

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :59/DS/2019
Série :055/Ch/2019

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme du Doctorat en
sciences**

En chimie organique - Option Phytochimie.

Par

Abderrahmane MEZRAG

**L'étude phytochimique et biologique des métabolismes
secondaire de deux espèces de la famille des Fabaceae :**

***Ononis angustissima* Lam. Var et *Lotus corniculatus* L**

Devant le jury:

BOUMAZA Ouahiba	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine	Présidente
BOUHEROUM Mohamed	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine	Directeur de thèse
		Rapporteur
SEGHIRI Ramdane	Professeur, Université Frères Mentouri, Constantine	Examineur
ABDALLAH EL HADJ abdallah	M.C.A, Université Saad Dahlab, Blida	Examineur
LAIDI Maamar	M.C.A, Université Yahia Farés, Medea	Examineur
BELGHOBSI Mabrouk	M.C.A, Université Mohamed seddik Benyahya, Jijel	Examineur

Soutenu le 15 Avril 2019

Dédicace

Je dédie ce travail et ma profonde reconnaissance à mon cher papa et ma chère maman pour leurs sacrifices, leur soutien, leurs prières et leur présence à chaque instant tout au long de mes études. Que ce travail est le fruit de votre soutien et vos sacrifices ; merci maman, merci papa, sans vous je n'en serais pas a aujourd'hui

A

Ma chère Epouse Aissaoui meriem, fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie

À mes enfant youcef et anes, je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.

A mes chères sœurs et frère pour leur encouragement permanents, et leur soutien moral.

Ames toute mes amis, redoine ,labib, mohamed ,omar ,samira, sihem, hanane, fairouz pour leur soutien .

A la mémoire de mon amie fares, qui serait heureux de qui de constater ce succès, s'il était la

Remerciement

Mes remerciements sont d'abord à Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout.

Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, spécialité chimie organique, a été réalisé au sein de l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Sciences Exactes, Université des Frères Mentouri, Constantine 1, sous la direction du Professeur **Mohamed BOUHEROUM** Professeur au département de chimie à l'université des Frères Mentouri, Constantine 1, à qui je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour m'avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils précieux, ses efforts, et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail, et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de ces années de thèse de doctorat.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Fadila BENAYACHE** Professeur à l'Université des Frères Mentouri et Monsieur **Samir BENAYACHE** Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour leur écoute, disponibilité, encouragements, leur aide et conseils précieux.

Mes vifs remerciements vont également à Madame le Professeur **Ouahiba BOUMAZA** de l'université de Constantine 1 pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

J'aimerais également remercier vivement Monsieur le Professeur **SEGHIRI Ramdane** de l'université de Constantine 1, Monsieur le Docteur **ABDALLAH EL HADJ abdallah**, Maître de conférences A de l'université de Saad Dahlab Blida-1, Monsieur le Docteur **LAIDI Maamar**, Maître de conférences A de l'université Yahia Farès de Medea et Monsieur le Docteur **BELGHOBESSI Mabrouk**, Maître de conférences A de l'université de Mohamed seddik Benyahya, Jijel, pour avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat.

Mes sincères remerciements s'adressent à Madame le Professeur **De TOMMASI Nunziatina** pour leur accueil et leur aide précieuse durant mon stage dans leur laboratoire et pour l'enregistrement des spectres de RMN mono et bidimensionnelle et les spectres de masse à haute résolution, ainsi son équipe : **MALAFRONTI Nicola** et **VASSALLO Antonio** pour l'aide technique et scientifique.

Remerciement

J'exprime mes sincères remerciements à Mr. **LEÓN Francisco, BROUARD Ignacio** de l'Université de La Laguna Espagne, pour la réalisation des spectres RMN et des spectres de masse.

Je remercie tous mes collègues :Labib, Redouane, Omar, Mohamed, Ammar, Samira, Sihem , Majda , Fairouz et Khawla , je voudrais également remercier les ingénieurs de notre unité de recherche : monsieur **HAZMOUNE Hichem** et madame **TEBBOUB Naouel** pour pour la gentillesse ,leur aide et leur disponibilité.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Liste des Abréviations

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de la terminologie anglo-saxonne.

LC-MS :	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CC :	chromatographie liquide sur colonne
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CC :	Chromatographie sur colonne ouverte
CCE :	Chromatographie sur couche épaisse
SM :	Spectrométrie de masse
CLHP (HPLC) :	Chromatographie liquide haute performance
IR :	Infra-rouge
UV :	Ultra-violet
SMIE :	Spectrométrie de masse en mode impact électronique
ESI :	Ionisation par electrospray
EI :	Impact électronique
HE :	Huiles-essentiels
HR :	Haute résolution
DEPT :	Distorsionless enhancement by polarization transfer
δ (ppm) :	Déplacement chimique en partie par million
J (Hz) :	Constante de couplage exprimé en hertz
Cq :	Carbone quaternaire
R_f :	Facteur de retardement (retardation factor)
uma :	Unité de masse atomique
Da :	Dalton (unité de masse moléculaire)
m/z :	Masse/charge électrique
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice à 50%
DPPH• :	Radical 1,1-diphényl-2 picrylhydrazyl
AcOEt :	Acétate d'éthyle
EtOH :	Ethanol
MeOH :	Méthanol
CHCl₃ :	Chloroforme
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
CDCl₃ :	Chloroforme deutéré

Liste des Abréviations

CD₃OD :	Méthanol deutéré
<i>n</i>-BuOH :	Butanol
<i>s</i> :	Singulet
<i>sl</i> :	Singulet large
<i>d</i> :	Doublet
<i>dl</i> :	Doublet large
<i>dd</i> :	Doublet de doublets
<i>dt</i> :	Doublet de triplets
<i>t</i> :	Triplet
<i>td</i> :	Triplet de doublets
<i>m</i> :	Multiplet
Cq :	Carbone quaternaire
RMN ¹H :	Résonance magnétique nucléaire du proton
1D :	Monodimensionnelle
2D :	Bidimensionnelle
RMN ¹³C :	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C :	Température en degrés Celsius
cm :	Centimètre
eV :	Electron Volt
g :	Gramme
h :	Heure
Hz :	Hertz
kg :	Kilogramme
MHz :	Mégahertz
mg :	Milligramme
min :	Minute
ml :	Millilitre
m :	Mètre
nm :	Nanomètre
ppm :	Partie par million
µg :	Microgramme
λ_{max} :	Longueur d'onde d'absorption maximale

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Références bibliographiques.....	3

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. la famille des Fabaceae.....	4
I.1.1. Aspects générales et distribution.....	4
I.1.2. Caractères botaniques.....	4
I.1.3. Classification systématique de la famille	5
I.1.4. Importance économique.....	6
I.2. Aperçu bibliographique sur Le genre <i>Lotus</i>	7
I.2.1. Toxicité.....	7
I.2.2. Usage traditionnel.....	8
I.2.3. Caractère chimique du genre <i>Lotus</i>	8
I.2.3.1. Les flavonoïdes	8
I.2.3.2. Autres composés.....	11
I.3. Aperçu bibliographique sur Le genre <i>ononis</i>	15
I.3.1. Usage traditionnel et propriétés biologiques.....	16
I.3.2. Principaux métabolites secondaires des plantes du genre <i>ononis</i>	16
I.3.2.1. Les flavonoïdes	16
I.3.2.2. Autres composés.....	23
I.4. Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	33

Chapitre II : Etude des Saponosides et Flavonoïdes

II.1. Saponosides.....	37
II.1.1. Définition.....	37
II.1.2. Classification des saponosides.....	37

SOMMAIRE

II.1.2.1. Saponosides triterpénique.....	37
II.1.2.2. Saponosides stéroïdiques.....	40
II.1.3. Osés	41
II.1.4. Distribution des saponines	41
II.1.5. Biosynthèse des saponosides	42
II.1.6. Propriétés biologiques des saponosides	44
II.2. Les flavonoïdes.....	44
II.2.1. Généralité	44
II.2.2. Classification	45
II.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	46
II.2.4. Isoflavonoïdes	49
II.2.4.1 Distribution.....	50
II.2.4.2. Biosynthèse des isoflavonoïdes.....	50
II.2.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	51
Références bibliographiques.....	52

Chapitre III : Partie expérimentale

III.1. Etude phytochimique de l'espèce <i>Ononis angustissima</i>	55
III.1.1. Description et caractéristiques botanique de l'espèce <i>O. angustissima</i>	55
III.1.2. Place dans la systématique botanique.....	56
III.1.3. Protocole expérimental.....	56
III.1.3.1. La Récolte et Extraction du matériel végétal.....	56
III.1.3.2. Séparation et purification des composés de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	59
III.1.3.3. Séparation et purification des composants de l'excdat Chloroforme.....	62
III.2. Etude phytochimique de l'espèce <i>lotus corniculatus</i>	67
III.2.1. Description et caractéristiques botanique de l'espèce <i>lotus corniculatus</i>	67
III.2.2. Place dans la systématique botanique.....	67
III.2.3. Protocole expérimental.....	68

SOMMAIRE

III.2.3.1. La Récolte du matériel végétal.....	68
III.2.3.2. Extraction.....	68
III.2.3.3. Séparation et purification des composés de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	69
III.2.3.4. Séparation et purification des composants de l'exsudat Chloroforme.....	72
III.3. Le profil LC-MS.....	74
III.4. Appareillage et matériels.....	77
III.4.1. Chromatographie sur (CCM) et (CCE).....	77
III.4.2. Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	77
III.4.3. La chromatographie en phase liquide à haute performance CLHP.....	77
III.4.4. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS.....	77
Référence bibliographique.....	78

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV.1. Identification des produits d' <i>Ononis angustissima</i>	79
IV.1.1. Elucidation structurale du composé 1.....	79
IV.1.2. Elucidation structurale du composé 2.....	87
IV.1.3. Elucidation structurale du composé 3.....	95
IV.1.4. Elucidation structurale du composé 4.....	101
IV.1.5. Elucidation structurale du composé 5.....	110
IV.1.6. Elucidation structurale du composé 6.....	122
IV.1.7. Elucidation structurale du composé 7.....	131
IV.1.8. Elucidation structurale du composé 8.....	135
IV.1.9. Elucidation structurale du composé 9.....	141
IV.1.10. Elucidation structurale du composé 10.....	143
IV.1.11. Elucidation structurale du composé 11.....	151
IV.1.12. Elucidation structurale du composé 12.....	158
IV.1.13. Elucidation structurale du composé 13.....	161
IV.1.14. Elucidation structurale du composé 14.....	164

SOMMAIRE

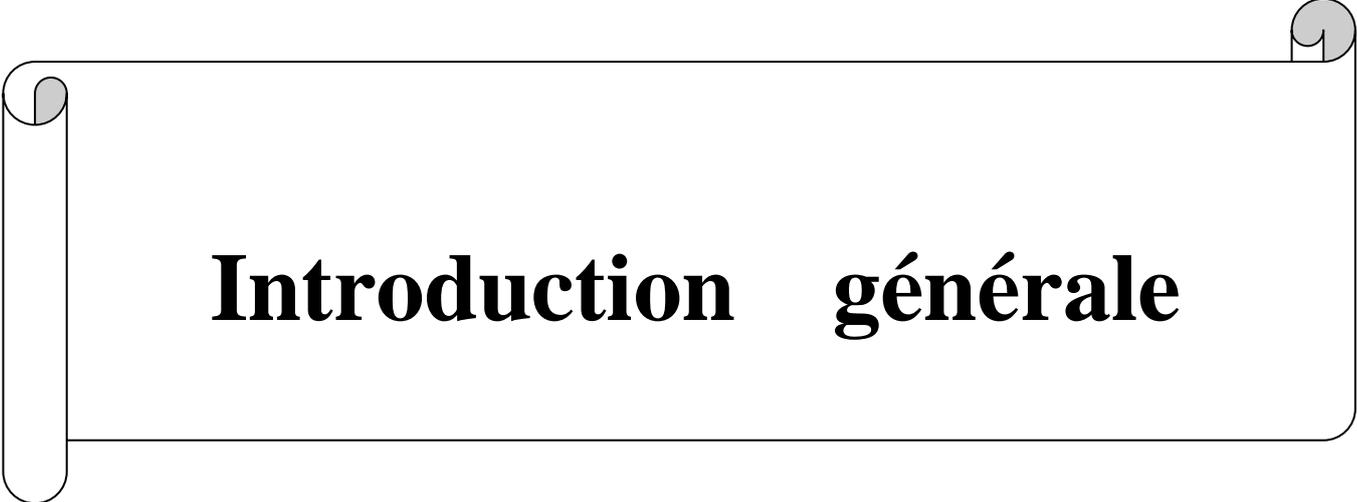
IV.1.15. Elucidation structurale du composé 15.....	169
IV.1.16. Elucidation structurale du composé 16.....	173
IV.1.17. Elucidation structurale du composé 17.....	174
IV.1.18. Elucidation structurale du composé 18.....	180
IV.1.19. Elucidation structurale du composé 19.....	185
IV.2. Identification des produits de <i>Lotus corniculatus</i>	188
IV.2.1. Elucidation structurale du composé 20.....	188
IV.2.2. Elucidation structurale du composé 21.....	190
IV.2.3. Elucidation structurale du composé 22.....	195
IV.2.4. Elucidation structurale du composé 23.....	199
IV.2.5. Elucidation structurale du composé 24.....	211
IV.2.6. Elucidation structurale du composé 25.....	217
IV.2.7. Elucidation structurale du composé 26.....	228
IV.2.8. Elucidation structurale du composé 27.....	230
IV.3. Conclusion.....	235
Référence bibliographique.....	236

Chapitre IV : Testes biologiques

V. Introduction	239
V.1. Évaluation de l'activité antioxydante	239
V.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH Mesure.....	239
V.1.2. Test de blanchissement du β -carotène.....	241
V.1.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	242
V.1.4. Dosage des phénols totaux	243
V.1.5. Résultats et discussion.....	243
V.2. Évaluation de l'activité antiproliférative	248
V.2.1. Activité des extraits et des composés d' <i>Ononis angustissima</i>	249
V.2.2. Résultats et discussion.....	250
V.2.3. Activité des extraits et des composés <i>lotus corniculatus</i>	251

SOMMAIRE

V.2.4. Résultats et discussion.....	251
V.4. Conclusion.....	252
Référence bibliographique.....	253
Conclusion générale.....	255
Résumé	

A decorative horizontal scroll graphic with rounded ends and a vertical strip on the left side, resembling a rolled-up document. The text is centered within the scroll.

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines, parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques.

Depuis l'aube des temps, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir à ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux. Au cours du temps, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du XX^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale.

Ce n'est qu'à la fin du 18^{ème} siècle que les médicaments s'inscrivent dans une logique scientifique. Dans un premier temps, on a découvert que les plantes renfermaient plusieurs constituants, la première substance médicinale pure dérivée des plantes était la morphine, qui a été extraite du pavot au début du 19^{ème} siècle [1].

Avec l'isolement des premiers principes actifs avec les progrès de la chimie aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles, l'histoire du rôle thérapeutique des plantes est aussi longue que l'histoire de l'humanité elle-même [2].

aujourd'hui, plus de 60% des médicaments sont soit des substances naturelles, soit des dérivés ou des analogues, soit encore des molécules synthétisées sur le modèle de substances naturelles. Les médicaments à base de plantes ont été la principale source de soins dans de nombreux pays où près de 80% de la population mondiale dépend toujours des médicaments à base de plantes pour leurs soins[3]. Comparaison de cette ressource des remèdes des extraits des plantes, un faible pourcentage (6%) a été étudié pour leurs activités biologiques[4].

L'Algérie, en raison de son climat diversifié (méditerranéen, semi-aride et saharien) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires, dont la plupart existe à l'état spontané. Cette flore compte environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques parmi lesquelles 15 % sont endémiques [5].

La famille Fabaceae est l'une des plus importantes familles de plantes supérieures [6]. Les plantes de cette famille sont riches en métabolites secondaires comme les alcaloïdes [7-9], saponosides [10,11] et flavonoïdes particulièrement les isoflavonoïdes qui sont une branche très limitée dans le règne végétal, caractérisant seulement la sous-famille Papilionoideae appartenant à la famille Fabaceae [12, 13]. De plus, les plantes de cette famille possèdent des activités biologiques intéressantes telles que: antidiarrhéique,

Introduction générale

estrogénique et/ou anti-estrogénique, anti-oxydante et antimicrobienne, un effet préventif dans le cas des cancers du sein et de la prostate, ainsi que dans celui du colorectal et aussi elles ont des propriétés insecticides [14-17].

S'insérant dans le cadre du programme de recherche de notre unité sur les plantes médicinales algériennes, ce travail de thèse consiste à renforcer la connaissance phytochimique et biologique de deux espèces appartenant à la famille des Fabaceae et mettre en évidence des traceurs spécifiques pour chacune et une possibilité d'utilisation de leurs extraits ultérieurement dans l'industrie.

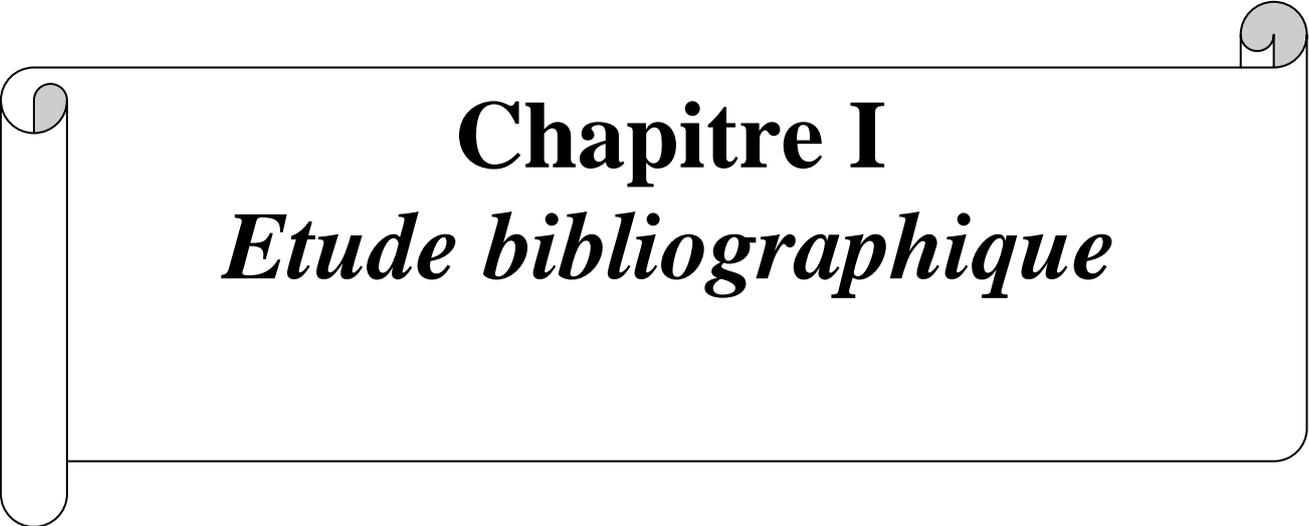
Cette thèse de doctorat sera divisée en cinq grands chapitres :

- Le premier chapitre de cette thèse concerne tout d'abord l'étude bibliographique des plantes objet de notre recherche. Cette étude commence par une synthèse bibliographique relative au famille et genres des plantes étudiées à savoir l'étude botanique, les travaux phytochimiques antérieurs reportant ses métabolites secondaires les plus courants ainsi que l'activité biologique.
- Le deuxième chapitre renferme les connaissances bibliographiques disponibles pour quelques classes de métabolites secondaires notamment les saponosides et les flavonoïdes qui sont des marqueurs chimiotaxonomique pour les genres *Ononis* et *Lotus*.
- Le troisième chapitre qui se débute par le positionnement des deux espèces *Ononis angustissima* et *Lotus corniculatus* dans la systématique des Fabaceae suivie par la présentation de nos travaux personnels sur les deux espèces, nous détaillerons toutes les procédures relatives à la macération, le fractionnement, la séparation et la purification et la purification des composés isolés par l'utilisation des différentes méthodes chromatographique (CC, CCM, CLHP).
- Dans le quatrième chapitre, nous décrivons les résultats obtenus et les élucidations structurales des composés isolés. en utilisant les expériences de résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnelle, ainsi que l'utilisation de la spectrométrie de masse et de la spectrophotométrie UV-visible.
- Dans le dernier chapitre nous présenterons les résultats des tests biologiques sur les extraits de ces espèces. Nous finissons le tout par une conclusion générale à travers laquelle nous essayons de faire le point sur les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives que ce travail a permis d'entrevoir.

Introduction générale

Références bibliographiques

- [1] **Simmonds M.S.J.**, 2003. Novel drugs from botanical sources. *Drug Discovery Today*. 8, 721-722.
- [2] **Quentin-Leclerc J.** 2002. Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal De Pharmacie De Belgique*. 57, 11-20.
- [3] **Tiwari S.** 2008. Plants: A rich source of herbal medicine, *Journal of Natural Products* 1, 27-35.
- [4] **Verpoorte R.** 2002. La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^{ème} congrès européen d'ethnopharmacologie IRD Edition, Paris.
- [5] **Quezel P.**, Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [6] **Wojciechowski M. F.**, Lavin M., Sanderson M. J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported sub clades with in the family. *Am J Bot.* 11, 1846-2004.
- [7] **Fdil R.**, El Hamdani N., El Kihel A., Sraidi K., 2012. Distribution of alkaloids in the aerial parts of *Retamamonosperma*(L.) Boiss. in Morocco. *Ann Toxicol Anal.*24(3), 139-143.
- [8] **Wink M.** 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64, 3-19.
- [9] **Greinwald R.**, Bachmann P., Witte L., Czygan F.C., 1992. The alkaloids of *Hesperolaburnum platycarpum* (Fabaceae: Genisteae): Chemotaxonomic implications. *Biochem Syst Ecol.* 20(6), 583-588.
- [10] **Negri G.**, Tabach, R., 2013. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandr dulcis* roots. *Rev Bras Farmacogn.* 23, 851-860.
- [11] **Anam E. M.**, 2003. Triterpenoid saponins from *Abrus precatorius* (Fabaceae). *Ind J Chem.* 42, 386-389.
- [12] **Bruneton J.**, 1999. Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales. Ed° TEC & DOC, 3^{ème} édition, Paris, 347-351.
- [13] **Botta B.**, Menendez, P., Zappia G., Lima, R. A., Torge R., Monachea G. D., 2009. Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. *An update (1995-2006)*. *Curr, Med, Chem.* 16(26), 3414-3468.
- [14] **Harbone J. B.**, 1994. The flavonoids: Advances in research since 1986. Ed Chapman & Hall, London.
- [15] **Ahmadu A.**, Zezi A. U., Yaro A. H., 2007. Anti-diarrheal activity of the leaf extracts of *Daniellia oliveri* hutch and dalz [Fabaceae] and *Ficus sycomorus* miq [Moraceae]. *Afr J Tradit Compliment Altern Med.* 4, 524-528.
- [16] **Wang Y.**, Gho W. M., Chan F. L., Chen S., Leung L. K., 2008. The redclover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibit saromatase activity and expression. *Brit J Nutr.* 99, 303-310.
- [17] **Redko F.**, Clavin M. L., Weber D., Ranea F., Anke T., Martino V., 2007. Antimicrobial isoflavonoids from *Erythrinacristagalli* infected with *Phomopsis* sp. *ZNaturforsch C.* 62, 164-168.

A decorative horizontal scroll graphic with rounded ends and a vertical tail on the left side. The scroll is white with a thin black border and contains the chapter title.

Chapitre I
Etude bibliographique

I.1. La familles des Fabaceae

I.1.1. Aspects générales et distribution

Appelées également légumineuses, les Fabaceae sont une très vaste famille de plantes herbacées [1]. Originaires d'Afrique, de Chine, d'Indonésie, d'Europe, d'Amérique du Sud et cultivées depuis plus de 6000 an, les Fabaceae représentent une part importante de l'alimentation de l'humanité. Gaston Bonnier écrivait en 1905 dans son cours de botanique : «La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones c'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.» [2]. Cette famille inclut plus de 730 genres et 19400 espèces, Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées [3]. Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme [2].



Figure I.1 : Répartition géographique mondiale des Fabaceae

I.1.2. Caractères botaniques

Les plantes de la famille Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique.

Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote [3]. Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou

trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin).

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les Fabacées les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une réduction du nombre d'étamines à 10 et la fleur devient zygomorphe. La préfloraison est imbriquée 2, descendante ou vexillaire³. Toutes les Fabacées possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations. Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscente), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres. Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, ex albuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja),

I.1.3. Classification systématique de la famille

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques. Quatre sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabacées : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae, les Bauhinioïdes et les Faboideae (= Papilionoideae). Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Dans la plupart des classifications, ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme

synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN). [4,5] La position systématique des Fabaceae est présentée dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique [6,7,8,9] .

	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APGIII (2009)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytæ	Spermatophyta
Sous- embranchement	Angiospermae	-	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae
Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Eurosidae I (= Fabidées)
Sous-Ordre	Leguminosineae	-	Fabineae	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae =Papilionaceae Mimosaceae Caesalpiniaceae	Fabaceae	Fabaceae (= Leguminosae)
Sous- Famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae		Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae Swartzioideae	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae Bauhinioides

I.1.4. Importance économique

Les Fabacées, et plus particulièrement la sous-famille des Faboideae, ne seraient dépassées que par les Poaceae dans un classement des familles par importance économique. De nombreuses plantes alimentaires, mais aussi des plantes fourragères, ornementales ou encore médicinales de premier ordre appartiennent à cette sous-famille. Il est néanmoins important de noter que de nombreux genres sont hautement toxiques [11,12], [4,5].

Une grande quantité de graines et de cosses de diverses espèces herbacées de Faboideae, communément appelées légumineuses ou légumes secs, sont une source alimentaire universelle autant humaine qu'animale. Ces plantes alimentaires de grande consommation comprennent entre autres *Arachis hypogaea* L. (l'arachide ou cacahuète), *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (le pois d'Angole), *Cicer arietinum* L. (le pois chiche), *Dolichos lablab* L. (le pois indien), *Glycine max* Merr. (le soja), *Glycyrrhiza glabra* L. (la réglisse), *Lens* (les lentilles), *Phaseolus* (les haricots), *Pisum* (les pois) et *Vicia* (les fèves). Ces espèces sont cultivées dans le monde entier. Elles sont recherchées pour leur haute teneur en protéines et en minéraux.

Certains genres font l'objet d'un usage ornemental. Les plus connus étant *Cytisus* (les gènes), *Laburnum anagyroides* Medik. (La pluie d'or ou Cytise à grappes), *Lathyrus* (les gesses),

Lupinus (les lupins), *Wisteria* (les glycines) et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes, *Genista tinctoria* L. ou genêt des teinturiers, de même que certaines espèces d'*Indigofera* dont est tirée la teinture d'indigo [11], [5].

De nombreuses plantes Faboideae ont joué un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique, notamment comme source de matière première à l'image de la lécithine de *Glycine max* Merr., présente dans toutes les cellules vivantes et qui est un constituant important des cellules nerveuses et cérébrales. Plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses plantes Faboideae. On citera la spartéine, cet alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolé de *Cytisus scoparius* (L.) Link ou la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolé de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigma venenosum* Balf. Cette dernière qui est un inhibiteur réversible des cholinestérases, est utilisée comme antidote lors de l'intoxication par les parasympholytiques. Elle est aussi testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [12]

I.2. Aperçu bibliographique sur le genre *Lotus*

Le genre *Lotus*, avec 120-130 espèces, est le plus grand genre de la tribu Loteae [13].

Il est largement distribué autour de la Méditerranée. Ce genre comprend des plantes annuelles et vivaces avec une racine pivotante ramifiée forte Il est représenté en Algérie par 15 espèces : *Lotus conimbricensis* Brot, *L. glinoides* Del, *L. edulis* L, *L. drepanacarpus* Dur, *L. ornithopodioides* L, *L. roudairei* Bonnet, *L. jolyi* Batt, *L. creticus* L, *L. pedunculatus* Cav, *L. palustris* Willd, *L. corniculatus* L, *L. parviflorus* Desf, *L. hispidus* Desf, *L. pusillus* Medik, et *Lotus angustissimus* L [14].

Il possède les caractères suivants :

- Calice à 5 dents presque égales ou à 2 lèvres, ovaire multi ovulé, gousse linéaire Déhiscente non ailée sur les sutures.
- Feuilles trifoliées et stipulées.
- Fleurs jaunes, blanchâtres ou rosées.

I.2.1. Toxicité

Les espèces *Lotus jolyi* Batt et *L. arabicus* L. (vesce d'égypte) sont toxiques pour les animaux (chevaux, moutons, chèvres, dromadaires). Plusieurs cas d'intoxication de bétail par *Lotus jolyi* ont été observés au Maroc. Les symptômes de l'intoxication sont les suivants météorismes, inappétence, immobilité de l'animal [15].

I.2.2. Usage traditionnel

Les espèces appartenant au genre *Lotus* ne sont pas très utilisées en médecine Traditionnelle si l'on se réfère à la littérature.

L'espèce *Lotus jolyi* Batt est utilisée, en cataplasmes, avec de l'ail haché et de l'huile d'olive, pour faire pousser les cheveux. Cependant, en phytothérapie, il est connu que *Lotus corniculatus* est un antidépresseur naturel qui agit également sur l'hypertension artérielle et certaines de ses conséquences. Il agit aussi sur la production par le coeur d'une hormone qui augmente la pression artérielle [16].

I.2.3. Caractère chimique du genre *Lotus*

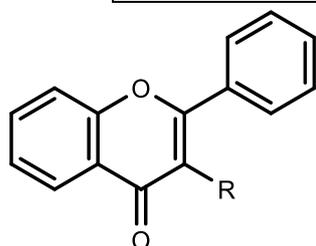
I.2.3.1. Les flavonoïdes

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *lotus*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires, Les flavonoïdes sont des composés largement répandus dans le genre *lotus*

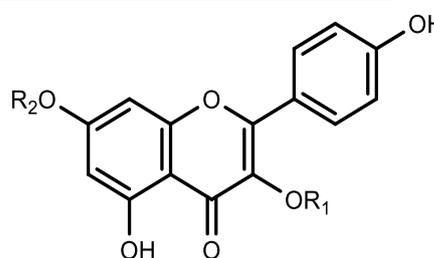
L'ensemble des flavonoïdes isolés du genre *lotus* est rassemblé dans le tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *lotus*

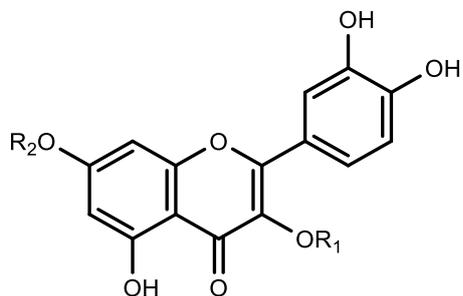
Espèces	Structure	Référence
<i>L. tenuis</i>	<u>1</u> , <u>2</u> , <u>3</u> , <u>4</u> , <u>5</u> , <u>6</u> , <u>7</u>	[16]
<i>L. corniculatus</i>	<u>8</u> , <u>9</u> , <u>10</u> , <u>11</u> , <u>12</u> , <u>13</u> , <u>14</u> , <u>15</u>	[18, 19]
<i>L. creticus</i>	<u>16</u> , <u>17</u> , <u>18</u> , <u>19</u>	[26] [17]
<i>L. polyphyllus</i>	<u>20</u> , <u>21</u> , <u>22</u> , <u>23</u> , <u>24</u> , <u>25</u> , <u>26</u> , <u>27</u> , <u>28</u> , <u>29</u> , <u>30</u> , <u>31</u> , <u>32</u> , <u>33</u>	[20]
<i>L. hispidus</i>	<u>34</u> , <u>35</u> , <u>36</u>	[21]
<i>L. pusillus</i>	<u>19</u>	[22]



1 R=H
2 R=OH



3 R1=H, R2= Glu
4 R1 = Glu, R2= H
5 R1= Rha, R2= Rha
6 R1= H, R2= Rha
7 R1= Glu, R2= Rha



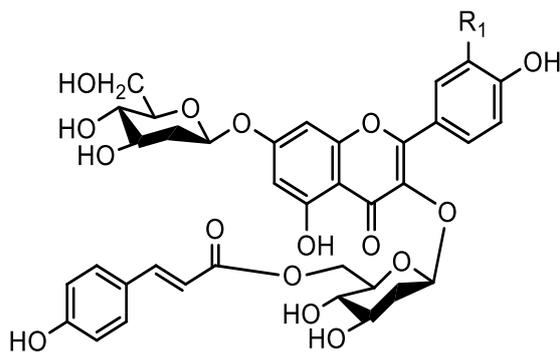
8 $R_1=H, R_2=Rha$

9 $R_1=Rha, R_2=H$

10 $R_1=Gal, R_2=H$

11 $R_1=Rha, R_2=Glu$

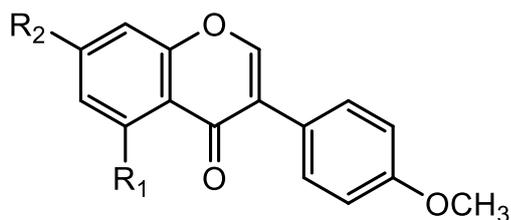
12 $R_1=Rha, R_2=Rha$



13 $R_1=H$

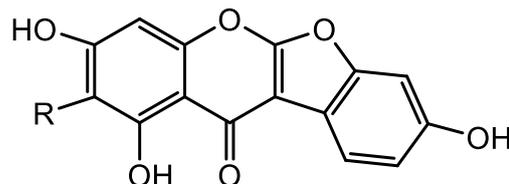
14 $R_1=OH$

15 $R_1=OCH_3$



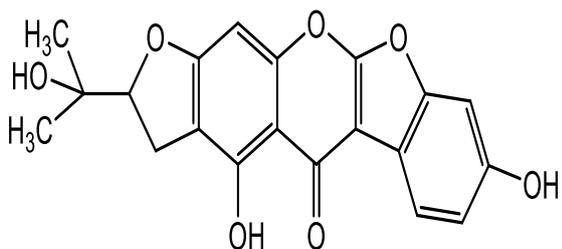
16 $R_1=H, R_2=OH$

17 $R_1=OH, R_2=OH$

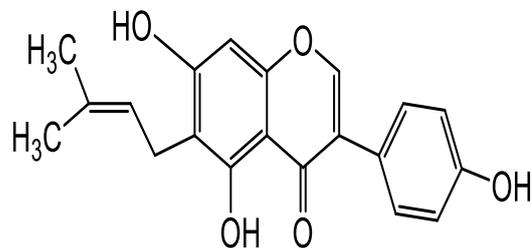


18 $R=H$

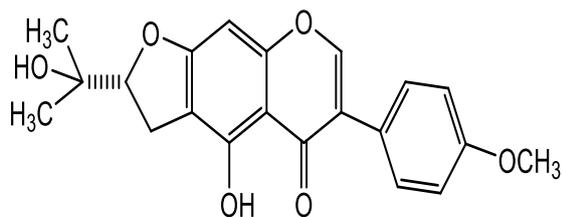
19 $R_1=(CH_3)_2C=CH-CH_2-$



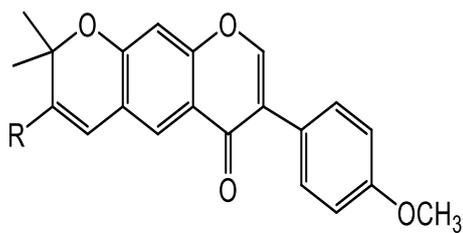
20



21

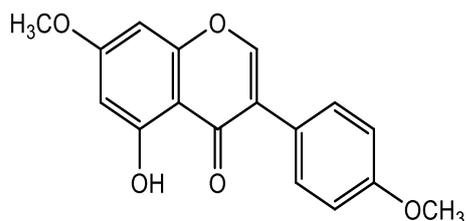


22

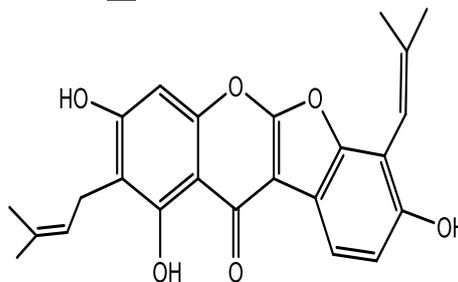


23 R=OH

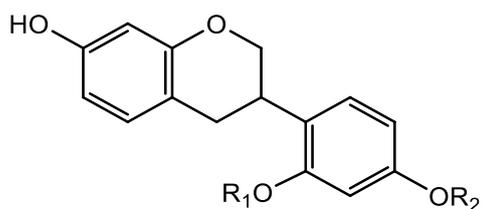
24 R=H)



25



26

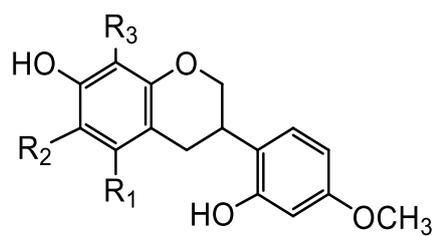


27 R₁=H, R₂=H

28 R₁=OH, R₂=OCH₃

29 R₁=R₂=OCH₃

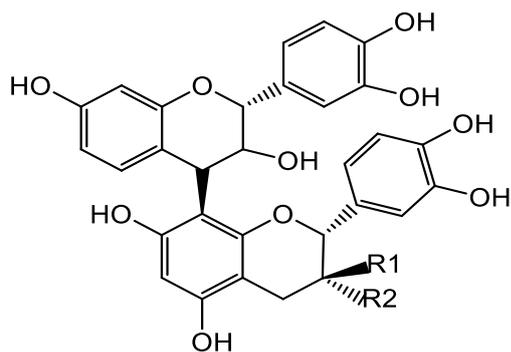
30 R₁=OCH₃, R₂=H



31 R₁=OCH₃, R₂=R₃=H

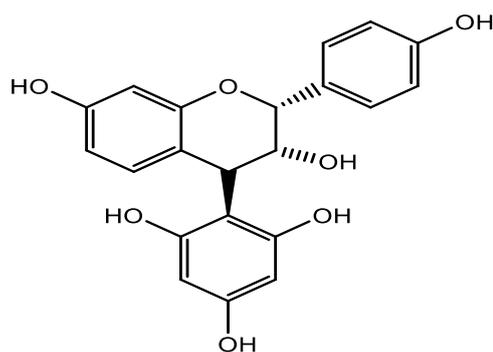
32 R₁=R₃=H, R₂=OCH₃

33 R₁=R₂=H, R₃=OCH₃



34 R₁=OH, R₂=H

35 R₁=H, R₂=OH



36

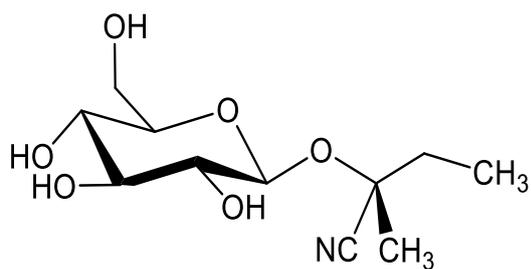
- 1 Flavone
- 2 Flavonole
- 3 Kæmpférol-7-*O*- β - glucoside
- 4 Kæmpférol-3-*O*- β - glucoside
- 5 Kæmpférol -3,7-di-*O*- α - rhamnoside
- 6 Kæmpférol -3,7-di-*O*- α - rhamno glucoside
- 7 Kæmpférol -7-*O*- α - rhamnoside
- 8 Quercétin-7-*O*- α -rhamnoside
- 9 Quercétin-3-*O*- α -rhamnoside
- 10 Quercétin-3-*O*- β -galactoside
- 11 Quercétin-3,7-di-*O*- α - rhamnoglucoside
- 12 Quercétin-3,7-di-*O*- α - rhamnoside
- 13 Kæmpférol-3-*O*- β -(6"-*O*-*E-p*-coumarylglucoside)-7-*O*- β - glucoside
- 14 Quercétin -3-*O*- β -(6"-*O*-*E-p*-coumarylglucoside)-7-*O*- β - glucoside
- 15 Isorhamnétine -3-*O*- β -(6"-*O*-*E-p*-coumarylglucoside)-7-*O*- β - glucoside
- 16 Formononétine
- 17 Biochanine A
- 18 Lupinalbine A
- 19 Lupinalbine B
- 20 Lupinalbine C
- 21 Wightéone-4"-Méthyléthere
- 22 4'-*O*-méthylerythrine C
- 23 4'-*O*-méthyl-2"-hydroxydihydroalpinumisoflavone
- 24 4'-*O*-méthylalpinumisoflavone
- 25 4',7- diméthoxy-5-hydroxyisoflavone
- 26 Lupinalbine F
- 27 deméthylvestitol (7, 2',4'- trihydroxyisoflavane
- 28 vestitol (7,2'-dihydroxy-4'- méthoxyisoflavane
- 29 sativane (7-hydroxy-2',4'- diméthoxyisoflavane
- 30 isovestitol (7, 4'dihydroxy-2'- méthoxyisoflavane
- 31 5-méthoxyvestitole
- 32 6-méthoxyvestitole
- 33 8-méthoxyvestitole
- 34 Epicatéchine-(4 β →8)-catéchine
- 35 Epicatéchine-(4 β →8)-épicatechine
- 36 Epicatéchine-(4 β →2)-phloroglucinole

I.2.3.2. Autres composés

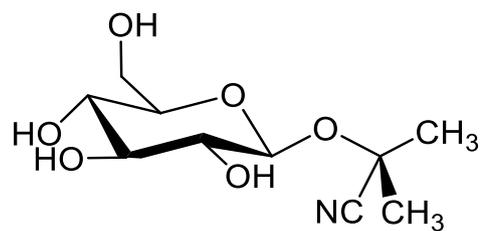
D'autres types de composés ont été isolés et identifiés dans le genre *lotus*. Un certain nombre est cité dans le tableau I.3 ci-dessous.

Tableau I.3 : Divers composés isolés du genre *lotus*

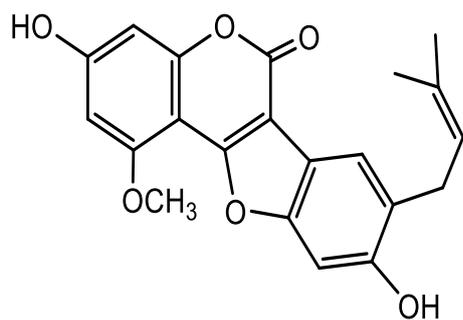
Espèces	Structure	Référence
<i>L. tenuis</i>	<u>41</u> , <u>42</u> , <u>43</u> , <u>44</u> , <u>45</u>	[23]
<i>L. garcinii</i>	<u>46</u> , <u>52</u> , <u>53</u>	[24]
<i>L. lalambensis</i>	<u>47</u> , <u>48</u> , <u>49</u> , <u>50</u> , <u>51</u>	[25]
<i>L. creticus</i>	<u>37</u> , <u>38</u> , <u>39</u> , <u>40</u>	[26]
<i>L. pusillus</i>	<u>54</u> , <u>55</u> , <u>56</u> , <u>57</u> , <u>58</u> , <u>59</u> , <u>60</u> , <u>61</u>	[22]



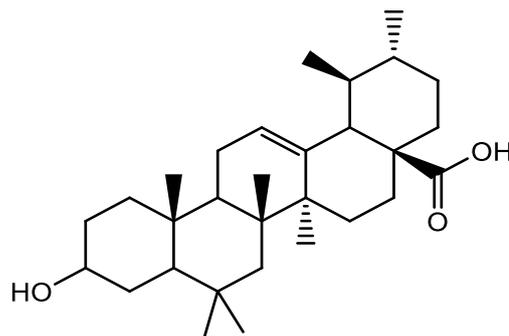
37



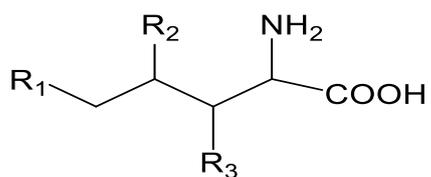
38



39



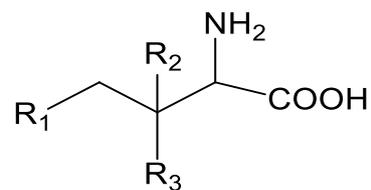
40



41 R₁= NH₂, R₂= R₃=H

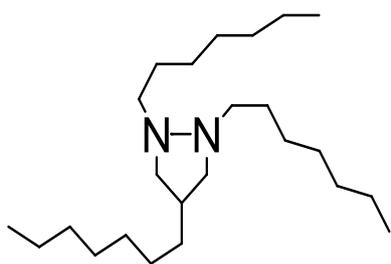
42 R₁= R₂=H, R₃= NH₂

43 R₁= R₃=H, R₂= NH₂

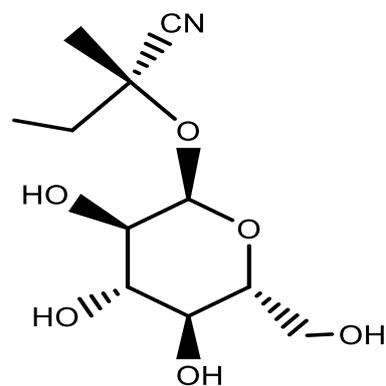


44 R₁= H, R₂= Me, R₃= NH₂

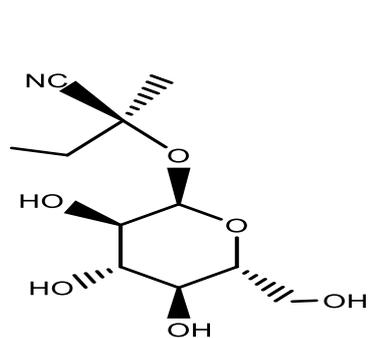
45 R₁= NH₂, R₂= H, R₃= M



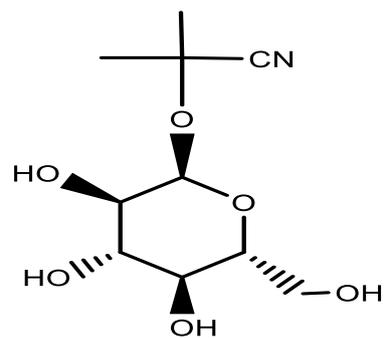
46



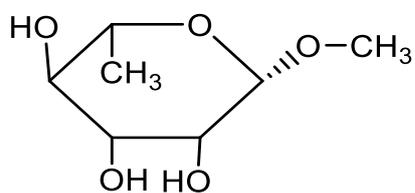
47



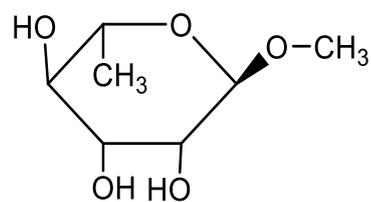
48



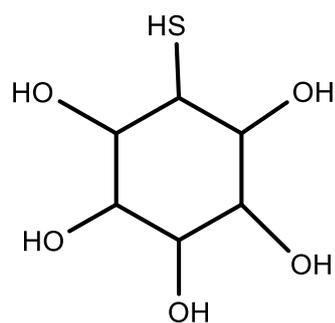
49



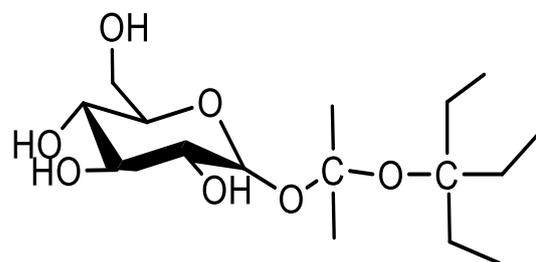
50



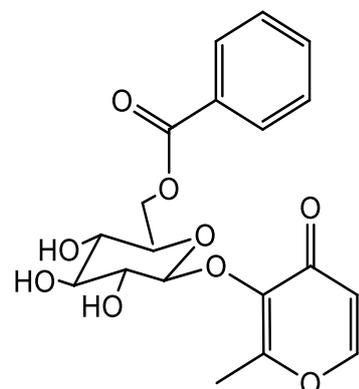
51



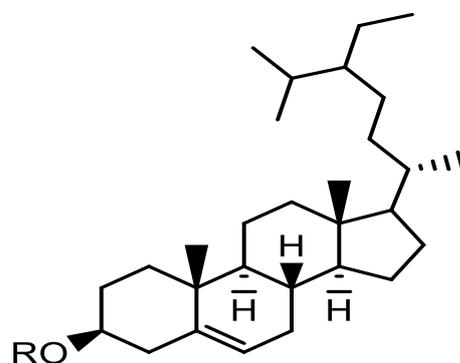
52



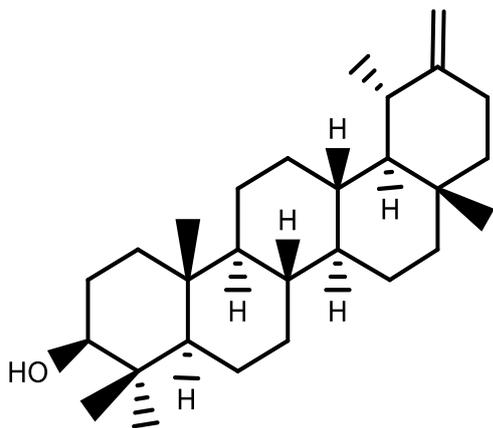
53



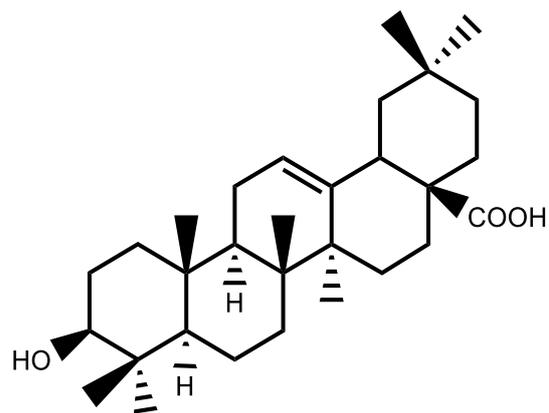
54



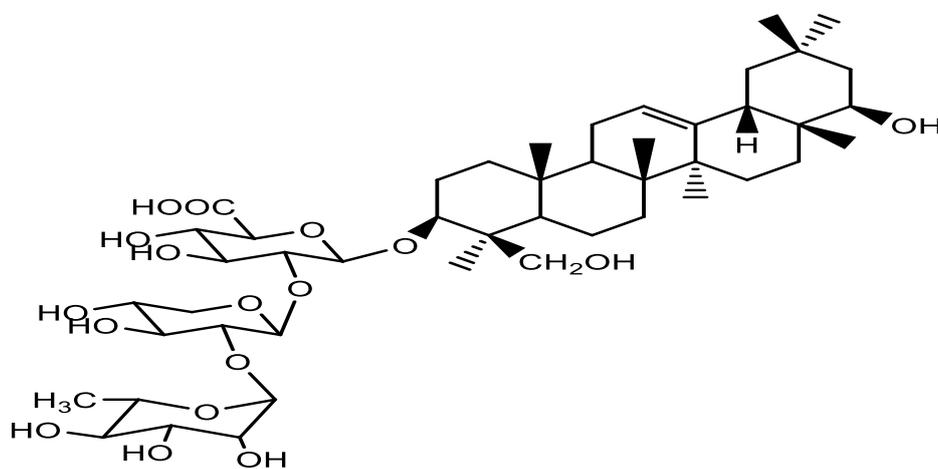
55 R= H
56 R=Glu



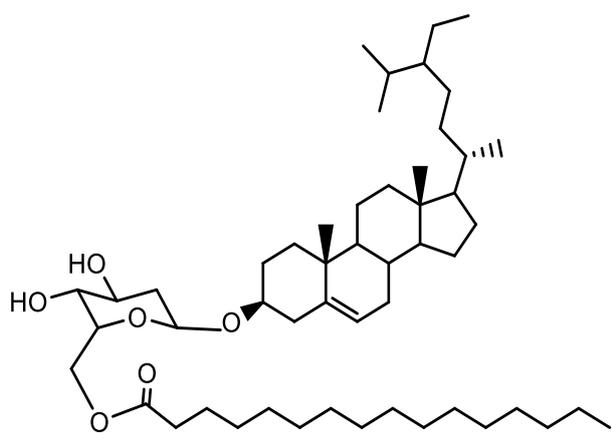
57



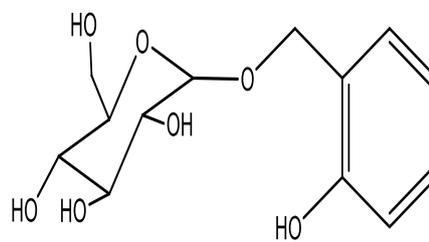
58



59



60



61

- 37 Lotaustralin
38 Linamarine
39 8-(γ,γ -dimethyl-allyl)-1-Methoxycoumestrol
40 L'acide ursolique
41 L'acide 2,5-diaminopentanoique
42 L'acide 2,3-diaminopentanoique
43 L'acide 2,4-diaminopentanoique
44 L'acide 2,3-diamino-3-methylbutanoique
45 L'acide 2,4-diamino-3-methylbutanoique
46 Garcienne
47 Epilotaustraline
48 Lotaustraline
49 Linamarine
50 méthyl- α et β -L-rhamnopyranoside
51 méthyl- α et β -L-rhamnopyranoside
52 Garthiole
53 Garoside
54 maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside
55 β -sitosteroles (R= H)
56 Daucostérol (R=Glu)
57 taraxastérol
58 Acide oléanolique
59 Astragaloside VIII
60 β -sitostérol 3- β -D-glucopyranoside-6-*O*-palmitate
61 2-hydroxybenzyle- β -D-glucopyranoside

I.3. Aperçu bibliographique sur le genre *ononis*

Le genre *Ononis* appartient à la tribu des trifolieae qui constitue une des 31 tribus relevant de la sous-famille Papilionoideae. Ce genre qui compte environ 75 espèces, est largement distribué dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale [27]. En Algérie, on rencontre principalement les espèces suivantes [14] relevant de ce genre.

<i>O. cenisia</i> (L.)	<i>O. sicula</i> (Guss.)	<i>O. alba</i> (Poiret.)
<i>O. crinita</i> (Pomel.)	<i>O. rosea</i> (Dur.)	<i>O. villosissima</i> (Desf.)
<i>O. serrata</i> (Forsk.)	<i>O. hirta</i> (Desf.)	<i>O. avellana</i> (Pomel.)
<i>O. mitissima</i> (L.)	<i>O. cephalantha</i> (Pomel.)	<i>O. diffusa</i> (Ten.)
<i>O. cossoniana</i> (Boiss.)	<i>O. antennata</i> (Pomel.)	<i>O. alopecuroides</i> (L.)
<i>O. pubescens</i> (L.)	<i>O. ornithopodioides</i> (L.)	<i>O. fruticosa</i> (L.)
<i>O. viscosa</i> (L.)	<i>O. incisa</i> (Coss.)	<i>O. natrix</i> (L.)
<i>O. serotina</i> (Pomel.)	<i>O. laxiflora</i> (Desf.)	<i>O. angustissima</i> (L.)
<i>O. reclinata</i> (L.)	<i>O. minutissima</i> (L.)	<i>O. pendula</i>
<i>O. aragonensis</i> (Asso.)	<i>O. euphrasiaefolia</i> (Desf.)	<i>O. biflora</i> (Desf.)
<i>O. hispida</i> (Desf.)	<i>O. spinosa</i> (L.)	<i>O. variegata</i> (L.)

I.3.1. Usage traditionnel et propriétés biologiques

La recherche bibliographique menée sur les espèces du genre *Ononis* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes et sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies comme le traitement de l'ictère, les troubles des voies urinaires.

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique : L'herpès et les maladies de la peau [15,28 ,29].

- *Ononis arvensis* : Ses parties aériennes sont utilisées pour traiter les infections des voies urinaires et les maladies de la peau [30].
- *Ononis hirta* : les parties aériennes de la plante sont employées pour traiter les boutons de fièvre, l'herpès et le cancer de la peau [29].
- *Ononis natrix* : les racines et les fleurs sous forme d'infusion, sont utilisées pour le traitement de certains troubles de l'appareil urinaire [15].
- *Ononis sicula* : les parties aériennes de cette espèce sont utilisées contre les cancers de la peau [29].
- *Ononis spinosa* : cette plante est connue depuis longtemps pour son action diurétique. La racine est efficace contre la goutte et diverses affections de l'appareil urinaire et prévient la formation de calculs rénaux et biliaires [31].

I.3.2. Principaux métabolites secondaires des plantes du genre *ononis*

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Ononis* ont mis en évidence la présence de flavonoïdes et isoflavonoïdes [28,32 ,33 ,34], de dérivés du résorcinol [33,35] et de l'acide anthranilique [31,36,37] , isocoumarines et dihydroisocoumarines [28,37,38,39] , ptérocarpanes [32,40], stéroïdes, triterpénoïdes [41] et de lactones aromatiques [42].

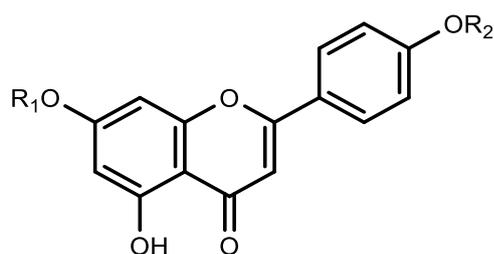
Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples de produits isolés à partir des plantes

I.3.2.1. Les flavonoïdes

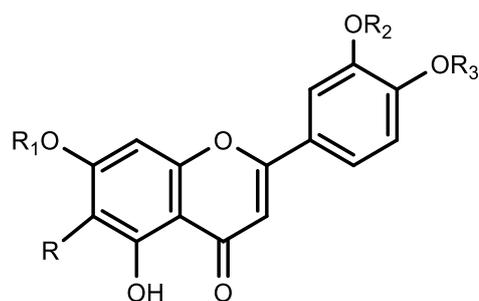
Tableau I.4. : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Ononis*

Espèces	Structure	Référence
<i>o.natrix ssp ramosissima</i>	<u>62</u> , <u>67</u> , <u>69</u> , <u>71</u> , <u>84</u> , <u>85</u> , <u>86</u> , <u>87</u> , <u>88</u> , <u>93</u> , <u>94</u> , <u>101</u> , <u>102</u> , <u>103</u> , <u>104</u> , <u>105</u> , <u>106</u> , <u>107</u> , <u>108</u> , <u>109</u> , <u>110</u> , <u>111</u> , <u>112</u> , <u>113</u> , <u>118</u> , <u>121</u> , <u>122</u> , <u>123</u>	[43] [32]
<i>o.natrix ssp hispanica</i>	<u>84</u>	[36]
<i>o.fruticosa</i>	<u>62</u> , <u>63</u> , <u>64</u> , <u>65</u> , <u>66</u> , <u>69</u> , <u>79</u> , <u>80</u> , <u>81</u> , <u>82</u>	[43]

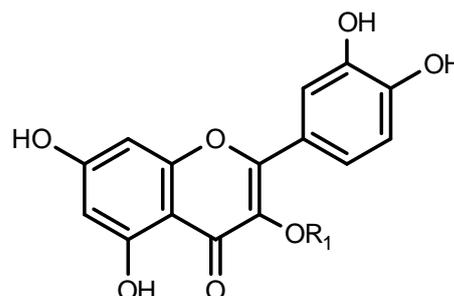
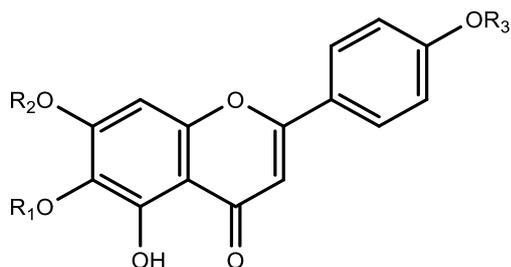
<i>o.natrix ssp natrix</i>	<u>87, 88, 89</u>	[44]
<i>o.natrix(2coll)</i>	<u>62, 63, 66, 67, 68, 69,72, 77, 84, 92</u>	[43]
<i>o.ronindifolia</i>	<u>62, 63, 64, 72, 77, 79, 80,</u>	[43]
<i>o.sicula</i>	<u>62, 77, 78, 81, 83</u>	[43]
<i>o.spinosa</i>	<u>62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 72, 73, 77, 81</u>	[43]
<i>o.tridentate</i>	<u>66, 67, 68, 69, 71, 72, 74, 78, 80</u>	[43]
<i>o.vaginalis</i>	<u>62, 70, 75, 78, 90</u>	[45]
	<u>129,130</u>	[46]
	<u>131</u>	[47]
	<u>119, 121, 122, 132, 133, 134, 135, 136</u>	[48]
	<u>137, 138</u>	[49]
<i>o.angusstissima</i>	<u>90,95, 96, 97,</u>	[53]
	<u>91, 98, 100, 115</u>	[51]
	<u>98, 99, 114 ,115</u>	[52]
	<u>116, 117, 118, 119, 120, 121,</u>	[54]
<i>o.viscosa ssp Breviflora</i>	<u>121, 122, 126, 127, 128</u>	[40]
	<u>124, 125</u>	[37]



- 62 R₁= H, R₂= H
63 R₁= CH₃, R₂= H
64 R₁= H, R₂= CH₃
65 R₁= CH₃, R₂= CH₃



- 66 R= H, R₁= H, R₂= H, R₃= H
67 R= H, R₁=H, R₂= CH₃, R₃= H
68 R= H, R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=CH₃
69 R= H, R₁= CH₃,R₂=H,R₃= H
70 R= H, R₁= H, R₂=R₃= CH₃
71 R₁= H, R₂= H, R₃= H, R₄= CH₃
72 R= OCH₃, R₁=H, R₂= CH₃, R₃= H
73 R= H, R₁= R₂=R₃= CH₃
74 R= OCH₃, R₁= CH₃, R₂= CH₃, R₃= H
75 R= OCH₃, R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CH₃
76 R= OCH₃, R₁= CH₃ ,R₂= CH₃ ,R₃= H



77 R₁=H, R₂=H, R₃=CH₃

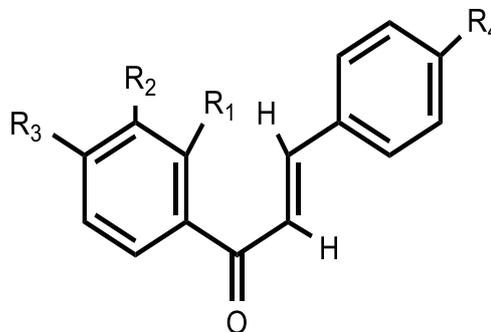
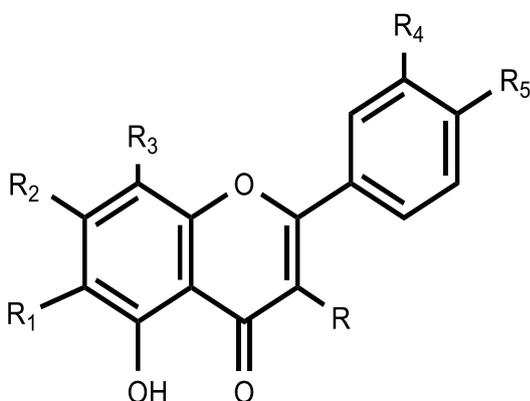
78 R₁=CH₃, R₂=H, R₃=CH₃

79 R₁=H, R₂=CH₃, R₃=CH₃

80 R₁=CH₃, R₂=CH₃, R₃=CH₃

81 R₁= H

82 R₁=Glu



83 R= R₁, R₂= OCH₃, R₃= R₄=H, R₅= OH

84 R=H, R₁= R₃= R₅= OCH₃, R₂=OH, R₄=H

85 R=H, R₁= R₂= R₃= OCH₃, R₄=R₅= OH

86 R=H, R₁= OCH₃, R₂= R₄=OH, R₃=R₅= OCH₃

87 R=H, R₁= R₃=R₄=R₅= OCH₃, R₂= H,

88 R=H, R₁= R₂= R₃=OCH₃, R₄=H, R₅= OH

89 R=H, R₁=, R₂=R₃= R₅= OCH₃, R₄=H

90 R=H, R₁= H, R₂= OH, R₃= H, R₄=H, R₅= H

91 R=H, R₁= OH, R₂= OH, R₃= H, R₄=H, R₅= H

92 R=H, R₁= OCH₃, R₂= OH, R₃=OCH₃, R₄=OH, R₅= H

93 R=H, R₁= R₂= R₃= OCH₃, R₄=H, R₅= OH

94 R=H, R₁= H, R₂= OH, R₃= H, R₄=H, R₅= H

95 R=H, R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃=H, R₄=H, R₅= OH

96 R=H, R₁= OH, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄=H, R₅= H

97 R=H, R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃=OCH₃, R₄=H, R₅= H

98 R₁= OH, R₂= H, R₃= OH

99 R₁= OH, R₂= H, R₃= H

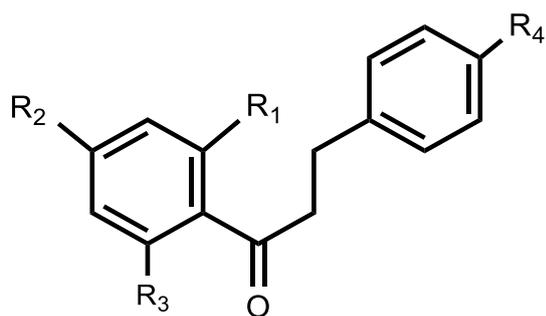
100 R₁= R₂= R₃= OH

101 R₁= R₂= R₃= H

102 R₁= OH, R₂= H, R₃= OCH₃

103 R₁= R₄= OH), R₂= H, R₃= OCH₃

104 R₁= R₂=R₃=R₄= OH



105 $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$

106 $R_1 = R_2 = R_3 = OH, R_4 = H$

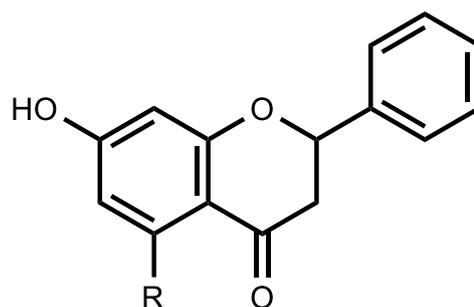
107 $R_1 = R_3 = OH, R_2 = OCH_3, R_4 = H$

108 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = OCH_3, R_4 = H$

109 $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = OCH_3$

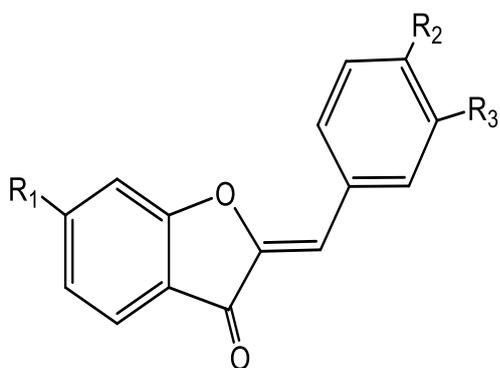
110 $R_1 = R_2 = R_4 = OH, R_3 = OCH_3$

111 $R_1 = R_3 = OH, R_2 = R_4 = OCH_3$



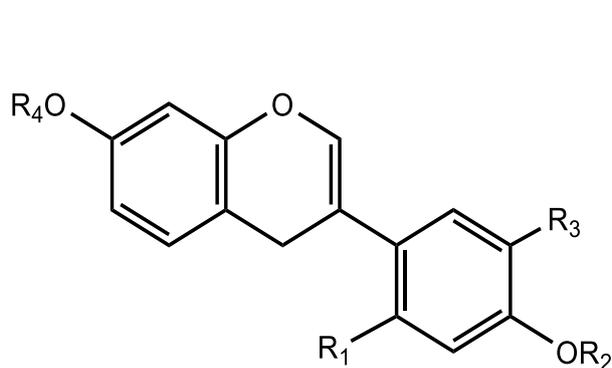
112 (R = H)

113 (R = OH)



114 (R1 = R2 = OH, R3 = H)

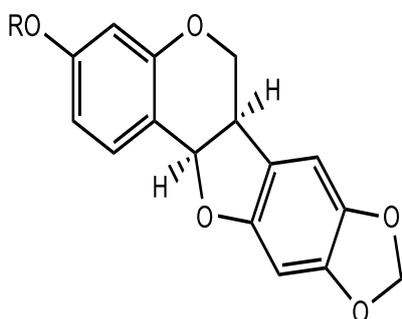
115 (R1 = OH, R2 = R3 = H)



116 (R1 = OCH3, R2 = Glu, R3 = OH, R4 = H)

117 (R1 = H, R2 = CH3, R3 = H, R4 = Glu)

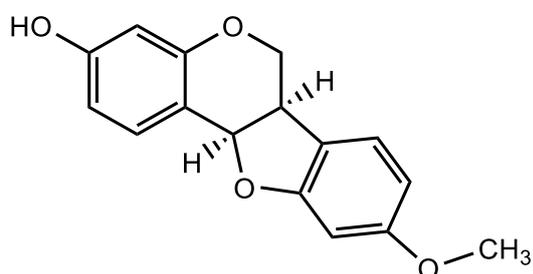
118 (R1 = H, R2 = CH3, R3 = H, R4 = H)



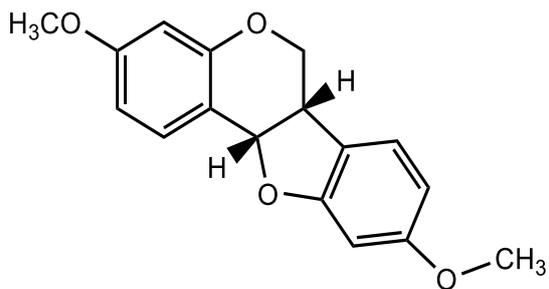
119 (R1 = Glu)

120 (R = 6'-O-malonate-Glu)

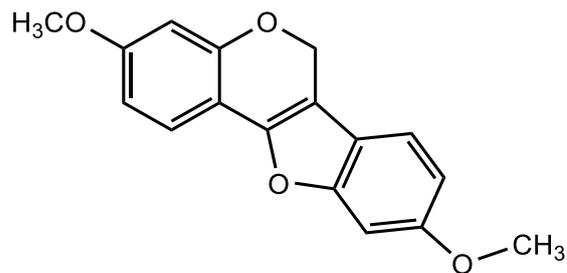
121 (R = H)



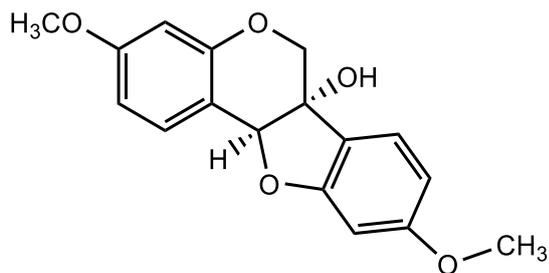
122



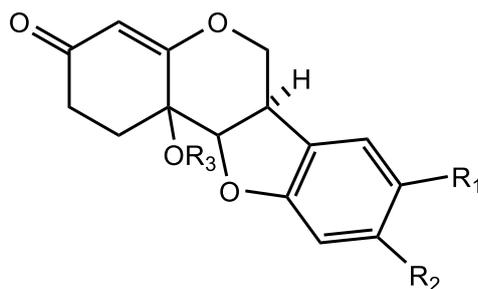
123



124



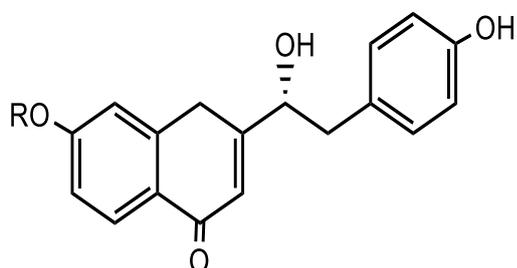
125



126 R₁= H, R₂= OCH₃ R₃= H

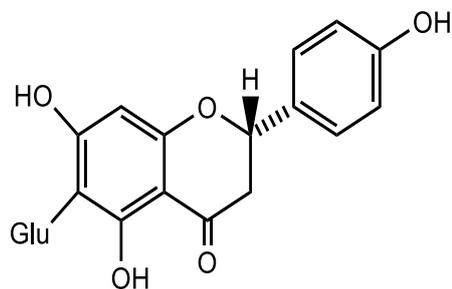
127 R₁= R₂= OCH₂O, R₃= H

128 R₁=R₂= OCH₂OR₃= AC

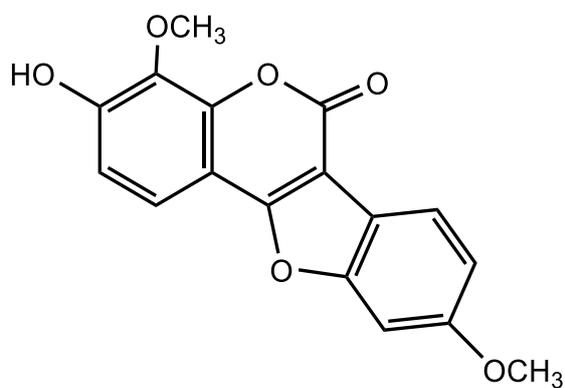


129 R= H

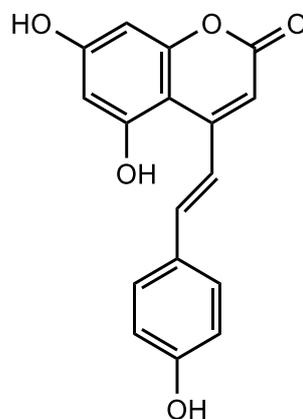
130 R=B-D-Glucopyranosyl



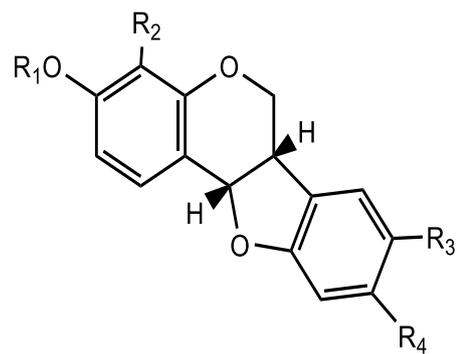
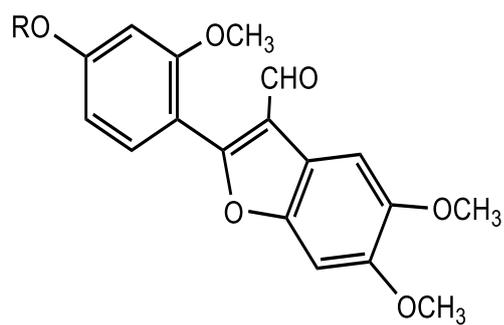
131



132



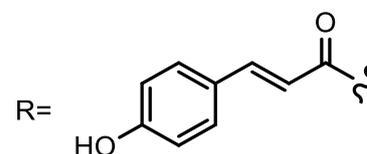
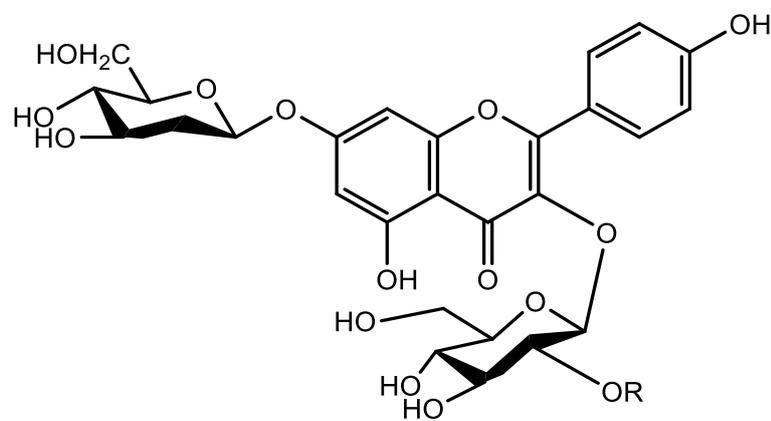
133



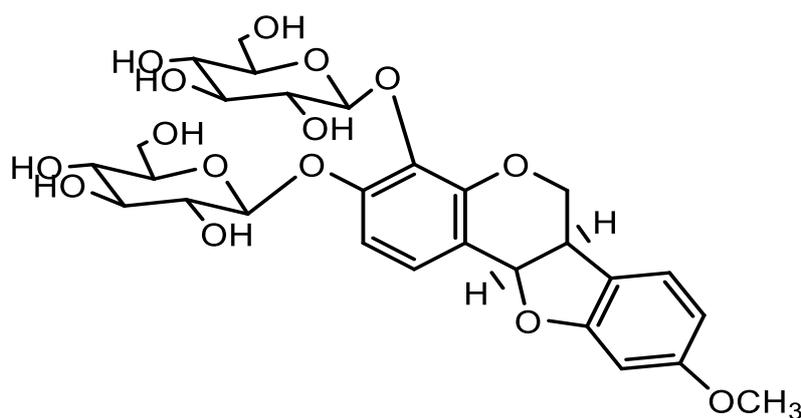
135 R=AC

134 R=H

136 R₁= CH₃ , R₂= R₄= OCH₃ R₃= H



137



138

62 Apégénine
63 Genkwanine

- 64** Acacétine
- 65** 7,4'-diméthoxyapigénine
- 66** Lutéoline
- 67** Chrysoériol
- 68** Velutine
- 69** 7, méthoxy Lutéoline
- 70** 3',4' diméthoxyLutéoline
- 71** Nepetin
- 72** Jaceosidin
- 73** 7,3',4' triméthoxyLutéoline
- 74** Cirsilineol
- 75** Eupatilin
- 76** 6,7,3' triméthoxyLutéoline
- 77** Hispiduline
- 78** Cirsimaritine
- 79** Pectolarigénine
- 80** Salvigénine
- 81** Quercetine
- 82** Quercetine -3-O--glucopyranoside
- 83** Penduletin
- 84** Nevadensin
- 85** Sideritiflavone
- 86** Acerosin
- 87** Hymenoxin
- 88** Xanthomicrol
- 89** Gardenin B
- 90** Chrysin
- 91** Tectochrysin
- 92** Desmethyilsudachitin
- 93** Agecorynin D
- 94** Hypolaetin -8,3',4'- trimethyl
- 95** 6,7-di-O-methylbaicalein
- 96** negletein
- 97** alnetin
- 98** 2',4'-Dihydroxychalcone
- 99** 2'-hydroxychalcone
- 100** 2',3',4'-Trihydroxychalcone
- 101** Chalcone
- 102** 2',hydroxy-4'-methoxychalcone
- 103** 4,2'Dihydro-4'- methoxychalcone
- 104** 4,2',4'-Trihydroxychalcone
- 105** DihydroChalcone
- 106** 2',4',6'-Trihydroxydihydrochalcone
- 107** 2',6',Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone
- 108** 2',4',Trihydroxy- 6'-methoxydihydrochalcone
- 109** 4, 2',6'-Trihydroxy- 4'-methoxydihydrochalcone
- 110** 4, 2',4'-Trihydroxy- 6'-methoxydihydrochalcone
- 111** 2',6',Dihydroxy-4,4'-dimethoxydihydrochalcone
- 112** 7-Hydroxyflavanone
- 113** 5, 7 Hydroxyflavanone
- 114** 6-Hydroxy-4'-méthoxy aurone
- 115** 6-Hydroxyaurone
- 116** 3-(4-(glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-methoxyphenyl)-7-hydroxy-4H-chromen- 4-one
- 117** Ononine
- 118** Ormononetine

119	Trifolirhizine
120	Trifolirhizin-6-O-malonate trifolirhizin
121	Maackiaine
122	Medicarpine
123	Homopterocarpine
124	anhydrovariabiline
125	variabiline
126	11b –hydroxy-16b-dihydromedicarpine
127	11b –hydroxy-11b-1-dihydromaackiane
128	11b –acétoxy-11b-1-dihydromaackiane
129	(R)-6- hydroxy-3-(1-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)naphthalen-(4H)-one
130	Ononin glucoside
131	hemipholine
132	3-hydroxy-4,9-dimethoxy-coumestane
133	5,7,4'-Trihydroxy-4-styrycoumarine
134	2-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-3-benzofurane-carboxaldehyde
135	Maginaldehyde monoacetate
136	3,4,9-Trimethoxypterocarpane
137	3-O-(2-O-(E) –p-coumaroyl-B-D-glucopyranosyle)Kaemferol
138	3,4-di-O-B-D-glucopyranosyl-4-hydroxymedicarpine

I.3.2.2. Autres composés

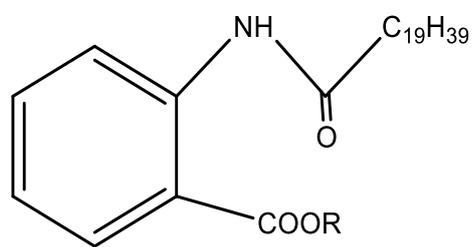
Autres types de composés moins dominants ont été isolés et identifiés dans le genre *Ononis*

Un certain nombre est cité dans le tableau I.5 ci-dessous.

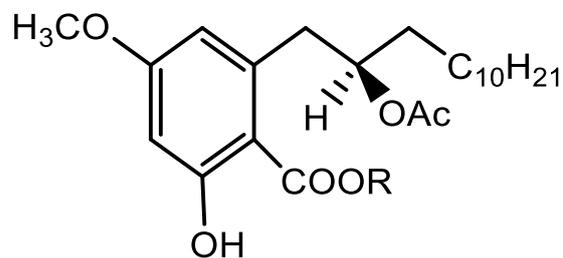
Tableau I.5 : Divers composés isolés du genre *Ononis*

Espèces	Structure	Référence
<i>o.natrix ssp ramosissima</i>	<u>152, 153, 154, 155, 156, 157</u>	[32]
<i>o.natrix ssp hispanica</i>	<u>141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151</u>	[36]
<i>o.natrix</i>	<u>161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168</u>	[57]
	<u>169, 170,</u>	[50]
	<u>139, 140,</u>	[28]
	<u>171, 172, 173, 174, 175</u>	[56]
	<u>176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188</u>	[38]
<i>O. Viscosa</i>	<u>189, 190, 191, 192, 193, 194, 195.</u>	[55]
<i>O.Viscosa ssp Breviflora</i>	<u>196, 197, 198,199, 200, 201, 202,</u>	[37]
	<u>203, 204, 205, 206, 207, 208, 209,</u>	
	<u>210, 211</u>	[40]
	<u>212, 213</u>	
<i>O.angusstissima</i>	<u>158, 159, 160</u>	[54]

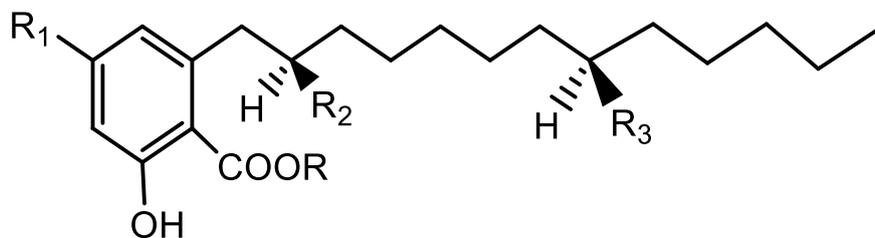
--	--	--



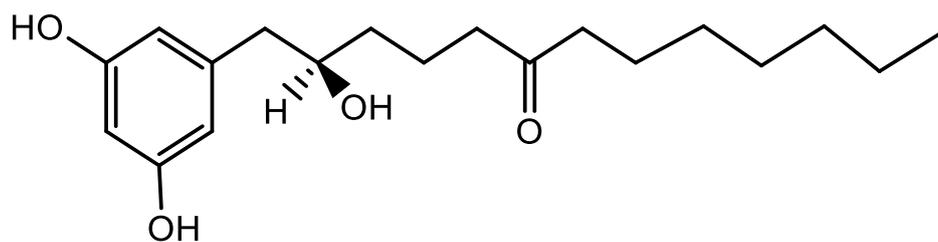
139 R= H)
140 R= CH₃)



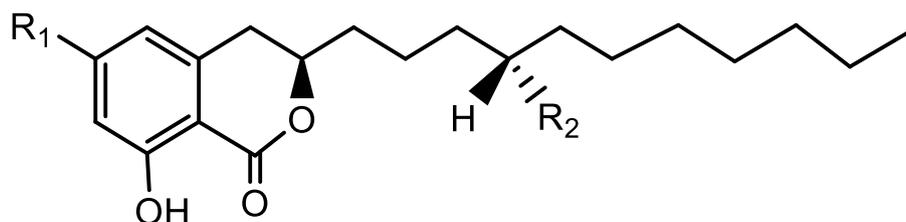
141 R=H
142 R=CH₃



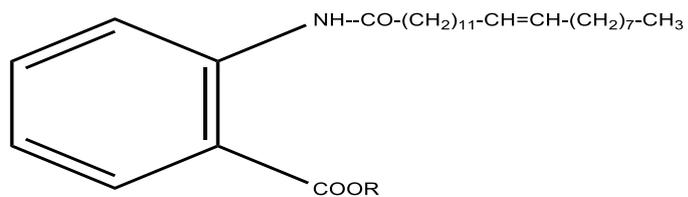
143 R₁= OCH₃, R₂= OAc , R₃= H)
144 R₁= OH, R₂= OAc , R₃= H)
145 R₁= OCH₃, R₂= OH , R₃= OH)
146 R₁= OH, R₂= OH ,R₃= OH)
147 R₁= OCH₃, R₂= OH ,R₃= OH)



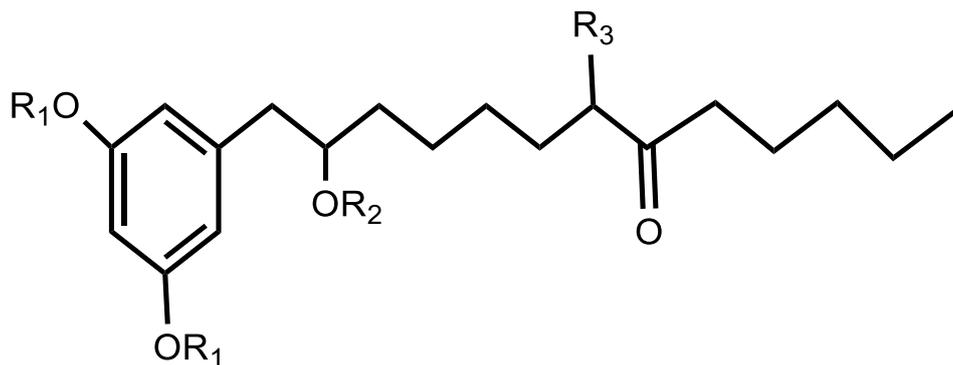
148



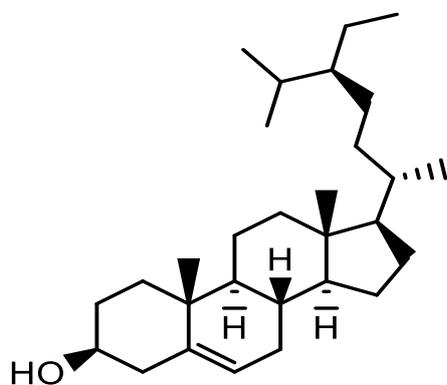
149 R₁= OH, R₂= H
150 R₁= OCH₃, R₂=H



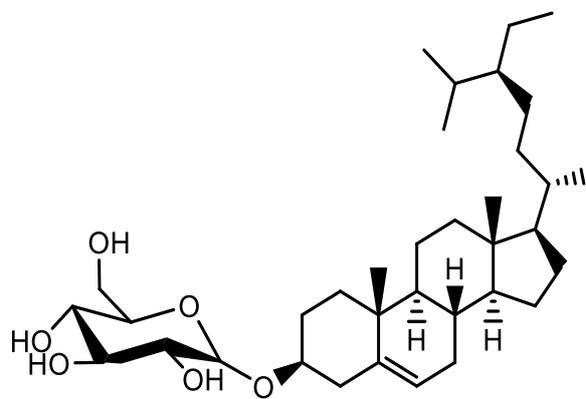
151 $\text{R}=\text{H}$
152 $\text{R}=\text{CH}_3$



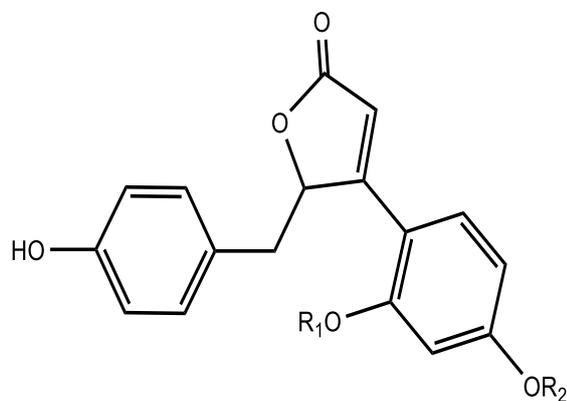
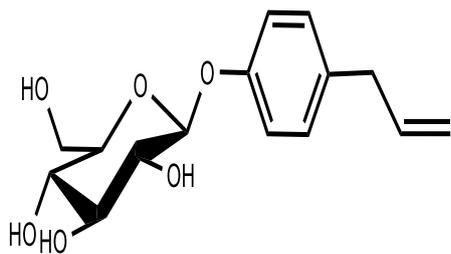
153 $\text{R}_1=\text{Ac}$, $\text{R}_2=\text{Ac}$, $\text{R}_3=\text{H}$
154 $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{Ac}$, $\text{R}_3=\text{OH}$



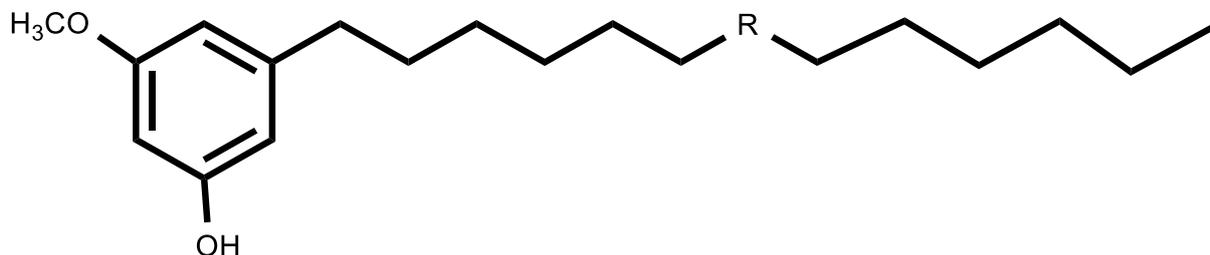
155



156



157



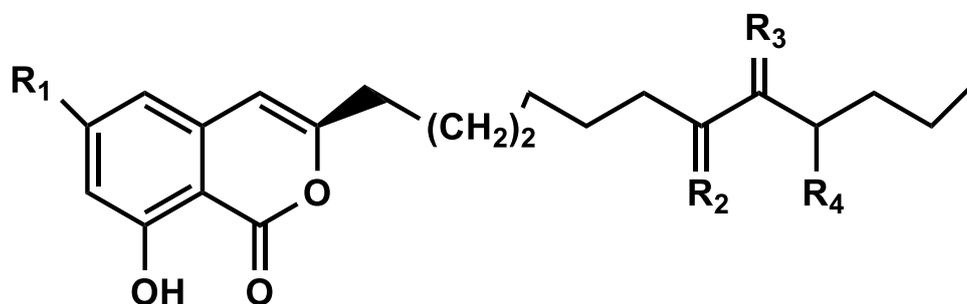
158 R₁= Glu , R₂= H

159 R₁= Glu , R₂= CH₃

160 R₁= H , R₂= H

161 (R = C=O)

162 (R = CH₂)



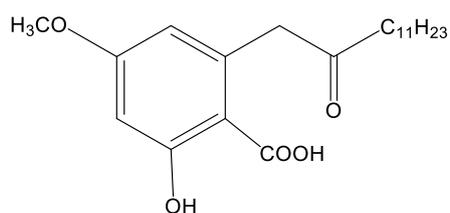
163 R= OH, R₁= R₄= H, R₂=H₂ Ac , R₃= O

164 R= OH, R₁= H , R₂= R₃= H₂ , R₄= OH

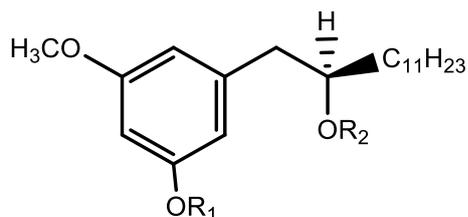
165 R= OCH₃, R₁=OH, R₂= R₃=H₂, R₄= H

166 R= OH, R₁= R₄= H, R₂=O ,R₃= H₂

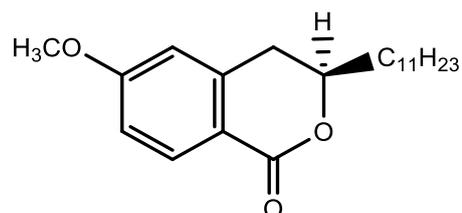
167 R= R₁= OCH₃, R₃= R₂= H₂ R₄=H



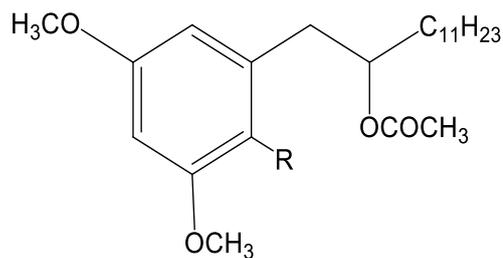
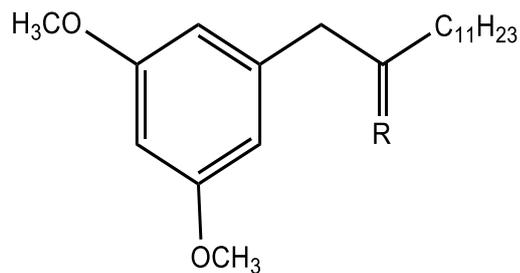
168



169 R₁= H, R₂=Ac

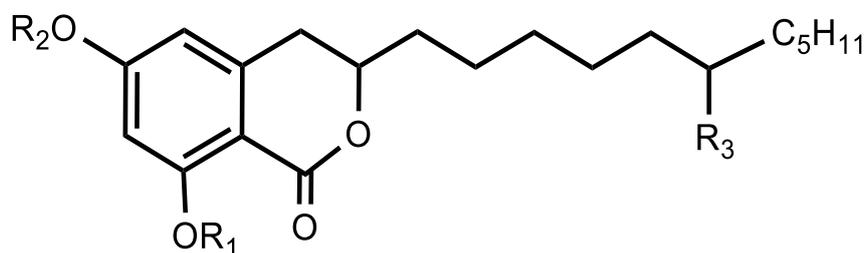


170



171 R= O
172 R= OH

173 R=H
174 R=COOH
175 R=OH



176 R₁=H, R₂= CH₃, R₃=H

177 R₁= R₂= R₃= H

178 R₁=H, R₂= H, R₃=O

179 R₁= R₂=H, R₃=OH

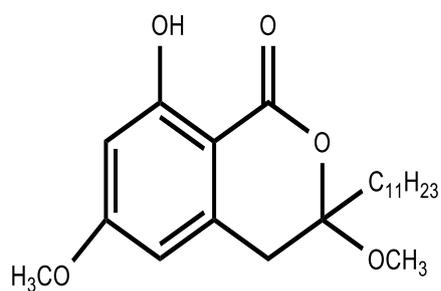
180 R₁=H, R₂= CH₃, R₃=O

181 R₁=H, R₂= CH₃, R₃=H

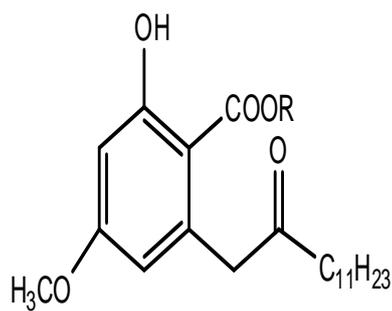
182 R₁= R₂= CH₃, R₃=H

183 R₁= R₂= CH₃, R₃=O

184 R₁= R₂= CH₃CO, R₃= CH₃COO

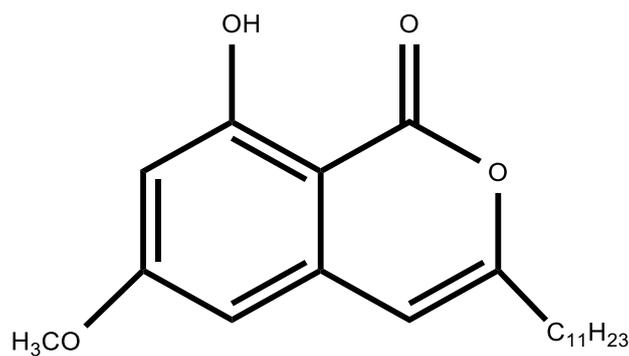


185

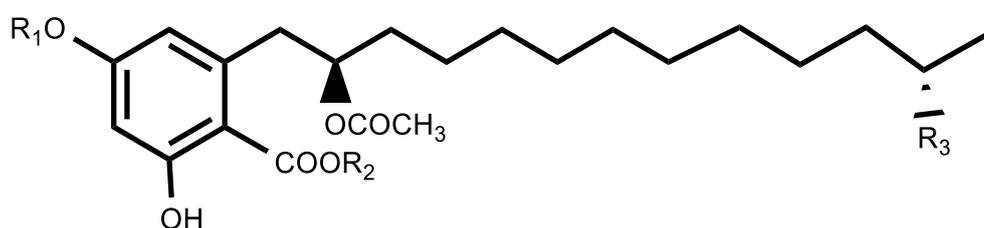


186 R=H

187 R=Me



188



189 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OAC$

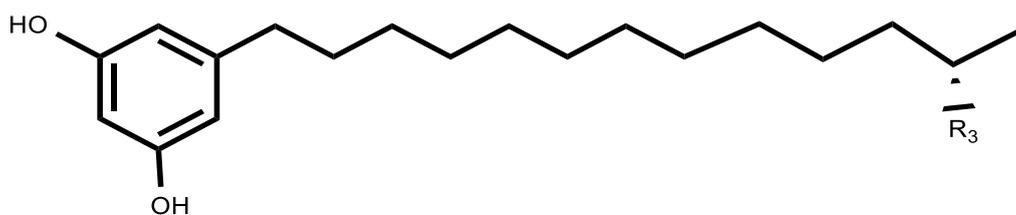
190 $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = OAC$

191 $R_1 = R_2 = CH_3, R_3 = OAC$

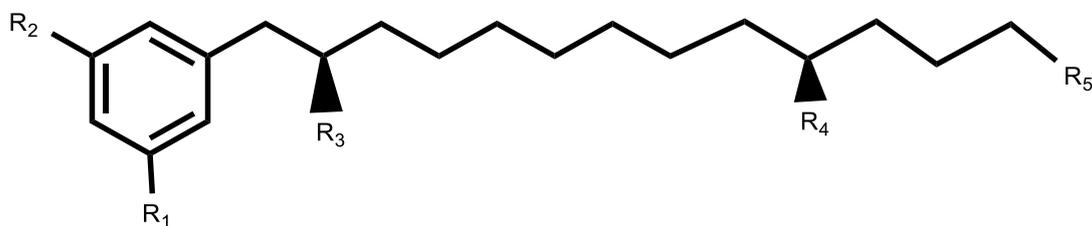
192 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$

193 $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = OH$

194 $R_1 = R_2 = CH_3, R_3 = H$



195



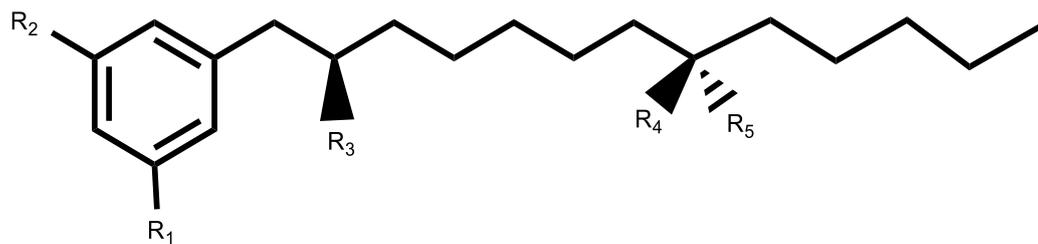
196 $R_1 = OCH_3, R_2 = R_5 = OH, R_3 = R_4 = H$

197 $R_1 = R_5 = OAC, R_2 = OCH_3, R_3 = R_4 = H$

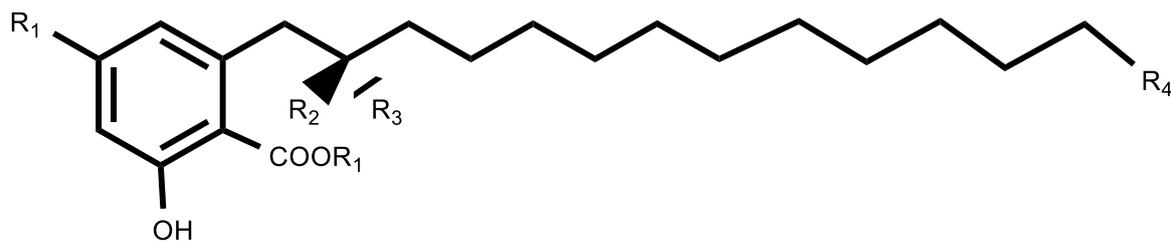
198 $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = R_4 = OH, R_4 = H$

199 $R_1 = R_3 = R_5 = OAC, R_2 = OCH_3, R_4 = H$

200 $R_1 = OCH_3, R_2 = R_4 = OH, R_3 = R_5 = H$

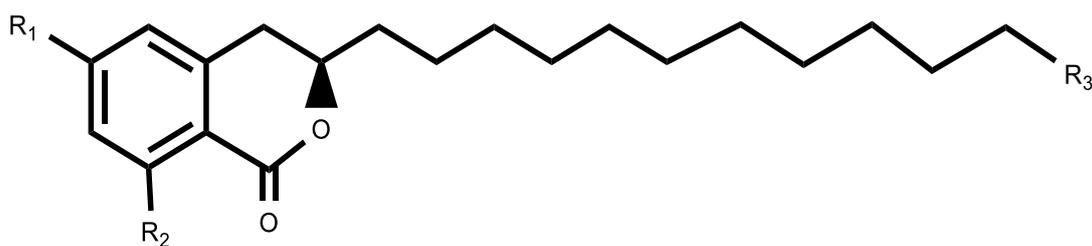


201 $R_1=R_2=R_3= OH, R_4= R_5=O$



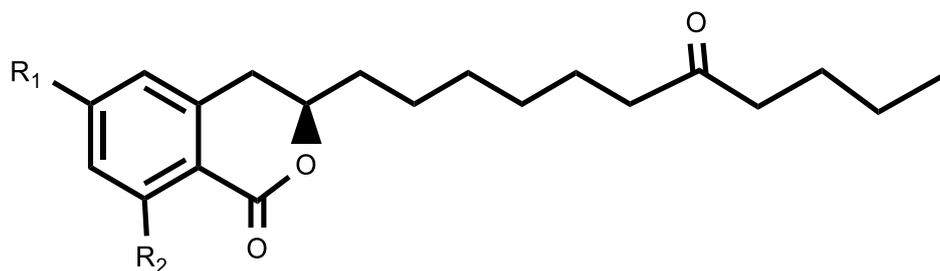
202 $R_1= OCH_3, R_2= R_3= O, R_4=H$

203 $R_1= OCH_3, R_2=OAC, R_3=R_4 =H$



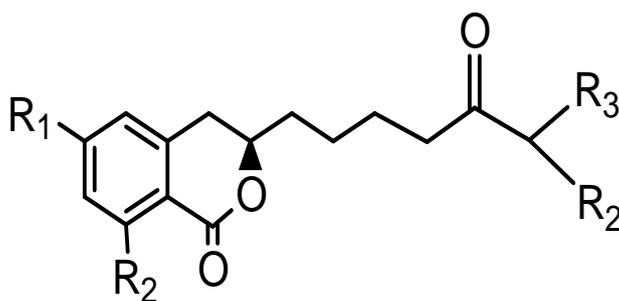
204 $R_1= OCH_3, R_2= R_3=OH$

205 $R_1= OCH_3, R_2=R_3=OAC$



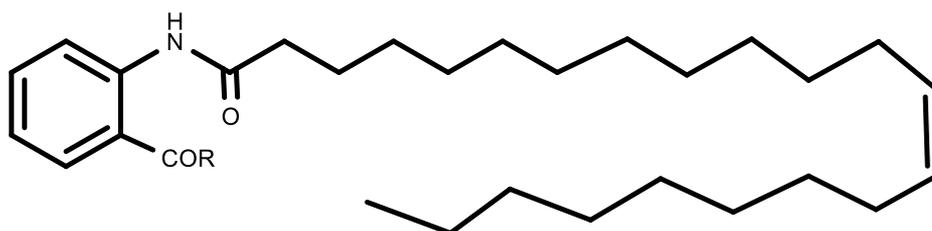
206 $R_1= OCH_3, R_2=OH$

207 ($R_1= OCH_3, R_2=OAC$)



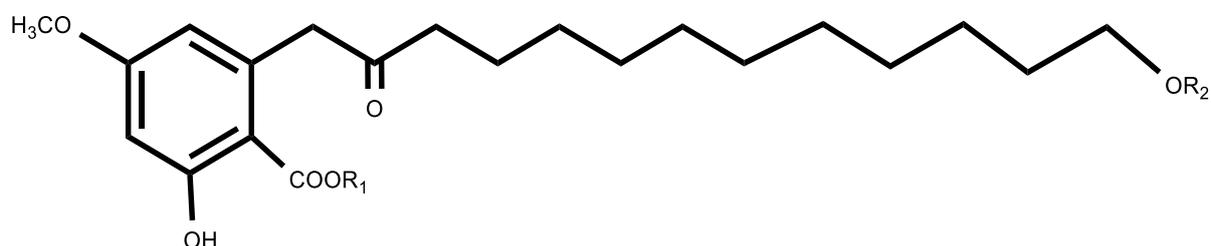
208 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{Pentyl}$

209 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = \text{Heptyl}$



210 $R = \text{OH}$

211 $R = \text{OCH}_3$



212 $R_1 = R_2 = \text{H}$

213 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

- 139 l'acide *N*-arachidylanthranilique
140 Methyl *N*-arachidylanthranilate
141 L'acide (2'R)-6-(2-acétoxy-tridécy)-2-hydroxy-4-méthoxybenzoïque
142 Methyl (2'R)-6-(2-acétoxytridécy)-2-hydroxy-4-méthoxybenzoate
143 (2'R)-5-(2-acétoxytridécy) résorcinol méthyl éther
144 (2'R)-5-(2-acétoxy-tridécy) résorcinol
145 (2'R)-5-(2-hydroxytridécy) résorcinol méthyl éther
146 (2'R, 8'S)-5-(2,8-dihydroxytridécy) résorcinol
147 (2'R, 8'S)-5-(2,8-dihydroxytridécy) résorcinol méthyl éther
148 (2'R)-5-(2-hydroxy-8-oxytridécy) résorcinol
149 (3R)-6,8-dihydroxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
150 (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
151 l'acide *N*- Δ^{13} -docosenoylanthranilique

- 152** Méthyl N- Δ^{13} -docosenoylanthranilate
153 1,3-Di-*O*-acétyl-5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol
154 5-(2-Acétoxy-7-hydroxy-8-oxotridécyl) résorcinol
155 β - sitostérol
156 Daucostérole
157 Chavicol 1-*O*- β -D-glucopyranoside
158 (+)-Puerol A-2'- *O*- β - D-glucopyranose
159 (-)-Puerol B-2'- *O*- β - D-glucopyranose
160 (+)-Puerol A
161 5-(7'-oxotridecyl)-3-méthoxyphénol
162 5-tridecylresorcinol méthyl éther
163 (3R)-6,8-dihydroxy-3-(7'-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
164 (3R)-6,8-Dihydroxy-3-(8'-hydroxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
165 (3R)-3,8-Dihydroxy-6-méthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
166 (3R)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
167 (3R)-8-hydroxy-3,6-diméthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
168 Cétoacide
169 5-(2-acétoxytridecyl)-3-méthoxyphénol
170 -8-hydroxy-6-diméthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
171 1-(3,5-Diméthoxyphényl) tridécane-2-one
172 1-(3,5-Diméthoxyphényl) tridécane-2-ol
173 1-(3,5-Diméthoxyphényl) dodécane-2-yl acétate
174 L'acide 2-(2-acétoxydodécyl)-4,6-diméthoxybenzoïque
175 1-(2-hydroxy-3,5-Diméthoxyphényl) dodécane-2-yl acétate
176 8-Hydroxy-6-méthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
177 (3R)-6,8-Dihydroxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
178 (3R)-6,8-Dihydroxy-3-(6-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
179 (3R)-6,8-Dihydroxy-3-(6-hydroxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
180 (3R)-8-Hydroxy-6-méthoxy-3-(6-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
181 (3R)-8-Hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
182 (3R)-6,8-Diméthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
183 (3R)-6,8-Diméthoxy-3-(6-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
184 (3R)-6,8-Diacétoxy-3-(6-acétoxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
185 (3R)-8-Hydroxy-3,6-diméthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
186 l'acide 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(2-oxotridecyl) benzoïque
187 Méthyl 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(2-oxotridecyl) benzoate
188 (3R)-8-Hydroxy-3-diméthoxy-3-undécyl-3,4-dihydroisocoumarine
189 l'acide (2'R, 12'S)-6-(2,12-diacétoxytridécyl)-2,4-dihydroxy benzoïque
190 Méthyl (2'R, 12'S)-6-(2,12-diacétoxytridécyl)-2,4-dihydroxy- benzoate
191 Méthyl (2'R, 12'S)-6-(2,12-diacétoxytridécyl)-2-hydroxy-4-méthoxy benzoate
192 l'acide (2'R, 12'S)-6-(2-acétoxy-12-hydroxytridécyl)-2,4-dihydroxybenzoïque
193 Méthyl (2'R, 12'S)-6-(2-acétoxy-12-hydroxytridécyl)-2,4-dihydroxy benzoate
194 Méthyl (2'R, 12'S)-6-(2-acétoxytridécyl)-2-hydroxy-4-méthoxy benzoate
195 (2'R, 12'S)-5-(2-acétoxy-12-hydroxytridécyl) Résorcinol
196 5-(13-Hydroxytridecyl)-1-*O*-methylresorcinol
197 1-*O*-Acetyl-5-(13-acétoxytridecyl)-3-*O*-merhyiresorcinol
198 (2'R)-5-(2,13-dihydroxytridecyl) resorcinol
199 (2'R)-1-*O*-Acetyl-5-(2,13-diacétoxytridecyl)-3-*O*-méthyl-resorcinol
200 (10'R)-5-(10-Hydroxytridecyl)-1-*O*-méthyl-resorcinol
201 (2'R)-1,3-di-*O*-acetyl-5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl)resorcinol
202 Méthyl 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(2-oxotridecyl)-benzoate
203 Méthyl (2'R)-6-(2-acétoxytridecyl)-2-hydroxy-4-méthoxybenzoate
204 (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(11-hydroxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
205 (3R)-8-Acétoxy-6-méthoxy-3-(11-acétoxyundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine
206 (3S)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(7-oxoundécyl)-3,4-dihydroisocoumarine

- 207** (3R)-8-Acétoxy-6-méthoxy-3-(7-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
208 (3R)- 8-hydroxy-6-methoxy-3-(6-hydroxy-5-oxoundecyl)-3,4- dihydroisocoumarine
209 (3R)-8-hydroxy&methoxy-3-(6-hydroxy-5-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
210 l'acide 13'-docosenoyl-anthranilique
211 Méthyl (Z)-N- 13-docosenoylanthranilate
212 l'acide 2-hydroxy-4-methoxy-6-(13-hydroxy-2- oxotridecyl) benzoïque
213 Methyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-(13-hydroxy-2- oxotridecyl) benzoate

I.4. Conclusion

A l'issue de cette investigation bibliographique concernant les genres *Lotus* et *Ononis* appartenant à la famille des fabaceae, ces deux genres possèdent une grande diversité structurale des métabolites secondaires. Les flavonoïdes sont majoritairement présents dans le genre *Lotus*, alors que dans le genre *Ononis* les flavonoïdes sont les plus abondants. Il est important de signaler la présence des chaînes aliphatiques dans ce genre. On citera notamment les dérivés du résorcinol, les acides phénoliques, les dihydroisocoumarines ainsi que les dérivés de l'acide anthranilique.

Après cette première partie consacrée à une étude bibliographique des plantes étudiées et en particulier des genres *Lotus* et *Ononis* portant sur l'aspect botanique, l'utilisation en médecine traditionnelle, les activités biologiques et les différentes classes de métabolites antérieurement isolés, la deuxième partie présente une étude bibliographique des polyphénols et les saponosides.

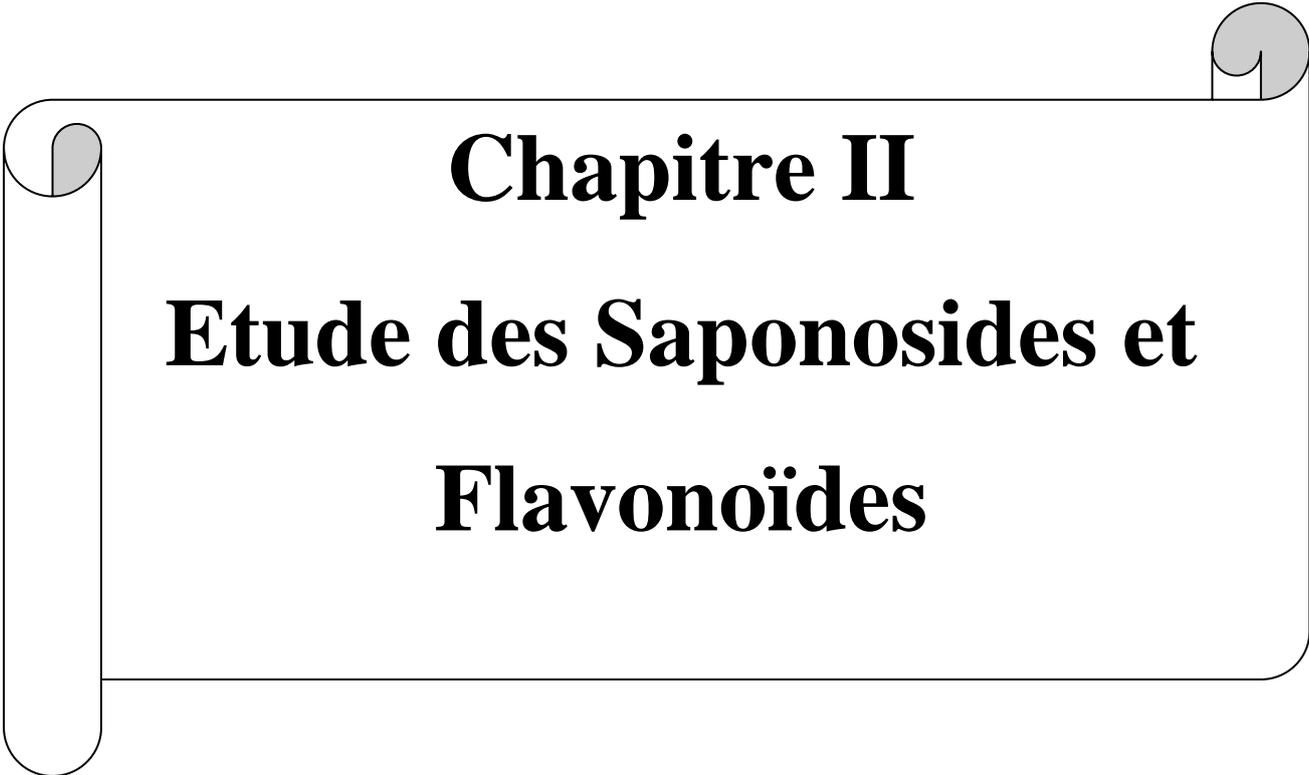
Références bibliographiques

- [1] **Guignard J.I.**, 1994. Abrégé de botanique. 9ème édition Ed Masson, 276.
[2] **Wojciechowski M.F.**, Lavin M., Sanderson M.J.A., 2004. Phylogeny of Legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. 91 (11), 1846-1862.
[3] **Dupont F.**, Guignard J.L., 2007. Abrégé de Botanique 14ème édition Editions Masson. Paris, 285.
[4] **Judd W.S.**, Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P., 2002. Botanique Systématique Une perspective phylogénétique. 1^{ère} édition. DeBoeck Université, Paris, 283-288, 292-299.

- [5] **Spichiger R.E.**, Savolainen V.V., Figeat M., Jeanmonod D., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs : Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3^{ème} édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 202-211.
- [6] **Engler A.**, Prantl K., 1889. Die natürlichen Pflanzenfamilien. First edition, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- [7] **Cronquist A.**, 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second edition, The New York Botanical Garden, New York.
- [8] **Thorne R.F.**, 1992. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*, 13, 365-389.
- [9] **Thorne R.F.**, 1992. Classification and geography of the flowering plants. *Bot. Rev.*58, 225-348.
- [10] **The Angiosperm Phylogeny Group**, 2009.
- [11] **Heywood V.H.**, 1996. Flowering Plants of the World. Third edition, Oxford University Press, 141-145, 149-152.
- [12] **Bruneton J.**, 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 3^{ème}. Édition éditeur Technique et Documentation, Paris.
- [13] **Allan G.J.**, Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Boerner E., Zimmer E.A., 2004. Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island Lotus (*Fabaceae: Loteae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32, 123-138.
- [14] **Quezel P.**, Santa S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *In : CNRS (Ed.)*, Vol. 1-2. Paris.
- [15] **Bellakhdar J.**, 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- [16] **Strittmatter C.D.**, Wagner M.L., Kade M., Crurni A.A., 1992, Identification of *Lotus tenuis* Flavonoids parts III. *Biochemical Systematics and Ecology*. 20, 685-687.
- [17] **Yang S. S.**, Gao F., Mabry T. J., Amer M. E., Abdel-Kader M. A., Mahmoud Z. F., & Abdel-Salam N. A., 1989. Flavonoids from *Lotus creticus*. *Phytochemistry*. 28(6), 1749-1750.
- [18] **Reynaud J.**, Lussignol M., 2005. The Flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus News letter*.35, 78-82
- [19] **Koelzer J.**, Pereira D.A., Dalmarco J. B., Pizzolatti M.G., Frode T.S., 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*.117, 444-450.
- [20] **Abdel-kader M.S.**, Amer M. E, Tang S., Kingston D.G.I., Two new isoflavone derivatives from the roots of an Egyptian collection of *Lotus polyphyllus*. *Nat. Prod*. 20, 922- 926.
- [21] **Ingham J. L.**, Dewick P. M., 1979. A new isoflavan phytoalexin from leaflets of *Lotus hispidus*. *Phytochemistry*.18, 1711-1714.
- [22] **Golea L.**, Haba H., Lavaud C., Long, C., Benkhaled M., 2012. Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik. *Biochemical Systematics and Ecology*. 45, 12-15. .
- [23] **John Shaw G.**, Ellingham P.J., Nixon L.N., 1981. 2,4-Diamino-3 Methylbutanoic Acid, A Novel Amino Acid in Root Nodule Hydrolysates from *Lotus tenuis*. *Phytochemistry*.20, 1853-1855.

- [24] **Shaiq ALI M.**, Ahmad F., Ahmad V. U., 2001. Unusual Chemical Constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turk J Chem.* 25, 107-112.
- [25] **El Youssef H.M.**, Murphy B.T., Amer M.E., Abdel-kader M.S., Kingston D.J.I., 2008. Two New Flavonol Glycosides from the Aerial Parts of *Lotus lalambensis* growing in Saudi Arabia Saudi. *Natural Product Sciences.* 16, 86-89.
- [26] **Mahmoud Z. F.**, Amer M. E, Abdel Kader M. S., Abdel-Salam N. A., 1999. A coumestan from *Lotus creticus*. *Phytochemistry.* 29, 355-356.
- [27] **Willis J. C.**, 1973. A dictionary of the flowering plants and ferns, 8th Ed. Cambridge University Press.
- [28] **Nawasreh M.**, Abu Zarga M., Sabri S., Al-Khalil S., Bomeister E., Zeller C-P., Atta-Ur-Rahman., 2004. A new anthranilic acid derivative from *Ononis natrix* of Jordanian origin. *Alex. J. Pharm. Sci.* 18, 165–170.
- [29] **Talib W. H.**, Mahasneh A. M., 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.* 78, 33–45.
- [30] **Al-Qudah M. A.**, Al-Ghoul A. M., Trawenh I. N., Al-Jaber H. I., Al Shboul T. M., Abu Zarga M. H., Abu orabi, S. T., **2014.** Antioxidant Activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis Natrix* L. and *Ononis Sicula* Guss. *Journal of Biologically Active Products from Nature* .4, 52–61.
- [31] **Iserin P.**, 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. édition Larousse, Paris, 241.
- [32] **Barrero A. F.**, Herrador M. M., Arteaga P., Rodriguez-Garcia I., Garcia-Moreno M., 1997. Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subsp. *ramosissima*. *J. Nat. Prod.* 60, 65–68.
- [33] **Wollenweber E.**, Dörr, M., Rivera, D., Roitman, J. N., 2003. Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z. Naturforsch.* .58, 771–775.
- [34] **Benedec D.**, Vlase L., Oniga I., Toiu A., Tămaş M., Tipericiu B., 2012. Isoflavonoids from *Glycyrrhiza* sp. and *Ononis spinosa*. *Farmacologia* .60, 615–620.
- [35] **Barrero A. F.**, Sanchez J. F., Barron A., Corrales F., Rodriguez I., 1989. Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. *Phytochemistry* .28, 161–164.
- [36] **Barrero A. F.**, Sanchez J. F., Rodriguez I., 1990. *N*- Δ 13-Docosenoylanthranilic acid and alkylresorcinols from *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. *Phytochemistry.* 29, 1967 – 1969.
- [37] **Barrero A. F.**, Cabrera E., Rodriguez I., Fernandez-Gallego E. M., 1994. Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* .36, 189–194.
- [38] **San Feliciano A.**, Miguel Del Corral J. M., Cañedo L. M., Medarde M., 1990. 3,4 Dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochemistry* .29, 945–948.
- [39] **Barrero A. F.**, Cabrera E., Rodriguez I., Planelles F., 1994. Alkylresorcinols and isocoumarins from *Ononis pubescens*. *Phytochemistry* .35, 493–498.
- [40] **Barrero A. F.**, Cabrera E., Rodriguez Garcia I., 1998. Pterocarpans from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* 48, 187–190.
- [41] **Rowan M. G.**, Dean, P. D. G., 1972. α -Onocerin and sterol content of twelve species of *Ononis*. *Phytochemistry.* 11, 3263–3265.

- [42] Barrero A. F., Sanchez J. F., Barron A., Rodriguez I., 1989. Specionin and speciosides A and B: new aromatic lactones from *Ononis speciosa*. *J. Nat. Prod.* 52, 1334–1337.
- [43] **Wollenweber E. Dörr.**, Rivera D., Roiman J N., 2003. Externally Accumulated Flavonoid des in Three Mediterranean *Ononis* Species, *Z. Naturforsch.* 58c, 771-775,
- [44] **Al-Khalil S.**, Masalmeh A., Abdalla S., Tosa H., linuma M .,1995), *N*-Arachydlanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. *J. Nat. Prod.* 58, 760-763.
- [45] **Amer M. E.**, Abdel-Kader M. S., Mahmoud Z. F., AbdelSalam N. A., Yang S. S., Mabry, T. J. 1989. Flavonoids of *Ononis vaginalis*. *Rev. Latinoamer. Quim* 20, 152-53.
- [46] **Bernhardt M.**, Kamel H.S., Hani A.M., 2000. Elgamal and Karlheinz Seifert .The New Bishomoflavone Ononin and Its Glucoside from *Ononis vaginalis* . *J.Z. Naturforsch.* 55c, 516 -519
- [47] **Maged S. A.**, 1997.Two New Norphenylpropanoid Glucosides and Hemipholin from the Flowers of *Ononis vaginalis* *J. Braz. Chem. Soc.* 8, 637-639,
- [48] Maged S. A., 2001. Phenolic Constituents of *Ononis vaginalis* Roots *j Planta Med.* 67
- [49] **Kamel H. S.**, Dockendorff K., Bernhardt M., Seifert K., 2004. A New Triterpenoid Saponin from *Ononis spinosa* and Two New Flavonoid Glycosides from *Ononis vaginalis* *J. Z. Naturforsch.* 59b, 124 – 128
- [50] **San feliciano A.**,Barrero F.A, manuel medarde jose m. miguel del corral, and maria v. Calle. *Phytochemistry* 22(9):2031-2033 · 1983
- [51] **Benabderahmane W.**, Mezrag A., BouheroumM., Benayache F., Mosset P.,2014. The chemical investigation of the chloroformic extract of *Ononis angustissima* Lam. *Var. species. j. Der Pharmacia Lettre.* 6 (3):88-91
- [52] **Mezrag A.**, Bouheroum **M.**, Beghidja N., Khalfaoui A., Zaiter L., Benayache S., Benayache F., 2013. *Chemistry of Natural Compounds.* 49(4), 749-750.
- [53] **Bouheroum M.**, Zaiter L., Benayache S., Benayache F., Bermejo J. B., Leon F., Garcia V., 2009. *Chemistry of Natural Compounds.* 45, No. 6, 874-875.
- [54] **Ghribi L.**, Waffo-Teguo P, Cluzet S, Marchal A, Marques J, Merillon JM, Ben Jannet H., 2015. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorg Med Chem Lett.* 25, 3825–3830.
- [55] **Barrero A. F.**, Sanchez J. F., Reyes., F., Rodriguez I., 1991. RESORCINOL DERIVATIVES FROM *Ononis viscosa* *Phytochemistry* VOL 30,N. 2,. 641-643, 1991
- [56] **Muhammad T.**, Hussain,A.S., Nasim H. R., Abdul R. R.,2001. Cliv W. Bird . Mass Spectrometric Studies of Principal Dihydroisocoumarins of *ononis natrix* and Some Related Compounds *journal-chemical society of pakistan* ·
- [57] **Muhammad Y.**, Adnan J. A., Ahmada M.S., Mohammed A. J.Mustafaa Al-Yahyaa, Mansour S. Al-Saida, Jianping Zhaob, Ikhla.s A.,2015.Khan A 5-alkylresorcinol and three 3,4-dihydroisocoumarins derived from *Ononis natrix*. *Phytochemistry Letters*, 1–5.

A decorative scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is partially unrolled, with the top edge curving upwards and the bottom edge curving downwards. The text is centered within the scroll.

Chapitre II
Etude des Saponosides et
Flavonoïdes

II.1. Saponosides

II.1.1 Définition

Les saponosides, produits naturels issus du métabolisme secondaire, constituent un vaste groupe d'hétérosides fréquemment rencontrés chez des nombreux végétaux (*Saponaria*, Quinoa, etc.) Les plantes à saponines ont été très recherchées pour leurs propriétés détergentes [1], à l'instar de la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) qui a été largement employée pendant des siècles. Les saponines ont été aussi recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ pour l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens [2]. Elles présentent plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique). Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante.

II.1.2. Classification des saponosides

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit tri-terpéniques, soit stéroïdiques. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (liaison des sucres en C-3 ou en C-28 de l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques (liaison des sucres en C-3 et en C-28. Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dix dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques (quatre chaînes) [4]. La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des géniens peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

II.1.2.1. Saponosides triterpéniques

Les saponosides triterpéniques sont rencontrés principalement chez les angiospermes Dicotylédones et quelques organismes marins tels que les étoiles de mer.

Les triterpènes sont une classe de métabolites secondaires composés de 30 atomes de carbones comportant habituellement cinq ou moins fréquemment quatre cycles. Au niveau biosynthétique, les 200 différents squelettes connus jusqu'à ce jour et isolés desources naturelles

proviennent de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3-dihydro-squalène (**Figure II.1**) et quelquefois du squalène lui-même.

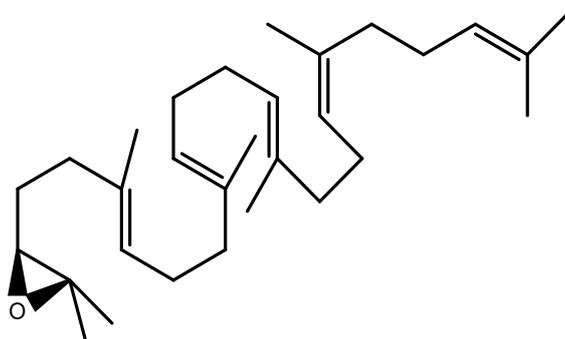


Figure II.1 : Structure du 2,3-époxydosqualène.

Les triterpènes peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique, pentacyclique [4].

➤ **Composés aliphatiques (acycliques) :**

Tel que le squalène (**Figure II.2**), surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.

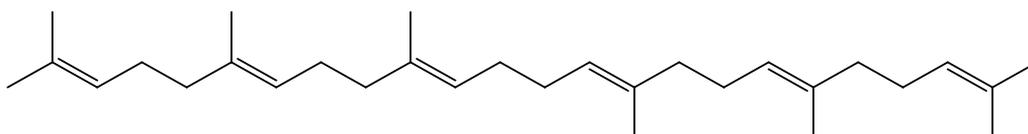
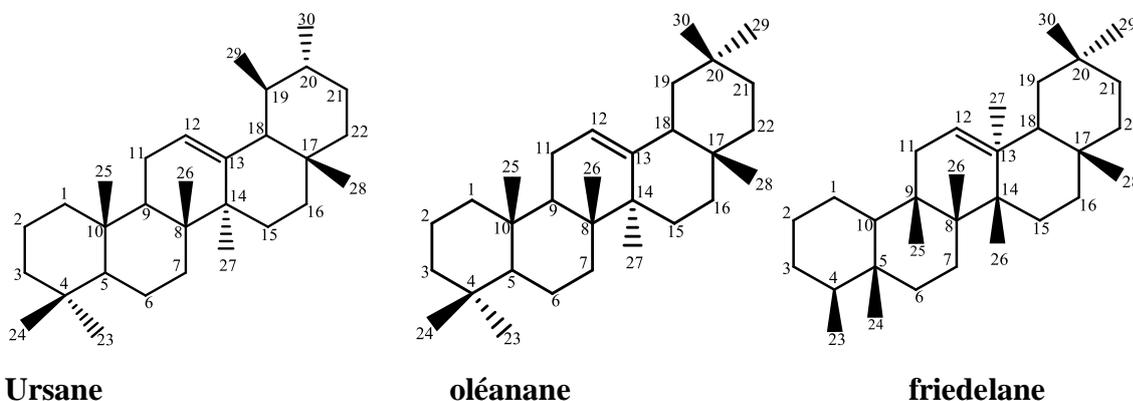


Figure II.2 : Structure de squalène.

➤ **Composés pentacycliques :**

Les sapogénines pentacycliques sont issues des squelettes oléanane, ursane, lupane, friedelane et hopane (**Figure II.3**) [5].



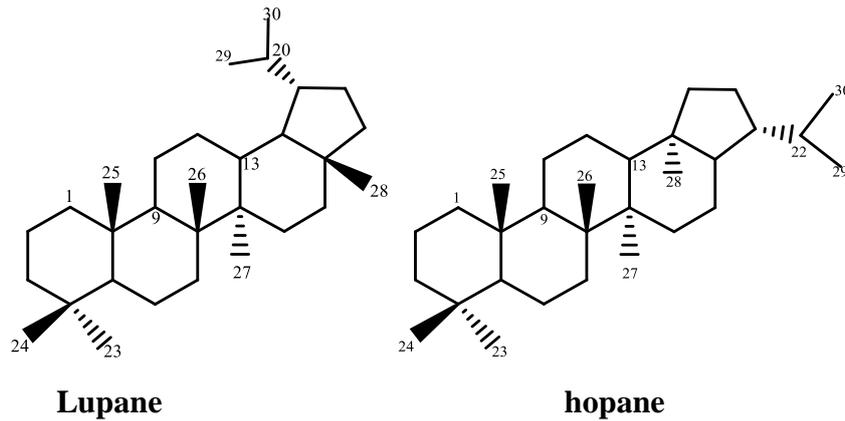


Figure II.3 : Les différents squelettes pentacycliquetriterpéniques rencontrés.

Ils sont le plus souvent hydroxylés en position 3. Les triterpènes libres très fréquents chez les plantes sont l' α - amyrine et la β - amyrine (FigureII.4)

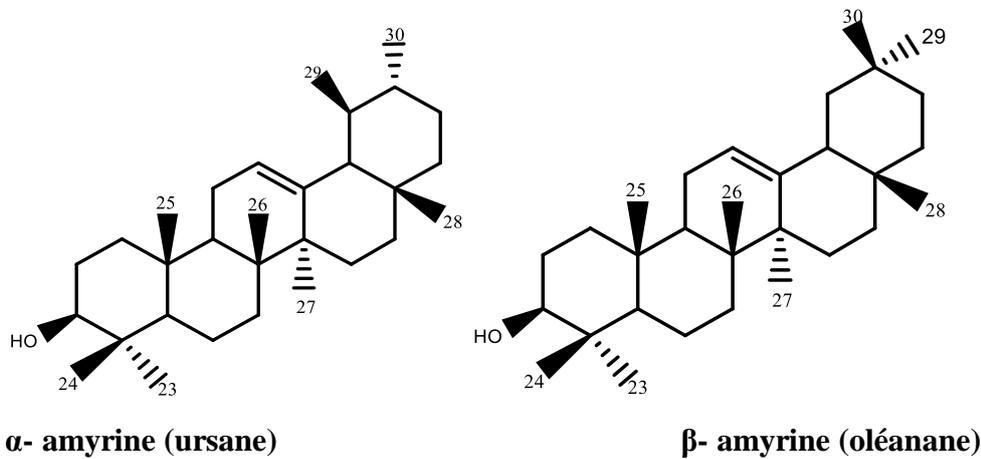
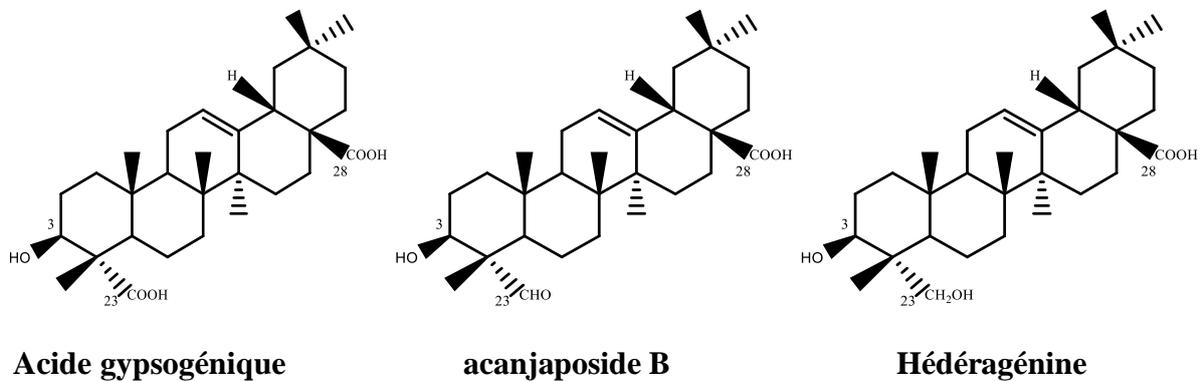


Figure II.4: Triterpènepentacyclique.

Les saponosides ont également un hydroxyle en position 3, généralement en position β . Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique. Les positions 23, 24, 28, 29 et 30 sont souvent fonctionnalisées sous forme hydroxyle, aldéhyde ou acide carboxylique.



Les saponosides bidesmosidiques possèdent généralement leur seconde chaîne osidique sur l'acide carboxylique en C-28 (Figure II.5).

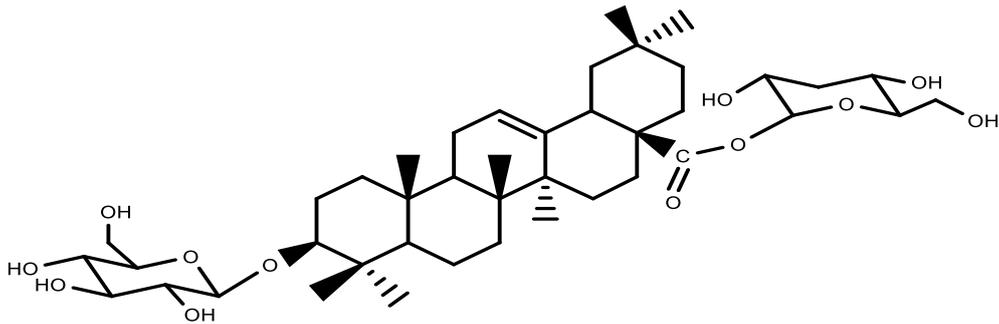


Figure II.5 : 3-O- α -D-glucopyranosyl-oléanolique -28-O- β - D-glucopyranosyl ester.

➤ **Composés tétracycliques :**

Les sapogénines tétracycliques dérivent de trois squelettes principaux : dammarane, cucurbitane et lanostane (Figure II.6).

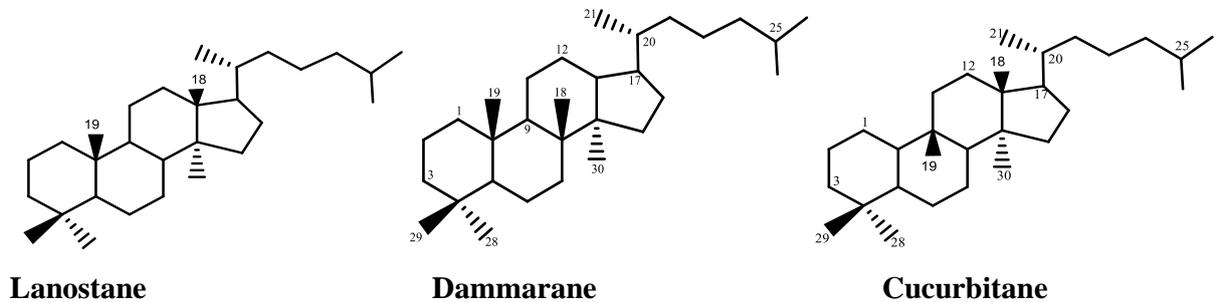
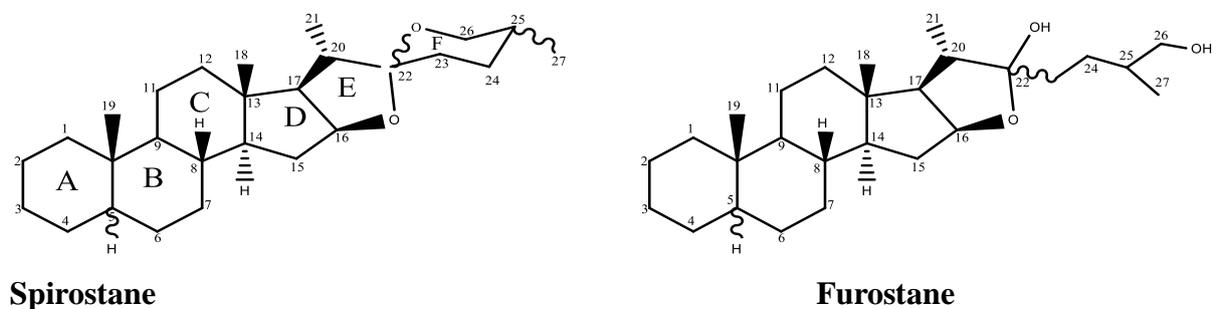


Figure II.6.: Les différents squelettes tétracycliques de saponosides rencontrés.

II.1.2.2. Saponosides stéroïdiques

Les angiospermes monocotylédones Liliaceae (Asperge, petit houx), Dioscoraceae (Discoreae) et Agavaceae sont assez fournies en saponosides stéroïdiques [6,7]. La génine de ces derniers (on dénombre plus d'une centaine) est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbone [8]. Deux principaux types de squelette existent [6]: pentacyclique (furostane) et hexacyclique (spirostane).



Pour ces deux squelettes et en l'absence d'une double liaison en 5(6), la fusion descycles A et B peut être *cis* ou *trans*. Ces composés possèdent invariablement un hydroxyle en positions 3 (α ou β). D'autres fonctions hydroxyles peuvent être présentes en positions C-1, C-2, C-6, C-14 et C-17 [6].

II.1.3. Oses (Partie osidique)

Les unités saccharides qui constituent les saponines sont communes : D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique (**Figure II.7**). La partie sucre de la molécule peut compter jusqu'à 11 oses liés à la génine par une liaison de type acétal. Habituellement, la liaison glycosidique s'effectue entre une seule section saccharidique et le groupement hydroxyle en position 3 de la génine, les saponosides sont dits dans ce cas monodesmosidiques (glycyrrhizine). Toutefois, lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, en positions 3 et 28 on parle de saponosides bidesmosidiques (Sénégine III). [4].

Exceptionnellement, la littérature a rapporté l'isolation et l'identification de quelques tridesmosides et des bidesmosides chez lesquels les sections sucres sont liées d'une manière covalente par une double estérification sur un diacide (Tubeimoside 1) [4].

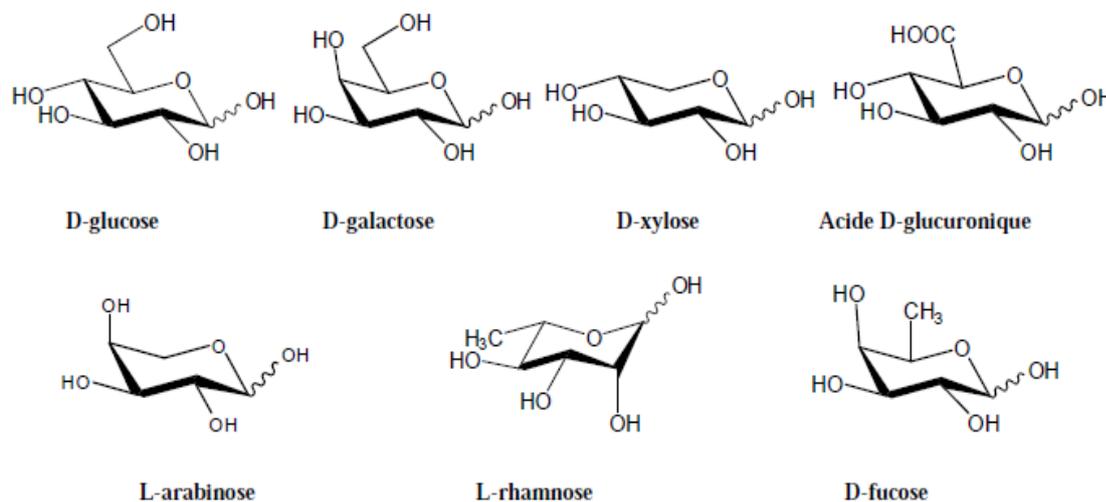


Figure II.7 : Différents squelettes des oses

II.1.4. Distribution des saponines

Les saponines sont distribuées dans une large variété de produits alimentaires tels que l'asperge, les haricots, les mûres sauvages, les pois, les pommes de terre, la betterave sucrière, le thé et dans plusieurs familles de plantes Caryophyllaceae, Caryocaraceae et Fabaceae. [9-12].

II.1.5. Biosynthèse des saponosides

Les deux types structuraux des saponines : saponines stéroïdiques et saponines triterpéniques présentent une étoile parenté, puisqu'ils proviennent de la même origine biosynthétique lesqualéne (**Figure II.8**). Ce composé hydrocarboné insaturé ($C_{30}H_{50}$) se forme par l'assemblage de queue-queue de deux unités de farnésyl-diphosphate en C_{15} (**Figure II.9**). Il apparaît tout d'abord le présqualéne qui est ensuite transformé en squalène.

L'acétyl-CoA sert comme un produit initial pour la synthèse d'un isoprène activé. L'acide mévalonique est son précurseur direct. L'addition successive de trois isoprènes conduit au farnésyl-diphosphate, qui représente le produit initial pour la synthèse des triterpènes qui est leur précurseur en C_{15} [4 ,13].

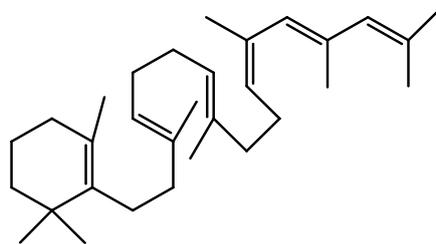


Figure II.8 : La formule cycliqueduSqualéne

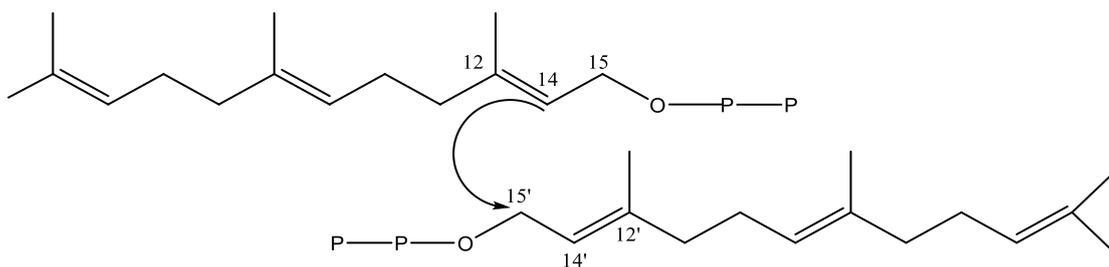


Figure II.9 :L'assemblage queue-queue de deux unités farnésyldiphosphate

Les principales étapes de biosynthèse du squaléne et la formation des sapogénines sont schématisées dans la Figure II.10[33]

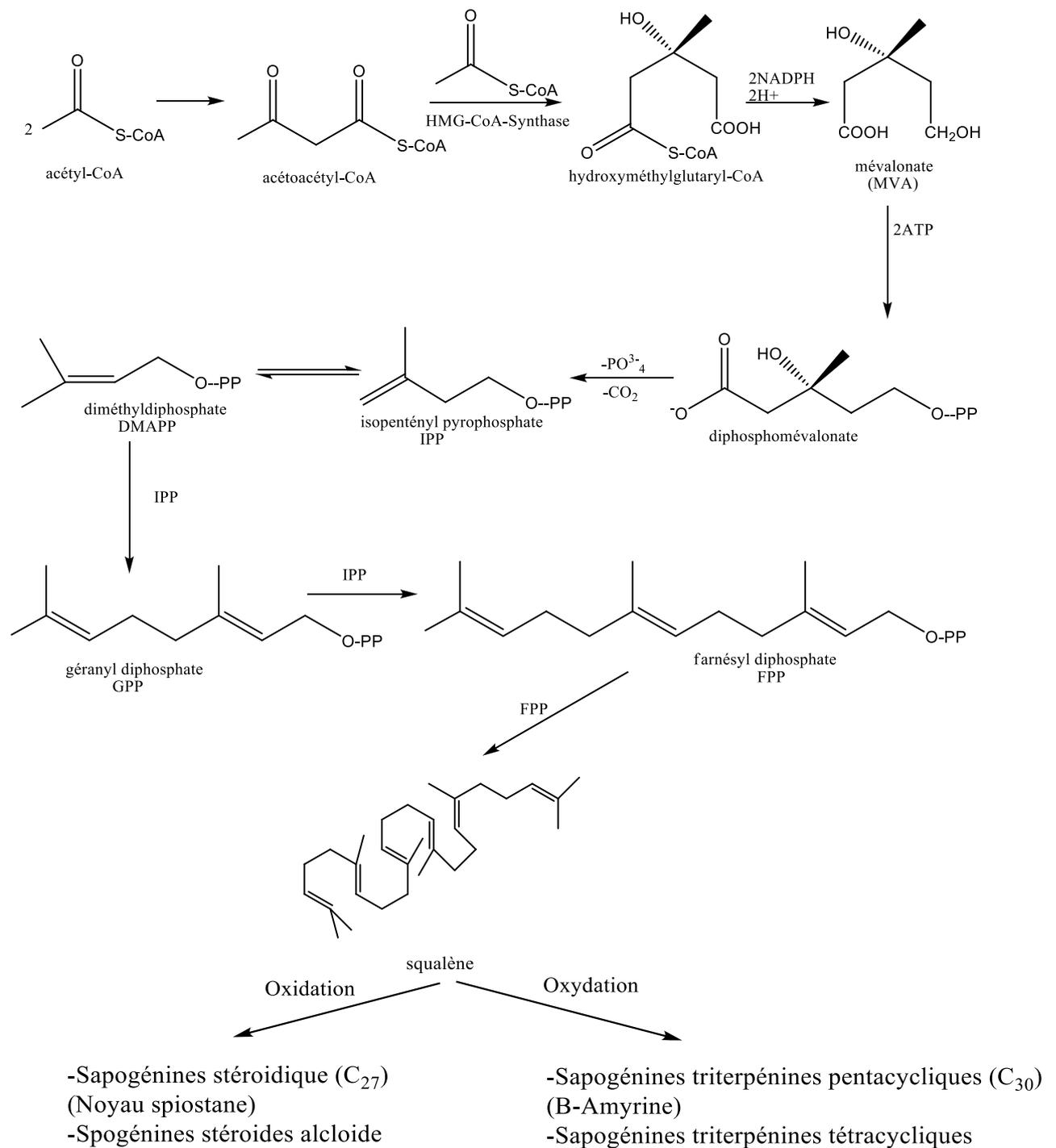


Figure II.10 : Biosynthèse des différentes saponogénines

II.1.6. Propriétés biologiques des saponosides :

Les nombreuses études biologiques ont montré que les saponosides possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses : molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et

immunomodulatrice [14-16]. Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités antiapoptotiques sur différents types de cellules : Jurkat (lymphocytes T-humains leucémiques), tératocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques [17, 18, 19, 20]. Le pouvoir des saponosides à lyser les globules rouges ou hémolytique (érythrocytes) est connu depuis très longtemps [11]. Cette propriété peut être utilisée comme moyen de détection au sein des plantes. Cependant, en raison de la variation structurale de cette classe de métabolites secondaires, chaque saponoside n'est pas forcément hémolytique [11]. Le phénomène d'hémolyse est expliqué par l'adsorption des saponosides sur la membrane cellulaire des érythrocytes. Cette adsorption se fait par complexation des saponosides avec les stérols membranaires [11]. Le pouvoir hémolytique dépend de la nature de la génine et du nombre d'unités osidiques [21]. La comparaison des activités des saponosides monodesmosides et bidesmosides a prouvé que les premiers cités sont généralement plus hémolytiques [22]. De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses [23]. Les valeurs d'IC₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 µg/ml et 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire [24]. Les saponosides sont connus pour leur toxicité envers les animaux à sang froid tels que les poissons. Quelques plantes à saponosides sont ainsi utilisées traditionnellement comme poison de pêche [12]. Certains saponosides à squelette cycloartane comme l'oleifolioside A, oleifolioside B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de l'espèce *Astragalus oleifolius*, sont très actifs contre la leishmaniose [22].

II.2. Les flavonoïdes

II.2.1. Généralité

Les flavonoïdes représentent un groupe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Actuellement, plus de 9000 flavonoïdes ont été isolés et caractérisés [25]. On les trouve fréquemment et avec une plus grande diversité structurale chez les angiospermes. Ils sont localisés dans divers organes : feuilles, fleurs, fruits et racines [26].

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C 6-C3-C6). Ce dernier situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et le cycle B de 2' à 6' (**Figure II.11**) [27].

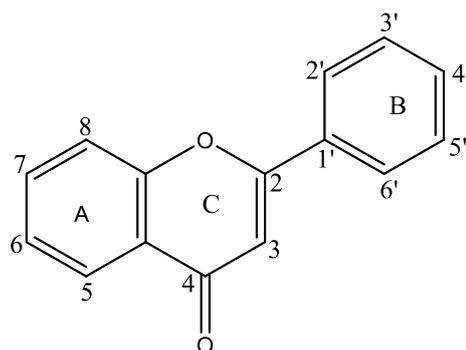
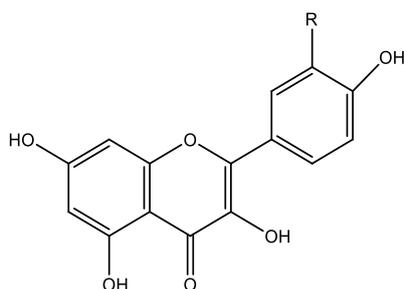


Figure II.11 : Squelette de base des flavonoïdes

II.2.2. Classification

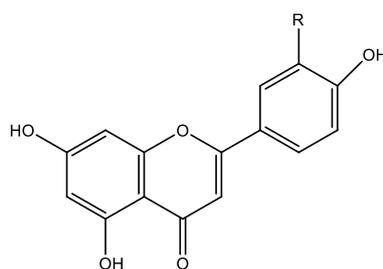
Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (**figure II.12**), nous citerons les principales :

Flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, Anthocyanidine, chalcones, aures, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, coumestanes,... etc. (**Figure II.12**). [28].



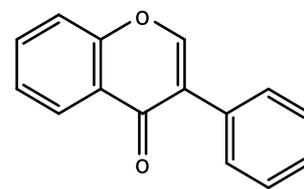
Flavanols

R=H ; kaempférol
R=OH; quercétine

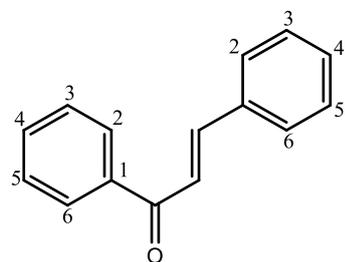


Flavones

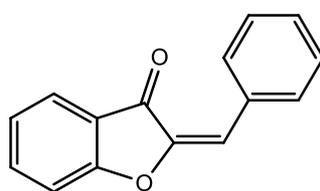
R=H ; apigénine
R=OH; lutéoline



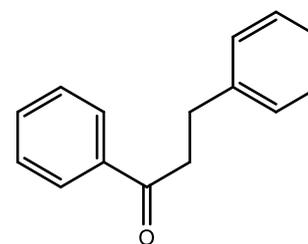
Isoflavone



Chalcone



Aurone



Dihydrochalcone

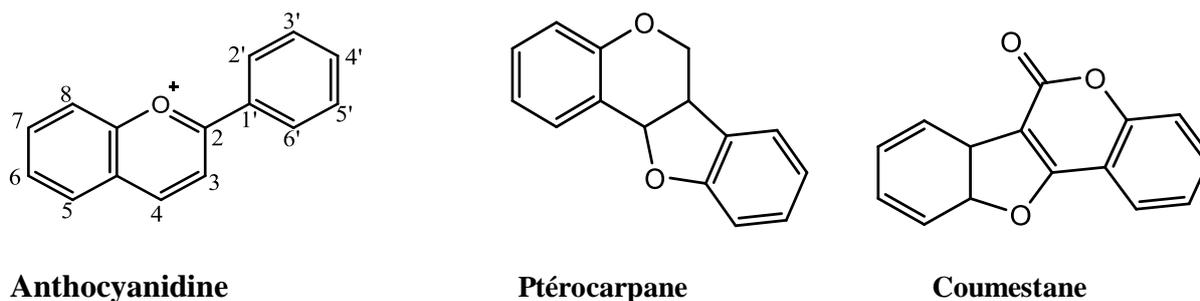


Figure II.12 : Les différentes sous-classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme *C*- ou *O*-glycosylés; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les *O*-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que les *C*-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [4].

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le *D* glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le *D*-galactose et le *D*-mannose, ainsi que des pentoses, le *D*-xylose, le *L*-arabinose et le *D*-apiose sont fréquents avec le *L*-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide *D*-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants sont le rutinoside et le néohesperidose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate [29].

II.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonique est la chalconesynthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone [30]. Cette dernière est l'intermédiaire qui caractérise la synthèse des différentes classes de flavonoïdes. Le tableau II.1 rassemble la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes telles que présentées dans la Figure II.13

Tableau II.1 la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes

Numéro	Abréviation	L'enzyme
1	CHS	Chalconesynthase
2	CHI	Chalconeisomérase
3	FNSI	Flavonesynthase I
4	FNSII	Flavonesynthase II
5	IFS	Isoflavonesynthase
6	FNR	Flavanone 4-réductase
7	F3H	Flavanone 3-hydroxylase
8	ANS	Anthocyanine synthase
9	DFR	Flavonolsynthase
10	DFR	Dihydroflavonol 4-reductase
11	F3GT	Flavonoïde 3-O-glucosyl-transférase

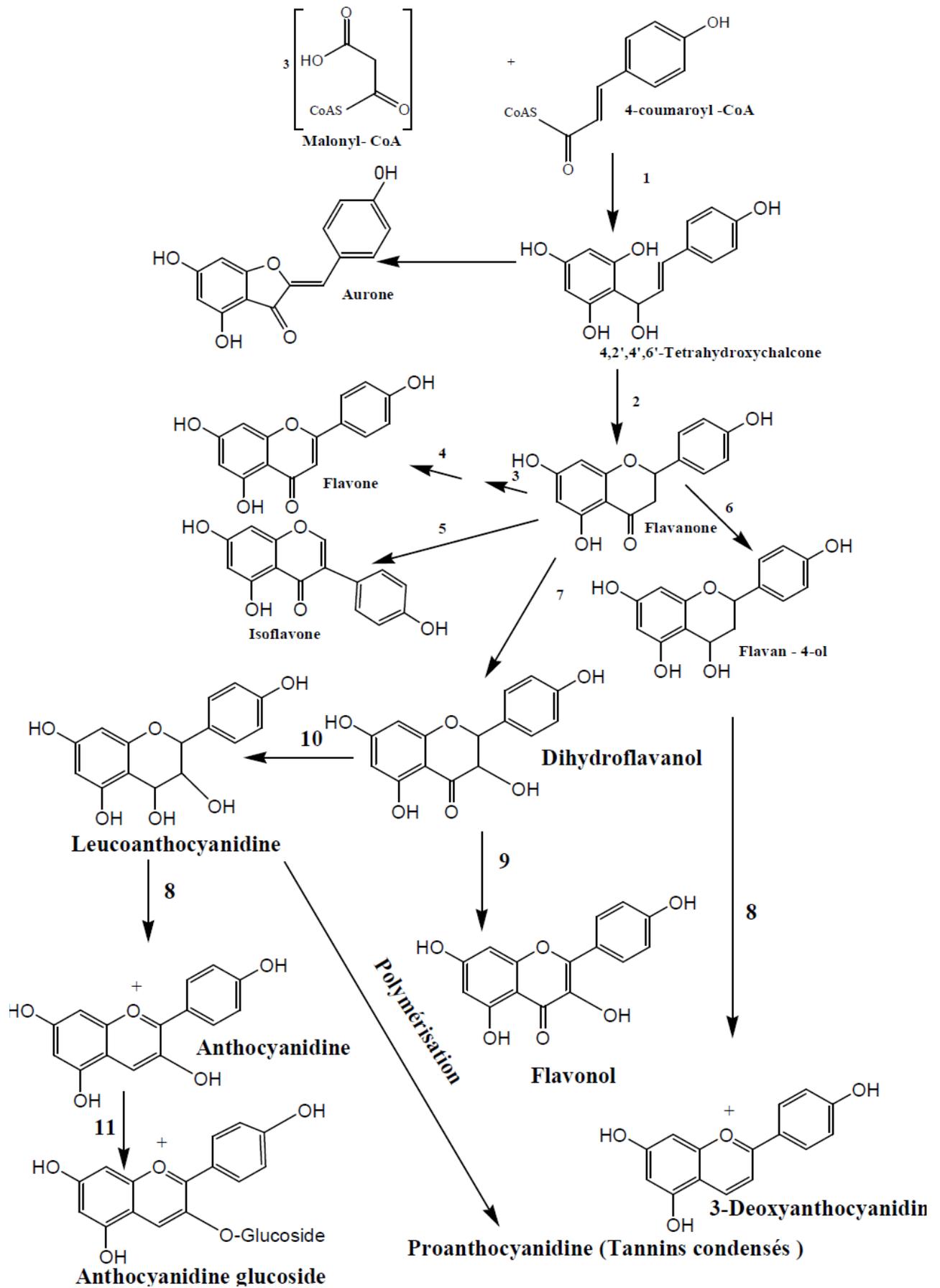
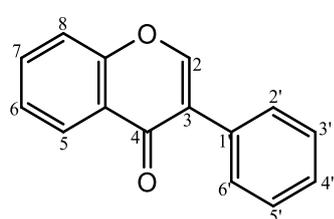


Figure II.13: Biosynthèse des flavonoïdes

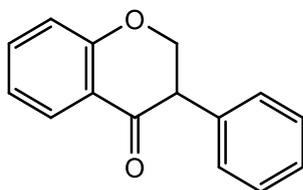
II.2.4. Isoflavonoïdes :

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B en C-3 au lieu de C-2, formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane. Ces composés sont presque spécifiques de la famille Fabaceae [31]. Cette spécificité est liée à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) en 3-phénylchromone (isoflavone) [4]. Ils peuvent être classés selon le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires en plusieurs sous classes : isoflavones, isoflavanones, isoflavanes, isoflavanols, isoflav-3-ènes, coumaronochromones, coumestanes, 3-arylcoumarines, roténoïdes, ptérocarpanes, 2-arylbenzofurane, α -méthyldéoxybenzoïne

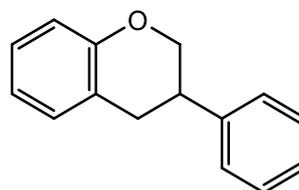
(Figure II.14).



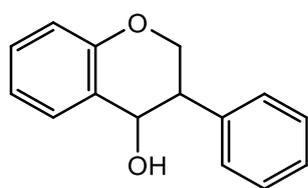
Isoflavone



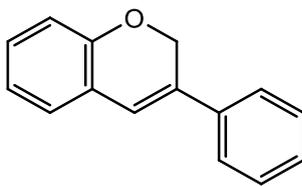
isoflavanone



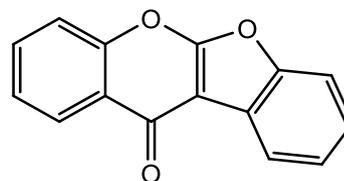
isoflavane



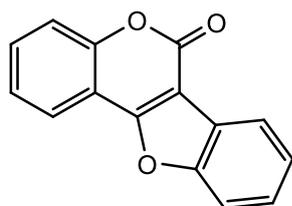
Isoflavanol



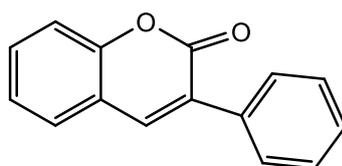
isoflav-3-ène



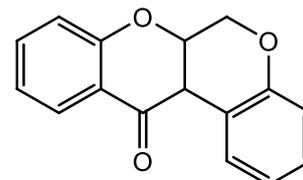
coumaronochromone



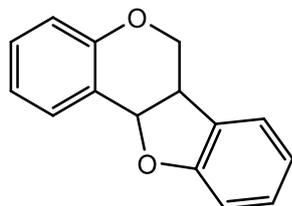
Coumestane



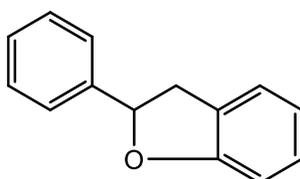
3-arylcoumarine



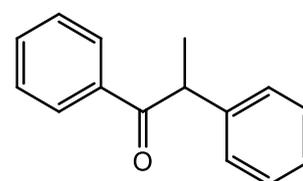
roténoïde



Ptérocarpane



2-arylbenzofurane



α -méthyldéoxybenzoïne

Figure II.14: Structure des différentes sous classes d'isoflavonoïdes

II.2.4.1. Distribution

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones, sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce, les graines et quelquefois dans les feuilles et fleurs [32].

Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont presque exclusivement présents chez les Légumineuses. En effet, 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille [32]. Il apparaît néanmoins qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes appartenant à 59 autres familles [29]. Comme chez les Légumineuses, la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones [33].

II.2.4.2. Biosynthèse des isoflavonoïdes

La biosynthèse des isoflavones repose sur une voie générale avec la phénylalanine comme précurseur. Sa transformation en acide cinnamique ou l'un de ses dérivés, lui-même transformé en acide paracoumarique ou l'un de ses dérivés, aboutit à une chalcone, précurseur biosynthétique de la plupart des flavonoïdes [34]. La figure suivante illustre la voie biosynthétique des isoflavonoïdes.

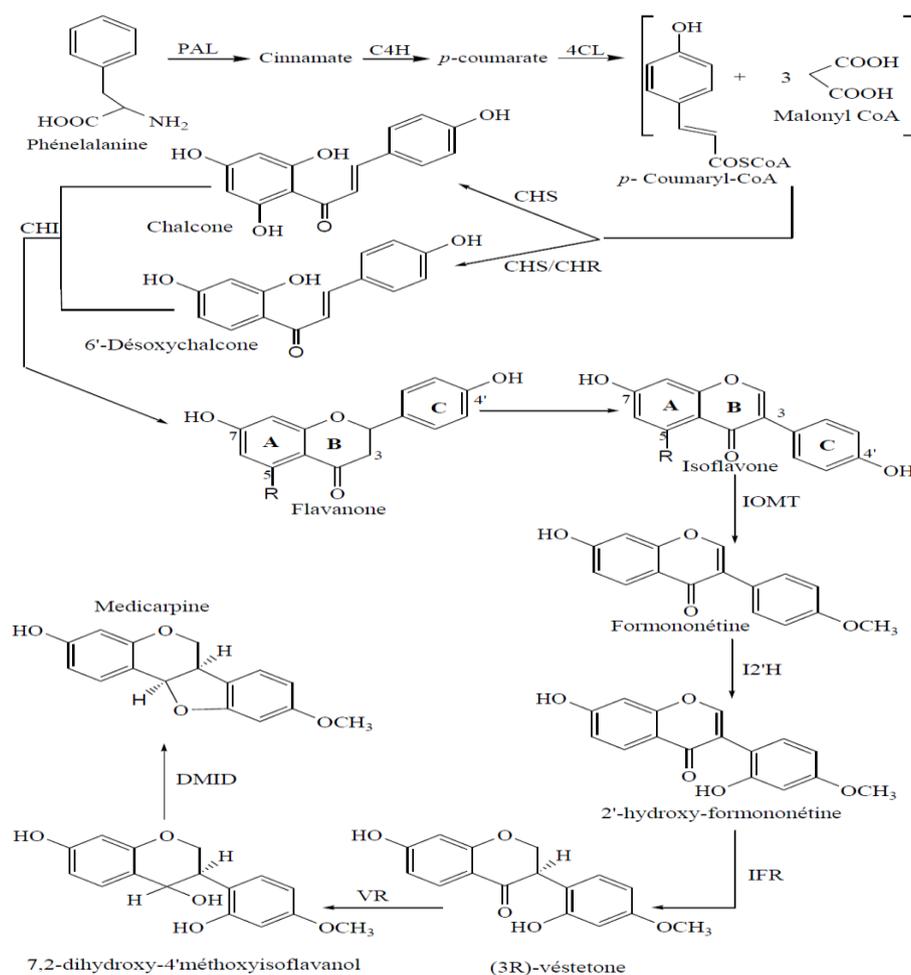


Figure II.15 : Biosynthèse des isoflavonoïdes**II.2.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes**

Connus pour leurs multiples rôles, les composés flavoniques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins). La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

❖ Piégeage de radicaux

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène [35].

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations, d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections: cancers, inflammations chroniques, athéroscléroses...

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèse [36]. De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardio-vasculaires.

❖ Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux :

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ($O_2\bullet$). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [35]. Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques ($OH\bullet$). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer [37].

Les flavonoïdes possèdent en plus de leur pouvoir antioxydant des propriétés :Ostrogéniques (isoflavones), anti-hépatotoxique, antispasmodique, anti diarrhéique et anti cancérogène et

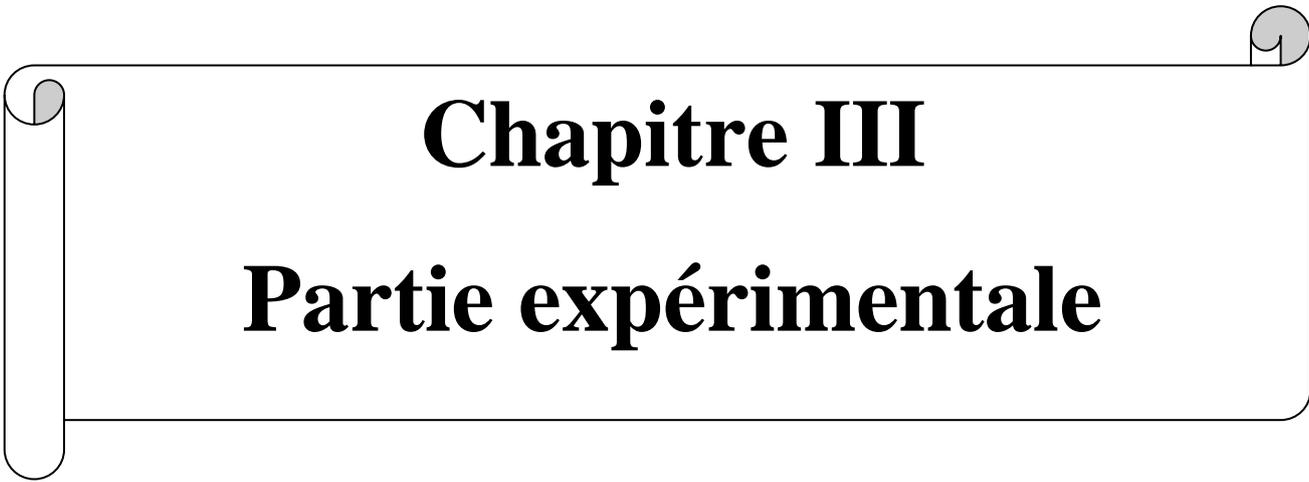
inhibitrice de la croissance des cellules tumorales *in vitro*. Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents anti-ulcéreux [38].

Références bibliographiques

- [1] **Sparg S.G.**, Light M.E., van Staden J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethno pharmacology*. 94, 219-243.
- [2] **Mors W.B.**, do Nascimento M.C.L., Ruppelt Pereira, B.M., Pereira, N.A., 2000. Plant natural products active against snake bite the molecular approach. *Phytochemistry*. 55, 627-642.
- [3] **Kaipnazarov T.N.**, Uteniyazov K.K., Saatov Z., 2004. The structure of cyclostipuloside from *tragacantha stipulosa* Boriss. In: International conference on saponins. Phytochemistry and application of plant saponins. Pulaway: Institute of soil science and plant cultivation, pp 82.
- [4] **Bruneton J.**, 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.
- [5] **Hostettmann K.**, Marston, A., 1995. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Saponins. Cambridge University Press, 117.
- [6] **Chawlek M.**, 2004. Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine, étude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité Hémolytique. Thèse de Doctorat. Université de Reims, France.
- [7] **Robinet F. G.**, 2004. Métabolites des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de Doctorat. Université de Paris, France.
- [8] **Malecky M.**, 1951. Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Suisse.
- [9] **Dini I.**, Tenore G.C., Schettino O and Dini A., 2001. New oleananesaponins in *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3976–3981.
- [10] **Xia Z. H.**, Zou M. L., Sang S. M., Lao A. N., 2004. Segetoside L, A New Triterpenoidsaponin from *Vaccaria segetalis*. *Chin. Chem. Lett.* 15, 55–57.
- [11] **AlabdulMagid A.**, 2005. Étude chimique de deux Caryocar de Guyane et d'un Guioa de Nouvelle Calédonie. Thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne.
- [12] **Yalcin F. N.**, Piacente S., Perrone A., Capasso A., Duman H., Çalis I., 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm. *Phytochemistry*. 73, 119–126.
- [13] **Lüttge U.**, Kulg M., Baner G., 1992. *Botanique; Traité fondamental*, Ed. Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 207.
- [14] **Lacaille-Duboi, M.A.**, Wagner H., 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 2, 363–386.
- [15] **Lacaille-Dubois M. A.**, 2005. Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-Ur-Rahman (Ed.). *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32, 209–246.
- [16] **Lacaille-Dubois M. A.**, Wagner H., 2000. In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in *Natural Product Chemistry*. Vol.21. 633–687. Elsevier Amsterdam.
- [17] **Lee Y. N.**, Lee H. Y., Kim S. I., Lee, S. K., Park B. C., Kim K. W., 1996. *In vitro* introduction of differentiation by gensenosides in F9 Teratocarcinoma cells. *Eur. J. Cancer*. 32A, 1420–1428.

- [18] **Park J. A.**, Lee K. Y., Oh Y. J., Kim K. W., Lee S. K., 1997. Activation of caspase protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of gensenosides Rh-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121, 73–81.
- [19] **Yui S.**, Ubukata K., Hodono K., Kitahara M., Mimaki Y., Kuroda M., Sashida Y., Yamasaki M., 2001. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpenesaponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *Int Immuno pharmacol.* 1, 1989–2000.
- [20] **Gaidi G.**, Correira M., Chauffert B., Beltramo J. L., Wagner M., Lacaille-Dubois M.A., 2002. Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. *Planta Med.* 68, 70–72.
- [21] **Hassane A.**, 2010. Etude de l'activité antioxydant des saponines du tourteau de L'arganier. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V Agdal, Maroc.
- [22] **Arrif S.**, 2009. Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum* : *V. balli* et *V. dentifolium*. Université Hadj Lakhdar, Batna.
- [23] **Gauthier C.**, 2008. Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono- et bidesmosidique. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Canada.
- [24] **Gauthier C.**, 2006. Glycosidation de triterpène pentacyclique de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux. Thèse de Doctorat. Université du Québec., Canada.
- [25] **Ferrer J. L.**, Austin M. B., Stewart Jr, C., Noel J. P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry.* 46, 356–370
- [26] **Harborne J. B.**, 1977. Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms. *Biochem.Syst. Ecol.* 5, 7–22.
- [27] **Lhuillier A.**, 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *agauria salicifolia* hook. F. Ex. oliver, *agauria polyphyla* baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* baker (*Monimiaceae*) & *Embelia concina* baker (*Myrsinaceae*). Thèse de Doctorat. Université Toulouse, France.
- [28] Forkmann, G., Heller, W. 1999. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1. Elsevier Science, Amsterdam, 713–748.
- [29] **Hollman P.C.H.**, Arts I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavanols nature occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80, 1081-1093.
- [30] **Richter G.**, 1993. Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.
- [31] **Lapčik O.**, 2007. Isoflavonoids in non-leguminoustaxa: A rarity or a rule. *Phytochemistry* .68, 2909–2916.
- [32] Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research.* 113, 287-299.
- [33] **Reynaud J.**, Guilet D., Terreux R., Lussignol M and Walchshofer N., 2005. Isoflavonoids in non leguminous families: an update. *Natural Products Reports.* 22, 504-515.
- [34] **Wang, X.**, 2011. Structure function and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *FunctIntegr Genomics.* 11, 13-22.

- [35] **Pietta P.**, 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63, 1035-1042.
- [36] **Merken H.M.**, Beecher G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 577-599.
- [37] **Magnania L.**, Gaydoua E.M., Hubaudb J.C., 2000. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion., *Analytica Chimica Acta*. 411, 209-216
- [38] **DiCarlo G.**, Mascolo N., Izzo, A.A., Capasso F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65, 337-353.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and a light gray shadow, positioned horizontally across the middle of the page. The scroll is unrolled, with the top and bottom edges curving upwards at the ends.

Chapitre III

Partie expérimentale

III.1. Etude phytochimique de l'espèce *Ononis angustissima*

III.1.1. Description et caractéristiques botanique de l'espèce *O. angustissima*

Ononis angustissima est une plante rameuse à nombreuses tiges dressées bien verte. Elle peut atteindre 30 à 100 cm. Les rameaux sont persistants après la floraison.

Feuilles à trois folioles étroites quatre à cinq fois plus longues que large, plus ou moins dentées. Les feuilles sont munies de deux stipules engainantes à leur base, le pétiole des feuilles est court. Fleurs jaunes, petites et moyennes (environ 0,3 à 2,5 cm) portées par un long pétiole qui se prolonge au-delà de l'insertion de la fleur [1].

Les gousses peuvent être régulièrement déhiscent, ou manquent de points de suture et irrégulièrement déhiscent. La corolle et le calice sont généralement persistantes après l'anthèse, avec un ou parfois les deux en fonctionnement dispersion des fruits.

Les quatre pétales inférieurs (aile et de la quille) sont partiellement soudés et leurs griffes sont adnées au tube staminal ; les pétales supérieurs (bannière) peuvent également être soudés aux pétales inférieurs, et parfois à l'étamine libre.

La nacelle est souvent de texture du papier et sont entièrement situés dans la corolle persistante et souvent fortement modifiés ou calice [1] [2].



Figure III.1. : Schéma de l'espèce *Ononis angustissima*.

III.1.2. Place dans la systématique botanique [3].

Tableau III.1. : Classification d'*Ononis angustissima*

Règne	Végétal
Taxonomie	<i>Ononis angustissima</i>
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Rasales (fabales)
Famille	Légumineuseae (fabaceae)
Sous Famille	Papilionaceae
Tribus	Trifoleae
Genre	<i>Ononis</i>
Espèce	<i>angustissima</i>

III.1.3. Protocole expérimental

III.1.3.1. La Récolte et Extraction du matériel végétal

Le matériel végétal étudié a été récolté en mois d'avril 2007 à Biskra par monsieur BOUHEROUM dans la région de la wilaya de Biskra (sud algérien), et puis elle a été identifiée par le professeur KAABACHE (université de Sétif). Un échantillon a été déposé au niveau de l'unité de recherche (VARENBIOMOL).

Les parties aériennes de *O. angustissima* fraîchement cueillies dont le poids est 500 g ont été mise à une exsudation où sont trempés dans 1 litre de chloroforme pendant 30 minutes, l'exsudat obtenu après évaporation du solvant à $T = 35^{\circ} \text{C}$ a une masse de 20 g.

Une masse de 980 g des parties aériennes de la plante *O. angustissima* séché à l'abri des rayons solaires et pulvérisée est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Éthanol/Eau, gggggggg80/20, V/V), en répétant cette opération 3 fois avec renouvellement du solvant (24 à 48 heures/3 fois). L'extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 35°C , puis dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1Kg de matière sèche. Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (la chlorophylle, les cires, les résines, les boues terpéniques, le sable

etc...). La solution ainsi dégraissée subit une filtration pour obtenir une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi des extractions de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol (figure III.2).

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

Tableau III.2 : Rendement des extraits d'*Ononis angustissima*

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
980g	Éther de pétrole	2.08	0.21
	Chloroforme	28.09	2.86
	Acétate d'éthyle	16.03	1.63
	<i>n</i> -Butanol	9.34	0.95

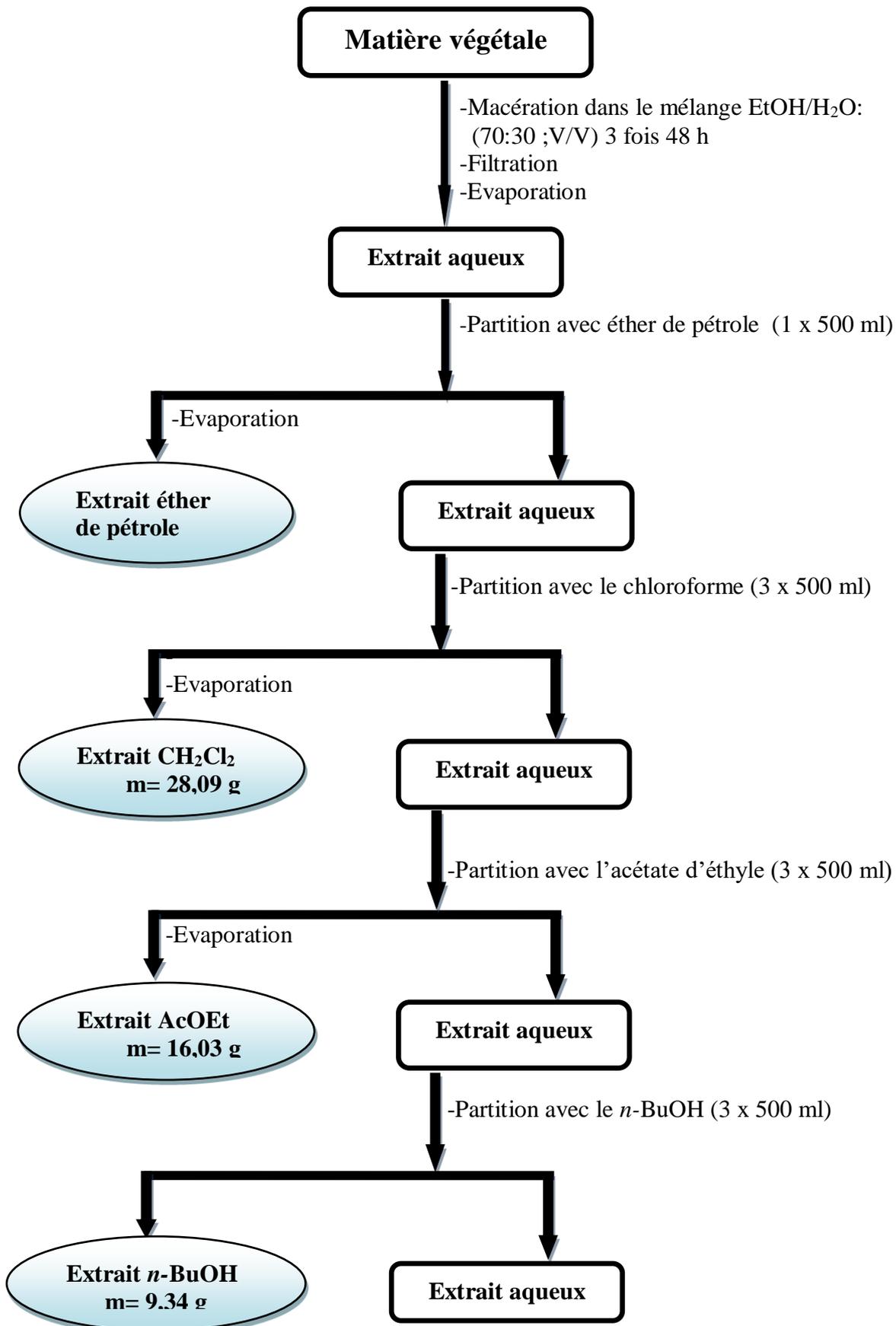


Figure III.2 : Schéma d'extraction de la plante *Ononis angustissima***III.1.3.2. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanol**

Une masse d'environ 2,5 g d'extrait *n*-butanol est déposée sur une colonne de sephadex LH-20. L'élution est réalisée par le méthanol avec un fractionnement tous les 10 ml (1.1ml/min). Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (type 60, F-254 mesh, Merck) sur support en verre. Les plaques sont éluées avec le CHCl₃/MeOH/H₂O (40/9/1) et le BAW : *n*-but/AcOH/H₂O (60/15/25) visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec le Ce(SO₄)₂/H₂SO₄ et chauffées pendant 3mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.13.

Tableau III.3 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol

Système d'élution MeOH 100 %	
N° de fraction	Masse (mg)
Ona/2/1	159.6
Ona/2/2	101.5
Ona/2/3	303.2
Ona/2/4	417.8
Ona/2/5	351.4
Ona/2/6	99.6
Ona/2/7	278.3
Ona/2/8	245
Ona/2/9	168.2
Ona/2/10	93.8
Ona/2/11	305.1
Ona/2/12	46.4
Ona/2/13	61.6
Ona/2/14	37.9
Ona/2/15	10.3
Ona/2/16	40.8
Ona/2/17	8

Les fractions présentant le même profil CCM (testées dans les deux systèmes différents qui sont : BAW et le CH₃COOH/MeOH/H₂O) sont réunies pour donner 5 fractions majoritaires (A-E), selon le tableau III.4 :

Tableau III.4 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanol d'*Ononis angustissima*.

Nom des fractions	Poids des fractions mg	Observations
A	900	Mélange complexe.
B	800	Mélange séparable.
C	178.3	Mélange séparable.
D	168	Mélange séparable.
E	195.8	Produit pur.

➤ **Fraction B :**

Cette fraction de masse 800 mg, a subit une séparation par CLHP préparative en utilisant le MeOH/H₂O : (15/35) comme système avec 8 injections le temps de l'injection est 58 min les résultats finaux de cette purification (produit pur) sont donnés dans le tableau III.5:

Tableau III.5 : Résultat de séparation de la fraction B

N° de composé	Temps de rétention t_R (min)	Masse (mg)
composé 8	46	1.1
composé 9	50	1.6

➤ **Fraction C :**

Une séparation par CLHP- préparative est effectuée pour purifier La fraction C en utilisant le MeOH/H₂O (35/65) comme système, les résultats finaux de cette purification (produit pur) sont donnés dans le tableau III.6 :

Tableau III.6 : Résultat de séparation de la fraction C

N° de composé	Temps de rétention t_R (min)	Masse (mg)
composé 7	15	1.0
composé 4	27	1.5
composé 6	34	8.0
composé 3	44	1.5

➤ Fraction D :

La fraction D d'une masse de 168,0 mg a permis d'obtenir les deux composés (1,2) par une CLHP-préparative le système de élution est MeOH/H₂O (15/35) les résultats finaux de cette purification (produit pur) sont donnés dans le tableau III.7 :

Tableau III.7 : Résultat de séparation de la fraction E.

N° de composé	Temps de rétention t_R (min)	Masse (mg)
composé 1	27	1,0
composé 2	14	2,4

➤ Fraction E :

la formation d'un précipité que nous avons récupéré et filtré pour obtenir un produit pur sous forme d'une poudre Blanche **composé 5** (195,5 mg) .

L'organigramme de séparation et de purification des produits isolés de l'extrait *n*-butanol de *ononis angustissima* est représenté ci-dessous (Figure III.3).

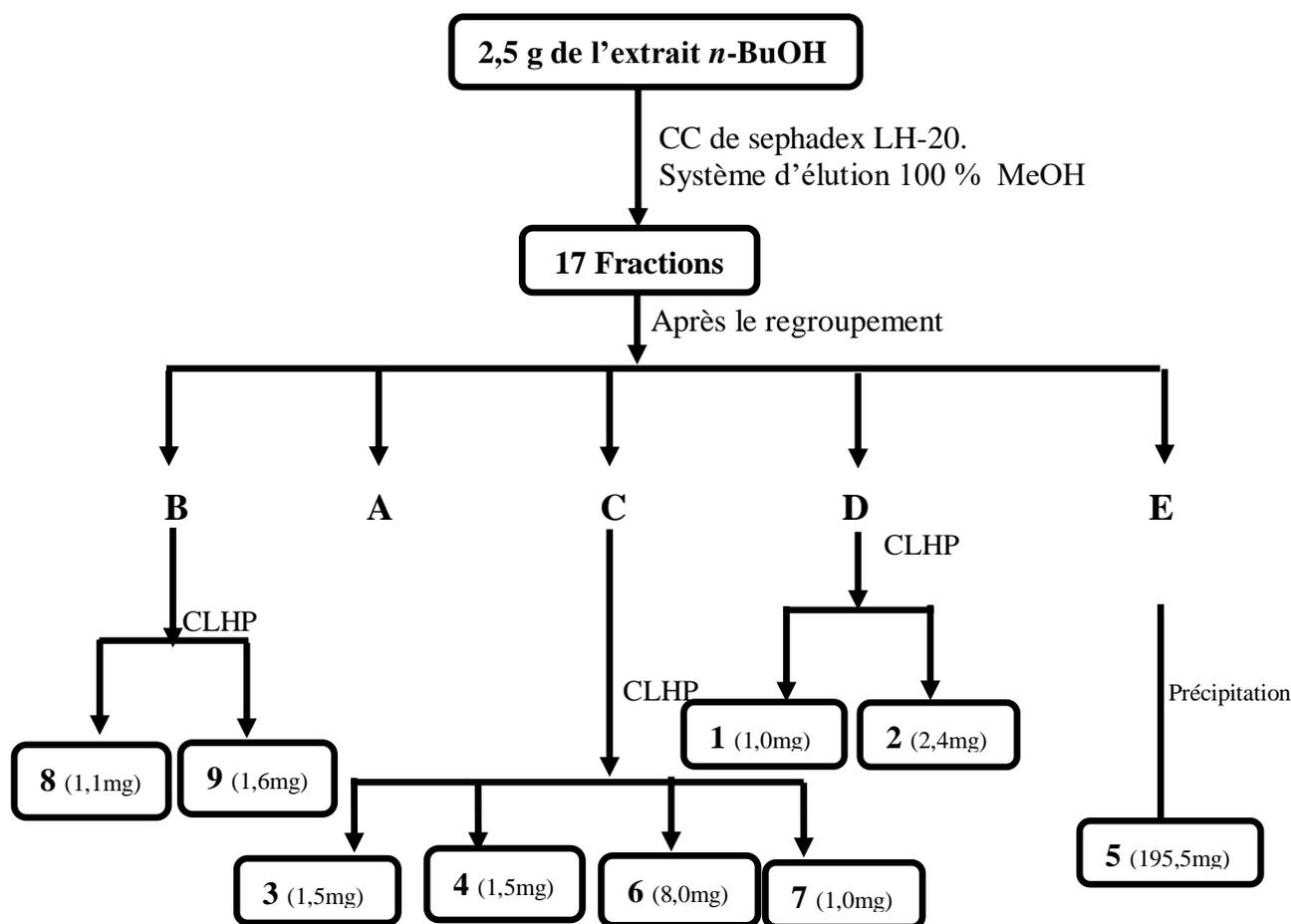


Figure III.3.: Schéma de purification des produits issus de l'extrait n-BuOH d'*O. angustissima*

III.1.3.3. Séparation et purification des composants de l'exsudat Chloroforme

Une masse d'environ **17 g** de l'exsudat chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système Ether de pétrole / Acétone avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.8

Tableau III.8: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'exsudat

Lot de fraction	N° de fraction	Masse de fraction (mg)	Système d'élution	
			%Ether de pétrole	%Acétone
1-5	Ona/3/1	45.1	100	0
5-10	Ona/3/2	47.2	99	1
11-20	Ona/3/3	20.1	97	3
21-41	Ona/3/4	225.8	95	5
37-50	Ona/3/5	66.4	90	10
51-60	Ona/3/6	26.3	87	13
61-83	Ona/3/7	30.7	86	16
84-95	Ona/3/8	72.7	81	19
96-110	Ona/3/9	607.9	80	20
111-123	Ona/3/10	88.4	80	20
124-130	Ona/3/11	7.5	80	20
131-144	Ona/3/12	44.6	75	25
145-156	Ona/3/13	43.2	70	30
157-170	Ona/3/14	104.5	65	35
171-183	Ona/3/15	21.5	65	35
184-195	Ona/3/16	20.3	60	40
196-220	Ona/3/17	20.2	55	45
221-240	Ona/3/18	196.3	55	45
241-260	Ona/3/19	68.3	50	50
	Ona/3/20	266.2	45	55
261-280	Ona/3/21	222.7	45	55

281-290	Ona/3/22	207.7	40	60
291-295	Ona/3/23	87.7	35	65
296-301	Ona/3/24	194.5	30	70
302-310	Ona/3/25	194.5	25	75
311-319	Ona/3/26	15.6	20	80
320-326	Ona/3/27	128.1	15	85
327-329	Ona/3/28	35.6	10	90
330-340	Ona/3/29	366	0	100

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont toujours testées dans les deux systèmes différents qui sont : BAW et le $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, Ces tests nous permettent de réaliser un deuxième regroupement qui est donné ainsi 14 fractions de (AA-NN), qui est présenté dans le tableau III.9:

Tableau III.9 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'exsudat.

Nom des fractions	Masse des fractions (mg)
AA	650,0
BB	260,9
CC	450,0
DD	2000,6
EE	534,8
FF	840,0
GG	580,3
HH	562,3
II	359,3
JJ	480,2
KK	650,9
LL	1,5
MM	1802,0
NN	3000,9

Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparations et purifications grâce l'utilisation des différentes méthodes chromatographiques sur colonne de gel de silice normale (CC), sur plaque préparative (CEE), sur couche mince (CCM) et sur Sephadex LH-20,CLHP. Ce qui a permis d'obtenir 9 composés à l'état pur.

➤ **Fraction AA (650,0 mg) :**

Le composé 15 (72,0 mg) sous forme d'un précipité de couleur jaune a été obtenu, après lavage par l'Acétone.

➤ **Fraction CC (450,0 mg) :**

Un précipité jaune a été trouvé dans cette fraction. Le lavage avec du l'Acétone nous a permis l'obtention du composé 11 (35,1 mg.).

➤ **Fraction DD (2 g) :**

L'investigation de cette fraction sur colonne de gel de silice normale avec un gradient du système *n*-Hexane / chloroforme (100/0, 30/70,0/100), permis l'obtention de douze sous-fractions.

La sous fraction DD₆ (580,9 mg) soumise à une purification sur plaques préparatives de gel de silice dans le système d'éluion *n*-hexane/CHCl₃ :3/7), nous a permis d'isoler deux produits (composé 10 (49 mg), composé 12 (25,0 mg)). Ces derniers sont soumis à une ultime purification sur colonne de Sephadex LH-20 en présence de méthanol

➤ **Fraction GG (580,0 mg) :**

Les produits issus de la purification par CLHP-préparative (MeOH/H₂O :70 /30) de cette fraction sont identiques aux produits 11 et 12 séparés précédemment.

Tableau III.10 : Résultat de séparation de la fraction GG.

N° de composé	Temps de rétention <i>t_R</i> (min)	Masse (mg)
composé 11	46	1,0
composé 12	47,5	2,4

➤ **Fraction HH (562,3 mg) :**

Le traitement de la fraction HH par CLHP-préparative dans un mélange MeOH /H₂O dans les proportions (70/30) donne deux composés l'un des deux est identique au composé 12. Le tableau III-11 montre le résultat de la séparation :

Tableau III.11 : Résultat de séparation de la fraction HH.

N° de composé	Temps de rétention <i>t_R</i> (min)	Masse (mg)
composé 12	47,5	1,1
composé 14	35	1,0

➤ **Fraction II (359,3 mg) :**

La fraction II est mise à une séparation par CLHP préparative éluée dans le système [MeOH/H₂O, (35/65)] pour donner le composé 13 et le composé 14 trouvé ultérieurement. Le tableau III.12 montre le résultat de la séparation

Tableau III.12 : Résultat de séparation de la fraction II.

N° de composé	Temps de rétention t_R (min)	Masse (mg)
composé 13	29	1,6
composé 14	31	1,6

➤ **Fraction JJ (480,2 mg) :**

De la même façon on a procédé à la purification de la fraction Ona /3/29 .l'élution a été faite dans le système [MeOH/H₂O, (45/55)].

Tableau III.13 : Résultat de séparation de la fraction JJ.

N° de composé	Temps de rétention t_R (min)	Masse (mg)
composé 16	28	1,6
composé 18	35	2,6
composé 19	35	4,4

➤ **Fraction KK (605,9 mg) :**

La fraction KK a donné un précipité jaune qui a été lavé plusieurs fois par l'Acétone pour obtenu un produit pur identique au **composé 18**.

➤ **Fraction LL (1,5 g) :**

La fraction LL a subit une séparation chromatographique sur colonne en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire, l'élution a été réalisé par l'éluant chloroforme-méthanol avec des polarités croissantes, la purification des sous- fractions intermédiaires sur plaques préparatives de gel de silice en utilisant le système (CHCl₃/MeOH :80 /20) qui a donné le produit pur 17 (**composé 17**).

La séparation et purification s'appuyant, principalement, sur les techniques chromatographiques citées précédemment, se sont soldées par l'isolement de 10 métabolites secondaires purs (Figure III.4)

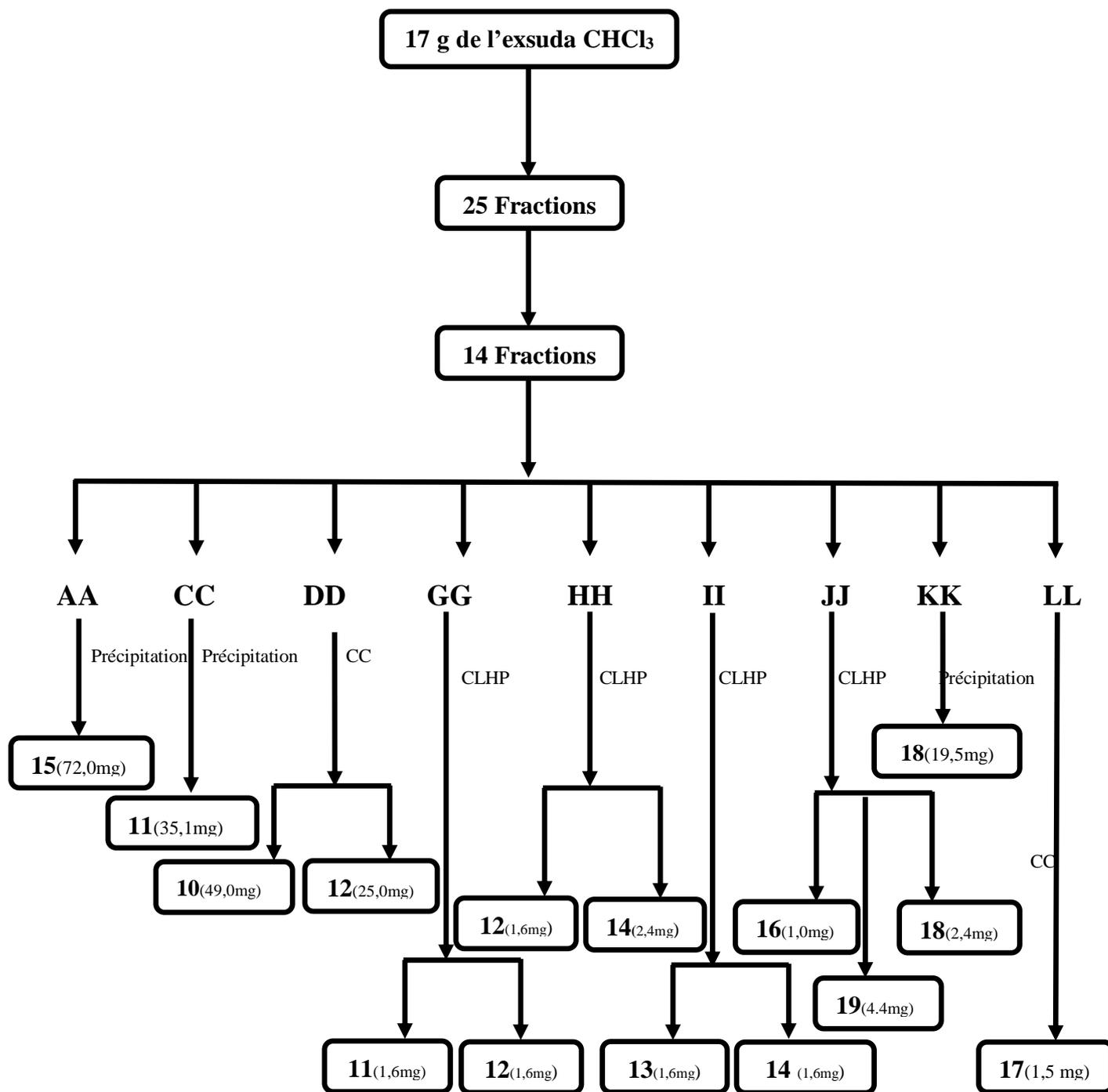


Figure III.4: Schéma de purification des produits issus de l'extrait de l'exsudat d'*O. angustissima*

III.2. Etude phytochimique de l'espèce *Lotus corniculatus*

III.2.1. Description et caractéristiques botanique de l'espèce *L.corniculatus*

Le Lotier corniculé (*Lotus corniculatus* L.) est une plante herbacée vivace de la famille des Fabaceae couramment cultivée comme plante fourragère qui entre dans la composition des mélanges de semences pour prairies mixtes graminées-légumineuses.

Lotier vient de *lotos*, un mot qui désignait plusieurs plantes chez les Anciens Grecs, dont le lotier corniculé. Corniculé vient de *cornu* qui signifiait corne, une allusion aux gousses de la plante qui ressemblent à de petites cornes. Le lotier est communément connu sous le nom de pied de poule, pois joli, sabot de la mariée, sabot du petit Jésus, trèfle cornu, cornette, fourcette, pantoufle, pantoufle du petit Jésus, petit sabot...

C'est une plante basse, plutôt couchée, aux feuilles à trois folioles, ovales, les stipules situées à la base y étant semblables.

La tige est pleine, ce qui permet de le distinguer d'un autre Lotier très commun, le Lotier des marais (*Lotus pedunculatus* Cav.).

Les fleurs jaunes ou jaune-orangé sont en petites têtes. [3,4].



Figure III.5 : Photo de l'espèce *Lotus corniculatus*.

III.2.2. Place dans la systématique botanique : [3]

Tableau III.14. : Classification de *Lotus corniculatus* L.

Règne	Végétal
Sous-Règne	<i>Tracheobionta</i>
Taxonomie	<i>Lotus corniculatus</i>
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous Classe	Rosidae
Ordre	Rasales (fabales)

Famille	Légumineuseae (fabaceae)
Genre	<i>Lotus</i>
Espèce	<i>corniculatus</i>

III.2.3. Protocole expérimental

III.2.3.1. La Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *Lotus corniculatus* ont été récoltées durant le mois de Mars 2012 à Constantine (Algérie). La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par Mr. Mohamed BOUHEROUM. Elles ont été séchées dans un endroit aéré à l'abri des rayons solaires.

III.2.3.2. Extraction

Après broyage, toutes les parties aériennes (500 mg) ont été extraites dans un mélange éthanol-eau (70/30) pendant deux jours (48 h). Après filtration, cette opération est renouvelée 3 fois. Les filtrats ont été ensuite réunis et évaporés à sec sous vide à une température inférieure à 35 °C donnant ainsi l'extrait une solution hydro-alcoolique. Cette solution est soumise à une extraction liquide-liquide par les solvants suivants: Chloroforme, Acétate d'éthyle et enfin par le *n*-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont évaporées et concentrées à sec pour conduire aux extraits suivants : chloroforme (1,7 g), acétate d'éthyle (2,5 g) et *n*-butanol (24,6 g).

Le protocole d'extraction est présenté dans la figure (Figure II.6).

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le tableau III.15 :

Tableau III.15 : Rendement des extraits de *Lotus corniculatus*

Matière végétale	Phase	Masse (g)	Rendement (%)
500 g	Chloroforme	1,7	0,34
	Acétate d'éthyle	2,5	0,50
	<i>n</i> -Butanol	24,6	4,92

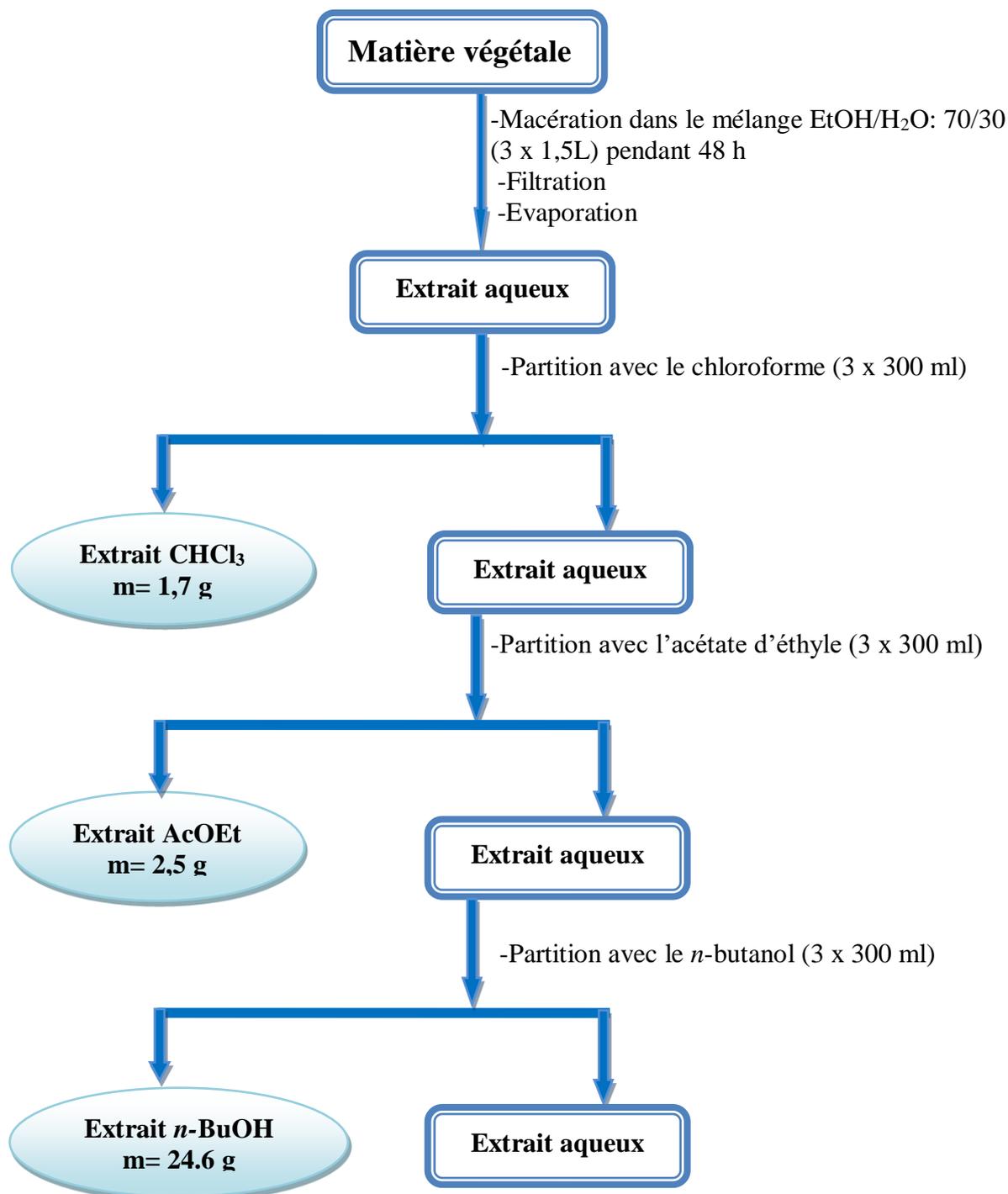


Figure III.6 : Schéma d'extraction de la plante *Lotus corniculatus*

II.2.1.3.3. Séparation et purification des composés de l'extrait *n*-butanol

Avant d'entamer la séparation chromatographique sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec le système d'élution Chloroforme/ Méthanol.

Une masse d'environ 13 g d'extrait *n*-butanol sont déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans le chloroforme. L'élution a été faite par du chloroforme avec un gradient de méthanol et un fractionnement tous les 450 ml. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV ($\lambda=254$ et 365 nm) puis révélées par une solution acide et chauffées à 100 °C pendant 3 min. on obtient 25 fractions, le tableau III.16 rassemble les résultats de cette colonne.

Tableau III.16. Progression de la colonne de l'extrait *n*-butanol

Lot de fraction	N° de fraction	Masse de fraction (mg)	Système d'élution	
			%CHCl ₃	%CH ₃ OH
21-5	lc/3/1	45,1	100	0
5-10	lc/3/2	47,2	99	1
11-20	lc/3/3	20,1	97	3
21-36	lc/3/4	12,8	95	5
37-50	lc/3/5	66,4	90	10
51-60	lc/3/6	26,3	90	10
61-83	lc/3/7	30,7	90	10
84-95	lc/3/8	72,7	88	12
96-110	lc/3/9	607,9	85	15
111-123	lc/3/10	88,4	80	20
124-130	lc/3/11	7,5	80	20
131-144	lc/3/12	44,6	75	25
145-156	lc/3/13	43,2	70	30
157-170	lc/3/14	104,5	65	35
171-183	lc/3/15	21,5	55	45
184-195	lc/3/16	26,3	50	50
184-195	lc/3/17	20,3	50	50
184-195	lc/3/18	18,3	50	50
184-195	lc/3/19	21,3	50	50
184-195	lc/3/20	19,3	50	50

184-195	lc/3/21	29,1	50	50
184-195	lc/3/22	25,4	50	50
184-195	lc/3/23	42,3	50	50
184-195	lc/3/24	33,1	50	50
196-220	lc/3/25	20,2	40	60

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont toujours testées dans les deux systèmes différents qui sont : BAW et le $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, Ces tests nous ont permis de réaliser un second regroupement on constate que la plupart des fractions de l'extrait est presque identique, qui est donné ainsi 8 fractions de (A-H), présenté dans le tableau III.17 :

Tableau III.17 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanol de Lc.

Nom des fractions	Poids des fractions mg
A	332
B	1,865
C	700
D	800,8
E	989,5
F	502,1
G	2,239
H	3,505

➤ **Fraction A (332 mg) :**

Une quantité de cette fraction de masse 100 mg a subi une séparation par CLHP-préparative en utilisant comme système MeOH/EAU dans les proportions (40:60) avec 5 injections, on obtient le produit pur **20** (5,0 mg, $t_R=18$ min)

➤ **Fraction C (700 mg) :**

La séparation des composés **21** ($t_R= 8$ min, 4.0 mg) et **22**($t_R= 30$ min, 1.1mg) a été réalisée par une CLHP-préparative en éluée par le système Méthanol/eau (45/55), Le tableau III.18 montre le résultat de la séparation

Tableau III.18 : Résultat de séparation de la fraction C.

N° de composé	Temps de rétention $t_R(\text{min})$	Masse (g)
composé 21	8	1,1 mg
composé 22	30	1,6 mg

➤ **Fraction D (800 mg) :**

Une chromatographie préparative sur CLHP est réalisée sur la fraction **D** en utilisant comme éluant le système Méthanol/eau (50/ 50) aboutit au composé (23, 24,25), Le tableau III.19 montre le résultat de la séparation :

Tableau III.19_: Résultat de séparation de la fraction D.

N de composé	Temps de rétention $t_R(\text{min})$	Masse (g)
composé 23	32	2,7 mg
composé 24	32	2,7mg
composé 25	37	1,7 mg

6 composés purs ont été isolés à partir des différentes fractions issues de cet extrait par l'emploi de divers procédés de séparation et purification (Figure III. 7).

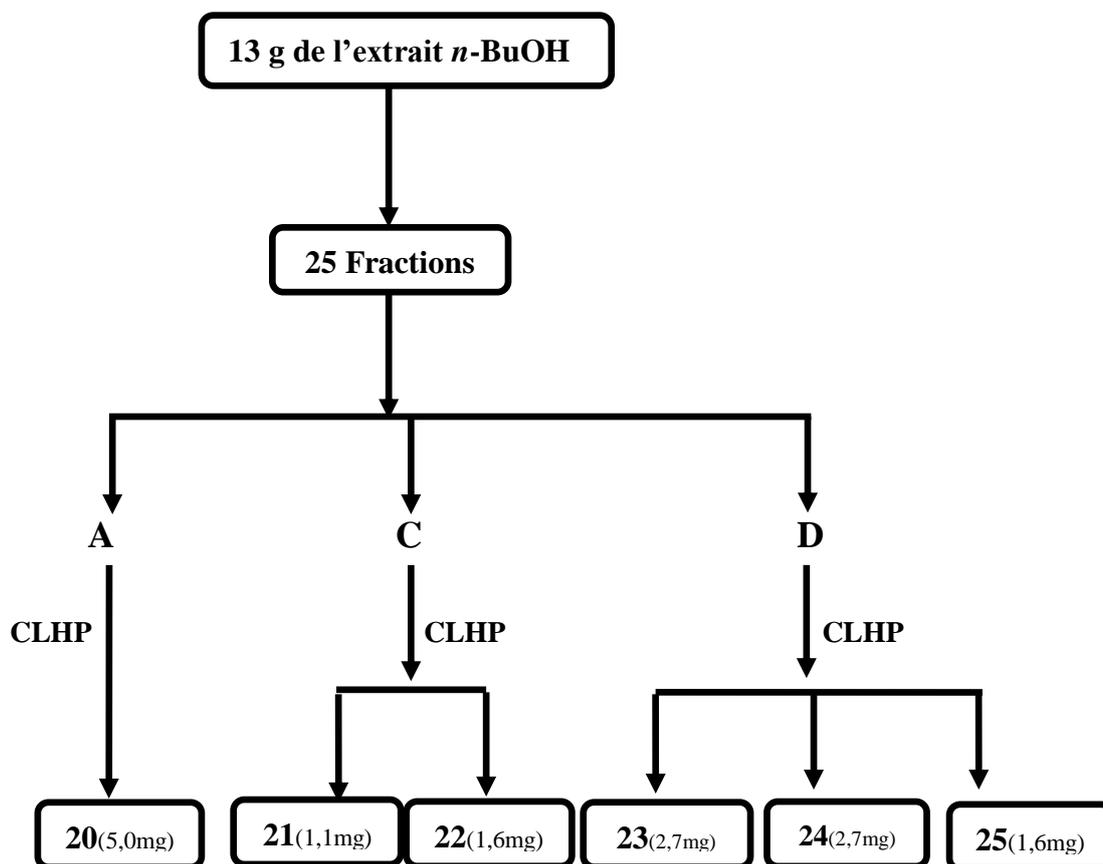


Figure III.7.: Schéma de purification des produits issus de l'extrait *n*-BuOH de *L.c*

III.2.3.4. Séparation et purification des composants de l'extrait Chloroforme

L'extrait chloroforme (1,6 g) a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase inverse. L'éluant est mené par un gradient $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, Des fractions de 50 ml ont été

récoltées et regroupées en fonction de leur profil chromatographique (CCM) en phase normale pour donner 5 (A-E) fractions présentées dans le tableau III.20.

Tableau III.20 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Chloroformique de Lc.

Fractions	Eluant		Masse (mg)
	CHCl ₃	MeOH	
A	0	100	403,2
B	20	80	20,0
C	30	70	55,6
D	40	100	445,3
E	50	50	398,2
F	65	35	172,0

➤ **Fraction B (20,0mg) :**

Cette fraction comporte un seul produit de masse 20 mg (composé **26**).

➤ **Fraction F (172,0mg) :**

La fraction F (172,0 mg) a subi une chromatographie sur CLHP-préparative avec le système d'éluion (MeOH/Eau) (55/45) conduisant ainsi à l'isolement du composé **27**(3,0 mg, $t_R=14$ min)

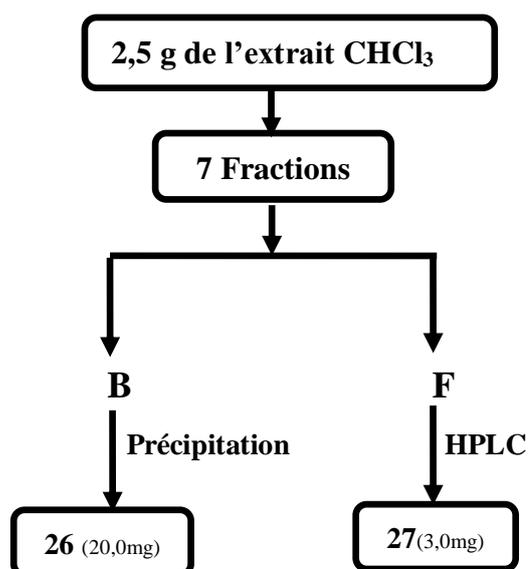


Figure III.8.: Schéma de purification des produits issus de l'extrait chloroforme de L.C

III.3. Le profil LC-MS

l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *ononis angustissima* a été soumis aux analyses LC-HRSIMS et LC-HRSIMS / MS, afin de fournir plus d'informations sur les polyphénols contenus dans les parties aériennes d'*O. angustissima* (**Figure III.9**). Trente-deux pics principaux ont été révélés, y compris les composés 1 à 18. En tenant compte des principaux fragments observés dans les spectres MS / MS, la structure de quatorze autres dérivés était proposée (**Tableau III.21**). En particulier, neuf autres flavones (composés a – e, g, h, j et l) et quatre isoflavones (f, k, m et n) ont été détectées : ces dernières se sont distinguées par la perte de fragment de 56 amu qui est observé uniquement dans les spectres MS / MS d'isoflavones [5].

Le nombre de groupements hydroxyles et méthoxyles sur les cycles A et B peut être reconnu en tenant compte des différents ions $^{1,3} A^+$ liées à la fragmentation des cycles C [6]. Les ions suivants suggèrent le nombre de groupements hydroxyle et méthoxyles du cycle A pour les composés a – h et j – n : $m/z = 137 / (C_7H_5O_3)^+$ indiqué un hydroxyle, $m/z = 153 (C_7H_5O_4)^+$: deux hydroxyles, $m/z = 167 / (C_8H_7O_4)^+$ un hydroxyle et un méthoxyle, $m/z = 181 (C_9H_9O_4)^+$; deux méthoxyles, $m/z = 183 / (C_8H_7O_5)^+$: deux hydroxyles et un méthoxyle, $m/z = 197 / (C_9H_9O_5)^+$: deux méthoxyles et un hydroxyle, $m/z = 213 / (C_9H_9O_6)^+$: deux méthoxy et deux hydroxy, $m/z = 227 / (C_{10}H_{11}O_6)^+$: trois groupements méthoxyles et un groupement hydroxyle respectivement. De plus, une aurone (composé i) a également été proposée. Ces résultats sont en accord avec l'activité antioxydante remarquable de l'extrait *n*-butanol.

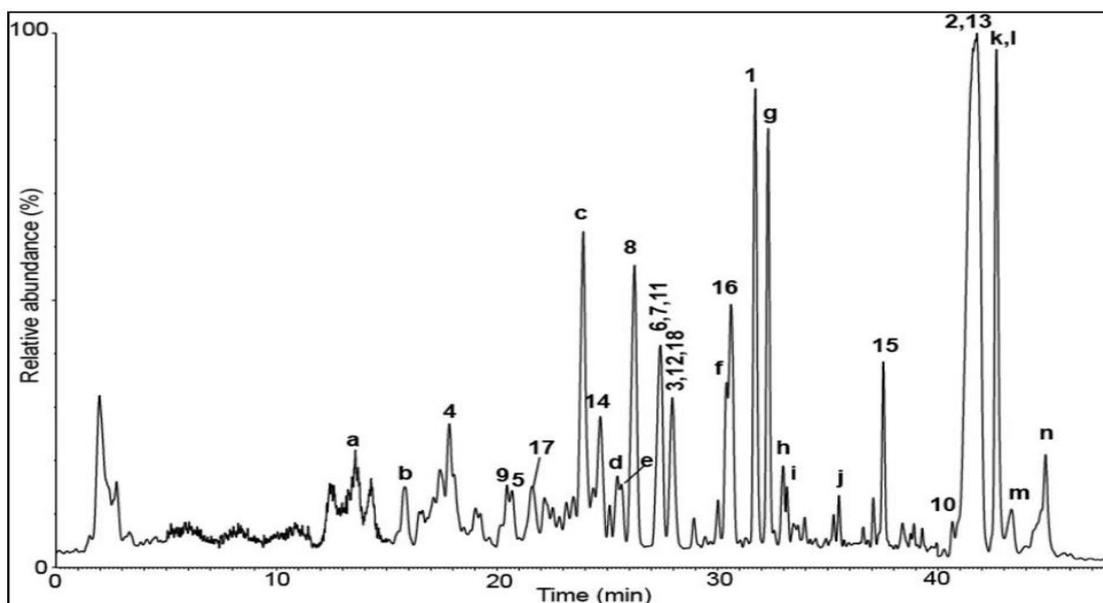
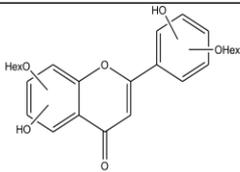
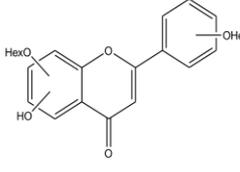
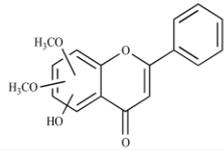
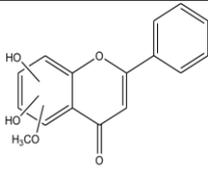
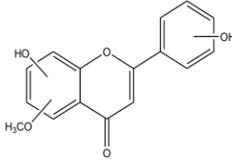
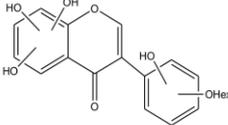
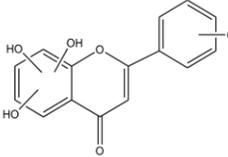
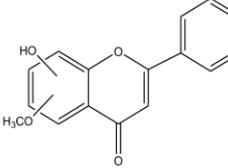
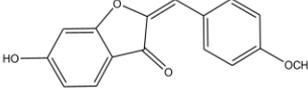
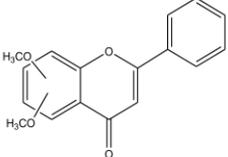
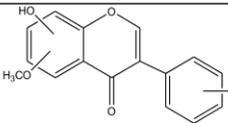
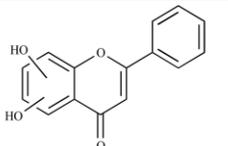
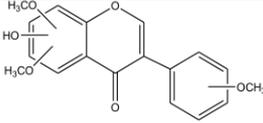
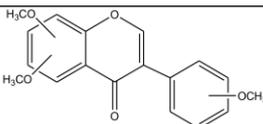


Figure III.9 : Chromatogrammes LC-HRESIMS de l'extrait *n*-BuOH des parties aériennes d'*Ononis angustissima*

Tableau III.21 : Identification des principaux composés observés dans l'analyse HR-LCMS en mode positif de l'extrait *n*-BuOH d'*O. angustissima*.

Peak	[M+H] ⁺	Main fragments (<i>m/z</i>)	Tentative assignment/compound ¹	Theoretical MW
A	611.1625	449.12, 287.09, 153.04		610.1534
B	595.1677	433.11, 271.08, 153.02		594.1585
4	653.1721	491.11, 447.09, 285.04, 153.01	4	652.1640
9	297.1343	135.00	9	296.1260
5	447.1302	285.05, 165.01	5	446.1213
17	449.1092	287.06, 153.02	17	448.1006
C	299.0924	284.07, 197.04, 179.03		298.0841
14	285.0770	270.06, 167.02	14	284.0685
D	285.0772	270.05, 183.04, 168.03		284.0685
E	285.0775	270.04, 167.03, 152.03		284.0685
8	327.1451	165.01	8	326.1366
6	475.1612	313.06, 193.01	6	474.1526
7	445.1505	283.02, 163.01	7	444.1420
11	241.0873		11	240.0786
3	431.1353	269.04, 254.02, 213.01	3	430.1264
12	287.1289	272.09, 183.07	12	286.1205
18	269.0820	254.05, 167.02, 152.01	18	268.0736

F	465.1041	405.09, 349.05, 269.03		464.0955
16	285.0781	270.05, 183.01, 168.01	16	284.0685
2	463.1251	301.04, 286.03, 245.03, 137.01	2	462.1162
g	287.0563	169.03, 141.02		286.0477
h	269.0821	254.06; 167.05, 152.03		268.0736
i	269.0820	254.05, 159.01 111.01		268.0736
j	283.0982	268.07, 181.04		282.0892
15	329.1031	314.07, 227.03, 212.02	15	328.0947
10	273.1132	258.09, 169.03	10	272.1049
1	449.1453	287.05, 272.04, 137.01	1	448.1369
13	361.0930	346.07, 227.04, 212.03	13	360.0845
k	299.0926	284.08, 243.07, 167.05		298.0841
l	255.0663	153.02		254.0579
m	329.1046	314.10, 273.08, 197.03		328.0947
n	313.1095	298.10, 257.08, 181.6		312.0998

hex = hexose

*La numérotation des pics est cohérente dans le profil LC-MS illustré à la figure III.9.

III.4. Appareillage et matériels

III.4.1. Chromatographie sur (CCM) et (CCE)

Pour les analyses sur couche mince (CCM) ou les purifications sur couche épaisse (CCE), nous utilisons des plaques de gel de silice en phase normale [Kieselgel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)], prêtes à l'emploi à support en aluminium pour les CCM et en verre pour les CCE.

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Les révélateurs utilisés lors des expériences sont les vapeurs d'ammoniaque, une solution acide (CH₃COOH/H₂O/H₂SO₄ ; 80:16:4) et une solution de l'anisaldéhyde (4-Methoxybenzaldehyde/ CH₃COOH / CH₃OH/ H₂SO₄ ; 0.5 :10 :85 :5).

III.4.2. Chromatographie liquide sur colonne (CC)

Les phases stationnaires utilisées dans cette étude pour la CC sont le gel de silice60 en phase normale (Merck 200-400 mesh, 40-63 µm), et le Sephadex LH-20.

La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Les quantités de la silice et le Sephadex utilisées sont généralement 30 à 35 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.

III.4.3. La chromatographie en phase liquide à haute performance CLHP :

- Conditions de Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :
 - Colonne et injecteur : Shimadzu C8µ-phenomenex (25cm*10mm, 10 µm eau, 2.0ml min⁻¹) (phase inverse).
 - Détecteur : Shimadzu RID-10A.
 - Pompe : Shimadzu LC-8A, Débit : 2 ml/min

III.4.4. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS :

Le profile LC-MS a été réalisée sur une colonne de type C18 phenomenex (150 x 2,1 mm, 5 µm, Phenomenex, Palo Alto, USA) .le système d'élution est : A =H₂O+ 0,1% l'acide formique, B= l'acétonitrile. L'élution des composés a été réalisée en utilisant un gradient linéaire de 1% à 50% de B pendant 45 minutes. Les spectres de masse ont été acquis en mode ion positif sur un intervalle de 200 à 800 *m/z*. La température a été réglée à 120 ° C, à la tension capillaire à 3300 eV et à la tension au cône de 50 eV.

Les spectres HRESIMS / MS ont été acquis pour les quatre ions les plus abondants observés dans chaque MS spectre (mode de balayage dépendant).

Référence bibliographique

- [1] **Ozenda, P.** 1958. Flore de Sahara Septentrionale et Centrale. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique; pp. 486.
- [2] **Burnett GT.** 1833. Outlines of botany. London: Adlard JC; p. 453–454.
- [3] **Quezel P,** Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol.1-.CNRS, Paris
- [4] **Wink M,** Mohamed GIA. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae : mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Bioch. System. Ecol.* 31(8):897-917.
- [5] **Cooper JD,** Qiu F, Paiva NL. 2002. Biotransformation of an exogenously supplied isoflavonoid by transgenic tobacco cells expressing alfalfa isoflavone reductase. *Plant Cell Rep.* 20:876–884.
- [6] **Wu W,** Yan C, Li L, Liu z, Liu S. 2004. Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1047:213–220.

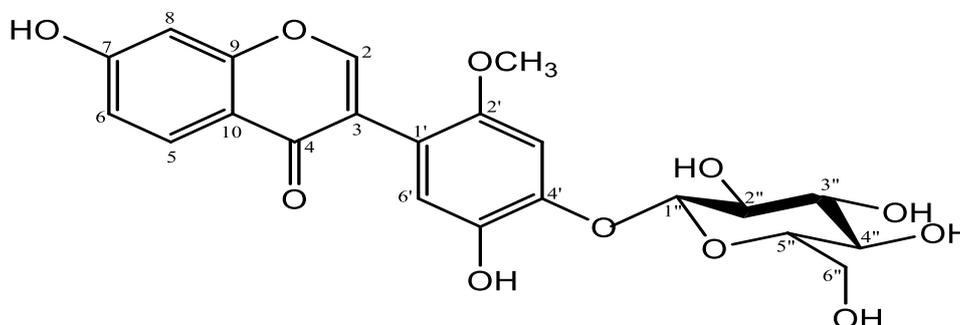
A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded corners. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curving upwards and downwards respectively. The text is centered within the unrolled portion.

Chapitre IV

Résultats et Discussions

IV.1. Identification des produits d'*Ononis angustissima*

IV.1.1. Elucidation structurale du composé 1



Le composé **1** est obtenu sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol, visible sous la lumière UV à 254 nm et 365 nm. Il se colore en orange après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS de ce composé obtenu en mode positif (**Figure IV.1**) révèle un pic d'ion quasimoléculaire à $m/z = 463,1251$ $[M+H]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 462 uma et une formule brute en $C_{22}H_{22}O_{11}$.

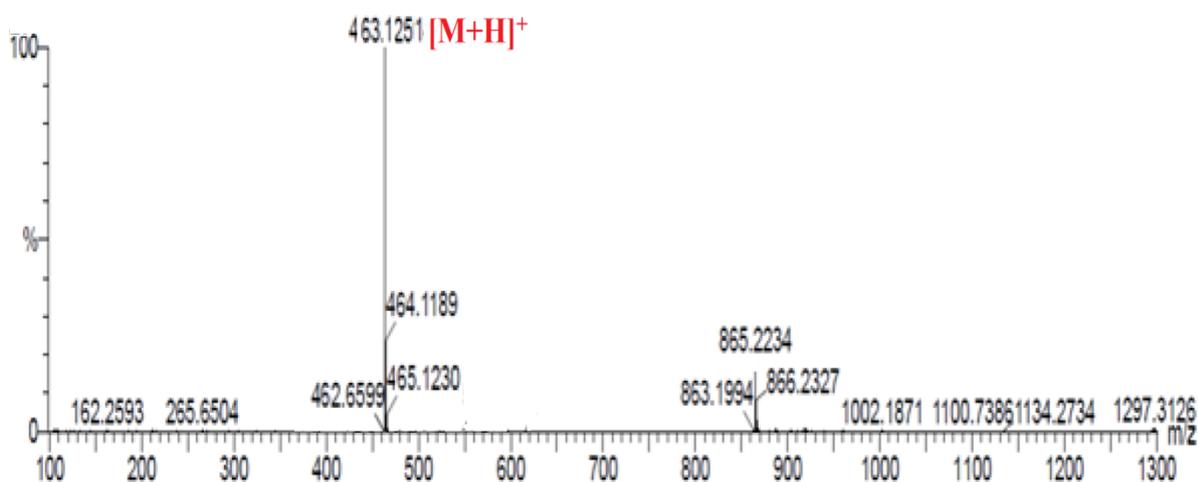
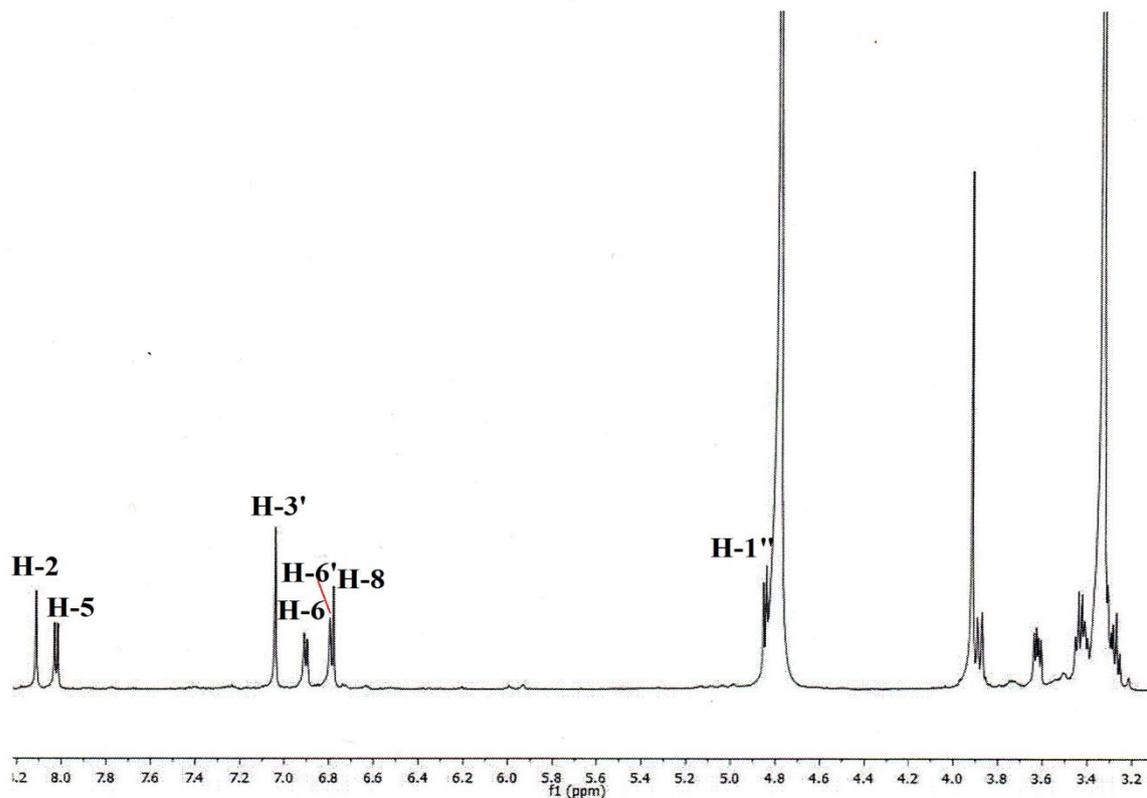


Figure IV.1: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1

L'analyse combinée des spectres RMN 1H (**Spectre IV.1**), COSY H-H (**Spectre IV.2**) et HSQC (**Spectre IV.3**) du composé 2 montre la présence de :

- ◆ Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 8,11$ ppm caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone. Son carbone résonne à $\delta_C = 155,2$ ppm selon l'expérience HSQC [1].



Spectre IV.1 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 1

- ◆ Trois protons aromatiques appartenant à un même système de spins de type ABX à $\delta_H = 6,80$ ppm (d , $J = 1,5$ Hz), $\delta_H = 6,90$ (dd , $J = 8,5$ et $1,5$ Hz) et $\delta_H = 8,02$ (d , $J = 8,5$ Hz). Leurs carbones sont détectés sur le spectre HSQC (Spectre IV.3) à $\delta_C = 102,6$ ppm ; $\delta_C = 116,9$ ppm et $\delta_C = 127,4$ ppm respectivement.
- ◆ Deux protons aromatiques sous forme de deux singulets à $\delta_H = 7,05$ ppm ; $\delta_H = 6,78$ ppm. ce qui indique un système de spins AX pour le cycle B. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC à $\delta_C = 102,8$ ppm, $\delta_C = 117,3$ ppm. L'absence de couplage sur le spectre COSY H-H (Spectre IV.2) indique une position *para* pour ces protons qui ne peuvent être que les protons H-3' et H-6' du cycle B tétrasubstitué.

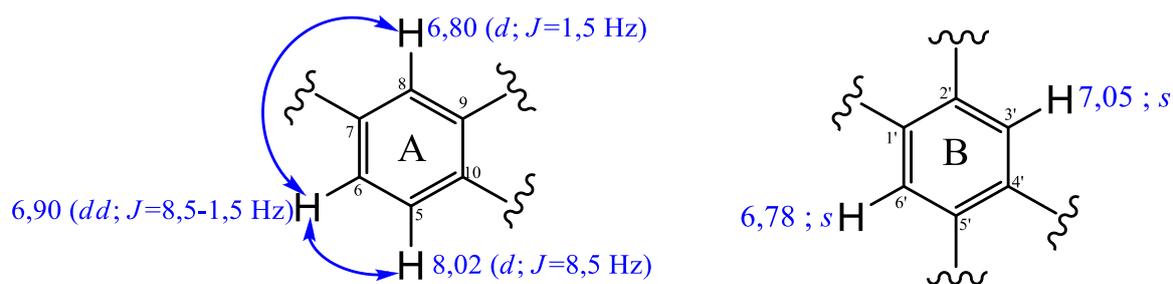
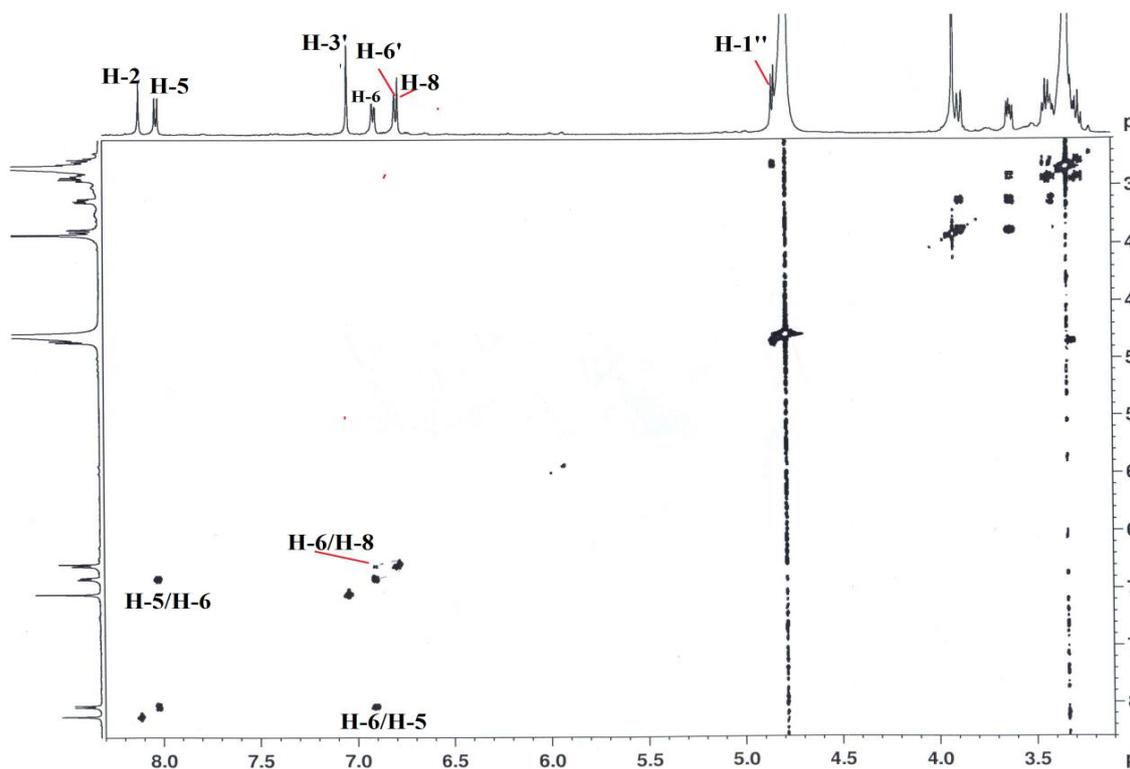
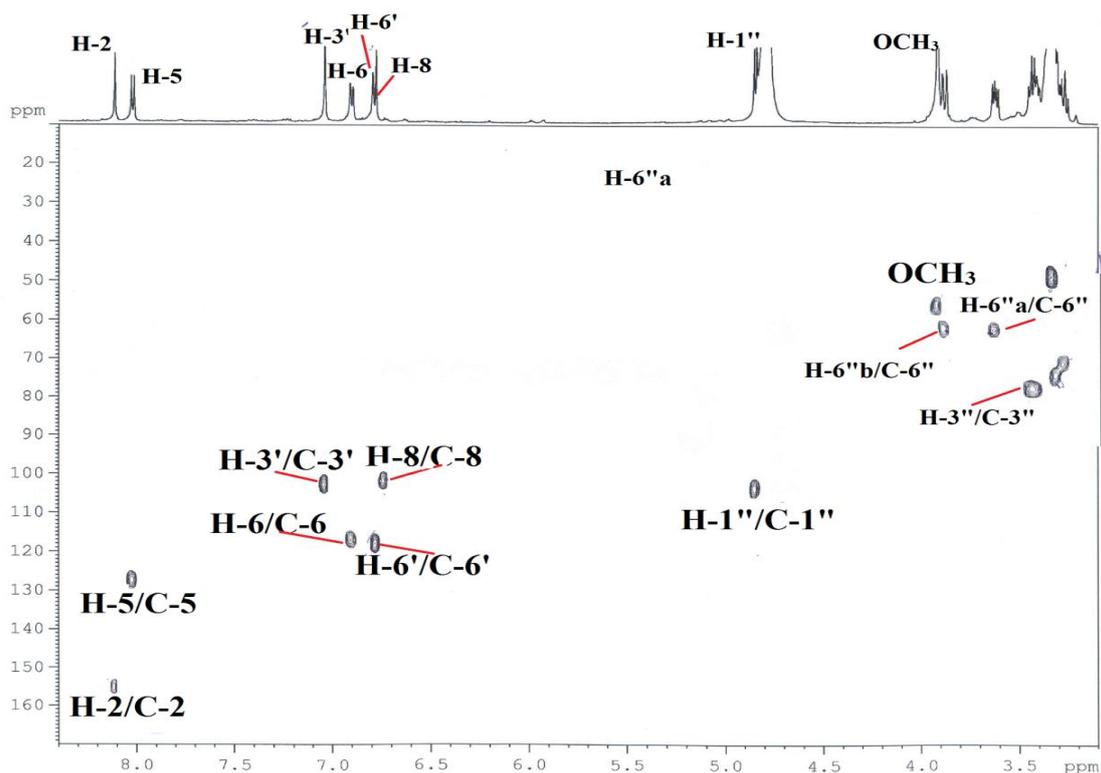


Figure IV.2 : Cycles aromatiques A et B du composé 1

- ◆ Un signal sous forme de singulet à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule. son carbone est détecté par l'expérience HSQC $\delta_{\text{C}} = 56,0$ ppm (Spectre IV.3)
- ◆ Toujours sur le spectre RMN ^1H , on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,84$ ppm ($J = 7,5$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, d'après la valeur de son déplacement chimique, par un pont oxygène. plusieurs autres signaux sont observés entre 3 et 4 ppm correspondant sans doute aux protons de la partie osidique.



Spectre IV.2: Spectre COSY (600 MHz, CD_3OD) du composé 1



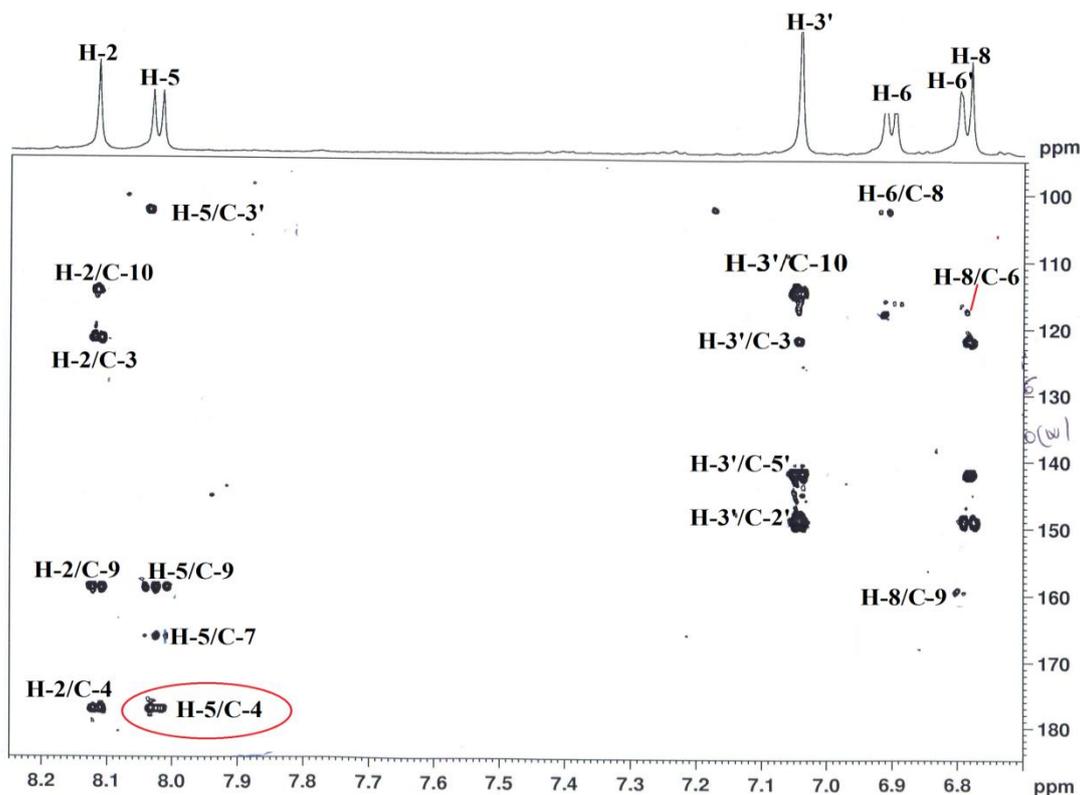
Spectre IV.3 : Spectre HSQC (CD_3OD , 600 MHz) du composé 1

L'élucidation structurale du composé 1 repose principalement sur l'analyse de corrélations observées sur le spectre HMBC (Spectre IV.4). En effet le proton H-2 ($\delta_{\text{H}}=8,11$ ppm, *s*) montre des corrélations avec trois carbones quaternaires résonant à $\delta_{\text{C}}=177,5$ ppm (C-4), $\delta_{\text{C}}=158,9$ ppm et $\delta_{\text{C}}=121,6$ ppm. Le déplacement chimique à $\delta_{\text{C}}=158,9$ ppm est attribué facilement au carbone aromatique oxygéné C-9, tandis que le deuxième correspond au carbone C-3.

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.4) de ce composé, il est observé des corrélations entre un proton aromatique résonant à $\delta_{\text{H}}=8,02$ ppm (*d*, $J = 8,5$ Hz) et les carbones C-4, C-9 déjà attribués et un autre carbone quaternaire oxygéné à $\delta_{\text{C}}=166,5$ ppm. Le déblindage de ce proton dû à l'effet d'anisotropie du groupement carbonyle, permet de placer ce proton en position C-5. Donc, le carbone à $\delta_{\text{C}}=166,5$ ppm correspond au C-7.

Les deux protons restant sont positionnés en C-6 et C-8. La distinction entre ces deux protons est facile du fait que l'un de ces protons est sous forme de doublet de doublets à $\delta_{\text{H}}=6,90$ ppm (*dd*, $J = 8,5$ et $1,5$ Hz) indiquant des couplages *ortho* et *méta* avec deux protons différents est attribué au proton H-6, donc le proton à $\delta_{\text{H}}=6,80$ ppm (*d*, $J = 1,5$ Hz) correspond au proton H-8 (couplage *méta*). Ces deux protons H-8 et H-6 couplent sur le spectre HMBC en 3J avec les carbones C-6 et C-8 et avec le carbone quaternaire C-10 à $\delta_{\text{C}}=114,6$ ppm. Pour le noyau aromatique B, ce spectre montre des grandes taches de corrélation en 3J entre Les protons H-3'

et H-6' et les carbones quaternaires C-1' ($\delta_C=122,1$ ppm) et C-3 ($\delta_C=121,6$ ppm), ainsi avec les carbones oxygénés C-2' ($\delta_C=148,0$ ppm), C-4' ($\delta_C=149,1$ ppm) et C-5' ($\delta_C=141,7$ ppm).

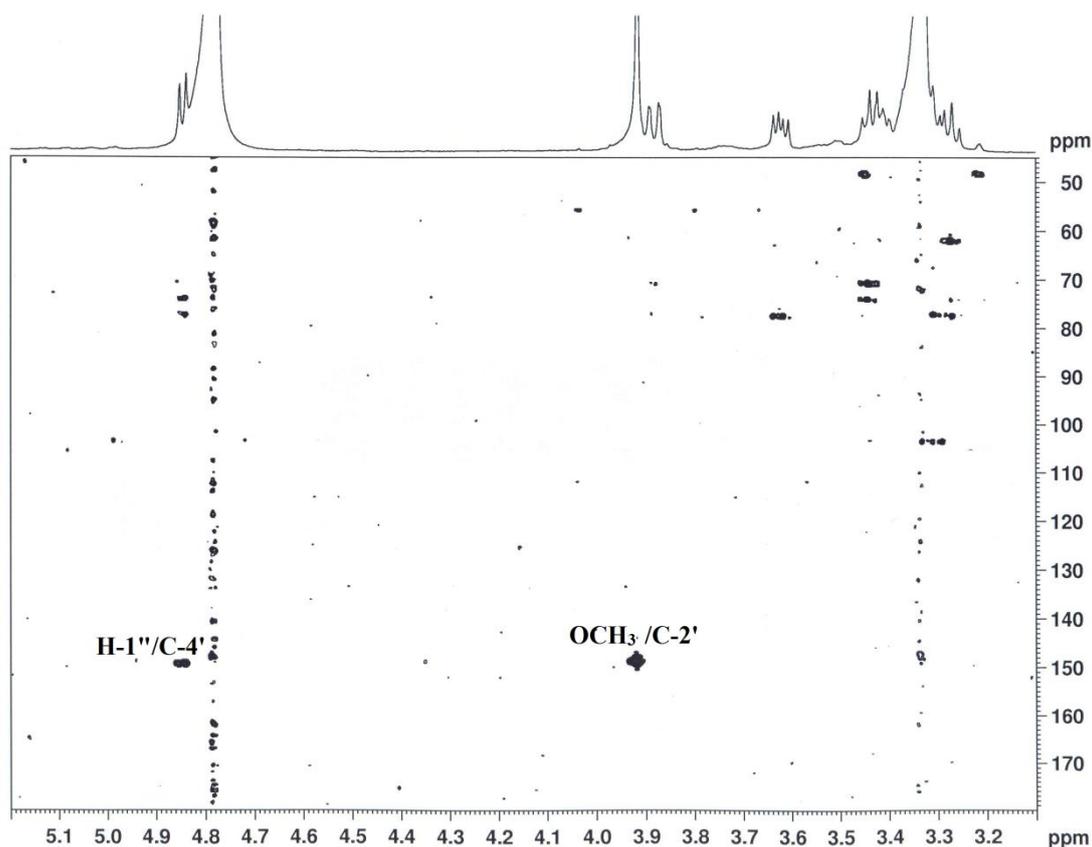


Spectre IV.4: Spectre HMBC étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 1

La substitution du cycle B en position C-2', C-4', C-5'a été confirmée par les corrélations observées dans l'expérience HMBC (Spectre IV.5) entre :

- ◆ le proton anomère H-1'' du glucose et le carbone C-4' ($\delta_C=149,1$ ppm), indiquant que le sucre est positionné en C-4'.
- ◆ les protons du groupement méthoxyle et le carbone C-2' ($\delta_C=148,0$ ppm), confirmant que le groupe méthoxyle est localisé en C-2'.

Ainsi, les substituants en positions C-5' ($\delta_C=141,7$ ppm) et C-7 ($\delta_C=166,5$ ppm) sont identifiés aux groupements hydroxyles en raison des valeurs déblindées de leurs déplacements chimiques et de l'absence des corrélations de ces deux carbones (C-5' et C-7) sur le spectre HMBC avec d'autres protons.



Spectre IV.5: Spectre HMBC étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 1

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles A, B et C sont déterminés. Il reste alors à identifier le substituant osidique lié au carbone C-4'.

Le spectre COSY H-H (**Spectre IV.6**) permet d'identifier l'unité osidique à travers les taches de corrélation H-1'' ($\delta_{\text{H}}=4,84$ ppm, *d*, $J=7,5$ Hz)/H-2'' ($\delta_{\text{H}}=3,31$ ppm, *t*, $J=9,0$ Hz). H-2''/H-3'' ($\delta_{\text{H}}=3,42$ ppm, *t*, $J=9,0$ Hz), H-3''/H-4'' ($\delta_{\text{H}}=3,28$ ppm, *t*, $J=9,0$ Hz), H-4''/H-5'' ($\delta_{\text{H}}=3,42$ ppm, *m*), H-5''/H-6''b ($\delta_{\text{H}}=3,87$ ppm, *dd*, $J=12,0-3,5$ Hz), H-6''b/H-6''a ($\delta_{\text{H}}=3,62$ ppm, *dd*, $J=12,0-5,0$ Hz). Ces données permettent d'identifier un glucose de configuration β ($J_{\text{H}1''-\text{H}2''}=7,5$ Hz) (**Figure IV.3**).

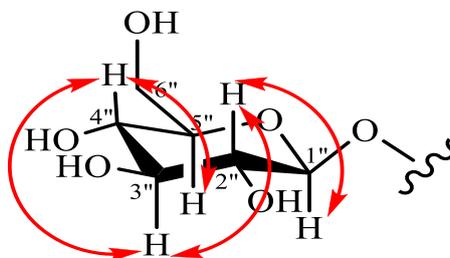
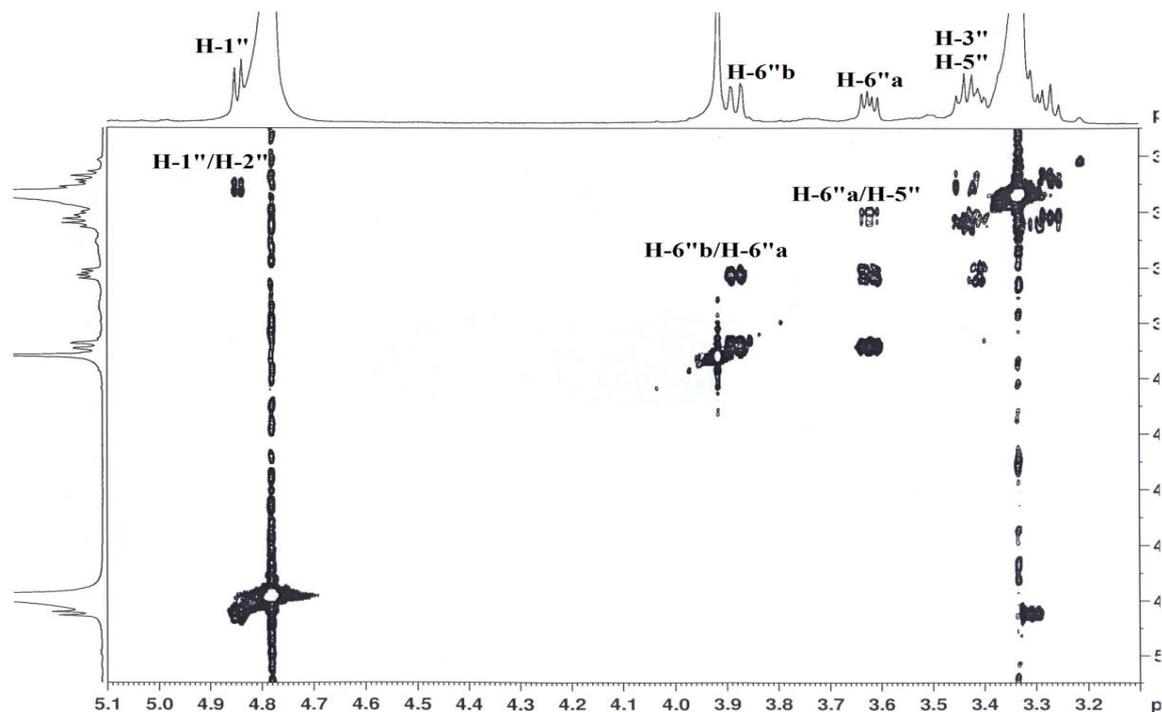


Figure IV.3: Couplages COSY du β -D-glucose



Spectre IV.6: Spectre COSY étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 1

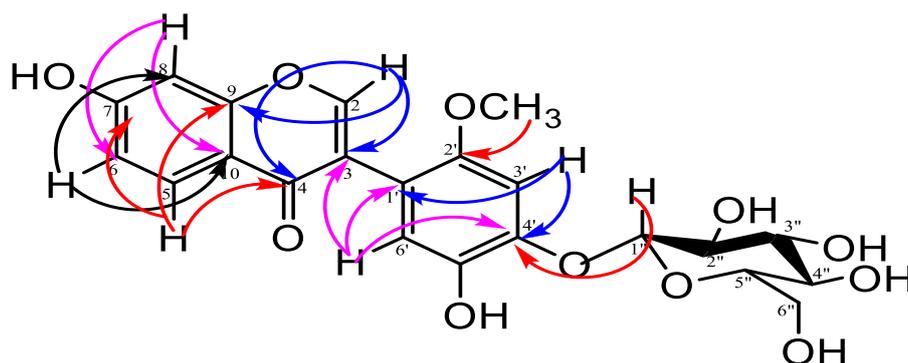


Figure IV.4 : Corrélations HMBC du composé 1

L'ensemble des données spectrales établies et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé **1** au : **5',7-dihydroxy-2'-methoxy-isoflavone 4'-O- β -d-glucopyranoside** [2].

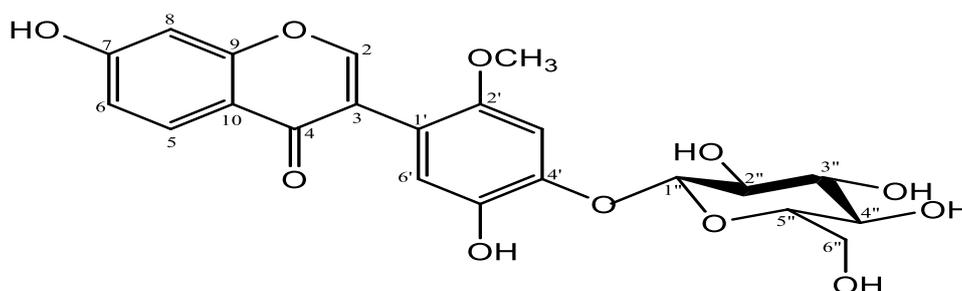


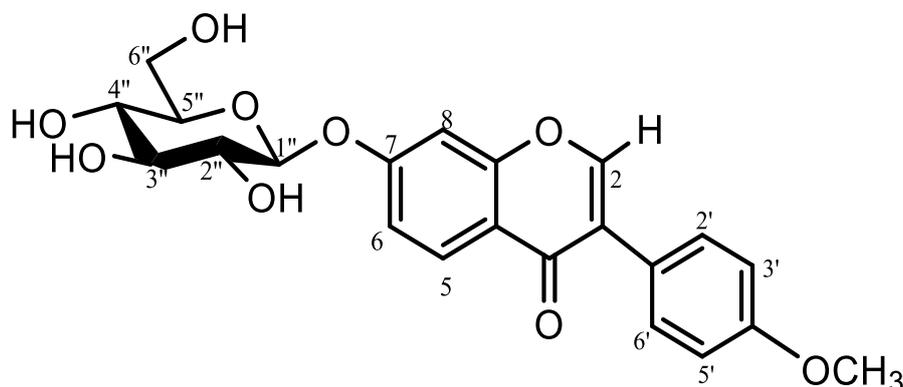
Figure IV.5 : Structure du composé 1: **5',7-dihydroxy-2'-methoxy-isoflavone 4'-O- β -d-glucopyranoside**

Les déplacements chimiques des protons du composé **1** sont donnés dans le tableau IV.1

Tableau IV.1 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé **1**

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	155,2(CH)	8,11, <i>s</i>
3	121,6(C)	-
4	177,5(C)	-
5	127,4(CH)	8.02, <i>d</i> (8,5)
6	116,9(CH)	6,90, <i>dd</i> (8,5 - 1,5)
7	166,5(C)	-
8	102,6(CH)	6,80, <i>d</i> (1,5)
9	158,9(C)	-
10	114,6(C)	-
1'	122,1(C)	-
2'	148,0(C)	-
3'	102,6(CH)	7,05, <i>s</i>
4'	149,1(C)	-
5'	141,7(C)	-
6'	117.3(CH)	6,78, <i>s</i>
OCH₃-4'	56,0(CH₃)	3,91, <i>s</i>
Glucose		
1''	103,1(CH)	4,84, <i>d</i> (7,5)
2''	74,3(CH)	3,31, <i>t</i> (9,0)
3''	77,2(CH)	3,42, <i>t</i> (9,0)
4''	71,2(CH)	3,28, <i>t</i> (9,0)
5''	77,2(CH)	3,42, <i>m</i>
6''	61,5(CH₂)	3,62, <i>dd</i> (12,0 -5,0) 6''a 3,87, <i>dd</i> (12,0 -3,5) 6''b

IV.1.2. Elucidation structurale du composé 2



Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible en UV à 254 et 366 nm, il se colore en jaune par pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-SM) (**Figure IV.6**), donne un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z=453,2$; compatible avec la formule brute $C_{22}H_{22}O_9$.

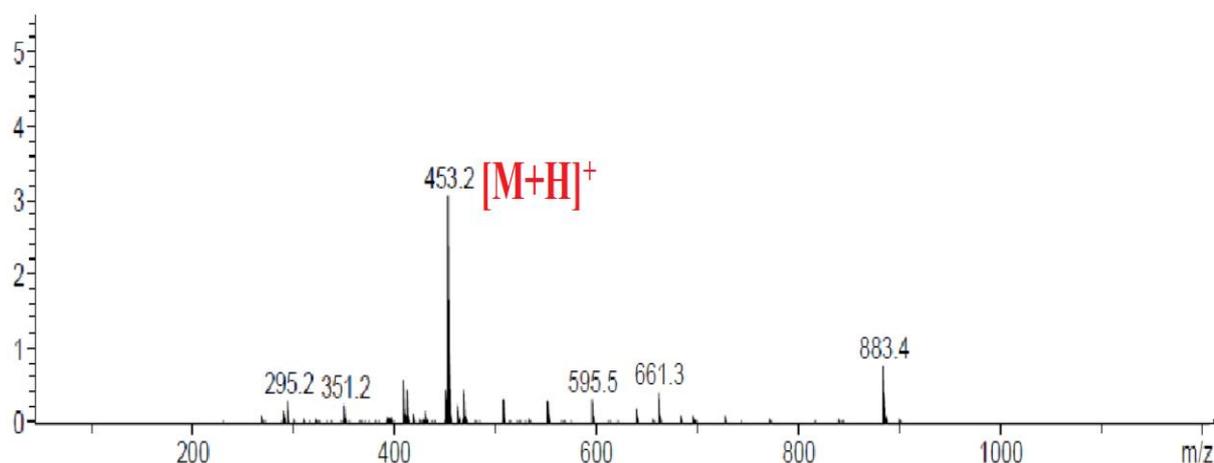
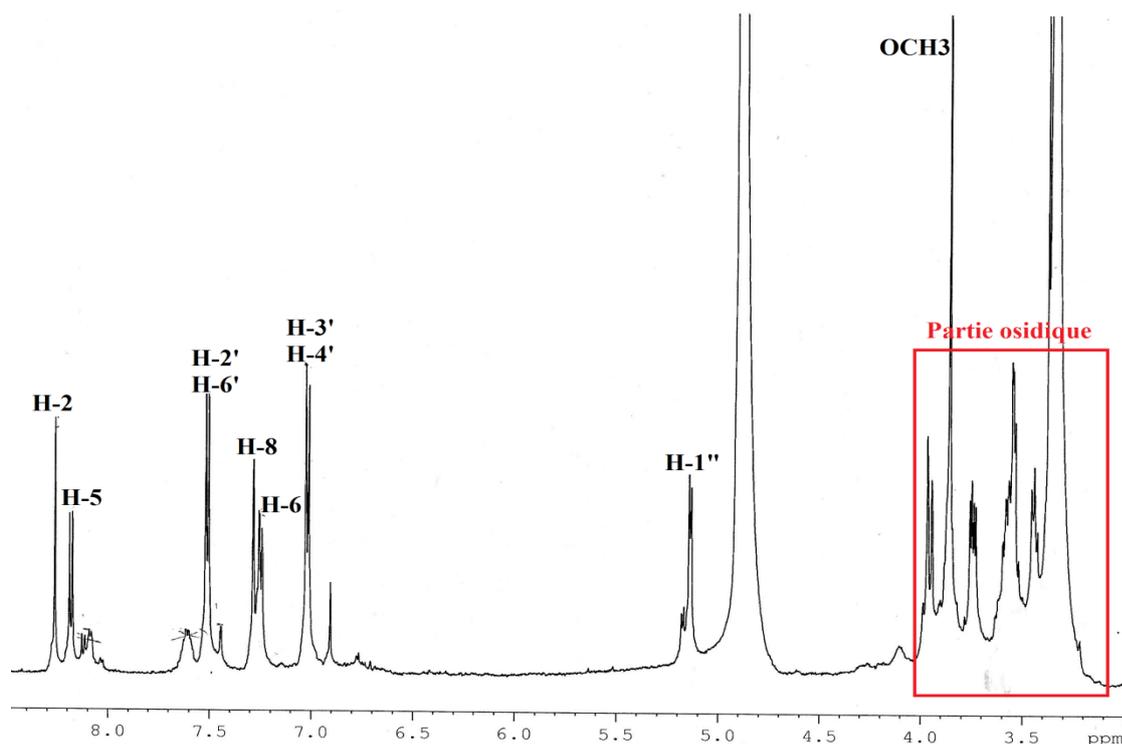


Figure IV.6: Spectre de masse ESI-MS du composé 2

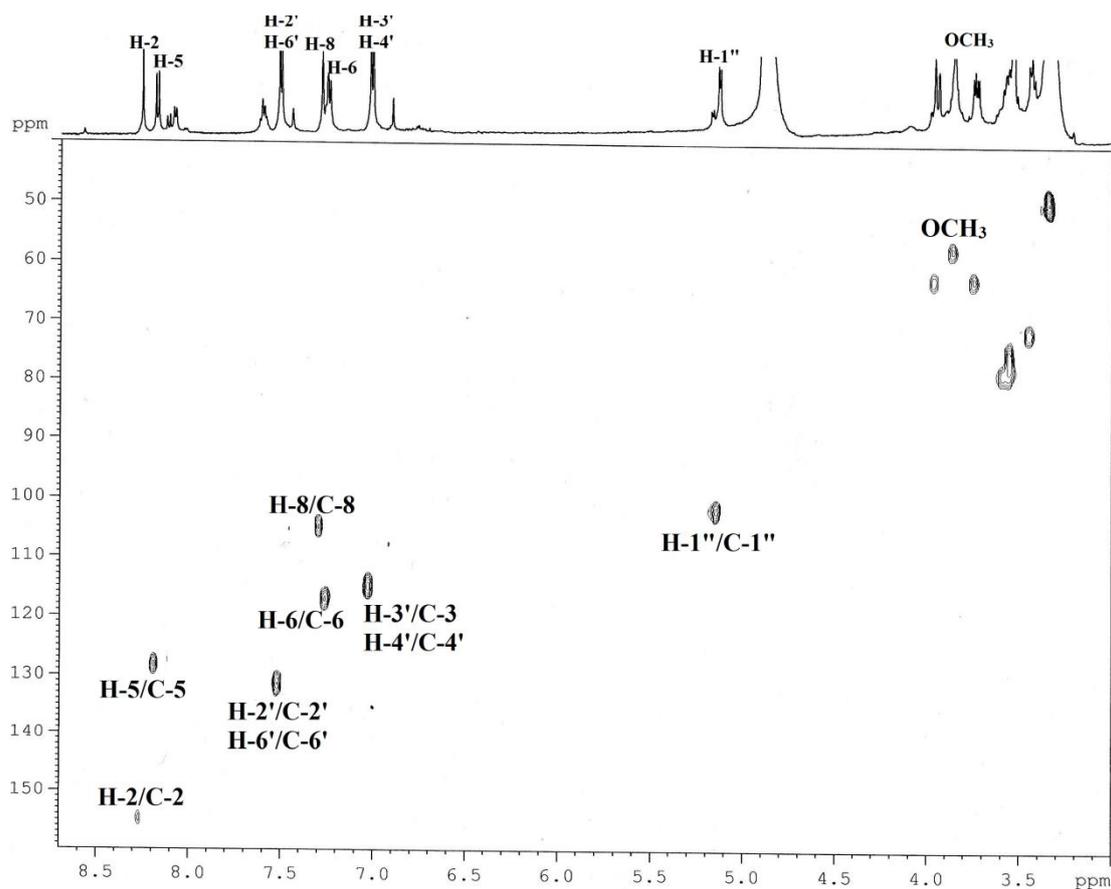
Comme pour le produit **1** décrit précédemment, l'ensemble des informations recueillies à partir des spectres RMN 1H (**Spectre IV.7**), HSQC (**Spectre IV.8**) et COSY (**Spectre IV.9**) révèle que ce composé fait également partie de la classe des isoflavonoïdes, Le spectre RMN 1H du composé **2** (**Spectre IV.7**) révèle une similitude structurale avec celui du composé précédent **1** au niveau des cycles A et C.



Spectre IV.7: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 2

En effet on remarque :

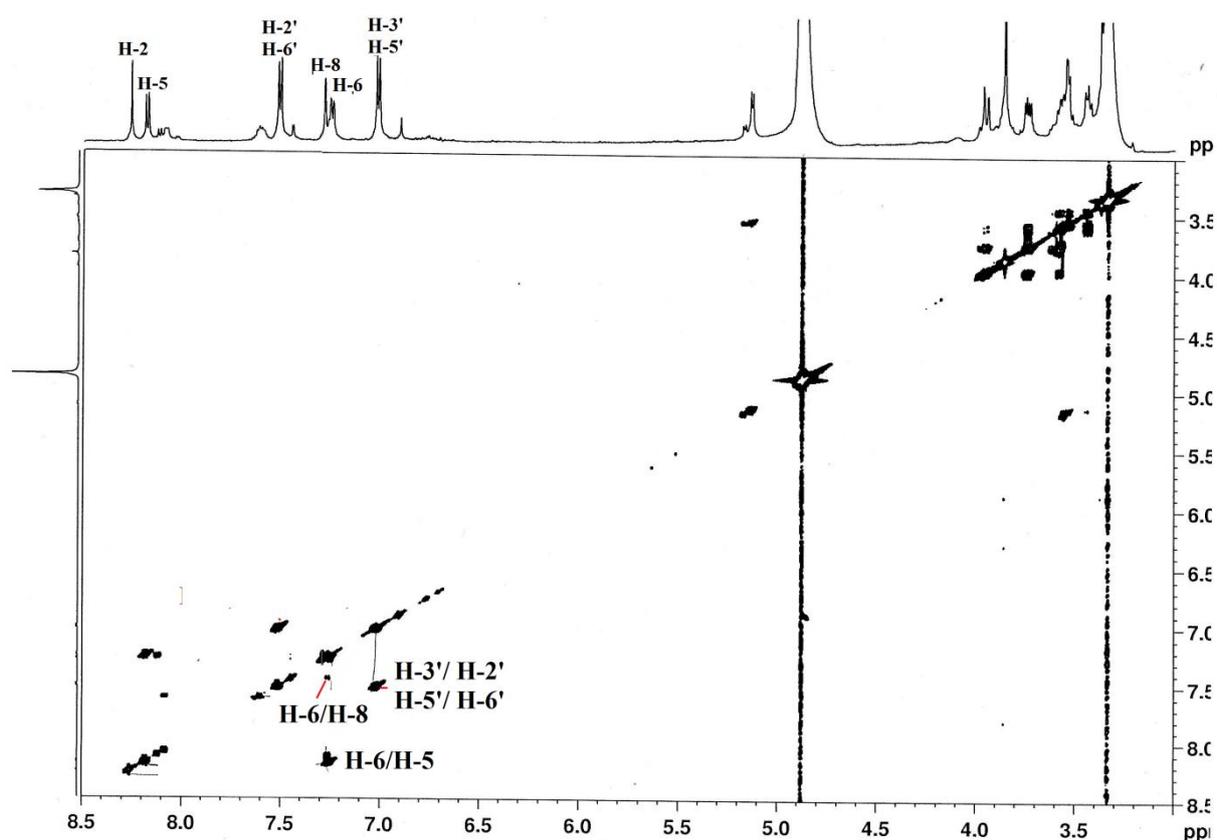
- ◆ Un signal sous forme de singlet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 8,27\text{ppm}$ caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone. Son carbone résonne à $\delta_{\text{C}} = 154,0$ ppm selon l'expérience HSQC.
- ◆ Un doublet dédoublé ($J = 8,5$ Hz ; $J = 1,5$ Hz), indicateur d'un couplage *méta* et d'un couplage *ortho* à $\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm attribuable à H-6.
- ◆ Un doublet d'intégration 1H ($J = 1,5$ Hz), indicateur d'un couplage *méta* à $\delta_{\text{H}} = 7,28$ ppm attribuable à H-8.
- ◆ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 8,19$ ppm ($J = 8,5$ Hz), indicateur d'un couplage *ortho* attribuable à H-5. La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle A substitué en positions 7.
- ◆ Un signal singlet s'intégrant pour 3 protons à $\delta_{\text{H}} = 3,86$ ppm, suggèrent la présence d'un groupement méthoxyle.
- ◆ La présence d'une partie osidique est clairement notée, confirmée notamment avec le proton anomérique à $\delta_{\text{H}} = 5,15$ ppm ($J = 7,4$ Hz), plusieurs autres signaux sont observés entre 3 et 4 ppm correspondant sans doute aux protons de la partie osidique.



Spectre IV.8: Spectre HSQC (CD₃OD , 600 MHz) du composé 2

La distinction entre les deux composés **1** et **2** est constatée au niveau du cycle B de l'isoflavone. En effet, on observe :

- ◆ Deux signaux sous forme de doublet chacun correspondant à quatre protons aromatiques d'un système A_2X_2 à $\delta_H=7,03\text{ppm}$ (2H) et $\delta_H =7,52 \text{ ppm}$ (2H) avec une constante de couplage $J = 8,5 \text{ Hz}$ traduisant un couplage de type *ortho*. Selon le spectre COSY (**Spectre IV.9**) ces protons appartiennent à un même système de spins, attribuables aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' respectivement du cycle B d'une isoflavone [3]. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC à $\delta_C=114,7 \text{ ppm}$ (C-3' et C-5') et $\delta_C =131,6\text{ppm}$ (C-2'/C-6')



Spectre IV.9: Spectre COSY (CD_3OD , 600 MHz) du composé 2

L'expérience COSY H-H (Spectre IV.10) permet l'identification de l'unité osidiques par l'observation des corrélations entre les différents protons.

Partant du proton anomère H-1'' [$\delta_{\text{H}}=5,15\text{ppm}$ (d , $J = 7,4$ Hz)], un système de sept spins d'un hexose est visualisé sur le spectre COSY :

- H-1''/H-2'' [$\delta_{\text{H}}=3,55$ ppm (d , $J = 7,4$ Hz)].
- H-2''/H-3'' [$\delta_{\text{H}}=3,59\text{ppm}$ (t , $J = 7,6$ Hz)].
- H-3''/H-4'' [$\delta_{\text{H}}=3,45\text{ppm}$ (t , $J = 7,6$ Hz)].
- H-4''/H-5'' [$\delta_{\text{H}}=3,59\text{ppm}$ (m)].
- H-5''/H-2-6'' [$\delta_{\text{H}}=3,97\text{ppm}$ (dd , $J = 11,2-5,6$ Hz, H-6''b)/ $\delta_{\text{H}}=3,73$ ppm (dd , $J = 11,2-1,3$ Hz, H-6''a)].

Les grandes valeurs des constantes de couplage entre les protons H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5'' montrant la position *trans*-diaxiale de ces protons sont caractéristiques d'un β -D-glucose.

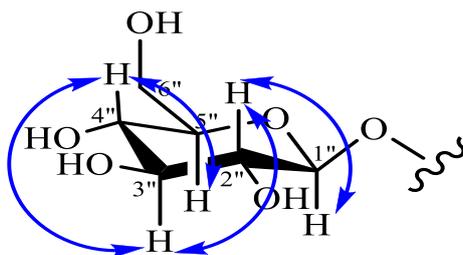
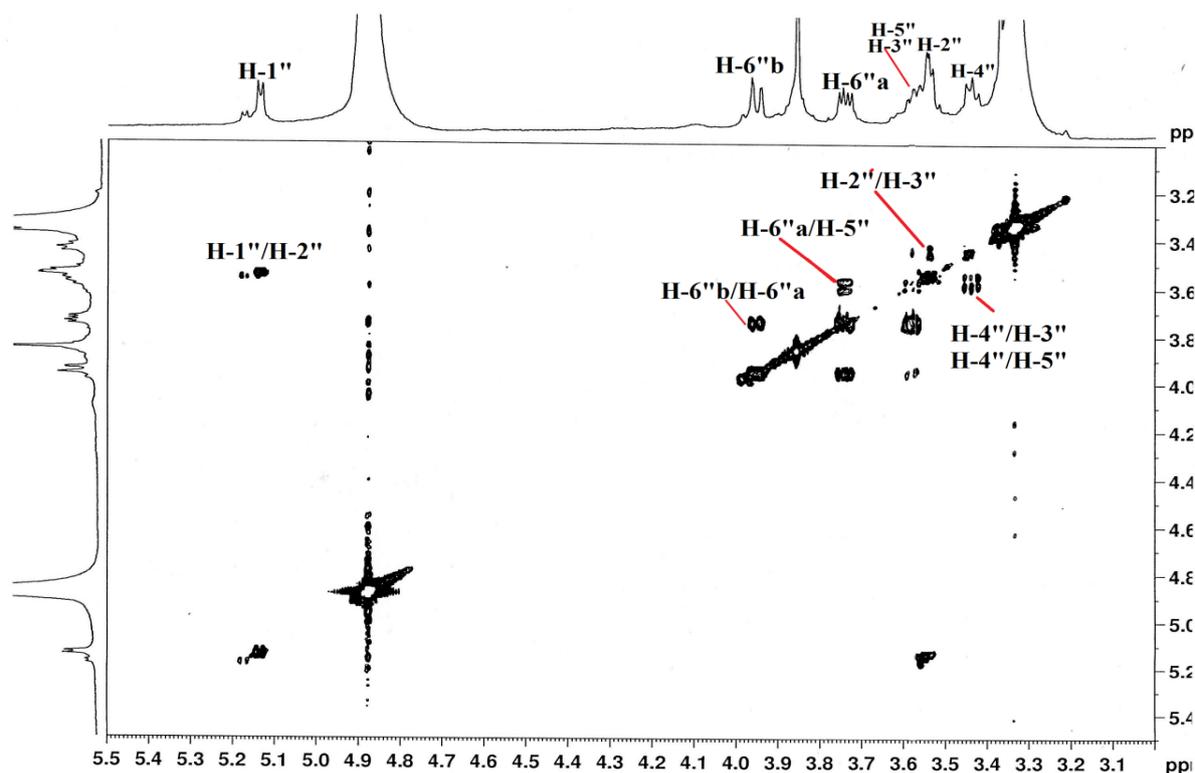


Figure IV.7: Couplages COSY du β-D-glucose

Spectre IV.10: Spectre COSY étalé (CD₃OD , 600 MHz) du composé 2

L'identification structurale du composé **2** est débutée par la localisation du proton H-2 ($\delta_{\text{H}} = 8,27$ ppm, *s*) caractéristique des isoflavonoïdes, qui montre des corrélations HMBC avec quatre carbones quaternaires résonant à $\delta_{\text{C}} = 176,8$ (C-4) ; $\delta_{\text{C}} = 157,8$ ppm ; $\delta_{\text{C}} = 125,5$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 124,9$ ppm. Le déplacement chimique à $\delta_{\text{C}} = 157,8$ ppm est attribué aisément au carbone aromatique oxygéné C-9.

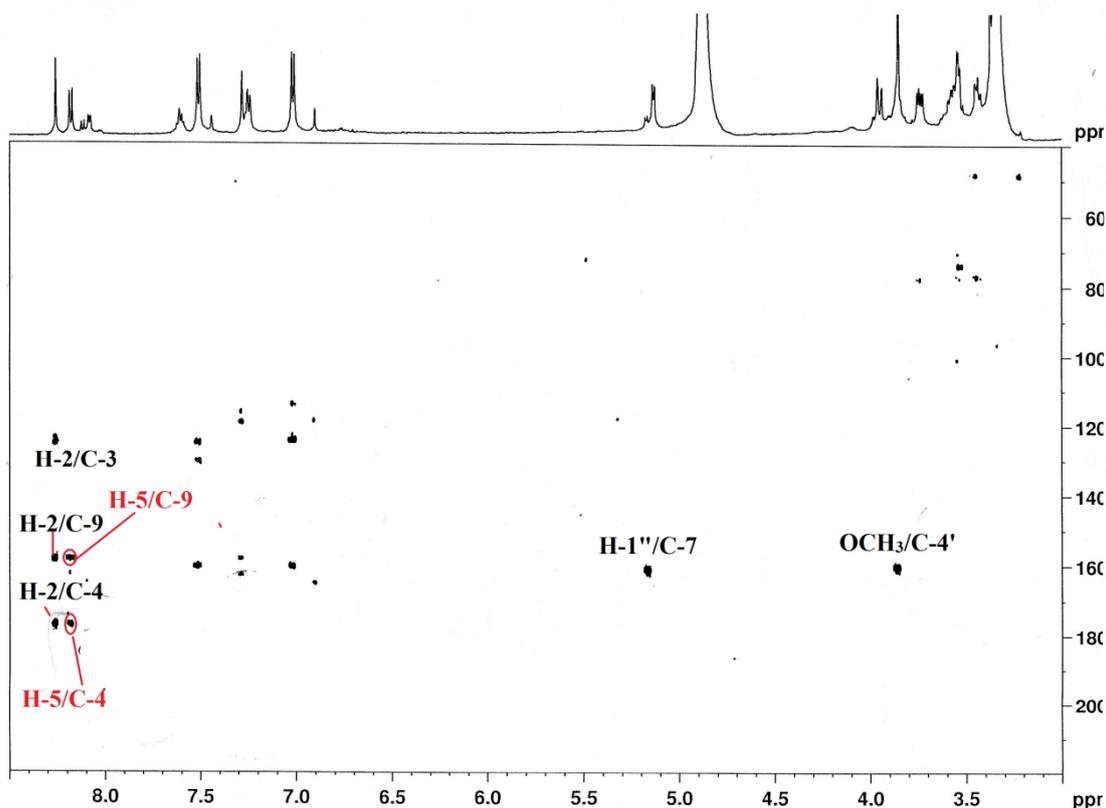
Les deux carbones à $\delta_{\text{C}} = 125,5$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 124,9$ ppm correspondent aux carbones aromatiques quaternaires C-3 et C-1'. La distinction entre ces deux carbones est facile du fait que les protons H-3' et H-5' du cycle B à $\delta_{\text{H}} = 7,03$ (*d*, $J = 8,5$ Hz) couplent en 3J sur le spectre HMBC (Spectre IV.11) avec un carbone à $\delta_{\text{C}} = 124,9$ ppm, ne pouvant être que le carbone C-1' de l'isoflavonoïde, donc le carbone à $\delta_{\text{C}} = 125,5$ ppm est attribué au carbone C-3.

Le spectre HMBC de ce composé permet aussi d'observer des taches de corrélation entre le proton H-2' et les carbones C-3 et C-6' déjà assignés et un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C=160,0$ ppm. Ce dernier montre des corrélations HMBC en 2J avec les deux protons H-3' et H-5', ce qui nous permet de placer ce carbone en C-4' ($\delta_C=160,0$ ppm). D'autres couplages sont visualisés entre les protons H-3' et H-5' et les carbones C-1', C-5' et C-3'.

Le spectre HMBC (**Spectre IV.11**) montre également les corrélations entre les quatre protons du cycle B et un carbone quaternaire oxygéné résonant à $\delta_C=160,0$ (C-4'). Ce dernier corrélant avec les protons du groupement méthoxyle ($\delta_H=3,86$) indique que ce groupement est positionné en C-4'.

Par ailleurs, le signal attribué au proton H-5 ($\delta_H=8,19$, *d*, $J = 8,5$ Hz) est confirmée par sa corrélation HMBC avec le carbonyle à $\delta_C=176,8$ (C-4), attestant que le système ABX est véritablement le fait des protons H-5/H-6/H-8 et que le carbone C-7 est porteur d'un substituant.

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-7 confirme que le glucose est attaché à la génine en position 7 (**Spectre IV.11**).



Spectre IV.11: Spectre HMBC (CD₃OD , 600 MHz) du composé 2

L'ensemble de ces données spectrales (**Tableau IV.2**) établies par RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [4], permettent à proposer pour le composé **2** la structure suivante :

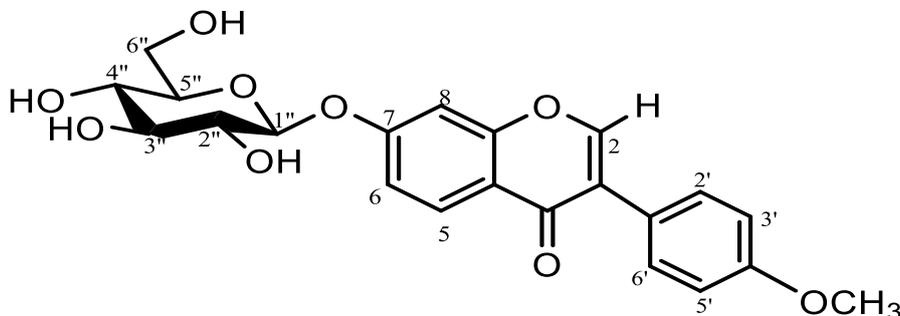


Figure IV.8: Structure du composé 2 : Formononetin 7-O- β -D-glucopyranoside (Ononin)

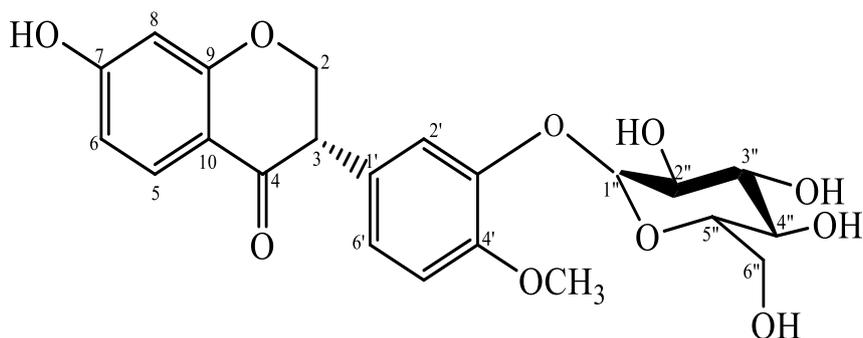
Ce composé a été isolé antérieurement de plusieurs espèces de du genre *Ononis* comme : *O. arvensis* [5] et *O. spinosa* subsp. *Leiosperma* [6].

Tableau IV.2 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 2

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
2	154,0(CH)	8,27, s
3	125,5(C)	-
4	176,8(C)	-
5	128,0(CH)	8,19, d(8,5)
6	116,6(CH)	7,25, dd (8,5 - 1,5)
7	162,0(C)	-
8	104,6(CH)	7,28, d (1,5)
9	157,8(C)	-
10	119,3(C)	-
1'	124,9(C)	-
2'	131,6(CH)	7,52, d (8,5)
3'	114,7(CH)	7,03, d (8,5)
4'	160,0(C)	-
5'	114,7(CH)	7,03, d (8,5)
6'	131,6(CH)	7,52, d (8,5)
OCH₃-4'	56,0(CH ₃)	3,86, s

	Glucose	
1''	101,3(CH)	5,15, <i>d</i> (7,4)
2''	75,0(CH)	3,55, <i>t</i> (7,4)
3''	78,0(CH)	3,59, <i>t</i> (7,6)
4''	70,0(CH)	3,45, <i>t</i> (7,6)
5''	78,0(CH)	3,59, <i>m</i>
6''	61,9(CH ₂)	3,73, <i>dd</i> (11,2 -1,3) 6''a 3,97, <i>dd</i> (11,2 -5,6) 6''b

IV.1.3. Elucidation structurale du composé 3



Le composé **3** est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa CCM révèle l'existence d'une tache noire violette sous lampe UV à 365 nm et donnant une coloration jaune après révélation par une solution acide et chauffage, ceci nous oriente vers un composé de nature flavonoïdique.

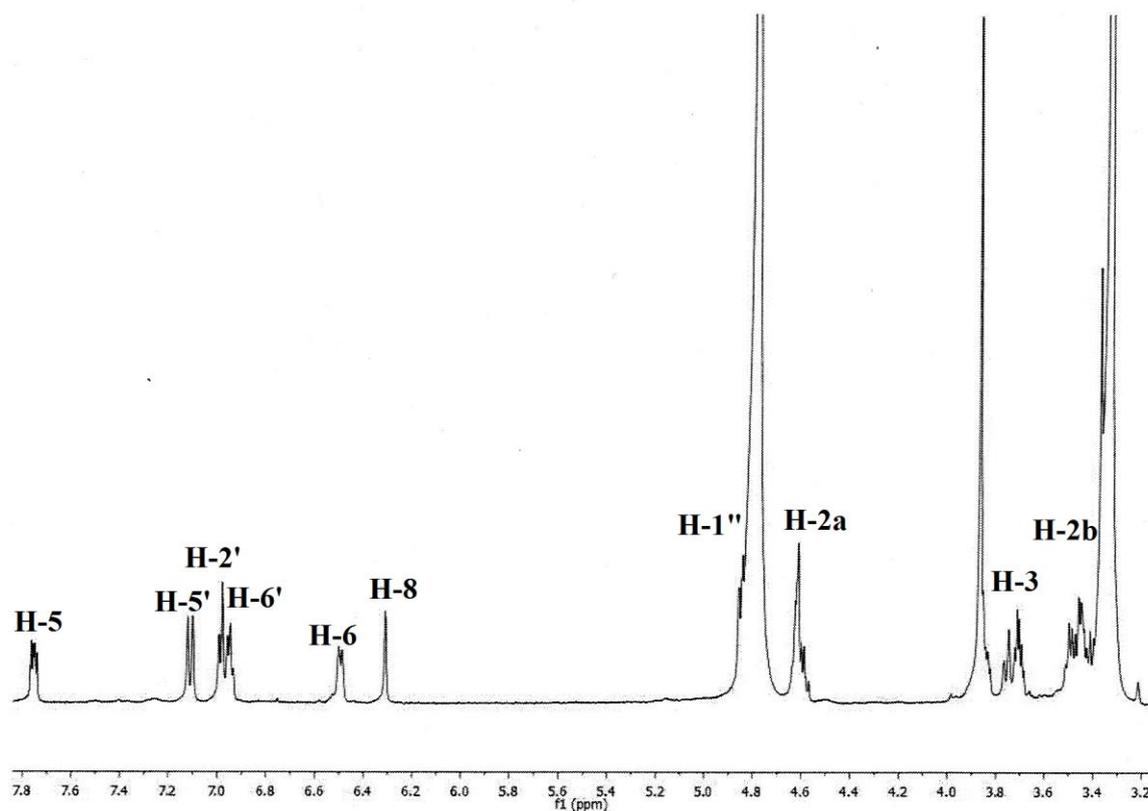
Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.12**) de ce composé présente une allure différente par rapport aux composés précédents **1** et **2**. En effet, il montre la présence de protons aromatiques, aliphatique et un groupement méthoxy à $\delta_{\text{H}}=3,85\text{ppm}$.

Ce spectre montre également les signaux des protons du glucose notamment le proton anomérique sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}}= 4,84\text{ ppm}$ ($J = 7,6\text{ Hz}$)

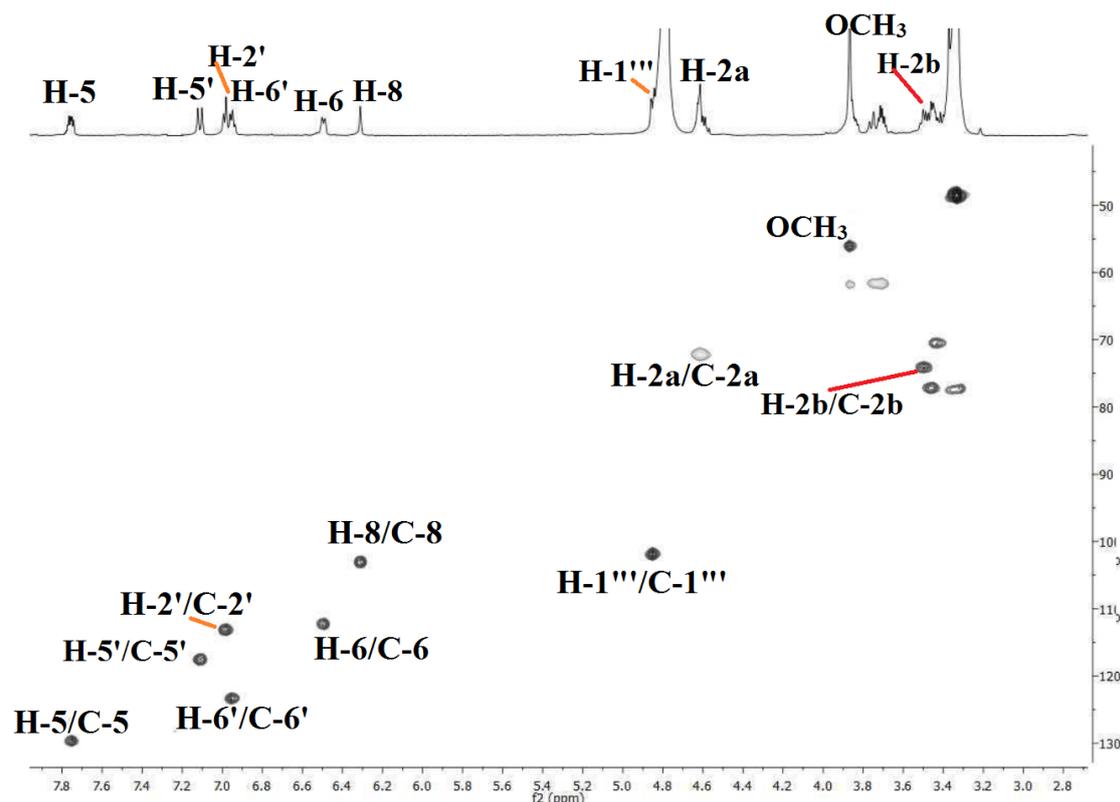
Les signaux observés sur le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.12**) dans la zone s'étalant de 6,30 à 7,8 ppm, d'intégration 1H chacun sous forme de deux systèmes ABX, le premier à $\delta_{\text{H}}=7,75\text{ ppm}$ ($d, J = 8,0\text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}}=6,48\text{ppm}$ ($dd, J = 8,0-1,5\text{ Hz}$) et $\delta_{\text{H}}= 6,31\text{ ppm}$ ($d, J = 1,5\text{ Hz}$), attribuable aux protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A, respectivement, comme il a été démontré précédemment lors de l'analyse structurale des composés **1** et **2**.

Le deuxième système ABX est observé entre les protons résonant à $\delta_{\text{H}}= 6,97\text{ ppm}$ (1H, $d, J = 1,5\text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}}= 7,11\text{ppm}$ (1H, $d, J = 8,0\text{ Hz}$) et $\delta_{\text{H}}= 6,95\text{ ppm}$ (1H, $dd, J = 8,0-1,5\text{ Hz}$), correspondant aux protons H-2', H-5' et H-6' respectivement, indiquant la présence d'un cycle B de type 1',3',4'- trisubstitué suite aux multiplicités des protons et valeurs des constantes de couplage[7].

Figure S1.

**Spectre IV.12 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 3**

L'analyse du spectre HSQC du composé 3 (Spectre IV.13) permet de déterminer les déplacements chimiques des protons cités précédemment à $\delta_{\text{C}}=129,6\text{ppm}$ (C-5), $\delta_{\text{C}}=112,2\text{ppm}$ (C-6), $\delta_{\text{C}}=102,9\text{ ppm}$ (C-8), $\delta_{\text{C}}=113,2\text{ ppm}$ (C-2'), $\delta_{\text{C}}=123,0\text{ppm}$ (C-6') et $\delta_{\text{C}}=117,5\text{ppm}$ (C-5').



Spectre IV.13 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 3

Les autres carbones sont détectés par analyse du spectre HMBC (Spectre IV.14) qui indique les corrélations longue distance en 2J et 3J entre le proton H-5 du cycle A et les carbones à $\delta_C=192,5$ ppm (C-4), $\delta_C=167,8$ ppm (C-7) et $\delta_C=164,7$ ppm (C-9), et le proton H-6 et les carbones C-8 et C-10 à $\delta_C=113,1$ ppm. En plus, le proton H-8 montre une point de corrélation en HMBC avec les carbones C-9 à $\delta_C=164,7$ ppm, C-6 et C-10. Les protons H-5' montre des couplages HMBC en 3J avec les carbones à $\delta_C = 147,0$ ppm (C-3') $\delta_C = 149,0$ ppm (C-4') et C-6'.

En plus, la localisation du proton H-5' à ($\delta_H=7,11$ / $\delta_C=117,5$) permet d'assigner les carbones C-3' à $\delta_C = 147,0$ ppm et C-4' à $\delta_C = 149,0$ ppm, ainsi que les protons H-2', H-6' à $\delta_C = 6,97$ ppm et $\delta_C = 6,95$ ppm caractérisent le déplacement chimique du carbone C-1' à $\delta_C = 129,1$ ppm selon l'expérience HMBC.

A ce stade d'interprétation tous les protons et carbones des cycles A et B sont déterminés, il reste à trouver les déplacements chimiques des protons et carbones du cycle C.

Le spectre RMN 1H du composé 3 montre, en plus des protons des cycles A et B : H-5/H-6/H-8 et H-2', H-6'/H-3', H-5', autres protons sont observés :

Un proton résonant à $\delta_H= 3,85$ ppm ($dd, J = 11,0 -5,0$ Hz) caractéristique du proton H-3 d'une isoflavanone et deux autres protons géminés résonant à $\delta_H=4,61$ ppm ($dd, J = 13,0-5,0$ Hz) et $\delta_H = 3,49$ ppm ($dd, J = 13 -11,0$ Hz) correspondant aux protons H-2a et H-2b respectivement.

Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à $\delta_C = 72,9$ ppm (C-2) et $\delta_C = 51,6$ ppm (C-3) [8].

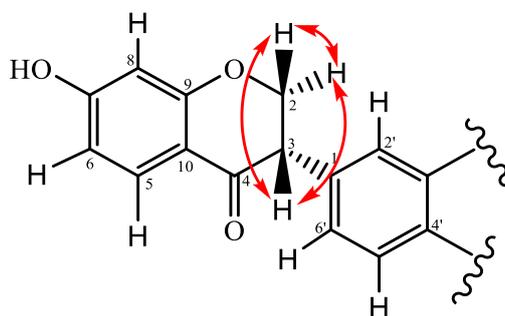
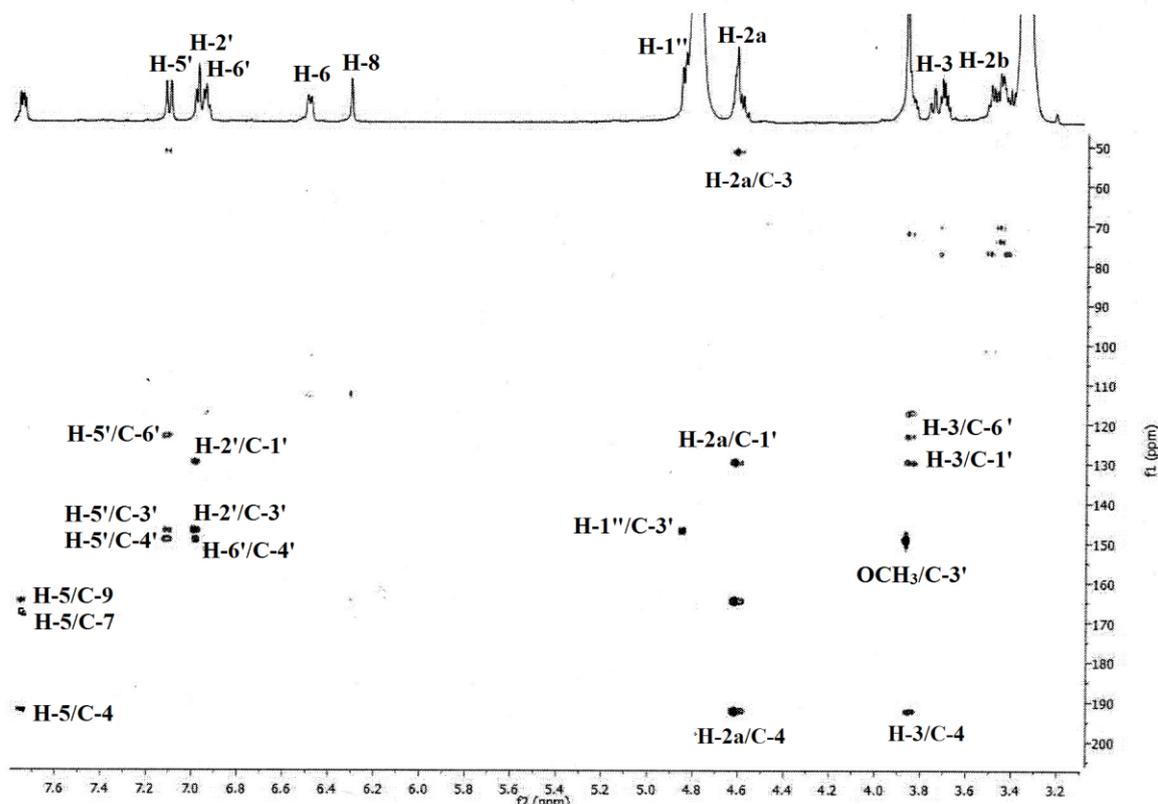


Figure IV.9 : Cycle C du composé 3

Le spectre HMBC de ce composé montre des corrélations entre le proton H-2a et les carbones C-3, C-1' et C-4. En plus, le proton H-3 présente des couplages avec les carbones C-1', C-4 et C-6'.

Le point de branchement du glucose avec l'aglycone est localisé en position C-3' raison de la présence d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Spectre IV.14) entre le carbone C-3' et le proton anomérique H-1''



Spectre IV.14: Spectre HMBC (CD₃OD , 600 MHz) du composé 3

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du composé **3** sont attribués.

La détermination de la configuration absolue du carbone chiral C-3 de ce composé est basée sur des considérations de biogénèse [9] et les valeurs des constantes de couplage entre le proton H-3 et les protons méthyléniques H-2a, H-2b ($J_{\text{H-3ax-H-2a-ax}} = 11,0$ ppm et $J_{\text{H-3ax-H-2b-eq}} = 5,0$ Hz) qui sont similaires à celles des composés analogues reportés dans la littérature [9] indiquant ainsi la configuration S du carbone C-3.

Ceci est confirmé par la mesure du pouvoir rotatoire qui est égale à ($[\alpha]_{\text{D}} = -36,5$, $c = 0,042$, MeOH) indiquant une configuration absolue (3S).

L'ensemble de ces données, permettent d'identifier la structure du composé **3** comme étant un nouvel isoflavanoïde nommé **(3S)-7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavane 3'β-D-glucopyranoside**. Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau IV.3.

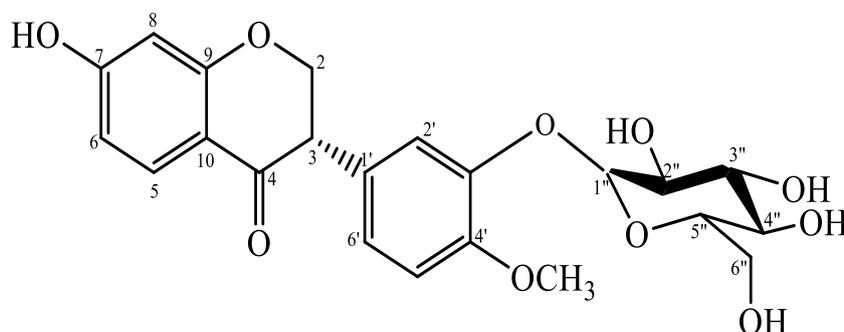


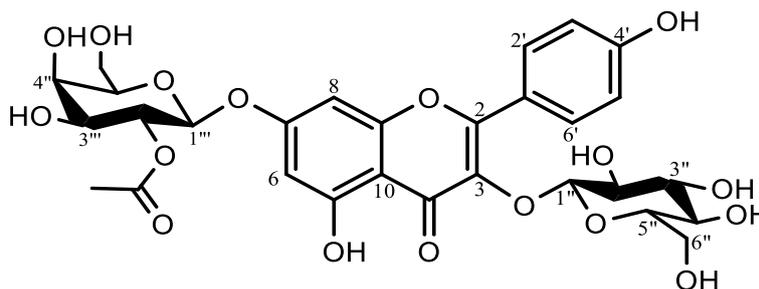
Figure IV.10 : Structure du composé **3** : **(3S)-7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavane 3' β -D-glucopyranoside**

Tableau IV.3 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé **3**

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
2a	72,9 (CH)	4,61, <i>dd</i> (13,0 - 5,0)
2b	72,9 (CH)	3,49, <i>dd</i> (12,5 - 11,0)
3	51,6 (CH)	3,85, <i>dd</i> (11,0 - 5,0)
4	192,5 (C)	-
5	129,6 (CH)	7,75, <i>d</i> (8,0)
6	112,9 (CH)	6,48, <i>d</i> (8,0)
7	167,8 (C)	-
8	102,9 (CH)	6,31, <i>d</i> (1,5)
9	164,7 (C)	-
10	113,1 (C)	-
1'	121,9 (C)	-

2'	113,2 (CH)	6,97, <i>d</i> (1,5)
3'	147,0 (C)	-
4'	149,0 (C)	-
5'	117,5 (CH)	7,11, <i>d</i> (8,0)
6'	123,0(CH)	6,95, <i>dd</i> (8,0 - 1,5)
Glucose		
1''	102,1 (CH)	4,84, <i>d</i> (7,5)
2''	73,4 (CH)	3,49, <i>t</i> (8,5)
3''	77,2 (CH)	3,34, <i>t</i> (9,0)
4''	70,3 (CH)	3,43, <i>t</i> (9,0)
5''	76,8 (CH)	3,46, <i>m</i>
6''	61,6 (CH₂)	3,85, <i>dd</i> (12,0 - 5,0) 6''a 3,72, <i>dd</i> (12,0 - 2,5) 6''b
OCH₃-4'	56,0 (CH₃)	3,85, <i>s</i>

IV.1.4. Elucidation structurale du composé 4



Ce composé est isolé sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol. Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254 nm.

Le spectre de masse en impact électronique couplé avec chromatographie liquide LC-MS du composé 4 (**Figure IV.11**) a donné un pic $[M-H]^+$ à $m/z = 651,05$ correspondant à la formule brute $C_{29}H_{32}O_{17}$. Un ion de fragment à $m/z = 488,96$ correspondant à $[M-H-162]^+$, issu de la perte d'un hexose, confirme ainsi la présence d'une unité osidique. Une fragmentation à $m/z = 283,97$ correspondant à $[M-H-162-206]^+$ indiquant la présence d'un hexose acétylé, confirme ainsi la présence de deux unités osidiques dans cette molécule.

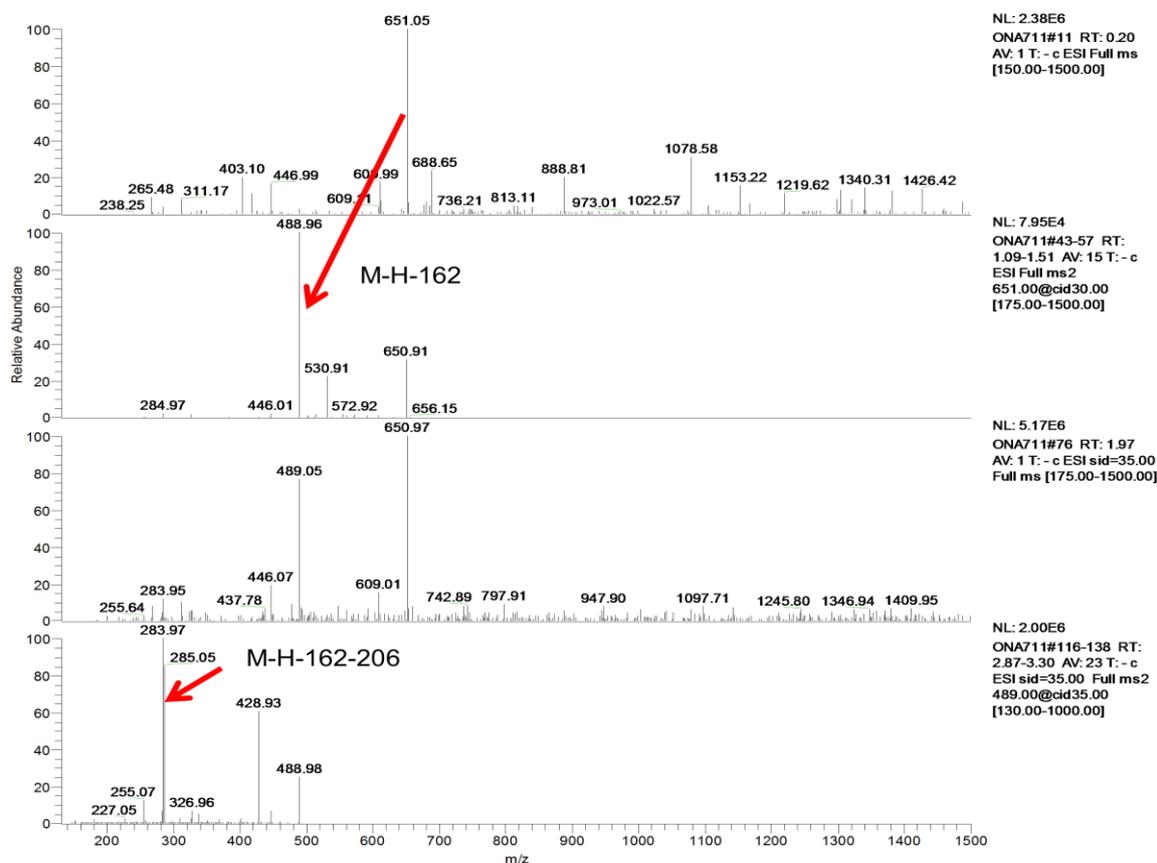
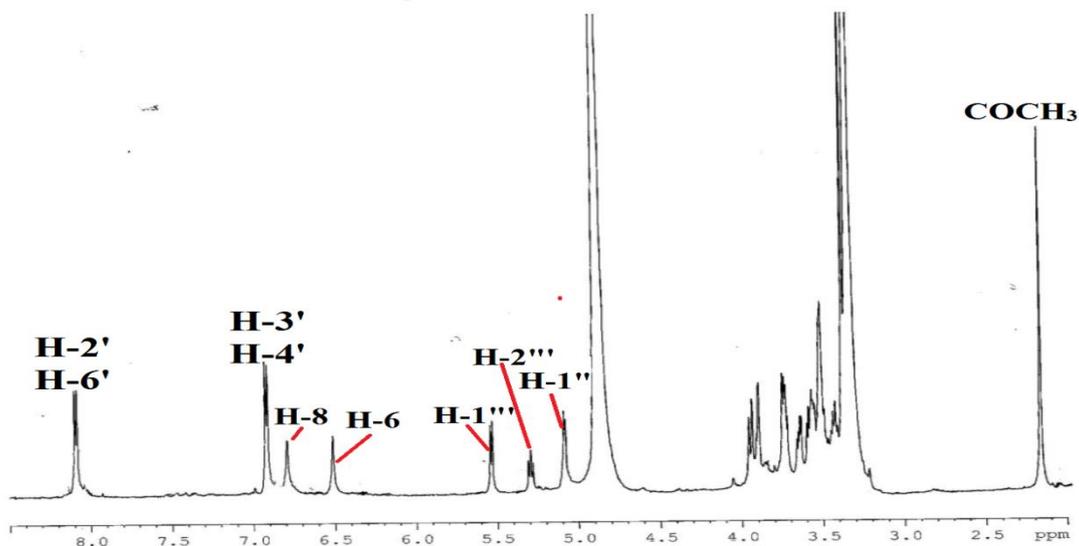


Figure IV.11 : Spectre de masse EI-MS du composé 4

Les signaux présents sur le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.15**) du composé **4** dans la région de protons aromatiques sont en faveur d'un squelette de type Kaempférol. En outre, nous observons les signaux de deux protons anomériques à $\delta_{\text{H}} = 5,54$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 5,09$ ppm indiquant la présence de deux sucres, dont l'une a l'allure d'un β -D-glucose. Les valeurs des déplacements chimiques de ces protons et de leurs carbones indiquent une jonction O-glycoside. Ce spectre montre aussi la présence d'un singulet d'intégration 3H correspondant à un méthyle à $\delta_{\text{H}} = 2,15$ ppm.



Spectre IV.15 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé **4**

L'identification structurale de cette génine flavonique diglycosylée est établie par analyse combinée de ses spectres RMN ^1H (**Spectre IV.15**), COSY H-H (**Spectre IV.16**) et HSQC (**Spectre IV.17**) qui montre la présence de :

- deux doublets déblindés s'intégrant pour deux protons chacun résonant à $\delta_{\text{H}}=6,90$ ppm (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=8,08$ ppm (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz), Selon le spectre COSY (**Spectre IV.16**), ces protons appartiennent à un même système de spins attribuables respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B paradisubstitué en position 4'. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC à $\delta_{\text{C}}=116,1$ ppm (C-3' et C-5') et $\delta_{\text{C}}=131,5$ ppm (C-2'/C-6').
- Deux signaux à $\delta_{\text{H}}=6,51$ ppm (*d*, $J = 1,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=6,80$ ppm (*d*, $J = 1,5$ Hz) formant un système AX, Les déplacements chimiques des carbones de ces protons ($\delta_{\text{C}}=100,1/\delta_{\text{H}}=6,51$) et ($\delta_{\text{C}}=94,6/\delta_{\text{H}}=6,80$), déterminés par le spectre HSQC (**Spectre IV.17**), permettent de les attribuer aux carbones 6 et 8 du cycle A respectivement. L'expérience COSY H-H en apporte la confirmation.

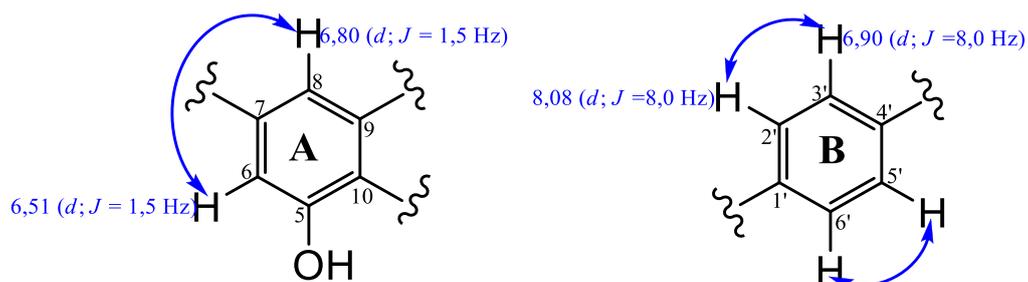
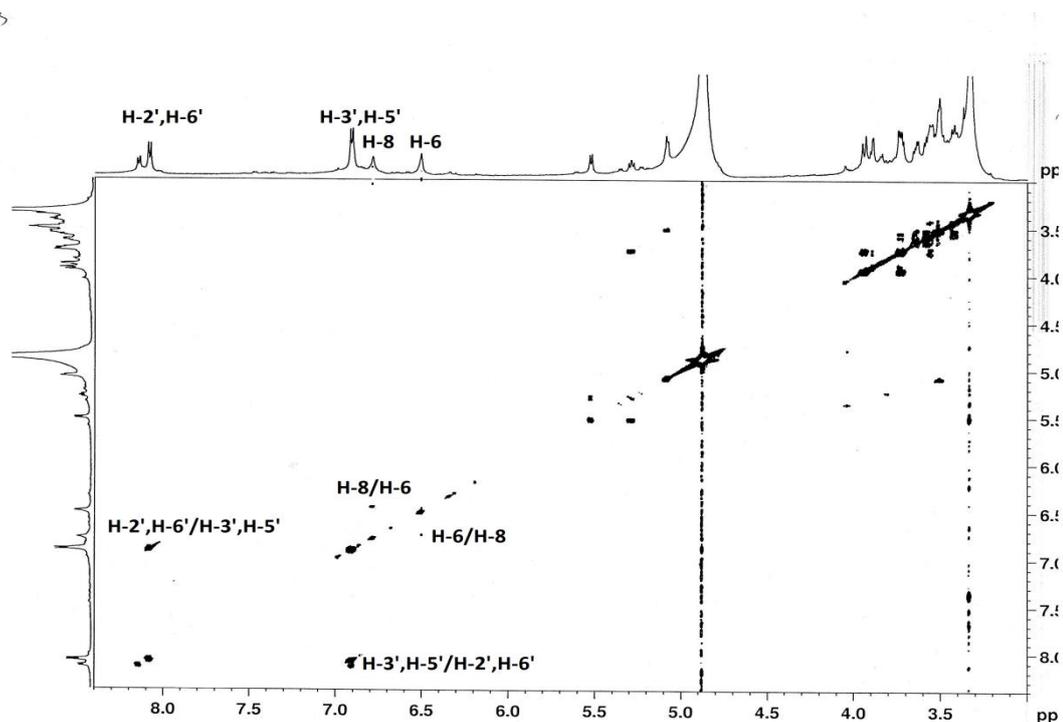
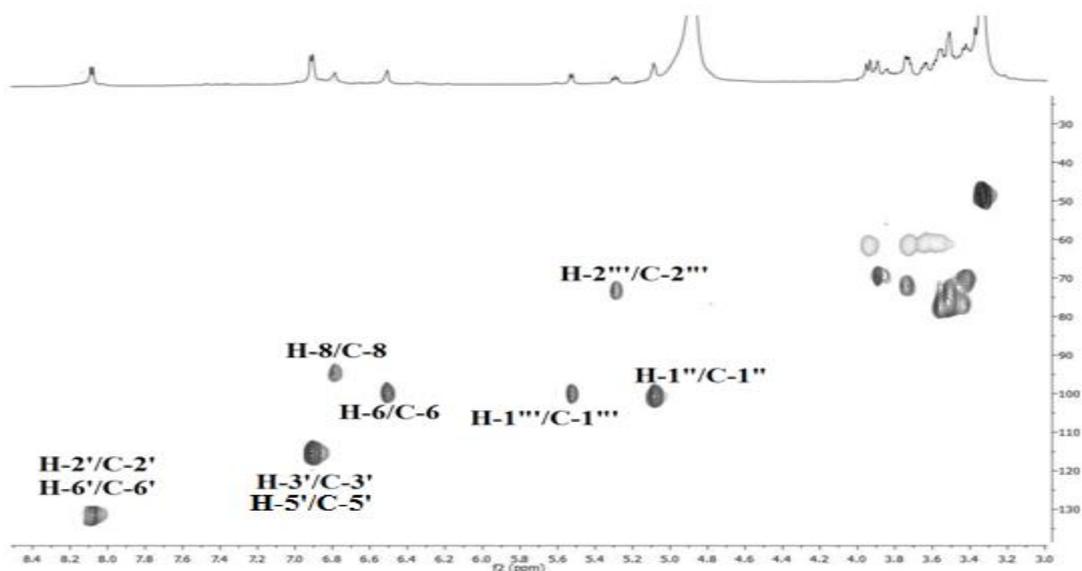


Figure IV.12 : Cycles aromatiques A et B du composé 4

,A S S >



Spectre IV.16: Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz) du composé 4



Spectre IV.17 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 4

A partir de ces protons le spectre HMBC (**Spectre IV.20**) permet de localiser les autres carbones du cycle A par les corrélations qu'il présente comme suit :

- ◆ Le proton H-6 et les carbones oxygénés C-5($\delta_C= 160,0$ ppm) et C-7 ($\delta_C= 165,0$ ppm), le carbone méthine C-8 ($\delta_C= 94,6$ ppm) et le carbone quaternaire C-10 ($\delta_C= 104,0$ ppm).
- ◆ Le proton H-8 et le carbone méthine C-6 ($\delta_C=100,1$ ppm), les carbones oxygénés C-7 et C-9 ($\delta_C=157,4$ ppm) et le carbone quaternaire et C-10.
- ◆ Les protons H-2'/H-6' et deux carbones quaternaires oxygénés à $\delta_C= 161,0$ ppm et $\delta_C= 158,0$ ppm s'accordant aux carbones C-2 et C-4' respectivement. tandis que les deux autres protons équivalents H-3' et H-5' couplent avec les carbones, C-1'($\delta_C=121,0$ ppm) et C-4'.

Afin de déterminer la partie aglycone de ce flavonoïde, les carbones quaternaires localisés à $\delta_C=134,9$ ppm et $\delta_C=178,2$ ppm sur le spectre HMBC (**Spectre IV.20**) et ne présentant aucune corrélation relatif à la partie aglycone sont attribués aux carbones C-3 et C-4 respectivement. La valeur du déplacement chimique du carbone C-3 ($\delta_C=134,9$) indique l'appartenance de cet aglycone à la classe des flavonols et plus précisément aux dérivés du Kaempférol substitué en 3, 5, 7 et 4' [10].

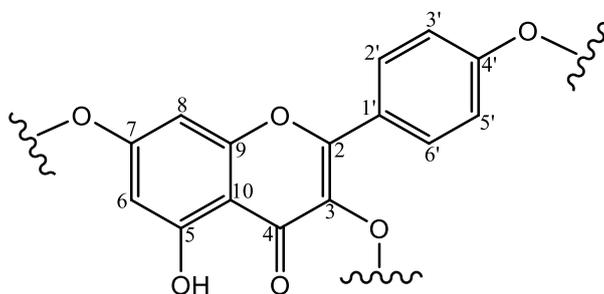
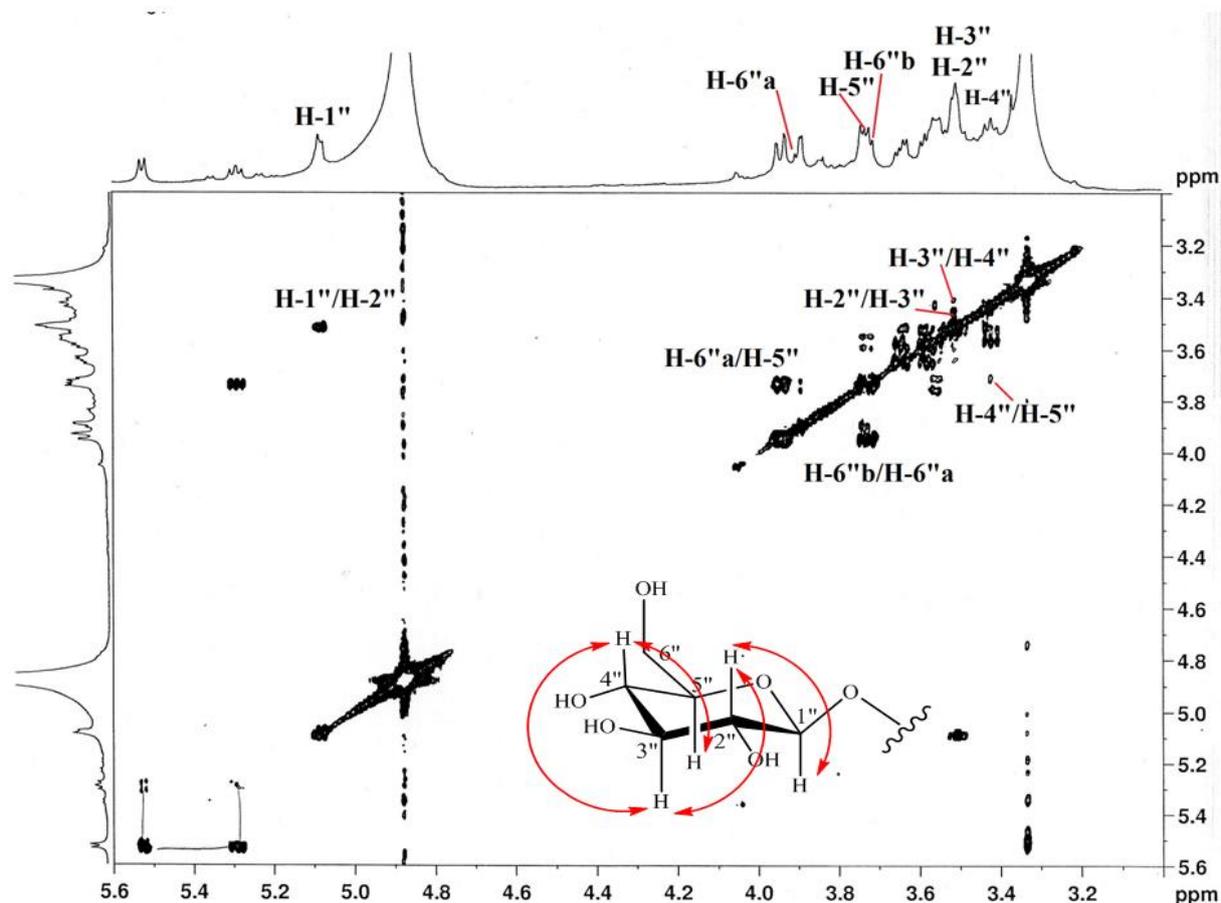


Figure IV.13 : Aglycone du composé 4

L'existence d'un hexose de type β -D-glucose est prouvée par analyse du spectre COSY de ce composé, où à partir du proton anomérique H-1" ($\delta_H=5,09$, $d, J = 7,5$ Hz), cette l'expérience (**Spectre IV.18**) permet de repérer un système de spins à sept protons. L'attribution de ces protons est réalisée à travers les couplages scalaires entre les protons résonant à $\delta_H=5,09$ ($d, J = 7,5$ Hz, H-1")/3,50 ($t, J = 8,5$ Hz, H-2")/3,49 ($t, J = 9,0$ Hz, H-3")/3,42 ($t, J = 9,0$ Hz, H-4")/3,79 ($m, H-5$ ")/3,94 ($dd, J = 12,0-5,0$ Hz, H-6"a) et 3,72 ($dd, J = 12,0-2,5$ Hz, H-6"b).



Spectre IV.18: Spectre COSY étalé (CD₃OD, 600 MHz) du composé 4

Le nombre de signaux non attribués sur le spectre RMN ¹H (Spectre IV .15) conduit à classer la deuxième unité osidique de ce composé partant du proton anomérique H-1'' sortant à $\delta_{\text{H}}=5,54$ ppm (*d*, $J = 7,0$ Hz), l'analyse du spectre COSY (Spectre IV.19), permet de repérer un système de spins à sept protons attestant ainsi de la présence d'un hexose. Le proton H-2'' est localisé à $\delta_{\text{H}}=5,29$ ppm (*t*, $J = 9,0$ Hz) suite aux couplages qu'il présente en COSY avec H-1'' et H-3''. Le proton H-3'' résonne à $\delta_{\text{H}}= 3,73$ ppm (*dd*, $J = 9,0-3,5$ Hz) et le proton H-4'' dont le signal sort à $\delta_{\text{H}}=3,49$ ppm (*dd*, $J = 3,5-3,4$ Hz). La petite valeur de la constante de couplage entre les protons H-3'' et H-4'' ($J_{3''-4''} = 3,5$ Hz) met en évidence une position équatoriale du proton H-4''. Le proton H-5'' [$\delta_{\text{H}}=3,88$ (*m*)], couple avec le proton H-4'' et avec deux protons géminés H₂-6'' [$\delta_{\text{H}}=3,70$ ppm (*dd*, $J = 12,0-5,0$ Hz), H-6''a et $\delta_{\text{H}}=3,56$ ppm (*dd*, $J = 12,0-2,5$ Hz), H-6''b]. Les valeurs des constantes de couplage entre tous les protons de cette unité osidique sont caractéristiques d'un β -D-galactose.

A signaler que le déblindage important de signaux de protons H-2'' laisse suggérer que le proton H-2'' est, estérifié

Par ailleurs, le proton H-2''' montrent une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle d'un ester à $\delta_c=171,4$ ppm, de son côté et toujours sur le même spectre, ce carbonyle montre une corrélation avec les protons du méthyle à $\delta_H=2,15$ ppm, ceci suppose la présence d'un groupement acétate en C-2''', ainsi le groupement galactopyranoside est en fait acétylé en position 2'''. A ce stade de notre analyse nous arrivons à la présence dans cette molécule de l'entité β -D-galactopyranoside-2'''-O-acétate reportée dans la (Figure IV .14)

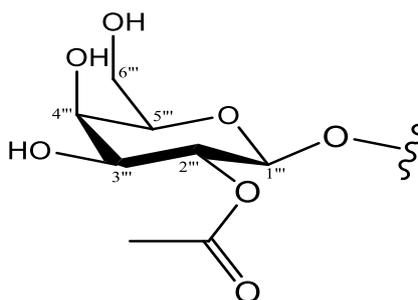
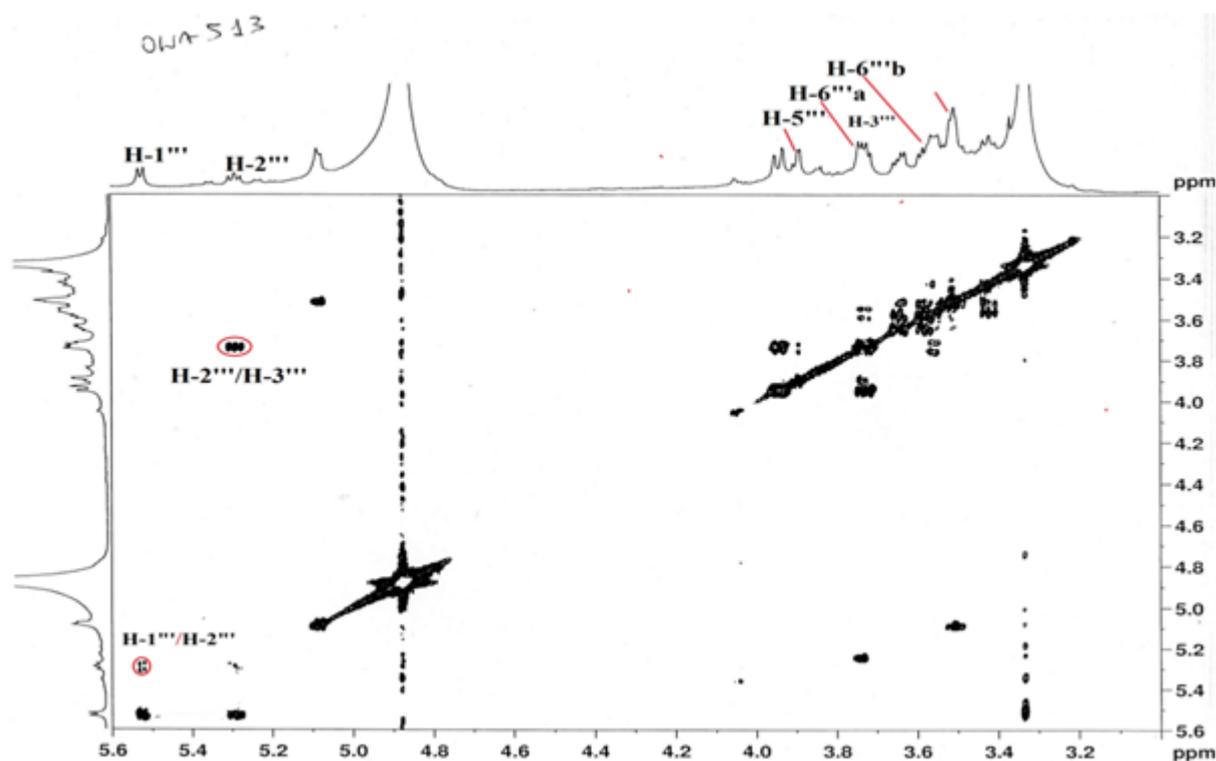


Figure IV.14 :Entité β -D-galactopyranoside-2'''-O-acétate présente dans le composé 4



Spectre IV.19. : Spectre COSY étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 4

L'hydrolyse acide de ce composé confirme cette analyse et libère un glucose et un galactose révélés par co-chromatographie avec des échantillons authentiques.

Les points de connectivité de ces deux osides avec l'aglycone sont déterminés par l'analyse du spectre HMBC (Spectre IV .20) qui montre le couplage entre le proton anomérique H-1''

du β -D-glucose et le carbone C-3 du Kaempférol. Il révèle aussi un couplage entre Le proton anomérique H-1''' et le carbone quaternaire C-7 conduisant à accorder le β -D-galactose au carbone C-7 du cycle A

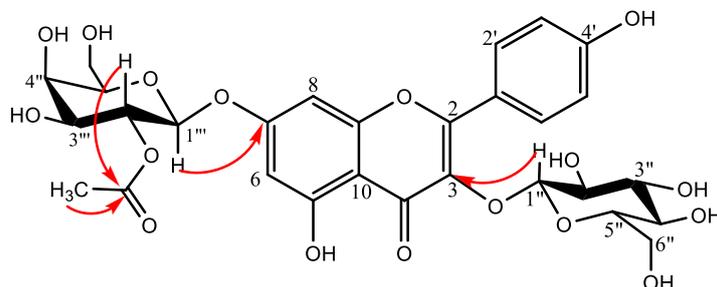
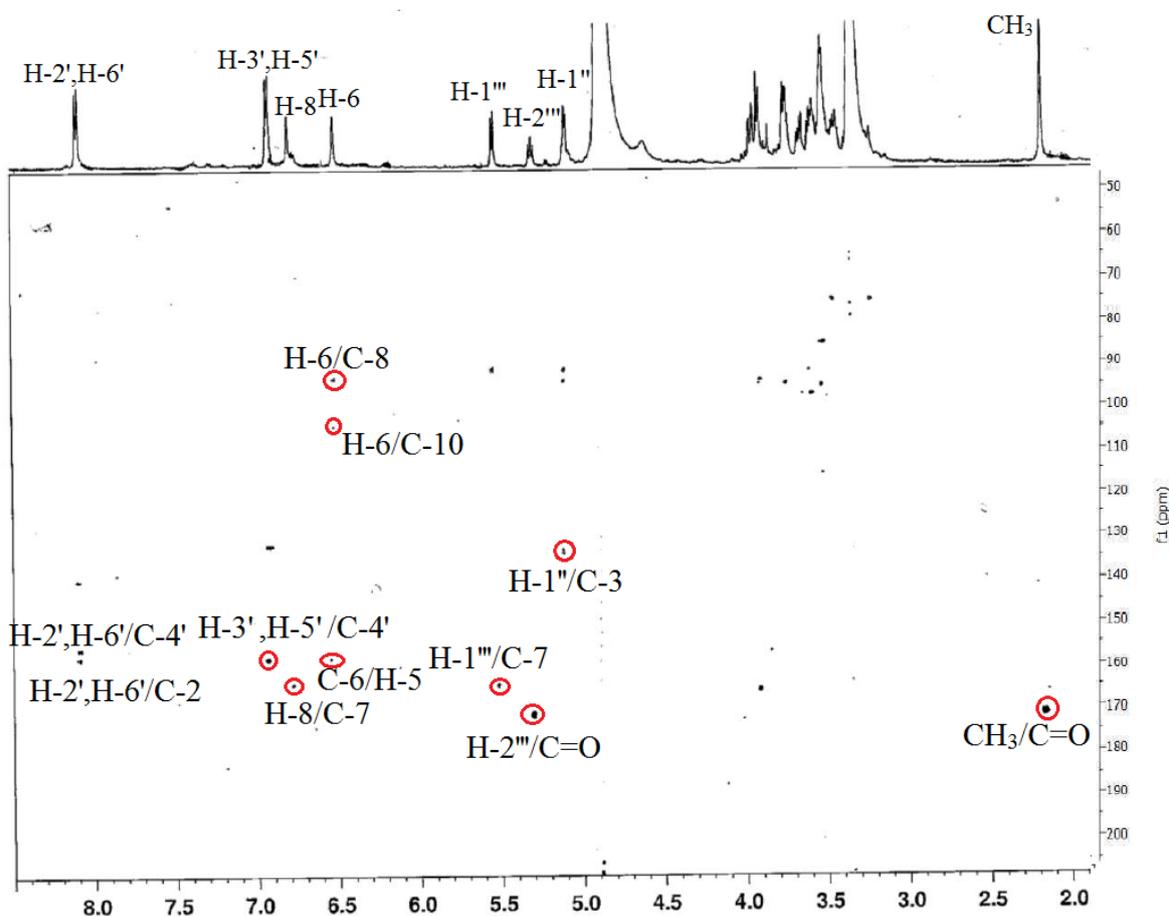


Figure IV.15 : Corrélations HMBC



Spectre IV.20: Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 4

L'ensemble de ces données ainsi permettent d'identifier le composé 4 au **Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- β -D-galactopyranoside**. Cette molécule est nouvelle, elle n'a jamais été isolée dans la littérature comme composé naturel à l'état natif.

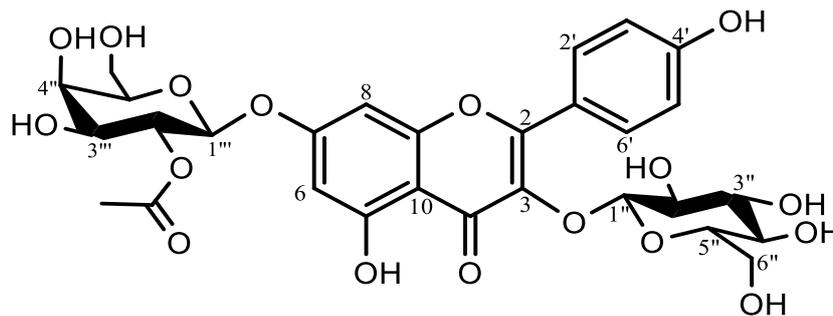


Figure IV.16 : Structure du composé 4 :Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside-7-O-(2''-acetyl)- β -D-galactopyranoside

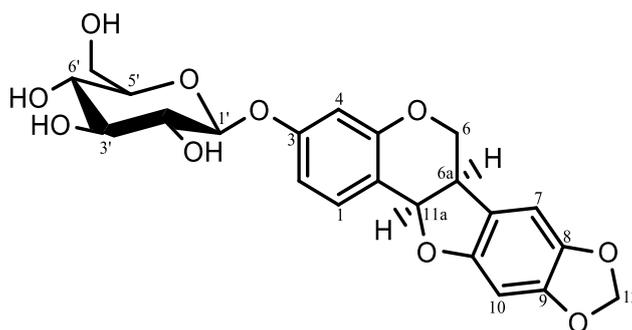
Les données de RMN ^1H et ^{13}C sont reportées dans le Tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 4

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	161,0 (C)	-
3	134,9 (C)	-
4	178,2 (C)	-
5	160,0 (C)	-
6	100,1 (CH)	6,51, <i>d</i> (1,5)
7	165,0 (C)	-
8	94,6 (CH)	6,80, <i>d</i> (1,5)
9	157,4 (C)	-
10	104,0 (C)	-
1'	121,0 (C)	-
2'	131,5 (CH)	8,08, <i>d</i> (8,0)
3'	116,1 (CH)	6,90, <i>d</i> (8,0)
4'	158,0 (CH)	-
5'	116,1 (CH)	6,90, <i>d</i> (8,0)
6'	131,5 (CH)	8,08, <i>d</i> (8,0)
Glucose		
1''	100,6 (CH)	5,09, <i>d</i> (7,5)
2''	73,8 (CH)	3,50, <i>t</i> (8,5)
3''	77,0 (CH)	3,49, <i>t</i> (9,0)
4''	70,2 (CH)	3,42, <i>t</i> (9,0)
5''	77,0 (CH)	3,79, <i>m</i>

6''	62,5 (CH₂)	3,94, <i>dd</i> (12,0-5,0) 6''a 3,72, <i>dd</i> (12,0-2,5) 6''b
Galactose		
1'''	100,0	5,54, <i>d</i> (7,0)
2'''	73,5	5,29, <i>t</i> (9,0)
3'''	77,0	3,73 ; <i>dd</i> (9,0-3,5)
4'''	72,1	3,49 ; <i>dd</i> (3,5-3,4)
5'''	69,4	3,88 ; <i>m</i>
6'''	62,5	3,70, <i>dd</i> (12,0-5,0) 6''a 3,56, <i>dd</i> (12,0-2,5) 6''b
<u>COCH₃</u>	171,4	-
<u>COCH₃</u>	22,0	2,15, <i>s</i>

IV.1.5. Elucidation structurale du composé 5



Le composé **5** a été isolé sous forme d'un cristal jaune. L'analyse du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode ESI (+) (**Figure IV.17**), montre la présence d'ions adduits correspondant à $[M+Na]^+$ à $m/z = 469.1107$, respectivement orientant vers la formule brute $C_{22}H_{22}O_{10}$ pour cette molécule qui doit contenir ainsi neuf insaturations.

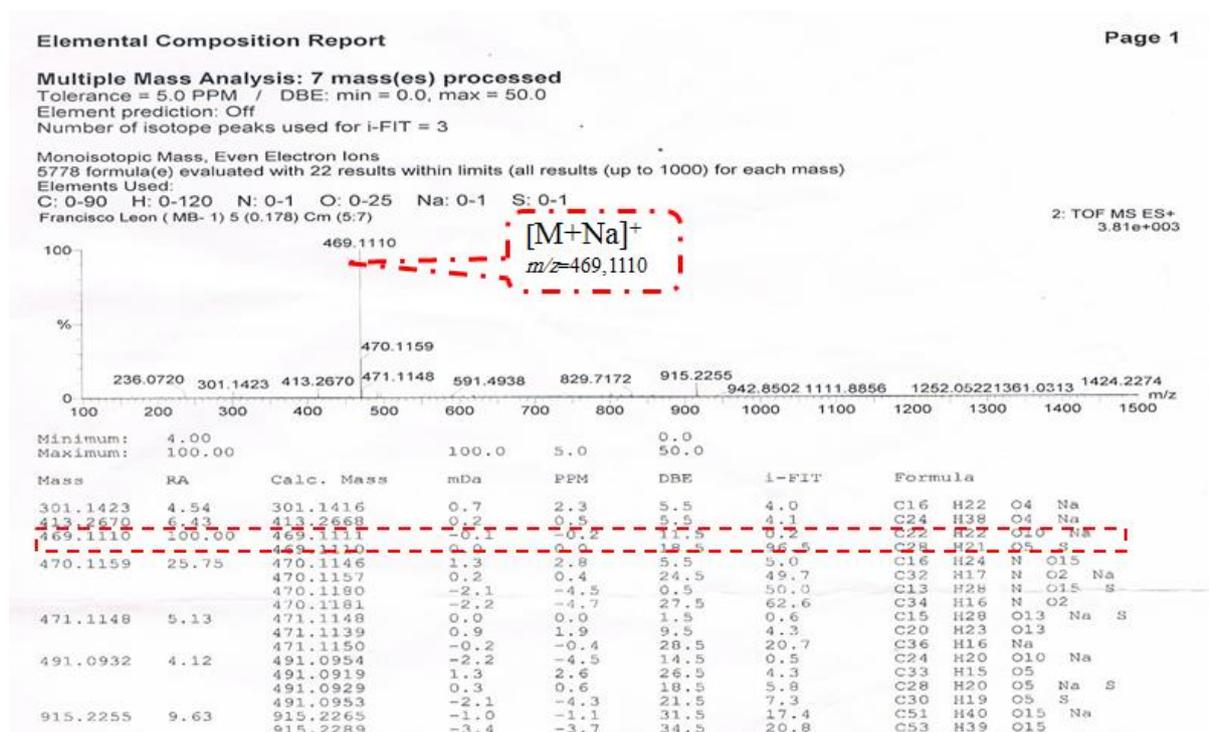
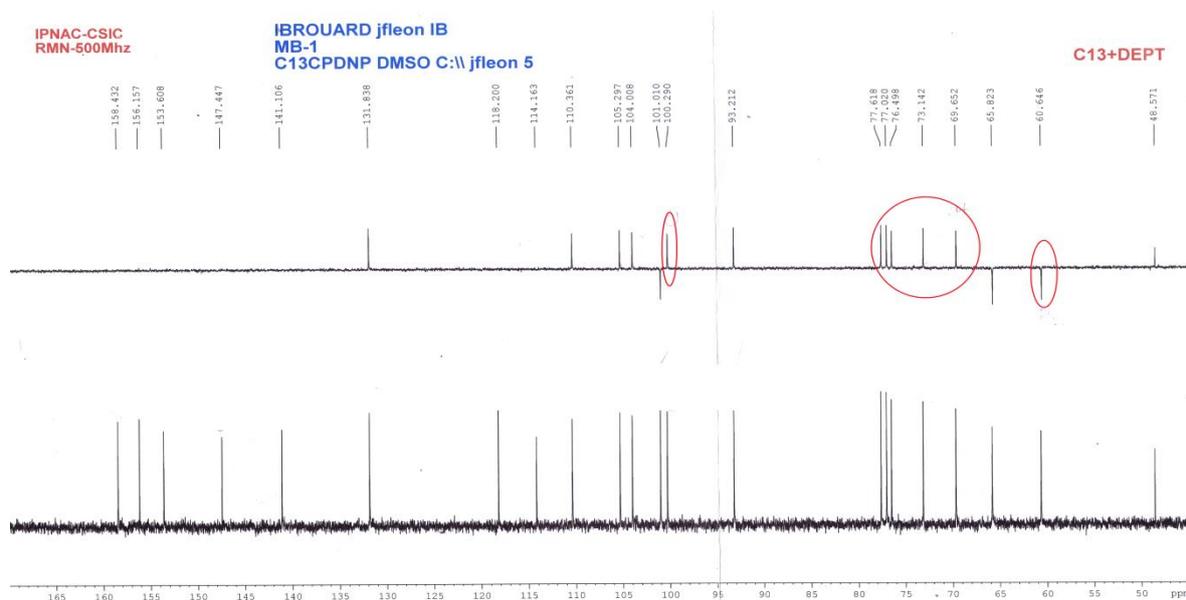


Figure IV.17 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 5

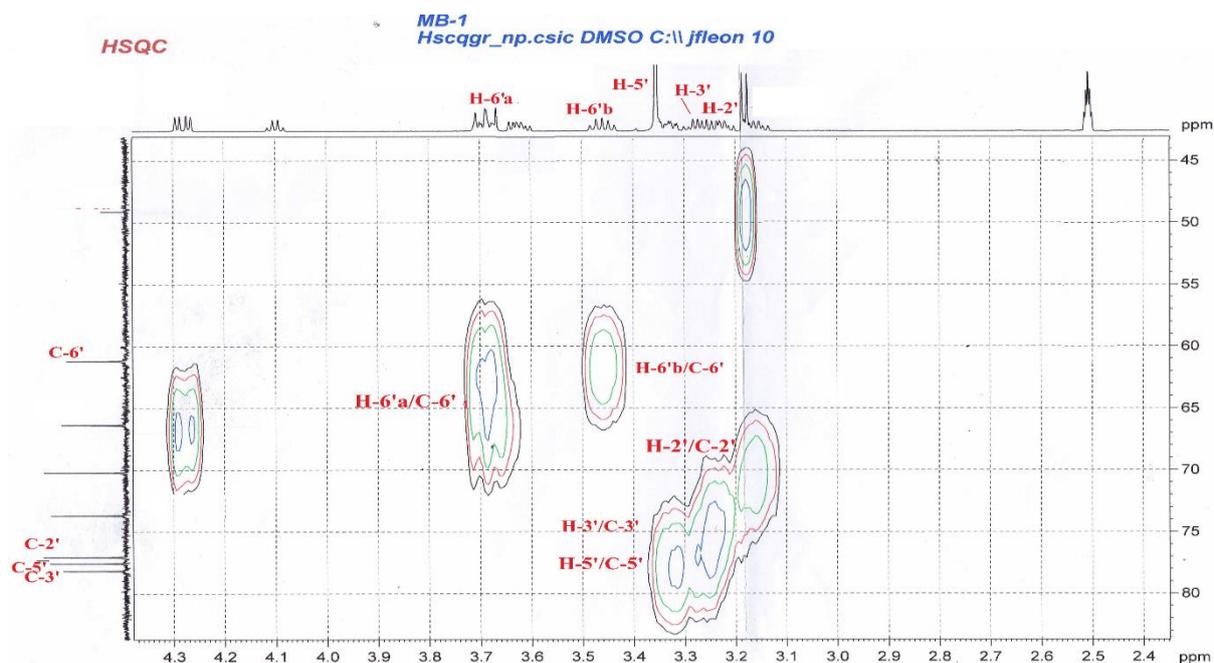
Ses spectres RMN 1H (**Spectre IV.21**) et ^{13}C enregistrés (**Spectre IV.22**) dans le DMSO- d_6 , montrent des signaux de protons aromatiques résonants entre 6,55 et 7,40 ppm et osidiques, suggérant que ce composé est également de nature phénolique.

Le spectre RMN ^{13}C du composé 5 (**Spectre IV.22**) montre six signaux caractéristiques d'un hexose notamment :

- Un CH₂ à $\delta_C = 60,64$ ppm corrélant sur le spectre relatif à l'expérience HSQC (**Spectre IV.23**) aux protons du signal résonant l'un à $\delta_H = 3,70$ ppm (*dd*, $J = 11,5-1,6$ Hz) et l'autre à $\delta_H = 3,48$ ppm (*dd*, $J = 11,5-5,3$ Hz) attribuable à C-6'.
- Un CH à $\delta_C = 101,29$ ppm ($\delta_H = 4,85$ ppm, *d*, $J = 7,4$ Hz) que l'on peut attribuer à la position anomérique C-1'. Les valeurs des déplacements chimiques de ce carbone et de son proton ainsi que la valeur de la constante de couplage résultant de l'interaction vicinale H-1'/H-2' axiale/axiale orientent bien vers une jonction *O*- β -glycosidique. Cette jonction est appuyée par la combinaison des résultats des analyses des spectres HSQC, COSY et qui permet d'attribuer les carbones et ses protons du glucopyranosyle C-2' (H-2'), C-3'(H-3'), C-4'(H-4'), C-5' (H-5'), C-6' (H₂-6') aux signaux $\delta_C = 73,13$ ppm ($\delta_H = 3,27$ ppm), $\delta_C = 77,02$ ($\delta_H = 3,34$ ppm), $\delta_C = 69,55$ ($\delta_H = 3,16$ ppm), et $\delta_C = 76,50$ ($\delta_H = 3,30$ ppm) respectivement.



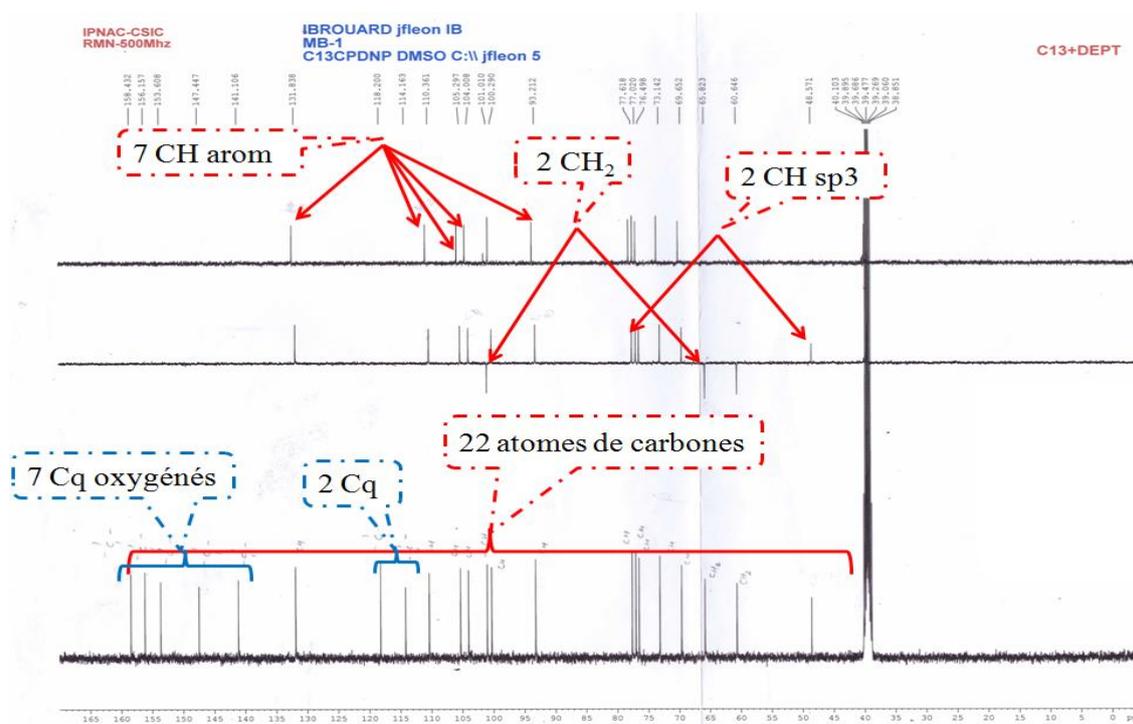
.Spectre IV.22 : Spectre ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) du composé 5



Spectre IV.23 : Spectre HSQC étalé (DMSO-*d*₆, 500 MHz) du composé 5

En faisant abstraction des signaux de la partie osidique, les spectres des expériences DEPT 90° et 135° (**Spectre IV.24**) et le spectre RMN ¹³C (**Spectre IV.22**) montrent :

- Deux CH₂ oxygénés à $\delta_C = 101,01$ ppm, $\delta_C = 65,82$ ppm.
- Cinq CH aromatiques à $\delta_C = 131,83$ ppm, $\delta_C = 110,36$ ppm, $\delta_C = 105,29$ ppm, $\delta_C = 104,0$ ppm, $\delta_C = 93,21$ ppm
- Deux carbones quaternaires à $\delta_C = 118,20$ ppm et $\delta_C = 114,16$ ppm.
- Cinq carbones quaternaires oxygénés à $\delta_C = 158,43$ ppm, $\delta_C = 156,15$ ppm, $\delta_C = 153,60$ ppm, $\delta_C = 147,44$ ppm, $\delta_C = 141,0$ ppm.
- deux groupements CH hybridé sp³ à $\delta_C = 77,61$ ppm et $\delta_C = 39,9$ ppm.



Spectre IV.24 : Spectre ^{13}C , DEPT 135 et 90 (DMSO-*d*₆, 125 MHz) du composé 5

Le spectre RMN ^1H , (Spectre IV.21), met en évidence la présence de 5 protons aromatiques.

- ❖ trois protons résonant à $\delta_{\text{H}} = 7,38$ ppm (*d*, $J = 8,7$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6,72$ ppm (*dd*, $J = 8,7-1,8$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 6,56$ ppm (*d*, $J = 1,8$ Hz), appartenant à un même système de spin selon le spectre COSY H-H (Spectre IV.25). Ils sont identifiables à un système ABX du noyau aromatique trisubstitué (cycle A).
- ❖ La présence d'un deuxième noyau aromatique tetrasubstitué (cycle B) est attestée par l'observation d'un système AX constitué par les signaux de deux protons sortant sous la forme de deux singulets respectivement à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6,52$ ppm et confirmée par expérience COSY H-H (Spectre IV.25). qui ne présente aucune corrélations entre ces deux protons, indique une position *para* pour ces protons (Figure IV. 18).

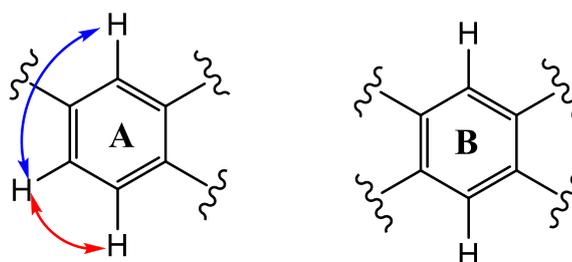


Figure IV.18 : Corrélations COSY observées pour la molécule 5

L'autre extrémité du spectre RMN ^1H révèle la présence d'un signal sous forme de deux doublet de doublets $\delta_{\text{H}}=4,27$ ppm (dd , $J=10,5-4,1$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=3,62$ ppm (m), d'intégration 2H caractéristique de deux protons d'un groupement CH_2 magnétiquement non équivalent, accordé sur le spectre HSQC (Spectre IV.23) à un carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=65,82$ ppm attribué à un groupement méthylène oxygéné.

Toujours sur le spectre H^1 On observe un signal sous forme d'un multiplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}= 3,63$ ppm, et un doublet résonant à $\delta_{\text{H}} = 5,56$ ppm (d , $J = 8,7$ Hz) intégrant pour un proton correspondant à un groupement oxyméthine OCH.

Ce dernier montre Sur le spectre COSY (Spectre IV.25), une corrélation avec le proton $\delta_{\text{H}}= 3,63$ ppm, lui-même corrélant avec deux protons géminés à $\delta_{\text{H}}=4,27$ ppm et $\delta_{\text{H}}=3,62$ ppm.

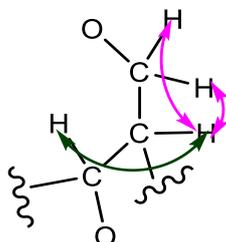
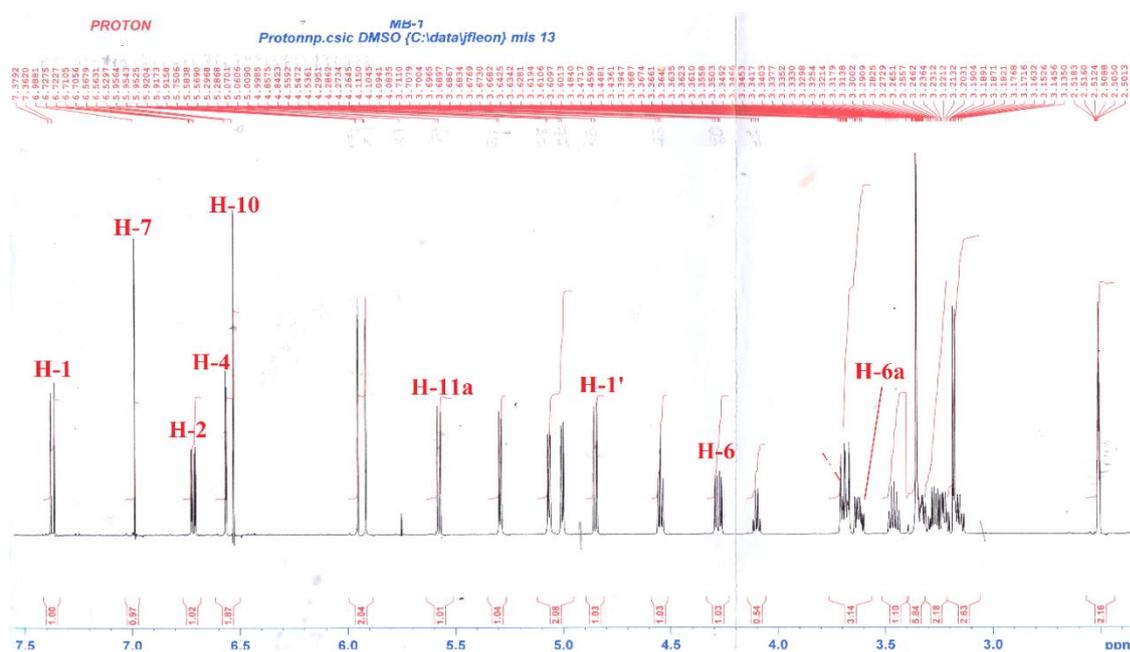
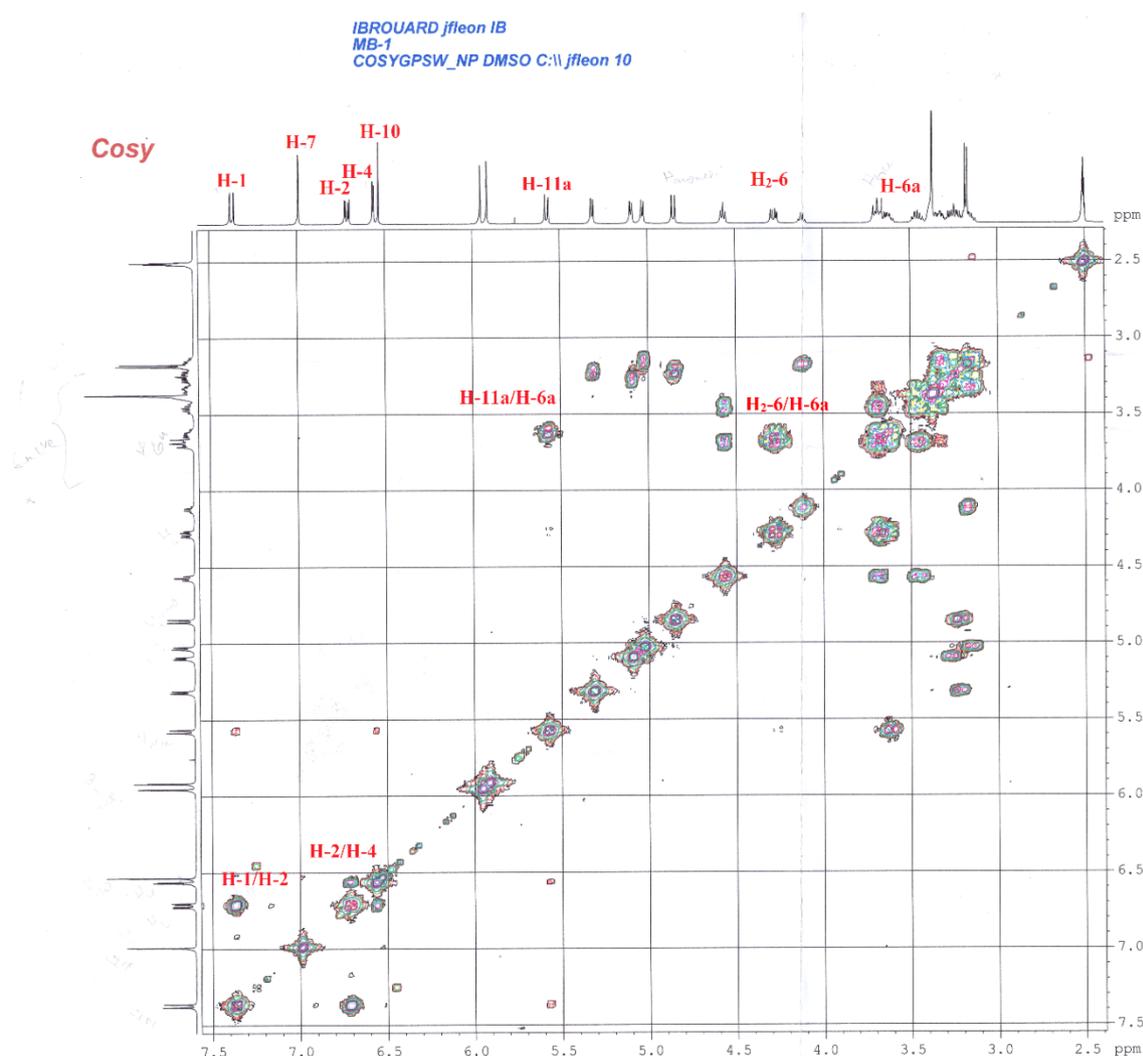


Figure IV.19 : Enchaînement présent dans la molécule 5

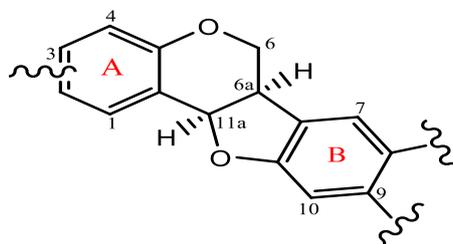


Spectre IV.21 : Spectre ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 5

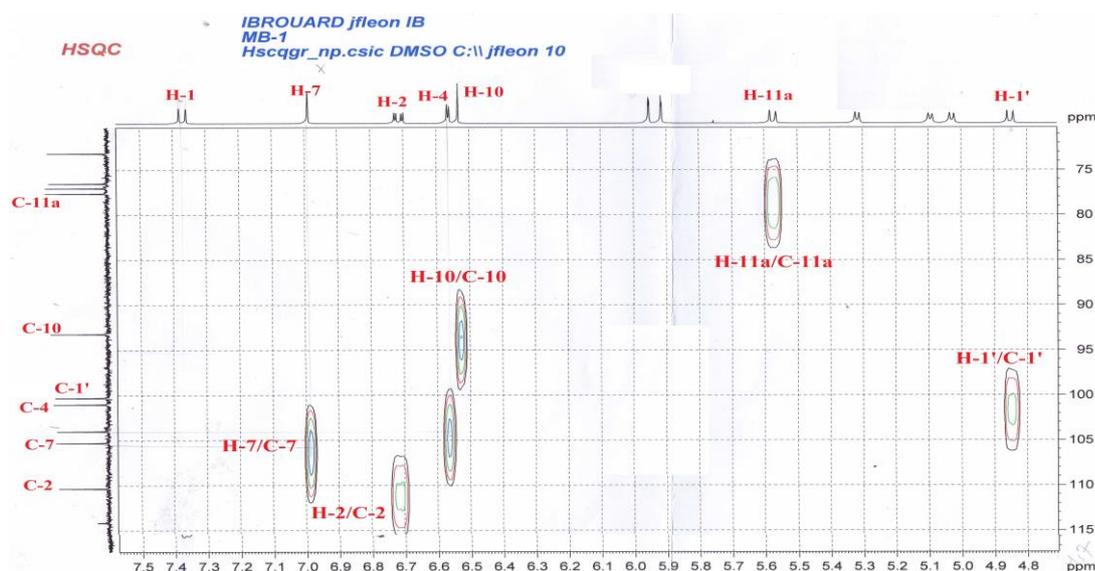


Spectre IV.25 : Spectre COSY (DMSO-*d*₆, 500 MHz) du composé 5

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC qui ont permis de déterminer tous les carbones de la molécule (**Spectre IV.26 et 27**), confrontée aux données de la littérature, nous oriente vers un composé à squelette isoflavonoïde, précisément un ptérocarpane très présents au sein des Fabaceae [11].



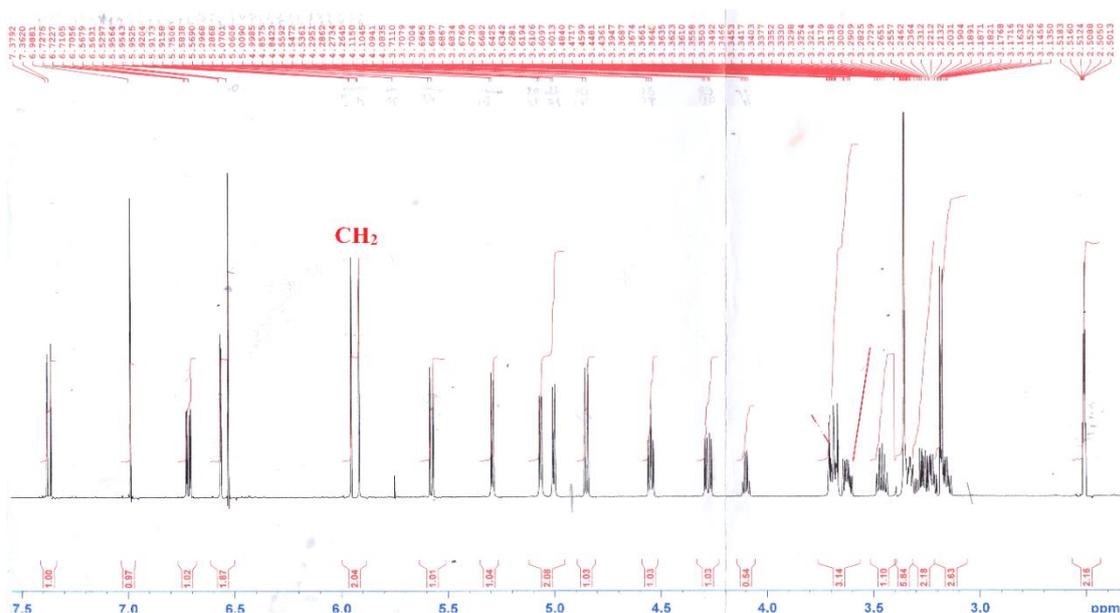
Les carbones qui les portent sont repérés sur le spectre HSQC (**Spectre IV.26**) à $\delta_C=131,83$ ppm (C-1), $\delta_C=110,36$ ppm (C-2), $\delta_C=105,29$ ppm (C-7), $\delta_C=104,06$ ppm (C-4), $\delta_C=93,21$ ppm (C-10) et $\delta_C=93,90$ ppm (C-6a) et $\delta_C=77,61$ ppm (C-11a).



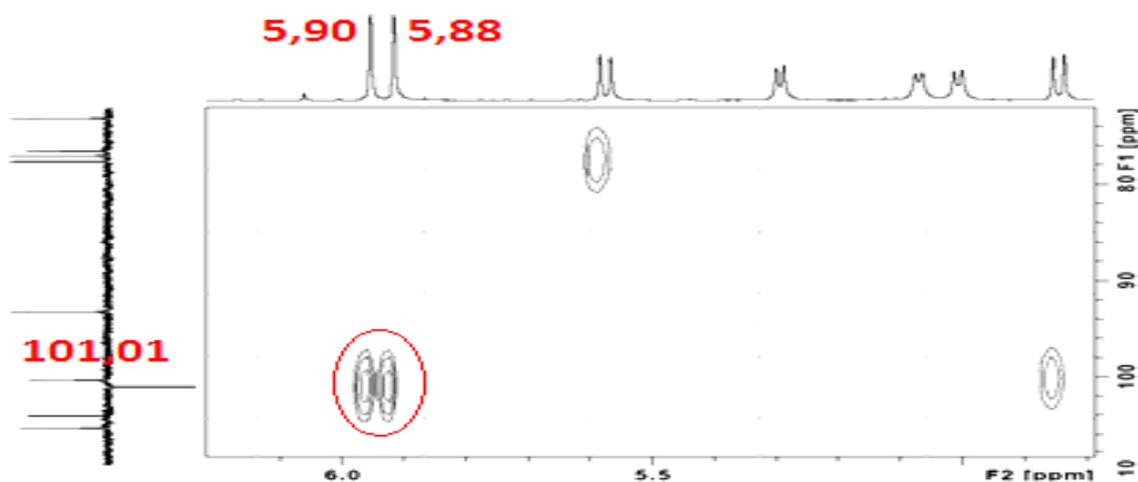
Spectre IV.26 : Spectre HSQC étalé (DMSO-*d*₆, 500 MHz) du composé 5

Le spectre HMBC (**Spectre IV.27**) montre les corrélations attendues pour cette structure, particulièrement entre :

- ❖ Le proton H-1 ($\delta_{\text{H}}= 7,83$ ppm) et les carbones quaternaires oxygénés C-11a ($\delta_{\text{C}}=77,61$ ppm), C-4a ($\delta_{\text{C}}= 156,15$) et C-3 ($\delta_{\text{C}}=158,43$ ppm).
- ❖ Le proton H-7 ($\delta_{\text{H}}=6,98$) et les trois carbones quaternaires oxygénés résonant à $\delta_{\text{C}}= 141,0$ ppm, $\delta_{\text{C}}= 147,44$ ppm et $\delta_{\text{C}}= 153,60$ ppm, attribuables respectivement à C-8, C-9 et C-10a oxygénés
- ❖ Le proton H-4 ($\delta_{\text{H}}= 6,56$ ppm) et le carbone C-2 ($\delta_{\text{C}}=110,36$ ppm) ainsi que deux carbones aromatiques quaternaires résonant à $\delta_{\text{C}}=114,16$ ppm et $\delta_{\text{C}}=156,15$ ppm attribuables respectivement aux carbones C-11b et C-4a.
- ❖ Le proton H-2 ($\delta_{\text{H}}= 6,72$ ppm) et les carbones aromatiques résonant respectivement à $\delta_{\text{C}}=104,0$ (C-4), $\delta_{\text{C}} =131,83$ (C-1) et le carbone quaternaire oxygéné $\delta_{\text{C}} =158,43$ (C-3).
- ❖ Le proton H-11a ($\delta_{\text{H}}=5,65$ ppm) et le méthylène à $\delta_{\text{C}} =65,82$ (C-6), le carbone aromatique C-1 $\delta_{\text{C}}=131,83$ ppm, ainsi que deux carbones quaternaires résonant à $\delta_{\text{C}}= 114,16$ (C-11b), $\delta_{\text{C}}=156,15$ (C-4a).
- ❖ Le proton à H-6a ($\delta_{\text{H}}=3,63$ ppm) et le méthine (CH) à $\delta_{\text{C}}=77,61$ ppm attribuable au (C-11a), ainsi avec le carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}}=118,20$ ppm, et le carbone oxygéné à $\delta_{\text{C}}= 156,15$ ppm attribuables aux C-6b et C-4a respectivement.
- ❖ Les protons H₂-6 ($\delta_{\text{H}}=4,27$ et $\delta_{\text{H}}=3,62$ ppm) et les deux carbones oxygénés à $\delta_{\text{C}} =77,61$ ppm, $\delta_{\text{C}} =156,15$ ppm attribuables aux C-11a et C-4a et le carbone quaternaire à



Spectre IV.28 : Spectre ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 5



Spectre IV.29 : Spectre HSQC étalé (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 5

Le spectre HMBC (Spectre IV.27) montre des taches de corrélation entre les protons CH_2 et les deux carbones quaternaires à $\delta_{\text{C}} = 141,0$ (C-8) ppm et $\delta_{\text{C}} = 147,44$ (C-9) ppm cycle **B** ce qui indique que ce groupement méthylène est placé sur les carbones quaternaires (C-8 et C-9) ceci est d'ailleurs correct vu la valeur du déplacement chimique de ce méthylène à $\delta_{\text{C}} = 101,01$ ppm, d'où la portion de structure (Figure IV.20)

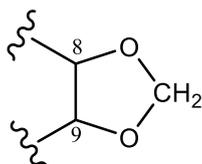
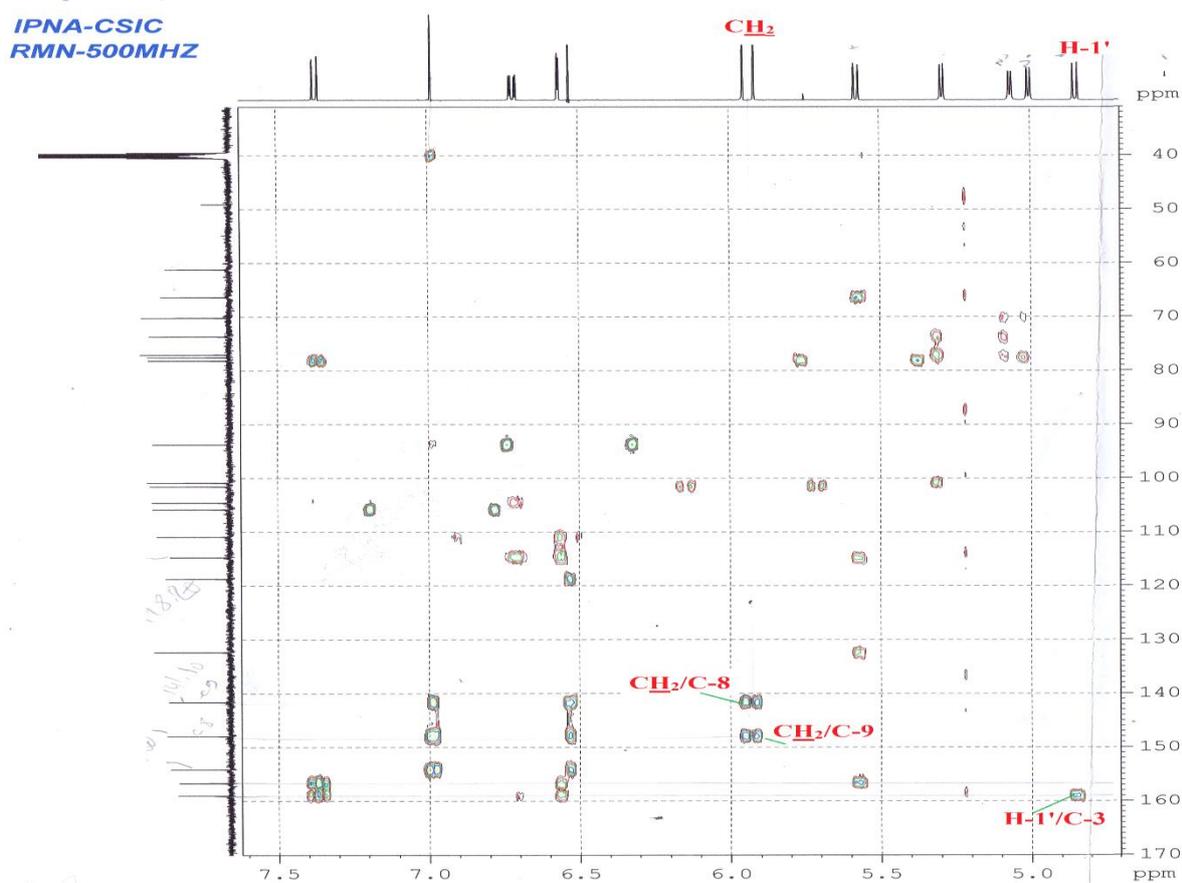


Figure IV.20 : Enchaînement présent dans le composé 5

Par ailleurs et toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre IV.30), le carbone quaternaire C-3 montre une corrélation avec le proton anomérique, indiquant ainsi la substitution du squelette ptérocarpane par l'entité glucopyranosyle en cette position.



Spectre IV.30 : Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*₆, 500 MHz) du composé 5

L'ensemble de ces données regroupées dans le tableau IV.5, et appuyées avec celles de la littérature [8] ont permis de conclure que le composé 5 ne peut être que la (-)-**maackiain 3-O-β-D-glucopyranoside** connue sous le nom de **Trifolirhizine**(Figure IV.17). Ce composé a été antérieurement isolé de l'espèce *Sophora japonica* [12].

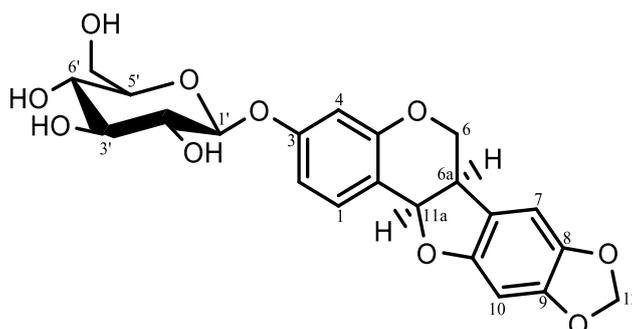
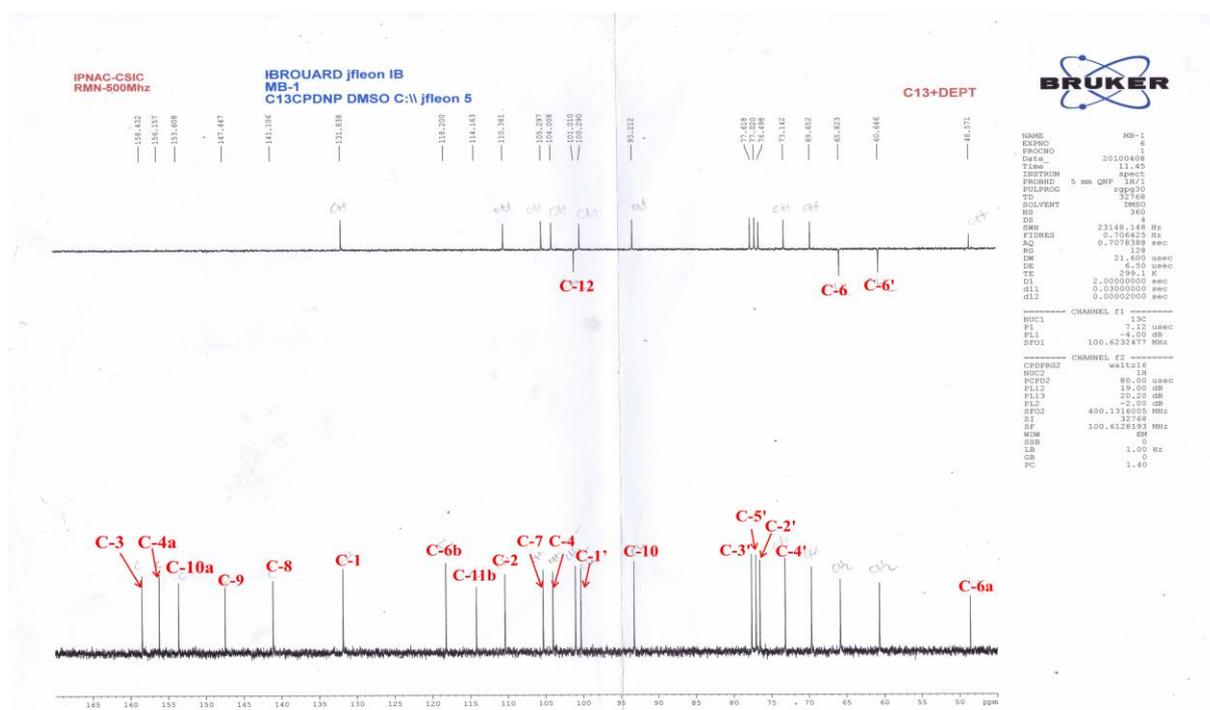


Figure IV.21 : Structure du composé 5: (-)-maackiain 3-O- β -D-glucopyranoside

Les données de la RMN ^{13}C et ^1H sont rassemblées dans le tableau IV.5 et le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.31).



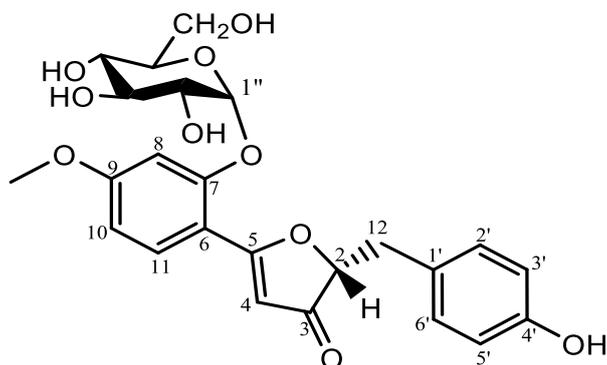
Spectre IV.31 : Spectre HMBC (CD_3OD , 600 MHz) du composé 5

Tableau IV.5 : Donnés de RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé 5

N°	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J Hz)
1	131,83(CH)	7,38, <i>d</i> (8,7)
2	110,36(CH)	6,72, <i>dd</i> (8,7-1,8)
3	158,43(C)	-
4	104,00(CH)	6,56, <i>d</i> (1,8)
4-a	156,15(C)	-
6	65,82(CH ₂)	4,27, <i>dd</i> (10,52- 4,12) 3,68, <i>m</i>
6-a	39,9(CH)	3,63, <i>m</i>
6-b	118,20(C)	-
7	105,29(CH)	6,98, <i>s</i>

8	141,00(C)	-
9	147,44(C)	-
10	93,21(CH)	6,52, <i>s</i>
10-a	153,60(C)	-
11-a	77,61(CH)	5,56, <i>d</i> (8,6)
11-b	114,16(C)	-
12	101,01(CH ₂)	5,90, <i>d</i> (0,5) 5,88, <i>d</i> (0,5)
Glucose		
1'	101,29(CH)	4,85, <i>d</i> (7,4)
2'	73,13(CH)	3,27, <i>m</i>
3'	77,02(CH)	3,34, <i>m</i>
4'	69,55(CH)	3,16, <i>m</i>
5'	76,50 (CH)	3,30, <i>m</i>
6'	60,64(CH ₂)	3,70, <i>dd</i> (11,5-1,68) H-6'a 3,48, <i>dd</i> (11,5-5,3) H-6'b

IV.1.6. Elucidation structurale du composé 6

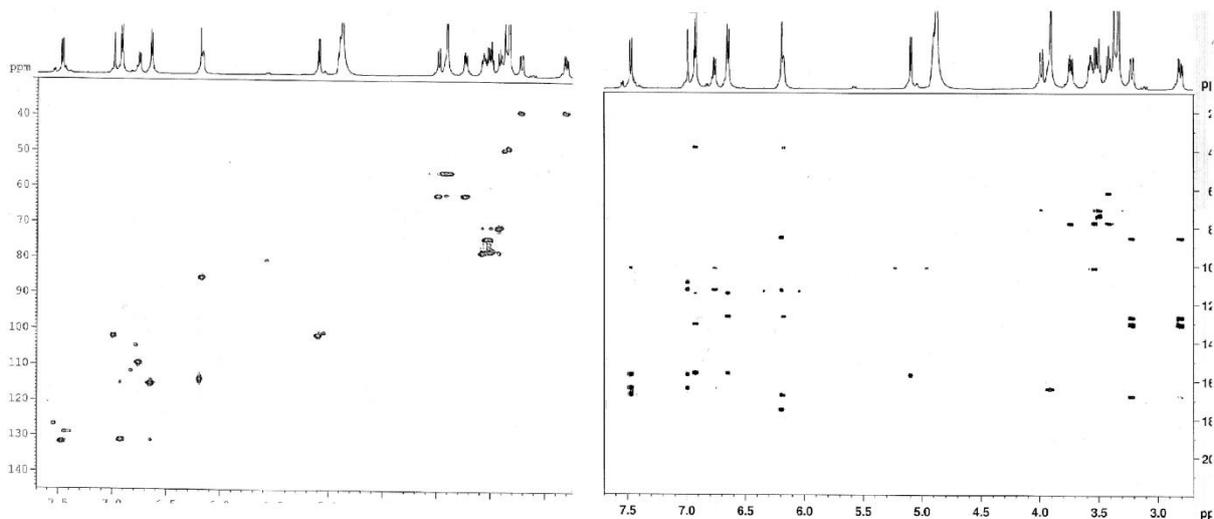


Ce produit se présente sous forme d'une poudre de couleur marron et de fluorescence noire violette sous lampe UV à 365 nm.

Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.32**) de ce composé indique la présence d'un nombre important de signaux dans les zones aromatiques et osidiques avec des différentes constantes de couplage indiquant la présence de plus d'un groupement aromatique.

L'analyse globale des spectres HSQC et HMBC de la partie aglycone (**Spectre IV.33**) révèle la présence de :

- 12 carbones aromatiques divisés en 7 groupements CH, et 5 carbones quaternaires dont trois oxygénés.
- Un carbone de groupement carbonyle.
- Un groupement méthoxyle.
- Un groupement CH_2 hybridés sp^3 .
- Un groupement CH oxygéné .

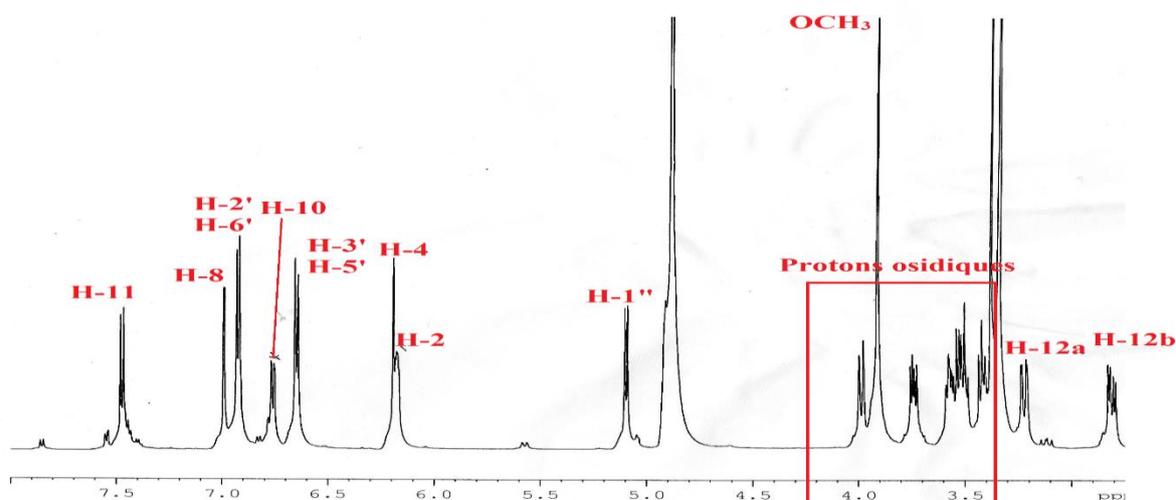


Spectre IV.33: Spectres HSQC et HMBC (600 MHz, CD_3OD) du composé 6

Cette répartition des carbones sp^2 permet d'obtenir le nombre de groupements aromatiques constituant la structure de **6** qui est composée de deux cycles notés A et B avec une présence de trois protons dans le cycle A et quatre dans le cycle B.

La multiplicité observée pour chaque proton aromatique sur le spectre RMN 1H (Spectre IV.32) et la mesure des constantes de couplage ont permis d'obtenir les protons des deux noyaux aromatiques. En effet, le doublet à $\delta_H = 6,99$ ppm ($J = 1,6$ Hz) correspond au proton H-8. Ce dernier est couplé avec H-10 ($\delta_H = 6,75$ ppm) qui est situé en position *mé*ta suite à sa multiplicité *dd* ($J = 8,2-1,6$ Hz). Cette dernière indique un autre couplage de H-10 avec un proton en position *ortho* qui est le H-11 ($\delta_H = 7,46$; *d*, $J = 8,2$ Hz).

Les autres signaux aromatiques visualisés sur le spectre RMN 1H de ces composés sortent à $\delta_H = 6,92$ ppm, et $\delta_H = 6,64$ ppm sous forme de doublet chacun avec une constante de couplage $J = 8,1$ Hz et d'intégration 2H chacun, traduisant un couplage de type *ortho*. Selon le spectre COSY (Spectre IV.34), ces protons appartiennent à un même système de spins, attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement du cycle B. Ces données indiquent la présence d'un cycle B de type 1,4-disubstitué.



Spectre IV.32: Spectre RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) du composé **6**

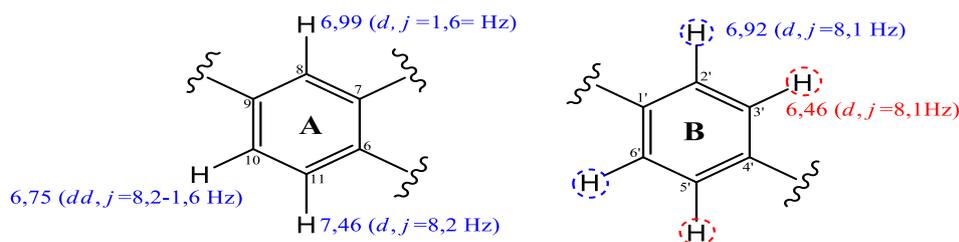


Figure IV.22 : Entité faisant partie du substituant du composé **6**

Le spectre COSY H-H (**Spectre IV.34**) confirme la position de ces protons par les corrélations qu'il révèle entre les protons couplés H-10/H-11, H-10/H-8 et H-2', H-6'/ H-3',H-5' pour les deux cycles A et B.

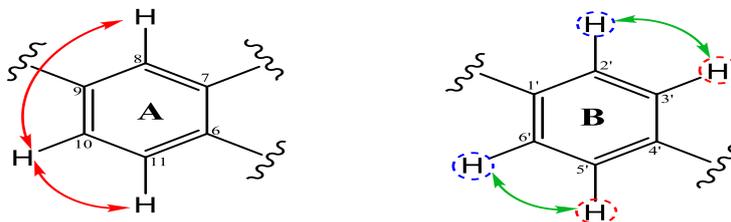
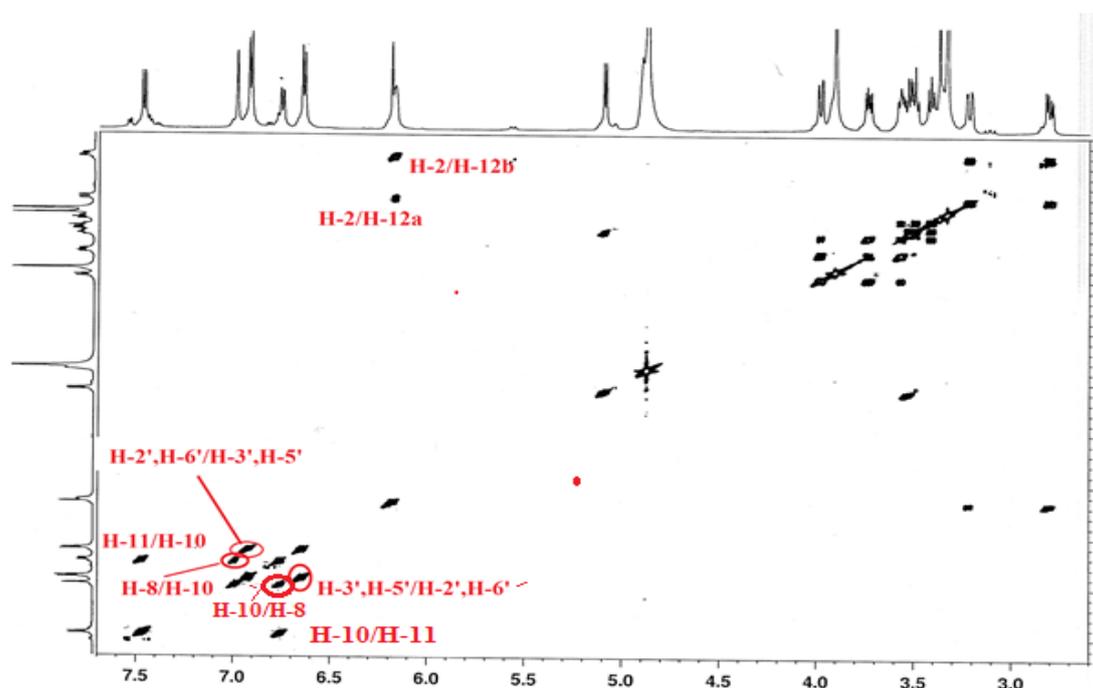
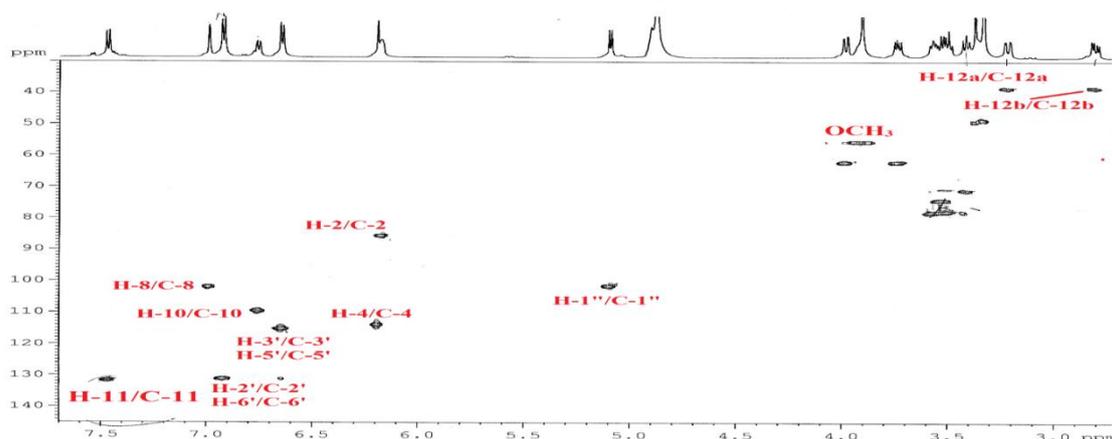


Figure IV.23 : Corrélations COSY observées pour la molécule 6



Spectre IV.34 : Spectres COSY (600 MHz, CD₃OD) du composé 6

Partant de ces protons, l'expérience HSQC (**Spectre IV.35**) permet d'assigner leurs déplacements chimiques comme suit : H-11/C-11 à ($\delta_H= 7,46/\delta_C= 131,6$ ppm), H-10/C-10 à ($\delta_H=6,75/\delta_C= 109,0$ ppm), H-8/ C-8 à ($\delta_H= 6,99/\delta_C=101,6$ ppm), H-2', H-6'/C-2',C-6' à ($\delta_H= 6,92/\delta_C= 130,8$ ppm), H-3', H-5'/C-3', C-5' à ($\delta_H= 6,64/\delta_C= 114,0$ ppm).



Spectre IV.35 : Spectres HSQC (600 MHz, CD₃OD) du composé 6

A partir de ces données, l'analyse du spectre HMBC conduit à attribuer les carbones quaternaires des cycles A et B à travers les corrélations en 3J qu'ils présentent (Spectre IV.36) entre :

❖ Pour le cycle A :

- Le proton H-11 et les carbones oxygénés C-7 ($\delta_C = 157,4$ ppm), C-9 ($\delta_C = 166,0$ ppm) et le C-8 ($\delta_C = 101,6$ ppm) déjà identifié.
- Le proton H-10 et les carbones C-9 ($\delta_C = 166,0$ ppm), C-8 ($\delta_C = 101,6$ ppm) et C-6 ($\delta_C = 112,4$ ppm).
- Le proton H-8 et les carbones C-6 ($\delta_C = 112,4$ ppm), C-7 ($\delta_C = 157,4$ ppm), C-9 ($\delta_C = 166,0$ ppm) et C-10 ($\delta_C = 109,0$ ppm).

❖ Pour le cycle B :

- Les protons H-2', H-6' et les carbones C-3', C-5' ($\delta_C = 114,0$ ppm), et C-4' ($\delta_C = 156,0$ ppm).
- Les protons H-3', H-5' et le carbone C-1' ($\delta_C = 129,5$ ppm) et le carbone oxygéné C-4' ($\delta_C = 156,0$ ppm).
-

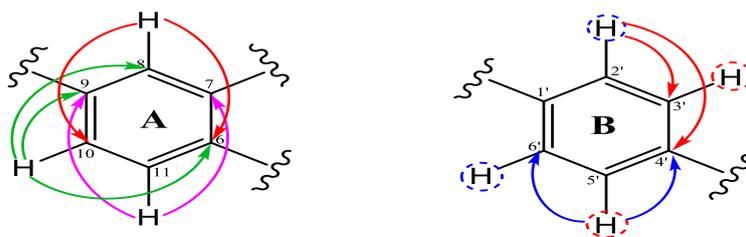


Figure IV.24 : Corrélations HMBC des protons aromatiques des cycles A et B du composé 6

Il est aussi observé sur ce spectre un autre couplage des protons aromatiques du cycle B du composé **6** H-2'/H-6' ($\delta_{\text{H}} = 6,92\text{ppm}$) avec un groupement CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 38,4\text{ ppm}$ qui est accordé sur le spectre HSQC au deux signaux détectés à $\delta_{\text{H}} = 3,24\text{ ppm}$ ($dd, J = 14,5-2,5\text{ Hz}$, H-12a) et $\delta_{\text{H}} = 2,8$ ($dd, J = 14,5-6,0\text{ Hz}$, H-12b) sont attribués à deux protons non équivalents d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$).

Les protons du groupement CH_2 -12 couplent de leur côté sur le spectre HMBC avec un carbone (CH) oxygéné résonant à $\delta_{\text{C}} = 85,0\text{ ppm}$. Ce carbone déblindé est attribué au carbone C-2.

Par ailleurs, le spectre COSY H-H (**Spectre IV.38**) montre les corrélations attendues entre les protons géminés de groupement méthylènes H-12a ($\delta_{\text{H}} = 3,24\text{ ppm}$) et H-12b ($\delta_{\text{H}} = 2,8\text{ ppm}$), ainsi qu'entre le proton H-2 ($\delta_{\text{H}} = 6,17\text{ ppm}$, $dd, J = 6,0-2,5\text{ Hz}$) Cette analyse nous conduit à proposer le fragment structural suivant (**Figure IV.25**) :

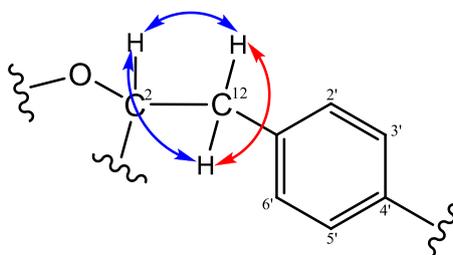
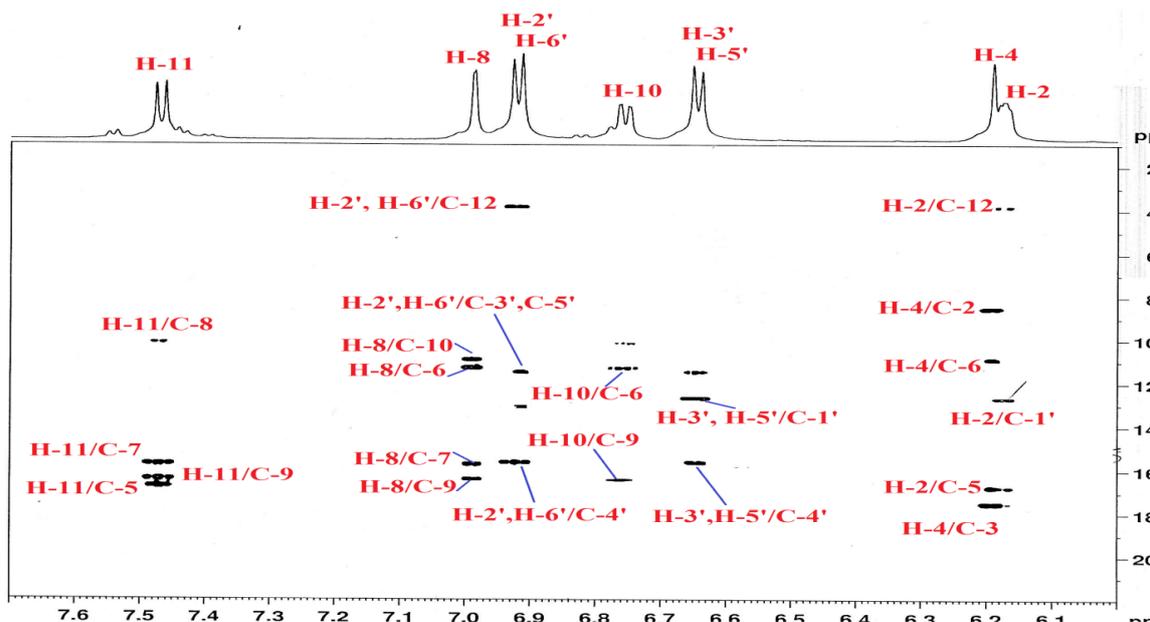


Figure IV.25 : Corrélations HMBC du composé 6

Le spectre HMBC montre des corrélations H/C en 3J (**Spectre IV.36**) conduisant à la formation d'un squelette de type 2,3-dihydro- 3-oxofurane à travers les couplages du proton oxyméthine H-2 ($\delta_{\text{H}} = 6,17\text{ ppm}$) et un carbone CH à $\delta_{\text{C}} = 113,4\text{ppm}$ qui est accordé sur le spectre HSQC au singulet résonant à $\delta_{\text{H}} = 6,18\text{ppm}$ est attribués au C-4. Le proton H-4 couple sur le spectre HMBC avec un carbone d'une fonction carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 175,0\text{ ppm}$, ce qui permet de lier le carbonyle en position C-3. Il est visualisé également un couplage entre le carbone quaternaire C-1' et le proton H-2.

Le pic restant dans la zone déblindée à $\delta_{\text{C}} = 167,5\text{ ppm}$ est clairement assigné au carbone C-5 (**Spectre IV.36**).



Spectre IV.36 : Spectres HMBC étalé (600 MHz, CD₃OD) du composé 6

A cette étape de l'élucidation structurale du composé **6**, il ne nous reste qu'à identifier les substituants attachés à ce squelette.

Le spectre HMBC (**Spectre IV.38**) montre bien la connectivité entre le cycle A (en position 6) et le carbone C-5 par la corrélation observée entre le proton oxyméthine H-4 et le carbone aromatique C-6.

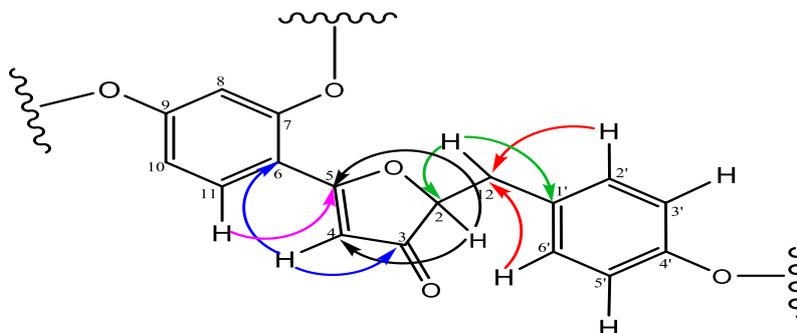


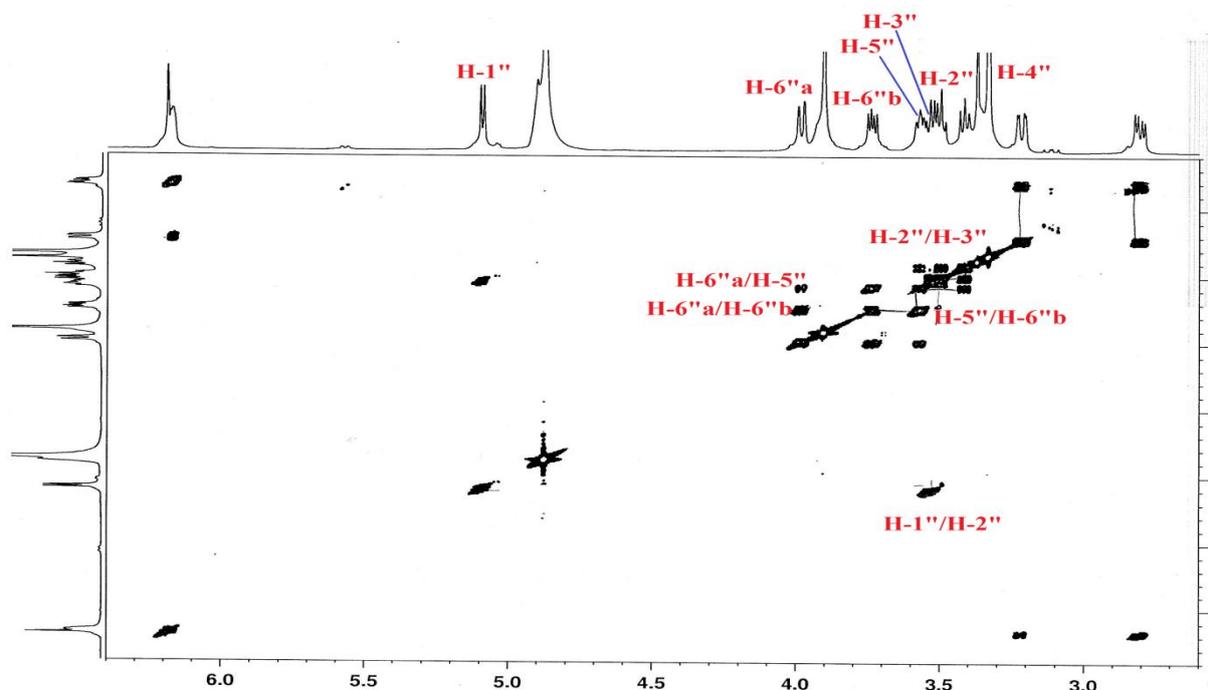
Figure IV.26 : Corrélations HMBC du composé 6

Par ailleurs, un singulet d'intégration 3H, sortant à $\delta_{\text{H}}=3,91$ ppm sur le spectre RMN ¹H et formant une tache de corrélation sur le spectre HSQC (**Spectre IV.38**) avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 55,2$ ppm, est attribué aux protons d'un méthoxyle.

Toujours sur le même spectre HSQC qui montre la présence d'une tache de corrélation entre un pic intense résonnant $\delta_{\text{C}}=100,20$ ppm et un signal d'intégration un proton à $\delta_{\text{H}}=5,09$ ppm

s'intègre pour un proton. Ceci suggère la présence d'un proton anomérique H-1'' d'un sucre ainsi que les autres signaux de ce sucre entre $\delta_H = 3,50$ ppm et $\delta_H = 4,10$ ppm.

Les protons du sucre sont identifiés par l'analyse du spectre COSY (Spectre IV.38) qui permet d'identifier le sucre au glucose en se basant sur les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplages de ces protons.

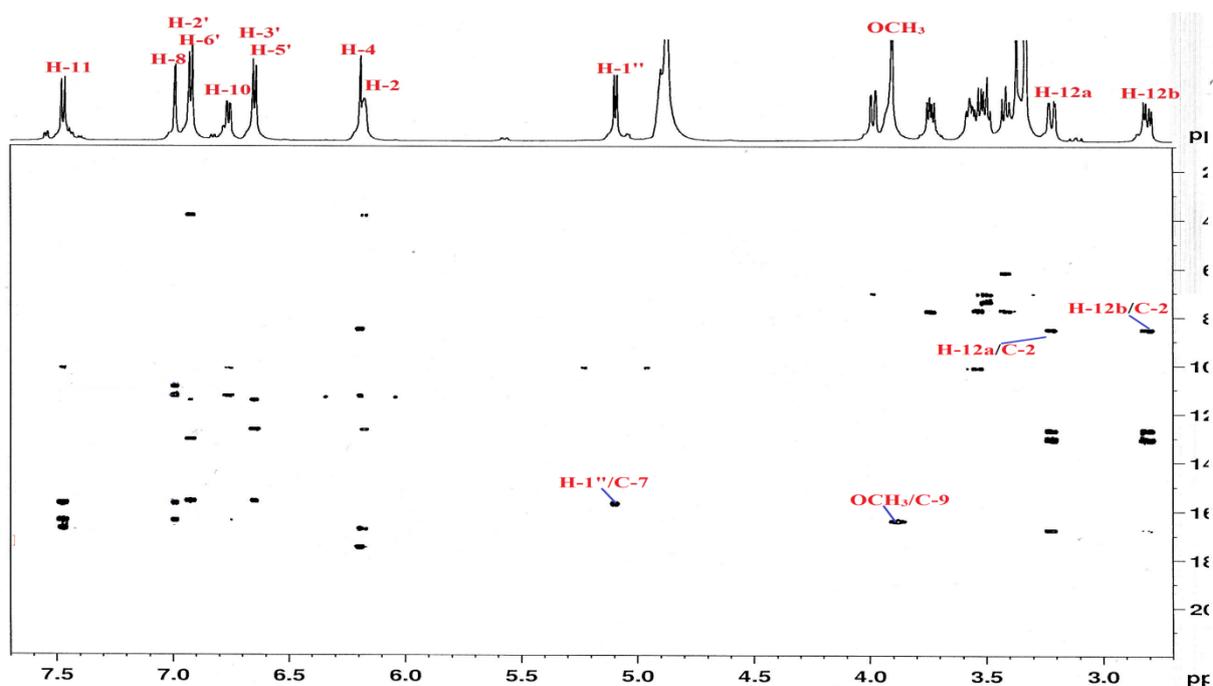


Spectre IV.38 : Spectres COSY étalé (CD₃OD ,600 MHz) du composé 6

Le point de branchement du glucose avec l'aglycone du composé **6** est localisé en position C-7 en raison de la présence d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Spectre IV.39) entre le carbone C-7 et le proton anomérique H-1''.

La tâche de corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton du groupement méthoxyle résonant à $\delta_H=3,91$ ppm et le carbone à $\delta_C= 166,0$ ppm permet de positionner ce groupement sur le carbone C-9 du cycle A.

Ainsi, le substituant en positions C-4' ($\delta_C= 146,9$) est identifié au groupement hydroxyle en raison de la valeur déblindée de son déplacement chimique et de l'absence des corrélations de ce carbone (C-4') sur le spectre HMBC avec d'autres protons.



Spectre IV.39 : Spectres HMBC (CD_3OD , 600 MHz) du composé 6

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau IV.6) et la comparaison avec celles de Littérature [13] nous conduit à proposer sans ambiguïté pour ce composé la structure moléculaire suivante : **9-O-méthylspinonine**.

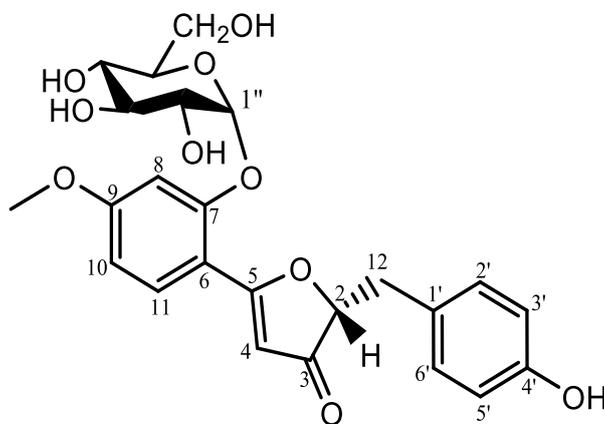


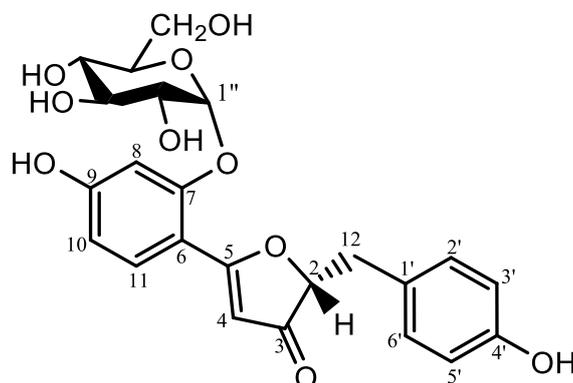
Figure IV.27 : Structure du composé 6 : 9-O-méthylspinonine

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 6 sont réunis dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 6

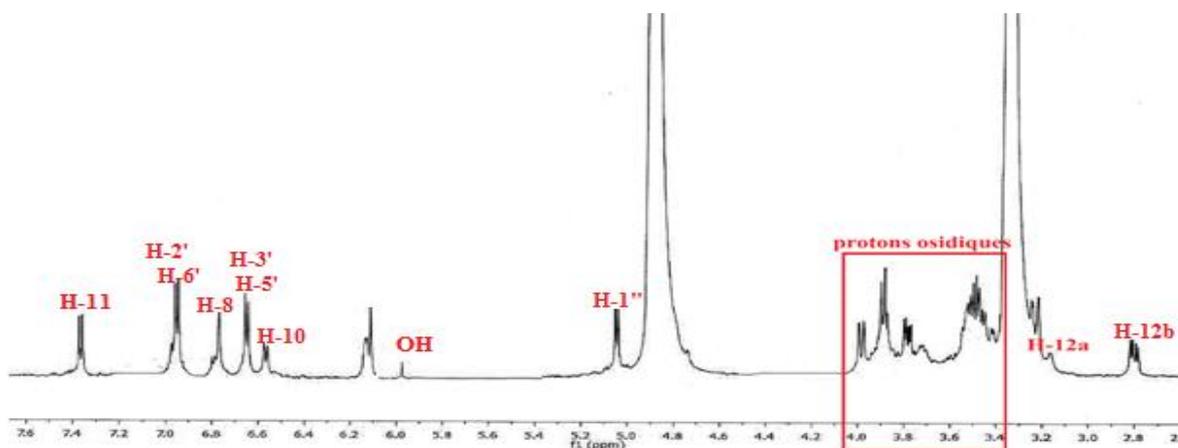
N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)
2	85,0(CH ₂)	6,17, <i>d</i> (6,0-2,5)
3	175,0(C)	-
4	113,5(CH)	6,18, <i>s</i>
5	167,7(C)	-
6	112,4(C)	-
7	157,4(C)	-
8	101,6(CH)	6,99, <i>d</i> (1,6)
9	166,0(C)	-
10	109,0(CH)	6,75, <i>dd</i> (8,2-1,6)
11	131,6(CH)	7,46, <i>d</i> (8,2)
12	38,4(CH ₂)	3,24, <i>dd</i> (14,5 -2,5) 12-a 2,81, <i>dd</i> (14,5 -6,0) 12-b
1'	129,5(C)	-
2'	130,8(CH)	6,92, <i>d</i> (8,1)
3'	114,0(CH)	6,64, <i>d</i> (8,1)
4'	156,0(C)	-
5'	114,0(CH)	6,64, <i>d</i> (8,1)
6'	130,8(CH)	6,92, <i>d</i> (8,1)
9-OCH ₃	55,2(CH ₃)	3,91 ; <i>s</i>
Glucose		
1''	100,2(CH)	5,09, <i>d</i> (7,4)
2''	73,4(CH)	3,53, <i>t</i> (7,4)
3''	77,2(CH)	3,50, <i>t</i> (7,6)
4''	77,2(CH)	3,40, <i>t</i> (7,6)
5''	77,0(CH)	3,58, <i>m</i>
6''	61,5(CH ₂)	4,01, <i>dd</i> (11,2 -1,3) 6''a 3,75, <i>dd</i> (11,2 -5,6) 6''b

IV.1.7. Elucidation structurale du composé 7



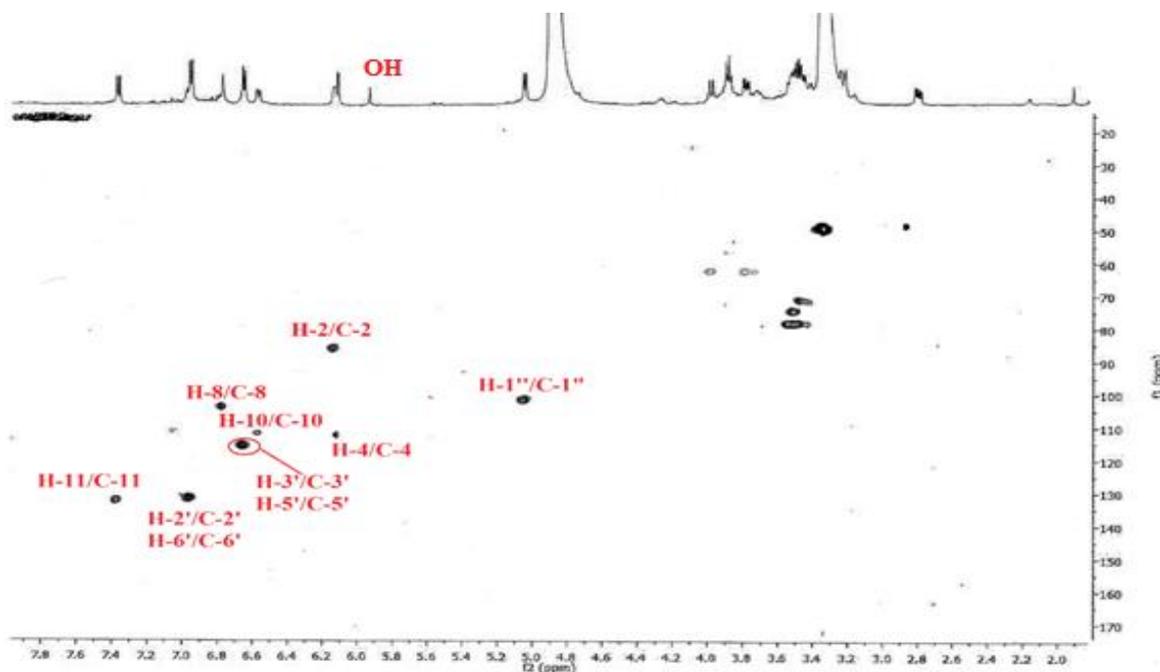
Les spectres RMN ^1H , COSY et HMBC du composé **7** montrent une similitude structurale avec le composé **6** déjà démontré au niveau des cycles A, B et C (**Spectre IV.40**). Cette similitude est confirmée par le spectre RMN ^1H qui permet de reconnaître quasiment tous les signaux des protons observés pour le composé **6**. On identifie :

- ◆ les trois protons aromatiques H-11 ($\delta_{\text{H}} = 7,38$; d ; $J = 8,2$ Hz), H-8 ($\delta_{\text{H}} = 6,77$; d ; $J = 1,6$ Hz), H-10 ($\delta_{\text{H}} = 6,58$, dd , $J = 8,2-1,6$ Hz) (**Spectre IV.42**).
- ◆ On reconnaît également les signaux des protons diastéréotopiques du groupement CH_2 -12 sortant à $\delta_{\text{H}} = 3,24$ ppm (dd , $J = 14,5-2,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 2,80$ ppm (dd , $J = 14,5-6,0$ Hz).
- ◆ le signal correspondant au proton anomérique du glucose résonant à $\delta_{\text{H}} = 5,05$ ppm (d , $J = 7,4$ Hz) et l'ensemble de multiplet dans l'intervalle $\delta_{\text{H}} = 3,40-4,10$ ppm attribuables aux protons 2', 3', 4' et 5' du groupement glucopyranosyle.

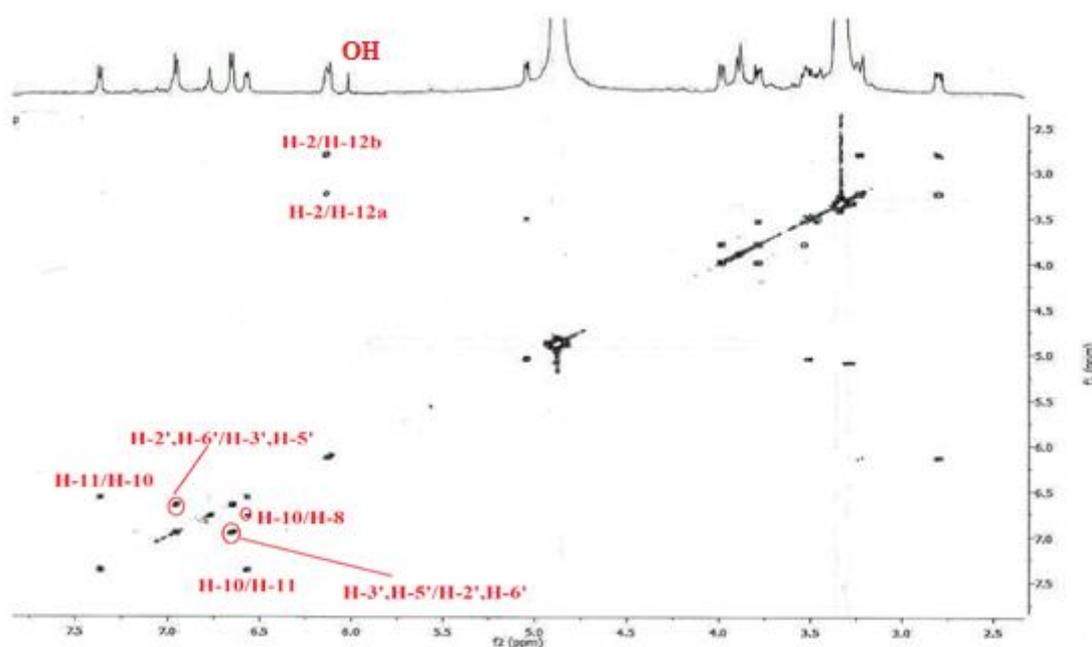


Spectre IV.40 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du composé **7**

La différence entre ces deux composés est notablement remarquée dans la disparition des signaux de protons et carbone d'un groupement méthoxyle et l'apparition d'un signal à $\delta_C = 5,80$ ppm et ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspond à un groupement hydroxyle. Le spectre HSQC (Spectre IV.41) permet l'attachement de ces protons à leurs carbones :



Spectre IV.41 : Spectre HSQC (600 MHz, CD₃OD) du composé 7



Spectre IV.42 : Spectre COSY (600 MHz, CD₃OD) du composé 7

Toutes ces données spectrales (**Tableau IV.7**) établies par RMN ^1H , COSY et HSQC, permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé **7** la structure connu sous le nom de **Spinonine**, cette molécule a été isolé précédemment d'une plante du genre *Ononis* *Ononisspinosa* subsp. *Leiosperma* [6].

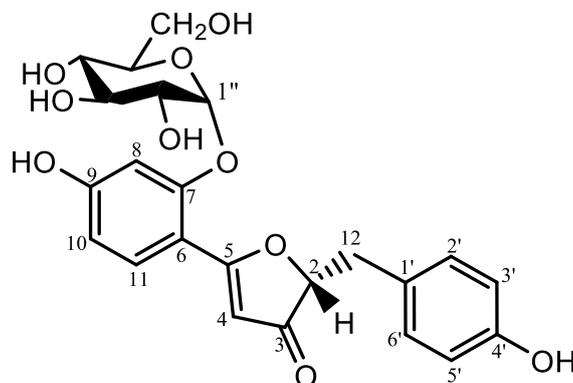


Figure IV.28 : Structure du composé 7 :Spinonine

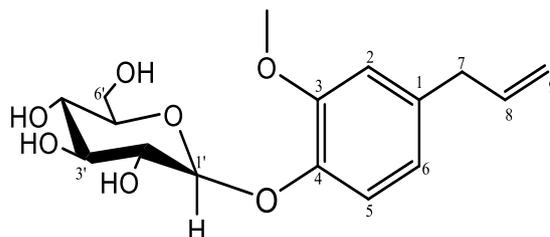
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **7** sont regroupées dans le tableau IV.7 :

Tableau IV.7 : Donnésde RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé 7

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)
2	85,0(CH ₂)	6,17, <i>d</i> (6,0-2,5)
3	175,0(C)	-
4	113,5(CH)	6,18, <i>s</i>
5	167,7(C)	-
6	112,4(C)	-
7	157,4(C)	-
8	101,6(CH)	6,77, <i>d</i> (1,6)
9	166,0(C)	-
10	109,0(CH)	6,58, <i>dd</i> (8,2-1,6)
11	131,6(CH)	7,38, <i>d</i> (8,2)
12	38,4(CH ₂)	3,24, <i>dd</i> (14,5 -2,5) 12-a 2,80, <i>dd</i> (14,5 -6,0) 12-b
1'	129,5(C)	-
2'	130,8(CH)	6,99, <i>d</i> (8,1)
3'	114,0(CH)	6,68, <i>d</i> (8,1)
4'	156,0(C)	-
5'	114,0(CH)	6,68, <i>d</i> (8,1)
6'	130,8(CH)	6,99, <i>d</i> (8,1)
Glucose		

1''	100,2(CH)	5,05, <i>d</i> (7,4)
2''	73,4(CH)	3,53, <i>t</i> (7,4)
3''	77,2(CH)	3,50, <i>t</i> (7,6)
4''	77,2(CH)	3,40, <i>t</i> (7,6)
5''	77,0(CH)	3,58, <i>m</i>
6''	61,5(CH₂)	4,01, <i>dd</i> (11,2 -1,3) 6''a 3,75, <i>dd</i> (11,2 -5,6) 6''b

IV.1.8. Elucidation structurale du composé 8



L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.44**), et son étalement (**Spectre IV.43**), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique trisubstitué dans les positions 1, 3 et 4 est caractérisé par :

- ◆ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,12$ ppm ($J = 8,5$ Hz), correspondant un couplage *ortho* attribuable au proton H-5.
- ◆ Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,76$ ppm ($J = 8,5 - 2,0$ Hz) attribuable au proton H-6.
- ◆ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,86$ ppm ($J = 2,0$ Hz), indiquant un couplage en *méta* attribuable au proton H-2. Ce système peut être représenté comme suit :

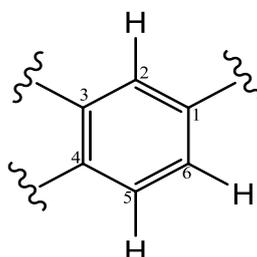
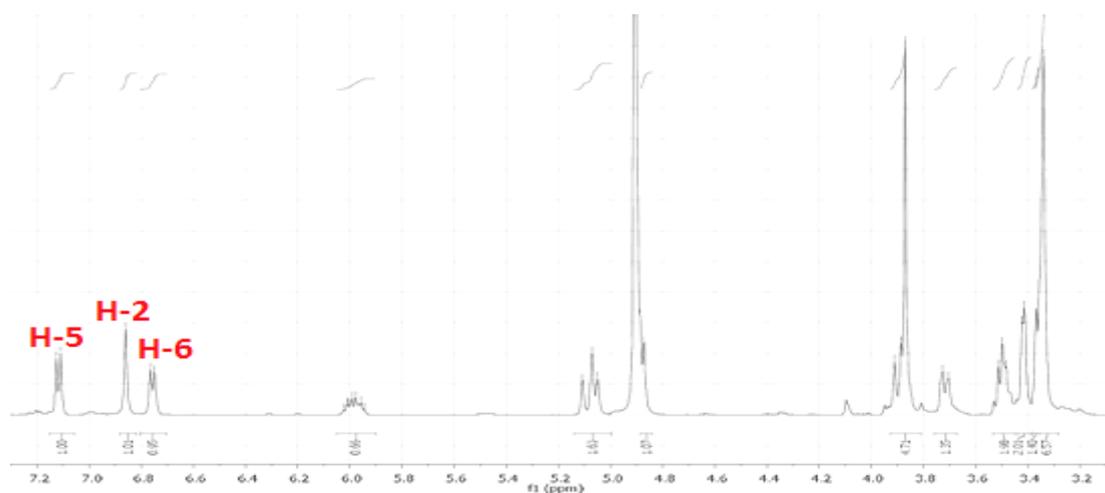


Figure IV.29 : Entité faisant partie du substituant de la molécule 8

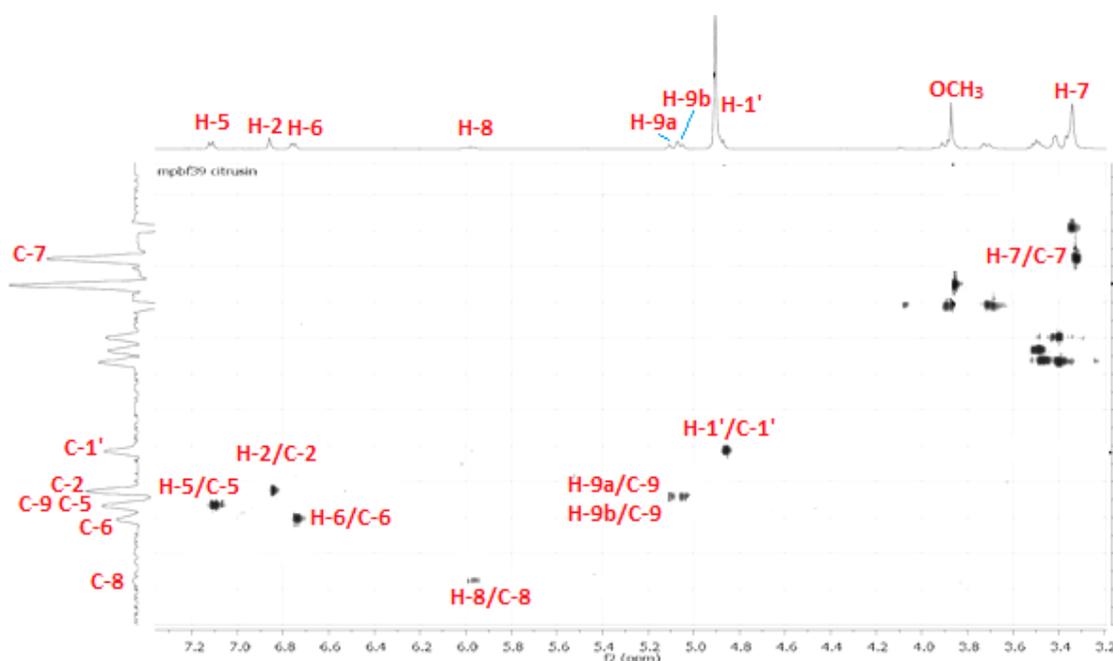


Spectre IV.43 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 8

Les carbones de ces protons sont localisés par l'expérience HSQC (Spectre IV.45) à $\delta_C=112,7$ (C-2), $\delta_C=121,1$ (C-6), et $\delta_C=116,3$ (C-5).

Les carbones quaternaires de ce cycle aromatique seront attribués grâce à leurs corrélations sur le spectre HMBC (Spectre IV.46), avec les protons décrits précédemment. Ainsi, le carbone C-1 sera associé au signal à $\delta_C=135,4$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-2 et H-5 ; de même le carbone quaternaire oxygéné C-3 sera attribué au signal à $\delta_C=149,3$ ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-2, H-5.

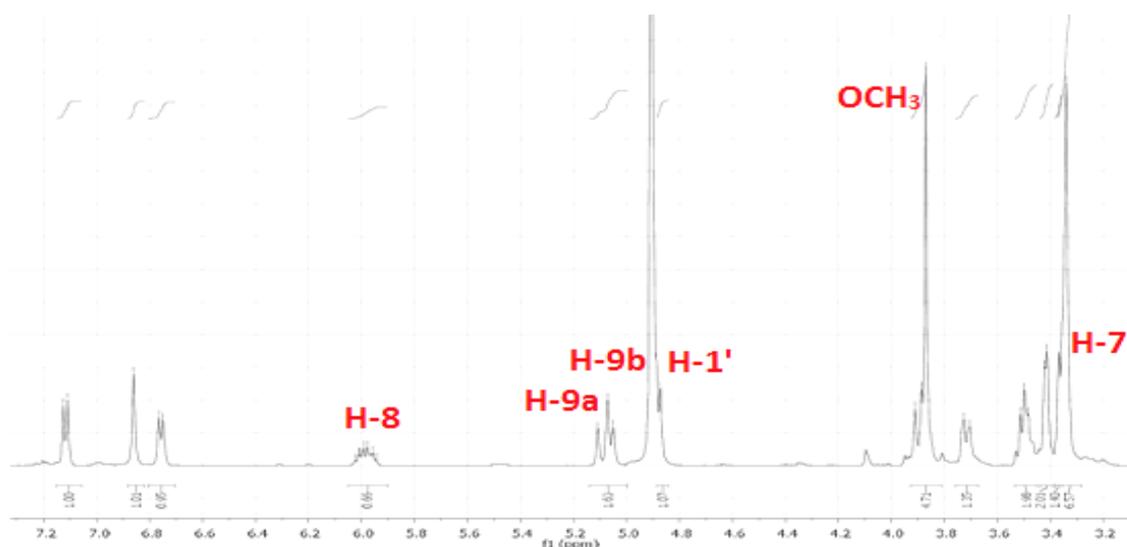
Les protons H-2, H-5 et H-6 corrélient tous les trois avec un carbone aromatique oxygéné ($\delta_C=144,9$ ppm), qui ne peut être que le C-4.



Spectre IV.45 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 8

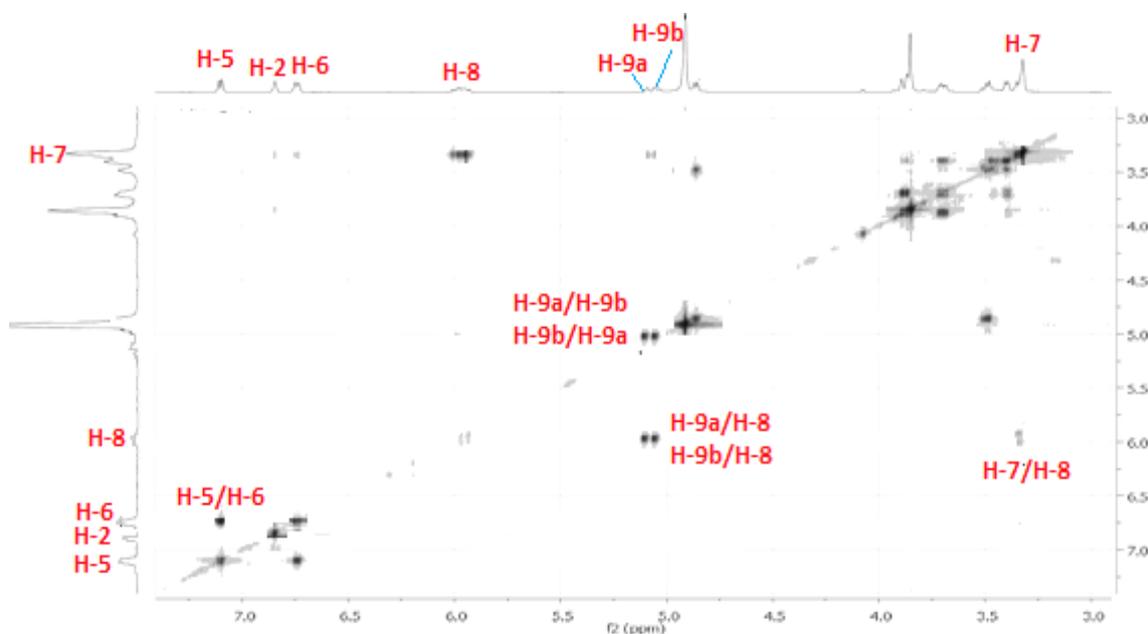
Un retour vers le spectre RMN ¹H permet de repérer également :

- ✓ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3,85$ ppm et porté par le carbone résonnant à $\delta_C=55,4$ ppm, indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH₃).
- ✓ Un doublet centré à $\delta_H=4,88$ ppm (1H, *d*, $J=7,3$ Hz), partiellement recouvert par le signal du méthanol, porté par le carbone résonnant à $\delta_C=103,5$ ppm, attribuable au H-1' anomérique d'un β -glucose.
- ✓ Un doublet à $\delta_H=3,33$ ppm (*d*, $J=6,8$ Hz) d'intégrations 2H attribuable à un groupement CH₂. Le carbone de ce méthylène résonne à $\delta_C=39,1$ ppm et est numéroté C-7.
- ✓ Deux doublets de doublets à $\delta_H=5,11$ ppm (*dd*, $J=15,8-1,6$ Hz) et $\delta_H=5,08$ ppm (*dd*, $J=8,2-1,6$ Hz) porté par le carbone résonnant à $\delta_C=115,0$ ppm d'intégration 2H, attribuable aux deux protons géminés non équivalents CH₂ éthylénique (H-a et H-b).

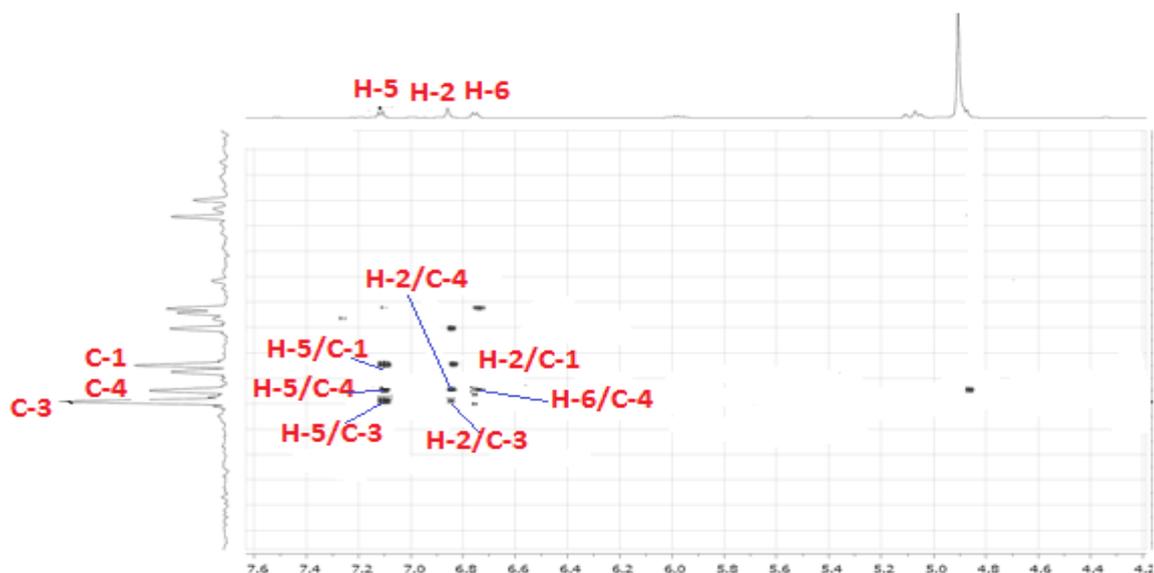


Spectre IV.44 : Spectre ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 8

La multiplicité observée pour ces protons sous forme de doublet de doublet qui résulte d'un couplage géminé entre eux et un couplage *Cis* et *trans* avec un proton adjacent. Ces élucidations sont confirmées par le spectre COSY H-H (Spectre IV.47) qui montre le couplage de ces protons géminés (CH_2) avec un proton repéré à $\delta_{\text{H}}=5,98$ ppm résonnant sous forme de doublet de doublet de triplet ($J = 15,8-8,2-6,8$ Hz). Ce même proton couplant en COSY avec les protons H_2-7 . ce proton ne peut être que le H-8 ($\delta_{\text{C}}=138,3$ ppm).



Spectre IV.47 : Spectre COSY (CD_3OD , 600 MHz) du composé 8



Spectre IV.46 : Spectre HMBC étalé (CD₃OD, 600 MHz) du composé 8

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la figure IV.29 dans notre molécule. Nous numérotons les carbones de cette entité 7, 8 et 9.

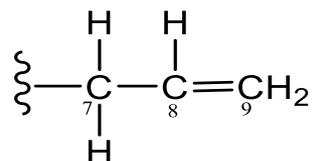
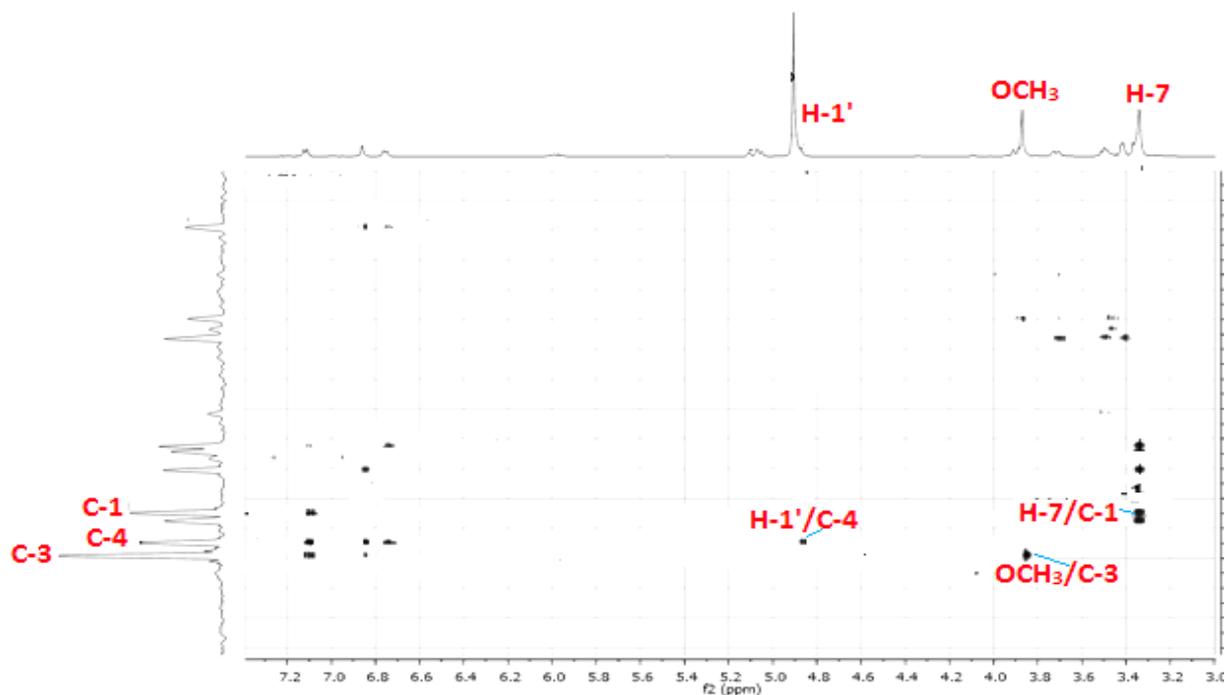


Figure IV.30 : Entité faisant partie du substituant de la molécule 8

Les protons H₂-7 montre une corrélation sur le spectre HMBC (Spectre IV.48) avec le carbone quaternaire C-1. Cette corrélation indique l'attachement de l'enchaînement CH₂-CH=CH₂ à cette position du cycle aromatique. Ce même spectre montre un couplage entre les protons du groupement OCH₃ et le carbone C-3 indiquant la substitution en position C-3 par le groupement méthoxyle. Le point de l'O-glycosylation avec l'aglycone est clairement localisé en position C-4 du cycle aromatique vu de la corrélation observée sur le spectre HMBC (Spectre IV.48) entre ce carbone et le proton anomérique H-1'.



Spectre IV.48 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 8

Ceci conduit à identifier ce composé comme étant la **Citrusine C**. (Figure IV.31). Cette identification est confirmée par la comparaison avec les données de la littérature [14].

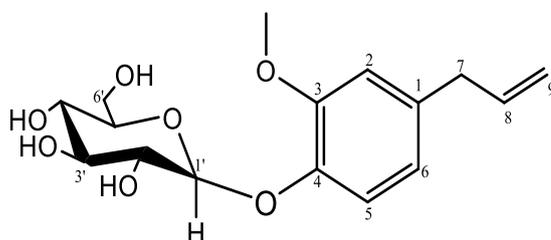


Figure IV.31 : Structure du composé 8 : Citrusine C.

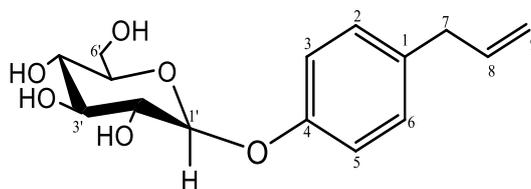
Ce phénylproanoïde a été détecté dans les parties aériennes de l'espèce *Citrus limon* BURM. [15]. A notre connaissance, il est isolé pour la première fois dans le genre *Ononis*.

Les attributions des tous les protons et les carbone de cette molécule sont reportées dans le tableau IV.8

Tableau IV.8 : Données de RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé 8

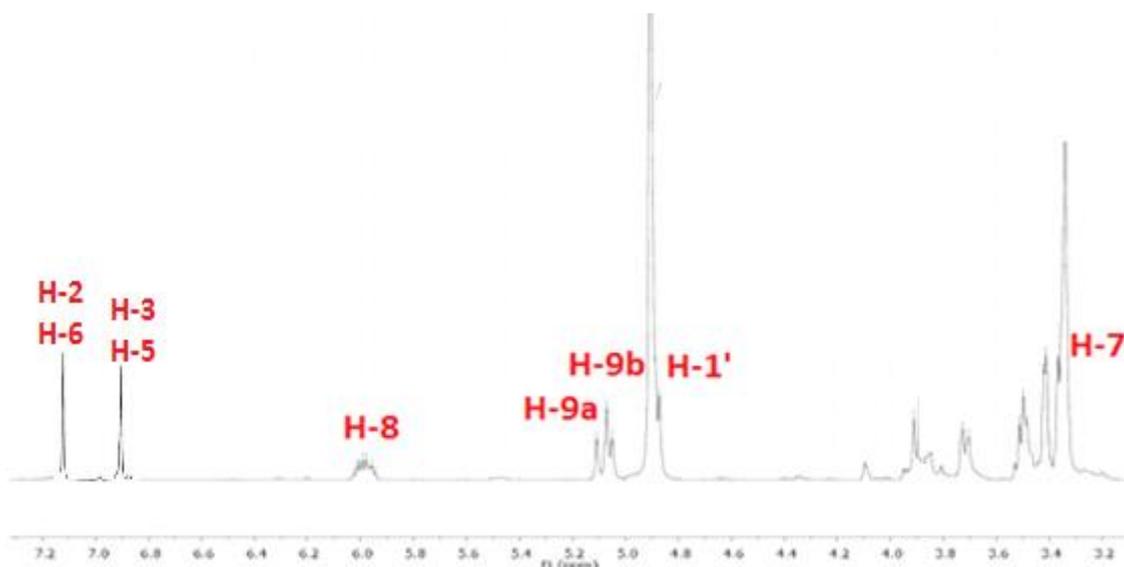
N°	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm, <i>m</i> , <i>J</i> Hz)
1	135,4 (C)	-
2	112,7(CH)	6,86, <i>d</i> (2,0)
3	149,3(C)	-
4	144,9(C)	-
5	116,3(CH)	7,12, <i>d</i> (8,5)
6	121,1(CH)	6,76, <i>dd</i> (8,5-2,0)
7	39,1 (CH ₂)	3,33, <i>d</i> (6,8)
8	138,3 (CH)	5,98, <i>ddt</i> (15,8-8,2-6,8)
9	115,0 (CH ₂)	5,11, <i>dd</i> (15,8-1,6) H-9a 5,08, <i>dd</i> (8,2-1,6) H-9b
3-OCH₃	55,4	3,85, <i>s</i>
Glucose		
1'	103,5(CH)	4,88, <i>d</i> (7,3)
2'	73,4(CH)	3,47, (<i>m</i>)
3'	76,2(CH)	3,47, (<i>m</i>)
4'	69,8(CH)	3,34, (<i>m</i>)
5'	76,9(CH)	3,39, (<i>m</i>)
6'	61,1(CH ₂)	3,88, <i>dd</i> (12,2-1,8) H-6'a 3,69, <i>dd</i> (12,2-4,7) H-6'b

IV.1.9. Elucidation structurale du composé 9



Le composé **9** a été obtenu sous forme des cristaux blancs. L'allure générale du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.49**) et la séquence HSQC (**Spectre IV.50**) de ce composé montrent une grande ressemblance avec ceux du **Citrisin C** avec l'absence du groupement méthoxye confirmé par :

- ◆ deux doublet d'intégration 2H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7,15$ ppm ($J = 8,5$ Hz), et à $\delta_{\text{H}} = 6,92$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable aux protons H-2/H-6 et H-3/H-5 respectivement, du cycle aromatique *para*-disubstitué.
- ◆ Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,88$ ppm (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz), attribuable au H-1' anomérique d'un β -glucose
- ◆ Un doublet de doublet de triple d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 5,98$ ppm ($J = 15,8-8,2-6,8$ Hz) attribuable à H-8.
- ◆ Deux doublets de doublet le premier à $\delta_{\text{H}} = 5,11$ ppm ($J = 15,8-1,6$ Hz) et le deuxième à $\delta_{\text{H}} = 5,08$ ppm ($J = 8,2-1,6$ Hz) attribuables à H-9a et H-9b.
- ◆ Un doublet large d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 3,33$ ppm ($J = 6,8$ Hz) attribuables à H-7.



Spectre IV.49 : Spectre RMN ^1H (CD $_3$ OD, 600 MHz) du composé 9

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec celles publiées [16] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier comme étant :

Le **Chavicol 1-O-β-D-glucopyranoside**, connue pour être présent dans le genre *Ononis* à partir des parties aériennes de *Ononis natrix* Sub species *ramosissima* [17] .

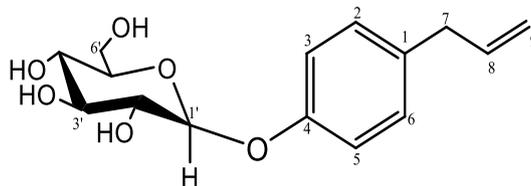


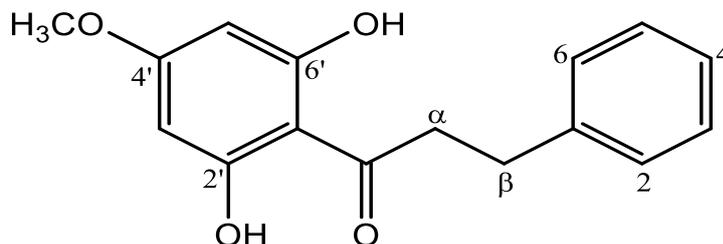
Figure IV.32 : Structure du composé 9 : Chavicol 1-O-β-D-glucopyranoside,

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H sont rassemblés dans le tableau IV.9

Tableau IV. : Donnés de RMN ^1H du composé 9

N°	$\delta_{\text{H}}(m, J \text{ Hz})$
1	-
2	7,15, <i>d</i> (8,5)
3	6,92, <i>d</i> (8,5)
4	-
5	6,9 , <i>d</i> (8,5)
6	7,11, <i>d</i> (8,5)
7	3,33 , <i>d</i> (6,8)
8	5,98, <i>ddt</i> (15,8-8,2-6,8)
9	5,08, <i>dd</i> (5,8-1,6) H-9a 5,11, <i>dd</i> (8,2-1,6)H-9b
1'	4,88, <i>d</i> (7,3)
2'	3,47, <i>m</i>
3'	3,47, <i>m</i>
4'	3,34, <i>m</i>
5'	3,39, <i>m</i>
6'	3,88, <i>dd</i> (12,2-1,8) H-6'a 3,69, <i>dd</i> (12,2-4,7) H-6'b

IV.1.10. Elucidation structurale du composé 10



Ce composé a été isolé sous forme des cristaux jaunes. La fluorescence noire violette sous UV a 366 nm et orange après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C laissant envisager une structure de type phénolique.

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre IV.50**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+Na+2H]^+$ à $m/z= 297,1095$ calculé pour $C_{16}H_{16}O_4Na$, orientant vers la formule brute $C_{16}H_{16}O_4$ soit une molécule comportant 9 insaturations.

Multiple Mass Analysis: 35 mass(es) processed

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -20.0, max = 1000.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

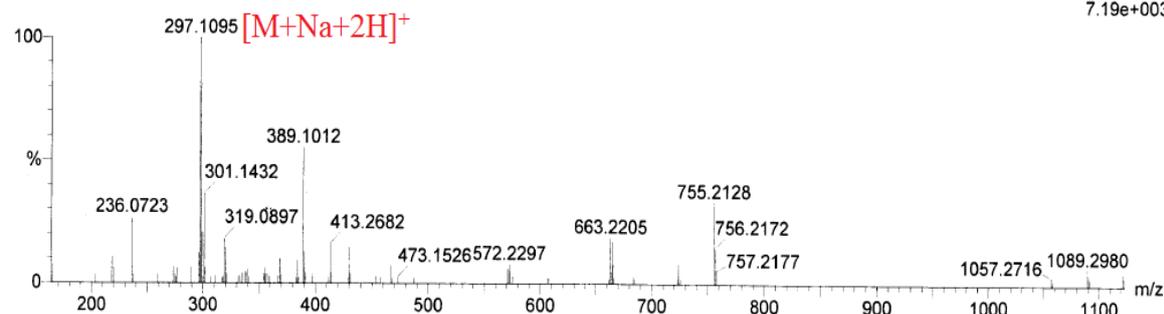
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

24878 formula(e) evaluated with 80 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-4 Na: 0-1 S: 0-1

H-2554-Inaki (IB-SBMBMA-6) 16 (0.678)

1: TOF MS ES+
7.19e+003

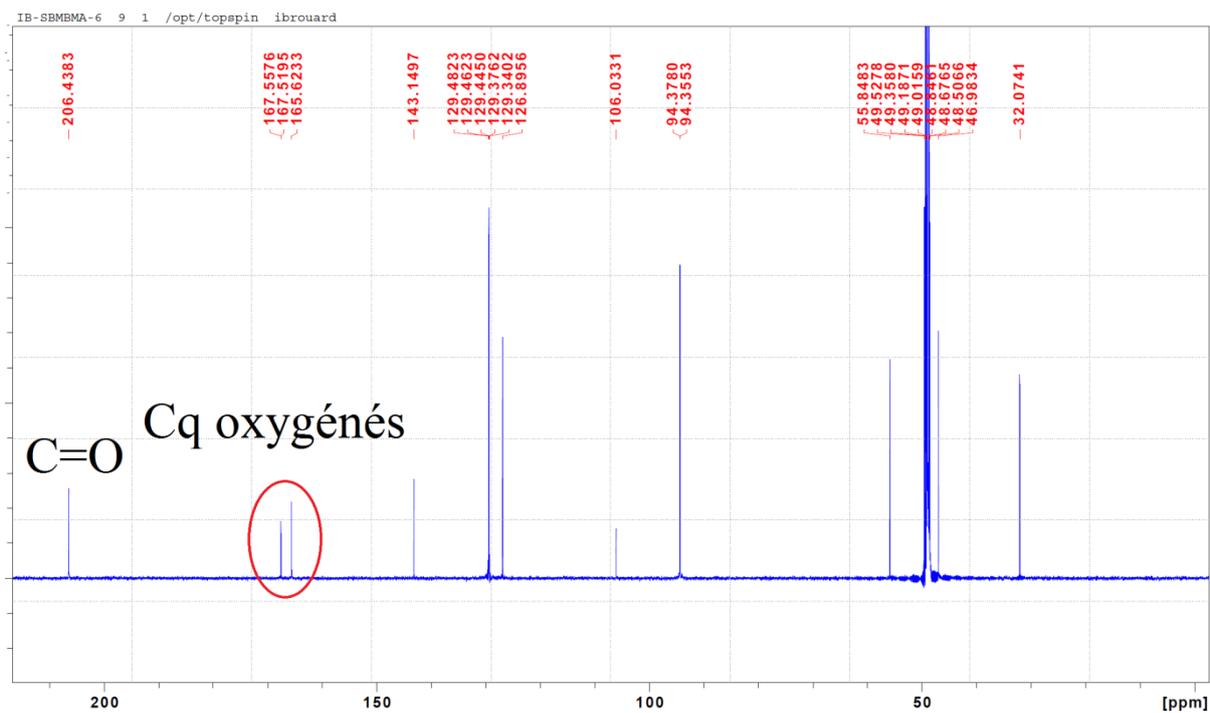
Minimum: 5.00
Maximum: 100.00

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
297.1095	100.00	297.1066	0.6	1.4	17.5	2.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₄ Na

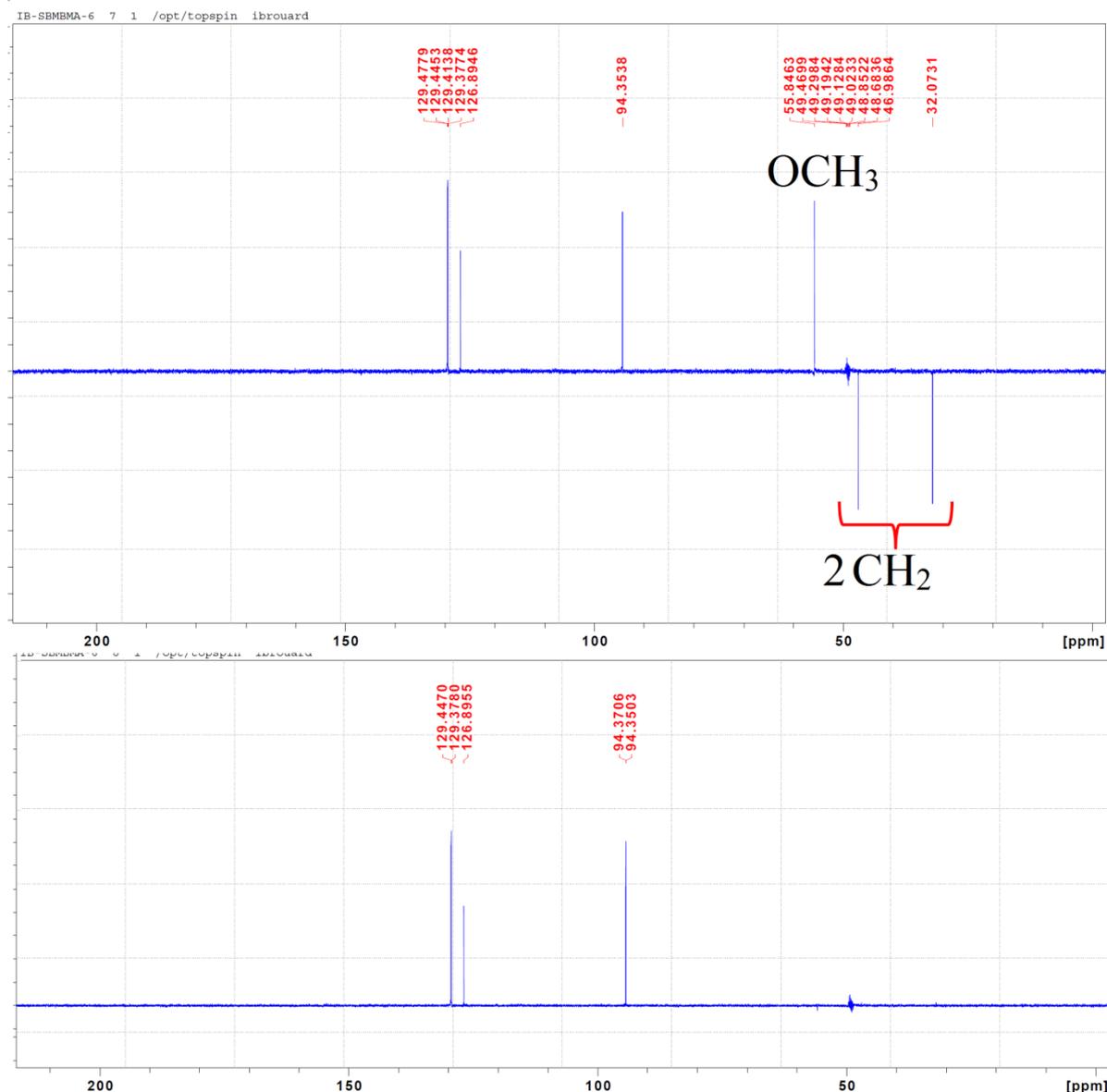
Spectre IV.50 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 10

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.51**) et le spectre relatif aux conséquences DEPT 135 et 90 (**Spectre IV.52**) confirment la présence de 16 atomes de carbone parmi lesquels on a :

- ◆ 5 carbones quaternaires sp² dont trois oxygénés et
- ◆ un groupement carbonyle à $\delta_C = 206,43$ ppm.
- ◆ 7 groupements CH aromatique.
- ◆ 2 méthylènes à $\delta_C = 48,68$; 32,07 ppm.
- ◆ un méthoxyle à $\delta_C = 55,84$ ppm.



Spectre IV.51 : Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) du composé 10



Spectre IV.52 : Spectres RMN DEPT90 et DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD) du composé 10

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.53) montre la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type (dihydrochalcone) reconnaissable par :

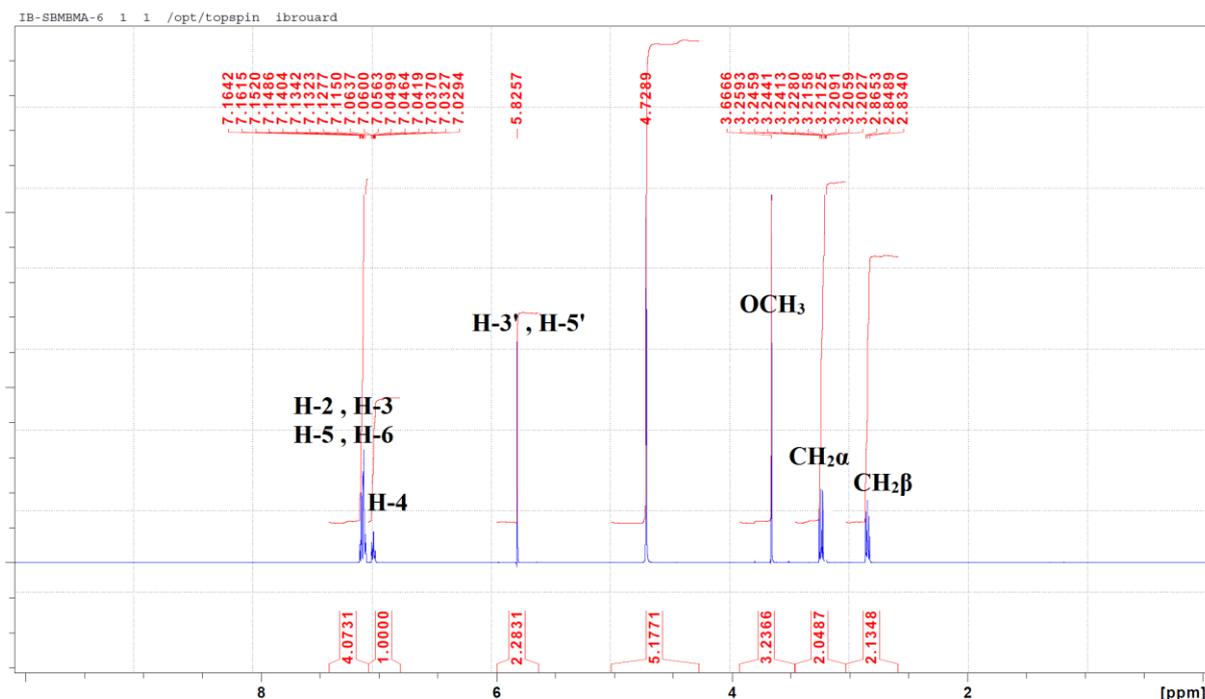
- ◆ Deux triplets d'intégration 2H chacun à des déplacements chimiques $\delta_{\text{H}} = 2,84$ ppm (t ; $J=7,45$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 3,24$ ppm (t ; $J=7,45$ Hz), attribuables à deux groupements méthylènes $\text{CH}_2\text{-}\alpha$ et $\text{CH}_2\text{-}\beta$ caractéristiques d'une dihydrochalcone [3].
- ◆ Deux noyaux aromatiques différents A, B. Les protons aromatiques du cycle A d'un flavonoïde résonnent habituellement entre 6 et 6,50 ppm. Dans cette zone, nous avons observé un signal singulet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 5,82$ ppm attribuable à H-3' et H-5'.
- ◆ Concernant le cycle B, ses protons résonnent généralement entre 6,7 et 7,9 ppm. Sur le présent spectre nous observons un massif de protons aromatiques entre $\delta_{\text{H}} = 7,11$ ppm et

$\delta_H = 7,16$ ppm intégrant pour quatre hydrogènes attribués à H-2, H-3, H-5 et H-6 et un multiplet d'intégration 1H à $\delta_H = 7,04$ ppm, attribué à H-4 caractéristiques du cycle B d'un flavonoïde monosubstitué [3].

Sur les mêmes spectres on constate aussi :

- ◆ Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3,66$ ppm, indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH₃) dans la molécule.

A ce stade, nous pouvons conclure que nous sommes en présence d'un flavonoïde renfermant deux cycles aromatiques dont le cycle B est monosubstitué, une fonction carbonyle et deux méthylènes, Il s'agit donc d'une dihydrochalcone.

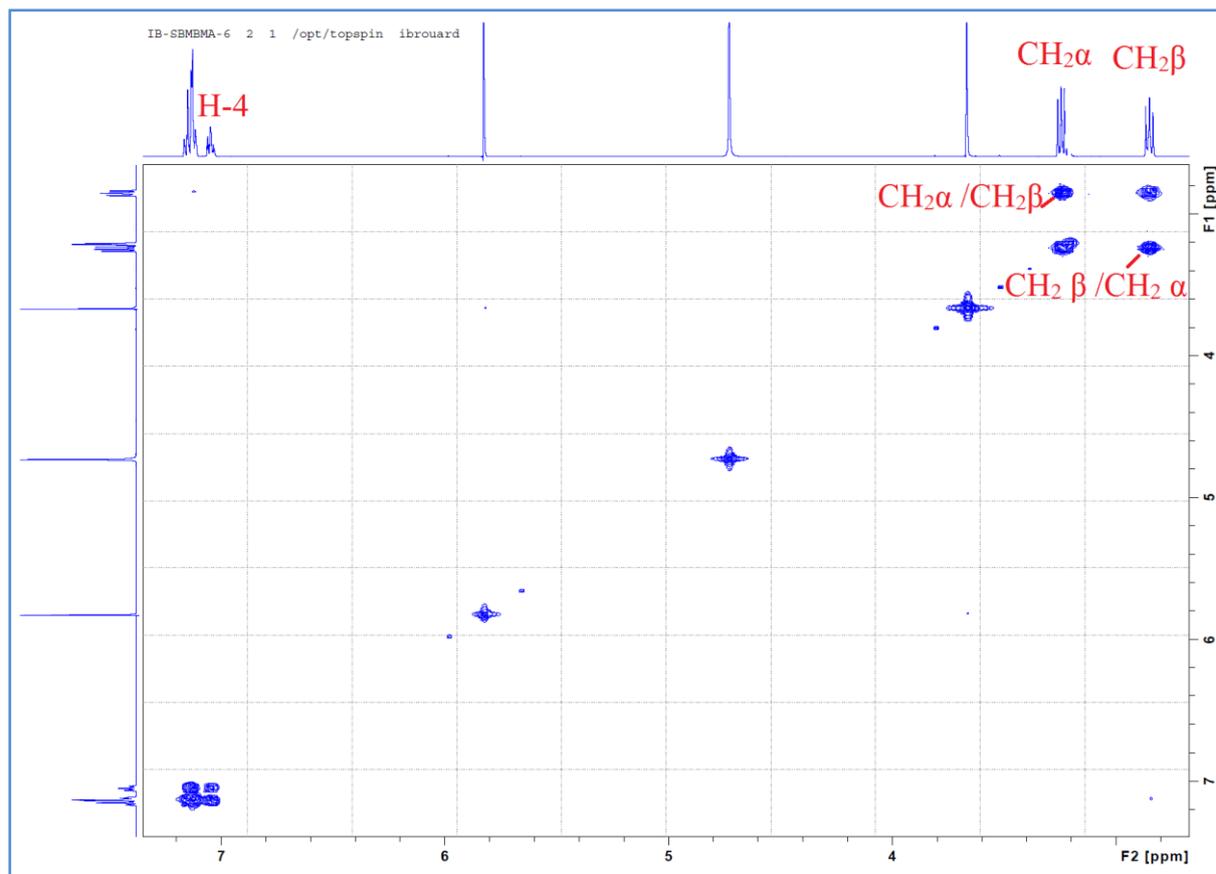


Spectre IV.53 : Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) du composé 10

L'analyse du spectre COSY (**Spectre IV.54**) montre également des taches de corrélations entre :

Les noyaux des triplets à $\delta_H = 3,24$ ppm et $\delta_H = 2,84$ ppm, confirme les attributions de CH₂- α et CH₂- β .

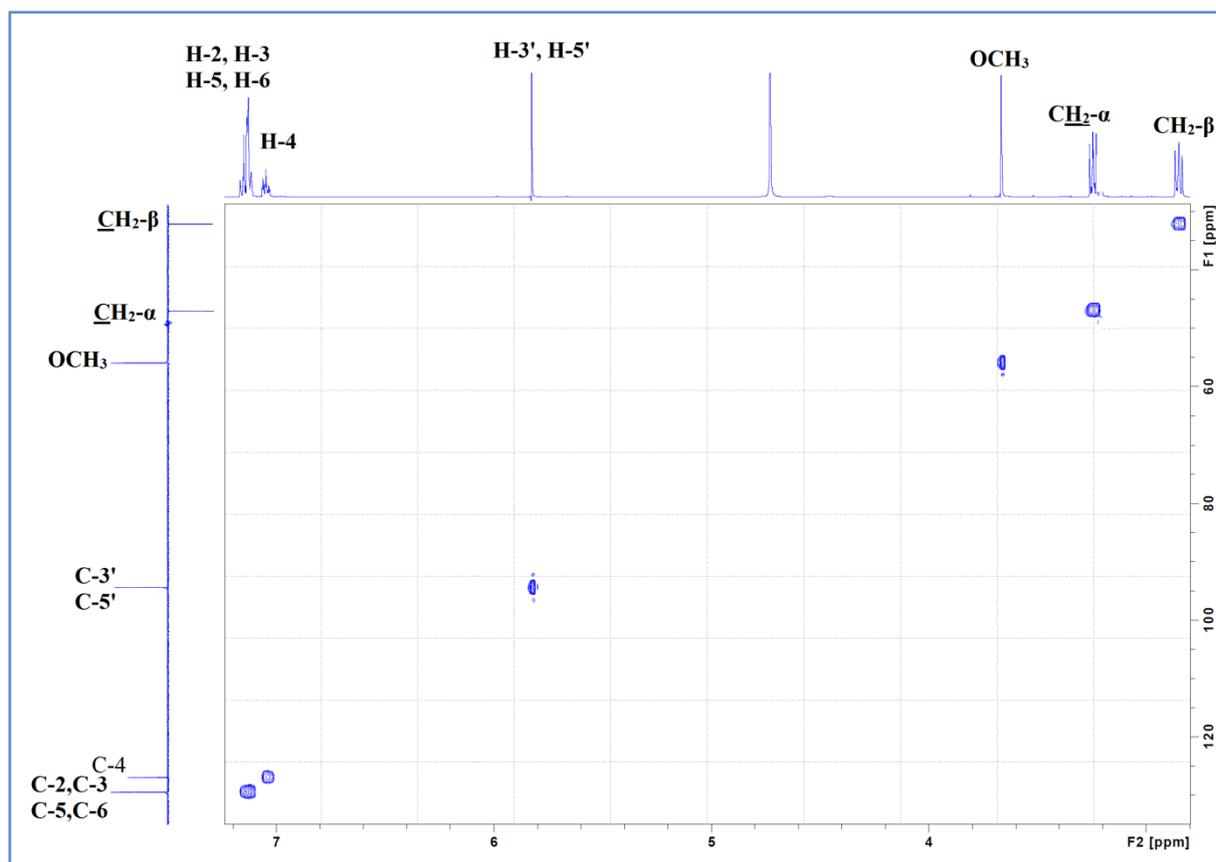
Sur le même spectre COSY on constate une tache de corrélation entre le noyau de multiplet à $\delta_H = 7,04$ ppm et les noyaux du multiplet entre $\delta_H = 7,11$ ppm et $\delta_H = 7,16$ ppm confirmant les attributions de H-2, H-3, H-5 et H-6 et H-4 donc une substitution du noyau B en 1.



Spectre IV.54 : Spectre RMN COSY (CD₃OD, 400 MHz) du composé 10

L'examen des spectres HSQC (**Spectre IV. 55**) permet l'attribution des carbones qui portent des protons suivants :

- Les protons H-2, H-3, H-5, H-6 et leur carbone à $\delta_C = 129,47$ ppm (C-2, C-3, C-5, C-6).
- Les protons H-3', H-5' et leur carbone à $\delta_C = 94,35$ ppm (C-3', C-5').
- Une tache de corrélation entre les protons des groupements $\text{CH}_2\text{-}\alpha$ et $\text{CH}_2\text{-}\beta$ et les atomes de carbones à $\delta_C = 46,98$ ppm et $\delta_C = 32,07$ ppm.
- Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta_C = 55,84$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle.

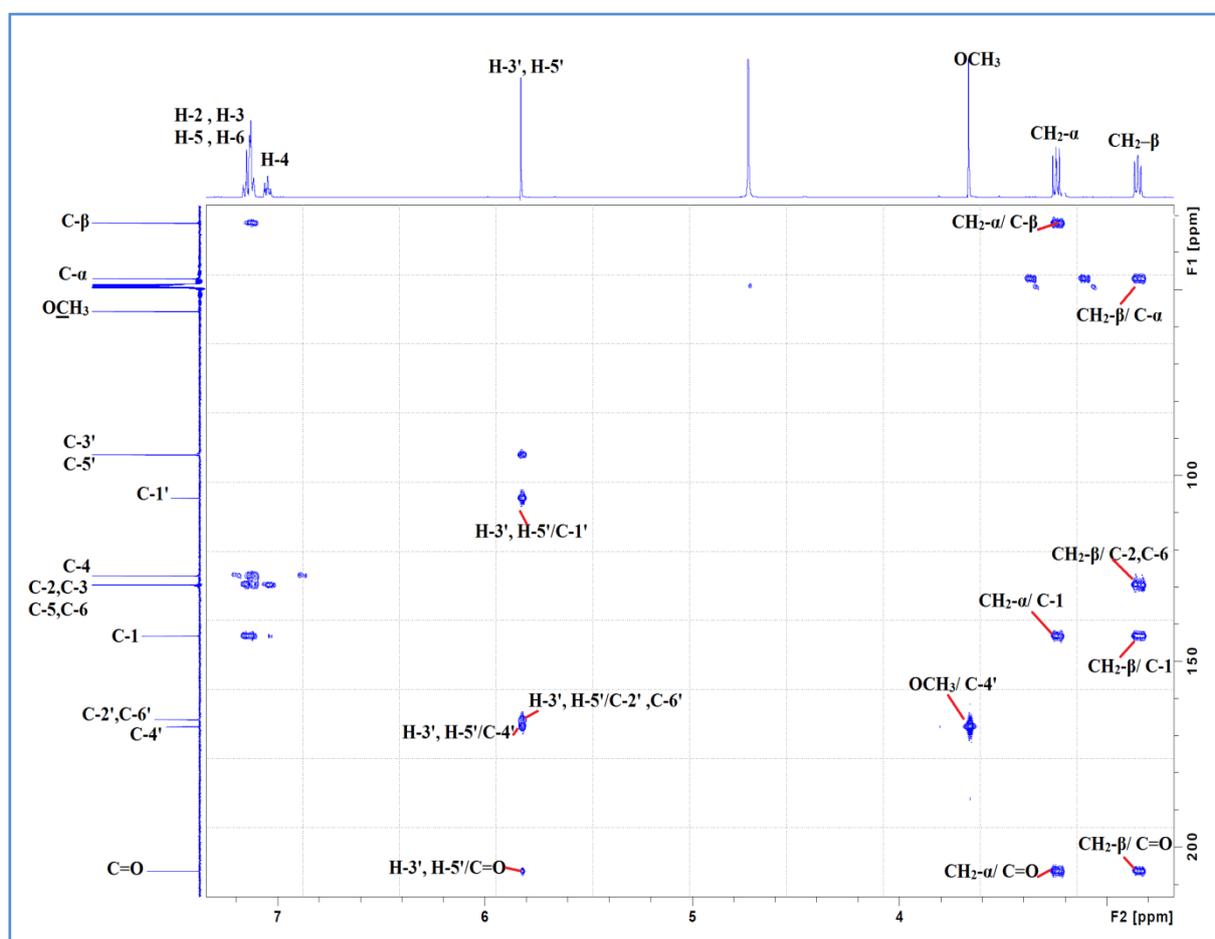


Spectre IV.55 : Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 400 MHz) du composé 10

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Spectre IV.56) qui sont :

- Quatre taches de corrélation entre le CH₂-β et quatre atomes de carbone, le premier à un déplacement chimique à $\delta_C = 46.0$ ppm attribuable à CH₂-α, le deuxième à $\delta_C = 129,4$ ppm qui est le C-2, C-6, le troisième atome à $\delta_C = 143,1$ ppm attribuable à C-1 et le quatrième atome à $\delta_C = 206,4$ ppm attribuable à C=O.
- Trois taches de corrélation entre le CH₂-α, le premier atome de carbone à $\delta_C = 32,06$ ppm qui est attribuable à CH₂-β, le deuxième atome de carbone à $\delta_C = 142$, ppm qui est le C-1 et le troisième atome à $\delta_C = 206,4$ ppm attribuable à C=O.
- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les carbones oxygénés à $\delta_C = 129,4$ ppm attribuables à C-2', C-6', ainsi avec le carbone à $\delta_C = 206,4$ ppm attribuable à C=O. Ces même protons montrent également une corrélation avec le carbones à $\delta_C = 106,0$ ppm et le carbone oxygéné à $\delta_C = 165,6$ ppm attribuables à C-1' et le C-4' respectivement.
- Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à

$\delta_C = 165, 6$ ppm qui est attribuable à C-4' permettant ainsi l'attribution du méthoxyle sur la position 4'.



SpectreIV.56 : Spectre HMBC (CD₃OD, 400 MHz) du composé 10

L'analyse spectrale combinée (RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC) qui est en accord avec celle indiquée dans la littérature [18] mène à la structure de la **2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone** identifiée pour la première fois dans le genre *Ononis*.

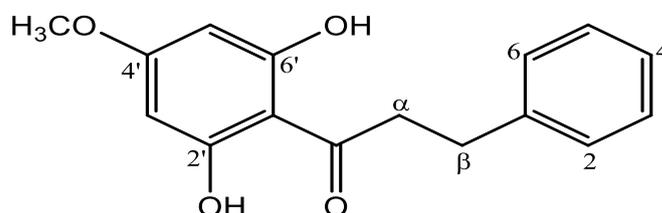


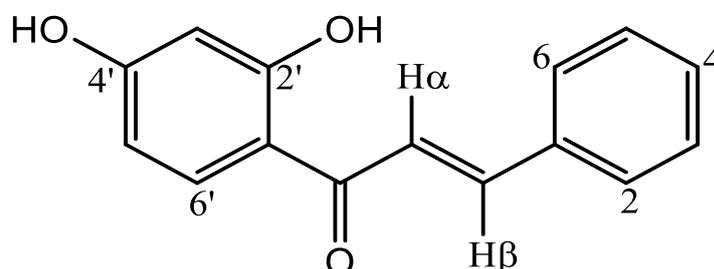
Figure IV.33 : Structure du composé 10 : 2',6'-dihydroxy-4'méthoxydihydrochalcone

Les déplacements chimiques des protons du composé 10 sont donnés dans le tableau IV.10

Tableau IV.10 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 10

N°	δC	δH (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
1	143.1 (C)	-
2	129.4 (CH)	7.16, <i>m</i>
3	129.4 (CH)	7.16, <i>m</i>
4	126.8 (CH)	7.04, <i>m</i>
5	129.4 (CH)	7.16, <i>m</i>
6	129.4 (CH)	7.16, <i>m</i>
α	46.9 (CH₂)	3,24, <i>t</i> (7,45)
β	32.0 (CH₂)	2,84, <i>t</i> (7,45)
C=O	206.4 (CH)	-
1'	106.0(C)	-
2'	167.5(C)	-
3'	94.3(CH)	5.82, <i>s</i>
4'	165.6(C)	-
5'	94.3(C)	5.82, <i>s</i>
6'	167.5(C)	-
4'-OCH₃	55.8(CH₃)	3.66, <i>s</i>

IV.1.11. Elucidation structurale du composé 11



Le composé **11** visible en UV (254 et 366 nm) se présente, sous forme de cristaux jaunes.

Le spectre UV-Visible enregistré dans le méthanol est caractérisé par la présence de deux bandes qui confirme que ce composé appartient à la famille des flavonoïdes [19].

- ✓ un maximum d'absorption de la bande I à une longueur d'onde maximal $\lambda_{I} = 349$ nm et une faible absorption de la bande II dont la longueur d'onde maximale $\lambda_{II} = 223$ nm, indique que ce composé est une chalcone [19].
- ✓ L'addition de NaOH provoque un effet bathochromique de la bande I ($\Delta\lambda_{I} = +39$) par rapport au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un groupement OH libre en position 4'.
- ✓ Le spectre enregistré en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ signale un effet bathochromique de la bande I ($\Delta\lambda_{I} = +58$) indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 2'.

Les résultats des spectres enregistrés dans la série spectrale UV-visible du composé **11** sont résumés dans le tableau IV.11.

Tableau IV.11: Données de la série spectrale UV (λ_{max} nm) du composé 11

Réactifs	Bande I	Bande II	Commentaires
MeOH	349	223	Chalcone
MeOH /NaOH	390	278	OH libre en 4'.
MeOH /AlCl ₃	407	263	
MeOH/AlCl ₃ +HCl	407	263	OH libre en 2'.
MeOH/NaOAc	388	277	/
MeOH/NaOAc+H ₃ BO ₃	349	223	
Spectre stable avec NaOH après 5 min			

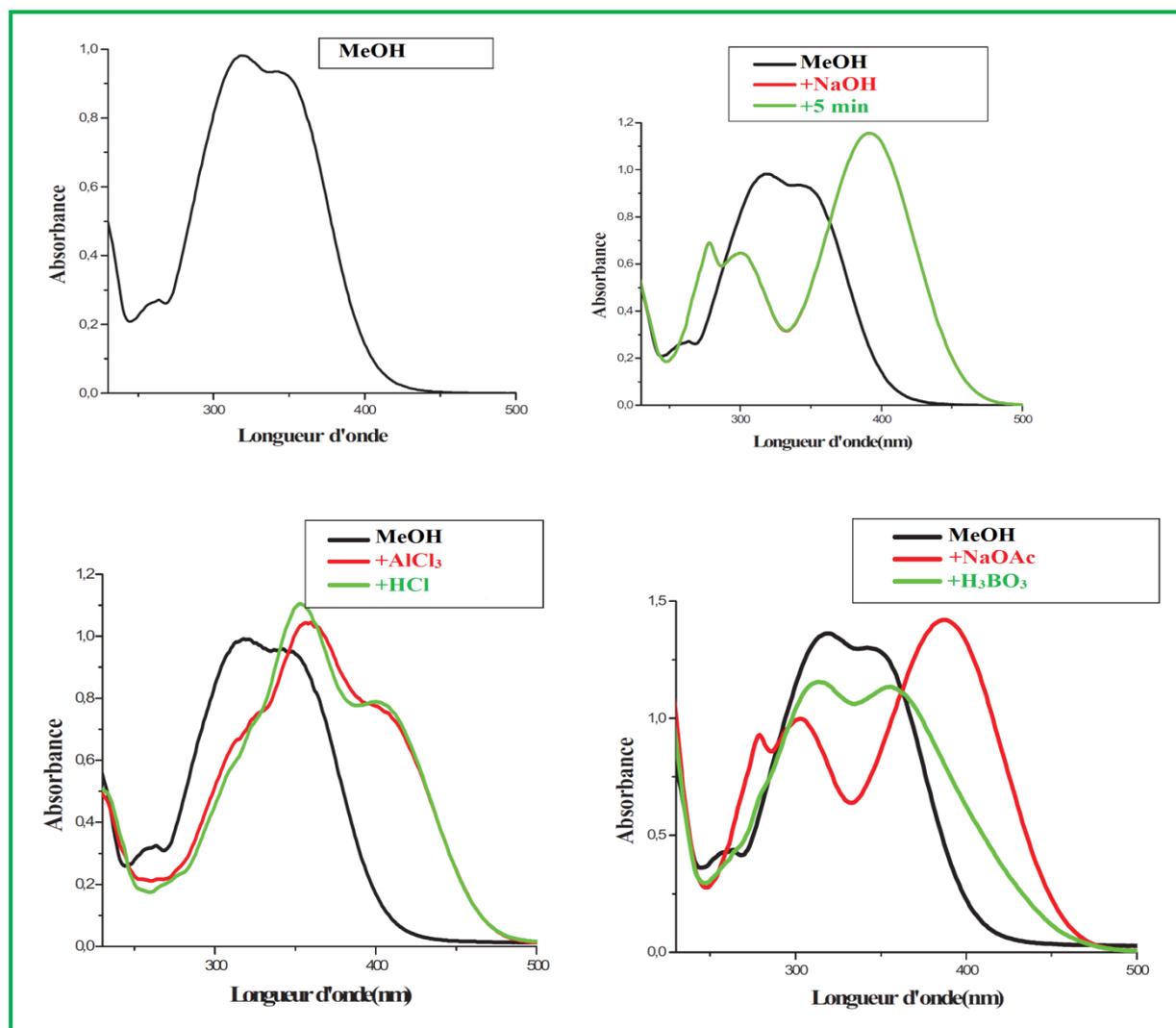
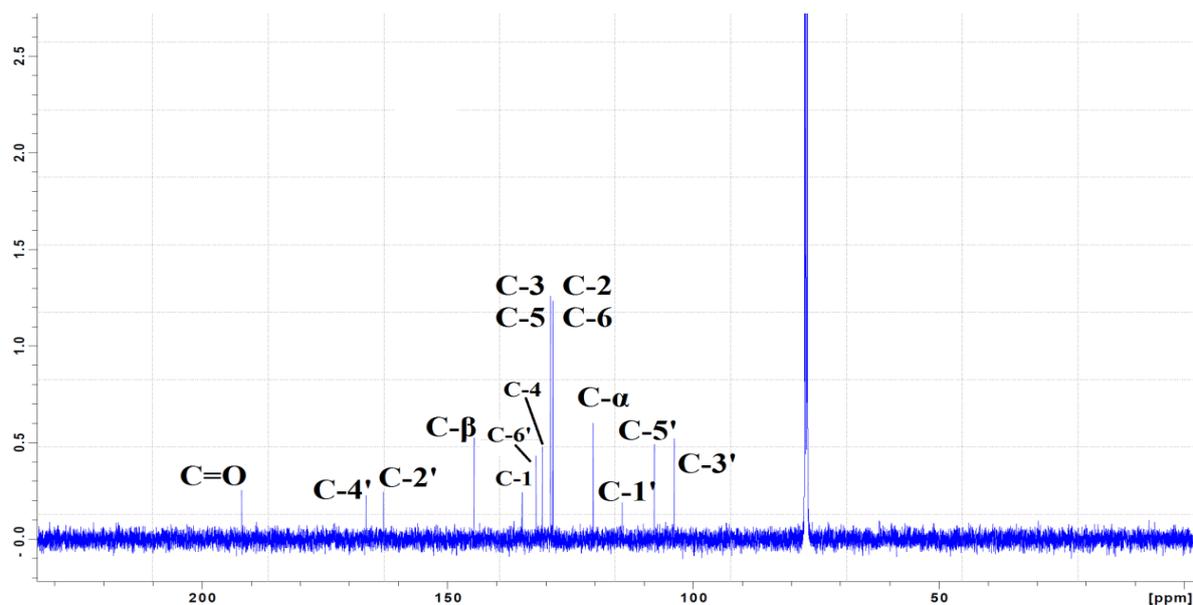


Figure IV.34 : La Série spectrale UV du composé **11**

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.57) du composé **11** montre la présence de 15 atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- ◆ 5 carbones quaternaire à δ_{C} (191,3 ; 166,5 ; 163,0 ; 114,4 et 134,8 ppm)
- ◆ 8 groupements CH sp² à δ_{C} (132,0 ; 131,9 ; 130,7 ; 128,5 ; 107,8 et 103,7 ppm)
- ◆ 2CH éthyléniques à δ_{H} =120,5 et 144.5 ppm
- ◆ Un groupement carbonyle d'une fonction carbonyle à δ_{C} = 191,3 ppm.



Spectre IV.57: Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) du composé 11

L'étude du spectre RMN ^1H (Spectre IV.58) et ses étalements (Spectre IV.59 et 60) ainsi que le spectre COSY (Spectre IV.61) montre la présence des signaux suivants :

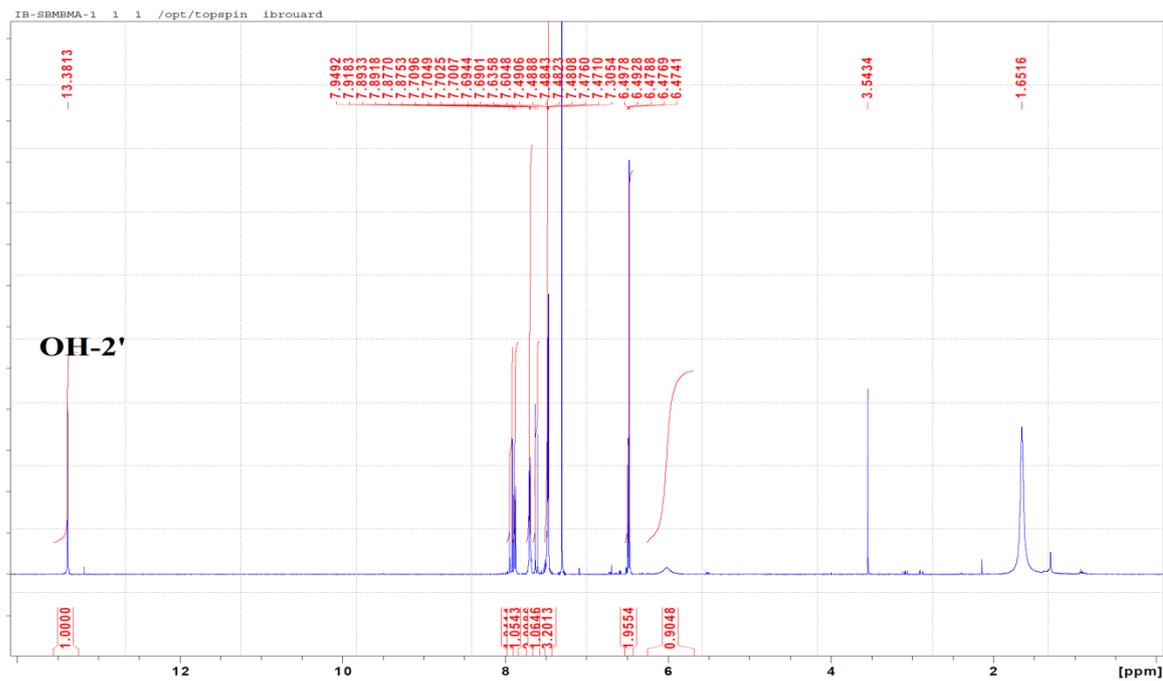
- ◆ Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7,92$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 7,61$ ppm, avec une constante de couplage $J = 15,6$ Hz attribué au H- α et H- β caractéristique des chalcones. [20].

L'étude des deux noyaux aromatiques correspondants indique la présence de :

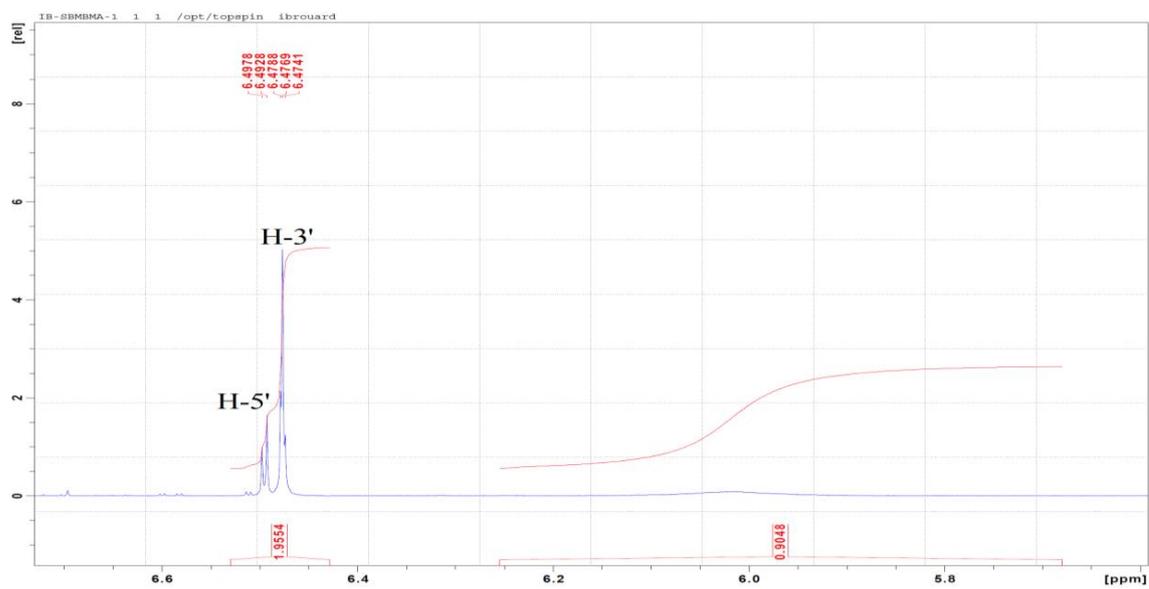
- ◆ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H apparaît à $\delta_{\text{H}} = 13,38$ ppm correspond au (OH-2') [21].
- ◆ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,88$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,7$ Hz, attribué au H-6'.
- ◆ Un signal sous forme d'un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,49$ ppm ($J = 8,7$ Hz, $2,4$ Hz) correspond peut être au proton H-5'. Ce proton montrant un couplage *ortho* et un couplage *méta* indique la présence de H-3' et H-6'.
- ◆ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,47$ ppm ($J = 2,4$ Hz) avec attribué au H-3'.

L'étude du cycle aromatique B indique la présence de :

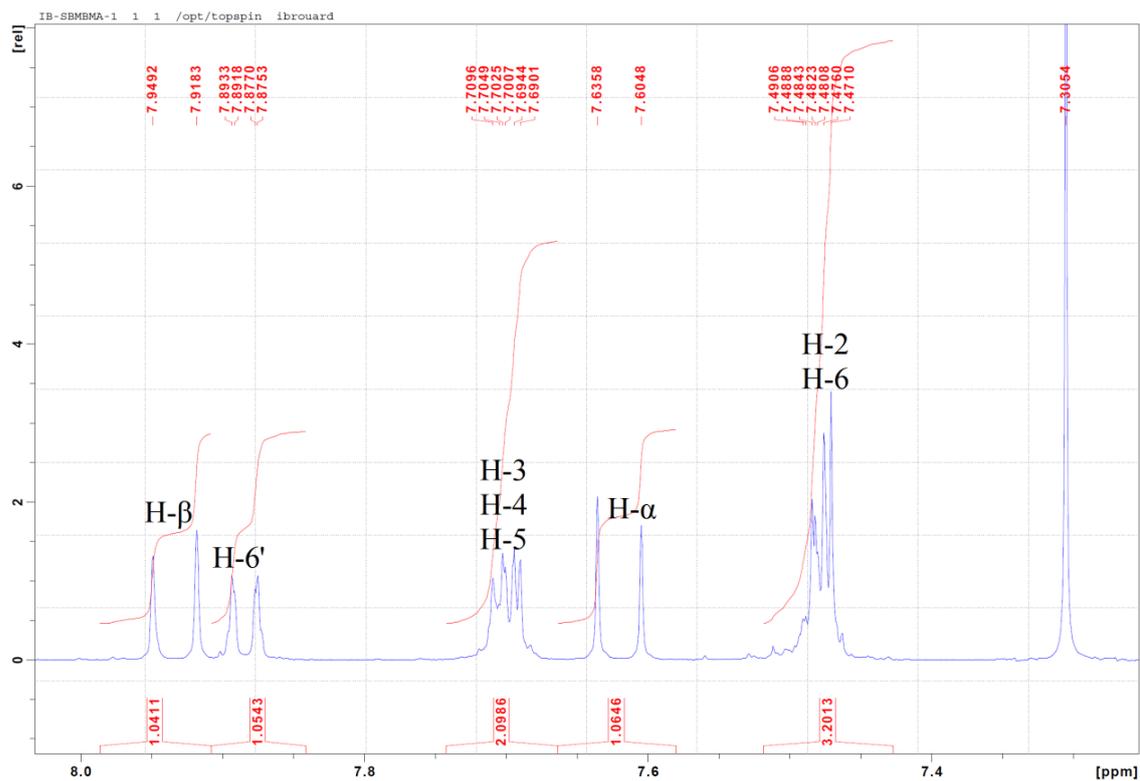
- ◆ Un signal sous forme de multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,48$ ppm attribuable aux protons H-2 et H-6.
- ◆ Un signal sous forme de multiplet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm attribuable aux protons H-3, H-4 et H-5.



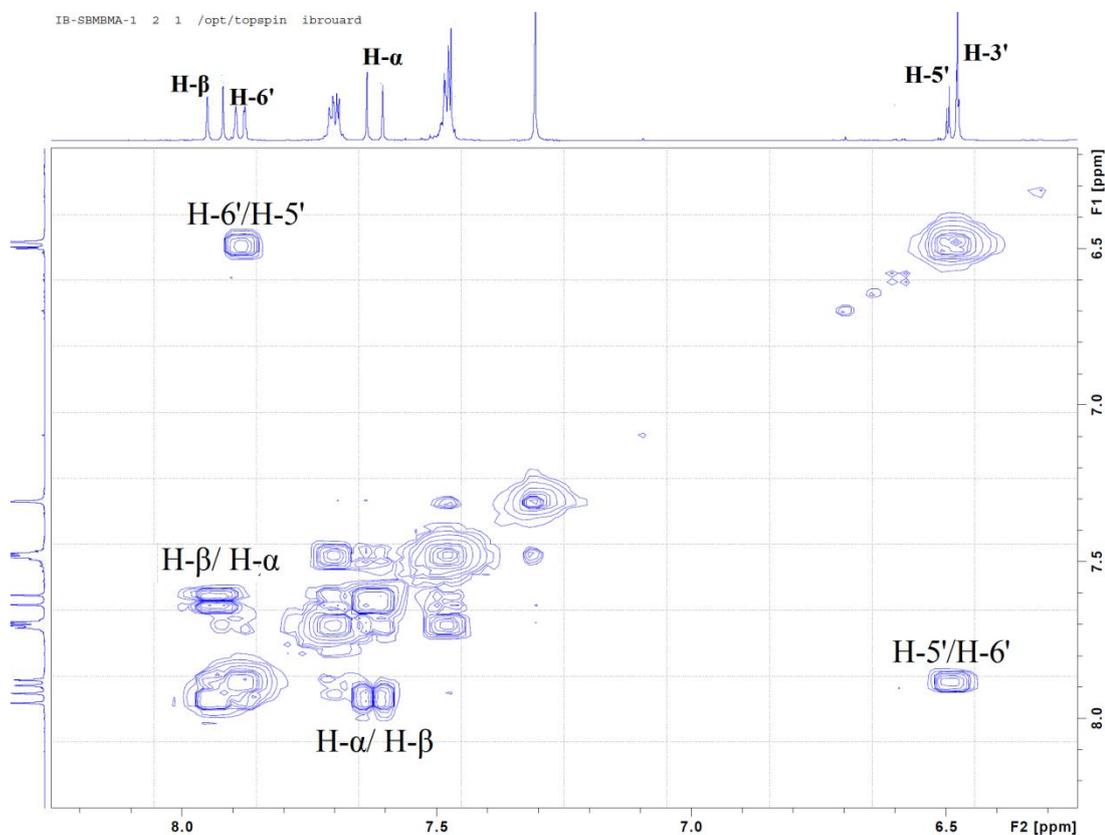
Spectre IV.58 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) du composé 11



Spectre IV.59 : Spectre RMN ^1H étalé(CDCl_3 , 400 MHz) du composé 11

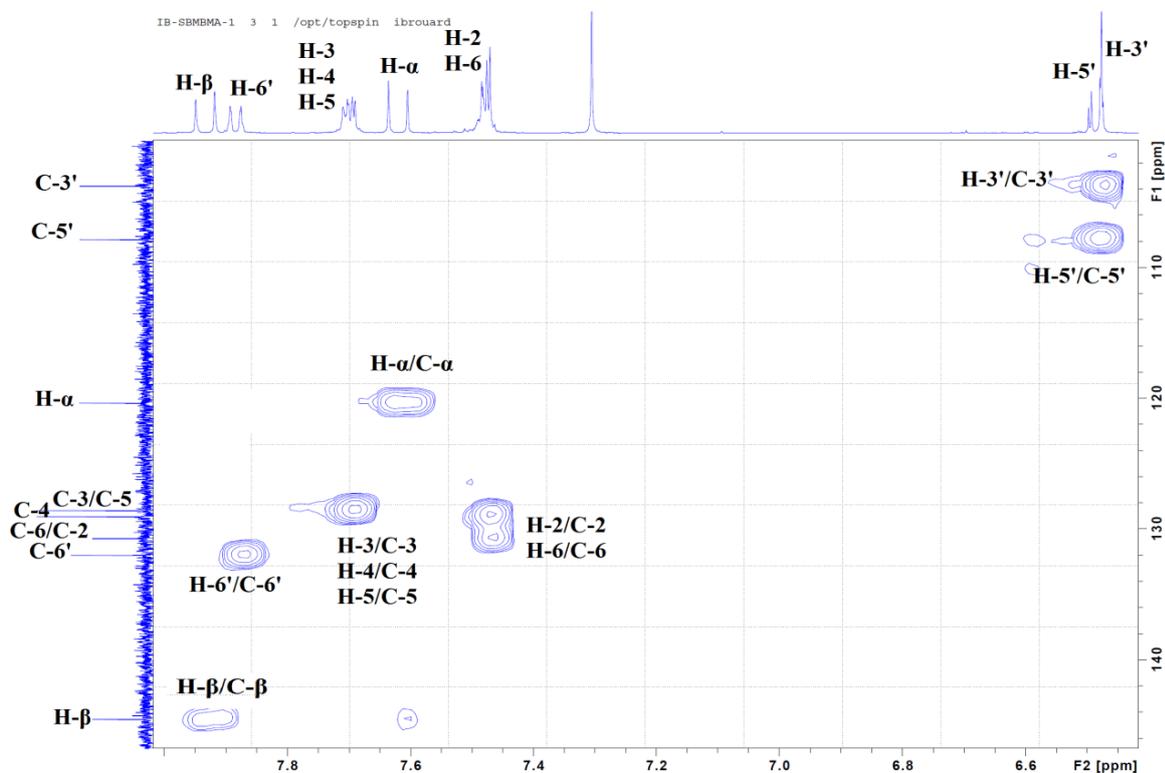


Spectre IV.60 : Spectre étalé RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) du composé 11



Spectre IV.61 : Spectre COSY (CDCl_3 , 400MHz) du composé 11

L'expérience HSQC (Spectre IV.62) permet d'observer les couplages entre les carbones et les protons directement liés entre eux :



Spectre IV.62 : Spectre HSQC (400MHz, CDCl_3) du composé 11

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau IV.12) établies par RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [22], permettent à proposer pour le composé 11 la structure suivante :

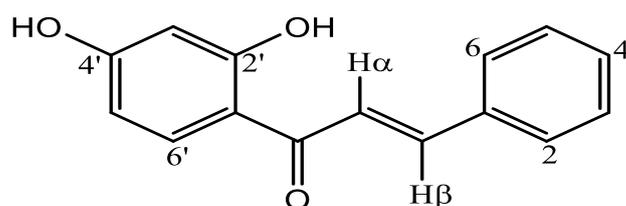


Figure IV.35 : Structure du composé 11 : 2',4'-dihydrochalcone

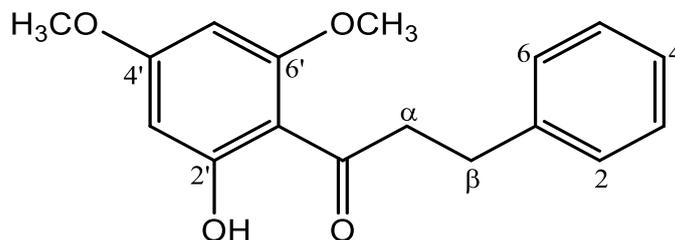
Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Ononis angustissima* [23].

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau IV.12 ci-dessous.

Tableau IV.12 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 11

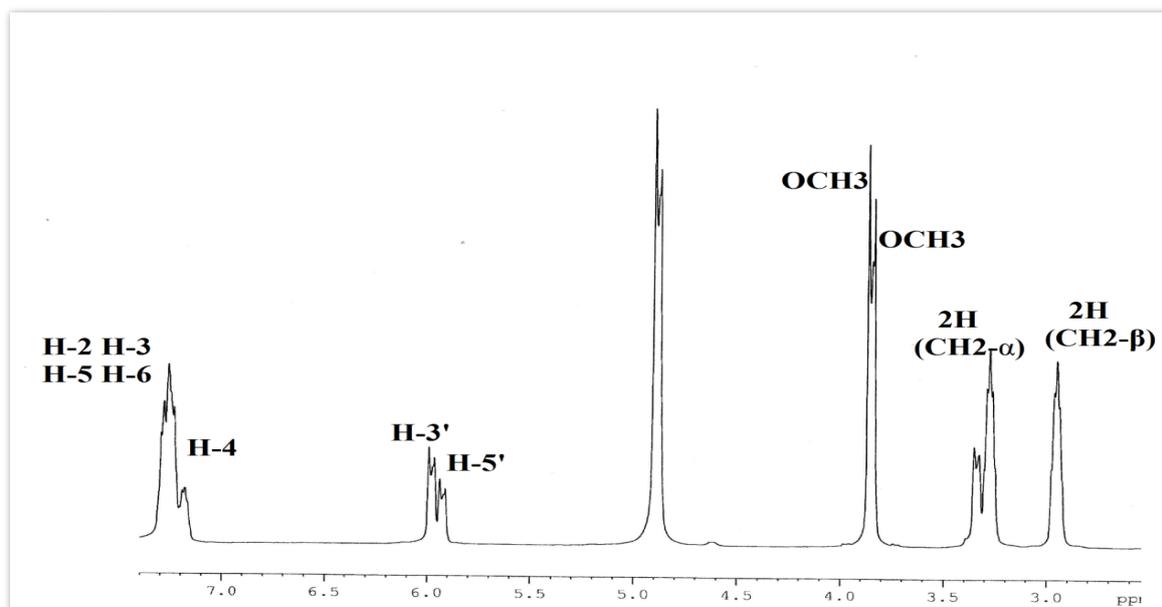
N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J Hz</i>)
1	134,8 (C)	-
2	128,5 (CH)	7,45, <i>m</i>
3	130,7 (CH)	7,70, <i>m</i>
4	132,0 (CH)	7,70, <i>m</i>
5	130,7 (CH)	7,70, <i>m</i>
6	128,5(CH)	7,45, <i>m</i>
α	120,5 (CH)	7,61, <i>d</i> (15,6)
β	144,5 (CH)	7,92, <i>d</i> (15,6)
C=O	191.3 (C)	-
1'	114,4 (C)	-
2'	163,0 (C)	-
3'	103,7 (CH)	6,47, <i>d</i> (8,7)
4'	166,5 (CH)	-
5'	107,8 (CH)	6,49, <i>dd</i> (8,7 - 2,4)
6'	131,9 (CH)	7,88 , <i>d</i> (8,7)

IV.1.12. Elucidation structurale du composé 12



Le composé **12** se présente également, comme le composé **10**, sous forme de cristaux blancs. Toutes les données spectrales de ce composé obtenues après analyse du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.63**), est confirmées par expériences HSQC (**Spectre IV.64**), se sont avérées totalement identiques à celles des composés **10**.

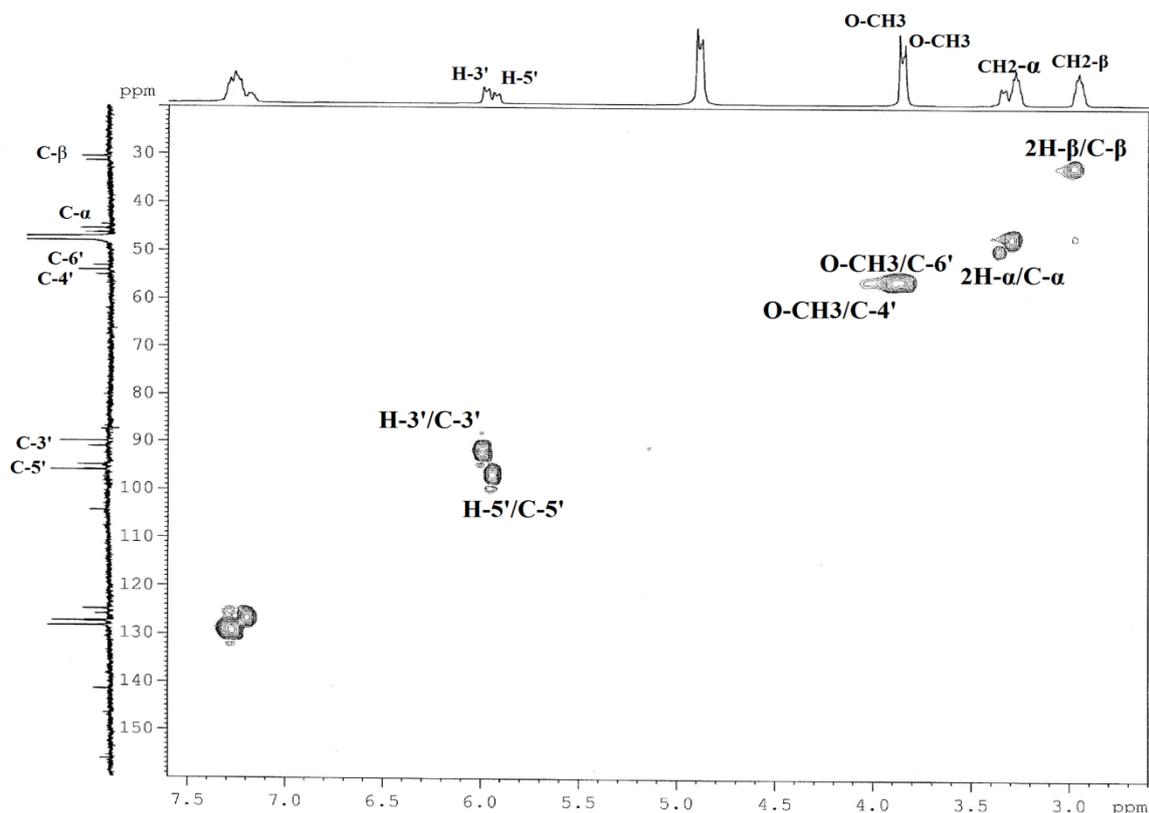
Cette similitude est confirmée par le spectre RMN ^1H enregistré dans CD_3OD (**Spectre IV.63**) qui permet de reconnaître quasiment tous les signaux des protons observés pour le composé **10**. On identifie les protons aromatiques du cycle B : H-2, H-3, H-5 et H-6 à $\delta_{\text{H}}=7,29$ ppm, H-4 à $\delta_{\text{H}}=7,19$, les protons H-3' et H-5' du cycle A donnent deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 5,97$ ppm (H-3', *d* ; $J=1,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 6,00$ ppm (H-5', *d* ; $J=1,5$ Hz). On reconnaît également les signaux des protons des groupements méthylènes $\text{CH}_2\text{-}\alpha$ ($\delta_{\text{H}} = 3,35$ ppm ; *t* ; $J=7,89$ Hz) et $\text{CH}_2\text{-}\beta$ ($\delta_{\text{H}} = 2,99$ ppm ; *t* ; $J=7,89$ Hz) ainsi que ceux du groupement méthoxy ($\delta_{\text{H}} = 3,72$; *s*).



Spectre IV.63: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 12

La seule différence notable entre ce composé et le composé **10** se situe au niveau du cycle A par l'apparition du signal d'un singulet d'intégration 3H à $\delta_H=3,90$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle, permettant de suggérer que le groupement OH-6' a laissé la place à un groupement OCH₃-6'.

La corrélation observée sur le spectre HSQC (**Spectre IV.64**) entre le nouveau signal des protons résonant à $\delta_H= 3,66$ ppm (s, 3H) et un carbone repéré à $\delta_C=55,9$ ppm indique qu'ils font partie d'un groupement méthylénique OCH₃.



Spectre IV.64: Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 12

L'ensemble de ces données (**Tableau IV .13**) établi par analyses spectrales, en plus des données de la littérature [24], nous autorise à proposer pour le composé **12** la structure suivante :

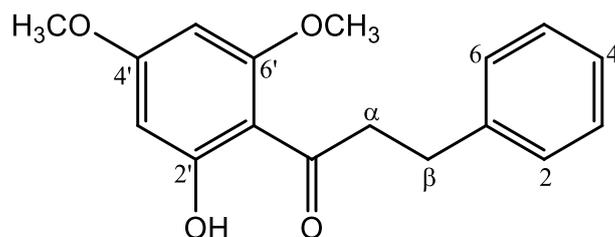


Figure IV.36 : Structure du composé 12 : (2'-hydroxy-4',6'-dimethoxydihydrochalcone)

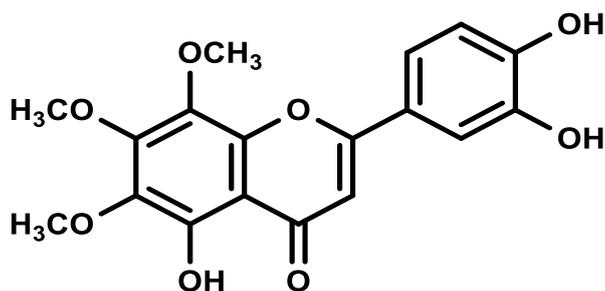
Ce composé connue également sous le nom de **DihydroflavokawinB**, Il a été détecté pour la première fois dans le genre *Ononis*.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **12** sont regroupés dans le tableau **IV.13**

Tableau IV.13 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 12

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
1	142,0(C)	-
2	128,8(CH)	7,29, <i>m</i>
3	128,8(CH)	7,29, <i>m</i>
4	126,2(CH)	7,19, <i>m</i>
5	128,8(CH)	7,29, <i>m</i>
6	128,8(CH)	7,29, <i>m</i>
α	45,8(CH ₂)	3.35, <i>t</i> (7,89)
β	32,0(CH ₂)	2,99, <i>t</i> (7,89)
C=O	206,4(C)	-
1'	106,0(C)	-
2'	167,5(C)	-
3'	94,3(CH)	5,97, <i>d</i> (1.5)
4'	165,6(C)	-
5'	91,9(CH)	6,0, <i>d</i> (1.5)
6'	167,5(C)	-
4'-OCH₃	55,8(CH ₃)	3,80, <i>s</i>
6'-OCH₃	55,9(CH ₃)	3,90, <i>s</i>

IV.1.13. Elucidation structurale du composé 13



L'étude de la série spectrale UV mène aux remarques suivantes (**Figure IV.37**) :

- ✓ Le maximum d'absorption de la bande I à 350 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol laisse supposer la structure de type flavone ou flavonol substitué en C-3.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I de 53 nm après l'addition de NaOH avec une stabilité de la densité optique, oriente vers un OH en 4'
- ✓ Un effet bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl} / \text{MeOH}$ ($\Delta\lambda = +18$ nm), indique la présence d'un OH libre en 5 avec oxygénation en C-6.
- ✓ L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II révélant la présence d'une substitution de type OR sur C-7.
- ✓ Ce spectre montre également un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +26$ nm) après l'ajout de NaOAc / H_3BO_3 par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant la présence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV.14

Tableau IV.14: Données de la série spectrale UV du composé 13

Réactifs	λ max		
	Bande I	Bande II	Autres bandes
MeOH	350	278	/
+NaOH	401	268	/
+AlCl ₃	382	289	/
+AlCl ₃ /HCl	368	286	/
+NaOAc	350	275	/
+NaOAc/H ₃ BO ₃	376	266	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

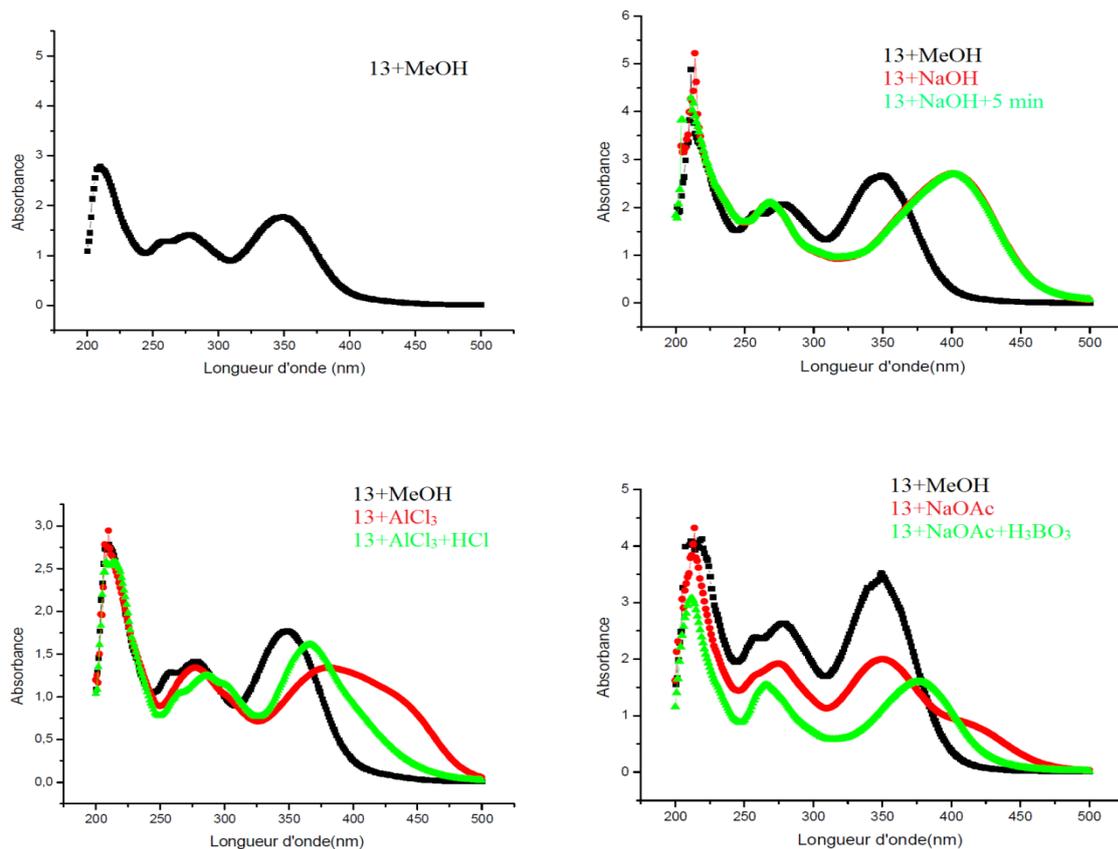
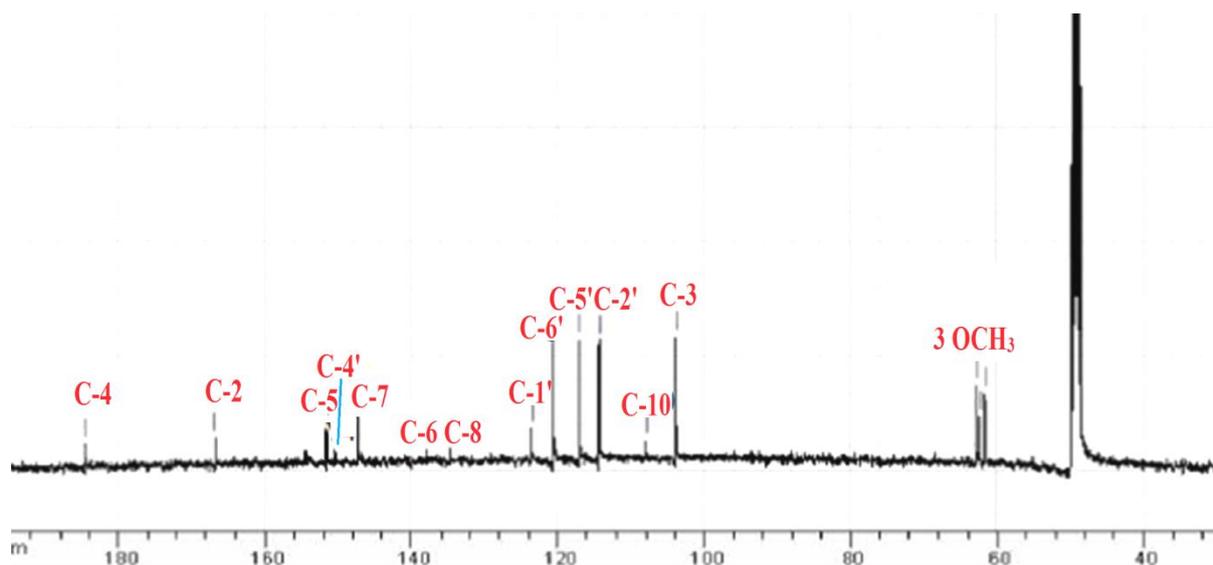


Figure IV.37 : Série spectrale UV du composé 13

Le spectre RMN ^{13}C (Spectre IV.65) révèle la présence de 18 atomes de carbone :

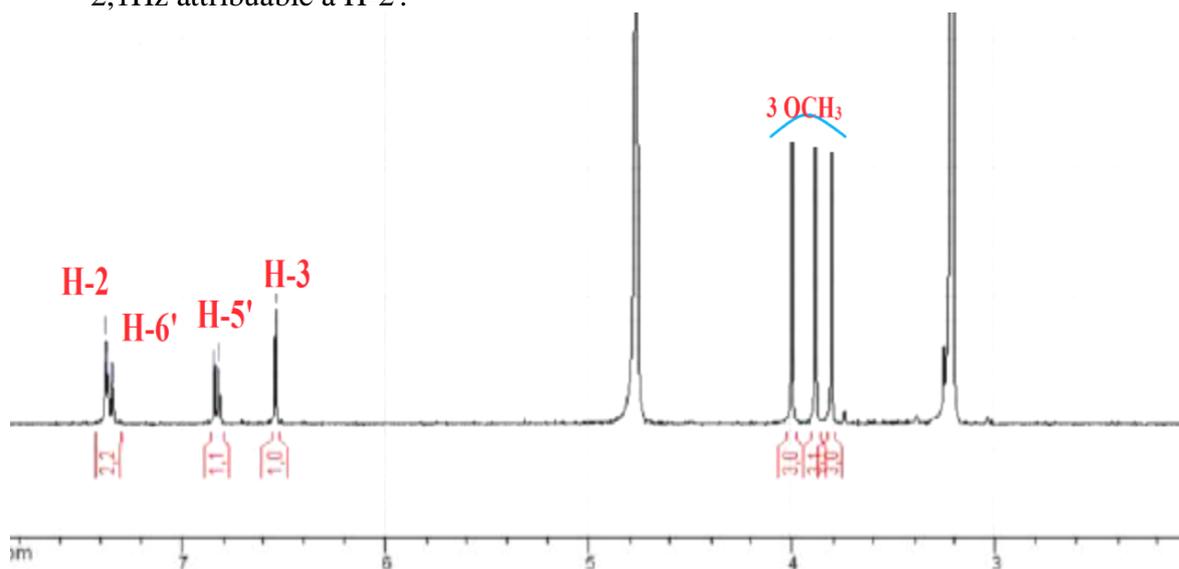
- ◆ 3 CH_3 oxygéné à $\delta = 61,47 ; 62,25 ; 62,68$ ppm.
- ◆ 4 groupements CH aromatiques caractéristiques des cycles C et B des flavonoïdes.
- ◆ 1 carbonyle à $\delta = 187,75$ ppm.
- ◆ 10 carbones quaternaires.



Spectre IV.65 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) du composé 13

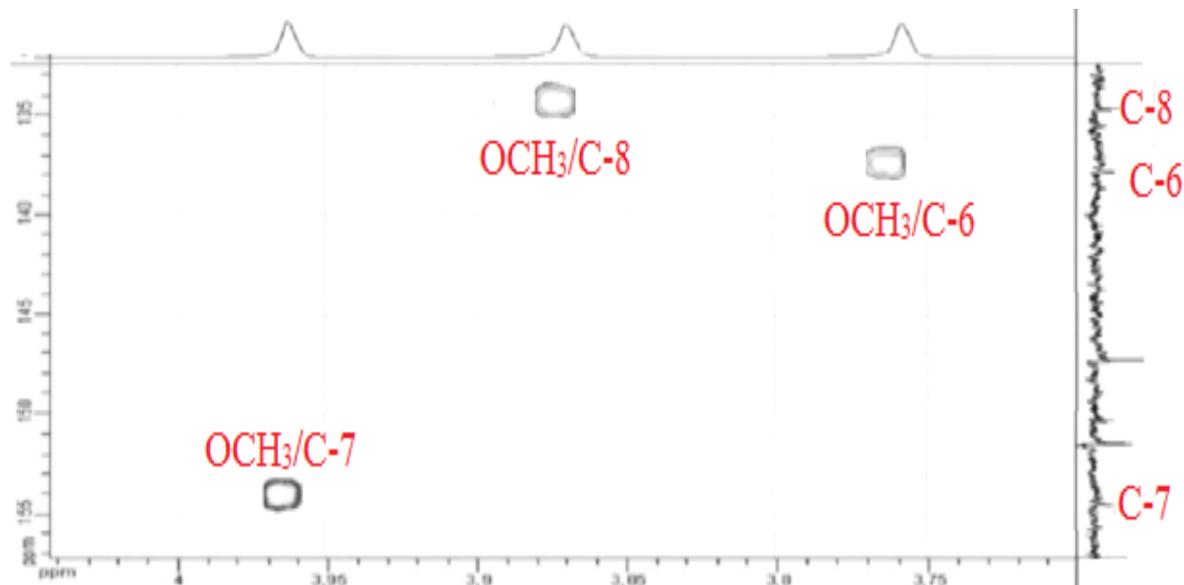
L'étude du spectre RMN ^1H donne les indications suivantes (Spectre IV.66)

- ◆ Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,54$ ppm attribuable à H-3.
- ◆ Trois singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 3,81$; $3,87$ et $3,98$ ppm attribuables à trois groupements méthoxyles
- ◆ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,83$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- ◆ Un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,36$ ppm ($J = 8,4 - 2,1$ Hz) attribuable à H-6'.
- ◆ Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7,38$ ppm avec une constante de couplage de $J = 2,1$ Hz attribuable à H-2'.



Spectre IV.66 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 13

L'analyse du spectre HMBC (**Spectre IV.67**) montre des taches de corrélation entre les trois méthoxyles et leurs carbones, le proton à $\delta_H = 3,81$ ppm corréle avec C-6 à $\delta_C = 136,3$ ppm, le proton à $\delta_H = 3,98$ ppm corréle avec C-7 à $\delta_C = 147,3$ ppm et le proton à $\delta_H = 3,87$ ppm corréle avec C-8 à $\delta_C = 134,2$ ppm.



Spectre IV.67 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 13

Sur la base de l'ensemble de ces données RMN ¹H, ¹³C et HMBC, le composé **13** est identifié comme étant : **5,3,4-trihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone** connu sous le nom de **Sideritiflavone**. [25]

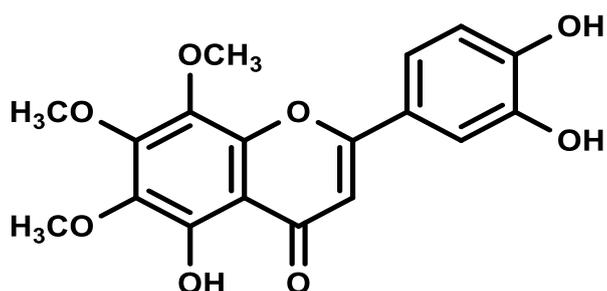


Figure IV.38 : Structure du composé 13 : Sideritiflavone

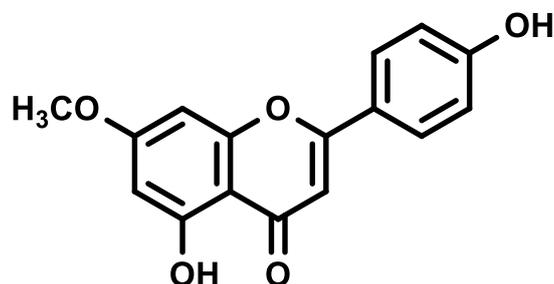
Le tableau IV.15 suivant regroupe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce Composé.

Tableau IV.15: Données de RMN ¹H et ¹³C du composé 13

Position	δ_C	δ_H (m, J Hz)
2	164,7 (C)	-

3	103,72 (CH)	6,54, <i>s</i>
4	184,49 (C)	-
5	151,5 (C)	-
6	136,3 (C)	-
7	147,3 (C)	-
8	134,2 (C)	-
9	147,2 (C)	-
10	107,8 (C)	-
1'	123,52 (C)	-
2'	114,22 (CH)	7,38, <i>d</i> (2,1)
3'	152,45(C)	-
4'	150,1(C)	-
5'	116,89 (CH)	6,83, <i>d</i> (8,4)
6'	120,52 (CH)	7,36, <i>dd</i> (8,4-2,1)
6-OCH₃	61,47(CH₃)	3,81, <i>s</i>
7-OCH₃	62,25 (CH₃)	3,87, <i>s</i>
8-OCH₃	62,68 (CH₃)	3,98, <i>s</i>

IV.1.14. Elucidation structurale du composé 14

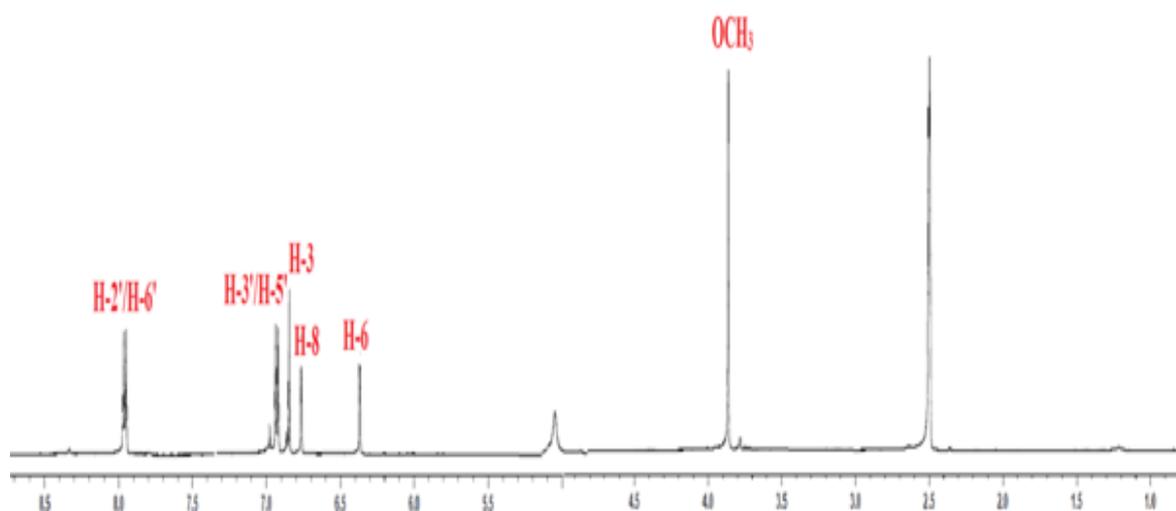


Le composé **14** visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation à l'acide sulfurique oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Une analyse approfondie du spectre RMN ^1H (**SpectreIV.68**) met en évidence la présence de :

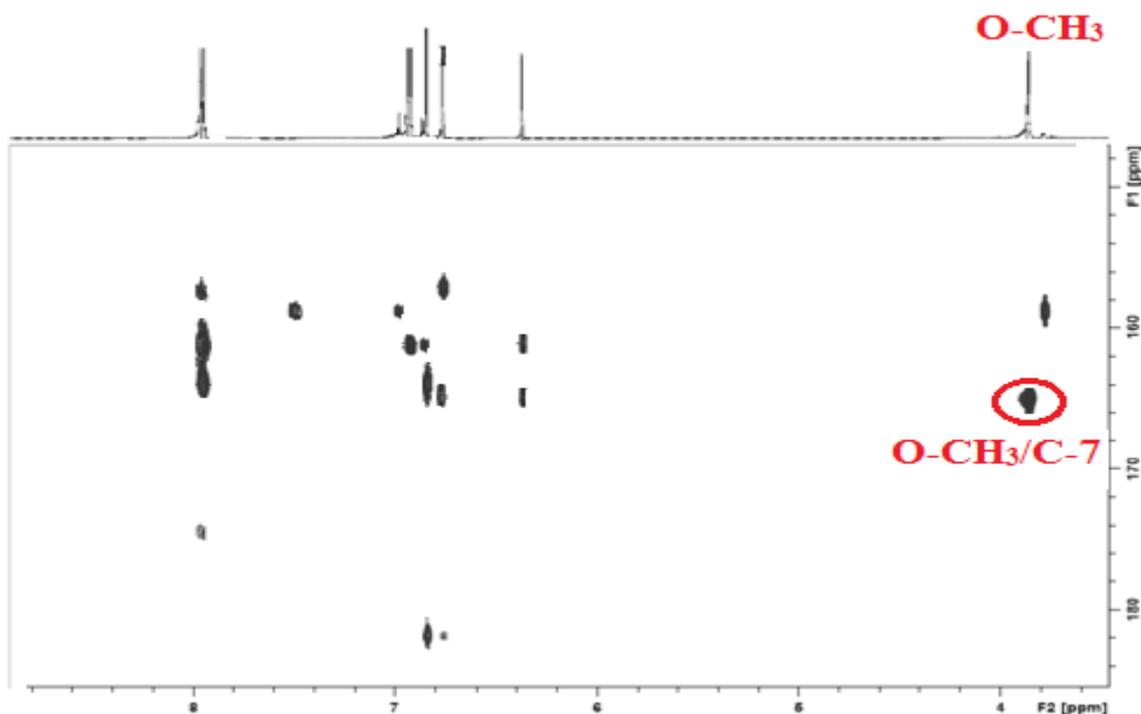
- ✓ deux signaux à $\delta_{\text{H}} = 6,93$ ppm et $7,96$ ppm d'intégration 2H chacun, et ayant la même constante de couplage ($J = 8,8$ Hz), attribués respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B.
- ✓ Un signal singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,37$ ppm ($d, J = 2,3$ Hz) sous forme d'un doublet, est attribué au proton H-6 du cycle A.
- ✓ Un signal singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,77$ ppm ($d, J = 2,3$ Hz) sortant sous forme de doublet également, correspond à H-8 du cycle A.
- ✓ un signal singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,86$ ppm, correspondant à un groupement méthoxyle.
- ✓ Un singulet d'intégrale 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,85$ ppm, est attribué au proton H-3 de la flavone.

Ceci permet de suggérer que le composé **14** est une flavone substituée en C-5, C-7 et C-4'.



Spectre IV.68 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé 14

La position du groupement méthoxyles en C-7 (**Spectre IV.69**) est confirmée par les corrélations OCH_3 (3H, $\delta_{\text{H}}=3,86$ ppm, s)/ C-7 ($\delta_{\text{C}}=64,9$ ppm).



Spectre IV.69: Spectre HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé 14

Ces données (**Tableau IV.16**) permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé 14 la structure de :7-methylapigenine connue sous le nom de **Genkwanine** [26].

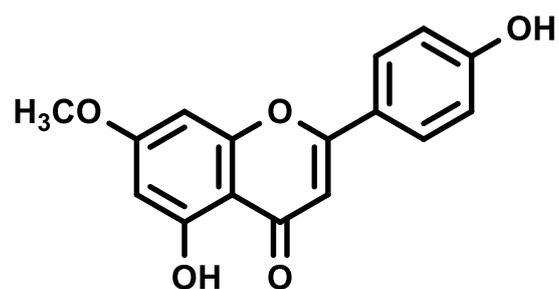
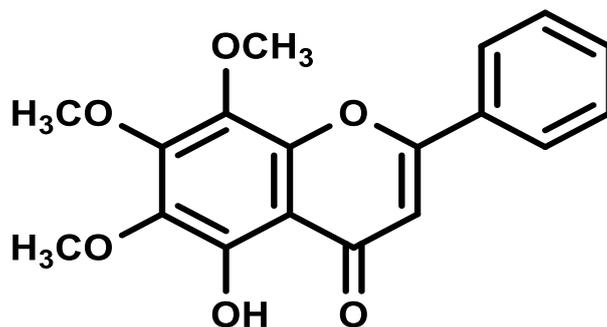


Figure IV.39 : Structure du composé 14 : Genkwanine

Tableau IV.16 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 14

Position	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	164,1 (C)	-
3	103,0 (CH)	6,85, <i>s</i>
4	182,0 (C)	-
5	161,5 (C)	-
6	97,8 (CH)	6,37, <i>d</i> (2,3)
7	164,9 (C)	-
8	92,6 (CH)	6,77, <i>d</i> (2,3)
9	157,1 (C)	-
10	104,8 (C)	-
1'	121,1 (C)	-
2'	128,6 (CH)	7,96, <i>d</i> (8,8)
3'	115,9 (CH)	7,58, <i>d</i> (8,8)
4'	161,3 (C)	-
5'	116,0 (CH)	7,93, <i>d</i> (8,8)
6'	126,6 (CH)	7,96, <i>d</i> (8,8)
O-CH₃	56,1(CH ₃)	3,86, <i>s</i>

IV.1.15. Elucidation structurale du composé 15

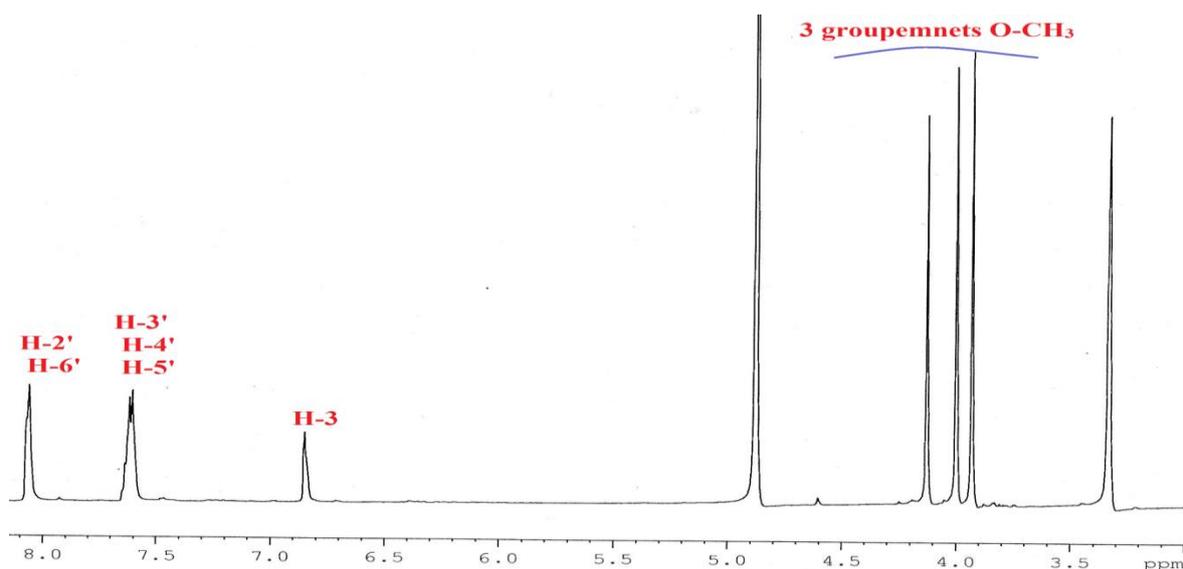


Ce composé est isolé sous forme d'une poudre jaune. Sa fluorescence noire violette sous la lumière UV à 365nm indique un squelette flavone.

Le spectre RMN ^1H (Spectre IV.70) met en évidence la présence de

- ◆ Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,86$ ppm correspondant à l'hydrogène C-3 de la flavone.
- ◆ Trois singulets à $\delta_{\text{H}} = 3,93$; 4,01 et 4,12 ppm respectivement intégrant (3H) chacun et correspondants à la présence de trois groupements méthoxyles
- ◆ Un multiplet d'intégration 2H aromatiques à $\delta_{\text{H}} = 8,07$ ppm.
- ◆ Un multiplet d'intégration 3H aromatiques à $\delta_{\text{H}} = 7,63$ ppm.

Ces deux derniers indiquent la présence d'un noyau aromatique monosubstitué dans la molécule flavonique.



Spectre IV.70 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 15

Pour les groupements aromatiques constituant la structure du composé **15**, le spectre HSQC (**Spectre IV.71**) permet d'assigner à chaque carbone du groupement CH le proton associé par les couplages observés entre :

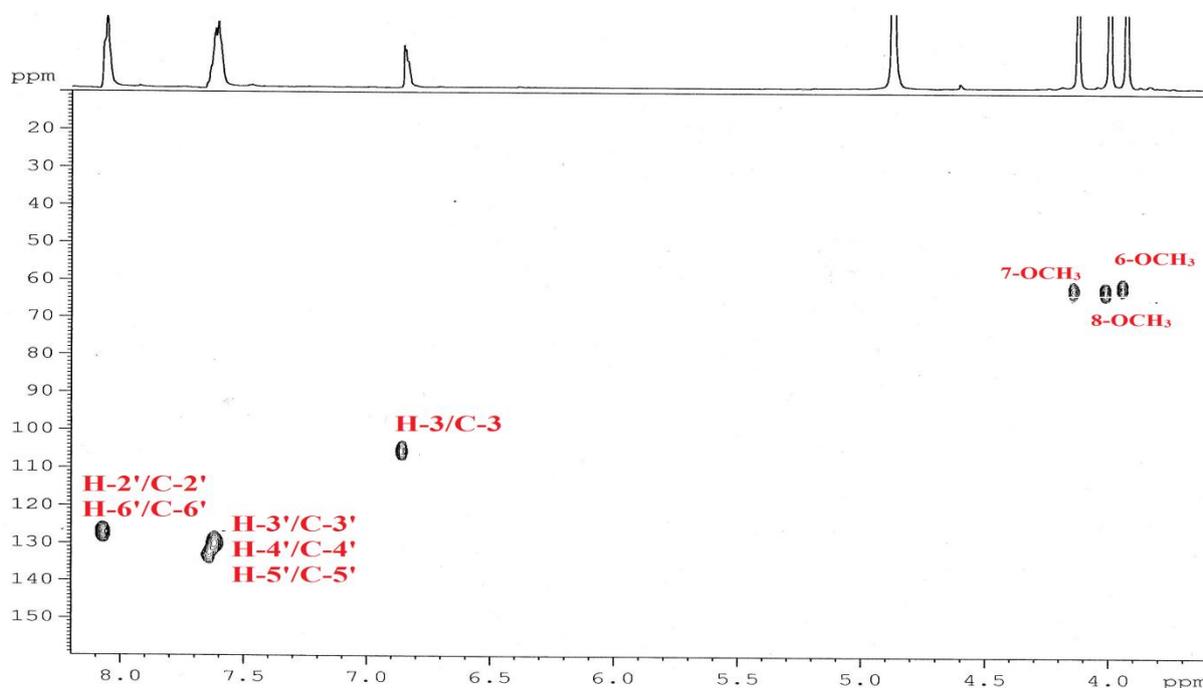
Le proton H-3 à $\delta_H=6,86$ ppm et le carbone à $\delta_C=105,0$ ppm.

Les protons H-2', H-6' à $\delta_H=8,07$ ppm et les carbones à $\delta_C=126,8$ ppm

Le proton H-4' à $\delta_H=7,63$ ppm et le carbone à $\delta_C=132,7$ ppm.

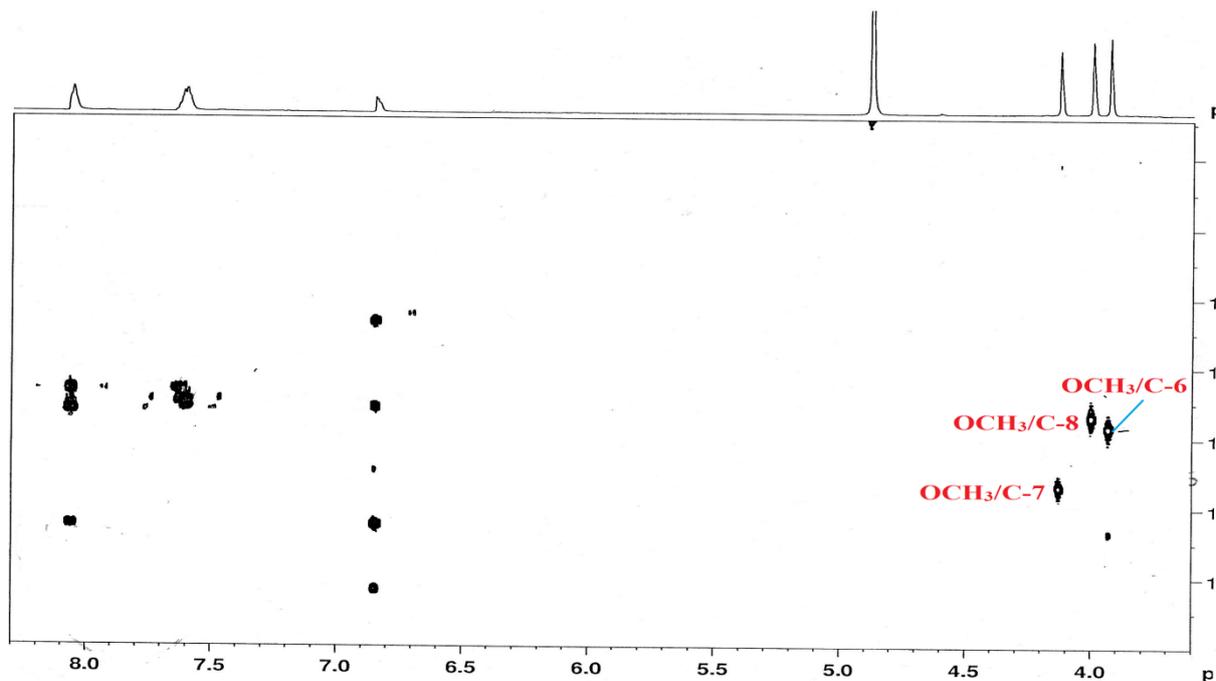
Les protons H-3', H-4' à $\delta_H=6,86$ ppm et le carbone à $\delta_C=127,4$ ppm.

Par ailleurs, les trois singulets, d'intégration 3H chacun, sortant à $\delta_H=3,93$; 4,01 et 4,12 ppm sur le spectre RMN 1H et formant des taches de corrélation sur le spectre HSQC avec les carbones résonant à 60,5 ; 61,9 et 62,2 ppm respectivement, sont attribués aux protons méthoxyliques.



Spectre IV.71 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 15

Les protons des trois groupements méthoxyles corrélient en 3J avec trois carbones aromatiques déblindés : C-6, C-7 et C-8 repérés à $\delta_C=136,6$; 153,4 et 133,5 ppm permettant de placer ces groupements en positions C-6, C-7 et C-8 (**Spectre IV.72**).



Spectre IV.72 : Spectre HMBC (600 MHz, CD₃OD) du composé 15

L'ensemble de ces données (Tableau IV.17), appuyées par celles de la littérature [27] ont permis de conclure sans ambiguïté que la structure du composé 15 n'est autre que le :5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone connu sous le nom Alnetin.

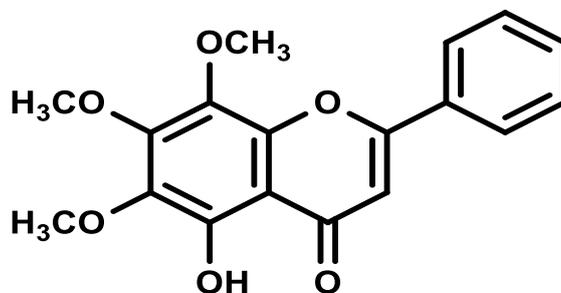
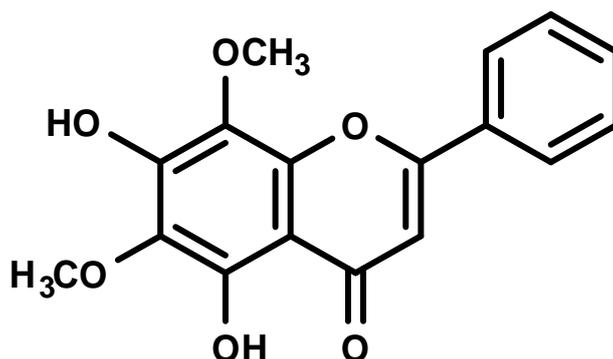


Figure IV.40 : Structure du composé 15 : Alnetine (hydroxy-6, 7,8-triméthoxyflavone)

Tableau IV.17 : Résultats de la RMN ^1H et ^{13}C du composé 15

Position	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	164,7 (C)	-
3	105,0 (CH)	6,86, <i>s</i>
4	183,0 (C)	-
5	148,5 (C)	-
6	136,6 (C)	-
7	153,4 (C)	-
8	133,5 (C)	-
9	156,9 (C)	-
10	107,2 (C)	-
1'	132,0 (C)	-
2'	126,8 (CH)	8,07 ; <i>m</i>
3'	127,4 (CH)	7,63 ; <i>m</i>
4'	132,7 (CH)	7,63 ; <i>m</i>
5'	127,4 (CH)	7,63 ; <i>m</i>
6'	126,8 (CH)	8,07 ; <i>m</i>
6-OCH₃	60,5 (CH ₃)	3,93 ; <i>s</i>
7-OCH₃	61,9 (CH ₃)	4,12 ; <i>s</i>
8-OCH₃	62,2 (CH ₃)	4,01 ; <i>s</i>

IV.2.16. Elucidation structurale du composé 16

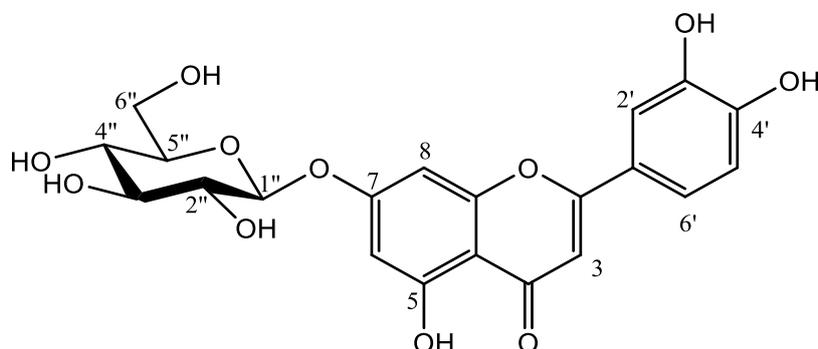


Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol.

Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254/366 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il s'agit d'un flavone appelé **5,7-dihydroxy- 6,8- diméthoxyflavone**.

Les données spectrales RMN ^1H à 600 MHz, réalisées dans le CH_3OH sont conformes à celles rapportées précédemment [28].

IV.1.17. Elucidation structurale du composé 17



Le spectre UV (**Figure IV.41**) enregistré dans le méthanol donne deux bandes d'absorption, une bande I à 346 nm et l'autre bande II à 256 nm, indiquant un squelette de type flavonol 3-OR ou un flavone pour le composé 17.

- ✓ L'effet bathochromique ($\Delta\lambda = + 48$ nm) observé après l'addition de NaOH avec augmentation de son intensité optique indique la présence d'un OH libre en position 4'.
- ✓ L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm suggère l'absence d'un OH libre en position 7.
- ✓ L'ajout de NaOAc n'induit à la solution méthanolique pas de déplacement bathochrome de la bande II, ce qui confirme l'absence de groupement hydroxyle, en position 7,
- ✓ L'addition de H_3BO_3 à la solution MeOH+NaOAc provoque un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 36$ nm) indiquant la présence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B, cette hypothèse est confirmée par le déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -39$ nm), observé sur le spectre enregistré dans MeOH+ $AlCl_3$ +HCl, comparativement à celui enregistré dans la solution MeOH+ $AlCl_3$.
- ✓ Après ajout de HCl à la solution d' $AlCl_3$ +MeOH, on observe un déplacement bathochromique de la bande I de $\Delta\lambda_I = + 43$ nm par rapport à celle observé dans le spectre enregistré dans MeOH, indiquant la présence d'un groupement OH libre en position 5 (**Tableau IV.18**)

La structure partielle reportée dans le schéma suivant (**Figure IV.42**)

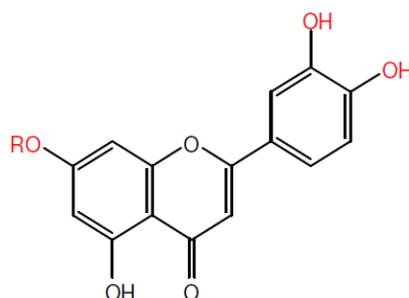


Figure IV.42 : Structure partielle du composé 17

Tableau IV.18 : Données de la série spectrale UV du composé 17

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	346	257	/	flavone
MeOH /NaOH	394	266	/	OH libre en 4`.
MeOH /AlCl ₃	428	273	/	
MeOH /AlCl ₃ +HCl	389	274	/	OH libre en 5
+NaOAc	404	252	/	OR en 5
MeOH /NaOAc+H ₃ BO ₃	382	262	/	3`,4`di-OH sur le cycle B

Spectre stable avec NaOH après 5 mn

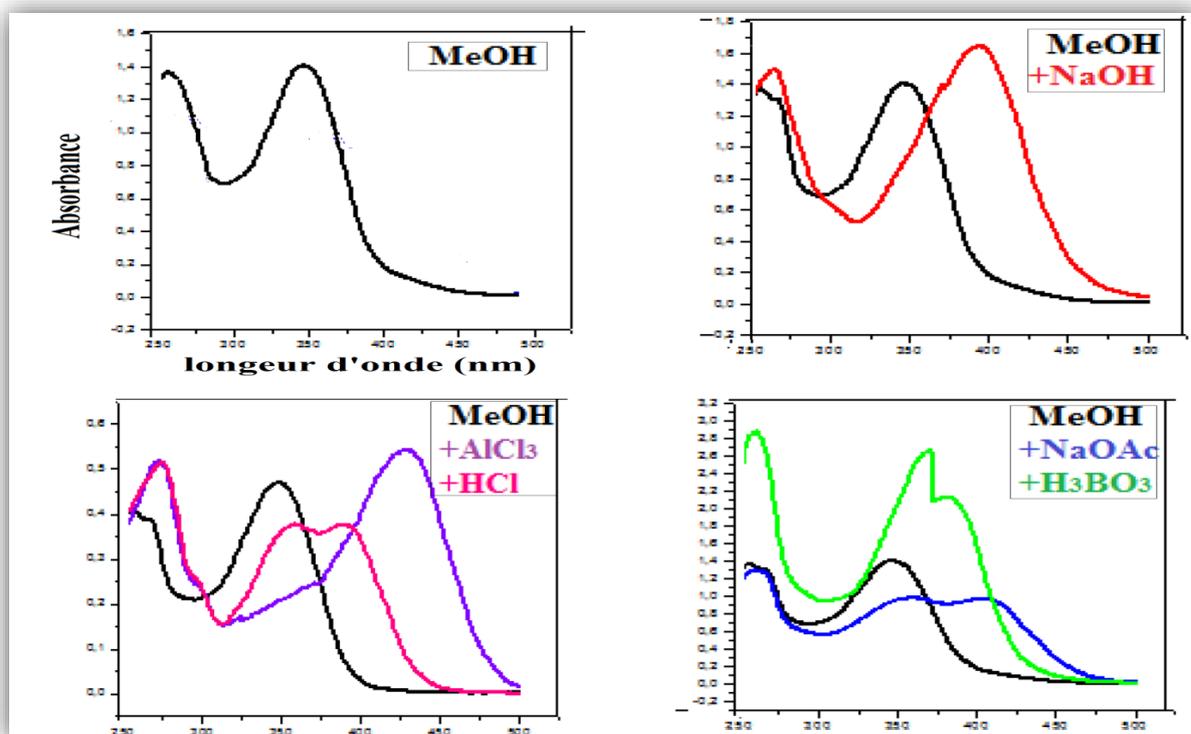
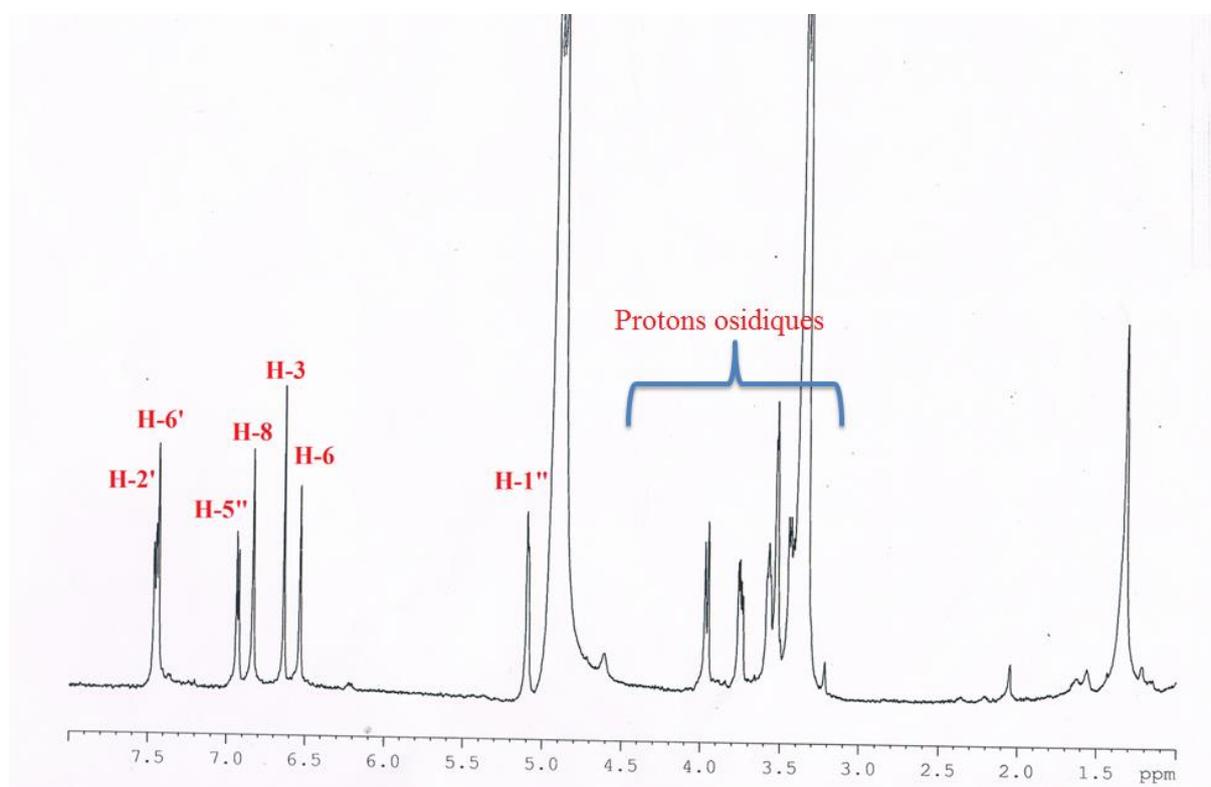


Figure IV.41 : La Série spectrale UV du composé 17

Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV .73**) montre la présence de deux protons aromatiques à $\delta_{\text{H}}=6,50$ ppm (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=6,38$ ppm (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Toujours sur le spectre RMN ^1H , on observe la présence de système ABX du cycle B : $\delta_{\text{H}}= 6,93$ ppm (*d*, $J= 8,3$ Hz, H-5') ; $\delta_{\text{H}}= 7,46$ ppm (*dd*, $J= 8,3-2,3$ Hz, H-6') ; et à $\delta_{\text{H}}= 7,43$ ppm (*d*, $J= 2,3$ Hz, H-2') . Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. Le singulet observé à $\delta_{\text{H}}= 6,64$ ppm est dû à la résonance de H-3, ce qui suggère la structure d'une flavone

Sur le même spectre, on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}}= 5,1$ ppm ($J = 7,4$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, d'après la valeur de son déplacement chimique, par un pont oxygène



Spectre IV .73: Spectre RMN ^1H étalé (CD_3OD , 500 MHz) du composé 17

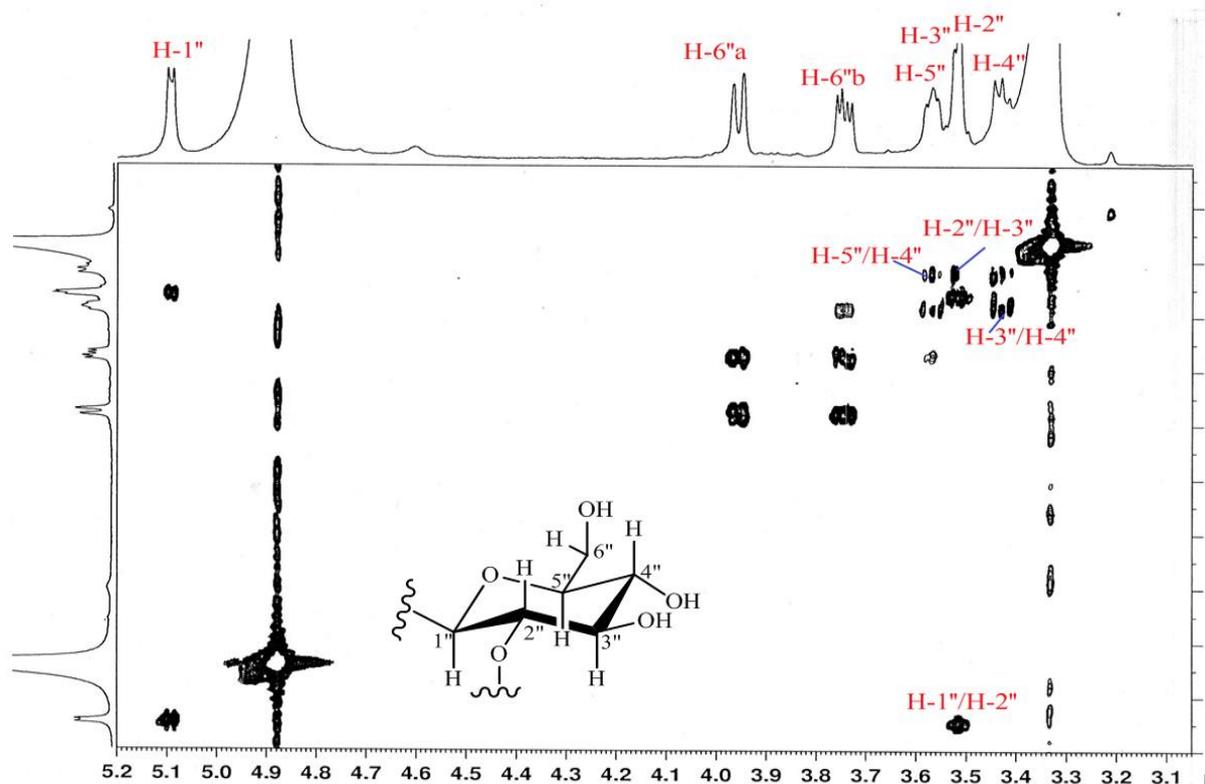
Par ailleurs , l'examen du spectre COSY 1H-1H enregistré dans CD_3OD et ses étalements (**Spectre IV.74**) permet en effet de mettre en évidence:

- La présence de H-2'' à $\delta_{\text{H}} = 3,53$ ppm sous forme d'un doublet de doublet (*dd*, $J = 8,4-7,4$ Hz) partiellement recouvert par d'autres signaux, par sa corrélation avec le H-1''.
- La localisation de H-2'' permet d'attribuer H-3'' au signal sous forme de doublet de doublet (*dd*, $J = 8,4-7,8$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 3,53$ ppm.

- Ce dernier noyau permet par sa corrélation l'attribution de H-4'' à $\delta_H = 3,44$ ppm. Ce signal apparaissant sous forme d'un triplet ($t, J = 7,8\text{Hz}$)
- L'attribution de H-4'' permet à son tour de localiser H-5'' sous forme de multiplet à $\delta_H = 3,58$ ppm
- Ce dernier noyau (H-5'') mène à l'attribution de H-6''b à $3,66$ ppm (1H, $dd, J = 11,6, 6,6$ Hz) et à H-6''a à $\delta = 3,97$ ppm (1H, $dd, J = 11,6, 2,0$ Hz).

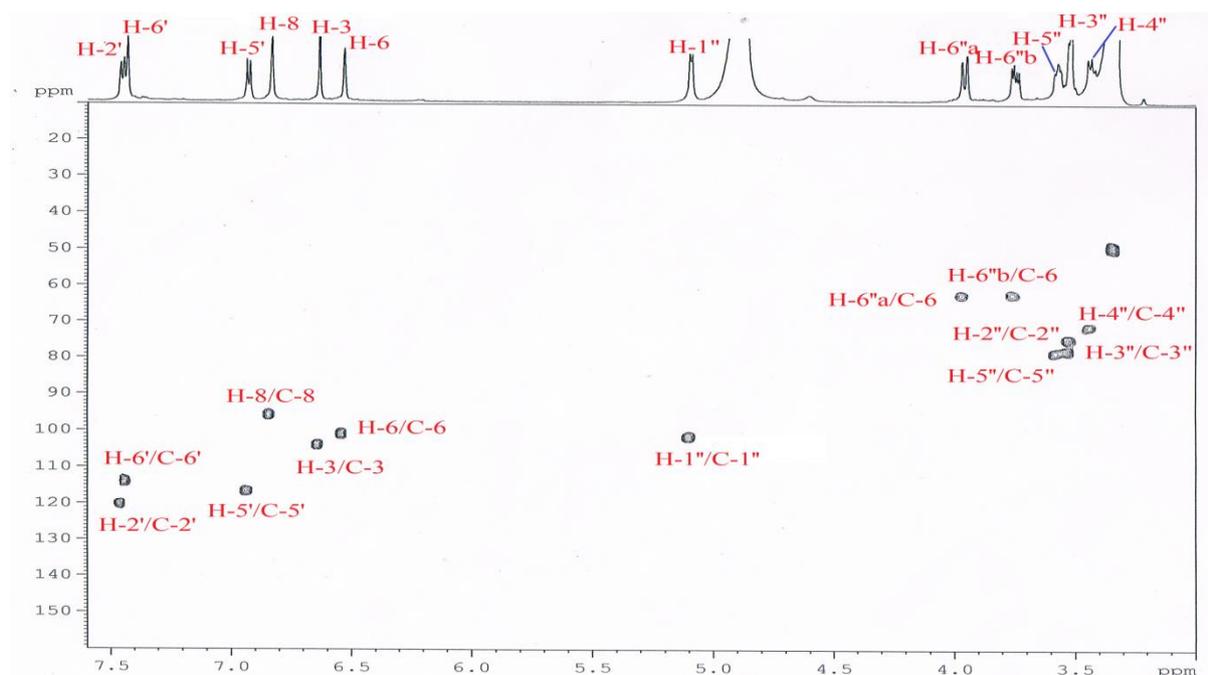
Les valeurs du déplacement chimique et de la constante de couplage de H-1'' indiquent qu'ils'agit d'un $-O-$ β -glucosyle.

Ces données sont caractéristiques d'un hexose de type glucose



Spectre IV .74: Spectre COSY étalé (CD_3OD , 500 MHz) du composé 17

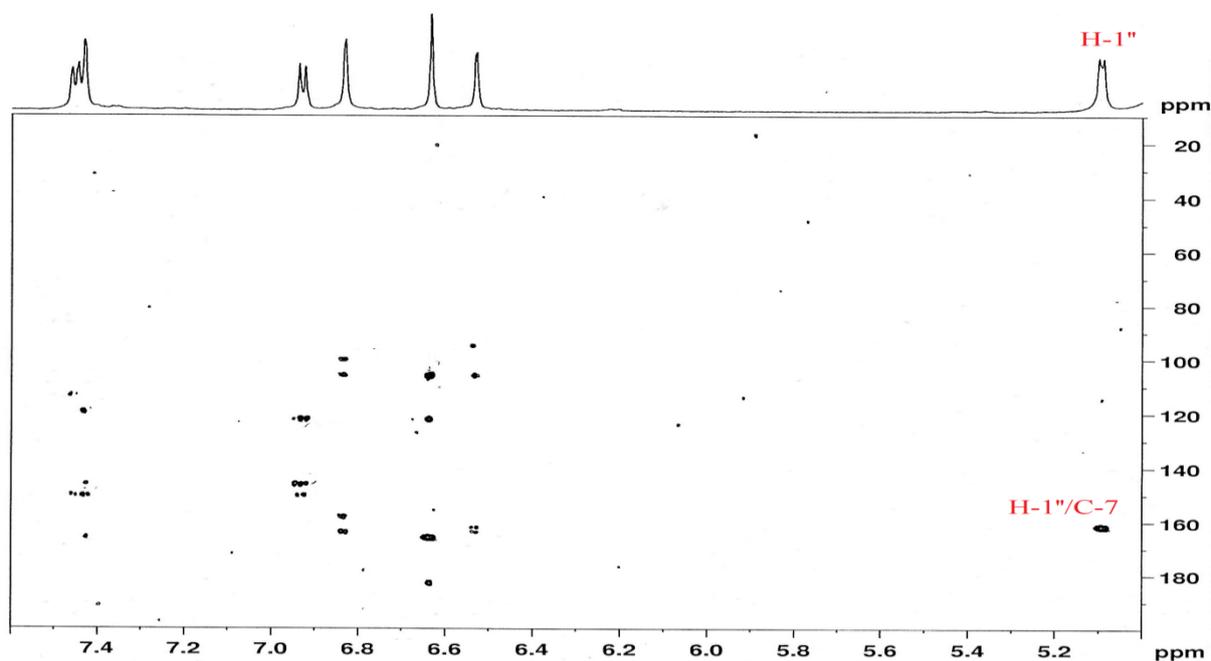
L'analyse du spectre HSQC (Spectre IV .75) permet d'attribuer chaque proton au carbone qui le porte.



SpectreIV.75 : Spectre RMN ^1H (CD₃OD, 500 MHz) du composé 17

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' et le carbone

C-7 confirme que le glucose est attaché à la génine en position 7 (Spectre IV.76).



Spectre IV.76: Spectre HMBC (CD₃OD, 500 MHz) du composé 17

Sur la base de l'ensemble de ces données le composé **17** est identifié comme étant **Lutéoline-7-O- β -glucoside** [26].

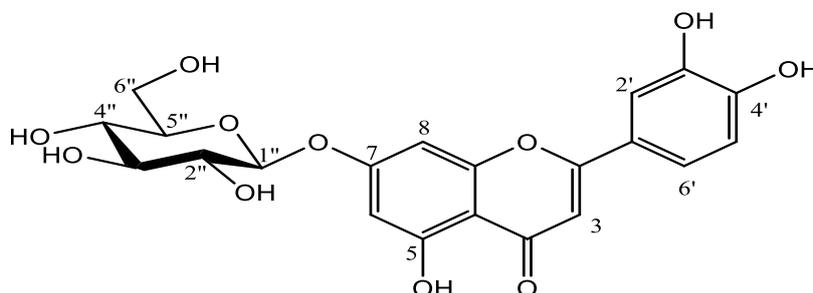


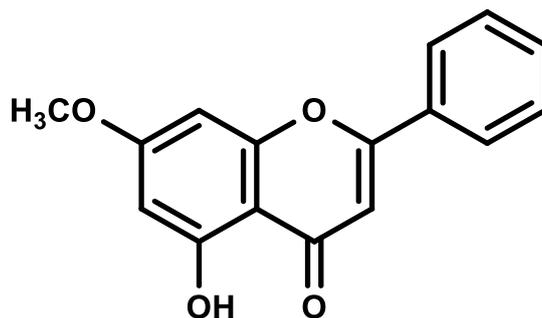
Figure IV.43 : Structure du composé **17**: Lutéoline-7-O- β -glucoside

Tableau IV.19 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé **17**

Position	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	165,8 (C)	-
3	103,0 (CH)	6,64, <i>s</i>
4	182,0 (C)	-
5	161,0 (C)	-
6	100,3 (CH)	6,54, <i>d</i> (1,98)
7	163,8 (C)	-
8	95,6 (CH)	6,48, <i>d</i> (1,98)
9	157,8 (C)	-
10	106,3 (C)	-
1'	122,8 (C)	-
2'	116,4 (CH)	7,47, <i>m</i>
3'	146,31 (CH)	-
4'	150,0 (CH)	-
5'	113,8 (CH)	6,93, <i>m</i>
6'	120,0 (CH)	7,44, <i>m</i>
Glucose		
1''	101,30(CH)	5,10, <i>d</i> (7,4)
2''	74,70(CH)	3,53, <i>dd</i> (8,4-7,4)
3''	78,90(CH)	3,53, <i>dd</i> (8,4-7,8)

4''	70.90(CH)	3,44, <i>t</i> (7,8)
5''	78.50(CH)	3,58; <i>m</i>
6''	61.90(CH)	3,66, <i>dd</i> (11,6 -6,6) 6''b 3,97, <i>dd</i> (11,6 -2,0) 6''a

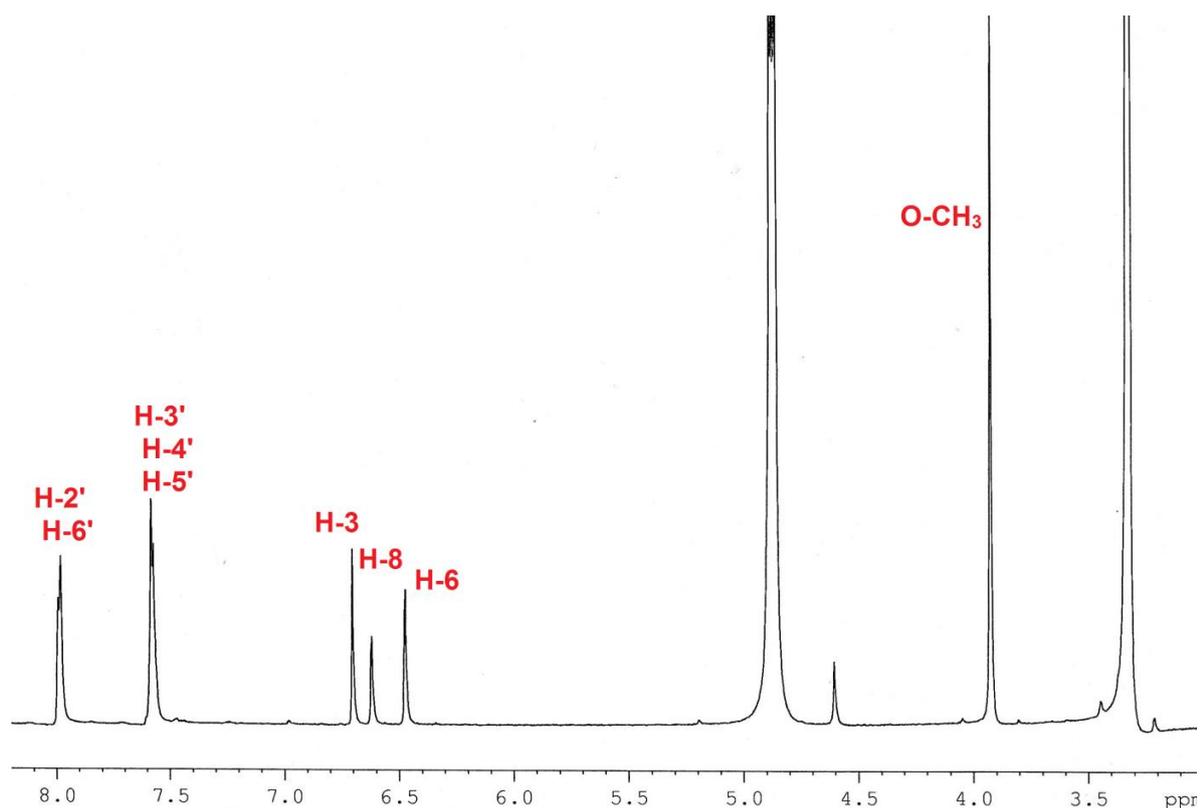
IV.1.18. Elucidation structurale du composé 18



Ce produit se présente sous forme d'un précipité jaune de fluorescence violet noire sous lampe UV à 365nm, oriente vers une structure d'une flavone ou flavonol substitué en 3(3-OR) L'étude de la série spectrale UV (**Figure IV.44**) montre :

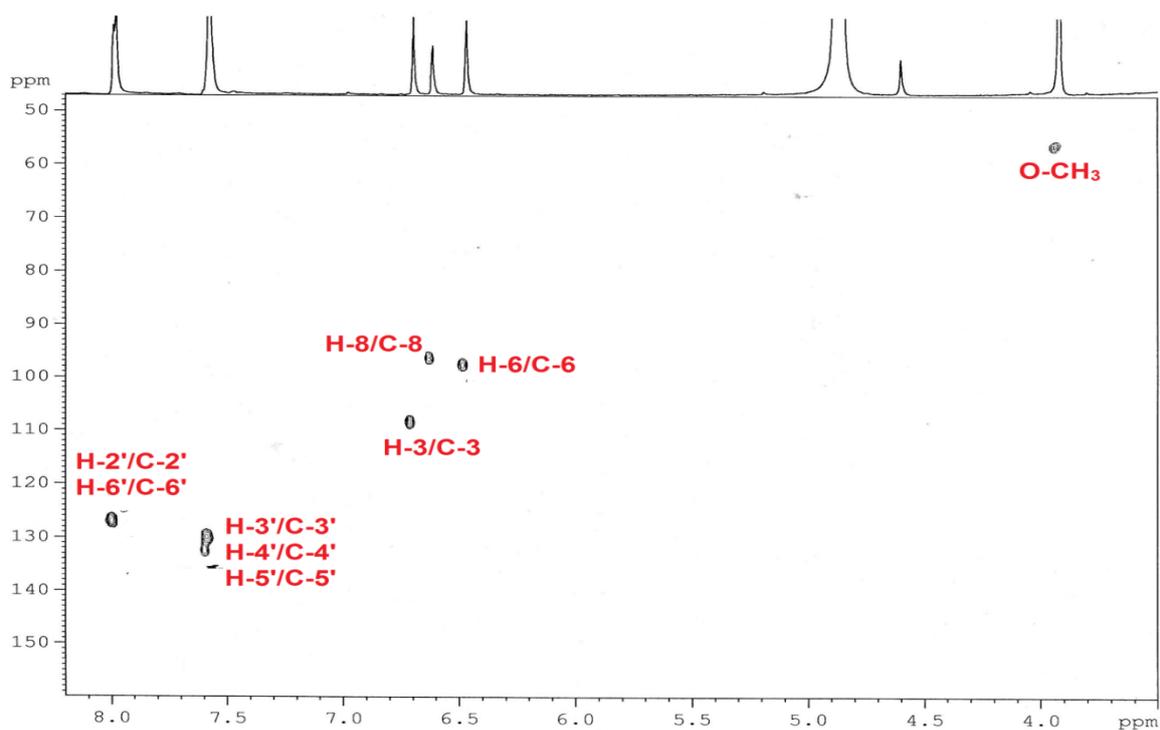
Le spectre de RMN du ^1H , réalisé dans le CD_3OD (**Spectre IV.77**) , permet d'observer des signaux compatibles avec la structure d'une flavone dans la région des aromatiques. On observe en effet :

- ◆ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H avec une constante de couplage ($J=2,0$, Hz) apparait à $\delta_{\text{H}}= 6,48$ ppm correspond au proton H-6.
- ◆ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H avec une constante de couplage ($J=2,0$, Hz) apparait à $\delta_{\text{H}} = 6,62$ ppm correspond au proton H-8.
- ◆ Un signal sous forme de multiplet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}}=7,58$ ppm attribuable aux protons H-3', H-4' et H-5'.
- ◆ Un signal sous forme de multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}}=8,0$ ppm attribuable aux protons H-2' et H-6'.
- ◆ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H apparait à $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm correspond au proton H-3.
- ◆ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H apparait à $\delta_{\text{H}} = 3,92$ ppm correspond au groupe méthoxyle (OCH_3).



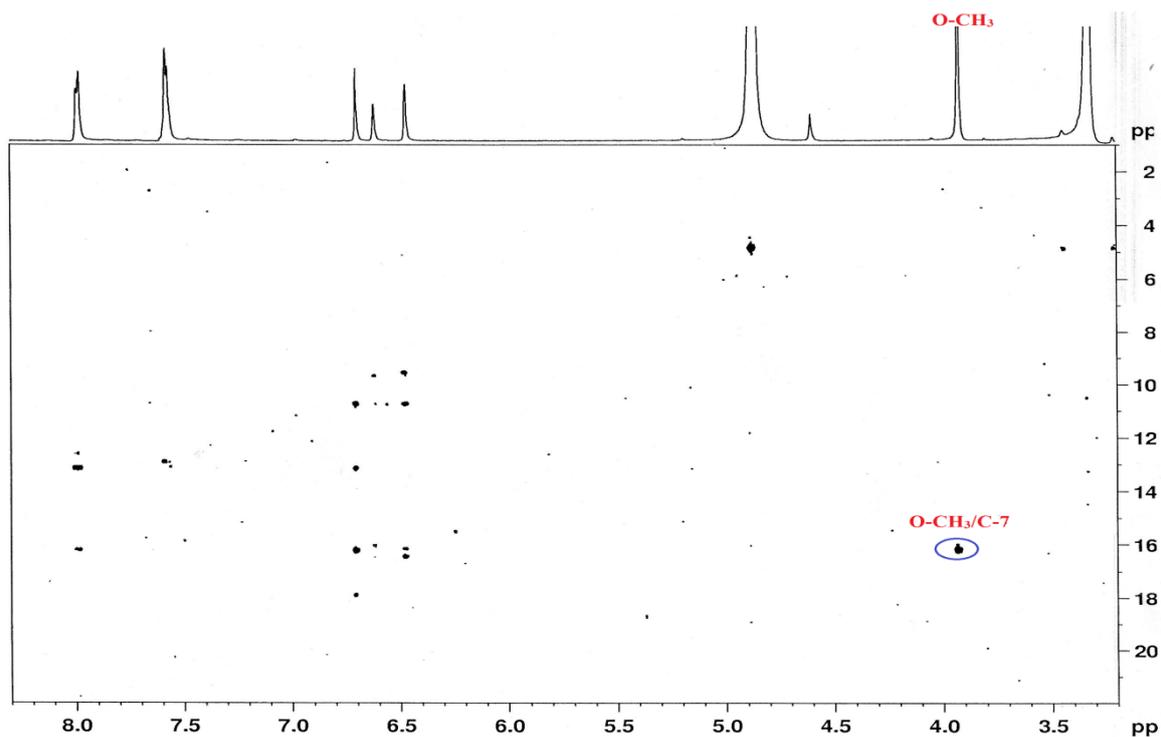
Spectre IV.77 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 18

L'examen du spectre de l'expérience HSQC (**Spectre IV.78**) permet de localiser les carbones : C-2' et C-6' ; C-3' et C-5' ; C-4' ; C-3 ; C-6 ; C-8 à $\delta_{\text{C}} = 126,6$; 129,4 ; 132,3 ; 108,0 ; 97,3 ; 96,1 ppm respectivement. Le spectre HSQC permet également d'attribuer le carbone du groupement méthoxyle à $\delta_{\text{C}} = 56,6$ ppm.



Spectre IV.78 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 18

Le spectre RMN 2D, HMBC (Spectre IV.79) montre une corrélation entre le carbone C-7 à 161,7 ppm avec le signal à $\delta_{\text{H}} = 3,92$ ppm, ce qui permet de placer ce méthoxyle en C-7.



Spectre IV.79: Spectre HMBC (CD_3OD , 600 MHz) du composé 18

L'ensemble de ces données et la comparaison avec celles de la littérature [29] mènent donc à la structure finale du composé 18: le **5-Hydroxy-7-méthoxyflavone**, connue sous le nom de **Tectochrysin**.

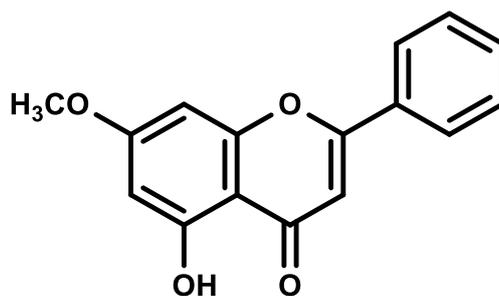
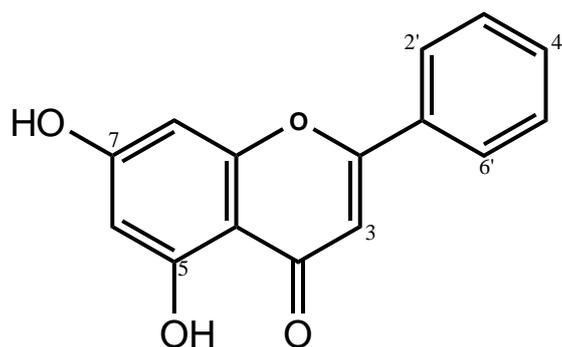


Figure IV.45 : Structure du composé 18 : Tectochrysin

Tableau IV.21 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 18

Position	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	161,8 (C)	-
3	108,0 (CH)	6,71, <i>s</i>
4	180,0 (C)	-
5	164,4 (C)	-
6	97,3 (CH)	6,48, <i>d</i> (2,0)
7	161,7 (C)	-
8	96,1 (CH)	6,62, <i>d</i> (2,0)
9	156,9 (C)	-
10	106,9 (C)	-
1'	131,3 (C)	-
2'	126,6 (CH)	8,0, <i>m</i>
3'	129,4 (CH)	7,58, <i>m</i>
4'	132,3 (CH)	7.58, <i>m</i>
5'	129,4 (CH)	7.58, <i>m</i>
6'	126,6 (CH)	8.0, <i>m</i>
O-CH₃	56,6 (CH ₃)	3,92, <i>s</i>

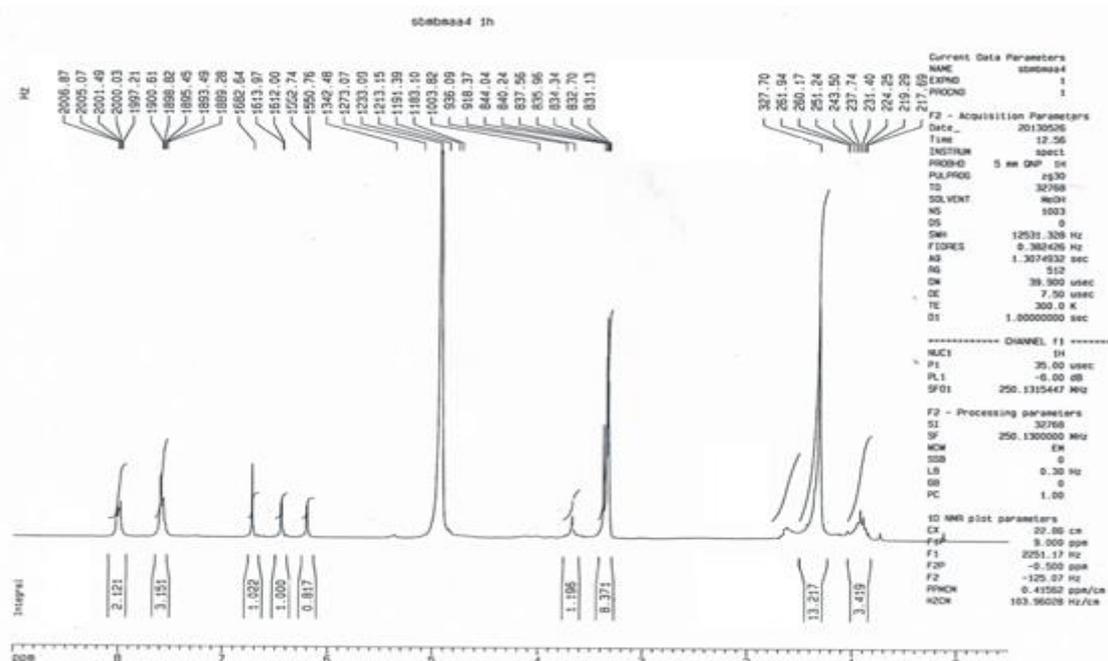
IV.1.19. Elucidation structurale du composé 19



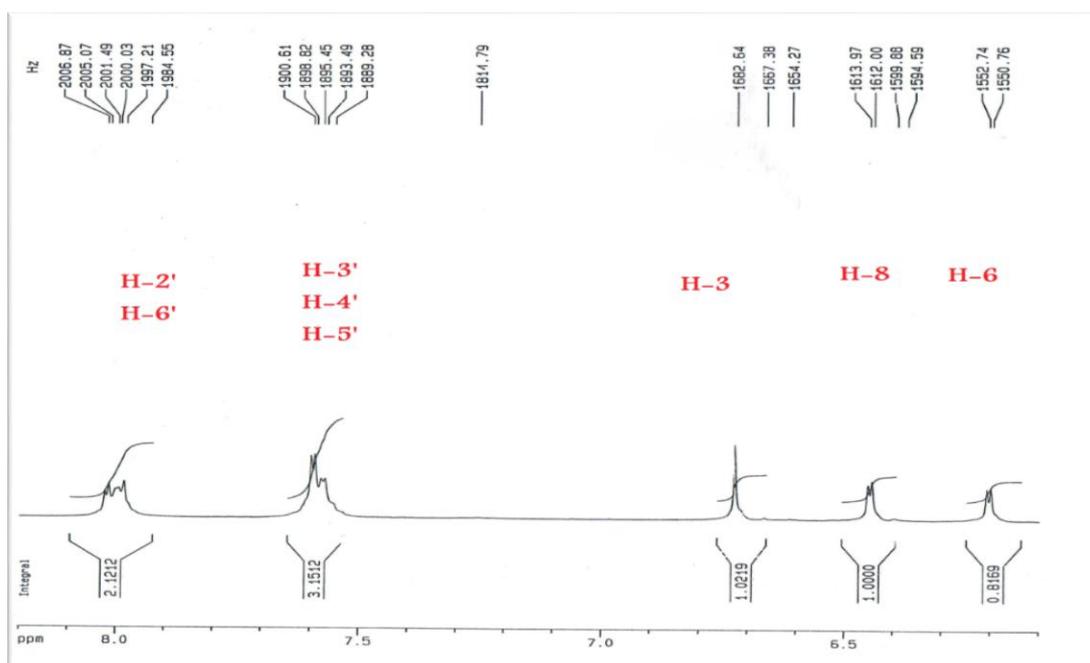
La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol substitué en C-3.

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.80**) et son étalement (**Spectre IV.81**) montre :

- ◆ Un signal à $\delta_{\text{H}}=6,21$ ppm (*d*, $J = 2,0$ Hz) sous forme d'un doublet, est attribué au proton H-6 du cycle A.
- ◆ Un signal à $\delta_{\text{H}}=6,46$ ppm (*d*, $J = 2,0$ Hz) sortant sous forme de doublet également, correspond à H-8 du cycle A.
- ◆ Deux protons sous forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 7,98$ ppm correspondent aux protons H-2' et H-6' du cycle B.
- ◆ Trois protons se présentant comme multiplet à $\delta_{\text{H}}=7,60$ ppm, sont attribués aux protons H-3' et H-4' et H-5' du cycle B.
- ◆ Un singulet à $\delta_{\text{H}}= 6,72$ ppm, est attribué au proton H-3 de la flavone.



Spectre IV.80 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 250 MHz) du composé 19



Spectre IV.81: Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 250 MHz) du composé 19

L'ensemble de ces données sont en accord avec ceux de la littérature [30] mènent à la structure : **Chrysin**.

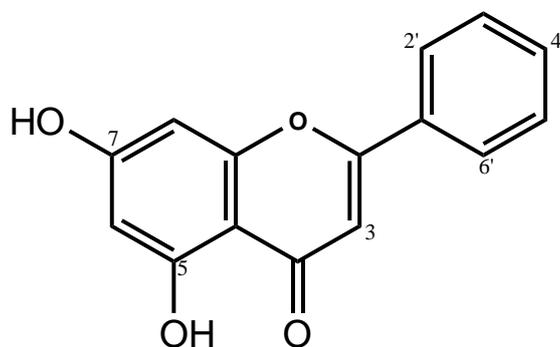


Figure IV.46 : Structure du composé 19 : Chrysin

Le tableau IV.22 résume tous les déplacements chimiques des protons et carbones de cette molécule.

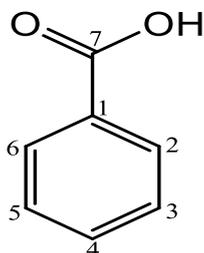
Tableau IV.22 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 19

Position	δ_{H} (m, J Hz)
2	-
3	6,72, s
4	-
5	-

6	6,21, <i>d</i> (2,0)
7	-
8	6,46, <i>d</i> (2,0)
9	-
10	-
1'	-
2'	7,98, <i>m</i>
3'	7,60, <i>m</i>
4'	7,60, <i>m</i>
5'	7,60, <i>m</i>
6'	7,98, <i>m</i>

IV.2. Identification des produits de *Lotus corniculatus*

IV.2.1. Elucidation structurale du composé 20

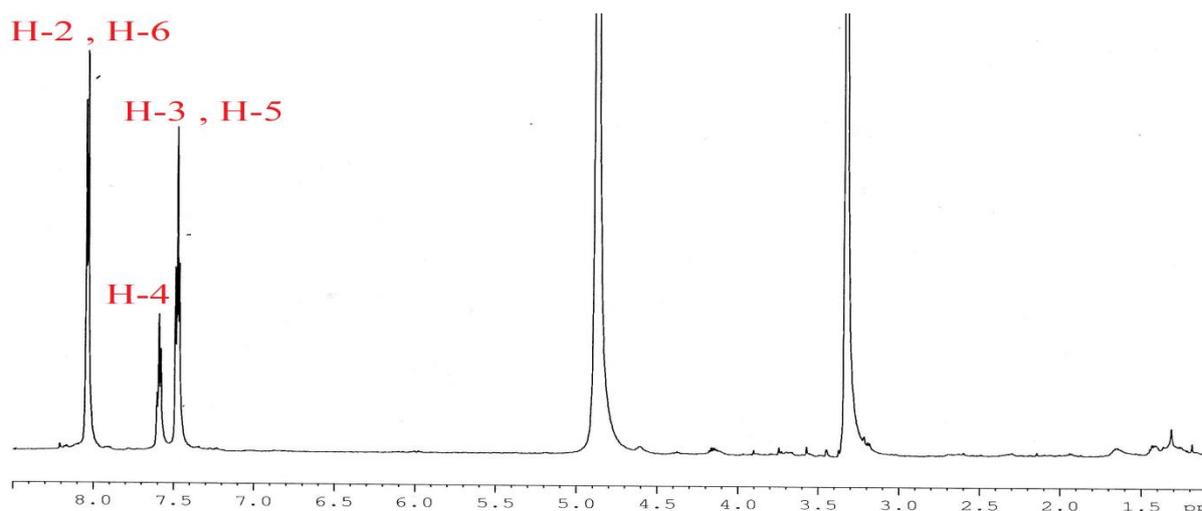


Ce composé qui a été isolé sous forme d'une poudre blanche est visible sur CCM à $\lambda = 254$ et 366 nm.

Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV. 82**) de ce composé indique sa simplicité par le nombre des signaux qu'il présente dans la zone aromatique.

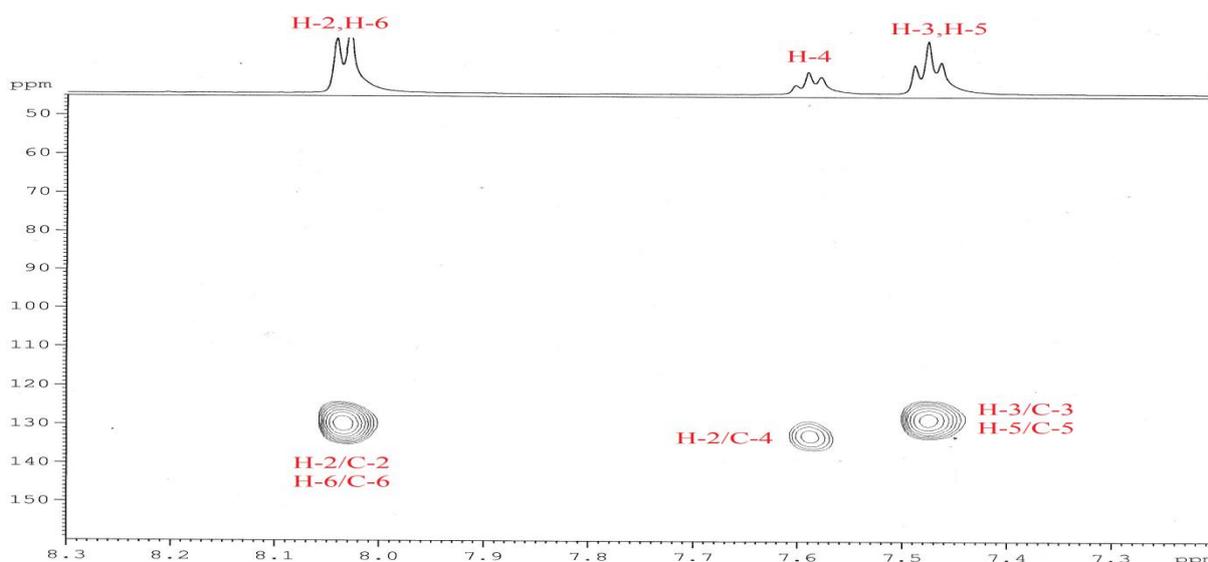
L'examen de ce spectre (**Spectre IV. 82**), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique mono substitué est caractérisé par :

- ◆ un doublet de doublet d'intégration 2H ($J=8,1-1,5\text{Hz}$) à $\delta_{\text{H}}=8,06$ ppm, attribué aux protons *ortho* H-2/H-6.
- ◆ un triplet d'intégration 2H ($J=8,1\text{Hz}$) à $\delta_{\text{H}}=7,47$ ppm. attribué aux protons *méta* H-3/H-5.
- ◆ un triplet large d'intégration 1H ($J=8,1\text{Hz}$) à $\delta_{\text{H}}=7,6$ ppm attribué au proton en position *para* H-4



Spectre IV.82 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 20

Les carbones de ces protons sont visualisés à $\delta_{\text{C}}=130,0$ ppm (C-2/C-6) et $\delta_{\text{C}}=128,6$ ppm (C-3/C-5). $\delta_{\text{C}}=132,4$ ppm (C-4) respectivement selon l'expérience HSQC (**Spectre IV.83**).



Spectre IV.83 : Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 83

La comparaison de ces attributions avec celles de la littérature [31] confirme l'identification du composé **20** à l'Acide benzoïque.

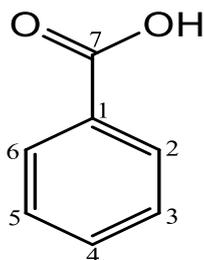


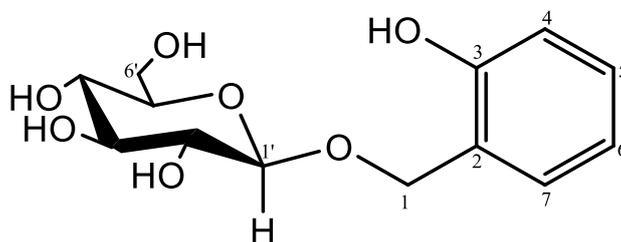
Figure IV.47 : Structure du composé 20 : L'acide benzoïque

Les données de la RMN ¹³C et ¹H sont rassemblées dans le tableau IV.23

Tableau IV.23 : Donnés RMN ¹H et RMN ¹³C du composé 20

N°	δ _C	δ _H (m, J Hz)
1	129,4 (C)	-
2	130,0(CH)	8,06, <i>d</i> (8,1-1,5)
3	128,6(CH)	7,47, <i>t</i> (8,1)
4	132,4(C)	7,60, <i>t</i> (8,1)
5	128,6 (CH)	7,47, <i>t</i> (8,1)
6	130,0(CH)	8,06, <i>d</i> (8,1 - 1,5)
7	170,0(CH)	-

IV.2.2. Elucidation structurale du composé 21



Ce produit se présente sous forme d'une poudre de couleur marron et de fluorescence bleu foncé sous lampe UV à 365 nm.

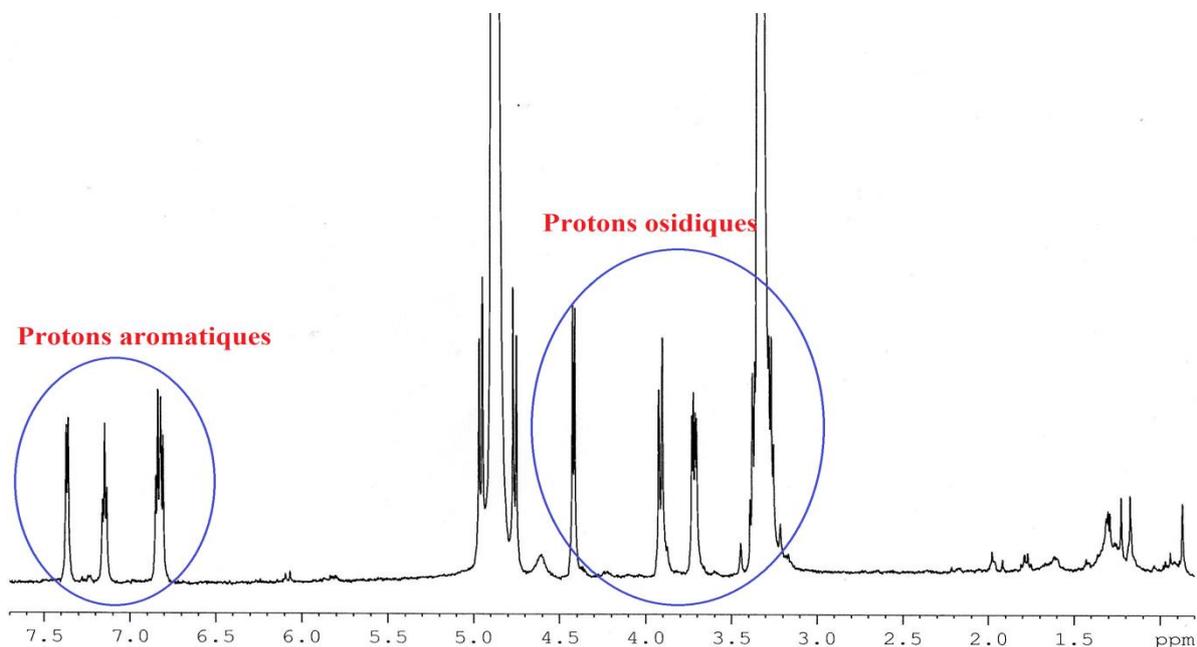
L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre IV.84**) et la séquence HSQC (**Spectre IV.85**), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique bi-substitué est caractérisé par :

- ✓ Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=7,37$ ppm (*dd*, $J=7,9 ; 1,3$ Hz) porté par le carbone situé à $\delta_{\text{C}}=131,2$ ppm
- ✓ Un autre doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=7,16$ ppm (*dd*, $J=7,4-1,3$ Hz) porté par le carbone situé à $\delta_{\text{C}}=129,3$ ppm
- ✓ Un triplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,85$ ppm (*t*, $J=7,4$ Hz) porté par le carbone situé à $\delta_{\text{C}}=119,5$ ppm.
- ✓ Un autre doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}}=6,82$ ppm (*d*, $J=7,9$ Hz) porté par le carbone situé à $\delta_{\text{C}}=115,5$ ppm.

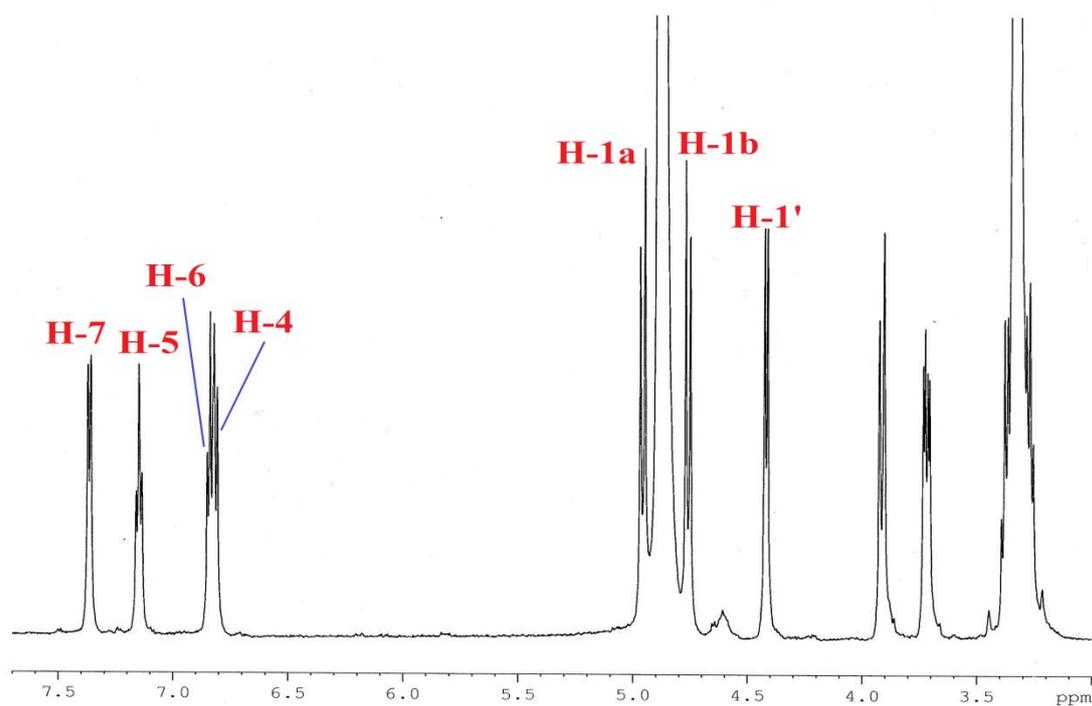
Ces signaux sont caractéristiques d'un noyau aromatique ortho di-substitué :

- ✓ Deux doublets d'intégration 1H pour chacun, formant un système AB à $\delta_{\text{H}}=4,96$ ppm (1H ; *d* ; $J=11,9$ Hz) et à $\delta_{\text{H}}=4,77$ ppm (1H, *d*, $J=11,9$ Hz), portés par le même carbone résonant à $\delta_{\text{H}}=67,3$ ppm, attribuable au groupement méthylène oxygéné CH₂-O.
- ✓ Un doublet centré sur $\delta_{\text{H}}=4,43$ ppm ($J=7,7$ Hz) relatif au proton H-1' d'un β -glucose, porté par le carbone résonant à $\delta_{\text{H}}=103,2$ ppm montre sa corrélation par un pont oxygéné.
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6'a, H-6'b à $\delta_{\text{H}}=3,92$ ppm (*dd*; $J=11,4 - 1,8$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=3,82$ ppm (*dd*, $J=11,4 - 5,3$ Hz) respectivement.

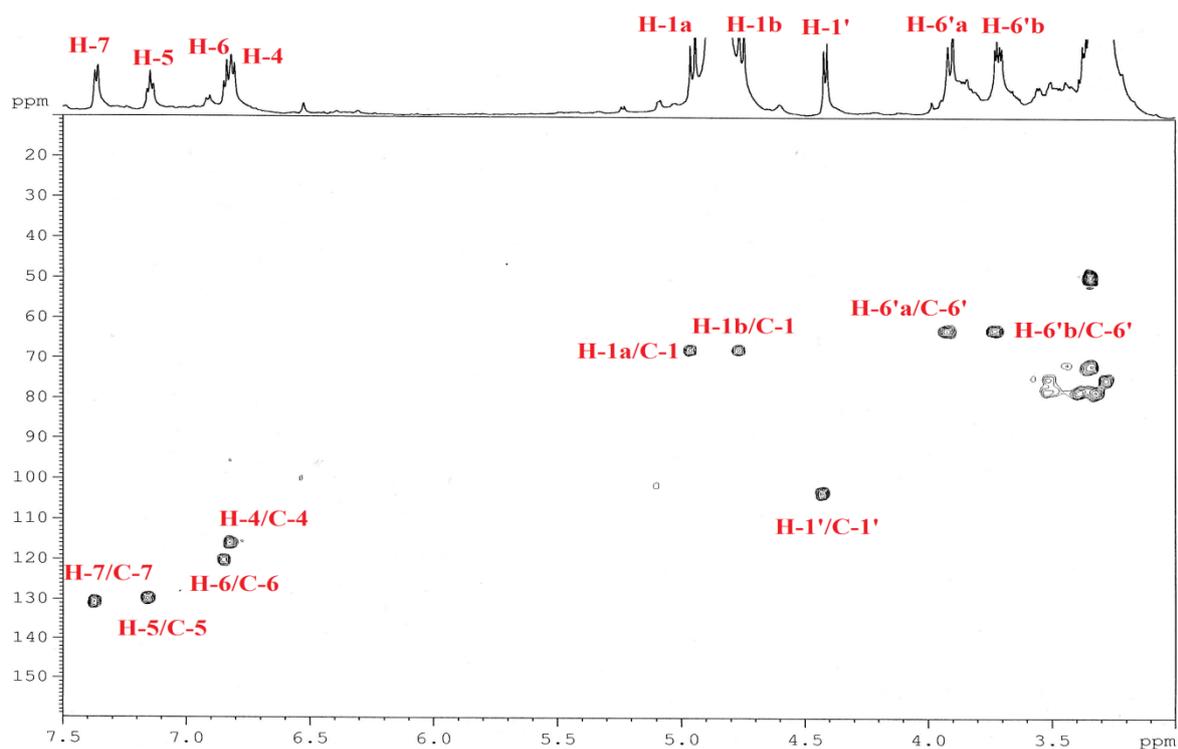
- ✓ Un ensemble de multiplets dans l'intervalle $\delta_H = 3.30 ; 3.40$ ppm, attribuable aux protons 2',3', 4', 5' du sucre, portés par les carbones résonant à $\delta_H = 74.8 ; 77.6 ; 71.6$ et 77.8 ppm respectivement.



Spectre IV.84 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 21



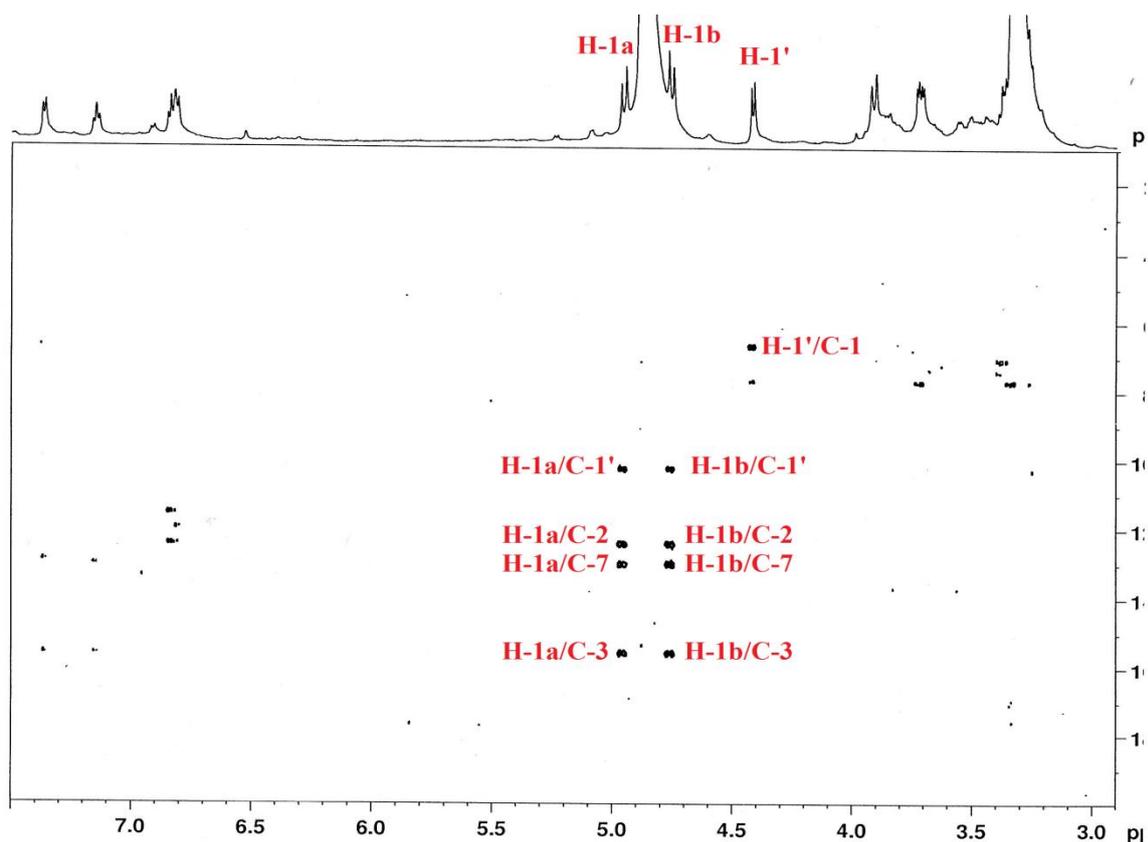
Spectre IV.84 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 20



Spectre IV.85 : Spectre RMN HSQC (CD_3OD , 600 MHz) du composé 21

L'analyse du spectre HMBC (**Spectre IV.86**) montre une corrélation entre les protons $-\text{CH}_2$ et le carbone résonnant à $\delta_{\text{C}} = 126,5\text{ppm}$ (C-2), atteste que le noyau aromatique est branché en cette position au groupement méthylène ce qui forme un groupement benzylique.

la présence d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (**Spectre IV.86**) entre le carbone du groupement méthylène (C-1) résonant à $\delta_{\text{H}} = 67,3\text{ppm}$ et le proton anomérique H-1', ainsi que les corrélations entre les protons $-\text{CH}_2$ benzyliques et le carbone anomérique C-1' indique que le point de branchement du glucose avec l'aglycone benzylique est localisé en position C-1.



Spectre IV.86 : Spectre RMN HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 21

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données de la littérature [32] qui nous mènent à la structure : **2-hydroxybenzyl β-D-glucopyranoside** connue également sous le nom **Isosalicin**. Ce composé isolé pour la première fois de *lotus corniculatus*, a été isolé antérieurement de l'espèce *Lotus pusillus Medik* [33].

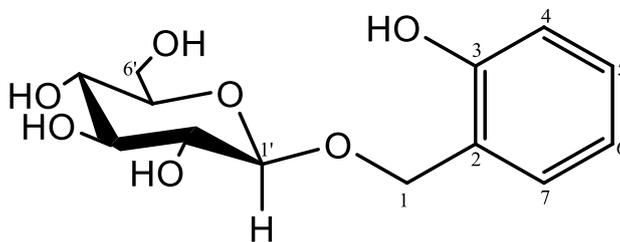


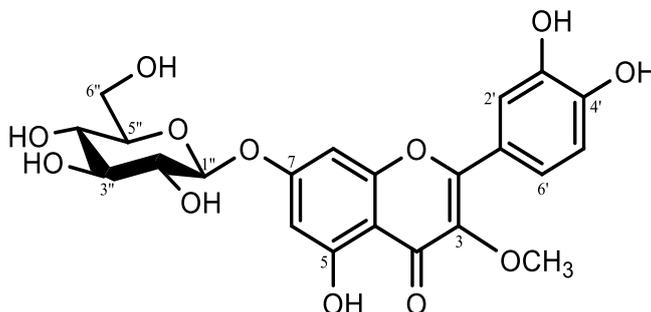
Figure IV.48 : Structure du composé 21 : Isosalicin

Les données de la RMN ¹H, ¹³C sont rassemblées dans le tableau IV.24.

Tableau IV.24 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 21

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
1	67,3 (CH₂)	4.96, <i>d</i> (11.9) H-1a 4.77, <i>d</i> (11.9) H-1b
2	126,5(C)	-
3	155,1(C)	-
4	115,5(CH)	6,82, <i>d</i> (7.9)
5	131,2(CH)	7,37, <i>dd</i> (1.3 - 7.9)
6	119,5(CH)	6,85, <i>t</i> (7,4)
7	129,3(CH)	7,16, <i>dd</i> (1.3 - 7.4)
1'	103,2(CH)	4,43, <i>d</i> (7,7)
2'	74,8(CH)	3,28, <i>t</i> (8,1)
3'	77,6(CH)	3,31, <i>t</i> (8,1)
4'	71,6(CH)	3,33, <i>t</i> (8,1)
5'	77,8(CH)	3,38, <i>m</i>
6'	62,4(CH₂)	3,92, <i>dd</i> (11,4- 1,8) H-6a 3,82, <i>dd</i> (11,4 - 5,3) H-6b

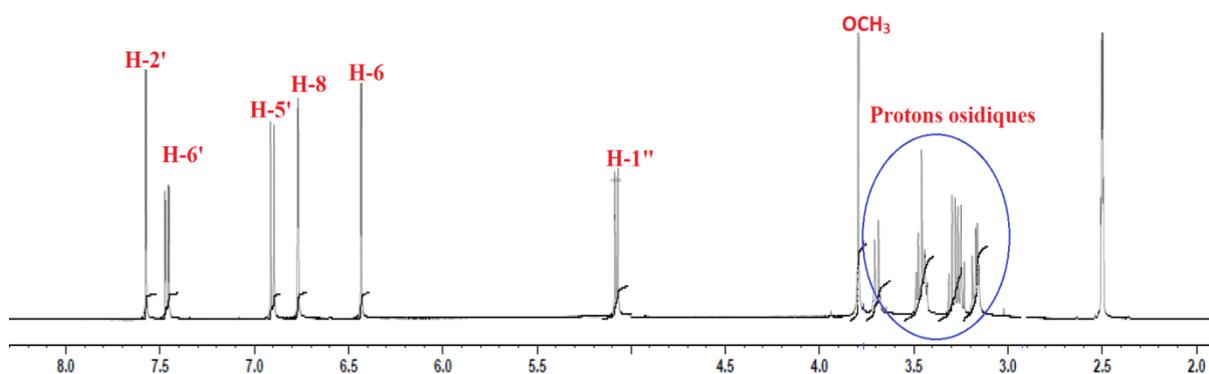
IV.2.3. Elucidation structurale du composé 22



Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.87**) de ce composé, montre un profil typique d'un flavonoïde glycosylé avec la présence de signaux de protons aromatiques résonant entre 6,40 et 7,60 ppm et osidiques sortant dans l'intervalle 3,40-5,10 ppm. Le signal du proton anomère (H-1'') à $\delta_{\text{H}}=5,10$ ppm (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz) qui suggère l'existence d'une seule unité osidique. Le même spectre indique clairement la présence d'un signal de groupement méthoxyle résonant à $\delta_{\text{H}}=3,80$ ppm.

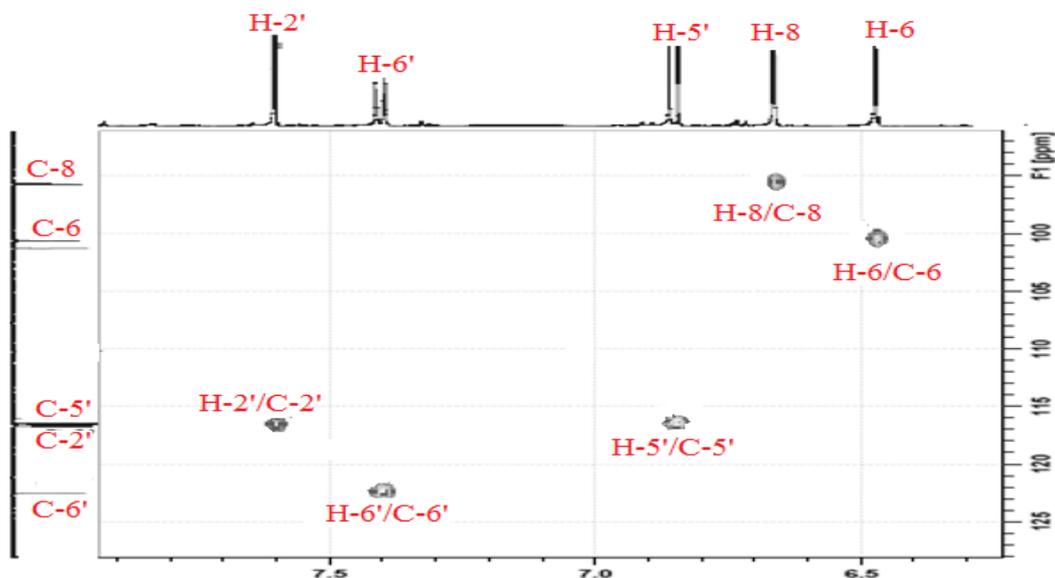
L'identification de l'aglycone est initiée par analyse du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.87**) qui exhibe des signaux de trois protons résonant à $\delta_{\text{H}}=7,57$ ppm (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), $\delta_{\text{H}}=7,46$ ppm (1H, *dd*, $J = 8,5-2,2$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,90$ ppm (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), caractéristiques des protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B disubstitué du flavonoïde. Les deux doublets résonant à $\delta_{\text{H}}=6,43$ ppm et $\delta_{\text{H}}=6,77$ ppm, d'intégration 1H chacun avec la même valeur de constantes de couplage ($J = 2,1$ Hz), sont attribuables aux protons H-6 et H-8 du cycle A.

Le doublet d'intégration 1 H, à $\delta_{\text{H}}=5,10$ ppm ($J = 7,4$ Hz) attribuable à un proton anomérique, ainsi que l'ensemble des signaux résonant entre $\delta_{\text{H}}= 3,40$ et 3,70 ppm, suggérant la présence d'un sucre en configuration β .



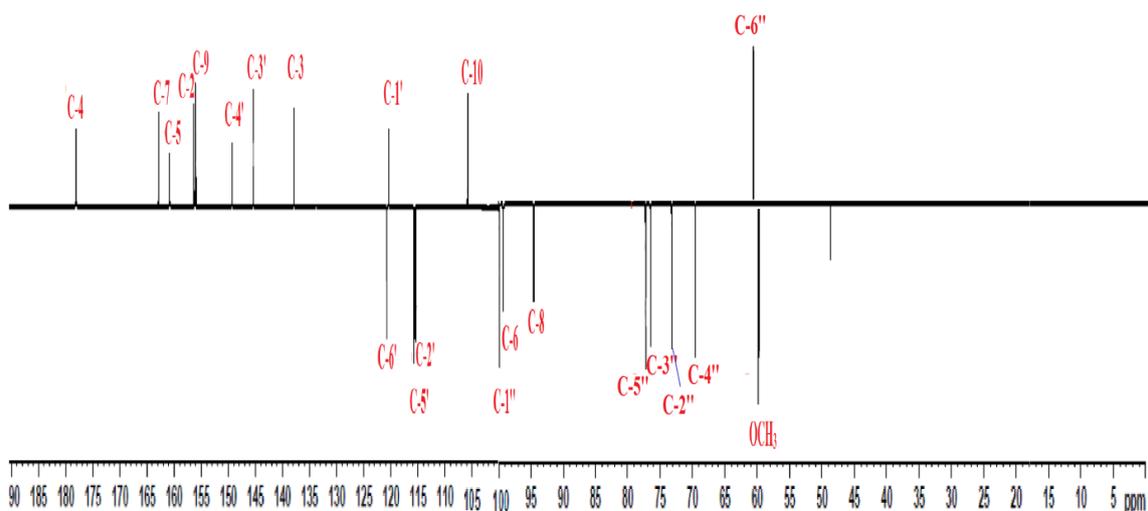
Spectre IV.87 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé 22

A partir des protons cités précédemment, l'expérience HSQC J -modulé (**Spectre IV.88**) (**Spectre IV.89**) permet d'identifier les carbones C-2' ($\delta_C = 115,4$ ppm), C-5' ($\delta_C = 115,7$ ppm), C-6' ($\delta_C = 120,7$ ppm), C-6 ($\delta_C = 99,3$ ppm) C-8 ($\delta_C = 94,6$ ppm), et C-1'' ($\delta_C = 99,2$ ppm) .



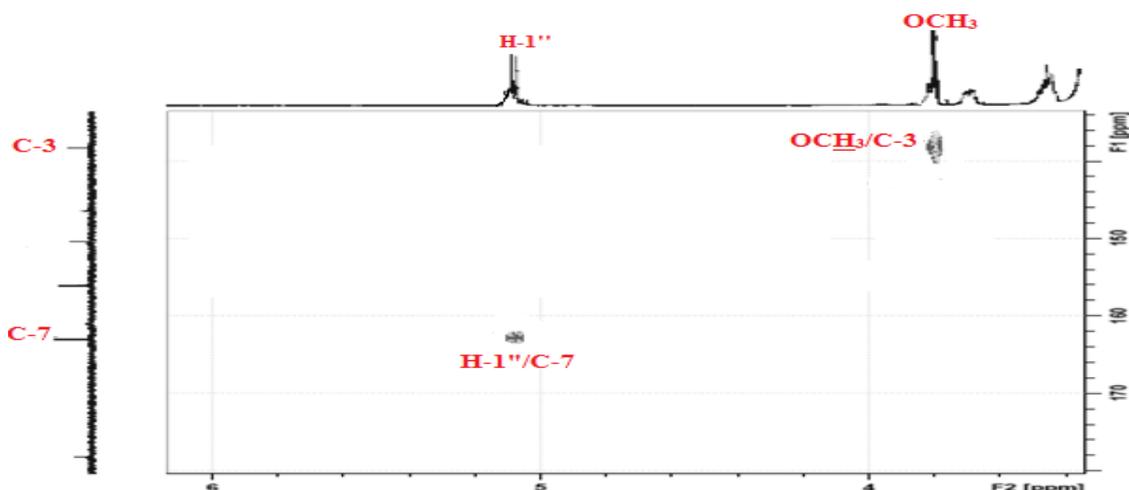
Spectre IV.88 : Spectre HSQC (600 MHz, DMSO) du composé 22

Toutes ces données spectrales ainsi que la valeur des déplacements chimiques des carbones C-2 et C-3 comparées avec celles de la littérature, laissent suggérer que la génine est un flavonol nommé quercétine, substituée en 3 [34] par un groupement méthoxy. Ceci est confirmé par expérience HMBC (**Spectre IV.90**) qui montre clairement un couplage hétéronucléaire longue distance entre les protons (3H, s , $\delta_H = 3,80$ ppm) de ce dernier et le carbone C-3 ($\delta_C = 137,7$ ppm).



Spectre IV.89 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO , 150 MHz) du composé 22

Le point de branchement du sucre est déterminé par expérience HMBC (Spectre IV.90) qui exhibe une corrélation entre le proton anomère H-1'' du β -D-glucose et le carbone C-7 ($\delta_C=162,9$ ppm) de l'aglycone.



Spectre IV.90 : Spectre HMBC (DMSO, 600 MHz) du composé 22

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature [35] la structure du composé 22 a pu être établie en tant que : **3-méthoxy-7-O- β -glucopyranosidequercétine**. Ce flavonolglycosylé, connu sous le nom de **Transilin** est isolé antérieurement à partir de différentes espèces comme *Lepisorus suriensis* appartenant à la famille Polyodiaceae [36] Ce composé est isolé pour la première fois du genre *lotus*.

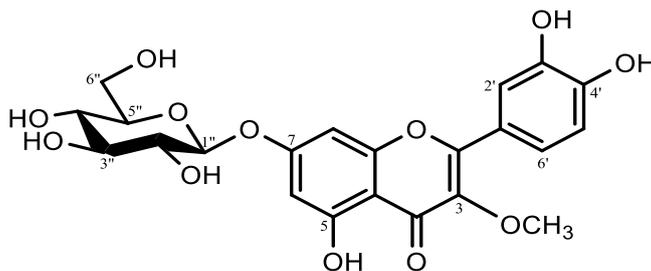


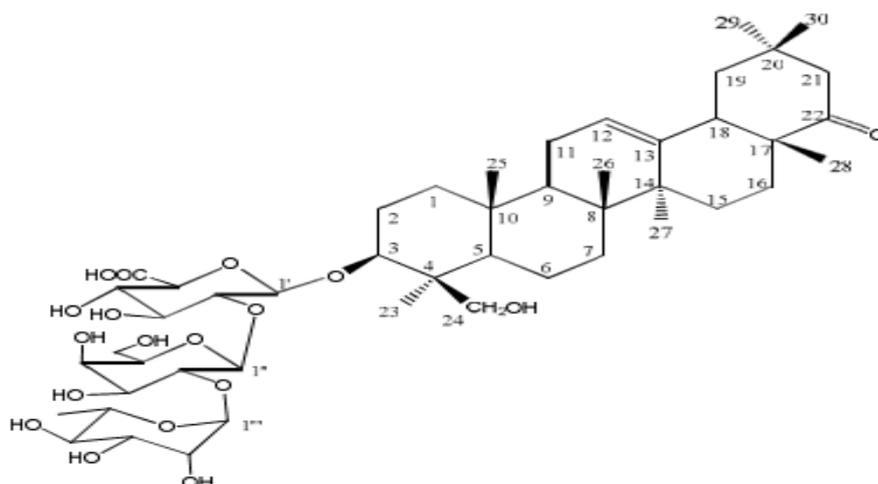
Figure IV.49 : Structure du composé 22 : Transilin

Le tableau ci-après reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 22.

Tableau IV.25 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 22

Position	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
2	156,2 (C)	-
3	137,7 (CH)	-
4	178,1(C)	-
5	160,8(C)	-
6	99,3 (CH)	6,43, <i>d</i> (2,1)
7	162,9(C)	-
8	94,6 (CH)	6,77, <i>d</i> (2,1)
9	156,0(C)	-
10	105,8(C)	-
1'	120,4(C)	-
2'	115,4 (CH)	7,57, <i>d</i> (2,2)
3'	149,3(CH)	-
4'	150,0 (CH)	-
5'	115,7(CH)	6,90, <i>d</i> (8,5)
6'	120,7(CH)	7,46, <i>dd</i> (8,5-2,2)
3-OCH ₃	59,7 (CH ₃)	3,80, <i>s</i>
Glucose		
1''	99,2(CH)	5,10, <i>d</i> (7,4)
2''	73,1(CH)	3,53, <i>dd</i> (8,4-7,4)
3''	76,4 (CH)	3,53, <i>dd</i> (8,4-7,8)
4''	69,5 (CH)	3,44, <i>t</i> (7,8)
5''	77.2 (CH)	3,58, <i>m</i>
6''	60,6 (CH)	3,70, <i>dd</i> (12,1-2,2) 6''a 3,46, <i>dd</i> (12,1- 5,6) 6''b

IV.2.4. Elucidation structurale du composé 23



Les spectres de masse ESI-MS de ce composé enregistrés en modes positif (**Figure V.50**) et négatif (**Figure IV.51**) indiquent la présence des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z=963,54$ $[M+Na]^+$, et $m/z=939,81$ $[M-H]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire égale à 940uma et une formule brute s'établissant en $C_{48}H_{76}O_{18}Na$, soit un nombre d'insaturation égale à 10.

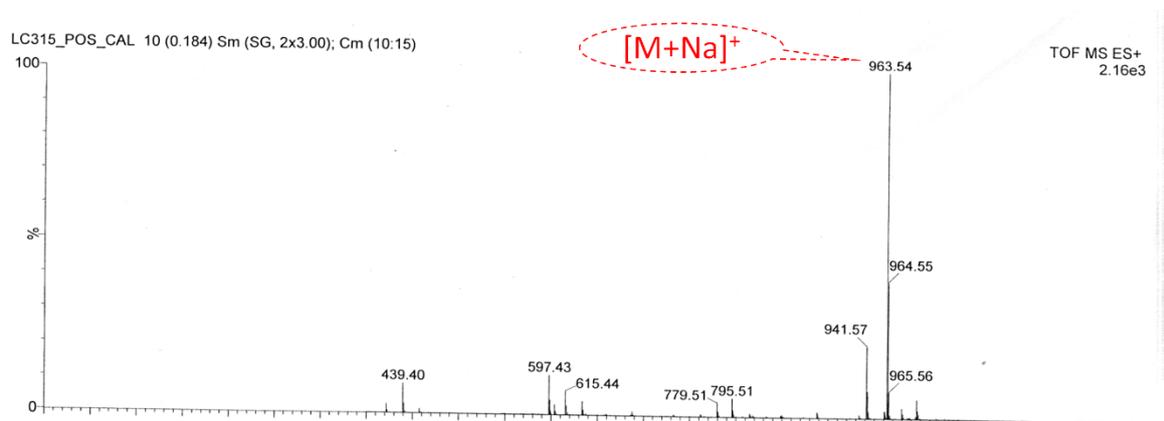


Figure IV.50 : Spectre de masse HRESI-MS du composé 23

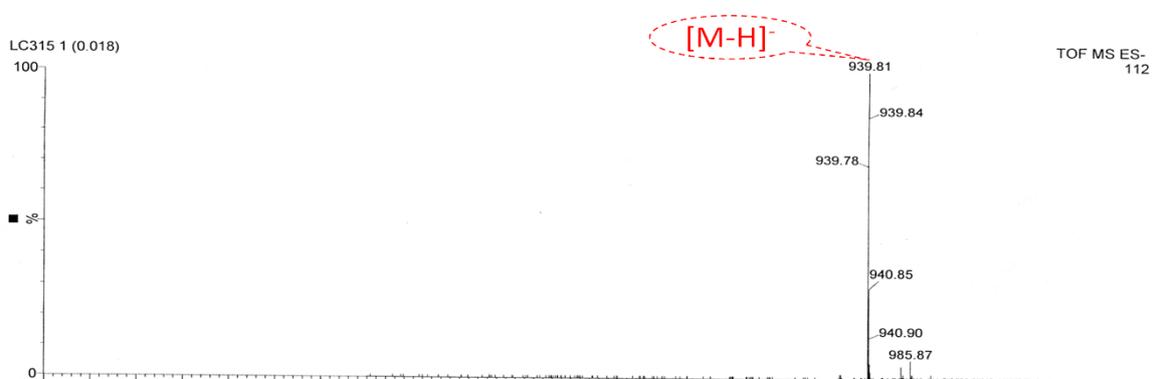


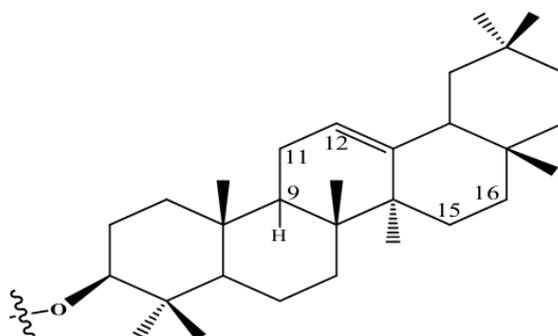
Figure IV.51 : Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé 23

L'observation du spectre RMN ^1H (**Spectre IV.91**) du composé 23 permet de le positionner dans la classe des triterpènes par la présence d'un nombre appréciable de signaux singulets d'intégration 3H chacun dans la zone du champ fort de ce spectre

Ce spectre (**spectre IV.91**) montre clairement la présence de :

- ✓ sept signaux singulets d'intégration 3H chacun résonant dans la région blindée entre $\delta_{\text{H}} = 0,88$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,29$ ppm, correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonant à $\delta_{\text{H}} = 1,26$ ppm (CH_3 -23) ; $\delta_{\text{H}} = 0,91$ ppm (CH_3 -25) ; $\delta_{\text{H}} = 1,01$ ppm (CH_3 -26) ; $\delta_{\text{H}} = 1,29$ ppm (CH_3 -27) ; $\delta_{\text{H}} = 1,02$ ppm (CH_3 -28) ; $\delta_{\text{H}} = 1,05$ ppm (CH_3 -29) ; $\delta_{\text{H}} = 0,88$ ppm (CH_3 -30).
- ✓ Un signal de proton éthylénique à $\delta_{\text{H}} = 5,38$ ppm (*sl*) caractéristique du proton H-12 du squelette oléanène .
- ✓ Un doublet de doublet à environ $\delta_{\text{H}} = 2,39$ ppm attribuable au proton H-18. (*dd*, $J = 13,4-3,4$) du triterpène. La valeur de son déplacement chimique laisse suggérer qu'il est voisin d'un groupement déblindant.
- ✓ Un massif de protons résonant entre $\delta_{\text{H}} = 0,90$ ppm et 2,58 ppm correspondant aux groupements CH et CH_2 des cinq cycles.
- ✓ Un signal sous forme de doublet de doublet résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,41$ ppm (*dd*, $J = 10,3-4,5$ Hz) d'un proton oxyméthine H-3 d'un triterpène.

Ce premier constat permet de déduire que le composé 23 est constitué d'une génine triterpénique à squelette oléanane insaturée en 12-13

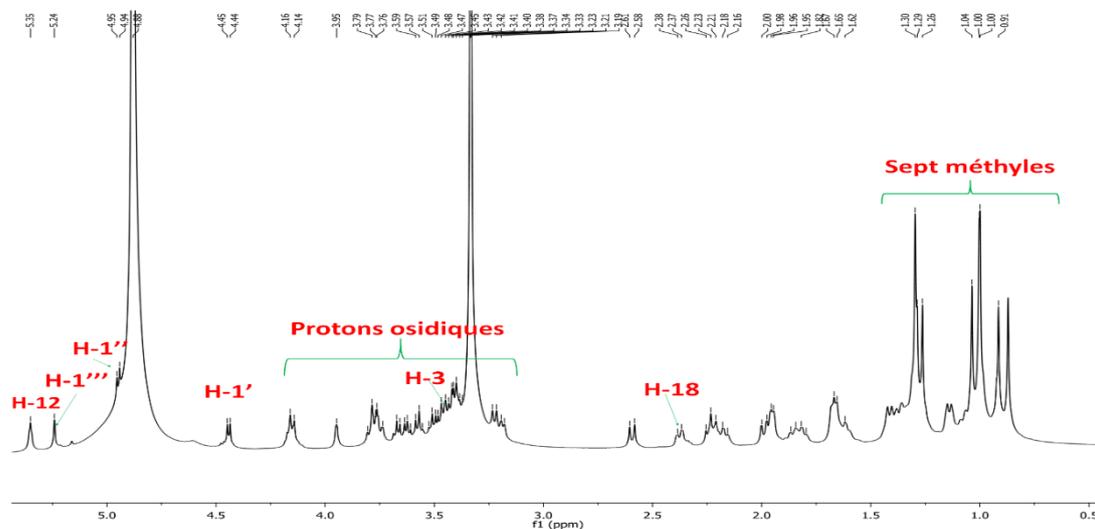


Squelette β -12oléanène

Toujours sur le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.91**) qui indique la nature glycosidique du Composé par l'observation :

- ✓ Un massif de protons résonant entre 3 et 4,2 ppm atteste la nature glycosidique du composé
- ✓ Trois signaux doublets à $\delta_{\text{H}} = 4,45$ ppm (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 4,99$ ppm (1H, *d*, $J = 7,5$

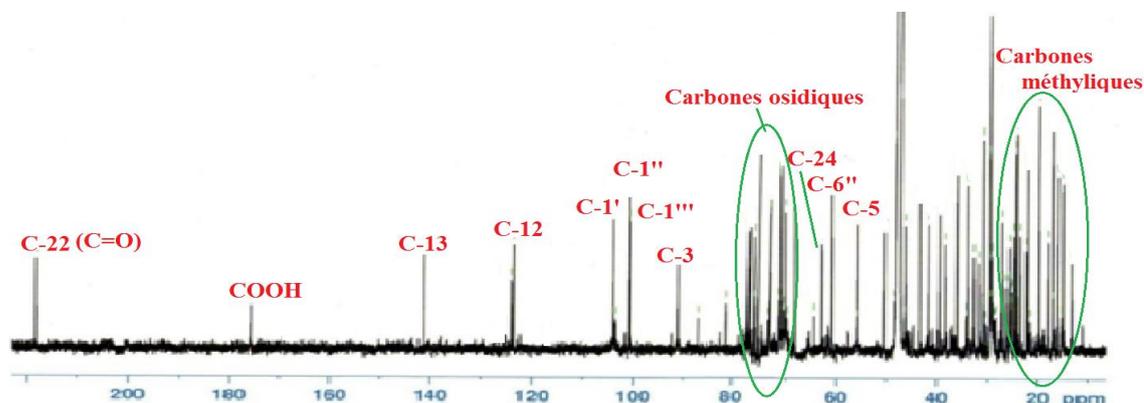
Hz), et $\delta_H = 5,25$ ppm (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz) caractéristiques de protons anomères, suggérant la présence de trois unités osidiques.



SpectreIV.91 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 23

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.92**) confirme la nature triterpénique de ce composé par la présence de 48 carbones dont 30 sont attribués à la génine et 18 au sucre. On distingue quelques carbones caractéristiques :

- ✓ Sept carbones méthyléniques repérés entre $\delta_C = 16,0$ ppm et $\delta_C = 31,0$ ppm.
- ✓ Deux carbones éthyléniques C-12 et C-13 à $\delta_C = 124,9$ ppm et $\delta_C = 142,4$ ppm.
- ✓ Le carbone C-3 de la génine repéré à $\delta_C = 92,2$ ppm. La valeur de déplacement chimique indique la substitution à ce niveau par des unités osidiques.
- ✓ Trois carbones anomériques résonnant à $\delta_C = 100,7$ ppm, $\delta_C = 100,9$ ppm et $\delta_C = 105,0$ ppm.
- ✓ Les carbones osidiques sortant entre $\delta_C = 61,2$ ppm et $\delta_C = 78,8$ ppm.
- ✓ Deux signaux caractéristiques de carbonyles d'une cétone à $\delta_C = 218,6$ ppm et d'un acide libre $\delta_C = 175,9$ ppm.



Spectre IV.92 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) du composé 23

L'ensemble de ces informations spectrales montrent qu'on est en présence d'une saponine triterpénique à squelette oléanane. Son élucidation structurale se répartit en deux étapes : la reconnaissance de la génine et de la partie osidique.

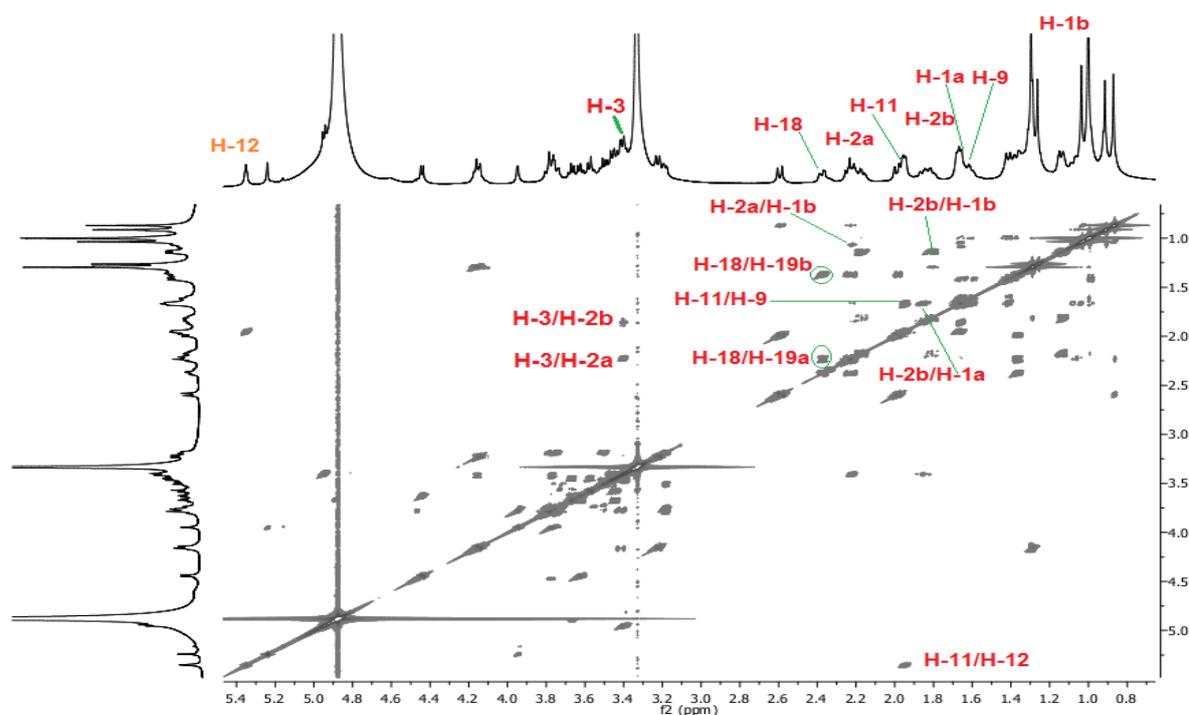
❖ Caractérisation de la génine

L'élucidation structurale du squelette triterpénique de ce composé est réalisée grâce à l'analyse conjointe des spectres RMN de corrélations COSY, HSQC, et HMBC.

La présence seulement de sept méthyles suppose l'oxydation de deux des huit méthyles constituant habituellement le squelette oléanane. L'observation sur le spectre RMN ^1H de deux signaux à $\delta_{\text{H}}=3,16$ ppm ($d, J=11,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=4,16$ ppm ($d, J=11,5$ Hz), laisse supposer que ce carbone oxydé est probablement inclus dans un groupement hydroxyméthyle CH_2OH . Son carbone est repéré sur le spectre HSQC à $\delta_{\text{C}}=63,8$ ppm.

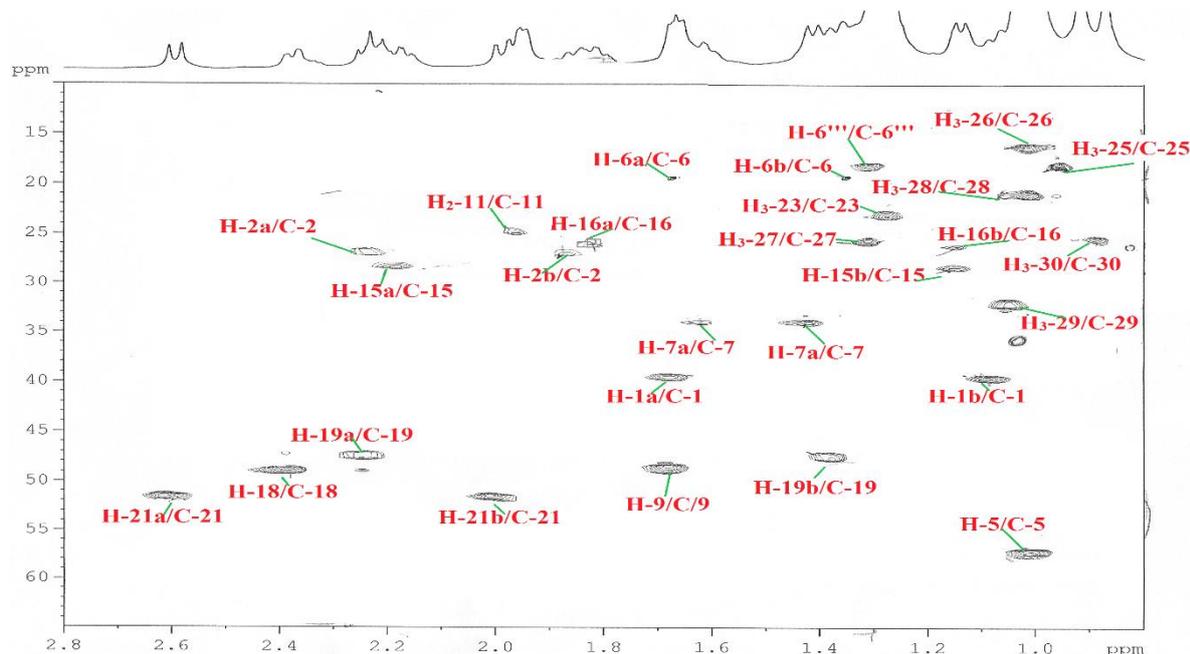
A partir du proton H-3, le spectre COSY H-H (**Spectre IV.93**) permet de localiser les groupements 2- CH_2 et 1- CH_2 par les couplages scalaires remarquables entre : H-3/H₂-2 ($\delta_{\text{H}}=1,86$ ppm et $\delta_{\text{H}}=2,24$ ppm, m)/H₂-1 ($\delta_{\text{H}}=1,09$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,70$ ppm, m).

- Les protons H₂-11 ($\delta_{\text{H}}=1,95$ ppm) à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-12.
- Le proton H-9 ($\delta_{\text{H}}=1,68$ ppm) vicinal aux protons H₂-11.
- Les deux protons H₂-19 ($\delta_{\text{H}}=1,37$ ppm, met $\delta_{\text{H}}=2,24$ ppm, $t, J=13,8$ Hz) vicinaux au proton H-18.



Spectre IV.93 : Spectre RMN COSY (CD₃OD, 600 MHz) du composé 23

L'expérience HSQC (**Spectre VI.94**) du composé 23 permet la détermination de déplacements chimiques des carbones correspondant aux groupements cités précédemment à C-1($\delta_C = 39,3$ ppm), C-2($\delta_C = 26,7$ ppm), C-3($\delta_C = 92,2$ ppm), C-9($\delta_C = 48,6$ ppm), C-11($\delta_C = 24,5$ ppm), C-12($\delta_C = 124,9$ ppm), C-18($\delta_C = 48,7$ ppm), C-19($\delta_C = 47,2$ ppm).



Spectre IV.94 : Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 23

L'analyse du spectre HMBC (**Spectre IV.95**) de ce composé permet de visualiser des corrélations entre le proton oxyméthine H-3 et le carbone C-1, un carbone quaternaire à $\delta_C = 43,3$ ppm attribué au C-4 et un signal du groupement méthyle à $\delta_C = 23,0$ ppm correspondant au méthyle angulaire CH₃-23. Ce méthyle couple également avec le carbone quaternaire C-4, le carbone C-24 porteur du groupement CH₂OH ($\delta_C = 63,8$ ppm) et le carbone C-5 ($\delta_C = 57,2$ ppm) qui corrèle aussi avec les protons méthyliques en CH₃-25 ($\delta_H = 0,91$ ppm) (**Spectre IV.95**). le déblindage du carbone 24 indique que le CH₃-24 est oxydé en alcool primaire.

Le méthyle CH₃-25 couple avec le carbone C-1, le carbone C-10 ($\delta_C = 36,7$ ppm) et le carbone C-9.

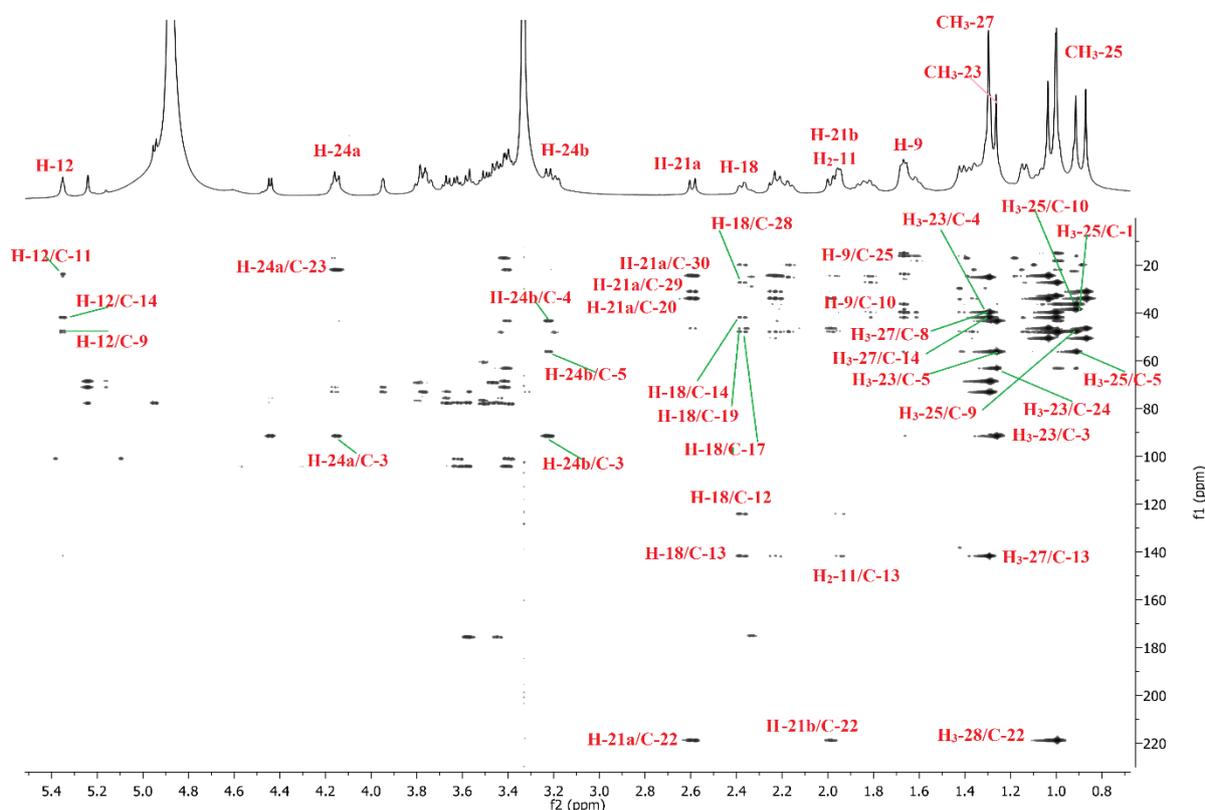
Toujours sur le spectre HMBC, la corrélation observée entre le proton H-9 et le carbone éthylénique C-12 résonant à $\delta_C = 124,9$ ppm permet de confirmer la localisation de la double liaison en C-12-C-13.

Le méthyle CH₃-26 résonnant à $\delta_H = 1,01$ ppm corrèle avec le carbone méthylénique C-7 ($\delta_C = 33,9$ ppm) le carbone C-9, et les carbones quaternaires C-8 ($\delta_C = 41,8$ ppm) et C-14 ($\delta_C = 41,6$ ppm).

Ces deux derniers corrèlent avec les protons méthyliques ($\delta_H = 1,29$ ppm) du groupement CH₃-27, eux même corrèlent avec le carbone quaternaire oléfinique C-13 ($\delta_C = 142,4$ ppm) et le carbone méthylénique CH₂-15 ($\delta_C = 28,2$ ppm).

A partir des protons CH₂-15 déterminé par l'expérience HSQC à $\delta_H = 1,15$ ppm et $\delta_H = 2,19$ ppm et selon le spectre COSY (**Spectre IV.93**) on peut localiser les protons géminés H₂-16 à $\delta_H = 1,14$ ppm et $\delta_H = 1,82$ ppm, leur carbone est repéré par l'expérience HSQC à $\delta_C = 26,2$ ppm. Ce deux protons géminée couplent sur le spectre HMBC avec les protons du groupement méthyle CH₃-28 ($\delta_H = 1,02$ ppm), eux-mêmes corrélant avec le carbone méthine attribué au C-18, le carbone quaternaire C-17 ($\delta_C = 19,0$ ppm) et un carbonyle résonant à $\delta_C = 218,6$ ppm attribué C-22.

Les deux groupements méthyles CH₃-29 ($\delta_H = 1,05$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_H = 0,88$ ppm) montrent des corrélations en HMBC (**Spectre IV.95**) avec le carbone quaternaire C-20 à $\delta_C = 34,3$ ppm et avec deux carbones méthyléniques localisés à $\delta_C = 47,2$ ppm et $\delta_C = 51,3$ ppm attribués respectivement aux CH₂-19 et CH₂-21. Leurs carbones respectifs sont localises sur le spectre HSQC à $\delta_C = 31,0$ ppm et $\delta_C = 25,0$ ppm.



Spectre IV.95 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 23

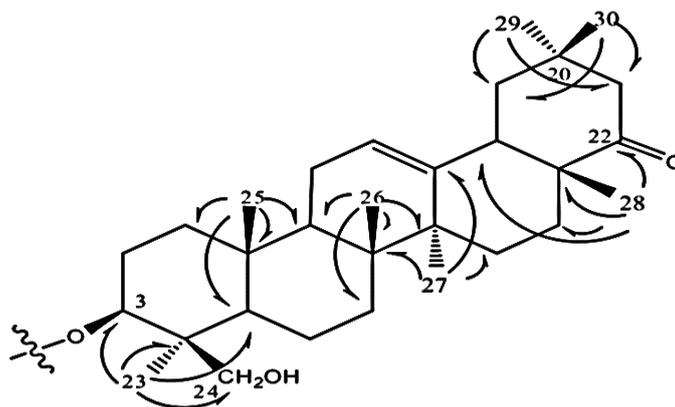
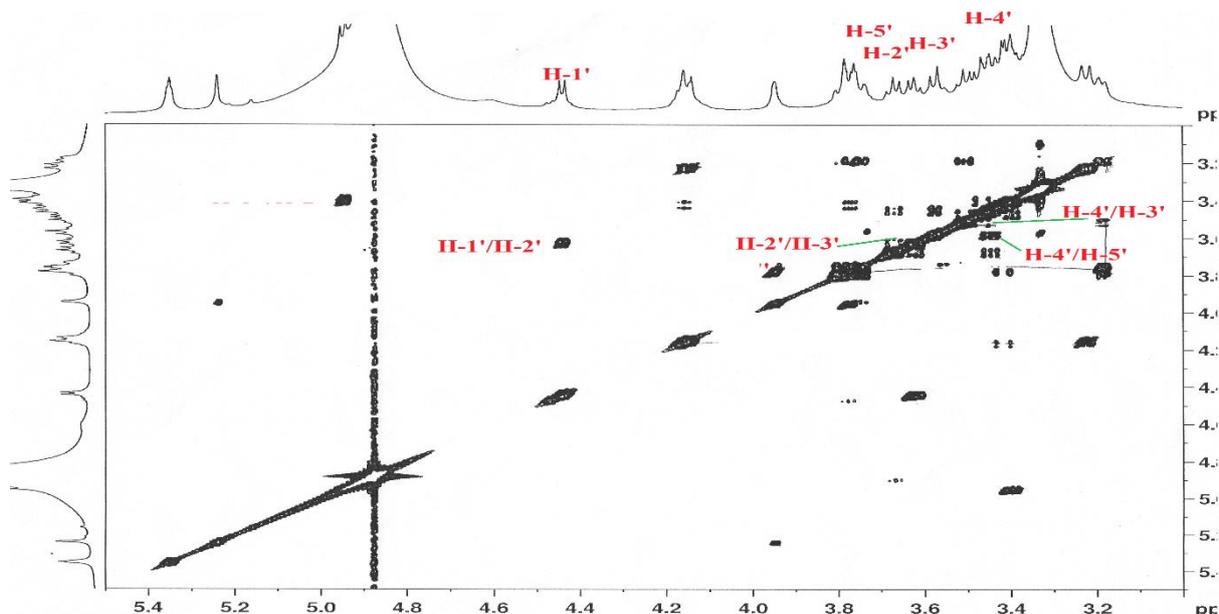


Figure IV.52 : Corrélations HMBC de la génine du composé 23

Les protons H-5, H₂-7 et H₂-21 portés par les carbones C-5, C-7 et C-21 déjà identifiés sont détectés par analyse du spectre HSQC à ($\delta_{\text{H}}=1,02$ ppm/ H-5), ($\delta_{\text{H}}=1,41$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,63$ ppm/ H₂-7), ($\delta_{\text{H}}=1,95$ ppm et $\delta_{\text{H}}=2,58$ ppm/H₂-21) (**Spectre IV. 94**). Les autres carbones et protons de l'aglycone sont repérés par analyse conjointe des spectres COSY et HSQC. Ainsi, les protons H₂-6 ($\delta_{\text{H}}=1,69$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,73$ ppm) sont identifiés sur le spectre COSY, en raison des corrélations qu'ils présentent avec les protons H₂-7. Son carbone est localisé à $\delta_{\text{C}}=19,1$ ppm. La stéréochimie des carbones asymétriques de la génine est établie par comparaison des données déjà mentionnées avec ceux de la littérature [37]. Cette analyse complète a permis d'identifier sans ambiguïté la génine

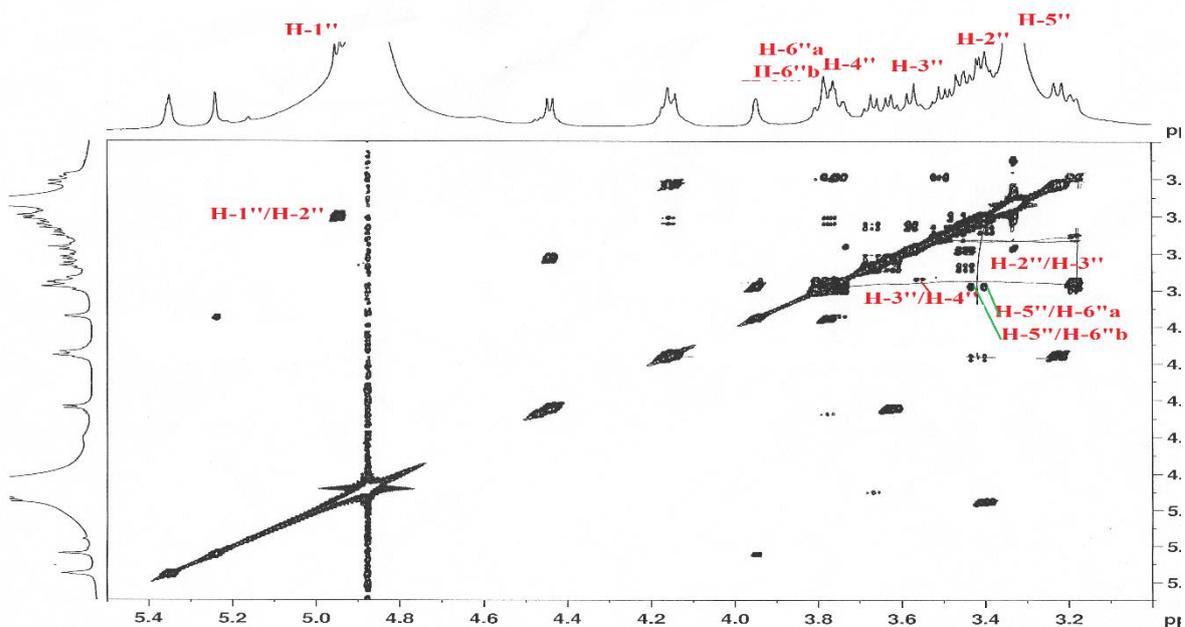
❖ Caractérisation de la partie osidique

L'analyse du spectre COSY (**Spectre IV. 96**) révèle que le proton anomérique à $\delta_{\text{H}}=4,45$ ppm fait partie d'un système à cinq spins couplés. Les constantes de couplage entre les protons H-2' et H-3', H-3' et H-4', H-4' et H-5' sont toutes supérieures à 8 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons. Le spectre HMBC visualise un carbonyle à $\delta_{\text{C}}=175,9$ ppm couplé au proton H-5' indiquant un acide uronique. Les déplacements chimiques des carbones déterminés à partir du spectre HSQC et les grandes valeurs des constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un acide β -D -glucuronopyranosique (Glc A) [36 ,38,39].



Spectre IV.96 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz) de l'acide β -D-glucuronopyranoiq

En partant du proton anomérique H-1'' à $\delta_{\text{H}}=4,99$ ppm. Le proton H-2'' ($\delta_{\text{H}}=3,48$, *dd*, $J=9,6-7,5$ Hz) est couplé au proton H-3'' ($\delta_{\text{H}}=3,58$, *dd*, $J=9,6-3,5$ Hz), lui-même couplé au proton H-4'' ($\delta_{\text{H}}=3,52$; *d*; $J=3,5$ Hz). La faible constante de couplage entre ces deux protons ($J_{\text{H-3''-H-4''}}=3,5$ Hz) indique que le proton H-4'' est en position équatoriale. Le proton H-5'' ($\delta_{\text{H}}=3,40$; *m*) couple, sur le spectre COSY avec les deux protons H-6''a ($\delta_{\text{H}}=3,80$; *m*) et H-6''b ($\delta_{\text{H}}=3,78$; *m*). Les valeurs des déplacements chimiques des carbonés et des protons ainsi les constantes de couplage sont caractéristiques d'un β -D-galactopyranose. (Spectre IV. 97).



Spectre IV.97 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz) du β -D-galactose

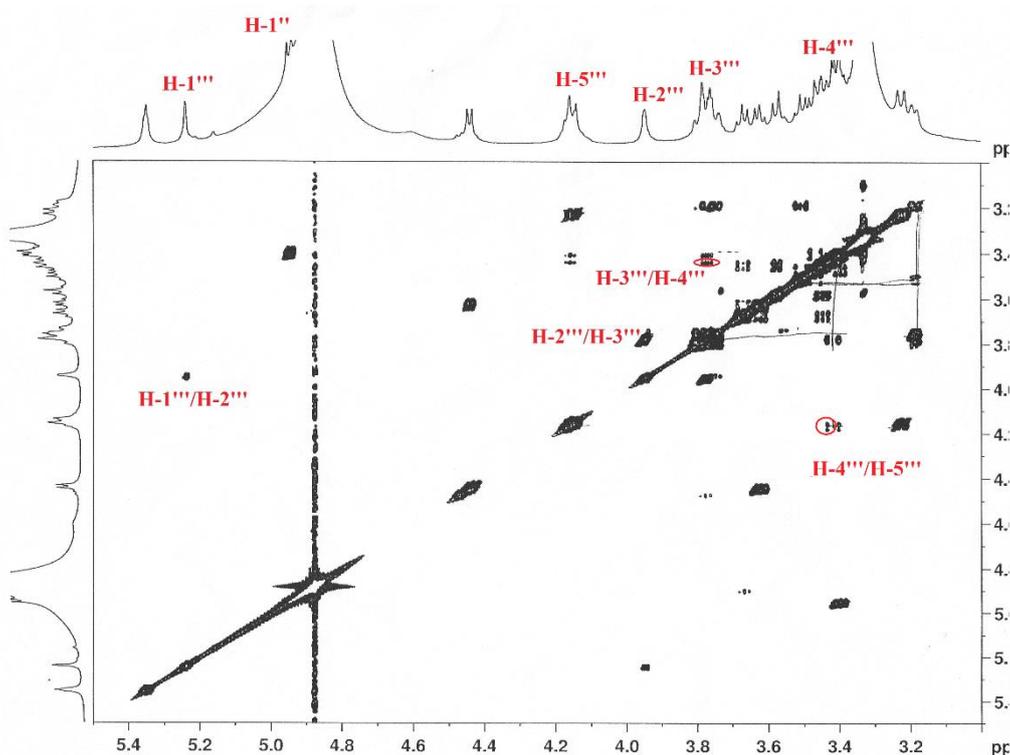
A partir du troisième proton anomère H-1''' ($\delta_H = 5,25$ ppm), l'analyse des spectres COSY (Spectre IV. 98) permet de relier tous les protons d'un désoxy-6-hexose, à travers leurs taches de corrélation. En effet, elle met en évidence les couplages entre :

- le proton H-1''' et le proton H-2''' ($\delta_H = 3,96$ ppm *dd*, $J = 3,3 - 1,6$ Hz), lui-même corrélé au proton H-3''' résonnant sous forme d'un doublet de doublets à $\delta_H = 3,61$ ppm (*dd*, $J = 9,6 - 3,3$ Hz).

La petite valeur de la constante de couplage $J_{H-2'''-H-3'''} = 3,3$ Hz indique que le proton H-2''' est en position équatoriale, alors que la grande constante de couplage $J_{H-3'''-H-4'''} = 9,6$ Hz révèle une position axiale du proton H-3'''.

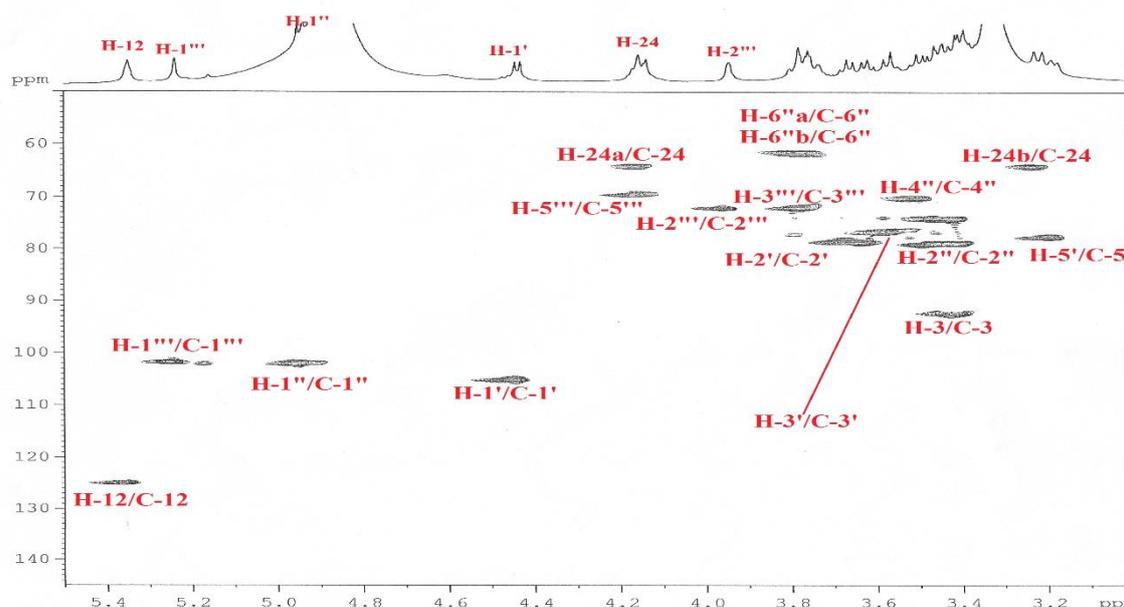
- le proton H-4''', couplé aux protons H-3''' et H-5''', résonne sous la forme d'un triplet à $\delta_H = 3,43$ ppm dont la constante de couplage ($J = 9,6$ Hz) atteste d'une position trans-diaxiale des protons H-4''' et H-5'''.

- le proton H-5''' $\delta_H = 4,17$ ppm corrèle avec les protons du méthyle H-6''' (*d*, $J = 6,2$ Hz) à $\delta_H = 1,29$ ppm. Ces corrélations permettent ainsi d'identifier un désoxy-6-hexose, il s'agit d'un rhamnose.



Spectre IV.98 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz) du α -L-rhamnose

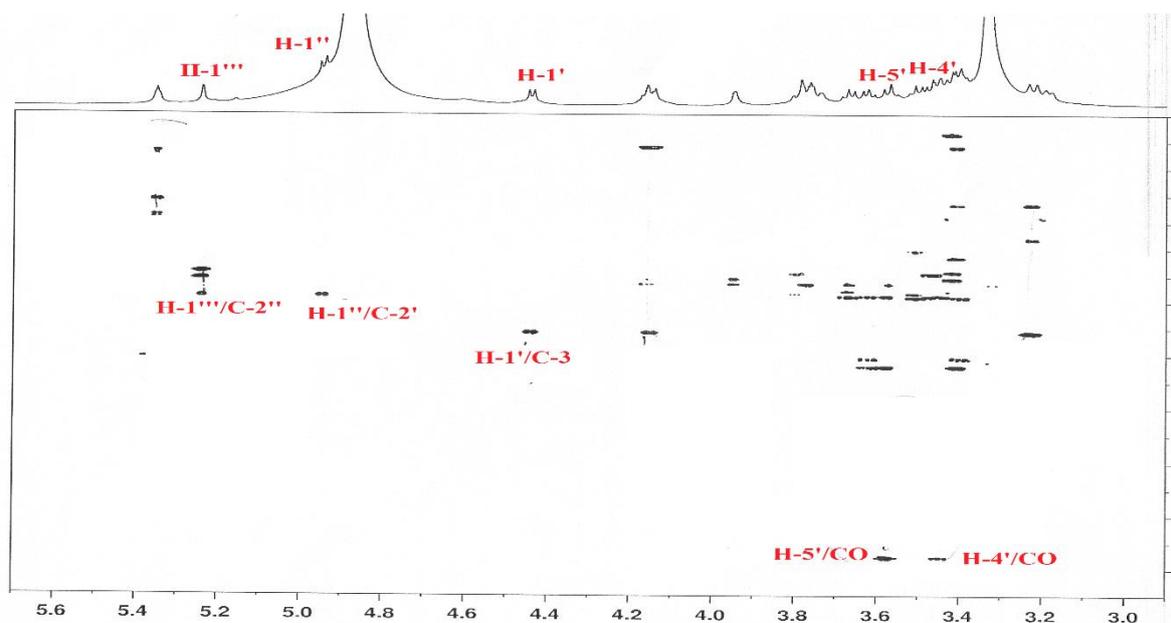
L'expérience HSQC (Spectre IV. 99) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones des trois oses.



Spectre IV.99 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) de la partie osidique du composé 23

La séquence et les sites de fixation des différents oses ont été déterminés par expérience HMBC (Spectre IV. 100).qui montre les corrélations entre :

- ✓ Le proton anomère H-1' ($\delta_H=4,45$ ppm) de l'acide glucuronique et le carbone C-3 ($\delta_C=92,2$ ppm) de la génine.
- ✓ Le proton anomère H-1'' ($\delta_H=4,9$ ppm) du galactose et le carbone C-2' ($\delta_C=78,3$ ppm) de l'acide glucuronique.
- ✓ Le proton anomère H-1''' ($\delta_H=5,25$ ppm) du rhamnose et le carbone C-2'' ($\delta_C=78,8$ ppm) du galactose.



Spectre IV.100 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) étalé du composé 23

A l'instar des résultats obtenus suite à toutes ces élucidations spectrales ainsi que la comparaison avec la littérature [40]. La structure du **composé 23** est identifiée comme étant :

3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène connu sous le nom de la **Dehydrosoyasaponine I**.

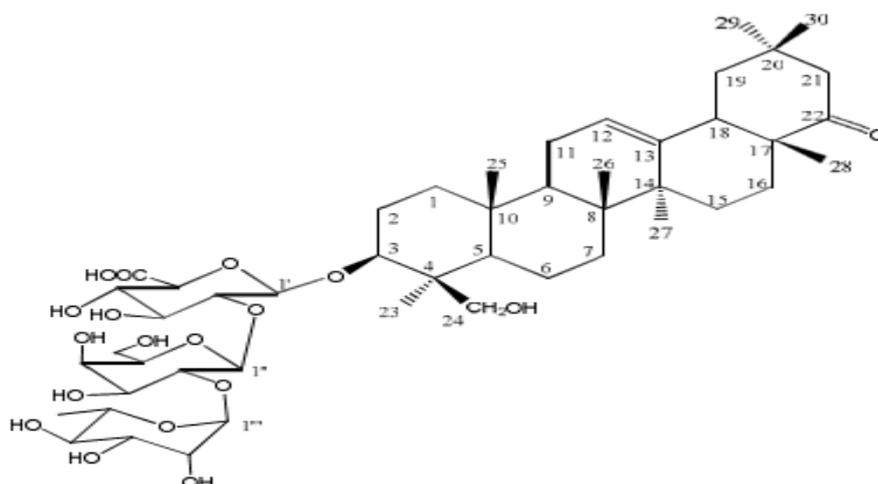


Figure IV.53 : Structure du composé 23 : Dehydrosoyasaponine I

Ce composé est isolé pour la première fois du genre *lotus*.

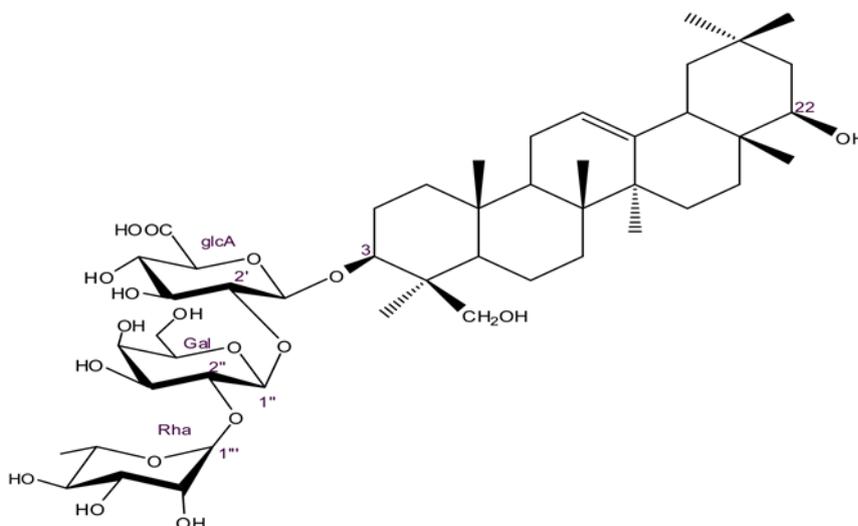
Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé, sont rassemblés dans le tableau IV.26 ci-dessous.

Tableau IV.26 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé 23

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)
1	39,3(CH ₂)	1,09-1,70, <i>m</i>
2	26,7(CH ₂)	1,86-2,24, <i>m</i>
3	92,2(CH)	3,41, <i>dd</i> (10,3- 4,5)
4	39,0(C)	-
5	57,2(CH)	1,02, <i>m</i>
6	19,1(CH ₂)	1,69-1,73, <i>m</i>
7	33,9(CH ₂)	1,41-1,63, <i>m</i>
8	41,8(CH ₂)	-
9	48,6(CH)	1,68, <i>m</i>
10	36,7(CH)	-
11	24,5(CH ₂)	1,95, <i>m</i>
12	124,9(CH)	5,38, <i>t</i> (3,5)
13	142,4(C)	-
14	41,6(C)	-
15	28,2(CH ₂)	1,15-2,19, <i>m</i>
16	26,2(CH ₂)	1,14-1,82, <i>m</i>
17	37,4(C)	-

18	48,7(CH)	2,39,dd (13,4-3,4)
19	47,2(CH ₂)	1,37,m 2,24,t(13,8)
20	34,3(C)	-
21	51,3(CH ₂)	1,95,dd (14,1 - 2,7) 2,58d(14)
22	218,6(C)	-
23	23,0(CH ₃)	1,26 s
24	63,8(CH ₂)	3,22,d (11,5) 4,16,d (11,5)
25	18,0(CH ₃)	0,91,s
26	16,0(CH ₃)	1,01,s
27	25,0(CH ₃)	1,29,s
28	21,0(CH ₃)	1,02,s
29	31,0(CH ₃)	1,05,s
30	25,0(CH ₃)	0,88, s
L'acide glucuronique		
1'	105,0 (CH)	4,45,d(8,7)
2'	78,3(CH)	3,61,dd (9.9 -8,7)
3'	76,3(CH)	3,58,t(9.9)
4'	73,0(CH)	3,43,t (9,6)
5'	76,0(CH)	3,20,d (9,7)
COOH	175,9	-
Galactose		
1''	101,9(CH)	4,99,d (7,5)
2''	78,8(CH)	3,48,dd (9,6- 7.5)
3''	76,0(CH)	3,58,dd (9,6- 3,5)
4''	69,2(CH)	3,52,d (3,5)
5''	78,0(CH)	3,40,m
6''	61,2(CH ₂)	3,78,m 3,80,m
Rhamnose		
1'''	101,7(CH)	5,25, d (1,6)
2'''	71,9(CH)	3,96,dd(3,3- 1,6)
3'''	72,1(CH)	3,61, dd (9,6- 3,3)
4'''	73,3(CH)	3,43,t (9,6)
5'''	69,3(CH)	4,17,m
6'''	17,9(CH ₃)	1,29,d (6,4)

IV.2.5. Elucidation structurale du composé 24



Le spectre de masse ESI⁺ (**Figure IV.54**) du composé 24 révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 965,58$ $[M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 942uma et une formule brute en $C_{48}H_{78}O_{18}Na$

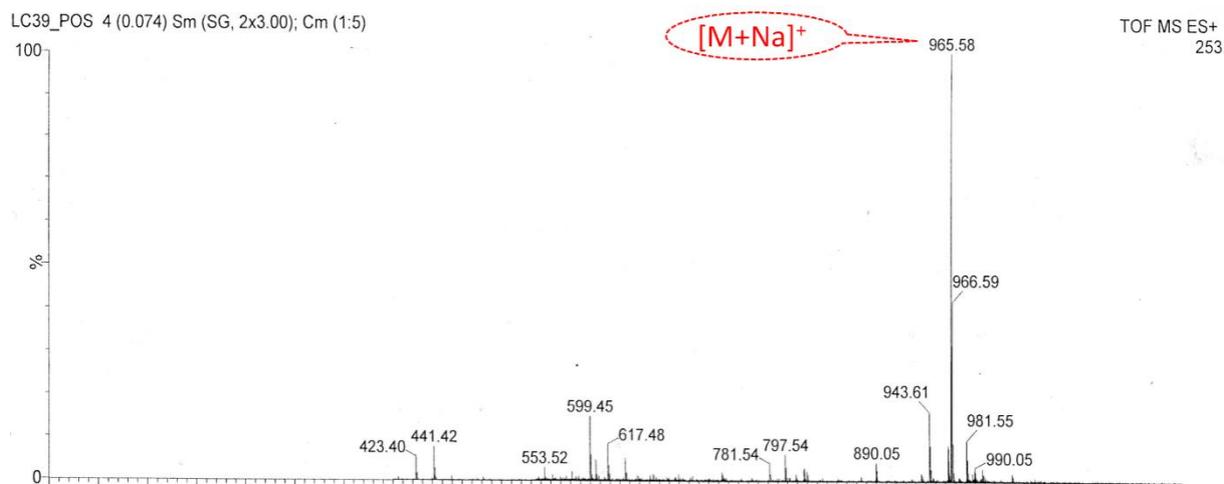


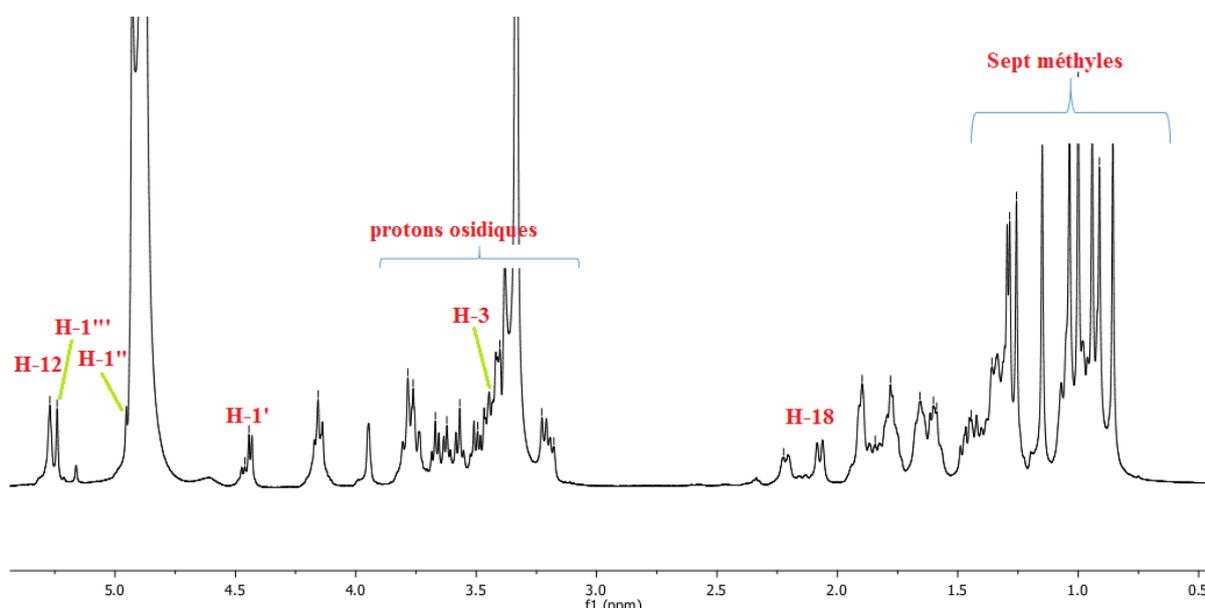
Figure IV.54 : Spectre de masse HRESI-MS du composé 24

Les spectres RMN (¹H, COSY, HSQC, et HMBC) du composé 24 ((**Spectre IV.101, IV.102 et IV.103, IV.104**), sont voisins à ceux du composé précédent 23, Il permet de reconnaître entre autres :

- Les protons H-3, H-12 et H-18 caractéristiques d'une molécule de nature triterpénique Pentacyclique résonant à $\delta_H=3,40$, dd (10,3- 4,5), 5,32 ($t, J = 3,5$ Hz) et $\delta_H=2,09$, dd (13,8-3,8)
- Un massif de protons repéré entre $\delta_H=0,98$ à 3,40 ppm, correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles.

- Les méthyles détectés sous forme de sept singulets fins entre $\delta_H=0,60$ et $1,30$ ppm.

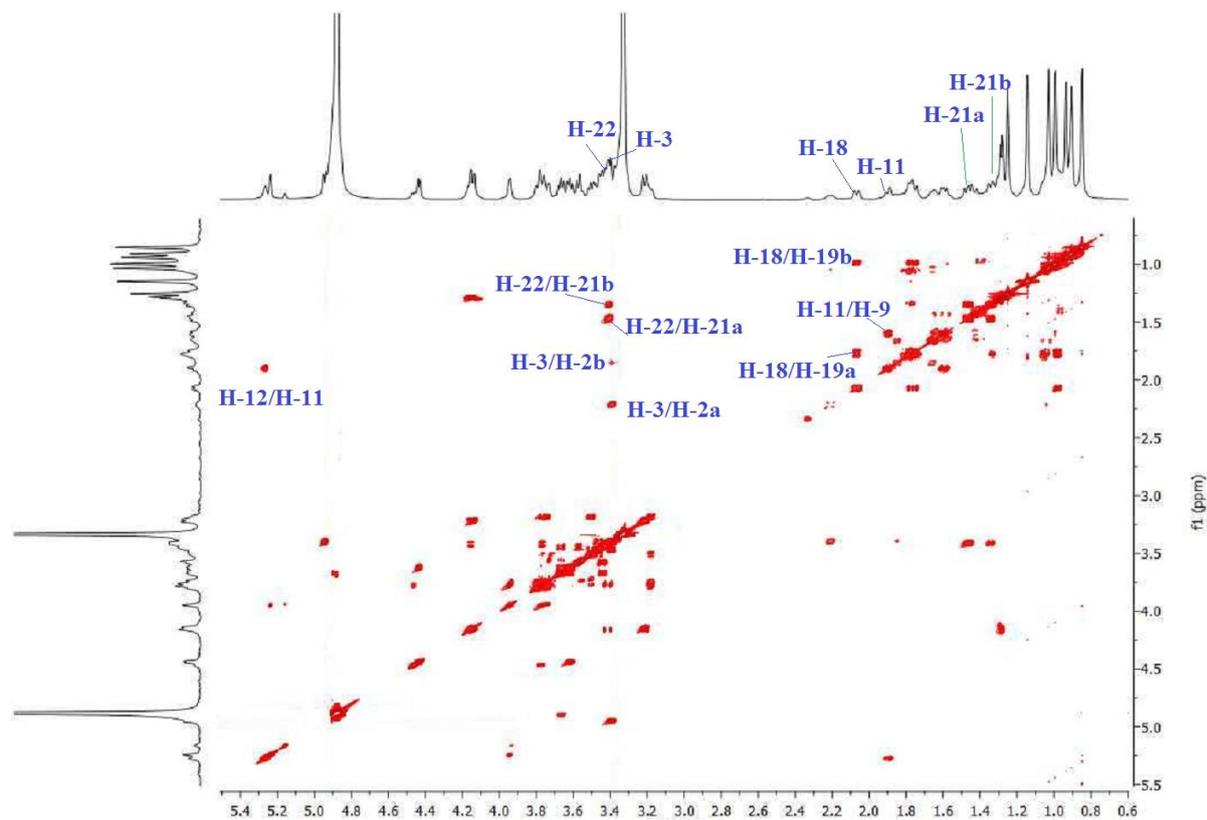
La différence par rapport au composé **23** concerne principalement la disparition du signal du groupement carbonyle C=O ($\delta_C=218,6$ ppm), et l'apparition d'un proton supplémentaire oxygéné à $\delta_H= 3,43$ ppm portés par un carbone oxydé vers $\delta_C =76,6$ ppm selon l'expérience HSQC.



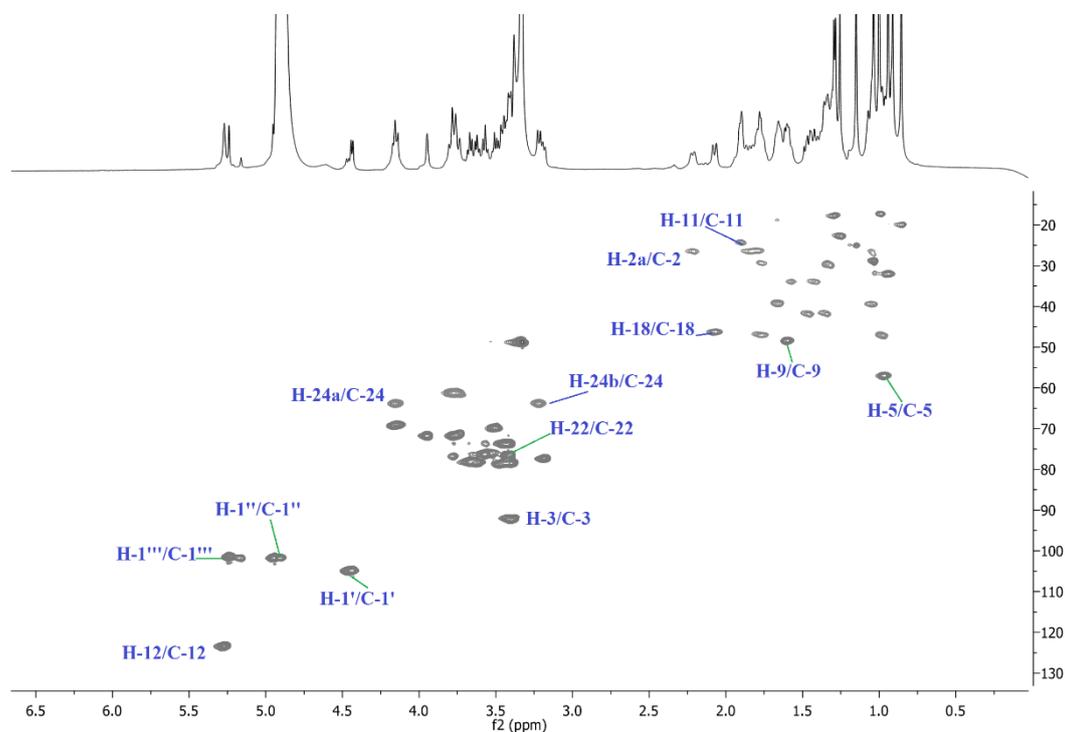
Spectre IV.101 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé **24**

Ces observations nous orientent vers une génine tri terpénique à squelette oléan-12-ène, porteuse d'un groupement hydroxyle (OH).

L'examen du spectre COSY H-H (Spectre IV.102) montre une tache de corrélation entre les deux protons H-21 résonants à $\delta_H=1,36$ ppm et $\delta_H=1,48$ ppm et le proton résonant à $\delta_H= 3,43$ ppm ce qui laisse logiquement déduire que le groupement OH est fixé au carbone C-22, c'est-à-dire la réduction du carbone carbonyle C-22 en groupement hydroxyméthine CHO

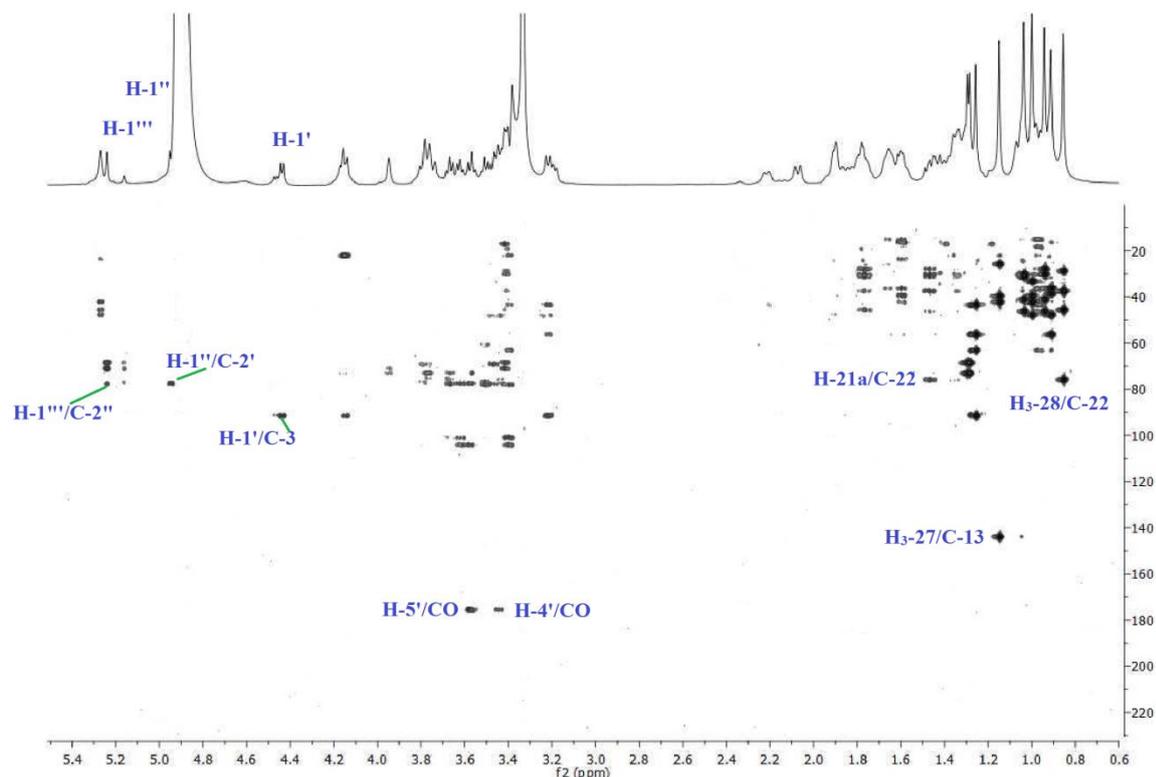


Spectre IV.102 : Spectre RMN COSY (CD₃OD, 600 MHz) du composé 24



Spectre IV.103 : Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 24

Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC (Spectre IV.104) qui montre des corrélations $^3J_{H-C}$ entre les protons du méthyle 28 et le carbone C-22.



Spectre IV.104 : Spectre RMN HMBC (CD₃OD, 600 MHz) du composé 24

Ces données spectrales permettent l'attribution au composé 24 la structure suivante: **3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 22 β , 24-trihydroxyléan-12-ène**. Ce composé, connu sous le nom **Soyasaponine I**, a été isolé précédemment de l'espèce *Astragalus sieversianus* [41]

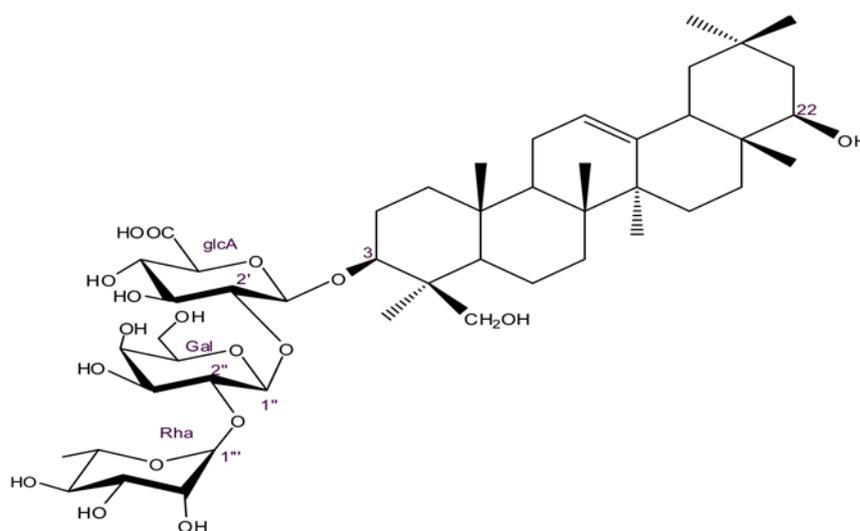


Figure IV.55 : Structure du composé 24 :3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 22 β , 24-trihydroxyléan-12-ène

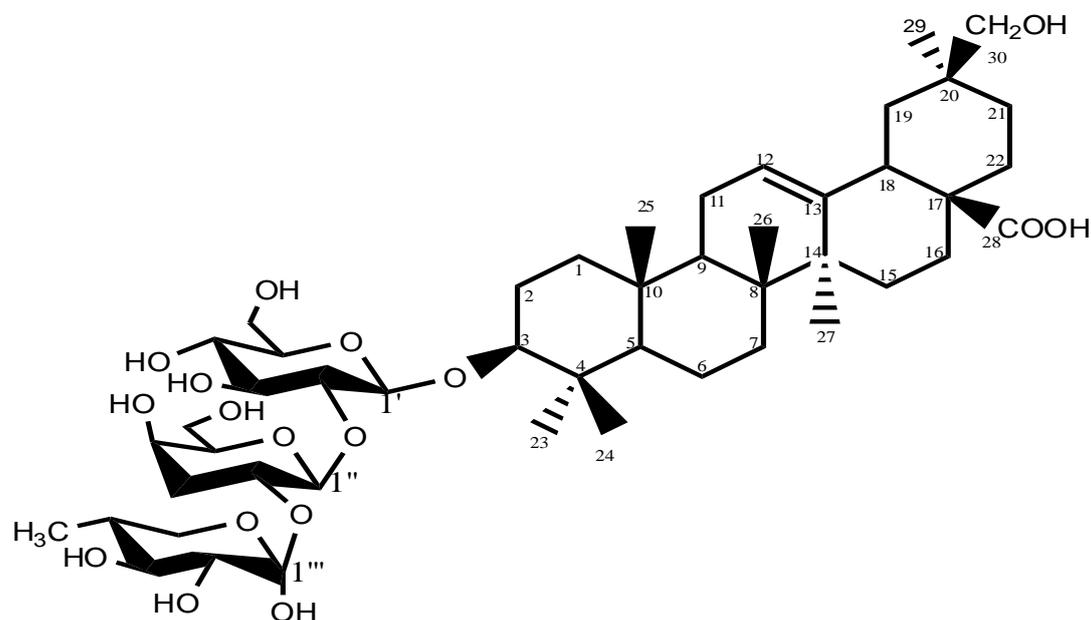
Le tableau suivant reproduit les déplacements chimiques de tous les carbones et protons du composé 24.

Tableau IV.27 : Données RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé 24

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)
1	39,7(CH ₂)	1,06 - 1,70, <i>m</i>
2	26,7(CH ₂)	1,86 - 2,24, <i>m</i>
3	92,2(CH)	3,40, <i>dd</i> (10,3- 4,5)
4	43,5(C)	-
5	57,3(CH)	0,98, <i>m</i>
6	16,8(CH ₂)	1,29 - 1,79, <i>m</i>
7	34,2(CH ₂)	1,45-1,58, <i>m</i>
8	39,0(C)	-
9	48,8(CH)	1,60, <i>m</i>
10	36,3(C)	-
11	24,5(CH ₂)	1,90, <i>m</i>
12	123,5(CH)	5,28, <i>t</i> (3,5)
13	144,0(C)	-
14	41,3(C)	-
15	29,6(CH ₂)	1,35 - 1,80, <i>m</i>
16	26,7(CH ₂)	1,16-1,82, <i>m</i>
17	49,0(C)	-
18	47,3(CH)	2,09, <i>dd</i> (13,8-3,8)
19	47,2(CH ₂)	1,00, <i>m</i> 1,78, <i>t</i> (13,8)
20	30,4(CH)	-
21	41,8(CH ₂)	1,48, <i>dd</i> (13,8-2,8) 1,36, <i>dd</i> (13,8 - 5,3)
22	76,6(CH)	3,43, <i>dd</i> (5,3 -2,8)
23	26,7(CH ₃)	1,16, <i>s</i>
24	64,9(CH ₂)	3,22, <i>d</i> (11,5) 4,16, <i>d</i> (11,5)
25	16,01 (CH ₃)	0,90, <i>s</i>
26	18,0(CH ₃)	1,09, <i>s</i>
27	25,0(CH ₃)	1,15, <i>s</i>
28	29,0(CH ₃)	0,86, <i>s</i>
29	32,0(CH ₃)	0,94, <i>s</i>
30	23,0(CH ₃)	0,80 <i>s</i>
L'acide glucuronique		
1'	105,0(CH)	4,56, <i>d</i> (8,6)
2'	78,3(CH)	3,61, <i>dd</i> (9,9 -8,7)
3'	76,3(CH)	3,58, <i>t</i> (9,9)
4'	74,0(CH)	3,43, <i>t</i> (9,6)
5'	76,0(CH)	3,20, <i>d</i> (9,7)
COOH	175,9(C)	-
Galactose		
1''	101,8(CH)	4,95, <i>d</i> (7,5)
2''	78,6(CH)	3,49, <i>dd</i> (9,6 - 7,5)
3''	77,4(CH)	3,41, <i>dd</i> (9,6 - 3,5)

4''	69,3(CH)	3,44, <i>m</i>
5''	78,1(CH)	3,52, <i>m</i>
6''	61,5(CH ₂)	3,79, <i>m</i> 3,81, <i>m</i>
Rhamnose		
1'''	100.7(CH)	5.25, <i>d</i> (1,6)
2'''	71,9 (CH)	3,96, <i>dd</i> (3,3 – 1,6)
3'''	72,1 (CH)	3,61, <i>dd</i> (9,6 – 3,3)
4'''	73,3 (CH)	3,43, <i>t</i> (9,6)
5'''	69,3 (CH)	4,17, <i>m</i>
6'''	17,9 (CH ₃)	1,29, <i>d</i> (6,4)

IV.2.6. Elucidation structurale du composé 25



Le composé 25 est isolé aussi sous forme d'une poudre blanche amorphe. Il est invisible sous lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm. Le spectre de masse ESIMS en mode négative (**Figure IV.56**) de ce composé présente un pic d'ion quasi moléculaire à $m/z=941,81$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 942 uma, correspondant à une formule brute $C_{48}H_{78}O_{18}$.

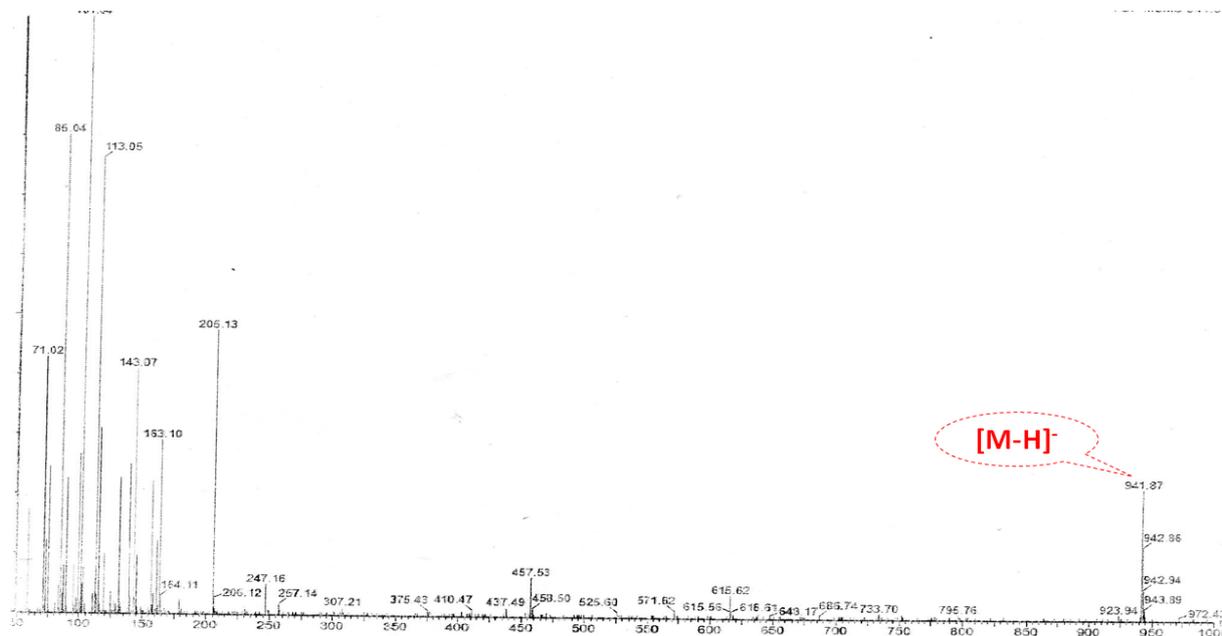


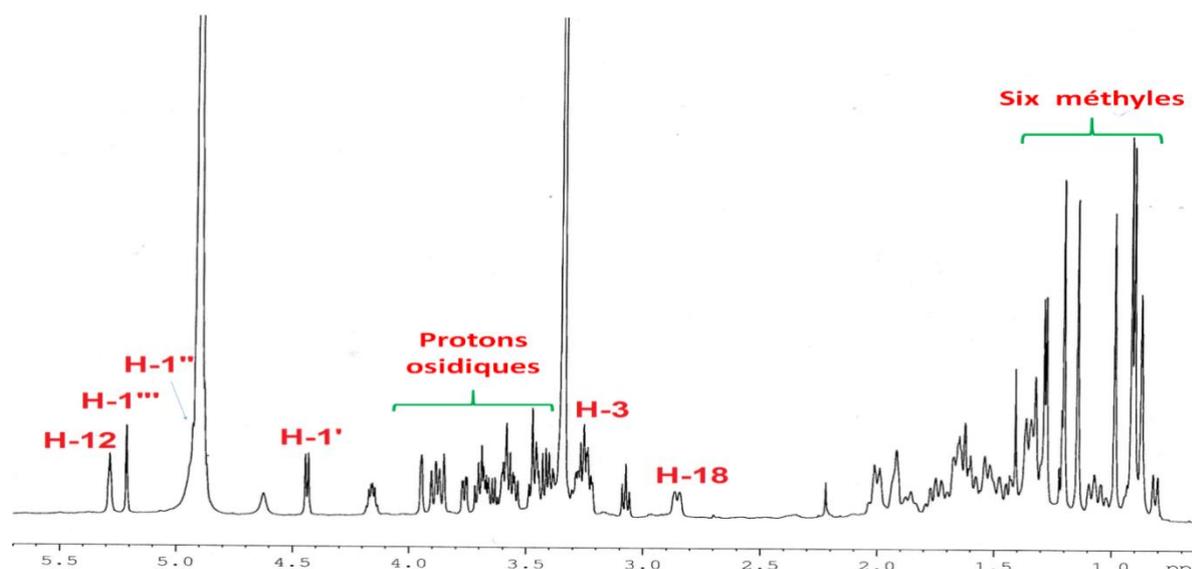
Figure IV.56 : Spectre de masse ESI-MS du composé 25

le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.105**) du composé 25 présente une allure un peu différente par rapport aux composés déjà identifiés. En effet, il montre six signaux singulets fins à champ, s'intégrant pour trois protons chacun attribuables aux méthyles résonant à $\delta_{\text{H}}=1,40$ ppm ($\text{CH}_3\text{-23}$), $\delta_{\text{H}}=0,90$ ppm ($\text{CH}_3\text{-24}$), $\delta_{\text{H}}=0,98$ ppm ($\text{CH}_3\text{-25}$), $\delta_{\text{H}}=0,87$ ppm ($\text{CH}_3\text{-26}$), $\delta_{\text{H}}=1,20$ ($\text{CH}_3\text{-27}$) et $\delta_{\text{H}}=0,98$ ppm ($\text{CH}_3\text{-29}$ ou $\text{CH}_3\text{-30}$), correspondant à des groupements méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

La présence seulement de six méthyles suppose l'oxydation de deux des huit méthyles constituant habituellement le squelette oléanane.

- ✓ D'autres signaux sont enregistrés à $\delta_{\text{H}}=5,27$ ppm (*t*, $J=3,4$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=3,24$ ppm (*dd*, $J=10,3-4,5$ Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12 et au proton H-3.
- ✓ un système AB résonne à $\delta_{\text{H}}=3,58$ ppm (*d*, $J=11,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=3,45$ ppm (*d*, $J=11,5$ Hz) correspondant à un groupement hydroxyméthyle CH_2OH .
- ✓ Un massif de protons résonant entre $\delta_{\text{H}}=1,00$ à 2,40 ppm, correspondant aux CH et CH_2 des cinq cycles du triterpène à squelette oléanane.
- ✓ Un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}}=2,85$ ppm ($J=13,8-3,8$ Hz) correspondant au proton H-18. Son déplacement chimique indique que le méthyle $\text{CH}_3\text{-28}$ est oxydé en acide. Le déblindage des protons $\text{H}_2\text{-16}$ dont les signaux sortent à $\delta_{\text{H}}=2,02$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,66$ ppm, $\text{H}_2\text{-22}$ sortant à $\delta_{\text{H}}=1,70$ ppm et 1,34 ppm illustre bien la présence d'un carbonyle libre en C-17.

Cette attribution est confirmée d'une part par le déblindage du C-17 résonant à $\delta_{\text{C}}=46,6$ ppm et d'autre part par le spectre HMBC (**Spectre IV.108**) qui montre une tache de corrélation entre les protons : $\text{H}_2\text{-16}$, $\text{H}_2\text{-22}$, H-18 et le carbone C-28 résonant à $\delta_{\text{C}}=180,0$ ppm.



Spectre VI.105 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 25

A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H (Spectre IV.106) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons de la génine triterpénique. On reconnaît entre autres :

- Les deux protons $\text{H}_2\text{-2}$ ($\delta_{\text{H}}=1,99$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,74$ ppm) à partir de leurs corrélations avec le proton H-3 connu.
- Les protons $\text{H}_2\text{-1}$ ($\delta_{\text{H}}=1,66$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,04$ ppm) couplant avec les protons $\text{H}_2\text{-2}$.
- Les protons $\text{H}_2\text{-11}$ ($\delta_{\text{H}}= 1,91$ ppm) à partir de leurs couplages avec le proton éthylénique H-12 .
- Le proton H-9 ($\delta_{\text{H}}=1,61$) corrélant avec les protons $\text{H}_2\text{-11}$.
- Les deux protons géminés $\text{H}_2\text{-19}$ ($\delta_{\text{H}}=1,62$ et $\delta_{\text{H}}=1,39$ ppm) présentant des couplages avec H-18 .

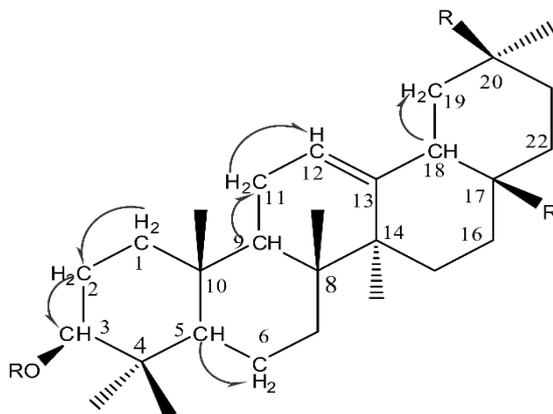
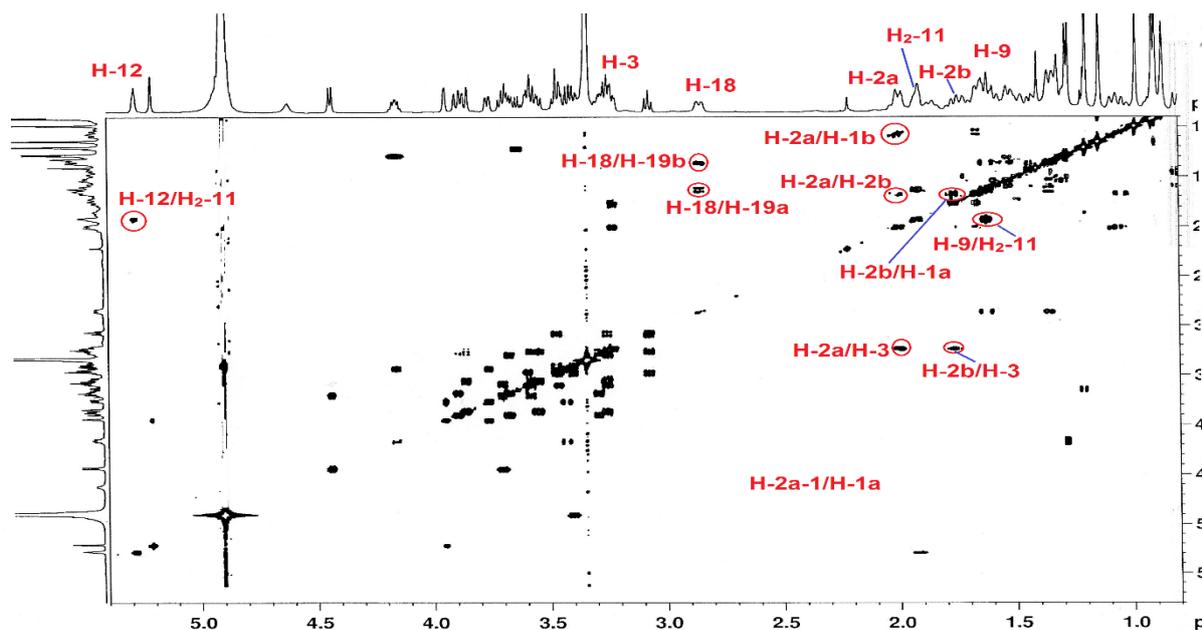
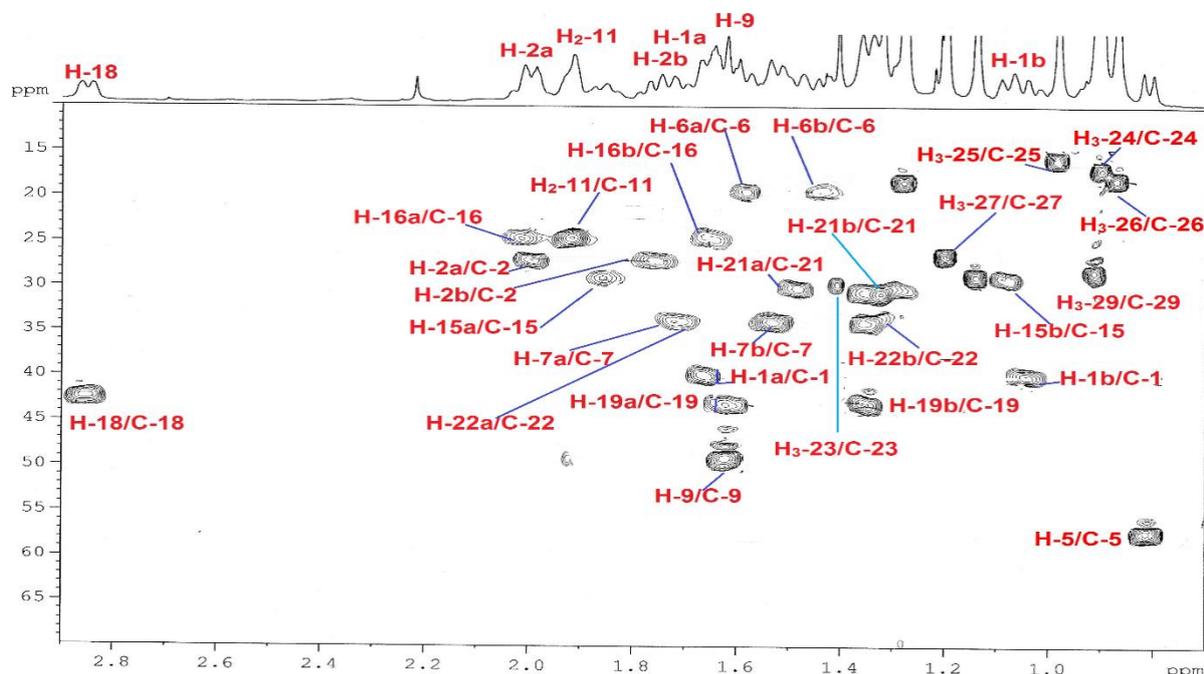


Figure IV.57 : Corrélations COSY pour le composé 25

Spectre VI.106 : Spectre COSY (CD_3OD , 600 MHz) de la partie génine du composé 25

Les carbones de ces groupements sont repérés C-1 ($\delta_C = 39,7$ ppm), C-2 ($\delta_C = 27,0$ ppm), C-3 ($\delta_C = 92,3$ ppm), C-9 ($\delta_C = 49,0$ ppm), C-11 ($\delta_C = 24,3$ ppm), C-18 ($\delta_C = 42,5$ ppm), C-12 ($\delta_C = 123,0$ ppm) et C-19 ($\delta_C = 42,7$ ppm); (**Spectre IV.107**).



Spectre VI.107 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) de la partie génine du composé 25

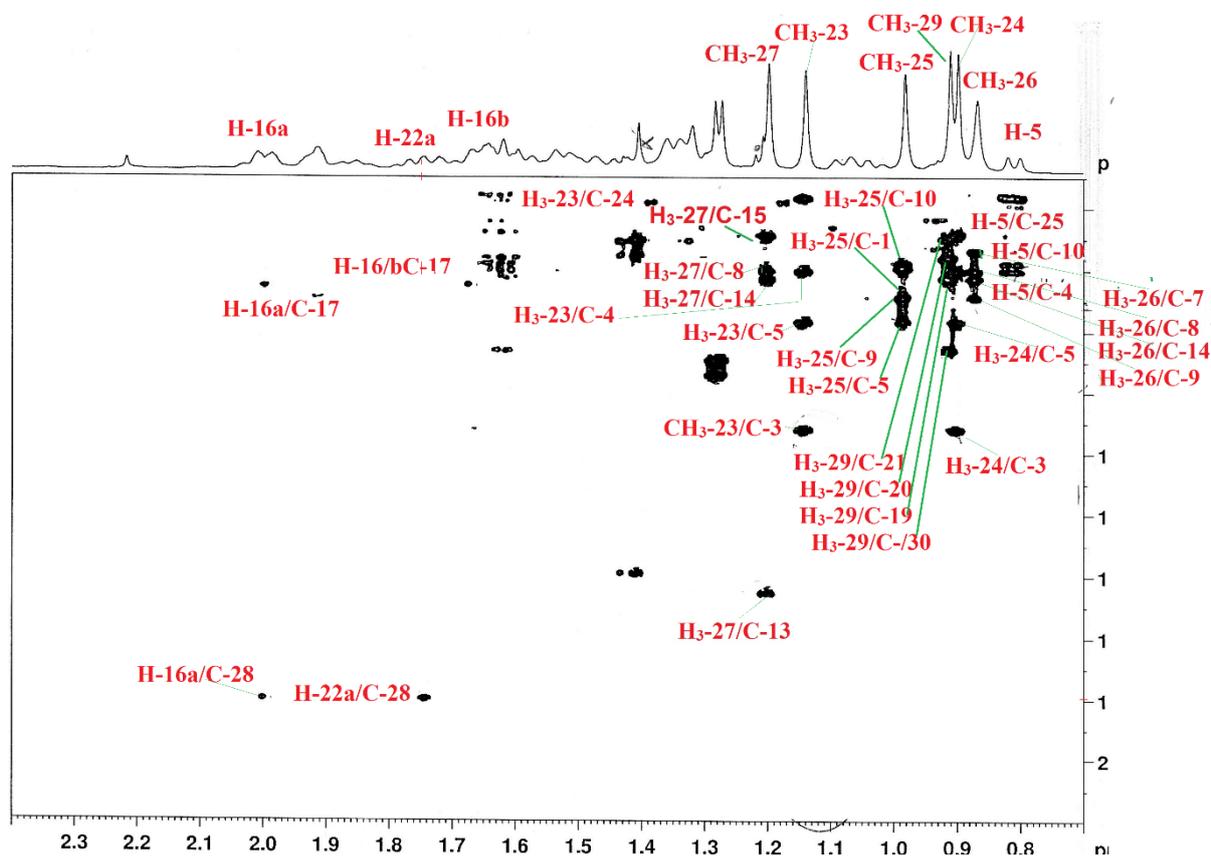
A partir du proton H-3 qui montre sur le spectre HMBC (**Spectre VI.108**) des corrélations avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 39,0$ ppm et un signal sortant à $\delta_C = 57,0$ ppm d'un groupement CH, attribués respectivement aux carbones C-4 et C-5, ainsi qu'avec deux signaux de groupements méthyliques résonant à $\delta_C = 28,5$ ppm et $\delta_C = 16,7$ ppm attribués aux méthyles angulaires 23-CH₃ et 24-CH₃

- le carbone C-5 corrèle avec les protons méthyliques en 25-CH₃. Son proton H-5 localisé ($\delta_H = 0,88$; *m*), par l'expérience HSQC (**Spectre VI.107**) conduit à repérer sur le spectre COSY (**Spectre VI.106**), les protons H₂-6 ($\delta_H = 1,58$ et $\delta_H = 1,43$ ppm) et H₂-7 ($\delta_H = 1,70$ et $\delta_H = 1,53$ ppm) et leurs carbones respectifs à $\delta_C = 19,0$ ppm et $\delta_C = 33,6$ ppm.
- Les protons méthyliques 25-CH₃ couplent avec les carbones C-1 ($\delta_C = 39,7$ ppm), C-10 ($\delta_C = 37,0$ ppm) et C-9 ($\delta_C = 49,0$ ppm). Toujours sur le spectre HMBC, la corrélation observée entre le proton H-9 résonant à $\delta_H = 1,61$ ppm et le carbone éthylénique C-12 résonant à $\delta_C = 123,0$ ppm permet de confirmer la localisation de la double liaison en C₁₂-C₁₃.
- Les protons méthyliques 26-CH₃ résonant à $\delta_H = 0,87$ ppm, montre sur le spectre HMBC quatre taches de corrélation avec les carbones C-7 et C-9 déjà assignés, et deux carbones quaternaires C-8 ($\delta_C = 40,1$ ppm) et C-14 ($\delta_C = 42,4$ ppm). Ce dernier identifié

suite à leur corrélation avec le proton éthylénique H-12, corrèle avec un autre groupement méthyle correspondant au méthyle CH₃-27 ($\delta_{\text{H}}=1,20$ ppm), qui couplent à leur tour avec les carbones C-8 ($\delta_{\text{C}}=40,1$ ppm), C-15 ($\delta_{\text{C}}=2,6$ ppm), ainsi qu'avec un carbone éthylénique quaternaire C-13 résonnent à ($\delta_{\text{C}}=145,0$ ppm). (Spectre IV.108).

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre IV.108) du composé 25 montre également une tache de corrélation entre les protons H₂-16 déjà identifié et un carbone quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}}=46,6$ ppm attribué au carbone C-17. Un couplage est observé entre les protons H-18 et H-22a avec un carbone du carbonyle acide résonant à $\delta_{\text{C}}=180,0$ ppm assigné au carbone C-28.

Les protons du CH₃-29 résonant à $\delta_{\text{H}}=0,98$ ppm, donnent des couplages avec les carbones C-20 ($\delta_{\text{C}}=36,0$ ppm), C-21 ($\delta_{\text{C}}=29,8$ ppm) déjà identifié, C-19 ($\delta_{\text{C}}=42,7$ ppm) et C-30 ($\delta_{\text{C}}=66,0$ ppm) (Spectre VI.107), le déblindage du carbone 30 indique que le CH₃-30 est oxydé en alcool primaire.



Spectre VI.108 : Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) de la partie génine du composé 25

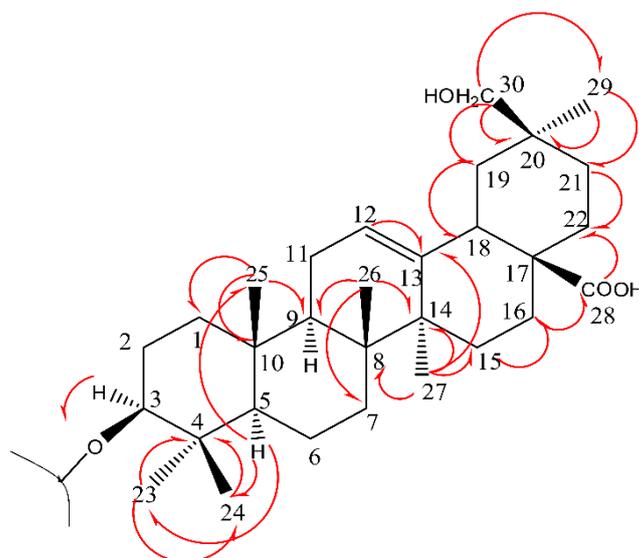
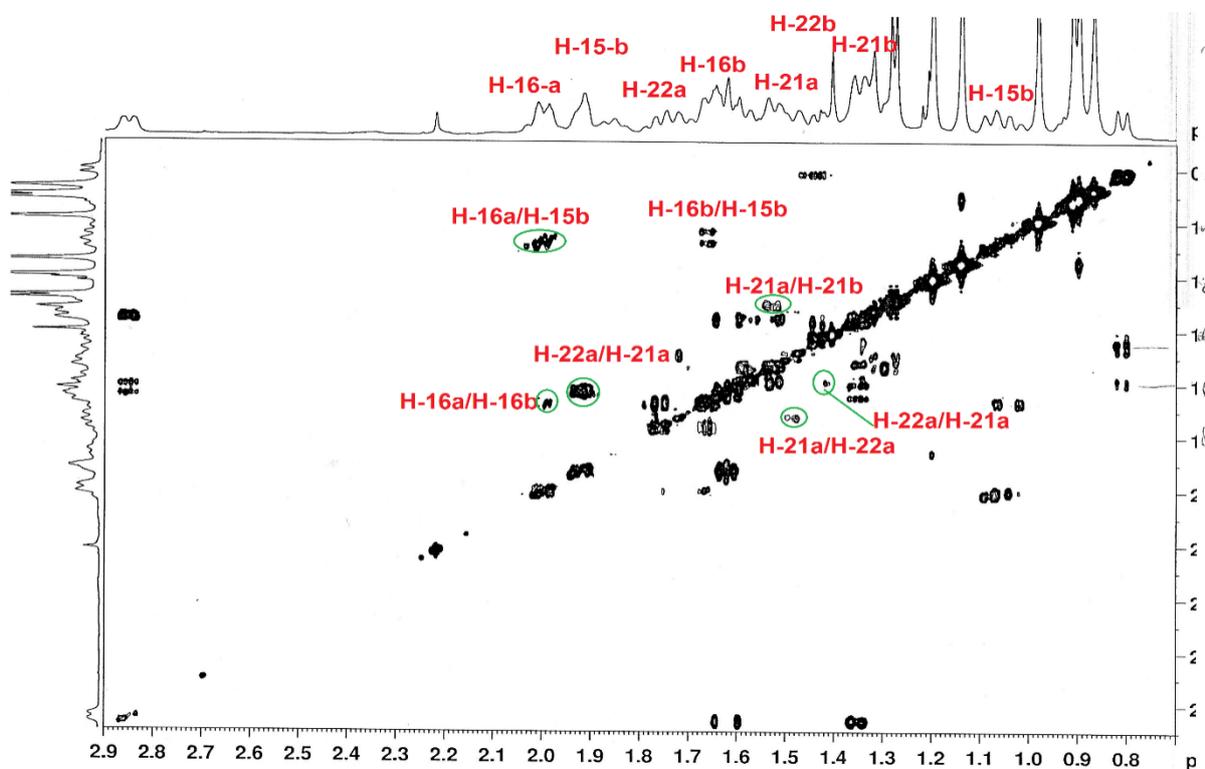


Figure IV.58 : Corrélations HMBC de la génine du composé 25

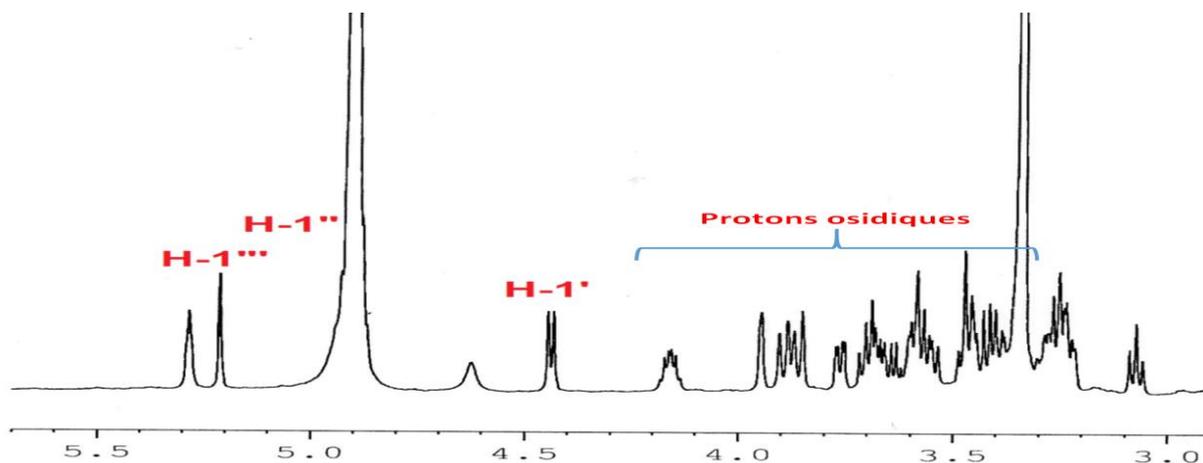
Les autres carbones et protons de la génine sont identifiés par analyse combinée des deux expériences HSQC et COSY H-H.

Les protons H₂-15 ($\delta_{\text{H}} = 1,86$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,08$ ppm), et H₂-21 ($\delta_{\text{H}} = 1,47$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 1,29$ ppm) sont localisés, d'après l'expérience COSY (Spectre IV.109), en raison de leurs corrélations qu'ils présentent avec les protons H₂-16, et H₂-22 respectivement. Leurs carbones sont repérés à $\delta_{\text{C}} = 28,6$ ppm) C-16, et ($\delta_{\text{C}} = 29,8$ ppm) C-21.



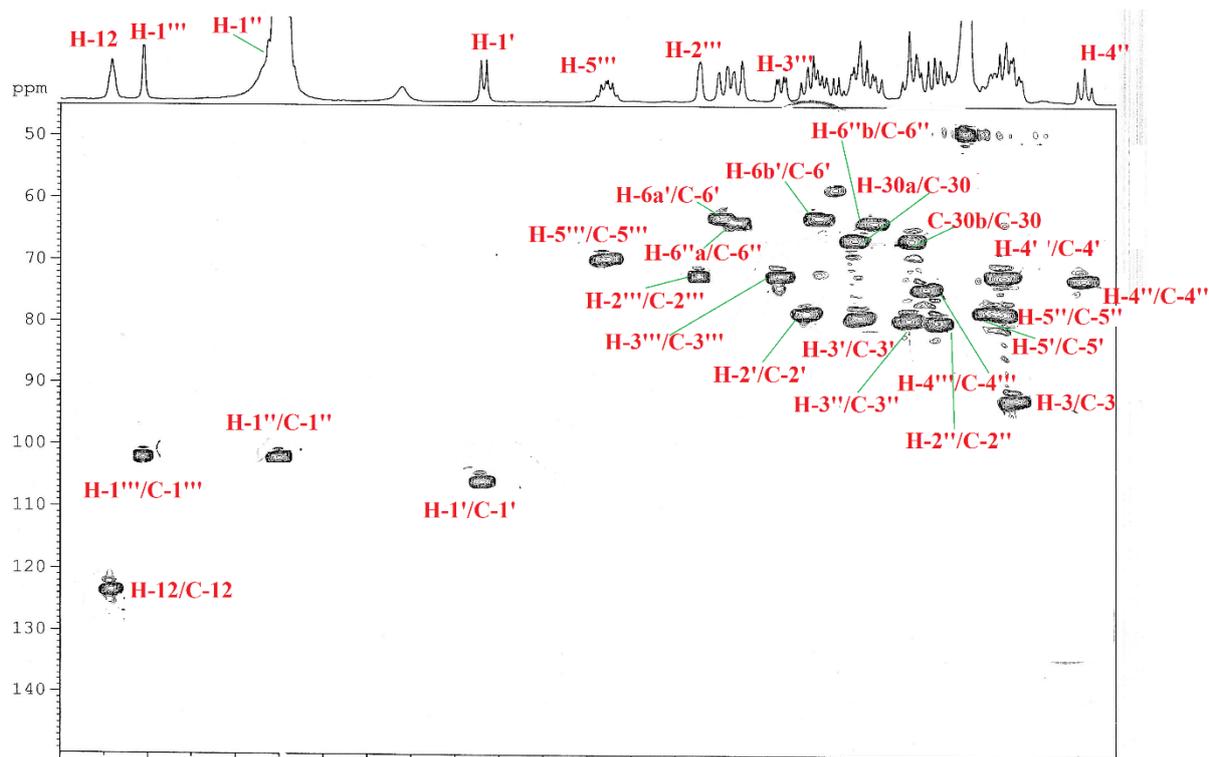
Spectre VI.109 : Spectre COSY (CD₃OD, 600 MHz) de la partie génine du composé 25

La partie osidique de ce saponoside est constituée de trois unités osidiques dont les protons anomériques résonnent à $\delta_{\text{H}}=4,45$ ppm ($d, J=7,4$ Hz), $\delta_{\text{H}}=4,90$ ppm ($d, J=7,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}}=5,23$ ppm ($d, J=1,6$ Hz) (**Spectre IV.110**) La présence d'un groupement méthyle à $\delta_{\text{H}}=1,28$ ppm ($d, J=6,2$ Hz) observé sur le spectre RMN¹H et la constante de couplage du dernier proton anomère ($d, J=1,6$ Hz) montre clairement qu'une des trois unités osidiques est un α -L-rhamnose.



Spectre IV.110 : Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) des anomères du composé 25

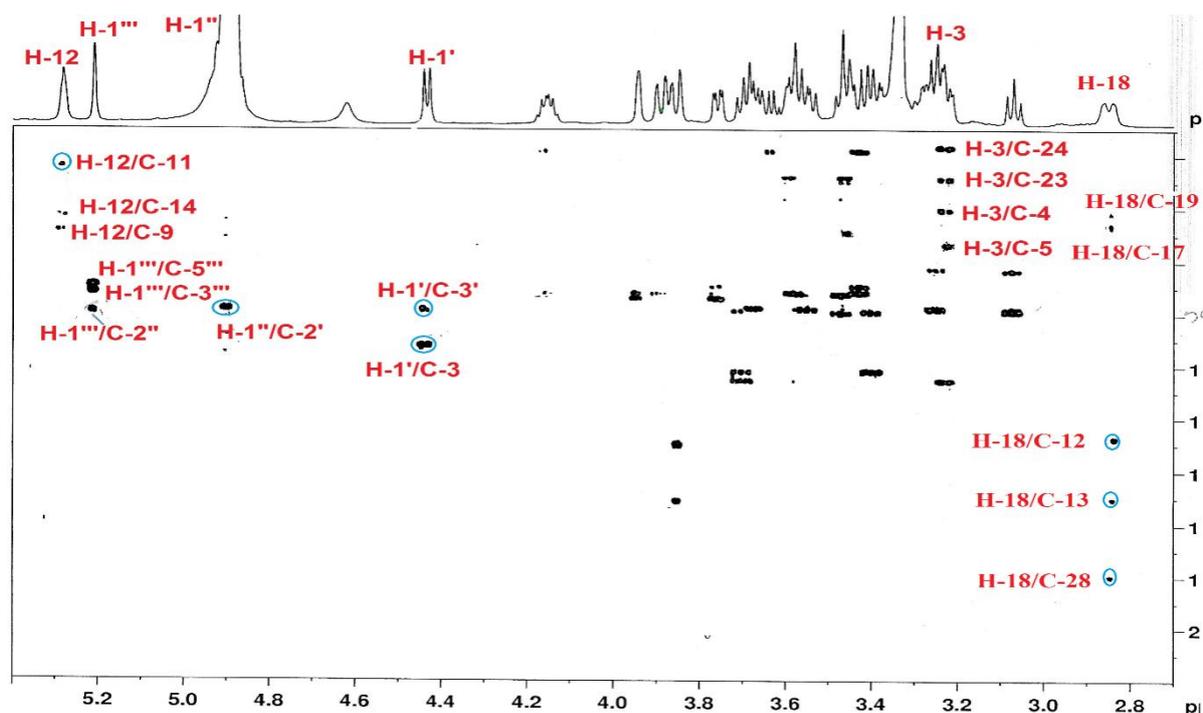
Les grandes valeurs des constantes de couplage des protons de deux autres unités osidiques permettent d'identifier ces hexoses comme étant deux glucoses où les valeurs $J_{\text{H-1}''/\text{H-2}''}=7,4$ Hz et $J_{\text{H-1}'''/\text{H-2}'''}=7,5$ Hz précisent leur configuration β -D-glucose (Glc A et Glc B). Les carbones de ces deux β -D-glucopyranosides sont détectés à travers l'analyse du spectre HSQC (**Spectre IV.111**).



Spectre IV.111 : Spectre HSQC (CD₃OD, 600 MHz) de la partie osidique des anomères du composé 25

Après l'identification des 3 unités osidiques, il faut maintenant déterminer leurs points de branchements. Le déblindage des carbones C-2' GlcA ($\delta_{\text{H}}=78,0$ ppm) et C-2'' Glc B ($\delta_{\text{H}}=79,5$ ppm), laisse suggérer des substitutions à ces niveaux par des sucres. Le séquençage de la partie osidique est confirmé par analyse du spectre HMBC (spectre IV.112) sur lequel les corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ suivantes sont observées :

- H-1''' Rhaternal / C-2'' glucose B;
- H-1'' Glucose B /C-2'Glucose A;
- H-1' Glucose A /C-3 de la génine.



Spectre VI.112: Spectre HMBC (CD₃OD, 600 MHz) de la partie génine du composé 25

Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé :

L'acide 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] queretaroïque. Ce saponoside connu sous le nom de Pharbitoside A, a été isolé antérieurement à partir des racines de *Pharbitisnil* [42]

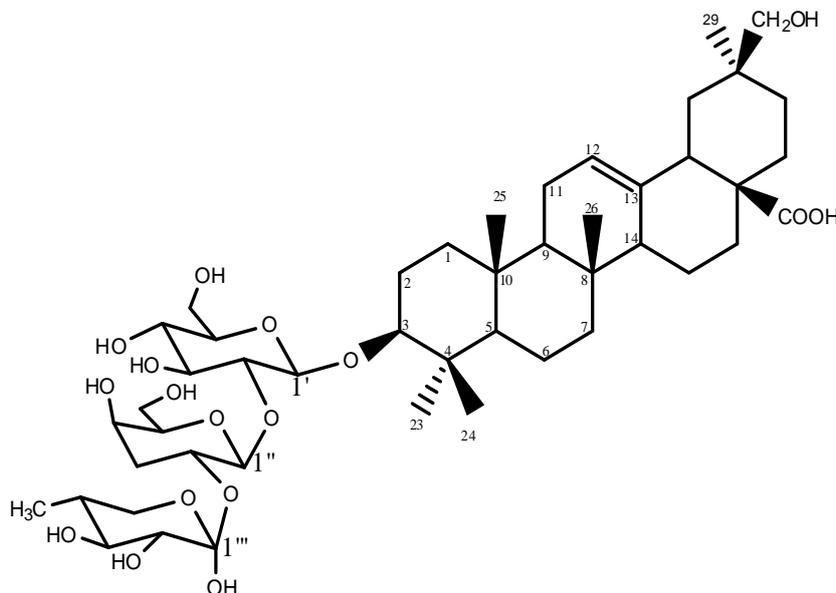


Figure IV.59 : Structure du composé 25 : L'acide 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] queretaroïque

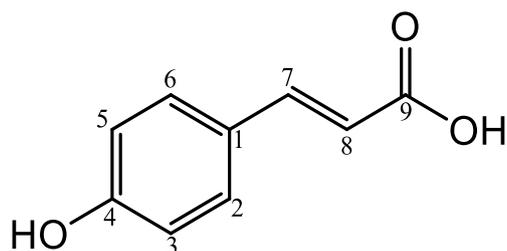
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 25 sont réunis dans le tableau IV.28.

Tableau IV.28 : Données RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé 25

N°	δC	δH (<i>m</i> , J Hz)
1	39,7(CH ₂)	1,04-1,66, <i>m</i>
2	27,0(CH ₂)	1,74-1,99, <i>m</i>
3	92,3(CH)	3,24, <i>dd</i> (10,3- 4,5)
4	39,0(C)	-
5	57,0(CH)	0,88, <i>m</i>
6	19,0(CH ₂)	1,58-1,43, <i>m</i>
7	33,6(CH ₂)	1,53-1,70, <i>m</i>
8	40,1(C)	-
9	49,0(CH)	1,61, <i>m</i>
10	37,0(C)	-
11	24,3(CH ₂)	1,91, <i>m</i>
12	123,0(CH)	5,27, <i>t</i> (3,5)
13	145,0(C)	-
14	42,4(C)	-
15	28,6(CH ₂)	1,08-1,86, <i>m</i>
16	24,2(CH ₂)	1,66-2,02, <i>m</i>
17	46,6(C)	-
18	42,5(CH)	2,85, <i>dd</i> (13,8-3,8)
19	42,7(CH ₂)	1,39, <i>m</i> 1,62, <i>t</i> (13,8)
20	36,0(C)	-
21	29,8(CH ₂)	1,47, <i>dm</i> 1,29, <i>dm</i>
22	33,6(CH ₂)	1,70, <i>dm</i> 1,34, <i>m</i>
23	28,5(CH ₃)	1,14, <i>s</i>
24	16,7(CH ₃)	0,90, <i>s</i>
25	15,1(CH ₃)	0,98, <i>s</i>
26	17,9(CH ₃)	0,87, <i>s</i>

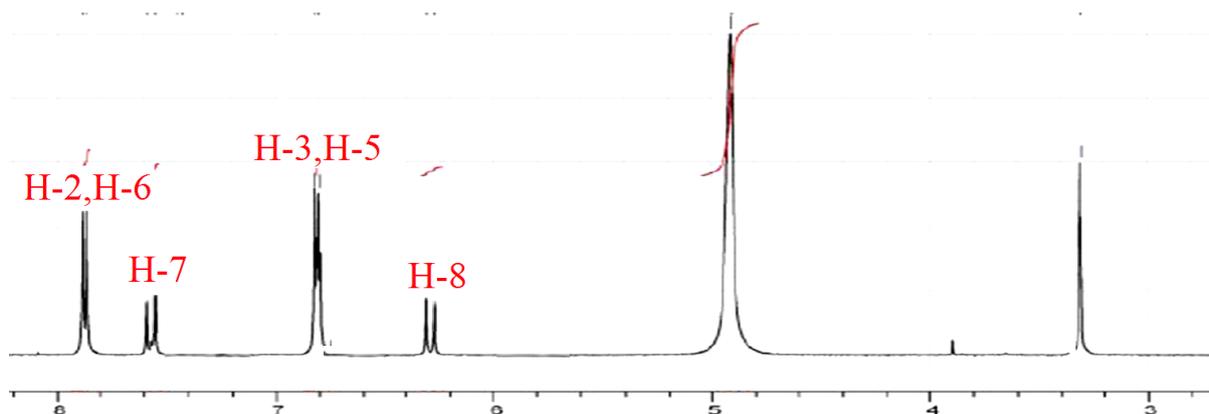
27	26,0(CH ₃)	1,20, <i>s</i>
28	180,0(CH ₃)	-
29	31,0(CH ₃)	0,98, <i>s</i>
30	66,0(CH ₃)	3,45, <i>d</i> (11,5) 3,58, <i>d</i> (11,5)
Glucose		
1'	105,7(CH)	4,45, <i>d</i> (8,3)
2'	78,0(CH)	3,70, <i>t</i> (7,4)
3'	78,4(CH)	3,58, <i>dd</i> (9,2-8,3)
4'	72,0(CH)	3,43, <i>t</i> (9,2)
5'	77,8(CH)	3,20, <i>d</i> (9,2)
6'	62,0(CH ₂)	3,69, <i>m</i> 3,89, <i>m</i>
Glucose		
1''	102,1(CH)	4,90, <i>d</i> (7,5)
2''	79,5(CH)	3,40, <i>dd</i> (9,6-7,5)
3''	77,0(CH)	3,47, <i>dd</i> (9,6-3,5)
4''	72,6(CH)	3,07, <i>nd</i>
5''	77,0(CH)	3,25, <i>m</i>
6''	66,5(CH ₂)	3,64, <i>m</i> 3,84, <i>m</i>
Rhamnose		
1'''	101,7(CH)	5,23, <i>d</i> (1,6)
2'''	72,2(CH)	3,94, <i>dd</i> (3,3-1,6)
3'''	72,0(CH)	3,76, <i>nd</i>
4'''	74,0(CH)	3,42, <i>t</i> (9,6)
5'''	69,5(CH)	4,15, <i>m</i>
6'''	17,0(CH ₃)	1,28, <i>d</i> (8,6)

IV.2.7. Elucidation structurale du composé 26



La comparaison des spectres RMN ^1H et ^{13}C (**Spectre IV. 113**) de ce composé avec ceux du composé **20** indique la présence d'un cycle aromatique 1,4-disubstitué dont les protons *ortho* sont identifiés à H-2/H-6 ($\delta_{\text{H}}=7,88$ ppm, *d*, $J=8,7$ Hz), ainsi que les protons *métra* à H-3/H-5 ($\delta_{\text{H}}=6,81$ ppm, *d*, $J=8,7$ Hz).

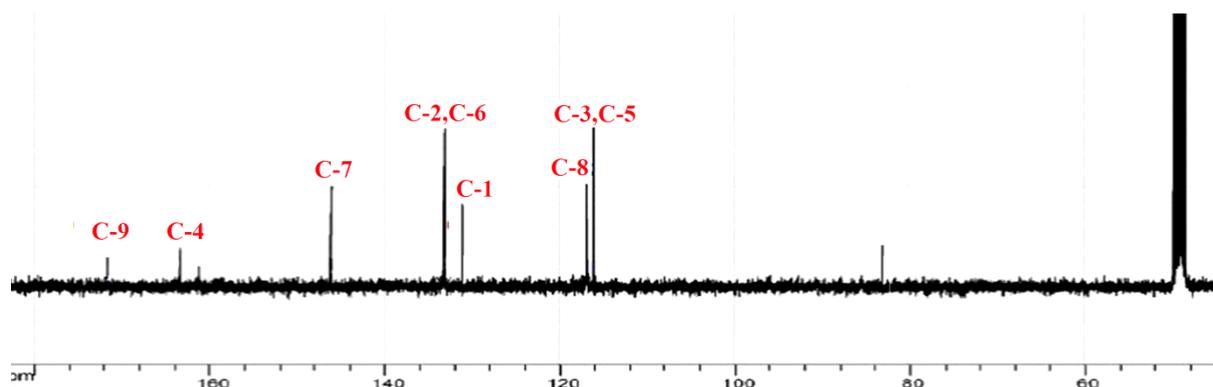
Le spectre montre également la présence d'un système AX à $\delta_{\text{H}}=7,57$ et $\delta_{\text{H}}=6,28$ ppm ($J=15,9$ Hz) montre un couplage vicinal éthylénique trans (CH=CH).



Spectre IV.113 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) du composé 26

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre IV.114**) du composé **26** montrent la présence de neuf atomes de carbones :

- ◆ Six groupements CH dont deux éthyléniques $\delta_{\text{C}}=146,1$ ppm et $\delta_{\text{C}}=116,9$ ppm et quatre aromatiques à $\delta_{\text{C}}=133,1$ et $\delta_{\text{C}}=116,2$ ppm.
- ◆ Deux signaux correspondants aux carbones quaternaires l'un à $\delta_{\text{C}}=127,5$ ppm et l'autre oxygéné à $\delta_{\text{C}}=163,3$ ppm.
- ◆ Un carbonyle d'une fonction acide à $\delta_{\text{C}}=171,7$ ppm.



Spectre IV.114 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) du composé **26**

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature [43], la structure du composé **26** a pu être établie en tant que l'**acide *p*-coumarique** connue également sous le nom de **l'acide parahydroxycinnamique**, Cette molécule est connue pour ses activités antioxydant [44] antidiabétiques et antihyperlipidémique[45].

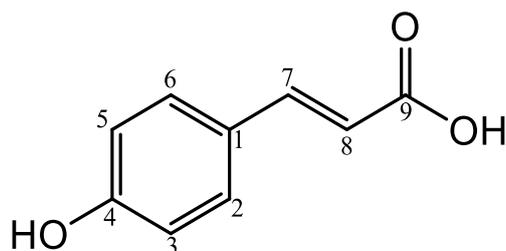


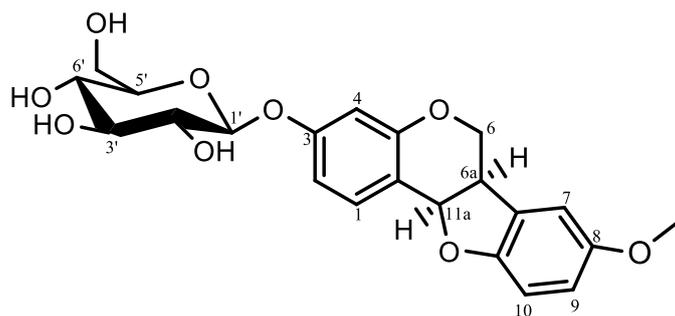
Figure IV.60 : Structure du composé **26** l'**acide *p*-coumarique**

Les données de la RMN ^{13}C et ^1H sont rassemblées dans le tableau IV.29.

Tableau IV.29 : Données de RMN ^1H et ^{13}C du composé **26**

N°	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)
1	127,5(C)	-
2	133,1(CH)	7,88, <i>d</i> (8,7)
3	116,2(CH)	6,81, <i>d</i> (8,9)
4	163,32(C)	-
5	116,2(CH)	6,81, <i>d</i> (8,9)
6	133,1(CH)	7,88, <i>d</i> (8,7)
7	146,1(CH)	7,57, <i>d</i> (15,9)
8	116,9(CH)	6,28, <i>d</i> (15,9)
9	171,7(C)	-

IV.2.8. Elucidation structurale du composé 27

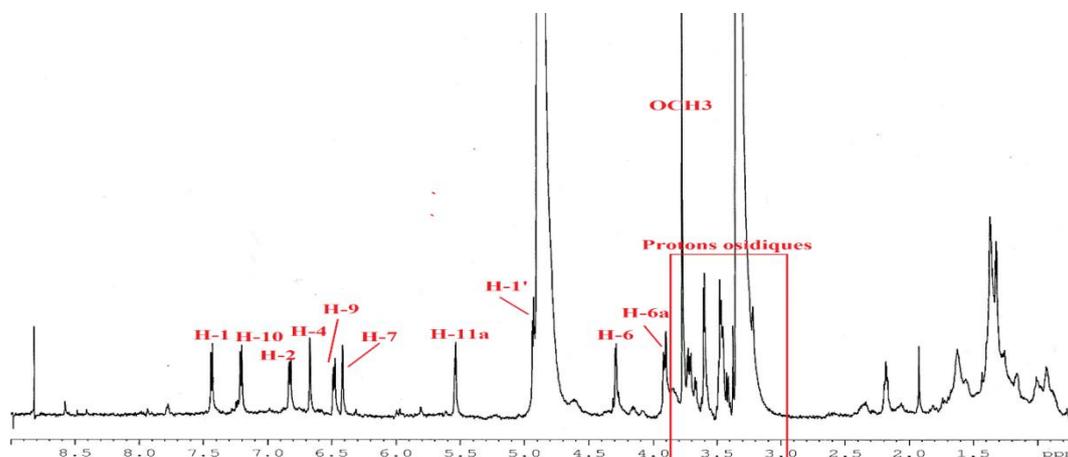


Le composé **27** est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le MeOH.

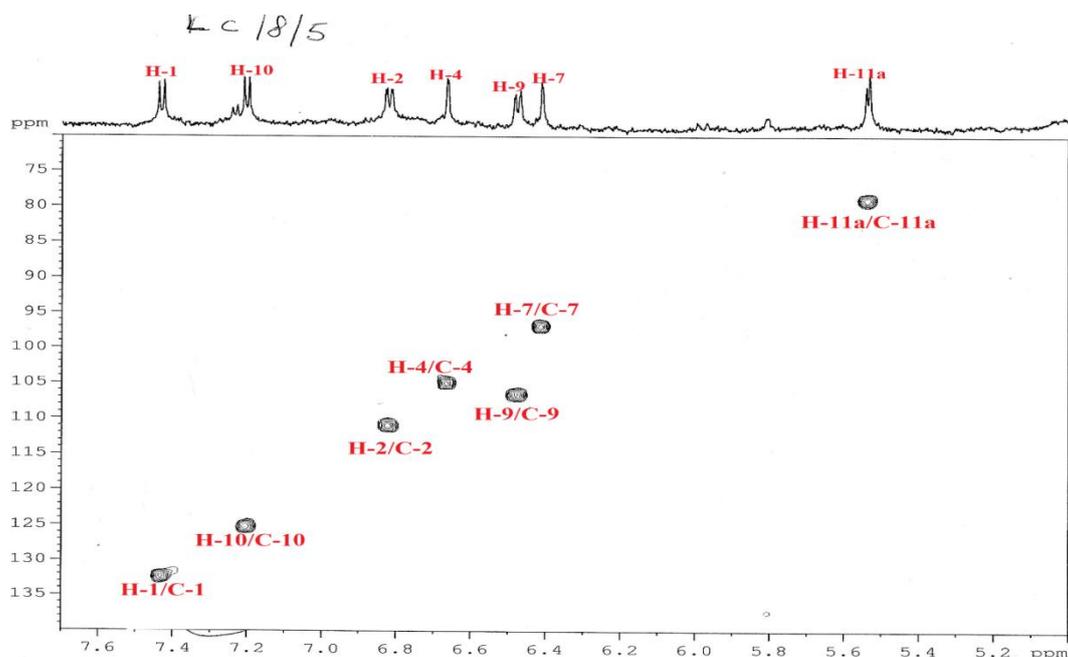
Le spectre RMN ^1H (**Spectre IV.115**) du composé **27**, supportés par les expériences HSQC (**Spectre IV.116 et IV.117**), COSY H-H (**Spectre IV.118, Spectre IV.119**) et HMBC (**Spectre IV.120**) sont globalement similaires à ceux du composé **5** déjà élucidé particulièrement au niveau des cycles A et C (**Figure IV.20**).

En effet, on identifie aisément :

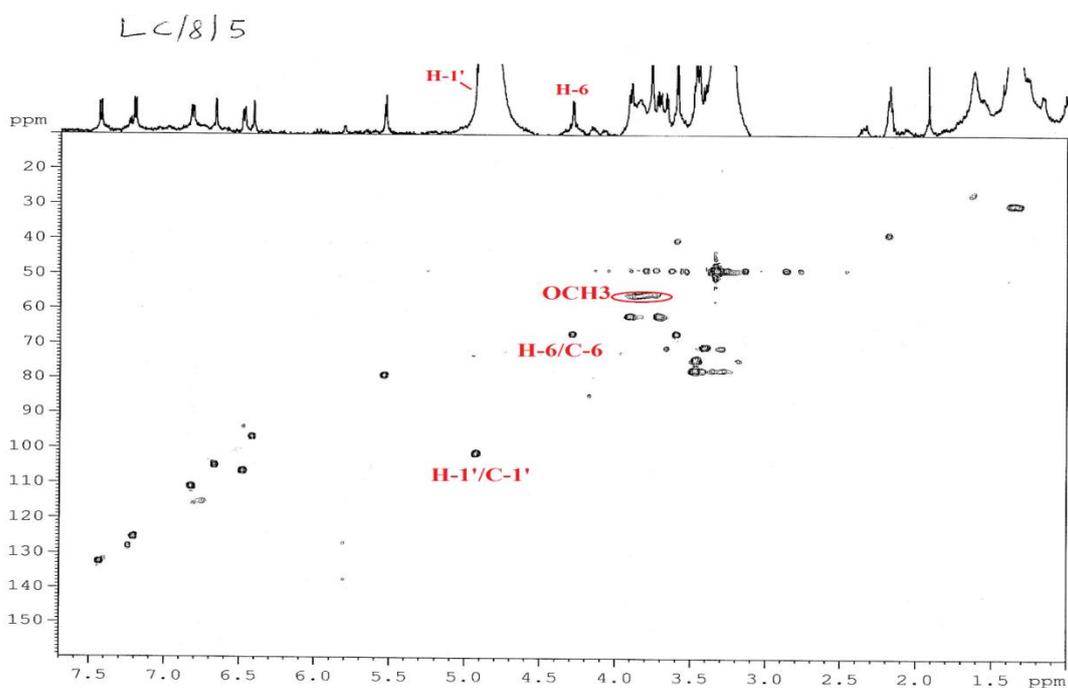
- ◆ la même aglycone de type ptérocarpan à travers les signaux caractéristiques du cycle A H-1 [$\delta_{\text{H}}=7,4$ ppm(*d*, $J = 8,7$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}= 132,2$], H-2 [$\delta_{\text{H}}= 6,82$ (*dd*, $J= 8,7-1,8$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=110,7$], H-4 [$\delta_{\text{H}}=6,64$ (*d*, $J= 1,8$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}= 104,8$], ainsi que H₂-6 [$\delta_{\text{H}}=4,29$ (*dd*, $J = 10,52- 4,12$) et $\delta_{\text{H}}=3,59$ (*m*)/ $\delta_{\text{C}}=66,6$], H-6a [$\delta_{\text{H}}=3,63$ (*m*)/ $\delta_{\text{C}}=41,0$] et H-11a [$\delta_{\text{H}}= 5,52$ (*d*, $J = 8,5$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}= 79,0$].
- ◆ la même unité osidique, en l'occurrence un β -D-glucose à travers les signaux caractéristiques suivants : H-1' [$\delta_{\text{H}}=4,92$ (*d*, $J= 7,4$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=101,0$], H-2' [$\delta_{\text{H}}=3,35$ (*t*, $J = 7,4$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=76,1$], H-3' [$\delta_{\text{H}}=3,46$ (*t*, $J = 7,6$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=77,0$], H-4' [$\delta_{\text{H}}=3,36$ (*m*)/ $\delta_{\text{C}}=70,0$], H-5' [$\delta_{\text{H}}=3,42$ (*m*)/ $\delta_{\text{C}}=75,8$], H-6'a [$\delta_{\text{H}}=3,70$ (*dd*, $J = 11,9- 5$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=61,3$], et H-6'b [$\delta_{\text{H}}=3,90$ (*dd*, $J = 11,9- 2,2$ Hz)/ $\delta_{\text{C}}=61,3$].



Spectre IV.115 : Spectre ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé 27



Spectre IV.116 : Spectre HSQC étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé **27**



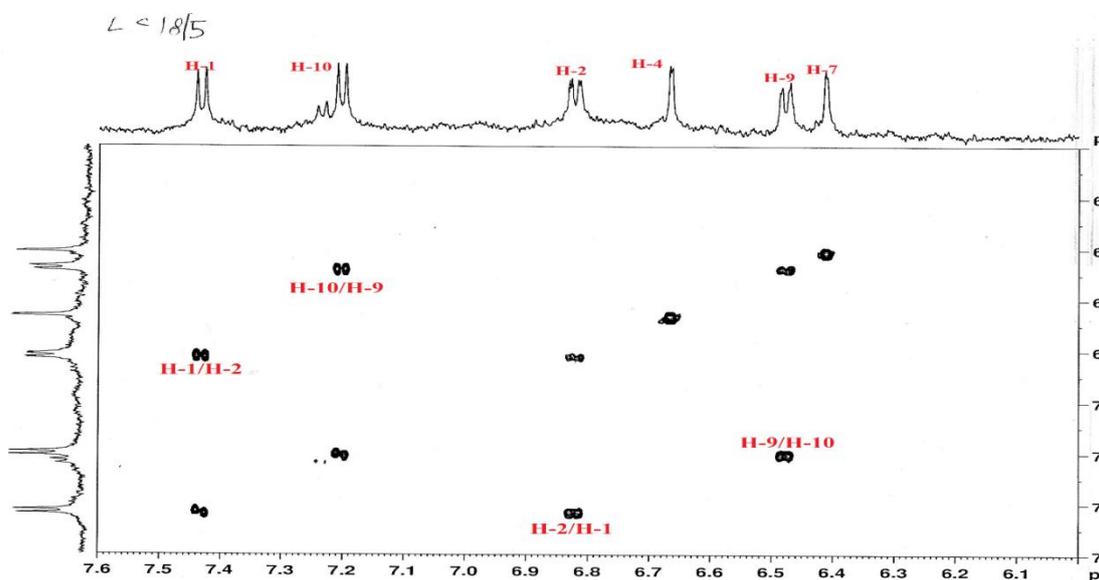
Spectre IV.117 : Spectre HSQC étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé **27**

La différence entre les deux composés **27** et **5** réside principalement dans la disparition des protons du groupement méthylène $\text{H}_2\text{-12}$ observés pour le composé **5** et l'apparition de

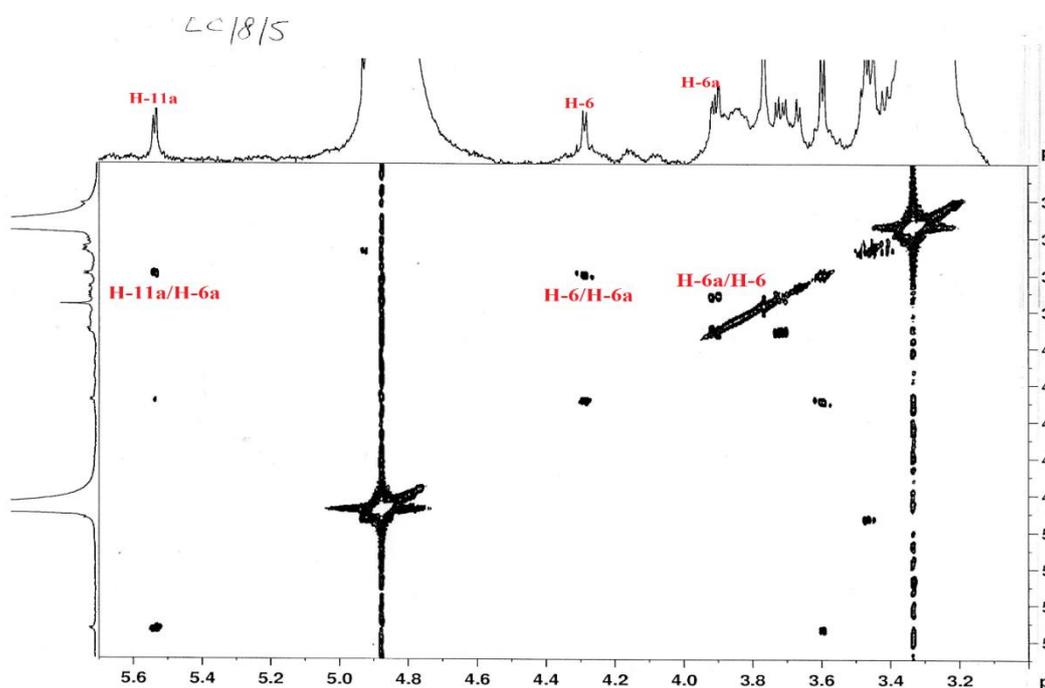
- ◆ Trois protons aromatiques appartenant à un même système de spins de type ABX à $\delta_{\text{H}}=6,41$ (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-7), $\delta_{\text{H}}=6,47$ (*dd*, $J = 8,7-2,2$ Hz, H-9) et $\delta_{\text{H}}=7,21$ (*d*, $J = 8,7$ Hz, H-10) caractéristiques d'un noyau aromatique 1,2,4 trisubstitués. Leurs carbones

sont détectés sur le spectre HSQC J -modulé à $\delta_C=96,6$ ppm, $\delta_C=107,4$ ppm et $\delta_C=124,8$ respectivement.

- ◆ Un signal singulet d'intégration 3H à $\delta_H=3,78/\delta_C=55,0$ ppm, atteste la présence d'un groupement méthoxyle comparativement au composé 5.



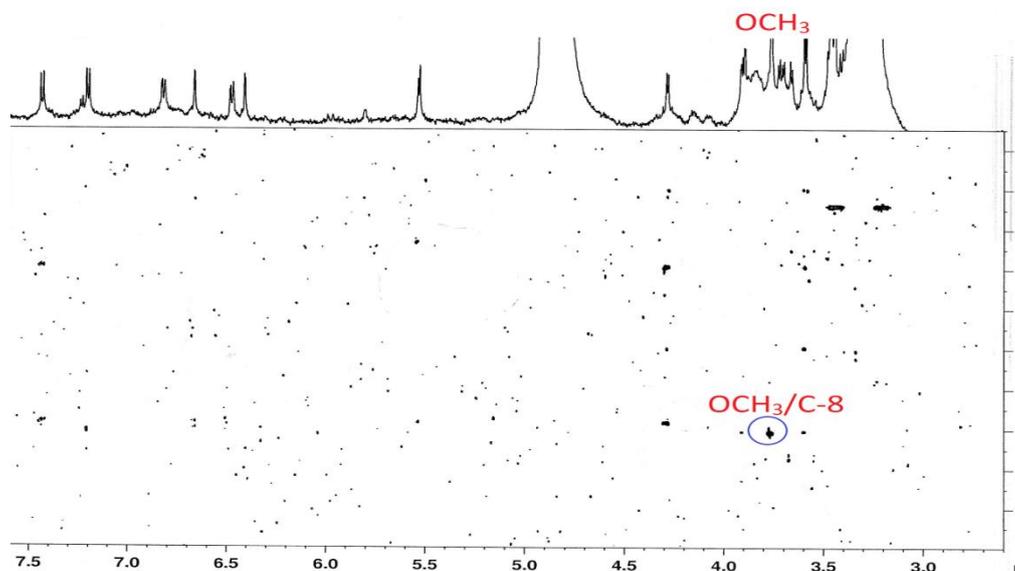
Spectre IV.118 : Spectre COSY étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 27



Spectre IV.119 : Spectre COSY étalé (CD_3OD , 600 MHz) du composé 27

La présence du système ABX indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 8 par le groupement méthoxyle. Ceci a été confirmé par le spectre HMBC qui montre des corrélations

entre les protons de ce groupent et un carbone oxygéné à $\delta_c=161,0$ ppm ne pouvant être que le carbone C-8.



Spectre IV.120 : Spectre HMBC étalé (CD₃OD, 600 MHz) du composé 27

Ainsi, cette molécule reportée dans la **figure IV.47** est connue sous le nom de **(3-O-β-D-glucoside-9-méthoxyptero-carpan** ou **Medicarpin 3-O-β-D-glucoside**). Elle a été isolée auparavant d'espèces de plusieurs familles [46]. Il est important de signaler que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *lotus*.

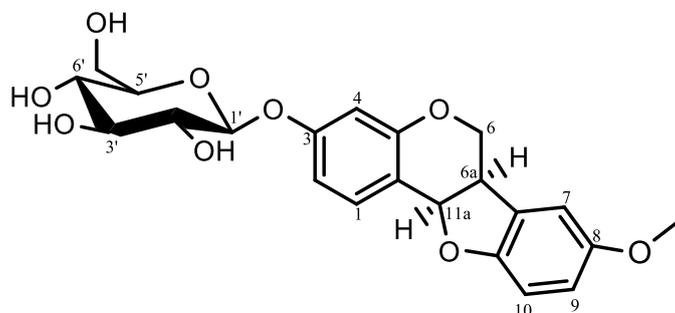


Figure IV.61 : Structure du composé 27 : Medicarpin 3-O-β-D-glucoside

Le tableau ci-après reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 27.

Tableau IV.30 : Données de RMN ¹H et RMN ¹³C du composé 27

N°	δ_c	δ_H (m, J Hz)
1	132.2(CH)	7.40, d (8,7)
2	110.7(CH)	6.82, dd (8,7-1,8)
3	158.6(CH)	-
4	104.8(CH)	6.64, d (1,8)
4-a	156.0(C)	-

6	66.6(CH₂)	4,27, <i>dd</i> (10,52- 4,12) 3,68, <i>m</i>
6a	41.0(CH)	3.63 <i>m</i>
6b	118.3(C)	-
7	96.6(CH)	6.41, <i>d</i> (2,2)
8	161.0(C)	-
9	107.4(CH)	6.47, <i>dd</i> (8,7-2,2)
10	124.8(CH)	7.21, <i>d</i> (8,7)
10a	154.8(C)	-
11a	79.0(CH)	5.52, <i>d</i> (8,5)
11b	114.0(C)	-
OCH₃	55.0(CH₃)	3.78, <i>s</i>
Glucose		
1'	101.0(CH)	4.92 <i>d</i> (7.4)
2'	76.1(CH)	3,27, <i>m</i>
3'	77.0(CH)	3,34, <i>m</i>
4'	70.0(CH)	3,16, <i>m</i>
5'	77.0(CH)	3,30, <i>m</i>
6'	61,3(CH₂)	3,70, <i>dd</i> (11,5 - 1,6) H-6'a 3,48, <i>dd</i> (11,5-5,3) H-6'b

IV.3.Conclusion

Afin d'accéder à la composition chimique de deux espèces Algériennes *Onoins angustissima* Lam. Var et *Lotus corniculatus* L, appartenant à la famille Fabaceae, une étude phytochimique a été menée sur l'exudat chloroforme et l'extrait *n*-butanol d'*Onoins angustissima* Lam. Var ,ainsi que les extraits *n*-butanol et chloroforme de l'espèce *Lotus corniculatus* L. Au cour de cette investigation, 27 métabolites secondaires dont deux possèdent de structures nouvelles, ont été isolés et caractérisés par la mise à contribution de différentes techniques chromatographiques (CLHP, CC et CCE) et spectroscopiques (RMN ^1H et ^{13}C , COSY H-H, HSQC, HMBC, HR-ESI-MS, ESI-MS, HR-EI-MS, UV et $[\alpha]_D$), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés caractérisés se répartissent en quatre classes chimiques de métabolites secondaires incluant les flavonoïdes, les polyphénols et les saponides .

Références bibliographiques :

- [1] **Markham K. R.**, Mabry T. J., 1975. Ultraviolet-Visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: *The Flavonoids*. Harborne, J., Mabry, T. J., Mabry, H. (eds.). Chapman and Hall, London. 45-77 .
- [2] **Ghribi L.**, Waffo-Teguo P., Cluzet S., Marchal A., Marques J., Merillon JM., Ben Jannet H. 2015. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima*L. *Bioorg Med ChemLett*. 25:3825–3830.
- [3] **Mabry T. J.**, Markham K. R., Thomas M. B., 1970. The systematic identification of Flavonoids. *springer, Berlin*. 169 -261.
- [4] **Wang Q.**, Ji S, Yu SW., Wang HX ., Lin XH., Ma TT., Qiao X., Xiang C.,Ye M, Guo D.,.2013. Three new phenolic compounds from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis*. *Fitoterapia*. 85:35–40.
- [5] **Kovalev V. N.**, Borisov M. I., 1974. Spiridonov, V. N.,. Phenolic compounds of *Ononis arvensis*. I. *Chem. Nat. Compd*. 10, 820–821.
- [6] **Kirmizigül S.**, Gören N., Yang S-W., Cordell G. A., Bozok-Johansson C., 1997. Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. *J.Nat. Prod*. 60, 378–381.
- [7] **Cooper J.D.**, Qiu F., Paiva NL., 2002. Biotransformation of an exogenously supplied isoflavonoid by transgenic tobacco cells expressing alfalfa isoflavone reductase. *Plant Cell Rep*. 20:876–884.
- [8] **Hammami S.**, Ben Jannet H., Bergaoui A., Ciavatta L., Cimino G., Mighri Z., 2004. Isolation and structure elucidation of a flavanone glycoside and vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* growing in Tunisia. *Molecules* 9, 602-608
- [9] **Slade D.**, Ferreira D., Marais JPJ., 2005. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*. 66:2177–2215.
- [10] **Horie T.**, Ohtsuru Y., Shibata K ., Yamashita K., Tsukayama M., Kawamura Y., 1998.¹³C NMR spectral assignment of A-ring of polyoxygenated flavones. *Pytochemistry*, 47: 865-874.
- [11] **Zhao S.**, Zhang L., Gao P., Shao Z., 2009. Isolation and characterisation of the isoflavones from *sprouted chickpea* seeds. *Food Chem*. 114:869–873.
- [12] **Park J A.**, Ja Kim H., Jin C., Lee K.T., Lee Y.S., 2003. A New Pterocarpan, (-)-Maackiain Sulfate, from the Roots of *Sophora subprostrata*. *Arch Pharm Res*, 26,(12), 1009-1013.
- [13] **Amer ME.**, 2001. 9-O-Methyl spinonin, A novel glucoside from *Ononis serrata* .*Alex. J. Pharm. Sci* .
- [14] **Hammami S.**, Ciavatta ML., Ben Jannet H., Cimino G., Mighri Z., 2006. Three phenolic and a sterol glycosides identified for the first time in *Matthiola longipetala* growing in Tunisia. *Croat Chem Acta*. 79,215–218.
- [15] **Matsubara Y.**, Yusa T., Sawabe A., Iizuka Y., Okamoto K .,1991. Structure and Physiological Activity of Phenyl Propanoid Glycosides in Lemon (*Citrus limon BURM. f.*) *Peel. Agricultural and Biological Chemistry* .55(3), 647-650.
- [16] **Higuchi R.**, Donnelly DMX.,1977. Pinus. Part 2. Glycosides from *Pinus contorta* need les ., *Phytochemistry* . 16:1587–1590.65-68.

- [17] **Barrero A F.**, Herrador M M., Arteaga P., Rodríguez-García I., García-Moreno M., 1977. Resorcinol Derivatives and Flavonoids of *Ononis snatrix Sub species ramosissima*. *Journal of Natural Products*, 60 (2).
- [18] **Orjala J.**, Wright AD., Behrends H., Folkers G., Sticher O., Ruegger H., Rali T. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J Nat Prod*, 57, 18–26.
- [19] **Jurd L.**, 1962. The chemistry of flavonoid compounds, 107-155.
- [20] **Huk M.**, Gorlister K., 1969. *Arch.pharm.* 302-423.
- [21] **Harborne J B.**, 1993. The flavonoids, édition Chapman and Hall/ CRC, London.
- [22] **Ghani NA.**, Ahmat N, Ismail NH, Zakaria I, Zawawi NKNA., 2012. Chemical constituent and cytotoxic activity of *Polya lthiacauli flora var. cauliflora*. *Res J Med Plant.* 6:74–82.
- [23] **Mezrag A.**, Bouheroum M., Beghidja N., Khalfaoui A., Zaiter L., Benayache S., and Benayache F., 2013 . MORE FLAVONOIDS FROM THE ETHYL ACETATE EXTRACT OF *Ononis angustissima* SPECIES, *Chemistry of Natural Compounds*, 49(4), 749-750.
- [24] **Itokawa H.**, Yoshimoto S., Morita H., 1988. Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosana* . *Phytochemistry.* 27:435–438.
- [25] **Ruiu S.**, Anzani N., Orrù A., Floris C., Caboni P., Alcaro S., Maccioni E., Distinto S., Cottiglia F., 2015. Methoxyflavones from *Stachys glutinosa* with binding affinity to opioid receptors: in silico, in vitro, and in vivo studies. *J Nat Prod.* 78:69–76.
- [26] **Agrawal PK.**, 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: *elsevier*; pp. 132, 152, 320, 321.
- [27] **Asakawa Y.**, 1971. Chemical constituents of *Alnus boldiana (Betulaceae)* II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes. *Bull Chem Soc Jpn.* 44:2765–2766.
- [28] **Dietz VH.**, Wollenweber E., Favre-Bonvin J., Smith DM., 1981. Two flavonoids from the frond exudate of *Pityrogramma triangularis var. triangularis* . *Phytochemistry.* 20:1181–1182.
- [29] **Heim K e.**, Tagliaferro AR., Bobilya DJ., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J NutrBiochem.* 13:572–584.
- [30] **Bouheroum M.**, zaiter L., Benayache S., Benayache F., Bermejo JB., Leon F., Garcia V., 2009. Four flavonoids from the aerial parts of *Ononis angustissima* species. *Chem Nat Compd.* 45:874–875.
- [31] **Tadesse G.**, Reneela P., Dekebo A. 2012. Isolation and characterization of natural products from *Helinus mystachnu s(Rhamnaceae)*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4: 1756-1762.
- [32] **Ferheen S.**, Ahmed E., Afza N., Malik A., 2005. Phytochemical Investigations on *Hypericum oblongifolium*. *Jour. Chem. Soc. Pak.* 27, 533-537.
- [33] **Golea L.**, Haba H., Lavaud C., Long C., Benkhaled M., 2012. Chemical constituents from *Lotus pusillu sMedik.* *Biochemical Systematics and Ecology.* 45:12-15
- [34] **Markham K. R.**, Ternai B., Stanley R., Geiger H., Mabry T. J., 1978. Carbon -13 NMR studies of flavonoids-III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, 34: 1389-1397.

- [35] **Krenn L.**, Miron A., Pemp E., Petr U., Kopp B., 2003. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Z Naturforsch.*, 58:11–16.
- [36] **Choi Y. H.**, Lim Y. H., Yeo H., and Kim J., 1996. A flavonoid diglycoside from *Lepisorus ussuriensis*. *Phytochemistry*, 43, 1111-1113.
- [37] **Hernández H.**, Aranda C., López G., Riego L., González A., 2011. Hap2-3-5-Gln3 determine transcriptional activation of GDH1 and ASN1 under repressive nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 157(Pt 3):879-89
- [38] **Bock K.**, Pedersen C., 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 41, 27- 49.
- [39] **Tan N.**, Zhou J., Zhao S., 1999. Advances in structural elucidation of glucuronidesoleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-O-bidismosides (1962–1997). *Phytochemistry*, 52, 153-192.
- [40] **Yang J.H.**, Kondratyuk T.P., Jermihov K.C., Marler L.E., Qiu X., Choi Y., Cao H., Yu R., Sturdy M., Huang R., Liu Y., Wang L Q., Mesecar AD., van Breemen RB., Pezzuto JM., Fong HHS., Chen YG., Zhang HJ., 2011. Bioactive compounds from the Fern *Lepisorus contortus*. *Journal of Natural Products*. 74(2), 129-136.
- [41] **Li-Xiang G.**, Xiao-Bing H., Yu-Qun C., 1986. The structures of thirteen astrasieversianins from *Astragalus sieversianus*. *Phytochemistry* 25, 2389–2393
- [42] **Jung da Y.**, Ha H., Lee HY., Kim C., Lee JH., Bae K., Kim JS., Kang SS., 2008. Triterpenoidsaponins from the seeds of *Pharbitisnil*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 56(2):203-206.
- [43] **Baderschneider B.**, Winterhalter P., 2001. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from *Riesling wine* and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2788-2798.
- [44] **Kiliç I.**, Yeşiloğlu Y., 2013. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 115, 719-724.
- [45] **Amalan V.**, Vijayakumar N., Indumathi D., Ramakrishnan A., 2016. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: *In vivo* approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84, 230-236.
- [46] **Sakagami Y.**, Kumai S & Suzuki A., 1974. Isolation and Structure of Medicarpin-β-d-glucoside in *Alfalfa Agric. Biol. Chem.* 38,(1031



Chapitre V

Tests Biologiques

V. Introduction

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées [1,2]. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [3]. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [9]; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [1]. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des différentes sources telles que les cultures agricoles et horticoles ou les plantes médicinales [4-7].

Durant cette étude, nous avons travaillé sur l'extrait *n*-butanolique et l'exsudat chloroformique d'*Ononis angustissima* ainsi que les dix-huit produits Purs isolé.

On s'est intéressé également à l'étude de l'activité antiproliférative de ces deux extraits, ainsi que l'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits *n*-butanolique et chloroformique et les composés isolés de l'espèce *Lotus corniculatus*.

V.1 Évaluation de l'activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits a été réalisée par trois techniques chimiques à savoir : l'effet scavenger du radical DPPH, l'activité du pouvoir réducteur et le teste de blanchissement du β -carotène.

V.1.1 Test de piégeage du radical libre DPPH:

➤ Principe de la méthode

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques [8,9].

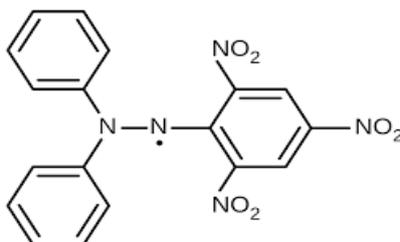


Figure V.1 : Formule du radical DPPH

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515-518nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits [10].

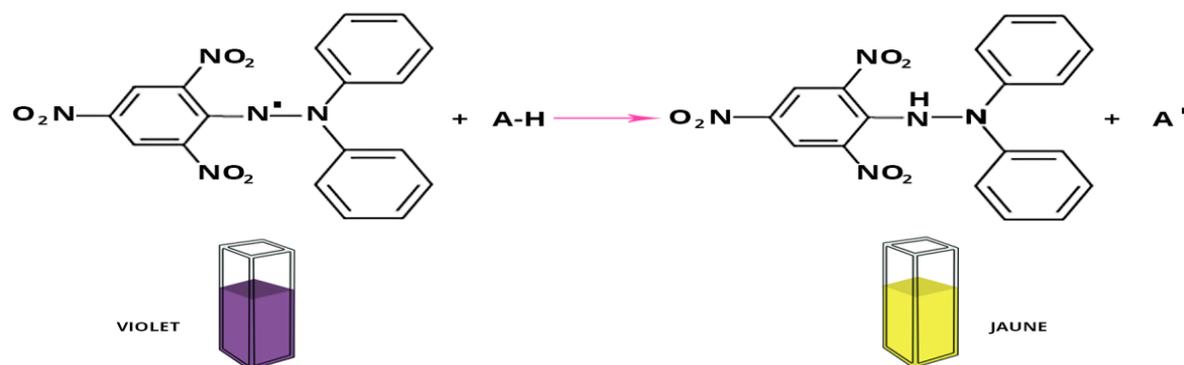


Figure V.2 : Réaction du radical DPPH avec un phénol.

➤ Potocole

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH est celui décrit par Milella *et al.* 2014 [11].

50µl de chaque solution méthanolique des extraits et les composés purs (1-18) de *Ononis angustissima* à différentes concentrations (de 0,0125 à 5mg/ml) ont été ajoutés à 160 µl de solution de 0,4 mM de DPPH dans le méthanol.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (Trolox) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. Les résultats ont été enregistrés en termes de pourcentage d'inhibition (I %) selon la réaction suivante :

$$I\% = \frac{(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Abs_{contrôle} est l'absorbance de la solution contenant le DPPH seul.

Abs_{test} est l'absorbance de la solution contenant l'échantillon.

Les résultats sont la moyenne des analyses en *triplicata*, ils ont été enregistrés en moyenne \pm écarttype. Le Torolox a été utilisés comme témoins positifs dans le test pour la comparaison de l'activité antioxydante de nos extraits et produits purs.

La concentration d'extrait (ou produit pur) a été calculée et exprimée en mg d'équivalent de Torolox par g d'extrait (mg TE / g d'extrait).

V.1.2 .Test de blanchissement du β -carotène

➤ Principe de la méthode

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco [12]. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

➤ Protocole

La méthode décrite par Milella *et al.* 2014 [11] a été employée avec une légère modification. 0,2 mg de β -carotène ont été dissous dans 0,2 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution qui est ajouté à une fiole contenant préalablement 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20. Après mélange des deux phases, le chloroforme a été complètement évaporé à l'aide d'un rotavapeur sous vide. Par la suite, 250 μ L d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés au mélange précédent avec agitation rigoureuse. 5 ml de l'émulsion obtenue ont été additionnés à une série de tubes contenant 0,2 ml de l'extraits ou de la référence (Butylhydroxytoluene (BHT) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml). Les tubes ont été placés, à l'obscurité, dans un bain-marie à 50 °C pendant 3h. Les valeurs d'absorbance ont été lues à des intervalles de temps réguliers de 30 min à 470 nm.

L'activité antioxydante relative aux extraits est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition\%} = (\text{A}\beta\text{-carotène après 3 h de dosage} * 100) / \text{A}\beta\text{-carotène initial}$$

Où ; **A β -carotène après 3 heures de dosage** est l'absorbance du β -carotène restant dans les échantillons après 3 heures de dosage et **A β -carotène initial** est l'absorbance du β -carotène initial au début de l'expérience. Tous les tests ont été effectués en couple. / **A β -carotène initial**

V.1.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

➤ Principe de la méthode

Le principe de ce test repose sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) par le composé teste. Dans un milieu acide à 37 °C, le complexe incolore 2, 4, 6-tripyridyltriazine ferrique (TPTZ- Fe^{3+}) est ajouté à l'échantillon. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme (TPTZ- Fe^{2+}) (**Figure V.3**) de couleur bleue et son absorbance est lue à 562 nm toutes les 15 s durant une période n'excédant pas 10 minutes qui forme un complexe avec le fer [13]. Ce test est rapide et donne une productibilité pour des solutions biologiques ou pour des solutions pures d'antioxydants.

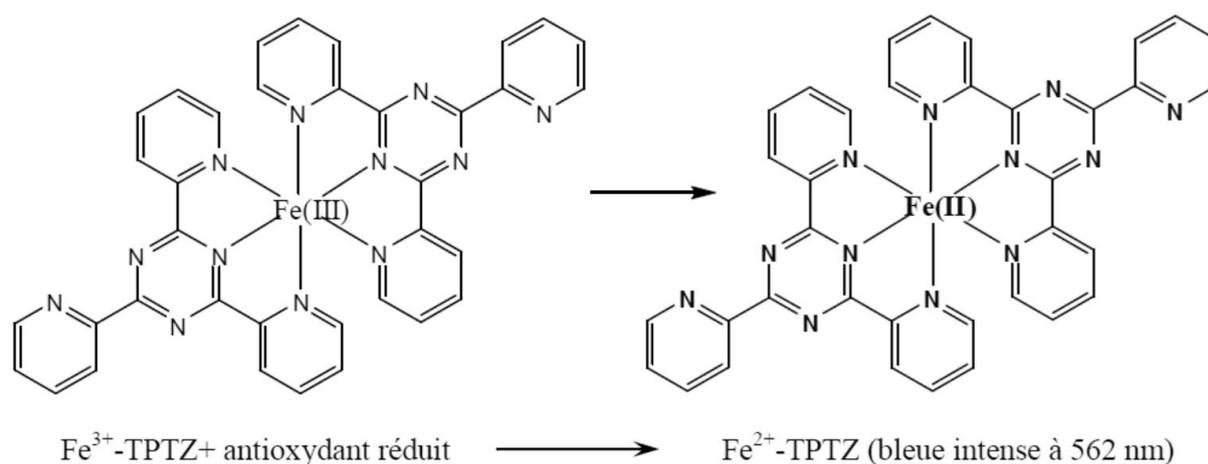


Figure V.3 : Réaction du test FRAP (FerricReducingAntioxidant Power)

➤ Protocole

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles est déterminé selon la méthode d'Oyaisu [14]. Dans un tube à essai contenant 1 ml de solution d'échantillon sont ajoutés 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) puis 2,5 ml d'hexacyanoferrate de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (10g/l). L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 2,5 ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique [FeCl_3] (1 g / l). Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est mesurée à 593 nm. Torolox a été utilisé comme référence positif. Les résultats est exprimés en mg d'équivalent de Torolox par g d'extrait (mg TE / g d'extrait).

V.1.4. Dosage des phénols totaux

➤ Principe de la méthode

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu [15], ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [16].

➤ Protocole

Cette méthode consiste à ajouter 425 µL d'eau distillée et 500 µL de réactif de Folin-Ciocalteu à 75 µL de solutions des extraits. Après 3 min d'agitation, 500 µL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium Na₂CO₃ (10% w/v) sont ajoutés. Après 1h d'incubation, l'absorbance à 723 nm est mesurée alors que l'acide gallique a été utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (GAE µg / mg d'extrait).

V.1.5. Résultats et discussions

Les extraits d'*O. angustissima* ont été soumis aux tests de 2,2-diphényl-2 picrylhydrazyle (DPPH), de blanchiment au β-carotène (BCB) et au pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) pour cribler leur activité antioxydante. Le contenu phénolique total (TPC) a également été mesuré. Comme démontré précédemment, le dosage simple ne peut pas déterminer l'activité antioxydante d'un phytocomplexe. Dans ce cas, nous avons utilisé trois approches complémentaires pour étudier le potentiel antioxydant d'*O. angustissima*. Les résultats du TPC ont été inclus dans le calcul de l'indice de capacité relative des antioxydants (RACI), car les composés phénoliques pourraient contribuer de manière significative à leur valeur bénéfique pour la santé. De cette manière, RACI a fourni une évaluation plus complète du potentiel antioxydant de l'extrait entier.

Les extraits *n*-BuOH et Ex-ONA ont démontré une activité antioxydante intéressante et se sont également révélées être une bonne source de composés phénoliques (**Tableau V.1**). Sur cette base, les fractions et les composés purs issus de ces deux extraits sont ensuite été analysés.

L'extrait de *n*-BuOH a été soumis à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 en recueillant cinq fractions principales (A, B, C, D, E). En conséquence, toutes les fractions ont été évaluées pour leur activité de TPC et leurs activités antioxydantes (**Tableau V.1**). La fraction E est la plus riche en TPC (199,5 mg GAE / g) suivie des fractions C et D (121,5 et

110,9 mg GAE / g). La fraction E présentait la valeur de DPPH la plus élevée (143,7 mg TE / g d'extrait), tandis que la valeur de BCB la plus élevée était enregistrée pour la fraction D, démontrant une activité antioxydante de 57,9%. Par ailleurs, la valeur de FRAP la plus élevée a été enregistrée pour la fraction C (29,6 mg TE / g). Les fractions ont montré des différences sensibles entre leurs AA et TPC (**Tableau V.1**), pour cette raison, RACI a été calculée pour examiner les résultats obtenus et les fractions ont démontré une activité relative décroissante comme suit: E > D > C > B > A. Sur la base des résultats de RACI (**Figure V.5a**) et sur l'hypothèse que les fractions les plus prometteuses devraient avoir au moins une valeur supérieure à celle de leur extrait relatif, la fraction (A) a été exclue de l'analyse ultérieure. Toutes les fractions sélectionnées ont été étudiées pour leur contenu phytochimique. Les fractions B-E ont été purifiées comme décrit précédemment (Chapitre III) et un total de neuf composés (1-9) ont été caractérisés (**Figure V.4**), dont deux nouveaux flavonoïdes (composés 3 et 4).

La teneur en TPC et le potentiel antioxydant des fractions d'exsudat (AA→NN) ont été analysés en suivant la même approche que celle décrite précédemment. On peut observer que ces fractions possèdent une teneur en TPC plus élevée que les fractions *n*-BuOH. Ceci est conforme aux résultats préliminaires des extraits respectifs (*n*-BuOH et Ex-ONA, **Tableau V.1**). La valeur de TPC la plus élevée a été observée dans les fractions II et HH avec respectivement 639,1 et 527,8 mgGAE / g. De plus, ces deux fractions étaient les plus actives dans le test DPPH (respectivement 93,3 et 78,2 mgTE / g). D'autre part, les fractions d'exsudat CC et DD présentaient l'AA le plus élevé lorsque mesuré par le test BCB. Ce phénomène peut s'expliquer par l'affinité du complexe antioxydant pour les lipides et, par conséquent, le caractère lipophile du test BCB pourrait être le facteur déterminant [11]. RACI a été calculé pour clarifier les sources les plus prometteuses de molécules promouvant la santé et, sur la base de ses résultats (**Figure V.5a**), les fractions LL, KK, MM et BB ainsi que la fraction inactive AA (données non présentées) ont été exclus de l'analyse ultérieure.

Enfin, l'activité antioxydante de ces composés nouveaux et connus utilisant les tests BCB, FRAP et DPPH a été mesurée (**Tableau V.1**). Parmi les composés isolés des fractions de l'extrait *n*-BuOH (1-9), le composé 1 présentait le RACI le plus élevé, tandis que les autres dérivés isolés (composés 2 et 3) étaient moins actifs que le composé 1. Cette différence peut être attribuée à la perte de -OH sur les cycles aromatiques, en fait, le composé 2 ne présente pas un -OH alors que le composé 1 possède 2 groupes -OH libres. Nos résultats ont montré que la présence de 2, 3 double liaison augmente l'activité du composé 1 par rapport au composé 3. De plus, une structure similaire (composé 5) dans laquelle il n'y a pas de groupe -OH libre et

il n'y a pas de 2, 3 double liaison, a montré l'activité la plus faible parmi les dérivés d'isoflavones (composés 1-2-3-5, **Figure V.5b**). Ces résultats sont en accord avec les évidences précédentes [17,18]. RACI a combiné les résultats de l'activité antioxydante obtenus à partir de toutes les substances isolées (**Figure V.5b**) et il est possible d'évaluer que les composés 17 et 13 sont les composés les plus actifs, tandis que les plus faibles RACI ont été observés pour les composés 8 et 9. Les composés les plus actifs sont les dérivés de flavonoïdes et sur la base de leurs structures, il est possible de confirmer l'importance de la proximité des deux groupes hydroxyle dans l'arrangement ortho-diphénolique. La perte d'activité du composé 8 pourrait être attribuée à la présence d'un groupe méthoxyle sur le cycle B. Ce résultat est cohérent avec les évidences précédentes où il avait été démontré que la présence d'un groupe méthoxyle diminuait sensiblement la capacité antioxydante des flavonoïdes [17,18]. Certains des composés purs testés exerçaient une activité antioxydante intéressante, et leur action pourrait expliquer en partie l'activité montrée par la fraction dont ils proviennent. La présence de ces composés phénoliques supplémentaires pourrait certainement mieux expliquer la forte activité antioxydante des extraits d'*O. angustissima*.

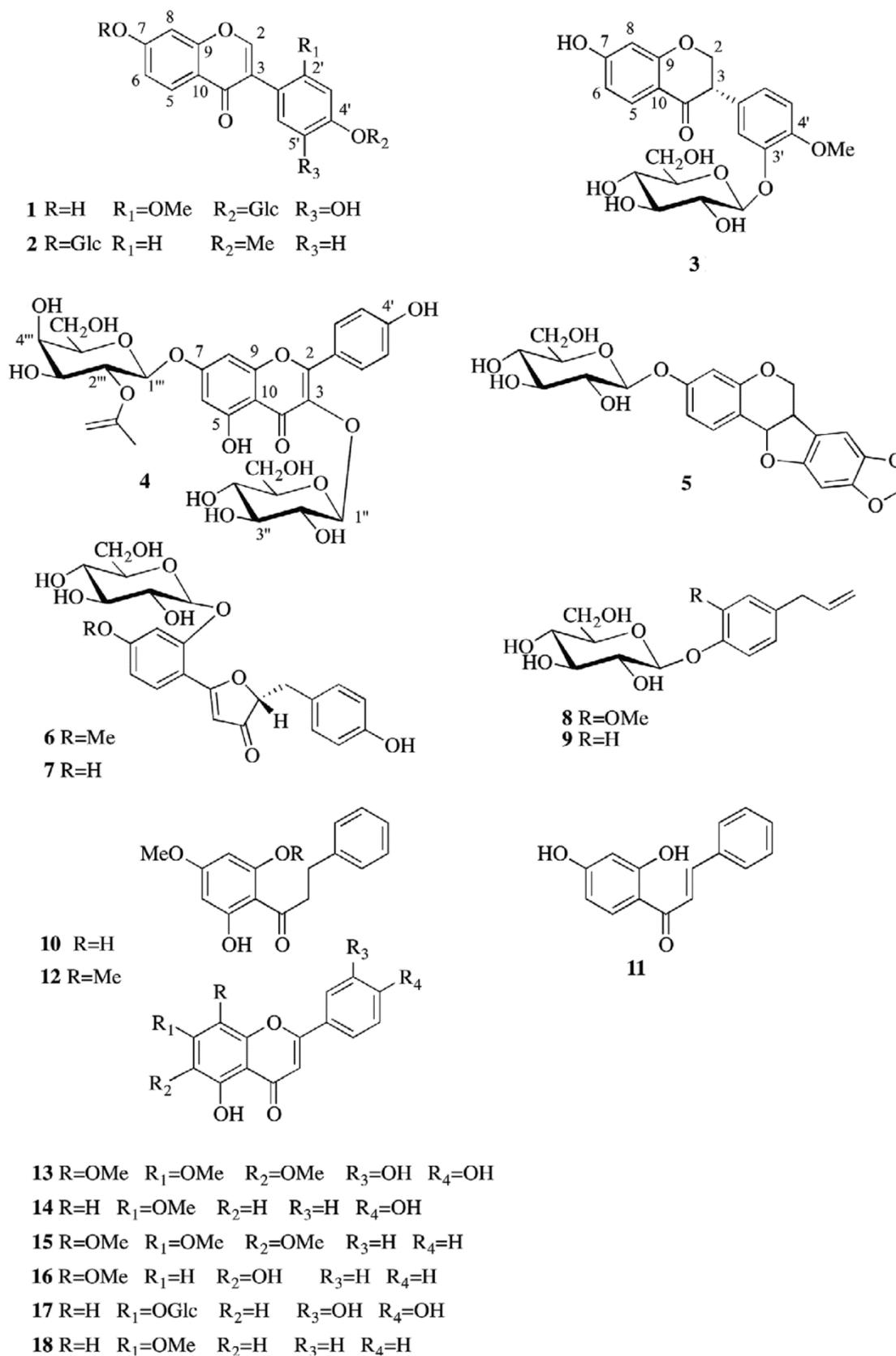


Figure V.4 : Structures chimiques des composés 1-18

Tableau V.1 : Contenu phénolique total (TPC) et activité antioxydante (dosages DPPH, BCB, FRAP) des Extraits, fractions et composés isolés d'*Ononis angustissima*

Extraits	DPPH mgTE/g*	BCB % AA**	FRAP mgTE/g*	TPC mgGAE/g***
Ex-ONA	17,5 ±1,4	34,9±2,7	84,6±4,1	236,0±16,8
<i>n</i> -BuOH	22,2±1,9	32,2±2,6	62,7±5,6	81,1±6,1
Fractions				
A	11,2±0,4	0,0±0,0	4,3±0,7	15,4±0,9
B	32,0±2,1	8,3±0,6	19,6±1,5	25,8±1,7
C	36,7±3,0	10,1±0,9	29,6±2,5	121,5±12,1
D	58,8±4,1	57,9±2,5	21,2±2,0	110,9±9,6
E	143,7±9,2	25,6±2,2	8,3±0,9	199,5±11,7
BB	5,1±0,5	4,9±0,3	39,1±2,6	61,0±4,7
CC	7,2±0,6	43,9±3,3	10,7±1,0	158,4±12,4
DD	25,9±1,9	46,4±4,2	5,5±0,4	169,3±9,1
EE	83,3±6,2	3,2±0,1	51,6±3,2	83,8±6,5
FF	16,4±1,8	1,9±0,1	44,1±4,1	268,9±11,9
GG	37,7±2,8	4,1±0,5	100,6±6,4	360,3±14,2
HH	78,2±6,5	6,0±0,7	194,7±9,9	527,8±16,3
II	93,3±9,1	8,1±0,6	56,4±4,2	639,1±19,4
KK	5,1±1,0	1,2±0,1	18,2±1,2	83,2±5,7
LL	11,5±0,9	2,2±0,3	14,8±1,0	72,4±4,9
MM	14,4±1,1	3,2±0,4	15,4±1,2	91,6±6,7
NN	190,5±11,3	32,7±2,6	13,5±0,9	194,2±11,4
Composés purs				
1	64,7±2,6	76,9±2,8	45,2±3,2	
2	78,5±4,2	36,2±2,5	88,0±6,2	
3	44,9±3,7	65,1±6,1	20,4±1,9	
4	41,7±5,4	33,4±2,6	9,7±1,1	
5	7,3±0,9	15,3±0,9	30,3±2,0	
6	15,5±1,2	46,7±2,8	1,1±0,2	
7	25,3±1,9	44,5±2,6	5,9±0,6	
8	18,5±1,4	4,4±0,3	15,8±1,3	
9	22,5±1,6	3,5±0,2	12,5±1,1	
10	84,3±6,2	7,5±0,7	63,2±3,2	
11	29,9±1,7	49,0±2,5	7,5±0,7	
12	1,4±0,2	36,8±2,6	6,0±0,8	
13	328,0±14,5	36,0±1,9	37,8±2,9	
14	60,5±4,5	78,4±5,2	8,0±1,0	
15	17,2±1,3	46,9±3,9	12,7±1,4	
16	18,6±1,9	6,0±1,0	83,1±1,8	
17	490,7±19,4	22,9±2,1	38,7±3,1	
18	3,4±0,5	43,7±3,6	11,0±1,0	

BHT***		87.1±4.5		
--------	--	----------	--	--

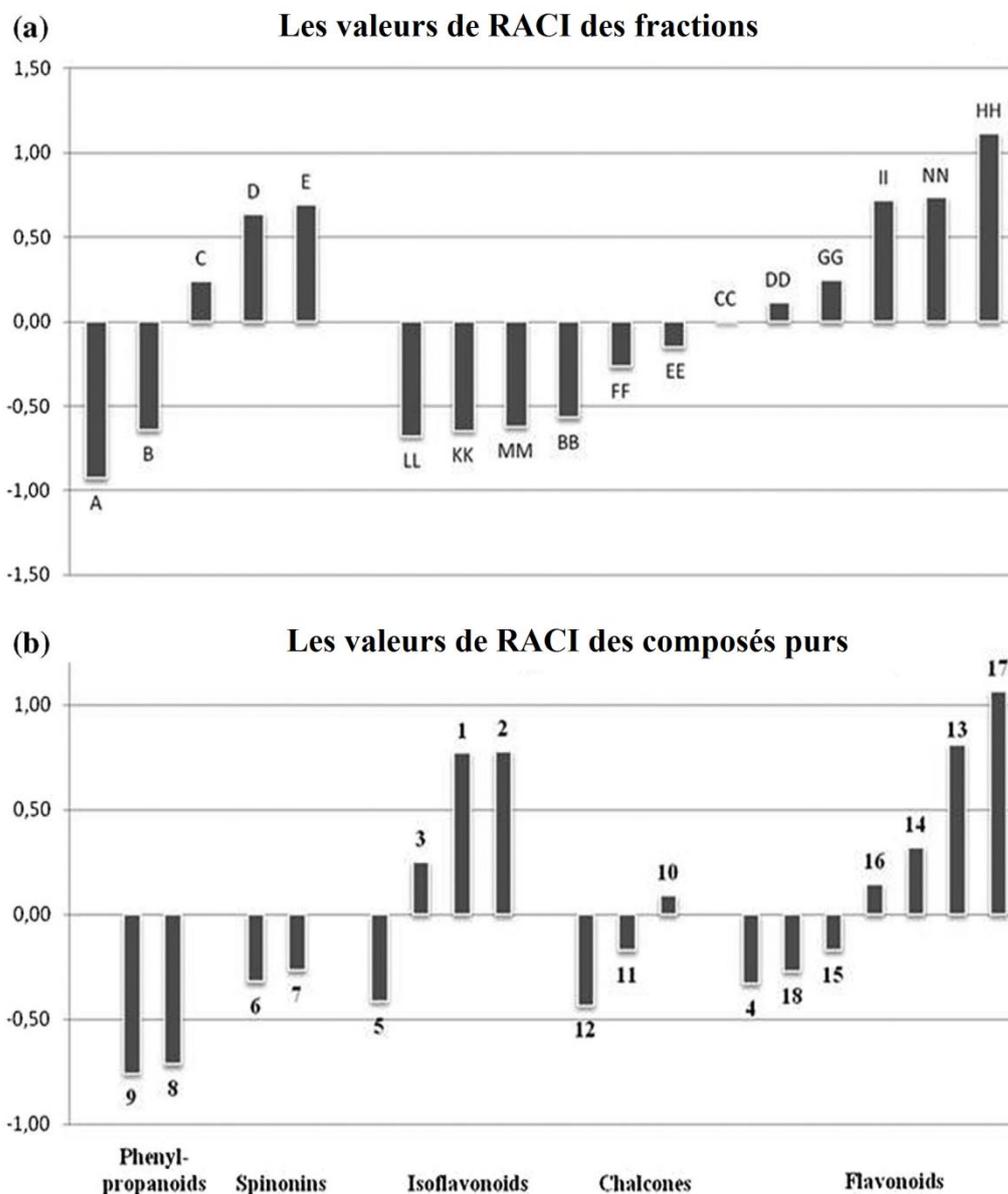


Figure V.5. : Valeurs de RACI des fractions (indiquées par des lettres) (a) et des composés purs (indiquées par nombres) (b) obtenus à partir des parties aériennes d’*Ononis angustissima*.

V.2. Évaluation de l’activité antiproliférative

Les cas de cancer sont diagnostiqués chaque année. Les causes de développement d’un cancer sont nombreuses et très variées. Il peut s’agir de causes d’ordre génétique (mutation autosomique dominante, prédispositions génétiques) ou d’effets secondaires liés à l’exposition à des facteurs externes (polluants, éléments radioactifs, rayons ultraviolets, champs

électromagnétiques, etc.), mais également à des agents infectieux (virus, bactéries, etc.). Les inflammations chroniques contribuent également au développement de nombreux cancers. Par ailleurs, le mode de vie des pays industrialisés (mauvais régime alimentaire, tabac, alcool, obésité, faible activité physique) est sans nul doute une des principales causes de développement du cancer [19, 20]. Ainsi, un mode de vie sain dans un environnement moins pollué accompagné d'une alimentation composée majoritairement de produits naturels riches en substances anticancéreuses permettrait de prévenir l'apparition et le développement du cancer.

C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits et des produits isolés d'*Ononis angustissima* et *Lotus corniculatus*

V.2.1. Activité des extraits et des composés d'*Ononis angustissima*

Les lignées cellulaires utilisées pour évaluer l'activité antiproliférative sont :

- Les cellules Jurkat T (leucémie)
- Les cellules Hela (cancer du col de l'utérus)
- Les cellules MCF7 (cancer du sein)

➤ Test de l'évaluation de la viabilité cellulaires au MTT

La croissance cellulaire globale a été évaluée au moyen du test colorimétrique MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2yl] -bromure de diphenyltétraazolium, Sigma Aldrich, France).

Le test colorimétrique MTT est un test *in vitro* mesurant la croissance globale d'une population cellulaire. Les trois lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été incubées pendant 24 h dans des plaques de 96 puits (de 10 000 à 40 000 cellules/ml de milieu de culture selon le type de cellules) avant le traitement avec la substance dont on souhaite mesurer l'effet sur la croissance cellulaire. Ce test d'évaluation de la prolifération cellulaire est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT, de couleur jaune, en son métabolite le bleu de formazan (de couleur violette). Le nombre de cellules vivantes après 72 h d'incubation en présence ou non des composés à tester ou de produits de référence est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée, quantitativement par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaque ELx 808 de marque Biotek à une longueur d'onde de 570 nm (avec une référence de 630 nm). Chaque condition expérimentale a été analysée en *quadriplacat* avec dix huit (18) concentrations, de 500 µg/ml à 0,0038 µg/ml.

➤ Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires de cancers humains utilisées dans cette étude et les milieux de culture proviennent de l'American Type Culture Collection (Manassas, Etats-Unis). Les

cellules ont été maintenues dans du DMEM (HeLa et MCF7) ou du RPMI 1640 (Jurkat) complétées avec un mélange de pénicilline 100 IU/ml (GibcoBRL), 100 mg/L, de streptomycine (Gibco BRL) et 10% du serum Fœtal Bovin ou FBS (GibcoBRL). Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans des flasques de culture cellulaire (Nunc, Invitrogen, France), dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Pour assurer une croissance logarithmique, les cellules ont été sous-cultivées tous les 2 jours. Les PBMC humains ont été isolés à partir de couches buffy de donneurs sains (fournis par le centre de transfusion sanguine de l'hôpital d'Avellino, Italie) en utilisant un gradient Ficoll-Hypaque standard. Les PBMC fraîchement isolées contiennent 93±2,9% de cellules vivantes selon la méthode d'exclusion du trypan bleu. Des solutions de stock (1 mg / mL) des extraits d'*O. angustissima* ont été préparées dans du DMSO et conservées à 4 ° C dans l'obscurité. Dans toutes les expériences, la concentration finale de DMSO n'a pas dépassé 0,3% (v / v). Des dilutions appropriées ont été préparées dans un milieu de culture immédiatement avant l'utilisation.

➤ Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (1 x 10⁴ cellules / puits). Un jour après l'ensemencement, les cellules ont été exposées à différentes concentrations d'extraits (25, 50, 100, 150 µg / mL) ou de véhicule seulement et incubées pour le temps établis. Le nombre de cellules viables a été quantifié par dosage MTT et CellTiter-Blu Test de viabilité cellulaire (Promega) [21] puis avec Un simple dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie, la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement est reconnue. Dans certaines expériences, la viabilité cellulaire a également été vérifiée par le test d'exclusion de trypan bleu en utilisant une chambre de comptage Bürker. Les valeurs IC₅₀ ont été calculées à partir de la dose de viabilité cellulaire et ont été définies comme la concentration entraînant une inhibition de 50% de la survie cellulaire par rapport aux témoins.

Des contrôles appropriés ont été inclus dans des expériences préliminaires pour exclure toute interférence de chaque composé avec les dosages. L'étoposide a été utilisé comme contrôle positif. Les valeurs IC₅₀ ont été réalisées avec le logiciel GraphPad.

V.2.2. Résultats et discussion

L'activité cytotoxique d'extraits bruts d'*O. angustissima* a été étudiée contre PBMC en bonne santé et trois lignées de cellules cancéreuses humaines HeLa, Jurkat et MCF7. Tous les extraits étaient inactifs aux concentrations testées. L'absence de cytotoxicité sur les PBMC pourrait suggérer l'utilisation d'*O. angustissima* dans la préparation de médicaments à base de plantes.

V.2.3. Activité des extraits et des composés de *Lotus corniculatus*

Les lignées cellulaires utilisées pour évaluer l'activité antiproliférative sont :

- J774.A1 : monocytes murins / macrophages.
- WEHI-164 : fibrosarcome murin.
- HEK-293 : cellules rénales épithéliales humaines.

➤ Mode opératoire

Les cellules ($3,4 \times 10^4$ cellules) sont réparties sur une microplaque de 96 puits la microplaque est incubée à 37°C dans un atmosphère enrichie de 5% de CO_2 et 95% d'air pendant 2 h. Par la suite, le milieu est remplacé par 50 μl de milieu frais et une portion aliquote de 75 μl de 1:4 dilutions successives de chaque composé d'essai est ajoutées, puis les cellules sont incubées pendant 72 h. Dans certaines expériences, des dilutions de 6-Mercaptopurine ont été ajoutés.

La viabilité de la cellule a été évaluée par le test MTT [22]. La densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée avec un spectrophotomètre à microplaque (Titertek Multiskan MCC / 340) équipé d'un filtre à 620 nm. La viabilité de chaque lignée cellulaire en réponse au traitement avec les composés testés et le 6-MP [23] a été calculée comme suit :

$$\% \text{ de cellules mortes} = 100 - (\text{DO traité} / \text{contrôle de OD}) \times 100.$$

Le tableau V.2 montre les résultats obtenus exprimés en IC_{50} valeur (μM), la concentration qui inhibait la croissance cellulaire de 50% par rapport au témoin.

V.2.14. Résultats et discussion

L'activité antiproliférative d'extraits et de composés isolés a été évaluée par rapport aux lignées cellulaires J774.A1, WEHI-164 et HEK-293. Ensuite, l'extrait *n*-BuOH était le seul actif présentant une IC_{50} de 27 ± 2 , $55 \pm 2,5$ et $> 100 \mu\text{g} / \text{mL}$ contre Les lignées cellulaires J774.A1, WEHI-164 et HEK-293, respectivement. Les dérivés phénoliques étaient presque inactif, alors que les données obtenues (valeurs IC_{50}) pour les saponines, soyasaponine I, dehydrosoyasaponin I et pharbitoside A sont rapportées dans le tableau V.2. D'après les résultats, le pharbitoside A était le constituant le plus actif. En règle générale, les effets cytotoxiques des composés saponines dépendaient du nombre d'unités de sucre, les fractions de sans sucre présentaient une activité plus intense que celles contenant davantage de fractions de sucre. Une explication possible du fait que le nombre de suggestions détermine les propriétés hydrophiles d'un composé, les composés hydrophiles sont moins capables de traverser la membrane cellulaire des cellules de mammifère, ce qui traduit par une cytotoxicité inférieure.

Tableau V.2 : Activité anti-proliférative *in vitro*

Composés	Lignées cellulaires (IC ₅₀ µM)		
	J774.A1 ^b	HEK- 293 ^c	WEHI-164 ^d
Dehydrosoyasaponin I	29.4 ± 0.6	36.1 ± 0.4	28.0 ± 0.3
Soyasaponin I	56.2 ± 0.8	67.0 ± 0.2	>100
Pharbitoside A	97.0 ± 1.2	>100	>100
6-MP ^f	0.003 ± 0.5	0.007 ± 0.4	0.015 ± 0.6

- ✓ IC₅₀ : valeur de la concentration d'extrait qui donne une réduction de 50% de la croissance cellulaire (après 3 jours d'incubation).
- ✓ J774.A1: macrophages murins monocytes .
- ✓ WEHI-164: fibrosarcome murin.
- ✓ HEK-293: cellules rénales épithéliales humaines
- ✓ 6-MP = 6-mercaptopurine.

V.4. Conclusion

L'étude de l'activité antioxydante des extraits et de composés purs issus de l'espèce *Ononis angustissima* selon trois méthodes : l'effet scavenger du radical DPPH, l'activité du pouvoir réducteur et le teste de blanchissement du β -carotène.

Les extraits *n*-BuOH et Ex-ONA sont parvenus à prouver une activité antioxydante remarquable et se sont aussi mises au grand jour être une bonne source de composés phénoliques.

L'activité antioxydante des produits purs de l'espèce *Ononis angustissima* a été réalisée par les trois méthodes précédentes. Les produits d'*Ononis angustissima* ont montrés une très bonne activité antioxydante par rapport aux standards utilisés.

Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes ont signalé les valeurs de RACI les plus élevées et la relation structure-activité basées sur la présence de groupes OH libres, de différents substituants. Sur les cycles aromatiques et la présence de 2,3 doubles liaisons dans le cycle C, ont été établies.

L'activité cytotoxique des extraits et des composés purs isolés de l'espèce *Lotus corniculatus* effectués sur les trois lignées cellulaires J774.A1, WEHI-164 et HEK-293, ont montré que seul l'extrait *n*-BuOH et le produit le pharbitoside A ont un effet cytotoxique vis-à-vis les trois lignées cellulaires.

Références bibliographiques :

- [1] **Suhaj, M.**, 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 531–537.
- [2] **Tadhani, M.B.**, Patel, V.H., et Subhash, R., 2007. In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 323-329.
- [3] **Koechlin-Ramonatxo C.** 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolique*. 20, 165-177.
- [4] **Dugas A. J.**, Castaneda-Acosta J. Bonin G.C, Price K.H. Fisches N.H. et Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radical scavenging capacity of flavonoids: structure activity relationships. *Journal of Natural Product*. 63, 31-327
- [5] **Huang, D.**, Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
- [6] **Marc Fr.**, Davin A., Deglène-Benbrahim L., et Ferrand C. 2004. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: médecine sciences*. 20(4), 458-463.
- [7] **Sanchez-Moreno C.** 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8(3), 121-137.
- [8]. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
- [9] **Brand-Williams W.**, Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30
- [10] **Molyneux P.**, 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 26 (2), 211-219.
- [11] Milella, L., Bader, A., De Tommasi, N., Russo, D., Braca, A., 2014. Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species. *Food Chem*. 160, 298-304.
- [12] **Marco, J. G.** 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 45, 594-598.
- [13] **Decker, E.A.**, Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 674-677.
- [14] **Oyaizu, M.** (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44, 307-315.
- [15] **Singleton V.L.**, Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Cioclateu reagent. *Method. Enzymol*. 299: 152-178.
- [16] **Boizot N.**, and Carpenter J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

- [17] **Heim K e**, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure- activity relationships. *J Nutr Biochem.* 13 :572–584.
- [18] **Rice-evans CA**, Miller NJ, Paganga g. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.* 20:933–956.
- [19] **Anand P**, Kunnumakkara AB, Sundaram C et al. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*; 25:2097-116.
- [20] **Boffetta P**, Tubiana M, Hill C et al. 2009. The causes of cancer in France. *Ann Oncol*; 20:550-5.
- [21] **Mosmann T**. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*; 65:55-63.
- [22] **Dal Piaz F**, Tosco A, Eletto D, Piccinelli AL, Moltedo O, Franceschelli S, Sbardella G, Remondelli P, Rastrelli L, Vesci L, Pisano C, DeTommasi N. 2010. The identification of a novel Natural activator P 300 histone acetyl tran ferase provides new insights into the modulation mechanism of this enzyme. *Chem.Bio.Chem* ;11:818-827.
- [23] **DalPiaz F**, Vassallo A, Temraz A, Cotugno R, Belisario MA, Bifulco G ,Chini MG ,Pisano C, DeTommasi N, Braca A. 2013. A chemical-biological study reveals C9-type iridoids as novel heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors. *J Med Chem.* ;28:56(4):1583-95.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. The scroll is unrolled in the center, and the text is written on the white surface. The scroll has a slight 3D effect with a grey shadow on the top and bottom edges.

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude est consacré à l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités biologiques de deux plantes médicinales *Ononis angustissima* et *Lotus corniculatus* appartenant à la famille Fabaceae. Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les saponosides, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes.

Les investigations phytochimiques réalisées sur l'exudat chloroforme et l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Ononis angustissima* ainsi que sur les extraits chloroforme et *n*-butanol de la plante *Lotus corniculatus* a débuté par l'extraction hydroalcoolique des parties aériennes, suivie par la concentration des extraits obtenus et leurs affrontements successifs, par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Nous soumettons ensuite les divers extraits organiques obtenus au différentes techniques de séparation notamment la chromatographie sur colonne (phase stationnaire : gel de silice normal, la phase inverse et sephadex LH 20), des plaques préparatives de gel de silice et par HPLC. Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle (^1H , ^{13}C et DEPT) et bidimensionnelle (HSQC, COSY et HMBC), ainsi que la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS et HR-EI-MS).

Ces travaux ont permis l'isolement et l'identification de 27 composés naturels majoritairement de type flavonoïdes, parmi lesquels deux ont des structures nouvelles qui n'ont jamais été décrites dans la littérature.

L'investigation phytochimique d'*Ononis angustissima* mené à l'isolement de 19 produits Les composés isolés et déterminés sont :

- ✓ Une nouvelle isoflavonoïde : **(3S)-7-hydroxy-4-methoxy-isoflavanone 3'- β -D-glucopyranoside**.
- ✓ Deux isoflavonoïdes : **5',7-dihydroxy-2'-méthoxy-isoflavone 4'-O- β -D-glucopyranoside**, et **Formononetin 7-O- β -D-glucopyranoside** isolés pour la première fois dans l'espèce *ononis angustissima*.
- ✓ Deux flavonoïdes glycosylés : **Lutéolin 7-O- β -D-glucopyranoside** et une nouvelle structure **Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- β -d galactopyranoside**.
- ✓ Un ptérocarpane : **Trifolirhizine** isolés pour la première fois dans l'espèce *ononis angustissima*.
- ✓ Deux composé phénolique glycosylés: **9-O-méthylspinonine** et **Spinonine**, isolés pour la première fois dans l'espèce *ononis angustissima*.

Conclusion générale

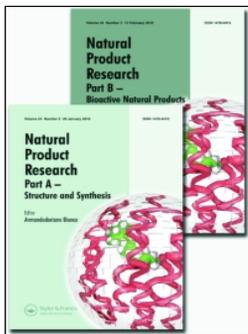
- ✓ Deux phénylpropanoïdes : **Citrusin C** et **Chavicol 1-O-β-D-glucoopyranoside**, isolés pour la première fois dans le genre *ononis*.
- ✓
- ✓ Deux dihydrochalcones : **2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone** et **dihydroflavokawin B**, isolés pour la première fois dans l'espèce *ononis angustissima*
- ✓ Une chalcone : **2',4'-dihydroxychalcone**.
- ✓ Six flavonoïdes aglycones : **5, 3,4'-trihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone**, **7-méthylapigénine**, **Alnetine**, **5,7-dihydroxy-6,8-diméthoxyflavone**, **Chrysine** et le **7-O-méthylchrysine**.

L'étude phytochimique menée sur *Lotus corniculatus* a permis l'obtention et l'identification de **8** produits. Il s'agit de :

- ✓ Trois saponoside : **Soyasaponin I**, **Dehydrosoyasaponin I**, **Pharbitoside A** isolés pour la première fois dans le genre *Lotus*.
- ✓ Un ptérocarpane : **Medicarpin-3-O-β-D-glucoopyranoside** isolé pour la première fois dans le genre *Lotus*.
- ✓ Un flavonoïde glycosylé : **3-méthoxy-7-O-β-glucoopyranoside quercétine** isolé pour la première fois dans le genre *Lotus*.
- ✓ Deux acides phénoliques : **l'Acide benzoïque**, **l'acide p-coumarique** et
- ✓ Un composé phénolique glucosylé : **2-hydroxybenzyl β-D-glucoopyranoside** isolé pour la première fois dans l'espèce *Lotus corniculatus*.

L'activité anti-radicalaire de l'exudat chloroforme, l'extrait *n*-butanol ainsi que les fractions et les composé isolé a été évaluée via trois méthodes : l'effet scavenger du radical DPPH, l'activité du pouvoir réducteur et le test de blanchissement du β-carotène. Les résultats obtenus ont montré une très bonne activité antiradicalaire par rapport aux standards utilisés. Ceci a été confirmé par l'estimation quantitative des polyphénols totaux dans ces extraits qui ont montré une forte teneur en polyphénols.

L'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits et des composés purs isolés de l'espèce *Lotus corniculatus* effectués sur les trois lignées cellulaires J774.A1 (macrophages murins monocytes), WEHI-164 (fibrosarcome murin) et HEK-293 (cellules rénales épithéliales humaines), ont montré que seul l'extrait *n*-BuOH et le produit le pharbitoside A ont un effet cytotoxique vis-à-vis les trois lignées cellulaires.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids

Abderrahmane Mezrag, Nicola Malafronte, Mohamed Bouheroum, Carmen Travaglino, Daniela Russo, Luigi Milella, Lorella Severino, Nunziatina De Tommasi, Alessandra Braca & Fabrizio Dal Piaz

To cite this article: Abderrahmane Mezrag, Nicola Malafronte, Mohamed Bouheroum, Carmen Travaglino, Daniela Russo, Luigi Milella, Lorella Severino, Nunziatina De Tommasi, Alessandra Braca & Fabrizio Dal Piaz (2017) Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids, *Natural Product Research*, 31:5, 507-514, DOI: [10.1080/14786419.2016.1195381](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1195381)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1195381>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 13 Jun 2016.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 139

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

 Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

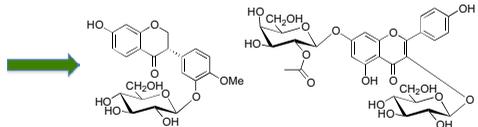
Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids

Abderrahmane Mezrag^{a,†}, Nicola Malafronte^{b,†}, Mohamed Bouheroum^c,
Carmen Travaglini^b, Daniela Russo^c, Luigi Milella^c, Lorella Severino^d,
Nunziatina De Tommasi^b, Alessandra Braca^e and Fabrizio Dal Piaz^b

^aLaboratoire de Valorisation des Ressources Naturelle, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Constantine, Algeria; ^bDipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, Italy; ^cDipartimento di Scienze, Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Italy; ^dDipartimento di Medicina Veterinaria e Produzione Animale, Sezione di Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italy; ^eDipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italy

ABSTRACT

Ononis angustissima aerial parts extract and exudate were subjected to phytochemical and biological studies. Two new natural flavonoids, (3*S*)-7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavanone 3'-β-D-glucopyranoside (**1**) and kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)-β-D-galactopyranoside (**4**), and sixteen known compounds were isolated through a bio-oriented approach. Their structural characterisation was achieved using spectroscopic analyses including 2D NMR. The phytochemical profile of the extracts was also performed, and the antioxidant activity of all compounds was tested by three different assays. To get a trend in the results and to compare the antioxidant capacity among the different methods used, the obtained data were transformed to a relative antioxidant capacity index.



ARTICLE HISTORY

Received 4 February 2016
Accepted 6 May 2016

KEYWORDS

Ononis angustissima;
Fabaceae; phenolic
derivatives; isoflavonoids;
antioxidant activity; mass
spectrometry

1. Introduction

Plants rich in antioxidant phenolics have been attracting an increasing attention, and nowadays, the discovery of new sources of safe and inexpensive antioxidants from natural origin is mandatory (Fernández et al. 2006), since some synthetic ones showed potential health risks and toxicity (Safer & Al-Nughamish 1999).

CONTACT Nunziatina De Tommasi  detommasi@unisa.it; Alessandra Braca  alessandra.braca@unipi.it

 The supplementary material for this paper is available online at <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1195381>.

[†]These authors contributed equally to this work.

Ononis L. is a large genus of perennial herbs and shrubs of the Fabaceae family (Ozenda 1958) known to be very rich in phenolic derivatives (Barrero et al. 1993; Abdel-Kader 2001; Mhamdi et al. 2015). Some *Ononis* species are favourite food for sheep, goats, donkeys and other animals; the young shoots are succulent and sweet and in some Saharian countries are eaten as vegetables (Burnett 1833; Ozenda 1958). Recently, some herbal teas containing *Ononis* species as components are sold in the market. Several plants belonging to the *Ononis* genus are used as folk medicine remedies for the treatment of jaundice, urinary tract inflammations and kidney stones; besides, some species have been used as wounds, eczema and rheumatic complaints healings, against skin cancer and lesions and topically as antiseptic and antimicrobial agents (Süntar et al. 2011). The ethnopharmacology importance and the richness in flavonoids of *Ononis* genus prompted us to carry out further studies (Bouheroum et al. 2009; Mezrag et al. 2013) on *Ononis angustissima* Lam., a plant widespread in Sahara regions. An antioxidant-oriented approach was carried out on the aerial part extracts and exudate, leading to the isolation and structural characterisation of two new natural flavonoids, (3S)-7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavanone 3'- β -D-glucopyranoside (**1**) and kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- β -D-galactopyranoside (**4**), together with sixteen known phenolic derivatives (**2–3** and **5–18**) (Figure 1). In order to deepen and fully characterise the phytochemical profile of *O. angustissima*, LC-HRESIMS and LC-HRESIMS/MS analyses were also performed. Extracts, fractions and pure compounds' antioxidant activity was tested using three different complementary methods, and the relative antioxidant capacity index (RACI) was also calculated. All extracts were also evaluated for their cytotoxic activity.

2. Results and discussion

In this study, all extracts of *O. angustissima* were subjected to the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene bleaching (BCB) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays to screen their antioxidant activity. As previously demonstrated (Milella et al. 2014), a single assay cannot determine the antioxidant activity of a phytocomplex; therefore, three complementary approaches were used to study the antioxidant potential of *O. angustissima*. Total phenolic content (TPC) was also measured, and the results were included in RACI calculation. In this way, RACI provided a more comprehensive assessment of the whole extract antioxidant potential. Both *n*-BuOH and crude exudate (Ex-ONA) extracts showed an interesting antioxidant activity and to be a good source of phenolics (Table S1); on the basis of these results, they were further analysed. The *n*-BuOH extract was subjected to Sephadex LH-20 column chromatography collecting five major fractions (A-E) that were consequently evaluated for their TPC and antioxidant activity (AA) (Table S1). Fraction E resulted the richest in terms of TPC (199.5 mgGAE/g) followed by fractions C and D (121.5 and 110.9 mgGAE/g, respectively). Fraction E showed the highest DPPH value (143.7 mgTE/g of extract), while the highest BCB value was registered for fraction D demonstrating 57.9% of AA. On the other hand, the highest FRAP value was obtained from fraction C (29.6 mgTE/g). On the basis of RACI results (Figure 2(a)), fractions B-E were purified and a total of nine compounds (**1–9**) were characterised (Figure 1) of which two were new natural flavonoids (**1** and **4**). Fraction E showed also the presence of highly polymerised polyphenols. Following the same approach, the TPC content and the AA of Ex-ONA fractions (AA-NN) were also studied, demonstrating a higher TPC content than the *n*-BuOH one, according to the respective extract results (Table S1). The highest TPC value was observed for fractions II and HH

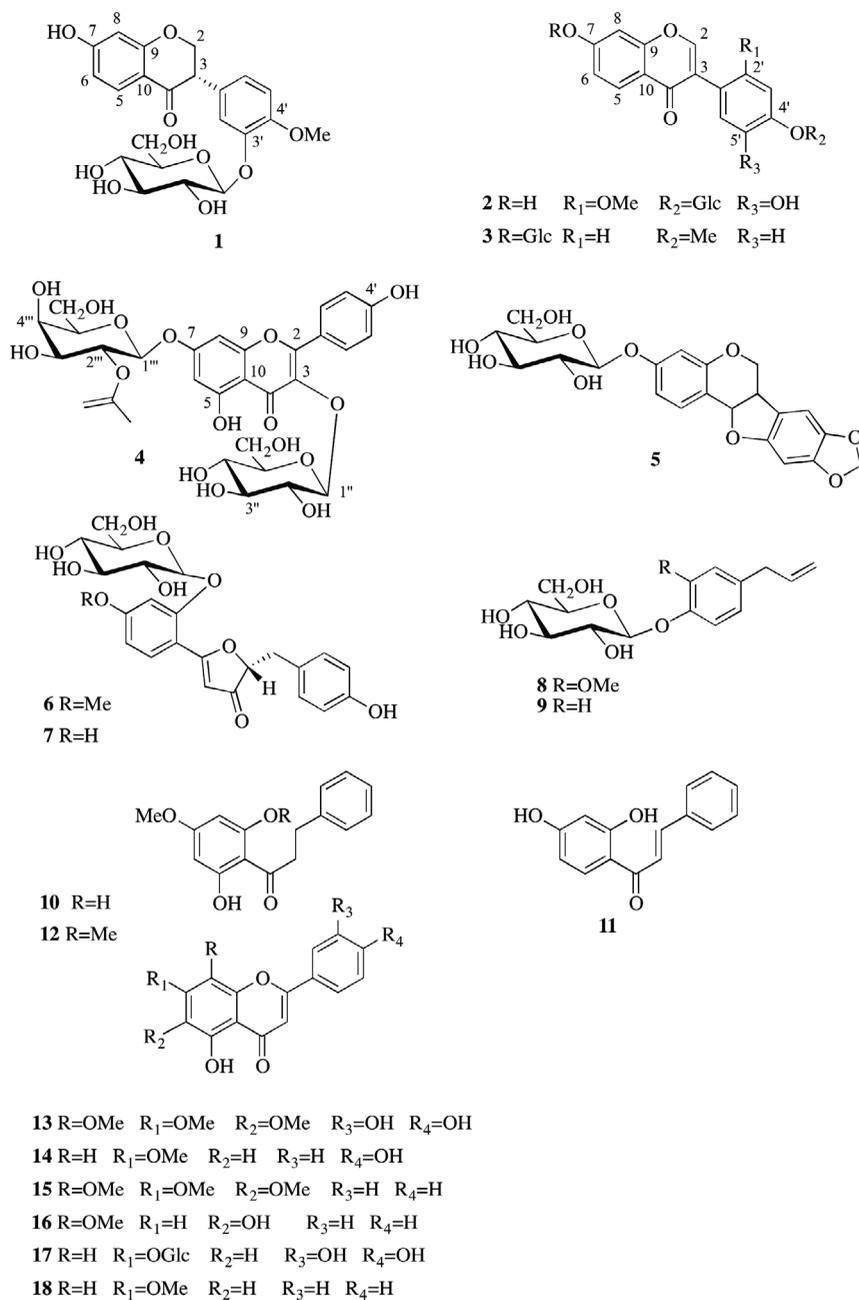


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–18.

with 639.1 and 527.8 mgGAE/g, respectively; these two fractions resulted also the most active in DPPH test (93.3 and 78.2 mgTE/g, respectively), together with the NN fraction (190.5 mgTE/g). On the other hand, Ex-ONA fractions CC and DD demonstrated the highest AA when measured by BCB test. This phenomenon can be explained by the affinity of the antioxidant complex for the lipids, and thus, the lipophilic nature of BCB test could be the

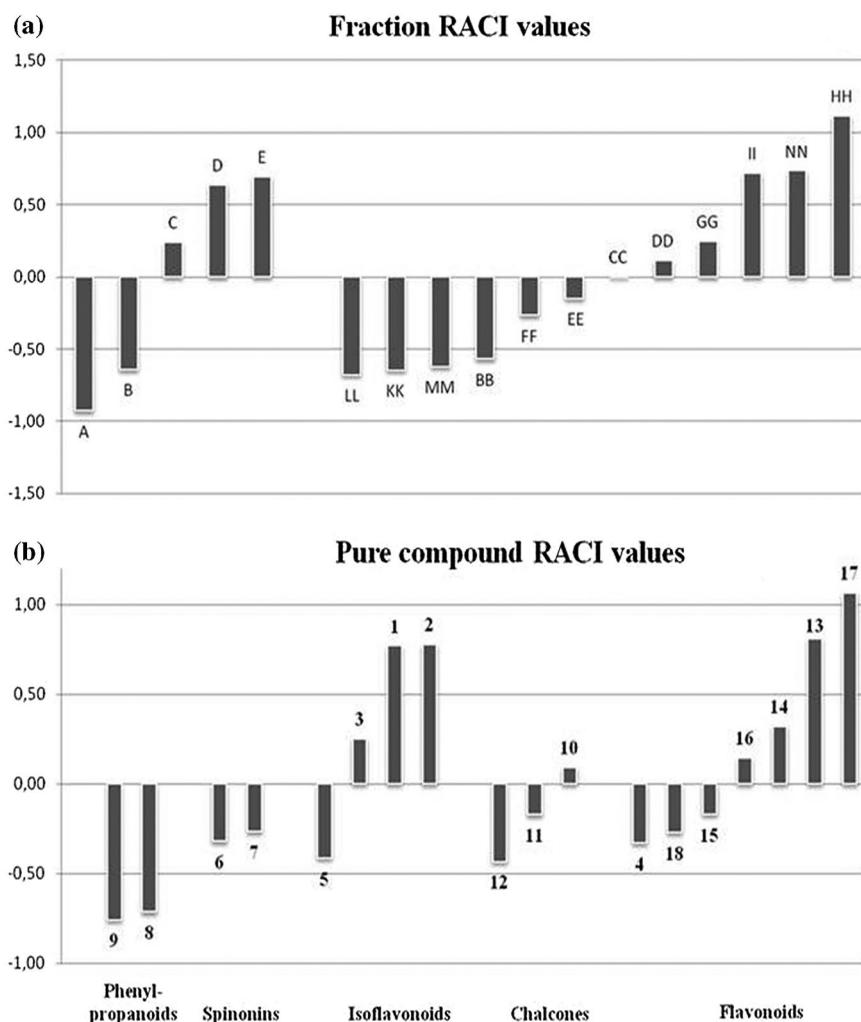


Figure 2. RACI values of fractions (indicated with letters) (a), and pure compounds (indicated with numbers) (b) obtained from *Ononis angustissima* aerial parts.

determining factor (von Gadow et al. 1997; Milella et al. 2014). RACI was calculated (Figure 2(a)) and fractions LL, KK, MM and BB, together with the totally inactive fraction AA (data not shown), were not further analysed.

The molecular formula of compound **1** ($C_{22}H_{24}O_{10}$) was determined by HRESIMS spectra (m/z 449.1453) and ^{13}C NMR. In the HRESIMS/MS spectrum, fragments at m/z 287.05 $[(M-162)+H]^+$ and 272.04 $[(M-162-15)+H]^+$ were observed. The 1H NMR spectrum of **1** (Table S2) showed signals for an oxygenated methine double of doublets at δ 3.85 (1H, dd, $J = 11.0$, 5.0 Hz, H-3), two methylene double of doublets at δ 4.61 (1H, dd, $J = 13.0$, 5.0 Hz, H-2a) and 3.49 (1H, dd, $J = 12.5$, 11.0 Hz, H-2b). The proton signals of ring A were observed at δ 7.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.48 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz, H-6) and 6.31 (1H, br s, H-8), while in the B-ring, a 1,3,4-trisubstitution was evident from the three signals at δ 7.11 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.5 Hz, H-6') and 6.97 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2') (Cooper et al. 2002).

In the ^1H NMR, the presence of an anomeric proton at δ 4.84 (1H, d, $J = 7.6$ Hz) and a methoxy group at δ 3.85 (3H, s) was also observed. The 1D-TOCSY spectrum together with information obtained from ^{13}C NMR led to establish the presence of a β -glucose unit. Hydrolysis of **1** with 1 N HCl, followed by GC analysis through a chiral column of the trimethylsilylated monosaccharide, led to the assignment of the glucose configuration. All the NMR assignments were obtained using 1D-TOCSY, COSY, HSQC and HMBC NMR correlations. The presence of the methoxy group at C-4' was confirmed by NMR chemical shifts and the HMBC correlation between OMe and C-4', while the correlation of H-1_{glc} and C-3' located the glucose moiety at C-3'. In order to establish the absolute configuration at C-3, the CD spectrum was recorded (Slade et al. 2005). The negative Cotton effect at 312 nm led to establish the (3S) configuration at C-3 of compound **1**. Thus, the structure of **1** was elucidated as (3S)-7-hydroxy-4-methoxyisoflavanone 3'- β -D-glucopyranoside.

The HRESIMS and HRESIMS/MS of compound **4** ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{17}$) displayed a quasimolecular ion peak at m/z 653.1721 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and prominent fragments at m/z 491.11 $[(\text{M}-162)+\text{H}]^+$, 447.09 $[(\text{M}-206)+\text{H}]^+$ and 285.04 $[(\text{M}-162-206)+\text{H}]^+$, corresponding to the losses of one hexose, one acetylated hexose and both the sugar units, respectively. The ^{13}C NMR spectrum (Table S2) showed 29 signals, of which 12 were assigned to a saccharide portion, 2 to an acetyl group and 15 to a flavonol moiety. The ^1H and ^{13}C NMR spectra (Table S2) of **4** clearly indicated that kaempferol was the aglycone (Agrawal 1989; Le Gall et al. 2003). Analysis of 1D-TOCSY and DQF-COSY spectra allowed the complete assignments of all proton resonances of the glucose unit starting from the anomeric proton signal at δ 5.09 and of the galactose unit starting from the H-1 signal at δ 5.54, and the H₂₋₆ signals at δ 3.70 and 3.56, showing that the hydroxyl group at C-2 of galactose was acetylated. These results were consistent with the typical esterification shift of H-2_{gal} signal at δ 5.29 and C-2_{gal} at 73.5 ppm (D'Agostino et al. 1992). The HMBC cross-peaks were useful in the determination of the aglycone substitution pattern. Diagnostic long-range correlations were observed between H-1_{glc} and C-3, H-1_{gal} and C-7, and H-2_{gal} and COO. The sugar configuration was established as reported for **1**. On the basis of the above results, **4** was characterised as kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside-7-O-(2'''-acetyl)- β -D-galactopyranoside.

Compound **2** had a molecular ion peak at m/z 463.1251 (HRESIMS), corresponding to a molecular formula of $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. The HRESIMS/MS spectrum showed one peak at m/z 301.04 $[(\text{M}-162)+\text{H}]^+$, due to the loss of one hexose moiety, and a fragment at m/z 245.03 $[(\text{M}-162-56)+\text{H}]^+$, diagnostic of the presence of an isoflavone skeleton (Kuhn et al. 2003). From 1D and 2D NMR data (Table S2), its structure was deduced to be 5',7-dihydroxy-2'-methoxyisoflavone 4'-O- β -D-glucopyranoside, recently described by Ghribi et al. from *O. angustissima* roots (Ghribi et al. 2015). However, chemical shifts of glucose moiety were completely wrongly attributed by these authors; compound **2** correct ^1H and ^{13}C NMR values are now assigned in Table S2, and all its experimental data are listed in Supplementary material.

Compounds **3** and **5–18** were characterised as formononetin 7-O- β -D-glucopyranoside or ononin (**3**) (Wang et al. 2013), trifolirhizin (**5**) (Zhao et al. 2009), 9-O-methylspinonin (**6**), spinonin (**7**) (Kirmizigül et al. 1997) citrusin C (**8**) (Hammami et al. 2006), chavicol 1-O- β -D-glucopyranoside (**9**) (Higuchi & Donnelly 1977), 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**10**) (Orjala et al. 1994), 2',4'-dihydroxychalcone (**11**) (Ghani et al. 2012), dihydroflavokawin B (**12**) (Itokawa et al. 1988), 5,3,4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (**13**) (Ruii et al. 2015), 7-methylapigenin (**14**) (Agrawal et al. 1989), alnetin (**15**) (Asakawa 1971), 5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone (**16**) (Dietz et al. 1981), luteolin 7-O- β -D-glucopyranoside (**17**)

(Agrawal et al. 1989) and 7-*O*-methylchrysin (**18**) (Heim et al. 2002), by spectrometric and spectroscopic measurements and comparison with the literature data.

The antioxidant activity of all pure compounds using DPPH, BCB and FRAP tests was assayed (Table S1). Among isolated compounds from the *n*-BuOH fractions (**1–9**), compound **2** showed the highest DPPH and FRAP values, while the other isoflavones **1** and **3** were less active (Table S1). This difference could be ascribed to the loss of free –OH on aromatic rings in **1** and **3**. Our data also confirmed that the presence of 2,3 double bond increases the activity of compound **2** when it is compared with that of **1**. These results are in agreement with those recently shown on similar molecules (Ghribi et al. 2015). Moreover, compound **5** showing no free –OH groups and 2,3 double bond displayed the lowest activity among isoflavone derivatives (Table S1). It is possible to assess that **17** and **13** are the most active flavones (Figure 2(b)), both exerting the catechol group on ring B, while compounds **8** and **9** showed the lowest values, both without any free phenolic hydroxyl group. RACI (Figure 2(b)), combining the antioxidant results obtained from different assays, showed that flavones and isoflavones are the most active compounds and confirmed the importance of the adjacency of two hydroxyl groups in the *ortho*-diphenolic arrangement (Rice-Evans et al. 1996; Heim et al. 2002; Lee et al. 2008). The interesting antioxidant potential obtained for *O. angustissima* extracts and fractions could be only partially attributed to the activity of pure isolated compounds: the presence of minor constituents could better clarify this activity. Therefore, the *n*-BuOH extract was subjected to LC-HRESIMS and LC-HRESIMS/MS analyses, in order to provide wider information concerning the polyphenols contents of *O. angustissima* aerial parts (Figure S10). Thirty-two main species were revealed, including compounds **1–18**. On the basis of accurate molecular weight determination, and taking into account the main fragments observed in the MS/MS spectra, the structure of further fourteen derivatives was proposed (Table S3). Particularly, nine other flavones (compounds **a–e**, **g**, **h**, **j** and **l**) and four isoflavones (**f**, **k**, **m** and **n**) were detected: the latter were distinguished by the loss of 56 amu fragment typically observed only in the MS/MS spectra of isoflavones (Cooper et al. 2002). The hydroxylation pattern on A and B rings could be recognised taking into account the different ions $^{1,3}A^+$ related to C-ring fragmentation (Wu et al. 2004). The following ions suggested the hydroxylation pattern of ring A for compounds **a–h** and **j–n**: m/z 137 ($C_7H_5O_3$)⁺ indicated one hydroxy, 153 ($C_7H_5O_4$)⁺ two hydroxy, 167 ($C_8H_7O_4$)⁺ one hydroxy and one methoxy, 181 ($C_9H_9O_4$)⁺ two methoxy, 183 ($C_8H_7O_5$)⁺ two hydroxy and one methoxy, 197 ($C_9H_9O_5$)⁺ two methoxy and one hydroxy, 213 ($C_9H_9O_6$)⁺ two methoxy and two hydroxy, 227 ($C_{10}H_{11}O_6$)⁺ three methoxy and one hydroxy groups, respectively. Moreover, one putative aurone (compound **i**) was also proposed. These results are in agreement with the detected antioxidant activity.

Finally, the cytotoxic activity of crude *O. angustissima* extracts was investigated against healthy PBMC and three human cancer cell lines HeLa, Jurkat and MCF7. All the extracts were inactive at the tested concentrations. The absence of cytotoxicity on healthy PBMC could suggest the use of *O. angustissima* in herbal drugs preparation.

3. Conclusion

Spectrometric and spectroscopic analyses including 2D NMR allowed to isolate and identify two new natural secondary metabolites and sixteen known compounds from *O. angustissima* aerial parts belonging to the flavonoid, isoflavonoid, phenylpropanoid, spinonin and

chalcone classes. Flavonoids and isoflavonoids reported the highest RACI and some structure–activity relationships based on the presence of free OH groups, different substituents on aromatic rings and the presence of 2,3 double bond in C-ring, were established.

Supplementary material

Experimental section, NMR spectra of compounds **1** and **4**, NMR data of compounds **1**, **2** and **4**, total ion current LC–HRESIMS chromatograms of *n*-BuOH fraction of the aerial parts, data of TPC and antioxidant activity of *Ononis angustissima* extracts, fractions and isolated compounds, and identification of the major compounds observed in aerial parts *n*-BuOH fraction by HR-LCMS analysis are available as Supplementary material.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Abdel-Kader MS. 2001. Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. *Planta Med.* 67:388–390.
- Agrawal PK. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier; pp. 132, 152, 320, 321.
- Asakawa Y. 1971. Chemical constituents of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae) II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes. *Bull Chem Soc Jpn.* 44:2765–2766.
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Rodriguez Garcia I. 1993. Phytochemistry of the genus *Ononis* (Papilionaceae). Pharmacological importance. *Ars Pharmaceutica.* 34:47–63.
- Bouheroum M, Zaïter L, Benayache S, Benayache F, Bermejo JB, Leon F, Garcia V. 2009. Four flavonoids from the aerial parts of *Ononis angustissima* species. *Chem Nat Compd.* 45:874–875.
- Burnett GT. 1833. *Outlines of botany.* London: Adlard JC; p. 453–454.
- Cooper JD, Qiu F, Paiva NL. 2002. Biotransformation of an exogenously supplied isoflavonoid by transgenic tobacco cells expressing alfalfa isoflavone reductase. *Plant Cell Rep.* 20:876–884.
- D'Agostino M, De Simone F, Zhong LZ, Pizza C. 1992. Flavonol glycosides from *Tagetes elliptica*. *Phytochemistry.* 31:4387–4388.
- Dietz VH, Wollenweber E, Favre-Bonvin J, Smith DM. 1981. Two flavonoids from the frond exudate of *Pityrogramma triangularis* var. *triangularis*. *Phytochemistry.* 20:1181–1182.
- Fernández EC, Viehmannová I, Lachman J, Milella L. 2006. Yacon [*Smalanthus sonchifolius* (Poeppig & Endlicher) H. Robinson]: a new crop in the Central Europe. *Plant Soil Environ.* 52:564–570.
- Ghani NA, Ahmat N, Ismail NH, Zakaria I, Zawawi NKNA. 2012. Chemical constituent and cytotoxic activity of *Polyalthia cauliflora* var. *cauliflora*. *Res J Med Plant.* 6:74–82.
- Ghribi L, Waffo-Tégou P, Cluzet S, Marchal A, Marques J, Mérillon JM, Ben Jannet H. 2015. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorg Med Chem Lett.* 25:3825–3830.
- Hammami S, Ciavatta ML, Ben Jannet H, Cimino G, Mighri Z. 2006. Three phenolic and a sterol glycosides identified for the first time in *Matthiola longipetala* growing in Tunisia. *Croat Chem Acta.* 79:215–218.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem.* 13:572–584.
- Higuchi R, Donnelly DMX. 1977. Pinus. Part 2. Glycosides from *Pinus contorta* needles *Phytochemistry.* 16:1587–1590.
- Itokawa H, Yoshimoto S, Morita H. 1988. Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosana*. *Phytochemistry.* 27:435–438.
- Kirmizigül S, Gören N, Yang SW, Cordell GA, Bozok-Johansson C. 1997. Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *Leiosperma*. *J Nat Prod.* 60:378–381.

- Kuhn F, Oehme M, Romero F, Abou-Mansour E, Tabacchi R. 2003. Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycones by MS2 ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO. *Rapid Commun Mass Sp.* 17:1941–1949.
- Le Gall G, DuPont MS, Mellon FA, Davis AL, Collins GJ, Verhoeven ME, Colquhoun IJ. 2003. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J Agr Food Chem.* 51:2438–2446.
- Lee S, Moon BH, Park Y, Lee E, Hong S, Lim Y. 2008. Methyl substitution effects on ^1H and ^{13}C NMR data of methoxyflavones. *Bull Korean Chem Soc.* 29:1793–1796.
- Mezrag A, Bouheroum M, Beghidja N, Khalfaoui A, Zaiter L, Benayache S, Benayache F. 2013. More flavonoids from the ethyl acetate extract of *Ononis angustissima* species. *Chem Nat Compd.* 49:749–750.
- Mhamdi B, Abbassi F, Abdelly C. 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal *Ononis natrix* growing wild in Tunisia. *Nat Prod Res.* 29:1157–1160.
- Milella L, Bader A, De Tommasi N, Russo D, Braca A. 2014. Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species. *Food Chem.* 160:298–304.
- Orjala J, Wright AD, Behrends H, Folkers G, Sticher O, Rüggeger H, Rali T. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J Nat Prod.* 57:18–26.
- Ozenda, P. 1958. Flore de Sahara Septentional et Centrale. Paris: Centre Nacional de la Recherche Scientifique; pp. 486.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.* 20:933–956.
- Ruiu S, Anzani N, Orrù A, Floris C, Caboni P, Alcaro S, Maccioni E, Distinto S, Cottiglia F. 2015. Methoxyflavones from *Stachys glutinosa* with binding affinity to opioid receptors: in silico, in vitro, and in vivo studies. *J Nat Prod.* 78:69–76.
- Safer AM, Al-Nughamish AJ. 1999. Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electrol microscopical study. *Histol Histopathol.* 14:391–406.
- Slade D, Ferreira D, Marais JPJ. 2005. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry.* 66:2177–2215.
- Süntar İpek, Baldemir A, Coşkun M, Keleş H, Akkol EK. 2011. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 135:63–70.
- von Gadow A, Joubert E, Hansmann CH. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agr Food Chem.* 45:632–638.
- Wang Q, Ji S, Yu SW, Wang HX, Lin XH, Ma TT, Qiao X, Xiang C, Ye M, Guo D. 2013. Three new phenolic compounds from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis*. *Fitoterapia.* 85:35–40.
- Wu W, Yan C, Li L, Liu Z, Liu S. 2004. Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1047:213–220.
- Zhao S, Zhang L, Gao P, Shao Z. 2009. Isolation and characterisation of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. *Food Chem.* 114:869–873.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/273461649>

Phytochemical investigation and citotoxic activity of *Lotus corniculatus*

Article in *Pharmacologyonline* · December 2014

CITATIONS

2

READS

181

11 authors, including:



Bouheroum Mohamed

University of Constantine 1

19 PUBLICATIONS 71 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Nicola Malafrente

Università degli Studi di Salerno

43 PUBLICATIONS 223 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Massimiliano D'Ambola

Università degli Studi di Salerno

13 PUBLICATIONS 4 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Lorella Severino

University of Naples Federico II

69 PUBLICATIONS 581 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Antioxidant activities and quali-quantitative analysis of different *Smallanthus sonchifolius* [(Poepp. and Endl.) H. Robinson] landrace extracts [View project](#)



Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase from *Andromachia igniaria* Humb. & Bonpl. [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Massimiliano D'Ambola](#) on 14 March 2015.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION AND CITOTOXIC ACTIVITY OF *LOTUS CORNICULATUS*

Mezrag, Abderrahmane¹; Mohamed, Bouheroum¹, Nicola, Malafronte²; Massimiliano, D'Ambola³;
Aissaoui, Meriem¹; Lorella, Severino^{3*};

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL),
Université Constantine 1, Route de Aïn El Bey, 25000 Constantine, Algérie

²Department of Pharmacy, University of Salerno, via Giovanni Paolo II, 84084 Fisciano (SA), Italy

³Department of Veterinary Medicine and Animal Production, Division of Toxicology, University of Naples Federico II via Delpino 1, 80137,
Naples, Italy

*lorella.severino@unina.it

Abstract

In the present work we reported the phytochemical investigation of *n*-buthanol and chloroform extracts of *Lotus corniculatus* L. a plant belonging to Fabaceae family. Our study reported the isolation of benzoic acid, transilin, isosalicin, soyasaponin I, dehydrosoyasaponin I, medicarpin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside, pharbitoside A and *p*-coumaric acid. The structures of all compounds were elucidated on the basis of NMR and MS analysis. The antiproliferative activity of the extracts was evaluated using three continuous murine and human culture cell lines J774A1, HEK-293, and WEHI-164. The *n*-BuOH showed moderate activity cytotoxic.

Key words: *Lotus corniculatus*, saponins, citotoxic activity

Introduction

Fabaceae family is one of the largest families, with 720-750 genera and 18,000 species [1]. This family has been traditionally divided into three subfamilies, the Caesalpinioideae, Mimosoideae, and Papilionoideae includes herbs, shrubs, trees and vines distributed throughout the world, especially the tropical rain forest. The genus *Lotus*, belonging to the subfamily Papilionoideae is mainly distributed around the Mediterranean region comprising Areas of Europe, Africa, Western Asia and Western North America. Only in Algeria there are about fifteen species [2]. *Lotus corniculatus* also known as "Birdsfoot trefoil" is a perennial dehiscent species, herbaceous member of the pea family (Fabaceae). It can be distinguished from all other members of the pea family by its five leaflets and head-like umbels of bright yellow flowers [1]. *Lotus corniculatus* is a legume species adapted to different climatic and soil conditions. Shows a high resistance to cold, drought and even the excess moisture³. Previous phytochemical studies reported the presence of phitoalexins, polyphenols, proanthocyanidins [4], tannins, flavonoids, oleanolic acid and saponins [5]. Different biological activities are reported, in particular the flowers are antispasmodic, cardiotoxic and sedative while the whole plant is used externally for a local skin inflammation [6]; the root is carminative, febrifuge, restorative [7]. In our ongoing research for new bioactive compounds from mediterranean medicinal plants [8-10] the aerial parts of *Lotus corniculatus* has been studied.

Material and Methods

Plant Material

Lotus corniculatus L. (Fabaceae) aerial parts, were collected in March 2011 from El-Djbel el ouahch near Constantine City, Algeria. The plant was identified by Pr. M. Bouhroum.

Chemicals

All reagents for cell culture were from Hy-Clone (Euroclone, Paignton Devon, U.K.); MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyl-2H-tetrazolium bromide] and 6-mercaptopurine (6-MP) were from Sigma Chemicals (Milan, Italy). *n*-Hexane, *n*-Butanol chloroform, methanol, hydrochloric acid and glacial acetic acid were purchased from VWR (Milano-Italy).

Extraction and isolation

Air dried aerial parts of *Lotus corniculatus* L. (500 g) were macerated four times with 70% MeOH solution by replacing the solution every day with fresh solvent. The hydro-alcoholic solutions were concentrated under reduced pressure to dryness and the residue was dissolved in water (200 mL) and kept in cold overnight. After filtration, the aqueous solution was successively extracted with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH for three times for each solvent, then the CHCl₃ (1.7 g), EtOAc (2.5 g) and *n*-BuOH (24.6 g) extracts were concentrated to dryness. Part of *n*-BuOH extract (13 g) was fractionated by a Silica gel 60 (Merck 200-400 mesh) column chromatography eluted with a gradient of CH₂Cl₂/MeOH with increasing polarity. Fractions of 50 ml were collected, analyzed by TLC and pooled into eight fractions (A-H). Fraction A (322 mg) was purified by RP-HPLC using MeOH-H₂O (2:3) to give benzoic acid (5.0 mg, t_R=18 min). Fraction C (700 mg) was purified by RP-HPLC using MeOH-H₂O (45:55) to give isosalicin (4 mg, t_R =8 min) and transilin (1.1mg, t_R =30 min). Fraction D (800 mg) was purified by RP-HPLC using MeOH-H₂O (1:1) to give soyasaponin I (2.7mg, t_R =32min), dehydrosoyasaponin I (1.7mg, t_R =37 min) and pharbitoside A (2.7mg, t_R =32min). The chloroform extract (1,6 g) was subjected to column chromatography using silica gel and eluted with CHCl₃ followed by increasing concentrations of MeOH (from 1% to 100%). Fractions of 50 mL were collected, analyzed by TLC (silica gel plates, in CHCl₃ and mixtures CHCl₃-MeOH) and grouped into five fractions (A-E). Fraction B (20mg) was pure *p*-coumaric acid. Fraction F (172 mg) was purified by RP-HPLC using MeOH-H₂O (55:45) to give medicarpin-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside (3mg, t_R =14 min). The purity of each compound was determined by HPLC, and NMR.

Experimental procedures

Column chromatography was performed over silica gel (63-200 μm, Merck, Darmstadt, Germany); TLC was performed on precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany); compounds were detected by Ce(SO₄)₂/H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) solution. HPLC separations were conducted on a Shimadzu LC-20AT Prominence system equipped with a Shimadzu RID-10A refractive index detector, and with a Waters μ-Bondapak C18 column (Waters, Milford, MA). NMR experiments were performed on a Bruker DRX-600 spectrometer at 300 K [11, 12]. The NMR data were processed on a Silicon Graphical

Indigo2 Workstation using UXNMR software. HRESIMS spectra were acquired in the positive ion mode on a Q-TOF premier spectrometer equipped with a nano electrospray ion source (Waters-Milford, MA, USA).

Antiproliferative assay

J774.A1, murine monocyte/macrophage, WEHI-164, murine fibrosarcoma, and HEK-293, human epithelial kidney cells were grown as reported previously [13]. J774.A1, WEHI-164, and HEK-293 (3.4×10^4 cells) were plated on 96-well microtiter plates and allowed to adhere at 37°C in 5% CO₂ and 95% air for 2 h. Thereafter, the medium was replaced with 50 µL of fresh medium and a 75 µL aliquot of 1:4 serial dilution of each test compound was added and then the cells incubated for 72 h. In some experiments, serial dilutions of 6-MP were added. The cell viability was assessed through an MTT conversion assay [14, 15]. The optical density (OD) of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC/340) equipped with a 620 nm filter. The viability of each cell line in response to treatment with tested compounds and 6-MP [13] was calculated as: % dead cells = $100 - (\text{OD treated} / \text{OD control}) \times 100$. Table 1 shows the results obtained expressed as an IC₅₀ value (µM), the concentration that inhibited cell growth by 50% as compared to the control.

Results and Discussion

The phytochemical investigation of *n*-BuOH and chloroform extracts of *Lotus corniculatus* aerial parts was conducted using for the extracts fractionation a Silica gel column chromatography followed on HPLC. Chromatographic and spectroscopic analyses of fractions indicated the presence of eight known compounds, in particular benzoic acid and *p*-coumaric acid [16], a phenolic glucoside isosalicin [17], a flavonoid glycoside transilin [18]; three saponins soyasaponin I, dehydrosoyasaponin I [19], pharbitoside A [20]; a pterocarpan glycoside medicarpin-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside [20]. Isosalicin was isolated for the first time in *Lotus corniculatus*; soyasaponin I, dehydrosoyasaponin I, pharbitoside A, medicarpin-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside and transilin were isolated for the first time in *Lotus* genus.

The antiproliferative activity of extracts and isolated compounds was evaluated against the J774.A1, WEHI-164, and HEK-293 cell lines.

The *n*-BuOH extract was the only active showing an IC₅₀ of 27±2, 55±2.5 and >100 µg/mL against J774.A1, WEHI-164, and HEK-293 cell lines, respectively. Phenolic derivatives were almost inactive, while data obtained (IC₅₀ values) for saponins: soyasaponin I, dehydrosoyasaponin I and pharbitoside A are reported in Table 1. As can be seen from the results, pharbitoside A, was the most active constituents. Generally, cytotoxic effects of compounds saponins were dependent on the number of sugar units: the ones having less sugar moieties were more intense in activity as compared with those having more sugar moieties. A possible explanation is that the number of the sugar moieties determines the hydrophilic properties of a compound; the hydrophilic compounds are less able to pass through the cell membrane of mammalian cells, which is reflected in a lower cytotoxicity.

References

1. Wink M, Mohamed GIA. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. *Biochem. System. Ecol.* 2003; 31(8): 897-917.
2. Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol.1.-CNRS, Paris
3. Grant WF, Niizeki M. Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.), R. J. Singh, Ed., Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Forage Crops 2009; 5: 153-204 CRC Press, Boca Raton, Florida.
4. Foo LY, Newman R, Waghorn G, McNabb WC, Ulyatt MJ. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 1996; 41: 617-624.
5. Koelzer J, Pereira DA, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Frode TS. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry* 2009; 117: 444-450.
6. Chiej R. Encyclopaedia of Medicinal Plants 1984; MacDonald, Edinburgh.
7. Duke JA, Ayensu ES. Medicinal Plants of China 1985; vol.2:705
8. De Tommasi N, Autore G, Bellino A, Pinto A, Pizza C, Sorrentino R, Venturella P. Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmata*. *Journal of Natural Products* 2000; 63: 308-314.
9. Aquino R, Peluso G, De Tommasi, N, De Simone F, Pizza, C. New polyoxypregnane ester derivatives from *Leptadenia hastata*. *Journal of Natural Products* 1996; 59: 555-564.
10. Braca A, Prieto JM, De Tommasi N, Tomè, F, Morelli, I. Furostanol saponins and quercetin glycosides from the leaves of *Helleborus viridis* L. *Phytochemistry* 2004; 65: 2921-2928.
11. Dal Piaz F, Cotugno R, Lepore, L, Vassallo A, Malafronte N, Lauro G, Bifulco G, Belisario M A, De Tommasi N. Chemical proteomics reveals HSP70 1A as a target for the anticancer diterpene oridonin in Jurkat cells. *Journal of Proteomics* 2013; 82: 14-26.

13. Dal Piaz F, Vassallo A, Temraz A, Cotugno R, Belisario MA, Bifulco G, Chini MG, Pisano C, De Tommasi N, Braca A. A chemical-biological study reveals C9-type iridoids as novel heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors. *J Med Chem.* 2013; 28: 56(4):1583-95.
14. Dal Piaz F, Tosco A, Eletto D, Piccinelli AL, Moltedo O, Franceschelli S, Sbardella G, Remondelli P, Rastrelli L, Vesce L, Pisano C, De Tommasi N. The identification of a novel natural activator of p300 histone acetyltransferase provides new insights into the modulation mechanism of this enzyme. *Chem.Bio.Chem* 2010; 11: 818-827.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63.
16. Pipari AWJ, Hu HM, Yabkowitz R, Dixit YM. The A20 zinc finger protein protects cell from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 12424-7.
17. Vivar Quintana AM, Baldi Coronel BM, Sanchez, JJ, Santos Buelga C. Phenolic composition of monofloral honeys of different origins. *Alimentaria (Madrid)* 1999; 306: 93-99.
18. Golea L, Haba H, Lavaud C, Long C, Benkhaled M. Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik. *Biochemical Systematics and Ecology* 2012; 45: 12-15.
19. Yang JH, Kondratyuk TP, Jermihov KC, Marler LE, Qiu X, Choi Y, Cao H, Yu R, Sturdy M, Huang R, Liu Y, Wang LQ, Mesecar AD, van Breemen RB, Pezzuto JM, Fong HHS, Chen YG, Zhang HJ. Bioactive compounds from the Fern *Lepisorus contortus*. *Journal of Natural Products* 2011; 74(2), 129-136.
20. Jung da Y, Ha H, Lee HY, Kim C, Lee JH, Bae K, Kim JS, Kang SS. Triterpenoid saponins from the seeds of *Pharbitis nil*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008, 56(2):203-6.
21. Tsunoda Y, Okawa M, Kinjo J, Ikeda T, Nohara T. Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chem Pharm Bull* 2008; 56(8):1138-42. Soyasaponin I, dehydrosoyasaponin I, medicarpin-3-O- β -D-glucopyranoside.

Table 1. *In vitro* Antiproliferative Activity.

Compounds	cell line (IC ₅₀ μ M)		
	J774.A1 ^b	HEK-293 ^c	WEHI-164 ^d
dehydrosoyasaponin I	29.4 \pm 0.6	36.1 \pm 0.4	28.0 \pm 0.3
soyasaponin I	56.2 \pm 0.8	67.0 \pm 0.2	>100
pharbitoside A	97.0 \pm 1.2	>100	>100
6-MP ^f	0.003 \pm 0.5	0.007 \pm 0.4	0.015 \pm 0.6

^a The IC₅₀ value is the concentration of compound that affords 50% reduction in cell growth (after a 3-days incubation).

^bJ774.A1 = murine monocyte/macrophage cell lines.

^cHEK-293 = human epithelial kidney cell lines.

^dWEHI-164 = murine fibrosarcoma cell lines.

^end = not determined. ^f6-MP = 6-mercaptopurine.

ملخص

إن الهدف من هذا العمل هو فصل مركبات فعالة جديدة وتقييم المنتجات الطبيعية المفصولة من النوعين المتوطنين في الجزائر:

Ononis angustissima و *Lotus corniculatus*، والمنتميان إلى عائلة Fabaceae. درستنا لمستخلصات الجزء الهوائي للنوعين المذكورين أعلاه باستخدام تقنية الفصل الكروماتوجرافي، أدت إلى فصل وتحديد البنية التركيبية لتسعة عشر مركبا من مستخلصات الكلوروفورم و البوتانول للنوع *Ononis angustissima* من بينهم مركبين جديدين.

كما تم فصل ثمانية مركبا من مستخلصات الكلوروفورم و البوتانول للجزء الهوائي للنوع *Lotus corniculatus*.

الصيغة البنائية للمركبات المفصولة تم تحديدها بواسطة عدة تقنيات مطيافية: مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ ، وثنائية البعد (COSY, , HSQC, HMBC)، مطيافية الكتلة (HR-ESI-MS)، ومقارنة النتائج مع المراجع.

أجرينا اختبارات على النشاط المضاد للتكاثر لمستخلص البوتانولي والمركبات المعزولة من *Lotus corniculatus* على ثلاثة خطوط خلوية سرطانية، WEHI-164، HEK-293J774.A1، أظهرت النتائج أن مستخلصات البوتانول ومركب Apharbitoside هي الأكثر نشاطا في خطوط الخلايا السرطانية الثلاثة. كما أظهرت مستخلصات البوتانول والكلوروفورم ومعظم المركبات المعزولة من النوع *Ononis angustissima* ان لديها نشاط مضاد للأكسدة ممتاز، لذلك تعتبر هذه الجزيئات مضادات الأكسدة من الدرجة الأولى مقارنة مع الجزيئات المرجعية، وبالتالي يمكن أن تستخدم للتطبيقات العلاجية.

الكلمات المفتاحية: Fabaceae، *Ononis angustissima* Lam. Var, *Lotus corniculatus* L NMR 1D 2D، نشاط مضاد للأكسدة، فعالية بيولوجية، فلافونويدات.

Abstract

Our phytochemical and biological work concerns the aerial parts of two endemic Saharan species belonging to the Fabaceae family: *Ononis angustissima* Lam. Var and *Lotus corniculatus* L.

Several chromatographic methods were used in our experimental work which allowed us to isolate nineteen products from the butanolic extract of *Ononis angustissima* Lam. Var. from which two are new, and eight products from *Lotus corniculatus* L.

The structures were established by different spectral methods: nuclear magnetic resonance with different applications (NMR ^1H , NMR ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC and HMBC), the mass spectrometry, UV, as well as comparison with literature data.

The antiproliferative activity tests of the *n*-butanol extract and the compounds isolated from *L. corniculatus* were carried out on three cell lines: J774.A1 (murine macrophages monocytes), WEHI-164 (murine fibrosarcoma) and HEK-293 (human epithelial renal cells) have shown that the *n*-butanol extract and the pharbitoside A compound are the most active against the three cell lines.

The two extracts and most of the isolated compounds of *Ononis angustissima* Lam. Var have excellent activity, so these molecules are considered first class antioxidants compared to reference molecules. They can therefore be used for therapeutic applications. Finally, the quantitative estimate of total polyphenols has shown that these extracts have a high content of polyphenols.

Keywords : Fabaceae, *Ononis angustissima* Lam. Var, *Lotus corniculatus* L, antioxidant activity, NMR 1D and 2D, Flavonoïds, class antioxidants, therapeutic applications.

Résumé

Notre travail phytochimique et biologique concerne les parties aériennes de deux espèces endémiques sahariennes appartenant à la famille des Fabaceae : *Ononis angustissima* Lam. Var et *Lotus corniculatus* L.

Les différentes méthodes chromatographiques de séparation utilisées dans notre expérimentation, ont permis l'isolement de dix-neuf composés de l'extrait butanolique et de l'exsudat Chloroforme de *Ononis angustissima* Lam. Var dont deux nouveaux, et huit composés de *Lotus corniculatus* L.

La détermination des structures a été réalisée par les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques : résonance magnétique nucléaire et ses différentes applications (RMN 1H, RMN 13C, DEPT, COSY, HMQC et HMBC), la spectrométrie de masse, l'ultra-violet, ainsi que par la comparaison des résultats avec les données de la littérature.

Les tests de l'activité antiproliférative de l'extrait *n*-butanol et les composés isolés de *L. corniculatus* ont été effectués sur trois lignées cellulaires : J774.A1 (macrophages murines monocytes), WEHI-164 (fibrosarcome murine) et HEK-293 (cellules rénales épithéliales humaines) ont montré que l'extrait *n*-butanol et le composé pharbitoside A sont les plus actifs vis à vis les trois lignées cellulaires.

Les deux extraits et la plupart des composés isolés d'*Ononis angustissima* Lam. Var possèdent une excellente activité, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants de première classe comparés à des molécules de référence. Ils peuvent être donc employés pour des applications thérapeutiques. Enfin l'estimation quantitative des polyphénols totaux a montré que ces extraits ont une forte teneur en polyphénols.

Mots clés : Fabaceae, *Ononis angustissima* Lam. Var, *Lotus corniculatus* L, activité antioxydante, RMN 1D and 2D, Flavonoïdes, agents antioxydants, application thérapeutique