

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre : 38/DS/2019  
Série :04/Ch/2019



## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences  
Spécialité: Chimie organique  
Option: phytochimie

Par

**BENABDERRAHMANE Wassila**

**Etude phytochimique et pharmacologique de *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) et *Cytisus triflorus* L'Her. (Fabaceae).**

Devant le jury :

M <sup>me</sup> BENAYACHE Fadila,	Pr	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
M <sup>me</sup> BENAÏSSA Ouahiba,	MCA	Université Mostafa Benboulaïd, Batna 2	Directrice de thèse (Rapporteuse)
M <sup>me</sup> AMRANI Amel,	MCA	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Mr. ZAÏTER Lahcen,	Pr	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinateur
Mr. BOUDJERDA Azzedine,	Pr	Universi Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel	Examinateur
Mr. BENMEKHBI Lotfi,	MCA	Université Salah Boubnider, Constantine 3	Examinateur

Année universitaire 2018/2019

## *Remerciements*

Tous d'abord, je remercie le bon Dieu de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour avoir terminé ce travail.

Ce travail a été réalisé à l'Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) Université Frères Mentouri, Constantine.

C'est un honneur et un plaisir pour moi de pouvoir remercier ici les personnes et institution dont l'aide, le soutien et les conseils m'ont été si précieux tout au long de la rédaction de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à Madame le docteur **BENAISSA Ouahiba**, ma directrice de thèse, pour avoir encadré ce travail, aussi pour m'avoir accordé sa confiance et pour ses conseils précieux.

Merci d'avoir été à mon écoute, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix, et c'est grâce à vos judicieux conseils et un encadrement constant que j'ai pu élaborer ce mémoire. Je tiens à lui exprimer également ma gratitude pour le temps investi dans la correction de ce manuscrit et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude.

Je souhaite remercier mon premier directeur de thèse, Monsieur le Professeur **BENAYACHE Samir** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et diriger ce travail de recherche, sa disponibilité, ses conseils éclairés et son concours constant dans cette thèse. Vos remarques constructives, fruit de votre expérience scientifique, ont contribué à améliorer ce manuscrit. Vous avez toujours su vous montrer disponible quand j'en avais vraiment besoin, Les remerciements exprimés ici ne sont donc «jamais» à la hauteur de votre implication dans la réalisation de ce travail de thèse. Merci encore et mille fois merci.

J'adresse de chaleureux remerciements à Madame la Professeur **BENAYACHE Fadila**. Je la remercie également pour ses précieux conseils, ses encouragements, l'intérêt scientifique qu'elle a porté à mes travaux de recherche et pour le grand honneur qu'elle me faite en acceptant de présider le jury de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Un remerciement particulier à Madame la Professeure **Marta LORES** et son équipe de recherche et surtout **Juan Pablo LAMAS** (Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions Analíticas (LIDSA), Analytical Chemistry Department. Faculty of

Chemistry, Campus VIDA-USC, Santiago de compostela E-15782. Espagne) pour ses qualités humaines et scientifiques, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, pour sa gentillesse, et pour sa participation aux analyses structurales. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et de ma sympathie.

*Je remercie également Madame la Professeure **Trinidad DE MIGUEL BOUZAS**, et son équipe de recherche, pour la réalisation des essais biologiques (Département de Microbiologie et parasitologie, Faculté de pharmacie de l'Université de Saint-Jacques-de-Compostela, Espagne)*

*J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à Madame le Docteur **AMRANI Amel MCA** à l'Université Frère Mentouri Constantine, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et son équipe de recherche, pour la réalisation des essais biologiques et d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également, à Messieurs les Professeurs **ZAITER Lahcene** de l'Université Frères Mentouri, Constantine 1, **BOUDJERDA Azzedine** de l'Université Mohamed Seddik Ben Yahia de Jijel, et le Docteur **BENMEKHBI Lotfi** de l'Université Salah Boubnider, Constantine 3, qui m'honorent en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.*

*Je voudrais également remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur disponibilité, ainsi que toutes mes amies et collègues : **Benayache. F, Achoube. H, Khantoul. H, Rahmouni. N, Aissaoui. H, Boutaoui. N, Terfassi. S** et **Sekhara. I...** pour avoir simplement été elles-mêmes.*

*Je voudrais également remercier les ingénieurs: **Nawel** et **Hichem** pour leur aide, et leur disponibilité.*

*Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce que la réalisation de ce travail se soit déroulée dans les meilleures conditions.*

*Merci*   
**WB**

# Dédicace

## *A mes très chers parents*

*Qui m'ont aidé à être ce que je suis. Que Dieu vous récompense pour tout ce que vous avez fait et vous accorde encore de nombreuses et belles années de vie aux côtés de vos enfants.*

## *A mes chères sœurs et frères*

*Pour leur aide et leur soutien moral que vous m'avez accordé, pour tous les efforts consentis.*

## *A tous mes Cousins et cousines*

*Ce travail est aussi le fruit de vos encouragements et conseils. Que Dieu nous garde tous unis, car c'est ainsi que nous serons plus fort*

## *A tous mes amies et collègues*

*Pour toutes ces années passées ensemble, pour votre amitié et pour votre soutien. Vous aurez toujours une place spéciale dans mon cœur.*

## *A tous mes promotionnaires*

*Courage et plein succès dans vos carrières respectives.*

## *A tous*

*ceux qui m'ont consacré temps, patience et conseils surtout dans les moments difficiles, a tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.*

*Je dédie ce Modeste travail.*

*Wassila*

## *Abréviations*

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CMI** : Concentration Minimale d'Inhibition

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricidale

**COSY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) : COrrélation SpectroscopY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$

**Cq** : Carbone quaternaire

**d** : Doublet

**dd** : Doublet de Doublets

**DEPT** : Distorsionles Enhancement by Polarisisation Transfer

**DMSO-d<sub>6</sub>** : diméthylsulfoxyde deutéré

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**EAG**: Équivalents d'acide gallique

**ESI** : Electrospray Ionisation (Electro Spray Ionisation)

**ESL**: Extraction Solide Liquide

**Et-p** : Ether de pétrole

**ETR**: Equivalents de Trolox

**EQ** : Equivalents de Quercétine

**FC** : Folin-Ciocalteu

**Fr** : Fraction

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HPLC-DAD** : High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Correlation

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Acide Borique

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice de 50%

**J(Hz)** : constante de couplage exprimée en Hertz

**MHz** : Méga Hertz

**m** : multiplet

**m/z** : Masse / Charge électrique

**MSPD** : Matrix solid-phase dispersion

**NaOAc** : Acétate de sodium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**Na<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4** : sulfate de sodium

**OMe** : Méthoxyle

**ppm** : Partie par million

**R** : Radical

**RMN<sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique nucléaire du Carbone 13

**RMN<sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique nucléaire du Proton

**s** : Singulet

**s/** : Singulet large

**SMIE** : Spectrométrie de Masse sous Impact Électronique

**UV** : Ultra violet

**uma** : Unité de Masse Atomique

**δ<sub>H</sub>** : Déplacement chimique du proton

**δ<sub>C</sub>** : Déplacement chimique du carbone

**μg EAG/mg** : microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme

## Table des Matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

### **Chapitre I:** *Généralités sur la famille des Fabaceae et le genre Cytisus*

I.1. Introduction .....	5
I.2. La famille Fabaceae .....	5
I.2.1. Description et répartition de la famille Fabaceae .....	5
I.2.2. Classification des Fabaceae .....	5
I.3. Le genre <i>Cytisus</i> .....	6
I.3.1. Description générale .....	6
I.3.2. Les composés phénoliques chez le genre <i>Cytisus</i> .....	6
I.3.2.1. Les acides phénoliques .....	6
I.3.2.2. Les alcaloïdes .....	8
I.3.2.3. Les aldéhydes et les cétones .....	9
I.3.2.4. Les flavonoïdes .....	9
I.3.2.4.1. Les flavones .....	9
I.3.2.4.2. Les flavonoles .....	10
I.3.2.4.3. Les isoflavones .....	11
I.3.2.5. Les coumarines .....	12
I.3.2.6. Les stéroïdes .....	12
I.3.2.7. Les alkénoles .....	13
I.3.2.8. Les benzénoïdes .....	13
I.3.2.9. Les caroténoïdes .....	14
I.3.2.10. Les monoterpènes .....	14
I.3.3. Activités pharmacologiques .....	15
I.4. Conclusion .....	16
Références bibliographiques .....	17

### **Chapitre II:** *Généralités sur la famille des Rosaceae et le genre Crataegus*

II.1. Introduction .....	21
II.2. Distribution géographique .....	21
II.3. Classification .....	21
II.4. Genre <i>Crataegus</i> .....	22
II.4.1. Description générale .....	22
II.4.2. Distribution géographique .....	23
II.4.3. Chimie connue des espèces de <i>Crataegus</i> .....	23
II.4.3.1. Les acides .....	23
II.4.3.2. Les terpènes .....	26
II.4.3.2.1. Monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes .....	26

II.4.3.2.2. Triterpénoïdes .....	29
II.4.3.3. Les stéroïdes .....	31
II.4.3.4. Les flavonoïdes .....	32
II.4.3.4.1. Les flavones .....	32
II.4.3.4.2. Les flavonols .....	35
II.4.3.4.3. Les flavanones et flavanonols .....	36
II.4.3.4.4. Les flavanols et les polymères de Flavanols .....	37
II.4.3.5. Les lignanes .....	40
II.4.3.6. Composés contenant de l'azote .....	41
II.4.4. Activités pharmacologiques .....	42
II.5. Conclusion .....	43
Références bibliographiques .....	44

### Chapitre III : *Etude phytochimique*

III.1. Introduction .....	50
III.2. Investigation phytochimique de l'espèce <i>C. oxyacantha</i> L. ....	50
III.2.1. Critère de choix de cette espèce .....	50
III.2.2. Place dans la systématique botanique .....	50
III.2.3. Nom vernaculaire .....	51
III.2.4. Noms latins .....	51
III.2.5. Noms communs .....	51
III.2.6. Description morphologique .....	52
III.2.7. Répartition géographique .....	53
III.2.8. Usages traditionnels .....	53
III.2.9. Travaux antérieurs .....	54
III.2.9.1. Phytochimie .....	54
III.2.9.2. Activités pharmacologiques .....	55
III.2.9.3. Emploi .....	57
III.2.10. Protocole Expérimental .....	59
III.2.10.1. Récolte du matériel végétal .....	59
III.2.10.2. Extraction .....	59
III.2.10.2.1. Extraction solide liquide (ESL) .....	59
III.2.10.2.2. Méthode de dispersion en phase Solide Matricielle (MSPD) .....	61
III.2.10.2.2.1. Matériels et méthodes .....	61
III.2.11. Étude des extraits (ESL) .....	63
III.2.11.1. Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle de <i>C. oxyacantha</i> (Feuilles) .....	64
III.2.11.2. Étude des fractions de l'extrait AcOEt .....	66
III.2.12. Analyse chromatographique des polyphénols par HPLC–DAD .....	71
III.2.13. Analyse de confirmation des polyphénols: LC-MS/MS .....	72
III.3. Investigation phytochimique de l'espèce <i>Cytisus triflorus</i> L'Her .....	73
III.3.1. Critère de choix de cette espèce .....	73
III.3.2. Place dans la systématique botanique .....	73
III.3.3. Description morphologique .....	73
III.3.4. Répartition géographique .....	74
III.3.5. Utilisation en médecine traditionnelle .....	75

III.3.6. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>C. triflorus</i> .....	76
III.3.6.1. Phytochimie .....	76
III.3.6.2. Teneur totale en composés phénoliques et concentrations de flavonoïdes..	76
III.3.6.3. Activités pharmacologiques .....	77
III.3.6.4. Les huiles essentielles .....	77
III.3.7. Protocole Expérimental .....	77
III.3.7.1. Récolte du matériel végétal .....	77
III.3.7.2. L'extraction .....	78
III.3.8. Étude des extraits .....	80
III.3.8.1. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle .....	80
III.3.8.1.1. Séparation et purification des fractions .....	82
III.4. Conclusion .....	88
Références bibliographiques.....	89

## Chapitre IV: *Résultats et discussion*

IV.1. Introduction .....	94
IV.2. Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD.....	94
IV.2.1. Identification des composés phénoliques dans les extraits de l'Extraction Solid liquide (ESL) .....	94
IV.2.2. Identification des composés phénoliques dans les extraits de MSPD .....	98
IV.3. Analyse de confirmation des polyphénols: LC-MS/MS .....	105
IV.4. Elucidation structurale des composés de <i>Crataegus oxyacantha</i> .L .....	106
IV.4.1. Elucidation structurale des composés de l'extrait AcOEt .....	106
IV.4.1.1. Elucidation structurale du composé WO1 .....	106
IV.4.1.2. Elucidation structurale du composé WO3 .....	119
IV.4.1.3. Elucidation structurale du composé WO2 .....	125
IV.4.1.4. Elucidation structurale du composé WO5 .....	138
IV.5. Elucidation structurale des composés de <i>C. triflorus</i> .....	149
IV.5.1. Elucidation structurale des composés de l'extrait AcOEt .....	149
IV.5.1.1. Elucidation structurale du composé (SBWP <sub>3</sub> ) .....	149
IV.5.1.2. Elucidation structurale du composé (SBWP <sub>4</sub> ) .....	156
IV.5.1.3. Elucidation structurale du composé WC8 .....	162
IV.5.1.4. Elucidation structurale du composé WC3 .....	165
IV.5.1.5. Elucidation structurale du composé WC2 .....	176
IV.5.1.6. Elucidation structurale du composé WC7 .....	182
IV.6. Conclusion .....	188
Références bibliographiques .....	189

## Chapitre V : *Etude Biologique*

V.1. Introduction .....	192
V.2. Investigation biologique de l'espèce <i>C. oxyacantha</i> .....	193
V.2.1. Matériel et méthode .....	193
V.2.1.1. Détermination des polyphénols totaux (PT) .....	193
V.2.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	194
V.2.1.3. Test de piégeage du radical libre DPPH .....	194
V.2.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique .....	195

V.2.1.5. L'étude de l'activité antimicrobienne .....	195
V.2.2. Résultats et discussion .....	198
V.2.2.1. Teneur phénolique totale des extraits de <i>C. oxyacantha</i> L. (feuilles et fruit) (ESL) .....	198
V.2.2.2. Activité scavenger du radical DPPH .....	201
V.2.2.3. Évaluation <i>in vitro</i> de la peroxydation lipidique .....	205
V.2.3. Résultats de l'approche MSPD .....	205
V.2.3.1. Teneur totale phénolique .....	206
V.2.3.2. Activité scavenger du radical DPPH .....	207
V.2.3.3. Comparaison entre les résultats des deux méthodes d'extraction (ESL, MSPD) .....	209
V.2.4. L'activité antimicrobienne .....	211
V.2.4.1. Zone d'inhibition .....	211
V.2.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....	212
V.2.4.3. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) .....	213
V.2.4.4. Discussion .....	215
V.3. L'investigation biologique de l'extrait AcOEt de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her .....	216
V.3.1. Matériel et méthode .....	216
V.3.1.1. Dosage des composés phénoliques totaux .....	216
V.3.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	216
V.3.1.3. Dosage de l'activité antiradicalaire DPPH .....	216
V.3.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique .....	216
V.3.2. Résultats et discussions .....	216
V.3.2.1. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux .....	216
V.3.2.2. Evaluation du pouvoir antioxydant .....	216
V.3.2.3. Evaluation <i>in vitro</i> de la peroxydation lipidique .....	217
V.3.2.4. Activité scavenger du radical DPPH des produits purs WC3, SBWP3, et SBWP4 .....	218
V.3.2.5. L'activité antimicrobienne .....	218
V.4. Conclusion .....	221
Références bibliographiques .....	223
Conclusion générale .....	225

## Introduction générale

**« Dans la touffeur des forêts primaires, le long des bancs coralliens, sous la terre et au fond des océans, les formes vivantes, innombrables, survivent grâce à leurs armes chimiques. Un arsenal de molécules demeure dissimulé dans notre environnement proche. Cet entrepôt bien fourni a été lentement constitué ; plusieurs milliards d'années ont été nécessaires. Peut-on parler de Magasin du Bon Dieu ? Il permit aux premiers hommes de se soigner. Il reste encore à explorer. »**

Pierre Potier

Dans *Le Magasin du Bon Dieu, les extraordinaires richesses thérapeutiques des plantes et des animaux* (2001)

La nature, ou comme l'appelle Pierre Potier « le Magasin du Bon Dieu », avec 250000 à 500000 espèces de plantes, ses micro-organismes et ses produits marins, est la source d'une formidable diversité de molécules, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, mais servant aussi de modèles à l'imagination des chimistes, pour créer des molécules plus actives. Seule une poignée de ces richesses a été explorée [1].

Bien qu'une grande partie du XX<sup>ème</sup> siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de ressources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines. [2]. Les méthodes usuelles de collecte de plantes pour la recherche pharmacologique sont, soit systématiques, soit basées sur la connaissance des particularités chimiques de certaines familles de plantes (chimiotaxonomie) ou encore, utilisent la médecine traditionnelle locale comme source primaire d'informations. Si l'homme a appris à connaître son environnement pour en tirer avantage et se soigner, les animaux ont, chaque jour, pour survivre et se nourrir, à éviter les plantes les plus toxiques. La composition chimique actuelle des végétaux est la réponse à 300 millions d'années de pressions de sélection, exercées par les agents pathogènes et les prédateurs. Elle est aussi le résultat d'associations bénéfiques entre espèces. [2].

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 80% de la population mondiale dans les pays en développement, pour des raisons socio-économiques et culturelles, dépendent essentiellement des plantes médicinales pour se soigner et traiter des maladies aussi bien bénignes (rhume, maux d'estomac...) que grave (cancer, paludisme, diabète...) [3]. Les vertus thérapeutiques de plantes sont dues à leurs métabolites secondaires appelés aussi "composés naturels", ce sont des composés organiques qui contribuent à l'activité biologique de la plante en assurant un rôle défensif contre les prédateurs (herbivores, insectes, micro

organismes) ou protecteurs des tissus végétaux contre les rayonnements ultra-violet nocifs ou attirant des pollinisateurs pour assurer la reproduction de l'espèce [4].

En Algérie, pays considéré parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne, avec plus de 3000 espèces dont 15% endémiques, auxquelles la population a recours à la médecine traditionnelle, on commence à entreprendre des systématiques portant sur des plantes médicinales issues de sa flore. Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmacologique des plantes médicinales algériennes, dans le double but de valoriser et de rationaliser leurs usages traditionnels et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel. [5,6]

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place dans le but d'obtenir des composés actifs d'origine naturelle, ceux-ci pouvant provenir aussi bien de plantes que de champignons ou de bactéries. Les criblages de collections de plantes ou de micro-organismes sont une méthode classique qui a permis par exemple la découverte de la plupart des antibiotiques actuels [7]. D'autres méthodes comme la chimiotaxonomie, la zoopharmacologie, l'ethnopharmacologie ou plus récemment les stratégies basées sur l'écologie chimique permettent de rationaliser cette recherche. De fait, il est actuellement possible de trouver des informations sur les applications thérapeutiques de plus de 85 000 espèces de plantes [8].

Les composés naturels sont plus souvent des molécules de faible poids moléculaire inférieur à 3000 daltons et présentent une diversité structurale considérable, plus de 100 000 substances sont identifiées actuellement [9].

Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: agro-alimentaire (additif alimentaire), cosmétique (parfum...), pesticide... C'est pourquoi, Notre unité de recherche a, depuis plusieurs années, développée un axe de recherche consacré principalement à la Phytochimie et à l'évaluation biologique des espèces des différents genres et différentes familles. Dans ce cadre, et dans la continuité du programme de recherche de notre unité sur les plantes algériennes, ce travail a pour objectif la recherche et la détermination structurale de nouvelles molécules à activité biologique potentielle. Ainsi deux plantes algériennes, l'une appartenant à la famille des fabacées *Cytisus triflorus* L'Her. et l'autre à la famille des Rosacées *Crataegus oxyacantha* L. ont été sélectionnées en vue d'étudier leur composition chimique et leur activités biologiques. La sélection de ces deux espèces est basée d'une part sur l'endémisme et d'autre part sur l'intérêt pharmacopie des deux espèces.

Notre travail s'articule autour de cinq chapitres :

- ✓ Le premier et le deuxième chapitre sont consacrés à une étude bibliographique sur les deux familles Rosaceae et Fabaceae, ainsi que les familles des principaux métabolites secondaires isolés dans le cadre de nos investigations.
- ✓ Le troisième chapitre comprend l'étude phytochimique des deux espèces sélectionnées dans notre programme. *Crataegus oxyacantha* Linn. (Rosaceae) et *Cytisus triflorus* L'Her. (Fabaceae), en utilisant deux méthodes d'extraction : Extraction Solide-Liquide (ESL), et Matrix Solide Phase Dispersion (MSPD).
- ✓ Le quatrième chapitre reporte les résultats phytochimiques obtenus suivis de discussions notamment la détermination structurale des différents métabolites secondaires isolés à partir de ces deux espèces, à savoir: des flavonoïdes.
- ✓ Le cinquième chapitre comprend l'étude biologique des deux espèces sélectionnées, ainsi que l'évaluation et la recherche de l'activité antioxydante de certains produits et extraits, la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, et l'activité antimicrobienne.

Et nous finirons le tout par une conclusion générale qui clôturera la présentation de ce travail.

## **Références**

- [1] Kinghorn, A.D., Chin, Y.W., Swanson, S.M., 2009. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current opinion in drug discovery & development* 12 (2), 189.
- [2] Gurib-Faki, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- [3] Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai H.B., Kinghorn, A.D., 2006. Drug discovery from natural sources. *The AAPS journal* 8(2), 239-253.
- [4] Treutter, D., 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* 7 (6), 581-591.
- [5] Gaussen, H., Leroy, H.F., 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2ème Ed. 426.
- [6] Quezel, P., and Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, C.N.R.S. Paris.
- [7] Simmonds, M.S.J., 2003. Novel drugs from botanical sources. *Drug Discovery Today* 8, 721-722.
- [8] Balunas, M.J. and Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431-441.
- [9] Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68 (7), 939-953.

# Chapitre I

*Généralités sur la famille des Fabaceae et le  
genre Cytisus*

### **I.1. Introduction**

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux composés [1]. La flore algérienne appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique ainsi que pharmacologique [2]. Dans ce qui suit, nous nous sommes intéressés au genre *Cytisus* de la famille des Fabaceae, l'une des plus étudiées. Elle est connue pour ses espèces médicinales et aromatiques. Pour cela, une plante de cette famille a fait l'objet d'une étude phytochimique et pharmacologique: *Cytisus triflorus* L'Her.

### **I.2. La famille Fabaceae**

#### **I.2.1. Description et répartition de la famille Fabaceae**

La famille Fabaceae (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de légumineuse sous laquelle cette famille est plus connue [3].

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 745 genres et 19 500 espèces situées en troisième place après Asteraceae et Orchidaceae en ce qui concerne la richesse des espèces au niveau global [4], réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [5]. Les plantes Fabaceae sont généralement de plantes herbacées, arbustes (à feuilles simples, réduites ou composées mais avec un nombre peu important de folioles), arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles [6]. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques.

Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées [7].

#### **I.2.2. Classification des Fabaceae**

La classification des Fabaceae la plus complète a été établie en 1981 par Polhill (1981) et reprise dans le dernier ouvrage de référence sur la famille [8]. Cette classification regroupe plusieurs tribus de Fabaceae : Genisteae, Thermopsidaeae, Crotalariaeae, Lipariaeae, Podalyrieae, Euchrestaeae, Mirbellieae, Bossiaeeae et Brongniartieae. Les Hypocalypteae sont parfois ajoutées à cette classification. Le complexe des « Genistoïdes » a une légitimité morphologique parmi les Fabaceae car il regroupe des espèces au port adapté à la sécheresse.

La famille des fabacées est anciennement connue pour ses propriétés médicinales et pharmacologiques est utilisée comme remède en médecine traditionnelle [9]. Pour toutes ces raisons, nous nous sommes intéressées au genre *Cytisus*.

### I.3. Le genre *Cytisus*

#### I.3.1. Description générale

*Cytisus* est un genre de plantes à fleurs appartenant à la famille des Fabacées sous-famille Papilionacées (*Faboideae*), [10]. Il comprend environ 70 espèces réparties dans la flore spontanée de nombreux pays, dans les régions à climat doux de l'Europe méridionale et centrale *Cytisus ardoinoi*, *C. arboreus*, *C. cantabricus*, *C. galianoi*, *C. insularis*, *C. multiflorus*, *C. oromediterraneus*, *C. sauzeanus*, *C. striatus*), de l'Afrique du Nord (*C. baeticus*, *C. balansae*, *C. maurus*, *C. megalanthus*, *C. transiens*, *C. valdesii*). et de l'Asie occidentale [11]. Toutes ces espèces se rencontrent dans quelques pays de l'Ouest de la Méditerranée : Algérie dont huit espèces sont de plus en plus dans le nord de l'Algérie [12], Espagne, France, Maroc et Portugal. Seul *Cytisus scoparius* fait exception avec une distribution s'étalant largement à l'Ouest et au Centre de l'Europe. [13-15.] A la différence des genres *Spartium* ou *Genista* qui poussent sur des sols calcaires, les *Cytisus* préfèrent les sols acides, même pauvres et secs, ce qui explique leur rareté dans le sud-est méditerranéen. Leur enracinement est traçant, leurs troncs présentent une écorce souvent noirâtre et écaillée comme l'espèce *arboreus* [16].

Le genre *Cytisus* est l'un de plusieurs genres dans la tribu *Genisteae* qui s'appellent généralement les balais. Son nom viendrait, semble-t-il, du grec "*kytisos*" désignant une espèce de trèfle très répandu sur l'île de *Kythnos* [17].

Les espèces de ce genre se produisent des arbustes non armés avec des brindilles nervurées cuites et alternées et autre, les feuilles sont persistantes, trifoliolée et pétiolées. Les inflorescences sont caractérisées par 1-3 fleurs en fascicules axillaires [10,13].

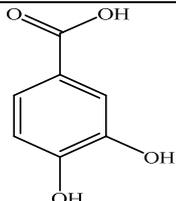
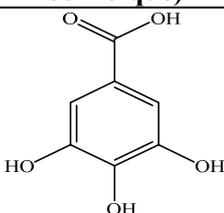
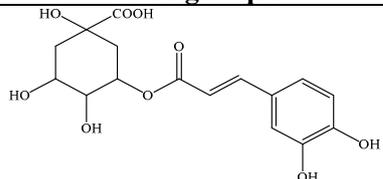
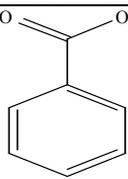
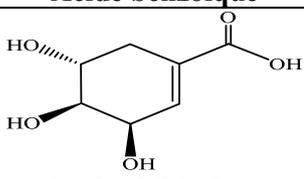
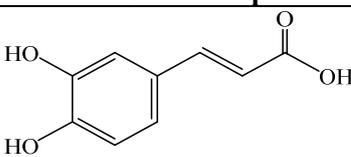
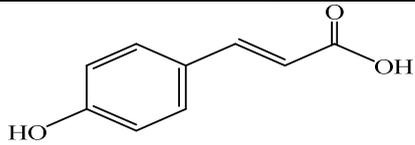
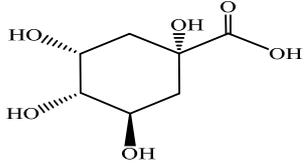
#### I.3.2. Les composés phénoliques chez le genre *Cytisus*

Ce genre est riche en métabolites secondaires notamment les acides, les alcaloïdes et les flavonoïdes.

##### I.3.2.1. Les acides phénoliques

Le genre *Cytisus*, est très pauvre en acides phénoliques. En effet, les principaux acides qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 1 :

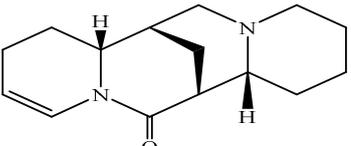
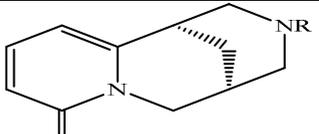
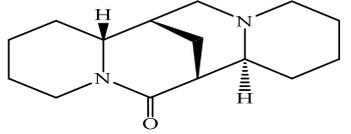
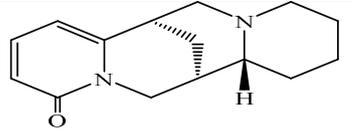
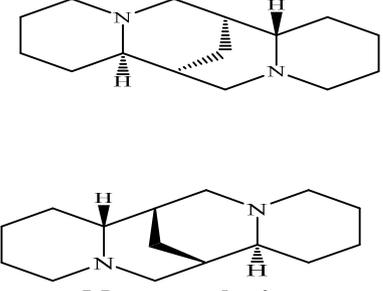
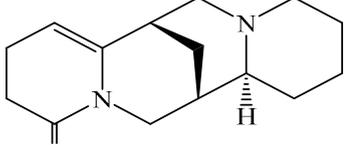
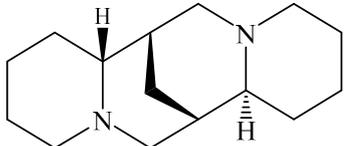
Tableau 1: Principales structures des acides isolés du genre *Cytisus*

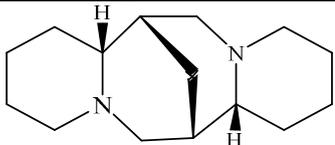
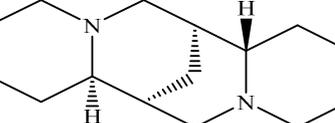
N°	Structure et nom du composé	Espèces	Références
1	 <p><b>protocatéchique acide (3,4-dihydroxy-acide benzoïque)</b></p>	<i>C. scoparius</i>	[18]
2	 <p><b>Acide gallique</b></p>	<i>C. scoparius</i>	
3	 <p><b>Acide chlorogénique</b></p>	<i>C. scoparius</i>	[19]
4	 <p><b>Acide benzoïque</b></p>	<i>C. scoparius</i>	
5	 <p><b>Acide chikimique</b></p>	<i>C. scoparius</i>	[15]
6	 <p><b>Acide Caféique</b></p>	<i>C. scoparius</i>	[20]
7	 <p><b>Para-Acide coumarique</b></p>		
8	 <p><b>Acide quinique</b></p>	<i>C. multiflorus</i>	[21]

## I.3.2.2. Les alcaloïdes

Cette classe de composés n'a jamais été signalée dans les espèces de *Cytisus* sauf chez l'espèce *C. scoparius*, *C. monspessulanus* et *C. laburnum*. [22, 23]. Dont les alcaloïdes qui ont été signalés dans cette espèce sont résumés dans le Tableau 2 :

**Tableau 2:** Principales structures des alcaloïdes isolés du genre *Cytisus*

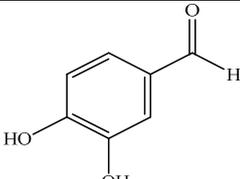
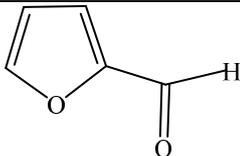
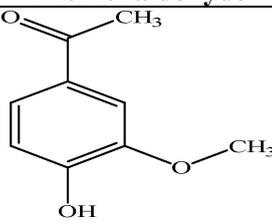
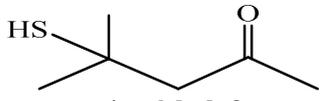
N°	Structure et nom du composé	Espèces	Références
9	 <p><b>(+)-2,3-déhydro-10-oxo-α-iso-sparteïne</b></p>	<i>C. monspessulanus</i>	[24]
10 11	 <p>R= CH<sub>3</sub> : N-méthylcytisine R=H : Cytisine</p>	<i>C. laburnum</i>	[25-28]
12	 <p><b>Aphylline</b></p>	<i>C. scoparius</i>	[29]
13	 <p><b>Anagyrine</b></p>	<i>C. scoparius</i>	
14	 <p><b>Monspessulanine</b></p>	<i>C. monspessulanus</i>	[30]
15	 <p><b>Aphyllidine</b></p>	<i>C. monspessulanus</i>	[24]
16		<i>C. scoparius</i>	[29]

	<b>Spartéine</b>		
17		<i>C. scoparius</i>	[31]
18	<b><math>\alpha</math>-Iso-spartéine</b>  <b>Lupanine (2-Oxospartéine)</b>	<i>C. scoparius</i>	[31]

Suite Tableau 2: Principale structures des alcaloïdes isolés du genre *Cytisus*

## I.3.2.3. Les aldéhydes et les cétones :

Tableau 3: Principale structures des aldéhydes et des cétones isolés du genre *Cytisus*

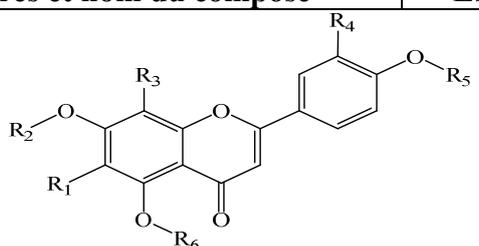
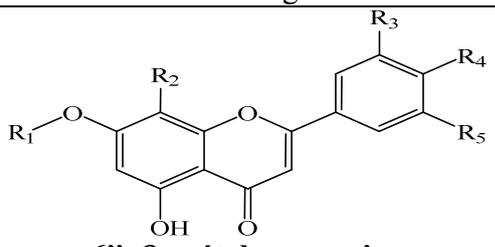
N°	Structure et nom du composé	Espèces	Références
19	 <b>3,4-Dihydroxybenzaldehyde</b>	<i>C. scoparius</i>	[18, 32]
20	 <b>2-furfuraldéhyde</b>	<i>C. scoparius</i>	[19]
21	 <b>acétovanillone</b>	<i>C. scoparius</i>	
22	 <b>4-Mercapto, 4-méthyl, 2-pentanone</b>	<i>C. scoparius</i>	[23]

## I.3.2.4. Les flavonoïdes

## I.3.2.4.1. Les flavones

Les flavones qui ont été identifiés dans les espèces de *Cytisus* ont été résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principale structures des flavones isolés du genre *Cytisus*

N°	Structures et nom du composé	Espèces	Références
			
23	<b>2''-O-pentosyl-8-C-hexoside apigénine</b> R <sub>3</sub> =GlcAra, R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> =R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = H	<i>C. multiflorus</i>	[21]
24	<b>2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-lutéoline</b> R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =Hex-Pent, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> =H	<i>C. multiflorus</i>	[33]
25	<b>2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-apigénine</b> R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =H, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> = Hex-Pent		
26	<b>2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-apigénine</b> R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> = Hex-Pent, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> =H		
27	<b>6''-O-(3-hydroxy-3-méthylglutaroyl)-2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-lutéoline</b> R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> = Hex-Pent-HMG		
28 29 30 31 32 33 34 35	Orientine C-hexosyl-apigénine Apigénine-7-O- glucoside Lutéoline-7-O- glucoside Chrysin-7-O-glucoside Chrysin-7-O-β-D-glucopyranoside Apigénine Lutéoline-5-O-glucoside		
36	 <b>6''-O-acétyle scoparine</b> R <sub>2</sub> = GlcAc R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H R <sub>4</sub> = OH R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>C. scoparius</i>	[34]
37 38 39	Chrysin Orientine Apigénine		[18]

#### 1.3.2.4.2. Les flavonols

Les flavonols se présentent comme constituants phénoliques majeurs chez le genre *Cytisus*. De ceux, et comme prévu, les dérivés de la quercétine et du kaempferol sont les plus représentatives.

Tableau 5 : Principales structures des flavonoles isolées du genre *Cytisus*

Structure du composé			
N°	Espèces	Nom du composé	Références
40	<i>C. scoparius</i>	<b>Quercétine- 3-O-rhamnoside</b> R <sub>2</sub> = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H R <sub>4</sub> = Rha	[34]
41		<b>Rhamnétine</b> R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH	
42	<i>C. multiflorus</i>	<b>Quercétine dihexoside</b> R <sub>1</sub> = R <sub>4</sub> = Glc R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = H	[21]
43	<i>C. multiflorus</i>	<b>Quercétine acétyldihexoside</b> R <sub>1</sub> = Glc, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = GlcAc	[21, 33]
44	<i>C. multiflorus</i>	<b>Rutine</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>4</sub> = Rut	[33]
45	<i>C. scoparius</i>	<b>Quercétine</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH	[34, 18, 19]
46	<i>C. scoparius</i>	<b>Rutine</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>4</sub> = Rut	[22, 32]
47	<i>C. scoparius</i>	<b>Kaempférol</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H	[34, 18, 19]

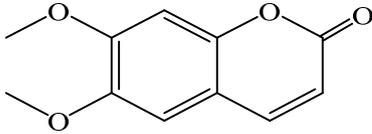
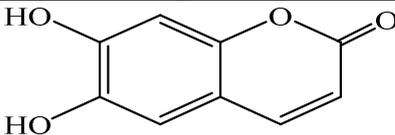
## I.3.2.4.3. Les Isoflavones

Tableau 6: Principales structures des Isoflavones isolés du genre *Cytisus*

Structure du composé			
N°	Espèces	Nom du composé	Références
48	<i>C. albus</i>	<b>Daidzine</b> R <sub>2</sub> = Glc R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H	[35]
49	<i>C. nigricans</i>	<b>Ononine</b> R <sub>2</sub> = Glc R <sub>1</sub> = H R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub>	[36]
	<i>C. albus</i>		[35]
50	<i>C. albus</i>	<b>Genistéine</b> R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H	[35]
51	<i>C. albus</i>	<b>Genistine</b> R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = Glc R <sub>3</sub> = H	[35]
52	<i>C. scoparius</i>	<b>Sarothamnoside</b> R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = ApiGlc	[34]
53	<i>C. scoparius</i>	<b>Isoquercétine</b>	[18]

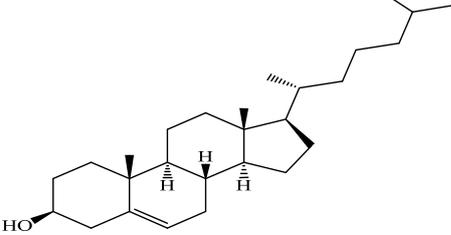
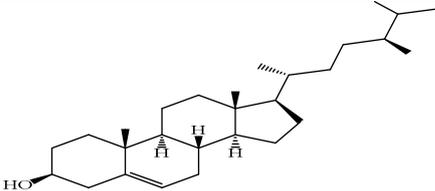
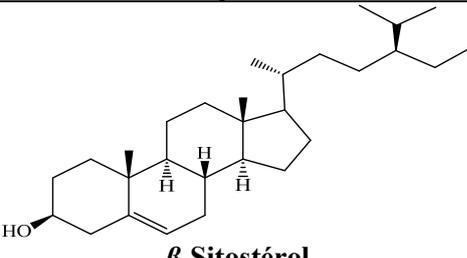
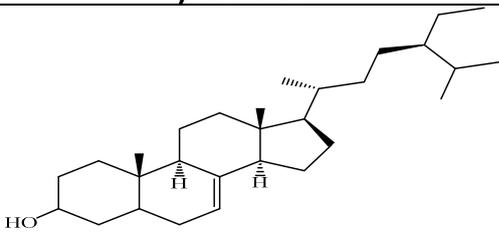
I.3.2.5. Les coumarines

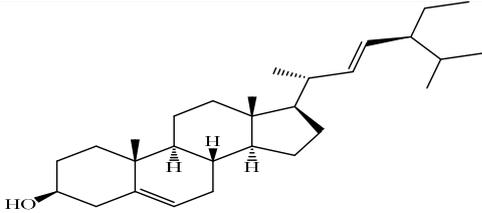
Tableau 7: Principales structures des coumarines isolées rapportées du genre *Cytisus*

N°	Espèce	Nom et structure du composé	Références
54	<i>C. scoparius</i>	 <p>Scoparone</p>	[20, 37]
55		 <p>Aesculetine</p>	

I.3.2.6. Les stéroïdes

Tableau 8: Principales structures des Stéroïdes isolés du genre *Cytisus*

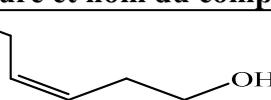
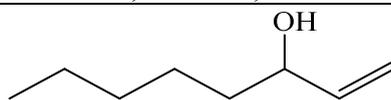
N°	Espèces	Nom et structure du composé	Références
56	<i>C. scoparius</i>	 <p>Cholestérol</p>	[38]
57		 <p>Campestérol</p>	
58		 <p><math>\beta</math>-Sitostérol</p>	
59		 <p>Stigmast 7-en, 3 <math>\beta</math>-Sitostérol</p>	

60	 <p><b>Stigmastérol</b></p>
----	---

Suite Tableau 8: Principales structures des Stéroïdes isolés du genre *Cytisus*

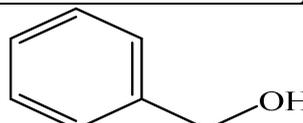
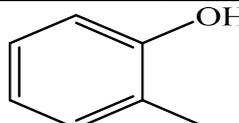
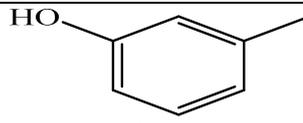
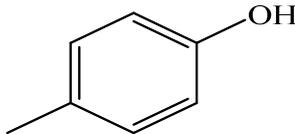
### I.3.2.7. Les alkénols

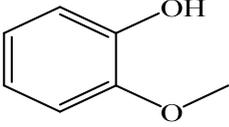
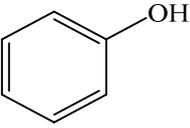
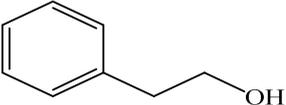
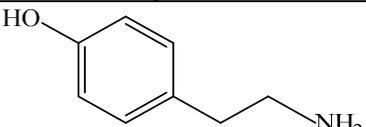
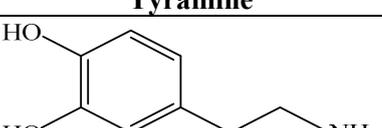
Tableau 9: Principales structures des Alkénols isolés du genre *Cytisus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
61	<i>C. scoparius</i>	 <p><b>Cis,Hex-3-én, 1-ol</b></p>	[20]
62		 <p><b>Oct-1-én-3-ol</b></p>	

### I.3.2.8. Les benzénoïdes

Tableau 10: Principales structures des benzénoïdes isolés du genre *Cytisus*

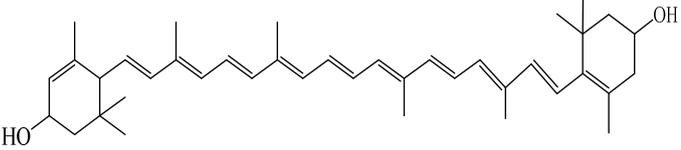
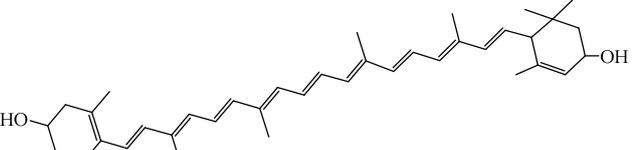
N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
63	<i>C. scoparius</i>	 <p><b>alcool benzylique</b></p>	[20]
64		 <p><b>o-Crésol</b></p>	
65		 <p><b>m-Crésol</b></p>	
66		 <p><b>p-Crésole</b></p>	

67			
68			
69			
70	<i>C. scoparius</i>		[39,40]
71			

Suite Tableau 10: Principales structures des benzénoïdes isolés du genre *Cytisus*

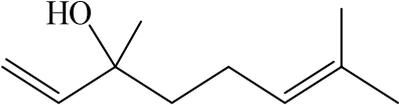
### I.3.2.9. Les caroténoïdes

Tableau 11: Principales structures des caroténoïdes isolés du genre *Cytisus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
72	<i>C. scoparius</i>		[41]
73	<i>C. scoparius</i>		

### I.3.2.10. Les monoterpènes

Tableau 12: Monoterpène isolé du genre *Cytisus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
74	<i>C. scoparius</i>		[20]

### I.3.3. Activités pharmacologiques

Plusieurs espèces du genre *Cytisus* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés pharmacologiques en particulier l'espèce *Cytisus scoparius*, mais certaines espèces sont presque inexplorées et c'est le cas de *C. triflorus*. [13].

Les résultats expérimentaux ont montré un large éventail de tels effets; certains d'entre eux ont été discutés et résumés dans le Tableau 13.

**Tableau 13:** Activités pharmacologiques de quelques espèces de *Cytisus*

Espèces	Zone de répartition	Parties	Activités pharmacologiques	Références
<i>C. multiflorus</i>	Portugal	Fleurs	Antioxydante	[33]
<i>C. scoparius</i>	(Santiago de Compostela, Espagne)	(Fleurs, graines, gousses et branches)	Antioxydante Anti bactérienne	[18]
<i>C. scoparius</i>	Lugo, Espagne	Toutes la plante	Antioxydante	[19]
<i>C. laburnum</i>	Pennsylvania, Philadelphia, PA)	graines et de gousses	Antidepressante	[42]
<i>C. scoparius</i> Link	Tamil Nadu, Inde	Feuilles	Diurétique	[43]
	/	Toute la plante	Hypnotique	[44]
	/		Anxiolytique	
	PUC-Rio de Janeiro, Brazil)	Toute la plante	Antidiabétique	[45, 46]
<i>C. syriacus</i>	Liban	Toute la plante	Antiparasitique	[47]
<i>C. striatus</i>	/		Antioxydante	[48]
<i>C. scoparius</i> Link	Portugal	Toute la plante	Anti-spasmodique	[49]
			Diurétique	
			antihypertenseur	
<i>C. villosus</i>	Algérie	feuilles	Anti bactérienne	[50]
<i>C. triflorus</i> L'Hérit.	Algérie	feuilles	anti-inflammatoire	[51]
<i>C. salvifolia</i> <i>C. triflorus</i>	Tunisie	feuilles	Activité enzymatique	[52]
<i>Cytisus striatus</i>	Portugal	Toute la plante	Activité enzymatique	[53]
<i>C. multiflorus</i> <i>C. scoparius</i> <i>C. striatus</i>	Portugal	fleurs	Activité Antioxydante	[54]

**I.4. Conclusion**

Concernant le genre *Cytisus*, on constate une grande variété des composés issus de diverses espèces. Par ailleurs une étude poussée sur certains composés de quelques-unes de ces espèces a permis de mettre en évidence leurs diverses et importantes activités biologiques.

Notre travail consiste donc à poursuivre cette recherche phytochimique guidée par la recherche de l'activité biologique d'une espèce de ce genre qui pousse en Est algérien dont *Cytisus triflorus* L'Her.

**Références bibliographiques:**

- [1] Pelt, J.M., 2001. Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris
- [2] Gaussen, H., Leroy, H. F., 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2eme Ed., 426.
- [3] Dušan, S., Matúš, K., 2012. Names of families and subfamilies, tribes and subtribes. *International Association for Plant Taxonom.*
- [4] Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. Legumes of the World. *Royal Botanical Gardens Kew*. London.
- [5] Wojciechowski, M.F., Lavin, M., and Sanderson, M.J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene solves many well supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 11: 1846.
- [6] Crisp, M. D., Gilmore, S. et Van Wyk, B.-E., 2000. Molecular phylogeny of the genistoid tribes of papilionoid legumes. In: P. S. Herendeen et A. Bruneau, *Advances in Legume Systematics* 9:28. *Royal Botanic Gardens Kew*, London.
- [7] Heywood, V.H., 1996. Flowering Plants of the World. 3th edition, *Oxford University Press*, Oxford, pp. 141-145, 149-152.
- [8] Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. et Lock, M., Eds., 2004. Legumes of the World. *Royal Botanic Garden Kew*, London.
- [9] Heywood, V.H., 1996. Les plantes à fleurs-306 familles de la flore mondiale Editions Fernand Nathan, Paris.
- [10] Cristofolini, G., Conte, L., 2002. Phylogenetic patterns and endemism genesis in *Cytisus* Desf. (Leguminosae-Cytiseae) and related genera. *Israel Journal of Plant Sciences*, 50, 37-50.
- [11] Sundararajan, R., Haja, N.A., Kumar, V., Mukherjee, K., Saha, B.P., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P.K., 2006. *BMC Complementary and Alternative Med.*, 6(8), 1-7.
- [12] Quezel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales : *Cytisus* L. (*Cytise*). Paris, 486-487.
- [13] Cristofolini, G., Troia, A., 2006. A reassessment of the sections of the genus *Cytisus* Desf. (Cytiseae, Leguminosae). *Taxon*, 55(3), 733-746.
- [14] Maire, R., 1987. Flore de l'Afrique du Nord. *Editions Lechevalier*, Paris.
- [15] Wink, M., Witte, L., Hartmann, T., 1981. Quinolizidine alkaloid composition of plants and of photomixotrophic cell suspension cultures of *Sarothamnus scoparius* and *Orobanche rapumgenistae*. *Planta medica*, 43, 342-352.
- [16] Abrams, L., 1944. Illustrated flora of the Pacific States. *Stanford University Press*, Stanford, CA, Vol. 2. 635.
- [17] Brum-Bousquet, M., et al., 1981. *Planta Med.* 43 :367-374.
- [18] Marta, L., Marta, P., Marta Á-C., Jorge, D., Carmen García-J., 2015. Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems, *Talanta* 140, 134-142.
- [19] Noelia, G., Daniela, R., Eduarda, F., Daniele, R., Nogueira, Enma, C., Andrés, M., María Pilar, V., Montserrat, M., Herminia, D., 2013. Potential use of *Cytisus*

- scoparius* extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 125, 83–8.
- [20] Kurihara, T., Kikuchi, M., 1980. Studies on the constituents of flowers. XIII. The flower components of *Cytisus scoparius*. *Yakugaku Zasshi*. 100, 1054-1057.
- [21] Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C., Santos-Buelga, C., 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 50(5), 1576-1582.
- [22] Kar, A., 2003. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. New Age International.
- [23] Tominaga, T., Dubourdieu, D., 1997. Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one from the box tree (*Buxus sempervirens* L.) and broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch). *Flavour and fragrance journal*.12, 373-376.
- [24] Nihei, K.-i., Shibata, K., Kubo, I., 2002. (+)-2, 3-Dehydro-10-oxo- $\alpha$ -isosparteine in *Uresiphita reversalis* larvae fed on *Cytisus monspessulanus* leaves. *Phytochemistry* 61, 987-990.
- [25] Freer, A., Robins, D., Sheldrake, G., 1987. Structures of (-)-cytisine and (-)-N-methylcytisine: tricyclic quinolizidine alkaloids. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* 43, 1119-1122.
- [26] Wink, M., 1984. N-Methylation of quinolizidine alkaloids: an S-adenosyl-L-methionine: cytisine N-methyltransferase from *Laburnum anagyroides* plants and cell cultures of *L. alpinum* and *Cytisus canariensis*. *Planta*, 161, 339-344.
- [27] Dale, H.H., Laidlaw, P.P., 1912. The physiological action of cytisine, the active alkaloid of laburnum (*Cytisus laburnum*). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 3, 205-221.
- [28] Prochaska, J.J., Das, S., Benowitz, N.L., 2013. Cytisine, the world's oldest smoking cessation aid. *Bmj*. 347, f5198.
- [29] Gresser, G., Witte, L., Dedkov, V.P., Czygan, F.-C., 1996. A survey of quinolizidine alkaloids and phenylethylamine tyramine in *Cytisus scoparius* (Leguminosae) from different origins. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51, 791-801.
- [30] White, E., 1964. 879. Alkaloids of the leguminosae. Part XXVII. The structure of monspessulanine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4613-4614.
- [31] Talavera, S., et Salgueiro, J. S., 1999. Sobre el tratamiento de la tribu Cytiseae Bercht. & J.Presl (Papilioideae, Leguminosae) en "Flora Iberica". *Anales Jardin Botanico de Madrid*, 57: 200-218.
- [32] Kazuki, S., Deyuki, S., Yoshiaki, Y., and Isamu M., 1994. Isolation and enzymatic synthesis of an ester alkaloid, (-)-3 $\beta$ -Hydroxy-13 $\alpha$ -tigloyloxylupanine, from *Cytisus scoparius*. *phytochemistry*, vol. 36, no. 2, pp. 309-311.
- [33] Olívia, R., Pereira, Artur M.S.S., Maria R.M.D., Susana M.C., 2012. Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food*, 131. 652–659
- [34] Raja, S., Ahamed, K., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P. K., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 41-47.
- [35] Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N., 2010. Phytochemical Analysis of Isoflavons from some Fabaceae Species Extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 57-60.

- [36] Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N., 2010. LC/MS analysis of isoflavones from Fabaceae species extracts. *Farmacia*, 58(2), 177-183.
- [37] BRUM, B.M., Paris, R., 1974. Flavonoids of common broom (*Sarothamnus scoparius*).
- [38] Sundararajan, R., Koduru, R., 2014. *Cytisus scoparius*: A review of ethnomedical, phytochemical and pharmacological information. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 2151-2169
- [39] Murakoshi, I., Yamashita, Y., Ohmiya, S., Otomasu, H., 1986. (-)-3 $\beta$ -13 $\alpha$ -dihydroxylupanine from *cytisis scoparius*. *Phytochemistry*, 25, 521-524.
- [40] Schmalzfuss, H., Heider, A., 1931. Tyramine, hydroxy tyramine, the blood-pressure-raising substances of the pod of the common broom *Sarothamnus scoparius* Wimm.
- [41] Egger, K., 1968. Zur identität von Taraxanthin und luteinepoxid. *Planta* 80, 65-76.
- [42] Mineur, Y.S., Eibl, C., Young, G., Kochevar, C., Papke, R.L., Gündisch, D., Picciotto, M.R., 2009. Cytisine-based nicotinic partial agonists as novel antidepressant compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329, 377-386.
- [43] Nirmal, J., Babu, C.S., Harisudhan, T., Ramanathan, M., 2008. Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC complementary and alternative medicine* 8,1.
- [44] Siegel, R.K., 1976. Herbal intoxication: Psychoactive effects from herbal cigarettes, tea, and capsules. *JAMA*, 236, 473-476.
- [45] Castro, E., V.R.O., 1998. Chromium in a series of Portuguese plants used in the herbal treatment of diabetes. *Biological trace element research*, 62, 101-106.
- [46] Osório Castro, V., 2001. Chromium and zinc in a series of plants used in Portugal in the herbal treatment of non-insulinized diabetes. *Acta Alimentaria* 30, 333-342.
- [47] Di Giorgio, C., Delmas, F., Tueni, M., Cheble, E., Khalil, T., Balansard, G., 2008. Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 14, 157-162.
- [48] Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C., 2011. Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteeae (Fabaceae). *Food and chemical toxicology*, 49, 2983-2989.
- [49] Gao, MS., González-Sanjósé, ML., Rivero-Pérez, MD., Pereira, CI., Pintado, ME., Malcata, FX., 2007. J. Sci. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2638-2647.
- [50] Hadjira, A., Farida, B., Abdelghani, B., Karima, B., David, Dura'n., Yasmina, B., Adouda, S., Juan, I., Tomas, Ruiz-Argu'eso., Luis R., 2014. *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse Bradyrhizobium strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105:1121-1129.
- [51] Ait-Kaci Aourahoun, K., Fazouane, F. & Benayache, S., 2015. Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Der Pharmacia Letter*, 7(5): 104-110.
- [52] Boubaker A., Kayouli C., Buldgen A., 2004. Compos ition chimique et teneur en

composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *CEHEAM Options Méditerranéennes*, n. 62. 315- 317.

- [53] Susana, F., Ana, P., Duarte, Maria, H.L., Ribeiro, b., João, A., Queiroz, a., Fernanda, C., Domingues, a., 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 45. 192–200
- [54] José, P., Lillian, B., Ana Maria, C., Isabel, C.F.R., Ferreira., 2011. Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae).

# Chapitre II

*Généralités sur la famille des Rosaceae et le  
genre Crataegus*

## II.1. Introduction

Rosaceae est une famille botanique qui réunit environ plus de 3000 à 4000 espèces classées en 4 sous familles [6]. Elle est représentée par de nombreuses espèces sauvages (on peut citer le sorbier, l'aubépine, le prunellier, l'églantier, la ronce commune, les fraisiers, les benoîtes, les potentilles, la reine-des-prés, la pimprenelle, l'aigremoine, etc.) [1].

Les feuilles sont alternes, simples ou composés avec des folioles dentées et stipulées. La fleur qui caractérise cette famille est hermaphrodite, pentamère, actinomorphe et cyclique. Le gynécée est dialycarpellé et parfois gamocarpellé. L'ovaire supère ou infère est syncarpe contenant dans chaque loge 1 à 2 ovules anatropes et bitégumentés ou unitégumentés ayant une placentation marginale ou axile. Quant à l'androcée: le nombre d'étamines est variable. La déhiscence de l'anthere est longitudinale. [2-4].

## II.2. Distribution géographique

La distribution géographique des Rosacées s'étend sur presque toute la surface du globe, mais de façon prépondérante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [6]. Les genres les plus importants sont *Potentilla* (500 espèces dont 42 en France), *Cotoneaster* (260 espèces), *Rubus* et *Alchemilla* (250 espèces), *Prunus* (200 espèces dont onze spontanées en France), *Sorbus* (193 espèces), *Crataegus* (500 espèces dont 42 en France), *Rosa* (150 espèces dont 32 en France) [5], et d'autres genres comme les fraisiers, les pommiers, les poiriers, les geum, etc., sont aussi ceux que l'on rencontre partout. Il y a cependant des genres qui sont propres à certaines régions : il y a que l'on ne rencontre qu'en Chine ou au Japon; d'autres, en Amérique du Sud (Andes, etc.). Les arbres fruitiers cultivés, qui presque tous appartiennent à cette famille végétale, sont originaires de l'Iran et ont été transplantés un peu partout. Seul l'icaquier est originaire de l'Amérique équatoriale et a été trouvé aussi à l'état spontané dans l'Afrique centrale [6].

## II.3. Classification

Dans la classification actuelle, les Rosacées forment une famille de l'ordre des Rosales. On y distingue des sous-familles (en violet), généralement subdivisées en tribus (kaki), rassemblant un peu plus d'une centaines de genres (marron), entre lesquels se distribuent de 3000 à 4000 espèces. C'est la disposition très variable du pistil et du fruit des différentes plantes de la famille des Rosacées qui sert de principal critère pour les subdivisions [6]. On distingue parmi les Rosacées quatre sous-familles homogènes : les Amygdaloideae (ou Prunoideae, famille du pêcher), les Maloideae (famille du pommier),

les Rosoideae (famille du rosier) et les Spiraeoideae (famille de la spirée).

Cette famille est très connue pour ses propriétés pharmacologiques pour cela nous sommes intéressées au genre *Crataegus*.

#### II.4. Genre *Crataegus* :

Le nom de genre *Crataegus* est dérivé de mot grec kratos signifiant dureté du bois [7]. Ce genre comprend un groupe complexe d'arbres et d'arbustes dans la famille des rosacées, originaire des zones tempérées du nord, principalement entre les latitudes 30 ° et 50 °.

*Crataegus* appartient à la sous-famille Maloideae dans les rosacées [8], un groupe naturel de genres complexes avec la possibilité de se croiser librement (hybrider).

Le mot 'haw' est un ancien mot en anglais pour "haie". Le hadith allemand, qui signifie "hedgethorn", révèle que dès le début, ils utilisaient *Crataegus* comme couverture pour diviser leurs terres en parcelles.

Hawthorn se réfère à la plante *Crataegus* est largement distribué dans la région tempérée nordique du monde avec environ 280 espèces [9].

##### II.4.1. Description générale

- ✓ Tronc et branches: le tronc mature est reconnu par son revêtement en écorce écailleuse et grisâtre. Les branches grises portent des épines ayant une couleur, longueur et corpulence différentes d'une espèce à une autre.
- ✓ Feuilles : elles sont vertes luisantes ou sombres, caduques, alternes et découpées en 1 à 8 paires de lobes par feuille, leur marge foliaire est soit entière, dentée ou crénelée.
- ✓ Fleur : 9 à 50 fleurs (jaunes, roses ou blancs) sont regroupées généralement en corymbe et rarement en ombelle présentant à leur base 1 à 3 bractées caduques.
- ✓ Fruit : La fructification de *Crataegus* prend son début à la fin de l'été jusqu'au début de la saison d'automne pour donner naissance à des baies globuleuses, pyriformes ou elliptiques d'une taille qui varie de 6 mm de longueur et 4 mm de diamètre, notamment chez *C. azarolus*, jusqu'à 35 mm de longueur et 27 mm de diamètre. Les couleurs ravissantes du fruit (jaune, vert, orange ou rouge).
- ✓ Le calice, caduque chez quelques espèces, est le plus souvent persistant et sessile formant une couronne sur la partie apicale des baies. A l'intérieur de ces dernières, on trouve 1 à 5 noyaux [10, 11].

### II.4.2. Distribution géographique

Ces arbres de petite taille sont cultivés en haie en Europe. Trouvé principalement dans les régions tempérées, y compris des pays comme l'Afrique du Nord, l'Asie occidentale, l'Inde, la Chine et l'Amérique du Nord. Dans les années 1800, les colons britanniques l'ont introduit en Tasmanie et dans d'autres parties de l'Australie en tant que haie et il court maintenant à Victoria, en Tasmanie, dans les collines d'Adélaïde et dans les plateaux de Nouvelle-Galles du Sud. *Crataegus* est un colon agressif, c'est-à-dire tenace et difficile à éliminer; Il a été déclaré une mauvaise herbe nocive dans de nombreux États australiens. En Inde, il se trouve dans l'Himalaya humide, le Cachemire et l'Himachal Pradesh, à une altitude de 1800 à 3000 m [7].

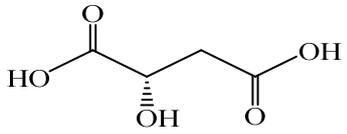
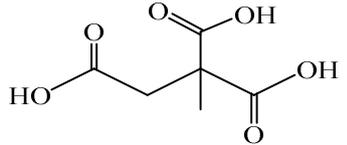
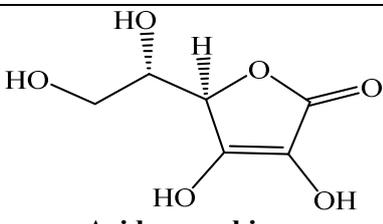
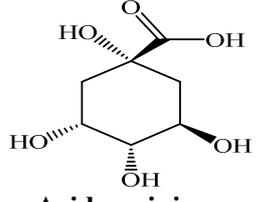
### II.4.3. Chimie connue des espèces de *Crataegus* :

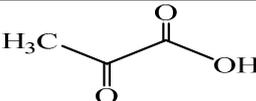
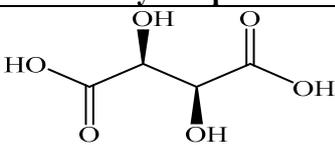
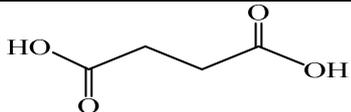
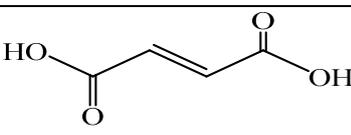
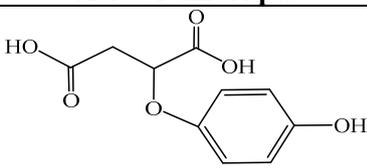
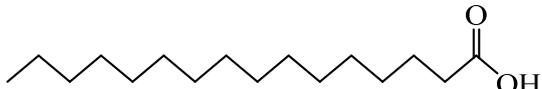
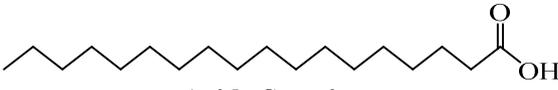
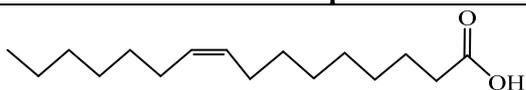
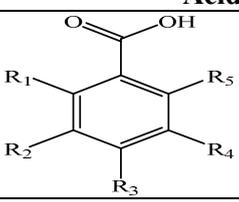
Le genre *Crataegus* est connu pour sa richesse en métabolites secondaires tels que les acides, les terpènes, les stéroïdes, les flavonoïdes, et les lignanes.

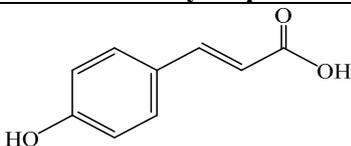
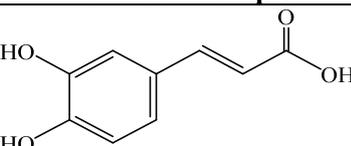
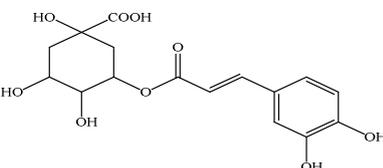
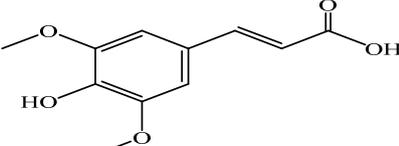
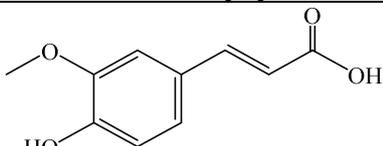
#### II.4.3.1. Les acides

Les principaux acides qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 14 :

**Tableau 14:** Acides isolés rapportés de différentes espèces du genre *Crataegus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
1	<i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p>Acide malique</p>	[12-14]
2	<i>C. aestivalis</i> <i>C. azarolus</i> <i>C. brettschneideri</i> <i>C. cuneata</i> <i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p>Acide citrique</p>	[15] [16] [17] [18] [13-19] [15]
3	<i>C. cuneata</i> <i>C. germanica</i> <i>C. hupehensis</i> <i>C. kansuensis</i> <i>C. maximowiczii</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p>Acide ascorbique</p>	[95,96] [13-19] [91]
4	<i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p>Acide quinique</p>	[13-19] [15]

5	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Pyruvique 129</b></p>	[15]
6	<i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide tartrique</b></p>	[13-19] [20] [15]
7	<i>C. azarolus</i> <i>C. pinnatifida</i> <i>C. monogyna</i> <i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide succinique 131</b></p>	[21,22] [23] [13-19] [24]
8	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Fumarique</b></p>	[25]
9	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide 2-(4-Hydroxyphenyl) malique</b></p>	[25]
10	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Palmitique</b></p>	[26]
11	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Stearique</b></p>	[26]
12	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Oléique</b></p>	[26]
13	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide Linoléique</b></p>	[26]
			
14	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	<b>Acide Benzoïque</b> R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =H, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> =H	[27]
16	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	<b>(3-hydroxyphenyl) benzoic acid</b> R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =H, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> =H	[28]
17	<i>C. pinnatifida</i> Graine <i>Crataegi folium</i>	<b>Acide gallique</b> R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =OH, R <sub>4</sub> =OH, R <sub>5</sub> =H	[28] [29]

18	<i>C. germanica</i> <i>C. pinnatifida</i> Graine	<b>Acide protocatéchique</b> $R_1=H, R_2=H, R_3=OH, R_4=OH, R_5=H$	[13-19] [30] [28]
19	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>	<b>Acide anisique</b> $R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=H, R_5=H$	[31]
20	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>	<b>Acide vanillique</b> $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=OH, R_4=H, R_5=H$	[31]
21	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i> <i>C. germanica</i>	<b>Acide syringique</b> $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=OH, R_4=OCH_3, R_5=H$	[31] [13-19]
22	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>	<b>Acide gentisique</b> $R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=H, R_5=OH$	[31]
23	<i>C. germanica</i>	$R_1=H, R_2=H, R_3=H, R_4=H, R_5=OH$ <b>Acide salysilique</b>	[13-19]
24	<i>Crataegi folium</i>	 <b>Acide coumarique</b>	[29,32]
	<i>C. monogyna</i> <i>C. oxyacantha</i>		[31]
25	<i>Crataegi folium</i>	 <b>Acide caféique</b>	[29,32]
	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>		[31]
26	<i>C. azarolus</i> var. <i>C. aronia</i>	 <b>Acide chlorogénique</b>	[32,33]
	<i>C. oxyacantha</i>		[7, 32,33]
	<i>C. tanacetifolia</i>		[35]
27	<i>C. germanica</i>	 <b>Acide sinapique</b>	[32, 34]
	<i>C. monogyna</i>		[32, 36]
28	<i>C. azarolus</i> var. <i>aronia</i>	 <b>Acide férulique</b>	[37,38]
	<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>		[31]

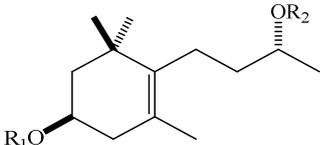
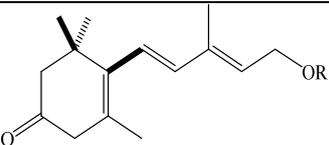
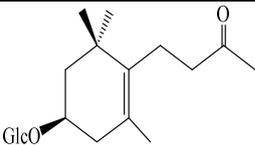
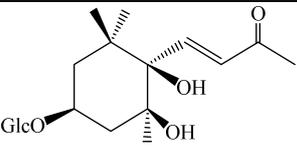
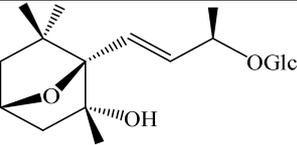
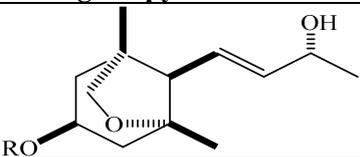
Suite Tableau 14: Acides isolés rapportés de différentes espèces du genre *Crataegus*

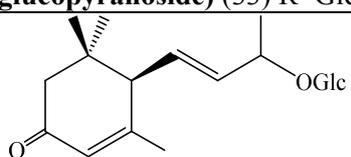
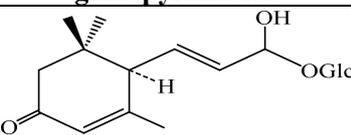
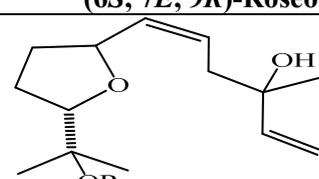
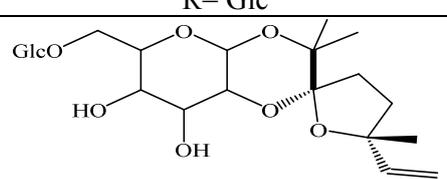
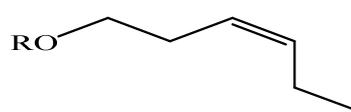
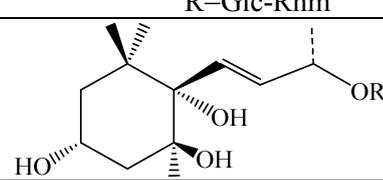
## II.4.3.2. Les terpènes

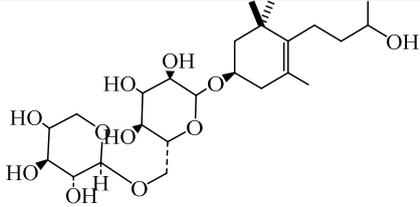
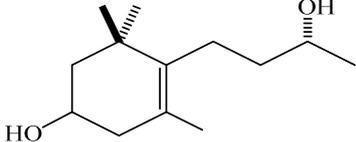
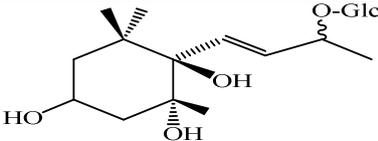
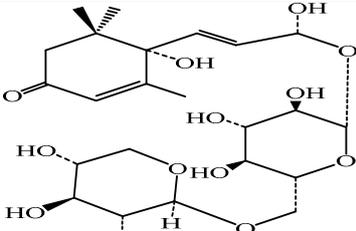
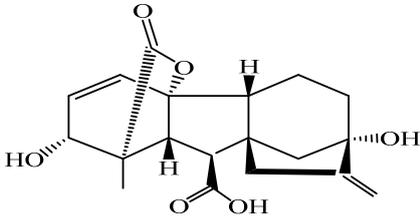
## II.4.3.2.1. Monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes

Les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes sont les constituants principaux de l'huile volatile du genre *Crataegus*, qui est une matière première importante dans l'industrie des épices et de la médecine. [27, 40]. Tableau 15

**Tableau 15:** Principales structures des terpènes isolés de différentes espèces du genre *Crataegus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
			
29	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	<b>Linarionosides A</b> , R <sub>1</sub> =Glc, R <sub>2</sub> =H	[39]
30		<b>Linarionosides B</b> , R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> =Glc	[39]
31		<b>Linarionoside C</b> , R <sub>1</sub> = Glc, R <sub>2</sub> =Glc	[40]
32	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <b>3β-glucopyranosyloxy-β-ionone</b> R=Glc	[39,40]
33		 <b>Icariside B6</b>	
34	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <b>Pisumionoside</b>	[39,40]
35		 <b>(3S, 5R, 6R, 7E, 9R) -3,6-époxy-7-Mégastigmen-5,9-diol-9-O-β-D-glucopyranoside</b>	
36	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles		[40]

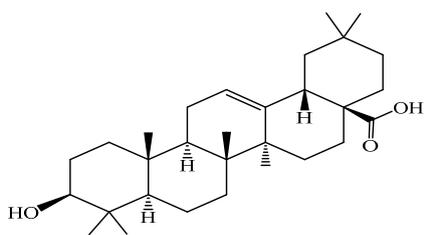
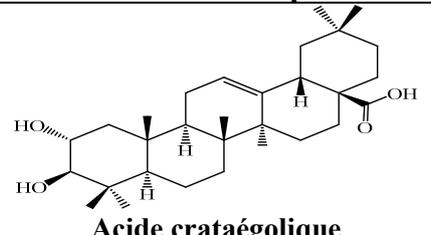
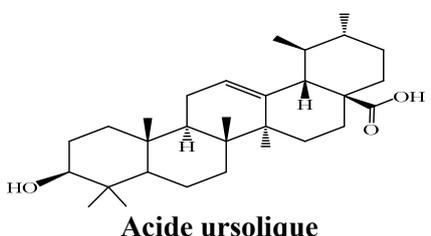
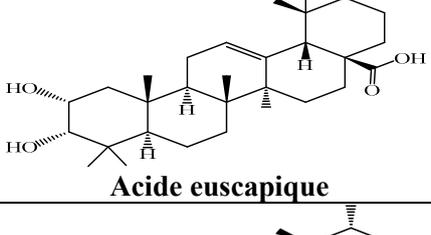
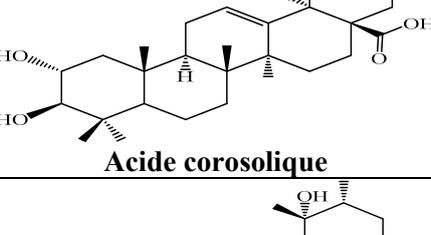
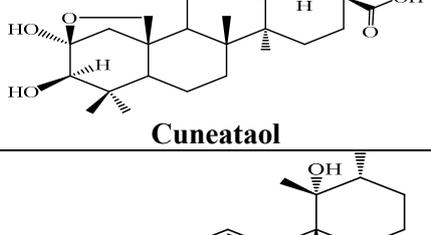
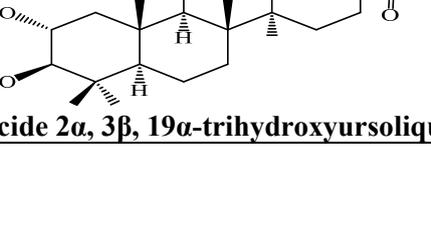
		(6 <i>S</i> , 7 <i>E</i> , 9 <i>R</i> -vomifoliol-9- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside) (33) R=Glc	
37	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles		[39,40]
		(6 <i>R</i> , 9 <i>R</i> ) -3-oxo- $\alpha$ -ionol-9- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside	
38			[39]
		(6 <i>S</i> , 7 <i>E</i> , 9 <i>R</i> )-Roséside	
			
39	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	(5 <i>Z</i> ) -6- [5- (2-hydroxypropan-2-yl) - 2-méthyltetrahydrofurane-2-yl] -3-méthylhexa-1, 5-dièn-3-ol (35) R=H	[40]
40		(5 <i>Z</i> ) -6- [5- (2- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl-propan-2-yl) -2-méthyltetrahydrofurane 2-yl] -3-méthylhexa-1,5-dièn-3-ol (36) R= Glc	
41	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles		[40]
		5-éthényl-2-[2- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl-propan-2-yl]-5- méthylterahydrofurane-2-ol	
			
42	<i>C. pinnatifida</i>	( <i>Z</i> )-3-hexényl <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside R= Glc-Glc	[40]
43		( <i>Z</i> )-3-hexényl <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -xylopyranosyl-(1''- 6')- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside R=Glc-xyl	
44		( <i>Z</i> )-3-hexényl <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -rhamnopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside R=Glc-Rhm	
			

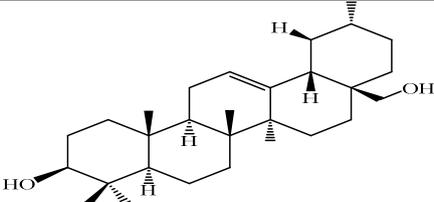
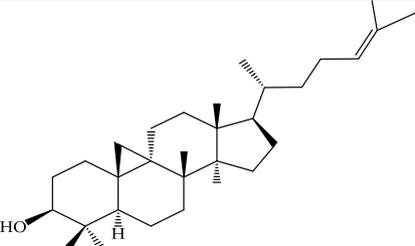
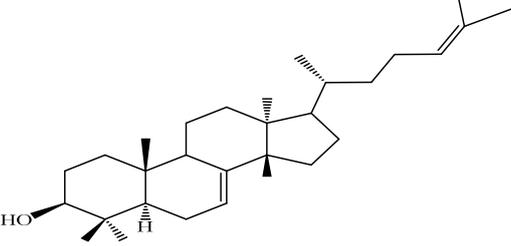
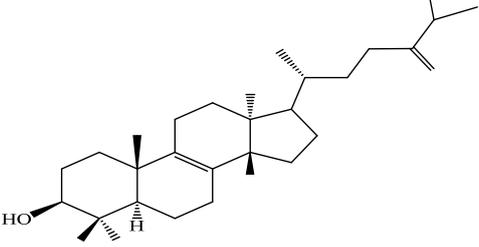
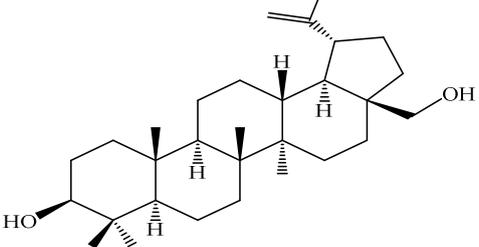
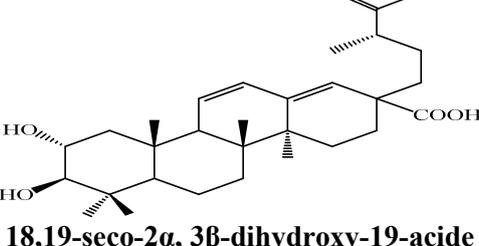
45		(3R,5S,6S,7E, 9S)-megastigman-7-ène-3,5,6,9-tetrol 9-O-β-D-glucopyranoside R= Glc	[40]	Suite Tableau 15: Principales structures des terpènes isolés de différentes espèces du genre <i>Crataegus</i> .
46	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	(3R,5S, 6S,7E,9S)-megastigman-7-ène-3,5,6,9-tetrol, R=H	[40]	
47		(6S, 7 <sup>E</sup> , 9R)-6,9-Dihydroxy-4,7-megastigmadièn-3-one 9-O-[β-Dxylopyranosyl-(1''→6')-β-D-glucopyranoside] R= Glc-xyl	[40]	
48	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 (3S,9R)-3,9-Dihydroxymegastigman-5-ène 3-O-primeveroside	[40]	
49	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 3,9-Dihydroxymegastigma-5-ène	[40]	
50	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 (3S,5R,6R,7E)-Megastigmane-7-ène-3-hydroxy-5, 6-epoxy-9-O-β-D-glucopyranoside	[40]	II.4.3.2. 2. Triterpénoïdes
51	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 Mégastigman-7-ène-3,5,6,9-tetrol	[40]	Les triterpénoïdes de ce genre sont classés en triterpénoïdes tétracycliques et
52	<i>C. pinnatifida</i> Fruit <i>C. monogyna</i> , <i>C. oxyacantha</i>	 Acide gibbérélique	[31]	

en triterpénoïdes pentacycliques. Tableau 16.

**Tableau 16:** Principales structures des triterpénoïdes isolés de différentes espèces du genre *Crataegus*.

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
----	---------	-----------------------------	------------

53	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide oléanolique</b></p>	[25,41]
54	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide crataégolique</b></p>	[42]
55	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. scabrifolia</i> <i>C. oxyacatha</i>	 <p><b>Acide ursolique</b></p>	[41,43]
56	<i>C. pinnatifida</i> Fruits	 <p><b>Acide euscapique</b></p>	[44]
57	<i>C. pinnatifida</i> Fruits	 <p><b>Acide corosolique</b></p>	[42,44,45]
58	<i>C. cuneata</i> Fruit	 <p><b>Cuneataol</b></p>	[46]
59	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Acide 2<math>\alpha</math>, 3<math>\beta</math>, 19<math>\alpha</math>-trihydroxyursolique</b></p>	[47]

60	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Uvaol</b></p>	[43]
61	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Cycloarténol</b></p>	[48]
62	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Butyrospermol</b></p>	[48]
63	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>24-méthylène-24-dihydrolanostérol</b></p>	[48]
64	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Bétuline</b></p>	[43]
65	<i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>18,19-seco-2<math>\alpha</math>, 3<math>\beta</math>-dihydroxy-19-acide oxo-urs11,13 (18) -dièn-28-oïque</b></p>	[27]

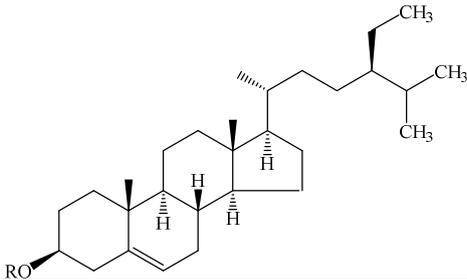
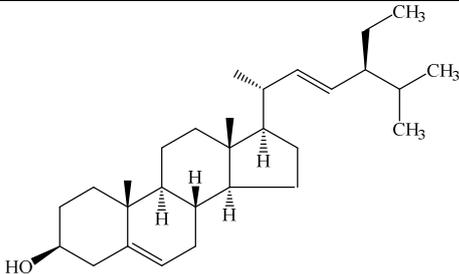
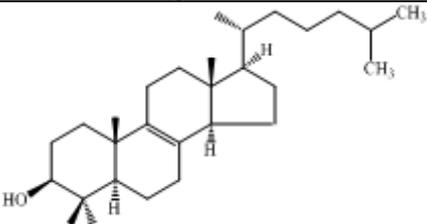
Suite  
**Tableau 16:**  
 Principales structures des triterpénoides isolés de différentes espèces du genre *Crataegus*.

**II.4.3.3. Les stéroïdes**  
 Les principaux stéroïdes qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 17 :

**Tableau**

**17:** Principaux stéroïdes isolés rapportées de différentes espèces du genre *Crataegus*.

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
----	---------	-----------------------------	------------

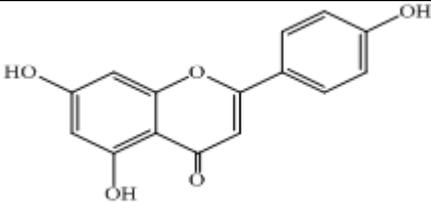
			
66	<i>C. pinnatifida</i> Fruits	<b>β-Sitostérol</b> R=H	[24]
67		<b>β-Daucostérol</b> R= Glc	
68	<i>C. pinnatifida</i> Fruits	 <b>Stigmastérol</b>	[24]
69	<i>C. pinnatifida</i> tiges et feuilles	 <b>24-Méthylèn-24-dihydrolanostérol</b>	[48]

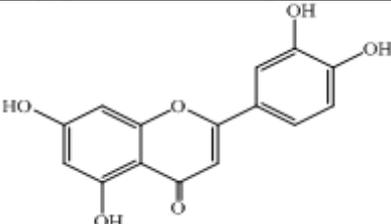
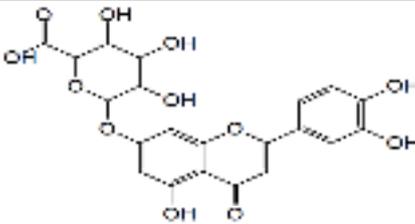
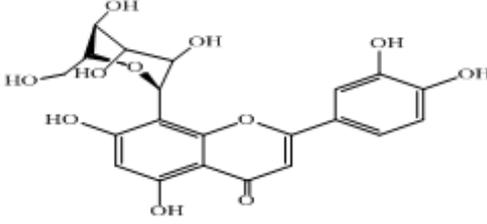
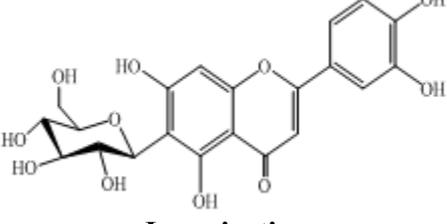
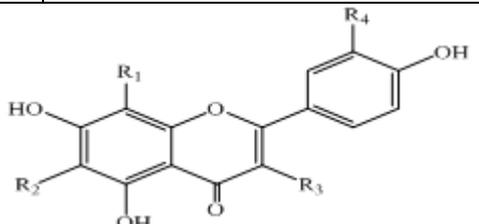
#### II.4.3.4. Les flavonoïdes

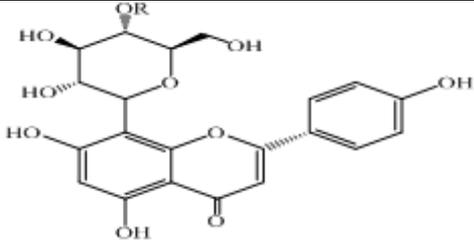
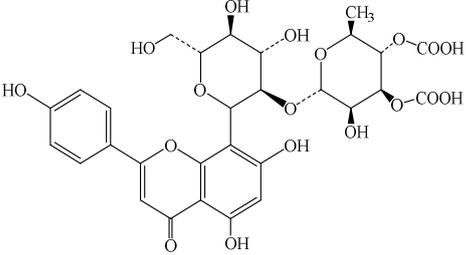
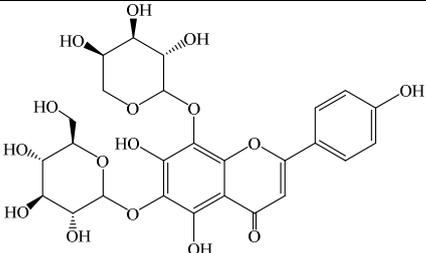
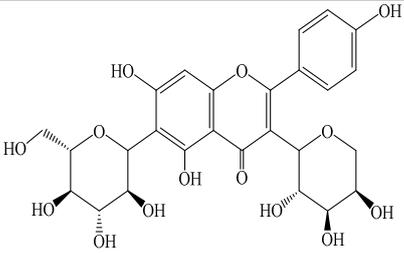
Les flavonoïdes et leurs dérivés, y compris les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanols et les polymères de flavanols, sont les composants chimiques les plus abondants du genre *crataegus*.

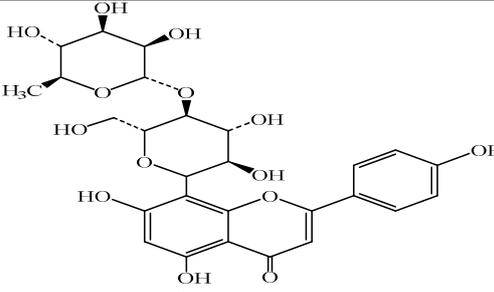
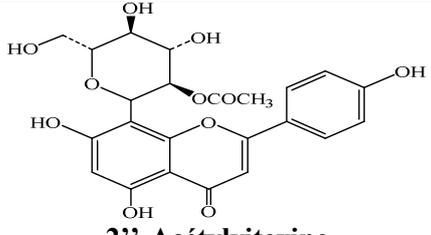
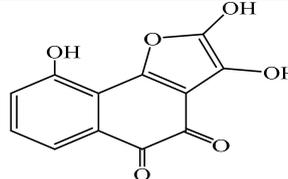
##### II.4.3.4.1. Les flavones

**Tableau 18:** Principaux flavones signalés dans le genre *Crataegus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
70	<i>C. microphylla</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <b>Apigénine</b>	[49, 50]

71	<i>C. monogyna</i>	 <p><b>Apigénine-6,8-di-C-glucosides</b></p>	[51, 52]
72	<i>C. curvisepala</i> <i>C. pinnatifida</i>	 <p><b>Lutéoline</b></p>	[53]
73	<i>C. macrocarpa</i>	 <p><b>Lutéoline-7-O-Glucuronide</b></p>	[54]
74	<i>C. monogyna</i> <i>C. pentagyna</i>	 <p><b>Orientine</b></p>	[55]
75	<i>C. monogyna</i> <i>C. pentagyna</i>	 <p><b>Iso-orientine</b></p>	[55]
			
76	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. microphylla</i> <i>C. maximowiczii</i> <i>C. macrocarpa</i> <i>C. pinnatifida</i>	<p><b>Vitexine</b> R<sub>1</sub>=Glc, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=H</p>	[56] [49] [57] [54] [56]

77	<i>C. microphylla</i> <i>C. davisii</i> <i>C. oxyacantha</i>	<b>Vitexine rhamnoside</b> $R_1=\text{Glc}^4\text{-Rha}$ , $R_2=\text{H}$ , $R_3=\text{H}$ , $R_4=\text{H}$	[49] [58] [7, 61]
78	<i>C. pinnatifida</i>	<b>Isovitexine</b> $R_1=\text{H}$ , $R_2=\text{Glc}$ , $R_3=\text{H}$ , $R_4=\text{H}$	[59]
79	<i>C. pinnatifida</i>	<b>Hyperoside</b> $R_1=\text{H}$ , $R_2=\text{H}$ , $R_3=\text{O-Gal}$ , $R_4=\text{OH}$	[60]
80	<i>C. davisii</i> <i>C. monogyna</i> <i>C. aronia</i> <i>C. pseudoheterophylla</i>	 <b>vitexine-2''-O-rhamnoside (3) R= 2''-O-rhamnose</b>	[58] [51, 52, 62] [62] [62]
81	<i>C. sinaica</i>	 <b>3''',4'''-di-O-acétyl-2''-O-<math>\alpha</math>-rhamnosylvitexine</b>	[63]
82	<i>C. monogyna</i>	 <b>Schaftoside</b>	[64]
83	<i>C. monogyna</i>	 <b>Néoschaftoside</b>	[64]
84	<i>C. monogyna</i>	<b>Néoisoschaftoside</b>	[64]

85	<i>C. curvisepala</i>	 <p><b>Craténacine</b></p>	[65]
86	<i>C. sanguinea</i>	 <p><b>2''-Acétylvitexine</b></p>	[66]
87	<i>C. davisii</i>	 <p><b>Crataéquinone B</b></p>	[67]

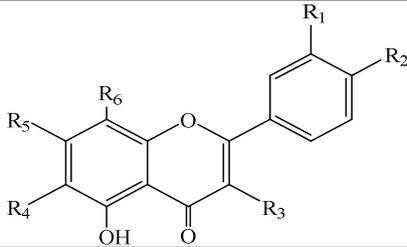
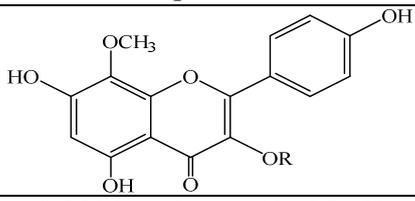
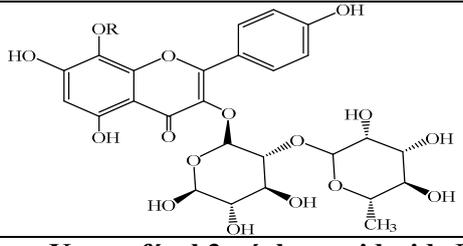
Suite Tableau 18: Principales flavones signalées dans le genre *Crataegus*

#### II.4.3.4.2. Les flavonols

Les principaux Flavonols qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 19 :

**Tableau 19:** Principaux flavonols qui ont été signalés pour le genre *Crataegus*

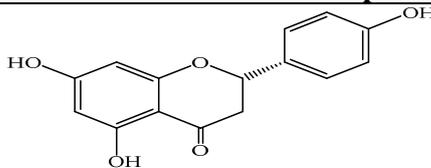
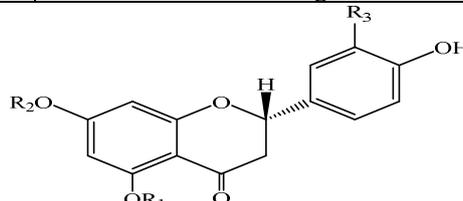
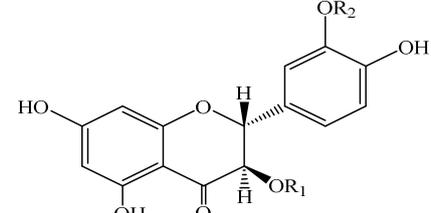
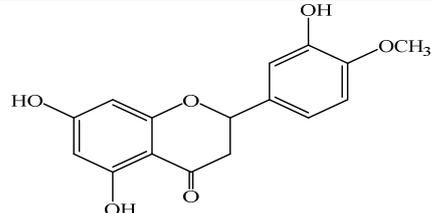
N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
----	---------	-----------------------------	------------

								
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	
88	<i>C. pinnatifida</i>	H	OH	OH	H	OH	H	[68]
<b>Kaempférol</b>								
89	<i>C. curvisepala</i>	OH	OH	OH	H	OH	H	[69]
<b>Quercétine</b>								
90	<i>C. anacetifolia</i>	H	OH	OH	H	OH	OH	[70]
<b>Herbacétine</b>								
91	<i>C. anacetifolia</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	[70]
<b>Santine</b>								
92	<i>C. anacetifolia</i>	H	OCH <sub>3</sub>	[70]				
<b>5-Hydroxyauranétine</b>								
93	<i>C. davisii</i>	OH	OH	O-rutinoside	H	OH	H	[67]
<b>Rutine</b>								
94		OH	OH	O-robinobioside	H	OH	H	[71]
<b>Bioquercétine</b>								
								
95	<i>C. pinnatifida</i>	<b>8-Méthoxykaempférol R=H</b>						[71]
96		<b>Pinnatifidine R= -Glc</b>						[72]
								
97	<i>C. pinnatifida</i>	<b>Kaempférol 3-néohesperidoside R=H 31</b>						[73]
98		<b>8-Méthoxykaempférol 3-néohesperidoside R=OCH<sub>3</sub></b>						[73]

#### II.4.3.4.3. Les flavanones et les flavanonols

Les principaux Flavanones et flavanonols qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 20:

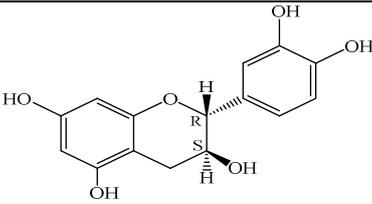
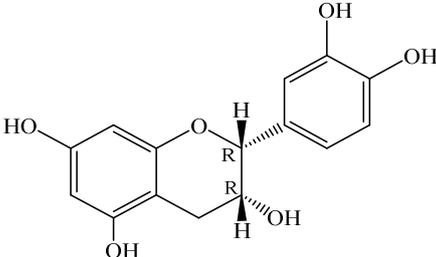
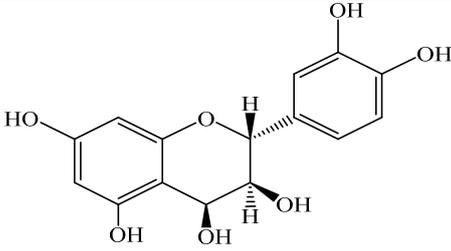
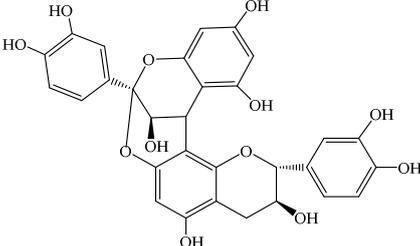
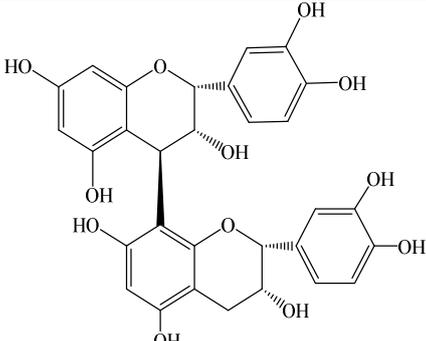
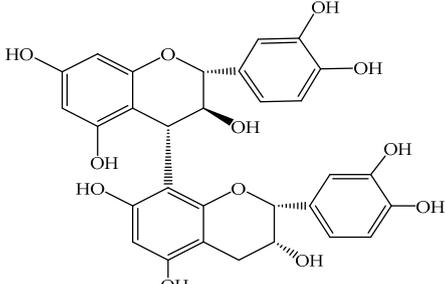
**Tableau 20:** Principales structures des flavanones et flavanonols isolés du genre *Crataegus*.

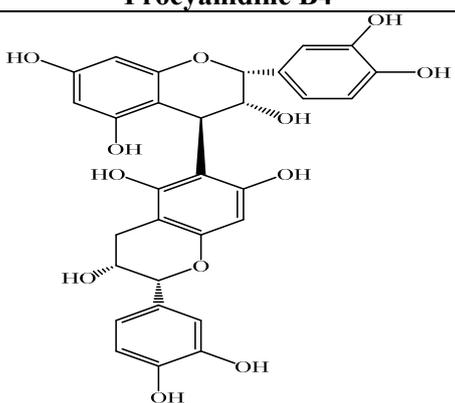
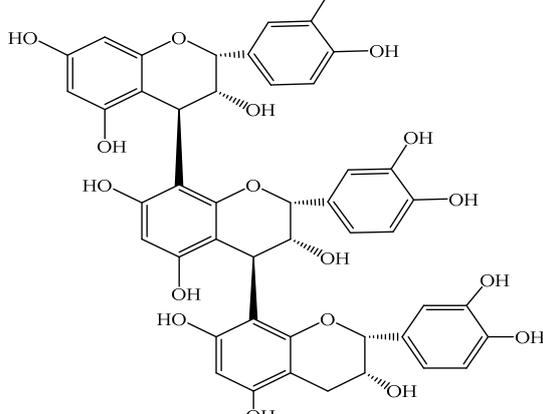
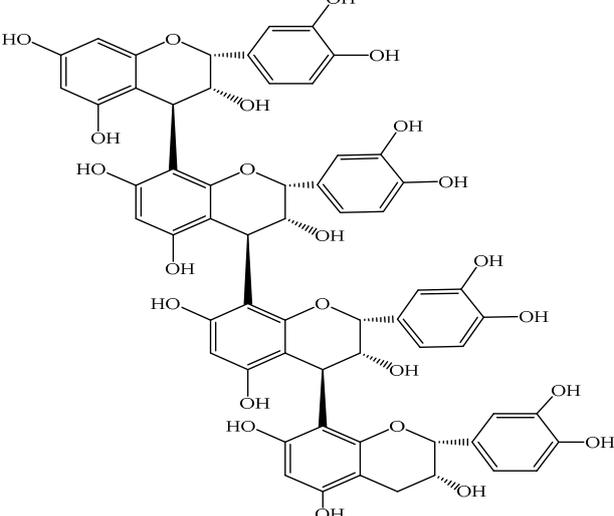
N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références						
99	<i>C. folium</i>	 <p>Naringénine</p>	[29]						
									
100	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. phaenopyeum</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-Glc</td> <td>-Glc</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> <p>Naringénine-5,7-di-glucoside</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	-Glc	-Glc	H	[74]
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>							
-Glc	-Glc	H							
101	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. phaenopyeum</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-Glc</td> <td>H</td> <td>-Glc</td> </tr> </tbody> </table> <p>Eriodictyol-5,3'-di-glucoside</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	-Glc	H	-Glc	[74]
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>							
-Glc	H	-Glc							
									
102	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. sinaica</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> <p>(+)-Taxifoline</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	H	H	[75]		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>								
H	H								
103	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. sinaica</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ara</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> <p>(+)-Taxifoline 3-O-arabinopyranoside 3-O-arabinopyranoside</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ara	H	[75]		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>								
Ara	H								
104	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. sinaica</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-Xyl</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> <p>(+)-Taxifoline 3-O-xylopyranoside</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	-Xyl	H	[75]		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>								
-Xyl	H								
105	<i>C. pinnatifida</i> <i>C. pentagyna</i> <i>C. monogyna</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>-Ara</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cratéside</p>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	H	-Ara	[76]		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>								
H	-Ara								
106	<i>C. microphylla</i>	 <p>Hesperétine</p>	[49]						

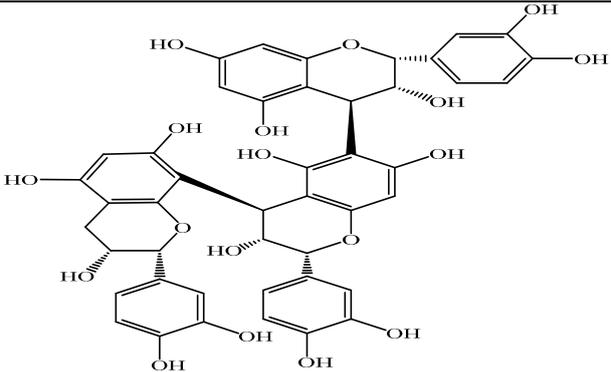
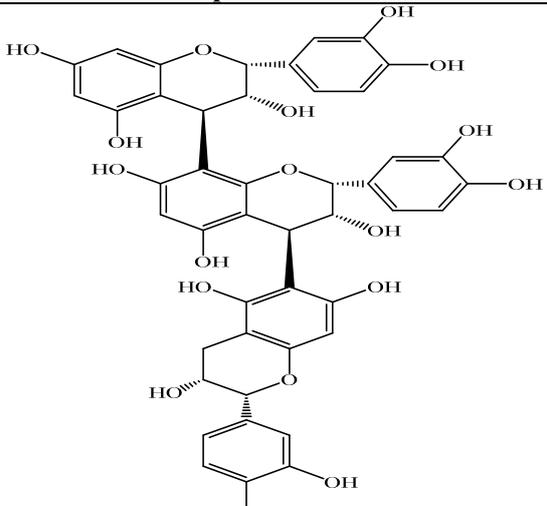
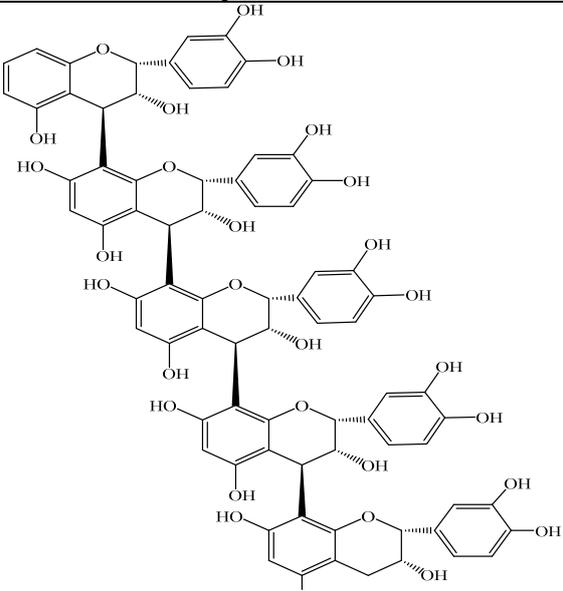
#### II.4.3.4.4. Les flavanols et les polymères de Flavanols

Tableau 21: Principales structures des flavanols et polymères de Flavanols isolés du genre *Crataegus*

N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
----	---------	-----------------------------	------------

107	<i>C. folium</i>  <i>C. sinaica</i>	 <p><b>(+)-Catéchine</b></p>	[77]  [63]
108	<i>C. monogyna</i> <i>C. curvisepala</i> <i>C. azarolus</i> var. <i>euazarolus</i> , <i>C. aronia</i> <i>C. oyacantha</i>  <i>C. sinaica</i>	 <p><b>Epicatechine</b></p>	[52] [65]  [61] [63]
109	<i>C. pinnatifida</i> Fruits	 <p><b>Leucocyanidine</b></p>	[78]
110	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Proanthocyanidine A2</b></p>	[79]
111	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Procyanidine B2</b></p>	[79]
112	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles		[79]

113	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	<p style="text-align: center;"><b>Procyanidine B4</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Procyanidine B5</b></p>	[79]
114	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p style="text-align: center;"><b>Procyanidine C1</b></p>	[79]
115	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p style="text-align: center;"><b>Procyanidine D1</b></p>	[79]

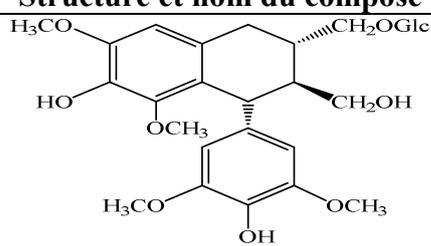
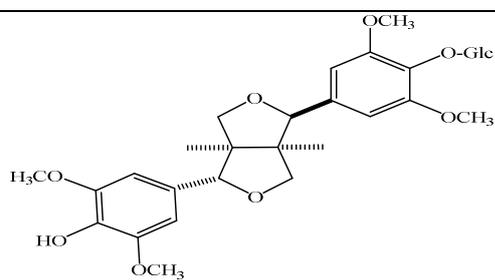
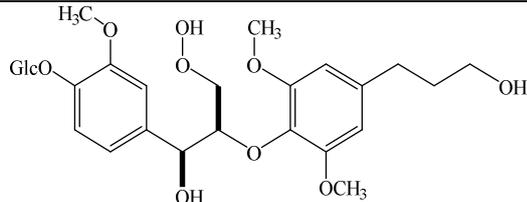
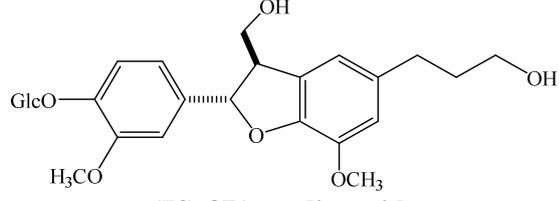
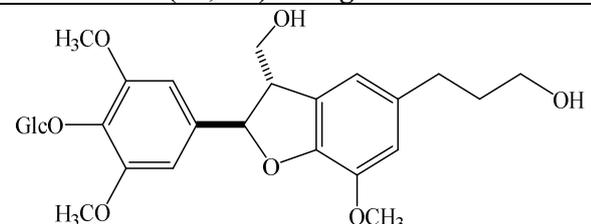
116	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Epicatechine-(4β→6)-Epicatechine-(4β→8)- Epicatechine</b></p>	[79]
117	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Epicatechine-(4β→8)-Epicatechine-(4β→6)- Epicatechine</b></p>	[79]
118	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Procyanidine E1</b></p>	[79]

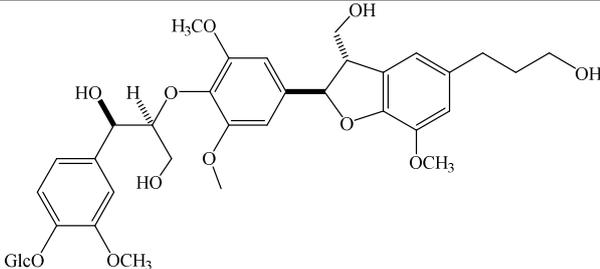
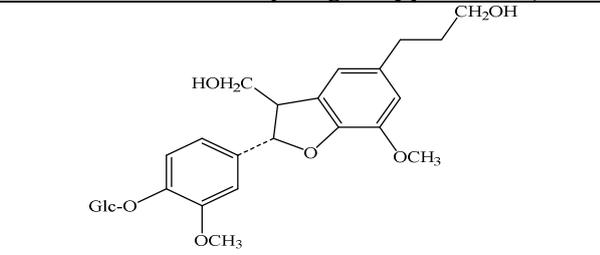
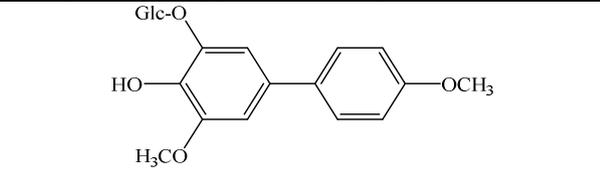
Suite Tableau 21: Principales structures des flavanols et polymères de Flavanols isolés du genre *Crataegus*

## II.4.3.5. Les lignanes

Les principaux lignanes qui ont été signalés pour ce genre sont résumés dans le Tableau 22 :

**Tableau 22:** Principales structures des lignanes isolés du genre *Crataegus*

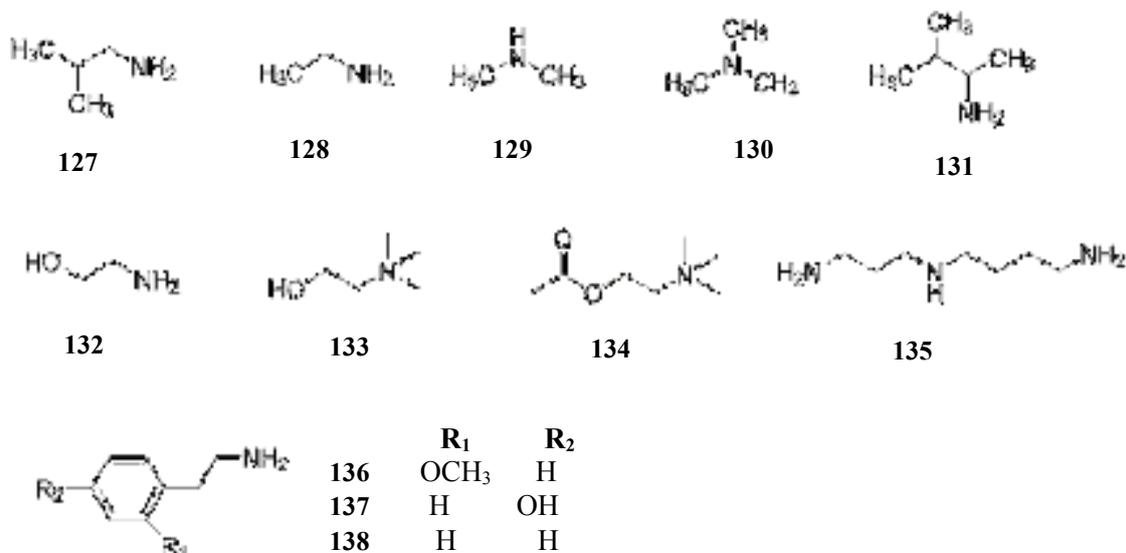
N°	Espèces	Structure et nom du composé	Références
119	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>(-)-2α-O-(β-D-glucopyranosyl)-lyoniresinol</b></p>	[80]
120		 <p><b>Tortoside A</b></p>	
121		 <p><b>Erythro-1-(4-O-β-D-glucopyranosyl-3-méthoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2,6-diméthoxyphenoxy]-1,3-propanediol</b></p>	
122		 <p><b>(7S, 8R)-urolignoside</b></p>	
123		 <p><b>(7S, 8R)-5-méthoxydihydrodédiconiferyl alcohol-4-O-β-D-glucopyranoside</b></p>	

124		 <p><b>Acérnikol-4''-O-β-D-glucopyranoside)</b></p>	
125	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>(2,3-Dihydro-2-(4-O-β-D-glucopyranosyl-3-méthoxy-Phényle)-3-hydroxyméthyle-5-(3-hydroxypropyl)-7-méthoxybenzofurane)</b></p>	[81]
126	<i>C. pinnatifida</i> Feuilles	 <p><b>Shanyenoside A</b></p>	[82]

Suite Tableau 22: Principales structures des lignanes isolés du genre *Crataegus*

#### II.4.3.6. Composés contenant de l'azote

Jusqu'à présent, sauf quelques composés azotés ont été isolés à partir des feuilles de *C. pinnatifida*. En 1990, les composés azotés isobutylamine (127), éthylamine (128), diméthylamine (129), triméthylamine (130), isoamylamine (131), éthanolamine (132), choline (133), acétylcholine (134), spermidine (135), la O-méthoxyphénéthylamine (136), la tyramine (137) et la phényléthylamine (138) ont été isolées et identifiées.



**Figure 1:** Principales structures chimiques des composés contenant de l'azote chez *C. pinnatifida*

#### II.4.4. Activités pharmacologiques :

Le genre *Crataegus* a été étudié pour plusieurs activités biologiques, notamment l'activité antihypertenseur, anti-arythmie, antioxydante, anti-inflammatoire, gastroprotectrice, antimicrobienne, antivirale et autres.

**Tableau 23:** Activités pharmacologiques de quelques espèces de *Crataegus*

Espèces	Parties	Activités pharmacologiques	Références
<i>C. tanacetifolia</i>	Feuilles	Activité	[83]
<i>C. oxyacantha</i>	/	antihypertenseur	[84]
<i>C. oxyacantha</i>	Feuilles	Activité anti-arythmique	[85]
<i>C. tanacetifolia</i>	/	Infarctus du myocarde	[86, 87]
<i>C. oxyacantha</i>	/		[88]
<i>C. oxyacantha</i>	/	anti-athéromate et coronarodilatant	[89]
<i>Crataegus meyeri</i>	/	Activité antiarythmique sur le myocarde ischémique	[90]
<i>C. oxyacantha</i> L <i>C. monogyna</i> Jacq	Baies	Insuffisance cardiaque congestive	[91]. [92]
<i>C. laevigata</i> <i>C. monogyna</i>	/	Activité antioxydante	[93]
<i>C. aronia</i>	Feuilles et		[94, 95]

	fruits non mûres		
<i>C. monogyna</i> , <i>C. oxycantha</i> <i>C. laevigata</i> <i>C. tanacetifolia</i> Lam	/	Activité anti-inflammatoire, gastroprotectrice,  Activité antimicrobienne	[96]
<i>C. aronia</i> var. <i>Aronia</i> , <i>C. monogyna</i> <i>C. pseudoheterophylla</i>	Feuilles et baies	Activité antivirale	[62]
<i>C. oxyacantha</i> <i>C. pinnatifida</i>	/	L'effet anxiolytique	[97,98]
<i>C. oxyacantha</i>	/	Activité antihyperlipdémique	[99 ,100]
<i>C. oxyacantha</i>	Fruits	Activité radioprotective	[101]
<i>C. pinnatifida</i>	Feuilles et fruits	Activité immunostimulante	[102]
<i>C. oxyacantha</i>	/	Activité inhibitrice diurétique /ACE	[103]
<i>C. oxyacantha</i>	/	Activité hypoglycémique	[103 ,104]
<i>C. pinnatifida</i>	Feuilles et fruits	Activité hépatoprotective	[102]
<i>C. pinnatifida</i>	/	Activité cytotoxique	[98]

**Suite Tableau 23:** Activités pharmacologiques de quelques espèces de *Crataegus*

## II.5. Conclusion

A l'issue de cet inventaire des métabolites secondaires isolés de genre *Crataegus* de la famille Rosaceae, il faut souligner la grande variété structurale des acides, triterpènes, stérols et composés phénoliques. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques. On citera en particulier les acides dicaféoylquiniques ; molécules naturelles d'origine végétales à haute valeur ajoutée pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, nutritionnels et agronomiques. Les iridoïdes naturels sont utilisés comme source de chiralité pour la conception de molécules bioactives que ce soit par la nature ou en synthèse. L'importance et le rôle des flavonoïdes, des triterpènes et des acides dans le domaine biologique sont bien connus.

**Références bibliographiques:**

- [1] Rodolphe-Edouard, S., Vincent, V., Savolainen, Murielle, F., Daniel, J., 2002. Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, *Presses polytechniques et universitaires romandes*, p. 188.
- [2] Takhtajan, A., 1893. Diversity and Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, New York.
- [3] Botineau, M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Tec et doc Lavoisier*, Paris.
- [4] Spighiger, R.E., Murielle, V.V.S., Jeanmonod, F.D. Botanique Systématique des Plantes à Fleurs. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes 3ème édition.
- [5] Michel, B., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, *Lavoisier*, p. 647.
- [6] <http://www.cosmovisions.com//rosacees.htm#5B4TtVZfpCPEdFLT.99.geo.gif>
- [7] Verma, S.K., Jain, V., Verma, D., Khamesra, R., 2007. *Crataegus oxyacantha*- A cardioprotective herb. *J Herbal Med Toxicol*, 1: 65-71.
- [8] Takhtajan, A., 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, New York.
- [9] Robertson, K.R., 1974. The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *J Arnold Arboretum*, 55: 303B-332, 334B-401, 611B-662.
- [10] Christensen, K., 1992. Revision of *crataegus* and nothosect. Crataeguineae (Rosaceae-Maloideae) in the old world. *Systematic Botany Monographs*, 35.
- [11] Aldasoro, J.J., Aedo, C., Navarro, C., 2005. Phylogenetic and phytogeographical relationships in maloideae (Rosaceae) based on morphological and anatomical characters. *Bulema* 50.
- [12] Glew, R.H., Ayaz, F.A., Sanz, C., Vanderjagt, D.J., Huang, H.S., Chuang, L.T., Strnad, M., 2003a. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. *Food Chem*, 83, 363–369.
- [13] Glew, R.H., Ayaz, F.A., Sanz, C., VanderJagt, D.J., Huang, H.S., Chuang, L.T., Strnad, M., 2003b. Effect of postharvest period on sugars, organic acids and fatty acids composition in commercially sold medlar (*Mespilus germanica* ‘Dutch’) fruit. *Eur. Food Res. Technol*, 216, 390–394.
- [14] Ayaz, F.A., Glew, R.H., Huang, H.S., Chuang, L.T., VanderJagt, D.J., Strnad, M., 2002a. Evolution of fatty acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) mesocarp at different stages of ripening. *Grasas Y Aceites*, 53, 352–356.
- [15] Chapman, G.W., Horvat, R.J., Payne, J.A., 1991. The nonvolatile acid and sugar composition of mayhaw fruits (*Crataegus aestivalis*, *C. opaca*, *C. rufula*). *J. Food Qual*, 14, 435–439.
- [16] Bignami, C., Paolocci, M., Scossa, A., Bertazza, G., 2003. Preliminary evaluation of nutritional and medicinal components of *Crataegus azarolus* fruits. *Acta Horti*, 597, 95–100.
- [17] Liu, P.Z., Kallio, H., Lu, D.G., Zhou, C.S., Ou, S.Y., Yang, B.R., 2010a. Acids, sugars, and sugar alcohols in Chinese hawthorn (*Crataegus spp.*) Fruits. *J. Agric. Food Chem*,

- 58, 1012–1019.
- [18] Gao, G.Y., Feng, Y.X., Qin, X.Q., 1995. Analysis of the chemical constituents of hawthorn fruits and their quality evaluation. *Yaoxue Xuebao*, 30, 138–143.
- [19] Ayaz, F.A., Huang, H.S., Chuang, L.T., Vanderjagt, D.J., Glew, R.H., 2002b. Fatty acid composition of medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of development. *Ital. J. Food Sci*, 14, 439–446.
- [20] DeBolt, S., Cook, D.R., Ford, C.M., 2006. L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 103, 5608–5613.
- [21] Bahri-Sahloul, R., Ammar, S., Grec, S., Harzallah-Skhiri, F., 2009b. Chemical characterisation of *Crataegus azarolus* L. fruit from 14 genotypes found in Tunisia. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*, 84, 23–28.
- [22] Hashempour, A., Ghazvini, R.F., Bakhshi, D., Ghasemnezhad, M., Sharafti, M., Ahmadian, H., 2010. Ascorbic acid, anthocyanins, and phenolics contents and antioxidant activity of ber, azarole, raspberry, and cornelian cherry fruit genotypes growing in Iran. *Hortic. Environ. Biotechnol*, 51, 83–88.
- [23] Lee, Y.C., Chuah, A.M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., 2008. Antioxidant activity of traditional Chinese medicinal herbs. *Food Sci. Technol. Res.* 14, 205–210.
- [24] Zhang, P.C., Xu, S.X., Guo, H. 1999. Study on chemical component in the fruit of *Crataegus pinnatifida*. *J. Shenyang Inst. Chem. Technol*, 16, 87–89.
- [25] Sun, X.F.; Yao, Q.Y., 1987. Chemical constituents from seed of *Crataegus pinnatifida* Bge. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*, 18, 441–454.
- [26] Evdokimova, O.V., Samylina, I.A., Nesterova, O.V., 1992. Examination of a lipophilic *Crataegus* fruit fraction. *Farmatsiya*, 41, 60–61.
- [27] Huang, X.X., Niu, C., Gao, P.Y., Li, L.Z., Ming, M., Song, S.J., 2010. Chemical constituents from the leaves of the *Crataegus pinnatifida* Bge (III). *J. Shenyang Pharm. Univ.* 27, 615–618.
- [28] Wang, X.S., Che, Q.M., Li, Y.M., He, Y.Q., 1999. A study on chemical constituents in seeds of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. Major N. E. Br. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 17, 739–740.
- [29] Demiray, S., Pintado, M.E., Castro, P.M.L., 2009. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Acad Sci Eng Technol*, 54: 312-317.
- [30] Shi, G.F., An, L.J., Jiang, B., Guan, S., Bao, Y.M., 2006. Alpinia protocathechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. *Neurosci. Lett*, 403, 206–210.
- [31] Schrall, R., Becker, H., 1977. Production of catechins and oligomeric proanthocyanidins in callus and suspension cultures of *Crataegus monogyna*, *C. oxyacantha* and *Ginkgo biloba*. *Planta Med*, 4, 297–318.
- [32] Dewick, P.M., 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, SXW, UK.
- [33] Bahri-Sahloul, R., Ammar, S., Fredj, R.B., Saguem, S., Grec, S., Trotin, F., Skhiri, F.H., 2009a. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. *Pak. J. Biol. Sci*, 12, 660–668.

- [34] Gulcin, I., Topal, F., Sarıkaya, S.B.O., Bursal, E., Bilsel, G., Goren, A.C., 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Rec. Nat. Prod.*, 5, 158–175.
- [35] Mericli, A.H., Ergezen, K., 1994. Flavonoids of *Crataegus tanacetifolia* (Rosaceae), an endemic species from Turkey. *Sci. Pharm.*, 3, 277–281.
- [36] Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J.L., Trotin, F., Grec, S., 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem.*, 115, 897–903.
- [37] Chen, J.H., Ho, C.T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374–2378.
- [38] Yeh, C.T., Yen, G.C., 2003. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 1474–1479.
- [39] Gao, P.Y., Li, L.Z., Peng, Y., Li, F.F., Niu, C., Huang, X.X., Ming, M., Song, S.J., 2010. Monoterpene and lignin glycosides in the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 38, 988–992.
- [40] Song, S.J., Li, L.Z., Gao, P.Y., Peng, Y., Yang, J.Y., Wu, C.F., 2011. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Food Chem.*, 129, 933–939.
- [41] Han, S.K., Ko, Y.I., Park, S.J., Jin, I.J., Kim, Y.M., 1997. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, 32, 769–773.
- [42] Chen, L.S., Lv, L., Xu, S.W., Xin, Y., 2008. Study on the Triterpene Acids in Fruit of *Crataegus pinnatifida*. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.*, 19, 2909–2910.
- [43] Shi, Y.P., Ding, X.B., 2000. Studies on chemical constituents from fruit of *Crataegus pinnatifida*. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*, 3, 173–175.
- [44] Park, S.-W., Yook, C.-S., Lee, H.-K., 1994. Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var *psilosa*. *Kor. J. Pharmacog.*, 25, 328–335.
- [45] Ahn, K.S., Hahm, M.S., Park, E.J., Lee, H.K., Kim, I.H., 1998. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* is a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. *Planta Med.*, 64, 468–470.
- [46] Ikeda, T., Ogawa, Y., Nohara, T., 1999. A new triterpenoid from *Crataegus cuneata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 1487–1488.
- [47] Song, S.J., Chen, J., Kou, X., Song, Y.H., Xu, S.X., 2006. Chemical constituents from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge (I). *J. Shenyang Pharm. Univ.*, 23, 88–90.
- [48] García, M.D., Sáenz, M.T., Ahumada, M.C., 1997. A.Cert.Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *J. Chromatogr. A* 767, 340–342.
- [49] Melikoglu, G., Bitis, L., Mericli, A.H., 2004. Flavonoids of *Crataegus microphylla*. *Natural. Product. Reserch*, 18, 211–213.
- [50] Melikoglu, G., Mericli, F., Mericli, A.H., 1999. Flavonoids of *Crataegus orientalis*. *Boll. Chim. Farm.*, 7, 351–352.
- [51] Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., Aruoma, O.I., 2003. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung*, 47: 191-198.
- [52] Nikolov, N.T., Vodenicharov, R.I., 2003. Di-C-glycosides from *Crataegus monogyna*.

- Chem Nat Compd*, 11: 436-437.
- [53] Titova, A.A., Batyuk, V.S., 1986. C-glycosides of *crataegus curvisepala*. *Chem. Nat. Compd*, 22, 348.
- [54] Ringl, A., Prinz, S., Huefner, A., Kurzmann, M., Kopp, B., 2007. Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (R)- and (S)-eriodietyl-7-O-glucuronide and luteolin-7-O-glucuronide. *Chem. Biodiv*, 4, 154–162.
- [55] Nikolov, N., Batyuk, V.S., Kovalev, I.P., Ivanov, V., 1973. Glycoflavonoids of *crataegus monogyna* and *C. pentagyna*. *Chem. Nat. Compd*, 9, 110.
- [56] Bykov, V.I., Glyzin, V.I., Ban'kovskii, A.I., 1972. Flavonoids of the genus *crataegus*. The structure of bioquercetin. *Chem. Nat. Compd*, 8, 657.
- [57] Bykov, V.I., Glyzin, V.I., 1972. Flavonoids of the genus *Crataegus*. *Chem Nat Compd*, 8: 672-673.
- [58] Sozer, U., Donmez, A.A., Mericli, A.H., 2006. Constituents from the leaves of *Crataegus davisii* Browicz. *Sci. Pharm*, 74, 203–208.
- [59] Nikolov, N., 1975. New flavone c-biosides from *Crataegus monogyna* and *Cr. Pentagyna*. *Chem. Nat. Compd*, 11, 434–435.
- [60] Batyuk, V.S., Prokopenko, A.P., Kolesnikov, D.G., 1965. New flavonoids from the leaves of *Crataegus curvisepala* Lindm. *Chem. Nat. Compd*, 1, 225–226.
- [61] Aneta, W., Oszmianski, J., 2007. Influence of polyphenols isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Crataegus oxyacantha* on the oxidative stability of cholesterol in butter stored in various conditions. *Eur Food Res Technol* 224: 635-642.
- [62] Orhan, I., Ozcelik, B., Kartal, M., Ozdeveci, B., Duman, H., 2007. HPLC quantification of vitexine-2-O-rhamnoside and hyperoside in three *Crataegus* species and their antimicrobial and antiviral activities. *Chromatographia*, 66, S153–S157.
- [63] El-Mousallamy, A.M.D., 1998. Chemical investigation of the constitutive flavonoid glycosides of the leaves of *Crataegus sinaica*. *Natral Product. Sci*, 4, 53–57.
- [64] Nikolov, N., Dellamonica, G., Chopin, J., 1981. Di-c-glycosyl flavones from *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry*, 20, 2780–2781.
- [65] Batyuk, V.S., Chernobrovaya, N.V., Prokopenko, A.P., 1966. Cratenacin-A new flavone glycoside from *Crataegus curvisepala*. *Chem. Nat. Compd*, 2, 90–93.
- [66] Kashnikova, M.V., 1984. Flavonoids of the flowers of *Crataegus sanguinea*. *Chem. Nat. Compd*, 20, 105–106.
- [67] Sözer, U., Dönmez, A.A., Mericli, A.H., 2006. Constituents from the leaves of *Crataegus davisii* Browicz. *Sci. Pharm*, 74, 203–208.
- [68] Zhang, P.C., Xu, S.X., 2001. Chemical constituents from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. Major N.E.Br. *Yao Xue Xue Bao* 10, 754–757.
- [69] Batyuk, V.S., Prokopenko, A.P., Kolesnikov, D.G., 1965. New flavonoids from the leaves of *Crataegus curvisepala* Lindm. *Chem. Nat. Compd*, 1, 225–226.
- [70] Mericli, A.H., Ergezen, K., 1994. Flavonoids of *Crataegus tanacetifolia* (Rosaceae), an endemic species from Turkey. *Sci. Pharm*, 3, 277–281.
- [71] Bykov, V.I., Glyzin, V.I., Ban'kovskii, A.I., 1972. Flavonoids of the genus *crataegus*. The structure of bioquercetin. *Chem. Nat. Compd*, 8, 657.

- [72] Bykov, V.I., Glyzin, V.I., Ban'kovakii, A.I., 1972. Pinnatifidin-a new flavonol glycoside from *Crataegus pinnatifida*. *Chem. Nat. Compd.* 8, 699–701.
- [73] Zhao, Y.P., Wang, C.X., Du, L.X., 2002. Study on chemical constituents in fruits and leaves of *Crataegus* L. *Beverage Ind*, 6, 8–12.
- [74] Kowalewski, Z., Mrugasiewicz, K., 1971. New falvanone glycosides in *Crataegus phaenopyeum*. *Planta Med*, 19, 311–317.
- [75] Shahat, A.A.; Ismail, S.I., Hammouda, F.M., Azzam, A.A., Lemiere, G., de-Bruyne, T., de-Swaef, S., Pieters, L., Vlietinck, A., 1998. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine* 2, 133–136.
- [76] Nikolov, N., Batyuk, V.S., Ivanov, V., 1973. Crateside—A new flavonol glycoside from *Crataegus monogyna* and *C.pentagyna*. *Chem Nat Comp*, 9, 150–151.
- [77] Schroder, D., Weiser, M., Klein, P., 2003. Efficacy of a homeopathic *Crataegus* preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency: results of an observational cohort study. *Eur J Heart Fail*, 5: 319-26.
- [78] Petrova, V.P., 1972. Catechins and leuconathocyanins of *Crataegus* fruit. *Ukr. Bot. Zh*, 2, 144–147.
- [79] Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J.P., Laakso, I., Hiltunen, R., 2002. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*, 60, 821–825.
- [80] Gao, P.-Y., Li, L.-Z., Peng, Y., Li, F.-F., Niu, C., Huang, X.-X., Ming, M., Song, S.-J., 2010. Monoterpene and lignan glycosides in the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Biochem. Syst. Ecol*, 38, 988–992
- [81] Hao, D.F., Yang, R.P., Zhou, Y.Z., Chen, H., Li, Z.F., Pei, Y.H. 2009. Chemical constituents from the leaves of the *Crataegus pinnatifida* Bge (II). *J. Shenyang Pharm. Univ*, 26, 282–284.
- [82] Chen, J., Song, S.J., He, J., Xu, S.X., 2006. A new biphenyl glucoside from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *J. Shenyang Pharma. Univ.* 23, 430–431.
- [83] Kocyildiz, Z.C., Birman, H., Olgac, V., Akgun-Dar, K., Meliko, G., Mericli, A.H., 2006. *Crataegus tanacetifolia* leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytother Res*, 20: 6-70.
- [84] Chopdat, I.F., 2000. The efficacy of *Crataegus oxyacantha* on refractory hypertension in males. Faculty of Health Sciences, *Johannesburg*. Pp, 51-82.
- [85] Long, S.R., Carey, R.A., Crofoot, K.M., Proteau, P.J., Filtz, T.M., 2006. Effect of 2012. hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*, 13: 643-650.
- [86] Wagner, H., Grevel, J., 1982. Cardioactive drugs IV. *Planta Med* 6: 98-101.
- [87] Kocyildiz, Z.C., Birman, H., Olgac, V., Akgun-Dar, K., Meliko, G., Mericli, A.H., 2006. *Crataegus tanacetifolia* leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytother Res*, 20: 6-70.
- [88] Jayalakshmi, R., Thirupurasundari, C.J., Niranjali, D.S., 2006. Pretreatment with alcoholic extract of *Crataegus oxyacantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol -induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*, 292: 59-67.
- [89] Petkov, V., 1979. Plants and hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am J Chinese Med*, 3: 197- 236.

- [90] Garjani, A., Nazemiyeh, H., Maleki, N., Valizadeh, H., 2000. Effects of extracts from flowering tops of *Crataegus meyeri* A. Pojark. on ischaemic arrhythmias in anaesthetized rats. *Phytother Res*, 14: 428-431.
- [91] Blesken, R., 1992. *Crataegus* in cardiology. *Fortschr Med*, 15: 290-292.
- [92] Furst, R., Zirrgiebel, U., Totzke, F., Zahler, S., Vollmar, AM., Koch, E., 2010. The *Crataegus* extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-beta. *Atherosclerosis*, 2: 409-417.
- [93] Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, B.P., Warber, S., Bolling, S., Chang, C.S. 2003. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agr Food Chem*, 51: 3973-3976.
- [94] Ljubuncic, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A., 2005. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *J. Ethnopharmacol*, 101: 153-161.
- [95] Ebrahimzadeh, M.A., Bahramian, F., 2009. Antioxidant activity of *Crataegus pentaegyna subsp.* fruits extracts used in traditional medicine in Iran. *Pak. J. Biol. Sci*, 12, 413-419.
- [96] Benli, M., Yig, N., Geven, F., Kerim, G., Bingo, U., 2008. Antimicrobial activity of endemic *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers and observation of the inhibition effect on bacterial cells. *Cell Biochem Funct*, 26: 844-851.
- [97] Hanus, M., Lafon, J., Mathieu, M., 2004. Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr Med Res Opin*, 20: 63-71.
- [98] Min, B.S., Kim, Y.H., Lee, S.M., Jung, H.J., Lee, J.S., Na, M.K., Lee, C.O., Lee, J.P., Bae, K., 2000. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch Pharm Res*, 23: 155-158.
- [99] Akila, M., Devaraj, H., 2008. Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. *Vasc Pharmacol*, 49(4-6): 173-177
- [100] Kanyonga, M.P., Faouzi, M.Y.A., Zellou, A., Essassi, M., Cherrah, Y., 2011. Effect of methanolic extract of *Crataegus oxyacantha* on blood haemostasis in rats. *J Chem Pharm Res*, 3(3): 713-717.
- [101] Hosseinimehr, S.J., Azadbakht, M., Mousavi, S.M., Mahmoudzadeh, A., Akhlaghpour, S., 2007. Radioprotective effects of hawthorn fruit extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res*, 48: 63-67.
- [102] Li, F., Yuan, Q., Rashid, F., 2009. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. *Carbohydr Polym*, 78: 80-88.
- [103] Schroder, D., Weiser, M., Klein, P., 2003. Efficacy of a homeopathic *Crataegus* preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency: results of an observational cohort study. *Eur J Heart Fail*, 5: 319-26.
- [104] Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 99: 325-348.

# Chapitre III

*Étude phytochimique*

### III.1. Introduction

Comme il a été décrit dans le premier et le deuxième chapitre les principaux métabolites secondaires du genre *Crataegus* et *Cytisus* sont, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les iridoïdes. Dans ce qui suit nous nous intéressons à l'espèce, *Crataegus oxyacantha* L., et l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her.

### III.2. Investigation phytochimique de l'espèce *Crataegus oxyacantha* L.

#### III.2.1. Critère de choix de cette espèce

Plusieurs critères ont guidé le choix de cette étude, parmi lesquels on cite :

- ☞ Son intérêt économique et ses utilisations. C'est une plante de grand intérêt économique dans l'alimentation humaine et en pharmacopée [1]
- ☞ Son utilisation en médecine traditionnelle [1,2]
- ☞ Notre intérêt prononcé au genre *Crataegus* qui a la capacité d'accumuler des molécules à activité biologique potentielle, notamment les flavonoïdes.
- ☞ Les résultats des investigations phytochimiques et biologiques obtenus sur cette espèce, nous ont encouragés à entreprendre cette étude à la recherche de nouvelles molécules.

#### III.2.2. Place dans la systématique botanique

Ce classement se réfère à la classification botanique [3,4] Tableau 24:

**Tableau 24:** Classification taxonomique de *Crataegus oxyacantha* Linn.

<b>Royaume</b>	Plantae
<b>Division</b>	Angiosperme
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Rosales
<b>Famille</b>	Rosaceae
<b>Sous-famille</b>	Maloidae
<b>Tribe</b>	Crataegeae
<b>Genre</b>	<i>Crataegus</i>
<b>Espèce</b>	<i>C. oxyacantha</i> Linn.

**Tableau 25:** Classification phylogénique APG IV 2016 de *Crataegus oxyacantha* Linn.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Clade</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Rosidées
<b>Ordre</b>	Rosales
<b>Famille</b>	Rosacées
<b>Sous famille</b>	Spiraeoïdées
<b>Genre</b>	<i>Crataegus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Crataegus laevigata</i> (Poir).DC
<b>Synonymes</b>	<i>Crataegus oxyacantha</i> (L) auct, <i>Crataegus oxyacanthoides</i> . Thuill

**III.2.3. Nom vernaculaire:** [5]

Anglais: Hawthorn, May Thorn, harthorne, haw.

Hindi: Vansaangli

Nom local: Pandaakh

**III.2.4. Noms Latins:** *Crataegus laevigata* (Poir.).DC, (également connu comme *Crataegus oxyacantha*), *Crataegus monogyna*, tient son étymologie du latin: *crataegus* ou « kratos » dont la signification en français exprime la branche dure par allusion à la dureté de cet arbrisseau. [1,6]

**III.2.5. Noms communs**

Cette espèce est connue en France sous les noms suivants :

- **Aubépine** : obtenu suite à une déformation du nom latin « spina alba » puis « albispina » qui veut dire épine blanche [7].
- **Aubépine à deux styles** : vu que la fleur en présente deux [8].
- **Aubépine des haies, épine blanche** : vue qu'elle est armée d'épines sur ses branches claires.
- **Epine de mai** en se référant au mois de mai, la saison de sa floraison [9].
- Et en vieux français on l'appelait **albispine** puis **albispin** [7].

Les anglais utilisent les appellations de : **hawthorn** qui tient sa racine d'un mot composé anglais ancien « hagathorn » dont hedge=haie ; thorn=épine [10], **haws, may bush, may bollossom, white thorn, hawthorn midland** [11].

En langue arabe littéraire cet arbrisseau porte la nomination de : الزعرور **Zaaror** [12]. Quant aux noms vernaculaires les plus répandus en Algérie sont: Baba adjina (بابا عجينة), Boumekherri (بومخري) [13]. Dans la région de Tlemcen les branches sont connus sous le nom de : Ain baquera (عين البقرة) quant au fruit, on l'appelle Zaaror (الزعرور).

Les noms berbères ou targui sont: **Admamai, Allmène, Idmine**, à Jijel (الدمام). [13].

### III.2.6. Description morphologique

Le nom de l'espèce *oxyacantha*, dérive du grec Mots « oxus » signifiant aigue ou pointue, et « akantha » signifiant une épine [14]. Un arbre à feuilles caduques de petite à moyenne taille aux rosacées avec des grappes en forme de parapluie de fleurs blanches ou roses, brillant.

**Les feuilles** dentées et les baies rouges brillantes et brillantes.

**Les fleurs** de couleur blanche sont portées à l'intérieur d'inflorescences à tête plate appelées corymbes ou dans des inflorescences globulaires appelées umbels et contiennent habituellement 5 pétales, 5 à 18 étamines et ont une odeur rance.

**Les fruits** d'*oxyacantha* (Figure 2) sont connus sous le nom de pommes, bien que les graines et leurs endocarpes osseuses soient appelés pyrenes. Entre 1 et 5 pyrenes sont produites en chaque pomme.

**Le calice** est persistant au sommet du fruit, il renferme cinq sépales libres de couleur verte-brune d'un aspect glabre et de forme triangulaire.

**La corolle** est aussi pentamère et libre, blanchâtre de forme arrondie à approximativement ovale. **Les épines** sont de petites branches à pointes pointues qui proviennent d'autres branches ou du tronc et ont généralement une longueur de 1-3 cm.

**Le tronc** ou **la tige** de *C. oxyacantha* a été difficile bois, écorces lisses et gris-gris et branches épineuses [15, 16].



**Figure 2:** *Crataegus oxyacantha* Linn.: (Illustration des différentes parties de l'appareil végétatif (branche comportant des épines, feuilles lobés) et reproducteur (sommités fleuris, baies) [15].

### III.2.7. Répartition géographique

Ces arbres de petite et moyenne taille (5-15 m de haut) sont cultivés et spontanée dans les pays du Maghreb, en Algérie et au Maroc où elle est commune, en Tunisie ainsi que dans tous les pays d'Europe notamment en France et en Asie occidentale; et se retrouvent principalement dans des régions tempérées comme l'Amérique du Nord, l'Inde, la Chine et l'Afrique du Nord. Dans les années 1800, les colons britanniques l'ont introduit en Tasmanie et dans d'autres parties de l'Australie en tant que haie, et il court maintenant à Victoria, à Tasmanie, aux collines d'Adélaïde et aux plateaux de Nouvelle-Galles du Sud. *Crataegus* est une plante agressive qui est tenace et difficile à éliminer. En Inde, il se trouve dans l'Himalaya modéré, le Cachemire et l'Himachal Pradesh, à une altitude de 1800-3000 mètre. [15,17, 18].

En Algérie, *Crataegus oxyacantha* Linn., est commune dans tout le pays, sauf sur les hauts plateaux; elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tellien, elle peut être confondue avec d'autres espèces [19].

### III.2.8. Usages traditionnels

*C. oxyacantha* Linn. est une plante fruitière ayant une longue histoire dans la médecine traditionnelle. Il a été utilisé traditionnellement:

En Algérie, pour apaiser les troubles intestinaux et lutter contre l'hypertension [20].

En Chine comme boisson populaire chinoise et pour abaisser les taux de lipides sanguins chez les humains et les rats [21]. En Europe, comme cardiotoniques, diurétiques, hypotensifs et comme agent anti athérosclérose [20, 22, 23], En Irlande, pour traiter diverses affections du cœur [24]. En Amérique, comme médicaments par groupes autochtones [24].

Les hindous se servaient des feuilles sous forme de cataplasme pour faire disparaître les furoncles, les plaies et les ulcères alors que la décoction des racines est utilisée comme diurétique [22]. En Turquie, cette plante a été utilisée en cas d'hémorroïdes et contre le diabète [25]. Comme un tonique cardiaque et les utilisations actuelles incluent le traitement de l'angine, de l'hypertension, des arythmies, de l'insuffisance cardiaque congestive [26].

D'autres usages de l'aubépine ont inclus dans le traitement des affections digestives, la dyspnée, les calculs rénaux. Aujourd'hui, l'aubépine est utilisé principalement pour diverses maladies cardiovasculaires, mais il n'est pas encore entré en Inde comme tonique cardiaque [27].

### III.2.9. Travaux antérieurs

#### III.2.9.1. Phytochimie

*C. oxyacantha* L. contient du glycoside d'heptahydroxy flavane, des polymères de flavane [28, 29]. Les composants flavonoïdes et les procyanidines oligomères, en tant que constituants clés de *C. oxyacantha*, sont responsables de son potentiel thérapeutique [23].

Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les baies. Les Principaux phytoconstituants de *C. oxyacantha* ont été mentionnés dans le Tableau 26.

Tableau 26: Phytoconstituants de *C. oxyacantha* L.

Partie de plante	Nom du composé	Zone de recherche	Année	Référence
<b>Données reportées</b>				
Fruits, Feuilles	Hépta Hydroxy Flavone glycoside	Allemagne	1955	[28]
Fruits, Feuilles	Polymères de flavane	Allemagne	1967	[29]
Feuilles, Fleurs	Monoamines noradrénaline, adrénaline, dopamine et L-DOPA	Italie	2007	[30]
Feuilles, Fruits	Procyanidines	Pologne	2007	[31]
Feuilles, Fleurs	Les flavonoïdes tels que la Vitexine-2"-O-Rhamnoside, l'hyperoside et les procyanidines oligomères	Italie	2007	[32]
Feuilles	3-O-Acide-Caffeoylquinique (A), Vitexine 2"- $\alpha$ -L-Rhamnoside (B), Vitexine-2"-(4-O-Acétyle- $\alpha$ -L-Rhamnoside) (C), 9-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4,9-dihydroxy-3-methoxypropionophénone (D) Acide 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-p-coumarique (E)	Japon	2007	[33]
<b>Données révisées</b>				
Fruits, fleurs, feuilles	Sotautylamine, O-méthoxy phényléthylamine, Acide ursolique, Acide oléanolique, Acide Cratégolique, Adénosine Adénine, Guanine, Acide Caféique, Quercétine, Hyperoside, Rutine, Vitamine C, Vitexin-4'-Rhamnoside, Epicatéchol, Tyramine	Inde	2007	[18]

### III.2.9.2. Activités pharmacologiques

Le fruit rouge est riche en flavonoïdes et est la partie la plus fréquente dans la phytothérapie. Divers extraits de *C. oxyacantha*. Sont évalués pour le dépistage des modèles in vitro/in vivo. Dans les études expérimentales, l'activité hypolipidémique, anti-inflammatoire et anti-anxiété des baies de *C. oxyacantha* a été confirmée [1,34, 35] Du point de vue médicinal, les extraits de fruits d'aubépine contiennent une forte proportion de composés polyphénoliques et présentent de bonnes activités antioxydantes et antimicrobiennes. Les composés phénoliques ont principalement porté sur l'activité antioxydante des extraits de fruits. Ainsi, le fruit

d'aubépine a une importance biologique significative pour ses propriétés antioxydantes et microbiologiques [36]. Les bioflavonoïdes de *C. oxyacantha* se détendent et dilatent les artères, en particulier les artères coronaires. Cela augmente le flux sanguin du muscle cardiaque et réduit les symptômes de l'angine et les contractions du muscle cardiaque [37]. Les bioflavonoïdes sont également fortement antioxydants, contribuant à réduire la dégénérescence des vaisseaux sanguins [38,39].

Diverses activités pharmacologiques de *C. oxyacantha*. ont été mentionnés dans le Tableau 27.

**Tableau 27:** Activités pharmacologiques de l'espèce *C. oxyacantha* L.

Partie utilisée	Extraction	Extrait	Activité biologique	Zone de recherche	Année	Référence
Feuilles	Percolation	Aqueuse	Hypotensive	Banque de l'ouest	1987	[40]
Baies	Percolation	Alcoolique	Hypolipidémie	Inde	1994	[41]
Écorce	Extraction à chaud	Acétone - acétate d'éthyle	Antioxydante	Portugal	2000	[42]
Plante entière	86% de macération	Alcool	Hypotensive	Johannesburg	2000	[43]
Feuilles, Baies	Percolation	Méthanol	Inhibiteurs de l'ECA	France	2001	[44]
Baies	Extraction à chaud	49% d'éthanol	Cardioprotecteur	Suisse	2003	[45]
Feuilles, Baies	Percolation	Alcoolique	Anxiété et dépression	France	2004	[46]
Feuilles	Extraction à chaud	50% d'éthanol	Effet chronotrope négatif, Cardiotonique	Etats-Unis	2006	[47]
Baies	Percolation à froid	95% d'éthanol	Infarctus du myocarde	Etats-Unis	2006	[2]
Fleurs	Percolation	81% hydro-alcoolique	Antioxydante	Pologne	2007	[31]
Baies	Triple percolation	70% d'éthanol	Free-radical-balayage, Anti-inflammatoire, gastro-protecteur, Activités antimicrobiennes	Serbie	2011	[48]
Baies	Percolation	/	Hypolipidémique et antioxydant	Inde	2008	[49]
Feuilles, baies,	Percolation	/	Cardioprotecteur	Etats-Unis	2008	[50]

fleurs						
Fleurs	Percolation	Alcoolique	Inhibition du Thromboxane A2	Etats-Unis	2010	[51]
Feuilles, baies	Macération	Alcoolique	Immunomodulate	Inde	2010	[52]
Plante entière	Extraction à chaud	Méthanol	Hypolipidémie	Maroc	2011	[53]
Fruits frais	Macération	Ethanol	Antimicro*bienn e	Serbie	2012	[36]
Fleurs	/	/	Antimicrobienne	Algérie	2011	[54]
<b>Feuilles</b>	Macération	<i>n</i> -butanol	<b>Effets hépatoprotecteu rs</b>	Algérie	2018	[74 , 75]

Suite Tableau 27: Activités pharmacologiques de l'espèce *C. oxyacantha* L.

### III.2.9.3. Emplois

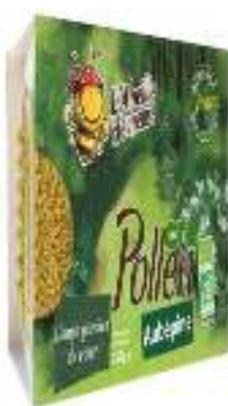
#### ✓ Produits naturels

*C. oxyacantha* se trouve comme **miel** de couleur ambrée et de consistance légèrement crémeuse ayant une saveur agréable et douce à la dégustation. Recommandé en tant que calmant, tonique du coeur, antispasmodique, apaisant dans les états de stress ou de nervosisme. Il est également bénéfique chez les artérioscléreux, dyspeptiques et les femmes présentant des troubles de la ménopause [55]. Elle est aussi utilisée comme **pollen** et **tisanes**, il est connu par sa richesse en fer, en vitamines (B6-B9-C) mais surtout par sa forte teneur en protéines végétales [56-58].

Les baies séchées sont préconisées principalement pour leur effet hypolipémiant [59].



Miel de *C. oxyacantha* [55].



Pollen cru de *C. oxyacantha* [56].



Tisanes de sommités fleuries de *C. oxyacantha* [58]



Baies entières séchées de *C. oxyacantha* [59]

**Figure 3:** Produits naturels préparés de *C. oxyacantha*

✓ **Préparations galéniques à base d'extrait d'aubépine :**

Elles se présentent sous différentes formes solides et liquides (gélules, comprimés, solutions buvables...). [60, 61]



**Figure 4:** Préparations commercialisées à base de *C. oxyacantha*

Ces compléments alimentaires contiennent des extraits de nature différente de fleurs, feuilles ou baies à des concentrations variables, ce qui est à l'origine de la diversité d'indication [60, 61]

✓ **Médicaments :**

*C. oxyacantha* se présente sous différentes formes de médicaments commercialisés en Europe et surtout en Allemagne. : (**Crataegutt**) ce médicament est indiqué dans l'insuffisance cardiaque de classe I ou II de NYHA. Il est capable également d'atténuer les symptômes liés à l'IC. (**Cardiocalm**) indiqué contre les palpitations, les troubles légers de sommeil ou comme traitement symptomatique de nervosité. [61],



**Figure 5:** Crataegutt et Cardiocalm : médicaments à base d'aubépine

### III.2.10. Protocole Expérimental

#### III.2.10.1. Récolte du matériel végétal

*C. oxyacantha* Linn. a été récoltée de la région de la wilaya de Mila (Est algérien), en Septembre 2014 et authentifiée par le professeur Mohamed Kaabache (département de botanique, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie). Un spécimen de référence (CO 24/09/14) a été déposé dans l'Herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine.

Les parties aériennes (feuilles et fruits) ont été séchées dans un endroit sec et à l'abri de la lumière du soleil et d'humidité ensuite broyées et pesées, et on obtient finalement (feuilles 800 g, fruits 460 g).

#### III.2.10.2. Extraction

##### III.2.10.2.1. Extraction solide liquide (ESL)

Les parties aériennes (feuilles 800 g et fruits 460 g) sont mises à macérer dans un mélange hydro alcoolique (Ethanol /Eau, 80/20 ; v/v) pendant 24 heures à température ambiante. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure 48, 72 heures. Cette opération effectuée à froid permet d'éviter la dégradation des produits thermolabiles.

Après la filtration, l'extrait hydro alcoolique récupéré est concentré sous pression réduite et une température environ de 35 °C, à cet extrait, on ajoute 400 ml d'eau distillée, puis on le laisse reposer pendant une nuit. Après filtration la solution aqueuse obtenue subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduites à sec et pesées.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme reporté dans la figure 6 et le rendement des phases organiques sont données dans le Tableau 28 :

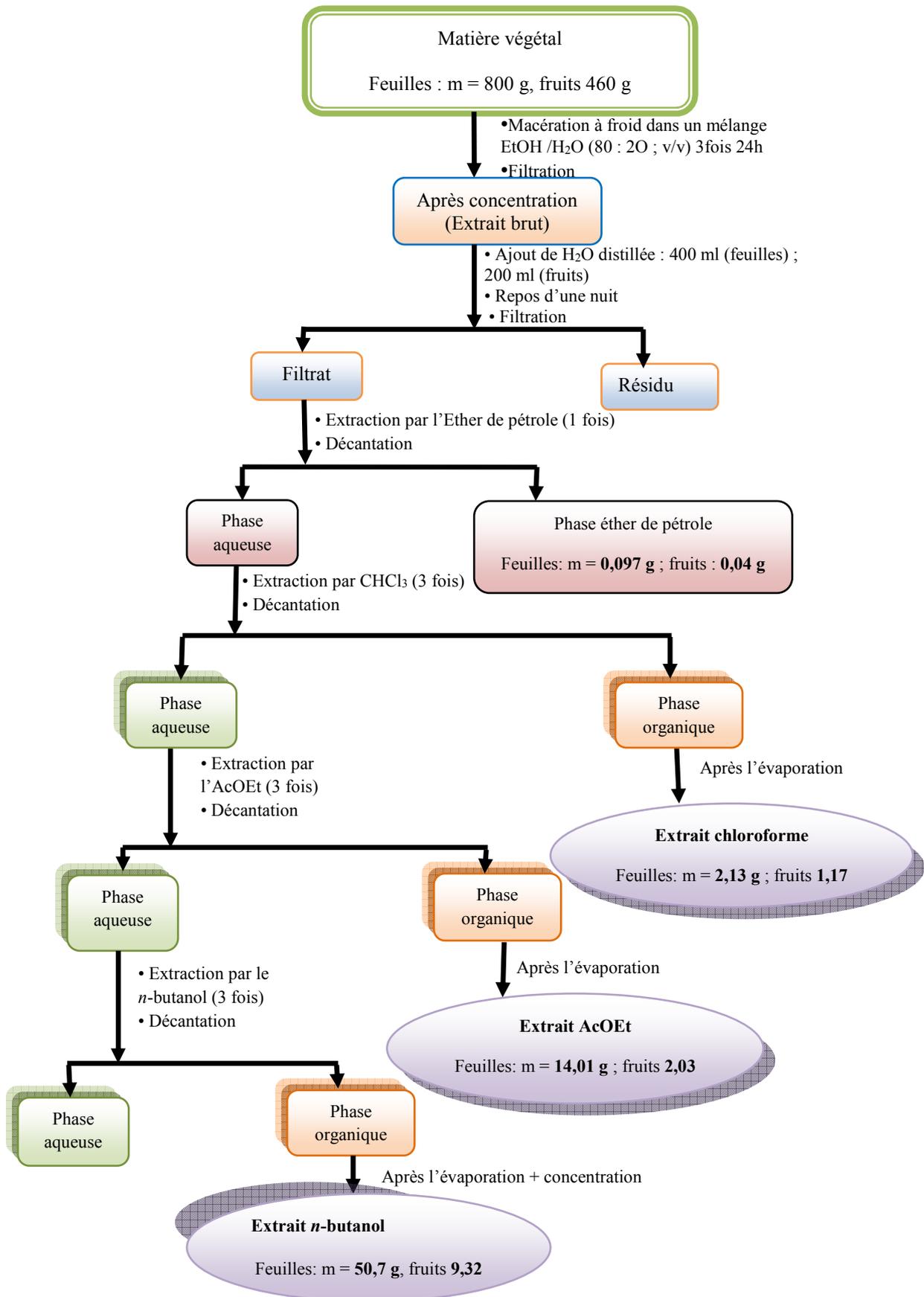


Figure 6: Extraction de *Crataegus oxyacantha* L. (Feuilles et fruits)

**Tableau 28:** Rendement des phases de *C. oxyacantha* Linn (Feuilles et fruits)

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
Feuilles : 800 g	Ether de pétrole	0,097	0,01
	Chloroforme	2,13	0,26
	Acétate d'éthyle	14,01	1,75
	<i>n</i> -Butanol	50,7	6,33
Fruits : 460 g	Ether de pétrole	0,04	0,008
	Chloroforme	1,17	0,25
	Acétate d'éthyle	2,03	0,44
	<i>n</i> -Butanol	9,32	2,02

### III.2.10.2.2. Méthode d'extraction MSPD : (Matrix Solid-Phase Dispersion)

#### III.2.10.2.2.1. Matériels et méthodes

##### ✓ 1. Produits chimiques

L'éthanol (EtOH) (98-100%) (Merck, Darmstadt, Allemagne), L'eau ultrapure a été produite en laboratoire avec un système de gradient Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

La procédure d'extraction de MSPD a été réalisée avec du sable de mer lavé (200-300  $\mu\text{m}$ , Scharlau) comme sorbant dispersant et du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 99%) acheté à Panreac (Barcelone, Espagne) comme agent de séchage. L'extraction de MSPD a été réalisée dans des cartouches en plastique de 15 mL disponibles dans le commerce.

Des frités de filtre de polyéthylène (PE) de taille de pores de 20  $\mu\text{m}$  de Supelco Analytique (Bellefonte, PA, USA) ont été utilisées pour compacter la phase de nettoyage et l'échantillon dispersé dans la colonne MSPD. L'eau, L'éthanol et les mélanges hydroéthanoliques de composition différente ont été testés en tant que solvant d'extraction.

Tous les solvants et réactifs étaient de qualité analytique. Les standards polyphénoliques purs (97 à 99%) ont toutes été fournies par Sigma-Aldrich (St. Louis, États-Unis). Des solutions stockées standard individuelles de 2000 - 8000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ont été préparées dans du méthanol. Les solutions de travail dans l'eau contenant les analytes cibles ont été obtenus par dilution appropriée. Les solutions ont été stockées à -20 °C et protégées de la lumière.

##### ✓ 2. Méthode (MSPD)

Un g d'échantillon de *C. oxyacantha* broyé a été mélangé doucement avec 4 g de la phase de dispersion (sable de mer) et 2 g de l'agent de séchage ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre) dans un mortier de

verre en utilisant un pilon de verre jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène (environ 5 min.). Ainsi, une fois le processus de mélange terminé, le mélange a été transféré dans une colonne MSPD remplie de 1 g de sable marin lavé au fond et munie d'une fritte de polypropylène (IST, 16 mm/20 µm).

Une deuxième fritte a été placée au dessus de l'échantillon avant compression avec un piston de seringue. L'élution a été faite par écoulement par gravité en utilisant de l'éthanol (EtOH 100%) ou différents mélanges d'EtOH:H<sub>2</sub>O (50 % : 50 %), et l'eau (H<sub>2</sub>O 100%). Le volume d'élution sélectionné était de 10 mL, et l'éluant a été recueilli dans un tube conique gradué (Figure 7 et 8).

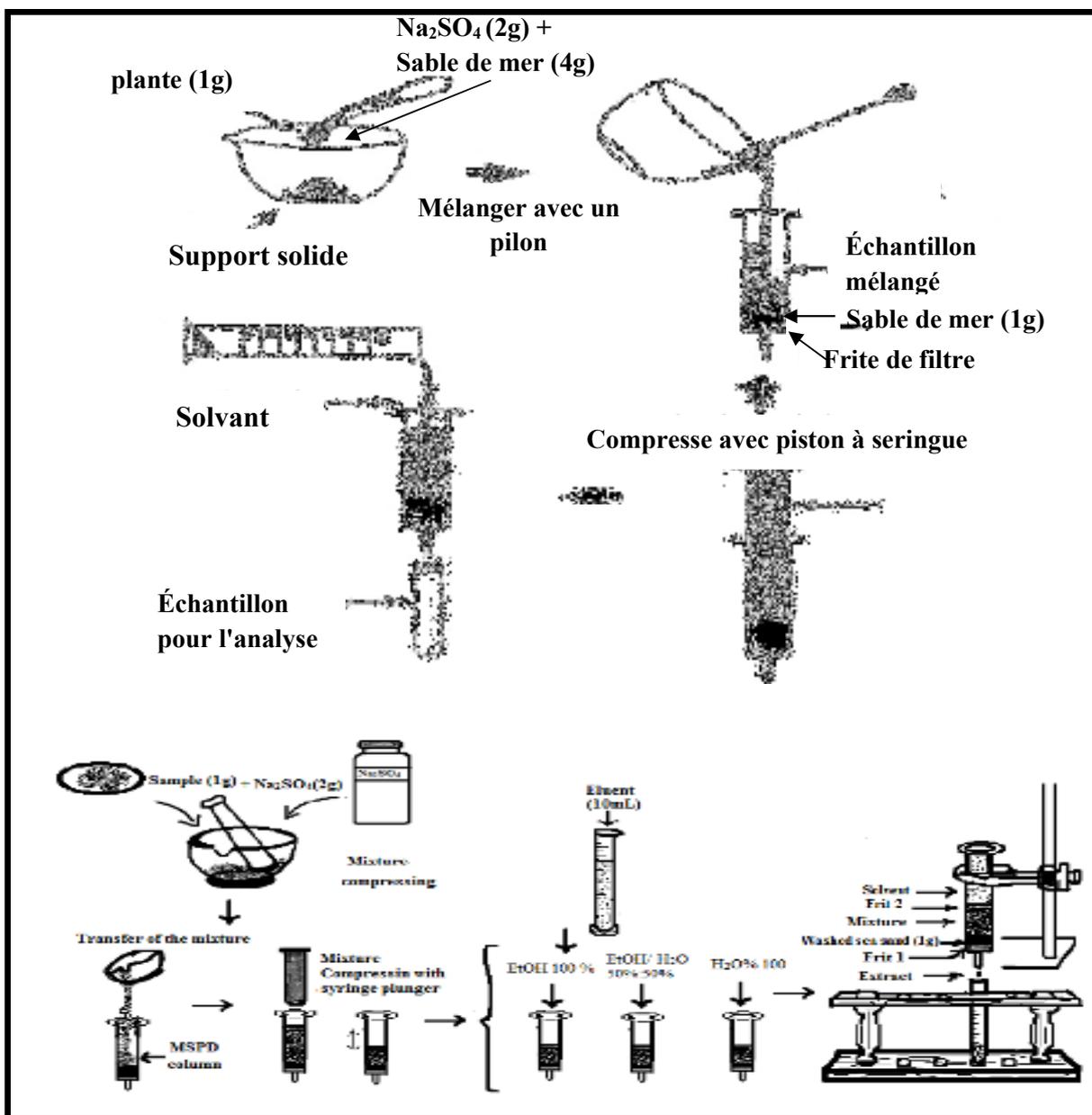


Figure 7: Procédure d'extraction (MSPD)

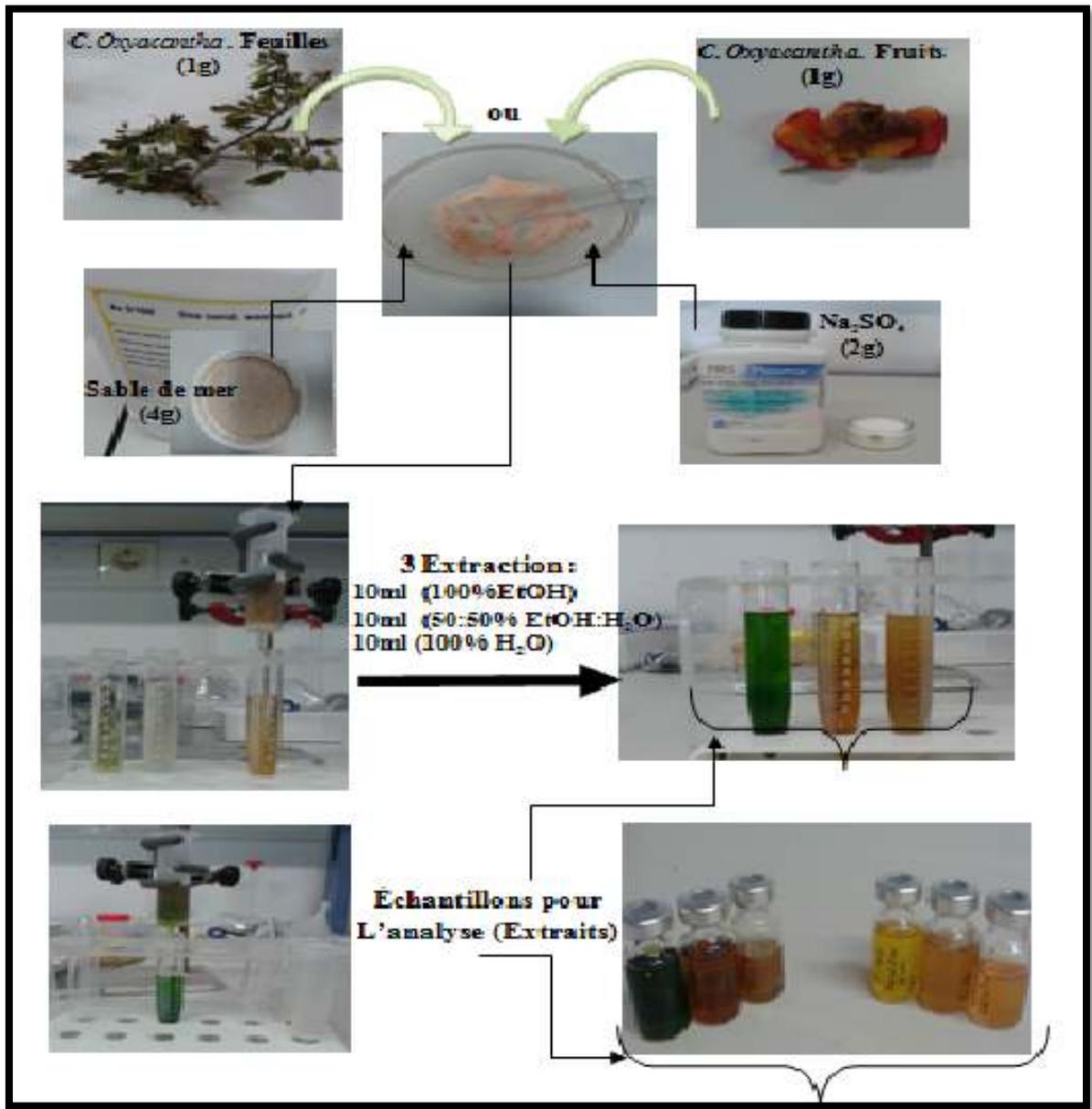


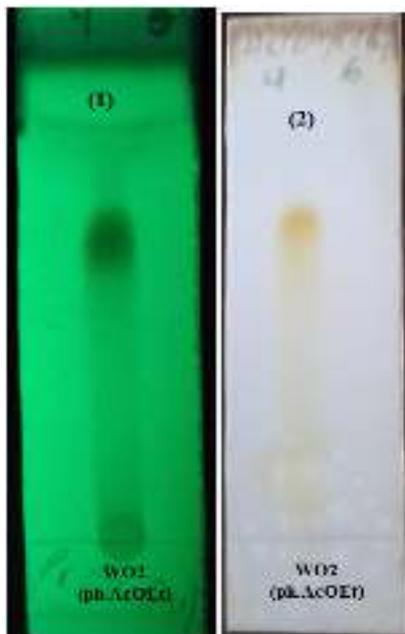
Figure 8: Extraction (MSPD) de *Crataegus oxyacantha* L.

### III.2.11. Étude des extraits (ESL (Feuilles))

Les extraits obtenus sont soumis à un traitement par chromatographie analytique, sur couche mince de gel de silice, pour mettre au point l'éluant, ou le système d'éluant, qui donnerait les meilleurs résultats de séparation, et également afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits. Notre choix s'est porté sur l'extrait acétate d'éthyle (feuilles), vu leur richesse en composés phénoliques.

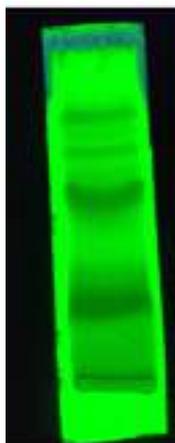
**III.2.11.1. Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle de *C. oxyacantha* (Feuilles)**

L'extrait AcOEt renferme un précipité jaune de bonne quantité, après filtration et plusieurs lavages avec les solvants MeOH et Acétone, on a obtenu le composé 1 (WO2, m = 300 mg), soluble dans le DMSO). Figure 9.



**Figure 9:** Plaque CCM du composé 1, (1) : dans le système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 6/4) sous lumière UV 254 nm, (2) : Révélateur (Anisaldéhyde).

Avant de faire la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium ; la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant Chloroforme/ Méthanol (8 : 2). Figure 10.



**Figure 10:** Plaque CCM de l'extrait AcOEt dans le système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH: 8/2) (Sous lumière UV 254 nm).

Ainsi une masse d'environ 9 g de l'extrait acétate d'éthyle (Feuilles), dissoute dans le méthanol est mélangé avec une petite quantité de gel de silice pour colonne, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), préparée dans le chloroforme.

L'élution a été réalisée par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradient de polarité avec un fractionnement tous les 50 ml du lot 1 au lot 74 et tous les 25 ml jusqu'à la fin puis un lavage final au méthanol pur. Le suivi de la colonne a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les lots sont regroupés selon la similitude de leur profil chromatographique en couche mince. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium avec plusieurs systèmes. Les plaques sont visualisées sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à  $100$  °C. Les lots de même composition sont rassemblés, on obtient ainsi 24 fractions. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 29.

**Tableau 29:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt de *C. oxyacantha*. (Feuilles)

lots (50 ml)	Fractions	Système d'élution %		Masse (g)	Observations
		CHCl <sub>3</sub>	MeOH		
1-27	Fr <sub>1</sub>	100	0	0,107	Mélange séparable (beaucoup de taches)
28-51		99	1		Mélange séparable
52-58	Fr <sub>2</sub>	98	2	0,169	Mélange séparable avec un produit majoritaire
59-66	Fr <sub>3</sub>	97	3	0,9	Mélange séparable
67-74	Fr <sub>4</sub>			0,7	Mélange séparable
lots (25ml)	Fr <sub>5</sub>			0,34	Mélange séparable avec un précipité blanc soluble dans l'AcOEt de faible quantité
75-79					
80-84	Fr <sub>6</sub>			0,32	Mélange séparable
85-90	Fr <sub>7</sub>			0,64	Mélange complexe
91-96	Fr <sub>8</sub>			96	4
97-101	F <sub>9</sub>	Mélange complexe			
102-107	Fr <sub>10</sub>	94	6		

					Produit majoritaire
108-114	Fr <sub>11</sub>			0,73	Mélange complexe
115-119	Fr <sub>12</sub>	92	8	1,25	Mélange donnant plusieurs taches
120-126	Fr <sub>13</sub>	90	10	0,21	Mélange donnant plusieurs taches
127-132	Fr <sub>14</sub>	88	12	0,111	Mélange séparable avec un Produit majoritaire
133-143	Fr <sub>15</sub>			0,301	
145-160	Fr <sub>16</sub>	85	15	0,45	Mélange séparable avec un Produit majoritaire
161-163					
164-168	Fr <sub>17</sub>	83	17	0,255	Mélange séparable avec un Produit majoritaire
169-176	Fr <sub>18</sub>			0,64	Traînée
178-180		80	20		
181-187	Fr <sub>19</sub>			0,401	Mélange donnant plusieurs taches
188-193					Mélange complexe
194-209	Fr <sub>20</sub>	78	22	0,39	
210-216		75	25		
217-225				0,254	Traînée
226-241	Fr <sub>21</sub>	70	30		Mélange donnant plusieurs taches
242-257		60	40		Traînée.
258-273	Fr <sub>22</sub>	50	50	0,200	Mélange complexe
274-289		40	60		Mélange complexe
290-306	Fr <sub>23</sub>	30	70	0,042	Mélange complexe
307-322		20	80		Mélange complexe
323-338	Fr <sub>24</sub>	10	90	0,07	Traînée.
339-354		0	100	0,016	Mélange complexe

**Suite Tableau 29:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt de *C. oxyacantha*. (Feuilles)

### III.2.11.2. Étude des fractions de l'extrait AcOEt

Parmi les 24 fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des fractions Fr<sub>10</sub>, Fr<sub>14</sub>, Fr<sub>15</sub>, Fr<sub>16</sub> et Fr<sub>17</sub> à cause de leur simplicité et de leur poids relativement important. Pour ces fractions on a utilisé les petites colonnes, les plaques préparatives et la recristallisation.

#### ➤ Étude de la fraction Fr<sub>10</sub>

La fraction Fr<sub>10</sub> (141 mg) additionnée de méthanol a montré la formation d'un précipité. Après filtration et lavage au méthanol, ce précipité a donné le composé **2** (WO<sub>3</sub>, m = 14 mg), soluble dans le DMSO

Le reste de la fraction a été rechromatographié sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh. Merck), éluée par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradient de polarité. Des sous fractions de 25 ml ont été récupérées et rassemblées en fonction de leurs profils chromatographiques pour donner 9 sous fractions. La sous fraction 5 (Fr<sub>10-5</sub>) correspondant à un produit pur sous forme d'une poudre représente le composé **3** (WO8, m = 6 mg, MeOH).

Les résultats de cette opération sont récapitulés dans le Tableau 30.

**Tableau 29:** Récapitulatif de la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction Fr<sub>10</sub>

CHCl <sub>3</sub> (%)	MeOH (%)	Volume (ml)	Sous-fractions	Observation
100	0	75	Fr <sub>10-1</sub>	Mélange complexe
90	10	30	Fr <sub>10-2</sub>	Mélange complexe
80	20	50	Fr <sub>10-3</sub>	Mélange séparable
70	30	75	Fr <sub>10-4</sub>	Mélange séparable
<b>65</b>	<b>35</b>	<b>50</b>	<b>Fr<sub>10-5</sub> (Composé 3)</b>	<b>Mono tache</b>
50	50	80	Fr <sub>10-6</sub>	Mélange complexe
45	55	65	Fr <sub>10-7</sub>	Mélange séparable
40	60	75	Fr <sub>10-8</sub>	Mélange complexe

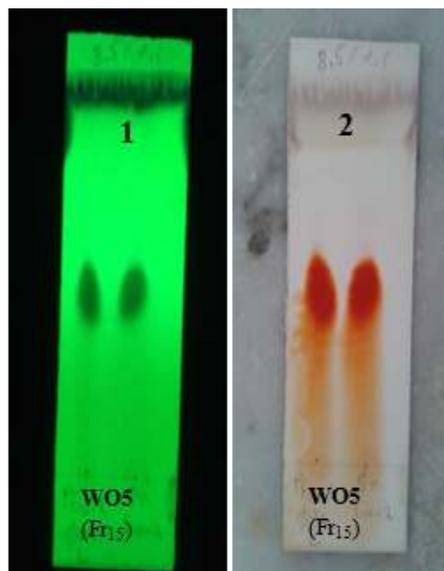
#### ➤ Étude de la fraction Fr<sub>14</sub>

La Fraction Fr<sub>14</sub> (111 mg) renferme un produit majoritaire sous-forme de cristaux blancs, qui a été purifié sur plaques analytiques de gel de silice, éluée par le système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 8/2)

pour donner le composé **4** (WO4, m = 14 mg, MeOH).

#### ➤ Étude de la fraction Fr<sub>15</sub>

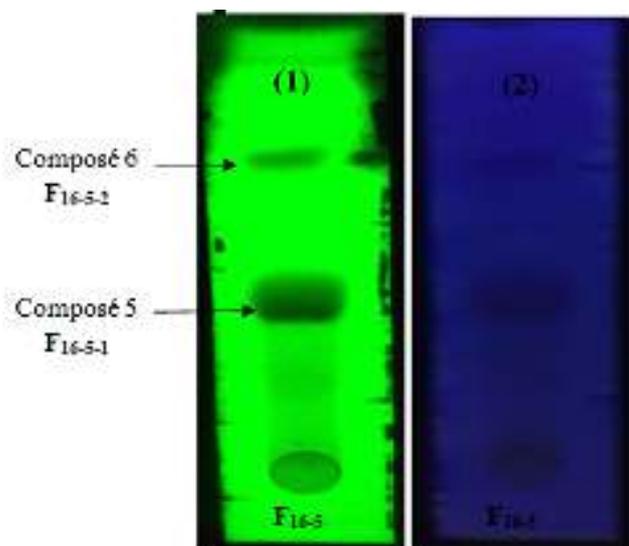
La fraction Fr<sub>15</sub> a été déposée sur plaques préparatives de gel de silice normale (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 7/3). En fin d'éluion, les plaques soumises à la lumière de Wood ont montré cinq bandes: la bande N°2 et la bande N°4 plus intenses que les autres, admettent une fluorescence noire violette pour la bande 2 et jaune pâle pour la bande 4 (365 nm), après récupération et éluion avec du méthanol, puis une purification ultime sur une colonne de gel de Séphadex LH-20, éluée par du méthanol, nous avons obtenu le produit **5** (WO5, m = 14,4 mg) soluble dans le MeOH + chauffage) (Figure 11), et le produit **6** (WO6, m = 4,2 mg) soluble dans le DMSO.



**Figure 11:** Plaque CCM du composé 5 ; (1): dans le système ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ : 8/2) sous lumière UV 254 nm ; (2): Révélateur (Anisaldéhyde).

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>16</sub>**

La chromatographie de la fraction Fr<sub>16</sub> (450 mg) sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh. Merck), éluée par le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  en gradient de polarité, a permis l'obtention de 14 sous-fractions, la purification du Fr<sub>16-5</sub> (30 mg) sur plaques préparatives a donné le composé **7** : Fr<sub>16-5-1</sub> (WO7, 12,7 mg, MeOH) et le composé **8** : Fr<sub>16-5-2</sub> (WO7', m = 2,3 mg, MeOH). Figure 12.



**Figure 12:** Plaques CCM du composés 7 et 8 dans le système ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  : 7/3) (Sous lumière (1) : UV 254 nm, (2) : 354 nm).

Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le Tableau31

**Tableau 31:** Récapitulatif de la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction **Fr<sub>16</sub>**

CHCl <sub>3</sub> (%)	MeOH (%)	Volume (ml)	Sous-fraction	Observations
100	0	75	Fr <sub>16-1</sub>	Traces
90	10	50	Fr <sub>16-2</sub>	Mélange complexe
80	20	65	Fr <sub>16-3</sub>	Mélange séparable
70	30	20	Fr <sub>16-4</sub>	Mélange séparable
60	40	80	<b>Fr<sub>16-5</sub></b>	<b>Tache majoritaire</b>
50	50	30	Fr <sub>16-6</sub>	Mélange complexe
50	50	55	Fr <sub>16-7</sub>	Mélange complexe
55	45	85	Fr <sub>16-8</sub>	Mélange complexe
55	45	30	Fr <sub>16-9</sub>	Mélange séparable
45	55	40	Fr <sub>16-10</sub>	Mélange séparable
45	55	75	Fr <sub>16-11</sub>	Mélange séparable
40	60	70	Fr <sub>16-12</sub>	Mélange complexe
40	60	40	Fr <sub>16-13</sub>	Mélange séparable
40	60	50	Fr <sub>16-14</sub>	Mélange complexe

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>17</sub>**

L'investigation de la fraction Fr<sub>17</sub> (255 mg) sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh. Merck), (2 g) avec un système gradient (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 7/3) a permis l'obtention de 13 sous-fractions. La sous fraction Fr<sub>17-4</sub> (50 mg) a été déposée sur plaques préparatives de gel de silice normale. Après récupération et élution avec du méthanol, suivi d'une purification ultime sur une colonne de gel de Séphadex LH-20 élué par du méthanol, nous avons obtenu le composé **9** : Fr<sub>17-4-1</sub> (**WO1**, m = 4,5 mg, MeOH). Nous avons utilisé le même protocole avec la sous fraction Fr<sub>17-8</sub> (25 mg) afin d'obtenir le composé **10**: Fr<sub>17-8-2</sub> (**WO1'**, m = 3,1 mg, MeOH)

Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le Tableau 32

**Tableau 32:** Récapitulatif de la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction Fr<sub>17</sub>

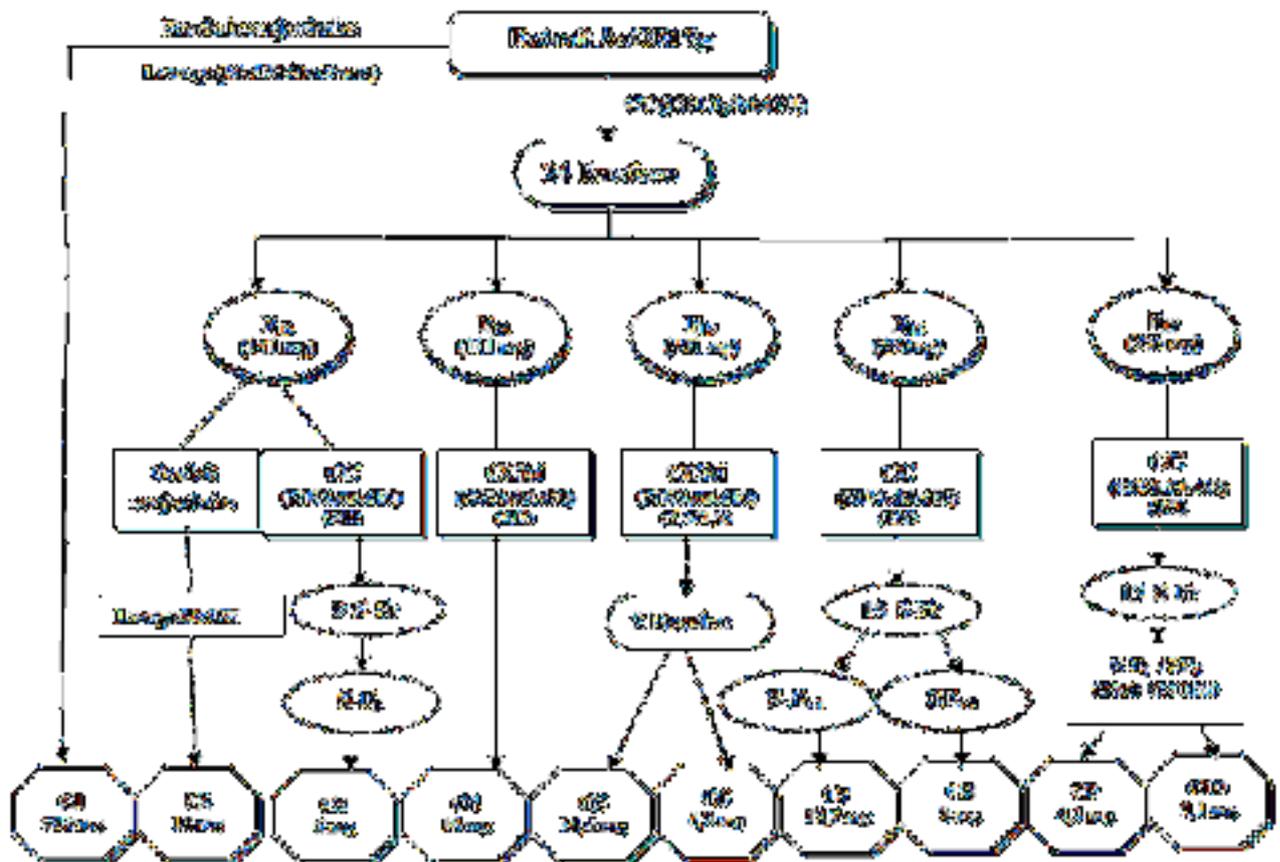
CHCl <sub>3</sub> (%)	MeOH (%)	Volume (ml)	Sous-fraction	Observations
100	0	60	Fr <sub>17-1</sub>	Traces
90	10	70	Fr <sub>17-2</sub>	Mélange complexe
80	20	58	Fr <sub>17-3</sub>	Mélange séparable
70	30	90	<b>Fr<sub>17-4</sub></b>	<b>Tache majoritaire</b>
60	40	80	Fr <sub>17-5</sub>	Mélange séparable
50	50	45	Fr <sub>17-6</sub>	Mélange complexe
45	55	70	Fr <sub>17-7</sub>	Mélange complexe
40	60	85	<b>Fr<sub>17-8</sub></b>	<b>Tache majoritaire</b>
40	60	60	Fr <sub>17-9</sub>	Mélange complexe
35	65	75	Fr <sub>17-10</sub>	Mélange complexe
35	65	75	Fr <sub>17-11</sub>	Mélange séparable
30	70	50	Fr <sub>17-12</sub>	Mélange séparable
30	70	40	Fr <sub>17-13</sub>	Mélange séparable

Le tableau 33 résume tous les résultats obtenus de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. oxyacantha* (Feuilles) avec ses références.

**Tableau 33 :** Composés isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. oxyacantha* (Feuilles) avec ses références

Composé	Référence	Masse (mg)	Solvant
C1	WO2	300	DMSO
C2	WO3	14	DMSO
C3	WO8	6	MeOH
C4	WO4	14	MeOH
C5	WO5	14,4	DMSO
C6	WO6	4,2	DMSO
C7	WO7	12,7	MeOH
C8	WO7'	2,3	MeOH
C9	WO1	4,5	MeOH
C10	WO1'	3,1	MeOH

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des composés issus de l'extrait AcOEt de *C. oxyacantha* est représenté dans la Figure 13.



**Figure 13:** Schéma de purification des fractions de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. oxyacantha* Linn. (Feuilles)

### III.2.12. Analyse chromatographique des polyphénols par HPLC–DAD

Afin de caractériser les principaux polyphénols individuels des extraits de *C. oxyacantha* obtenus dans ce travail, une analyse chromatographique par HPLC-DAD a également été réalisée. En bref:

Une aliquote de 1 ml de chaque extrait de *C. oxyacantha* (50 ppm) a été filtrée à travers un filtre PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  (Simple pure, USA) et analysée à l'aide d'une HPLC Jasco équipée d'une pompe PU-4180, d'un échantillonneur automatique AS-4150, d'un four (CO-4061 MD-4010 photodiode array detector (PDA)), et 3,9 mm  $\times$  150 mm, 4  $\mu\text{m}$ , (60  $\text{\AA}$ , Waters Nova-Pak C18 colonne). Le volume d'injection était de 5  $\mu\text{L}$  dans tous les cas. Les solvants de phase mobile étaient (A) 1 % d'acide formique/eau et (B) 1% d'acide formique / méthanol. Le programme de gradient de phase mobile a commencé avec 5 % de B, a été changé à 15% de B à 10 min, 25 % de B à 15 min, 30% de B à 20

min, 50 % de B à 25 min et ensuite changé à 100 % de B à 35 min avec une prise de 7 min. Le temps d'exécution complet de la HPLC était de 42 minutes avec un débit de 1,0 ml/min et une température de colonne de 50 °C. Les polyphénols ont été détectés à 280 nm et 320 nm et ont été identifiés par comparaison avec les temps de traitement et les spectres UV des cartes de purge correspondantes.

### III.2.13. Analyse de confirmation des polyphénols: LC-MS/MS

Afin de confirmer l'identité de ces polyphénols non décrits précédemment chez cette espèce, une analyse LC-MS/MS des extraits a été réalisée. Un instrument Thermo Scientific (San José, CA, USA) constitué d'un spectromètre de masse TSQ Quantum Ultra™ triple quadrupole équipé d'une source HESI-II (ionisation par électrospray chauffée) a été utilisé. Une colonne Thermo Scientific Hypersil Gold aQ, 1,9 µm, 100 mm x 2,1 mm a été utilisée à un débit de 300 µL/min et à 30 °C avec une pompe / un échantillonneur automatique HPLC Accela 1250. La phase mobile consistait en un mélange de solvant A (eau de qualité HPLC) et de solvant B (méthanol) contenant tous les deux 0,1% d'acide formique. L'analyse a été réalisée en mode d'élution en gradient. Le volume d'injection était de 10 µL.

Les conditions de travail optimales établies pour la source HESI étaient les suivantes: pression du gaz de gaine, 35 unités (unités arbitraires); pression de gaz auxiliaire, 10 au; pression de gaz du cône de balayage ionique, 0 au ; température capillaire, 320 °C; température de vaporisation, 350 °C et tension de pulvérisation (2500V, en mode négatif). Des transitions sélectionnées de surveillance de la réaction (SRM) et des énergies de collision ont été optimisées pour chacun des polyphénols ciblés par perfusion directe dans la source d'ions fonctionnant en mode négatif: acide caftarique [ion parent ( $m/z$ ): 310,958; ions du produit ( $m/z$ ): 148,961; 174,946; 178,968; énergie de collision (V): 14, 17, 17, respectivement]; et orientine: [ion parent ( $m/z$ ): 447,16; ions du produit ( $m/z$ ): 327,141; 357,157; énergie de collision (V): 23, 22, respectivement]. Le logiciel Xcalibur 2,2 a été utilisé pour contrôler le système et gérer les chromatogrammes et les spectres.

### III.3. Investigation phytochimique de l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her.

#### III.3.1. Critère de choix de cette espèce

Pour notre étude, plusieurs critères ont guidés notre choix, parmi lesquels :

- Les espèces de ce genre sont réputées pour l'accumulation des métabolites secondaires de types terpènes, tanins, flavonoïdes, acides phénolique, alcaloïdes et des coumarines [62 ,63]
- Les résultats des investigations phytochimiques obtenus sur cette espèce dans notre laboratoire, nous ont encouragés à entreprendre cette étude à la recherche de nouvelles molécules.

#### III.3.2. Place dans la systématique botanique

Ce classement se réfère à la classification botanique [65] Tableau 34.

**Tableau 34:** Classification taxonomique de *C. triflorus* L'Her. dans le règne végétal. [65]

<i>Cytisus triflorus</i> L'Her.	
<b>Royaume</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Fabales
<b>Famille</b>	Fabaceae (Papilionaceae)
<b>Sous-famille</b>	Faboideae
<b>Tribu</b>	Genisteae
<b>Genre</b>	<i>Cytisus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Cytisus triflorus</i> L'Her.) (Syn. <i>Cytisus villosus</i> Pourr.)
<b>Nom commun</b>	Broom, Cytise à trois fleurs

#### III.3.3. Description morphologique

*Cytisus triflorus* L'Her. est connue sous le nom "Ilougui" est l'espèce la plus répandue parmi les 8 espèces à croissance naturellement dans tout le nord de l'Algérie. Il est un balai pérenne de 1-2 m de hauteur avec des branches poilues. Les feuilles sont en trois, avec des poils densément soyeux, la médiane est presque deux fois plus longtemps que les latéraux, quand assombrissement fleurs jaunes sec. 1-3 aisselle des feuilles supérieures. Le fruit est une gousse poilu aplatie de l'enquête bibliographique a montré qu'il n'y a pas de rapport sur l'utilisation traditionnelle de cette plante en particulier dans la région méditerranéenne. [66]

Cependant, *C. triflorus* est connu dans le Nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales. Il est utilisé pour traiter la douleur abdominale, la cicatrisation des plaies et comme hémostatique, antifungal and hypotenseur. En outre, les feuilles sont utilisées comme "henné" pour traiter et teindre les cheveux.

- ✓ Arbrisseau de 1 m à 1,50 m, dressé, robuste, à rameaux allongés, les jeunes couverts de poils appliqués.
- ✓ Feuilles pétiolées, à folioles obovales, couvertes sur les deux faces de poils appliqués, ne noircissant pas par la dessiccation.
- ✓ Fleurs latérales de couleur jaune, en grappes feuillées sur les rameaux anciens
- ✓ pédicelles égalant à peu près le calice
- ✓ Calice à poils étalés-dressés, allongé, tubuleux, à lèvres divariquées, la supérieure à dents obtuses, peu courbées en dehors
- ✓ Fruit gousse de 25-30 mm sur 5-6, à valves convexes, noire, très velue-soyeuse.
- ✓ Floraison : Mai-Juin [64]



**Figure 14:** *Cytisus triflorus* L'Her.

#### III.3.4. Répartition géographique

*Cytisus triflorus* pousse fréquemment en Algérie, en France, en Italie, en Espagne, au Portugal et en Tunisie. En Algérie, il est commun dans la région du Tell Algéro-constantinois. [66]

Parmi les légumineuses, une place particulière peut être accordée à l'espèce *C. triflorus* présente dans les régions de, Azazga, Jijel, Kala, Alger (Nord et Est algérien).

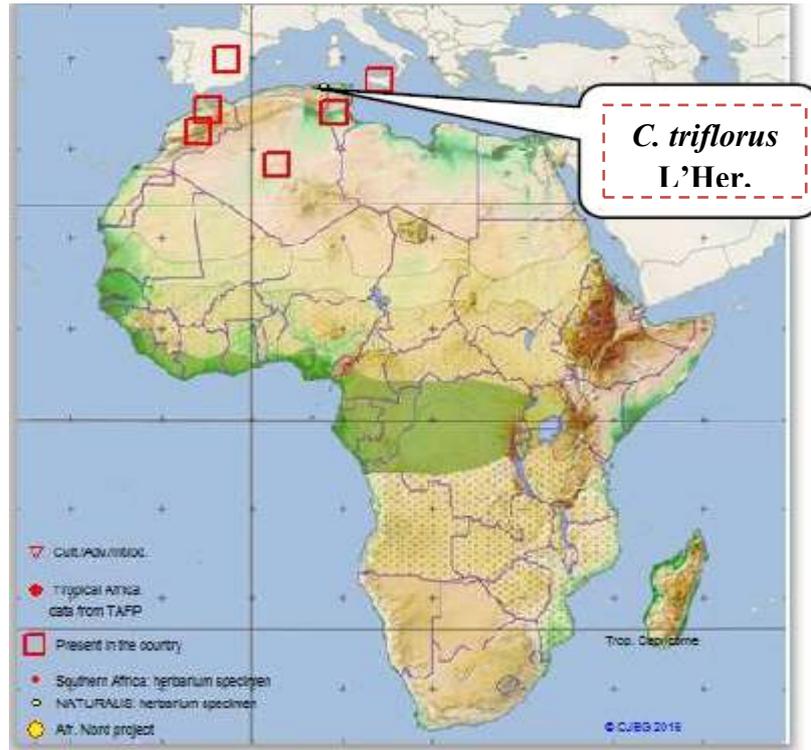


Figure 15 : Carte de répartition géographique du genre *Cytisus* [67]

### III.3.5. Utilisation en médecine traditionnelle

*Cytisus triflorus* L'Her. est utilisé par les populations rurales dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques (africaine, chinoise ...) :

- ✓ Comme remède efficace contre les blessures. [69].

Elle est utilisée aussi [68]:

- ✓ Pour soigner les sinusites, on presse les feuilles et on applique le jus obtenu dans le nez ;
- ✓ La décoction des feuilles sert à baigner le visage, soigner les infections oculaires, les conjonctivites et les troubles de la vision et en gargarismes, les aphtes ;
- ✓ Elle est utilisée dans les cas d'hypertension qui se manifestent par des maux de tête et des vertiges. Malgré leur goût amer, les feuilles sont mastiquées en prévention des caries dentaires, comme substitut de dentifrice ;
- ✓ En cas de perte d'appétit et de déshydratation, on boit deux cuillères à soupe, matin et soir, du jus des feuilles pilées auxquelles on a ajouté un peu d'eau et du sel.
- ✓ Les feuilles entrent dans la composition de décoctions utilisées pour le soin des diarrhées ;

### III.3.6. Travaux antérieurs sur l'espèce *C. triflorus* L'Her.

#### III.3.6.1. Phytochimie

Un criblage phytochimique préliminaire de *C. triflorus* a montré la présence de terpènes, tanins, flavonoïdes, acides phénoliques, des alcaloïdes, coumarines et des Stéroïdes [62, 69]. *C. triflorus* est aussi riche en alcaloïdes quinolizidinique représente traditionnellement un remède de plusieurs affections [63].

Selon plusieurs études, les principaux constituants chimiques sont répartis dans les différentes parties de la plante comme suite :

- ✓ Feuille : tanins et stérols (bêta sitostérol, cholestérol, stigmastérol, campestérol) ;
- ✓ Graine : glucides (63 %), protéines (20 %), particulièrement riches en phénylalanine, lipides (1 %), acides phénoliques, nombreuses vitamines ;
- ✓ Ecorce et racine : anthraquinone (cajaquinone), flavonoïdes (cajanone, cajaflavone, cajanine, cajanol), tanins [68].

Une étude a montré que l'automne est la saison où le rendement en alcaloïdes est plus élevé, et que la teneur en alcaloïdes est plus importante dans les organes jeunes de la plante. Les feuilles de *C. triflorus* montrent par ailleurs un rendement en alcaloïdes plus élevé que les tiges notamment à l'état sec.

Le test du pouvoir antioxydant montre que cet extrait d'alcaloïdes quinolizidiniques présente un bon pouvoir antioxydant 1,71 fois plus élevé que l'acide ascorbique [63].

Cependant, les activités biologiques ainsi que la phytochimie de *C. triflorus* ont presque inexplorées seulement quelques études ont été réalisées précédemment [62, 70].

#### III.3.6.2. Teneur totale en composés phénoliques et concentrations de flavonoïdes

Les résultats de la quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes à l'aide des méthodes de Follin-Ciocalteu et de chlorure d'aluminium sont respectivement présentés dans Tableau 35. [71]

L'extrait de feuilles présentait la teneur la plus élevée en composés phénoliques et flavonoïdes totaux.

**Tableau 35:** Teneur totale en composés phénoliques et concentrations de flavonoïdes

Extraits	Teneur phénolique totale (mg EAG/g d'extrait)	Concentration de flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)
EF	204 ± 4,24	52,13 ± 1,69
ET	166,5 ± 3,54	16,82 ± 0,86

EF: extrait de feuille, ET: extrait de tige. Les résultats sont moyens ± S.D. de trois mesures parallèles.

La concentration de flavonoïdes dans l'extrait de feuilles de *C. triflorus* était trois fois plus élevée que dans l'extrait de tige. Selon la littérature, les teneurs en flavonoïdes totaux déterminées dans ces extraits sont très proches des résultats trouvés chez d'autres espèces du genre *Cytisus*. [71]

### III.3.6.3. Activités pharmacologiques

Une étude a clairement révélée que toutes les parties aériennes de *C. triflorus* (feuille, tige, fleur et fruits) ont différentes activités antioxydantes potentielles qui varient en fonction de l'extrait végétal. Le rendement d'extraction dépend du solvant et de la méthode d'extraction. [72] Notamment l'extrait de feuilles, de *C. triflorus* a montré un potentiel antioxydant et des effets anti-inflammatoires, activité antiparasitaire, Activité inhibitrice de la Monoamine Oxydase, ce qui pourrait être lié à leurs composés phénoliques. La plante est donc à prendre en considération pour de plus amples phytochimique et enquêtes biologiques. [69, 71, 72]

### III.3.6.4. Les huiles essentielles

L'huile essentielle de *Cytisus triflorus* a été obtenue par distillation à la vapeur et identifiée par GC et GC-MS. 61 composés ont été déterminés. Les composants terpénoïdes oxygénés constituaient la fraction la plus importante (64 %) suivie des acides gras (8,2 %) et des fractions hydrocarbonées (10,7 %). [70,73]

### III.3.7. Protocole Expérimental

#### III.3.7.1. Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes (Feuilles et fleurs) de *C. triflorus* L'Her, ont été récoltées localement Azazga (Nord de l'Algérie ; (Wilaya de Tizi Ouzou)) en mars 2011. La plante a été identifiée par le professeur Mohamed Kaabache (département de botanique, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie).

Un spécimen (CTA 125/03/11) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL. Université Frères Mentouri Constantine.

### III.3.7.2. L'extraction

Les parties aériennes (feuilles et fleurs) de *C. triflorus*, ont été séchées dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, et d'humidité ensuite coupées en petits morceaux et pesées (700 g). Le matériel végétal est broyé, puis mises à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau) (80:20, v/v) pendant 24 heures. L'opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant, et a duré 48, 72 heures successivement.

Après filtration, concentration sous vide à une température n'excédant pas de 35 °C. On ajoute 400 ml de H<sub>2</sub>O distillé et le mélange est filtré. Le filtrat ainsi obtenue est épuisée successivement par l'ether de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, puis le *n*-butanol.

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduites à sec et pesées donnant les extraits :

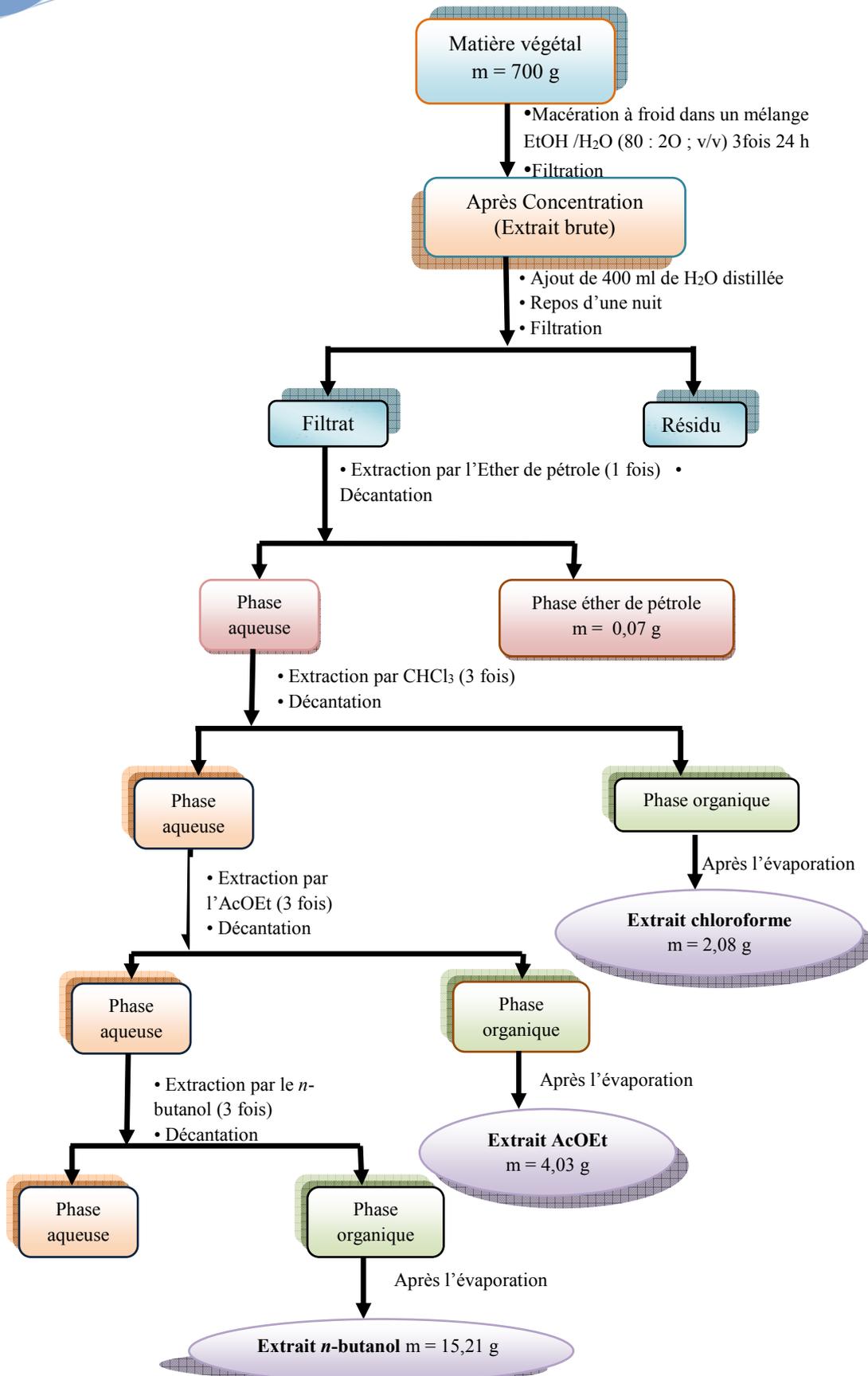
- Éther de pétrole (0,07 g)
- Chloroforme (2,08 g)
- Acétate d'éthyle (4,03 g)
- *n*-butanol (15,21 g)

Le tableau 36 présente les poids et les rendements des extraits obtenus.

**Tableau 36:** Rendement des phases de *C. triflorus*

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
700 g	Ether de pétrole	0,07	0,01
	Chloroforme	2,08	0,29
	Acétate d'éthyle	4,03	0,57
	<i>n</i> -Butanol	15,21	2,14

Le processus d'extraction est résumé par le protocole reporté dans la Figure 16.

Figure 16: Protocole d'extraction de *C. triflorus* L'Her.

### III.3.8. Étude des extraits

Pour l'ensemble des extraits; nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice, pour mettre au point l'éluant, ou le système d'éluant qui donnerait les meilleurs résultats de séparation, et également afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits. Les résultats de nos travaux analytiques nous ont poussés à sélectionner l'extrait acétate d'éthyle à cause de leur richesse en composition chimique.

#### III.3.8.1. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Un précipité blanc a été trouvé dans la phase AcOEt sous forme de poudre soluble dans le DMSO. Après plusieurs lavage avec du méthanol il nous a permis l'obtention du composé **11** (WC3, m = 450 mg, DMSO).

Pour le reste de l'extrait acétate d'éthyle, Les tests chromatographiques effectués sur couche mince de gel de silice révèlent que la meilleure séparation est obtenues avec le système (Chloroforme/Méthanol : 9/1). Figure 17.



**Figure 17:** Plaque CCM de l'extrait Acétate d'éthyle dans le système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 9/1)  
Révélateur : Anisaldéhyde.

Ainsi de 3,5 g de l'extrait Acétate d'éthyle sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice normale. L'éluant a été réalisé avec du chloroforme et un gradient de méthanol. 756 pots de 25-50 ml ont été collectés. L'analyse par CCM de ces fractions avec visualisation par des lampes UV (254 et 366 nm) puis révélation avec l'anisaldéhyde suivie par un chauffage à 100 °C. 19 fractions ont été obtenues (Tableau 37), après rassemblement

des pots présentant des similitudes. Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 11 composés ont été isolés (Tableau 39, Figure 24).

**Tableau 37:** Fractionnement de la colonne.

Pots (25 ml)	Fractions	Système d'éluion %		Masse (g)	Observations
		CHCl <sub>3</sub>	MeOH		
1-48	Fr <sub>1</sub>	100	0	0,001	Mélange séparable (beaucoup de taches)
49-69	Fr <sub>2</sub>	99	1	0,007	Mélange séparable
70- 90	Fr <sub>3</sub>	98	2	0,022	Mélange séparable avec un produit majoritaire
91-107	Fr <sub>4</sub>	97	3	0,0377	Mélange séparable
108-124	Fr <sub>5</sub>	96	4	0,0200	Mélange séparable Un précipité jaune soluble dans le (DMSO)
125-141	Fr <sub>6</sub>	95	5	0,085	Mélange séparable avec unprécipité blanc soluble dans l'AcOEt de faible quantité
142-174	Fr <sub>7</sub>	94	6	0,0184	Mélange séparable
		93	7		
175-191	Fr <sub>8</sub>	92	8	0,0021	Mélange séparable
192-207		91	9		
208-223		90	10		
224-239		89	11		
240-256		88	12		
257-272		87	13		
<b>Pots (50ml)</b>		Fr <sub>9</sub>	86		
273-289					
290-306	Fr <sub>10</sub>	85	15	0,0298	Mélange séparable
307-322		84	16		
323-338		83	17		
339-354		82	18		
355-370		81	19		
371-386		80	20		
387-402		79	21		
403-418	Fr <sub>11</sub>	78	22	0,0907	Mélange séparable avec un précipité blanc soluble dans le MeOH
419-434		77	23		
435-450	Fr <sub>12</sub>	76	24	0,0317	Mélange séparable
451-466		75	25		
467-482	Fr <sub>13</sub>	74	26	0,0463	Mélange séparable
483-498		73	27		

499-514		72	28		
515-530	Fr <sub>14</sub>	71	29	0,3408	Mélange complexe
531-546		70	30		
547-562		65	35		
563-578	Fr <sub>15</sub>	60	40	0,1455	Mélange séparable
579-594	Fr <sub>16</sub>	55	45	0,043	Mélange séparable avec un produit majoritaire (précipité soluble dans le DMSO)
595-610		50	50		
611-616		45	55		
617-632	Fr <sub>17</sub>	40	60	0,068	Mélange séparable avec un produit majoritaire
633-648		35	65		
649-664		30	70		
665-680		25	75		
681-696	Fr <sub>18</sub>	20	80	0,1222	Mélange séparable (plusieurs taches)
697-710		15	85		
711-726		10	90		
727-740		5	95		
741-756	Fr <sub>19</sub>	0	100	0,0895	Mélange complexe

Suite Tableau 37: Fractionnement de la colonne.

### III.3.8.1.1. Séparation et purification des fractions

Parmi les fractions obtenues, seules les fractions Fr<sub>3</sub>, Fr<sub>5</sub>, Fr<sub>7</sub>, Fr<sub>11</sub>, Fr<sub>15</sub>, Fr<sub>17</sub> et Fr<sub>18</sub> qui ont été étudiées

#### ➤ Étude de la fraction Fr<sub>3</sub>

La fraction Fr<sub>3</sub> (22 mg) a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice en utilisant comme système d'éluion le mélange (Ether de pétrole/AcOEt : 7/3) pour obtenir le composé **12** (SBWP<sub>3</sub>, m = 6 mg, Acétone). Figure 18.

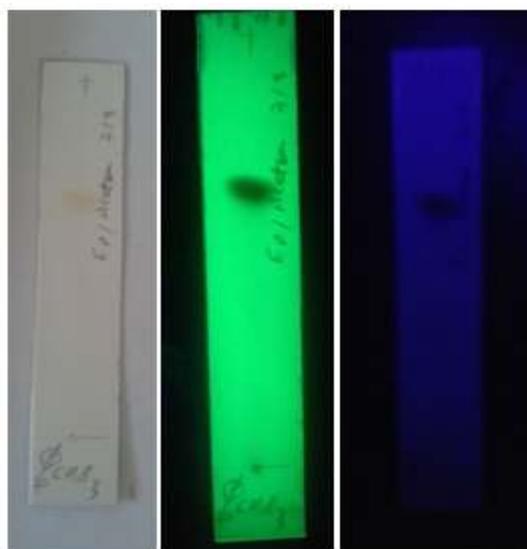


Figure 18: Le composé 12 sur plaque CCM sous lampe UV 254 et 365 nm.

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>5</sub>**

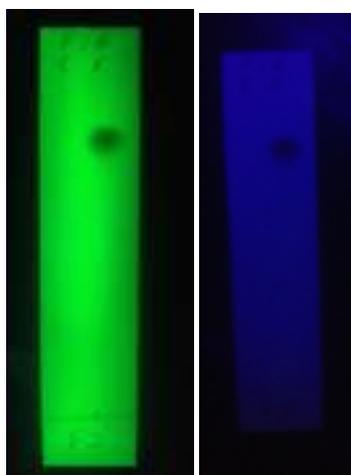
La fraction Fr<sub>5</sub> (20 mg) renferme un précipité jaune, qui a été purifié sur plaques analytiques de gel de silice, éluée par le système *n*-hexane/AcOEt (7:3; deux éluions) pour donner le composé **13** à l'état pur, (SBWP<sub>4</sub>, m = 4 mg, MeOH). Figure 19.



**Figure 19:** Le composé 13 sur plaque CCM sous lampe UV 254 et 365 nm

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>7</sub>**

La fraction Fr<sub>7</sub> (12,4 mg) testée sur plaque CCM, montre deux taches, dont une plus intense par rapport à l'autre. Cette fraction se présente sous forme d'un précipité blanc contenant un produit majoritaire mêlé à un autre produit, ainsi cette fraction a été soumise à une purification par CCM sur gel de silice normale avec le système d'éluion Éther de pétrole/acétate d'éthyle (5 : 5, v/v ; deux éluions), menant à l'obtention du composé **14** sous forme de précipité blanc soluble dans le MeOH (WC<sub>6</sub>, m = 2 mg), Figure 20.



**Figure 20:** Le composé 14 sous lampe UV 254 et 365 nm.

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>11</sub>**

La fraction Fr<sub>11</sub> (90,7 mg) a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), éluée par le système (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt) en gradient de polarité. Des fractions de 25 ml ont été récupérées et rassemblées en fonction de leur profil chromatographique pour donner sept sous fractions (Fr<sub>11-1</sub>-Fr<sub>11-7</sub>). La sous fraction Fr<sub>11-6</sub> comportant un produit pur (poudre blanche) a donné le composé **15** (WC8, m = 3,7 mg, MeOH).

Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le Tableau 38.

**Tableau 38:** Récapitulatif de la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction Fr<sub>11</sub>

CHCl <sub>3</sub> (%)	AcOEt (%)	Lot (25 ml)	Sous-fraction	Observations
100	0	1-3	Fr <sub>11-1</sub>	Mélange de produits en faible quantité
90	10	4-7	Fr <sub>11-2</sub>	Mélange complexe
80	20	8-10	Fr <sub>11-3</sub>	Mélange séparable
70	30	11-14	Fr <sub>11-4</sub>	Mélange complexe
60	40	15-17	Fr <sub>11-5</sub>	Mélange séparable
50	50	18-22	<b>Fr<sub>11-6</sub></b>	Mono tache <b>(Composé 15)</b>
40	60	23-30	Fr <sub>11-7</sub>	Mélange complexe

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>15</sub>**

La chromatographie de cette fraction (145,5 mg) sur plaques analytiques de gel de silice éluée par le système (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt : 7,5/2,5), a permis d'isoler le composé **16** (WC9, m = 6,2 mg, MeOH) sous forme d'un précipité blanc. Les autres produits issus de cette séparation, sont également sous forme de mélanges et en très faibles quantités.

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>17</sub>**

La chromatographie sur couche mince de cette fraction (68 mg) a montré deux taches majoritaires. La séparation effectuée par chromatographie sur plaques préparatives, éluées par le système (MeOH/CHCl<sub>3</sub> : 4/6) a permis l'isolement de deux composés purs de faibles quantités, le composé **17**(WC4, m = 2,5 mg, MeOH) et le composé **18** (WC5, m = 2 mg, MeOH).

➤ **Étude de la fraction Fr<sub>18</sub>**

Après plusieurs tests sur plaques analytiques de gel de silice, le système d'éluion convenable est : (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 8/2), cette fraction a plusieurs spots dont un très intense (produit majoritaire noir violet sous UV 365 nm) et les autres en faibles quantités.

Une masse de 122,2 mg de cette fraction a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 Merck) éluee par le système (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) en gradient de polarité. Le suivi de la composition est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les sous fractions de 25 ml ont été récupérés et regroupés en fonction de leurs profils chromatographique menant ainsi à 9 sous-fractions.

Parmi les 9 sous-fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation des sous fractions Fr<sub>18-2</sub>, Fr<sub>18-5</sub>, et Fr<sub>18-6</sub> à cause de leur simplicité et de leur poids relativement important.

Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le Tableau 39.

**Tableau 39:** Récapitulatif de la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction Fr<sub>18</sub>

CHCl <sub>3</sub> (%)	MeOH (%)	Lot (25 ml)	Sous-fraction	Observations
100	0	1-4	Fr <sub>18-1</sub>	Traces
90	10	5-10	<b>Fr<sub>18-2</sub></b>	Tache majoritaire <b>(Composé 19)</b>
80	20	11-15	Fr <sub>18-3</sub>	Mélange séparable
70	30	16-20	Fr <sub>18-4</sub>	Mélange complexe
60	40	21-27	<b>Fr<sub>18-5</sub></b>	Tache majoritaire <b>Composé 20</b>
50	50	28-34	<b>Fr<sub>18-6</sub></b>	Tache majoritaire <b>(Composé 21)</b>
40	60	35-39	Fr <sub>18-7</sub>	Mélange complexe
30	70	40-46	Fr <sub>18-8</sub>	Mélange séparable
20	80	47-51	Fr <sub>18-9</sub>	Mélange séparable

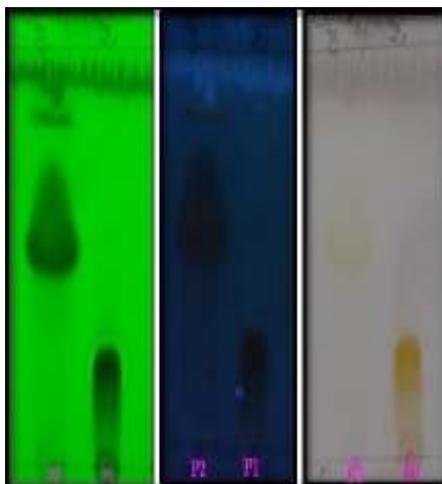
✓ **Étude de la sous fraction Fr<sub>18-2</sub>**

La sous fraction Fr<sub>18-2</sub> est précipitée sous forme d'une poudre jaune dans le méthanol, cette dernière est purifiée sur plaque de gel de silice dans le système (CHCl<sub>3</sub>/Acétone : 8/2) pour donner le composé **19** à l'état pur (WC1, m = 9 mg, MeOH), (mono-tache, absorbe

sous UV 356 d'une couleur jaune et sous UV 254 nm d'une couleur noir et jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde).

✓ *Étude de la sous fraction Fr<sub>18-5</sub>:*

Après évaporation du solvant, la sous fraction Fr<sub>18-5</sub> a donné un précipité blanc-jaunâtre soluble dans le DMSO. L'analyse par CCM de ce dernier montre un produit majoritaire noir violet sous lumière UV (365nm) et noir sous lumière UV (254 nm), jaune après révélation avec l'anisaldéhyde. Ce précipité est purifié par lavage successif à l'aide du méthanol ensuite séché puis pesé on obtient le composé **20** (WC2, m= 5 mg, MeOH). Figure 21.



**Figure 21:** Plaque CCM des composés 19 et 20 sous lumière UV et après la révélation.

✓ *Étude de la sous fraction Fr<sub>18-6</sub>:*

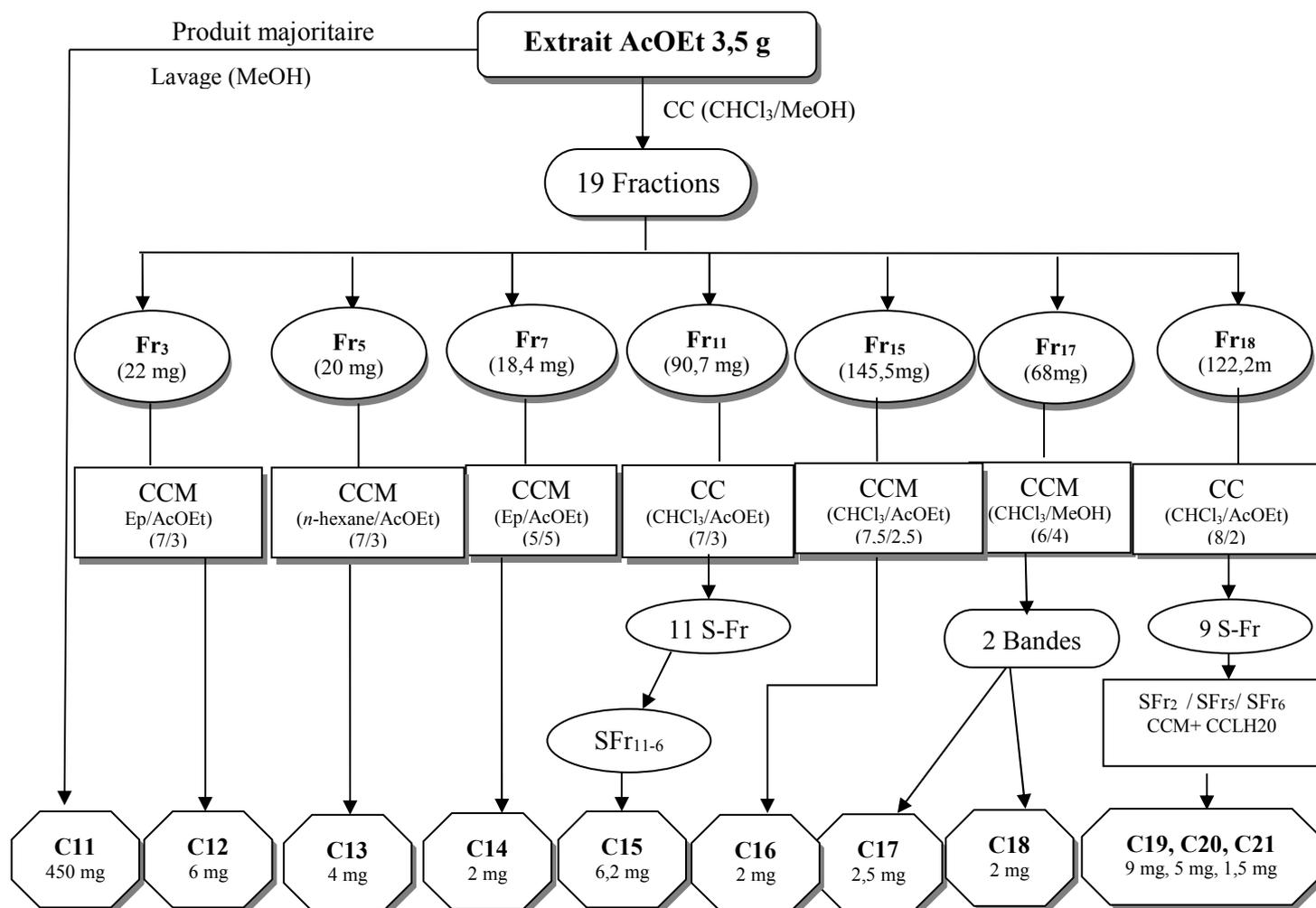
Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice, La sous fraction Fr<sub>18-6</sub> renferme deux produits majoritaires. Ce qui nous a poussé à faire une purification ultime de cette sous fraction sur une colonne de Séphadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant. Cette technique s'est soldée par l'obtention d'un produit propre, le produit **21** (WC7, m = 2,2 mg, MeOH). Ce dernier donne une fluorescence jaune sous la lumière UV (365 nm) et une couleur noir à 254 nm, marron foncé après révélation avec l'anisaldéhyde.

Le Tableau 40 reporte tous les composés isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. triflorus*. avec ses références.

Tableau 40 : composés isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. triflorus*. avec ses références

Composé	Référence	Masse (mg)	Solvant
C11	WC3	450	DMSO
C12	SBWP <sub>3</sub>	6	Acétone
C13	SBWP <sub>4</sub>	4	MeOH
C14	WC6	2	MeOH
C15	WC8	3,7	MeOH
C16	WC9	6,2	MeOH
C17	WC4	2,5	MeOH
C18	WC5	2	MeOH
C19	WC1	9	MeOH
C20	WC2	5	MeOH
C21	WC7	2,2	MeOH

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des composés issus de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* est représenté dans la Figure 22.

Figure 22: Schéma de purification des fractions de l'extrait AcOEt de l'espèce *C. triflorus*.

#### III.4. Conclusion :

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions issues des colonnes de gel de silice 60, des extraits de plantes *C. oxyacantha* Linn et *C. triflorus* L'Her. a mené à l'isolement et la purification de 21 produits.

L'investigation phytochimique de la phase acétate d'éthyle de l'extrait hydro alcoolique des feuilles de *C. oxyacantha* L. a mené à la séparation de 10 produits. Seulement 4 produits ont été soumis à l'analyse structurale complète, tenant compte du poids des composés isolés et de l'allure de leur spectre RMN-<sup>1</sup>H. Tandis que l'investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle (feuilles et fleurs) de *C. triflorus* a aboutit à l'isolement et la purification de 11 composés en quantité appréciable. Seulement 6 produits de l'extrait acétate d'éthyle ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et discussion de ces analyses seront développés au chapitre IV.

**Références bibliographiques :**

- [1] Tadic, V.M., Dobric, S., Markovic, G., Dordevic, S.M., Arsic, I.A., Menkovic, N.R., Stevic, T., 2008. Anti inflammatory, gastroprotective, free-radicalscavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agr Food Chem*, 56: 7700-7709.
- [2] Long, S.R., Carey, R.A., Crofoot, K.M., Proteau, P.J., Filtz, T.M., 2006. Effect of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*. 13: 643-650.
- [3] Potter, D., 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae., *Plant and Evolution*, 266 (1-2): 5-43.
- [4] Rasmussen, P., 2011. Hawthorn-*Crataegus monogyna* (common hawthorn) or *Crataegus laevigata* (midland hawthorn; *Crataegus oxyacantha*); also known as haw, thornapple, maythorn, whitethorn. *J Prim Health Care*, 3(1): 63-64.
- [5] Hawthorn. Natural Medicines Comprehensive Database Web site. 2009. Accessed at [www.natural database.com](http://www.natural database.com)
- [6] Hawthorn in National centre for complementary and alternative medicine <http://nccam.nih.gov/health/hawthorn/>.
- [7] Coquillat, M., 1962. Sur quelques noms patois de plantes. Bulletin mensuel de la société linnéenne de Lyon, vol 31. P 26
- [8] Dif, M., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., Becheikhi, F.A., 2015. Enquête sur l'utilisation phytothérapeutique de 11 plantes médicinales poussant dans le Tessala. *Lavoisier SAS*.
- [9] Bézanger, L., Pinkas, B., 2014. Plantes médicinales de la région du Nord (Nord, Pas-de-Calais, Somme). Bulletin de la Société Botanique en France.
- [10] Patrick, J., Henry, Mc., 1996. A Milton Herbal. *Milton Quarterly Journal*.30: 72.
- [11] Verma, S.K., Jain, V., Verma, D., Khamesra, R., 2007. *Crataegus oxyacantha*-A Cardioprotective Herb., *J Herbal Med Toxicology*, 1: 65-71.
- [12] Ibn El Baytar الجامع لمفردات الأدوية و الأغذية
- [13] Beloued, A., 05/2012. Plantes Médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. 6 ème édition.
- [14] Couplan, F., 2012. Les plantes et leurs noms : Histoires insolites. *Editions Quae*, P 28.
- [15] WHO., 2003. monographs on medicinal plants newly independent states. Pp. 91-93.
- [16] Huang, Y., Chen, Z.Y., Ho, WKK., 2004. Herbal and Traditional Medicine, *Biomolecular and Clinical Aspects*, 2, China.
- [17] Lasseigne, F.T., Blazich, F.A., 2009. *Crataegus* L. North Carolina State University, Department of Horticultural Science.
- [18] Verma, S.K., Jain, V., Verma, D., Khamesra, R., 2007. *Crataegus oxyacantha*-A Cardioprotective Herb., *J Herbal Med Toxicology*, 1: 65-71.
- [19] Farhat, R., 2007. "Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des huiles des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L., et *Ziziphus lotus* L.". Mémoire de magister (Agronomie), Université El Hadj Lakhdar. Batna. pp.109.

- [20] Yuan, C. S., Bieber, E.J., Bauer, B., 2011. Traditional chinese medicine. *Taylor and Francis group*. P 215.
- [21] Chen, J.D., Wu, Y.Z., Tao, Z.L., Chen, Z.M., Liu, X.P., 1995. Hawthorn (shan zha) drink and its lowering effect on blood lipid levels in humans and rats. *World Rev Nutr Diet* 77: 147-154.
- [22] Khan, I.A., Abou rached, E., 2010. Leung's encyclopedia of common natural ingredient used in food, drugs and cosmetics. 3ème édition. *John Wiley & Sons, Canada*. P 352.
- [23] Ju, L.Y., 2005. *Crataegus oxyacantha* (aubepine) in the use as herb medicine in France. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 30(8):634-640.
- [24] <http://www.stevenfoster.com> (Accessed on 02-02-2011).
- [25] Fournier, P.V., 2010. Dictionnaire des Plantes Médicinales et Vénéneuses de France. Omnibus, Paris. P 130.
- [26] Miller, A.L., 1998. Botanical influences on cardiovascular disease, *Altern Med Rev*, 3(6): 422-431.
- [27] Rigelsky, J.M., Sweet, B.V., 2002. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm*, 59(5): 417-422.
- [28] Bersin, T., Muller, A., Schwarz, H., 1955. Ingredients of *Crataegus oxyacantha* L. III. Heptahydroxyflavan glycoside. *Arzneimittelforschung*, 5(8): 490-1.
- [29] Rewerski, W., Lewak, S., 1967. Some pharmacological properties of flavan polymers isolated from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *Arzneimittelforschung*, 17(4): 490-491.
- [30] Saija, A., Germano, M.P., Marzullo, D., Imperatore, C., Campo, S., De Pasquale, R., 1992. The determination of catecholamines in *Crataegus oxyacantha* L. Flowers and leaves by high pressure liquid chromatography-electrochemical detection. *Phytochem Analysis*, 3: 254-257.
- [31] Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., Wojdylo, A., 2007. Antioxidant activity of phenolic compounds of Hawthorn, pine, skullcap. *Food Chem*, 103(3): 853-859.
- [32] Bilia, A.R., Eterno, F., Bergonzi, M.C., Mazzi, G., Vincieri, F.F., 2007. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: the case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. *J Pharm Biomed Anal*, 44(1): 77-78.
- [33] Sakai, H., Kiichiro, K., Hiroyuki K., Nobuo, K., Yukihiro, G., 2007. Characterization of Major Components in *Crataegus oxyacantha* L. Leaves and Analyses of the Leaves and Commercial Hawthorn Leave Products. *Japanese Journal of Food Chemistry*, Vol. 14(2).
- [34] Lakshmi, T., Geetha, R.V., Anitha, R., 2012. *Crataegus oxyacantha* Linn. commonly known as Hawthorn-A Scientific Review. *International Journal of PharmTech Research*, Vol.4, No.1, pp 458-465.
- [35] Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Chen, Z., 2001. Characterization of antioxidants present in Hawthorn fruits. *J Nutr Biochem*, 12(3): 183-186.
- [36] Danijela, A.K., Jasmina, M.V., Snezana, S.M., Milan, N.M., and Sasa, S.R., 2012. Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus*

- Oxyacantha* L (Rosaceae) Fruit Extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1): 117-124.
- [37] Massoni, G., 1968. On the use of hawthorn extract (*Crataegus*) in the treatment of certain ischemic myocardial diseases in old age. *G Gerontol*, 16(9): 979-984.
- [38] Pittler, M.H., Schmidt, K., Ernst, E., 2003. Hawthorn Extract for Treating Chronic Heart Failure: Meta-analysis of Randomized Trials. *Am J Med*, 114: 665-671.
- [39] Tabach, R., Mattei, R., 2009. Araujo Carlini ELD Pharmacological evaluation of a phytotherapeutic product - CPV (dry extract of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L. and *Valeriana officinalis* L.) in laboratory animals. *Brazilian J Pharmacognosy*, 19: 255-260.
- [40] Abdul-Ghani, A.S., 1987. Hypotensive effect of *Crataegus oxyacantha*. *Int J Crude Drug Res*, 25: 216-220.
- [41] Shanthi, S., Parasakthy, K., Deepalakshmi, P.D., 1994. Hypolipidaemic activity of tincture of *Crataegus* in rats. *Indian J Biochem Biophys*, 31(2): 143-146.
- [42] Silva, A.P., Silva, M.L., Filomena, M., 2000. Antioxidants in Medicinal Plant Extracts. A Research Study of the Antioxidant Capacity of *Crataegus*, *Hamamelis* and *Hydrastis*. *Phytother Res*, 14: 612-616.
- [43] Chopdat, I.F., 2000. The efficacy of *Crataegus oxyacantha* on refractory hypertension in males. Faculty of Health Sciences, *Johannesburg*, 51-82.
- [44] Lacaille, D., Franck, U., 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8(1): 47-52
- [45] Degenring, F.H., Suter, A., Weber, M., Saller, R.A., 2003. randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (*Crataegisan*®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, 10:363-369.
- [46] Hanus, M., Lafron, J., Mathieu, M., 2004. Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr Med Res Opin*, 20(1); 63-71.
- [47] Jayalakshmi, R., Thirupurasundari, C.J., Niranjali Devaraj, S., 2006. Pretreatment with alcoholic extract of *Crataegus oxyacantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol – induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*, 292: 59-67.
- [48] <http://www.toddcalddecott.com> (Accessed on 02-02-2011).
- [49] Akila, M., Devaraj, H., 2008. Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. *Vasc Pharmacol*, 49(4-6): 173-177.
- [50] Zick, S.M., Gillespie, B., Aaronson, K.D., 2008. The effect of *Crataegus oxyacantha* special extract WS 1442 on clinical progression in patients with mild to moderate symptoms of heart failure. *Eur J Heart Failure*, 10(6): 587-593.
- [51] Jayachandran, K., Mahmood, K., Karuppaiyah, S., Niranjali, D.S., Periannan, K., 2010. *Crataegus oxyacantha* Extract Attenuates Apoptotic Incidence in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Regulating Akt and Hif-1 Signaling Pathways. *J Cardiovasc*

- Pharmacol*, 56(5): 526-531.
- [52] Elango, C., Devaraj, S.N., 2010. Immunomodulatory effect of Hawthorn extract in an experimental stroke model. *J Neuroinflamm*, 7:97.
- [53] Kanyonga, M.P., Faouzi, M.Y.A., Zellou, A., Essassi, M., Cherrah, Y., 2011. Effect of methanolic extract of *Crataegus oxyacantha* on blood haemostasis in rats. *J Chem Pharm Res*, 3(3): 713-717.
- [54] Nassima, B.B., Thoraya, D., Kahina, H., Fatima, S., 2011. The antibacterial activity of flavonoids extracted from *crataegus oxyacantha* (l.) flowers of boumerdes (algeria). *Section Advances in Biotechnology*, 295-298.
- [55] Brunet, J.L., 2006. Les insectes et la santé. *John Libbey Eurotext*.
- [56] Disponible sur : <https://www.abeille-heureuse.fr/le-pollen-cru'd'aubepine.html> (Consulté le 25/05/2017)
- [57] Disponible sur : <https://www.pollenergie.fr/site/medias/dossieraubepine.pdf> (Consulté le 25/05/2017)
- [58] Disponible sur : <https://www.terroirselect.com> (consulté le 25/05/2017)
- [59] Disponible sur : <https://www.herboristerieeduvalmont.com/plantes-medecinales-en-frac/368-aubepine> (consulté le 23/05/2017)
- [60] Disponible sur : <https://www.soin-et-nature.com> (consulté le 23/05/2017)
- [61] Meriem, B., 2017. Etude bibliographique sur l'Aubépine : *Crataegus laevigata* Poir (DC) (syn: *Crataegus oxyacantha* L) Famille : Rosacées. Thèse de doctorat (Pharmacie), Université Abou bekr Belkaïd, Tlemcen. p 54-57
- [62] Ait-Kaci, K.A., 2001. PhD thesis, Superior Normal School, Kouba, Algeria.
- [63] Chebili, S., Ait-Kaci, K., Fazouane, F., 2011. Etude comparative des methodes d'extraction des alcaloides de la plante medicinale *cytissus triflorus* l'hérit. Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2. Ouargla.
- [64] Julve, Ph., 2015. ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>
- [65] Auvray, G., Malécot, V., 2013. A revision of *Cytissus* sections Alburnoides, Spartopsis and Verzinum (genisteeae, fabaceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 70, 61-120.
- [66] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Editions C.N.R.S, Paris. P 484.
- [67] Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., Paris, R., 1977. From the twigs of *Sarothamnus scoparius koch* has been isolated a new C-Glycosyl fla-vone: The 6"-O acetyl scoparin. *Lloyd*, 40, 591.
- [68] Jean-Pierre, N., 1997. Plantes médicinales du Nord de Madagascar Ethnobotanique antakarana et informations scientifiques : *Cajanuscajan* (L.) Druce, N° 42497439200021.62.
- [69] Larit, F., 2017. Phytochemical and Biological Studies of Two Algerian Medicinal Plants: *Cytissus villosus* Pourr. (Fabaceae) and *Hypericum afrum* Lam.(Hypericaceae). Mémoire de doctorat (chimie organique), Université frères Mentouri. Constantine. Algérie.
- [70] Ait-Kaci, K.A., Aissaoui, M., Fazouan, F., Larit, F., Chalard, P., Chalchat, J.C., Figueredo, G., Benayache, F., and Benayache, S., 2013. Essential oil of *Cytissus*

- triflorus* L' Her, *Der Pharm.Lett*, 5(5), 276-279.
- [71] Ait-Kaci, K.A, Fazouane, F., and Benayache, S., 2015. Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Der Pharmacia Lettre*, 7(5) 104-105.
- [72] Ait-kaci, K.A, Fazouane, F., Benayad, T., Bettache, Z., 2014. Denni, N., The synthetic antioxidant Butylated Hydroxytoluene, a naturally occurring constituent of the broom *Cytisus triflorus* L'Hérit, *Journal of Natural Products*, Vol. 7: 58-64.
- [73] Ait-kaci, K., Fazouane, F., Benayache, S., Souici, F., March 2016. Fatty acid Profiles of soxhlet and Ultrasonic obtained oils from the promising medicinal legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, Vol 5 [4]: 05-09.
- [74] Mecheri, A., Benabderrahmane, W., Amrani , A., Boubekri, N., Benayache, F., Benayache, S., and Zama ,D. 2018. Hepatoprotective Effects of Algerian *Crataegus oxyacantha* Leaves. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 9, 00-00.
- [75] Kockar MC., Nazıroğlu M., Celik O., Tola HT., Bayram D., Koyu A. 2010; N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct* 28(8): 673-7.

# Chapitre IV

*Résultats et discussion*

### IV.1. Introduction

L'étude phytochimique de l'espèce *Crataegus oxyacantha* Linn. (Feuille) et de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. triflorus* L'Her. de la flore algérienne, nous a permis d'isoler et d'identifier plusieurs produits, et d'établir la structure de dix composés d'entre eux (pour *C. oxyacantha*); et la structure de six composés d'entre eux (pour *C. triflorus*), par les différentes techniques d'analyses modernes notamment la HPLC-DAD, la RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, RMN bidimensionnelle, ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution, la spectrométrie UV-vis et l'hydrolyse acide.

### IV.2. Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD

Le tableau ci-dessous montre la référence des extraits (ESL, MSPD) sur les chromatogrammes HPLC-DAD des différents extraits (feuilles et fruits).

**Tableau 41:** Références des extraits de feuilles et de fruits sur les chromatogrammes HPLC-DAD

Extraits (ESL)	Matière végétale	
	Feuilles	Fruits
CHCl <sub>3</sub>	(A)	(D)
AcOEt	(B)	(E)
<i>n</i> -Butanol	(C)	(F)
Extraits (MSPD)	Feuilles	Fruits
EtOH : 100 %	(A')	(D')
EtOH/H <sub>2</sub> O : 50 % 50 %	(B')	(E')
H <sub>2</sub> O : 100 %	(C')	(F')

#### IV.2.1. Identification des composés phénoliques dans les extraits de l'Extraction Solid liquide (ESL)

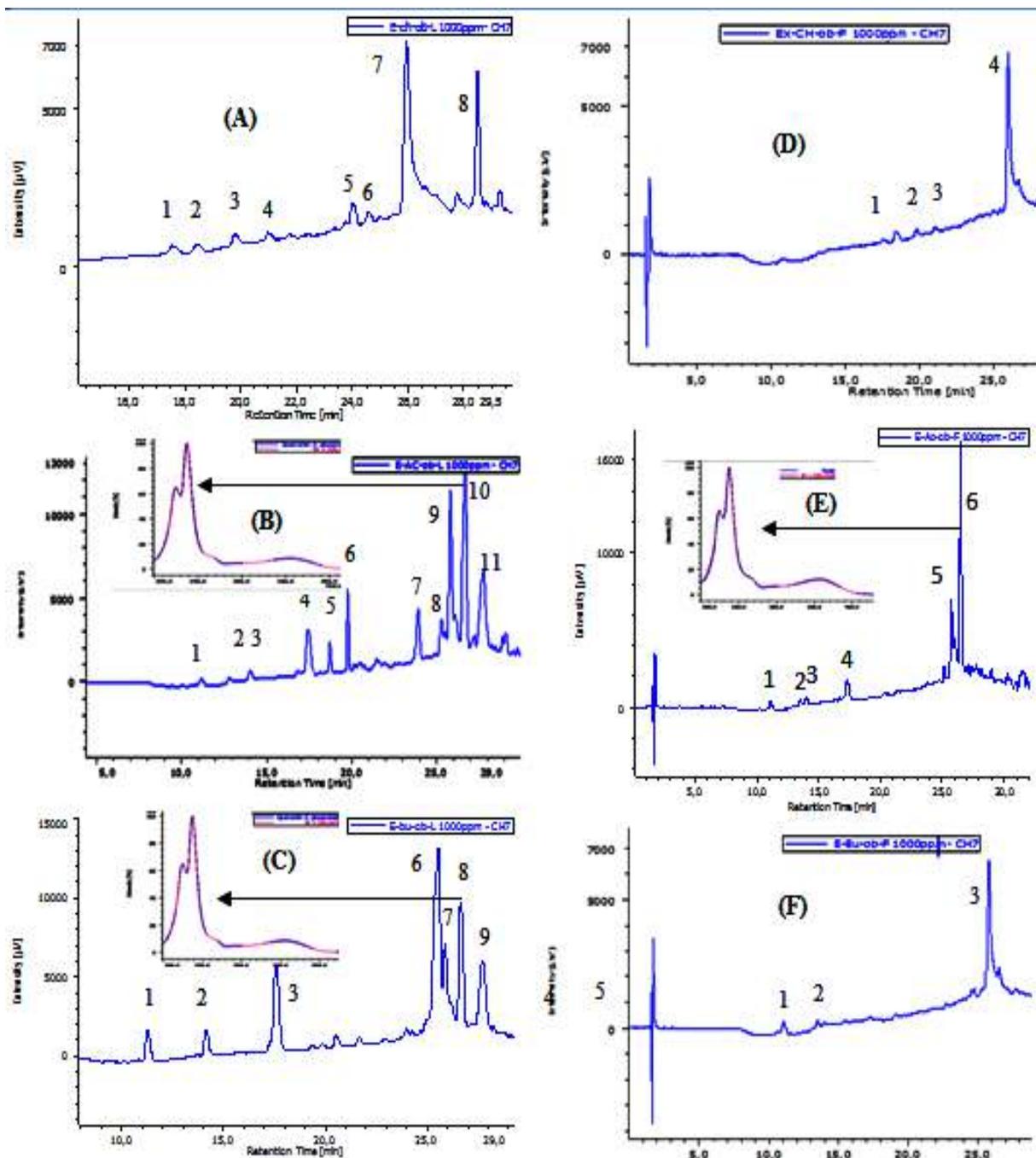
Les extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-Butanol des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha* ont été soumis à une analyse HPLC-DAD afin de caractériser les principaux polyphénols individuels qui y sont présents. Les chromatogrammes résultants sont montrés sur la Figure 23, Tableau 42. Les profils chromatographiques confirment que les feuilles et les fruits de *C. oxyacantha* sont riches en polyphénols, quelque soit le solvant organique utilisé pour leur extraction. L'identification des composés phénoliques dans les extraits correspondants a été basée sur la comparaison des temps de rétention et des spectres UV obtenus par détection par

photodiodes des pics inconnus à ceux acquis pour les standards authentiques utilisés comme référence. Mais en raison de leur similarité spectrale, une parfaite adéquation entre les temps de rétention et les spectres UV des normes polyphénoliques pures, on a clairement identifié huit seulement : Epicatéchine, Quercétine, Quercétine-3-glucoside, Quercétine-3-rutinoside, Naringénine, acide Caftarique, acide Caféique, et l'orientine tel que les pics 10 et 8 dans les extraits AcOEt (B) et *n*-Butanol (C) des feuilles (Figure 23) ont été positivement identifiés comme étant la quercétine-3-glucoside, Le pic 6 dans l'extrait de fruits AcOEt (E) et 9 dans l'extrait AcOEt (B) (feuilles), ont été identifiés comme Quercétine-3-rutinoside ou Rutine, également par comparaison avec un étalon authentique. Les deux polyphénols sont des flavonols, une famille de polyphénols bien connus pour ses bienfaits pour la santé. Aussi les deux pics 1 dans les deux extraits AcOEt (B) et *n*-Butanol (C) des feuilles ont été positivement identifiés comme étant l'acide caftarique, également, les pics 4, 6, 7 et 8 dans l'extrait AcOEt (B) des feuilles ont été positivement identifiés respectivement comme étant l'acide caféique, l'Epicatéchine, la Quercétine et la Nringénine (Figure 24). Le pic 6 dans l'extrait *n*-Butanol (C) a été positivement identifié comme étant l'orientine.

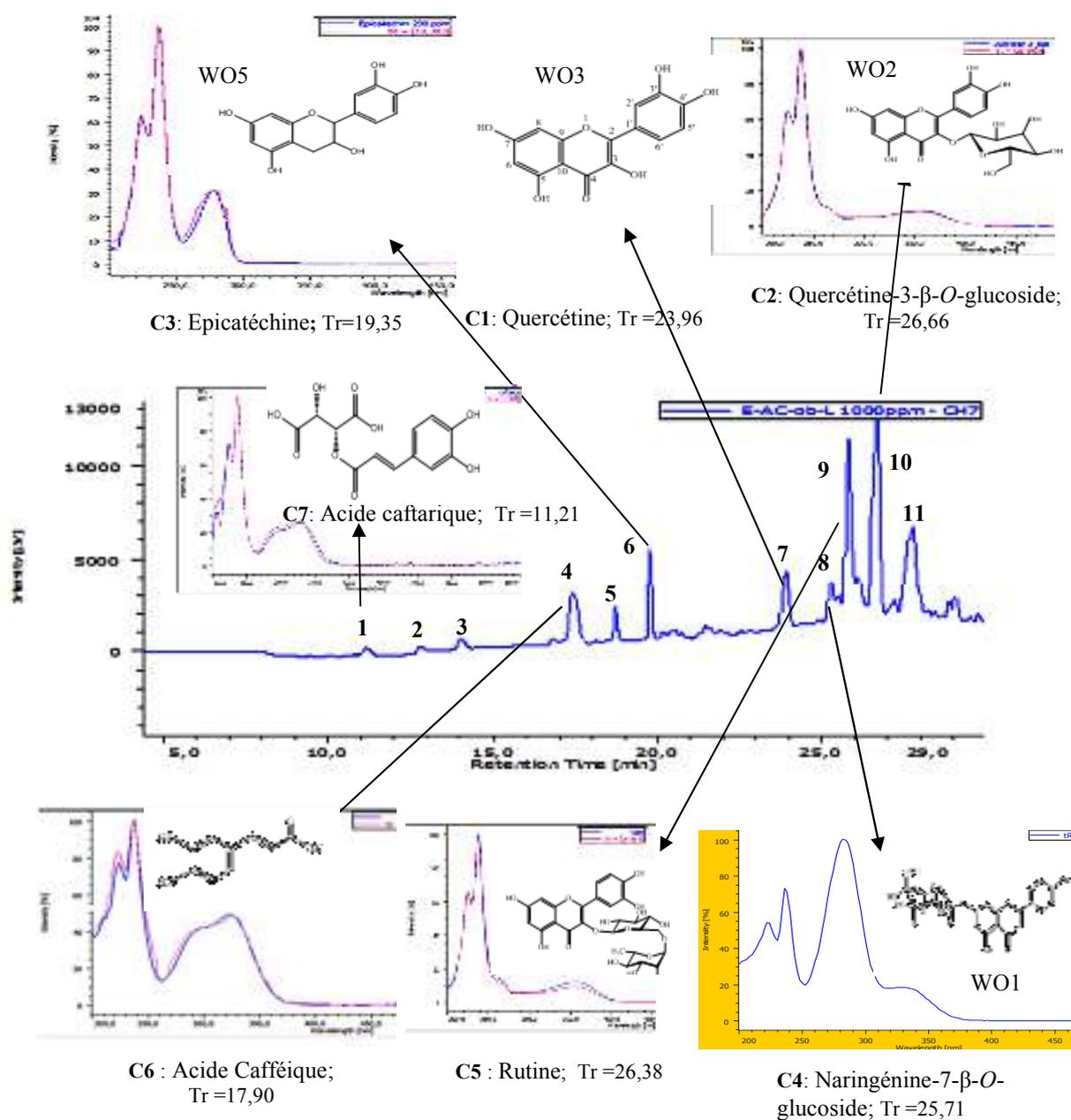
L'identité possible des pics restants dans le chromatogramme peut être provisoirement suggérée uniquement sur la base des données de la littérature. L'identification provisoire de ces composés est brièvement discutée sur la base des approches qui ont utilisé la technique HPLC-UV [1-5] Bernatoniené et al. (2008) [5] ont quantifié les niveaux de sept polyphénols (Épicatéchine, Procyanidine B2, Procyanidine B5, Procyanidine C1, Hyperoside, Isoquercétine et Acide chlorogénique) dans les fruits mûrs de l'aubépine chinoise (*C. monogyna*) par la méthode HPLC-UV; et Svedström et al. (2002) [1,2] ont découvert que les oligopeptides sont les principaux constituants actifs des feuilles de *Crataegus*. Ces auteurs ont également identifié la présence d'ideain (Cyanidine-3-*O*-galactoside), d'acide chlorogénique comme principal acide phénolique, de flavonol glycosides-hyperoside (Quercétine-3-*O*-galactoside) et d'isoquercétine (Quercétine-3-*O*-glucoside).

**Tableau 42:** Identification des principaux polyphénols par HPLC-DAD: comparaison de l'expérience Spectres UV obtenus à partir des pics inconnus dans les chromatogrammes des extraits (ESL) (lignes roses) à ceux des standards polyphénoliques de référence purs (Lignes bleues).

Numéro de pic (Correspondant Chromatogramme dans Figure.7)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Concentration ppm	Tr (min)	Nom du Composé	Extraits
1	320	1000	11,21	Acide caftarique	(B) Extrait AcOEt (feuilles)
4	320	1000	17,90	Acide caféique	
6	320	1000	19,39	Epicatéchine (WO5)	
7	320	1000	23,96	Quercétine (WO3)	
8			25,71	Naringénine (WO1)	
9	320	1000	26,38	Rutine	
10	320	1000	26,66	Quercétine-3- glucoside (WO2)	
1	320	1000	11,21	Acide caftarique	(C) Extrait <i>n</i> -Butanol (feuilles)
8	320	1000	26,66	Quercétine-3- glucoside (WO2)	
6	320	1000	25,55	Orientine	
6	280	1000	26,41	Rutine	(E) Extrait AcOEt (fruits)



**Figure 23:** Chromatogrammes HPLC-UV des extraits obtenus par ESL. (Feuilles) (280 nm), (A) :  $\text{CHCl}_3$ , (B) : AcOEt et (C) : *n*-Butanol. Fruits (320 nm) (D) :  $\text{CHCl}_3$ , (E) : AcOEt, et (F) : *n*-Butanol.



**Figure 24:** Chromatogramme (HPLC-DAD et UV) de l'extrait AcOEt (feuilles ) de *C. oxyacantha* avec les principaux constituants.

#### IV.2.2. Identification des composés phénoliques dans les extraits de MSPD.

Les extraits de MSPD des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha* ont été soumis à une analyse HPLC-DAD afin de caractériser les principaux polyphénols individuels présents dans ceux-ci. L'identification des composés phénoliques dans les chromatogrammes correspondants (Figures 25 et 26) a été basée, comme dans les extraits (ESL), sur la comparaison des temps de rétention et des spectres UV obtenus par détection par photodiodes des pics inconnus à ceux des étalons purs. Les résultats sont résumés dans le Tableau 43

Cette approche confirme la présence de Quercétine-3-glucoside, dans tous les extraits de fruits : EtOH 100% ; EtOH:H<sub>2</sub>O/1:1; et H<sub>2</sub>O 100% et dans l'extraits100% H<sub>2</sub>O feuilles), ce produit est déjà détecté dans les extraits (ESL): AcOEt et *n*-Butanol (feuilles). La présence de : Quercétine-3-rutinoside (Rutine) dans les extraits de feuilles avec n'importe quel solvant malgré sa polarisation. Il est clair que la plupart des solvants testés, malgré leur polarité, sont capables d'extraire ce plan phénolique. Un autre flavonol (Epicatechine) a également été identifié positivement dans les extraits de fruits obtenu avec de l'éthanol pur et dans l'extrait hydroéthanolique. Les acides caftarique et caféique ont également été positivement identifiés à la fois dans les fruits et dans les feuilles, et l'acide chlorogénique dans tous les extraits de feuilles

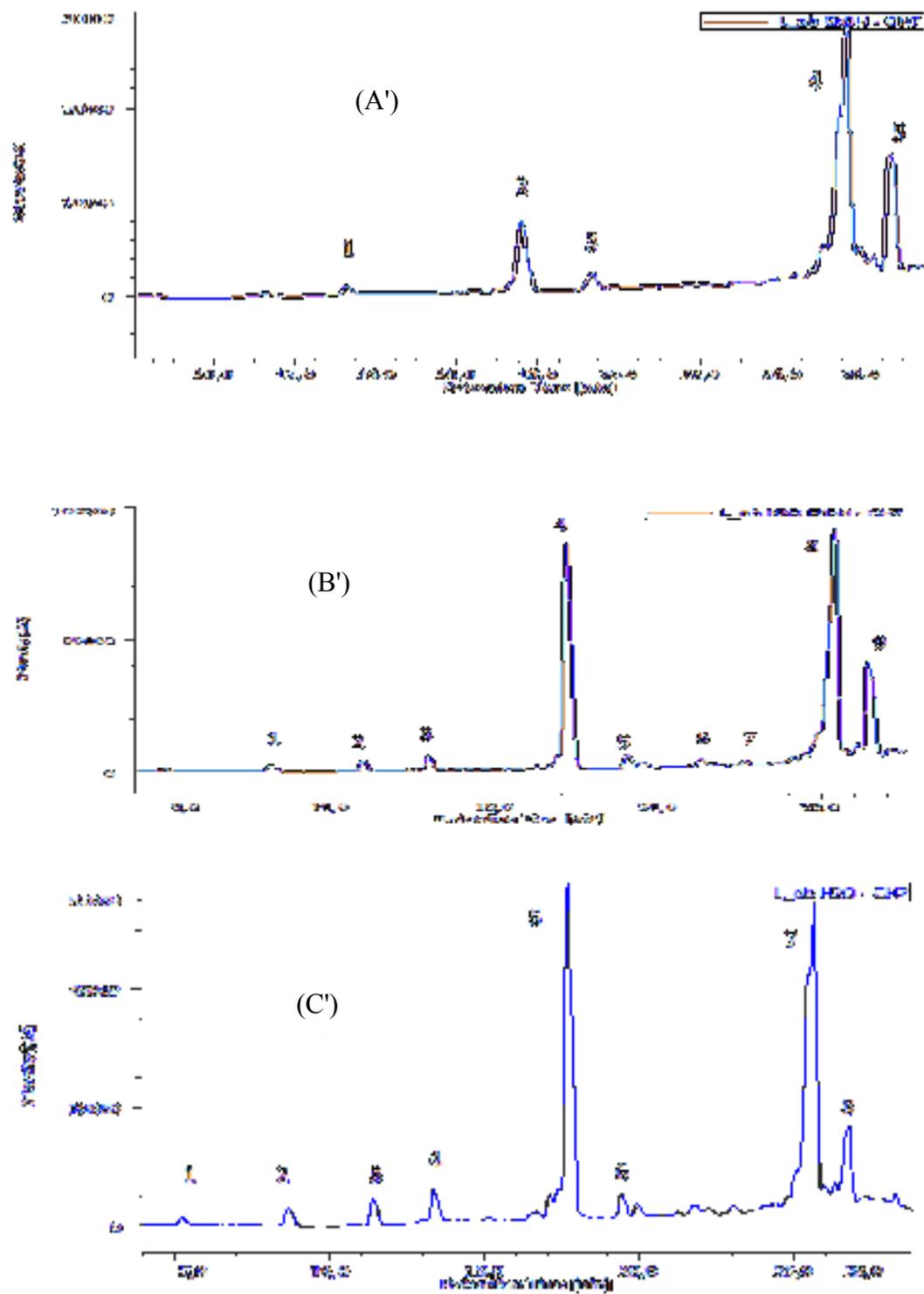
Deux flavones ont également été identifiés positivement dans les extraits de feuilles: l'Orientine a été extraite avec de l'éthanol pur et l'eau, et l'apigénine a été trouvée dans les extraits de feuilles obtenues avec n'importe quel solvant. Ces flavones ont des avantages importants pour la santé: l'orientine présente une grande variété d'activité antivirale, antioxydante, antimicrobienne et même de radioprotection [6]; et, en plus d'avoir des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, l'apigénine a acquis un intérêt particulier en tant qu'agent favorisant la santé par rapport à d'autres flavonoïdes structurellement apparentés [7].

Comme il est résumé dans le Tableau 43, la plupart des composés phénoliques mentionnés dans la littérature ont été trouvés dans des extraits de fruits et de feuilles de *C. oxyacantha* en utilisant l'approche basée sur MSPD. Les polyphénols Quercétine-3-glucoside, Acide caftarique et Orientine n'ont pas été décrits auparavant chez cette espèce.

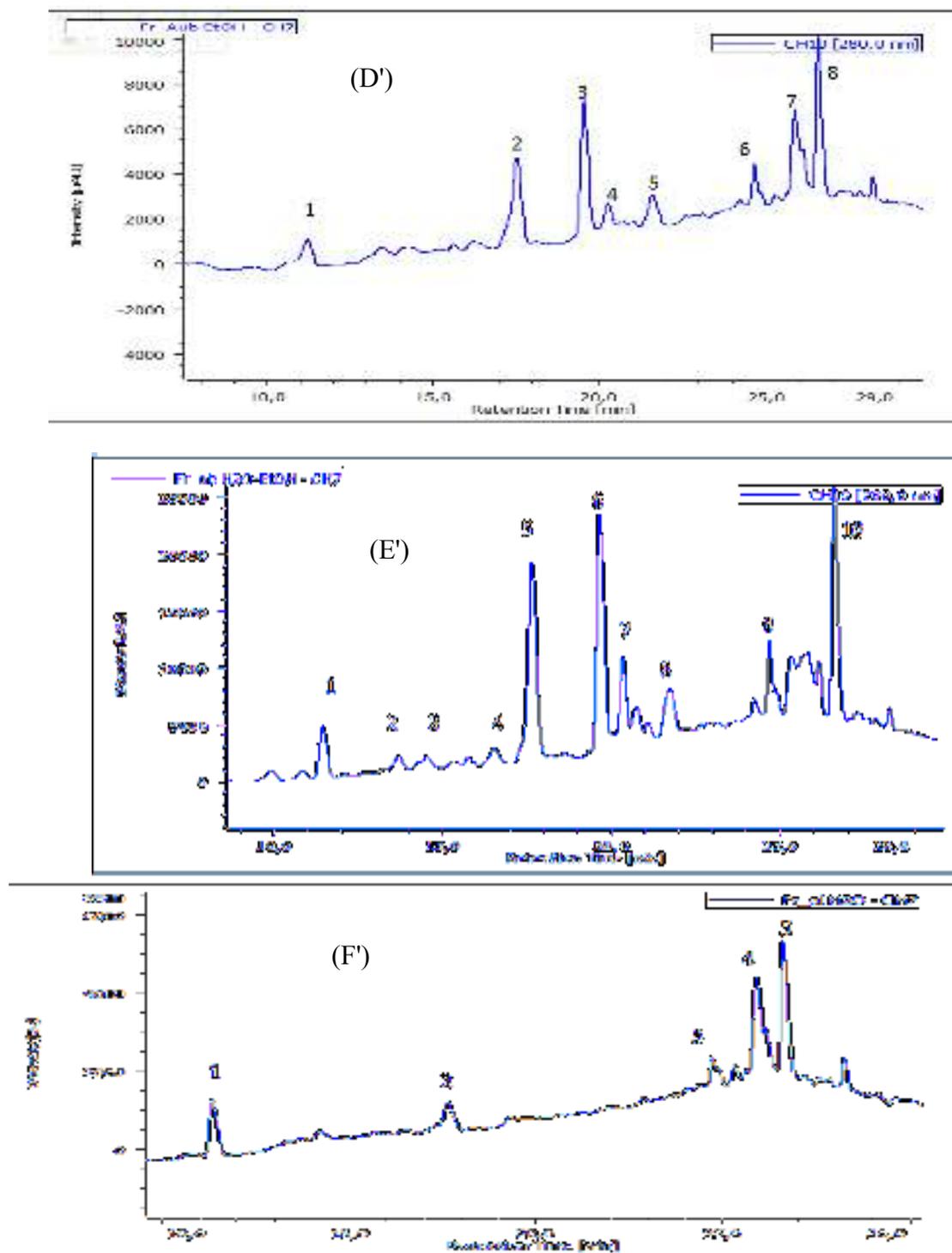
Par conséquent, *C. oxyacantha* semble être une matière première appropriée et MSPD une technique d'extraction adéquate pour obtenir des composés bioactifs et préparer des formes améliorées de thérapies efficaces à base de composés phénoliques végétaux.

**Tableau 43:** Résumé des résultats de caractérisation des extraits de *C. oxyacantha* Linn. (feuilles et fruits) obtenus par MSPD: Principaux polyphénols identifiés dans les chromatogrammes HPLC-DAD ( $\lambda = 280$  nm, 320 nm) avec différents solvants d'extraction.

Matériel végétal		Feuilles			Fruits		
Solvants d'extraction		EtOH (A')	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) (B')	H <sub>2</sub> O (C')	EtOH (D')	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) (E')	H <sub>2</sub> O (F')
Principaux polyphénols	Quercétine-3- glucoside	+			+	+	+
	Quercétine-3- rutinoside (Rutine)	+	+	+			
	Epicatéchine				+	+	
	Acide caftarique			+	+	+	+
	Acide caféique		+	+		+	
	Acide chlorogénique	+	+	+			
	Orientine	+		+			
	Apigénine	+	+	+			



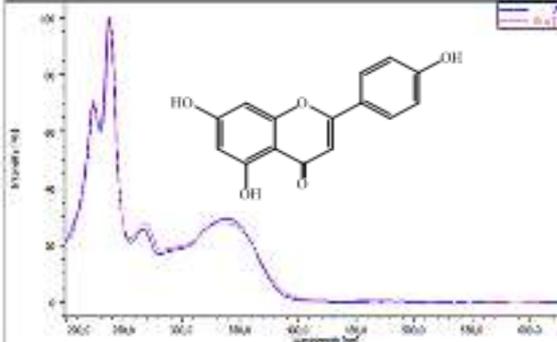
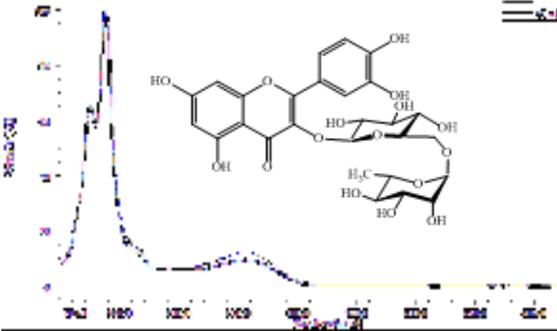
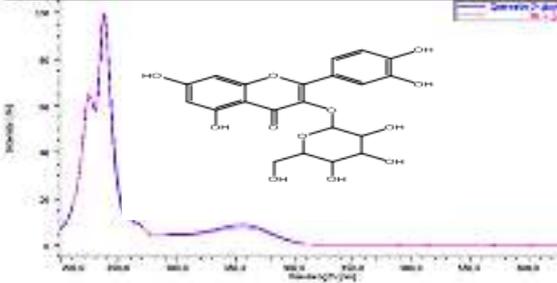
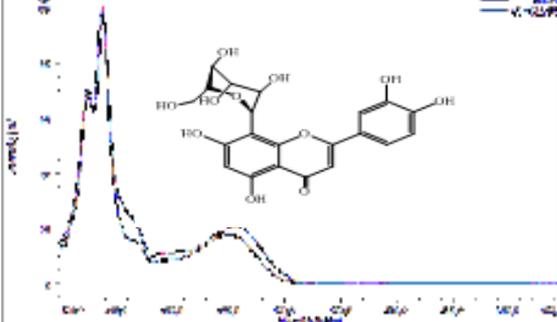
**Figure 25:** Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits de (MSPD) de *C. oxyacantha* (feuilles): (A') : EtOH 100%, (B') : EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50, (C') : H<sub>2</sub>O 100%.



**Figure 26:** Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits MSPD de *C. oxyacantha* (fruits):  
 (D') : EtOH 100%, (E') : EtOH /H<sub>2</sub>O 50/50, (F') : H<sub>2</sub>O 100%.

**Tableau 44:** Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD: comparaison des spectres UV expérimentaux obtenus à partir des pics inconnus dans les chromatogrammes des extraits MSPD (lignes roses) à ceux des standards polyphénoliques de référence purs (lignes bleues).

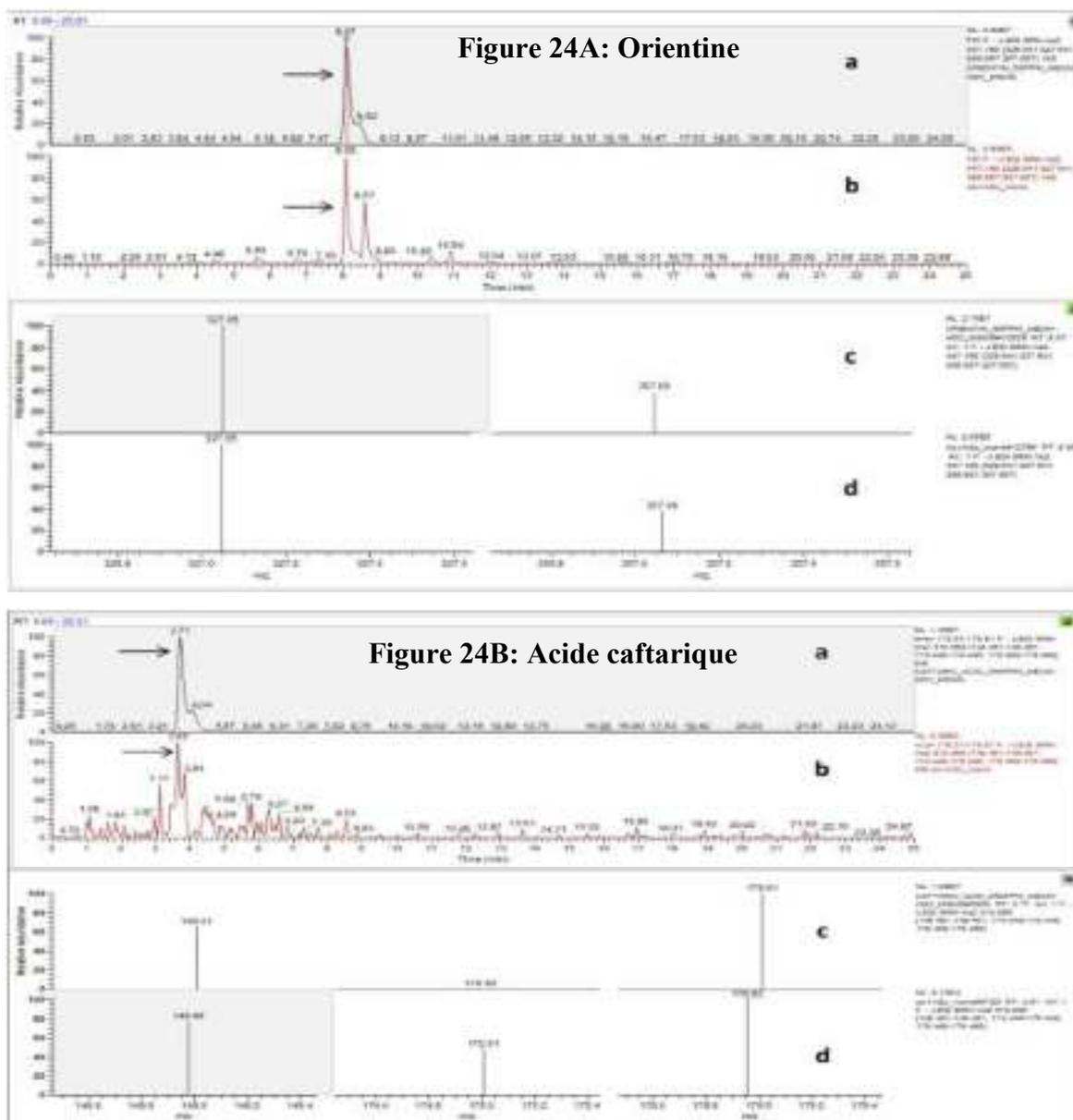
Nom du composé	Exemple de numéro de pic (Correspondant Chromatogramme des figures 4 et 5)	Temps de rétention, (min)	Spectres superposés: Spectre de référence standard pur (Bleu), Spectre expérimental (Rose)
Acide chlorogénique (1)	2(B') 3(C')	11,21	
Acide caftarique (2)	1 (D') 1 (E') 1 (F')	11,39	
Acide Caféique (3)	4(B') 5(E') 5(C')	17,90	
Epicatechine (4)	3(D') 6(E')	19,63	

<p><b>Apigénine</b></p> <p>(6)</p>	<p>7(C') 8(B')</p>	<p>25,58</p>	
<p><b>Quercétine-3-rutinoside</b></p> <p>(Rutine)</p> <p>(7)</p>	<p>5(A') 9(B') 8(C')</p>	<p>26,38</p>	
<p><b>Quercétine-3-glucoside</b></p> <p>(8)</p>	<p>5 (A') 8 (D') 10 (E') 5 (F')</p>	<p>26,66</p>	
<p><b>Orientine</b></p> <p>(9)</p>	<p>4(A')</p>	<p>24,11</p>	

**Suite Tableau 44:** Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD: comparaison des spectres UV expérimentaux obtenus à partir des pics inconnus dans les chromatogrammes des extraits MSPD (lignes roses) à ceux des standards polyphénoliques de référence purs (lignes bleues).

### IV.3. Analyse de confirmation des polyphénols: LC-MS/MS

Les polyphénols Quercétine-3-glucoside, Acide caftarique et Orientine n'avaient pas été décrits auparavant chez cette espèce; ainsi, leur identité a été confirmée par LC-MS / MS (Figure 27) à l'exception de l'Epicatechine, suggérée sur la base du spectre UV et de son temps de rétention dans les deux systèmes chromatographiques. Par conséquent, la MSPD semble être une technique d'extraction adéquate pour obtenir des composés bioactifs à partir de *C. oxyacantha*.

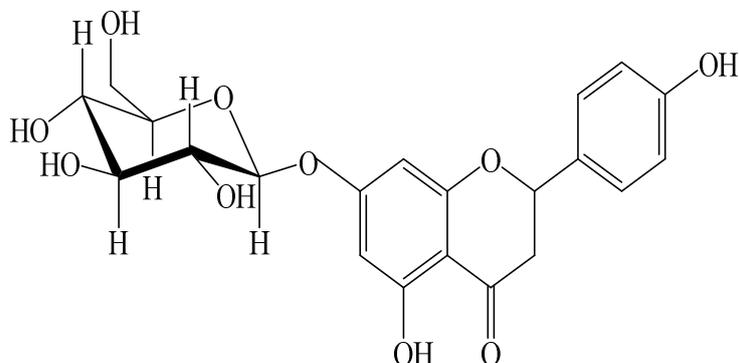


**Figure 27:** Chromatogrammes ioniques LC-MS/MS de l'orientine (A) et de l'acide caftarique (B): étalons purs dans MeOH:H<sub>2</sub>O (a); extrait MSPD de feuilles de *Crataegus oxyacantha* dans 100% de H<sub>2</sub>O (b); et les spectres MS-MS correspondants pour les standards (c) et l'extrait (d).

#### IV.4. Elucidation structurale des composés de *Crataegus oxyacantha* L.

##### IV.4.1. Elucidation structurale des composés de l'extrait AcOEt

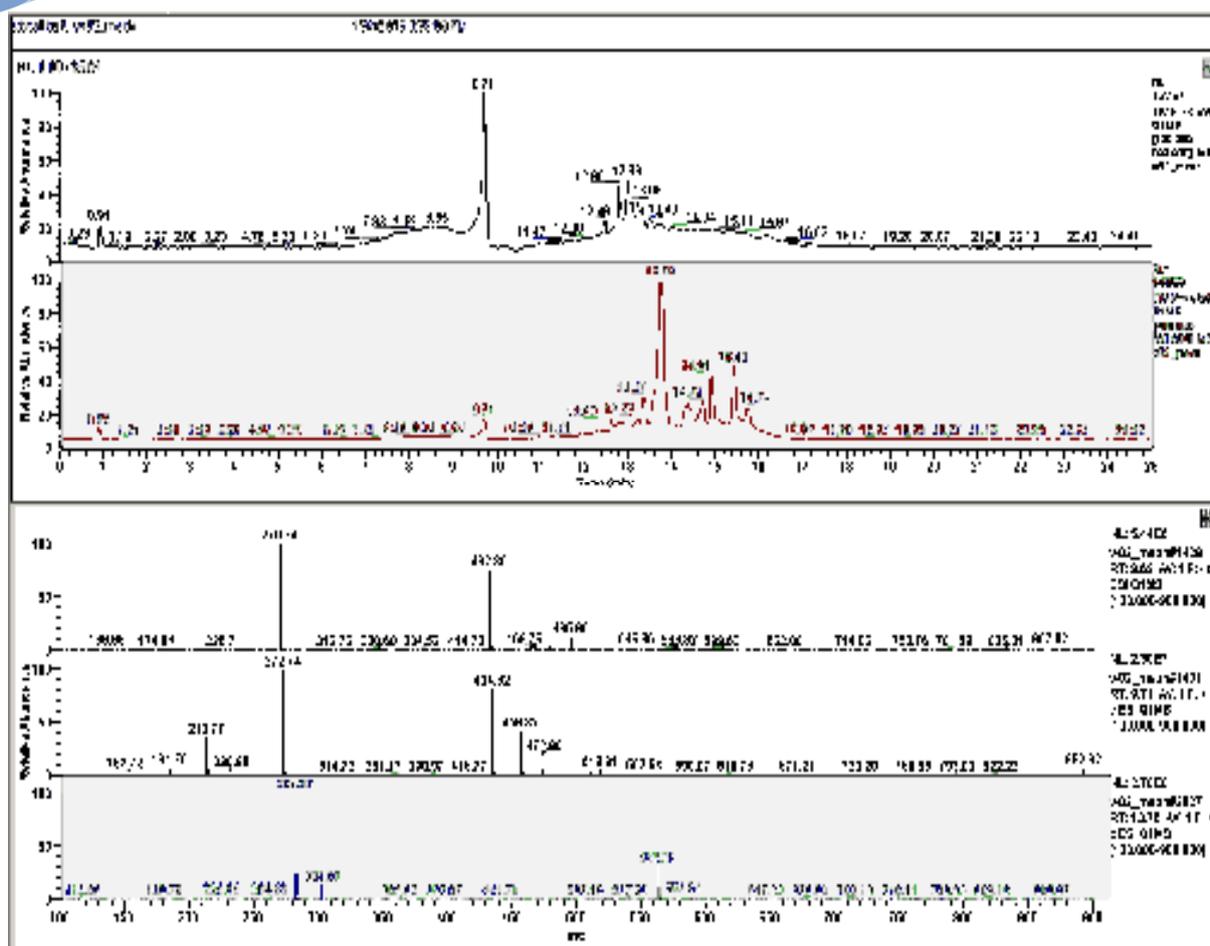
##### IV.4.1.1. Éluclidation structurale du composé WO1



Le composé WO1 a été isolé de l'extrait AcOEt sous forme de poudre de couleur jaune soluble dans le DMSO.

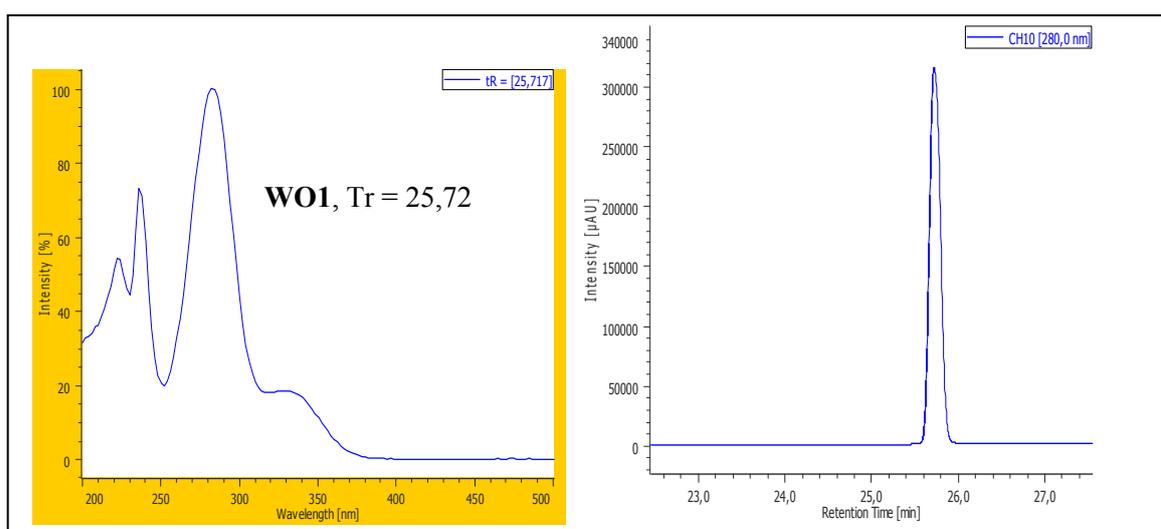
Ce composé est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm et une couleur orange après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 min ce qui permet d'envisager une structure de type flavanone.

Le spectre de masse du composé WO1 enregistré sur le spectromètre Waters Q-Tof 2. ESI de résolution positive (Spectre 1) montre un pic de masse quasi moléculaire à  $m/z$  (434,80) correspondant à la masse moléculaire 434 *uma* en accord avec la formule brute  $C_{21}H_{22}O_{10}$ , soit une molécule renfermant 11 insaturations.



**Spectre 1:** Spectre de masse du composé WO1 enregistré sur le spectromètre Waters Q-ToF2

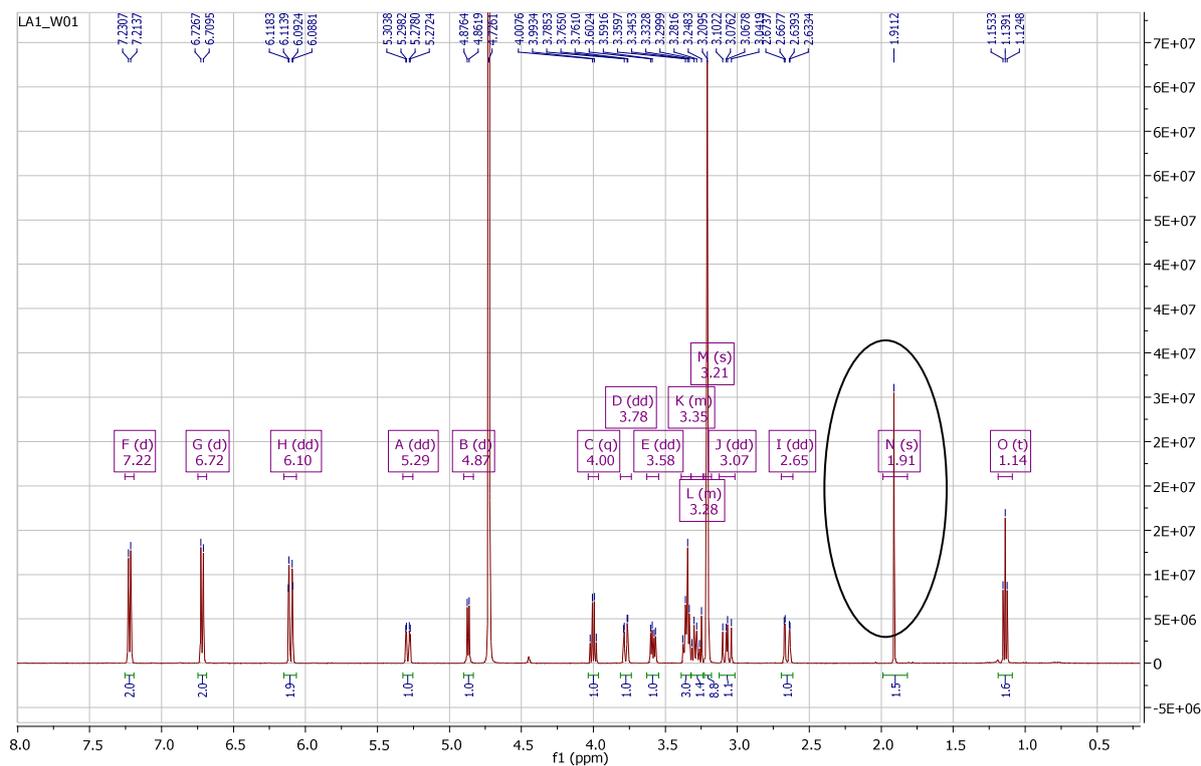
Il y a un pic dans l'injection de W01 à 9,82 min avec un spectre très propre (Spectre 2) qui montre l'état pur de ce produit et un spectre UV montre que ce produit est de type flavonoïde (deux bandes : bande I à 280, et la bande II à 225).



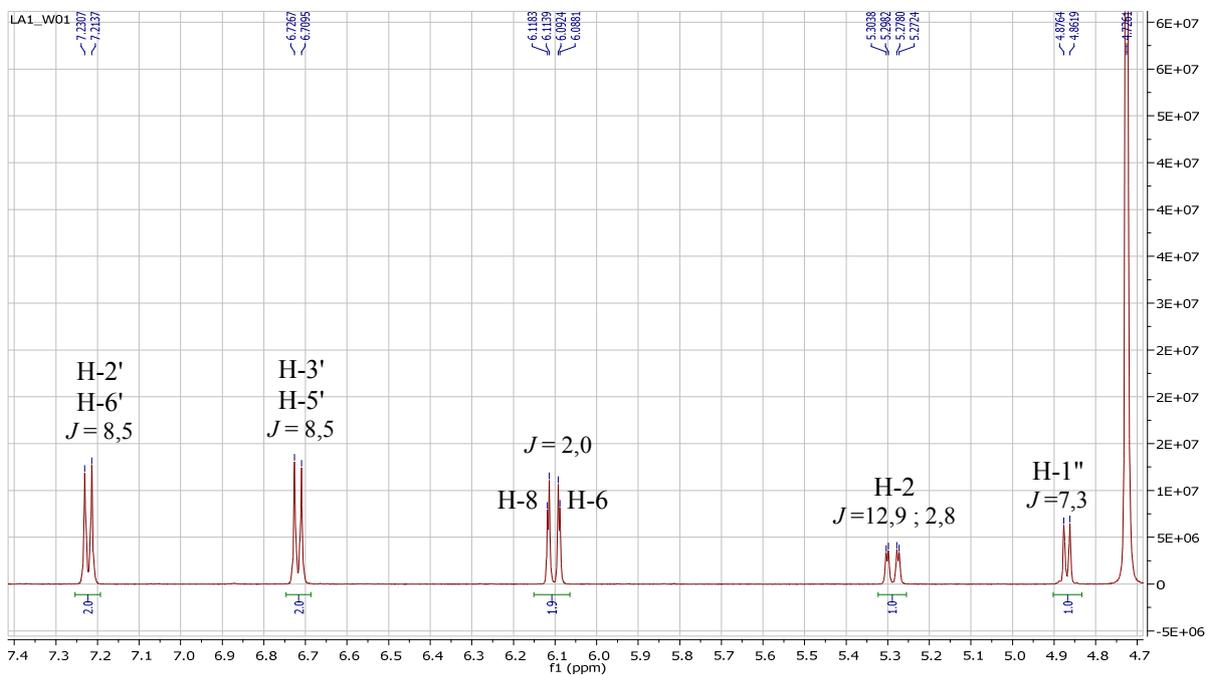
**Spectre 2:** Spectre UV et chromatogramme HPLC-DAD du composé WO1

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 3) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavanone reconnaissable par :

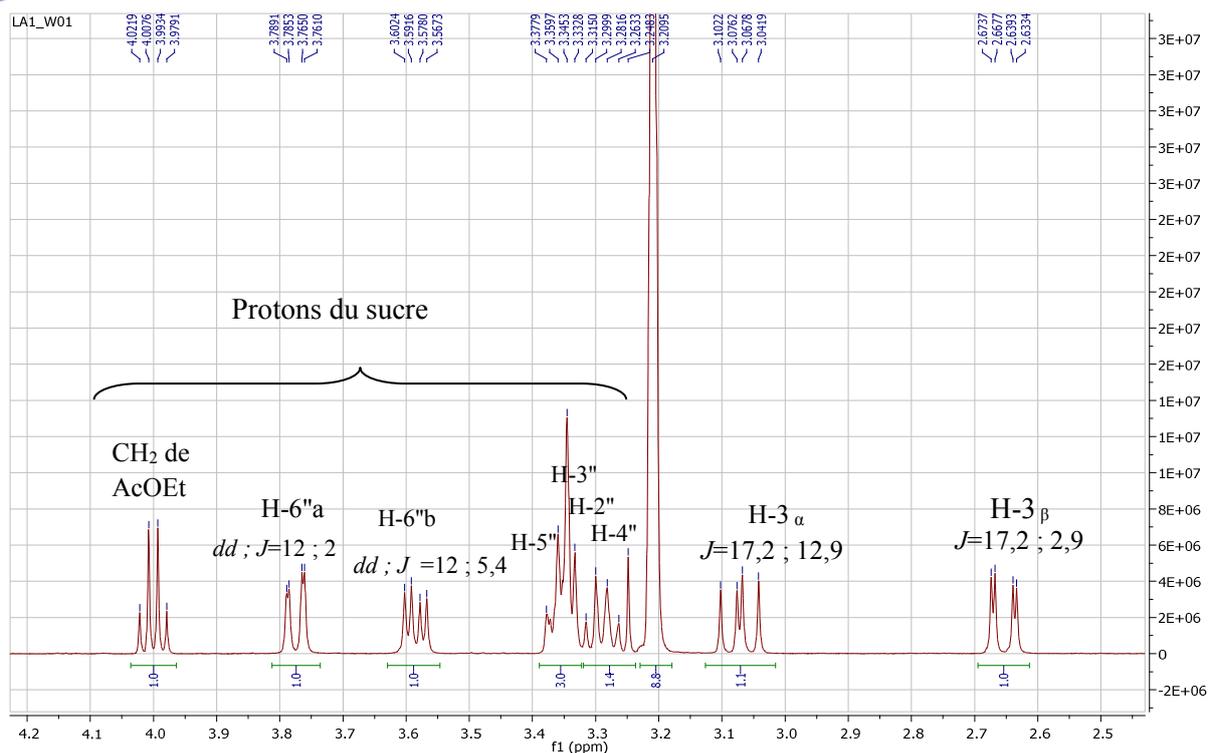
- ✓ Un doublet dédoublé d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5,28$  ppm (*dd* ;  $J = 12,9$  ; 2,8 Hz) correspondant au proton H-2 [8].
- ✓ Deux doublets dédoublés d'intégration 1H chacun, à  $\delta_{\text{H}} = 2,64$  ppm (*dd* ;  $J = 2,9$  ; 17,2 Hz) et  $\delta_{\text{H}} = 3,08$  ppm (*dd* ;  $J = 12,9$  ; 17,2 Hz) correspondant respectivement aux protons H-3 $_{\beta}$  et H-3 $_{\alpha}$  d'une flavanone [9].
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 4,87$  ppm avec une constante de couplage  $J = 7,3$  Hz attribuable au proton anomérique H-1" d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone, quant à la valeur 7,3 Hz de constante de couplage, cette entité pourrait être soit un glucosyle soit un galactosyle avec une configuration  $\beta$  du carbone anomérique et ayant le proton 2" avec une orientation axiale. [10-12].
- ✓ Un ensemble de multiplet dans l'intervalle 3,72-4,1 ppm attribuable par conséquent aux protons du substituant sucre.
- ✓ Dans la région des protons aromatiques, deux doublets à  $\delta_{\text{H}} = 7,22$  et 6,72 ppm intégrant chacun pour 2H et couplés entre eux ( $J = 8,5$  Hz) attribuables aux protons H-6', H-2' et H-5', H-3' respectivement.
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun, à  $\delta_{\text{H}} = 6,10$ ,  $\delta_{\text{H}} = 6,12$  ppm ( $J = 2,0$  Hz) attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.



Spectre 3: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1.

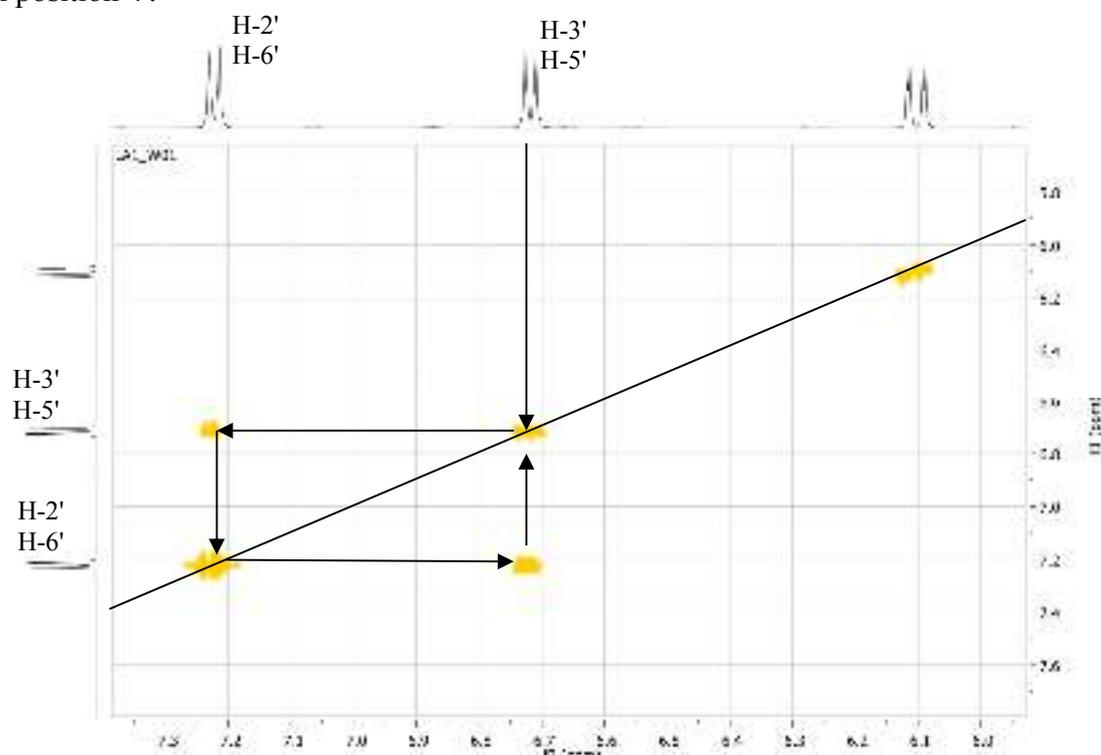


Spectre 3-1: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement).



**Spectre 3-2:** Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WO1, (Etalement).

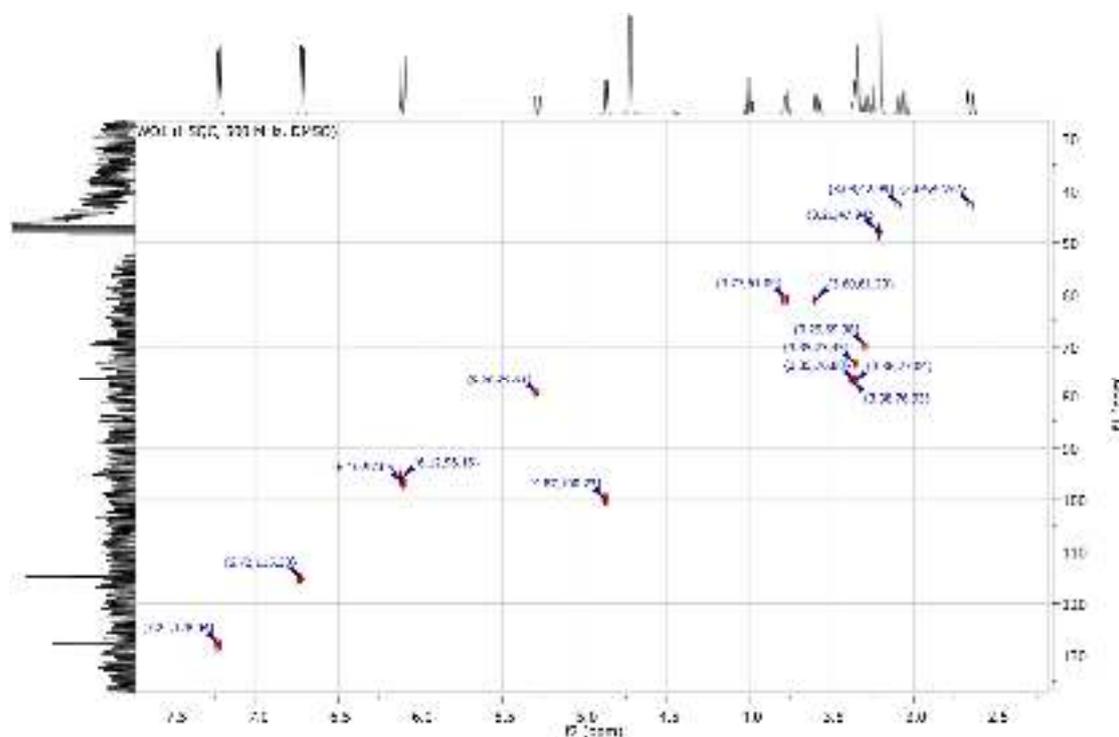
L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 4) montre Une tache de corrélation entre les protons H-3', H-5' et les protons H-2', H-6' ce qui confirme la substitution du noyau B en position 4'.



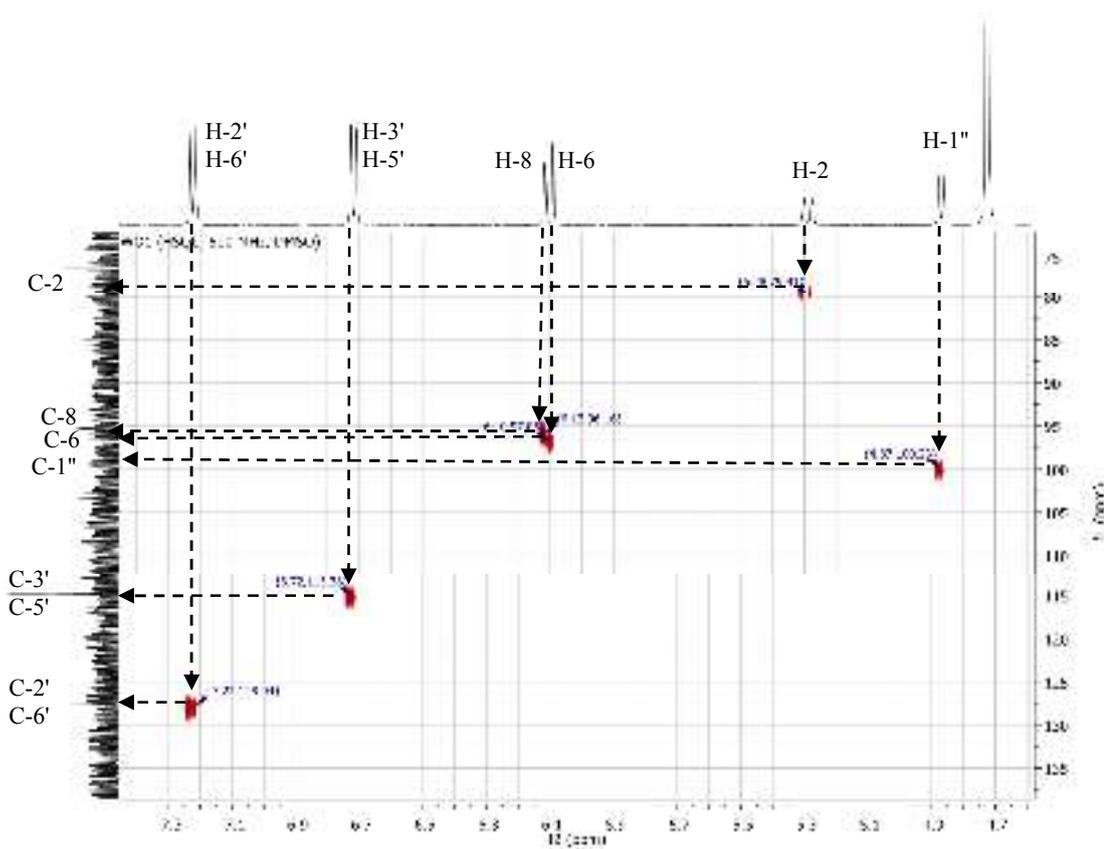
**Spectre 4:** Spectre COSY (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WO1, (Etalement).

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 5) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

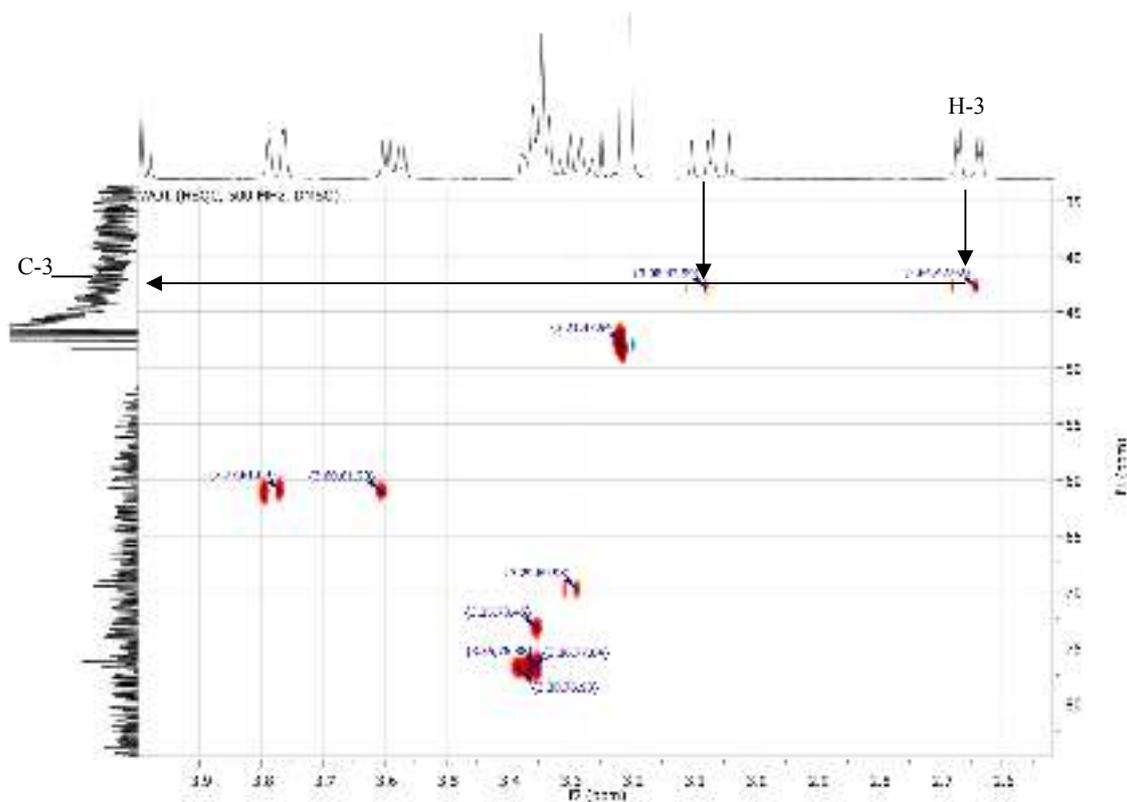
- 🧩 Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à  $\delta = 96,16$  ppm qui est le C-8.
- 🧩 Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à  $\delta = 97,05$  ppm qui est le C-6.
- 🧩 Une tâche de corrélation entre le H-5', H-3' et les carbones C-5' et C-3' à  $\delta_C = 115,38$  ppm.
- 🧩 Une tâche de corrélation entre le H-6', H-2' et ces carbones C-6' et C-2' à  $\delta_C = 128,04$  ppm.
- 🧩 Une tâche de corrélation entre le H-2 et le C-2 à  $\delta_C = 79,91$  ppm.
- 🧩 Une tâche de corrélation entre les H<sub>2</sub>-3 et le C-3 à  $\delta_C = 42,95$  ppm.
- 🧩 Une tâche de corrélation entre le H-1" et le C-1" à  $\delta_C = 100,23$  ppm.



**Spectre 5:** Spectre HSQC (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé WO1.



Spectre 5-1: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement).



Spectre 5-2: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement).

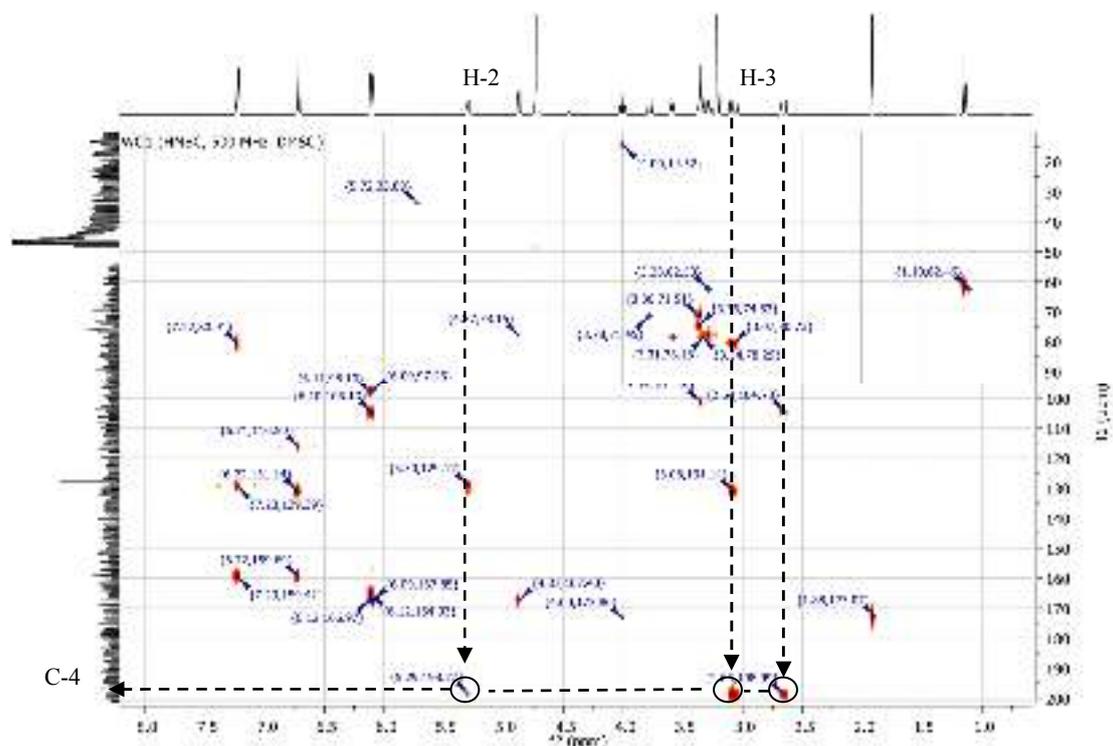
L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 6 et ses étalements) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes:

- ✚ Une corrélation entre H-2 et le carbone à  $\delta_c = 129,17$  ppm attribuable à C-1', cette attribution est confirmée par la présence d'une tache de corrélation entre ce carbone et les deux protons H-2' et H-6'.
- ✚ Le carbone C-4 est localisé à  $\delta_c = 198,77$  grâce à sa corrélation avec les deux protons H-2 et H-3, vu la valeur de son déplacement chimique, la plus élevée des carbones oxygénés quaternaires.
- ✚ Le carbone C-5 est localisé à  $\delta_c = 166,97$  grâce à sa corrélation avec le proton H-6.

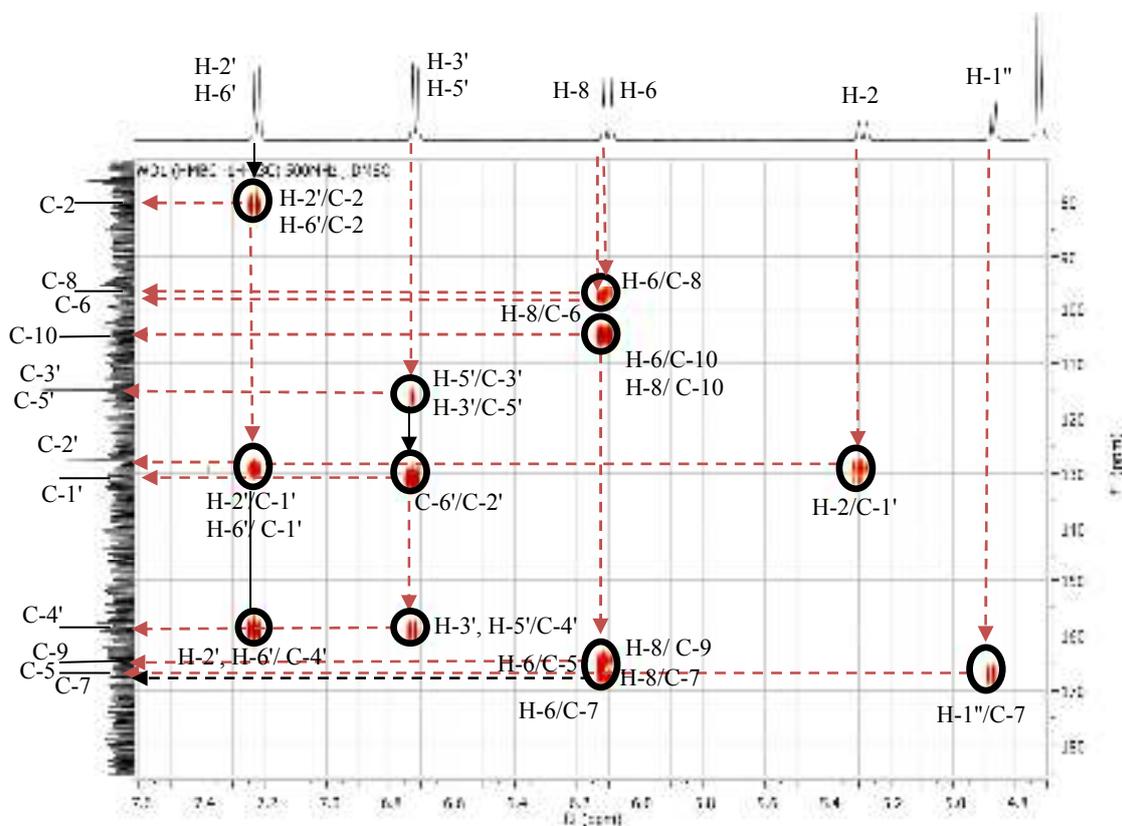
L'attribution de C-8 et C-6 permet la localisation de C-10 à  $\delta_c = 105,13$  ppm et C-9 à  $\delta_c = 164,9$  ppm vu la tache de corrélation observée entre ces carbones et les protons H-8 et H-6. Ces deux protons montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à 167,40 ppm qui ne peut être que le C-7. Par ailleurs et toujours sur le même spectre ce carbone montre une tache de corrélation avec le proton anomérique du sucre. Cette observation permet de placer le substituant sucre en position 7.

- ✚ Les protons H-2' et H-6', H-3' et H-5' montrent une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_c = 159,55$  ppm attribuable à C-4'.

La nature de sucre de type hexose est confirmée par la présence de cinq signaux sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en plus du signal relatif au carbone anomérique (C-1'') et de ceux du squelette flavonique (Spectre 7).

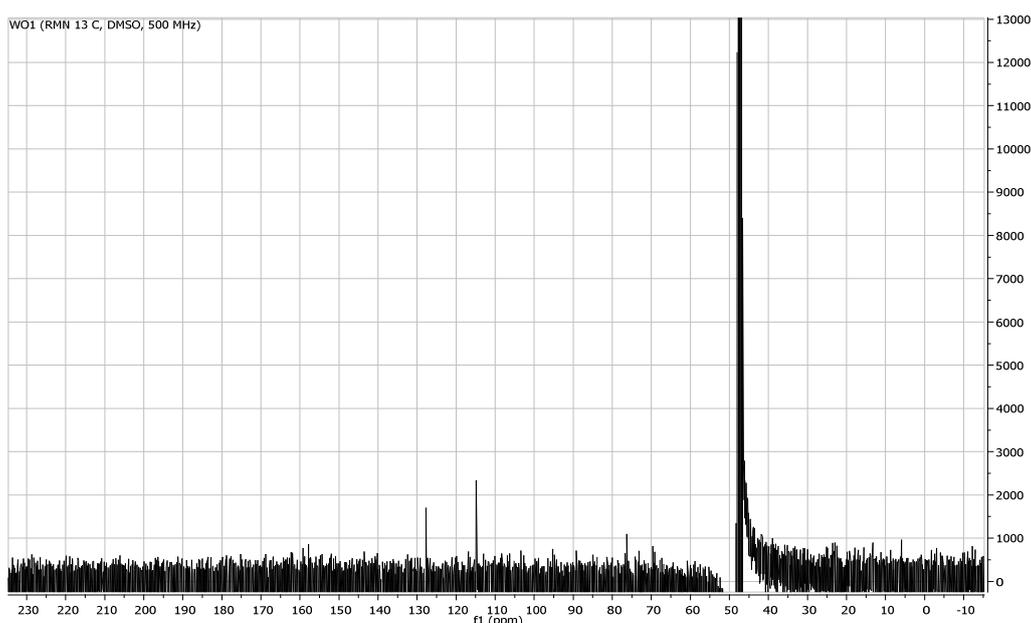


Spectre 6: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1.

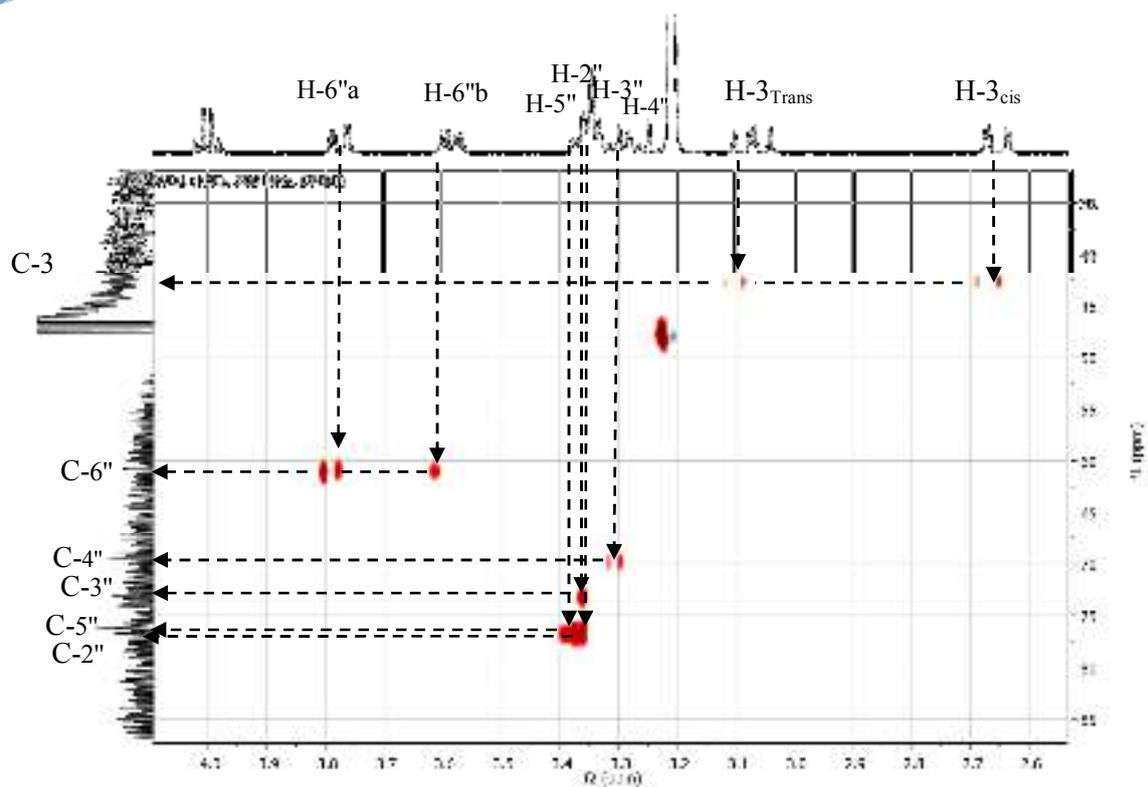


Spectre 6-1: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement).

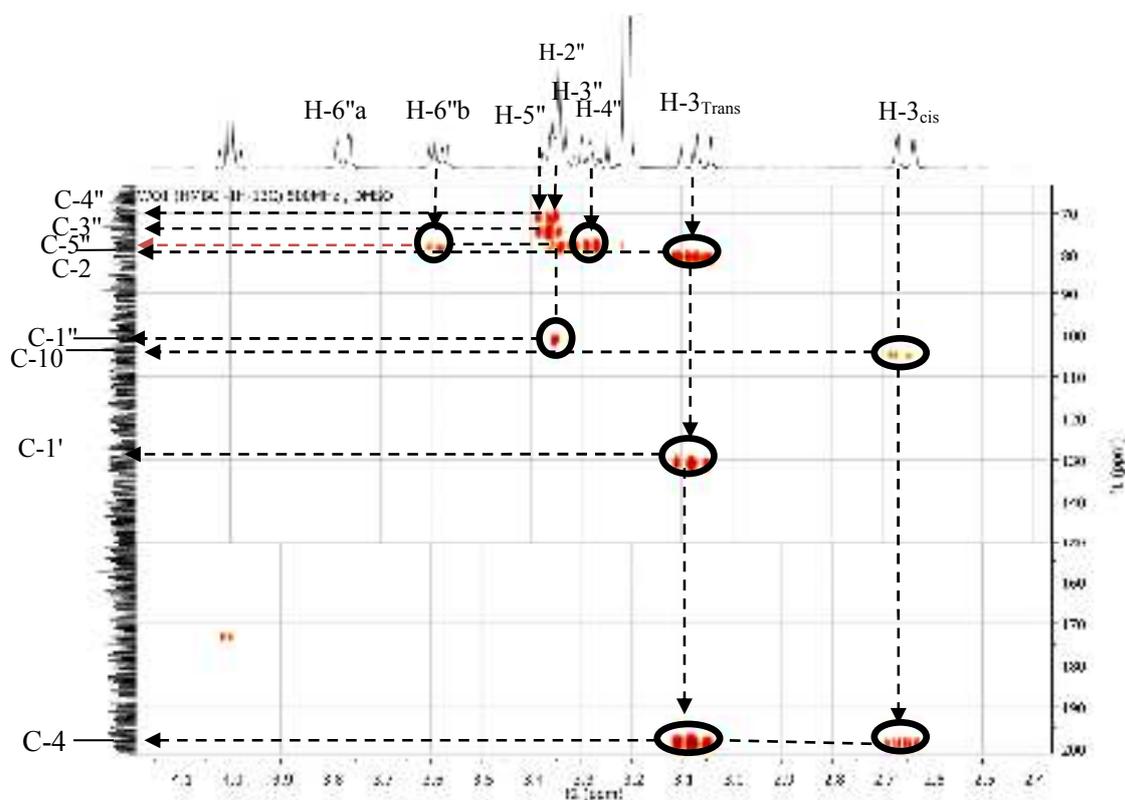
- ✚ L'examen approfondi du spectre HMBC (Spectre 6-3), permet de localiser le proton H-2" du glycosyle ( $\delta_H = 3,35$  ppm) grâce à sa corrélation avec le carbone C-1" ( $\delta_C = 100,23$  ppm). Ce proton (H-2") montre une tache de corrélation avec le carbone ( $\delta_C = 74,71$  ppm, attribuable au C-3").
- ✚ Un retour vers le spectre HSQC (Spectre 5), le proton H-2" permet de localiser C-2" à  $\delta_C = 78,15$  ppm, et le carbone C-3" permet de localiser le proton H-3" à  $\delta_H = 3,33$  ppm.
- ✚ Sur le spectre HMBC, le carbone C-2" corrèle avec deux protons à  $\delta_H = 3,33$  (H-3") et 3,27 ppm attribuable à H-4", ce dernier proton permet de localiser son carbone C-4" à  $\delta_C = 69,98$  ppm (Spectre 5). Le signal de H-3" apparaît sous forme d'un triplet à  $\delta_H = 3,33$  ppm ( $J = 9,0$  Hz), présentant un effet de toit avec celui de H-4" est attribuable au H-4". Cette valeur de la constante de couplage suppose une interaction axiale-axiale entre H-3" et H-4". Cette observation oriente vers un H-4" axiale. En conséquence le groupement glycosyle présent en C-7 est donc un glucosyle.
- ✚ Sur le spectre HSQC (Spectre 5), les deux protons à  $\delta_H = 3,78 ; 3,59$  ppm (H-6" a et H-6" b) corrélient avec le carbone à  $\delta_C = 61,16$  ppm attribuable à C-6".
- ✚ Le proton H-5" est localisé à  $\delta_H = 3,36$  ppm grâce à sa corrélation avec les deux carbones C-3" et C-4" (Spectre 6-3), ce dernier, permet de localiser son carbone à  $\delta_C = 76,88$  (Spectre 5).



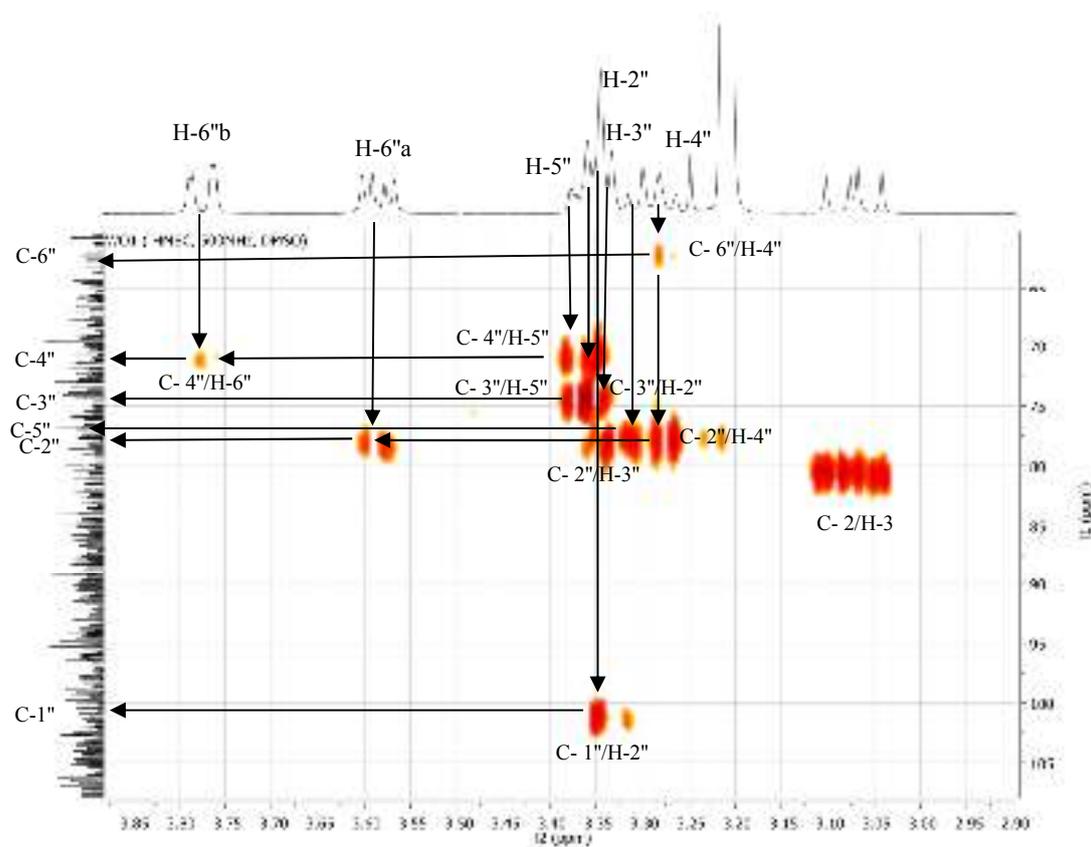
**Spectre 7:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1.



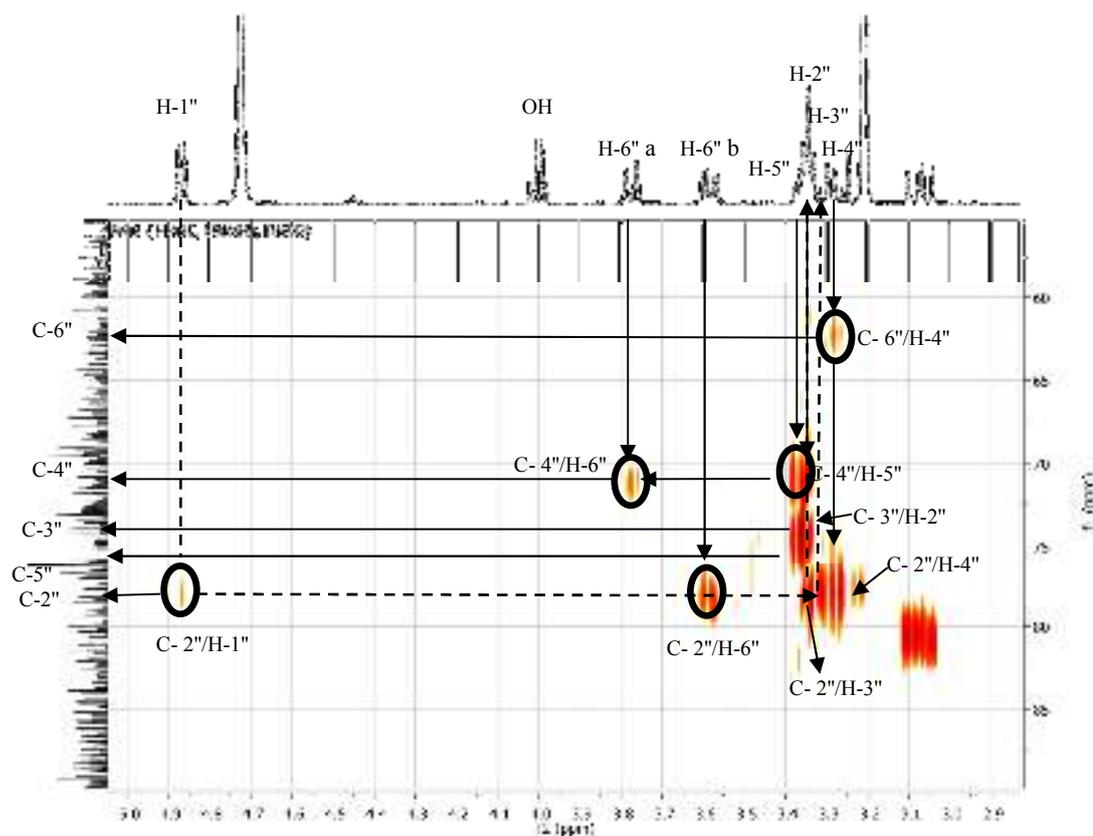
Spectre 5-2: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement)



Spectre 6-2: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO1, (Etalement).



Spectre 6-3: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_{ppm}$ ) du composé WO1, (Etalement).



Spectre 6-4: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_{ppm}$ ) du composé WO1, (Etalement)

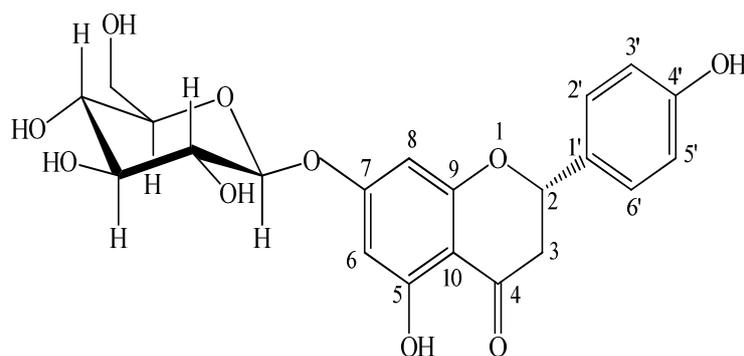
Les données relatives au spectre de RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC et HMBC de ce composé sont reportées dans le Tableau 45.

**Tableau 45:** Données expérimentales de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) du composé WO1.

N°	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	( <i>m</i> , <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	/	/	/
2	5,28	( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 12,9 ; 2,8 )	79,91
3 <sub><math>\alpha</math></sub>	3,08	( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 12,9 et 17,2 )	42,95
3 <sub><math>\beta</math></sub>	2,64	( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 2,9 et 17,2 )	42,95
4	/	/	198,77
5	/	/	166,97
6	6,12	( <i>d</i> ; <i>J</i> = 2,0 )	97,05
7	/	/	167,40
8	6,10	( <i>d</i> ; <i>J</i> = 2,0 Hz)	96,16
9	/	/	164,93
10	/	/	105,13
1'	/	/	129,17
2' , 6'	7,22	( <i>d</i> ; <i>J</i> = 8,5 Hz)	128,04
3' , 5'	6,72	( <i>d</i> ; <i>J</i> = 8,5 Hz)	115,38
4'	/	/	159,55
1''	4,87	( <i>d</i> ; <i>J</i> = 7,3 Hz)	100,23
2''	3,34	( <i>t</i> ; <i>J</i> = 9,1 Hz)	78,15
3''	3,33	( <i>t</i> ; <i>J</i> = 9,0 Hz)	74,71
4''	3,27	<i>t</i>	69,98
5''	3,36	<i>m</i>	76,88
6''-a	3,78	( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 12 ; 2 Hz)	61,16
6''-b	3,59	( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 12 ; 5,5 Hz)	61,16

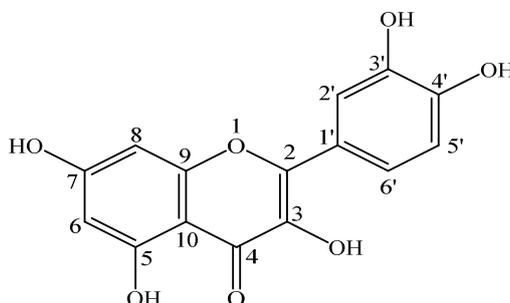
L'ensemble de ces données mènent à la structure finale du composé WO1. Ces analyses sont en accord direct avec la littérature [9, 13] cela donc permet d'attribuer au WO1 la structure de : **Naringénine-7-O- $\beta$ -glucosyde**. Cette molécule n'avait pas été décrite auparavant chez cette espèce.

Plusieurs rapportent que cette molécule possède de multiples activités biologiques et des effets pharmacologiques, y compris: antioxydant, antithrombotique, anti-inflammatoire et joue de rôles vasodilatatoires dans l'athérosclérose [14].



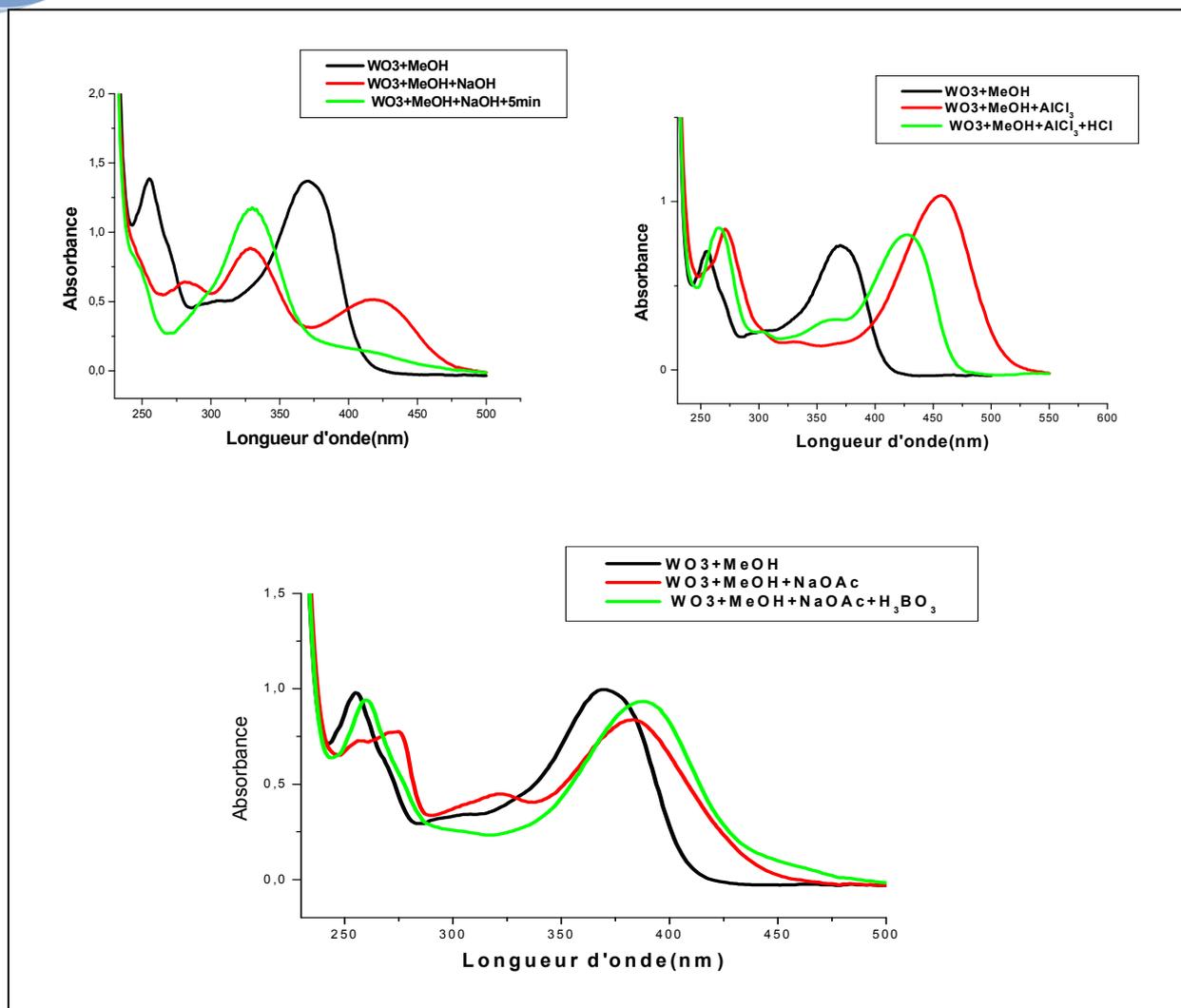
**Figure 28:** Structure finale du composé WO1:  
(Naringénine-7-O- $\beta$ -glucosyde)

#### IV.4.1.2. Élucidation structurale du composé WO3



- ✓ Le spectre UV du composé WO3 (Spectre 8), enregistré dans le MeOH montre deux bandes à 370 et 255 nm relatifs respectivement à la bande I et II caractéristiques d'un flavonol [15].
- ✓ L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de +48 nm pour la bande I, indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre indique la présence d'un OH libre en position 3.
- ✓ L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II de +18 nm par rapport au spectre MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.
- ✓ Le déplacement bathochromique de la bande I de +58 nm avec une augmentation de son intensité lumineuse, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH+AlCl<sub>3</sub> + HCl comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre, atteste que ce flavonol porte un groupement hydroxyle libre en position 5.
- ✓ La présence du système orthodihydroxy sur le noyau B est expliquée par le déplacement hypochrome de la bande I (-29 nm) en comparant les deux spectres AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub> + HCl et par le déplacement bathochrome (+17 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH.

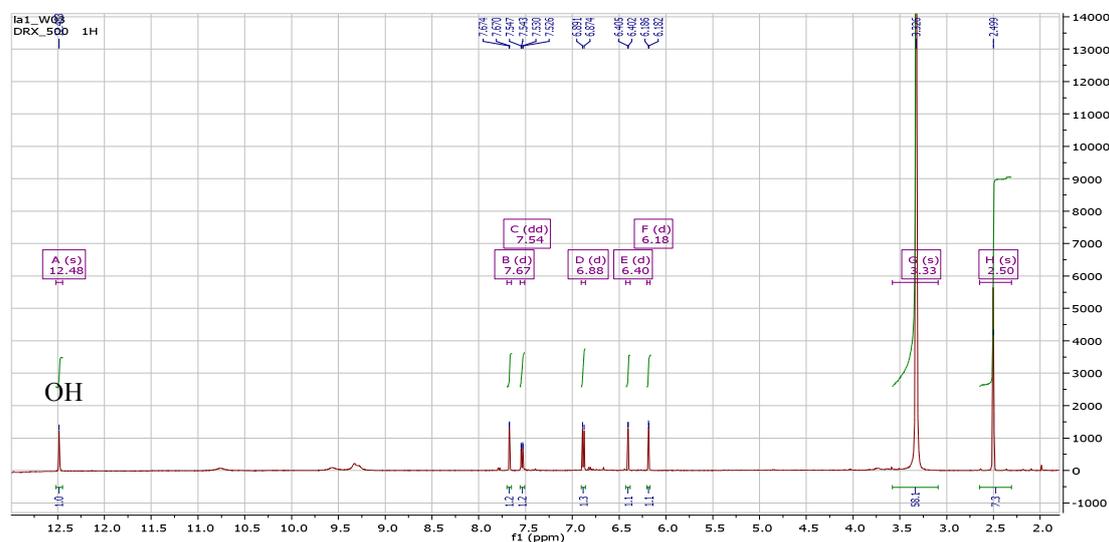
Ces données spectrales UV sont mentionnés dans le Tableau 46.

Spectre 8: Série spectrale UV-vis du composé WO<sub>3</sub>.Tableau 46: Données spectrales UV-vis du composé WO<sub>3</sub>

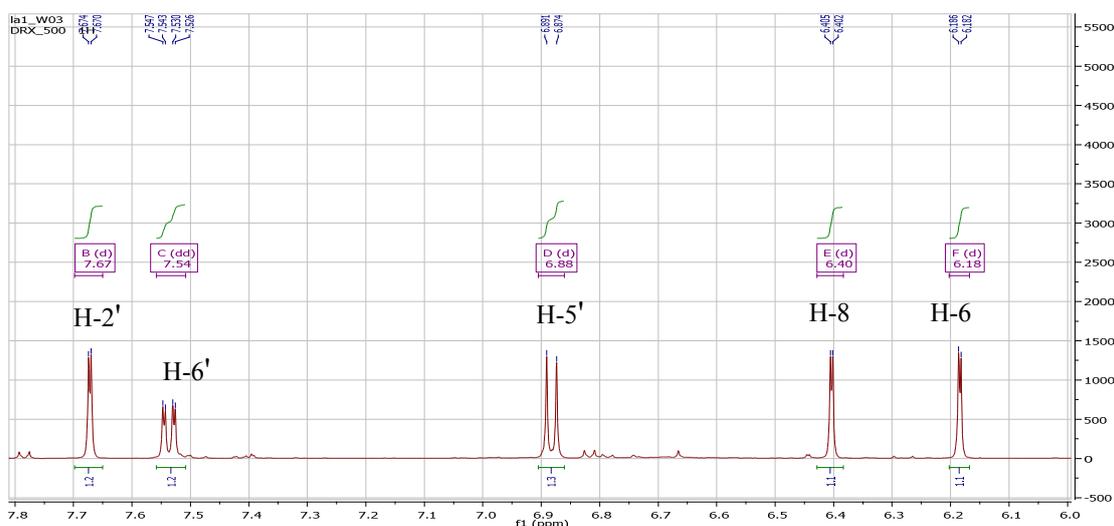
Solvants-réactifs	$\lambda_{\max}$			Commentaires
	Bande I (nm) Cycle B	Bande II (nm) Cycle A	Autres bandes	
MeOH	370	255	/	OH libre en position 3
NaOH	418	282	328	OH libre en position 4' OH libre en position 7
NaOH + 5 min	330	249	/	/
AlCl <sub>3</sub>	457	270	361 } →	OH libre en position 5 Système <i>ortho</i> -OH sur le noyau B
AlCl <sub>3</sub> + HCl	428	266		
NaOAc	382	273	321	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	387	259	/	Système <i>ortho</i> -OH sur le noyau B

L'examen du spectre de RMN  $^1\text{H}$  et son étalement (Spectre 9, Spectre 9-1) du composé WO3 montrent des signaux qui confirment bien l'existence d'un squelette flavonoïde [16]. Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et les attributions des signaux observés sont comme suit:

- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}} = 6,18$  ( $J = 2,1$  Hz), le second à  $\delta_{\text{H}} 6,4$  ( $J = 2,1$  Hz) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, pour le cycle A.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 7,67$  ppm avec une constante de couplage de  $J = 2,1$  Hz attribuable à H-2'.
- ✓ Un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta = 7,54$  ppm ( $J = 2,1; 8,4$ Hz) attribuable à H-6'.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6,88$  ppm ( $J = 8,4$  Hz) attribuable à H-5'.
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 12,48$  ppm attribuable à OH-5.

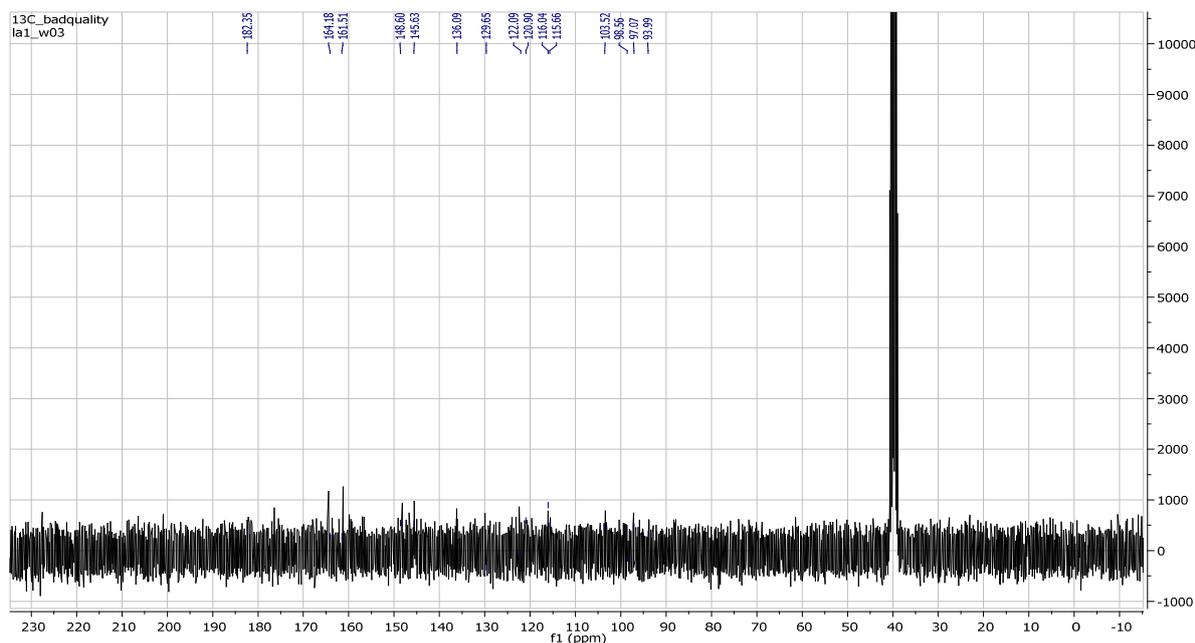


**Spectre 9:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO3.



**Spectre 9-1:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO3, (Étalement).

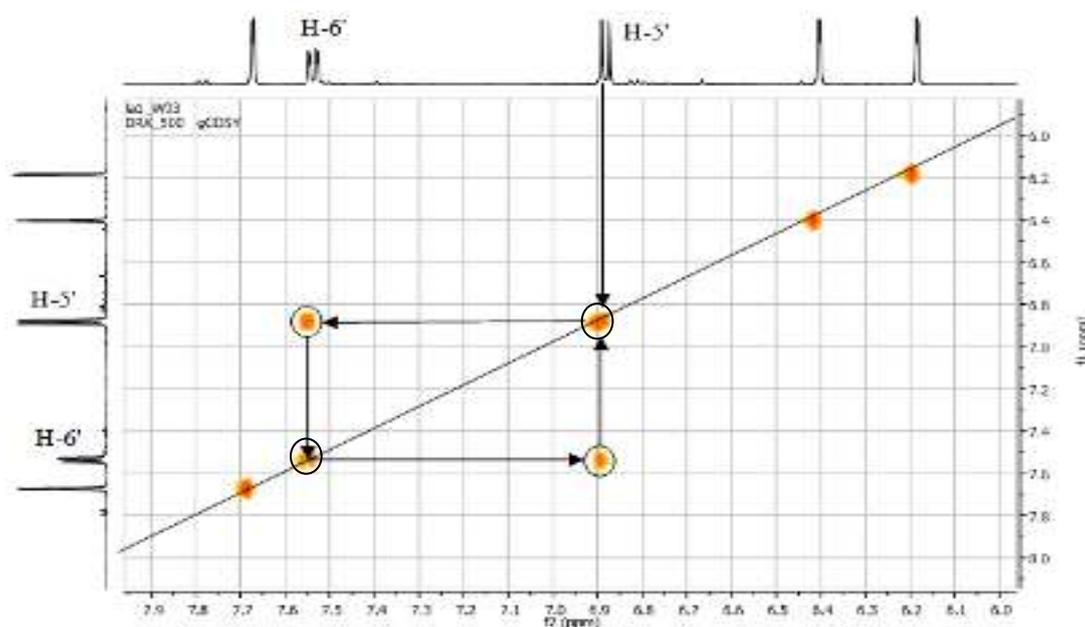
L'examen du spectre relatif à l'expérience RMN<sup>13</sup>C (Spectre 10) montre la présence de 15 atomes de carbones. Ce qui confirme qu'il s'agit bien d'un flavonoïde.



**Spectre 10:** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WO3.

L'absence sur le spectre RMN <sup>1</sup>H d'un signal sigulet entre 6,70 et 7,30 ppm (H-3) et l'apparition sur le spectre <sup>13</sup>C d'un nouveau signal à δ<sub>c</sub> = 136,39 ppm (C-3) confirme la présence d'un OH libre en position C-3.

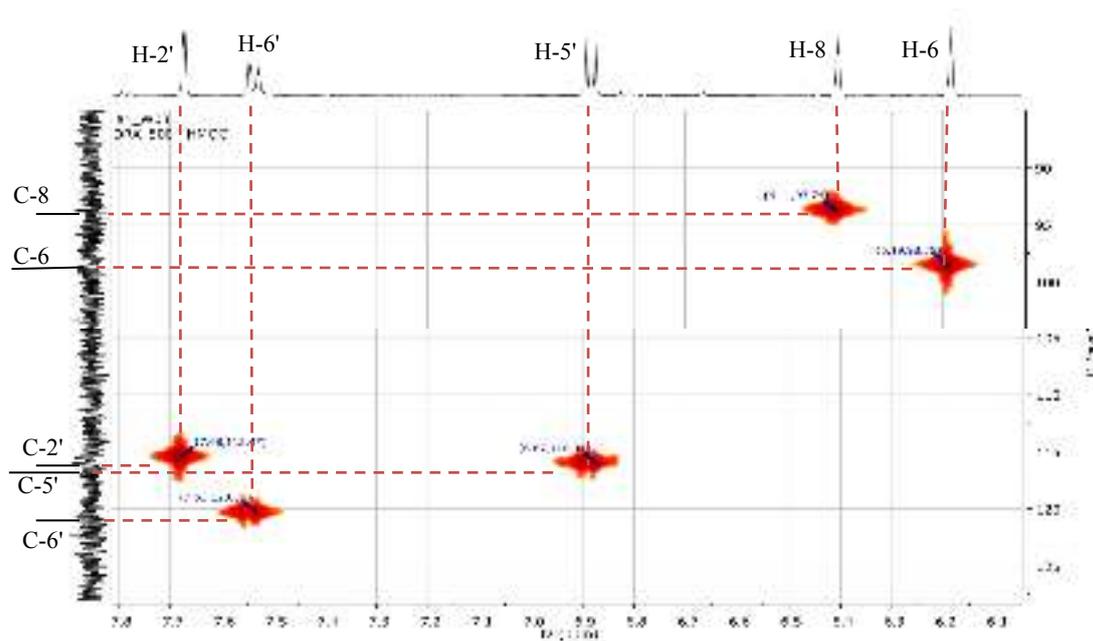
L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 11) montre bien nos attributions par une tache de corrélation entre le proton H-5' et le proton H-6' (couplage ortho).



**Spectre 11:** Spectre COSY (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WO3.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 12) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- ✓ Une corrélation entre le proton H-8 et le carbone C-8 à  $\delta_C = 93,74$  ppm.
- ✓ Une corrélation entre le H-6 et le signal du carbone C-6 à  $\delta_C = 98,56$  ppm.
- ✓ Le proton H-2' permet la détermination de C-2' à  $\delta_C = 115,47$  ppm.
- ✓ Le proton H-5' permet la détermination de C-5' à  $\delta_C = 116,04$  ppm.
- ✓ Le proton H-6' permet la détermination de C-6' à  $\delta_C = 120,34$  ppm.

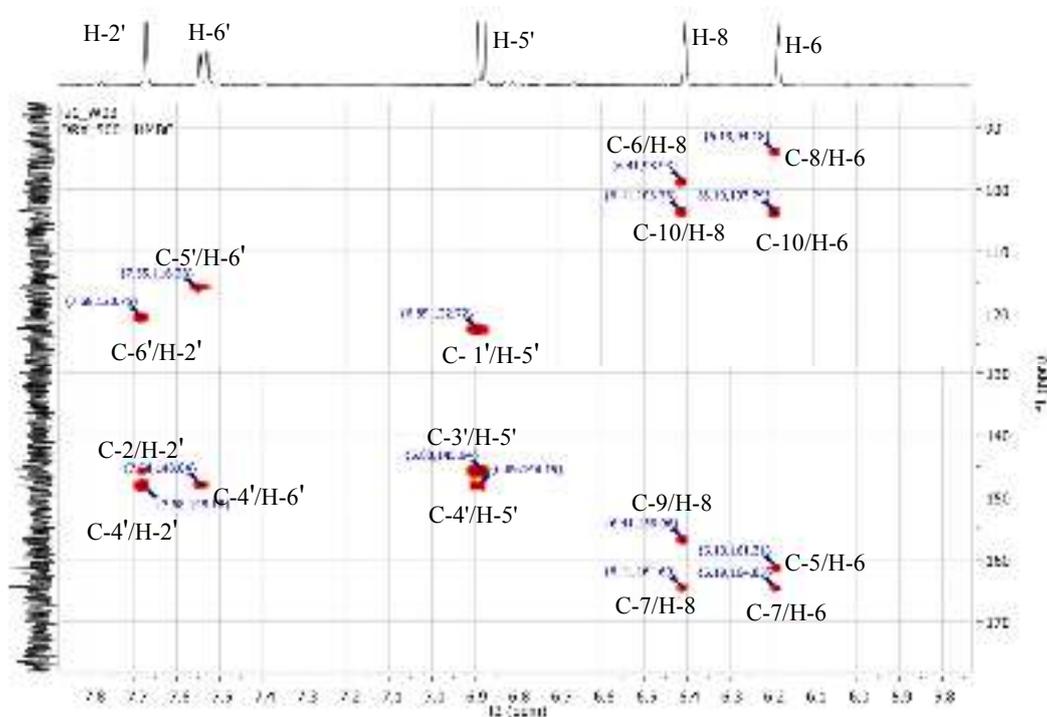


**Spectre 12:** Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO3.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 13) permet l'attribution des autres carbones correspondants ainsi :

- ✓ Le proton H-8 montre une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 164,69$  ppm attribuable à C-7 vu la valeur de son déplacement chimique, la plus élevée des carbones oxygénés quaternaires.
- ✓ Par ailleurs et toujours sur le même spectre HMBC, L'attribution de C-8 permet la localisation de C-10 à  $\delta_C = 103,77$  ppm vu la tache de corrélation observée entre ce carbone et le proton H-8. Le carbone C-2 est localisé à  $\delta_C = 148,04$  ppm grâce à sa corrélation avec H-2' et la valeur de son déplacement chimique.
- ✓ Le déplacement chimique du carbone C-2 indique également un OH libre en position C-3.
- ✓ Toujours sur le même spectre, les protons H-2', H-5' et H-6' montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné à  $\delta_C = 148,19$  ppm ne pouvant être attribué qu'au C-4'. On observe également des taches de corrélations entre le proton

H-5' et le carbone quaternaire aromatique oxygéné à  $\delta_c = 145,94$  ppm ne pouvant être attribué qu'au C-3', et le le carbone quaternaire aromatique à  $\delta_c = 122,72$  ppm ne pouvant être attribué qu'au C-1'. Ces résultats sont comparés avec ceux de la littérature [17, 18].



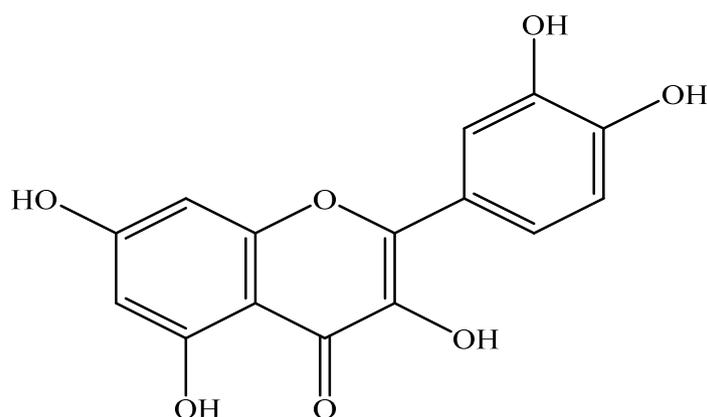
**Spectre 13:** Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO3.

Les données relatives aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont reportées dans le Tableau 47.

**Tableau 47:** Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) du composé WO3.

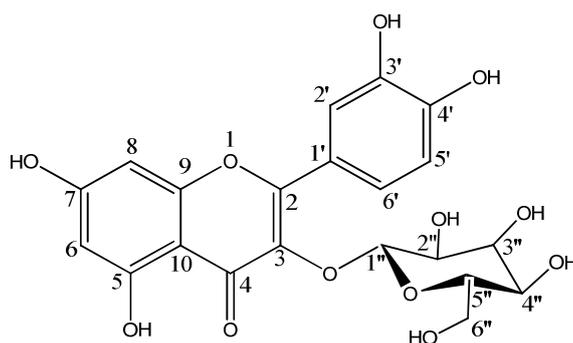
N°	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	148,04
3	-	-	122,72
4	-	-	179,60
5	-	-	161,31
6	6,18	$d(2,1)$	98,56
7	-	-	164,69
8	6,40	$d(2,1)$	93,74
9	-	-	156,96
10	-	-	103,77
1'	-	-	122,72
2'	7,67	$d(2,1)$	115,47
3'	-	-	145,94
4'	-	-	148,19
5'	6,88	$d(8,4)$	116,04
6'	7,54	$dd(8,4; 2,1)$	120,75
OH-5	12,48	$s$	-

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le Tableau 46, permettent d'identifier ce composé au **5, 7, 3', 4'-tétrahydroxyflavonol**, connu sous le nom de la **Quercétine**, isolé antérieurement de genre *Crataegus* [19]. Cette molécule est nouvelle pour l'espèce *C. oxyacantha*. La quercétine est réputée pour être le plus actif des flavonoïdes. Elle a des propriétés biologiques intéressantes anti-oxydantes [20], anti-inflammatoires [8], et anti-histaminiques (anti-allergiques) [21]. Ces activités ont été constatées au cours de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. La quercétine a aussi des effets positifs sur la capillaire et le système cardiovasculaire [22].



**Figure 29:** Structure finale du composé WO3 : (**Quercétine**)

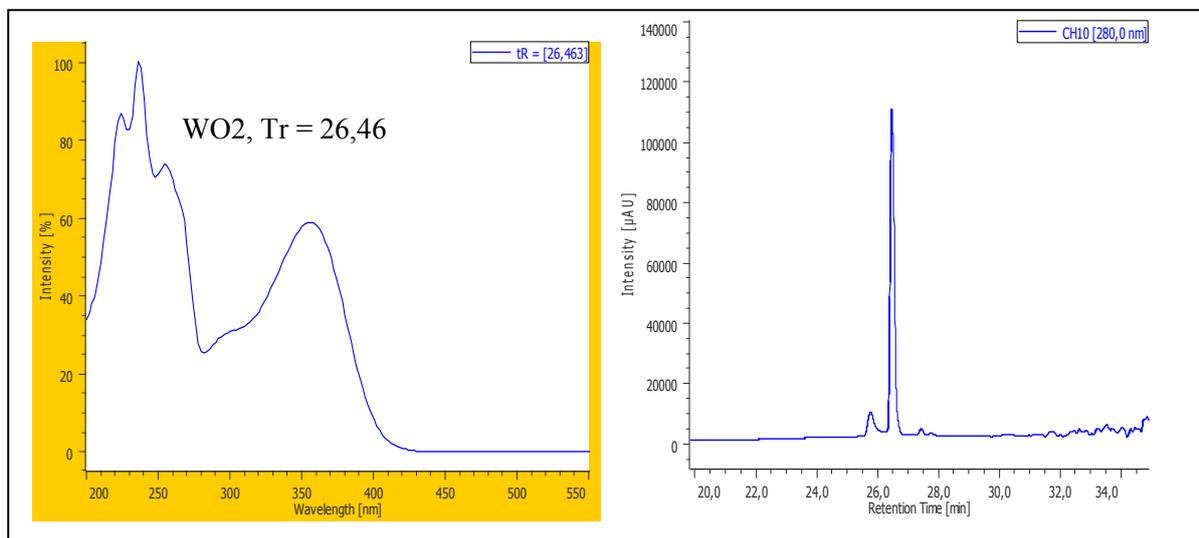
#### IV.4.1.3. Élucidation structurale du composé WO2



Le composé WO2 a été isolé de l'extrait AcOEt sous forme de poudre de couleur jaune soluble dans le MeOH. (C'est le produit majoritaire de cet extrait).

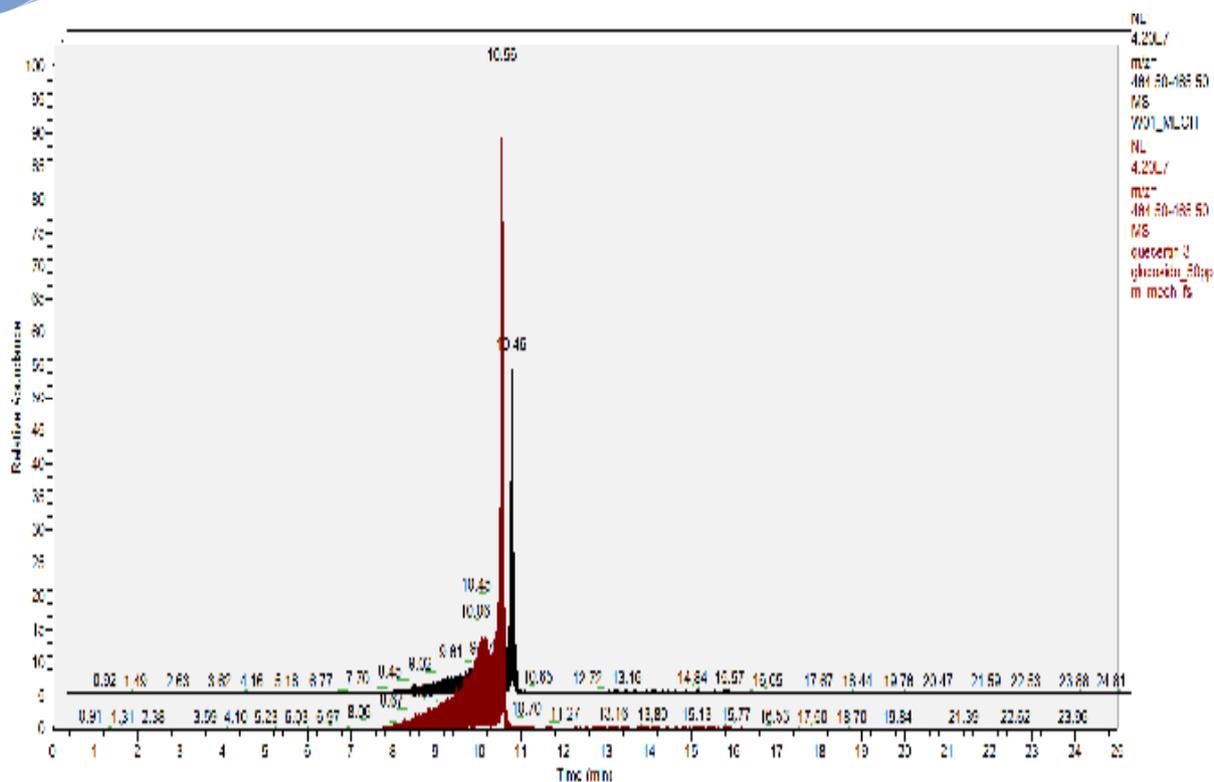
Le chromatogramme HPLC-DAD du composé WO2 (Spectre 14), un spectre très propre ce qui montre que ce composé est un composé pur.

Ce composé est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm et une couleur jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 min ce qui confirme que la structure de ce composé est de type flavonoïde.



**Spectre 14:** Spectre UV et chromatogramme HPLC-DAD du composé WO2

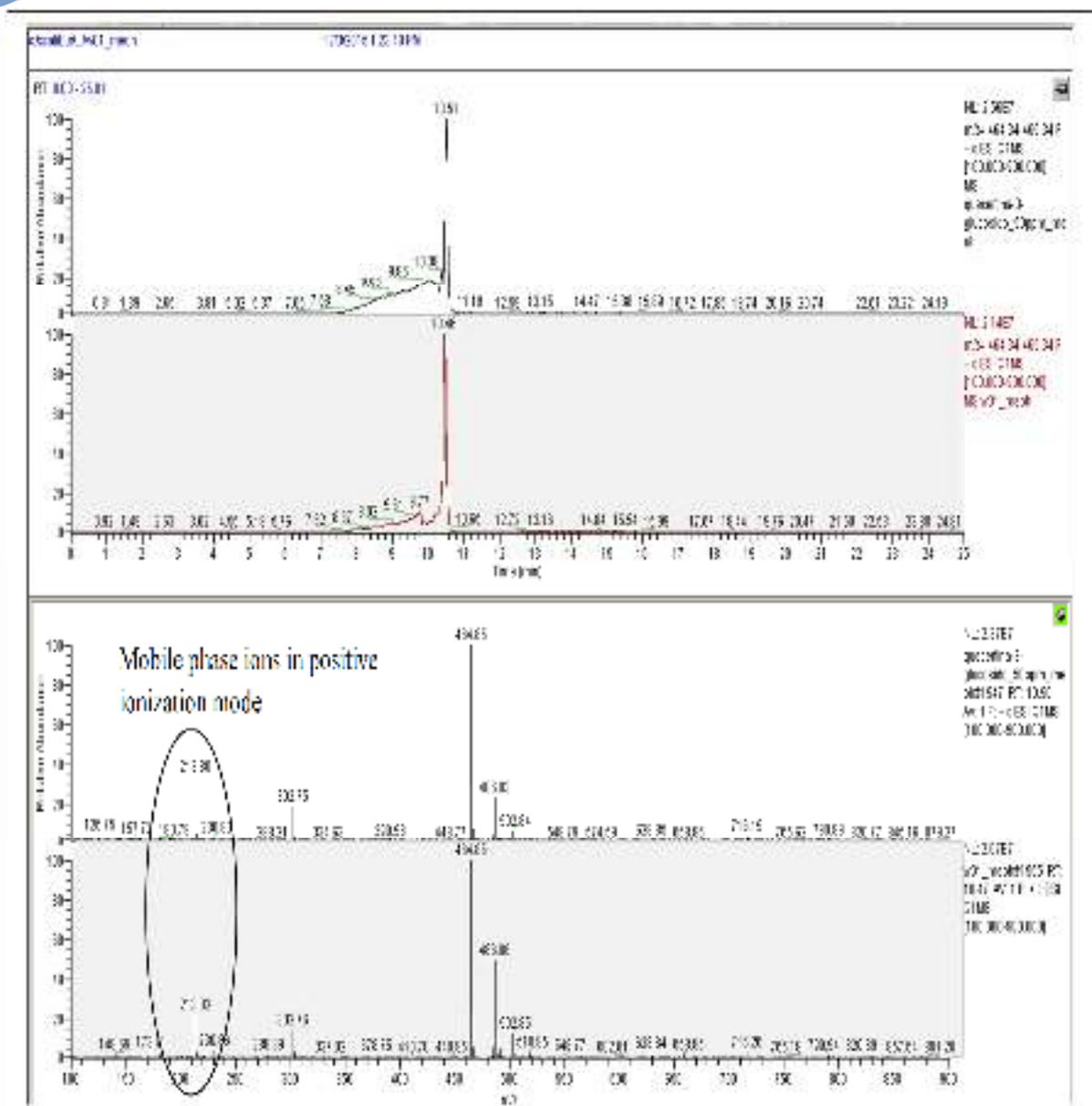
La comparaison des chromatogrammes et des spectres LC (mode Electrospray\_ESI\_positif) indique que le composé W02 et un étalon de quercétine-3-glucoside correspondent en temps de rétention (Chromatogramme) et en ions  $m/z$  (spectres MS) ainsi, il est hautement probable que WO2 est la quercétine-3-glucoside. Dans la figure ci-dessous la trace rouge est la Quercétine-3-glucoside et la noire est l'injection de W02.



**Spectre 15:** Spectre LC (mode Electrospary\_ESI\_positif) du composé WO2

C'est un résultat qualitatif, nous allons confirmer ces résultats, par les autres expériences (MS, UV, RMN (1D) et (2D)).

Le spectre de masse du composé WO2 enregistré sur le spectromètre (Waters Q-ToF 2.) ESI de résolution positive (Spectre 16) montre un pic quasi moléculaire  $m/z = 464,85$  correspondant à une masse moléculaire égale à 464 *uma* en accord avec la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{12}$ , soit une molécule comportant 12 insaturations.



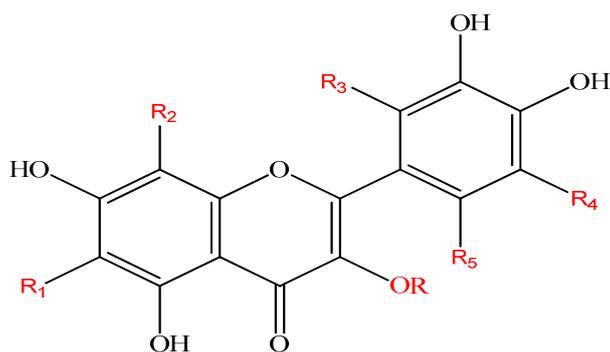
**Spectre 16:** Spectre de masse du composé WO2 enregistré sur le spectromètre Waters Q-ToF2

Le spectre UV du composé WO2 (Spectre 17), enregistré dans le MeOH montre deux maxima d'absorption à 359 et 256 nm relatifs respectivement à la bande I et II caractéristiques d'un flavonol substitué en position 3 [15].

- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de + 50 nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre indique la présence d'un OH libre en position 7.

- On remarque un déplacement bathochromique de la bande II de +17 nm par rapport au spectre MeOH provoqué par l'addition de NaOAc, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.
- Le déplacement bathochromique de la bande I de +42 nm, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH+AlCl<sub>3</sub> + HCl comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre, atteste que ce flavonol porte un groupement hydroxyle libre en position 5.
- Le déplacement hypsochrome de la bande I (-35 nm) en comparant les deux spectres AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl, montre la présence du système orthodihydroxy sur le noyau B. Cette observation est confirmée par le déplacement bathochrome (+20 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH. Ces données spectrales UV sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la quercétine substituée en position 3 [15].

Ces données permettent de proposer la structure partielle suivante :

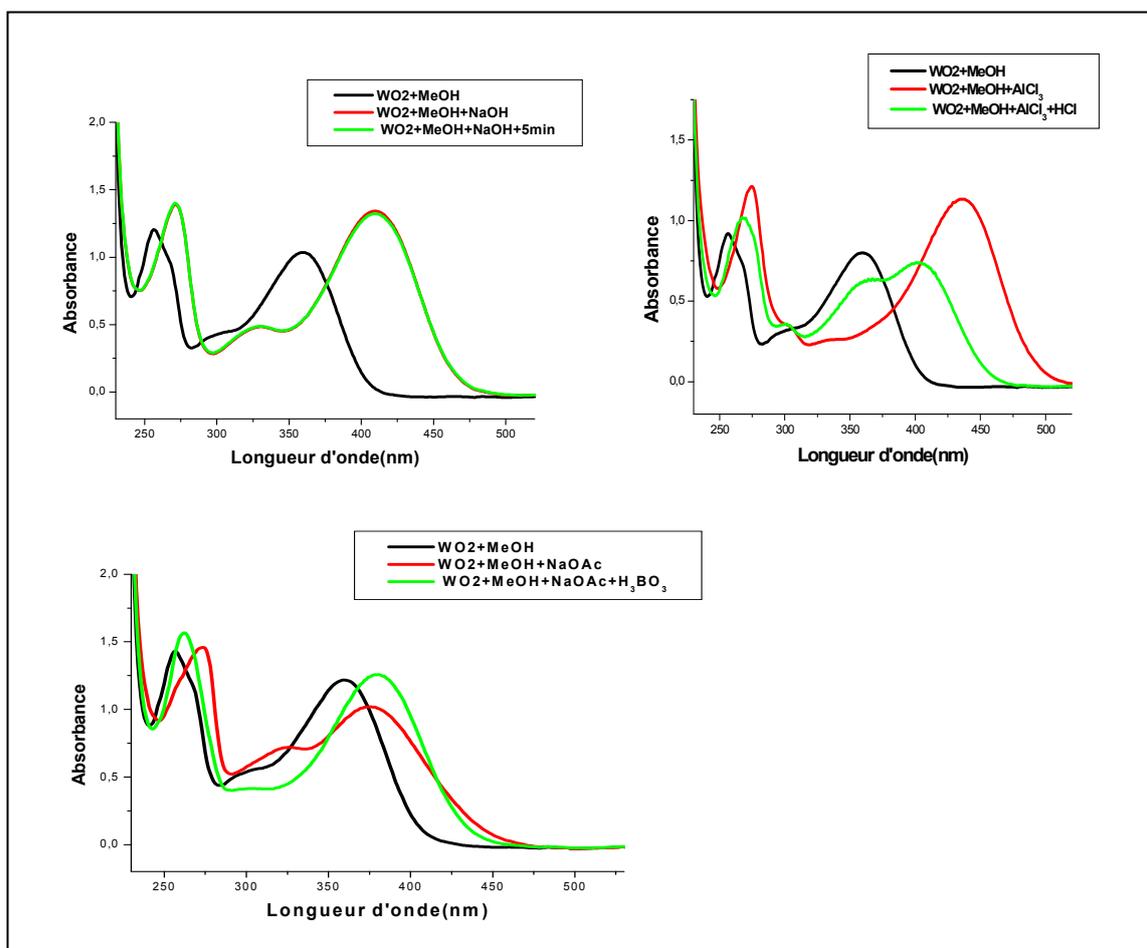


**Figure 30:** Structure partielle du composé WO2

Toutes les données de Spectrophotométrie UV-Visible sont mentionnées dans le tableau 48.

Tableau 48: Données spectrales UV du composé WO2

Solvants-réactifs	Bande I $\lambda_{\max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{\max}$ (nm)	Autres bandes $\lambda_{\max}$ (nm)	Commentaires
MeOH	359	256	/	Flavonol-3-OR
NaOH	409	271	328	OH libre en position 4' OH libre en position 7
AlCl <sub>3</sub>	436	274	/	/
AlCl <sub>3</sub> + HCl	401	267	/	OH libre en position 5
NaOAc	375	273	324	/
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	379	262	/	Système <i>ortho</i> di-OH sur le noyau B



Spectre 17: Série spectrale UV-vis du composé WO2.

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 18) du composé WO2 montre les cinq protons aromatiques caractéristiques de la quercétine [16], et les attributions des signaux observés sont comme suit :

- Deux doublets intégrant chacun pour un proton à  $\delta_{\text{H}} = 6,23$  ppm ( $J = 2,1$  Hz), et  $\delta_{\text{H}} = 6,43$  ppm ( $J = 2,1$  Hz) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, du cycle A.
- Deux signaux d'intégration 1H sous forme d'un doublet large (*dl*) à  $\delta_{\text{H}} = 7,61$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) et un singulet large (*sl*) à  $\delta_{\text{H}} = 7,86$  ppm. Ces deux noyaux sont attribuables à H-6' et H-2', respectivement, du cycle B [1].
- Un doublet (*d*) d'intégration 1H, à  $\delta_{\text{H}} = 6,89$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) attribuable à H-5' du cycle B. [1].

En revanche, on peut observer sur le même spectre et notamment dans la région du sucre (Spectre 18-2) un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5,19$  ppm avec une constante de couplage  $J = 7,6$  Hz attribuable au proton anomérique H-1" d'un sucre relié à l'aglycone. Cette valeur de la constante de couplage du proton anomérique avec le proton en C-2", exclue le manose et oriente vers un groupement glycopyranosyle d'où la jonction à la génine est faite par le biais d'un pont oxygéné de configuration  $\beta$ . [10-12]

- Dans l'intervalle 3,89-3,48 ppm se trouvent les autres protons du sucre.

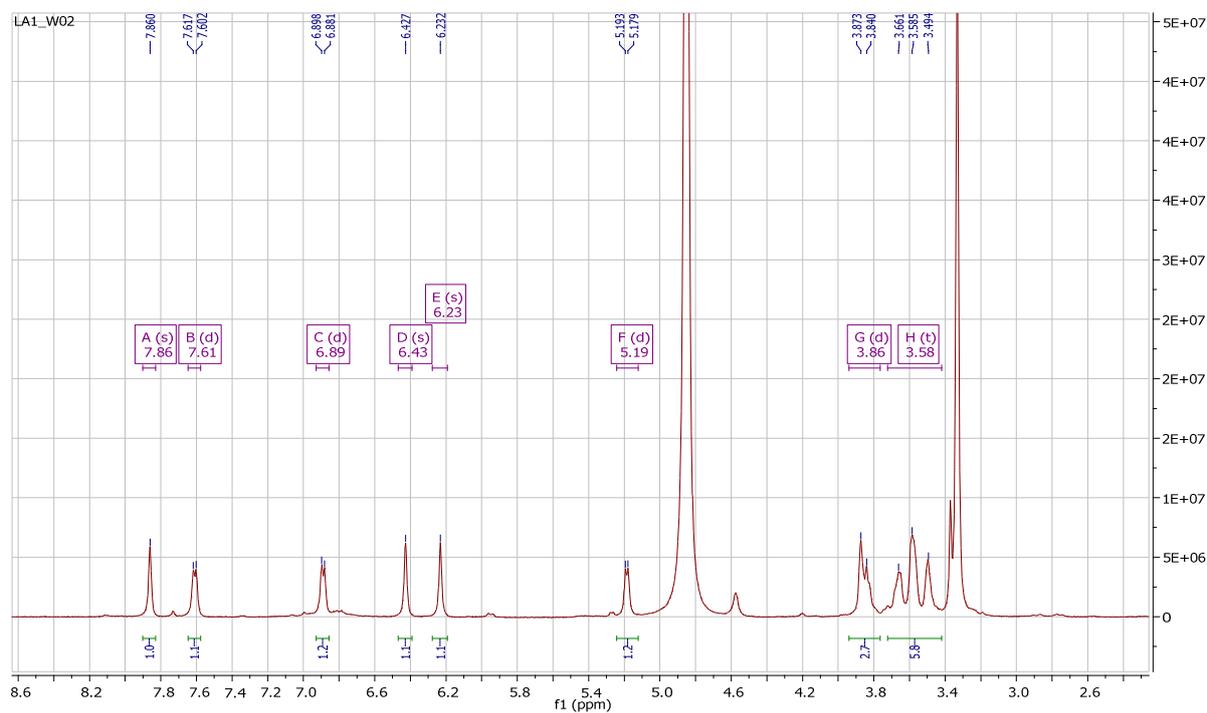
L'examen du spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 19-1) montre :

- Une tache de corrélation entre le proton H-5' et le proton H-6' confirmant le couplage ortho.

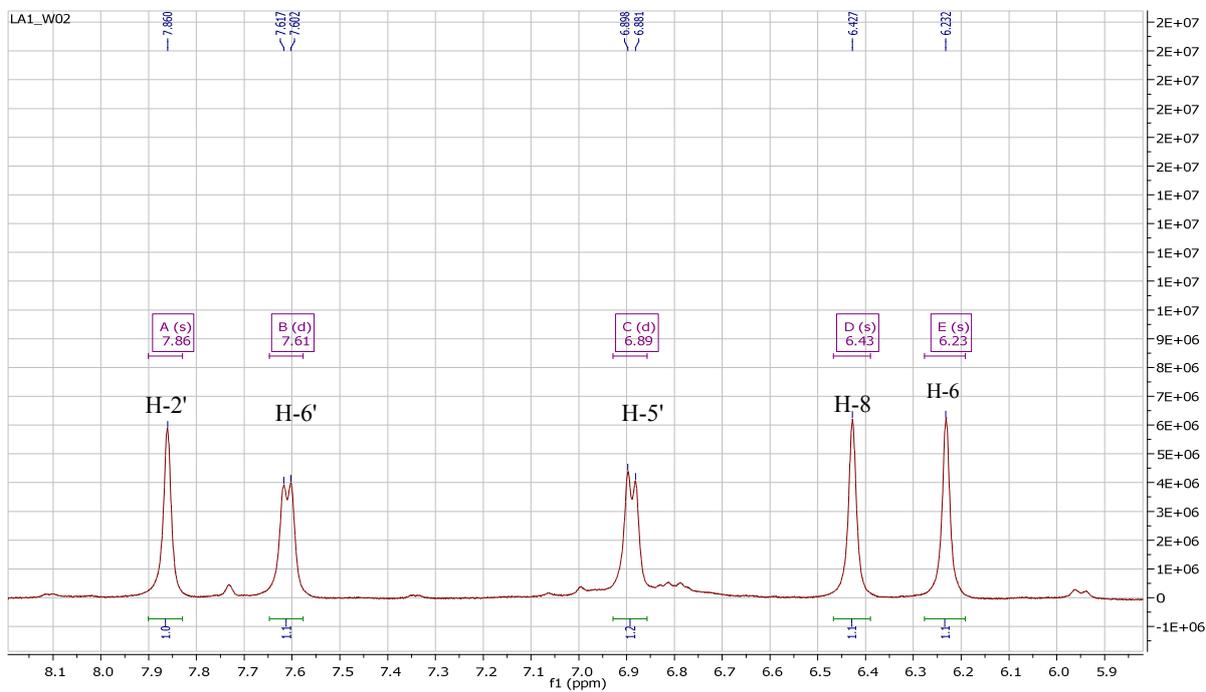
Sur le même spectre COSY (Spectre 19) on remarque la présence de :

- Une tache de corrélation entre le H-1" à  $\delta = 5,12$  ppm et le signal d'un proton à  $\delta_{\text{H}} = 3,81$  ppm, ce proton est alors attribuable à H-2", ( $\delta_{\text{C}} = 72,1$  ppm).

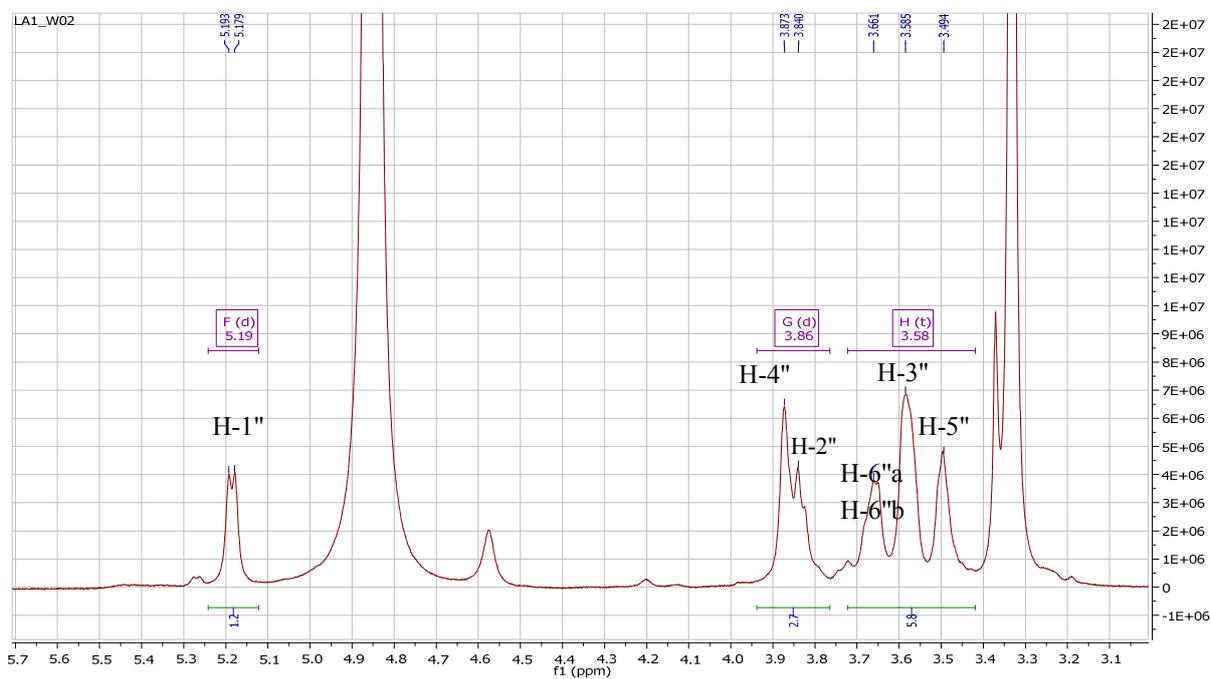
Quatre autres signaux apparaissent dans la région située entre 3,48- 3,90 ppm et sont relatifs aux protons (3,88 ppm, H-4"), (3,68 ppm, H-6"a, H-6"b), (3,59 ppm, H-3"), (3,51 ppm, H-5") [23]. Ces résultats sont comparés aussi avec ceux publiés dans la littérature [17, 18].



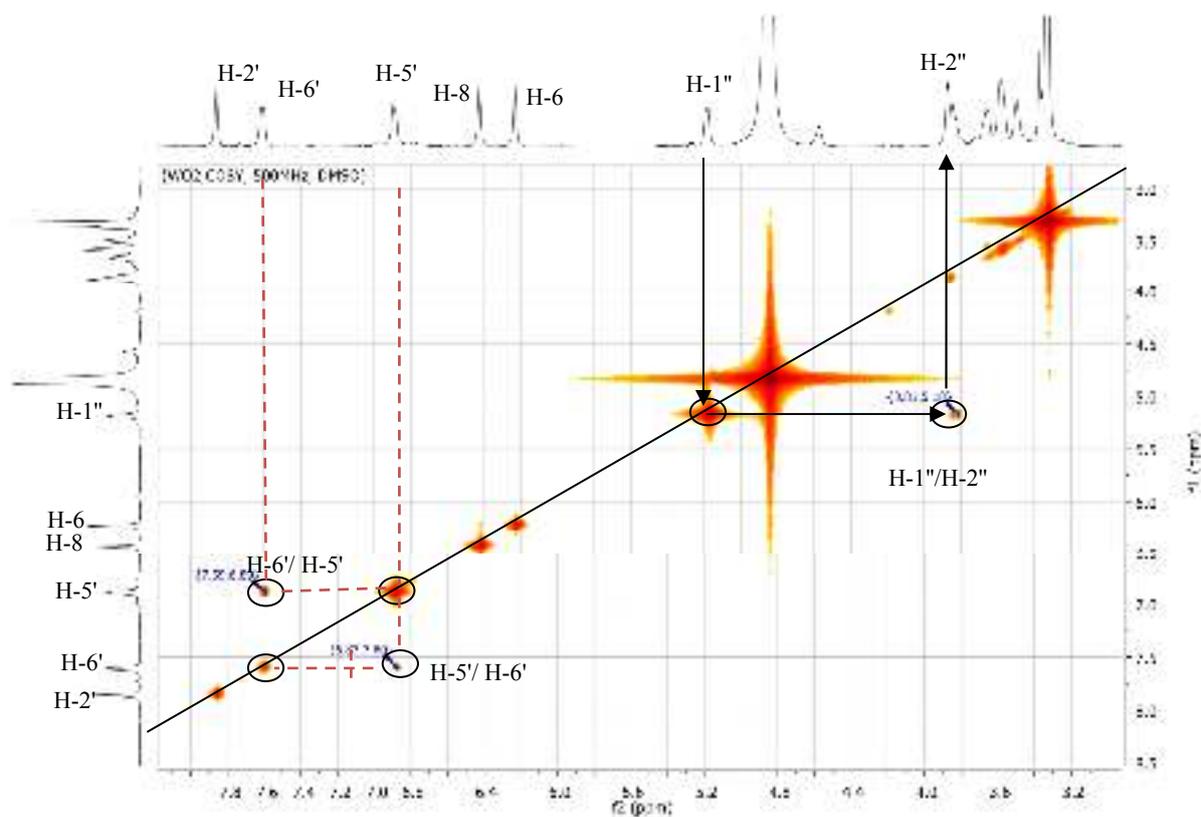
Spectre 18: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2.



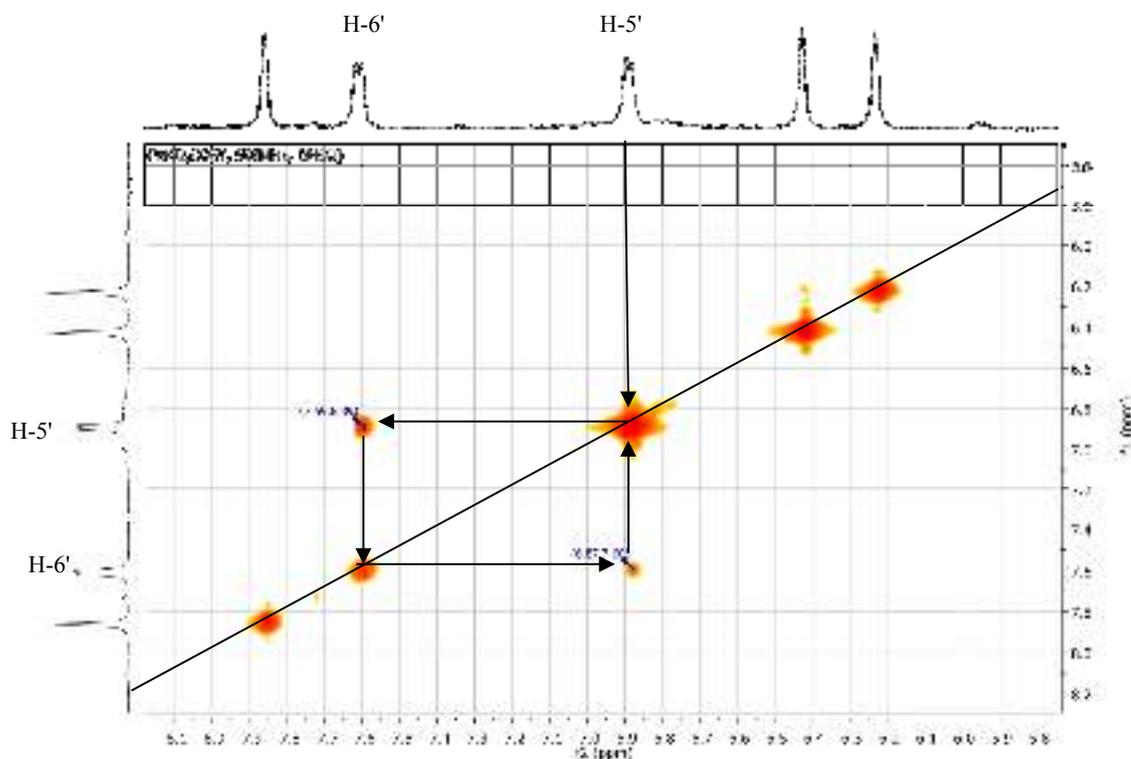
Spectre 18-1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2, (Étalement).



**Spectre 18-2:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé  $\text{WO}_2$ , (Étalement).

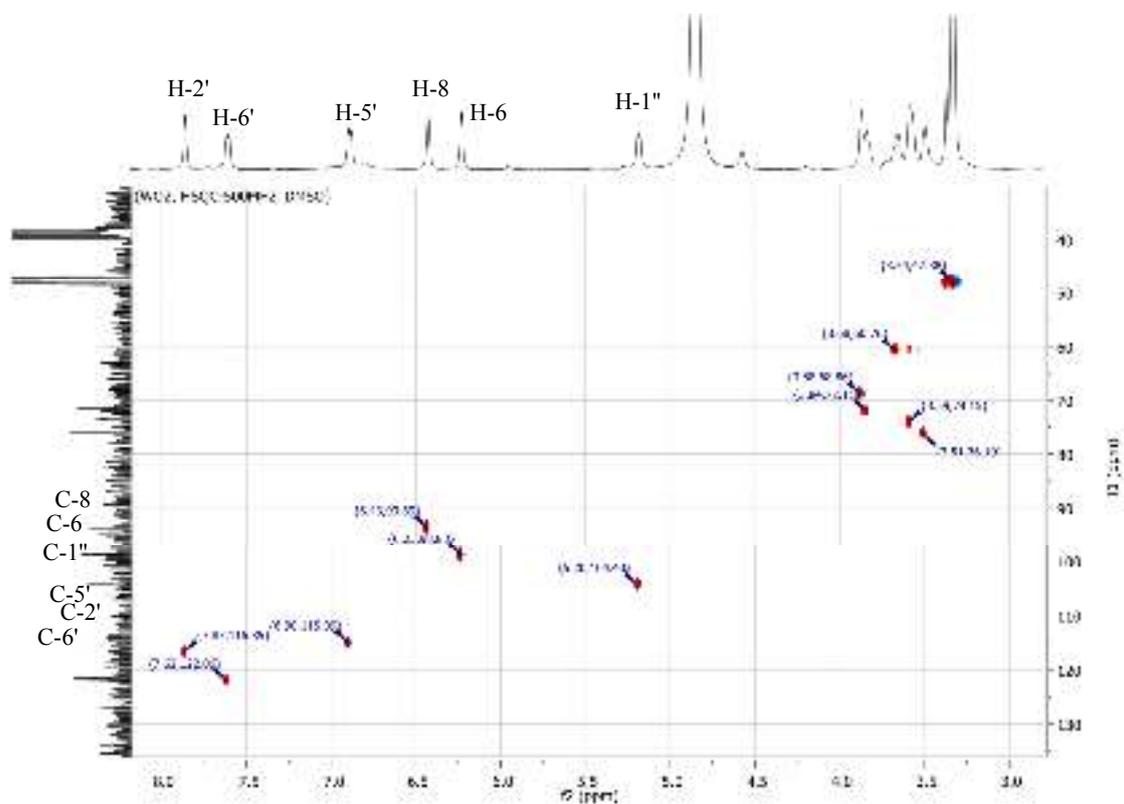


**Spectre 19:** Spectre COSY (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé  $\text{WO}_2$ .

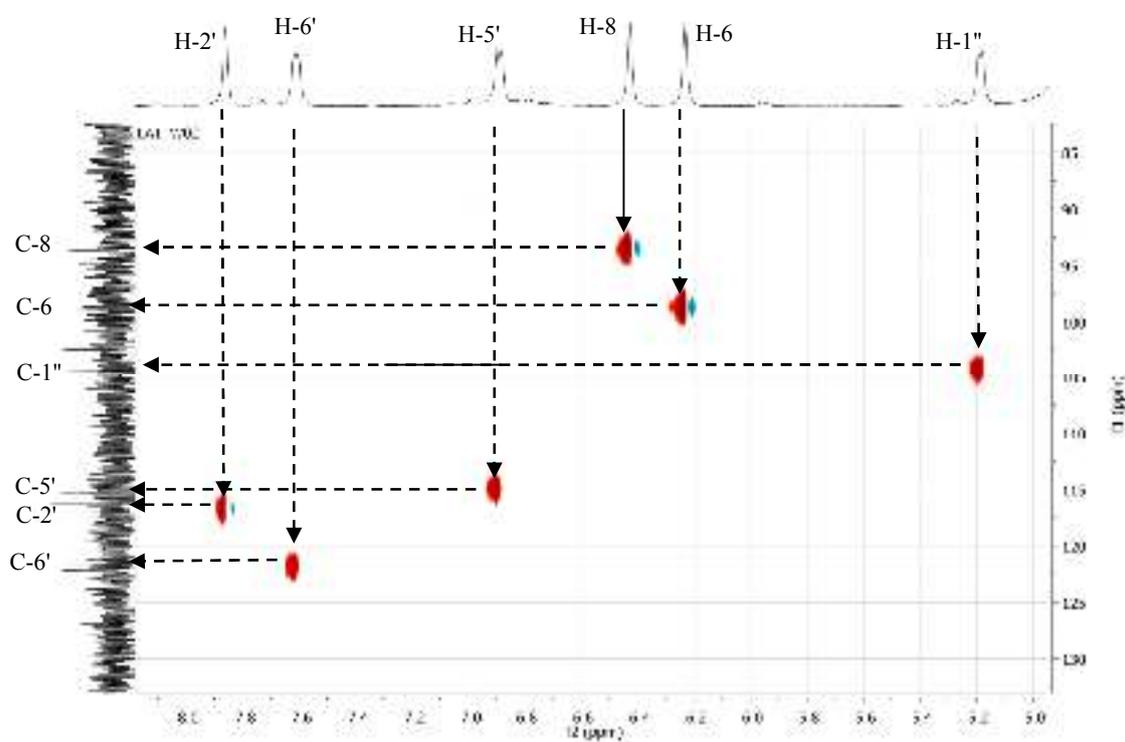


**Spectre 19-1:** Spectre COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2, (Etalement)

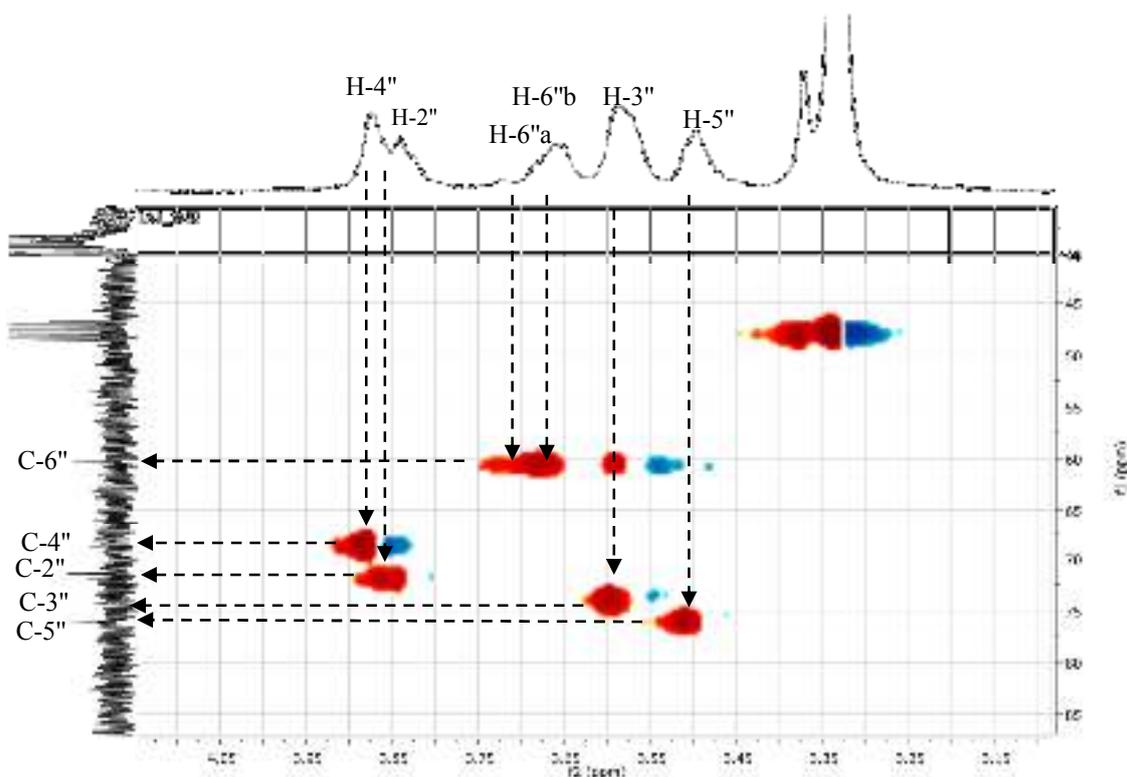
L'examen de l'expérience HSQC (Spectre 20-1) permet de localiser les noyaux C-2', C-5', C-6', C-6, C-8 et C-1" à  $\delta = 116,85; 115,09; 122,06; 98,88; 93,69$  et  $104,43$  ppm respectivement. Les protons obtenus du groupement glycosyle permettent l'attribution des signaux à  $\delta_c = 104,43; 76,19; 74,15; 72,11; 68,86; 60,76$  ppm aux carbones C-1", C-5", C-3", C-2", C-4" et C-6" respectivement (Spectre 20-2), par comparaison de ces déplacements avec ceux de la littérature, ces valeurs sont indicatives d'un groupement glucose. [11,24]



Spectre 20: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2.



Spectre 20-1 : Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2, (Etalement).



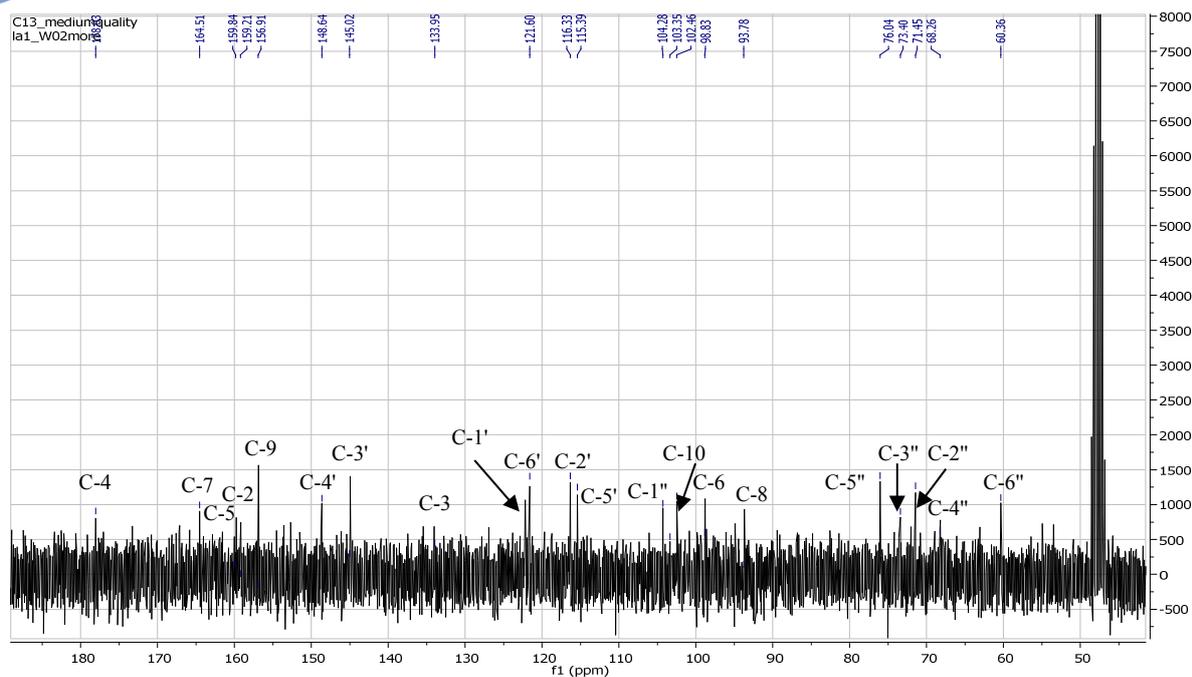
**Spectre 20-2** : Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO2, (Etalement).

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre 21) enregistré dans le DMSO- $d_6$  de ce produit montre 21 atomes de carbone, dont 15 correspondent à ceux de la génine (Quercétine).

L'ensemble des carbones de cette génine sont répartis comme suit [11,24].

- Cinq CH aromatiques: (C-6, C-8, C-2', C-5'; C-6').
- Un signal à  $\delta_{\text{C}} = 178,03$  ppm caractéristique d'un groupement carbonyle C-4 ;
- Neuf carbones quaternaires, dont huit qui résonnent dans la zone allant de ( $\delta_{\text{C}} = 122$  ppm à 170 ppm) notamment : C-2 à  $\delta_{\text{C}} = 159,2$  ppm; C-3 à  $\delta_{\text{C}} = 133,95$  ppm; C-5 à  $\delta_{\text{C}} = 159,84$  ppm; C-7 à  $\delta_{\text{C}} = 164,51$  ppm ; C-9 à  $\delta_{\text{C}} = 156,91$  ppm ; C-1' à  $\delta_{\text{C}} = 122,46$  ppm ; C-3' à  $\delta_{\text{C}} = 145,02$  ppm et C-4' à  $\delta_{\text{C}} = 148,64$  ppm. et un à  $\delta_{\text{C}} = 103,35$  ppm (le carbone quaternaire C-10);

Les données relatives au spectre de RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont reportées dans le Tableau 49.



Spectre 21 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé WO2.

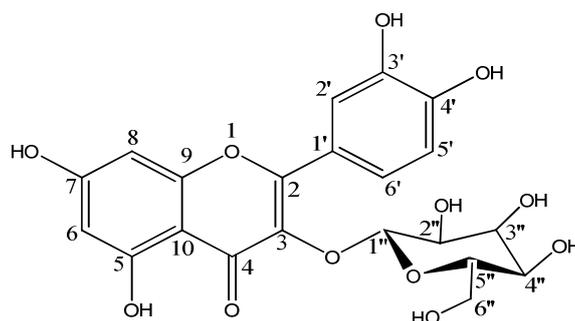
Tableau 49: Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) du composé WO2.

N°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)
2	159,2	-	<b>Glu</b>		
3	133,95	-	1''	104,43	5,19 J = 7,6
4	178,03	-	2''	72,11	3,81
5	159,84	-	3''	74,15	3,59
6	98,88	6,23	4''	68,86	3,88
7	164,51	-	5''	76,19	3,51
8	93,69	6,43	6''	60,76	3,68
9	156,91	-	-	-	-
10	103,35	-	-	-	-
1'	122,46	-	-	-	-
2'	116,85	7,86 (sl)	-	-	-
3'	145,02	-	-	-	-
4'	148,64	d	-	-	-
5'	115,09	6,89 (d ; J = 8,5)	-	-	-
6'	122,06	7,61 (dl ; J = 8,5)	-	-	-

L'ensemble de ces analyses spectrales et la comparaison avec ceux publiés dans la littérature [30] permettent l'identification du WO2 comme étant : **(Quercétine-3-O- $\beta$ -glucoside)** connue sous le nom **(Isoquercétrine)**.

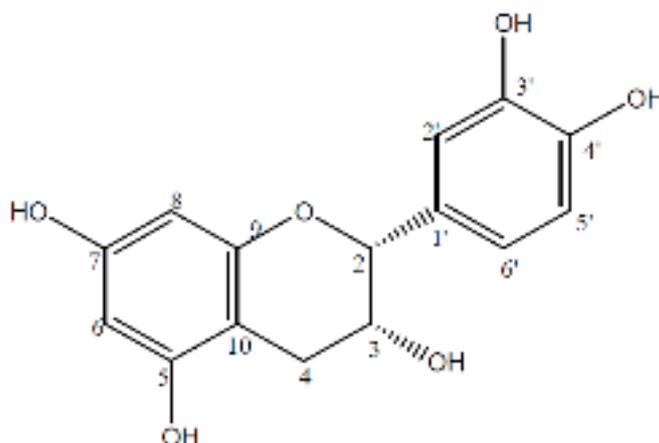
Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans l'espèce *C. oxyacantha*.

(D'où son nom) est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones.

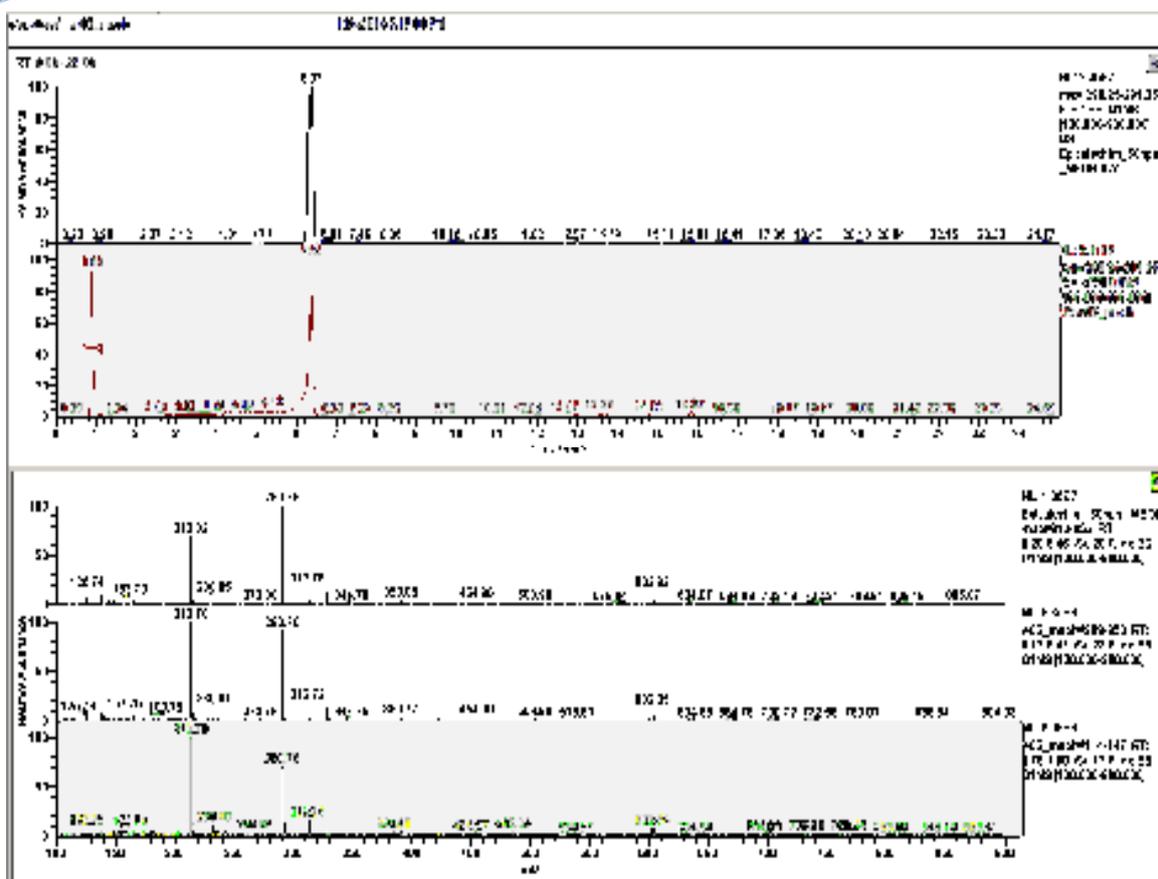


**Figure 31:** Structure finale du composé WO2 : (Isoquercétrine)

#### IV.4.1.4. Élucidation structurale du composé WO5

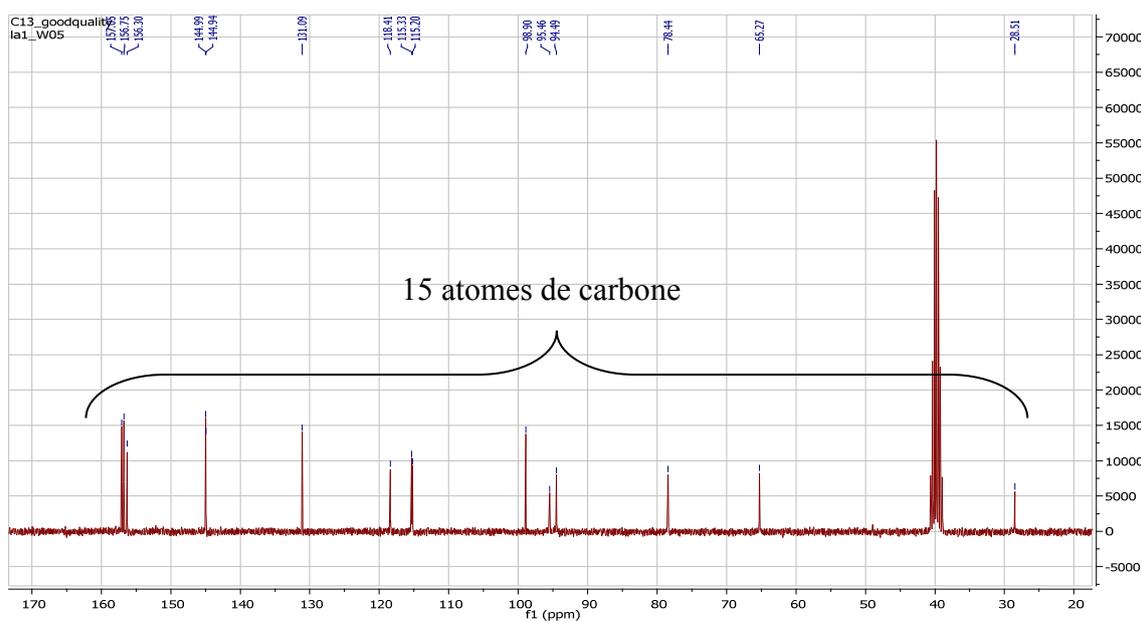


L'examen du spectre de masse à haute résolution (**Spectre 22**) du composé WO5 enregistré sur le spectromètre Waters Q-Tof 2. en mode électrospray postif (ESI+) (**Spectre 22**) montre un pic quasi moléculaire  $m/z = 290,75$  correspondant à une masse moléculaire égale à 290 *uma*. La RMN  $^{13}\text{C}$  indique 15 carbones, et les valeurs d'intégrations du spectre RMN  $^1\text{H}$  indiquent 9 protons. Pour compléter les données de la masse, on suppose la présence de 5 groupements hydroxyles et d'un oxygène, ce qui permet de proposer la formule brute  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ . Soit une molécule renfermant 9 insaturations.



Spectre 22: Spectre de masse du composé WO5 enregistré sur le spectromètre Waters Q-Tof2.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre 23) confirme la présence de 15 atomes de carbone.

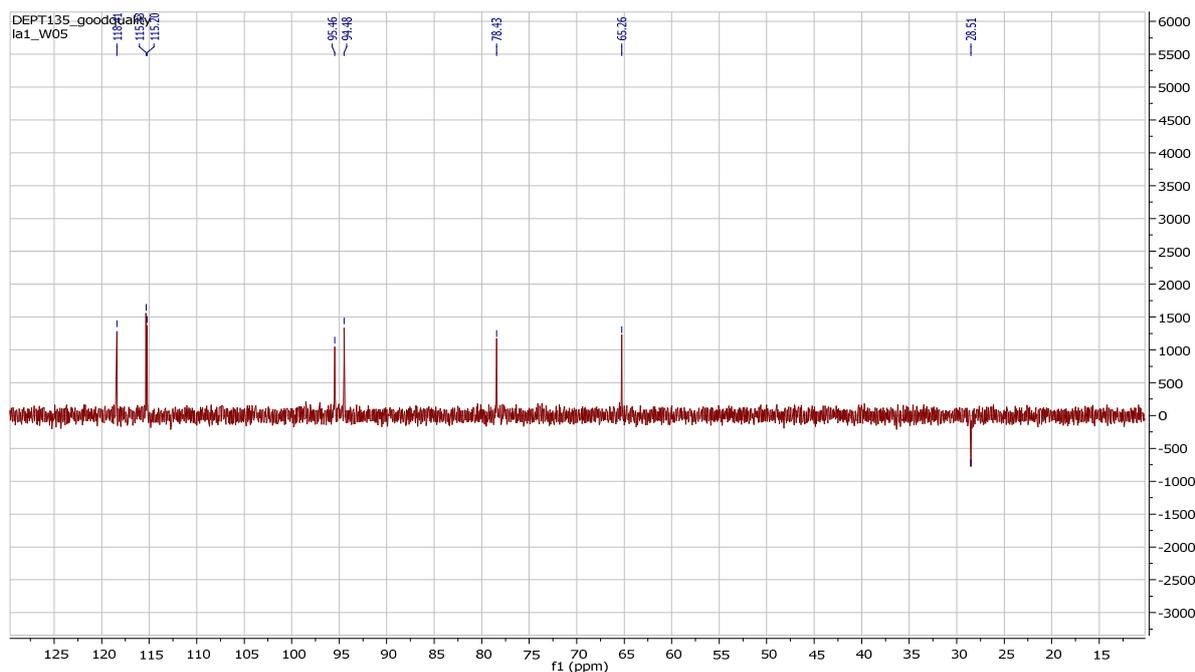


Spectre 23: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.

L'examen simultané des spectres  $^{13}\text{C}$  et DEPT  $135^\circ$  (Spectre 23, Spectre 24) nous a révélé la présence de :

- ❖ Un groupe de 3C quaternaires autour de 156-158 ppm et d'un groupe de 2C quaternaires autour de 144-145 ppm, correspondant a priori à 5 carbones aromatiques substitués par un oxygène (car fortement déblindés).
- ❖ 3 CH vers 115-118,5 ppm appartenant à un cycle aromatique.
- ❖ 2 CH autour de 94-95,5 ppm, pouvant être attribués à 2 CH aromatiques en position méta sur un autre cycle.
- ❖ 2 CH à  $\delta_{\text{C}} = 65,27$  et  $78,44$  ppm très déblindés indiquant la présence de substituants oxygénés.

La présence de 9 insaturations nous laisse supposer d'une part, l'existence d'un cycle et de deux cycles aromatiques (un cycle compte pour une insaturation et un cycle aromatique compte pour 4 insaturations) et les hypothèses développées précédemment nous permettent d'autre part, de proposer la structure du composé WO5 (Épicatéchine). [25]



**Spectre 24:** Spectre DEPT 135 (125 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé WO5.

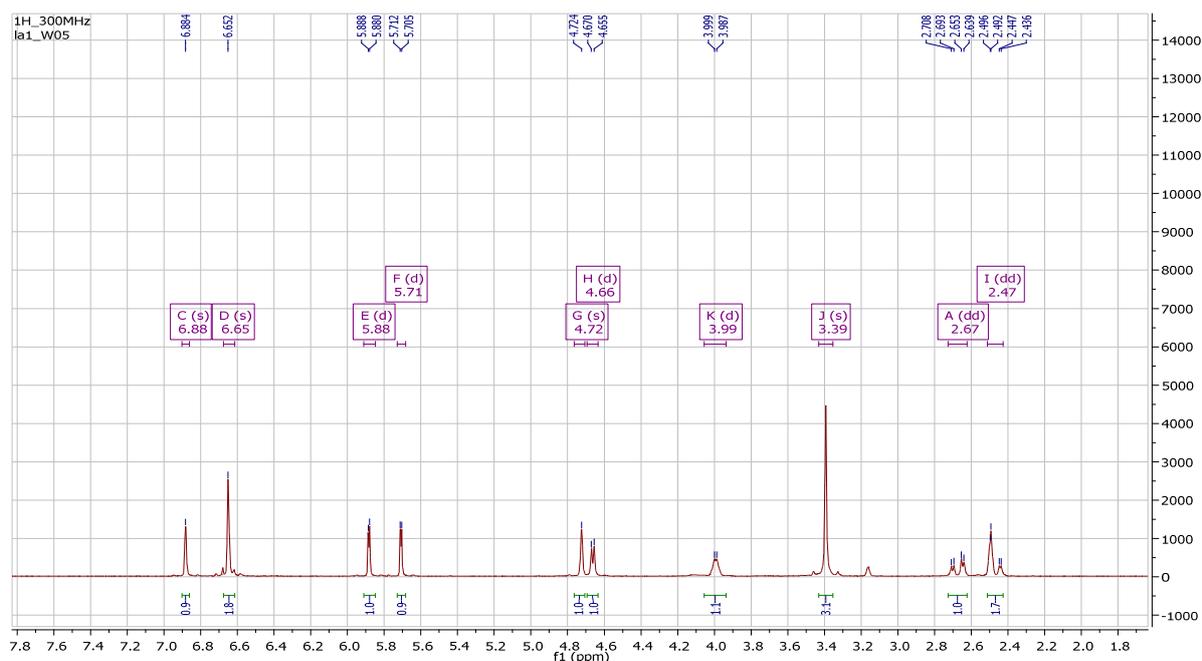
L'analyse simultanée des spectres protons (Spectre 25 et ses étalements), COSY (Spectre 26), et HMQC (Spectre 27) montre:

- ❖ La présence de 2 doublets dédoublés (2,47-2,70 ppm) qui intègrent pour 2 protons. Ces 2 protons sont liés entre eux par une forte constante de couplage (16,7 Hz). Ce fort couplage de type géminal indique qu'il s'agit de protons portés par le carbone secondaire C-4 [25].
- ❖ Chacun de ces protons montre une tache de corrélation (Spectre 28-2) avec les deux carbones à  $\delta_C = 65,27$  ppm et  $\delta_C = 78,44$  ppm attribuable à C-3 et C-2 respectivement. Grâce à ces attributions et l'analyse de spectre HMQC (Spectre 27) nous avons pu d'attribuer les deux protons portés par ces deux carbones H-3 (3,99 ppm,  $J = 3,6$  Hz) et H-2 (4,72 ppm,  $J = 4,5$  Hz).

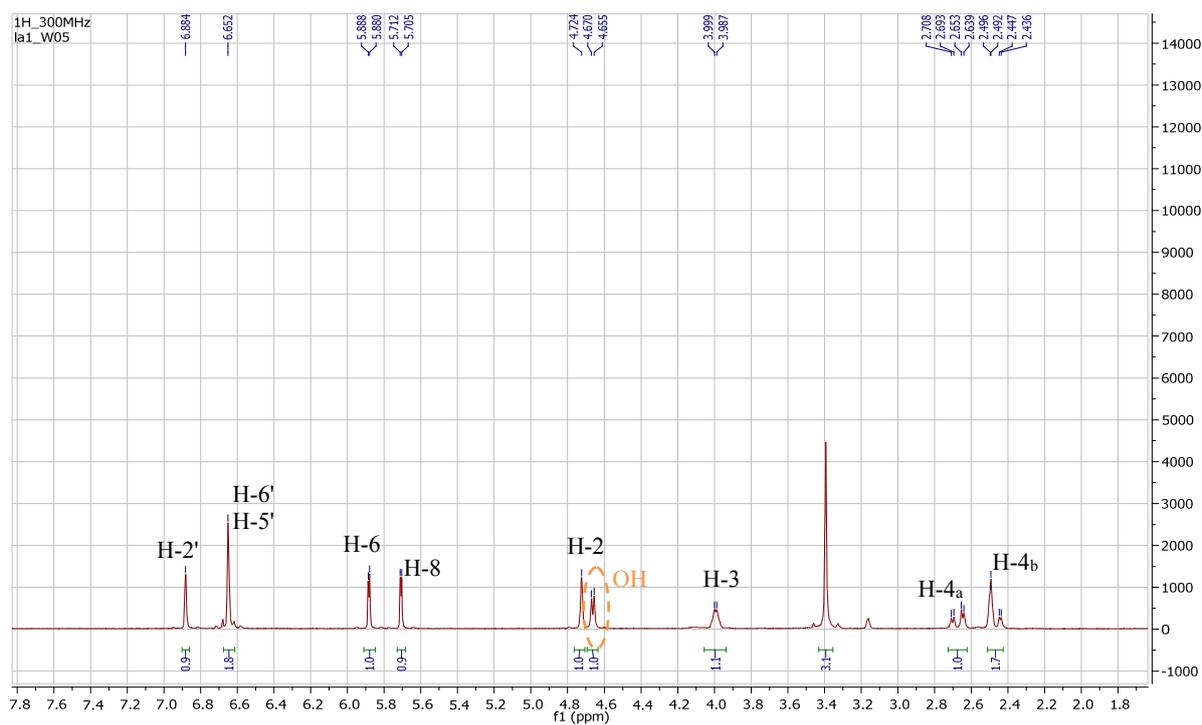
Ces résultats permettent de proposer l'enchaînement suivant:

- ❖ La faible constante de couplage entre les protons H-2 ( $J = 4,5$  Hz) et H-3 ( $J = 3,6$  Hz), montre une stéréochimie cis et permet de différencier la cathéchine (trans) de l'épicathéchine (cis). [25]
- ❖ On constate l'existence de deux types de protons aromatiques: un groupe de trois protons aromatiques à 6,88 ; 6,65 et 6,65 ppm (H-2' ; H-5'et H-6') d'une part et un groupe de deux protons aromatiques d'autre part vers 6 ppm (H-6 et H-8). Ceci permet de confirmer la présence de deux cycles aromatiques
- ❖ Les protons aromatiques H-6 et H-8 sont responsables de deux doublets (un à  $\delta_H 5,71$  ppm et l'autre à  $\delta_H 5,88$  ppm). Leur constante de couplage ( $J = 2,2$  ; 2,2 Hz) indique qu'ils sont en position méta.

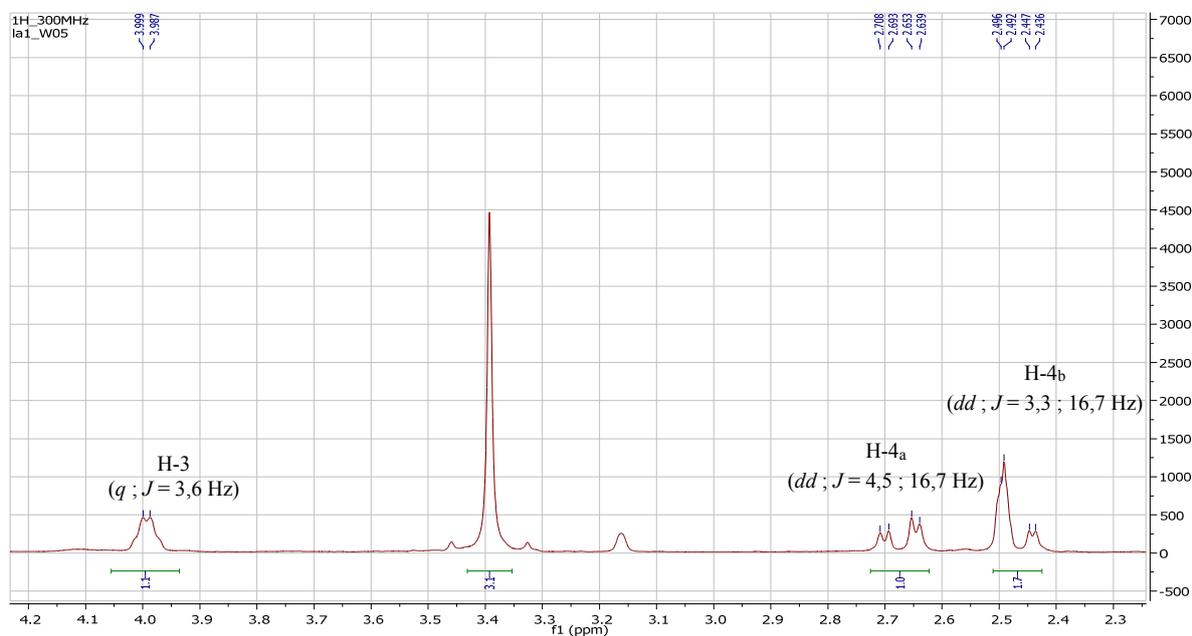
On remarque bien, que tous ces résultats sont en accord avec la structure de l'épicathéchine.



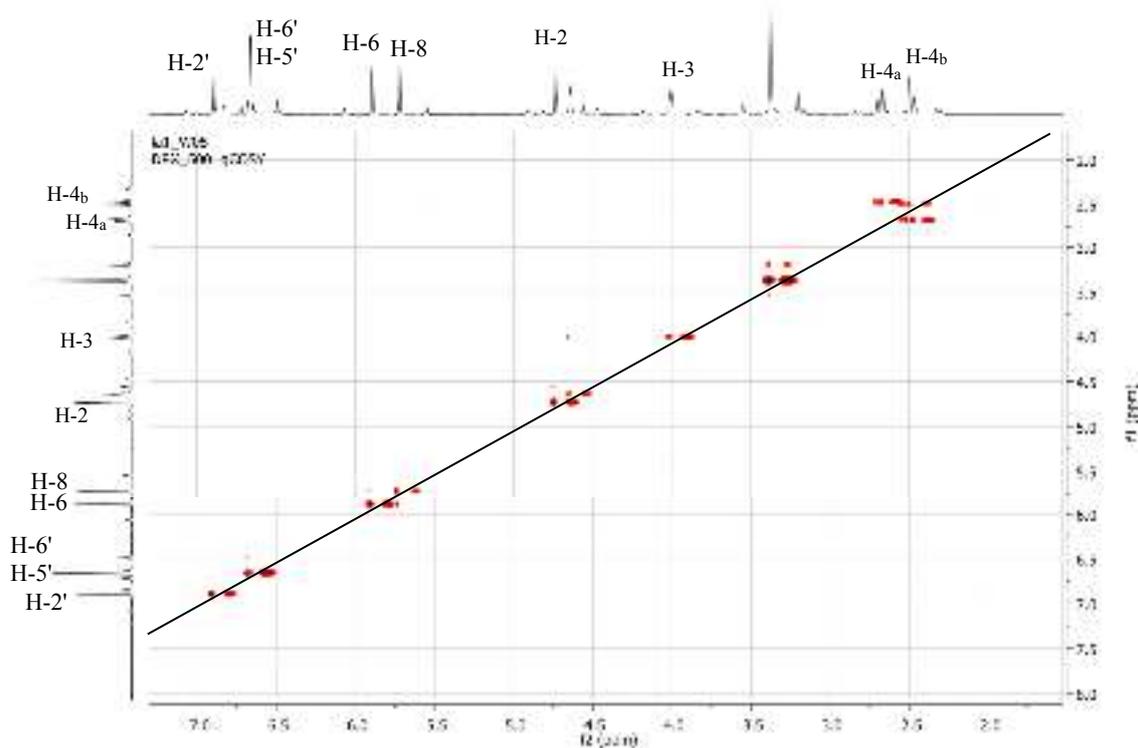
**Spectre 25:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



Spectre 25-1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



Spectre 25-2: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5, (Etalement).



**Spectre 26:** Spectre COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.

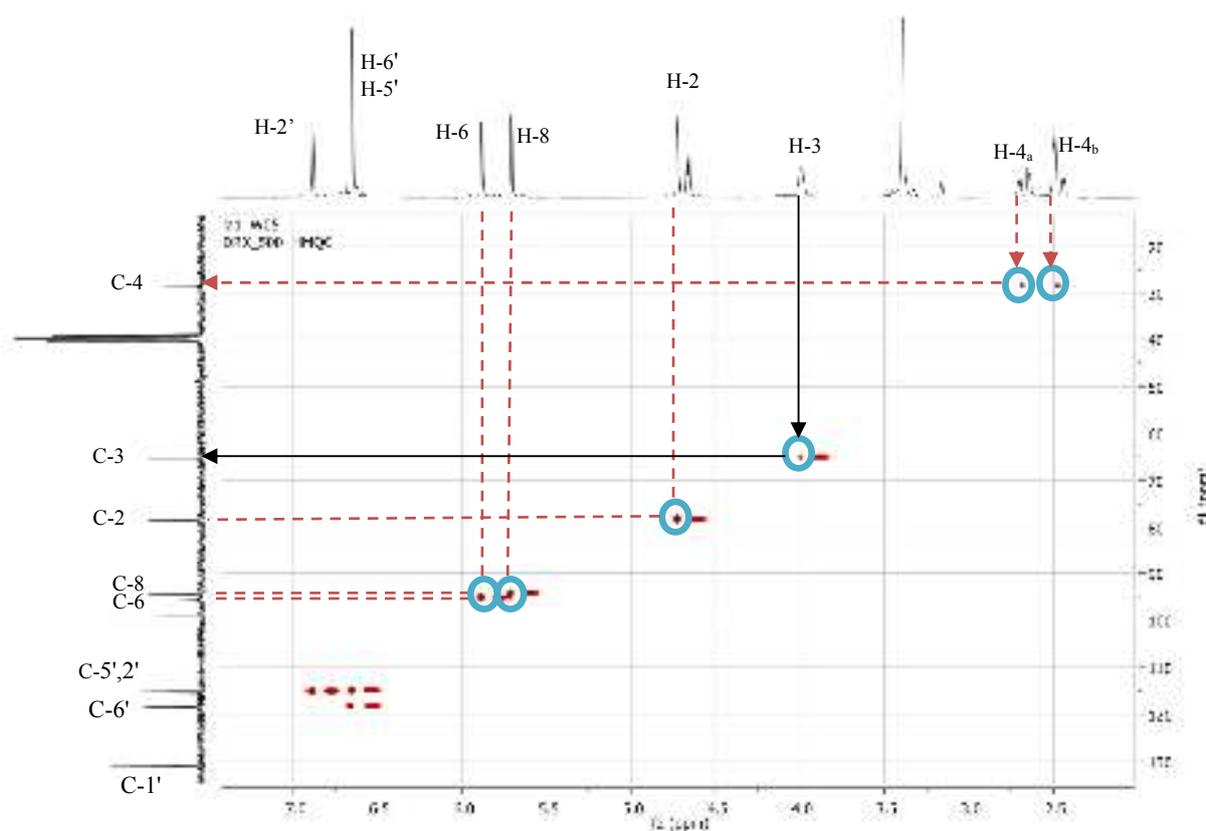
**Tableau 50:** Données expérimentales de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) du composé WO5

N° de C	$\delta$ (ppm) m	Constantes de couplage $J$ (Hz)
4b	2,47 ( <i>dd</i> )	3,3 ; 16,7
4a	2,70 ( <i>dd</i> )	4,5 ; 16,7
3	3,99 ( <i>q</i> )	3,6
2	4,72( <i>d</i> )	4,5
8	5,71 ( <i>d</i> )	2,2
6	5,88 ( <i>d</i> )	2,2
6'	6,65 ( <i>m</i> )	/
5'	6,65 ( <i>m</i> )	/
2'	6,88 ( <i>d</i> )	2,2

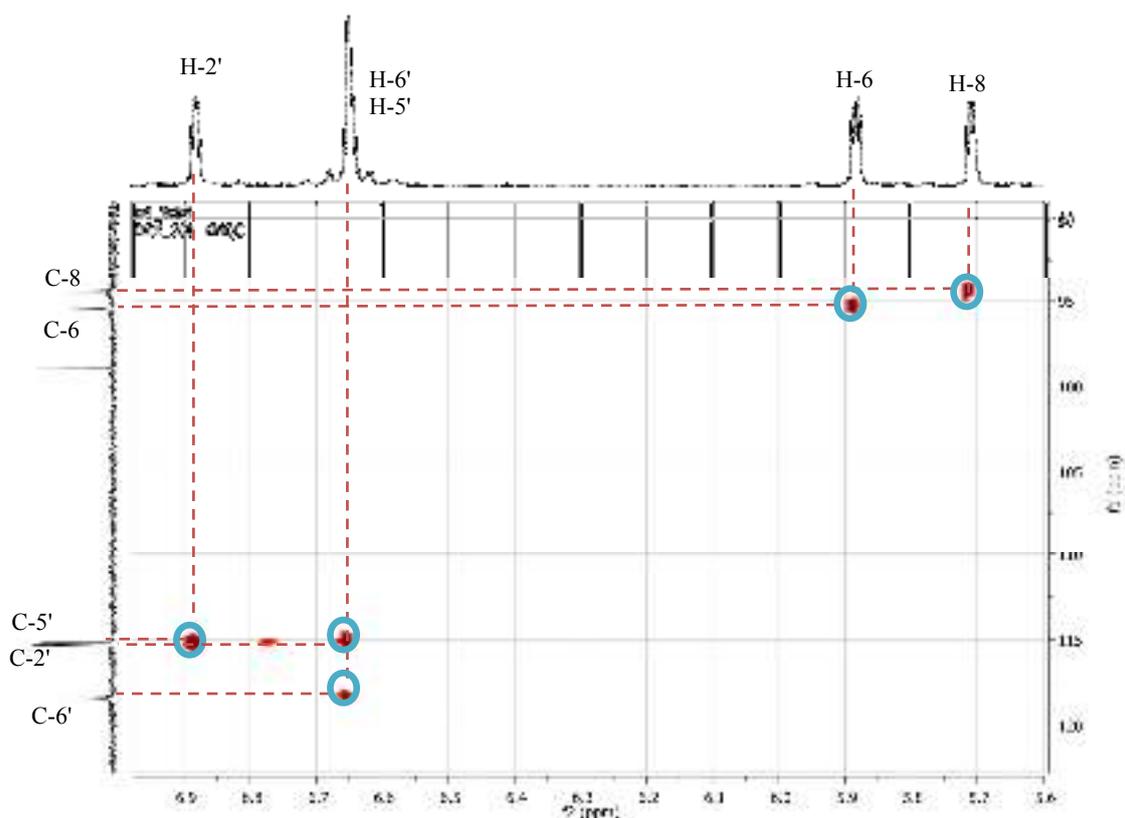
L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMQC (Spectre 27) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- ❖ Une tâche de corrélation entre les deux protons H-4<sub>a</sub> et H-4<sub>b</sub> et le C-4 à  $\delta_{\text{C}} = 28,51$  ppm.

- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-3 et le C-3 à  $\delta_C = 65,27$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-2 et le C-2 à  $\delta_C = 78,44$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-8 et le C-8 à  $\delta_C = 94,49$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-6 et le C-6 à  $\delta_C = 95,46$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-5' et le C-5' à  $\delta_C = 115,33$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-2' et le C-2' à  $\delta_C = 115,20$  ppm.
- ❖ Une tâche de corrélation entre le H-6' et le C-6' à  $\delta_C = 118,41$  ppm.



**Spectre 27:** Spectre HMQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



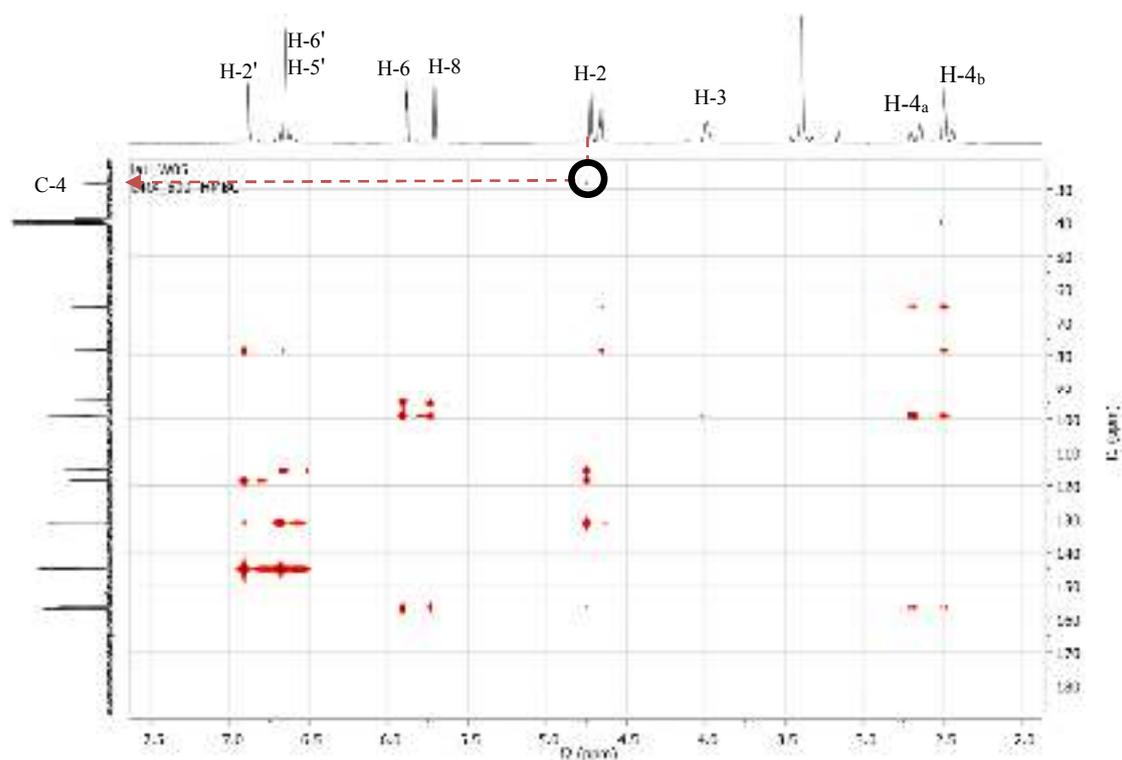
**Spectre 27-1:** Spectre HMQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.

Le spectre HMBC (Spectre 28) nous a détecté les corrélations entre un carbone et ses protons éloignés. De plus les corrélations à longues distances nous ont fournis des renseignements concernant les carbones quaternaires.

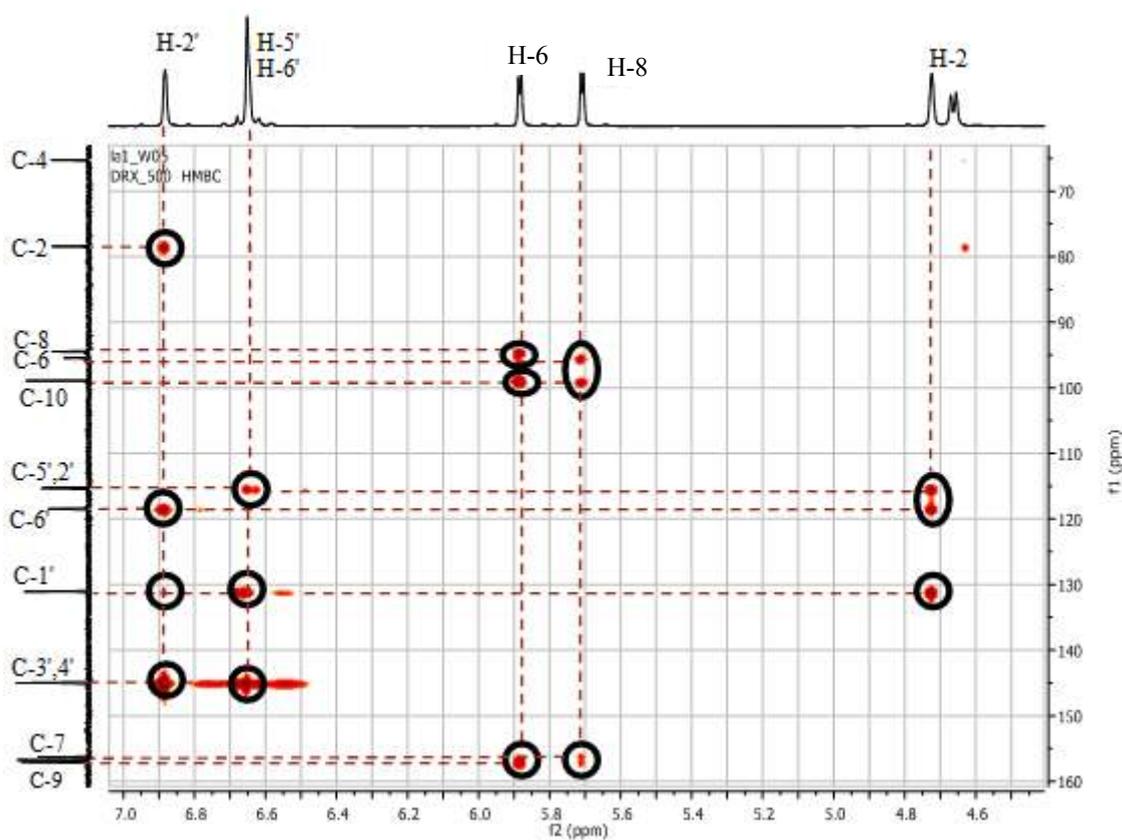
- ❖ Ainsi, le carbone à  $\delta_C = 131,09$  ppm corrèle avec les protons benzéniques H-2', H-5' et H-6' et le proton H-2 du cycle voisin attribuable au carbone quaternaire C-1'.
- ❖ D'autre part, il existe des corrélations entre le carbone à  $\delta_C = 98,90$  ppm et les protons H-2, H-4<sub>a</sub>, H-4<sub>b</sub>, H-6 et H-8, ce carbone ne peut être que le C-10.
- ❖ Le carbone C-9 est attribué à  $\delta_C = 157,05$  ppm grâce à ses corrélations avec les deux protons H-4 et H-8.
- ❖ Les attributions des carbones C-5 (156,30 ppm) et C-7 (156,75 ppm) ont été faits grâce à ses corrélations avec leurs protons voisins portés par les carbones C-6 et C-8.

Cette information confirme donc l'attribution des signaux à  $\delta_H = 5,88$  ;  $5,71$  ppm de la RMN  $^1H$  aux protons aromatiques H-6 et H-8.

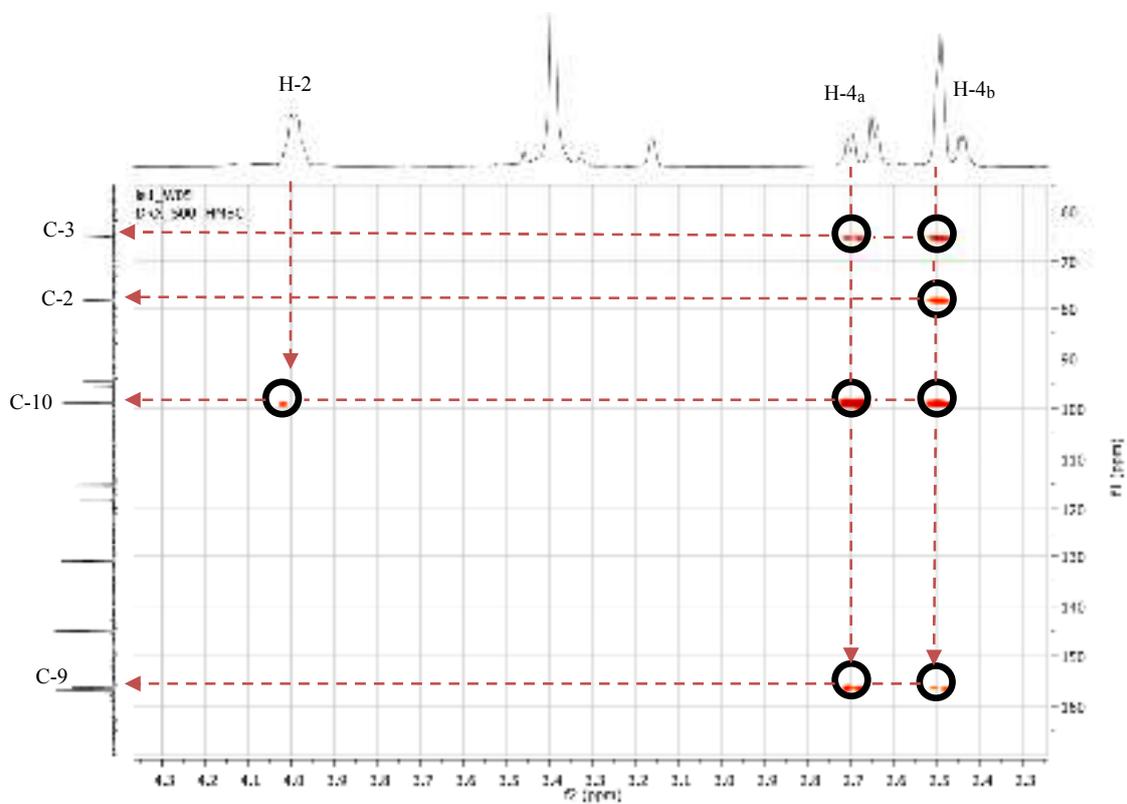
- ❖ Par ailleurs il existe des corrélations entre les deux carbones à  $\delta_C = 144,94$  et  $144,99$  ppm et les protons H-2', H-5' et H-6', ces deux carbones ne peut être que le C-3' et C-4' respectivement.



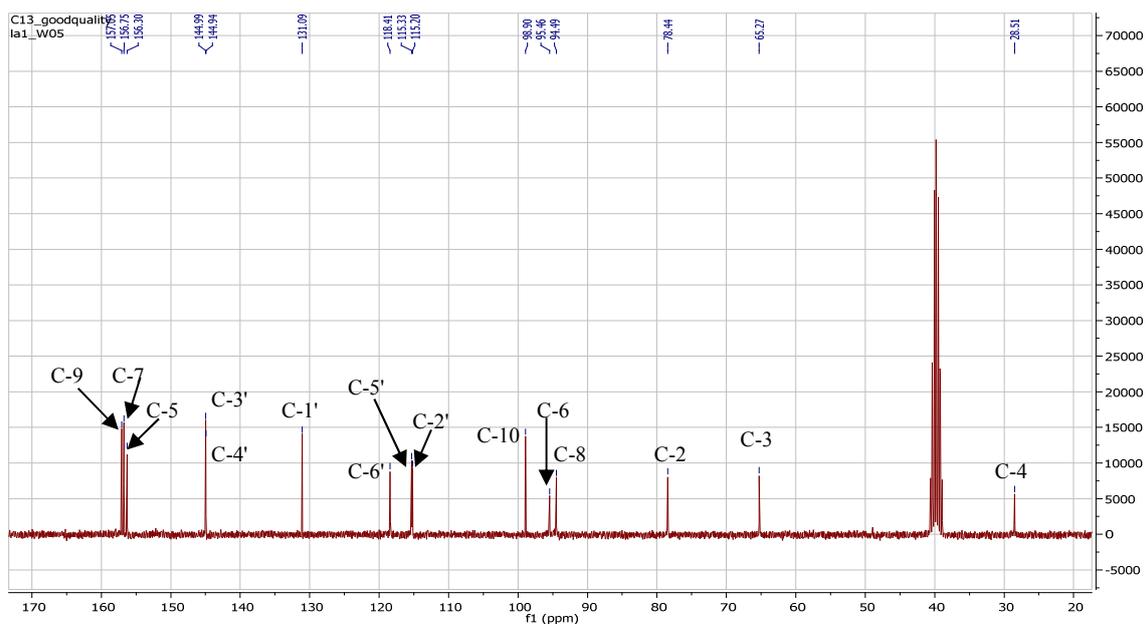
Spectre 28: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



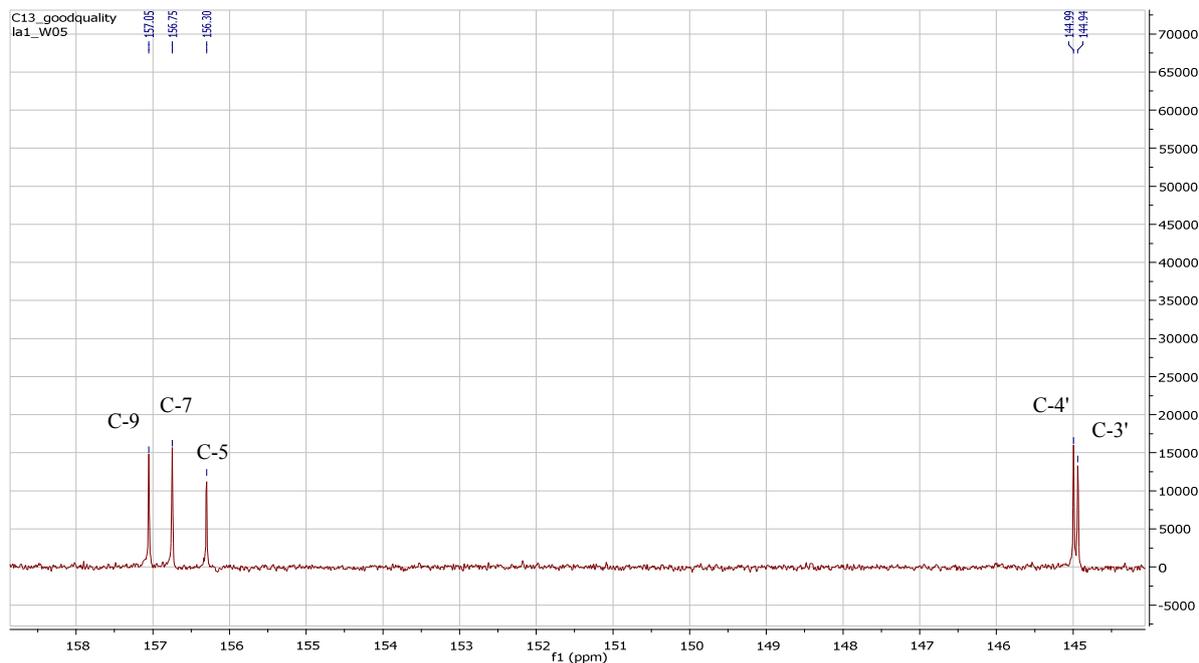
Spectre 28-1: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



Spectre 28-2: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



Spectre 23: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WO5.



**Spectre 23-1:** Spectre RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WO5, (Etalement).

**Tableau 51:** Données expérimentales de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz), et RMN <sup>13</sup>C et DEPT (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz), et du HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) du composé WO5

N° de C	DEPT	δ <sub>c</sub> (ppm)	HMBC Corrélations <sup>13</sup> C → <sup>1</sup> H
2	CH	78,44	2' ; 3 ; 4 ; 6
3	CH	65,27	4 ; 2
4	CH <sub>2</sub>	28,51	3 ; 2
5	Cq	156,30	6 ; 8 ; 4
6	CH	95,46	7 ; 8
7	Cq	156,75	2 ; 4 ; 8 ; 6
8	CH	94,49	7,9
9	Cq	157,05	6 ; 8 ; 2 ; 4
10	Cq	98,90	8 ; 6 ; 3 ; 4
1'	Cq	131,09	2' ; 5' ; 6' ; 2
2'	CH	115,20	2 ; 6' ; 5'
3'	Cq	144,94	2' ; 5' ; 6' ; 2
4'	Cq	144,99	2' ; 5' ; 6'
5'	CH	115,33	2 ; 2' ; 5' ; 6'
6'	CH	118,41	2' ; 5' ; 2

Ces analyses sont en accord direct avec la littérature [25,26], cela donc permet d'attribuer au WO5 la structure de l'**Epicatechine**. Cette molécule a des propriétés biologiques intéressantes notamment l'activité anti-oxydante [27].

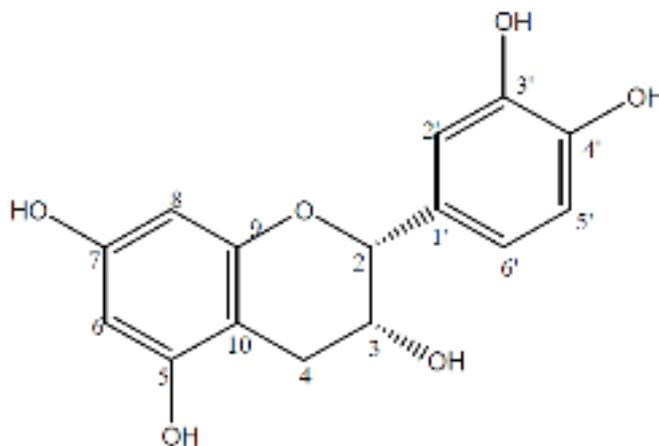
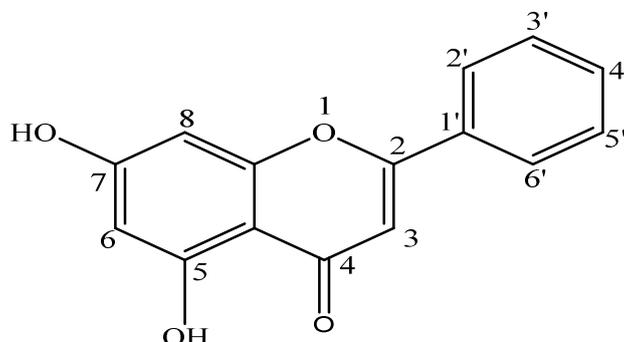


Figure 32: Structure finale du composé WO5 : (Epicatechine)

#### IV.5. Éluclidation structurale des composés de *C. triflorus* L'Her.

##### IV.5.1. Éluclidation structurale des composés de l'extrait AcOEt

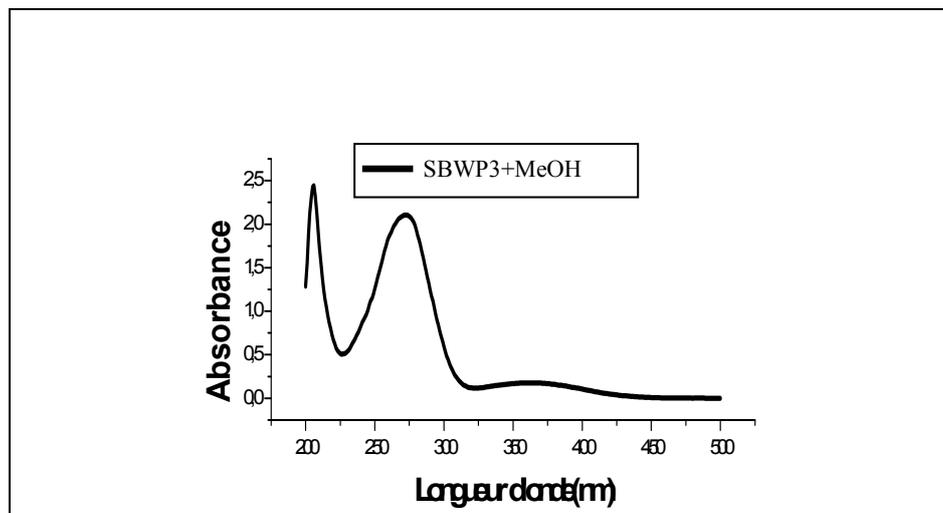
##### IV.5.1.1. Éluclidation structurale du composé (SBWP3)



Le composé SBWP3 est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm et une couleur jaune après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 min ce qui permet d'envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen de la série spectrale UV-vis du composé SBWP3 (Spectre 29) a permis de montrer les indications suivantes :

- ✚ Un maximum d'absorption de la bande I à 325, et la bande II à 271 dans le spectre enregistré dans le méthanol, caractéristiques d'une flavone [15].

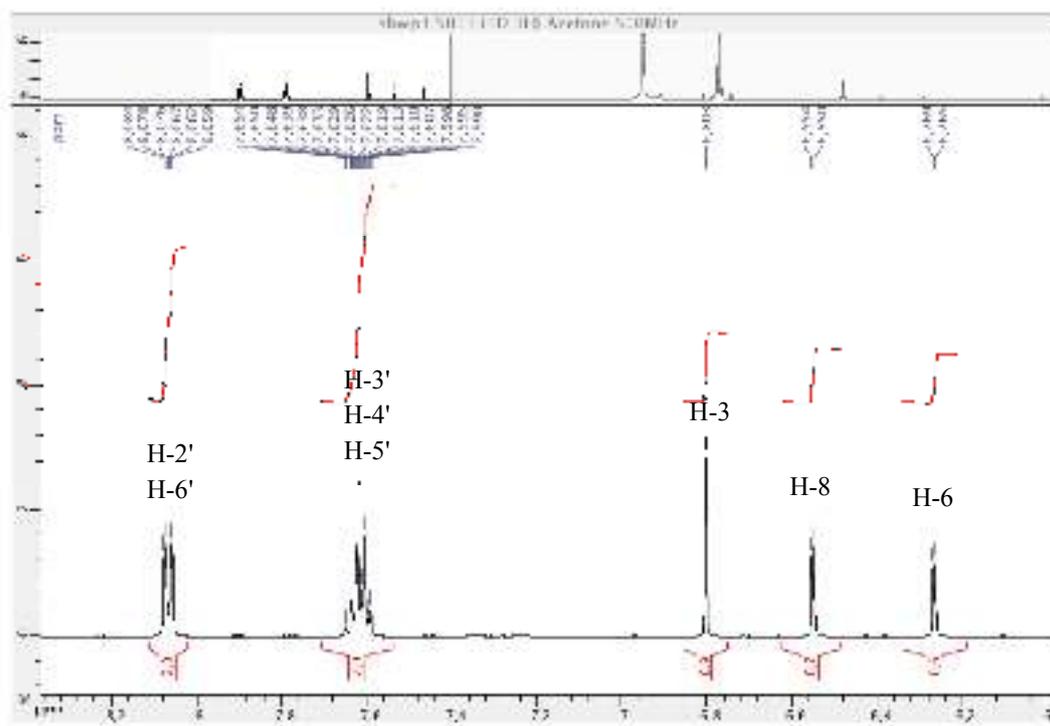


**Spectre 29:** Série spectrale UV-Vis du produit SBWP<sub>3</sub>.

La RMN <sup>13</sup>C (Spectre 34) indique la présence de 15 atomes de carbones, et les valeurs d'intégrations du spectre RMN <sup>1</sup>H indiquent la présence de 8 protons, cela montre la présence de deux substitutions qui ne peuvent être que des hydroxyles, ce qui permet de proposer la formule brute C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>.

L'examen du spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>) du composé SBWP<sub>3</sub> (Spectre 30) a permis de mettre en évidence la présence de:

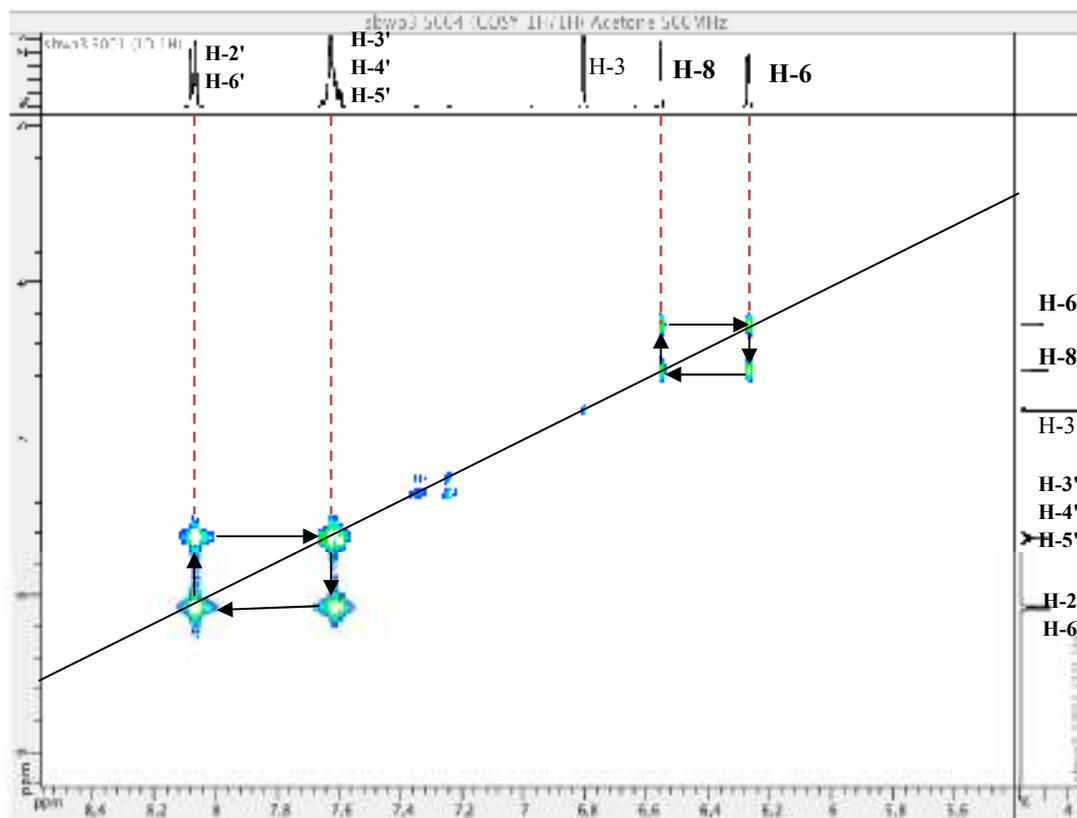
- ✚ Deux protons à  $\delta_H = 6,55$  et  $\delta_H = 6,26$  ppm qui apparaissent comme doublets dont la constante de couplage est  $J = 2,1$  Hz, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement, ce qui montre une substitution du noyau A en position 7 et 5.
- ✚ Un proton se présentant comme singulet à  $\delta_H = 6,8$  ppm attribuable à H-3 confirmant la structure d'une flavone [15].
- ✚ Un doublet de doublets à  $\delta_H = 8,06$  ppm, d'intégration 2H, avec une constante de couplage ( $J = 8,00 ; 2,2$  Hz), attribuables à H-2', H-6', et un multiplet (*m*) à  $\delta_H = 7,59-7,60$  ppm, d'intégrale 3H, attribuables à H-3', H-4' et H-5', montrant aucune substitution sur le cycle B.



**Spectre 30:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, Acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé SBWP<sub>3</sub>.

L'examen du spectre COSY (Spectre 31) confirme les résultats précédents, en effet, ce spectre montre:

- ✚ Une tache de corrélation entre les protons H-6 à  $\delta_{\text{H}} = 6,26$  ppm et H-8 à  $\delta_{\text{H}} = 6,55$  ppm confirmant le couplage méta et aussi les attributions de H-6 et H-8 respectivement.
- ✚ Une tache de corrélation entre le double de doublets à  $\delta_{\text{H}} = 8,06$  ppm et le multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 7,59$  ppm, confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-4' et H-5', ce qui confirme aussi qu'il n'y a aucune substitution sur le noyau B.

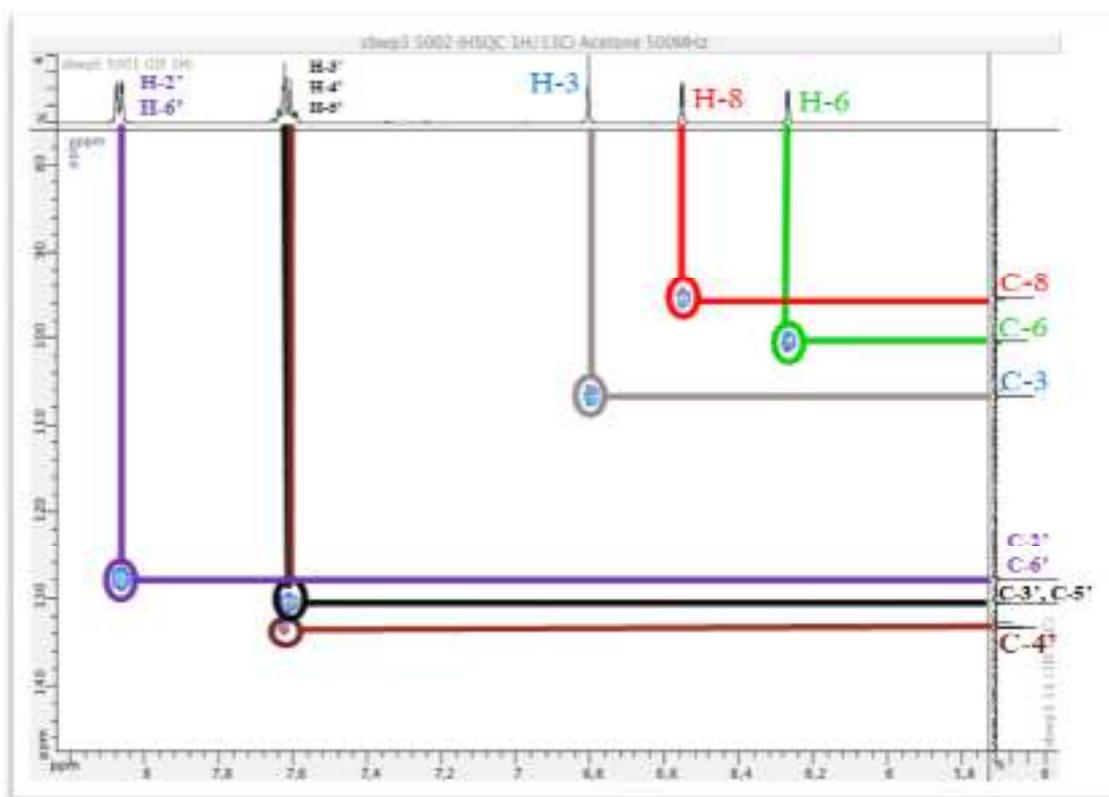


**Spectre 31:** Spectre RMN COSY (500 MHz, Acétone-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé SBWP<sub>3</sub>.

Les valeurs RMN <sup>13</sup>C pour tous les carbones ont été attribuées sur la base des corrélations HSQC (Spectre 32) et HMBC (Spectre 33).

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 32) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

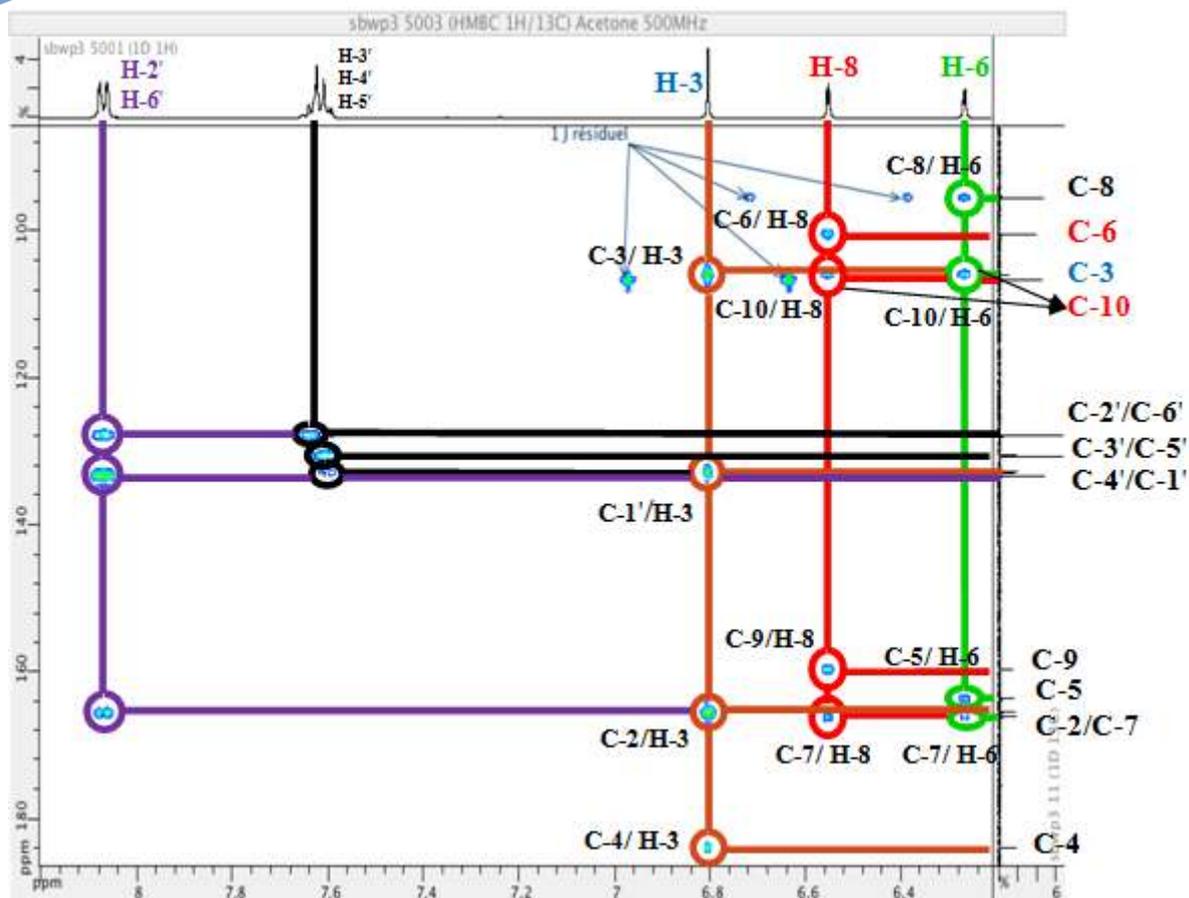
- ✚ Une corrélation entre le proton en position 6 et le carbone C-6 à δ<sub>C</sub> = 100,20 ppm.
- ✚ Une corrélation entre le H-8 et le signal du carbone C-8 à δ<sub>C</sub> = 95,26 ppm.
- ✚ Le H-3 permet la détermination de C-3 à δ<sub>C</sub> = 106,46 ppm.
- ✚ Le H-3' et H-5' corrélient avec le C-3' et C-5' à δ<sub>C</sub> = 130,38 ppm.
- ✚ Les H-2' et H-6' permettent l'attribution des carbones C-2' et C-6' à δ<sub>C</sub> = 127,62 ppm.
- ✚ Le H-4' corrélie avec le C-4' à δ<sub>C</sub> = 132,62 ppm.



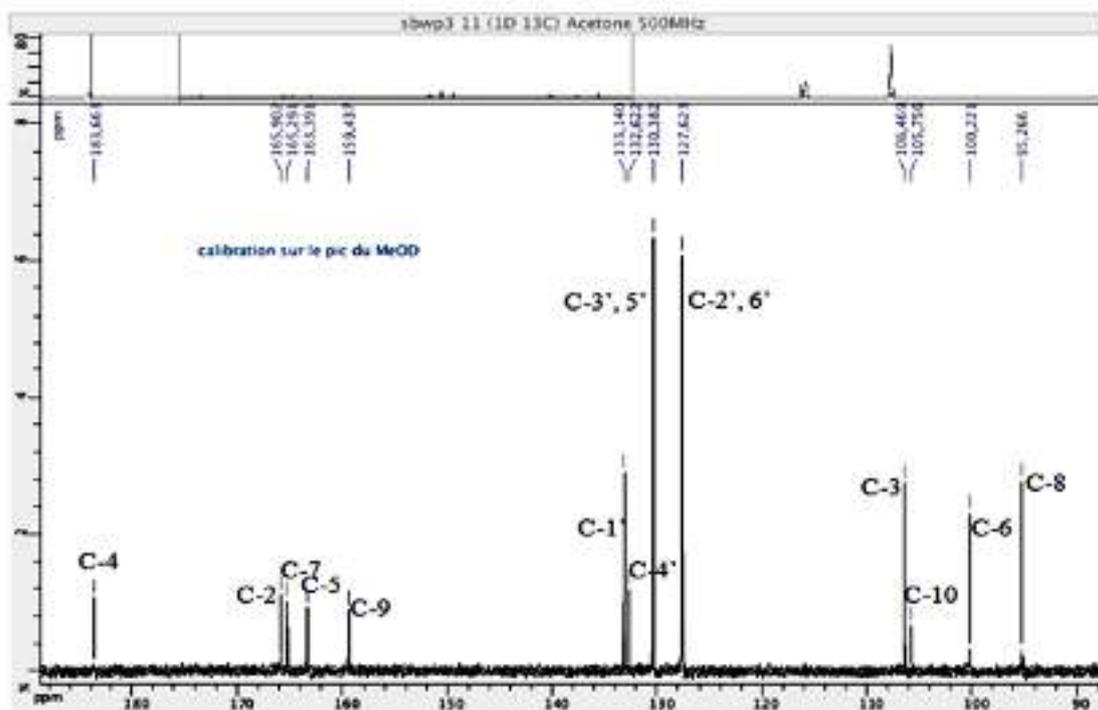
**Spectre 32:** Spectre RMN HSQC (500 MHz, Acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé SBWP<sub>3</sub>.

Les autres carbones sont attribués sur la base de l'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 33), qui montre en effet :

- 🧩 Une corrélation entre le proton H-3 et les carbones à  $\delta_C = 133,14$  ppm et  $183,66$  ppm attribuables aux C-1' et C-4 respectivement. (L'attribution de C-4 (lié à un oxygène) vu la valeur de son déplacement chimique, la plus élevée des carbones oxygénés quaternaires)
- 🧩 L'attribution de C-1' est confirmée par la corrélation entre ce carbone et les protons H-2', H-6', H-3', H-5'.
- 🧩 Une corrélation entre le carbone à  $\delta_C = 165,29$  ppm et les deux protons H-6 et H-8 qui ne peut être que le carbone C-7.
- 🧩 Une corrélation entre le carbone à  $\delta_C = 165,9$  ppm et les protons H-2', H-6' et H-3, qui ne peut être que le carbone C-2.
- 🧩 Une corrélation entre le Carbone  $\delta_C = 103,75$  ppm et les deux protons H-6 et H-8, qui ne peut être que le carbone C-10.
- 🧩 L'attribution de C-4, C-7, C-8 et C-10 permet l'attribution de C-5 à  $\delta_C = 163,39$  ppm vu la corrélation de ce carbone avec le proton H-6.



Spectre 33: Spectre RMN HMBC (500 MHz, Acétone-d<sub>6</sub>, δ ppm) du composé SBWP<sub>3</sub>.



Spectre 34: RMN <sup>13</sup>C (125MHz, Acétone-d<sub>6</sub>, δ ppm) du composé SBWP<sub>3</sub>.

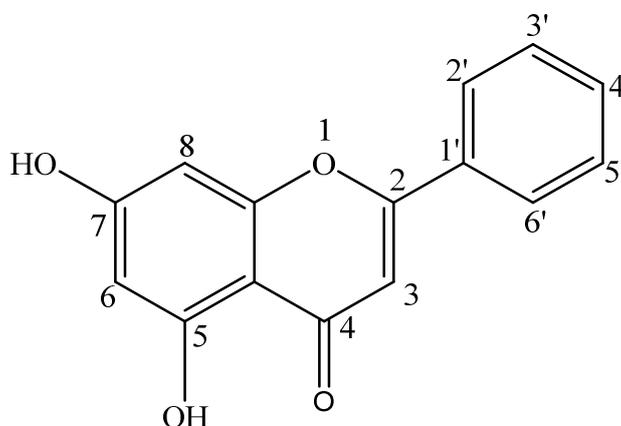
L'ensemble des résultats RMN 1D & 2D sont résumés dans le tableau suivant:

**Tableau 52:** Données spectroscopiques du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé SBWP<sub>3</sub>

N°	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC (H→C)
2	-	-	165,9	-
3	6,8	<i>s</i>	106,46	C-2 ; 4 ; 10
4	-	-	183,66	-
5	-	-	163,39	-
6	6,26	<i>d</i> (2,1)	100,22	C-8 ; 10 ; 7
7	-	-	165,29	-
8	6,55	<i>d</i> (2,1)	95,26	C-6 ; 5 ; 7 ; 10 ; 9
9	-	-	159,4	-
10	-	-	103,75	-
1'	-	-	133,14	-
2' ; 6'	8,05-8,08	<i>dd</i> (7,7 ; 2,2)	127,62	C-3' ; 5' ; 1' ; 2
3' ; 5'	7,59-7,65	<i>m</i>	130,38	C-2' ; 6'
4'	7,59-7,65	<i>m</i>	132,62	C-2' ; 6'

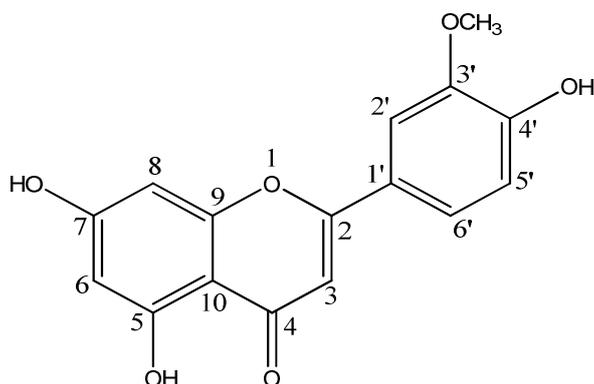
Sur la base des preuves ci-dessus et de la comparaison avec les valeurs de la littérature [28], on conclue que la formule brute du composé SBWP<sub>3</sub> est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> correspondant à onze insaturations, ce qui conduit vers un squelette de type flavonoïde dilydroxylés qui est donc le 5,7-dihydroxyflavone (**Chry sine**). (Figure 33). Connue, précédemment dans le genre *Cytisus* [29].

La chry sine est l'un des flavonoïdes végétaux naturels importants, plusieurs études ont été rapportées son posséder de multiples activités biologiques et des effets pharmacologiques, y compris antioxydant, anti-inflammatoire, anti-vieillessement et anticancéreux [30,31].



**Figure 33:** Structure finale du composé SBWP<sub>3</sub> : (**Chry sine**)

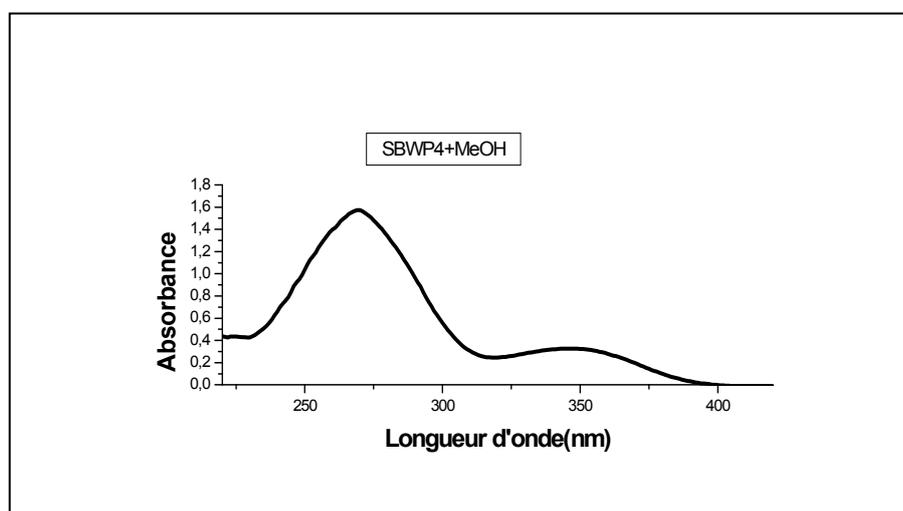
## IV.5.1.2. Élucidation structurale du composé (SBWP4)



Le composé SBWP<sub>4</sub> est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm et une couleur jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 min ce qui permet d'envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen de la série spectrale UV-vis du composé SBWP<sub>4</sub> (Spectre 35) a permis de montrer les indications suivantes :

Un maximum d'absorption de la bande I à 345 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol orienté vers la structure d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position 03. Tableau 53.



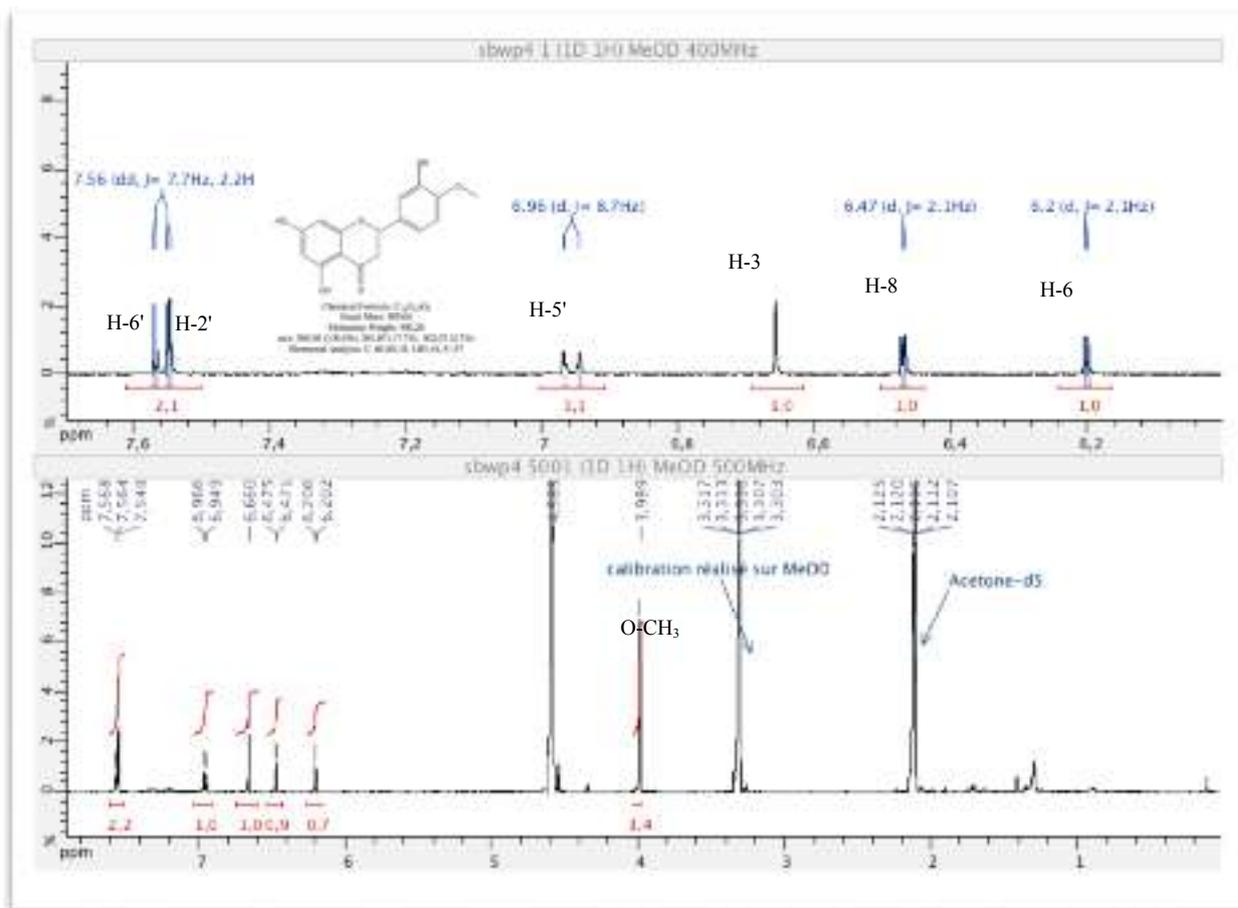
Spectre 35: Spectre UV-vis du composé SBWP<sub>4</sub>.

Tableau 53: Données de la série spectrale UV-vis ( $\lambda_{\max}$  nm) du composé SBWP<sub>4</sub>.

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	345	269	flavone ou flavonol

L'examen de la série spectrale RMN  $^1\text{H}$  du composé SBWP<sub>4</sub> (Spectre 36) enregistré dans le MeOH- $d_4$ , 400 MHz ainsi que son spectre étalé a permis de montrer les indications suivantes :

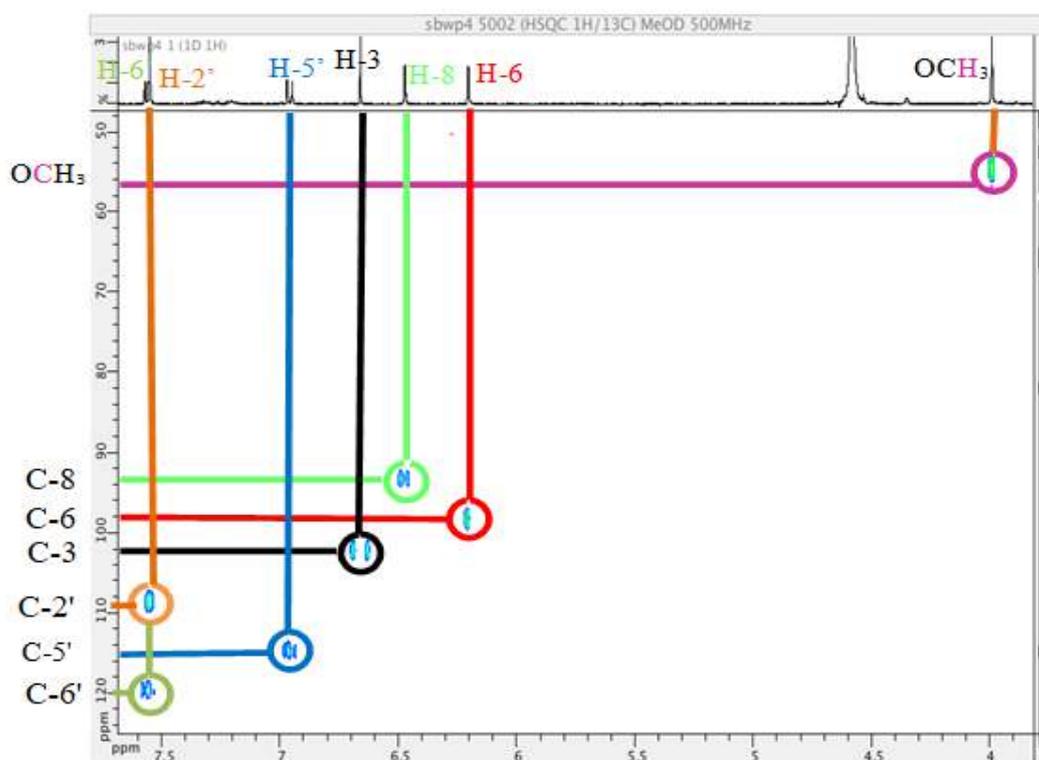
- ✚ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 12,8$  ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- ✚ Un doublet d'intégration 1H, à  $\delta_{\text{H}} = 7,57$  ( $J = 2,2$  Hz) attribuable à H-6'.
- ✚ Un doublet de doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,53$  ppm ( $J = 8,5 ; 2,2$  Hz) attribuable à H-2'.
- ✚ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,96$  ppm ( $J = 8,5$  Hz), attribuables à H-5'.
- ✚ Une substitution du noyau A en position 7 déduit de la présence du OH-5 et deux doublets d'intégration 1H chacun avec la même constante de couplage ( $J = 2,1$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 6,47$  et 6,20 ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.
- ✚ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,67$  ppm attribuable à H-3.
- ✚ Un singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}} = 3,93$  ppm, attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle.



**Spectre 36:** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé SBWP $_4$ .

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 37) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- ✓ Une corrélation entre le proton en position 6 et le carbone C-6 à  $\delta_{\text{C}} = 98,43$  ppm.
- ✓ Une corrélation entre le H-8 et le signal du carbone C-8 à  $\delta_{\text{C}} = 93,61$  ppm.
- ✓ Le H-3 permet la détermination de C-3 à  $\delta_{\text{C}} = 103,22$  ppm.
- ✓ Le H-5' corrèle avec le C-5' à  $\delta_{\text{C}} = 114,28$  ppm.
- ✓ Le H-6' permet l'attribution du carbone C-6' à  $\delta_{\text{C}} = 119,53$  ppm.
- ✓ Une corrélation entre le proton en position 2' et le C-2' à  $\delta_{\text{C}} = 109,44$  ppm.
- ✓ Les protons de méthoxyle à  $\delta_{\text{H}} = 3,93$  ppm permettent l'attribution de carbones de méthoxyle ( $\text{OCH}_3$ ) à  $\delta_{\text{C}} = 55,5$  ppm.



**Spectre 37:** RMN HSQC (500 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé SBWP<sub>4</sub>.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 38) met en évidence les corrélations proton-carbones à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

- ✚ Les protons H-6 et H-8 montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C = 103,59$  ppm, attribuable au C-10, l'attribution de ce carbone est confirmé par la présence d'une tache de corrélation entre ce carbone et le proton H-3.
- ✚ Une corrélation entre le carbone à  $\delta_C = 123,04$  ppm et les deux protons H-3 et H-5', ce carbone ne peut être que le C-1'.
- ✚ Une corrélation entre le carbone à  $\delta_C = 163,51$  ppm et les protons H-3, H-2' et H-6', ce carbone ne peut être que le C-2.
- ✚ L'attribution de C-10, C-1' et C-2 permet l'attribution de C-4 à  $\delta_C = 182,14$  ppm (vu la tache de corrélation entre le proton H-3 et ces carbones).
- ✚ L'attribution de C-2', C-6' et C-2 permet l'attribution de C-4' à  $\delta_C = 151,15$  ppm.
- ✚ Le H-6 montre deux tâches de corrélation:

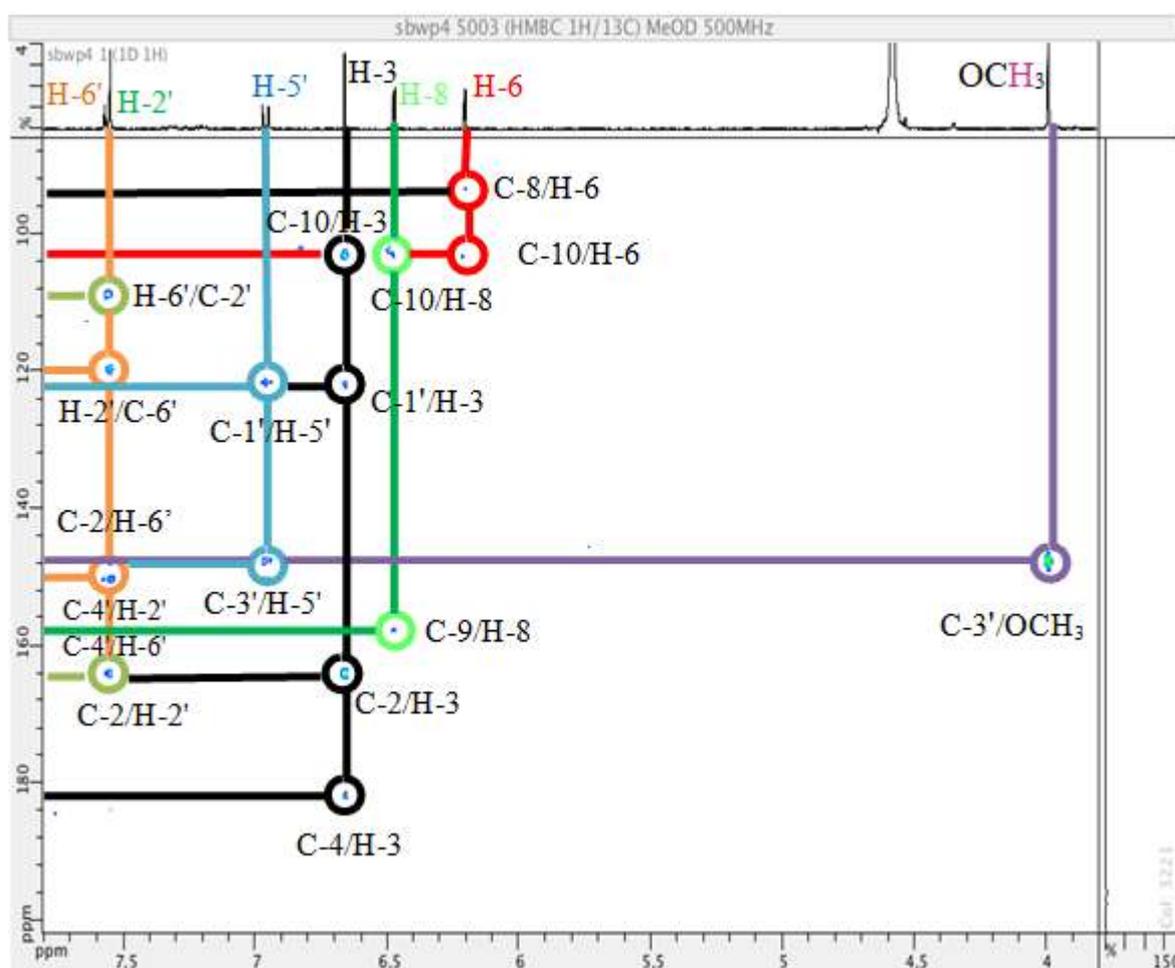
La première avec le signal à  $\delta_C = 103,59$  ppm (C-10), la seconde avec le signal à  $\delta_C = 93,61$  ppm qui ne peut être que le (C-8).

L'attribution de C-9 est fait par la présence de deux taches de corrélation avec le proton H-8  
La première à  $\delta_C = 103,59$  (C-10), la seconde avec le signal à  $\delta_C = 157,33$  ppm dont ce carbone ne peut être que le C-9.

✚ le proton H-2' montre deux tâches de corrélation:

La première avec le signal à  $\delta_C = 119,53$  ppm attribuable à C-6', la seconde avec le signal à  $\delta_C = 151,15$  ppm, ce qui montre que ce carbone est le carbone C-4'.

✚ Les protons H-2', H-5' et H-6' montrent des taches de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 147,26$  ppm qui ne pouvant être attribué que le carbone quaternaire aromatique oxygéné C-3', Par ailleurs et toujours sur le même spectre ce carbone montre une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle. Cette observation permet de placer le substituant méthoxyle en position 3'.



**Spectre 38:** RMN HMBC (500 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm) du composé SBWP<sub>4</sub>.

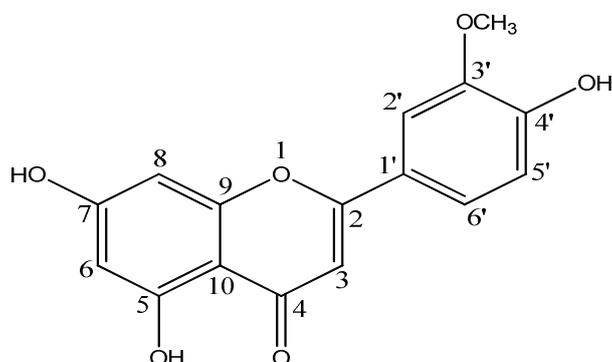
Les données de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont reportées dans le Tableau 54.

**Tableau 54:** Données spectroscopiques du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé SBWP<sub>4</sub>

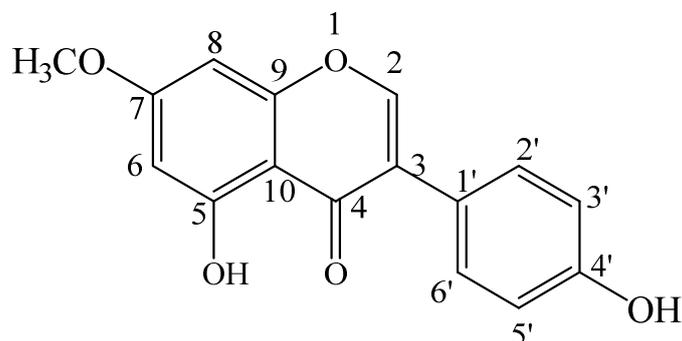
Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	163,51
3	6,67	<i>s</i>	103,22
4	-	-	182,14
5	12,80	<i>s</i>	161,54
6	6,20	<i>d</i> (2,1)	98,43
7	-	-	164,26
8	6,47	<i>d</i> (2,1)	93,61
9	-	-	157,33
10	-	-	103,59
1'	-	-	123,04
2'	7,57	<i>d</i> (2,2)	109,44
3'	-	-	147,26
4'	3,93	<i>s</i>	151,15
5'	6,96	<i>d</i> (8,7)	114,28
6'	7,53	<i>dd</i> (7,7 ; 2,2)	119,53
OCH <sub>3</sub>	3,93	<i>s</i>	55,5

La combinaison des données de la RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN (2D) et de la série spectrale UV-vis mène à la structure finale du composé SBWP<sub>4</sub> : **5, 7, 4'-Trihydroxy, 3'-métoxy-flavone**, une flavone, connu sous le nom (**Chryoériol**) [32,33].

Cette molécule est nouvelle pour le genre *Citysus*.

**Figure 34:** Structure finale du composé SBWP<sub>4</sub> : (**Chryoériol**)

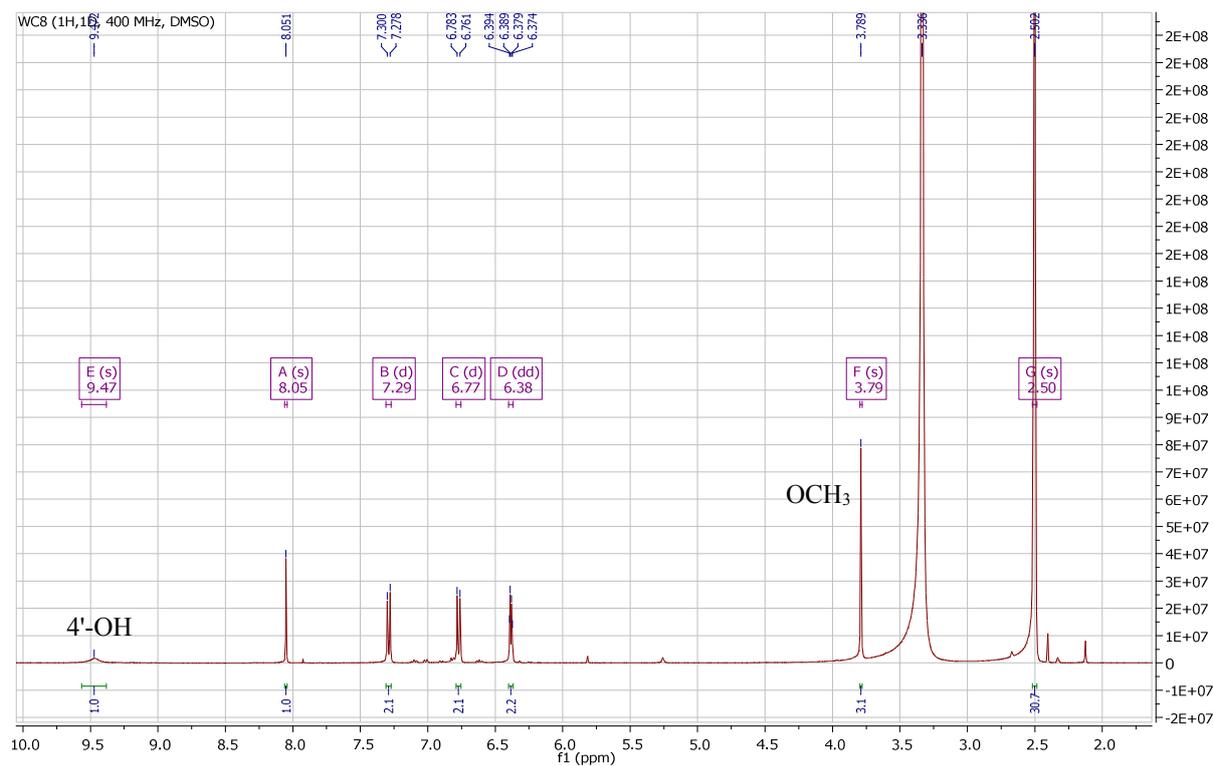
## IV.5.1.3. Élucidation structurale du composé WC8



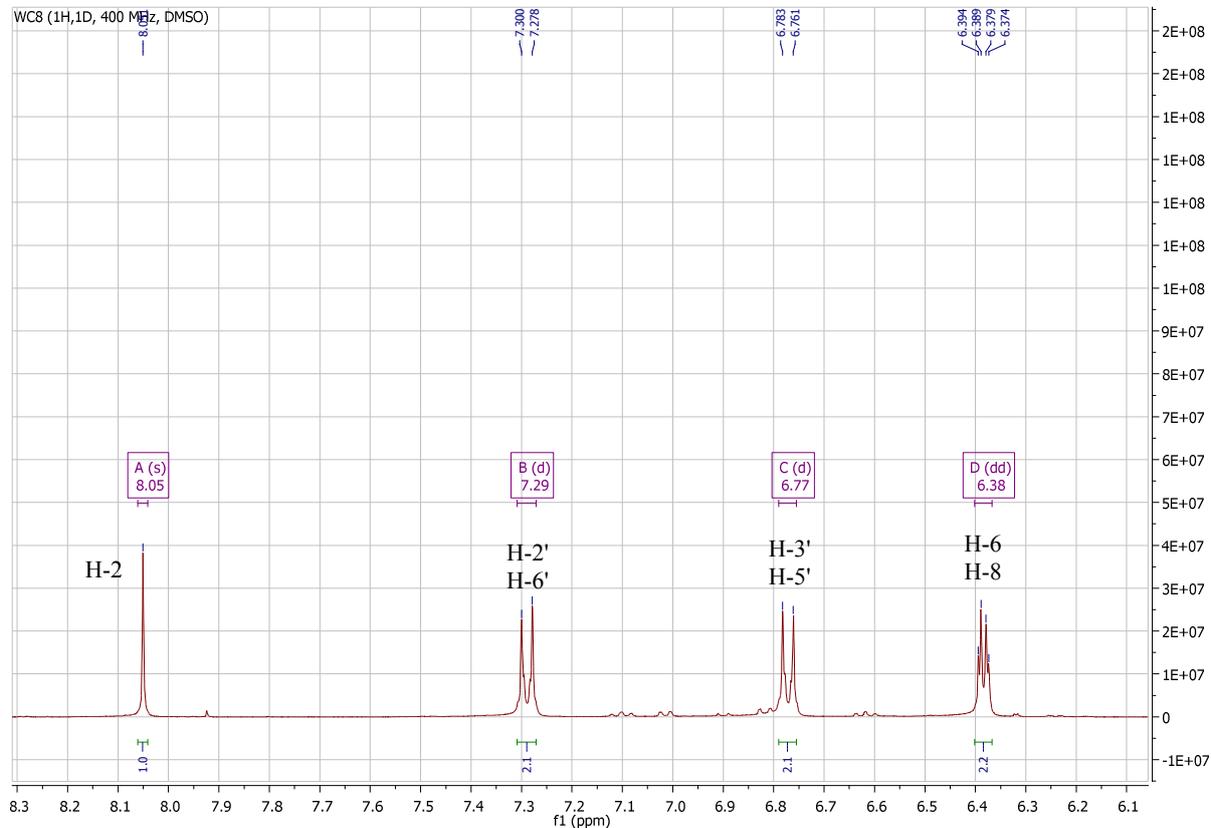
L'étude du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 39) de ce composé permet de tirer les indications suivantes :

- ✚ Un singlet à  $\delta_{\text{H}} = 8,05$  ppm intégrant pour 1H attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone. [34, 13]
- ✚ Deux doublets à  $\delta_{\text{H}} = 6,77$  et  $7,29$  ppm, chacun intégrant pour 2H, avec une constante de couplage  $J = 8,8$  Hz, caractéristique à un flavonoïde substituée en position 4' du cycle B, ces protons sont alors attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6', respectivement.
- ✚ Un doublet d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 6,38$  ( $J = 2,0$  Hz) indicateur d'un couplage méta attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.
- ✚ Un singlet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}} = 3,79$  ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.
- ✚ Un massif d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 9,47$  ppm attribuable à 4'-OH. [35]

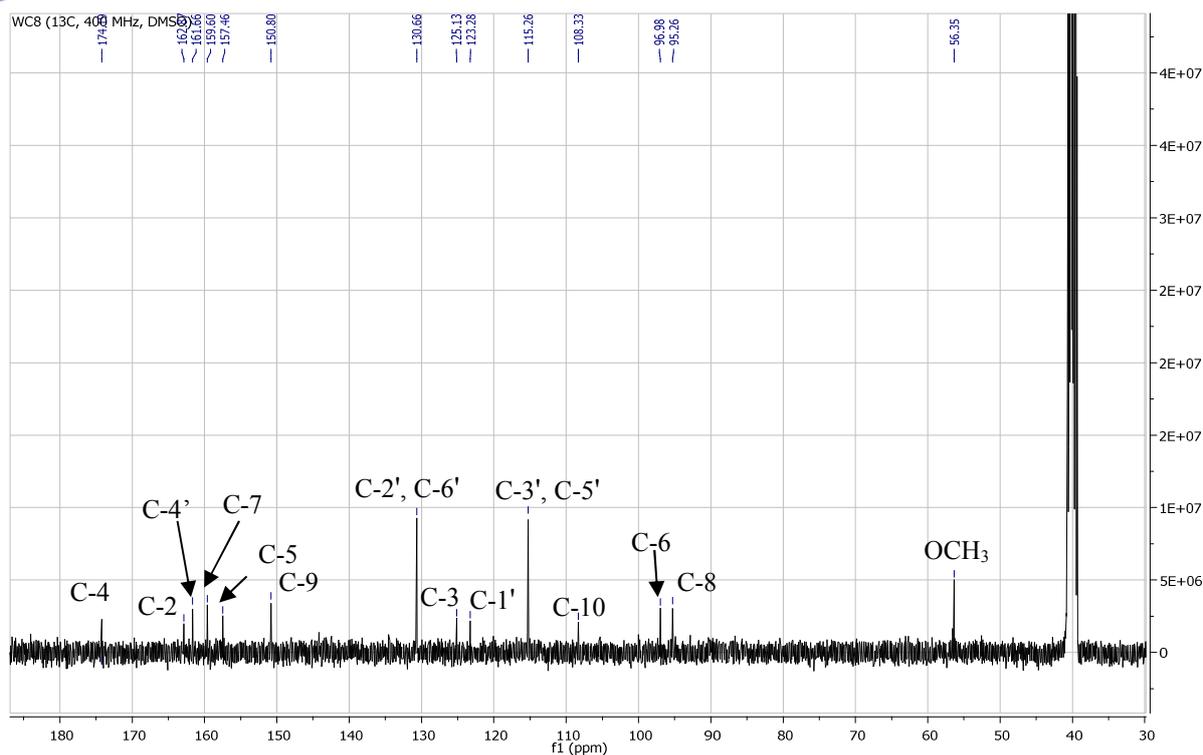
L'analyse conjointe de spectre RMN $^{13}\text{C}$  et la comparaison avec les données de la littérature [34-36] permettent d'attribuer sur le spectre RMN $^{13}\text{C}$  tous les carbones (Tableau 55).



Spectre 39: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WC8



Spectre 39-1: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) du composé WC8, (Etalement).



Spectre 40: RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC8

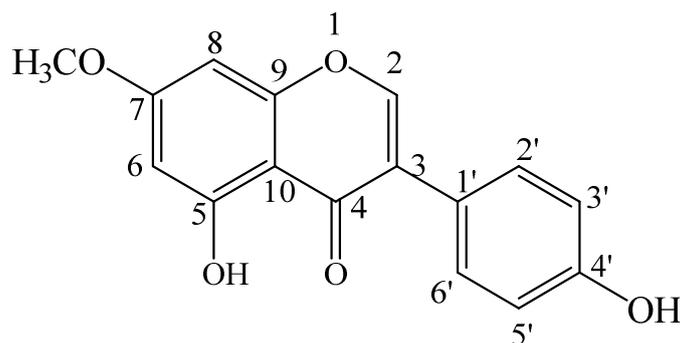
Tableau 55: Données spectroscopiques du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé WC8

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	8,05	-	162,87
3	-	-	125,13
4	-	-	174,32
5	-	-	159,60
6	6,38	$d$ (2,0)	96,95
7	-	-	161,66
8	6,38	$d$ (2,0)	95,26
9	-	-	157,46
10	-	-	108,29
1'	-	-	123,28
2', 6'	7,29	$d$ (8,8)	130,66
3', 5'	6,77	$d$ (8,8)	115,26
4'	9,47	<i>massif</i>	161,66
OCH <sub>3</sub>	3,79	<i>s</i>	56,37

La combinaison des données de la RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , et la comparaison avec les données de la littérature [34-36] permettent de confirmer la structure d'une isoflavone d'une part et placer le méthoxyle en position 7. Ces constatations mènent au composé :

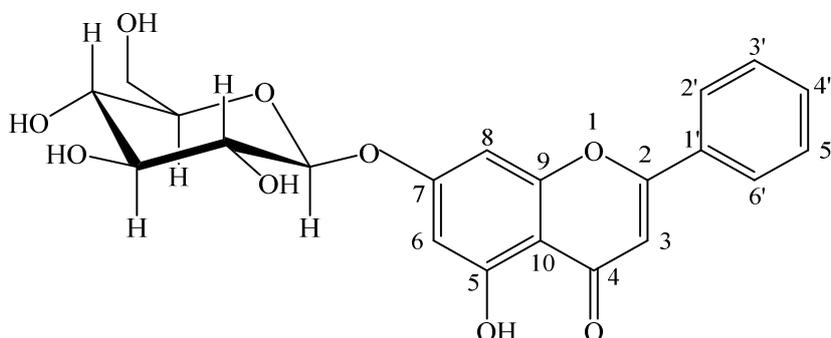
**5,4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone** une isoflavone, connu sous le nom (**Prunétine**) [13].

Cette molécule est isolée pour la première fois du genre *Cytisus*.



**Figure 35:** Structure finale du composé WC8 : (**Prunétine**)

#### IV.6.1.4. Élucidation structurale du composé WC3



Ce composé est caractérisé par une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm et une couleur jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3 min ce qui permet d'envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen de la série spectrale UV-vis du composé WC3 (Spectre 41) a permis de montrer les indications suivantes:

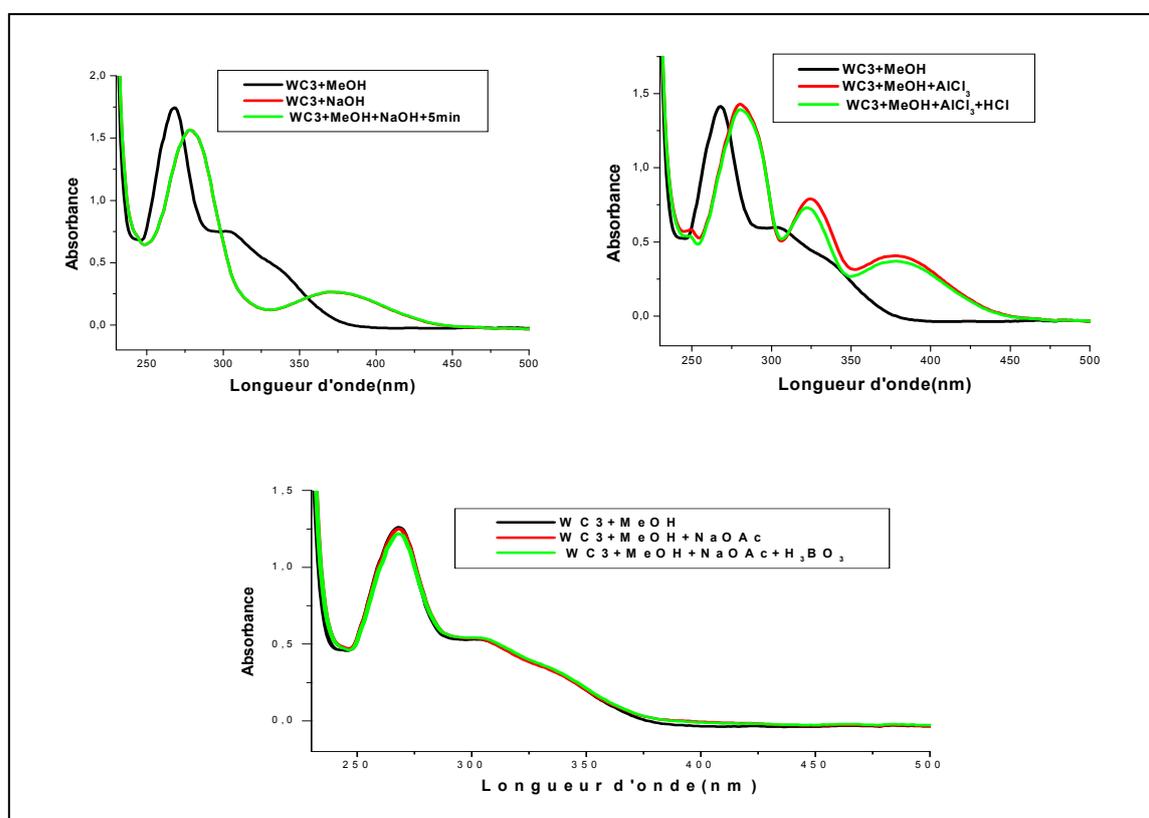
- Un maximum d'absorption de la bande I à 330 nm et de la bande II à 267 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol oriente vers la structure d'une flavone [15].

- Le spectre enregistré en présence de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  montrent un effet bathochromique de la bande I par rapport au spectre méthanolique ( $\Delta\lambda_I = +48 \text{ nm}$ ) indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 5.
- L'absence d'une nouvelle bande dans le spectre NaOH entre 320-335 nm indique la présence d'un OR en position 7.
- Le fait qu'il n'y est pas de changement notable de la bande I en comparant les spectres  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  et  $\text{AlCl}_3$  laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le Tableau 56:

**Tableau 56:** Données de la série spectrale UV-vis du composé WC3

Réactifs	Bande I ( $\lambda_{\text{max}}$ nm)	Bande II ( $\lambda_{\text{max}}$ nm)	Commentaires
MeOH	330	267	Flavone
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	378	280	OH libre en 5
+ $\text{AlCl}_3$	378	280	
+NaOAc	324	267	Substitution en C-7 (7-OR)



**Spectre 41:** Série spectrale UV-Vis du produit WC3.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré dans le DMSO- $d_6$  et ses étalements (Spectre 42, 42-1) du composé WC3 présentent des similitudes avec ceux du composé SBWP3 identifié comme la chrysrine.

Cette ressemblance a été vue sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé WC3 à partir des deux doublets  $\delta_{\text{H}}$  à 6,89 ppm (H-8),  $\delta_{\text{H}} = 6,48$  ppm (H-6) du cycle A, un doublet large à  $\delta_{\text{H}} = 8,10$  ppm (H-2' et H-6'), un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 7,58-7,65$  (H-3', H-4' et H-5') du cycle B et un proton oléfinique à  $\delta_{\text{H}} = 7,06$  ppm (H-3). (Tableau 56)

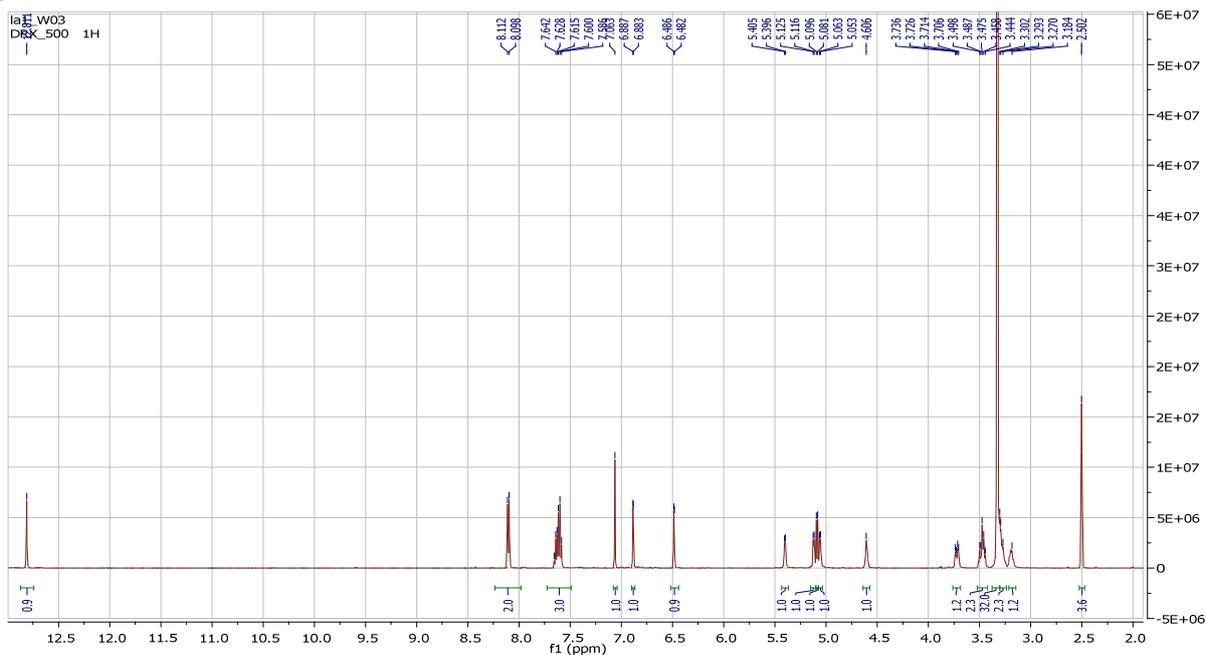
Ainsi que sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre 43) à partir des signaux observés entre 99 et le signal d'un carbonyle à  $\delta_{\text{C}} = 182,99$  relatif au squelette flavonique.

La différence réside dans l'apparition des signaux entre  $\delta_{\text{H}} = 3,18$  à 3,73 ppm indiquant la présence d'un sucre, représenté par le doublet  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  ppm avec une constante de couplage ( $J = 7,5$  Hz) caractéristique du proton anomérique H-1", porté par le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}} = 100,36$  ppm attribuable au C-1" d'après le spectre HSQC (Spectre 46)

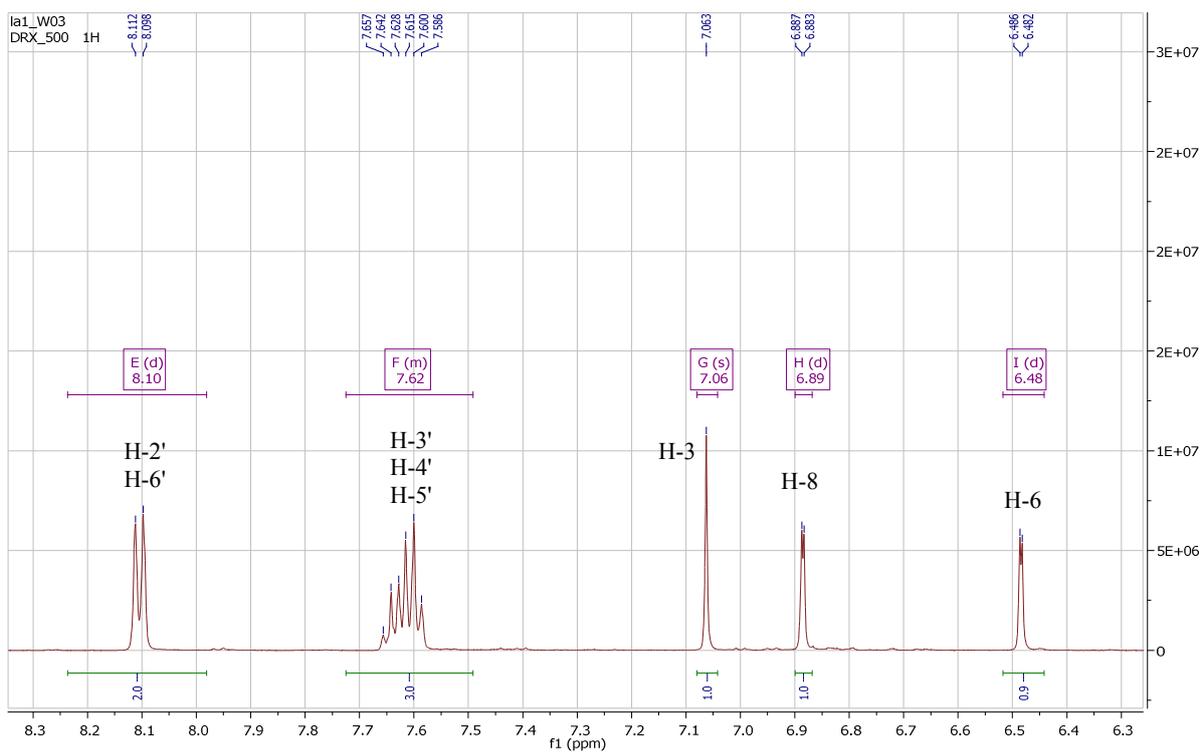
La jonction  $\beta$ -O-glycosidique de la génine et le type de sucre (glucose ou galactose) relative à cette molécule est déduite de la valeur des déplacements chimiques du carbone et du proton anomérique ( $\delta_{\text{C-1}''} = 100,28$  ;  $\delta_{\text{H-1}''} = 5,08$ ) et de la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-1" ( $d, J = 7,5$  Hz). [12]

**Tableau 57:** Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé WC3

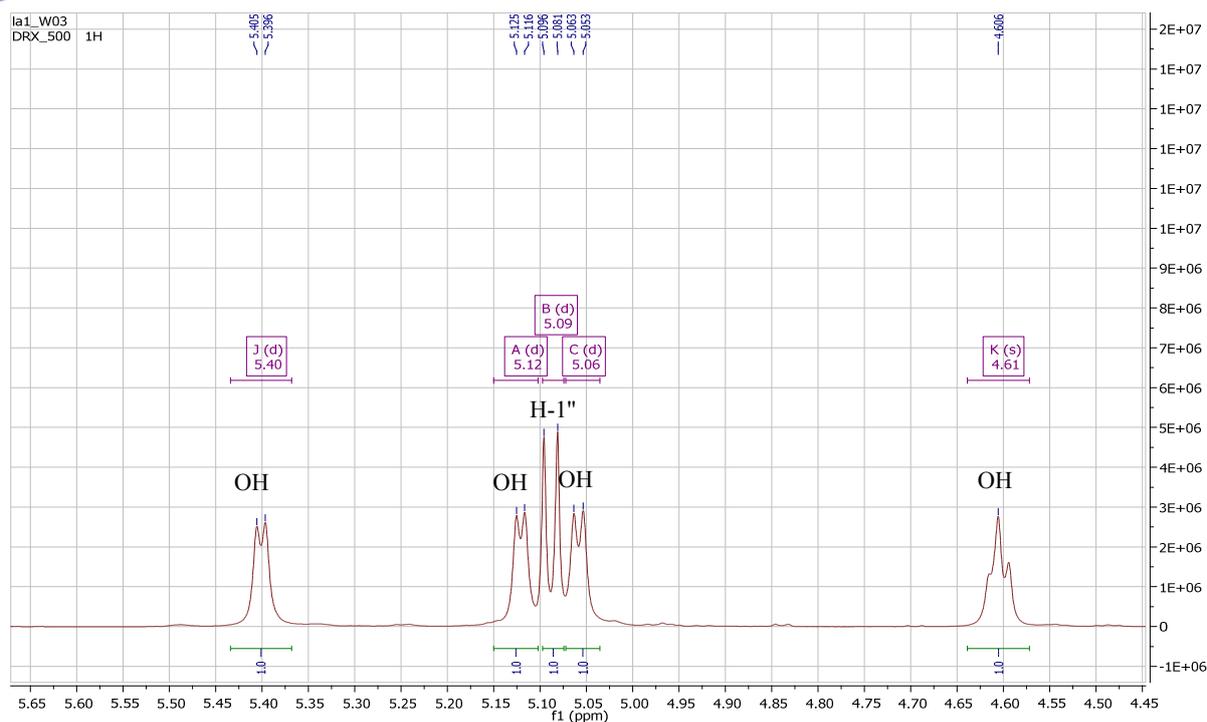
$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	Intégration	Interprétation
7,06	<i>s</i>	1H	H-3
6,89	<i>d</i> (2,0)	1H	H-8
6,48	<i>d</i> (2,0)	1H	H-6
3,18-3,73	<i>m</i>	-	Protons du sucre
8,09-8,11	<i>dl</i> (7,0)	2H	H-2', H-6'
7,58-7,65	<i>m</i>	3H	H-3', H-5' et H-4'
5,09	<i>d</i> (7,5)	1H	H-1" (anomérique)
12,81	<i>s</i>	1H	OH en 5



Spectre 42: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC3.



Spectre 42-1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du WC3 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC3, (Etalement).



**Spectre 42-2** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta_{\text{ppm}}$ ) du composé WC3, (Etalement).

L'analyse du spectre COSY (Spectre 45) permet d'identifier un premier système de spins à cinq protons à partir du proton anomérique H-1'' ( $\delta_{\text{H}} = 5,09$  ppm), ce proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton à  $\delta_{\text{H}} = 3,30$  ppm, ce proton est alors attribuable à H-2'' ( $\delta_{\text{C}} = 73,44$  ppm).

- ✓ Une tache de corrélation entre le H-2'' et un proton résonant à  $\delta_{\text{H}} = 3,29$  ppm (t;  $J = 9,0$  Hz) attribuable à H-3'' ( $\delta_{\text{C}} = 76,82$  ppm).
- ✓ Une tache de corrélation entre le H-3'' et un proton résonant à  $\delta_{\text{H}} = 3,19$  ppm (t;  $J = 9,0$  Hz) attribuable à H-4'' ( $\delta_{\text{C}} = 69,93$  ppm). Cette valeur de la constante de couplage suppose une interaction axiale-axiale entre H-3'' et H-4''. Cette observation oriente vers un H-4'' en position axiale. En conséquence le groupement glycosyle présent en C-7, est donc un glucosyle [37].
- ✓ Une tache de corrélation entre le H-4'' et un proton résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 3,46$  ppm attribuable à H-5'' ( $\delta_{\text{C}} = 78,82$  ppm),
- ✓ Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, le proton H-5'' corrèle avec deux doublets de doublets  $\delta_{\text{H}} = 3,72$  et  $\delta_{\text{H}} = 3,48$  ppm. ils sont attribuables aux deux protons H-6''a et H-6''b respectivement.

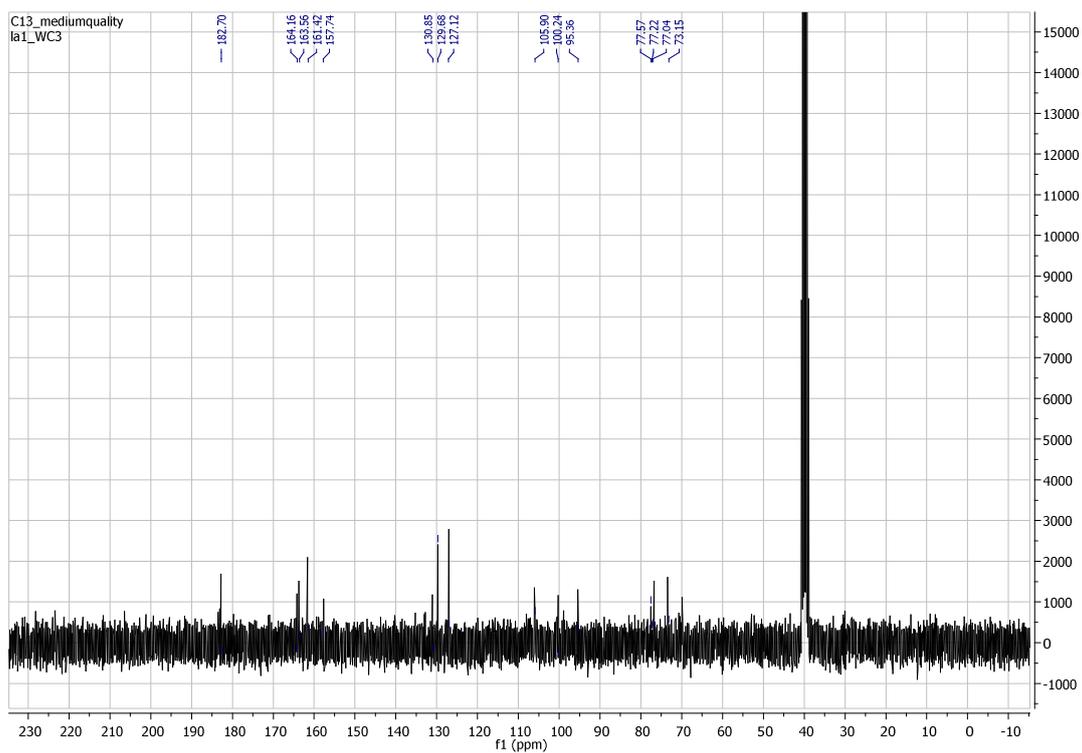
Par ailleurs, l'analyse du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 47) montre les indications suivantes :

- Une tache de corrélation entre les protons H-6 et H-8 et le carbone du carbonyle à  $\delta_C = 164,06$  ppm que nous pouvons attribuer au C-7 de la génine. (Ce carbone montre également une tache de corrélation avec le proton anomérique du sucre H-1", cette observation confirme de placer le substituant sucre en position 7).
- Ces deux protons H-6 et H-8 et le proton H-3 montrent une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 106,37$  ppm qui ne peut être sans doute le C-10.
- L'attribution de C-7 et C-10 a permis l'attribution de C-9 à  $\delta_C = 157,94$  ppm grâce à sa corrélation avec le proton H-8, et l'attribution de C-5 à  $\delta_C = 161,75$  ppm grâce à sa corrélation avec les deux protons H-3 et H-6, cette attribution permet d'attribuer les deux carbones restants C-2 à  $\delta_C = 164,51$  ppm et C-1' à  $\delta_C = 131,39$  grâce à ses corrélations avec le proton H-3.

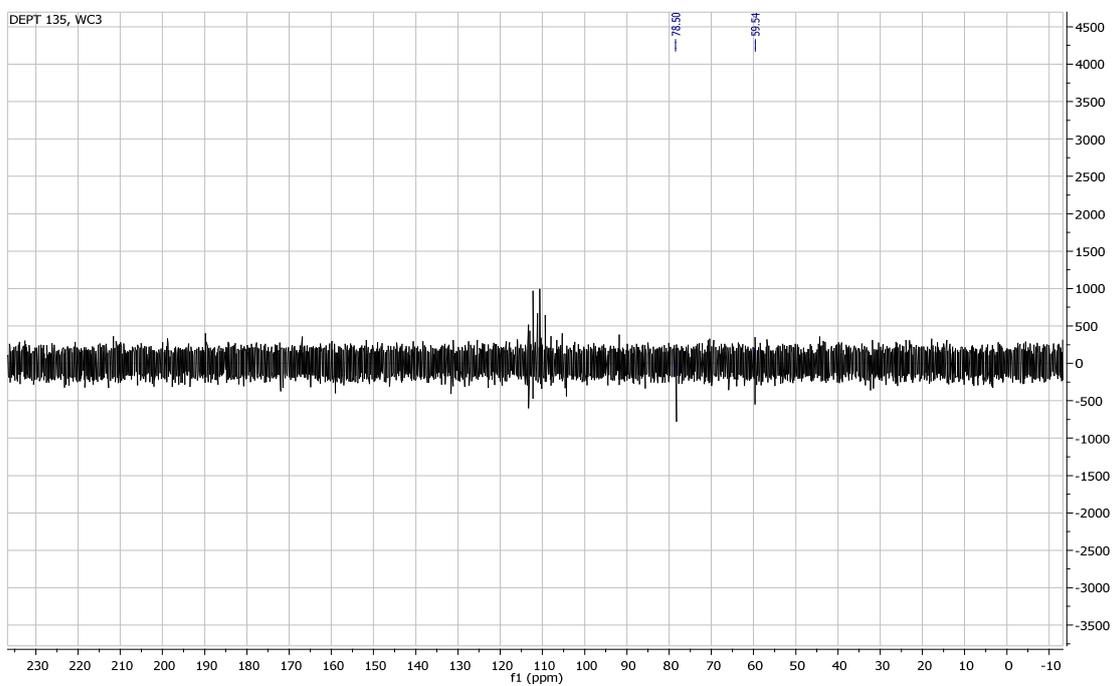
L'analyse du spectre RMN<sup>13</sup>C révèle la présence de 21 atomes de carbones, parmi lesquels on distingue un groupement méthylène d'après le DEPT 135.

Conformément au spectre RMN <sup>13</sup>C, les carbones résonnant à  $\delta_C = 100,36$  (C-1"), 73,44 (C-2"), 76,82 (C-3"), 69,93 (C-4"), 78,82 (C-5"), 61,04 (C-6") ppm montre bien la présence du sucre. Ces valeurs confirment la présence d'un groupement glucosyle. [11,18, 24]

Les déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C présentés dans le Tableau 57, ont été attribués selon l'analyse de ses spectres RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY, HMQC et HMBC (Spectre 42), (Spectre 43), (Spectre 45) , (Spectre 46) et (Spectre 47).

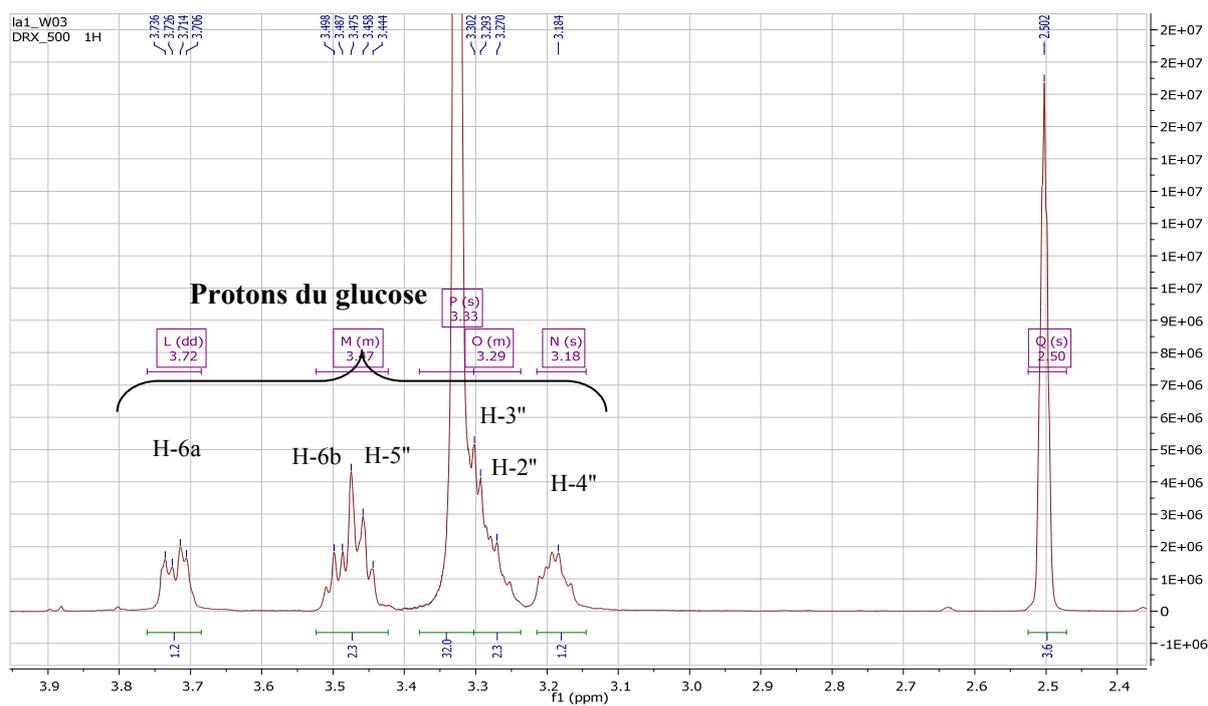


Spectre 43: Spectre  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (125MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC3.

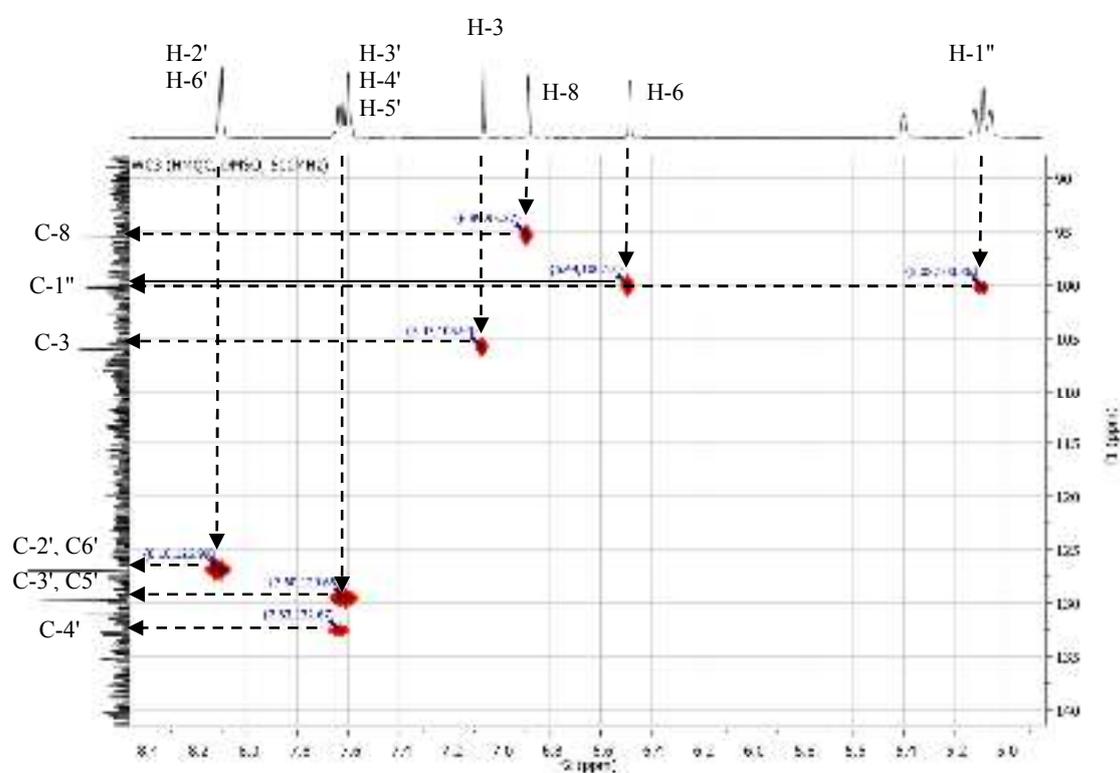


Spectre 44: Spectre DEPT 135 (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC3.



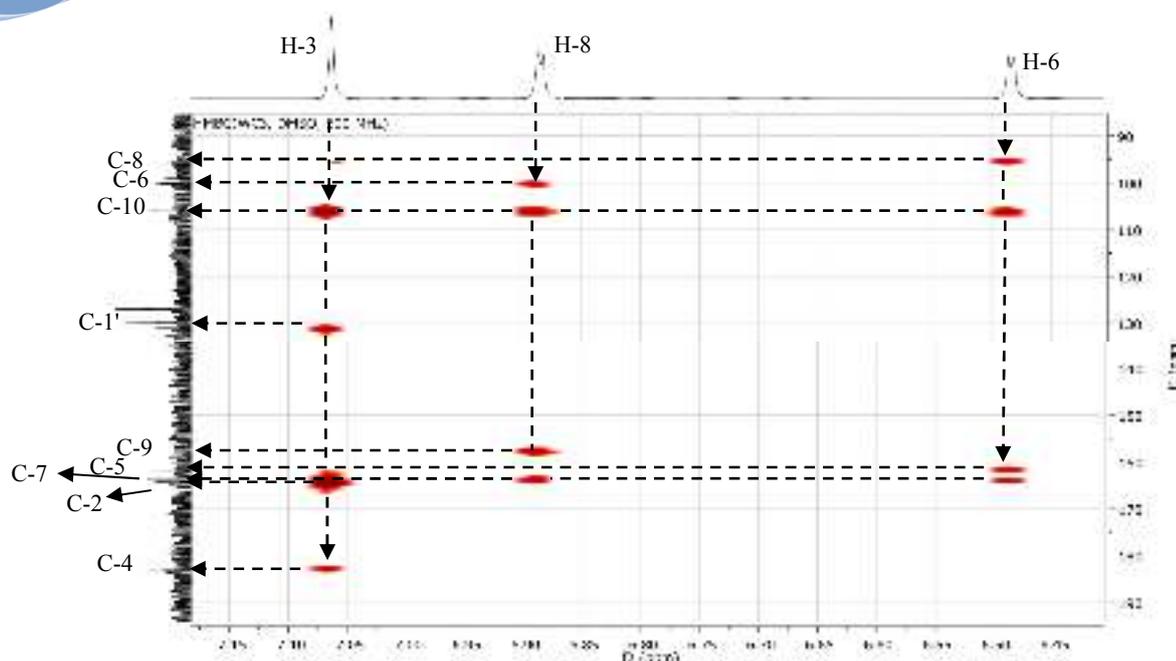


Spectre 42-3 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) du composé WC3, (Etalement).



Spectre 46-1 : Spectre HMQC (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) du composé WC3, (Etalement).

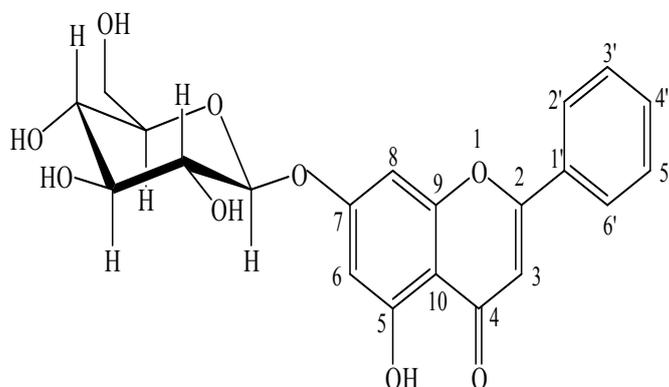




**Spectre 47-1** : Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC3, (Etalement).

Sur la base des preuves ci-dessus et par comparaison avec les données de la littérature pour les composés analogues et comparaison avec celles de la chrysine et ses dérivés aux données de la littérature [28], la structure du composé WC3 a été établie comme flavonoïde connu sous le nom **Chrysine-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**.

Cette molécule a été isolée des espèces des genres *Cytisus* [38], *Adenocarpus* [39], *Halostachys* [40], elle est connue pour ses différentes activités biologiques antidiabétiques [41], diurétiques, anti-inflammatoire, et aussi des activités antimicrobiennes et anti-oxydantes [40].



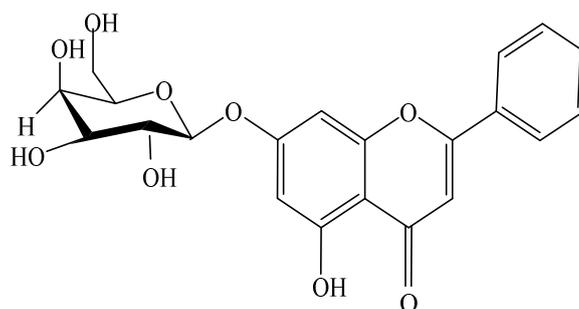
**Figure 36**: Structure finale du composé WC3 : (**Chrysine-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**)

Les données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC de ce composé sont listées dans le Tableau 58

Tableau 58: Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé WC3

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	164,51
3	7,06	<i>s</i>	105,90
4	-	-	182,99
5	-	-	161,75
6	6,48	<i>d</i> (1,6)	100,13
7	-	-	164,07
8	6,89	<i>sl</i>	95,37
9	-	-	157,94
10	-	-	106,37
1'	-	-	131,39
2'	8,10	<i>dd</i> (8 ; 1,6)	126,99
3'	7,60	<i>m</i>	129,65
4'	7,62	<i>m</i>	132,67
5'	7,60	<i>m</i>	129,65
6'	8,10	<i>dd</i> (8 ; 1,6)	126,99
1"	5,08	<i>d</i> (7,5)	100,36
2"	3,30	<i>dd</i>	73,44
3"	3,29	<i>t</i>	76,82
5"	3,46	<i>m</i>	78,82
4"	3,19	<i>m</i>	69,93
6"a	3,72	<i>dd</i> (11,0 ; 5,0)	61,04
6"b	3,48	<i>dd</i> (11,5 ; 5,5)	61,04

## IV.5.1.5. Éluclation structurale du composé WC2



La tâche de ce composé sur plaque analytique donne une fluorescence noire sous lumière Wood UV 254 nm, une couleur noir-violette sous lumière UV 365 nm ainsi qu'une coloration jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde + chauffage pendant 3min laissant envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen de la série spectrale UV-vis (Spectre 48) a permis de montrer les indications suivantes :

✓ Un maximum d'absorption de la bande I à 331 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol s'agit d'un flavonoïde de type flavone, et l'absence d'une nouvelle bande entre 320-335 nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique que la position 7 est substituée (OR).

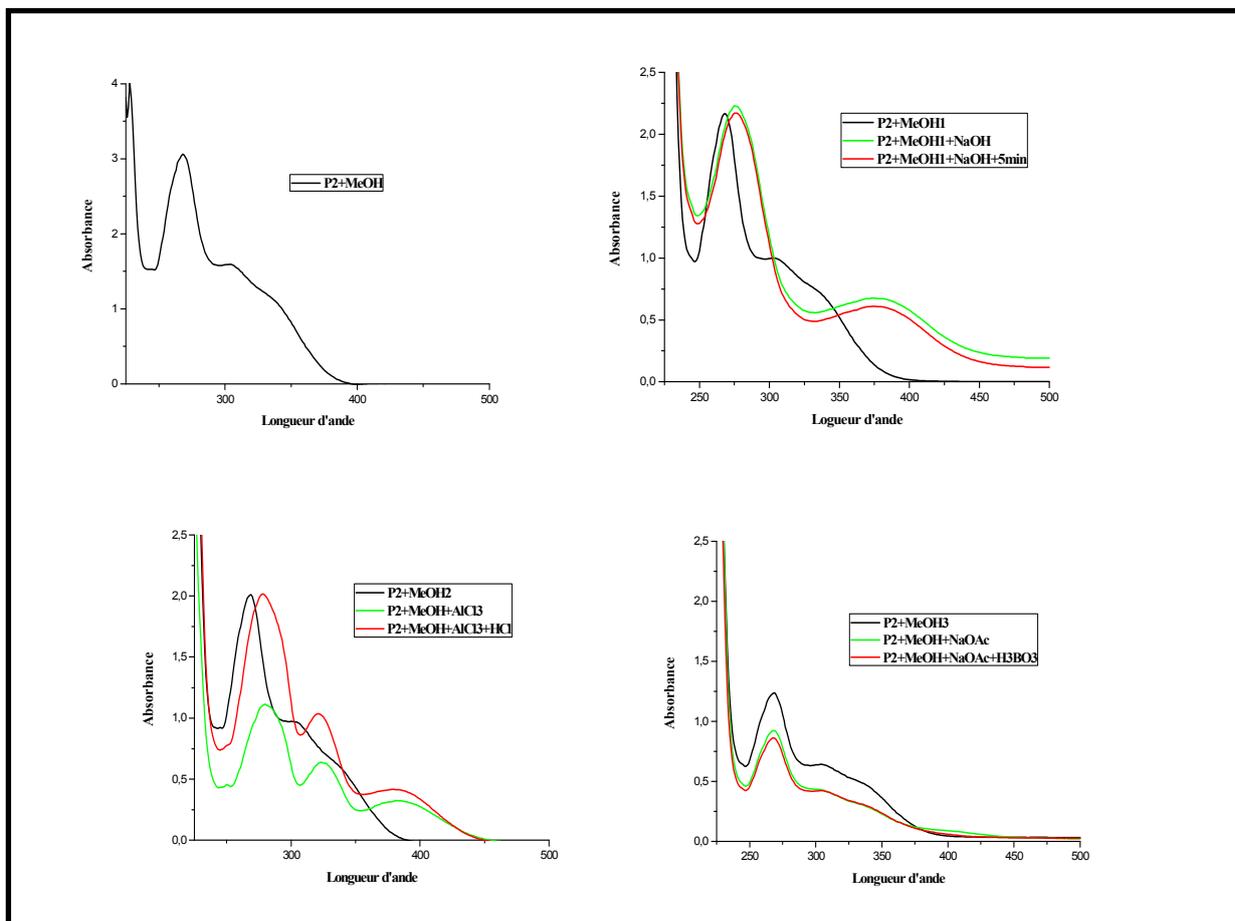
✓ L'effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu  $\text{AlCl}_3$  ( $\Delta\lambda_I = +58$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en C-5.

✓ La comparaison du spectre NaOAc par rapport au spectre MeOH: déplacement très faible ( $\Delta\lambda_I = +2$  nm) ce qui traduit la présence d'une substitution en C-7.

Les données de la série spectrale UV-vis de ce composé sont reportées sur le Tableau 59.

**Tableau 59:** Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\text{max}}$  nm) du composé WC2.

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	331	268	Flavone
+ $\text{AlCl}_3$	371	280	OH libre en 5
+ $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$	371	280	
+NaOAc	316	268	Substitution en C7 (7-OR)



**Spectre 48:** Série spectrale UV-Vis du produit WC2.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 49) et ses étalements (Spectre 48-1 et Spectre 48-2), réalisé dans le DMSO, indique la présence d'un groupement OH en position 5 (singlet à  $\delta_{\text{H}} = 12,97$  ppm) ainsi que huit signaux dans la région propre aux protons aromatiques :

✓ Un singlet à  $\delta_{\text{H}} = 6,98$  ppm d'intégration 1H est caractéristique du proton en position 3 ce qui confirme la structure d'une flavone.

✓ Cinq protons aromatiques résonant à  $\delta_{\text{H}} = 8,05$  ppm (*dd*,  $J = 7,8$  et  $2,4$  Hz, 2H),  $7,58$  ppm (*m*, 3 H). Ces protons sont caractéristiques d'un noyau aromatique mono-substitué qui ne peut être que le cycle B du flavone

✓ Deux doublets à  $\delta_{\text{H}} = 6,89$  et  $6,48$  ppm ( $J = 1,9$  Hz) sont associés à deux protons aromatiques en méta sur le cycle A, attribuables à H-8 et H-6.

Ce spectre montre également un multiplet dans la zone  $3,15$ - $3,5$  ppm indiquant des protons du sucre, et un autre signal d'intégral 1H sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 5,05$  ppm avec une constante de couplage  $J = 6,9$  Hz caractérisant le proton anomérique d'un sucre relié

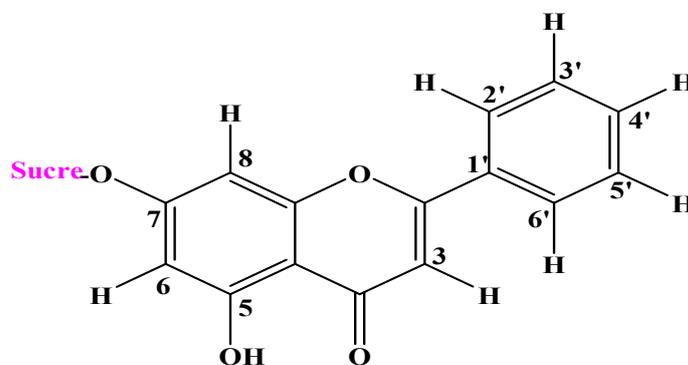
à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage du proton anomérique, cette entité pourrait être soit un glucosyle soit un galactosyle avec une configuration  $\beta$  du carbone anomérique.

Les données relatives à la RMN  $^1\text{H}$  de ce composé sont reportées sur le Tableau 60.

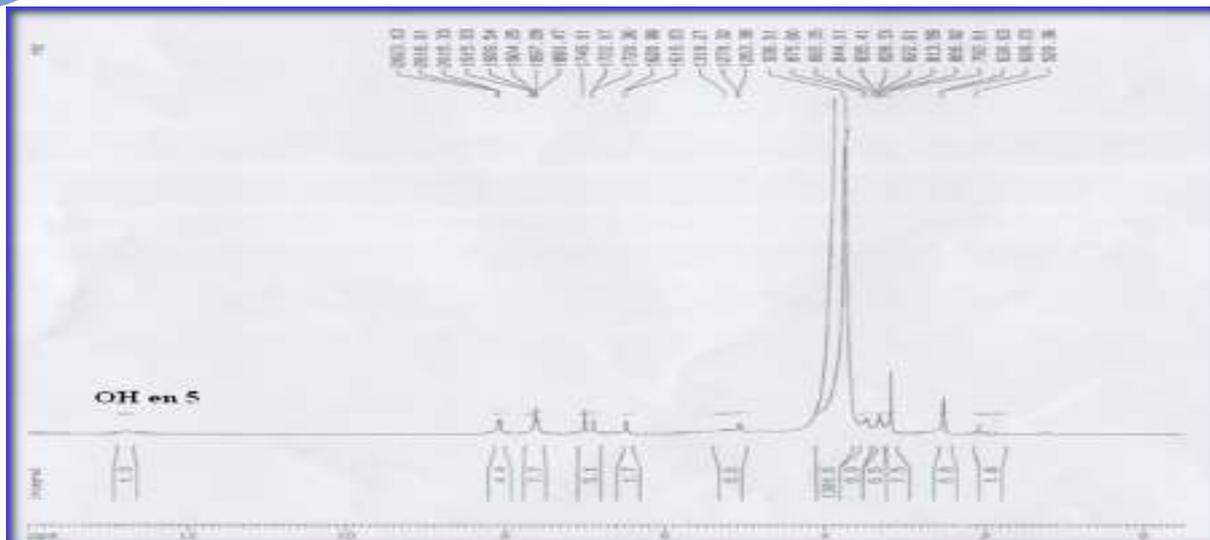
**Tableau 60:** Résultats du RMN  $^1\text{H}$  du composé WC2

Le déplacement chimique $\delta$ (ppm)	Multiplicité, $J$ (Hz)	Intégration	Interprétation
12,97	<i>Sl</i>	1H	OH en 5
8,05	<i>dd</i> , (7,8 ; 2,4)	2H	H-2' et H-6'
7,58-7,61	<i>m</i>	3H	H-3', H-5' et H-4'
6,98	<i>S</i>	1H	H-3
6,89	<i>d</i> (1,9)	1H	H-8
6,48	<i>d</i> (1,9)	1H	H-6
5,05	<i>d</i> (6,9)	1H	H-1''
3,15-3,50	<i>m</i>	5H	Protons du sucre

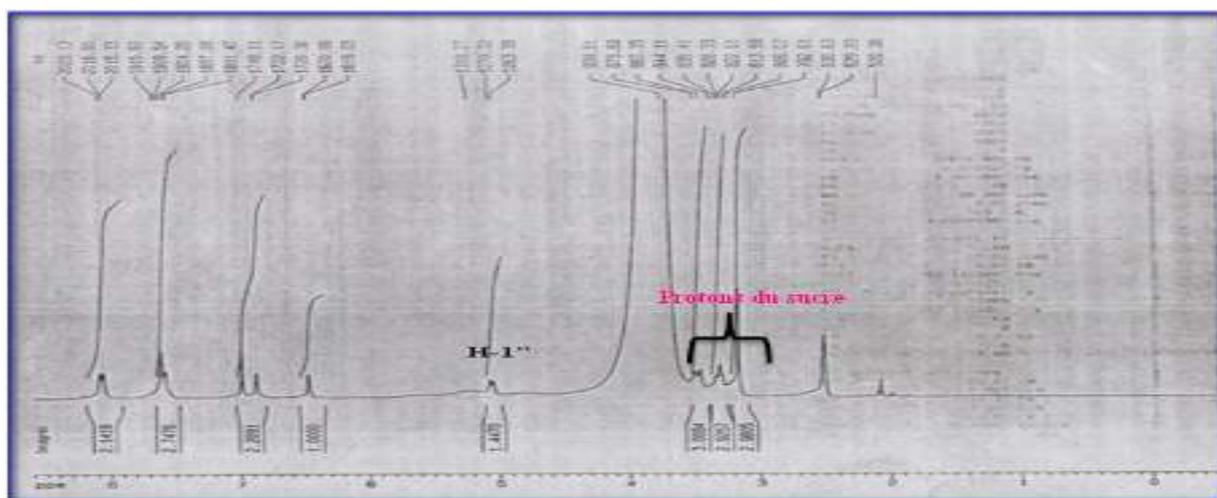
Toutes ces données mènent à la structure partielle suivante :



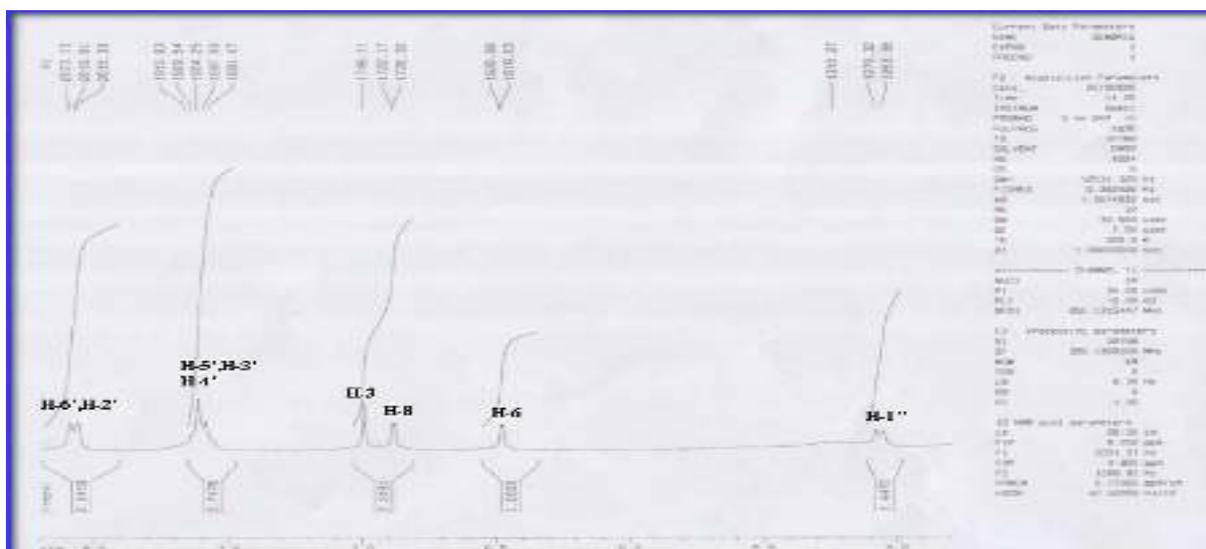
**Figure 37:** Structure partielle du composé WC2.



Spectre 49: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC2.

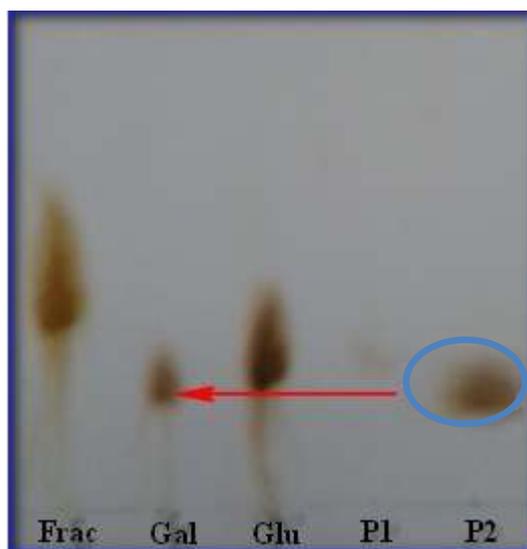


Spectre 49-1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC2, (Étalement).

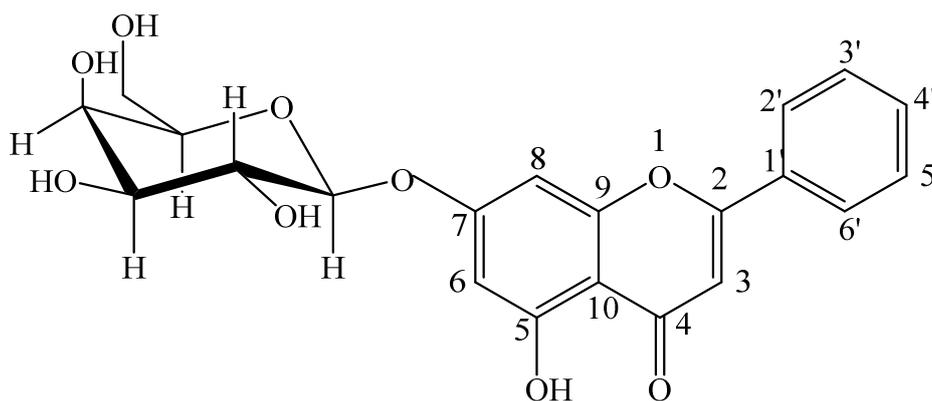


Spectre 49-2: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC2, (Étalement).

L'hydrolyse acide de ce composé libère le galactose comme un sucre révélé par Co-chromatographie avec l'échantillon authentique (Figure 38). Toutes ces données mènent à la structure finale de ce composé: **5-hydroxy-7-O-galactosylflavone**, connu sous le nom : **7-O- $\beta$ -D-galactopyranosylchrysin**. Cette molécule est isolée pour la première fois du genre *Cytisus*.

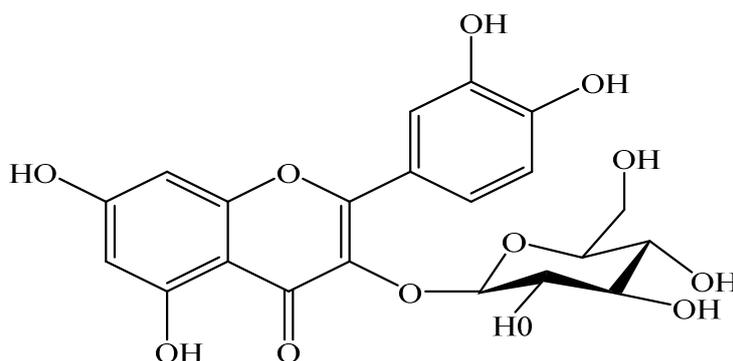


**Figure 38:** Résultat de la Co-chromatographie des sucres avec des témoins.



**Figure 39:** Structure finale du composé WC2 : (7-O- $\beta$ -D-galactopyranosylchrysin)

## IV.5.1.6. Élucidation structurale du composé WC7:

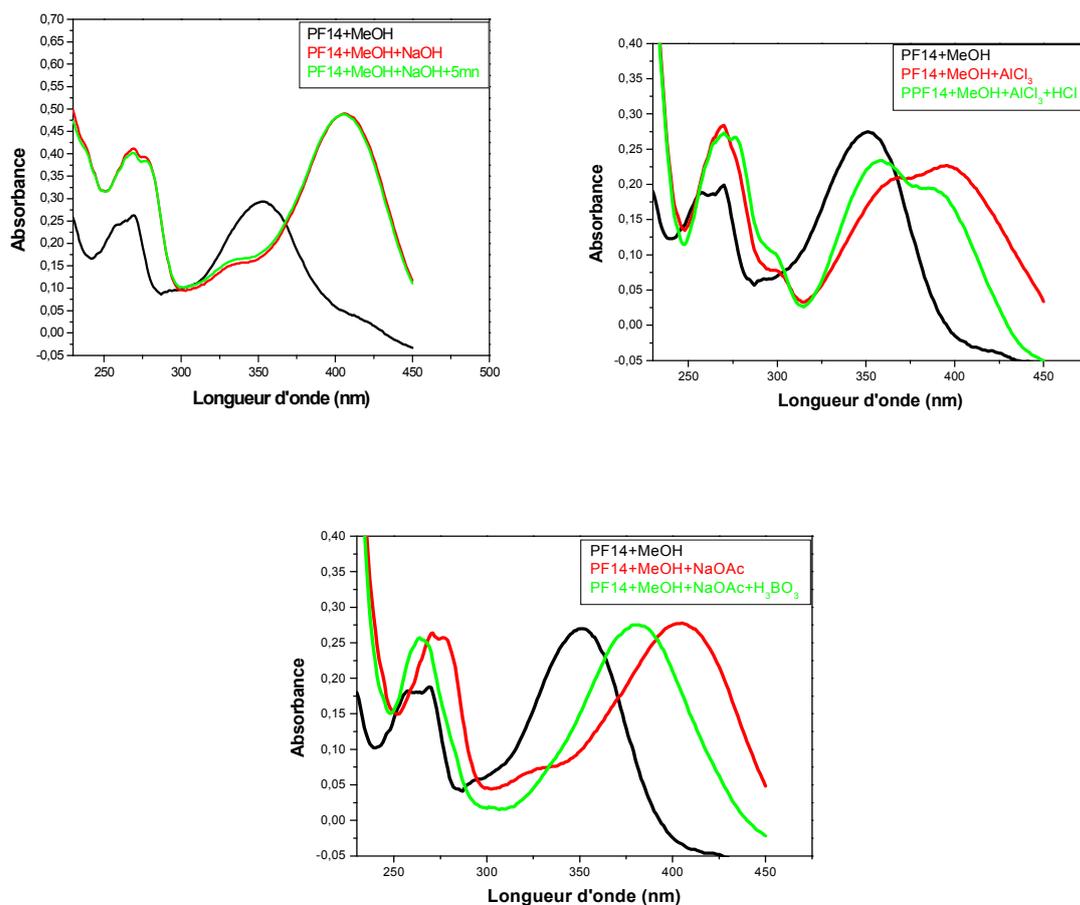


Ce composé prend une couleur noire sous lumière UV 254 nm, une couleur noir –violette sous lumière UV 365 nm et une couleur jaune après révélation et chauffage pendant 2 min ce qui permet d'envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen de la série spectrale UV-visible (Spectre 50) montre :

- ❖ Un maximum d'absorption de la bande I à 352 nm et de la bande II à 262 nm caractéristiques d'un flavonol substitué en position 3. [38, 42]
- ❖ Un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 54$  nm) et une augmentation de son intensité lumineuse après addition de NaOH, sont en faveur d'un groupement OH libre en position 4'. Par contre l'apparition d'une nouvelle bande à 331 nm suppose la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ❖ L'addition du réactif NaOAc provoque un effet bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = + 12$  nm), comparé au spectre méthanolique, confirmant ainsi la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ❖ Un déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ) comparé à celui enregistré dans le méthanol ( $\Delta\lambda = + 34$  nm) indique la présence d'un groupement OH libre en 5.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +28$  nm) dans NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  comparé au spectre méthanolique, oriente vers un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B.

Ces données spectrales UV sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la quercétine substituée en position 3. [1]



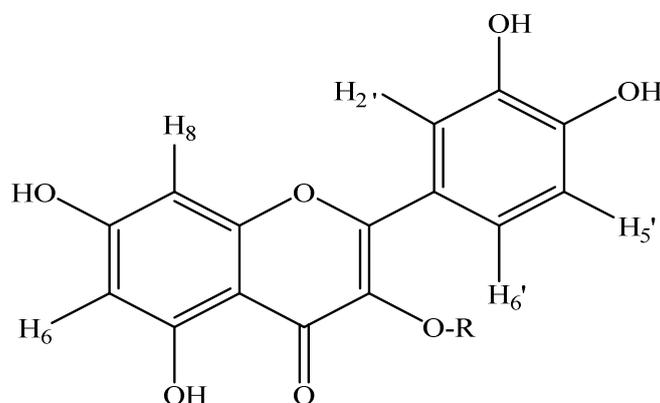
**Spectre 50:** la série spectrale UV-vis du composé WC7.

L'ensemble des données de la série spectrale UV –Visible est reporté dans le Tableau 61.

**Tableau 61:** Données de la série spectrale UV du composé WC7

Réactifs	Bande I (nm)	Autres bande (nm)	Bande II (nm)	Commentaires
MeOH	352	/	262	Flavonol
+NaOH	406	/	271	OH libre en 4'
	/	331	/	OH libre en 7
Spectre stable en présence de NaOH après 5 min				
+AlCl <sub>3</sub>	395	367	269	OH libre en 5
+AlCl <sub>3</sub> /HCl	386	357	271	
+NaOAc	404	325	274	7-OH
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	380	/	263	Ortho di-OH sur le cycle B

L'ensemble de ces données permet de déposer la structure partielle suivante :



**Figure 40:** Structure partielle du composé WC7

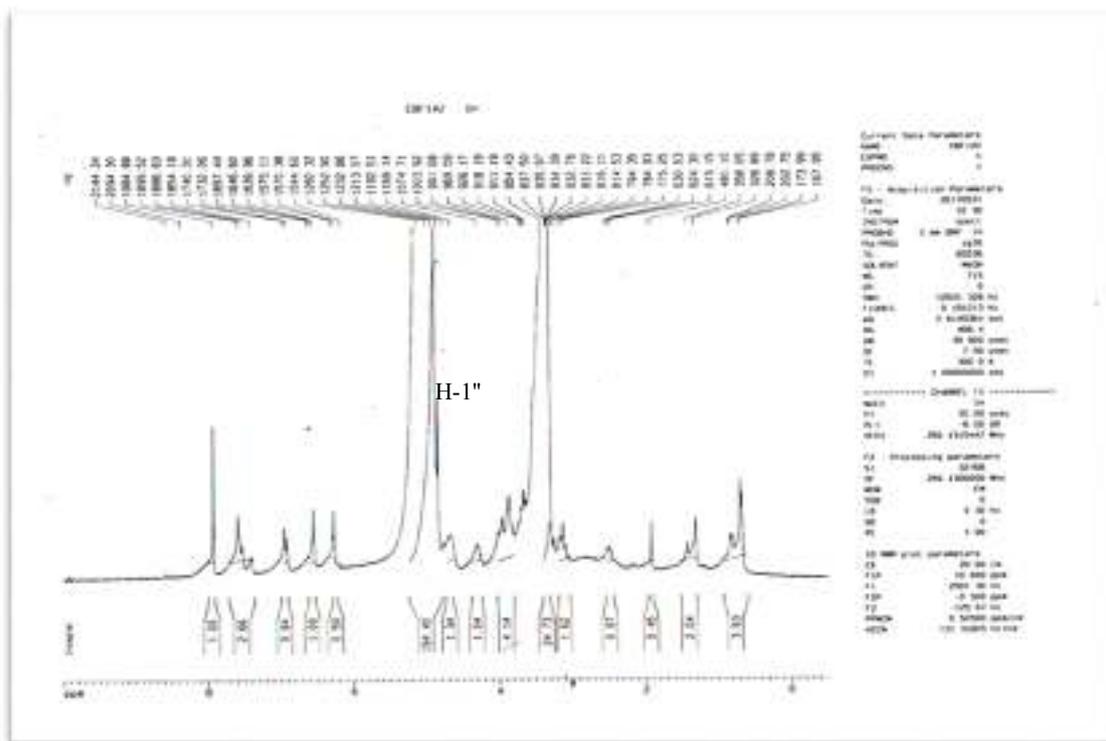
L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 51) dans la zone correspondante aux protons de la génine a permis d'attribuer les différents signaux aux protons suivants :

- ❖ Un doublet ( $J = 2,0$  Hz) d'intégration 1H, à  $\delta_{\text{H}} = 7,91$  ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublé ( $J = 12,89 ; 2,0$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,56$  ppm attribuable à H-6'
- ❖ Un doublet ( $J = 8,25$  Hz) d'intégration 1H, à  $\delta_{\text{H}} = 6,95$  ppm attribuable à H-5'.

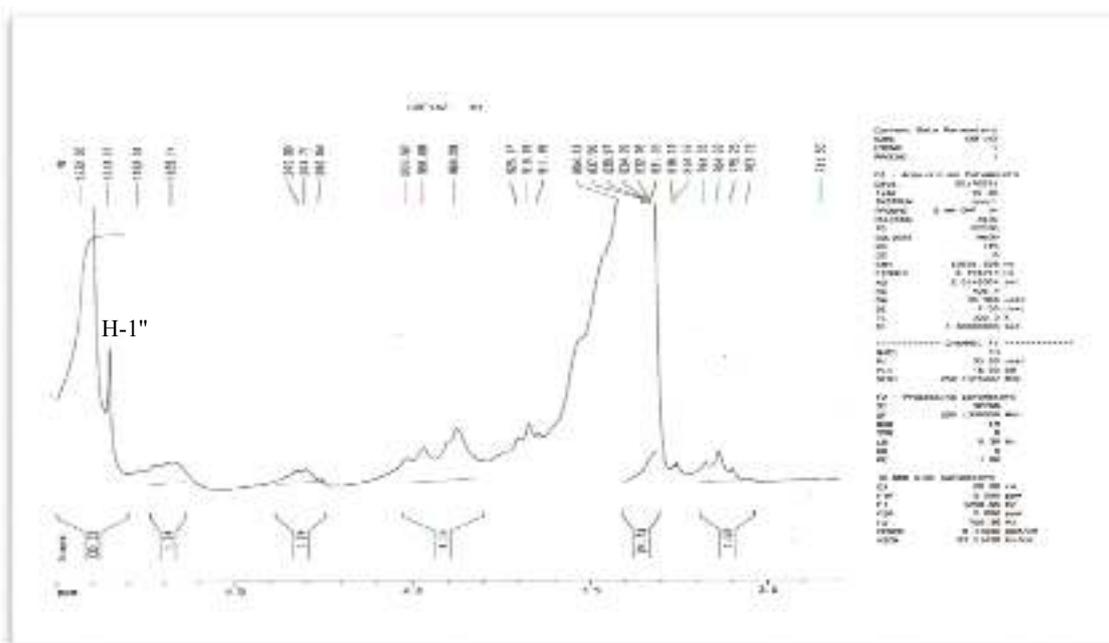
Ces signaux confirment l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B.

- ❖ Deux doublet ( $J = 2,7$  Hz) d'intégration 1H a chacun, à  $\delta_{\text{H}} = 6,19$  ppm et attribuable à H-6 et H-8 respectivement indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 4,95$  ppm attribuable au proton anomérique H-1''
- ❖ Un ensemble de multiples dans l'intervalle 3,10-3,90 ppm attribuable par conséquent aux protons du substituant sucre.

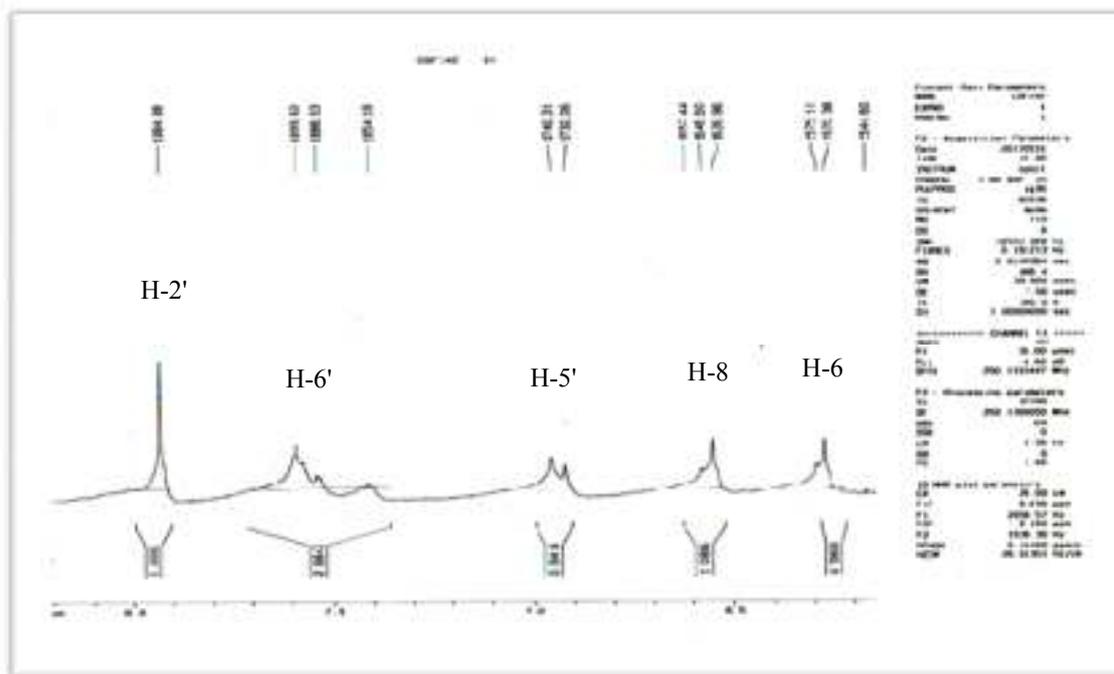
Pour confirmer la nature de sucre qui est relié à l'aglycone, nous avons fait l'hydrolyse acide (Figure 41).



Spectre 51: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, MeOD- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC7.



Spectre 51-1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, MeOD- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC7, (Etalement).



Spectre 51-2 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé WC7, (Etalement).

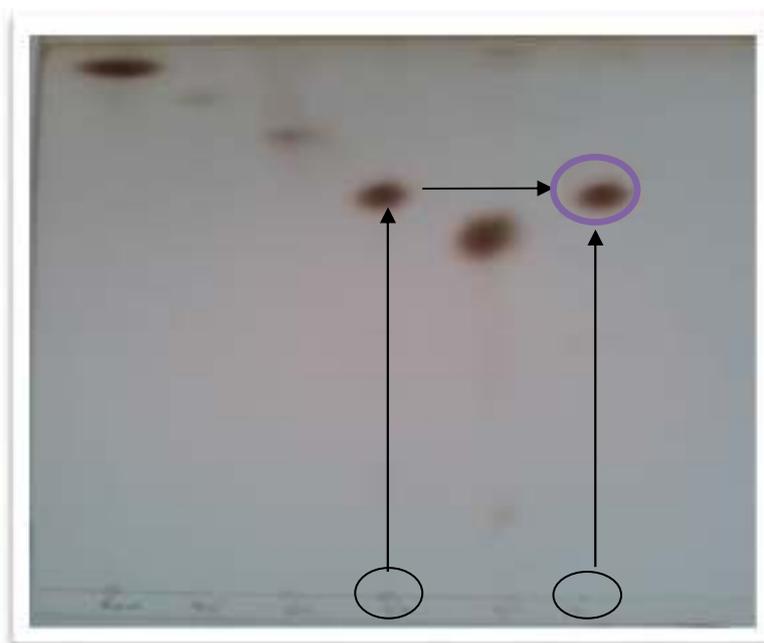


Figure 41: Résultat de la Co-chromatographie des sucres avec des témoins.

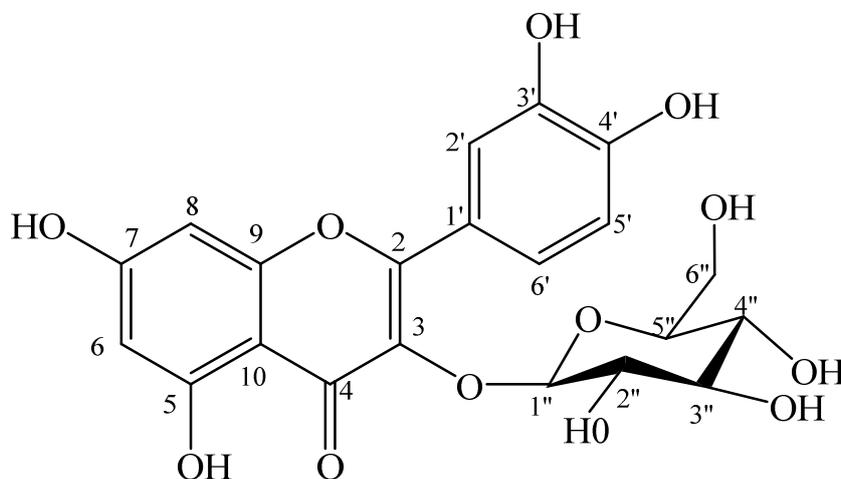
L'hydrolyse acide de ce composé libère le glucose comme sucre révélé par Co-chromatographie avec l'échantillon authentique.

L'ensemble des données spectroscopiques relatives à la RMN  $^1\text{H}$  du composé WC7 sont représentées dans le Tableau 62.

**Tableau 62:** Résultat RMN  $^1\text{H}$  du composé WC7

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplicité (Hz)	Intégration	Interprétation
6,19	$d$ ( $J = 1,9$ )	1H	H-6
6,39	$d$ ( $J = 1,9$ )	1H	H-8
6,95	$d$ ( $J = 8,2$ )	1H	H-5'
7,56	$dd$ ( $J = 8,5 ; 2,0$ )	1H	H-6'
7,91	$d$ ( $J = 2,0$ )	1H	H-2'
4,95	$d$	1H	H-1''

Ces données, en accord avec celles de la littérature [28, 29], nous ont permis d'identifier le composé WC7 comme étant la : **Quercétine-3- $\beta$ -O-glucopyranosyl** connue sous le nom Isoquercitrine. (Figure 42). Cette molécule n'avait pas été décrite auparavant chez cette espèce.



**Figure 42:** Structure finale du composé WC7 : (Isoquercitrine)

#### IV.6.Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de la plante *Crataegus oxyacantha* Linn. a permis d'isoler et d'identifier par diverses méthodes chromatographiques et analytique, 10 composés naturels. Il s'agit de:

- Quercétine
- Isoquercétrine
- Épicathéchine
- Naringénine-7-O-β-glucosyde
- Apigénine
- Acide chlorogénique
- Acide Caféique
- Acide caftarique
- Rutine
- Orientine

L'investigation phytochimique réalisée sur l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her. (feuilles et fleurs), a mené à l'isolement de 11 composés et l'identification structurale à ce stade de notre travail, de 6 composés. Les composés identifiés appartiennent à une classe de métabolites secondaires: les flavonoïdes. Ils se répartissent comme suit:

- 5,7-dihydroxyflavone (Chrysin)
- 5,7, 4'-Trihydroxy, 3'-méthoxy-flavone (Chysoériol)
- 5, 4'-dihydroxy-7-methoxyisoflavone (Prunétine)
- 7-O-β-D-glucopyranosylchrysin.
- 7-O-β-D-galactopyranosylchrysin
- 3-O-β-glucopyranosyl-quercétine (Isoquercitrine)

Par ailleurs l'utilisation d'un procédé de dispersion en phase solide matricielle (MSPD) pour extraire les polyphénols de *C. oxyacantha* a été évaluée. Les extraits de fruits et de feuilles de MSPD ont une teneur remarquable en polyphénols, bien que le profil phénolique particulier dépende du solvant. Les extraits ont été analysés par HPLC-DAD pour l'identification précise des principaux polyphénols bioactifs, dont certains n'ont jamais été décrits pour cette espèce. La MSPD s'est avérée être une bonne alternative aux méthodes classiques d'obtention d'extraits naturels, rapides et à faible consommation de temps, d'énergie et de solvants organiques, donc respectueux de l'environnement.

## Références bibliographiques

- [1] Svedstrom, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Huovinen, K., Laakso, I., Hiltunen, R., 2002. Highperformance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidins from dimers up to the hexamer in hawthorn. *J. Chromatogr. A.* 968:53-60.
- [2] Svedstrom, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J.P., Laakso, I., Hiltunen, R., 2002. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry.* 60:821-825.
- [3] Cui, T., Nakamura, K., Tian, S., Kayahara, H., Tian, Y.L., 2006b. Polyphenolic content and physiological activities of Chinese hawthorn extracts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2948-295.
- [4] Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J.L., Trotin, F., Grec, S., 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem.* 115:897-903.
- [5] Bernatonienė, J., Masteikova, R., Majienė, D., Savickas, A., Kėvelaitis, E., Bernatonienė, R., Dvorčáčkova, K., Civinskienė, G., Lekas, R., Vitkevičius, K., Pečiūra, R., 2008. Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina (Kaunas).* 44: 706-711.
- [6] Lam, K.Y., Ling, A.P.K., Koh, R.Y., Wong, Y.P., Say, Y.H., 2016. A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Adv Pharmacol Sci.* ID 4104595, 9.
- [7] Shukla, S., Gupta, S., 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm. Res.* 27: 962-978.
- [8] Tarayre, J. P., Laouressergues, H., 1977. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid anti-inflammatory agents. *Arzneimittel forschung.* 17, 1144-1149
- [9] Meratate Faiza, 2013. Etude phytochimique et pouvoir biologique des métabolites secondaires de la plante *Zizyphora hispanica* L. de la région de M'SILA. Thèse de doctorat. Université de M'sila. Algérie.
- [10] Gonçalves, J. L. S., Leitão, S. G., Delle Monache, F., 2001. In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 8 (6): 477-80.
- [11] Ternai, B., Markham, K.R. 1976. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I: Flavones and flavonols. *Tetrahedron* 32(5), 565-569.
- [12] Sara, B., 2015. Recherche et Détermination Structurale de Métabolites Secondaires à Activité Biologique Potentielle de Plantes Sahariennes. Activités Biologiques. Thèse de doctorat. Université de constantine 1. Algérie.
- [13] Sylvie Morel., 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse du doctorat Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Angers. France
- [14] Lisa J. Wilcox, Nica M. Borradaile, Murray W. Huff. 1999., Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. *Cardiovascular Drug Reviews* Vol. 17, No. 2, pp. 160-178.
- [15] Mabry, T.J., Markham, K., Thomas, M., 1970. The ultraviolet spectra of flavones

- and flavonols, The systematic identification of flavonoids. *Springer*, pp. 41-164.
- [16] Markham, K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. *Academic Press*. London.
- [17] Wagner, V., Janete, H. Y., Vilegas, M.D., 2000. Tobias Glaser and Klaus Albert " Application of On-line C30 RP-HPLC-NMR for the Analysis of Flavonoids from Leaf Extract of *Maytenus aquifolium* ". *Phytochem. Anal.* 11, 317–321.
- [18] Hideyuki, I., Eisei, N., Takao, K., Midori, T., Mutsuo, K., Takashi, Y., 2000. " Flavonoid and benzophenone glycosides from *Coleogyne ramosissima* ". *Phytochemistry*. 54 695-700.
- [19] Batyuk, V.S., Prokopenko, A.P., Kolesnikov, D.G., 1965. New flavonoids from the leaves of *Crataegus curvisepala* lindm. *Chem. Nat. Compd.* 1, 225–226.
- [20] Mc Anlis, G.T., Mc Pearce, J., Young, I.S., 1999. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onion, in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53, 92-96.
- [21] Thornhill, S.M., Kelly, A.M., 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altem. Med. Rev.* 5, 448-454
- [22] Janssen, K., Mensink, R.P., Cox, F.J., Harryvan, J.L., Hovenier, R., Hollman, P.C., Katan, M.B., 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am.J.Clin. Nutr.* 67, 255-262.
- [23] Lefahal Mostefa., 2014. Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles Plumbaginaceae, Tamaricaceae et Apiaceae. Thèse de doctorat. Université de constantine 1. Algérie.
- [24] Vvedenskaya, I.O., Rosen, R.T., Guido, J.E., Russell, D.J., Mills, K.A., and Vorsa, N. 2004. , Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2), 188-195.
- [25] Keltoum, B., 2005. Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat. Université Abou bekr Belkaid. Algérie.
- [26] Emeline HOUËL., 2011., Analyse de préparations phytothérapeutiques a base de quassia amara l. (simaroubaceae) et psidium acutangulum dc. (myrtaceae) utilisées en guyane française pour une indication antipaludique identification et analyse métabolomique d'huiles essentielles a activite antifongique. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. France
- [27] Cui, T., Li, J.Z., Kayahara, H., Ma, L., Wu, L.X, Nakamura, K., 2006a. Quantification of the polyphenols and triterpene acids in Chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 54:4574–4581.
- [28] Antri, A.E., Messouri, I., Tlemçani, R.C., Bouktaib, M., El Alami, R., El Bali, B., Lachkar, M., 2004. Flavone glycosides from *Calycotome Villosa* subsp. *intermedia*. *Molecules*. 9, 568-573.
- [29] Pereira, O.R., Silva, A.M., Domingues, M.R., Cardoso, S.M., 2012. Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*. 131, 652-659.
- [30] Araújo, J.R., Gonçalves, P., Martel, F., 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*. 31, 77-87.
- [31] Souza, L.C., Antunes, M.S., Borges Filho, C., Del Fabbro, L., de Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Donato, F., Prigol, M., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2015. Flavonoid

- Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 134, 22-30.
- [32] Hua, H., Sun, J., Li, X., 1999. Flavonoids from yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). *Chin Tradit Herb Drugs*, 30:332–334. Chinese.
- [33] Wan Chun, P., 2011. Constituents from charred *Cirsium japonicum*. *Chem. Nat. Comp.* 47:279–280.
- [34] Santos, S.A., Carvalho, M.G., 1995. Unambiguous <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR-assignments of isoflavones from *Virola caducifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 4, 349-352.
- [35] Salima, A., 2016. Etude phytochimique et biologique de *Bituminaria bituminosa*(L.)C.H.Stirton (Fabaceae) et *Centaurea dimorpha* Viv. (Asteraceae). Thèse de doctorat. Université de constantine 1. Algérie.
- [36] Naima, B., 2013. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Thèse de doctorat. Université de constantine 1. Algérie.
- [37] Markham, K., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T., 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*. 34, 1389-1397.
- [38] Manel, B., 2016. Contribution phytochimique à la valorisation de deux plantes médicinales : *Echinops spinosus* et *Pulicaria undulata*. Recherche et détermination structurale de leurs principales substances bioactives. Thèse de doctorat. Université de constantine 1. Algérie.
- [39] Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M., 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. 12, 2327–2340.
- [40] Hao, Liu., et al. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules*, ISSN. 1420-3049.
- [41] Castro, V. 1998. Chromium in a series of Portuguese plants used in the herbal treatment of diabetes. *Biological Trace Element Research*, 62, 101–106.
- [42] Kong, C.S.; Kim, Y.A.; Kim, M.m., Park, J.S.; Kim, J.A.; Kim, S.K.; Lef, B.J.; Nam, T.J.; Seo, Y., 2008. *Toxicol. In Vitro*, Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells, (22), 1742-1748.

# Chapitre V

*Étude Biologique*

### V.1. Introduction

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [1], ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [2].

La raison pour laquelle, les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxide, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles, collectivement connu sous le nom oxygène actif [1].

D'un point de vue biologique, les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive, ils sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes (Trouble de la vision) [3].

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes [4].

Dans ce qui suit, nous présentons nos travaux sur la recherche des polyphénols et les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et *n*-butanol de l'espèce *C. oxyacantha* (Feuilles et fruits) et l'extrait AcOEt de l'espèce (*C. triflorus*).

Les objectifs de cette partie consistent à identifier l'organe qui présente plus d'activité, puis à caractériser les composés antimicrobiens présents.

## V.2. Investigation biologique de l'espèce *C. oxyacantha*

### V.2.1. Matériel et méthode

#### V.2.1.1. Détermination des polyphénols totaux (PT)

##### ➤ Méthode 1

La teneur totale de polyphénols (PT) dans les extraits de *C. oxyacantha* a été déterminée selon la méthode colorimétrique Folin-Ciocalteu (FC) [5].

En bref, après dilution appropriée dans l'eau distillée, 5 ml de chaque extrait de solution d'eau ont été mélangés avec 0,1 ml de réactif (FC) et 1 ml de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 % p/v). Après le vortexage, le mélange réactionnel a été maintenu pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante, un temps suffisant pour la réduction du réactif (FC) par les composés polyphénoliques dans des conditions alcalines, ce qui entraîne le développement d'une couleur bleue enregistrée à 750 nm (Spectrophotomètre Shimadzu, UVmini-1240, Tokyo-Japon) et mesurée contre un blanc préparé avec de l'eau. Cet essai a été effectué en trois fois pour chaque échantillon. Les teneurs en PT ont été quantifiées à partir d'une courbe d'étalonnage préparée avec des solutions standard d'acide gallique à des concentrations allant de 3 à 20  $\text{mg l}^{-1}$  ( $y = 0,0707 x + 0,053$ ,  $R^2 = 0,9988$ ) et exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique dans l'extrait liquide (mg GAE  $\text{L}^{-1}$ ). Les concentrations d'échantillon de PT ont été exprimées en mg d'acide gallique par gramme de poids sec des échantillons de *C. oxyacantha* (mg EAG  $\text{g}^{-1}$  dw).

##### ➤ Méthode 2

Les extraits sont solubilisés dans le méthanol à une concentration de 1 mg/mL pour le dosage des polyphénols totaux. Le taux de polyphénols totaux est déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le dosage de ces polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Singleton et al. 1999 [6]. 20  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont mélangés avec 1580  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 300  $\mu\text{L}$  d'une solution de carbonate de sodium 20 %. Après agitation et d'incubation de cinq minutes, 100  $\mu\text{L}$  du réactif de Folin-Ciocalteu 1 N sont additionnés ; après 30 minutes d'incubation à 40 °C, la lecture de l'absorbance est faite à 765 nm contre un blanc. Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de 50 à 500 mg/mL.

✓ La concentration des composés phénoliques totaux dans les extraits a été déterminée en  $\mu\text{g}$  d'équivalents d'acide gallique (GAE) par mg d'extrait à l'aide d'une équation obtenue à partir d'une droite d'étalonnage d'acide gallique. ( $R^2 = 0,991$ ).

$$\text{Absorbance} = 0,001 \times \text{acide gallique } (\mu\text{g}).$$

### V.2.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur total en flavonoïdes a été estimé selon la méthode décrite par Wang et al. 2008 [7]. En bref, à 0,5 ml d'échantillon, on ajoute 0,5 ml de solution à 2% d' $\text{AlCl}_3$ . Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm. Le teneur totale en flavonoïdes est calculé en  $\mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine (EQ) pour 1 mg d'extrait à l'aide d'une équation obtenue à partir d'une droite d'étalonnage de la quercétine (standard).

$$(R^2 = 0,983). \text{ Absorbance} = 0,034 \times \text{quercétine } (\mu\text{g}) + 0,015.$$

### V.2.1.3. Test de piégeage du radical libre DPPH

#### ➤ Méthode 1

L'activité de balayage des radicaux du DPPH a été déterminée en utilisant le procédé modifié de Brand-Williams et al [8], contre Trolox.DPPH. On a dissous 0,1 mM dans le méthanol 100%. 0,1 ml des extraits de *C. oxyacantha* ont été ajoutés à 3,9 ml de la solution méthanolique de DPPH. Le mélange a été secoué vigoureusement et laissé au repos à température ambiante dans l'obscurité pendant 60 min. La diminution de l'absorbance de la solution résultante a été surveillée à 515 nm à 30 min (Spectrophotomètre Shimadzu, UVmini-1240, Tokyo-Japon). L'activité antioxydante (AA) a été déterminée en utilisant l'équation suivante ( $y = 0,9211x + 0,0667$ ;  $R^2 = 0,989$ ) obtenue à partir d'une régression linéaire après avoir tracé le  $A_{515}$  de solutions connues de Trolox contre la concentration (0,08-1 mM). L'activité de balayage des radicaux libre des extraits a été exprimée sous forme de mM Trolox  $\text{g}^{-1}$  de *C. oxyacantha* (dw). La solution mère radical a été préparée quotidiennement

#### ➤ Méthode 2

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, il est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon [9]. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger ce radical. Le pourcentage de piégeage du radical (I%) est calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

**A1:** absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

**A2:** absorbance en présence d'extrait.

L'effet des extraits sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Braca et al. 2001 [10]. Un volume de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 3 mL de la solution méthanolique du DPPH (0,004 %) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc (méthanol).

➤ **Calcul des concentrations inhibitrice à 50 % « IC<sub>50</sub> » :**

L'IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration 50%) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait et le standard (Vitamine C).

#### **V.2.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique (LPO) dans le jaune d'œuf est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Cao et Ikeda, 2009 [11]. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 532 nm).

#### **V.2.1.5. L'étude de l'activité antimicrobienne**

L'effet antimicrobien des extraits a été testé sur deux micro-organismes. (Deux souches bactériennes) selon la méthode de diffusion en milieu gélosé.

L'étude de l'activité antimicrobienne a consisté à déterminer des paramètres antibactériens (CMI et CMB) des extraits (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-Butanol) de *C. oxyacantha* et de l'extrait AcOEt de *C. triflorus*. Pour sa réalisation, nous avons utilisé la méthode de la microdilution en milieu liquide.

Les tests de sensibilité des micro-organismes ont été effectués sur le milieu Mueller Hinton solide en utilisant la technique des puits.

➤ **1. Souches bactériennes testés et conditions de milieu de culture**

Le support microbien utilisé est composé de deux souches bactériennes fournies par le laboratoire de département de microbiologie et parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de Santiago de Compostela, Espagne. Il est composé de :

Une souche de Gram positif connu sous le référence *Staphylococcus aureus* CECT 240 et une souche de Gram négatif connu sous le référence *Escherichia coli* CECT 4099.

Les deux milieux de cultures ont été maintenues à 80 °C dans du bouillon de soja tryptique (TSB) (Difco) contenant 15% de glycérol et réactivée dans des plaques de gélose tryptique de soja (TSA), fabriqués à partir du milieu TSB supplémenté avec de l'agar-agar 2%. Les milieux TSB et TSA ont toujours été utilisés pour la croissance bactérienne à l'exception du cas des méthodes de diffusion, qui ont été réalisées sur des plaques de Müller-Hinton (MH) moyen (Difco) supplémenté avec de l'agar-agar à 3%.

Les deux milieux de cultures sont traités à 12 °C à l'autoclave pendant 1 heure.

Les milieux de cultures bactériennes ont toujours été cultivés à 37 °C. Dans le cas des cultures liquides, des flacons Erlenmeyer contenant du milieu du TSB et les souches bactériennes ont été incubées dans un agitateur orbital à 37 °C et 200 tours par minute.

### ➤ 2. Préparation des extraits pour les tests antimicrobiens

Les extraits ont été d'abord séchés pour éliminer le solvant d'extraction et on dissout dans (DMSO:H<sub>2</sub>O / 50:50) afin d'obtenir une concentration finale de 200 mg/ml.

200 mg sont d'abord solubilisés dans 0,5 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) avant d'y ajouter 0,5 ml d'eau distillée.

### ➤ 3. Test de diffusion en milieu gélosé

50 microlitres d'une culture de nuit (souche bactérie) ont été étalées sur des plaques de gélose MH (Muler Hinton). Ensuite, six puits, chacun de 10 mm de diamètre ont été découpés dans l'agar-agar, et 20 µL d'agarose fondu ont été versés dans chaque puits pour sceller le fond. Une fois que l'agarose est solidifiée, soit 150 microlitres d'extrait ou polyphénol purifié ont été versés dans chaque puits et les plaques ont été incubées à 37 °C à l'étuve pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne des échantillons a été évaluée qualitativement par la présence ou l'absence de zone d'inhibition.

Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37 °C à l'étuve pendant 24 h

Dans le cas d'échantillons qui sont disponibles uniquement dans une très petite quantité, une modification de cette méthode a été utilisée. Ainsi, après étalement de la souche bactérienne sur des plaques de gélose MH et laissé à sécher, une goutte de chaque échantillon a été versé sur celle-ci. L'inhibition a été évaluée au moyen de zones claires où les gouttes ont été versées. Les échantillons présentant une activité antimicrobienne ont été sélectionnés pour éviter les tests quantitatifs d'inhibition.

➤ **4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est généralement la plus faible concentration d'agent antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après une période d'incubation de 18 à 24 heures. Elle mesure donc un effet bactériostatique et ne renseigne pas par l'état de la population bactérienne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier [12]. Ici la détermination de la CMI s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. La turbidité de chaque puits est appréciée de l'œil nu à la lumière du jour.

Afin d'évaluer la concentration minimale inhibitrice, les plaques de TSA contenant différentes concentrations de chaque extrait sélectionné ont été préparées avec la procédure suivante :

Des volumes croissants de cet extrait ont été ajoutés aux flacons contenant du milieu stérile TSA à 55 °C pour atteindre des concentrations finales allant de 0,06 à 4 mg/ml et on mélange doucement jusqu'à homogénéisation.

Les mélanges ont ensuite été versés dans des boîtes de Pétri stériles et laissés se solidifier. 50  $\mu$ L de la dilution  $10^{-4}$  d'une culture bactérienne d'une nuit ont été étalées sur chaque plaque et incubés pendant 24 heures. La croissance bactérienne a été évaluée par l'observation des colonies. La concentration minimale d'extrait à laquelle aucune colonie n'a été observée après 24 heures a été la CMI.

➤ **5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration d'un agent antibactérien capable de tuer une bactérie particulière (plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial. (La concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0,01 % de germes survivants de la suspension de départ en 24 heures). Elle définit l'effet bactéricide d'un échantillon donné. Les concentrations minimales bactéricides (CMBs) ont été déterminées comme suit:

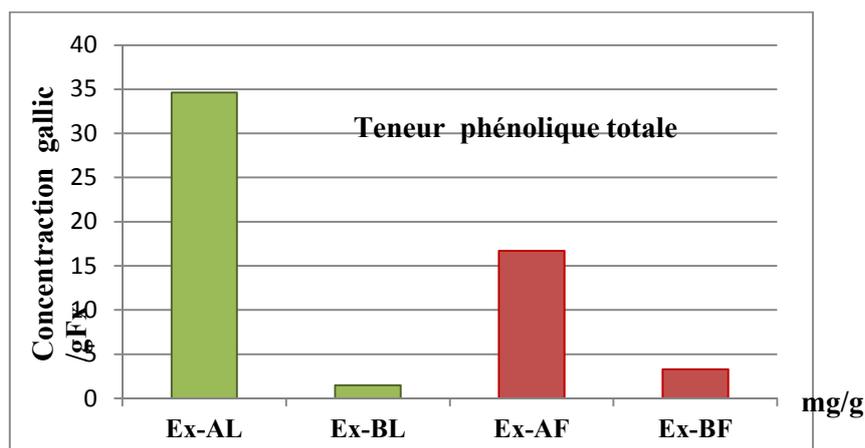
Les puits d'une microplaque à 96 puits multiples ont été remplis d'une quantité totale de 100 mL de milieu TSB et des dilutions en série de l'extrait, ce qui conduit à une diminution des concentrations de 100 mg/mL à 0,195 mg/ml. Ensuite, chaque puits a étéensemencé avec 30  $\mu$ L d'une culture bactérienne pendant une nuit et incubé pendant 24 heures. Ensuite, 50  $\mu$ L de chaque puits ont été étalées sur des plaques de TSA et incubées à nouveau pendant 24 heures. La croissance des bactéries sur des plaques de TSA a été évaluée au moyen de l'observation

des colonies. Les concentrations bactéricides sont celles présentes dans les puits, ce qui conduit à aucune croissance bactérienne après incubation sur des plaques de TSA

## V.2.2. Résultats et discussion

### V.2.2.1. Teneur phénolique totale des extraits de *C. oxyacantha*.L (ESL)

La teneur phénolique totale des extraits de fruits et de feuilles de *C. oxyacantha* obtenus par l'extraction solide-liquide (ESL) (Figure 43) est donnée dans le Tableau 63. (Méthode 1)



**Figure 43:** Concentrations des composés polyphénols trouvés dans les extraits étudiés de *C. oxyacantha*.L : Ex-AL : Extrait AcOEt (Feuilles), Ex-BL : Extrait *n*-Butanol (Feuilles), Ex-AF : Extrait AcOEt (Fruits), Ex-BF : Extrait *n*- Butanol (Fruits).

**Tableau 63:** Teneur phénolique totale (PT) et activité antioxydante (AA) des extraits de *C. oxyacantha*.L obtenus par ESL (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 3).

Matériel végétal	Solvant d'extraction	Concentration (mg/l=ppm)	PT mg EAG/l	PT Mg EAG/g dw	AA m M ETR	Inhibition (%)
Feuilles	Acétate d'éthyle	50	345,36 $\pm$ 0,23	34,633 $\pm$ 0,12	0,249 $\pm$ 0,27	17,99
	<i>n</i> -Butanol	50	160,30 $\pm$ 0,50	1,469 $\pm$ 0,30	0,154 $\pm$ 0,42	8,31
	Chloroforme	400	/	/	0,215 $\pm$ 0,35	14,16
Fruits	Acétate d'éthyle	50	179,16 $\pm$ 0,34	16,702 $\pm$ 0,25	0,183 $\pm$ 0,23	11,22
	<i>n</i> -Butanol	50	68,36 $\pm$ 1,15	3,292 $\pm$ 0,31	0,098 $\pm$ 0,17	2,61
	Chloroforme	400	/	/	0,216 $\pm$ 0,19	14,27
polyphénols standards commerciaux purs (Références)	Epicatechine	50	/	/	<b>0,530</b>	<b>38,29</b>
	Acid gallique	80	/	/	<b>0,209</b>	<b>15,10</b>

Ainsi, les résultats obtenus de la méthode 2 montrent la richesse des extraits de *Crataegus oxyacantha* (Feuilles) en polyphénols et en flavonoïdes dont les teneurs représentés sur le Tableau 64 :

**Tableau 64:** Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux

Matériel végétal	Extrait	Composés phénoliques µg (EAG) / mg	Flavonoïdes totaux µg (EQ / mg extrait)
Feuilles	Acétate d'éthyle	577±56,58	375,49±29,03
	<i>n</i> -Butanol	278±29,14	54,87±1,94

Dans la présente étude, le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux montre la richesse des deux extraits de *C. oxyacantha* en polyphénols et en flavonoïdes.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux: la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, etc.
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [9].

Les extraits d'acétate d'éthyle ont le taux le plus élevé de phénols totaux (de 179,16 ± 0,34 mg EAG /L pour l'extrait de fruit à 345,60 ± 0,23 mg EAG/l pour l'extrait de feuilles); cependant ces substances étaient légèrement représentées dans le *n*-Butanol, de 68,36 ± 1,15 EAG mg/l à 160,30 ± 0,50 EAG mg/l. L'extrait AcOEt de feuilles a montré la teneur la plus élevée en composés phénoliques, plus de deux fois de la teneur trouvée dans l'extrait *n*-BuOH des feuilles. Des problèmes techniques ont empêché la mesure des polyphénols totaux dans les extraits de chloroforme.

En ce qui concerne l'évaluation des différentes parties de la plante comme source de polyphénols bioactifs, les résultats montrent que la teneur en polyphénols totaux dans les extraits étudiés dépend du solvant, et ainsi les extraits AcOEt des feuilles et des fruits conduisent à des teneurs phénoliques plus élevées (34,633 et 16,702 mg EAG.gdw<sup>-1</sup>, respectivement) que les deux extraits de *n*-Butanol (1,469 et 3,292 mg EAG.gdw<sup>-1</sup>, respectivement) en termes de poids sec. Notamment, la teneur totale en composés phénoliques

dans les extraits de fruits est d'environ la moitié de la teneur en PT dans les feuilles lors de l'utilisation d'AcOEt, mais la tendance est inverse lorsque l'on utilise le *n*-Butanol; Cependant, avec ce solvant, les deux valeurs sont faibles.

Certaines études suggèrent que le contenu polyphénolique des fruits des plantes est influencé par le génotype, les conditions de l'habitat et la maturité des fruits. D'autres facteurs, tels que l'altitude, la lumière, la température et la teneur en matières nutritives dans le sol, peuvent également influencer le métabolisme des phénylpropanoïdes [13]. Mais, dans le cas des fruits de *C. oxyacantha*, la variation entre les espèces et les cultivars est très remarquable.

Ainsi, dans la revue très complète de Edwards et al. (2012) [14] sur la chimie du genre *Crataegus*, il est souligné que la concentration en phénol total est mesurée de façon routinière dans la littérature, en rapportant les valeurs suivantes par (mg.g<sup>-1</sup>); dans les fruits: *C. azarolus* var. *aronia* (5-6,5); *C. azarolus* var. *azarolus* (7,8-8,1); *C. germermanica* (3,5-5,6); *C. monogyna* (9,1-57,1); *C. pentagyna* (92,1); *C. pinnatifida* (19,4-249, cette valeur élevée pour la var. Majeur) dans les feuilles: *C. cuneata* (37-62); *C. pinnatifida* var. majeure (11-23) et *C. scabrifolia* (7-8,7).

Comme on peut le voir, la variabilité des données est vraiment grande; bien que la comparaison ne puisse pas être simple car les valeurs de PT sont très influencées par la technique d'extraction, la nature et la polarité des solvants d'extraction. D'autres études ont évalué la teneur en PT dans des cultures de cellules à partir de bourgeons floraux et d'extraits de cals de *C. monogyna* [14-18] et *C. sinaica* [19], représentant une source alternative pour la production d'antioxydants naturels; à titre d'exemple, la production de composés phénoliques peut atteindre 47,4 mg.g dw<sup>-1</sup> après environ un mois de culture.

En ce qui concerne *C. oxyacantha*, qui n'a pas été considéré dans la revue précédente, dans notre étude la teneur la plus élevée en phénols totaux trouvés était de 34,63 mg EAG/g dw<sup>-1</sup> dans les feuilles, beaucoup plus élevé que les 4,60 mg.g<sup>-1</sup> obtenus dans les même espèces dans la région d'Oum el Alou de Tlemcen (Sud algérien); mais comparable à la valeur de 34,82 mg/g obtenue dans les feuilles de *C. monogyna* Jacq. du Mont Tessala (ouest de l'Algérie) [20]. Il est important de souligner qu'il y a peu d'études sur les feuilles du genre *Crataegus* en général; et il n'y a pas d'études antérieures sur les feuilles de *C. oxyacantha*, en particulier. De plus, la teneur moyenne en phénols totaux condensés dans le péricarpe du fruit de *C. monogyna* (Mont de Tessala, ouest algérien) et de *C. monogyna* de la région de Batna (est algérien), est estimée à 16,62 mg/g et 21,72 mg/g, respectivement [20]. Ces valeurs sont également proches de celles obtenues dans la présente étude, 16,702 mg EAG /g dw<sup>-1</sup>, à partir

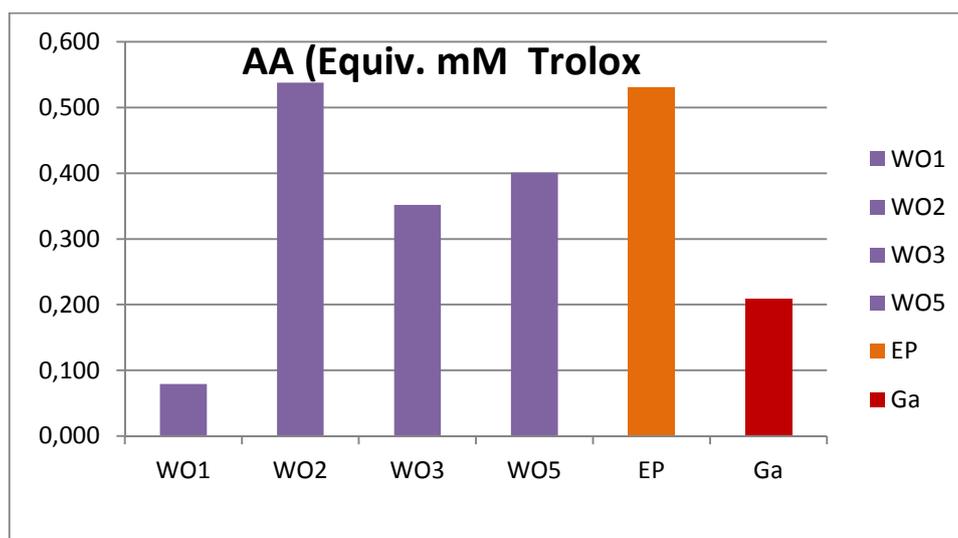
de fruits de *C. oxyacantha*.L de Mila (Est Algérien). Néanmoins, Tadicet al. (2008) [21] ont trouvé des valeurs plus élevées,  $35,4 \pm 2,48$  mg EAG/g dw<sup>-1</sup>, en étudiant l'extrait de baies d'aubépine d'un mélange (1:1) des espèces *C. monogyna* et *C. oxyacantha*, tel que défini par la pharmacopée européenne pour le traitement de divers problèmes de santé.

### V.2.2.2. Activité scavenger du radical DPPH

#### ➤ 1. Activité scavenger du radical DPPH des produits purs WO1, WO2, WO3, WO5

Les radicaux libres DPPH sont principalement utilisés dans les tests antioxydants pour la détermination de l'activité des métabolites naturels présents dans les extraits car ils peuvent transmettre l'atome d'hydrogène labile aux radicaux libres. Ceci représente le mécanisme le plus simple et le plus courant de protection antioxydante.

Les activités de piégeage des radicaux DPPH des produits purs WO1, WO2, WO3, WO5 de l'extrait AcOEt de *C. oxyacantha* (feuilles) sont également montrées dans le Tableau 65 (Figure 44). Les activités antioxydantes (AA) de ces produits, sont variées entre 0,079 et 0,538 mM d'équivalents Trolox (ETR). Ainsi, l'activité de piégeage radicalaire de ces derniers est très bonne pour les trois produits WO2 (0,538 mM ETR), WO5 (0,401 mM ETR) et WO3 (0,352 mM ETR) où l'activité antioxydante du produit WO2 est la plus élevée que celle des autres produits, ce qui montre que les composés WO2 (Quercétine-3-glucoside) et WO5 (Epicatechine) qui sont responsables de l'activité de piégeage des radicaux libres de cette espèce.



**Figure 44:** Activité antioxydante du DPPH Radical scavenger (mM.ETR) des produits WO1, WO2, WO3, et WO5.

**Tableau 65:** Activité antioxydante (AA) des produits de *C. oxyacantha*.L (extrait AcOEt feuilles), ETR: équivalents de Trolox)

Produits	Concentration (mg/l = ppm)	Absorbtion/ 515 nm	AA mM ETR	Inhibition (%)
WO1 (Naringénine-7-β-O-glucoside)	50	0,907	0,079	5,708
WO2 (Quercétine-3-glucoside)	50	0,484	0,538	38,87
WO3 (Quercétine)	50	0,648	0,352	25,43
WO5 (Epicatechine)	50	0,604	0,401	28,97
<b>polyphénols standards commerciaux purs (références)</b>				
Epicatechine	50	/	<b>0,530</b>	<b>38,29</b>
Acide gallique	80	/	<b>0,209</b>	<b>15,10</b>

➤ **2. Activité scavenger du radical DPPH des extraits (ESL)**

Les activités de piégeage des radicaux DPPH des extraits de CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-Butanol des fruits et des feuilles de *C. oxyacantha* (Figure 46) sont également montrées dans le (Tableau 63). La capacité réductrice de différentes parties de *C. oxyacantha*, mesurée comme activité antioxydante (AA) des extraits obtenus, ont varié entre 0,098 et 0,249 mM ETR. L'activité de piégeage radicalaire de l'extrait AcOEt de feuilles (0,249 mM ETR) est plus élevée que celle de l'extrait *n*-Butanol de feuilles (0,154 mM ETR); après les deux extraits de fruits (0,183 et 0,098 mM ETR, respectivement). Les activités de piégeage des radicaux DPPH ont également été déterminées pour les extraits de CHCl<sub>3</sub>, étant équivalents pour les feuilles et les fruits (0,215 et 0,216 mM ETR, respectivement); ces valeurs sont plus proches de celles obtenues pour les extraits AcOEt que pour les extraits de *n*-Butanol. Dans tous les cas l'AA était plus élevé pour les feuilles que pour les extraits de fruits.

Le Tableau 65 montre également les valeurs de pourcentage d'inhibition. Le pourcentage d'inhibition dépend de la concentration et, par conséquent, la concentration des extraits doit être connue. Les concentrations ont été maintenues à 50 ppm afin d'avoir des réponses comparables; Bien que pour les extraits de chloroforme, on ait utilisé une concentration de 400 ppm, le pourcentage d'AA et le pourcentage d'inhibition sont donc nettement inférieurs à ceux des autres extraits. Comme prévu, les pourcentages d'inhibition pour les extraits d'AcOEt étaient plus élevés que ceux pour les extraits de *n*-Butanol à la fois pour les fruits et les feuilles, en ligne avec la teneur en polyphénols plus élevée.

Dans tous les cas, l'activité antioxydante a été trouvée fortement corrélée avec la composition phénolique [22]. Les constituants des fruits qui sont responsables de l'activité de piégeage des radicaux libres sont, entre autres, l'épicatéchine, l'hyperoside et l'acide chlorogénique, et ces composés sont considérés comme les meilleurs antilipoperoxydants [23].

Néanmoins, le potentiel des radicaux libres de scavenger est directement lié à la structure moléculaire de chaque composé phénolique mais pas nécessairement à sa concentration individuelle; c'est-à-dire que, dans certains cas, des extraits ayant une faible teneur en PT se présentent avec une activité antioxydante élevée en vertu du profil polyphénolique individuel.

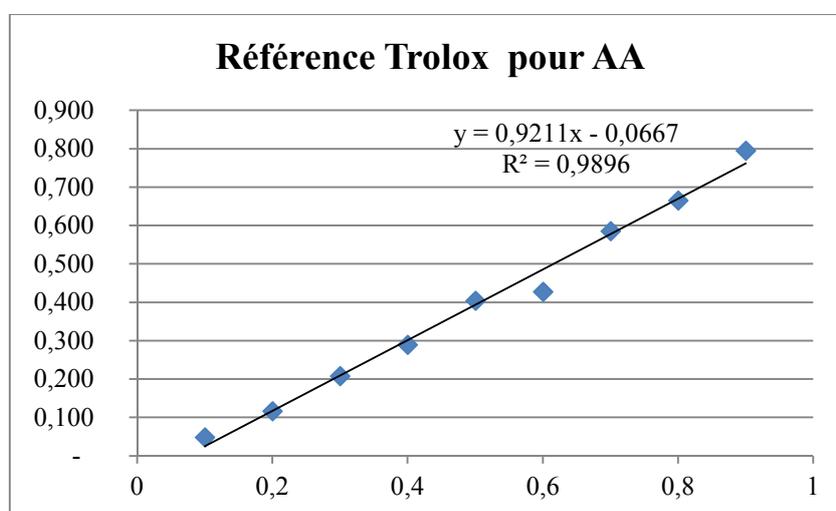


Figure 45: Courbe étalon de Trolox (référence pour l'activité antioxydante)

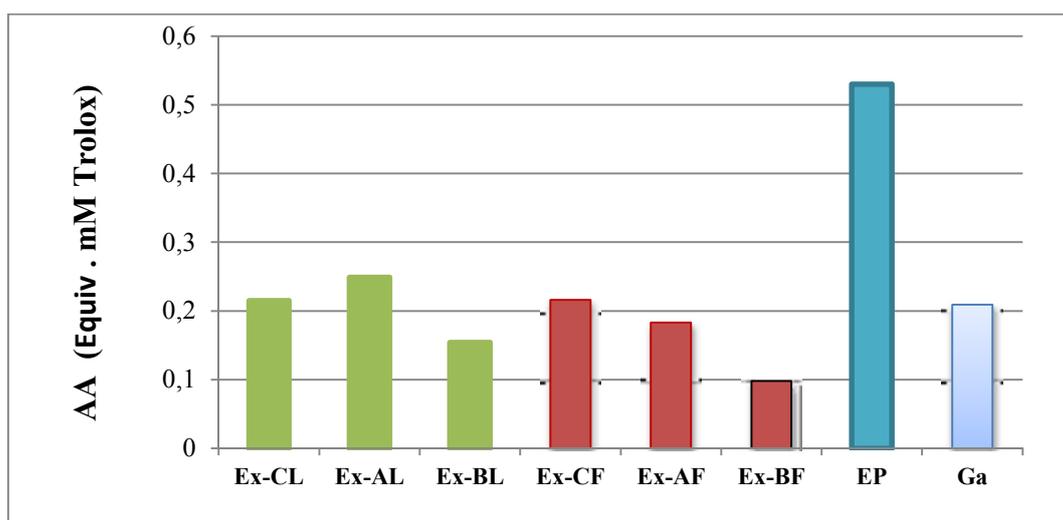
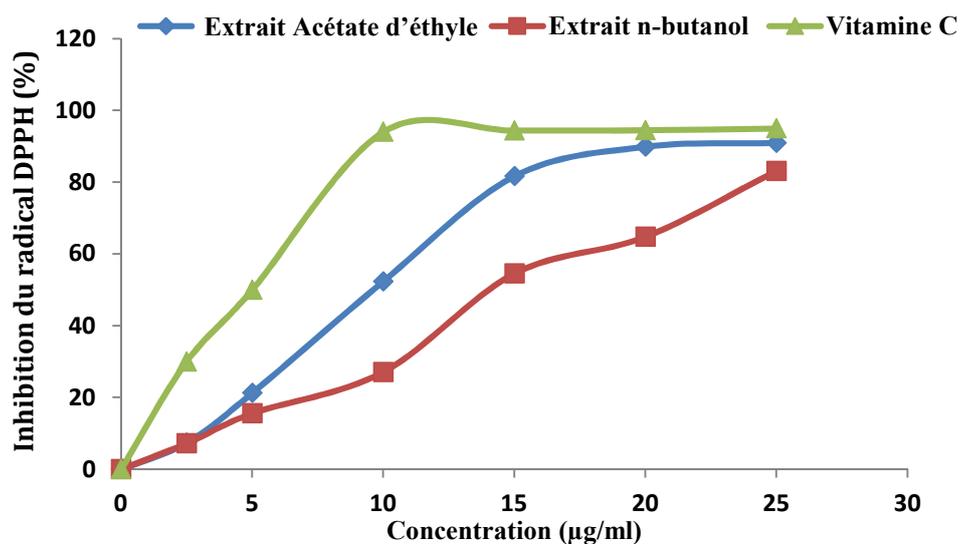


Figure 46: Activité antioxydante du Radical scavenger DPPH, mM ETR (Ex-CL: extrait de  $\text{CHCl}_3$  de feuilles, Ex-AL: extrait AcOEt de feuilles, Ex-BL: extrait *n*-Butanol de feuilles, Ex-CF: extrait de  $\text{CHCl}_3$  de fruits, Ex-AF: extrait de AcOEt de fruits, Ex-BF : Extrait *n*-Butanol de fruits, EP: Epicatéchine, Ga: Acide gallique).

À partir des valeurs obtenues de la méthode 2 (Tableau 66), nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule citée plus haut. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentées sur la Figure 47 qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits (AcOEt et *n*-Butanol (feuilles)). Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondant à 50 % d'inhibition ( $IC_{50}$ ).



**Figure 47:** Pourcentage de l'activité antiradicalaire des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des feuilles de *C. oxyacantha* vis-à-vis du radical libre DPPH, classés selon l'ordre décroissant suivant (25 µg/mL) : vitamine C (96,00 %) > acétate d'éthyle (90,97%) > *n*-butanol (81,94 %).

En comparant les  $IC_{50}$  des extraits testés (Tableau 66) par rapport à celle de la vitamine C, nous remarquons que l'activité antiradicalaire des extraits est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH• de la substance de référence ( $5 \pm 0,10$  µg/mL). Il est évident que l'activité de l'extrait *n*-Butanol est attribuable à sa richesse en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes).

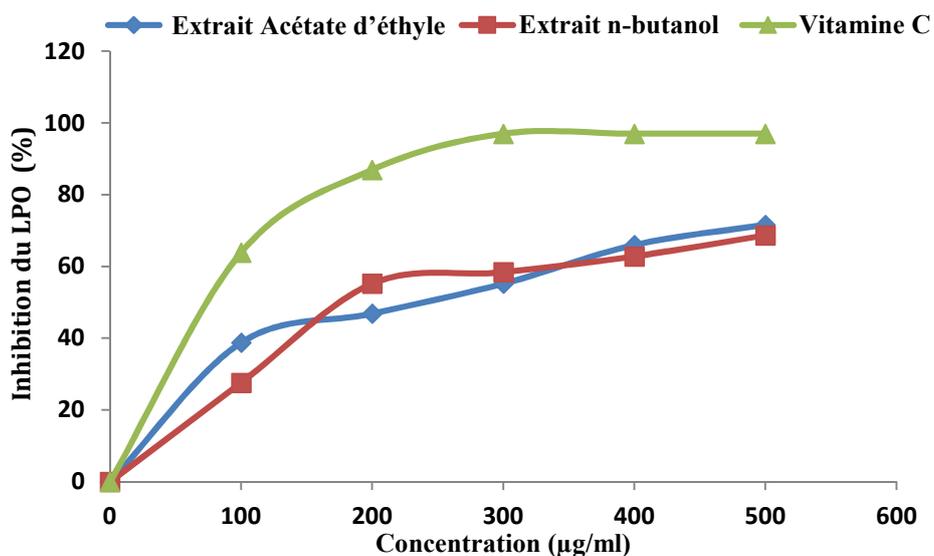
**Tableau 66:** Valeurs des  $IC_{50}$  (DPPH et LPO) des extraits AcOEt et *n*-Butanol de *C. oxyacantha* (feuilles)

Matériel végétal	Extrait	DPPH ( $IC_{50}$ ) µg/mL	LPO ( $IC_{50}$ ) µg/mL
Feuilles	Acétate d'éthyle	9,87±0,20	230,28±7,38
	<i>n</i> -Butanol	15,48±0,13	254,07±6,07

### V.2.2.3. Évaluation *in vitro* de la peroxydation lipidique

Dans cette étude, nous avons également évalué l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits AcOEt, *n*-Butanol et de la vitamine C.

La lecture de la Figure 48, montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des extraits de *C. oxyacantha* et de la vitamine C est dose dépendante. En comparant les IC<sub>50</sub> des extraits testé (Tableau 66) par rapport à celle de la vitamine C, nous remarquons que l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique des extraits est inférieure à la capacité de la vitamine C ( $20 \pm 1,40 \mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 48 :** Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits *n*-Butanol et acétate d'éthyle des feuilles de *C. oxyacantha* et la vitamine C.

Nos résultats ont montré que l'inhibition de la peroxydation lipidique exercée par les extraits de *C. oxyacantha* est démontrée par la diminution de la concentration des radicaux libres produits par le FeSO<sub>4</sub>. Ces résultats expliquent les propriétés antioxydantes des composés phénoliques reportées dans plusieurs travaux [24].

### V.2.3. Résultats de l'approche MSPD

Afin de compléter la caractérisation des polyphénols de *C. oxyacantha*, une nouvelle approche d'extraction basée sur la dispersion en phase solide matricielle (MSPD) a été appliquée. Les solvants choisis étaient l'éthanol, l'eau et un mélange hydroéthanolique (1:1). Bien que cette sélection de solvants ne permette pas la comparaison directe entre les deux approches d'extraction, il est utile de compléter la gamme de polarités des milieux d'extraction et, par conséquent, d'approfondir la caractérisation des phytoconstituants de la plante cible.

De plus, l'eau et l'éthanol sont utilisés dans la fabrication de différentes préparations pharmaceutiques à partir de fruits d'aubépine [25].

#### V.2.3.1. Teneur phénolique totale

La teneur totale en composés phénoliques des extraits de fruits et de feuilles de *C. oxyacantha* obtenus par MSPD est donnée dans le (Tableau 67) et se situe entre 5,70 mg EAG.gdw<sup>-1</sup> pour l'extrait aqueux des feuilles et 14,69 mg EAG.gdw<sup>-1</sup> pour l'extrait hydroéthanolique fruit; bien que les différences entre les parties des plantes soient plus légères que dans les extraits de l'ESL. Une corrélation directe entre la nature de la matière première et le solvant utilisé n'a pas pu être établie, ce qui montre que l'extraction des polyphénols est fortement influencée par la relation entre la polarité des analytes et les solvants et la matrice elle-même. L'eau va extraire les composés phénoliques les plus polaires, tandis que l'éthanol pur les moins polaires en termes relatifs; le mélange hydroéthanolique va mieux extraire un mélange d'entre eux.

Kostic et al. [22] ont également exploré la teneur en composés phénoliques de l'alcool, de l'hydroalcool et des extraits aqueux de fruits pleinement mûrs de *C. oxyacantha*, collectés dans une région de Serbie exempte d'influences négatives sur l'environnement.

L'extraction a été effectuée dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes trois fois de suite avec respectivement 30, 25 et 20 ml de solvant; et confectionné pour marquer avec le même solvant dans un ballon de 100 ml. Les résultats obtenus étaient de 2,12; 19,32 et 24,89 mg de EAG.g dw<sup>-1</sup> pour les extraits d'éthanol, d'éthanol/eau (1:1) et d'eau, respectivement; montrant une dépendance nette des valeurs obtenues seulement avec le solvant d'éluion mais aussi avec la technique d'extraction.

Tahirović et Bašić (2014) [26]. ont étudié la teneur en composés bioactifs dans différents extraits de fruits frais de *C. monogyna*. La procédure d'extraction a été réalisée dans un bain à ultrasons (25 ml de chaque solvant x 30 min x 2). Les résultats obtenus pour les composés phénoliques totaux sont plus faibles (de 2,010 mg EAG.g dw<sup>-1</sup> à 3,962 mg EAG.g dw<sup>-1</sup>) mais mieux en accord avec ceux obtenus avec l'approche MSPD: les teneurs les plus élevées en PT éthanol/eau (1:1).

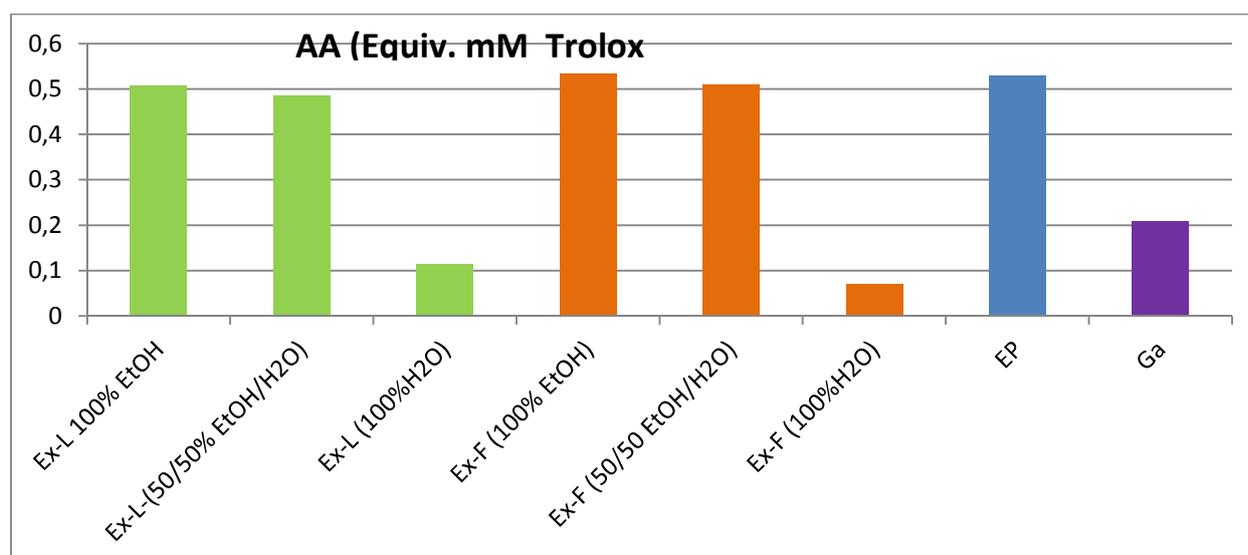
Selon certains chercheurs, les solutions alcool/eau ont montré une meilleure influence sur l'extractibilité des composés phénoliques par rapport aux solvants mono-composants. En outre, bien que les méthodes d'extraction proposées par les auteurs susmentionnés (Kostic et al., 2012 [22]; Tahirović & Bašić 2014 [26]) soient plus courtes et plus écologiques que les approches classiques, la MSPD va encore plus loin: économie de solvant (10 ml vs 50 ml/100 ml)) temps (15 min vs 60 min/45 min) et énergie (pas de consommation en MSPD car

l'extraction a lieu dans des conditions normales de laboratoire (25 °C, pression atmosphérique) sans apport d'énergie supplémentaire.

**Tableau 67:** Résumé des résultats de caractérisation des extraits de *C. oxyacantha* L. (feuilles et fruits) obtenus par MSPD: Teneur totale en composés phénoliques (PT) et activité antioxydante (AA) (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 3).

Matériel végétal	Fruits			Feuilles		
	EtOH	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	H <sub>2</sub> O	EtOH	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	H <sub>2</sub> O
<b>PT (mg EAG/L)</b>	246,35 $\pm$ 0,95	399,58 $\pm$ 1,93	290,19 $\pm$ 0,99	598,77 $\pm$ 1,87	528,05 $\pm$ 1,12	509,43 $\pm$ 1,97
<b>PT (mg EAG/g dw)</b>	8,97 $\pm$ 0,55	14,69 $\pm$ 1,62	11,26 $\pm$ 0,91	6,94 $\pm$ 0,07	5,90 $\pm$ 1,12	5,70 $\pm$ 0,78
<b>AA (mM ETR)</b>	0,113 $\pm$ 0,02	0,162 $\pm$ 0,06	1,012 $\pm$ 0,18	0,160 $\pm$ 0,07	0,203 $\pm$ 0,08	0,932 $\pm$ 0,13
<b>Inhibition (%)</b>	4,05	9,02	94,82	8,83	13,22	86,67

### V.2.3.2. Activité scavenger du radical DPPH



**Figure 49:** Activité antioxydante du DPPH Radical scavenger Equivalent .mM Trolox. (Extraits MSPD; Ex : Extraits, L : Feuilles, F : Fruits, EP: Epicatechine, Ga: Acide gallique).

Le Tableau 67 résume les activités de piégeage des radicaux DPPH des extraits de MSPD; avec des valeurs allant de 0,160 à 0,932 mM ETR dans les feuilles, et de 0,13 à 1,012 mM ETR dans les fruits. L'activité de piégeage radicalaire dans les extraits contenant de l'eau, à la fois des feuilles et des fruits, était plus élevée que pour les extraits d'éthanol absolus, suggérant que l'utilisation d'eau dans le mélange d'extraction est essentielle à la capacité antioxydante des extraits végétaux. Indépendamment de la valeur de la teneur totale en polyphénols, l'eau est capable d'extraire des polyphénols ayant un potentiel antioxydant supérieur à ceux extraits avec un solvant organique pur.

Fréquemment, l'activité antioxydante est fortement corrélée avec la composition phénolique comme indiqué ci-dessus. Néanmoins, le potentiel des radicaux libres de scavenger est directement lié à la structure moléculaire de chaque composé phénolique mais pas nécessairement à sa concentration individuelle; c'est-à-dire que, dans certains cas, des extraits ayant une faible teneur en PT se présentent avec une activité antioxydante élevée en vertu du profil polyphénolique individuel. Ce fait explique pourquoi les extraits de feuilles et de fruits obtenus avec de l'éthanol absolu ont montré un pouvoir antioxydant inférieur à ceux extraits par l'eau ou le mélange hydroéthanolique, et non corrélés avec les teneurs en PT.

Pour soutenir cette idée, des solutions de standards polyphénoliques purs ont été préparées: Épicatéchine (50 ppm) et Acide gallique (80 ppm) et leur AA ont été mesurés dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits, donnant respectivement des valeurs de 0,530 et 0,209 mM ETR. Ainsi, il est clair que l'AA pour l'épicatéchine est beaucoup plus élevé que pour l'acide gallique, et on peut estimer qu'une solution d'environ 200 ppm d'acide gallique (4 fois plus concentrée) est nécessaire pour atteindre le potentiel antioxydant de l'épicatéchine (50 ppm).

En termes de pourcentage d'inhibition (valeurs également indiquées dans le Tableau 67), le potentiel des extraits d'eau pure est très remarquable, avec des valeurs extrêmement élevées; suivi de loin par les extraits hydroéthanoliques et éthanoliques absolus, avec les valeurs les plus basses pour ces derniers. Comme indiqué, il n'y a pas de corrélation directe entre le pourcentage d'inhibition et la teneur totale en polyphénols, suggérant que certains des polyphénols extraits dans l'eau pure ont une importante activité de piégeage des radicaux.

### V.2.3.3. Comparaison entre les résultats des deux méthodes d'extraction (ESL, MSPD)

#### V.2.3.3.1. Teneur phénolique totale des extraits de *C. oxyacantha*

- **Comparaison entre l'acétate d'éthyle et le *n*-Butanol en tant que solvants d'extraction**

Les extraits d'acétate d'éthyle ont le taux le plus élevé de phénols totaux (de 179,16 ± 0,34 mg/l pour l'extrait de fruits à 345,60 ± 0,23 mg/l pour les extraits de feuilles), mais ces substances étaient légèrement avec le *n*-Butanol, (de 68,36 ± 1,15 EAG mg/l à 160,30 ± 0,50 EAG mg/l). L'extrait d'acétate d'éthyle (feuilles) a montré la plus haute teneur en composés phénolique.

- **Comparaison de plantes entières et de différentes parties comme sources de polyphénols bioactifs**

Les résultats montrent que la teneur en phénols totaux dans les extraits étudiés des feuilles était élevée, allant de 160,30 EAG mg/l pour l'extrait de *n*-Butanol à 345,36 EAG mg/l pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

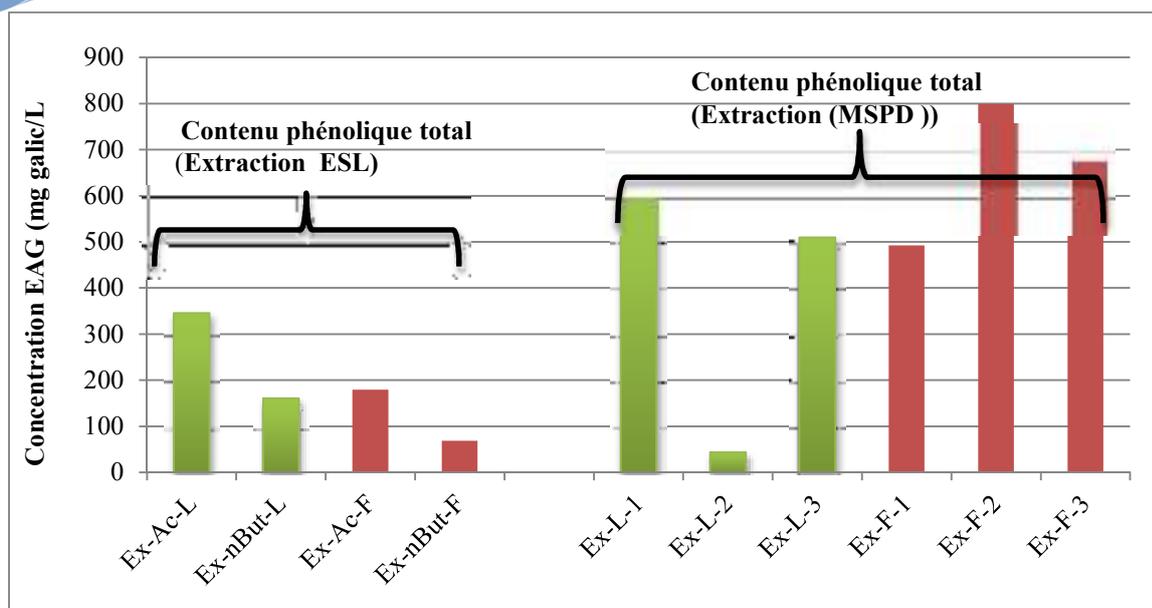
Les résultats montrent également que la teneur en phénols totaux dans les extraits de fruits était inférieure par port à la teneur en phénols totaux dans les extraits de feuilles, tel que de 68,36 EAG mg/l pour l'extrait de fruit de *n*-Butanol à 179,16 EAG mg/l de l'extrait d'acétate d'éthyle (fruit).

- **Comparaison de l'éthanol, de l'éthanol/eau et de l'eau comme solvants d'extraction (méthode MSPD)**

Les résultats montrent que la teneur en phénols totaux dans l'extrait eau était supérieure à la teneur en phénols totaux obtenue dans les deux extrait ethanol/eau et ethanol 100%.

- **Comparaison entre la teneur en phénols totaux obtenus par ESL et la teneur en phénols totaux obtenus par extraction MSPD**

Les résultats montrent que la teneur en phénols totaux dans l'extraction MSPD était supérieure à la teneur en phénols totaux obtenue par extraction ESL. (Figure 50)



**Figure 50:** Comparaison des polyphénols des extraits de *C. oxyacantha* par ESL et polyphénols extraits par MSPD ; (Ex : Extraits, Ac: AcOEt, nBut: *n*-Butanol, L: feuille, F : Fruit, 1 : Éthanol 100%, 2 : Éthanol/eau (50/50%, 3 : Eau 100%). Concentration EAG mg AG/L.

#### V.2.3.3.2. Activité de balayage des radicaux DPPH

- **Comparaison entre l'activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et de *n*-Butanol**

L'activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits de feuilles de chloroforme était très similaire à l'extrait de chloroforme des fruits.

L'activité de piégeage des radicaux libres dans les deux extraits d'acétate d'éthyle de fruits et de feuilles était plus élevée que celle des extraits de *n*-Butanol et de chloroforme.

- **Comparaison entre l'activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits de feuilles et des extraits de fruits**

L'activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits de feuilles était légèrement supérieure à celle des extraits de fruits.

- **Comparaison entre l'éthanol, l'éthanol/eau et l'eau comme solvants d'extraction (méthode MSPD)**

L'activité de piégeage des radicaux dans les extraits d'éthanol et d'éthanol /eau des fruits et des feuilles était plus élevée que celle de l'eau.

L'activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits de feuilles était très similaire à celle des extraits de fruits.

- **Comparaison de l'activité antioxydante des extraits obtenus par ESL et activité antioxydante des extraits obtenus par extraction MSPD**

Les résultats montrent que l'activité de piégeage des radicaux DPPH dans les extraits de MSPD était supérieure à l'activité de piégeage des radicaux DPPH qui a été obtenue par extraction ESL.

Les extraits d'extraction MSPD ont le taux le plus élevé d'activité de piégeage des radicaux DPPH (de 0,114 à 0,508 mM ETR) pour l'extrait de feuilles et (de 0,07 à 0,533 mM ETR) pour les extraits de fruits, cependant l'activité antioxydante était légèrement dans les extraits d'ESL, allant de 0,154 à 0,215 mM ETR pour l'extrait de feuilles et (de 0,0980 à 0,216 t mM ETR) pour les extraits de fruits.

Il a été rapporté que les extraits de fruits de *C. oxyacantha* présentaient une forte activité de piégeage contre les radicaux DPPH, allant de 60,6 à 89,9 % [18].

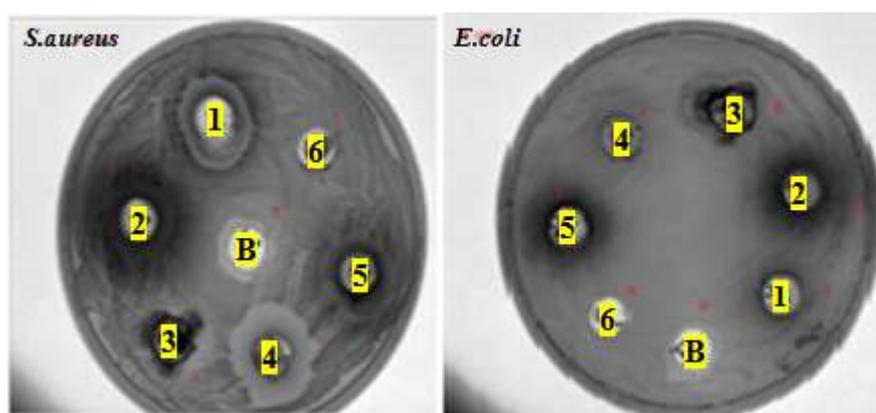
#### V.2.4. L'activité anti microbienne

##### V.2.4.1. Zone d'inhibition

Le potentiel antibactérien des extraits a été évalué en termes de zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

Les résultats de l'activité antimicrobienne (zone d'inhibition) des extraits de fruits et feuilles de *C. oxyacantha* L contre *S. aureus* et *E. coli* sont représentés dans le (Tableau 68).

Les résultats de cette étude montrent que les extraits développent une activité assez bonne contre la souche à Gram positif mais aucun pouvoir inhibiteur n'a été observé contre la souche de Gram négatif. (Figure 51)



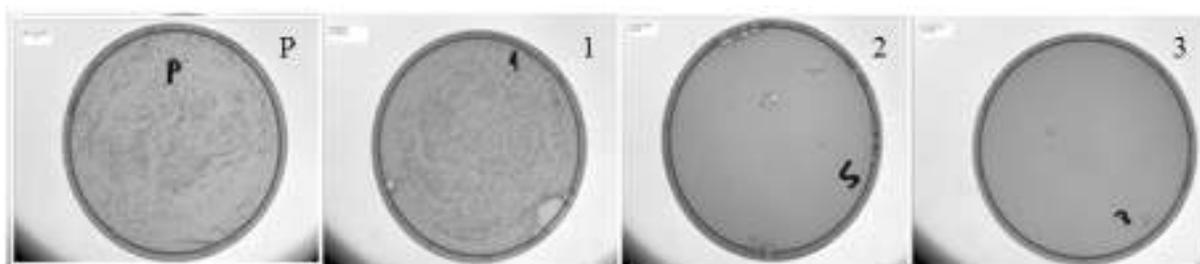
**Figure 51:** Zone d'inhibition des extraits de *C. oxyacantha*: (1): extrait *n*-Butanol (feuilles), (2): extrait AcOEt (feuilles), (3): extrait CHCl<sub>3</sub> (feuilles), (4): extrait *n*-Butanol (fruits), (5): extrait AcOEt (fruits), (6): extrait CHCl<sub>3</sub> (fruits), (B): Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO).

**Tableau 68:** présence (+) ou absence (-) de zone d'inhibition avec des extraits de *C. oxyacantha* (Feuilles et Fruits)

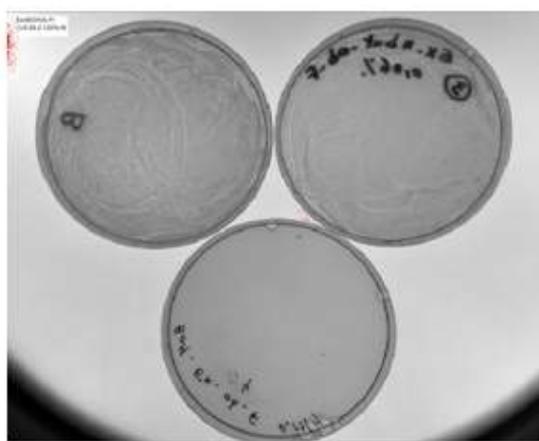
Zone d'inhibition (Puissance antimicrobienne)			
Microorganism			
Extraits		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>n</i> - Butanol (1)	Feuilles	+	-
AcOEt (2)		+	-
CHCl <sub>3</sub> (3)		+	-
<i>n</i> - Butanol (4)	Fruits	+	-
AcOEt (5)		+	-
CHCl <sub>3</sub> (6)		+	-
Blanc	H <sub>2</sub> O/DMSO	-	-

#### V.2.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

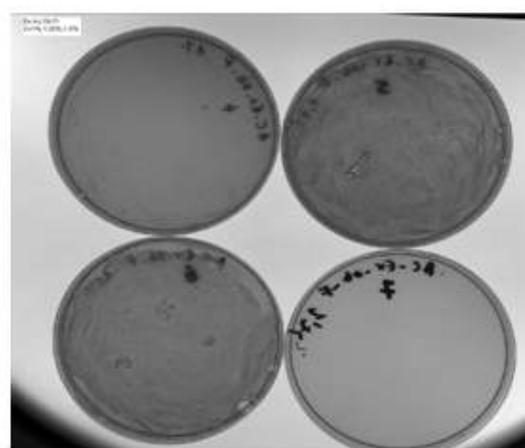
Les valeurs de la concentration minimale d'inhibition (CMI) des extraits de *C. oxyacantha* ont été présentés dans le (Tableau 69), Figure 52 (l'extrait *n*-Butanol (feuilles)); Figure 53 (l'extrait *n*-Butanol (fruits)) et Figure 54 (l'extrait AcOEt (fruits)).



**Figure 52:** Valeurs de CMI de l'extrait *n*-Butanol (feuilles) de *C. oxyacantha* (mg/mL)  
p: Blanc ; 1: 0,25% ; 2: 0,5% ; 3: 0,75%.



**Figure 53:** Valeurs de CMI de l'extrait *n*-Butanol (fruits) de *C. oxyacanthas* (mg/ml)  
B: Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO), 3: 0,06 %, 4: 0,125 %.



**Figure 54:** Valeurs de CMI de l'extrait AcOEt (fruits) de *C. oxyacantha*. (mg/ml)  
B: Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO) ; 4: 1 % ; 5: 1,25 % ; 6: 1,5 % ; 7 : 1,75 %.

**Tableau 69:** La croissance de *S. aureus* en présence de différentes concentrations des extraits: *n*- Butanol (feuilles) (A), *n*-Butanol (fruits) (B) et AcOEt (fruits) (C).

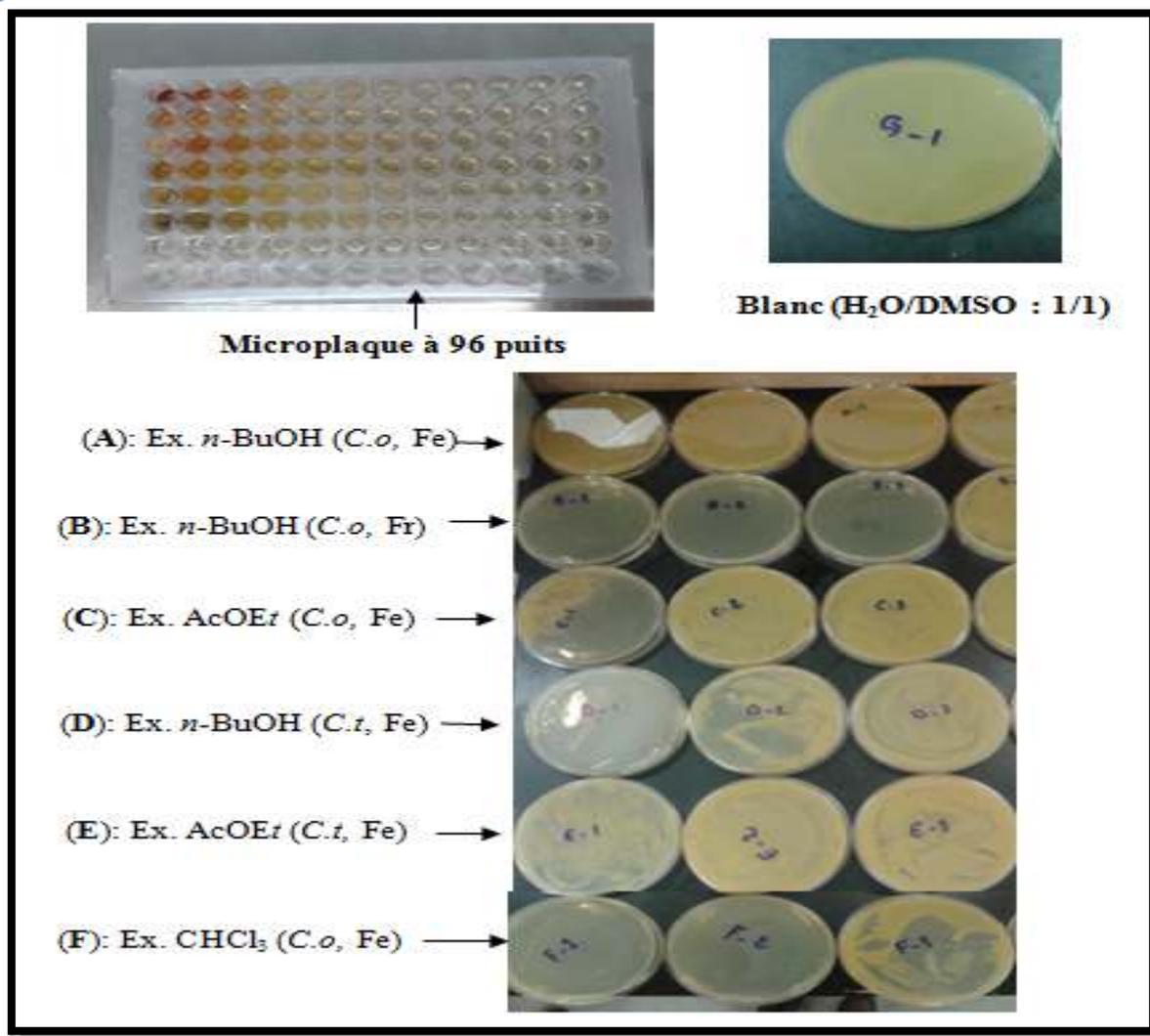
Concentration mg/ml	Extraits		
	(A)	(B)	(C)
0,06	++	+	++
0,125	++	-	++
0,25	++	-	++
0,5	+	-	++
0,75	-	-	++
1	-	-	++
1,25	-	-	++
1,5	-	-	+
1,75	-	-	-
2	-	-	-
2,5	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-

++ représente la taille normale de la colonie, + petite taille de la colonie, - pas de croissance.

Tous les extraits ont été préalablement séché et dissous dans 50 : 50 ; H<sub>2</sub>O : DMSO.  
(Nous n'avons pas testé la CMI des extraits AcOEt, CHCl<sub>3</sub> de feuilles et les extraits CHCl<sub>3</sub>, Ether de pétrole (fruits) parce que on a pas eu les quantités suffisantes.

#### V.2.4.3. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMBs)

Les valeurs de la concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits de *C. oxyacantha* ont été présentées dans le Tableau 70.



**Figure 55:** Détermination des valeurs de CMB des extraits ; (A): *n*-Butanol (*C.o* feuilles), (B): *n*-Butanol (*C.o* fruits), (C): AcOEt (*C.o* fruits), (E): AcOEt (*C.t*), (F):  $\text{CHCl}_3$  (*C.o* feuilles) de *C. oxyacantha* (mg/ml), (G): Blanc ( $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ).

**Tableau 70:** Valeurs de concentrations minimale bactéricide (MBCs) (mg/mL) des extraits de *C. oxyacantha* fruits et feuilles contre *S. aureus* (test de microdilution). (A): *n*-Butanol (*C.o* feuilles), (B): *n*-Butanol (*C.o* fruits), (C): AcOEt (*C.o* fruits), (F):  $\text{CHCl}_3$  (*C.o* feuilles) de *C. oxyacantha* (mg/ml), (G): Blanc ( $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ).

Concentration mg/ml	Extraits				
	(A)	(B)	(C)	(F)	(G)
6,25	++	++	++	++	++
12,5	++	+	++	++	++
25	++	-	++	+	++
50	++	-	+	-	++
100	++	-	-	-	++

++ représente la taille normale de la colonie, + petite taille de la colonie, - pas de croissance.

#### V.2.4.4. Discussion

Les résultats de cette étude montrent que tous les extraits *C. oxyacantha* Linn. présentaient une sorte d'activité antibactérienne contre les bactéries Gramme-positifs et aucun pouvoir inhibiteur contre les souches Gramme-négatifs, Ce qui indique que la souche Gram-(+) est plus sensible que celle des bactéries Gram(-). Cette observation peut être attribuée à des différences dans la structure de la paroi cellulaire des bactéries.

Les résultats montrent aussi que le solvant d'extraction joue un rôle important dans le comportement anti-bactérien des extraits de *C. oxyacantha*, tel que notre expérience a révélé que l'extrait *n*- Butanol des fruits et des feuilles ont été les extraits les plus actifs. Cependant, l'extrait *n*- Butanol de fruits a montré la plus forte activité avec une valeur de CMI entre 0,06-0,125 mg/ml et une valeur de CMB entre 12,5-25 mg/ml contre *S. aureus*.

Comme prévu, le témoin H<sub>2</sub>O : DMSO (50:50) n'a montré aucun effet d'inhibition, donc on a utilisé ce mélange comme un témoin négatif.

Cette observation est soutenue par plusieurs travaux dont ceux de Kostic et al (2012) [22] et de Bahari-sahloul et al, (2014) [18].

Il existe des différences entre les résultats des études mentionnées. Les différences observées ne sont probablement dues aux différentes méthodes et les concentrations des solutions d'extrait testé, mais aussi, les résultats dépendent de la sensibilité des souches sauvages testées, ainsi que la composition et la quantité de composants actifs extraits de matériaux testés proviennent de différentes régions géographiques, les conditions de croissance de matériel végétal ainsi que les variations saisonnières et aussi les espèces de *Crataegus*.

Lors de cette étude, la sensibilité des germes testés face aux extraits de *C. oxyacantha*, pourrait justifier l'utilisation des feuilles et fruits de cette plante dans la prévention traditionnelle de certaines infections microbiennes, si les tests cliniques montraient faible toxicité ou non. Et dans le traitement traditionnel des maladies microbiennes dans différentes régions de l'Algérie.

### **V.3. L'investigation biologique de l'extrait AcOEt de *Cytisus triflorus* L'Her.**

#### **V.3.1. Matériel et méthode**

##### **V.3.1.1. Dosage des composés phénoliques totaux**

La teneur en composés phénoliques totaux dans l'extrait a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteus selon la méthode de Singleton et al. (1999) [6]. (Page 193)

##### **V.3.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux**

Le teneur total en flavonoïdes a été estimé selon la méthode décrite par Wang et al. 2008 [7]. (Page 194).

##### **V.3.1.3. Dosage de l'activité antiradicalaire DPPH**

La capacité des échantillons d'essai de donneur d'hydrogène a été examinée en présence de radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) en utilisant la méthode décrite par Braca et al. (2001) [10] (Page 194).

##### **V.3.1.4. Inhibition de la peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique dans le vitellus des œufs est évaluée par le dosage de Malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Cao U et Ikeda. (2009) [11]. En milieu acide et à chaud (PH = 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de Thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 532 nm)

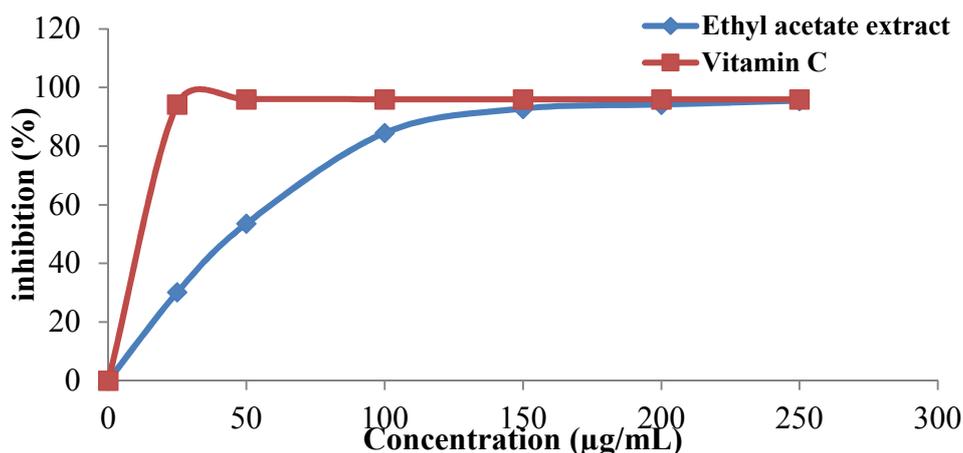
#### **V.3.2. Résultats et discussions**

##### **V.3.2.1. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux**

Les résultats obtenus montrent la richesse de l'espèce *C. triflorus* en polyphénols et en flavonoïdes dont la teneur dans 1 mg d'extrait d'acétate d'éthyle de *C. triflorus* est :  $180,33 \pm 12,22$  µg d'équivalents d'acide gallique EAG/mg d'extrait et  $16,78 \pm 1,54$  µg d'équivalents de quercétine/mg d'extrait respectivement.

##### **V.3.2.2. Evaluation du pouvoir antioxydant**

Les résultats figurant dans la courbe (Figure 56) illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle de *C. triflorus* vis-à-vis du radical libre DPPH :



**Figure 56:** Pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle de *C. triflorus* du vis-à-vis du radical libre DPPH.

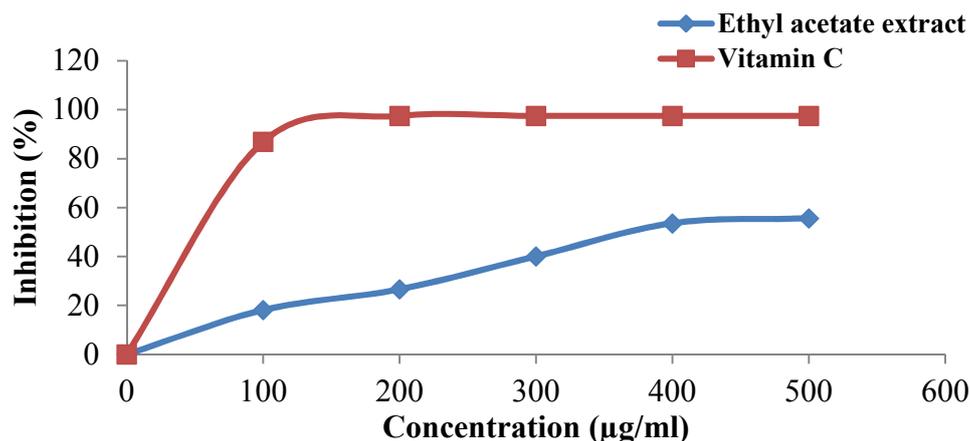
La capacité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle de *C. triflorus* de l'acide ascorbique (témoin positif) est dose-dépendante. Les valeurs d'IC<sub>50</sub>, calculées sur une moyenne de trois essais, sont les suivantes:

- ✓ Acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 5±0,19 µg/ml);
- ✓ Extrait acétate d'éthyle (IC<sub>50</sub> = 51,97±0,18 µg/ml);
- ✓ Le pouvoir antioxydant de l'extrait vis à vis du DPPH, le plus élevé (96%) est observé avec une dose de 250 µg/ml; pouvoir équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (96%) à la concentration 25 µg/ml.

L'activité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle de *C. triflorus* est probablement liée à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes.

### V.3.2.3. Evaluation in vitro de la peroxydation lipidique

La lecture de la (Figure 57) montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait est dose dépendant. Le pouvoir antioxydant de l'extrait vis à vis du LPO, le plus élevé (55,58 %) est observé avec une dose de 500 µg/ml. L'inhibition de la peroxydation lipidique exercée par l'extrait due à la diminution de la concentration des radicaux libres produite par le FeSO<sub>4</sub>. Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des composés phénoliques démontrés dans plusieurs travaux [11].



**Figure 57:** Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait Acétate d'éthyle de *C. triflorus*

#### V.3.2.4. Activité scavenger du radical DPPH des produits WC3, SBWP3, et SBWP4

De plus, nous avons noté que la valeur  $IC_{50}$  du composé WC3 est très proche de la valeur  $IC_{50}$  de l'extrait d'EtOAc, alors que les valeurs  $IC_{50}$  des autres produits SBWP3 et SBWP4 sont très élevées ( $\geq 300$ ), ce qui montre que le composé WC3 est le premier responsable de la haute activité antioxydante de cet extrait.

**Tableau 71:** Valeurs  $IC_{50}$  des activités antioxydantes de l'extrait AcOEt de *C. triflorus*, composés purs et la vitamine C dans les tests DPPH et LPO. Les valeurs sont moyennes  $\pm$  SD (n=3).

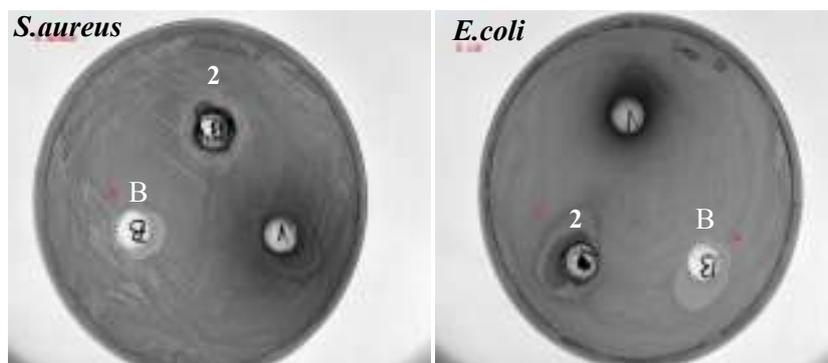
Extrait/composés	DPPH ( $IC_{50}$ ) $\mu\text{g/mL}$	LPO ( $IC_{50}$ ) $\mu\text{g/mL}$
Extrait AcOEt	51,97 $\pm$ 0,18	397,9 $\pm$ 7,91
Vitamine C	5 $\pm$ 0,19	20,54 $\pm$ 2,33
WC3 (Chrysin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside)	52,59 $\pm$ 0,55	/
SBWP3 (Chrysin)	$\geq 300$	/
SBWP4 (Diosmétine)	$\geq 300$	/

#### V.3.2.5. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été testée sur l'extrait AcOEt de l'espèce *C. triflorus*.

L'effet antimicrobien de l'extrait a été testé aussi sur deux micro-organismes: staphylococcus aureus CECT 240 et Escherichia coli CECT 4099, selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'étude de l'activité antimicrobienne a consisté à déterminer des paramètres antibactériens (CMI et CMB) de l'extrait AcOEt de *C. triflorus*. Pour sa réalisation, nous avons utilisé la méthode de la macrodilution en milieu liquide.

## ➤ 1. Zone d'inhibition



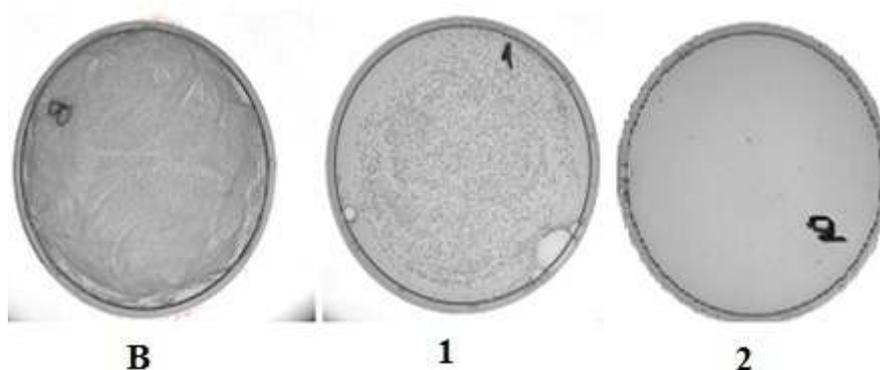
**Figure 58:** Zone d'inhibition de l'extrait AcOEt de *C. triflorus*: (2) : extrait AcOEt, (B) : blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO).

**Tableau 72:** présence (+) ou l'absence (-) de zone d'inhibition de l'extraits AcOEt (2) de *C. trifloru*.

Zone d'inhibition (Puissance antimicrobienne)		
<i>Microorganism</i>		
Extraits	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
AcOEt (2)	+	-

## ➤ 2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les valeurs de la concentration minimale d'inhibition (CMI) de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* ont été présentées dans la Figure 59.



**Figure 59:** Détermination de la concentration minimale d'inhibition de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* (mg/ml) B: Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO); 1: 0,5 mg/ml; 2: 0,75 mg/ml.

L'ensemble des résultats de la concentration minimale d'inhibition (CMI) de *C. triflorus* contre *S. aureus* sont rassemblés dans le Tableau 73.

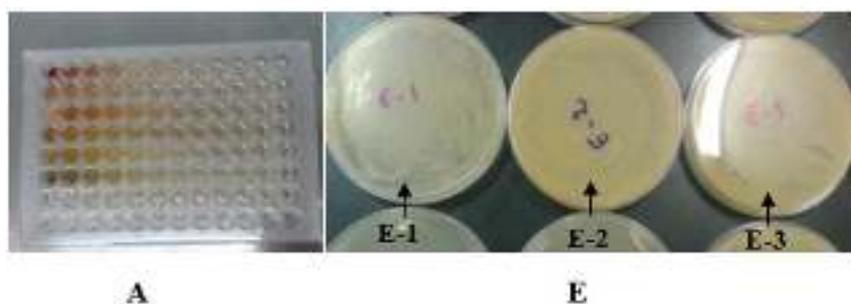
**Tableau 73:** La croissance de *S. aureus* en présence de différentes concentrations de l'extrait: AcOEt

CMI (mg/ml)	Extrait AcOEt	B: Blanc
0,06	++	++
0,125	++	++
0,25	++	++
0,5	+	++
0,75	-	++
1	-	++

++ représente la taille normale de la colonie, + petite taille de la colonie, - pas de croissance.

### ➤ 3. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMBs)

Les valeurs de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* ont été présentées dans la (Figure 60, Tableau 74).



**Figure 60:** Determation des valeurs de CMB de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* (mg/ml), (E-1): 100 mg/ml, (E-2): 50 mg/ml, (G-1): Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO).

**Tableau 74:** Valeurs de concentration minimale bactéricide (CMB) (mg/ml) de l'extrait AcOEt de *C. triflorus* contre *S. aureus* (test de microdilution), (G):Blanc (H<sub>2</sub>O/DMSO).

CMB ( mg/ ml )	Ex. AcOEt (E)	(G):Blanc
12,5	++	++
25	++	++
50	+	++
100	-	++

### ➤ 4. Discussion

Tout d'abord, l'activité antimicrobienne des échantillons a été évaluée qualitativement par la présence ou l'absence d'halogénures d'inhibition. L'extrait a été précédemment séché et dissous dans H<sub>2</sub>O:DMSO (50:50); comme prévu, le solvant lui-même n'a pas montré d'effet d'inhibition, ce mélange a donc été utilisé comme témoin négatif. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait testé a des effets antibactériens contre *S. aureus* et n'ont aucun pouvoir

inhibiteur sur *E. coli*. Ainsi, les valeurs CMI et CMB de l'extrait AcOEt contre *S. aureus* sont (CMI: 0,5-0,75 mg/ml), et CMB : 50-100 mg/ml).

En résumé, l'extrait AcOEt de *C. triflorus* présentait une sorte d'activité antibactérienne contre Gram+ et aucune activité antibactérienne contre les souches Gram-; indiquant que la bactérie de Gram+ était plus sensible que la Gram-. Cette observation peut être attribuée à des différences dans la structure de la paroi cellulaire bactérienne.

Des propriétés antibactériennes similaires ont été rapportées dans cette et d'autres espèces appartenant au genre *Cytisus* [27]. Le profil d'activité antimicrobienne de l'extrait AcOEt de *C. triflorus*, indique que leur différentes classes de composés phénoliques, principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont les plus susceptibles d'être des substances actives pour inhiber la croissance des souches de *S. aureus*.

#### V.4. Conclusion

Afin de compléter la caractérisation des polyphénols de *C. oxyacantha* Linn. une nouvelle approche d'extraction basée sur la dispersion en phase solide de matrice (MSPD) a été appliquée.

Les solvants choisis étaient l'éthanol, l'eau et un mélange hydroéthanolique (1:1). Bien que cette sélection de solvants ne permette pas la comparaison directe entre les deux approches d'extraction, il est utile de compléter la gamme de polarités des milieux d'extraction et par conséquent, d'approfondir la caractérisation des phytoconstituants de la plante cible.

De plus, l'eau et l'éthanol sont utilisés dans la fabrication de différentes préparations pharmaceutiques à base de fruits de *C. oxyacantha*. [20].

Les extraits de fruits et de feuilles de *C. oxyacantha* ont un contenu exceptionnel de polyphénols, qu'ils soient obtenus par ESL ou par MSPD, bien que le profil phénolique particulier dépende de la technique et du solvant.

La technique MSPD s'est avérée être une bonne alternative aux méthodes classiques d'obtention d'extraits naturels, rapides et à faible consommation de temps, d'énergie et de solvants organiques, donc respectueux de l'environnement. Bien que les deux techniques d'extraction peuvent être utilisées de manière complémentaire, en fonction des objectifs finaux du processus. Les bioactivités peuvent être considérées aussi très remarquables, révélant des extraits avec des niveaux élevés d'activité antioxydante. De plus, les extraits de *C. oxyacantha* ont montré une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gramme

positif, justifiant l'utilisation des feuilles et des fruits de cette plante dans la prévention traditionnelle de certaines infections microbiennes.

L'activité antibactérienne la plus efficace a été exprimée par l'extrait *n*-BuOH des fruits de *C. oxyacantha* (85%), contre les bactéries à Gramme positif *S. aureus* avec la valeur de 0,06 à 0,125 mg/ml de CMI et de 12,5 à 25 mg/ml pour CMB.

*C. oxyacantha* apparaît donc comme une matière première appropriée pour l'obtention de composés bioactifs et la préparation de formes améliorées de thérapies efficaces à base de composés phénoliques végétaux.

Les résultats obtenus appuient l'utilisation traditionnelle de *C. oxyacantha* pour soigner les affections gastro-intestinales et ont mis en évidence son utilisation possible dans les industries alimentaires et pharmaceutiques comme source d'antioxydants naturels. [22]

Ainsi, les résultats obtenus indiquent que l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her. constitue des pièges aux radicaux libres et des antioxydants puissants. Cette activité est liée en grande partie à la composition de l'extrait et leur richesse en composés flavonoïdes.

L'extrait AcOEt de *C. triflorus* a présenté des propriétés bactéricides contre les bactéries *S. aureus* avec la valeur de 0,5 à 0,75 mg/ml de CMI et de 50 à 100 mg/ml pour CMB.

D'après les résultats obtenus, cet extrait concentre mieux les principes actifs. Par ailleurs, nos résultats peuvent être exploités pour la purification des principes actifs des deux plantes et la préparation des formes améliorées de remèdes efficaces à base de *Crategus oxyacantha* Linn. et *Cytisus triflorus* L'Her.

Ces activités biologiques prometteuses nous ont encouragés à réaliser l'investigation phytochimique de ces extraits afin de déterminer ses composantes chimiques en vue de rechercher les molécules responsables de ces activités.

## Références bibliographiques

- [1] Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S et McAnalley, B., 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience& Nutrition*.4 (6). 7.
- [2] Vansant, G., 2004. Radicaux libres et antioxydants: principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- [3] Hale, A.L., 2003. Screening PotatoGenotypes for AntioxidantActivity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of GraduateStudies of Texas A & M University. *Genetics*, 260.
- [4] Billing, J., Sherman, P.W., 1998. Antimicrobial Functions of Spices : Why some Like it Hot. *Quarterly Review of Biology*, vol.73, n°1, pp.3-49.
- [5] Singleton, V.L, Rossi, J.A.J.r., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.
- [6] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and otheroxidationsubstrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteureagent. In: Packer L, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, vol. 299. San Diego, CA: AcademicPress p: 152–78.
- [7] Wang, H., Dong Gao, X., Zhou, G.C., Cai, L., 2008. Yao WB. In vitro and in vivo antioxidantactivity of aqueous extract from Choerospon diasaxillaris fruit. *Food Chem*, 106:888-895.
- [8] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28:25–30.
- [9] Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., 2014. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredoliaaretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie* 12(6): 364–371.
- [10] Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., 2001. Morelli Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*.*J. Nat. ProdI*, 64:892-895.
- [11] Cao, U., Ikeda, I., 2009. Antioxidantactivity and antitumoractivity (in vitro) of xyloglucanselinious ester and surfatedxyloglucan. *Int.J. Biol. Macromol*, 45:231-235.
- [12] Bergogne-Bérésin, E., Brogard, J.M., 1999. Bases biologiques de l'antibiothérapie. ed., Masson, p27.
- [13] Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7:1085-1097.
- [14] Edwards, J.E., Brown, P.N., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R., 2012. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*.79 :5-26
- [15] Kartnig, T., Kogl, G., Heydel, B., 1993. Production of flavonoids in cell cultures of *Crataegus monogyna* *Planta Med*. 59:537–538.
- [16] Bajorun, T., Trotin, F., Pommery, J., Vasseur, J., and Pinkas, M., 1994. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med*. 60:323–328.
- [17] Bajorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., Aruoma, OI., 2003. Phenolic constituents and antioxidant capacities of

*crataegus*

- [18] Bahri-Sahloul, R., Ben Fredj, R., Boughalleb, N., Shriaa, J., Saguem, S., Hilbert, J.L., Trotin, F., Ammar, S., Bouzid, S., Harzallah-Skhiri, F., 2014. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. aronia (Willd.) Batt. Ovaries Calli. J Bot. Article ID 623651, 11.
- [19] Maharik, N., Elgengaihi, S., Taha, H., 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. Acad Res Int. 1:30–34.
- [20] Zoheir, M., Mokhtaria, H., Ali, L., 2015. Evaluation of parietal polysaccharides and polyphenols of *Crataegus monogyna* Jacq. and valorization prospect. Postersession presented at: International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015). 7-8 April Phuket (Thailand).
- [21] Tadic, M.V., Dobric, S., Markovic, M.G., Dordjevic, M.S., Arsic, AI., 2008. Antiinflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. J. Agric. Food Chem. 56:7700-7709.
- [22] Kostic, D.A., Velickovic, J.M., Mitic, S.S., Mitic, M.N., Randelovic, S.S., 2012. Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from SE Serbia. Trop J Pharm Res. 11:117–124.
- [23] Cui, T., Li, J.Z., Kayahara, H., Ma, L., Wu, L.X, Nakamura, K., 2006a. Quantification of the polyphenols and triterpene acids in Chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 54:4574–4581.
- [24] Amrani A, Benaissa O, Boubekri N, Zama D, Benayache F, Benayache S (2017) *In vitro* antioxidant activities of *Rhantheriumsuaevolens* extracts. J. Mater. Environ. Sci 8(11):4002-4006
- [25] Bernatoniene, J., Masteikova, R., Majiene, D., Savickas, A., Kėvelaitis, E., Bernatoniene, R., Dvorčáčkova, K., Civinskienė, G., Lekas, R., Vitkevičius, K., Pečiūra, R., 2008. Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. Medicina (Kaunas). 44: 706-711.
- [26] Tahirović, A., Bašić, N., 2014. Phenolic content and antioxidant activity of *Crataegus monogyna* L. fruit extracts. Works Fac Forest Univ of Sarajevo. 2: 29-40.
- [29] Marta, L., Marta, P., Marta Á-C., Jorge, D., Carmen García-J., 2015. Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems., Talanta 140, 134–142.

## Conclusion générale

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de la plante *Crataegus oxyacantha* L., espèce de l'Est algérien appartenant à la famille Rosaceae, a permis d'isoler et d'identifier par diverses méthodes chromatographiques, 10 composés naturels. Il s'agit de:

- Quercétine
- Isoquercétine
- Épicathéchine
- Naringénine-7- $\beta$ -O-glucosyde
- Apigénine
- Acide chlorogénique
- Acide Caféique
- Acide caftarique
- Rutine (Quercétine-3-rutinoside)
- Orientine

Tous ces composés n'ont pas été décrits auparavant chez cette espèce sauf l'acide chlorogénique, l'acide Caféique et l'épicathéchine.

L'investigation phytochimique réalisée sur l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her, a mené à l'isolement de 11 composés et l'identification structurale à ce stade de notre travail, de 6 composés de type flavonoïde dont 3 composés nouveaux dans le genre et 1 composé nouveau dans l'espèce. Il s'agit de:

- 5,7-dihydroxyflavone (Chrysin)
- 5,7, 4'-Trihydroxy,3'-métoxy-flavone (Chrysoériol): Nouveau dans le genre.
- 5, 4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone (Prunétine) : Nouveau dans le genre
- 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosylchrysin
- 7-O- $\beta$ -D-galactopyranosylchrysin: Nouveau dans le genre.
- Quercétine-3- $\beta$ -O-glucopyranosyl (Isoquercitrine) Nouveau dans l'espèce.

L'identification de ces composés a été réalisée grâce à la spectrophotométrie UV-Visible, l'analyse des spectres de masse haute résolution HRESI-M, RMN 1D et ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC, et HMBC), l'analyse des spectres de HPLC-DAD, et par la comparaison avec les données de la littérature.

Enfin concernant l'étude biologique, deux activités ont été mises en évidence pour ces deux plantes, une activité antioxydante et une anti-bactérienne.

L'étude de l'activité antioxydante relevée sur les trois extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-Butanol de l'espèce *C. oxyacantha* en utilisant comme modèles de test : le DPPH, il a montré que les extraits *n*-Butanol et EtOAc et présentent un effet antioxydant important, avec un potentiel maximal pour l'extrait *n*-Butanol. Et sur une sélection de trois composés purs de *Crataegus oxyacantha* ainsi, présentent un effet antioxydant important, avec un potentiel maximal pour le produit (Quercétine-3-β-*O*-glucopyranosyl).

L'étude de l'activité anti-bactérienne, a été effectuée par des expériences *in vitro*, elle été testé sur deux souches bactériennes selon la méthode de diffusion en milieu gélosé sur les extraits *n*-Butanol, AcOEt et CHCl<sub>3</sub> de feuilles et de fruits de l'espèce *Crataegus oxyacantha* L., et l'extrait AcOEt de l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her.

L'étude de l'activité antimicrobienne a consisté à déterminer des paramètres antibactériens (CMI et CMB) des extraits de *C. oxyacantha*. et *C. triflorus*. Pour sa réalisation, nous avons utilisé la méthode de la microdilution en milieu liquide.

L'activité antibactérienne la plus efficace a été exprimée par l'extrait *n*-Butanol des fruits de *C. oxyacantha* (85%), contre les bactéries à Gramme positif *S. aureus* avec la valeur de 0,06 à 0,125 mg/ml de CMI et de 12,5 à 25 mg/ml pour CMB.

Les résultats obtenus appuient l'utilisation traditionnelle de *C. oxyacantha* pour soigner les affections gastro-intestinales et ont mis en évidence son utilisation possible dans les industries alimentaires et pharmaceutiques comme source d'antioxydants naturels.

L'activité antibactérienne pour l'espèce *C. triflorus* a été exprimée par l'extrait AcOEt contre les bactéries à Gramme positif *S. aureus* avec la valeur de 0,5 à 0,75 mg/ml de CMI et de 50 à 100 mg/ml pour CMB.

Afin de compléter la caractérisation des polyphénols de *C. oxyacantha*, une nouvelle approche d'extraction basée sur la dispersion en phase solide de matrice (Matrix Solid-Phase Dispersion) (MSPD)) a été appliquée. Les extraits que nous avons obtenus de cette technique ont montré une richesse de polyphénols et une bonne activité antioxydante. Cette technique s'est avérée être une bonne alternative aux méthodes classiques d'obtention d'extraits naturels, rapides et à faible consommation de solvants organiques, donc respectueux de l'environnement.

Vu l'importance et la richesse en substances naturelles curatives de ces deux plantes, nous nous proposons de développer encore dans ce travail, pour une nouvelle approche thérapeutique de ces deux espèces.

## Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des deux plantes médicinales algérienne (*Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) et *Cytisus triflorus* L'Her. (Fabaceae) en les caractérisant par une étude phytochimique, une évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne, et une identification structurale de certains composés phénoliques. Ainsi, afin d'obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt, les flavonoïdes, nous avons opté pour deux méthodes d'extraction, une extraction solide liquide, en utilisant différents solvants de polarité croissantes (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-Butanol) et une deuxième extraction en utilisant la méthode dispersion en phase solide matricielle, par différents solvants de polarité croissantes (H<sub>2</sub>O 100%, H<sub>2</sub>O/EtOH 1/1 et EtOH 100%). Cette étude a permis d'isoler 21 composés et d'identifier 16 composés. Parmi ces 16 composés, 3 acides et 7 flavonoïdes (3 flavonol dont 1 glucosylé, 1 flavanone glucosylé, 1 flavanol et 2 flavones) ont été isolés de l'espèce *C. oxyacantha* L.

A partir de l'extrait AcOEt (Fleurs + Feuilles) de l'espèce *Cytisus triflorus* L'Her., 6 métabolites secondaires de type flavonoïdes ont été identifiés. Dont 3 flavones : (5,7-dihydroxyflavone (Chryisine) ; 5,7,3'-Trihydroxy,4'-métoxy-flavone ; 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone (Prunétine)) et 3 flavonoïdes glucosylés : (7-*O*-β-D-glucopyranosylchryisine. ; 7-*O*-β-D-galactopyranosylchryisine ; Quercétine-3-β-*O*-glucopyranosyl : (Isoquercitrine). Parmi ces composés isolés, 3 nouveaux dans l'espèce.

Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des chromatogrammes HPLC-DAD, des spectres UV-vis et des spectres de masse à haute résolution (HRESI-MS), RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des différents extraits et de trois produits isolés de *C. oxyacantha*, et de l'extrait AcOEt et de trois produits isolés de *C. triflorus* a été réalisé par la méthode de piégeage du radical (DPPH\*), ainsi les extraits de deux plantes présentent des activités antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les différents extraits étudiés ont révélé aussi une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*. De même, une tendance a été montrée indiquant que les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent des activités antibactériennes les plus élevées.

**Mots clés :** Rosaceae, Fabaceae, *Crataegus oxyacantha*, *Cytisus triflorus*, Flavonoïdes, composés phénoliques, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, RMN 1D et 2D, HPLC-DAD.

## Abstract

The work presented in this thesis contributes to the valorization of both Algerian medicinal plants (*Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) and *Cytisus triflorus* L'Her. (Fabaceae) by characterizing them by a phytochemical study, an evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities, and a structural identification of certain phenolic compounds. Thus, in order to obtain an extract enriched in metabolites of interest, flavonoids, we opted for two extraction methods, a liquid solid extraction using different solvents of increasing polarity (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-Butanol) and a second extraction using the Matrix solid phase dispersion (MSPD) method, using different solvents of increasing polarity (100% H<sub>2</sub>O, 1:1 H<sub>2</sub>O / EtOH and 100% EtOH).

This study allowed the isolation 21 compounds and structural elucidation of 16 compounds. Of these 16 compounds, 3 acids and 7 flavonoids: (3 flavonols including 1 glucosyl, 1 glucosyl flavanone, 1 Flavanol and 2 flavones) were isolated from *C. oxyacantha* L. From the EtOAc extract the aerial parts (Flowers + Leaves) of the species *Cytisus triflorus* L'Her., 6 secondary metabolites were identified (flavonoids). Among these compounds, 3 flavones: (Chrysin, Prunetin) and 3 glucosyl flavonoids (2 Chrysin and Isoquercitrin). Of these isolated compounds, 3 new in the species.

These major active ingredients possess various biological activities and play an important and acknowledged role in maintaining good health.

The structures of the isolated compounds were established by HPLC-DAD chromatogram analysis, UV-vis spectra and high resolution electrospray mass spectra (HRESI-MS), by extensive use and interpretation of NMR experiments spectra : 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and DEPT) and 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC) and by comparison with the literature data.

The in vitro evaluation antioxidant activity of the various extracts and of three isolated products of *C. oxyacantha*, and the AcOEt extract and three products isolated from *C. triflorus* was performed by the radical scavenging method (DPPH \*). The extracts of two plants have interesting antioxidant activities, dependent on the content of total polyphenols and flavonoids.

The various extracts studied were also revealed a high antibacterial activity towards *S. aureus*. Similarly, a tendency shown indicating that the richest extracts of flavonoids and polyphenols exhibit the higher antibacterial activities.

**Keywords:** Rosaceae, Fabaceae, *Crataegus oxyacantha*, *Cytisus triflorus*, Flavonoids, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, 1D and 2D NMR, HPLC-DAD.

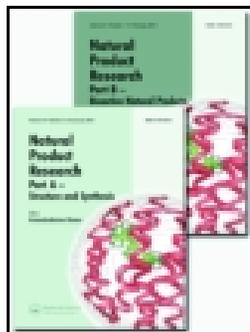
## ملخص

يهدف العمل المقدم في هذه الأطروحة إلى المساهمة في إعطاء الأهمية لاثنتان من النباتات الطبية الجزائرية : *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) et *Cytisus triflorus* L'Her. (Fabaceae) الفيتوكيميائية , تقييم الأنشطة المضادة للأوكسدة و الميكروبات و كذا تحديد بعض المركبات الفينولية. وهكذا ، من أجل الحصول على مستخلص غني بالمستقلبات ذات الأهمية ، الفلافونويدات ، اخترنا طريقتين للاستخلاص ، الاستخلاص سائل- صلب باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة (كلوروفورم, أسيتات الإيثيل و البيتانول) . و الاستخلاص الثاني(MSPD) باستخدام مذيبات متزايدة القطبية (ماء 100% , ماء/إيثانول 50/50, إيثانول 100%). هذه الدراسة سمحت بفصل 21 مركب والتعريف البنوي ل 16 . من بين هذه 16 مركب , 10 مركبات قمنا بعزلها من مستخلص أسيتات الإيثيل للمستخلص الكحولي المميه لنبته *C. oxyacantha* L. وهي 3 أحماض و 7 فلافونويدات من بينها 2 فلافونويدات غلوكوزيدية أحدهما فلافونول والأخر فلافانول و 5 فلافونويدات أغليكونية: 2 فلافونول و 1 فلافانول, 2 فلافون) . إنطلاقا من مستخلص أسيتات الإيثيل لنبته *C. triflorus* L'Her. , قمنا بفصل 6 أيضا ثانوي كلها ذات طبيعة فلافونويدية من بينها 3 فلافونويدات غلوكوزيدية و 3 فلافونويدات أغليكونية. من بين هذه المركبات 3 عزلت لأول مرة من *C. triflorus* L'Her. هذه المركبات الرئيسية النشطة تمتلك أنشطة بيولوجية مختلفة تلعب دورا هاما في الحفاظ على الصحة.

تم التعرف البنوي للمركبات المفصولة بفضل إستخدام مختلف الطرق المطيافية منها كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مع كشف صيفي الصمام الثنائي HPLC-DAD, طيف الأشعة فوق البنفسجية , مطيافية الكتلة, الرنين المغناطيسي النووي و تطبيقات (COSY, HSQC, HMBC) et RMN 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT) بالإضافة إلى مقارنة النتائج مع المراجع.

تم دراسة النشاط المضاد للأوكسدة لمختلف المستخلصات, ثلاث مركبات معزولة من النبتة *C. oxyacantha* و مستخلص أسيتات الإيثيل و ثلاث مركبات معزولة من النبتة *C. triflorus* باستخدام طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH\* حيث أظهرت النتائج فعالية مضادة للأوكسدة جد عالية مقارنة مع حمض غاليك و فيتامين س, مرتبطة بمحتوى البوليفينولات و الفلافونويدات. كما أظهرت نتائج مقبولة في نشاط تثبيط البيروكسيدات الدهنية مقارنة مع فيتامين س. من جهة أخرى مختلف المستخلصات المدروسة كانت أيضا محلا لدراسة النشاط المضاد للميكروبات, حيث أظهرت نتيجة مهمة مع الميكروبات *S. aureus* كما تم إثبات أن المستخلصات الغنية بالبوليفينولات و الفلافونويدات كانت المستخلصات الأكثر فعالية, كما تم إثبات أن المستخلصات الغنية بالبوليفينولات و الفلافونويدات كانت المستخلصات الأكثر فعالية.

**الكلمات المفتاحية :** Rosaceae, Fabaceae, *Crataegus oxyacantha*, *Cytisus triflorus*, فلافونويدات, مركبات فينولية , النشاط المضاد للأوكسدة , النشاط المضاد للميكروبات , HPLC-DAD, RMN 1D et 2D.



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

## Matrix solid-phase dispersion as a tool for phytochemical and bioactivities characterisation: *Crataegus oxyacantha* L.\_A case study

Wassila Benabderrahmane, Marta Lores, Juan Pablo Lamas & Samir Benayache

To cite this article: Wassila Benabderrahmane, Marta Lores, Juan Pablo Lamas & Samir Benayache (2017): Matrix solid-phase dispersion as a tool for phytochemical and bioactivities characterisation: *Crataegus oxyacantha* L.\_A case study, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2017.1326040](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1326040)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1326040>

 View supplementary material 

 Published online: 15 May 2017.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



## Matrix solid-phase dispersion as a tool for phytochemical and bioactivities characterisation: *Crataegus oxyacantha* L. A case study

Wassila Benabderrahmane<sup>a</sup>, Marta Lores<sup>b</sup>, Juan Pablo Lamas<sup>b</sup> and Samir Benayache<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unit of Valorization of Natural Resources, bioactive molecules and physicochemical and biological analysis (VARENBIOMO), Faculty of Science, University of Constantine 1, Constantine, Algeria; <sup>b</sup>Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Faculty of Chemistry, Analytical Chemistry Department, Campus VIDA-USC, Santiago de Compostela, Spain

### ABSTRACT

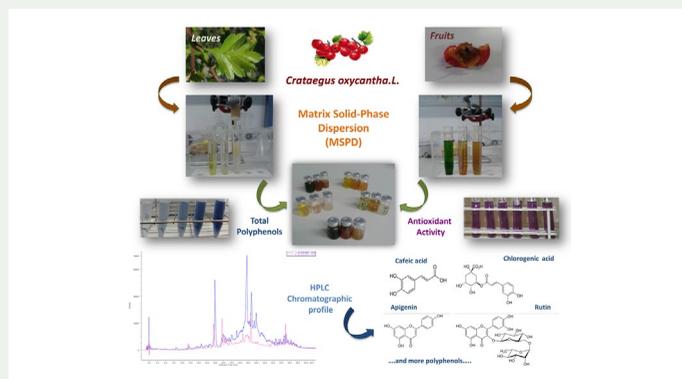
The use of a matrix solid-phase dispersion (MSPD) process to extract polyphenols from hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) a deciduous shrub with an expected rich phytochemical profile, has been evaluated. MSPD extracts of fruits and leaves have an outstanding content of polyphenols, although the particular phenolic profile is solvent dependent. The extracts were analysed by HPLC-DAD for the accurate identification of the major bioactive polyphenols, some of which have never been described for this species. MSPD has proven to be a good alternative to the classic methods of obtaining natural extracts, fast and with low consumption of organic solvents, therefore, environmentally friendly. The bioactivities can be considered also very remarkable, revealing extracts with high levels of antioxidant activity.

### ARTICLE HISTORY

Received 22 January 2017  
Accepted 24 April 2017

### KEYWORDS

*Crataegus oxyacantha* L.;  
matrix solid-phase dispersion  
(MSPD); polyphenols;  
antioxidant activity



## 1. Introduction

Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae)) is a deciduous plant well-known in phytotherapy. Polyphenols are the main active constituents in hawthorn leaves and flowers, mostly

**CONTACT** Marta Lores  marta.lores@usc.es

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1326040>.

responsible for the bioactivities of extracts from different species of *Crataegus* (Chang et al. 2002; Tadić et al. 2008; García-Mateos et al. 2012; Kostic et al. 2012; Rabiei et al. 2012); although the individual polyphenolic profile of *C. oxyacantha* was by far the less studied. MSPD is a Green Chemistry-based process for conducting simultaneous disruption and extraction of solid and semi-solid samples (Figure S1), with a number of advantages over the classical procedures (Barker 2000). No previous MSPD studies have been found on the content and identity of the main polyphenols in *C. oxyacantha* fruit and leaves. The aim of the present work is therefore to investigate the main phytoconstituents and antioxidant activities of the *C. oxyacantha* MSPD extracts.

## 2. Results and discussion

The selected elution solvents for the MSPD extractions were ethanol, water and a hydro-ethanolic mixture (1:1), commonly used in manufacturing pharmaceutical preparations from hawthorn fruits. The total phenolic contents (TP) of *C. oxyacantha* MSPD extracts are given in Table 1. A direct correlation between the nature of the raw material and the solvent used could not be established, showing that the polyphenols extraction is greatly influenced by the relationship between the polarity of the analytes and solvents, and the matrix itself. Water will extract the most polar phenolics, while pure ethanol will elute the less polar ones; the hydro-ethanolic mixture will better extract a mix of them. Kostic et al. (2012) also explored TP content of alcohol, hydroalcohol and aqueous extracts of *C. Oxyacantha* fully ripe fruits (2.12, 19.32 and 24.89 mg GAE.g fw<sup>-1</sup>, respectively) using ultrasound-assisted extraction (UAE); proving a clear dependence of the obtained values not only with the elution solvent but also with the extraction technique. Rabiei et al. (2012) also applied UAE to get fruit extracts from *C. pentagyna*, finding lower values (about 90 µg GAE.mL<sup>-1</sup>) than with the classical solid–liquid approach (about 225 µg GAE.mL<sup>-1</sup>); still low compared to the TP values found in this work (Table 1). Although the UAE process is shorter and greener than the classical approaches, the MSPD goes even further: saving solvent (10 vs. 70 mL); time (15 vs. 45 min) and energy (no consumption in MSPD because the extraction takes place at normal laboratory conditions (25°C, P atm) without any extra energy input. Table 1 also summarises the DPPH-based antioxidant activities (AA) of the MSPD extracts. The AA in extracts containing water, both from leaves and fruits, was higher than for the absolute ethanol extracts, suggesting that the use of water in the extraction mixture is key in the antioxidant capacity of the plant extracts. Frequently, AA is highly correlated with phenolic composition. Nevertheless, the antioxidant capacity is directly related with the molecular structure of each phenolic compound but not necessarily with its individual concentration; that is, in some cases, extracts with low TP content arise with high AA in virtue of the individual polyphenolic profile. This fact explains why leaves and fruit extracts obtained with absolute ethanol showed lower AA, and no correlation with the TP contents could be found for any of the extraction solvents.

The MSPD extracts of *C. oxyacantha* fruits and leaves were submitted to HPLC-DAD analysis to characterise the main individual polyphenols present in them (Table 1). The identification of the phenolic compounds in the chromatograms (Figure S2) was based on the comparison of the retention times and the UV spectra (Figure S3); confirming the presence of Miquelianin and Rutin in extracts with any solvent, despite its polarity; although Rutin just in leaves. García-Mateos et al. (2012) identified quercetin glycosides in the flower extracts of other

**Table 1.** Summary of the characterisation results of *C. oxyacantha* L. extracts (leaves and fruits) obtained by MSPD: Total phenolic content (TP) and antioxidant activity (AA) (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ). Main polyphenols identified in the HPLC-DAD chromatograms ( $\lambda = 280$  nm, 320 nm) with different extraction solvents.

Starting plant material	Fruits			Leaves		
	EtOH	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	H <sub>2</sub> O	EtOH	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	H <sub>2</sub> O
Extraction solvent						
TP (mg GAE <sup>a</sup> /L)	246.35 $\pm$ 0.95	399.58 $\pm$ 1.93	290.19 $\pm$ 0.99	598.77 $\pm$ 1.87	528.05 $\pm$ 1.12	509.43 $\pm$ 1.97
TP (mg GAE <sup>a</sup> /g dw)	8.97 $\pm$ 0.55	14.69 $\pm$ 1.62	11.26 $\pm$ 0.91	6.94 $\pm$ 0.07	5.90 $\pm$ 1.12	5.70 $\pm$ 0.78
AA (mM TRE <sup>b</sup> )	0.113 $\pm$ 0.02	0.162 $\pm$ 0.06	1.012 $\pm$ 0.18	0.160 $\pm$ 0.07	0.203 $\pm$ 0.08	0.932 $\pm$ 0.13
<i>Main polyphenols</i>						
Quercetine-3-glucuronide or Miquelianin	X	X	X	X	X	X
Quercetine-3-rutinoside or Rutin	X	X		X	X	X
Epicatechin	X	X	X		X	X
Caffeic acid	X	X			X	X
Cafelic acid		X			X	X
Chlorogenic acid				X	X	X
Orientin				X	X	X
Apigenin				X	X	X

<sup>a</sup>GAE means Gallic Acid Equivalents.

<sup>b</sup>TRE means Trolox<sup>®</sup> Equivalents.

*Crataegus* species. Other flavonols were also positively identified in fruit extracts: Epicatechin gallate (ECG) and Epicatechin. The acids Caftaric and Cafeic were positively identified both in fruits and in leaves, and Chlorogenic in all leaves extracts whatever the solvent used. The healthy flavones Orientin and Apigenin have also been positively identified in leaves extracts. The polyphenols ECG, Caftaric and Orientin have not previously been described in this species; and thus, their identity has been confirmed by LC-MS/MS (Figure S4) except for ECG, suggested on the basis of the UV spectrum and its retention time in both chromatographic systems. Therefore, MSPD appears to be an adequate extraction technique for obtaining bioactive compounds from *C. oxyacantha*.

## Acknowledgements

This work was supported by the Xunta de Galicia, Spain under Grant GPC2014/035; and Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique (Algeria) for a pre-doctoral stay fellowship of one of the authors.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by the Xunta de Galicia, Spain [grant number GPC2014/035]; Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique (Algeria).

## References

- Barker SA. 2000. Matrix solid-phase dispersion. *J Chromatogr A*. 885:115–127.
- Chang Q, Zuo Y, Harrison F, Chow MS. 2002. Hawthorns: an overview of chemical, pharmacological and clinical studies. *J Clin Pharmacol*. 42:605–612.
- García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernández M, Nieto-Angel R. 2012. Flavonoids and antioxidant activity of flowers of Mexican *Crataegus* spp. *Nat Prod Res*. 27:834–836.
- Kostic DA, Velickovic JM, Mitic SS, Mitic MN, Randelovic SS. 2012. Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from SE Serbia. *Trop J Pharm Res*. 11:117–124.
- Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. 2012. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *Elburensis*. *Nat Prod Res*. 26:2353–2357.
- Tadić MV, Dobrić S, Marković MG, Đorđević MS, Arsić AI. 2008. Antiinflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agric Food Chem*. 56:7700–7709.