

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

**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :
Série:

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle (LMD)

**Spécialité: Chimie pharmaceutique
Option : Analyse physico-chimique, contrôle de la qualité et synthèse de
substances bioactives**

Par

Madame BOUGANDOURA AMINA

Intitulé

**Recherche et détermination structurale de métabolites
secondaires de trois espèces algériennes.**

Devant le jury

Pr. Fadila BENAYACHE	Université des frères Mentouri Constantine	Présidente
Pr. Ratiba MEKKIOU	Université des frères Mentouri Constantine	Rapporteur Directrice de thèse
Pr. Samir BENAYACHE	Université des frères Mentouri Constantine	Examineur
Pr. Ramdane SEGHIRI	Université des frères Mentouri Constantine	Examineur
Pr. Farouk ZAIDI	Université Ferhat Abbas, Sétif	Examineur
Dr. Ouahiba BENAÏSSA	Université Batna 2	Examinatrice

Soutenue publiquement le 07/05/2018

DÉDICACES

Je dédie ce travail

A mon père maamar, je lui dédie avec fierté cette thèse

A ma mère, qui m'a supporté et aidé pour être ce que je suis;

merci maman.

A ma grand mère "Zerafi Akila

A l'âme de ma grand mère "derbale Zineb

A mon mari moussa

A mes frères : Abdou, Mani, Salah, Farouk et Doudou.

A ma sœur : Meriem.

A ma fille : Darine.

A ma belle famille

A ma grande famille chacun avec son nom pour leurs aides morales, leurs conseils précieux et leurs encouragements;

je ne peux témoigner ma reconnaissance.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout-puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience pour terminer ce travail.

Le présent travail a été réalisé au niveau de l'Unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université des frères Mentouri Constantine 1, sous la direction du professeur **Ratiba Mekkiou**, directrice de thèse, recevez ici mes sincères remerciements pour la confiance et les conseils que vous m'avez accordés tout au long de ces années. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Je n'oublie jamais votre soutien moral qui m'a souvent aidée à remonter la pente dans les moments difficiles.

A madame **Fadila Benayache**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour le grand honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de soutenance.

A monsieur **Samir Benayache**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, directeur de l'unité de Recherche VARENBIOMOL, Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect pour avoir accepté la participation à ce jury. Je vous remercie encore une fois pour avoir mis à ma disposition l'espèce *Cistanche violacea*, espèce saharienne qui n'a jamais fait objet d'étude.

Je suis sensible à l'honneur que me fait monsieur **Ramdane SEGHIRI** professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, monsieur **Farouk ZAIDI** professeur à l'université Ferhat Abbas, Sétif et **Dr. Ouahiba BENAÏSSA** Maître de conférences à l'université El Hadj Lakhdar, Batna en acceptant de juger ce travail, je leur adresse mes plus vifs remerciements.

Mes plus vifs remerciements vont à monsieur **Antonio Fiorentino** Professeur à l'université Naples II, Italie et son équipe dont je cite en particulier **Brigida D'Abrosca** et

Monica Scognamiglio pour leur accueil, leur disponibilité, leurs conseils et surtout pour l'enregistrement des spectres RMN mono et bidimensionnelle.

Je remercie vivement madame **Ameddah Souad** et monsieur **Menad Ahmed** professeurs à l'université des frères Mentouri, Constantine 1 et monsieur **Bensouici Chawki** responsable du laboratoire de biochimie, Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine, pour la réalisation des essais de l'activité biologique.

Mes plus vifs remerciements vont à madame **Ouahiba Boumaza**, monsieur **Ramdane Seghiri** professeurs à l'université des frères Mentouri, Constantine 1 et monsieur **Sarri Djamel** Maître de conférences à l'université de M'Sila pour la cueillette et l'identification des deux autres espèces.

L'ensemble des collègues du laboratoire trouvera ici l'expression de toute ma gratitude pour leur sympathie, leur encouragement et leur aide.

Enfin, 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.

Abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
CHCl₃	chloroforme
CD₃OD	méthanol deutéré
EtOH	éthanol
MeOH	méthanol
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
SiO₂	gel de silice normale
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>ddd</i>	doublet de doublets de doublets
<i>dl</i>	doublet large
<i>dt</i>	doublet de triplets
<i>td</i>	triplet de doublets
<i>t</i>	triplet
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
<i>m</i>	multiplet
RMN 1H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN 13C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
COSY H-H	Correlated Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>J</i>	constante de couplage exprimée en Hz
δ	déplacement chimique exprimée en ppm
SM	Spectrométrie de Masse
ESI	Spectrométrie de masse par Electrospray
uma	unité de masse atomique
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
R	Radical

glc	glucose
gal	galactose
rha	rhamnose
λ	longueur d'onde
PhGs	phenylethanoides glycosides

Liste des schémas et des figures

CHAPITRE I

Schéma I.1: Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Astragalus</i>	11
Schéma I.2: Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Genista</i>	19
Schéma I.3: Structures chimiques de quelques iridoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Cistanche</i>	25

CHAPITRE II

Schéma II.1: squelette de base de flavonoïdes	38
Schéma II.2: Structures des différents squelettes des flavonoïdes.....	39
Schéma II.3: Biosynthèse des flavonoïdes famille des fabacées.....	41
Schéma II.4: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.	42
Schéma II.5: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques....	43
Schéma II.6: Structure du squelette iridane.....	44
Schéma II.7: Structure de l'iridodial.....	44
Schéma II.8: Nomenclature usuelle.....	45
Schéma II.9: Exemples de différents sucres présents dans les hétérosides d'iridoïdes.....	46
Schéma II.10: Exemples d'iridoïdes en C ₁₀	46
Schéma II.11: Exemples d'iridoïdes en C ₉ et en C ₈	46
Schéma II.12: Exemples de sécoiridoïdes possédant une chaîne latérale vinylique.....	47
Schéma II.13: Exemples de sécoiridoïdes possédant un groupement éthylidène.....	47
Schéma II.14: Exemple de sécoiridoïde possédant une structure tricyclique	48
Schéma II.15: Exemples de bisiridoïdes.....	48
Schéma II.16: Exemples d'iridoïdes simples.....	48
Schéma II.17: Exemples d'iridoïdes alcaloïdiques.....	49

CHAPITRE III

Schéma III.1: Photo d' <i>Astragalus gombo</i> Coss.& Dur.....	63
---	----

Schéma III.2: Différentes étapes du processus d'extraction.....	65
Schéma III.3: Organigramme résumant les résultats obtenus.....	70
Schéma III.4: Photo de <i>Genista cinerea ssp. ramosissima</i>	71
Figure III.5: Organigramme expliquant les étapes d'extraction de <i>G. cinerea ssp. ramosissima</i>	73
Figure III.6: Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).....	77
Figure III.7 Photo de <i>Cistanche violacea Desf.</i>	78
Figure III.8: Différentes étapes du processus d'extraction.....	80
Figure III.9 : Organigramme résumant les résultats obtenus	84

CHAPITRE IV

Figure IV.1: Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 300MHz) du composé F ₄₂₋₄	91
Figure IV.2 : Spectre HSQC du composé F ₄₂₋₄	92
Figure IV.3: Spectre HMBC du composé F ₄₂₋₄	92
Figure IV.4 : Squelette du kaempférol.....	93
Figure IV.5 : Spectre COSY du composé F ₄₂₋₄	96
Figure IV.5a : Spectre COSY étalé du composé F ₄₂₋₄	96
Figure IV.2a : Spectre HSQC étalé du composé F ₄₂₋₄	97
Figure IV.6 : Chaîne présente dans le composé F ₄₂₋₄	98
Figure IV.5b: Spectre COSY étalé du composé F ₄₂₋₄	98
Figure IV.2b : Spectre HSQC étalé du composé F ₄₂₋₄	99
Figure IV.3a : Spectre HMBC étalé du composé F ₄₂₋₄	99
Figure IV.3b : Spectre HMBC étalé du composé F ₄₂₋₄	100
Figure IV.7 : Kaempférol 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl-(1→2)-[6- <i>O</i> -(3- hydroxy-3-methylglutaryl)-D-galactopyranoside.....	101
Figure IV.8 : Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD ; 300MHz) du composé F ₃₈₋₁₂	103
Figure IV.8-a : Spectre RMN ¹ H étalé (5,1-8,2ppm) du composé F ₃₈₋₁₂	104
Figure IV-8-b : Spectre RMN ¹ H étalé (0,5-4,2ppm) du composé F ₃₈₋₁₂	105
Figure IV-9 : Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD ; 75MHz) du composé F ₃₈₋₁₂	106
Figure IV-9-a: Spectre RMN ¹³ C étalé (15-105 ppm) du composé F ₃₈₋₁₂	106
Figure IV-10 : Spectre HSQC du composé F ₃₈₋₁₂	107
Figure IV-11 : Spectre HMBC du composé F ₃₈₋₁₂	108

Figure IV-12: 7-methylkaempférol 3-O- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -galactopyranoside.....	109
Figure IV-13 : Spectre RMN ^1H (CD ₃ OD ; 250MHz) du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	111
Figure IV-13-a : Spectre RMN ^1H étalé (5-9ppm) du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	111
Figure IV-14: La série spectrale UV du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	113
Figure IV-15 : structure partielle du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	113
Figure IV-16: 3-O- α -rhamnopyranosyl-4'-O- β -galactopyranosyl kaempférolOu 3-O- β -galactopyranosyl- 4'-O- α -rhamnopyranosyl kaempférol.....	114
Figure IV-17: Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm) du composé F ₉₋₂	116
Figure IV-17-a: Spectre RMN ^1H (8,1 – 5,4ppm) du composé F ₉₋₂	116
Figure IV-17-b: Spectre RMN ^1H étalé (3,9-1,3 ppm) du composé F ₉₋₂	116
Figure IV-18 : structure partielle du composé F ₉₋₂	117
Figure IV- 19 : La Série Spectrale UV du composé F ₉₋₂	118
Figure IV-20 : Isorhamnétine 3-O- β -galactopyranosyl	119
Figure IV-21: Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm) du composé F ₉₋₃	120
Figure IV-21-a : Spectre RMN ^1H étalé (7,9-6,2 ppm) du composé F ₉₋₃	120
Figure IV-21-b: Spectre RMN ^1H étalé (3.3à 5.1 ppm) compose F ₉₋₃	121
Figure IV- 22: La série spectrale UV du composé F ₉₋₃	122
Figure IV-23 : Quercétine 3-O-robinobioside	123
Figure IV-24: courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	124
Figure IV-25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	125
Figure IV-26 : La quantité en polyphénols (mgEAG/g d'extrait) et en flavonoïdes (mgEQ/g d'extrait) dans l'extrait acétate d'ethyle et <i>n</i> -butanol de l'espèce <i>G. cinerea</i> ssp. <i>ramosissima</i>	126
Figure IV-27 : % DPPH effet de balayage des échantillons testés.....	126
Figure IV-28 : Série spectrale UV du composé F ₅₋₂	129
Figure IV-29: Spectre RMN ^1H (300 MHz, CD ₃ OD, δ ppm) du composé F ₅₋₂	130
Figure IV-30: Apigénine	130
Figure IV-31: Spectre RMN ^{13}C (CD ₃ OD; 75MHz) du composé F ₇₋₃	131
Figure IV-31: Spectre RMN ^1H (300 Hz, CD ₃ OD) du composé F ₇₋₃	132
Figure IV-31-a : Spectre RMN ^1H étalé (3,1-5,5ppm) du composé F ₇₋₃	133
Figure IV-31-b: Spectre RMN ^1H étalé (1,1-2,7ppm) du composé F ₇₋₃	134
Figure IV-32 : Spectre HSQC du composé F ₇₋₃	134

Figure IV-35: squelette iridoïde avec numérotation	136
Figure IV-36: Chaîne latérale faisant partie du composé F ₇₋₃	136
Figure IV-33 : spectre COSY ¹ H- ¹ H du composé F ₇₋₃	137
Figure IV-34: spectre HMBC du composé F ₇₋₃	137
Figure IV-34-a : spectre HMBC étalé du composé F ₇₋₃	138
Figure IV-34-b : spectre HMBC étalé du composé F ₇₋₃	138
Figure IV-37: Structure plane du composé F ₇₋₃	139
Figure IV-38: Spectre NOESY du composé F ₇₋₃	139
Figure IV-39 : Cistanine-8-methyl-malonate (violaceine).....	139
Figure IV-40 : Spectre ¹ H (CD ₃ OD; 300MHz) du composé F ₁₂₋₇	141
Figure IV-40-a : Spectre ¹ H étalé (5,3-8,3ppm) du composé F ₁₂₋₇	142
Figure IV-40-b: Spectre RMN étalé (0,75 ; 5,25ppm) du composé F ₁₂₋₇	142
Figure IV-41 : Spectre COSY du composé F ₁₂₋₇	143
Figure IV-41-a: Spectre COSY étalé du composé F ₁₂₋₇	143
Figure IV-42: Spectre HSQC du composé F ₁₂₋₇	144
Figure IV-42-a: Spectre HSQC étalé du composé F ₁₂₋₇	144
Figure IV-42-b: Spectre HSQC étalé du composé F ₁₂₋₇	144
Figure IV-44: Entité 1 se trouvant dans la structure du composé F ₁₂₋₇	145
Figure IV-43: Spectre HMBC du composé F ₁₂₋₇	146
Figure IV-43-a: Spectre HMBC étalé du composé F ₁₂₋₇	146
Figure IV-45: Entité 2 présente dans la structure du composé F ₁₂₋₇	148
Figure IV-43-b: Spectre HMBC étalé du composé F ₁₂₋₇	148
Figure IV-41-b : Spectre COSY étalé du composé F ₁₂₋₇	150
Figure IV-46 : Spectre H2BC du composé F ₁₂₋₇	151
Figure IV-46-a: Spectre H2BC étalé du composé F ₁₂₋₇	151
Figure IV-42-c: Spectre HSQC étalé du composé F ₁₂₋₇	152
Figure IV-43-c: Spectre HMBC étalé du composé F ₁₂₋₇	153
Figure IV-43-d: Spectre HMBC étalé du composé F ₁₂₋₇	154
Figure IV- 47: E-Tubuloside D.....	155
Figure IV- 48 : Z-Tubuloside D.....	156
Figure IV-49: Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD; 75MHz) du composé F ₁₄₋₇₋₃	159
Figure IV-50: Spectre ¹ H (CD ₃ OD; 300MHz) du composé F ₁₄₋₇₋₃	160

Figure IV-50a: Spectre ^1H étalé [3,6 ; 6,3] du composé F_{14-7-3}	161
Figure IV-50-b: Spectre ^1H étalé [2,85 ; 4,05ppm] du composé F_{14-7-3}	161
Figure IV-51: Spectre COSY du composé F_{14-7-3}	161
Figure IV-51-a: Spectre COSY étalé du composé F_{14-7-3}	162
Figure IV-52: Spectre HSQC du composé F_{14-7-3}	162
Figure IV-52-a: Spectre HSQC étalé du composé F_{14-7-3}	163
Figure IV-50c: Spectre ^1H étalé du composé F_{14-7-3}	164
Figure IV-51b : Spectre COSY étalé du composé F_{14-7-3}	165
Figure VI-52b : Spectre HSQC étalé du composé F_{14-7-3}	165
Figure IV-53: Spectre HMBC du composé F_{14-7-3}	166
Figure IV- 54 : 6-Deoxycatalpol.....	167
Figure VI-55: Spectre ^1H ($\text{CD}_3\text{ OD}$; 300MHz) du composé F_{14-9-2}	169
Figure IV-55a: Spectre ^1H RMN étalé (5,5; 7,9) ppm du composé F_{14-9-2}	169
Figure IV-56 : Spectre HSQC du composé F_{14-9-2}	170
Figure IV-56a: Spectre HSQC étalé du composé F_{14-9-2}	170
Figure IV-57: Spectre COSY du composé F_{14-9-2}	171
Figure IV-57-a: Spectre COSY étalé du composé F_{14-9-2}	171
Figure IV-57-b: Spectre COSY étalé du composé F_{14-9-2}	171
Figure VI-58: Spectre HMBC étalé du composé F_{14-9-2}	172
Figure VI-58a: Spectre HMBC étalé du composé F_{14-9-2}	172
Figure VI-57c: Spectre COSY étalé du composé F_{14-9-2}	175
Figure VI-57d: Spectre COSY étalé du composé F_{14-9-2}	175
Figure VI-58b: Spectre HMBC étalé du composé F_{14-9-2}	176
Figure VI-58c: Spectre HMBC étalé du composé F_{14-9-2}	177
Figure IV- 59: E-Tubuloside E.....	177
Figure IV-60: Z-Tubuloside E.....	178

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.1: Flavonoïdes isolés du genre <i>Astragalus</i>	6
Tableau I.2 : Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Genista</i>	12
Tableau I.3: Les iridoïdes isolés du genre <i>Cistanche</i>	22
Tableau I.4 : les phenylethanoides glycosides isolés du genre <i>Cistanche</i>	25

CHAPITRE II

Tableau II.1 : Liste des enzymes.	40
---	----

CHAPITRE III

Tableau III.1: Rendements de l'extraction	59
Tableau III.2: La progression de la colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>A. gombo</i>	66
Tableau III.3: Résultats de la séparation par chromatographie en phase inverse de la fraction F ₃₈	68
Tableau III.4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F ₄₂	69
Tableau III.5 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol.	74
Tableau III.6 Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Cistanche violacea</i>	77
Tableau III.7 : Résultats de séparation de la fraction F ₅	82
Tableau III.8: Résultat de la séparation de la fraction F ₇	83
Tableau III.9 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Cistanche violacea</i>	84

CHAPITRE IV

Tableau IV.1: Déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C du composé F ₄₂₋₄ dans CD ₃ OD.....	102
Tableau IV.2 : Les données spectroscopiques du composé F ₃₈₋₁₂	109
Tableau IV.3: Données RMN ¹ H du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	111
Tableau IV.4 : Données relatives à la série spectrale UV du composé F ₄₂₋₁₁₋₁	112

Tableau IV.5 : Les données relatives à la RMN 1H du composé F ₉₋₂	117
Tableau IV.6 : Les données de la série spectrale UV du composé F ₉₋₂	118
Tableau IV.7 : Données RMH ¹ H du composé F ₉₋₃	121
Tableau IV.8 : Données relatives à la série spectrale UV du composé F ₉₋₃	122
Tableau IV.9 : taux des polyphénols dans les deux extraits.....	124
Tableau IV. 10 : Taux des flavonoïdes dans les deux extraits.....	125
Tableau IV.11 : Valeurs de IC50 dans les deux extraits et le standard.....	127
Tableau IV.12 : Données de la série spectrale UV du composé F ₅₋₂	128
Tableau IV.13 : Données du spectre RMN ¹ H du composé F ₅₋₂	130
Tableau IV.14 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé F ₇₋₃	140
Tableau IV.15 : Déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C du composé E-Tubuloside. D...	157
Tableau IV.16 : Déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C du composé Z-Tubuloside. D....	158
Tableau IV.17 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé F ₁₄₋₇₋₃	167
Tableau IV.18 : Déplacements chimiques des protons et carbones du E-Tubuloside E.....	179
Tableau IV.19 : Déplacements chimiques des protons et carbones du Z-Tubuloside E.....	180
Tableau IV.20 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de <i>C. violaceae</i> sur la dénaturation des protéines et la membrane HRBC lysis (% d'inhibition).....	182

SOMMAIRE
INTRODUCTION GENERALE 1
Références bibliographiques 3

CHAPITRE I

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**La famille Fabaceae et les genres *Astragalus* et *Genista*,
la famille Orobanchaceae et le genre *Cistanche***

I-1- La famille Fabaceae.....	5
I-1-1- Généralités sur la famille Fabaceae	5
I-1-2- Le genre <i>Astragalus</i>	5
I-1-2-1- Utilisation en médecine traditionnelle	5
I-1-2-2- Toxicité de quelques espèces du genre <i>Astragalus</i>	6
I-1-2-3- Travaux antérieurs.....	6
I-1-3 : Le genre <i>Genista</i>	11
I-1-3-1 : Généralités sur le genre <i>Genista</i>	11
I-1-3-2- Description du genre	11
I-1-3-3- Utilisation en médecine traditionnelle	12
I-1-3-4- Travaux antérieurs.....	12
I-2- La famille Orobanchaceae	20
I-2-1- Généralités sur la famille Orobanchaceae.....	20
I-2-2- Le genre <i>Cistanche</i>	20
I-2-2-1 : Généralités sur le genre <i>Cistanche</i>	20
I-2-2-2 : Description du genre <i>Cistanche</i>	21
I-2-2-3 : Utilisation en médecine traditionnelle.....	21
I-2-2-4 : Travaux antérieurs.....	22
Références bibliographiques.....	29

CHAPITRE II

Les métabolites secondaires flavonoïdes, iridoïdes et phényéthanoïdes

II-1- Les flavonoïdes	38
II-1-1- Généralités sur les flavonoïdes	38
II-1-2- Classification des flavonoïdes	38
II-1-3- Biosynthèse des flavonoïdes.....	40

II-1-4- Activités biologiques des flavonoïdes	42
II-2- les iridoïdes	44
II-2-1- Définition	44
II-2- 2-Classification.....	45
II-2- 2-a- Hétérosides d'iridoïdes	45
II-2- 2-a-1 Iridoïdes carbocycliques	46
II-2-2-a-2 Sécoiridoïdes	47
II-2-2-a-3 Bis-iridoïdes.....	48
II-2- 2-b Iridoïdes simples.....	48
II-2- 2-c Alcaloïdes monoterpéniques.....	49
II-2- L'activité biologique des iridoïdes	49
II-3 Les phenylethanoïde glycosides	50
II-3-1 Activité biologique de PhGs	51
II-3-1-1 Activité antioxydant	51
Références bibliographiques	53

CHAPITRE III

PARTIE EXPERIMENTALE

III-1- Etude phytochimique de l'espèce <i>Astragalus gombo</i>	61
III-1- 1 : Etude bibliographique.....	61
III-1-2 : Choix du matériel végétal	62
III-1-3 Place dans la systématique	62
III-1-4: Description botanique	62
III-1-5 : Protocole expérimentale	63
III-1-5-1 : Récolte du matériel végétal	63
III-1-5-2 : Extraction	63
III-1-5-3 : Séparation chromatographique des composants de l'extrait n-butanol.....	66
III-1-5-3-a La Fraction F ₃₇	67
III-1-5-3-b La Fraction F ₃₈	67
III-1-5-3-c La Fraction F ₄₂	68
III-2- Etude phytochimique de l'espèce <i>G. cinerea ssp. ramosissima</i> Desf.	70
III-2-1- Choix du matériel végétal.....	70
III-2-2- Place dans la systématique.....	70

III-2-3- Description botanique.....	71
III-2-4- Protocole expérimentale	71
III-2-4-1- Récolte du matériel végétal	71
III-2-4-2 - Extraction	71
III-1-4-3- Séparation chromatographique des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	74
L'étude de la fraction F9	74
III-2-5 Etude biologique de l'espèce <i>G. cinerea</i> ssp. <i>ramosissima</i> Desf.....	75
III-2-5-1 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	75
III-2-5-1a Dosage des polyphénols totaux.....	75
III-2-5-1b Dosage des flavonoïdes.....	76
III-2-5-2 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	76
III-2-5-2a Introduction.....	76
III-2-5-2b Préparation de la DPPH.....	77
III-2-5-2c Procédure.....	77
III-3- Etude chimique de l'espèce <i>C. violacea</i>	78
III-3-1- Etude bibliographique.....	78
III-3-2- Place dans la systématique.....	78
III-3-3- Description botanique.....	78
III-3-5- Protocole expérimentale	78
III-3-5-1- Récolte du matériel végétal	78
III-3-5-2- Extraction	79
III-3-5-3- Séparation chromatographique.....	81
III-3-5-3a- Séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle	81
III-3-4 -1-a Etude de la fraction F5	82
III-3-4 -1-b Etude de la fraction F6	82
III-3-4 -1-c Etude de la fraction F7	83
III-3-4 -1-d Etude de la fraction F ₁₂	83
III-3-4 -1-e Etude de la fraction F ₁₄	83
III-3-5-3b : Séparation et purification de l'extrait <i>n</i> -butano.....	84
III-3-4 Activité anti-inflammatoire in vitro	85
III-3-4-1 La méthode de stabilisation de la membrane (HRBC).....	85
III-3-4-2 L'inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	86
III-4 Conclusion.....	87
Référence	88

CHAPITRE IV

Résultats et discussions

IV-1- Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait n-BuOH de l'espèce Astragalus gombo.....	91
IV-1-1- Le composé P ₃₇ ≡F ₄₂₋₄	91
IV-1-1- Composé F38-12	101
IV-1-1- Composé F42-11-1	110
IV-2 - Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait n-BuOH de l'espèce Genista cinerea ssp. ramosissima.....	115
IV-2 -1- Le composé P ₁ ≡F9-2.....	115
IV-2 -2- Le composé P ₂ ≡F9-3.....	119
IV-2 -3- Evaluation de l'activité antioxydante.....	123
IV-2 -3- 1- Dosage des polyphénols totaux.....	123
IV-2 -3- 2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	124
IV-2 -3- 3- Evaluation de l'activité antioxydante.....	126
IV-3 - Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce Cistanche violacea.....	128
IV-3 -1- Composés F5-2.....	128
IV-3 -2- Composés F7-3	131
IV-3 -3- Composés F12-7.....	141
IV-3 -4- Composé 14-7-3	159
IV-3 -5- Composé F14-9-2.....	168
IV-3 -6- Activité anti-inflammatoire.....	181
IV-4 Conclusion	183
Références bibliographiques.....	185
Conclusion générale	188

Introduction

générale

Depuis l'Antiquité, l'homme a appris l'importance des plantes pour sa propre survie et l'art de les cultiver. Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des milliers d'années pour aromatiser et conserver la nourriture, traiter les troubles de santé et maladies de l'événement, y compris les épidémies [1, 2].

Les plantes médicinales ont été utilisées dans presque toutes les cultures comme source de médicaments. L'assurance de la sécurité, de la qualité et de l'efficacité des plantes médicinales et des produits à base de plantes médicinales est devenue une question clé dans les pays industrialisés et dans les pays en développement [2].

La connaissance de leurs propriétés curatives a été transmise au cours des siècles au sein et entre les communautés humaines. Les composés actifs produits au cours du métabolisme secondaire sont généralement responsables des propriétés biologiques des espèces végétales utilisées dans le monde entier à diverses fins, y compris le traitement des maladies infectieuses. A titre d'exemple, actuellement, les données sur l'activité antimicrobienne de nombreuses plantes, jusqu'ici considérées comme empiriques, ont été scientifiquement confirmées, avec le nombre croissant de rapports sur les microorganismes pathogènes résistants aux antimicrobiens. Les produits dérivés de plantes peuvent potentiellement contrôler la croissance microbienne dans diverses situations et dans le cas spécifique du traitement de la maladie, de nombreuses études ont cherché à décrire la composition chimique de ces antibiotiques de la plante et les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la croissance microbienne, séparément ou associés antimicrobiens conventionnels [2].

Le terme de plantes médicinales comprend différents types de plantes utilisées en herboristerie et certaines de ces plantes ont des activités médicinales. Les plantes médicinales sont la «colonne vertébrale» de la médecine traditionnelle, ce qui signifie que plus de 3,3 milliards de personnes dans les pays les moins développés utilisent régulièrement des plantes médicinales [3].

L'utilisation de la médecine traditionnelle et des plantes médicinales dans la plupart des pays en développement, comme base pour le maintien de la bonne santé, a été largement observé par l'UNESCO (1996) [4].

Au cours de la dernière décennie, on a assisté à une résurgence considérable de l'intérêt et de l'utilisation des plantes médicinales, particulièrement en Amérique du Nord. Les enquêtes sur l'utilisation des plantes médicinales par le public américain ont montré une augmentation

d'environ 3% de la population en 1991 à plus de 37% en 1998 [5]. Le marché nord-américain des ventes de plantes médicinales montre une augmentation d'environ 3 milliards de dollars par année [6].

Ces plantes médicinales peuvent être utilisées dans le développement de médicaments de synthèse grâce à leurs richesses en ingrédients, par ailleurs ces plantes ont joué un rôle essentiel dans le développement des cultures humaines [2].

Un recours croissant à l'utilisation de plantes médicinales dans les sociétés industrialisées a été attribué en partie à l'effet thérapeutique des métabolites secondaires extraits de ces plantes ainsi que le développement de plusieurs médicaments dont leurs principes actifs étaient à base de plantes[7].

La flore Algérienne avec ces différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [8], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Le présent travail s'inscrit donc dans le cadre de la recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique. Pour cela, trois plantes ont fait l'objet d'une étude phytochimique, *Astragalus gombo* et *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* appartenant à la famille Fabaceae et *Cistanche violacea* de la famille Orobanchaceae.

La présentation de nos travaux répartie comme suit :

Une première partie consacrée à une synthèse bibliographique comporte deux chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la connaissance botanique et phytochimique des deux familles, Fabaceae et les genres *Astragalus* et *Genista*, Orobanchaceae et le genre *Cistanche* ; les travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants chez les trois genres. Il reporte également les résultats relatifs à leurs activités biologiques.

Le deuxième est consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires flavonoïdes, iridoïdes et phenylethanoïdes.

Une deuxième partie consacrée aux travaux personnels comporte deux chapitres :

Le troisième chapitre renferme une exposition détaillée des travaux phytochimiques et biologiques réalisés.

Le quatrième chapitre renferme la discussion des résultats obtenus.

Ce manuscrit est terminé par une conclusion générale

Références bibliographiques

1. Laxminarain, M.; **2013**; Traditional phytomedicinal systems, scientific validations and current popularity as Nutraceuticals; *International Journal of Traditional and Natural Medicines* 2(1): 27-75
2. Singh, R; **2015**; Medicinal plants: A review; *Journal of Plant Sciences* 3(1-1): 50-55
3. Davidson-Hunt I; **2000**: Ecological ethno botany: stumbling toward new practices and paradigms. *MASA Journal* 16(1): 1-13.
4. UNESCO; **1996**; Culture and Health, Orientation Texts – World Decade for Cultural Development 1988 – 1997, Document CLT/DEC/PRO – 1996, pgs. 129, Paris, France.
5. Brevoort P; **1998**; The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram* 44; 33–46.
6. Glaser. V; **1999**; Billion-dollar market blossoms as botanicals take root; *Nature Biotechnology* 17:17–18.
7. UNESCO; **1998** Terminal Report: Promotion of ethno botany and the sustainable use of plant resources in Africa FIT/504-RAF-48, pgs. 60, Paris, France.
8. Quezel, P., Santa, S., **1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 2. Paris. France.

Partie I

Synthèse

bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les familles

Fabaceae et Orobanchaceae

I.1. La famille Fabaceae

I.1.1. Généralités

La famille Fabaceae (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue. Les fabacées constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [1]. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées [2]. 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 légumineux-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 [1].

I.1.2. Le genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus*, appartenant à la famille Fabaceae, est largement distribué dans les régions tempérées situées principalement en Europe, en Asie et en Amérique du Nord [3]. Environ 2000 espèces ont été décrites dont 372 en Amérique du Nord et 133 en Europe [3-4]. Une cinquantaine d'espèces sont rencontrées en Afrique du Nord dont 15 environ au Sahara algérien [5]. Les plantes de ce genre se présentent en général sous forme d'un calice tubuleux en cloche, à 5 dents subégales ou très inégales. Pétales généralement longuement onguiculés. Etendard dressé. Carène égalant environ les ailes. Etamines diadelphes, à gaine entrouverte au sommet. Ovaire pluri ovulé à ovules sur 2 rangs. Gousse de forme variée, rarement uniloculaire, généralement à 2 loges plus ou moins complètes par intro flexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente. Feuilles imparipennées en général stipulées [6].

I.1.2.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les racines de l'astragale sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme un anti sudorifique, diurétique et tonique. Il a été également utilisé pour traiter le diabète, la néphrite, la leucémie et le cancer de l'utérus [7].

Certaines espèces d'astragales comme *Astragalus mongholicus* et *A. membranaceus* sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise en raison de leurs propriétés anticancéreuses [7-9].

En Anatolie qui est situé dans le sud-est de la Turquie, l'extrait aqueux des racines de l'*astragale* est traditionnellement utilisé contre la leucémie et pour traiter les blessures [10].

La drogue orientale connue sous le nom d'*Astragali Radix*, utilisée pour ses propriétés anti-transpirantes, diurétiques et toniques n'est autre qu'une mixture préparée à partir des racines sèches de *A. membranous* et *A. mongholicus* et d'autres espèces d'astragales [11]. Elle est également employée pour traiter l'anémie, les blessures, la fièvre, les allergies multiples, la fatigue chronique ainsi que la perte d'appétit [12]. L'espèce *A. scorpioides* est employée en application locale contre les piqûres de scorpions [13].

I.1.2.2. Toxicité de quelques espèces du genre *Astragalus*

L'intoxication par les espèces du genre *Astragalus* a été décrite pour la première fois chez les moutons en 1873 à l'ouest des Etats Unis [14], puis dans d'autres pays du monde tels que le Canada, l'Australie, l'Espagne, le Maroc et autres [15- 17].

Le genre *Astragalus* regroupe des espèces toxiques et d'autres non toxiques.

- **Astragales non toxiques :** La majorité des astragales ne sont pas toxiques. Certaines sont utilisées pour l'alimentation du bétail comme *A. nuttalianus* et *A. cicer* rencontrées respectivement dans le Sud-Ouest et à l'Ouest des Etats Unis qui sont très appréciées par le bétail. D'autres comme *A. tennelus* bien que non toxiques, elles ne sont pas appréciées par les animaux [18].
- **Astragales toxiques :** Les espèces toxiques du genre *Astragalus* sont classées selon la nature du principe toxique dominant et le type d'intoxication qu'elles provoquent, en trois catégories [18-19] :
 - Les astragales accumulatrices de Sélénium.
 - Les astragales synthétisant des produits nitrés.
 - Les astragales renfermant des alcaloïdes indolizidiques.

I.1.2.3. Travaux antérieurs

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Astragalus*, ont permis l'isolement et l'identification de divers types de métabolites secondaires, constitués majoritairement de saponosides triterpéniques et de flavonoïdes.

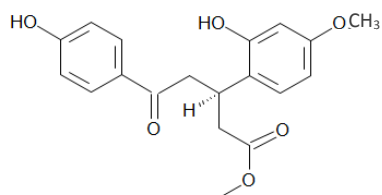
Dans ce qui suit, le tableau I.1 rassemble les quelques flavonoïdes isolés du genre *Astragalus*.

Tableau I.1: Quelques flavonoïdes isolés du genre *Astragalus*

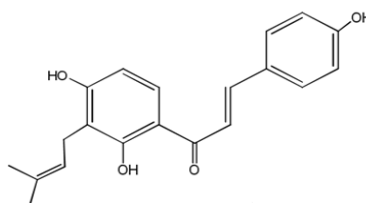
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	plante entière	<p>*Astradurnine (1)</p> <p>*4,2',4'-trihydroxy-3'-prenylchalcone (2)</p> <p>*2',4'-dihydroxy-3,4-diméthoxychalcone (3)</p> <p>*4,2',4'-trihydroxychalcone (4)</p> <p>*2',4'-dihydroxy-2,3-diméthoxychalcone (5)</p> <p>*2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone [isoliquiritigénine-4-méthyléther] (6)</p> <p>*2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (7)</p> <p>*Melilotocarpane B (8)</p> <p>*2,3-dihydro-5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone (9)</p> <p>2,3-dihydro-6,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone (10)</p> <p>5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavanone (11)</p> <p>7,4'-diméthoxyisoflavanone (12)</p> <p>5,7,2'-trihydroxy-4'-méthoxy-isoflavanone (13)</p> <p>7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavanone (14)</p> <p>(3R)-7,3'-dihydroxy-2',4'-diméthoxy isoflavane [(R)-mucronulatol] (15)</p>	[20]
<i>A. gombiformis</i>	parties aériennes	<p>* kaempférol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (16)</p> <p>*7-méthylquercétine 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-galactopyranoside (17)</p> <p>*7-méthylkaempférol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (18)</p> <p>*7-méthylkaempférol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-galactopyranoside] (19)</p> <p>*7-méthylquercétine 3-O-β-D-galactopyranoside (20)</p> <p>Kaempférol 7-méthyl ether (21)</p> <p>*7-méthylquercétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-O-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (22)</p>	[21]
<i>A. inopinatus</i>	parties aériennes	Apigénine (23)	[22]
<i>A. shikokianus</i>	parties aériennes	<p>Astrasikokioside I (24)</p> <p>Kaempférol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1\rightarrow2)-β-D-galactopyranosyl-7-O-α-L-rhamnopyranoside (25)</p>	[23]

Tableau I.1: Flavonoïdes isolés du genre *Astragalus* (suite)

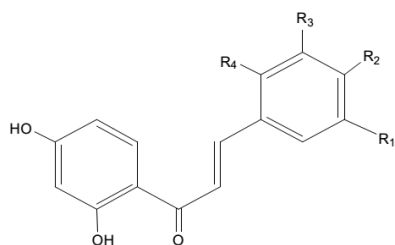
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. shikokianus</i>	parties aériennes	Robinine (25)	[23]
<i>A. mongholicus</i>	racines	Formononetine (26) Ononine (27) Calycosine (28) Calycosine 7- <i>O</i> - glucopyranoside (29) 9,10-diméthoxypterocarpan 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (30)	[24]
<i>A. cruciatus</i>	plante entière	Narcissine (31) Nicotiflorine (32) Kaempferol 3- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (33) 5, 7, 2'-trihydroxyflavone (34)	[25]



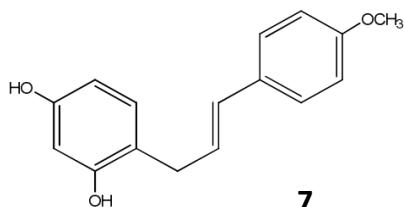
1



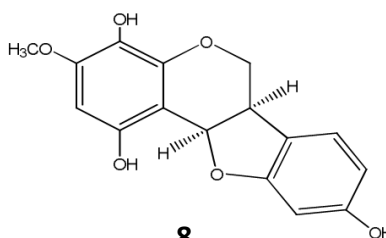
2



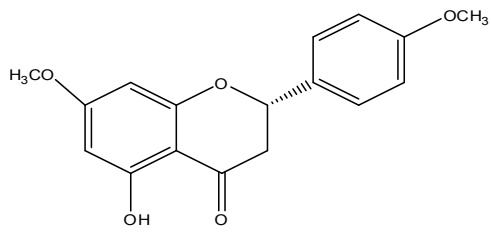
	R1	R2	R3	R4
3	H	OCH ₃	OCH ₃	H
4	H	OH	H	H
5	H	H	OCH ₃	OCH ₃
6	H	OCH ₃	H	H



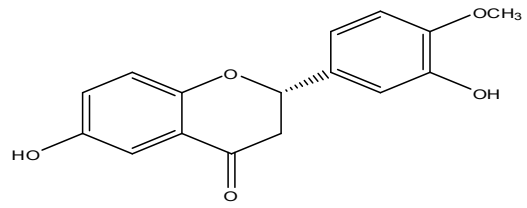
7



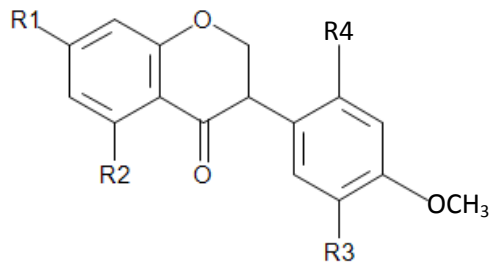
8



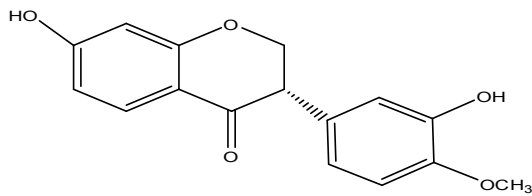
9



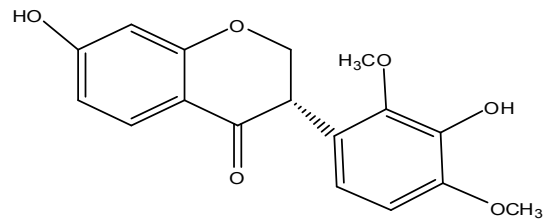
10



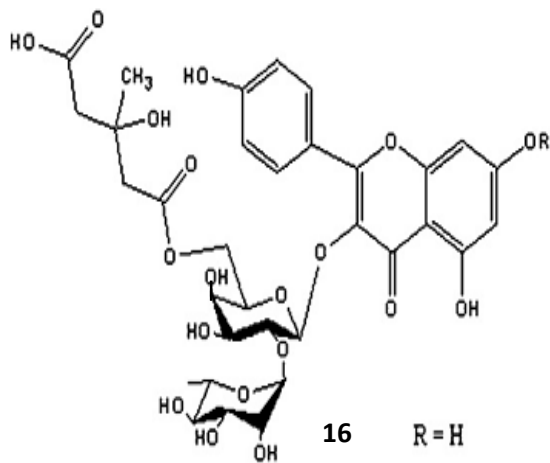
	R1	R2	R3	R4
11	OH	OH	H	H
12	OCH ₃	H	H	H
13	OH	OH	H	OH



14

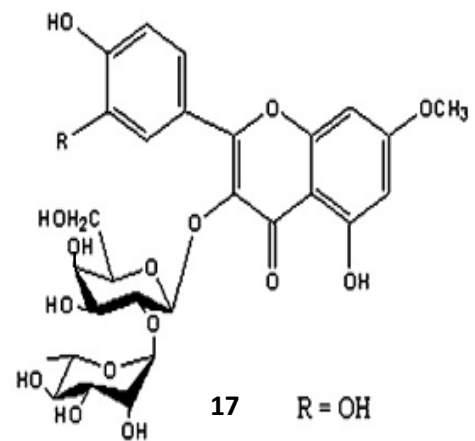


15



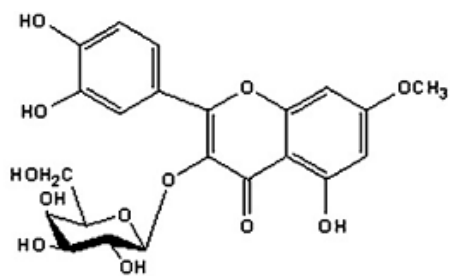
16 R = H

18 R = CH₃

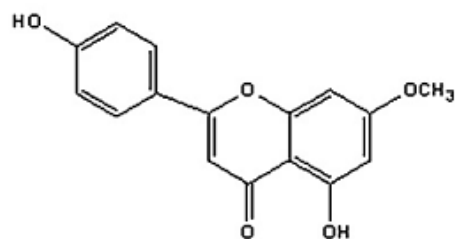


17 R = OH

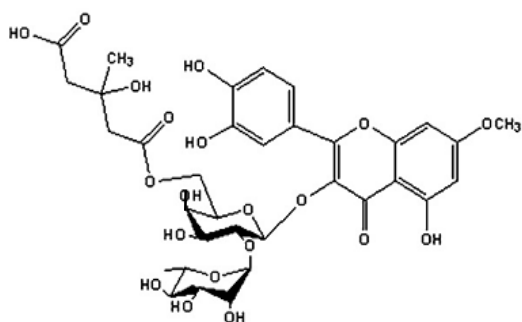
19 R = H



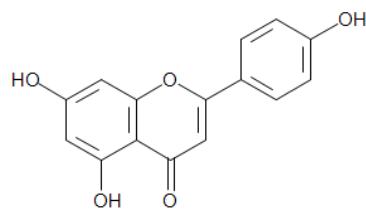
20



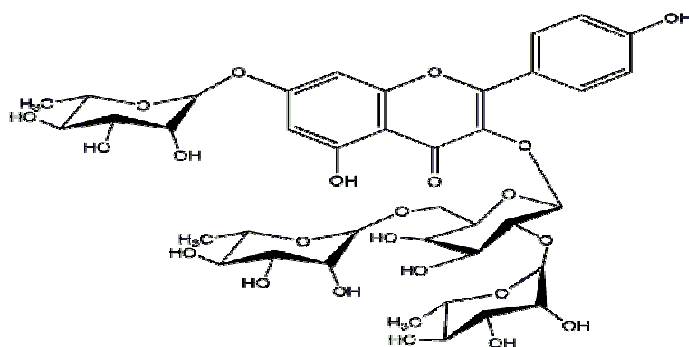
21



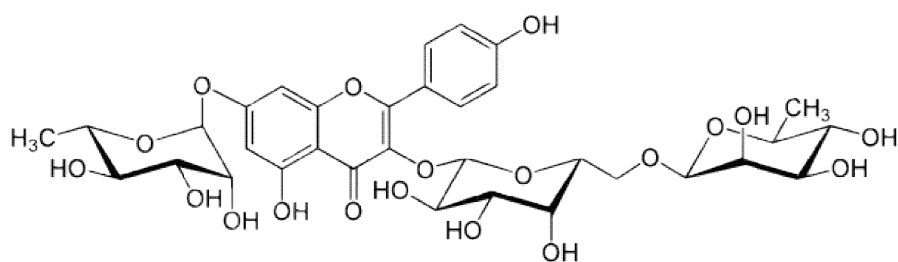
22



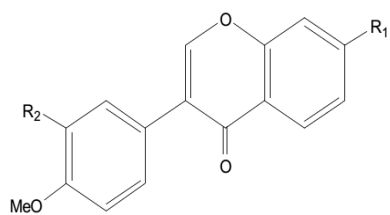
23



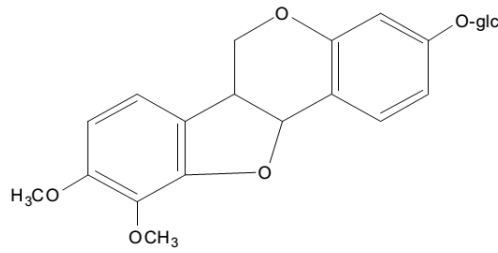
24



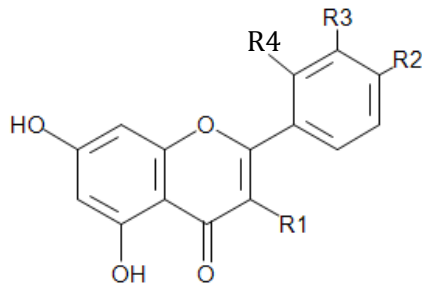
25



	R1	R2
26	OH	H
27	OGlu	H
28	OH	OH
29	OGlu	OH



30



	R1	R2	R3	R4
31	rha(1 →6)glu	OH	OCH ₃	H
32	rha(1 →6)glu	OH	H	H
33	rha(1 →4)rha(1 →6)glu	OH	H	H
34	H	H	H	OH

Schéma I-1: Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Astragalus*.

I.1.3. Le genre *Genista*

I.1.3.1. Généralités sur le genre *Genista*

Le nom *Genista* dérive de l'ancien mot Gaulois Gen, qui signifie arbuste, appartenant à la famille des Légumineuses sous-familles des papilionacées [26-27]. Il est reconnu comme tel par Linné (1753) [26]. Ce genre est Circumméditerranéen, constitué d'arbustes épineux et non-épineux, la plupart des espèces de ce genre forment des maquis sclérophylles ou des matorrals, avec 87 espèces [28]. Le genre *Genista* est représenté en Europe occidentale et centrale, il est également présent en Turquie, en Syrie et en Afrique du Nord [29]. Selon Quezel et Santa en Algérie ce genre inclus 16 espèces dont 11 endémiques [30].

I-1-3-2. Description du genre

Calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, rarement calice campanulé à 5 dents subégales. Carène oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. Etendard étroit, 10 étamines monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Stigmate oblique. Gousse déhiscence, variable. Arbrisseaux épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Feuilles 1-3 folioles, stipulées ou non, graines non arillées [30].

I.1.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Certaines espèces du genre *Genista* sont utilisées en médecine traditionnelle populaire pour guérir bon nombre de maladies, On citera à titre d'exemple *Genista tenera* dont l'infusion des parties aériennes est utilisée dans la médecine traditionnelle Portugaise pour traiter le diabète [31]. Alors que deux autres plantes, *G. anglica* et *G. germanica*, sont préconisées en tant que diurétiques pour le traitement de néphrolithiase et encore contre la goutte [32-33].

I.1.3.4. Travaux antérieurs

L'étude bibliographique menée sur les espèces du genre *Genista* a montré que les travaux phytochimiques effectués ont permis, essentiellement l'isolement d'alcaloïdes [34-37] et de flavonoïdes, notamment les isoflavonoïdes [38- 41]. Le tableau I-2 rassemble un nombre d'espèces du genre *Genista* et leur contenu flavonique, les structures respectives sont données dans le schéma I-2.

Tableau I-2: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*.

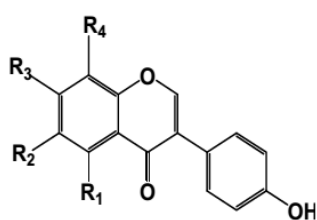
Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N° de la structure	réf
<i>G. epheroïdes</i>	Génistéine	36a	38
	Isoprunétine	36b	
	Wighteone	36c	
	Génistine	36d	
	Génisteone	36e	
	8-C-glucoside génistéine	36f	
	Alpinumisoflavone	36g	
	Hydroxyalpinumisoflavone	36h	
	Apigénine	22	
	Ephedroïdine	36i	
	Isokaempféride	36j	
<i>G. cinerea</i>	8-C-glucoside génistéine	36f	39
	6-C-glucoside génistéine	37	
	Daidzéine	38a	40
	Génistéine	36a	
	Isoprunétine	36b	
	7-O-β-D-glucopyranoside génistéine	36d	
	7-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine	38b	
	7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside génistéine	38c	
	7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine	38d	
	Lutéoline	38e	
	7-O-β-D-glucopyranoside lutéoline	38f	



Tableau I-2: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

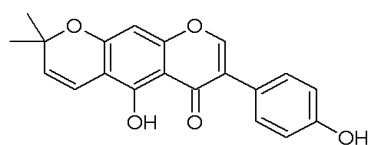
Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N° de la structure	Réf
<i>G. morisii</i>	Orientine	38g	41
	Vitexine	38h	
	Eriodictyol	38i	
<i>G. corcica</i>	Daidzéine	38a	
	Isoprunétine	36b	
	Isoderrone	39a	
	Ficuisoflavone	39b	
	Dihydroisoderrondiol	39c	
	Lutéoline	38e	
	lutéoline 7-O-β- glucoside	39d	
	lutéoline 4'-O-β-glucoside	39e	
	Taxifoline	39f	
	5-methoxytaxifoline	39g	
	<i>G. saharae</i>	Génistéine.	36a
5,7-dihydroxy-6'', 6''-diméthylpyrano [2'', 3'' :4',3']flavone		40a	
5, 7-dihydroxy-3'-methoxy-6'', 6''- diméthylpyrano[2'', 3'' : 4', 5'] flavone		40b	
Apigénine.		23	
Kaempférol		21	
4', 5, 7-trihydroxy 6-méthoxy isoflavone		40c	
5, 7-dihydroxy 8-C-glucosylisoflavone.		40d	
8-C-glucopyranosylgénistéine		40e	
4', 7-dihydroxy 8-C-glucosyl 5-methoxyisoflavone	40f		
<i>G. ferox</i> poirret	Génistéine	36a	42
	Apigénine.	23	
	7-O-glucosyl apigénine	41a	
	Lutéoline	38e	
<i>Genista ulicina</i>	5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone	42a	43
	6,8-di-C-β-D-glucopyranosyl apigénine	42b	
	6-C-β-D-glucopyranosylapigénine	42c	
	3-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→2)-α-L-rhamnosyl(1→6)-β- -D- glucopyranosyl] kaempférol	42d	

Tableau I-2: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

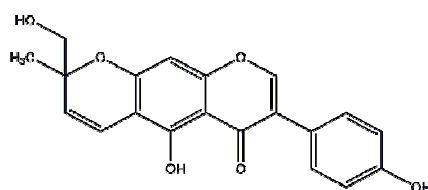
Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N° de la structure	Réf
	3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] isorhamnetine	42e	43
	3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] quercétine	42f	
<i>G. quadriflora</i> Munby	Thevetiaflavone	43 a	44
	Génistéine	36a	
	Isoprunétine	36b	
	Biochanine A	43b	
	Genkwanine	43c	
<i>G. aspalathoides</i> Lamk <i>ssp.</i> <i>erinaceoides</i> (Lois.)	Laburnetine	44a	44
	Isokaempferide	44b	
	7-(2-hydroxyisobutyrate)génistéine	44c	
	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-isopropyl-4H-furo[2,3-h] chromen-4-one.	44d	
	Sakuranetine	44e	
	Isoprunétine	36b	
	7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside génistéine	36d	
	4'- <i>O</i> -Methylderrone	44f	
	Eriodictyol 7, 3'-dimethyl ether	44g	



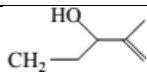
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
36a	OH	H	OH	H
36b	OCH ₃	H	OH	H
36c	OH	-CH ₂ - 	OH	H
36d	OH	H	Oglu	H
36e	OH	-CH ₂ - 	Oglu	H
36f	OH	H	OH	glu

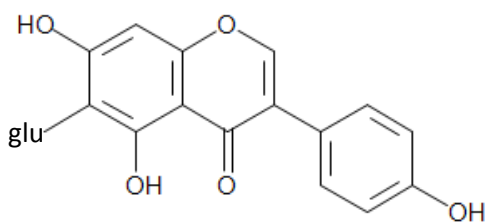
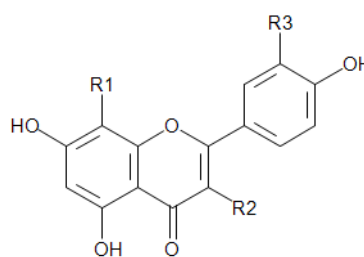


36g

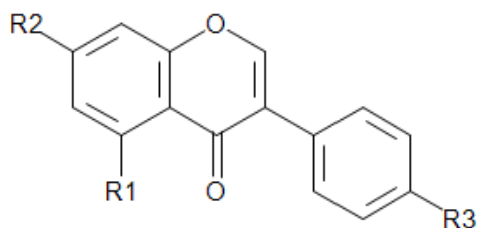


36h

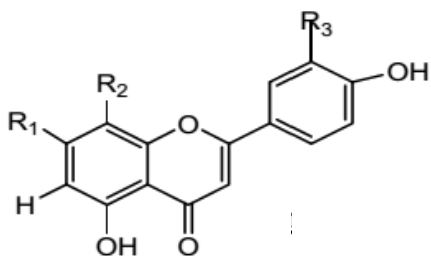
	R ₁	R ₂	R ₃
36i		H	H
36j	H	OCH₃	H



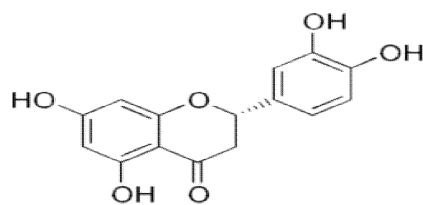
37



	R ₁	R ₂	R ₃
38a	H	OH	OH
38b	OCH ₃	Oglu	OH
38c	OH	Oglu	Oglu
38d	OGH ₃	Oglu	Oglu

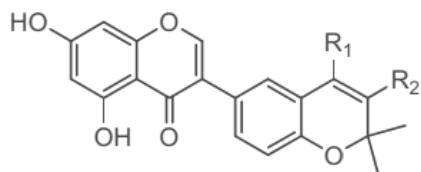


	R ₁	R ₂	R ₃
38e	OH	H	OH
38f	O glu	H	OH
38g	OH	glu	OH
38h	OH	glu	H

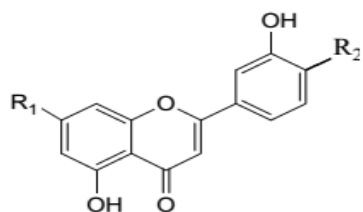


38i

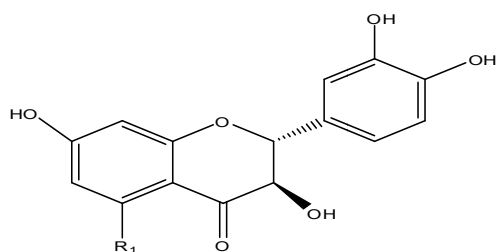
Schéma I-2 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*.



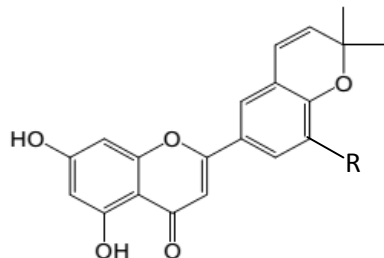
	R1	R2
39a	H	H
39b	H	OH
39c	OH	OH



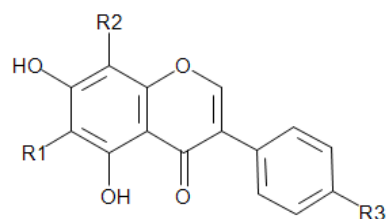
	R1	R2
39d	Oglu	OH
39e	OH	Oglu



	R1
39f	OH
39g	OCH ₃

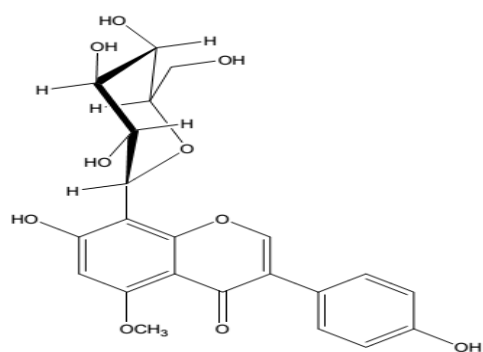


	R
40a	H
40b	OCH ₃

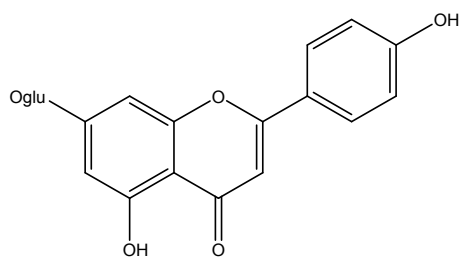


	R1	R2	R3
40 c	OCH ₃	H	OH
40 d	H	Glu	H
40 e	H	Glu	OH

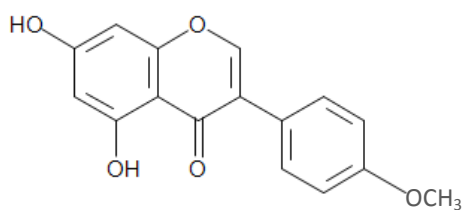
Schéma I-2 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).



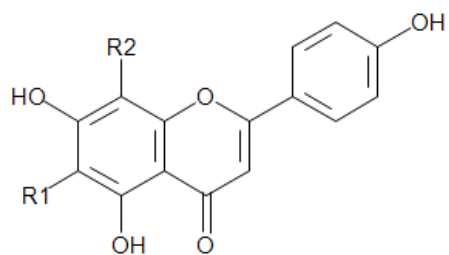
40f



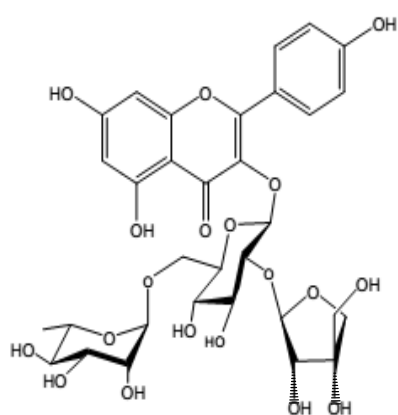
42a



41a

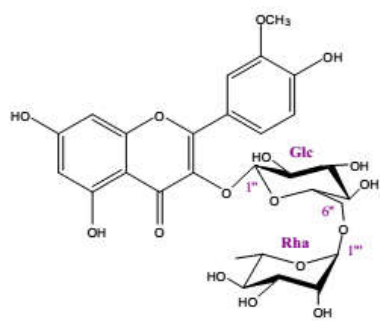


	R1	R2
42b	glu	glu
42c	glu	H

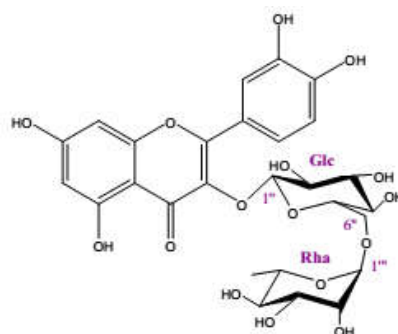


42d

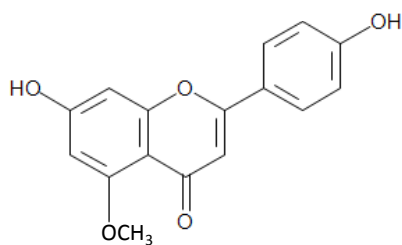
Schéma I-2 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).



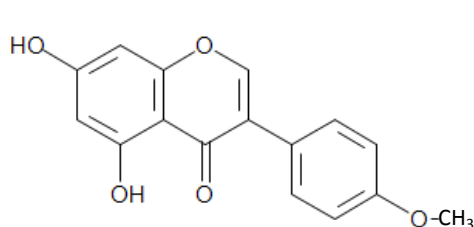
42e



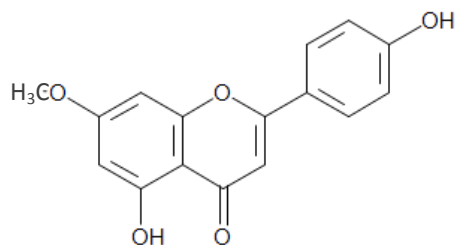
42f



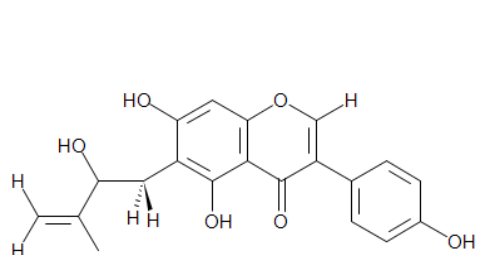
43a



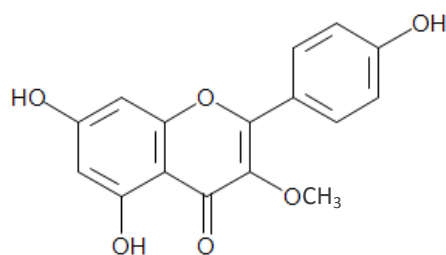
43b



43c

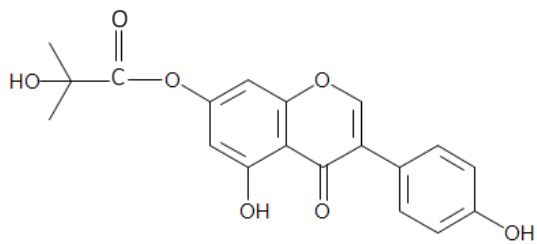


44a

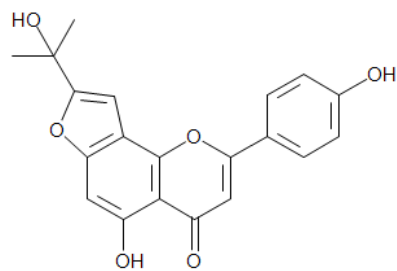


44b

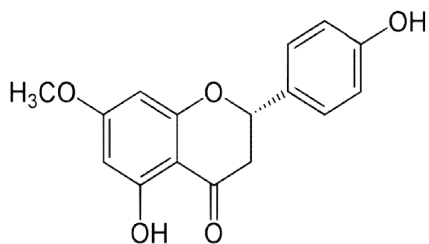
Schéma I-2 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).



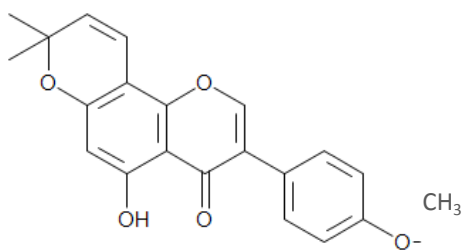
44 c



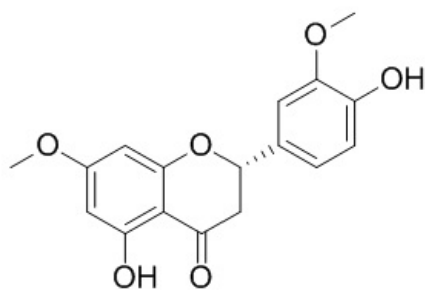
44d



44e



44f



44g

Schéma I-2 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

I-2. La famille Orobanchaceae

I-2-1. Généralités sur la famille Orobanchaceae

Orobanchaceae comme redéfini par Young et al. (1999) [45], morphologiquement est une famille variée principalement herbacée, les plantes de cette famille sont des parasites. La majorité des espèces sont des parasites racines, qui peuvent être photosynthétiques (hémiparasites) ou totalement dépendantes de la plante hôte (holoparasites).

Plusieurs genres de cette famille, tels que *Striga*, *Alectra* et *Orobanche* sont des ravageurs agricoles des cultures de céréales et de légumineuses en particulier dans les régions tropicales et subtropicales sèches, où ils peuvent réduire considérablement les rendements des cultures [46].

La famille Orobanchaceae a une distribution mondiale, y compris les espèces de latitudes extrêmes du Nord tel que, *Pedicularis dasyantha*, endémique de l'Arctique russo-européen [47], mais les principaux centres de distribution sont la Méditerranée, l'Afrique du sud, l'Himalaya et l'Ouest de l'Amérique du Nord. Certains genres sont répartis sur plusieurs continents, tels que *Euphrasia* (Europe, Nord et Sud d'Amérique, Océanie), *Bartsia* (Afrique, Europe, Nord et Sud d'Amérique), *Buchnera* et *Melasma* (Afrique, Asie, Nord et Sud d'Amérique).

Actuellement 89 genres, contenant environ 2061 espèces, sont comptabilisés dans la famille Orobanchaceae [48]. Ainsi, cette famille est la plus riche en espèces parmi les familles d'angiospermes parasites [48].

I-2-2. Le genre Cistanche

I-2-2-1. Généralités sur le genre Cistanche

Cistanche (famille Orobanchaceae) est un genre de plantes désertiques holophrastiques croissent sur les plantes du désert comme *Haloxylon*, *Salvadora*, *Reaumuria*, *Kalidium* et *Tamarix* [49].

Les espèces du genre *Cistanche* manquent de chlorophylle et obtiennent leurs éléments nutritifs et l'eau à partir des racines des plantes hôtes [49]. Ce genre est principalement distribué dans les terres arides et les déserts de l'hémisphère nord, comme Xinjiang, Mongolie intérieure, régions autonomes du Ningxia ainsi que l'Iran, l'Inde, la Mongolie, etc... [50]. Elles croissent dans des environnements très sévères : climat extrêmement aride, des variations sévères de températures, ensoleillement intensive, moins de 250 mm de précipitations annuelles et des sols appauvries [51-52].

Le genre *Cistanche* est représenté dans le Sahara algérien par trois espèces : *Cistanche tubulosa*; qui est commun au Sahara central (Tassili N'Ajjer), *Cistanche tinctoria* (Desf.) Beck, qui est une espèce Saharo-Méditerranéenne et enfin, *Cistanche violacea* qui est un arbuste endémique du Nord de l'Afrique [53].

I-2-2-2. Description du genre Cistanche

La plante fixée à la racine de l'hôte par une plage ténue et fragile. Elle est formée d'une ou de plusieurs tiges, chacune renflée à la base en un gros tubercule allongé portant des rangées hélicoïdales d'écailles. Au tubercule fait suite une tige cylindrique d'un diamètre de l'ordre du pouce, également habillée d'écailles foliaires, mais celles-ci espacées ; elle porte souvent des fleurs déjà à un niveau très bas, à peu de distance du tubercule, et passe progressivement à un épi floral dense, comprenant plusieurs dizaines de fleurs. Toute la plante est charnue, y compris les fleurs ; les parties souterraines (tubercule et tige) sont ordinairement d'un blanc ivoire tandis que les épis, qui seuls sortent de terre, sont d'un jaune vif et peuvent atteindre plus d'un mètre chez *C. tincloria*, d'un violet améthyste et de 1 à 3 dm seulement chez *C. violacea*. [54].

I-2-2-3. Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Cistanche* a été enregistré pour la première fois en *Nong Bencao Jing* in ca. 100 B.C. [55]. Les plantes de ce genre aussi appelé ginseng du désert a été considéré comme un tonique supérieur et utilisé pour traiter l'insuffisance rénale, l'impuissance, l'infertilité féminine, leucorrhée morbide, abondant métrorragie et la constipation chronique chez les personnes âgées [56]. Parmi les espèces du genre *Cistanche* seulement *C. deserticola* et *C. tubulosa* sont enregistrées dans la pharmacopée chinoise (Édition 2010) [57].

Cependant ces dernières années, les deux espèces *C. deserticola* et *C. tubulosa* sont en voie d'extinction en raison de la surexploitation. Deux autres espèces de *Cistanche*, *Cistanche salsa* et *C. sinensis*, sont souvent utilisées comme substituts dans certaines régions de la Chine [49]. *Cistanche salsa* est utilisée traditionnellement comme un agent tonique, favorisant la circulation sanguine, le traitement de l'impuissance, l'infertilité féminine, le lumbago et la faiblesse corporelle [58-59].

Les études sur les espèces du genre *Cistanche* ont commencé en 1980, un certain nombre de composés ont été isolés à partir de ce genre comprenant les huiles essentielles, les phenylethanoïdes glycosides, les monoterpènes, les lignanes et autres [60-63].

Les phenylethanoïdes ont été signalés comme un type des principaux composants actifs et démontrent plusieurs activités biologiques : antioxydante, neuroprotection, Amélioration de l'immunité, hépatoprotection et antiradiation [64-66]. Les glucides et polysaccharides se trouvent également dans les espèces du genre *Cistanche*, ont été considérés comme un principe actif, qui améliore l'immunité du corps et possède les Propriétés anti-vieillessement et antitumorales [67-69].

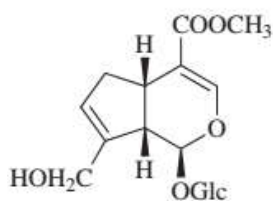
I-2-2-4. Travaux antérieurs

L'étude phytochimique des espèces du genre *Cistanche* a conduit à l'isolement de plusieurs groupes chimiques comprenant les phenylethanoïdes glycosides, les iridoïdes et les lignanes (présents sous forme libre et glycosidique), Polysaccharides, acides aminés libres, éléments de cendres et minéraux [51-54]. Cependant, dans la présente étude, on s'est intéressés aux phenylethanoïdes glycosides et aux iridoïdes. Le tableau I.2 résume les iridoïdes isolés du genre *Cistanche*.

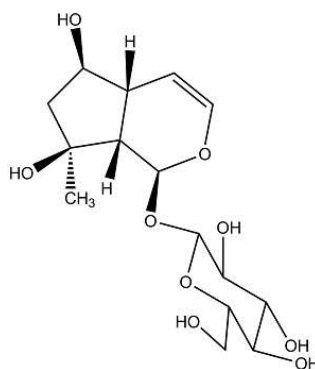
Tableau I.3: Les iridoïdes isolés du genre *Cistanche*

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf.
<i>C. sinensis</i>	Tiges	Geniposide 45 Ajugol 46 8- acide épiloganique 47 8-épiloganine 48 Mussaenoside 49	[49]
<i>Cistanche deserticola</i>	Tiges	Ajugol 46 Bartsioside 50 8- acide epiloganique 47 6-deoxycatalpol 51 Cistanin 63 Cistachlorin 64 Acide Genposidique 59 Acide Mussaeonosidique 58	[70], [71]. [70], [71]. [70]. [70], [71]. [72], [73]. [73]. [70]. [70].
<i>Cistanche Tubulosa</i>	Tiges	Kankanoside A 52 Kankanoside B 53 Kankanoside C 54 Kankanoside D 55 (R) – Rotundiol 56	[75] [75] [75] [75] [75]

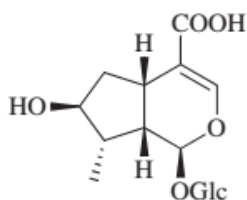
		Kankanol 57	[75]
		Acide Mussaeonosidique 58	[74-75]
		Acide Genposidique 59	[74-75]
		Acide 8-epologanique 47	[75]
		Glucoside 60	[75]
		-Antirrhide 61	[75]
		-Ajugol 46	[75]
		-Bartsioside 50	[75]
		6-Deoxy catalpol 51	[75]
		Argyol 62	[75]
		Cistanin 63	[75]
		Cistachlorin 64	[75]
<i>C. phelypaea</i>		6-Deoxy catalpol 51	[70]
		Glucoside 60	[70]
		-Ajugol 46	[70]
		Phelypaeside 65	[76]



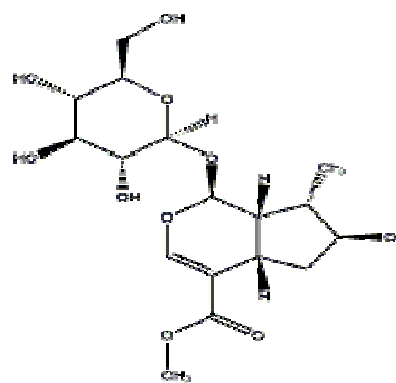
45



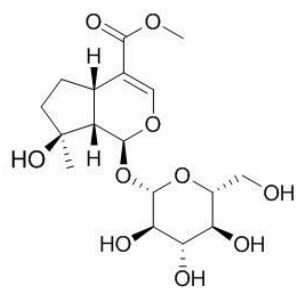
46



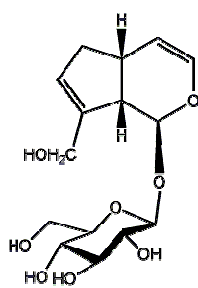
47



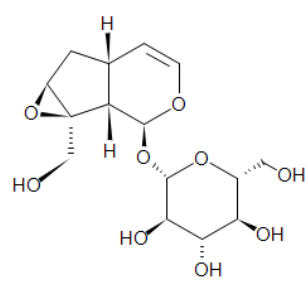
48



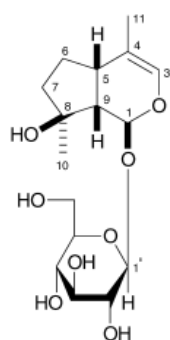
49



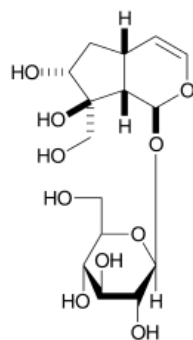
50



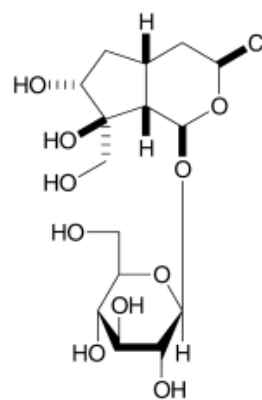
51



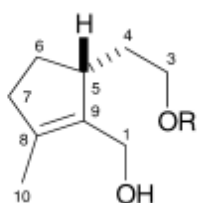
52



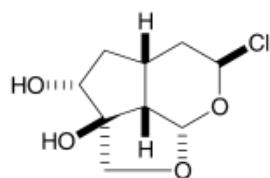
53



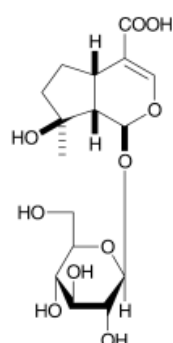
54



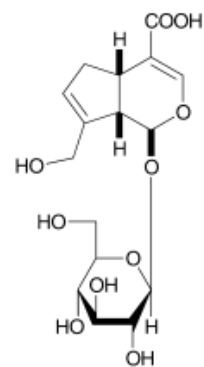
R= Glu	R=H
55	56



57



58



59

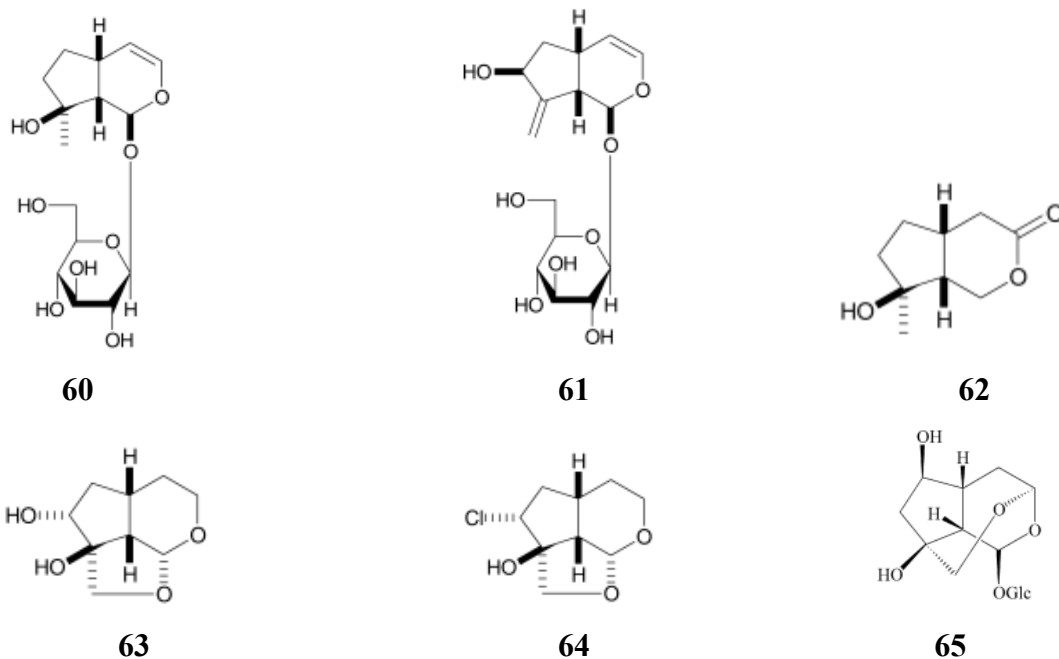


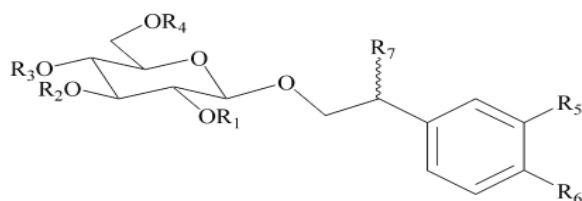
Schéma I-3: Structures chimiques de quelques iridoïdes isolés de différentes espèces du genre *Cistanche*.

Tandis que le tableau (I.4) rassemble les phenylethanoides glycosides isolés des espèces du genre *Cistanche*.

Tableau I.4 : les phenylethanoides glycosides isolés du genre *Cistanche*

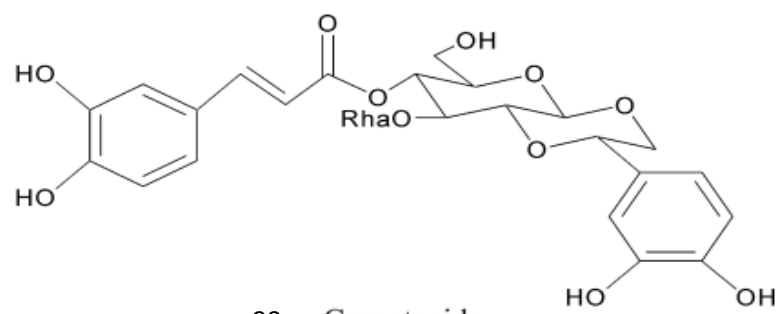
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>C. deserticola</i>	Plante entière	2-Acetylacteoside (66)	[77]
		Acteoside (67)	[77]
		Cistanoside A (68)	[78]
		Cistanoside B (69)	[79]
		Cistanoside C (70)	[79]
		Cistanoside D (71)	[80]
		Cistanoside E (72)	[81]
		Cistanoside G (73)	[82]
		Cistanoside H (74)	[79 ,83]
		Decaffeoylacteoside (75)	[83]
		Echinacoside (76)	[77]
		Isosyringalide-3--l-rhamnopyranoside (78)	[84]
		Salidroside (80)	[80]
		Syringalide A-3--l-rhamnopyranoside (81)	[82]
		Tubuloside A (82)	[84]
		Tubuloside B (83)	[84]
Tubuloside C (84)	[77]		

<i>C. phelypaea</i>	Plante entière	2-Acetylacteoside (66) Acteoside (67) Echinacoside (76) Tubuloside A (82) Tubuloside E (86)	[85]
<i>C. tubulosa</i>	Plante entière	2-Acetylacteoside (66) Acteoside (67) Cistanoside A (68) Decaffeoylacteoside (75) Echinacoside (76) Isosyringalide-3--l-rhamnopyranoside (78) Osmanthuside B (79) Syringalide A-3--l-rhamnopyranoside (81) Tubuloside A (82) Tubuloside B (83) Tubuloside C (84) Tubuloside D (85) Tubuloside E (86) Cistantubuloside A (87) Cistantubuloside B1/B2 (88) Cistansinenside A (89) Kankanoside F (93) Kankanoside G (94) Cistantubuloside C1/C2 (95) Crenatoside (99)	[86] [87] [88] [86] [89] [86, 88] [90] [86, 91] [86, 90] [86, 88] [88] [88] [88] [90] [92] [92] [91] [91] [92] [87]
<i>C. salsa</i>	Tiges	2-Acetylacteoside (66) Acteoside (67) Cistanoside C (70) Cistanoside D (71) Isoacteoside (77) Isosyringalide-3--l-rhamnopyranoside (78) Tubuloside C (84) Cistantubuloside C1/C2 (95) Salsaside D (96) Salsaside E (97) Salsaside F (98)	[93] [93] [93] [93] [93] [93] [93] [94] [93] [93] [93]
<i>C. sinensis</i>	Tiges	Jionoside D (90) Poliumoside (91) Kankanoside F (92)	[95] [95] [95]



N°de composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
(66)	Ac	Rha	Cf	H	OH	OH	H
(67)	H	Rha	Cf	H	OH	OH	H
(68)	H	Rha	Cf	Glc	OMe	OH	H
(69)	H	Rha	Fr	Glc	OMe	OH	H
(70)	H	Rha	Cf	H	OMe	OH	H
(71)	H	Rha	Fr	H	OMe	OH	H
(72)	H	Rha	H	H	OMe	OH	H
(73)	Ac	Rha	H	H	H	OH	H
(74)	H	Rha	H	H	OH	OH	H
(75)	H	Rha	H	H	OH	OH	H
(76)	H	Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
(77)	H	Rha	H	Cf	OH	OH	H
(78)	H	Rha	Cm	H	OH	OH	H
(79)	H	Rha	Cm	H	H	OH	H
(80)	H	H	H	H	H	OH	H
(81)	H	Rha	Cf	H	H	OH	H
(82)	Ac	Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
(83)	Ac	Rha	H	Cf	OH	OH	H
(84)	Ac	TA-Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
(85)	Ac	TA- Rha	Cm	Glc	OH	OH	H
(86)	Ac	TA- Rha	Cm	H	OH	OH	H
(87)	H	Rha	Cf	Glc	H	OH	H
(88)	H	Rha	Cm/c-Cm	Glc	OH	OH	H
(89)	Ac	Rha	Cf	H	OH	OMe	H
(90)	H	Rha	Cf	H	OH	OMe	H
(91)	H	Rha	Cf	Rha	OH	OH	H
(92)	H	Rha	H	Glc	OH	OH	H
(93)	H	Rha	H	Cf	H	OH	H
(94)	H	H	H	Cm	H	OH	H
(95)	H	Rha	Cf	Glu	OH	OH	OH
(96)	Ac	Rha	Cf	H	H	OH	H
(97)	Ac	Rha	Cf	H	OMe	OH	H
(98)	Ac	Rha	H	Cm	OH	OH	H

Cf: *trans*-cafféoyle; Cm: *trans*-coumaroyl; c-Cm: *cis*-coumaroyle; Glc: β -glucopyranose. Rha: α -L-rhamnopyranose; TA-Rha: 2'', 3'', 4''-triacétyle- α -L-rhamnopyranose; Ac: acétyle.



99 . Crenatoside

Références

bibliographiques

1. Wojciechowski, M. F., Lavin, M. et Sanderson, M. J., **2004**, A 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.
2. Dupont, F. et Guignard, J.L., **2007**, Abrégé de Botanique 14^{ème} édition. Edition Masson, Paris; 285 p.
3. Davis, A.M., **1982**, Crude protein, crude fiber, tannin, and oxalate concentrations of 33 *Astragalus* species, *Journal of Range Management*, 35: 32–34.
4. Rios, J.L. et Waterman., P.G., **1997**, A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phytotherapy Research*. 11(6) : 411–418.
5. Ozenda, P., **1991**, Flore et végétation du Sahara. Edition CNRS, Paris, France.
6. Quezel, P. and Santa, S., **1963**, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition CNRS, Vol. 2. Paris. France.
7. Tang, W. et Eisenbrand, G., **1992**, Chinese Drugs of Plant Origin. Springer-Verlag, Berlin.
8. Leung, Foster A. Y., S., In: Leung A. Y, Foster S, editors. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. 2nd ed. New York: Wiley; **1996**. p. 50.
9. Upton, R. et Petrone, C., **1999**, Santa Cruz: American Herbal Pharmacopoeia.
10. Polat, E., Ozgen C.-A., Perrone, A., Piacente S. et Bedir, E., **2009**, Cycloartane-type glycosides from *Astragalus amblolepis*, *Phytochemistry*, 70(5): 628–634
11. Kitagawa, I., Wang, H. K., Katagi, A., Fuchida, M., Miura, I. et Yoshikawa, M., **1983**, Chemical constituents of Astragali radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (1). Cycloastragenol, the 9,19-cyclolanostane-type aglycone astragalosides, and the artifact aglycone astragenol, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*, 31: 689–697.
12. Kim, C., Ha, H., Kim, J. S., Kim, Y. T., Kwon, S.C. et Park, S.W., **2003**, Induction of growth hormone by the roots of *Astragalus membranaceus* in pituitary cell culture, *Archives of Pharmacal Research*, 26: 34–39.
13. Bellakhdar, J., **1997**, La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
14. James L. F., **1972**, Effect of locoweed on fetal developpement, preliminary study in sheep, *America Journal of Veterinary Research*, 33: 835- 840.
15. Marsk C. D., **1908**, The locoweed disease of the plaints. Bureau of plant industry. *Us. Department. agriculture. Bulletin.*, 121: 37- 40.
16. Marsk C. D. et Clawson A. B., **1920**, *Astragalus tetrapterus*, a new poisonous plant of Utah and Nevada. *Us. Department. agriculture. Circular.*, 81: 86- 89.

17. El Hamidi M., et Leipold H.W., **1989**, Poisoning of sheep by *Astragalus lusitanicus* in Morocco. Field and experimental studies, *Journal Veterinary Medical Association*, 36: 115- 121.
18. James L. F., et Shupe J. L., **1986**, Selenium accumulators. In current Veterinary Therapy, Food animal practice 2 (Edited By Howard J. L.). *Philadelphia* , USA, WB Saunders : 394.
19. Williams M. C., **1981**, Nitro-compound in foreign species of *Astragalus*, *Weed Science.*, 29 (3): 261- 269.
20. Chen, J., Li, Y., Yang, L. Q., Li, Y. Z., Nan, Z. B. et Gao, K., **2012**, Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food Chemistry*, 131: 546– 551.
21. Montoro, P., Teyeb, H., Masullo, M., Mari, A., Douki, W. et Piacente, S., **2013**, LC– ESIMS quali-quantitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72: 89– 98
22. Gromova, A. S., Lutsky, V. I., Cannon, J. G., Li, D. et Owen, N. L., **2001**, Secondary metabolites of *Astragalus danicus* Retz. and *Astragalus inopinatus* Boriss. *Russian Chemical bulletin* 50: 1107–1112.
23. Yahara, S., Kohjyouma, M. et Kohoda, H., **2000**, Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. *Phytochemistry* 53: 469–471.
24. Yu, D., Duan, Y., Bao, Y., Wei, C. et An, L., **2005**, Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 89–94.
25. Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D. et Benkhaled, M., **2013**, Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance. *Records Natural Products*. 7: 105–113.
26. Spach, E., **1834**, Histoire naturelle des végétaux phanérogames, volume1, n° 10, Librairie Encyclopédique de Roret, rue Hautefeuille, Paris, p. 204, (www.books.google.dz).
27. Maire R., **1987**, La flore de l’Afrique du nord. Les légumineuses, Lechevalier. Ed. Paris XVI, pp. 123-193.
28. Martins, A., Wink, M., Tei, A., Brum-Bousquet M., Tillequin F. et Rauter A.A., **2005**, Phytochemical Study of the Quinolizidine Alkaloids, *phytochemical analysis* ; 16(4): 264-6.
29. Spach, E., Revisio generis *Genista.*, *Annales Sciences Naturelles*, 2(3): 102-279.

30. Quezel, P. et Santa, S., **1963**, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, C.N.R.S. Paris.
31. Rauter, A. P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L. M., Araujo, M., Borges, C., Justino, J., Silva, F., Goulart, M., Thomas-Oates., Rodrigues, J. A., Edwards, E., Noronha, J. et Helder Mota-Filipe, R. P., **2009**, Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*, *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 384–393.
32. Adams, M., Berset, C., Kessler, M. et Hamburger, M., **2009**, Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders, A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 343–359.
33. Guarrera, P.M. et Leporatti, M.L., **2007**, Ethnobotanical remarks on Central and Southern Italy, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 23.
34. Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Morselli, I., Rubiolo, P. et Bicchi, C., (2001), Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*, *Biochemical systematics and ecology*, 29(2):137-141.
35. Christov, V. et Evstalieva, L., **2000**, Alkaloid profile of Bulgarian species from genus *Genista*, *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite*, 53(11): 25-28.
36. Kirch, J., Veit, M., Wätzig, H., Grenwald, R. et Czygan, F.-C., **1995**, Alkaloidal variation in *Genista lobelii*. (Fabaceae). *Biochemical systematics and ecology*, 23(6): 636-643.
37. Van Rensen I., Wrey, V., Witte, L., Canto, P., Grenwald, R., Veen, G., Veit, M. et Czygan, F.-C., **1994**, Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*, *Phytochem.* 95(2): 421-424.
38. Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I. et Manumata, A., **1998**, Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products*, 61 (11): 1404-1406.
39. Van Rensen I., Veit, M., Wrey V. et Czygan, F.-C., **1996**, Genistein-C-glucoside from *Genista cinerea*. *Natural Product Letters*, 6 (3): 203-207.
40. Giachi, I., Manunta, A., Morelli, I. et Pistelli, L., **2002**, Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(8): 801-803.
41. Pistelli, L., Giachi, I., Potenzs, D. et Morselli, I., **2000**, A New Isoflavone from *Genista corcica*. *Journal of Natural Products*, 63 : 504-506.
42. Mekkiou Ratiba, thèse de doctorat université Mentouri Constantine **2005**.
43. Naima Boutaghane, thèse de doctorat université Mentouri Constantine **2013**.
44. Boukaabache Rabia, thèse de doctorat université Mentouri Constantine **2015**.

45. Young, N. D., Steiner, K. E. et Depamphilis, C. W., **1999**, The evolution of parasitism in Scrophulariaceae/Orobanchaceae: plastid gene sequences refute an evolutionary transition series, *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 876-893.
46. Riches C. R., Parker C., **1995**, Parasitic plants as weeds. In M. C. Press, J. D. Graves , *Parasitic plants* 226-255 Chapman & Hall, London, UK.
47. Odasz, A. M., Savolainen O., **1996**, Genetic variation in populations of the Arctic perennial *Pedicularis dasyantha* (Scrophulariaceae), on Svalbard, Norway. *American Journal of Botany*, 83: 1379-1385.
48. Nickrent, D. L., **2006**, The parasitic plant connection: parasitic plant genera. Department of Plant Biology, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, USA. Website <http://www.parasiticplants.siu.edu/ListParasites.html> [accessed 8 January 2006].
49. Xiao-Ming Liu, Jun Li, Yong Jiang, Ming-Bo Zhao, Peng-Fei Tu., **2013**, Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 47: 21–24.
50. Tan D.Y., Q.S., Guo, C.L., **2004**, Wang, Study on the status quo of *Cistanche deserticola* and its exploitation and utilization in China. *Forest Resources Managemet.* 2 : 29.
51. Zhu R.H., Luo Z.M., Hunan J., **2000** *Forest Science and Technology* 27 : 19.
52. Luo T.B., Chen Y.N., Ren W., Zhon Y.M., Zhong W.Z., 2002, The Herba Cistanche is Investigation Improving, *Arid Zone Research*, 19: 56.
53. Ozenda, P., 1993, *Flore et Végétation du Sahara*, Edition Paris, 388.
54. Ozenda, P. et Capdepon, M., **1977**, Recherches sur les Phanérogames parasites V. Sur quelques particularités anatomiques du genre *Cistanche* (Orobanchacées). *Bulletin de la Société Botanique de France*, 124: 451-464.
55. Jiangsu New Medical College, Dictionary of Chinese Materia Medica, *Shanghai Science and Technology Press*, Shanghai, **1977**, 895-897.
56. Xinjiang Institute of Traditional Chinese Ethnologic Medicines Ed., Culture Techniques of Xinjiang Staple Medicinal Plants Xinjiang, *Science and Technology Press: Xinjiang*, **2004**; pp 84-88.
57. China Pharmacopoeia Committee, Chinese Pharmacopoeia, vol. I. China Medical Science and Technology Press, Beijing, **2010**, p. 126.
58. Namba, T., **1994**, In The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Pictures (Vol II), *Hoikusha publishing Co. ltd. Osaka*, pp 80

59. Kobayashi, H., Oguchi, H., Takizawa, N., Miyase, T., Ueno, A., Usmanghani, K., Ahmad, M., **1987**, New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. I., *Chemical. Pharmaceutical. Bulletin.*, 35: 3309–3314.
60. Wang T., Zhang X., Xie W., **2012**, *Cistanche deserticola* Y. C. Ma, Desert Ginseng: A Review, *Am Journal of Chinese Medical.*, 40 1123-1141.
61. Liu. XM., Li, J., Jiang, Y., Zhao, MB., Tu, PF., **2013**, Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae), *Biochemical Systematics and Ecology.*, 47 21-24.
62. Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Machova, E., Naran, R., Hribalova, V., **1997**, Isolation and Characterization of Mitogenic Pectic Polysaccharides from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma., *Chemical. Papers*, 51 289-294.
63. Deyama, T., Kobayashi, H., Nishibe, S., Tu, T., **2006**, Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants, *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products (Part M)*, 33 645-74.
64. Geng. X., Song, L., Pu, X., Tu, P., **2004**, Neuroprotective Effects of Phenylethanoid Glycosides from *Cistanches salsa* against 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-Induced Dopaminergic Toxicity in C57 Mice, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 27(6): 797-801.
65. Liu, C. Z., Cheng, X. Y., **2008**, Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress, *Plant Cell Reports*, 27 (2): 357-362.
66. Tian, X. F., Pu, X. P., **2005**, Phenylethanoid glycosides from *Cistanches salsa* inhibit apoptosis induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in neurons, *Journal. Ethnopharmacol.*, 97 (1) 59-63.
67. Sun Y., D. J., Wang, Liu X. M., Shi L., Zhang H. Q., **2002**, *Chinese Pharmacol Bulletin.*, 18, 84-87.
68. Zeng .Q. L., Mao. J. H., Lu. Z. L., **1998**, *J. Zhejiang Medical. University*, 27,108-111.
69. Xue, D. J., Zhang. M., Wu, X. H., Chen, X. D., Zhang, Y. C., **1995**, *Zhongguo Zhongyao Zazhi Chana Journal. Chinese Materials Medicine*, 20, 6.
70. Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., **1985**, VI Isolation and Structure of a New Iridoid Glucoside, 6-Deoxycatalpol . *Chemical Pharmaceutical. Bulletin.* 33 3645
71. Nan, ZD., Zhao, MB., Zeng. KW., Tian. SH., Wang, WN., Jiang, Y., Tu, PF., **2016**, Anti-inflammatory iridoids from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim Desert. *Chinese Journal of Natural Medicines.*, 14(1):61-5

72. Xu, C.H., Yang, J.S., Lv, R.M., **1999**, Chin. Trad. Herb. Drugs 30: 244.
73. Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., and Fukushima, S., **1984**, studies on the constituents of cistanchis herba II: isolation and structures of new iridoids, cistanin and cistachlorin *chemical. Pharmmaceutical. Bulletin.* 32 729.
74. Song, Z.H., Mo S.H., Chen, Y., Tu, P.F., Zhao, Y.Y., Zheng, J.H., **1999**, China *J. Chin. Mater.Med.* 25 728.
75. Xie, H.H., Morikawa, T., Matsuda, H.S.S., Nakamura, S.K., Muraoka, O.S., Yoshikawa, M.S., **2006**, Monoterpene Constituents from Cistanche tubulosa-Chemical Structures of Kankanosides A-E and Kankanol *chemical. Pharmmaceutical. Bulletin.* 54: 669.
76. Deyama, T., Yahikozawa K., Al-Easa, H.S., 1995, Constituents des plantes qui poussent dans la partie Qatar, *International Journal chemical*, 6 : 107.
77. Du, N.S., Wang, H., Yi, Y.H., **1993** Isolation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola*, *NaturalProduct Research Development*, 5 : 5.
78. Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., Fukushima, T., S **1984**, Studies on the constituents of Cistanchis herba III *chemical. Pharmmaceutical. Bulletin.* 32, 3009
79. Xu, W.H., Qiu, S.X., Zhao, J.H., **1994**, *Chinese TraditionalHerbal Drugs*, 25: 509.
80. Kobayashi, H., Karasawa H., Miyase, T., Fukushima, T., S 1984 Studies on the constituents of Cistanchis herba IV, *Chemica Pharmmaceutical. Bulletin.* 32, 3880.
81. Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., **1985**, Studies on the Constituents of Cistanchis Herba. V. Isolation and Structures of Two New Phenylpropanoid Glycosides, Cistanosides E and F, *chemicalPharmmaceutical Bulletin.* 33:1452.
82. Karasawa, H., Kobayashi, H., Takizawa, N., **1986b**, Studies on the constituents of cistanchis herba VIII. isolation and structures of cistanosides H and I, *Yakugaku Zasshi*, 106: 721.
83. Karasawa, H., Kobayashi, H., Takizawa, N., **1986a**, Studies on the constituents of cistanchis herba VII, *Yakugaku Zasshi*, 106: 562.
84. Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T., Namba, T., **1996** Antioxidative effects of phenylethanoids from Cistanche deserticola Biol, *Pharmmaceutical Bulletin*, 19: 1580.
85. Deyama, T., Yahikozawa, K., AL-Easa, H.S., Rizk, A.M., **1995**, Constituents of plants growing in qatar: Part XXVIII, *Science Journal*, 15 (1): 51- 55.
86. Song, Z.H., . Tu, P.F, Zao, Y.Y., Zheng, J.H., *Chinese Traditional Herbal Drugs* 31 (2000) 808.
87. Cheng, M.H., Liu, F.S., Xu, J.P., *China Journal Chinese material Medical.* **1993**, 18: 424.

88. Kobayashi, H., Oguchi, H., Takizawa, N., **1987**; New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 35: 3309.
89. Du, N.S., Zhou, P.W., Wang, J., J. Chin. **1993** *Pharm. Univ.* 24: 46.
90. Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N., 1990 , Les constituants de *Cistanche tubulosa*; *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 38 (7): 1927-1930.
91. Masayuki, Y., Hisashi, M., Toshio, Morikawa, H., Seikou, N., Osamu, M., **2006**, Phenylethanoid oligoglycosides and acylated oligosugars with vasorelaxant activity from *Cistanche tubulosa*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14: 7468.
- 92 . Tu, P.F., Song, Z.H., Shi, H.M., Yong, J., Zhao, Y.Y., **2006**, Arylethyl (= Phenylethanoid) Glycosides and Oligosaccharide from the Stem of *Cistanche tubulosa* Helv, *Chimica. Acta*, 89: 927.
93. Lei, L., Jiang, Y., Liu, X.M., Tu, P.F., Chen, F.K., **2007** New Glycosides from *Cistanche salsa*, *Helv. Chimica. Acta*, 90 :79.
94. Yang, J.H., Du, N.S., Kasimu, R., **2005**, *Chinese Pharmaceutical Journal*, 14: 242.
95. Tu, P.F., Shi, H.M., Song, Z.H., Yong, J., J. **2007**, Chemical constituents of *Cistanche sinensis*, *Asian Naural Product Research*, 9: 79.

Chapitre II

Métabolites

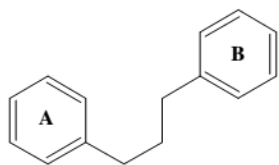
Secondaires

II-1 Les flavonoïdes

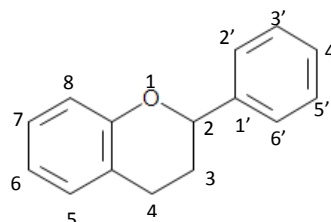
II-1-1 Généralités

Les flavonoïdes (flavus : jaune) appartiennent à la famille des polyphénols et forment une grande partie des métabolites secondaires par plus de 9000 structures naturelles qui ont été isolées et caractérisées jusqu'à 2007 [1]. Les flavonoïdes sont réputés pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple anti-oxydante, antivirale, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antibactérienne, anti-allergique et antitumorale.....etc [2].

La structure d'un flavonoïde est basée toujours sur un squelette de quinze atomes de carbone le 1, 3- diphenylpropane C₆-C₃-C₆ (schéma 1), constitué de deux cycles benzyliques A et B reliés par une chaîne en C₃, cette chaîne peut être complétée par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A.



Squelette de base des flavonoïdes



structure tricyclique commune aux flavonoïdes

Schéma II-1: squelette de base de flavonoïdes

II-1-2 Classification

Le degré d'oxydation du chaînon propyle C₃ et la nature des différents substituants présents sur les cycles, peuvent être déterminer les plusieurs sous-groupes des flavonoïdes telles que: les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, roténoïdes, 3- arylcoumarines, coumestanesetc [3], comme le montre le schéma II- 2:

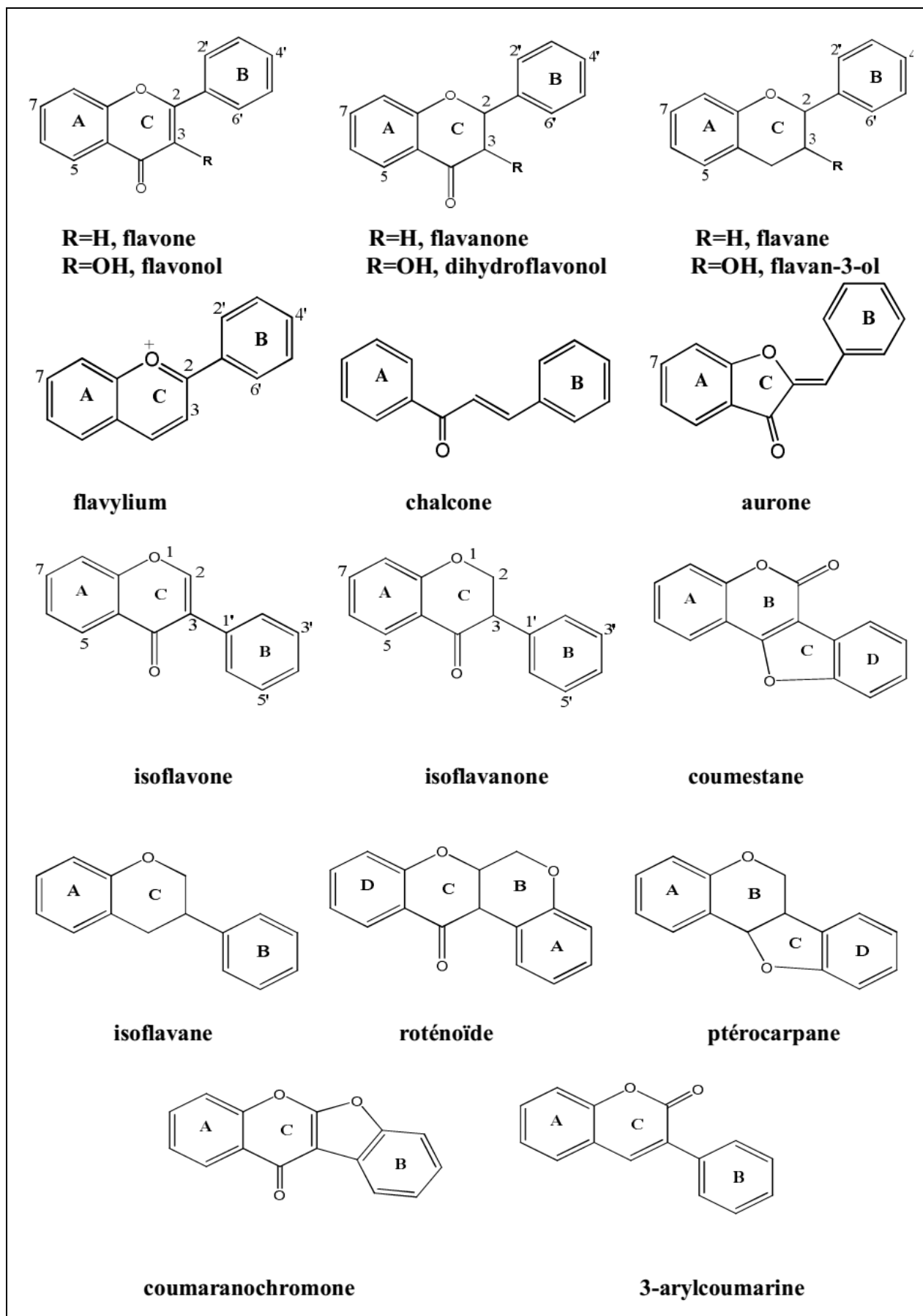


Schéma II- 2 : Structures des différents squelettes des flavonoïdes

La plus part des flavonoïdes sont renferment des unités osidiques fixées sur l'aglycone. La partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. Les monosaccharides sont généralement le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose. En règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont les sites de glycosilation [4]

II-1-2 La biosynthèse des flavonoïdes

L'enzyme clé pour créer un squelette flavonique est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec la 4-coumaroylCoA pour accorder la 4, 2', 4', 6'- tétrahydroxychalcone [5]. A partir de cette chalcone nous pouvons obtenir les différents groupes de flavonoïdes.

Le tableau ci-dessous rassemble la liste des enzymes concernées par différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes telles que présentées dans le schéma II-3.

Tableau II.1 : Liste des enzymes

Némuro	Abréviation	L'enzyme
1	CHS	Chalcone synthase
2	CHI	Chalcone isomerase
3	FNSI	Flavone synthase I
4	FNSII	Flavone synthase II
5	IFS	Isoflavone synthase
6	FNR	Flavanone 4-reductase
7	F3H	Flavanone 3-hydroxylase
8	ANS	Anthocyanine synthase
9	FLS	Flavonol synthase
10	DFR	Dihydroflavonol 4-reductase
11	F3GT	Flavonoïde 3-O-glucosyl-transférase

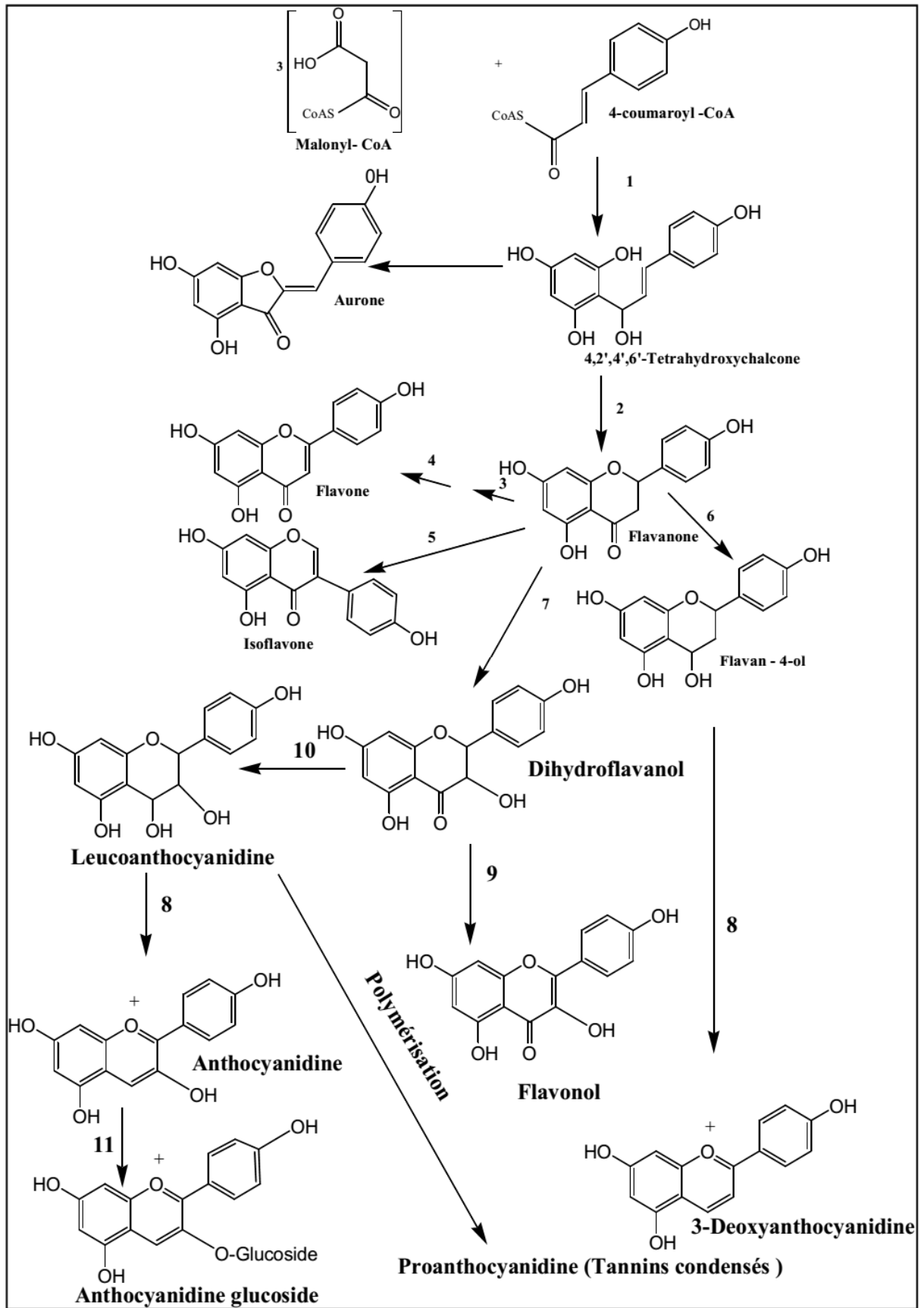


Schéma II.3 : Biosynthèse des flavonoïdes

II.1.3 Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, anti hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives [6].

II-1-3-a .L'activité antioxydant

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes [7-10] est conditionnée par:

*Pour le cycle C: La présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4 et une hydroxylation en 3.

* Pour le cycle A: une dihydroxylation en 5 et 7

*Pour le cycle B: une *ortho*-dihydroxylation.

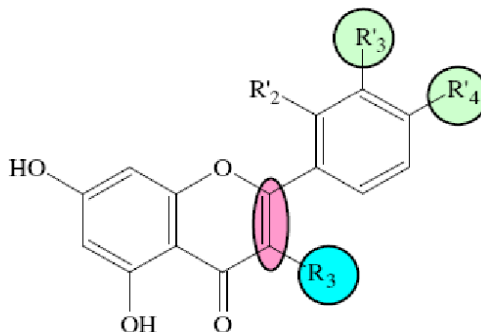


Schéma II-4: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes [7, 11]. Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule [7]. Les 3 sites de chélation principaux [9] se situent:

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4.
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4.
- Entre les deux hydroxyles en positions 3' et 4' sur le cycle B.

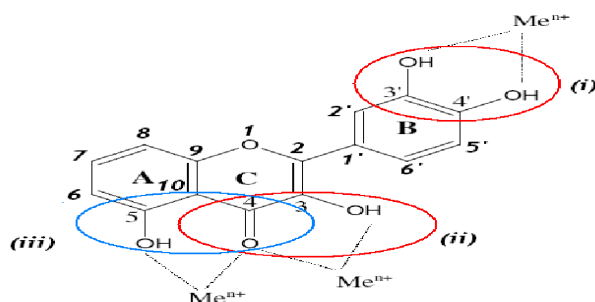


Schéma II-5 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques

II-1-3-b. Effets vasculoprotectrices

Les flavonoïdes fonctionnent pour maintenir la perméabilité vasculaire normale [12- 13]. Cette action est appelée la propriété vitaminique P sur les vaisseaux sanguins [14],

Autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité est reliée avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine [15- 16].

II-1-3-c. Propriétés antihépatotoxiques

Silybum marianum (chardon marie) qui est riche aux flavonoïdes a été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques[17]. La quercétine, issue d'*Artemisia scoparia*, a une activité protectrice *vis-à-vis* de l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris [18].

II-1-3-d. Propriétés anti-allergiques

Les flavonoïdes également réputés pour leurs effets anti-allergiques où ils agissent sur l'inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [19- 22].

II-1-3-e. Activité anti-inflammatoire

Plusieurs travaux indiquent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [23- 25]. La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse, la cyclo-oxygénase (pour les prostaglandines) et la li-oxygénase (pour les leucotriènes) des principaux médiateurs de l'inflammation [26].

II-1-3-f. Activité antiulcéreuses:

Les flavonoïdes ont le pouvoir de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes par exemple l'hypolaetine-8- glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, montre une activité anti-ulcérogène significative [27]. De la même manière La naringénine et la quercétine exercent une activité antiulcéreuse mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol [28].

II-2. Les iridoïdes

II-2-1. Définition

Ce sont des composés monoterpéniques caractérisés par le squelette cyclopenta [c] pyrane , nommé iridane. Le groupe iridoïdes inclus près de 1700 composés identifiés jusqu'à 2012 [29634]. La majorité des composés de ce groupe sont glycosylés.

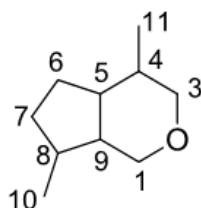


Schéma II-6: Structure du squelette iridane

Les iridoïdes doivent leur nom aux fourmis Australiennes du genre *Iridomyrmex* d'où ont été isolées ces substances en 1956, impliqués dans un mécanisme de défense de ces insectes [35]. Le premier iridoïde séparé est l'iridial qui est en équilibre avec la forme lactol [36], représentant la structure de base des iridoïdes.

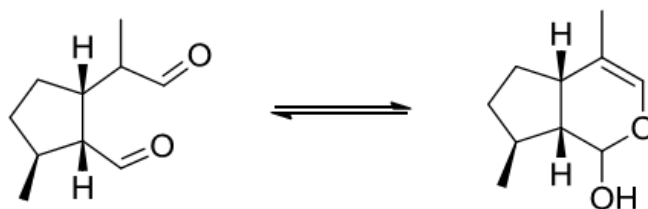


Schéma II-7: Structure de l'iridodial

Malgré que les premiers iridoïdes ont été isolé à partir des fourmis, ce groupe des substances est rare chez les insectes, par contre elles sont particulièrement répandus dans le règne végétal.

Ils sont présents exclusivement dans les dicotylédones part en particulier chez les Asteridae1 : Dipsacales, Gentianales, Lamiales, Plantaginales, Rubiales, Scrophulariales [37].

II-2-2. Classification

Plusieurs classifications des iridoïdes ont été proposées. Parmi celles-ci, A. Bianco[33] divise les iridoïdes en deux sous classes :

➤ Les composés iridoïques subdivisés en quatre groupes (glycosides d'iridoïdes, iridoïdes simples, sécoiridoïdes et bisiridoïdes).

➤ Les alcaloïdes monoterpéniques.

La classification de H. Franzyk considère trois sous classes [34] :

➤ Les hétérosides d'iridoïdes (regroupant les iridoïdes carbocycliques, les sécoiridoïdes et les bis-iridoïdes).

➤ Les iridoïdes simples.

➤ Les alcaloïdes monoterpéniques.

Nous avons choisi la dernière classification et nous allons présenter quelques exemples d'iridoïdes.

La numérotation utilisée dans ces exemples, sera la numérotation usuelle.

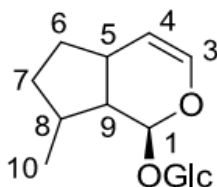
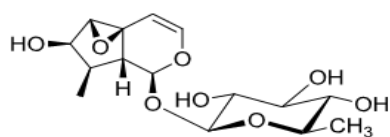


Schéma II-8 : Nomenclature usuelle

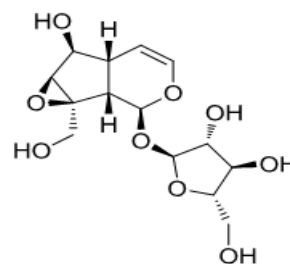
(1S)-1-(O-β-D-glucoopyranosyl)-1, 5, 6, 7, 8, 9-hexahydrocyclopentano[c]pyrane

II-2-2-a .Hétérosides d'iridoïdes

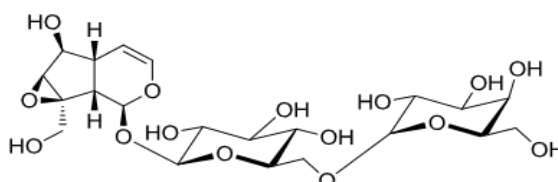
Dans la plupart des cas, le sucre est un glucose relié à la génine par une liaison osidique entre l'hydroxyle en C1 de la génine avec l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du sucre, mais dans quelques cas le sucre peut être un rhamnose [38], un arabinose (jioglutoside)[39] ou un oligosaccharide (rehmannioside)[40]



5,6- β -époxy-7 β -hydroxy-8 β -
méthyl-1 β -D-rhamnosidal iridoïde



jioglutoside A



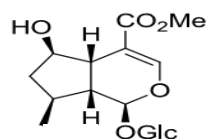
rehmannioside A

Schéma II-9: Exemples de différents sucres présents dans les hétérosides d'iridoïdes

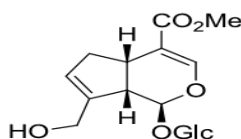
II-2-2-a-1 .Iridoïdes carbocycliques

Les iridoïdes ont généralement 10 atomes de carbone comme loganine [41,42], géniposide [43]),

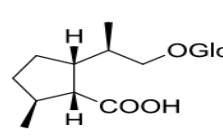
dans certains cas le cycle pyranique est ouvert par exemple le népétariaside [44].



loganine



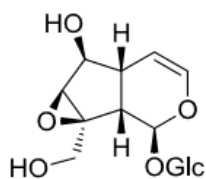
géniposide



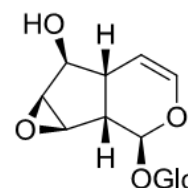
népétariaside

Schéma II-10: Exemples d'iridoïdes en C10

On trouve aussi des composés à 9 carbones (le catalpol) et plus rarement les molécules en C8 (unédoside).



catalpol



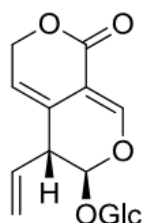
unédoside

Schéma II-11 : Exemples d'iridoïdes en C9 et en C8

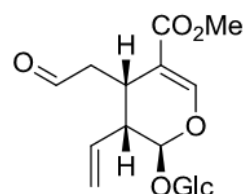
II-2-2-a-2. Sécoiridoïdes

Ces composés résultent par l'ouverture oxydante de la liaison C7-C8 de la génine. Les différentes génines se caractérisent par certaines fonctionnalités :

➤ Présence d'un groupe vinyle en C9 sous forme lactone par exemple le gentiopicroside [45] ou ouverte (sécologanoside)[46,47]) :



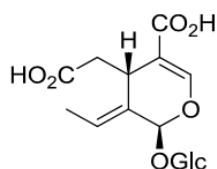
gentiopicroside



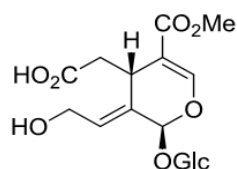
sécologanoside

Schéma II-12: Exemples de sécoiridoïdes possédant une chaîne latérale vinylique

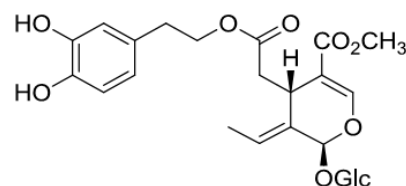
➤ Présence d'un groupement éthylidène (oléoside [48]) ou hydroxyéthylidène (10-hydroxyoléoside-11-méthylester (14) [49]) en C9. Présence d'un acide carboxylique estérifié (oleuropéine[50]) ou non.



oléoside



10-hydroxy-11-méthylester-oléoside



oleuropéine

Schéma II-13: Exemples de sécoiridoïdes possédant un groupement éthylidène

➤Présence d'une structure tricyclique : par refermeture en C8 *via* une liaison C-O, comme pour le sécogalioside [51] :

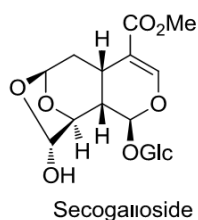


Schéma II-14: Exemple de sécoiridoïde possédant une structure tricyclique

II-2-2-a-3 *Bis-iridoïdes*

ce type d'iridoïdes est composé de deux molécules iridoïques reliées au minimum par une liaison (généralement une liaison ester). Les deux composés iridoïdes peuvent être liés directement entre eux (sylvestroside I [52]) ou par un squelette intermédiaire (coelobillardin [53]).

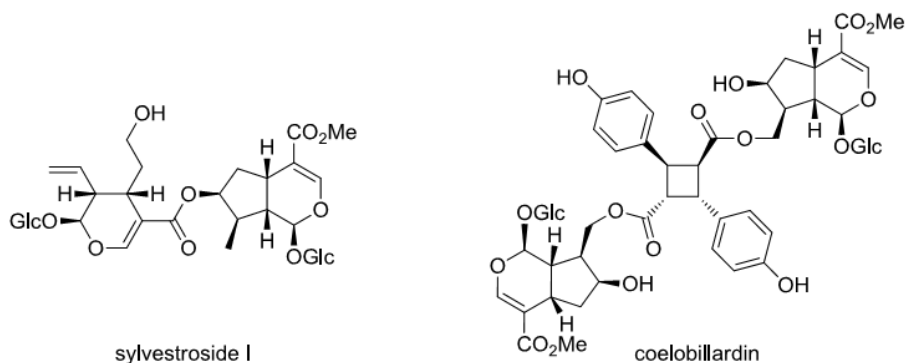


Schéma II-15: Exemples de bisiridoïdes

II-2-2-b *Iridoïdes simples*

Ils sont souvent appelés aglycones d'iridoïdes ou génines d'iridoïdes, caractérisés par l'absence de l'unité glucosidique en C1

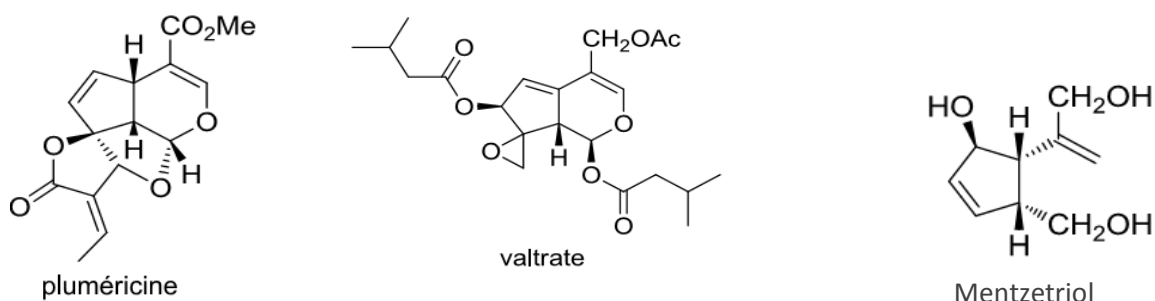
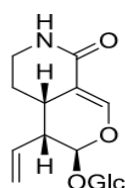
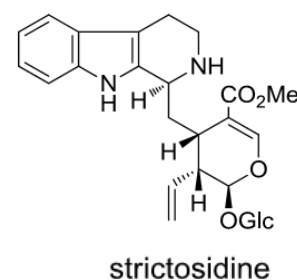
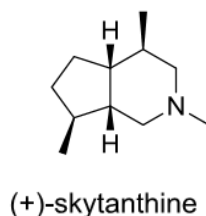
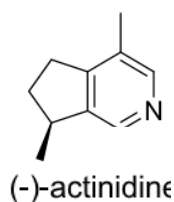


Schéma II-16: Exemples d'iridoïdes simples

II-2-2-c. *Alcaloïdes monoterpéniques*

Les iridoïdes alcaloïdiques naturels qui ont été isolés sont peu nombreux, alors que plusieurs

composés de ce groupe ont été produits au niveau de l'extraction réalisée en présence d'ammoniaque.



bakankoside

Iridoïde azoté naturel

Schéma II-17: Exemples d'iridoïdes alcaloïdiques

II-2-3. L'activité biologique des iridoïdes

Les iridoïdes sont souvent présents dans les feuilles de plantes utilisées en phytothérapie et en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques antipyrétiques, antitussives, hypotensives et dans le traitement de diverses affections et plaies cutanées. Certaines plantes à iridoïdes sont enregistrées dans la pharmacopée européenne à titre d'exemple on peut citer :

- L'*Harpagophytum procumbens*, les racines sèches utilisées pour le traitement symptomatique des manifestations articulaires mineures, peuvent contenir jusqu'à 2 % d'harpagoside.
- Les racines sèches de l'espèce *Gentiana lutea* sont utilisées comme stimulant de l'appétit. Elles peuvent contenir jusqu'à 9 % de gentiopicroside.
- Les feuilles sèches de l'olivier (*Olea europaea*, Oleaceae) ont des propriétés hypotensives, hypoglycémiantes et diurétiques. Elles peuvent contenir jusqu'à 9 % d'oleuropéine . Nombreux travaux se sont intéressés aux activités biologiques et pharmacologiques d'iridoïdes et de sécoiridoïdes. Ces travaux ont montré que ces composés possèdent de multiples activités

biologiques et plusieurs revues font état d'activités pharmacologiques de type anti-allergique, hypotensif, anti-hépatotoxique, cholérétique, hypoglycémiant, purgatif, anti-inflammatoire, antispasmodique, antitumoral, antiviral et antibiotique[31,54-55].

II.3) Les Phenylethanoïdes glycosides :

Les composés naturels phenylethanoïdes glycosides (PhGs) ont été un sujet d'intérêt pour les chimistes médicaux dont les applications pharmaceutiques et industrielles.

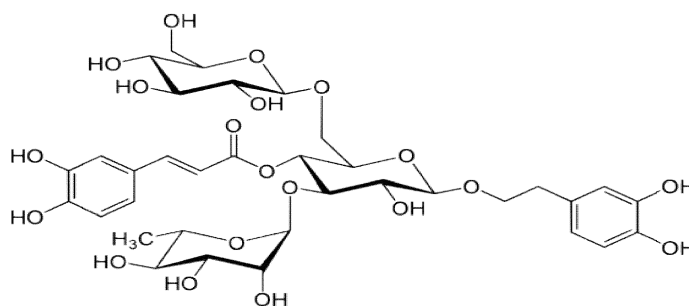
Comme leur nom l'indique les structures de base de PhGs sont caractérisées par le fragment hydroxyphényléthyl attaché à un β -glucopyranose par une liaison glycosidique.

Les structures de base sont souvent substituées avec des substituants tels que les acides aromatiques (ex : acide cinnamique, acide férulique et l'acide isoférulique) et les divers sucres (ex : rhamnose, xylose, apiose et arabinose) attaché respectivement au résidu de glucose par une liaison ester ou bien par une liaison glucosidique [56].

Les phenylethanoïdes glycosides (phGs) sont solubles dans l'eau, distribués largement dans le règne végétal, la plupart sont isolés à partir de plantes médicinales. Ces composés ne sont pas spécifiques pour un organe et ont été isolés des racines des plantes, écorces, feuilles, parties aériennes [57].

La majorité des phényléthanoïdes rapportés à ce jour se trouvent dans les familles: Oleaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae et Orobanchaceae [58].

La première référence de la littérature sur les phenylethanoïdes glycosilés concerne l'isolement de echinacoside à partir de *Échinacée angustifolié* (Asteraceae) en 1950 [59] mais leurs structures n'ont été déterminées qu'en 1983 [60].



Echinacoside

Grace à l'amélioration rapide des technologies de l'isolement, purification et élucidation de la structure presque 200 nouveaux PhGs ont été identifiés jusqu'à 2008 [56].

II-3-1 Activité biologique de PhGs :

Au cours des dix dernières années un grand nombre de PhGs ont été isolés à partir de différentes plantes dont plusieurs ont montré une activité pharmaceutique variée comprenant : antibactérienne [61, 62, 63, 64, 65], neuroprotective [56], antioxydant [66], immunosuppresseur [67], antitumeur [68-69], antihypertension [68-69], analgésique [68-69], antivirale [70], antihépatotoxique [71] et anti inflammatoire [56].

II-3-1-1) L'antioxydant et les capacités de piégeage des radicaux libres

Les radicaux libres surproduits ou le système antioxydant naturel affaibli peuvent souvent conduire à un stress oxydatif qui peut éventuellement entraîner des blessures et des maladies oxydatives. Il a été largement reconnu aujourd'hui que la réduction du stress oxydatif peut offrir des avantages cliniques sur une variété de conditions pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires, l'ischémie rétinienne, le sida et les maladies neurodégénératives telles que la congestion, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.

Le traitement anti-oxydant a donc été considéré comme une thérapie adéquate pour atténuer les lésions oxydatives de ces troubles. En tant que groupe de polyphénols naturels, des composés PhGs (ainsi que des extraits PhGs ont été largement étudiés pour leurs activités anti-oxydantes au cours des dernières années. Des études ont en effet montré que les propriétés antioxydantes de PhGs sous tendent un grand nombre des autres activités biologiques observées pour ces composés [56].

Les extraits PhGs d'un certain nombre d'herbes telles que *Plantago major* [72], *Wulfenia carinthiaca* [73], et *Forsythia suspense* [74] ont été signalés comme antioxydants remarquables. Un grand nombre de composés PhG présentent également des capacités antioxydantes, par exemple, Actéoside qui possède un effet de piégeage des radicaux évalué dans un certain nombre d'études [75-78]. L'étude réalisée par Nektarios et al a démontré que Actéoside a la capacité de piégeage le 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) comparables à celle du hydroxytoluènebutylé et de α -tocophérol, ce qui indique la possibilité d'utiliser l'actéoside comme agent protecteur naturel contre le rancissement oxydatif [79]. Neoneuzhenide des fruits de *Ligustrum lucidum* [76], 2-acetylacteoside, poliumoside et brandioside de *Brandisia hancei* [75], ont des effets antioxydants puissants contre l'hémolyse des globules rouges induits par les radicaux libres. Plantamajoside, 2- O-acetylplantamajoside et 2,6"- diacetylplantamajoside

issues de *Wulfenia carinthiaca* qui présentent des activités antioxydantes élevées en réaction de Briggs-Rauscher (BR) [73], tandis que les cistanosides ont une activité anti-oxydante et lipoxygénases inhibitrices *in vitro* [80].

Références

bibliographiques

1. Harborne. J. B. ; Baxter, H. ; **1999**; The handbook of natural flavonoids, John Wiley & Sons : Chichester.
2. Raskin. I. , Ribnicky, D. ,Komarnytsky, S , N. , Poulev, A. , Borisjuk, N. , Brinker, A. , Moreno, D. Ripoll, C., Yaboki, N., O'Neal, J., Cornwell, T., Pastor, I. ,Fridlender, B. , **2002**, *Trends Biotechnol.*, , 20, pp 522-531.
3. Lawson, A. M., **2006**, Etude phytochimique d'une Fabacee tropicale, *Lonchocarpus Nicou* évaluation biologique préliminaire. Thèse de Doctorat. Université de Limoges.
4. Bruneton, J., **1993**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition Université de Paris- sud, France. pp 389–617.
5. Richter, G., **1993**, Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, *Lausanne* CH-1015.
6. Ghedira. K., **2005**, Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie* Volume 3., Issue 4,pp 162–169.
7. Halbwirth, H., **2010**, The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathwa., *International Journal of Molecular Sciences.*, 11, 595-621.
8. Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S., **2008**, Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level, *Phytotherapy Research.*, 22, 567–577.
9. Mladinka, P., Zatloukalova, Filipsky, L., T., Hrdina, R., **2010**, Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine.*, 49, 963–975.
10. Rufer, C. E, Kulling, S. E, **2006**, Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 54, 2926–2931.
11. Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., **2010**, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants; *Food Chemistry.*, 125, 288–306.
12. Shih, CM., Lin, H., Liang, YC., **2004**, Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *European Journal Pharmacology.*, 496 (1-3), 41-8.
13. Youdim, KA, Donald, Mc J., Kalt, W., **2002**, Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *Journal of Nutritional Biochemistry.*, 13 (5), 282-8.

14. Beretz, A., Cazenave, JP., **1991**, Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Med.*, 57 (7), S68-72.
15. Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., **2004**, Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.*, 500 (1-3), 299-313.
16. Ursini, F., Tubaro, F., Rong, J., **1999**, Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr Rev.*, 57 (8), 241-9.
17. Magliulo, E., Carosi, PG., Minoli, L., **1973**, Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneimittelforschung, Suppl.*, 23, 161-7.
18. Gilani, AH., Janbaz, KH., **1993**, Protective effect of *Artemisia scoparia* extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity; *Gener Pharmacol., The Vascular System* 24 (6), 1455- 1458.
19. Amella , M., Bronner, C., Briancon , F., **1985**, Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids; *Planta Med.*, 51 (1), 16-20.
20. Berg ,PA., Daniel PT., **1988**, Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in Clinical and Biological Research, Cody V, Middleton E, Liss AR Inc., New York, Harborne JB (Eds), 280, 157-171.
21. Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., **2000**, Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice., *J Allerg Clin Immunol*, 106 (1), 159-66.
22. Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K et al., **1998.**, Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry.*, 48 (1), 131-6.
23. Da Silva, E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J., **1994**, Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46(2) : 118-22.
24. Galati, E. M., Monforte, M. T., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Trovato, A., Tripodo, M.M., **1994**, Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid, (Note I), antiinflammatory and analgesic activity., *Farmaco*, 40(11) : 709-12.
25. Middleton, E. J., **1996**, Biological properties of plant flavonoids, an overview *International Journal of Pharmacognosy*, 34(5): 344-348.
26. Middleton, E. J., Drzewiecki, G., **1984**, Flavonoid inhibition of human basophil histaminerelease stimulated by various agents, *Biochemical and Pharmacology*, 33(21):

- 3333-3338.
27. Villar, A, Gasco, MA., Alcaraz, MJ., **1987**, Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39 (7), 502-7.
 28. Martin, MJ., Marhuenda, E., Perez-Guerrero, C., et al., **1994**, Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, 49 (3), 144-50.
 29. Bruneton, J., **2009**, Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinales, Tech & Doc, 4ème édition, Paris.
 30. Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y., **2007**, Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids, A review, part 2., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55: 689–728.
 31. Dinda. B., Chowdhury. D., **2009**, Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity, An Updated Review, Part 3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57: 765–796.
 32. Dinda, B., Debnath, S., Banik, R., **2011**, Naturally occurring iridoids and secoiridoids, An updated review, part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59, 803–33.
 33. Bianco, A., **1990**, The Chemistry of Iridoids, In Studies, Natural, Products, Chemistry. Vol. 7, Elsevier Science B.V, Amsterdam, pp. 439–497.
 34. Franzyk, H, **2000**, Synthetic aspects of iridoid chemistry, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 79: 1–114.
 35. Cavill, G., Ford, D., Locksley, H., **1956**, The chemistry of ants. I., Terpenoid constituents of some Australian Iridomyrmex species, *Australian Journal of Chemistry*, 9:288.
 36. Cavill, G., Ford, D., **1960**, The Chemistry of Ants. III. Structure and Reactions of Iridodia, *Australian Journal of Chemistry*, 13: 29.
 37. Jensen, S. R., Franzyk, H., Wallander, E., **2002**, Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers, *Phytochemistry*, 60, 213–31.
 38. Boros, C. A., Stermitz, F. R., **1990**, Iridoids. An Updated Review. Part I, *Journal of Natural Products*, 53:1055–1147.
 39. Morota, T., Sasaki, H., Nishimura, H., Sugama., K., Chin(Chen Zhengxiong), M., Mitsuhashi, H., **1989**, Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa*, *Phytochemistry*, 28: 2149–2153.
 40. Oshio, H., Inouye., H., **1982**, Iridoid glycosides of *Rehmannia glutinosa*, *Phytochemistry*, 21, 133–138.
 41. Anet, F., Hughes, G., Ritchie, E., **1953**, Alkaloids of australian strychnos species. I.

- Constituents of *S. lucida* R.Br. and *S. psilosperma* F.Muell., *Australian journal chemistry*, 6: 58.
42. Mustafayeva, K., Mahiou-Leddet, V., Suleymanov, T., Kerimov, Y., Ollivier, E., Elias, R., **2011**, Chemical constituents from the roots of *Cephalaria kotschyi*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47: 839–842.
43. Endo, T., Taguchi, H., **1973**, The Constituents of *Gardenia jasminoides* Geniposide and Genipin-gentiobioside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 2684–2688.
44. Murai, F., Tagawa, M., Inouye, H., Ishida, T., Inoue, M., **1987**, A new iridoid glucoside, nepetariaside from *Nepeta cataria*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35: 2533–2537.
45. Asahina, Y., Asano, J., Tanase, Y., Ueno, Y., **1936**, Über das Gentiopikrin (I. Mitteil.). *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, 69, 771–779.
46. Battersby, A. R., Burnett, A. R., Parsons, **1968**, P. G. Preparation of secologanin: its conversion into ipecoside and its role in indole alkaloid biosynthesis, *Chemical Communications*, 1280.
47. Souzu, I., Mitsuhashi, H., **1969**, Structures of iridoids from *Lonicera Morrowii* A. Gray, *Tetrahedron letters*, vol 10, issue 32, 2725–2728.
48. Garibold, P., Jommi, G., **1986**, Secoiridoids from *Olea europaea*, *Phytochemistry*, 25, 865–869.
49. Shen, Y.-C, Lin, C.-Y., Chen, C.-H., **1990**, Secoiridoid glycosides from *Jasminum multiflorum*. *Phytochemistry*, 29, 2905–2912.
50. Panizzi, L., Scarpati, M., Oriente, G., **1960**, The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action, *Gazz. Chim. Ital*, 90, 1449–1485.
51. Bock, K., Jensen, S. R., Nielsen, B. J., Johnson, I., Taticchi, A., Anthonsen, T., **1976**, Secogalioside, an Iridoid Glucoside from *Galium album* Mill. and ¹³C NMR Spectra of Some Seco-iridoid Glucosides, *Acta Chemica Scandinavica*, 30b, 743–748.
52. Abdallah, O. M., **1991**, Phenolic glucoside and other constituents of *Dipsacus laciniatus*, *Phytochemistry*, 30, 2805–2806.
53. Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Tillequin, F., Seguin, E., Cosson, J.-P., **2002**, Coelobillardin, an iridoid glucoside dimer from *Coelospermum billardieri*, *Phytochemistry*, 60, 415–418.
54. Villasenor, I. M., Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Statti, G. A., **2007**, Bioactivities of Iridoids. Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents, *Medicinal Chemistry*, 6, 307–314.
55. Menichini, F., **2008**, Biological and Developments Pharmacological Activities of Iridoids, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 399–420.

56. Fu, G. M., Pang, H. H et Wang. Y. H., october **2008**, Naturally Occurring Phenylethanoid Glycosides: Potential Leads for New Therapeutics, *Current Medicinal Chemistry*, Volume 15, Number 25, pp. 2592-2613(22)
57. Jiménez, C. et Riguera, R., **1994**, Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity, *Natural Product Reports*, Issue 6.
58. Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Kumarasamy, Talebpour, Y., A. H., Delazar, A., Nahar, L., Sarke, S. D., 2006, Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(9), 721.
59. Stoll.,A., Renz, J and Brack, A., **1950**, *Helv. Chim. Acta.*, 33, 1877.
60. Becker, H., Hsieh, W. C., Wylde, R., Laffite, C and Andary, C., *Naturforsch, Z.*, **1982**, Structure of echinacoside C: *Journal of biosciences* 37, 351.
61. Shoyama, Y., Matsumoto, M. and I., Nishioka, 1986, *Phytochemistry.*, **25**, 1633
62. Ravn, H. and Brimer, L., **1988**, *Phytochemistry.*, **27**,3433
63. Shoyama, Y., Matsumoto, M. and I. Nishioka, **1987**, *Phytochemistry.*, **26**, 983.
64. Endo, K., Takahashi, K., Abe, T. and Hikino, H., **1981**, Structure of forsythoside A antibacterial principle of *Forsythia suspense* leaves, *Heterocycles* vol 16, 1311.
65. Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H. and Akisada, T., 1982, Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus." VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspense*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 30: 4548.
66. Miyase, T., Ishino, M., Akahori, C., Ueno, A., Ohkawa, Y. and Tanizawa, H., 1991, Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*, *Phytochemistry*,30, 2015.
67. To, K., Ka, I., Sasaki, H., Komatsu, Y., **1990**, Yasuhiro Tsumura, *Chemical abstracts*,113, 120 777.
68. Andary, C., Privat, G., Chevallet, P., Orzalesi, H., Serrano, J. J. and Boucard, M., 1980, Chemical and pharmacodynamic study of heteroside esters of acid cafeic, isolated from *Orobanche rapum genistae.*, *Il Farmaco, Ed Sci* 35: 3-30.
69. Khan, I. A., Erdelmeier, C. A. J., Sticher, O. and Rali, T., **1992**, *Journal of Natural Products*, 55, 1270
70. Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H. and R., Brouillard, 1988, *Phytochemistry.*, 27: 2787.
71. Houghton, P. J. and Hikino, H., **1989**, *Planta Medica*, 55: 123.

72. Skari, K. P., Malterud, K. E., Haugli, T., 1999, Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from plantago major, a medicinal plant, *Special Publication -Royal Society of,Chemistry*, 240: 200.
73. Cervellati, R., Speroni, E., Govoni, P., Guerra, M. C., Costa, S., Arnold, U. W., Stuppner, H., **2004**, *Zeitschrift fuer Naturforschung., C: Journal of Biosciences*, 59,255.
74. Zhang, L. W., Liu, J., Yang, P., 2003, *Food Science.*, 24, 122.
75. He Z. D., Lau, K. M., Xu, H. X., Li, P. C., But, P. P. H., **2000**, *Ethnopharm*,71: 483.
76. Takeda, T., Narukawa, Y., Hada, N., **1999**, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 47, 284.
77. Aligiannis, N., Mitaku, S., Tsitsa-Tsardis, E., Harvala, C., Tsaknis, I., Lalas, S., Haroutounian, S., **2003**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7308.
78. He, Z. D., But, P. P. H., Chan, T. W. D., Dong, H., XU, H. X., Lau, C. P., Sun, H. D., **2001**, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49:780.
79. Aligiannis, N., Mitaku, S., Tsitsa-Tsardis, E., Harvala, C., Tsaknis, I., Lalas, S. and Serko Haroutounian, **2003**, Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51 (25): 7308– 7312.
80. Gulinuer, M ., Liu, M. J., Lu, J. F., **2001**, *Journal of Chinese Pharmceutical Sciecne* , 10: 157.

Partie II

Partie Experimentale

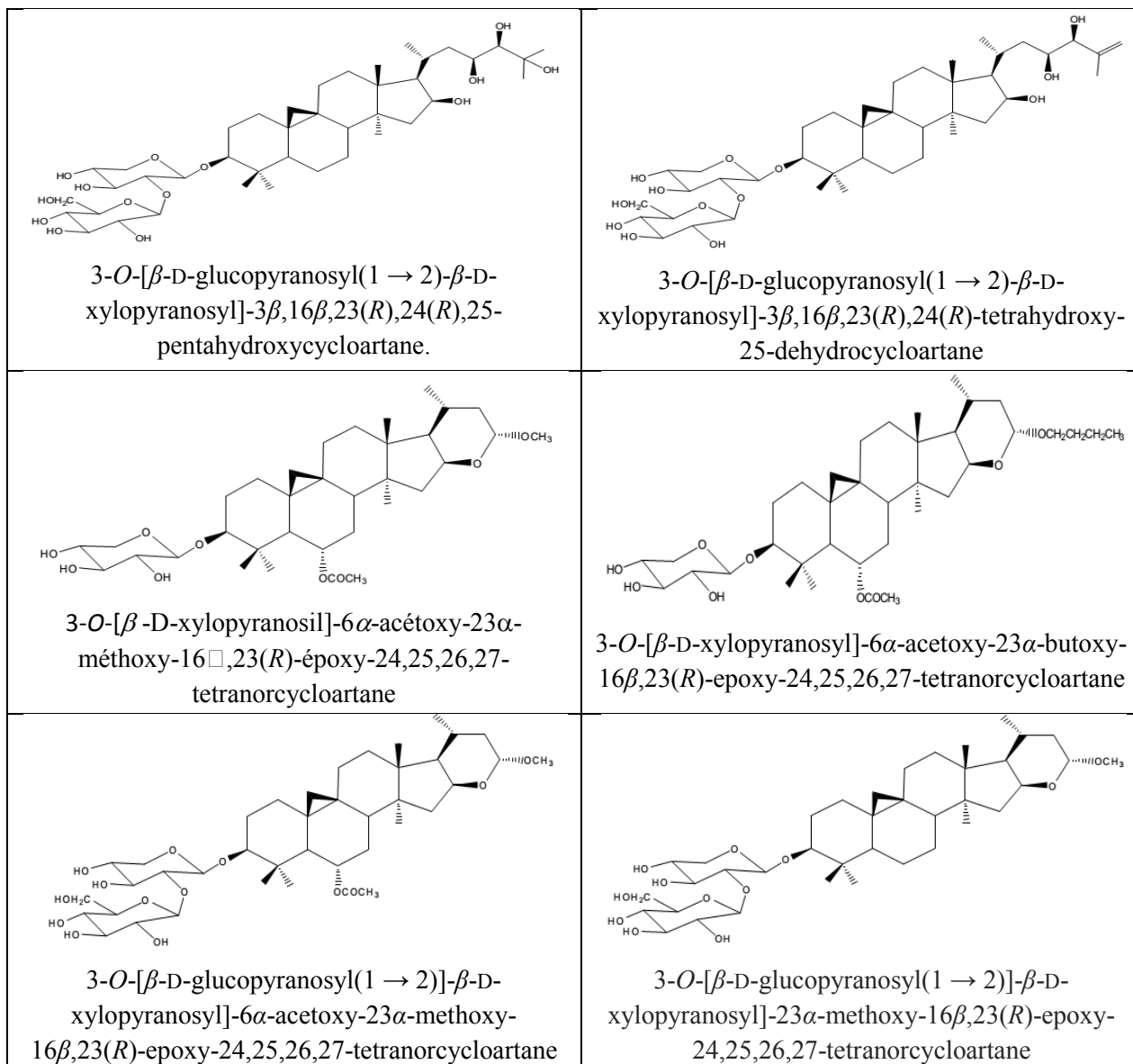
Chapitre III

Travaux Personnels

III-1- Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

III-1- 1 : Etude bibliographique :

La recherche bibliographique menée sur les travaux effectués sur l'espèce *Astragalus gombo* Coss. & Dur., espèce endémique au Nord du Sahara, a montré une seule étude sur celle poussant en Algérie de la région de Biskra montrant sa richesse en métabolites secondaires notamment les saponines de type cycloartaniques dont 6 étaient nouveaux et deux flavonols glycosylés [1-2]



*Tomentoside II

* Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - β -D-galactopyranoside

* Kaempférol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - [6-O- (3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside].

III-1-2 : Choix du matériel végétal

Dans cette étude, notre choix a porté sur les espèces sahariennes dont la spécificité est double ; d'une part, l'endémisme de nombreuses espèces au Sahara et d'autre part les conditions climatiques variées qui offrent des caractéristiques intéressantes et non négligeables à ces espèces.

Le choix de l'espèce *A. gombo* Coss. & Dur., a reposé essentiellement sur son endémisme au nord saharien et le peu d'études phytochimiques effectuées sur cette espèce. En effet, comme signalé précédemment, seule une investigation a été réalisée parallèlement avec la présente étude [1-2].

III-1-3 : Place dans la systématique

Règne	====>	Plante
Sous règne	====>	Tracheobionta
Sous Embranchement	====>	Angiospermes
Classe	====>	Magnoliopsidas
Sous classe	====>	Rosidae
Ordre	====>	Fabales
Famille	====>	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille	====>	Faboideae
Genre	====>	<i>Astragalus</i>
Espèce	====>	<i>Astragalus gombo</i> Coss. et Dur.

III-1-4: Description botanique

L'espèce *A. gombo* est une plante vigoureuse au port dressé élevé de couleur claire. Elle porte de très longues feuilles aux nombreuses petites folioles. Les pétioles, perdant leurs folioles, deviennent coriaces et piquants à l'extrémité. Les pieds bien développés atteignent aisément 40 à 50 cm de haut. Les fleurs papilionacées sont jaunes, en grappes axillaires denses. Comme pour toutes les espèces d'Astragale, la caractérisation du fruit est déterminante. Les gousses de 35-55mm, droites sur le dos, fortement et grossièrement côtelées-réticulées par de grosses nervures saillantes, acuminées en rostre aigu et droit, long de 7-9mm. Fleurs longues de 25mm environ, pubescentes veloutées [3].

Astragalus gombo est une plante endémique au nord saharien et dispose de trois noms vernaculaires qui sont : **Gelza**, **Foum el hamir** ou encore **Djelban el hamir** [4].



Schéma III-1 : Photo d'Astragalus gombo Coss.& Dur.

III-1-5 : Protocole expérimentale

III-1-5-1 : Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *A. gombo* ont été recueillies en mai 2010 de la région de M'Sila. La plante a été identifiée par Dr. Sarri (Université de M'Sila, Algérie). Les feuilles et les fruits ont été coupés en petits morceaux et séchés dans un endroit aéré et loin des rayons solaires et de l'humidité puis pesés.

III-1-5-2 : Extraction

Une masse de 600 g du matériel végétal (feuilles et fruits) est mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution obtenue, on ajoute sous agitation magnétique 180 ml d'eau distillée jusqu'à disparition de la coloration verte au profit d'une coloration marron. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette dernière permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc....

Après filtration on obtient une solution aqueuse de coloration rouge brune. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante. Le filtrat est épuisé, en premier par le chloroforme et la phase organique obtenue est séchée par le

Na₂SO₄ anhydre, filtrée puis concentrée à sec à une température n'excédant pas 35°C et donne une masse de 1,2 g de l'extrait chloroforme.

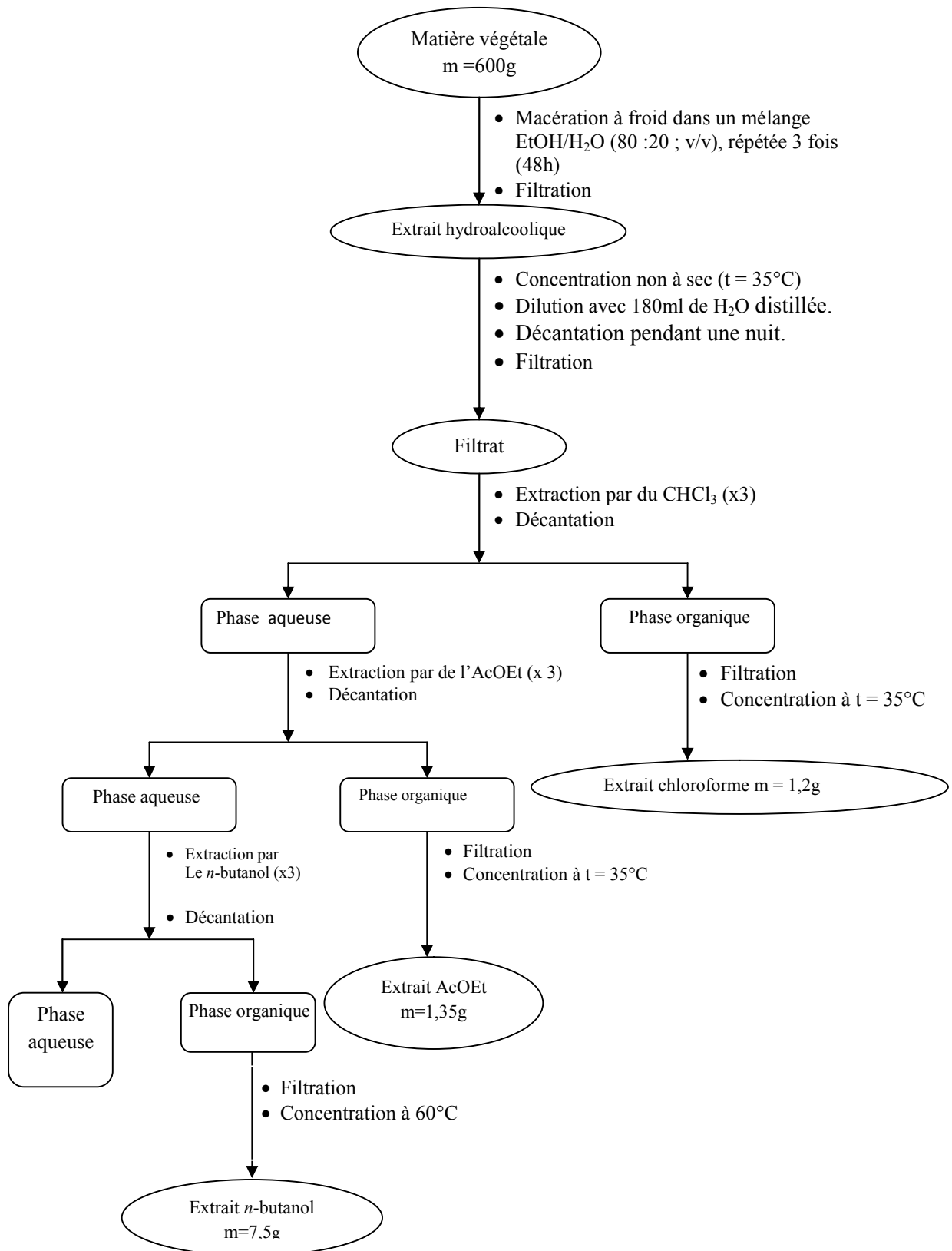
La phase aqueuse résiduelle est reprise avec l'acétate d'éthyle. La phase organique séchée par le Na₂SO₄ anhydre est filtrée puis concentrée à sec, donne un extrait de masse 1,35 g. Finalement en suivant la même procédure avec du *n*-butanol, on obtient un extrait de masse 7,5 g.

Le tableau III-1 rassemble les valeurs des rendements de l'extraction.

Tableau III-1 : Rendements de l'extraction

L'extrait	masse (g)	rendement (%)
CHCl ₃	1,2	0,2
AcOEt	1,35	0,225
<i>n</i> -Butanol	7,5	1,25

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme présenté dans le schéma III-2.



Shéma III-2: Différentes étapes du processus d'extraction

III-1-5-3 : Séparation chromatographique des composants de l'extrait *n*-butanol

Les trois extraits ont été soumis à des tests chromatographiques en utilisant essentiellement la chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluion qui donnerait les meilleures séparations. Les résultats de ces travaux ont montré une richesse importante de tous les extraits et vu la faible quantité des deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle, notre choix a porté sur l'extrait *n*-butanol.

Une masse de 7 g de ce dernier est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merk), préparée dans le chloroforme, l'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme/méthanol, en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de cette colonne est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 03 min à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-2.

Tableau III – 2 : La progression de la colonne de l'extrait *n*-butanol.

Lots de fraction	Fraction N°	MeOH%	Masse (mg)	Remarques
1-7	1	0	8,7	Une tache bleue
08-13	2	0	3	Deux taches bleues
14-19	3	0	1	Trois taches bleues
20-26	4	0	2	Trois taches bleues et une tache jaune
27-28	5	1	0,5	Mélange complexe
29-31	6	1	6	Mélange complexe
32-34	7	1	5	Mélange complexe
35-53	8	1	6	Mélange complexe
54	9	1	4	Mélange complexe
55-58	10	1	3	Mélange complexe
59-61	11	1	2	Mélange complexe
62-64	12	1	2	Mélange complexe
65-76	13	1	4	Mélange complexe
77-88	14	1	7	Mélange complexe
89-121	15	1	5	Mélange complexe
122-141	16	1	15	Mélange complexe
142-153	17	4	10	Mélange complexe
154-162	18	4	16	Mélange complexe
163-172	19	4	210	Mélange complexe
173-180	20	4	210	Mélange complexe
181-189	21	4	150	Mélange complexe
190-209	22	4	95	Mélange complexe
210-215	23	4	84	Mélange complexe
216-220	24	4	99	Mélange complexe
221-230	25	4	32	Mélange complexe
231-238	26	4	41	Mélange complexe
239-246	27	4	77	Mélange complexe
247-260	28	8	50	Mélange complexe
261-270	29	8	50	Mélange complexe
271-292	30	8	140	Mélange complexe

Tableau III – 2 : La progression de la colonne de l'extrait *n*-butanol. (suite)

293-309	31	10	330	Mélange complexe
310-327	32	10	352	Mélange complexe
328-353	33	10	255	Mélange complexe
354-373	34	10	322	Mélange complexe
374-392	35	20	330	Mélange complexe
393-416	36	20	280	Mélange complexe
417-422	37	20	200	Formation d'un précipité jaune
423-445	38	25	300	Mélange séparable
446-452	39	25	280	Mélange complexe
453-463	40	25	376	Mélange complexe
464-490	41	30	350	Mélange complexe
491-540	42	45	386	Mélange séparable
541-555	43	60	599	Mélange complexe
556-600	44	100	490	Mélange complexe

La recherche du meilleur éluant en combinant deux ou trois solvants avec différentes proportions a été très difficile vue la complexité du profil chromatographique de la majorité des fractions. Seules les fractions F_{37} , F_{38} et F_{42} ont été traitées.

III-1-5-3-a La Fraction F_{37} :

La fraction F_{37} (100 mg) contient un précipité jaune qui a été récupéré par filtration puis rincé avec de l'acétone pour obtenir un produit propre sous forme d'une poudre jaune nommé P_{37} de masse 5,2 mg.

III-1-5-3-b La Fraction F_{38} :

La chromatographie en phase normale s'est avérée insuffisante pour la séparation de la fraction F_{38} malgré sa simplicité, alors nous avons essayé la séparation par chromatographie en phase inverse. La fraction F_{38} (300 mg) a subi une séparation sur une colonne en phase inverse en utilisant le gel de silice greffée C-8 préparé dans le méthanol. L'éluion est réalisé par un gradient de polarité du système eau/méthanol, en commençant par les proportions 8/2 et avec un fractionnement tous les 20 ml.

Le suivi de cette colonne est réalisé par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 03 min à 100°C. Les résultats obtenus de la re-chromatographie de la fraction F_{38} sont enregistrés dans le tableau III – 3.

Tableau III.3 : Résultats de la séparation par chromatographie en phase inverse de la fraction F₃₈

Fraction N°	Lot de fraction	Système d'élution		Remarque	Masse (mg)
		Eau%	Méthanol%		
F1	1	80	20	Mélange complexe	50
F2	2	80	20	Mélange complexe	90,6
F3	3	80	20	Mélange	14,6
F4	4-5	80	20	Mélange	11,6
F5	6-10	80	20	Mélange	14,8
F6	11-20	60	40	Mélange	19
F7	21-26	60	40	Mélange	7
F8	27-36	60	40	Mélange	2,2
F9	37-38	40	60	Mélange	0,9
F10	39-45	40	60	Mélange	3
F11	46-48	40	60	Mélange	0,9
F12	49	40	60	Produit monotache	13,4
F13	50-53	20	80	Mélange	7,2
F14	54	20	80	Mélange	0,8
F15	55	20	80	Mélange	5,4
F16	56-57	20	80	Mélange	4,2
F17	58-61	20	80	Mélange	10,9
F18	62-63	0	100	Mélange	11,3
F19	64-81	0	100	Mélange	15,6
F20	82-90	0	100	Mélange	10,1

Cette étape a permis l'obtention du produit F₃₈₋₁₂ sous forme d'une monotache de masse 13,4mg.

III-1-5-3-c La Fraction F₄₂

Comme la fraction F₃₈, la fraction F₄₂ a été testée sur deux plaques greffées, l'une en C₁₈ et l'autre en C₈ et la meilleure séparation a été obtenue avec la plaque greffée en C₈.

Une masse de 386 mg de la fraction F₄₂ a subi une séparation sur une colonne de phase inverse avec le gel de silice greffée en C₈ (RP-8), comme phase stationnaire, préparé dans le méthanol.

L'élution est réalisé avec un gradient de polarité du système eau/méthanol, en commençant par eau/méthanol (8/2) et un fractionnement tous les 20 ml. Le suivi de cette colonne est réalisé par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 03 min à 100°C. Les résultats de cette colonne sont enregistrés dans le tableau III-4.

Tableau III-4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F₄₂.

N° Fraction	Lot de fractions	Système d'éluant		Remarques	Masse (mg)
		Eau%	Méthanol %		
F1	1-6	80	20	Mélange complexe	99,9
F2	7-9	80	20	Mélange complexe	100
F3	10	80	20	Mélange	5
F4	11	60	40	Produit pur	7
F5	12	60	40	Mélange	6
F6	13	60	40	Mélange	3
F7	14-17	60	40	Mélange	13
F8	18-21	60	40	Mélange	0,9
F9	22	40	60	Mélange	9
F10	23	40	60	Mélange	0,7
F11	24-25	40	60	Mélange de deux produits	15
F12	26-28	40	60	Mélange	10,6
F13	29	40	60	Mélange	8
F14	30-33	40	60	Mélange	3,5
F15	34	20	80	Mélange	4,7
F16	35-36	20	80	Mélange complexe	3,5
F17	37-39	20	80	Mélange complexe	2,8
F18	40-49	20	80	Mélange complexe	9,2
F19	50-59	0	100	Mélange complexe	10,6
F20	60-70	0	100	Mélange complexe	13,4

La sous fraction F₄₂₋₄ donne une monotache. La pureté de ce composé a été confirmée par une rechromatographie sur une plaque CCM en utilisant la phase organique du système éluant CHCl₃/MeOH /H₂O (13 : 7 : 3).

De même la sous fraction F₄₂₋₁₁ a subi une séparation sur plaque de gel de silice normale en utilisant le même système éluant que précédemment pour donner deux produits F₄₂₋₁₁₋₁ de masse 3 mg et F₄₂₋₁₁₋₂ de masse 4.2 mg.

L'organigramme présenté dans le schéma III-2 résume l'ensemble des résultats obtenus.

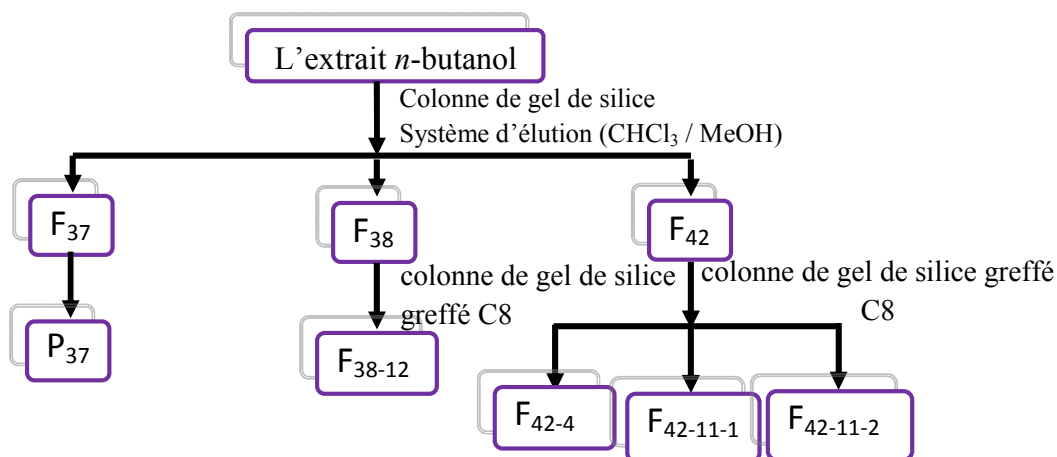


Schéma III-3: Organigramme résumant les résultats obtenus

Un teste de purification des prouduits isolés de l'espèce *Astragalus gombo* à montré que le P₃₇ est identique au prouduit F₄₂₋₄

III-2- Etude phytochimique de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* Desf.

III-2-1 : Choix du matériel végétal

Les résultats obtenus au cours des travaux phytochimiques réalisées sur quelques espèces du genre *Genista*, au sein du laboratoire de l'unité de recherche VARENBIOMOL, ont montré la richesse de ce genre en métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes réputés d'avoir diverses propriétés pharmacologiques. Ceci nous a encouragés à entreprendre ce travail phytochimique sur l'espèce *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* qui d'après plusieurs recherches bibliographiques, il semble que cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude chimique ni biologique à ce jour.

III-2-2 : Place dans la systématique

Règne	═══════════>	Plante
Embranchement	═══════════>	Spermatophytes
Sous Embranchement	═══════════>	Angiospermes
Classe	═══════════>	Dicotylédones
Sous classe	═══════════>	Rosidae
Ordre	═══════════>	Fabales
Famille	═══════════>	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille	═══════════>	Faboideae
Genre	═══════════>	<i>Genista</i>
Espèce	═══════════>	<i>G. cinerea</i> ssp. <i>ramosissima</i>

III-2-3: Description botanique

D'après Quezel et Santa (1962) [3], Il existe deux sous espèces de *G. cinerea* DC. La première est la sous-espèce *G. cinerea* Maire et la seconde c'est la sous espèce *ramosissima* Desf. (Maire). La sous espèce *G. ramosissima*, sujet de notre travail se trouve sous forme d'un arbuste de 1,5-2 m avec fleurs longues de 14-17 mm et gousses à pubescence fauve.



Schéma III-4 : Photo de *Genista cinerea* ssp. *ramosissima*

III-2-4 : Protocole expérimentale

III-2-4-1 : Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *G. cinerea* ssp. *ramosissima* ont été recueillies en Avril 2012 de la région de Ibn Ziad près de Constantine. La plante a été identifiée par Dr. Sarri (Université de M'Sila, Algérie).

III-2-4-2 : Extraction

Le matériel végétal, après avoir été séché à l'ombre, a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau) dans les proportions (80/20 ; v/v) pendant 48 heures. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les 3 extraits hydroéthanoliques sont réunis, concentrés à une température n'excédant pas 35 °C.

A la solution concentrée obtenue on ajoute 480 ml de l'eau distillée, laissée au repos pendant une nuit pour décantation, la solution est filtrée à l'aide d'un Büchner.

Le filtrat obtenu a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Durant l'extraction avec le *n*-butanol, une quantité importante de précipité s'est formée. Ce dernier a été séparé de la phase aqueuse par simple décantation puis pesé.

Le précipité de masse 30 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice (CCM) avec comme éluant la phase organique du système CHCl_3 /MeOH/eau (14 :7 :4). Cette étape a donnée deux bandes de concentrations importantes et de fluorescence noire-violette sous la lumière de Wood (365nm). Les deux bandes ont été récupérées, filtrées puis testées sur plaque CCM pour donner deux produits propres nommés respectivement C1 (8mg) et C2 (10mg).

Les trois phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite.

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma III-5

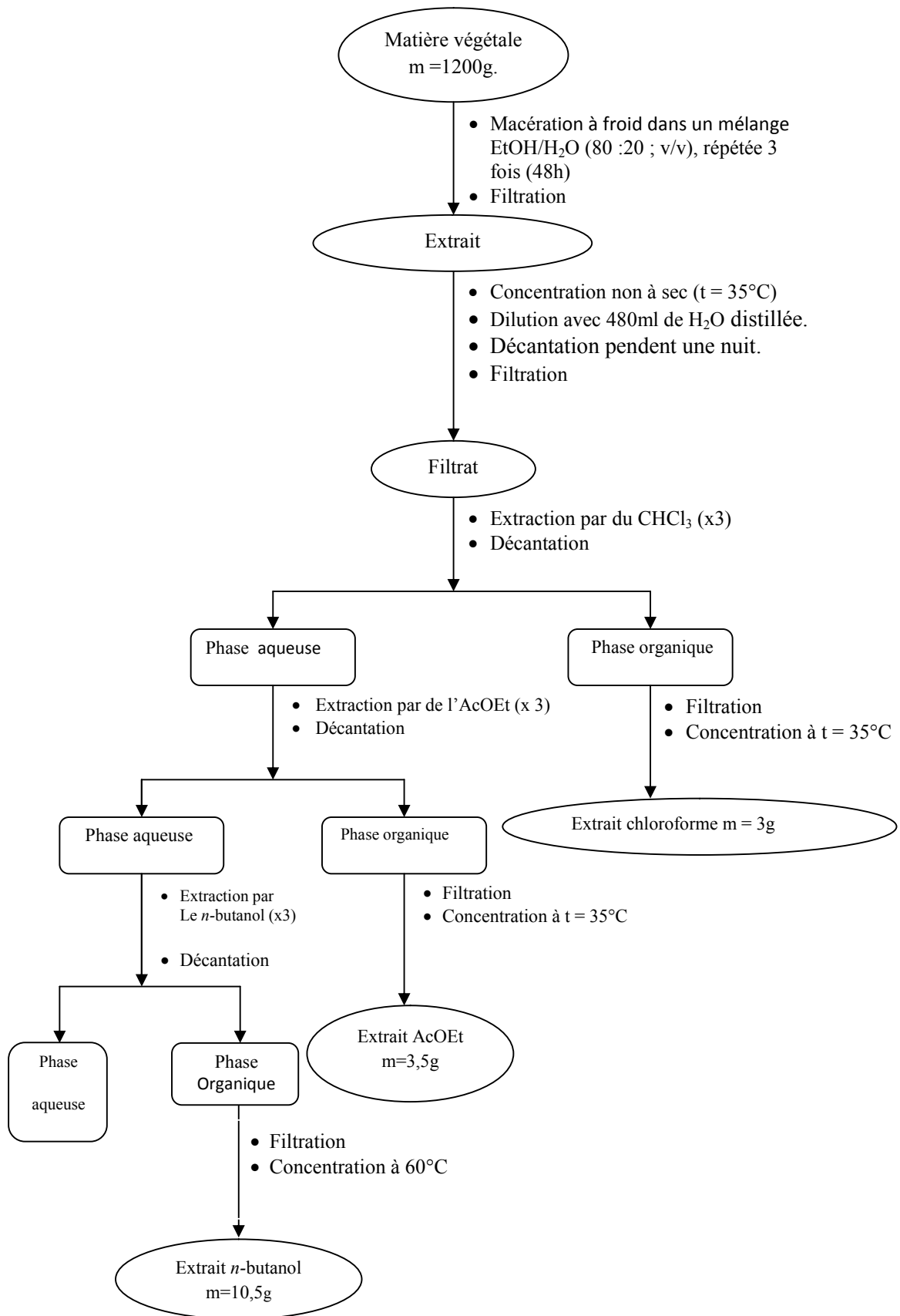


Schéma III-5: Organigramme expliquant les étapes d'extraction de *G. cinerea* ssp. *ramosissima*

III-2-4-3 : Séparation chromatographique des composants de l'extrait *n*-butanol

La formation d'un précipité au cours de la concentration de la phase *n*-butanol ainsi que sa quantité relativement importante par rapport aux deux autres extraits nous a encouragées à choisir cet extrait pour notre étude.

Une masse de 8 g de l'extrait *n*-butanol est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merk), préparée dans le chloroforme, l'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme/méthanol, en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 200 ml. Le suivi de cette colonne est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 03 min à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III- 5.

Tableau III-5: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol

N° Fraction	Lot de fractions	Système d'élution		Remarques	Masse (mg)
		CHCl ₃ %	MeOH%		
F1	1-20	100	0	Mélange	139
F2	21-40	98	2	Mélange	350
F3	41-60	96	4	Mélange	368
F4	61-80	83	7	Mélange	546
F5	81-100	80	10	Mélange	620
F6	101-120	78	12	Mélange	450
F7	121-140	75	15	Mélange	600
F8	141-160	80	20	Mélange séparable	1000
F9	161-180	70	30	Mélange séparable	2000
F10	181-200	60	40	Mélange complexe	1500

Parmi les 10 fractions obtenues, les fractions F8 et F9 ont un profil chromatographique très similaire et comporte deux produits majoritaires. Notre choix a porté sur la fraction F9 à cause de son poids important.

III-2-4-3-a L'étude de la fraction F9

La séparation de la fraction F9 a été effectuée sur papier Whatman III, élue par le système aqueux acide acétique (20%), puis visualisée sous la lampe UV (365nm). Cette étape a permis l'obtention de cinq bandes, parmi lesquelles trois ont été d'une coloration noire-violette. Ces dernières ont été recueillies, coupées en petits morceaux, dissoutes dans le méthanol puis

filtrées et pesées. Cette séparation a permis l'obtention de trois produits purs F9-1 (1 mg), F9-2 (4mg) et F9-3 (4,5mg).

Un teste de purification des prouduits isolés de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* à montré que le C₁ est identique au prouduit F₉₋₂, de même C₂ est identique au prouduit F₉₋₃.

Il avéré que les deux produits sont majoritaires dans l'extrait *n*-butanol

III-2-5 Etude biologique de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* Desf.

III-2-5-1 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

III-2-5-1a Dosage des polyphénols totaux

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux contenu dans l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu, ce réactif est formé d'acide phosphomolibdique H₃PMo₁₂O₄₀ et d'acide posphotungstique H₃PW₁₂O₄₀ qui est réduit par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₂₃ [5].

Les phénols sont estimés par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde $\lambda = 765$ nm en utilisant l'acide gallique comme référence.

✓ Le protocole [6]

- Une solution mère d'acide gallique a été préparé avec une concentration de 1mg/ml (1000 µg /ml) à partir de laquelle on a préparé une série de solutions filles de 10 ml de concentrations (50, 75, 150, 300 µg/ml). Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir de ces solutions filles d'acide gallique.
- 1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 7,5 ml d'eau distillée.
- Après agitation puis repos pendant 10 minutes, un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 10% a été ajouté.
- Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les absorbances obtenues avec les solutions filles d'acide gallique ont permis d'établir la courbe d'étalonnage.
- Les extraits à doser ont été préparés de la même manière et dans les mêmes conditions que la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, chaque concentration est répétée trois fois et l'absorbance est lue à 765 nm.

Les concentrations de ces extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

III-2-5-1b Dosage des flavonoïdes

Dans cette méthode on utilise le chlorure d'aluminium (AlCl_3), ce réactif forme un complexe avec le flavonoïde très stable, de couleur jaune, avec les groupements hydroxyles (OH) et absorbe à une longueur d'onde de 430 nm.

Les flavonoïdes sont estimés par spectrophotométrie UV, dont la quercétine est utilisée comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 430 \text{ nm}$ [6].

✓ Le protocole

A partir de la solution mère de la quercétine (utilisée comme étalon) préparée dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml, des solutions filles de différentes concentrations (50, 150, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$) ont été préparées.

- 1ml de chaque solution de quercétine ou de l'extrait est introduit dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 5 ml d'eau distillée et 0,3 ml de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5%.
- Après repos de 5 minutes, 0,6ml d' AlCl_3 sont ajoutés.
- Après repos de 5 minutes encore une fois, un volume de 2ml de $\text{NaOH}(1\text{N})$ est additionné et la solution est complétée jusqu'à 10ml avec de l'eau distillée.
- Après agitation, la lecture de l'absorbance a été faite au moyen du spectrophotomètre à 430 nm. Les absorbances obtenues avec les solutions filles de quercétine ont permis d'établir la courbe d'étalonnage.
- Les extraits à doser ont été préparé de la même manière et dans les mêmes conditions que la courbe d'étalonnage de quercétine, chaque concentration est répétée trois fois et l'absorbance est lue à 430 nm.

Les concentrations de ces extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la quercétine et sont exprimées en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

III-2-5-2 Test de piégeage du radical libre DPPH

III-2-5-2a Introduction

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine

C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et superoxydes (O2•).

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [7-8]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote Schéma III-6 Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH•.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

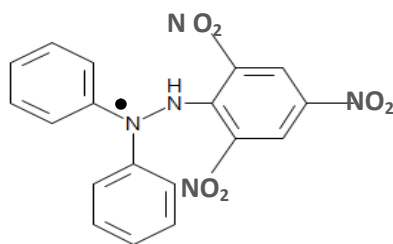


Schéma III-6: Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

III-2-5-2b Préparation de la DPPH

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

III-2-5-2c Procédure:

Dans une cuve on met 160 µl (solution de DPPH) + 40 µl (extrait), la lecture est réalisée à 517nm dans le spectrophotomètre.

Les mesures de l'absorbance du DPPH de nos extraits permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant l'équation suivante [9].

$$I(\%) = [(Abs\ contrôle - Abs\ échant) / Abs\ contrôle] * 100$$

- I(%) : Pourcentage d'inhibition.
- Abs contrôle : absorbance de contrôle négatif.

Abs échant : absorbance de l'échantillon (nos extraits).

III-3- Etude chimique de l'espèce Cistanche violacea

III-3-1 : Etude bibliographique

La recherche bibliographique menée sur les travaux effectués sur les espèces du genre *Cistanche* a montré que l'espèce *Cistanche violacea* n'a jamais fait objet d'étude de ce type.

III-3-2 : Place dans la systématique

Règne	=====>	Plante
Sous règne	=====>	Tracheobionta
Sous Embranchement	=====>	Angiospermes
Classe	=====>	Magnoliopsidas
Sous classe	=====>	Asteridae
Ordre	=====>	Scrophulariales
Famille	=====>	Oranbanchaceae
Genre	=====>	<i>Cistanche</i>
Espèce	=====>	<i>Cistanche violacea</i> Desf.

III-3-3 : Description botanique

Corolle violette munie de 2 plis jaunâtres à la gorge. Bractées et bractéoles glabres. Etamines insérées au-dessous du milieu du tube. Capsule au moins aussi longue que le calice, celui-ci de 15-18 mm [10]. Espèce parasite sur les Chénopodiacées et les *Limoniastrum* [10].



Schéma III-7 : Photo de Cistanche violacea Desf.

III-3-4 : Protocole expérimentale

III-3-4-1 : Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *C. violacea* ont été recueillies au mois d'Avril 2011 de la région de Bechar au sud-ouest de l'Algérie. La plante a été identifiée par M. Benabdelhakem (Directeur

de l'agence nationale de préservation des ressources naturelles, Bechar, Algérie). Un spécimen avec le numéro d'identification OCV/04/2011 était déposé à l'Herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université des frères Mentouri Constantine 1.

III-3-4-2 : Extraction

Une masse de 300g du matériel végétal (fruits et feuilles) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol /Eau ; 80 :20 ; v /v) à température ambiante pendant 48 heures. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les trois extraits hydroalcoolique récupérés sont concentrés à une température n'excédant pas 35°C et sous pression réduite.

A la solution concentrée obtenue, on ajoute 120 ml d'eau distillée, la solution obtenue laissée au repos pendant une nuit pour décantation. Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les trois phases organique ainsi obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont concentrés à sec sous pression réduite puis pesées. Une masse de 0,8 g d'extrait chloroforme, 3,5 g d'extrait acétate d'éthyle, et 18,8 g d'extrait *n*-butanol ont été obtenus.

L'organigramme (Shéma III-8) montre les différentes étapes du processus d'extraction.

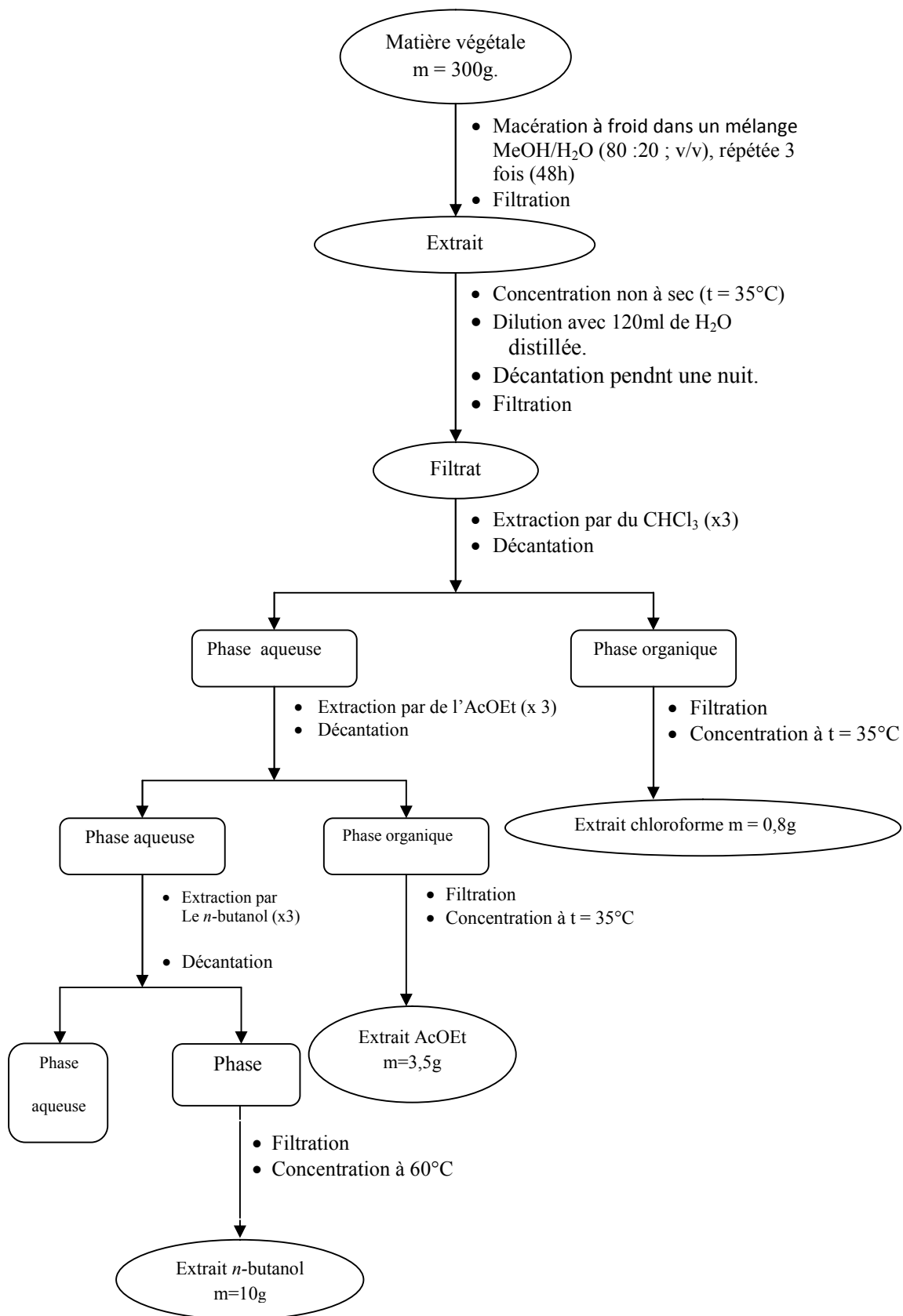


Schéma III-8 : Différentes étapes du processus d'extraction

III-3-4-3 : Séparation chromatographique

III-3-4-3-1 : Séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Pour avoir une idée sur les meilleurs systèmes de séparation, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium en utilisant plusieurs systèmes d'élution, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant Chloroforme/Méthanol (9 :1)

➤ Séparation sur colonne

L'extrait acétate d'éthyle (3,5g) dissout dans le méthanol est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck), préparée dans le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système Chloroforme / Méthanol, en commençant par de chloroforme pur et en terminant par de méthanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium (Merck) qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III -6.

Tableau III -6: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Cistanche violacea*

Lot de fraction	N° Fraction	Système d'élution		Masse (mg)
		CHCl ₃ %	MeOH%	
1-5	F1	100	0	8
6	F2	97	3	12,5
7-8	F3	97	3	15,3
9-14	F4	97	3	47
15-17	F5	95	5	24
18-21	F6	95	5	27,4
22-25	F7	95	5	33,6
26-34	F8	92	8	36,5
35-56	F9	92	8	41,1
57-65	F10	90	10	200
66-76	F11	90	10	74,5
77-89	F12	85	15	227,5
90-96	F13	85	15	251
97-105	F14	80	20	119
106-112	F15	80	20	132
113-118	F16	80	20	267,6

Tableau III -6: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Cistanche violacea* (Suite)

Lot de fraction	N° Fraction	Système d'éluion		Masse (mg)
		CHCl ₃ %	MeOH%	
119-127	F17	70	30	60
128-138	F18	70	30	100
139-147	F19	60	40	365
148-157	F20	60	40	403
158-177	F21	0	100	678

Parmi les 21 fractions obtenues, seules les fractions F5, F6, F7, F12 et F14 ont été soumis à la séparation à cause de leur simplicité et de leur poids. La séparation des fractions F5, F6 et F7 a été effectuée sur couche mince, alors que les fractions F12 et F14 ont subi des séparations sur flash colonne.

III-3-4 -1-a Etude de la fraction F5

La fraction F5 de masse 24 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, éluee une seule fois par le système Hexane/Chloroforme/Isopropanol (7 :1 :2). Après élution et séchage, une partie de la plaque est révélée avec l'anisaldéhyde puis chauffée pendant 3 min à 100°C. Cette opération a permis l'apparition de deux taches, la première de coloration rouge et la seconde de coloration jaune. Sur la base de cette observation, les deux bandes ont été récupérées et les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III-7

Tableau III-7 : Résultats de séparation de la fraction F5

Sous fraction	Remarque	Masse
F5-2	Produit pur	3 mg
F5-3	Produit pur	1,3 mg

III-3-4-3-1-b Etude de la fraction F6

De même que la fraction F₅, la fraction F₆ de masse 27.4 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec comme système éluant hexane / chloroforme / isopropanol (7: 1: 2), puis visualisée sous la lampe UV (254, 365nm) a permis l'observation de trois bandes de couleur bleue pale. La révélation d'une partie de la plaque avec l'anisaldéhyde puis chauffage pendant 03 mm à 100°C a permis l'apparition d'une coloration marron sur l'une des trois bandes précédentes permettant après séparation, l'obtention d'un produit nommé F₆₋₃ de masse 3mg.

III-3-4-3-1-c Etude de la fraction F₇

La fraction F₇ de masse 33,6 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec le même système précédent, la visualisation sous la lampe UV (365nm) montre la présence de cinq bandes. Sur la base de cette observation nous avons dessinés les cinq bandes. La révélation d'une partie de la plaque avec l'anisaldéhyde puis chauffage pendant 03 mm à 100°C a permis l'apparition d'une coloration marron de deux bandes sur les cinq précédentes permettant après séparation l'obtention de deux produits (F₇₋₁) de masse 4mg et (F₇₋₃) 3mg respectivement. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III-8:

Tableau III-8: Résultat de la séparation de la fraction F7.

Sous fraction	Remarque	masse (mg)
F ₇₋₁	Produit pur	2.5
F ₇₋₂	Mélange	3
F ₇₋₃	Produit pur	3
F ₇₋₄	Mélange	2
F ₇₋₅	Mélange	4

Un test de purification a montré que les produits F6-3 et F7-1 sont identiques.

III-3-4-3-1-d Etude de la fraction F₁₂

La fraction F₁₂ de masse 24 mg a subi une séparation sur flash colonne de gel de silice (230-400mesh) éluées par la phase organique du système CHCl₃/MeOH/H₂O (13:7:3) pour donner le composé F₁₂₋₇ (15 mg).

III-3-4-3-1-e Etude de la fraction F₁₄:

Environ 251 mg de la fraction F₁₄ ont été déposés sur une flash colonne de gel de silice (230-400 mesh) avec la phase organique du système CHCl₃/MeOH/H₂O (13:7:3) comme éluant pour obtenir dix sous fractions (F_{14.1}-F_{14.10}). La sous fraction F₁₄₋₇ a subi une autre séparation sur une plaque CCM de gel de silice avec le système AcOEt /MeOH / H₂O (10:1:1) comme éluant pour donner le produit pur F₁₄₋₇₋₃ de masse 6mg et le produit le F₁₄₋₇₋₅ (24 mg)

La sous fraction F₁₄₋₉ a subi une autre séparation sur une plaque CCM de gel de silice avec le système AcOEt/MeOH/H₂O (10:1:1) pour donner le produit F₁₄₋₉₋₂.

L'organigramme résumant les résultats obtenus est rapporté dans le schéma III-9

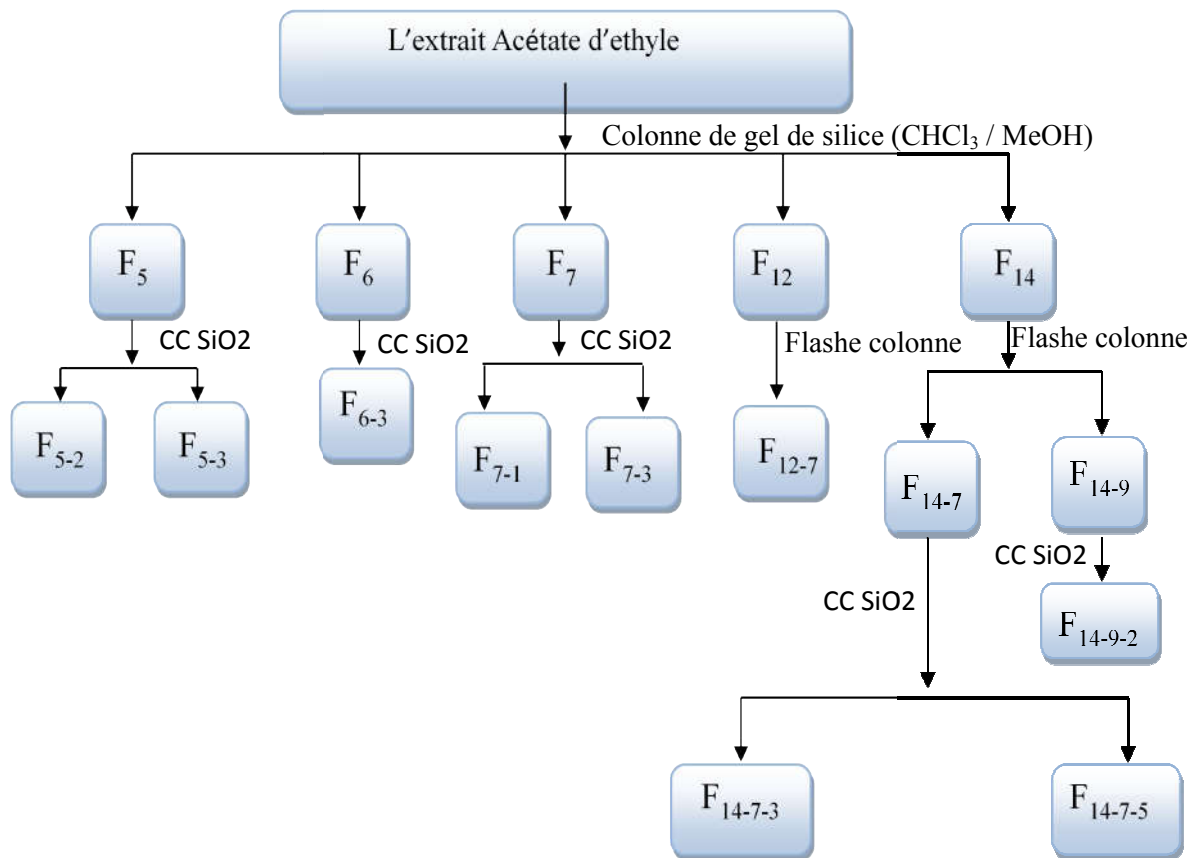


Schéma III-9: Organigramme résumant les résultats obtenus

III-3-5-3b : Séparation et purification de l'extrait *n*-butanol

Une masse de 8 g de l'extrait *n*-butanol a été déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisée par un gradient de polarité du système Chloroforme/ Methanol en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le methanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C.

A l'issue de ce fractionnement, 22 fractions (F1 à F22) ont été recueillies et sont rassemblées dans le tableau III.9.

Tableau III.9: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *Cistanche violacea*

Lot de fraction	N° Fraction	Système d'éluion		Masse (mg)
		CHCl ₃ %	MeOH%	
1-20	1	100	0	19
21-41	2	97	3	47
42-56	3	94	6	79
57-62	4	94	6	39
63-73	5	91	9	74,5
74-82	6	91	9	125
83-93	7	88	12	108
94-104	8	88	12	288,2
105-116	9	85	15	279,7
117-125	10	85	15	258
126-135	11	82	18	302
136-146	12	82	18	365
147-156	13	82	18	387
157-166	14	82	20	398
267-277	15	80	20	455,2
278-297	16	60	40	467,6
298-307	17	55	45	376
308-318	18	55	45	647
319-339	19	50	50	834
340-360	20	40	60	969
361-381	21	20	80	870
382-402	22	0	100	1027

Parmi les 22 fractions obtenues, seules les fractions F₃, F₆ et F₇ ont été traités à cause de leur simplicité. Les trois fractions ont subi une séparation sur couche mince avec le même système éluant hexane / chloroforme / isopropanol (7 : 1 : 2) pour obtenir les produits F₆₋₃, F₇₋₁, F₃₋₁, F₃₋₂ et F₃₋₃.

Nous n'avons pu obtenir la série spectrale de ces composés jusqu'à ce jour.

III-3-4 : activité anti-inflammatoire In vitro

III-3-4-1 La méthode de stabilisation de la membrane (HRBC)

Le principe impliqué ici est la stabilisation de la membrane HRBC induite par hypo-toncité. Le sang recueilli a été mélangé avec un volume égal de solution d'alsever stérilisée (2% dextrose, 0.8% citrate de sodium, 0.05% acid citrique et 0.42% chlorure de sodium dans l'eau).

Le mélange était centrifugé à 3000 tr / min et les cellules tassées ont été lavées avec de l'isosaline (0,85%, pH 7,2). Le dosage du mélange contenait l'extrait de *C. violacea* (0,5 ml, 50-

1000 µg / ml) / le standard diclofénac de sodium (0.5 ml; 50, 100, 200µg/ml), 1 ml de tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4), 2 ml d'hyposaline (0,36%), 0,5 ml de suspension HRBC, ont été incubés à 37°C pendant 30 min et centrifugés pendant 20min à 3000 tr / min. La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm. Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été pris comme 100%. La stabilisation ou la protection de la membrane (HRBC) a été calculée à l'aide de la formule suivante:

% Stabilisation = 100 - [(A₁ (échantillon / standard) / A₀ (contrôle) x 100], où A₀ était l'absorbance de la réaction témoin et A₁ était l'absorbance en présence de l'échantillon / le standard (Diclofénac de sodium).

III-3-4-2 L'inhibition de la dénaturation de l'albumine:

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été testée en utilisant le procédé de Misushima et Kobayashi [11]. Le mélange réactionnel se constitue de:

- 50-500 µg/ml d'extrait acétate de la *C. violacea*.
- (0.5-10 µM) du composé (A) : (+) – asteriscunolide A ou du composé (M) : l'acide ester méthylique pulicaroïque.
- Et d'une solution aqueuse à 01% d'albumine de sérum de bovin (ABS).
- Le pH du mélange réactionnel est ajusté à 6.3 avec HCl (1N) et les échantillons ont été soumis à une incubation à une température de 37°C pendant 20 min, puis échauffé à 51°C pendant 20min. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée par spectrophotométrie à 660 nm.
- Les résultats ont été comparés a un anti- inflammatoire standard le diclofinac sodique à différentes doses (50, 100, 200µg/ml) et l'inhibition exprime en pourcentage, a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A₀: Absorbance de la réaction témoin ;

A₁: Absorbance de l'échantillon standard le diclofinac sodique .

Tous les essais sont répétés trois fois et les résultats ont été exprimés en tant que moyennes ± écart-type (écart-type)

III-4 Conclusion

- L'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Astragalus gombo* a permis d'isoler et purifier 4 composés dont la détermination structurale de trois composés d'entre eux sera présentée dans le chapitre IV.

- L'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* a permis d'isoler et purifier 3 composés dont l'élucidation structurale de deux d'entre eux sera présentée dans le chapitre IV.

L'activité antioxydant des extraits AcOEt et *n*-butanol de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

- L'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. violacea* a permis d'isoler et purifier 10 composés. La structure de 7 composés sera développée dans le chapitre IV.

L'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. violacea* a été évalué pour son activité anti-inflammatoire en utilisant deux méthodes, la méthode de stabilisation de la membrane HRBC et la méthode de dénaturation de l'albumine. Les résultats seront développés dans le chapitre IV.

Alors que l'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de la même espèce a conduit à l'isolement de 5 composés. Aucune série spectrale n'a pu être obtenue jusqu'à ce jour.

Références

bibliographiques

1. Thèse de doctorat Maamria Leyla Université El-Hadj Lakhdar, Batna.
2. Leyla Maamria, Christophe Long, Hamada Haba, Catherine Lavaud, Audrey Cannac, Mohammed Benkhaled , **2015**, Cycloartane glycosides from *Astragalus gombo* *Phytochemistry Letters*, 11: 286-291.
3. Quezel, P., Santa, S., **1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1–2. Paris. France.
4. benchelah, A. C., Bouziane, H., Make, M., Ouahès, C., **2000**, Fleurs du Sahara. Ibis, Press.
5. chaovabalikit And Worlstar, R.E., (2004), Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties, *Food and Chemical Toxicology*, 69: 67-72.
6. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymol*, 1999; 299:152-178.
7. BLOIS M S., **1958**, Antioxidant determinations by the use of stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
8. BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M E., BERSSET C., **1995**, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. (28): 25- 30.
9. Koleva, V., Beek, T.A., Linssen, J.P.H., (2002), Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochemical Analysis*, 15: 8- 17.
10. Ozenda, P., **1993**, Flore et Végétation du Sahara, Edition Paris, 388.
11. Mizushima, Y., M. Kobayashi, 1968, Interaction of anti-inflammatory drugs with serumproteins, especially with some biologically active proteins, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 20: 169–173.

Chapitre IV

Resultats Et

Discussions

IV-1- Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait n-BuOH de l'espèce *Astragalus gombo*

IV-1-1- Le composé $P_{37} \equiv F_{42-4}$

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol.

Sa fluorescence noire violette sous lumière de Wood (365nm) devient jaune terne après révélation avec de l'ammoniaque, laisse supposer qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol substitué en 3.

L'analyse simultanée des spectres RMN ^1H (figure IV-1) et HSQC (figure IV-2) montre la présence des signaux typique d'un flavonoïde de type kaempférol reconnaissable par :

- Deux signaux sous forme d'un doublet ($J = 9$ Hz) et d'intégration 2H chacun, le premier résonant à δ_{H} 8,03ppm attribuable aux protons H-2' et H-6' et le second à δ_{H} 6,88ppm attribuable aux protons H-3' et H-5'. Cette constatation indique clairement une para-substitution du cycle B. Ces quatre protons corrélient sur le spectre HSQC avec leurs carbones à δ_{C} 132,1ppm et 116,2ppm respectivement.
- Deux autres signaux sous forme de doublet ($J = 2,4$ Hz) d'intégration 1H chacun, le premier résonant à δ_{H} 6,3ppm attribuable à H-8 (δ_{C} 95,5ppm d'après le spectre HSQC) et le second à δ_{H} 6,12ppm attribuable à H-6 (δ_{C} 100,6ppm d'après le spectre HSQC). Ces deux signaux sont caractéristiques d'une substitution en méta du cycle A.

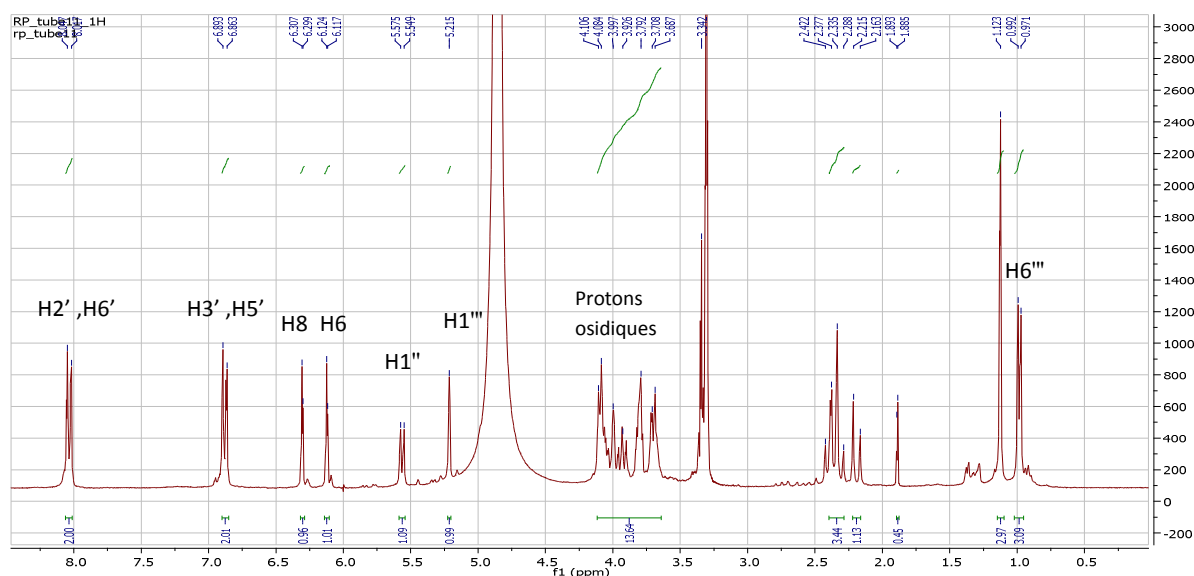


Figure IV-1 : Spectre RMN ^1H (CD₃OD ; 300MHz) du composé F₄₂₋₄

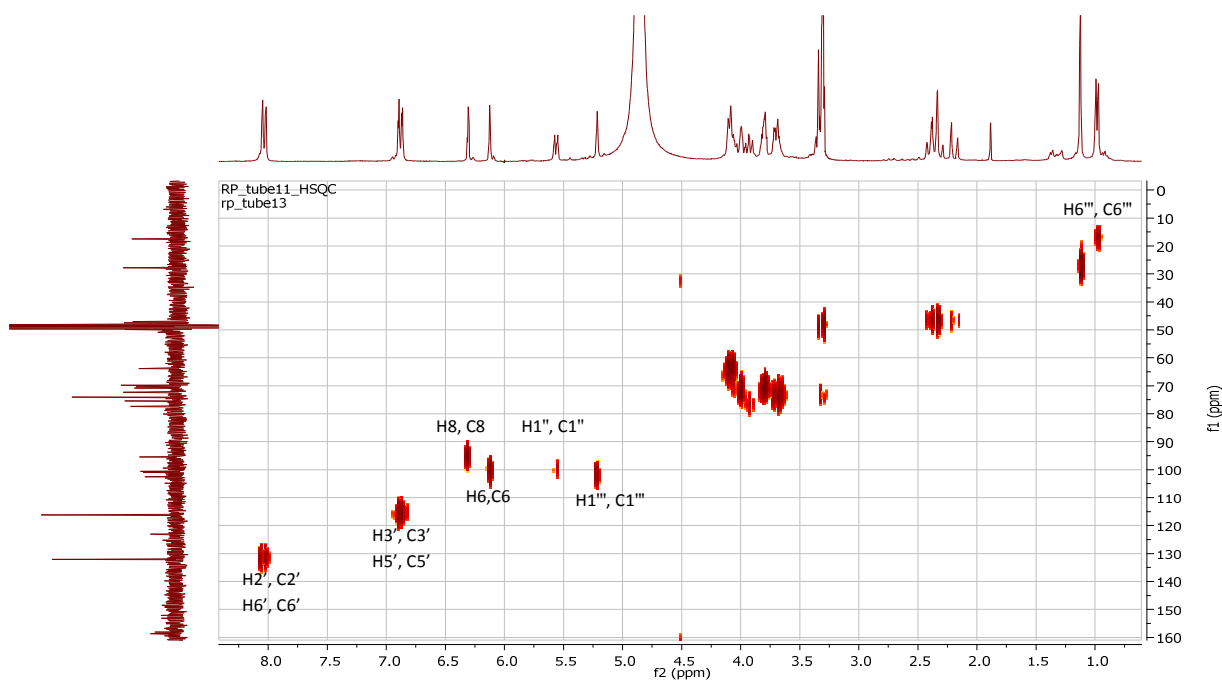


Figure IV-2 : Spectre HSQC du composé F_{42-4}

L'analyse du spectre HMBC (figure IV-3) permet de repérer les carbones quaternaires du squelette flavonique comme suit :

- Les deux protons H2' et H-6' montrent une tâche de corrélation avec le carbone résonant à δ_C 158,1ppm attribuable au carbone C-2.
- Les deux protons H3' et H-5' montrent deux tâches de corrélation, une première avec le carbone résonant à δ_C 123,0ppm attribuable au carbone quaternaire aromatique C-1' et la deuxième à δ_C 161,4ppm qui ne peut être que le carbone quaternaire oxygéné C-4'.
- Le proton H-8 corrèle avec quatre signaux, la première tâche de corrélation apparaît avec le carbone résonant à δ_C 100,6ppm déjà attribué à C-6 (HSQC), la deuxième avec le carbone résonant à δ_C 104,7ppm attribuable au carbone C-10, la troisième avec le carbone à δ_C 158,6ppm qui ne peut être que le C-9 et la dernière tâche avec le carbone résonant à δ_C 168,8ppm attribuable au carbone C-7.
- Le proton H-6 montre une tâche de corrélation avec le carbone résonant à δ_C 163ppm qui ne peut être que le C-5.

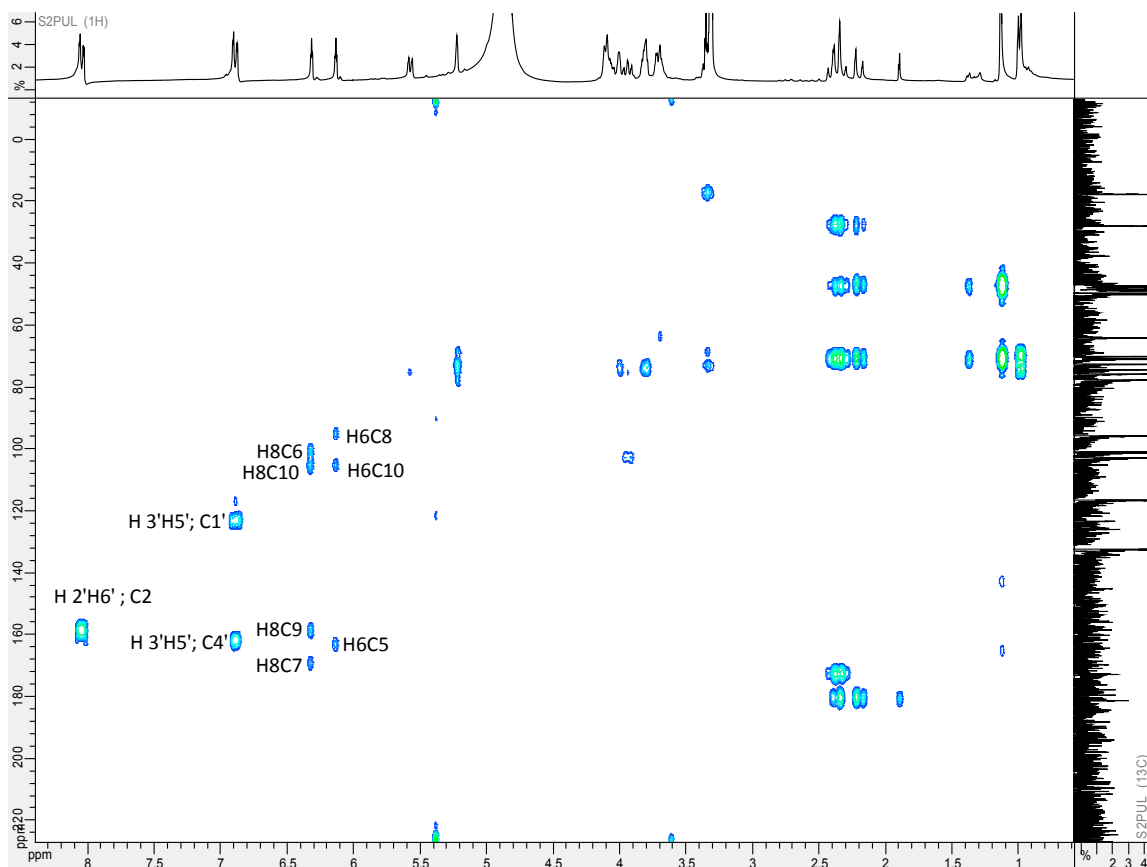


Figure IV-3 : Spectre HMBC du composé F_{42-4}

Toutes ces données sont en faveur d'un squelette flavonoïdique de type kaempférol substitué en position 3 comme le montre la figure IV-4.

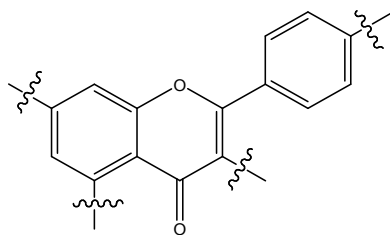


Figure IV-4 : Squelette du kaempférol

Sur le même spectre proton (figure IV-1), on observe également la présence d'autres signaux typiques d'unités osidiques :

- Un premier signal d'intégration 1H sous forme de doublet ($J = 7,8$ Hz) résonant à δ_H 5,56ppm caractéristique du proton anomérique montrant la présence d'une entité sucre de type glucose ou galactose. La valeur du déplacement chimique indique une jonction *O*-

sucres, alors que la valeur de la constante de couplage est en faveur d'une configuration β -osidique.

- Le second signal, également d'intégration 1H sous forme de singulet large à δ_H 5,21 ppm caractéristique du proton anomérique d'un rhamnose. Ceci est confirmé par le signal à δ_H 0,98 ppm d'intégration 3H sous forme de doublet ($J = 6,3\text{Hz}$) typique du groupement CH_3 du rhamnose.
- Un ensemble de signaux très complexe se trouvant dans l'intervalle 3,2-4,1 ppm attribuable aux autres protons osidiques.

L'étude du spectre relatif à l'expérience homonucléaire COSY ^1H - ^1H (figure IV-5) permet de repérer les protons de la partie osidique grâce aux taches de corrélation suivantes :

- Le proton anomérique (d ; $J=7,8\text{Hz}$) de la première entité osidique noté H-1" (δ_H 5,56 ppm) corrèle avec le signal résonant à δ_H 3,92 ppm qui ne peut être que le H-2" (recouvert par d'autres signaux). Ce proton (H-2") montre une tache de corrélation avec le proton résonant à δ_H 3,67 ppm attribuable au proton H-3" (également recouvert par d'autres signaux). Ce même proton montre une tâche de corrélation avec le proton résonant à δ_H 3,79 ppm permettant son attribution au proton H-4" (recouvert par d'autres signaux), ce dernier montre une tâche de corrélation avec le signal à δ_H 3,70 ppm attribuable au proton H-5" (recouvert par d'autres signaux), lequel à son tour montre deux tâches de corrélation avec deux autres signaux, le premier à δ_H 4,07 ppm et le second à δ_H 4,10 ppm (tous deux recouvert par d'autres signaux) attribuables aux deux protons H-6"b et H-6"a respectivement.

Les déplacements chimiques des carbones osidiques sont déduits par analyse du spectre HSQC (figure IV-2-a) comme suit :

- Le proton anomérique H-1" (δ_H 5,56 ppm) avec son carbone C-1" à δ_C 101,0 ppm.
- Le proton H-2" (δ_H 3,92 ppm) avec le carbone C-2" à δ_C 77,4 ppm.
- Le proton H-3" (δ_H 3,67 ppm) avec le carbone C-3" à δ_C 74,1 ppm.
- Le proton H-4" (δ_H 3,79 ppm) avec le carbone C-4" à δ_C 70,4 ppm.
- Le proton H-5" (δ_H 3,70 ppm) avec le carbone C-5" à δ_C 75,5 ppm.
- Les protons H-6"a et H-6"b avec le carbone C-6" à δ_C 63,8 ppm.

Vu le recouvrement de l'ensemble des signaux des protons, la nature du sucre a été déduite par comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce sucre notamment celui

de C-3" (δ_C 74,1ppm) avec ceux de la littérature, cette comparaison suggère qu'il s'agit du D-galactose. En effet, dans le cas du D-glucose le C-3 est plus déblindé (δ_C 78,0ppm) [1].

Un retour au spectre COSY (figure IV-5) et (figure IV-5-a) permet de repérer les protons de la deuxième entité osidique qui n'est autre que le rhamnose grâce aux corrélations suivantes :

- Le proton anomérique du rhamnose noté H-1''' (*s/l*) et le proton résonant à δ_H 3,98ppm qui ne peut être que le H-2'''. Ce dernier (H-2''') corrèle avec le proton résonant δ_H 3,80ppm attribuable au proton H-3''', celui-ci H-3''' montre à son tour une tâche de corrélation avec le proton résonant à δ_H 3,34ppm correspondant au proton H-4''', le même proton corrèle sur le même spectre avec le proton résonant à δ_H 4,03 attribuable au proton H-5''' (l'ensemble de ces signaux se trouvent recouvert par d'autres signaux), et ce dernier corrèle avec le signal du CH₃ (*d*; $J=6,3\text{Hz}$) à δ_H 0,98ppm.

De même, les carbones correspondants aux protons osidiques sont repérés grâce au spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (figure IV-2-a).

- Le proton anomérique H-1''' (δ_H 5,21ppm) avec son carbone C-1''' à δ_C 102,5ppm.
- Le proton H-2''' (δ_H 3,98ppm) avec le carbone C-2''' à δ_C 72,4ppm.
- Le proton H-3''' (δ_H 3,80ppm) avec le carbone C-3''' à δ_C 72,3ppm.
- Le proton H-4''' (δ_H 3,34ppm) avec le carbone C-4''' à δ_C 74,1ppm.
- Le proton H-5''' (δ_H 4,03ppm) avec le carbone C-5''' à δ_C 69,8ppm.
- Les protons CH₃-6''' (δ_H 0,98ppm) avec le carbone C-6''' à δ_C 17,5ppm.

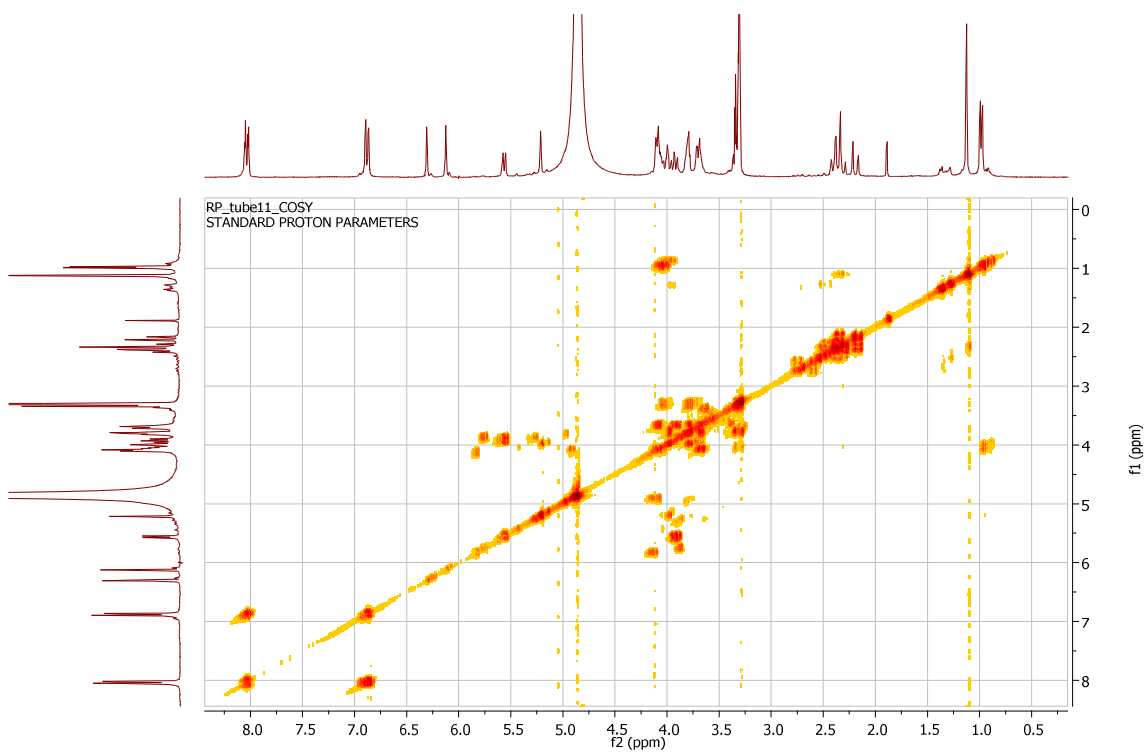


Figure IV-5 : Spectre COSY du composé F₄₂₋₄

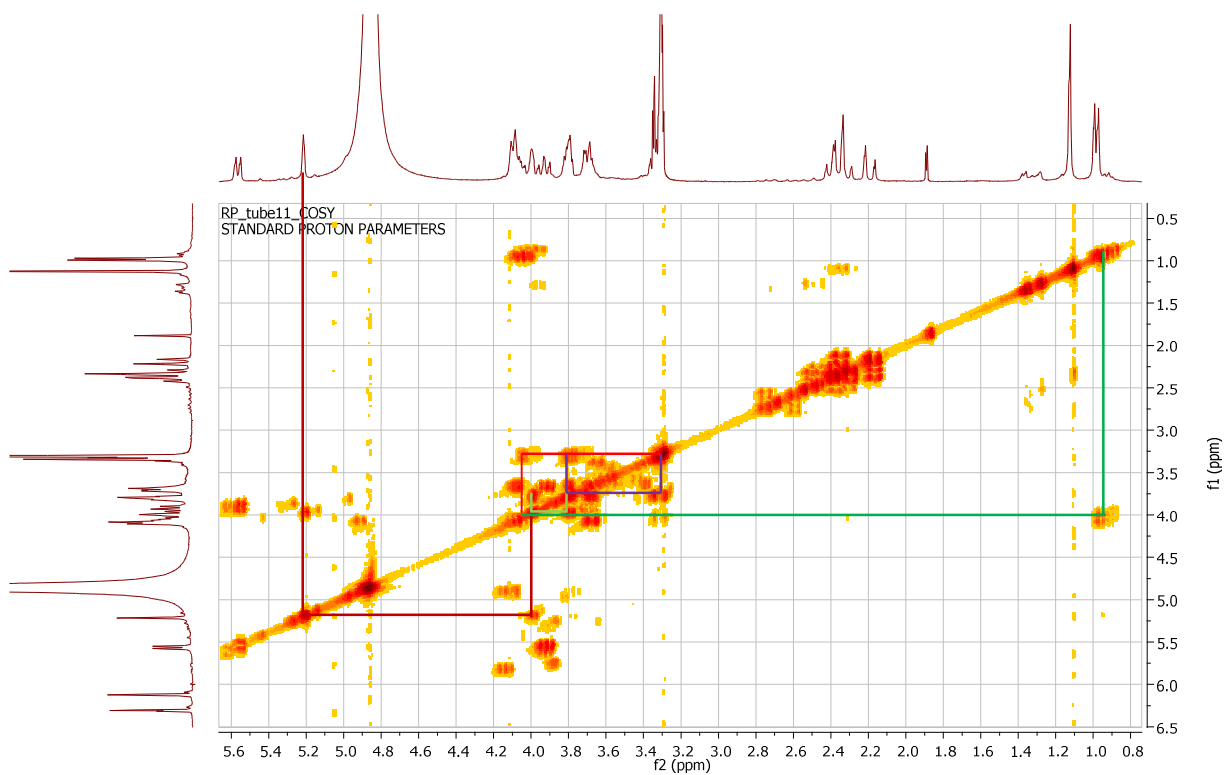


Figure IV-5-a : Spectre COSY étalé du composé F₄₂₋₄

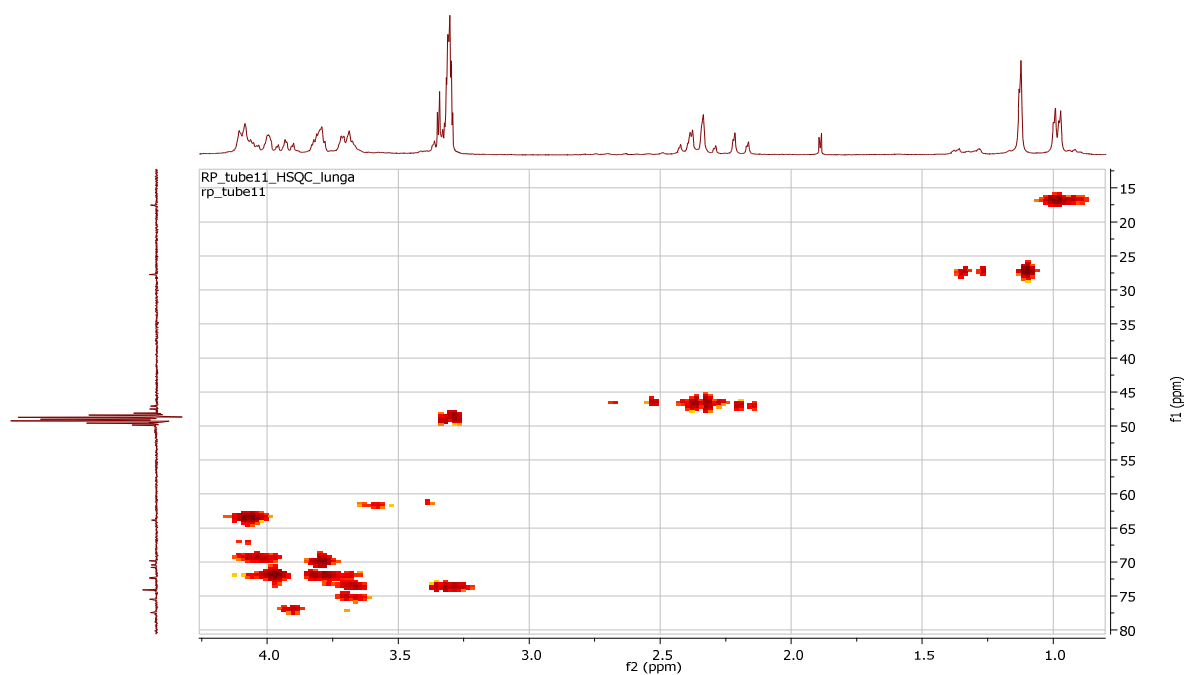


Figure IV-2a : Spectre HSQC étalé du composé F_{42-4}

Un deuxième retour au spectre proton indique la présence d'autres signaux dans la zone 2,1-2,6ppm. L'analyse simultanée des spectres RMN proton (figure IV-1), COSY (figure IV-5), HSQC (figure IV-2) et HMBC (figure IV-3) permet de tirer les constatations suivantes :

- Un signal sous forme d'un doublet ($J=15,4$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 2,19ppm corrèle sur le spectre COSY avec le signal à δ_H 2,36ppm qui apparait sur le spectre RMN proton sous forme de doublet ($J=15,4$ Hz). Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à δ_C 47,1ppm. Cette observation indique que ces deux protons sont diastériotopiques. Ces mêmes protons corrèlent sur le spectre HMBC avec le carbone du carbonyle à δ_C 180ppm. La valeur du déplacement chimique de ce dernier carbonyle montre qu'il s'agit d'un carbonyle d'acide.
- Un signal sous forme de doublet ($J=14,0$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 2,31ppm corrèle sur le spectre COSY avec le signal à δ_H 2,4ppm qui apparait sur le spectre proton sous forme de doublet ($J=14,0$ Hz). Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à 47,5ppm. Cette dernière observation indique que ces deux protons sont également diastériotopiques. Ces mêmes protons corrèlent sur le spectre HMBC avec le carbone du carbonyle à δ_C 172,2ppm attribuable à un carbonyle d'ester.

Ces observations permettent de déduire la présence de deux groupements méthylène et chaque groupement est lié à un groupement carbonyle.

- D'autre part ces quatre protons (les deux groupements méthylène) montrent sur le spectre HMBC quatre tâches de corrélation avec le même carbone quaternaire résonnant à δ_c 70,8ppm. La valeur du déplacement chimique de ce dernier carbone indique qu'il est oxygéné. Ce même carbone montre, sur le même spectre, une tâche de corrélation avec le signal à δ_H 1,12ppm (δ_c 27,7ppm) qui apparaît sur le spectre proton sous forme de singulet d'intégration 3H. Vu son déplacement chimique ainsi que sa multiplicité, ce signal ne peut être qu'un groupement méthyle porté par le carbone quaternaire oxygéné (δ_c 70,8ppm).

L'ensemble de cette dernière analyse permet de proposer la chaîne représentée dans la figure IV-6 ci-dessous.

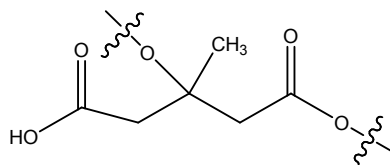


Figure IV-6 : Chaîne présente dans le composé F_{42-4}

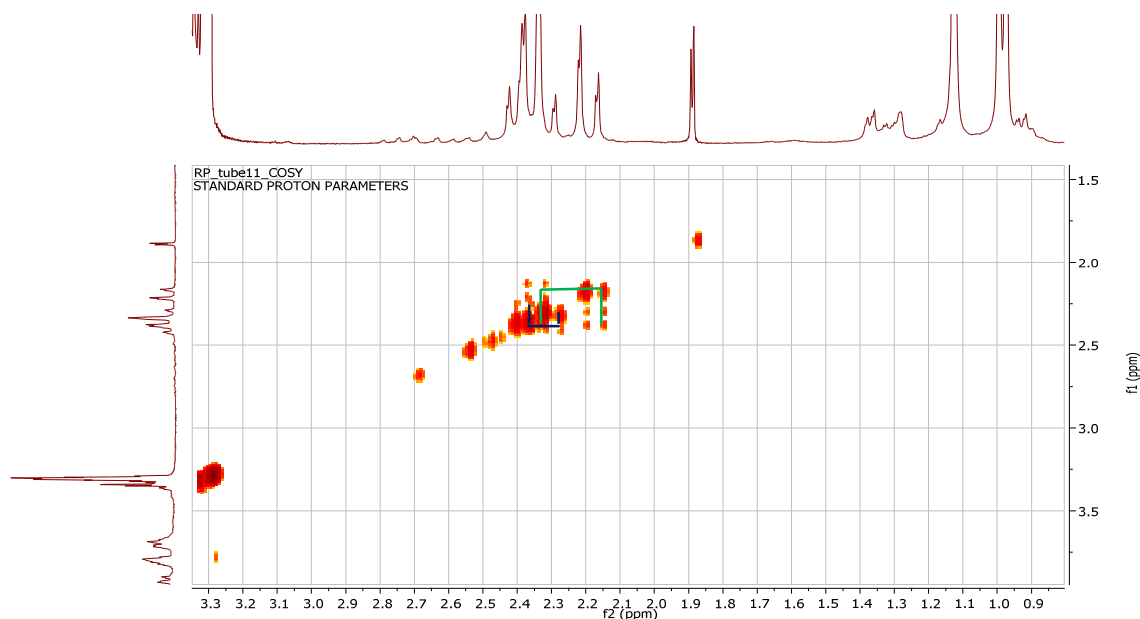


Figure IV-5-b : Spectre COSY étalé du composé F_{42-4}

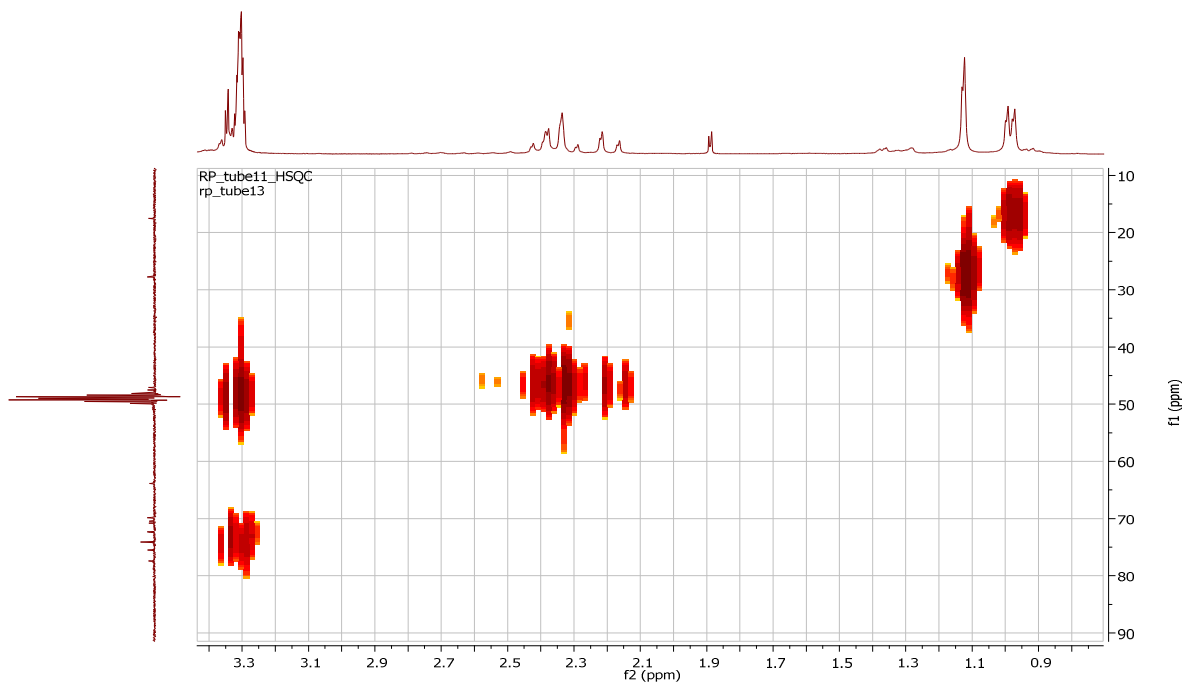


Figure IV-2b : Spectre HSQC étalé du composé F_{42-4}

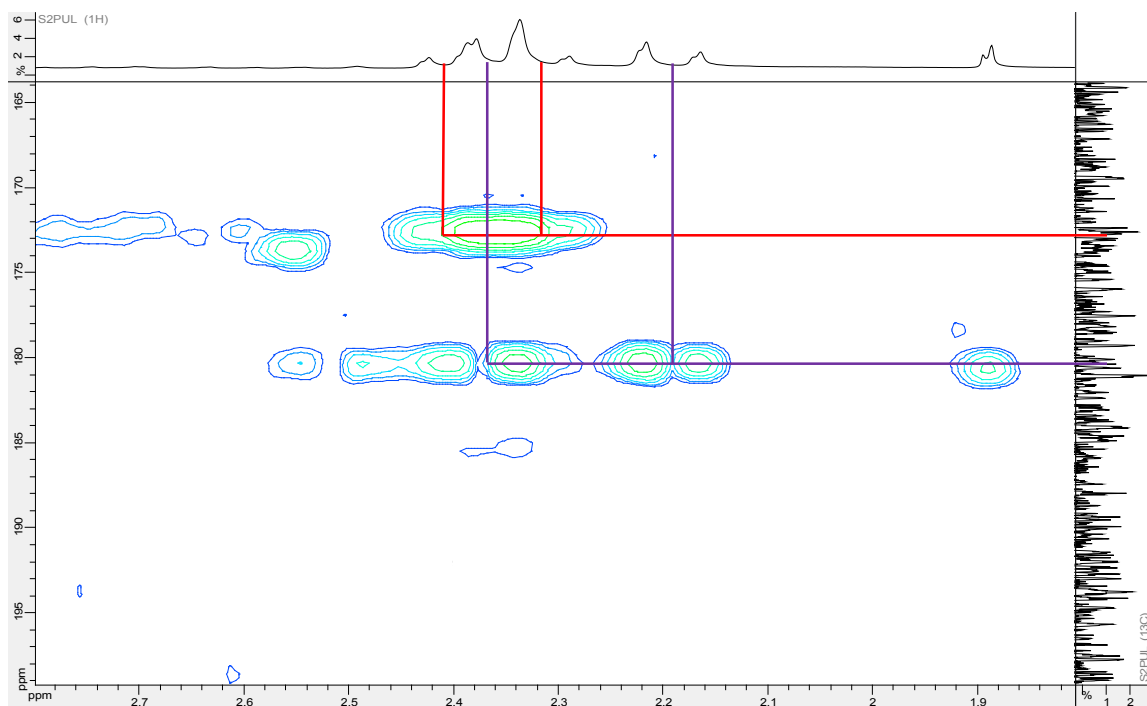


Figure IV-3-a : Spectre HMBC étalé du composé F_{42-4}

A la fin de cette analyse et vu l'absence d'autres signaux sur le spectre proton, les autres substituants ne peuvent être que des groupements hydroxyles et il ne reste qu'à lier les

différentes parties déterminées précédemment à savoir le squelette kaempférol, les deux entités osidiques (galactose et rhamnose) et la chaîne latérale. Ceci peut se faire aisément grâce au spectre HMBC sur lequel on observe :

- Une première tâche de corrélation entre le proton anomérique du galactose et le carbone résonant à δ_c 134,2ppm qui ne peut être que le carbone C-3 du squelette flavonique.
- Une deuxième tâche de corrélation entre le proton H-2'' du galactose et le carbone anomérique C-1''' du rhamnose. Cette corrélation permet de déduire que le rhamnose est lié au galactose par une liaison 1→2.
- Une troisième tâche de corrélation entre le proton H-6''a du galactose et le carbone du carbonyle à δ_c 172,2ppm noté C-1'''' de la chaîne. Ceci permet de déduire que la chaîne est portée par le carbone C-6'' du galactose.

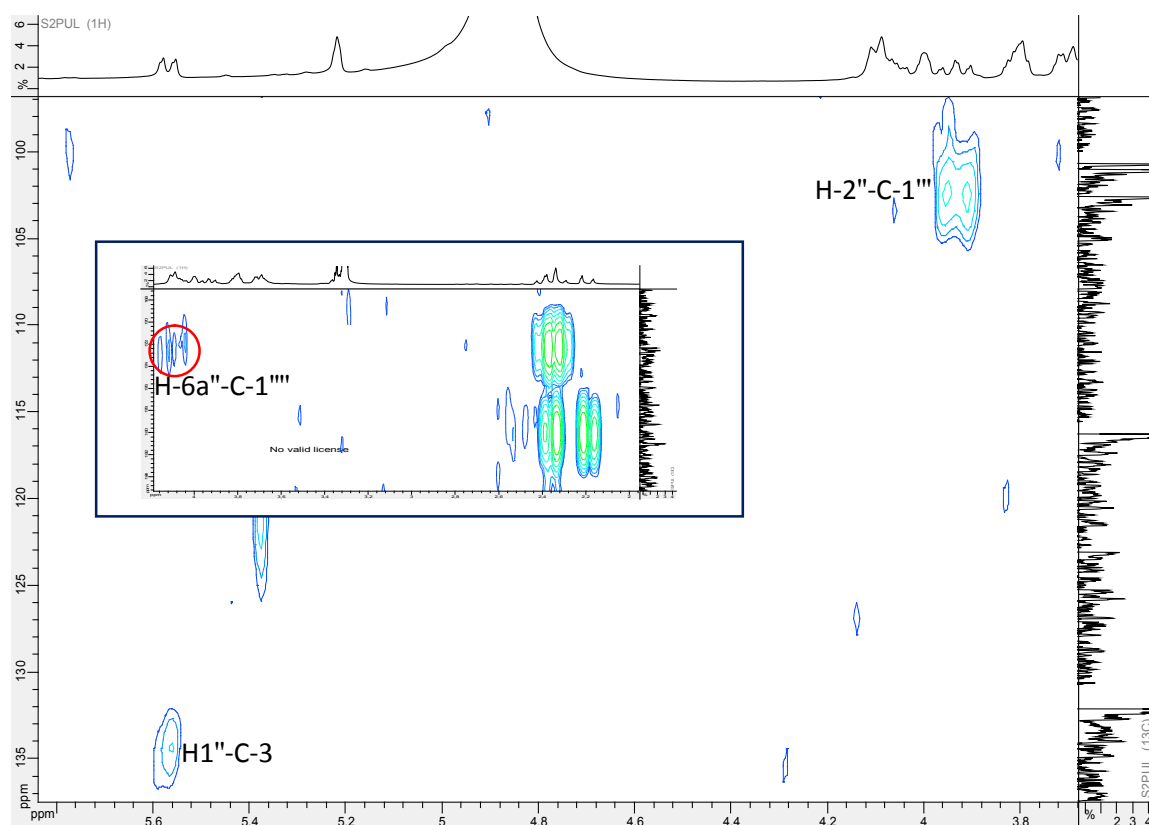


Figure IV-3-b : Spectre HMBC étalé du composé F₄₂₋₄

L'ensemble de ces données se trouve en bon accord avec la structure du composé nommé Kaempférol 3-O-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-D-galactopyranoside représenté dans la figure IV-7. Ce composé a été isolé auparavant de

plusieurs espèces du genre *Rosa* [2], de l'espèce *Oxytropis falcate* [3] et récemment des espèces du genre *Astragalus* [4].

Toutes les données spectrales relatives à ce produit sont rassemblées dans le tableau IV-1.

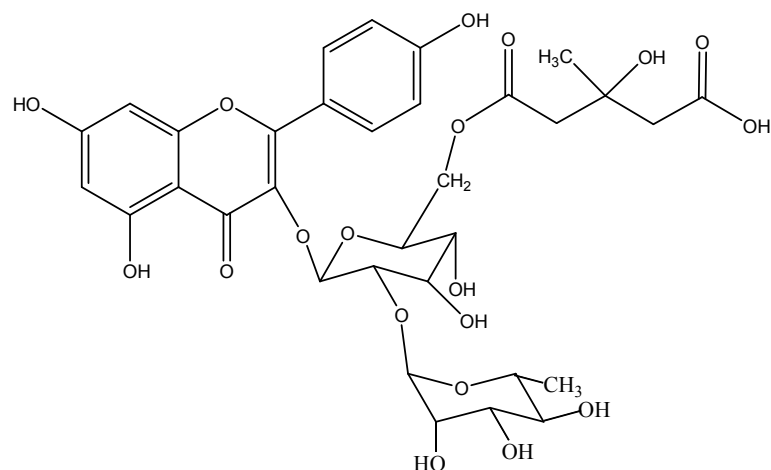


Figure IV-7: Kaempférol 3-*O*-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6- *O*-(3- hydroxy-3-methylglutaryl)]-*D*-galactopyranoside

Tableau IV.1 : Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé F_{42-4} dans CD_3OD

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	158,1
3	-	134,2
4	-	178,4
5	-	163,0
6	6,12	100,6
7	-	168,8
8	6,3	95,5
9	-	158,6
10	-	104,7
1'	-	123,0
2'	8,03	132,1
3'	6,88	116,2
4'	-	161,4
5'	6,88	116,2
6'	8,03	132,1
1''	5,56	101,0
2''	3,92	77,4
3''	3,67	74,1
4''	3,79	70,4
5''	3,70	75,5
6''a	4,04	63,8
6''b	4,10	
1'''	5,21	102,5
2'''	3,98	72,4
3'''	3,80	72,3
4'''	3,34	74,1
5'''	4,03	69,8
6'''	0,98	17,5
1''''	-	172,2
2''''	2,31 2,4	47,5
3''''	-	70,8
4''''	2,19 2,36	47,1
5''''	-	180,0
6''''	1,12	27,7

IV-1-2- Le composé F_{38-12}

Le composé F_{38-12} se présente sous forme de poudre jaune soluble dans le méthanol.

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood (365 nm) devient jaune après exposition de la plaque CCM à la vapeur d'ammoniaque oriente vers un composé à structure flavonoïdique de type flavone ou flavonol substitué en 3.

Le spectre RMN ^1H (figure IV-8) enregistré dans le CD_3OD montre une forte similitude des signaux avec ceux du composé précédent. En effet, on note aisément la présence de plusieurs signaux caractéristiques des protons aromatiques résonants entre 6 et 8 ppm et autres caractéristiques des protons osidiques entre 3 et 5,6 ppm indiquant la nature hétérosidique de ce composé.

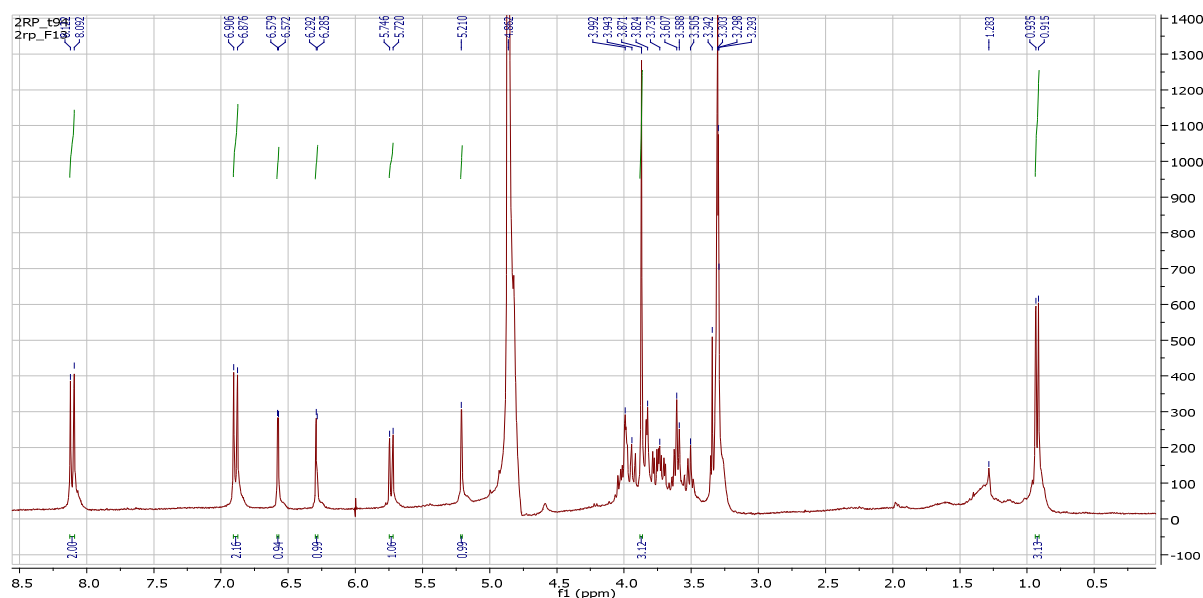


Figure IV-8 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 300MHz) du composé F_{38-12}

Une lecture attentive des spectres RMN ^1H étalés (Figure IV-8-a) et (Figure IV-8-b) et le spectre HSQC (Figure IV-9) montre clairement la présence des signaux suivants :

- Deux doublets ($J = 9$ Hz) d'intégration 2H chacun, le premier à δ_{H} 8,11 ppm et le second à δ_{H} 6,89 ppm attribuables respectivement aux protons H-2'/ H-6' et H-3'/H-5' du cycle B du flavonoïde. Ceci indique clairement que le cycle B est parasubstitué en position 4'.
- Deux doublets ($J = 2,2$ Hz) d'intégration 1H chacun, le premier à δ_{H} 6,57 ppm et le deuxième à δ_{H} 6,29 ppm attribuables respectivement aux protons H-8 et H-6 du cycle A du flavonoïde. Ceci oriente vers une substitution des positions 5 et 7 du cycle A.

- Un autre doublet ($J = 7,8$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 5,73 ppm caractéristique du proton anomérique d'un sucre noté H-1". La valeur du déplacement chimique oriente vers une jonction *O*-sucre, alors que celle de la constante de couplage indique qu'il s'agit d'un glucose ou galactose de configuration β .
- Un dernier signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à δ_H 5,21 ppm caractéristique d'un second proton anomérique noté H-1''' attestant la présence d'un deuxième sucre. La présence d'un signal sous forme d'un doublet ($J=6$ Hz) d'intégration 3H à δ_H 0,92ppm montre clairement la présence d'un groupement méthyle. La présence de ce dernier ainsi que la multiplicité (*s/l*) du proton anomérique indique sans nul doute qu'il s'agit d'un rhamnose.

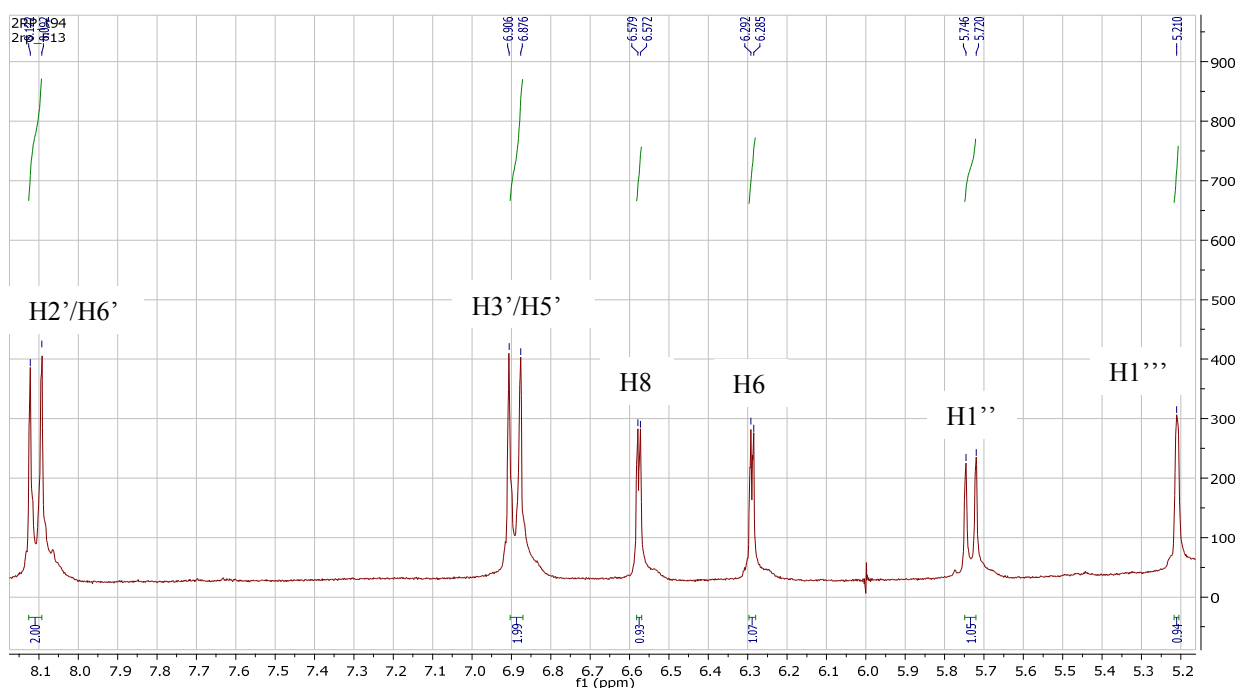


Figure IV-8-a : Spectre RMN ¹H étalé (5,1-8,2ppm) du composé F₃₈₋₁₂

- Un ensemble de signaux dans l'intervalle 3,30-4,5 ppm confirme la présence de deux unités osidiques. Dans cet ensemble, on repère également un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à δ_H 3,87 ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

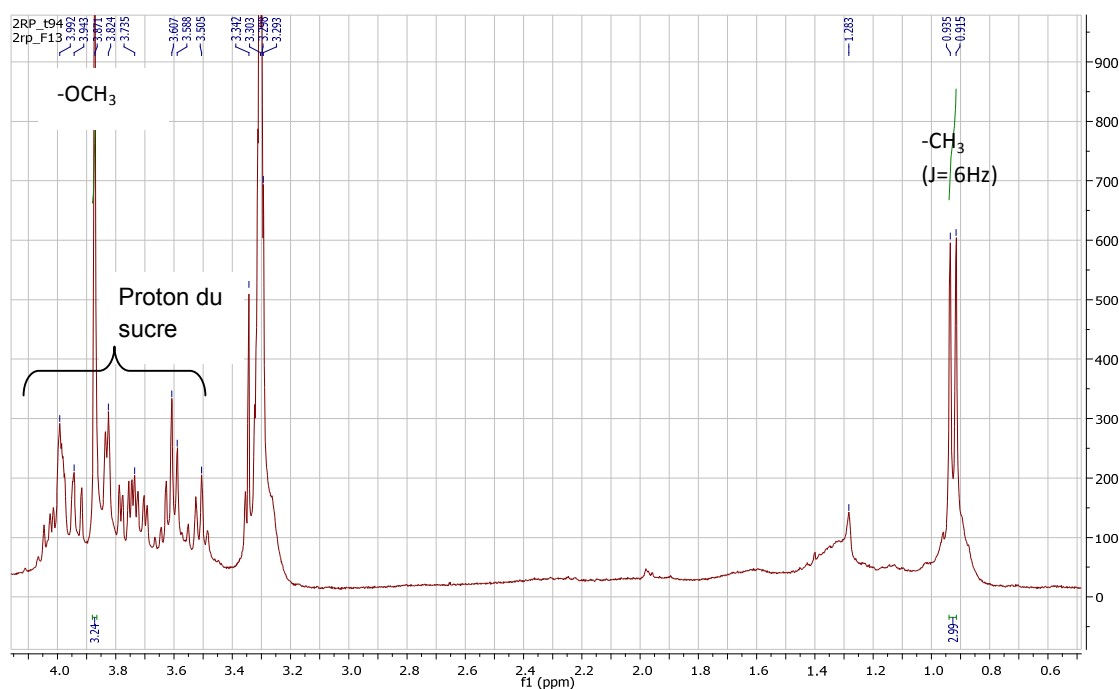


Figure IV-8-b : Spectre RMN ^1H étalé (0,5-4,2ppm) du composé F_{38-12}

L'ensemble des données de cette première analyse permet de déduire que le composé F_{38-12} est un flavonoïde disubstitué sur le cycle A, parasubstitué sur le cycle B et également substitué en position 3 du cycle C. Ces constatations permettent de déduire que le squelette flavonique n'est autre que le kaempférol substitué en C-3. Ce même composé est aussi porteur de deux entités osidiques dont l'une est un rhamnose et il reste à identifier la nature de la deuxième entité ainsi que leur point de branchement sur l'aglycone en plus de l'emplacement du groupement méthoxyle.

L'étude du spectre RMN ^{13}C (figure IV-9) du composé F_{38-12} permet de dénombrer 13 atomes de carbone se trouvant dans la zone 15-105 ppm, caractéristiques des carbones osidiques, confirmant ainsi la présence de deux entités sucres dont l'une est un rhamnose grâce à la présence du signal du méthyle caractéristique du rhamnose à δ_{C} 17,4ppm (spectre VI-9-a) et un carbone à δ_{C} 56,4 attribuable à un groupement méthoxyle.

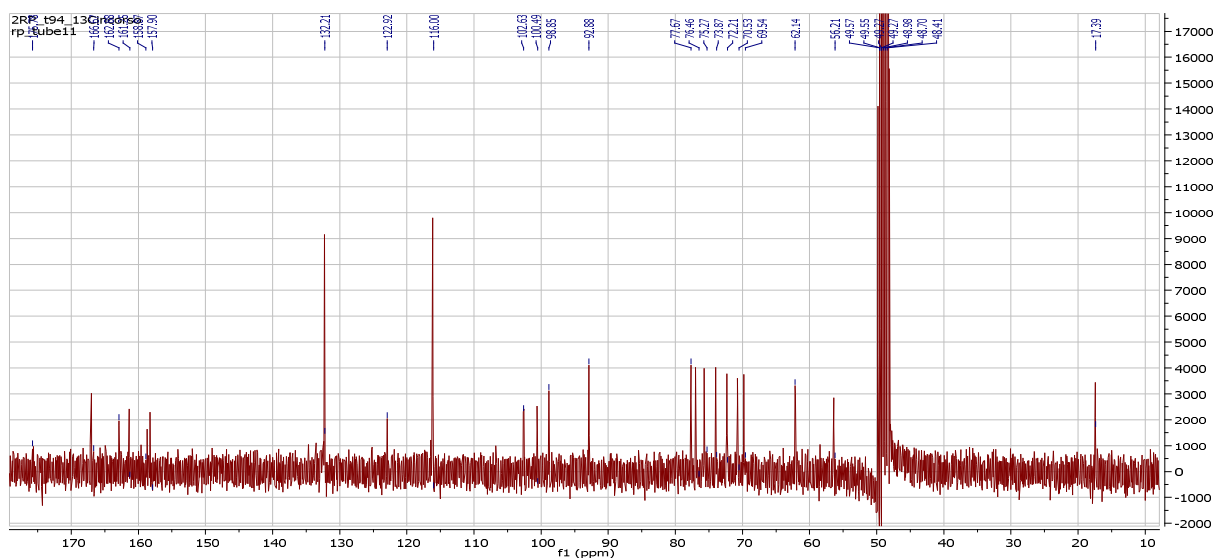


Figure IV-9 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD ; 75MHz) du composé F_{38-12}

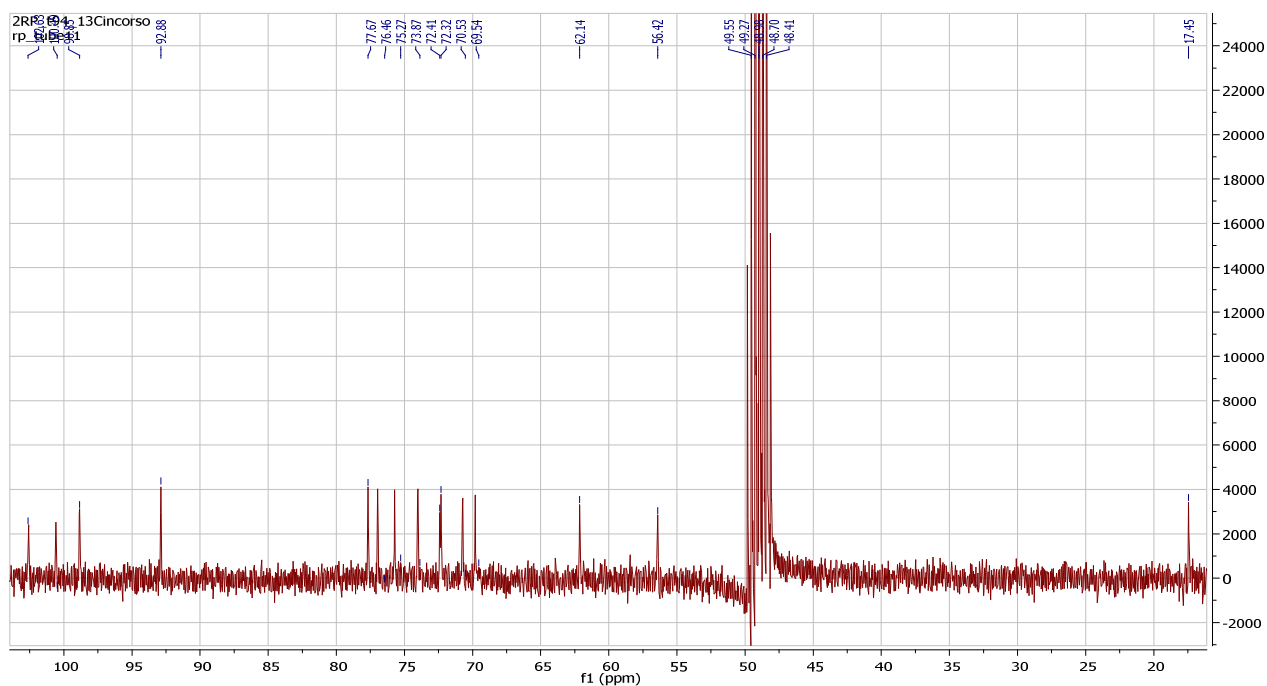


Figure IV-9-a: Spectre RMN ^{13}C étalé (15-105 ppm) du composé F_{38-12}

L'expérience hétéronucléaire HSQC (spectre VI-10) met en évidence les corrélations entre les protons et les carbones qui les portent, ces derniers sont repérés comme suit :

- Le signal des protons H-2'/H-6' permet la localisation de C-2' et C-6' à δ_{C} 132,2ppm.
- Le signal des protons H-3'/H-5' permet la localisation de C-3' et C-5' à δ_{C} 116,0ppm.
- Le H-8 à δ_{H} 6,57ppm permet de localiser le C-8 à δ_{C} 92,9ppm.
- Le H-6 à δ_{H} 6,29ppm permet de localiser le C-6 à δ_{C} 98,8ppm.
- Les protons du groupement methoxye avec leur carbone à δ_{C} 56,4ppm.

Ainsi que les corrélations des deux protons osidiques avec leurs carbones :

- Le H-1'' à δ_H 5,73ppm permet de localiser le C-1'' à δ_C 100,5ppm.
- Le H-1''' à δ_H 5,21ppm permet de localiser le C-1''' à δ_C 102,6ppm.
- Le CH₃''' à δ_H 0,93ppm permet de localiser le C-6''' à δ_C 17,4ppm.

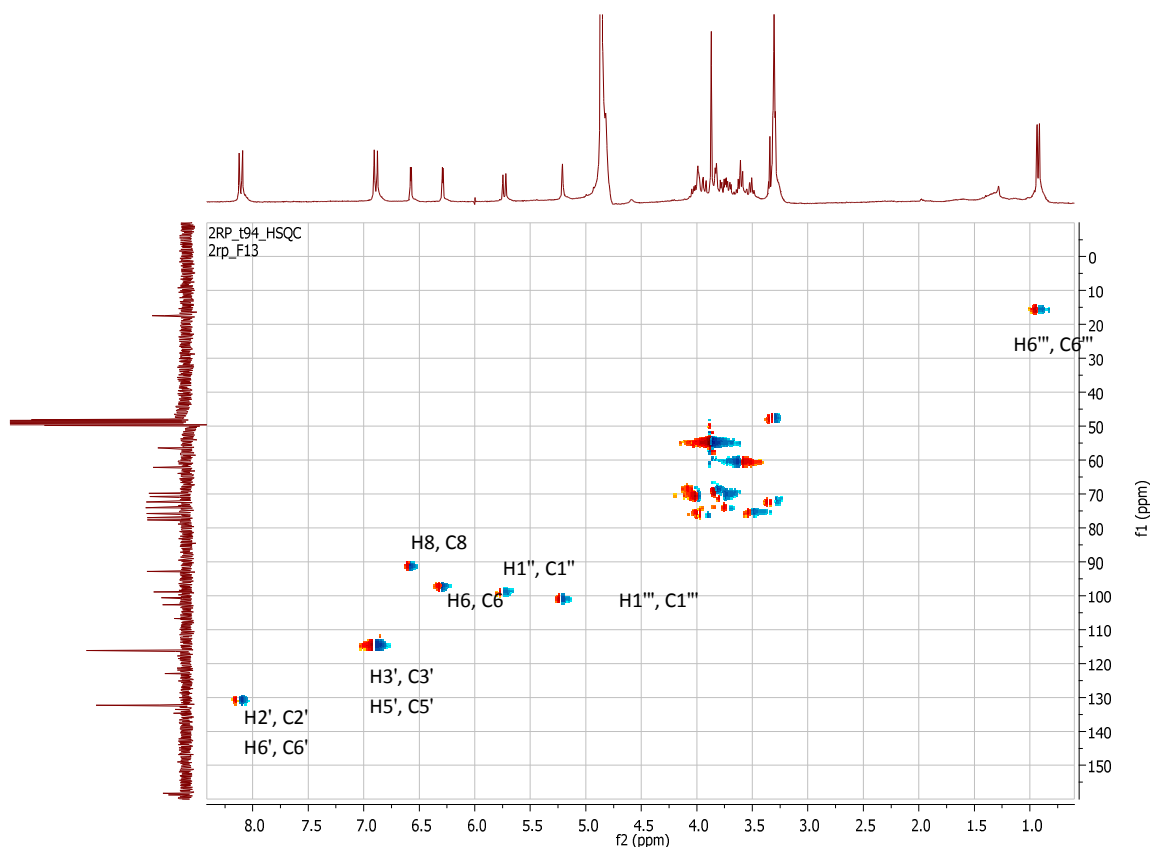


Figure IV-10 : Spectre HSQC du composé F₃₈₋₁₂

L'analyse du spectre HMBC (Figure VI-11) permet de visualiser les corrélations entre:

- Les protons H-3'/H-5' du cycle B et deux carbones quaternaires résonant à δ_C 161,4 et 122,9ppm attribuables respectivement aux carbones C-4' oxygéné et C-1'.
- Les protons H-2'/H-6' et le carbone quaternaire oxygéné C-4' (δ_C 161,4ppm) ainsi que le carbone à δ_C 158,6ppm qui ne peut être que C-2.
- Le proton H-8 (δ_H 6,57ppm) et trois carbones quaternaires, le premier à δ_C 106,4ppm attribuable à C-10, le second à δ_C 158,3ppm attribuable au carbone oxygéné C-9 et le troisième à δ_C 167,0ppm attribuable au carbone C7.
- Le proton H-6 (δ_H 6,29ppm) et deux carbones quaternaires oxygénés, le premier à δ_C 162,9 ppm ne pouvant être que C-5 et le second à δ_C 167,0ppm déjà attribué au C-7.

- Le proton anomère H1" (δ_H 5,73 ppm) de la première unité osidique et le signal du carbone résonant à δ_C 134,7ppm attribuable au carbone C-3. La valeur de déplacement chimique de ce carbone confirme la glycosylation du flavonol en cette position.
- Les protons du groupement méthoxyle et le carbone résonant à δ_C 167,0ppm qui n'est autre que le C7. Cette constatation permet de positionner le groupement méthoxyle en C-7 et déduire que les deux sucres sont portés par le carbone C-3 donc liés entre eux.

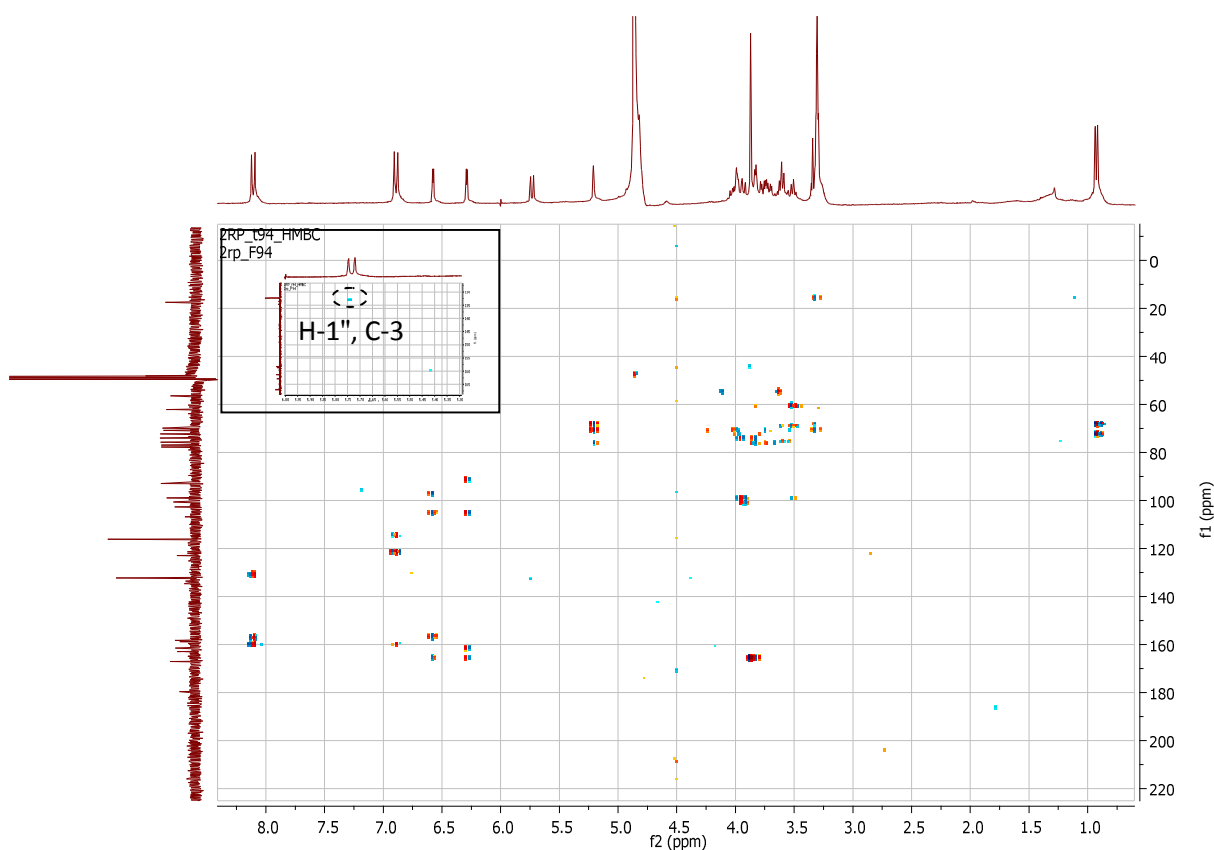


Figure IV-11 : Spectre HMBC du composé F_{38-12}

En vu de déterminer la nature de l'autre sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide du composé F_{38-12} . Après concentration des phases organiques et aqueuses, nous avons procédé, d'une part à une Co-chromatographie sur plaque analytique CCM éluee par le système acétone-eau (9/1) de la phase aqueuse en présence d'échantillons authentiques des sucres. Il est apparu que cette opération à confirmer la présence du rhamnose et à préciser la nature du sucre en question qui n'est autre que le galactose.

D'autre part, la fluorescence du composé a été vérifiée sous lumière de Wood qui a donné une coloration jaune confirmant ainsi l'attachement des deux sucres en position C-3. Le point d'attachement des deux sucres est déterminé par comparaison avec la littérature et a permis de

déduire que ce composé n'est autre que le 7-methylkaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -galactopyranoside reporté dans la figure IV-12, ce composé a été déjà isolé d'*Astragalus gomboformis* et d'*Astragalus gombo* [4] et également de l'espèce *Oxytropis falcate* [5].

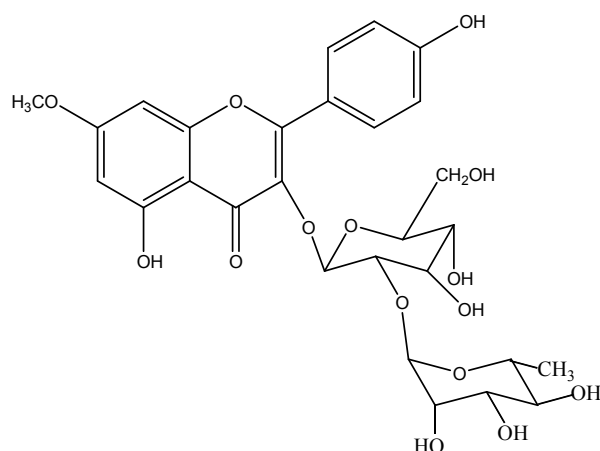


Figure IV-12: 7-methylkaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -galactopyranoside

Toutes les données spectroscopiques de ce composé sont rassemblées dans le tableau IV- 2

Tableau IV- 2: les données spectroscopiques du composé F₃₈₋₁₂

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
H-2	-	158,6
H-3	-	134,7
H-4	-	
H-5	-	162,9
H-6	6,29	98,8
H-7	-	167,0
H-8	6,57	92,9
H-9	-	158,3
H-10	-	106,4
H-1'	-	122,9
H-2'	8,11	132,2
H-3'	6,89	116,0
H-4'	-	161,4
H-5'	6,89	116,0
H-6'	8,11	132,2
OCH ₃	3,87	56,4
H-1"Gal	5,73	100,5
H-1''' Rha	5,21	102,6
3H-6''' Rha	0,92	17,4

IV-1-3- Le composé F₄₂₋₁₁₋₁

Le composé F₄₂₋₁₁₋₁ se présente sous forme de poudre jaune soluble dans le méthanol. La fluorescence noire violette sous lumière de Wood (365 nm) devient jaune après exposition de la plaque CCM à la vapeur d'ammoniaque oriente vers un composé à structure flavonoïdique de type flavone ou flavonol substitué en 3.

L'analyse du spectre RMN ¹H enregistré dans le CD₃OD (figure IV-13) montre :

- Un signal sous forme de doublet ($J = 8,8\text{Hz}$) d'intégration 2H à δ_{H} 8,09ppm attribuable aux deux protons H-2' et H-6'.
- Un signal sous forme de doublet ($J = 8,8\text{Hz}$) d'intégration 2H à δ_{H} 6,91ppm attribuable aux deux protons H-3' et H-5'.
- Un signal sous forme de singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 6,33ppm attribuable au proton H-8.
- Un signal sous forme de singulet large, également d'intégration 1H à δ_{H} 6,16ppm attribuable au proton H-6.
- Un signal sous forme de doublet ($J = 7,7\text{Hz}$) d'intégration 1H à δ_{H} 5,70ppm caractéristique du proton anomérique d'un sucre noté H-1". La valeur du déplacement chimique oriente vers une jonction O-sucre, alors que celle de la constante de couplage indique qu'il s'agit d'un glucose ou d'un galactose avec une orientation β de la liaison liant le sucre à la génine.
- Un signal sous forme de singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 5,24 ppm correspondant au proton anomérique de la deuxième entité osidique, la présence d'un signal sous forme de doublet ($J = 6,2\text{Hz}$) d'intégration 3H à δ_{H} 0,97ppm, indique que cette entité est un rhamnose.
- La présence de deux sucres est confirmée par l'ensemble de signaux se trouvant dans la zone 3-4ppm.

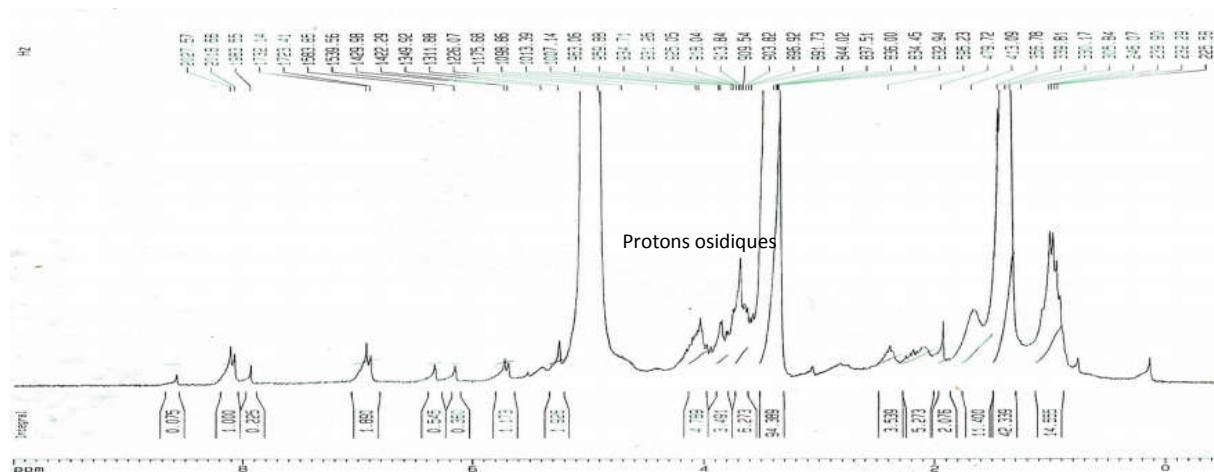


Figure IV-13 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD ; 250MHz) du composé $F_{42-11-1}$

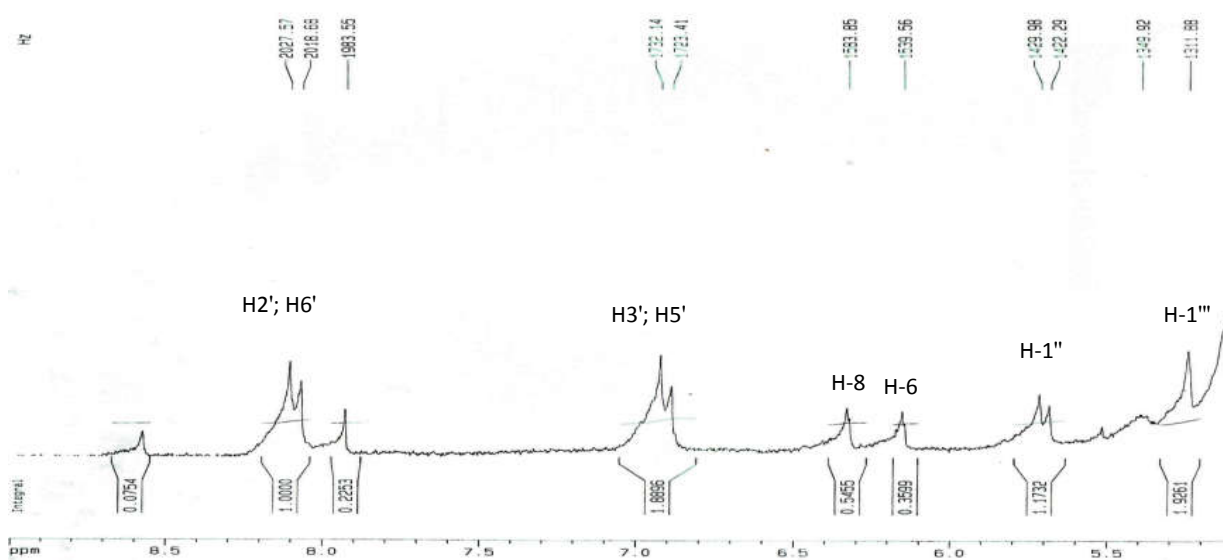


Figure IV-13-a : Spectre RMN ^1H étalé (5-9ppm) du composé $F_{42-11-1}$

Les données du spectre RMN proton, rassemblées dans le tableau IV-3, permettent d'identifier l'aglycone comme étant le kaempférol glycosylé en position C-3.

Tableau IV-3: Données RMN ^1H du composé $F_{42-11-1}$

Déplacement chimique δ_{H} (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
8,09	2H	<i>d</i> (8,9)	H-2' & H-6'
6,91	2H	<i>d</i> (8,8)	H-3' & H-5'
6,33	1H	<i>sl</i>	H-8
6,16	1H	<i>sl</i>	H-6
5,70	1H	<i>d</i> (7,69)	H-1''
5,24	1H	<i>sl</i>	H-1''' rhamnose
0,97	3H	<i>d</i> (6,2)	CH_3 -rhamnose

Afin de compléter la détermination de la structure de ce composé, les spectres UV ont été enregistrés en présence du méthanol et d'autres réactifs, l'étude de cette série a montré que :

- Le spectre UV enregistré dans le méthanol possède deux bandes d'absorption dont l'une est à $\lambda_{\max} = 345\text{nm}$ caractéristique de la bande I d'un flavonoïde et confirmant ainsi qu'il s'agit d'un squelette flavonoïdique de type flavonol substitué en 3 (3-OR).
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +48\text{ nm}$) avec une légère diminution de son intensité provoqué par l'addition de NaOH comparativement au spectre méthanolique laisse supposer l'absence d'un OH libre en 4'.
- Sur le même spectre, l'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\max} = 325\text{nm}$ par rapport au spectre enregistré dans le MeOH renseigne sur la présence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +6\text{ nm}$) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirmant ainsi la présence d'un groupement OH libre en 7.
- La stabilité relative du spectre enregistré dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans AlCl_3 laisse supposer l'absence du système ortho di-OH sur le cycle B.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +57\text{nm}$) enregistré sur le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en 5.

Les données relatives à la série spectrale UV du composé F_{42-11} sont rassemblées dans le tableau IV-4.

Tableau IV-4: Données relatives à la série spectrale UV du composé $F_{42-11-1}$

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	345	266	-	Flavonol 3-OR
+NaOH	393	274	325	7-OH
+NaOH+5 min	393	274	325	4'-OR
+AlCl ₃	407	267	306/ 349	/
+AlCl ₃ /HCl	402	273	303/343	5-OH
+NaOAc	364	272	-	7-OH
+NaOAc/H ₃ BO ₃	352	267	-	/

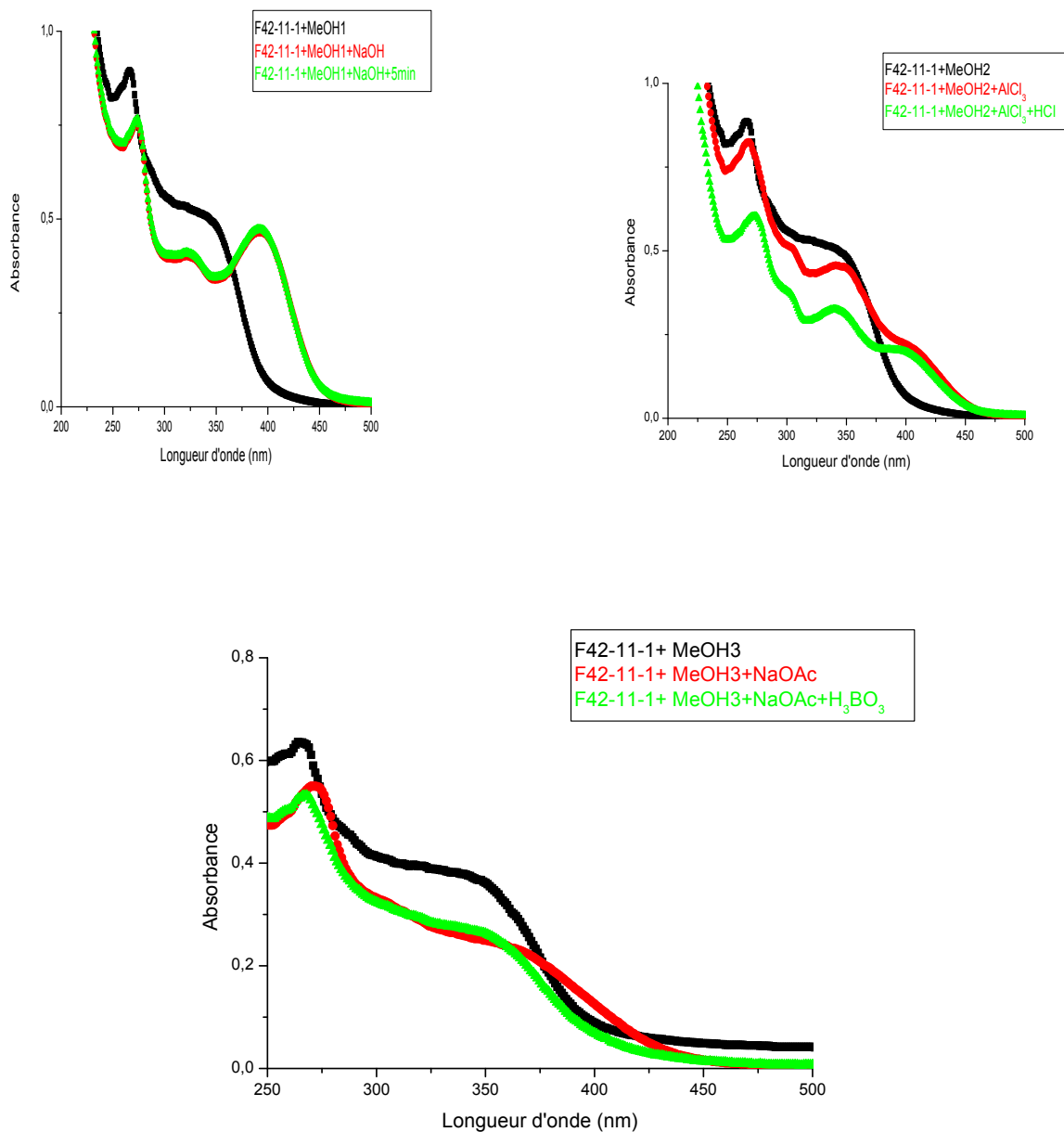


Figure IV-14: La série spectrale UV du composé $F_{42-11-1}$

La combinaison des données spectrales UV et RMN proton permet de proposer la structure partielle représentée dans la figure IV-15.

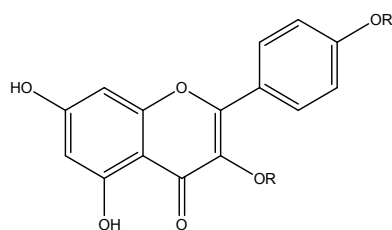
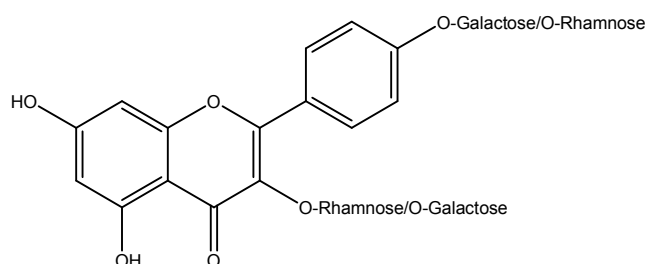


Figure IV-15 : structure partielle du composé $F_{42-11-1}$

La nature des deux sucres a été déterminée par hydrolyse acide comme précédemment. Une Co-chromatographie sur plaque analytique CCM éluée par le système acétone-eau (9/1) de la phase aqueuse en présence d'échantillons authentiques, à confirmer la présence du rhamnose et à identifier le deuxième sucre comme étant le galactose. Alors qu'une goutte de la phase organique, déposée sur du papier Whatman III, a donnée une coloration jaune sous lumière de Wood (365 nm) confirmant ainsi le rattachement de l'un des deux sucres à l'aglycone en position C-3. L'ensemble des données spectrales (UV et RMN) permet de proposer, pour ce composé, les deux structures reportées dans la figure IV-16.



**Figure IV-16: 3-O- α -rhamnopyranosyl-4'-O- β -galactopyranosyl kaempférol
Ou
3-O- β -galactopyranosyl- 4'-O- α -rhamnopyranosyl kaempférol**

Les flavonoïdes di-glycosilés sont très présents dans les espèces du genre *Astragalus* [6].

Conclusion

Les travaux de séparation et de purification menés sur l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Astragalus gombo* ont été difficile vu la richesse de cet extrait et ont permis l'isolement, uniquement de quatre composés de type flavonoïde et la détermination de la structure de trois d'entre eux en combinant diverses méthodes spectroscopiques. Il s'agit de :

- 7-methylkaempférol 3-O- α -rhamnopyranosyl-(1→2)-O- β -galactopyranoside
- Kaempférol 3-O-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6- O-(3- hydroxy-3-methylglutaryl)-D-galactopyranoside
- Kaempférol 3-O- α -rhamnopyranosyl-4'-O- β -galactopyranoside **Ou** kaempférol 3-O- β -galactopyranosyl- 4'-O- α -rhamnopyranoside

IV-2 - Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait n-BuOH de l'espèce *Genista cinerea ssp. ramosissima*

IV-2 -1- Le composé P₁≡F9-2

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, de fluorescence noir violette sous lumière de Wood, et affiche une coloration jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque laissant supposé qu'il s'agit d'un squelette de type flavone ou flavonol substitué en 3.

L'analyse du spectre RMN ¹H (Figure VI-17) enregistré dans le CD₃OD montre :

- Un doublet ($J = 1,9$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 8ppm attribuable au proton H-2'.
- Un double de doublet ($J = 8,5 ; 1,9$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 7,6ppm attribuable au proton H-6'.
- Un doublet ($J = 8,5$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 6,9ppm attribuable au proton H-5'.
- Un singulet large d'intégration 1H à δ_H 6,43ppm attribuable au proton H-8.
- Un doublet ($J = 1,7$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 6,23ppm attribuable au proton H-6.
- Un doublet ($J = 7,8$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 5,4ppm caractéristique du proton anomérique d'un sucre. La valeur du déplacement chimique de ce proton montre que le sucre est relié à l'aglycone par un pont oxygène, alors que la valeur de la constante de couplage ($J = 7,8$ Hz) oriente vers la présence d'un glucose ou d'un galactose avec une configuration β de la liaison liant le sucre à l'aglycone.
- Un singulet d'intégration 3H à δ_H 3,9ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle.
- Un ensemble de signaux dans la zone 3,4-4ppm attribuable aux autres protons du sucre.

L'ensemble de ces signaux indique qu'il s'agit d'un squelette de type quercétine substitué par un sucre et un groupement méthoxyle.

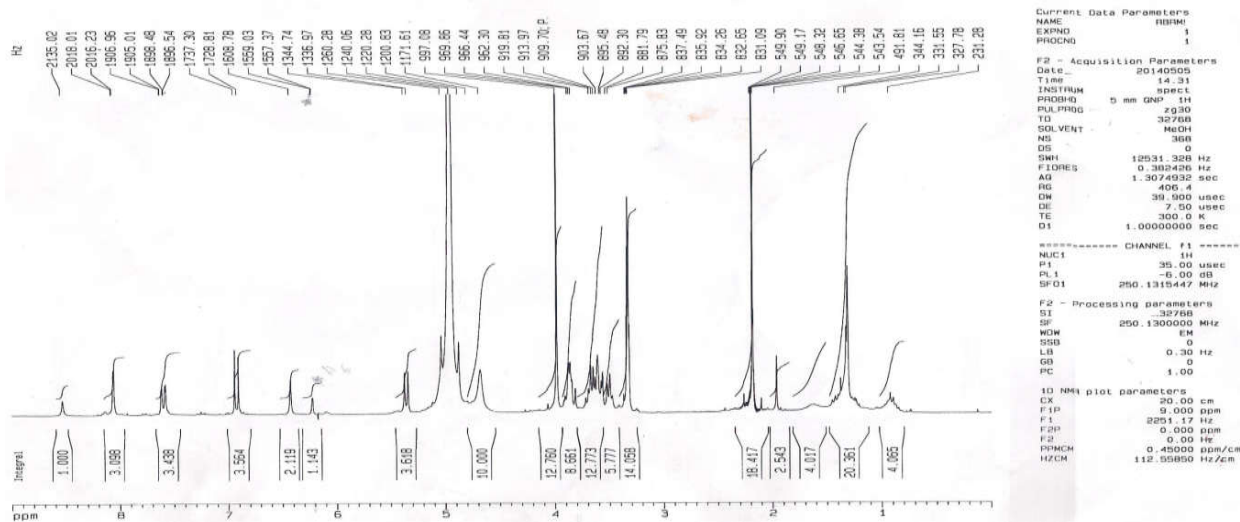


Figure IV-17: Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé F_{9-2}

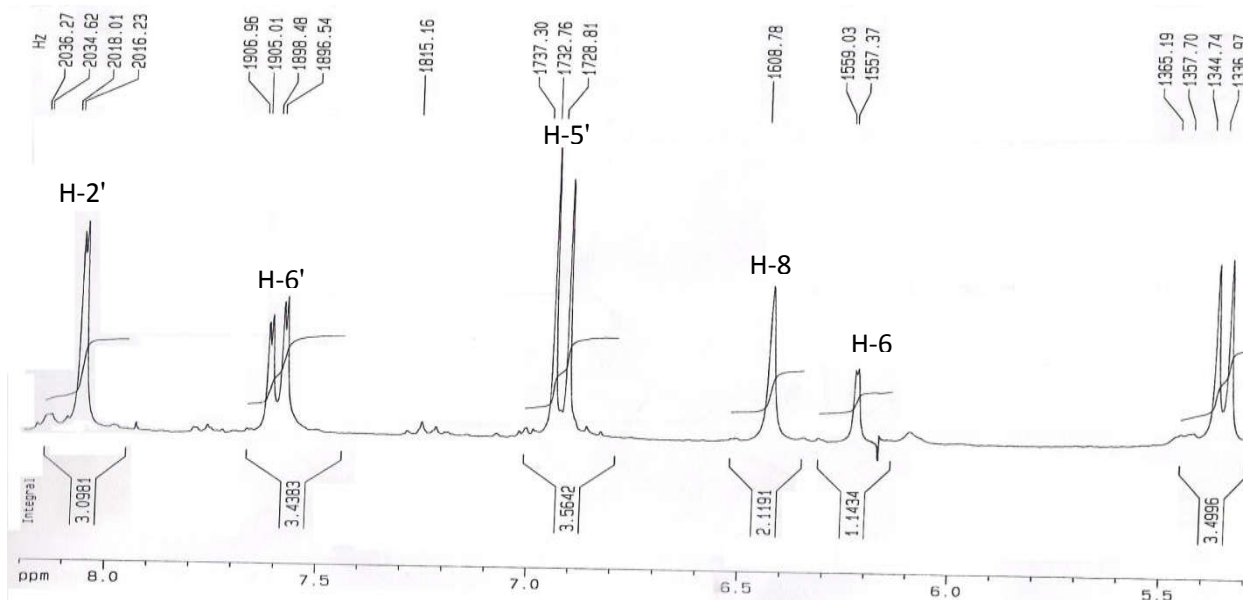


Figure IV-17-a: Spectre RMN ^1H (8,1 – 5,4ppm) du composé F_{9-2}

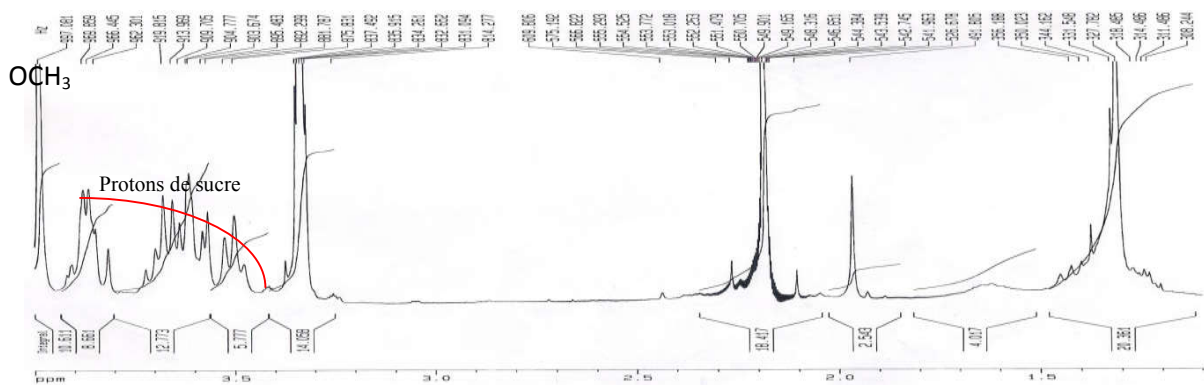


Figure IV-17-b: Spectre RMN ^1H étalé (3,9-1,3 ppm) du composé F_{9-2}

Les données relatives à la RMN 1H sont reportées sur le tableau VI-5.

Tableau IV-5: Les données relatives à la RMN 1H du composé F₉₋₂.

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7.9	1H	<i>d</i> (1,9)	H-2'
7.6	1H	<i>dd</i> (8,5 ; 1,9)	H-6'
6.9	1H	<i>d</i> (8,5)	H-5'
6.4	1H	<i>sl</i>	H-8
6.2	1H	<i>d</i> (1,7)	H-6
5	1H	<i>d</i> (7,8)	H-1" (anomérique)
4.8	3H	<i>s</i>	-OCH ₃

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante (figure IV-18).

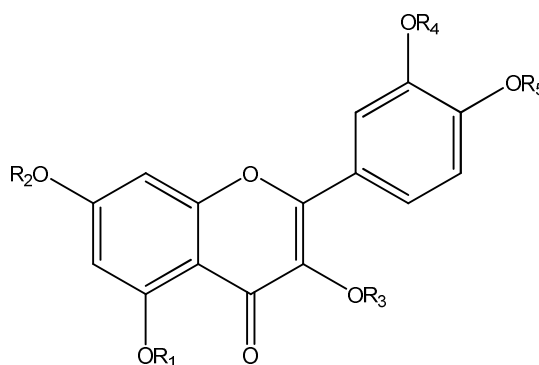


Figure IV-18 : structure partielle du composé F₉₋₂

Etude de la série spectrale UV du composé F₉₋₂

- L'examen du spectre UV du composé F₉₋₂ enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption dont la bande I est à $\lambda_{\max} = 355\text{nm}$ confirmant ainsi qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (3-OR).
- L'addition de la base forte NaOH à la solution méthanolique provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta \lambda_I = +60\text{ nm}$) avec augmentation de l'intensité comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indiquant ainsi la présence d'un OH libre en 4'.
- Sur le même spectre, l'apparition d'une nouvelle bande à 330 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH renseigne sur la présence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta \lambda_{II} = +11\text{nm}$) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirmant ainsi la présence d'un groupement OH libre en 7.

- La stabilité relative du spectre enregistré dans AlCl_3+HCl comparativement à celui enregistré dans AlCl_3 laisse supposer l'absence du système ortho di-OH sur le cycle B.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I=+48\text{nm}$) enregistré sur le spectre AlCl_3+HCl par rapport à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en 5.

Ces données sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV- 6 : Les données de la série spectrale UV composé F_{9-2}

Réactifs	Bande I	Bande II	Autre bande	Commentaire
MeOH	355	254		Flavonol (3-OR)
+NaOH	415	271	330	OH libre en 4' OH libre en 7
+NaOH+5 min	415	271	330	
+ AlCl_3	403	267	302 ; 366	/
+ AlCl_3/HCl	403	267	297 ; 364	OH libre en 5
+NaOAc	373	265	271 ; 329	OH libre en 7
+NaOAc/ H_3BO_3	359	255	267	/

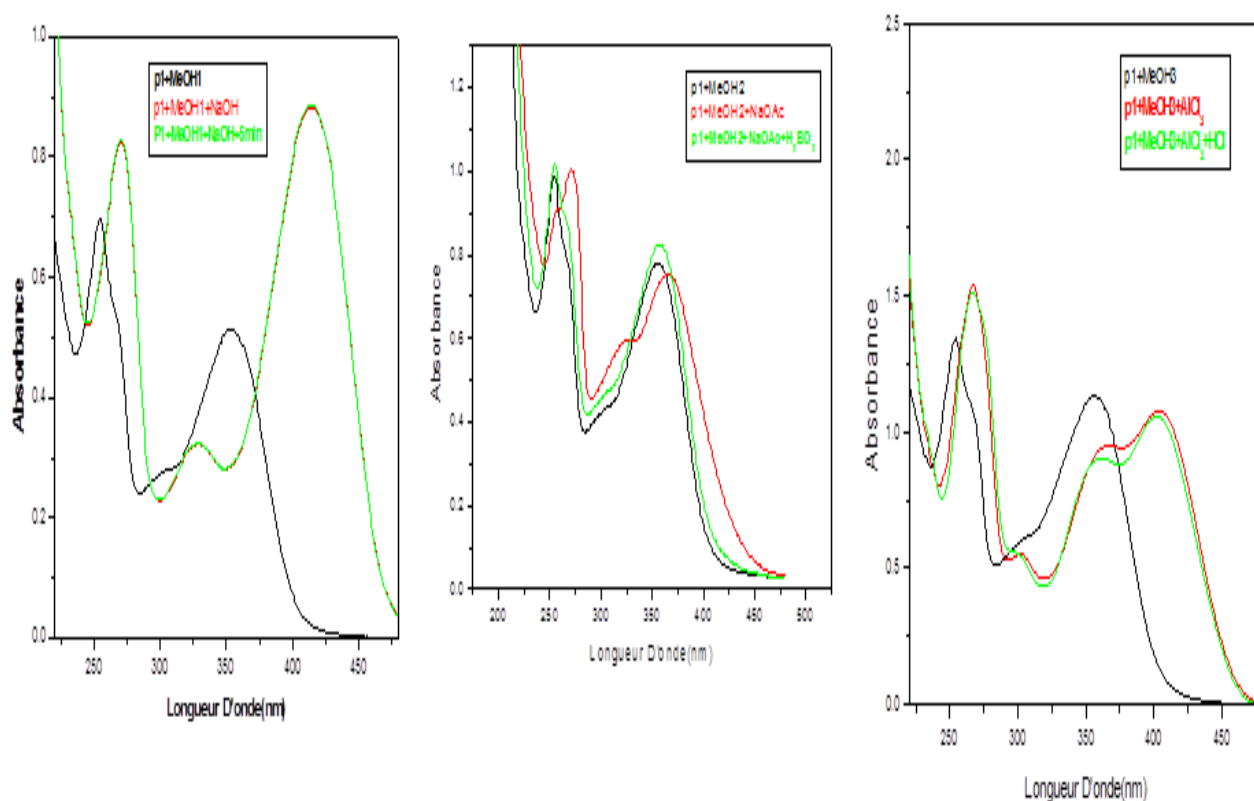


Figure IV- 19 : La Série Spectrale UV du composé F_{9-2}

Les données de la série spectrale UV permettent de déduire que $OR_1 = OR_2 = OR_4 = OH$, il reste à déterminer OR_3 et OR_5 . Le spectre RMN proton montre la présence d'un groupement méthoxyle et d'un sucre.

La nature du sucre a été déterminée par hydrolyse acide comme précédemment. La Co-chromatographie de la phase aqueuse a montré que le sucre en question n'est autre que le galactose, alors que la phase organique a donné une coloration jaune en l'examinant sous lumière de Wood sur du papier Whatman. Ces constatations permettent de déduire que le galactose est attaché à l'aglycone en position 3 du squelette flavonique et du coup permettent de placer le groupement méthoxyle en position 3'. Toutes ces données sont en faveur de la structure présentée dans la figure IV-20, connue sous le nom de 3-O- β -galactopyranosyl isorhamnétine.

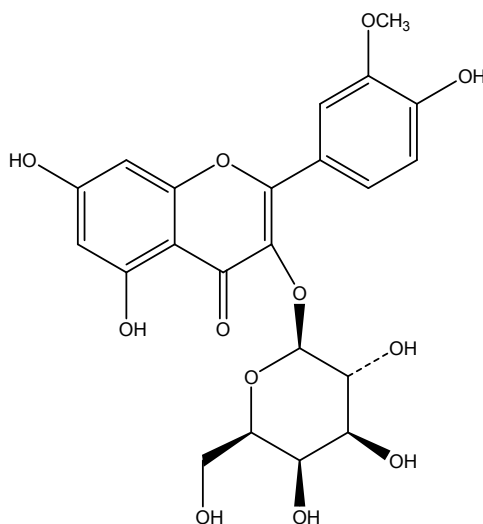


Figure IV-20 : Isorhamnétine 3-O- β -galactopyranosyl

Ce produit a été déjà isolé de plusieurs espèces de la famille Fabaceae [7].

IV-2 -2- Le composé $P_2 \equiv F_{9,3}$

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, de fluorescence noire violette sous lumière de Wood et affichant une coloration jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque laissant supposé qu'il s'agit d'un squelette de type flavone ou flavonol substitué en 3.

L'analyse du spectre RMN 1H (Figure IV-21) enregistré dans le CD_3OD montre:

- Un doublet ($J=2,1Hz$) d'intégration 1H à δ_H 7,9ppm attribuable au proton H-2'.

- Un doublet de doublet ($J = 8,5 ; 2,2$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 7,6ppm attribuable au proton H-6'.
- Un doublet ($J = 8.5$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 6,9ppm attribuable au proton H-5'.
- Un doublet ($J = 2$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 6,4ppm attribuable au proton H-8.
- Un doublet ($J = 2$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 6,2ppm attribuable au proton H-6.
- Un doublet ($J = 7,8$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 5ppm attribuable au proton anomérique d'une entité osidique. La valeur de la constante de couplage indique que cette entité peut être un glucose ou un galactose, alors que la valeur du déplacement chimique oriente vers une jonction *O*-sucre.

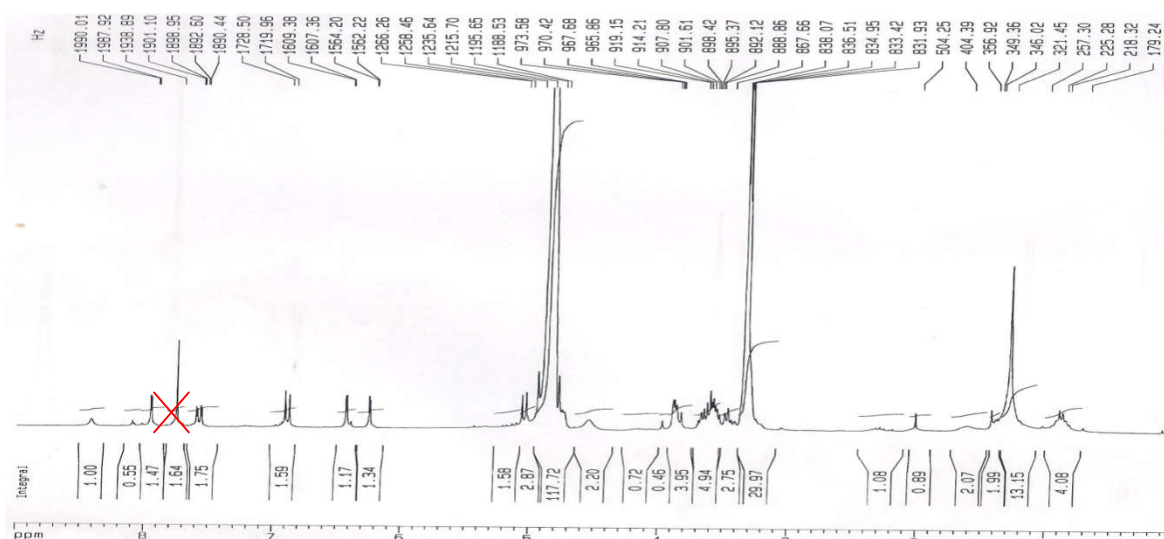


Figure IV-21: Spectre RMN 1H (250 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé F_{9.3}

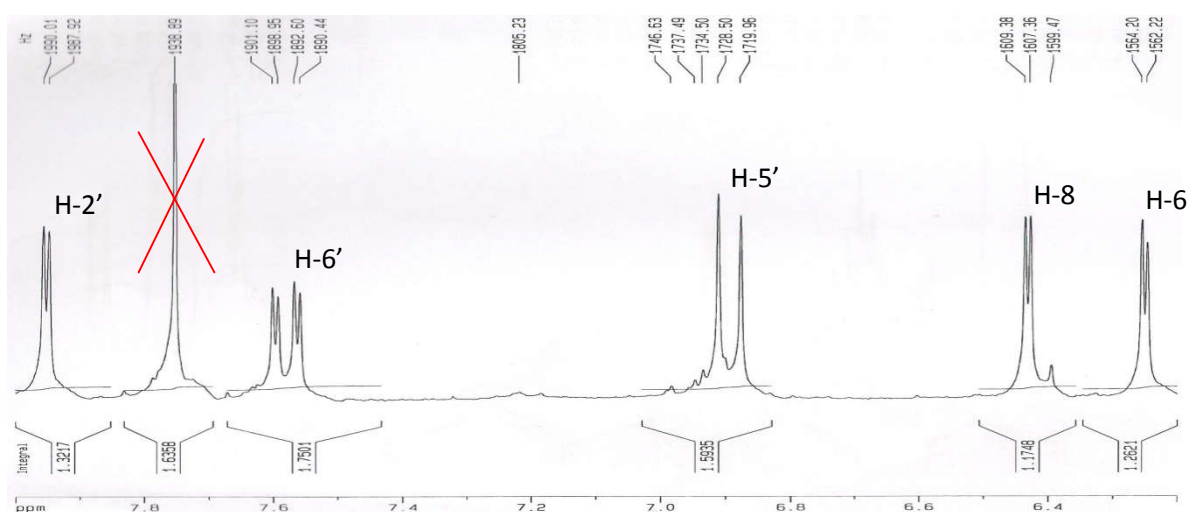


Figure IV-21-a : Spectre RMN ¹H étalé (7,9-6,2 ppm) du composé F_{9.3}

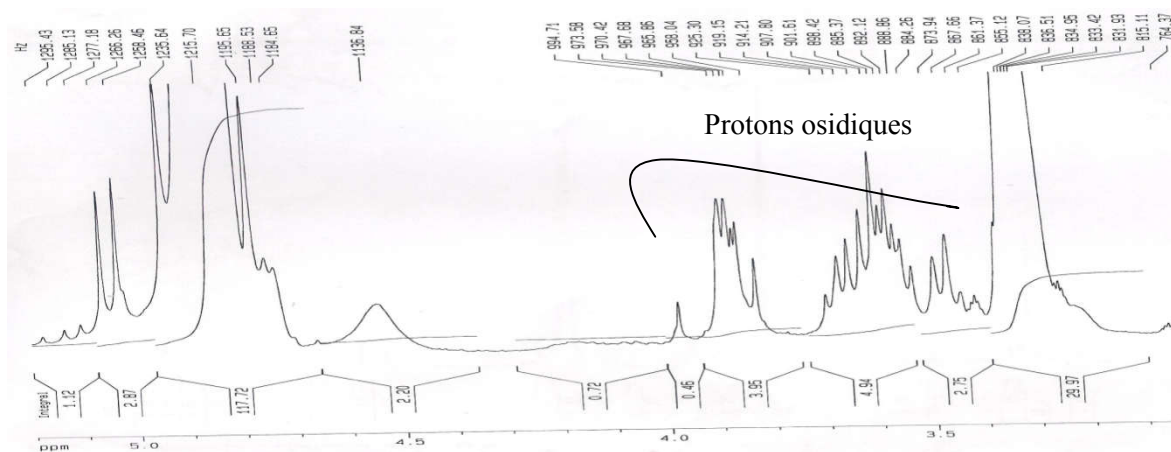


Figure IV-21-b: Spectre RMN ^1H étalé (3.3 à 5.1 ppm) composé F_{9-3}

Les données relatives à la RMH ^1H sont reportées dans le tableau IV-7.

Tableau IV-7: Données RMH ^1H du composé F_{9-3}

Déplacement chimique $\delta(\text{ppm})$	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7,9	1H	<i>d</i> (2,1)	H-2'
7,6	1H	<i>dd</i> (8,5-2,2)	H-6'
6,9	1H	<i>d</i> (8,5)	H-5'
6,4	1H	<i>d</i> (2)	H-8
6,2	1H	<i>d</i> (2)	H-6
5	1H	<i>d</i> (7,8)	H-1" (anomérique)

Ces données permettent de déduire qu'il s'agit d'un squelette quercétine substitué par un glucose ou un galactose.

Etude de la série spectrale UV visible :

L'examen de la série spectrale UV (figure IV-22) du composé F_{9-3} montre :

- Le maximum d'absorption de la bande I se trouve, sur le spectre enregistré dans le MeOH, à $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ indiquant ainsi qu'il s'agit d'un flavonol substitué en position 3.
- L'addition de la base forte NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +52 \text{ nm}$) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4'.
- Sur le même spectre, la présence d'une nouvelle bande à 332 nm par rapport au spectre MeOH renseigne sur la présence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +16 \text{ nm}$) par rapport au spectre MeOH confirme la présence du OH libre en 7.

- L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +47\text{nm}$) en comparant le spectre AlCl_3+HCl avec le spectre enregistré dans le MeOH, indique la présence d'un OH libre en 5.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +21\text{nm}$) provoqué par l'addition de $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ comparativement à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B.

Ces données sont reportées dans le tableau IV-8.

Tableau IV-8: Données relatives à la série spectrale UV du composé F9-3

Réactifs	Bande I	Bande II	Autre bande	Commentaire
MeOH	360	258	/	Flavonol 3-OR
NaOH	412	273	334	OH libre en 4' OH libre en 7
+NaOAc	376	274	332	OH libre en 7
NaOAc + H_3BO_3	381	264	/	Ortho-di-OH sur le noyau B
+ AlCl_3	432	273	/	/
+ AlCl_3 + HCl	407	269	366	OH libre en 5

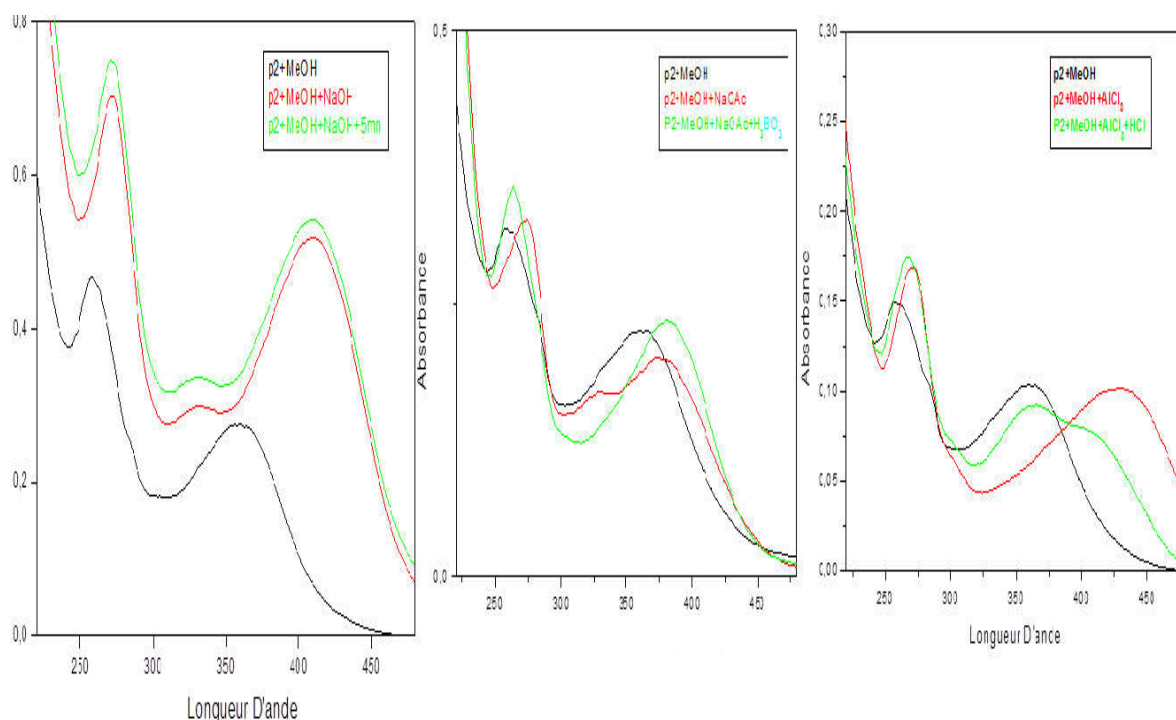


Figure IV- 22: La série spectrale UV du composé F_{9,3}

Les données de la série spectrale UV permettent de confirmer le squelette quercétine avec une substitution de la position 3. Ce substituant ne peut être que le sucre indiqué par ses signaux sur le spectre RMN proton.

Comme précédemment, pour déterminer la nature du sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide de ce composé qui a libéré deux entités sucre, à savoir le galactose et le rhamnose indiquant ainsi que le proton anomérique du rhamnose se trouve recouvert par l'eau de contamination du solvant, alors que la phase organique a donné une fluorescence jaune sous lumière de Wood confirmant la substitution de la position 3 de la quercétine par les deux sucres (galactose et rhamnose).

Pour mettre en évidence la jonction des deux sucres, on s'est basé sur les données de la littérature. En effet, lorsque le H-6 du galactose apparaît à un déplacement chimique inférieur à 4 ppm, ceci indique une jonction 1-6 rhamnose-galactose caractérisant l'entité robinobioside [8].

Toutes ces données permettent d'arriver à la structure finale du composé F_{9,3} représentée dans la figure IV-23 connue sous le nom de 3-O-robinobioside quercétine.

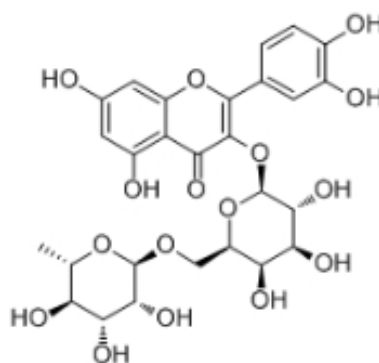


Figure IV-23 : Quercétine 3-O-robinobioside

IV-2 -3- Evaluation de l'activité antioxydante

IV-2 -3- 1- Dosage des polyphénols totaux

L'étude quantitative des deux extraits (Acétate d'éthyle et *n*-butanol) des parties aériennes de *G. cinerea* ssp. *ramosissima* au moyen du dosage spectrophotométrique avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des deux extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) et déterminées à partir de la courbe d'étalonnage (Figure IV-24)

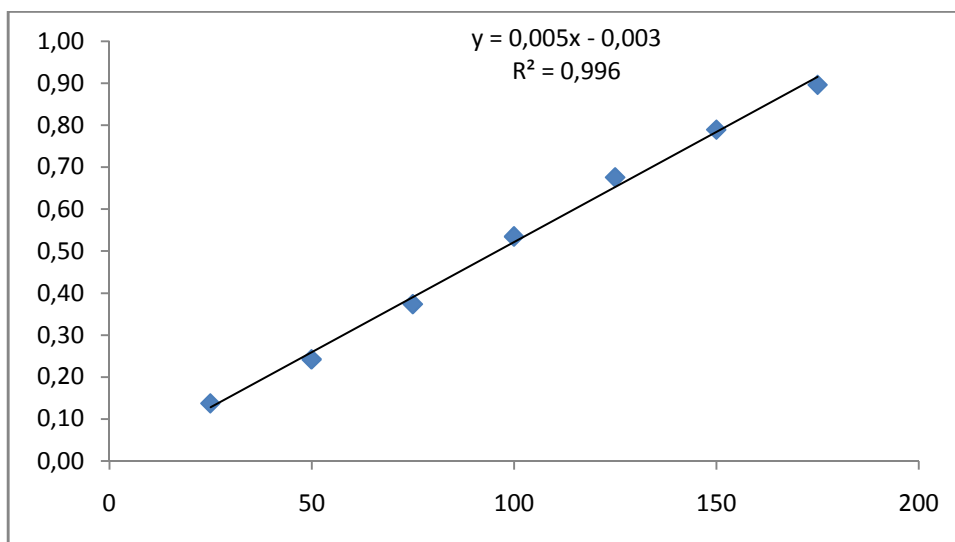


Figure IV-24: courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le tableau (IV-9) montre le taux des polyphénols totaux présents dans les deux extraits. Nous remarquons que l'extrait *n*-BuOH présente la teneur la plus élevée ($373,33 \pm 4,89$ mgEAG /g d'extrait) suivi par l'extrait AcOEt ($335,26 \pm 4,77$ mgEAG/g).

Tableau IV-9 : taux des polyphénols dans les deux extraits.

Extraits	TPC (mgEAG/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	$335,26 \pm 4,77$
<i>n</i> -Butanol	$373,33 \pm 4,89$

IV-2 -3- 2- Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes totaux dans les deux extraits a été quantifiée par la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Une courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine a été établie (Figure IV-25). La teneur en flavonoïdes est enregistrée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

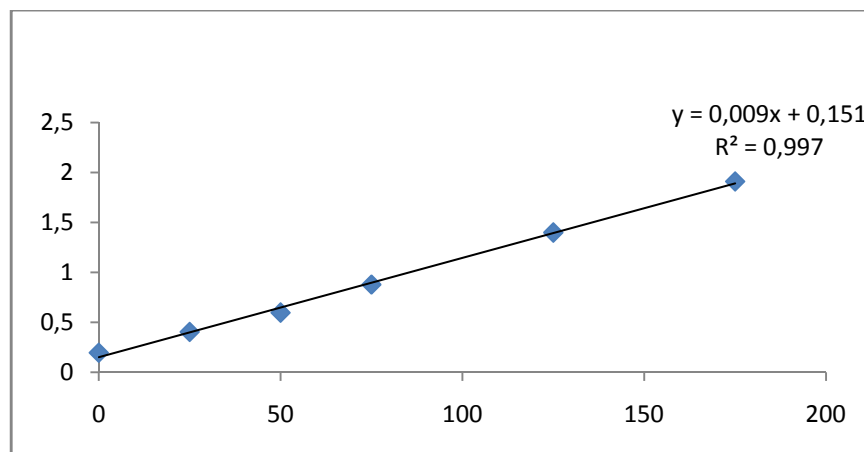


Figure IV-25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats de la quantification des flavonoïdes montrent que l'extrait AcOEt renferme la quantité des flavonoïdes la plus élevée (59,25 mgEQ/g) suivi de l'extrait *n*-BuOH (74,77 mgEQ/g) comme le montre le tableau (IV-10).

Tableau IV-10: Taux des flavonoïdes dans les deux extraits.

Extraits	TFC (mgEQ/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	59,25 ± 3,20
<i>n</i>-Butanol	74,77 ± 11,20

Les résultats de dosages des polyphénols et des flavonoïdes sont exprimés sous forme d'histogramme présentés dans la figure VI-26

L'examen de la figure IV-26 permet de relever les points suivants :

- La teneur en polyphenols dans l'extrait *n*-BuOH est supérieure à celle de l'extrait acétate d'éthyle.
- De même, la teneur en flavonoides dans l'extrait *n*-BuOH est supérieure à celle de l'extrait acétate d'éthyle.
- La proportion des polyphénols est plus importante que celle des flavonoïdes dans les deux extraits.

Ce résultat est en accord avec l'étude qualitative qui montre la présence des taches de coloration différente de celle qui caractérise les composés flavonoïdiques sous lumière UV.

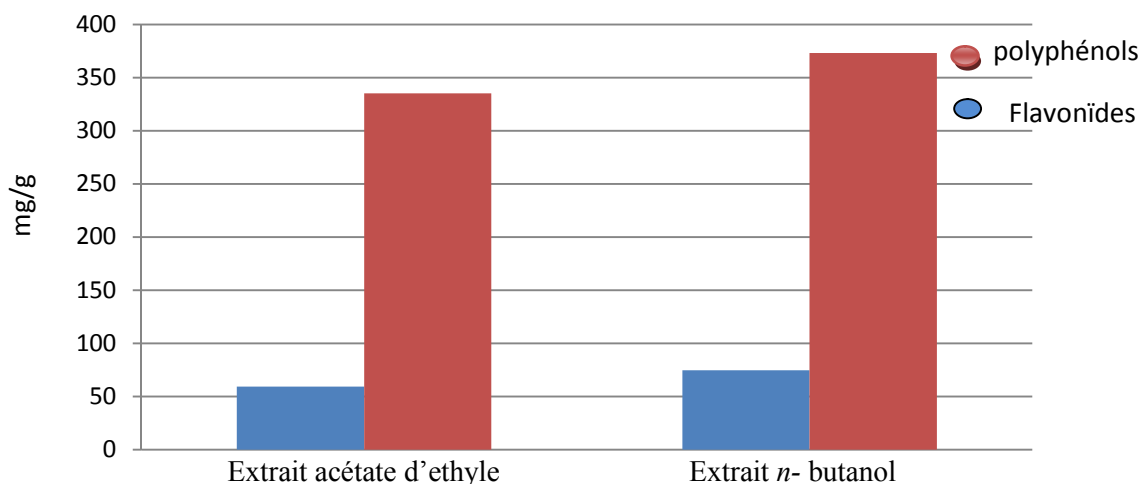


Figure IV-26 : La quantité en polyphénols (mgEAG/g d'extrait) et en flavonoïdes (mgEQ/g d'extrait) dans l'extrait acétate d'ethyle et n-butanol de l'espèce *G. cinerea ssp. ramosissima*

IV-2 -3- 3- Evaluation de l'activité antioxydante

Les résultats obtenus (Figure IV-27) montrent que les deux extraits ainsi le standard (référence) réduisent de manière dose dépendante le radical DPPH. C'est à dire le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration des extraits.

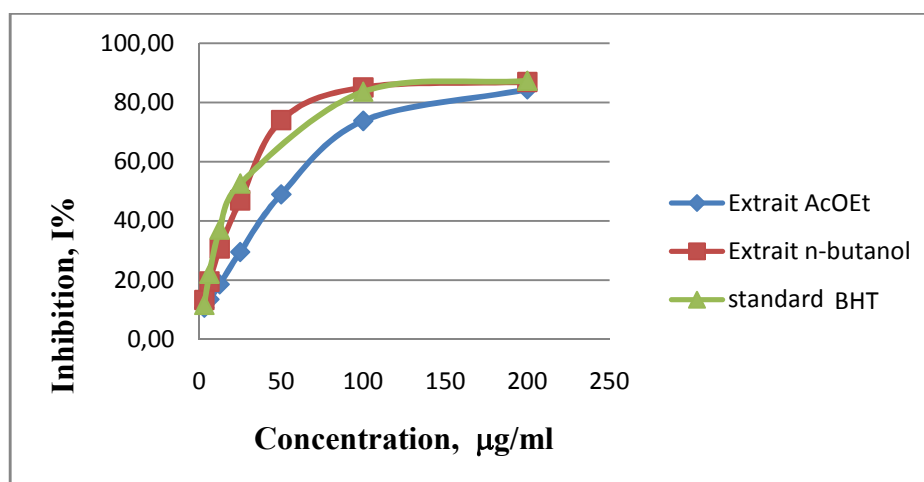


Figure IV-27 : % DPPH effet de balayage des échantillons testés.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH (IC_{50}) est calculée à partir de la courbe semi algorithmique :

Tableau IV-11: Valeurs de IC₅₀ dans les deux extraits et le standard.

Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)
Acétate d'éthyle	52,15 ± 2,97
<i>n</i> -butanol	27,13 ± 1,74
BHT (standard)	22,32 ± 1,19

L'extrait *n*-butanol présente l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH avec une valeur de IC₅₀ de 27,13 ± 1,74mg/ml très proche de celle du BHT utilisé comme standard avec une IC₅₀ de 22,32 ± 1,19mg/ml. L'activité de cet extrait semble être liée à la nature des composés qu'il renferme qui sont de nature flavonique et possède un squelette quercétine glycosilés en position 3 comme a été mentionné dans la partie chimique. L'extrait acétate d'éthyle présente un effet moins important (IC₅₀ 52,15 ± 2,97mg/ml).

IV-3 - Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *Cistanche violacea*

IV-3 -1- Le composé F₅₋₂

Le composé F₅₋₂ se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa fluorescence noire violette sous la lumière de Wood (365nm) indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol substitué en 3.

Les données de la série spectrale UV (figure IV-28) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 335 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', ainsi l'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm indique la présence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 7$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirme la présence du OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl₃ + HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 47$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre AlCl₃ + HCl par rapport au spectre AlCl₃, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Toutes ces données sont reportées dans le tableau IV-12.

Tableau IV-12: Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I $\lambda(\text{nm})$	Autres bandes $\lambda(\text{nm})$	Bande II $\lambda(\text{nm})$	Commentaire
MeOH	335	/	268	flavone
+ NaOH	392	327	276	OH libre en 4' OH libre en 7
+ NaOH+5mn	392	325	276	Spectre stable
+AlCl ₃	383	346 302	276	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ /HCl	382	341 301	277	
+NaOAc	354	301	275	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	342	301	269	/

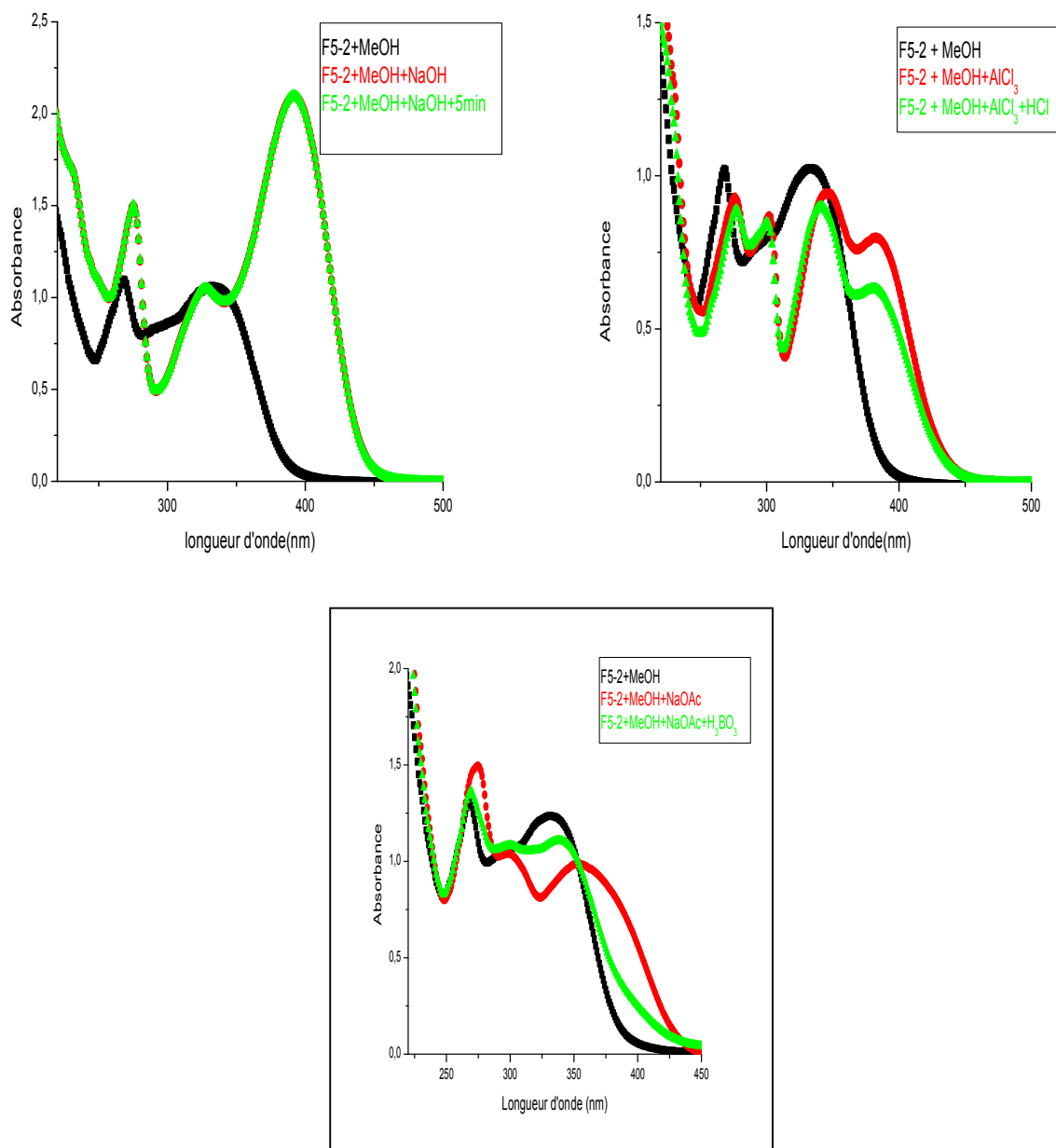


Figure IV-28 : Série spectrale UV du composé F_{5-2}

L'étude du spectre RMN ^1H de ce composé (figure IV-29), enregistré dans CD_3OD montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde reconnaissable par :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_{H} 6,59 ppm attribuable au proton H-3 en faveur d'un squelette de type flavone.
- Deux doublets ($J= 2,1$ Hz) d'intégration 1H chacun, le premier à δ_{H} 6,45 ppm attribuable au proton H-8 et le deuxième à δ_{H} 6,20 ppm attribuable au proton H-6. Ces deux signaux indiquent clairement une substitution des positions 5 et 7 du cycle A.

- Deux autres doublets ($J= 9$ Hz) d'intégration 2H chacun, le premier à δ_H 7,85 ppm attribuables aux protons H-2' et H-6' et le second à δ_H 6,93 ppm attribuables aux protons H-3' et H-5' du cycle B du flavonoïde. Ces deux signaux indiquent clairement une disubstitution en para du cycle B.

Le tableau IV-13 rassemble les données de la RMN proton

Tableau IV-13: Données du spectre RMN 1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attributions
6,59	1H	<i>s</i>	H-3
6,45	1H	<i>d</i> (2.1)	H-8
6,20	1H	<i>d</i> (2.1)	H-6
7,85	2H	<i>d</i> (9)	H-2', H-6'
6,93	2H	<i>d</i> (9)	H-3', H-5'

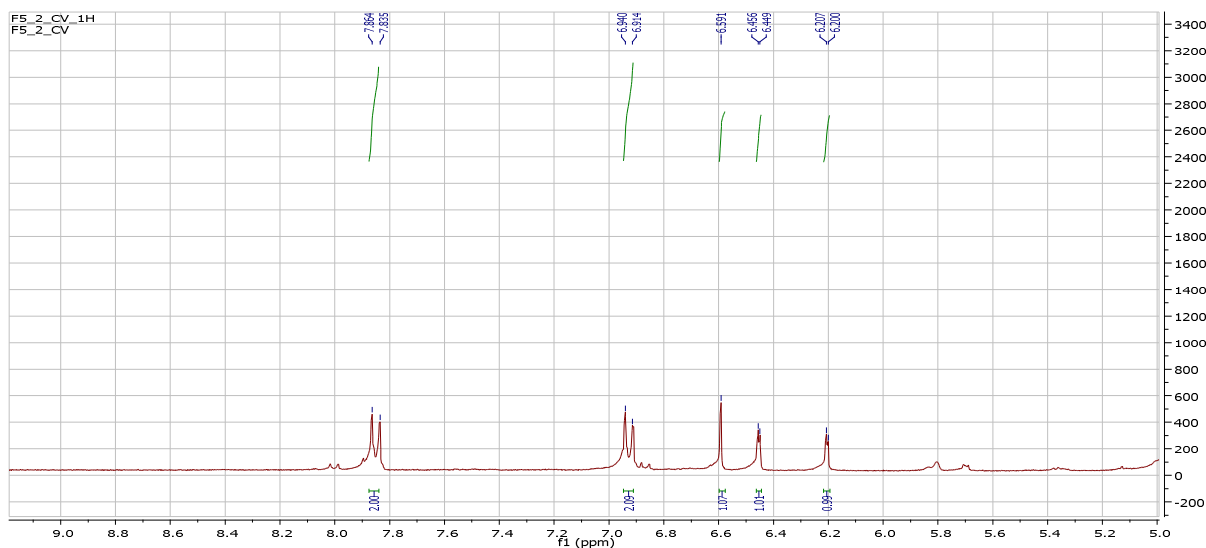


Figure IV-29: Spectre RMN 1H (300 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé F_{5-2}

L'ensemble des données de la série spectrale UV ainsi que la RMN 1H oriente vers le composé : **4', 5, 7-trihydroxyflavone** connue sous le nom d'**Apigénine**. Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Cistanche* [9].

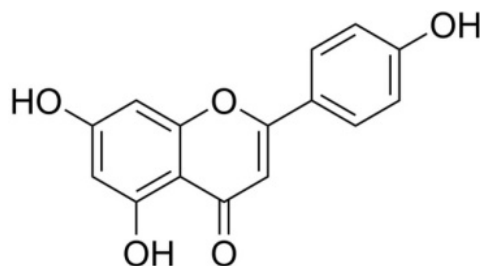


Figure IV-30: Apigénine

IV-3 -2- Le composé F_{7-3}

Le composé F_{7-3} se présente sous forme d'une poudre amorphe soluble dans le méthanol.

Le spectre de masse du composé F_{7-3} enregistré sur un spectromètre muni d'un analyseur Q-TOF en mode électro-nébulisation positif (ESI-Q-TOF (+)) présente un ion quasi-moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 287,1126$ (100%) correspondant à la formule brute $C_{13}H_{18}O_7$ indiquant que ce composé comporte 5 insaturations.

Le spectre RMN ^{13}C (figure IV-31) et le spectre DEPT 135 indiquent la présence de 13 signaux qui peuvent être répartis comme suit :

- Trois carbones quaternaires dont un à δ_c 89,2ppm et deux carbonyles d'ester à δ_c 175 et 177,1ppm.
- Quatre méthynes dont un se trouve très déblindé à δ_c 102,2ppm et un autre à 79,5ppm.
- Cinq méthylènes dont deux sont oxygénés à δ_c 56,3 et 71,3ppm.
- Un méthyle oxygéné à δ_c 52ppm.

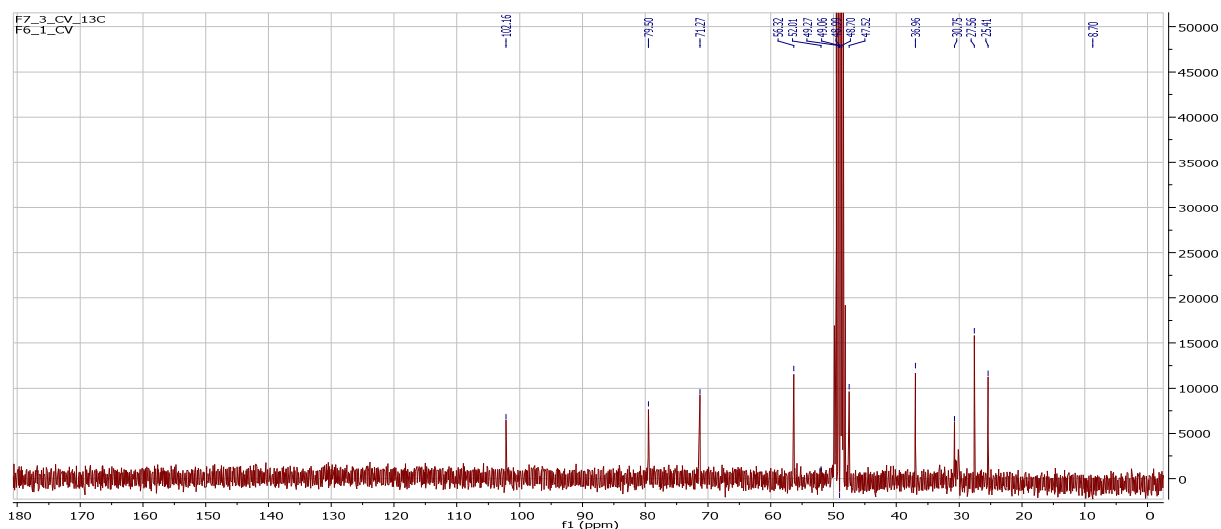


Figure IV-31: Spectre RMN ^{13}C ($CD_3 OD$; 75MHz) du composé F_{7-3} .

L'étude simultanée des spectres RMN 1H (figure VI31 et 31-a étalé) et HSQC (figure VI-32) de ce composé montre:

- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J= 5,7$ Hz) à δ_H 5,34 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_c 102,2ppm. La valeur du déplacement chimique du proton ainsi que celle de son carbone indique une dioxygénation de ce noyau.

- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J=9,9$ Hz) à δ_H 4,44ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_C 71,3ppm, ce dernier montre une autre tache de corrélation avec le proton à δ_H 3,38 ppm qui apparait sous forme d'un doublet avec la même constante de couplage ($J=9,9$ Hz) sur le spectre RMN 1H . Cette observation ainsi que la valeur de la constante de couplage indiquent clairement que ces deux protons sont diastéréotopiques. Ce groupement méthylène est oxygéné vu les valeurs des déplacements chimiques relativement élevées.
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet de triplet ($J= 9,3 ; 5,4$ Hz) à δ_H 4,13ppm, celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_C 79,3ppm.
- Un signal d'intégration 1H sous forme de doublet de triplet ($J=13,5 ; 2,4$ Hz) à δ_H 3,92ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_C 56,3ppm, ce même carbone présente sur le spectre HSQC une autre tache de corrélation avec un deuxième proton résonant à δ_H 3,48ppm. Ce dernier proton apparait sur le spectre proton sous forme d'un doublet de doublet de doublet ($J=11,4 ; 5,1 ; 2,1$ Hz) indiquant que ces deux protons sont également diastéréotopiques. Ce groupement méthylène est également oxygéné vu les valeurs des déplacements chimiques.
- Un signal d'intégration 3H sous forme d'un singulet à δ_H 3,66ppm attribuable à un groupement méthoxye corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 52,0 ppm.

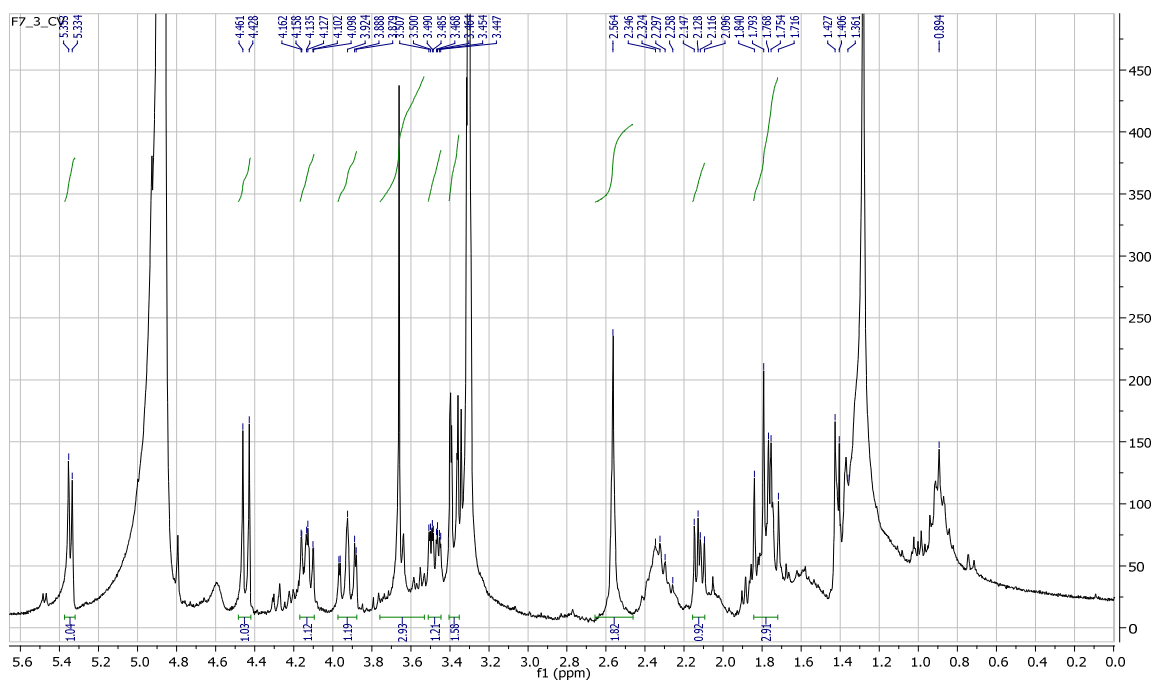


Figure IV-31: Spectre RMN 1H (300 Hz, CD_3OD) du composé F7-3

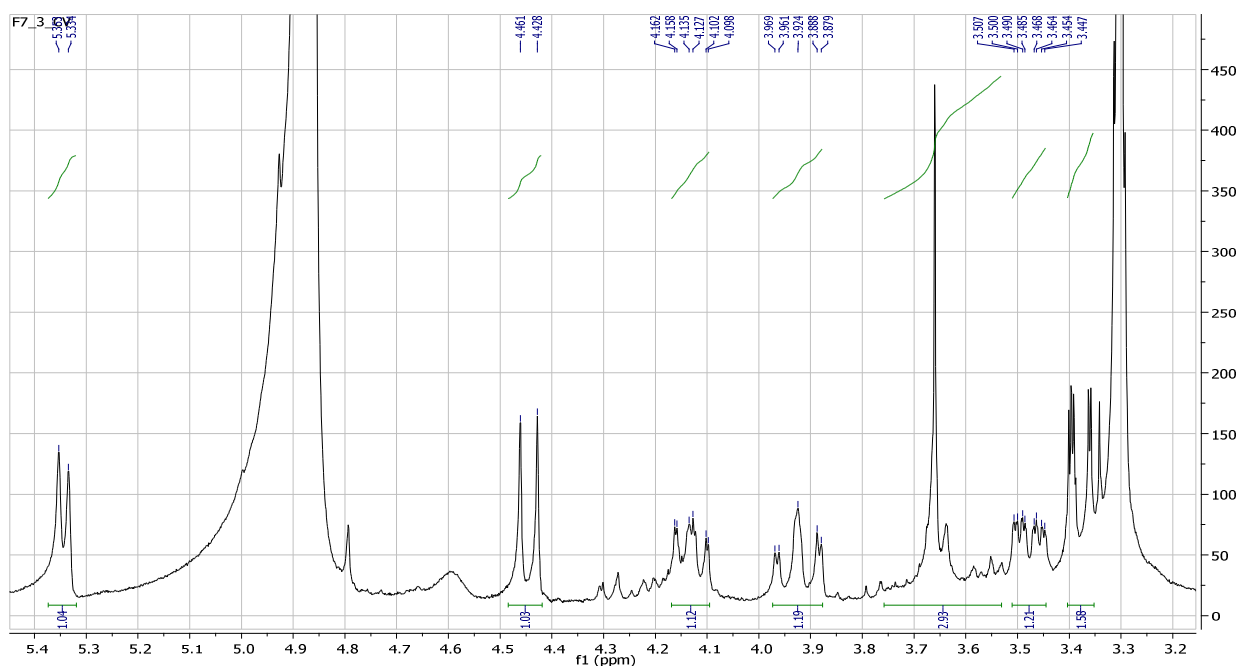


Figure IV-31-a : Spectre RMN ^1H étalé (3,1-5,5ppm) du composé F_{7-3}

En plus des signaux signalés précédemment, le spectre RMN ^1H étalé figure (VI- 31b étalé) montre :

- Un signal d'intégration 2H sous forme d'un singulet à δ_{H} 2,56 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 30,8ppm.
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un multiplet à δ_{H} 2,35 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 27,6ppm.
- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ($J= 8,1 ; 5,7$ Hz) à δ_{H} 2,12ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 47,5ppm.
- Sur le spectre HSQC, le signal résonant à δ_{C} 25,4ppm corrèle avec deux autres signaux, le premier à δ_{H} 1,84ppm et le second à δ_{H} 1,41ppm. Ces deux signaux apparaissent sur le spectre proton sous forme de multiplet d'intégration 1H chacun permettant de déduire qu'ils sont également diastéréotopiques.
- Un signal d'intégration 2H sous forme d'un singulet à δ_{H} 1,79 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 37,0ppm.

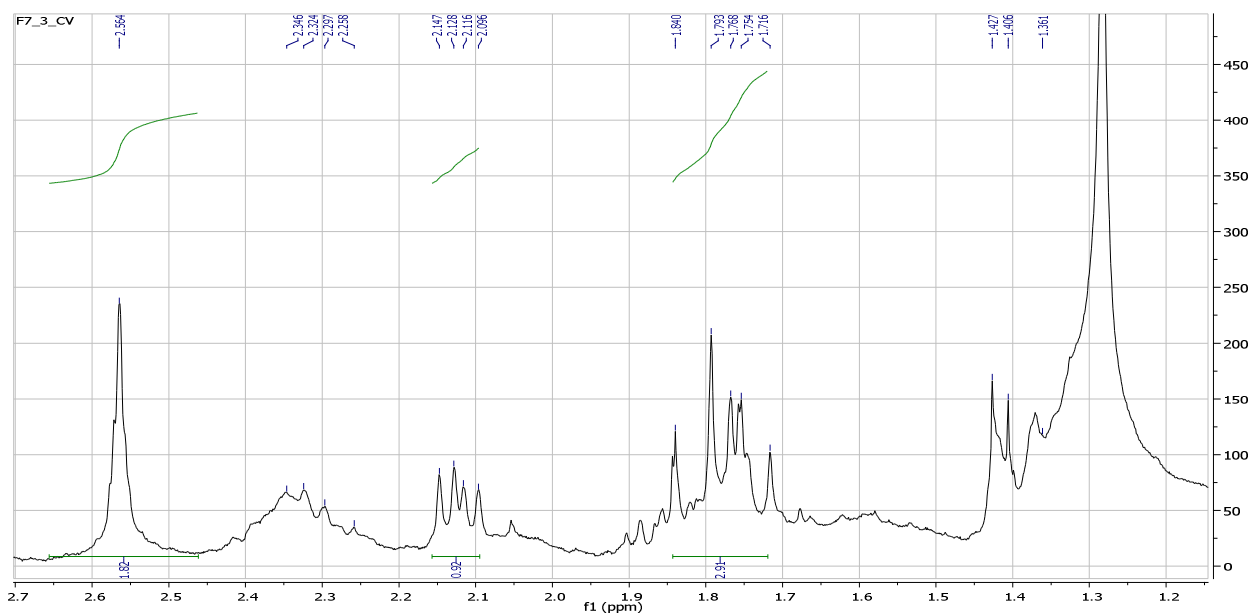


Figure IV-31-b: Spectre RMN ^1H étalé (1,1-2,7ppm) du composé F₇₋₃

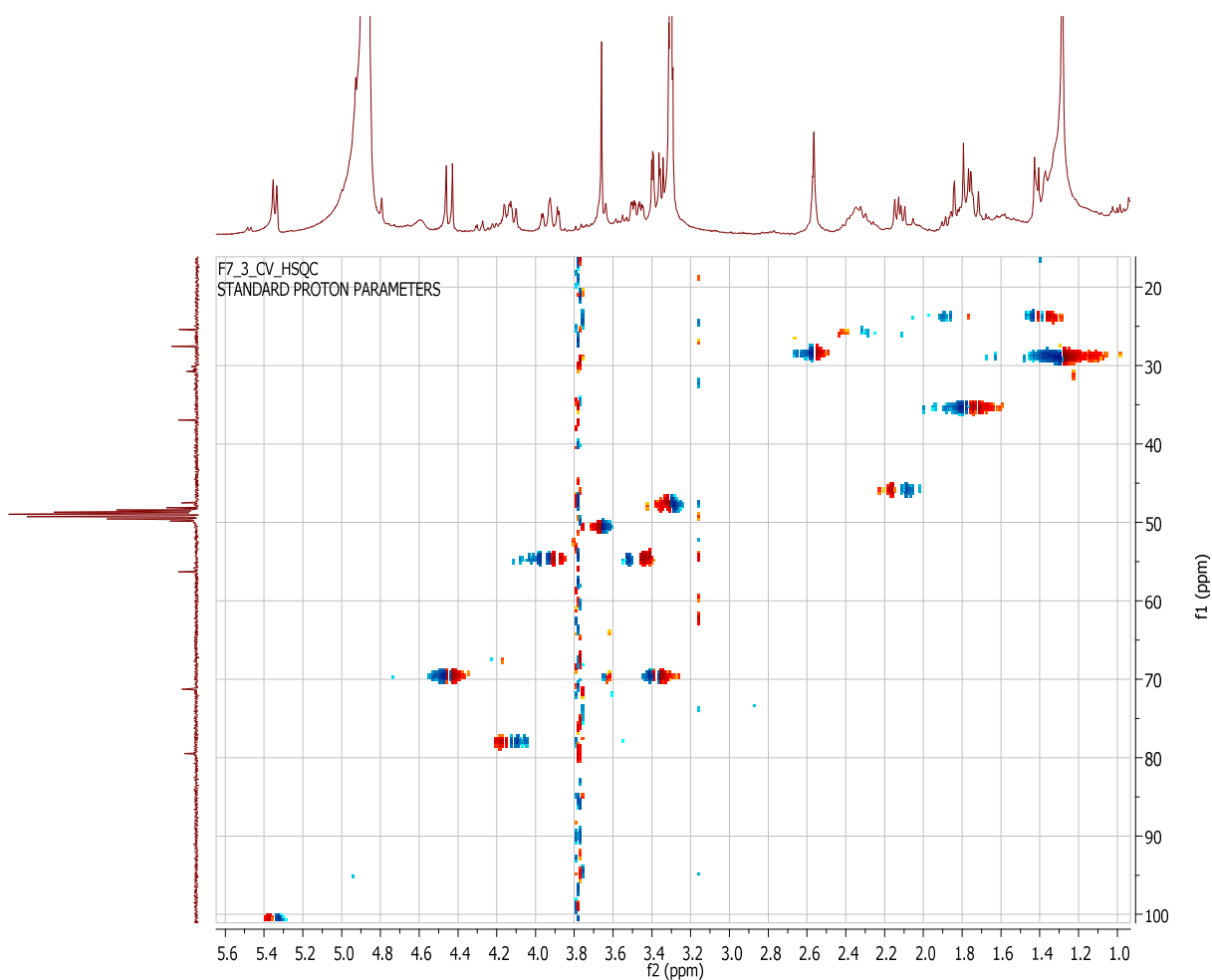


Figure IV-32 : Spectre HSQC du composé F₇₋₃

L'analyse simultanée des spectres de l'expérience homonucléaire COSY ^1H - ^1H (figure IV-33) et l'expérience hétéronucléaire HMBC (figure IV-34) permet de mettre en évidence les corrélations suivantes :

- Le proton à δ_{H} 5,34ppm (δ_{C} 102,2ppm) et le proton à δ_{H} 2,12ppm (δ_{C} 47,5ppm).
- Ce dernier (δ_{H} 2,12ppm) montre une tache de corrélation avec le proton à δ_{H} 2,35ppm (δ_{C} 27,6ppm) qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un multiplet.
- Ce proton (δ_{H} 2,35ppm) montre deux taches de corrélation avec les deux protons diastéréotopiques à δ_{H} 1,84 et 1,41 ppm (δ_{C} 25,4ppm).
- Ces deux derniers protons corrélaient également avec les deux protons diastéréotopiques résonant à δ_{H} 3,92 et 3,48ppm qui sont portés par le carbone résonant à δ_{C} 56,3ppm.
- Ce dernier carbone montre une tache de corrélation sur le spectre HMBC avec le proton à δ_{H} 5,34ppm (δ_{C} 102,2ppm). Cette dernière observation (tache de corrélation entre le C 56,3ppm et le proton 5,34ppm), additionnant à ceci l'absence d'une tache de corrélation entre les deux derniers protons diastéréotopiques (δ_{H} 3,92 et 3,48ppm) et le proton (5,34ppm) sur le spectre COSY ainsi que le déblindage de l'ensemble de ces protons indiquent la présence d'un hétéroatome entre les deux carbones porteurs de ces protons qui ne peut être qu'un atome d'oxygène ce qui permet de déduire la présence d'un cycle pyrane.
- D'autre part, les protons du groupement méthylène à δ_{H} 1,79ppm (δ_{C} 37,0 ppm) montrent une tache de corrélation sur le spectre COSY ^1H - ^1H avec le proton à δ_{H} 4,13ppm. Ces deux protons (δ_{H} 1,79ppm) montrent sur le spectre HMBC des taches de corrélation avec les carbones à δ_{C} 27,6ppm (δ_{H} 2,35ppm); 47,5ppm (δ_{H} 2,12ppm) ; 79,5ppm (δ_{H} 4,13 ppm) et une dernière tache avec le carbone quaternaire à δ_{C} 89,2ppm. Ce dernier carbone montre une tache de corrélation avec le proton à δ_{H} 2,12ppm (δ_{C} 47,5ppm) du groupement méthylène du cycle pyrane ce qui permet la création d'une deuxième fermeture.

L'ensemble de cette analyse et en se reportant aux données de la littérature permettent de déduire qu'il s'agit d'un squelette iridoïde typique du genre *Cistanche* [10] comme le montre la figure ci-dessous (figure IV-35).

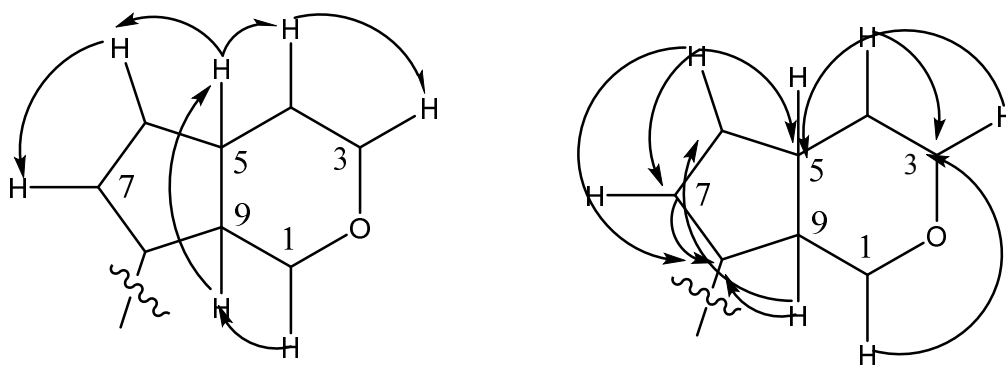


Figure IV-35: squelette iridoïde avec numérotation

Toujours sur le spectre HMBC (figure IV-34), l'un des protons diastéréotopiques (δ_H 4,44 ppm) corrèlent avec les carbones à δ_C 47,5ppm (δ_H 2,12ppm); δ_C 102,2ppm (δ_H 5,34ppm) et le carbone quaternaire à δ_C 89,2ppm permettant de déduire la présence d'un fragment époxyde produit par une déshydratation entre les hydroxyles des carbones C-1 et le carbone à δ_C 71,3 ppm noté C-10 sur le squelette iridoïde.

Un retour au spectre RMN 1H (figure IV-31) permet l'observation de deux autres signaux, le premier sous forme d'un singulet d'intégration 2H à δ_H 2,56ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 30,8ppm, le deuxième signal à δ_H 3,66ppm sous forme d'un singulet d'intégration 3H indiquant ainsi la présence d'un groupement méthoxyle.

L'analyse du spectre HMBC (figure IV-34) montre, d'une part, deux taches de corrélation entre les protons équivalents du groupement CH_2 à δ_H 2,56ppm et les deux signaux caractéristiques de deux groupements carbonyle à δ_C 175ppm et 177,1ppm, ceci indique clairement que ce CH_2 est limité par les deux carbonyles, et d'autre part les protons du groupement méthoxyle corrèlent avec le groupement carbonyle résonant à δ_C 175ppm. Ceci permet de déduire la chaîne latérale reportée dans la figure IV-36.

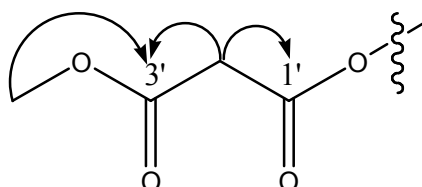


Figure IV-36: Chaîne latérale faisant partie du composé F₇₋₃.

Cette dernière chaîne ne peut être portée que par le carbone quaternaire C8 vu la valeur de son déplacement chimique.

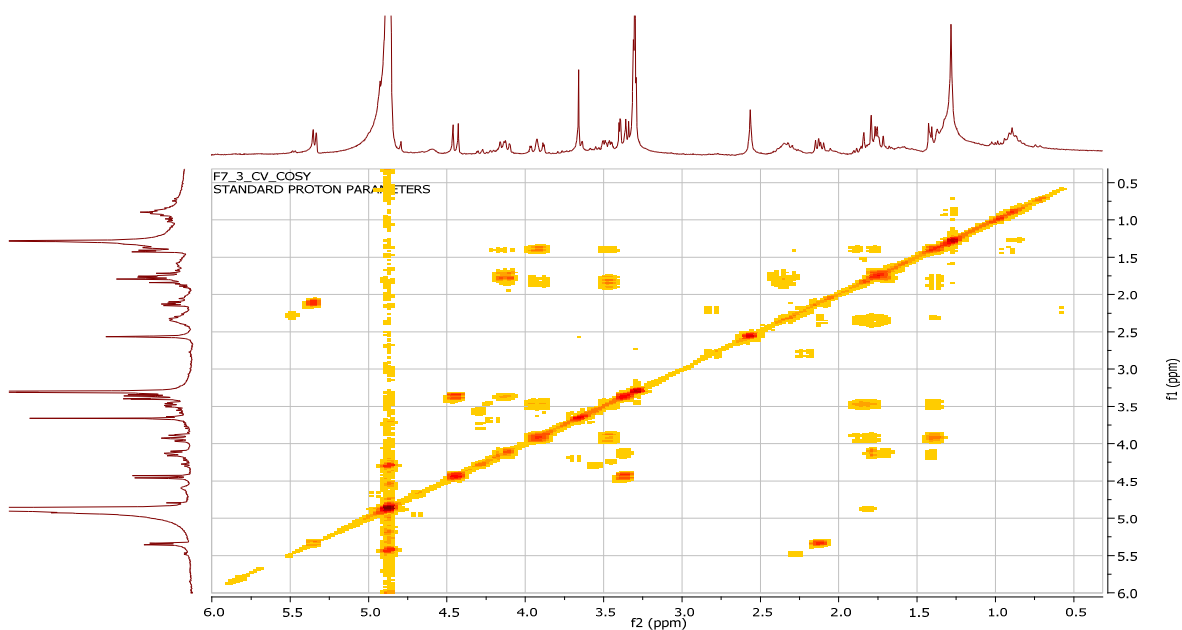


Figure IV-33 : spectre $\text{COSY}^1\text{H}-^1\text{H}$ du composé F_{7-3}

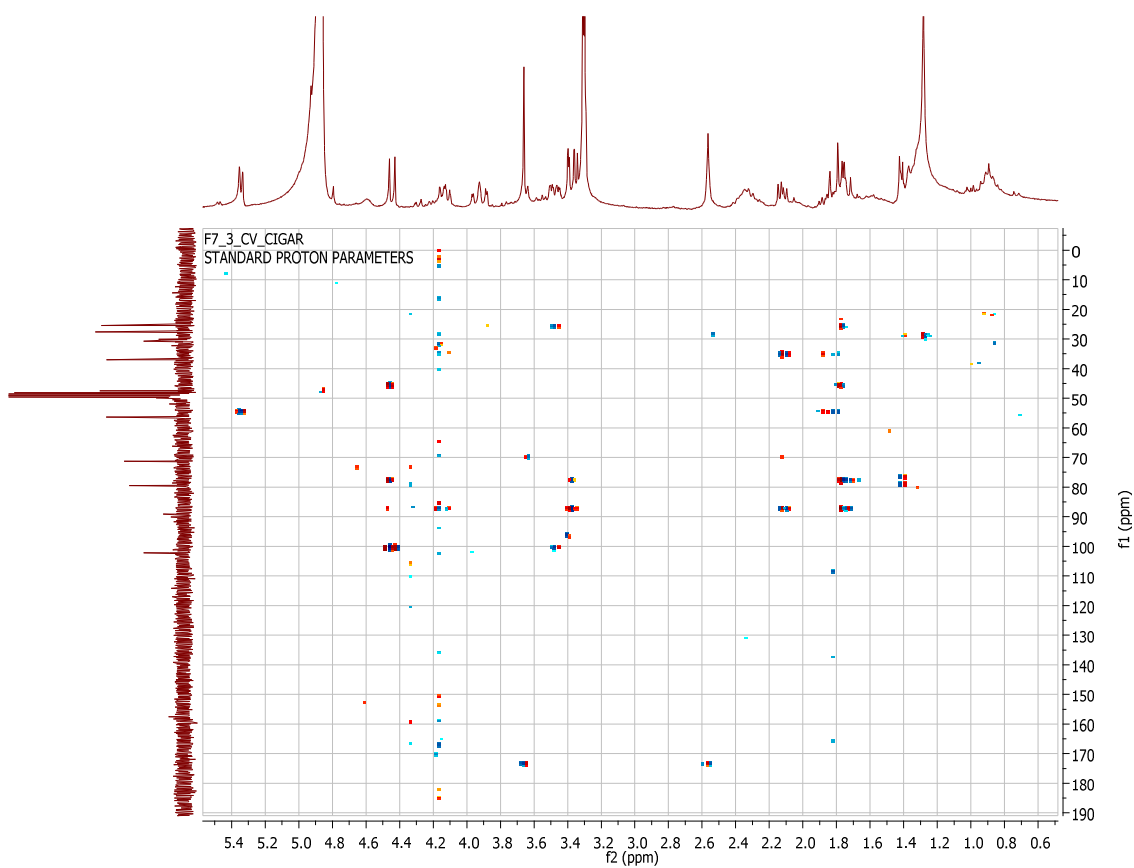


Figure IV-34: spectre HMBC du composé F_{7-3}

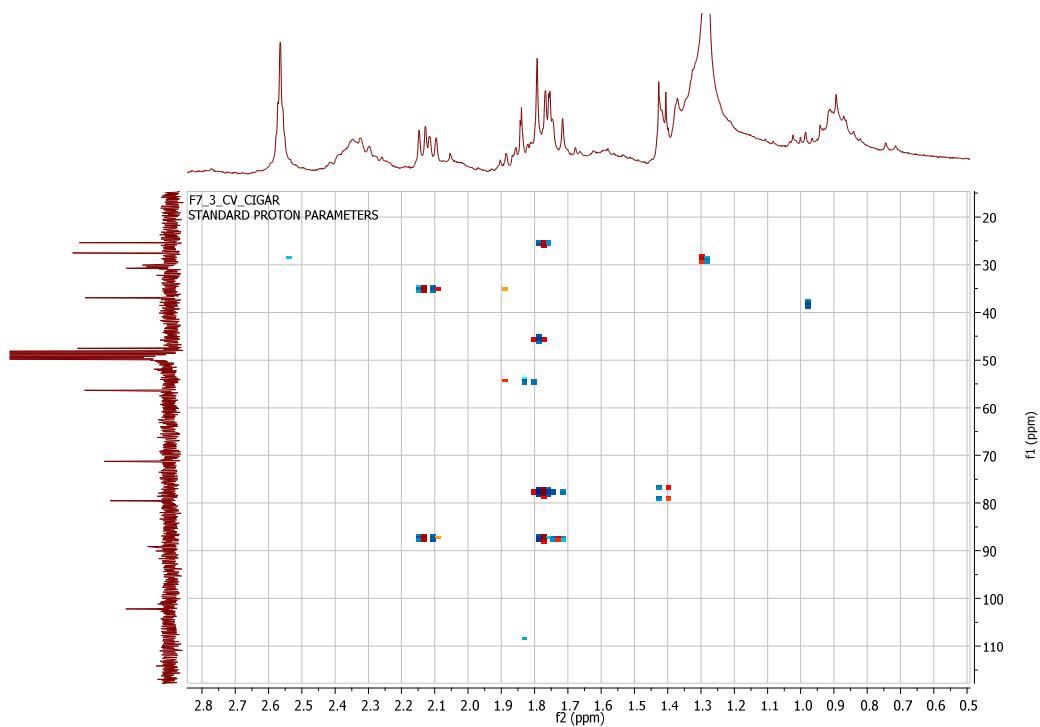


Figure IV-34-a : spectre HMBC étalé du composé F_{7-3}

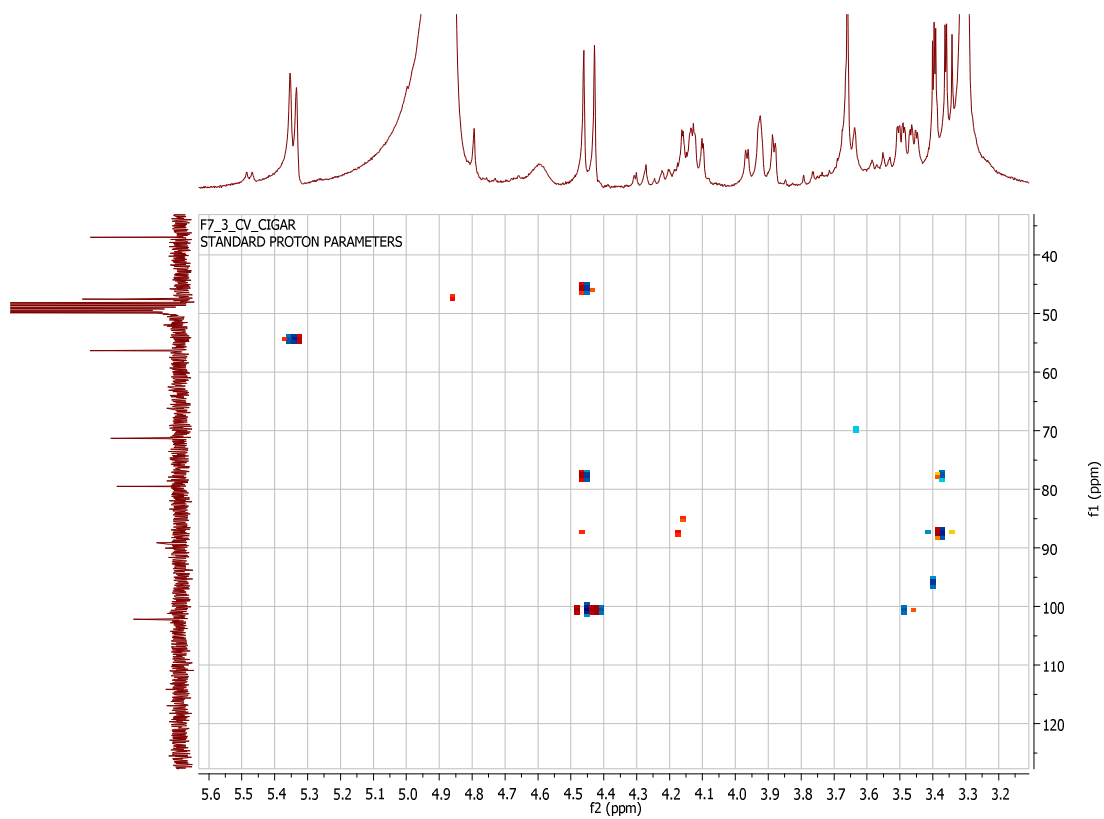


Figure IV-34-b : spectre HMBC étalé du composé F_{7-3}

Cette analyse permet de proposer la structure plane présentée ci-dessous pour le composé F₇₋₃.

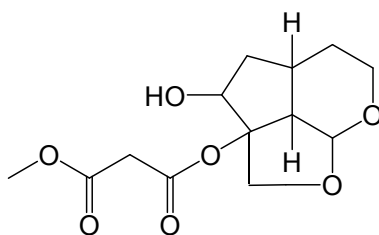


Figure IV-37: Structure plane du composé F₇₋₃

La stéréochimie de cette structure a été déterminé en se basant sur le spectre de l'expérience NOESY Figure IV-38. En effet, ce spectre montre des corrélations NOE entre les paires de protons suivantes : H-1 et H-5, ce dernier et le H-9, H-7 et H10 β .

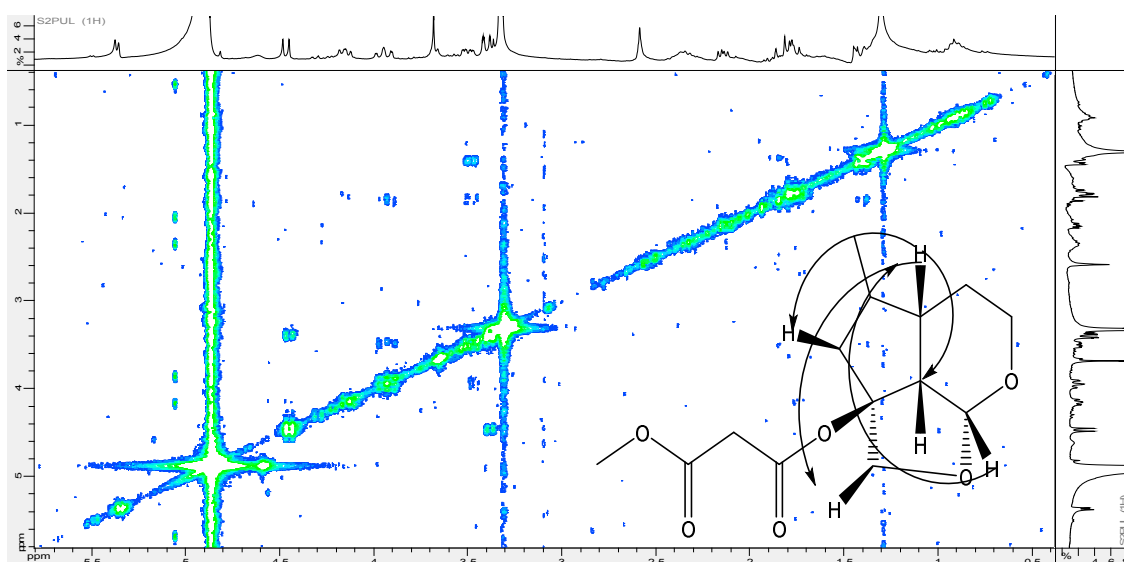


Figure IV-38: Spectre NOESY du composé F₇₋₃

L'ensemble de ces données spectroscopiques a permis d'identifier le composé **F7-3** comme étant l'iridoïde : Cistanin-8-methyl-malonate. Ce composé que nous avons nommé **violaceine** est décrit pour la première fois dans la littérature.

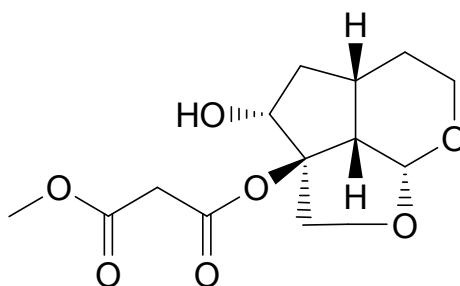


Figure IV-39 : Cistanine-8-methyl-malonate (violaceine)

Toutes les données spectrales du composé F₇₋₃ sont rassemblées dans le tableau (VI-14).

Tableau VI-14: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé F₇₋₃

Position	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	HMBC (H→C)
1	5,34 d (5,7)	102,2	CH	C-3 ; C-5
3	3,92 dt (13,5 ; 2,4) 3,48 ddd (11,4 : 5,1 ; 2,1)	56,3	CH ₂	C-1 ; C-5
4	1,84 m 1,41 m	25,4	CH ₂	C-3
5	2,35 m	27,6	CH	
6	1,79 m	37,0	CH ₂	C-5 ; C-7 ; C-8 ; C-9 ; C-10
7	4,13 dt (9,3 ; 5,4)	79,5	CH	C-8
8	--	89,2	C	
9	2,12 dd (8,1 ; 1,2)	47,5	CH	C-6 ; C-8 ; C-10
10	4,44 d (9,9) 3,38 d (9,9)	71,3	CH ₂	C-1 ; C-7 ; C-9 C-7 ; C-8
1'	--	177,1	C	
2'	2,56 s	30,8	CH ₂	C-1' ; C-3'
3'	--	175,0	C	
3'OMe	3,66 s	52,0	CH ₃	C-3'

IV-3 -3- Le composé F_{12-7}

Le composé F_{12-7} se présente sous forme huileuse d'une couleur verdâtre. Après révélation avec le révélateur acide il apparaît sous forme d'une tache de coloration rouge.

Le spectre RMN ^1H (figure IV-40) de ce composé montre deux zones distinctes de signaux, l'une renseigne sur la présence de protons aromatiques et l'autre indique la présence de plusieurs entités osidiques.

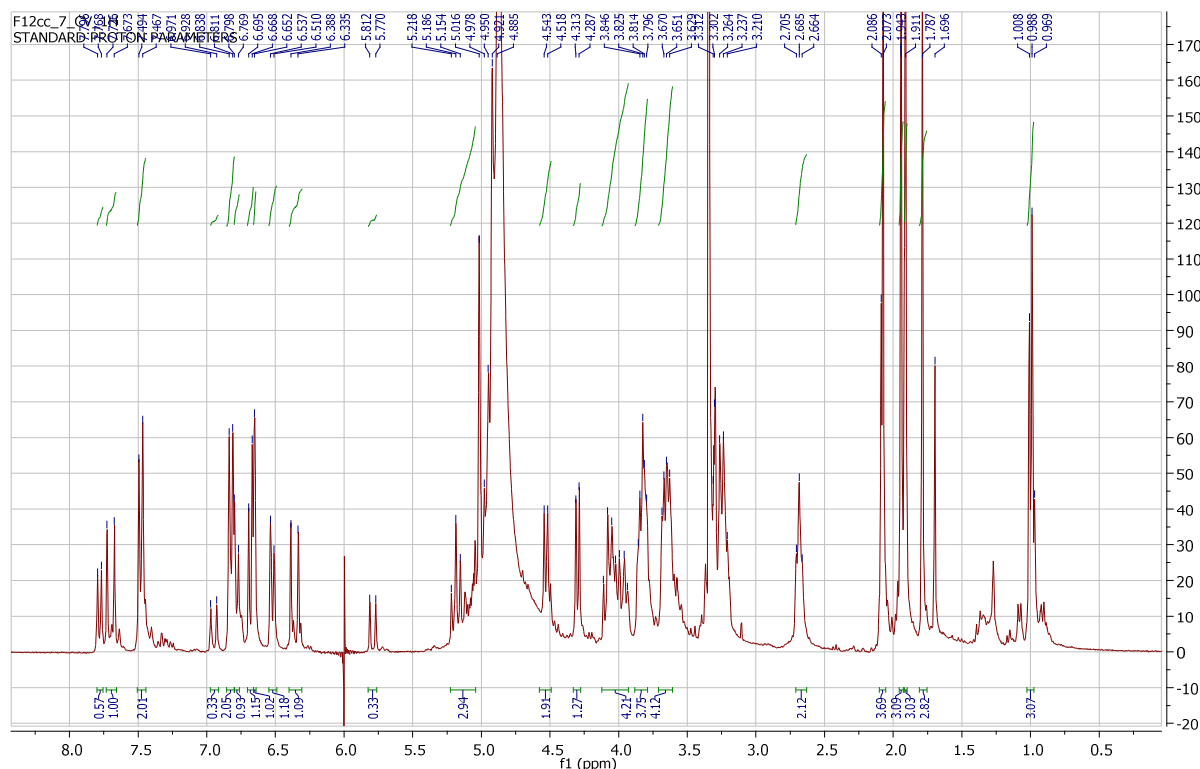


Figure IV-40 : Spectre ^1H (CD_3OD ; 300MHz) du composé F_{12-7}

L'analyse simultanée des spectres RMN ^1H étalé (figure IV-40a et IV-40-b), COSY (figure IV-41) et HSQC (figure IV-42) montre :

- Un signal sous forme de doublet ($J= 8,1\text{Hz}$) d'intégration 1H à δ_{H} 6,68ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 116,3ppm.
- Un signal sous forme de singulet large d'intégration 1H à δ_{H} 6,65ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 117,2ppm.
- Un signal sous forme d'un doublet large ($J= 8,1\text{Hz}$) d'intégration 1H à δ_{H} 6,52ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 121,3ppm.

Ces trois signaux permettent de déduire la présence d'un cycle aromatique trisubstitué en dans les position 1, 3 et 4.

- Un signal sous forme de triplet montrant un couplage vicinal ($J = 6,3$ Hz) à δ_H 2,68 ppm d'intégration 2H corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à 36,2ppm.
- Ce signal montre sur le spectre COSY deux taches de corrélations avec deux autres signaux, le premier résonne à δ_H 3,61ppm alors que le deuxième à δ_H 4,02ppm, ces derniers corrélerent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à 71,9ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des protons ainsi que celui de leur carbone indiquent que ce groupement méthylène est oxygéné.

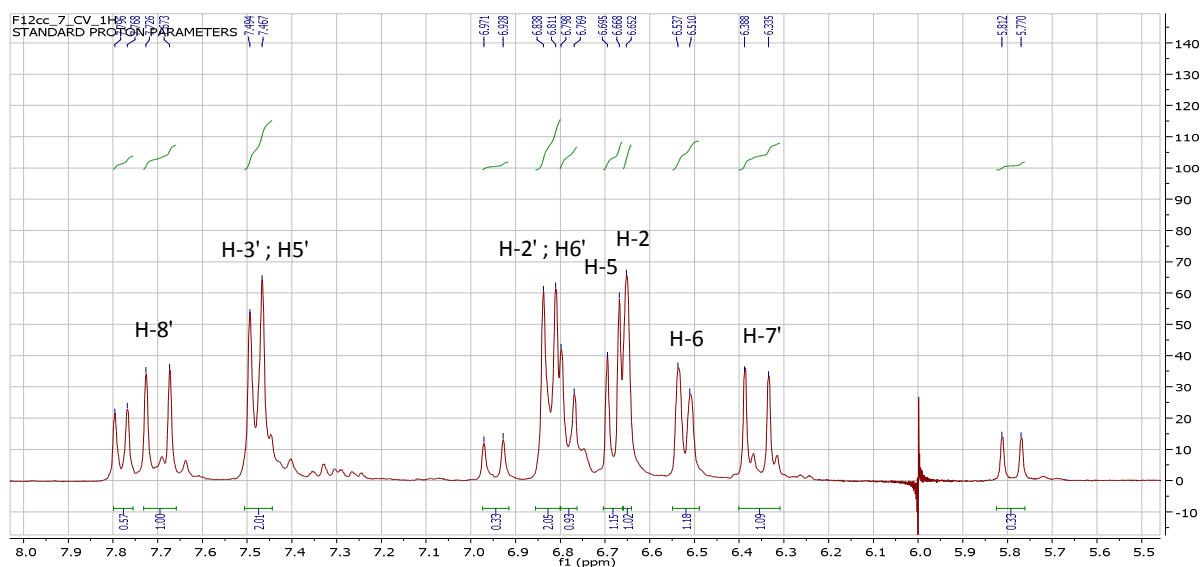


Figure IV-40-a : Spectre 1H étalé (5,3-8,3ppm) du composé F_{12-7}

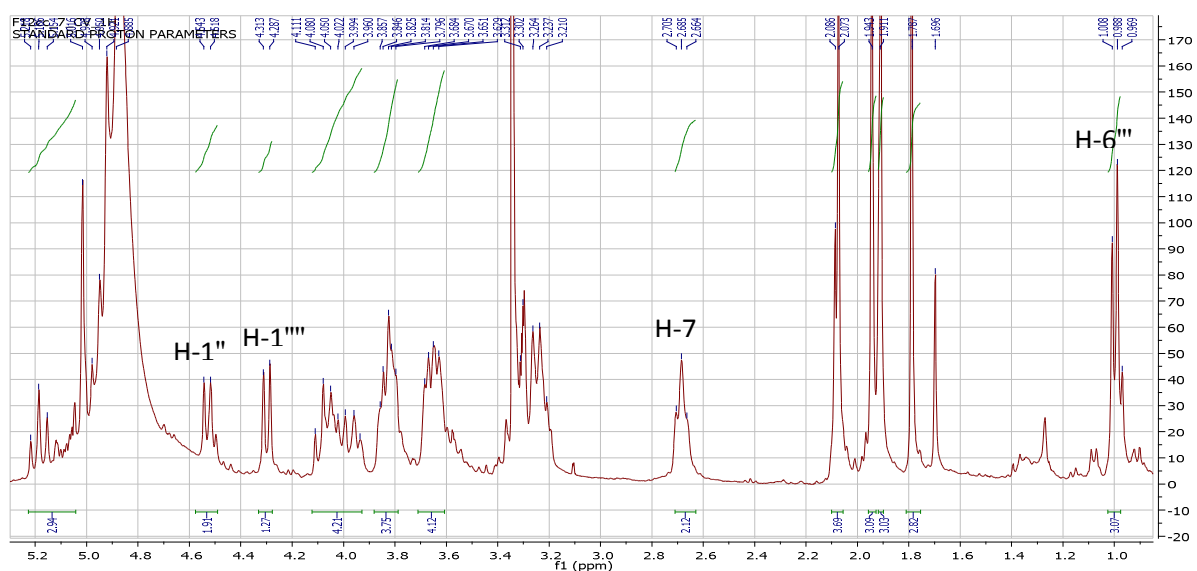


Figure IV-40-b: Spectre RMN étalé (0,75 ; 5,25ppm) du composé F_{12-7}

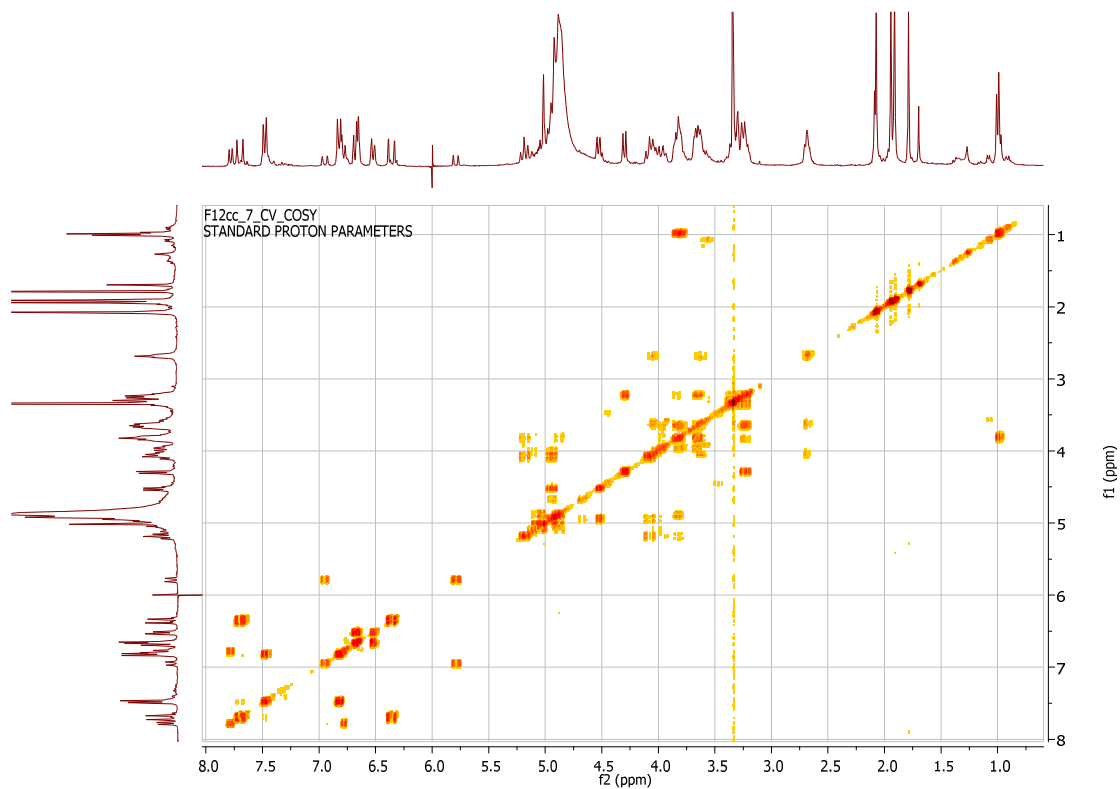


Figure IV-41 : Spectre COSY du composé F₁₂₋₇

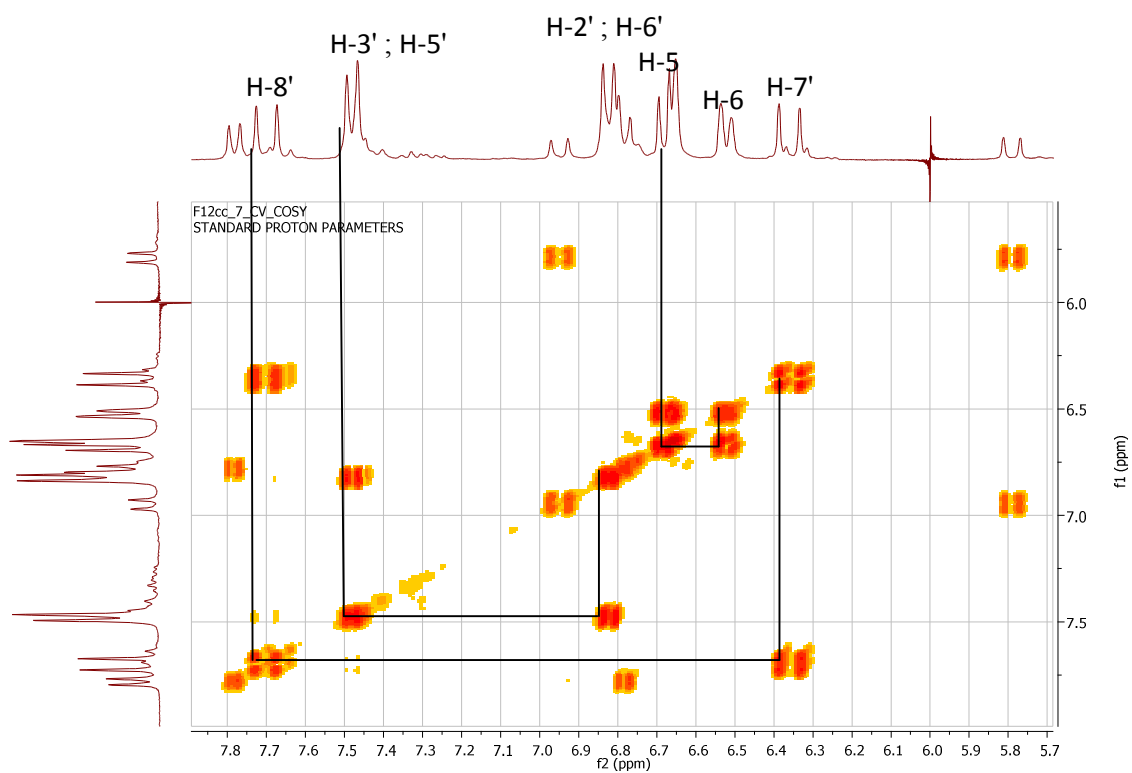


Figure IV-41-a: Spectre COSY étalé du composé F₁₂₋₇

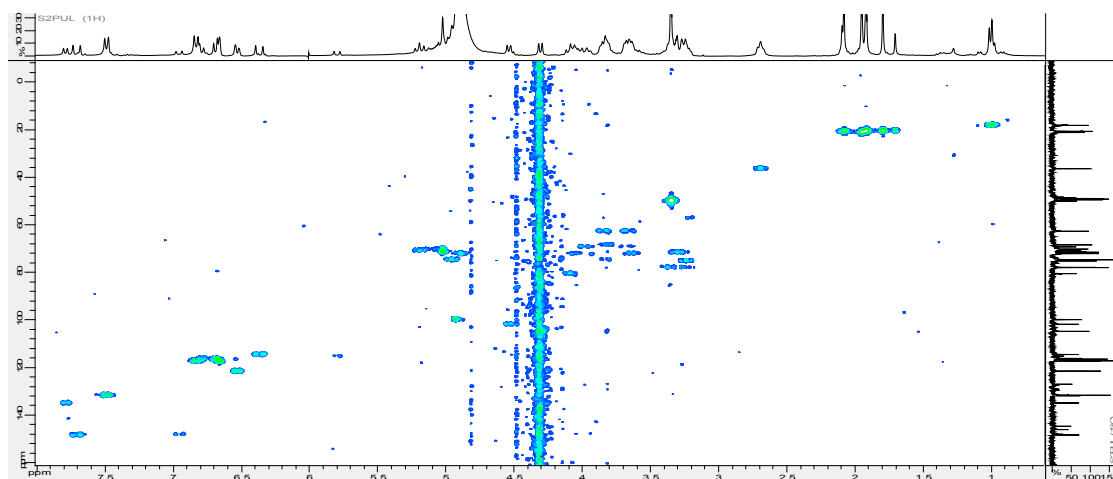


Figure IV-42: Spectre HSQC du composé F_{12-7}

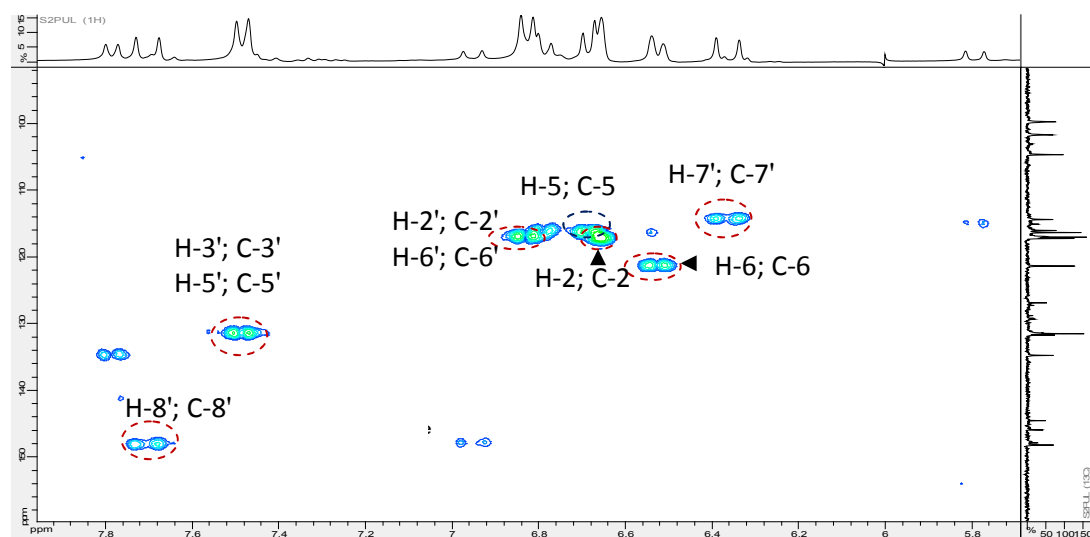


Figure IV-42-a: Spectre HSQC étalé du composé F_{12-7}

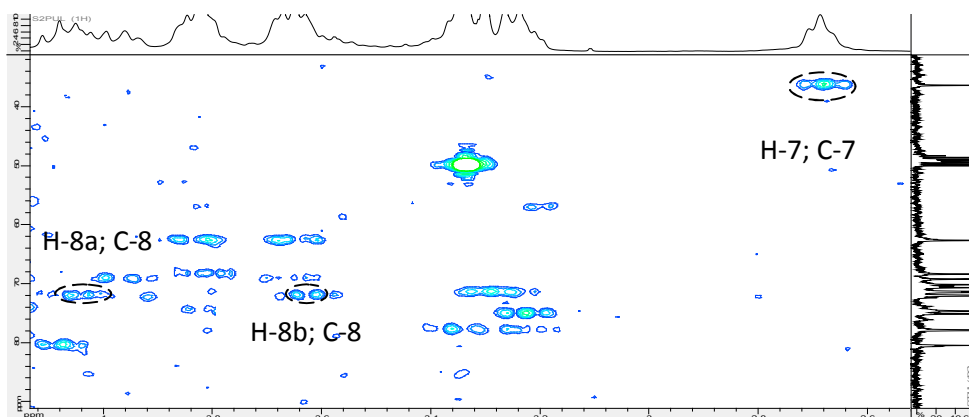


Figure IV-42-b: Spectre HSQC étalé du composé F_{12-7}

L'ensemble de cette première analyse montre la présence d'un cycle aromatique trisubstitué et d'un groupement $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$.

L'observation du spectre HMBC (figure IV-43) montre des taches de corrélation entre:

- Le proton H-2 du cycle aromatique (δ_{H} 6,65ppm ; δ_{C} 117,2ppm) et trois carbones, le premier attribuable à C-6 (δ_{C} 121,3ppm) déjà identifié, le second est un carbone quaternaire aromatique oxygéné résonnant à δ_{C} 144,5ppm attribuable au C-4 et le troisième carbone résonne à δ_{C} 131,6ppm ne peut être que le carbone C-1. Cette déduction est confirmée par les corrélations observées entre ce dernier carbone et les protons de la chaîne éthane.
- Le proton H-5 (δ_{H} 6,68ppm) et le carbone C-1 (δ_{C} 131,6ppm) et un autre carbone résonnant à δ_{C} 145,9ppm correspondant au carbone C-3. La valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné.
- Le proton H-6 (δ_{H} 6,52ppm) et les carbones C-2 (δ_{C} 117,2ppm), C-4 (δ_{C} 144,5ppm) et le carbone de la chaîne éthane à δ_{C} 36,2ppm noté C7.

Cette observation permet de lier le groupement $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ au cycle aromatique trisubstitué en position 1 et donc déduire la présence de l'unité phényléthyl disubstitué en 3 et 4 comme aglycone dans ce composé (figure IV-44). Ceci oriente vers une structure de type phénylethanoïde.

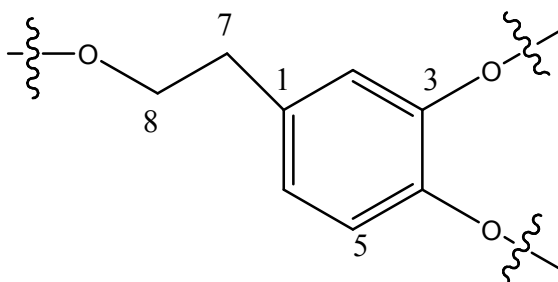


Figure IV-44: Entité 1 se trouvant dans la structure du composé F_{12-7}

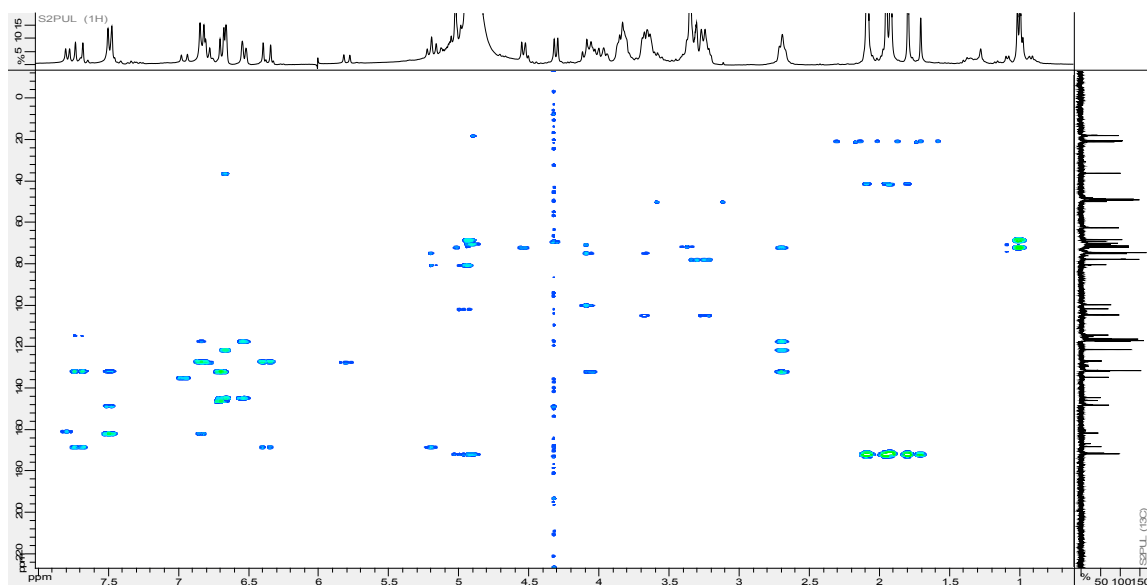


Figure IV-43: Spectre HMBC du composé F_{12-7}

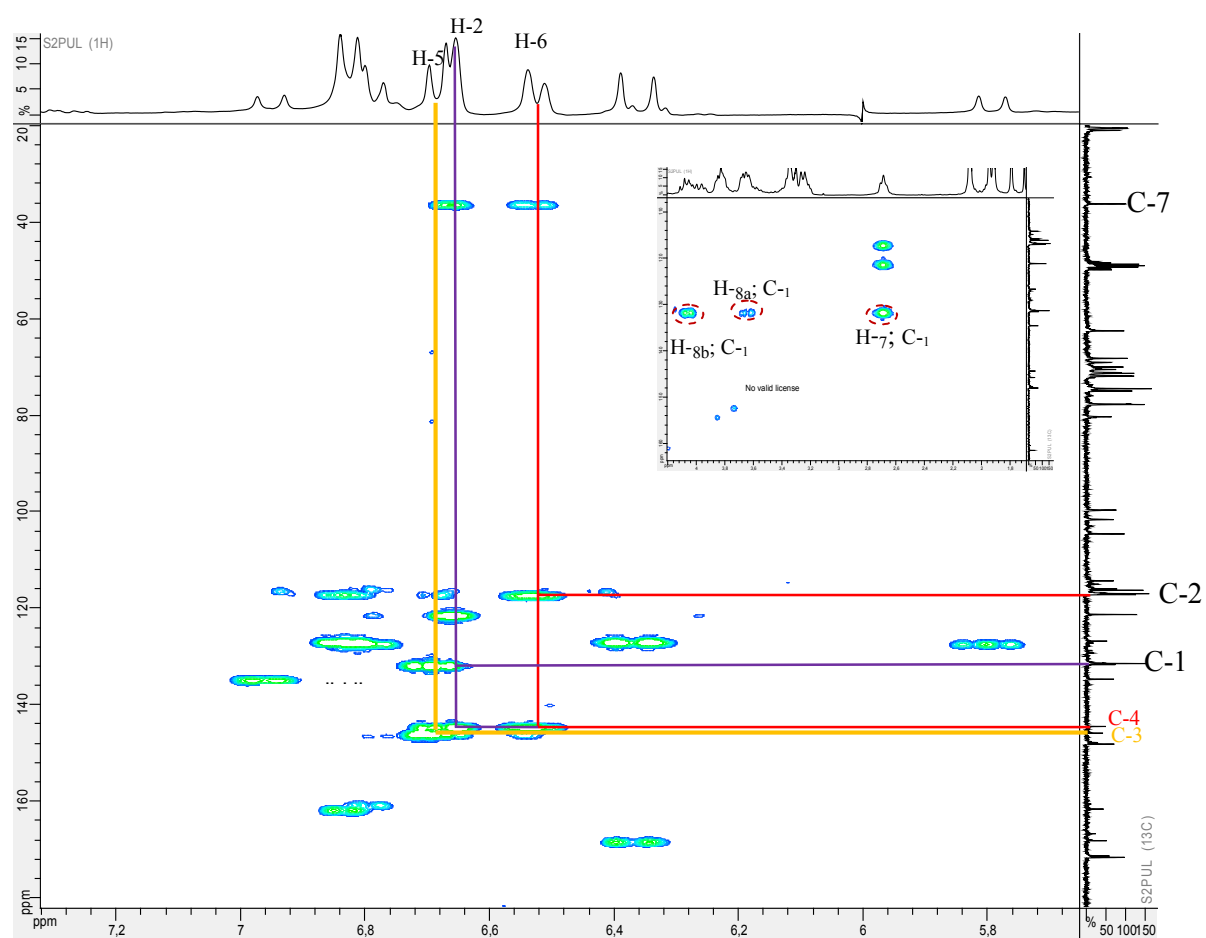


Figure IV-43-a: Spectre HMBC étalé du composé F_{12-7}

Une seconde analyse, similaire à la précédente, des spectres RMN ^1H (figure IV-40), COSY (figure IV-41) et HSQC (figure IV-42) montre :

- Un signal sous forme de doublet ($J= 8,1\text{Hz}$) caractéristique d'un couplage ortho d'intégration 2H à δ_{H} 7,48ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 131,6ppm.
- Un signal sous forme de doublet de même constante de couplage ($J= 8,1 \text{ Hz}$) d'intégration 2H à δ_{H} 6,82ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 117,0ppm.

La valeur de la constante de couplage ainsi que celles des déplacements chimique des deux signaux orientent vers la présence d'un noyau aromatique para substitué.

- Un signal sous forme de doublet ($J= 15,9 \text{ Hz}$) d'intégration 1H à δ_{H} 7,70ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 148,13ppm.
- Ce proton donne une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le signal à δ_{H} 6,36ppm qui apparait sur le spectre RMN proton, également sous forme de doublet ($J= 15,9 \text{ Hz}$) d'intégration 1H (δ_{C} 114,30ppm déduite du spectre HSQC).

La grande valeur de la constante de couplage des deux protons indique qu'ils sont portés par une double liaison de configuration *trans*.

L'étude du spectre HMBC (figure IV-43) permet de repérer les corrélations suivantes :

- Les deux protons aromatiques à δ_{H} 7,48ppm notés H-2'/H-6' et le carbone résonant à δ_{C} 126,8ppm attribuable au carbone quaternaire aromatique C-1'.
- Les deux protons aromatiques à δ_{H} 6,82ppm notés H-3'/H-5' et deux signaux, le premier corrèle avec un carbone quaternaire oxygéné résonnant à δ_{C} 161,5ppm correspondant au carbone C-4', le second avec le carbone résonant à δ_{C} 148,1ppm correspondant au carbone éthylénique.
- Le proton de ce dernier carbone (δ_{C} 148,13ppm) résonant à δ_{H} 7,70ppm montre une tache de corrélation avec le carbone quaternaire à δ_{C} 168,1ppm qui ne peut être qu'un carbone d'un carbonyle d'ester.
- Le deuxième proton de la double liaison résonnant à δ_{H} 6,36ppm (δ_{C} 114,3ppm) montre une tache de corrélation avec le carbone C-1' (δ_{C} 126,8ppm).

Ces constatations permettent de relier d'une part, le cycle aromatique à la double liaison éthylénique et d'autre part la double liaison au groupement ester et de déduire la présence d'un groupement para-coumarique dans la structure du composé F₁₂₋₇ comme reporté dans la figure IV-45.

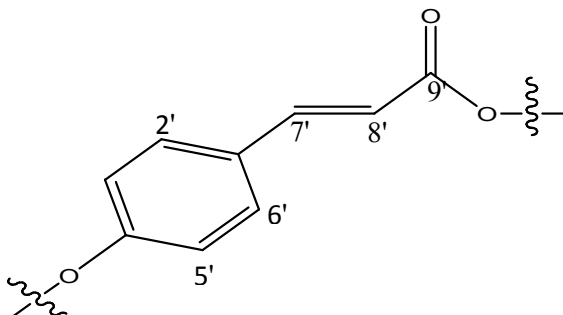


Figure IV-45: Entité 2 présente dans la structure du composé F₁₂₋₇

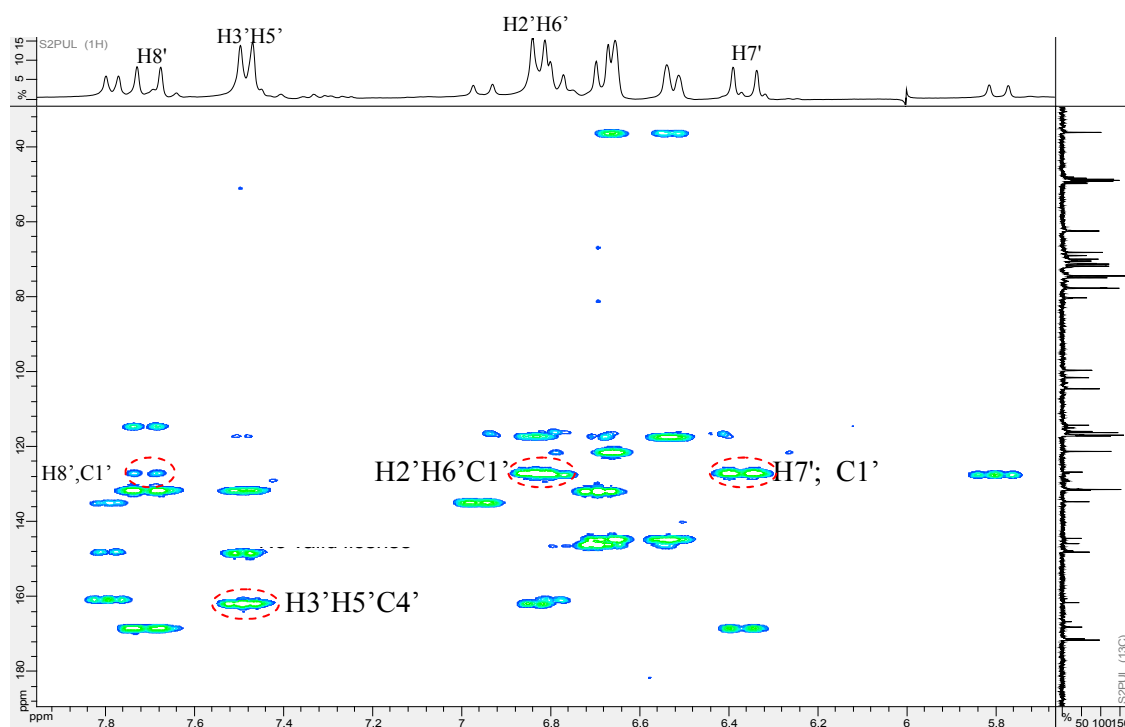


Figure IV-43-b: Spectre HMBC étalé du composé F₁₂₋₇

Une étude approfondie du spectre RMN 1H (figure IV-40) montre d'autres signaux se trouvant dans la zone caractéristique des protons osidiques, en effet on observe sur ce spectre :

- Deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier à δ_H 4,30ppm sous forme de doublet ($J=7,5$ Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 104,6ppm. Le deuxième signal à δ_H 4,53ppm également, sous forme de doublet ($J=8,1$ Hz) corrélant sur le spectre HSQC

avec le carbone à δ_C 101,6ppm. Les valeurs de leurs déplacements chimiques orientent vers la présence de deux entités osidiques confirmée par la présence d'un ensemble de signaux dans la zone 3-5 ppm.

Ces signaux sont caractéristiques de deux protons anomériques appartenant à deux unités osidiques qui peuvent être glucose et / ou galactose. Les valeurs des déplacements chimiques orientent vers une jonction *O*-sucre alors que les valeurs des constantes de couplage indiquent une configuration β des liaisons osidiques.

- Le même spectre montre un signal sous forme de doublet ($J= 6,0$ Hz) d'intégration 3H à δ_H 0,99ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 17,8ppm typique du groupement méthyle (CH_3) d'un rhamnose. Ceci permet de déduire la présence d'une troisième entité osidique dans ce composé.

Les autres protons de trois entités osidiques peuvent être identifiés à l'aide des expériences COSY 1H - 1H (figure IV-41) et H2BC (figure IV-46) qui montrent des taches de corrélation entre :

- Le proton anomérique à δ_H 4,53ppm noté H1'' (δ_C 101,6ppm) et le proton résonant à δ_H 4,91ppm attribuable à H2'' (δ_C 74,5ppm) (ce H2'' est recouvert par le signal de l'eau de contamination du solvant), lui-même corrélant avec un proton résonant à δ_H 4,05ppm (δ_C 80,3ppm) correspondant au proton H-3'' (recouvert par d'autres signaux). Le proton H-3'' et un proton résonant sous forme de triplet à δ_H 5,18ppm ($J = 9,3$ Hz) correspondant au proton H-4'' (δ_C 70,5ppm), ce dernier et le proton résonant à δ_H 3,83ppm (δ_C 74,5ppm) attribuable au proton H-5'' (recouvert par d'autres signaux). Le proton H-5'' et un proton résonant à δ_H 3,68 ppm correspondant au proton H-6''b lui-même corrélant avec un proton résonant à δ_H 3,98ppm attribuable au proton H-6''a, ces deux derniers protons sont portés par le carbone à δ_C 69,1ppm.

La multiplicité du signal correspondant au proton H-4'' ainsi que la valeur de sa constante de couplage indique des interactions axiales-axiales et permet de déduire que cette première entité est un glucose.

De la même manière que précédemment, les valeurs des déplacements chimiques des protons et de leurs carbones sont identifiés grâce à l'étude des spectres COSY (figure IV-41-b) et H2BC (figure IV-46), en effet on observe les taches de corrélation entre :

- Le proton anomérique à 4,30ppm (δ_C 104,6ppm) nommé H1''' et le proton résonant à δ_H 3,21ppm attribuable à H2''' (δ_C 75,0ppm), ce dernier avec un proton résonant à δ_H 3,32ppm correspondant au proton H-3''' (δ_C 77,8ppm). Ce proton H-3''' et le proton

résonant à δ_H 3,30ppm attribuable à H4''' (δ_C 71,3ppm), ce dernier avec un proton résonant à δ_H 3,32 ppm correspondant au proton H-5''' (δ_C 77,8ppm). Le proton H-5''' et le proton résonant à 3,62 ppm attribuable à H6a''' (δ_C 62,5ppm), ce dernier avec un proton résonant à 3,79 ppm attribuable au proton H-6b''' (δ_C 62,5ppm). Cette entité est identifiée comme étant un glucose à cause du déblindage du C-3''' (δ_C 77,8ppm).

- Les protons résonant à δ_H 0,99ppm du groupement méthyle noté H6''' et le proton résonant à δ_H 3,85 ppm attribuable à H5''', ce dernier avec un proton résonant à δ_H 5,02 ppm correspondant au proton H-4'''. Ce proton et le proton résonant à δ_H 5,05 ppm attribuable à H3''', lequel à son tour corrèle avec proton résonant à δ_H 4,85 ppm correspondant au proton H-2'''. Ce proton et le proton résonant à δ_H 4,92 ppm correspondant au proton anomérique H1'''.

Vu la dissimulation des signaux des protons caractéristiques des entités osidiques et afin de confirmer leur nature, une analyse par la technique GC/MS a été réalisé sur le composé après avoir subi une acétylation.

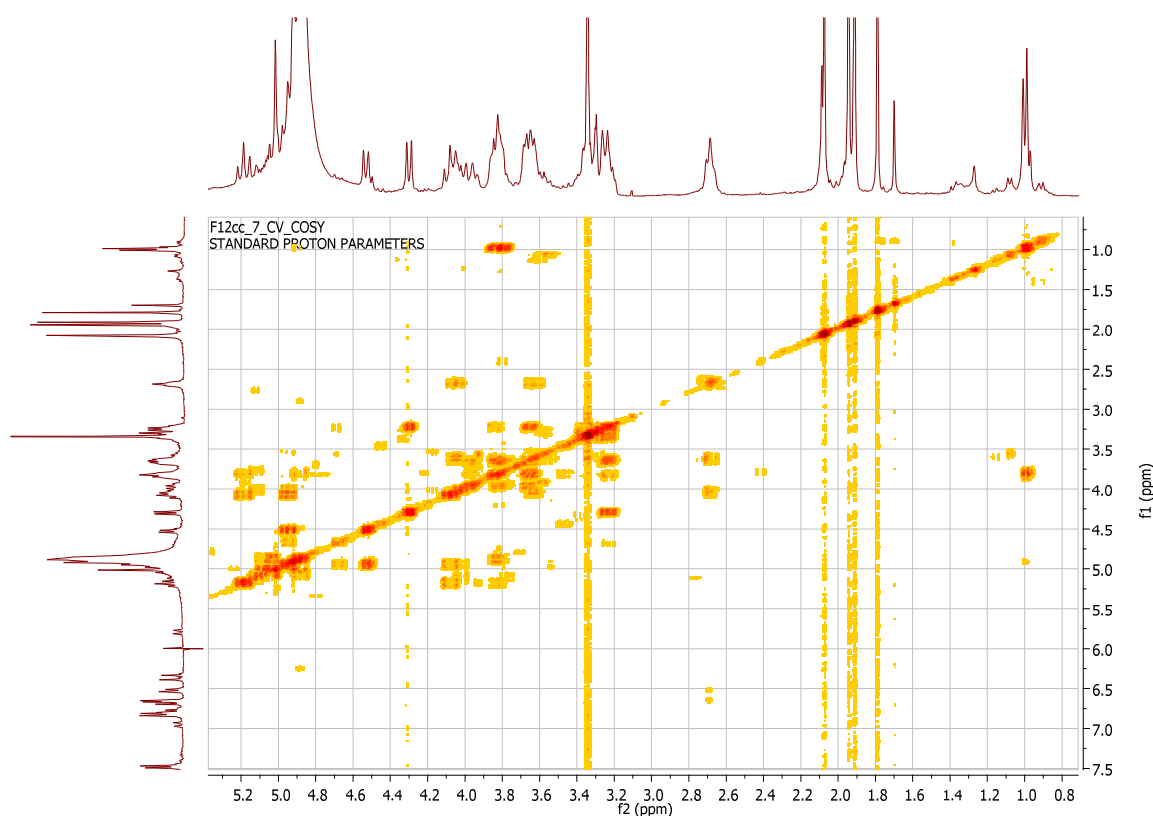


Figure IV-41-b : Spectre COSY étalé du composé F_{12-7}

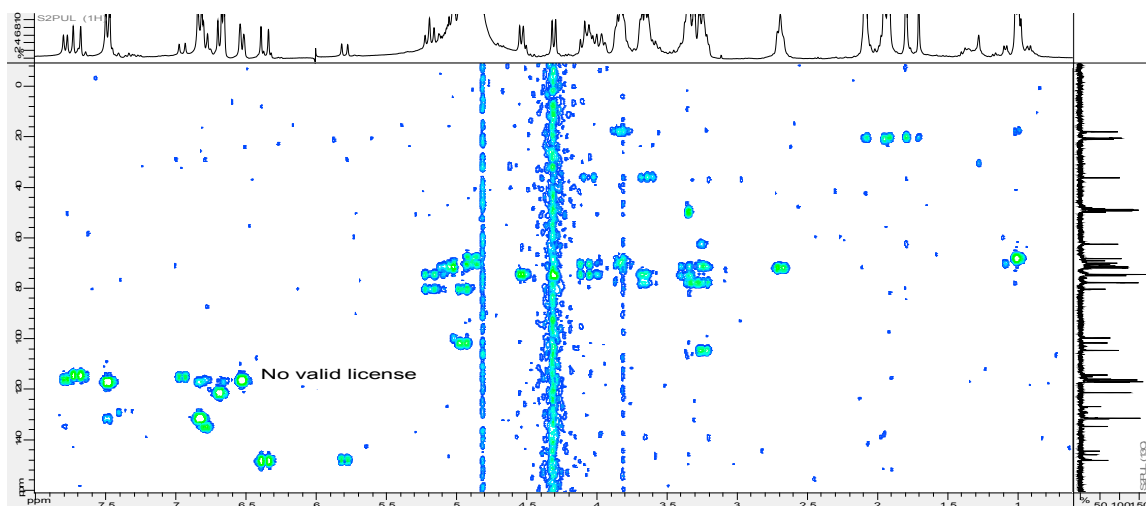


Figure IV-46 : Spectre H2BC du composé F₁₂₋₇

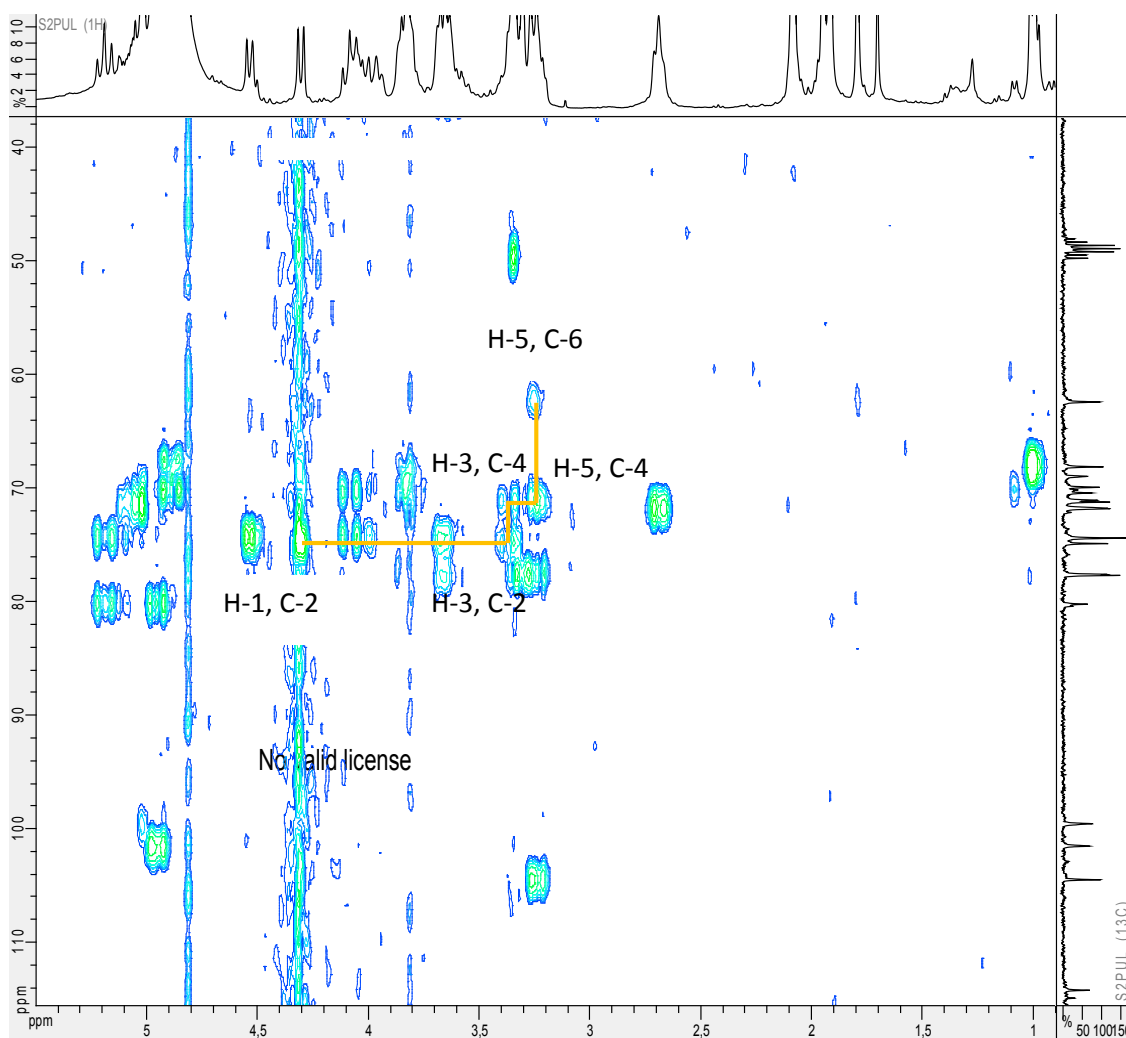


Figure IV-46-a: Spectre H2BC étalé du composé F₁₂₋₇

Le spectre proton (figure IV-40) montre encore une fois quatre signaux sous forme de singulet d'intégration 3H chacun résonnant à δ_H 1,79 ; 1,92 ; 1,95 et 2,10ppm et chacun corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_C 20,4 ; 20,5; 21; 20,6ppm respectivement.

Toutefois, chacun de ces quatre groupements méthyles montre, sur le spectre HMBC (figure IV-43-c), des taches de corrélation avec les carbonyles à δ_C 171,7 ; 171,4 ; 171,7 ; 171,6ppm respectivement. Donc ce composé renferme quatre groupements acétyles qui peuvent être attribués à leurs positions grâce à l'analyse du spectre HMBC, effectivement on note les corrélations entre les protons de chaque groupement acétyle et les carbonos osidiques C2''', C3''', C2'', C4''' respectivement. Donc les quatre groupements acétyles sont liés aux deux sucres en position 2'', 2''', 3''' et 4'''.

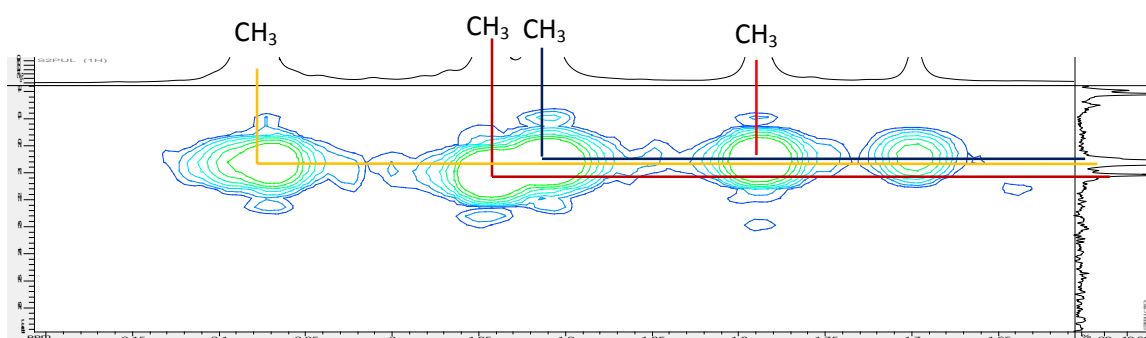


Figure IV-42-c: Spectre HSQC étalé du composé F₁₂₋₇

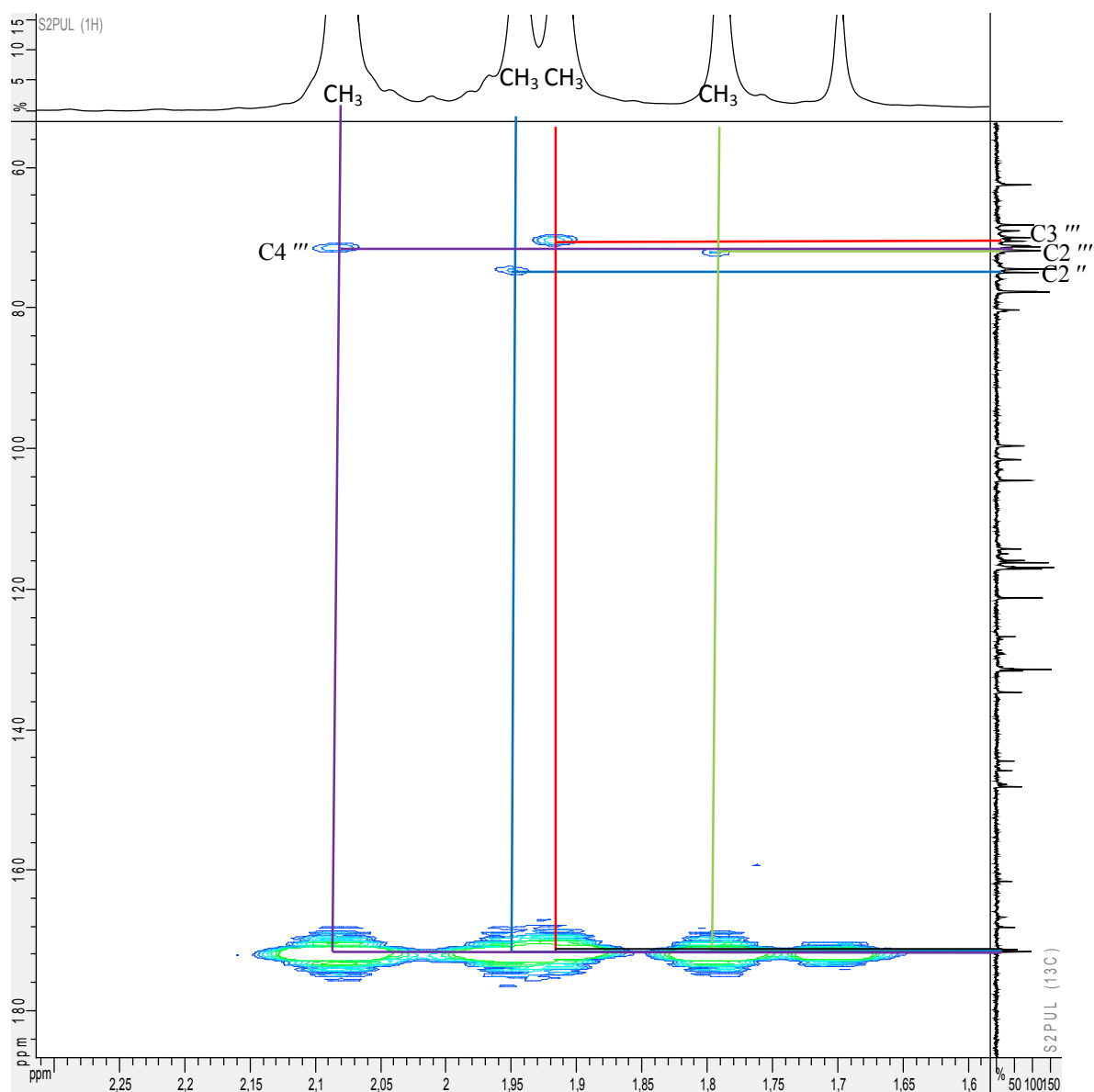


Figure IV-43-c: Spectre HMBC étalé du composé F₁₂₋₇

A ce niveau de notre analyse et vu l'absence d'autres signaux sur le spectre proton, les substituants des deux cycles aromatiques ne peuvent être que des groupements hydroxyles. A la fin il ne reste qu'à établir le lien entre le groupement 3,4-dihydroxyphénylétanoïde, le groupement *p*-coumarique et les trois entités osidiques à l'aide du spectre HMBC qui montre les taches de corrélation suivantes entre:

- Les deux protons de la chaîne éthane (δ_H H-8_a, H-8_b) et le carbone C-1'' ce qui permet de déduire que le premier glucose est lié au groupement phénylétanoïde par une liaison entre le C-8 et le carbone anomérique C-1''.

- Le proton H-4'' du premier glucose et le carbone du carbonyle à δ_C 168,1ppm noté C-9', ceci permet de déduire que le premier glucose est lié à l'acide coumarique par une liaison entre le C-9' et le C-4''.
- Le proton anomérique du rhamnose H-1''' et le C-3'' ce qui permet de déduire que le rhamnose est lié au premier glucose par une liaison entre le C-1''' et le C-3''.
- Les protons H-6''a, H-6''b du premier glucose et le carbone anomérique du deuxième glucose C-1''', ceci indique que le deuxième glucose est lié au premier par une liaison entre le C-1'''' et le C-6''.

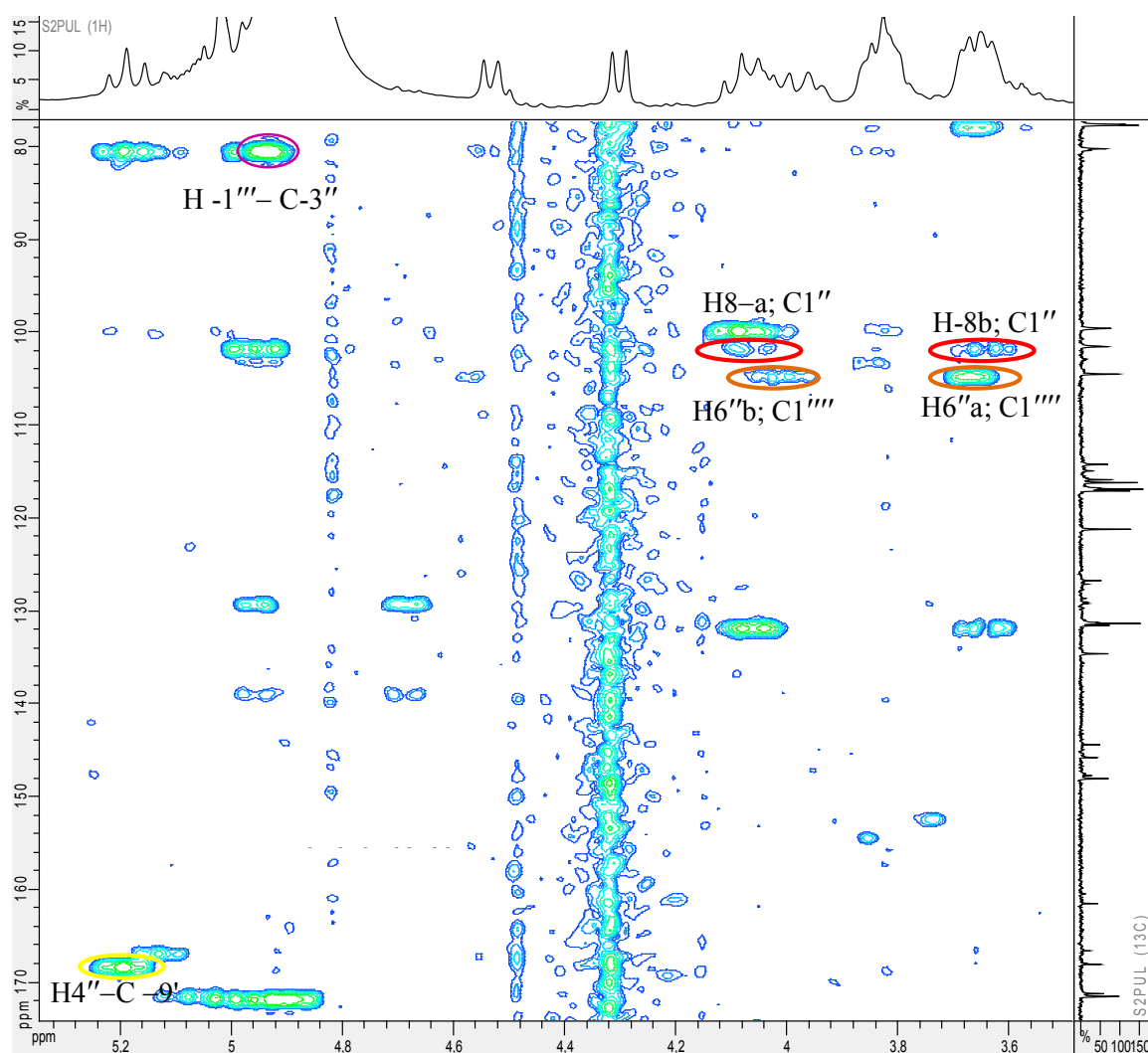


Figure IV-43-d: Spectre HMBC étalé du composé F_{12-7}

L'ensemble de ces données spectrales permet de donner au composé F₁₂₋₇ le nom : 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-(4-*O*-*p*-coumaryl)-2-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside nommé E-Tubuloside D dont la structure est présentée dans la figure IV-47. Ce type de composé est très répandu dans les espèces du genre *Cistanche* [11].

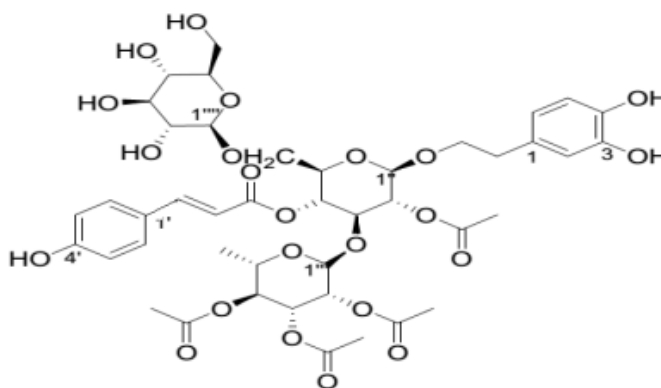


Figure IV- 47: E-Tubuloside D

Une analyse approfondie du spectre RMN ¹H et une lecture attentive des valeurs d'intégration d'un certain nombre de protons indiquent clairement que ce composé F₁₂₋₇ est en fait un mélange de deux phenylethanoides. En effet, les signaux qui montrent la présence d'un deuxième composé minoritaire appartiennent au groupement coumarique, reconnaissable par :

- Deux signaux sous forme de doublet ($J= 8,7$ Hz) à δ_H 7,78 et 6,77ppm d'intégration 0,57 chacun caractéristique des protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle aromatique.
- Deux signaux sous forme de doublet ($J= 12,6$ Hz) à δ_H 6,95 et 5,78ppm caractéristiques des protons H-7 et H-8 indiquant la présence d'une double liaison. La valeur de la constante de couplage ($J= 12,6$ Hz) indique qu'il s'agit de l'énantiomère *Cis* du premier composé.

Un calcul simple mené sur les valeurs d'intégrales permet de déduire qu'on est en présence d'un mélange de deux énantiomères *Trans* et *Cis* avec les proportions 76,76% en faveur du premier composé E-Tubuloside D. Ce composé, **Z-Tubuloside D** (figure IV-48) est nouveau malgré que les espèces du genre *Cistanche* soient connues pour accumuler ce type de composés.

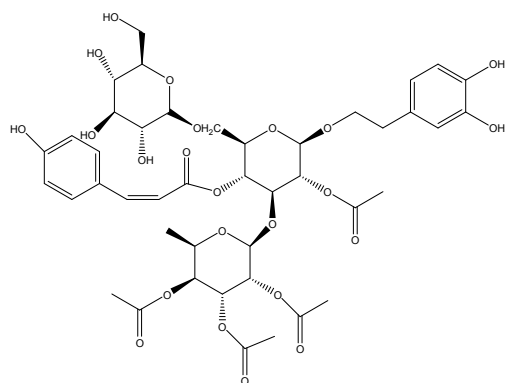


Figure IV- 48 : Z-Tubuloside D

Toutes les données spectrales sont rassemblées dans les tableaux IV-15 et IV-16.

Tableau IV.15: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé E-Tubuloside.D

Position	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	DEPT	HMBC(H→C)
1	-	131,6	C	
2	6,64 <i>d</i> (1.8)	117,2	CH	C-1, C-4, C-6
3	--	145,9	C	
4	--	144,5	C	
5	6,67 <i>d</i> (8.1)	116,2	CH	C-1, C-3
6	6,52 <i>dd</i> (8.1, 1.8)	121,3	CH	C-2, C-4, C-5, C-7
7	2,70 <i>t</i> (7.0)	36,2	CH ₂	C-1, C-5, C-6, C-8
8	4,02 (chev) 3,61 (chev)	71,9	CH ₂	
1'	--	126,8	C	
2'	6,82 <i>d</i> (8.1)	117,0	CH	C-4'
3'	7,48 <i>d</i> (8.1)	131,6	CH	C-4', C-8'
4'	--	161,5	C	
5'	7,48 <i>d</i> (8.1)	131,6	CH	C-4', C-8'
6'	6,82 <i>d</i> (8.1)	117,0	CH	C-4'
7'	6,36 <i>d</i> (15.9)	114,3	CH	C-1', C-8', C-9'
8'	7,70 <i>d</i> (15.9)	148,1	CH	C-1', C-5', C-9'
9'	--	168,1	CH	
1''(Glc)	4,53 <i>d</i> (8.1)	101,6	CH	C-4''
2''	4,91 (chev)	74,5	CH	C-1'', C-3''
3''	4,05 (chev)	80,3	CH	
4''	5,18 <i>t</i> (9.3)	70,5	CH	C-2'', C-3'', C-5'', C-9''
5''	3,83 (chev)	74,5	CH	
6''	3,68 (chev) 3,98 (chev)	69,1	CH ₂	
1'''(Rha)	4,92 (chev)	99,6	CH	C-3'''
2'''	4,85 (chev)	71,8	CH	C-1'''
3'''	5,05 (chev)	70,0	CH	
4'''	5,02	71,2	CH	
5'''	3,85 (chev)	68,2	CH	
6'''	0,98 <i>d</i> (6.0)	17,8	CH ₃	
1''''(Glc)	4,30 <i>d</i> (7.5)	104,6	CH	C-6''''
2''''	3,21 (chev)	75,0	CH	
3''''	3,32 (chev)	77,8	CH	
4''''	3,30 (chev)	71,3	CH	
5''''	3,32 (chev)	77,8	CH	
6''''	3,62 (chev) 3,79 (chev)	62,5	CH ₂	
2''-CH ₃ CO	1,94 <i>s</i>	21,0	CH ₃	
4''-CH ₃ CO	2,10 <i>s</i>	20,6	CH ₃	
3'''-CH ₃ CO	1,92 <i>s</i>	20,5	CH ₃	
2'''-CH ₃ CO	1,70 <i>s</i>	20,4	CH ₃	
2''-CH ₃ CO	--	171,7	C	
4''-CH ₃ CO	--	171,6	C	
3'''-CH ₃ CO	--	171,4	C	
2'''-CH ₃ CO	--	171,7	C	

Tableau IV.16: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé Z-Tubuloside D

Position	δ ¹ H	δ ¹³ C	DEPT	HMBC(H→C)
1	-	131,6	C	
2	6,64 <i>d</i> (1.8)	117,2	CH	C-1, C-4, C-6
3	--	145,9	C	
4	--	144,5	C	
5	6,67 <i>d</i> (8.1)	116,2	CH	C-1, C-3
6	6,52 <i>dd</i> (8.1. 1.8)	121,3	CH	C-2, C-4, C-5, C-7
7	2,70 <i>t</i> (7.0)	36,2	CH ₂	C-1, C-5, C-6, C-8
8	4,02 (chev) 3,61 (chev)	71,9	CH ₂	
1'	--	128,7	C	
2'	6,77 <i>d</i> (8.7)	116,1	CH	C-4'
3'	7,78 <i>d</i> (8.7)	134,8	CH	C-4', C-β'
4'	--	160,5	C	
5'	7,78 <i>d</i> (8.7)	134,8	CH	C-4', C-β'
6'	6,77 <i>d</i> (8.7)	116,1	CH	C-4'
7'	5,78 <i>d</i> (12.9)	115,1	CH	C-1', C-β', C-γ'
8'	6,95 <i>d</i> (12.9)	147,8	CH	C-1', C-5', C-γ'
9'	--	168,1	CH	
1''(Glc)	4,53 <i>d</i> (8.1)	101,6	CH	C-4''
2''	4,91(chev)	74,5	CH	C-1'', C-3''
3''	4,05 (chev)	80,3	CH	
4''	5,18 <i>t</i> (9.3)	70,5	CH	C-2'', C-3'', C-5'', C-γ''
5''	3,83 (chev)	74,5	CH	
6''	3,68 (chev) 3,98 (chev)	69,1	CH ₂	
1'''(Rha)	4,92 (chev)	99,6	CH	C-3'''
2'''	4,85 (chev)	71,8	CH	C-1'''
3'''	5,05 (chev)	70,0	CH	
4'''	5,02	71,2	CH	
5'''	3,85 (chev)	68,2	CH	
6'''	0,98 <i>d</i> (6.0)	17,8	CH ₃	
1''''(Glc)	4,30 <i>d</i> (7.5)	104,6	CH	C-6''''
2''''	3,21 (chev)	75,0	CH	
3''''	3,32 (chev)	77,8	CH	
4''''	3,30 (chev)	71,3	CH	
5''''	3,32 (chev)	77,8	CH	
6''''	3,62 (chev) 3,79 (chev)	62,5	CH ₂	
2''-CH ₃ CO	1,94 s	21,0	CH ₃	
4''-CH ₃ CO	2,10 s	20,6	CH ₃	
3'''-CH ₃ CO	1,92 s	20,5	CH ₃	
2'''-CH ₃ CO	1,70 s	20,4	CH ₃	
2''-CH ₃ CO	--	171,7	C	
4''-CH ₃ CO	--	171,6	C	
3'''-CH ₃ CO	--	171,4	C	
2'''-CH ₃ CO	--	171,7	C	

IV-3 -4- Le composé F_{14-7-3}

Le composé F_{14-7-3} se présente sous forme huileuse soluble dans le méthanol.

Le spectre RMN ^{13}C (figure IV-49) de ce composé montre la présence de 15 atomes de carbone, parmi lesquels, on repère facilement les méthynes osidiques dans la zone [60-80ppm].

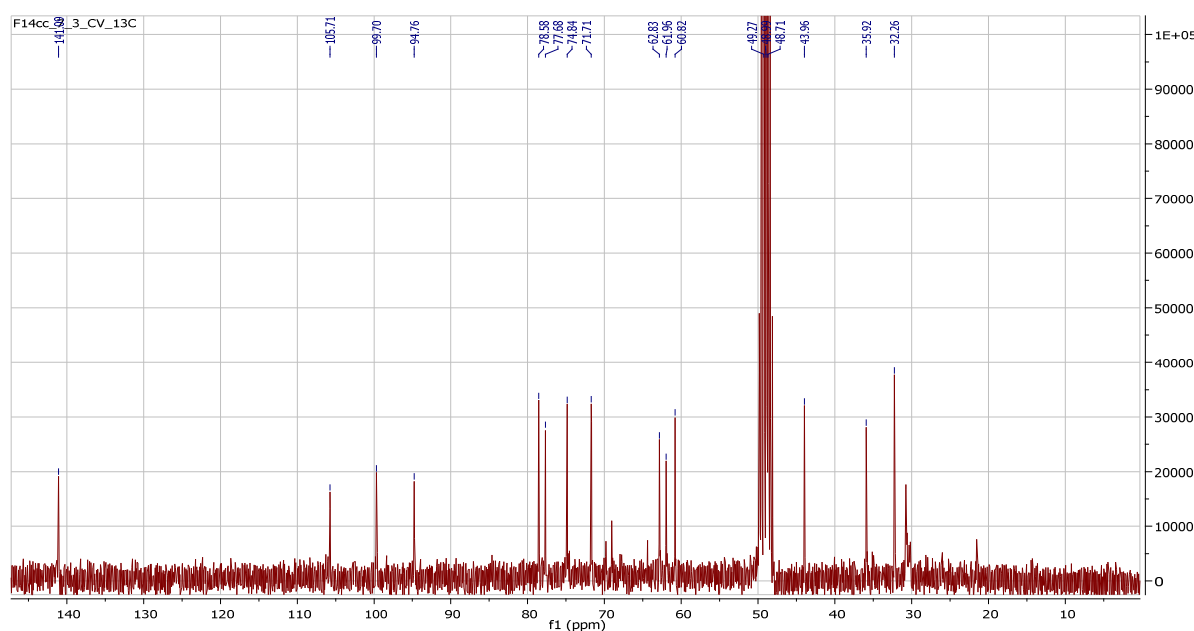


Figure IV-49: Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD ; 75MHz) du composé F_{14-7-3}

Cette constatation est confirmée par l'étude simultanée des spectres RMN ^1H (Figure IV-50), COSY ^1H - ^1H (Figure IV-51) et HSQC (Figure IV-52) dont on peut facilement repérer les signaux suivants :

- Un signal d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J=9$ Hz) à δ_{H} 4,78ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 99,7ppm caractéristiques du proton et du carbone anomériques d'un hexose. Les valeurs des déplacements chimiques indiquent une jonction *O*-sucre et la valeur de la constante de couplage ($J=9$ Hz) résultant de l'interaction vicinale H-1'/H-2' est en faveur d'une configuration β osidique. Ce proton montre sur le spectre RMN 2D homonucléaire (COSY ^1H - ^1H) une tache de corrélation avec un signal recouvert par le signal du solvant (CD_3OD) à δ_{H} 3,26ppm qui ne peut être que le H2' corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à $\delta_{\text{C}}=74,8$ ppm.
- Sur le même spectre, ce proton montre une tache de corrélation avec le proton H3' à δ_{H} 3,37ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 77,9ppm, ce proton apparaît sur le spectre RMN ^1H sous forme d'un triplet ($J=8,4$ Hz). La multiplicité et la

valeur de la constante de couplage de ce proton indiquent des orientations axiales pour les protons H-2', H-3' et H-4'.

- Ce proton (δ_H 3,37ppm) montre, de son côté, une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le signal à δ_H 3,29ppm, partiellement recouvert par le signal du solvant, ne peut être que le proton H4', celui-ci corréle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_c 71,7ppm.
- Le proton H4' montre une autre tache de corrélation sur le spectre COSY 1H - 1H avec le proton à δ_H 3,30ppm attribuable au proton H5', également recouvert par le signal du solvant et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_c 78,6ppm.
- Ce dernier proton montre une tache de corrélation avec le signal à δ_H 3,64ppm (*dd* ; $J=11,7$; 5,4 Hz) et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_c 62,8ppm. Ce même carbone montre une autre tache de corrélation avec le proton à δ_H 3,90ppm, ce dernier apparait sur le spectre RMN 1H sous forme d'un doublet large ($J=11,7$ Hz). Tenant compte des multiplicités de ces deux signaux ainsi que de leurs valeurs de déplacements chimiques, Ces protons ne peuvent être que H6'b et H-6'a respectivement. Toutes ces constatations permettent de déduire la présence de l'entité β -glucopyranoside dans la molécule liée à la génine par une jonction *O*-sucre.

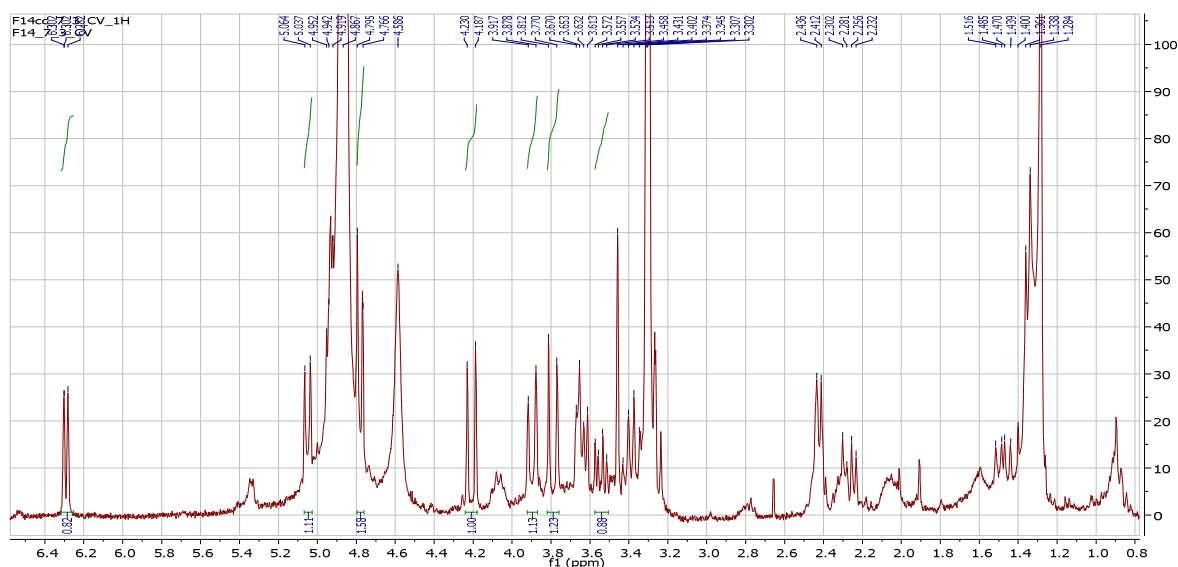


Figure IV-50: Spectre 1H (CD_3OD ; 300MHz) du composé F14-7-3

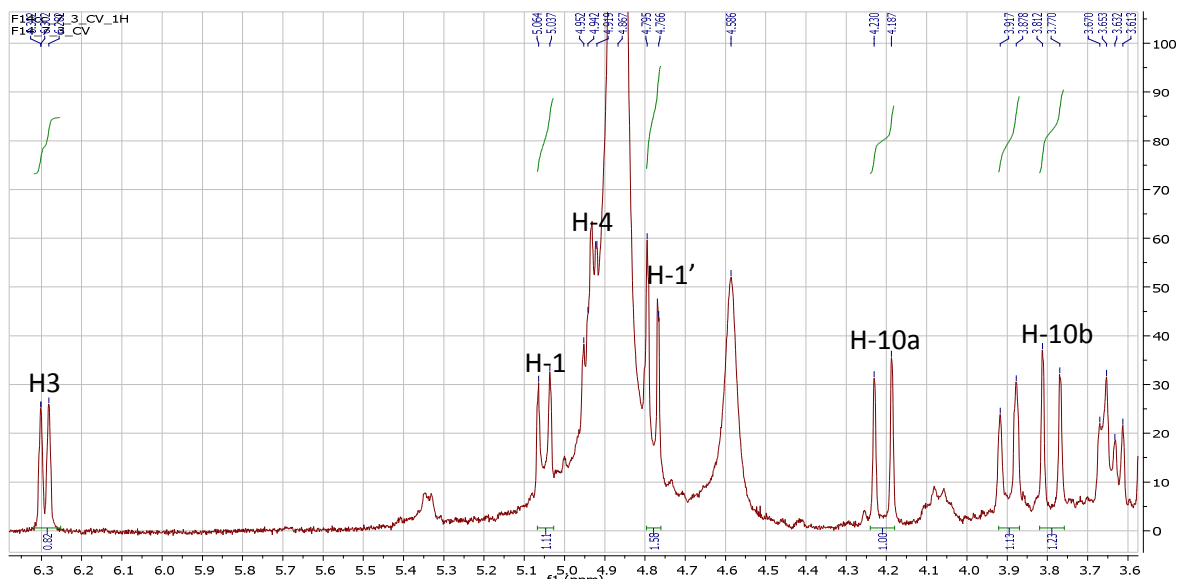


Figure IV-50a: Spectre ^1H étalé [3,6 ; 6,3] du composé F₁₄₋₇₋₃

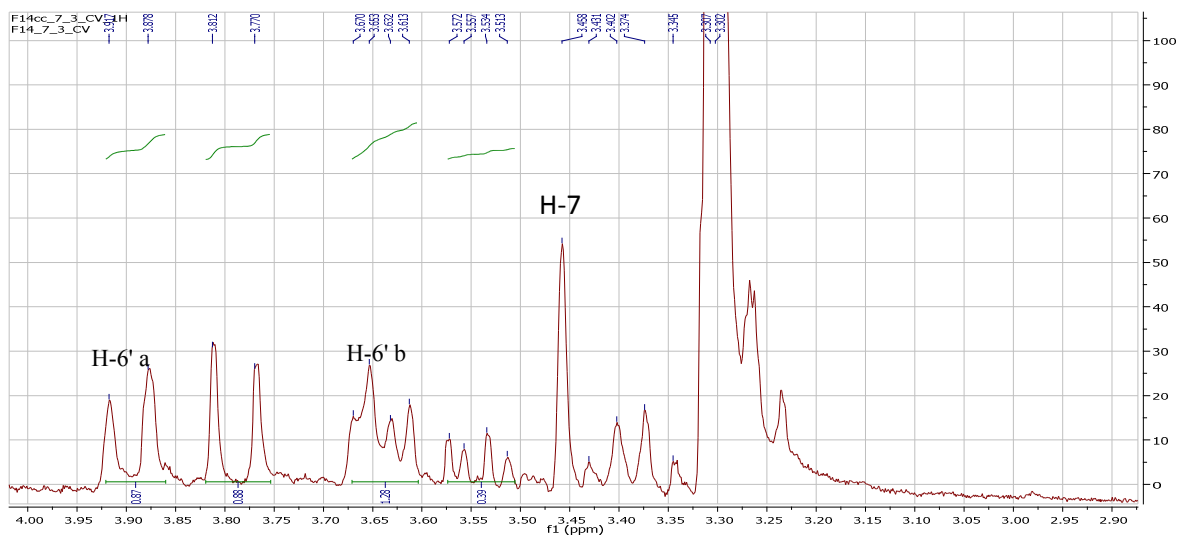


Figure IV-50-b: Spectre ^1H étalé [2,85 ; 4,05ppm] du composé F₁₄₋₇₋₃

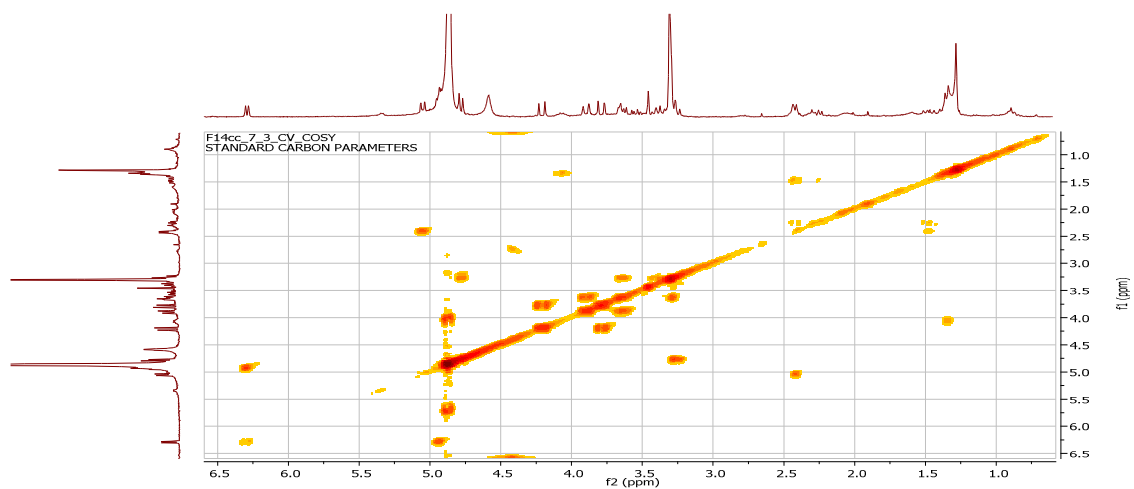


Figure IV-51: Spectre COSY du composé F₁₄₋₇₋₃

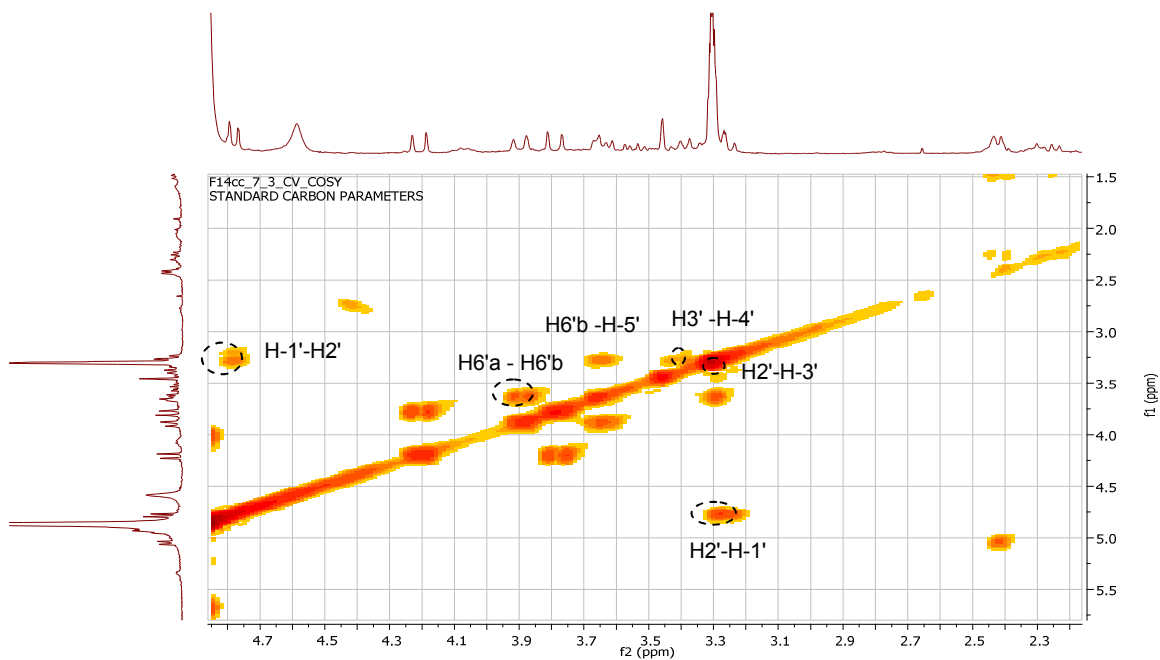


Figure IV-51-a: Spectre COSY étalé du composé F₁₄₋₇₋₃

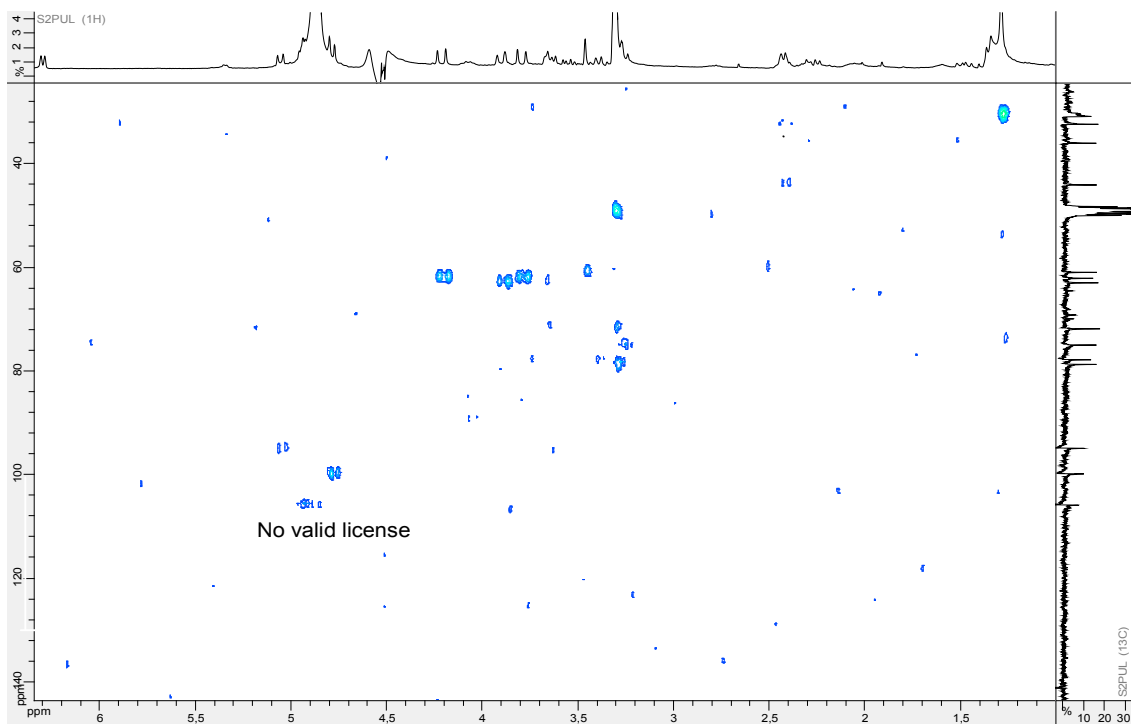


Figure IV-52: Spectre HSQC du composé F₁₄₋₇₋₃

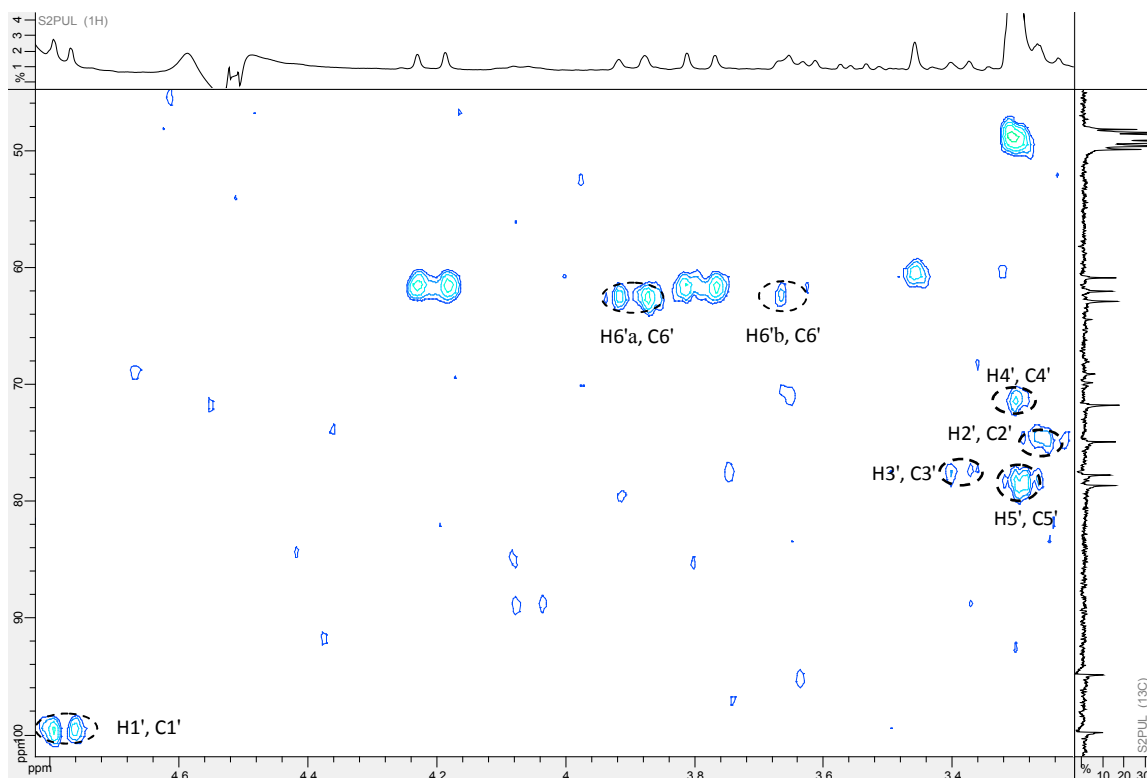


Figure IV-52-a: Spectre HSQC étalé du composé F₁₄₋₇₋₃

Un retour aux spectres RMN ¹H (figure IV-50), COSY ¹H-¹H (figure IV-51) et HSQC (figure IV-52) et en faisant abstraction aux signaux du glucose, on peut facilement repérer des signaux très semblable aux signaux du composé précédent (composé F_{7.3}) renseignant ainsi sur la présence d'un squelette iridoïde [11] reconnaissable par :

- Un signal sous forme de doublet ($J=6,3\text{Hz}$) à δ_{H} 6,30ppm d'intégration 1H caractéristique du premier proton oléfinique H-3 (δ_{C} 141,1ppm). Un autre signal partiellement recouvert par l'eau de contamination du solvant à δ_{H} 4,96 ppm attribuable au deuxième proton oléfinique H-4 (δ_{C} 106,0ppm). Ces attributions sont confirmées par les taches de corrélation qui apparaissent clairement sur le spectre COSY ¹H-¹H entre ces deux noyaux.
- Un signal sous forme de doublet ($J= 8,7 \text{ Hz}$) à δ_{H} 5,06 ppm d'intégration 1H caractéristique du proton H-1 (δ_{C} 94,7ppm). Ce proton montre une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le proton résonnant à δ_{H} 2,42ppm (δ_{C} 42,6ppm) attribuable à H-9.
- Deux signaux sous forme d'un doublet ($J=12,6\text{Hz}$) d'intégration 1H chacun, le premier à δ_{H} 4,23 et le second à δ_{H} 3,81ppm attribuables aux protons H10a et H10b respectivement corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 62,0ppm.

- Un signal sous forme d'un singulet large à δ_H 3,46 ppm qui ne peut être que le proton H-7 (δ_C 60,8 ppm). Les valeurs des déplacements chimiques proton et carbone indiquent une oxygénation de cette position.
- Un signal sous forme de doublet dédoublé ($J=13,8 ; 7,2$ Hz) à δ_H 1,47 d'intégration 1H attribuable au proton H-6b, ce proton montre sur le spectre COSY deux tâches de corrélation, la première avec le proton résonant à δ_H 2,27 apparaît sur le spectre RMN proton sous forme d'un doublet dédoublé ($J=13,8 ; 7,2$ Hz) qui ne peut être que le H-6a, ces deux protons corrélent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant δ_C 35,9 ppm, et le deuxième avec le proton à δ_H 2,42 apparaît sur le spectre RMN proton sous forme de doublet large ($J=7,2$ Hz) attribuable au proton H-5, ce dernier proton montre sur le spectre HSQC une tâche de corrélation avec le carbone résonant à δ_C 32,3 ppm.

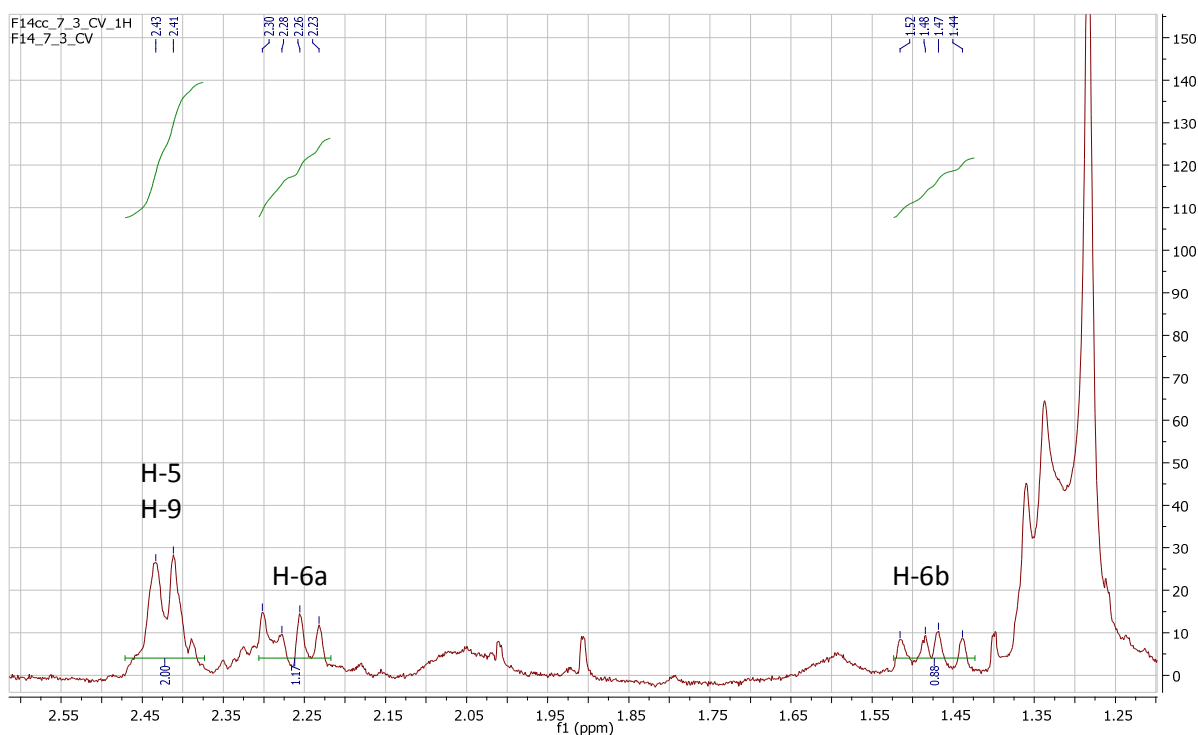


Figure IV-50c: Spectre ^1H étalé du composé F14-7-3

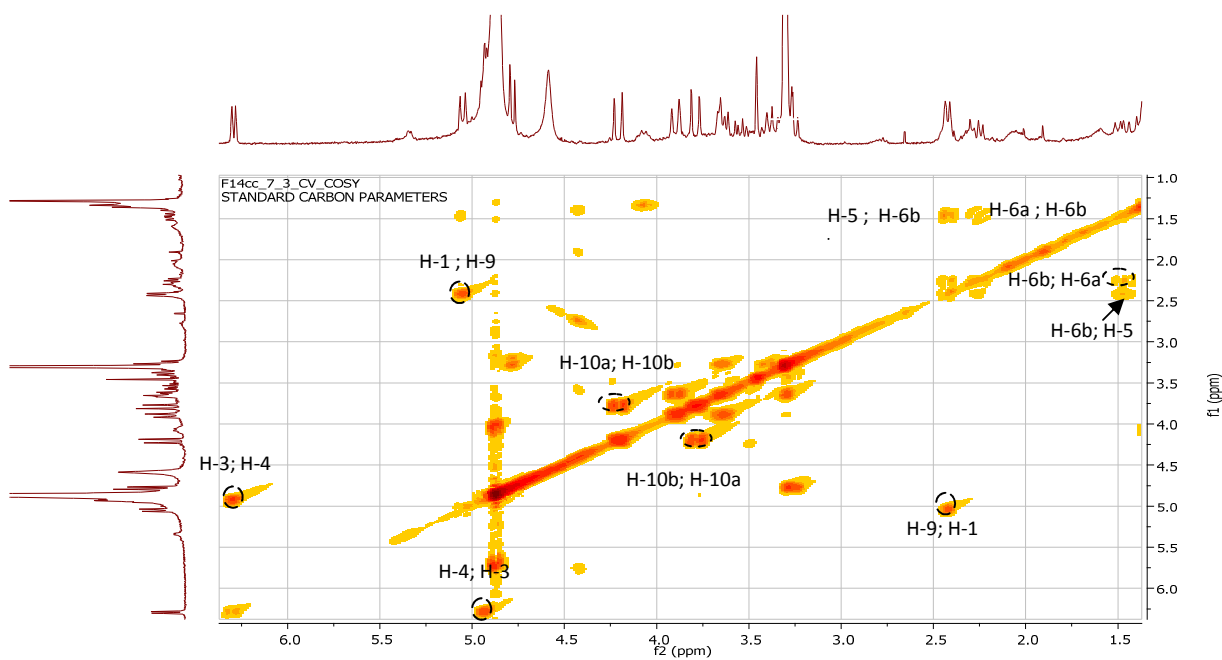


Figure IV-51b : Spectre COSY étalé du composé F₁₄₋₇₋₃

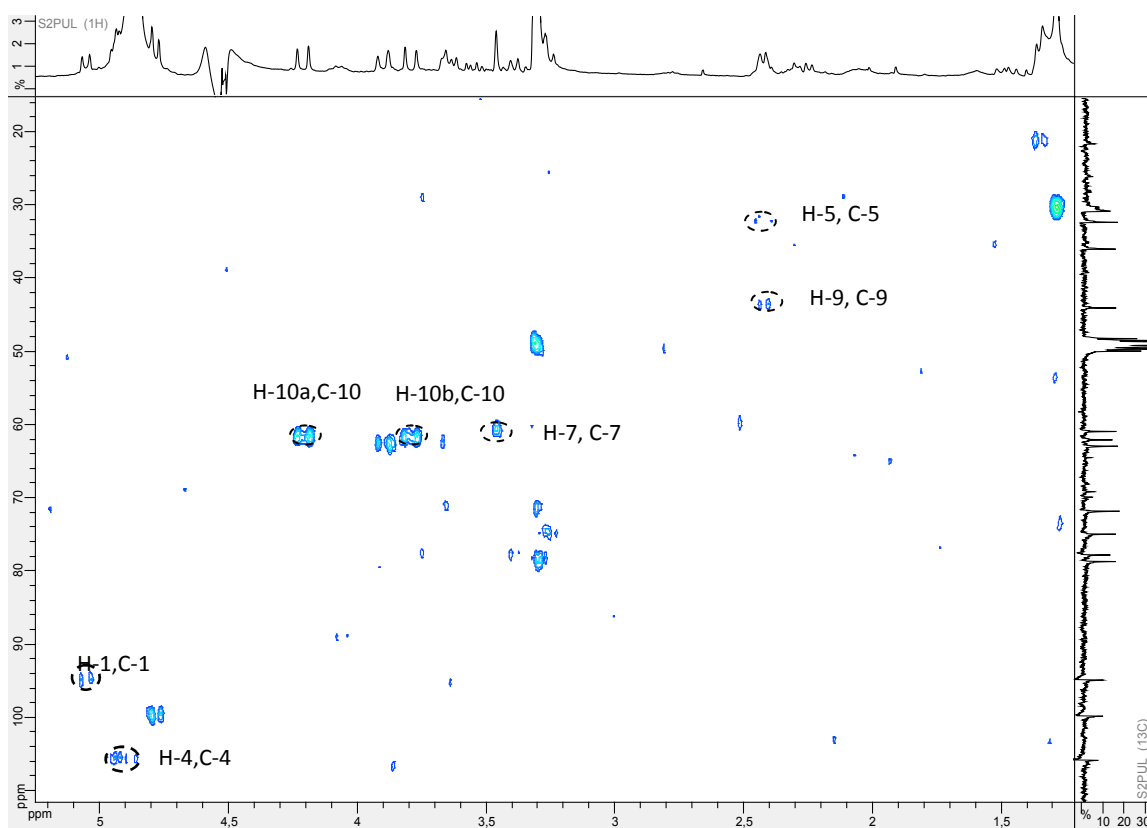


Figure VI-52b : Spectre HSQC étalé du composé F₁₄₋₇₋₃

L'analyse du spectre HMBC de ce composé (figure IV-53) montre des tâches de corrélation entre:

- Le proton H-1' du glucose et le carbone C-1 de la génine. Ceci permet de placer l'entité osidique sur le squelette iridoïde en position 1.
- Les deux protons du groupement $-\text{CH}_2-10$ et les carbones C-7 ($\delta_{\text{C}} 60,8\text{ppm}$), C-9 ($\delta_{\text{C}} 42,6\text{ppm}$) et le carbone quaternaire résonnant à $\delta_{\text{C}} 69,04\text{ppm}$. La valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné et permet son attribution au carbone C-8. Cette attribution est confirmée par la tache de corrélation entre le proton H-7 ($\delta_{\text{C}} 60,8\text{ppm}$) et ce même carbone quaternaire ($\delta_{\text{C}} 69,04\text{ppm}$). La comparaison de ces données avec les données de la littérature du catalpol et ses dérivés [REF] confirme la présence de la fonction epoxide entre les carbones C-7 et C-8.

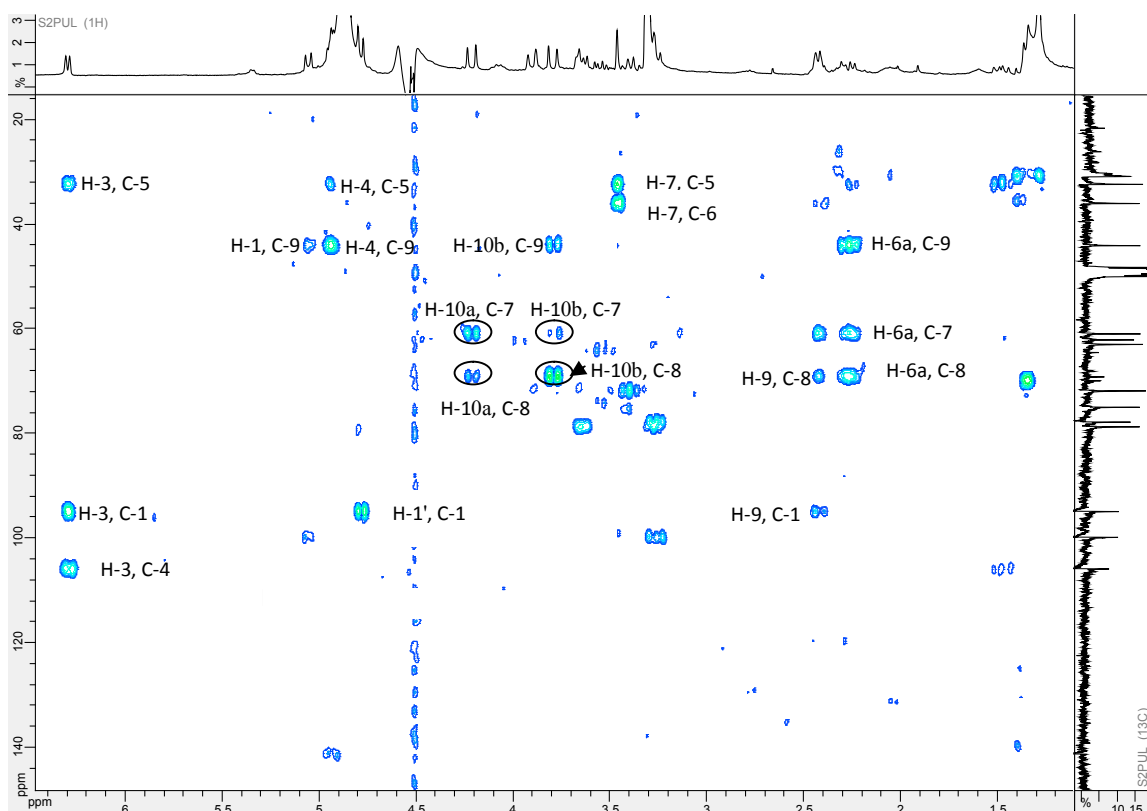


Figure IV-53: Spectre HMBC du composé F₁₄₋₇₋₃

Toutes ces données permettent d'établir sans ambiguïté la structure du composé **F₁₄₋₇₋₃** comme étant le **6-Deoxycatalpol [11]** (figure IV- 54).

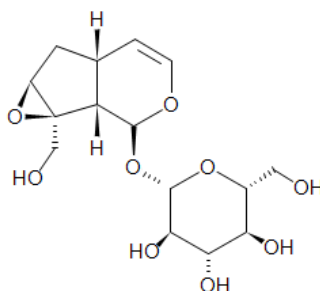


Figure IV- 54 : 6-Deoxycatalpol

L'ensemble des données spectroscopiques est rapporté dans le tableau IV-17

Tableau IV-17: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé F₁₄₋₇₋₃

Position	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	HMBC
1	5,06 <i>d</i> (8,7)	94,7	CH	C _{1'} ; C ₉
3	6,30 <i>d</i> (6, 3)	141,08	CH	C ₁ ; C ₄ ; C ₅
4	4.96 <i>ov</i>	106	CH	C ₅ ; C ₉
5	2.42 <i>d</i> (7,2)	32,3	CH	C ₇
6	1,47 <i>dd</i> (13,8 ; 7,2) 2,27 <i>dd</i> (13,8 ; 7,2)	35,9	CH ₂	C ₇ ; C ₈ ; C ₉ C ₅
7	3,46 <i>s</i>	60,8	CH	C ₅ ; C ₆
8	-	69,04	C	-
9	2,42 <i>d</i> (7,2)	42,6	CH	C ₁ ; C ₈
10	3,81 <i>d</i> (12.6) 4,23 <i>d</i> (12.6)	62,0	CH ₂	C ₈ ; C ₉ C ₇
1'	4,78 <i>d</i> (9)	99,7	CH	C _{2'}
2'	3,26	74,8	CH	C _{1'} ; C _{3'}
3'	3,37	77,9	CH	C _{4'}
4'	3,29	71,7	CH	C _{3'}
5'	3,30	78,6	CH	/
6'	3,64 <i>dd</i> (11,7 ; 5,4) 3,90 <i>dd</i> (11,7 ; 5,4)	62,8	CH ₂	C _{5'} /

IV-3-5-Le composé F₁₄₋₉₋₂

Le composé F₁₄₋₉₋₂ se présente sous forme huileuse soluble dans le méthanol.

Le spectre RMN ¹H (figure VI-55) montre une forte similitude avec le spectre proton du composé F₁₂₋₇ indiquant ainsi la possibilité de présence d'un mélange de deux produits de nature phenylethanoïde.

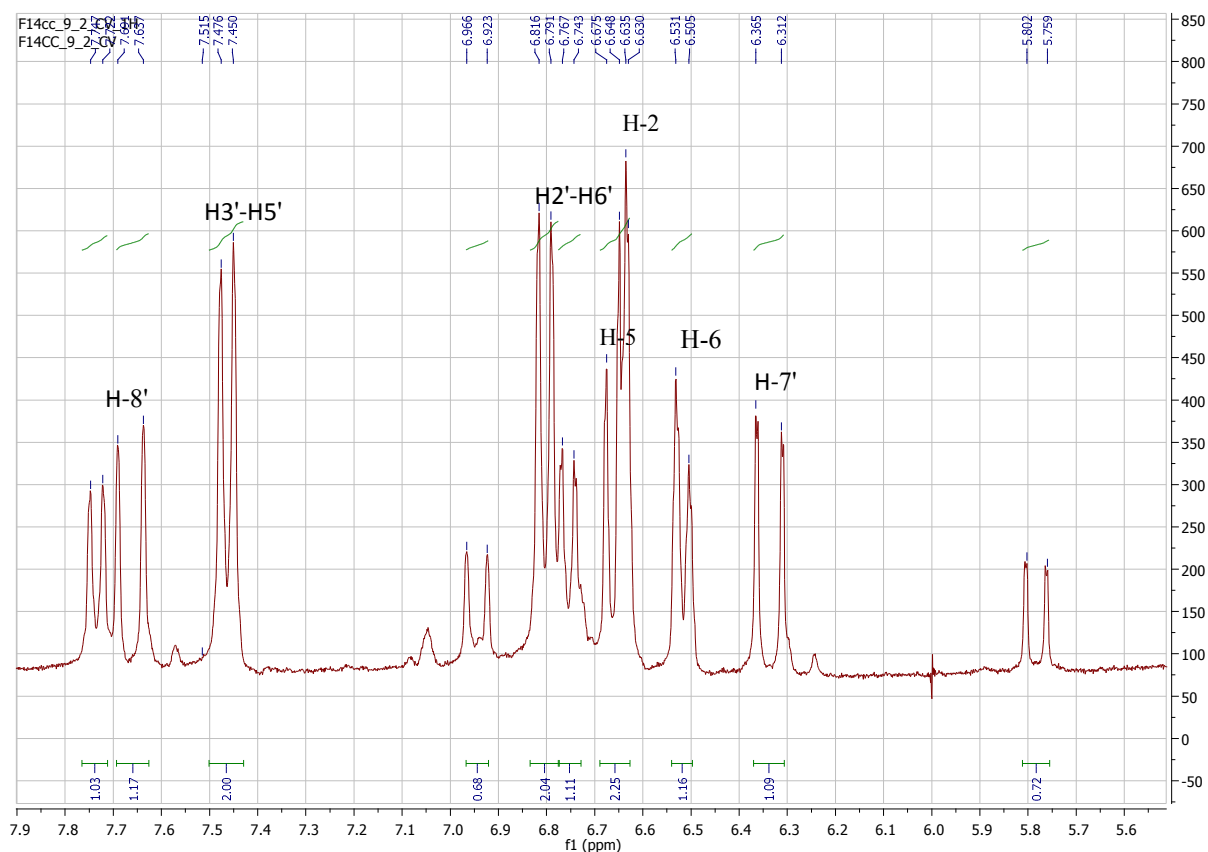
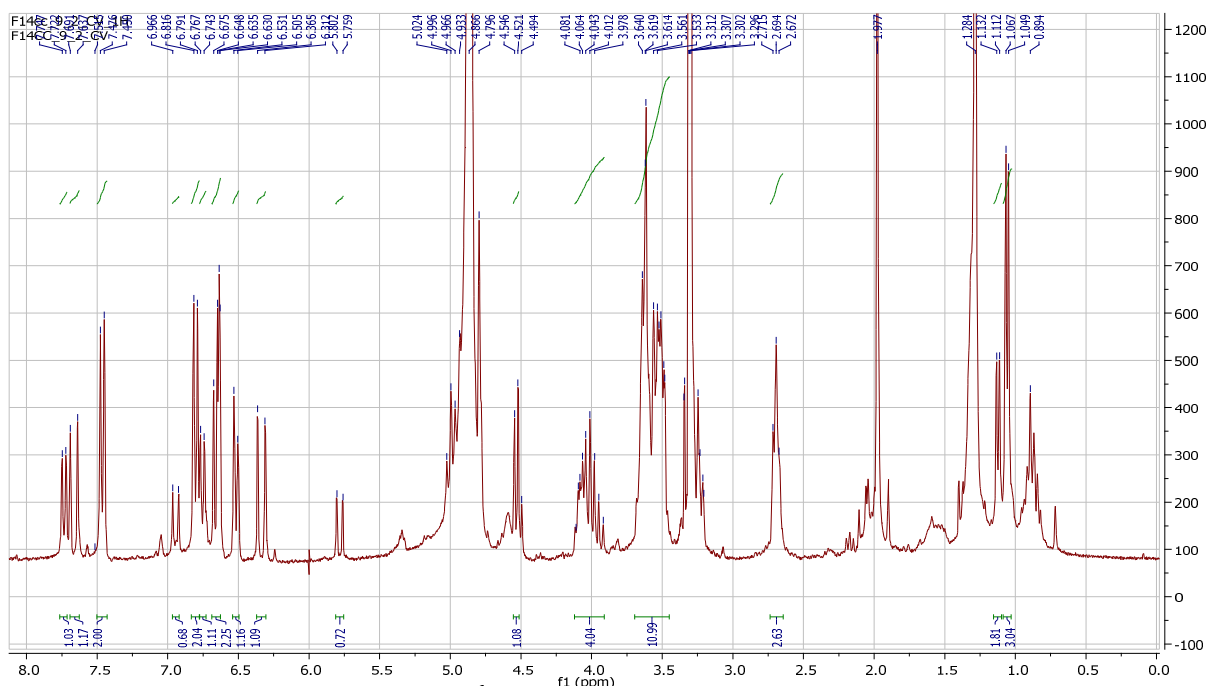
L'analyse simultanée des spectres RMN ¹H (figure VI-55), HSQC (figure VI-56) et COSY (figure VI-57) montre :

- Un signal sous forme de doublet ($J=8,1\text{Hz}$) à δ_{H} 6,66ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-5, corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_{C} 116,04ppm. Ce proton montre une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le signal à δ_{H} 6,51ppm, celui-ci apparaît sur le spectre RMN ¹H sous forme de doublet de doublet ($J=7,8 ; 1,5\text{Hz}$) d'intégration 1H qui ne peut être que le proton H-6. Ce dernier proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_{C} 120,8ppm.
- Un signal sous forme de doublet ($J=1,5\text{Hz}$) à δ_{H} 6,63ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-2 ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_{C} 115,6ppm.
- Un signal sous forme de triplet ($J=6,3\text{Hz}$) à δ_{H} 2,69ppm d'intégration 2H corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 35,1ppm. Les mêmes protons montrent sur le spectre COSY deux taches de corrélation, la première avec le signal à δ_{H} 3,63ppm recouvert par le signal de solvant et le deuxième à δ_{H} 4,07ppm également recouvert par d'autres signaux. Ces deux derniers signaux corrélient sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à δ_{C} 71,1ppm. Cette observation indique que ces deux signaux sont des protons diastéréotopiques et les valeurs de leurs déplacements chimiques sont en faveur d'une oxygénation en cette position d'où la présence d'un groupement CH₂-CH₂-O dans la molécule.

Ceci permet de déduire la présence d'un premier cycle aromatique trisubstitué en 1, 3 et 4 en plus d'une chaîne ethoxy. La jonction entre ces deux fragments ainsi que les déplacements chimiques des carbones quaternaires du cycle aromatique peuvent être déterminés à l'aide de l'analyse du spectre HMBC (figure IV-58). En effet, ce spectre montre :

- Le proton H-2 et le carbone résonant à δ_{C} 130,1ppm qui ne peut être que le C-1.
- Le proton H-6 et le carbone résonant à δ_{C} 142,6ppm attribuable au carbone C-4.
- Le proton H-5 et le carbone résonant à δ_{C} 143,8ppm attribuable au carbone C-3.

- Le proton H-7 et le carbone C-1 (δ_C 130,1ppm). Cette corrélation permet de lier le groupement $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ au cycle trisubstitué indiquant ainsi la présence d'une unité dihydroxyphénylethyl comme génine.



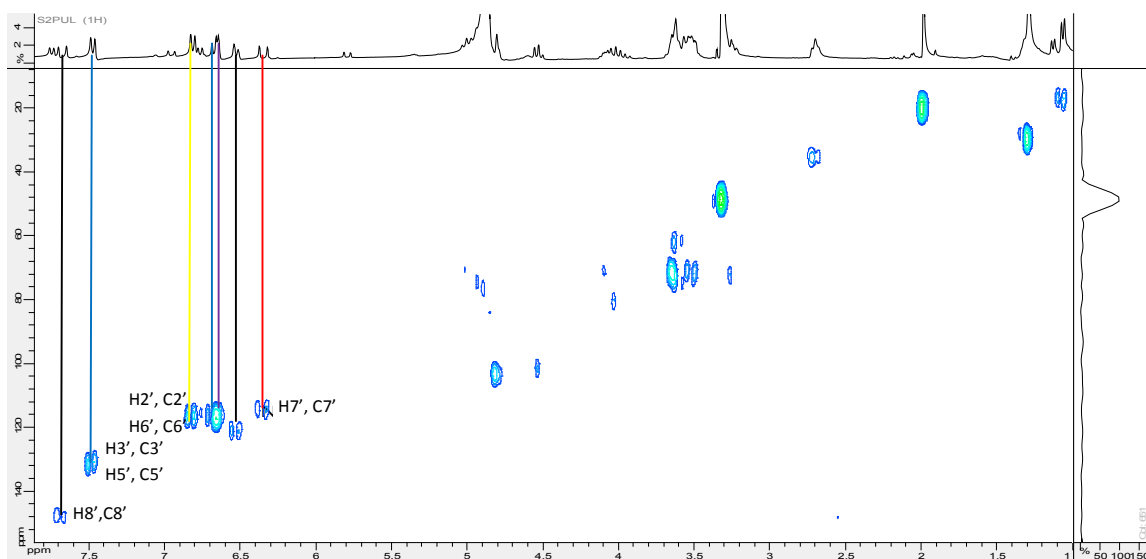


Figure IV-56 Spectre HSQC du composé F14-9-2

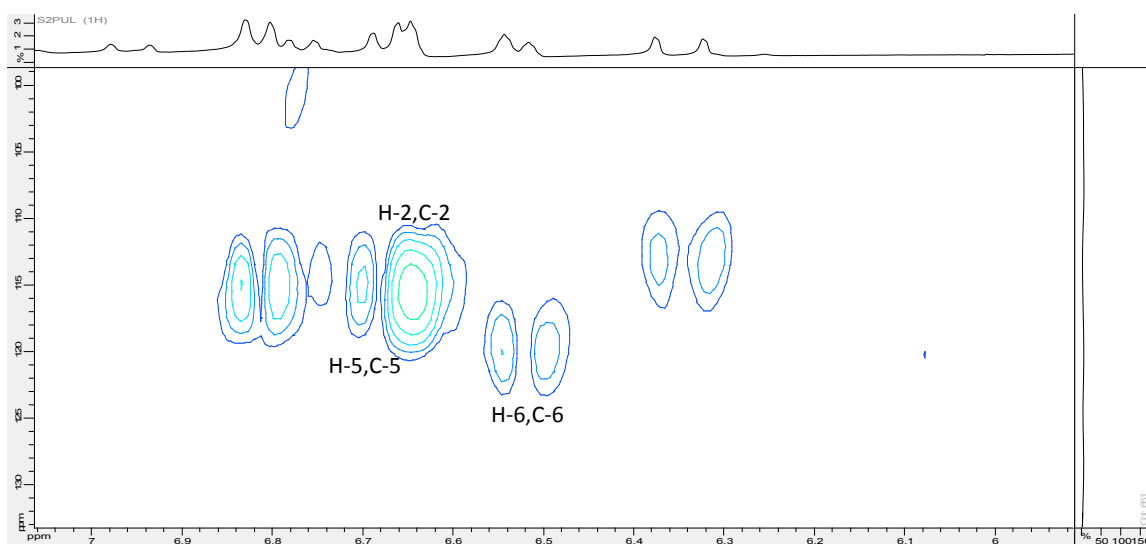


Figure IV-56a: Spectre HSQC étalé du composé F14-9-2

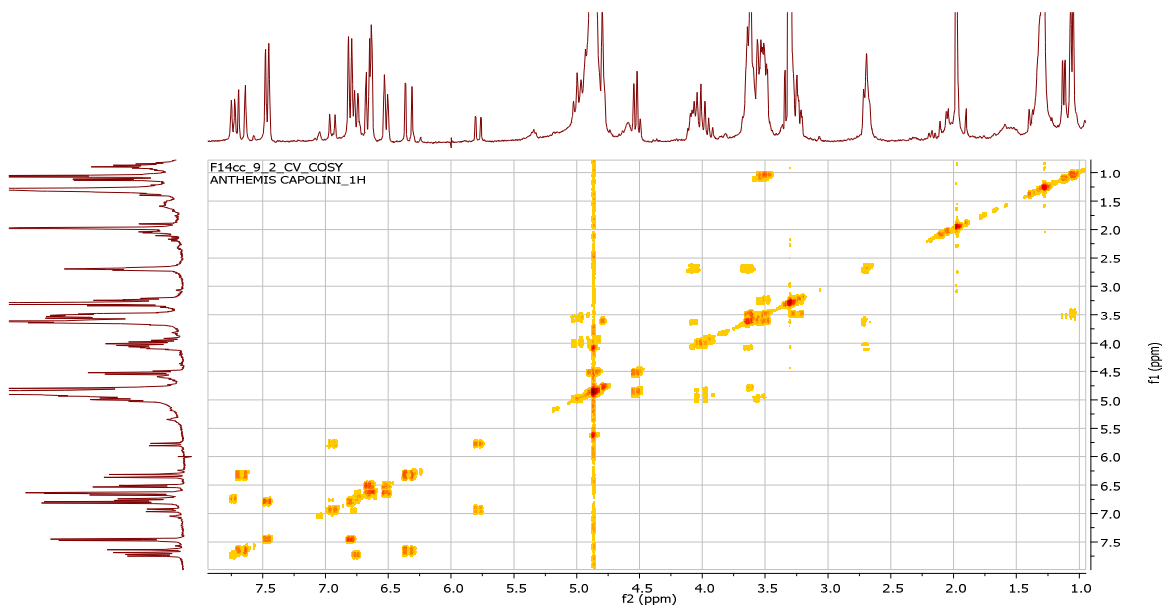


Figure IV-57: Spectre COSY du composé F14-9-2

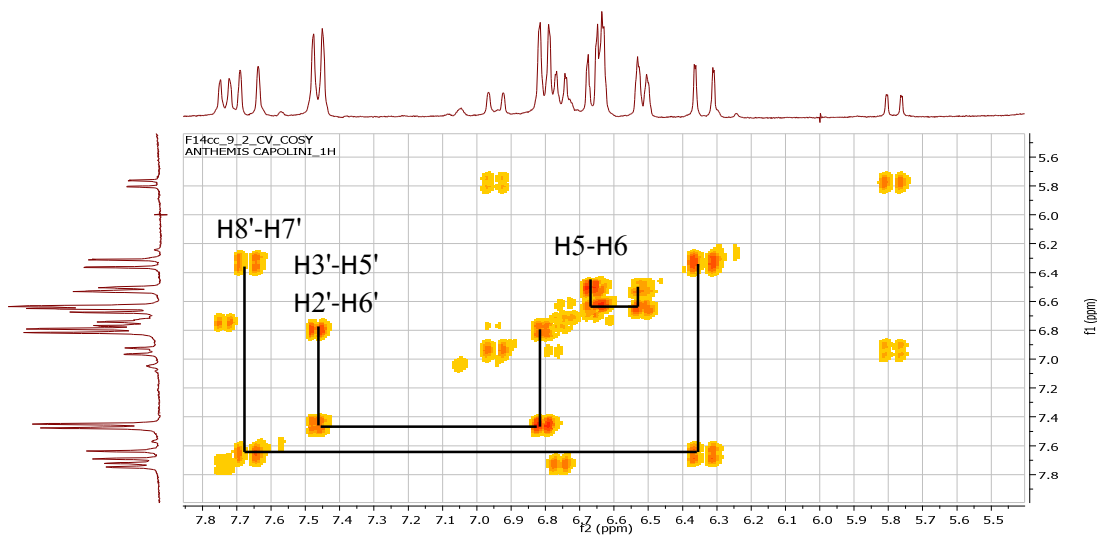


Figure IV-57-a: Spectre COSY étalé du composé F14-9-2

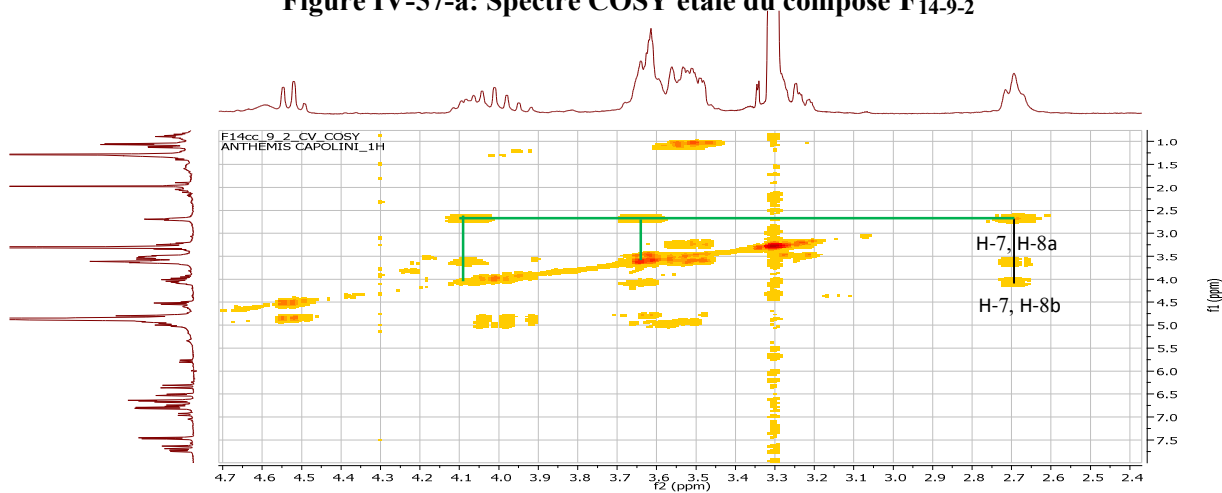


Figure IV-57-b: Spectre COSY étalé du composé F14-9-2

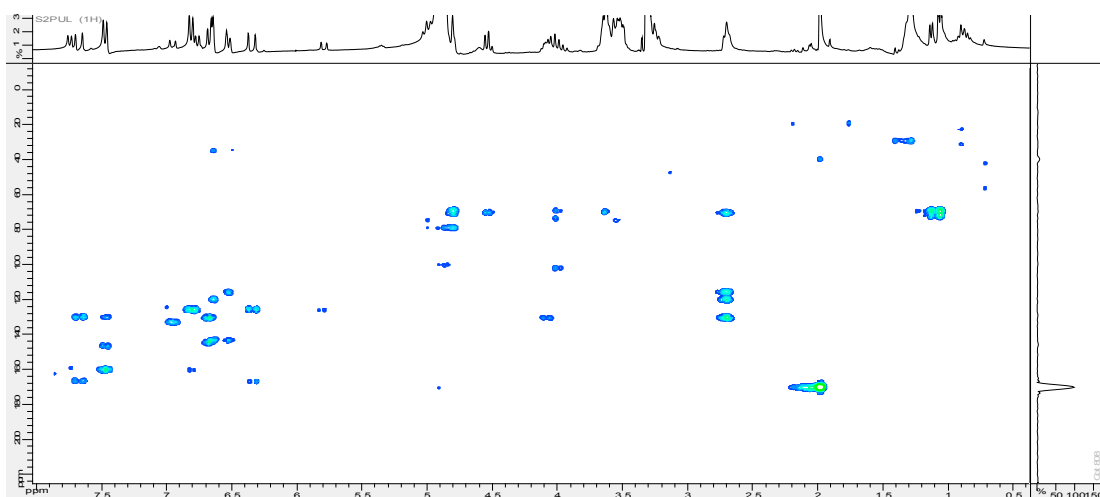


Figure IV-58: Spectre HMBC étalé du composé F14-9-2

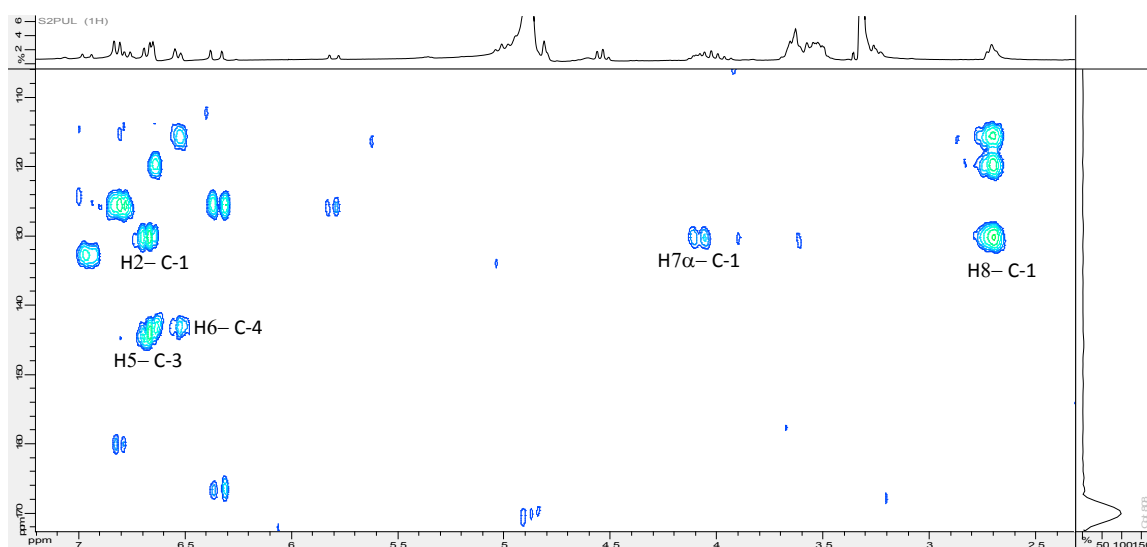


Figure IV-58a: Spectre HMBC étalé du composé F14-9-2

Un retour à l'analyse des spectres RMN ^1H (figure VI-55), HSQC (figure VI-56) et COSY (figure VI-57) montre:

- Un signal sous forme de doublet ($J=7,8\text{Hz}$) à δ_{H} 7,46ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-3', H-5' corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 131,0ppm, ces protons montrent une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le signal à δ_{H} 6,8ppm qui apparaît sur le spectre RMN ^1H sous forme de doublet ($J=7,5\text{Hz}$) d'intégration 2H également qui ne peuvent être que les protons H-2', H-6'. Ces derniers protons corrélient sur le spectre HSQC avec leur carbone résonant à δ_{C} 116,3ppm, ce qui permet de déduire la présence d'un cycle aromatique para substitué.
- Un signal sous forme de doublet ($J=16,2\text{Hz}$) à δ_{H} 7,66 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-8' corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_{C} 147,5 ppm. Ce proton

donne une tache de corrélation sur le spectre COSY avec le signal à δ_H 6,34ppm (d ; $J=16,0$ Hz) d'intégration 1H attribuable au proton H-7', celui-ci corréle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_C 114,13ppm. Les valeurs du déplacement chimique et celle de la constante de couplage permettent de déduire la présence d'une chaîne éthylénique de configuration *trans*.

Un retour à l'étude du spectre HMBC (figure VI-58) de ce composé montre des tâches de corrélations entre:

- Les protons H-3', H-5' et deux carbones, le premier résonne à δ_C 160,2ppm attribuable à C-4' et le second résonne à δ_C 147,5 (C-8').
- Les protons H-2', H-6' et le carbone résonant à δ_C 125,6ppm attribuable au carbone quaternaire aromatique C-1'.
- Ce dernier carbone (C-1') et le proton éthylénique H-7'. Cette dernière observation permet de lier le cycle aromatique parasubstitué avec la chaîne éthylénique.
- Le proton éthylénique à δ_H 7,66 (H-8') et le carbone du carbonyle d'ester résonant à δ_C 166,3ppm.

Ces données permettent de déduire la présence d'un groupement para-coumarique dans ce composé.

Une deuxième analyse simultanée des spectres RMN 1H (figure IV- 55), HSQC (figure IV- 56) et COSY (figure IV- 57) permet de repérer l'existence de deux unités osidiques, effectivement on observe :

- Un signal sous forme de doublet ($J= 8,1$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 4,53ppm corréle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_C 99,96ppm attribuable au proton (H-1'') et au carbone (C-1'') anomériques d'un hexose qui peut être soit un β -glucose soit un β -galactose vu la valeur de la constante de couplage. La valeur du déplacement chimique indique une jonction O-sucre.
- Un signal sous forme de doublet ($J= 6$ Hz) d'intégration 3H à δ_H 1,06ppm corréle sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_C 16,83ppm caractéristique du groupement méthyle d'un rhamnose.

Les autres protons des deux entités osidique peuvent être déterminés à l'aide de l'expérience COSY (figure IV- 57c et figure IV- 57d) qui montre des taches de corrélation entre :

- Le proton anomérique du premier sucre nommé H-1'' et le proton résonant à δ_H 4,89ppm attribuable au proton H-2'', le signal de ce proton sur le spectre RMN du proton est recouvert par le signal du solvant.
- Le proton H-2'' et le proton résonant à δ_H 4,02ppm attribuable au proton H-3'', le signal de ce dernier sur le spectre proton se trouve chevauché avec d'autres signaux.
- Le proton H-3'' et le proton résonant à δ_H 4,99ppm attribuable au proton H-4'', apparaît sur le spectre RMN proton sous forme de triplet ($J= 8,4\text{Hz}$). La multiplicité de H-4'' ainsi que la valeur de la constante de couplage ($J= 8,4\text{Hz}$) indique que les protons H-3'', H-4'' et H-5'' admettent des interactions axiales-axiales. Cette constatation permet de déduire qu'il s'agit d'un glucose.
- Le proton H-4'' et le proton résonant à δ_H 3,56ppm ne peut être que le proton H-5'', le signal de ce proton sur le spectre RMN proton est recouvert par d'autres signaux.
- Le proton H-5'' et le proton résonant à δ_H 3,50ppm attribuable au proton H-6''b, le signal de ce proton sur le spectre RMN proton est également recouvert par d'autres signaux. Le proton H-6''b et le proton résonant à δ_H 3,62ppm attribuable au proton H-6''a, le signal de ce proton sur le spectre proton est recouvert par d'autres signaux.

Le même spectre COSY montre des tâches de corrélation liant les protons de la deuxième entité osidique qui n'est autre que le rhamnose. En effet :

- Les trois protons du méthyle noté H-6''' (δ_H 1,06ppm) du rhamnose et le proton résonant à δ_H 3,50ppm attribuable au proton H-5'''.
- Le proton H-5''' et le proton résonant à δ_H 3,24ppm attribuable au proton H-4'''.
- Le proton H-4''' et le proton résonant à δ_H 3,54ppm ne peut être que le proton H-3'''.
- Le proton H-3''' et le proton résonant à δ_H 3,56ppm attribuable au proton H-2'''.
- Le proton H-2''' et le proton résonant à δ_H 4,85ppm ne peut être que le proton anomérique du rhamnose H-1''' (recouvert par le signal du solvant).

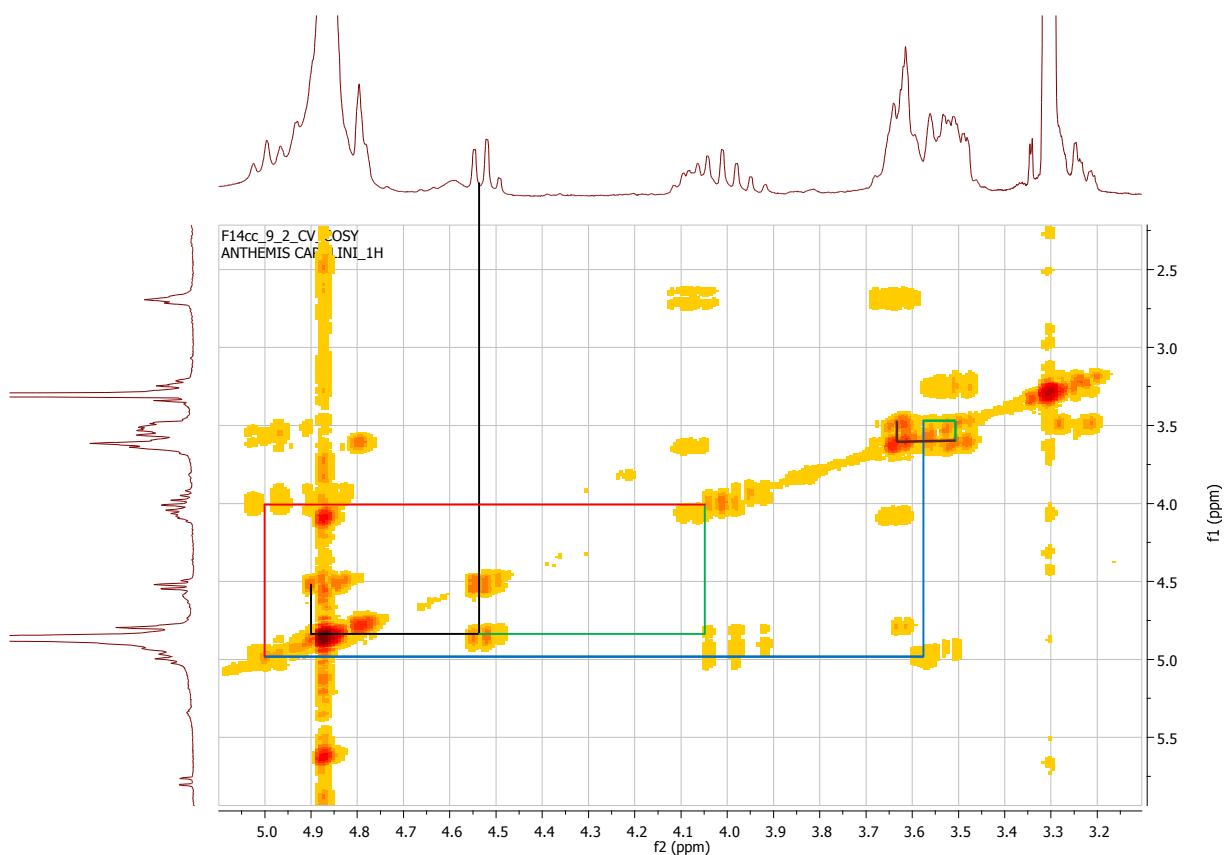


Figure VI-57c: Spectre COSY étalé du composé F14-9-2

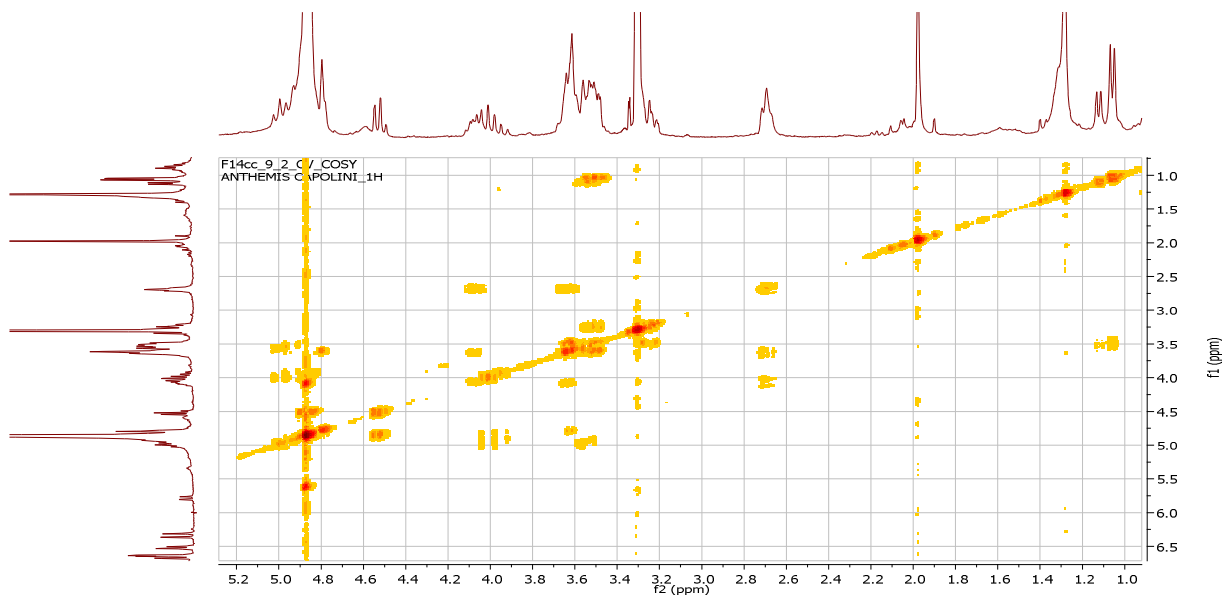


Figure VI-57d: Spectre COSY étalé du composé F14-9-2

Toujours sur le spectre RMN de proton (figure IV- 55) on observe :

- Un signal sous forme de singulet d'intégration 3H à δ_H 1,98ppm corrèle sur le spectre HSQC (figure IV- 56) avec le carbone résonant à δ_C 19,5ppm, ce groupement méthyle montre sur le spectre HMBC (figure IV- 58b) une tâche de corrélation avec le carbone résonant à δ_C 169,7ppm, celui-ci ne peut être qu'un carbonyle d'ester vu la valeur de son

déplacement chimique. Cette observation permet de déduire la présence d'un groupement acétyle dans ce composé.

Vu l'absence d'autres signaux sur le spectre RMN¹H, les substituants des deux cycles aromatiques ne peuvent être que des groupements hydroxyyles comme déjà mentionnés.

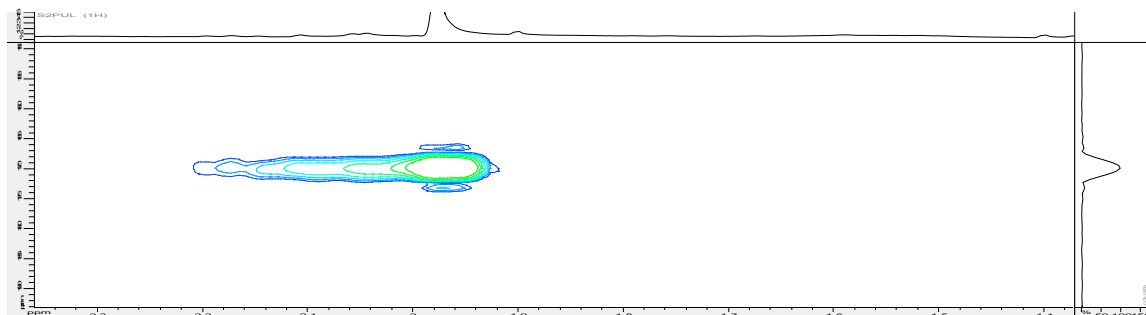


Figure VI-58b: Spectre HMBC étalé du composé F₁₄₋₉₋₂

L'analyse de l'ensemble des données spectroscopiques du composé F₁₄₋₉₋₂, montre que ce dernier renferme quatre entités, à savoir un groupement 3,4-dihydroxyphényethyl, un acide *p*-coumarique et deux unités osidiques, un glucose et un rhamnose. L'étude du spectre HMBC permet de les relier comme suit grâce aux taches de corrélation :

- Le H-8a (δ_H 4,07) du groupement phénylethanoïde et le carbone anomérique C-1'' du glucose (δ_C 99,96ppm), cette corrélation permet de lier le groupement phénylethanoïde au glucose en position 1.
- Le proton H-2'' du glucose (δ_H 4,89ppm) et le carbone de groupement acétyle (δ_H 169,7 ppm), ceci permet de déduire que le C-2'' du glucose est acétylé.
- Le proton H-3'' du glucose (δ_H 4,02 ppm) et le carbone anomérique du rhamnose C-1''' (δ_C 102,1ppm). Cette observation permet de lier le rhamnose au glucose en position 1→3.
- Le proton H-4'' du glucose (δ_H 4,99 ppm) et le carbone du carbonyle C-9' (δ_C 166,3 ppm). Cette observation permet de lier l'acide coumarique au glucose en position 4.

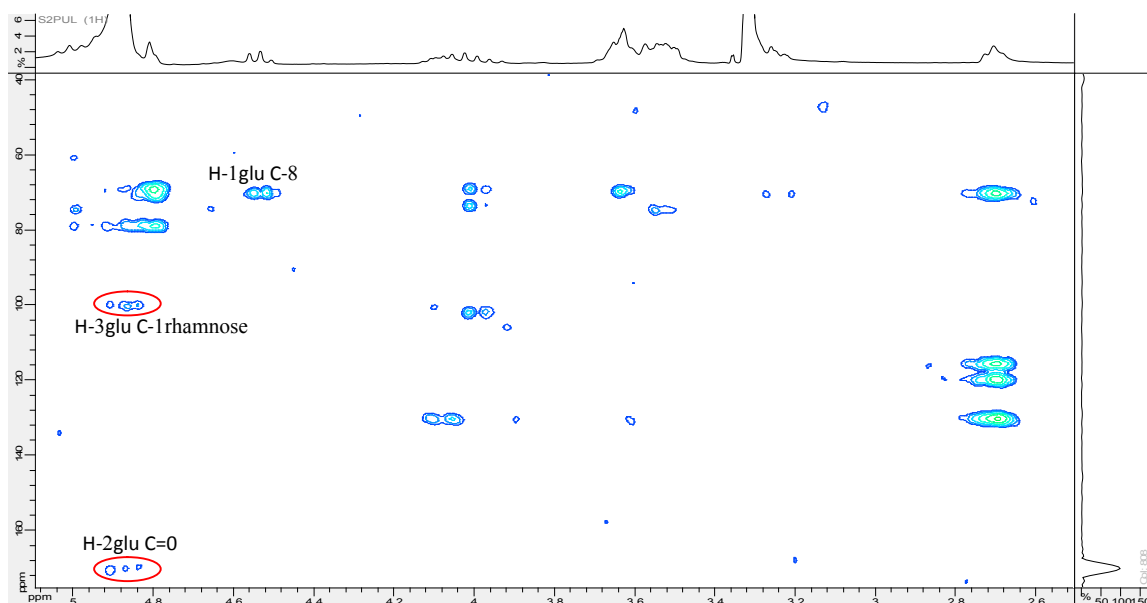


Figure IV-58c: Spectre HMBC étalé du composé F14-9-2

La combinaison de l'ensemble de ces données spectrales mène à la structure 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(4-*O*-*p*-coumaryl)-2-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside appelé aussi *E*-Tubuloside *E* [12].

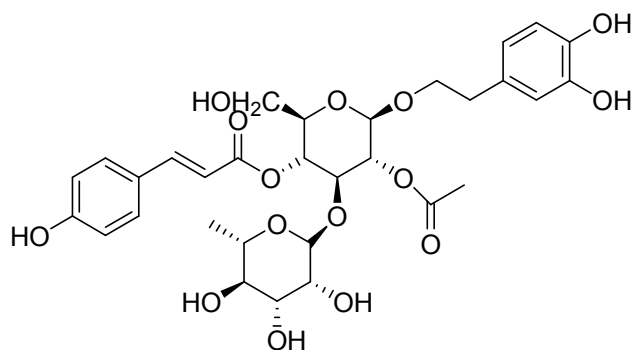


Figure IV- 59: *E*-Tubuloside *E*

Une lecture attentive du spectre RMN ^1H (Figure IV- 55) montre un dédoublement des signaux notamment ceux de la zone osidique, mais la présence de l'isomère *Cis* du composé F₁₄₋₉₋₂ est confirmé par les signaux du groupement coumarique, effectivement on observe :

- Deux signaux sous forme de doublet ($J=9$ Hz) à δ_{H} 7,74 et 6,76ppm d'intégration 1,03 chacun caractéristique des protons H-3', H-5'et H-2', H-6' d'un cycle aromatique parasubstitué.

- Deux signaux sous forme de doublet ($J= 12,9$ Hz) à δ_H 5,79 et 6,95ppm caractéristique des protons H-7' et H-8' indiquant la présence d'une double liaison. La valeur de la constante de couplage ($J= 12,6$ Hz) indique qu'il s'agit de l'énantiomère *Cis* du premier composé appelé Z-Tubuloside E [13].

Un calcul simple mené sur les valeurs d'intégrales permet de déduire qu'on est en présence d'un mélange de deux énantiomères *Trans* et *Cis* avec les proportions 60,22% en faveur du premier composé E-Tubuloside E.

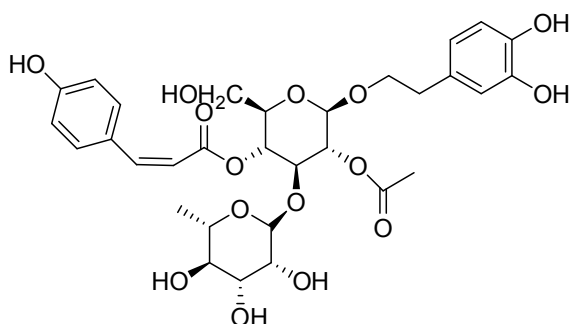


Figure IV-60: Z-Tubuloside E

L'ensemble des données spectroscopiques est rapporté dans les tableaux IV-18 et IV-19.

Tableau IV-18: Déplacements chimiques des protons et carbones du *E-Tubuloside E*

Position	δ H	δ C
1	/	130,1
2	6,63 <i>d</i> (1,5 Hz)	115,6
3	/	143,8
4	/	142,6
5	6,66 <i>d</i> (8,1 Hz)	116,0
6	6,51 <i>dd</i> (7,8 ; 1,5 Hz)	120,8
7	2,69 <i>t</i> (6,6Hz)	35,1
8	3,63 <i>m</i> 4,07 <i>m</i>	71,1
1'	/	125,6
2'	6,8 <i>d</i> (7,8 Hz)	116,3
3'	7,46 <i>d</i> (7,8 Hz)	131,0
4'	/	160,2
5'	7,46 <i>d</i> (7,8 Hz)	131,0
6'	6,8 <i>d</i> (7,8 Hz)	116,3
7'	6,34 <i>d</i> (16,0 Hz)	114,1
8'	7,66 <i>d</i> (16,2 Hz)	147,5
9'	/	166,3
1''	4,53	100,96
2''	4,89	74,8
3''	4,02	80,4
4''	4,99	69,9
5''	3,56	74,7
6''	3,50 3,62	61,7
1'''	4,85	103,0
2'''	3,56	70,8
3'''	3,54	70,4
4'''	3,24	71,9
5'''	3,50	71,1
6'''	1,06	16,83
2''-CH ₃ CO	1,98 <i>s</i>	19,5
2''-CH ₃ CO	/	169,7

Tableau IV-19: Déplacements chimiques des protons et carbones du *Z-Tubuloside E*

Position	δ H	δ C
1	/	130,1
2	6,63 <i>d</i> (1,5 Hz)	115,6
3	/	143,8
4	/	142,6
5	6,66 <i>d</i> (8,1 Hz)	116,0
6	6,51 <i>dd</i> (7,8 ; 1,5 Hz)	120,8
7	2,69 <i>t</i> (6,6 Hz)	35,1
8	3,63 <i>m</i> 4,07 <i>m</i>	71,1
1'	/	125,7
2'	6,76 <i>d</i> (9 Hz)	114,5
3'	7,74 <i>d</i> (9 Hz)	132,6
4'	/	158,9
5'	7,74 <i>d</i> (9 Hz)	132,6
6'	6,76 <i>d</i> (9 Hz)	114,5
7'	6,34 <i>d</i> (16,0 Hz)	114,3
8'	7,66 <i>d</i> (16,2 Hz)	144,8
9'	/	166,3
1''	4,53	100,96
2''	4,89	74,8
3''	4,02	80,4
4''	4,99	69,9
5''	3,56	74,7
6''	3,50 3,62	61,7
1'''	4,85	103,0
2'''	3,56	70,8
3'''	3,54	70,4
4'''	3,24	71,9
5'''	3,50	71,1
6'''	1,06	16,83
2''-CH ₃ CO	1,98	19,5
2''-CH ₃ CO	/	169,7

IV -3-6 activité anti-inflammatoire In vitro

Discussion des résultats

L'inflammation est considérée comme un mécanisme de défense physiologique primaire qui aide le corps à se protéger contre les différents stimuli [14]. La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien documentées de maladies inflammatoires et arthritiques [15]. Les enzymes lysosomales libérées au cours de l'inflammation produisent une variété de troubles [16]. L'activité extra-cellulaire de ces enzymes est censée être liée à une inflammation aiguë ou chronique [17].

Comme le montre le tableau IV-20, l'effet de prévention de l'extrait acétate d'éthyle de *C. violacea* sur la membrane HRBC lysis induite par une solution hypotonique a augmenté avec l'augmentation de la concentration. La capacité de cet extrait ($59,51 \pm 0,86$ à $75,52 \pm 0,46\%$) pour protéger les membranes HRBC lysis a été clairement étendue de 400 à 1000 $\mu\text{g/ml}$ et était nettement comparable au sodium-diclofénac (référence) laquelle était plus active ($79,47 \pm 0,74\%$) à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$. L'inhibition de la dénaturation des protéines a été prise comme une mesure de l'activité antiarthritique *in vitro* [18]. La production d'auto-antigène dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation de la protéine [19]. Comme il peut être déduit du tableau 3, l'extrait acétate d'éthyle de *C. violacea* ($62,05 \pm 5,39$ à $68,09 \pm 1,62\%$) a eu une bonne inhibition de la dénaturation d'albumine à la concentration étendue de 400 à 600 $\mu\text{g/ml}$. L'effet le plus élevé ($80,91 \pm 1,32\%$) a été prouvé par le sodium-diclofénac à la concentration 200 $\mu\text{g/ml}$. L'effet anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle de *C. violacea* a été clairement mis en évidence par les valeurs de IC50 présentées dans tableau 3, les valeurs IC50 pour l'inhibition des deux membranes HRBC lysis et la dénaturation des protéines prouvées par cet extrait étaient $240,49 \pm 16,3 \mu\text{g/ml}$, $206,12 \pm 23,48\mu\text{g/ml}$, respectivement par comparaison avec le diclofénac sodique qui était de $42,91 \pm 2,19\mu\text{g/ml}$ et $42,77 \pm 0,78\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Tableau IV- 20: Effet de l'extrait acétate d'éthyle de *C. violacea* sur la dénaturation des protéines et la membrane HRBC lysis (% d'inhibition)

membrane HRBC lysis (inhibition%)			dénaturation Anti-protéine (%)		
Concentration (µg/mL)	inhibition EtOAc extract	sodium-Diclofenac inhibition	Concentration (µg/mL)	inhibition EtOAc extract	sodium-Diclofenac inhibition
50	32.4±1.66	49.66±1.18	50	31.75±2.1	50.99±0.60
100	37.4±1.44	75.39±0.80	100	39.62±1.41	73.06±1.55
200	47.61±0.92	79.47±0.74	200	45.87±1.65	80.91±1.32
400	50.32±1.55		400	52.41±1.45	
600	59.51±0.86		600	62.05±5.39	
1000	5.52±0.46		1000	68.09±1.62	
IC ₅₀	240.49±16.30**	42.91±2.19**	IC ₅₀	206.12±23.49**	42.77±0.79**

Chaque valeur est la moyenne ± écart-type (n = 3), * p <0,005, ** p <0,01 (test t de Student) par rapport au contrôle correspondant

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle de *Cistanche violacea* dans cette investigation peut être due à l'un ou la combinaison de plusieurs constituants chimiques, comme mentionnés ci-dessus, incluant deux iridoïdes, quatre phenylethanoïde glycosides et un flavonoïde (apigénine). Il a été rapporté que ces classes de composés possèdent diverses activités pharmacologiques y compris l'activité anti-inflammatoire [20-21]. Les études antérieures ont rapporté que les iridoïdes ainsi que les phenylethanoïdes glycosides sont doués d'une forte activité anti-inflammatoire [22]. Parmi les flavonoïdes, l'apigénine a également été bien documenté pour son activité anti-inflammatoire [23-24].

En conclusion, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle de *C.violacea* qui a été probablement médité par l'inhibition de l'activité arthritique et la libération lysosomique peut être influencée par l'action synergique des iridoïdes, des phenylethanoïdes glycosides et de l'apigénine. Ces effets pourraient être extrapolés dans la limitation des réponses inflammatoires et suggérant que l'extrait acétate d'éthyle de *C. violacea* servirait comme source pour la découverte de nouveaux agents anti-inflammatoires.

IV-4 Conclusion

- L'investigation chimique effectuée sur l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Astragalus gombo* (Fabaceae), a permis d'isoler quatre composés de type kaempférol et l'élucidation des structures de 3 d'entre eux par utilisation des différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D, 2D et UV), il s'agit de
 - Kaempférol 3-*O*-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-D-galactopyranoside.
 - 7-methylkaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*- β -galactopyranoside.
 - kaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-4'-*O*- β -galactopyranosyl ou kaempférol 3-*O*- β -galactopyranosyl-4'-*O*- α -rhamnopyranosyl.
- De la même manière, l'investigation chimique effectuée sur l'extrait *n*-butanol de l'espèce *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* (Fabaceae), a conduit à l'isolement de trois flavonoïdes et l'élucidation de deux entre eux par l'utilisation des différentes méthodes spectroscopiques (RMN H¹ et UV) les deux produits sont identifiés comme suit:
 - Isorhamnétine 3-*O*- β -galactopyranoside
 - Quercétine 3-*O*-robinobioside.
- Le test de l'activité antioxydant (test au DPPH) sur les extraits AcOEt et *n*-butanol de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* montre que l'extrait *n*-BuOH présente l'effet le plus puissant *vis-à-vis* du radical libre DPPH comparativement au BHA utilisé comme standard.
- D'autre part, l'investigation chimique effectuée sur l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Cistanche violacea* (Orobanchaceae), a permis d'isoler 10 produits et l'élucidation de sept d'entre eux en utilisant des différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D, 2D et UV). Les composés identifiés appartiennent à trois classes de métabolites secondaires, les iridoïdes et les phenylethanoïdes qui sont très présents dans ce genre et les flavonoïdes qui n'ont jamais été isolés à partir de ce genre.

Les composés se répartissent comme suit :

- Cistanin I-8-methyl-malonate (nouveau produit)
- 6- Deoxy Catalpol (nouveau pour l'espèce)
- Apigénine (nouveau pour le genre)
- Z-tubuloside D (nouveau produit)
- E-tubuloside D (nouveau pour l'espèce)
- Z-tubuloside E (nouveau pour l'espèce)
- E-tubuloside E (nouveau pour l'espèce)

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle montrent que ce dernier possède une activité anti-inflammatoire très importante en utilisant deux méthodes (la méthode de stabilisation de la membrane HRBC et la méthode de dénaturation de l'albumine) ces résultats montrent que cet extrait peut être utilisé comme source pour la découverte de nouveaux agents anti-inflammatoire. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication internationale.

Références bibliographiques

1. Agrawal PK, **1992**, NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10): 3307-30.
2. Elaine A. Porter, Alexander A. van den Bos, Geoffrey C. Kite, Nigel C. Veitch, Monique S.J. Simmonds, **2012**, Flavonol glycosides acylated with 3-hydroxy-3-methylglutaric acid as systematic characters in *Rosa*. *Phytochemistry*, 81: 90–96.
3. Shan-Shan Wang, Xiao-Jing Zhang, Sheng Que, Guang-Zhong Tu, Dan Wan, Wei Cheng, Hong Liang, Jia Ye and Qing-Ying Zhang, **2012**, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Flavonol Glycosides from *Oxytropis falcate*. *Journal of natural products*, 75, 1359–1364.
4. Montoroa P., Teyeb H., Masullo M., Mari A., Douki W., Piacente S., **2013**, LC–ESI-MS quali-quantitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 : 89–98.
5. S. Liu, Y. Ma, Y. Tang, J. Chen, X. Zhang, **2008**, Chemical constituents of *Oxytropis falcate*, *Phytochemical Plants Research*, 33: 1418–1421.
6. Ibrahim, L.F.; Marzouk, M.M.; Hussein, S.R.; Kawashty, S.A.; Mahmoud, K.; Saleh, N.A.M. **2013**, Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss. *Natural Products Research*, 27: 386–393.
7. Gudej, J., Nazaruk, J., **2001** Flavonol glycosides from the flowers of *Bellis perennis*, *Fitoterapia*, 72 (7), 839-840 .
8. Nkeoma N. and Chukwuma O. B., **2016**, Anti-oxidant and Antimicrobial Flavonoid Glycosides from *Alstonia boonei* De Wild Leaves, *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6): 1-9.
9. D'Abrosca, B., Pacifico, S., Scognamiglio, M., D'Angelo, G., Galasso, S., P. Monaco, Fiorentino, A., **2013**, A new acylated flavone glycoside with antioxidant and radical scavenging activities from *Teucrium polium* leaves. *Natural Product Research*. 27: 356-363
10. Jiang. Y, Tu. PF, **2009**, Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species, *Journal of Chromatography A*, 1216: 1970-1979.
11. Kobayashi. H, Oguchi. H, Takizawa. N, Miyase. T, Ueno. A, Usmanghani. K, Ahmad. M, New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 35 (1987) 3309–3314.
12. Koo. KA, Sung. SH, Park. JH, Kim. SH, Lee. KY, Kim.YC, **2005**, In vitro neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma*, *Planta Medica*, 7,

13. Liu. XM, Jiang. Y, Sun. YQ, Xu. XW, Tu. PF, **2011**, Study on chemical constituents of *Cistanche deserticola*, *Chinese Pharmaceutical Journal*, 46: 1053–1058.
14. Tabas. I, Glass. CK., **2013**, Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities, *Science*, 166: 166-172.
15. Srikanth. N, Elumalai. A, M. Chinna Eswaraiah, N. Veldi, 2012, An updated review on anti- arthritic medicinal plant, *International Journal of Pharmacy Review & Research*, 2: 11-15.
16. Mishra. NK, Bstia. S, Mishra. G, Chowdary. KA, Patra. S, **2011**, Anti-arthritic activity of *Glycyrrhiza glabra*, *Boswellia serrata* and their synergistic activity in combined formulation studied in Freund's adjuvant induced arthritic rats, *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2: 92-98.
17. Sherwood. ER, Toliver-Kinsky .T. **2004**, Mechanisms of the inflammatory response, *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18 () 385-405.
18. Umapathy. E, Ndebia. EJ, Meeme. A, Adam. B, Menziwa. P, Nkeh-Chungag. BN, Iputo. JE, **2010**, An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation, *Journal of medicinal plant research*, 4: 789-795.
19. Sangeetha. M, Kousalya. K, Lavanya. R, Cherukuru. S, Chamundeswari. D, Maheswara . UC, **2011**, *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of leaves of *Cleodendron inerme*, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2: 822-827.
20. M. Del Carmen Recio, RM. Giner, S. Máñez, JL. Ríos, **1994**, Structural Considerations on the Iridoids as Anti-Inflammatory Agents, *Planta medica*, 60: 232-234.
21. Dinda. B, Debnath. S, Harigaya. Y, **2007**, Naturally occurring iridoids, A review, part 1, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55: 159–222.
22. Tundis. R, Loizzo. MR, Menichini. F, Statti. GA, Menichini. F, **2008**, Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8: 399-420.
23. Soares. R, Azevedo. I, **2006**, Apigenin: is it a pro- or anti-inflammatory agent, *American Journal of Pathology*, 168: 1762.
24. Eldahshan. OA, Azab. SS, **2012**, Anti-inflammatory Effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin-Induced Rat Oedema Model, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02: 74-79.

Conclusion

Générale

A l'issue de la présente recherche qui représente une contribution à l'étude phytochimique de trois plantes endémiques de la flore algérienne : *Astragalus gombo* (Fabaceae), *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* (Fabaceae) et *Cistanche violacea* (Orobanchaceae).

L'objectif était, d'une part atteindre des structures nouvelles pour ces représentants de la flore algérienne et d'autre part évaluer l'importance de cette dernière.

La mise en place de techniques chromatographiques classiques de fractionnement des extraits des parties aériennes d'*Astragalus gombo* a conduit à l'isolement de quatre composés. En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC), et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu identifier les structures de trois composés comme suit :

- Kaempférol 3-*O*-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-*D*-galactopyranoside
- 7-méthylkaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*- β -galactopyranoside
- kaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-4'-*O*- β -galactopyranosyl ou kaempférol 3-*O*- β -galactopyranosyl-4'-*O*- α -rhamnopyranosyl

De la même manière, le traitement de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* a conduit à l'isolement de trois composés, nous avons pu identifier les structures de deux composés comme suit :

- Isorhamnétine 3-*O*- β -galactopyranoside
- Quercétine 3-*O*-robinobioside

Le test de l'activité antioxydant (test au DPPH) sur les extraits AcOEt et *n*-butanol de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* montre que l'extrait *n*-BuOH présentait l'effet le plus puissant *vis-à-vis* du radical libre DPPH comparativement au BHT utilisé comme standard.

Alors que l'étude phytochimique des extraits Acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *C. violacea* a permis l'isolement de quinze composés, nous avons pu identifier la structure de sept composés comme suit :

- Cistanin I-8-méthyl-malonate (nouveau produit) que nous avons nommé **violacéine**
- 6- Deoxy Catalpol (nouveau pour l'espèce)
- Apigénine (nouveau pour le genre)

- Z-tubuloside D (nouveau produit)
- E-tubuloside D (nouveau pour l'espèce)
- Z-tubuloside E (nouveau pour l'espèce)
- E-tubuloside E (nouveau pour l'espèce)

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle en utilisant deux méthodes (la méthode de stabilisation de la membrane HRBC et la méthode de dénaturation de l'albumine) montrent que cet extrait peut être utilisé comme source pour la découverte de nouveaux agents anti-inflammatoires. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication internationale.

الملخص

هذا العمل مخصص للدراسة الكيميائية لثلاث أجناس أصلية الأول و الثاني من العائلة القرنية وهما *Astragalus gombo* و *Genista cinerea ssp. ramosissima* في حين الثالث من العائلة الهالوكية و هو *Cistanche violacea*

دراسة الأجزاء الهوائية لنبات *A. gombo* أدى إلى فصل أربعة فلافونويدات و تحديد ثلاث فلافونويدات. في حين قادتنا دراسة الأجزاء الهوائية لنبات *G. cinerea ssp. ramosissima* إلى فصل ثلاث فلافونويدات و تحديد بنية فلافونودين.

كما سمحت دراسة الأجزاء الهوائية لنبات *C. violacea* بفصل خمسة عشرة مركبا تم تحديد بنية سبعة مركبات منها مركبين يفصلان لأول مرة وستة مركبات جديدة في النوع و الجنس تم التعرف على بنية هذه المركبات باستخدام مطيافية الرنين المغناطيسية RMN 1D & 2D و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).

تم تقدير كمية البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي لمستخلصات طور خلات الايثيل و الطور البيوتانولي لنباتة *Genista cinerea ssp. ramosissima* باستخدام الطرق اللونية. وأظهرت هذه الخطوة محتوى أعلى من مادة البوليفينول وفلافونيدات في المستخلص البيوتانولي. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لهاته المستخلصات من خلال طريقة تثبيط الجذور الحرة DPPH. أظهرت النتائج أن المستخلص البيوتانولي له التأثير الأقوى على الجذور الحرة DPPH مقارنة BHT المستخدم كمعيار.

تم تثمين طور خلات الايثيل لنوع *C. violacea* بسبب نشاطه المضاد للالتهاب باستخدام طريقتين (طريقة تثبيت غشاء HRBC و طريقة إزالة اليوميون). أظهرت النتائج أن هذا المستخلص يمكن استخدامه كمصدر لاكتشاف عوامل جديدة مضادة للالتهاب.

كلمات مفتاحية : *Astragalus gombo*, *Genista cinerea ssp. ramosissima*, Fabaceae, *Cistanche violacea*, Orobanchaceae, flavonoïdes glycosides, Iridoïdes, Phenylethanoïde Glycosides, Activité antioxydant, Activité anti-inflammatoire.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical and biological study of three species endemic to Algeria. It concerning *Astragalus gombo* and *Genista cinerea* ssp. *ramosissima*, both belong to the Fabaceae family and the third species is *Cistanche violacea* from the Orobanchaceae family.

The phytochemical investigation of *n*-butanol extracts from the aerial parts of *A. gombo* and *Genista cinerea* ssp. *ramosissima* allowed the isolation of 8 products and the structural identification of 5 of them. All the identified products present a kaempferol or quercetin skeleton which is glucosided in 3. While, the phytochemical investigation of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *C. violacea* allowed the isolation of 15 products and identification of 7 from the EtOAc among which two are new (one iridoid and one phenylethanoid glycoside) and five others reported for the first time in the *Cistanche* genus. The structural elucidation of the isolated compounds was carried out by combining the various spectroscopic methods (UV, 1D & 2D NMR) as well as by comparing the results with the literature data.

Quantification of the total polyphenols and total flavonoids of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *G. cinerea* ssp. *ramosissima* was performed by colorimetric methods. This step showed a content of polyphenols and flavonoids more important in the *n*-BuOH extract. The antioxidant activity of the EtOAc and *n*-BuOH extracts was evaluated by the free radical scavenging method (DPPH). The *n*-BuOH extract exhibited the strongest effect with respect to the DPPH free radical comparing to BHT used as standard.

The EtOAc extract of *C. violacea* was estimated for its anti-inflammatory activity by using two methods (HRBC membrane stabilization method and Albumin denaturation inhibition). The results showed that this extract can be used as source of new anti-inflammatory agents.

Keywords: *Astragalus gombo*, *Genista cinerea* ssp. *ramosissima*, Fabaceae, *Cistanche violacea*, Orobanchaceae, flavonoid glycosides, Iridoids, Phenylethanoide Glycosides, antioxidant Activity, anti-inflammatory Activity.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de trois espèces endémiques à l'Algérie, Il s'agit de *Astragalus gombo* et *Genista cinerea* ssp. *ramosissima*, toutes deux appartiennent à la famille Fabaceae et la troisième espèce *Cistanche violaceae* de la famille Orobanchaceae.

L'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *A. gombo* et de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *G. cinerea* ssp. *ramosissima* a permis l'isolement 7 produits et l'élucidation des structures de 5 d'entre eux. Tous les produits présentent un squelette de type kaempférol ou quercétine glycosylé en 3. Alors que l'investigation phytochimique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *C. violacea* a permis l'isolement de quinze produits et l'identification de 7 produits issus de l'extrait acétate d'éthyle dont deux nouveaux (un iridoïde et un phenylethanoïde) et cinq autres rapportés pour la première fois dans le genre. L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques (UV, RMN 1D & 2D) ainsi que par la comparaison des résultats avec les données de la littérature.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *G. cinerea* ssp. *ramosissima* a été réalisée par les méthodes colorimétriques. Cette étape a montré un contenu en polyphénols et en flavonoïdes plus important dans l'extrait *n*-butanol. L'activité antioxydant de ces mêmes extraits a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Les résultats montrent que l'extrait *n*-BuOH présentait l'effet le plus puissant *vis-à-vis* du radical libre DPPH comparativement au BHT utilisé comme standard.

L'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *C. violacea* a été évalué pour son activité anti-inflammatoire en utilisant deux méthodes (la méthode de stabilisation de la membrane HRBC et la méthode de dénaturation de l'albumine). Les résultats ont montré que cet extrait peut être utilisé comme source pour la découverte de nouveaux agents anti-inflammatoires.

Mots clés : *Astragalus gombo*, *Genista cinerea* ssp. *ramosissima*, Fabaceae, *Cistanche violacea*, Orobanchaceae, flavonoïdes glycosides, Iridoïdes, Phenylethanoïde Glycosides, Activité antioxydant, Activité anti-inflammatoire.