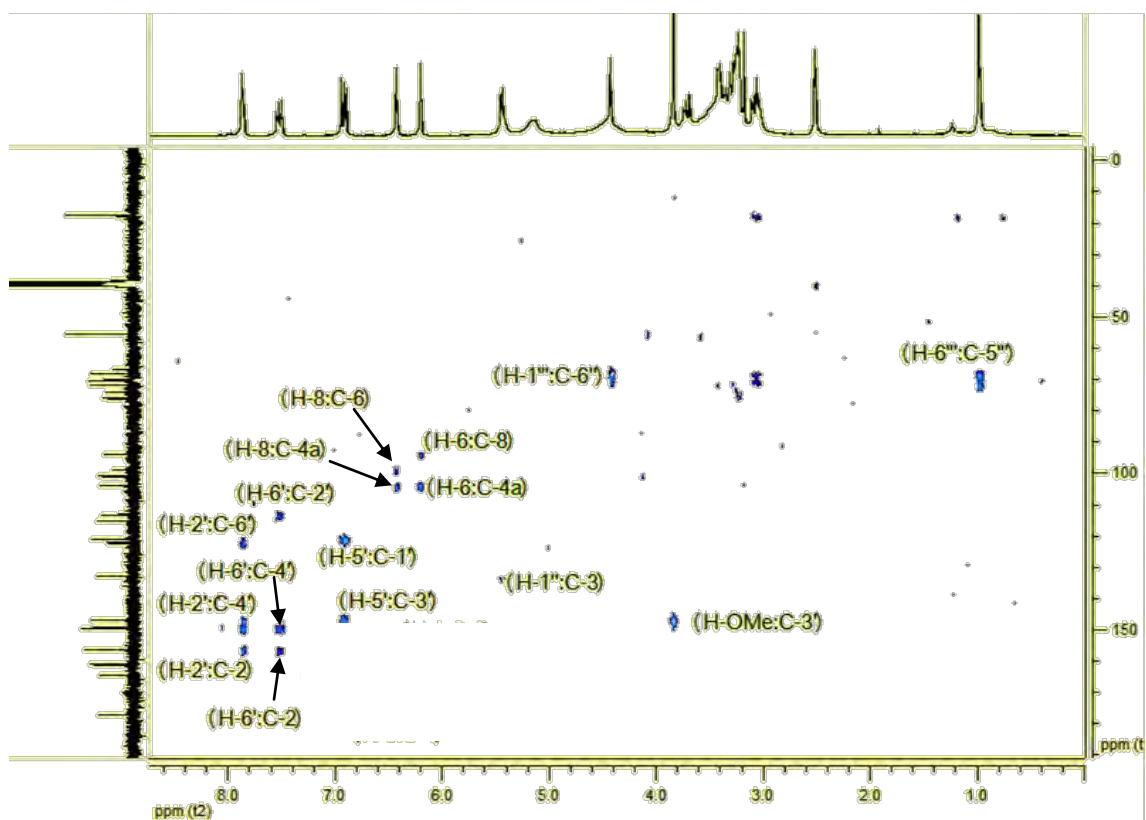


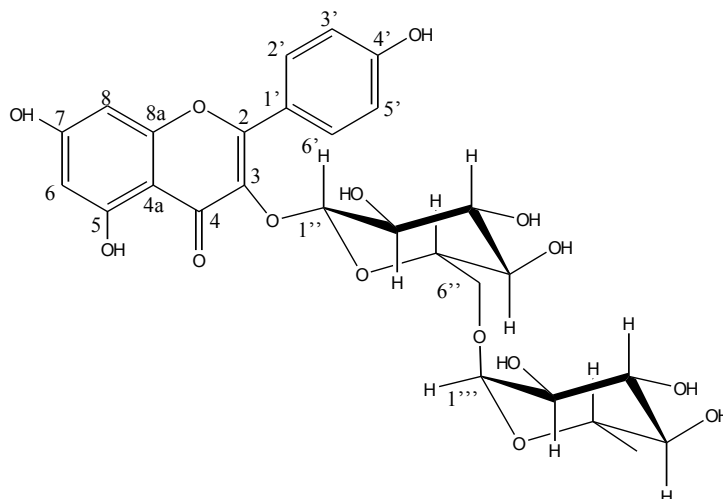
Figure IV-77 - Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé B4.

Position	¹ H, δ (ppm), m	J (Hz)	¹³ C, δ (ppm)	HMBC	Cosy
2			156,42		
3			132,92		
4			177,24		
5			161,12		
6	6,20 (d)	1,71	98,73	C-4a, C-8,	H-8
7			164,33		
8	6,43 (d)	1,71	93,79	C-4a, C-6	H-6
8a			156,45		
4a			103,87		
1'			120,97		
2'	7,86 (d)	1,68	113,17	C-6', C-4', C-2	H-6'
3'			146,82		
4'			149,34		
5'	6,50 (d)	8,49	115,18	C-1', C-3'	H-6'
6'	7,53 (dd)	8,49/1,68	122,20	C-4', C-2', C-2	H-5', H-2'
1''	5,45 (d)	7,17	101,13	C-3	H-2''
2''			74,22		
3''			76,30		
4''			70,02		
5''			75,86		
6''			66,77		
1'''	4,41		100,86	C-6''	H-2'''
2'''			70,24		
3'''			70,52		
4'''			71,71		
5'''			68,24		
6'''	0,98 (d)	6,03	17,66		
OMe	3,83 (S)		55,57	C-3'	

Tableau IV-13 : Donnés spectrales du composé B4

Par comparaison avec les données de la littérature [23], le composé **B4** est identifié comme étant la *3'-O-Methylquercitin 3-rutinoside* ou *Isorhamnetin 3-β-D-glucopyranosyl-(6 → 1)-L-rhamnopyranoside* ou **Narcissin**, isolé pour la première fois des fleurs du *Narcissus tazetta* par Kubota et Hase [24].

IV. 2. 5. Le composé **B5**



Afin de déterminer la structure de ce composé, une analyse par spectrophotométrie UV à l'aide des réactifs de déplacement a été menée d'après Markham [20]. Le tableau IV-13 présente les résultats obtenus sur le composé **B5**.

Réactif	Bande II	Bande I	
MeOH	266 (0,36)	350 (0,29)	
NaOH	274 (0,42)	401 (0,44)	325 (0,22)
AlCl ₃	274 (0,36)	398 (0,26)	353 (0,26)
AlCl ₃ + HCl	274 (0,32)	395 (0,2)	345 (0,24)
NaOAc	274 (0,5)	377 (0,26)	305 (0,23)
NaOAc + H ₃ BO ₃	267 (0,36)	353 (0,25)	

Tableau IV-14 : Résultats de l'analyse des spectres UV avec les réactifs de déplacement du composé B5 d'après Markham [20].

La valeur du maximum d'adsorption de la bande I à 350 nm du spectre UV-Visible enregistré dans le méthanol montre qu'on est en présence d'un système OR en position 3.

Le spectre méthanol après addition de NaOH présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol (51 nm) qui montre la présence d'un hydroxyle libre en position 4', la présence d'une nouvelle bande à 325 nm montre la présence d'un hydroxyle en position 7 confirmé par le spectre enregistré en présence de NaOAc (déplacement bathochrome de la bande II par rapport à celle du méthanol de 8 nm).

Le spectre en présence d' AlCl_3 montre un déplacement bathochrome de la bande I de 49 nm ce qui milite en faveur de l'hydroxyle en position 5. Alors que le spectre en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ a le même profil que celui d' AlCl_3 ce qui montre l'absence d'un système orthodihydroxylé.

Le spectre de masse du composé **B5**, (figure IV-78), obtenu à haute résolution en mode électrospray (ESI), a permis d'observer un ion pseudo-moléculaire à m/z 617 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ainsi que divers ions à m/z 471 $[\text{M}+\text{Na}-147+\text{H}]^+$ correspond à la perte d'un hexose et à m/z 309 $[\text{M}+\text{Na}-308+\text{H}]^+$ correspondant au départ de deux sucres, ce qui suggère la présence d'un diglycoside. Le composé **B5** a donc une masse de 594 Uma.

Afin de déterminer la nature des deux sucres mis en évidence par l'analyse du spectre de masse, l'hydrolyse acide du composé **B5** a été entreprise. Cette dernière a donné le glucose et le rhamnose, identifié par la chromatographie sur couche mince en gel de silice et par comparaison à des échantillons de référence.

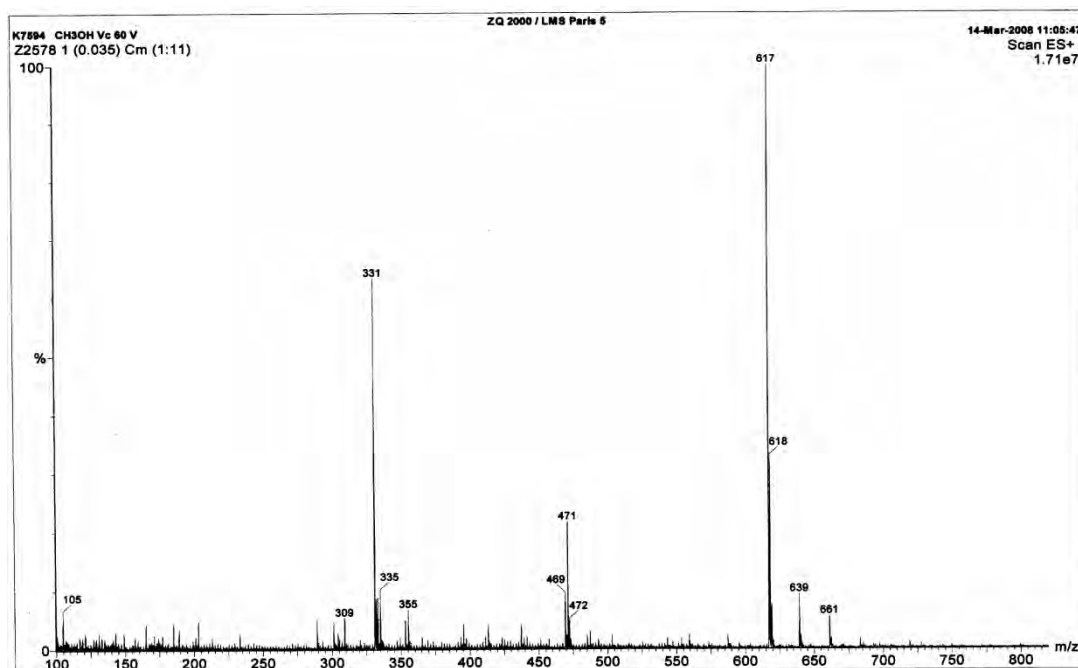


Figure IV-78 : Spectre de masse en Electrospray du composé B5

Les données des spectres RMN ^1H et ^{13}C , (Tableau IV-14), indique que le composé est une flavonoïde diglycosylé. En effet l'étude des signaux du spectre RMN- ^1H , (300 MHz dans le DMSO- d_6) (figure IV-79), de la zone des protons aromatiques a permis de mettre en évidence la présence de substituants hydroxyles en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification d'un couplage *mé*ta des protons H-6 et H-8 du cycle A à δ 6,07 et 6,27 ppm : ceci est en bonne adéquation avec les résultats fournis par les mesures effectuées à l'UV.

La substitution du noyau B est indiquée par la présence de deux couples de doublets couplant en position *ortho* à δ 7,97 (d, $J = 8,28$ Hz) et 7,97 (d, $J = 8,28$ Hz) pour H-2' et H-6' et δ 6,88 (d, $J = 8,28$ Hz) et 6,88 (d, $J = 8,28$ Hz) pour H-3' et H-5'. Ces données et les résultats des mesures de l'expérience UV nous permet de placer le groupement hydroxyle en position 4' sur le cycle B.

Ces données proposent quant à la présence de la génine kaempférol. Comme pour le composé **B4** (Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside), nous remarquons que le composé est un hétéroside.

La partie osidique est représentée par les deux pics anomériques H-1'' et H-1'''. Les déplacements dans la région des sucres sont caractéristiques d'un glucose, dont on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique H-1'' à δ 5,26 ppm (1H, d, $J=7,14$ Hz) [21]. Le second proton anomérique résonne à δ 4,39 ppm avec une constante de couplage faible et le signal à δ 1 ppm (3H, d, $J=6$ Hz) confirme la présence du rhamnose ce qui est en bonne adéquation avec les résultats de l'hydrolyse acide. Les autres protons des sucres sont situés entre δ 3 et 3,7 ppm.

Les spectres RMN ^{13}C (300 MHz dans DMSO- d_6) (figure IV-80) et DEPT 135 (figure IV-81) montrent bien la présence d'un dioside. Le carbone 6''' du rhamnose présente un pic caractéristique à δ 17,73 ppm, cependant que les pics des carbones anomériques C1'' et C1''' du glucose et du rhamnose sortent respectivement à δ 101,79 et δ 100,78 ppm. Le déplacement chimique vers les champs faibles du carbone C6'' du glucose à 66,81 ppm montre bien que la liaison glucose rhamnose est (1 \longrightarrow 6) [22].

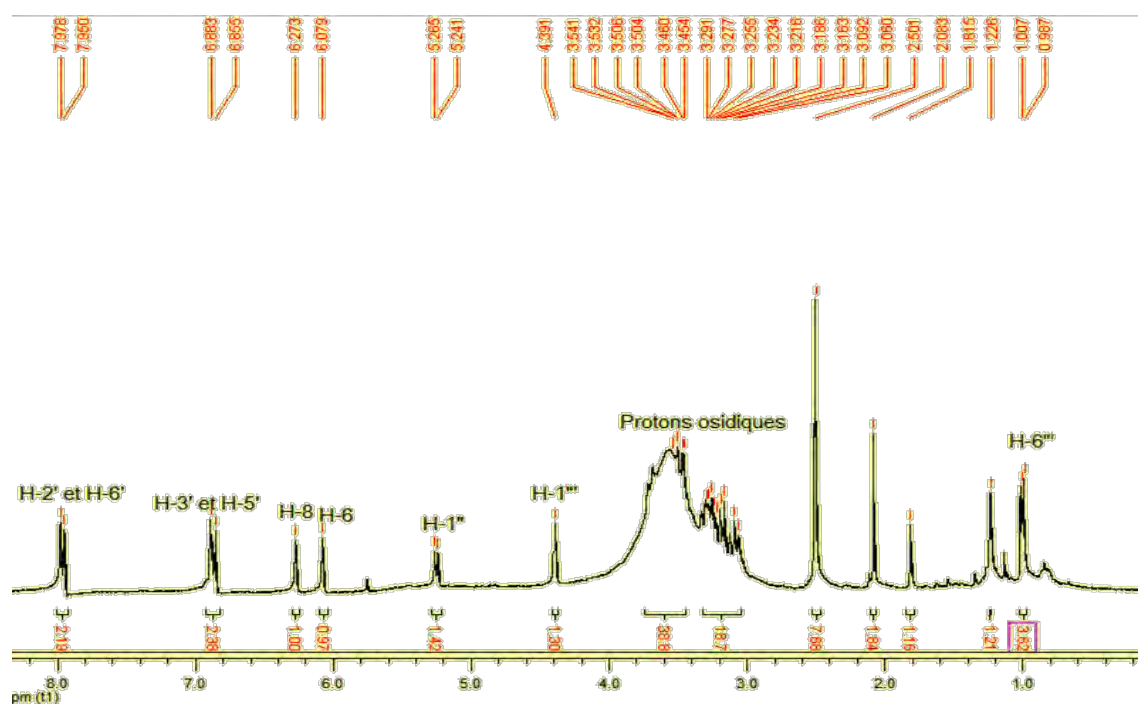


Figure IV-79 : Spectre RMN ^1H (300 MHz DMSO- d_6) du composé B5

Les déplacements chimiques des signaux attribuables au cycle B de la génine (différant de ceux du composé **B4**) nous permettent d'indiquer la présence d'un carbone quaternaire aromatique (δ_C 121.5 ppm), d'un carbone quaternaire aromatique portant un groupement hydroxyle (δ_C 160.6 ppm) et de quatre CH aromatiques deux à deux superposés à δ_C 131.5 et 115.8 ppm. L'équivalence des signaux confirme que le groupement hydroxyle se situe en position 4'

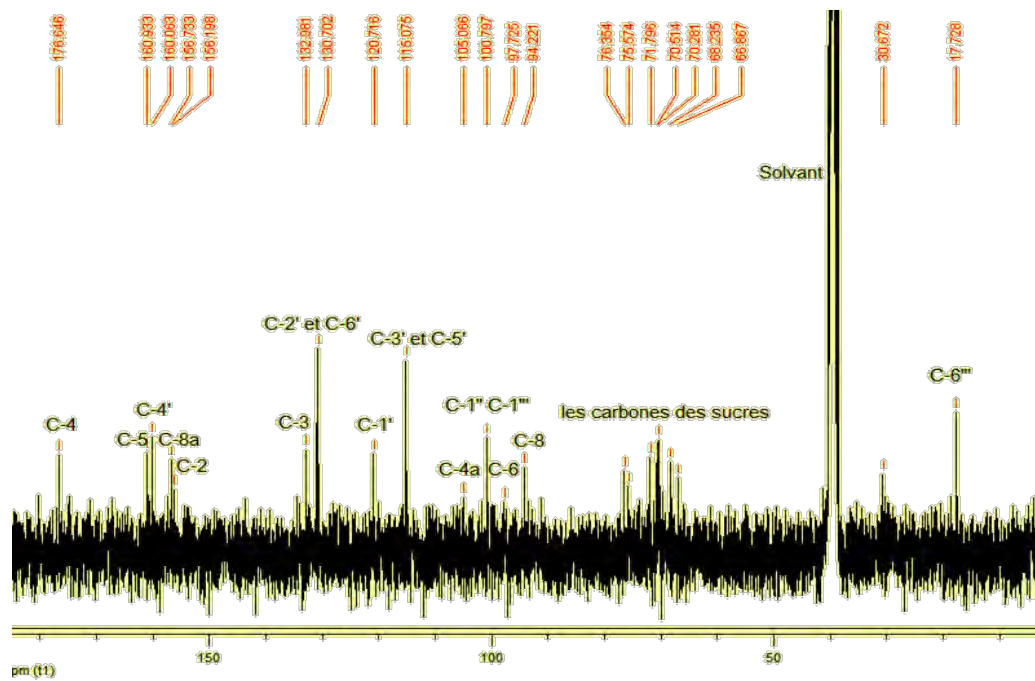


Figure IV-80 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz DMSO-d6) du composé B5

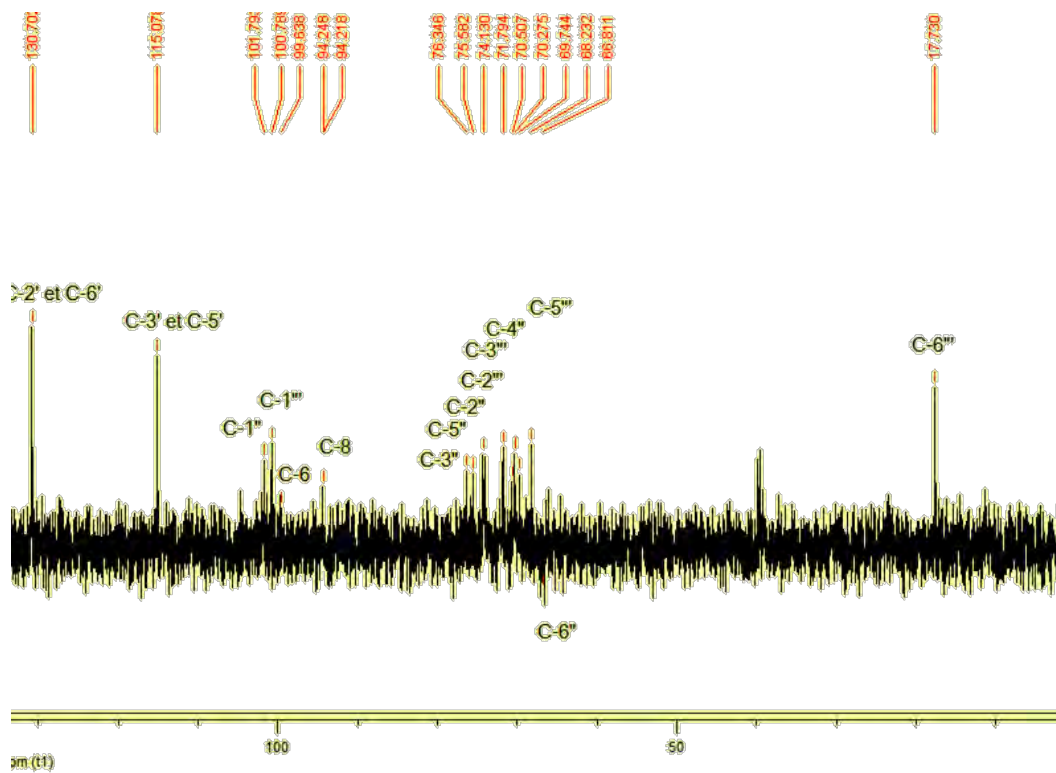


Figure IV-81 : Spectre DEPT 135 du composé B5

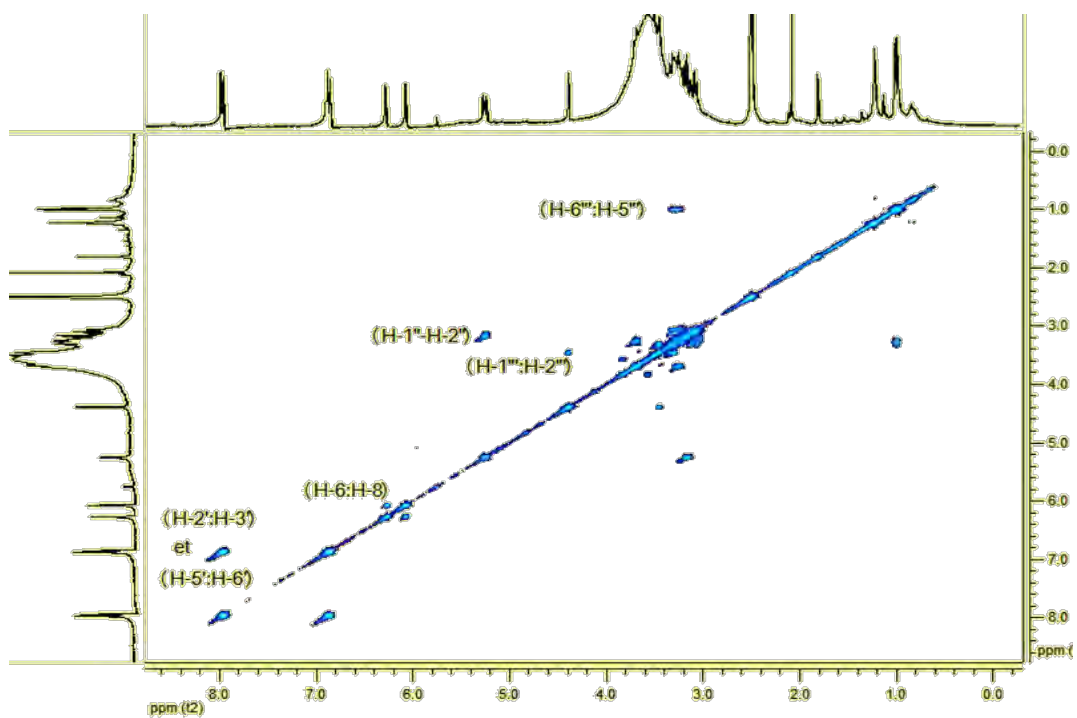


Figure IV-82 : Spectre COSY du composé B5

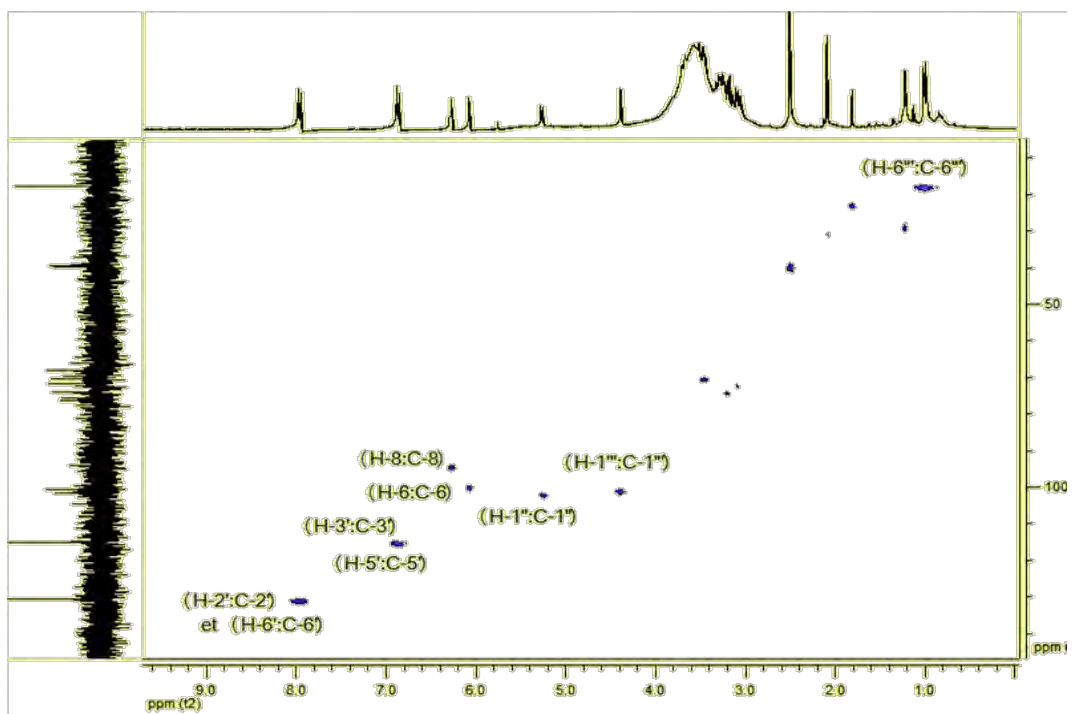


Figure IV-83 : Spectre HMQC du composé B5

Position	¹ H, δ (ppm), m	J (Hz)	¹³ C, δ (ppm)	Cosy
2			156,19	
3			132,96	
4			176,64	
5			160,93	
6	6,07	/	97,72	H-8
7				
8	6,27	/	94,22	H-6
8a			156,73	
4a			105,06	
1'			120,71	
2'	7,97 (d)	8,28	130,70	H-3'
3'	6,88 (d)	8,28	115,07	H-2'
4'			160,06	
5'	6,88 (d)	8,28	115,07	H-6'
6'	7,97 (d)	8,28	130,70	H-5'
1''	5,26 (d)	7,14	101,79	H-2''
2''			74,13	
3''			76,34	
4''			70,27	
5''			75,58	
6''			66,81	
1'''	4,39		100,78	H-2'''
2'''			71,79	
3'''			70,50	
4'''			71,71	
5'''			68,23	
6'''	0,98 (d)	6,0	17,73	

Tableau IV-15 : Données spectrales du composé B5

Nous avons comparé l'ensemble des données RMN (^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, et HMQC, du composé **B5** avec celles du composé **B4** et celles-ci ne diffèrent qu'au niveau des signaux du cycle B. Le reste des signaux et notamment les signaux de la zone des sucres étaient identiques.

Par comparaison avec les données de la littérature [23], le composé **B5** est identifié comme étant le *kaempférol-3-O- β -rutinoside* aussi appelé *nicotiflorine*

Reference

1. Chatterjee, J. Banerji and S. C. Basu, (1972). *Tetrahedron*, 5, 175.
2. Nielsen, B. E., and. Tidsskr. Farm., (1970). *Chem. Abstr.*, 74, 20314.
3. Benahmed M., Akkal S., Louaar S., Laouer and Duddeck (2006), *Biochem. Syst. Ecol.* 34: 645-647.
4. Atta-ur-Rahman, M. Iqbal Choudhary, Safdar Hayat, A. Majeed Khan, Aftab Ahmad, Shahid Malik (1999). *Phytochemistry*, 52, 495-499.
5. Heneka B., Rimpler H., Ankli A., Sticher O., Gibbons S., Heinrich M. (2005), *Phytochemistry* 66, 649-652.
6. Ngunde Ngwendson, J., Bedir, E., Efang S. M. N., Okunji, C. O., Iwu M. M., Schuster B. G., and Khan I. A. (2003), *Pharmazie*, 58, 587-589.
7. Elgamal M. H., Elewa N. H., Elkhrisy E. A. M. and Duddeck H. (1979), *Phytochemistry*, 18, 139-143.
8. Tosun F., Kizilay C. A., Erol K., Sultan F., Kurkuçuoğlu M. and Baser K. H. C. (2008), *Food Chemistry* 107, 990 -993.
9. Mahuzier F., Carreau O., Pascal M., Machali C., Lebret P., Locq S., Forlot P., (1989), in: T.B. Fitzpatrick, P. Forlot, M.A. Pathak, F. Urbach (Eds.), *Psoralens, Past, Present and Future of Photochemoprotection and other Biologi-cal Activities*, John Libbey Eurotext, Paris, p. 263.
10. Barnes C. S., and Occolowitz, J. L., (1964). *Aust. J. Chem.*, 17, 975.
11. Furuya, T., and Kojima, H., (1967). *J. Chromatogr.*, 29, 382.
12. Stevenson P. C., Simmonds M. S. J., Yule M. A., Veitch N. C., Kite G. C., Irwin D., and Legg M. (2003), *Phytochemistry* 63, 41-46.
13. Al-Barwani F.M., and Eltayeb E.A. (2004), *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 1097 -1108.
14. Wei Y., Zhang T. and Ito Y. (2004), *Journal of Chromatography* 1033, 373–377.
15. Hitotsuyanagi Y., Kojima H., Ikuta H., Takeya K. and Itokawa H. (1996), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 6, No. 15, 1791-1794.
16. Harkar S., Razdan T. K. and Waight E. S. (1984), *Phytochemistry*, 23, 429-426.
17. Niu X. M., Hongli S. and Jiang B. (2002), *Journal of Asian Products Research* 4, 1, 33-41.
18. Anna Rita Bilia, Lucia Ciampi, Jeannette Mendez and Ivano Morelli (1996), *Pharmaceutica Acta Helvaticae* 71, 199-204.

19. Barrero A. F., Haidour A., Munoz-Dorado M., Akssira M., Sedqui A. and Mansour I. (1998), *Phytochemistry* 48, 7, 1237-1240.
20. Markham, K.R. (1982), *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
21. Harbone J. B. (1986), *The flavonoids: Advances in research Since*. Champon and Hall London.
22. Markham K. R., Ternay B., Stanley R., Geiger H. and Mabry T. J. (1978), *Tetrahedron*. 34, 1389-1397.
23. Sang S., Lapsley K., Jeong W., Lachance P., Ho C., and Rosen R. (2002), *J. Agric. Food Chem.* 50, 2459-2463.
24. Kubota T. and Hase T. (1956), *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ. Ser. C*, 5, 49.

CONCLUSION

A l'issue de la présente recherche qui représente une contribution à l'étude phytochimique de certaines plantes endémique de la flore Algérienne. *Carum montanum* Coss. & Dur. et *Bupleurum montanum* Coss., famille des Apiacées.

L'objectif était : d'une part, atteindre des structures nouvelles pour ces représentants de la flore Algérienne et d'autre part évaluer l'importance de cette dernière.

La mise en place de techniques chromatographiques classiques de fractionnement des extraits des parties aériennes de *C. montanum* a conduit à l'isolement de neuf composés. En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC), et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu identifier les structures de huit composés comme suit :

- 8-méthoxy-5-O- β -D-glucosylpsoralène (nouveau produit)
- Nothoapiole
- Isopimpinelline
- Isobergapten.
- Xanthotoxine
- Osthole
- Bergaptène
- 8-hydroxy-5-O- β -D-glucosylpsoralène (rapporté pour la première fois dans le genre).

De la même manière, le traitement des parties aériennes de l'espèce *B. montanum* a révélé la présence de quatre flavonoïdes dont deux hétérosides et un acide :

- Quercétine
- Tamarixetine
- acide 3, 4-dihydroxy benzoïque.
- 3'-O-Methylquercitin 3- O- β -rutinoside
- kaempférol-3-O- β -rutinoside

Cette étude a permis de mieux connaître la chimie de deux plantes endémiques de la flore Algérienne. Seule une faible partie des espèces de la flore Algérienne a été caractérisée du point de vue phytochimique. Les sujets d'étude dans ce domaine ne manquent donc pas et

chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacochimiques originales à valoriser.

ملخص

هذا العمل مخصص للدراسة الكيميائية لجنسين أصيلين من العائلة الخيمية؛ *Carum montanum* Coss. & Dur. و *Bupleurum montanum* Coss. و قد سمحت لنا دراسة الأجزاء الهوائية لنبات *C. montanum* فصل ثماني مركبات كومارينية فيها مركب لطيفي نويدي فيصم لأول مرة و مركب آخر جديد في النوع و الجنس. أما دراسة الأجزاء الهوائية لنبات *B. montanum* فقد أدى إلى فصل و تحديد أربعة فلافونويدات و مركب حمضي. تم التعرف على بنية هذه المركبات باستخدام مطيافية الرنين النووي المغناطيسي؛ مطيافية الكتلة و كذلك عن طريق الأماهة الحمضية.

كلمات مفتاحية: Apiaceae, *Bupleurum*, *Carum*, Flavonoïdes, Furanocoumarines

Summary

This report contributes to complete the phytochemical study of two endemic species, of apiaceae family: *Carum montanum* Coss. & Dur. and *Bupleurum montanum* Coss. Eight coumarinic compounds were isolated from the aerial parts of the *C. montanum* species, one of them is a new natural compound and another is reported for the first time in the genus. The study of the aerial parts of *B. montanum* led to the isolation and characterization of an acid and four flavonoïdes (Quercitin, tamarixetin, narcissin and nicotiflorine). The structures of the compounds were elucidated by the use of techniques of NMR 1D and 2D, mass spectrometry and acid hydrolysis.

Key Words: Apiaceae, Bupleurum, Carum, Flavonoids, Furanocoumarins.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux espèces, endémique, des Apiacées : *Carum montanum* Coss. & Dur. et *Bupleurum montanum* Coss. Huit composés coumariniques ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *C. montanum* dont, un furanocoumarine glucoside est nouveau composé naturel et un autre rapporté pour la première fois dans le genre. Cinq composés ont été identifiés des parties aériennes de l'espèce *B. montanum* : Quercétine, Tamarixetine, Narcissin, nicotiflorine et 3, 4 dihydroxy- acide benzoïque. Les structures des composés ont été élucidées par l'utilisation de techniques de RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse et par hydrolyse acide.

Mots clés : Apiaceae, *Bupleurum*, *Carum*, Flavonoïdes, Furanocoumarines