

### **Description botanique du genre *Asteriscus***

Le genre botanique méditerranéen *Asteriscus* appartient à la famille des Asteraceae, les fleurs (ou fleurons) sont groupées sur un capitule entouré d'un involucre de bractées. Elles sont de couleur jaune, les périphériques ligulées, celles du disque central tubulées. Les feuilles, simples, sont alternes, plus ou moins lancéolées. Les bractées, semblables aux feuilles supérieures, se terminent par une pointe ou par une épine.

### **III.1.2. Présentation de l'espèce *Asteriscus maritimus***

Appelée en Algérie « Kerkeba », originaire du Portugal, de la Méditerranée occidentale, la Grèce et les îles Canaries. On la retrouve à l'état sauvage principalement dans les zones arides et rocheuses et sur les falaises du bord de mer. De son vrai nom *Odontospermum maritimum*, il s'agit d'une petite vivace à tiges très ramifiées, qui portent un feuillage persistant vert bleuté et se couvrent d'avril à septembre d'une multitude de jolies fleurs d'un jaune soleil. Elle reste basse (25 cm environ) et résiste également à la sécheresse [1]. Une plante trop peu employée, idéale pour les jardins secs, comme couvre sol ou en bordure.

### **III.1.3. Classification dans la systématique botanique**

Royaume	Plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermatophytes
Classe	
Sous-classe	Dicotylédones
Ordre	Astériidae Astérales
Famille	Asteraceae
Sous famille	Asteroideae
Genre	<i>Asteriscus</i>
Espèce	<i>Asteriscus maritimus</i>

### **III.1.4. Flavonoïdes isolés du genre *Asteriscus***

Le genre *Asteriscus* a fait l'objet de certaines études de la composition chimique, le criblage de différents constituants a commencé par la détermination des sesquiterpènes lactones (Asteriscunolides A–D, Aquatolide, Naupliolide.....etc. isolés à partir de plusieurs espèces (*A. aquaticus*, *A. graveolens*, *A. sericeus*, *A. vogelii*, [2-5], *A. schimperi* [6] et *A.*

*pygmaeus*) [7]. Quelques flavonoïdes ont été isolés à partir du genre *Asteriscus* (L'espèce *A. graveolens*) (Tableau III.1.)

**Tableau III.1. :** Flavonoïdes isolés du genre *Asteriscus*

Flavonoïdes	Plantes	Réf.
Luteoline 7-o-glucoside	<i>Asteriscus graveolens</i>	[8]
Luteoline 3-o-glucoside		
Luteoline 7-o-galactoside		
Kaempferol-7-o-glucoside		
Quercétine 7-o-glucoside		
3,6,3' trimethyl ether queretagine		

## Description des travaux et discussion des résultats

### III.2.1. Choix du matériel végétal

La partie aérienne d'*Asteriscus maritimus* (voir figure III.1) a été récoltée de façon aléatoire dans la région côtière (Ain-Achir), Annaba (Algérie). Cette plante a été choisie pour plusieurs critères :

- Elle constitue un patrimoine local floristique très important et qu'elle n'est en grande partie décrite que d'un point de vue botanique.
- L'endémisme de l'espèce *Asteriscus maritimus* de la côte algérienne, dont le climat et le type d'écosystème offre des caractéristiques et des spécificités non négligeables à la végétation.
- Notre intérêt prononcé au genre *Asteriscus* pour sa capacité d'accumulation de molécules (Sesquiterpènes, flavonoïdes etc.....) à activités biologiques potentielles.



**Figure III.1:** Photographie d'*Asteriscus maritimus*

La plante a été récoltée au mois d'Avril 2007. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Bélair (Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba). Un échantillon a été déposé au laboratoire d'obtention des substances thérapeutiques (Constantine) sous la référence (LOST/A.m./04/07). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été pulvérisées et pesées (1000g).

1000g de la partie aérienne de la plante pulvérisée sont mis à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/Eau ; 70:30, v/v) pendant 3 jours à la température ambiante.

Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 45°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

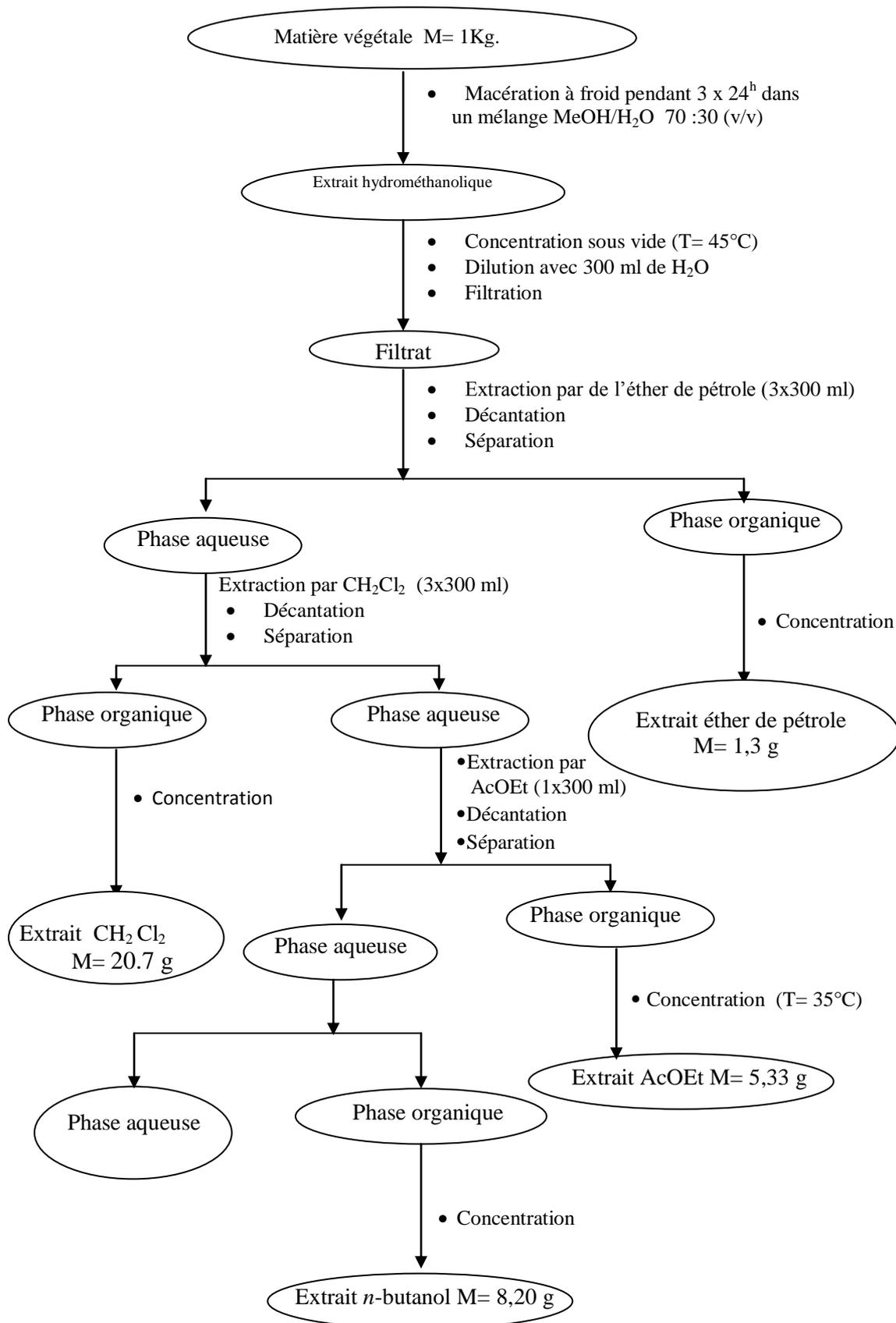
Les trois extraits hydro-alcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute 300ml d'eau. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc.... Après filtration, on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (ether de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

Les phases organiques récupérées sont séchées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le Tableau III.2.

**Tableau III.2 :** Rendement des extractions

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
1000 g	éther de pétrole	1.3	0.13
	dichlorométhane	20.7	2.07
	acétate d'éthyle	5.33	0.53
	<i>n</i> -butanol	8.20	0.82

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure III.2.



**Figure III.2 :** Protocole d'extraction des parties aériennes d'*Asteriscus maritimus*

## Séparation chromatographique

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats.

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanolique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium et polyamide, qui a montré que la phase acétate et *n*-butanolique sont très proches. Pour cela, notre choix s'est basé sur la phase *n*-butanolique.

Une masse de 8.2 g d'extrait *n*-butanolique est déposée sur une colonne de gel polyamide SC<sub>6</sub> préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-méthanol en commençant par le toluène pur et en terminant par le méthanol pur. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium en utilisant divers systèmes d'élution. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées par la vanilline sulfurique.

Les fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.3.

**Tableau III.3:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanolique d'*Asteriscus maritimus*.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		Observation
		% Toluène	% Méthanol	
1-2	F01	100	0	Cires et cristaux blancs
3-19	F02	98	2	Mélange complexe
20-34	F03	96	4	Mélange séparable
35-46	F04	92	8	Mélange séparable
47-60	F05	88	12	Mélange complexe
61-72	F06	85	15	Mélange complexe
73-113	<b>F07</b>	80	20	Mélange séparable
114-139	<b>F08</b>	75	25	Mélange séparable
140-162	<b>F09</b>	70	25	Mélange séparable
163-187	<b>F10</b>	60	30	Mélange séparable
188-194	F11	55	45	Mélange complexe
195-200	F12	45	55	Mélange complexe
201-209	F13	20	80	Mélange complexe
210-216	F14	0	100	Mélange complexe

Le regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanolique a été testé sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant divers systèmes d'élution.

Parmi les 14 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions F07, F08, F09 et F10 et ce, soit pour leur simplicité, soit pour leur poids relativement important.

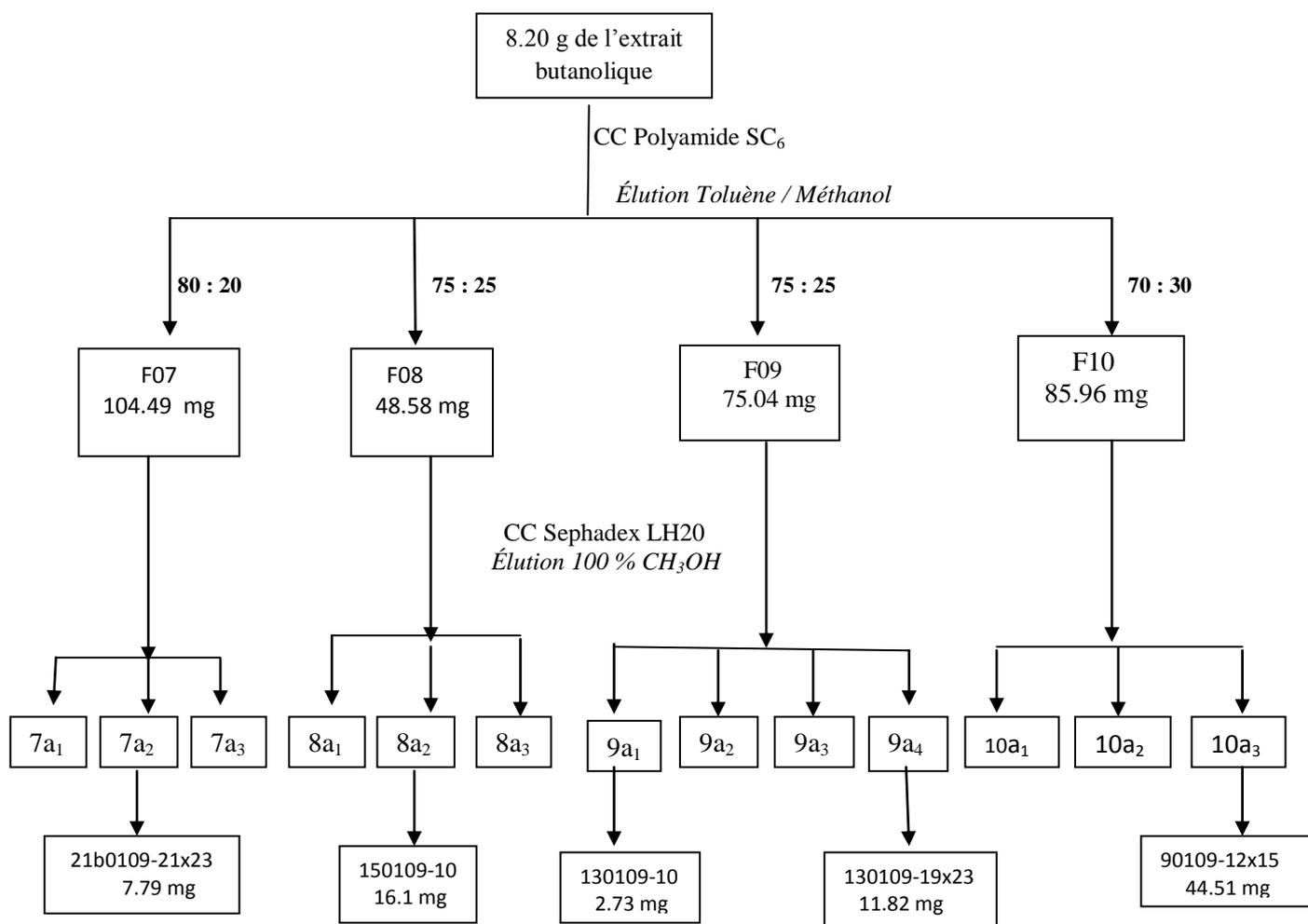
Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions ont été purifiées par chromatographie sur colonne de séphadex LH-20 et éluées par le méthanol filtré.

La séparation par chromatographie sur colonne a été suivie par un contrôle des fractions sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant le système de séparation (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ eau : 80/5/5/10).

L'examen des plaques est réalisé sous lumière UV à 254 nm et 365nm, Les sous fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées.

Trois sous fractions ont été obtenues séparément à partir de F07, F08 et F10, par contre la fraction F09 a donné quatre sous fractions.

La progression de cette colonne est rassemblée dans l'organigramme suivant :



Une seule bande de fluorescence jaune sous lampe Wood a été séparée, purifiée sur colonne de séphadex LH 20 à partir des sous-fractions 7a<sub>1</sub>, 8a<sub>1</sub>, 9a<sub>4</sub> et 10a<sub>3</sub>; une fluorescence violette caractérise la sous fraction 9a<sub>1</sub>.

L'utilisation de cette technique chromatographique a conduit respectivement à l'isolement de cinq produits en état pur : 21b0109-21x23, 150109-10, 130109-10, 130109-19x23 et 90109-12x15).

Le composé 9010912x15 semble être le constituant majoritaire, présentant une masse de 44,51 mg. Les autres produits présentent des valeurs qui oscillent entre 2,73 et 11,82 mg.

Les sous-fractions restantes se présentent, soit en faible quantité, soit elles ont des R<sub>f</sub> très proches et les tentatives de séparations ont échoué.

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques particulièrement la RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC.

### III.2.3. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés

#### a. Elucidation de la structure du composé 150109-10

##### • Analyses physico-chimiques

- Poudre de couleur jaune fluorescent, Fluorescence sous lampe Wood : Jaune
- R<sub>f</sub> = 0,43 dans le système (Acétate d'éthyle/H<sub>2</sub>O/MeOH : 9:1:1) et R<sub>f</sub> = 0.50 dans le système (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ H<sub>2</sub>O: 80 :5:5:10)

##### • Analyses spectroscopiques

Dans le spectre de RMN <sup>1</sup>H du composé 150109-10, enregistré dans le méthanol (Spectre N°a.1), on observe dans la région des aromatiques, la présence de système ABX du cycle B : δ<sub>H</sub> = 7.74 ppm (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), δ<sub>H</sub> = 7.64 ppm (1H, dd, J = 8.5 Hz et J = 2.2 Hz, H-6') et δ<sub>H</sub> = 6.87 ppm (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'.

Un singulet à δ<sub>H</sub> = 6.84 ppm correspond soit au proton H-6 ou au proton H-8, toutefois le spectre HSQC étalé, (Spectre N°a.5) montre que ce proton est corrélé au carbone dont le signal apparaît à δ<sub>C</sub> = 95.5 ppm, il ne peut être donc attribué qu'au carbone 8.

La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à δ<sub>H</sub> = 3.89 ppm et confirmée par la RMN du <sup>13</sup>C (Spectre N°a.2), par l'apparition d'un carbone à δ<sub>C</sub> = 61.6 ppm.

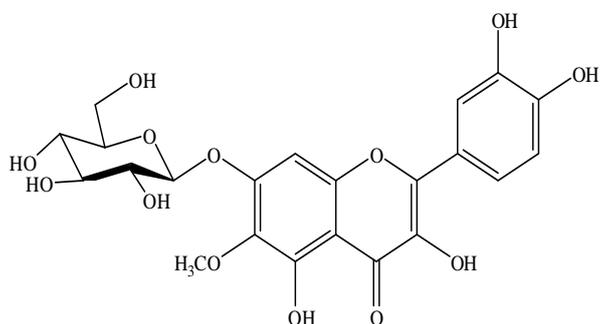
Un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à δ<sub>H</sub> = 5.1 ppm (J = 7.3 Hz, 1H). Le même spectre permet notamment l'observation d'un signal à δ<sub>C</sub> = 102.1 ppm correspondant au carbone anomérique de glucose. La présence de cinq C en RMN du <sup>13</sup>C à δ<sub>C</sub> = 74.8 ppm (C-2"), δ<sub>C</sub> = 78.6 ppm (C-3"), δ<sub>C</sub> = 71.4 ppm (C-4"), δ<sub>C</sub> = 78.0 ppm (C5")

et  $\delta_c = 62.6$  ppm (C-6''), permet de confirmer la présence d'un seul sucre, notamment le glucose [9].

L'expérience HMBC (Spectres N°a.7) permet de déterminer les positions des constituants de la molécule. Le signal à  $\delta_H = 5.1$  ppm (H-1'') de proton anomérique du glucose est corrélé avec le signal à  $\delta_c = 157.7$  ppm (C-7) de l'aglycone, indiquant que la position C-7 de l'aglycone est glycosylée. De plus le signal du méthoxyle à  $\delta_H = 3.89$  ppm est corrélé avec le signal C-6 à  $\delta_c = 133.4$  ppm du cycle A, indiquant que le groupe méthoxyle est attaché à la position C-6 et non à C-8.

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétiques nucléaires bidimensionnelles (HSQC, HMBC).

Ces données ont permis d'établir la structure du composé 150109-10 comme étant le 6-méthoxy-7-O- $\beta$ -glucosyl-quercétine.

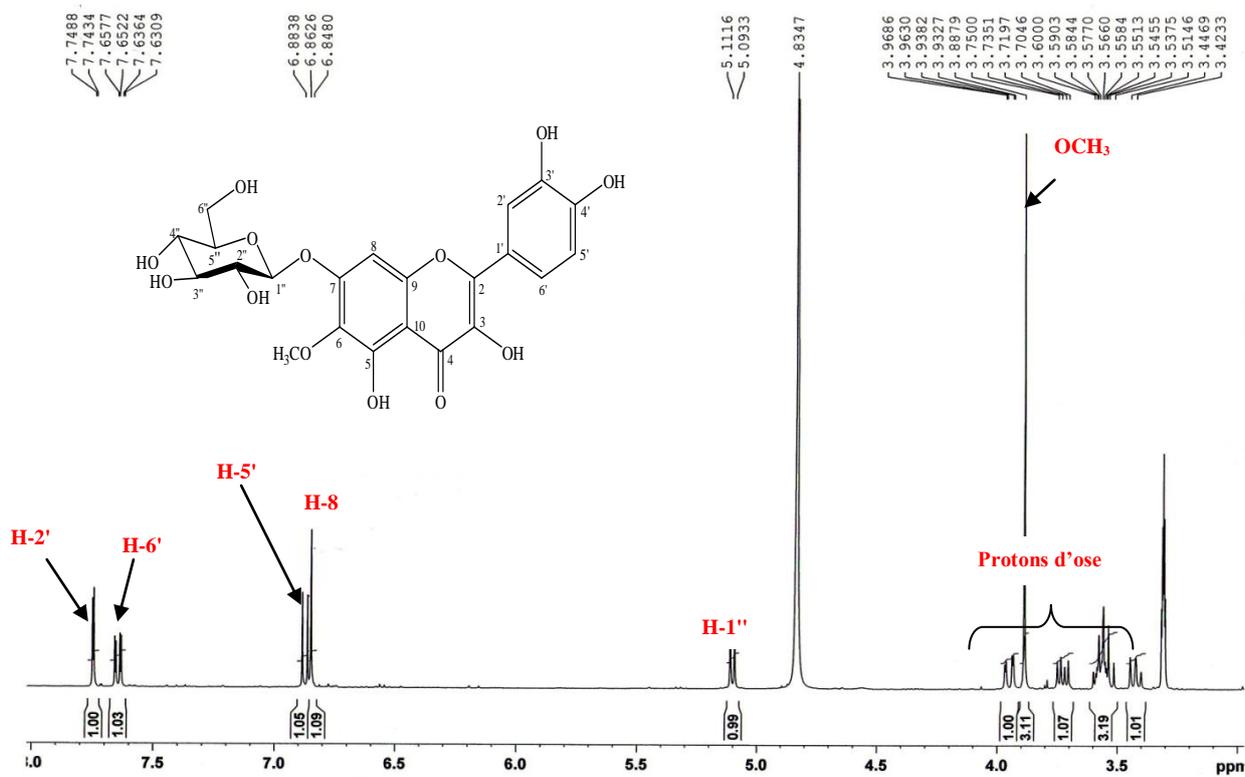


6-méthoxy-7-O- $\beta$ -glucoside-quercétine

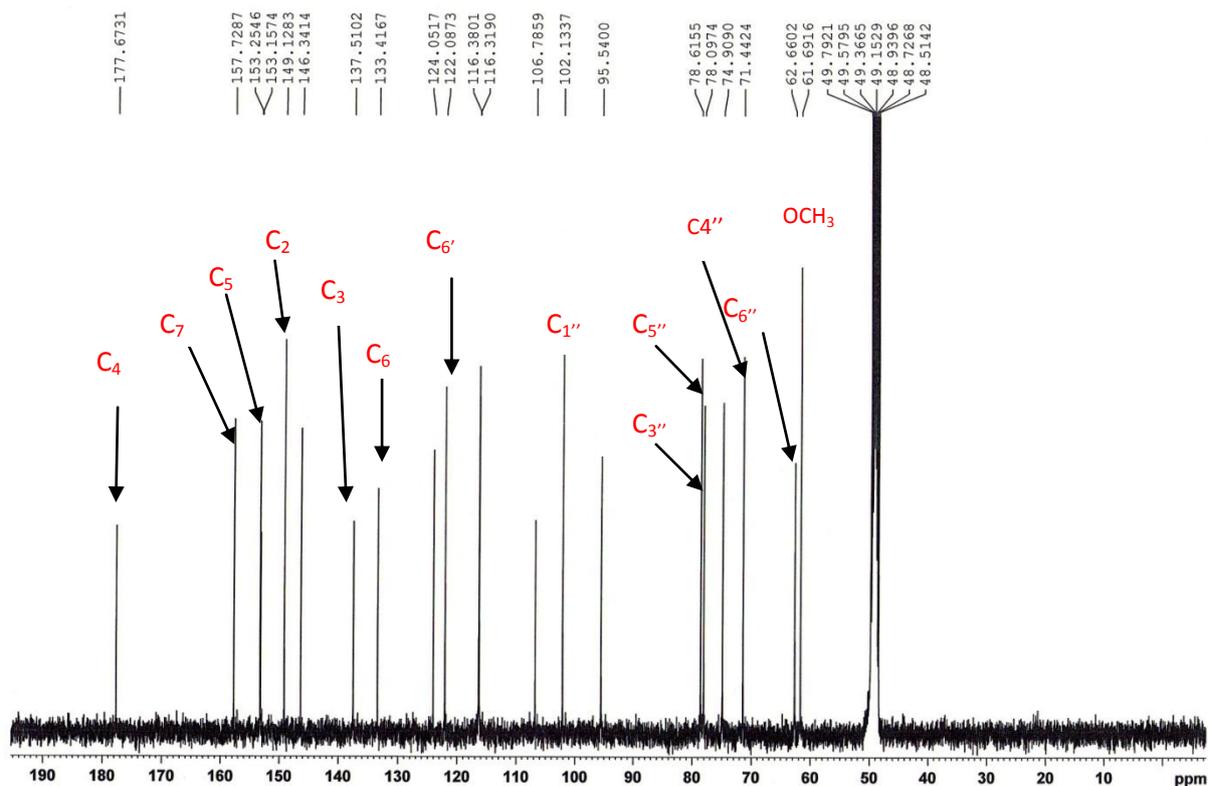
Les données de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentées dans le tableau III.4.

**Tableau III.4 :** RMN du H<sup>1</sup> et du C<sup>13</sup> (400 MHz,  $\delta$ ,  $J$ , en Hz ; 100 MHz,  $\delta$ ) du composé 150109-10 dans le CD<sub>3</sub>OD.

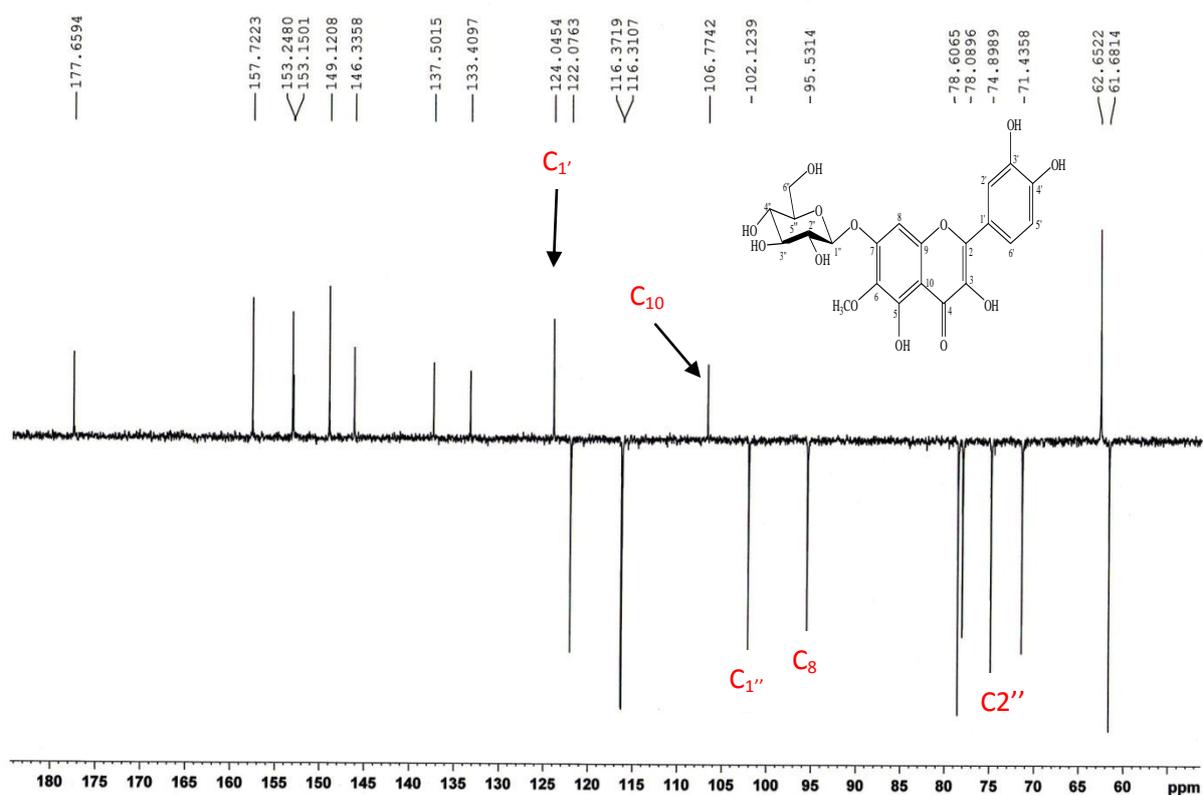
Génine	Composé 150109-10	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
	$\delta$ (ppm)	
2	-	149.1
3	-	137.5
4	-	177.6
5	-	153.2
6	-	133,4
7	-	157.7
8	6.84 <i>s</i> (1H)	95.5
9	-	153.1
10	-	106.7
1'	-	124.0
2'	7.74 <i>d</i> ( $J= 2.2$ Hz, 1H)	153.2
3'	-	146.3
4'	-	149.1
5'	6.87 <i>d</i> ( $J= 8.5$ Hz, 1H)	153.2
6'	7.64 <i>dd</i> ( $J= 8.5$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	122.0
G <sub>1</sub> ''	5.1 <i>d</i> ( $J= 7.3$ Hz, 1H)	102.1
G <sub>2</sub> ''	3.58 <i>t</i> ( $J= 9.2$ Hz)	74.8
G <sub>3</sub> ''	3.54 <i>t</i> ( $J= 9.2$ Hz)	78.6
G <sub>4</sub> ''	3.42 <i>brt</i> ( $J= 9.4$ Hz ; $J= 9.8$ Hz, 1H)	71.4
G <sub>5</sub> ''	3.56 <i>m</i>	78.0
G <sub>6</sub> ''	<b>a:</b> 3.72 <i>dd</i> ( $J= 12.2$ Hz ; $J= 6.0$ Hz, 1H) <b>b:</b> 3.95 <i>dd</i> ( $J= 12.2$ Hz ; $J= 2.2$ Hz, 1H)	62.6
OCH <sub>3</sub>	3.89 <i>s</i> (3H)	61.6



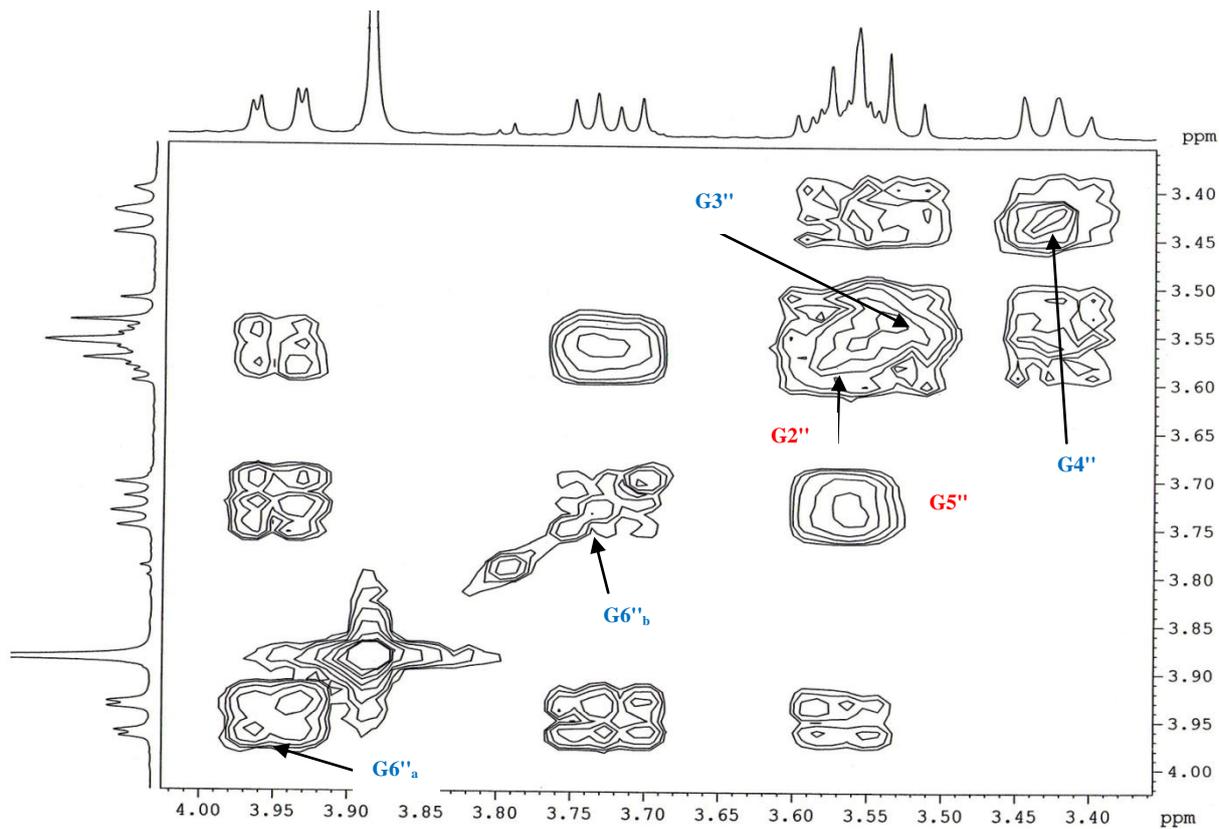
Spectre a.1 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 150109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



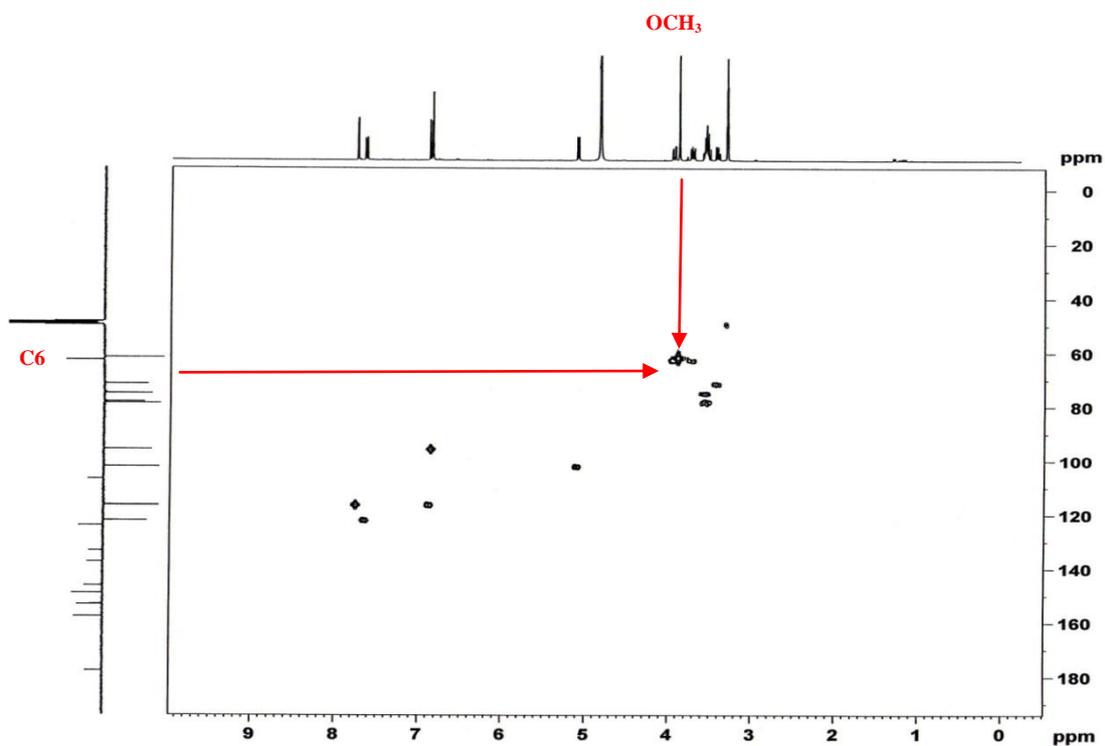
Spectre a.2 : Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé 150109-10 (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



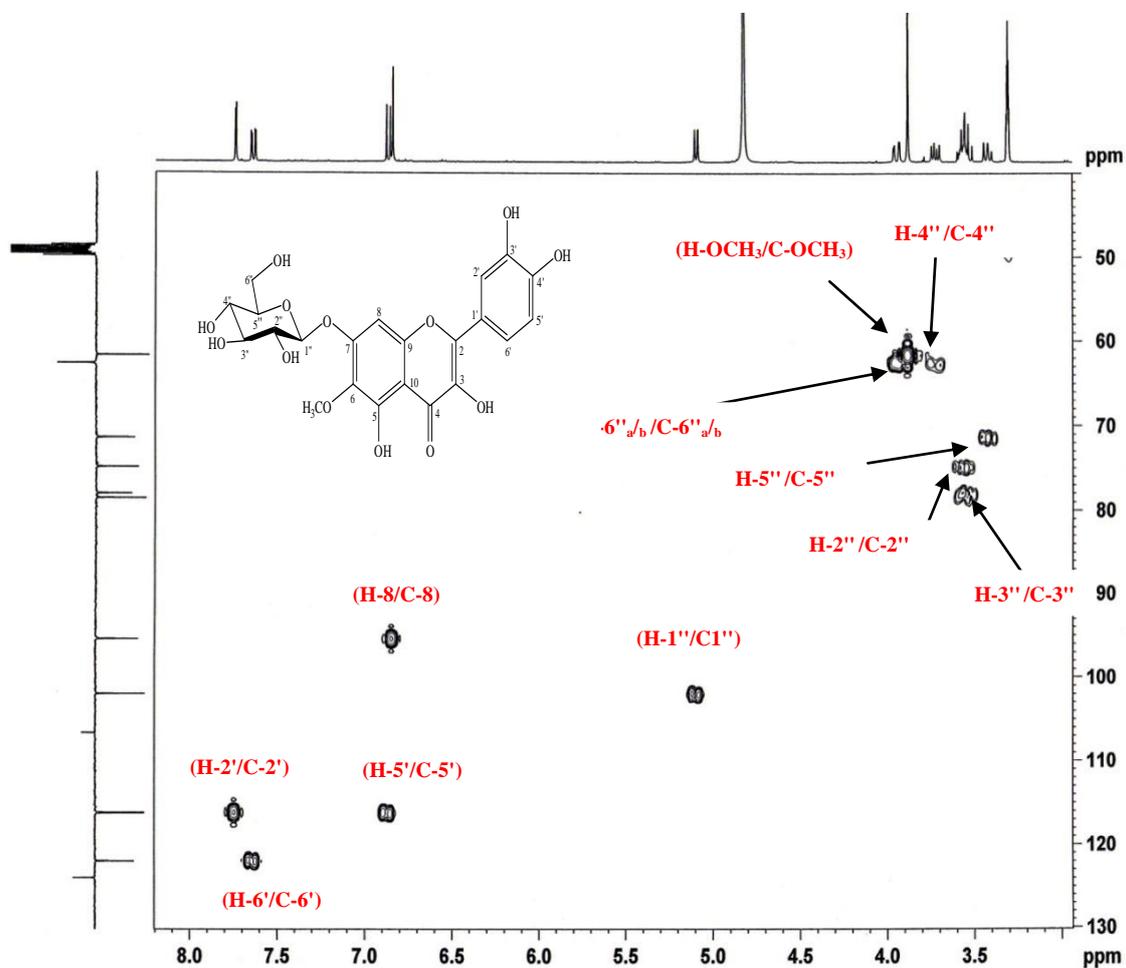
**Spectre a.3 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 étalé (60 à 180 ppm) du composé 150109-10 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



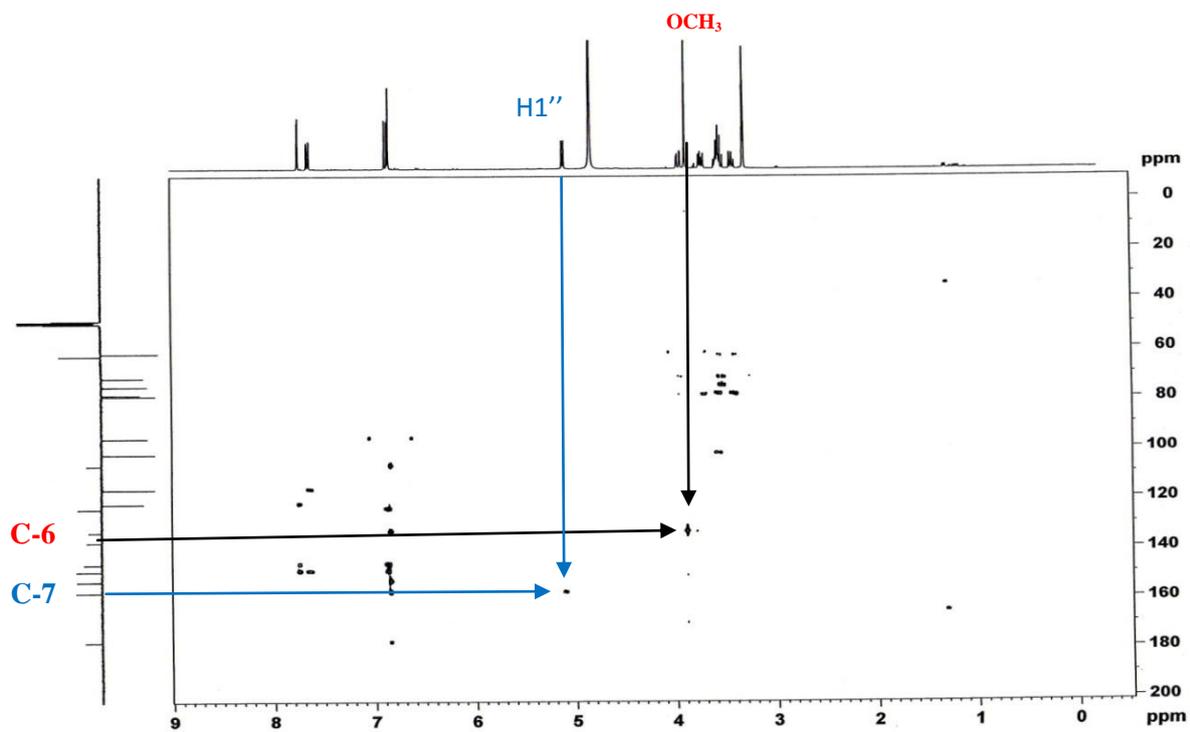
**Spectre a.4 :** Spectre Cosy étalé (3.4 à 4.0 ppm) du composé 150109-10 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



Spectre a.5 : Spectre HMQC du composé 150109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



Spectre a.6 : Spectre HMQC étalé (50 à 130 ppm) du composé 150109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



Spectre a.7 : Spectre HMBC du composé 150109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

## b. Elucidation de la structure du composé 21 B 0109-21 à 23

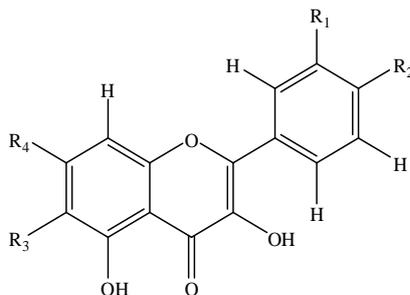
### •Analyses physico-chimiques

- Fluorescence sous lampe Wood : Jaune.
- $R_f = 0.46$  dans le système (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ H<sub>2</sub>O: 100 ml/ 5ml/ 5ml/ 10 ml).

### •Analyses spectroscopiques

Au niveau du spectre de RMN du <sup>1</sup>H (Spectre b.1), on observe un système ABX :  $\delta_H = 6.89$  ppm (d,  $J = 8.5$  Hz, H-5') ;  $\delta_H = 7.75$  ppm (d,  $J = 2.2$  Hz, H-2') ;  $\delta_H = 7.64$  ppm (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, H-6'). Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. La présence de deux méthyles est caractérisée par l'apparition d'un singulet à  $\delta_H = 3.88$  ppm (méthoxyle) et d'un doublet à  $\delta_H = 1.04$  ppm (méthyle), cela est confirmé respectivement par la RMN du <sup>13</sup>C (Spectre b.2) par la résonance d'un carbone à  $\delta_C = 61.6$  ppm et d'un carbone à  $\delta_C = 13.9$  ppm.

Un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à  $\delta_H = 5.10$  ppm ( $J = 7.3$  Hz). Le singulet résonnant à  $\delta_H = 6.84$  ppm est attribué à H-8 de l'aglycone. Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Quant au spectre de RMN du <sup>13</sup>C, il permet de distinguer les signaux correspondant au glucose et ceux de la génine. Les déplacements chimiques à  $\delta_C = 74.8$  ppm (C-2''),  $\delta_C = 77.8$  ppm (C-3''),  $\delta_C = 71.7$  ppm (C-4''),  $\delta_C = 75.8$  ppm (C-5'') et  $\delta_C = 65.1$  ppm (C-6'') confirment la présence d'un seul ose, le glucose [9].

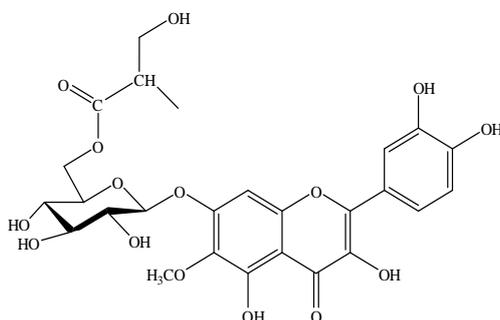
Concernant la nature et la position de l'ose substituant la génine, la comparaison des déplacements chimiques (en RMN du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C) et de la constante de couplage de la fonction hémiacétalique avec les données recueillies dans la littérature tend à indiquer qu'il s'agit d'un glucose branché sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine. Ceci est confirmé par l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Spectre b.6) qui montre la corrélation du carbone 7 ( $\delta_C = 157.6$  ppm) avec le proton H-1'' ( $\delta_H = 5.10$  ppm). De plus, le

signal du méthoxyle à  $\delta_H = 3.88$  ppm est corrélé avec le signal C-6 à  $\delta_C = 133.5$  ppm de l'aglycone, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché à la position C-6 lors de l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC.

La présence d'un signal d'un deuxième méthyle à  $\delta_H = 1.04$  ppm qui corrèle avec le signal d'une fonction CH qui apparaît  $\delta_C = 43.8$  ppm, avec une fonction cétonique qui apparaît à  $\delta_C = 176.5$  ppm et avec une fonction  $\text{CH}_2\text{OH}$  qui apparaît à  $\delta_C = 65.2$  ppm ceci indique la présence d'un groupement propanoyl branché en 6'' du glucose (Spectre b.6) à cause des taches de corrélations entre le carbonyle et les deux protons H-6''a et H-6''b

La structure du composé 21 B 0109-21 à 23 a donc pu être établie comme étant :

6-méthoxy-7-O- $\beta$ -[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucosyl]-quercétine : ce produit est nouveau, isolé et rapporté pour la première fois d'une source végétale.

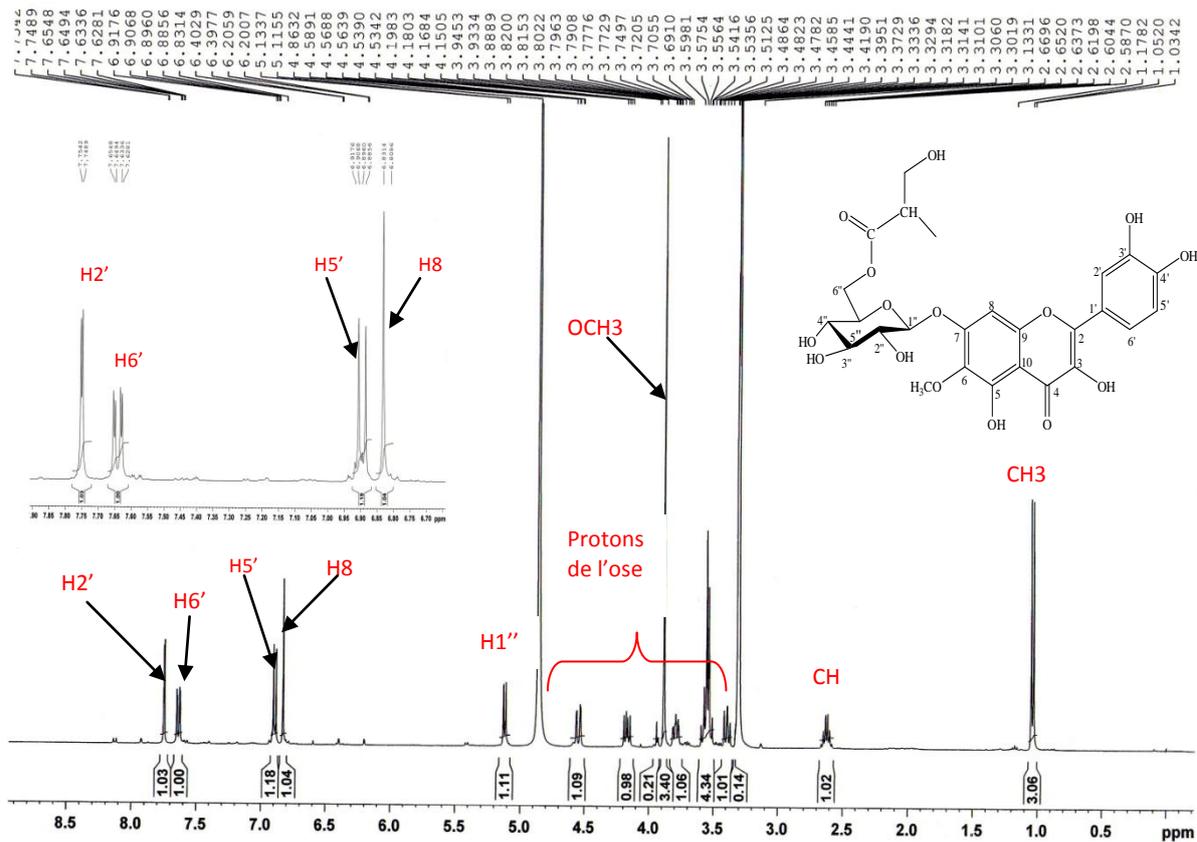


6-méthoxy-7-O- $\beta$ -[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucosyl]-quercétine

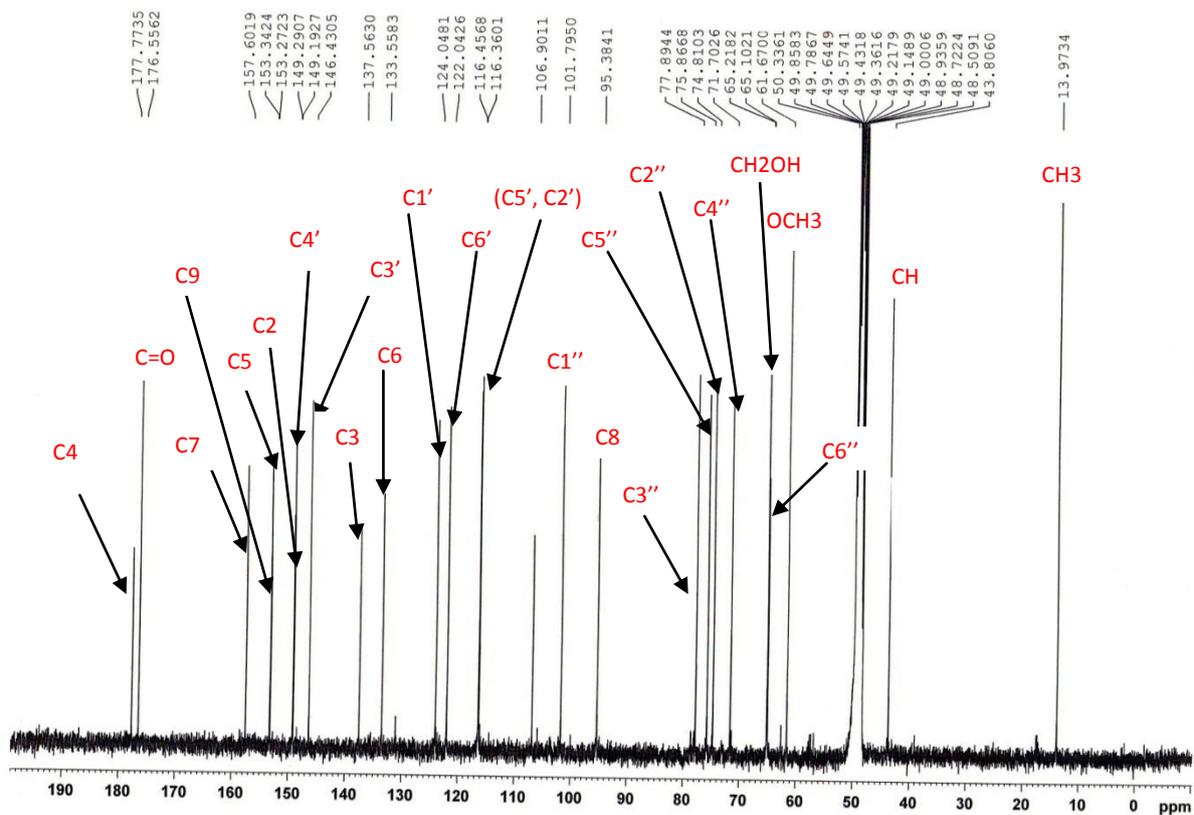
Les données de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentées dans le tableau III.5

**Tableau III.5 :** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\delta$ ,  $J$ , en Hz ; 100 MHz,  $\delta$ ) du composé **21B0109-21à2**

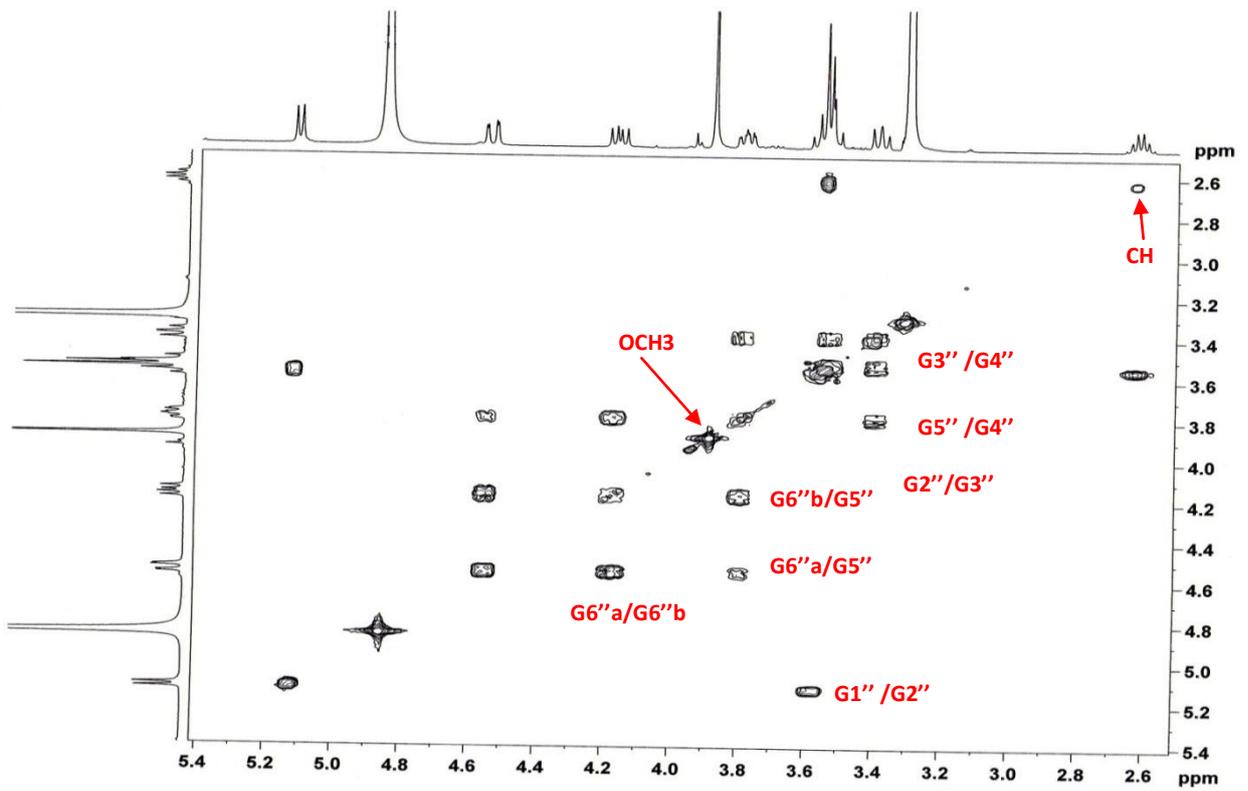
Génine	Composé 21B0109-21à23	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
	$\delta$ (ppm)	
2	-	149.2
3	-	137.5
4	-	177.7
5	-	153.2
6	-	133,5
7	-	157.6
8	6.84 <i>s</i> (1H)	95.3
9	-	153.3
10	-	106.9
1'	-	124.0
2'	7.75 <i>d</i> ( $J= 2.2$ Hz, 1H)	116.4
3'	-	146.4
4'	-	149.1
5'	6.89 <i>d</i> ( $J= 8.5$ Hz, 1H)	116.6
6'	7.64 <i>dd</i> ( $J= 8.5$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	122.0
OCH <sub>3</sub>	3.88 <i>s</i> (3H)	61.6
<b>Glucose</b>		
1''	5.10 <i>d</i> ( $J= 7.3$ Hz, 1H)	101.7
2''	3.57 <i>t</i> ( $J= 9.1$ Hz, 1H)	74.8
3''	3.53 <i>t</i> ( $J= 9,2$ Hz, 1H)	77.8
4''	3.4 <i>t</i> ( $J= 9,6$ Hz, 1H)	71.7
5''	3.8 <i>ddd</i> ( $J= 9,2; 7,2; 1,9$ Hz, 1H)	75.8
6''	a: 4.17 <i>dd</i> ( $J= 12.0$ Hz ; $J= 7.2$ Hz, 1H) b: 4.55 <i>dd</i> ( $J= 12.0$ Hz ; $J= 2.0$ Hz, 1H)	65.1
<b>Propanoyl</b>		
CH	2.63 Sextuplet ( $J= 7.0$ Hz , 1H)	43.8
CH <sub>3</sub>	1.04 <i>d</i> ( $J= 7.1$ Hz, 3H)	13.9
CH <sub>2</sub> OH	3,55 <i>d</i> ( $J= 5.9$ Hz, 2H)	65.2
C=O	-	176.5



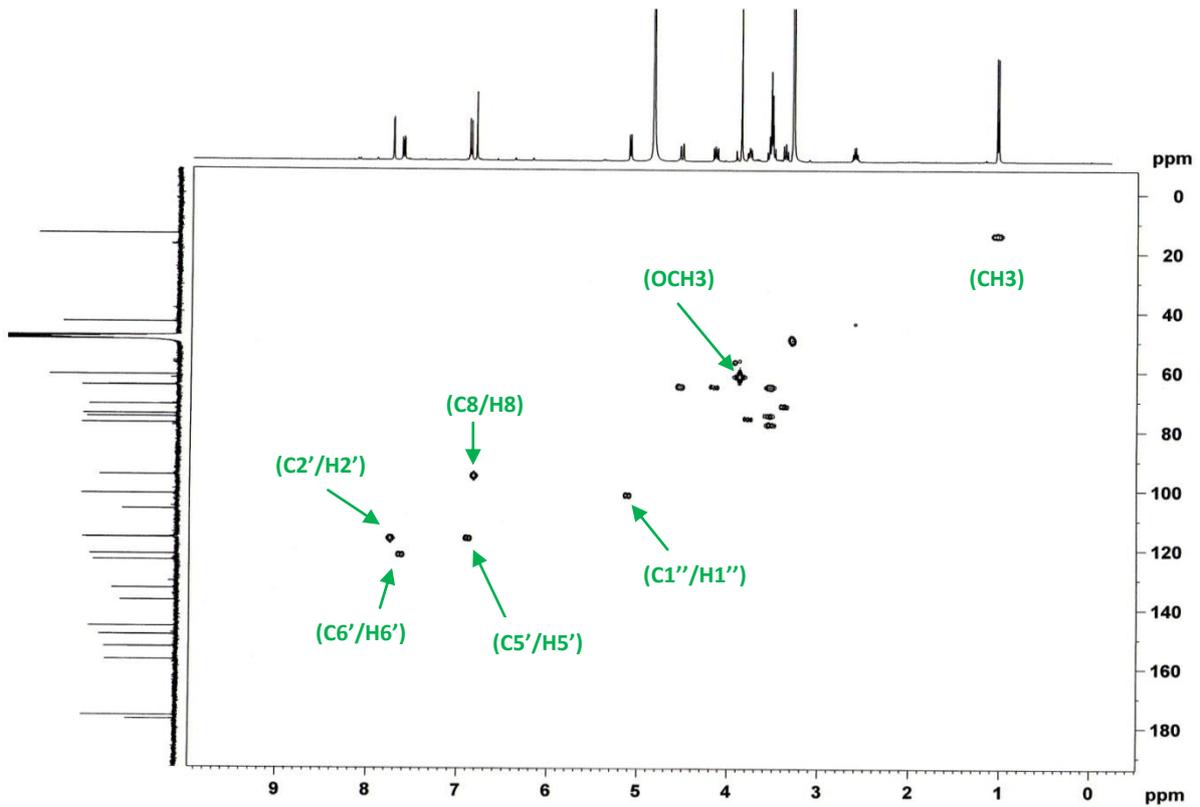
Spectre b.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 21B0109-21à23 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



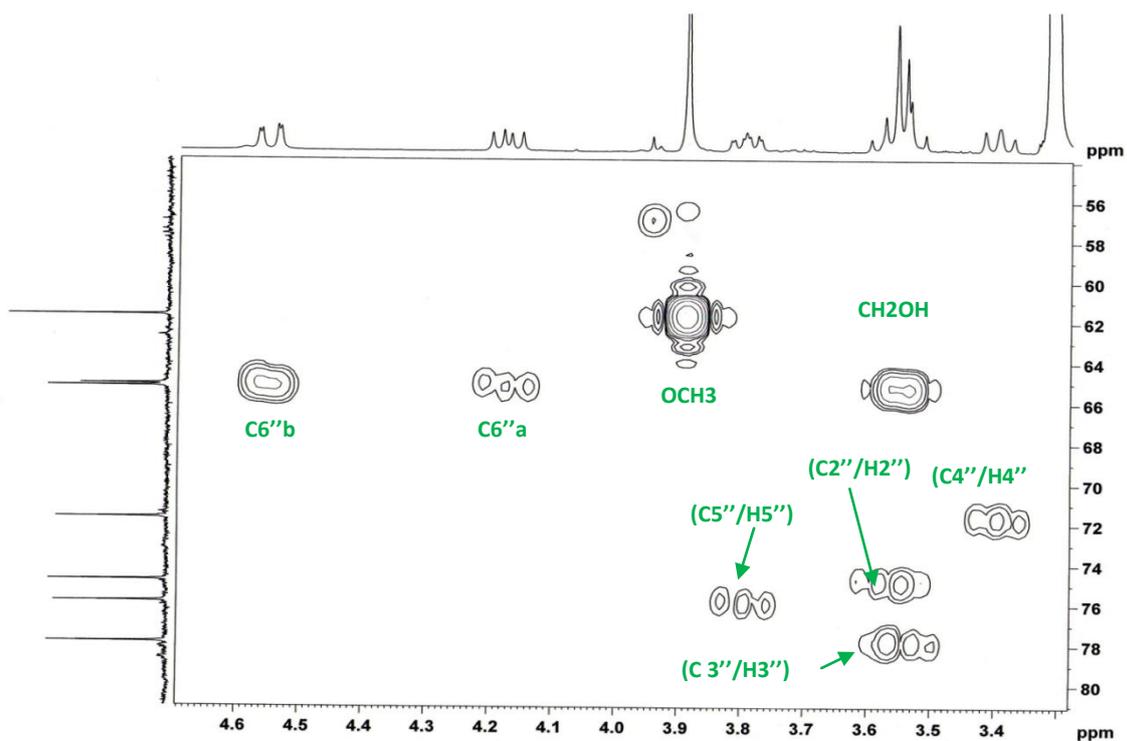
Spectre b.2 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 21B0109-21à23 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



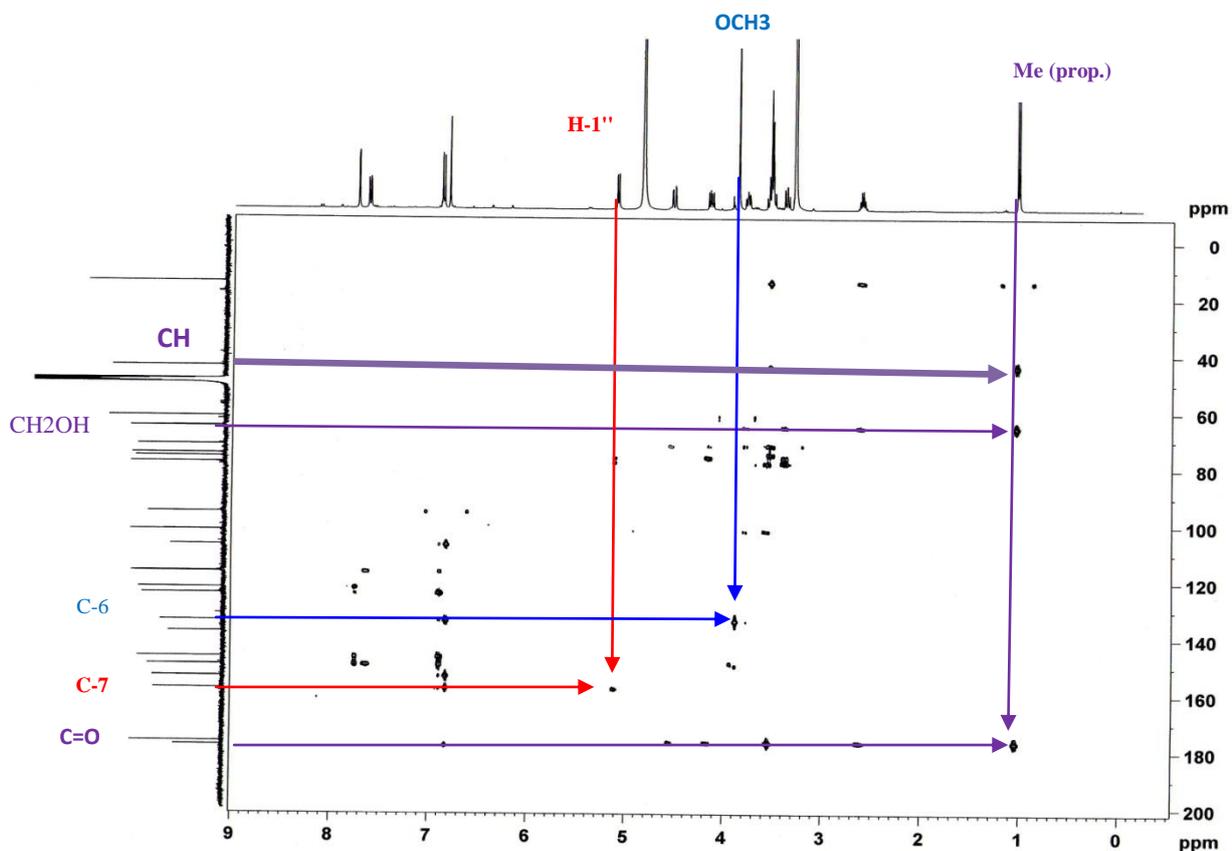
Spectre b.3 : Spectre Cosy étalé (2.6 à 5.4 ppm) du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



Spectre b.4 : Spectre HMQC du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



Spectre b.5 : Spectre HMBC étalé (56 à 80 ppm) du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



Spectre b.6 : Spectre HMBC du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

### c.Elucidation de la structure du composé 130109-10

#### •Analyses physico-chimiques

- Le composé 130109-10 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : Violette,  $R_f = 0,42$  dans le système (Acétate d'éthyle / acide acétique/ acide formique/ H<sub>2</sub>O : 80 :5 :5 :10)

#### •Analyses spectroscopiques

Les signaux présents sur le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé 130109-10 enregistré dans le méthanol (Spectre N°c.1) dans la région de protons aromatiques sont en faveur d'un squelette de type quercétine. En outre, nous observons les signaux de deux protons anomériques à  $\delta_H = 4.51$  ppm et  $\delta_H = 5.10$  ppm indiquant la présence de deux sucres.

Cette génine flavonique diglycosylée montre un système ABX, les signaux  $\delta_H = 7.66$  ppm (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H),  $\delta_H = 7.63$  ppm (dd,  $J = 8.4$ Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H) et  $\delta_H = 6.87$  ppm (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) correspondent respectivement avec les protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B.

La RMN <sup>1</sup>H montre aussi deux signaux à  $\delta_H = 6.21$  ppm (d,  $J = 2.1$ Hz, 1H) et à  $\delta_H = 6.40$  ppm (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H) qui correspondent respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A de flavonoïde.

Dans le spectre de RMN <sup>1</sup>H, on observe deux signaux correspondant à des protons anomériques à  $\delta_H = 4.51$  ppm (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H) et  $\delta_H = 5.10$  ppm (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H) avec des constantes de couplage caractéristiques de  $\alpha$  et  $\beta$ - configuration, respectivement [9-11].

Le rhamnose est identifié par son proton anomérique qui résonne à  $\delta_H = 4.51$  ppm avec une constante de couplage faible et le doublet du méthyle situé à  $\delta_H = 1.12$  ppm (3H,  $J = 6.2$  Hz). Les autres protons des sucres sont situés entre 3.26 ppm et 3.80 ppm.

Le spectre du <sup>13</sup>C montre bien la présence d'un dioside dont la majorité de ses carbones résonne entre 67 ppm et 76 ppm. Le spectre c.4 permet l'observation des signaux à  $\delta_C = 104.7$  ppm et  $\delta_C = 102.4$  ppm correspondant aux protons anomériques de glucose et rhamnose respectivement [9]. Le carbone C-6''' à  $\delta_C = 17.9$  ppm est caractéristique du méthyle du rhamnose.

Le spectre du <sup>13</sup>C (spectre N°c.2) montre 27 signaux dénombrés et qui ont permis de suggérer la formule brute C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>.

Les techniques HSQC, COSY et HMBC permettent l'attribution de tous les signaux de RMN du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C pour le produit naturel 130109-10.

L'expérience HMBC (Spectre N°c.7) permet de déterminer les positions respectives des deux constituants de la molécule. Le signal à  $\delta_H = 5.10$  ppm (H-1'') du proton anomérique du

glucose est corrélé avec le signal à  $\delta_C = 135.7$  ppm (C-3) de l'aglycone, indique que la position C-3 de l'aglycone est glycosylée.

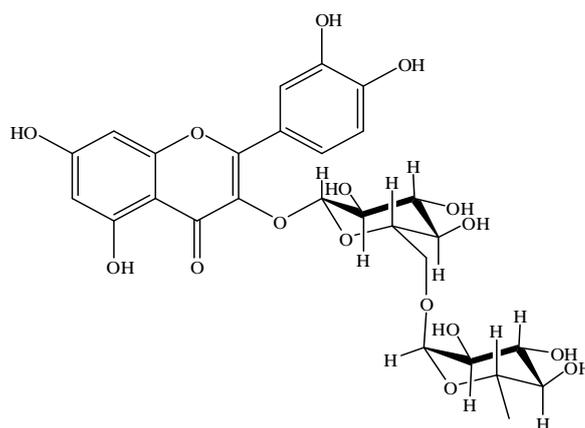
Le signal à  $\delta_H = 68.7$  ppm de C-6'' et avec comparaison avec le glucose indique que C-6'' est glycosylé. Le signal  $\delta_H = 4.51$  ppm (H-1''') montre une corrélation avec le signal  $\delta_H = 68.7$  ppm (C-6'') du glucose, indiquant que le rhamnose est attaché à C-6'' du glucose par son carbone C-1'''.

Ainsi, ces corrélations HMBC observées ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en (C1-C6) et d'identifier le diglycoside comme étant du rutinose (rhamnopyranosyl-( $\alpha$ 1-6)-glucopyranoside) et ont attesté que le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3.

Le composé 130109-10 a donc été identifié comme étant la quercétine-3-O- $\beta$ -rutinoside, aussi appelée rutine [12]. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans *Ruta graveolens* (d'où son nom) et elle est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones.

Elle est également très connue pour ses nombreuses propriétés biologiques notamment antioedémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombotiques, anti-hypotensive, spasmolytique et antihémorragique [13].

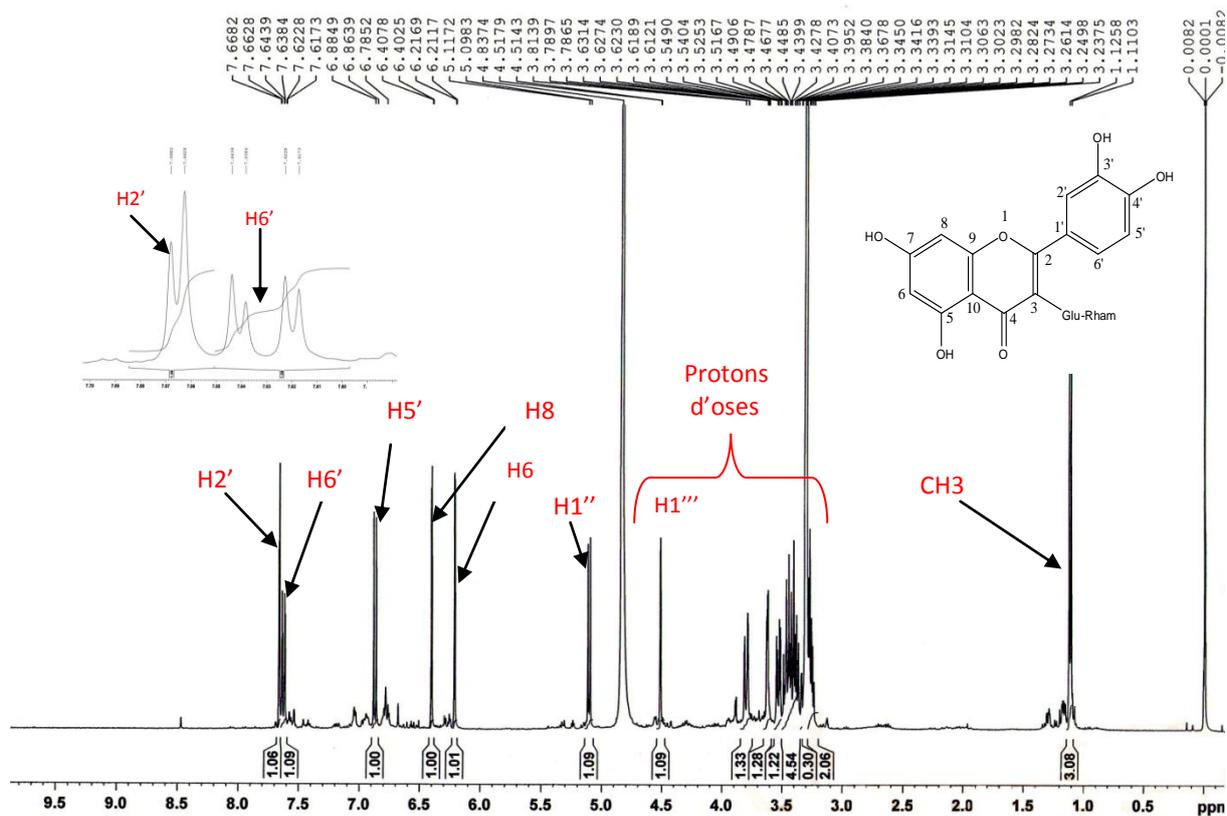
Les attributions de tous les signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentées dans le tableau III.6.



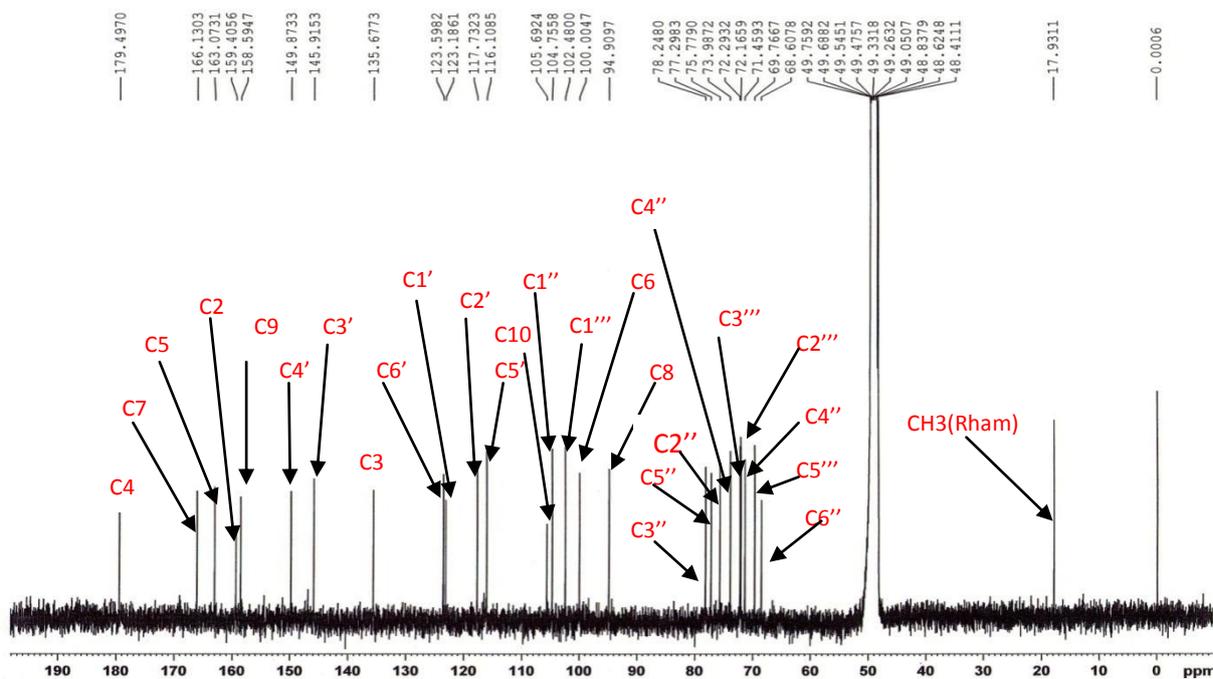
3-O- $\beta$ -rutinoside-quercétine

**Tableau III.6 :** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\delta$ ,  $J$ , en Hz ; 100 MHz,  $\delta$ ) du composé 130109-10 dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

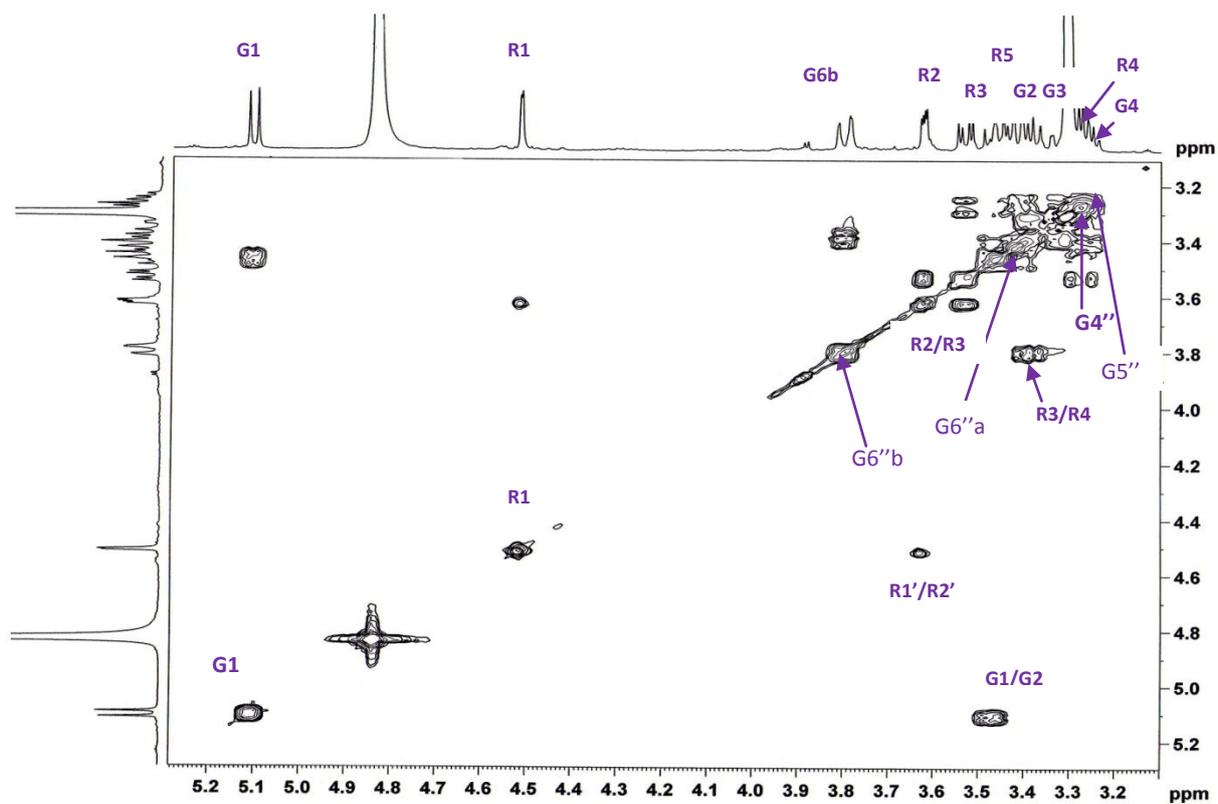
Génine	Composé 130109-10	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
	$\delta$ (ppm)	
2	-	159.4
3	-	135.7
4	-	179.5
5	-	163.1
6	6.21 <i>d</i> ( $J= 2.1$ Hz, 1H)	100.0
7	-	166.1
8	6.40 <i>d</i> ( $J= 2.1$ Hz, 1H)	94.9
9	-	158.6
10	-	105.7
1'	-	123.1
2'	7.66 <i>d</i> ( $J= 2.2$ Hz, 1H)	117.7
3'	-	145.9
4'	-	149.9
5'	6.87 <i>d</i> ( $J= 8.4$ Hz, 1H)	116.1
6'	7.63 <i>dd</i> ( $J= 8.4$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	123.6
<b>glucose</b>		
1''	5.10 <i>d</i> ( $J= 7.5$ Hz, 1H)	104.7
2''	3.47 <i>t</i> ( $J= 9.2$ Hz, 1H)	75.8
3''	3.41 <i>t</i> ( $J= 9.3$ Hz, 1H)	78.2
4''	3.26 <i>t</i> ( $J= 9.54$ Hz, 1H)	71.4
5''	3.30 <i>m</i>	77.3
6''	a: 3.38 <i>dd</i> ( $J= 10.9$ Hz, $J= 6.5$ Hz, 1H)	68.7
	b: 3.80 <i>dd</i> ( $J= 10.9$ Hz, $J= 1.3$ Hz, 1H)	
<b>rhamnose</b>		
1'''	4.51 <i>d</i> ( $J= 1.4$ Hz, 1H)	102.4
2'''	3.62 <i>dd</i> ( $J= 3.40$ Hz, $J= 1.6$ Hz, 1H)	72.1
3'''	3.53 <i>dd</i> ( $J= 9.5$ Hz, $J= 3.4$ Hz, 1H)	72.3
4'''	3.27 <i>t</i> ( $J= 9.4$ Hz, 1H)	73.9
5'''	3.45 <i>m</i>	69.7
6'''	1.12 <i>d</i> ( $J= 6.2$ Hz, 3H)	17.9
$\text{CH}_3(\text{Rha})$		



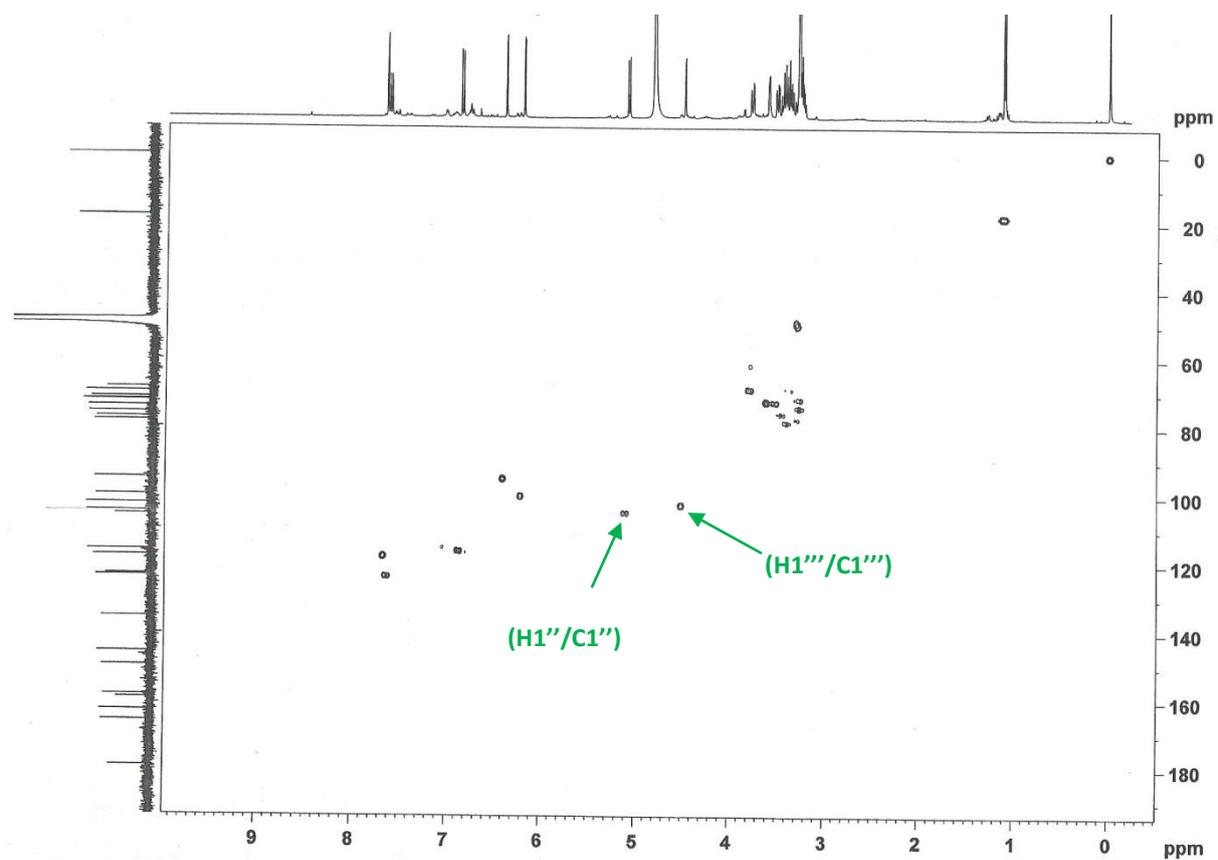
Spectre c.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 130109-10 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



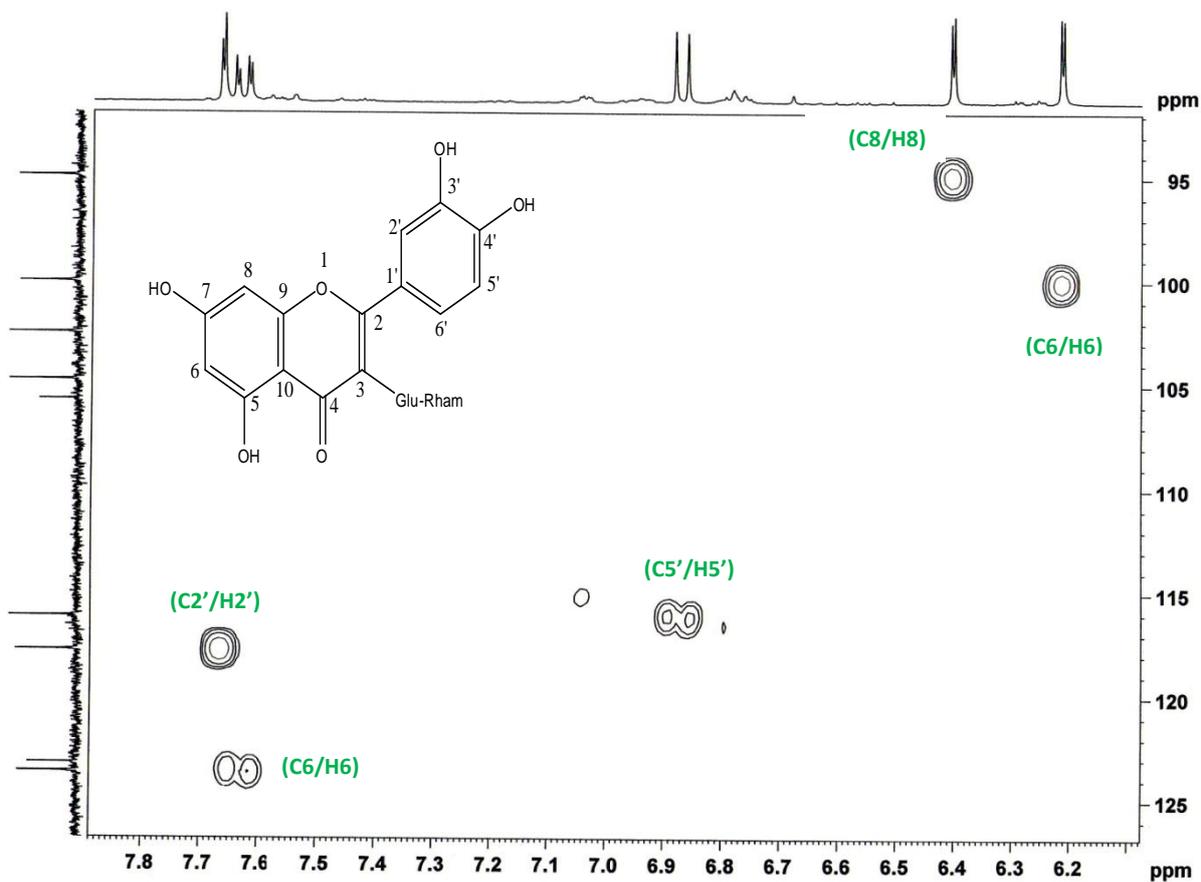
Spectre c.2 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 130109-10 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



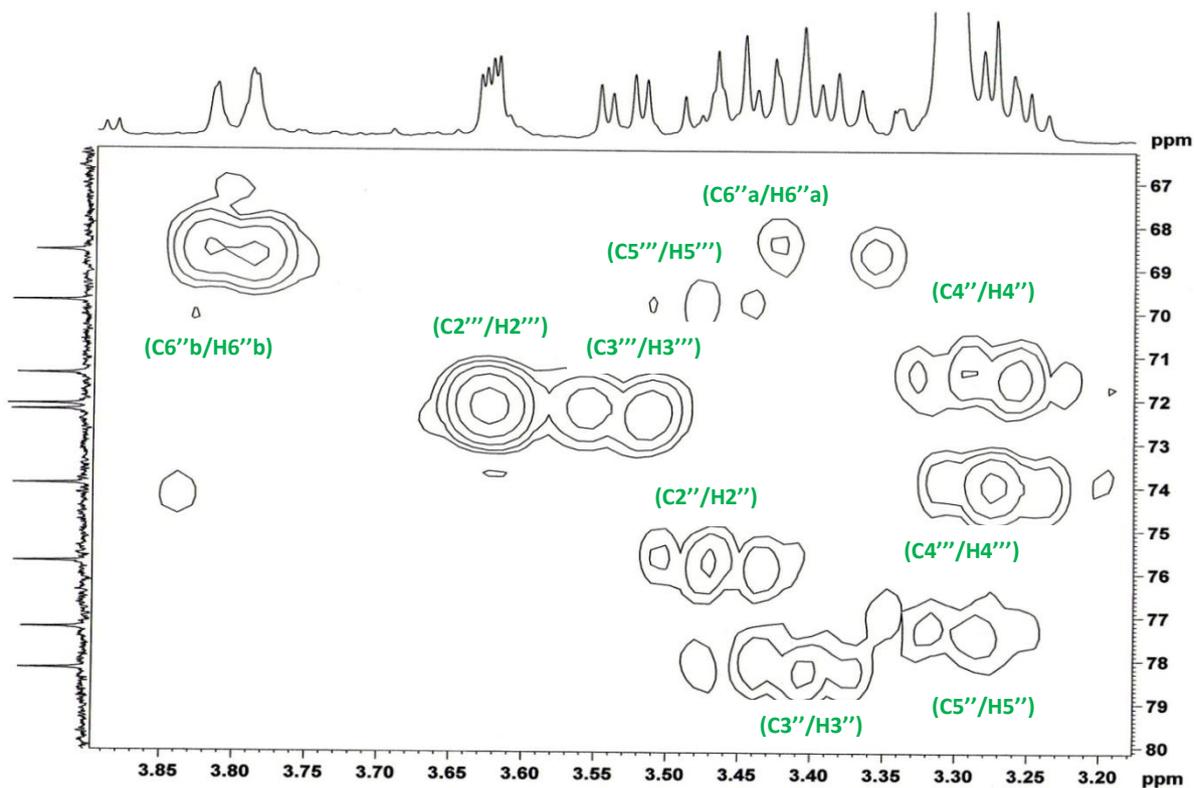
**Spectre c.3 :** Spectre Cosy étalé (3.2 à 5.2 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



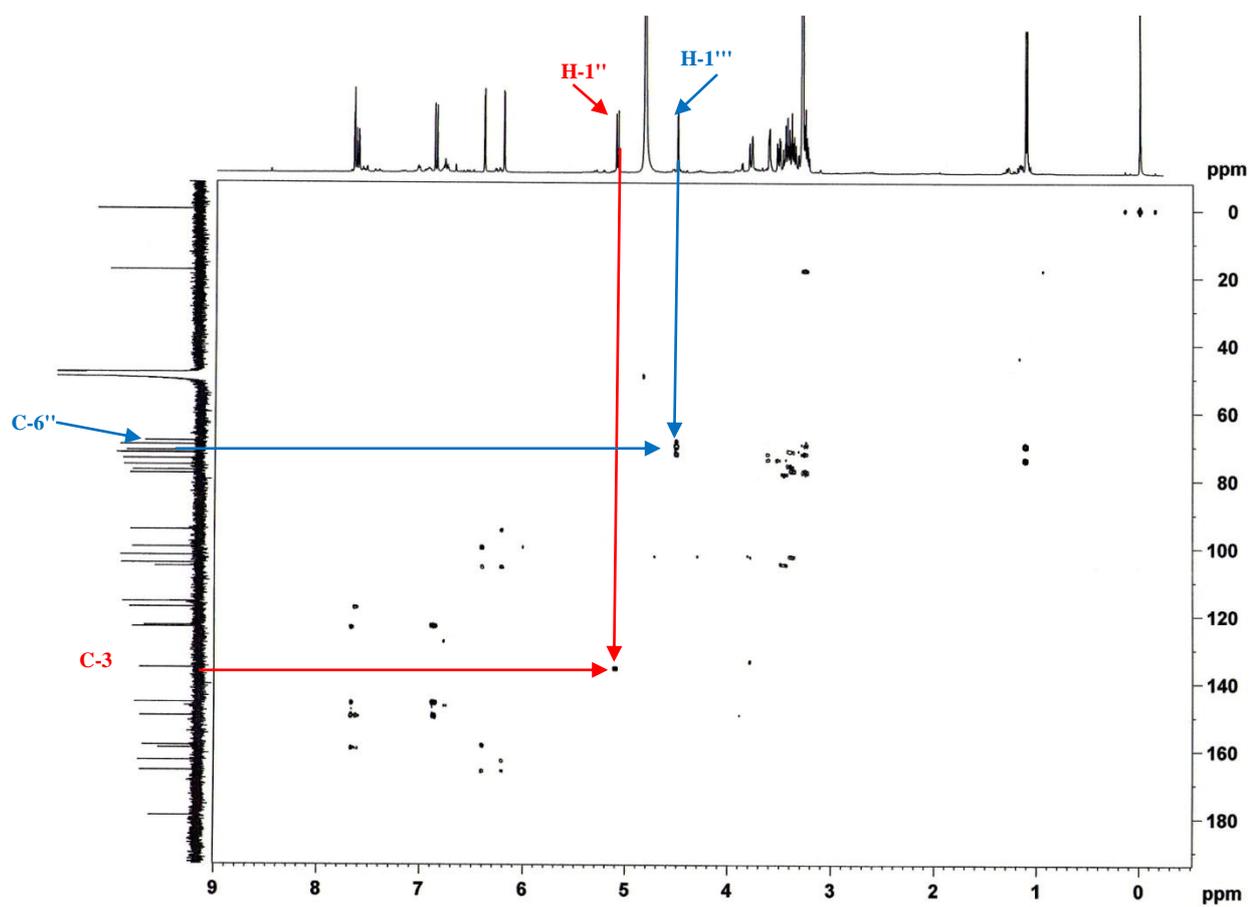
**Spectre c.4 :** Spectre HMQC du composé 130109-10 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



Spectre c.5 : Spectre HMQC étalé (95 à 125 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Spectre c.6 : Spectre HMQC étalé (95 à 125 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



Spectre c.7: Spectre HMBC du composé 130109-10 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).