

Etude phytochimique et activités biologiques de quatre espèces
Camerounaises de la famille des Myrtaceae: *Eucalyptus saligna*
Sm., *Callistemon viminalis* W., *Syzygium guineense* W. et
Syzygium aromaticum M. et P.

Thèse présentée à la faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel par

Djoukeng Jules Désiré

Chimiste diplômé de l'Université de Dschang (Cameroun)

Pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences

Co-dirigée par

Pr. Tabacchi Raffaele
Institut de Chimie
Université de Neuchâtel

Dr. Tapondjou A. Léon
Département de Chimie
Université de Dschang

Juillet 2005

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Etude phytochimique et activités biologiques
de quatre espèces camerounaises de la famille
des Myrtaceae : *Eucalyptus saligna* Sm., *Callis-
temon viminalis* W., *Syzygium guineense* W. et
Syzygium aromaticum M. et P.**

Jules Désiré DJOUKENG

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

Mmes M.-A. Lacaille Dubois (Dijon)
A. Boulanger (Mulhouse) et
MM. R. Tabacchi (co-directeur de thèse)
P. Küpfer, O. Potterat (Bâle)
A. L. Taponjougou (co-directeur de thèse, Dschang Cameroun)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 23 septembre 2005

La doyenne:



M. Rahier

A mes parents Djoumedem David et Tsapfack Joséphine
A ma grande sœur Mme Tsamo Ramelie
A Dongmo Aurelie
A Marcellin Moukam Kameni Curé de Grimisuat
A Christina Wyss
A toute ma famille

Le présent travail a été réalisé à l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel durant la période d'Octobre 2002 à Juillet 2005, au sein du Département de Chimie Organique analytique dirigé par le professeur Raffael Tabacchi.

Je tiens à le remercier très chaleureusement pour m'avoir accueilli au sein de son groupe, pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour les grandes libertés qu'il m'a accordées dans la conduite de ce projet et surtout pour sa disponibilité.

Je remercie le Dr. Taponjou A. Léon du Laboratoire de Chimie Appliquée et Environnementale de l'Université de Dschang, co-directeur de ces travaux pour m'avoir initié à la chimie des substances naturelles, et aussi pour sa confiance.

Je remercie les membres de mon jury de thèse (Pr. Philippe Kupfer, Pr. Marie-Aleth Lacaille Dubois, Dr. Olivier Potterat et le Dr. Anna Boulanger) qui ont accepté de juger ce travail.

Cette thèse n'aurait pas abouti sans l'aide précieuse de nombreuses personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant ces trois dernières années.

Je tiens vivement à remercier:

Le Docteur Abou-Mansour Eliane «Madame Produits Naturels» pour son appui précieux et indispensable, elle trouvait toujours du temps pour répondre à mes questions et m'orienter dans la bonne direction.

Les docteurs Claude Saturnin, Manuel Tharin, Sandrine Chieroux, Marie Lorène et Laura Gonzales pour les longues et passionnantes discussions ainsi que de précieux conseils qu'il m'ont transmis tout au long de ce travail.

J'exprime également ma profonde gratitude à Nicolas Mottier et Bernard Jean-Denis pour le service de masse et surtout pour les moments mémorables passés ensemble durant ces trois années en E-31 et en dehors.

Je remercie une fois de plus le Dr. Claude Saturnin et Monsieur Heinz Bursian pour les beaux spectres RMN.

Durant cette thèse nous avons établi des collaborations avec des scientifiques d'autres domaines et tout particulièrement des biologistes, j'exprime donc toute ma reconnaissance aux personnes suivantes:

Dr, Daniel Job et ses collaborateurs à l'Université de Neuchâtel qui ont mis à ma disposition le matériel et les appareils nécessaires aux tests biologiques.

Dr. Siegrist de l'Institut de Microbiologie à l'hôpital de la Chaux-de-Fond qui a mis à ma disposition le matériel nécessaire aux tests biologiques sur des souches pathogènes.

Dr. Herrero Victor, Humbert Nicolas et Monsieur Ronald Van Door pour leurs précieux conseils et les beaux moments passés ensemble.

Madame Nicole, laborantine de microbiologie pour la culture des souches nécessaires pour les tests biologiques et pour sa grande disponibilité.

Je tiens également à citer les autres membres du groupe avec qui j'ai passé de très bons moments: Claire lise Zbinden, Tiaoubi Moustapha, Jean-Marc Vaucher, José Poliart, Mélanie et Sabine Untermaher.

A tous les enseignants de la faculté des sciences de l'Université de Dschang pour ma formation.

Je remercie également mes collègues de l'Université de Dschang, plus particulièrement Eric Gatchuissi qui malgré la distance a toujours répondu présent à mes sollicitations.

Au risque d'oublier quelqu'un, je ne peux malheureusement pas citer toutes les autres personnes côtoyées pendant ces années à l'institut. Je leurs témoigne simplement toute mon affection et je les remercie pour le bonheur qu'elles m'ont apporté soit à travers une information, une blague ou un sourire.

Je remercie enfin la commission fédérale des bourses Suisse pour étudiants étrangers pour son soutien financier tout au long de ces trois dernières années.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Une partie de ce travail a été présentée sous forme de posters dans différents congrès, et fait l'objet de publications scientifiques

Publications

- A.-C. Mitaine-Offer, J. D. **Djoukeng**, L. A. Tapondjou, H. Bouda, H. Lerche, D. Lontsi, M.-A. Lacaille-Dubois. 2003. Constituents of the leaves of *Eucalyptus saligna*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1457-1460.

- J. D. **Djoukeng**, E. Abou-Mansour, R. Tabacchi, A. L. Tapondjou, H. Bouda, D. Lontsi. 2005. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 283-286.

- J. D. **Djoukeng**, E. Abou-Mansour, A. L. Tapondjou, H. Bouda, D. Lontsi, R. Tabacchi, Ellagic acid rhamnoside from the stem bark of *S. guineense* (Myrtaceae). *Planta Medica*:

Submitted for publication.

- J. D. **Djoukeng**, E. Abou-Mansour, A. L. Tapondjou, D. Lontsi, R. Tabacchi. Antibacterial and antioxidant compounds from leaves of *Syzygium aromaticum* Merr. and Perry (Myrtaceae). *Journal of Natural Products*, **in preparation**.

- J. D. **Djoukeng**, E. Abou-Mansour, A. L. Tapondjou, D. Lontsi, R. Tabacchi. Bioactive Constituents of the leaves of *Callistemon viminalis* Willd (Myrtaceae). *Chemistry and Biodiversity*, **in preparation**.

-Posters

Djoukeng J. D., Abou-Mansour E., Tapondjou, A. L., Tabacchi R. (2004). Triterpenes and ellagic acid rhamnosides from stem bark of *Syzygium guineense*, Palaza Feltrini, Gargnano, Italia, 5-8 may.

Djoukeng J. D., Abou-Mansour E., Tabacchi R., Tapondjou A. L. (2004). Phytochemical study of bark of *Syzygium guineense* (Willd) var macrocarpum. Swiss Chemical Society, Zurich, October.

Résumé

Les plantes de la famille des Myrtaceae sont très aromatiques, avec une abondance en huile essentielle d'où l'usage médicinal. Certaines plantes de cette famille sont utilisées traditionnellement dans la conservation des denrées en stockage dans les pays en voies de développement. Afin de mieux comprendre l'utilisation traditionnelle de *Eucalyptus saligna* Sm., *Callistemon viminalis* G., *Syzygium guineense* W. et *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry (Myrtaceae) nous avons entrepris l'étude phytochimique et pharmacologique de ces quatre espèces.

Les feuilles et les écorces ont été récoltées dans le département de la Menoua à l'ouest du Cameroun. Elles ont été découpées, séchées, broyées puis extraites au mélange CH₂Cl₂-MeOH (1:1). Les extraits obtenus ont été testés sur différentes cibles biologiques. Ils ont été ensuite dissous dans l'eau et extrait à nouveau avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol et testés. Sur la base de l'activité biologique, les extraits ont été analysés par HPLC-UV, LC-MS et GC-MS et étudiés de façon plus approfondie. Ils ont été fractionnés sur des colonnes ouvertes et par MPLC et HPLC semi-préparative. Une partie de leurs constituants ont été isolés et leurs structures déterminées par des méthodes spectroscopiques, en particulier la RMN (1D, 2D) et la MS. Quarante quatre composés ont été isolés parmi lesquels sept nouveaux produits naturels. Ces molécules sont regroupées en cinq groupes: Les alkylphénols, les dérivés d'acide ellagique, les phloroglucinols, les flavonoïdes et les triterpènes. Les alkylphénols et les triterpènes possèdent des activités antibactériennes, les phloroglucinols ont des activités antibactériennes et antifongiques alors que les flavonoïdes et les dérivés d'acide ellagique possèdent une activité anti-oxidante.

Ce travail nous a permis de mieux connaître la phytochimie de ces quatre plantes de la famille des Myrtaceae, d'isoler de nouveaux produits naturels avec des propriétés biologiques et pharmacologiques importantes. Nous avons pu dans certains cas lier l'utilisation traditionnelle des plantes à la présence de certains métabolites secondaires isolés de ces plantes.

Summary

Plants of the Myrtaceae family are aromatic and rich in essential oils, which explain their use in medicine. Some plants of this family are used traditionally as post-harvest grain protectants in developing countries. In the aim to understand the traditional uses of *Eucalyptus saligna* Sm., *Callistemon viminalis* G., *Syzygium guineense* W. and *Syzygium aromaticum* Merr and Perry (Myrtaceae), we studied their phytochemical and pharmacological properties.

The leaves and stem bark of the different plants collected in the Menoua subdivision in west Cameroon were chopped, dried, ground and extracted with the mixture $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). The extracts obtained were tested on different microorganisms. After that, they were dissolved in water and successively extracted with hexane, ethyl acetate and *n*-butanol and tested again. On the basis of these results, the different extracts were analysed by HPLC, LC-MS and GC/MS and studied in-depth. They were fractionated on open column chromatography and then purified by MPLC and semi-preparative HPLC. Some parts of their metabolites were isolated and their structure elucidated by spectroscopic methods in particular NMR (1D and 2D) and mass spectrometry. Forty four compounds were thus isolated among which seven were new natural products. These compounds were grouped into five classes: alkylphenols, ellagic acid derivatives, phloroglucinols, flavonoids and triterpenes. Alkylphenols and phloroglucinols showed antibacterial activity, the latter also showing antifungal activity, whereas ellagic acid derivatives and flavonoids were anti-oxidant.

This project allowed us to know better about the phytochemistry of these four plants of the Myrtaceae family and to isolate new natural products with important biological and pharmacological properties. These results enable us in some cases to establish a link between the chemical composition of some plant and their traditional uses in folk medicine.

ABREVIATIONS

br s: Singulet large

CC: Chromatographie sur colonne ouverte

CCM: Chromatographie sur couche mince

COLOC: Corrélation via le couplage longue distance
(Correlation via long range couplings)

COSY: Spectroscopie de corrélation

d: Doublet

dd: Doublet de doublet

DAD: Détecteur à réseau de diodes

DEPT: Augmentation sans déformation par transfert de polarisation
(Distortionless enhancement by polarisation transfer)

DPPH: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle

EI: Impact électronique

ESI: Ionisation par électrospray

GC: Chromatographie en phase gazeuse

Glc: Glucose

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation

HMQC: Heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance/pression

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

m: multiplet

QIC: Quantité minimum d'inhibition

MPLC: Chromatographie liquide à moyenne pression

MS: Spectrométrie de masse

MSⁿ: Spectrométrie de masse en n étapes

NOESY: Spectroscopie NOE et d'échange

q: Quadruplet

SPE: Extraction en phase solide

t: triplet

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
I-1: Les Myrtacées	2
I-2: <i>Eucalyptus saligna</i> Sm.	2
I-2-1: Aspects botaniques	2
I-2-2: Usage traditionnel	3
I-2-3: Travaux chimiques antérieurs	3
I-2-4: Intérêts pharmacologiques	6
I-2-5: Importance économique et écologique	8
I-2-6: Proposition de biosynthèse de quelques phloroglucinols	8
I-2-6-1: Robustaol A	8
I-2-6-2: Sidéroxylonal	9
I-3: <i>Callistemon viminalis</i> Willd	9
I-3-1: Aspects botaniques	9
I-3-2: Usage traditionnel	10
I-3-3: Travaux chimiques antérieurs	10
I-3-4: Intérêts Pharmacologiques	12
I-3-5: Biosynthèse des flavonoïdes	13
I-4: <i>Syzygium guineense</i> Willd et <i>Syzygium aromaticum</i> Merr. et Perry	15
I-4-1: Aspects botaniques	15
I-4-2: Usage traditionnel	15
I-4-3: Travaux chimiques antérieurs	15
I-4-4: Intérêts pharmacologiques	18
I-4-5: Intérêts économiques	18
I-5: But du travail	19
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES.	20
II-1: Récolte et extraction du matériel végétal	21
II-2: Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait de <i>E. saligna</i>	22
II-3: Fractionnement et activités biologiques de <i>C. viminalis</i>, <i>S. guineense</i> et <i>S. aromaticum</i>	23
II-3-1: Analyse chimique des extraits à l'hexane et au <i>n</i> -butanol de <i>C. viminalis</i> par HPLC-UV (DAD)-MS	24
II-3-2: Fractionnement et isolement des métabolites de <i>C. viminalis</i>	24
II-3-3: Analyse chimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle de <i>S. guineense</i> par HPLC-UV (DAD)-MS	25
II-3-4: Fractionnement et isolement des métabolites de <i>S. guineense</i>	26
II-3-5: Séparation de l'acide arjunolique et de l'acide asiatique par la méthode de Lewis	27
II-3-6: Analyse chimique des extraits par HPLC-UV (DAD)-MS de <i>S. aromaticum</i>	28
II-3-7: Fractionnement et isolement des métabolites de <i>S. aromaticum</i>	30

III-4: Techniques analytiques	30
III-4-1: Ionisation électrospray	30
III-4-2: Trappe ionique	32
II-5: Test Antioxydant	35
II-5-1: Méthode bioautographique	35
II-5-2: Méthode par mesure d'absorption UV	35
II-6: Tests antifongiques	36
II-6-1: Méthode par diffusion sur minidisque	36
II-6-2: Méthode bioautographique	36
II-7: Tests antibactériens	37
II-7-1: Méthode par diffusion sur minidisque	37
II-7-2: Méthode bioautographique	38
II-8: Tests Insecticides	39
II-8-1: Préparation du matériel animal	39
II-8-2: Préparation des différentes doses	39
II-8-3: Etude de l'effet répulsif des extrait	39
II-8-4: Etude de l'effet toxique de l'extrait	40
CHAPITRE III: RESULTATS	41
III-1: Les Alkylphénols	42
III-1-1: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadec-5',7',14'-triène (Sah ₁)	42
III-1-2: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadec-5',7'-diène (Sah ₂)	47
III-1-3: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadec-5'-ène (Sah ₃)	51
III-1-4: Identification de la structure de l'acide salicylique-6-heptadecane (Sah ₄)	54
III-2: Les dérivés de l'acide ellagique	56
III-2-1: Identification de la structure de l'acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'- α -rhamnoside (Sg ₁)	56
III-2-2: Détermination de la structure de l'acide 3- <i>O</i> -méthylellagique -4'- α -2'''- <i>O</i> -Rhamnoside (Sg ₂)	60
III-2-3: Détermination de la structure de l'acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'- α -3'''- <i>O</i> -rhamnoside (Sg ₃)	64
III-2-4: Détermination de la structure de l'acide 3, 4, 3'- <i>O</i> -triméthylellagique -4'- β -2''',3''',4'''- <i>O</i> -triacétylrhamnoside (Sgf ₇)	68
III-2-5: Identification de la structure de l'acide 3, 3'- <i>O</i> -diméthylellagique-4'- <i>O</i> - β -glucoside (Cv ₁₁)	74
III-2-6: Identification de la structure de l'acide 3, 4, 3'- <i>O</i> -triméthylellagique acide 4'- <i>O</i> - β -glucopyranoside (Cv ₁₂)	76
III-3: Les Phloroglucinols	80
III-3-1: Identification de la structure du 2, 6-dihydroxy-3-méthyle -4-méthoxyisobutyrophenone (Cv ₁₀)	80
III-3-2: Identification de la structure du 2, 6-dihydroxy -4-méthoxyisobutyrophenone (Cv ₂₁)	83
III-3-3: Identification de la structure du 2, 6-dihydroxy-4-méthoxyisovalerophenone (Cv ₂₂)	85

III-3-4: Détermination de la structure du dimère de la jensenone (Es ₅)	88
III-3-5: Identification de la structure du sideroxylonal C (Es ₆)	90
III-4: Les flavonoides	92
III-4-1: Identification de la quercétine (Sa ₇)	93
III-4-2: Identification de la myricétine (Sa ₁₁)	94
III-4-3: Identification de la myricétine -3-O-β-glucopyranoside (Sa ₁₀)	96
III-4-4: Identification de la quercétine -3-O-β-glucopyranoside (Sa ₉)	98
III-4-5: Identification de la quercétine-3-O-(6''-galloyl)-β-glalactopyranoside (Sa ₄₂)	99
III-4-6: Identification de la quercétine-3-O-α-rhamnopyranoside (Sa ₈)	100
III-4-7: Identification de la myricétine-3-O-β-arabinopyranoside (Sa ₁₂)	101
III-4-8: Identification de la myricétine-3-O-(6''-galloyl)-β-glalactopyranoside (Sa ₄₁)	103
III-4-9: Identification de la myricétine-3-O-β-D-xylopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranoside(Sa ₅₂)	107
III-4-10: Identification de la quercétine-3-O-β-D-xylopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranoside (Sa ₅₁)	111
III-4-11: Identification du mélange (4S)-α-terpinéol 1-8-O- β-D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside et (4R)-α-terpinéol-8-O-β-D-(6'-O-galloyl)glucopyraoside (Sa ₁₃)	117
III-4-12: Identification de la quercétine-3-O-α-L-arabinopyranoside (Cv ₉)	121
III-4-13: Identification de l'eucalyptine (Es ₁)	123
III-4-14: Identification de la catéchine (Cv ₇)	124
III-5: Les triterpènes	125
III-5-1: Identification de la bétuline (Es ₅)	125
III-5-2: Identification de l'acide bétulinique (Sgf ₂)	126
III-5-3: Identification de l'uvaol (Es ₃)	127
III-5-4: Identification de l'acide ursolique (Es ₄)	127
III-5-5: Identification de l'acide oléanolique (Sgf ₃)	128
III-5-6: Identification du mélange d'acide 2α-3β-dihydroxyurs-12-ènoïque et d'acide 2α-3β-dihydroxyoléan-12-ènoïque (Sgf ₄)	129
III-5-7: Identification du mélange d'acide asiatique et d'acide arjunolique (Sgf ₅)	130
III-5-8: Identification du mélange d'acide-6-hydroxyasiatique et d'acide-6-hydroxyarjunolique (Sgf ₆)	132
III-6: Les saponosides	134
III-6-1: Identification du mélange d'acide arjunolique-28-β-D-glucopyranosyle ester et D'acide asiatique-28-β-D-glucopyranosyle ester (Sgf ₈)	134
III-6-2: Identification de l'acide asiatique-28-β-D-glucopyranosyl ester (Sa ₁₅)	136
III-6-3: Identification du 3-O-β-D-glucopyranosyle-β-sitostérol (Sgf ₇)	138
III-6-4: Identification du 3-O-α-L-arabinopyranosyle-hédéragénine (Cv ₁₃)	139
III-6-5: Détermination de la structure de l'hédéragénine-3-O-β-D- glucopyranosyl (1→2)-β-D- xylopyranoside (Cv ₁₄)	141
III-6-6: Détermination de la structure de l'acide oléanolique 3-O-[α-L- rhamnopyranosyl (1→2) β-D- glucopyranosyl]-28-O-β-D-glucopyranoside (Sa ₁₄)	145

III-7: Autres métabolites	150
III-7-1: Détermination de la structure du 1-méthoxylrhamnoside (Sa16)	151
III-7-2: Identification des acides gras des extraits apolaires de <i>C. viminalis</i> et <i>S. aromaticum</i> Par GC/MS	153
III-8: Tests Biologiques	155
III-8-1: Tests antibactériens	155
III-8-2: Tests antifongiques	156
III-8-3: Activité biologique des extraits de plantes étudiés	156
III-8-3-1: Tests insecticides de l'extrait de <i>E. saligna</i>	156
III-8-3-2: Activités biologiques de <i>Calistemon viminalis</i> , <i>Syzygium guineense</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	158
III-8-4 : Activités biologiques des composés isolés	159
III-8-4: Les triterpènes	159
III-8-5: Les phloroglucinols	160
III-8-6: Les alkylphénols	161
III-8-7: Les acides ellagiques	162
III-8-8: Les flavonoïdes	163
CHAPITRE IV: Discussion des résultats	166
IV-1: Phytochimie	167
IV-1-1: <i>Eucalyptus saligna</i>	167
IV-1-2: <i>Callistemon viminalis</i>	167
IV-1-3: <i>Syzygium guineense</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	167
IV-2: Activités biologiques des métabolites isolés	169
CHAPITRE V: Conclusion et perspectives	171
CHAPITRE VI: Partie expérimentale	176
VI-1: Tests Analytiques	177
VI-1-1: Test de Liebermann Buchard	177
VI-1-2: Test au chlorure ferrique	177
VI-1-3: Test pour identification des flavonoïdes	177
VI-2: Méthodes chromatographiques analytiques	177
VI-2-1: Chromatographie sur couche mince	177
VI-2-2: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie Ultraviolet/Visible (HPLC-UV/VIS)	178
VI-2-3: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie UV/Vis et à la spectrométrie de masse (HPLC-UV/VIS-ESI-MS ⁿ)	178
VI-2-4: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS	179
VI-2-5: Chromatographie en phase gazeuse avec espace de tête couplée à la spectrométrie de masse HS-GC/MS	179
VI-3: Méthodes préparatives	180

VI-3-1: Partage liquide-liquide	180
VI-3-2: Chromatographie liquide sur colonne	180
VI-3-2-1: Chromatographie d'adsorption	180
VI-3-2-2: Chromatographie d'exclusion	180
VI-3-2-3: Chromatographie de partage	181
VI-4: Chromatographie liquide à moyenne pression	181
VI-5: Méthodes physico-chimiques	181
VI-5-1: Pouvoir rotatoire	181
VI-5-2: Spectres ultraviolets (UV)	181
VI-5-3: Spectres Infra-Rouge (IR)	182
VI-5-4: Point de fusion (Pf)	182
VI-5-5: Spectrométrie de masse (MS)	182
VI-5-6: Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)	182
VI-6: Méthodes chimiques	183
VI-6-1: Hydrolyse acide	183
VI-6-2: Hydrolyse enzymatique	183
CHAPITRE VII: REFERENCES	184

Liste des figures

Figure 1-1: Feuilles et fleurs de <i>E. saligna</i>	2
Figure 1-2: Feuilles et fleurs de <i>C. viminalis</i>	10
Figure 1-3: Feuilles et fleurs de <i>S. guineense</i>	15
Figure 2-1: Profil chromatographique de l'extrait à l'hexane de <i>C. viminalis</i>	24
Figure 2-2: Profil chromatographique de l'extrait au <i>n</i> -butanol de <i>C. viminalis</i>	24
Figure 2-3: Profil chromatographique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de <i>S. guineense</i>	25
Figure 2-4: Spectre UV des molécules détectées de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de <i>S. guineense</i>	26
Figure 2-5: Profil chromatographique de l'extrait à l'hexane des feuilles de <i>S. aromaticum</i>	28
Figure 2-6: Spectre UV des molécules détectées de l'extrait à l'hexane de <i>S. aromaticum</i>	29
Figure 2-7: Profil chromatographique de l'extrait à l'acétate d'éthyle de <i>S. aromaticum</i>	29
Figure 2-8: Profil chromatographique de l'extrait au <i>n</i> -butanol de <i>S. aromaticum</i>	29
Figure 2-9: Représentation de la méthode électrospray par la formation du cône de Taylor	31
Figure 2-10: Représentation schématisée de la formation de la goutte chargée à son explosion	32
Figure 2-11: Schéma d'une trappe ionique	33
Figure 2-12: Diagramme de stabilité de la trappe ionique	34
Figure 2-13: Test antifongique réalisé par la méthode de diffusion sur minidisque	36
Figure 2-14: Test antifongique réalisé par la méthode bioautographique	37
Figure 2-11: Test antibactérien réalisé par la méthode bioautographique	38
Figure 3-1: Spectre RMN ¹ H de Sah ₁	43
Figure 3-2: Spectre DEPT de Sah ₁	43
Figure 3-3: Spectre RMN ¹³ C de Sah ₁	43
Figure 3-4: Spectre COSY de Sah ₁	44
Figure 3-5: Spectre HMQC de Sah ₁	44
Figure 3-6: Agrandissement du spectre HMQC de Sah ₁	45
Figure 3-7: Spectre HMBC de Sah ₁	46
Figure 3-8: Agrandissement du spectre (HMBC) de Sah ₁	46
Figure 3-9: Agrandissement du spectre HMBC de Sah ₁	47
Figure 3-10: Spectre RMN ¹ H de Sah ₂	48
Figure 3-11: Spectre COSY de Sah ₂	48
Figure 3-12: Spectre RMN ¹³ C de Sah ₂	49
Figure 3-13: Spectre HMBC de Sah ₂	50
Figure 3-14: Agrandissement du spectre HMBC de Sah ₁	50
Figure 3-15: Spectre RMN ¹ H de Sah ₃	51
Figure 3-16: Spectre COSY de Sah ₃	52
Figure 3-17: Spectre RMN ¹³ C de Sah ₁	52
Figure 3-18: Spectre HMBC de Sah ₃	53
Figure 3-19: Agrandissement du spectre HMBC de Sah ₃	53
Figure 3-20: Spectre RMN ¹ H de Sah ₄	54
Figure 3-21: Spectre de masse de Sg ₁	57
Figure 3-22: Spectre RMN ¹ H de Sg ₁	57
Figure 3-23: Spectre COSY de Sg ₁	58
Figure 3-24: Spectre RMN ¹³ C de Sg ₁	58
Figure 3-25: Spectre HMBC de Sg ₁	59
Figure 3-26: Spectre de masse de Sg ₂	60
Figure 3-27: Spectre RMN ¹ H de Sg ₂	61

Figure 3-28: Spectre COSY de Sg ₂	61
Figure 3-29: Spectre RMN ¹³ C de Sg ₂	62
Figure 3-30: Spectre HMBC de Sg ₂	63
Figure 3-31: Spectre NOESY de Sg ₂	63
Figure 3-32: Spectre de masse de Sg ₃	64
Figure 3-33: Spectre RMN ¹ H de Sg ₃	65
Figure 3-34: Spectre COSY de Sg ₃	65
Figure 3-35: Spectre RMN ¹³ C de Sg ₃	66
Figure 3-36: Spectre HMBC de Sg ₃	67
Figure 3-37: Spectre NOESY de Sg ₃	67
Figure 3-38: Spectre RMN ¹ H de Sgf ₇	69
Figure 3-39: Spectre RMN ¹³ C de Sgf ₇	69
Figure 3-40: Spectre COSY de Sgf ₇	70
Figure 3-41: Spectre HMBC de Sgf ₇	71
Figure 3-42: Agrandissement du spectre HMBC de Sgf ₇	72
Figure 3-43: Spectre RMN ¹ H de Cv ₁₁	75
Figure 3-44: Spectre RMN ¹³ C de Cv ₁₁	75
Figure 3-45: Spectre HMBC de Cv ₁₁	76
Figure 3-46: Spectre RMN ¹ H de Cv ₁₂	77
Figure 3-47: Spectre RMN ¹³ C de Cv ₁₂	78
Figure 3-48: Spectre HMBC de Cv ₁₂	78
Figure 3-49: Agrandissement du spectre HMBC de Cv ₁₁	79
Figure 3-50: Spectre RMN ¹ H de Cv ₁₀	81
Figure 3-51: Spectre COSY de Cv ₁₀	81
Figure 3-52: Spectre RMN ¹³ C de Cv ₁₀	82
Figure 3-53: Spectre de corrélation COLOC de Cv ₁₂	82
Figure 3-54: Spectre RMN ¹ H de Cv ₂₁	83
Figure 3-55: Spectre COSY de Cv ₂₁	84
Figure 3-56: Spectre RMN ¹³ C de Cv ₂₁	84
Figure 3-57: Spectre COLOC de Cv ₂₁	85
Figure 3-58: Spectre RMN ¹ H de Cv ₂₂	86
Figure 3-59: Spectre COSY de Cv ₂₂	86
Figure 3-60: Spectre RMN ¹³ C de Cv ₂₂	87
Figure 3-61: Spectre COLOC de Cv ₂₂	88
Figure 3-62: Spectre de masse de Sa ₇	93
Figure 3-63: Spectre RMN ¹ H de Sa ₇	94
Figure 3-64: Spectre de masse de Sa ₁₁	95
Figure 3-65: Spectre RMN ¹ H de Sa ₁₁	96
Figure 3-66: Spectre de masse de Sa ₁₀	97
Figure 3-67: Spectre RMN ¹ H de Sa ₁₀	97
Figure 3-68: Spectre de masse de Sa ₉	98
Figure 3-69: Spectre RMN ¹ H de Sa ₉	99
Figure 3-70: Spectre de masse de Sa ₄₂	99
Figure 3-71: Spectre RMN ¹ H de Sa ₄₂	100
Figure 3-72: Spectre de masse de Sa ₈	101
Figure 3-73: Spectre RMN ¹ H de Sa ₈	101
Figure 3-74: Spectre de masse de Sa ₁₂	102
Figure 3-75: Spectre RMN ¹ H de Sa ₁₂	102
Figure 3-76: Spectre de masse de Sa ₄₁	103
Figure 3-77: Spectre UV de Sa ₄₁ en présence des réactifs	104

Figure 3-78: Spectre RMN ^1H de Sa ₄₁	105
Figure 3-79: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₄₂	105
Figure 3-80: Spectre COSY de Sa ₄₂	106
Figure 3-81: Spectre HMBC de Sa ₄₂	106
Figure 3-82: Spectre de masse de Sa ₅₂	107
Figure 3-83: Spectre RMN ^1H de Sa ₅₂	108
Figure 3-84: Spectre COSY de Sa ₅₂	109
Figure 3-85: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₅₂	109
Figure 3-86: Spectre HMBC de Sa ₅₂	110
Figure 3-87: Spectre de masse de Sa ₅₁	111
Figure 3-88: Spectre UV de Sa ₅₁ en présence des réactifs	112
Figure 3-89: Spectre RMN ^1H de Sa ₅₁	113
Figure 3-90: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₅₁	113
Figure 3-91: Spectre COSY de Sa ₅₁	114
Figure 3-92: Spectre HMBC de Sa ₅₁	115
Figure 3-93: Spectre RMN ^1H de Sa ₁₃	118
Figure 3-94: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₁₃	118
Figure 3-95: Spectre HMBC de Sa ₁₃	119
Figure 3-96: Spectre RMN ^1H de Cv ₉	122
Figure 3-97: Spectre RMN ^{13}C de Cv ₉	122
Figure 3-98: Spectre UV de Es ₁ en présence des réactifs	123
Figure 3-99: Spectre RMN ^{13}C de Sgf ₄	129
Figure 3-100: Spectre RMN ^{13}C de Sgf ₅	131
Figure 3-101: Spectre RMN ^1H de Sgf ₅₁	131
Figure 3-102: Spectre RMN ^{13}C de Sgf ₅₂	131
Figure 3-103: Spectre RMN ^{13}C de Sgf ₆	133
Figure 3-104: spectre GC/MS d'analyse qualitative et quantitative de Sgf ₆	134
Figure 3-105: Spectre RMN ^1H de Sgf ₈	135
Figure 3-106: Spectre RMN ^{13}C de Sgf ₈	135
Figure 3-107: Spectre RMN ^1H de Sa ₁₅	137
Figure 3-108: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₁₅	137
Figure 3-109: Spectre RMN ^1H de Cv ₁₃	140
Figure 3-110: Spectre RMN ^{13}C de Cv ₁₃	140
Figure 3-111: Spectre RMN ^1H de Cv ₁₄	142
Figure 3-112: Spectre RMN ^{13}C de Cv ₁₄	142
Figure 3-113: Spectre HMBC de Cv ₁₄	143
Figure 3-114: Agrandissement du spectre HMBC de Cv ₁₄	144
Figure 3-115: Spectre RMN ^1H de Sa ₁₄	146
Figure 3-116: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₁₄	146
Figure 3-117: Spectre HMBC de Sa ₁₄	147
Figure 3-118: Agrandissement du spectre HMBC de Sa ₁₄	148
Figure 3-119: Spectre RMN ^1H de Sa ₁₆	150
Figure 3-120: Spectre RMN ^{13}C de Sa ₁₆	151
Figure 3-121: Spectre COSY de Sa ₁₆	151
Figure 3-122: Agrandissement du spectre HMBC de Sa ₁₆	152
Figure 3-123: Profil GC/MS des composés volatiles de <i>C. viminalis</i>	153
Figure 3-124: Profil GC/MS de <i>S. aromaticum</i>	154
Figure 3-125: Spectre de masse du β -guaiène	154
Figure 3-126: Spectre de masse du α -guaiène	154

Liste des tableaux

Tableau 1-1: Quelques phloroglucinols isolés du genre <i>Eucalyptus</i>	3
Tableau 1-2: Autres composés isolés du genre <i>Eucalyptus</i>	5
Tableau 1-3: Quelques métabolites secondaires isolés des plantes du genre <i>Callistemon</i>	10
Tableau 1-4: Quelques composés isolés du genre <i>Syzygium</i>	16
Tableau 2-1: Fractionnement de l'extrait de <i>E. saligna</i>	21
Tableau 2-2: Résultats des tests insecticides de l'extrait des feuilles de <i>E. saligna</i>	21
Tableau 2-3: Résultats des tests antifongiques, antibactériens, anti-radicalaire de <i>S. guineense</i> , <i>C. viminalis</i> et <i>S. aromaticum</i>	23
Tableau 3-1: Déplacements chimiques des protons de Sah ₁ à Sah ₃	55
Tableau 3-2: Déplacements chimiques des carbones de Sah ₁ à Sah ₃	55
Tableau 3-3: Déplacements chimiques des protons de Sg ₁ , Sg ₂ , Sg ₃ et Sgf ₇	72
Tableau 3-4: Déplacements chimiques des carbones de Sg ₁ , Sg ₂ , Sg ₃ et Sgf ₇	73
Tableau 3-5: Déplacements chimiques des protons et des carbones de Cv ₁₁ et Cv ₁₂	79
Tableau 3-6: Données spectrales RMN ¹ H et ¹³ C de Cv ₁₀ , Cv ₂₁ et Cv ₂₂	88
Tableau 3-7: Données spectrales RMN ¹ H et ¹³ C de Es ₅ et Es ₆	91
Tableau 3-8: Récapitulatif des flavonols détectés dans l'extrait à l'AcOEt de <i>S. aromaticum</i>	89
Tableau 3-9: Données spectrales RMN ¹ H de Sa ₄₁ , Sa ₅₁ et Sa ₅₂	115
Tableau 3-10: Données spectrales RMN ¹³ C de Sa ₄₁ , Sa ₅₁ et Sa ₅₂	116
Tableau 3-11: Données spectrales de RMN ¹ H du mélange (4S)- α -terpinéol 1-8-O- β -D-(6'-O-galloyl)glucopyranoside et (4R)- α -terpinéol-8-O- β -D-(6'-O-galloyl)glucopyraoside(Sa ₁₃)	120
Tableau 3-12: Données spectrales de RMN ¹³ C du mélange (4S)- α -terpinéol 1-8-O- β -D-(6'-O-galloyl)glucopyranoside et (4R)- α -terpinéol-8-O- β -D-(6'-O-galloyl)glucopyraoside(Sa ₁₃)	120
Tableau 3-13: Données spectrales de RMN ¹³ C de Cv ₁₃ , Cv ₁₄ et Sa ₁₄ dans le CD ₃ OD à 100 MHz	148
Tableau 3-14: Composés identifiés des extraits à l'hexane de <i>C. viminalis</i> et <i>S. aromaticum</i> par GC/MS	153
Tableau 3-15: Résultats des tests insecticides de l'extrait des feuilles de <i>E. saligna</i>	156
Tableau 3-16: Pourcentage moyen de répulsion de l'extrait de <i>E. saligna</i> sur <i>T. castaneum</i> et <i>T. confusum</i> en fonction des doses	157
Tableau 3-17: Résultats des tests antifongiques, antibactériens et anti-radicalaire de <i>S. guineense</i> , <i>C. viminalis</i> et <i>S. aromaticum</i>	158
Tableau 3-18: Tests antibactériens des triterpènes en μ g/spot	160
Tableau 3-19: Tests antibactériens des phloroglucinols Cv ₁₀ , Cv ₂₁ , Cv ₂₂ en μ g/spot	160
Tableau 3-20: Tests antifongiques des phloroglucinols Cv ₁₀ , Cv ₂₁ , Cv ₂₂ en μ g/spot	161
Tableau 3-21: Tests antibactériens des alkylphénols Sah ₁ , Sah ₂ , Sah ₃ et Sah ₄ en μ g/spot	162
Tableau 3-22: Tests anti-oxydant des dérivés de l'acide ellagique par la méthode UV	163
Tableau 3-23: Tests anti-oxydant des flavonoïdes par la méthode UV	164
Tableau 6-1: Système 1 pour analyse des extraits à l'acétate d'éthyle et au n-butanol	178
Tableau 6-2: Système 2 pour analyse des extraits à l'hexane	178

Liste des schémas

Schéma 1-1: Proposition de biosynthèse du robustaol	8
Schéma 1-2: Proposition de biosynthèse du sideroxylonal B	9
Schéma 1-3: Biosynthèse des flavonoïdes	14
Schéma 2-1: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de <i>E. saligna</i>	22
Schéma 2-2: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de <i>C. viminalis</i>	25
Schéma 2-3: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de <i>S. guineense</i>	26
Schéma 2-4: Séparation du mélange acide arjunolique (Sgf ₅₁) et acide asiatique (Sgf ₅₂)	27
Schéma 2-5: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de <i>S. aromaticum</i>	30
Schéma 3-1: Mécanisme de fragmentation du sideroxylonal C	91
Schéma 3-2: Fragmentation des flavonols selon Ma	93
Schéma 3-3: Proposition du mécanisme de la perte successive de deux molécules de CO par la quercétine en ESI mode positif	94
Schéma 3-4: Proposition du mécanisme de la déshydratation suivie de la perte de CO par la myricétine en ESI mode positif.	95
Schéma 3-5: Formation de l'ion ^{0,2} B ⁺	95
Schéma 3-6: Formation de l'ion ^{1,3} A ⁺	96

I: INTRODUCTION

I-1: Les Myrtaceae

La famille des Myrtaceae possède environ 140 genres et 3000 espèces qu'on retrouve surtout dans les pays chauds. Ce sont des végétaux ligneux (arbustes à grands arbres). Le feuillage est alterne, les feuilles sont simples à limbe entier et assez souvent coriaces (certaines feuilles sont recouvertes de cire). Beaucoup de plantes de cette famille sont utiles dans divers domaines: Comme bois d'œuvre, certains fruits sont comestibles, certaines plantes sont aromatiques, avec une abondance en huile essentielle d'où l'usage condimentaire ou médicinal. Certaines plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées post-récolte dans les pays en voie de développement^{1;2}. Chimiquement cette famille est riche en composé phénoliques et en tannins. Elle est aussi reconnue comme une des principales familles qui produit des flavonoïdes C-méthylés^{3;4}.

I-2: *Eucalyptus saligna* Sm.

I-2-1: Aspects botaniques

Le genre *Eucalyptus* est originaire d'Australie où il existe plus de 750 espèces⁵⁻⁸, parmi lesquelles *Eucalyptus saligna*. *E. saligna* est un grand arbre pouvant atteindre cent mètres de hauteur, les feuilles sont obiculaires et d'aspect argenté à la surface (figure 1-1), elles mesurent environ 4 cm de large et 25 cm de long. Les inflorescences portent des fleurs blanches. Les plantes du genre *Eucalyptus* produisent des fruits en capsules avec une forte odeur aromatique très agréable⁹, et sont connues pour leur développement très rapide⁸. On les retrouve depuis la grande forêt tropicale jusqu'aux zones désertiques⁶. Le nom «Gum» communément donné à l'eucalyptus fut introduit en 1770 par Joseph Banks, et c'est ainsi que l'*Eucalyptus saligna* s'appelle encore Sydney bleu gum¹⁰.



Figure 1-1: Feuilles et fleurs de *E. saligna*

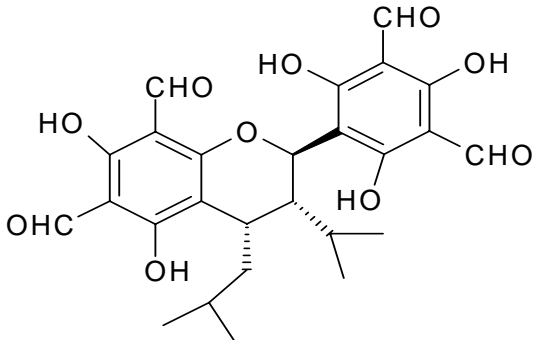
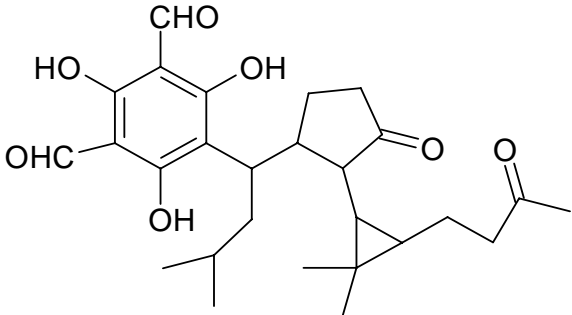
I-2-2: Usage traditionnel

Les feuilles d'*Eucalyptus saligna* sont utilisées à l'ouest du Cameroun pour protéger les denrées post-récolte contre les attaques d'insectes^{2;11;12}. Les écorces de quelques espèces d'*Eucalyptus* sont utilisées pour soigner la fièvre, la diarrhée, la toux, les morsures de serpents, les maux de dents et d'autres douleurs^{5;13-19}.

I-2-3: Travaux chimiques antérieurs

Eucalyptus saligna n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude phytochimique exhaustive¹⁰, par contre beaucoup d'autres espèces du genre ont largement été étudiées. Il ressort de ces études que le genre *Eucalyptus* contient des phloroglucinols (Tableau 1-1), des flavonoïdes, des stilbènes et des triterpènes comme principaux métabolites secondaires (Tableau 1-2). Il est important de souligner que les phloroglucinols du type sidéroxylyonal, macrocarpal, euglobal et robustadial se trouvent majoritairement dans le genre *Eucalyptus*.

Tableau 1-1: Quelques phloroglucinols isolés du genre *Eucalyptus*

Structures	Sources et références
 <p>Sideroxylyonal A (1)</p>	<i>E. sideroxylyon</i> et <i>E. grandis</i> ^{20;21}
 <p>Eucalyptone (2)</p>	<i>E. amplifolia</i> ²² et <i>E. globulus</i> ²³

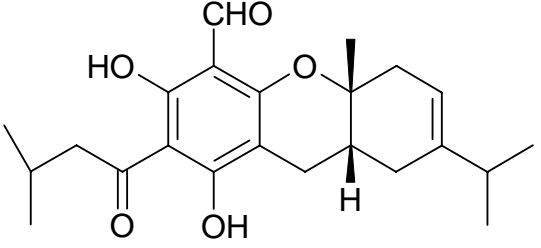
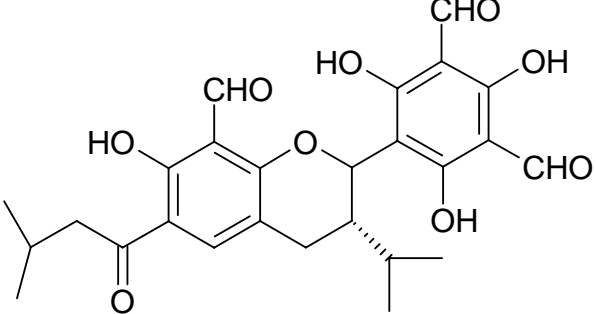
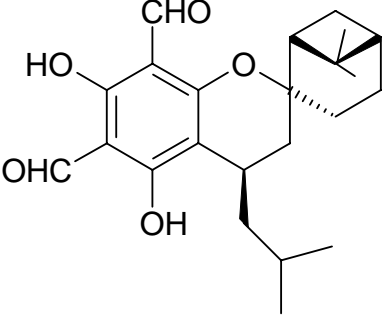
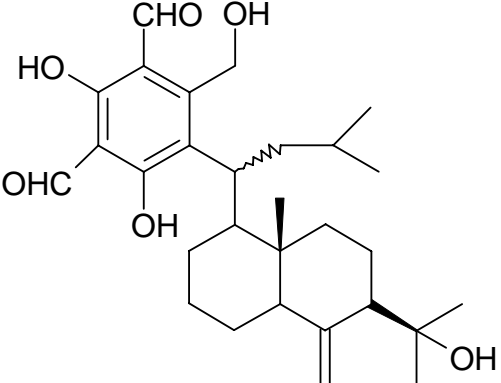
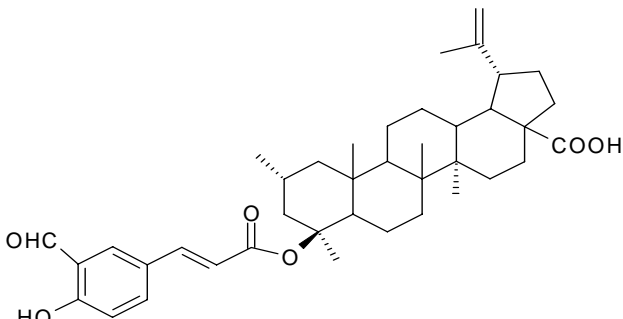
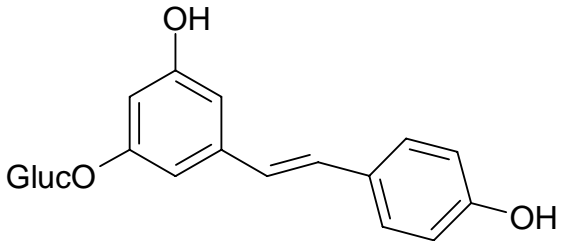
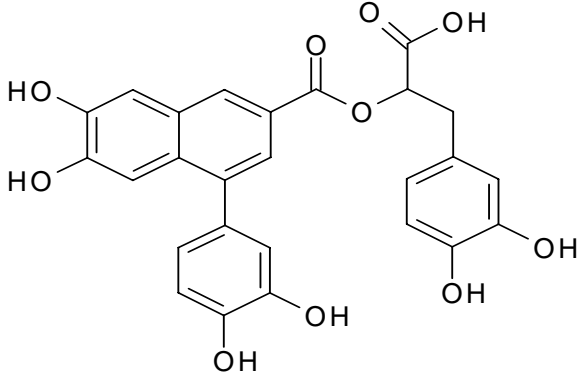
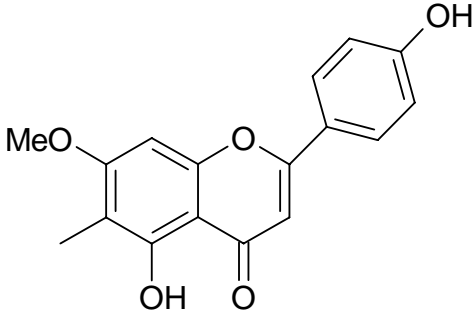
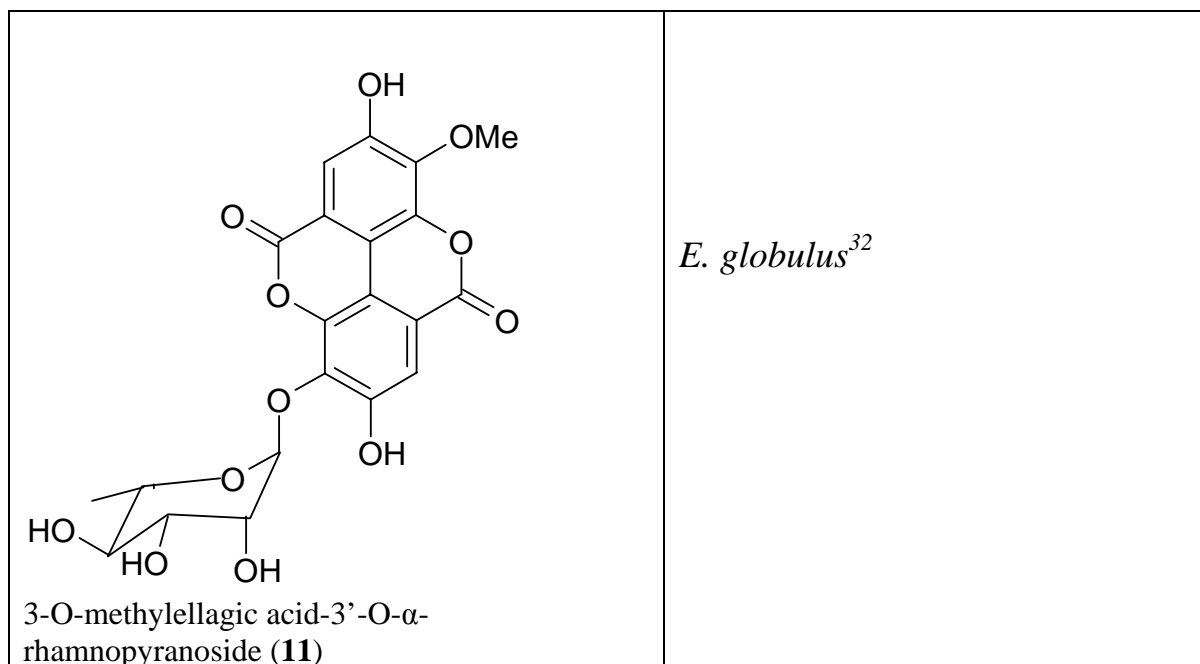
 <p>Euglobal G6 (3)</p>	<p><i>E. grandis</i>²⁴</p>
 <p>Grandinal (4)</p>	<p><i>E. grandis</i>²⁵</p>
 <p>Robustadial A (5)</p>	<p><i>E. robusta</i>^{26;27}</p>
 <p>Macrocarpal H (6)</p>	<p><i>E. globulus</i>^{28;29}</p>

Tableau 1-2: Autres composés isolés du genre *Eucalyptus*

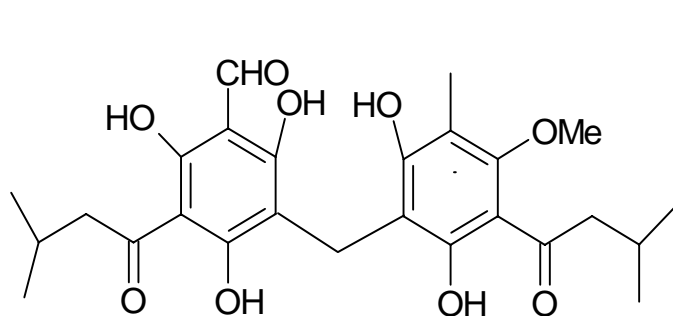
Structures	Sources et références
 <p>Acide lupénique (7)</p>	<p><i>E. camaldulensis</i>⁷</p>
 <p>Polydatine (8)</p>	<p><i>E. rubida</i>³⁰</p>
 <p>Globoidnan A (9)</p>	<p><i>E. globoidea</i>³¹</p>
 <p>8-demethylsideroxylin (10)</p>	<p><i>E. saligna</i>¹⁰</p>



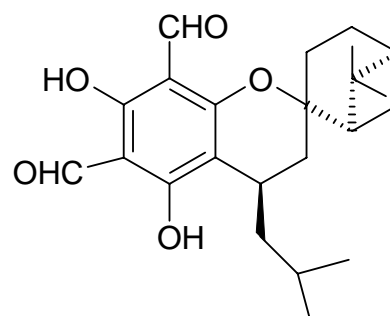
I-2-4: Intérêts pharmacologiques

Les huiles essentielles des feuilles d'*Eucalyptus saligna* comme celles de la plupart d'autres espèces sont connues pour leurs activités insecticides^{11;12;33-35}, analgésiques, anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques^{36;37}.

Les extraits organiques des plantes du genre *Eucalyptus* possèdent également des composés ayant des activités biologiques très prononcées. C'est ainsi que le robustaol A (**12**) et les robustadials A (**13**) et B (**5**) isolés des feuilles de *E. robusta* ont des propriétés anti-paludéennes^{25;27}.

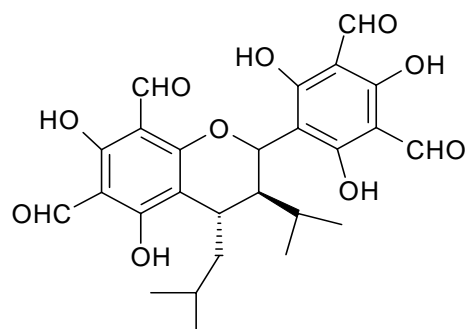


Robustaol A (**12**)



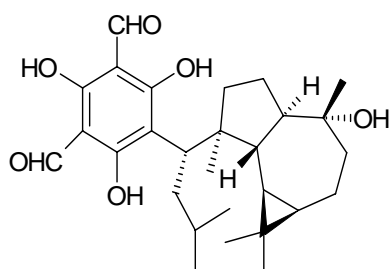
Robustadial B (**13**)

Les sidéroxytonals A (**1**) et B (**14**) isolés de *E. sideroxylon* possèdent des activités antibactériennes sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (3.9 et 7.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²⁰.

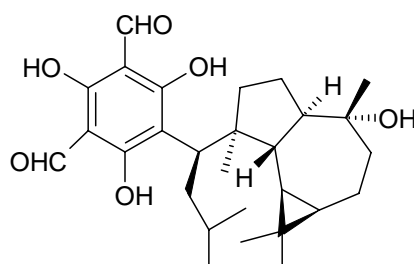


Sideroxylonal B (14)

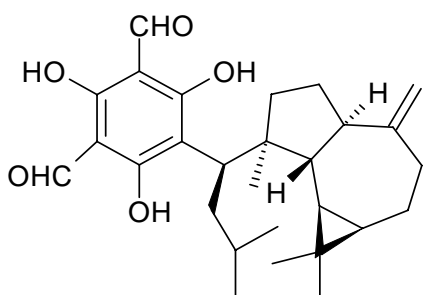
Les macrocarpals A, B, C, D et E isolés des feuilles de *E. macrocarpa* sont très actifs contre les bactéries gram positif^{38;39}, ils inhibent la HIV-RTase avec des IC₅₀ respectives de 10; 5.3; 8.4; 12 et 8.1μM⁴⁰. Les macrocarpals à savoir le A, B et D inhibent l'aldose reductase, enzyme qui induit les complications de la cataracte, la rétinopathie, la neuropathie et la néphropathie pouvant conduire au diabète⁴¹.



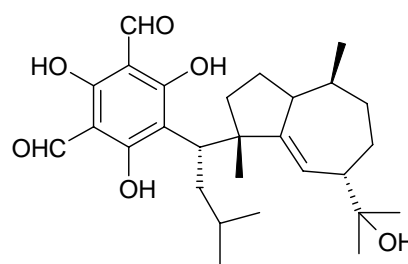
Macrocarpal B (15)



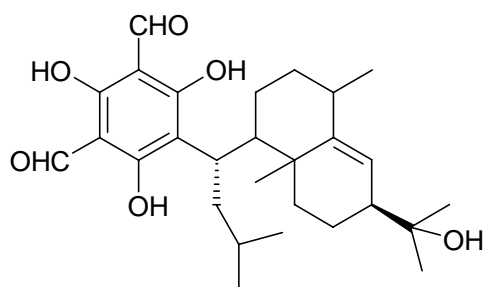
Macrocarpal A (16)



Macrocarpal C (17)



Macrocarpal D (18)



Macrocarpal E (19)

On retrouve également dans le genre *Eucalyptus* des acides ellagiques rhamnosides (**11**) des lignanes (**9**) et des triterpènes ayant des activités antioxydantes³², anti HIV³¹ et cytotoxique⁴² respectivement. Au-delà de ces vertus, le genre *Eucalyptus* possède également des atouts économiques.

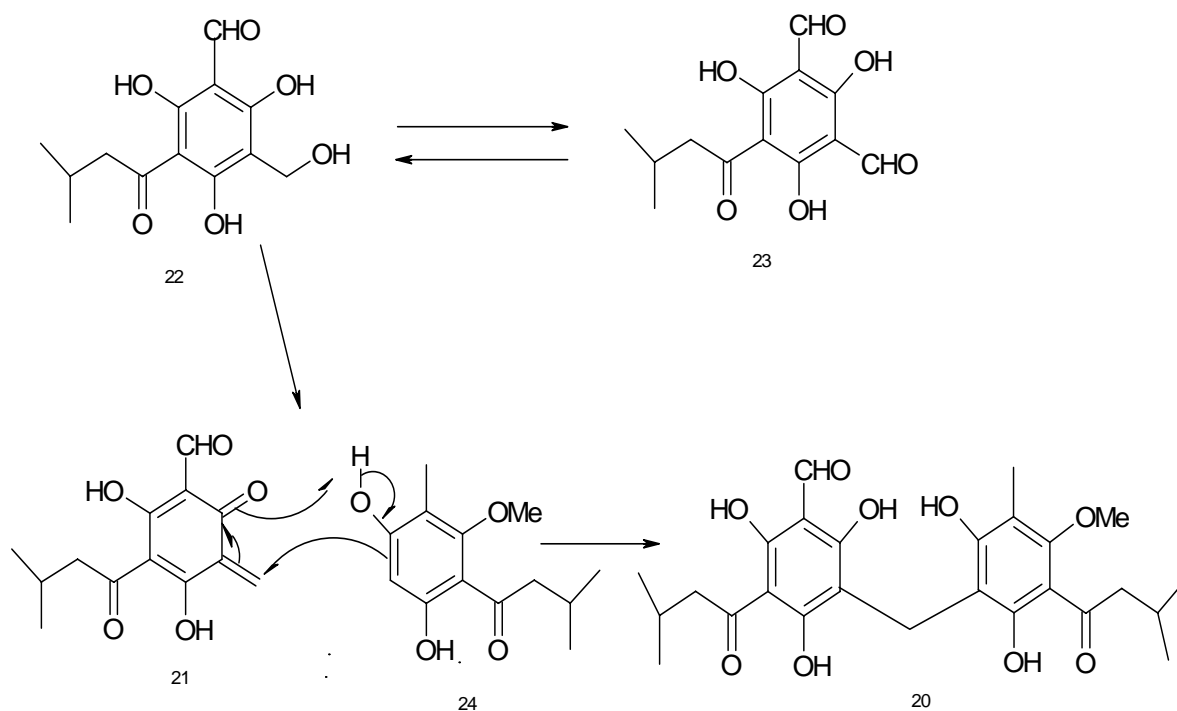
I-2-5: Importance économique et écologique

Les espèces du genre *Eucalyptus* ont la particularité de pousser rapidement et sont utilisées pour assécher les sols marécageux. Elles sont également utilisées comme bois d'œuvre et de chauffage. Leurs huiles essentielles sont utilisées dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques pour la fabrication de différents produits⁴³.

I-2-6: Proposition de biosynthèse de quelques phloroglucinols

I-2-6-1: Robustaol A

La biosynthèse du robustaol A (**20**) nécessite l'intermédiaire du O-quinone methide (**21**). Cette molécule devrait formellement dériver du précurseur (**22**) de la jensenone (**23**) qui réagit avec le carbone éthylénique de l'analogue de l'homoisobackeole (**24**).



Schema 1-1: Proposition de biosynthèse du robustaol ⁴⁴

I-2-6-2: Sidéroxylyonal

La biosynthèse des sidéroxylyonals A (**1**) et B (**14**) peut être envisagée à partir de l'o-quinone methide (**25**) et du styrène (**26**). Ces deux précurseurs peuvent dériver d'un même intermédiaire (**27**). Dans cette réaction il peut y avoir déshydratation suivant deux orientations suivi d'une cycloaddition [4+2] de type hétéro Diels-Alder entre **25** et **26** pour générer le cycle chromane du sydéroxylyonal.

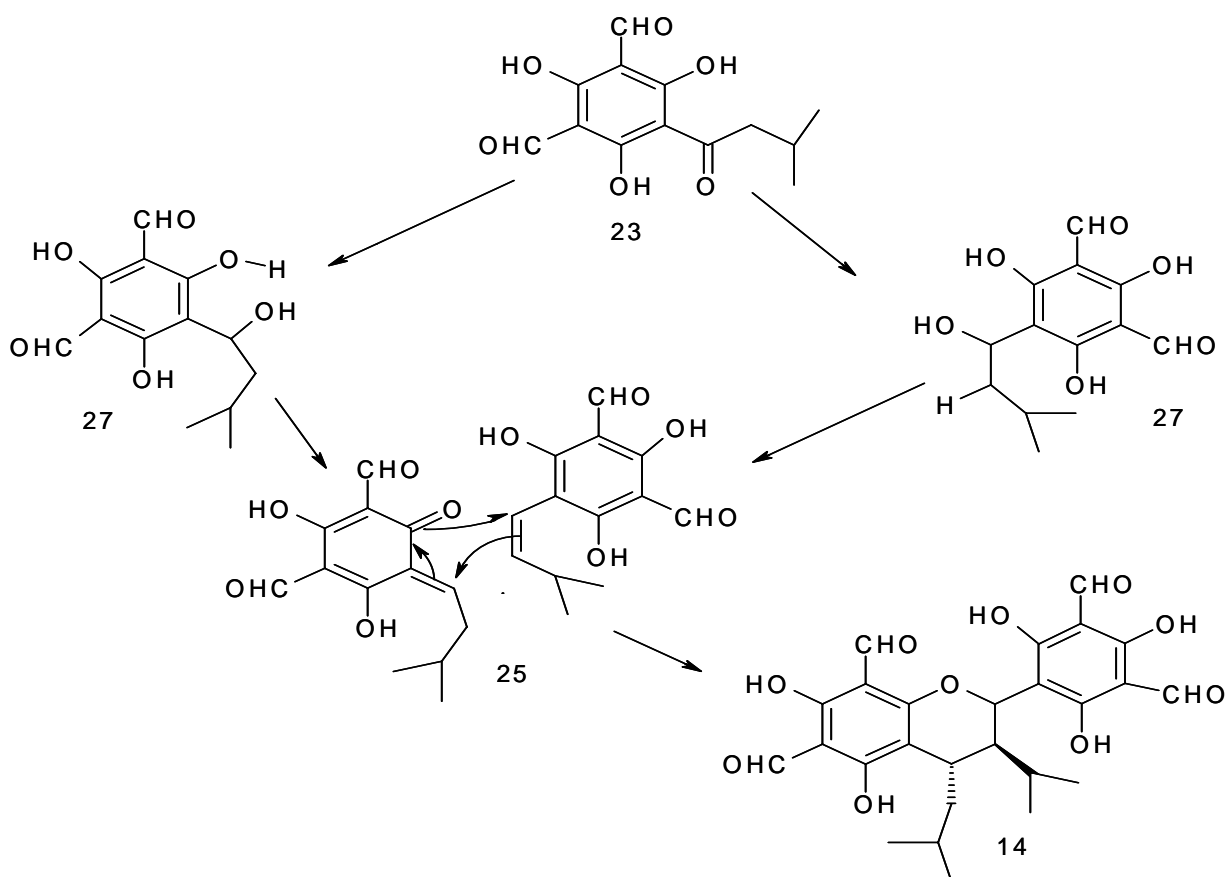


Schéma 1-2: Proposition de biosynthèse du sydéroxylyonal B (**14**)⁴⁴

I-3: *Callistemon viminalis* Willd

I-3-1: Aspects botaniques

Callistemon viminalis est un arbuste aux feuilles vert foncée et lancéolées (Figure 1-2). Les fleurs sont constituées de longues étamines formant un manchon remarquable autour du rameau et surmontées d'un bouquet de feuilles ressemblant à un rince bouteille d'où le nom "bottlebrush" donné à ce genre. Le genre *Callistemon* contient environ 25 espèces, difficiles

à nommer correctement du fait d'une taxonomie difficile et d'une nomenclature incertaine^{45,46}.



Figure 1-2: Feuilles et fleurs de *C. viminalis*

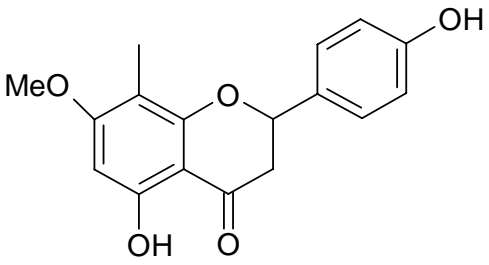
I-3-2: Usage traditionnel

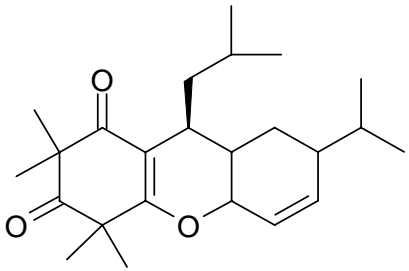
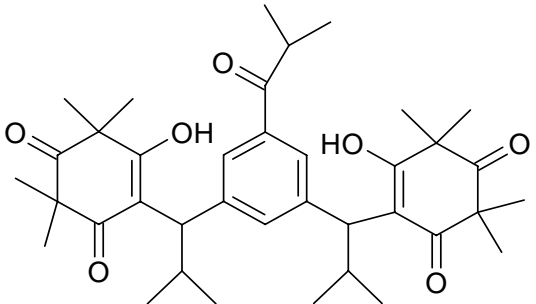
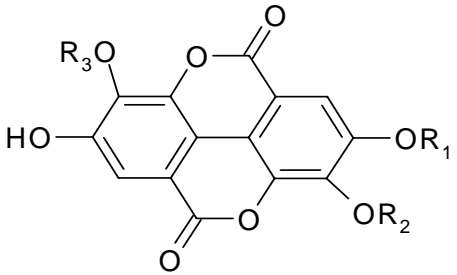
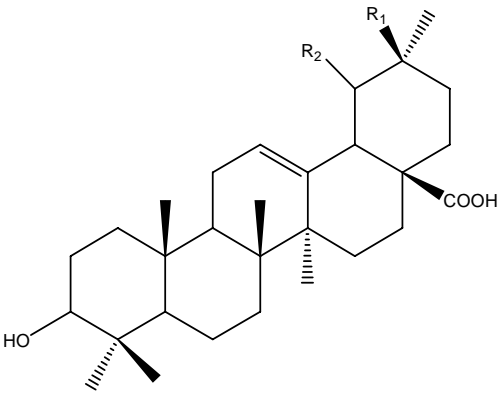
Le genre *Callistemon* est utilisé traditionnellement comme insecticide et également pour soigner la bronchite⁴⁷.

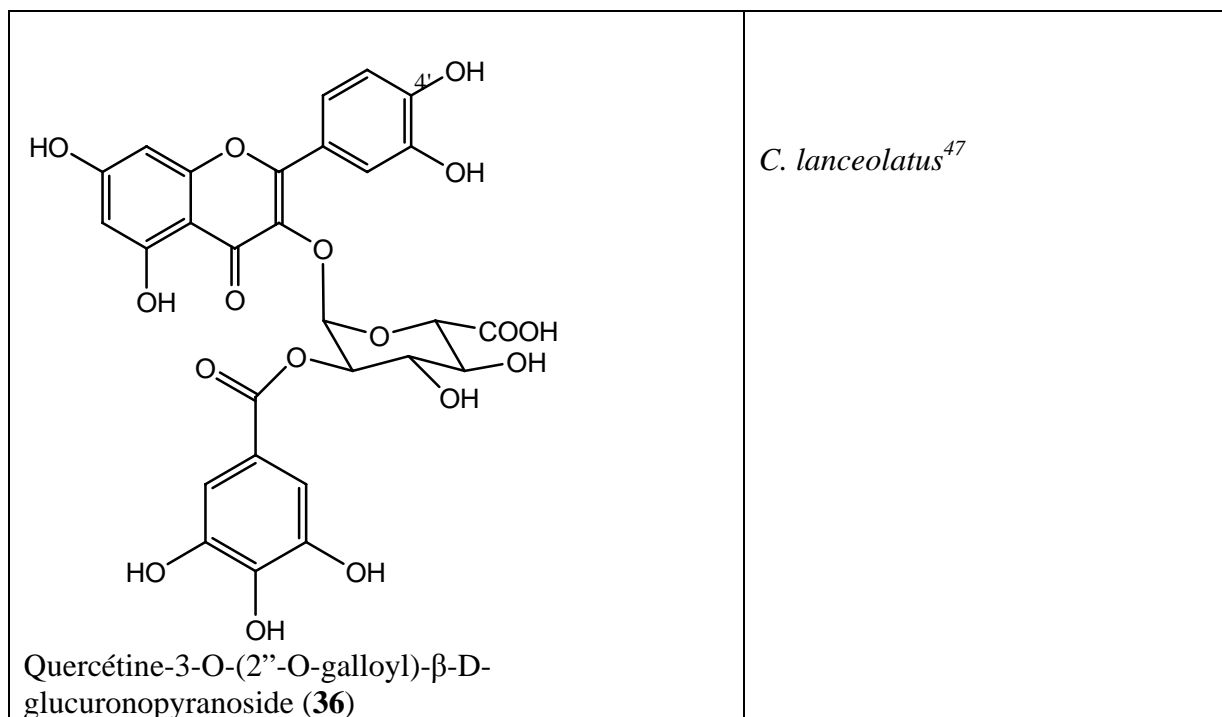
I-3-3: Travaux antérieurs

En dehors de *Callistemon lanceolatus*, les autres espèces de ce genre n'ont pas fait l'objet d'une étude phytochimique exhaustive, il ressort de ces études que le genre *Callistemon* possède des triterpènes, des flavonoïdes et des tétradécahydroxanthènediones (Tableau 1-3).

Tableau 1-3: Quelques métabolites secondaires isolés des plantes du genre *Callistemon*.

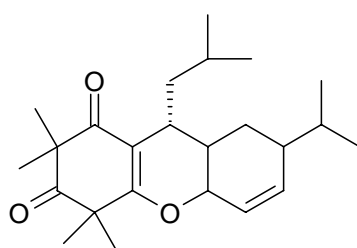
Structures	Sources et références
 <p>5,4'-dihydroxy-8-C-méthyl-7-méthoxyflavanone (28)</p>	<p><i>C. coccineus</i>⁴</p>

 <p>Viminadione B (29)</p>	<p><i>C. viminalis</i>⁴⁸</p>
 <p>Myrtucommulone A (30)</p>	<p><i>C. lanceolatus</i>⁴⁹</p>
 <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$ (31) $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$ (32) $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$ (33) Dérivés d'acide ellagique </p>	<p><i>C. lanceolatus</i>⁵⁰</p>
 <p> $R_1 = H, R_2 = CH_3$ (34) Acide ursolique $R_1 = CH_3, R_2 = H$ (35) Acide oléanolique </p>	<p><i>C. lanceolatus</i>⁵¹</p>



I-3-4: Intérêt pharmacologique

Les huiles essentielles des feuilles de *C. viminalis* ont des effets anthelminthiques in vitro contre les vers, alors que les extraits aqueux des fleurs et des feuilles ont des effets antibactériens contre les bactéries gram-positif⁴⁶. Les viminadiones A (**37**) et B (**29**) isolés de *C. viminalis* ont des effets insecticides sur *Musca domestica*, *Aphis fabae* et *Thrips tabaci*^{48;52}.



Viminadione A (**37**)

I-3-5: Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un des plus important groupe de produits naturels phénoliques. Ils sont universellement distribués dans les plantes. Ils ont été également trouvés dans les mousses mais sont plutôt rares chez les champignons. Les flavonoïdes sont constitués de deux grandes catégories selon que l'hétérocycle central soit insaturé (anthocyanines, flavones, flavonols) ou non (flavanones, flavanes). Ils interviennent dans la protection de la plante contre les radiations UV de type B, dans la pigmentation des fleurs, dans les attaques microbiennes et la défense contre les herbivores. Les études pharmacologiques montrent que certains flavonoïdes ont une activité antioxydante, antitumorale, oestrogenique, anti-inflammatoire, antibactérienne pour ne citer que leurs principales propriétés. Les composés de ce groupe se divisent en plusieurs classes: Les chalcones, les flavonols, les flavones, anthocyanines, flavanones, flavanes, auronnes et isoflavones. Certaines classes de ces flavonoïdes (chalcones, flavanones et les flavan-3-ols) sont des intermédiaires biosynthétiques du au fait que c'est le produit final qui s'accumule dans les tissus de la plante^{53;54}.

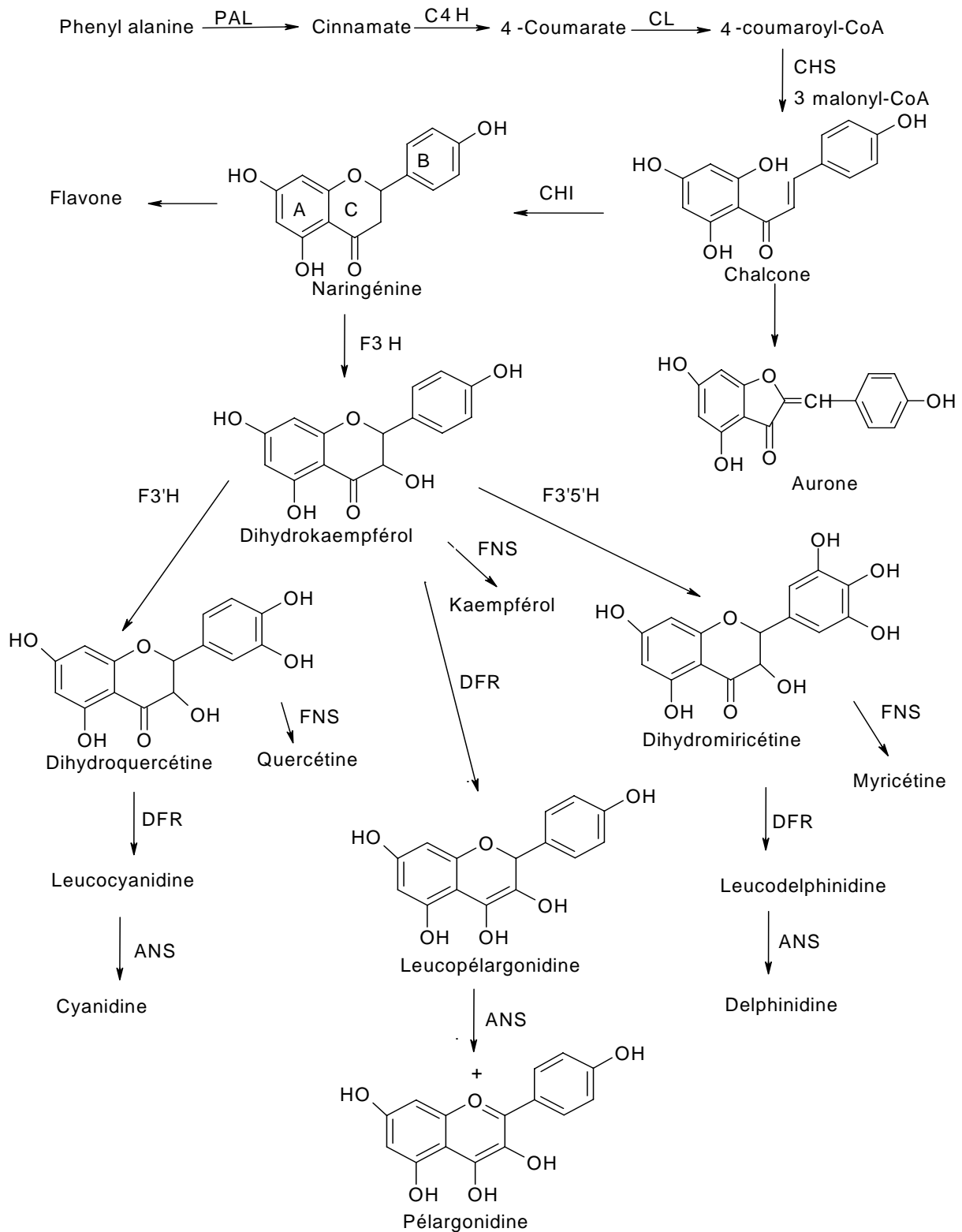


Schéma 1-3: Biosynthèse des flavonoïdes⁵⁴

CHS, chalcone synthétase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone hydroxylase; F3'H, flavonoïde-3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoïde-3',5'-hydroxylase; FNS, flavone synthase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; ANS, anthocyanidine synthase

I-4: *Syzygium guineense* W. et *Syzygium aromaticum* M. et Perry

I-4-1: Aspects botaniques

Les plantes du genre *Syzygium* ont un feuillage persistant vert sombre (Figure 1-3), vernissé au revers plus clair. Les feuilles sont elliptiques 10-12cm à nervure médiane marquée et parsemées de glandes sur le revers. A l'extrémité des rameaux se trouvent des fleurs constituées d'étamines blanches saillantes. Ces plantes poussent rapidement et atteignent des hauteurs variant entre 10 et 15 mètres⁵⁵.



Figure 1-3: Feuilles et fleurs de *S. guineense*

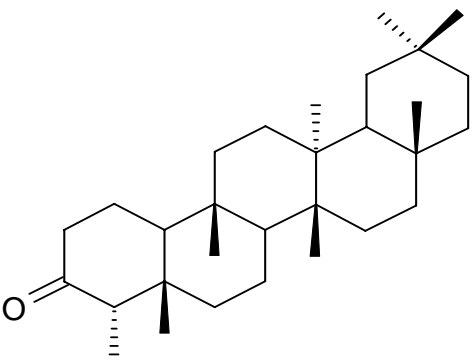
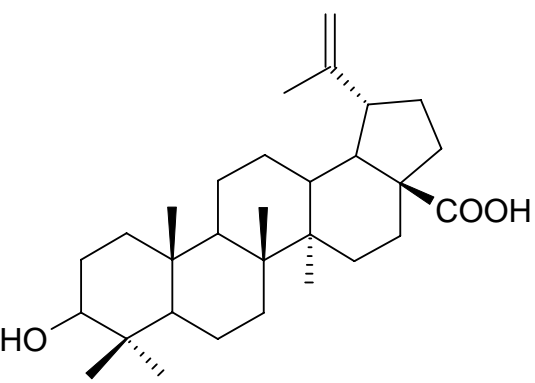
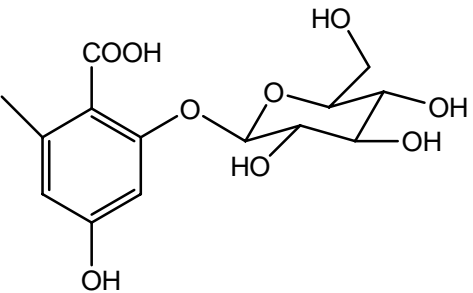
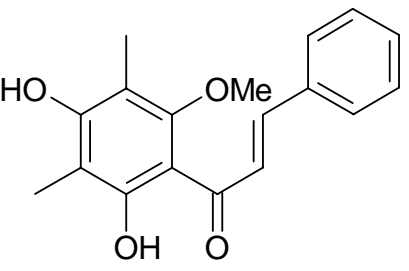
I-4-2: Usage traditionnel

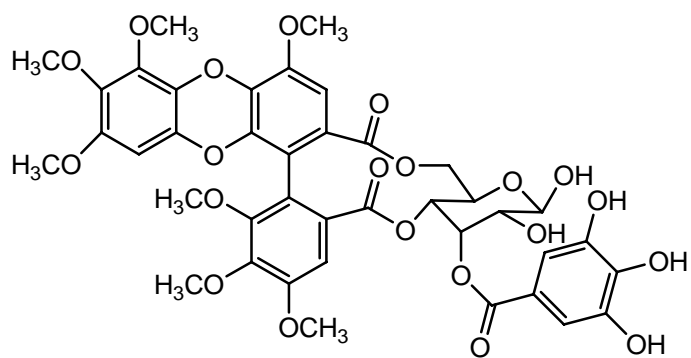
Syzygium est un genre très utilisé en médecine traditionnelle. Il est utilisé pour les troubles gastro-intestinaux, la diarrhée⁵⁶⁻⁶⁰, les faiblesses sexuelles chez les hommes⁶¹, les maladies infectieuses comme la malaria, la tuberculose et le choléra⁶². Il sont également utilisé contre la nausée les vomissements^{63, 64} les bactéries, les champignons⁶⁵, les inflammations⁶⁶ le diabète⁶⁷, les virus⁶⁸ et pour la conservation des denrées post-récolte¹.

I-4-3: Travaux antérieurs

Le genre *Syzygium* et en particulier *Syzygium aromaticum* a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques, mais il existe encore plusieurs espèces qui n'ont encore fait l'objet d'aucune étude chimique comme *Syzygium guineense*. Les plantes du genre *Syzygium* contiennent essentiellement des composés phénoliques et des triterpènes (Tableau 1-4).

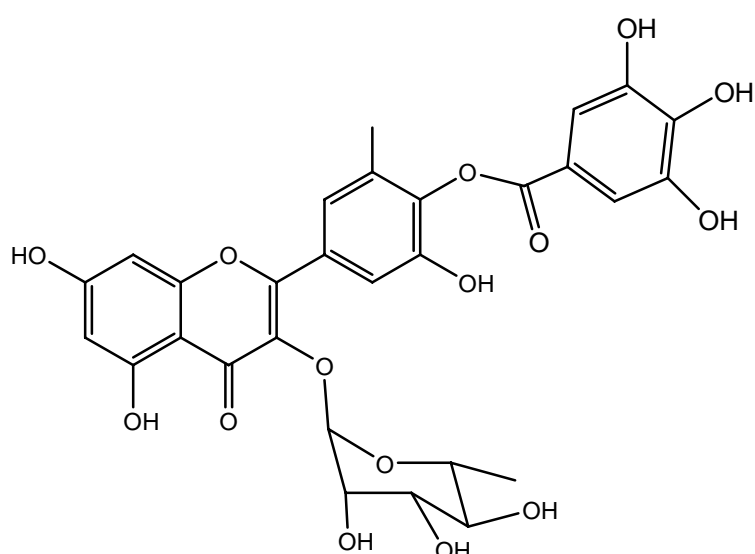
Tableau 1-4: Quelques composés isolés du genre *Syzygium*

Structures	Sources références
 <p>4-épifriedeline (38)</p>	<p><i>S. formosanum</i>⁶⁹</p>
 <p>3-épi-butylinate (39)</p>	<p><i>S. samarangense</i>⁷⁰</p>
 <p>orsélinic-2-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside (40)</p>	<p><i>S. aromatica</i>⁷¹</p>
 <p>4',6'-dihydroxy-2'-méthoxy-3',5'-diméthylchalcone (41)</p>	<p><i>S. samarangense</i>⁷⁰</p>



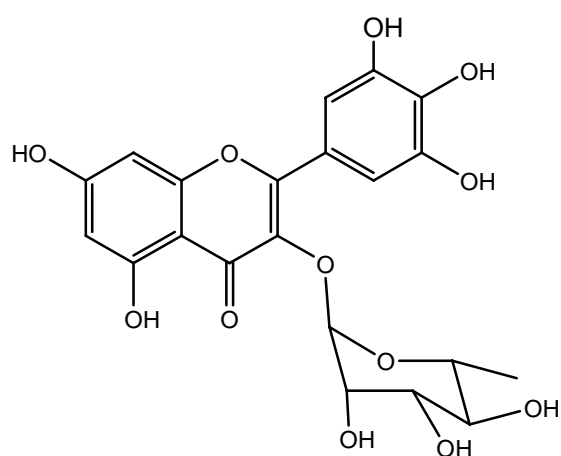
Syzyginin B (**42**)

*S. aromaticum*⁷²



2'-C-méthyl-4'-O-galloylmyricétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (**43**)

*S. samarangense*⁷³

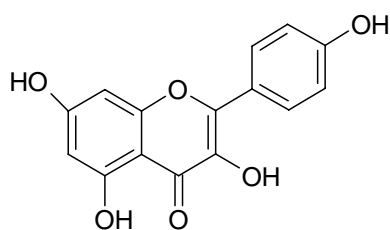


myricétine-3-O- α -rhamnopyranoside (**44**)

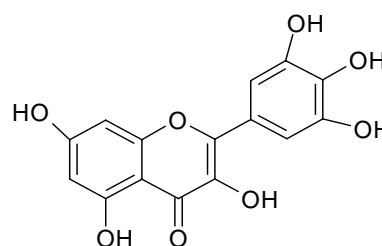
*S. samarangense*⁷⁴

I-4-4: Intérêt pharmacologique

Les huiles essentielles du genre *Syzygium* sont utilisées comme antibactériens, antifongiques, antioxydants et insecticides⁷⁵⁻⁸³. Par ailleurs les études phytochimique des extraits organiques de ces plantes ont conduit à l'isolement et la caractérisation de plusieurs métabolites bioactifs, le kaempférol et la myricétine isolés de *S. aromaticum* inhibent la croissance de *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* qui sont des bactéries de la bouche⁸⁴.

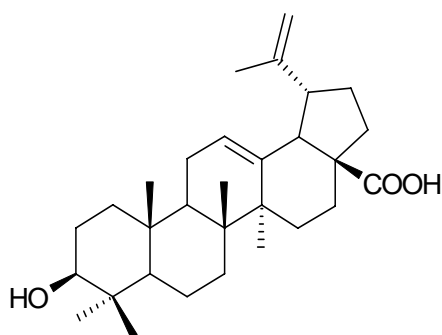


Kaempférol (45)

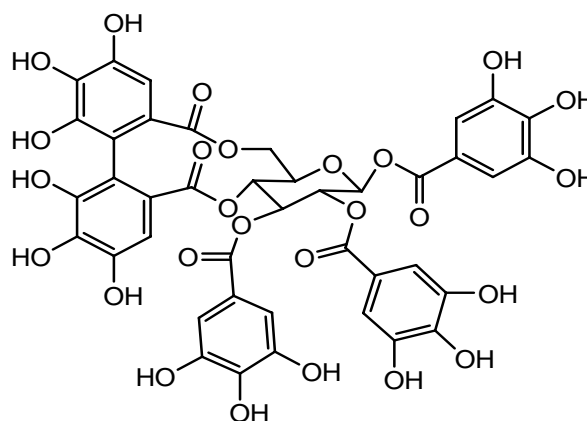


Myricétine (46)

L'acide bétulinique (47), l'acide oléanolique (27) et l'eugéniine (48) isolés de *S. claviformum* et *S. aromaticum* ont des activités anti-virales⁸⁵⁻⁸⁷.



Acide bétulinique (47)



Eugéniine (48)

I-4-5: Intérêts économiques

Les huiles essentielles des boutons floraux de *S. aromaticum* aussi appelés clous de girofle et des feuilles de *S. aromaticum* sont utilisées dans la fabrication des produits dentaires tel que les pâtes dentifrices, les solutions pour l'haleine. Ces huiles sont également utilisés dans la

fabrication du savon et en cosmétique⁸⁸. Les clous de girofle sont aussi utilisés comme épice⁸⁸.

I-5: But du travail

Aujourd'hui une grande majorité de la population mondiale, plus particulièrement les pays en voie de développement se soignent avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne s'appuie largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites⁸⁹. D'autre part ces populations utilisent ces mêmes plantes pour la protection de leurs denrées post-récolte en stockage, car les cultures vivrières dont la production est encore faible à cause de l'utilisation de techniques rudimentaires, sont souvent détruites au cours de leurs stockages par des champignons et des ravageurs. Ces pertes sont estimées à environ 40% de la production⁹⁰. A ce jour le règne végétal semble être une source inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces connues ont été étudiées sur le plan phytochimique et pharmacologique et chaque espèce peut contenir plusieurs milliers de constituants distincts⁸⁹. Dans le cadre de la recherche des molécules ou des activités biologiques nouvelles dans le règne végétal, les critères de choix des plantes à étudier sont souvent basés sur leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire; ceci valorise l'expérience accumulée par les autochtones d'une région ou d'une localité. Une autre possibilité de choix est basée sur la considération de l'écosystème où se développent les espèces végétales. Dans le cadre de ce projet quatre espèces de la famille des Myrtaceae (*Eucalyptus saligna*, *Callistemon viminalis*, *Syzygium guineense* et *S. aromaticum*) utilisées généralement dans les pays du sud et particulièrement à l'ouest du Cameroun pour la conservation des denrées en stockage ont été étudiées pour isoler et identifier les métabolites secondaires afin de mieux comprendre à travers les tests biologiques leur usage traditionnel et envisager la possibilité d'aller au de-là des activités insecticides.

II: MATERIELS ET METHODES

II-1: Récolte et extraction du matériel végétal

Quatre espèces de la famille des Myrtaceae ont été récoltées manuellement au mois d'août des années 2000, 2002 et 2003 dans le département de la Menoua (Ouest Cameroun). Les espèces ont été identifiées par le Dr. Satabie Benoît de l'Herbier National du Cameroun où les échantillons sont déposés. Le matériel végétal a été séché à température ambiante au laboratoire (24°C) puis broyé et extrait au mélange CH₂Cl₂-MeOH (1:1).

II-2: Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait de *E. saligna*

Eucalyptus saligna a été étudié au Laboratoire de chimie appliquée et environnementale de l'Université de Dschang. Le fractionnement de 250 g de cet extrait a été effectué dans un entonnoir Büchner avec verre fritté contenant 500 g de silice fine (32-43 µm) avec un gradient hexane- acétate d'éthyle et acétate d'éthyle - MeOH. 65 fractions de 500 ml ont été récoltées et regroupées en quatre grandes fractions (Tableau 2-1) puis soumises aux tests insecticides sur *Tribolium castaneum* et *Tribolium confusum*. Seules les fractions actives ont été étudiées.

La fraction I (40 g) a été chromatographiée sur colonne ouverte contenant 200 g de silice avec un gradient hexane - acétate d'éthyle. 85 fractions de 250 ml ont été recueillies et regroupées en 8 fractions sur la base de la CCM. Dans la fraction 2, il s'est formé des cristaux jaunes (70 mg) sous forme d'aiguille constitués en fait de deux produits. Ce mélange a été purifié sur colonne de Séphadex avec comme éluant le mélange hexane-CH₂Cl₂. Es₁ (50 mg) et Es₂ (7 mg) ont été ainsi obtenu. Les fractions 6 et 7 ont été regroupées et purifiées sur colonne avec le mélange Hexane - chlorure de méthylène, trois composés ont été obtenus Es₃ (7 mg), Es₄ (12 mg) et Es₅ (15 mg). La fraction II a également été chromatographiée sur colonne avec un gradient Hexane-AcOEt, deux produits en ont été isolés Es₆ (25 mg) et Es₇ (20 mg).

Tableau 2-1: Fractionnement de l'extrait de *E. saligna*

Solvants	Regroupement
Hexane	1-12 Fraction 1
Hexane-AcOEt (3/2 et 2/2)	13-29 Fraction 2
Hexane-AcOEt (1/3)	30-49 Fraction 3
AcOEt et AcOEt-MeOH (3/1)	50-65 Fraction 4

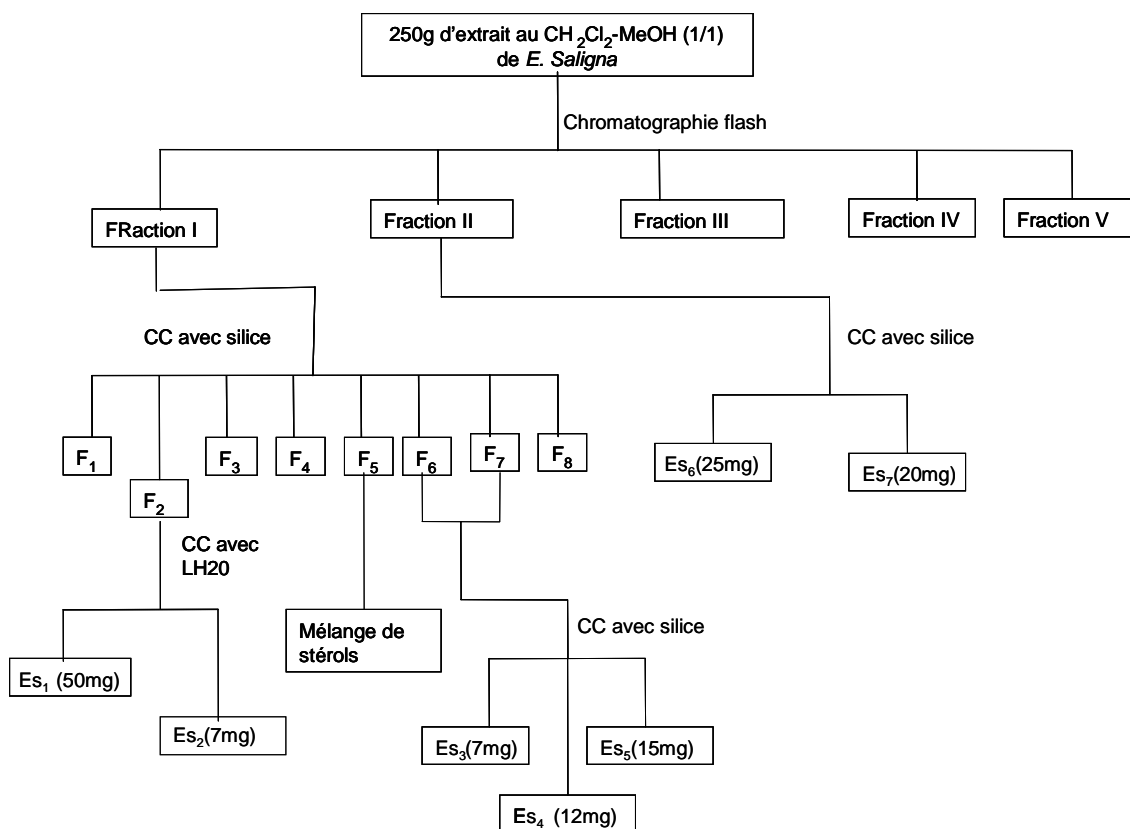


Schéma 2-1: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de *E. saligna*

II-3: Fractionnement de *Calistemon viminalis*, *Syzygium guineense* et *Syzygium aromaticum*

Callistemon viminalis, *Syzygium guineense* et *Syzygium aromaticum* ont été étudiés au laboratoire de chimie analytique de l'Université de Neuchâtel. Les extraits ont été dissous dans de l'eau et re-extrait à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol successivement. Afin d'orienter nos travaux les différents sous- extraits ont été soumis à des tests biologiques et chimiques afin de déterminer leurs activités et rechercher les composés actifs.

- antifongique contre *Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.*
- antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei*
- anti-radicalaire avec le DPPH

Les tests antifongiques et antibactériens ont été effectués par diffusion sur minidisque et par la méthode bioautographique.

II-3-1: Analyse chimique des extraits à l'hexane et au *n*-butanol de *C. viminalis* par HPLC-UV (DAD)-MS

Les extraits possédant des activités biologiques ont été analysés par HPLC-UV (DAD)-MS (ESI) en mode négatif afin d'obtenir leur profil chromatographique et des informations sur la nature chimique et la masse de leurs constituants.

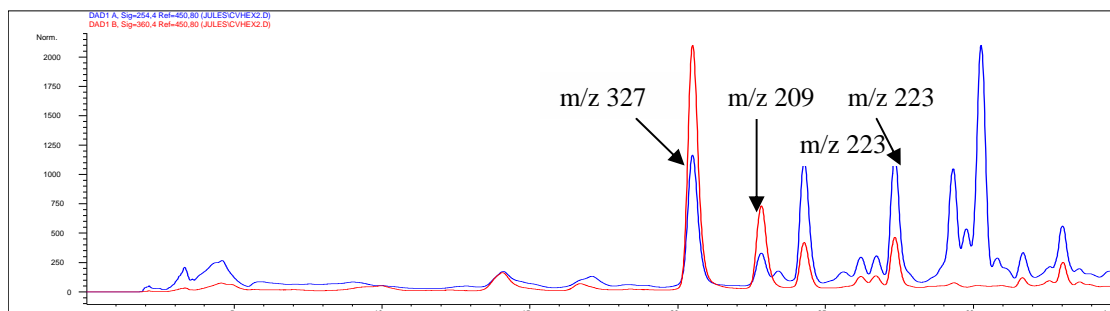


Figure 2-1: Profil chromatographique à 254 et 366 nm de l'extrait à l'hexane de *C. viminalis*

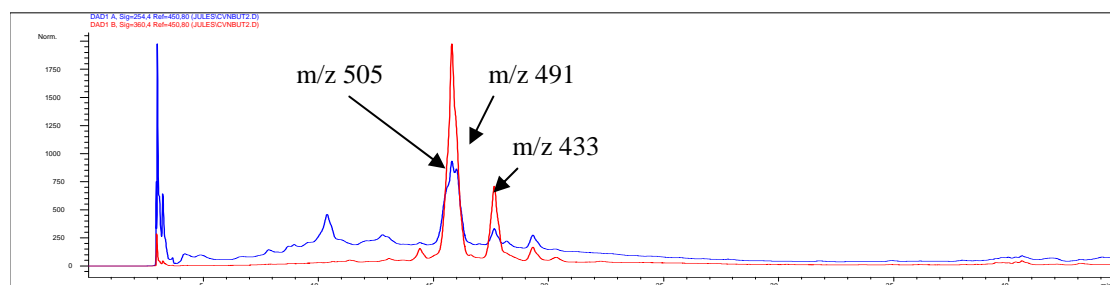


Figure 2-2: Profil chromatographique à 254 et 366 nm de l'extrait au *n*-butanol de *C. viminalis*

II-3-2: Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait de *C. viminalis*

100 g de l'extrait brut de *C. viminalis* ont été dissous dans de l'eau et extrait successivement avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol pour conduire après évaporation à sec du solvant à 10, 75 et 7 g d'extrait à l'hexane, acétate d'éthyle et *n*-butanol respectivement. L'extrait hexanique a été fractionné sur colonne de Séphadex LH-20 pour éliminer les pigments, ensuite la fraction dépourvue de pigments a été purifiée par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient Hexane-AcOEt. Cinq composés ont été obtenus dont deux d'entre elles Cv₁ et Cv₂ étaient des mélanges de deux produits chacun. Ils ont été repurifiés par HPLC sur colonne de C-18 (Nucléosil, 100-7) avec le mélange MeOH-H₂O (8:2) (schéma 2-2). La chromatographie sur colonne de silice de l'extrait butanolique (6 g) avec le mélange CHCl₃-MeOH par polarité croissante a permis d'isoler

quatre composés parmi lesquelles Cv_{13} qui est un mélange de deux composés qui seront séparés sur des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) (éluant MeOH-H₂O (1:1)).

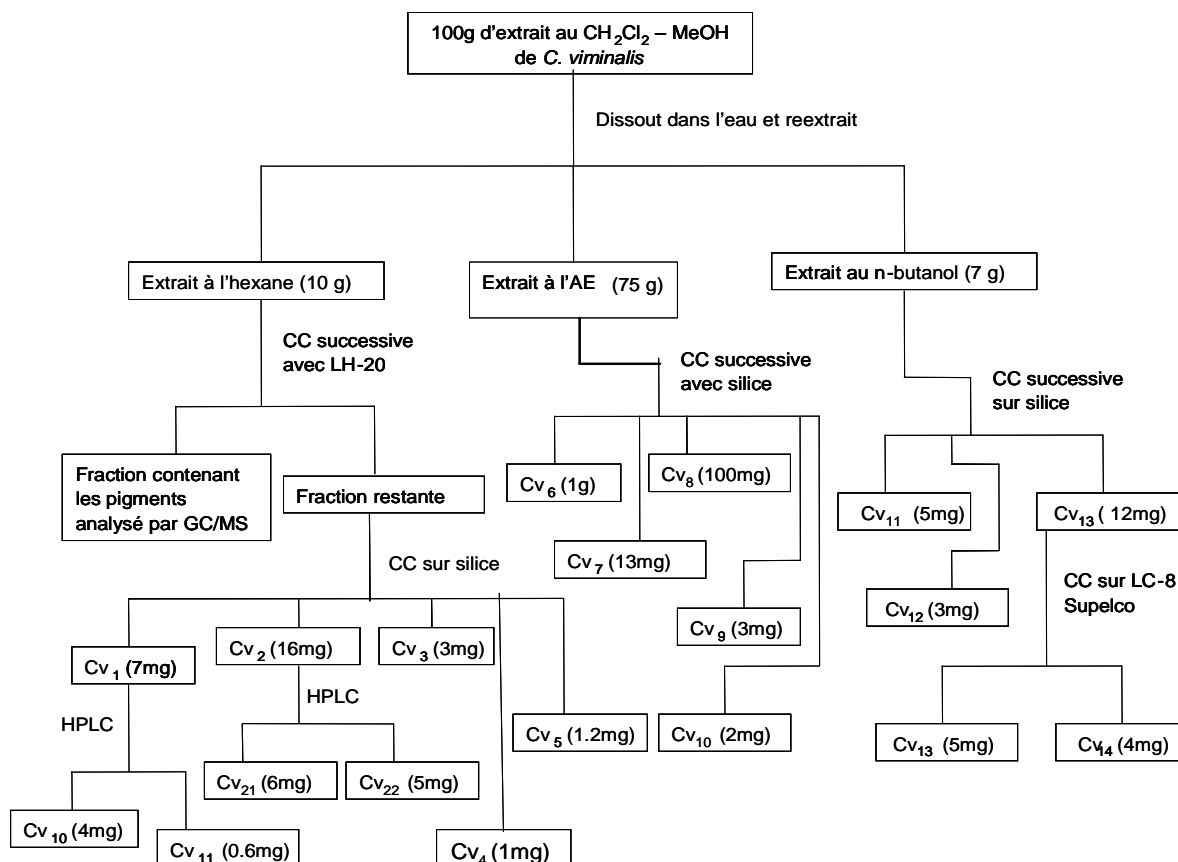


Schéma 2-2: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de *C. viminalis*.

II-3-3: Analyse chimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *S. guineense* par HPLC-UV-MS

L'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *S. guineense* a été analysé par HPLC-UV-MS dans le but d'obtenir les informations sur la nature chimique et la masse des composés de cet extrait.

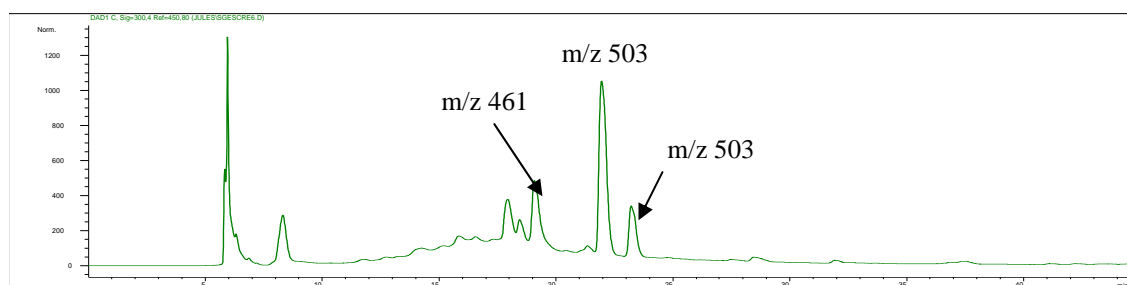


Figure 2-3: Profil chromatographique à 254 nm de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *S. guineense*

Tous les composés détectés dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de *S. guineense* montrent le même spectre UV, ce qui indique qu'ils ont les mêmes chromophores. Peu d'informations peuvent être déduite à ce stade de l'analyse.

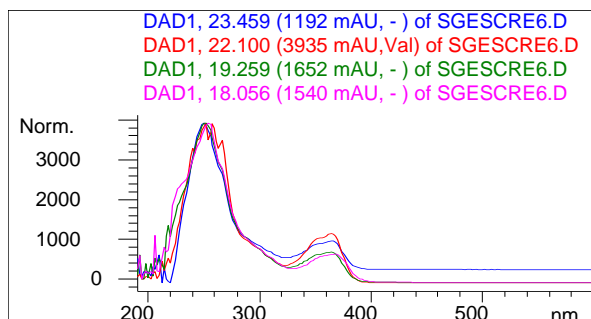


Figure 2-4: Spectre UV des composés détectés dans l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *S. guineense*.

II-3-4: Fractionnement et isolement des métabolites de *S. guineense*.

L'extrait des feuilles de *S. guineense* (180 g), a été dissout dans 1 litre d'eau et re-extrait avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Les différents extraits ont été chromatographié sur silice suivant le protocole ci-dessous.

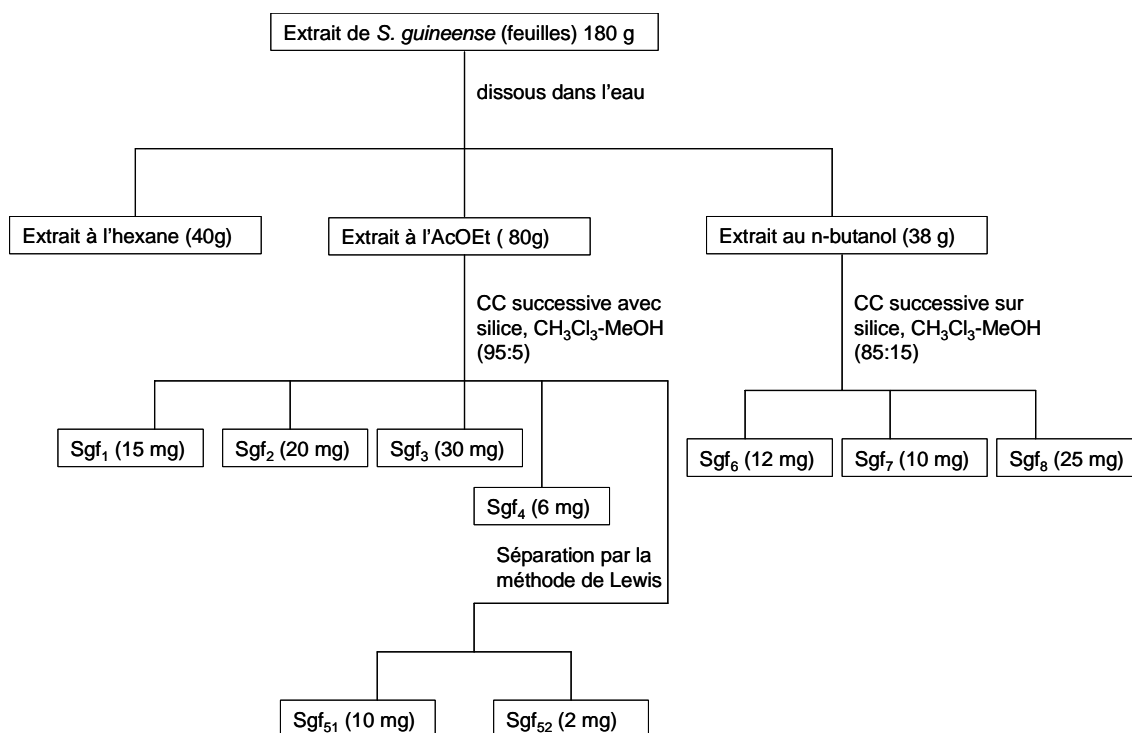
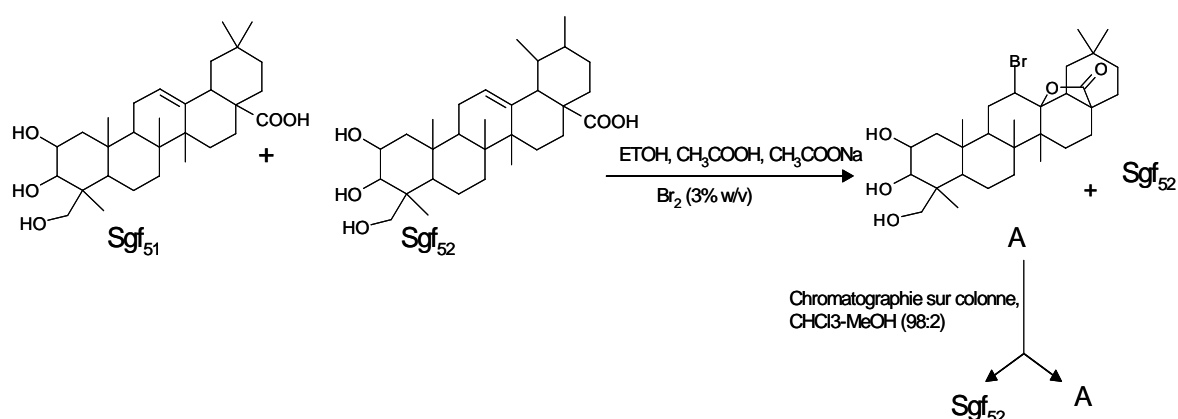


Schéma 2-3: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de *S. guineense*

L'extrait des écorces de *S. guineense* (200 g) a été fractionné suivant le même protocole que les feuilles. L'analyse par CCM nous a permis de constater que l'extrait au *n*-butanol contenait les mêmes métabolites que l'extrait à l'acétate d'éthyle. L'extrait à l'AcOEt a été fractionné sur silice et ensuite purifié par chromatographie à moyenne pression avec le gradient CHCl₃-MeOH ce qui nous a permis d'obtenir six composés indexés Sg₁, Sg₂, Sg₃, Sg₄, Sg₅ et Sg₆. Sg₂ était un mélange de deux produits qui ont été purifiés sur colonne ouverte en phase inverse (RP-18) (éluant MeOH-H₂O (1:1)) pour obtenir deux composés nommés Sg₂ et Sg₃.

II-3-5: Séparation de l'acide arjunolique et de l'acide asiatique par la méthode de Lewis.

100 mg du mélange d'acide arjunolique (Sgf₅₁) et d'acide asiatique (Sgf₅₂) ont été solubilisés dans 2 ml d'éthanol auquel ont été ajoutés 2 ml d'acide acétique 90% et 50 mg d'acétate de sodium. La solution a été traitée avec un excès de solution de brome dans l'acide acétique (3% W/V), le mélange a été mis sous agitation pendant 45 minutes. Le mélange réactionnel a été ensuite mélangé à 50 ml d'eau, il se forme un précipité blanc qui a été filtré et purifié sur colonne avec un mélange CHCl₃-MeOH (98:2). On a obtenu 10 mg du dérivé ursolique et 4 mg du dérivé bromé. Le dérivé bromé (4 mg) a été chauffé avec 2 ml d'acide acétique et 10 mg de zinc dans un bain marie et sous agitation pendant trois heures. Le mélange réactionnel a été filtré et le filtrat est mis dans 4ml d'eau et refroidit, il se forme une solution blanchâtre qui est décantée et concentrée pour donner 2 mg du dérivé oléanane.



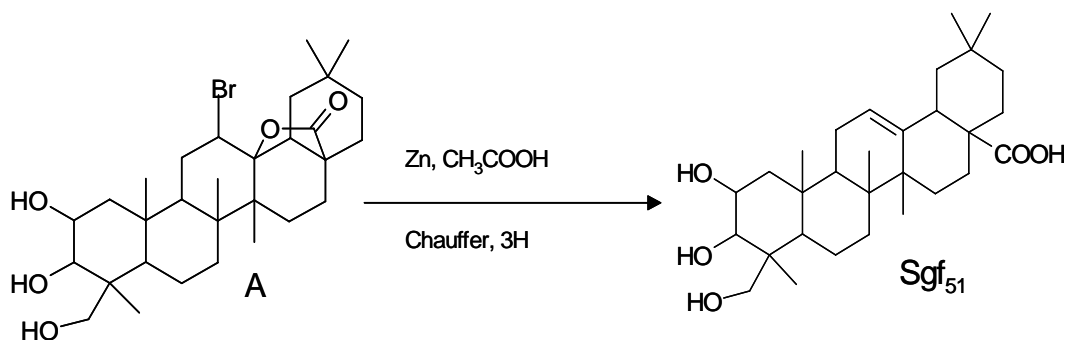


Schéma 2-4: Séparation du mélange acide arjunolique (Sgf₅₁) et acide asiatique (Sgf₅₂)

II-3-6: Analyse chimique des extraits par HPLC-UV (DAD)-MS de *S. aromaticum*

Les différents extraits de *S. aromaticum* ont montré des activités antibactériennes et anti-oxydantes. Dans le but d'obtenir des informations sur la nature chimique et les masses des différents constituants de ces extraits nous avons effectué des analyses par HPLC-UV-MS.

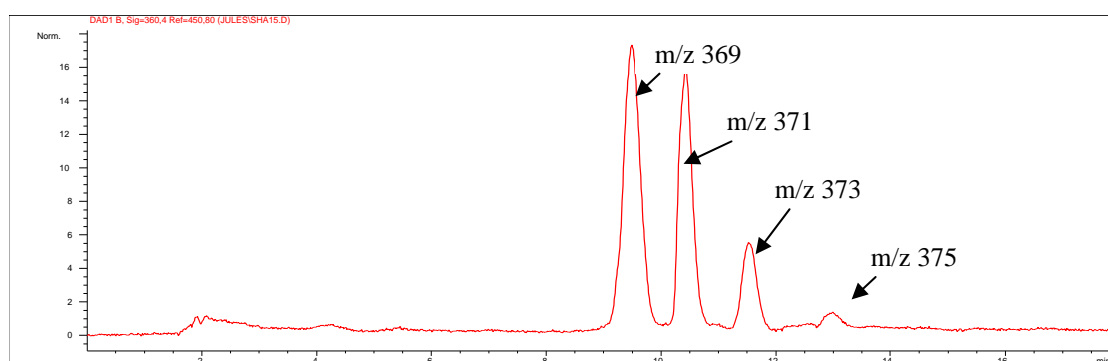


Figure 2-5: Profil chromatographique à 254 nm de l'extrait à l'hexane des feuilles de *S. aromaticum*

Dans l'extrait à l'hexane de *S. aromaticum*, les quatre composés détectés montrent le même spectre UV ce qui indique que ces métabolites appartiennent à la même classe de composés. Sur leurs spectres de masse on observe une différence de 2 Da entre deux signaux successifs ce qui nous permet de supposer la saturation d'une double liaison éthylénique.

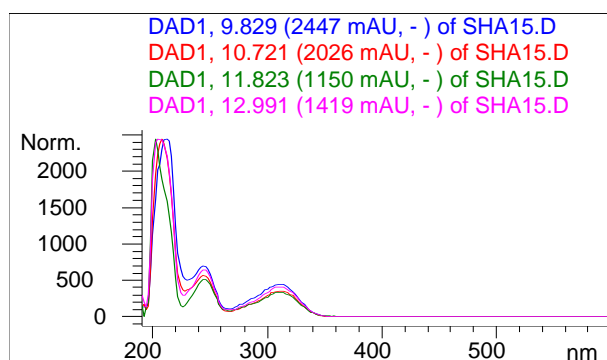


Figure 2-6: Spectre UV des composés détectés dans l'extrait à l'hexane *S. aromaticum*.

L'analyse des extraits à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol est faite en HPLC-UV-MS. Les chromatogrammes montrent principalement des composés avec des masses moléculaires comprises entre m/z 170 et 655 Da, en ESI-MS mode positif.

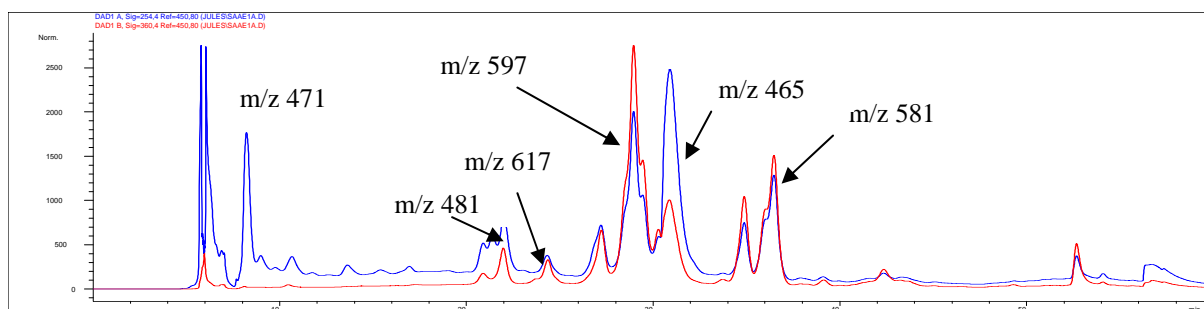


Figure 2-7: Profil chromatographique à 254 et 366 nm de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *S. aromaticum*

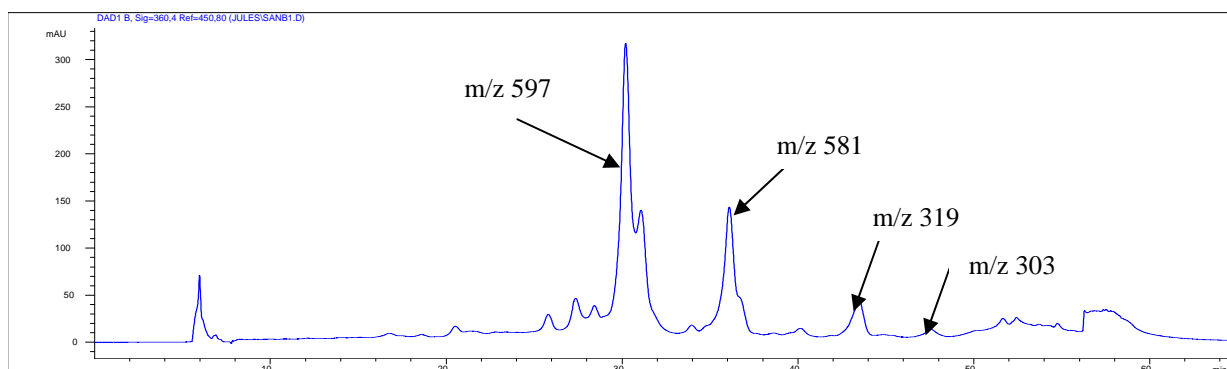


Figure 2-8: Profil chromatographique à 254 nm de l'extrait au *n*-butanol de *S. aromaticum*

II-3-7: Fractionnement et isolement des métabolites de *S. aromaticum*

160 g d'extrait au CH_2Cl_2 -MeOH des feuilles de *S. aromaticum* ont été dissous dans l'eau et reextrait successivement à l'hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol pour donner respectivement 15, 75, 25 et 35 g d'extraits (schéma 2-5).

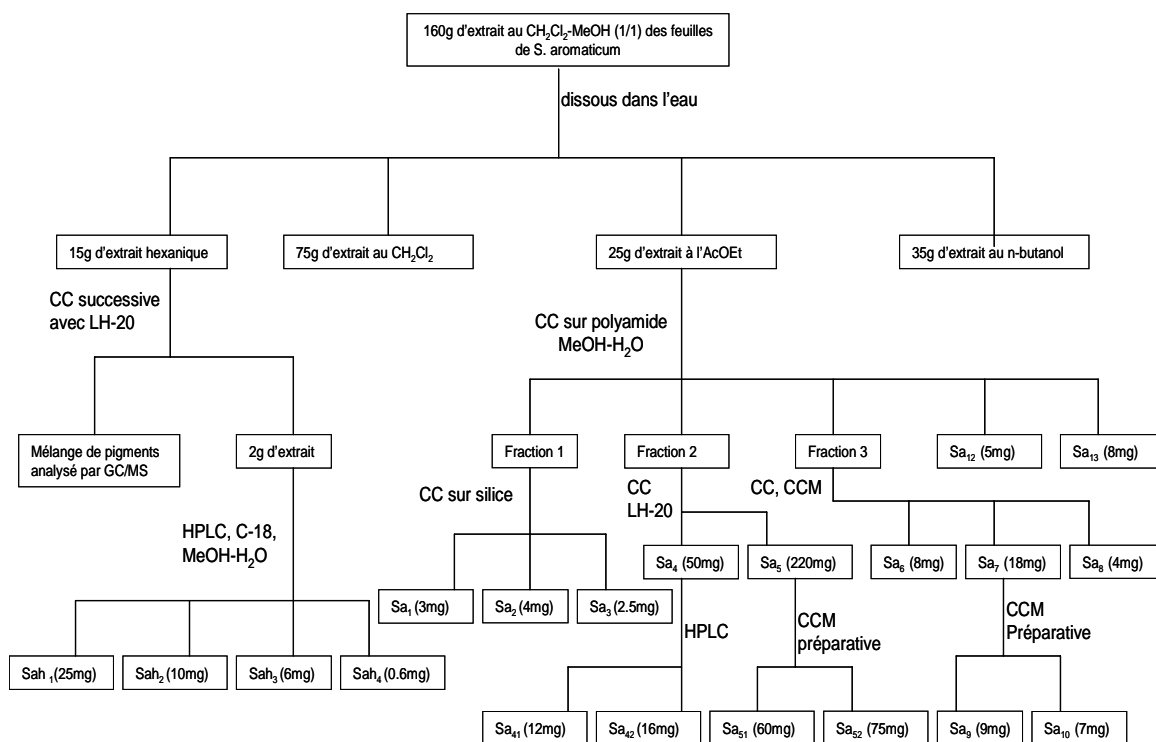


Schéma 2-5: Protocole d'isolement des métabolites secondaires de *S. aromaticum*

L'extrait au *n*-butanol a été soumis à la chromatographie sur colonne (polyamide); 4 fractions ont été obtenues. Tous les produits retrouvés dans la troisième et quatrième fraction avaient déjà été purifiés de l'extrait à l'acétate d'éthyle. La purification de la fraction 1 sur colonne de silice (32-63 μm) avec le mélange CHCl_3 -MeOH- H_2O (35-15-10) phase inférieure donne les composés Sa_{14} (20 mg), et Sa_{15} (2.5 mg). La fraction 2 a été également purifiée sur colonne de silice (32-63 μm) avec le mélange CHCl_3 -MeOH- H_2O (35-15-10) phase inférieure, permettant d'obtenir deux composés notés Sa_{16} (3 mg) et Sa_{17} (2 mg).

II-4: Techniques analytiques

II-4-1: Ionisation électrospray

L'interface électrospray fait partie des nouvelles techniques d'ionisation à pression atmosphérique (API). Comme son nom l'indique, l'ionisation des molécules se fait dans une chambre à pression atmosphérique et non à vide poussée comme les autres procédés décrits précédemment. Ce processus résulte de l'auto répulsion des charges électrostatiques à la surface de la goutte. Nous pouvons nommer trois interfaces majeures : L'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ion spray (ISP) qui mettent en application le phénomène décrit par Zeleny en 1917^{91;92} des gouttes de taille uniformes de 1 μm de diamètre sont produites par l'application d'un potentiel à la sortie du capillaire émergeant du solvant.

L'interface ESI développée par Whitehouse⁹³ est décrite de la façon suivante: Une solution est introduite dans une chambre à pression atmosphérique à travers une aiguille en acier inoxydable à un débit de 5-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un potentiel de -3.5 kV est appliqué à l'électrode cylindrique (l'aiguille étant relié à la terre) pour la détection des ions positifs. Un potentiel de -4.5 à +40 kV est appliqué à l'entrée et à la sortie du capillaire en verre respectivement. Les potentiels sont inversés pour la détection des ions négatifs. Le liquide est pulvérisé depuis la pointe de l'aiguille et les gouttes formées sont dispersées par un flux chaud d'azote appliqué à contre courant à un débit de 150 mL/ min. Les ions formés par évaporation du solvant par le gaz séchant sont entraînés à travers le capillaire à travers une chambre où un vide partiel est établi (10^{-4} Torr) formant un faisceau d'ions supersoniques. Finalement ceux-ci sont filtrés à travers l'écumoire et dirigés par des lentilles électrostatiques vers l'analyseur de masse.

Le procédé de formation des ions par l'application d'un potentiel a longtemps été débattu, mais il peut être divisé en trois parties:

- La formation des gouttes
- La réduction des gouttes
- La formation des ions gazeux

L'application d'un champ électrique élevé à la pointe de l'aiguille de l'électrospray produit une séparation partielle des ions positifs et négatifs. En mode positif, les ions positifs sont accumulés à la surface de la pointe du liquide du capillaire et les ions négatifs sont amassés à l'intérieur du liquide. Les répulsions des ions positifs à la surface et le champ électrique régnant entre les charges positives augmente la tension de surface du liquide pour former un

cône, appelé cône de Taylor⁹⁴ (figure 2-9) L'accumulation des charges à la pointe du cône provoque un filament liquide qui finalement se divise en gouttelettes chargées⁹⁵. Ce phénomène n'apparaît que si le champ électrique E_0 vaut:

$$E_0 = (2Y \cos 49^\circ / \epsilon_0 r_c)^{1/2} \quad (1)$$

Y : Tension de surface

ϵ_0 : Constante de permittivité du vide

$\cos 49^\circ$: Moitié de l'angle du cône de Taylor

r_c : rayon du capillaire

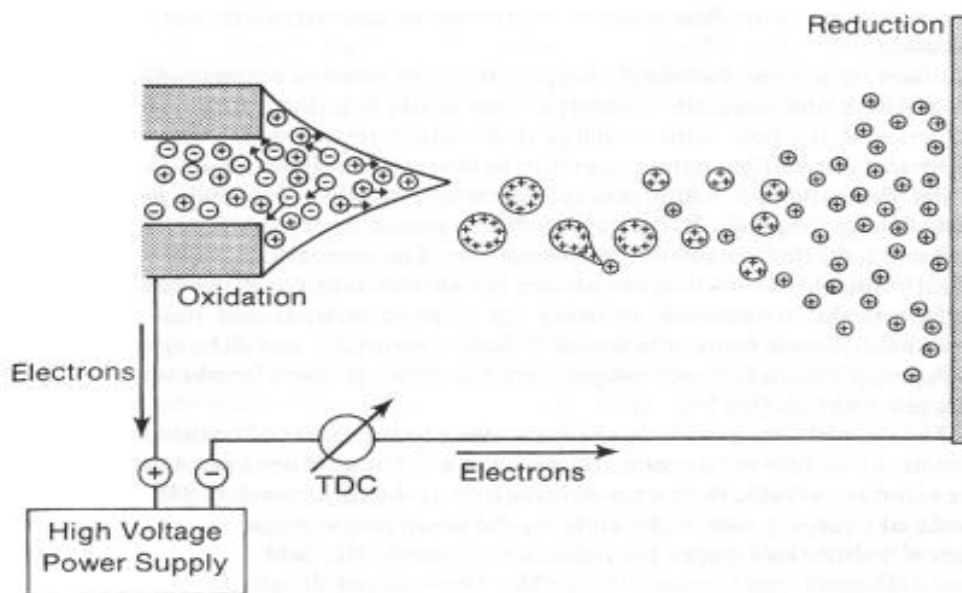


Figure 2-9: Représentation du procédé "électrospray" par la formation du cône de Taylor.

Le champ électrique est proportionnel à la tension de surface et celle-ci est dépendante de la concentration des ions en solution. Pour qu'un phénomène électrospray apparaisse, il faut une concentration minimale en électrolyte de 10^{-5} M. Au dessus de cette limite, le courant totale des gouttes augmente très lentement par rapport à la concentration des ions en solution⁹⁴.

En conclusion, l'augmentation de la concentration en électrolytes dans les gouttes augmente la conductivité et de ce fait diminue le rayon des gouttes. L'évaporation du solvant induite par la température ambiante, conduit à la diminution du rayon des gouttes. Lorsque le rayon vaut environ $1 \mu\text{m}$, il est proche de la limite de Rayleigh⁹⁶.

L'explosion de la goutte en gouttelette 100 fois plus petites est du au fait que les forces de répulsions coulombiennes dépassent la force de cohésion de la tension de surface⁹⁷, ceci conduit à la formation de l'ion gazeux: Lorsque la goutte ne contient plus de solvant, la charge se dépose sur l'électrolyte MX formant l'ion M⁺⁹⁸.

$$E_{RY} = (4Y / \epsilon_0 R)^{1/2} \quad (2)$$

R : Rayon de la goutte en μm

N = Nombre de charges élémentaires sur la surface de la goutte

Δt = Temps utilisé pour la réduction de la goutte jusqu'à la limite de Rayleigh⁹⁹

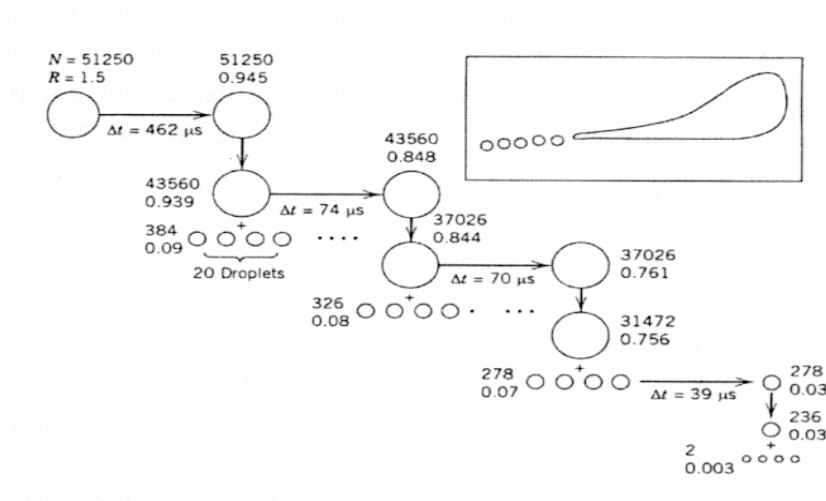


Figure 2-10: Représentation schématique de la formation de la goutte chargée à son explosion.

Comme la source ESI délivre un courant électrique continu, une oxydation électrochimique créant des ions positifs ou éliminant les ions négatifs, se produit sur capillaire métallique (cathode) et une réduction électrochimique éliminant les ions positifs se produit sur la contre électrode (anode)¹⁰⁰.

II-4-2: La trappe ionique

Le quadropôle ion trap (QIT) est un analyseur comprenant 3 électrodes. Les deux électrodes se trouvant aux extrémités sont appelées entrance et exit end caps électrodes, celle se trouvant au centre du QIT en forme de demi-lune est appelée ring électrode (Figure 2-11): Chaque end cap électrode possède un petit trou afin de permettre l'entrée et la sortie des ions dans la cavité de l'analyseur. Les ions éjectés à travers l'électrode de sortie sont focalisés par

la conversion dynode et accélérés à travers les lentilles de sortie vers le système de détection des ions.

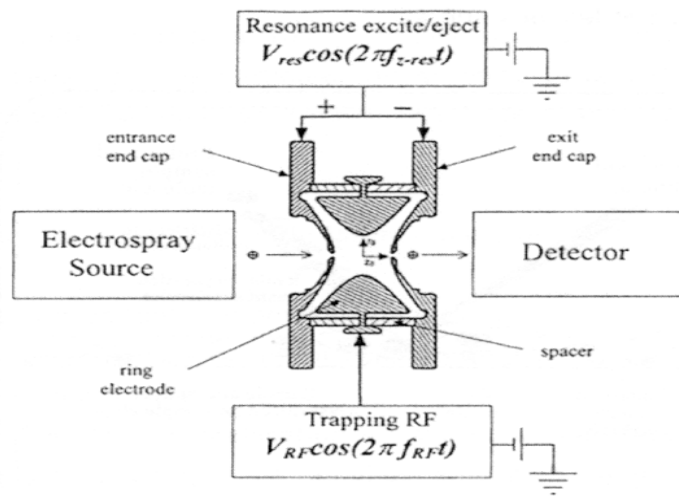


Figure 2-11: Schéma d'une trappe ionique⁹⁹.

Un champ électrique est formé par les 3 électrodes lorsque la radiofréquence rf vaut :

$$Rf = V_{rf} \cos(2\pi f_{rf} t) \quad (3)$$

Le champ électrique trappe les ions et les stocke au centre de l'analyseur. Les ions suivent alors la trajectoire décrite par l'équation différentielle de Matthieu¹⁰¹, selon les paramètres a_z et q_z représentant les paramètres dimensionnels de "trappage" des ions en fonction de l'axe z.

$$a_z = -2 \quad a_r = -16eU/m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2 \quad (4)$$

$$q_z = -2 \quad q_r = -8eV/m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2 \quad (5)$$

r: Direction radiale

z: Direction axiale

U: Amplitude du courant direct (dc)

V: Amplitude de la radiofréquence (rf)

e: Charge d'un ion

m: masse d'un ion

r_0 : Rayon interne de la ring électrode

z_0 : Distance axiale depuis le centre de l'analyseur jusqu'au point le plus proche d'une end capped electrode.

Ω : $\Omega = 2\pi f_{rf}$; f_{rf} est la fréquence du voltage principal (rf)

Le diagramme de stabilité du QIT est représenté en fonction de a_z et q_z selon la solution de l'équation de Mathieu (équation 4 et 5) (Figure 2-12). La flèche montre les points de stabilité du diagramme lorsque $a_z = 0$, depuis le point d'entrée de l'ion dans la trappe jusqu'à la sortie. Les cercles représentent la valeur de q_z pour des ions ayant la valeur de q_z pour des ions ayant un rapport m/z différent, car q_z est inversement proportionnel à la masse (m), un rapport m/z élevé signifie un q_z bas. Chaque ion a un propre q_z à $V = \text{constante}$, de ce fait les ions ayant un rapport m/z élevé ne sont pas détectés lorsque q_z vaut 0 et sont à la limite de détection lorsque $q_z = 0.0908$. Lorsque V augmente, les ions positionnés sur l'axe q_z se déplacent vers un q_z plus élevé. Lorsque q_z vaut 0.900, les ions passent en phase d'excitation, puis lorsque $q_z = 0.908$, ils se trouvent à la limite de la stabilité et sont éjectés à travers le trou de l'électrode end capped.

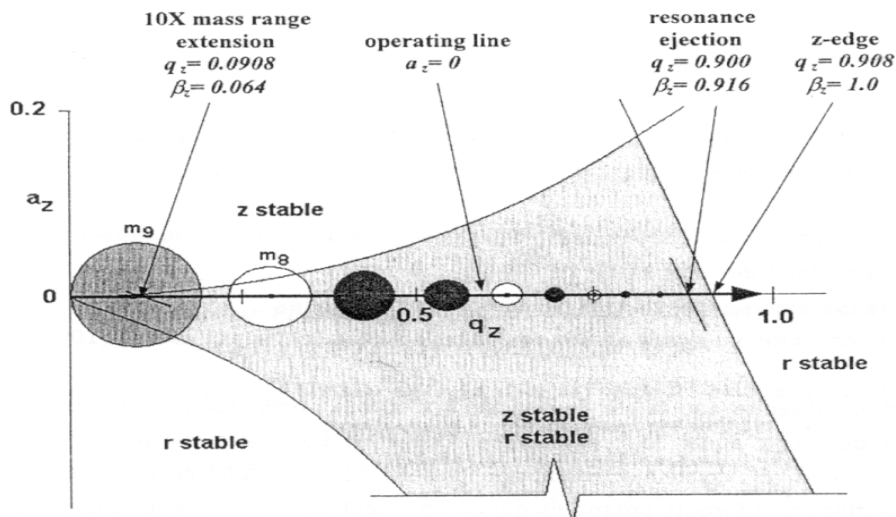


Figure 2-12: Diagramme de stabilité de la trappe ionique

Les ions de rapport m/z possèdent une fréquence de mouvement fondamentale propre au q_z et cette fréquence est couramment utilisée pour faire résonner ces ions. Les fréquences de mouvement des ions dans la dimension z sont définies par l'équation suivante :

$$f_h = (hf_{rf} \pm \beta_z f_{rf}/2) \text{ où } h = (0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots) \quad (6)$$

f_h : Fréquence de mouvement de l'ion

f_{rf} : Fréquence de la rf appliquée à la ring electrode

β_z : Paramètre utilisé pour définir la fréquence d'un ion en fonction de sa position sur le diagramme de stabilité.

A la limite de détection, β_z vaut 0.064, à la limite de stabilité, β_z vaut 0.916 et lorsque l'ion est éjecté, β_z vaut 1.

II-5: Test antioxydant

Les tests antioxydants ont été effectués par deux méthodes à savoir la méthode bioautographique et par la méthode de détection UV.

II-5-1: Méthode bioautographique

L'activité antioxydante des extraits et des composés purs a été évaluée sur couche mince par le DPPH [1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (Aldrich)] suivant la méthode de Takao¹⁰². Les échantillons (100 µg) ont été déposés sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck), et ensuite développés dans des systèmes d'élution adéquat. Les plaques sont ensuite révélées par une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml; ce réactif est un radical stable qui, réduit par les capteurs de radicaux, passe du pourpre au jaune, révélant ainsi les composés ayant une activité antioxydante.

II-5-2: Méthode par mesure d'absorption UV

Cette méthode a été utilisée uniquement pour les produits purs. Plusieurs solutions à des concentrations différentes de produits purs ont été préparées, dix microlitres de chaque concentrations est mélangé à 1ml d'une solution éthanolique de DPPH à une concentration de 100 µM; l'ensemble a été incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Chaque concentration a été préparée 3 fois. La baisse d'absorbance du DPPH dans la solution a été mesurée à 517 nm et convertie en pourcentage antioxydant^{103;104} (AA) en utilisant la formule:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[Ab_{\text{échantillon}} - Ab_{\text{blanc}}] \times 100}{Ab_{\text{control}}} \right\}$$

Dix microlitres du produit pur à une concentration déterminée dans 1 ml de méthanol ont été utilisés comme blanc. La solution éthanolique de DPPH a été utilisée comme contrôle. La catéchine, l'acide ellagique et le trolox ont été utilisés comme contrôle positif. La IC₅₀ est la concentration requise pour un échantillon permettant la réduction des capteurs de radicaux de 50%. Cette valeur a été calculée sur la base de la droite de régression linéaire des valeurs d'inhibition reportées en fonction du logarithme des concentrations (3 concentrations en micromole par litre). Les intervalles de confiance ont été calculés directement sur Microsoft Excel 5.0.

II-6: Tests antifongiques

II-6-1: Méthode par diffusion sur minidisque

Un milligramme de chaque extrait a été dissout dans 500 μL du mélange $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1); 10, 20, 30, 40, 50 et 100 μL de la solution ont été prélevés et déposés sur un disque de 9 mm de diamètre et séchés à température ambiante. Ces disques ont été ensuite déposés dans des boîtes de pétri de malt agar préalablement infesté par différents champignons (*Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*). Ces boîtes ont été conservées à l'étuve à 24°C, après trois jours une zone d'inhibition a été observée autour du disque pour les extraits possédant des composés actifs^{105;106}. La quantité minimale d'inhibition (MIQ) est la plus petite quantité nous permettant d'observer une zone d'inhibition.

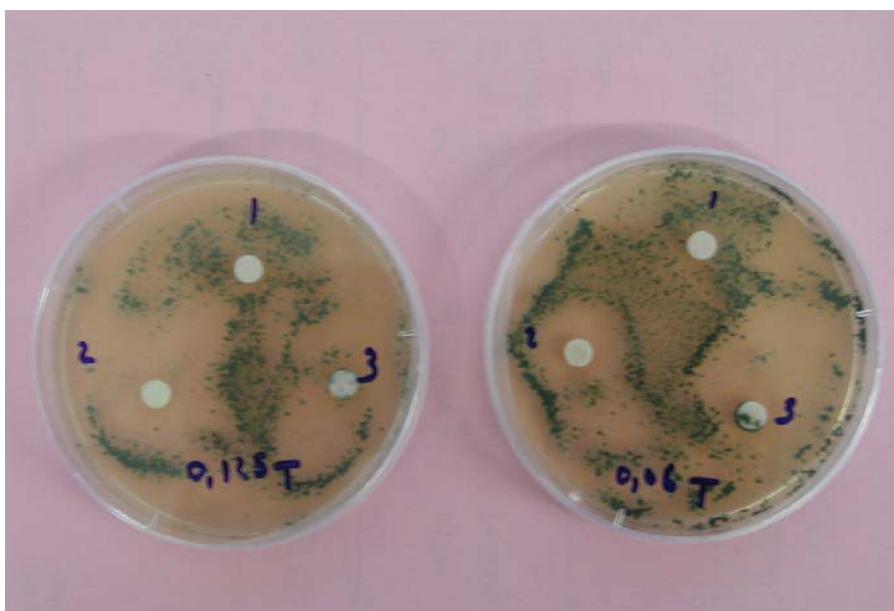


Figure 2-9: Test antifongique réalisé par la méthode de diffusion sur minidisque

Les tests biologiques sur minidisque indiquent la présence ou non d'une activité bactérienne ou fongique du produit testé, mais nous ne pouvons rien apprendre de plus précis à savoir si l'activité constatée résulte d'un unique composé ou de la synergie de plusieurs.

II-6-2: Méthode bioautographique

Le développement de ce test a été fait suivant la méthode de Hadacek¹⁰⁵. 100 μg de chaque extrait ont été déposés sur une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck) et élués avec un mélange de solvant adéquat. Différentes concentrations (0.1 à 10 μg) des produits purs ont été

déposées sur le même type de plaque de gel de silice et les plaques développées dans un système de solvant adéquat. Après évaporation totale des solvants, une suspension des spores de chaque champignon (*Trichoderma harzianum*, *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*) dans son milieu nutritif a été coulée sur les plaques, qui ont ensuite été incubées à 24°C à l'étuve. Les composés actifs sont révélés à la fin du test par des zones d'inhibition claires sur fond verdâtre produit par le développement des champignons. La concentration minimale d'inhibition a été définie comme précédemment.

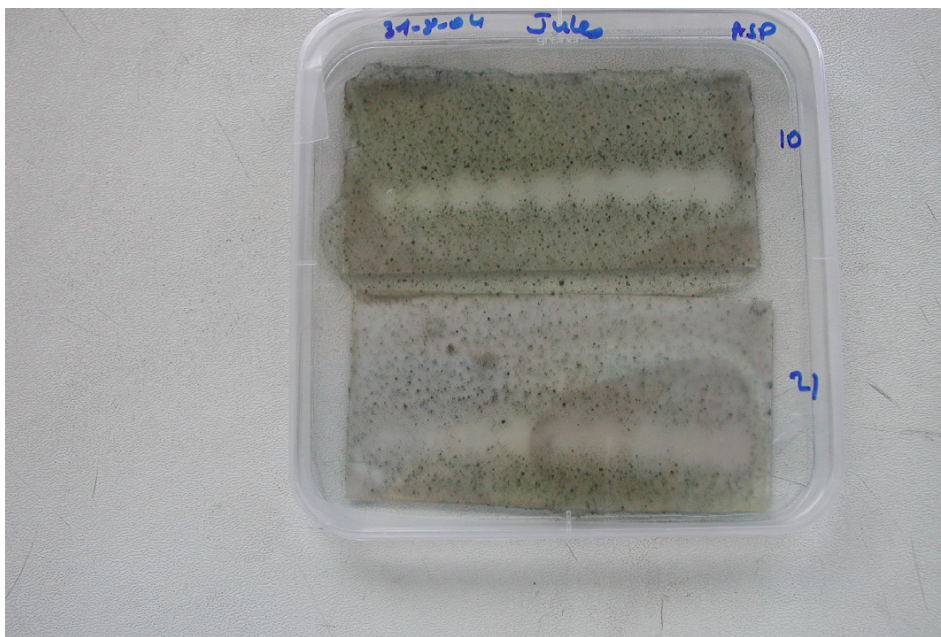


Figure 2-10: Test antifongique réalisé par la méthode bioautographique

II-7: Tests antibactériens

II-7-1: Méthode par diffusion sur minidisque

Un milligramme de chaque extrait a été dissout dans 500 μL du mélange $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1); 10, 20, 30, 40, 50 et 100 μL de la solution sont prélevés et déposés sur un disque de 9 mm de diamètre et séchés à température ambiante. Ces disques ont été ensuite déposés dans des boîtes de pétri de nutrient agar préalablement infesté par différentes bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei*) Ces boîtes ont été conservées à l'étuve à 37°C pour *E. coli* et *S. sonnei* et à 30°C pour *B. subtilis*, après deux jours la zone d'inhibition a été observée autour du disque pour les extraits possédant des composés actifs. Dans certains cas il a été nécessaire de pulvériser les boîtes de pétri avec une solution méthanolique de bromure

de tétrazolium de bleu de thiazolyle¹⁰⁷. La concentration minimale d'inhibition (MIQ) est la plus petite concentration nous permettant d'observer une zone d'inhibition.

II-7-2: Méthode bioautographique

Ce test a été fait suivant la méthode de Hadacek¹⁰⁵. 100µg de chaque extrait ont été déposés sur une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck) et élués avec un mélange de solvant hexane-acétate d'éthyle (6:4) pour les extraits à l'hexane, CHCl₃-MeOH (9:1) pour les extraits à l'acétate d'éthyle et CHCl₃-MeOH (75:25) pour les extraits au n-butanol. Différentes concentrations des extraits bruts et des produits purs (0.1 à 10 µg) ont été déposées sur le même type de plaque de gel de silice et éluées dans le système de solvant adéquat. Après évaporation totale des solvants, une suspension bactérienne (*E. coli*, *B. subtilis* et *S. sonnei*) dans son milieu nutritif a été coulée sur les plaques. Celles-ci ont été ensuite incubées à l'étuve dans les mêmes conditions que précédemment (III-5-1). Les plaques ont été ensuite pulvérisées par une solution éthanolique de bromure de tétrazolium de bleu de thiazole (2.5 mg/ml). Après incubation à 30°C pendant 15 minutes les composés actifs se révèlent par des taches claires sur fond pourpre.

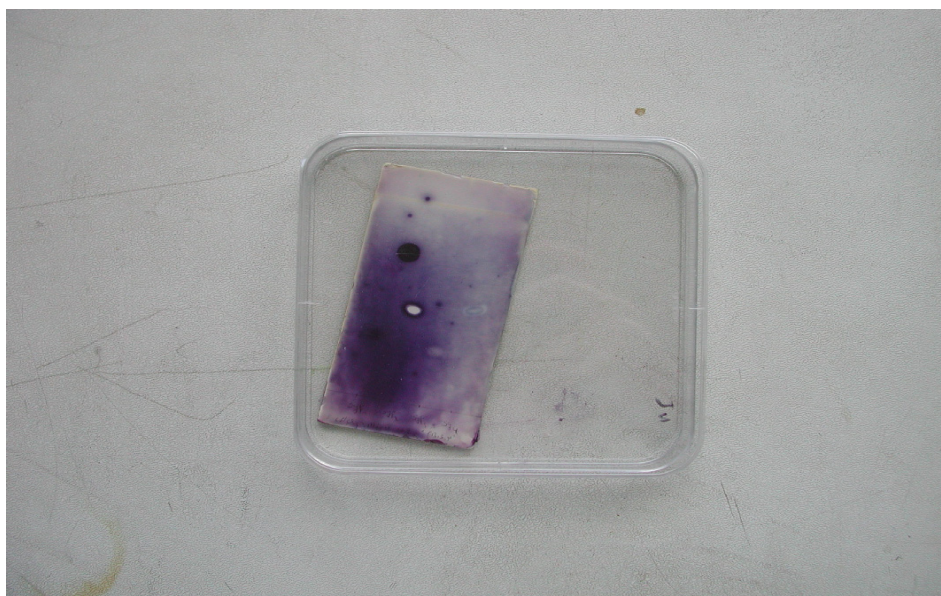


Figure 2-11: Test antibactérien réalisé par la méthode bioautographique

II-8: Tests insecticides

II-8-1: Préparation du matériel Animal

Les souches adultes de *Tribolium confusum* et *Tribolium castaneum* ont été obtenues de l'institut de protection des denrées alimentaires de Berlin en Allemagne. Un élevage de masse a été réalisé au laboratoire dans de grandes boîtes de pétri contenant de la farine de maïs à une humidité relative de 70 % et à une température comprise entre 24-26°C dans le but de générer une population homogène et suffisante d'insectes pour les tests. Au bout de quatre semaines, le contenu de ces boîtes a été tamisé de manière à éliminer tous les insectes adultes initialement introduits. Dix jours plus tard on obtient en masse des insectes âgés d'au plus dix jours pour les tests.

II-8-2: Préparation des différentes doses

Quatre solutions d'extrait de *E. saligna* ont été préparées en solubilisant dans l'acétone des quantités connues d'extrait. Chaque solution a été uniformément répandue à l'aide d'une seringue sur une moitié de rondelle de papier filtre de 9 cm de diamètre préalablement coupée à raison de 1, 2, 4 et 8 mg/cm². L'autre moitié de papier a été traitée uniquement à l'acétone et utilisée comme témoin. Les deux moitiés ont été séchées à température ambiante jusqu'à évaporation complète du solvant. Elles ont été ensuite ressoudées à l'aide d'une bande adhésive et déposées dans des boîtes de pétri de même diamètre pour les tests de répulsion. En ce qui concerne les tests de toxicité par contact sur papier filtre le protocole a été identique à la seule différence que les doses ont été répandues uniformément sur les papiers filtre de 9 cm, séchées et déposées dans les boîtes de pétri de même diamètre. Dans les boîtes témoins, le papier filtre avait été imbibé uniquement d'acétone.

II-8-3: Etude de l'effet répulsif des extraits

Les tests de répulsion ont été réalisés en déposant au centre de chaque boîte de pétri contenant les papiers filtre préalablement préparées 20 insectes non sexés de chaque espèce. Pour chaque dose quatre répétitions ont été effectuées. Après deux heures d'exposition le nombre d'insectes présents sur la partie traitée et ceux présents sur la partie non traitée ont été notés respectivement (Nt) et (Nc). Le pourcentage de répulsion (Pr) a été calculé en utilisant la méthode de McDonald¹⁰⁸.

$$Pr = [(Nc - Nt) / (Nc + Nt)] \times 100$$

II-8-4: Etude de la toxicité par contact des extraits

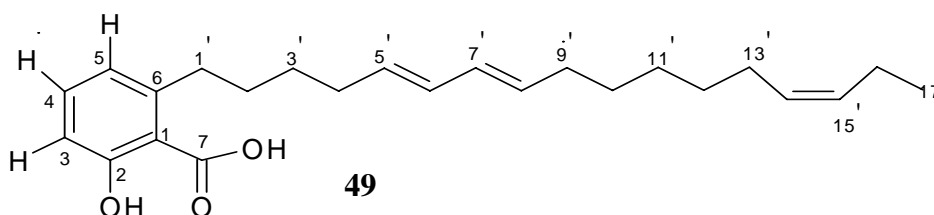
Les tests de toxicité par contact des extraits ont été réalisés en déposant dans les boîtes de pétri contenant les rondelles de papiers filtre précédemment préparées 20 insectes de chaque espèce. Chaque dose a été répétée quatre fois. Après chaque 24 heures et ce pendant huit jours le nombre d'insectes morts a été dénombré. Le pourcentage de mortalité a été calculé en divisant la moyenne du nombre d'insectes morts par le nombre d'insectes initial multiplié par 100.

III: RESULTATS

III-1: Les Alkylphénols

Les alkylphénols sont des composés possédant un noyau aromatique et une chaîne alkyle. Dans la nature on distingue trois types d'alkylphénols à savoir l'acide ginkgolique, le ginkgole et le bilobole¹⁰⁹. Dans nos travaux, nous avons uniquement isolé l'acide ginkgolique et ses dérivés de l'extrait à l'hexane de *S. aromaticum*.

III-1-1: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadeca-5',7',14'-triène (Sah₁)



Ce composé est identifié pour la première fois

Sah₁ est une huile incolore isolé par HPLC avec un temps de rétention de 9.83 min suivant le système 2 décrit dans la partie expérimentale (VI-2-2). L'analyse LC/MS-ESI ionisation négative donne l'ion moléculaire m/z 369 $[M-H]^-$ qui correspond à une masse de 370 Da. Cette masse est confirmée par ESI haute résolution (m/z 369.24319) en mode négatif. La MS² nous donne un fragment à m/z 325 $[M-H-44]^-$ correspondant à la perte d'un CO₂. Les spectres de RMN ¹³C et de DEPT indiquent la présence de 24 atomes de carbone (tableau 3-2) parmi lesquels 4 quaternaires, 9 méthines, 10 méthylènes et 1 méthyle. L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à sah₁ la formule moléculaire brute suivante C₂₄H₃₄O₃ avec un nombre d'insaturation égal à 8. On observe 2 bandes sur le spectre UV. La bande 1 a 318 nm et la bande 2 à 250 nm. Le spectre IR met en évidence une fine bande à 3319.4 cm⁻¹ qui est celle de l'élongation O-H, nous observons également des bandes à 1602, 757 et 669 cm⁻¹ correspondant au cycle aromatique.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-1) met en évidence la présence de trois protons aromatiques. Le proton à δ_H 7.34 (H-4) apparaît en doublet de doublet (dd) avec des constantes de couplage $J_1 = 8.1$ Hz et $J_2 = 7.7$ Hz indiquant des couplages ortho. Le proton à δ_H 6.86 (H-3) est également un dd avec des constantes de couplage $J_1 = 7.7$ et $J_2 = 1.0$ Hz, correspondant respectivement à un couplage ortho et méta, le troisième proton aromatique est un dd à δ_H 6.76 (H-5) avec des constantes de couplage $J_1 = 8.1$ et $J_2 = 1.1$ Hz. Le fort déblindage du proton phénolique observé à 11.5 ppm est du à l'effet chélateur du carbonyle en C-7.

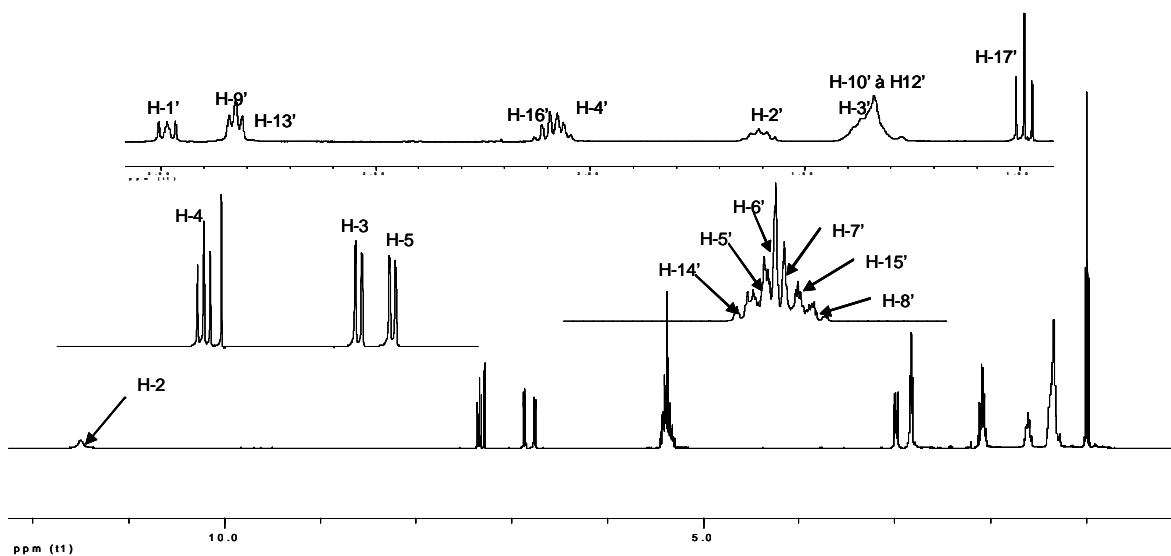


Figure 3-1: Spectre RMN ^1H de Sah₁

En superposant le spectre DEPT (figure 3-2) au spectre RMN ^{13}C (figure 3-3), on constate que dans l'intervalle de 20 à 40 ppm, tous les atomes de carbone sont des méthylènes et à 14.7 ppm nous avons un méthyle ce qui nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle il existe une chaîne aliphatique dans la structure.

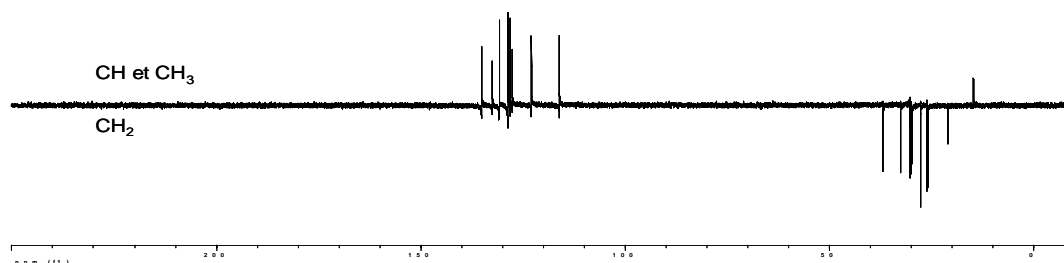


Figure 3-2: Spectre DEPT de Sah₁

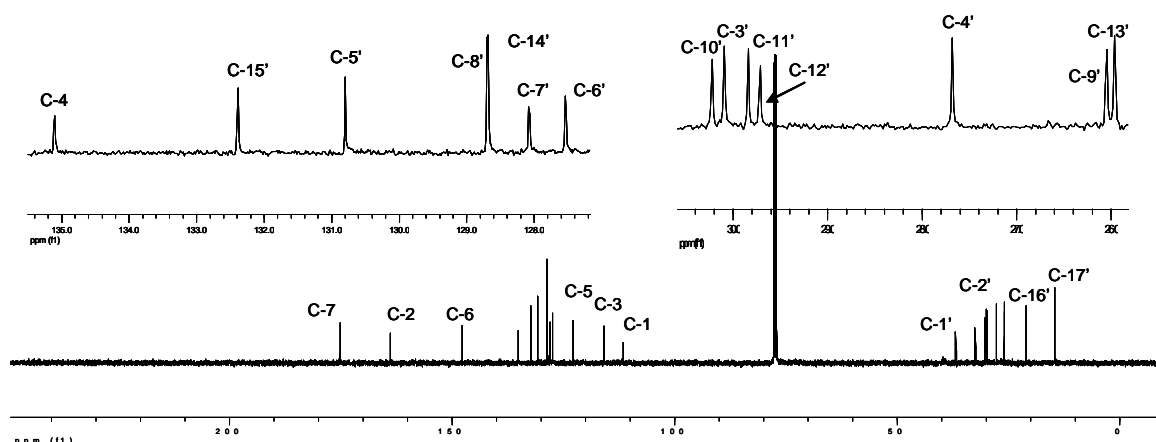


Figure 3-3: Spectre RMN ^{13}C de Sah₁

Le spectre COSY (figure 3-4) met en évidence deux sous structures distinctes dans Sah₁, l'une est aromatique, l'autre étant la chaîne aliphatique. Dans la partie aromatique on observe une corrélation entre 7.34 et 6.86 ppm et entre 7.34 et 6.76 ppm. Dans la partie aliphatique on observe des corrélations entre les protons à 2.06, 2.10, 2.83 et 2.81 et ceux à 5.30, 5.34, 5.39 et 5.42 ppm. Ces corrélations indiquent la disposition des CH par rapport aux CH₂ de la chaîne.

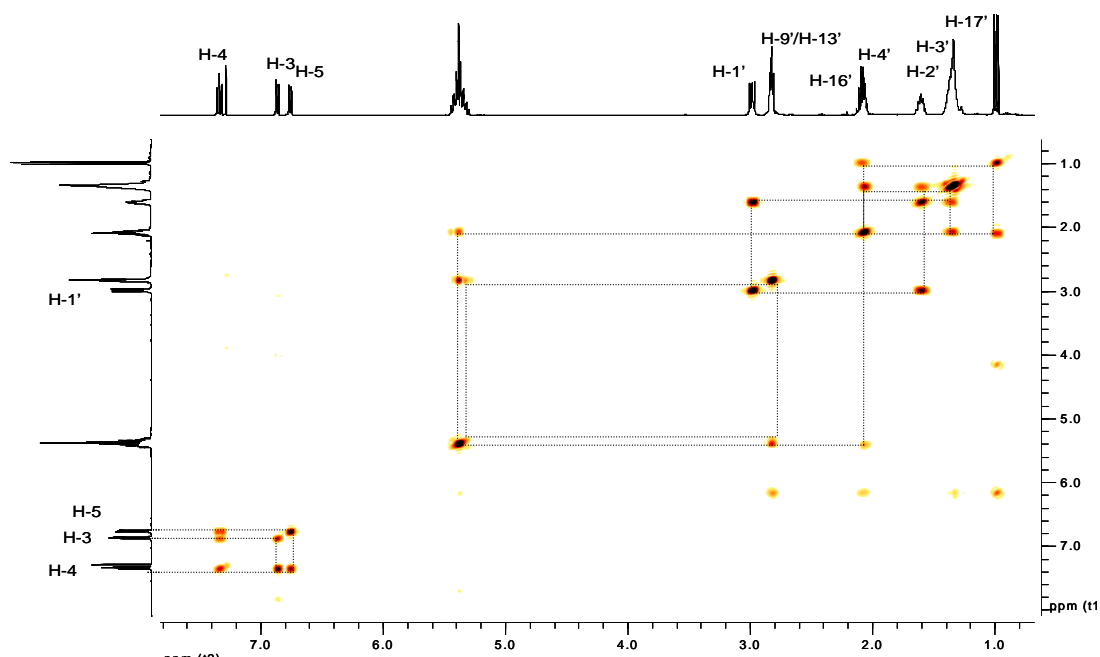


Figure 3-4: Spectre COSY ^1H - ^1H de Sah₁

Le spectre de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à courte distance ^1H - ^{13}C (figure 3-5) nous permet de fixer chaque proton à son atome de carbone.

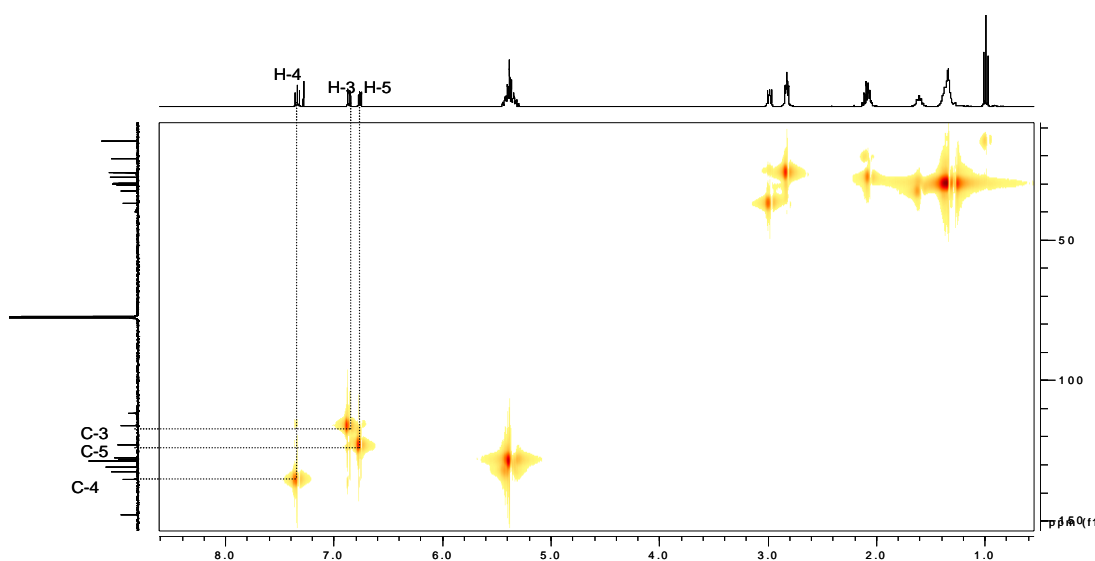


Figure 3-5: Spectre HMQC de Sah₁

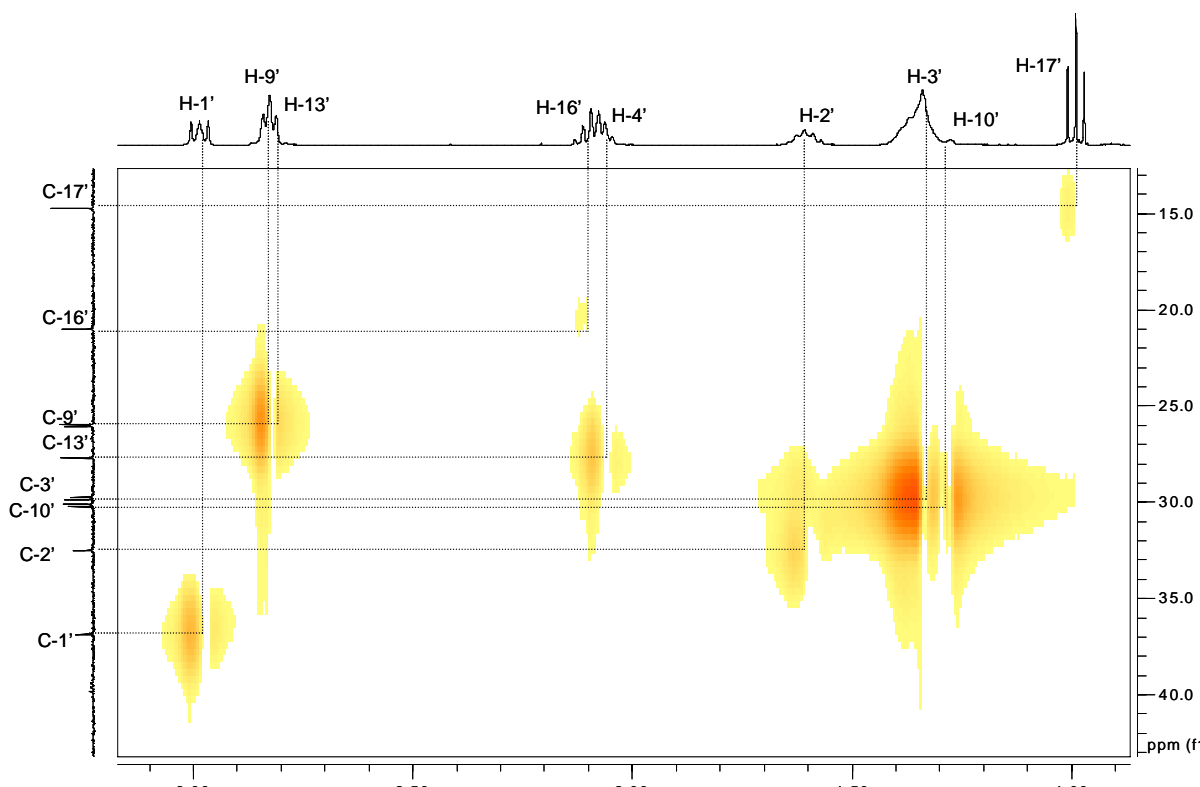
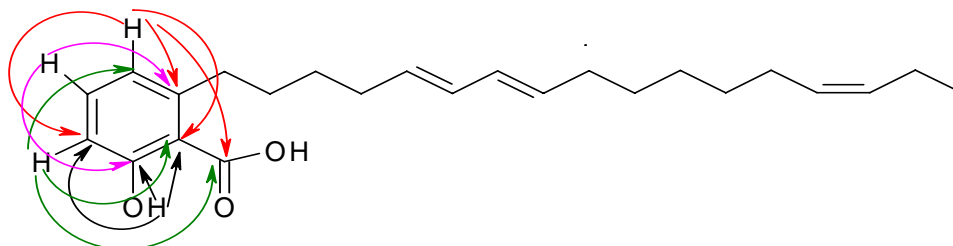


Figure 3-6: Agrandissement du spectre HMQC de Sah₁

Le spectre HMBC (figures 3-7 et 3-8) nous permet de joindre la partie aromatique de la molécule à sa partie aliphatique. En effet sur ce spectre on observe des corrélations entre le proton à δ_H 2.98 (H-1') avec les atomes de carbone à δ_C 111.5 (C-1); 122.8 (C-5); 147.8 (C-6) et à 32.5 (C-2'). Le proton chélaté à δ_H 11.5 a des corrélations avec les atomes de carbone à δ_C 163.9 (C-2), 111.5 (C-1) et 116.0 (C-3). Les protons à δ_H 6.86 (H-3) et 6.76 (H-5) ont une corrélation avec l'atome de carbone à 175.3 ppm (C-7) qui est le carbonyle de l'acide en position C-1 du noyau aromatique (Figure 3-7 et 3-8). Le proton à δ_H 1.60 (H-2') a une corrélation avec l'atome de carbone δ_C 147.8 (C-6). Ceci nous permet de fixer la chaîne aliphatique en position C-6 du noyau aromatique (Figure 3-9).



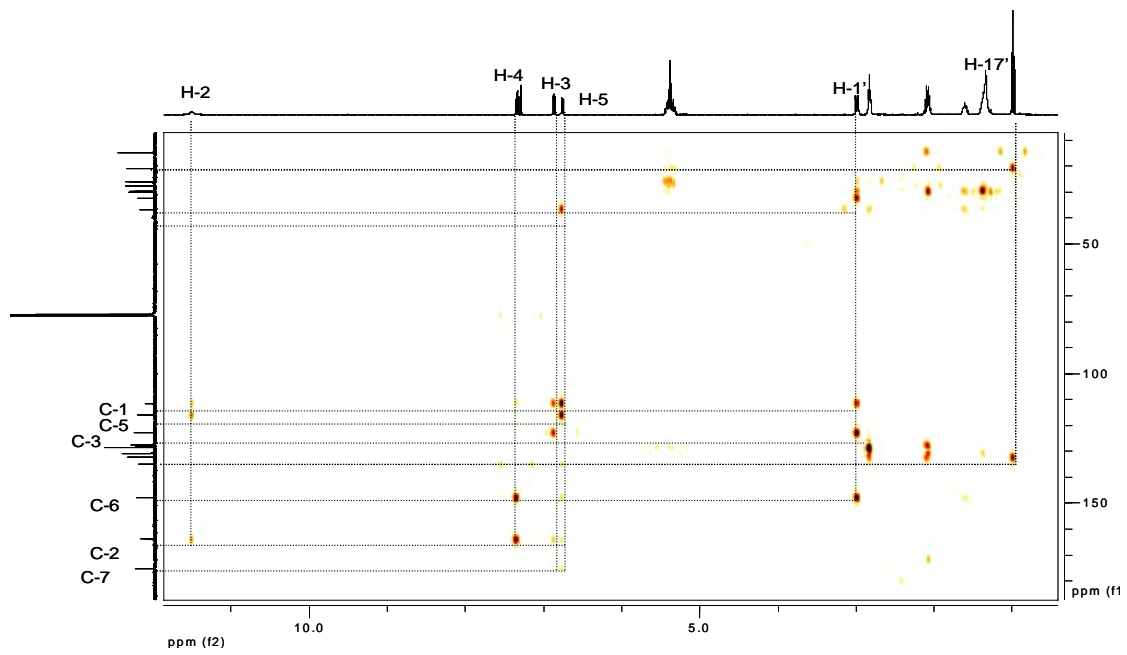


Figure 3-7: Spectre HMBC de Sah₁

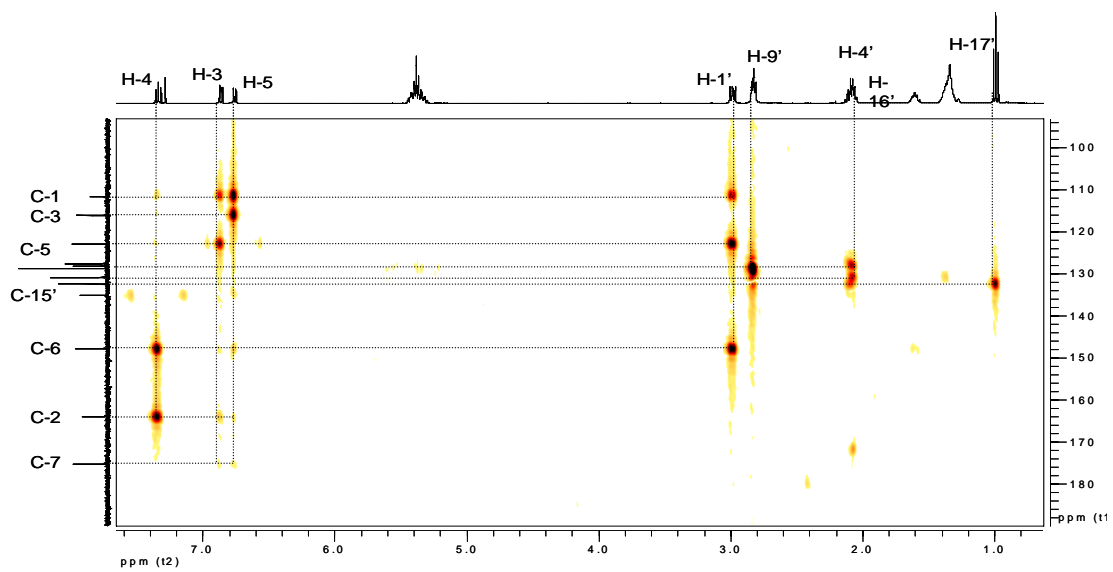
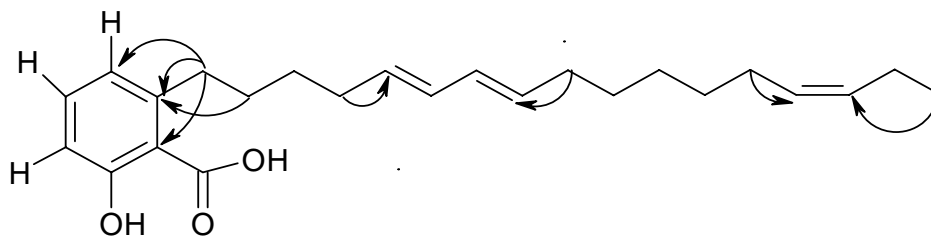


Figure 3-8: Agrandissement du spectre HMBC de Sah₁



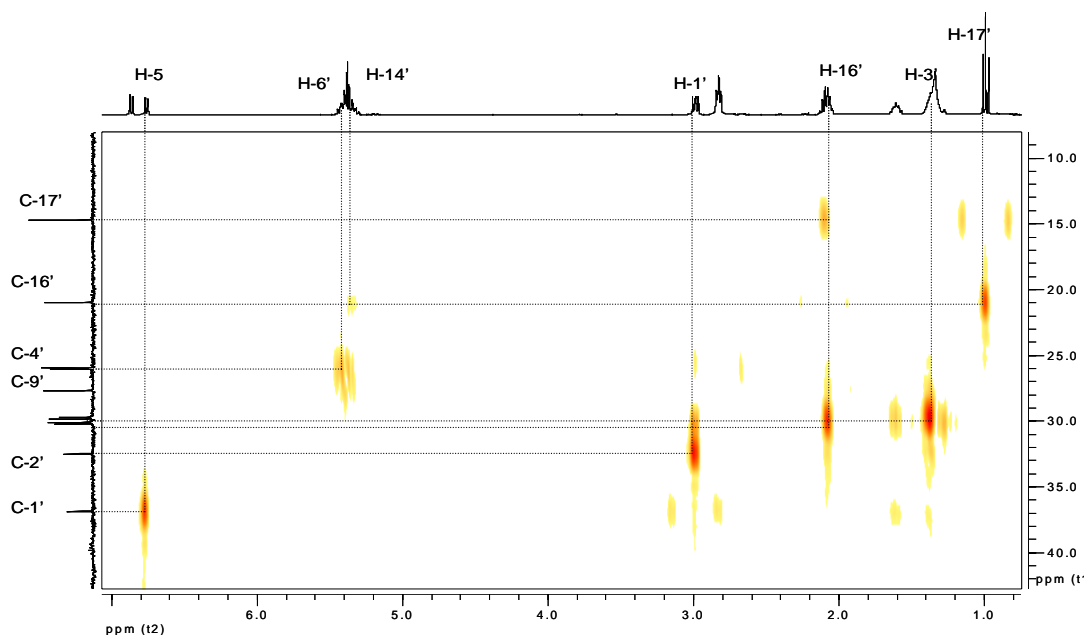
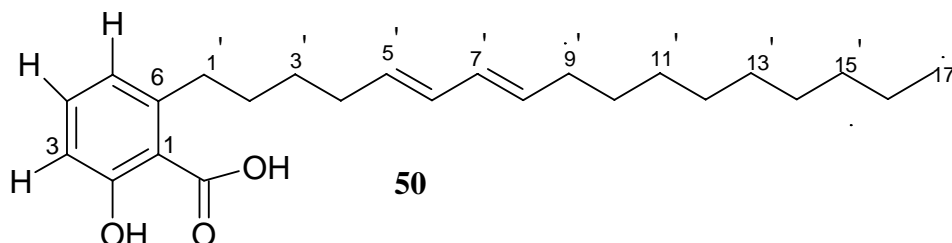


Figure 3-9: Agrandissement du spectre HMBC de Sah₁

L'ensemble de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sah₁ la structure **49**

II-1-2: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadeca-5',7'-diène (Sah₂)



A notre connaissance comme Sah₁ cette molécule est identifiée pour la première fois

Sah₂ est isolé sous forme d'une huile incolore isolée par HPLC avec un temps de rétention de 10.72 min suivant le système 2 (VI-2-2). L'analyse LC/MS-ESI ionisation négative donne l'ion moléculaire m/z 371 $[M-H]^-$ qui correspond à une masse de 372 Da. Cette masse est confirmée par ESI haute résolution (m/z 371.25901) en mode négatif. La MS² nous donne un fragment à m/z 327 $[M-H-44]^-$ correspondant à la perte d'un CO₂. Les spectres de RMN ¹³C et de DEPT indiquent la présence de 24 atomes de carbone (tableau 3-2) parmi lesquels 4 quaternaires, 7 méthines, 12 méthylènes et 1 méthyle. L'ensemble de ces données nous

permet d'attribuer à sah₂ la formule moléculaire brute suivante C₂₄H₃₆O₃ avec un nombre d'insaturation égal à 7. Les spectres UV et IR sont superposables à ceux de Sah₁.

Le spectre RMN ¹H de sah₂ (figure 3-10) est similaire à celui de Sah₁ dans la zone aromatique.

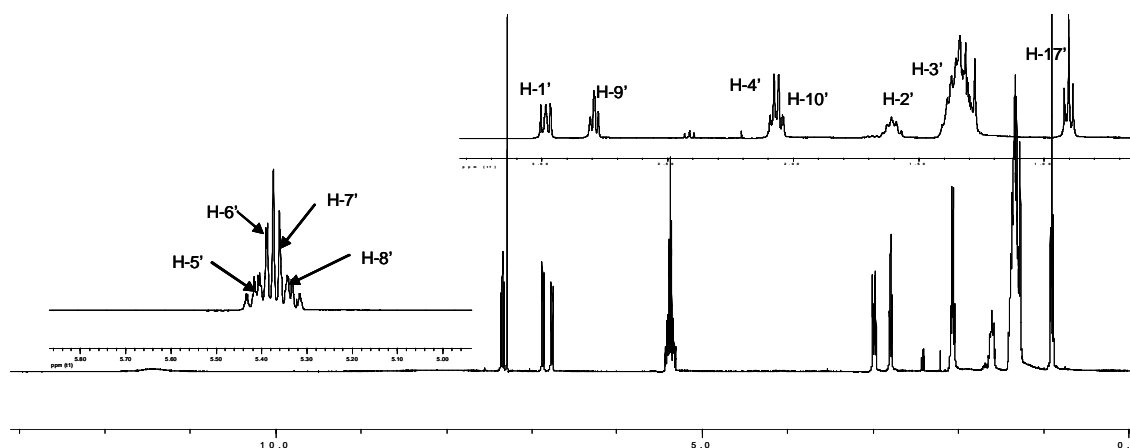


Figure3-10: Spectre RMN ¹H de Sah₂

Le spectre homonucléaire ¹H-¹H (COSY) (figure 3-11) nous montre les corrélations identiques à celles de Sah₁ dans la zone aromatique. Dans la partie aliphatique nous constatons la disparition de la corrélation entre H-17' et H-15' de Sah₁ ce qui nous permet de supposer qu'il y a eu des modifications sur la chaîne aliphatique.

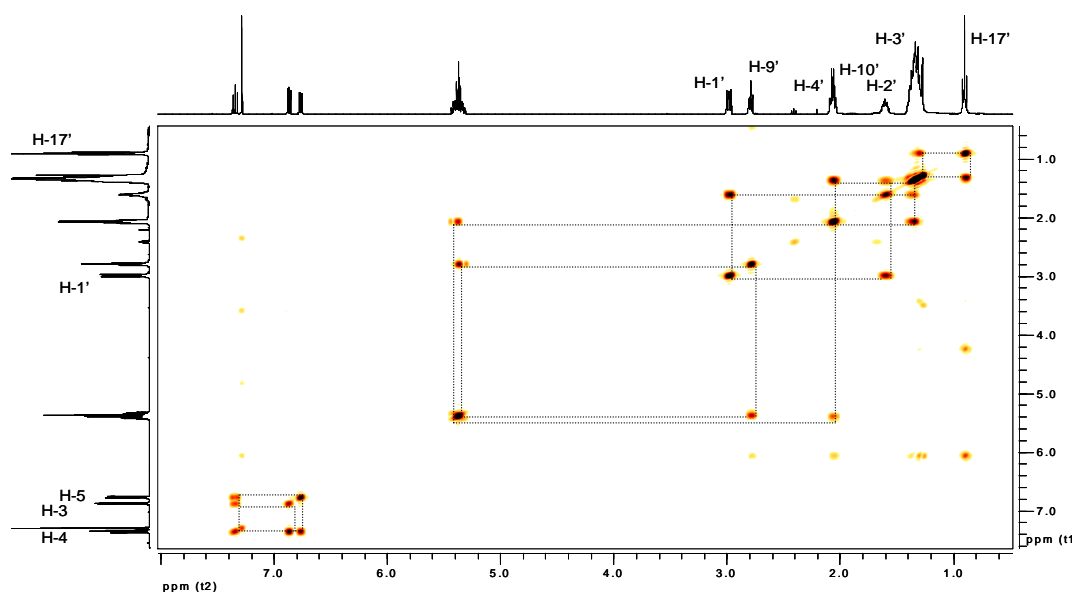


Figure 3-11: Spectre COSY de Sah₂

La comparaison des spectres de RMN ^{13}C (figure 3-12) et DEPT de Sah₂ montre la disparition de deux CH et une apparition de deux CH₂ par rapport à Sah₁ ce qui nous amène à supposer qu'une double liaison de la chaîne aliphatique a été saturée.

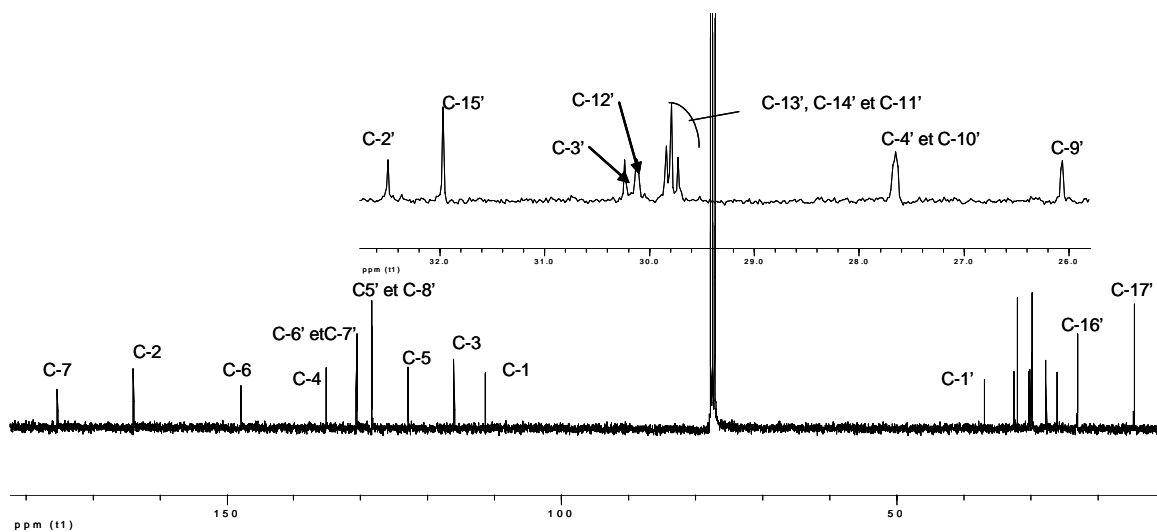
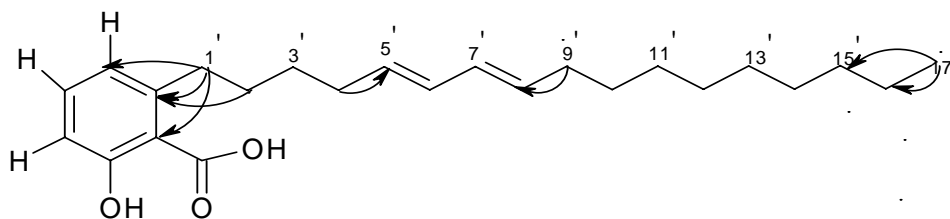


Figure 3-12: Spectre RMN ^{13}C de Sah₂

Le spectre HMBC (figure 3-13) nous permet de constater que nous avons les mêmes corrélations que Sah₁ dans la zone aromatique. On observe des corrélations différentes sur la chaîne aliphatique. C'est ainsi que le méthyle terminal (H-17) a une corrélation avec les carbones à 23.0 (C-16') et 31.9 ppm (C-15') ce qui nous permet de conclure que la double liaison C=C entre C-15' et C-14' a été saturée.



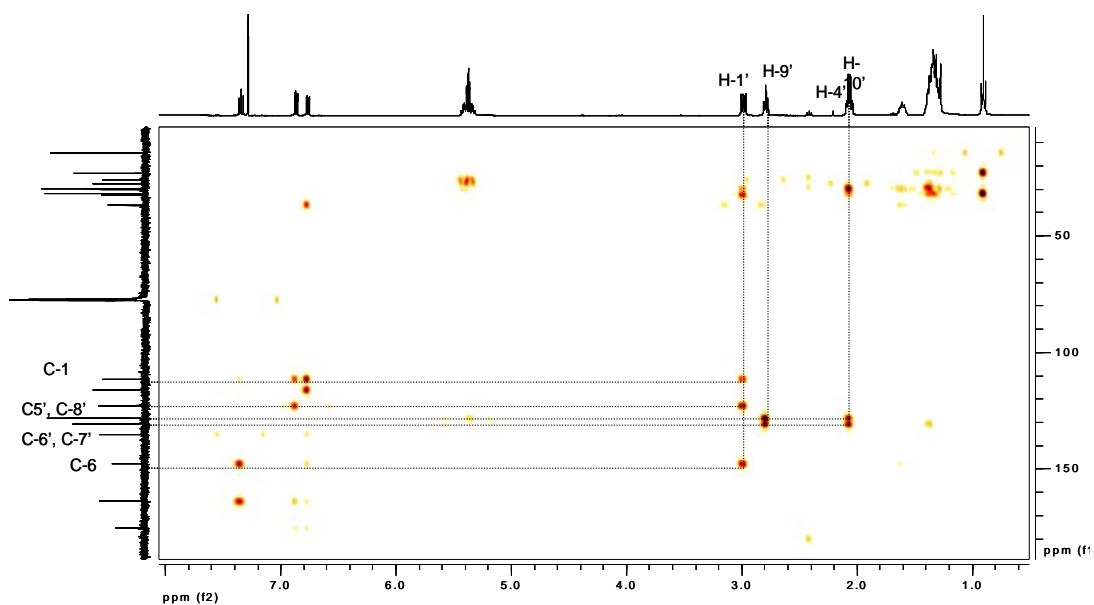


Figure 3-13: Spectre HMBC de Sah₂

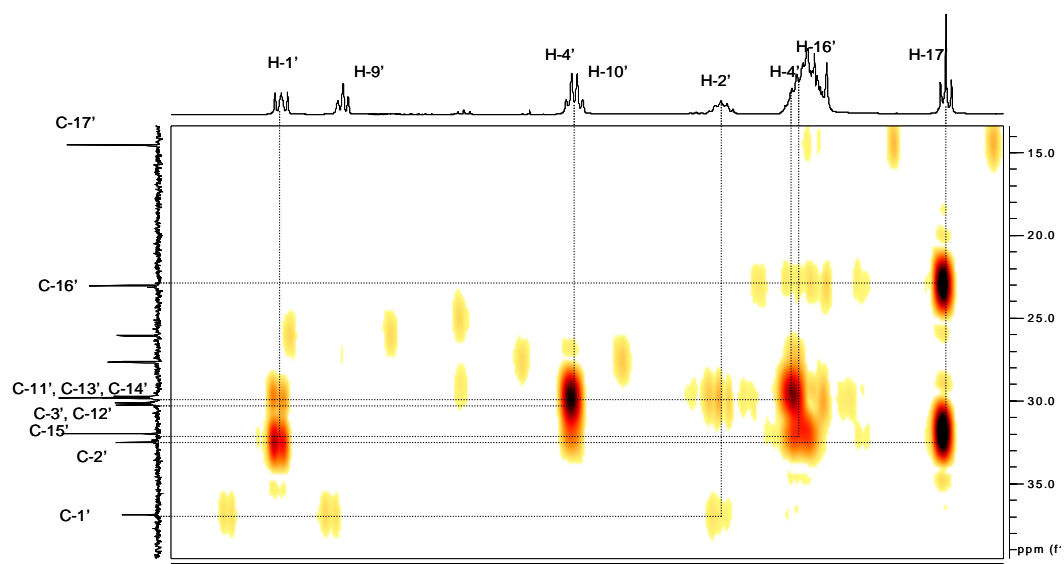
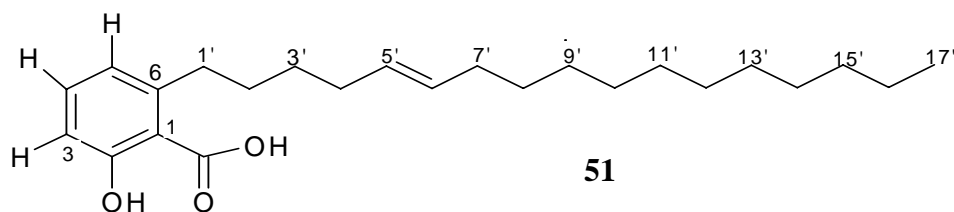


Figure 3-14: Agrandissement du spectre HMBC de Sah₂

L'analyse de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sah₂ la structure **50**

III-1-3: Détermination de la structure de l'acide salicylique-6-heptadeca-5'-ène (Sah₃)



Cette molécule est identifiée pour la première tout comme Sah₁ et Sah₂.

Sah₃ est une huile incolore isolée par HPLC avec un temps de rétention de 11.82 min suivant le système 2 (VI-2-2). L'analyse par LC/MS-ESI ionisation négative donne l'ion moléculaire m/z 373 $[M-H]^-$ qui correspond à une masse de 374 Da. Cette masse est confirmée par ESI haute résolution (m/z 373.27490) en mode négatif. La MS^2 nous donne un fragment à m/z 329 $[M-H-44]^-$ correspondant à la perte d'un CO_2 . Les spectres RMN ^{13}C et DEPT indiquent la présence de 24 atomes (tableau 3-2) de carbone parmi lesquels 4 quaternaires, 5 méthines, 14 méthylènes et 1 méthyle. L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à Sah₃ la formule moléculaire brute suivante $C_{24}H_{38}O_3$ avec un nombre d'insaturation égal à 6.

Le spectre RMN 1H (figure 3-15) est semblable à ceux de Sah₁ et Sah₂ dans la zone aromatique. On y observe la disparition des protons à 2.81 (H-9') et 2.83 ppm (H-13') (tableau 3-1) ce qui nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle une des doubles liaisons conjuguées a été saturée.

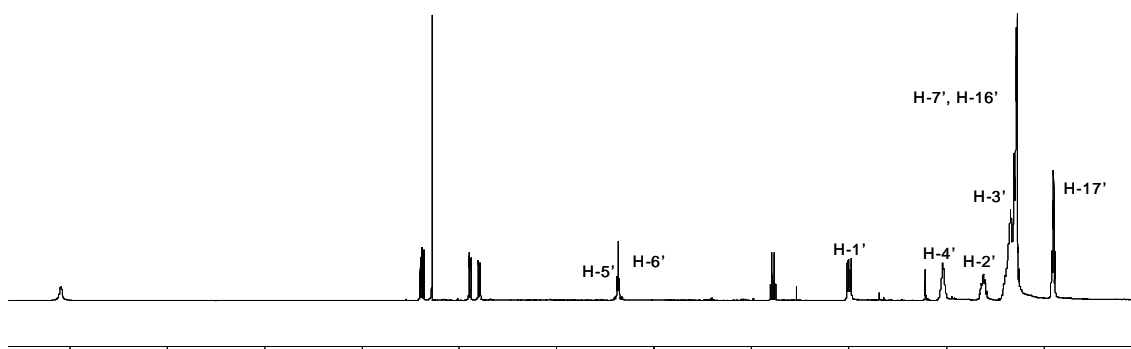


Figure 3-15: Spectre RMN 1H de Sah₃

Le spectre de COSY (figure 3-16) montre le couplage entre les protons à δ_H 5.37 et 2.02. Ce couplage nous permet de distinguer les protons voisins de la double liaison.

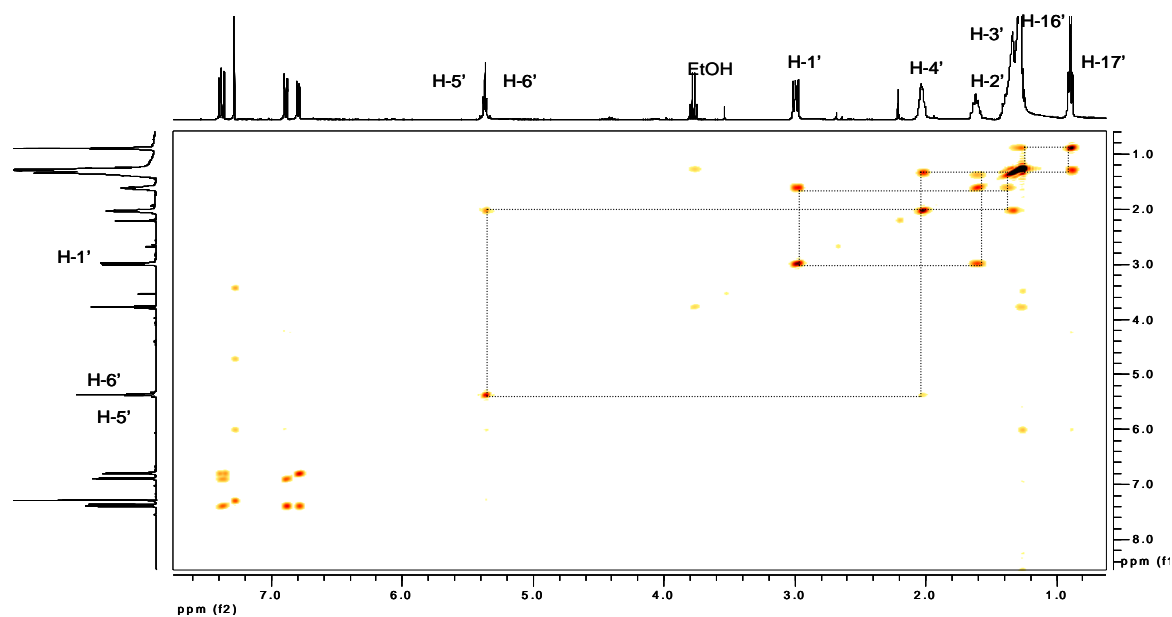


Figure 3-16: Spectre COSY de Sah₃

Le spectre de RMN ¹³C (figure 3-17) nous permet également d'observer la disparition de deux carbones à 128 ppm et l'apparition de deux atomes de carbone dans l'intervalle 29.6-27.7 ppm confirmant l'hypothèse précédente.

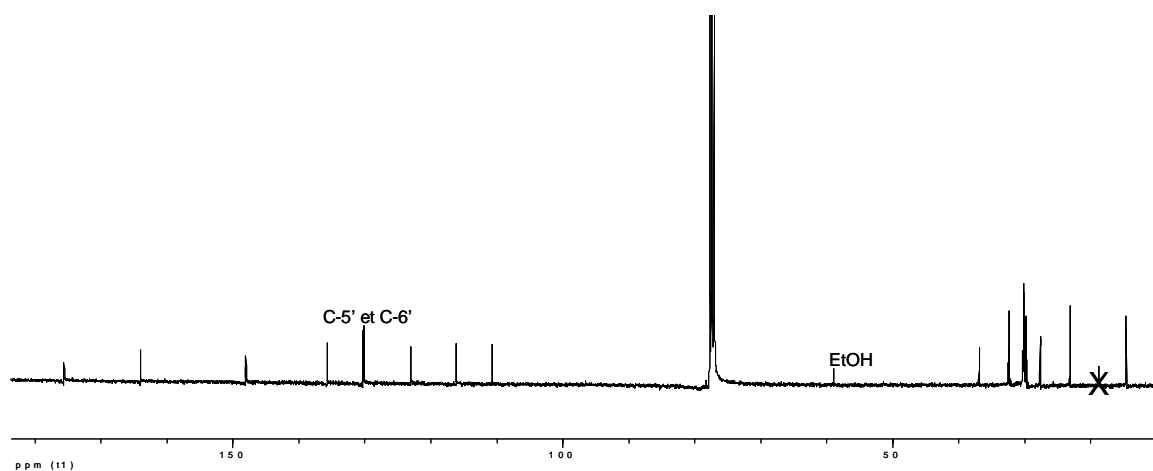


Figure 3-17: Spectre RMN ¹³C de Sah₃

Le spectre HMBC (figure 3-18) nous montre les corrélations hétéronucléaires à longue distance ¹H-¹³C. Dans la zone aromatique on a les mêmes corrélations que Sah₁ et Sah₂. Dans la zone aliphatique on observe une variation de corrélation par rapport à Sah₂.

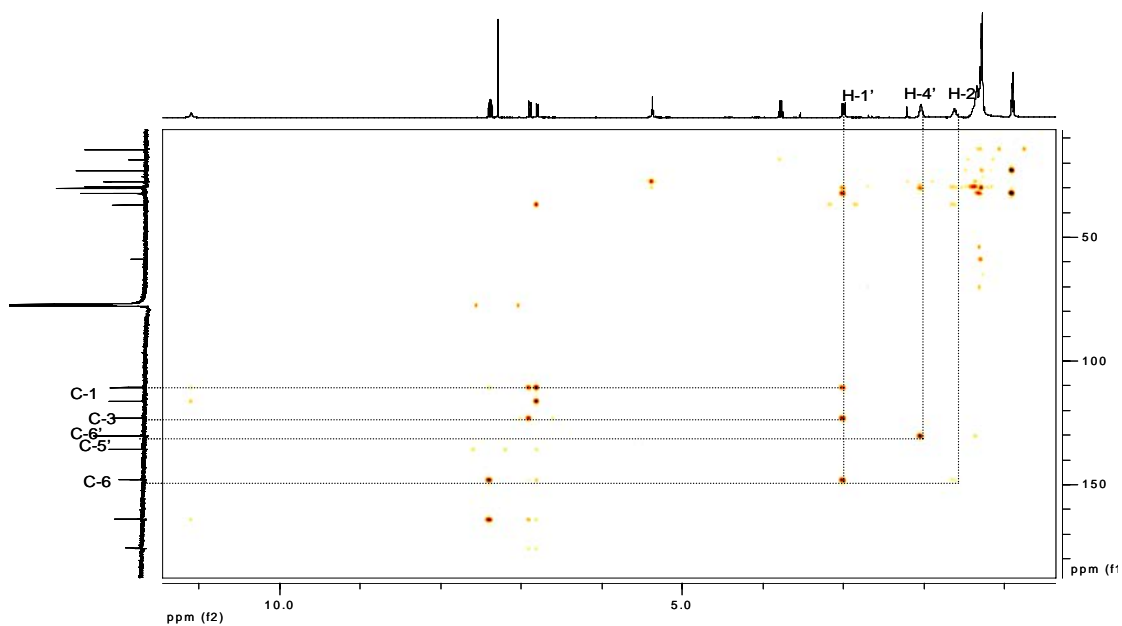


Figure 3-18: Spectre HMBC de Sah₃

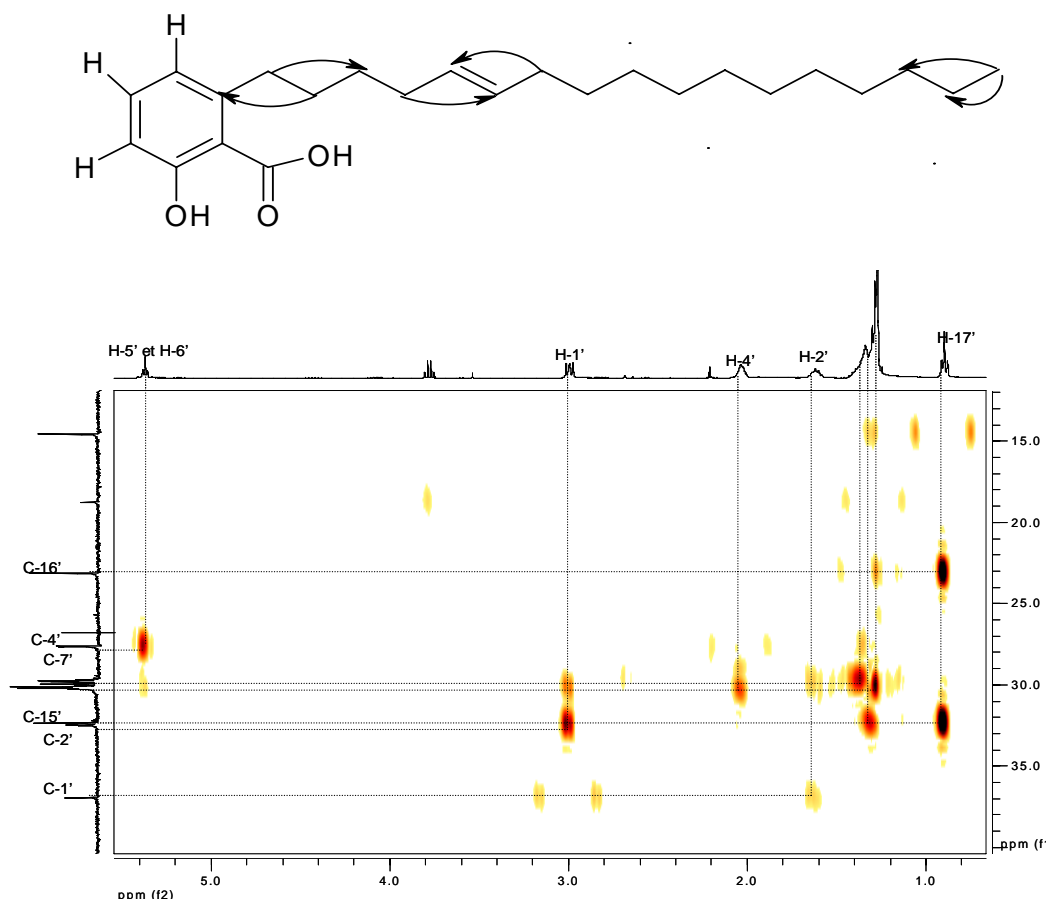
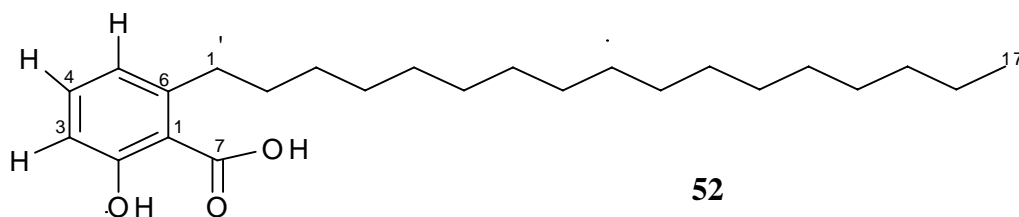


Figure 3-19: Agrandissement du spectre HMBC de Sah₃

L'association de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sah₃ la structure **51**

III-1-4: Identification de l'acide salicylique-6-heptadecane (Sah₄)



L'acide ginkgolique a déjà été isolé par Young dans les feuilles du Ginkgo¹¹⁰.

Sah₄ est un composé huileux isolé par HPLC avec un temps de rétention de 12.99 min suivant le système 2 (VI-2-2). Le spectre de masse en LC/MS-ESI ionisation négative donne le pic de l'ion pseudo moléculaire m/z 375 $[M-H]^-$ équivalant à la masse moléculaire m/z 376 Da qui correspond à la formule brute $C_{24}H_{40}O_3$. La MS^2 donne un fragment à m/z 331 $[M-H-44]^-$ correspondant à la perte d'un CO_2 . Les spectres UV et IR sont superposables à ceux de sah₁, sah₂ et sah₃.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-20) est identique à celui de sah₃ dans la zone aromatique, mais on constate la disparition des signaux à 5.3 ppm ce qui indique l'absence de doubles liaisons sur la chaîne aliphatique.

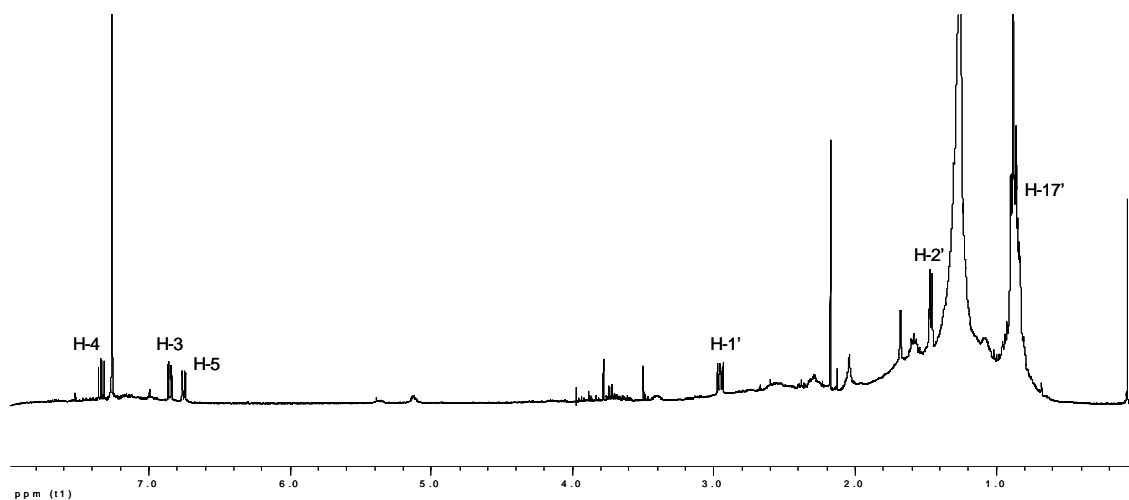


Figure 3-20: Spectre RMN ¹H de Sah₄

L'analyse des spectres de masse et proton permet d'identifier Sah₄, structure **52**, à l'acide ginkgolique¹¹⁰

Tableau 3-1: Déplacements chimiques des protons de Sah₁-Sah₃ dans le CDCl₃ à 400 MHz

	¹ H Sah ₁	¹ H Sah ₂	¹ H Sah ₃
2-OH	11.51, s	11.48, s	11.10, s
3	6.86, dd, 8.3: 1.1	6.86, dd, 7.5; 1.0	6.89, dd, 8.3; 1.2
4	7.33, dd, 8.1; 7.9	7.34, dd, 8.1; 7.7	7.38, dd, 8.3; 7.5
5	6.76, dd, 7.5; 1.2	6.76, dd, 8.3; 1.1	6.79, dd, 8.3: 1.0
1'	2.98, t	2.99, t	2.99, t
2'	1.60, m	1.60, m	1.62, m
3'	1.36, m	1.36, m	1.41, m
4'	2.10, m	2.10, m	2.02, m
5'	5.42, m	5.38, m	5.37, m
6'	5.39, m	5.36, m	5.36, m
7'	5.34, m	5.34, m	2.04, m
8'	5.30, m	5.32, m	1.26, m
9'	2.81, m	2.80, m	1.36, m
10'	1.39, m	2.06, m	1.34, m
11'	1.44, m	1.37, m	1.32, m
12'	1.37, m	1.36, m	1.35, m
13'	2.83, m	1.42, m	1.29, m
14'	5.44, m	1.27, m	1.27, m
15'	5.32, m	1.33, m	1.25, m
16'	2.06, q	1.30, m	1.30, m
17'	0.99, t	0.99, t	0.99, t

(a, b, c) a: déplacement chimique, b: multiplicité, c: constante de couplage

Tableau 3-2: Déplacements chimiques des carbones de Sah₁-Sah₃ dans le CDCl₃ à 100 MHz

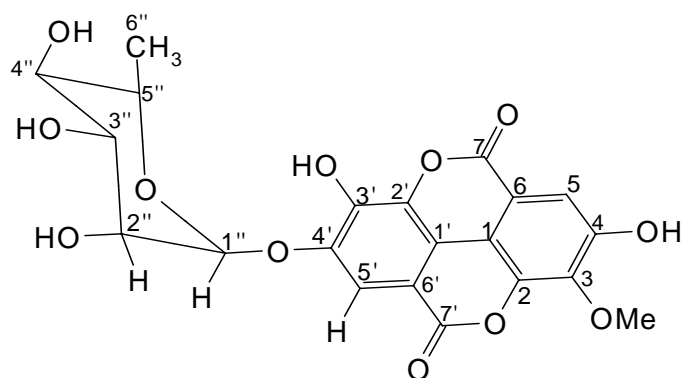
	¹³ C Sah ₁	¹³ C Sah ₂	¹³ C Sah ₃
1	111.5	111.4	110.8
2	163.9	163.9	164.1
3	116.0	116.0	116.3
4	135.1	135.1	135.8
5	122.8	122.9	123.1
6	147.8	147.8	148.1
7	175.3	175.3	175.6
1'	36.8	36.9	36.9
2'	32.5	32.5	32.5
3'	30.1	30.2	30.3
4'	27.6	27.6	27.6
5'	128.1	128.4	130.4
6'	128.8	130.6	130.2
7'	128.7	130.5	27.7
8'	127.5	128.3	29.6
9'	25.9	26.0	30.2
10'	30.2	27.6	30.1

11'	29.7	29.9	29.9
12'	29.8	30.1	30.0
13'	26.0	29.8	29.8
14'	130.9	29.7	29.7
15'	132.4	31.9	32.3
16'	20.9	23.0	23.1
17'	14.7	14.5	14.5

III-2: Les dérivés de l'acide ellagique

Les acides ellagiques sont connus comme étant des composés ayant une structure rigide et possédant une faible solubilité¹¹¹. Ils sont généralement caractérisés par la présence de deux protons aromatiques dans l'intervalle 7-8 ppm sous forme de singulet sur le spectre RMN ¹H. Les dérivés de l'acide ellagique ci-dessous ont été isolés des feuilles et des écorces de *S. guineense* (Sg₁, Sg₂, Sg₃ et Sg₇) et des feuilles de *C. viminalis* (Cv₁₁ et Cv₁₂).

III-2-1: Identification de l'acide 3-O-méthylellagique-4'-α-rhamnopyranoside (Sg₁)



53

Cette molécule a été isolée pour la première fois dans *Eucalyptus globulus*, *E. regnans* et *E. deglupta* par Yazaki¹¹².

Sg₁ est isolé sous forme de poudre blanche des écorces de *S. guineense*. Son spectre de masse (figure 3-21) en ESI mode négatif (figure 3-21) exhibe deux pics, le pic pseudo moléculaire m/z 461 [M-H]⁻ correspondant à une masse de 462 Da, et un pic à m/z 315 [M-H-146]⁻ correspondant à l'aglycone. La masse est confirmée en mode positif m/z 485.0692 [M+Na]⁺. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT nous permet d'attribuer à Sg₁ la formule

moléculaire $C_{21}H_{18}O_{12}$ avec 13 insaturations. Le point de fusion est supérieur à $300^{\circ}C$. Le spectre IR montre des bandes caractéristiques à 3380 , 1740 et 1607 cm^{-1} indiquant respectivement la présence d'une fonction hydroxyle, d'une lactone α , β -insaturée et d'un noyau aromatique.

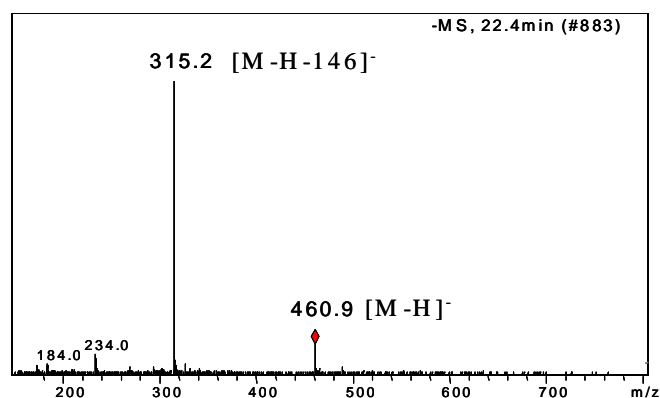


Figure3-21: Spectre de masse de Sg_1

Le spectre RMN 1H (figure 3-22) contient 9 signaux (tableau 3-3) parmi lesquels deux singulets aromatiques (δ_H 7.53 et 7.69), un signal à δ_H 4.03 intégrant pour 3H correspondant à un méthoxyle, 5 signaux (δ_H 5.47, 4.00, 3.84, 3.55, 3.32) attribuables aux méthines oxygénés et un méthyle à 1,13 ppm qui est un doublet avec une constante de couplage $J = 6.2\text{ Hz}$ indiquant la présence d'un sucre. Le proton anomère à 5.47 ppm est un doublet ayant une constante de couplage $J = 1,4\text{ Hz}$ ce qui confère au sucre une configuration α . Ces déplacements chimiques sont similaires à ceux de l'acide-3-O-méthylellagique-4'- α -rhamnopyranoside¹¹².

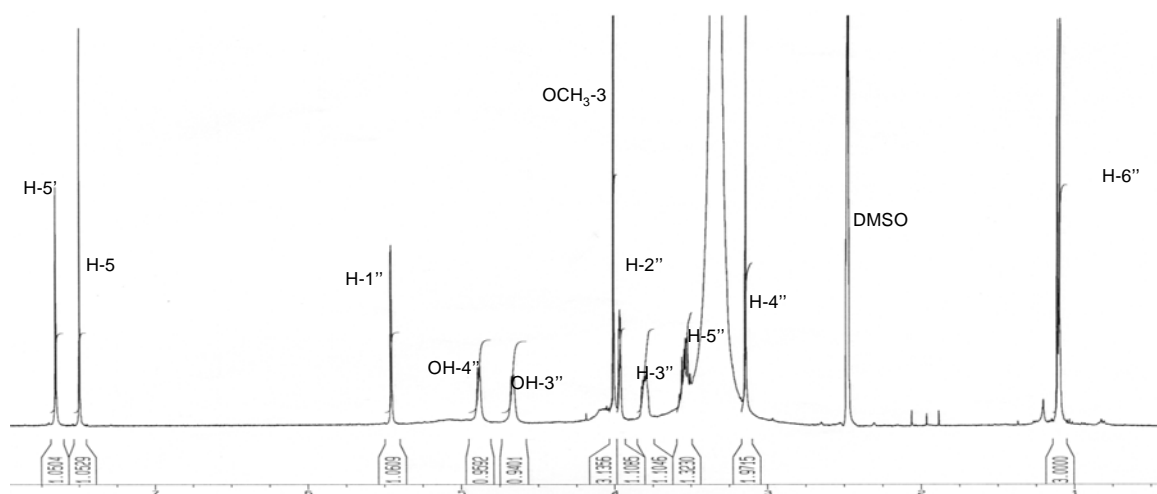


Figure 3-22: Spectre RMN 1H de Sg_1

L'analyse du spectre COSY (figure 3-23) nous permet de constater que tous les 5 protons des méthines oxygénés couplent entre eux [δ_H 5.47 (H-1''), 4.00 (H-2''), 3.84 (H-3''), 3.32 (H-4''), 3.55 (H-5'')] et H-5'' couple avec le méthyle à 1.13 ppm ce qui nous permet d'identifier le sucre comme étant le rhamnose.

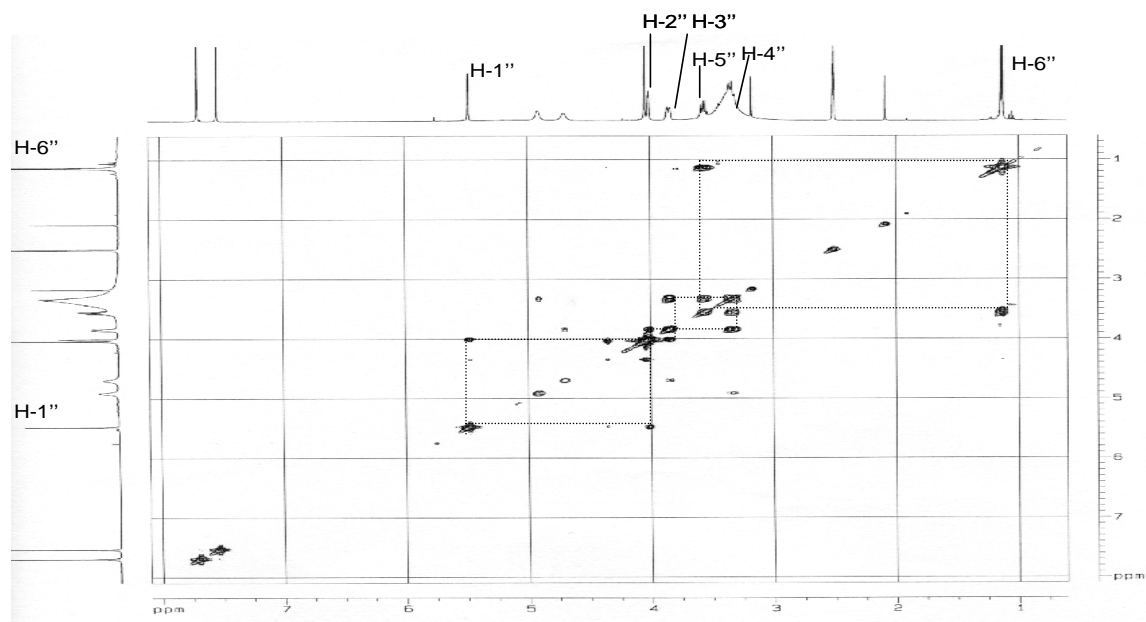


Figure 3-23: Spectre COSY de Sg₁

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-24) contient 21 atomes de carbone (tableau 3-4) parmi lesquels nous avons deux atomes carbone à 159.6 à 159.7 ppm qui sont ceux des carbonyles α , β -insaturés des lactones. Le DEPT nous permet d'observer deux méthines aromatiques à δ_c 112.2 et 112.7, un méthoxyle à δ_c 61.8, un méthyle à δ_c 18.7 et cinq méthines oxygénés.

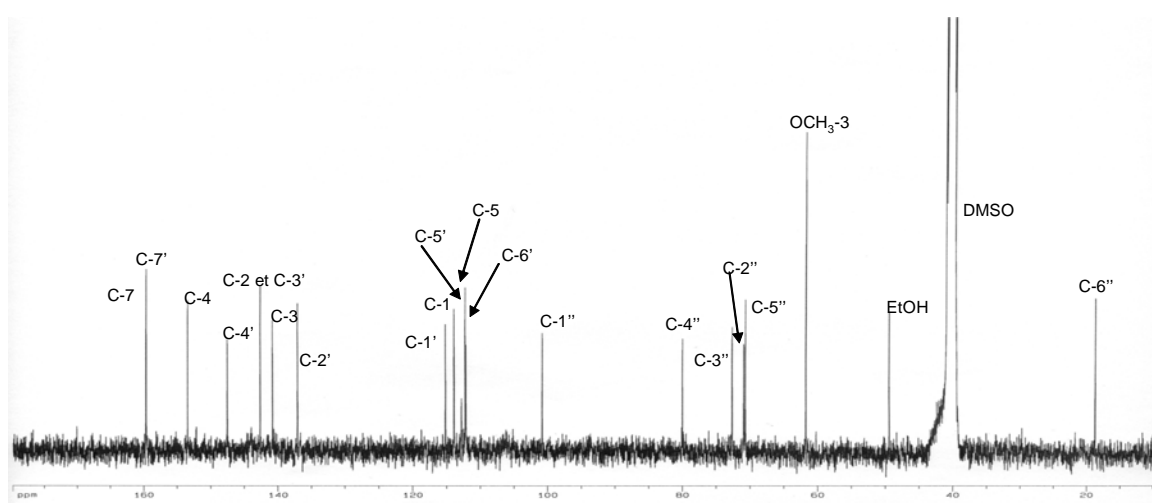


Figure 3-24: Spectre RMN ¹³C de Sg₁

Le spectre de HMBC (figure 3-25) montre des corrélations entre le proton anomère H-1'' et le carbone à δ_c 147.5 (C-4') indiquant la position du sucre sur l'aglycone. Nous y observons également des corrélations entre le proton du méthoxyle à 4.03ppm et le carbone à δ_c 140.9 (C-3), entre le proton aromatique à δ_H 7.53 et les carbones à δ_c 159.7 (C-7), 113.9 (C-1), 140.9 (C-3) et 153.5 (C-4) et entre le second proton aromatique à δ_H 7.69 (H-5') et les atomes de carbone à δ_c 159.6 (C-7'), 115.2 (C-1'), 147.5 (C-4') et 142.7 (C-3')

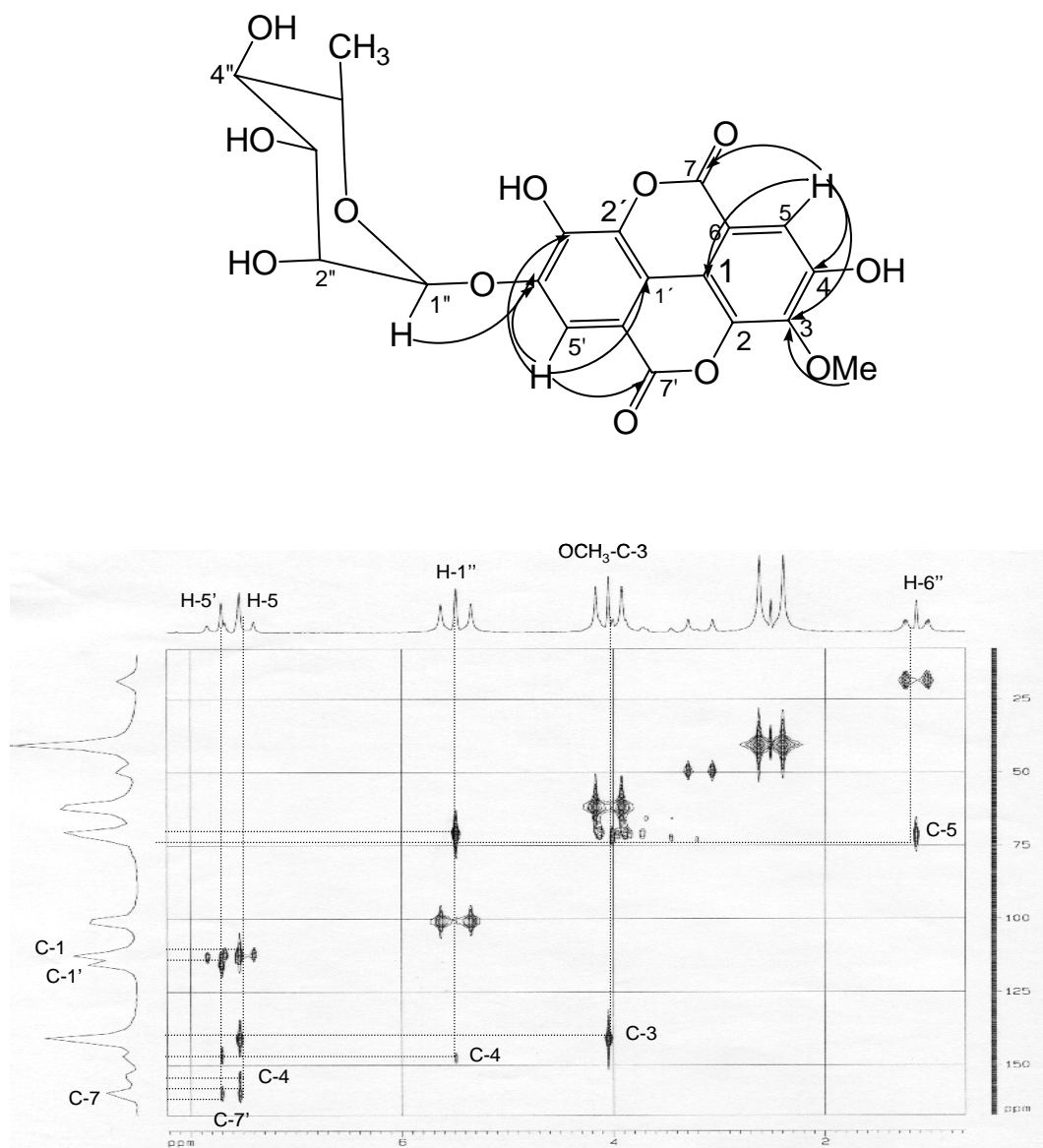
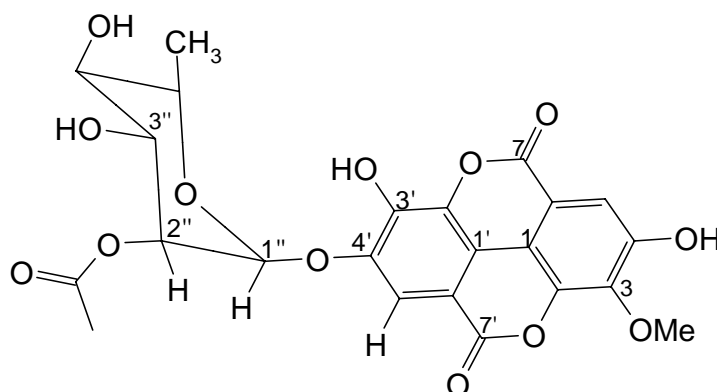


Figure 3-25: Spectre HMBC de Sg₁

L'analyse de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sg₁ la structure **53**.

III-2-2: Détermination de la structure de l'acide 3-*O*-méthylellagique -4'-*O*- α -2''-*O*-acétylrhamnopyranoside (Sg₂).



54

Cette molécule est un nouveau produit naturel

Sg₂ est isolé sous forme de poudre blanche des écorces de *S. guineense*. Le spectre de masse en mode négatif (figure 3-26) montre un pic pseudo moléculaire m/z 503 [M-H]⁻ qui correspond à une masse de 504 Da. Cette masse est confirmée en haute résolution mode positif m/z 527.07959 [M+Na]⁺. La MS² de l'ion [M-H]⁻ nous donne des fragments à m/z 443 [M-H-60]⁻ correspondant à la perte de l'acide acétique et à m/z 315 [M-H-188]⁻ qui correspond à la masse de l'aglycone de Sg₁. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT nous permet d'attribuer à Sg₂ C₂₃H₂₀O₁₃ comme formule moléculaire ayant 14 insaturations. Le spectre IR est superposable à celui de Sg₁ et le point de fusion est compris entre 196-198°C

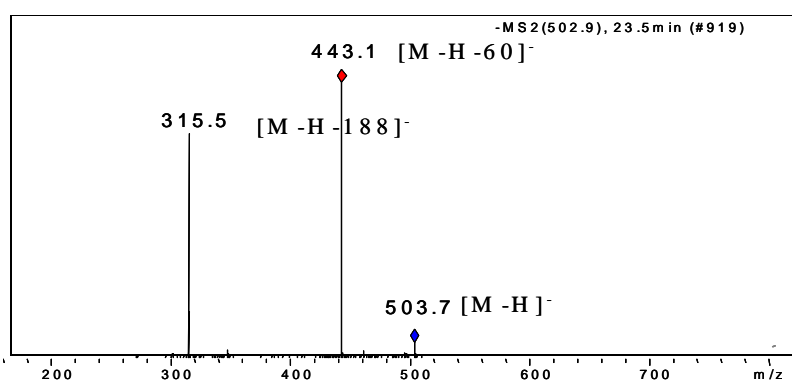


Figure 3-26: Spectre de masse (MS²) de Sg₂

Le spectre RMN ¹H (figure 3-27) nous montre la présence d'un méthyle supplémentaire à δ_H 2.09 par rapport à Sg₁. On y observe aussi une variation significative du déplacement chimique des protons du rhamnose (δ_H 5.60, 5.30, 4.08, 3.38 et 3.60) (tableau 3-3). Le

déblindage significatif du proton H-2'' de (1.3 ppm) nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle le sucre est substitué en C-2''.

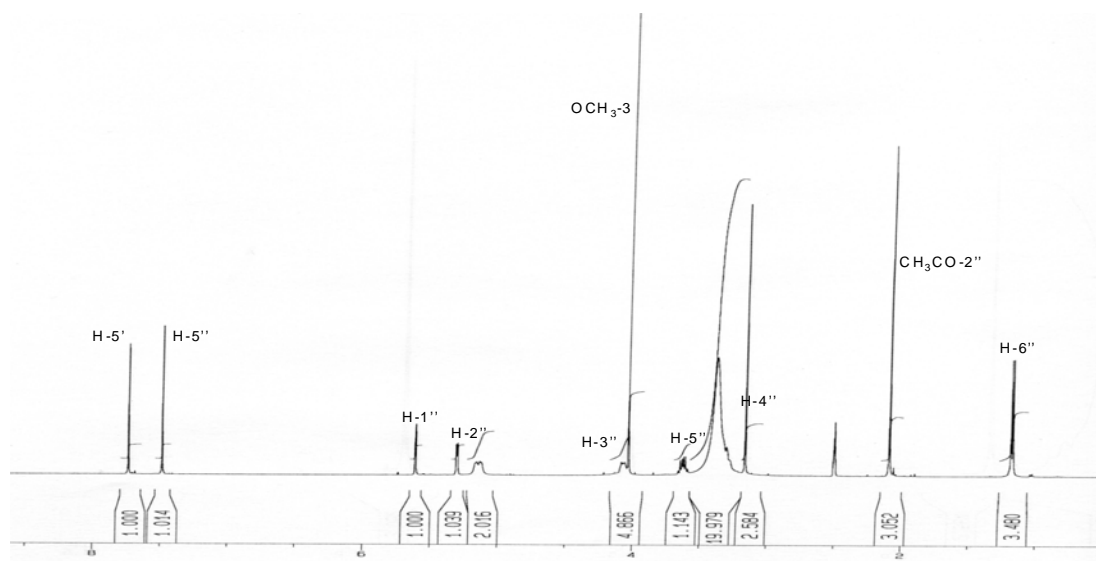


Figure 3-27: Spectre RMN ¹H de Sg₂

Le spectre de COSY (figure 3-28) nous permet d'identifier le sucre comme étant le rhamnose de par les couplages entre ses protons.

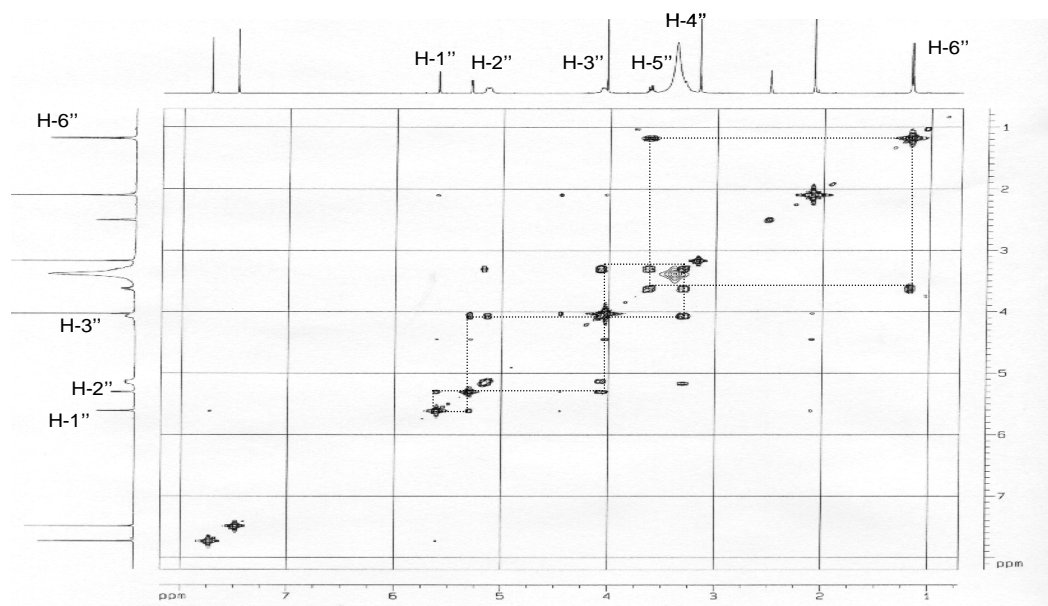


Figure 3-28: Spectre COSY de Sg₂.

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-29) nous permet de noter la présence de deux carbones supplémentaires par rapport Sg_1 à δ_c 21.8 et 170.8 attribuable respectivement au méthyle et au carbonyle d'un groupe acétyle.

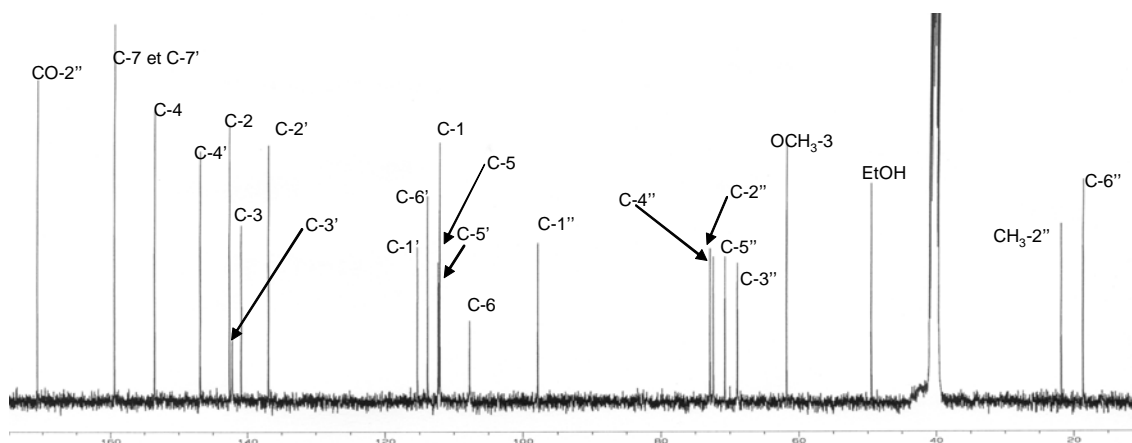
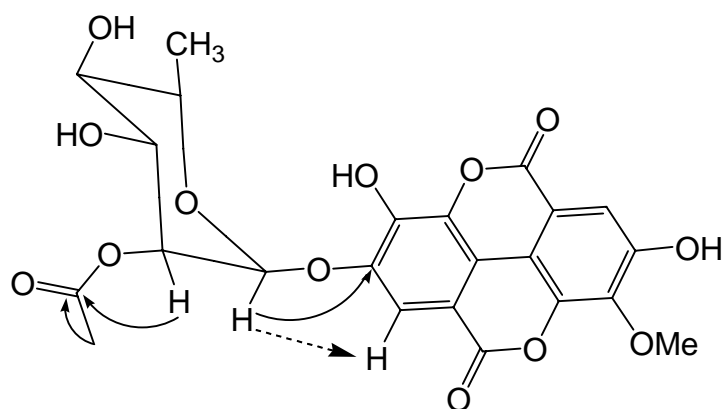


Figure 3-29: Spectre RMN ^{13}C de Sg_2

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance (HMBC) nous permet d'observer en plus des corrélations de Sg_1 , des corrélations entre les signaux des protons à δ_H 2.09 et 5.30 avec le carbone à δ_c 170.8 confirmant l'hypothèse selon laquelle C-2'' est substitué par un groupe acétyle (figure 3-30).



-----> NOESY

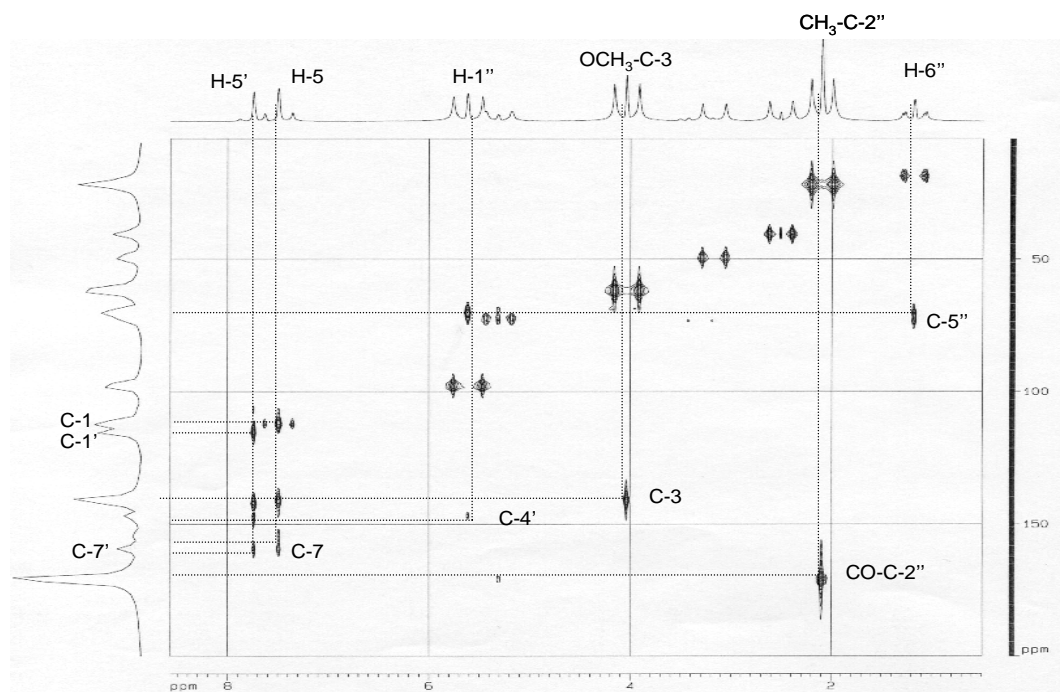


Figure 3-30: Spectre HMBC de Sg_2

Le spectre de corrélation homonucléaire 1H - 1H (NOESY) confirme la position du rhamnose sur l'aglycone à travers la corrélation entre le proton H-5' et le proton anomère H-1''. Cette corrélation existe uniquement quand le sucre est en position 4 ou 4' de l'acide éllagique¹¹³ (figure 3-31).

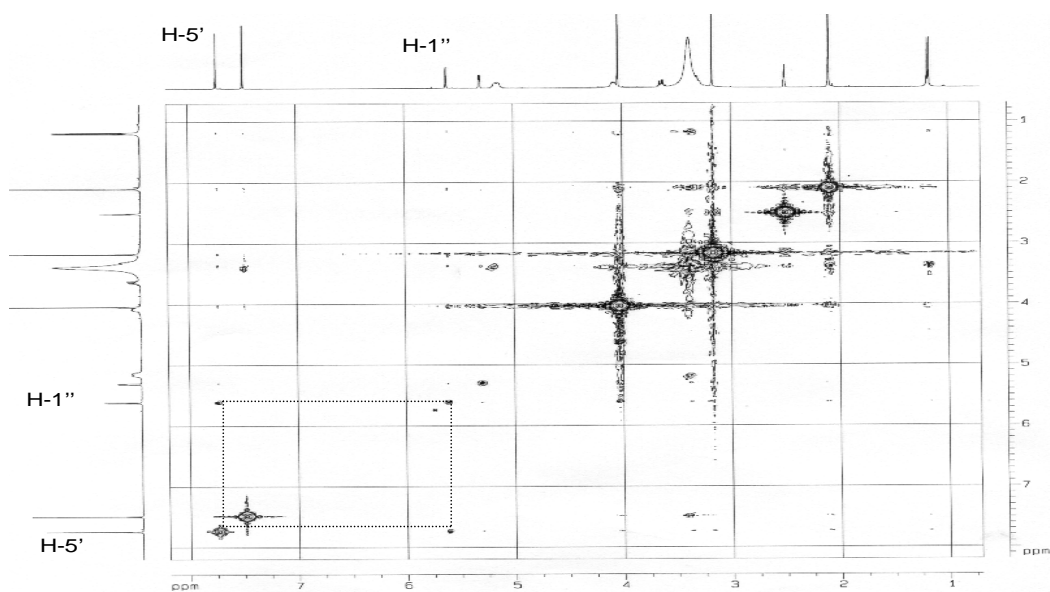
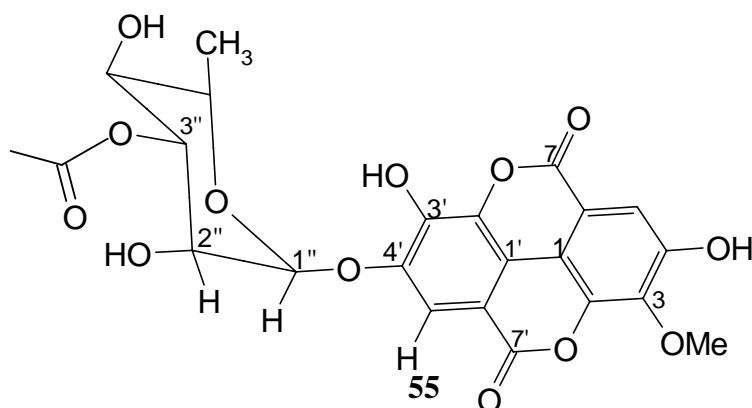


Figure 3-31: Spectre NOESY de Sg_2

L'interprétation de toutes ces données nous permet de donner à Sg₂ la structure **53** Ce composé est un nouveau produit naturel.

III-2-3: Détermination de la structure de l'acide 3-*O*-méthylellagique-4'-*O*- α -3''-*O*-acétylrhamnopyranoside (Sg₃).



Tout comme Sg₂, Sg₃ est un nouveau produit naturel

Sg₃ est isolé sous forme de poudre blanche des écorces de *S. guneense*. Le spectre de masse (figure 3-32) en mode négatif est identique à celui de Sg₂. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT nous a permis d'attribuer à Sg₃ C₂₃H₂₀O₁₃ comme formule moléculaire ayant 14 insaturations. Le spectre IR est superposable a ceux de Sg₁ et Sg₂, son point de fusion est également compris entre 197-200⁰C.

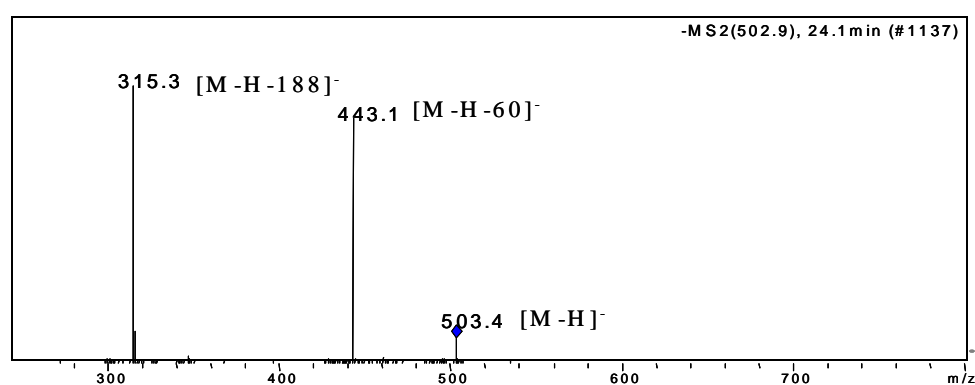


Figure 3-32: spectre de masse de Sg₃

Le spectre RMN ¹H (figure 3-33) montre le même nombre de protons que dans Sg₂. On note une variation des déplacements chimiques des protons du sucre δ_H (5.49, 4.20, 5.10, 3.75, 3.55, 1.17) (tableau 3-3).

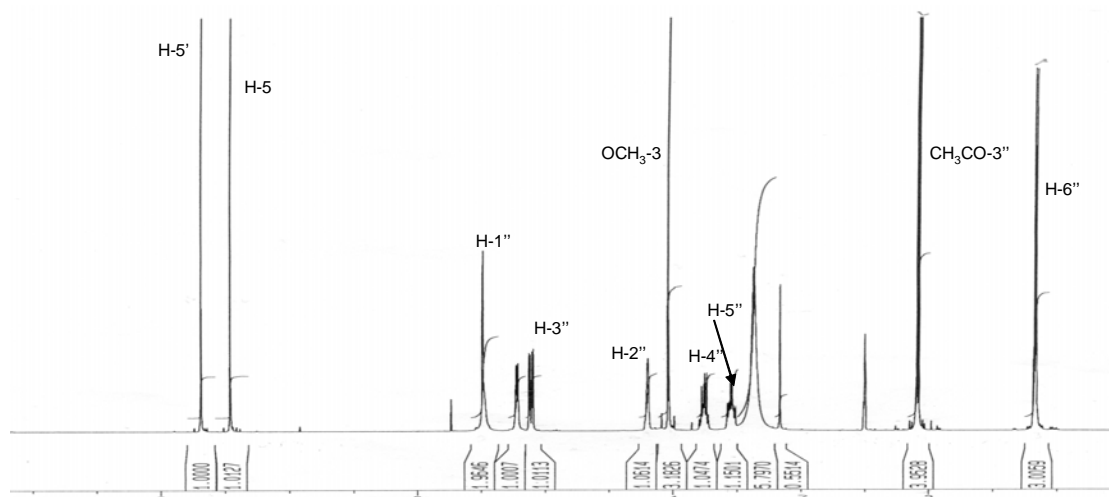


Figure 3-33: Spectre RMN ^1H de Sg_3

Le spectre de COSY (figure 3-34) nous permet d'observer les corrélations directes entre les différents protons du rhamnose. Le déblindage du proton H-3'' de (1.02 ppm) nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'acétyle est situé sur HO-C-3'' .

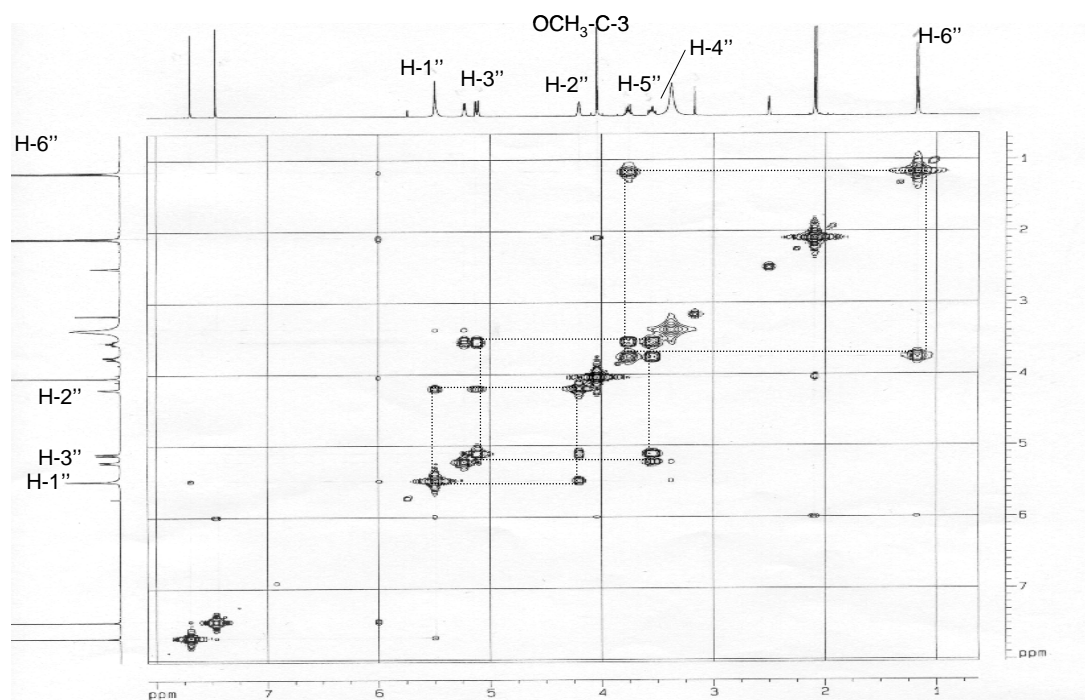


Figure 3-34: Spectre COSY de Sg_3

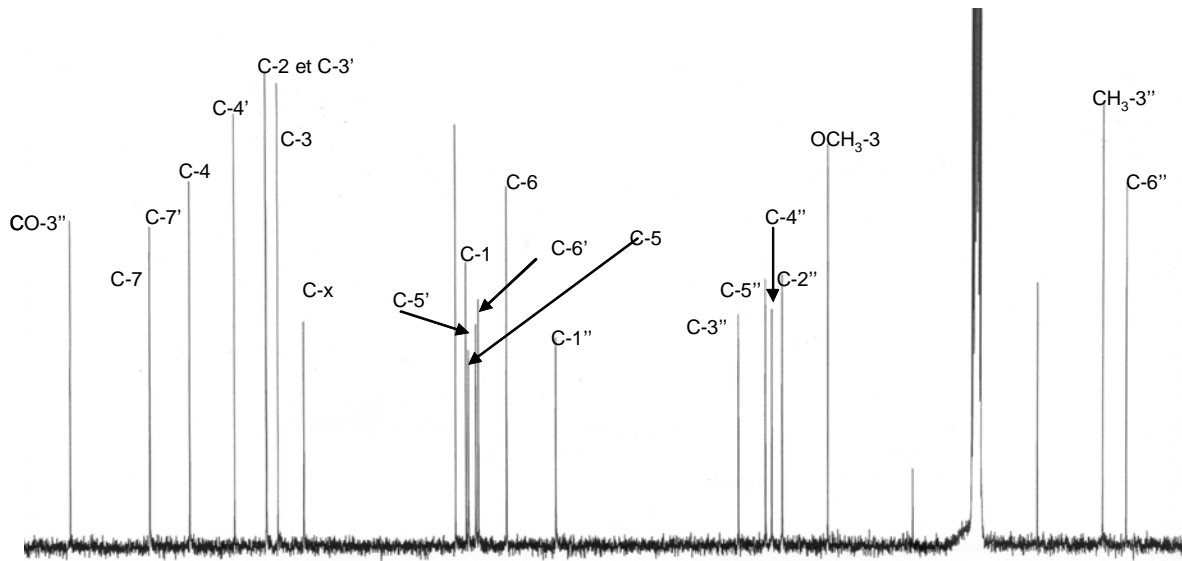
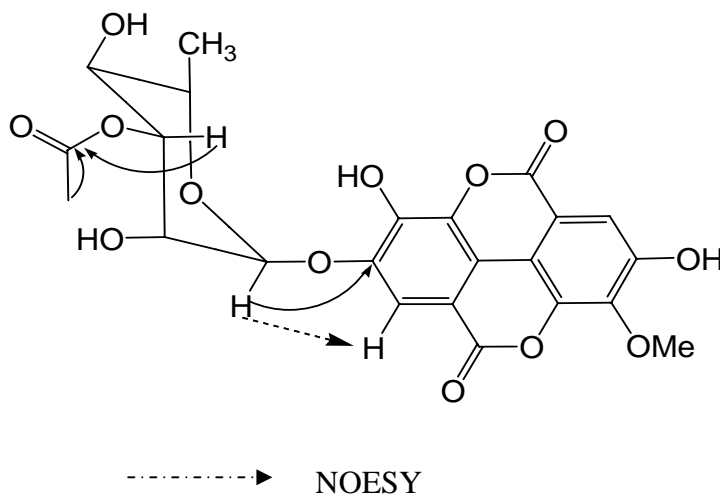


Figure 3-35: Spectre RMN ^{13}C de Sg_3

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance de Sg_3 nous permet d'observer en plus des corrélations de Sg_1 , des corrélations entre les signaux des protons à δ_{H} 2.09 et 5.10 avec le carbone à δ_{C} 170.8 indiquant la substitution de HO-C-3'' par un acétyle, ce qui confirme la supposition ci-dessus (figure 3-36).



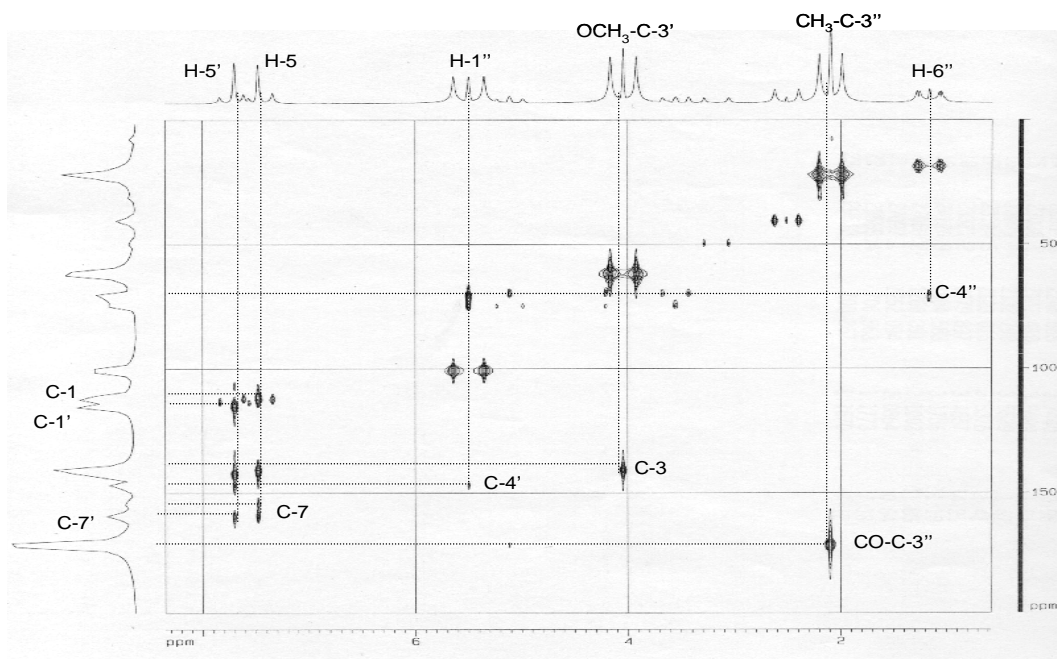


Figure 3-36: Spectre HMBC de Sg_3

Le spectre de corrélation homonucléaire 1H - 1H (NOESY) confirme la position du rhamnose sur l'aglycone à travers la corrélation entre le proton H-5' et le proton anomère H-1'' (figure 3.37). Cette corrélation existe uniquement quand le sucre est en position 4 ou 4' de l'acide éllagique¹¹³

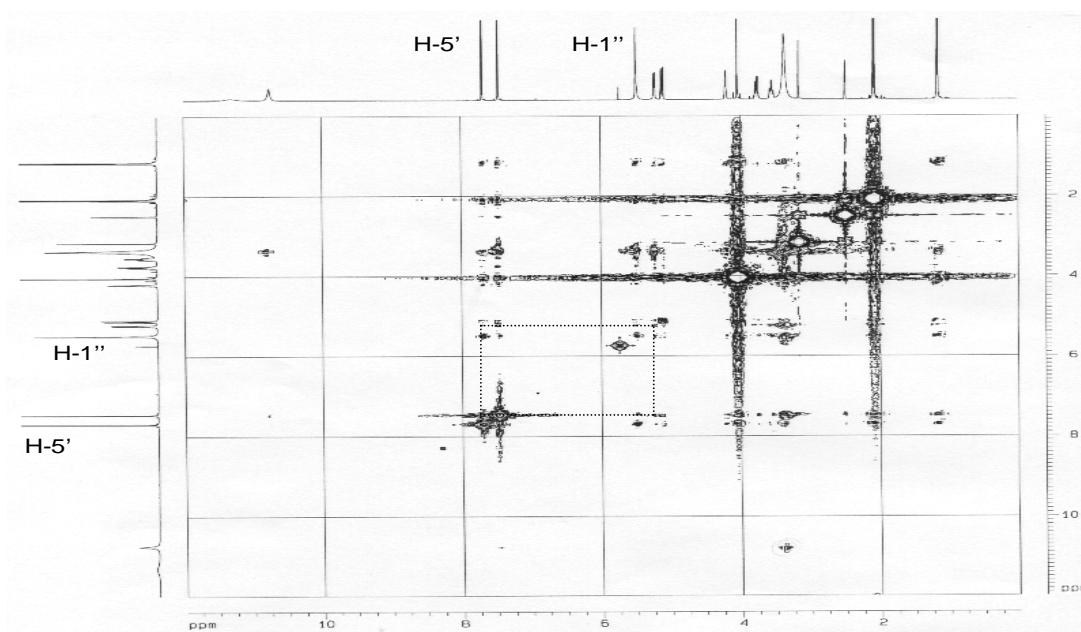
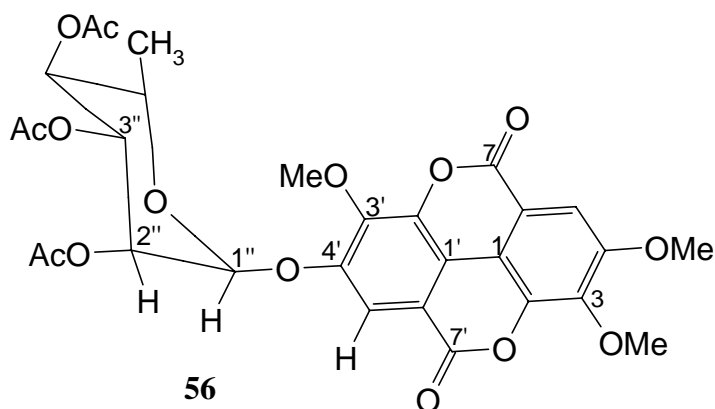


Figure 3-37: Spectre NOESY de Sg_3

Toutes ces données nous permettent d'attribuer à Sg₃ la structure **55**. Cette molécule est identifiée pour la première fois.

III-2-4: Détermination de la structure de l'acide-3, 4, 3'-O-triméthylellagique-4-O-β-2'',3'', 4''-O-triacétylrhamnopyranoside (Sgf₇)



A notre connaissance ce composé est un nouveau produit naturel. Il a été également détecté en trace dans l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *S. guineense* par HPLC-UV-MS.

Sgf₇ est isolé des feuilles de *S. guineense* sous forme de poudre jaunâtre. Cette molécule n'est pure qu'à 95%. Le spectre IR montre des bandes caractéristiques à 1748 et 1607 cm⁻¹ indiquant respectivement la présence d'une lactone α, β-insaturée et d'un noyau aromatique. Son spectre de masse nous permet d'observer l'ion pseudo moléculaire à m/z 615 [M-H]⁻ correspondant à une masse de 616 Da. L'analyse des spectres de masse et RMN ¹³C nous permet d'attribuer à sgf₇ la formule moléculaire C₂₉H₂₈O₁₅ avec 16 insaturations.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-38) nous permet d'observer deux protons aromatiques sous forme de singulet à δ_H 7.84 et 7.66, trois singulets à 3.98, 4.02 et 4.05 ppm attribuables aux méthoxyles et quatre singulets à δ_H 2.00, 2.04, 2.06 et 2.08 intégrant pour 3H chacun indiquant la présence de 4 méthyles (tableau 3-3).

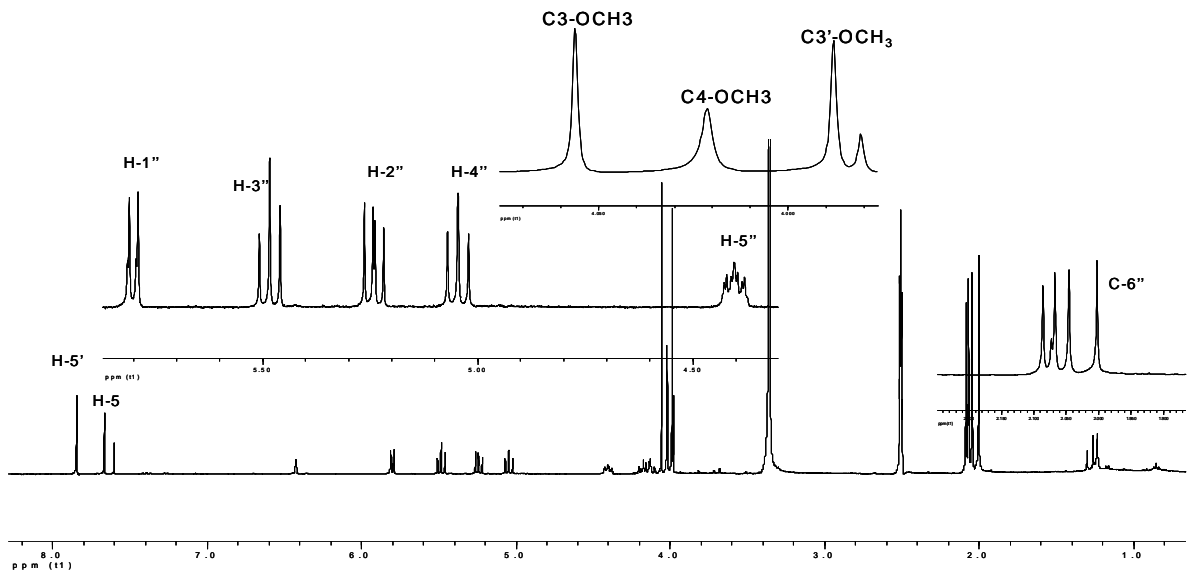


Figure 3-38: Spectre RMN ^1H de Sgf₇

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-39) nous permet de noter la présence de quatre carbonyles à δ_c 170.0, 170.3, 170.5 et 170.8 ppm parmi lesquels celui à 170.8 ppm peut être du à la présence d'une impureté; de deux carbonyles α,β -insaturés à δ_c 159.0 et 159.1.

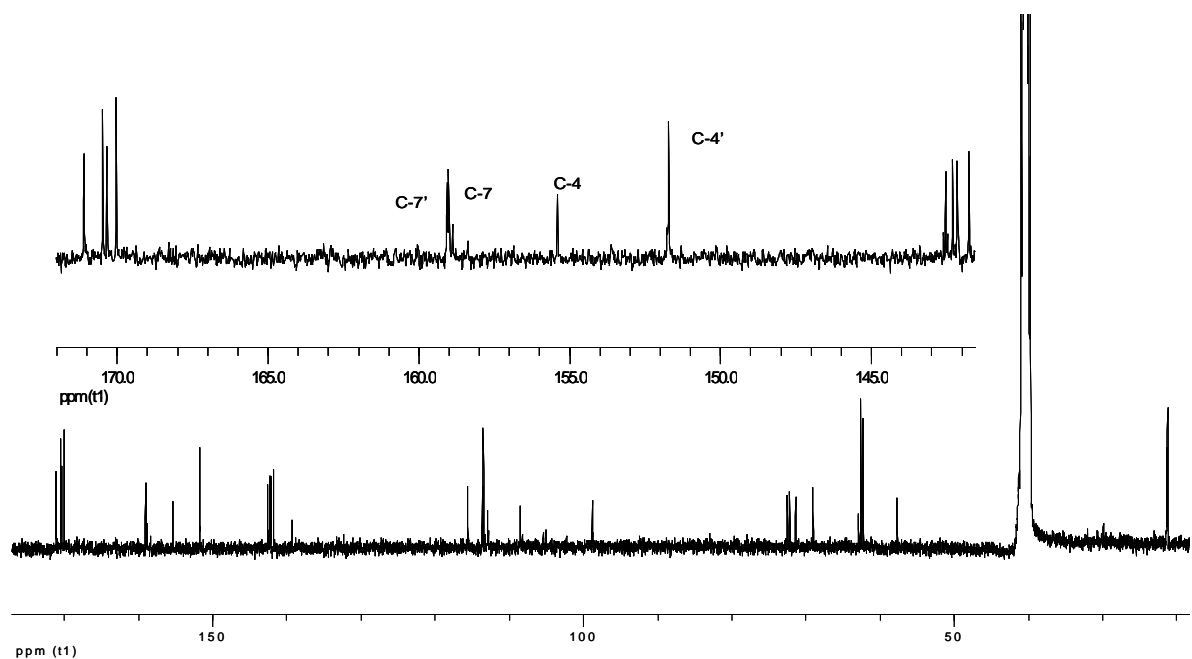


Figure 3-39: Spectre RMN ^{13}C de Sgf₇

Le spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (figure 3-40) nous permet à partir des couplages successifs de définir le sucre comme étant le rhamnose. Le signal du proton

anomère apparaît à δ_H 5.80 avec une constante de couplage $J=7.9$ Hz ce qui indique une conformation β du sucre.

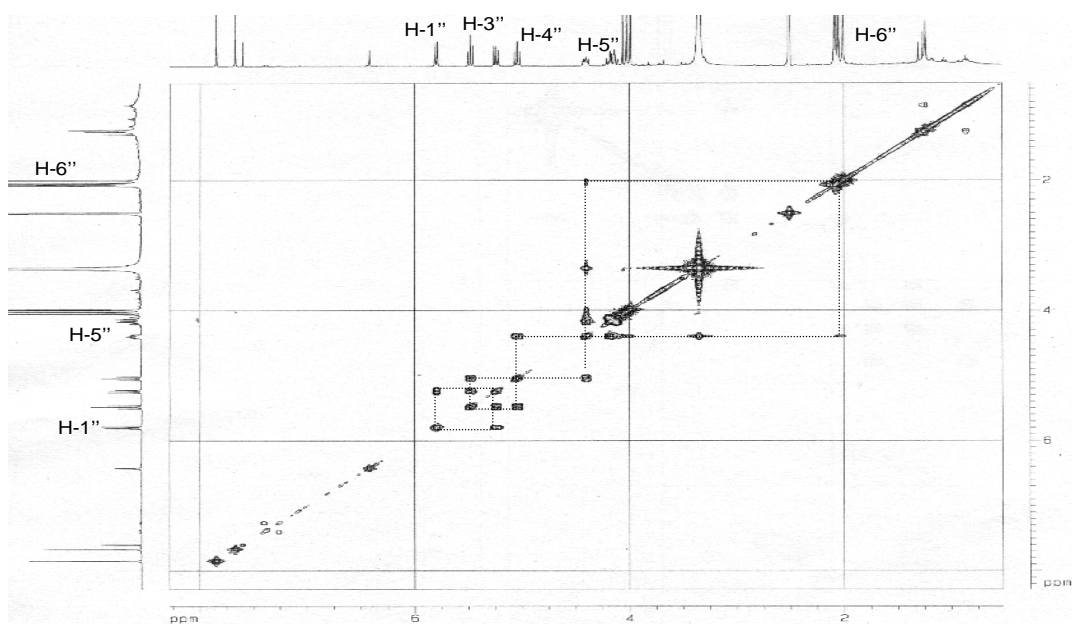


Figure 3-40: Spectre COSY de Sgf₇

Le spectre HMBC (figure 3-40) nous montre des corrélations entre les méthoxyyles à δ_H 3.98, 4.02 et 4.05 et les carbones à δ_C 155.4, 151.7 et 141.8 respectivement. Le proton anomère H-1'' (δ_H 5.80) a une corrélation avec le carbone à δ_C 151.7 indiquant ainsi la position du sucre sur l'aglycone. De même les protons à δ_H 5.24 (H-2''), 5.48 (H-3'') et 5.04 (H-4'') montrent des corrélations respectives avec les carbones à δ_H 170.0, 170.5 et 170.3 indiquant ainsi la position de chaque groupe acétyle sur le rhamnose.

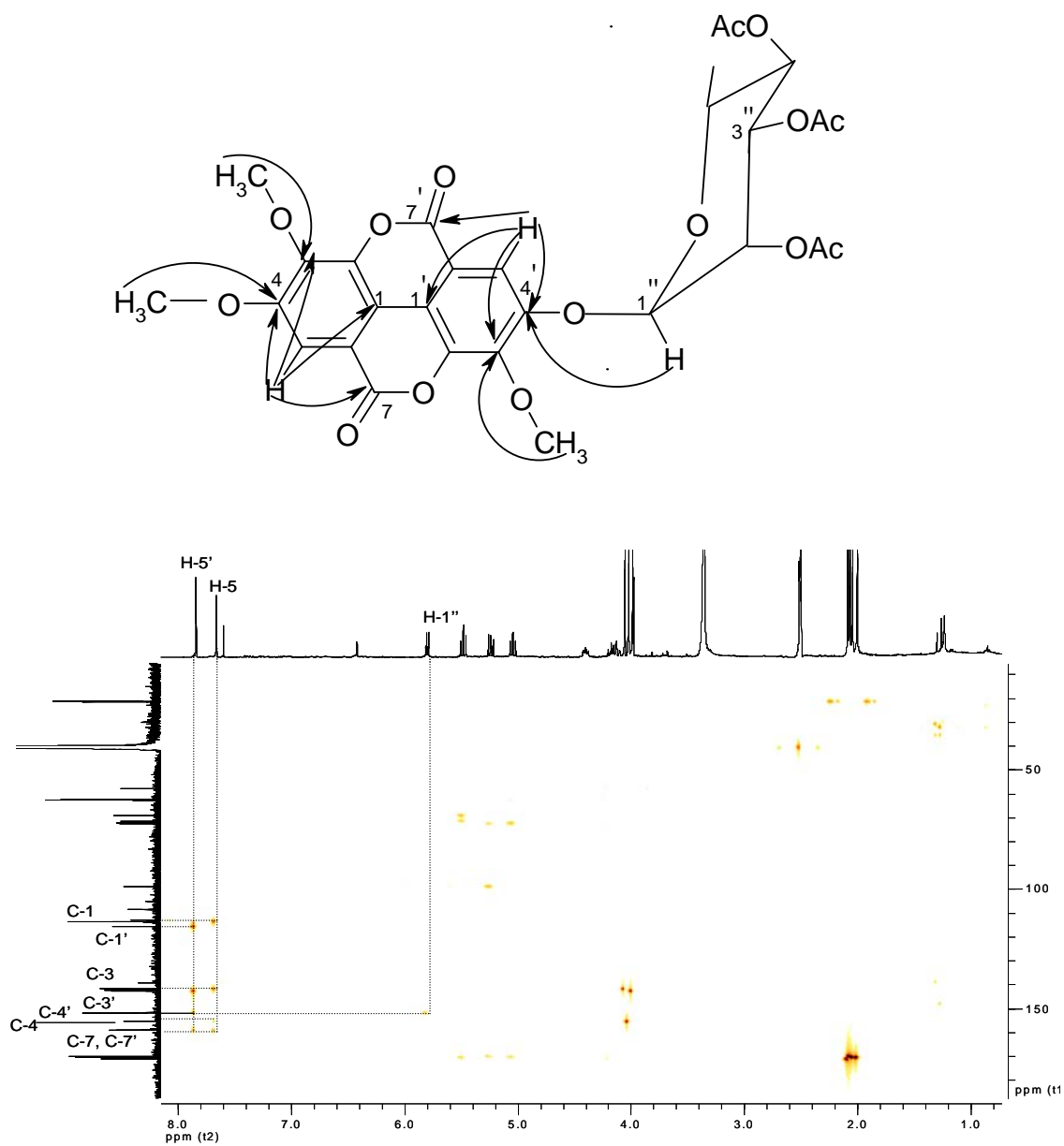


Figure 3-41: Spectre HMBC de Sgf₇

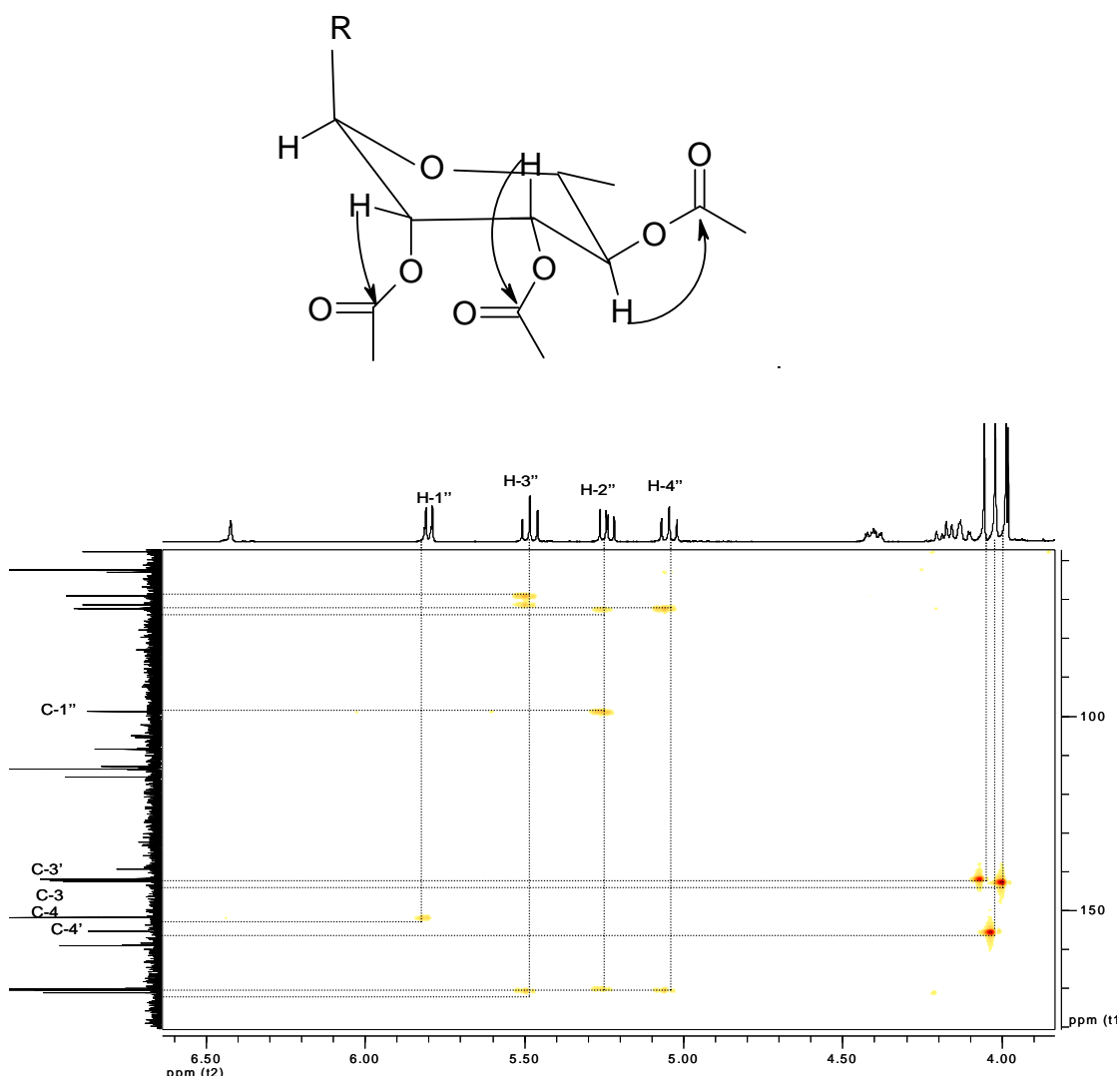


Figure3-42: Agrandissement du spectre HMBC de Sgf₇

L'analyse conjointe de toutes ces données nous a permis d'attribuer à sgf-7 la structure **56**

Tableau 3-3: Déplacements chimiques des protons de Sg₁, Sg₂, Sg₃ et Sgf₇ dans le DMSO à 400 MHz.

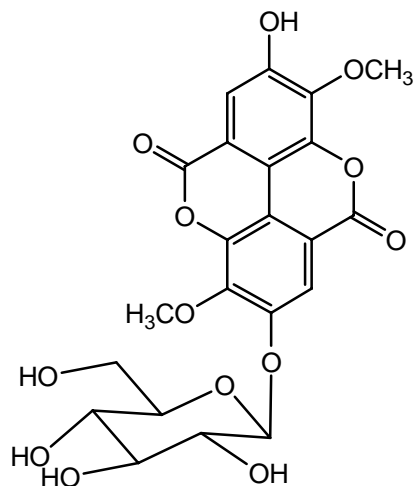
	¹ H (sg1)	¹ H (sg2)	¹ H (sg3)	¹ H (sgf-7)
H-5	7.53 (s, 1H)	7.50 (s, 1H)	7.46 (s, 1H)	7.60(s, 1H)
H-5'	7.69 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.84(s, 1H)
H-1''	5.47 (d, 1.4, 1H)	5.60 (d, 1.5, 1H)	5.49 (d, 1.6, 1H)	5.80 (d, 7.9, 1H)
H-2''	4.00 (dd, 1.8, 3.2, 1H)	5.30 (dd, 1.6, 3.6, 1H)	4.2 (dd, 1.5, 3.8, 1H)	5.24(dd, 1.9, 7.9, 1H)
H-3''	3.84 (dd, 3.6, 9.8, 1H)	4.08 (dd, 3.2, 9.8, 1H)	5.10 (dd, 3.2, 9.4, 1H)	5.48 (t, 1H)
H-4''	3.32 (m, 1H)	3.38 (m, 1H)	3.75 (m, 1H)	5.04 (t, 1H)
H-5''	3.55 (dq, 1H)	3.60 (dq, 1H)	3.55 (dq, 1H)	4.41(m, 1H)

H-6''	1.13 (d, 6.2, 1H)	1.18 (d, 6.2, 3H)	1.16 (d, 6.2, 3H)	2.02 (d, 5.2)
OCH ₃ -3	4.03 (s, 3H)	4.03 (s, 3H)	4.04 (s, 3H)	4.05 (s, 3H)
OCH ₃ -4				4.02 (s, 3H)
OCH ₃ -3'				3.98 (s, 3H)
CH ₃ CO-2''		2.09 (s, 3H)		2.07 (s, 3H)
CH ₃ CO-3''			2.09 (s, 3H)	2.00 (s, 3H)
CH ₃ CO-4''				2.04 (s, 3H)

Tableau 3-4: Déplacements Chimiques de RMN ¹³C de Sg₁, Sg₂, Sg₃ et Sgf₇ dans le DMSO à 100 MHz.

	¹³ C (Sg ₁)	¹³ C (Sg ₂)	¹³ C (Sg ₃)	¹³ C (Sgf-7)
1	113.9	112.0	113.7	113.6
2	142.7	142.6	142.5	142.1
3	140.9	140.9	140.9	141.8
4	153.5	153.5	153.3	155.4
5	112.2	112.1	112.3	108.5
6	107.7	107.7	107.0	113.5
7	159.7	159.4	159.3	159.0
1'	115.2	115.3	115.2	115.5
2'	137.1	136.9	137.1	142.3
3'	142.7	142.2	142.5	142.5
4'	147.5	146.9	147.0	151.7
5'	112.7	112.3	113.7	112.9
6'	112.0	113.8	111.9	113.5
7'	159.6	159.5	159.3	159.1
1''	100.8	97.8	100.8	98.8
2''	70.7	72.4	68.3	71.4
3''	70.9	68.9	74.5	72.5
4''	72.7	72.9	69.8	69.1
5''	70.7	70.7	70.6	72.4
6''	18.7	18.6	18.6	21.2
OCH ₃ -3	61.8	61.8	61.8	62.2
OCH ₃ -4				57.7
OCH ₃ -3'				62.5
CH ₃ CO-2''		21.8		21.3
CH ₃ CO-3''			22.0	21.2
CH ₃ CO-4''				21.1
CO-2''		170.8		170.5
CO-3''			170.9	170.0
CO-4''				170.3

III-2-5: Identification de l'acide 3,3'-*O*-diméthylellagique 4-*O*- β -glucopyranoside (Cv₁₁)



57

Ce composé a été isolé pour la première fois de *Dionaea muscipula* par Grzegorz¹¹⁴

Cv₁₁ est isolé des feuilles de *C. viminalis* sous forme de poudre blanche. Cette molécule n'est pure qu'à 98%. Sur le spectre IR on distingue des bandes caractéristiques à 3380, 1740 et 1607 cm⁻¹ indiquant respectivement la présence d'une fonction hydroxyle, d'une lactone α , β -insaturée et d'un noyau aromatique. Son spectre de masse nous permet d'observer deux pics, l'ion pseudo moléculaire à m/z 491 [M-H]⁻ et son fragment à m/z 328 [M-H-163]⁻ qui correspond à la perte d'un glucose par l'ion parent. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT nous permet d'attribuer à Cv₁₁ la formule moléculaire C₂₂H₂₀O₁₃ avec 13 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-43) montre deux protons aromatiques sous forme de singulets à δ_H 7.82 et 7.54. On y distingue également deux singulets à δ_H 4.06 et 4.09 attribuables aux protons des méthoxyles ainsi que le proton anomère à δ_H 5.15 sous forme de doublet avec une constante de couplage J=7.6 Hz indiquant la configuration β du sucre.

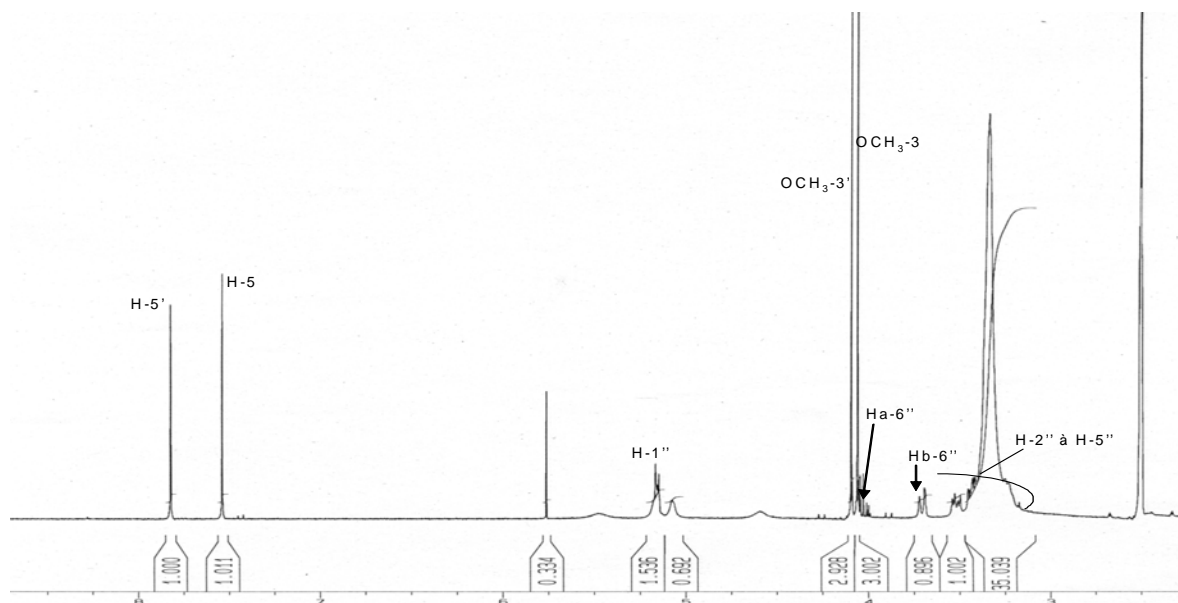


Figure 3-43: Spectre RMN ^1H de Cv_{11}

L'analyse des spectres RMN ^{13}C (figure 3-44) et DEPT nous permet de distinguer 22 atomes de carbone (tableau 3-5), parmi lesquels 7 méthines, 2 méthyles, un méthylène et 12 carbones quaternaires.

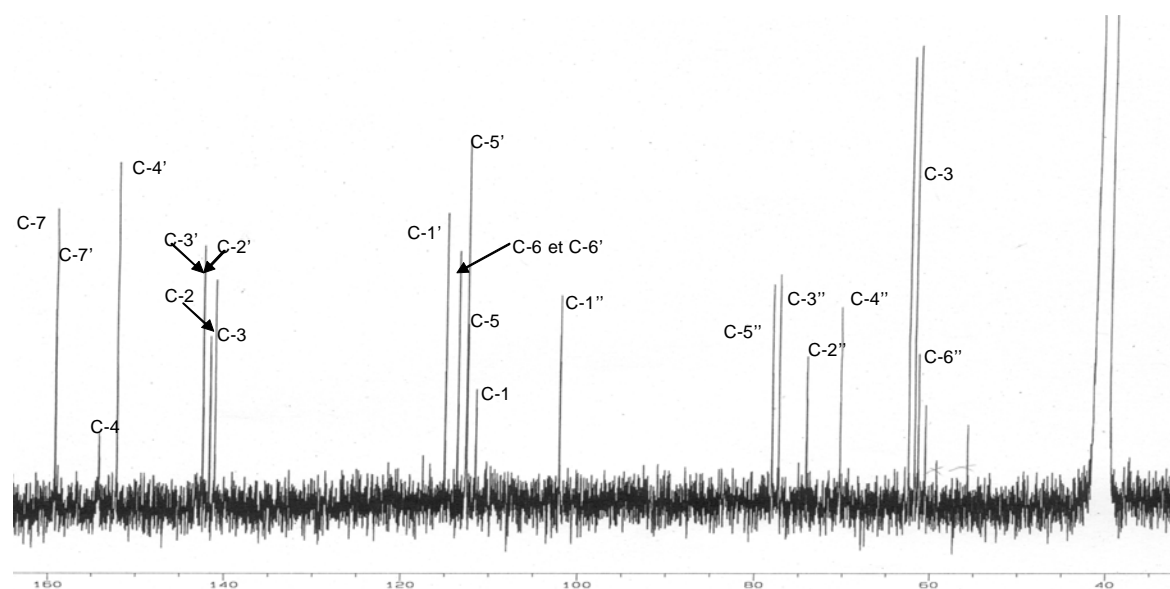


Figure 3-44: Spectre RMN ^{13}C de Cv_{11}

L'analyse du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^1H - ^{13}C (HMBC), nous permet d'observer une corrélation entre le doublet à δ_{H} 5.15 (H-1'') et le carbone à δ_{C} 152.3

(C-4') indiquant ainsi la position du sucre par rapport à l'aglycone. Les singulets à δ_H 4.06 et 4.09 ont des corrélations avec les atomes de carbone à δ_C 141.2 (C-3) et 142.6 (C-3') ce qui nous permet de définir la position de ces méthoxyles sur l'aglycone (tableau 3-45).

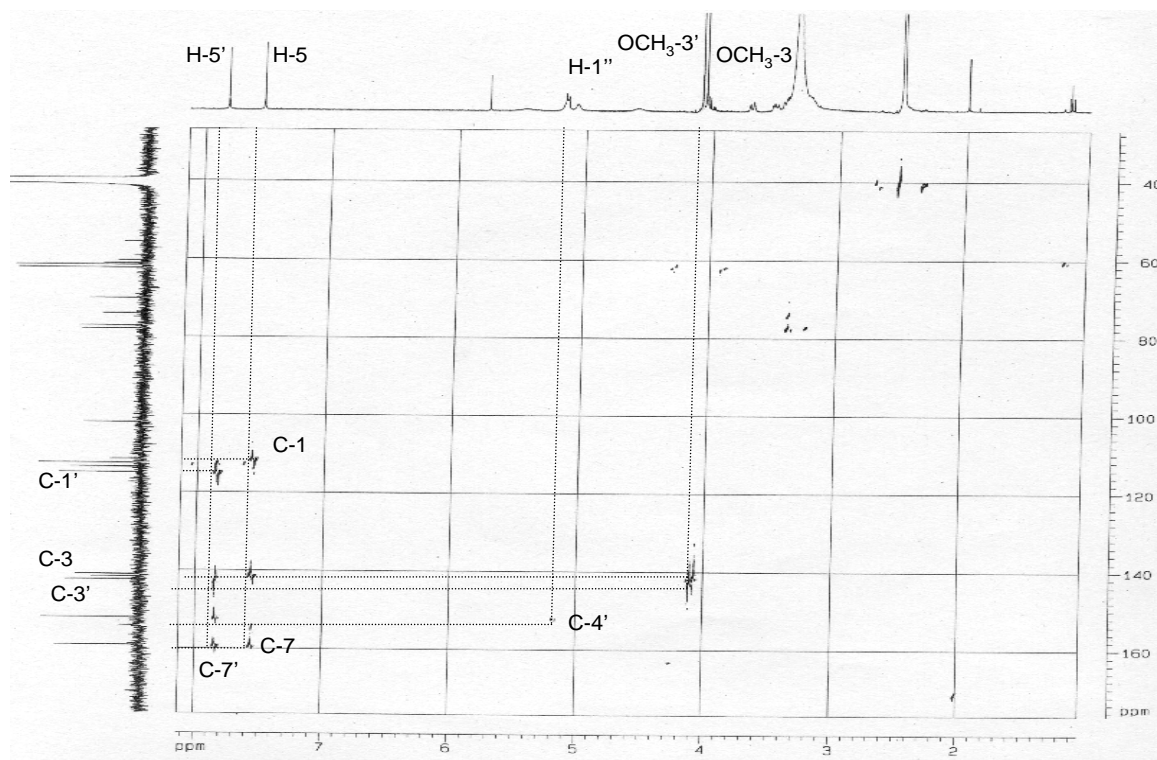
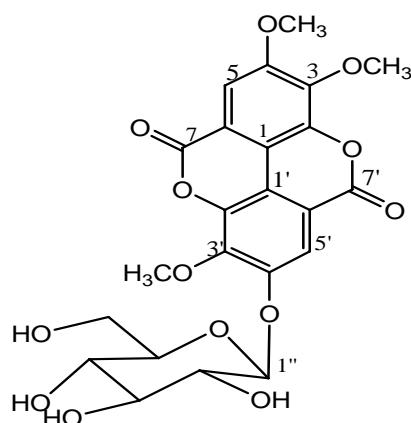


Figure 3-45: Spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^1H - ^{13}C (HMBC) de Cv_{11}

Toutes ces données nous permettent de donner à Cv_{11} la structure **57**

III-2-6: Identification de l'acide 3,3',4 -*O*-triméthylellagique 4'-*O*- β -glucopyranoside (Cv_{12})



58

Ce composé a été isolé pour la première fois de *Nyssa sylvatica* et *Miconia Myriantha* et complètement caractérisé par Xing-Cong¹¹⁵

Cv₁₂ est isolé des feuilles de *C. viminalis* sous forme de poudre blanche. Le spectre de masse montre l'ion pseudo moléculaire m/z 505 [M-H]⁻. L'analyse conjointe des spectres RMN ¹³C et DEPT permet d'attribuer à Cv₁₂ la formule moléculaire C₂₃H₂₂O₁₃ avec 13 degrés d'insaturation. Le spectre IR est superposable à celui de Cv₁₂.

Le spectre RMN ¹H de Cv₁₂ (figure 3-46) est similaire à celui de Cv₁₁, la différence entre les deux spectres est la présence d'un singulet à 4.02 ppm attribuable à un méthoxyle supplémentaire à Cv₁₂.

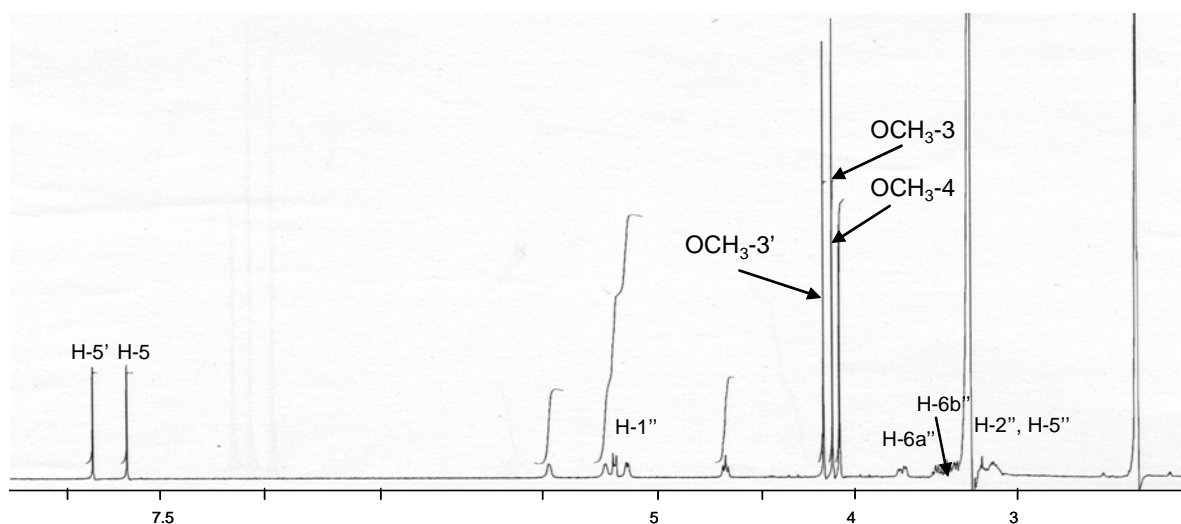


Figure 3-46: Spectre RMN ¹H de Cv₁₂

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-47) nous permet de distinguer 23 carbones (tableau 3-5), l'analyse du DEPT nous montre 7 méthines, 3 méthoxyles et un méthylène, ce qui nous permet de déduire que la molécule contient 12 carbones quaternaires.

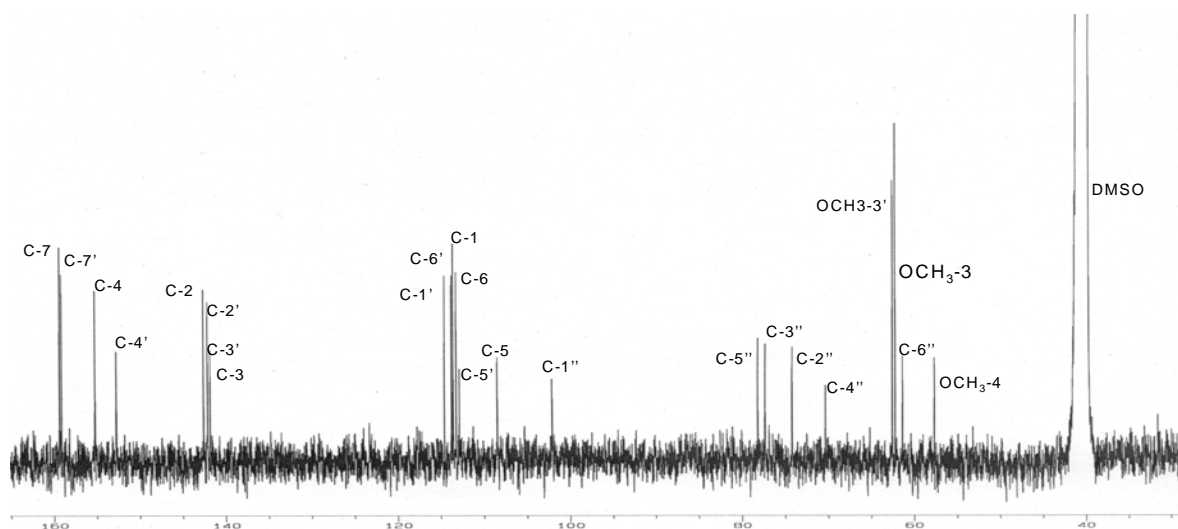


Figure 3-47: Spectre RMN ^{13}C de Cv_{12}

L'analyse du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^1H - ^{13}C (HMBC), montre une corrélation entre le doublet à δ_{H} 5.17 (H-1'') et le carbone à δ_{C} 152.7 (C-4') indiquant ainsi la position du sucre par rapport à l'aglycone (figure 3-48). Les singulets à 4.06, 4.09 et 4.02ppm ont des corrélations avec les carbones à δ_{C} 141.7 (C-3), 142.6 (C-2') et 155.2 (C-4). Toutes ces données sont compatibles avec celles de l'acide 3,3',4-*O*-triméthylellagique 4'-*O*- β -glucopyranoside¹¹⁵.

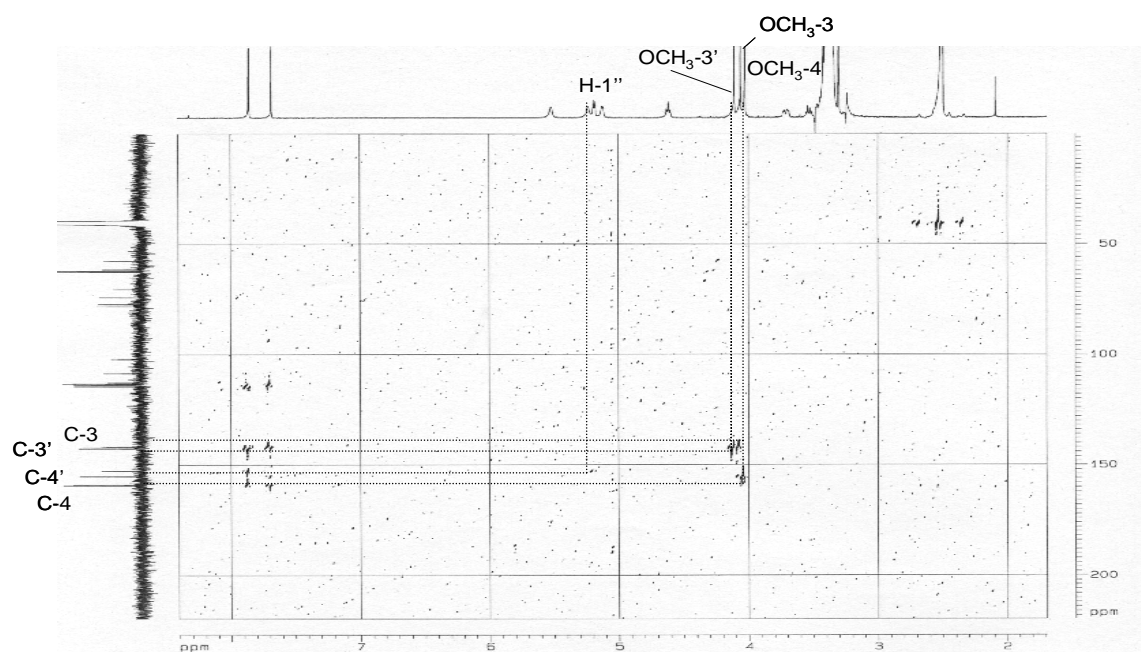


Figure 3-48: Spectre HMBC de Cv_{12} .

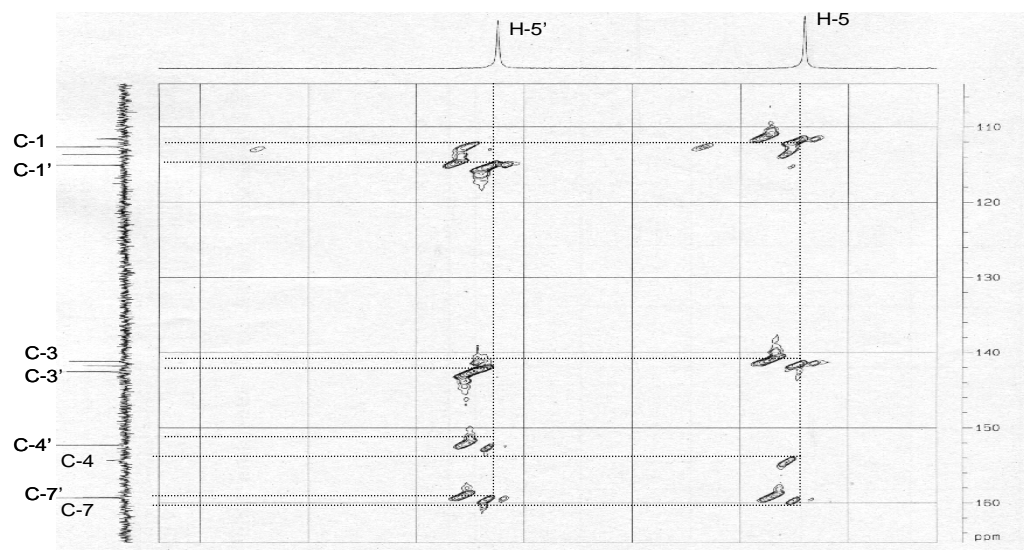


Figure 3-49: Agrandissement du spectre HMBC dans la zone aromatique de Cv₁₂

Tableau 3-5: Déplacement chimique des protons et des carbones de Cv₁₁ et Cv₁₂

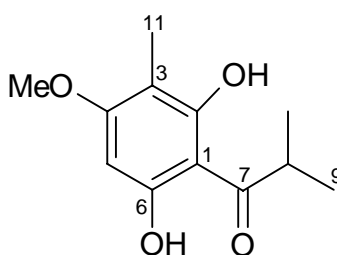
	¹ H (Cv ₁)	¹³ C	¹ H (Cv ₂)	¹³ C
1		111.6		113.6
2		141.8		142.5
3		141.2		141.7
4		154.4		155.2
5	7.54 (s, 1H)	112.6	7.67 (s, 1H)	108.5
6		113.7		113.8
7		159.4		159.3
1'		115.1		114.6
2'		142.5		142.6
3'		142.6		142.1
4'		152.3		152.8
5'	7.82 (s, 1H)	112.7	7.85 (s, 1H)	112.8
6'		113.7		113.2
7'		159.3		159.0
1''	5.15 (d, 7.6, 1H)	102.2	5.17 (d, 7.4, 1H)	102.1
2''	3.37	74.2	3.36	74.3
3''	3.35	77.3	3.41	77.3
4''	3.24	70.3	3.25	70.3
5''	3.40	78.1	3.44	78.1
6''	3.70 (dd, 5.2, 12.6, 1H) 3.50 (dd, 5.5, 12.7, 1H)	61.4	3.71 (dd, 5.4, 12.1, 1H) 3.54 (dd, 5.6, 12.4, 1H)	61.4
OCH ₃ -3	4.06 (s, 3H)	61.8	4.04 (s, 3H)	62.2
OCH ₃ -4			4.02 (s, 3H)	57.7
OCH ₃ -3'	4.09 (s, 3H)	62.5	4.11(s, 3H)	62.7

Les analyses sont effectuées dans le DMSO à 400 et 100 MHz respectivement pour la RMN ¹H et ¹³C

III-3: Les phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des composés phénoliques ayant comme squelette de base le 1, 3, 5-trihydroxybenzène¹¹⁶. Dans le règne végétal on dénombre plusieurs sous classes de phloroglucinols à savoir les acylphloroglucinols et leurs dimères (sideroxylonal, macrocarpal, robustaol...). Dans le présent travail nous avons isolé les acylphloroglucinols de *C. viminalis* (Cv₁₀, Cv₂₁ et Cv₂₂) et les dimères de types robustaol (Es₅) et sideroxylonal (Es₆) de *E. saligna*.

III-3-1: Identification du 2,6-dihydroxy-3-méthyle-4-méthoxyisobutyrophénone (Cv₁₀)



59

Cette molécule est isolée pour la première fois des feuilles de *C. viminalis*. Elle a été précédemment synthétisée par Baigent¹¹⁷. C'est à notre connaissance la première fois que cette molécule est identifiée par des méthodes spectroscopiques.

Cv₁₀ est isolé sous forme d'aiguilles jaunes. Le spectre de masse en ESI mode négatif exhibe l'ion pseudo moléculaire m/z 223 $[M-H]^-$. La fragmentation de cet ion nous donne un pic à m/z 180 $[M-C_3H_7]^-$. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT permet d'attribuer à cv₁₀ la formule moléculaire C₁₂H₁₆O₄ avec 5 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-50) nous montre la présence d'un proton aromatique sous forme de singulet à δ_H 6.10, d'un méthoxyte à 3.80 ppm, d'un méthyle à 1.90 ppm. Nous y observons également la présence d'un multiplet à 4.00 ppm et de deux méthyles sous forme de doublet ayant une constante de couplage $J = 6.6$ Hz à 1.15 ppm ce qui indique la présence d'un groupe isopropyle.

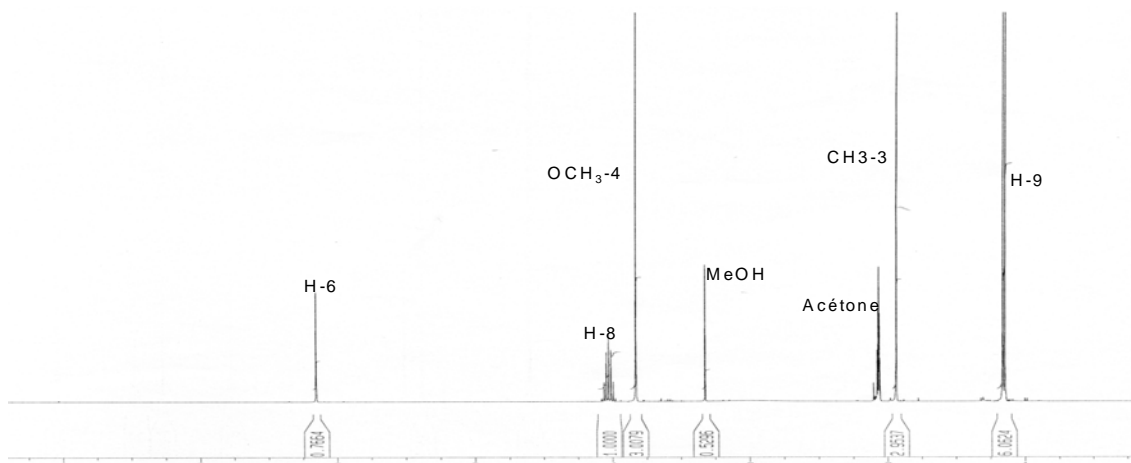


Figure 3-50: Spectre RMN ¹H de Cv₁₀

Le spectre de corrélation homonucléaire ¹H-¹H (COSY) montre la présence d'un couplage entre le proton de résonance δ_H 1.15 (J = 6.6Hz, 6H) et le multiplet à δ_H 4.00 confirmant la présence d'un groupe isopropyle (figure 3-51).

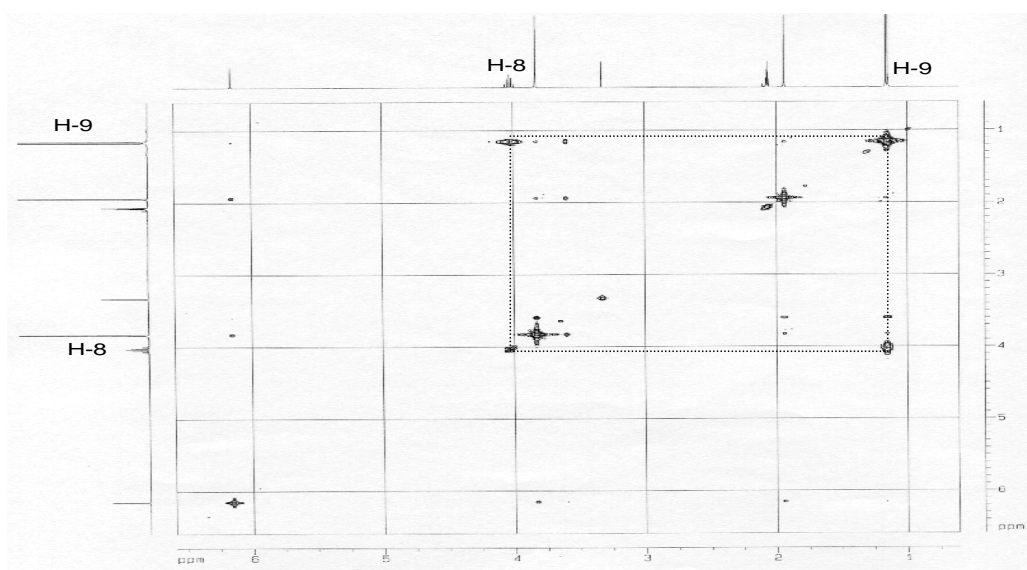


Figure 3-51: Spectre COSY de Cv₁₀

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-52) montre un signal à δ_c 210.8 qui correspond au carbonyle de la cétone ainsi que des atomes de carbone à δ_c 104.0, 104.1, 160.3, 163.4, 163.8 et 96.7 appartenant au noyau aromatique (tableau 3-6).

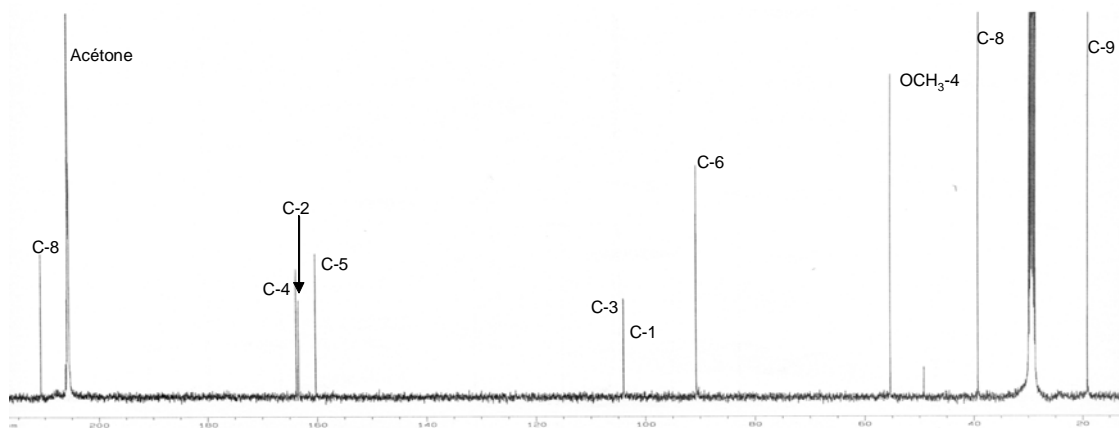


Figure 3-52: Spectre RMN ^{13}C de Cv_{10}

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^{13}C - ^1H (COLOC) montre des corrélations entre l'atome de carbone à δ_{C} 163.8 (C-4) et le méthoxyle à δ_{H} 3.80 et entre les atomes de carbone à δ_{C} 104.1 (C-1), 163.8 (C-4), 163.4 (C-2) et le méthyle à δ_{H} 1.90. Les atomes de carbone à δ_{C} 104.0 (C-1), 104.1 (C-3) corrélient avec le proton à δ_{H} 6.10, et le carbone C-7 (δ_{C} 210.8) a une corrélation avec le méthyle à δ_{H} 1.15 (H-10) (figure 3-53).

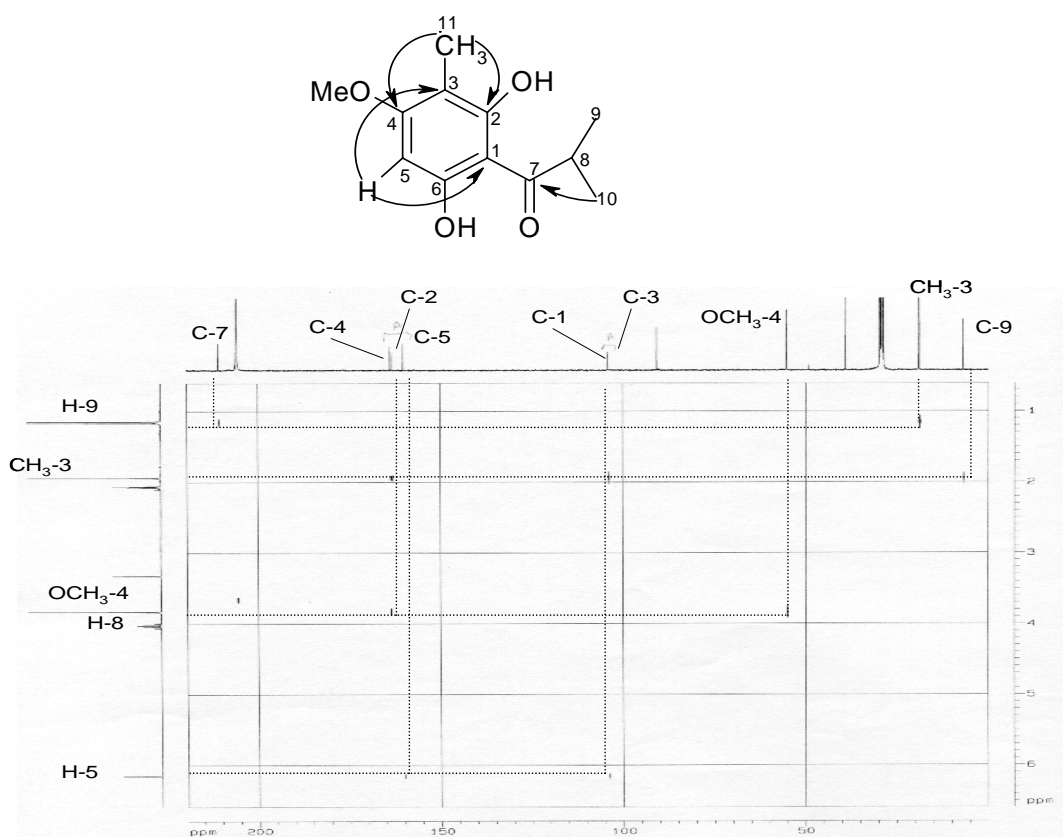
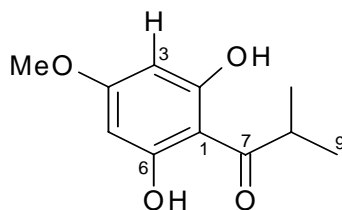


Figure 3-53: Spectre COLOC de Cv_{10}

L'analyse de toutes ces données nous permet d'attribuer à Cv₁₀ la structure **59** correspondant à la 2,6-dihydroxy-3-méthyle-4-méthoxyisobutyrophénone.

III-3-2: Identification du 2,6-dihydroxy-4-méthoxyisobutyrophénone (Cv₂₁)



60

Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans des espèces du genre *kunzea*¹¹⁸

Cv₂₁ est isolé sous forme d'une huile jaunâtre des feuilles de *C. viminalis*. Le spectre de masse montre le pic de l'ion moléculaire m/z 209 [M-H]⁻ et le fragment m/z 167 [M-C₃H₇]⁻. L'analyse du spectre RMN ¹³C et du DEPT nous permet d'attribuer à cette molécule la formule moléculaire C₁₁H₁₄O₄ avec 5 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-54) présente des similitudes avec celui de Cv₁₀ au niveau du groupe isopropyle et du méthoxyle à 3.80 ppm. Nous y observons également la présence de deux protons aromatiques à 6.00 ppm. Ces déplacements chimiques du proton sont similaires à ceux de la 2,6-dihydroxy-4-méthoxyisobutyrophénone¹¹⁸.

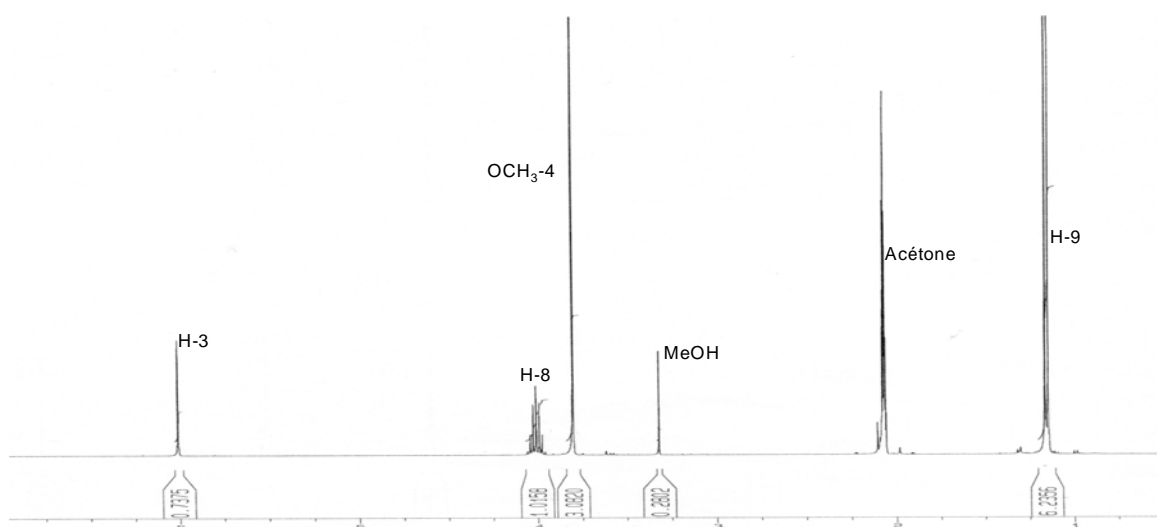


Figure 3-54: Spectre RMN ¹H de Cv₂₁

Le spectre COSY (figure 3-55) nous permet d'observer la corrélation entre les protons H-8 et H-9.

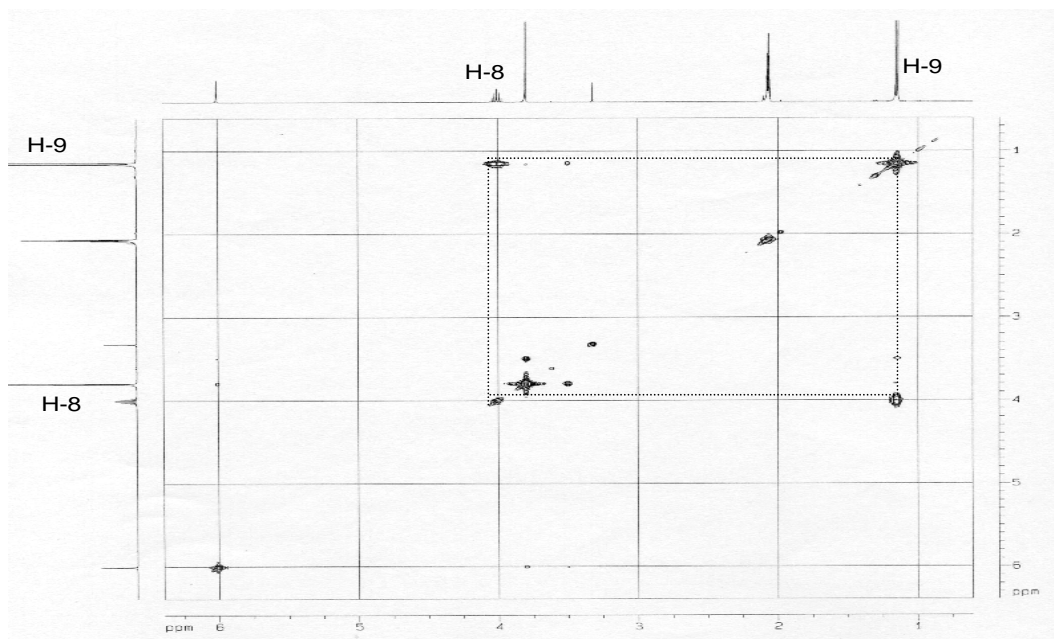


Figure 3-55: Spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (COSY) de Cv_{21}

On observe sur le spectre RMN ^{13}C (figure 3-56) un signal à δ_c 206.8 (C-7) qui correspond au carbonyle de la cétone et les carbones à δ_c 104.4 (C-1), 164.6 (C-6), 166.1 (C-2) et 93.9 (C-5) qui sont ceux du noyau aromatique.

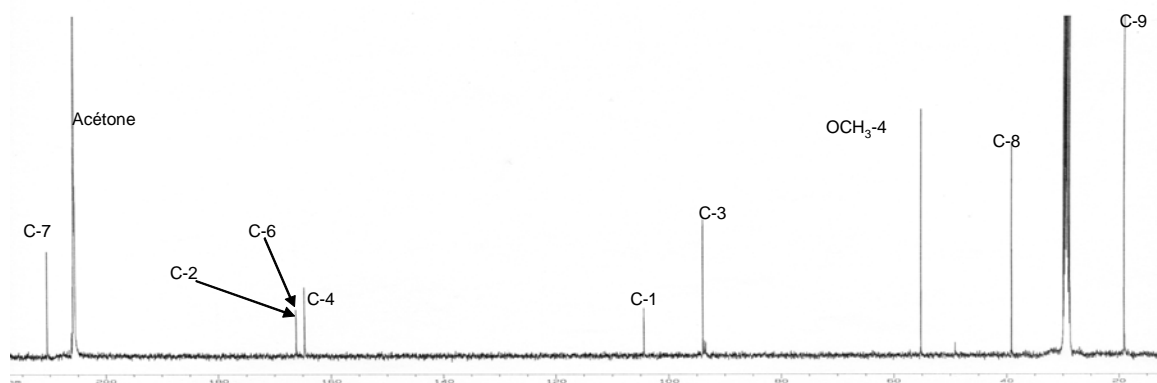


Figure 3-56: Spectre de RMN ^{13}C de Cv_{21}

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ^{13}C - ^1H (COLOC) montre des corrélations entre l'atome de carbone à δ_c 164.6 (C-4) et le méthoxyle à δ_H 3.80, ainsi qu'entre le carbone à δ_c 104.4 (C-1) et les protons aromatiques à δ_H 6.00 (H-3, H-5) (figure 3-57).

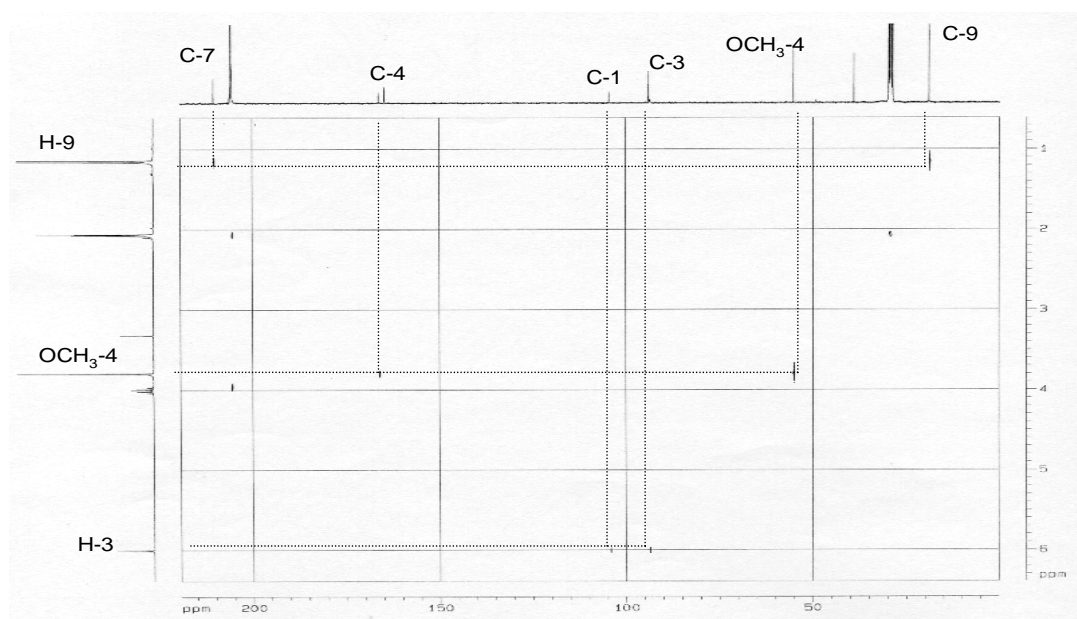
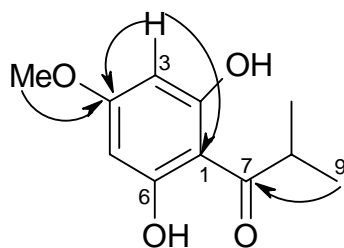
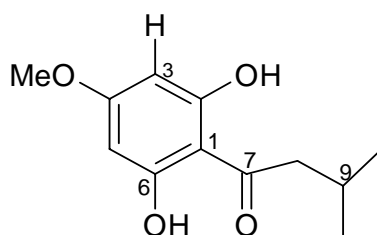


Figure 3-57: Spectre COLOC de Cv_{21}

III-3-3: Identification de la 2,6-dihydroxy-4-méthoxyisovalérophénone (Cv_{22})



61

A notre connaissance, seuls les déplacements chimiques des carbones de cette molécule sont énumérés dans la littérature¹¹⁹.

Cv_{22} est une huile jaunâtre isolée des feuilles de *C. viminalis*. Le spectre de masse en ESI mode négatif montre l'ion pseudo moléculaire m/z 223 [M-H], la MS^2 donne l'ion m/z 167

[M-C₄H₉]. L'analyse des spectres RMN ¹³C et DEPT nous permet d'attribuer à cette molécule la formule moléculaire C₁₂H₁₆O₄ ayant 5 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-58) nous montre la présence d'un méthyle sous forme de doublet avec une constante de couplage J = 6.7 Hz à δ_H 0.99, d'un méthine sous forme de multiplet à δ_H 2.26 et d'un méthylène sous forme de doublet à δ_H 2.96. Nous y observons également la présence du proton chélaté à 10.4 ppm. Les déplacements chimiques des protons en RMN sont identiques à ceux de la 2,6-dihydro-4-méthoxyisovalérophénone^{118;119}.

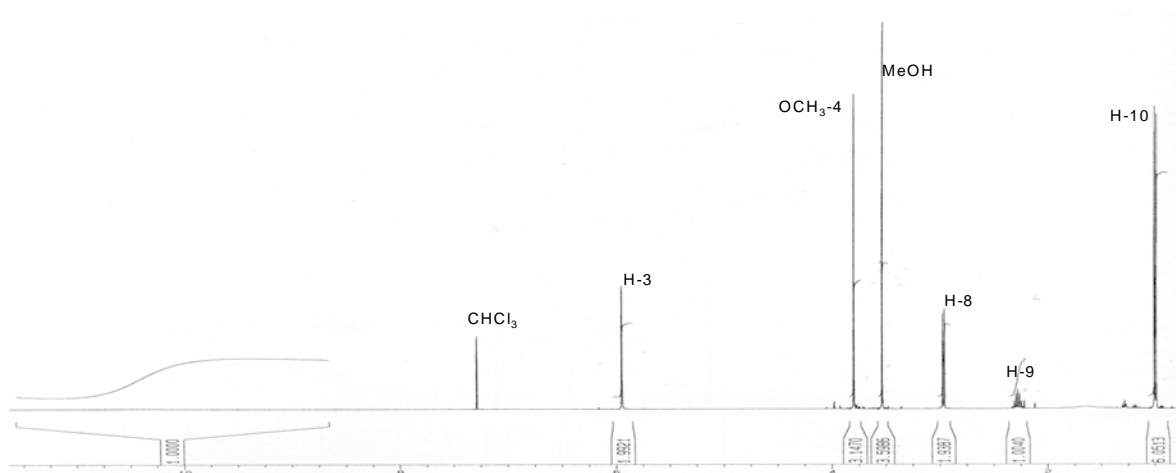


Figure 3-58: Spectre RMN ¹H de Cv₂₂

Le spectre COSY (figure 3-59) nous montre des corrélations successives entre les protons à δ_H 0.99 (H-10), 2.26 (H-9) et 2.96 (H-8).

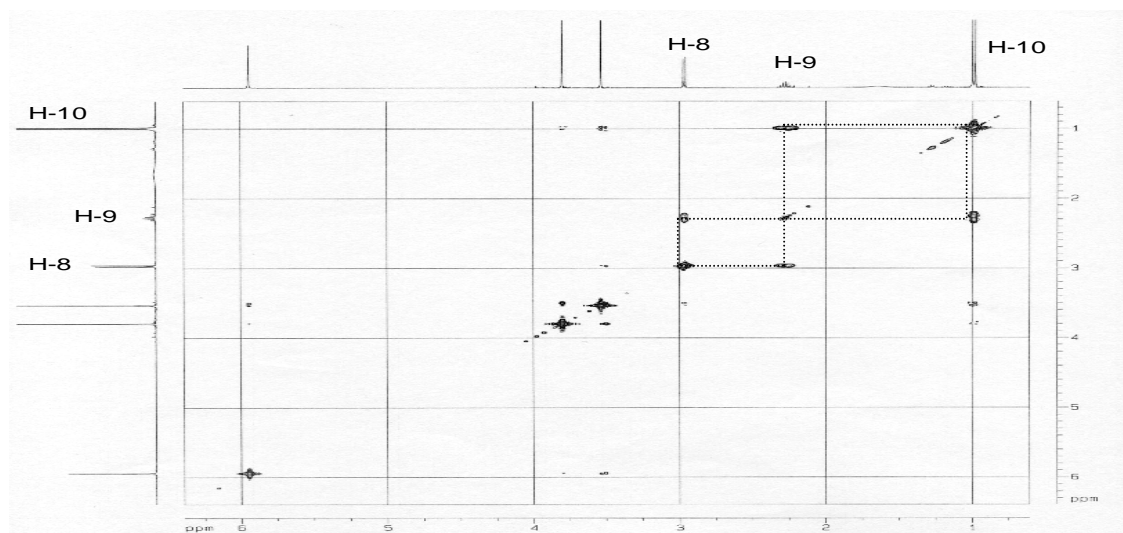


Figure 3-59: Spectre COSY de Cv₂₂

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-60) montre le signal d'un carbone à δ_c 206.3 attribuable au carbonyle de la cétone et des carbones à δ_c 105.6 (C-1); 163.9 (C-6); 165.9 (C-4) et 94.6 (C-5) appartenant au noyau aromatique (tableau 3-6).

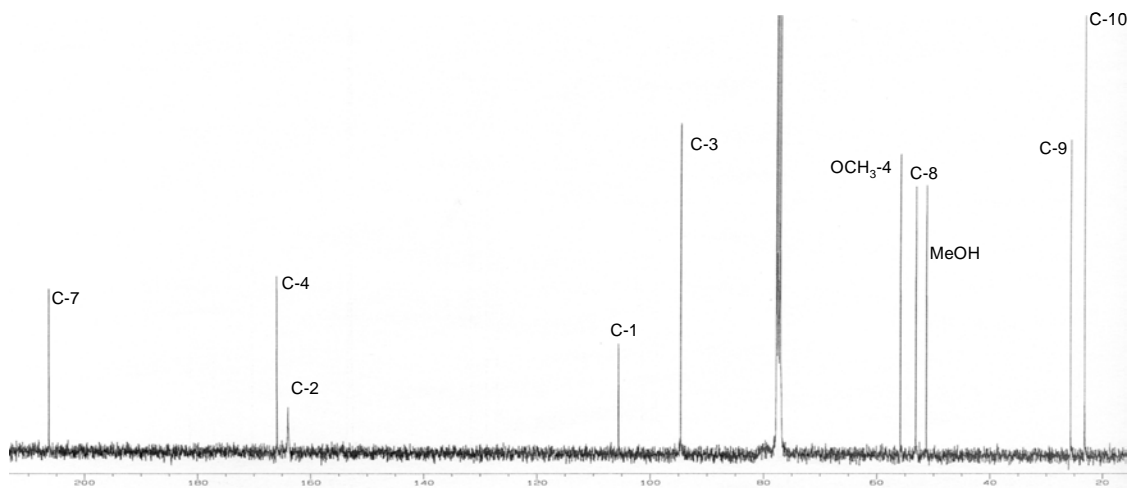
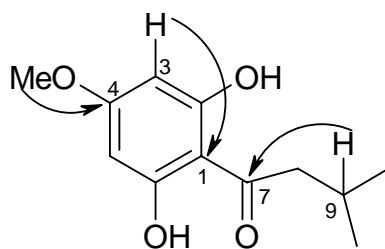


Figure 3-60: Spectre RMN ^{13}C de Cv₂₂

Le spectre de corrélation hétéronucléaire ^{13}C - ^1H à longue distance (COLOC) montre des corrélations entre le carbone à δ_c 165.9 (C-4) et le méthoxyle à δ_H 3.80, ainsi qu'entre le carbonyle à δ_c 206.3 (C-7) et le proton H-9 (δ_H 2.26) (figure 3-61).



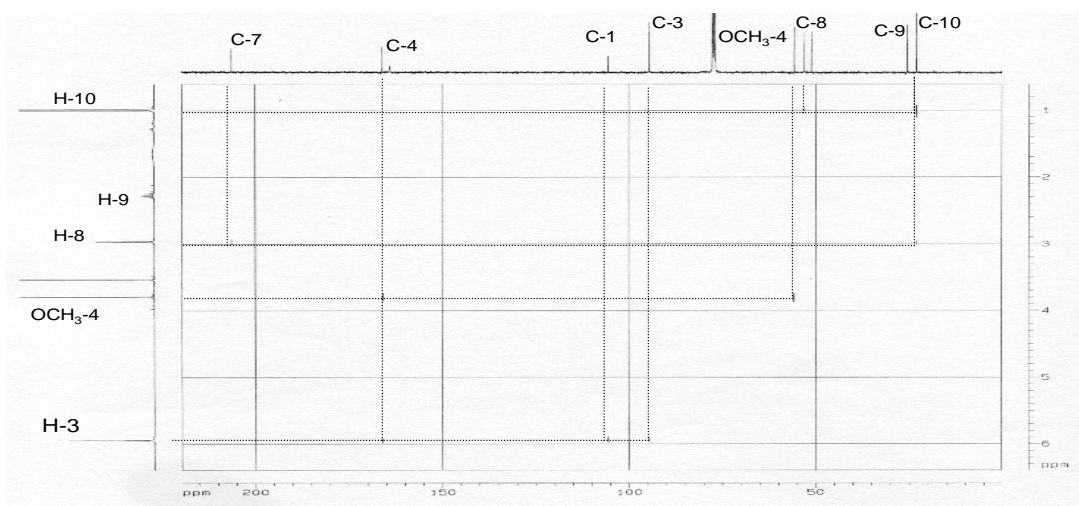
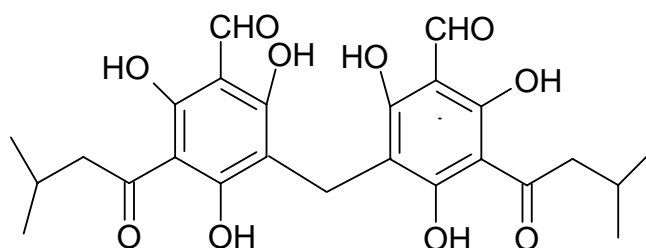


Figure 3-61: Spectre COLOC de Cv₂₂

Tableau 3-6: Données spectrales RMN ¹H et ¹³C de Cv₁₀, Cv₁₂ et Cv₂₂ à 400 et 100 MHz.

	Cv ₁₀ (acétone-d ₆)		Cv ₂₁ (acétone-d ₆)		Cv ₂₂ (CDCl ₃)	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		104.0		104.4		105.6
2		163.4		166.1		163.9
3		104.1	6.00, s, 1H	93.9	5.94, s, 1H	94.6
4		163.8		164.6		165.9
5	6.10, s, 1H	90.7	6.00, s, 1H	93.9	5.94, s, 1H	94.6
6		160.3		166.1		163.9
7		210.8		210.5		206.3
8	4.00, m, 1H	39.3	4.00, m, 1H	39.2	2.96, d, (6.8), 2H	53.1
9	1.15, d, (6.7), 6H	19.1	1.15, d, (6.7), 6H	19.0	2.26, m, 1H	25.7
10	1.15, d, (6.7), 6H	19.1	1.15, d, (6.7), 6H	19.0	0.99, d, (6.7), 6H	23.2
11					0.99, d, (6.7), 6H	23.2
OCH ₃	3.80, s, 3H	55.4	3.80, s, 3H	55.3	3.80, s, 3H	55.9
CH ₃	1.90, s, 3H	6.9				
H-2					10.41, s, 1H	

III-3-4: Détermination de la structure du dimère de la jensenone (Es₅)

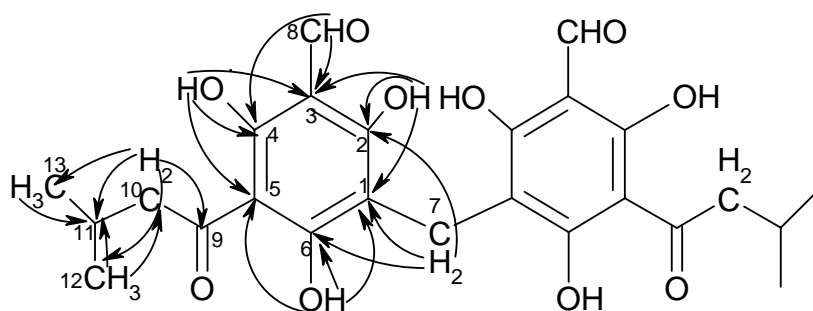


Cette molécule est un nouveau produit naturel.

Es₅ est isolé sous forme de poudre brune des feuilles de *E. saligna*. Le spectre de masse en ESI mode négatif montre l'ion pseudo moléculaire à m/z 487 [M-H]⁻ indiquant que la masse moléculaire est 488 Da ce qui est compatible avec la formule moléculaire C₂₅H₂₈O₁₀. La MS² de cet ion nous donne les fragments à m/z 237 et 249. Ce mode de fragmentation a déjà été observé sur le robustaol-A qui a un squelette apparenté à celui de Es₅¹²⁰.

L'analyse du spectre RMN ¹H montre deux protons chélatés à δ_H 17.6 et 14.5. Ce type de proton fortement déblindé se trouve généralement dans les phloroglucinols²⁵. On distingue le proton d'une fonction aldéhyde à δ_H 10.16 et d'un hydroxyle à δ_H 9.79. Le doublet à δ_H 3.01 est attribué au méthylène adjacent au carbonyle (tableau 3-7). Le spectre COSY montre des corrélations successives entre les méthyles à δ_H 1.00, le multiplet à δ_H 2.27 et le méthylène à δ_H 3.01 indiquant ainsi la présence d'un groupe isobutyle dans la structure.

Le spectre HMBC montre des corrélations à longue distance entre le méthylène à δ_H 3.73 (H-7) et les atomes de carbone à δ_C 104.8 (C-1), 169.9 (C-2) et 164.9 (C-6). Nous y distinguons également les corrélations entre le méthylène à δ_H 3.01 (H-10) et les carbones à 207.4 (C-9), 25.2 (C-11), 22.7 (C-13). Les protons chélatés à δ_H 17.6 (H-2) et 14.5 (H-4) corrélient respectivement avec les carbones à δ_C (104.8 (C-1), 169.9 (C-2), 103.6 (C-3)) et (103.6 (C-3), 168.5 (C-4), 104.7 (C-5)). L'ensemble de toutes ces données nous permet d'attribuer à Es₅ la structure **62** correspondant au dimère de la jensenone qui est une molécule nouvelle.



de carbone résonant respectivement à δ_c 167.8 (C-2') et 168.5 (C-6'). L'ensemble de toutes ces données nous permet d'attribuer à cette molécule la structure **63** du sidéroxylyonal C.

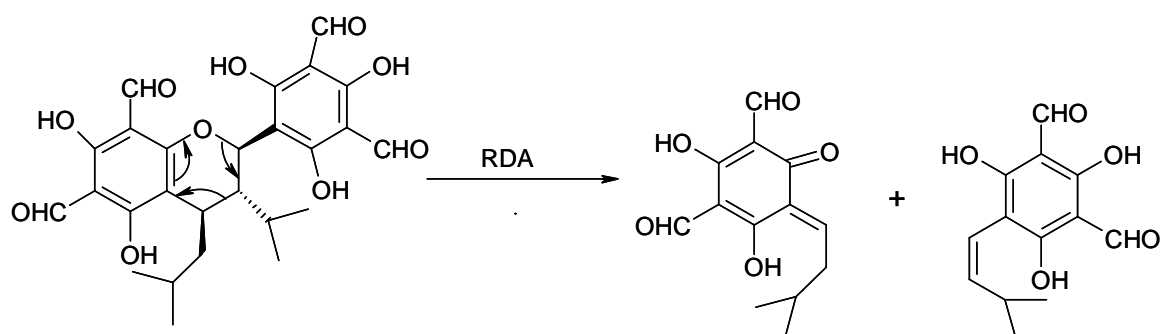


Schéma 3-1: Mécanisme de la fragmentation du sidéroxylyonal C

Tableau 3-7: Données spectrales RMN ^1H et ^{13}C de Es₅ et Es₆

	Es ₅ (CDCl ₃)		Es ₆ (Pyridine d-5)				
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
1		104.8		104.6	1'		102.8
2		169.9		105.2	2'		167.8
3		103.6		174.5	3'		104.1
4		168.5		104.6	4'		171.1
5		104.7		176.5	5'		103.6
6		164.9		103.0	6'		168.5
7	3.73, s	14.7	2.94, ddd, (2.5; 6.5, 7.8)	26.4	7'	5.86, d, (11.0)	77.2
8	10.16, s	193.3	10.54, s	192.8	8'	10.40, s	191.9
9		207.4	10.48, s	193.1	9'	10.12, s	191.7
10	3.01, d, (6.7)	52.2	2.36, m	53.3	10'	3.20, ddd, (2.5, 2.5, 11.0)	53.5
11	2.27, m	25.2	2.34, m	25.7	11'	2.20, m	28.9
12	1.00, d, (6.7)	22.7	1.00, d, (6.6)	23.1	12'	0.98, d, (6.6)	20.4
13	1.00, d, (6.7)	22.7	0.93, d, (6.6)	23.1	13'	0.87, d, (6.6)	16.4
HO-C ₂	17.6, s						
HO-C ₄	14.5, s						
HO-C ₆	9.79, s						

Les mesures de Es₅ et Es₆ ont été effectuées dans le CDCl₃ et la pyridine-d₅ à 500 et 125 MHz respectivement pour la RMN ^1H et ^{13}C .

III-4: Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent l'une des plus importante classe de métabolites secondaires retrouvés dans les plantes. On distingue deux catégories de flavonoïdes: La première catégorie avec le cycle C insaturé (flavonols, flavones et anthocyanines), et la seconde catégorie a le cycle C saturé (flavanes et flavanones)⁵³. Au cours de nos investigations nous avons identifié par LC-DAD-ESI/MS 16 flavonols dans l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *S. aromaticum* (tableau 3-8), ainsi qu'un dérivé d'acide gallique à 10.2 minutes.

Tableau 3-8: Récapitulatif des flavonols détectés dans l'extrait à l'AcOEt de *S. aromaticum*

Retention time (min)	Composés	HPLC-DAD λ_{\max} nm	[M + H] ⁺	MS ⁿ
19.7	Myricétine-3-O-(6''-galloyl)-galactopyranoside	262, 355	633	319.1, 301.1, 273.1, 226.8, 179.3, 166.1
21.2	Myricétine-3-O-glucuronic acide	265, 352	495	319.0, 301.0, 273.0, 179.1, 166.1
21.8	Myricétine-3-O-glucopyranoside	264, 364	481	319.1, 301.0, 273.3, 179.3, 166.1
24.8	Quercétine-3-O-(6''-galloyl)-galactopyranoside	262, 352	617	465.0, 303.1, 257.0, 147.3
26.0	Myricétine-3-O-arabinopyranoside	260, 353	451	319.0, 301.1, 273.0, 166.1
26.3	Myricétine-3-O-rhamnopyranoside	262, 350	465	319.0, 301.0, 273.2, 179.2, 166.1
27.1	Myricétine-3-O-diglycoside	258, 351	597	319.0, 301.1, 273.0, 166.1
27.7	Quercétine-3-O-glucopyranoside	258, 264sh, 352	465	303.1, 257.4, 229.1, 166.1, 147.3
28.9	Kaempférol-3-O-(6''-galloyl)-glucopyranoside	260, 348	601	287.0, 241.0
32.0	Kaempférol-3-O-glucopyranoside	264, 344	449	287.1, 241.0
33.7	Quercétine-3-O-rhamnopyranoside	257, 263sh, 348	449	303.1, 257.1, 166.1
34.2	Quercétine-3-O-diglycoside	256, 349	581	449.0, 303.1, 257.1
39.6	Kaempférol-3-O-diglycoside	256, 345	565	433.0, 287.3, 241.0
40.6	Kaempférol-3-O-rhamnopyranoside	264, 344	433	287.1, 241.0
44.6	Myricétine	256, 366	319	301.1, 273.2, 179.2, 166.3
49.1	Quercétine	254, 362	303	257.4, 247, 147.3

Dans le but de confirmer les résultats obtenus et de tester les molécules pures, 10 des 16 composés détectés ont été isolés et identifiés.

Dans la fragmentation de ces flavonols (myricétine, quercétine et kaempférol) en mode positif on observe les ions correspondant à $[M+H-H_2O-CO]^+$, $[M+H-2xCO]^+$, $^{1,3}A^+$ et $^{0,2}B^+$. Pour

essayer d'expliquer cette fragmentation, nous avons supposé que l'ionisation se faisait sur la double liaison en position 2, 3 de la flavonole¹²² (Schéma 3-2 et 3-3).

La fragmentation au niveau du cycle C des flavonols suit le processus ci-dessous.

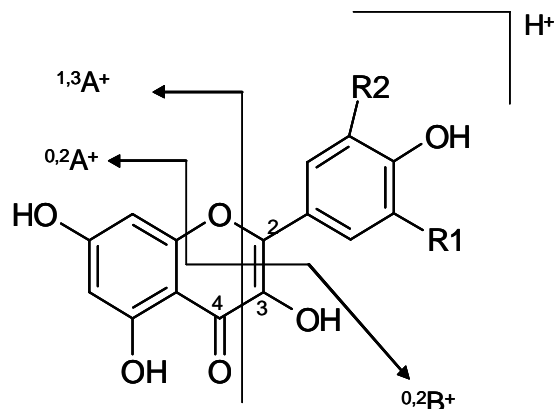
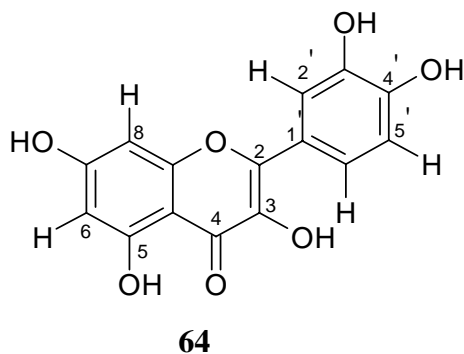


Schéma 3-2: Fragmentation des flavonols selon Ma¹²³

III-4-1: Identification de la quercétine (Sa₇)



La quercétine en LC-MSⁿ a un temps de rétention de 49.1 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif (figure 3-62) montre l'ion moléculaire m/z 303 [M+H]⁺ et la MS² donne plusieurs fragments parmi lesquels m/z 247 [M+H-2xCO]⁺.

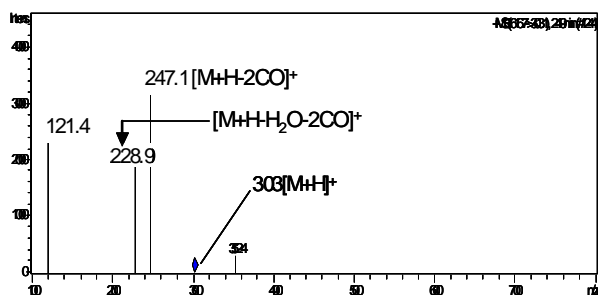


Figure 3-62: Spectre de masse Sa₇

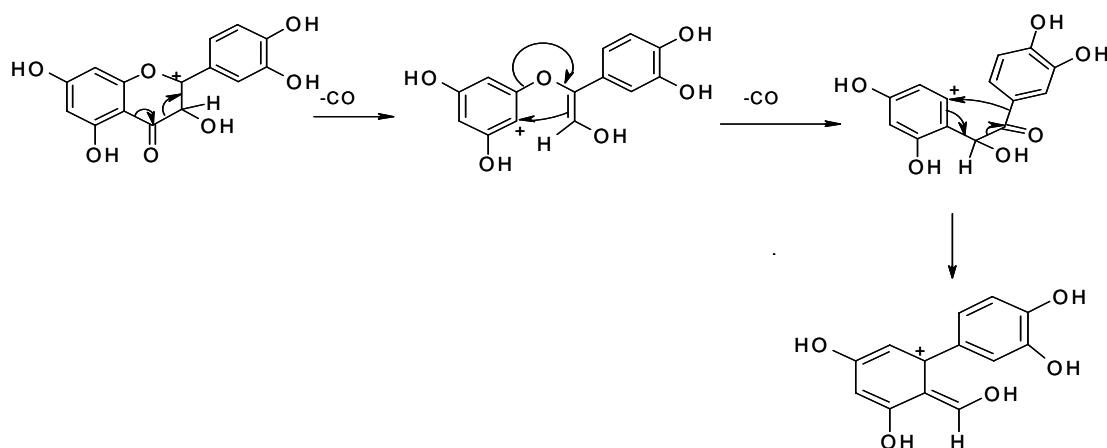


Schéma 3-3: Proposition du mécanisme de la perte successive de deux molécules de CO par la quercétine en ESI mode positif

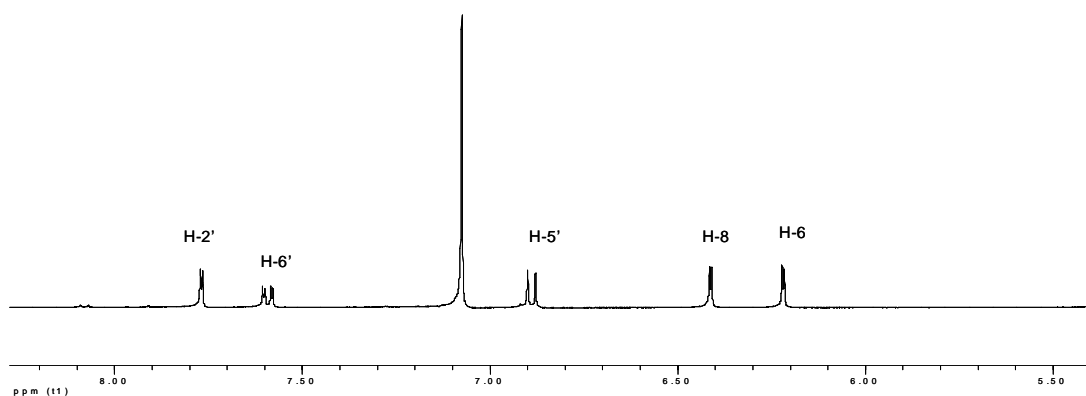
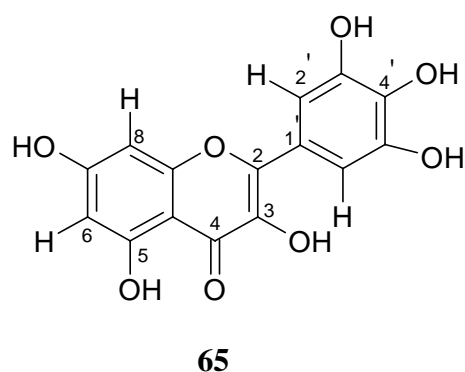


Figure 3-63: Spectre de RMN ^1H de Sa_7

Le spectre RMN ^1H de Sa_7 (figure 3-63) montre les signaux de résonance δ_{H} 6.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.59 (1H, dd, $J=2.2$ et 8.5 Hz) et 7.76 (1H, d, $J=2.2$ Hz) qui sont caractéristiques du noyau B 3,4-dihydroxyl substitué de la quercétine¹²⁴.

III-4-2: Identification de la myricétine (Sa_{11})



La myricétine en LC-MSⁿ a un temps de rétention de 44.6 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif (figure 3-64) montre l'ion moléculaire m/z 319 [M+H]⁺ et la MS² nous donne plusieurs fragments parmi lesquels m/z 301 [M+H-H₂O]⁺ et m/z 273 [M+H-H₂O-CO]⁺.

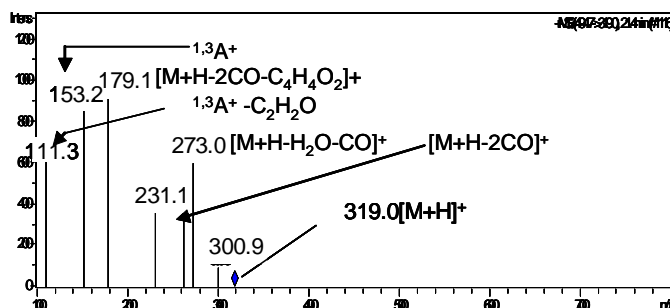


Figure 3-64: Spectre de masse de Sa₁₁

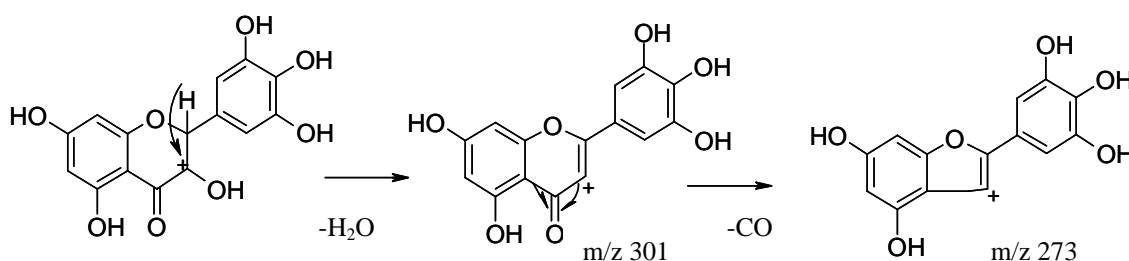


Schéma 3-4: Proposition de la déshydratation suivie de la perte du CO par Sa₁₁ en ESI mode positif.

La formation de l'ion m/z 153 dans le cas de la myricétine peut être due à la fragmentation $^{1,3}A^+$ (schéma 3-6) ou $^{0,2}B^+$ (schéma 3.5). Il est difficile de les distinguer quand la collision se passe à basse énergie car dans ces conditions ils apparaissent avec une forte intensité¹²³.

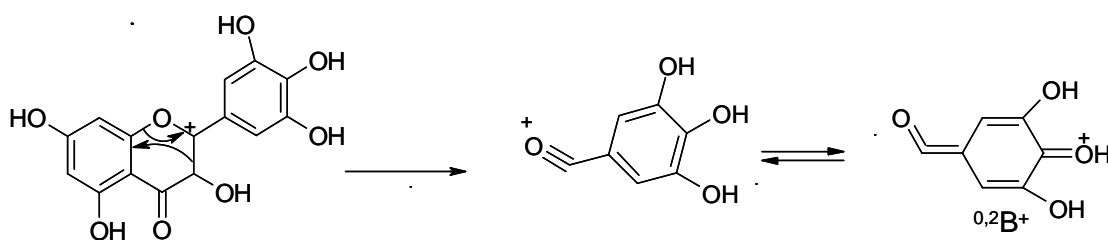


Schéma 3-5: Formation de l'ion $^{0,2}B^+$

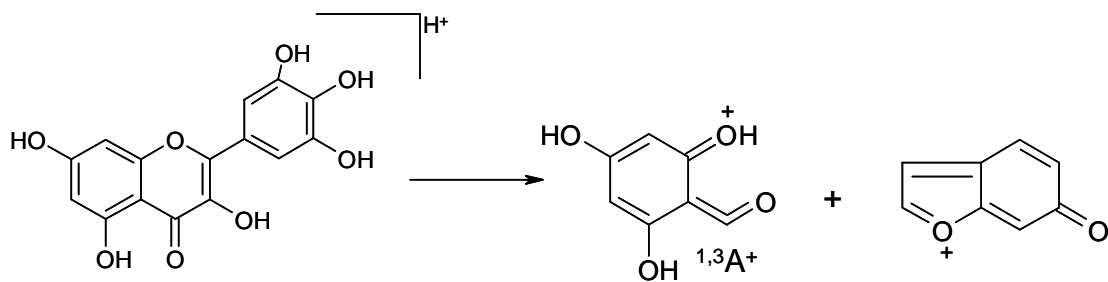


Schéma 3-6: Formation de l'ion $^{1,3}A^+$

Le spectre RMN 1H (figure 3-65) montre deux protons H-2'/H-6' de résonance δ_H 7.37 (s, 2H) et des protons H-6 et H-8 de résonance δ_H 6.18 et 6.38 respectivement avec des constantes de couplage de 2.1 Hz chacun indiquant des couplages méta. Ces données sont caractéristiques de la myricétine¹²⁴.

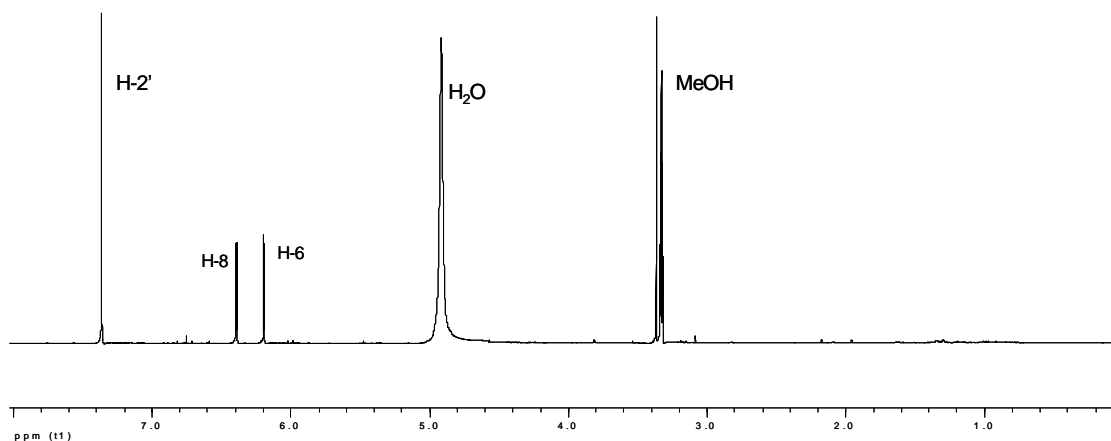
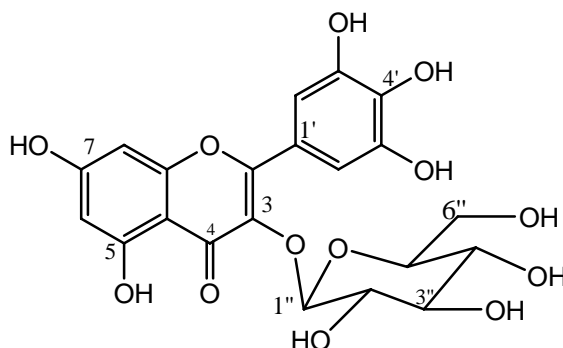


Figure 3-65: Spectre RMN 1H de S₁₁

III-4-3: Identification de la myricétine-3-O- β -glucopyranoside (Sa₁₀)



Le composé Sa₁₀ en LC-MSⁿ a un temps de rétention de 21.8 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif montre l'ion moléculaire m/z 481 [M+H]⁺ et la MS² nous donne le fragment m/z 319 [M+H-162]⁺, correspondant à la perte d'un hexose (figure 3-66). Les spectres UV sont superposables à ceux de la myricétine.

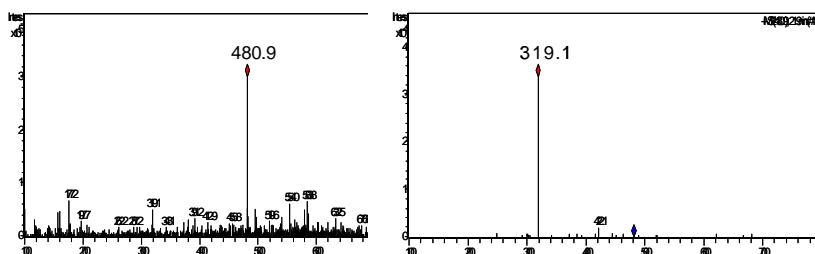


Figure 3-66: Spectre de masse de Sa₁₀

Le spectre RMN ¹H (figure 3-67) montre les signaux de deux protons H-2'/H-6' de résonance δ_H 7.37 (s, 2H) et des protons H-6 et H-8 de résonance δ_H 6.18 et 6.38 respectivement avec des constantes de couplage de 2.1 Hz chacun indiquant des couplages méta. Ces données sont caractéristiques de la myricétine. Nous y distinguons le doublet du proton anomère à δ_H 5.38 avec une constante de couplage J= 7.8 Hz indiquant la configuration β du sucre. Les protons des méthines du glucose sont dans l'intervalle 3-4 ppm. L'hydrolyse acide a permis d'identifier par CCM le glucose d'une part et la myricétine d'autre part (structure **66**). Sa₁₀ est identifié comme étant la myricétine-3-O-β-glucoyranoside^{125,126}

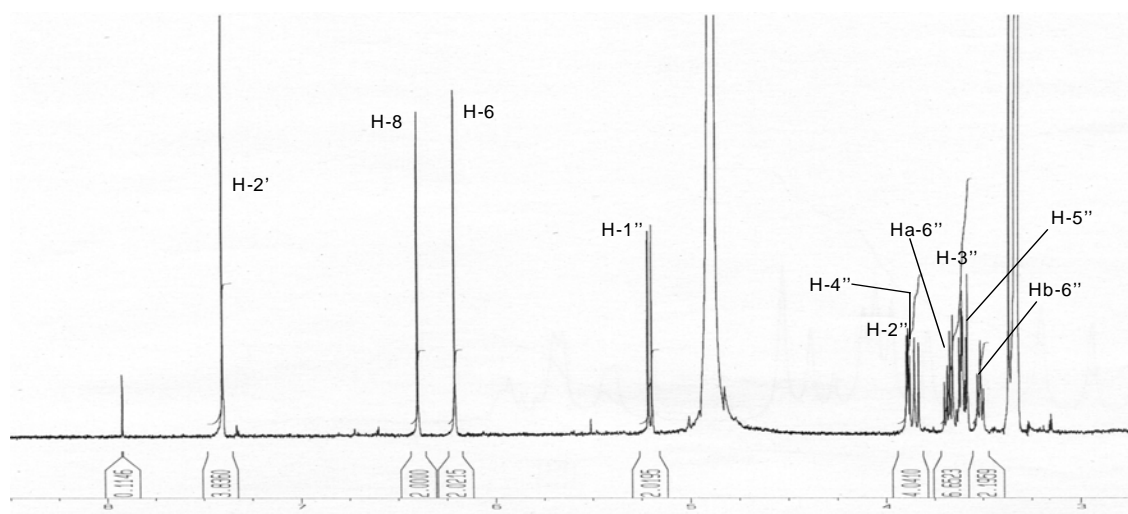
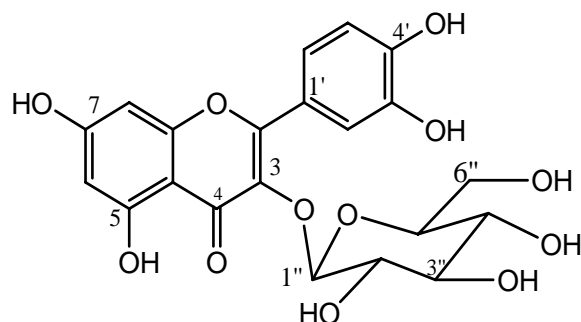


Figure 3-67: Spectre RMN ¹H de Sa₁₀

III-4-4: Identification de la quercétine-3-O-β-glucopyranoside (Sa₉)



67

Le composé Sa₉ en LC-MSⁿ a un temps de rétention de 27.7 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif montre l'ion moléculaire à m/z 465 $[M+H]^+$ et la MS² nous donne le fragment à m/z 303 $[M+H-162]^+$, ce qui correspond à la perte d'un hexose (figure 3-68).

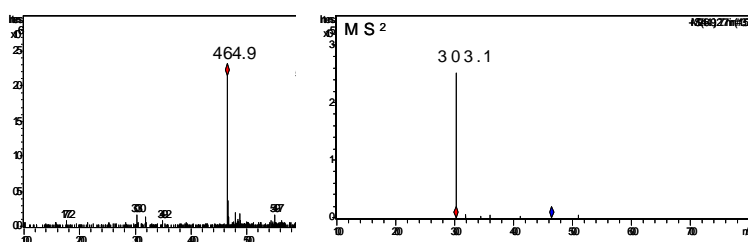


Figure 3-68: Spectres de masse de Sa₉

Le spectre RMN ¹H (figure 3-69) montre les signaux de résonance δ_H 6.88 (1H, d, J= 8.5 Hz), 7.59 (1H, dd, J = 2.2 et 8.5 Hz) et 7.76 (1H, d, J = 2.2 Hz) qui sont caractéristiques du noyau B 3, 4-dihydroxyl substitué de la quercétine. Nous observons le doublet du proton anomère à δ_H 5.38 avec une constante de couplage J= 7.7 Hz indiquant la configuration β du sucre. Les protons des méthines de l'hexose sont dans l'intervalle 3-4 ppm. Le signal de résonance δ_H 12.64 est celui du proton chélaté de l'hydroxyle en C-5. L'hydrolyse acide nous permet d'identifier d'une part l'hexose comme étant le glucose et d'autre part la quercétine comme l'aglycone par CCM comparative. Sa₉ est donc identifié comme étant la quercétine-3-O- β -glucopyranoside¹²⁵ (structure 67).

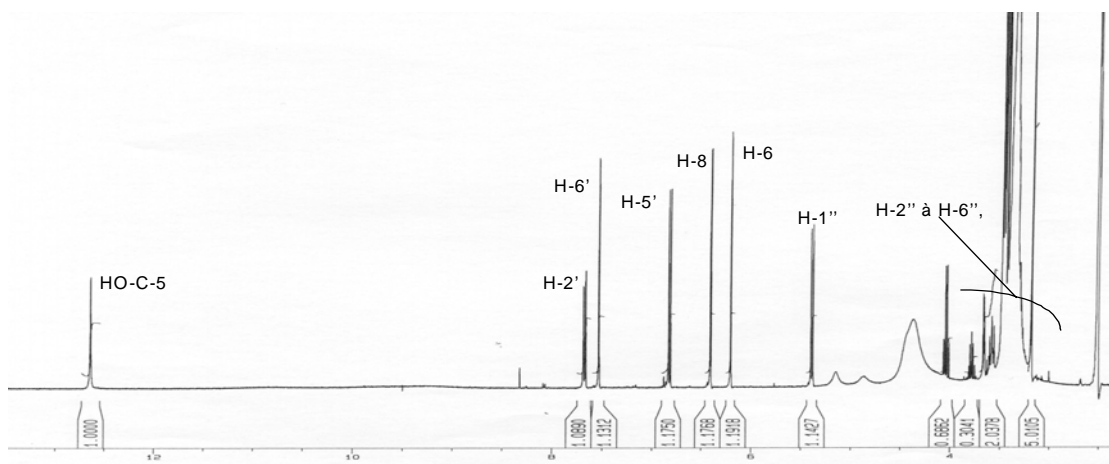
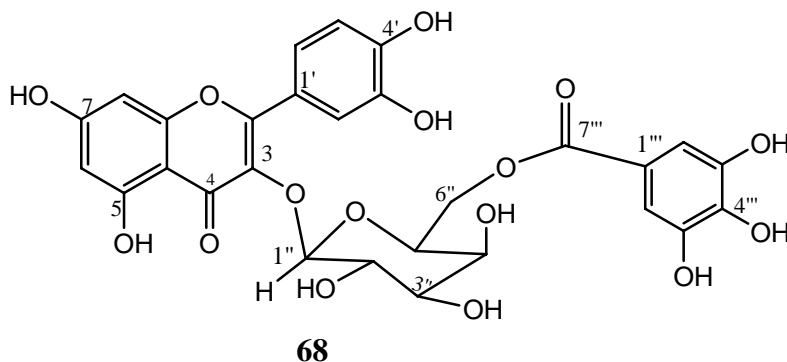


Figure 3-69: Spectre RMN ^1H de Sa_9

III-4-5: Identification de la quercétine 3-*O*-(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (Sa_{42})



Le composé Sa_{42} est détecté en LC- MS^n à un temps de rétention de 24.8 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif montre l'ion moléculaire m/z 617 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et la MS^2 donne les fragments m/z 465 $[\text{M}+\text{H}-152]^+$ qui correspond à la perte d'un groupe galloyl, et m/z 303 $[\text{M}+\text{H}-152-162]^+$ correspondant à la perte d'un hexose (figure 3-70).

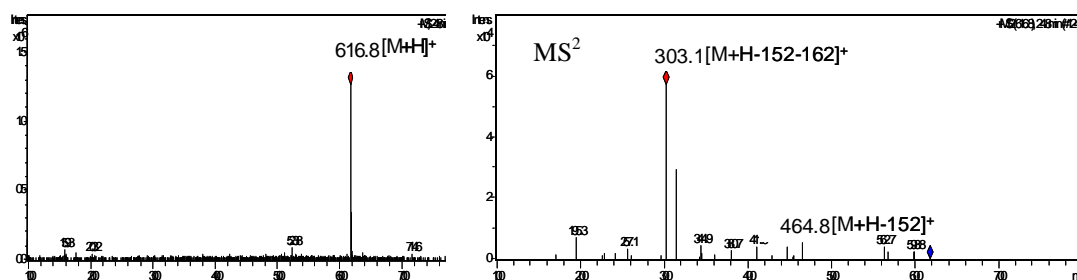


Figure 3-70: Spectres de masse de Sa_{42}

L'hydrolyse acide nous permet d'identifier le sucre comme étant le galactose par CCM comparative. Le spectre RMN ^1H (figure 3-71) montre en plus des signaux de la quercétine, la présence du proton H-2'''/H-6''' de résonance δ_{H} 6.92 qui indique la présence du groupe gallol. Le signal de résonance δ_{H} 5.21 sous forme de doublet avec une constante de couplage $J=7.6$ Hz indique que le sucre a une configuration β . Le déblindage des protons Ha-6'' et Hb-6'' nous indique que le galactose est substitué en cette position (C-6''). Ces informations nous permettent d'identifier Sa₄₁ comme étant la quercétine 3-O-(6''-galloyl)- β -galactopyranoside^{127;128} (structure **68**).

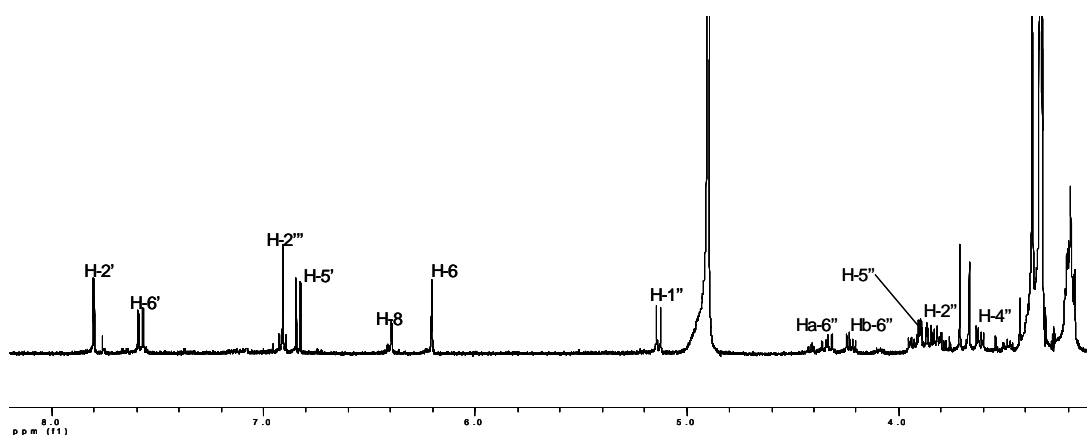
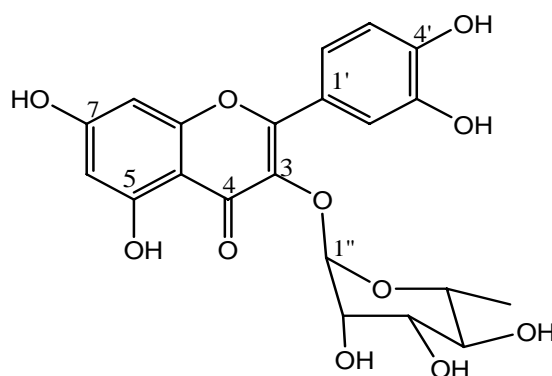


Figure 3-71: Spectre RMN ^1H de Sa₄₂

III-4-6: Identification de la quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (Sa₈)



69

Le composé Sa₈ est détecté en LC-MSⁿ à un temps de rétention de 33.7 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif montre l'ion moléculaire m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et la MS² nous donne le fragment m/z 303 $[\text{M}+\text{H}-146]^+$ qui correspond à la perte d'un rhamnose (figure 3-72).

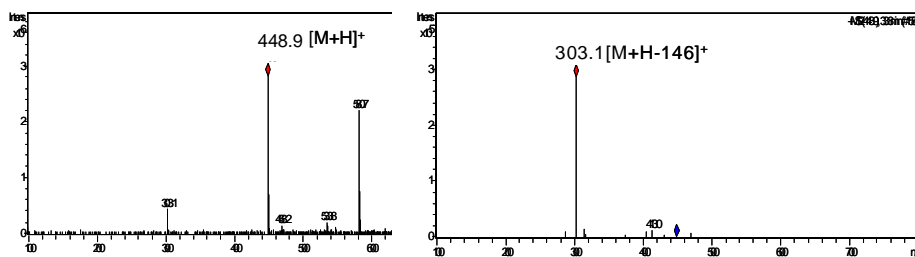


Figure 3-72: Spectres de masse de Sa₈

Le spectre de RMN ¹H (figure 3-73) montre en plus des signaux de la quercétine un doublet à δ_H 5.36 avec une constante de couplage J=1.6 Hz indiquant la configuration α du rhamnose¹²⁹.

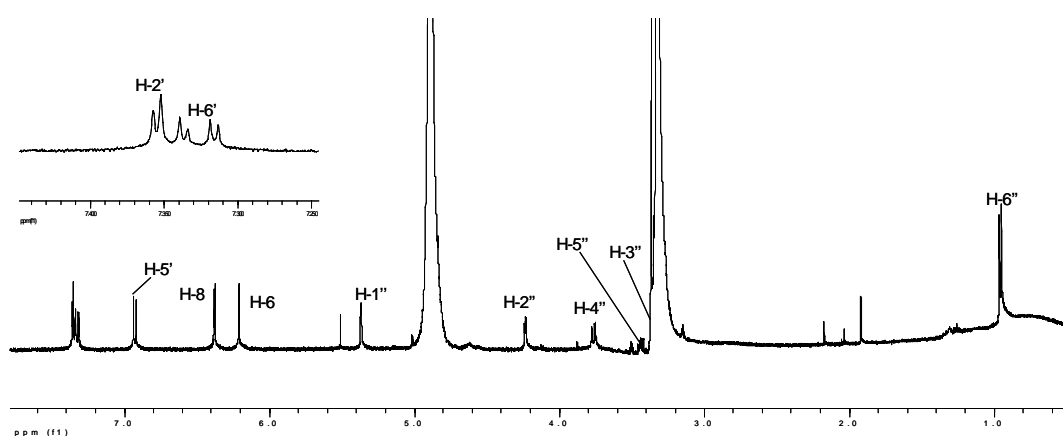
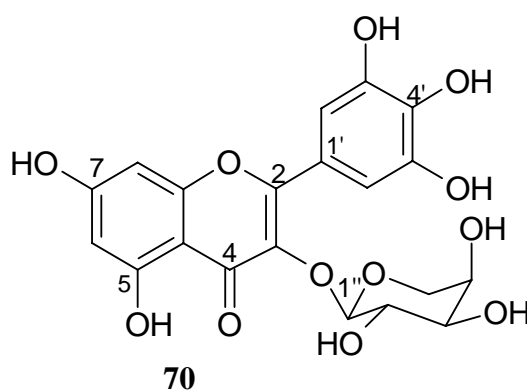


Figure 3-73: Spectre RMN ¹H de Sa₈

III-4-7: Identification de la myricétine 3-O-α-arabinopyranoside (Sa₁₂)



Le composé Sa₁₂ est détecté en LC-MSⁿ à un temps de rétention de 26.0 minutes. Le spectre de masse en ESI mode positif montre l'ion moléculaire m/z 451 [M+H]⁺ et la MS² donne le fragment m/z 319 [M+H-132]⁺ correspondant à la perte d'un pentose (figure 3-74).

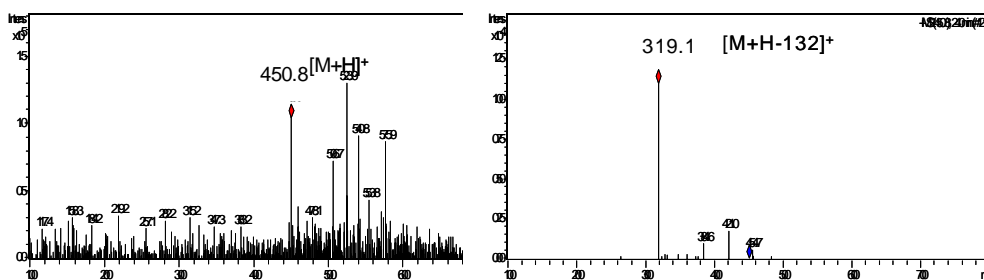


Figure 3-74: spectres de masse de Sa₁₂

L'hydrolyse acide permet d'identifier l'arabinose d'une part et le myricétine d'autre part par CCM comparative. Le spectre de RMN ¹H (figure 3-75) donne en plus des signaux de la myricétine, le doublet du proton anomère à δ_H 5.20 avec une constante de couplage de 7.0 Hz indique la configuration α du sucre. Sa₁₂ est identifié comme étant la myricétine 3-O- α -arabinopyranoside^{130;131}.

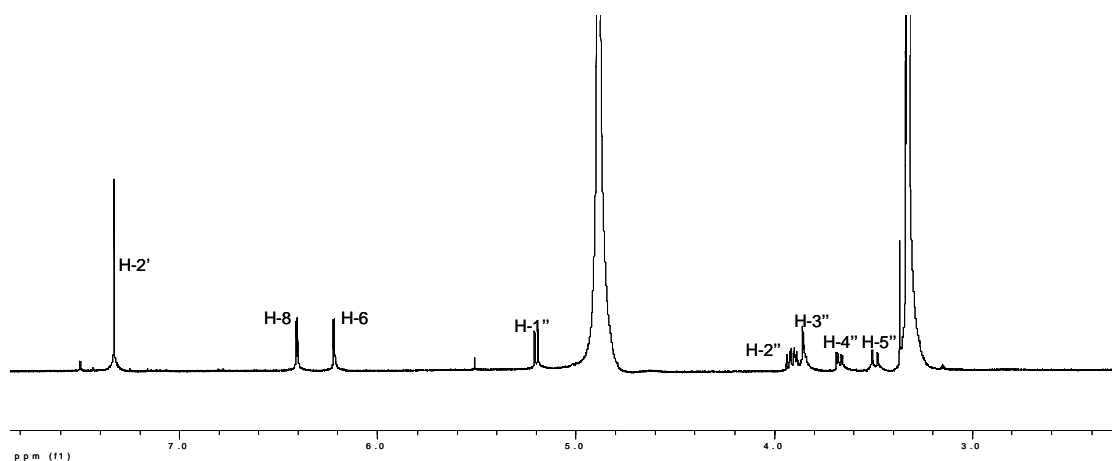
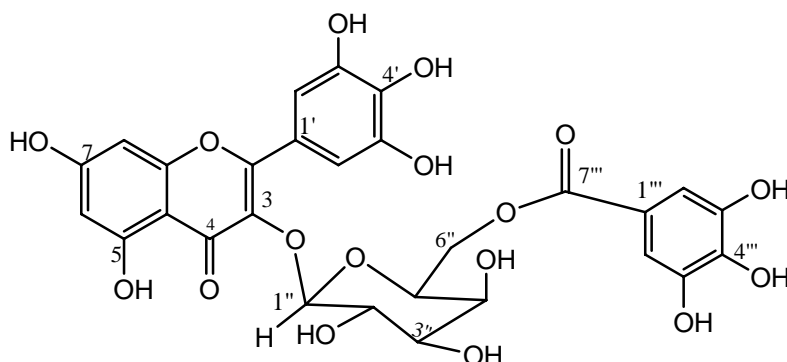


Figure 3-75: Spectre RMN ¹H de Sa₁₂

III-4-8: Identification de la myricétine 3-O-(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (Sa₄₁)



71

Sa₄₁ est isolé sous forme de poudre jaune des feuilles de *S. aromaticum*. Le spectre de masse donne le pic de l'ion moléculaire en ESI mode positif m/z 633 $[M+H]^+$. On observe lors de la fragmentation le pic m/z 481 $[M+H-152]^+$ correspondant à la perte d'un galloyl suivi d'un signal m/z 319 $[M+H-152-162]^+$ correspondant à la perte d'un hexose (figure 3-76). Le spectre IR montre les signaux du carbonyle de l'ester, des hydroxyles et du carbonyle α , β -insaturé à 1710, 3414 et 1640 cm^{-1} respectivement.

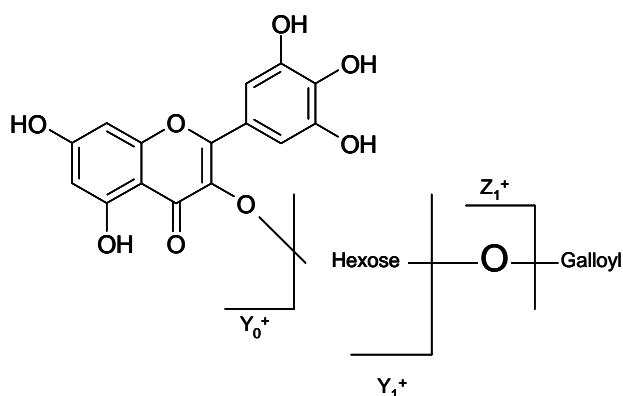
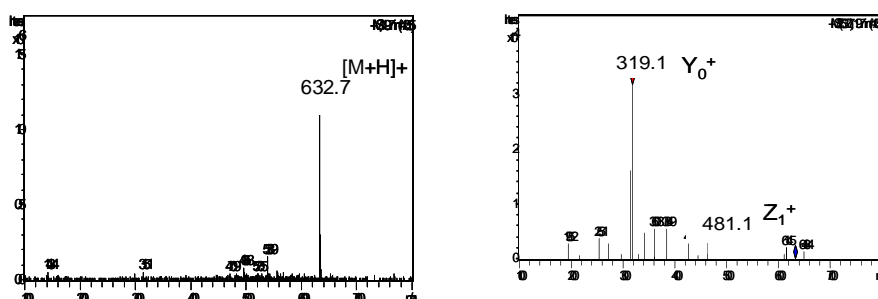


Figure 3-76: Spectres de masse et schéma de fragmentation de Sa₄₁

Le spectre UV de Sa₄₁ dans le méthanol (figure 3-77) montre des bandes avec des maxima à 266 et 352 nm suggérant que c'est une flavone ou un flavonol. On enregistre un déplacement bathochromique d'environ 80 nm de la bande I après l'addition de AlCl₃, cet effet bathochromique reste après l'ajout du HCl au AlCl₃ indiquant la présence d'un hydroxyle libre en position C-5. Le déplacement hypsochromique observé à la bande I après l'addition de AlCl₃+HCl par rapport à celle du AlCl₃ indique la présence de deux hydroxyles adjacents sur le cycle B. L'addition du NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II ce qui indique que l'hydroxyle en position 7 est libre, le même effet est observé sur la bande I ce qui indique que l'hydroxyle en position 4' est également libre. L'effet bathochromique observé après l'addition du NaOMe sans décroissance d'intensité confirme le fait que l'hydroxyle en 4' est libre (figure 3-77).

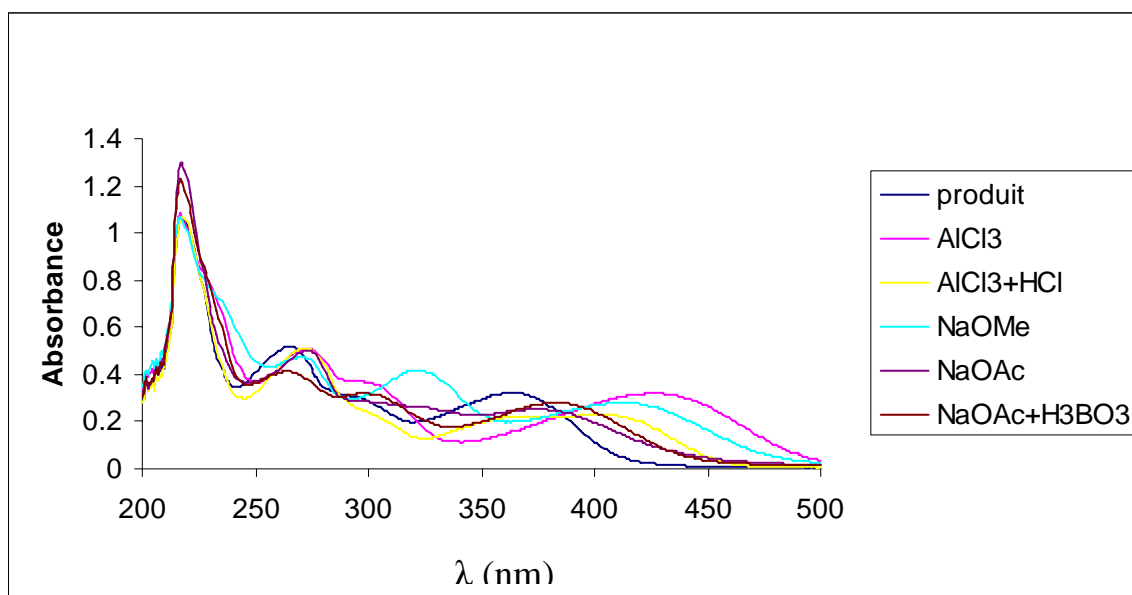


Figure 3-77: Spectres UV de Sa₄₂ en présence de quelques réactifs.

L'hydrolyse acide de Sa₄₂ permet d'identifier le galactose et le myricétine par CCM comparative avec des échantillons authentiques. Le spectre RMN ¹H (figure 3-78) permet d'identifier l'aglycone comme étant la myricétine à travers la présence des protons H-2'/H-6' de résonance δ_H 7.37 (s, 2H) et des protons H-6 et H-8 de résonances δ_H 6.18 et 6.38 respectivement avec des constantes de couplage de 2.1 Hz chacun indiquant des couplages méta. La présence des protons H-2''/H-6'' de résonance δ_H 6.92 indique la présence du gallol. Le signal de résonance δ_H 5.21 sous forme de doublet avec une constante de couplage $J=7.8$ Hz indique la configuration β du sucre.

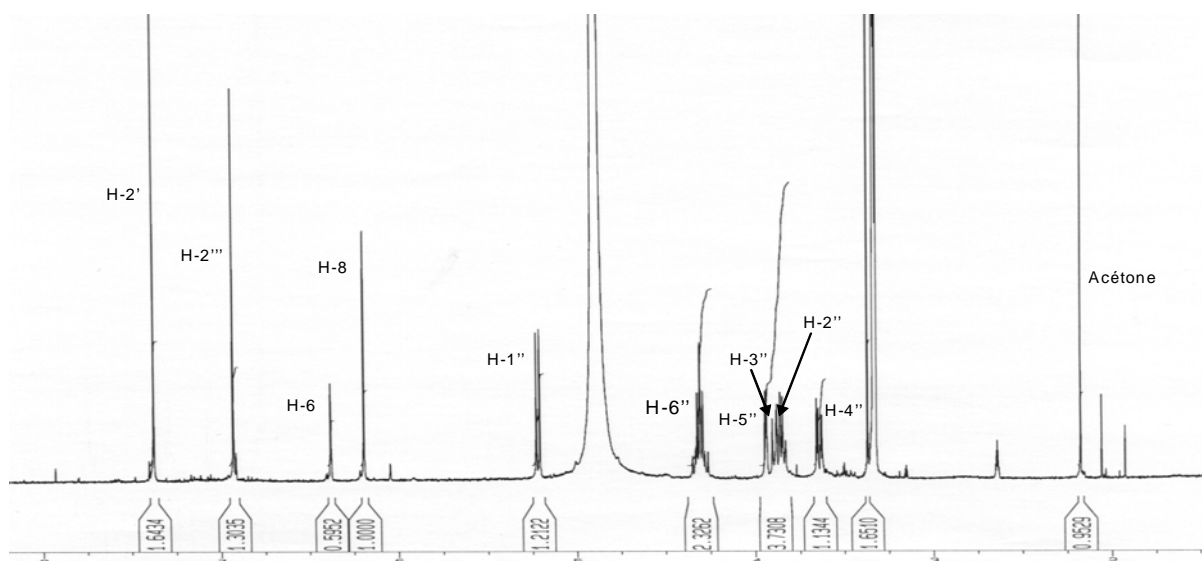


Figure 3-78: Spectre RMN ^1H de Sa_{41}

Le spectre de RMN ^{13}C (figure 3-79) nous permet de distinguer 24 atomes de carbone parmi lesquels ceux du galloyl et de la myricétine^{132;133}.

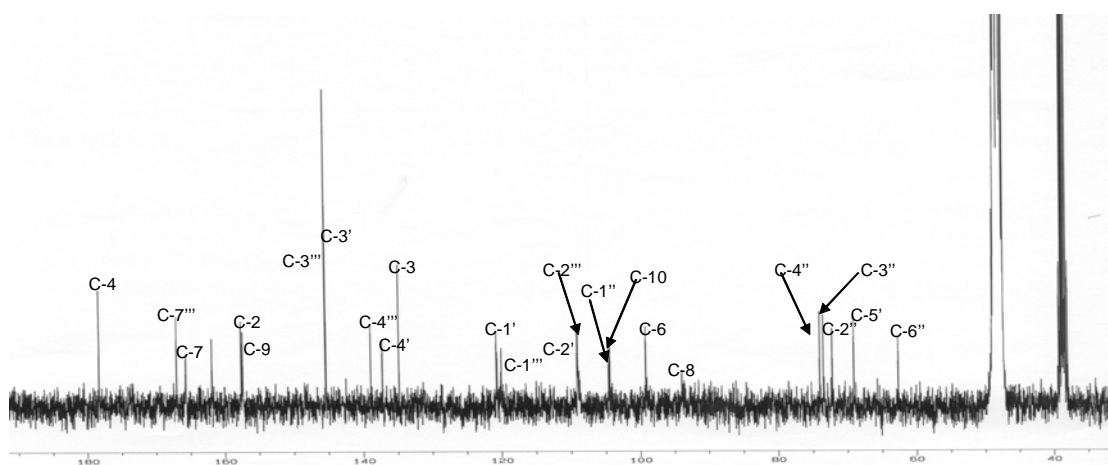


Figure 3-79: Spectre RMN ^{13}C de Sa_{41}

Le spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (COSY) nous permet de distinguer à travers les corrélations les protons appartenant au sucre (figure 3-80).

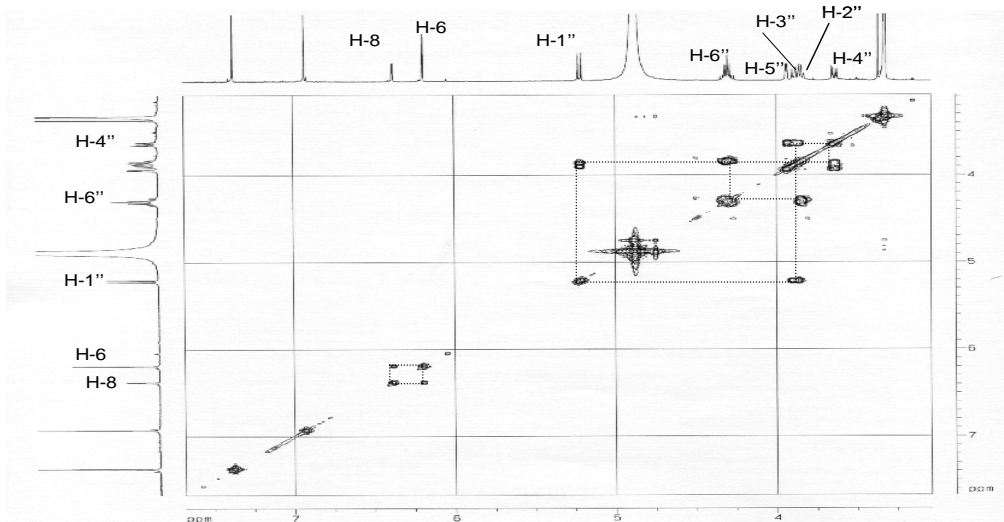


Figure 3-80: Spectre COSY de Sa₄₁

Le spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance ¹H-¹³C (HMBC) nous permet de déterminer la position du galloyl sur le galactose et celle du galactose sur la myricétine (figure 3-81).

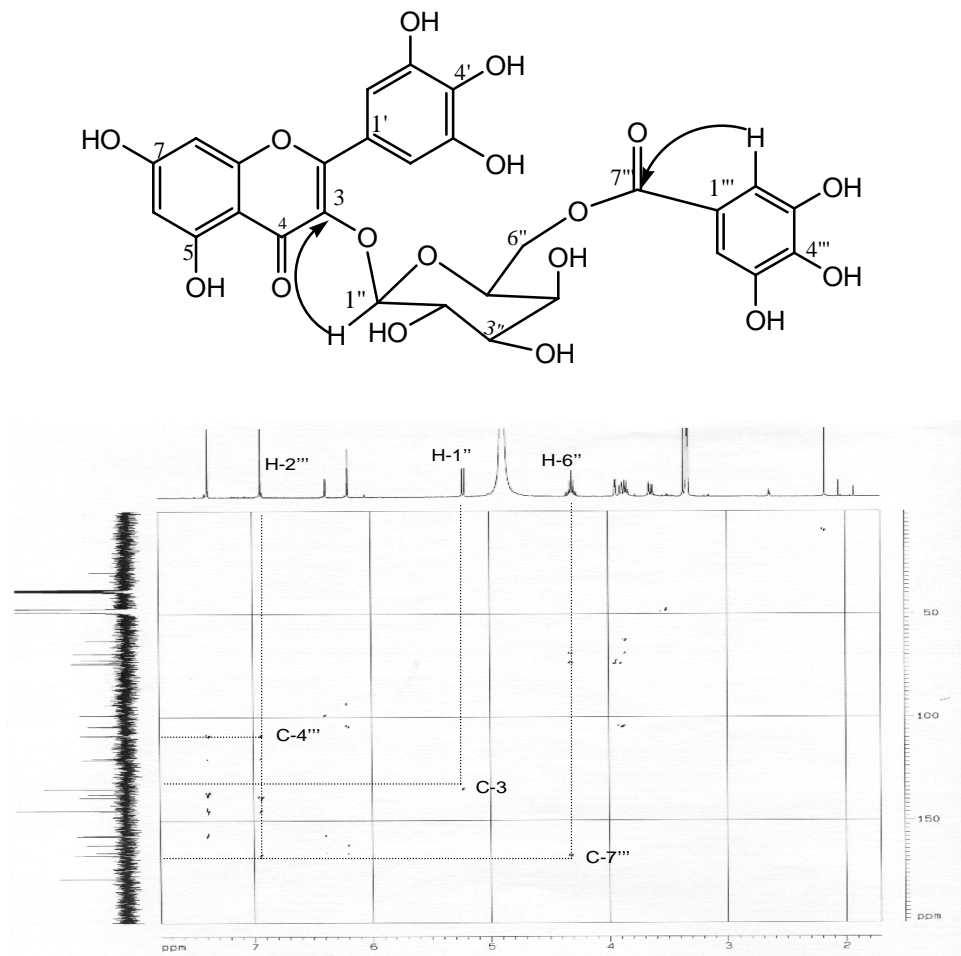
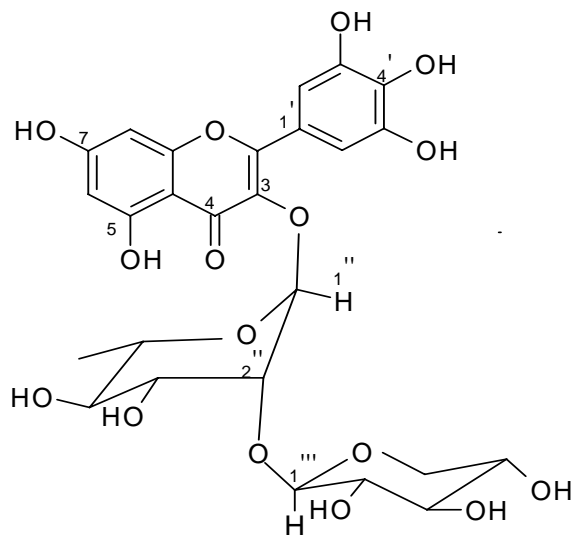


Figure3-81: Spectre HMBC de Sa₄₁

Toutes ces données nous permettent d'attribuer à cette molécule la structure **71** correspondant à la myricétine 3-O-(6''-galloyl)-β-galactopyranoside¹³⁴.

III-4-9: Identification de la myricétine-3-O-β-D-xylopyranosyl (1→2)-α- L-rhamnopyranoside (Sa₅₂)



72

Cette molécule a précédemment été isolée de *Eugenia jambos*¹³⁵ qui est aussi une plante de la famille des Myrtaceae.

Sa₅₂ est isolé sous forme de poudre blanche des feuilles de *S. aromaticum*. Le spectre de masse donne le pic de l'ion moléculaire en ESI mode positif à m/z 599 [M+H]⁺, Nous observons lors de la fragmentation le pic m/z 465 [M+H-132]⁺ correspondant à la perte d'un pentose suivi d'un pic m/z 319 [M+H-132-146]⁺ correspondant à la perte d'un hexose (figure 3-82). Le spectre IR montre les signaux des hydroxyles et du carbonyle α, β- insaturé à 3414 et 1640 cm⁻¹ respectivement. Le spectre UV de Sa₅₂ a les mêmes caractéristiques que celui de Sa₄₁.

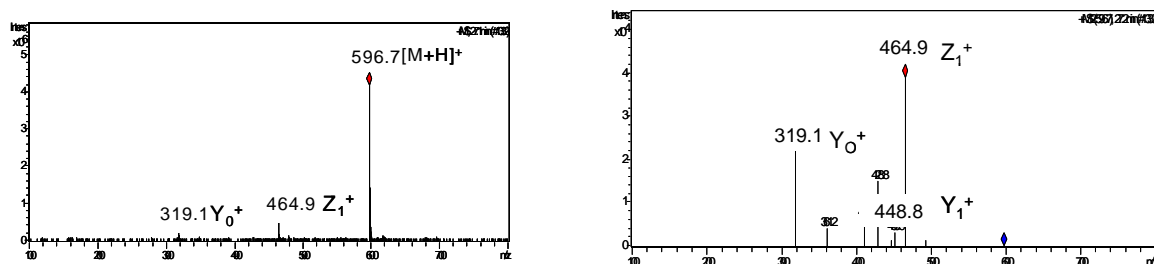
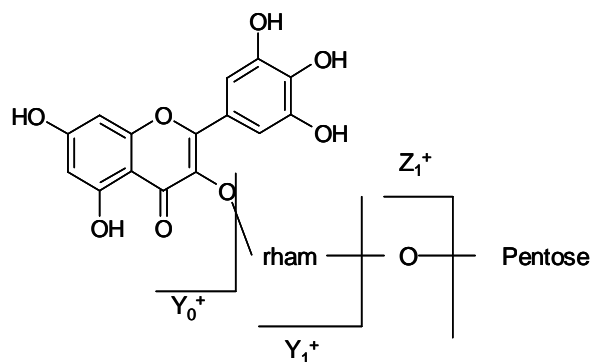


Figure 3-82: Spectres de masse de Sa₅₂



L'hydrolyse acide nous permet d'identifier le rhamnose et le xylose par CCM comparative. Le spectre RMN ^1H (figure 3-83) montre des similitudes avec celui de Sa₄₁ ce qui nous permet également de déduire la présence de la myricétine. Nous y observons des protons de résonance δ_{H} 5.29 et 4.24 sous forme de doublets ayant des constantes de couplage respectives de 1.4 et 7.6 Hz indiquant que les sucres ont une configuration α pour l'un et β pour l'autre.

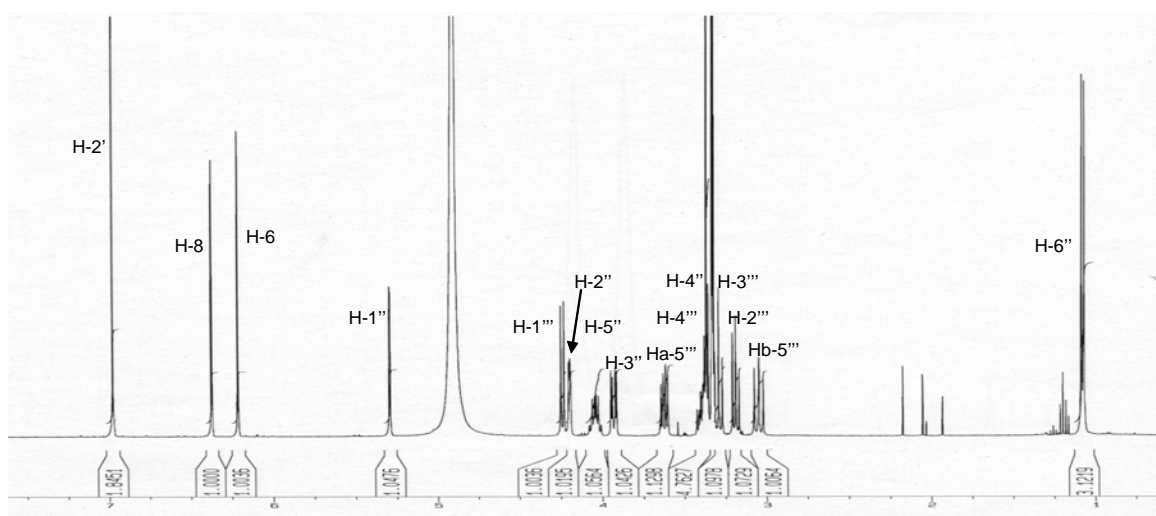


Figure 3-83: Spectre RMN ^1H de Sa₅₂

Le spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (COSY) nous permet de distinguer à travers les corrélations les protons appartenant à chaque sucre (figure 3-84). C'est ainsi que nous avons pu identifier les protons du rhamnose et du xylose.

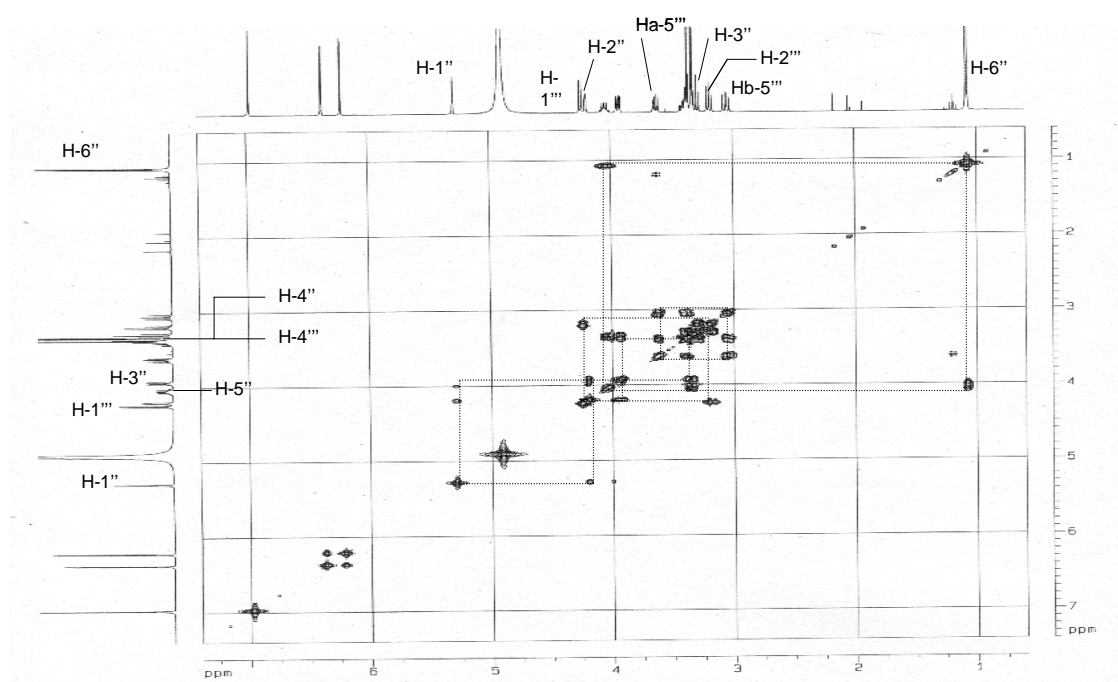


Figure 3-84: Spectre COSY de Sa₅₂

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-85) nous montre 24 carbones (Tableau 3-10) parmi lesquels on distingue ceux de la myricétine.

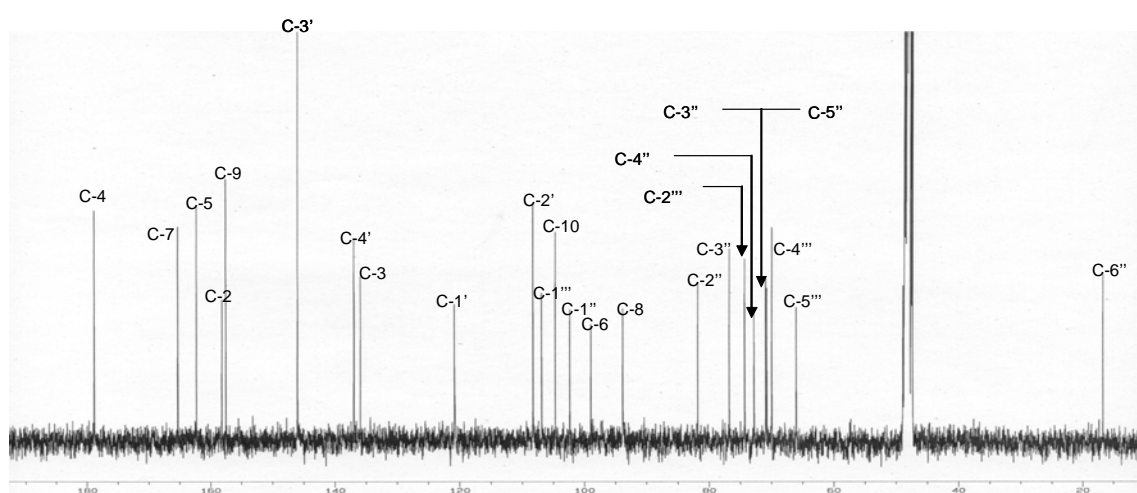


Figure 3-85: Spectre RMN ¹³C de Sa₅₂

Nous observons sur le spectre de corrélation hétéronucléaire ¹H-¹³C à longue distance (HMBC) la position du rhamnose sur l'aglycone et du pentose sur le rhamnose (figure 3-86).

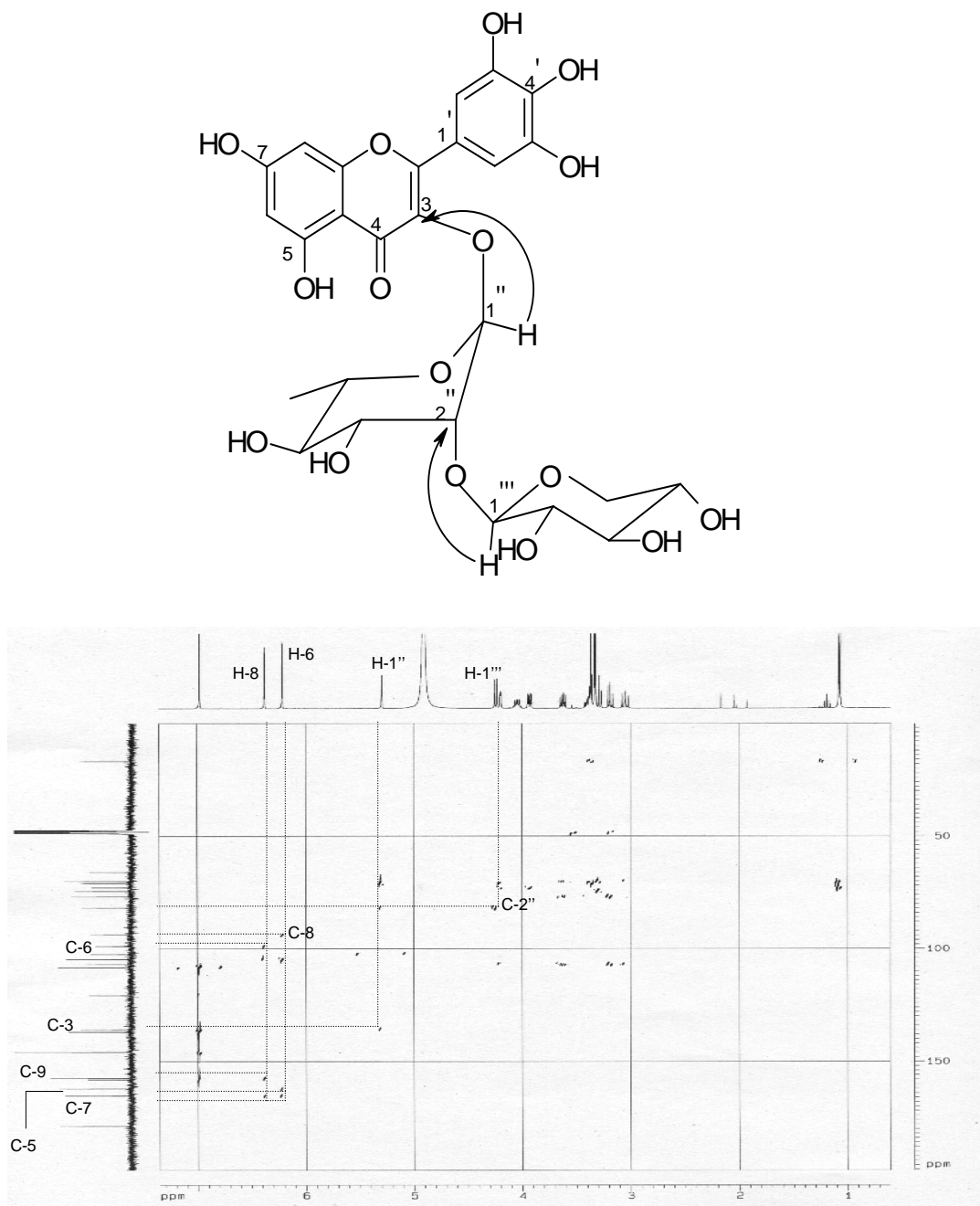
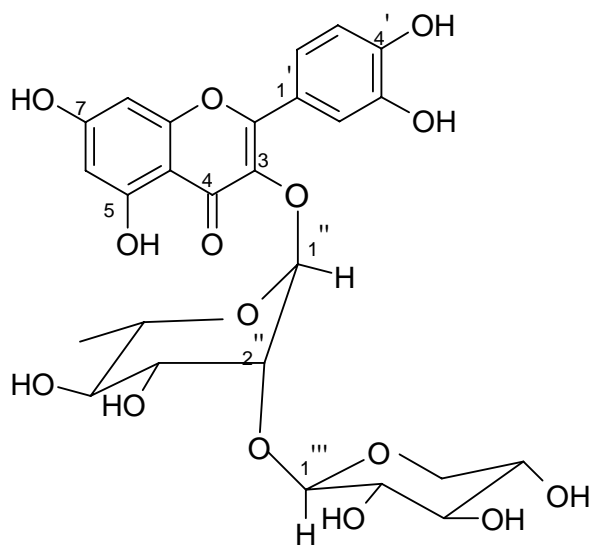


Figure 3-86: Spectre HMBC de Sa₅₂

Toutes ces données nous permettent d'attribuer à cette molécule la structure **72** correspondant à la myricétine-3-*O*-β- D-xylopyranosyl (1→2)-α- L-rhamnopyranoside¹³⁵.

III-4-10: Identification de la quercétine-3-O-β- D-xylopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranoside (Sa₅₁)



73

Sa₅₁ est isolé sous forme de poudre jaune des feuilles de *S. aromaticum*. Le spectre de masse donne le pic de l'ion moléculaire m/z 581 $[M+H]^+$, la MS^2 donne les fragments m/z 449 $[M+H-132]^+$ correspondant à la perte d'un pentose et m/z 303 $[M+H-132-146]^+$ correspondant à la perte d'un hexose (figure 3-87). Le spectre IR montre les signaux des hydroxyles et du carbonyle α, β -insaturé à 3410 et 1640 cm^{-1} respectivement.

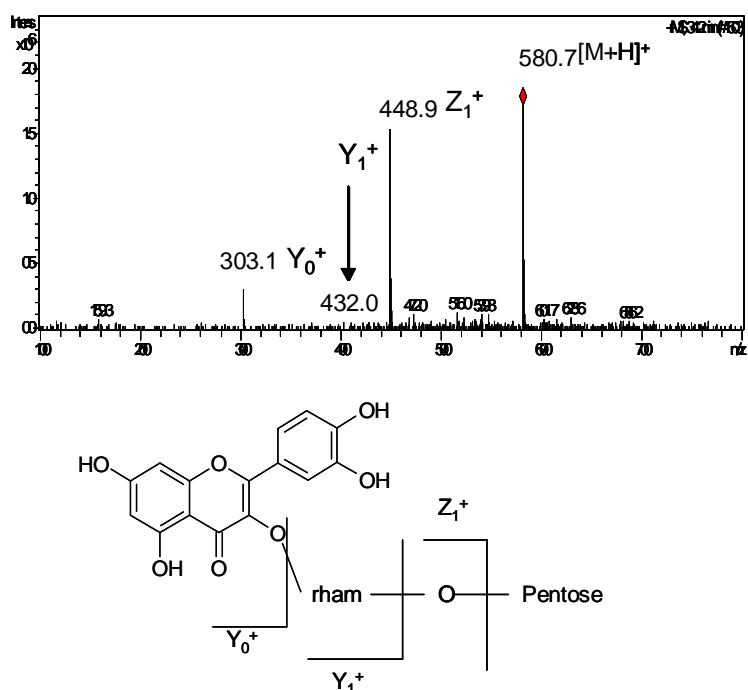


Figure 3-87: Spectre de masse et schéma de fragmentation de Sa₅₁.

Le spectre UV de Sa₅₁ dans le méthanol (figure 3-88) montre des maxima d'absorptions à 256 et 349 nm indiquant la présence d'une flavone ou d'un flavonol (figure 3-88). La bande I à 349 nm indique que le cycle B est dioxygéné. L'addition du NaOMe provoque un déplacement bathochromique de cette bande sans décroissance d'intensité indiquant ainsi la présence d'un hydroxyle libre en 4' de la molécule. L'addition de NaOAc provoque un effet bathochromique de la bande II ce qui permet de déduire que l'hydroxyle en position 7 est libre, ce même effet est simultanément observé sur la bande I confirmant le fait que l'hydroxyle en position 4' est libre. On enregistre également un déplacement bathochromique d'environ 80 nm de la bande I après l'addition de AlCl₃ et cet effet bathochromique reste après l'ajout du HCl au AlCl₃ ce qui indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5 et l'absence d'un hydroxyle libre en C-3. Le déplacement hypsochromique de la bande I de 30 nm après l'addition du AlCl₃+HCl par rapport celle du AlCl₃ indique la présence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B (figure 3-88).

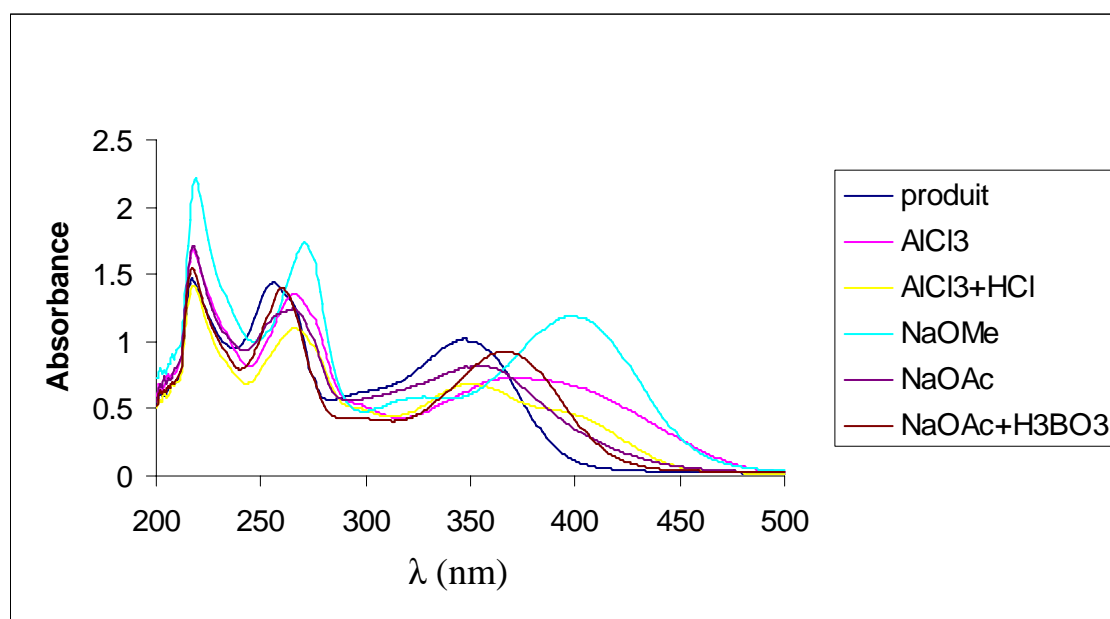


Figure 3-88: Spectres UV de Sa₅₁ en présence de quelques réactifs

Le spectre RMN ¹H (figure 3-89) nous suggère la présence de la quercétine comme aglycone. Les signaux de résonance δ_H 6.96 (1H, d, J= 8.3 Hz), 7.32 (1H, dd, J= 1.9 et 8.3 Hz) et 7.39 (1H, d, J=1.9Hz) sont caractéristiques du noyau B 3,4-dihydroxy substitué de la quercétine. L'hydrolyse acide permet d'identifier d'une part le xylose et le rhamnose et d'autre part la quercétine par CCM comparative avec des échantillons authentiques. Les déplacements chimiques des protons osidiques sont similaires à ceux de Sa₅₁.

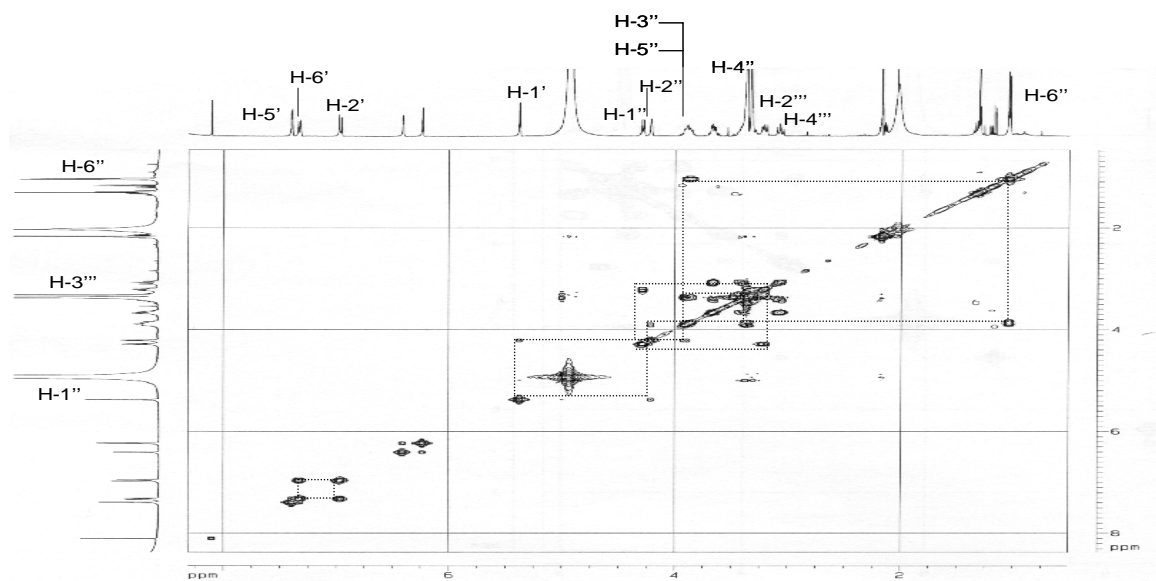
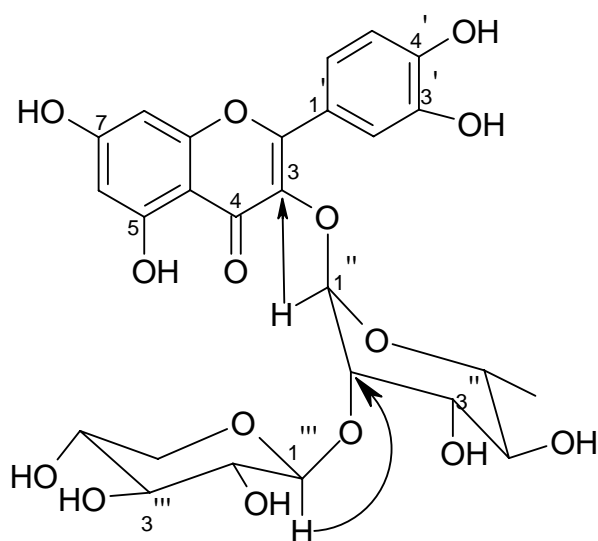


Figure 3-91: Spectre COSY de Sa₅₁

Sur le spectre de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance (HMBC) nous observons une corrélation entre le proton à δ_{H} 5.37 (H-1'') et le carbone à δ_{C} 135.8 (C-3) indiquant que le sucre est lié à la quercétine en position C-3. Le proton à δ_{H} 4.28 (d, H-1''', $J=7.4\text{Hz}$) possède une corrélation avec le carbone à δ_{C} 81.7 (C-2'') indiquant que le second sucre est lié au rhamnose à cette position (figure 3-92).



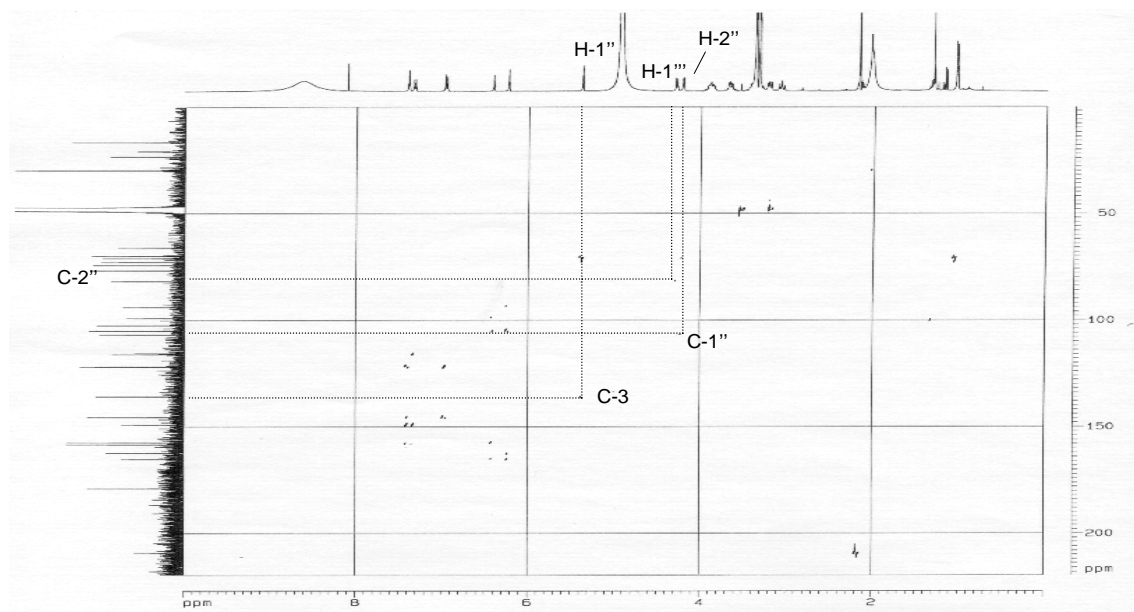


Figure 3-92: Spectre HMBC de Sa₅₁

Toutes ces données nous permettent d'attribuer à cette molécule la structure **73** correspondant à la quercétine-3-*O*-β- D-xylopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranoside¹³⁵.

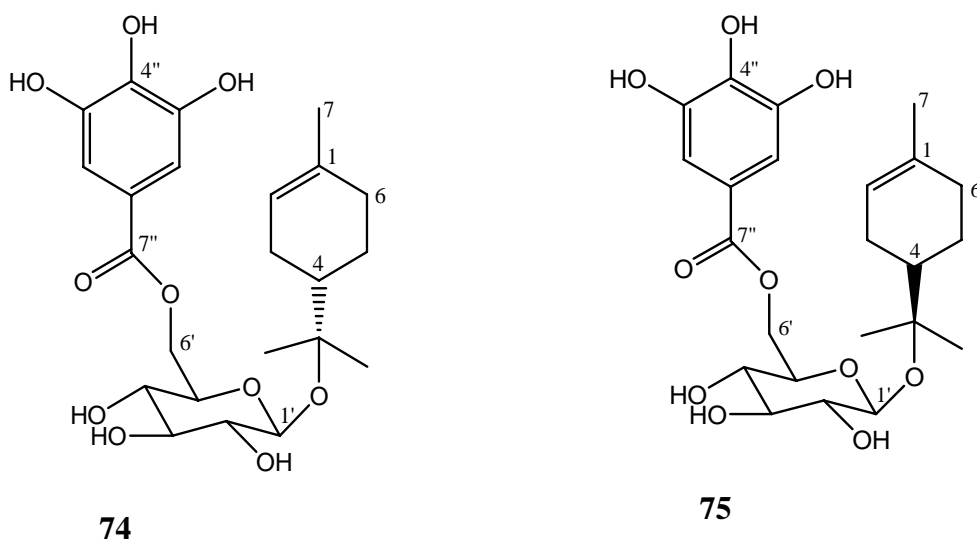
Tableau 3-9: Données spectrales RMN ¹H de Sa₄₁, Sa₅₁ et Sa₅₂ dans le CD₃OD à 400 MHz

	Sa ₄₁	Sa ₅₁	Sa ₅₂
6	6.18, d, 2.1 Hz	6.23, d, 1.6 Hz	6.21, d, 2.1 Hz
8	6.38, d, 2.1 Hz	6.40, d, 1.6 Hz	6.37, d, 2.1 Hz
2'	7.37, s	7.39, d, 1.9 Hz	6.98, s
5'		6.96, d, 8.3	
6'	7.37, s	7.32, dd, 1.9 ; 8.3 Hz	6.98, s
1''	5.21, d, 7.8 Hz	5.37, br s	5.29, d, 1.4 Hz
2''	3.87, d, 1.5 Hz	4.21	4.19, dd, 3.5 ; 1.5 Hz
3''	3.85, d, 4.9 Hz	3.91	3.93, dd, 9.7 ; 3.5 Hz
4''	3.64, dd, 9.6 ; 3.4 Hz	3.36	3.36, t
5''	3.93	3.91, m	4.04, m
6''	4.30, m	1.04, d, 6.1 Hz	1.07, d, 6.2 Hz
1'''		4.28, d, 7.4Hz	4.24, d, 7.6 Hz
2'''	6.92, s	3.21, t	3.18, dd, 9.0 ; 3.5 Hz
3'''		3.32	3.29, t
4'''		3.86	3.39, m
5a'''		3.66, dd, 11.2 ; 5.0 Hz	3.63, dd, 11.6 ; 5.7 Hz
5b'''		3.08, t	3.05, dd, 11.6 ; 10.4 Hz

Tableau 3-10: Données spectrales RMN ^{13}C de Sa₄₁, Sa₅₁ et Sa₅₂ dans le CD₃OD à 100 MHz

	Sa ₄₁	Sa ₅₁	Sa ₅₂
2	157.6	158.2	158.2
3	134.8	135.8	135.9
4	178.2	178.8	178.9
5	161.8	162.2	162.2
6	99.1	98.9	98.9
7	165.6	165.2	165.3
8	93.9	93.8	93.8
9	157.3	157.5	157.5
10	104.3	104.8	104.7
1'	120.6	121.9	120.8
2'	109.1	115.9	108.2
3'	145.3	148.0	146.0
4'	137.2	145.5	136.9
5'	145.3	115.5	146.0
6'	109.1	121.7	108.2
1''	104.5	102.3	102.3
2''	72.2	81.7	81.8
3''	73.9	70.8	70.9
4''	69.0	72.6	72.8
5''	73.4	70.8	70.7
6''	62.6	16.7	16.7
1'''	119.9	106.7	106.8
2'''	109.0	74.2	74.3
3'''	145.4	76.7	76.8
4'''	138.9	69.9	69.9
5'''	145.4	66.0	66.0
6'''	109.0		

III-4-11: Identification du mélange de (4S)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6-O-galloyl) glucopyranoside et du (4R)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6-O-galloyl) glucopyranoside (Sa₁₃)



Sa₁₃ est isolé sous forme de poudre blanche des feuilles de *S. aromaticum*. Ce composé est détecté en LC-MS-MS à un temps de rétention de 10.2 minutes. Bien qu'il s'agisse d'un mélange de diastéréoisomères, son pouvoir rotatoire est égal à zéro. Le spectre de masse en ESI mode négatif montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 469 $[M-H]^-$ correspondant à la formule moléculaire $C_{23}H_{32}O_{10}$. Le spectre IR révèle la présence des hydroxyles (3420 cm^{-1}), de l'ester conjugué (1698 cm^{-1}), et du noyau aromatique (1613 cm^{-1}).

Le spectre RMN ^1H (figure 3-93) nous permet d'observer le signal d'un proton à δ_{H} 7.08 (s, 2H), de deux méthyles à δ_{H} 1.59 et 1.51, d'un méthyle à δ_{H} 4.53 (1H, $J=7.6\text{ Hz}$) et les protons d'un glucose disubstitué à δ_{H} (4.48, 4.38, 3.58, 3.37, 3.36 et 3.19). Nous y distinguons également la superposition des signaux dans l'intervalle de 1-2 ppm.

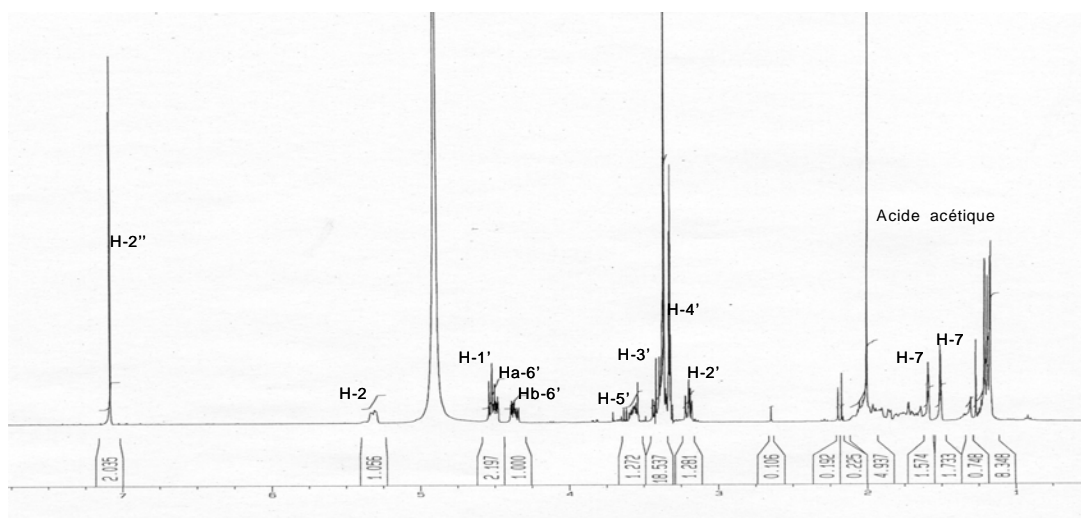


Figure 3-93: Spectre RMN ^1H de Sa_{13}

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-94) nous révèle la présence des signaux correspondant aux carbones du galloyl à δ_{C} (167.4, 145.4, 138.8, 120.5 et 109.2). Nous notons également sur ce spectre que la plupart des pics sont doublés ce qui nous laisse supposer la présence de deux épimères.

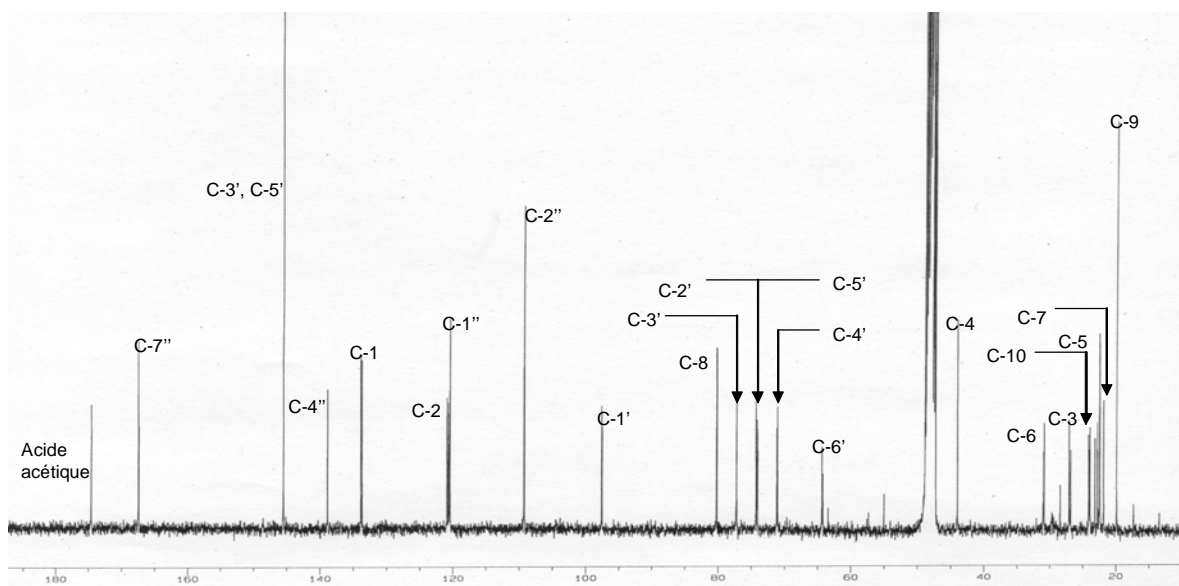


Figure 3-94: Spectre RMN ^{13}C de Sa_{13}

Le spectre de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance (HMBC) nous permet d'observer une corrélation entre le proton de résonance δ_{H} 4.53 et le carbone à δ_{C} 80.3, nous y distinguons également des corrélations entre les protons à δ_{H} 4.48 (Ha-6') et 4.38 (Hb-6') et le

carbone à δ_c 167.4 (C-7'') et les protons à δ_H 7.08 (H-2'') et les carbones à δ_c 167.4 (C-7''), 145.5 (C-3'') et 138.8.(C-4'') (figure 3-94).

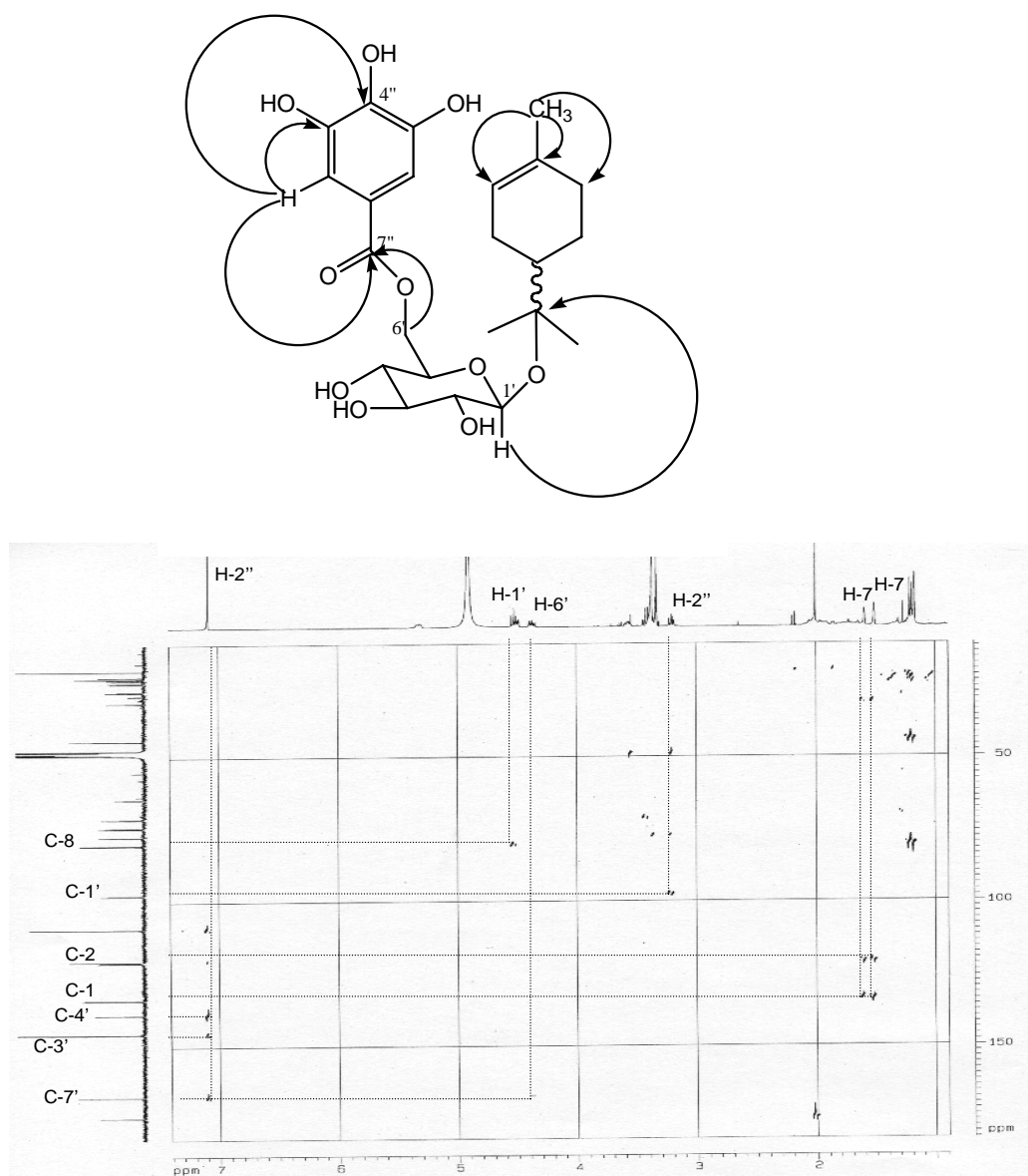


Figure 3-95: Spectre HMBC de Sa₁₃

Sa₁₃ a été identifié comme étant un mélange de (4S)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside et de (4R)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside¹³⁶ ayant comme structure **74** et **75** respectivement.

Tableau 3-11 : Données spectrales RMN ^1H du mélange (4S)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside et de (4R)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside dans le CD_3OD à 400 MHz (Sa_{13}).

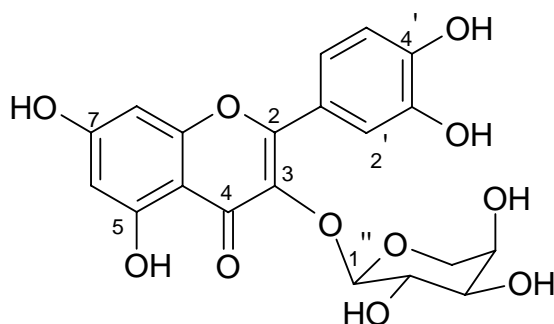
	Sa_{13} (4S)	Sa_{13} (4R)
2	5.30, m	5.32, m
3eq	2.02, m	2.03, m
4	1.64, dddd, 12.0; 12.0; 4.4; 2.2 Hz	1.60, dddd, 12.0; 12.0; 4.6; 2.0 Hz
5ax	1.15, dddd, 12.0; 12.0; 12.0; 5.4 Hz	1.15, dddd, 12.0; 12.0; 12.0; 3.9 Hz
5eq	1.98, m	1.97, m
6ax	1.90, m	1.92, m
6eq	1.82, br d, 16.6 Hz	1.86, br d, 16.4 Hz
7	1.51, br s	1.59, br s
9	1.15, s	1.16, s
10	1.20, s	1.19, s
1'	4.53, d, 7.6 Hz	4.53, d, 7.6 Hz
2'	3.19, dd, 8.8; 7.6 Hz	3.18, dd, 8.8; 7.6 Hz
3'	3.37, m	3.45, m
4'	3.36, m	3.37, m
5'	3.58, ddd, 8.8; 6.6; 2.2 Hz	3.59, ddd, 8.8; 7.1; 2.0 Hz
6'	4.48, dd, 11.7; 2.2 Hz 4.38, dd, 11.7; 6.6 Hz	4.54, dd, 11.7; 2.0 Hz 4.28, dd, 11.7; 7.1 Hz
2''/6''	7.8, s	7.8, s

Tableau 3-12 : Données spectrales RMN ^{13}C du mélange (4S)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside et de (4R)- α -terpinéol 8-O- β -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside dans le CD_3OD à 100 MHz (Sa_{13}).

	Sa_{13} (4S)	Sa_{13} (4R)
1	134.2	134.1
2	121.6	121.7
3	27.6	27.5
4	44.5	44.5
5	24.5	24.4
6	31.5	31.6
7	23.5	23.5
8	79.8	79.7
9	22.9	23.9
10	25.1	24.1
1'	98.2	98.2
2'	75.0	75.0
3'	78.0	78.0
4'	71.5	71.5
5'	74.5	74.5
6'	64.9	64.9
1''	121.8	121.8
2''/6''	109.8	109.8

3''/5''	145.9	145.9
5''	138.6	138.6
7''	166.7	166.7

III-4-12: Identification de la quercétine 3-*O*- α -L-arabinopyranoside (Cv₉)



76

Cette molécule a été isolée des feuilles de *C. viminalis* sous forme de poudre jaune. Le spectre de masse donne l'ion moléculaire en ESI mode négatif m/z 433 $[M-H]^-$ correspondant à la masse moléculaire de 434 Da. La MS^2 de cet ion nous donne le fragment m/z 301 $[M-H-132]^-$ qui résulte de la perte d'un pentose. L'analyse du spectre de RMN ^{13}C et du DEPT indique la présence de 20 carbones parmi lesquels 10 quaternaires, 9 méthines et un méthylène. L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à Cv₉ la formule moléculaire $C_{20}H_{18}O_{11}$, avec 12 degrés d'insaturation.

L'hydrolyse acide nous permet d'identifier l'arabinose par CCM comparative avec un échantillon authentique. Le spectre RMN 1H (figure 3-96) montre les signaux de résonance δ_H 6.88 (1H, d, $J= 8.5$ Hz), 7.59 (1H, dd, $J= 2.2$ et 8.5 Hz) et 7.76 (1H, d, $J=2.2$ Hz) qui sont caractéristiques du noyau B 3,4-dihydroxyle substitué de la quercétine. Le doublet du proton anomère résonne à δ_H 5.18 avec une constante de couplage de 6.6 Hz indiquant la configuration α de l'arabinose. Ces données sont similaires à celles de la guaijaverine (quercétine 3-*O*- α -L-arabinopyranoside)¹³⁷

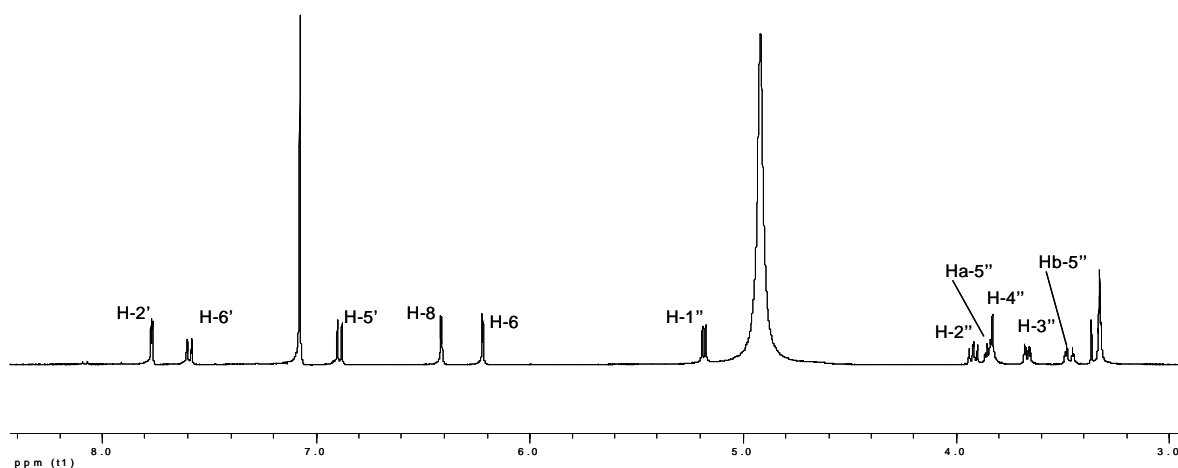


Figure 3-96: Spectre RMN ^1H de Cv_9

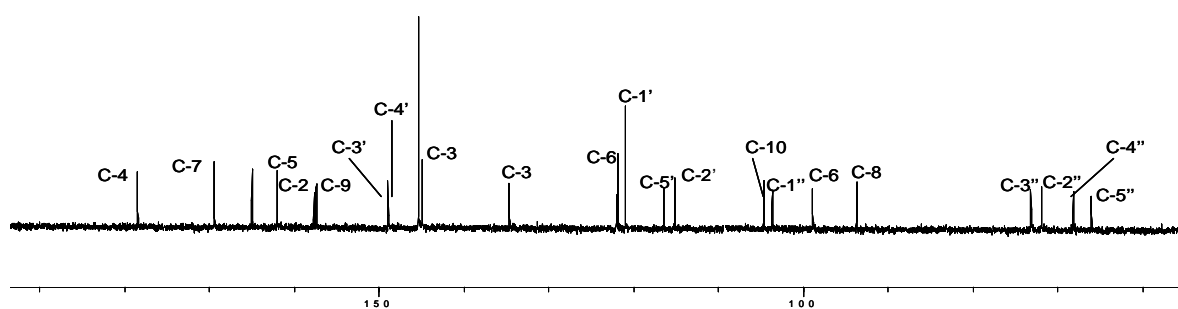
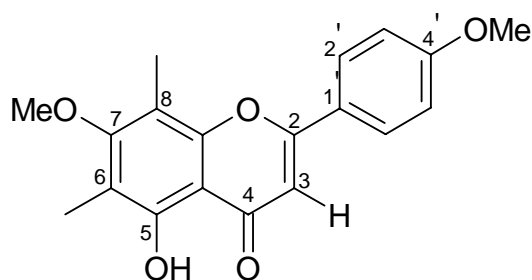


Figure 3-97: Spectre de RMN ^{13}C de Cv_9

Données RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} 6.22 (d, $J=2.1$ Hz, H-6), 6.41 (d, $J=2.1$ Hz, H-8), 7.76 (d, $J=2.2$ Hz H-2'), 6.88 (d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.59 (dd, $J=2.2; 8.5$ Hz, H-6'), 5.18 (d, $J=6.6$ Hz, H-1''), 3.91 (dd, $J=5.2; 7.1$ Hz, H-2''), 3.66 (dd, $J=3.1, 8.4$ Hz, H-3''), 3.83 (ddd, $J=2.0, 3.2, 5.2$ Hz, H-4''), 3.46 (dd, $J=3.1; 13.5$ Hz, Hb-5''), 3.85 (dd, $J=5.1, 7.1$ Hz, Ha-5'')

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} 157.7 (C-2), 134.6 (C-3), 178.5 (C-4), 162.0 (C-5), 98.8 (C-6), 165.0 (C-7), 93.7 (C-8), 157.4 (C-9), 104.6 (C-10), 121.9 (C-1'), 116.5 (C-2'), 148.9 (C-3'), 145.4 (C-4'), 115.2 (C-5'), 122.0 (C-6'), 103.6 (C-1''), 71.9 (C-2''), 73.1 (C-3''), 68.2 (C-4''), 66.0 (C-5'').

III-13: Identification de l'eucalyptine (Es₁, Cv₃, Sgf₁)



77

L'eucalyptine est isolée sous forme d'aiguilles jaunes des feuilles de *E. saligna* (Es₁), *C. viminalis* (Cv₃) et de *S. guineense* (Sgf₁). Le spectre de masse donne l'ion moléculaire en ESI mode négatif à 327 [M-H]⁻. L'analyse du spectre RMN ¹³C et du DEPT indique la présence de 19 carbones parmi lesquelles 10 quaternaires, 5 méthines et un méthylène, deux méthoxyles et deux méthyles. L'ensemble de ces données permet d'attribuer à Es₁ la formule moléculaire C₁₉H₁₈O₅, avec 11 degrés d'insaturation.

Le spectre UV (figure 3-98) montre 2 bandes d'absorption, la bande I et la bande II à 310 et 355 nm respectivement. L'addition de NaOMe à la solution initiale provoque un déplacement bathochromique de la bande I avec une baisse d'intensité ce qui nous permet de dire que l'hydroxyle en C-4' est substitué. L'addition du AlCl₃ provoque un déplacement bathochrome induit par la présence de l'hydroxyle en C-5, l'addition de HCl ne change pas la nature du spectre ce qui indique l'absence de groupes hydroxyles en ortho sur le cycle B.

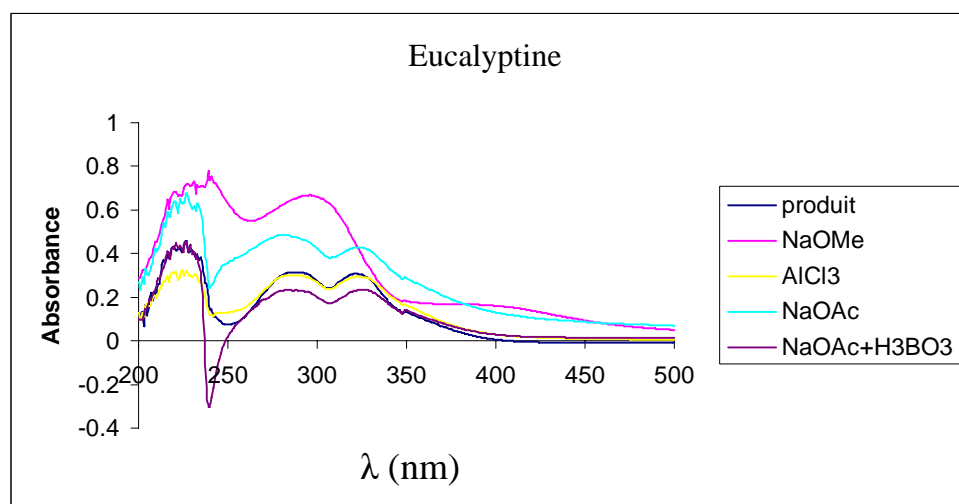


Figure 3-98: Spectre UV de l'eucalyptine

Le spectre RMN ^1H montre un singulet qui résonne à δ_{H} 6.66 indiquant la présence d'un proton en C-3 sur le noyau γ -pyrone. On y distingue également 4 singulets intégrant chacun pour trois protons, les singulets résonant à δ_{H} 3.81 et 3.99 sont attribuables aux méthoxyles alors que ceux qui paraissent à δ_{H} 2.23 et 2.41 sont attribués aux protons des méthyles phénoliques. On y distingue également deux doublets intégrant chacun pour deux protons à δ_{H} 7.06 et 7.90 avec une constante de couplage $J=9.0$ Hz correspondant à un système A_2B_2 ; ils sont attribuables aux protons 3',5' et 2',6' du noyau B de la flavone. Le singulet à 12.90 ppm est attribuable au proton chélaté de l'hydroxyle en C-5.

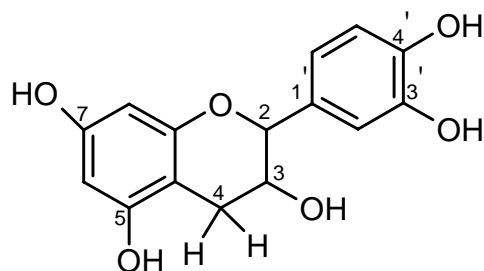
Le spectre RMN ^{13}C montre des signaux à δ_{C} 8.2, 8.5 et 55.5, 60.4 qui sont attribués respectivement à deux méthyles et deux méthoxyles. Le carbone de résonance δ_{C} 183.2 est celui du carbonyle α , β - insaturé des flavones. L'analyse conjointe de ces données nous permet d'identifier Es_1 et Cv_3 et Sgf_1 comme étant l'eucalyptine¹¹⁹ (structure **74**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 6.66 (s, H-3), 7.90 (d, $J=9$ Hz, H-2', H-6'), 7.06 (d, $J=9.0$ Hz H-3', H-5'), 2.23 (s, CH_3 -8), 2.41 (s, CH_3 -6), 3.81(s, CH_3O -7), 3.91 (s, CH_3O -4'), 12.9 HO-5)
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 163.9 (C-2), 104.0 (C-3), 183.2 (C-4), 153.0 (C-5), 108.8 (C-6), 162.6 (C-7), 114.5 (C-8), 157.3 (C-9), 107.4 (C-10), 123.9 (C-1'), 114.1 (C-2', C-6'), 127.0 (C-3', C-5'), 162.6 (C-4'), 8.2 (CH_3 -8), 8.5 (CH_3 -6), 55.5 (CH_3O -7), 60.5 (CH_3O -4')

Identification de Cv_7

Cv_7 est isolé sous forme de poudre jaune des feuilles de *C. viminalis*. Le spectre de masse nous donne l'ion moléculaire en ESI mode négatif à m/z 289 $[\text{M}-\text{H}]^-$, correspondant à la masse moléculaire de 290 Da. L'analyse du spectre de RMN ^{13}C et du DEPT indique la présence de 15 carbones parmi lesquelles 7 quaternaires, 7 méthines et un méthylène. L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à CV-4 la formule moléculaire $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ avec 9 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ^1H montre deux doublets à δ_{H} 5.93 (H-8) et 5.96 (H-6) avec une constante de couplage de 2.3 Hz chacun, indiquant des couplages méta. Nous y observons également deux protons résonant à δ_{H} 2.87 (dd, Ha-4, $J=4.6; 16.8$ Hz) et 2.78 (dd, Hb-4, $J=2.9; 16.8$ Hz). Le spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (COSY) montre le couplage entre les protons Ha-4 et Hb-4, ces deux protons couplent simultanément avec le proton à δ_{H} 4.19 (m, H-3) qui couple également avec celui à 4.83 (d, H-2). Ces données sont compatibles avec celles de la catéchine¹³⁸.



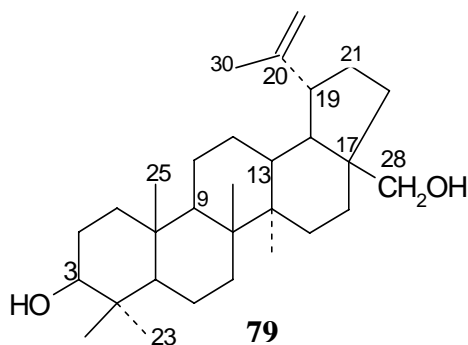
78

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 4.9 (d, H-2), 4.2 (m, H-3), 2.87 (dd, Ha-4, $J = 4.6; 16.8$ Hz), 2.78 (dd, Hb-4, $J = 2.9; 16.8$ Hz), 5.96 (d, H-6, $J = 2.3$ Hz), 5.93 (d, H-8, $J = 2.3$ Hz), 6.99 (d, H-2', $J = 1.9$ Hz), 6.82 (dd, H-6', $J = 1.9, 0.4$ Hz), 6.80 (dd, H-5', $J = 1.9, 0.4$ Hz). RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ_{C} 78.8 (C-2), 66.4 (C-3), 28.2 (C-4), 144.8 (C-5), 95.4 (C-6), 144.9 (C-7), 94.9 (C-8), 157.0 (C-9), 99.1 (C-10), 131.3 (C-1'), 114.2 (C-6'), 156.4 (C-3'), 156.7 (C-4'), 118.3 (C-5'), 114.3 (C-2').

III-5: Les triterpènes.

Les triterpènes sont des composés constitués de six unités isopréniques et ayant trente atomes de carbone qui dérivent de la cyclisation du squalène. Cette classe de composés possède environ cent squelettes distincts. La plupart des triterpènes sont en 6-6-6-5 tétracycliques, 6-6-6-6-5 pentacycliques ou en 6-6-6-6-6 pentacyclique, mais on distingue également des triterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques et hexacycliques isolés de sources naturelles¹³⁹. Dans le cadre de nos travaux nous avons isolé trois sous-classes à savoir des oléananes, des ursanes et des lupanes.

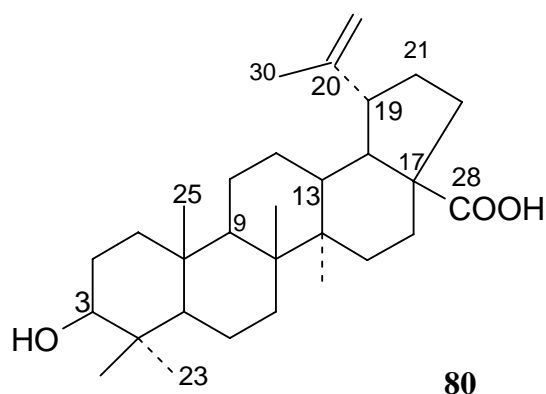
III-5-1: Identification de la bétuline (Es_2)



Es₂ a été isolé des feuilles de *E. saligna* sous forme de poudre blanche. Le spectre de masse en ESI mode négatif montre l'ion moléculaire m/z 441 [M-H]⁻ correspondant à la formule moléculaire C₃₀H₅₀O₂. Cette molécule a été identifiée comme étant la bétuline (structure **79**) en comparant ses données de RMN ¹³C à celles de la littérature ¹⁴⁰.

Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 38.8 (C-1), 27.2 (C-2), 78.9 (C-3), 38.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.9 (C-8), 50.4 (C-9), 37.2 (C-10), 20.9 (C-11), 25.3 (C-12), 37.3 (C-13), 42.7 (C-14), 27.0 (C-15), 29.2 (C-16), 47.8 (C-17), 48.8 (C-18), 47.8 (C-19), 150.6 (C-20), 29.8 (C-21), 34.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.8 (C-27), 60.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.1 (C-30)

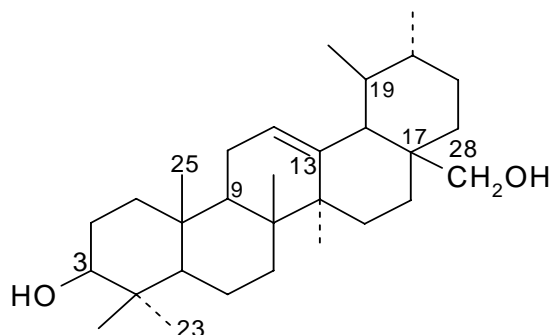
III-5-2: Identification de l'acide bétulinique (Sgf₂)



Sgf₂ est isolé des feuilles de *S. guinéense* sous forme de poudre incolore. Le pic de l'ion moléculaire sur le spectre de masse ESI négatif est m/z 455 [M-H]⁻ correspondant à la formule moléculaire C₃₀H₄₈O₃. Ce composé a été identifié comme étant l'acide bétulinique (structure **80**) par comparaison des données spectrales de RMN ¹³C à celles de la littérature ⁸³.

Données spectrale de RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz): 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 78.9 (C-3), 38.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.7 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 20.8 (C-11), 25.5 (C-12), 38.4 (C-13), 42.4 (C-14), 30.5 (C-15), 32.2 (C-16), 56.3 (C-17), 46.8 (C-18), 49.2 (C-19), 150.3 (C-20), 29.7 (C-21), 37.0 (C-22), 27.9 (C-23), 15.3 (C-24), 16.0 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 180.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.4 (C-30).

III-5-3: Identification de l'uvaol (Es₃)

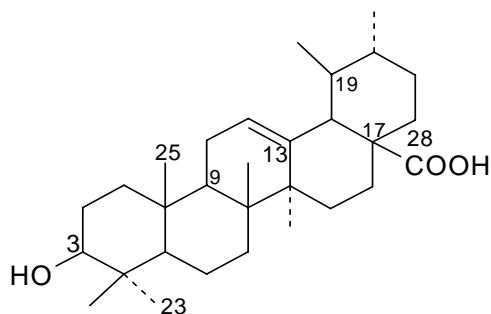


81

Es₃ est isolé des feuilles de *E. saligna* sous forme de poudre blanche. Le spectre de masse montre l'ion moléculaire m/z 439 $[M-H]^-$ correspondant à la formule moléculaire C₃₀H₄₈O₂. Es₃ a été identifié comme étant l'uvaol (structure **81**) par comparaison de ses données spectrales de ¹³C à celles de la littérature¹⁴¹.

Données spectrale de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 38.8 (C-1), 27.3 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.4 (C-5), 18.4 (C-6), 32.9 (C-7), 39.4 (C-8), 47.8 (C-9), 37.2 (C-10), 23.3 (C-11), 125.0 (C-12), 138.0 (C-13), 42.8 (C-14), 29.2 (C-15), 22.6 (C-16), 36.8 (C-17), 54.1 (C-18), 38.9 (C-19), 39.4 (C-20), 30.7 (C-21), 30.6 (C-22), 28.1 (C-23), 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 16.9 (C-26), 23.4 (C-27), 69.7 (C-28), 16.2 (C-29), 21.3 (C-30).

III-5-4: Identification de l'acide ursolique (Es₄)



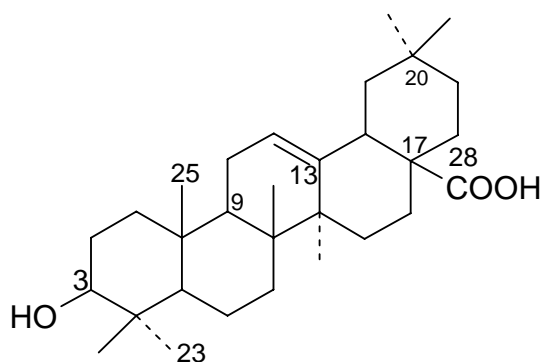
82

Es₄ a été isolé des feuilles de *E. saligna* sous forme de poudre blanche. Le spectre de masse en ESI mode négatif montre le pic de l'ion moléculaire m/z 455 $[M-H]^-$ correspondant à la

formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$. Ce composé a été identifié comme étant l'acide ursolique (structure **82**) en comparant ses données de ^{13}C à celles de la littérature¹⁴².

Données spectrale de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) : 38.5 (C-1), 27.2 (C-2), 79.1 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.3 (C-6), 32.9 (C-7), 39.0 (C-8), 47.5 (C-9), 36.7 (C-10), 23.4 (C-11), 125.8 (C-12), 137.8 (C-13), 42.0 (C-14), 28.0 (C-15), 24.2 (C-16), 47.6 (C-17), 52.7 (C-18), 38.9 (C-19), 39.0 (C-20), 30.7 (C-21), 36.7 (C-22), 28.1 (C-23), 15.4 (C-24), 15.3 (C-25), 16.9 (C-26), 23.2 (C-27), 180.1 (C-28), 17.1 (C-29), 21.1 (C-30).

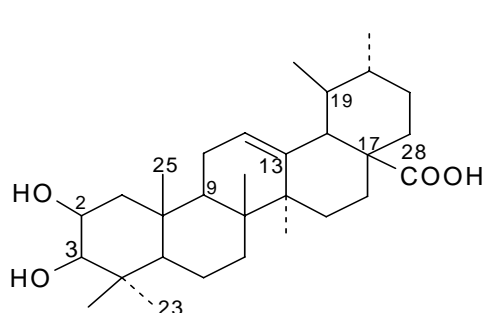
III-5-5: Identification de l'acide oléanolique (Sgf₃, Sg₄, Cv₆, Sa₁)



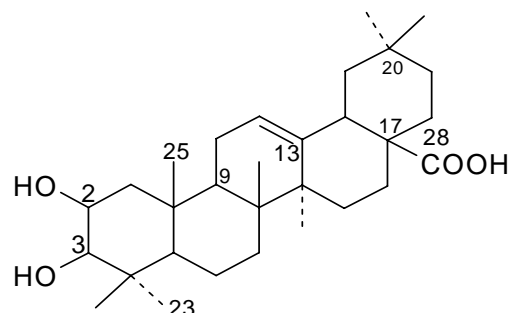
83

Ce composé a été isolé dans toutes les plantes que nous avons étudiées. Il cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (7/3). Le spectre de masse en ESI mode négatif montre le pic de l'ion moléculaire m/z 455 $[M-H]^-$ correspondant à la formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$. Cette molécule a été identifiée comme étant l'acide oléanolique (structure **83**) en la comparant sur CCM avec un échantillon authentique de notre laboratoire.

III-5-6: Identification du mélange d'acide 2 α -3 β -dihydroxyurs-12-èn-oïque et d'acide 2 α -3 β -dihydroxyoléan-12-èn-oïque (Sgf₄, Sg₅ Cv₈ et Sa₂)



Acide 2 α -3 β -dihydroxyurs-12-èn-oïque **84**



Acide 2 α -3 β -dihydroxyoléan-12-èn-oïque **85**

Ce composé est isolé sous forme de poudre blanche notamment des feuilles des *S. guineense* (Sgf₄), *S. aromaticum* (Sa₂), *C. viminalis* (Cv₈) et des écorces de *S. guineense* (Sg₅). Le spectre de masse en ESI mode négatif montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 471 [M-H]⁻ correspondant à la formule C₃₀H₄₈O₄.

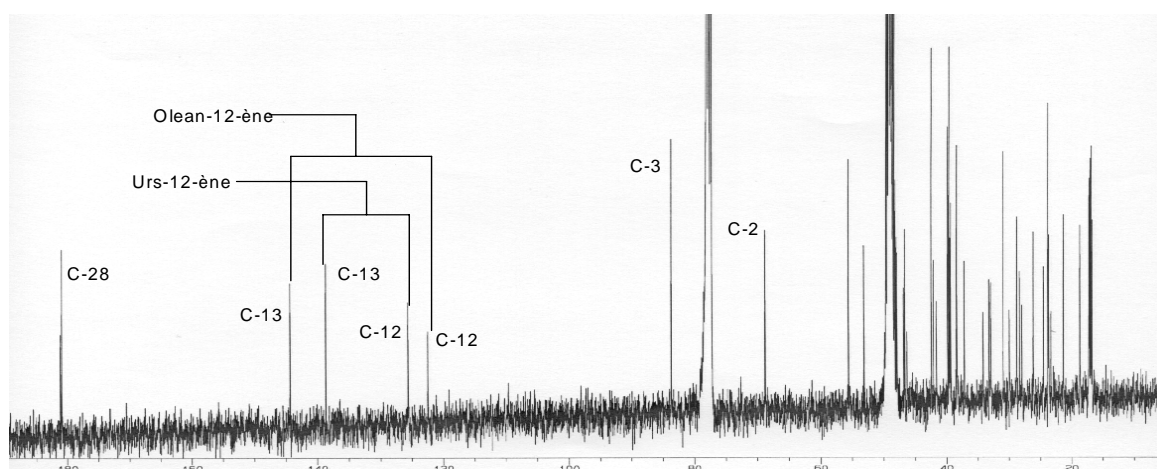


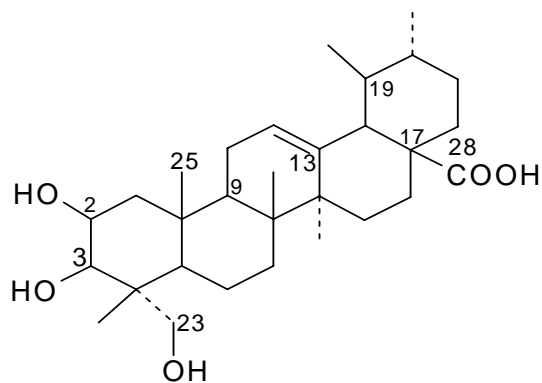
Figure 3-99: Spectre de RMN ¹³C de Sgf₄

Le spectre RMN ¹³C permet d'observer deux groupes d'atome de carbone à δ_c (125.7, 138.7) et (122.1, 144.2) respectivement caractéristiques des triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène et oléan-12-ène. Ceci indique que ce composé est un mélange de deux triterpènes pentacycliques dont l'un est de la série oléanolique et l'autre de la série ursolique. Par comparaison avec les données de la littérature¹⁴³ il nous a été possible de l'identifier comme étant le mélange de l'acide 2 α -3 β -dihydroxyurs-12-èn-oïque (structure **84**) et de l'acide 2 α -3 β -dihydroxyoléan-12-èn-oïque (structure **85**).

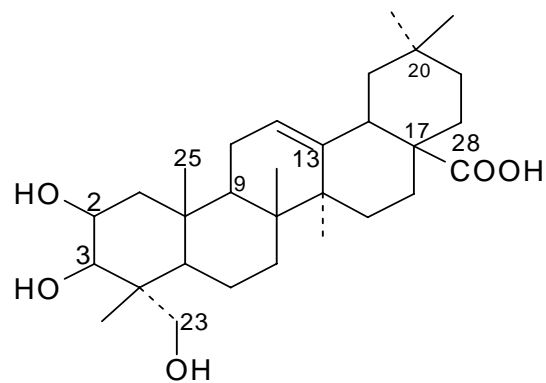
Données spectrales RMN ^{13}C de l'acide 2α - 3β -dihydroxyurs-12-èn-oïque (CD_3OD , 100 MHz): 46.9 (C-1), 68.6 (C-2), 83.5 (C-3), 39.6 (C-4), 55.6 (C-5), 18.6 (C-6), 32.4 (C-7), 39.8 (C-8), 47.9 (C-9), 38.3 (C-10), 23.7 (C-11), 125.7 (C-12), 138.7 (C-13), 42.3 (C-14), 28.2 (C-15), 24.4 (C-16), 48.0 (C-17), 53.3 (C-18), 39.3 (C-19), 39.4 (C-20), 30.9 (C-21), 37.1 (C-22), 28.5 (C-23), 16.5 (C-24), 16.7 (C-25), 16.9 (C-26), 23.3 (C-27), 180.7 (C-28), 17.0 (C-29), 20.8 (C-30).

Données spectrales RMN ^{13}C de l'acide 2α - 3β -dihydroxyoléan-12-èn-oïque (CD_3OD , 100 MHz): 47.1 (C-1), 68.6 (C-2), 83.5 (C-3), 39.5 (C-4), 55.6 (C-5), 18.6 (C-6), 34.0 (C-7), 39.8 (C-8), 47.9 (C-9), 38.2 (C-10), 23.5 (C-11), 122.1 (C-12), 144.2 (C-13), 42.0 (C-14), 27.8 (C-15), 24.4 (C-16), 48.0 (C-17), 53.3 (C-18), 46.9 (C-19), 30.8 (C-20), 34.0 (C-21), 32.93 (C-22), 28.5 (C-23), 16.4 (C-24), 16.7 (C-25), 16.9 (C-26), 23.4 (C-27), 180.9 (C-28), 17.0 (C-29), 20.9 (C-30).

III-5-7: Identification du mélange d'acide arjunolique et d'acide asiatique (Sgf_5 , Sg_6 , Sa_3)



Acide asiatique **86**



Acide arjunolique **87**

Ce composé a été notamment isolé des feuilles de *S. guineense* (Sgf_5), *S. aromaticum* (Sa_3) et des écorces de *S. guineense* (Sg_6) sous forme de poudre brune. L'analyse de son spectre de masse donne le pic de l'ion moléculaire m/z 487 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ce qui indique la présence d'un oxygène supplémentaire par rapport à Sgf_4 . Cet ion correspond à la formule moléculaire $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$.

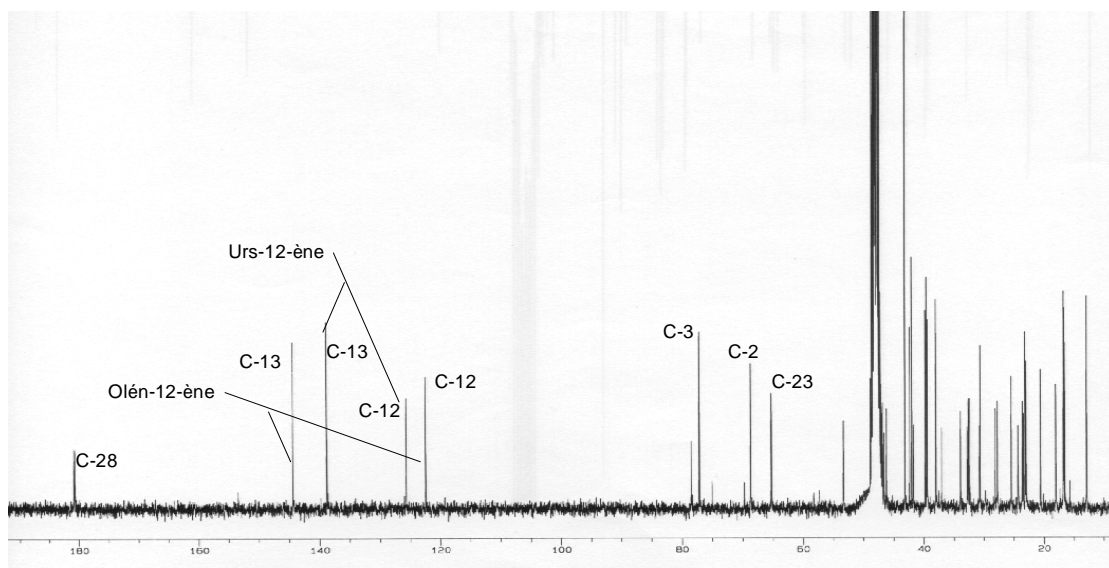


Figure 3-100: Spectre de RMN ^{13}C de Sgf₅

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-100) permet également de se rendre compte qu'il s'agit d'un mélange de deux triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène et oléan-12-ène. La différence significative entre ce spectre RMN ^{13}C et celui de Sgf₄ (figure 99) se trouve au niveau des atomes de carbone du cycle A. L'interprétation de toutes les données spectrales de ce produit en comparaison avec celles de la littérature a permis de l'identifier comme étant un mélange d'acide arjunolique (structure **86**)^{70;144} et d'acide asiatique (structure **87**)¹⁴⁵. Au vu de l'activité biologique qu'a présenté ce mélange, nous avons entrepris la séparation des deux isomères par la méthode de Lewis¹⁴⁶, ce qui a conduit à leur purification.

100 mg de ce mélange ont été séparés fournissant 10 mg d'acide asiatique (Sgf₅₁) et 2 mg d'acide arjunolique (Sgf₅₂) respectivement.

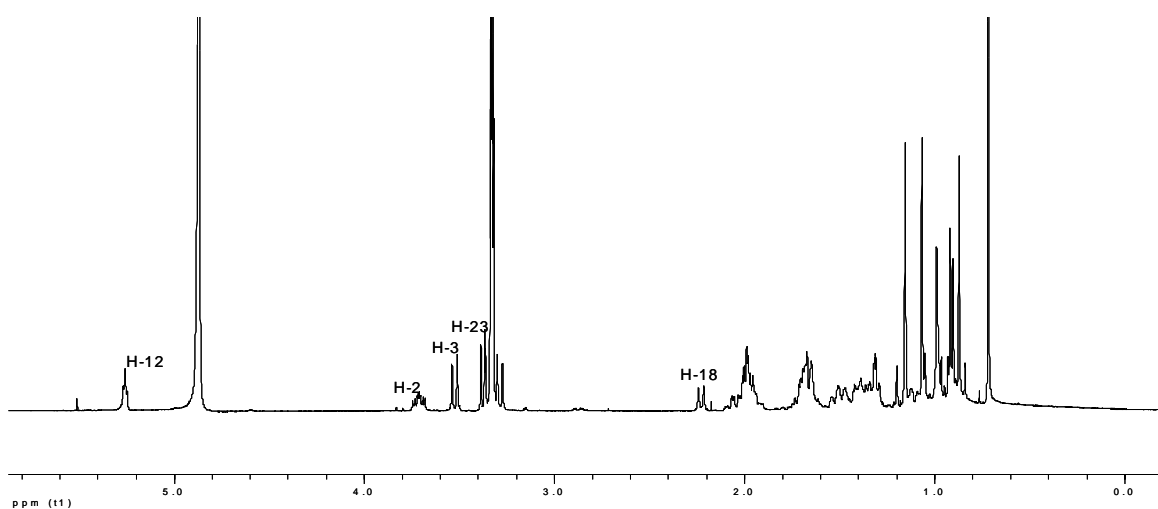


Figure 3-101: Spectre RMN ^1H de Sgf₅₁

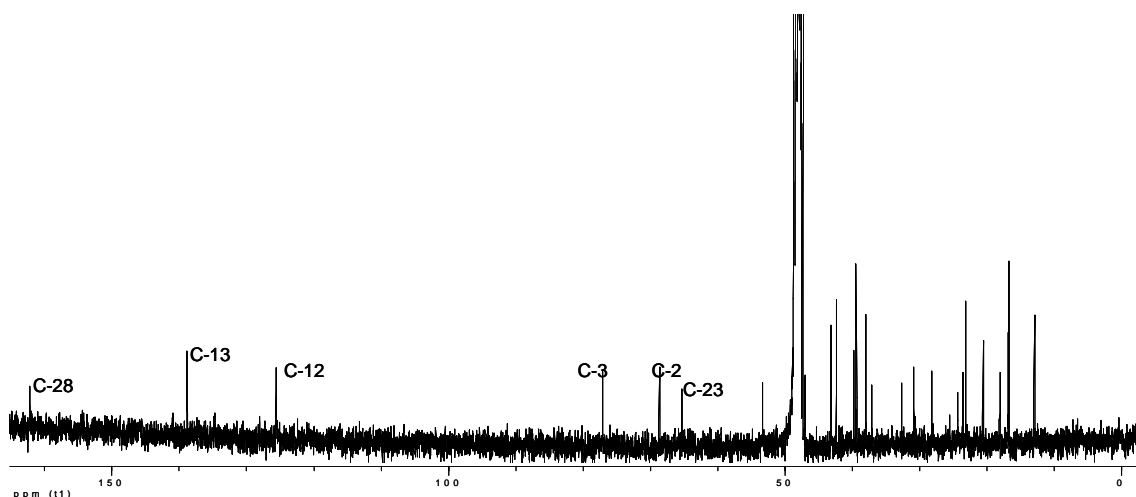
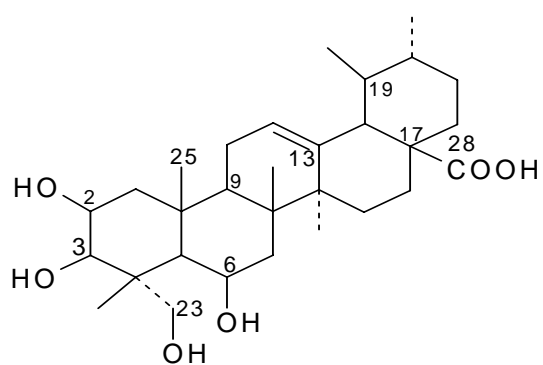


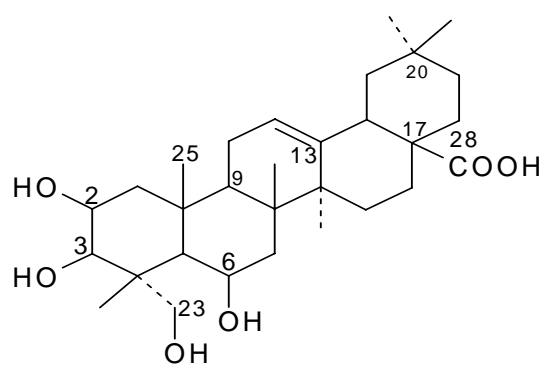
Figure 3-102: Spectre RMN ^{13}C de Sgf_{52}

Données spectrales de l'acide asiatique (CD_3OD , 100 MHz): 47.0 (C-1), 68.7 (C-2), 77.3 (C-3), 43.3 (C-4), 47.8 (C-5), 18.1 (C-6), 32.6 (C-7), 39.8 (C-8), 47.1 (C-9), 37.9 (C-10), 23.4 (C-11), 125.7 (C-12), 138.8 (C-13), 42.3 (C-14), 28.2 (C-15), 24.3 (C-16), 48.0 (C-17), 53.3 (C-18), 39.5 (C-19), 39.4 (C-20), 30.7 (C-21), 37.1 (C-22), 65.2 (C-23), 12.9 (C-24), 16.7 (C-25), 16.9 (C-26), 23.1 (C-27), 180.7 (C-28), 16.8 (C-29), 20.6 (C-30).

III-5-8: Identification du mélange d'acide-6-hydroxyasiatique et d'acide-6-hydroxyarjunolique (Sgf_6)



Acide-6-hydroxyasiatique **88**



Acide -6-hydroxyarjunolique **89**

Sgf_6 a été isolé des feuilles de *S. guineense* sous forme de poudre blanche. Son spectre de masse montre l'ion moléculaire à m/z 503 $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondant à la formule moléculaire $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$, indiquant la présence d'un atome d'oxygène de plus par rapport à l'acide arjunolique ou l'acide asiatique.

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3-103) montre également qu'il s'agit d'un mélange de deux triterpènes pentacycliques isomères dont l'un est de série oléan-12-ène et l'autre de la série urs-12-ène. La différence fondamentale entre ce spectre et celui du mélange acide arjunolique/ acide asiaticum est l'apparition d'un signal supplémentaire de carbone hydroxylé à δ_c 67.4. L'interprétation de toutes les données spectrales en comparaison avec celles de la littérature¹⁴⁷ a permis d'identifier ce produit comme étant un mélange d'acide-6-hydroxyasiaticum (structure **88**) et d'acide-6-hydroxyarjunolique (structure **89**)¹⁴⁸.

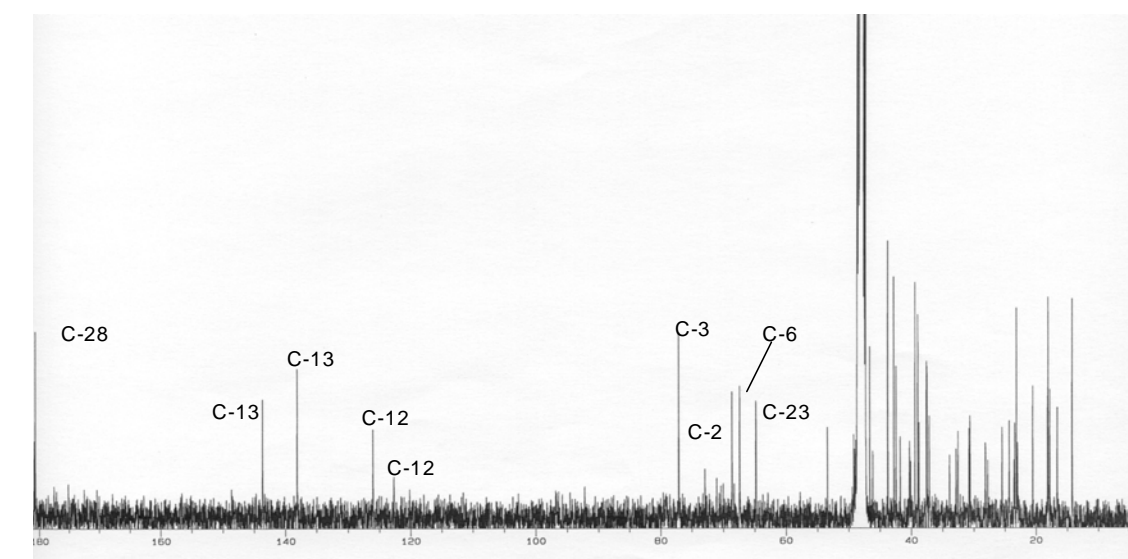


Figure 3-103: Spectre RMN ^{13}C de Sgf₆

L'analyse GC/MS (figure 3-104) montre la présence de deux molécules avec des temps de rétention de 13.92 et 13.95 min. Le calcul des aires nous donne un rapport de 3/5 pour celui à 13.92 et 2/5 pour celui à 13.95 min. Cette analyse ne nous permet pas de distinguer les deux isomères car leur fragmentation en EI est identique.

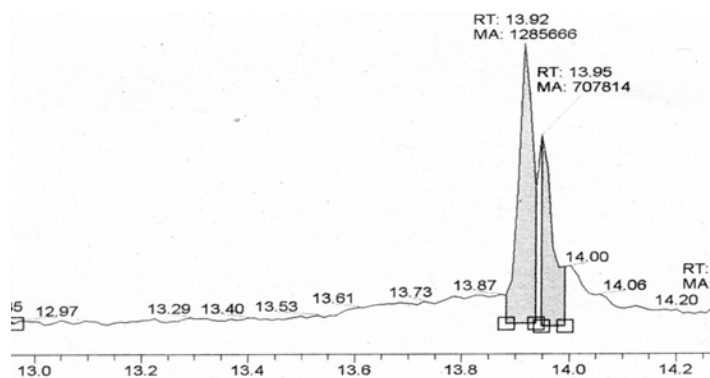
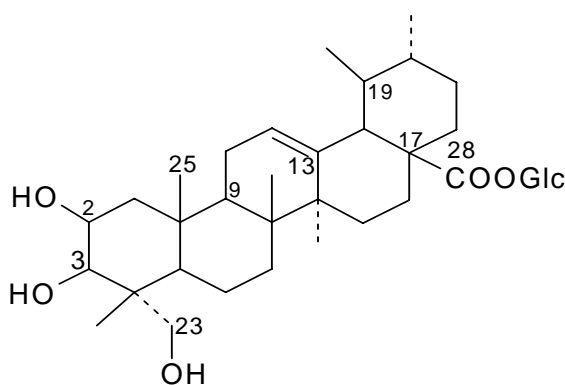


Figure 3-104: Spectre GC/MS d'analyse qualitative et quantitative de sgf_6

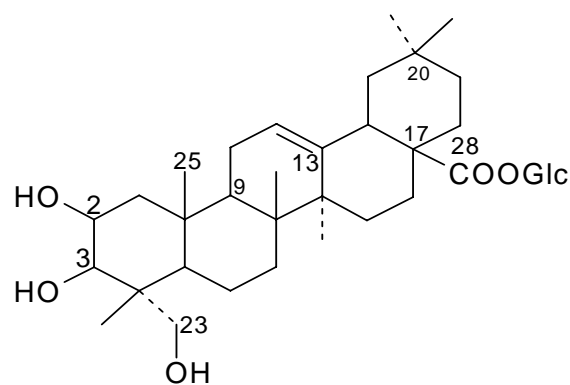
III-6: Les Saponosides

Les saponosides sont des triterpènes ou des stéroïdes mono ou polyglycosylés. Au cours de ces travaux nous avons uniquement isolé des triterpènes mono et polyglycosylés.

III-6-1: Identification du mélange d'acide arjunolique-28- β -D-glucopyranosyle ester et d'acide asiatique-28- β -D-glucopyranosyle ester. (Sgf_8)



Acide asiatique-28- β -D-glucopyranosyle ester **90**



Acide arjunolique-28- β -D-glucopyranosyle ester **91**

Sgf_8 est isolé des feuilles de *S. guineense* sous forme de poudre blanchâtre. L'analyse de son spectre de masse montre l'ion moléculaire en ESI mode négatif m/z 649 $[\text{M-H}]^-$ correspondant à la formule moléculaire $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}$. La MS^2 de cet ion moléculaire nous donne

le fragment m/z 487 $[M-H-162]^-$ correspondant à la perte d'un hexose. Ce fragment correspond à la masse moléculaire de l'acide arjunolique ou de l'acide asiatique.

Le spectre RMN 1H montre deux doublets à δ_H 5.37 et 5.35 ayant la même constante de couplage $J= 8.1\text{Hz}$ attribuable au proton anomère de l'hexose ayant la configuration β .

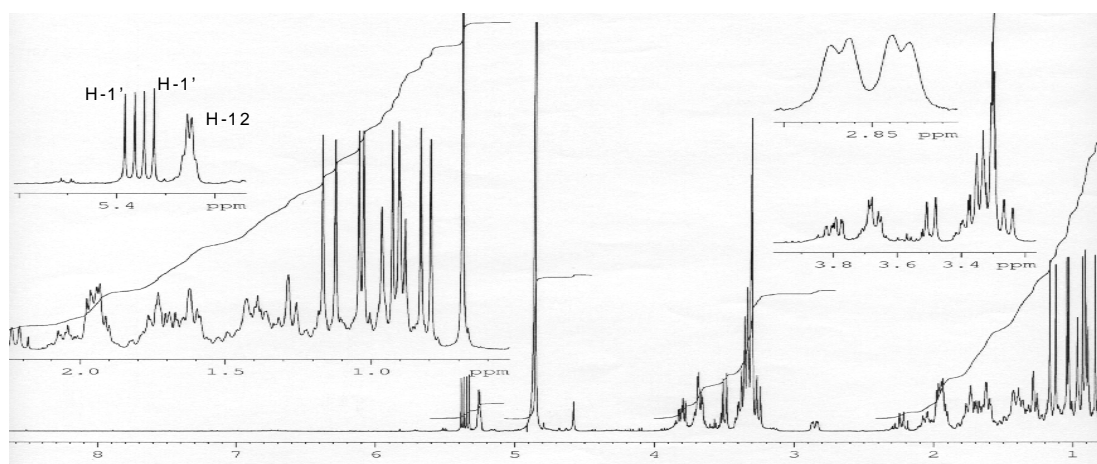


Figure 3-105: Spectre RMN 1H de Sgf_8

Le spectre RMN ^{13}C nous montre la qu'il s'agirait d'un mélange de saponosides ayant des triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène et oléan-1-ène comme aglycones. Son hydrolyse enzymatique a permis d'identifier le mélange d'acide arjunolique et d'acide asiatique comme aglycones d'une part et le glucose d'autre part comme sucre. La variation du déplacement chimique de l'atome de carbone C-28 de l'aglycone de δ_c 180.7 à 177.9 implique que le glucose est lié à l'aglycone en C-28. Le carbone anomère qui résonne à δ_c 95.7 confirme que le glucose a estérifié la fonction acide de l'aglycone. Les protons anomères résonant à δ_H 5.37 et 5.35 présentent des corrélations avec le carbonyle de l'ester résonant à 177.9 ppm sur le spectre de HMBC. Cette corrélation confirme la position du glucose en C-28. Sgf_8 a été identifié comme étant un mélange d'acide arjunolique-28- β -D-glucopyranosyle ester¹⁴⁹ et d'acide asiatique-28- β -D-glucopyranosyle ester¹⁵⁰⁻¹⁵².

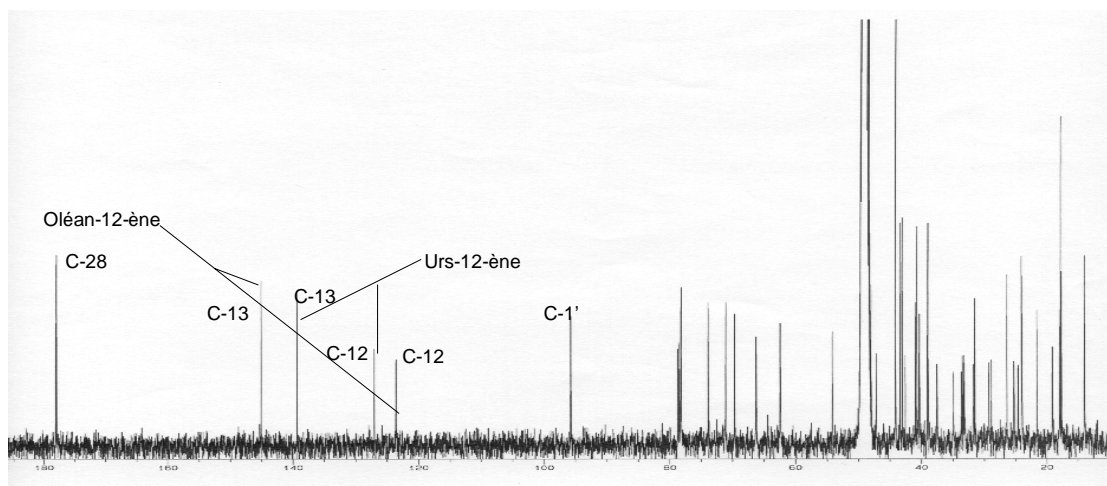
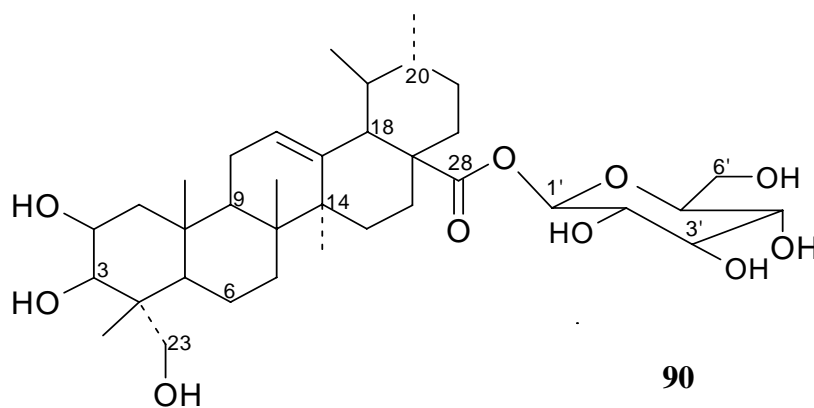


Figure 3-106: Spectre RMN¹³C de Sgf₈

III-6-2: Identification de l'acide asiatique-28-β-D-glucopyranosyle ester Sa₁₅



Sa₁₅ est isolé sous forme de poudre brune des feuilles de *S. aromaticum*. Son spectre de masse est identique à celui de Sgf₈.

Le spectre de RMN ¹H (figure 3-107) montre le proton anomère du glucose à δ_H 5.36 avec une constante de couplage J=8.0 Hz indiquant que le glucose a une configuration β. On note également la présence du proton oléfinique H-12 qui résonne à δ_H 5.23.

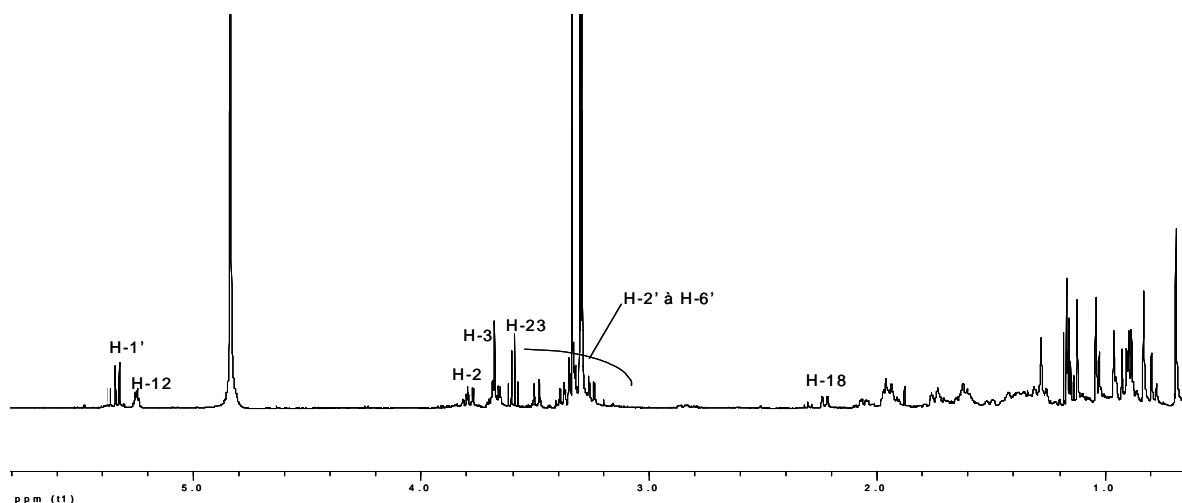


Figure 3-107: Spectre RMN ^1H de Sa_{15}

Sur le spectre RMN ^{13}C (figure 3-108) on note la présence des atomes de carbone du glucose à δ_c 95.7, 73.8, 79.2, 71.1, 78.5 et 62.5 ainsi que des atomes de carbone oléfiniques très caractéristiques à δ_c 125.8 et 138.7 indiquant que Sa_{15} est un saponoside ayant pour aglycone une triterpène pentacyclique de type urs-12-ène. Celui-ci est identifié comme étant l'acide asiatique par comparaison avec les composés précédemment décrits. La corrélation observée sur le spectre de HMBC entre le proton anomère à δ_H 5.23 et le carbone C-28 (δ_c 177.9) indique que le glucose est lié à l'acide asiatique en position C-28.

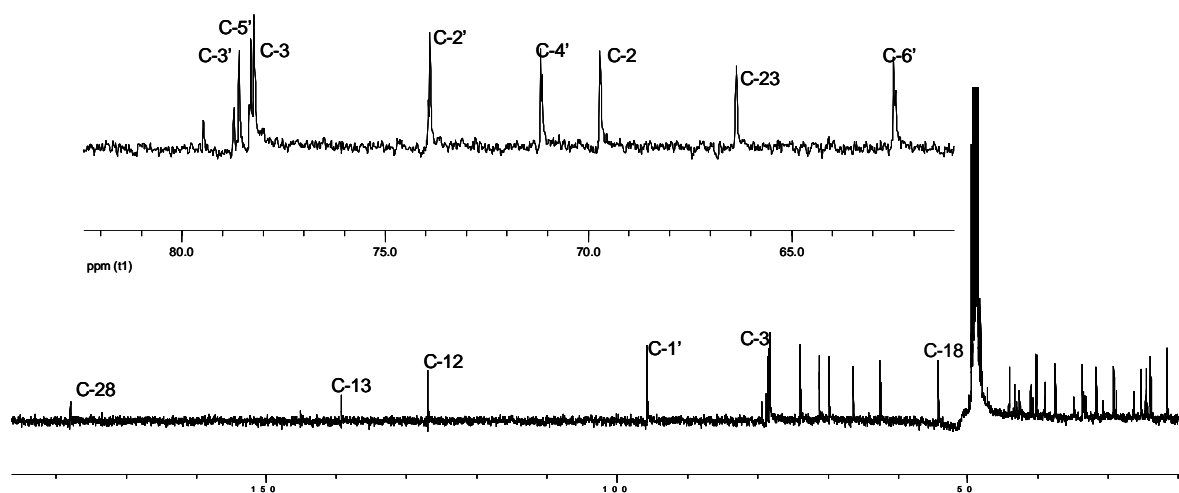
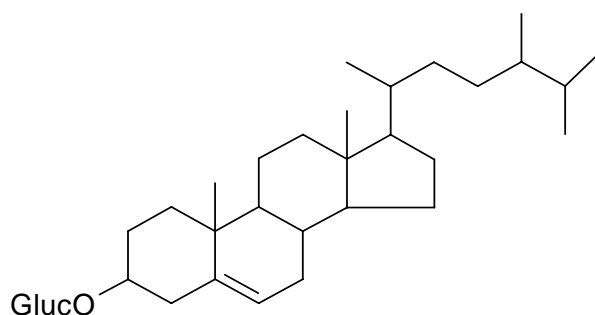


Figure 3-108: Spectre RMN ^{13}C de Sa_{15}

L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à Sa_{15} la structure de l'acide asiatique-28- β -D-glucopyranosyle nouvellement identifié dans *S. aromaticum* et isolé pour la première fois de *Combretum quadrangulare*¹⁵².

RMN ^{13}C de Sa₁₅ (CD₃OD, 125 MHz): 47.0 (C-1), 68.7 (C-2), 77.3 (C-3), 43.3 (C-4), 47.8 (C-5), 18.1 (C-6), 32.6 (C-7), 39.8 (C-8), 47.1 (C-9), 37.9 (C-10), 23.4 (C-11), 125.7 (C-12), 138.8 (C-13), 42.3 (C-14), 28.2 (C-15), 24.3 (C-16), 48.0 (C-17), 53.3 (C-18), 39.5 (C-19), 39.4 (C-20), 30.7 (C-21), 37.1 (C-22), 65.2 (C-23), 12.9 (C-24), 16.7 (C-25), 16.9 (C-26), 23.1 (C-27), 177.9 (C-28), 16.8 (C-29), 20.6 (C-30), 95.7 (C-1'), 73.8 (C-2'), 79.2 (C-3'), 71.1 (C-4'), 78.5 (C-5'), 62.5 (C-6').

III-6-3: Identification du 3-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol (Es₇, Sa₆, Cv₁₀ et Sgf₇)



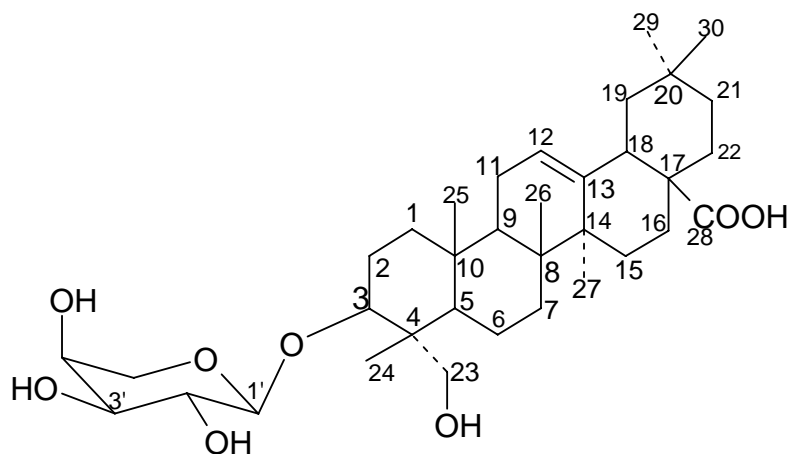
92

Cette molécule a été isolée sous forme de poudre brune de toutes les plantes que nous avons étudiées. Le spectre de masse montre l'ion moléculaire en mode négatif m/z 575 [M-H]⁻ correspondant à une masse de 576 Da. La MS² nous donne un fragment à m/z 413 [M-H-162]⁻ correspondant à la perte d'un hexose. L'analyse des spectres de RMN ^{13}C et de DEPT nous indique la présence de 35 atomes de carbone parmi lesquels 3 carbones quaternaires, 14 méthines, 12 méthylènes et 6 méthyles. L'ensemble de ces données a permis d'attribuer à Es₇ la formule moléculaire brute C₃₅H₆₀O₆ avec 6 degrés d'insaturation. Ce composé a été identifié par CCM comparative avec un échantillon authentique et aussi par comparaison des données spectroscopiques avec celles de la littérature comme étant le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol¹⁵³.

RMN ^{13}C (pyridine-d₅, 100 MHz) δ_c 37.5 (C-1), 30.0 (C-2), 78.1 (C-3), 39.3 (C-4), 140.6 (C-5), 123.8 (C-6), 32.0 (C-7), 32.2 (C-8), 50.3 (C-9), 36.9 (C-10), 21.3 (C-11), 39.9 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.5 (C-15), 28.5 (C-16), 56.2 (C-17), 12.0 (C-18), 19.4 (C-19), 36.4 (C-

20), 19.0 (C-21), 34.2 (C-22), 26.3 (C-23), 46.0 (C-24), 29.4 (C-25), 19.2 (C-26), 20.0 (C-27), 23.4 (C-28), 12.2 (C-29), 102.5 (C-1'), 75.3 (C-2'), 78.5 (C-3', C-5'), 71.7 (C-4'), 62.8 (C-6')

III-6-4: Identification du 3-*O*- α -L-arabinopyranosyle hédéragenine (Cv₁₃)



93

Cv₁₃ a été obtenu sous forme d'une poudre marron des feuilles de *C. viminalis*. L'analyse de son spectre de masse montre l'ion moléculaire en ESI mode négatif m/z 603 [M-H]⁻ correspondant à une masse de 604 Da. La MS² de cet ion nous donne un fragment à m/z 471[M-H-132]⁻ indiquant la perte d'un pentose. Les spectres de DEPT et de ¹³C indiquent la présence de 35 carbones parmi lesquels 8 carbones quaternaires 9 carbones tertiaires, 12 carbones secondaires et 6 carbones primaires. L'ensemble de ces données permet d'attribuer à Cv₁₃ la formule moléculaire C₃₅H₅₆O₈ avec un degré d'insaturation de 8.

L'hydrolyse acide de Cv₁₃ nous a permis d'identifier l'arabinose comme le sucre d'une part et l'hédéragenine (acide 23-hydroxyoléanolique) comme aglycone d'autre part par comparaison sur CCM avec des échantillons authentiques

Le spectre RMN ¹H (figure 3-109) montre dans les champs faibles les signaux à δ_H 5.23 (t, 1H) et à 4.31 (d, J=6.8Hz, 1H) attribuable respectivement au proton vinylique H-12 et au proton anomère du pentose (H-1'). Nous y observons également des protons osidiques à δ_H 3.51 (H-2'), 3.49 (H-3'), 3.78 (H-4'), 3.83 (Ha-5'), 3.52 (Hb-5') correspondant au pentose.

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-110) est caractéristique d'un triterpène pentacyclique de type oléan-12-ène (tableau 3-11). Le déplacement vers les champs faibles du signal du carbone C-3 (δ_C 83.3) de 6 ppm par rapport à un triterpène pentacyclique dont le groupe HO-C-3 est libre comme l'acide asiatique (δ_C 77.3) indique que l'aglycone est substitué en cette position. Ceci

est confirmé sur le spectre HMBC où on observe une corrélation entre le proton anomère H-1' à δ_H 4.31 et le carbone C-3 à δ_C 83.3.

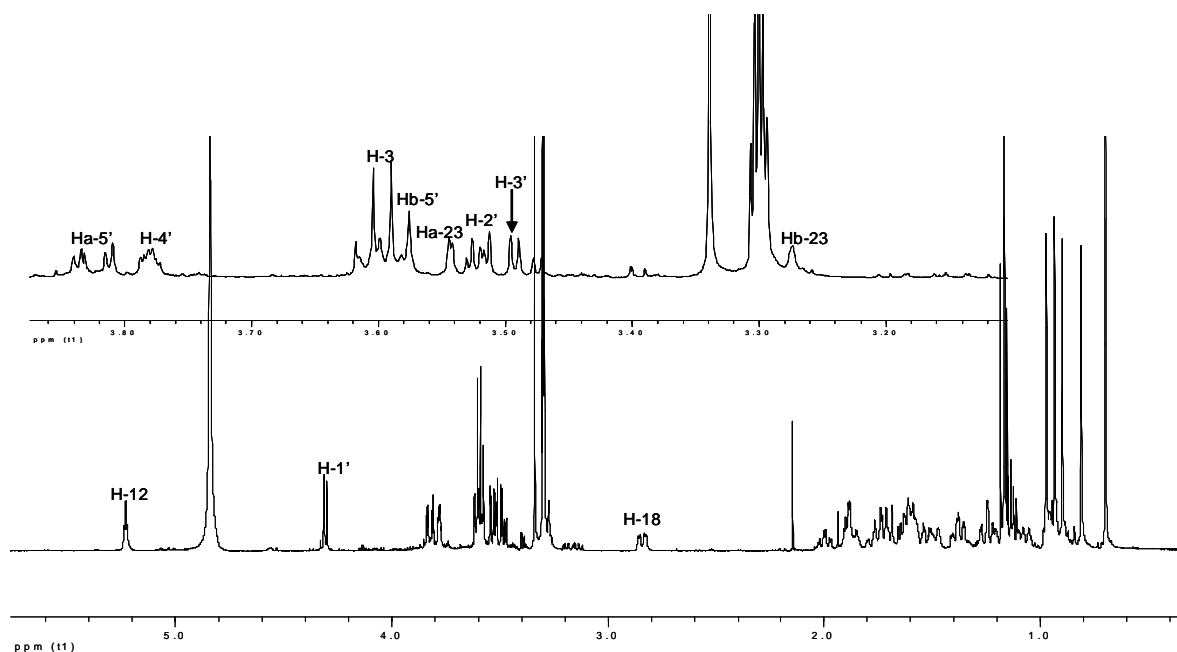


Figure 3-109: Spectre de RMN ^1H de Cv_{13}

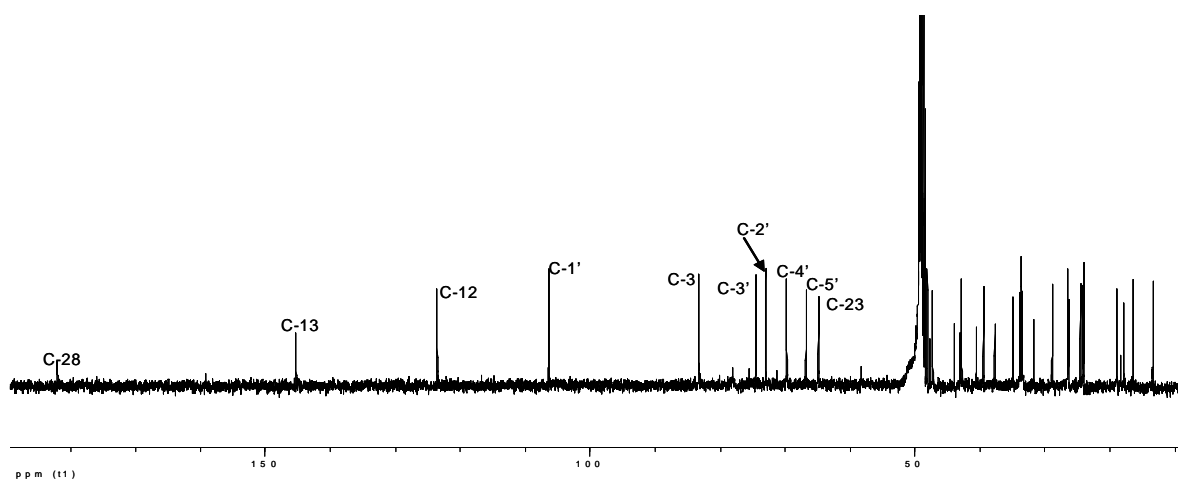
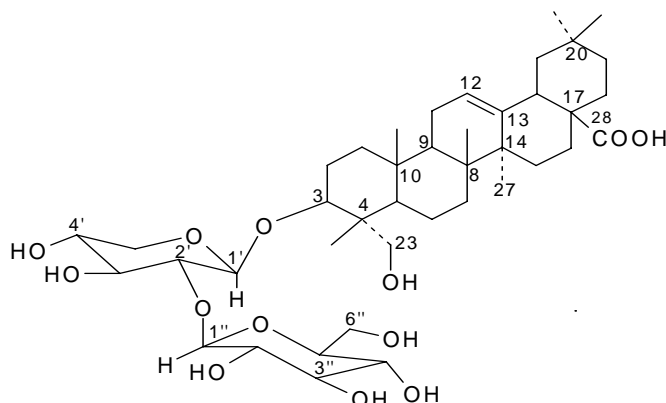


Figure 3-110: Spectre de RMN ^{13}C de Cv_{13}

L'analyse conjointe de toutes ces données a ainsi permis d'identifier Cv_{13} comme étant la 3-*O*- α -L-arabinopyranosyle hédéragenine¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

III-6-5: Détermination de la structure de l'hédéragenine 3-O-β- glucopyranosyl - (1→2)- β- D-xylopyranoside (C_{V14})



94

C_{V14} est isolé sous forme de poudre blanche des feuilles de *C. viminalis*. L'analyse de son spectre de masse en ESI mode négatif permet d'observer le pic de l'ion moléculaire à m/z 765 [M-H]⁻ correspondant à la masse moléculaire de 766 Da. La MS² de cet ion moléculaire donne le fragment à m/z 603 [M-H-162]⁻ et la MS³ le fragment à m/z 471 [M-H-162-132]⁻ correspondant respectivement à la perte d'un hexose et d'un pentose. Les spectres RMN ¹³C et DEPT indiquent la présence de 41 carbones parmi lesquels 8 carbones quaternaires 14 méthines, 13 méthylènes et 6 méthyles. L'ensemble de ces données permet d'attribuer à C_{V14} la formule moléculaire C₄₁H₆₆O₁₃ avec 9 degrés d'insaturation.

L'hydrolyse acide de C_{V14} nous a permis d'identifier le xylose et le glucose comme sucres d'une part et l'hédéragenine comme aglycone d'autre part par comparaison sur CCM avec des échantillons authentiques.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-111) montre dans les champs faibles le proton vinylique H-12 à δ_H 5.23 et deux protons anomériques à δ_H 4.57 (d, J=7.3 Hz) et 4.36 (d, J=7.3 Hz). Le spectre RMN ¹³C (figure 3-112) est caractéristique des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène (tableau 3-11). Le déplacement vers les champs faibles du signal du carbone C-3 (δ_C 82.5) de 5 ppm par rapport à celui de l'acide asiatique (δ_C 77.3) indique que l'aglycone est substitué en cette position. On observe également cette variation sur le carbone C-2 du xylose qui implique qu'il est substitué en cette position par le glucose. Ces informations sont confirmées par le spectre HMBC (figure 3-113 et 3-114) où nous observons des corrélations d'une part entre le proton anomère du xylose H-1' (δ_H 4.36) et le carbone C-3 (δ_C 82.5) et d'autre part entre le proton anomère du glucose (δ_H 4.57) et le carbone C-2' (83.3) du xylose. Toutes ces

données nous permettent d'attribuer à Cv_{14} la structure **94** qui est celle de l'hédéragénine 3-O- β -glucopyranosyl -(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside

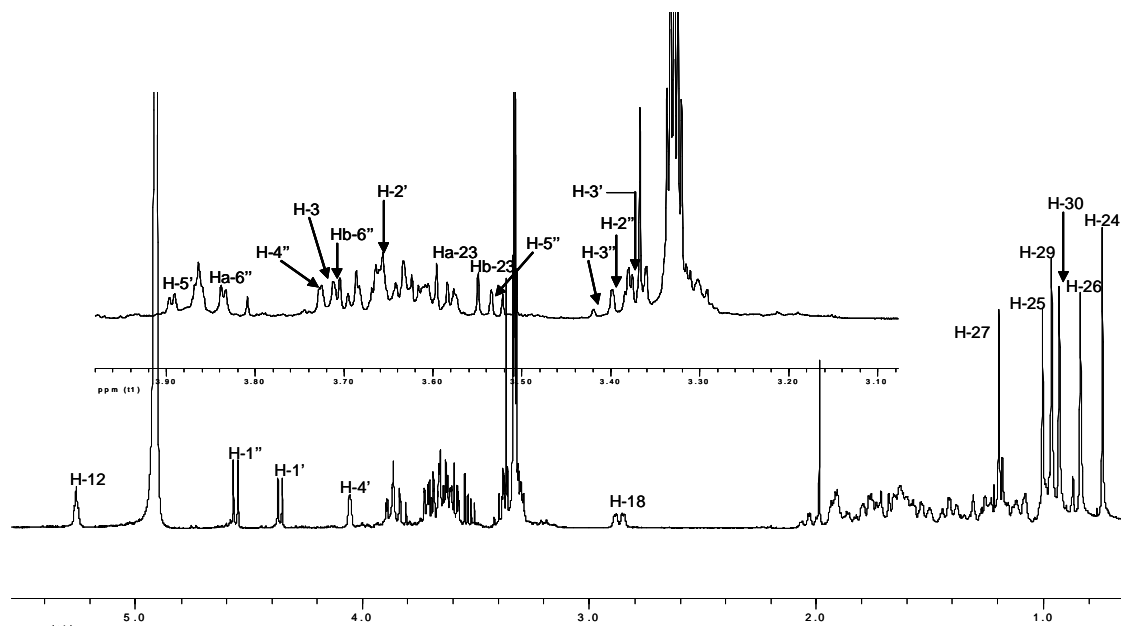


Figure 2-111: Spectre RMN 1H de Cv_{14}

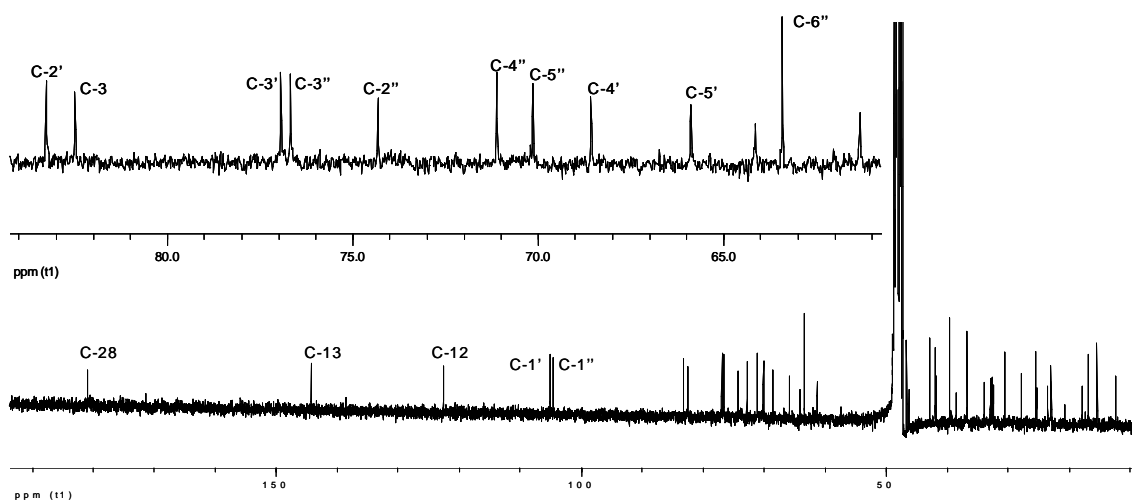


Figure 3-112: Spectre RMN ^{13}C de Cv_{14} .

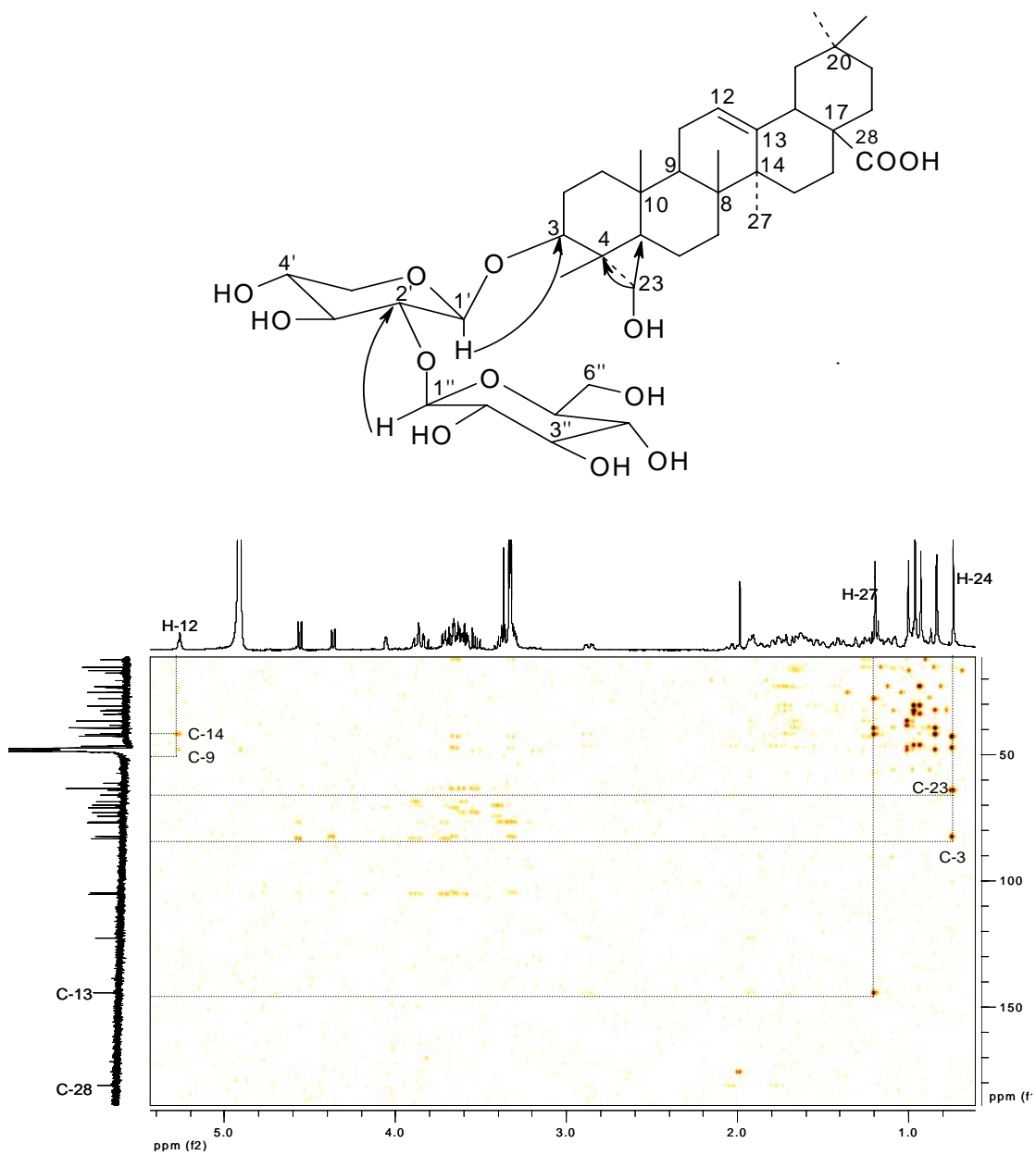


Figure 3-113: Spectre HMBC de CV₁₄

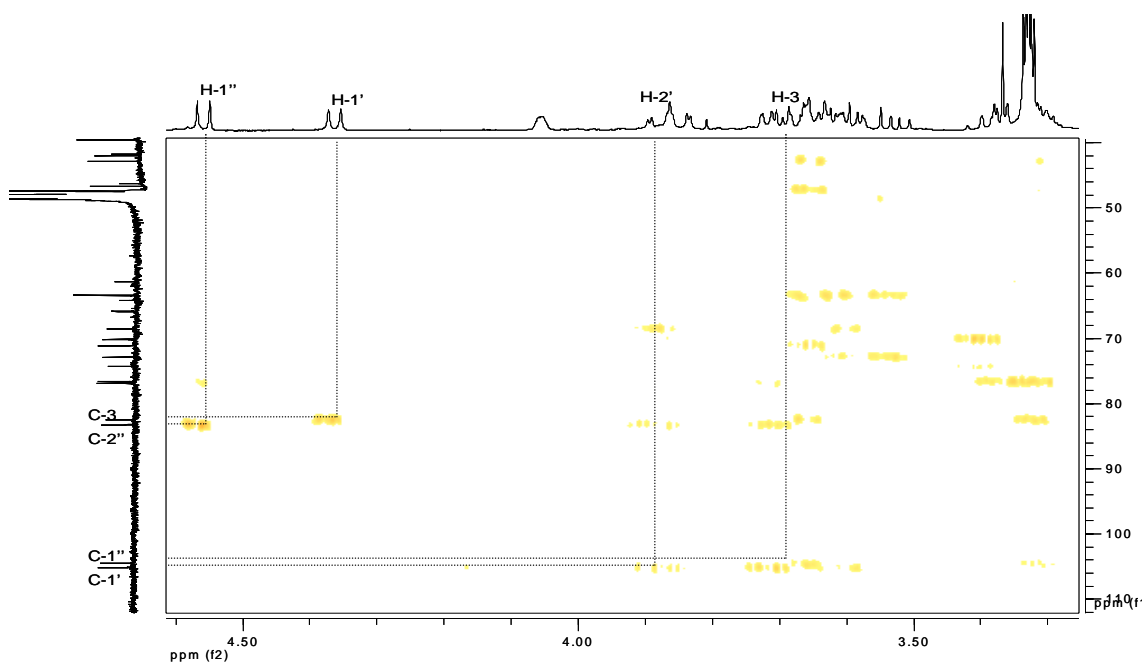
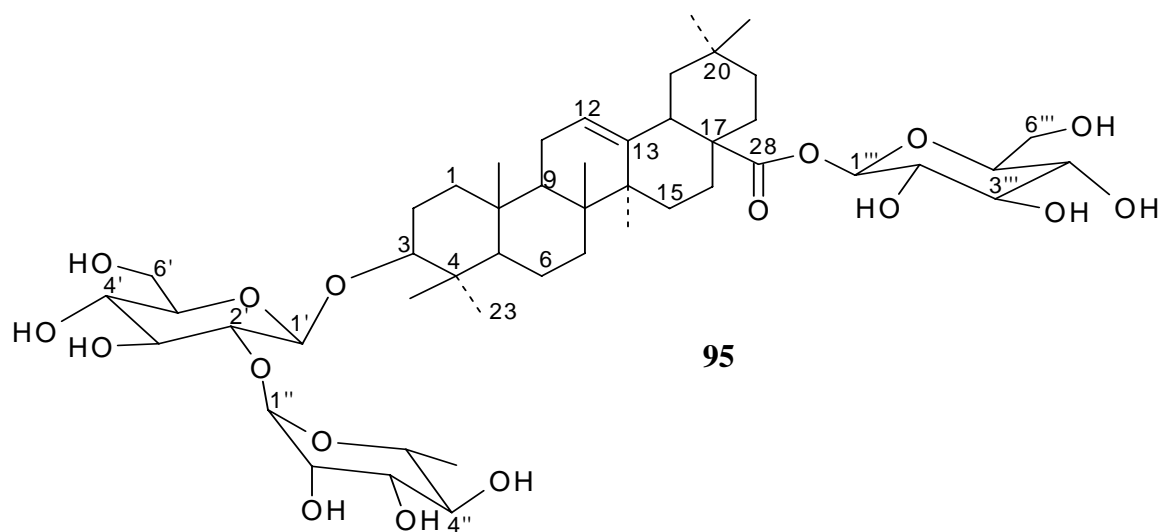


Figure 3-114: Agrandissement du spectre HMBC de Cv_{14}

A notre connaissance l'hédéragénine 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(2 \rightarrow 1)- β -glucopyranoside est un nouveau produit naturel

RMN 1H (CD_3OD , 400 MHz): 1.70 (H-1), 1.10 (H-2), 3.72 (H-3), 3.33 (H-5), 1.54 (H-6), 1.30 (H-7), 3.34 (H-9), 1.19 (H-11), 5.26 (H-12), 1.64 (H-15), 1.90 (H-16), 2.86 (H-18), 3.37 (H-19), 1.45 (H-21), 1.81 (H-22), 3.58 (H-23), 0.74 (H-24), 1.00 (H-25), 0.83 (H-26), 1.19 (H-27), 0.96 (H-19), 0.92 (H-30), 4.36 (d, $J=7.3Hz$, H-1'), 3.66 (H-2'), 3.37 (H-3'), 4.05 (H-4'), 3.89 (H-5'), 4.57 (d, $J=7.3Hz$ H-1'') 3.37 (H-2''), 3.39 (H-3''), 3.74 (H-4''), 3.40 (H-5'') 3.83 (dd, Ha-6''), 3.70 (dd, Hb-6'').

III-6-6: Identification de l'acide oléanolique 3-*O*-[α -L- rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D- glucopyranosyl]-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (Sa₁₄).



Sa₁₄ est une poudre blanche isolée de *S. aromaticum*. L'analyse de son spectre de masse montre l'ion moléculaire en ESI mode négatif à m/z 925 $[M-H]^-$ correspondant à une masse de 926 Da. La MS² de cet ion nous donne un fragment à m/z 763 $[M-H-162]^-$. Les spectres de DEPT et de ¹³C indiquent la présence de 48 carbones parmi lesquels 8 carbones quaternaires, 20 groupes CH, 12 méthylènes et 8 méthyles. L'ensemble de ces données permet d'attribuer à Sa₁₄ la formule moléculaire C₄₈H₇₈O₁₇ avec 9 degrés d'insaturation.

L'hydrolyse acide de Sa₁₄ nous a permis d'identifier le rhamnose et le glucose comme les sucres d'une part et l'acide oléanolique comme aglycone d'autre part par comparaison sur CCM avec des échantillons authentiques.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-115) nous montre trois protons anomériques à δ_H 5.39 (d, J=8.1Hz), 4.34 (d, J=7.7 Hz) et 5.10 (br, s). Les constantes de couplage indiquent que deux des sucres ont des configurations β .

Le spectre RMN ¹³C (figure 3-116) est caractéristique des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène (tableau 3-11). Le déplacement vers les champs faibles du signal du carbone C-3 (δ_c 89.3) de 11 ppm par rapport à celui de l'acide oléanolique (δ_c 78.7) indique que l'aglycone est substitué en cette position. Nous observons également cette variation sur le carbone 2 du glucose qui implique qu'il est substitué à cette position. Par ailleurs la variation du déplacement chimique de l'atome de carbone C-28 de l'aglycone de δ_c 180.1 à 177.1 par rapport à celui de l'acide oléanolique, implique que le glucose est lié à l'aglycone en C-28. Le carbone anomère qui résonne à δ_c 94.7 confirme que le glucose a estérifié la fonction acide de

l'aglycone. Les corrélations observées sur le spectre HMBC (figure 3-117) entre les protons anomères à δ_H 5.10 (H-1'''), 4.34 (H-1') et 5.39 (H-1''') avec les carbones à δ_c 85.3 (C-2'), 89.7 (C-3) et 177.1 (C-28) respectivement indiquent la position des ces sucres. L'analyse de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sa₁₄ la structure **95** qui est celle de l'acide oléanolique 3-O-[α -L- rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D- glucopyranosyl]-28-O- β -D- glucopyranosyl ester identifié pour la première fois dans les feuilles de *S. aromaticum*

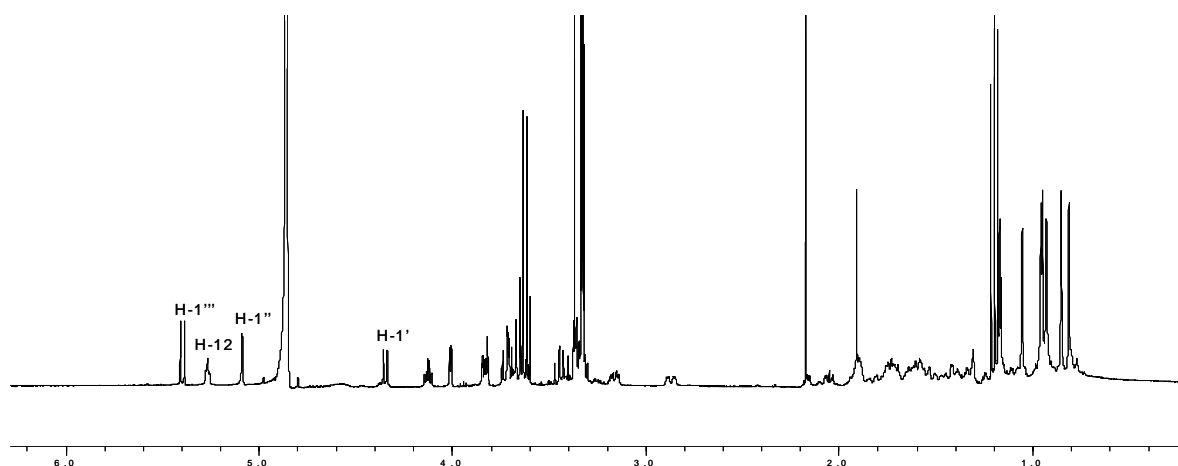


Figure 3-115: Spectre RMN ¹H de Sa₁₄

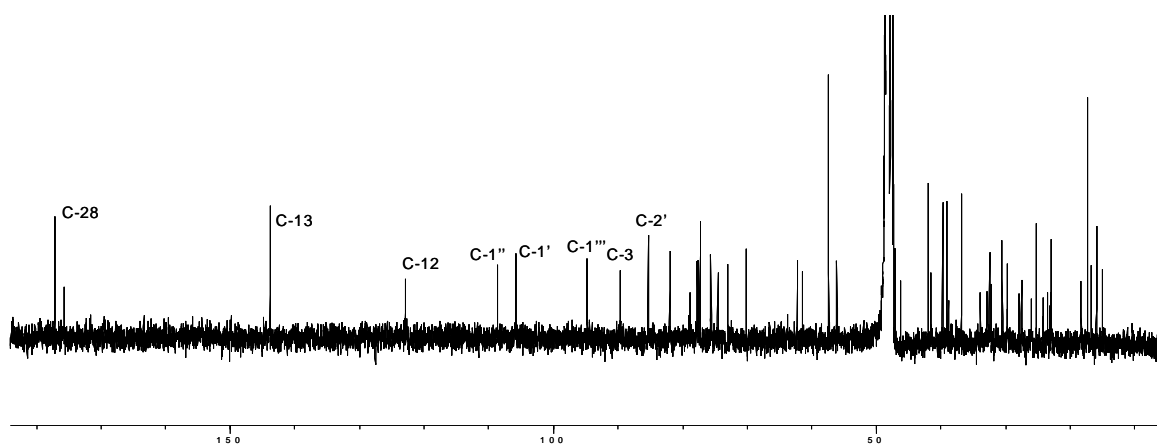


Figure 3-116: Spectre de RMN ¹³C de Sa₁₄

Nous notons également sur le spectre HMBC (figure 3-118) des corrélations entre les protons H-23, H-24 et les carbones C-3, C-4 et C-5. De même le proton H-27 corrèle avec les carbones C-8, C-13, C-14 et C-15. Nous y distinguons aussi une corrélation entre le proton H-26 et les carbones C-8, C-9, et C-14.

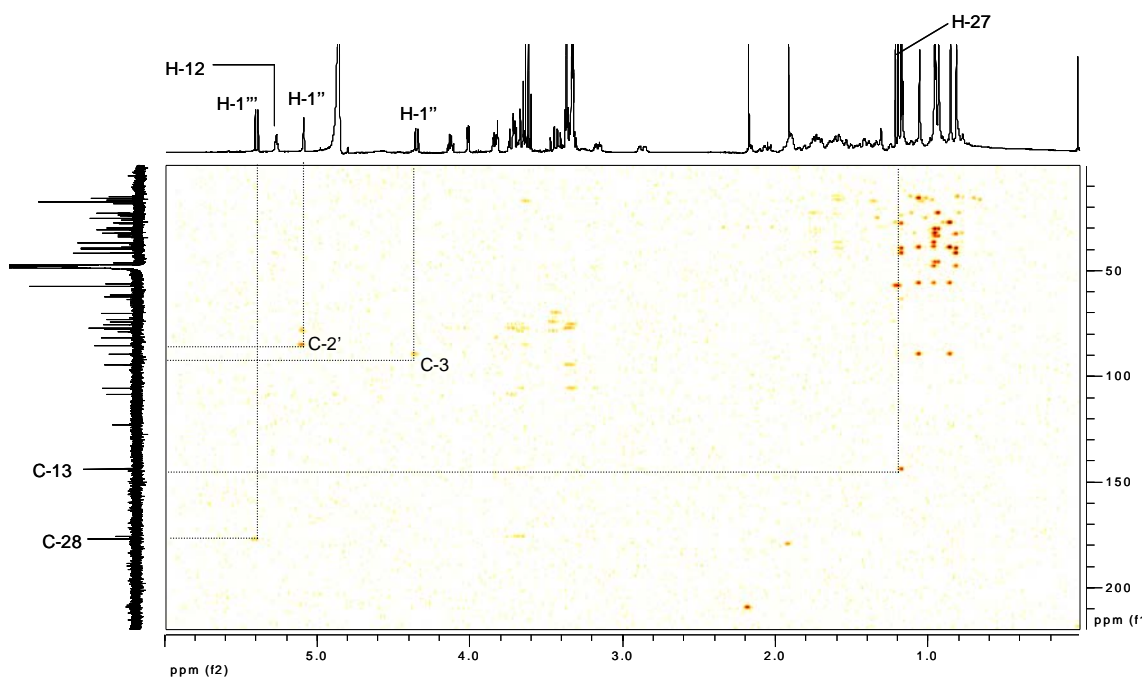
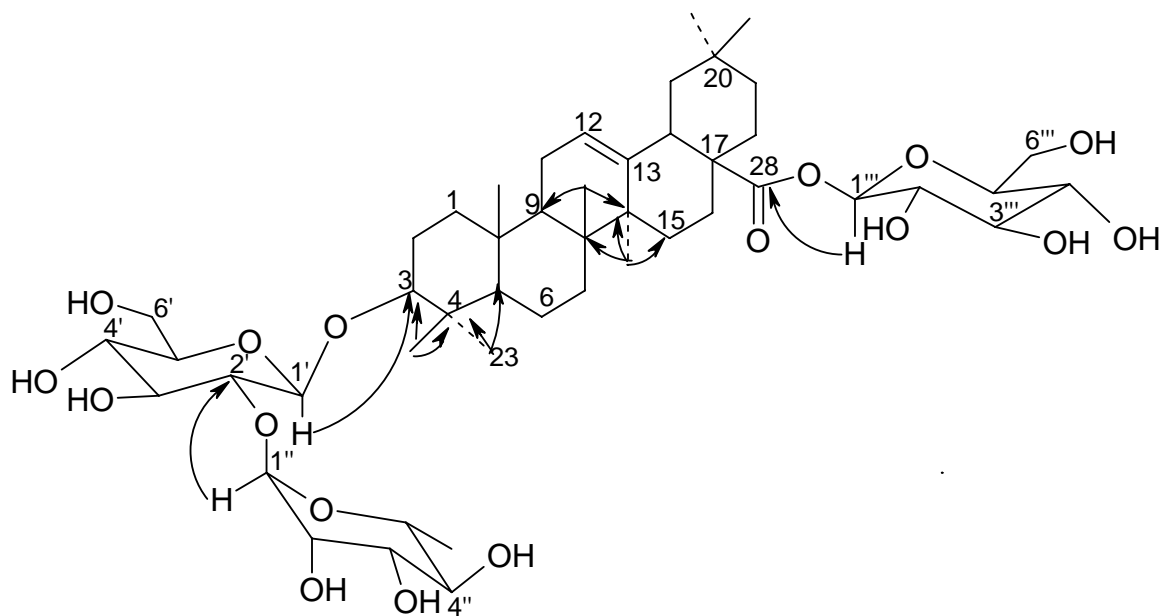


Figure 3-117: Spectre HMBC de Sa₁₄

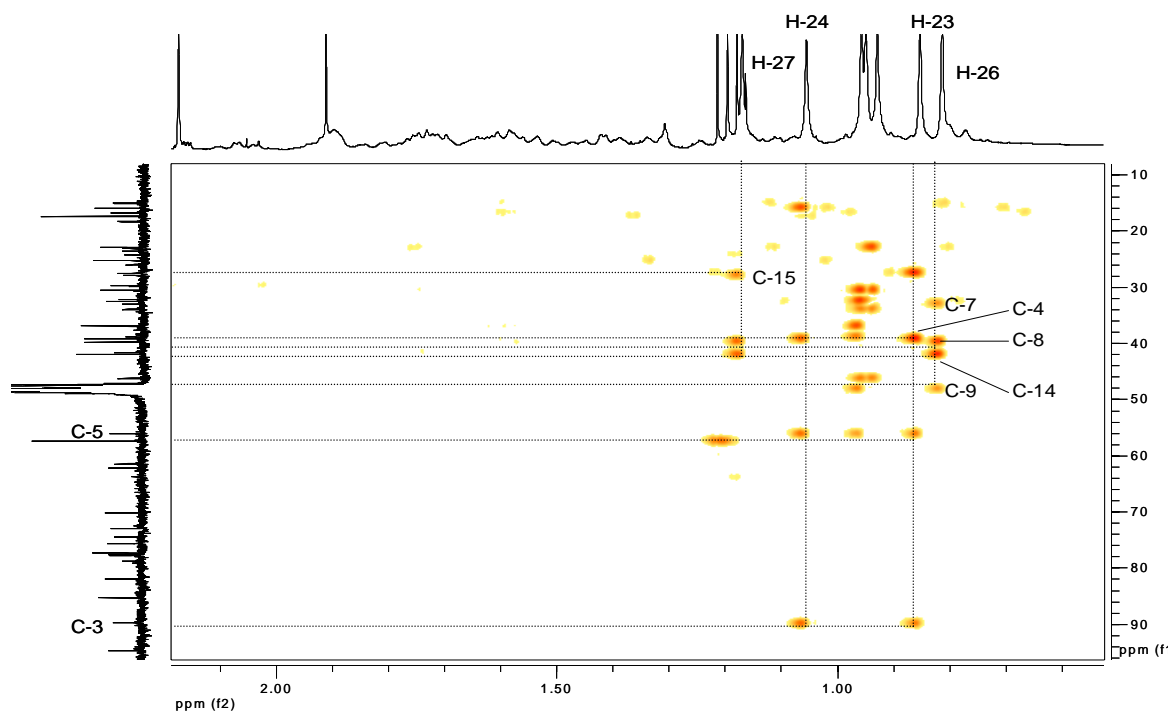


Figure 3-18: Agrandissement du spectre HMBC de Sa₁₄

Il est surprenant de constater que le carbone anomère du rhamnose est déplacé vers les champs faibles 108.6 ppm (C-1''), en attendant d'y trouver une explication et par ailleurs d'effectuer le spectre de TOCSY pour pouvoir distinguer les protons appartenant à chaque sucre nous proposons à la molécule Sa₁₄ la structure **95** qui est celle de l'acide oléanolique 3-*O*-[α -L- rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D- glucopyranosyl]-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester isolé pour la première fois de *Mussaenda pubescens*¹⁵⁷.

Tableau 3-13: Données spectrales RMN ¹³C de Cv₁₃, Cv₁₄ et Sa₁₄ dans le CD₃OD à 100 MHz

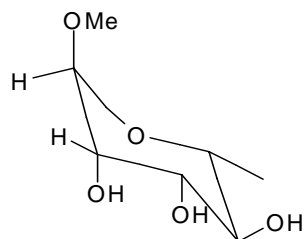
	Cv ₁₃	Cv ₁₄	Sa ₁₄
1	39.5	38.4	38.8
2	26.3	27.8	27.9
3	83.3	82.5	89.3
4	43.9	42.8	39.2
5	47.7	47.7	56.1
6	18.4	17.9	18.3
7	33.5	32.4	32.9
8	40.6	39.5	39.7
9	48.5	48.1	47.0
10	37.7	36.7	36.9
11	24.9	23.5	23.1
12	123.6	122.5	122.9
13	145.3	144.2	143.8

14	43.0	41.9	41.9
15	28.8	25.3	27.9
16	24.6	23.1	23.5
17	47.3	46.6	48.1
18	42.8	41.7	41.6
19	46.5	46.2	46.2
20	31.6	30.6	30.5
21	34.9	33.9	33.9
22	33.6	32.8	32.2
23	64.9	63.4	27.5
24	13.4	12.3	15.0
25	16.4	15.8	15.9
26	17.8	16.4	16.7
27	26.5	25.4	25.3
28	182.0	180.9	177.1
29	24.1	22.9	22.9
30	33.9	32.5	32.5
1'	106.3	105.1	105.8
2'	73.0	83.3	85.3
3'	74.5	76.9	77.7
4'	69.8	68.7	72.9
5'	66.8	65.9	68.8
6''			61.4
1''		104.5	108.6
2''		74.3	70.1*
3''		76.3	72.9*
4''		71.1	75.6*
5''		70.1	70.1*
6''		61.3	17.4
1'''			94.7
2'''			74.5
3'''			78.8
4'''			72.9
5'''			77.8
6'''			62.2

*C: carbone interchangeable

III-7: Autres métabolites

III-7-1: Identification du 1-méthoxyrhannose Sa₁₆



96

Sa₁₆ est isolé sous forme de poudre blanche. Le spectre de masse nous donne l'ion moléculaire en mode négatif à m/z 177 $[M-H]^-$. L'analyse de ses spectres de RMN ^{13}C et de DEPT nous indique la présence de 7 atomes de carbone parmi lesquels 5 groupes CH et deux méthyles. L'ensemble de ces données nous permet d'attribuer à Sa₁₆ la formule moléculaire brute $C_7H_{14}O_5$ avec un degré d'insaturation.

Le spectre de RMN 1H montre le doublet du proton anomère à δ_H 4.57 (H-1) avec une constante de couplage de 1.6Hz indiquant la configuration α du sucre. Le singulet de résonance δ_H 3.36 est attribuable au méthoxyle.

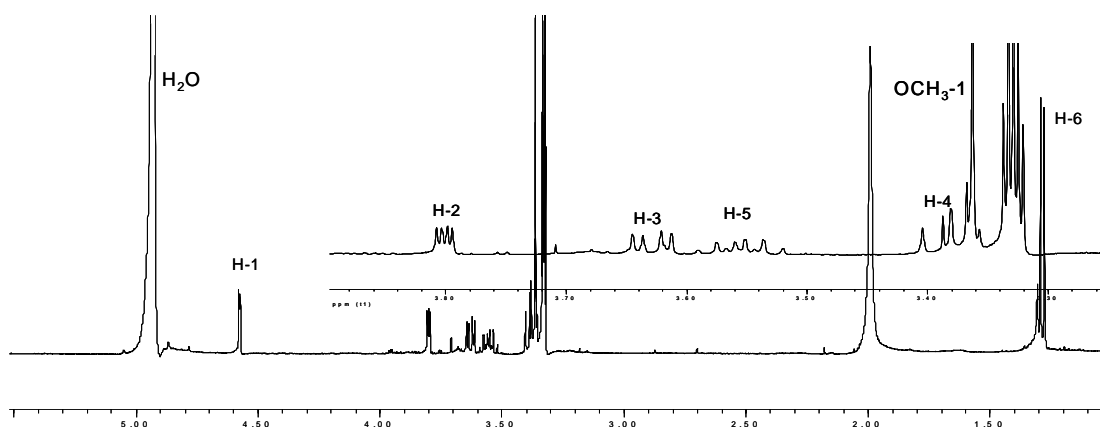


Figure 3-119: Spectre de RMN 1H de Sa₁₆

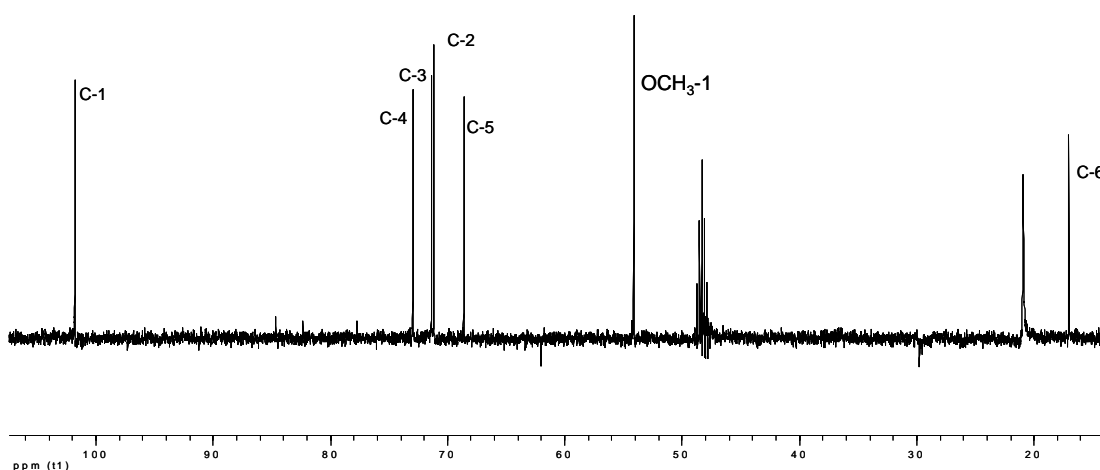


Figure 3-120: Spectre RMN ^{13}C de Sa₁₆

Le spectre de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H nous permet d'identifier à travers les couplages le sucre comme étant le rhamnose.

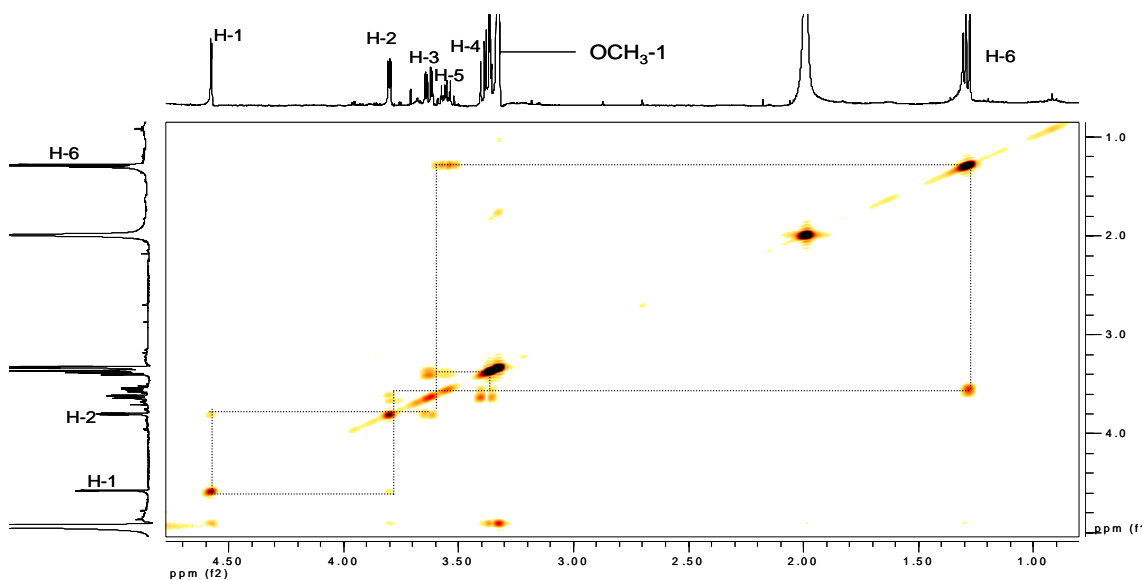


Figure 3-121: Spectre COSY de Sa₁₆

Le spectre de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance montre des corrélations entre le méthoxyle et le carbone à δ_{C} 101.8 (C-1), ainsi qu'entre le proton à δ_{H} 1.28 et les carbones à 72.9 (C-4) et 68.6 (C-5).

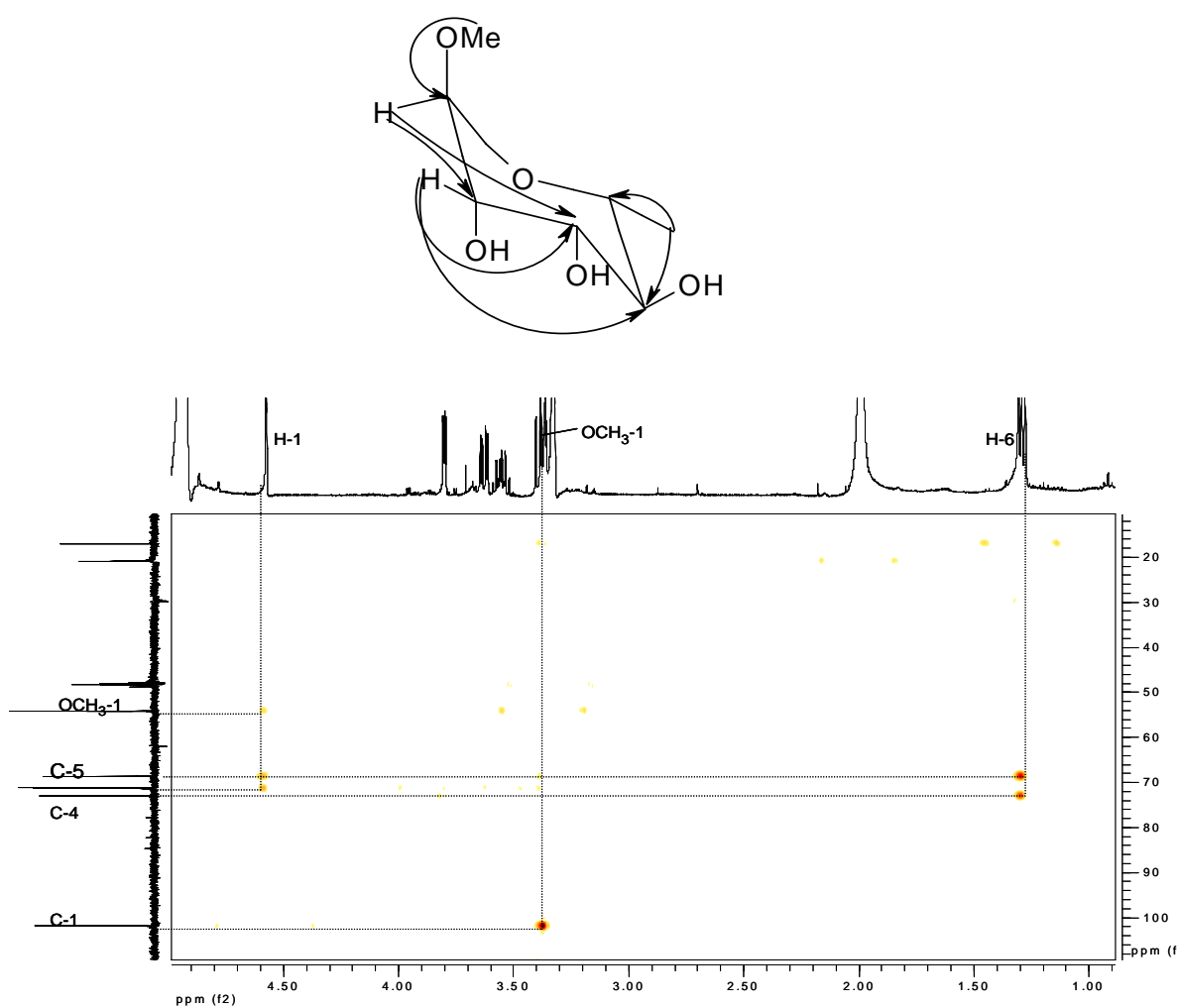


Figure 3-122: Spectre HMBC de Sa₁₆

L'ensemble de toutes ces données nous permet d'attribuer à Sa₁₆ la structure du 1-méthoxylrhannose. Cette molécule est isolée pour la première fois de *S. aromaticum*. Ce composé est isolé pour la première de de *Osmunda japonica*¹⁵⁸.

RMN ¹H Sa₁₆ (400 MHz, CD₃OD) δ_H 4.57 (d, H-1, J= 1.6 Hz), 3.80 (dd, H-2, J= 3.5 ; 1.7 Hz), 3.62 (dd, H-3, J= 9.5 ; 3.5 Hz), 3.38 (dd, H-4, J= 6.8, 9.5 Hz), 3.56 (m, H-5), 1.28 (d, H-6, J= 6.2 Hz). RMN ¹³C Sa₁₆ (100 MHz, CD₃OD) δ_C 101.8 (C-1), 71.2 (C-2), 71.3 (C-3), 72.9 (C-4), 68.6 (C-5), 17.0 (C-6), 54.1 (OCH₃)

III-7-2: Identification des acides gras des extraits apolaires de *C. viminalis* et *S. aromaticum* Par GC/MS

Des fractions contenant des acides gras provenant des extraits à l'hexane ont été analysées par GC/MS. La source utilisée en masse a été l'impact électronique (EI). Cette identification a été faite par comparaison des spectres de masse EI avec une librairie NIST.

Tableau 3-14: Composés identifiés dans les extraits à l'hexane de *C. viminalis* et *S. aromaticum* par GC/MS

Numéro	Temps de rétention	Nom des composés	Masse moléculaire
1	7.12	Eucalyptol ^{ab}	152
2	7.94	Acide 11, 13-dihydroxytertadéc-5-ynoïque methyl ester ^{ab}	270
3	9.19	Acide 10,12-octadécadiynoïque ^{ab}	276
4	15.37	β-Guaiène ^{ab}	204
5	16.93	Acide 9, 12,15-octadécatrienoïque 2,3-dihydroxypropyl ester ^b	352
6	19.54	Longifolène ^{ab}	204
7	20.67	α-Guaiène ^{ab}	204
8	22.7	α-Terpinéol ^{ab}	154

X^{ab} : Molécule identifiée dans les deux plantes

X^b : Molécule identifiée dans *S. aromaticum* uniquement

Le profil GC/MS des composés volatils de *C. viminalis* est presque similaire à celui de *S. aromaticum*, la seule différence se trouve au niveau de la molécule à 16.93 minutes. Cette molécule est uniquement présente dans l'extrait de *S. aromaticum*. L'eucalyptol (7.12 min) est le composé majoritaire de ces extraits.

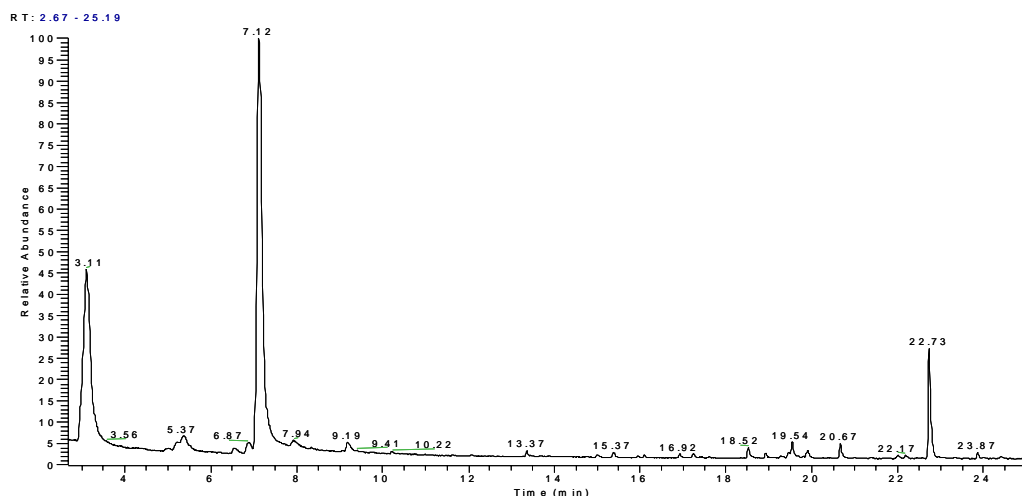


Figure 3-123: Profil GC/MS des composés volatils de *C. viminalis*

RT: 2.84 - 25.59

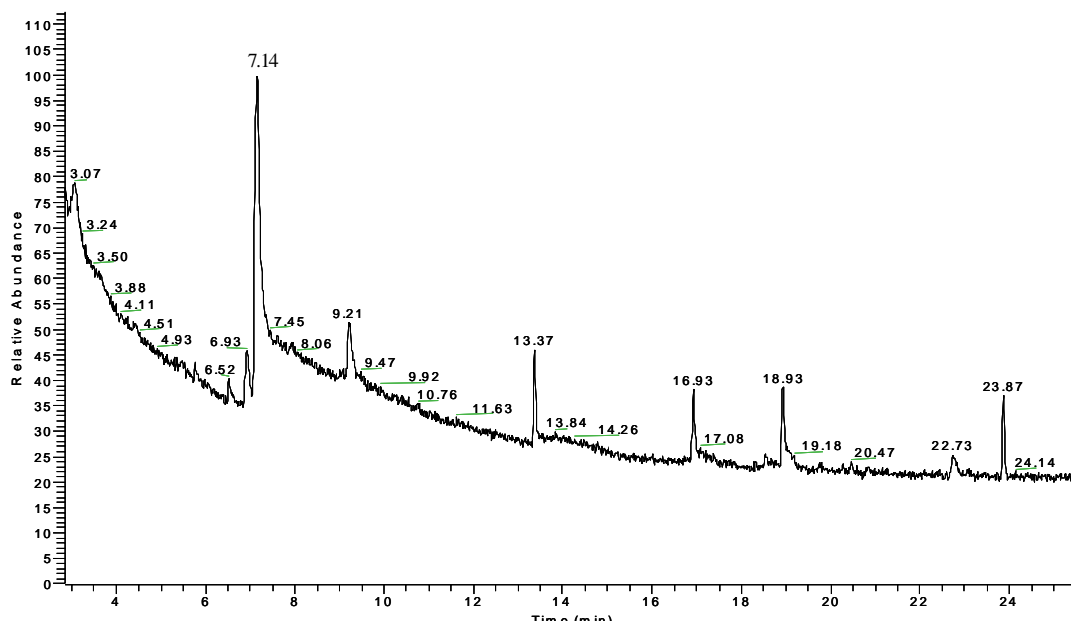


Figure 3-124: Profil GC/MS de *S. aromaticum*

Le β -guaiène (15.37min) et l' α -guaiène (20.67 min) étant deux isomères, ils ont été identifiés en fonction de l'intensité de quelques ions caractéristiques. C'est ainsi que le spectre de masse du β -guaiène montre les ions à m/z 147 et 161 avec des intensités respectives de 40 et 100% alors que celui de l' α -guaiène montre ces ions avec des intensités de 70 et 20%.

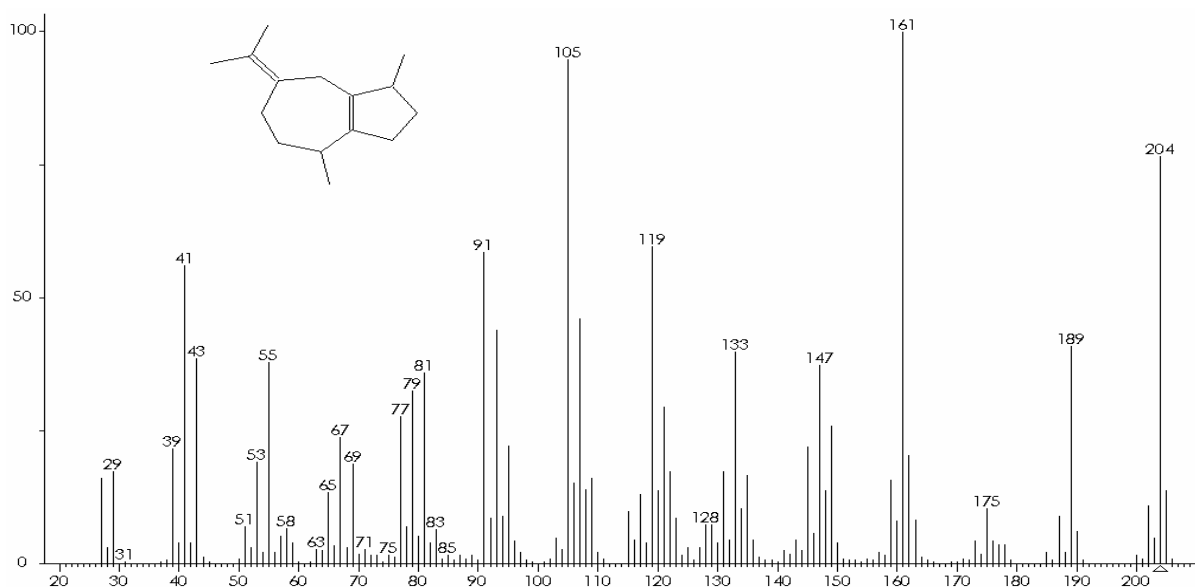


Figure 3-125: Spectre de masse du β -guaiène

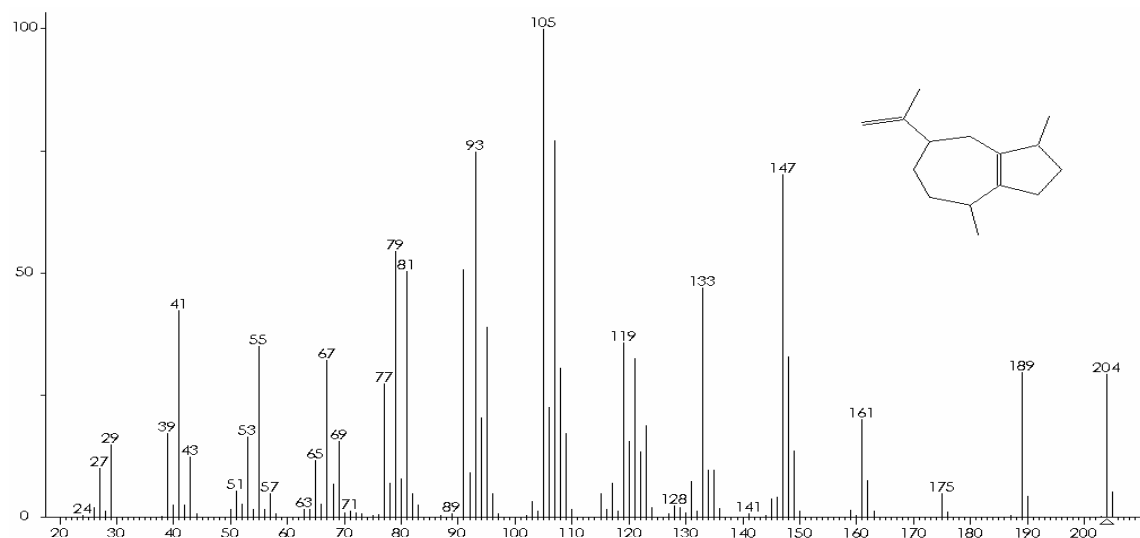


Figure 3-126: Spectre de masse du α -guaiène

III-8: Tests Biologiques

III-8-1: Tests antibactériens

Les bactéries sont responsables de diverses infections dans les organismes vivants allant jusqu'à causer de nombreux décès chaque année. Avec la découverte des antibiotiques les chercheurs ont espéré pouvoir éradiquer certaines maladies. Malheureusement la large utilisation de ces médicaments a généré une résistance croissante des bactéries face aux antibiotiques. Dans le but de trouver des molécules nouvelles et efficaces comme alternative, nous avons fait une chromatographie suivie de tests biologiques pour rechercher les molécules actives des extraits.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* (gram négatif) et *Bacillus subtilis* (gram positif) comme bactéries. *S. sonnei* est pathogène pour l'homme et nécessite des conditions particulières pour la manipulation, raison pour laquelle nous l'avons fait à l'Institut de Microbiologie de l'Université de Neuchâtel. Quant à *E. coli* et *B. subtilis* ils ne sont pas pathogènes et ne présentent aucun danger pour le manipulateur.

B. subtilis est un excellent modèle pour l'étude des bactéries pathogènes telles *Staphylococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* et autres staphylocoques. *E. coli* est une bactérie communément trouvée dans la flore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud, elle représente l'espèce dominante de la flore fécale aérobie. Il existe plusieurs types dont certains pouvant causer des maladies infectieuses¹⁵⁹.

III-8-2: Tests antifongiques

Les champignons sont classés dans le domaine des Eucaria puisqu'ils possèdent un noyau délimité par une membrane. Ils font partie du règne des fungi ou mycota. Pour ce travail, nous avons choisi pour les tests *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

Penicillium sp. et *Aspergillus sp.* s'attaquent très souvent aux produits agroalimentaires et aux denrées en stockage. *Trichoderma sp.* est un champignon capable de parasiter de nombreuses espèces de champignons et par conséquent néfaste pour la culture des champignons comestibles tel que *Agaricus sp.* Il est en revanche utilisé comme contrôle biologique des plantes.

III-8-3: Activité biologique des extraits de plantes étudiés

III-8-3-1: Tests insecticides de l'extrait de *E. saligna*

L'extrait brut *Eucalyptus saligna* et les fractions obtenues de la chromatographie liquide sous vide (VLC) (tableau 2-1) ont été soumis aux tests insecticides sur *Tribolium castaneum* et *Tribolium confusum* (tableau VI-1).

Tableau 3-15: Résultats des tests insecticides de l'extrait des feuilles de *E. saligna*

Fraction	Toxicité par contact		Répulsion	
	<i>T. Castaneum</i>	<i>T. confusum</i>	<i>T. Castaneum</i>	<i>T. confusum</i>
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0	0	+	+
Fraction 1	0	0	+++	+++
Fraction 2	0	0	++	++
Fraction 3	0	0	0	0
Fraction 4	0	0	0	0

0: pas d'activité, +: Faible activité, ++: Activité moyenne, +++: Forte activité

Le pourcentage de répulsion moyen observé en fonction des doses de l'extrait de *E. saligna* est reporté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3-16: Pourcentage moyen de répulsion de l'extrait de *E. saligna* sur *T. castaneum* et *T. confusum* en fonction des doses

Dose en mg/cm ²	<i>E. saligna</i>	
	<i>T. castaneum</i>	<i>T. confusum</i>
1	20	40
2	20	40
4	40	60
8	90	60

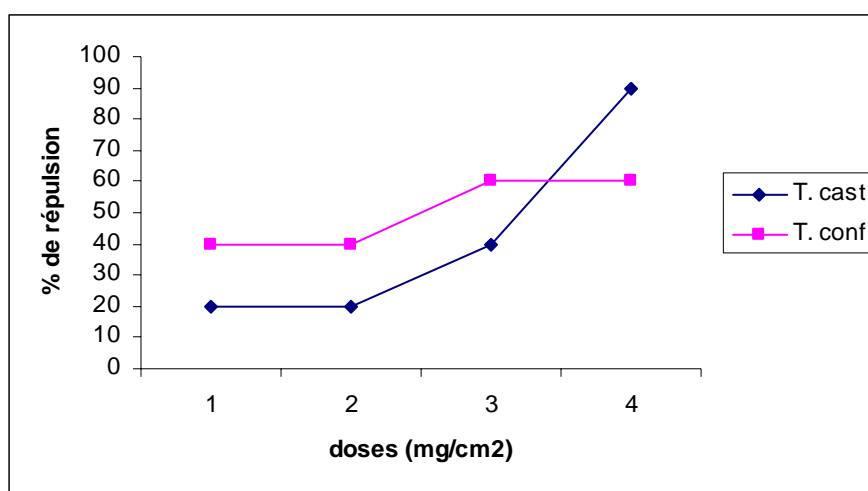


Figure 3-127: Pourcentage moyen de répulsion de l'extrait de *E. saligna* sur *T. castaneum* et *T. confusum*

Aux faibles doses (1 et 2 mg/cm²), les extraits de *E. saligna* occasionnent un effet répulsif constant tout au long de l'exposition sur *T. castaneum* et *T. confusum*. Par ailleurs nous constatons que *T. confusum* est plus sensible à ces doses. La concentration la plus élevée occasionne une répulsion significative vis-à-vis *T. castaneum*. Cette sensibilité peut être due à la présence des phloroglucinols dans l'extrait. Il a été montré par Singh¹⁶⁰ que les phloroglucinols de type sideroxydonal et robustaol isolés de *E. globulus* et *E. grandis* ont un effet répulsif à l'égard de la moule bleue *mytilus edulis galloprovincialis*¹⁶⁰. Nous n'avons pas pu tester les différents composés isolés par défaut de quantité. Néanmoins, les différentes fractions issues de la chromatographie flash ont été testées et nous avons noté que les fractions (I et II) contenant les phloroglucinols (sideroxydonal C et le dimère de la jensenone) avaient un effet répulsif vis-à-vis de ces ravageurs.

III-8-3-2: Activités biologiques de *Calistemon viminalis*, *Syzygium guineense* et *Syzygium aromaticum*

Les extraits de *Calistemon viminalis*, *Syzygium guineense* et *Syzygium aromaticum* ont été dissous dans de l'eau et re-extrait à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au n-butanol. Les différents sous- extraits ont été soumis à des tests biologiques et chimiques afin de déterminer leurs activités.

- antifongique contre *Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.*
- antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei*
- anti-radicalaire avec le DPPH

Les tests antifongiques et antibactériens ont été effectués par diffusion sur minidisque et par la méthode bioautographique.

Tableau 3-17: Résultats des tests antifongiques, antibactériens, et anti-radicalaire de *S. guineense*, *C. viminalis* et *S. aromaticum*

Espèces	Organes	Extrait	Th	Asp	Pe	Ec	Bs	Ss	DPPH	
<i>C. viminalis</i>	Feuilles	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	+	+	+	+	+	+	+	
		Hexane	++	++	++	+++	+++	++	+	
		Acétate d'éthyle	0	0	0	0	0	0	0	++
		n-butanol	0	0	0	0	0	0	0	++
<i>S. guineense</i>	Feuilles	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0	0	0	+	+	0	0	
		Hexane	0	0	0	0	0	0	0	
		Acétate d'éthyle	0	0	0	++	++	+	0	
		n-butanol	0	0	0	+	+	0	0	
<i>S. guineense</i>	Ecorces	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0	0	0	+	+	0	+	
		Hexane	0	0	0	0	0	0	0	
		Acétate d'éthyle	0	0	0	+	+	+	0	
		n-butanol	0	0	0	0	0	0	0	++
<i>S. aromaticum</i>	Feuilles	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0	0	0	+	+	0	+	
		Hexane	0	0	0	+	++	0	+	
		Acétate d'éthyle	0	0	0	0	0	0	0	+++
		n-butanol	0	0	0	0	0	0	0	+++

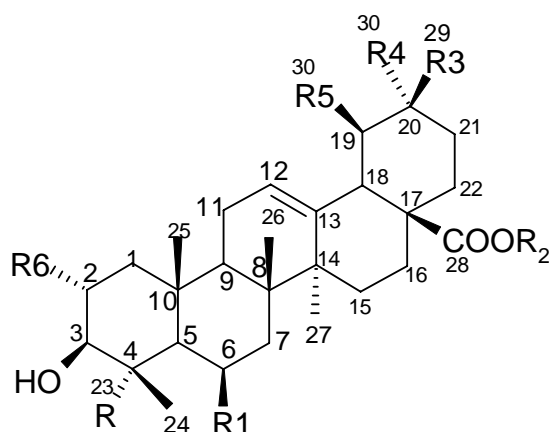
- 0: pas d'activité, +: Faible activité, ++: Activité moyenne, +++: Forte activité

-Th: *Trichoderma harzianum*, Asp: *Aspergillus sp.*, Pe: *Penicillium sp.*, Ec: *Escherichia coli*, Bs: *Bacillus subtilis*, Ss: *Shigella sonnei*

III-8-4: Activités biologiques des métabolites isolés

III-8-4-1: Les triterpènes

Les extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles et des écorces de *Syzygium guineense* ont montré des activités antibactériennes sur les bactéries gram positif (*B. subtilis*) et gram négatif (*E. coli*, *Shigella sonnei*) par la méthode de diffusion sur minidisques. La méthode bioautographique indique la présence de deux composés responsables de ces activités. La chromatographie suivie des essais biologiques a permis d'isoler le mélange d'acide arjunolique et d'acide asiatique et un mélange d'acide 6-hydroxyarjunolique et d'acide 6-hydroxyasiatique. D'autres composés ayant le même squelette de base que les molécules actives ont été isolées dans le but d'établir des relations structure-activité. Le chloramphénicol a été utilisé comme contrôle positif et le solvant seul comme contrôle négatif.



Nom de la molécule	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Acide oléanolique (83)	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H
Acide 2-hydroxyasiatique (84)	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	OH
Acide 2-hydroxyoléanolique (85)	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	H	OH
Acide asiatique (86)	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	H	CH ₃	OH
Acide arjunolique (87)	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	CH ₃	H	OH
Acide 6-hydroxyasiatique (88)	CH ₂ OH	OH	H	CH ₃	H	CH ₃	OH
Acide 6-hydroxyarjunolique (89)	CH ₂ OH	OH	H	CH ₃	CH ₃	H	OH
Acide asiatique 28-β-glucopyranosyle ester (90)	CH ₃	H	Glc	CH ₃	H	CH ₃	OH
Acide arjunolique 28-β-glucopyranosyle ester (91)	CH ₃	H	Glc	CH ₃	CH ₃	H	OH

Tableau 3-18: Tests antibactériens des triterpènes. MIQ en µg/ spot

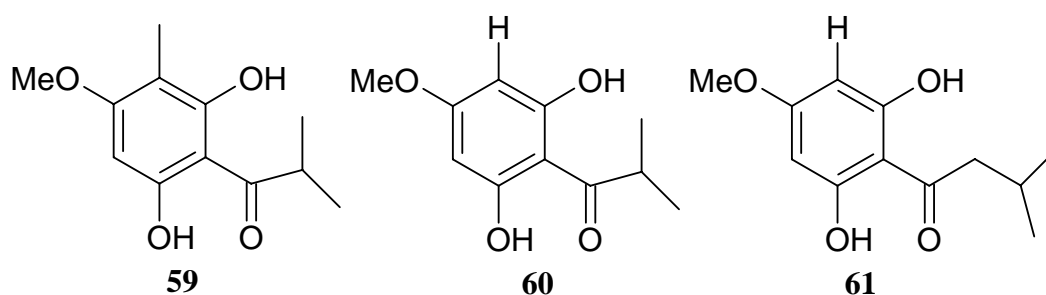
	83	84+85	86	87	88+89	90+91	90	Chloramphénicol
<i>E. coli</i>	0	0	5	3	6	0	0	0.3
<i>B. subtilis</i>	0	0	0.75	0.5	3	0	0	0.1
<i>S. sonnei</i>	0	0	30	30	50	0	0	2

QIC: Quantité minimale d'inhibition

Les résultats de ces tests obtenus par la méthode bioautographique indiquent que l'hydroxyle en C-23 a un apport très important dans l'activité de ces molécules (**86**, **87**). Par ailleurs la présence d'un hydroxyle supplémentaire en C-6 diminue considérablement cette activité (**88+89**). Quand le proton de l'acide est substitué par le glucopyranosyl ou quand l'hydroxyle en C-23 est absent, on constate une perte totale de cette activité. C'est la toute première fois que ces molécules sont mentionnées pour leurs activités antibactériennes, elles sont plutôt connues pour leurs activités antivirales¹⁶¹.

III-8-4-2: Les phloroglucinols

Les phloroglucinols sont connus pour leurs activités antibactériennes et anti-virales^{118;162}. Les phloroglucinols isolés de *C. viminalis* ont été testés sur les champignons, les bactéries par la méthode bioautographique et pour leur activité anti-oxydante sur CCM. Les doses sont en µg/spot.

**Tableau 3-19:** Tests antibactériens des phloroglucinols (CV₁₀, CV₂₁ et CV₂₂). MIQ (µg/ spot)

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
CV ₁₀ (59)	0.4	0.2
CV ₂₁ (60)	0.6	0.5
CV ₂₂ (61)	4	0.6
Chloramphénicol	0.3	0.1

Tableau 3-20: Tests antifongiques des phloroglucinols (Cv₁₀, Cv₂₁ et Cv₂₂). MIQ en µg/ spot

	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>T. harzianum.</i>
Cv ₁₀ (59)	0.5	8	2
Cv ₂₁ (60)	0.75	6	16
Cv ₂₂ (61)	10	10	>30
Amphotéricine	1.5	3	3

La molécule Cv₁₀ est la plus active tant sur les bactéries que sur les champignons. Il est à noter que d'un point de vue général, ces molécules sont plus actives sur les bactéries gram positives comme le montre les travaux de Yamakoshi³⁸. Cv₁₀ et Cv₂₁ montrent une activité considérable à l'encontre d'*Aspergillus* alors que l'activité est faible vis-à-vis des autres champignons testés.

Cv₁₀, Cv₂₁ et Cv₂₂ ont tous montré des activités anti-oxydantes à 10 µg/spot par la méthode bioautographique.

III-8-4-3: Les alkylphénols

Les alkylphénols sont trouvés dans les feuilles de *Ginkgo biloba*. Cette classe de composés possède des activités insecticides¹⁶³, antibactériennes contre les bactéries gram-positives¹⁶⁴, ils sont également cytotoxiques¹⁶⁵, mutagéniques¹⁶⁶, neurotoxiques¹⁶⁷ et antitumoraux¹⁶⁸. Ils provoquent enfin des allergies de contact¹⁶⁹. Dans nos travaux nous avons évalué leurs activités contre les bactéries (gram-positives, gram-négatives) et les champignons par la méthode bioautographique.

Le composé Sah₁ a montré une activité minimale à 10µg/spot contre *Trichoderma harzianum* mais comme Sah₂-Sah₄, il reste inactif vis-à-vis des autres champignons. Nous observons une activité appréciable contre les bactéries comme le démontrent les résultats présentés sur le tableau ci-dessous.



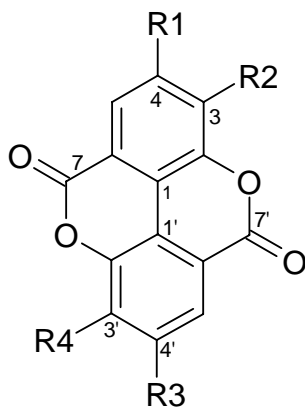
Tableau 3-21: Tests antibactériens des alkylphénols (Sah₁, Sah₂, Sah₃, Sah₄). MIQ en µg/spot

molécules	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Sah ₁ (49)	0.5	0.2
Sah ₂ (50)	1	0.5
Sah ₃ (51)	1	0.8
Sah ₄ (52)	15	5
Chloramphénicol	0.3	0.1

Ces résultats permettent de constater que la diminution du nombre d'insaturations sur la chaîne aliphatique entraîne une diminution de l'activité inhibitrice de la molécule sur la bactérie gram-positif, qui est par ailleurs la plus sensible. Ceci est en accord avec les travaux de Kubo¹⁶⁴. Cette forte activité des composés **49-52** peut être due à la perturbation de la membrane externe de la bactérie par la chaîne aliphatique qui facilite la pénétration de la molécule dans la cellule. Au delà de cette activité antibactérienne, nos travaux nous ont permis d'attribuer également une activité anti-oxydante par la méthode bioautographique. Les molécules Sah₁-Sah₄ ont montré une activité anti-oxydante à la dose minimale de 5µg/spot. Ce serait pour ces raisons, que certains composés appartenant à cette classe comme l'acide anarcadique sont utilisés pour la conservation des denrées nutritives en industrie agroalimentaire et pour la fabrication de produits cosmétiques¹¹⁶.

III-8-4-4: Les acides ellagiques

Les dérivés de l'acide ellagique [Sg₁ (**53**), Sg₂ (**54**), Sg₃ (**55**), Sgf₇ (**56**), Cv₁₁ (**57**) et Cv₁₂ (**58**)] isolés de *S. guineense* et *C. viminalis* ont montré des activités antioxydantes. Seuls sgf₇ et Cv₁₂ possédaient une activité négligeable.



molécules	R1	R2	R3	R4
Acide ellagique (97)	OH	OH	OH	OH
Acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'-rhamnoside (53)	OH	OCH ₃	rhamnoside	OH
Acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'-(2''acétyl) rhamnoside (54)	OH	OCH ₃	2''acétylrhamnoside	OH
Acide 3- <i>O</i> -méthoxyl ellagique-4'-(3''-acétyl) rhamnoside (55)	OH	OCH ₃	2''acétylrhamnoside	OH
Acide 3, 4, 3'-triméthoxyl ellagique-4'-(2'',3'',4''-triacétyl) rhamnoside (56)	OCH ₃	OCH ₃	(2'',3'',4''-triacétyl) rhamnoside	OCH ₃
Acide 3- <i>O</i> -méthoxylellagique-4'-glucoside (57)	OH	OCH ₃	glucoside	OH
Acide 3,3',4-triméthoxylellagique-4'-glucopyranoside (58)	OCH ₃	OCH ₃	glucopyranoside	OCH ₃

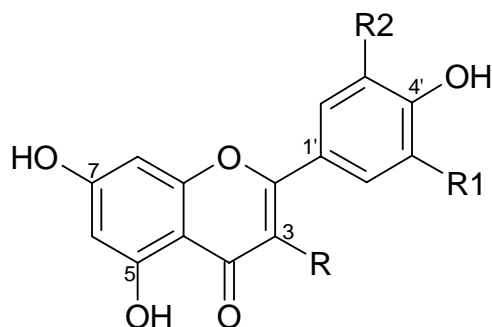
Tableau 3-22: Tests anti-oxydant par la méthode UV

Molécules	IC ₅₀ (μM)
97	4.9 ±0.30
53	6.1±0.50
54	5.8±0.44
55	6.2±0.46
56	>30
57	9.3±0.30
58	>25

De part nos résultats, nous pouvons dire que l'activité anti-oxydante des dérivés de l'acide ellagique ne dépend pas de la nature du glycoside mais du nombre d'hydroxyles libres sur l'aglycone. L'activité diminue en corrélation avec le nombre d'hydroxyles substitués, et cette activité tend à s'annuler quand toutes les fonctions hydroxyles sont substituées par des méthoxyles.

III-8-4-5 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été isolés de *S. aromaticum* et de *C. viminalis*. L'activité anti-oxydante a été évaluée par la méthode de détection UV.



Molécules	R	R1	R2
Quercétine (64)	OH	OH	H
Myricétine (65)	OH	OH	OH
Myricétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (66)	O-glucopyranoside	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (67)	O-glucopyranoside	OH	H
Quercétine-3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (68)	6''-Galloyl- β galactopyranoside	OH	H
Quercétine-3- <i>O</i> - β -rhamnopyranoside (69)	O-rhamnopyranoside	OH	H
Myricétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranoside (70)	O-arabinose	OH	OH
Myricétine-3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (71)	6''-Galloyl- β galactopyranoside	OH	OH
Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (72)	xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)-rhamnopyranosyl	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (73)	xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)-rhamnopyranosyl	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranoside (76)	arabinopyranosyl	OH	H

En plus de ces composés nous avons également évalué l'activité anti-oxydante de l'eucalyptine (**77**), du mélange de (4S)- α -terpinéol 8-*O*- β -D-(6-*O*-galloyl)glucopyranoside (**74**) et (4R)- α -terpinéol 8-*O*- β -D-(6-*O*-galloyl)glucopyranoside (**75**) et de la catéchine (**78**). La IC₅₀ de chacun de ces produits a été déterminée.

Tableau 3-23: Tests antioxydant par la méthode UV

Numéro des composés	IC ₅₀ +SD (μ M)
64	3.30 \pm 0.03
65	4.00 \pm 0.10
66	5.40 \pm 0.06
67	5.25 \pm 0.05
68	2.25 \pm 0.04
69	5.30 \pm 0.03
70	5.90 \pm 0.31
71	2.76 \pm 0.09

72	8.60± 0.35
73	10.9± 0.08
76	3.60± 0.11
77	20.5± 0.03
74+75	2.80± 0.34
78	10.80± 0.33
72+73	9.30± 0.41
68+73	7.30± 0.03
Trolox	6.04± 0.02

Valeur de la moyenne ± SD (n= 3)

Les résultats de ces tests antioxydants montrent que l'activité des flavonols baisse progressivement en présence d'un ou de deux sucres substitués en C-3. Cette activité est accrue si le sucre du flavonol est estérifié par une unité galloyl. D'autre part nous constatons généralement que la quercétine et ses dérivés sont plus actifs que la myricétine et ses dérivés. La présence de l'hétérocycle C, composé du carbonyle en C-4, de la double liaison en C-2 et de l'hydroxyle en C-3 favorise la délocalisation des électrons du noyau A à B. Cette délocalisation d'électrons stabilise le radical formé après la perte de l'hydrogène¹⁷⁰⁻¹⁷². Nous nous sommes intéressés à l'étude synergique des flavonols d'activités différentes et des flavonols d'activités voisines dans le but de savoir si un effet synergique pouvait modifier leur activité. Nos résultats montrent que le mélange des flavonols ne change pas de façon considérable les activités, mais qu'il y a plutôt un équilibre entre les flavonols d'activités différentes.

IV: DISCUSSION DES RESULTATS

IV-1: Phytochimie

IV-1-1-*Eucalyptus saligna*

Les études précédentes de *E. saligna* montrent qu'il a été isolé de cette plante le sideroxylin et le 8-déméthylsideroxylin¹⁰. D'un point de vue chimiotaxonomique, il n'est pas surprenant d'isoler l'eucalyptine de notre extrait, car c'est un dérivé méthoxylé du sideroxylin. La betuline, l'uvaol, l'acide ursolique et le β -sitostérol-3-O- β -D-glucopyranoside sont des métabolites généralement retrouvés dans les plantes. Le sidéroxylylone C et le dimère de la jensénone sont des acylphloroglucinols dimérisés uniques au genre *Eucalyptus*⁴⁴. Selon Ghisalberti⁴⁴, la jensénone est liée au précurseur des sideroxylylones, euglobales et macrocarpales qui sont tous des acylphloroglucinols dimérisés, par deux voies biogénétiques différentes dérivant des mêmes précurseurs. La jensénone, le robustaol A ou les phloroglucinols du type sideroxylylone sont obtenus soit par une substitution électrophile aromatique syn soit par une réaction Diels-Alder. Il est intéressant de retrouver dans le même extrait des feuilles de *E. saligna* le dimère de la jensénone et le sidéroxylylone C qui résultent des deux voies biogénétiques possibles: La substitution électrophile pour la jensénone et la Diels-Alder pour le sidéroxylylone C.

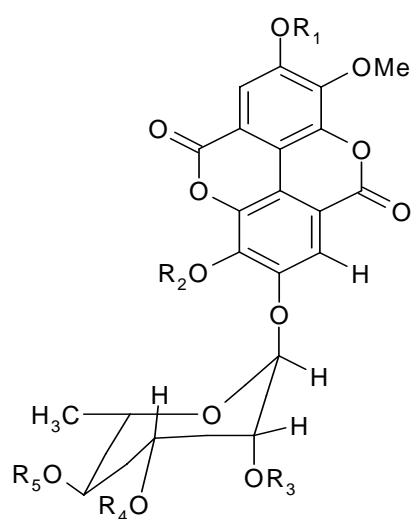
IV-1-2: *Callistemon viminalis*

L'unique étude phytochimique menée sur *C. viminalis* à notre connaissance a conduit à l'isolement des tétradécahydroxanthenedione⁴⁸. Nos travaux ont permis d'isoler l'eucalyptine, trois acylphloroglucinols, deux dérivés glucosylés de l'acide ellagique, des triterpènes et des saponosides. La plupart de ces métabolites sont isolés pour la première fois de cette plante. La présence de l'eucalyptine et des acylphloroglucinols rapproche du point de vue chimiotaxonomique *C. viminalis* de *E. saligna*. La présence des dérivés de l'acide ellagique dans l'extrait des feuilles de *C. viminalis* n'est pas surprenante, car dans la famille des Myrtaceae cette classe de composés se retrouve généralement dans le genre *Eucalyptus*^{32;112}.

IV-1-3: *Syzygium guineense* et *Syzygium aromaticum*

Nos investigations phytochimiques sur *Syzygium guineense* sont les premières sur cette plante. Cette étude a permis d'isoler l'eucalyptine, les triterpènes et surtout des rhamnosides de l'acide ellagique. L'eucalyptine avait déjà été isolée de *Eugenia biflora*¹⁷³. Les genres *Eugenia*, *Syzygium* et *Myrtus* sont dans la plupart des cas utilisés comme des

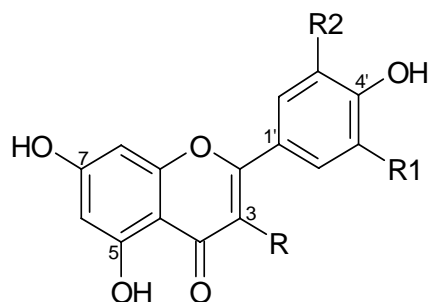
synonymes^{174;175}. Après avoir isolé l'eucalyptine de *E. saligna*, *C. viminalis* et *S. guineense* nous pouvons soutenir la suggestion de Sarker et de Wollenweber selon laquelle les flavonoïdes C-méthylés sont caractéristiques de la famille des Myrtaceae^{4;10}. Les triterpènes polyhydroxylés isolés de cette plante, à savoir l'acide arjunolique, l'acide asiatique, l'acide 6-hydroxyl arjunolique et leurs glucosides ont précédemment été isolés de *S. samarangense*, *S. cordatum* et *S. claviflorum*^{70;85;144}. Les acides ellagiques rhamnosides, composés majoritaires des écorces, se retrouvent largement dans le genre *Eucalyptus*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Sg ₁	H	H	H	H	H
Sg ₂	H	H	CH ₃ CO	H	H
Sg ₃	H	H	H	CH ₃ CO	H
Sgf-7	CH ₃	CH ₃	CH ₃ CO	CH ₃ CO	CH ₃ CO

De part la position du groupe acyle, Sg₂ et Sg₃ sont des régioisomères. Certains auteurs pensent que l'une de ces molécules peut être un artéfact formé par la migration du groupe l'acyle pendant l'extraction ou l'isolement³². Dans notre cas, ces molécules ne peuvent être due à l'isolement dans la mesure où l'analyse HPLC-UV-MS de l'extrait brut nous montre la présence de ces deux molécules (figure 2-3). Par contre il serait possible que cet artéfact se soit formé lors de l'extraction de la matière végétale.

Par ailleurs l'étude de *S. aromaticum*, une plante ayant fait l'objet de plusieurs investigations phytochimiques, a permis de détecter et d'isoler des composés phénoliques, des alkylphenols et des triterpènes. Les alkylphenols n'ont jamais été mentionnés par le passé ni dans *S. aromaticum* ni dans la famille des Myrtacées. Les flavonols isolés de *S. aromaticum* sont en revanche retrouvés dans la famille des Myrtaceae.



Molécules	R	R1	R2
Quercétine (64)	OH	OH	H
Myricétine (65)	OH	OH	OH
Myricétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (66)	O-glucopyranoside	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (67)	O-glucopyranoside	OH	H
Quercétine 3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (68)	6''-galloyl- β -galactopyranoside	OH	H
Quercétine-3- <i>O</i> - β -rhamnopyranoside (69)	O-rhamnopyranoside	OH	H
Myricétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranoside (70)	O-arabinoside	OH	OH
Myricétine 3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (71)	6''-galloyl- β -galactopyranoside	OH	OH
Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (72)	xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)-rhamnopyranoside	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (73)	xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)-rhamnopyranoside	OH	OH
Quercétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranoside (76)	arabinopyranoside	OH	H

IV-2: Activités biologiques des métabolites isolés

Ce travail a pu mettre en évidence le potentiel antioxydant des composés Sa₁₃ (**74+75**), Sa₄₂ (**68**) et Sa₄₁ (**71**). Leurs activités (IC₅₀ 2.80, 2.25, 2.76 μ M) respectives sont supérieures à celle du trolox (IC₅₀ 6 μ M) utilisé comme contrôle positif. Peng¹⁷⁶ en utilisant les méthodes de la capacité antioxydante équivalente de trolox (TEAC) contre les radicaux d'ABTS [2,2'-azinobis(acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique)] et du phenyl-tert-butyl nitron (PBN) azo initiateur (AI) sur 10 flavonols a pu constater qu'un flavonol glycoside estérifié par une unité de galloyl voyait son pouvoir antioxydant croître. De même, il observe que la quercétine a une activité supérieure à celle du kaempférol, et cette différence demeure quand les deux flavonols sont substitués par le même sucre. Dans nos travaux, nous observons également le même principe, par contre nous ne pourrions pas les classer rigoureusement puisque les techniques utilisées sont différentes.

Le phloroglucinol Cv₁₀ montre un fort potentiel antifongique. L'activité inhibitrice importante (QIC 0.5 µg/spot) est supérieure à celle de l'amphotéricine (QIC 1.5 µg/spot) sur *Aspergillus*. Ceci peut être dû à la faible solubilité de l'amphotéricine dans les solvants organiques. Ce résultat nous incite à faire des études plus approfondies sur cette molécule en particulier, et sur cette classe de composés en général, car les phloroglucinols sont beaucoup plus connus pour leurs activités antibactériennes et antivirales^{38;40;118;177}.

Les phloroglucinols (Cv₁₀), les alkylphénols (Sah₁, Sah₂, Sah₃) et les tritrepènes (sgf₅₁ et sgf₅₂) ont montré un potentiel antibactérien très prononcé. Leurs quantités minimales d'inhibition (QIC 0.2, 0.2, 0.5, 0.8, 0.5 et 0.75 µg/spot) respectives sur *B. subtilis* (gram positif) sont très voisines de celle du chloramphénicol (QIC 0.1 µg/spot) utilisé comme contrôle positif. Ces résultats de Sgf₅₁ et Sgf₅₂ viennent ainsi compléter ceux obtenus par Tsakala⁶⁰ qui avait uniquement testé les extraits hydrosolubles de *S. guineense* avec lequel il observait un potentiel d'inhibition appréciable sur les bactéries gram positif du genre *Staphylococcus* pathogènes pour l'homme. Ces molécules sont par ailleurs (Sgf₅₁ et sgf₅₂) connues pour leurs activités anti-HIV¹⁶¹ avec des IC₅₀ de 36 et 8 µg/ml. Leur présence dans *S. guineense* et *S. aromaticum* peut corroborer l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans le traitement des maladies infectieuses. Il est important de noter que toutes ces molécules montrent une forte activité sur la bactérie gram positive *B. subtilis*. Malgré le fort potentiel antibactérien de Cv₁₀, Sah₁, Sah₂ et Sah₃ il faut relever le large spectre d'activité manquant de spécificité. Quant aux molécules Sgf₅₁ et Sgf₅₂, d'autres études devront être menées pour déterminer dans quelles mesures il est possible d'accroître l'activité antibactérienne de ces molécules, puisque dans le présent travail à travers la relation structure activité des tritrepènes (IV-3) nous avons déterminé les groupements fonctionnels influençant l'activité de ces molécules.

V: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre contribution à l'étude phytochimique de *E. saligna*, *C. viminalis*, *S. guineense* et *S. aromaticum* a conduit à l'isolement de 44 produits parmi lesquels quatre alkylphénols, six dérivés de l'acide ellagique, cinq phloroglucinols quatorze flavonols et quinze triterpènes et leurs glycosides (Tableau 5-1). Malgré les résultats de Takechi¹⁷⁸ concernant la présence des tannins dans le genre *Syzygium*, aucun composé de cette classe n'a été isolé au cours de ces travaux. Comme aucune autre étude ultérieure n'a confirmé leur présence, à l'exception des ellagitannins de *S. aromaticum*¹⁷⁹, une recherche plus ciblée devrait être entreprise pour répondre à cette question.

Tableau 5-1: Récapitulatif de tous les métabolites isolés de *E. saligna* (*Es*), *C. viminalis* (*Cv*), *S. guineense* feuilles (*Sgf*), *S. guineense* écorces (*Sg*) et de *S. aromaticum* (*Sa*)

Nom des molécules	<i>Es</i>	<i>Cv</i>	<i>Sgf</i>	<i>Sg</i>	<i>Sa</i>
Les alkylphénols					
*Acide salicylique -6-heptadeca-5',7',14'-triène (49)					X
*Acide salicylique -6-heptadeca-5',7'-diène (50)					X
*Acide salicylique -6-heptadeca-5'-ène (50)					X
*L'acide ginkgolique (52)					X
Dérivés d'acide ellagique					
*Acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'- α -L-rhamnopyranoside (53)				X	
Acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'- <i>O</i> - α -L- 2'' - acétylrhamnopyranoside (54)				X	
*Acide 3- <i>O</i> -méthylellagique-4'- <i>O</i> - α -L-3''- acétylrhamnopyranoside (55)				X	
*Acide-3, 4, 3'- <i>O</i> - triméthylellagique-4'- <i>O</i> - β -L-2'',3'',4''- <i>O</i> - triacétylrhamnoside (56)			X		
*Acide-3,3'- <i>O</i> -diméthylellagique-4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (57)		X			
*Acide-3,3',4- <i>O</i> -triméthylellagique-4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (58)		X			
Les phloroglucinols					
*2,6-dihydroxy-3-méthyl-4-méthoxyisobutyrophénone (59)		X			
*2,6-dihydroxy-4-méthoxyisobutyrophénone (60)		X			
*2,6-dihydroxy-4-méthoxyisovalérophénone (61)		X			
Dimère de la jensenone (62)	X				
Sidéroxyional C (63)	X				
Flavonoïdes					
*Quercétine (64)					X
*Myricétine (65)					X
*Myricétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (66)					X
*Quercétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (67)					X

*Quercétine 3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (68)					X
*Quercétine-3- <i>O</i> - β -rhamnopyranoside (69)					X
*Myricétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranoside (70)					X
*Myricétine-3- <i>O</i> -(6''-galloyl)- β -galactopyranoside (71)					X
*Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (72)					X
*Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (73)					X
*(4S)- α -terpinéol-8- <i>O</i> - β -(6- <i>O</i> -galloyl)glucopyranoside (74)					X
*(4R)- α -terpinéol-8- <i>O</i> - β -(6- <i>O</i> -galloyl)glucopyranoside (75)					X
*Quercétine-3- <i>O</i> - β -arabinopyranosyl (76)			X		
*Eucalyptine (77)	X	X	X		
*Catéchine (78)		X			
Triterpènes et leurs glycosides					
Bétuline (79)	X				
Acide bétulinique (80)			X		
uvaol (81)	X				
Acide ursolique (82)	X				
Acide oléanolique (83)		X	X	X	X
Acide 2 α -3 β -dihydroxyurs-12- β -D-xylopyranoside (84)		X	X	X	X
Acide 2 α -3 β -dihydroxyoléanol-12- β -D-xylopyranoside (85)		X	X	X	X
*Acide asiatique (86)			X	X	X
*Acide arjunolique (87)			X	X	X
*Acide-6-hydroxyasiatique (88)			X		
*Acide-6-hydroxyarjunolique (89)			X		
Acide asiatique-28- β -D-glucopyranosyl ester (90)			X		X
Acide arjunolique-28- β -D-glucopyranosyl ester (91)			X		X
3- β -O-D-glucopyranosyl- β -sitostérol (92)	X	X	X	X	X
3- <i>O</i> - α -L-arabinosyle hédéragénine (93)		X			
Hédéragénine-3-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranoside (94)		X			
Acide oléanolique-3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -glucopyranosyl]-28- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (95)					
Méthoxylrhamnose (96)					X

Toutes les molécules en gras sont des produits nouveaux. *A : Molécule ayant une ou plusieurs activités biologiques.

Es: *Eucalyptus saligna* feuilles. **Cv:** *Callistemon viminalis* feuilles. **Sgf:** *Syzygium guineense* feuilles. **Sg:** *Syzygium guineense* écorces. **Sa:** *Syzygium aromaticum* feuilles.

L'acide arjunolique (Sgf₅₁), l'acide asiatique (sgf₅₂), les alkylphénols, isolés respectivement de *S. guineense* et *S. aromaticum* ont montré des propriétés antibactériennes significatives, ce qui nous permet de faire la relation entre leur présence dans les extraits et l'utilisation traditionnelle de ces plantes. Il serait intéressant de faire des tests plus avancés sur des

souches pathogènes pour l'homme et si possible étudier leur mode d'action pour pouvoir déterminer les sites sur lesquels agissent ces molécules, d'autant plus qu'elles sont connues pour diverses autres activités¹⁶¹.

Les phloroglucinols (acylphloroglucinols) isolés de *C. viminalis* en particulier Cv₁₀ inhibent tant la croissance des bactéries que celles des champignons et possèdent également une activité anti-oxydante. Ces propriétés démontrent le potentiel pharmacologique de cette classe de composés qui mériterait d'être étudiée de manière plus exhaustive. Très peu d'études phytochimiques ont été effectuées sur le genre *Callistemon*, sa taxonomie étant difficile⁴⁵. Il serait dès lors intéressant d'entreprendre une étude phytochimique plus approfondie des espèces de ce genre afin d'établir des relations chimiotauxonomiques plus précises. Les résultats présentés dans ce travail et les données de la littérature indiquent que dans la famille des Myrtaceae, le genre *Eucalyptus* est la source principale des phloroglucinols⁴⁴. Des études chimiotauxonomiques du genre *Callistemon* axées sur ces produits devraient en conséquence être entreprises surtout qu'un dérivé de ces composés a déjà été isolé d'une autre espèce de ce genre¹⁸⁰. Dans un premier temps de telles recherches demanderaient de continuer l'étude phytochimique des différentes espèces se trouvant à l'ouest du Cameroun, afin de recenser toutes celles contenant les phloroglucinols; ensuite la HPLC-UV-MS-MS pourrait être utilisée pour réaliser le profil phloroglucinique de l'ensemble de ces espèces.

L'utilisation de la HPLC-UV (DAD) et de la HPLC-UV-MSⁿ a permis d'identifier les composés en trace dans l'extrait de *S. aromaticum*. C'est une méthode utilisée en phytochimie pour identifier ou obtenir des informations sur des molécules non isolables, ou bien pour identifier des molécules connues sans avoir à les isoler. Dans le cadre de ce travail, cette méthode nous a permis d'identifier les flavonoïdes déjà reportés dans la famille des Myrtaceae. Cette procédure est cependant plus facile à mettre en œuvre dans le cas des flavonoïdes, dont les propriétés spectrales sont caractéristiques et bien connues, que pour d'autres classes de composés.

En conclusion, cette étude nous a permis de mieux connaître la phytochimie des plantes étudiées. Elle a en outre démontré leur intérêt comme source de nouveaux produits naturels et de composés aux activités biologiques et pharmacologiques prometteuses. Certaines de ces activités ont permis de faire un rapprochement avec l'utilisation traditionnelle de ces plantes. Sachant que l'Afrique en général et le Cameroun en particulier possèdent une immense biodiversité qui ne demande qu'à être étudiée, les sujets dans ce domaine ne manquent donc

pas, car chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacologiques particulières.

VI: PARTIE EXPERIMENTALE

VI-1 Tests analytiques

VI-1-1: Test de Liebermann Buchard

Ce test est utilisé pour l'identification des triterpènes. Dans un tube à essai, une faible quantité de produit est solubilisé dans 5ml de chloroforme. A cette solution sont ajoutés 2ml d'anhydride acétique et 1ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration bleu verdâtre indique la présence de triterpènes.

VI-1-2: Test au chlorure ferrique (FeCl_3)

Ce test est utilisé pour l'identification des composés phénoliques. Environ 1 mg de produit est solubilisé dans l'éthanol et à cette solution sont ajoutées quelques gouttes de FeCl_3 . La présence de composés phénoliques provoque la formation de complexes de type $[\text{Fe}(\text{OAr})_6]^{3-}$ de couleur bleue ou violette.

VI-1-3: Test pour l'identification des flavonoïdes

A une solution alcoolique du produit (1 mg/ml) ont été ajoutés des copeaux de magnésium et ensuite quelques gouttes d'acide chlorhydrique 37%. La présence des flavonoïdes se manifeste par l'apparition d'une coloration rougeâtre.

VI-2: Méthodes chromatographiques analytiques

VI-2-1: Chromatographie sur couche mince

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck) et de gel de silice C18 UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). Après développement dans des cuves de verre, les plaques ont été observées à la lumière du jour ensuite sous la lampe UV aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm. Suivant les cas, les plaques ont été révélées par des réactifs de détection polyvalents et spécifiques. Une solution méthanolique d'acide sulfurique 50% est ensuite vaporisée sur la plaque et ensuite chauffé avec un appareil PHG 600-2 CE (BOSCH) jusqu'à apparition des taches de différente coloration sur fond blanc.

VI-2-2: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie UV (HPLC-UV/VIS).

Les analyses en chromatographie liquide ont été effectuées à l'aide d'un système Hewlett-Packard (HP) 1050 couplé à un détecteur de barrettes de diodes (DAD) HP série 1050 pour l'enregistrement des spectres UV/VIS. Les injections ont été effectuées manuellement. Les extraits à l'acétate d'éthyle et au n-butanol ont été analysés en utilisant une colonne analytique (Nucléosil 100-7 C18, 7 μ m, 250 x 4.6 mm) avec un système de solvant acétonitrile (ACN)-H₂O +1% d'acide acétique (AcOH) dans l'eau. Un débit de 0.5 ml/min a été utilisé suivant le gradient ci-dessous.

Tableau 6-1: Système 1 pour analyse des extraits à l'acétate et au n-butanol

Temps (min)	Acétonitrile	H ₂ O+1% AcOH
0	15	85
2	15	85
40	30	70
50	50	50
55	100	0
60	100	0

Les extraits à l'hexane ont été analysés sur la même colonne en utilisant le système de solvant MeOH- H₂O avec 1% d'acide acétique à un débit de 1 ml/min.

Tableau 6-2: Système 2 pour l'analyse des extraits à l'hexane

Temps (min)	MeOH	H ₂ O+1% AcOH
0	85	15
2	85	15
10	100	100
25	100	100

VI-2-3: Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrophotométrie UV/ VIS et à la spectrométrie de masse (HPLC-UV/VIS-ESI-MSⁿ)

Les extraits ont été analysés en mode positif ou négatif suivant les cas dans les conditions chromatographiques décrites (système 1 et 2). L'appareil utilisé est un Agilent 1100 couplé à un détecteur à barrettes de diode. Cet appareil a un système de pompe binaire (model G 1312A) un injecteur automatique (model 1313A). Le système HPLC-UV/ VIS est couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique (Agilent 1100 LCMD) de type électrospray. Les conditions suivantes ont été utilisées : Température de vaporisation : 300°C, température du

capillaire de transfert : 200°C, gaz nébuliseur : N₂ avec pour pression et flux égal à 60 psi et 7ml/min respectivement, l'hélium est le gaz de collision dans la trappe ionique.

VI-2-4: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS.

L'analyse des mélanges de triterpènes a été réalisée à l'aide d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse de type GC Trace couplé à un spectromètre de masse Polaris Q (Thermo Finnigan). Cet appareil a été utilisé en ionisation impact électronique (EI, énergie 70 eV). Une colonne capillaire ZB-1 (longueur 30 m x 0.25mm id x 0.25µm) est utilisée pour les séparations. Les injections ont été effectuées en mode CT split (Split moyen 1/10) avec un injecteur PTV. L'hélium est utilisé comme gaz porteur avec un flux de 1.5ml/min. Le programme de température suivant a été appliqué en 1 heure: 60°C pendant une minute de 60 à 250°C à 10°C/min. La température de l'injecteur et de la ligne de transfert était de 220°C.

VI-2-5: Chromatographie en phase gazeuse avec espace de tête couplé à la spectrométrie de masse HS-GC-MS

L'analyse des acides gras de *C. viminalis* et *S. aromaticum* a été effectuée sur le même appareil ci-dessus (4). Les échantillons sont incubés à 50°C pendant une minute, l'espace de tête possède une seringue SPDE de 2,5ml, son aiguille est à 110°C. Cette seringue effectue 4 cycles d'aspiration dans les flacons possédant l'échantillon pour concentrer le maximum de composés volatils dans son polymère. Les injections ont été effectuées en mode PTV split (Split moyen 1/15), l'injection est effectuée à 35°C, l'évaporation et le transfert de l'échantillon à 200°C. La colonne est de type ZB-Wax avec les mêmes dimensions que celle ci-dessus (III-4). Le programme de température appliqué est le suivant: 50°C pendant cinq minutes, de 50 à 250°C en 50 minutes avec une croissance de 4°C/minute et de 55 à 57 minutes on a une température constante de 250°C. Le gaz porteur est l'hélium avec un flux de 1ml/min.

VI-3: Méthodes préparatives

VI-3-1: Partage liquide - liquide

Les extraits de *C. viminalis*, *S. guineense* et *S. aromaticum* ont été solubilisés dans l'eau et extrait ensuite successivement avec l'hexane, l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le n-butanol. Après évaporation des solvants, nous avons obtenu quatre extraits distincts (hexane, AE, n-butanol et aqueux).

VI-3-2: Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

VI-3-2-1: Chromatographie d'adsorption

Les colonnes ouvertes de silice 60 (63-200 μ m ou 32-63 μ m) ont été utilisées dans la première et la deuxième étape de fractionnement des extraits. La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et la quantité des fractions à recueillir étaient adaptés à la qualité, la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élutions, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. Les échantillons ont été introduits en tête de colonne sous forme solide en les fixant avec l'adsorbant à 2.5 fois le poids de l'extrait. Les gradients de mélange d'hexane-acétate d'éthyle ou CHCl₃-MeOH entre autre ont été utilisés comme système d'élution et des fractions variant entre 100 et 250 ml ont été recueillies.

VI-3-2-2: Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel a été réalisée comme étape de fractionnement visant à éliminer les pigments ou bien comme une méthode nous permettant de séparer des produits à poids moléculaires différents. Elle a été effectuée sur séphadex LH-20 avec un système CHCl₃-MeOH (1:1) ou du MeOH comme phase mobile. Les échantillons à séparer ont été introduits dans la colonne sous forme liquide après dissolution dans un volume minimal de phase mobile filtrée si nécessaire. Le suivi de la séparation et le rassemblement des différentes fractions ont été effectués sur la base d'analyses CCM.

VI-3-2-3: Chromatographie de partage

La chromatographie de partage ou chromatographie liquide sous vide (VLC) est une séparation grossière mais rapide pour éliminer les pigments de certaines fractions. Elle nous permet également de dégrossir l'extrait en fractions facilement analysables. Le rapport de la quantité de phase sur la masse était d'un facteur 5 à 10. Les fractionnements ont été effectués dans les entonnoirs Büchner avec verre fritté, sous un vide (la trompe à eau). Les échantillons ont été introduits sous forme solide en mélangeant les échantillons à 2-3 fois leur poids de phase solide. Les mélanges de solvant hexane-acétate d'éthyle et acétate d'éthyle- MeOH ont été utilisés pour la séparation.

VI-4: Chromatographie liquide à moyenne pression

Le système utilisé est constitué d'une pompe Rheos 4000. La phase utilisée est la RP18 dans une colonne remplie par l'utilisateur (370 x 15mm i.d., Büchi). Les échantillons ont été introduits sous forme liquide, et la phase mobile est constituée d'un mélange MeOH- H₂O.

VI-5: Méthodes physico-chimiques

VI-5-1: Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été déterminé sur un polarimètre Perkin Elmer 241. La rotation α est mesurée dans le CHCl₃, MeOH ou le DMSO dans une cuve de 1cm de long à température ambiante. La raie de la lampe de sodium a été utilisée comme source. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ est défini en degré comme suit :

$$[\alpha]_D = 1000\alpha/l.c$$

- α : Valeur moyenne de 4 lectures
- l : Longueur de la cuve en dm
- c : Concentration de la solution en mg/mL

VI-5-2: Spectres ultraviolets (UV)

Les spectres UV des composés nouveaux et des flavonoïdes ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre Ultrospec 4000 UV/visible dans le CHCl₃, MeOH ou le DMSO. Les λ_{max} des autres molécules isolées ont été déduits directement de la HPLC-DAD-UV.

VI-5-3: Les Spectres infra- rouges (IR)

Les spectres infra rouges ont été mesurés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer FT-IR, Paragon 1000.

VI-5-4: Point de Fusion (PF)

Le point de fusion des molécules a été mesuré sur un appareil Buchi 510. Certains dérivés de l'acide ellagique avaient des points de fusion supérieurs à 300°C, limite supérieure de mesure de l'appareil

VI-5-5: Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des molécules isolées ont été mesurés en mode négatif ou positif en fonction de la capacité de la molécule à s'ioniser. Les méthodes utilisées sont l'électrospray (ESI) et l'impact électronique (IE). L'appareil utilisé pour l'ESI est un LQC Finnigan (San José, California) alors que celui utilisé pour l'EI est un Polaris Q, Thermo Finnigan.

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés en mode positif ou négatif sur un spectromètre Bruker FTMS 4.7T, BioapexII en mode ESI.

VI-5-6: Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ont été mesurés à 400MHz (^1H) et 100MHz (^{13}C) ou 500MHz (^1H) et 125MHz (^{13}C) sur des spectromètres Bruker AMX-400 et Bruker AMX-500. Un appareil Bruker Avance 600 a été également utilisé pour des échantillons de très faible quantité. Les échantillons ont été solubilisés dans des solvants deutérés (CDCl_3 , MeOD, DMSO, acétone- d_6 , pyridine- d_5) et les déplacements chimiques (δ) ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.

Au cours de ces travaux nous avons utilisé la RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT) et la 2D (COSY, NOESY, HMQC, COLOC et HMBC). L'expérience HMBC avec utilisation des gradients permet d'obtenir en un temps d'expérimentation court (6 heures) avec des faibles concentrations (~50mM) la carte de corrélation entre proton et carbone non chimiquement lié via les couplages ^nJ ($n > 1$) entre protons et carbones. Cette séquence est équivalente à la séquence COLOC mais bénéficie d'une sensibilité plus de 50 fois supérieure et d'un temps d'expérimentation plus long (24 heures). Dans le cas du COLOC on parle de corrélation entre carbones et protons.

VI-6: Méthodes chimiques

VI-6-1: Hydrolyse acide

L'échantillon (1-5mg) a été dissout dans un minimum de méthanol, ensuite ajouté à 10ml de HCl 2N. Le mélange a été chauffé à reflux pendant deux heures. Les aglycones ont été ensuite extraits à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau et évaporée à sec sous pression réduite. Le mélange résultant est suspendu dans le méthanol et analysé par comparaison sur CCM avec les échantillons authentiques de sucres (Fluka) avec comme éluant le mélange AcOEt-AcOH-H₂O-MeOH (65-20-15-15).

VI-6-2: Hydrolyse enzymatique

Le mélange de l'acide asiatique-28-glucopyranoside et de l'acide arjunolique -28-glucopyranoside (10mg) a été dissout dans 2ml de tampon acétate de pH 5.5. 2mg de β -glucosidase (Fluka) y est ajouté et le mélange est incubé à 37°C pendant 48 heures. Le mélange a ensuite été extrait à l'acétate d'éthyle pour donner 7 mg du mélange d'acide arjunolique et d'acide asiatique.

VII: REFERENCES

1. Ho, S. H., L. P. L. Cheng, K. Y. Sim, and W. T. H. Tan. (1994). Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) as a grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology* 4: 179-183.
2. Tapondjou, A. L., H. Bouda, D. A. Fontem, L. Zapfack, D. Lontsi, and B. L. Sondengam. (2000). Local plants used for traditional stored product protection in the menoua division of the western highlands of Cameroon, IntegrateProtection of stored Products. *Integrated Protection of stored Products/ IOBC Bulletin* 23: 73-77.
3. Huq, F. and L. N. Misra. (1997). An alkenol and C-methylated flavones from *Callistemon lanceolatus* leaves. *Planta Medica* 63: 369-370.
4. Wollenweber, E., R. Wehde, M. Dorr, G. Lang, and J. F. Stevens. (2000). C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry* 55: 965-970.
5. Elliot, W. R. and D. L. Jones. (1984). *Encyclopaedia of Australian Plants suitable for cultivation*.
6. Letouzey, R. (1982). *Manuel de botanique Forestière, Afrique tropicale*. Centre de Technique forestière, Nogent S/Manne, 105-106.
7. Siddiqui, B. S., Farhat, S. Begum, and S. Siddiqui. (1997). Isolation and structural elucidation of acylated pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* var. obtusa. *Planta Medica* 63: 47-50.
8. Singh, I. P., K. Umehara, and H. ETOH. (1999). Macrocarpals in *Eucalyptus* sp. as attachment-inhibitors against the blue mussel. *Natural Product Letters* 14: 11-15.
9. Iwu, M. M. (1993). *Handbook of African Medicinal plants*. CRC Press Inc., London.
10. Sarker, S. D., B. Bartholomew, R. J. Nash, and M. S. J. Simmonds. (2001). Sideroxylin and 8-demethylsideroxylin from *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 759-762.
11. Tapondjou, A. L., C. Alder, D. A. Fontem, H. Bouda, and C. Reichmuth. (2003). Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers Agricultures* 12: 401-402.
12. Tapondjou, A. L., C. Adler, D. A. Fontem, H. Bouda, and C. Reichmuth. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research* 41: 91-102.
13. Barr, A. (1988). *Traditional Bush Medecine: An Aboriginal Pharmacopoeia*. Greenhouse Publications.
14. Barr, A. (1993). *Traditional Aboriginal Medecines in the Northen Territory of Australia*. Darwin.

15. Cribb, A. B. and J. W. Cribb. (1981). *Wild Medicine in Australia*. Collins Publications, Sydney.
16. Cribb, A. B. and J. W. Cribb. (1982). *Useful Wild Plants in Australia*. Collins Publications, Sydney.
17. Katinka, P. and G. T. J. Thomas. (1999). Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica* 72: 39-52.
18. Lassak, E. V. and T. McCarthy. (1983). *Australian Medicinal Plants*. Methuen, Australia.
19. Nakayama, R., M. Murata, S. Homma, and K. Aida. (1990). Antibacterial Compounds From *Eucalyptus perriniana*. *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 231-232.
20. Satoh H., H. Etoh, N. Watanabe, H. Kawagishi, K. Arai, and K. Ina. 1992. Structures of sideroxytonals from *Eucalyptus sideroxyton*. *Chemistry Letters*. 1917-1920.
21. Singh, I. P., K. Takahashi, and H. Etoh. (1996). Potent attachment-inhibiting and -promoting substances for the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*, from two species of *Eucalyptus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60: 1522-1523.
22. Singh, I. P. and H. Etoh. (1995). New macrocarpal-am-1 from *Eucalyptus amplifolia*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 2330-2332.
23. Osawa, K., H. Yasuda, H. Morita, K. Takeya, and H. Itokawa. (1995). Eucalyptone from *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry* 40: 183-184.
24. Umehara, K., I. P. Singh, H. Etoh, M. Takasaki, and T. Konoshima. (1998). Five phloroglucinol-monoterpene adducts from *Eucalyptus grandis*. *Phytochemistry* 49: 1699-1704.
25. Singh, I. P., R. Hayakawa, H. ETOH, M. Takasaki, and T. Konoshima. (1997). Grandinal, a new phloroglucinol dimer from *Eucalyptus grandis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61: 921-923.
26. Lal, K., S. M. Mazza, and R. G. Salomon. (1986). Total synthesis and a new proposal for the structure of robustadials. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 191: 238.
27. Koser, S., H. M. R. Hoffman, and D. J. Williams. (1993). Stereoselective synthesis of precursors of naturally occurring robustadials-A and robustadials-B. *Journal of Organic Chemistry* 58: 6163-6165.
28. Osawa, K., H. Yasuda, H. Morita, K. Takeya, and H. Itokawa. (1996). Macrocarpals H, I, and J from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *Journal of Natural Products* 59: 823-827.
29. Osawa, K., H. Yasuda, H. Morita, K. Takeya, and H. Itokawa. (1997). Configurational and conformational analysis of macrocarpals H, I, and J from *Eucalyptus globulus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45: 1216-1217.

30. Etoh, H., S. Watanabe, M. Suzuki, K. Sakata, and K. Ina. (1991). Stilbene glucoside esters and their related-compounds as repellents against the blue mussel, *Mytilus-edulis*. *Nippon Kagaku Kaishi* 542-545.
31. Ovenden, S. P. B., S. S. W. Jin Yu, R. M. T. Gian Sberna, S. C. David Rhodes, N. G. W. Jonathan Coates, and M. M.-G.Barbara. (2004). Globoidnan A: a lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase. *Phytochemistry* 65: 3255-3259.
32. Jong-Pyung, K., L. In-Kyoung, Y. Bong-Sik, C. Sung-Hyun, S. Gyu-Seop, K. Hiroyuki, and Y. Ick-Dong. (2001). Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry* 54: 587-591.
33. Papachristos, D. P. and D. C. Stamopoulos. (2002). Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 38: 365-373.
34. Papachristos, D. P. and C. D. Stamopoulos. (2002). Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 38:365-373.
35. Papachristos, D. P. and D. C. Stamopoulos. (2004). Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 40: 517-525.
36. Jeane,S., A.Worku, M.S.Sousa, G.V.Duarte, L.I.M.Machado, and A.J.Matos. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology* 89:277-283.
37. Sung-Eun, L., C. Won-Sik, L. Hoi-Seon, and P. Byoung-Soo. (2000). Cross-resistance of a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) to fumigant toxicity of essential oil extracted from *Eucalyptus globulus* and its major monoterpene, 1,8-cineole. *Journal of Stored Products Research* 36: 383-389.
38. Yamakoshi, Y., M. Murata, A. Shimizu, and S. Homma. (1992). Isolation and characterization of macrocarpal-B macrocarpal-G antibacterial compounds from *Eucalyptus macrocarpa*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1570-1576
39. Yamashita, N., H. Etoh, K. Sakata, H. Ina, and K. Ina. (1989). New acylated rhaponticin isolated from *Eucalyptus rubida* as a repellent against the Blue mussel *Mytilus-edulis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 2827-2829.
40. Nishiza, M., M. Emura, Y. Kan, H. Yamada, K. Ogawa, and N. Hamanaka. (1992). Macrocarpals - HIV-RTASE Inhibitors of *Eucalyptus globulus*. *Tetrahedron Letters* 33: 2983-2986.
41. Murata, M., Y. Yamakoshi, S. Homma, K. Arai, and Y. Nakamura. (1992). Macrocarpals, antibacterial compounds from *Eucalyptus*, inhibit aldose reductase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 2062-2063.
42. Samira, B., B. Samir, B. Fadila, L. Francisco, Q. José, L. Matías, C. H. Juan, E. Francisco, and B. Jaime. (2005). Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. *Phytochemistry* 66: 627-632.

43. Hyodo, S., H. Etoh, N. Yamashita, K. Sakata, and K. Ina. (1992). Structure of resinosides from *Eucalyptus resinifera* as repellents against the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 138.
44. Ghisalberti, E. L. (1996). Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. *Phytochemistry* 41: 7-22.
45. Lebrun, J.-P. and L. A. Stork. (1991). Enumération des plantes à fleurs d'Afrique tropicale. Ville de Genève, 145.
46. Srivastava, S. K., A. Ahmad, K. V. Syamsunder, K. K. Aggarwal, and S. P. S. Khanuja. (2003). Essential oil composition of *Callistemon viminalis* leaves from India. *Flavour and Fragrance Journal* 18:361-363.
47. Mahmoud, I. I., F. A. Moharram, M. S. A. Marzouk, M. W. Linscheid, and M. I. Saleh. (2002). Polyphenolic constituents of *Callistemon lanceolatus* leaves. *Pharmazie* 57: 494-496.
48. Khambay, B. P. S., D. G. Beddie, A. M. Hooper, M. S. J. Simmonds, and P. W. C. Green. (1999). New insecticidal tetradecahydroxanthenediones from *Callistemon viminalis*. *Journal of Natural Products* 62: 1666-1667.
49. Lounasma, M., H. S. Puri, and C. J. Widen. (1977). Phloroglucinol derivatives of *Callistemon lanceolatus* leaves. *Phytochemistry* 16: 1851-1852.
50. Bhatia, I. S., M. S. Bhatia, R. S. Sharma, and K. L. Bajaj. (1972). Polyphenolic constituents of seeds and bark of *Callistemon lanceolatus* Linn. *Indian Journal of Chemistry* 10: 959.
51. Varma, R. S. and M. R. Parthasarathy. (1975). Triterpenoids of *Callistemon lanceolatus* leaves. *Phytochemistry* 14: 1675-1676.
52. Khambay, B. P. S., D. G. Beddie, A. M. Hooper, and M. S. J. Simmonds. (2003). Isolation, characterisation and synthesis of an insecticidal tetramethyltetrahydrochromenedione-spiro-bicyclo[3.1.1]cycloheptane from two species of Myrtaceae. *Tetrahedron* 59: 7131-7133.
53. Harborne, J. B. and H. Baxter. (1999). The handbook of the Natural Flavonoids. John Willey and Sons, Inc..
54. Schijlen, G. W. M. E., H. C. R. de Vos, Van Tunen A. J., and G. B. Arnaud. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65: 2631-2648.
55. Hutchinson, J. and J. M. Dalziel. (1954). Flora of west Tropical Africa. 235-241.
56. Adeyemi, O. O., S. O. Okpo, and A. A. Adesanya. (2003). Gastrointestinal activity of the Aqueous Extract of the Nigerian Polyherbal Preparation. *West African Journal of Pharmacology and drug research* 19: 22-27.
57. Djipa, C. D., M. Delmee, and J. Quetin-Leclercq. (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 71: 307-313.

58. Hamill, F. A., S. Apio, K. N. Mubiru, M. Mosango, R. Bukenya-Ziraba, W. O. Maganyi, and D. D. Soejarto. (2000). Traditional herbal drugs of southern Uganda, I. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 281-300.
59. Oluwole, O. G. A., S. D. Pricilla, D. M. Jerome, and P. M. Lydia. (2002). Some herbal remedies from Manzini region of Swaziland . *Journal of Ethnopharmacology* 79: 109-112.
60. Tsakala, T. M., O. Penge, and K. John. (1996). Screening in vitro antibacterial activity from *syzygium guineense* (Willd) hydrosoluble extract. *Annales Pharmaceutiques Francaise* 54: 276-279.
61. Tajuddin, S. A., L. Abdul, and A. Q. Iqbal. (2004). Effect of 50% ethanolic extract of *syzygium aromaticum* Perry. (clove) on sexual behaviour of normal male rats. *BMC complementary and alternative medicine* 4: 1-10.
62. Chevallier, A. (2001). Encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley.
63. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. Lavoisier Publishing.
64. Jellin, J. M., F. Batz, and K. Hitchens. (2000). Natural medicines comprehensive database. Therapeutic Research Faculty.
65. Chandrasekaran, M. and V. Venkatesalu. (2004). Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 105-108.
66. Muruganandan, S., K. Srinivasan, S. Chandra, S. K. Tandan, J. Lal, and V. Raviprakash. (2001). Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia* 72: 369-375.
67. Kim, H. M., E. H. Lee, S. H. Hong, H. J. Song, M. K. Shin, S. H. Kim, and T. Y. Shin. (1998). Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 125-131.
68. Kurokawa, M., K. Nagasaka A, T. Hiraba Yashi, S. Uyama, H. Sato, T. Kageyama, S. Kadota, H. Ohyama, T. Hozumi, T. Namba, and K. Shiraki. (1995). Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against Herpes-simplex virus type-1 infection in-vitro and in-vivo. *Antiviral Research* 27: 19-37.
69. Chang, C. W., T. S. Wu, Y. S. Hsieh, S. C. Kuo, and P. D. L. Chao. (1999). Terpenoids of *Syzygium formosanum*. *Journal of Natural Products* 62: 327-328.
70. Srivastava, R., A. K. Shaw, and D. K. Kulshreshtha. (1995). Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. *Phytochemistry* 38: 687-689.
71. Charles, R., S. N. Garg, and S. Kumar. (1998). An orsellinic acid glucoside from *Syzygium aromatica*. *Phytochemistry* 49: 1375-1376.
72. Tanaka, T., Y. Orii, G. I. Nonaka, I. Nishioka, and I. Kouno. (1996). Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry* 43: 1345-1348.

73. Nair, A. G. R., S. Krishnan, C. Ravikrishna, and K. P. Madhusudanan. (1999). New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*. *Fitoterapia* 70: 148-151.
74. Kuo, Y. C., L. M. Yang, and L. C. Lin. (2004). Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta Medica* 70: 1237-1239.
75. Abdel-Wahhab, M. A. and S. E. Aly. (2003). 234 Antioxidant property of essential oil isolated from black comin seeds (*Nagilla sativa*) and clove buds (*Syzygium aromaticum*) in rats during aflatoxicosis. *Toxicology Letters* 144: 66.
76. Beg, A. Z. and I. Ahmad. (2002). In vitro fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 313-315.
77. Burt, S. A. and R. D. Reinders. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7. *Letters in Applied Microbiology* 36: 162-167.
78. Byung-Ho, L., C. Won-Sik, L. Sung-Eun, and P. Byeoung-Soo. (2001). Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection* 20: 317-320.
79. Byung -Ho, L., C. A. Peter, T. Fa'ale, and C. Won-Sik. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research* 40: 553-564.
80. Damien Dorman, J. H., A. Christina Figueiredo, G. B.J osé, and G. D. Stanley. (2000). In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 12-16.
81. Pauli, A. and H. Schilcher. (2004). Specific Selection of Essential Oil Compounds for Treatment of Children's Infection Diseases. *Pharmaceuticals* 1: 1-30.
82. Ponce, A. G., R. Fritz, C. del Valle, and S. I. Roura. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 36: 679-684.
83. Shafi, P. M., M. K. Rosamma, K. Jamil, and P. S. Reddy. (2002). Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. *Fitoterapia* 73: 414-416.
84. Cai, L. N. and C. D. Wu. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products* 59: 987-990.
85. Kashiwada, Y., H. K. Wang, T. Nagao, S. Kitanaka, I. Yasuda, T. Fujioka, T. Yamagishi, L. M. Cosentino, M. Kozuka, K. Okabe, Y. Ikeshiro, C. Q. Hu, E. Yeh, and K. H. Lee. (1998). Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* 61: 1090-1095.
86. Kurokawa, M., T. Hozumi, P. Basnet, M. Nakano, S. Kadota, T. Namba, T. Kawana, and K. Shiraki. (1998). Purification and characterization of eugenin as an anti-

- herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284: 728-735.
87. Takechi, M. and Y. Tanaka. (1981). Purification and characterization of anti-viral substance from the bud of *Syzygium aromaticum*. *Planta Medica* 42: 69-74.
 88. Srivastava, k. A., K. S. Srivastava, and V. K. Syamsundar. (2005). Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 51-53.
 89. Hostettman, K., O. Potterat, and J.-L. Wolfender. (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia* 52: 10-17.
 90. Bebdeder, B. (1986). Dharek drupes and leaves as protectants against *S. cerialotta* infesting wheat seeds. *Bull-grain technology* 9: 7.
 91. Fenn, B. J. (1993). Ion formation from charge droplets: Roles of Geometry, Energy, and Time. *Journal of American Society Mass Spectrometry* 4:524-535.
 92. Zeleny, J. (1917). Electric discharge from points. *Physical Review* 9: 562-563.
 93. Whitehouse, C. M., R. N. Dreyer, M. Yamashita, and J. B. and Fenn. (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* 57: 675-679.
 94. De la Mora, J. F. and I. G. Locertales. (1994). The effect of charge emission from electrified liquid cones. *Journal of Fluid Mechanics* 243: 561.
 95. Kebarle, P. and L. Tang. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical Chemistry* 65: 9.
 96. Griessmann, U. and F. W. Röllgen. (1981). Electrodynamic effects in field desorption mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 38: 267.
 97. Gomez, A. and K. Tang. (1994). Charge and fission droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids* 6: 404.
 98. Zhou, S. and K. D. Cook. (2000). Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round? *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 11: 961-966.
 99. Cole, R. B. (2000). Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 763-772.
 101. Blades A. T., M. G. Ikonou, and P. Kebarle. (1991). Mechanisms of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical Chemistry* 63: 2109.
 102. March, R. E. (2000). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 351-369.

103. Takao, T., F. Kitani, N. Watanabe, A. Yagi, and K. Sakata. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58: 1780-1783.
103. Chen-Hui, C., S. Chin-Ying, C. Chien-Chih, and T. Ying-Chieh. (2002). 2,3,4-trimethyl-5, 7-dihydroxy-2,3-dihydrobenzofuran, a novel antioxidant, from *penicillium citrinum* F5. *Journal of Natural Products* 65: 740-741.
104. Yu-Ling, H., Y. Pei-Yu, S. Chien-Chang, and C. Chien-Chih. (2003). Antioxidant flavonoids from the rhizomes of *Helminthostachys zeylanica*. *Phytochemistry* 64: 1277-1283.
105. Hadacek, Franz and H. Greger. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* 11: 137-147.
106. Rahalison, L., M. Hamburger, K. Hostettmann, M. Monod, and E. Frenk. (1991). A bioautographic Agar overlay method for detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 199-203.
107. Wariel, P. (2003). Investigation Phytochimique des plantes aquatiques *potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L., et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae). These de Doctorat, Université de Lausanne.
108. McDonald, L. L., R. H. Guy, and R. D. Siers. (1970). Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. US Dep. of Agric..
109. Van Beek, T. A. (2002). Chemicals analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A* 967: 21-55.
110. Young Hae, C., C. Hyung-kyoon, A. M. G. Peltenburg-Looman, W. M. L. Alfons, and R. Verpoote. (2004). Quantitative analysis of Ginkgolic acid from *Ginkgo* leaves and products using ¹H-NMR. *Phytochemical Analysis* 15: 325-330.
111. Yang, S. W., B. N. Zhou, J. H. Wisse, R. Evans, H. van der Werff, J. S. Miller, and D. G. I. Kingston. (1998). Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname rainforest. *Journal of Natural Products* 61: 901-906.
112. Yazaki, Y. and W. E. Hillis. (1976). Polyphenols of *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus regnans* and *Eucalyptus deglupta*. *Phytochemistry* 15: 1180-1182.
113. Sinha, A., W. H. Taylor, I. H. Khan, S. T. McDaniel, and J. D. Esko. (1999). Glycoside primers of *Psittacanthus cucullaris*. *Journal of Natural Products* 62: 1036-1038.
114. Grzegorz, P. and B. Jaromir. (1996). Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea Muscipula* from in vitro cultures. *Phytochemistry* 41: 775-778.
115. Xing-Cong, L., N. E. Hala, C. D. Hufford, and A. M. Clark. (1999). NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* 37: 856-859.

116. Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Technique et documentation-Lavoisier, 383.
117. Baigent, D. R. and I. R. C. Bick. (1973). Synthesis of agglomerone. *Australian Journal of Chemistry* 26: 2065-2066.
118. Bloor, S. J. (1992). Antiviral phloroglucinols from *New-Zealand Kunzea* species. *Journal of Natural Products* 55: 43-47.
119. Sarker, S. D., Z. Latif, and R. J. Nash. (2001). Application of gradient-enhanced nuclear overhauser effect spectroscopy (GOESY) in the structure elucidation of plant secondary metabolites. *Phytochemical Analysis* 12: 23-27.
120. Qin, G. W., Z. X. Chen, H. C. Wang, and M. K. Qian. (1981). The structure and synthesis of robustaol-A. *Acta Chimica Sinica* 39: 83-89.
121. Neve, J., P. D. Leone, A. R. Carroll, R. W. Moni, N. Paczkowski, G. Pierens, P. Bjorquist, J. Deinum, J. Ehnebm, T. Inghardt, G. Guymer, P. Grimshaw, and R. J. Quinn. (1999). Sideroxylonal C, a new inhibitor of human plasminogen activator inhibitor type-1, from the flowers of *Eucalyptus albens*. *Journal of Natural Products* 62: 324-326.
122. Kuhn F.,M. Oehme, F. Romero, E. Abou-Mansour, and R. Tabacchi. (2003). Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycone by MS² ion trap mass spectrometry and double neutral loss of CO. *Rapid communications in Mass Spectrometry* 17: 1941-1949.
123. Ma, L Y., M. Q. Li, H. Van den, and M. Claeys. (1997). Characterization of Flavone and Flavonol Aglycones by Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 11: 1357-1364.
124. Kazuma, K., N. Noda, and M. SUZUKI. (2003). Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 62: 229-237.
125. Ducrey, B., J. L. Wolfender, A. Marston, and K. Hostettmann. (1995). Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry* 38: 129-137.
126. Yinrong, L. and F. L. Yeap. (2002). Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. *Food Chemistry* 80: 71-76.
127. Pichonprum, N., J. Raynaud, L. Debourcieu, and M. J. Joseph. (1989). Presence of acylated heteroside in leaves of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Pharmazie* 44: 508-509.
128. Collins, F. W., B. A. Bohm, and C. K. Wilkins. (1975). Flavonol glucoside gallates from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* 14: 1099-1102.
129. Peng, Z. F., D. Strack, A. Baumert, R. Subramaniam, N. K. Goh, T. F. Chia, S. N. Tan, and L. S. Chia. (2003). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* 62:219-228.

130. Manguro, A. L. O., O. J. Midiwo, and K. Wolfgang. (1996). A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves. *Phytochemistry* 43: 1107-1109.
131. Santos, S. C., and G. P. Waterman. (2001). Polyphenols from *Eucalyptus consideriana* and *Eucalyptus viminalis*. *Fitoterapia* 72: 95-97.
132. Mahmoud, I. I., S. A. M. Marzouk, A. M. Fatma, R. E.-G. Mohamed, and M. K. H. Amel. (2001). Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 58: 1239-1244.
133. Kim, H. J., E. R. Woo, C. G. Shin, and H. Park. (1998). A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *Journal of Natural Products* 61: 145-148.
134. William, C. F., A. B. Bruce, and K. W. Cornelius. (1975). Flavonol glycoside gallates from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* 14:1 099-1102.
135. Slowing, K., M. Sollhuber, C. Emilia, and V. Angel. (1994). Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. *Phytochemistry* 37: 255-258.
136. Hiroe, K., S. Akemi, M. Yoko, and N. Nobuji. (2000). Galloylglucosides from Berries of *Pimenta dioica*. *Journal of Natural Products* 63 749-752.
137. Fraisse, D., A. Heitz, A. Carnat, A.-P. Carnat, and J.-L. Lamaison. (2000). Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* 71: 463-464.
138. Hongxing, L., Y. Yamazaki, T. Sasaki, M. Uchida, H. Tanaka, and S. Oka. (1999). A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry* 51: 297-308.
139. Ran, X., C. F. Gai, and P. T. M. Seiichi. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65: 261-291.
140. Sholichin, M., K. Yamasaki, R. Kasai, and O. Tanaka. (1980). C-13 Nuclear Magnetic Resonance of lupeol, betulin and betulinic acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 28: 1006-1008.
141. Dodrell, D. M., P. W. Khong, and K. G. Lewis. (1974). Stereochemical dependence of C-13 chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-ene as an aid to structural assignment. *Tetrahedron Letters* 2381-2384.
142. Seo, S., Y. Tomita, and K. Tori. (1975). C-13 NMR-Spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* hara tissue-cultures. *Tetrahedron Letters* 7-10.
143. Bilia, A. R., E. Palme, S. Catalano, G. Flamini, and I. Morelli. (1994). New triterpenoid saponins from the roots of *Potentilla tormentilla*. *Journal of Natural Products* 57: 333-338.
144. Candy, H. A., E. J. McGarry, and K. H. Pegel. (1968). Constituents of *Syzygium cordatum*. *Phytochemistry* 7: 889-890.

145. Shukla, A., A. M. Rasik, G. K. Jain, R. Shankar, D. K. Kulshrestha, and B. N. Dhawan. (1999). In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 1-11.
146. Lewis, K. G. and D. J. Tucker. (1983). The separation of substituted olean-12-en-28-oic acids from the corresponding urs-12-en-28-oic acid isomers. *Australian Journal of Chemistry* 36: 2297-2305.
147. Row, L. R. and G. S. R. S. Rao. (1960). A new triterpene carboxylic acid from *Terminalia tomentosa* Wight et Arn. *Tetrahedron Letters* 12-16.
148. Collins, D. J., C. A. Pilotti, and A. F. A. Wallis. (1992). Triterpene acids from some Papu-New-Guinea *Terminalia* species. *Phytochemistry* 31: 881-884.
149. Honda, T., T. Murae, T. Tsuyuki, T. Takahashi, and M. Sawai. (1976). Arjungenin, arjunglucoside-1, and arjunglucoside-2 new triterpene and new triterpene glucosides from *Terminalia arjuna*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 49: 3213-3218.
150. Adnyana, I. K., Y. Tezuka, S. Awale, A. H. Banskota, K. Q. Tran, and S. Kadota. (2000). Quadranosides VI-XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 48: 1114-1120.
151. Damu, A. G., P. C. Kuo, L. S. Shi, C. Q. Hu, and T. S. Wu. (2003). Chemical constituents of the stem of *Sargentodoxa cuneata*. *Heterocycles* 60: 1645-1652.
152. Adnyana, I. K., Y. Tezuka, A. H. Banskota, Q. B. Xiong, K. Q. Tran, and S. Kadota. (2000). Quadranosides I-V, new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. *Journal of Natural Products* 63: 496-500.
153. Guido, F., A. Elena, and M. Ivano. (2001). Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* 57: 559-564.
154. Susumu, K., Y. Ichiro, and S. Yoshiki. (1995). Antitumor agents, 162 cell-based assays for identifying novel DNA topoisomerase inhibitors: Studies on the constituents of *Fatsia japonica*. *Journal of Natural Products* 58: 1647-1654.
155. Bialy, Z., M. Jurzysta, M. Mella, and A. Tava. (2004). Triterpene Saponins from Aerial Parts of *Medicago arabica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1095-1099.
156. Jin-Woo, J., S. Shengmin, H. Kan, C. Xiaofang, Z. Nanqun, E. S. Ruth, Y. Z. Qun, T. R. Robert, and H. Chi-Tang. (2001). Characterization of the Triterpene Saponins of the Roots and Rhizomes of Blue Cohosh (*Caulophyllum Thalictroides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5969-5974.
157. Zhao, W. M., G. J. Yang, R. S. Xu, and G. W. Qin. (1996). New saponins from *Mussaenda pubescens*. *Natural Product Letters* 8:119-126.
158. Akiyama, T., K., Tanaka, S., Yamamoto, and S., Iseki. (1988). Blood-group active proteoglycan containing 3-O-methylrhamnose (acofriose) from young plants of *Osmunda japonica*. *Carbohydrate research* 178: 320-326.

159. Didier, R. (1998). Dictionnaire de maladies infectieuses, diagnostic-épidémiologie-répartiton géographique taxonomie-symptomalogie. Elsevier, Paris.
160. Kashiwada, Y., H. K. Wang, T. Nagao, S. Kitanaka, I. Yasuda, T. Fujioka, T. Yamagishi, L. M. Cosentino, M. Kozuka, K. Okabe, Y. Ikeshiro, C. Q. Hu, E. Yeh, and K. H. Lee. (1998). Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* 61: 1090-1095.
161. Mathekg, A. D. M., J. J. M. Meyer, M. M. Horn, and S. E. Drewes. (2000). An acylated phloroglucinol with antimicrobial properties from *Helichrysum caespitium*. *Phytochemistry* 53: 93-96.
162. Kubo, I., I. Kinshori, and Y. Yokokawa. (1994). Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *Journal of Natural Products* 57: 545-551.
163. Kubo, I., H. Muroi, and A. Kubo. (1995). Structural functions of antimicrobial long chain alcohols and phenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3: 873-880.
164. Van Beek, T. A. (2002). Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A* 967: 21-55.
165. Westendorf, J. and J. Regan. (2000). Induction of DNA strand-breaks in primary rat hepatocytes by ginkgolic acids. *Pharmazie* 55: 864-865.
166. Ahlemeyer, B., D. Selke, C. Schaper, S. Klumpp, and J. Krieglstein. (2001). Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *European Journal of Pharmacology* 430: 1-7.
167. Itokawa, H., N. Totsuka, K. Nakahara, K. Takeya, J. P. Lepoittevin, and Y. Asakawa. (1987). Antitumor principles from *Ginkgo-biloba* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 35: 3016-3020.
168. Lepoittevin, J. P., C. Benezra, and Y. Asakawa. (1989). Allergic contact-dermatitis to *Ginkgo-biloba* L.-relationship with urushiol. *Archives of Dermatological Research* 281: 227-230.
169. RiceEvans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 21: 417.
170. RiceEvans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956.
171. RiceEvans, C. A., J. Miller, and G. Paganga. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
172. Singh, I. P., K. Takahashi, and H. Etoh. (1996). Potent attachment-inhibiting and -promoting substances for the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*, from two species of *Eucalyptus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60: 1522-1523.

173. Gottlieb, O. R., M. L. Dasilva, and J. G. S. Mala. (1972). Chemistry of Brazillian Myrtaceae 3. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species *Phytochemistry* 11: 1185-&.
174. Raina, V. K., S. K. Srivastava, K. K. Aggarwal, K. V. Syamasundar, and S. Kumar. (2001). Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour and Fragrance Journal* 16: 334-336.
175. Hussein, S. A. M., A. N. M. Hashem, M. A. Seliem, U. Lindequist, and M. A. M. Nawwar. (2003). Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry* 64: 883-889.
176. Peng, Z. F., D. Strack, A. Baumert, R. Subramaniam, N. K. Goh, T. F. Chia, S. N. Tan, and L. S. Chia. (2003). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* 62: 219-228.
177. Murata, M., Y. Yamakoshi, S. Homma, K. Aida, K. Hori, and Y. Ohashi. (1990). Macrocarpal-A, a novel antibacterial compound from *Eucalyptus macrocarpa*. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 :3221-3226.
178. Takechi, M. and Y. Tanaka. (1981). Purification and characterization of anti-viral substance from the bud of *Syzygium aromatica*. *Planta Medica* 42: 69-74.
179. Tanaka, T., Y. Orii, G. I. Nonaka, I. Nishioka, and I. Kouno. (1996). Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry* 43: 1345-1348.
180. Lounasmaa, M., H. S. Puri, and C. J. Widen. (1977). Phloroglucinol derivatives of *Callistemon lanceolatus* leaves. *Phytochemistry* 16: 1851-1852.

