

Mag-CH09/29

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

2002

CENTRE UNIVERSITAIRE LARBI BEN M'HENNIA

OUM EL-BOUAGHI



15 sep. 04. 55. 58

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES

MEMOIRE

PRESENTE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE MAGISTER

Spécialité : Chimie Organique Industrielle

THEME

ETUDE COMPARATIVE
DES COUMARINES DU TABAC ALGERIEN

PAR

ABDELAZIZ AHMED

SOUTENUE LE : .../.../2002

Devant le jury :

| | | | |
|---------------------|------------------|-------|-----------------------|
| <u>Président :</u> | Mr A. DIBI* | Prof. | U. de BATNA |
| <u>Rapporteur :</u> | Mr Dj. BELKACEMI | M.C | C.U. de OUM ELBOUAGHI |
| <u>Examineurs :</u> | Mr K. LAMARA | M.C | C.U. de OUM ELBOUAGHI |
| | Mr Y. BOUZAHER | M.C | U. de BATNA |

06/A
31

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire des produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique du Centre Universitaire de Oum El-Bouaghi , sous la direction de Monsieur DJABALLAH . BELKACEMI .

Je tiens tout particulièrement à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour le sujet qui m'a confié ainsi que son orientation durant l'élaboration de cette thèse .

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur A. DIBI Professeur à l'Université de Batna, qui m'a fait le privilège présider le jury de cette thèse et d'apporter des remarques nécessaires ,

Mes vifs remerciements vont également à :

✍ Monsieur K . LAMARA, Maître de Conférence au Centre Universitaire de Oum El-Bouaghi .

✍ Monsieur Y . BOUZAHER , Maître de Conférence à l'Université de Batna .

Je remercie particulièrement ma famille et mes collègues pour leur soutien moral et matériel.

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| | |
| CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE | |
| I - A DESCRIPTION DU TABAC..... | 2 |
| I - A - 1 Introduction..... | 2 |
| I - A - 2 Définition..... | 2 |
| I - A - 3 Description..... | 3 |
| I - A - 4 Récolte..... | 4 |
| I - A - 5 Séchage..... | 4 |
| I - A - 6 Botanique du tabac..... | 4 |
| I - A - 6-1 Classification..... | 4 |
| I - B COUMARINES..... | 6 |
| I - B - 1 Introduction..... | 6 |
| I - B - 2 Formation des coumarines dans la plante..... | 7 |
| I - B - 3 Biosynthèse des coumarines dans les tissus du tabac..... | 8 |
| I - B - 4 Classification des coumarines..... | 9 |
| I - B - 5 Effets des coumarines sur la plante..... | 14 |
| I - B - 6 Effets des coumarines sur l'organisme animal..... | 17 |
| I - B - 7 Caractéristiques des coumarines..... | 18 |
| I - B - 8 Extraction des coumarines..... | 18 |
| I - B - 9 Séparation et purification des coumarines..... | 22 |
| I - B - 10 Propriétés spectrales des coumarines..... | 23 |
| | |
| CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE | |
| II - A IDENTIFICATION DES COUMARINES DANS LES FEUILLES DE LA PLANTE DU TABAC | 25 |
| II - B EXTRACTION DES COUMARINES DES FEUILLES DE LA PLANTE DU TABAC..... | 26 |
| II - B - 1 Préparation des feuilles..... | 26 |
| II - B - 2 Extraction..... | 26 |
| II - B - 3 Extraction des coumarines de la plante..... | 26 |
| II - B - 4 Séparation et purification du résidu..... | 30 |
| II - B - 5 Etude analytique des méthodes de séparation des coumarines..... | 31 |
| | |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION | |
| III - 1 IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLES..... | 34 |
| III - 1 - 1 Techniques d'analyses..... | 34 |
| III - 1 - 2 Détermination des structures probables des produits (A,B,C)..... | 35 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE..... | 53 |
| | |
| Bibliographie | |

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

L'étude phytochimique de la plante du tabac à priser-mâcher, entre dans le cadre d'une suite de recherches sur les plantes récoltées en Algérie [3]. Cette culture est très répandue dans la région de Oum El-Bouaghi.

Cette plante appartient à la famille des *Solanacées* (*Nicotiana Solanacée*), au sous genre *Nicotiana Rustica* et à l'espèce(variété) connu(e) en Algérie sous le nom de *Berzili*, est représentée par un nombre limité d'espèces qui se trouvent presque dans toutes les parties du monde[1, 2].

Et dans ce contexte, nous avons absorbé l'examen phytochimique de cet espèce(variété) afin d'apporter notre contribution à la connaissance du genre *Nicotiana* au point de vue phytochimique.

Cela nous semble d'autant plus nécessaire que la recherche bibliographique relative à cette étude, nous a montré que certains espèces dans diverses parties du monde à déjà fait l'objet des recherches phytochimiques très récentes[7, 8, 25, 27].

Le but de cette étude est de savoir quels genres de coumarines existantes dans la plante et la connaissance de leurs teneurs par rapport à celle des alcaloïdes où la nicotine est majoritaire. Vu leurs intérêts thérapeutique, la biosynthèse des coumarines dans les tissus de la culture du tabac permet d'augmenter leurs teneurs afin de minimiser la toxicité causée par le tabac [27].

Le présent travail est composé, plus d'une introduction générale, de trois chapitres et une conclusion générale.

Dans le premier chapitre, on a étudié la partie théorique qui comprend la description et la classification botanique du tabac et en plus, on a étudié une description des coumarines.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude expérimentale où on a étudié le matériel et les méthodes utilisées pour l'extraction des coumarines de l'espèce de la plante du tabac (*Nicotiana Rustica*).

Par ailleurs, le troisième chapitre est réservé à la discussion des résultats expérimentaux obtenus.

CHAPITRE I

PARTIE THEORIQUE :

A- DESCRIPTION DE LA PLANTE DU TABAC

B- COUMARINES

1 - A DESCRIPTION DU TABAC

I- A - 1 Introduction

La culture du tabac est la première culture industrielle introduite en Algérie.

On peut distinguer deux catégories de tabacs cultivées en Algérie :

- A fumer,
- A priser – mâcher.

La culture du tabac à fumer est concentrée dans trois régions (Annaba, Mitidja, Kabylie)

Pour le priser-mâcher, sa culture est concentrée dans les régions de Kherrata, Ain Mlila, El Oued et Mascara.

I - A - 2 Définition

Plante Aromatique, de la famille *Solanacées*, cultivée essentiellement pour ses feuilles, riches en alcaloïdes (nicotine) et qui séchées préparées, prennent aussi le nom du tabac et serve à la fabrication :

- Du tabac de coupe pour cigarettes scaferlati et pipe,
- Des cigarettes,
- Des couvertures et intérieurs de cigare,
- Du tabac à priser-mâcher,
- Du tabac à nicotine.

Le tabac (*Nicotina Tabacum*) est une plante très exigeante en chaleur : son développement est lent au-dessus de 15°C ; son optimum de croissance se situe entre 25 et 30°C. A 0°C, les feuilles peuvent être endommagées ; à -30°C, la plante est détruite.

Le tabac exige des sols profonds, fertiles, légèrement acides, bien pourvus en eau.

Une tonne de feuilles exporte environ 75 kg d'azote, 15kg de phosphore, 125kg de potasse et 105kg de chaux.

La nicotine, qui n'existe pas dans les graines, est présente (avec d'autres alcaloïdes) dans tout le reste de la plante, et surtout dans les feuilles.

Sa teneur croît avec la maturation (les feuilles hautes sont plus riches que les feuilles basses).

Elle varie également avec le climat, le sol (plus élevée en sols riches en Azote), la densité de plantation (plus élevée si les plantes sont très espacées), l'écimage, la dessiccation, la fermentation et la variété [1-2].

I - A - 3 Description

- Plantes annuelles à tige herbacée,
- Feuilles isolées entières, rarement sinuées ou ondulées,
- Fleures hermaphrodites, l'autofécondation étant la règle,
- Fruit : capsule,
- Graines nombreuses, petites, presque réniformes. (11000 graines /g) .

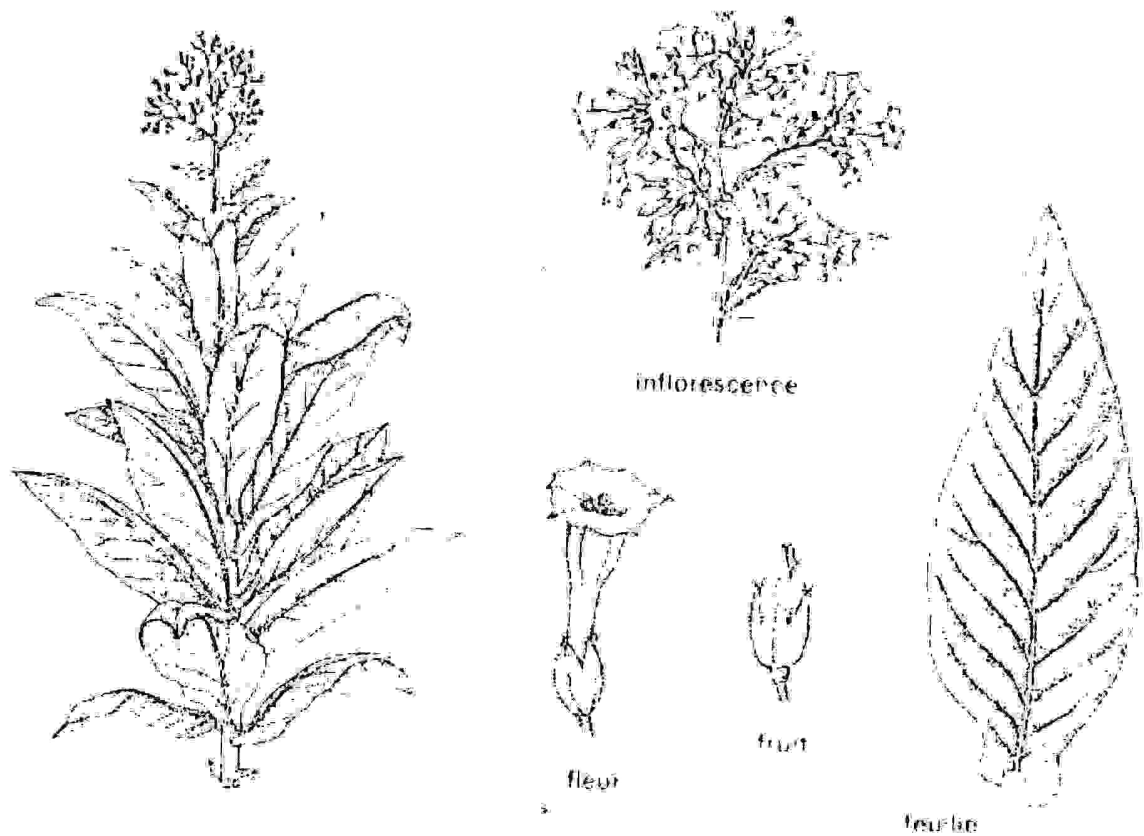


Fig.1 : Description de la plante du tabac [1].

I - A - 4 Récolte

Le temps de maturité est lié à plusieurs facteurs : variété, sol, fumure, climat.

La modification de teinte (vert-jaune) de la feuille n'est pas un critère universel pour déterminer le moment de la récolte : la position de la feuille, le cloquage du limbe, etc... sont des caractéristiques techniques dépendant du type du tabac qui sont également à prendre en considération.

La récolte qui a lieu environ trois mois après la plantation, se fait soit en feuilles, soit en tiges soit indifféremment.

I - A - 5 Séchage

C'est l'opération la plus importante. En fait, c'est bien plus qu'une simple dessiccation de la feuille, car il conduit à l'obtention d'un produit de qualité grâce à la création de conditions optimales permettant certaines modifications chimiques au sein de la feuille.

On distingue quatre procédés :

- Le séchage à l'air naturel en séchoir (air curing),
- Le séchage à l'air naturel au soleil (Sun curing),
- Le séchage à la fumée (fire curing),
- Le séchage artificiel à l'air chaud (flue curing).

I - A - 6 Botanique du tabac

Tous les tabacs appartiennent au genre *Nicotiana* [2] (J. Nicot a introduit en France le *Nicotiana Rustica* : Le tabac industriel, *N. Tabacum*, a été introduit par A. Thévet).

I - A - 6-1 Classification

Il existe environ 60 espèces différentes de *Nicotiana*, classées en trois sous-genres d'après leur morphologie, leur localisation, et leurs particularités cytogénétiques [2-3].

a- Le sous-genre *Pétunioide* comprend 45 espèces mais n'a pas d'intérêt économique.

b- Le sous-genre *Rustica* fournit les tabacs corsés, riches en nicotine (teneur de 4 à 5% d'ordinaire, mais qui peut aller jusqu'à 16 %) et il comprend 9 (neuf) espèces toutes originaires d'Amérique du sud.

Il est utilisé pour la préparation du tabac à priser – mâcher, et même pour l'extraction d'alcaloïdes. Sa culture est pratiquée dans certaines régions d'Europe et d'Asie et en Afrique du Nord :

l'Algérie, le Maroc et la Tunisie (VAN DIERENDONCK, 1959-Rapport anonyme 1961-AKEHURST, 1981) [3].

c- Le sous genre *Tabacum* (6 espèces originaires de l'Amérique du Sud) est de loin le plus important car il comprend 9/10° des tabacs cultivés dans le monde.

Il renferme un très grand nombre de races que l'on peut rassembler en 4 types idéaux supposés purs et actuellement disparus.

- *Nicotiana Tabacum Havanensis* (gabarit de la plante ellipsoïdale), qui sert à faire les cigares

du genre « Havane » et qui comprend également certaines races de tabac d'orient, de Java et de Sumatra.

- *N.T Brasiliensis* (gabarit de la plante conique) dont les principales races sont : le Brésil de Bahia, le Burley et le Paraguay.

- *N.T Virginica* (gabarit de la plante formée par deux cônes réunis par leur base, le supérieur étant beaucoup plus haut que l'inférieur) dont les principales races sont les Kentucky et le Virginie.

- *N.T purpurea* (gabarit de la plante cylindrique) qui comprend les tabacs orientaux.

Dans la réalité, tous ces types de *Nicotiana Tabacum* sont mélangés et on ne retrouve pas pratiquement, de variétés pures qui présentent tous les caractères de chacun des types précédents [2].

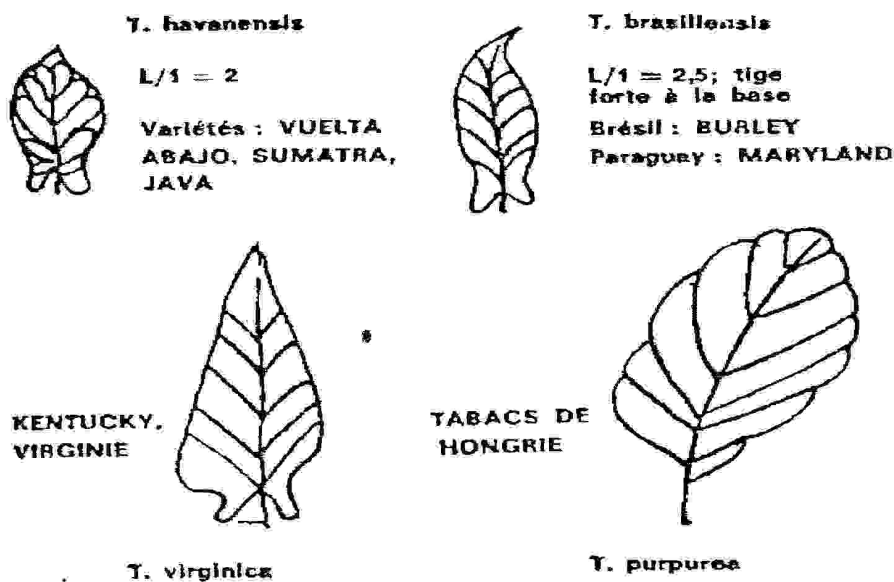
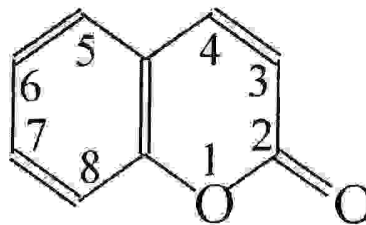


Fig.2 : Classification botanique de *Nicotiana Tabacum* [2].

I – B COUMARINES

I – B –1 Introduction

La coumarine est dérivée du benzopyrone. Sa structure a été élucidée en 1820[4].



(I)

La coumarine est ensuite retrouvée dans plusieurs végétaux aussi à l'état libre que sous forme de glucosides.

La coumarine donne son nom à tout produit naturel possédant le squelette (I).

Les coumarines sont très répandues chez les dicotylédones (fabales), Astéracées, notamment dans les racines et les écorces ; plus de huit cents ont été répertoriées [4,5].

Les coumarines les plus fréquemment rencontrées sont l'Ambelliférone, l'Esculétole et le scopolétole.

On rencontre des coumarines chez les végétaux inférieurs (champignons.....) et chez les plantes supérieures chez les monocotylédones et les dicotylédones [5].

Certaines familles sont riches en coumarines [4, 6]:

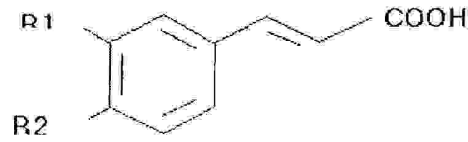
- Légumineuse
- Umbellifères
- Rutacées
- Composées
- Orchidacées

Les coumarines se trouvent dans toutes les parties des plantes mais elles existent en taux élevés dans les fruits, à savoir [6,7]:

- *Angelica* 3.5%
- *Parsnip* 1.7%

I – B – 2 Formation des coumarines dans la plante

Les coumarines peuvent être obtenues à partir des acides organiques présents dans la plante, de formules générales :



| | R ₁ | R ₂ |
|----------------------|------------------|----------------|
| - Acide cinnamique | H | H |
| - Acide p-coumarique | H | OH |
| - Acide caféique | OH | OH |
| - Acide férulique | OCH ₃ | OH |

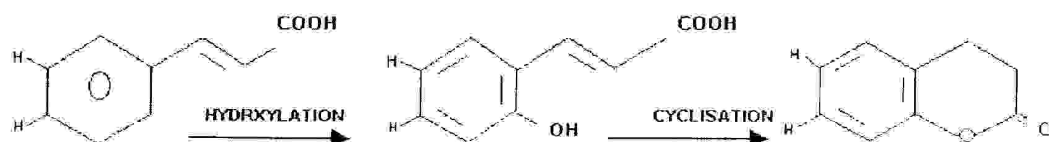


Schéma.1 : Voie de l'Acide Cinnamique [4].

La fixation d'une unité isoprénique conduit à toute une série de coumarines soit comportant une unité furanne ou pyranne.

1 – B – 3 Biosynthèse des coumarines dans les tissus du tabac

L'étude de la culture du tabac (*Nicotiana Tabacum*) montre que certains composés présents peuvent être des origines de certaines coumarines, et cela par leurs différentes possibilités de branchement :

- Les possibilités de branchement de l'acide caféique dans les tissus de la culture conduit à des coumarines comme le montre la réaction chimique suivante:

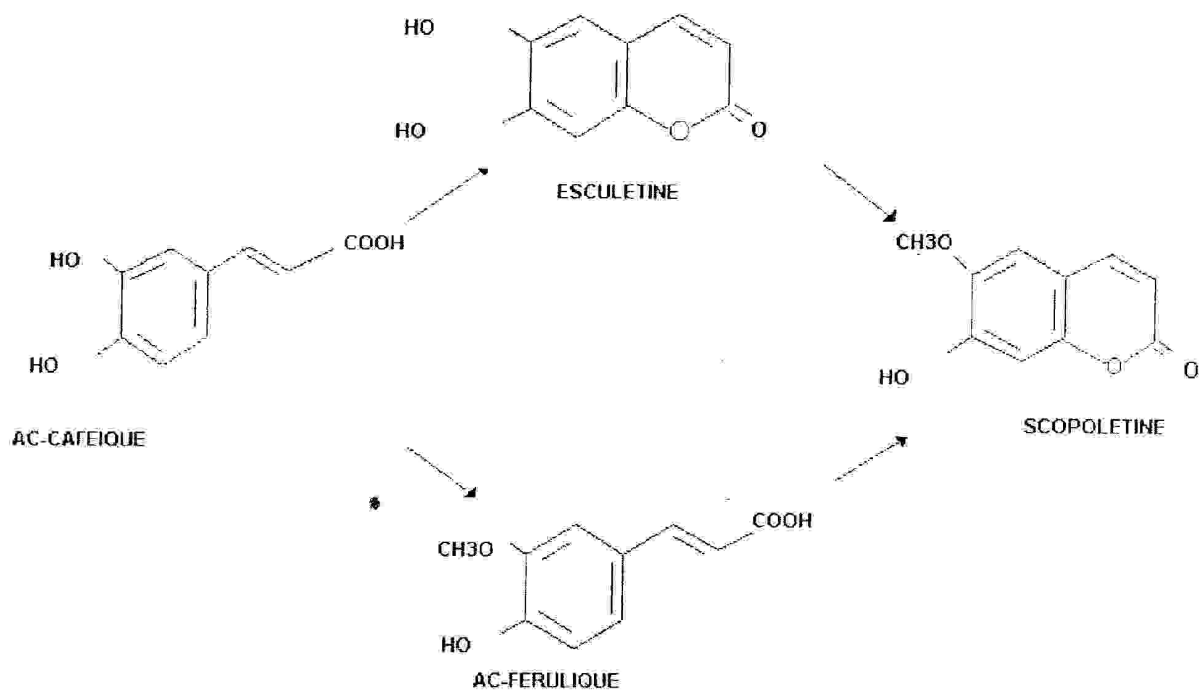


Schéma. 2 : Les possibilités de branchement de l'acide caféique

- De même certaines comarines (Scopolétine et Scopoline) dans les tissus de la culture du tabac peuvent être obtenues à partir du phénylalanine (PAL) selon son chemin proposé de transformation montré par les réactions suivantes [8]:

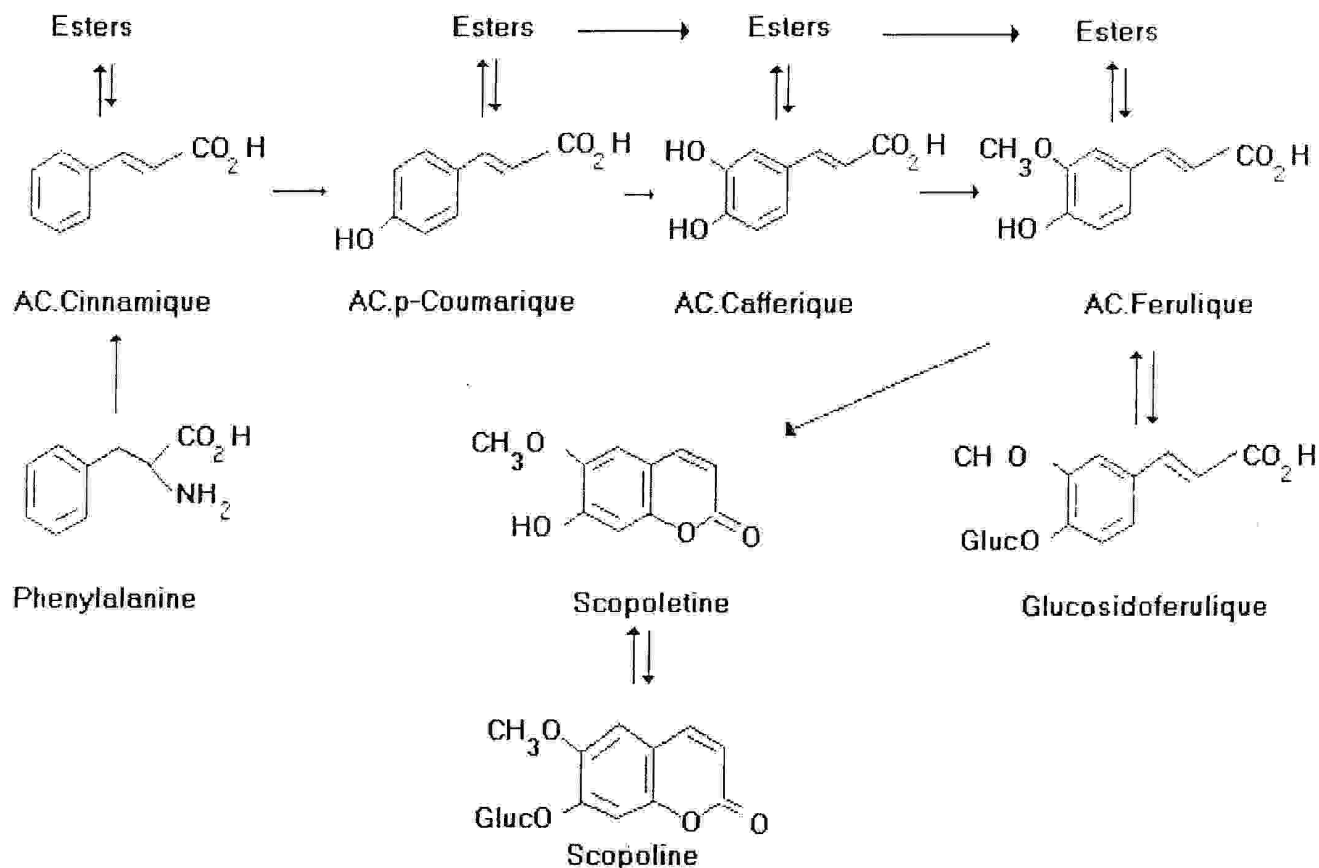


Schéma. 3 : Les possibilités de branchement de phénylalanine (PAL)

I - B - 4 Classification des coumarines

L'activité principale des coumarines est due à la présence de benzo- α -pyrone.

Elles peuvent être classées comme suit [9,10] :

a- Coumarines simples

La plupart de ces composés dans cette série sont substitués par les groupements OH et OCH₃ en positions C-6 et C-7.

- Produits naturels :

Angelica, *Imperatoriae*, *Levisticae*, *Pimpinellae* et *Heraclei radix*, exemple: Ambelliferone.

Scopolitae radix, exemple : Scopoletine.

Abrotani herba, exemple : Scopoletine et Ambelliferone.

Fraxini cortex, exemple : Fraxidine, Isofraxidine et Fraxitine.

Herniariae herba, exemple : Hernianine.

b- Coumarines substituées

Les coumarines peuvent être substituées soit sur le noyau benzène, soit sur le noyau pyrone.

- Produits naturels

Rutae herba, exemple : Rutamarine.

Angelicae radix, exemple : Ambelliprenine.

Imperatoriae radix, exemple : Ostruthine.

Et citons aussi les coumarines dimériques.

c- Coumarines condensées

c.1 Furanocomarines

Elles dérivent de l'Ambelliferone par condensation avec une unité isoprénique .

- Si le cycle furanne est fixé en C-6 et C-7 du système du cycle de la coumarine, il s'agit du type psoralène ou furanocoumarine linéaire.

- Si le cycle furanne est fixe en C-7 et C-8 du système, il s'agit du type Angelicine ou furanocoumarine angulaire.

- Produits naturels

Angelicae, Imperatoriae, Levisticae, Pimpinellae et Heraclei radix, exemple :

Bergaptene, Angelicine, Impératorine.

Ammi majoris fructus, exemple : Bergaptene, Xanthotoxine.

Rutae herba, exemple : Bergaptene, Psoralene.

c . 2 Pyranocoumarines

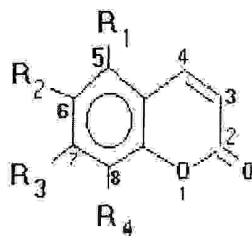
Le cycle pyranne est fixé en C-7 et C-8 du système du cycle de la coumarine.

-Produits naturels

Ammi majoris fructus, exemple : Visnadine, Samidine.

On peut représenter les formules chimiques des composés des coumarines par le tableau suivant :

Formules des constituants des coumarines naturelles



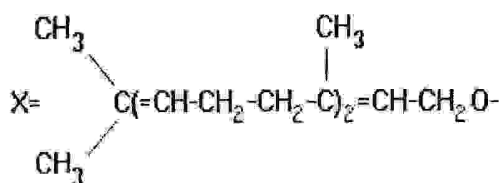
A- Coumarines simples:

| R_1 | R_2 | R_3 | R_4 | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| H | H | OH | H | Ambelliferone (7-Hydroxycoumarine) |
| H | H | OCH ₃ | H | Herniarine (7-Methoxycoumarine) |
| H | OH | OH | H | Aesculetine (6,7-Hydroxycoumarine) |
| H | H | OH | OH | Daphnoretine (7,8-Hydroxycoumarine) |
| H | OCH ₃ | OH | H | Scopoletine (6-Methoxy-7-hydroxycoumarine) |
| H | OCH ₃ | OGluc | H | Scopoline (6-Methoxy-7-glucosidocoumarine) |
| H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Isofraxidine (7-Hydroxy-6,8-methoxycoumarine) |
| OCH ₃ | OH | OCH ₃ | H | Fraxinol (6-Hydroxy-5,7-methoxycoumarine) |

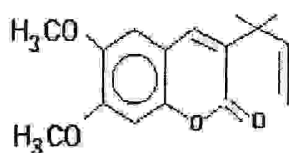
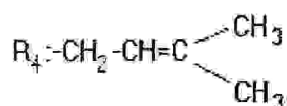
Tab.1 : Formules chimiques des coumarines simples.

B- Coumarine substituées:

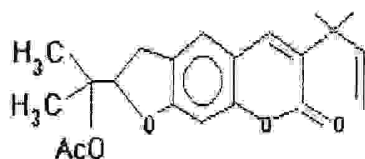
| R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| H | H | X | H | Ambelliprenine |
| H | X | OH | H | Ostruthine |



| R ₁ | R ₂ | R ₃ | |
|----------------|----------------|----------------|----------|
| H | H | OH | Osthol |
| H | H | OCH | Osthenol |

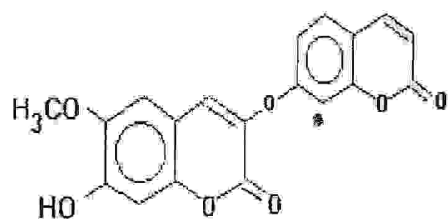


Rutaculline



Rutamarine

Coumarine dimerique



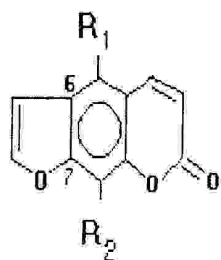
Daphnoretine

Tab.2 : Formules chimiques des coumarines substituées.

C-Coumarines condensées:

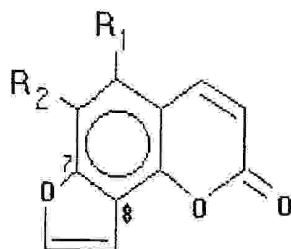
1-Furanocoumarines:

7,6-Furanocoumarines

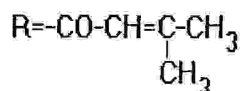
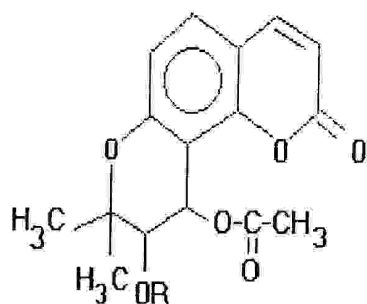


| R ₁ | R ₂ | Furanocoumarine |
|------------------|---|------------------------|
| H | H | Psoralene |
| OCH ₃ | H | Bergaptene |
| H | OCH ₃ | Xanthotoxine |
| H | OH | Xanthotoxol |
| OCH ₃ | OCH ₃ | Isopimpinelline |
| H | $-\text{OCH}_2-\text{CH}=\text{C}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ | Imperatorine |
| | $-\text{OCH}_2-\text{CH}=\text{C}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ H | Isoimperatorine |
| | $-\text{OCH}_2-\text{CH}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ H | Oxypeucedanine |
| | $-\text{OCH}_2-\text{CH}-\text{CH}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{matrix}$ H | Oxypeucedanine hydrate |

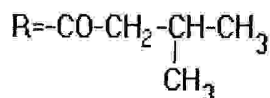
7,8-Furanocoumarine:



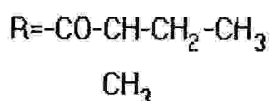
| R ₁ | R ₂ | Furanocoumarine |
|------------------|------------------|-----------------|
| H | H | Angelicine |
| OCH ₃ | H | Isobergaptene |
| H | OCH ₃ | Sphondine |
| OCH ₃ | OCH ₃ | Pimpinelline |

2-Pyranocoumarines :

Samidine



Dihydrosamidine



Visnadine

Tab.3 : Formules chimiques des coumarines condensées.

I – B – 5 Effets des coumarines sur la plante

Les effets des coumarines obtenues, des fruits *Angelicae* et *Parsnip*, sur l'accroissement des cellules cancéreuses HeLa-S cultivées loin de la lumière ont été étudié.

Il est conclu que pour des concentrations, de fractions des coumarines, au dessus de 5µg/ml inhibent l'accroissement des cultures [7, 10].

Les dix coumarines isolées par fractions, montrent leurs influences sur l'accroissement des cellules HeLa. Le profil de l'inhibition des cellules Hela par ces coumarines est comme suit :

Osthol > Xanthotoxol > 4-méthylescluletine > Isopinpinelline > Bergaptene > Xanthoxine > Inperatine > Coumarine > Ambelliferone > 4- Hydroxycoumarine.

Les effets des coumarines sur l'accroissement des cellules HeLa sont illustrés sur le tableau suivant [7]:

Tab.4 : Effets des coumarines simples et furanocoumarines sur l'accroissement des cellules HeLa.

Coumarines simples

| Composées | Teneur des protéines en cellules | Teneur des protéines en relation avec le contrôle (%) |
|---------------------|----------------------------------|---|
| Osthol | 74.0 ± 3.4 | 30.3 |
| 4-MtylAesculetine | 104.7 ± 3.3 | 42.8 |
| Coumarine | 208.5 ± 1.4 | 85.2 |
| Ambelliferone | 217.0 ± 2.8 | 88.8 |
| 4- Hydroxycoumarine | 218.3 ± 2.6 | 89.3 |
| Contrôle | 244.5 ± 2.4 | 100.0 |

Furanocoumarines

| | | |
|-----------------|---------------|-------|
| Xanthotoxol | 100.4 ± 4.4 | 41.1 |
| Isopimpinelline | 122.2 ± 4.5 | 50.0 |
| Bergaptene | 144.0 ± 5.5 | 58.9 |
| Xanthoxine | 149.7 ± 3.4 | 61.2 |
| Imperatorine | 177.7 ± 4.1 | 72.7 |
| Contrôle | * 244.5 ± 2.4 | 100.0 |

Ces résultats sont obtenus après incubation de 48 heures par des coumarines.

L'influence des coumarines provenant de *Angelica* et *Parsnip* sur l'accroissement des cellules HeLa est évaluée par la détermination de la teneur en protéines dans les cellules de la culture [7].

Cette influence est montrée par les tableaux suivants :

Tab.5 : Influence des concentrations des coumarines sur l'accroissement des cellules HeLa après incubation de 24 heures.

Incubation de 24 heures

| Fractions des Coumarines | Concentrations ($\mu\text{g} / \text{ml}$) | Teneur des cellules en protéines (μg) | Teneur en protéines en relation avec le contrôle (%) |
|--------------------------|--|--|--|
| Angelica | 5 | 151 ± 3.1 | 91.0 |
| | 25 | 115 ± 3.4 | 69.3 |
| | 50 | 81 ± 4.1 | 48.8 |
| Parsnip | 5 | 158 ± 3.3 | 95.2 |
| | 25 | 132 ± 2.0 | 76.5 |
| | 50 | 115 ± 4.3 | 69.3 |
| Contrôle | - | 166 ± 5.2 | 100.0 |

Tab.6 : Influence des concentrations des coumarines sur l'accroissement des cellules HeLa après incubation de 48 heures.

Incubation de 48 heures

| Fractions des Coumarines | Concentrations ($\mu\text{g} / \text{ml}$) | Teneur des cellules protéines (μg) | Teneur en protéines en relation avec le contrôle (%) |
|--------------------------|--|---|--|
| Angelica | 5 | 155 ± 2.2 | 78.7 |
| | 25 | 81 ± 2.5 | 41.1 |
| | 50 | 36 ± 3.1 | 18.3 |
| Parsnip | 5 | 189 ± 4.0 | 95.9 |
| | 25 | 119 ± 5.0 | 60.4 |
| | 50 | 79 ± 6.4 | 40.1 |
| Contrôle | - | 197 ± 6.8 | 100.0 |

Toutes les deux fractions des coumarines obtenues des plantes *Angelica* et *parsnip*, pour des concentrations de 5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ralentissent l'accroissement de la culture. La quantité des protéines, dans toutes les expériences des cultures, est abaissée en comparaison avec Le contrôle de la culture et encore diminuée après l'incubation des coumarines.

I – B – 6 Effets des coumarines sur l'organisme animal

L'étude des effets des composés des coumarines sur l'organisme animal, montre que ces composés, en plus leurs réactions telles que anticoagulation, spasmogène et photoactivité, montre aussi qu'elles ont des propriétés anti-cancéreuses [7].

La capacité de 8-methoxyPsoralène de diminuer le taux du Cancer de la peau causée par la radiation ultraviolette appliquée pour les souris blanches est décrite par O'Neal et Griffin [11].

Quelques coumarines également inhibent l'induction chimique du Cancer [4, 12].

Les furanocoumarines, en plus leurs capacité de ralentir l'action de mutagène et cancérigène, encore limitent l'augmentation du Cancer [13].

Les actions anti-cancéreuses des composés particuliers des coumarines peuvent variées et dépendent du type de composé et du type du cancer [4,14].

I – B – 7 Caractéristiques des coumarines

Les coumarines sont généralement des solides cristallisés blancs ou jaunâtres présentant une saveur amère.

Les hétérosides sont solubles dans H₂O et ROH, et les génines sont solubles dans l'alcool et l'éther.

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence sous l'UV à 365 nm, cette fluorescence à la couleur bleue pour les coumarines hydroxylées en C-7 (Ambelliferone), pourpre pour les coumarines alkyles avec un reste isoprénique et jaune pour les furanocoumarines. Cette fluorescence est plus intensifiée par la vapeur de NH₃.

La présence des groupements phénoliques fait que les produits peuvent être identifier par :

- Le perchlorure de fer
- Para nitroaniline azotée.

I – B – 8 Extraction des coumarines

Les coumarines se trouvent dans toutes les parties de la plante à l'état libre et hétérosidique.

En général, l'extraction des coumarines libres peut se faire à partir de la plante fraîche, en utilisant des solvants de plus en plus polaires.

Dans le cas des graines contenant des lipides, l'éther de pétrole qui entraîne les lipides entraînera en même temps les coumarines, et comme elles sont peu solubles dans l'éther de pétrole, elles précipitent. Après l'extraction, on se trouve en présence de plusieurs composés.

Parmi les différentes méthodes d'extractions des coumarines, on peut utiliser aussi la méthode d'extraction et de purification par voie chimique.

Cette méthode est appliquée comme complémentaire aux méthodes d'extraction par solvant.

Elle consiste à faciliter la séparation des constituants d'un mélange par l'utilisation d'un réactif, le plus souvent minéral [15].

Les organigrammes suivants montrent quelques méthodes d'extractions des coumarines à partir des produits naturels.

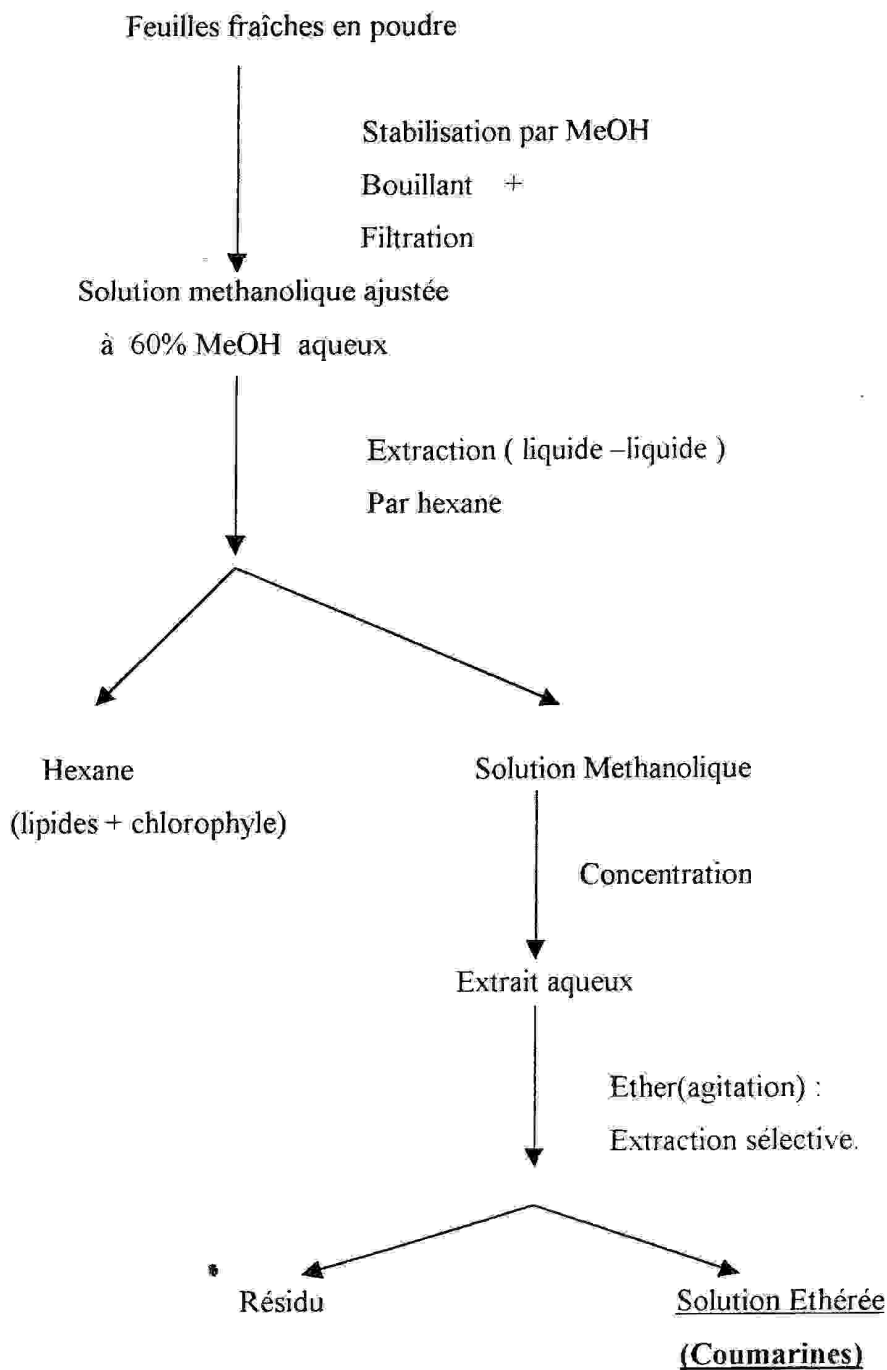


Fig. 3 : Organigramme de l'extraction des furanocoumarines des feuilles de la plante *Angélica Archangélica* (*Ambéllifères*).

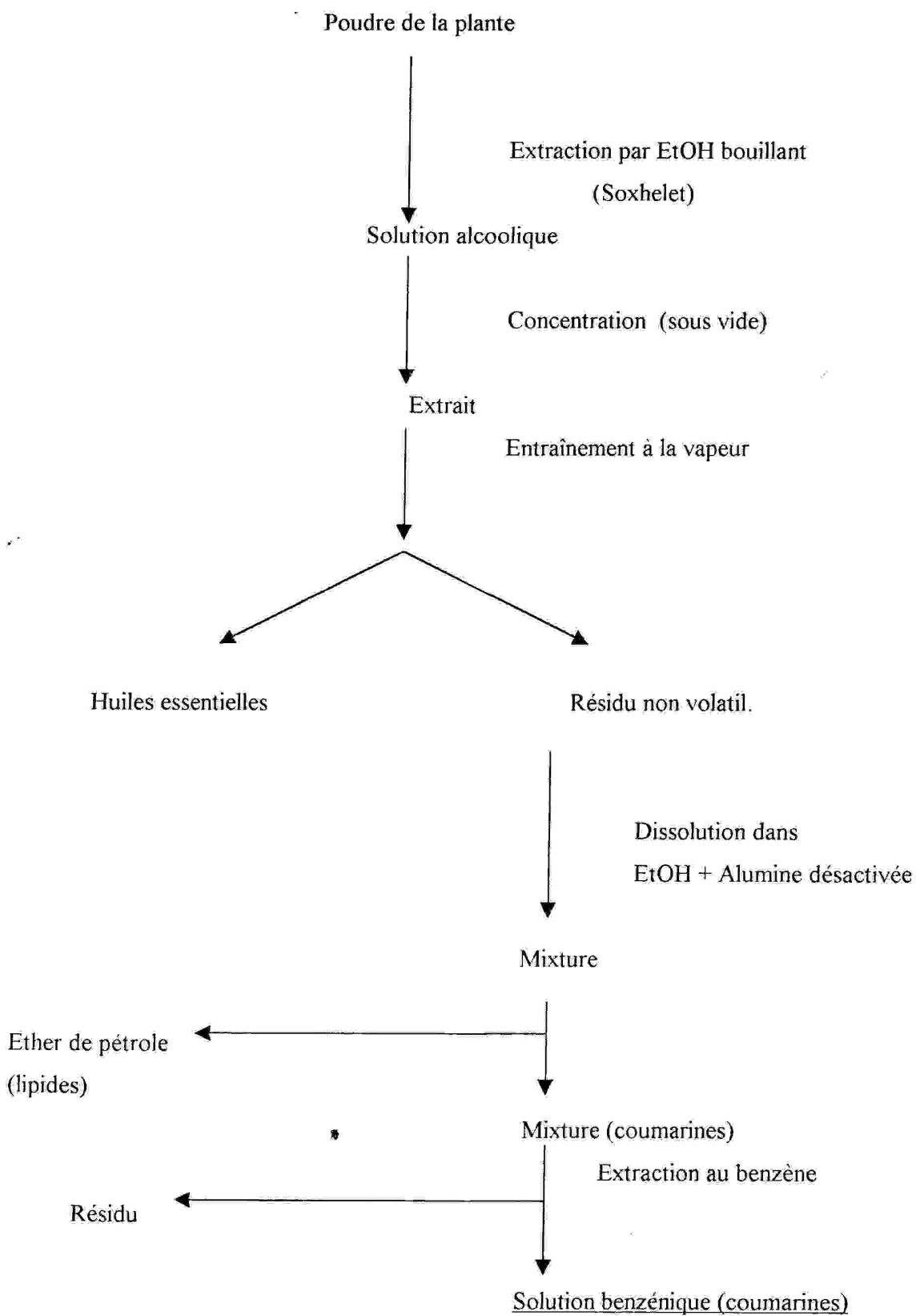


Fig. 4: Organigramme de l'extraction des coumarines et furanocoumarines des écorces de *Ruta Pumata* (Rutacées).

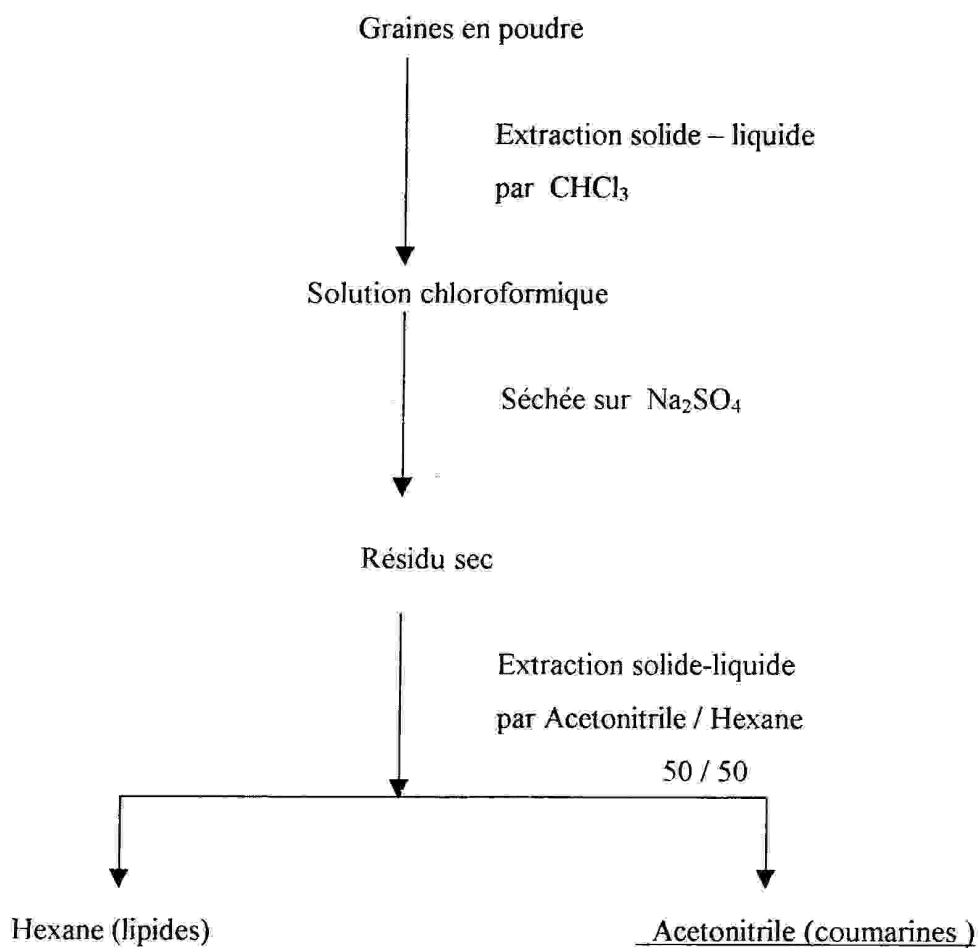


Fig. 5: Organigramme de l'extraction des furanocoumarines des graines *Ammi Majus* (*Ambellifères*).

I – B – 9 Séparation et purification des coumarines

Il s'avère parfois nécessaire d'utiliser la chromatographie sous différentes formes comme méthode de séparation des coumarines.

a- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette technique repose principalement sur le phénomène d'adsorption et de désorption des échantillons sur un support solide.

La chromatographie sur couche mince est une méthode efficace pour la séparation des coumarines, et parfois pour leurs identifications .

Quelques coumarines sont isolées par l'utilisation des plaques de silicagel comme phase stationnaire, et comme éluant formé de Toluène- Acétate d'Ethyle- Acide Acétique (5 :4:1).

Ces coumarines fluorescentes sous la lumière(ultra-violet), sont identifiées par le calcul de la valeur de leur facteur de rétention (Rf) [16 , 17] .

b - Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne s'apparente étroitement à la CCM.

Cependant , la phase stationnaire en silice ou en alumine remplit une colonne de longueur et de sections variables.

L'échantillon en solution concentrée de faible volume, est déposée au sommet de la colonne et la séparation des composés résulte de l'écoulement continu d'un éluant .

La polarité de l'éluant est progressivement augmentée afin d'accélérer la désorption des composés polaires qui adhèrent fortement au support solide.

La chromatographie sur colonne est une méthode efficace pour la séparation des coumarines, par l'utilisation de colonne SE 30.

Les coumarines isolées sont identifiées par L' UV, IR , RMN , et peuvent être purifiées par chromatographie sur couche mince [17].

c- Chromatographie à haute performance (HPLC)

Cette technique donne des meilleures séparations par rapport aux autres méthodes.

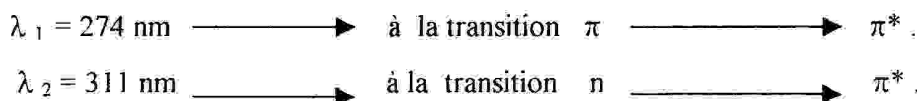
Elle est utilisée pour la séparation et la purification des furanocoumarines et les coumarines instables [21].

I – B – 10 Propriétés spectrales des coumarines

a- Spectroscopie ULTRA-VIOLET (UV) :

Les rayonnements électromagnétiques (UV) sont responsables de faire les transitions des électrons dans la molécule, de l'état fondamental à l'état excité. Le domaine spectral de l' UV se situe entre 200 et 400 nm .

Les longueurs d'ondes du rayonnement susceptibles de provoquer les transitions des électrons dans la coumarine simple, correspondent aux valeurs :



Lorsqu'il y'a des substituants alkyls : peu de modifications.

On revanche, l'introduction d'un OH sur le noyau aromatique provoque un effet bathochrome à 325 nm. Et selon la position de OH, le déplacement est plus au moins fort [4].

b- Spectroscopie INFRA-ROUGE (IR) :

Les rayonnements IR sont susceptibles de provoquer les vibrations des liaisons dans la molécule.

L'application de cette technique d'analyse pour les coumarines, peut donner peu d'indications.

- De 1600 à 1660 cm^{-1} : présence de la liaison C=C
- De 1720 à 1750 cm^{-1} : présence de la liaison C=O
- A environ 3350 cm^{-1} : présence d'un groupement OH

c- Spectroscopie RMN (Résonance magnétique nucléaire) :

La technique d'analyse spectrale de résonance magnétique nucléaire (^{13}C RMN, ^1H RMN) a une très vaste utilisation pour l'identification des structures chimiques les plus probables des composés organiques naturels ou synthétiques.

Le ^1H RMN est la technique spectrale la plus courante utilisé pour l'identification des structures chimiques et la nature des coumarines naturelles.

Par cette méthode d'analyse on peut facilement connaître la coumarine non substituée en position 3 et 4 grâce aux valeurs des spectres d'absorptions.

La présence de deux doublets ($J = 9.50 \text{ Hz}$), le premier a son signal aux alentours de 6.1 et 6.4 ppm (proton -3) et le deuxième se situe entre 7.5 et 7.9 ppm (proton -4).

Ces deux valeurs précédentes peuvent indiquer la présence du noyau de la coumarine non substituée par un groupement d'oxygène en position -5.

Lorsque la valeur du deuxième doublet se situe entre 7.9 et 8.2 ppm et la valeur du premier doublet reste inéchangeable, le noyau de la coumarine est substitué par un groupement d'oxygène en position -5.

Si la valeur du premier spectre d'absorption augmente et la valeur du deuxième diminue, le noyau de la coumarine est substitué en position -8 [18 - 20].

On peut résumer tous ces données du ^1H RMN par le tableau suivant :

Tab.7 : Domaines d'absorption des protons de la coumarines en positions 3 et 4 [6, 21].

| Nature du spectre | Domaine d'absorption (δ) | Nature de substitution |
|--|-----------------------------------|---|
| a - deux doublets de ($J= 9.50 \text{ Hz}$) | 6.1 - 6.4 7.5 - 7.19 | Pas du groupement d'oxygène en position -5 |
| b - deux doublets ($j= 9.5 \text{ Hz}$) | 6.1 - 6.4 7.5 - 8.2 | Présence du groupement d'oxygène en position -5 |
| c - deux doublets ($J = 8.5 \text{ Hz}$) | 6.6 - 6.9 7.1 - 7.5 | Présence d'une substitution en position -8 |
| d - deux doublets ($J= 2.5 \text{ Hz}$) | Environ 7 | Coumarine est substituée en position 5 et 7 |
| e-un doublet dédoublé (dd) ($J= 1.2 \text{ 5Hz}$) un doublet ($J= 2.5 \text{ Hz}$) | 6.7 - 7.2 7.5 - 7.7 | Proton α furanne Proton β furanne |

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE :

MATERIELS ET METHODES UTILISEES

II – A IDENTIFICATION DES COUMARINES DANS LES FEUILLES DE LA PLANTE DU TABAC

L'extrait éthérique de 10 ml de la poudre des feuilles de la plante du tabac est évaporé jusqu'au séchage.

- le résidu est dissout dans l'eau chaude (1-2ml)
- la solution aqueuse est menée dans deux tubes à essais.
- la premier sert comme référence.
- on ajoute au deuxième tube à essais 0.5 ml de $\text{NH}_4^+ \text{OH}^-$ à 10%.
- l'apparition de la couleur bleue ou verte fluorescentes et une intense fluorescence sous la lumière UV indiquent la présence des coumarines et leur dérivées [22].

Ces tests chimiques sur la présence des coumarines dans la plante étudiée sont enregistrés sur le schéma suivant :

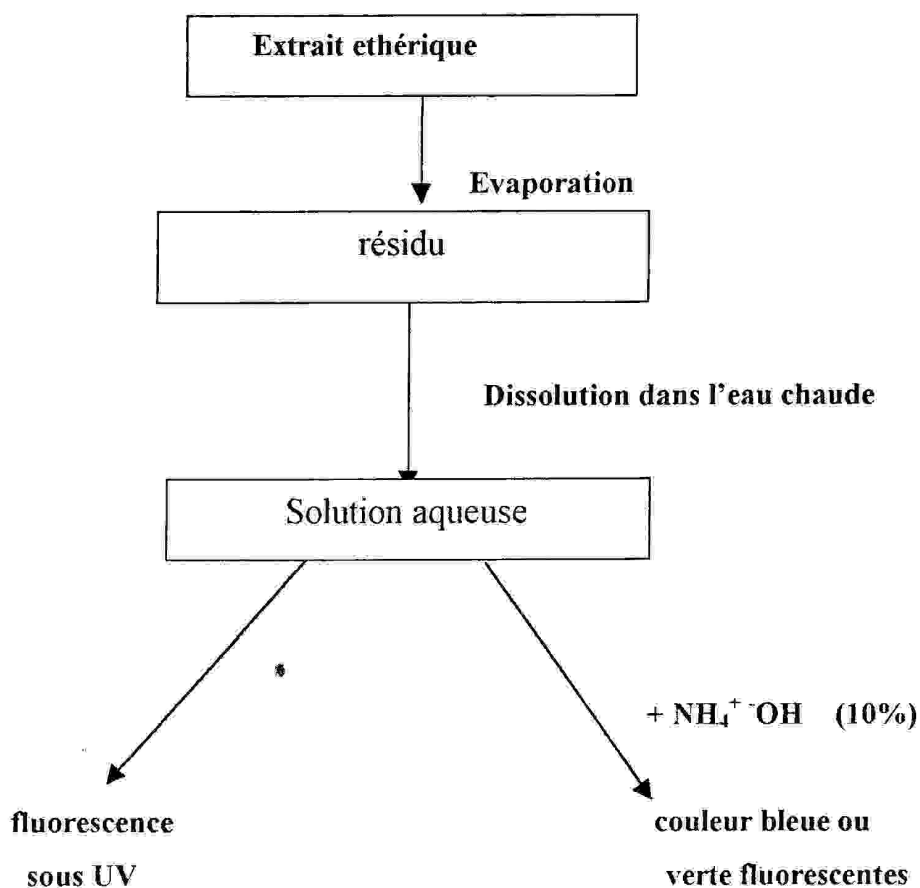


Fig.6 : Organigramme d'identification des coumarines dans les feuilles de la plante du tabac.

II – B EXTRACTION DES COUMARINES DES FEUILLES DE LA PLANTE DU TABAC

II – B – 1 Préparation des feuilles

Les feuilles de la plante du tabac cultivées en mois d'octobre sont séchées à l'air en absence de la lumière, puis réduites en poudres.

II – B – 2 Extraction

Les feuilles réduites en poudres sont introduites dans l'extracteur « un Sokshelet » pour l'extraction continue, en employant l'Ethanol comme solvant.

La durée de l'extraction est variable selon la rapidité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant.

II – B – 3 Extraction des coumarines de la plante

Le volume du solvant de l'extrait a été réduit au minimum sous pression réduite.

Le résidu obtenu, qui est dissout dans l'Ethanol (70%) de volume égale à 100 ml, a été ajouté un réactif sélectif qui est la soude (NaOH) environ 15% [21, 23].

Le mélange est soumis à reflux pendant une heure.

Après refroidissement, il est dilué à son double volume par l'eau distillé .

L'extraction multiple du mélange par le chloroforme (CHCl_3), permet de distinguer deux phases :

Une phase aqueuse contenant les composés saponifiés, et une phase organique contenant le reste.

Les coumarines présentes sont régénérées par traitement de la phase aqueuse par une solution diluée d'acide chlorhydrique (HCl), avec agitation continue jusqu'au PH acide.

Le milieu acide est laissé reposer pendant une nuit.

L'extraction multiple du mélange par le solvant précédant, permet de distinguer deux autres phases.

La phase organique obtenue, qui contient les coumarines, est lavée, séchée par Na_2SO_4 , filtrée et traitée par le charbon actif afin d'éliminer le chlorophile.

Après l'évaporation du solvant, la masse du résidu jaunâtre est de : 1.75 g .

La méthode suivie pour l'extraction des coumarines de la plante est représentée par l'organigramme suivant:

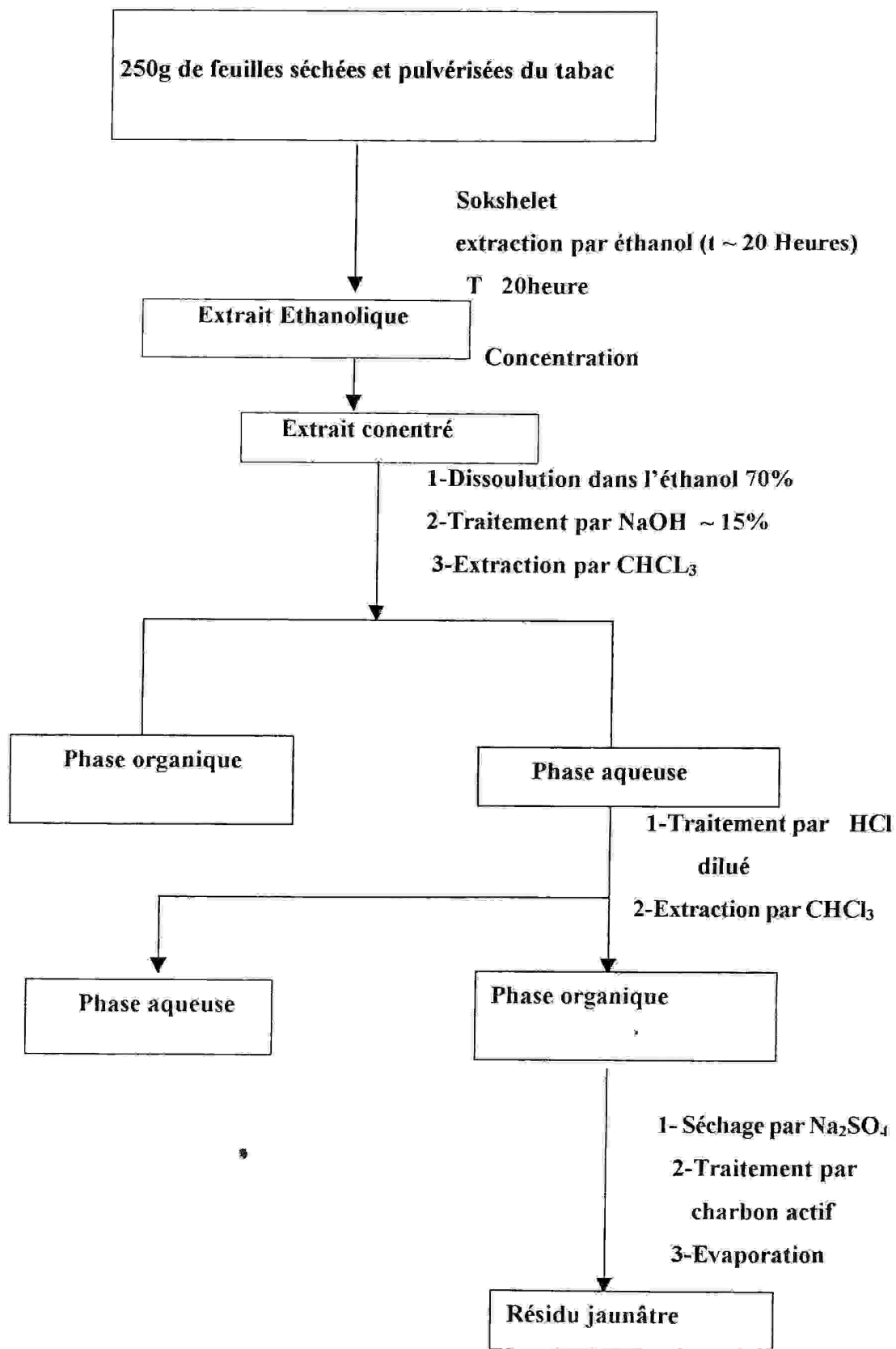
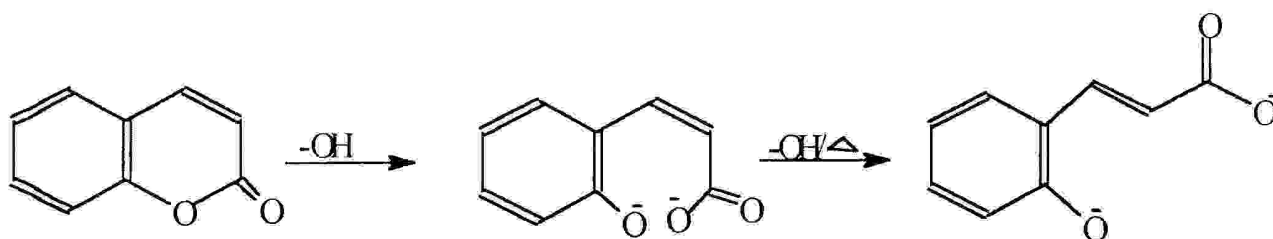


Fig.7 : Organigramme d'extraction des coumarines des feuilles de la plante du tabac.

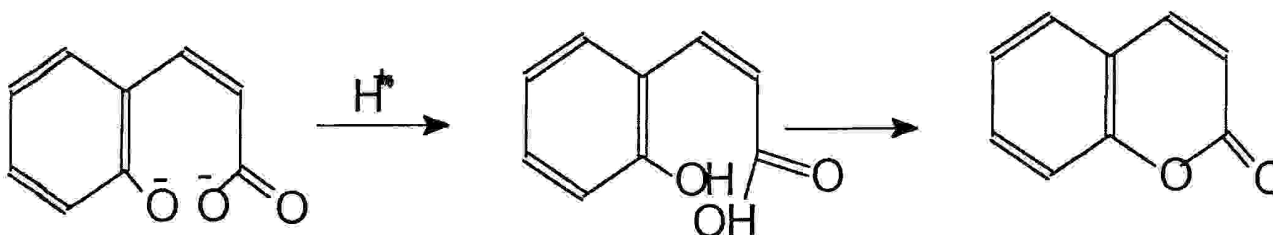
Notons finalement que la phase organique, contenant les composés non saponifiés, a été traité par l'acide-base extraction. Et après séchage a donné une masse de 9.46 g et qui correspond à un pourcentage élevé par rapport à la masse des coumarines.

On peut expliquer la méthode utilisée pour l'extraction des coumarines de la plante par les réactions suivantes :

a- Transformation des coumarines en sels des acides coumariques, par une base diluée, en composés trans [6] :



b-La régénération du produit principal, se fait par l'acidification de la solution basique des coumarines [6, 15].

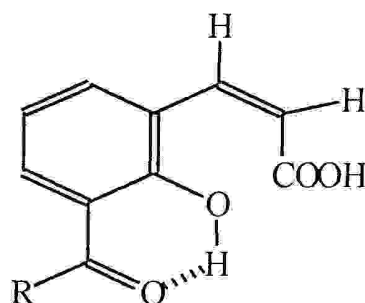


Cette méthode a une vaste utilisation pour la séparation des coumarines des extraits de la plante neutres et acides [6].

Les inconvénients de cette méthode d'extraction sont :

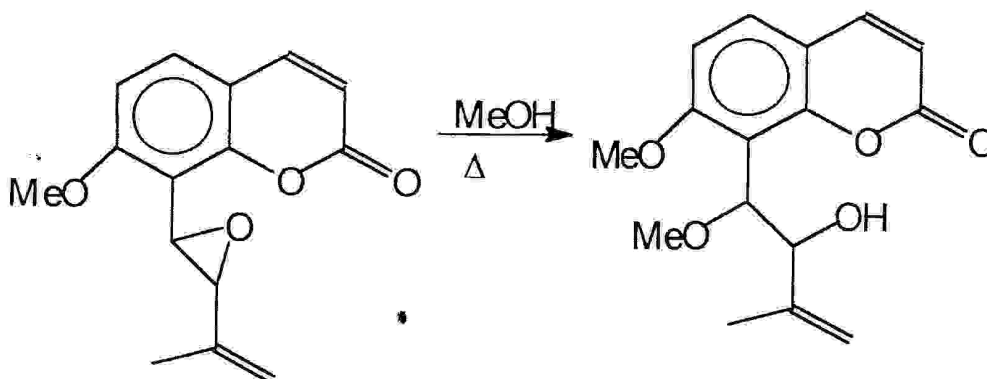
On risque parfois de la formation d'artéfacts qui empêchent la relictionisation, surtout dans les solutions basiques faibles [4, 6].

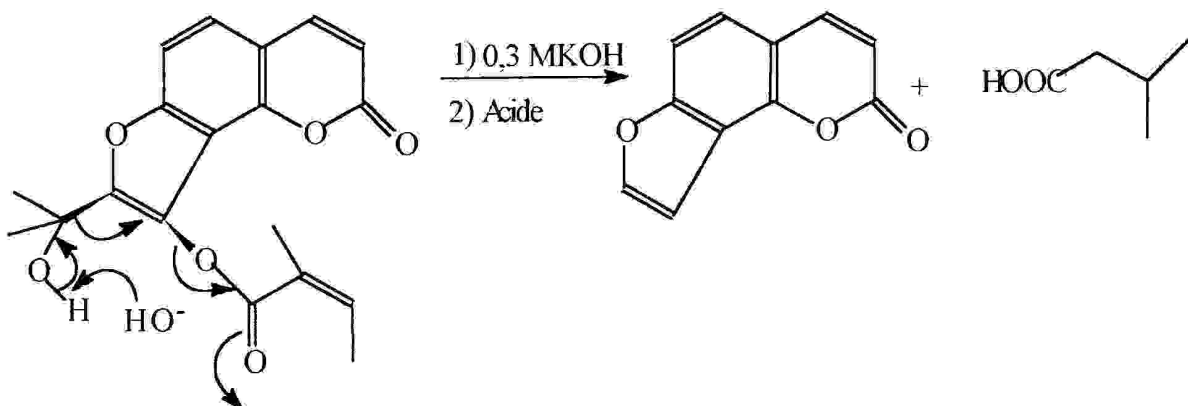
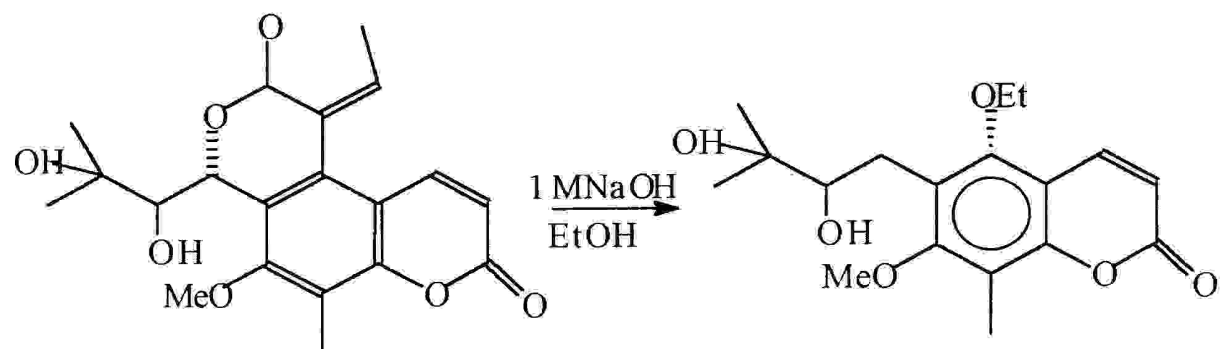
Et cela peut s'expliquer par la forte acidité de l'acide coumarique.



- On risque parfois d'obtenir des coumarines qui ne sont pas des composés originaux du produit naturel, et qui résultent des traitements chimiques lors de la séparation.

Et cela peut s'expliquer par les réactions suivantes :





II – B – 4 Séparation et purification du résidu

La technique suivie pour la séparation des coumarines du résidu jaunâtre est, la chromatographie sur couche mince.

Les différentes vitesses de migration des composés nous a permis de distinguer des spots colorés de R_f (facteurs de retentions) différentes.

La séparation du résidu par la chromatographie sur couche mince est due par l'utilisation de Silicagel comme phase stationnaire et différentes proportions des mélanges de solvants comme éluants.

II – B – 5 Etude analytique des méthodes de séparation des coumarines

Le résidu est dissout dans l'Ethanol comme solvant.

Les différents types de séparations par la chromatographie sur couche mince, sont montrés par les essais suivants :

Premier essais :

Avec l'utilisation de 4ml d'éther de pétrole comme éluant, on a obtenu un seul spot jaunâtre de $R_f = 0.14$.

Il est conclu qu'aucune séparation n'est possible.

Deuxième essais :

Avec l'utilisation de 4ml d'éthylacétate comme éluant, on a obtenu un seul spot jaunâtre de $R_f = 1$.

Il est conclu que, tous les composés du résidu ont migré.

Troisième essais :

Avec l'utilisation de 4ml du chloroforme comme éluant, aucune indication sur la séparation n'a été observée.

Des trois essais précédents, on a conclu que : le mélange des solvants précédents peut nous donner une meilleure séparation comme suit :

a- Après l'utilisation de l'éluant formé d'éther de pétrole – chloroforme (4 : 6), on a obtenu des spots colorés non éloignés les uns des autres.

Il est conclu que pour obtenir une meilleure séparation, l'augmentation de la polarité est indispensable.

b- Après l'utilisation de l'éluant formé d'éther de pétrole – chloroforme – acétate d'éthyle (4 : 6 : 1), on a obtenu une meilleure séparation des spots.

Le schéma suivant montre , la séparation des coumarines sur une plaque préparative en verre .

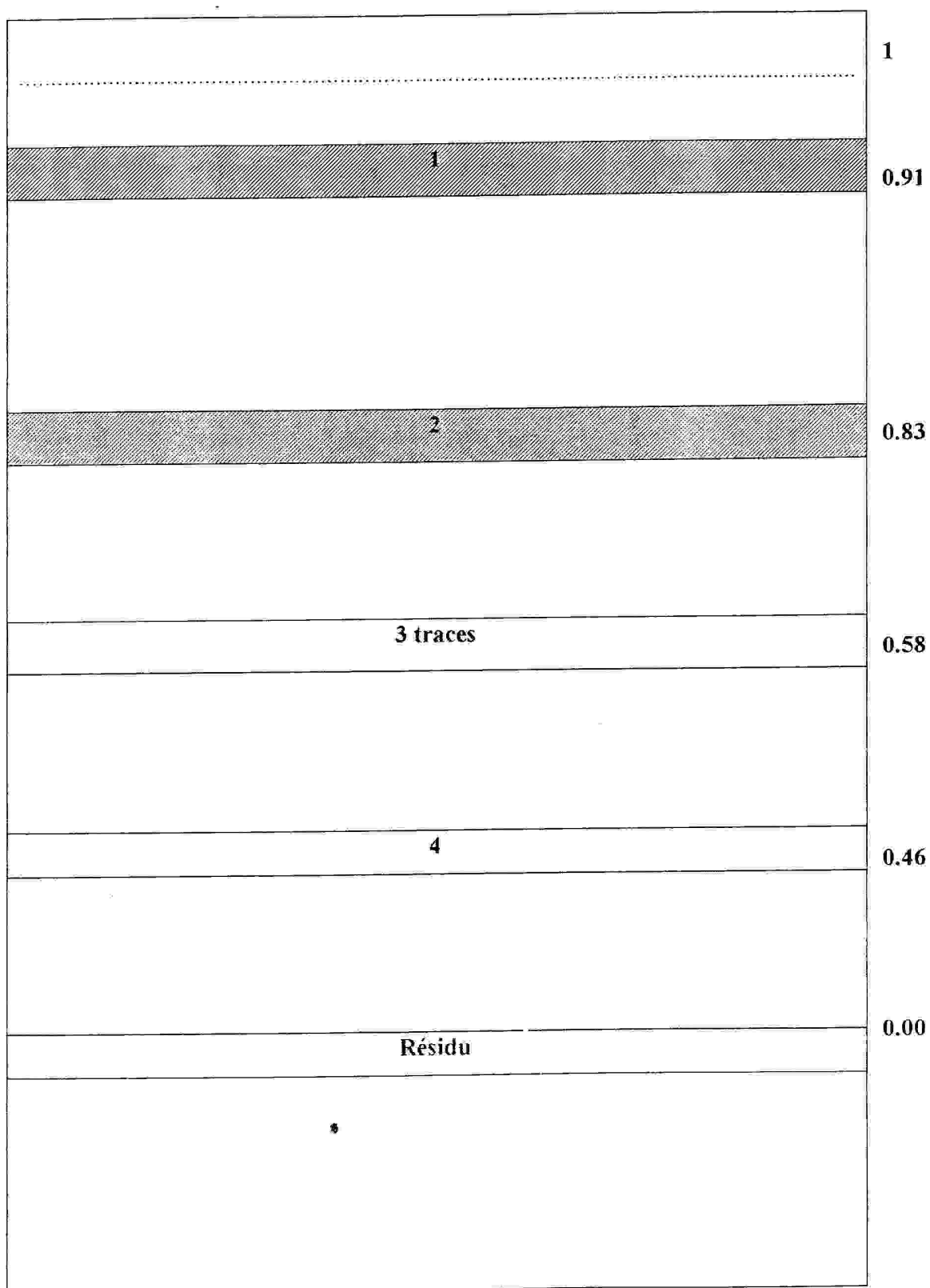


Fig.8 : Séparation des coumarines sur une plaque en verre.

Après la révélation de cette plaque sous la lumière UV($\lambda = 365 \text{ nm}$) on a observé trois composés fluorescents, comme le montre le tableau suivant :

Tab.8 : Résumé des composés isolés par CCM.

| Composé | Rf | Masse (g) | Rendement % | Couleurs sous UV |
|----------|------|-----------|-------------|-----------------------------|
| 1 | 0.91 | 0.03 | 0.012 | Bleue- violet |
| 2 | 0.83 | 0.04 | 0.016 | Intense fluorescence violet |
| 4 | 0.46 | 0.06 | 0.024 | Large fluorescence bleue |

Des résultats précédents, on peut conclure que la quantité des composés isolés par rapport à la masse du résidu est très faible et de même pour la masse de la plante sèche soumise à l'extraction.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

III – 1 IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLES

III – 1 – 1 Techniques d'analyses

Les techniques d'analyse utilisées pour la détermination des structures chimiques probables des composés isolés par chromatographie sur couche mince (TLC), de type ALUFAULIEN KIESELGEL 60 F₂₅₄ ART 5554 DC, sont :

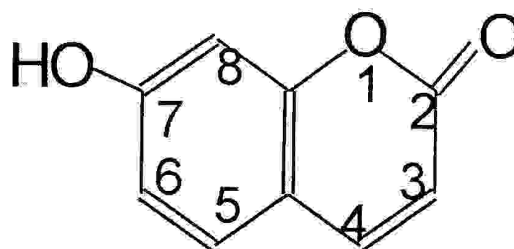
- La Spectroscopie infra-rouge (IR)
- La Spectroscopie UV – Visibles
- La Spectroscopie ¹H RMN.
- La Spectroscopie de masse .

Tab.9: Appareillages utilisés et solvant

| Techniques d'analyses | Appareil | Solvant |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| IR | SHIMADZU | CHCl ₃ |
| UV- Visible | UV: 1601 SHIMADZU | Ethanol |
| ¹ H RMN | BRÜCKER DPX 250 MHZ | CDCl ₃ |
| S. de masse | OPEN LYNX REPORT VARIAMMAT 311 | MeOH |

III – 1 – 2 Détermination des structures probables des produits (A,B,C).

Le produit (A) : C'est l'Ambelliferone (7- hydroxy coumarine) sa formule chimique brute est $C_9H_6O_3$, de masse molaire 162 g et de structure chimique :



(A)

L'étude spectrale pour ce composé par différentes techniques d'analyses, a montré des résultats qui nous ont amené à déterminer sa structure la plus probable.

a- Les spectres donnés par IR ont indiqués les résultats suivants :

- * Absorption vers 1710 cm^{-1} , indique la vibration de la liaison C=O.
- * Absorption vers 2900 et 3100 cm^{-1} , indique la vibration de la liaison C-H olefinique et aromatique.
- * Une absorption vers 3300 cm^{-1} , donne des indications sur la présence du groupement hydroxyl (OH).

b- La spectroscopie UV a donné des bandes d'absorption correspondantes aux valeurs suivantes :

- * La première bande λ_1 max vers 216 nm.
- * Une deuxième large bande λ_2 max vers 328nm résulte de l'effet bathochrome qui est cité dans le texte.

Ces valeurs de bandes d'absorption correspondent à celles données dans la littérature [4].

c- Les spectres de ^1H RMN pour ce produit nous ont permis de savoir avec une grande probabilité, le type des hydrogènes présents dans la molécule par leurs déplacement chimiques.

On remarque que les protons H₃ et H₄ apparaissent sous forme de doublet chacun (6.37δ) et (7.75δ) avec une constante de couplage de 9.5 Hz, ceci est en accordance avec la littérature [4, 6].

Le proton H₅ apparaît comme doublet lui aussi à (7.23δ) puisqu'il est couplé avec le proton H₆ seulement (J=9.4 Hz).

Le proton H₆ est couplé avec H₅ (J=9.4 Hz) et faiblement couplé avec H₈ (J=2 Hz), il apparaît comme un doublet dédoublé (dd) à (6.90δ).

Le proton H₈ apparaît comme doublet (d) à (6.80δ) avec J=2 Hz

Les valeurs de delta (δ) pour le produit (A) sont enregistrées sur le tableau suivant:

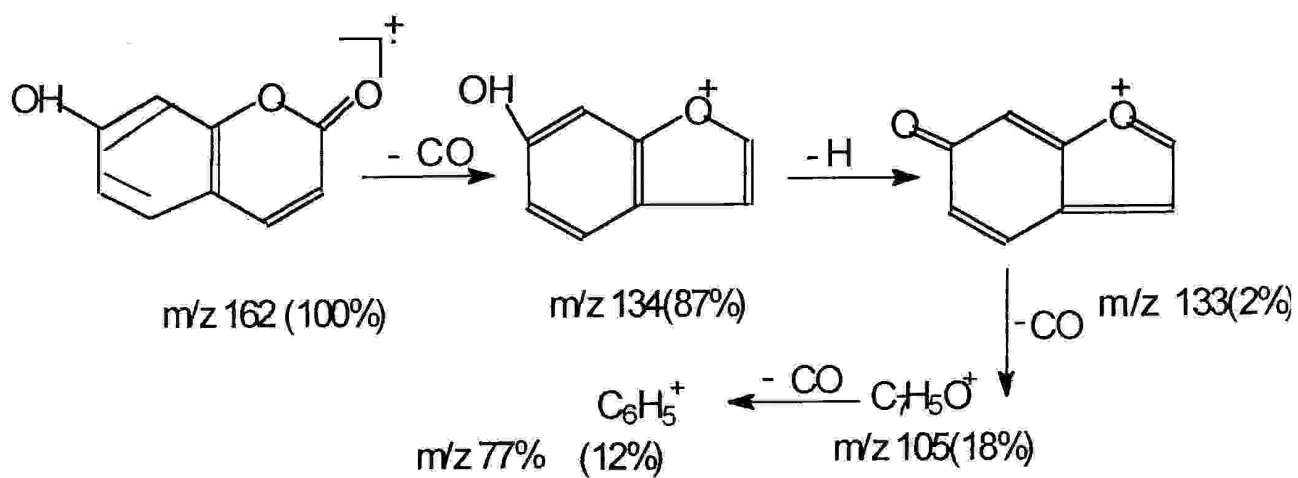
| Position de l'hydrogène | δ (delta) ppm | J (Hz) |
|-------------------------|---------------|---------------|
| H-3 | 6.37 (d) | J=9.5 |
| H-4 | 7.75 (d) | J=9.5 |
| H-5 | 7.23 (d) | J=9.4 |
| H-6 | 6.90 (dd) | J1=2 , J2=9.4 |
| H-8 | 6.80 (d) | J=2 |
| OH(7) | - | |

Tab.10 : Spectres ¹H RMN du produit (A).

d- Les spectres de masse pour le produit précédent, nous ont permis de situer la molécule et de savoir les différentes fragmentations possibles.

- M (Masse moléculaire) = 162
- M⁺_{•1} = 163

Les masses des différents fragments sont expliquées selon le schéma suivant:



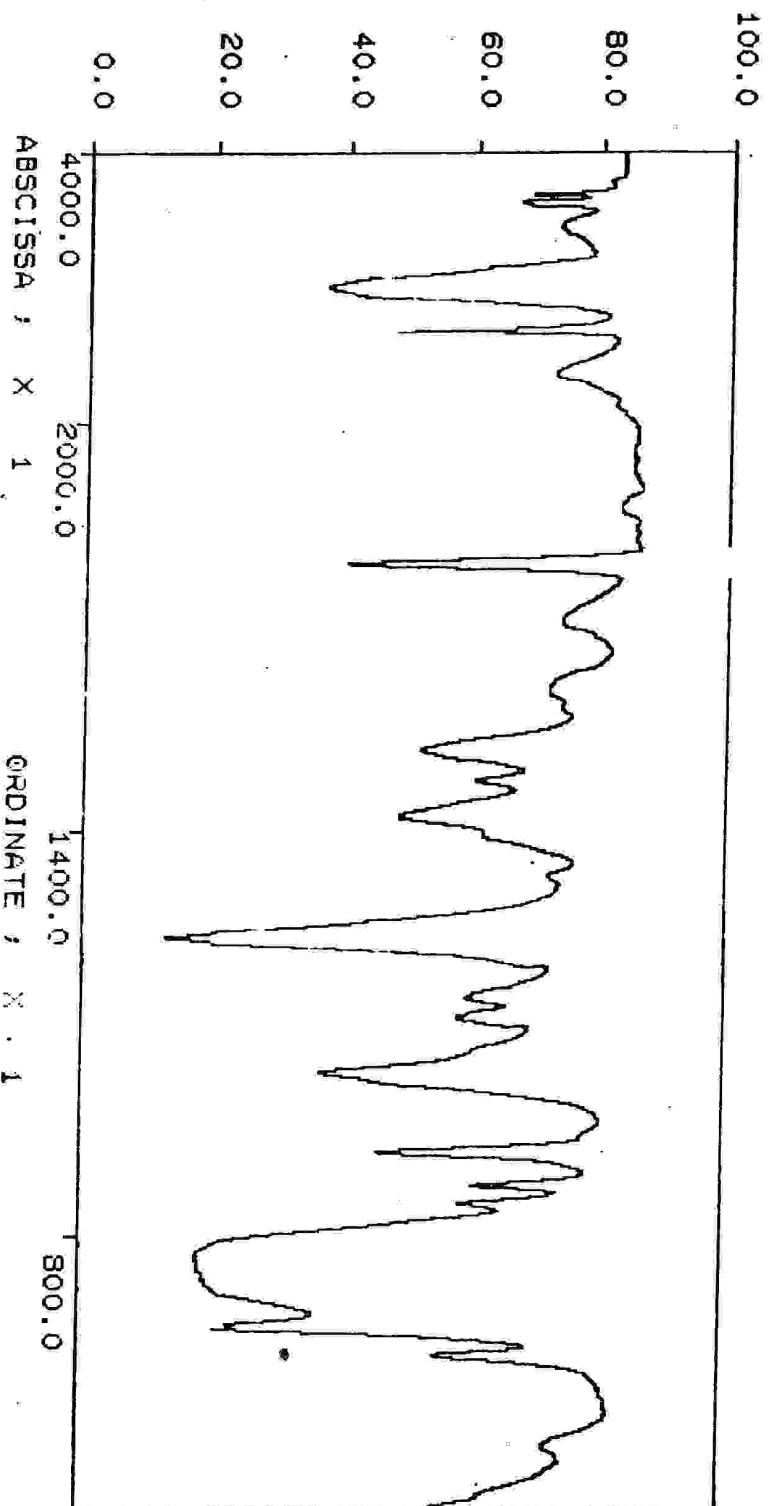


Fig.9 : Spectre IR du produit (A)

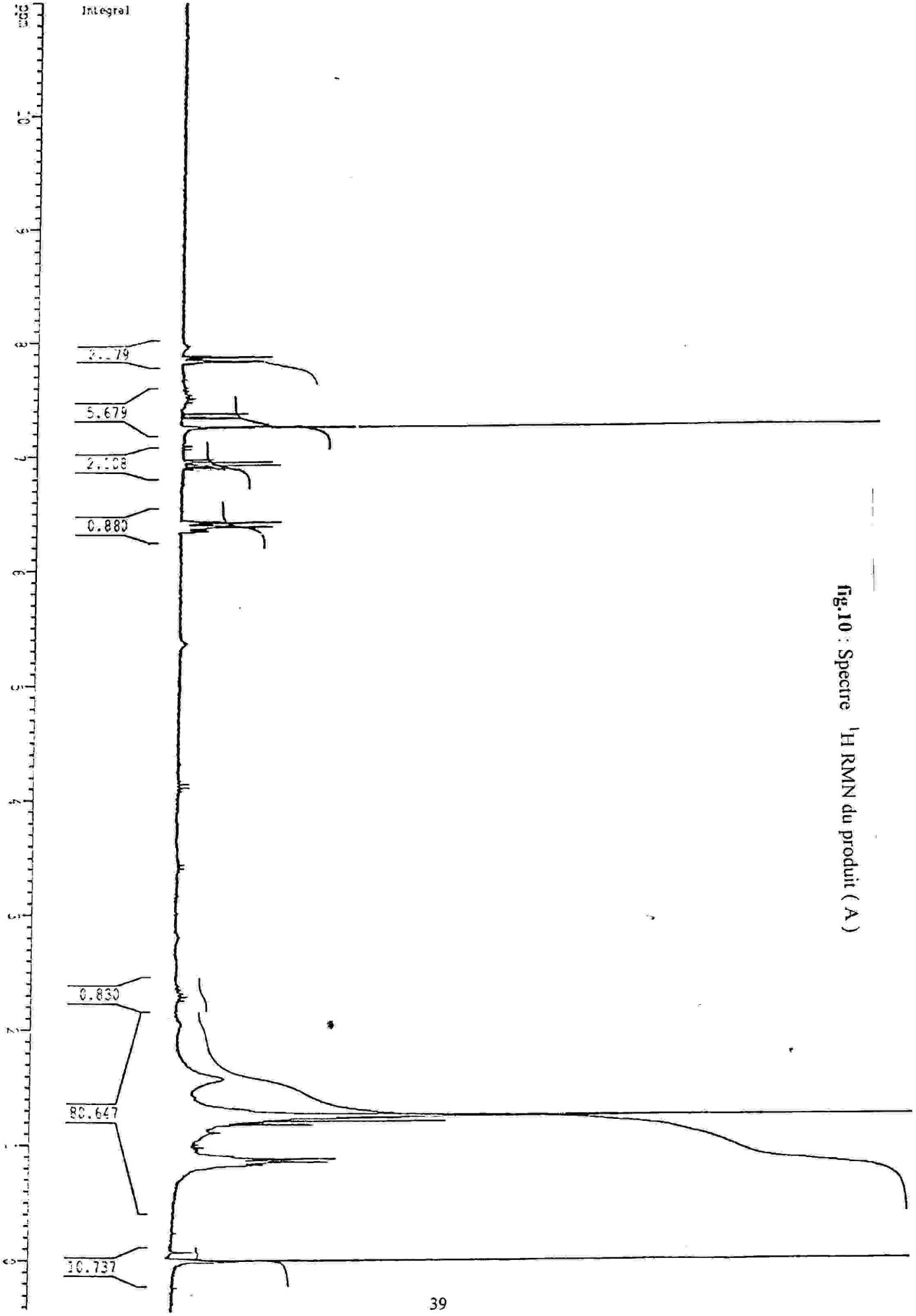


Fig.10 : Spectre ¹H RMN du produit (A)

Combine (15:21-69:70)

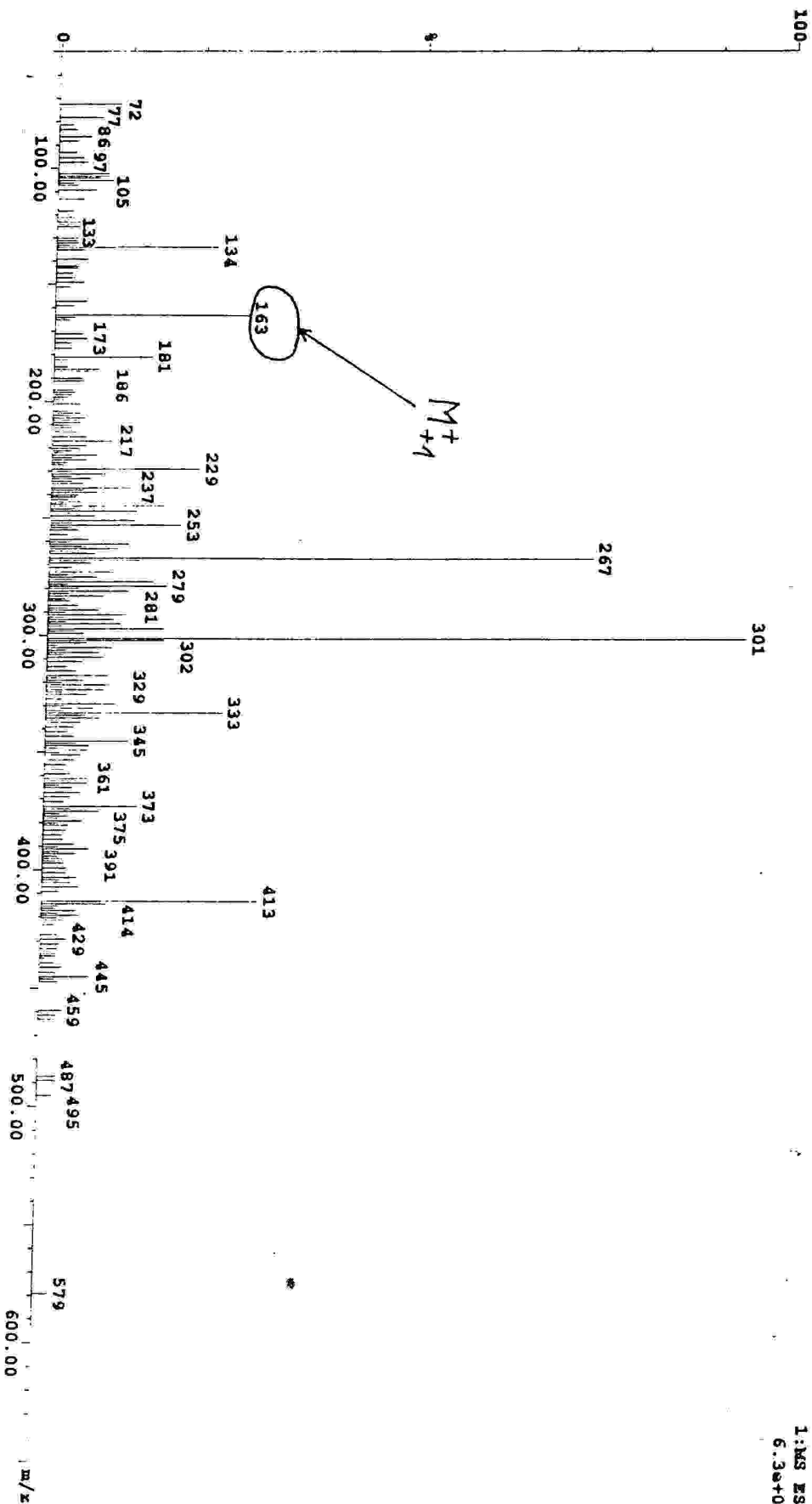
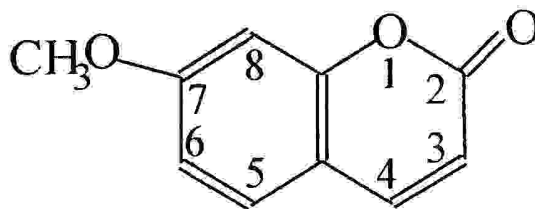


Fig.11 : Spectre de MASSE du produit (A)

Le produit (B) : c'est l'Heriarine (7- méthoxy coumarine)

Sa formule chimique brute est $C_{10} H_8 O_3$, de masse molaire 176 g et de structure moléculaire :



(B)

L'étude spectrale pour ce composé par différentes méthodes d'analyses, nous a permis de déterminer sa structure chimique la plus probable.

a- L'étude des pics donnés par IR a indiqué les résultats suivants :

- * Une absorption vers 1710 cm^{-1} , indique le vibration de la liaison $C = O$
- * L'absorption vers 2900 et 3100 cm^{-1} , indique la vibration de liaison $C-H$ oleifnique et aromatique.
- * Un pic vers 1430 cm^{-1} , indique la présence de liaison $C-O-C$.

b- La spectroscopie UV nous a donné des valeurs de λ_{max} des bandes d'absorptions

- $\lambda_{1\text{max}}$ vers 285 nm
- $\lambda_{2\text{max}}$ vers 320nm

c- Les spectres de ^1H RMN pour ce produit, nous ont permis de savoir les valeurs des types d'hydrogènes présents dans la molécule par leurs valeurs de delta (δ).

Ces valeurs correspondantes aux positions des hydrogènes sont enregistrées sur le tableau suivant :

*

| Position de l'hydrogène | δ (ppm) | J (HZ) |
|-------------------------|------------------|------------------|
| OCH ₃ (7) | 3.80 (s) | - |
| H-3 | 6.17 (d) | J= 9,4 |
| H-4 | 7.54 (d) | J= 9,4 |
| H-5 | 7.32 (d) | J= 9.35 |
| H-6 | 6.72 - 6.77 (dd) | J1= 2 , J2= 9.35 |
| H-8 | 6.72 (d) | J= 2 |

Tab.11 : Spectres ¹H RMN du produit (B).

Pas d'oxygène en position -5, les protons H₃ et H₄ apparaissent sous forme de deux doublets chacun (J= 9.4Hz).

Il y a aussi un couplage entre les protons H₆ et H₅ (J= 9.35 Hz),

le doublet du proton H₆ est partiellement chauvauché par le signal du proton H₅.

Tandis que le groupement méthoxy (OCH₃) apparaît sous forme d'un singulet à (3.80 δ).

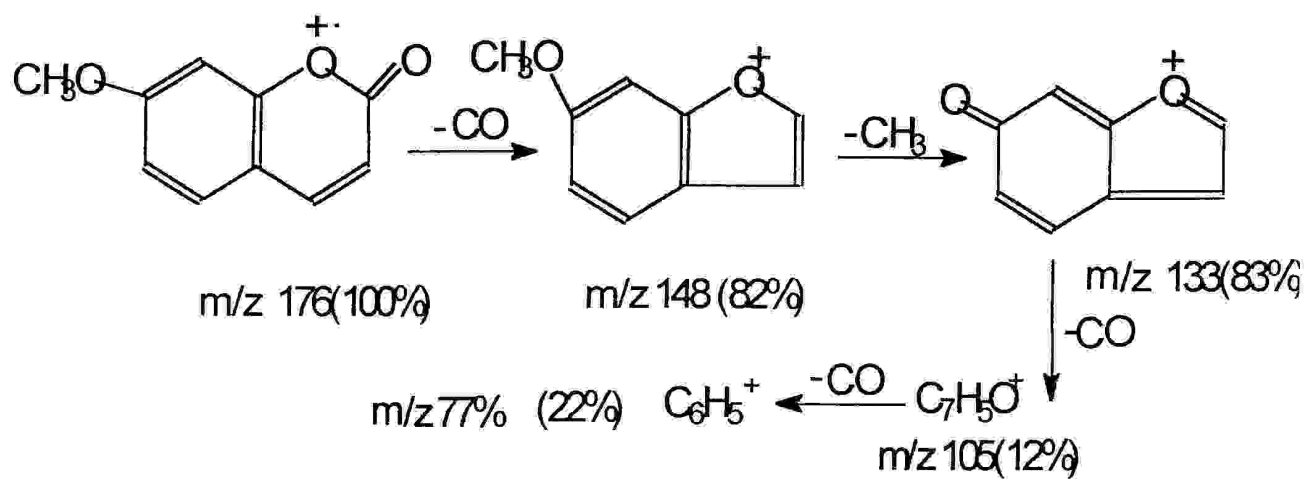
Ces valeurs de delta (δ) pour différents hydrogènes de la molécule sont très proches ou presque identiques à celles citées dans [4].

d- La spectroscopie de masse pour la molécule précédente, nous a permis de situer la molécule et de savoir les différentes fragmentations possibles.

- M (Masse moléculaire) = 176
- $M^+_{+1} = 177$

Les masses des différents fragments sont expliquées selon le schéma suivant:

•



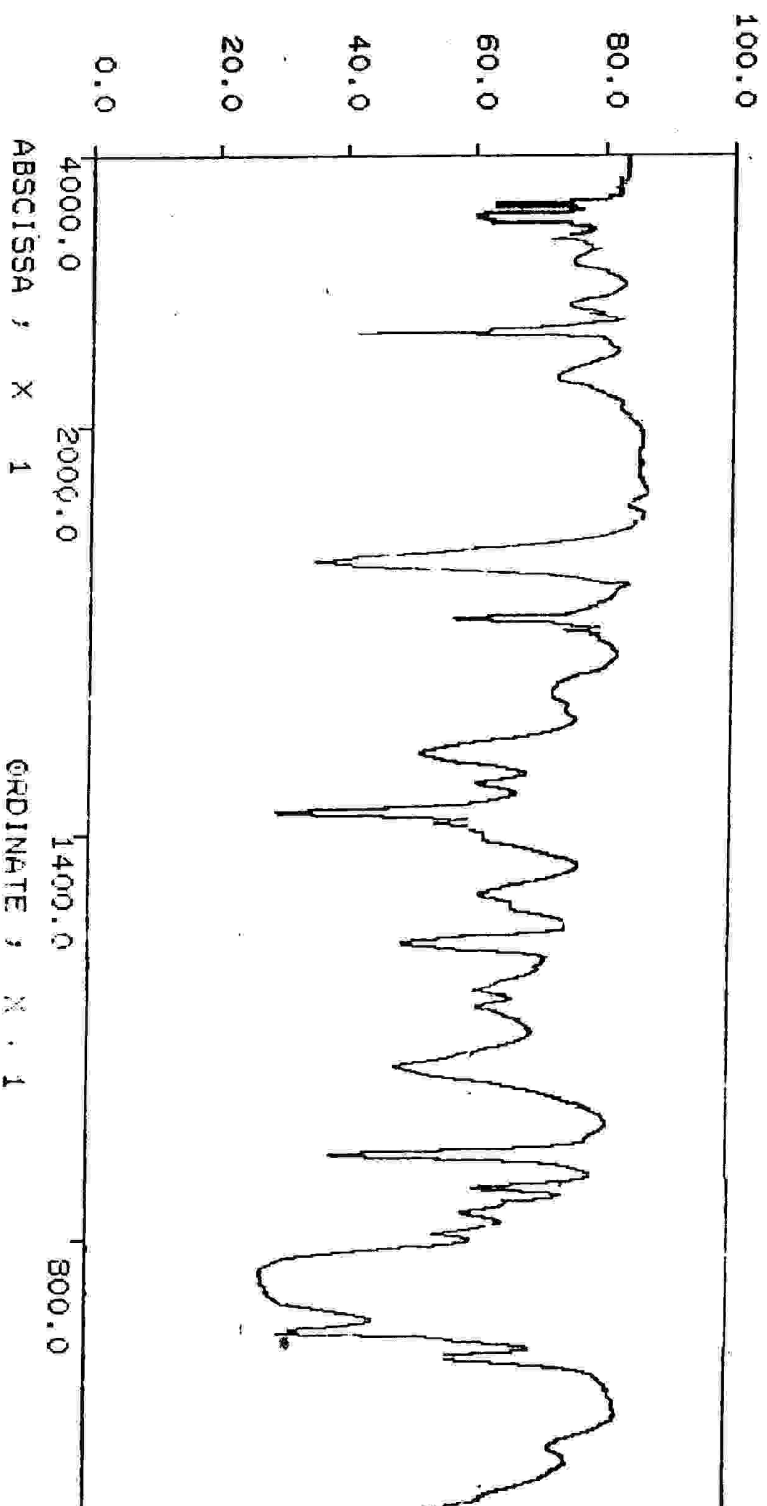
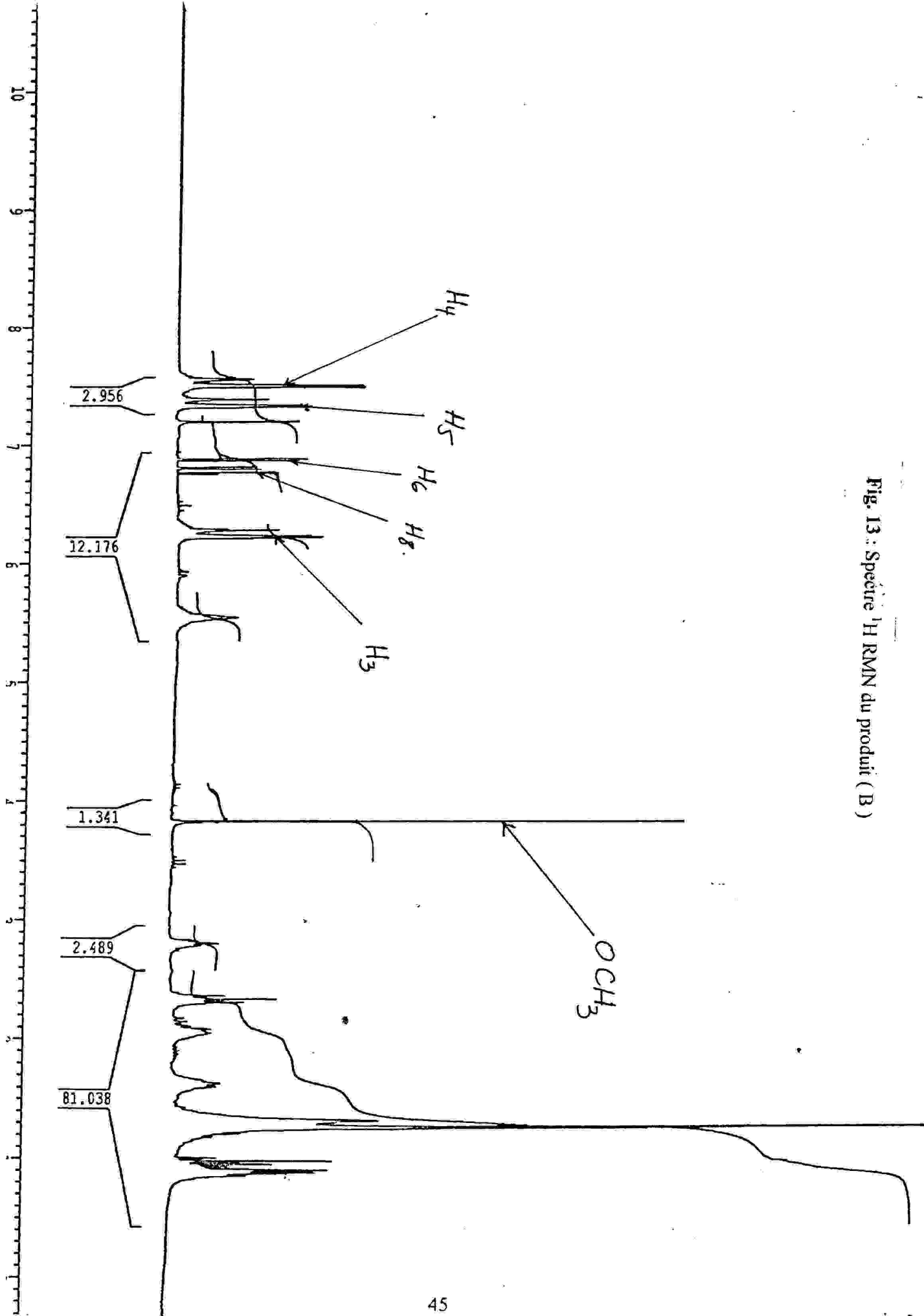


Fig.12 : Spectre IR du produit (B)

Fig. 13.: Spectre ^1H RMN du produit (B)



Combine (1:6:22-79:80)

1:MS ES+
4.9e+004

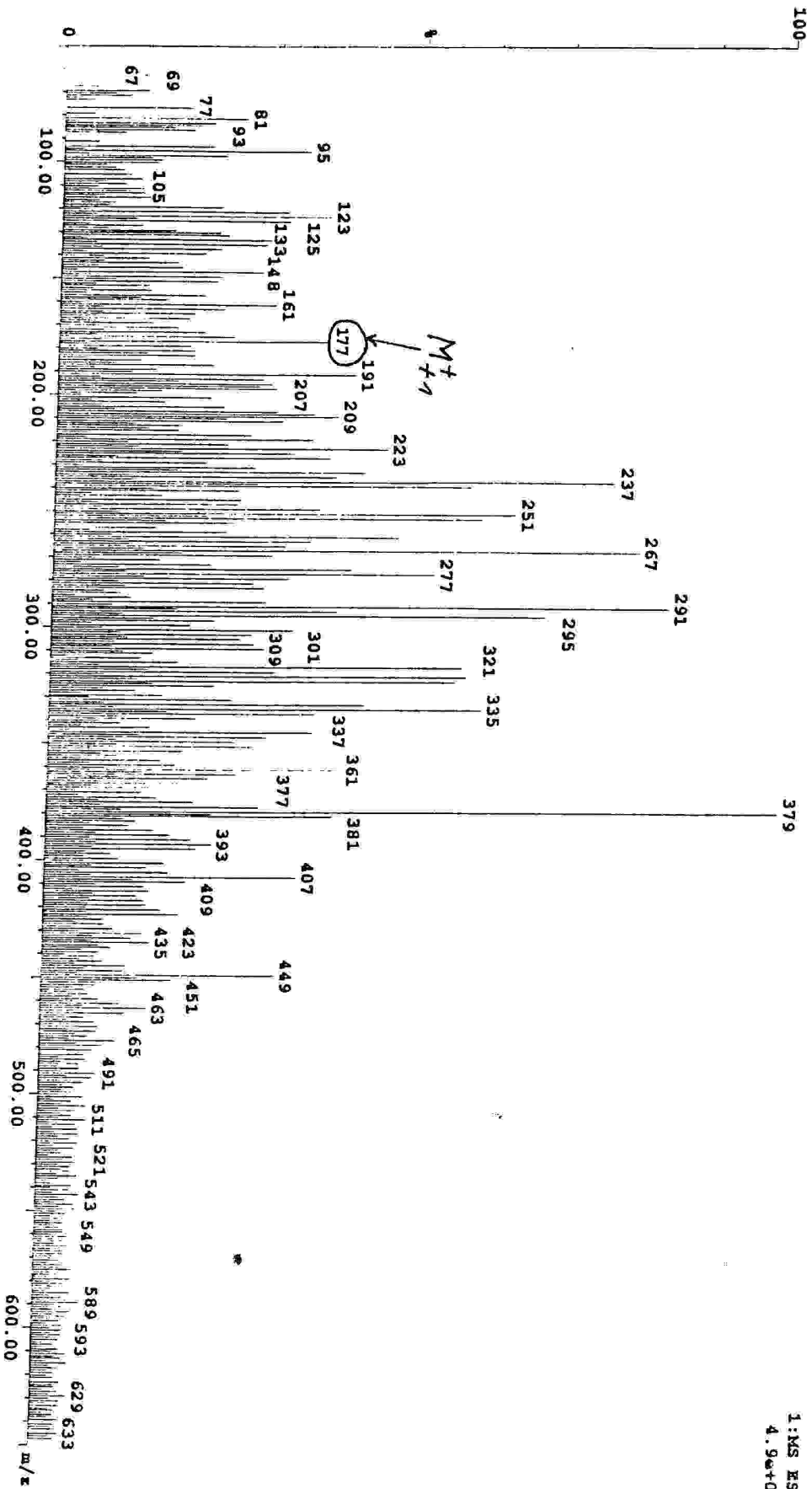
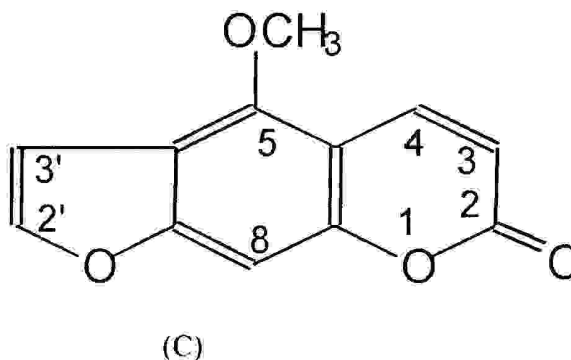


Fig. 14 : Spectre de MASSE du produit (B)

Le produit (C) : c'est le Bergaptene (6-7furano , 5- methoxy coumarine)

Sa formule chimique brute est $C_{12}H_8O_4$, de masse molaire 216g et de structure moléculaire :



L'étude spectrale pour ce composé par différentes méthodes d'analyses, nous a permis de déterminer sa structure chimique la plus probable.

a- L'étude des pics essentiels donnés par IR, a indiquée les résultats suivants :

- * Une absorption vers 1720 cm^{-1} , indique la présence du groupement carbonyle (C=O)
- * Absorption vers 1625 cm^{-1} , indique la vibration de la double liaison (C=C).
- * Absorption vers 3000 cm^{-1} , indique la vibration de la liaison (C-H) aliphatique.
- * Une absorption vers 1435 cm^{-1} , Indique la présence de la liaison (C-O-C).

b- La spectroscopie UV nous a donné des valeurs de bandes d'absorptions (λ_{max}) suivantes :

222 nm, 248 nm, 277 nm et 308 nm.

Ces valeurs sont très proches à celles données par [23].

c- les spectres de ^1H RMN pour ce composé, nous ont permis de savoir les valeur des types d'hydrogènes présents dans la molécule par leurs valeurs de delta (δ).

Le produit (C) est substitué par un groupement d'oxygène en position -5, les protons H_3 et H_4 apparaissent sous forme de deux doublets chacun (6.20 δ , J=9.8 Hz et 8.08 δ , J=8.8 Hz).

Le proton H_8 apparaît comme doublet à 7.05 δ avec J=2.3 Hz.

Tandis que les protons H_2 et H_3 apparaissent sous forme de deux doublets chacun (7.56 δ , 6.98 δ) avec une constante de couplage J=2.3 Hz.

Le groupement methoxy en position -5 apparaît sous forme d'un singulet à 4.23 δ .

Les valeurs de delta (δ) pour le produit (C) sont indiquées sur le tableau suivant :

| Position de l'hydrogène | δ (ppm) | J (HZ) |
|-------------------------|----------------|--------|
| OCH ₃ (5) | 4.23 (s) | - |
| H-3 | 6.20 (d) | 9.8 |
| H-4 | 8.08 (d) | 8.8 |
| H-8 | 7.05(d) | 1.0 |
| H-2' | 7.56 (d) | 2.3 |
| H-3' | 6.98 (d) | 2.3 |

Tab.12 : Spectres ¹H RMN du produit (C)

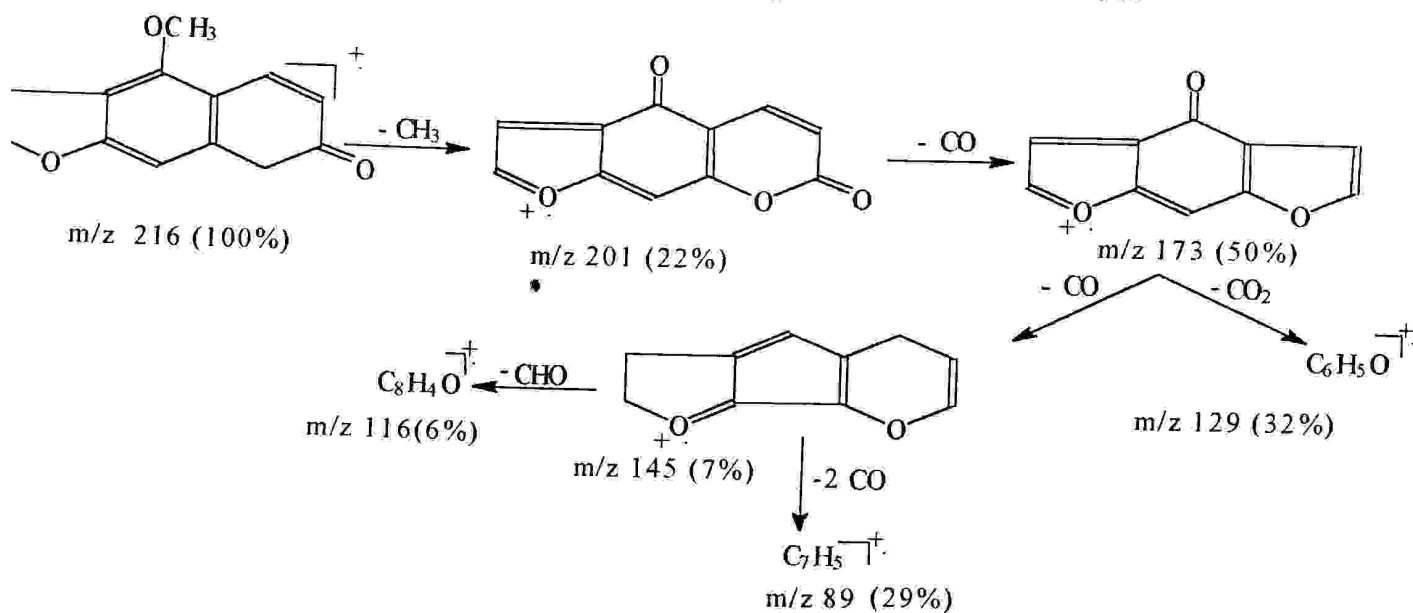
On constate que les valeurs de delta (δ) obtenues pour le produit (C) coïncident à celles de la littérature [9].

d- Les spectres de masse donnés pour le produit précédent, nous ont permis de situer la molécule et de savoir les différentes fragmentations possibles de la molécule.

M (Masse moléculaire) = 216

- $M^{+}_{+1} = 217$

Les masses des différents fragments sont expliquées selon le schéma suivant:



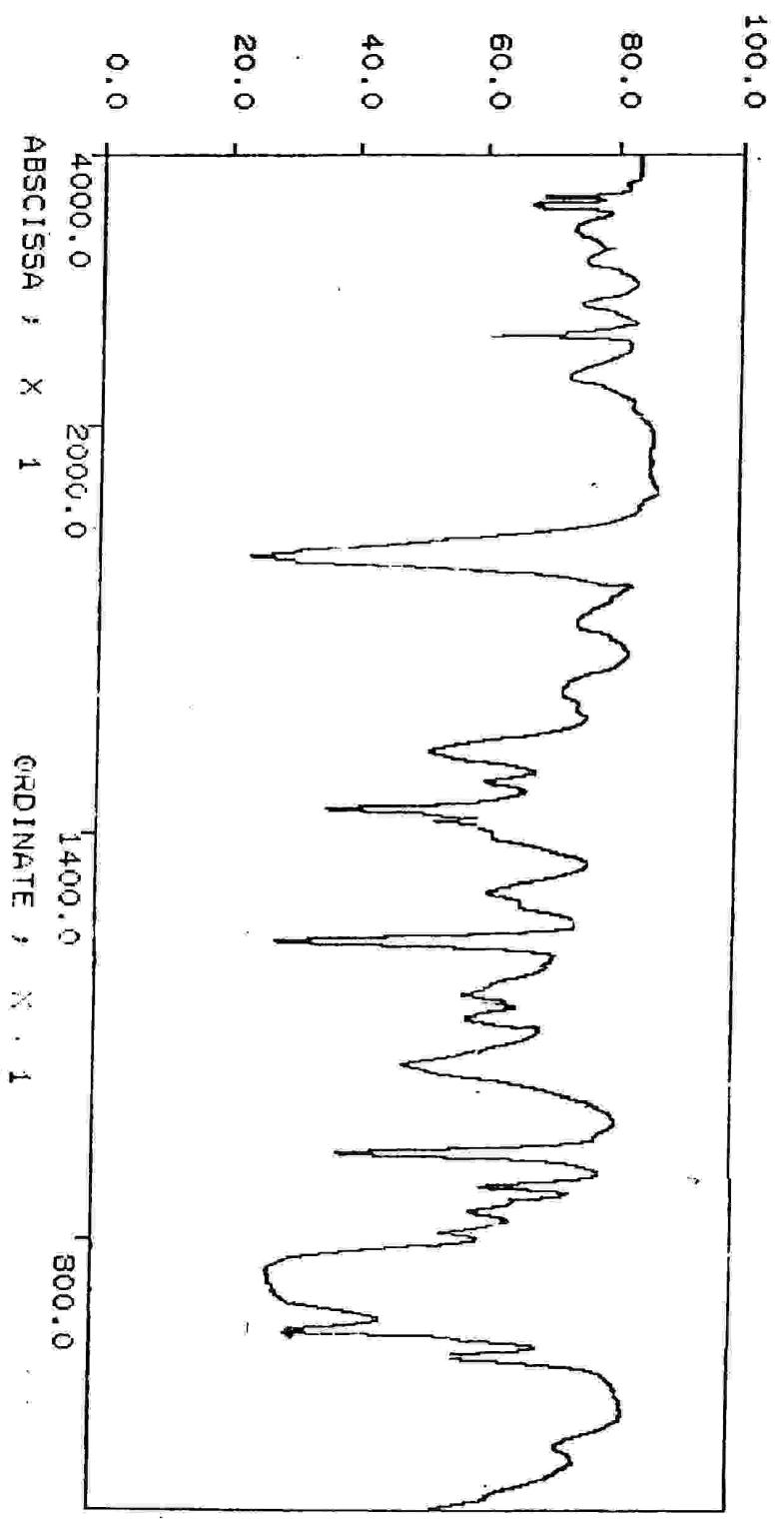
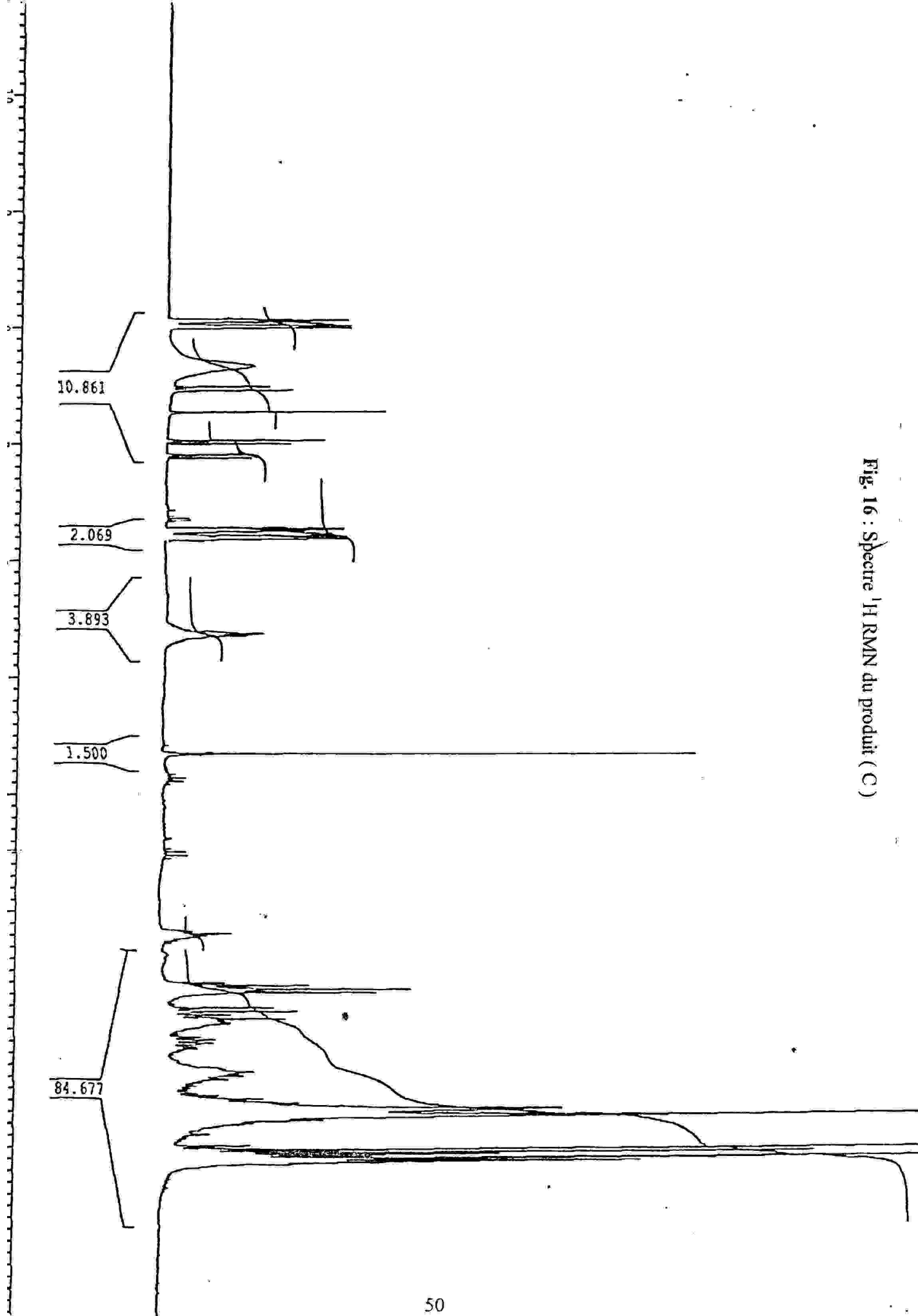


fig.15 : Spectre IR du produit (C)

Fig. 16 : Spectre ^1H RMN du produit (C)



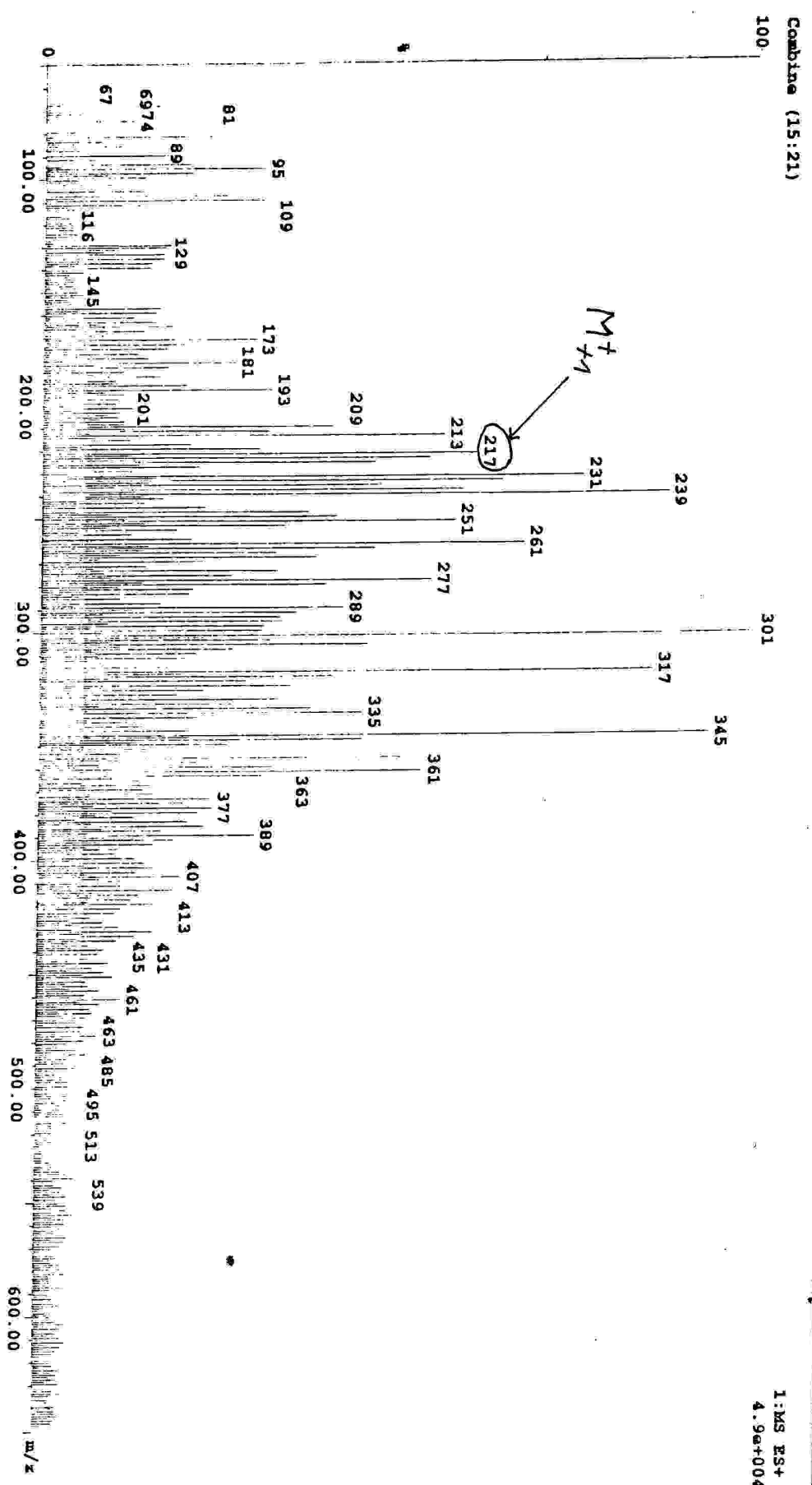


Fig. 17 : Spectre de MASSE du produit (C)

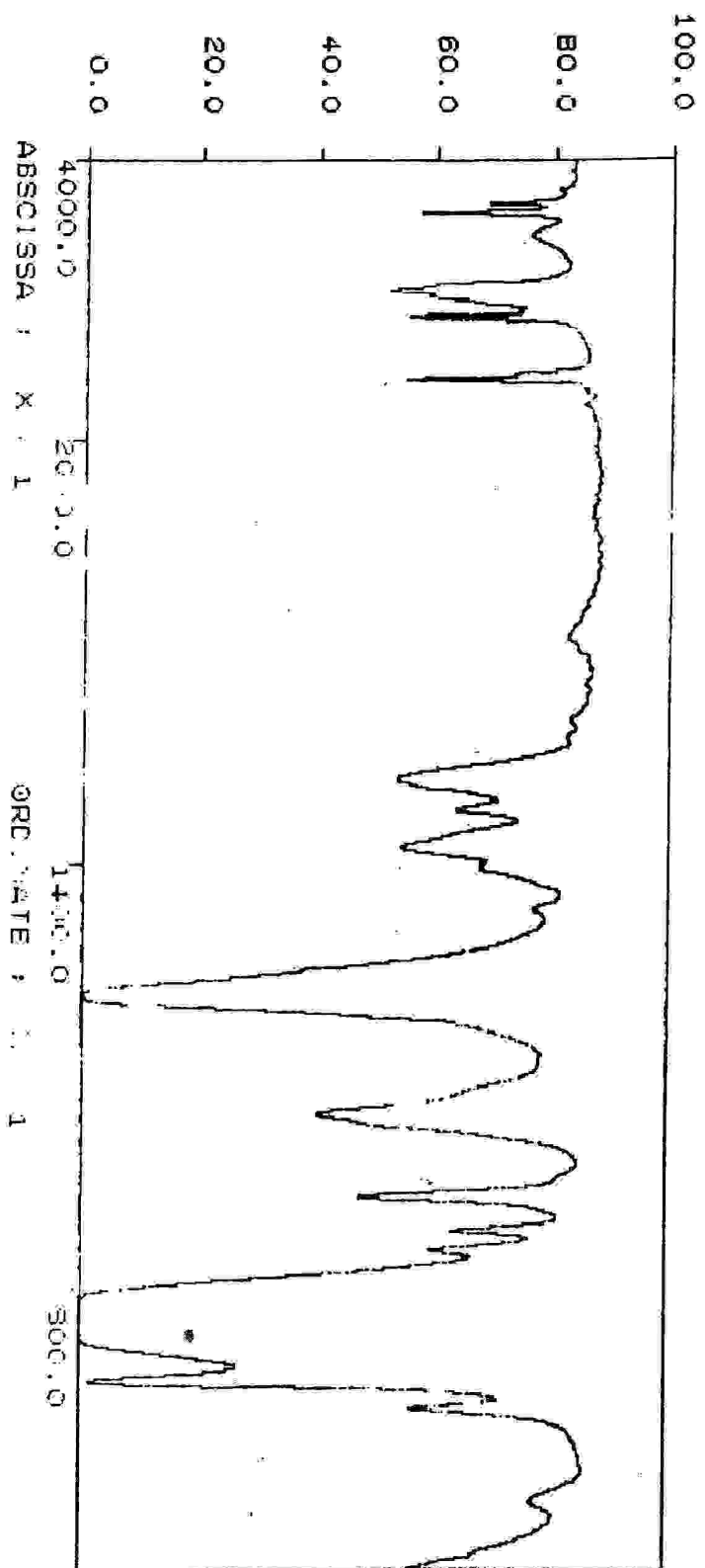


Fig.18 : Spectre IR du chloroforme (CHCl₃) utilisé

CONCLUSION GENERALE

L'extraction et purification par voie chimique de l'espèce de *Nicotiana Rustica*, nous a permis d'isoler trois produits naturels les plus probables par l'utilisation de chromatographie sur couche mince de gel de silice.

La purification de ces produits est avérée très difficile et qui dépend de plusieurs facteurs ; citons le manque de moyens disponibles au laboratoire et aussi les faibles quantités qui présentent ces produits naturels isolés dans l'espèce de la plante du tabac.

Manipuler de quantités aussi infimes s'avère difficile, il y a un grand risque de perdre ces quantités dans la colonne ou sur les plaques préparatives de gel silice.

Les structures chimiques ont été établies, grâce à l'exploitation de différentes méthodes d'analyses spectroscopiques usuelles (UV, IR, ¹H RMN et la spectrométrie de masse).

Les deux premiers produits qui ont été isolés par les traitements chimiques précédents, sont des coumarines simples :

- Le premier produit est l'Ambilliférone (7-hydroxy coumarine), sa structure a été identifier par la RMN du proton et par la spectrométrie de masse, on a déterminé M_r1 et fragmentations.
- Le deuxième produit qui est le Herniarine (7-methoxy coumarine), sa structure a été aussi identifier par les méthodes spectroscopiques précédentes.
- Tandis que le troisième produit isolé est une furanocoumarine linéaire connue sous le nom de Bergaptène (6,7-furano, 5- methoxy coumarine) et qui est le produit majoritaire.

Notons finalement, que les teneurs des coumarines dans cette espèce de *Nicotiana Rustica* est très faible par rapport à celle des alcaloïdes, calculée dans les mêmes conditions de travail, où la nicotine représente le produit majoritaire et qui vaut 3.78% [1-3].

Pour cette raison et afin de réduire la toxicité causée par le tabac, l'augmentation de la teneur en coumarines dans la plante de tabac par la biosynthèse est devenue très nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] Jean-Michel C.; "Larousse Agricole"; Librairie Larousse, p.1078, Paris (1981).
- [2] Ministère de la Coopération et du développement Française ; "Mémento de L'agronomie" ; 4^{ème} édition, pp996-1002, (1991).
- [3] Boudelaa M.; "Contribution à l'étude Biométrique du Tabac en Algérie"; mémoire d'ingénieur en Agronomie, INA-EL Harrach, 24 pages, (1983).
- [4] Marray, R.D.H., Mendez, J., Brown; "The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry"; ed. John Wiley & Sons, New York, S.A (1982).
- [5] J.L. Guingnard; "Biochimie Végétale"; Masson, Paris, pp.181-182, (1996).
- [6] (1996) حسن بن محمد الحازمي "المنتجات الطبيعية"; عمادة شؤون المكتبات، ص ص 170-164، جامعة الملك سعود، (1996).
- [7] A. Grown and K. Glowniak; "Cytostatic Activity of Coumarins in Vitro"; planta medica, pp. 526-529, (1987).
- [8] B. Fritig, L. Hirth and G. Ourisson; "Biosynthesis of the Coumarins: Scopolin Formation in Tobacco Tissue cultures"; phytochemistry. Vol. 9, pp. 1963-1975, (1970).
- [9] K.Nakanishi et al; "Natural Products"; vol. 2, Academic Press Inc., (1975).
- [10] Stewart A. Brown; "Coumarins, Biochemistry of Plants"; vol.7, J. Wiley & Sons, (1982).
- [11] O'Neal, M.A. Griffin, A.C (1957) Cancer. Res. 17, 911.
- [12] Wattenberg, L.W., Lam, L.K.T., Fladmoe, A.V (1979) Cancer Res. 39, 1651.
- [13] Thornes, R.D., Lynch, G., Sheehan, M.V (1983) Ir. Med. J.76, 53.
- [14] Vermel, E.M., Tsetlin, A.L (1964) Vop. Onkologü 10, 85.
- [15] M. Chavanne, Ar. Jullien et al. ; "Chimie Organique Expérimentale"; pp. 241-247, 2^{ème} édition (1987).
- [16] C.T. Joseph; "Practice of TLC."; pp.101-109, J. Wiley & Sons. (1977).
- [17] K. Kajima Mulengi et al; "Chimie Organique Expérimentale"; pp. 88-91, (1993).
- [18] Tian-Shung Wu et al; "Coumarins of The Flowers of *Murraya Paniculata* "; phytochemistry, vol. 28, N°1, pp. 293-294, (1989).
- [19] Bao-Ning et al; "Sesquiterpene Coumarin and Related Derivatives from *Ferula Pallida*"; J. Nat. Prod., vol. 63, pp. 436-440, (2000).
- [20] Jin-Na Cai et al; "Coumarins from the Fruits of *Cnidium Monnieri*"; J.Nat. Prod., vol. 63, pp. 484-488, (2000).

- [21] جمعة قليعة؛ "استخلاص المركبات الكومارينية من نبات الشيت"؛ رسالة ماجستير، دائرة الكيمياء، المركز الجامعي أم البواقي، 69 صفحة، (2000).
- [22] I. Culei; "*Methodology for Analysis of Vegetable Drugs*"; Faculty of Pharmacy, Bucharest, Romania, (1983).
- [23] بلقاسم أكساس؛ "استنباط المركبات الفيرانوكومارينية من التين، تحضير بعض المشتقات الفيرانوكومارينية الجديدة"؛ رسالة ماجستير، معهد الكيمياء، جامعة قسنطينة، 88 صفحة، (1985).
- [24] Adtler Research Laboratories Inc., "*NMR Spectra Handbouk*"; RMN 3220 et RMN 87, (1967).
- [25] R.Gasser, H. Kern and G. Défago; "*Scopolin, a Biochemical Marker for Resistance to Thielaviopsis basicola in Callus and Grown-Gall Tissue Cultures of Tobacco*"; J.Phytopathology 123, pp.115-123, (1988).
- [26] Luis Sequeira; "*Synthesis of Scopolin and Scopoletin in Tobacco plants Infected by pseudomonas Solacearum*"; J. Phytopathology, vol-59, pp. 473-478, (1969).
- [27] C.EL. Modafar, A. Clerivet, A. Feuriet and J.J Macheix; "*Inoculation of platanus Acerfalia With Ceratocystis Fimbriata F. SP. Platani Induces Scopoletin and Umbelliferone Accumulation*"; Phytochemistry, vol. 34. N°5, pp. 1271-1276, (1993).

ملخص

نبات التبغ الجزائري (*Nicotiana Rustica*) نبات حولي عطري ينتمي إلى العائلة *الباننجية* ، ويعتبر أول الزراعات الصناعية في الجزائر ، حيث يتواجد في جل مناطق العالم. أثبتت الدراسات الكيميائية لهذا النبات أنه غني بالقلويدات و يحتوي على كميات ضئيلة من الكومارينات .

انصب اهتمامنا في هذا البحث على معرفة أنواع الكومارينات المتواجدة في هذا النوع من النبات و التي تعتبر مركبات كيميائية ذات فوائد علاجية و صيدلانية .

تم استخلاص و تنقية المواد الكومارينية بالمعالجة الكيميائية (حمض - أساس) ، أما فصلها فكان بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

إن الطرق التحليلية الطيفية (*S.MASSE, ¹H RMN, UV, IR*) سمحت لنا بتشخيص

المركبات الكومارينية المفصولة من النبات ، و إثبات البنية الجزيئية الأكثر احتمالا و التي هي:

Ambelliferone (7- hydroxy coumarine) , *Herniarine* (7 - methoxy coumarine) ,

Bergaptene (6,7 - furano , 5- methoxy coumarine) .

الكلمات الدالة :

Nicotiana Tabacum ; Nicotiana Rustica ; Coumarins ; Umbelliferone ; Herniarin ; Bergaptene .

Résumé

L'espèce de *Nicotiana Rustica*, de la plante du tabac que nous avons étudié, appartient à la famille des Solanacées.

La culture de cette plante, aromatique annuelle est pratiquée dans toutes les parties du monde, elle est la première culture industrielle en Algérie.

Les études phytochimiques pour cette plante, ont montré qu'elle est très riche en alcaloïdes et contenant des quantités infimes en coumarines.

Nous avons essayé dans notre étude de savoir quels genres de coumarines existantes, dans l'espèce *Nicotiana Rustica*, qui ont des intérêts thérapeutiques.

L'extraction par les solvant, le traitement acido-basique et séparation sur couche mince (TLC) des coumarines de l'espèce de *Nicotiana Rustica*, nous ont permis d'isoler trois produits.

L'identification de ces derniers par les méthodes d'analyses spectroscopiques (IR, UV, ¹H RMN ET S. MASSE) nous ont permis de déterminer leur structures chimiques les plus probables qui sont :

Ambelliferone (7-hydroxy coumarine), *Herniarine* (7-methoxy coumarine) et *Bergaptene* (6,7-furano, 5-methoxy coumarine).

Mots clés :

Nicotiana Tabacum ; *Nicotiana Rustica* ; Coumarins ; *Umbelliferone* ; *Herniarin*
Bergaptene.

Abstract

N*icotiana Rustica* is an annual *Solanacerum* plant .
This aromatic plant is considered the first industrial culture in
Algeria.

Chemical studies shown that the species of *Nicotiana Rustica* is rich in alkaloids and contain a poor amount of coumarins .

Coumarins were extracted , from this plant, by chemicals treatment (Acid-base) and were isolated by thin layer chromatography (TLC) .

The identification of the molecular structures of these three coumarins present in this plant , is established by a spectral analysis methods such as (IR , UV , ¹H RMN and M.S) wich are :

Ambelliferone (7- hydroxy coumarin) , *Herniarin* (7 - methoxy coumarin) and *Bergaptene* (6,7- furano , 5- methoxy coumarin) .

Key words :

Nicotiana Tabacum ; *Nicotiana Rustica* ; *Coumarins* ; *Umbelliferone* ; *Herniarin* ; *Bergaptene* .