

## II.1. Description des travaux et discussion des résultats sur l'espèce *Chrysanthemum trifurcatum*

### II.1.1. Description botanique

*Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab. est une plante vivace à souche ligneuse, peu élevée (15-30 cm) et rameuse dès la base. Les feuilles sont pennatiséquées, à lanières courtes, lancéolées aiguës et mucronulées. Les capitules sont hétérogames, radiés, sur de longs pédoncules, atteignant 2 cm de diamètre sans les ligules. Les bractées sont orbiculaires, atténuées à la base et entièrement scarieuses vers l'extrémité. Les ligules sont jaunes. Les akènes sont tous semblables, à couronne membraneuse denticulée et plus ou moins auriculée. La plante pousse sur les sables et les terrains pierreux [1], figure II.1.

### II.1.2. Classification dans la systématique botanique [1, 2]

Royaume	Plantes
Sous royaume	Tracheobiontes
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermatophytes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Chrysanthemea
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Chrysanthemum</i>
Espèce	<i>Chrysanthemum trifurcatum</i> (Desf.) Batt. et Trab.



**Figure II.1** : Photographie de *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab

### II.1.3. Utilisation traditionnelle

La plante *C. trifurcatum* est connue sous le nom « *gartoufa* ». Elle est utilisée dans la médecine populaire tunisienne pour traiter la constipation. Elle est aussi réputée pour soulager

des douleurs spécifiquement féminines. Les fleurs séchées peuvent être additionnées à la soupe, elles peuvent être encore moulues, mélangées avec de la farine et préparées en purée [3]. Au Maroc, l'infusion de la plante entière est utilisée contre les désordres hépatiques [4].

#### II.1.4. Matériel végétal

La plante *Chrysanthemum trifurcatum* a été récoltée par Mr. Kamel Kabouche dans une station à quelques kilomètres de Ghardaïa. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba).

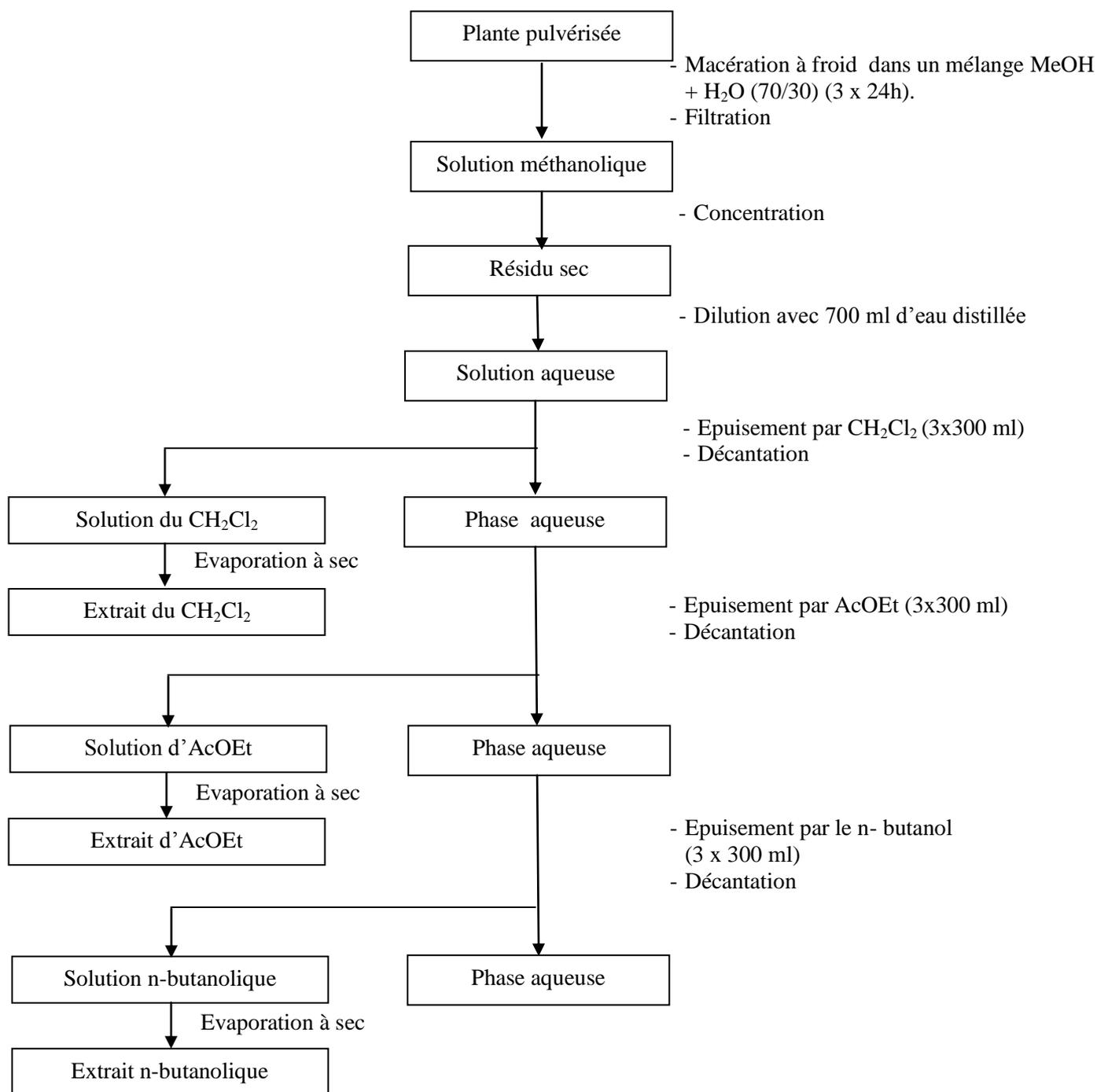
#### II.1.5. Extraction

Les parties aériennes (1 kg) de la plante *Chrysanthemum trifurcatum* séchées puis réduites en poudre sont mises à macérer dans le mélange Méthanol + Eau (70/ 30) pendant (3 x 24h). Après filtration, le filtrat obtenu est concentré à sec sous pression réduite dans un Rotavapor; annexe (figure III. 3). L'extrait ainsi obtenu, est soumis à l'extraction liquide-liquide par le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le *n*-butanol (*n*-but), avec des quantités de 3 x 300 ml pour chaque solvant. Les 3 extraits sont évaporés à sec, puis pesés.

**Tableau II.1:** Rendements des extractions

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
	Extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1,18	0,12
	Extrait AcOEt	5,82	0,58
	Extrait <i>n</i> -but	16,34	1,63

La figure ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction des parties aériennes du *Chrysanthemum trifurcatum*.



**Figure II.2 :** Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes du *Chrysanthemum trifurcatum*.

Chaque extrait subit une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier. Notre choix s'est porté sur celui de la phase acétate d'éthyle.

### II.1.6. Séparation des métabolites secondaires de la phase acétate d'éthyle

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec l'éluant Dichlorométhane / Méthanol (8/2).

Une masse de 4,5 g de l'extrait d'acétate d'éthyle est mélangée à une quantité de gel de silice puis chromatographiée sur une colonne de gel de silice 60 (0,063-0,2 mm). L'élution a été initialement effectuée par le dichlorométhane pur puis on augmente progressivement la polarité de la phase mobile par addition de méthanol.

Des fractions de 20 millilitres sont recueillies en bas de colonne dans des tubes, ainsi 174 fractions sont obtenues. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées à l'aide d'un réactif de détection obtenu à partir d'un mélange d'acide acétique, acide sulfurique et de l'eau (80 /16/4) et finalement chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à l'apparition de taches de diverses couleurs. La progression des produits dans la colonne est rassemblée dans le tableau II.2.

**Tableau II.2:** Résultat du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle du *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab.

Fraction	Eluant		Quantité d'éluant (ml)
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> %	MeOH%	
F <sub>1</sub>	100	0	300
F <sub>2</sub>	95	5	300
F <sub>3-43</sub>	92	8	800
F <sub>44-52</sub>	88	12	200
F <sub>53-58</sub>	85	15	100
F <sub>59-63</sub>	82	18	100
F <sub>64-69</sub>	75	25	100
F <sub>70-117</sub>	70	30	600
F <sub>118-122</sub>	50	50	100
F <sub>123-174</sub>	0	100	1000

Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince, tableau II.3.

**Tableau II.3.** : Regroupement des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle du *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab.

Fraction	Eluant	Observation	
F <sub>1-4</sub>	Cyclohexane / AcOEt (9/1)	Mélange complexe	
F <sub>5-8</sub>	Cyclohexane / AcOEt (6/4)	Mélange complexe	
F <sub>9-14</sub>		Mélange séparable non traité du à sa faible quantité	
F <sub>15</sub>	Cyclohexane / AcOEt (5/5)	Mélange séparable non traité du à sa faible quantité	
F <sub>16</sub>		Mélange séparable	
F <sub>17</sub>		Mélange séparable non traité due sa faible quantité	
F <sub>18</sub>		Mélange complexe	
F <sub>19-21</sub>		Mélange séparable	
F <sub>22</sub>		Mélange complexe	
F <sub>23</sub>		Mélange séparable	
F <sub>24</sub>		Mélange complexe	
F <sub>25-27</sub>		Ether diéthylique / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (6/4)	Mélange séparable
F <sub>28-36</sub>			Mélange complexe
F <sub>37</sub>	Mélange séparable		
F <sub>38-48</sub>	Ether diéthylique / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (8/2)	Mélange complexe	
F <sub>49</sub>		Mélange complexe	
F <sub>50</sub>		Mélange séparable	
F <sub>51-59</sub>		Mélange complexe	
F <sub>60-70</sub>		Mélange complexe	
F <sub>71-75</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / MeOH (8/2)	Mélange complexe	
F <sub>76-88</sub>	Cyclohexane / Acide acétique / Ether diéthylique (10/1/10)	Mélange complexe	
F <sub>89-101</sub>	Cyclohexane / Acide acétique / Ether diéthylique (10/1/17)	Mélange complexe	
F <sub>102-128</sub>	Cyclohexane / Acide formique / Ether diéthylique (6/0,5/5,5)	Mélange complexe	
F <sub>129-141</sub>	Toluène/ AcOEt/ Acide formique (6/4/1)	Mélange complexe	
F <sub>142-174</sub>	AcOEt/ MeOH/ Acide acétique (8/1/0,3)	Mélange complexe	

### II.1.6.1. Purification des sous-fractions

La purification de ces sous-fractions a été effectuée par recristallisation. Les produits obtenus sont solubles dans le méthanol mais insolubles dans l'acétate d'éthyle. Ils ont été dissous dans un minimum de méthanol et saturés à l'acétate d'éthyle. Par séchage lent dans le mélange MeOH/ AcOEt, il se forme un précipité blanc (F<sub>16</sub>) et des cristaux jaunes pour les fractions restantes.

#### a. Elucidation de la structure du composé F<sub>16</sub>

- **Résultats des données chromatographiques**

Fluorescence : **Violette**

Révéléateur (Réactif de NEU) : **Jaune fluorescent.**

R<sub>f</sub>: 0,228 (Cyclohexane / AcOEt/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 3 / 4 / 3)

0,447 (Cyclohexane / AcOEt : 6 / 6 ; 2<sup>ème</sup> élution)

- **Résultats des données spectrales**

**Tableau II.4:** Données des spectres UV-Visible du produit F<sub>16</sub>

Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	334	-	269
NaOH	391	310	275
AlCl <sub>3</sub>	382	302, 346	276
AlCl <sub>3</sub> .HCl	382	300, 340	278
NaOAc	384	307	275
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	347	297	271

**Tableau II.5 :** Données du spectre RMN <sup>1</sup>H dans CD<sub>3</sub>OD à 250 MHz du produit F<sub>16</sub>

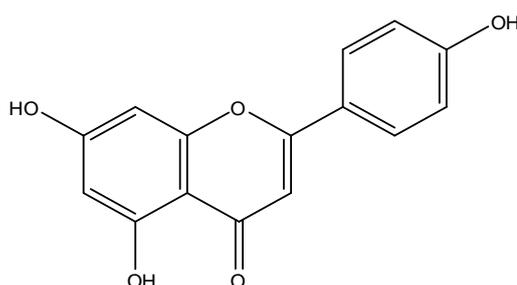
Déplacement chimique $\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
6,23	1H	d	2,1	H <sub>6</sub>
6,48	1H	d	2,1	H <sub>8</sub>
6,62	1H	s	-	H <sub>3</sub>
6,96	2H	d	8,9	H <sub>3'</sub> -H <sub>5'</sub>
7,88	2H	d	8,9	H <sub>2'</sub> -H <sub>6'</sub>

- **Interprétation des résultats**

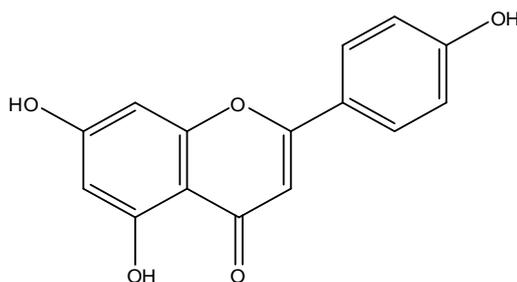
Le produit F<sub>16</sub> a donné une fluorescence jaune sous lampe de Wood, après révélation par le réactif de NEU, indiquant la présence d'un flavonoïde et l'observation d'une tache violette

sous lampe de Wood désigne un squelette d'une flavone. Le spectre UV effectué dans le méthanol permet de distinguer deux bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\text{max}} = 269 \text{ nm}$  et l'autre à  $\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$  confirmant la présence d'une flavone. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 57 \text{ nm}$ ) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à  $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$  montre la présence d'un OH libre en 7. L'absence d'effet hypsochrome après addition de HCl au système MeOH + AlCl<sub>3</sub> suggère l'absence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. L'effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 48 \text{ nm}$ ) observé après addition de AlCl<sub>3</sub> + HCl à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 [1, 2], (Spectre a.1).

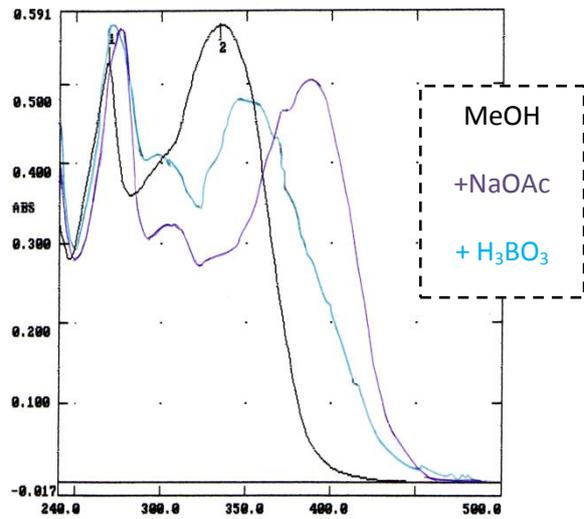
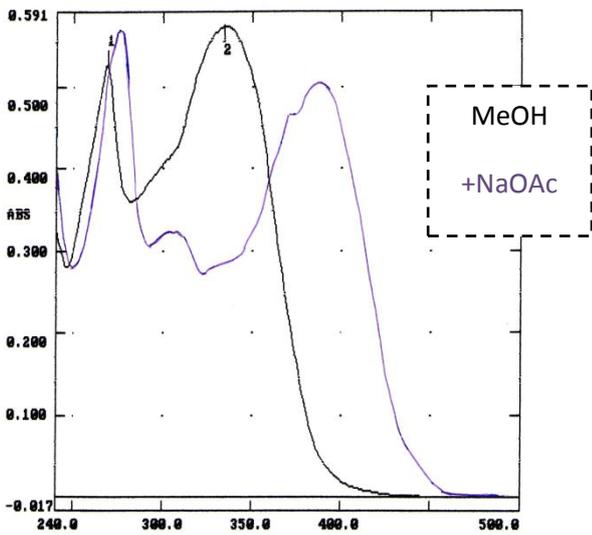
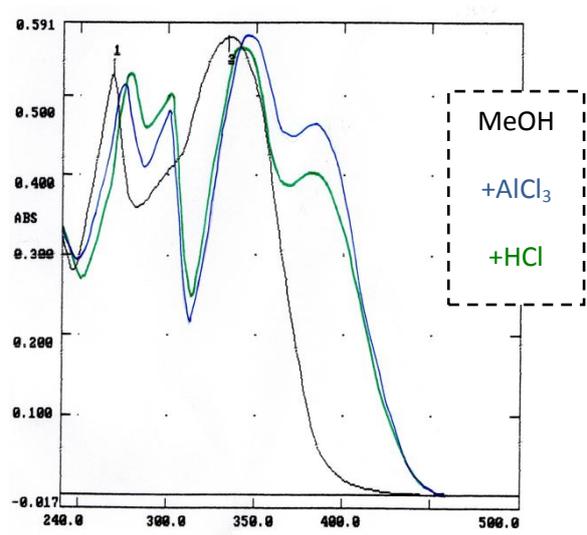
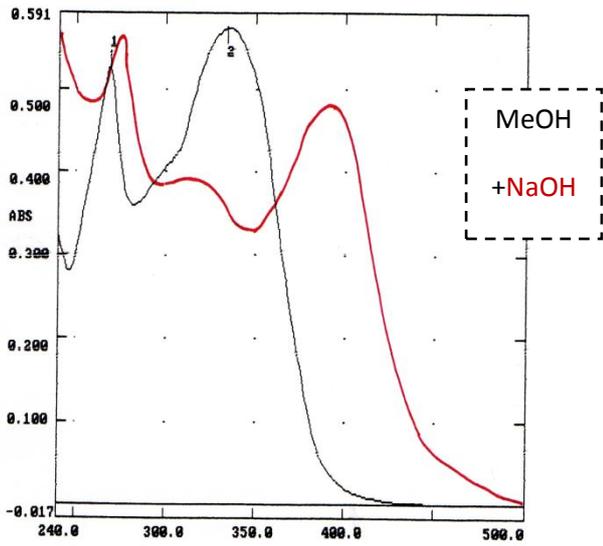
Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit F<sub>16</sub>.



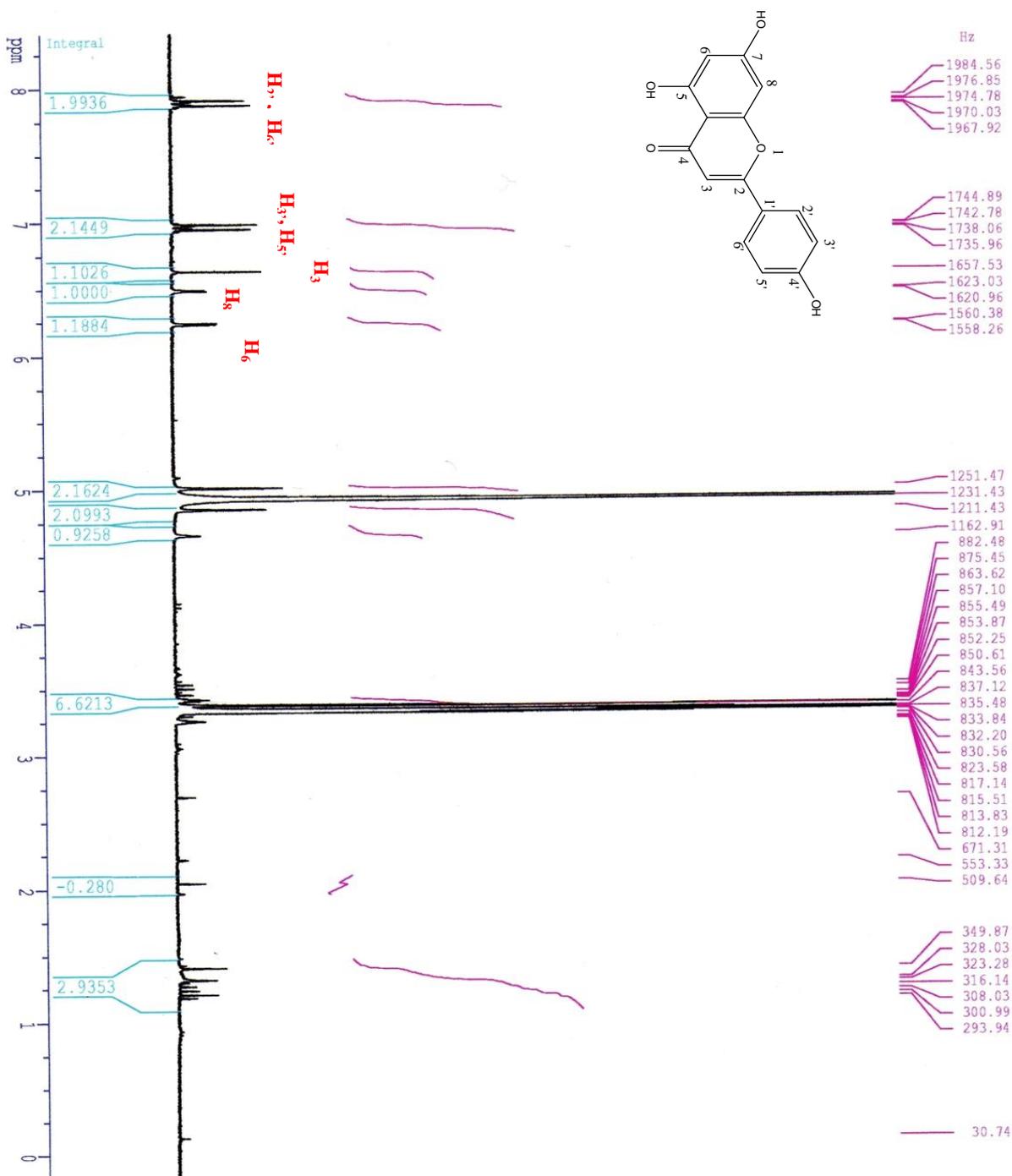
Le spectre RMN du proton, enregistré dans CD<sub>3</sub>OD à 250 MHz, permet d'observer des signaux caractéristiques des protons aromatiques dont les déplacements chimiques sont compris entre 6 et 8 ppm. En effet, il montre la présence de deux doublets, respectivement à 6,23 ppm ( $J = 2,1 \text{ Hz}$ ) et 6,48 ppm ( $J = 2,1 \text{ Hz}$ ), caractéristiques de deux protons en couplage *métra* (H<sub>6</sub> et H<sub>8</sub>), un singulet à 6,62 ppm, attribué à H<sub>3</sub> et deux doublets pour 4 protons, respectivement à 6,96 ( $J = 8,9 \text{ Hz}$ ) et 7,88 ppm ( $J = 8,9 \text{ Hz}$ ), caractéristiques des protons en couplage *ortho* (H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>) et (H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), (Spectre a.2 et a.3), ce qui confirme que le produit F<sub>16</sub> est l'apigénine.



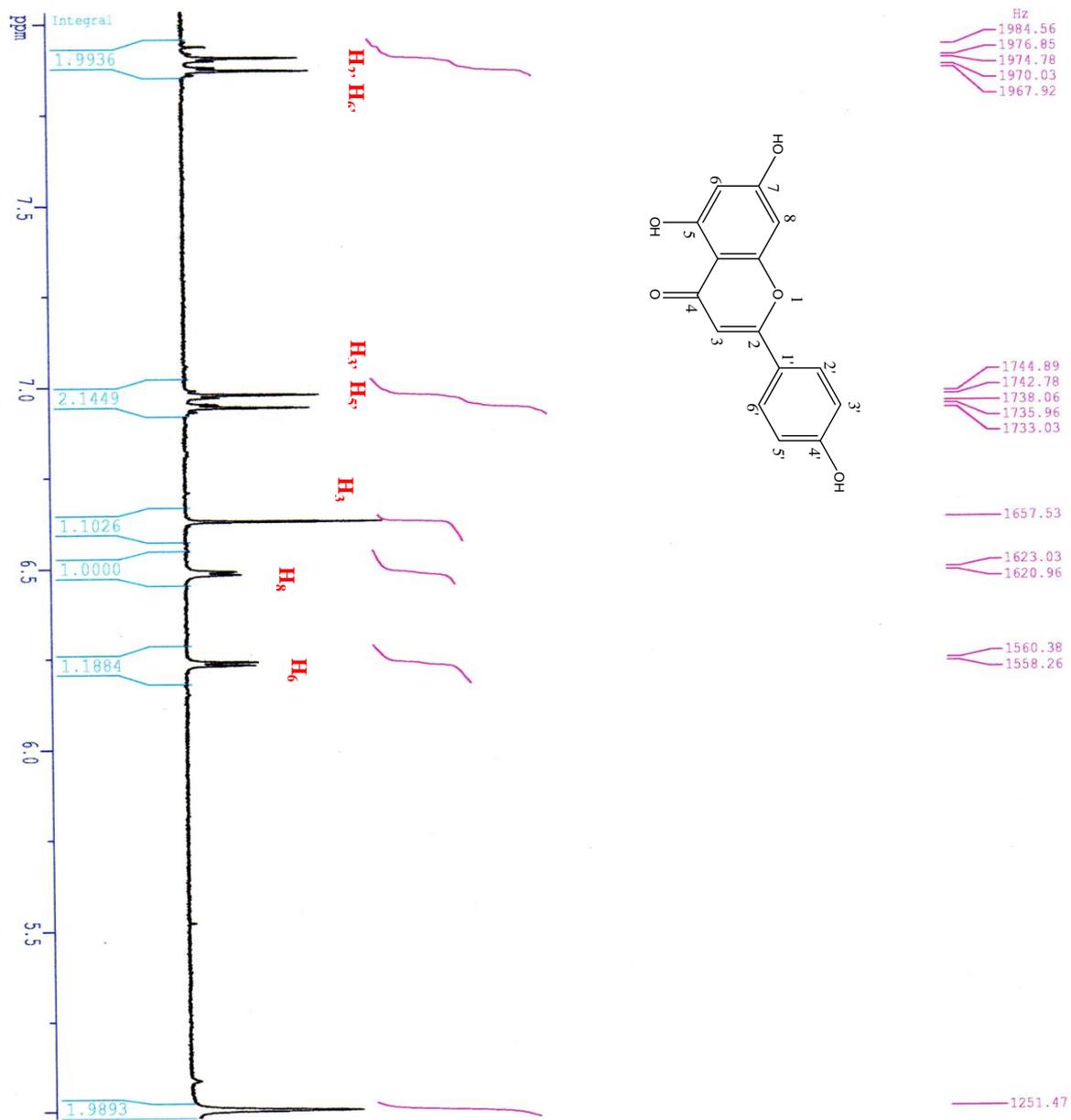
Apigénine



Spectre a.1 : Spectres UV du produit F<sub>16</sub>



Spectre a.2 : Spectre RMN<sup>1</sup>H du produit F<sub>16</sub>



Spectre a.3 : Spectre RMN<sup>1</sup>H étalé du produit F<sub>16</sub>

## b. Elucidation de la structure du composé F<sub>25-27</sub>

### ● Résultats des données chromatographiques

Fluorescence : Jaune.

Révélateur (Réactif de NEU) : Jaune.

R<sub>f</sub> : 0,353 (Toluène / AcOEt/ Acide formique : 9 /6,5 /0,5)

### ● Résultats des données spectrales

Tableau II.6: Données des spectres UV-Visible du produit F<sub>25-27</sub>

Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	367	-	255
NaOH	410	323	279
AlCl <sub>3</sub>	444	-	271
AlCl <sub>3</sub> +HCl	421	358	266
NaOAc	395	321	276
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	386	-	261

Tableau II.7: Données du spectre RMN <sup>1</sup>H dans CD<sub>3</sub>OD à 250 MHz du produit F<sub>25-27</sub>

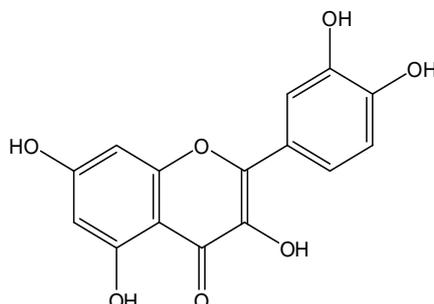
Déplacement chimique $\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage $J$ (Hz)	Attribution
6,20	1H	d	2	H <sub>6</sub>
6,40	1H	d	2	H <sub>8</sub>
6,90	1H	d	8,5	H <sub>5'</sub>
7,66	1H	dd	8,5 et 2	H <sub>6'</sub>
7,76	1H	d	2	H <sub>2'</sub>

### ● Interprétation des résultats

La fluorescence jaune sous lampe de Wood indique un squelette flavonol confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\max} = 255$  nm et l'autre à  $\lambda_{\max} = 367$  nm. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 43$  nm) avec diminution d'intensité indiquant la présence d'un OH en 3 sur le cycle C et un OH en 4' sur le cycle B. La présence d'une nouvelle bande à 323 nm montre la présence d'un OH libre en 7, ce qui est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = 21$  nm). L'effet hypsochrome ( $\Delta\lambda = -23$  nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl<sub>3</sub> suggère la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 19$  nm) du spectre obtenu après

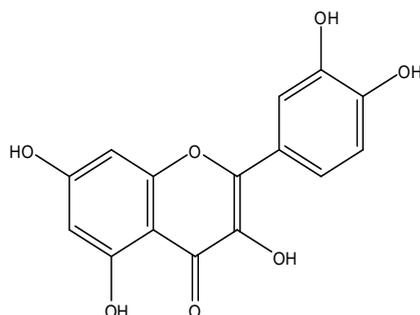
addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  au système  $\text{MeOH} + \text{AcONa}$ . L'effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 54 \text{ nm}$ ) observé après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 (Spectre b.1).

Ces premiers résultats permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit  $\text{F}_{25-27}$

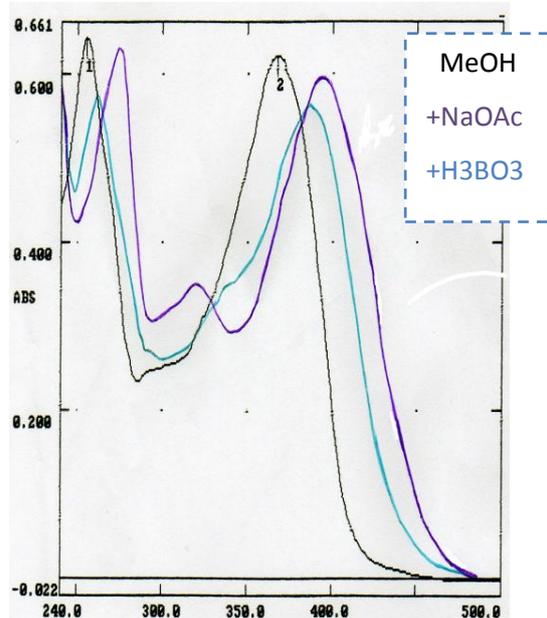
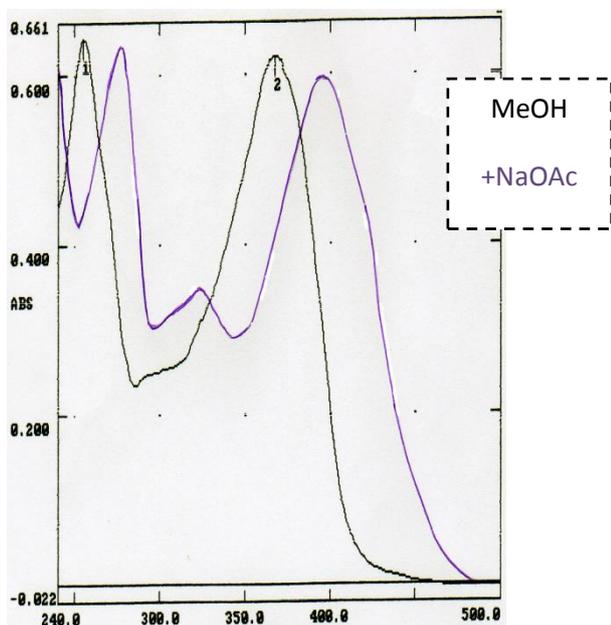
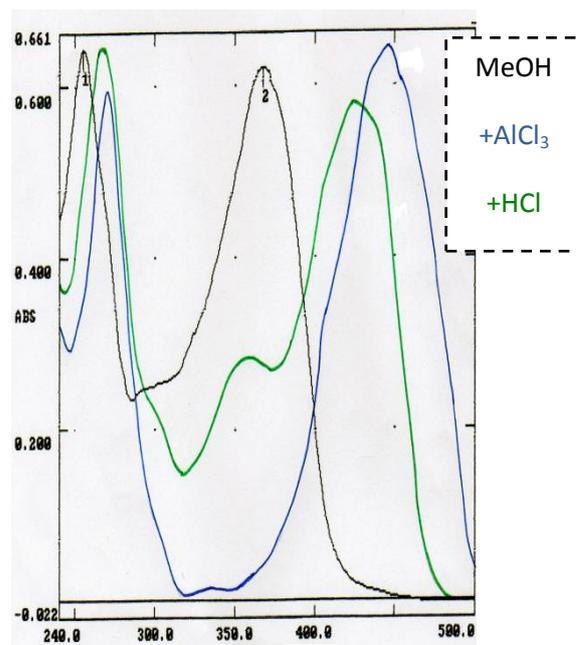
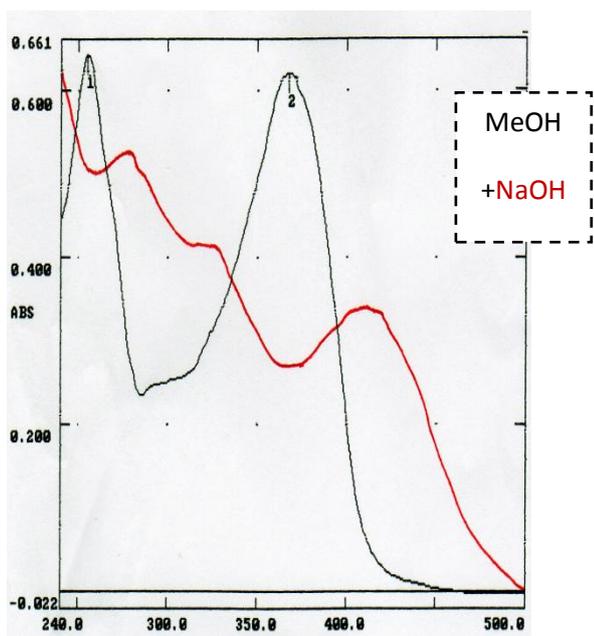


Le spectre RMN du proton enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 250 MHz montre la présence de 3 doublets pour 3 protons, respectivement à 6,20, 6,40 et 7,76 ppm ( $J = 2,0 \text{ Hz}$ ), caractéristiques des protons en couplage *mé*ta ( $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_8$  et  $\text{H}_2$ ), un doublet à 6,90 ppm ( $J = 8,5 \text{ Hz}$ ), attribué à  $\text{H}_5$ , et un doublet de doublet à 7,66 ppm ( $J = 8,5$  et  $2,0 \text{ Hz}$ ), caractéristique du proton  $\text{H}_6$  (spectres b.2 et b.3). Ces attributions confirment la structure proposée.

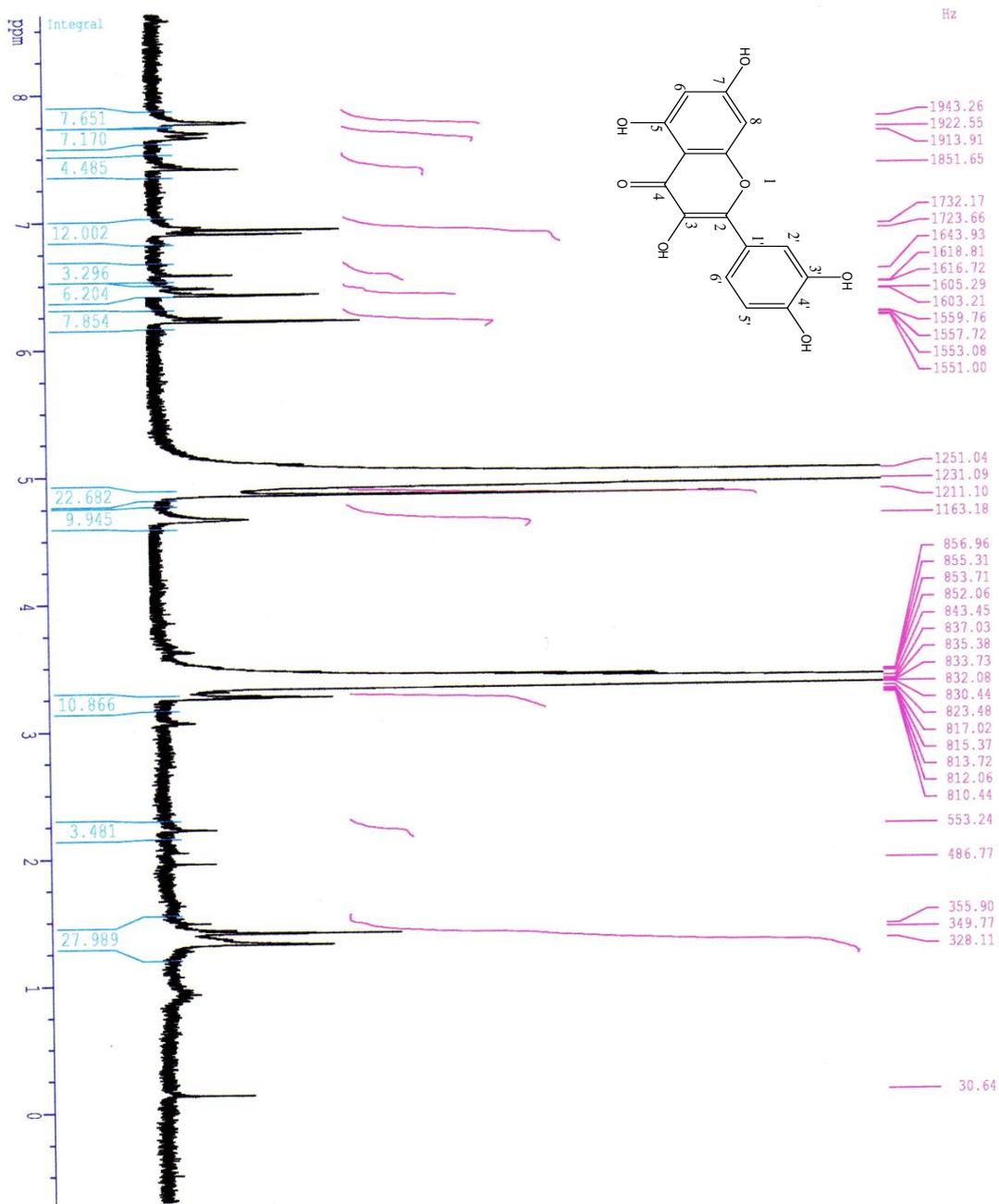
Les données spectroscopiques (UV, RMN  $^1\text{H}$ ) permettent d'identifier la structure de la quercétine.



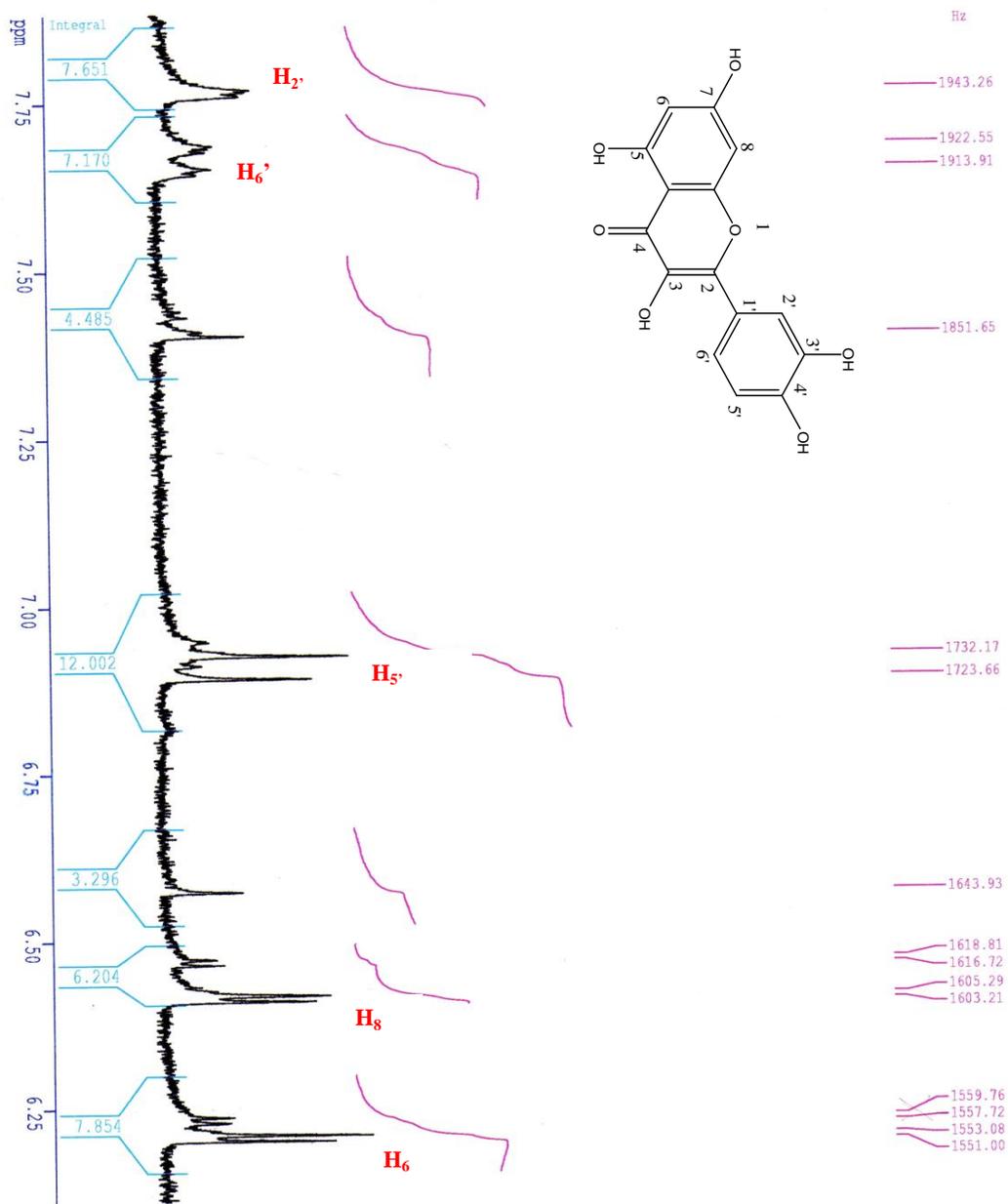
Quercétine.



Spectre b.1: Spectres UV du produit F<sub>25-27</sub>



Spectre b.2: Spectre RMN<sup>1</sup>H du produit F<sub>25-27</sub>



Spectre b.3: Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé du produit F<sub>25-27</sub>

### c. Elucidation de la structure du composé F<sub>37</sub>

#### • Résultats des données chromatographiques

Fluorescence : Bleue

Révélateur (Réactif de NEU) : Jaune

R<sub>f</sub>: 0,228 (Toluène / AcOEt/ Acide formique : 9 /6,5 /0,5)

R<sub>f</sub> : 0,447 (Cyclohexane / AcOEt : 6 /7 ; 2<sup>ème</sup> élution).

#### • Résultats des données spectrales

Tableau II.8. : Données des spectres UV-Visible du produit F<sub>37</sub>

Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)	
	Bande I	Bande II
MeOH	316	290
NaOH	344	301
AlCl <sub>3</sub>	361	263
AlCl <sub>3</sub> +HCl	329	244
NaOAc	315	289
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	329	294

Tableau II.9. : Données du spectre RMN <sup>1</sup>H dans CD<sub>3</sub>OD à 250 MHz du produit F<sub>37</sub>

Déplacement chimique $\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage $J$ (Hz)	Attribution
6,24	1H	d	15,9	H <sub>2</sub>
6,30	1H	d	8,1	H <sub>8</sub>
6,94	1H	dd	8,1 et 1,9	H <sub>9</sub>
7,05	1H	d	1,9	H <sub>5</sub>
7,52	1H	d	15,9	H <sub>3</sub>

#### • Interprétation des résultats

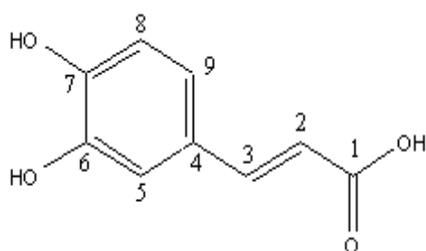
Le produit F<sub>37</sub> a donné une fluorescence bleue sous lampe de Wood. Les spectres UV obtenus montrent deux bandes d'absorption avec un épaulement remarquable sur la bande I (Spectre c.1). Ces spectres sont caractéristiques des acides phénoliques. Un déplacement bathochrome de la bande I de ( $\Delta\lambda = 45$  nm) après addition d'AlCl<sub>3</sub> à la solution méthanolique indique la présence d'un noyau benzénique di-ortho-hydroxylé (Spectre c.1).

Le spectre RMN <sup>1</sup>H montre la présence d'un doublet à 6,24 ppm ( $J = 15,9$  Hz) attribué à H<sub>2</sub>, et un autre ayant la même constante de couplage apparaissant à 7,52 ppm attribué à H<sub>3</sub>. La valeur de la constante de couplage indique que les 2 protons éthyléniques sont en position *trans*.

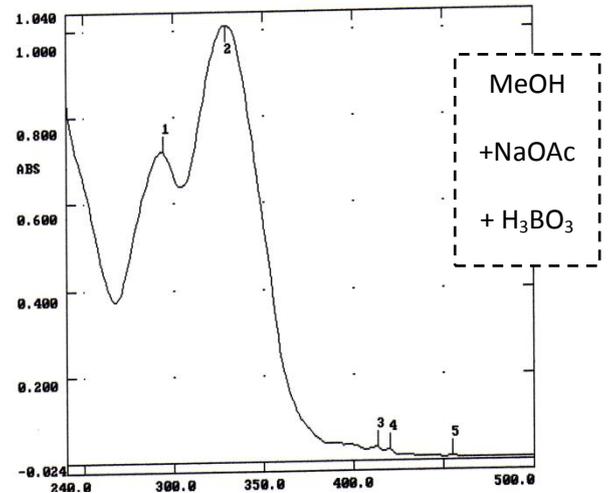
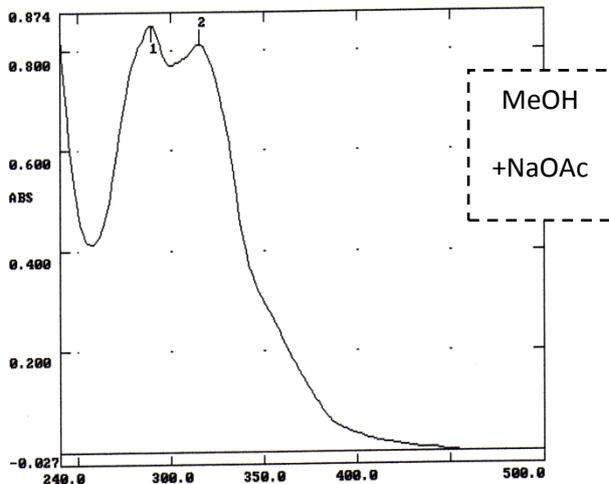
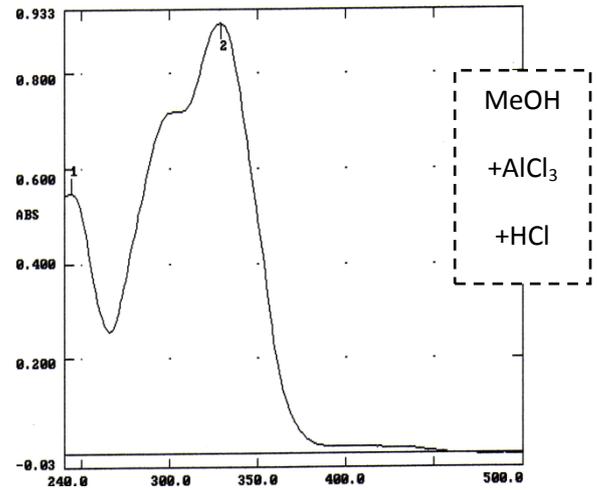
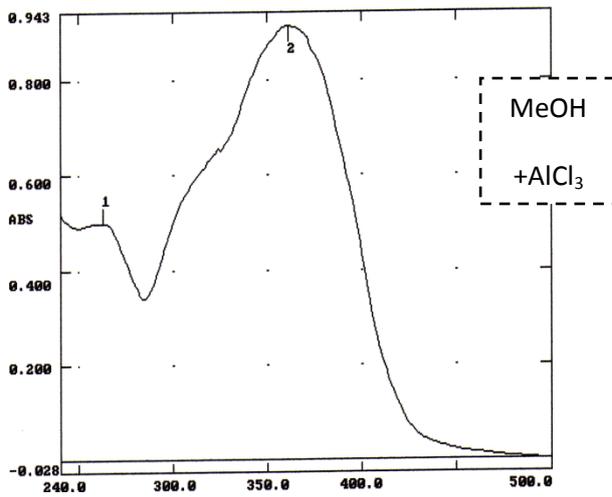
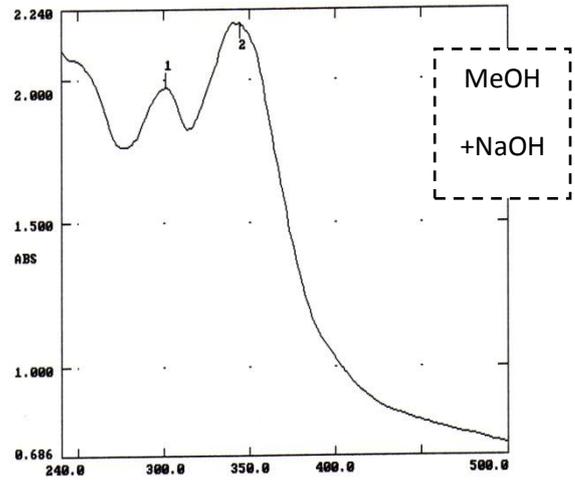
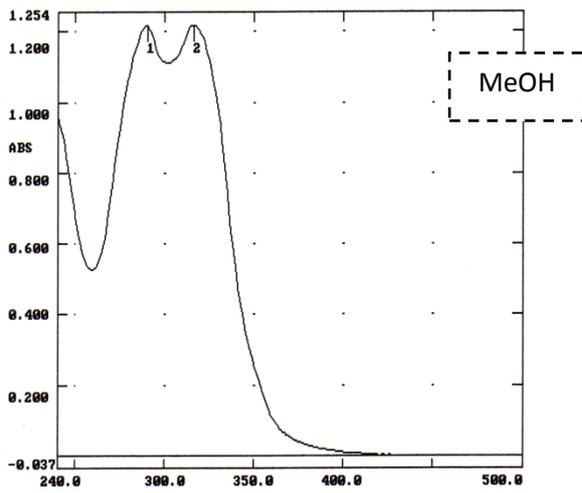
Le spectre permet d'observer également :

- Un doublet à 6,30 ppm qui ne peut être attribué qu'au proton H<sub>8</sub> car la valeur de la constante de couplage ( $J = 8,1$  Hz) indique la présence d'un proton en *ortho*,
- Un doublet de doublet à 6,94 ppm ( $J = 8,1$  et 1,9 Hz) qu'on attribue au proton H<sub>9</sub>,
- Un doublet à 7,05 ppm donnant un couplage *mé*ta avec ( $J = 1,9$  Hz) qu'on attribue au proton H<sub>5</sub> (Spectre c.2 et c.3).

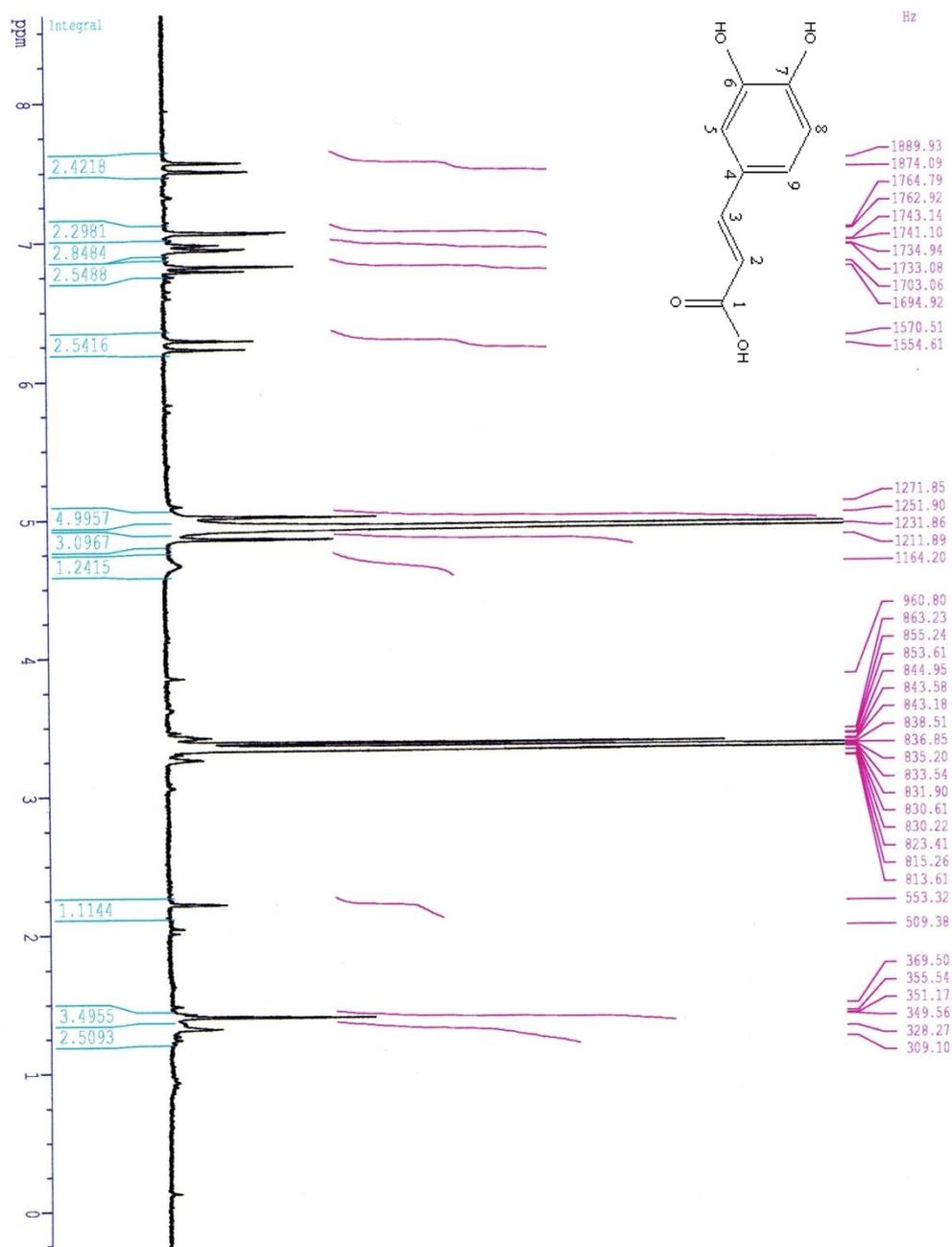
Ces résultats permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit **F**<sub>37</sub>.



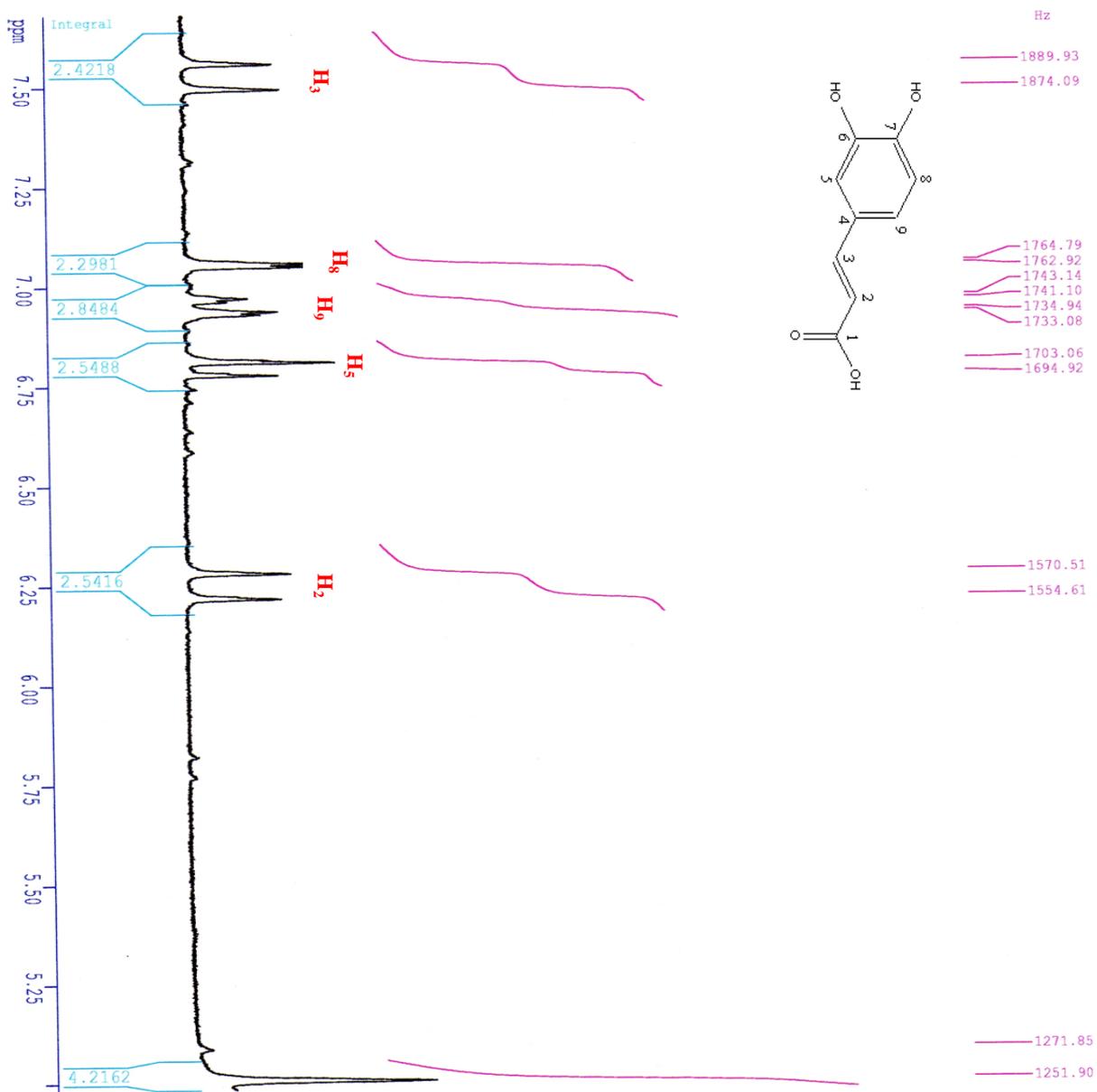
Acide caféique



Spectre c.1: Spectres UV du produit F<sub>37</sub>



Spectre c.2 : Spectre RMN<sup>1</sup>H du produit F<sub>37</sub>



Spectre c.3 :RMN<sup>1</sup>H étalé du produit F<sub>37</sub>

#### d. Elucidation de la structure du composé F<sub>19-21</sub>

##### • Propriétés physico-chimiques

Le composé F<sub>19-21</sub> se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en présentant une fluorescence violette sous lampe UV à 365 nm, laissant envisager une structure de type flavonoïdes.

**Tableau II.10** : Données spectroscopiques UV-visible du produit F<sub>19-21</sub>.

Réactif de déplacement	$\lambda_{\max}$ (nm)				
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement	Interprétation
MeOH	334	-	269	-	Flavone ou flavonol substitué en 3.
NaOH (base forte)	389	-	270	+ 55	OH libre en 4' OH substitué en 7
AlCl <sub>3</sub>	390	-	274	+ 56	OH libre en 5
AlCl <sub>3</sub> + HCl	392	-	274	-	Absence de 3',4'-di-OH sur le cycle B
AcONa (base faible)	387	-	268	-	
AcONa / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338	-	269	-	Absence de 3',4'-di-OH sur le cycle B

##### • Interprétation des résultats

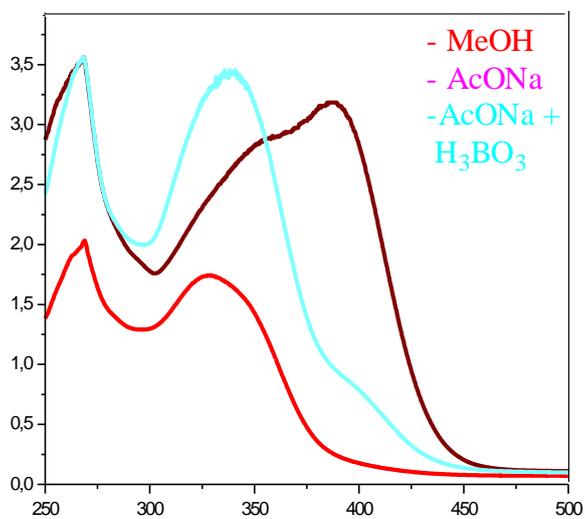
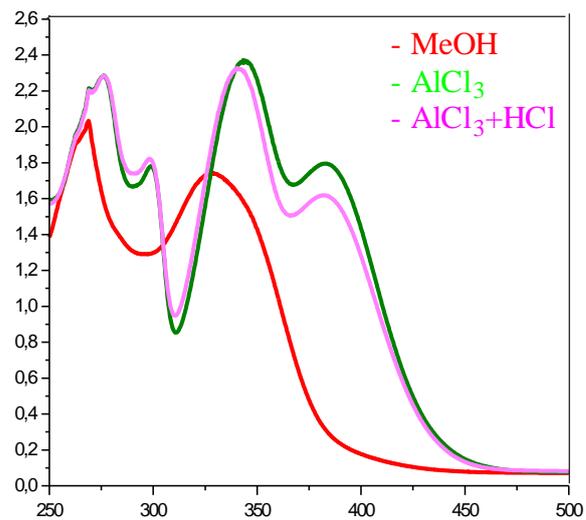
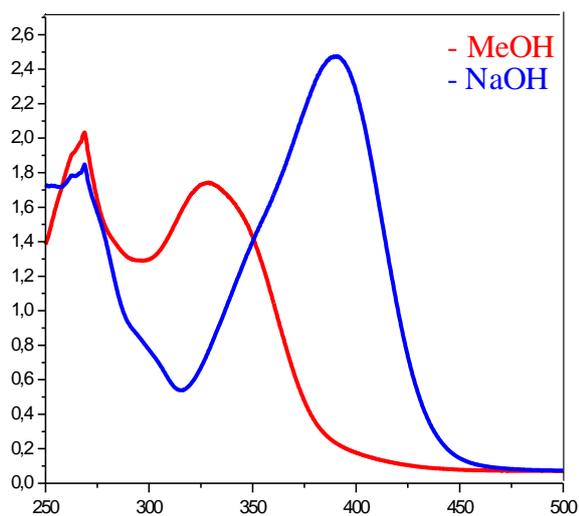
La fluorescence violette sous lampe de Wood indique un squelette flavone confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\max} = 269$  nm et l'autre à  $\lambda_{\max} = 334$  nm.

L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ( $\Delta\lambda = + 55$  nm) indiquant la présence d'un groupement OH libre en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique la présence d'un OH substitué en 7.

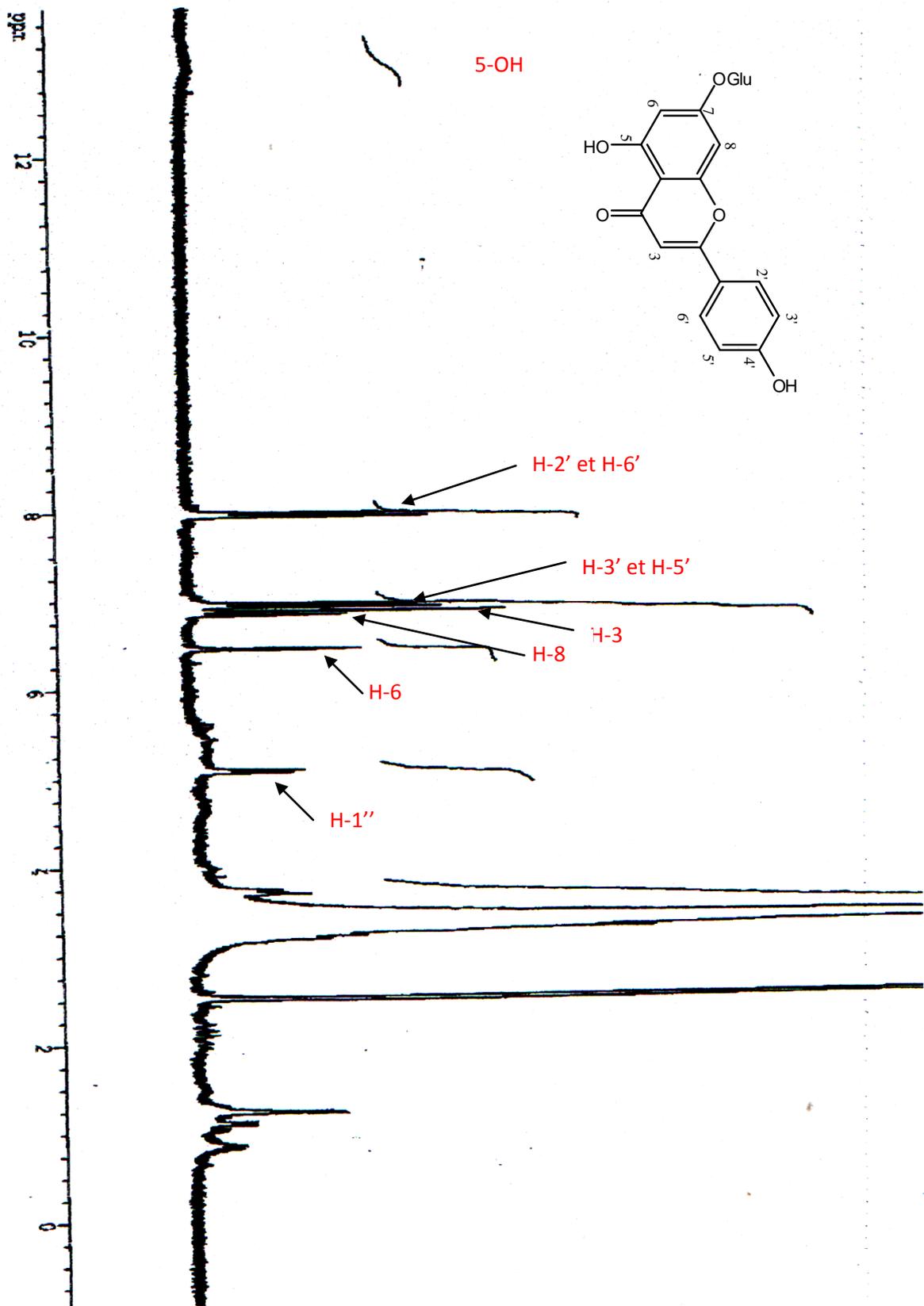
L'effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = 56$  nm) observé après addition d'AlCl<sub>3</sub> à la solution méthanolique indique la présence d'un groupement OH libre en 5.

L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système (MeOH + AlCl<sub>3</sub>) suggère l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande II, après addition de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> au système (MeOH + AcONa).

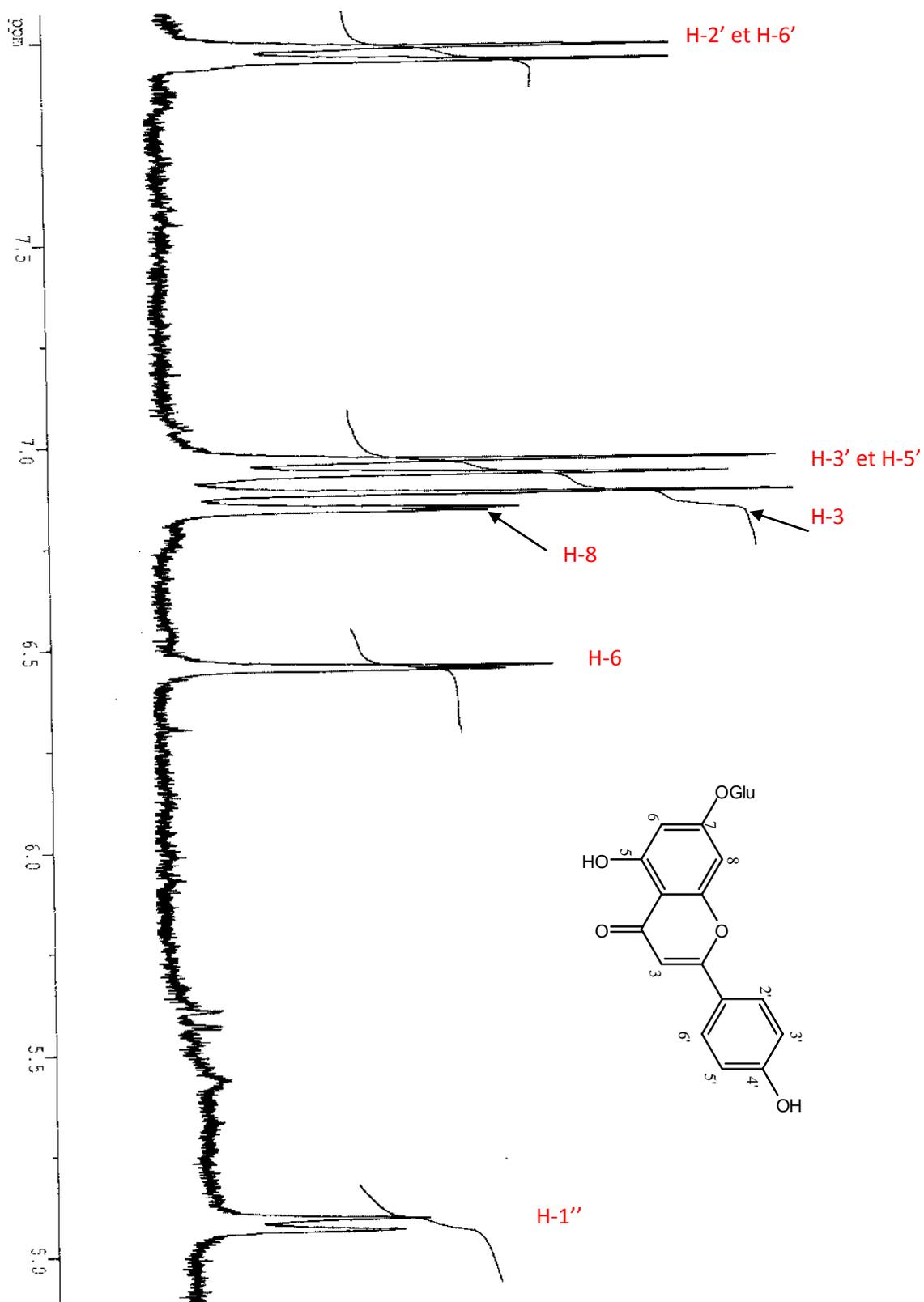




Spectres d.1 : spectre UV-visible du produit F<sub>19-21</sub>.



Spectre d.2. : Spectre RMN <sup>1</sup>H du produit F<sub>19-21</sub>.



Spectre d.3 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (5 à 8 ppm) du produit  $\text{F}_{19-21}$ .

### e. Elucidation de la structure du composé F<sub>23</sub>

#### • Propriétés physico-chimiques

- Poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- Révélation en CCM : Réactif de Neu (jaune fluorescent sous lampe UV).

#### • Données spectroscopiques

**Tableau II.12:** Données spectroscopiques UV-visible du produit F<sub>23</sub>.

Réactif de déplacement	$\lambda_{\max}$ (nm)				
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement	Interprétation
MeOH	346	-	258	-	Flavone ou flavonol substitué en 3.
NaOH (base forte)	410	-	269	+ 64	OH libre en 4' OH substitué en 7
AlCl <sub>3</sub>	420	-	274	+ 74	OH libre en 5
AlCl <sub>3</sub> + HCl	386	-	270	-	Existence d'ortho di-OH sur le cycle B
AcONa (base faible)	409	-	262	-	Pas de OH libre en 7
AcONa / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	372	-	259	+ 26	3',4'-di-OH sur le cycle B

**Tableau III.13 :** Données RMN-<sup>1</sup>H (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) du produit F<sub>23</sub>

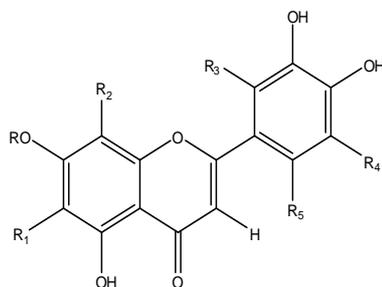
Interprétation	$\delta$ (ppm), m, J (Hz)	Intégration
H-2'	7.48, d, 2.2	1H
H-6'	7.43, dd, 2.2 et 8.2	1H
H-5'	6.91, d, 8.2	1H
H-6	6.45, d, 2.2	1H
H-8	6.80, d, 2.2	1H
H-3	6.77, s	1H
H-1''	5.09, d, 7.12	1H
Glu	3.71-3.00	5H

#### • Interprétation des résultats

La fluorescence violette sous lampe de Wood indique un squelette flavone confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\max} = 258$  nm et l'autre à  $\lambda_{\max} = 346$  nm. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome

( $\Delta\lambda = + 64$  nm) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm suggère la présence d'un OH substitué en 7. L'effet hypsochrome ( $\Delta\lambda = - 34$  nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl<sub>3</sub> indique la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 26$  nm) observé après addition de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> au système MeOH + AcONa (Tableau II.12, spectre e.1).

Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit **F<sub>23</sub>**.



Dans le spectre RMN <sup>1</sup>H du produit **F<sub>23</sub>**, on observe un doublet résonant à  $\delta = 7.48$  ppm ( $J = 2.2$  Hz) et un doublet de doublet à  $\delta = 7.43$  ppm ( $J = 8.2$  et  $2.2$  Hz) respectivement dues aux protons H-2' et H-6', un doublet due à H-5' apparaissant à  $\delta = 6.91$  ppm ( $J = 8.2$  Hz) et deux doublets résonant à  $\delta = 6.80$  ppm ( $J = 2.2$  Hz) et  $\delta = 6.45$  ppm ( $J = 2.2$  Hz) attribués respectivement à H-8 et H-6. Le singulet observé à  $\delta = 6.77$  ppm est du à la résonance de H-3. L'apparition d'un doublet à  $\delta = 5.09$  ppm ( $J = 7.1$  Hz) caractéristique d'un proton anomérique et de signaux entre  $\delta = 3.71$  et  $3.00$  ppm indiquent la présence d'un sucre lié à la 5,3',4'-trihydroxyflavone par le carbone-7. La constante de couplage ( $J = 7.1$  Hz) observée pour le proton anomérique de **F<sub>23</sub>**, suggère une liaison de configuration  $\beta$  entre le sucre et la génine.

La présence du groupement glucosyle est confirmée par la RMN <sup>13</sup>C qui permet de distinguer les signaux suivants : 100.2 (C-1''), 73.5 (C-4''), 76.7 (C-3''), 69.9 (C-5''), 77.5 (C-2''), 61.0 (C-6''), en plus des signaux caractéristiques des carbones flavoniques.

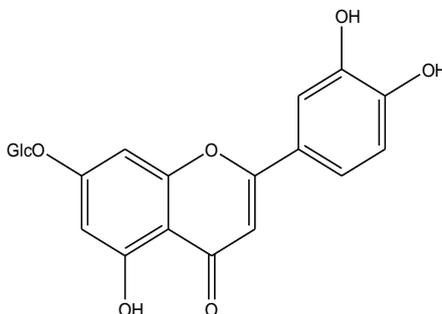
L'hydrolyse acide de ce composé libère le glucose comme sucre identifié par cochromatographie avec un échantillon authentique.

Les attributions finales des signaux sont dressées dans le tableau II.14.

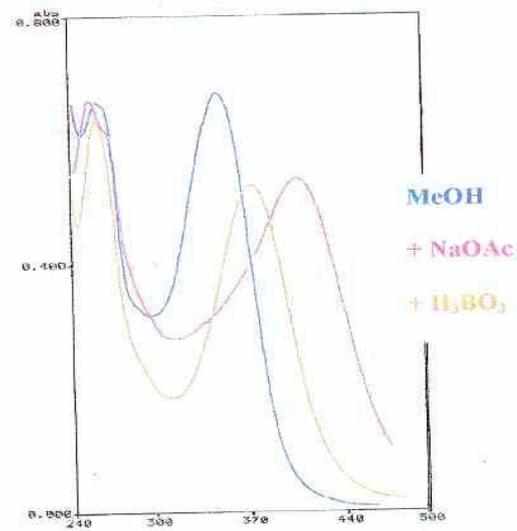
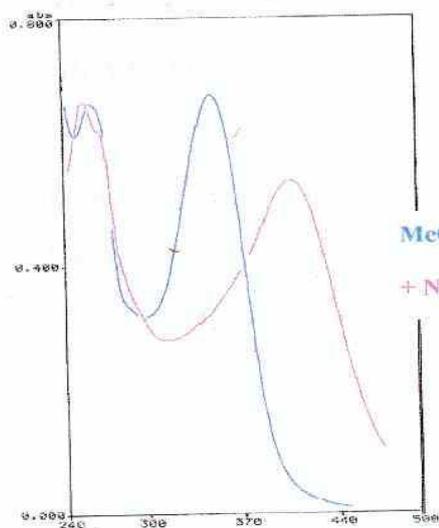
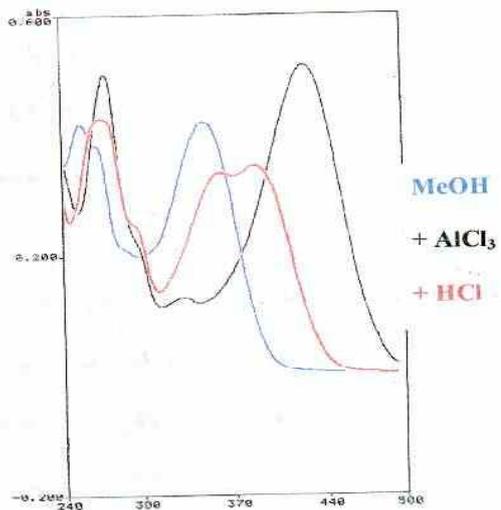
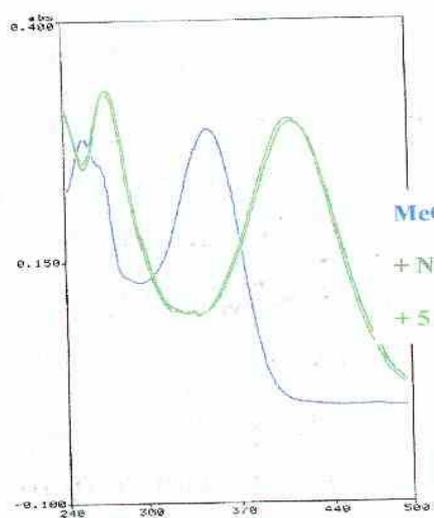
**Tableau II.14** : Données RMN-<sup>13</sup>C (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) du produit F<sub>23</sub>

Interprétation	δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)
C-2	163.3	C-3'	146.2
C-3	105.7	C-4'	150.3
C-4	182.3	C-5'	118.3
C-5	161.5	C-6'	119.6
C-6	99.9	C-1''	100.2
C-7	164.8	C-2''	77.5
C-8	95.1	C-3''	76.7
C-9	157.3	C-4''	73.5
C-10	103.5	C-5''	69.9
C-1'	121.7	C-6''	61.0
C-2'	113.9		

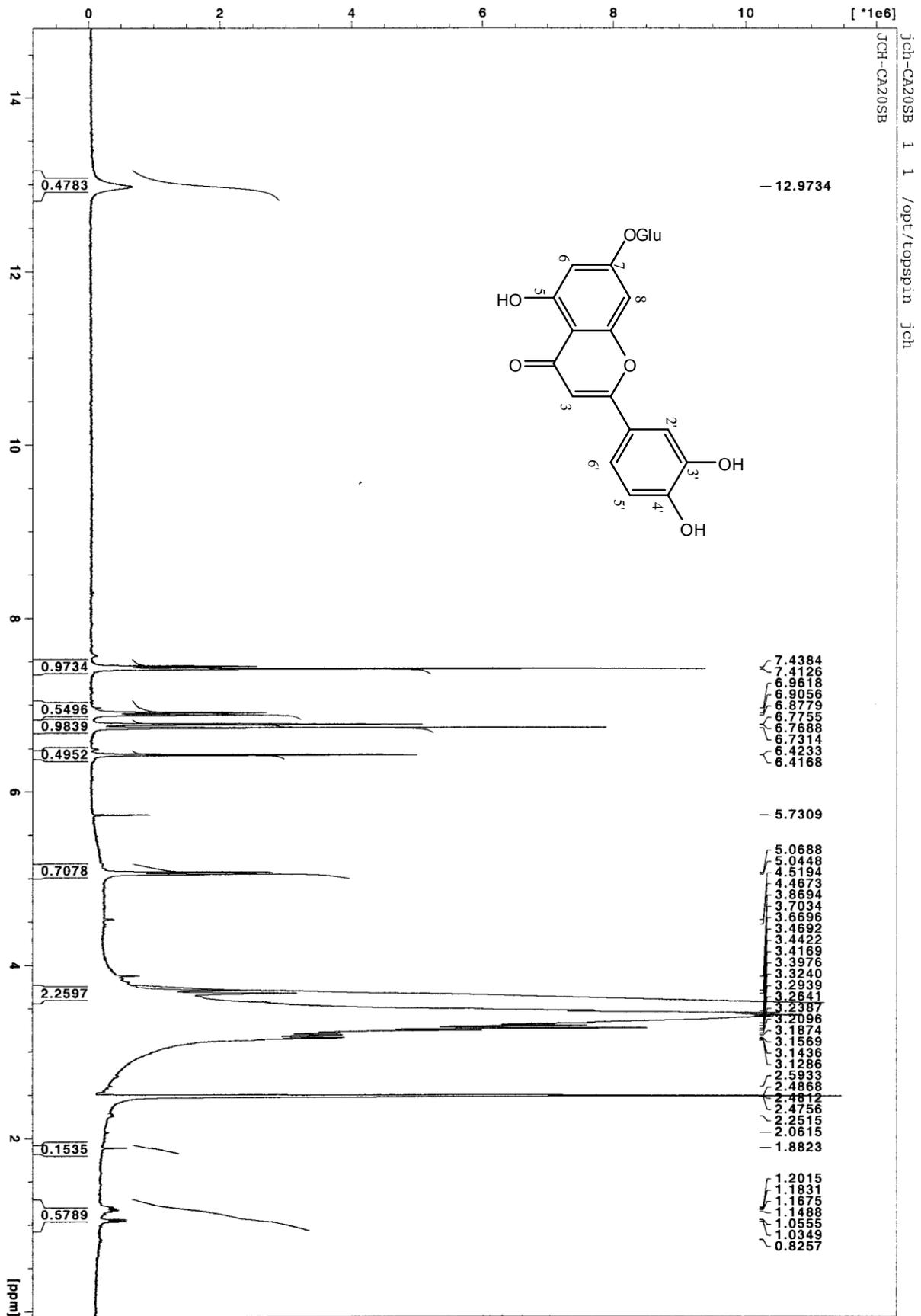
L'ionisation chimique donne un pic moléculaire à  $m/z = 449$  (Spectre e.5), suggérant la formule brute C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>. L'ensemble de ces données permet d'attribuer au flavonoïde considéré la structure : **7-O-β-D-glucosyl-5, 3',4'-trihydroxyflavone** ou (7-O-β-D-glucosyllutéoline).



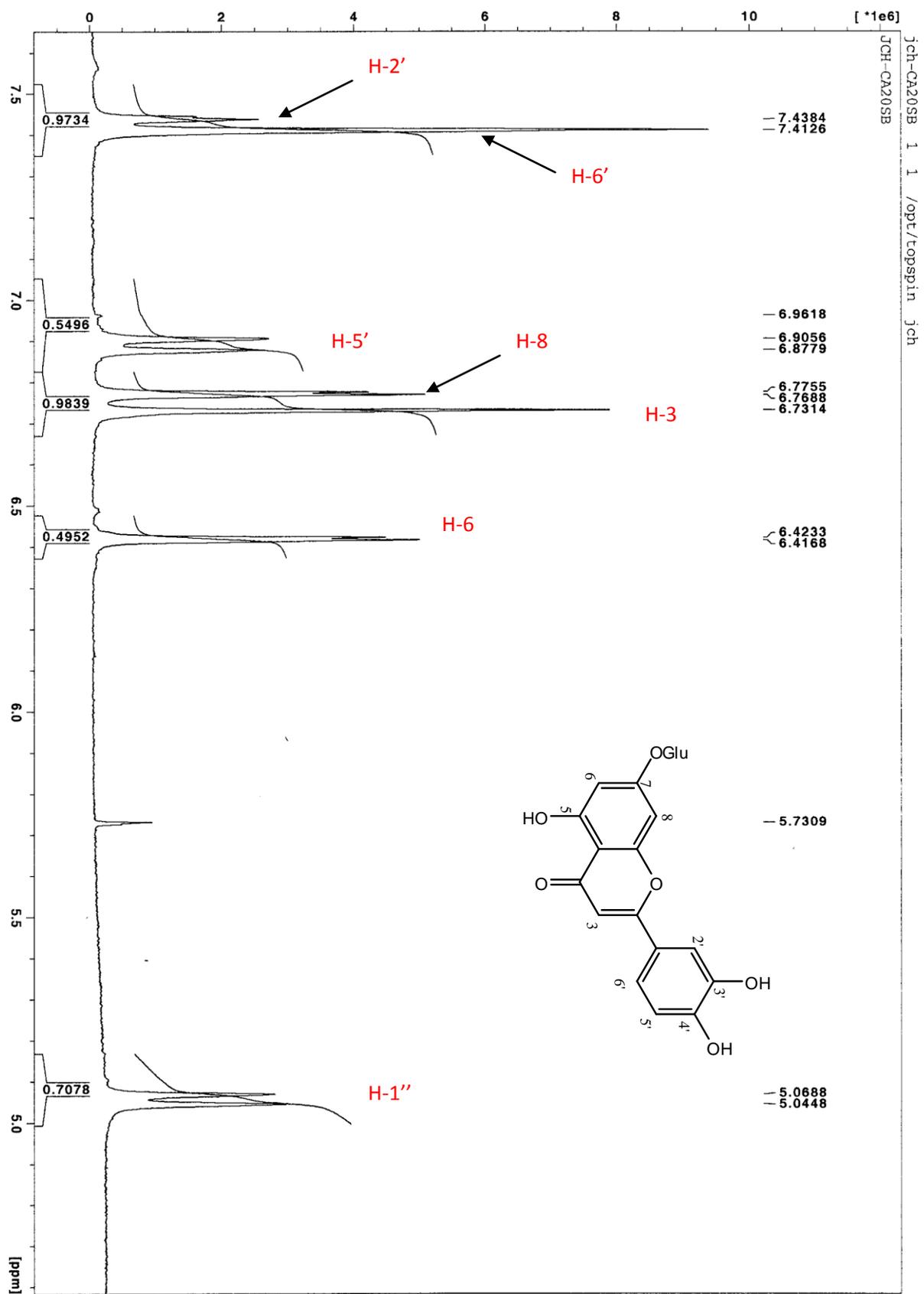
7-O-β-glucosyllutéoline



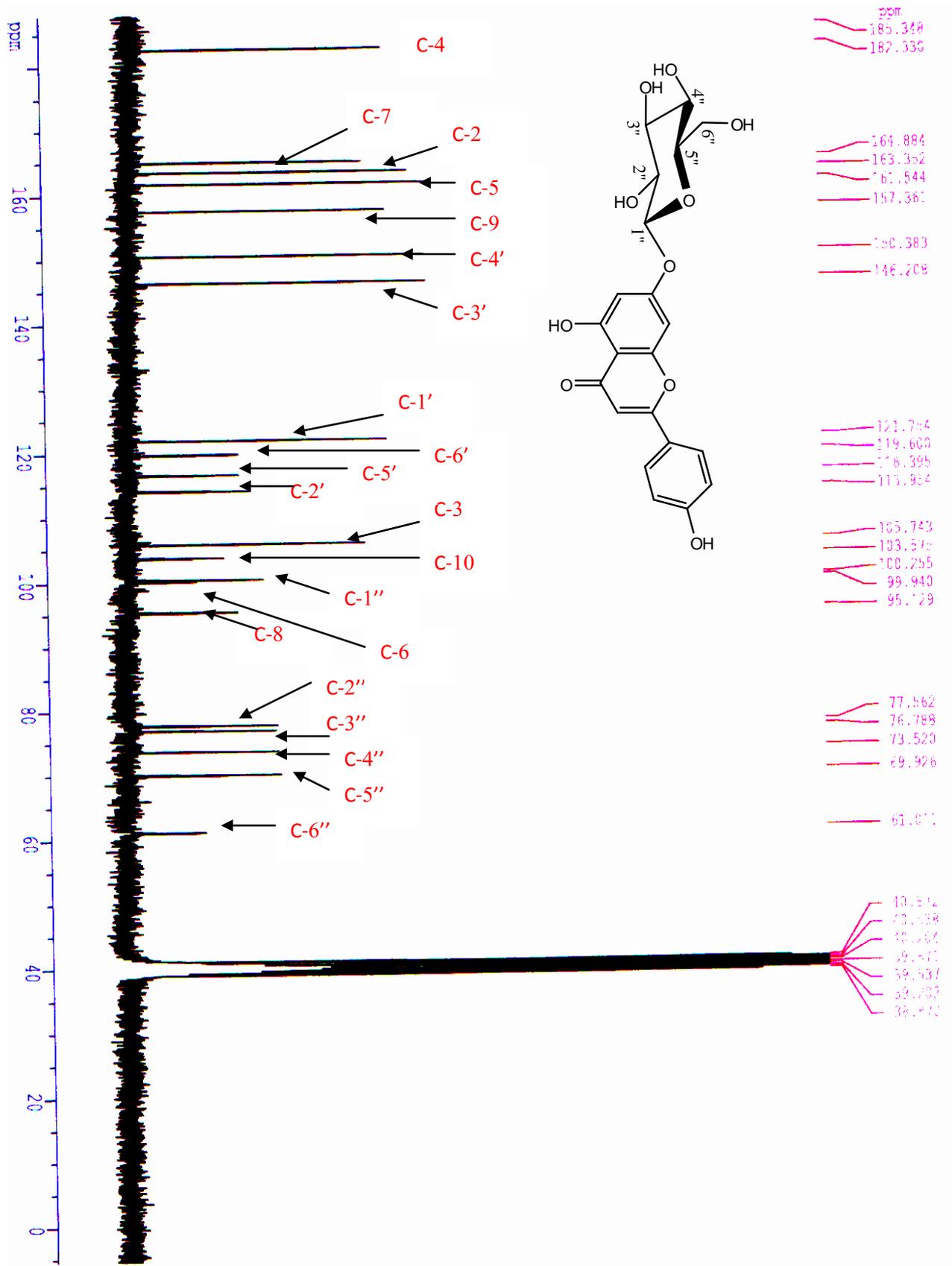
Spectre e.1 : spectres UV-visibles du produit F<sub>23</sub>



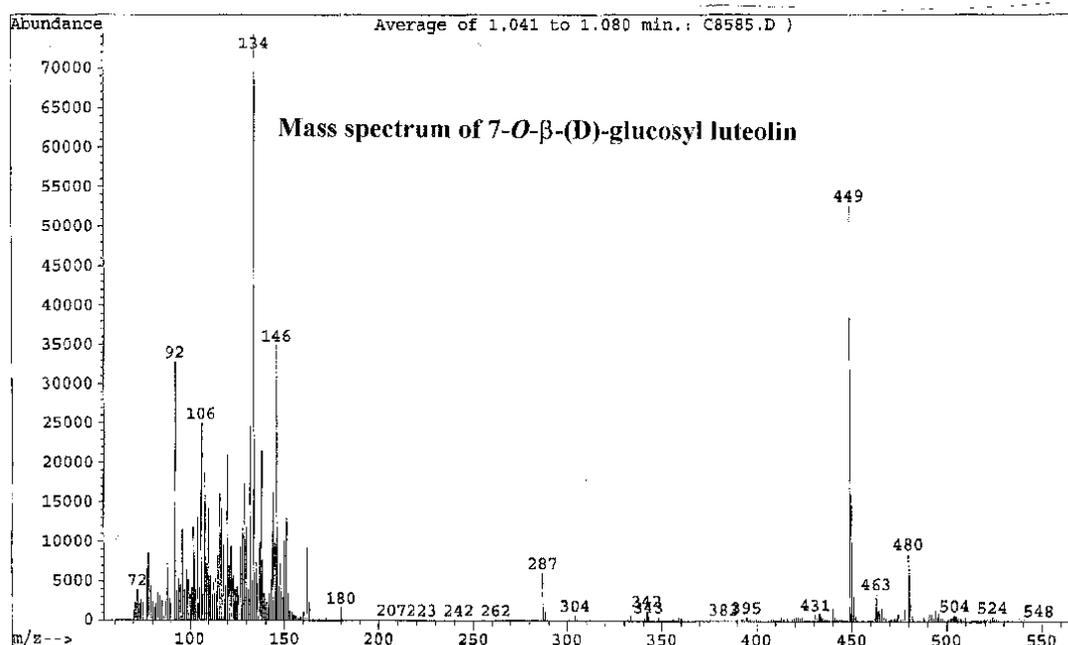
Spectre e.2: Spectre RMN <sup>1</sup>H du produit F<sub>23</sub>



**Spectre e.3 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (6 à 8 ppm) du produit  $\text{F}_{23}$



Spectre e.4 : Spectre RMN <sup>13</sup>C du produit F<sub>23</sub>



Spectre e.5 : Spectre de masse du produit F<sub>23</sub>

#### f. Elucidation de la structure du composé F<sub>50</sub>

##### • Données spectrales UV

Tableau II.15: Données spectrales UV

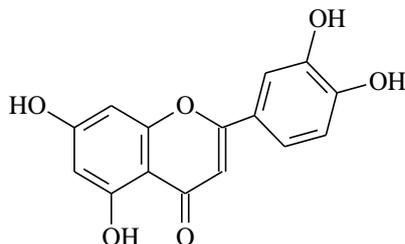
Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	346		256
NaOH	400	325	269
AlCl <sub>3</sub>	420		271
AlCl <sub>3</sub> +HCl	384		273
NaOAc	402		269
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	375		260

##### • Interprétation des résultats

Le produit F<sub>50</sub> a donné une fluorescence violette sous lampe de wood. Le spectre UV effectué dans le méthanol (Tableau II.15) permet d'observer 2 bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\max} = 256$  nm et l'autre à  $\lambda_{\max} = 346$  nm indiquant un squelette de flavone. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 54$  nm) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à  $\lambda_{\max} = 325$  nm montre la présence d'un OH libre en 7. L'effet hypsochrome ( $\Delta\lambda = -36$  nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl<sub>3</sub> suggère la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome ( $\Delta\lambda =$

29 nm) du spectre obtenu après addition de  $H_3BO_3$  au système MeOH + AcONa. L'effet bathochrome ( $\Delta\lambda = 38$  nm) observé après addition de  $AlCl_3 + HCl$  à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 (Tableau II.15, spectre f.1).

Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit  $F_{50}$ :



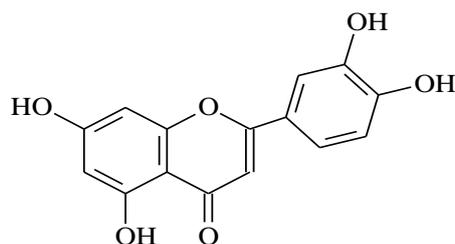
Le spectre RMN du proton enregistré dans  $CD_3COCD_3$  à 400 MHz montre la présence de 3 doublets s'intégrant pour 3 protons, respectivement à 7.38, 6.39, 6.12 ppm ( $J = 2.0$  Hz), caractéristiques des protons en couplage métra ( $H_{2'}$ ,  $H_8$  et  $H_6$ ), un doublet à 6.87 ppm ( $J = 8.2$  Hz), attribué à  $H_{5'}$  et un doublet de doublet à 7.35 ppm ( $J = 8.2$  et 2.0 Hz), caractéristique du proton  $H_{6'}$  (Tableau II.16).

**Tableau II.16:** Données RMN  $^1H$  dans  $CD_3COCD_3$  à 400 MHz

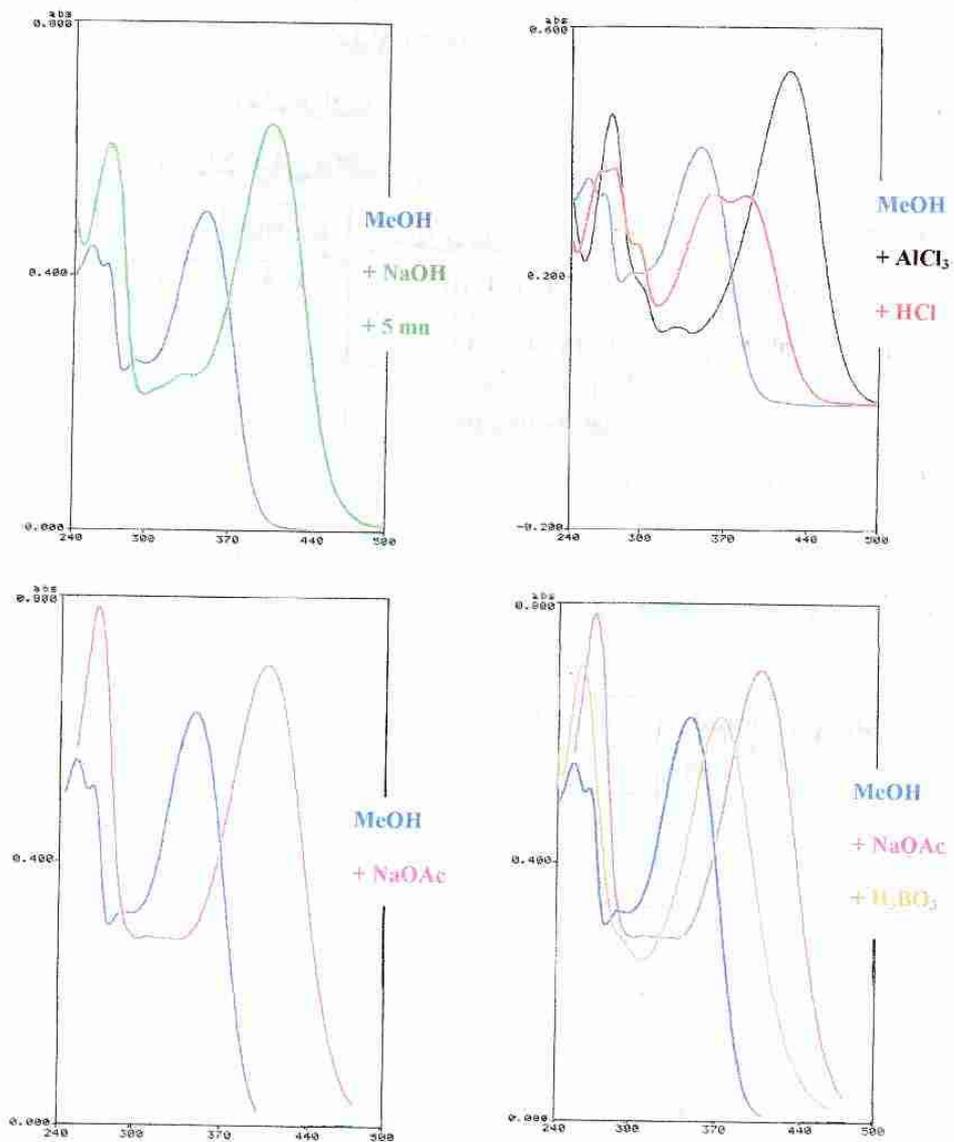
$\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage $J$ (Hz)	Attribution
6.12	1H	d	2.0	$H_6$
6.39	1H	d	2.0	$H_8$
6.45	1H	s	-	$H_3$
6.87	1H	d	8.2	$H_{5'}$
7.35	1H	dd	8.2 et 2.0	$H_{6'}$
7.38	1H	d	2.0	$H_{2'}$

Le spectre de masse enregistré en mode d'ionisation chimique permet d'observer le pic moléculaire à  $m/z = 287 [M+H]^+$  correspondant à la formule brute  $C_{15}H_{10}O_6$  (Spectre f.5)

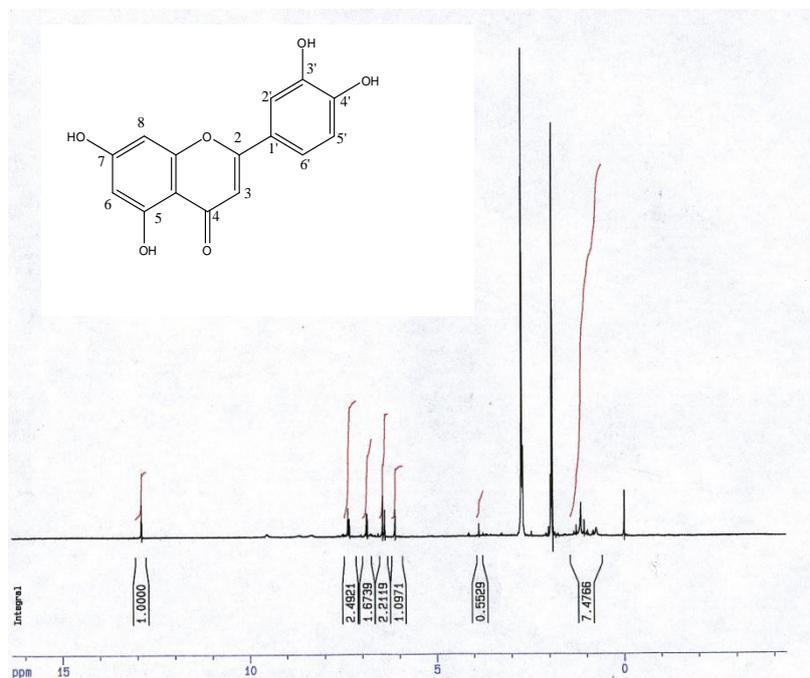
Les données spectroscopiques (UV, RMN, masse) permettent d'identifier la structure de la 5, 7,3',4'-trihydroxyflavone (ou lutéoline) du produit  $F_{50}$ :



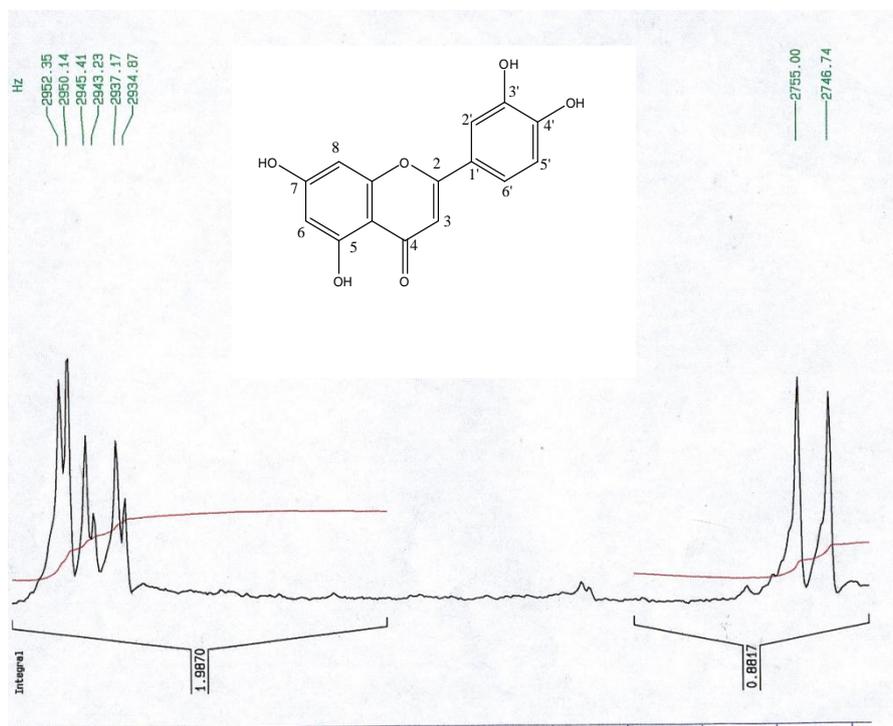
Lutéoline



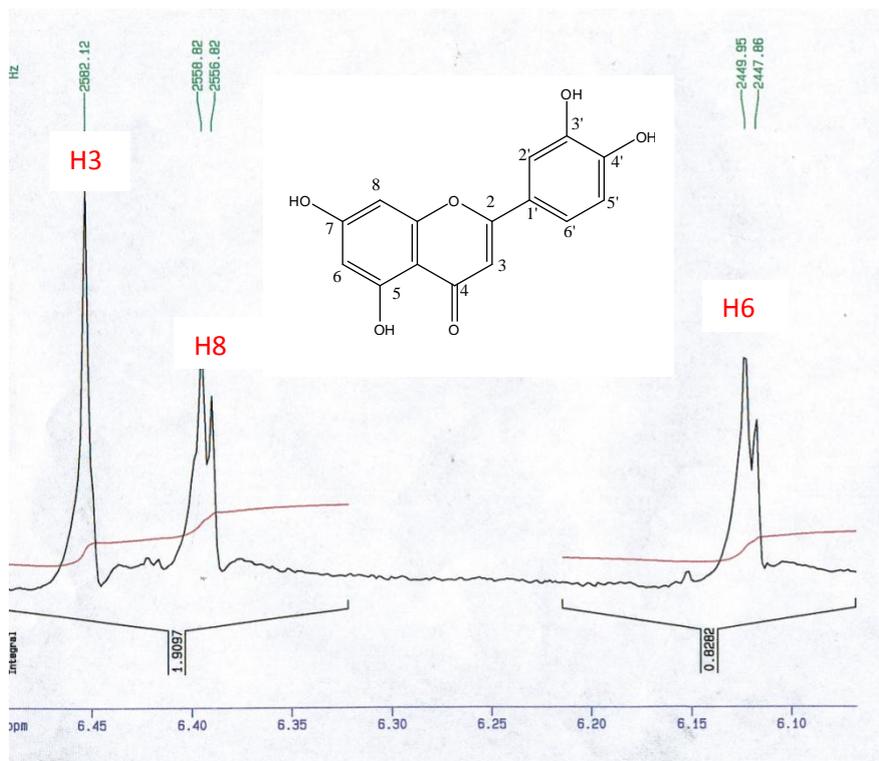
**Spectre f.1:** Spectres UV du produit F<sub>50</sub>



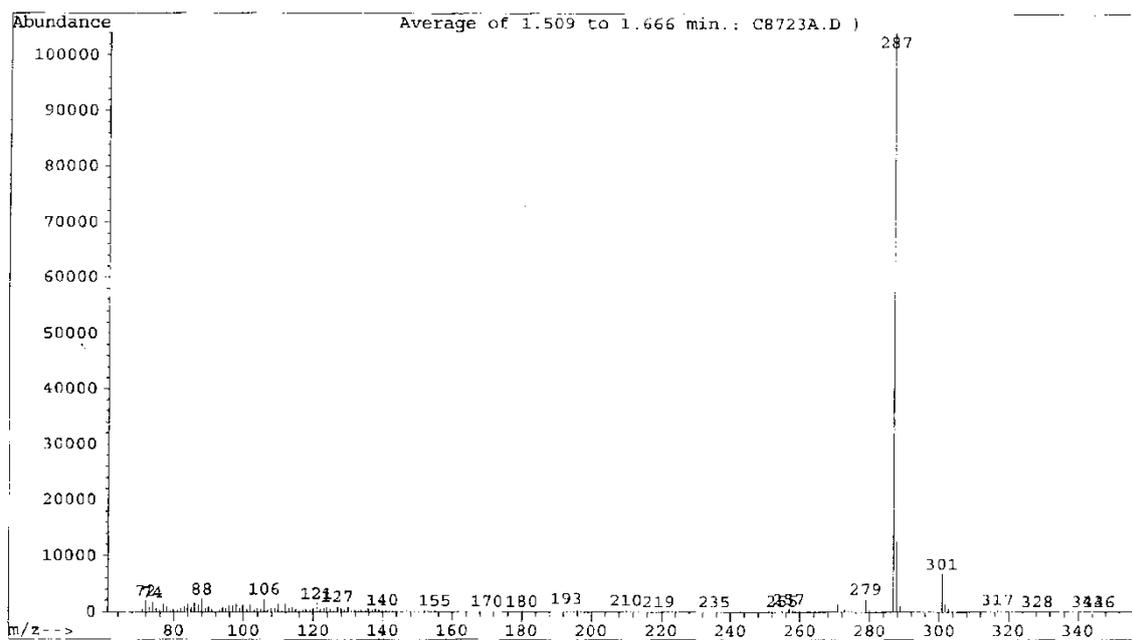
Spectre f.2: RMN<sup>1</sup>H du produit F<sub>50</sub>



Spectre f.3 : RMN<sup>1</sup>H étalé du produit F<sub>50</sub>



Spectre f.4: RMN<sup>1</sup>H étalé du produit F<sub>50</sub>



Spectre f.5 : Masse du produit F<sub>50</sub>

## Références bibliographiques

1. **Markham, K. R., 1982.** Techniques of flavonoids identification. Academic press, London .
2. **Voirin, B., 1983.** Phytochemistry, 22 (10): 2107.
3. **Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970.** Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, p 254.