

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine

N° d'ordre :.....

Série :.....

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie
Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES
En Chimie Organique
Option : Phytochimie

PAR

M^{me} BOUKAABACHE RABIA

THEME

**Recherche et détermination des métabolites secondaires de
plantes issues de la famille des fabacées**

Sous la direction du Professeur :
BOUMAZA OUAHIBA

Devant le jury :

M^r Benayache Samir	Pr.	U.Frères Mentouri Constantine	Président
M^{me} Boumaza Ouahiba	Pr.	U.Frères Mentouri Constantine	Rapporteur
M^{me} Benayache Fadila	Pr.	U.Frères Mentouri Constantine	Examinatrice
M^r Boujerda Azzedine	M.C.A	U.Mohamed Seddik Ben Yahia Jijel	Examinateur
M^r Zaidi Farouk	M.C.A	U.Ferhat Abbas Sétif	Examinateur
M^{me} Benaissa Ouahiba	M.C. A.	U. El Hadj Lakhdar Batna	Examinatrice

2015

Remerciements

*Le travail de thèse rapporté dans ce mémoire a été effectué au sein de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL). C'est pourquoi mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de thèse le professeur **BOUMAZA OUAHIBA**. Qu'elle trouve ici l'expression de ma grande gratitude pour avoir su me faire profiter de son expérience scientifique avec beaucoup de compétence et d'efficacité.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à monsieur le professeur **Samir Benayache** pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le jury de cette thèse.*

*Mes plus vifs remerciements vont à **Mme. Fadila Benayache** professeur à l'université Constantine1, sa disponibilité, ses conseils et surtout pour l'enregistrement des spectres RMN mono et bidimensionnelle et les spectres de masse, et pour sa participation au jury.*

*Je tiens à remercier monsieur **Zaidi Farouk** MAITRE ASSISTANT (A) à l'université de Stife d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également à monsieur **Boujerda Azzedine** MAITRE ASSISTANT (A) à l'université de Jijel, en acceptant de juger ce travail.*

*Je remercie également mademoiselle **Ouahiba Benais** MAITRE ASSISTANT (A) à l'université de El Hadj Lakhdar Batna pour sa participation au jury.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à monsieur **Ramdane Seghiri** et **Ratiba Mekkiou** professeur à l'Université Constantine1, leur aide, et leurs conseils précieux et pour tout ce qu'il m'antappris.*

*Nombreuses sont les personnes qui m'ont aidé à l'élaboration de ce travail. Je cite en particulier : **Linda, Nassima, Amel, Samia, Leila** .*

Mes remerciements s'adressent également à tous les chercheurs de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL).

*Et je voudrai remercier les ingénieurs : **Nawal** et **Hichem** pour leur aide, et leur disponibilité; A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



Dédicaces

♥ *A mes chers **parents** qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.*

♥ *A mon **mari** et mes **filles** ☺Aridj☺ Rïtadj☺*

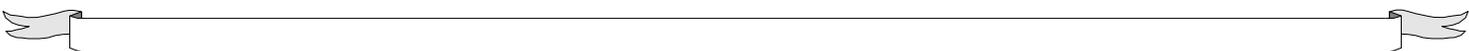
♥ *A mes **frères**, à mes **sœurs** ; je cite en particulier **NAÏMA***

♥ *A ma **famille** que dieu la protège.*

♥ *A mes chères **amies** pour leur soutien moral.*

Je dédie ce modeste travail.

RABIA



ABREVIATIONS

C4H : cinnamate-4-hydroxylase

4CL :4-coumaroyl CoA ligase

CHS :chalcone synthase

CHI :chalcone isomérase

FSI : Flavone synthase I

FSII : Flavone synthase II

FHT : Flavanone-3-hydroxylase

FLS : Flavonol synthase

2HIS : 2- hydroxyisoflavanone déhydratase

2HIS :2-hydroxyisoflavanone synthase

IFS : Isoflavone synthase

2HID: 2HydroxyIsoflavanoneDéhydratase

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

2HIDM : 2HydroxyIsoflavanoneDéhydrataseMéthyle

IOMT :Isoflavone *O*-méthyltransfèrease

DMA : Diméthylallyle

SAM : S-adenosyl-méthionine

UDP-Glu :Uridine diphosphate glucose

¹³C : Spectre de carbone 13

¹H : Spectre du proton

AcOEt : Acétate d'éthyle

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

COSY : Correlation Spectroscopy

d : Doublet

dd : Doublet de doublets

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

DPPH: 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyle

EIMS: Electrospray ionization mass spectrometry

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

ESI : Electrospray ionization

APCI : Atmospheric pressure chemical ionization

IE : Ionisation par impact électronique

IC 50: Half maximal inhibitory concentration

IEHR : Ionisation par impact électronique à haute résolution

J(Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz

m : Multiplet

MeOD: Méthanol deutéré

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NOE: Nuclear Overhauser Enhancement

ppm: partie par million

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROESY: Rotating Overhauser Effect Spectroscopy

s: Singulet

t: Triplet

UV: Ultraviolet

δ (ppm) : Déplacement chimique exprimé en ppm

λ max : Longueur d'onde maximale d'absorbance

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure I.1: La feuille composée des Fabacées. Evolutions et variations autour de la feuille imparipennée typique de la famille.	6
Figure I.2: La fleur des Fabacées	6
Figure I.3: Le fruit des Fabacées	7
Figure I.4: Photo de <i>Cytisus scopariu</i>	13
Figure I.5: Photo de <i>Lupinus</i>	13
Figure I.6: Structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés de certaines espèces de la famille des fabacées.	14
Figure I.7: Flavones et Flavonols répertoriés dans la Famille Fabacée.	16
Figure I.8: Flavanones et Flavanonols répertoriés dans la Famille Fabacée.	17
Figure I.9: Isoflavones répertoriés dans la Famille Fabacée.	18
Figure I.10: Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Genista</i>	22
Figure I.10: Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Genista</i> (suite).	23

CHAPITRE II

Figure II.1: Structures de base des flavonoïdes.	32
Figure II.2: biosynthèse des dérivés cinnamiques.	33
Figure II.3: Formation de chalcone à partir des acides cinnamiques.	34
Figure II.4: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes.	35
Figure II.5: Structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes	36
Figure II.6: Biosynthèse des isoflavonoïdes	37
Figure II.7: Quelques types de prénylations rencontrées dans la Famille Fabacées modifié d'après Barron et Ibrahim (1996)	40
Figure II.8: Transformation de l'isoflavane en pterocarpane	41
Figure II.9 : Exemples d'isoflavones méthoxylées.....	42
Figure II.10 : Éléments essentiels pour l'activité-antioxydant des flavonoïdes.	43
Figure II.11: Schéma de fragmentation d'une flavanone prénylée en position 6 (RDA :Rétro Diels-Alder).	51
Figure II.12 : Fragmentation par rétro Diels-Alder des flavones	51
Figure II.13: Principes des techniques de RMN à deux dimensions	53

CHAPITRE III

Figure III.1 : Photo les tiges de <i>G. aspalathoides</i> Lamk. ssp. <i>erinaceoides</i> (Lois)	60
Figure III.2 : Photo les fleurs de <i>G. aspalathoides</i> Lamk	61
Figure III.3 : Photo petit arbrisseau de <i>G. aspalathoides</i> Lamk.....	61
Figure III.4 : Photo de <i>Genista quadriflora</i> Munby	61
Figure III.5 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce <i>G. aspalathoides</i> Lamk	66
Figure III.6 : Étapes de la séparation de l'espèce <i>G. aspalathoides</i> Lamk.....	74
Figure III.7 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce <i>G. quadriflora</i> Munby	76
Figure III.8 : Étapes de la séparation de l'espèce <i>G. quadriflora</i> Munby.	82

CHAPITRE IV

Figure IV.1: Composé G1	89
Figure IV.2 : Isokaempferide	99
Figure IV.3: Composé G3	108
Figure IV.4 : Composé G4	118
Figure IV.5 : Sakuranetine	128
Figure IV.6 : IsoprUNETINE	137
Figure IV.7 : Génisteine -7-O- β – glucoside	146
Figure IV.8 : 4'-O-Methylderrone	157
Figure IV.9: Eriodictyol 7, 3'-dimethyl ether	165
Figure IV.10 : Thevetiaflavone	174
Figure IV.11 : Méthyl 4-(oxiran-2-yl) phenyl carbonate	178
Figure IV.12 : Génisteine	185
Figure IV.13 : Génisteine 5- méthyl éther (IsoprUNETINE)	187
Figure IV.14 : Biochanine A.	191
Figure IV.15 : Genkwanine	195

CHAPITRE V

Figure V.1: % DPPH effet de balayage des échantillons testés.	200
Figure V.2: % DPPH effet de balayage des échantillons testés.	201

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.1: Les différentes tribus qui composent cette famille	4
Tableau I.2 : Composés répertoriés dans la Famille des Fabacées et le genre Derris.	19
Tableau I.2: Composés répertoriés dans la Famille Fabacées et le genre Derris (suite)	20
Tableau I.3: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Genista</i>	24

CHAPITRE II

Tableau II.1 : Liste des enzymes.	39
Tableau II.2 : La relation entre le R_f et la structure flavonique.....	47
Tableau II.3 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.	48
Tableau II.4: Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes....	49

CHAPITRE III

Tableau III.1: Classification botanique des deux espèces étudiées.....	59
Tableau III.2: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de <i>G. aspalathoides</i> Lamk	68
Tableau III.3: Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle de <i>G. aspalathoides</i> lamk.	69
Tableau III.4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de <i>G. aspalathoides</i> Lamk.	71
Tableau III.5 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Chloroforme de <i>G. aspalathoides</i> Lamk.	72
Tableau III.6: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de <i>G. quadriflora</i> Munby.....	77
Tableau III.7 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle de <i>G. quadriflora</i> Munby	78
Tableau III.8: Résultats de la chromatographie sur couche mince de la fraction A4	79
Tableau III.9 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de la fraction A7	79
Tableau III.10 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de la fraction A11	79
Tableau III.11: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Chloroforme de <i>G. quadriflora</i> Munby	80
Tableau III.12: Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Chloroforme de <i>G. quadriflora</i> Munby	81
Tableau III.13 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de la fraction L3	82

CHAPITRE IV

Tableau IV.1.1 : Résultats globaux de la recherche de groupe de substances naturelles identifiées dans la plante <i>Genista quadriflora</i> Munby.....	84
Tableau IV.1.2 : Résultats globaux de la recherche de groupe de substances naturelles identifiées dans la plante <i>Genista aspalathoides</i> Lamk.	84
Tableau IV.1: Données de la série spectrale UV du composé G1	89
Tableau IV.2 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G1	90
Tableau IV.3 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C du composé G1	90
Tableau IV.4 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G1	91
Tableau IV.5 : Données de la spectroscopie COSY et NOESY du composé G1	91

Tableau IV.6: Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G2.....	100
Tableau IV.7: Données de la spectroscopie ^{13}C et DEPT 135et DPET 90 du composé G2.....	100
Tableau IV. 8: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G2	101
Tableau IV.9 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G3.....	109
Tableau IV.10 : Données de la spectroscopie ^{13}C et DEPT 135 du composé G3	109
Tableau IV.11 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G3.....	109
Tableau IV.12 : Données de la série spectrale UV du composé G4.....	115
Tableau IV.13 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G4	119
Tableau IV.14: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G4	119
Tableau IV.15 : Données de la spectroscopie ^{13}C et DEPT 135 du composé G4	120
Tableau IV.16 : Données de la spectroscopie Cosy et NOESY du composé G4	120
Tableau IV.17 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G 6	129
Tableau IV.18 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G6	129
Tableau IV.19 : Données de la spectroscopie ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 du composé G6 ...	130
Tableau IV.20: Données de la série spectrale UV du composé G7.....	138
Tableau IV.21 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G7	138
Tableau IV.22: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du compos G7	138
Tableau IV.23 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C du composé G7	139
Tableau IV.24: Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G8	147
Tableau IV.25 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G8	147
Tableau IV.26 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C et DEPT 90 du composé G8.....	148
Tableau IV.27 : Données de la série spectrale UV du composé K1	157
Tableau IV. 28 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du Composé K1	158
Tableau IV. 29 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du Composé K1	158
Tableau IV. 30 : Données de la spectroscopie ^{13}C du Composé K1	159
Tableau IV. 31 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé K6	166
Tableau IV. 32 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé K6	166
Tableau IV.33 : Données de la spectroscopie ^{13}C , DEPT 135et DEPT 90 du composé K6..	167
Tableau IV. 34: Données de la spectroscopie COSY et NOESY du composé K6.....	167
Tableau IV. 35 : Données de la série spectrale UV du composé A4-1.....	174
Tableau IV.36 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ , ppm, J/Hz) du composé A4-1	175
Tableau IV.37 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2	180
Tableau IV.38 : Données de la spectroscopie HSQC et COSY (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2.....	180
Tableau IV.39 : Données de la spectroscopie DEPT135 et DEPT 90 (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2.....	180
Tableau IV.40 : Données de la série spectrale UV du composé A7-1.....	185
Tableau IV.41 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ ,ppm, J/Hz)du composé A7-1	185
Tableau IV.42 : Données de la série spectrale UV du composé A11-1.....	188
Tableau IV.43 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ ppm, J/Hz) du composé A11-1	188
Tableau IV.44 : Données de la série spectrale UV du composé A11-2.....	190
Tableau IV.45 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD, δ , ppm, J/Hz) du composé A11-2	191

Tableau IV.46 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (63 MHz, CD ₃ OD, δ ,ppm, J/Hz) du composé A11-2	192
Tableau IV.47 : Données de la série spectrale UV du composé L5-1	194
Tableau IV.48 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD ₃ OD) du composé L5-1	195

CHAPITRE V

Tableau V.1: L'activité antioxydante des extraits <i>G. quadriflora</i> Munby	200
Tableau V.2: L'activité antioxydante des extraits <i>G. aspalathoides</i> Lamk ssp. <i>erinaceoides</i> (Lois.)	201

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Références bibliographiques	3
CHAPITRE I. LA FAMILLE DES FABACEES ET LE GENRE <i>GENISTA</i>	4
I.1. LES FABACEES	4
I.1.1. Distribution	5
I.1.2. Caractères principaux	5
I.1.3. Classification systématique et aspects botaniques	5
I.1.3.1. Appareil Végétatif.....	5
I.1.4. Importance économique des fabacées	7
I.1.5. Plantes médicinales et utilisation thérapeutique.....	8
I.1.6. Toxicité de certaines fabacées.....	10
I.1.7. Les Métabolites secondaires les plus courants chez les fabacées.....	11
I.1.7.1. Les Alcaloïdes	12
I.1.7.2. Les Coumarines	14
I.1.7.3. Les Flavonoïdes et les Isoflavonoïdes	15
I.2. LE GENRE GENISTA	21
I.2.1. Généralités	21
I.2.2. Distribution et aire géographique	21
I.2.3. Caractère chimique du genre Genista	21
I.2.4. Intérêt biologique du genre Genista	25
Références bibliographiques	26
CHAPITRE II. LES FLAVONOIDES ET LES ISOFLAVONOIDES	32
II.1 Généralités sur les flavonoïdes	32
II.2. Distribution et biosynthèse.....	32
II.2.1. Les Flavonoïdes	32
II.2.1.1. Distribution	32
II.2.1.2. Biosynthèse.....	33
II.2.1.3 Les Flavanones.....	35
II.2.2. Les Isoflavonoïdes	36
II.2.2.1. Distribution	36
II.2.2.2. Biosynthèse.....	37
II.2.3. Les Flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés.....	39
II.3. Substitution du squelette flavonique.....	41
II.3.1. La O-Substitution.....	41
II.3.1.1. L'hydroxylation.....	41
II.3.1.2. La Méthoxylation	41
II.3.1.3. L'O-Glycosylation	42
II.3.2. La C-Substitution	42
II.3.2.1. La C-Méthylation	42
II.3.2.2. La C-Glycosylation	43
II.4. Activité biologique des flavonoïdes	43
II.5. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes	43

II.6. L'étude chimique des flavonoïdes	45
II.6.1. Extraction	45
II.6.2. Séparation et purification	45
II.7. Analyse structurale des flavonoides	46
II.7.1. Solubilités des flavonoïdes	46
II.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique	47
II.7.3. La Fluorescence sous lumière de Wood.....	47
II.7.3.1. Absorption des rayonnements UV	48
II.7.3.2. Rôle et importance des réactifs sur le spectre UV	49
II.7.4. La Spectrométrie de masse	50
II.7.5. La Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	52
Références bibliographiques	54

CHAPITRE III. ETUDE CHIMIQUE DE DEUX ESPECES DE GENISTA 59

III.1. Etude bibliographique	59
III.2. Choix du matériel végétal	59
III.3. Place dans la systématique	59
III.4. Description botanique	59
III.5. Répartition géographique	60
III.6. Screening Chimique des deux plantes.....	62
III.6.1. Recherche des alcaloïdes	62
III.6.2. Recherche des coumarines	62
III.6.3. Recherche des triterpènes, stérols et terpènes	63
III.6.3.1. Identification des terpènes et stérols.....	63
III.6.3.2. Identification des triterpènes.....	63
III.6.4. Recherche des substances poly phénoliques (tanins)	63
III.6.4.1. Tanins catéchiques.....	64
III.6.4.2. Tanins galliques.....	64
III.6.5. Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes	64
III.6.6. Recherche des saponines	64
III.6.7. Recherche des anthocyanes	64
III.6.8. Recherche des quinones	65
III.7. Extraction de deux espèces <i>Genista</i>	65
III.7.1. Extraction de <i>Genista aspalathoides</i> Lamk	65
III.7.2. Séparation chromatographique	67
III.7.2.1. Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'éthyle.....	67
III.7.2.2. Séparation et purification des composants de l'extrait Chloroforme.....	71
III.7.3. Extraction de <i>Genista quadriflora</i> Munby.....	75
III.7.4. Séparation chromatographique	77
III.7.4.1. Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'éthyle	77
III.7.4.2. Séparation et purification des composants de l'extrait Chloroforme.....	80
Références bibliographiques	83

<u>CHAPITRE IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</u>	84
IV.1 Résultats et interprétation du Screening Chimique	84
IV.2 Identification des produits isolés de <i>G.aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides</i> (Lois.)	85
IV.2.1 Identification des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle.....	85
IV.2.1.1 Elucidation du Composé G1	85
IV.2.1.2 Elucidation du Composé G2.....	98
IV.2.1.3 Elucidation du Composé G3.....	106
IV.2.1.4 Elucidation du Composé G4.....	114
IV.2.1.5 Elucidation du Composé G6.....	126
IV.2.1.6 Elucidation du Composé G7.....	136
IV.2.1.7 Elucidation du Composé G8.....	143
IV.2.2 Identification des produits isolés de la phase Chloroforme	155
IV.2.2.1 Elucidation du Composé K1	155
IV.2.2.2 Elucidation du Composé K6.....	163
IV.3 Identification des produits isolés de <i>Genista .quadriflora Munby</i>	173
IV.3.1 Identification des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle.....	173
IV.3.1.1 Elucidation du composé A4-1	173
IV.3.1.2 Elucidation du composé A4-2	177
IV.3.1.3 Elucidation du composé A7-1	184
IV.3.1.4 Elucidation du Composé A11-1.....	187
IV.3.1.5 Elucidation du Composé A11-2.....	190
IV.3.2 Identification des produits isolés de la phase Chloroforme	194
IV.3 .2.1 Elucidation du Composé L5-1	194
Références bibliographiques	197
<u>CHAPITRE V. L'ACTIVITE BIOLOGIQUE.....</u>	198
V.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	198
V.1.1. INTRODUCTION.....	198
V.1.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?	198
V.1.3. Les polyphénols antioxydants.....	199
V.1.4. Principe du test au radical libre DPPH•.....	199
V.1.5. Matériels et méthodes.....	199
V.1.6. Résultats et discussions	200
CONCLUSION	201
Références bibliographiques	202
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	204

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une grande majorité de la population mondiale et plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents ^[1].

Dans le cadre de la recherche de molécules nouvelles à activités biologiques d'origine végétale, il est préférable de baser le choix des plantes à étudier sur leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent ces espèces végétales. Ainsi, la recherche de molécules aux propriétés antiradicalaires dans des plantes de montagne obéit à cette logique par exemple. En effet, celles-ci sont plus exposées aux rayons UV en altitude et ont donc dû développer des mécanismes de protection basés sur des métabolites secondaires spécifiques.

En Algérie il existe plus de 3000 espèces appartenant à différentes familles botaniques dont les fabacées qui constituent l'une des plus vastes du règne végétale. Ainsi, le genre *Genista* appartenant à cette famille fait l'objet d'une étude phytochimique et pharmacologique qui s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche lancé par notre équipe de recherche durant plusieurs années ^[2-5] C'est dans ce contexte que s'inscrit notre investigation phytochimique des extraits apolaires des espèces *Genista Qauadriflora* Mumby et *Genista Aspalathoides* Lamk ssp. *Erinaceoides* (Lois.)

La présentation de nos travaux peut être répartie comme suit :

- ✓ Une première partie bibliographique, comportant deux chapitres dont :
 - Le premier donne un aperçu botanique sur la famille des fabacées et sur les études phytochimiques antérieures menées sur les espèces du genre *Genista*. On y trouve également les principaux métabolites secondaires que renferme ce genre suivi de nombreuses données sur les activités biologiques et toxiques de ces plantes.
 - Le deuxième est consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes et isoflavonoïdes), les squelettes flavoniques, leur biogenèse, leur diversité structurale et leur intérêt thérapeutique, on reporte également toutes les

démarches et les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de substances naturelles.

✓ Une deuxième partie expérimentale consacrée à la présentation de nos travaux personnels et qui comporte :

- Un troisième chapitre qui étudie le Screening Chimique et les techniques d'isolement et de purification des flavonoïdes et isoflavonoïdes des deux espèces étudiées
- Le quatrième chapitre renferme l'établissement des structures des composés isolés et la discussion des résultats obtenus
- Le cinquième chapitre est consacré à l'étude des tests biologiques sur les extraits des espèces étudiées suivis d'une conclusion générale.

Références bibliographiques

- [1]-Hostettmann K, Potterat O, Wolfender J.L, The potentiel of Higher Plants as a Source of New Drugs, **1998**; 52, pp 10-17.
- [2]-Mekkiou R, Touahar H, Marie-Geneviève, Dijoux-Franca, Anne-Marie Mariotte, Benayache S, Benayache F, A new Isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005;33(6), p 635.
- [3]-Mekkiou R, Seghiri R, Boumaza O, Sarri D, Chebbah K, Benayache S, Bermejo J, Benayache F, Secondary Metabolites from *genista ferox*. *Chemistry of Natural compounds*, **2012**; 48(4), pp 710-711.
- [4]-Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Benayache S, Garcia V.P, Bermejo J, Benayache F, Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata* (Fabaceae). *Chemistry of Natural compounds*, **2006**;42(6), pp 730-731.
- [5]-Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Benayache S, Garcia V.P, Bermejo J, Benayache F, Secondary metabolites from chloroform extract of *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, **2011**; 47(2), pp 277-278.

Chapitre I

La famille des Fabacées et le genre Genista

CHAPITRE I. LA FAMILLE DES FABACEES ET LE GENRE *GENISTA*

I.1. LES FABACEES

La famille des Fabacées (de famba, la fève) constitue la troisième famille ; angiospermes (de par le nombre de ses représentants). Elle doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination sous laquelle elle est plus connue: les légumineuses. Les formes arborescentes de cette famille prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées ^[1]. 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 considéré comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote *via* la symbiose légumineuses-*rhizobium* permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme ^[2]. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres et leurs bois comme combustible, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie ^[2]. 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 ^[2].

Tableau I.1 Les différentes tribus qui composent cette famille sont :

Abreae/ Brongniartieae	Adesmieae/	Acacieae/	Aeschynomeneae/	Amorpheae/	Bossiaeeae/
Caesalpinieae/	Carmichaelieae/	Cassieae/	Cicereae/	Crotalarieae	
Dalbergieae/	Desmodieae/	Detarieae/	Dipterygeae/	Euchresteae	
Galegeae/	Genisteae/	Hedysareae/	Ingeae/	Indigofereae/	Liparieae/ Loteae/
Mimoseae /	Mirbelieae/	Mimozyganthe /	Millettieae		
Parkieae/	Phaseoleae/	Podalyrieae/	Psoraleeae/	Robinieae/	Sophoreae/ Swartzieae
Thermopsidaeae /	Trifolieae/	Vicieae.			

I.1.1. Distribution

La famille est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions subtropicales et tempérées chaudes, comme en Afrique du sud ou sur le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées regorgent d'espèces herbacées.

I.1.2. Caractères principaux

Les plantes de la famille des Fabacées possèdent plusieurs caractères botaniques en commun.

I.1.3. Classification systématique et aspects botaniques

Le monophylétisme des Fabacées est attesté par de nombreux caractères morphologiques et par les données de la séquence. Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabacées : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (= Papilionoideae). Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Dans la plupart des classifications, ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme des synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) ^[3-4].

I.1.3.1. Appareil Végétatif

Les Fabacées sont des arbres, des arbustes ou des lianes ligneuses, caduques ou persistantes, ou encore des herbes annuelles, vivaces ou pluriannuelles. Quelques espèces tropicales sont épiphytes et d'autres, grimpantes, elles développent des tiges vrillées, tournant généralement dans le sens des aiguilles d'une montre, plus rarement dans le sens inverse (*Phaseolus*, *Wisteria*), ou des vrilles axillaires, ou encore des crochets. Quelquefois, les feuilles sont réduites, les fonctions photosynthétiques étant transférées aux tiges, ou modifiées en phyllodes ^[5].

***Les feuilles sont généralement bien développées, généralement alternes mais parfois opposées à verticillées comme chez les Mirbelieae, spiralées ou distiques. Pulvinées ou non, elles sont très majoritairement stipulées, les stipules étant intrapétiolaires, caduques ou persistantes, souvent libres, parfois conrescentes ou transformées en écailles, en épines ou développant des glandes^[6].

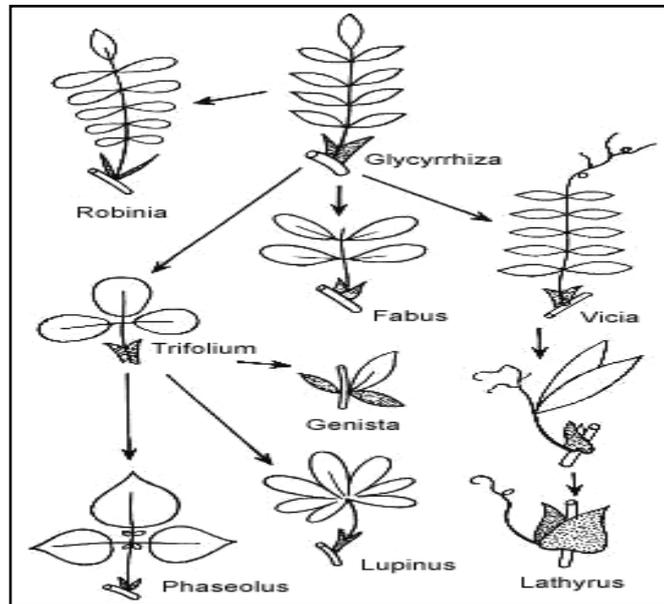


Figure I.1: La feuille composée des Fabacées. Evolutions et variations autour de la feuille imparipennée typique de la famille.

***Les fleurs sont solitaires ou rassemblées en panicules, en fascicules, en racèmes, en épis ou en têtes axillaires et terminales ou opposées aux feuilles comme chez certains membres des Bossiaecae.

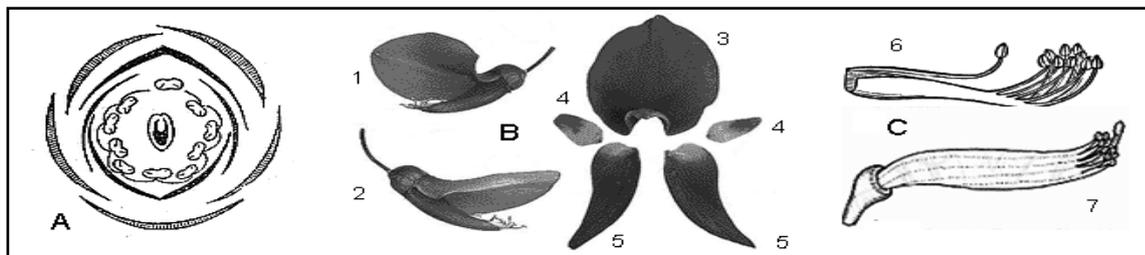


Figure I.2: La fleur des Fabacées

A - Diagramme floral chez *Phaseolus vulgaris*; **B**- La corolle chez *Erythrina crista-galii* : 1 et 2 vues des fleurs, 3 étendards, 4 ailes et 5 carènes; **C** - Androcée diadelphie 6 et monadelphie7.

*** Le fruit est un légume charnu ou non, déhiscent ou plus rarement indéhiscent, parfois lomentacées. La déhiscence est double : ventrale, le long de la ligne de suture du carpelle, et dorsale, au niveau de la nervure principale de la feuille carpellaire. La gousse peut, chez certaines espèces, se transformer secondairement.

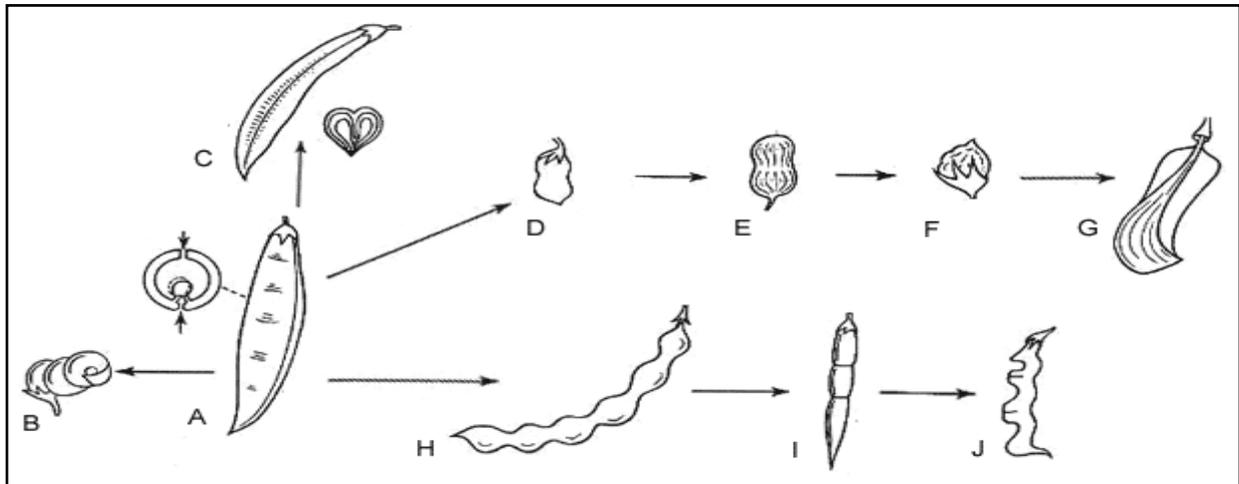


Figure I.3: Le fruit des Fabacées

A - La gousse typique des Fabaceae chez *Phaseolus*

B - Gousse spiralée chez *Medicago sativa*

C - Gousse à intraflexion chez *Astragalus*

D - Gousse bisperme chez *Lens culinaris*

E - Gousse pauciséminée devenue indéhiscente chez *Arachis hypogea*

F - Gousse uniséminée et indéhiscente de type akenoïde chez *Lathyrus*

G - Gousse monosperme, indéhiscente et ailée de type samaroïde chez *Toluidifera*

H - Gousse lomentacée chez *Sophora japonica*

I - Gousse articulée chez *Coronilla*

J - Gousse articulée chez *Hippocrepis*

I.1.4. Importance économique des fabacées

La vaste famille des fabacées regroupe de nombreuses plantes utiles recevant des applications industrielles, alimentaires ou encore ornementales ^[7]. L'intérêt agronomique des fabacées provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol

(*Rhizobiacées*), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosarum* », pour former des organes symbiotiques racinaires «nodules » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, les fabacées peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont le Pois (*Pisum*), la Féverole (*Faba*), le Haricot dites plantes améliorantes ^[8-9].

L'intérêt alimentaire découle du fait que les fabacées constituent une source très importante de protéines et lipides et rentrent dans l'alimentation humaine et animale ^[10-11].

- Protéagineux tels que (*Phaseolus*), le Pois chiche (*Cicer*) et les Lentilles (*Ervum*).
- Oléo protéagineux comme le Soja (*Soja*) et l'Arachide (*Arachis*).
- Fourrages tels que les Luzernes (*Medicago*), le Sainfoin (*Onobrychis*) et le Trèfle (*Trifolium*).

L'intérêt industriel résulte du fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le Soja qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides ^[10]. On peut citer comme exemple les *Derris*, dont l'espèce *Derris elliptica* Benth. est utilisée contre les parasites des animaux domestiques, des habitations et des végétaux ^[12].

D'autres espèces produisent des substances colorantes, et d'autres sont utilisées en parfumerie comme *Pterocarpus santalinus* ^[13]. Certaines espèces sont ornementales tels que le Robinier, faux Acacia, Cytise, Glycine, ... etc. ^[14].

L'intérêt pharmaceutique des fabacées est à son tour très important vu le nombre élevé d'espèces figurant dans les pharmacopées et donnant de nombreux produits utilisables en thérapeutique ^{[12], [15]}.

I.1.5. Plantes médicinales et utilisation thérapeutique

Beaucoup d'espèces de fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance ayant des propriétés médicinales ^[16-17] :

Alexa wachenheimi Benoist (Fabacée): l'écorce de cet arbre est utilisée en lavage externe contre la fièvre, elle est également employée par les amérindiens (du Nord-Ouest) contre le paludisme et les morsures de *Bothrops* (serpent venimeux) ^[18].

Andira coriacea Pulle (Fabacée): plante utilisée en Guyane pour guérir les lésions buccales ^[19].

Diploptropis purpurea Rich. (Fabacée): cet arbre, est fréquemment utilisé dans la construction des canoës, et possède par ailleurs des propriétés anti-fongiques ^[20-21].

Eperua sp. (Fabacée): les copeaux de ce genre de bois, utilisés comme litière, auraient un effet bénéfique contre le paludisme chez les singes et les écureuils en captivité (*Saimiri sciureus*) ^[22]. L'espèce *E. falcata* Aubl. est utilisée par les Alukus et les Créoles comme analgésique dentaire (décoction de l'écorce), tandis que la résine est employée par les Saramaka pour ses vertus cicatrisantes (l'effet antiseptique a été démontré *in vitro*) ^[23].

Hymenea courbaril L.(Fabacée): En médecine traditionnelle créole, la décoction de l'écorce de tronc de cet arbre très commun possède une fonction dépurative et antipyrétique, additionnée de sucre elle peut remplacer le thé. On utilise également la résine pour traiter les plaies récentes. Chez les Wayãpi, les sécrétions résineuses fraîches ainsi que l'arille des fruits offre un remède contre la dysenterie. Les Palikur, quant à eux, se servent de la résine fraîche délayée dans de l'eau pour combattre le « vents » (douleurs abdominales) et les « maux de cœur ». L'écorce est préparée en décoction (avec du miel) contre les maux d'estomac ^[18]. Le thé de courbaril est également utilisé contre la grippe, les courbatures et le paludisme ^{[20],[24]}.

Hymenolobium flavum Kleinh (Fabacée): l'écorce de ce grand arbre est préparée en décoction à titre d'antiseptique local, Une diminution de la parasitémie chez les singes atteints de paludisme est également observée lors d'un usage de ce bois en litière ^{[20], [22]}.

Inga alba Willd. (Fabacée): cette espèce, comme de nombreuses autres espèces du même genre, produit une sève riche en tanin utilisée comme colorant, ainsi que des fruits comestibles. Les Wayãpi utilisent l'écorce râpée et pressée en usage externe contre les dermatoses buccales et les piqûres de fourmi chez l'enfant. De manière générale, on observe un usage fréquent de l'écorce contre les infections cutanées et pour ses vertus cicatrisantes ^[18].

Parkia nitida Milk. (Fabacée): Les Tiriyo (de la famille liKarib) du Surinam utilisent le bois de cet arbre en décoction (une fois râpé), mais aussi en lavage externe pour soigner les fièvres ^[20] .

Pterocarpus rohrii Vahl. (Fabacée): *P. rohrii* est une espèce utilisée en Guyane contre le paludisme ^[25] .

Pseudoxandra cuspidata Maas. (Fabaceae): Les indiens Wayãpi et Palikur utilisent le décocté d'écorce contre le paludisme ^[25] .

***Peltogyne* spp.** (Fabaceae) :Ce genre se compose d'espèces employées comme bois de construction (*P. venosa* (Vahl.)Benth.). Placés en litière, les copeaux auraient un effet positif contre le paludisme observé chez des spécimens de singes écureuils en captivité ^[20].

Wisteria floribunda Willd. (Fabacée): cette plante ornementale d'origine asiatique (la glycine) n'a pas fait l'objet d'une sélection par enquête ethno pharmacologique, mais a été sélectionnée suivant l'hypothèse phytochimique de la présence d'isoflavones antipaludiques ^[26] .

Zygia racemosa Ducke (Fabacée): les espèces appartenant à ce genre sont utilisées par un grand nombre de populations indiennes d'Amérique du Sud (ex. : *Z. latifolia* Fawc et Rendle). La décoction de l'écorce, en lavage externe, permet de lutter contre les douleurs corporelles et les fièvres.

I.1.6. Toxicité de certaines fabacées

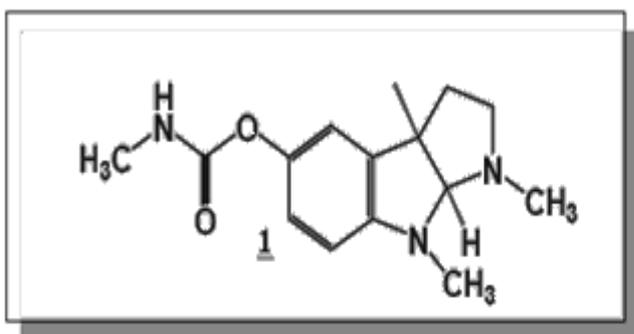
Un nombre non négligeable de fabacées est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses ^[27]. Après avoir cité quelques espèces d'intérêt thérapeutique, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques.

- *Physostigma venenosum* : (fève de Calabar), elle pousse spontanément en Afrique occidentale et elle est utilisée par les habitants locaux comme poison d'épreuve.

Le principal principe actif de cette espèce est la physostigmine **1** ou ésérine isolée dès 1864. C'est un inhibiteur réversible des cholinestérases. Elle empêche la destruction de

l'acétylcholine et se comporte comme un parasymphomimétique provoquant bradycardie, hypotension et autres effets comme vertiges, convulsions, paralysie respiratoire ^[28].

Cependant la physostigmine reste intéressante dans la myasthénie et dans les soins à donner aux malades empoisonnés par les organophosphates. Il a été reporté que la prise par voie orale ou intraveineuse de physostigmine redonnait la mémoire aux patients atteints de la maladie d'Alzheimer ^[29].



Physostigmine ou ésérine isolée
de *Physostigma venenosum*

- *Tephrosia vogelii* : elle est utilisée comme poison de pêche (Les feuilles, les gousses et les graines sont grossièrement pilées et jetées dans les cours d'eau préalablement barrés, les poissons meurent et remontent à la surface). Et pour la désinfection des animaux domestiques et les habitations car elle possède des propriétés insecticide ^[30].
- Certaines espèces du genre *Coronilles*, sont toxiques à certains moments de leur développement. Spontanément, le bétail évite de les consommer à ces périodes ^[31].
- Le mélilot, il est connu, pour ses propriétés thérapeutiques devient toxique à de très fortes doses, il provoque divers troubles et se montre émétique. Lorsque le mélilot moisit, la coumarine se transforme en dicoumarol, substance toxique utilisée pour tuer les rats et les souris par hémorragie interne ^[32].

I.1.7. Les Métabolites secondaires les plus courants chez les fabacées

La recherche bibliographique réalisée sur cet axe montre que la majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des fabacées certifie la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites

secondaires tels que : Les **alcaloïdes** ^[33-34], les **coumarines** ^[35], les **composés phénoliques** de type **flavonique** et **isoflavonique**, ^[36-37] et en petites quantités les **stéroïdes** ^[38] et les **saponosides** ^[39].

Pour notre part, nous allons parler des métabolites secondaires les plus distribués dans les différentes espèces de la famille et qui sont les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes, ainsi que de leurs rôles pharmacologiques.

I.1.7.1. Les Alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par Meisner ^[40]. Ce sont des substances organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), renfermant de l'azote, généralement incorporé dans un système hétérocyclique. La plupart ont des propriétés basiques. Il existe plusieurs types d'alcaloïdes, certains ont de structures très simples, d'autres de structures beaucoup plus complexes.

D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité ^[41-42]. Ils agissent en tant que :

- Dépresseurs au niveau du système nerveux central (morphine, scopolamine)
- Stimulants (caféine, strychnine)
- Anesthésiques locaux (cocaïne)
- Ganglioplégiques (spartéine, nicotine)
- Parasymphomimétique (physostigmine ou ésérine, pilocarpine).

Concernant la famille des fabacées, la production d'alcaloïdes est orientée vers trois types :

- Alcaloïdes pyrrolizidiniques issus de *Crotalaria* spp.
- Alcaloïdes indolizidiniques extraits des genres : *Astragalus*, *Oxytropis*, *Swainsona*.
- Alcaloïdes quinolozidiniques qui caractérisent un grand nombre de genres de cette famille tels que : *Anagyris*, *Cytisus*, *Genista*, *Laburnum*, *Lupinus*, *Spartium*, etc ^[27].

Ces alcaloïdes sont responsables, dans un certain nombre de cas de l'activité et / ou de la toxicité de ces espèces. Dans ce qui suit nous allons citer certaines espèces de la famille de fabacées contenant des alcaloïdes. Diverses espèces de *Crotalaria* sont toxiques par la

présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques comme la pyrrolizidine **2**, la supinidine **3** (**Fig I.6**), qui provoquent des intoxications marquées par la toxicité hépatique et pulmonaire ^[43]. Genêt à balais, *Cytisus scoparius* L. Link., (**Fig I.4**), cette espèce est une source de la (-) spartéine **4**, alcaloïde quinolizidinique ganglioplégique et analeptique cardiaque. Les autres alcaloïdes sont la lupanine **5** et ses dérivés ainsi que l'ammodendrine **6** et ses dérivés ^[35] (**Fig I.6**). Cytise: (*Cytisus laburnum* L = *Laburnumanagyroides* Med) toutes les parties de la plante renferment des alcaloïdes quinolizidiniques. Les graines sont caractérisées par la présence majoritaire de la cytisine **7** à côté de l'anagyryne **8** et l'ammodendrine **6** (**Fig I.6**) qui sont le plus souvent responsables des intoxications ^[7].

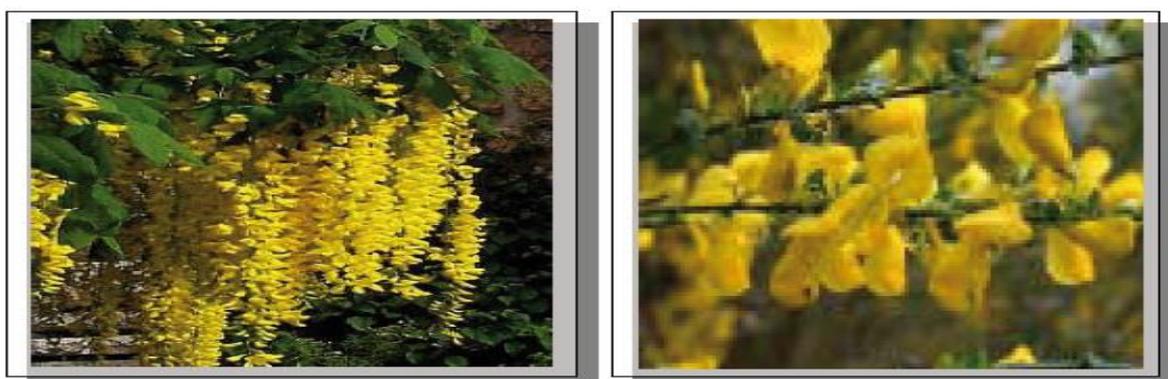


Figure I.4: Photo de *Cytisus scopariu*

Lupins, *Lupinus* spp. (**Fig I.5**): plusieurs espèces de ce genre renferment dans leurs organes, surtout dans les graines, des alcaloïdes quinolizidiniques tels que : la lupanine **9**, la lupanine **5**, l'anagyryne **8** ^[44]. De nombreuses espèces de Lupins doivent leur toxicité à l'anagyryne **8**, alcaloïde responsable d'une activité tératogène chez les bovins ^[45].



Fleurs de Lupinus

Lupinus angustifolius

Figure I.5: Photo de *Lupinus*

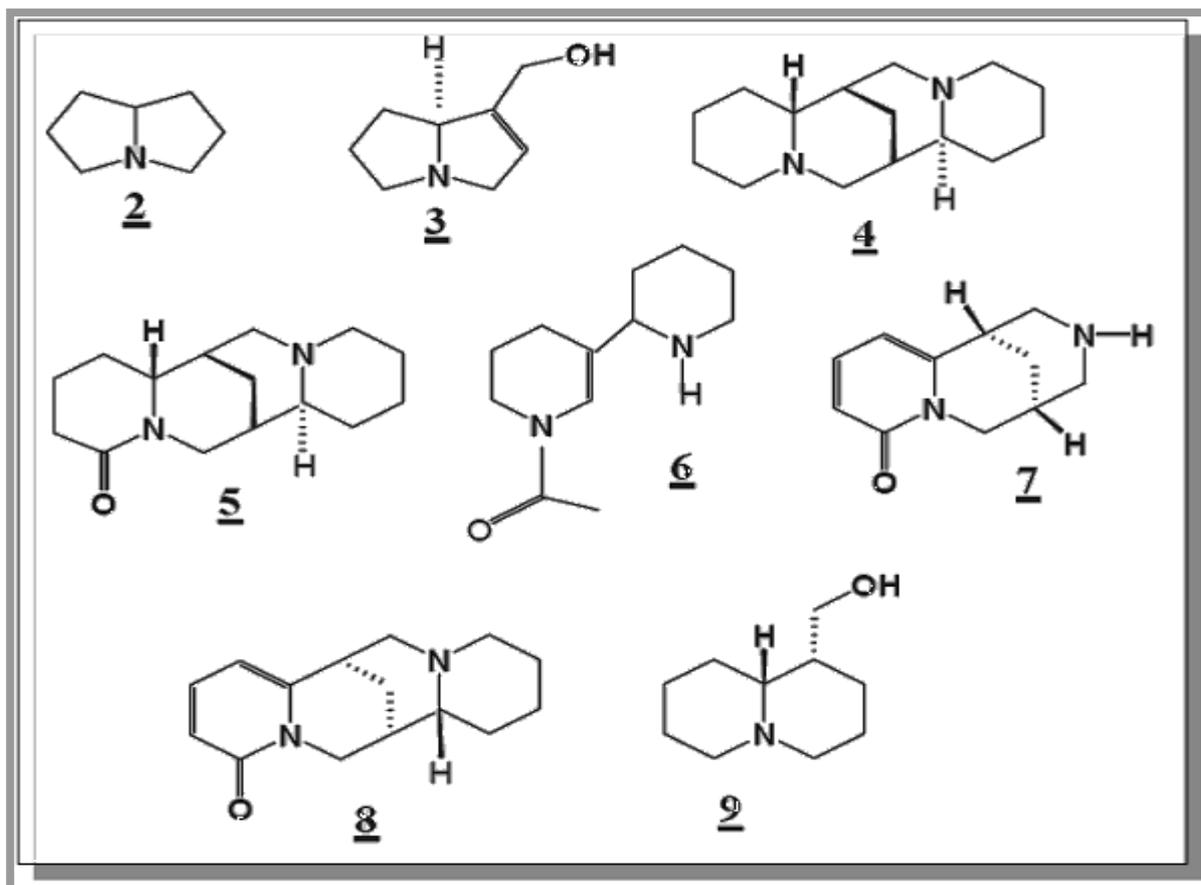
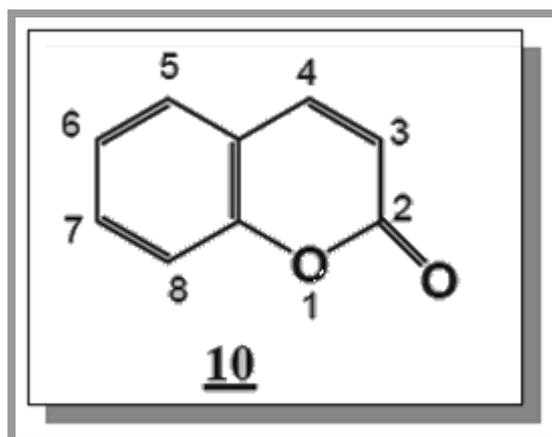


Figure I.6: Structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés de certaines espèces de la famille des fabacées.

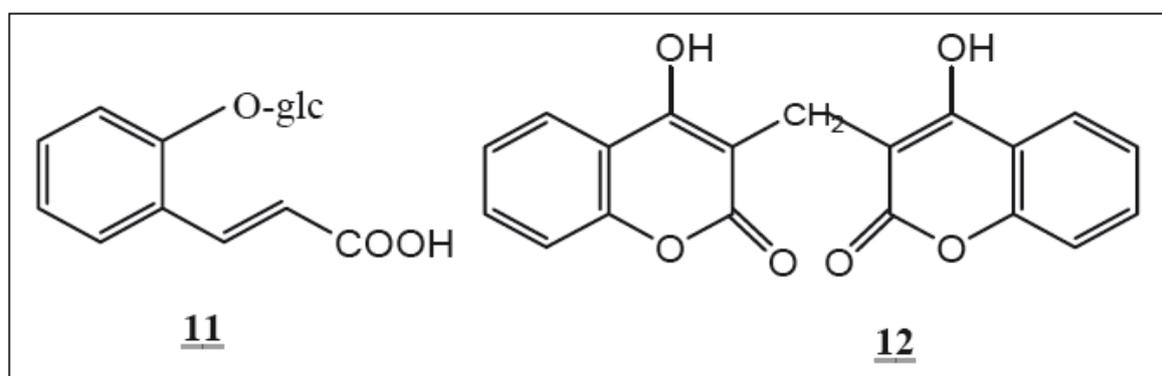
I.1.7.2. Les Coumarines

Le nom de coumarine vient de «coumarou», nom vernaculaire du fruit d'un arbre de la Guyane (*Dipteryx odorata* Willd, syn. *Coumarouna odorata* Aubl., Fabaceae). De ce fruit fût isolée en 1820 pour la première fois une substance cristalline odorante appelée coumarine^[46] **10**.



Les coumarines (2H-1-benzopyran-2-ones) sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal et considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7cinnamiques ^[40]. Elles existent sous forme libre ou encore liées à des sucres (hétérosides). La coumarine et ses dérivés ont des actions photo biologiques ^[46], bactériostatiques et anti fongiques ^[47-48], ils ont aussi un effet anti-œdémateux ^[49].

Toutes les espèces de mélilot renferment (surtout dans les jeunes feuilles) du Méliotoside **11**, un acide facilement hydrolysable par des enzymes pour donner la coumarine. En cas de contamination par des champignons, les mélilots produisent un produit susceptible d'être métabolisé en un composé anticoagulant, le dicoumarol **12**. C'est d'ailleurs à partir du modèle de ce composé végétal qu'on synthétise actuellement les anticoagulants coumariniques utilisés en médecine ^{[40], [50]}.

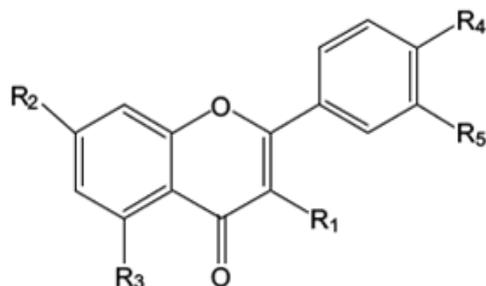


I.1.7.3. Les Flavonoïdes et les Isoflavonoïdes

- Flavones et flavonols ; Flavanones et flavanonols

Dans la famille des fabacées la plupart des flavones, flavonols, flavanonols et flavanones décrits sont des composés prénylés. Il s'agit de prénylations linéaires de type 3,3-DMA ou cyclisées de type « furano » ou « pyrano », sur le cycle A ou le cycle B, ils sont répertoriés dans le genre *Derris* ^[51]. Les composés **13**, **14**, **15**, **16**, **22**, **23**, **24**, **25** et **26** sont décrits comme possédant une activité antioxydante et ils inhibent l' α -glucosidase ^[53], le composé **26** est actif contre le *Mycobacterium tuberculosis* ^[53], et le composé **27** est cytotoxique ^[57], le composé **28** est anti-inflammatoires ^[58].

• Flavones et flavonols

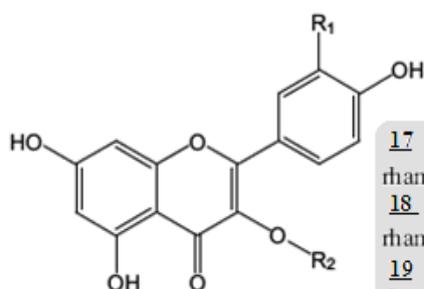


13 R₁=R₂=R₄=R₅=OMe, R₃=H, Fisetin tetramethyl ether

14 R₁=OMe, R₂=OH, R₃=H, R₄=R₅=O-CH₂-O, 3-méthoxy-7-hydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone

15 R₁=R₄=R₅=H, R₂=OMe, R₃=OH, 7-O-méthylchryssine

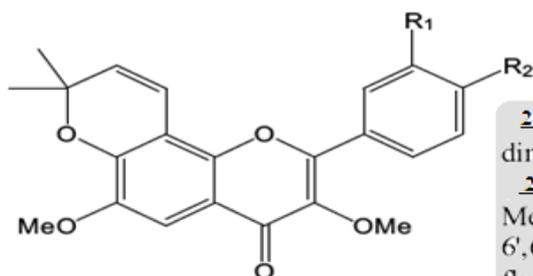
16 R₁=R₅=H, R₂=R₄=OMe, R₃=H, 7,4'-diméthoxy-5-hydroxyflavone



17 R₁=H, R₂= α -L-rha-(1-6)- β -D-glc-(1-3)- β -D-glc, kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside

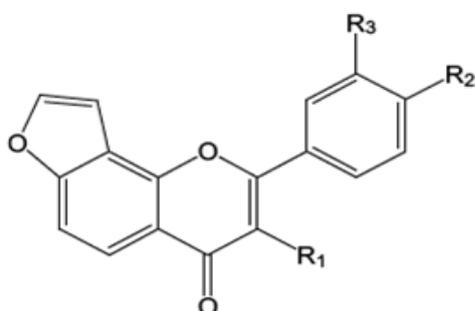
18 R₁=OH, R₂= α -L-rha-(1-6)- β -D-glc-(1-3)- β -D-glc, quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside

19 R₁=OH, R₂= α -L-rha-(1-6)- β -D-glc-(1-2)- β -D-glc, quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside



20 R₁=R₂=H, 3,6-diméthoxy-6'',6''-diméthylchroméno-(7,8,2'',2'')-flavone

21 R₁+R₂=O-CH₂-O, Méthylènedioxy-(3,4)-3,6-diméthoxy-6',6'-diméthylchroméno-(7,8,2',3')-flavone

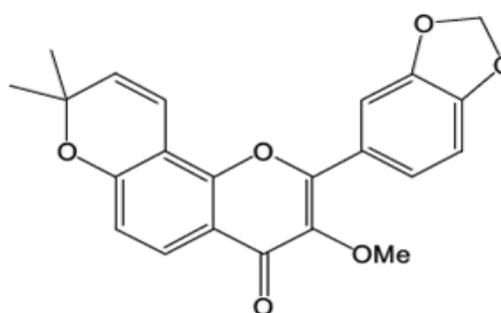


22 R₁=H, R₂=R₃=OH, 3',4'-dihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromén-4-one

23 R₁=R₂=R₃=OH, 3,3',4'-trihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromén-4-one

24 R₁=OMe, R₂=R₃=H, Karanjine

25 R₁=OMe, R₂=R₃=O-CH₂-O, Pongapine



26 pongachromène

Figure I.7: Flavones et Flavonols répertoriés dans la Famille Fabacée.

- Flavanones et flavanonols

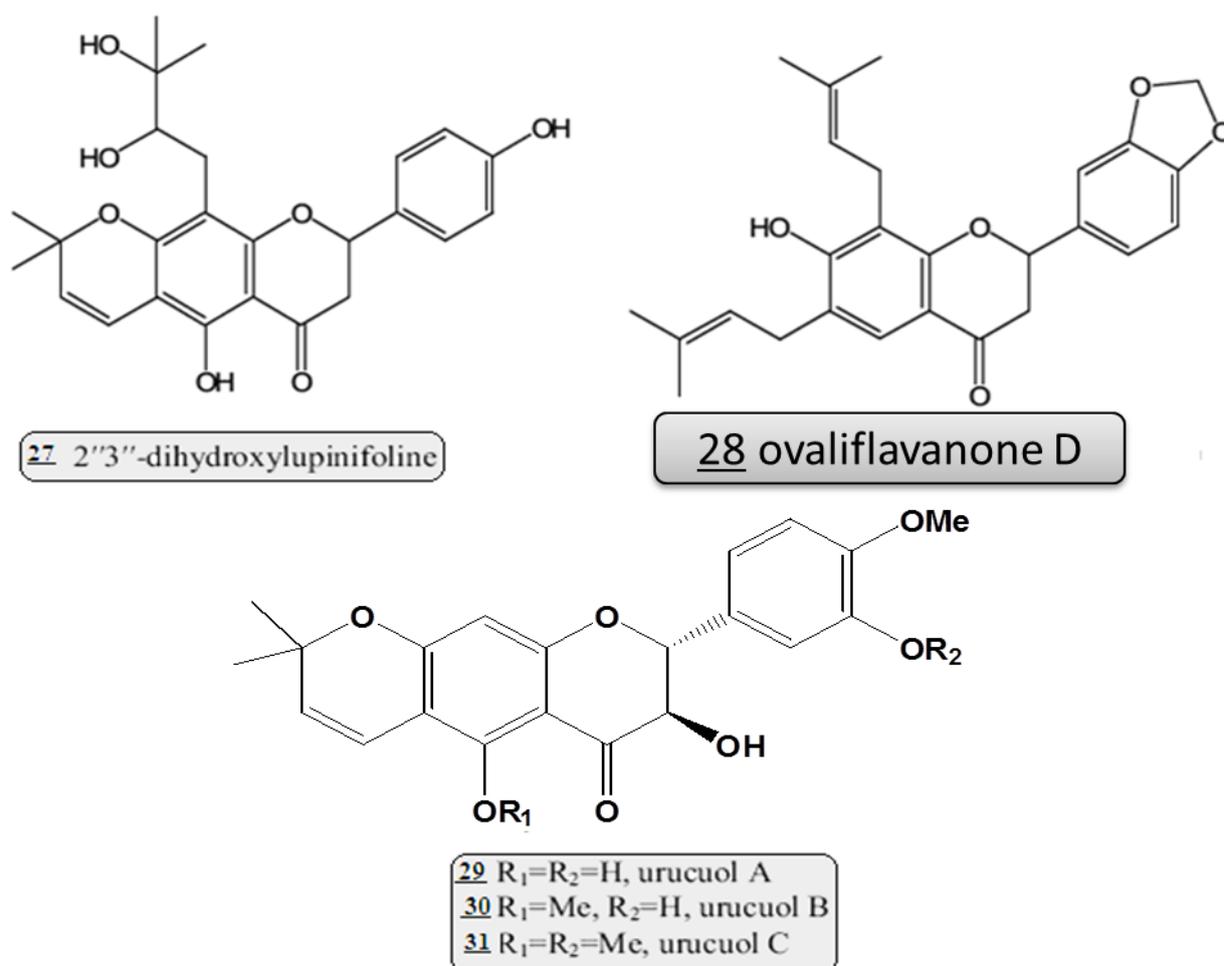


Figure I.8: Flavanones et Flavanonols répertoriés dans la Famille Fabacée.

- LES ISOFLAVONES

L'une des particularités importantes de la famille des fabacées est la production des métabolites secondaires spécifiques appelés isoflavonoïdes impliqués dans la signalisation symbiotique, dans les réactions de défense et présentant un grand intérêt pharmaceutique [52]. Ce sont des substances polyphénoliques d'une diversité structurale importante. (Fig I.9)

De nombreuses activités sont associées à ces composés: inhibiteur de l' α -glucosidase **33** [60], anti-dermatophyte **39** [62], anti-mycobactérien **40** [63], cytotoxique **41** [64], insecticide **42** [61], antioxydante **43** [60], antibactérienne **43** [60] et anti-inflammatoire **44** [65]

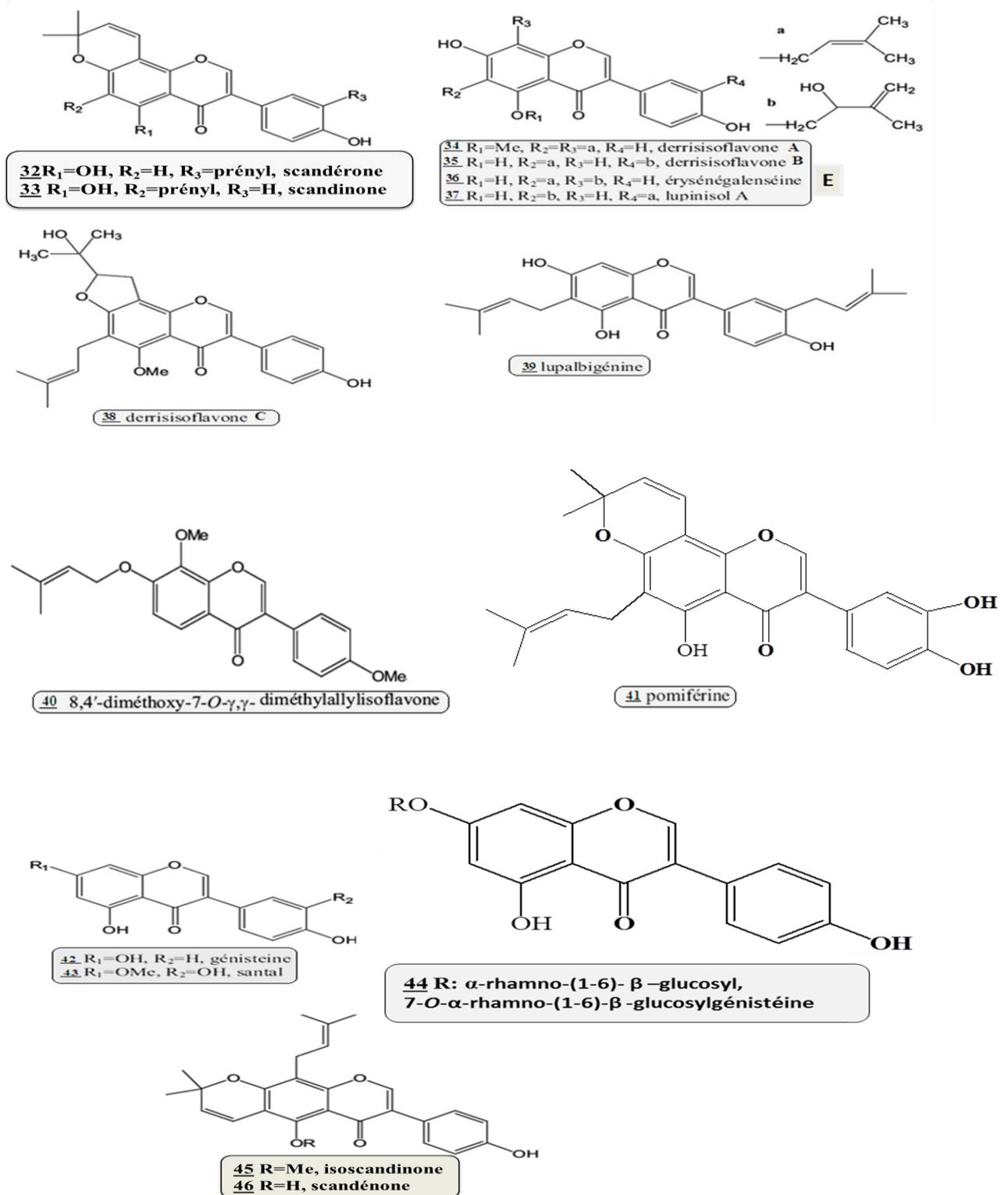


Figure I.9: Isoflavones répertoriées dans la Famille Fabacée.

Le tableau I.2 regroupe, les différents composés répertoriés dans la famille des fabacées et le genre Derris ainsi que leurs activités biologiques associées.

Tableau I.2 : Composés répertoriés dans la Famille des Fabacées et le genre Derris .

Composés	Nom de l'espèce	Activités biologiques	Références Bibliographiques
FLAVONES - FLAVONOLS :			
13 éther tétraméthyle de fisétine	Indica	Antioxydant	[53]
14 3-méthoxy-7-hydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone	Indica	Antioxydant	[53]
15 7-O méthychryrine	Indica	Antioxydant	[53]
16 7,4'-diméthoxy-5-hydroxyflavone	Indica	Antioxydant	[53]
17 kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - β -D-glucopyranoside	Trifoliata		[54]
18 quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - β -D-glucopyranoside	Trifoliata		[54]
19 quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - β -D-glucopyranoside	Trifoliata		[54]
20 3,6-diméthoxy-6'',6'' - diméthylchroméno-(7,8,2'',3'')-flavone	Obtusa		[55]
21 méthylènedioxy-(3,4)-3,6-diméthoxy-6'',6'' - diméthylchroméno-(7,8,2'',3'')-flavone	Araripensis		[56]
22 3',4'-dihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromèn-4-one	Indica	Antioxydant	[53]
23 3,3',4'-trihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromèn-4-one	Indica	Antioxydant	[53]
24 karanjine	Indica	Antioxydant	[53]
25 pongapine	Indica	Antioxydant	[53]
26 pongaglabrone	Indica	Antioxydant	[53]
Flavanones - Flavanonols :			
27 2''-3''-dihydroxylupinifoline	Reticulata	cytotoxique	[57]
28 ovaliflavanone	Scandens	Anti-inflammatoire	[58]
29 urucuol A	Urucu		[59]
30 urucuol B	Urucu		[59]
31 urucuol C	Urucu		[59]

Tableau I.2: Composés répertoriés dans la Famille Fabacées et le genre Derris (suite)

Composés	Nom de l'espèce	Activités biologiques	Références Bibliographiques
LES ISOFLAVONES :			
32 Scandérone	Scandens		[60]
33 Scandinone	Scandens	Antioxydant Insecticide Inhibiteur de l'α-glucosidase	[60] [61] [60]
34 Derrissoflavone A	Scandens	Antioxydant Antibactérien	[62]
35 Derrissoflavone B	Scandens		[62]
36 Erysénégalséine	Scandens		[62]
37 lupinisol A	Scandens		[62]
38 Derrissoflavone C	Scandens	Anti-dermatophyte	[53]
39 lupalbigénine	Scandens	Antioxydant Anti-dermatophyte	[60] [62]
40 8,4-diméthoxy-7-O- γ,γ -diméthylallylisoflavone	Indica	Anti-mycobactérien	[63]
41 Pomiférine	malaccensis	Cytotoxique	[64]
42 Génistéine	Scandens	Insecticide	[61]
43 Satal	Scandens	Antioxydant Antibactérien	[60] [60]
44 7-O- α -rhamno-(1-6)- β -glucosylgénistéine	Scandens	Antiinflammatoire	[65]
45 Isoscandinone	Scandens		[66]
46 Scandénone	Scandens	Insecticide Inhibiteur de l'α-glucosidase	[61] [66]

I.2. LE GENRE GENISTA :

I.2.1. Généralités :

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des légumineuses (fabales), sous-famille des papilionacées (fabacées) et à la tribu des génistées ^[67]. Parmi les 700 genres de la famille des fabacées, on trouve en Algérie environ 53 genre et 337 espèces ^[68]. Le genre *Genista* comporte 23 espèces dont 11 sont endémiques à l'Algérie^[67]. Ce genre constitue un matériel intéressant qui mérite d'être exploré afin de mettre en lumière tous ses avantages et ses potentialités. Il se distingue également par ses effectifs élevés d'espèces, sous espèces et des variétés endémiques et rares. Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Genista* qui montre une richesse en composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques divers ^[69-70].

I.2.2. Distribution et aire géographique :

Le genre *Genista* est circumméditerranéen, il est constitué d'arbustes épineux et non-épineux, la plupart de ces espèces forment des maquis sclérophylles ou des matorrals avec 87 espèces ^[71]. Le genre *Genista* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du nord (Libye, Tunisie, Algérie et Maroc). En Algérie, il est localisé dans la région est, sud et au grand Sahara ^[68].

I.2.3. Caractère chimique du genre Genista :

La recherche de molécules naturelles aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes est d'une grande importance aussi bien dans le domaine médicale que dans le domaine de l'industrie alimentaire. Dans ce contexte, les huiles essentielles constituent des sources potentielles pour ce type de molécules. Les effets antimicrobiens des différentes espèces de plantes aromatiques et d'épices sont connus depuis longtemps. Les travaux phytochimiques effectués sur ce genre ont permis essentiellement l'isolement des alcaloïdes ^[72-75], et des flavonoïdes notamment les isoflavonoïdes ^[76-79].

La figure I.10 et le tableau I.3 rassemblent un nombre d'espèces du genre *Genista* et leur contenu flavonique.

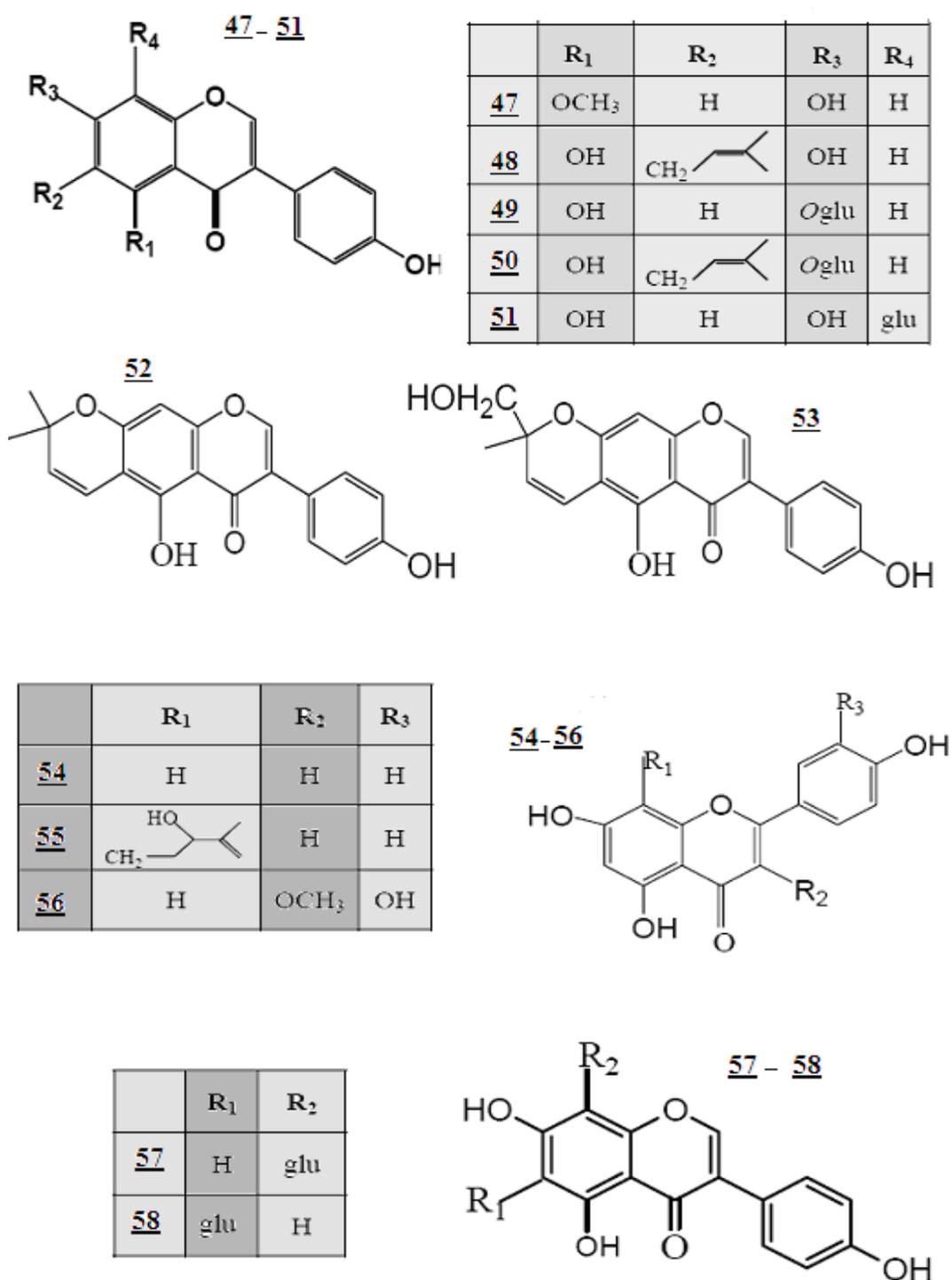


Figure I.10: Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*.

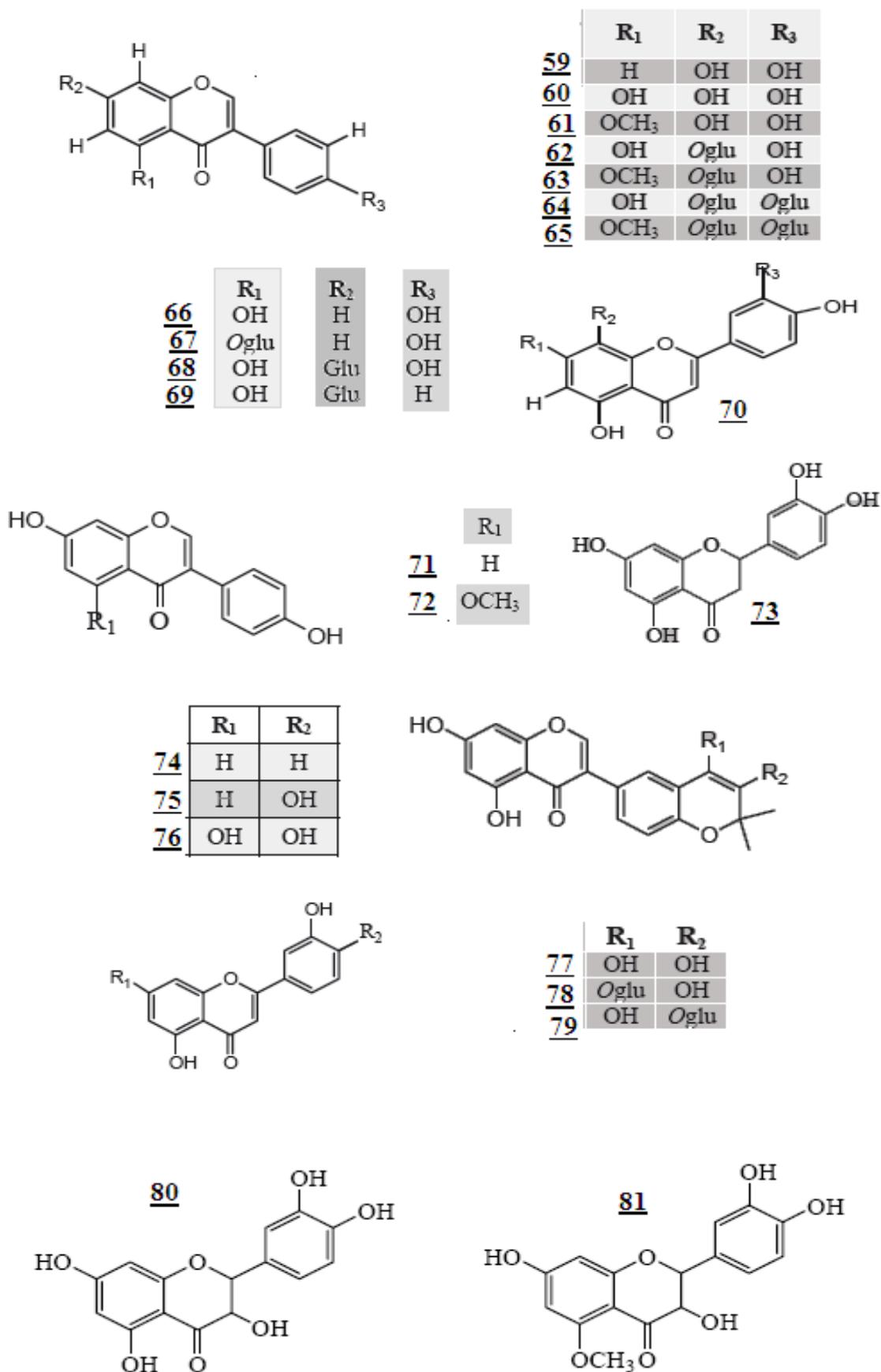


Figure I.10: Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre Genista. (suite).

Tableau I.3: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*

Composés	Nom de l'espèce	Références Bibliographiques
<u>47</u> Isoprunétine	<i>G. ephedroides</i>	[76]
<u>48</u> Wighteone		
<u>49</u> Génistine		
<u>50</u> Génisteone		
<u>51</u> 8-C-glucoside génistéine		
<u>52</u> Alpinumisoflavone		
<u>53</u> Hydroxyalpinumisoflavone		
<u>54</u> Apigénine		
<u>55</u> Ephedroïdine		
<u>56</u> Isokaempféride	<i>G. cinerea</i>	[77]
<u>57</u> 8-C-glucosode génistéine		
<u>58</u> 6-C-glucosode génistéine	<i>G. morisii</i>	[78]
<u>59</u> Daidzéine		
<u>60</u> Génistéine		
<u>61</u> Isoprunétine		
<u>62</u> 7-O-β-D-glucopyranoside genistéine		
<u>63</u> 7-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine		
<u>64</u> Lutéoline		
<u>65</u> 7-O-β-D-glucopyranoside lutéoline		
<u>66</u> 7-O-β-D-glucopyranoside genistéine		
<u>67</u> 7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside genistéine		
<u>68</u> 7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine		
<u>69</u> Orientine	<i>G. corcica</i>	[79]
<u>70</u> Vitexine		
<u>71</u> Eriodictyol		
<u>72</u> Daidzéine		
<u>73</u> Isoprunétine		
<u>74</u> Isoderrone		
<u>75</u> Ficuisoflavone		
<u>76</u> Dihydroisoderrondiol		
<u>77</u> Lutéoline		
<u>78</u> 7-O-β- glucoside lutéoline		
<u>79</u> 4'-O-β-glucoside luteoline		
<u>80</u> Toxifoline		
<u>81</u> 5-methoxytoxifoline		

I.2.4. Intérêt biologique du genre *Genista* :

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Genista* montre peu d'investigations réalisées dans ce domaine. Par ailleurs, ces travaux ont pu mettre en évidence quelques intérêts pharmacologiques dont on peut citer :

Une étude faite par Harionov (1988) ^[80] a montré :

- que les extraits flavoniques des deux plantes médicinales, *G. tinctoria* et *G. sessilifolia* ne sont pas toxiques à des doses ≤ 2000 mg/Kg.

- Aucune action ostrogénique ni androgénique n'a pu être mise en évidence pour une dose de 100 mg/Kg.

- le mélange flavonique de *G. sessilifolia* a une forte action anabolique et anti-inflammatoire alors que celui de *G. tinctoria* ne montre aucune action.

Une autre étude réalisée par Korpachov et ses collaborateurs (1995) ^[81] sur la fonction de la thyroïde a pu montrer que l'extrait flavonique de l'espèce médicinale *G. tinctoria* provoque une augmentation de la thyroxine de 19 à 31% chez les rats sains pour une dose de 20 à 60 mg/Kg et garde un niveau normal chez les rats hypothyroïdiens.

Références bibliographiques

- [1]-Dupont F, Guignard J.L, Abrégé de Botanique 14^{ème} édition. Editions Masson, Paris **2007**; p 285.
- [2]-Wojciechowski M.F, Lavin M, Sanderson M.J, 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*, **2004**; 11, pp 1846-2004.
- [3]-Judd W.S, Campbell C.S, Kellogg E.A, Stevens P, Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Bruxelles : De Boeck Université. **2002**.
- [4]-Spichiger R.E, Savolainen V.V, Figeat M. Jeanmonod D, Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Lausanne, Suisse : Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. **2004**.
- [5]-De WIT H. Les plantes du monde. Ed° Hachette Paris, **1963**; pp 308-323.
- [6]- Familia *Fabaceae* Lindl. *Systematic Botany*, Editions 2,**1836**; p 148.
- [7]- Debelmas A.M, Delaveau P, Guide des plantes dangereuses, II^{ème} édition Paris, **1983**; p 200.
- [8] -Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T, *Plant. Cell*, **1995** ; 7, pp 869-885.
- [9]- Echevin R, Angiospermes I éditeur Doin, **1964** ; p 496.
- [10]- Guignard J.I. Abrégé de botanique, 9^{ème} édition, éditeur Masson, **1994** ; p 276.
- [11]-Etienne-Pascal J, Véronique C, Jérôme G, Philippe T, Charles R. G, David B, Thierry H, Jean D, Pascal G , La légumineuse modèle *Medicago truncatula*: approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, **2001**.
- [12]-Bézanger-beauquesne L. Pinkas M , Torck M, Les plantes dans la thérapeutique moderne, **1986**; p 469.
- [13]-Arnone A, Camarda L, Merlini L, Nasini G,Taylor, D. A. H, Colouring matters of the West Africa red woods *Pterocarpus osun* and *P. santalinus*.J, *Chemical Society*, **1977**; 19, pp 2116-2118.
- [14]-Guignard J.L, Botanique systématique moléculaire 13^{ème} édition, éditeur Masson, **2004** ; p 284.
- [15]-Bruneton J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Technologie Doc*. 2^{ème} édition , **1993** ; p 915.

- [16]-Haieb I, Harzallah-Skhiri F, Chemli R, Contribution à une étude ethnobotanique de la flore en Tunisie (cas de la région de Sfax); travaux de fin d'études E.S.H.E, **1999**.
- [17]-Mahmoudi Y, La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Palais de livre Blida, **1980**.
- [18]-Grenand P, Moretti C, Jacquemin H, Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Créoles, *Palikur, Wayapi*, ORSTOM, Paris. **1987**.
- [19]-Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Solis P.N, Gupta M.P, Bienzle U, Eich E, Andinermals A.C, Antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. *Phytochem*, **2001**; 58, pp 769-774.
- [20]-Cirad-forêt, Doat J, Bois des Dom-Tom, Cirad-forêt, **1993**.
- [21]-Miller R. B, Wiedenhoeft A. C, Williams R. S, Stockman W, Green F. Characteristics of ten tropical hard woods from certified forests in Bolivia. Part II. *Natural durability to decay fungi*, *Wood and Fiber Science*, **2003**; 35, pp 429-433.
- [22]-Sauvain M, Etudes de plantes anti-parasitaires du plateau des Guyanes en Amazonie : antipaludiques et antileishmaniens, **1989**.
- [23]-Delaveau P, Vidal-Tessier A.M, Biologically active substances from tropical woods. Bulletin de la Société Botanique de France. *Actual. Botanique*, **1988**; 135, pp 25-36.
- [24]-Andel van T, The diverse uses of fish-poison plants in Northwest Guyana. *Economic Botany*, **2000**; 54, pp 500-512.
- [25]-Bertani S, Bourdy G, Landau I, Robinson J.C, Esterre P, Deharo E, Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies , *Journal Ethnopharmacol.* **2005**; 98, pp 45-54.
- [26]-Konoshima T, Okamoto E, Kozuka M, Nishino H, Tokuda H, Tanabe M, Studies on inhibitors of skin tumor promotion III. Inhibitory effects of isoflavonoids from *Wisteria brachybotrys* on Epstein-Barr virus activation. *Journal of Natural Products*, **1988** ; 51, pp 1266-1270.
- [27]-Bruneton J, Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2^{ème} édition, éditeur *Technique et Documentation*, Paris. **2001**.
- [28]-Pousset J.L, Plantes médicinales Africaines. Tome II, Edition marketing. **1992**; p159.
- [29]-Takano S. and Ogasawara K, The Alkaloids, Edited .by Brossi, New York, *Academic press*, **1989**; 36.
- [30]-Marston A, Msonthi J. D, Hostettman K, On the reported molluscicidal activity from *Tephrosia vogelii* leaves. *Phytochemistry*, **1984** ; 23(8), pp 1824-1825.

- [31]-Deyson G. Cours de botanique générale, Organisation et classification des plantes vasculaires 2^{ème} partie systématique, tome II. **1979** ; p 347.
- [32]-Hostettmann K. Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments. Editions Favre SA, Lausanne, **1997**; p 240.
- [33]-Huxtable R.J, Activation and pulmonary toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids, *Pharmacology & Therapeutics*, **1990** ; 47, pp 371-389.
- [34]-Keeler R.F, Quinolizidine alkaloids in Range. 25, and Grain Lupins in « Toxicants of Plant Origin » (Cheeke P. R. éd.), *Alkaloids, Chemical Rubber Company*, **1989** ;1, pp 133-168.
- [35]-Estévez-Braun A, Gonnzalles A.G, Coumarine. *Natural Products*, **1997**; 14, pp 465-475.
- [36]-Salwa F, Farag, Amany S. Ahmed Kenji T, Yoshiaki T, Messatake N, Isoflavonoids glucosides from *Dalbergia sissoo*. *Phytochemistry*, **2001**;57 ,pp 1263-1268.
- [37]-Bilia A.R , Flammini F, Fammini G, Morelli I , Masili A, *Phytochemistry*, **1993**; 34(1) pp847-852.
- [38]-Muhammad S.A, Faman A, Vqai U.A, Unusual chemical constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Journal of Chemical*, **2001**; 25, pp107-112.
- [39]-Ibraheim Z.Z, Khalifa A.A, *Bull. Pharmaceutical Science*, **2000**; 23 (2), pp 177-186.
- [40]-Bruneton J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales., Editeur *Technique et Documentation*, **1999**.
- [41]-Richter G, Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes, **1993**.
- [42]-Pelletier S.W, Alkaloids. Edition John Wiley, New York. *Chemical and biological perspectives*, **1983**.
- [43]-kellerman T.S, Coestzer J.A.W, Naudé T.W, Plant poisonings and mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa, Oxford University Press, **1988**; pp 183-186.
- [44]-Ortega A.D, Lazerson J, Anagryne-induced Red Cell Aplasia, Vascular Anomaly, and Skeletal Dysplasia, *Journal of Pediatrics*, **1987** ;111, pp 87-89.
- [45]-Panter K.E, James L.F, Gardner D.R, Lupines Poison hemlock and *Nicotiana* spp. Toxicity and Teratogenicity in Livestock, *Journal of Natural Toxins*, **1999** ; 8, pp 117-134.
- [46]-Hostettmann K, Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Zyma S.A, **1992** ; 8.

- [47]-Rufini L, Sampaolo G, Plants Off Aromi ,Saponi,osmétol, Aerosol, **1977** ;59,pp 9-32 et 64-75.
- [48]-Ficher F.C, Van Doorne H, Lim M. I, Svendsen A. B, *Phytochemistry*, **1976** ;30, pp 1078-1079.
- [49]-Houft J.R.S, Paya M, Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: *Natural Products with Therapeutic potential*, **1996**; (27), pp 711-722.
- [50]-Matis P , Mayer W, Zur Geschichte der « klassischen“ Antikoagulantien Heparin und Dicumarol, *Medizinische Welt*, **1979**; 30, pp 845-848.
- [51]-Sylvie M, Thèse de doctorat, Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), Ecole doctorale VENAM , **2011**.
- [52]-Dixon R.A , In *Comprehensive Natural Products Chemistry*,**1999** ; 1, pp 773-823.
- [53]-Rao R.R, Tiwari A.K , Reddy P.P, Babu K.S, Ali A.Z, Madhusudana K. Rao J.M.New furanoflavonoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam).*Bioorganic & Medicinal Chemistry* ,**2009**; 17,pp 5170-5175.
- [54]-Xu L.R, Zhou P, Zhi Y.E, Wu J. Zhang S, Three new flavanol triglycosides from *Derris trifoliata*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2009; 11, pp 79-84.
- [55]-Nascimento M.C.D, Diaz R.L.D.V, Mors W.B, Flavonoids of *Derris obtusa*: auronones and auronols. *Phytochemistry*, **1976**; 15, pp1553-1558.
- [56]-Nascimento M.C.D, Mors W.B, Flavonoids of *Derris araripensis*. *Phytochemistry*, **1981**; 20, pp 147-152.
- [57]-Mahidol C, Prawat H, Kaweetripob W, Ruchirawat S, Two New Pyranoflavanones from the Stems *Derris reticulata*. *Heterocycles*, **2002**; 57, pp 1287-1292.
- [58]- Ganapaty S, Josaphine J.S, Thomas P.S, Anti-inflammatory activity of *Derris scandens*. *Journal of Natural Remedies*, **2006**; 6, pp 73-76.
- [59]-Lobo L.T, Silva G.A.D, Ferreira M, Silva M.N.D, Santos A.S , Arruda A.C, Guilhon G.M.S.P, L.S.Santos, Borges R.D.S, Arruda M.S.P, Dihydroflavonols from the leaves of *Derris* (Leguminosae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity.*Journal of the Brazilian Chemical Societ*,**2009**; 20,pp 1082-1088.
- [60]-Mahabusarakam W, Deachathai S, Phongpaichit S, Jansakul C, and Taylor W.C. A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth. *Phytochemistry*, **2004**; 65, pp 1185-1191.

- [61]-Sreelatha T, Hymavathi A, Rao V.R.S, Devanand P, Rani P.U, Rao J.M, Babu K.S.A new benzil derivative from *Derris scandens*: structure-insecticidal activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**; 20, pp 549-553.
- [62]-Sekine T, Inagaki M, Ikegami F, Fujii Y, Ruangrunsi N, Six diprenylisoflavones, derrisisoflavone A.F, from *Derris scandens*. *Phytochemistry*, **1999**; 52, pp 87-94.
- [63]-Koysomboon S, Altena I.V, Kato S, Chantrapromma K, Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, **2006**; 67, pp 1034-1040.
- [64]-Svasti J, Srisomsap C, Subhasitanont P. Proteomic profiling of cholangiocarcinoma cell line treated with pomiferin from *Derris malaccensis*. *Proteomics*, **2005**; 5, pp 4504-4509.
- [65]-Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor W.C, Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. *Phytochemistry*, **2002**; 60, pp 827-834.
- [66]-Rao S A, Srinivas P V, Tiwari A.K, Isolation characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2007**; 855, pp 166-172.
- [67]-Maire R, La flore de l'Afrique du nord. Les légumineuses, Lechevalier Ed. Paris XVI, **1987**; pp 123-193.
- [68]-Quezel P, Santa S, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S.Paris, **1963**.
- [69]-Gordon H.M, *Journal of Natural Products.Rep*, **1996**; 13(4), pp 265-273.
- [70]-Dixon R.A, *Annual Review of Plant Biology*, **2004**; 55, pp 225-261.
- [71]-Martins A, Wink M, Tei A, Brum-bousquet M, Tillequin F Rauter A.P, A Phytochemical Study of the Quinolizidine Alkaloids from *Genista tenera* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Phytochemical Analysis*, **2005**; 16, pp 264-266.
- [72]-Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Morselli I, Rubiolo P et Bicchi C, Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical systematics and ecology*, **2001**; 29(2), pp 137-141.
- [73]-Christov V, Evstalieva L, Alkaloid profile of Bulgarian species from genus *Genista*. *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite*, **2000**; 53(11), pp 25-28.
- [74]-Kirch J, Veit M, Wätzig H, Grenwald R, Czygan F.C, Alkaloidal variation in *Genista lobelii*. (Fabaceae). *Biochemical systematics and ecology*, **1995**; 23 (6), pp 636-643.

- [75]-Van Rensen I , Wrey V, Witte L, Canto P, Grenwald R , Veen G, Veit M, and Czygan F.C, Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. *Phytochem*, **1994**; 95(2), pp 421-424.
- [76]-Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Manumata A, Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products*, **1998**; 61 (11) pp 1404-1406.
- [77]-Van Rensen I, Veit M, Wrey V, Czygan F.C, Genistein-C-glucoside from *Genista cinerea*. *Journal of Natural Products letters*, **1996**; 6 (3), pp 203-207.
- [78]-Giachi I , Manunta A, Morelli I, Pistelli L, Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2002**; 30 (8), pp 801-803.
- [79]-Pistelli L, Giachi I, Potenzs D, Morselli I, A New Isoflavone from *Genista corcica*. *Journal of Natural Products*, **2000**; 63, pp 504-506.
- [80]-Harionov I, Pharmacomogic effects on the reproductive system and anti-inflammatory action of the Total flavonoides mixtures contained in *G.tintoria* and *G. sessilifolia*. *Farmatsiya (Sofia Bumgaria)*, **1988**; 38(1), pp 47-51.
- [81]-Korpachov V.V, Lifvinenko O.O, Paster I. P, Effect of *Genista tinctoria* extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism Ukraine, *farmatsevtichnii zhurnal (Kiev)*, **1995** ; (5) pp 82-86.

Chapitre II

Les Flavonoïdes et les Isoflavonoïdes

CHAPITRE II. LES FLAVONOÏDES ET LES ISOFLAVONOÏDES

II.1 Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes (métabolites secondaires des plantes) sont fréquemment décrits chez les Fabaceae. Environ 6500 représentants différents identifiés à l'heure actuelle ^[1]. Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune. Ce groupe de composés est en effet défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement Ar-C3-Ar. (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones) (**Fig II.1**) et les isoflavonoïdes ^[2] (**Fig II.5**).

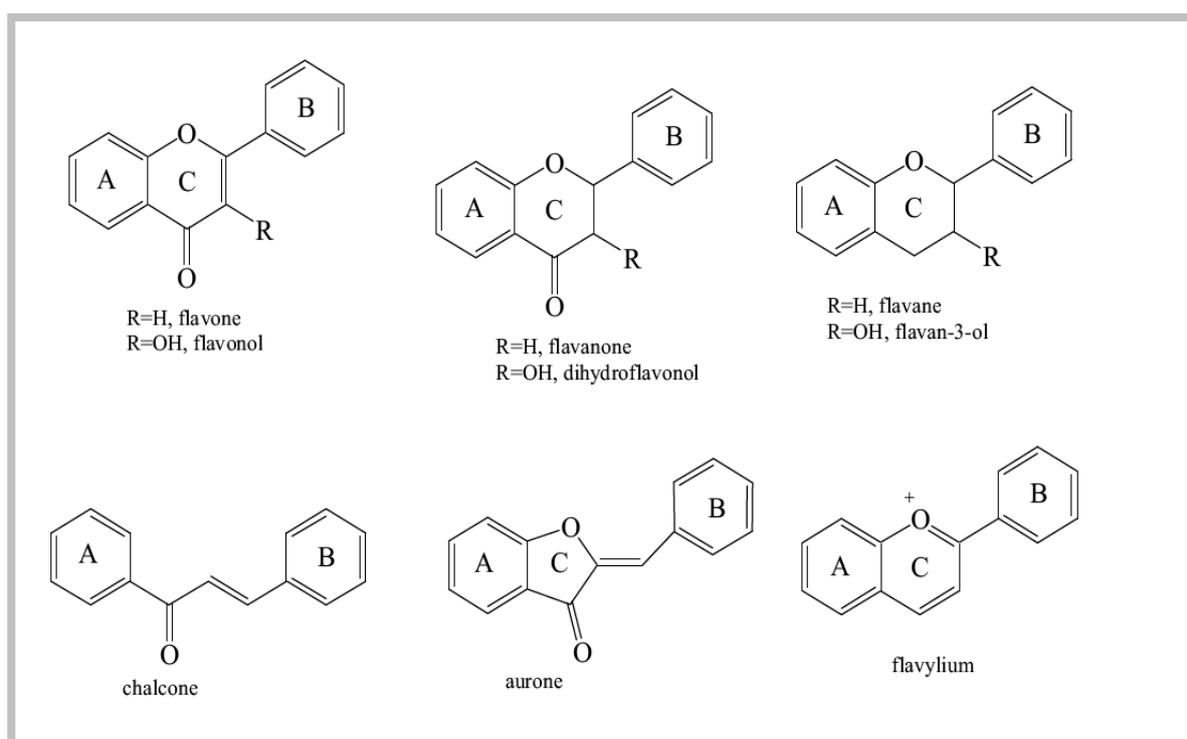


Figure II.1: Structures de base des flavonoïdes.

II.2. Distribution et biosynthèse

II.2.1. Les Flavonoïdes

II.2.1.1. Distribution

Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux ^[3].

II.2.1.2. Biosynthèse

Les flavonoïdes dérivent d'une structure de type 1,3-diphénylpropane. La première étape intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes est une étape commune à beaucoup d'autres métabolites, elle est désignée sous le nom générique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (**Fig II.2**). Elle permet la synthèse d'acide p-coumarique et d'acide cinnamique. L'enzyme, permettant la désamination non-oxydative de la phénylalanine et donc la formation de l'acide cinnamique, est nommée PAL pour phenylalanine ammonia lyase ^[4]

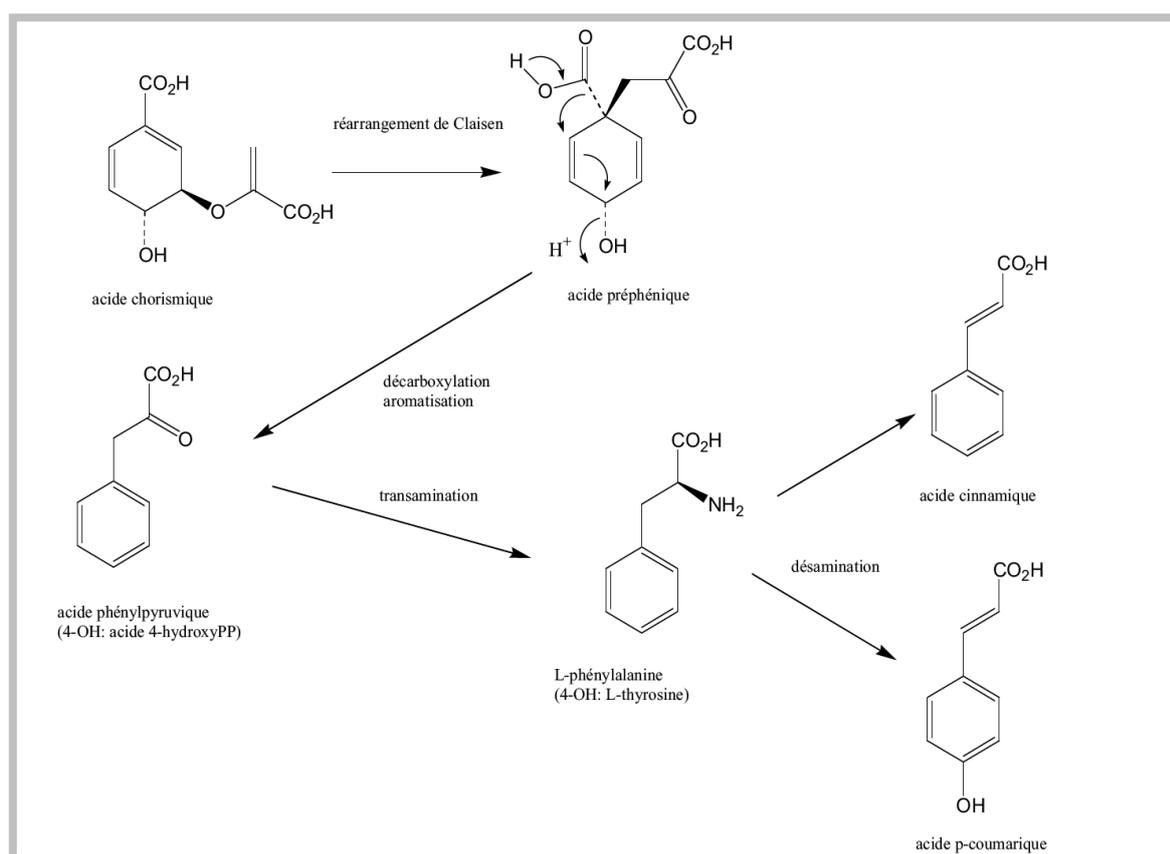


Figure II.2: biosynthèse des dérivés cinnamiques.

Le cytochrome cinnamate-4-hydroxylase (C4H), permet d'ajouter une fonction hydroxyle en position 4 du noyau aromatique et d'obtenir l'acide p-coumarique (**Fig II.3**). Le p-coumaroyl CoA est synthétisé via l'action de la 4-coumaroyl CoA ligase (4CL). Le p-coumaroyl CoA conduit à la synthèse de nombreux métabolites secondaires aromatiques. Une unité p-coumaroyl CoA va former le cycle B et la chaîne propanique, alors que le

cycle A est formé par condensation de 3 unités C2 (sous forme de 3 malonyl-CoA, formés à partir de l'acétate via une forme cytoplasmique de l'acétyl CoA carboxylase). Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (**Fig II.3**). La CHS appartient à la famille des polyketides synthases des plantes, enzymes intervenant dans la synthèse de nombreux produits naturels ^[5]. La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la voie des phenylpropanoïdes et des flavonoïdes sont organisées en complexe enzymatique, associées à la membrane ^[6].

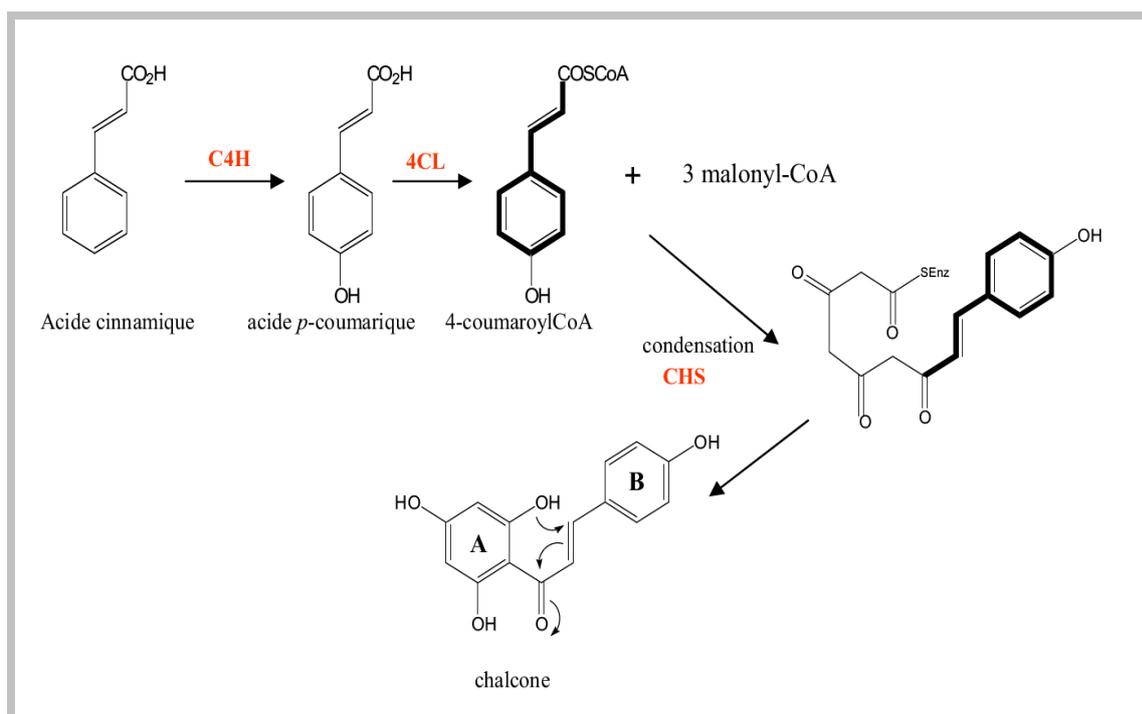


Figure II.3: Formation de chalcone à partir des acides cinnamiques.

Les différentes classes de flavonoïdes sont biosynthétisées à partir d'une chalcone (**Fig II.4**). La chalcone néoformée donne une 2S-flavanone (la naringénine), par une transformation stéréospécifique catalysée par une chalcone isomérase (CHI) ^[7] aringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses (**Fig II.3**).

Les flavone-synthases (FSI) introduisent une double liaison en 2,3 pour donner une flavone. La flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une

2S-flavanone pour donner un (2R,3R)-dihydroflavonol. Le dihydroflavonol peut ensuite être transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS) ^[6] .

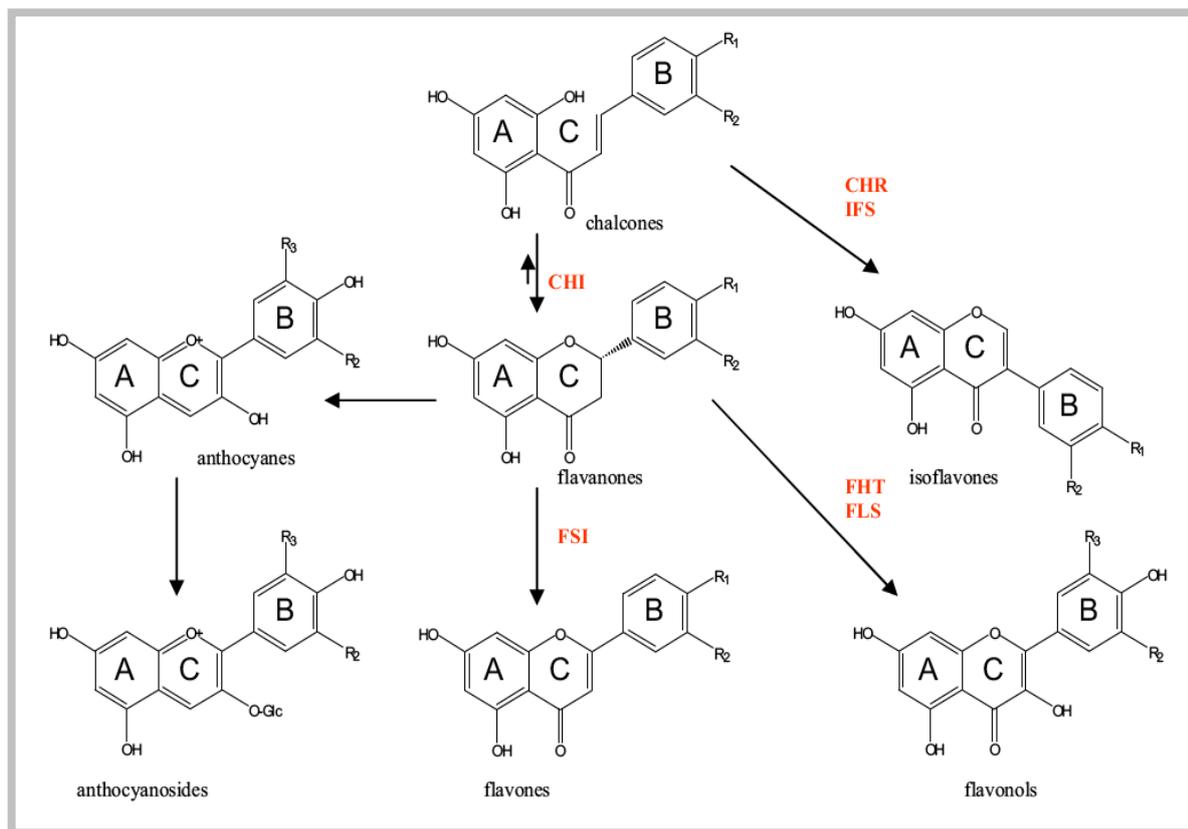


Figure II.4: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes

II.2.1.3 Les Flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase sous forme de 2S-flavanones, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin. Il semblerait que seuls les stéréo-isomères 2S sont biologiquement actifs ^[7]. Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont décrites dans de nombreuses familles, en particulier les Asteraceae, les Leguminoseae et les Rutaceae. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines, les écorces de racine, en particulier chez les Leguminoseae. La majorité des flavanones glycosylés sont des *O*-glycosides ^[3].

II.2.2. Les Isoflavonoïdes

les Isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane. Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (**FigII.5**), classés notamment en fonction du degré d'oxydation, l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires, les plus communs étant les isoflavones, alors que les isoflavanols et les coumaranochromones sont peu rencontrés ^[3] Les dérivés glycosylés sont très communs chez les isoflavones, alors qu'ils sont très rares dans les autres sous-classes d'isoflavonoïdes. Les C-glycosides sont essentiellement présents dans le genre *Dalbergia* (Leguminosae) ^[3].

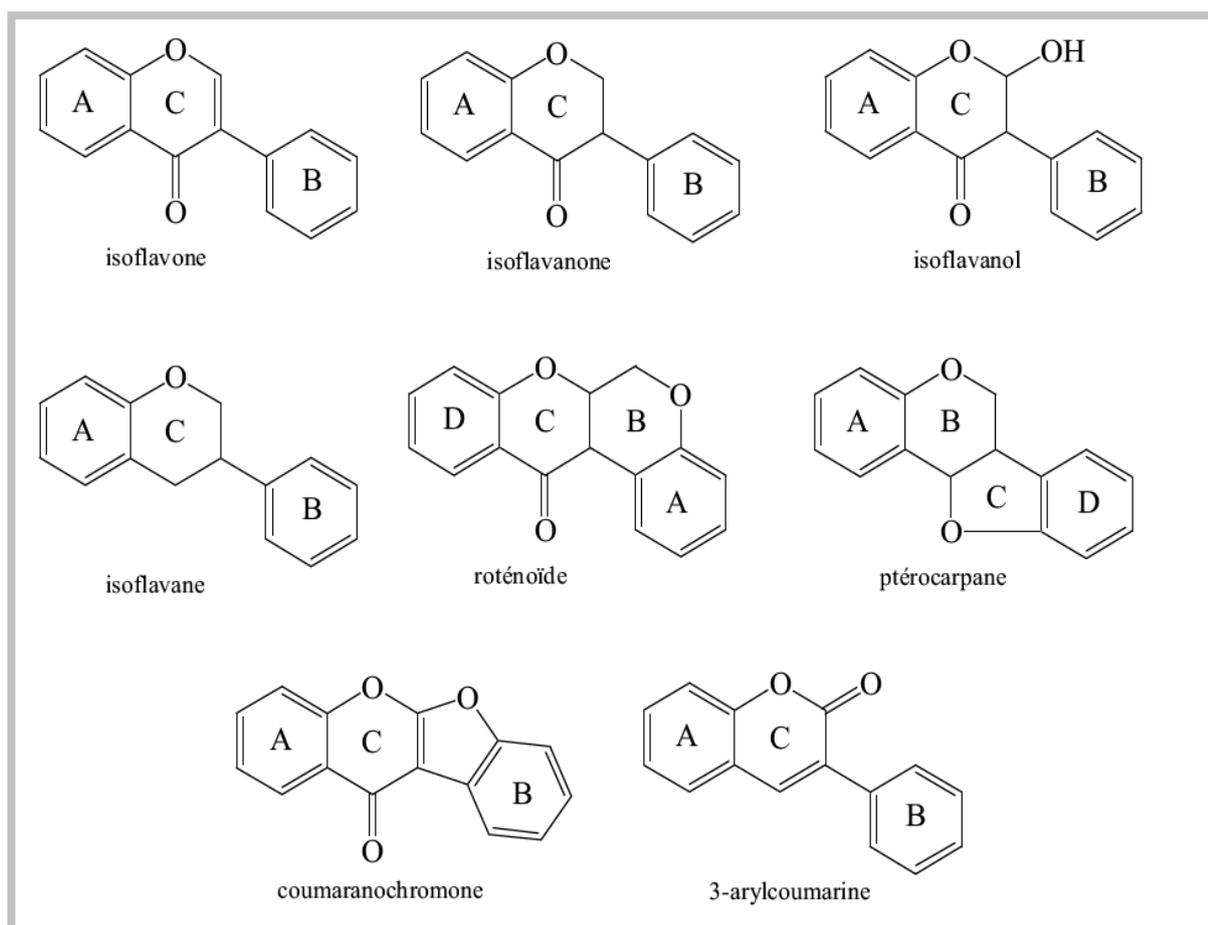


Figure II.5: Structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes

II.2.2.1. Distribution

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, dans les feuilles et les fleurs ^[3]. Contrairement

aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont quasi-uniquement présents chez les Légumineuses, puisque 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille ^[3]. Il apparaît néanmoins qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes n'appartenant pas aux Légumineuses, mais à 59 autres familles ^[8].

Comme chez les Légumineuses, la majorité des produits isolés sont des isoflavones. D'après une étude de Reynaud *et al* ^[9] sur 164 isoflavonoïdes répertoriés, 124 sont des isoflavones, 17 des déshydroroténoïdes et 6 des 12a-hydroxyroténoïdes. On retrouve également des isoflavanones (2), des roténoïdes (3), des ptérocarpanes (4), des coumestanes (5), des coumarochromones (2) ^[9].

II.2.2.2. Biosynthèse

La quasi-exclusivité de la présence d'isoflavonoïdes chez les Légumineuses peut s'expliquer. Il semblerait en effet, que l'on retrouve uniquement dans cette famille l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoïdes. Le terme IFS est utilisé pour décrire la réaction de migration du groupement aryle (**Fig II.6**), couplée à une 2-hydroxylation catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS), ainsi que la réaction de déshydratation qui est soit spontanée, soit catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone déshydratase (2HID) ^{[5],[10]}. Néanmoins, le gène codant pour IFS a été également identifié chez la canne à sucre (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae) ^[8].

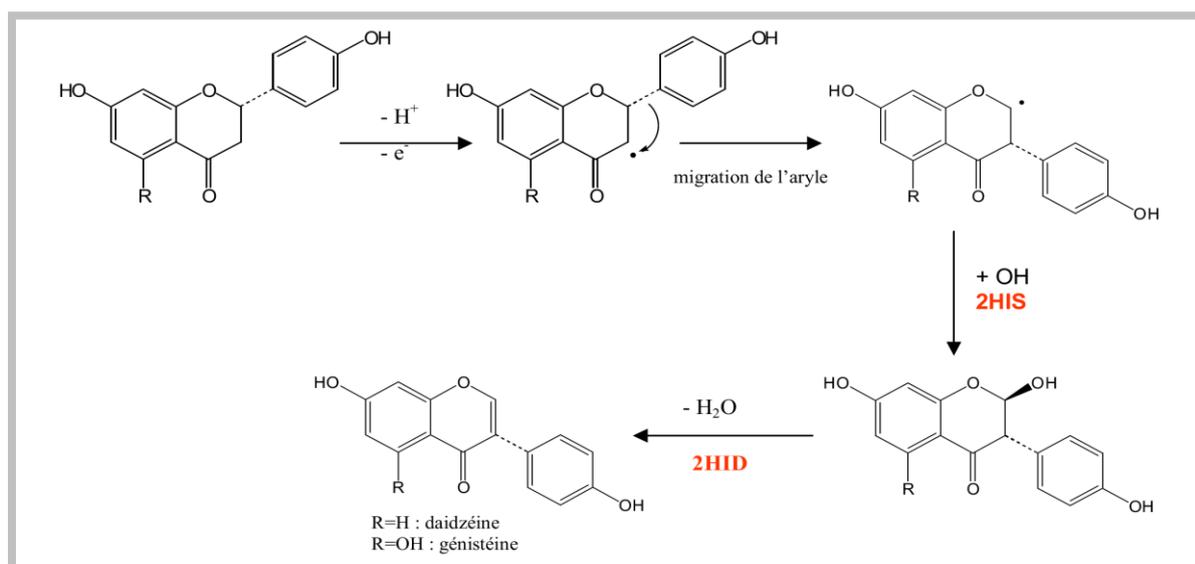


Figure II.6: Biosynthèse des isoflavonoïdes

La 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) catalyse uniquement les réactions à partir des 2S-flavanones. La migration du groupement aryle commence par l'attraction de l'hydrogène en position 3, suivie de la migration du cycle B de C-2 à C-3 et de l'hydroxylation du radical en 2, qui aboutit à la formation d'une 2-hydroxyflavanone ^[11-12]. Les ADNc codant pour la 2HIS ont été clonés à partir de différentes légumineuses. Ces 2HIS appartiennent à la famille des cytochromes, et sont dépendantes de NADPH et d'O₂ comme co-facteurs ^[12].

Cette classe d'enzyme comprend aussi la flavone synthase II (FSII) qui catalyse la 2-hydroxylation sans migration du groupement aryle, pour former après déshydratation une flavone à partir d'une flavanone ^[5].

Les précurseurs des isoflavonoïdes (flavanones) sont de simples flavanones comme la naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone) ou la liquiritigénine (7,4'-dihydroxyflavanone). Il semble que certaines 7-hydroxyflavanones sans groupement hydroxyle en position 4' puissent aussi être impliquées ^[8].

La fonction hydroxyle va ensuite être déshydratée en milieu acide par une 2-hydroxyisoflavanone déshydratase (2HID), qui est classée dans les carboxyestérases de la famille des hydrolases ^[5]. Les 2HID peuvent être divisées en: 2HIDH dont le substrat est une simple 2-hydroxyisoflavanone et en 2HIDM dont le substrat est un dérivé méthoxylé ^[11].

Il semblerait que la réaction de déshydratation puisse également se faire spontanément c'est-à-dire sans intervention d'enzyme dans le cas de certaines 2-hydroxyflavanones instables, mais avec des cinétiques très lentes, ce qui représenterait pour le végétal une voie de biosynthèse alternative, notamment quand une production rapide d'isoflavones n'est pas nécessaire ^[5]. Comme pour les flavonoïdes, les enzymes de la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes sont organisées en complexe enzymatique ^[6].

Une modification importante des isoflavonoïdes concerne la 4'-O-méthylation du cycle B puisque celle-ci permet notamment l'élaboration des ptérocarpanes (phytoalexines). Cette réaction est catalysée par l'isoflavone O-méthyltransfèreuse (IOMT). Il est intéressant de noter que la régiospécificité de cette enzyme est différente *in vivo* et *in vitro* (méthylation en position 7, sur le cycle A, *in vitro*) ^[5].

Le tableau II.1 rassemble la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes et isoflavonoïdes présentées dans la (Fig II.4) et la (Fig II.6)

Tableau II.1 : Liste des enzymes

Abreviations	L'enzyme
CHS	Chalcone synthase
CHI	Chalcone isomerase
FNSI	Flavone synthase I
FNSII	Flavone synthase II
IFS	Isoflavone synthase
2HIS	2-HydroxyIsoflavanoneSynthase
2HID	2HydroxyIsoflavanoneDehydratase
FLS	Flavonol synthase
FHT	Flavanone-3-hydroxylase

II.2.3. Les Flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés

Les métabolites prénylés sont présents chez les plantes, les champignons et les bactéries. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes ^[13]. Ils sont le plus fréquemment rencontrés dans les racines et les écorces, mais on en retrouve aussi dans les parties aériennes, les bourgeons floraux et les graines ^[14]. Même s'il existe une grande diversité de flavonoïdes prénylés, ces composés ont été isolés d'un nombre limité de familles, essentiellement chez les Leguminosae, Moraceae, Cannabaceae, Clusiaceae, Umbelliferae, Rutaceae, Euphorbiaceae et Asteraceae ^[14-16]. Environ 1 000 composés aromatiques prénylés ont été décrits ^[14-16], que ce soient des chalcones, des flavones, des flavanols ou encore des isoflavonoïdes ^[14] terme « prénylé » désigne les composés comportant une unité en C5, soit linéaire : diméthylallyle (DMA, également nommée isopentényle), époxyprényle, méthylbutyle, méthylbutényle, avec différentes hydroxylations, soit cyclique : de type furane ou pyrane, plus ou moins hydroxylé (Fig II.7).

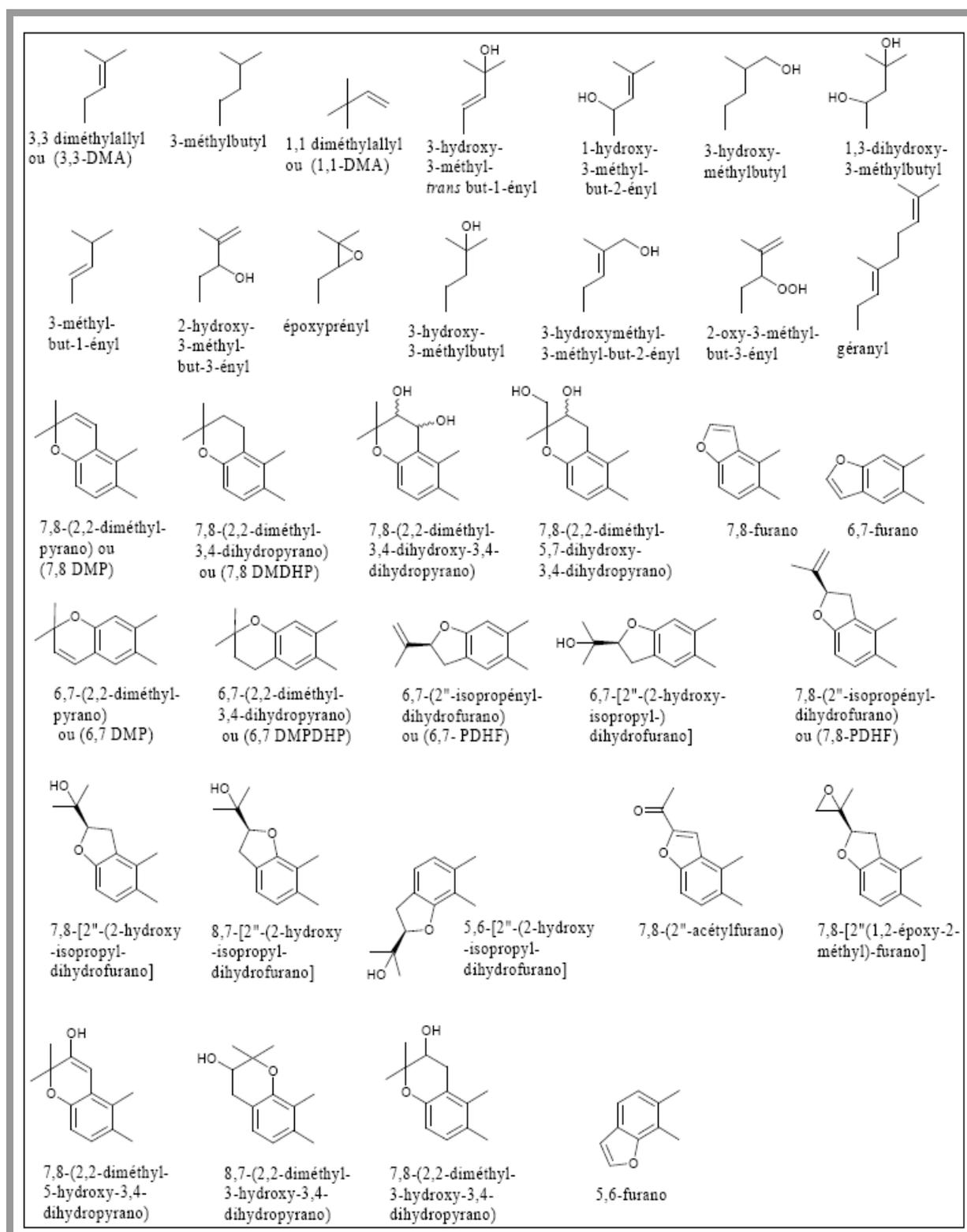


Figure II.7: Quelques types de prénylations rencontrées dans la Famille Fabacées modifié d'après Barron et Ibrahim (1996)

II.3. Substitution du squelette flavonique

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthoxylations et des glycosylations. Les composés de chaque sous-groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire ^[17].

II.3.1. La O-Substitution

II.3.1.1. L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogenèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone ^[18]. L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) ^[19, 20]. Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés ^[21]. Dans le cas des isoflavones, l'hydroxylation de la position 2' du cycle B conduit le plus souvent en présence des enzymes spécifiques à la formation du ptérocarpane ^[22].

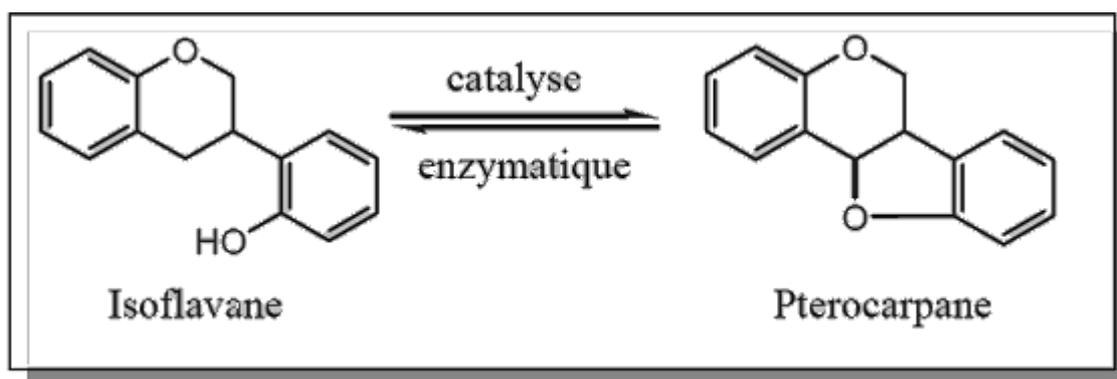


Figure II.8: Transformation de l'isoflavane en ptérocarpane

II.3.1.2. La Méthoxylation

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-Adenosyl-Méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone ^{[19],[23]} Cette réaction de

méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols ^[19]. Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri de l'espèce *Lupinus luteus* (fabacées) ^[24], on peut citer à titre d'exemple les deux isoflavones méthoxylés en positions 4' et 5 ^[25-26].

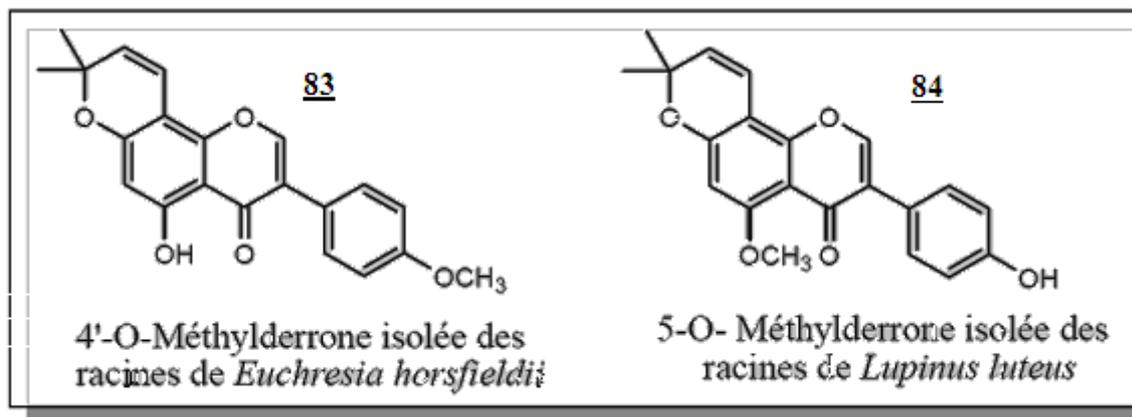


Figure II.9 : Exemples d'isoflavones méthoxylées

II.3.1.3. L'O-Glycosylation

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose). La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glucosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose). D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 ^[27].

II.3.2. La C-Substitution

II.3.2.1. La C-Méthylation

Le radical méthyle dans ce type de substitution va se lier directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 ou en position C-8, ou encore en position C-6 et C-8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en position 6 et / ou en position 8 est toujours inconnue ^[28].

II.3.2.2. La C-Glycosylation

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides ^[29]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide ^[30]. D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et ou en position C-8.

II.4. Activité biologique des flavonoïdes

Etant de distribution ubiquitaire au sein des végétaux, les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventives et curatives de plusieurs plantes médicinales. La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrices et venotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance ^[29]. Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmacologiques comme entre autres des effets, antiviraux, antimicrobiens et anticancéreux ^[31-32], antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, antitumoraux et hépato-protecteurs ^[33]. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels.

II.5. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation ^[34]. (**Fig II.10**).

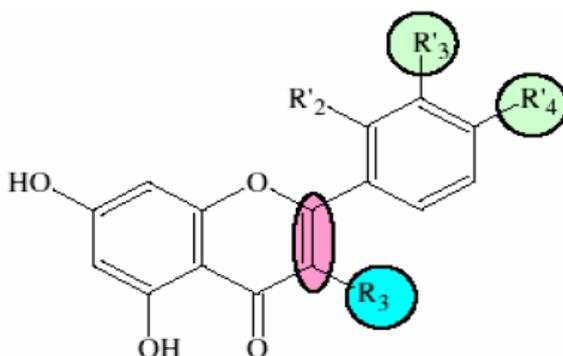
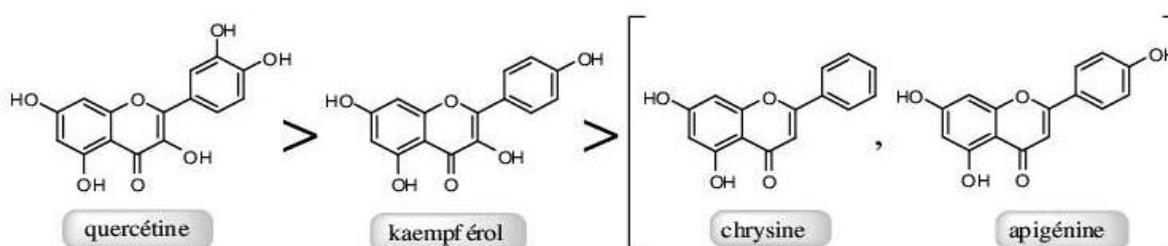


Figure II.10 : Éléments essentiels pour l'activité-antioxydante des flavonoïdes.

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydant optimale ont été établis par plusieurs auteurs ^[35-37] Il s'agit de :

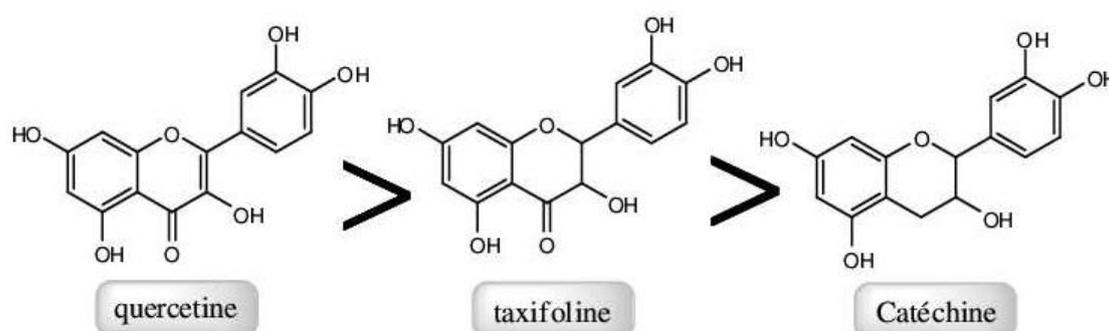
- La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B :

La configuration des ortho-dihydroxy du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydant. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.



- La présence d'un motif énone dans le cycle C.

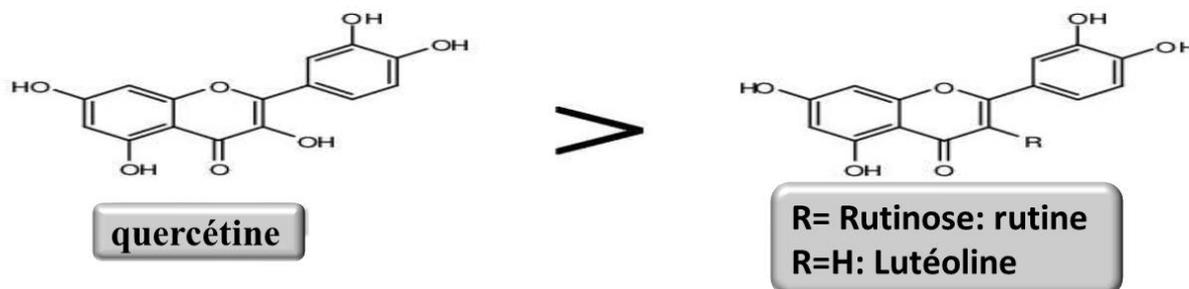
La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.



- La présence de groupement hydroxyle en position 3

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydant. Cet effet est moins marqué lorsque les

autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés anti oxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones ^[38].



II.6. L'étude chimique des flavonoïdes

II.6.1. Extraction

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes ^{[29], [39]} L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont :

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol).
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

II.6.2. Séparation et purification

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que :

1. la chromatographie liquide sur colonne (CC) : elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes ^[40].
2. la chromatographie préparative sur papier (CP) : basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont :
 - L'acide acétique **15** et **30 %** constitue le système aqueux.
 - Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) **4/1/ 5** constitue le système Organique ^[41].
3. la chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.

La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de Sephadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant.

II.7. Analyse structurale des flavonoïdes

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, etc....), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés ^[41-42]. Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur R_f dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

II.7.1. Solubilités des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes ^[43]:

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques .

- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle).
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde.
- des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH. Selon Saidman^[44], le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

II.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique

Ce facteur symbolisé par R_f est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. La valeur du R_f varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique^[40,41] et^[45]. Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II.2 : La relation entre le R_f et la structure flavonique

Structure flavonique	R_f
<i>Augmentation des groupes hydroxyles</i>	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux.
<i>Méthylation des hydroxyles</i>	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
<i>Glycosylation</i>	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

II.7.3. La Fluorescence sous lumière de Wood

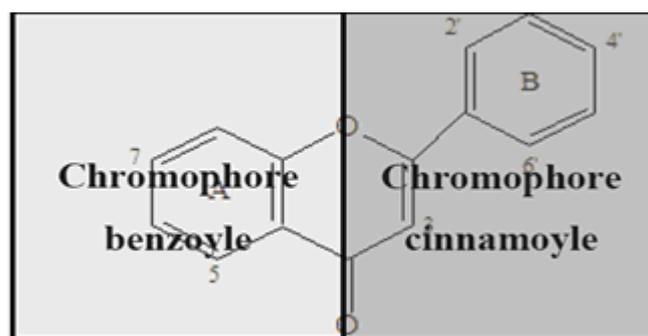
L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique^[41].

Tableau II.3 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5,6,7 ou 5,7,8 trihydroxy flavone. Flavones avec 3-OR. Chalcones .
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH et avec ou sans 5-OH.
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II.7.3.1. Absorption des rayonnements UV

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre ^[46-47]. Les spectres UV des flavonoïdes Exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle comme l'indique le schéma suivant :



Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs (tableau II.4).

Tableau II.4: Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.

classe des flavonoïdes	absorption UV-visible λ_{\max} (nm)	
	Bande II	Bande I
flavonol	250-280	330-385
quercétine	255, 269s	301s, 370
quercétine 3-O-glucoside	257, 269s	299s, 362
hespétine	288	300s
taxifolin	290	327s
flavone	250-280	310-350
chrysin	247s, 268	313
apigénine	267, 296s	336
flavanone et dihydroflavanol	275-295	300-330
flavanol	270-280	-
chalcone	230-270	340-390
4'-hydroxychalcone		328
2', 4, 4'-trihydroxychalcone		367
aurone	230-270	380-430
4-hydroxyaurone		389
6, 3', 4'-trihydroxyaurone-6-glucoside		405
anthocyane	270-280	465-560
cyanidin-3-glucoside	274	523
pelargonidine 3,7-diglucoside	279	498
isoflavone	245-275	310-330
daidzein	238s, 249	260s, 303s
genistein	261	328s

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet [48]. Pour l'acylation, peu de données existent sur l'effet de cette réaction sur les propriétés spectrales des flavonoïdes.

II.7.3.2. Rôle et importance des réactifs sur le spectre UV

Chlorure d'aluminium (AlCl_3) et mélange chlorure d'aluminium/acide chlorhydrique (AlCl_3/HCl): le chlorure d'aluminium forme un complexe très stable avec les flavonoïdes ayant les systèmes (5-OH/4-CO) et (3-OH/4-CO) et un complexe instable en milieu acide avec les systèmes ortho dihydroxylés. Cette réaction de complexation permet la détection des 5-OH, 3-OH et les systèmes ortho hydroxylés dans les flavonoïdes ou 2'-OH dans les chalcones et 4-OH dans les aurones. Cette réaction s'observe sur le spectre par un déplacement bathochromique de la bande II (présence de 5-OH, système ortho dihydroxylé sur le cycle A) ou de la bande I (3-OH, système ortho dihydroxylé sur le cycle B).

Méthanoate de sodium (NaOMe) : Base forte, ce réactif ionise tous les hydroxyles localisés sur le squelette des flavonoïdes. Il permet de détecter la présence des hydroxyles en position 5 et 7 par un effet bathochrome de la bande II. Il permet également de mettre en évidence les hydroxyles libres en position 3 et 4'.

Acétate de sodium (NaOAc) : Plus faible que la précédente, cette base n'ionise que des hydroxyles plus acides, localisés aux positions 7, 3, 4' d'une flavone. Compte tenu du fait que la bande II est liée au cycle A, l'ionisation du 7-OH sera caractérisée par un effet bathochrome de la bande II alors qu'une ionisation des 3-OH/ 4'-OH se traduira par un effet bathochrome de la bande I.

II.7.4. La Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet la détermination du poids moléculaire des aglycones ainsi que le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles ^[49-50]. Les ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, donnent des ions fragments caractéristiques, ces derniers fournissent des renseignements utiles, notamment sur la substitution des noyaux A et B ^[51]. Différentes techniques d'ionisation existent dont les plus récentes sont les techniques d'ionisation douces qui sont l'électrospray :

(ESI : electrospray ionization), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : atmospheric pressure chemical ionization), (IE) l'ionisation par impact électronique, (IEHR) l'ionisation par impact électronique à haute résolution et (FAB) Bombardement des atomes accélérés. Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$. D'autres ions peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié. Les flavonoïdes ont été largement étudiés en spectrométrie de masse en particulier les dérivés glycosylés ^[51-52]. Ces études ont permis d'établir des schémas de fragmentation de ces composés dans le but de pouvoir les identifier dans un extrait brut sans avoir à les isoler ^[53-55].

Les différents techniques et mécanismes de fragmentation des Flavonoïdes sont récapitulés dans les figures (II.11 et II.12) pris comme exemples.

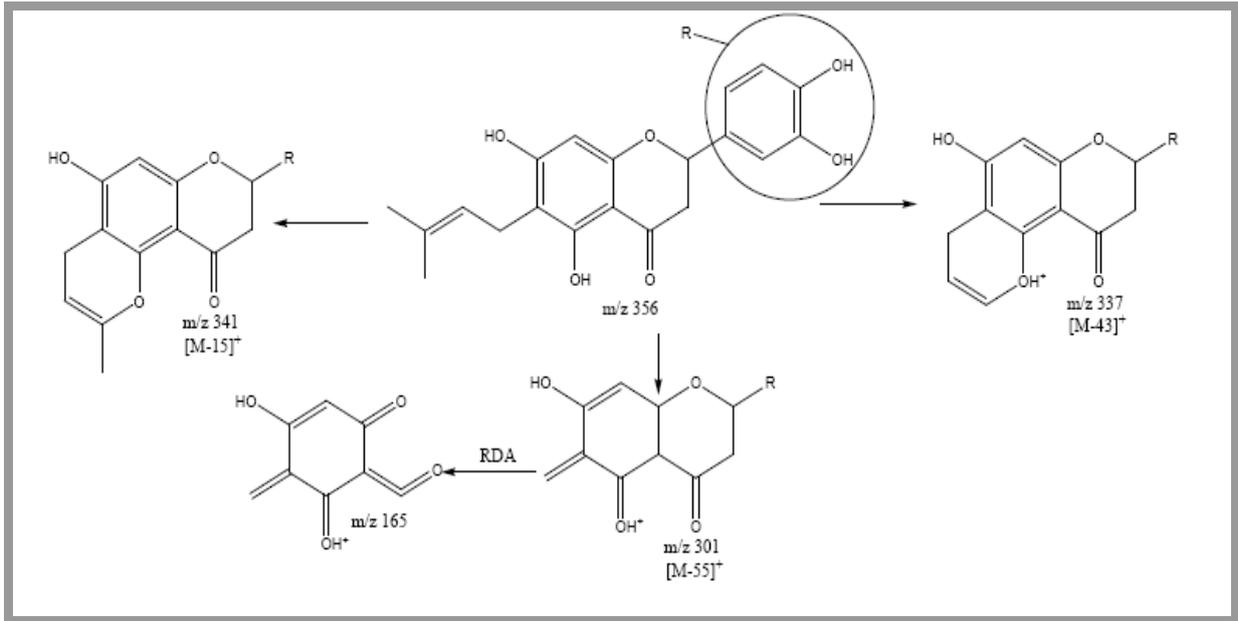


Figure II.11: Schéma de fragmentation d'une flavanone prénylée en position 6 (RDA : Rétro Diels-Alder).

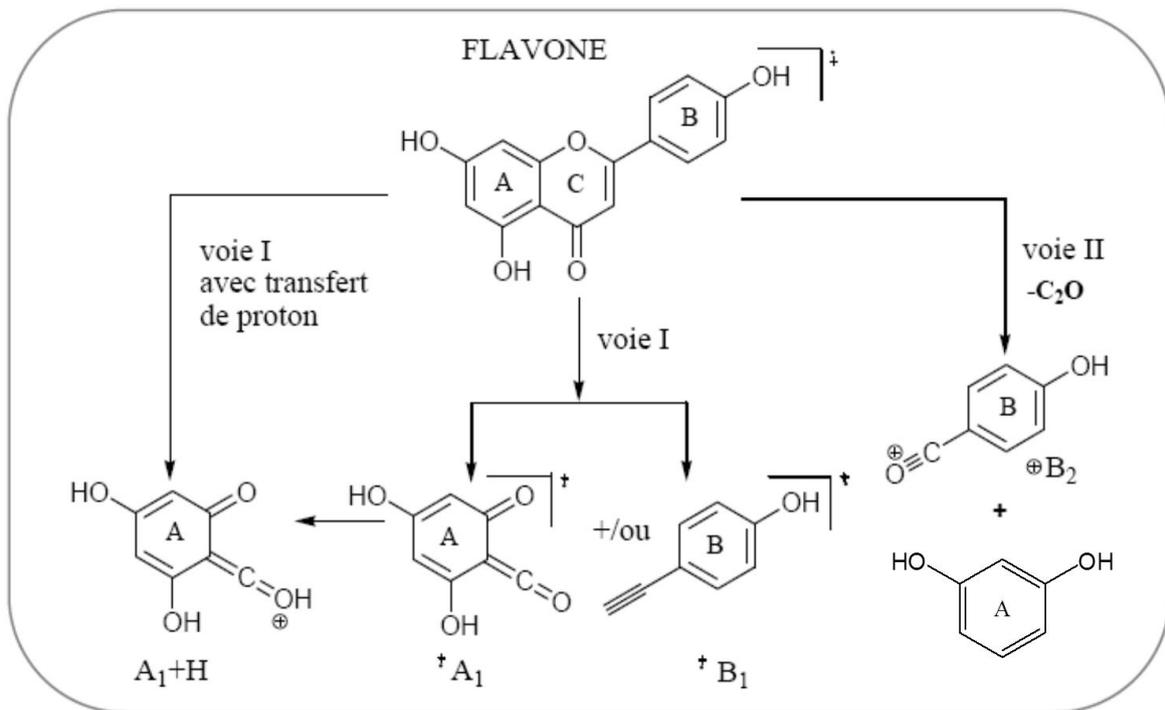


Figure II.12 : Fragmentation par rétro Diels-Alder des flavones

II.7.5. La Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques ^[56]. C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

- Spectre **RMN ¹H**: Elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm ^[56-60], elle permet de connaître :
 - La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde
 - Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique
 - Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.
- Spectre **RMN ¹³C**: Il permet de déterminer le nombre d'atomes de carbone et de connaître leurs déplacements chimiques et leurs natures (C quaternaire, CH, CH₂, ou CH₃). Il donne aussi des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que ^{[40], [60]} :
 - Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
 - la connaissance de type des liaisons –C et / ou –O sucres.
- Spectre **COSY (2D ¹H-¹H)** : Il permet de déterminer les couplages ¹H-¹H de protons géminés ou vicinaux. On observe des taches de corrélation entre deux protons voisins, distants de 2 liaisons (2J) et 3 liaisons (3J).
- Spectre **HSQC (2D ¹H-¹³C)** : Il permet d'établir les corrélations directes ¹H-¹³C. On observe sur le spectre des taches de corrélation entre les atomes de carbones et les protons directement liés.
- Spectre **HMBC (2D ¹H-¹³C)** : Il permet d'établir les corrélations entre protons ¹H-¹³C (**Fig II.14**) à longue distance à travers les liaisons. On observe sur le spectre des taches de corrélation entre les atomes de carbone et les protons distants de 2 ou 3 liaisons.

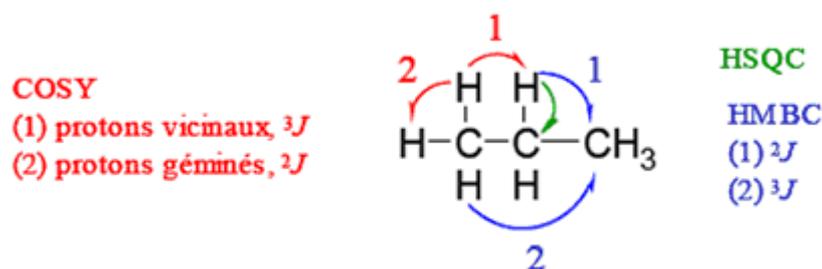


Figure II.13: Principes des techniques de RMN à deux dimensions

- Spectre **NOESY** ($2D\ ^1H-^1H$): Il indique les couplages $^1H-^1H$ à travers l'espace.
- Spectre **ROESY** ($2D\ ^1H-^1H$): Ce type d'expérience permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches. Les corrélations peuvent être d'origine intra- ou extra-résidu.

Les spectres NOESY et ROESY sont spécialement intéressants pour la détermination de distances interatomiques

- ✓ L'élucidation structurale nécessite l'analyse conjuguée de ces différents spectres. Les corrélations COSY permettent dans un premier temps de déterminer l'enchaînement des CH, CH₂, et CH₃ et d'élaborer des motifs de structure. Ceux-ci seront ensuite connectés grâce aux corrélations HMBC mettant en évidence les carbones quaternaires. Enfin, les corrélations NOESY permettent de déterminer la disposition spatiale des protons et d'établir la configuration relative de la molécule.

Références bibliographiques

- [1]-Harborne J.B, Williams C.A, Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* ,**2000**; 55, pp 481-504.
- [2]-Bruneton J, Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. *Edition médicales internationales*, **2009**; p 1292.
- [3]-Iwashina T, The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, **2000**; 113, pp 287-299.
- [4]-Vogt T, Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, **2009**; 3, pp 2-20.
- [5]-Dixon R.A, Steele C.L, Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, **1999**; 4, pp 394-400.
- [6]-Winkel-Shirley B, Flavonoid biosynthesis, a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **2001**; 126, pp 485-493.
- [7]-Fowler Z.L, Koffas M.A.G, Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2009**; 83, pp 799-808.
- [8]-Lapcik O, Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule?*Phytochemistry*, **2007**; 68, pp 2909-2916.
- [9]-Reynaud J, Guilet D, Terreux R. M,Lussignol and Walchshofer N. Isoflavonoids in nonleguminous families: an update. *Natural Products Reports*, **2005**; 22, pp 504-515.
- [10]-Veitch N.C, Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, **2006**; 24, pp 417-464.
- [11]-Akashi T, Aoki T, Ayabe S.I, Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydrase. Involvement of carboxyesterase-like proteins in Leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiology*, **2005**; 137, pp 882-891.
- [12]-Tian L, Pang Y, Dixon R.A, Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, **2008**; 7, pp 445-465.

- [13]-Heide L, Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**; 13, pp 171-179.
- [14]-Burrows M, The Neurobiology of an Insect Brain. Oxford. *University Press, Oxford, UK*, **1996**; 682.
- [15]-Yazaki K, Sasaki K, Tsurumaru Y, Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, **2009**; 70, pp 1739-1745.
- [16]-Sasaki K, Mito K, Ohara K, Yamamoto H, Yazaki K. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiology*, **2008**; 146, pp 1075-1084.
- [17]-Ikan R, Department of organic chemistry. Hebrew University, Jerusalem. Academic Press. *Natural products*, **1991**.
- [18]-Harborne J.B, Flavonoids in phytochemistry, Edition Lawrence, P.L, *Litton Educational Publishing*, **1975**; 2.
- [19]-Heller W, Forkmann G, In the flavonoids advances in research since 1980, Harborne J.B, *Chapman & Hall* ,**1988** ; pp 399-425.
- [20]-Deluca V, Ibrahim R. K, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1985**; p 606.
- [21]-Iinuma M, Mizuno M, *Phytochemistry*, **1989** ; 28, p 681.
- [22]-Kochs G, Grisebach H , *Journal of Biochem*, **1986**; 155, p 311.
- [23]-Ebel J, Hahlbrock K, In the flavonoids advances in research , Harborne J. B, Mabry T. J, *Chapman and Hall, Agricultural and Biological Chemistry*, **1982** ; pp 641-659.
- [24]-Khouri H.E, Tahara S, Ibrahim R.K, *Journal of Chromatography*, **1988**; 487, p 291.
- [25]-Tahara S, Hashidoko Y, Ingham, J.L, Mizutani J, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1986** ; 50, p1899.
- [26]-Mizuno M, Tanaka T, Tamura K.I , Matsuura N, Iinuma M, Phengklai C, *Phytochemistry* ,**1990** ; 29, pp 2663-2665.
- [27]-Harbone J.B, and Williams C.A, In the flavonoids advances in research since 1986. Harborne J.B , *Chapman & Hall*, **1988**; p 303.
- [28]-Heller W, and Forkmann G, In the flavonoids advances in research since 1986. Harborne J.B, *Chapman & Hall*, **1993**; pp 499-535.
- [29]-Brunneton J, Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, *Technique et Documentation* ,**1999** ; pp 310-353.

- [30]-Chopin J, Actualité de phytochimie fondamentale, Edition Masson, Paris .1966 ; p119.
- [31]-Narayana K.R, Reddy M.S, Chaluvadi M.R, Krishina D.R , Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 2001; 33, pp 2-16.
- [32]-Seyoum A, Asres K, El-Fiky, F.K, Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistr*, 2006; 67, pp 2058-2070.
- [33]-Middleton E, Kandaswami C, Theoharidies T.C, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews* ,2000 ; 52, pp 673- 751.
- [34]-Igor Passi L.B, Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo des Lam.(Rutaceae)*. Thèse Pharmacie, Bamako, 2002; p 133.
- [35]-Van Acker S.A.B.E, Van Den Berg D.j ,Tromp M.N.J.L, Griffioen D. H, Van Bennekom W.P, Van Der Vijgh W.J.F, Bast A, Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; 20 (3), pp 331-342.
- [36]-Sroka Z, Naturforsch Z, Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics , 2005; 60 (11-12), pp 833-843.
- [37]-Aliaga C, Lissi A. E, Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry*, 2004; 82, pp 1668-1673.
- [38]-Heim K.E, Tagliaferr A.R, Bobilya D.J, Flavonoid antioxidants:chemistry,metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; 13 (10), pp 572-584.
- [39]-Ribereau-Gayou J.B, The phenolic compounds of vegetals, Edition *Dundo, Paris*, 1968.
- [40]-Markham K.R, Technique of flavonoides identification, *Academic press, London*. 1982.
- [41]-Mabry T.J, Markham K.R, Thomas, M.B, The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag , Heidelberg*, 1970; p 254.
- [42]-Harborne J.B. In «Comparative Phytochemistry» (Goodwin, T.W.ed), *Academic Press London*, 1966; 59.
- [43]-Mompon B, Lemaire B, Mengal P, Surbled, In Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle, Polyphenols, *Bordeaux*, 1996.

- [44]-Saidman E , Yurquina A, Rudyk R, Molina M. A.A,Ferretti F. H, A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **2002**; 585, pp 1-13.
- [45]-Berthillier A, La chromatographie et ses applications», *Dunod paris* .**1972**.
- [46]-Harborne J.B, Williams C.A, Advances in flavonoid research since 1992.*Phytochemistry*, **2000**; **55** (6), pp 481-504.
- [47]-Kong J.M, Chia L.S, Goh N.K, Chia T.F, Brouillard R,Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **2003**; 64 (5), pp 923-933.
- [48]-Markham K, Techniques of flavonoid identification. *Academic Press*, **1982**; pp 36-93.
- [49]-Audier H. Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse, **1966**.
- [50]-Nielsen J.G, Moller J, *Acta Chemica Scandinavica*, **1970** ; 24, p 2665.
- [51]-Hvattum E, Ekeberg D,Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**; 38, pp 43-49.
- [52]-Stobiecki M, Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, **2000**; 54, pp 237-256.
- [53]-Lee J.S, Kim D.H, Liu K.H, Oh T.K, Lee C.H, Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS/. *library. Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2005**; 19, pp 3539-3548.
- [54]-Ye M,Yan Y, Guo D.A, Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2005**; 19, pp 1469-1484.
- [55]-Zhou D.y, Xu Q, Xue X.y, Zhang F.f, Liang X.m, Identification of Odiglycosyl flavanones in Fructus aurantii by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**; 42, pp 441-448.
- [56]-Markham K.R, Geiger H, The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, *Chapman & Hall*, **1993**.
- [57]-Wilson R.G, Bowie J.H, Williams D.H. *Tetrahedron*, **1986**; 24, p 1407.

[58]-Rodriguez E, Carman N.J, Mabry T.J, *Phytochemistry*, **1972**; **11**, p 409.

[59]-Markham K.R, Flavones, flavonols and their glycosides, In *Methods in Plant biochemistry*, P.M. Dey and Harborne J.B. *Academic Press* , **1989** ;pp 197-262.

[60]-Markham K.R, ¹³C NMR of flavonoides-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, **1976**; 32, pp 2607-2612.

Chapitre III

*ETUDE CHIMIQUE DE DEUX
ESPECES*

CHAPITRE III. ETUDE CHIMIQUE DE DEUX ESPECES DE *GENISTA*

III.1. Etude bibliographique

La recherche bibliographique que nous avons menée sur les deux espèces du genre *Genista*: *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby, a montré que ces deux plantes n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique auparavant.

III.2. Choix du matériel végétal

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

La rareté de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et l'endémisme de l'espèce *G. quadriflora* Munby. Ainsi que notre intérêt prononcé au genre *Genista* qui a la capacité d'accumuler des molécules à activité biologique potentielle, notamment les isoflavonoïdes.

III.3. Place dans la systématique

La classification botanique synthétisée de ces plantes est représentée dans le tableau III.1

Tableau III.1: classification botanique des deux espèces étudiées

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Tribu	Genisteae
Genre	<i>Genista</i>
Espèce 1	<i>G. aspalathoides</i> Lamk. ssp. <i>erinaceoides</i> (Lois.)
Espèce 2	<i>G. quadriflora</i> Munby

III.4. Description botanique

- *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.)

C'est un petit arbrisseau, de 10 à 50 cm. à tiges très rameuses, tortueuses, et dont les rameaux portent des renflements sur les côtés, leur ensemble forme un buisson serré et épineux. On le trouve dans les fentes des rochers et sur les coteaux, les fleurs jaunes

stigmate unilatéral forment une lame sur la face ^[1]. On reconnaît cette espèce aux caractères suivants ^[2]: Les feuilles sont entières, c'est-à-dire réduites à une seule foliole, sans pétiole et sans stipules, relativement petites, étroites et poilues. Les fleurs sont isolées ou groupées par 2 à 4 ; l'étendard est à peu près de la même longueur que la carène, il est couvert de petits poils et la carène est velue. Le fruit mûr, d'environ 10 à 15 millimètres de longueur sur 3 à 4 de largeur, est brun et couvert de petits poils. (Assez souvent, les fleurs sont très poilues et à étamines libres, ce qui est dû à un parasite).

• ***Genista quadriflora* Munby**

Le genêt à quatre fleurs est une espèce endémique algéro-marocaine (c'est-à-dire son aire de répartition est départagée entre le Maroc et l'Algérie). Pour notre pays cette espèce est rare, (Sensu Quézel et Santa). ^{[1], [3]} C'est une plante annuelle, arbrisseaux à rameaux dressés, éphédroides. Feuilles très vite caduques. Inflorescences 3 à 5 flores. Calice brièvement pubescent. Feuilles réduites à de simples écailles. Rameaux courts, raides et forts. Gousses dispermes de 10 à 12 mm, pubescentes. Fleurs jaunes. ^[1]

III.5. Répartition géographique

• ***G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.)**

Elle est commune à la région sud est Algérien, les figures III.1 ; III.2 et III.3 représentent des photos de cette plante.



Figure III.1 : Photo les tiges de *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois)



Figure III.2 : Photo les fleurs de *G. aspalathoides* Lamk



Figure III.3 : Photo petit arbrisseau de *G. aspalathoides* Lamk

• *Genista quadriflora* Munby

Elle est commune à l'Algérie et au Maroc, la figure III.4 montre la photo de cette espèce.



Figure III.4 : Photo de *Genista quadriflora* Munby

III.6. Screening Chimique des deux plantes

L'étude préliminaire effectuée sur les parties aériennes de ces plantes afin de déterminer les différentes substances chimiques est basée sur la méthode de colorimétrie. ^[4] Des alcaloïdes, des flavonoïdes, des hétérosides cardiotoniques et cyanogénétiques, des quinones, des saponines, des stéroïdes, des tanins et des terpénoïdes ont été testé sur ces deux espèces.

III.6.1. Recherche des alcaloïdes ^[5]

Mode opératoire

- *On dissout 5g de poudre végétal dans 25ml d'acide sulfurique dilué à 10% dans un Erlen Meyer.
- *laissé macérer pendant 24 heures ;
- * filtré et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 25ml du filtrat ;
- *introduire 1ml du filtrat dans un tube à essai ;
- * ajouter 3 gouttes du réactif de Dragen Dorff.

Caractérisation

Réaction de précipitation : l'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes.

III-6-2 Recherche des coumarines ^[6]

Mode opératoire

- * Mettre 1g de poudre végétale dans un Erlen Meyer;
- *Ajouter 20ml de l'éther di éthylique à la poudre avec agitation ;
- * Laissé macérer pendant 24heures ;
- *Filtré et complété le filtrat jusqu'à 20ml ;
- * Évaporé l'extrait éthéré à l'air libre jusqu'à 5ml ;
- *Reprendre avec 2ml de l'eau chaude;
- * Partager la solution entre deux tubes à essai;
- *Ajouter au contenu de l'un des tubes de l'ammoniaque à 25% ;
mélanger et observer la fluorescence sous UV à 366nm.

Caractérisation

Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

III.6.3. Recherche des triterpènes, stérols et terpènes

Mode opératoire

- *Laissé macérer 5g de matière végétale dans 50ml de Solution de méthanol/eau (v/v 80:20) pendant 24heures puis filtré ;
- *Evaporé l'extrait hydro alcoolique à sec;
- *Ajouté 20ml de l'éther di éthylique après refroidissement afin de dissoudre les composés apolaires.

III.6.3.1. Identification des terpènes et stérols ^[7]

La phase étherée obtenue est évaporée à sec, puis reprise par 15 ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est divisés en 3 parties:

- *La première partie: laissée comme témoin
- *La deuxième partie: à cette solution on a rajouté 3ml d'anhydre acétique et 3gouttes d'acide sulfurique concentré.

Caractérisation

Un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés, cette couleur devenue verte foncée montre la présence des terpènes

- *La troisième partie: à cette partie on rajoute quelques gouttes d'acide sulfurique.

Caractérisation

L'apparition d'une couleur rouge cerise montre la présence des stérols insaturés.

III.6.3.2. Identification des triterpènes ^[8]

Un volume de 10 ml d'extrait hydro alcoolique est évaporé à sec, le résidu obtenu est dissous dans 0,5ml d'anhydre acétique et 0,5ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec avec une pipette pasteur on rajoute (1 à 2 ml) d'acide sulfurique concentré au fond du tube.

Caractérisation

Au contact des deux phases organiques la formation d'un anneau marron montre la présence des triterpènes.

III.6.4. Recherche des substances poly phénoliques (tanins)

Mode opératoire

5g de matière végétale sont infusés dans 50ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes.

III.6.4.1. Tanins catéchiques ^[9]

Nous avons prélevé 2ml de l'infusé et mis dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%).

Caractérisation

L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques.

III.6.4.2. Tanins galliques ^[8]

Prélever 2ml de l'infusé précédent et les mettre dans un tube à essai, saturé en acétate de sodium puis rajouter quelques gouttes de chlorure ferrique à (1%).

Caractérisation

La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

III.6.5. Recherche des flavonoïdes et des leuco anthocyanes ^[10]

Mode opératoire

- *Mettre 5g de matière végétale à infuser dans 50ml d'eau distillée pendant quelques minutes;
- *Après filtration on introduit 6ml du filtrat dans 3 tubes, chacun contient 2ml on ajoute dans:
 - **1er tube: 1ml de NaOH;
 - **2ème tube: 1 ml d'eau distillée ;
 - **3ème tube: 1ml de HCl concentré et des copeaux de magnésium.

Caractérisation

En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées. La coloration rouge au 3eme tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

III.6.6. Recherche des saponines ^[11]

Mode opératoire

- *mettre dans un Erlen Mayer une quantité de l'infusé utilisé dans la recherche des flavonoïdes;
- *agité pendant quelques minutes.

Caractérisation

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

III.6.7. Recherche des anthocyanes ^[12]

Mode opératoire

- *laissé macérer 5g de matière végétale dans 50ml d'eau distillée bouillante pendant 15mn;
- *filtré et complété avec l'eau jusqu'à 50ml;
- *prendre et y ajouter 5ml d'acide sulfurique dilué à 10% et 5ml d'ammoniaque à 10%.

Caractérisation

La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

III.6.8. Recherche des quinones ^[13]

Mode opératoire

- *Humecter 5g de matière végétale par quelques gouttes de HCl ;
- *Mettre cette matière en macération dans un Erlen contenant 10ml d'éther de pétrole pendant 24 heures ;
- *Filtrer et prendre 2ml du filtrat dans un tube à essai ;
- *Ajouter 2ml de NaOH 10% au filtrat.

Caractérisation

La coloration rouge –violet indique la présence des quinones.

III.7. Extraction de deux espèces *Genista*

III.7.1. Extraction de *Genista aspalathoides* Lamk

La quantité de matériel végétal obtenue (2700g) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 72 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite et 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. On rajoute à cette solution concentrée et sous agitation magnétique 800 ml d'eau distillée. Puis on la laisse reposer pendant une nuit. Après filtration la solution aqueuse obtenue subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante à commencer par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On obtient **0,5g** d'extrait pour la phase éther de pétrole. **4g** d'extrait pour la phase chloroforme, **14g** d'extrait pour la phase acétate d'éthyle. **80 g** d'extrait *n*-butanol.

La Figure III.5 représente l'Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk.

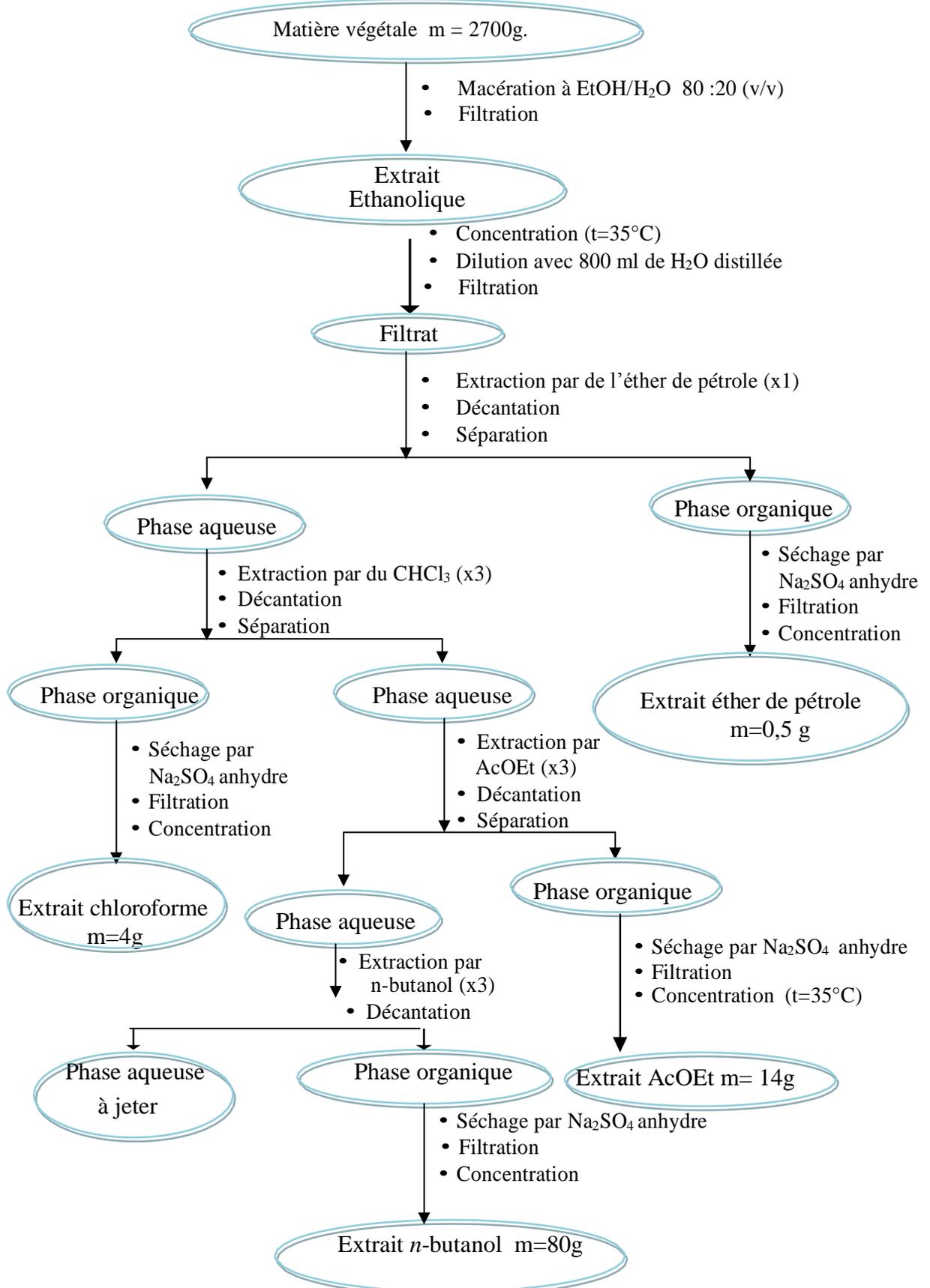


Figure III.5: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk.

III.7.2. Séparation chromatographique

III.7.2.1. Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'éthyle

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle (7:3).

➤ Séparation sur colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Une masse d'environ 13 g d'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système Ether de pétrole / Acétate d'éthyle en commençant par l'éther de pétrole pur et en terminant par l'acétate d'éthyle pur avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

Les résultats de La progression de cette colonne sont rassemblés dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. aspalathoides* Lamk

Lot de Fraction	N° de la Fraction	Système d'éluion	
		%Ether de pétrole	%Acétate d'éthyle
1-34	1	100	0
35-42	2	98	2
43-59	3	96	4
60-66	4	94	6
67-74	5	92	8
75- 79	6	90	10
80- 90	7	90	10
91 -99	8	85	15
100- 106	9	85	15
107- 112	10	80	20
113- 124	11	80	20
125- 139	12	80	20
140- 153	13	80	20
154- 163	14	75	25
164- 172	15	75	25
173- 180	16	70	30
181- 194	17	70	30
195- 202	18	70	30
203- 213	19	70	30
214- 219	20	60	40
220- 229	21	60	40
230- 242	22	60	40
243- 250	23	55	45
251- 260	24	55	45
261 -273	25	55	45
274- 281	26	50	50
282- 289	27	50	50
290- 300	28	50	50
301- 305	29	50	50
306- 318	30	45	55
319- 331	31	45	55
332 -337	32	45	55
338- 346	33	45	55
347- 351	34	40	60
352- 357	35	40	60
358- 366	36	25	75
367- 372	37	25	75
373- 378	38	25	75
379- 391	39	25	75
392- 405	40	15	85
406- 411	41	15	85
412- 417	42	15	85
418- 422	43	15	85
423- 429	44	5	95
430- 437	45	5	95
438- 445	46	5	95
446- 453	47	5	95
454- 461	48	0	100
462- 470	49	0	100
471- 481	50	0	100

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont testées dans le système chloroforme / MeOH avec différentes proportions. Ces tests nous ont permis de réaliser un second regroupement qui est présenté dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. aspalathoides* Lamk.

N° de la Fraction	Nom de la Fraction	Masse	Observations
1	AG1	077.9	Graisses et cires
2	AG2	044.5	Graisses et cires
3	AG3	130.3	Mélange complexe
4	AG4	108.3	Mélange complexe
5	AG5	112.6	Mélange complexe
6-7	AG6	256.3	Mélange complexe
8-9	AG7	1522,2	Mélange complexe
10- 13	AG8	320,0	Mélange séparable
14 -15	AG9	397.7	Mélange séparable
16 -19	AG10	316.1	Mélange séparable
20 -22	AG11	285.4	Mélange séparable
23- 25	AG12	587,2	Mélange complexe
26- 29	AG13	922,1	Mélange complexe
30- 33	AG14	254 .1	Mélange séparable
34 -39	AG15	820,0	Mélange séparable+Produit majoritaire
40 -43	AG16	205,5	Mélange complexe
44- 47	AG17	731.4	Mélange séparable
48 -50	AG18	5485,6	Mélange complexe

Parmi les 18 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions AG8, AG9, AG10, AG11, AG14, AG15et AG17 à cause de leur simplicité et leur poids relativement important.

➤ **Séparation et purification sur couche mince**

*** Fraction AG9**

La fraction AG9 de masse 397.7 mg a été séparée sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (70:30) pour donner un précipité de couleur blanche et monotâche sous U-V qu'on nomme **G 1** \equiv **143 mg**

*** Fraction AG10**

Une quantité (316.1 mg) de cette fraction, a été séparée sur plaques préparatives de gel de silice, éluées par le système d'éluion chloroforme/méthanol (90:10) après la 2^{ème} élution, nous avons obtenu deux produits à l'état pur.

G 2 \equiv **76.51 mg** précipité de couleur jaune qui s'avère un mélange.

G 3 \equiv **71.24 mg** produit monotâche de couleur jaune.

*** Fraction AG11**

Après regroupement, la fraction 285 mg résultante a subi une recristallisation dans un mélange de chloroforme et un peu de méthanol. Les cristaux Jaune obtenus sont lavés plusieurs fois avec du méthanol, pour donner un produit **G4** de masse 110 mg et le produit **G5** \equiv 42 mg produit monotâche de couleur jaune a été séparé sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (70:30).

*** Fraction AG14**

L'étude de la fraction AG14 de masse (254.1 mg) sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système Acétate d'éthyle / Ether de pétrole (70:30) a permis d'isoler un produit pur **G 6** \equiv **143 mg** produit sous forme de précipité de couleur blanche .

*** Fraction AG15**

L'ensemble de ces six fractions 820 mg a donné un produit majoritaire par une simple recristallisation avec méthanol, c'est le produit **G 7** \equiv **730 mg** sous forme d'un précipité blanc.

*** Fraction AG17** Poids 731.4 mg

La séparation a été faite sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant chloroforme/méthanol (9:1) pour donner : précipité blanc **G8** \equiv **82 mg**.

➤ En conclusion, nous pouvons dire que l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois) est très riche en métabolites secondaires ce qui rend la séparation délicate.

III.7.2.2. Séparation et purification des composants de l'extrait Chloroforme

➤ **Séparation sur colonne** : Une masse d'environ **3.5 g** de l'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système **Ether de pétrole / Acétate d'éthyle** avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.4

Tableau III.4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *G. aspalathoides Lamk.*

Lot de Fraction	N° de la Fraction	Système d'élution	
		%Ether de pétrole	%Acétate d'éthyle
1-10	1	100	0
11-19	2	100	0
20-29	3	100	0
30-40	4	100	0
41-50	5	98	2
51- 56	6	98	2
57- 63	7	98	2
64 -69	8	95	5
70- 77	9	95	5
78- 89	10	95	5
90- 92	11	95	5
93- 99	12	95	5
100- 105	13	90	10
106- 111	14	90	10
112- 118	15	90	10
119- 129	16	90	10
130- 137	17	90	10
138- 144	18	85	15
145- 153	19	85	15
154- 163	20	85	15
164-173	21	80	20
174- 182	22	80	20
183- 194	23	80	20
195- 204	24	75	25
205 -211	25	75	25
212- 221	26	75	25
222- 233	27	70	30
234- 241	28	70	30
242- 247	29	70	30
248- 256	30	60	40
257- 266	31	60	40
267 -289	32	60	40
290- 299	33	50	50
300- 314	34	50	50
315- 327	35	40	60
328- 335	36	40	60
336- 347	37	30	70
348- 356	38	30	70
357- 369	39	20	80
370- 383	40	20	80
384- 394	41	10	90
395- 401	42	10	90
402- 410	43	0	100
411- 430	44	0	100

Les pots de même composition sont rassemblés, on obtient 15 fractions (voir tableau III.5).

Tableau III.5 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Chloroforme de *G. aspalathoides* Lamk.

N° de la Fraction	Nom de la Fraction	Masse (mg)	Observations
1-4	OK1	064,7	Graisses et cires
5-7	OK2	164,4	Mélange complexe
8-12	OK3	180,6	Mélange complexe
13-17	OK4	241,2	Mélange complexe
18-20	OK5	118,0	Mélange séparable
21-23	OK6	035,0	Mélange séparable
24-26	OK7	070,0	Mélange séparable
27- 29	OK8	120,0	Mélange séparable
30 -32	OK9	304,7	Mélange complexe
33- 34	OK10	238,8	Mélange complexe
35- 36	OK11	289,4	Mélange complexe
37-38	OK12	258,5	Mélange complexe
39-40	OK13	110,0	Mélange séparable
41- 42	OK14	293,1	Trainée
43-44	OK15	747,7	Trainée

➤ Séparation sur couche mince

Pour des raisons de poids, seules les fractions OK5, OK6, OK7, OK8 et OK13 ont été traitées.

*** Fraction OK5**

La fraction OK5 (118mg) a été recristallisée dans le chloroforme additionné progressivement du méthanol. Après filtration, séchage lent (à l'air libre), des cristaux sous forme d'aiguilles de couleur jaune se sont formés. Ils sont purifiés par lavages successifs à l'aide du méthanol ensuite séchés puis pesés on obtient le produit **K 1** (71 mg). Dissout dans l'acétate d'éthyle ce produit est déposé sur une plaque analytique de gel de silice, éluée par le système *n*-Hexane :

AcOEt 7:3, on constate une monotâche sous lumière UV (254 nm) qui devient violet après révélation par l'acide sulfurique.

*** Fraction OK6**

La fraction OK6 (35 mg) a subi une séparation sur plaques préparatoires de gel de silice avec le système éluant chloroforme/méthanol (90:10) pour donner un produit de couleur jaune sous lumière de Wood qu'on nomme **K 2 (17 mg)**.

*** Fraction OK7**

Nous avons utilisé 10 plaques préparatives de gel de silice HF éluées dans le système chloroforme/méthanol (90:10) afin de purifier cette fraction de 70 mg. Nous avons pu isoler le produit **K 3 (48 mg)** de couleur jaune sous lumière de Wood.

*** Fraction OK8**

Cette fraction de 120 mg a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant chloroforme/méthanol (9.5:0.5) Pour donner le produit **K4 (53mg)**.

*** Fraction OK13**

Les 110 mg de cette fraction ont subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant chloroforme/méthanol (90:10). Nous avons procédé à deux éluations successives afin d'obtenir deux produits jaunes à l'état pur qui sont le **K 5 (57 mg)** et le **K 6 (21 mg)**.

La purification de l'extrait Chloroforme de *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois) a conduit à l'isolement de 06 produits.

➤ **CONCLUSION**

L'étude phytochimique de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois) a permis l'obtention de 14 produits à l'état purs de sa composante apolaire et semi-polaire.

La figure III.6 représente les étapes suivies pour la séparation et la purification des extraits acétate d'éthyle et chloroforme de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois).

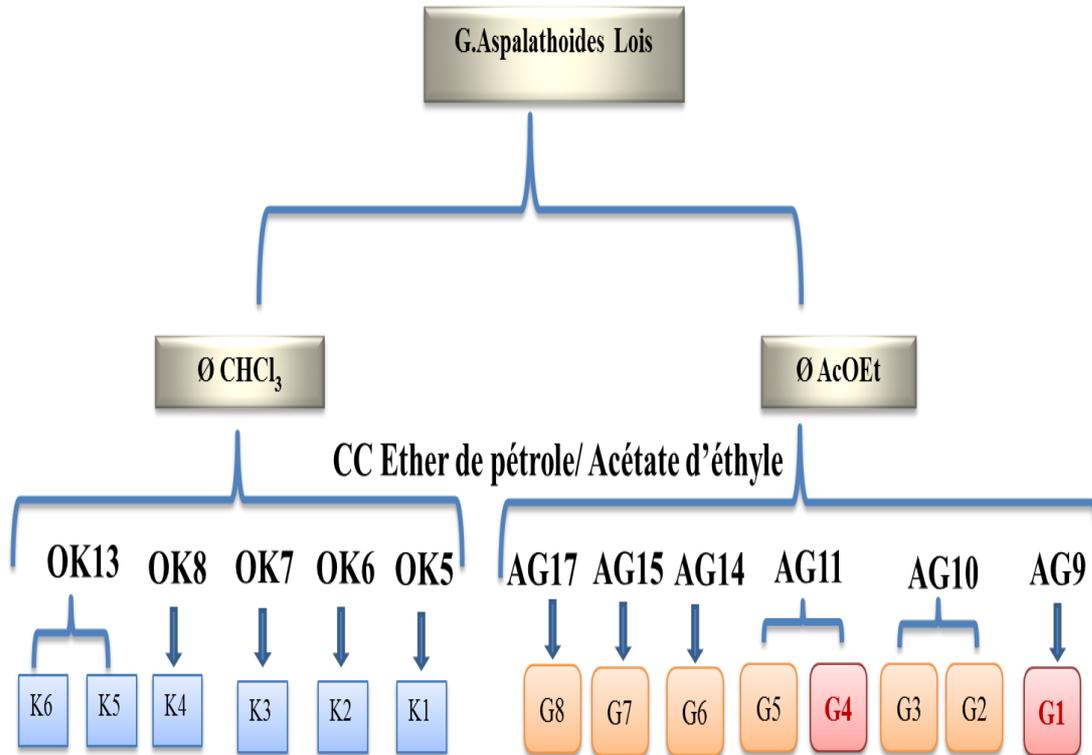


Figure III.6 : Étapes de la séparation de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk

III.7.3. Extraction de *Genista quadriflora* Munby

Une masse de 1130 g de la plante sèche est mise à macérer dans un mélange MeOH / H₂O (80/20;v/v) pendant 72 heures. Nous utilisons le même procédé d'extraction que pour la première plante (*G. aspathaloides*).

La figure III.7 représente toutes les étapes suivies pour l'extraction de cette espèce.

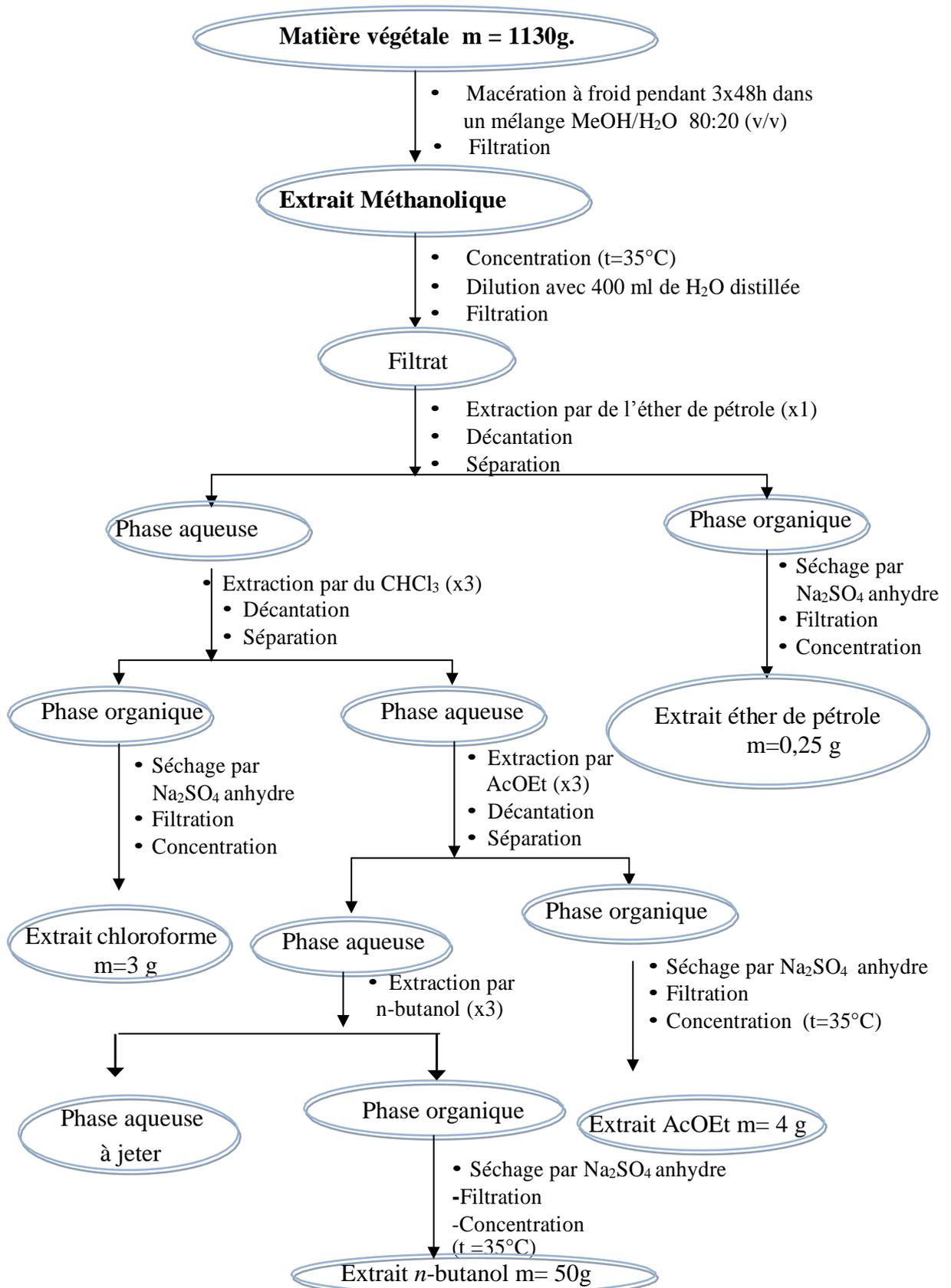


Figure III.7: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce *G. quadriiflora* Munby

III.7.4. Séparation chromatographique

III.7.4.1. Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'éthyle : L'extrait acétate d'éthyle a été testé avec plusieurs systèmes de solvant l'éluant choisi est le système chloroforme/méthanol (9:1).

➤ **Séparation sur colonne :** Une masse d'environ 4 g d'extrait acétate d'éthyle, dissoute dans le méthanol, est mélangée 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 et éluee par un gradient de polarité du système chloroforme / méthanol avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.6.

Tableau III.6: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. quadriflora* Munby

N° de Lot	Système d'élution		N° de la Fraction	Nom de la Fraction	Masse (mg)
	% Chloroforme	% Méthanol			
1 - 17	100	0	F1 -F4	A1	074,9
18- 60	99,8	0,2	F5 -F9	A2	171,6
61-89	99,6	0,4	F10-F12	A3	198,1
90-106	99,4	0,6	F13 -F17	A4	272,2
107- 123	99,2	0,8	F18- F19	A5	766,0
124 -157	99	1	F20- F24	A6	234,1
158- 184	98,5	1,5	F25-F27	A7	138,2
185 -199	98	2	F28-F29	A8	074,0
200 -245	95	5	F30-F33	A9	083,1
246 -283	90	10	F34-F38	A10	177,2
284 -304	80	20	F39-F40	A11	103,6
305 -330	70	30	F41-43	A12	428,4
331 -353	60	40	F44-F46	A13	063,4
354 -382	50	50	F47- F52	A14	100,3
383 -399	30	70	F53 -F55	A15	237,7
400	0	100	F56- F58	A16	464,6

Le regroupement de ces fractions a été fait sur la base des données de la chromatographie sur couche mince avec des systèmes adéquats. Le tableau III.7 résume les résultats de cette opération.

Tableau III.7 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. quadriflora* Munby

Nom de la Fraction	Observations
A1	Graisses et cires
A2	Mélange complexe
A3	Mélange complexe
A4	Mélange séparable
A5	Mélange complexe
A6	Mélange complexe
A7	Mélange séparable
A8	Mélange complexe
A9	Mélange complexe
A10	Mélange complexe
A11	Mélange séparable
A12	Mélange complexe
A13	Mélange complexe
A14	Trainée
A15	Trainée
A16	Trainée

Parmi les 16 fractions obtenues on a procédé à la séparation des fractions A4, A7, A11 à cause, soit de leurs simplicités soit de leurs poids relativement importants.

***Fraction A4** Poids 272.2 mg /10 plaques préparatives / gel HF

La purification des composés de cette fraction a débuté par une chromatographie sur plaques préparatives de gel silice éluée par le système Hexane /Acétate d'éthyle :

3/ 7. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III.8

Tableau III.8: Résultats de la Chromatographie sur couche mince de la fraction A4

<i>Bandes</i>	<i>Composés</i>	<i>Poids</i>	<i>Observations</i>
1 ^{ère}	A4-1	106mg	Précipite Jaune
2 ^{ème}	A4-2	56mg	Produit propre de couleur Marron

* **Fraction A7:** Poids 138.2mg /10 plaques préparatives / gel HF

Avec le même système d'éluion : Hexane /Acétate d'éthyle (3:7), nous avons procédé à une séparation sur plaques préparatives de gel silice. Le tableau III.9 montre le résultat de la séparation :

Tableau III.9 : Résultats de la Chromatographie sur couche mince de la fraction A7

<i>Bandes</i>	<i>Composés</i>	<i>Poids</i>	<i>Observations</i>
1 ^{ère}	A7-1	87mg	Produit sous forme de précipité de couleur Marron

* **Fraction A11 :** Poids 103.6 mg /15 plaques préparatives / gel HF

Cette fraction a subi une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice éluée par le système Hexane / Acétate d'éthyle ; 3/7, les résultats découlant de cette purification sont regroupés dans le tableau III.10

Tableau III.10 : Résultats de la Chromatographie sur couche mince de la fraction A11

<i>Bandes</i>	<i>composés</i>	<i>Poids</i>	<i>Observations</i>
1 ^{ère}	A11-1	60 mg	Produit majoritaire Précipite blanc
2 ^{ème}	A11-2	47.2 mg	précipité de couleur Marron

L'étude chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. quadriflora* Munby a permis l'isolement de cinq produits à l'état pur. Mais la détermination structurale de ces composés s'est avérée assez compliqué.

III.7.4.2 Séparation et purification des composants de l'extrait Chloroforme

L'extrait chloroforme de *G. quadriflora* Munby (3g) a été chromatographié 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 avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces 11 fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.11.

Tableau III.11: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Chloroforme de *G. quadriflora* Munby .

Lot de Fraction	Système d'élution		N° de la Fraction
	% Chloroforme	% Méthanol	
1 - 22	100	0	F1
23- 32	98	2	F2
33-42	96	4	F3
43-53	94	6	F4
54- 63	92	8	F5
64 -73	90	10	F6
74- 84	88	12	F7
85 -93	86	14	F8
94 -102	84	16	F9
103 -111	82	18	F10
112 -119	80	20	F11
120 -128	78	22	F12
129 -137	76	24	F13
138 -145	74	26	F14
146 -152	72	28	F15
153-163	70	30	F16
164-172	65	35	F17
173-180	60	40	F18
181-186	55	45	F19
187-194	50	50	F20
195-206	40	60	F21
207-215	30	70	F22
216-222	20	80	F23
223-229	10	90	F24
230-238	0	100	F25

Le regroupement des fractions a été effectué de la même façon que précédemment et a donné 11 fractions, les résultats sont regroupés dans le tableau III.12.

Tableau III.12: Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait Chloroforme de *G. quadriflora* Munby

N° de la Fraction	Nom de la Fraction	Masse mg	Observations
F1	L1	034,3	Graisses et cires
F2	L2	086,4	Mélange complexe + chlorophylle
F3	L3	109,4	Mélange séparable
F4	L4	245,2	Mélange complexe + chlorophylle
F5	L5	106,2	Mélange séparable
F6- F7	L6	176,0	Mélange de produits et de chlorophylle
F8 -F10	L7	167,0	Mélange complexe + chlorophylle
F11	L8	071,1	Trainée
F12- F15	L9	250,3	Trainée
F16- F20	L10	560,6	Mélange complexe
F21- F25	L11	890,4	Mélange complexe

➤ Remarque

Dans la majorité des fractions obtenues, la présence de la chlorophylle était prédominante par rapport aux produits existants c'est la raison pour laquelle la séparation était très délicate et on n'a pas pu aboutir à un nombre important de produits purs.

Parmi les 11 fractions obtenues on a procédé à la séparation des fractions L3 et L5.

➤ Séparation et purification sur couche mince

* **Fraction L3** Poids 109.4 mg /10 plaques préparatives / gel HF

Cette fraction est chromatographée sur plaques préparatives de gel silice éluées par le système : Acétate d'éthyle /Hexane 7:3 donnant deux produits à l'état pur les résultats sont reportés dans le tableau III .13

Tableau III.13 : Résultats de la Chromatographie sur couche mince de la fraction L3

<i>Bandes</i>	<i>Composés</i>	<i>Poids</i>	<i>Observations</i>
1 ^{ère}	L3-1	53mg	précipité de couleur Marron
2 ^{ème}	L3-2	5 mg	Produit pur en très faible quantité.

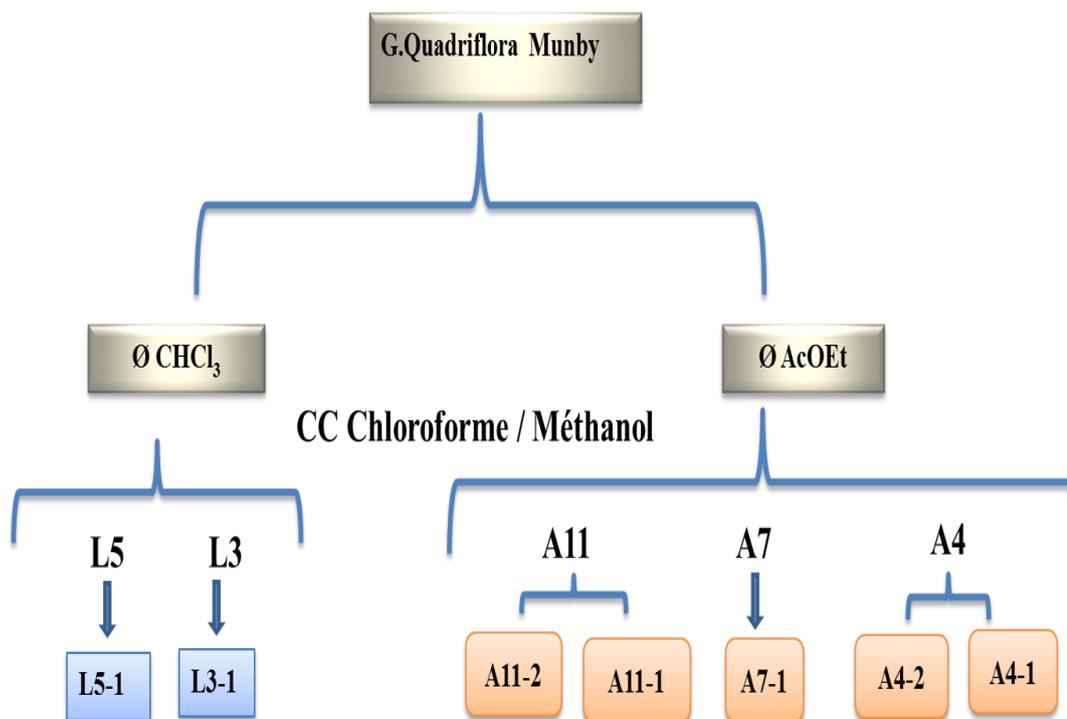
*** Fraction L5 :**

La fraction L5 (106,2 mg) soluble dans le chloroforme, cristallise dans méthanol. Nous avons procédé à une recristallisation dans ce solvant et récupéré des cristaux Jaune (L5-1) de masse 71mg.

➤ **CONCLUSION**

Cette étude portant essentiellement sur la séparation et la purification des extraits chloroforme et acétate d'éthyle de *G. quadriflora* Munby, a permis l'isolement de 7 produits à l'état pur.

La figure III.8 représente les étapes suivies pour la séparation et la purification des extraits acétate d'éthyle et chloroforme de l'espèce *G. quadriflora* Munby.

**Figure III.8** : Étapes de la séparation de l'espèce *G. quadriflora* Munby.

Références Bibliographiques

- [1]-Quezel P, Santa S Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris **1963**.
- [2]-Maire R, Quezel P, Flore de l'Afrique du Nord, Dicotyléédones. Leguminosae, part. Ed. **1987**; 16.
- [3]-Genista quadriflora Munby, *Bulletin de la Société Botanique de France*, **1855**; 2, p 283.
- [4]-N'guessan K, Kadja B, Zirih G, Traoré D, Aké-Assi L, *Science Naturel*, **2009**; 6(1), pp 1-15.
- [5]-Ladik C.M, rôle des produits secondaires (tanins et alcaloïdes des espèces forestières de l'est de Madagascar face à populations animales), **2000**, p107.
- [6]-Koudougou K, Étude de la chimie et de l'activité antimycosique des extraits de *Biophytum petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae), université de Ouagadougou-DEA, **2000** ; p16.
- [7]-Bekro Y.A, Mamyrbekova Bekro J.A, Boua B.B, Tra Bi F.H, Éhilé E.E, Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpiniaceae), *Sciences & Nature*, **2007** ; 4 (2), p 220.
- [8]-Mibindzou M.A, Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L (Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata* Aubrev. & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon, **2004** ; p 62.
- [9]-Kongo-Nzuzi Y, Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de *Candida albicans*, ISTM Kinshasa, **2009** ; p 25.
- [10]-Bouquet A, Plantes médicinales de Congo Brazzaville, Travaux et document O.R.S.T.O.M paris .**1972** ; 13, p 9.
- [11]-Lokadi L. P, Etude Chimique de l'espèce *Jacobinia Carnea*, Université de Lubumbashi **2008**.
- [12]-Dohou N, Yamini K, Tahrouch S, Idrissi Hassani L.M, Badoc A, Gmira N, Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *thymelaealythroides*, *Bulletin de la Société. Pharmacie Bordeaux*, **2003** ; p 66.
- [13]-Najjaa H, Zouari S, Arnault I, Auger J.E, Ammar R, Neffati M, Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Botanica Gallica*, **2011** ; 158(1), pp111-123.

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1 Résultats et interprétation du screening chimique

Les résultats du screening phytochimique de *G. quadriflora* Munby et *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.). Sont consignés dans les tableaux IV.1.1 et IV.1.2 respectivement.

- Réaction positive : +
- Réaction négative : -

Tableau IV.1.1 : Résultats globaux de la recherche de groupe de substances naturelles identifiées dans la plante *Genista quadriflora* Munby.

Groupes chimiques	Tiges	Fleurs
Alcaloïdes	+	+
Coumarines	+	+
Stérols	+	+
Tritèrpenes	+	+
Terpènes	+	+
Flavonoïdes	++	++
Leucoanthocyanes	-	-
Tannins	-	-
Saponines	+	+
Quinones	-	-
Anthocyanes	-	-

On constate que les métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, Stérols, triterpènes, terpènes et saponines, sont présents dans cette espèce.

Tableau IV.1.2 : Résultats globaux de la recherche de groupe de substances naturelles identifiées dans la plante *Genista aspalathoides* Lamk.

Groupes chimiques	Tiges
Alcaloïdes	+
Coumarines	-
Stérols	+
Tritèrpenes	+
Terpènes	+
Flavonoïdes	++
Leucoanthocyanes	-
Tannins	-
Saponines	+
Quinones	-
Anthocyanes	-

Sur l'ensemble de nos réactions en tubes, les alcaloïdes, stérols, triterpènes, terpènes, flavonoïdes et saponines ont donné des résultats positifs.

Conclusions : Nous avons établi un inventaire des substances naturelles et mené une évaluation des métabolites secondaires des deux espèces étudiées à partir du screening chimique. Les résultats obtenus montrent une richesse dans les groupes actifs tels que les flavonoïdes et les alcaloïdes, mais ceci reste travail préliminaire, l'important c'est d'isoler des molécules nouvelles.

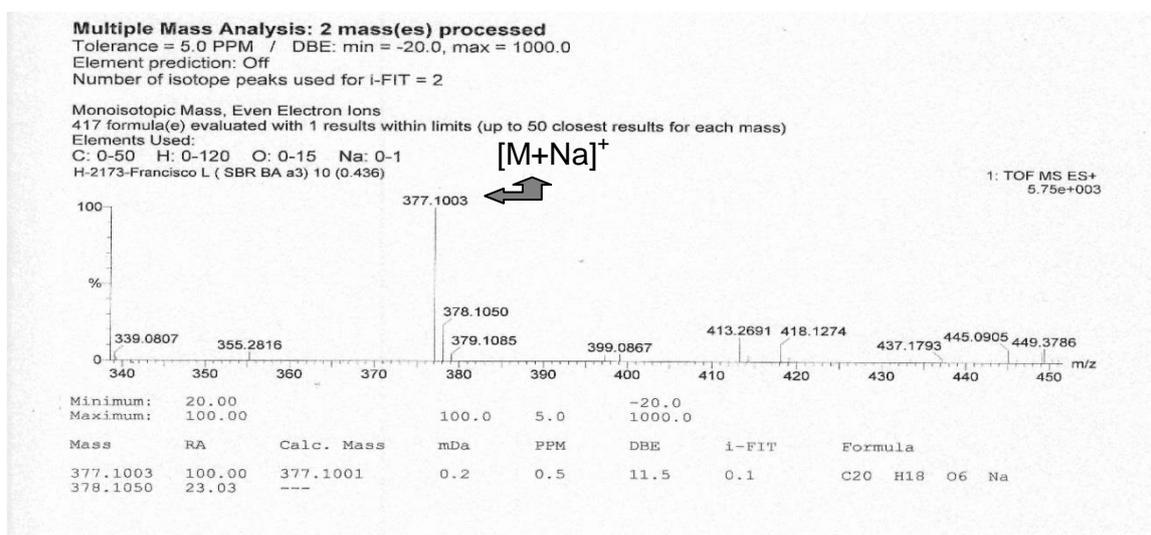
IV.2 Identification des produits isolés de *G. aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides* (Lois.)

IV.2.1 Identification des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle

Pour l'identification et l'élucidation structurales des différentes molécules isolées on a eu recours aux différentes méthodes spectrales telles que la spectroscopie d'absorption UV-Vis, la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et leurs séquences bidimensionnelles, ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution.

IV.2.1.1 Elucidation du Composé G1

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°1**) montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 377.1003$ calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$, orientant vers la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ soit une molécule comportant 12 insaturations.



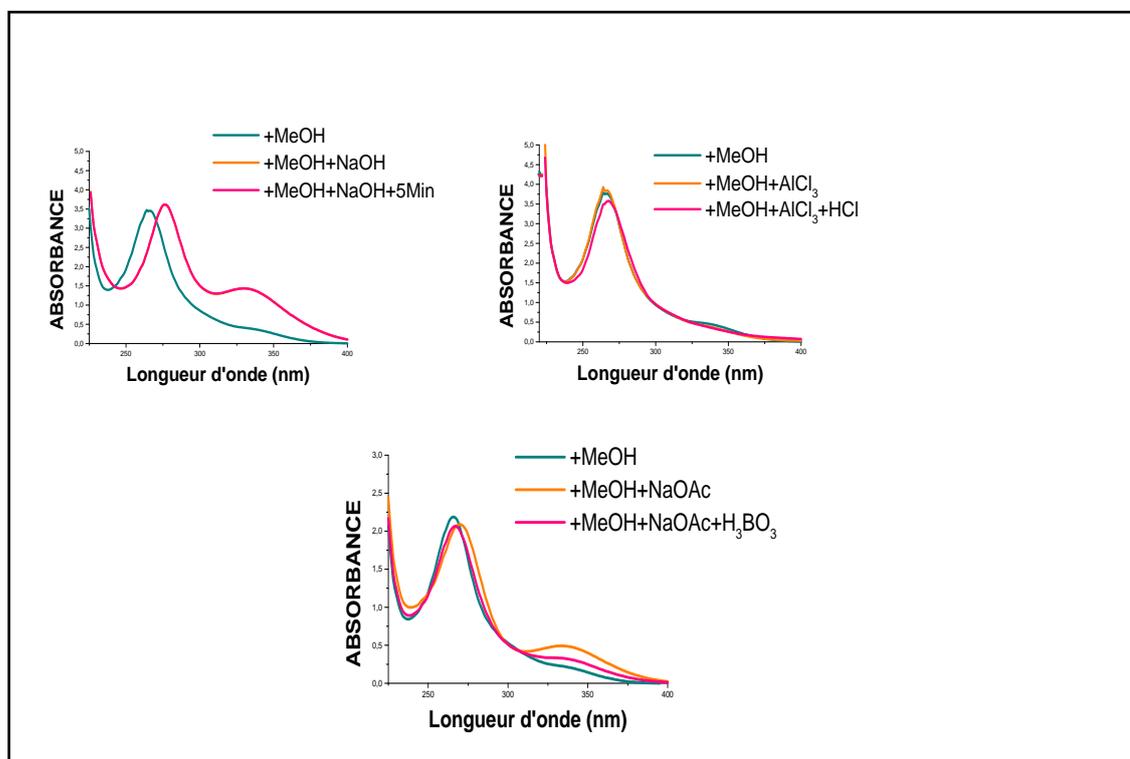
Spectre N°1: Masse en mode électrospray du composé G1

Le Spectre RMN ^{13}C (**Spectre N°2**) et ses séquences DEPT 90 et 135 (**Spectre N°3 et 4**) indiquent la présence de 20 atomes de carbones dont:

- ✓ 1 groupement CH_3 à $\delta = 17,15$ ppm.
- ✓ 7 groupements CH
- ✓ 2 CH_2 dont 1 éthylénique à $\delta = 109,99$ ppm.
- ✓ On déduit que les 10 atomes restants sont des carbones quaternaires.

Les données de la série spectrale UV (**Spectre N°5**) de ce composé enregistrée dans le MeOH montrent deux bandes d'absorption, la bande I à 333 nm est sous forme d'épaule caractéristique d'une isoflavone et la bande II est à 264 nm.

L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +7$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 7 et l'absence d'une oxygénation en C-6.



Spectre N°5: Série spectrale UV du composé G1

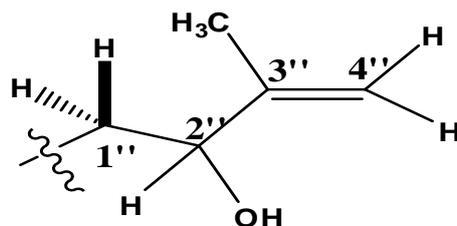
L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre N°6**) et ses spectres étalés (**Spectres N°7 et 8**) montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,29$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets ($J = 6,8$ Hz) d'intégration 2H chacun à $\delta = 7,40$ ppm et à $\delta = 6,85$ ppm sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 6,45$ ppm d'intégration 1H attribuable soit à H-6 ou H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 8 ou en position 6 et 5. Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à $\delta = 13,30$ ppm attribuable à 1 OH formant une chélation avec le carbonyle montre que cette position est hydroxylée.

Sur le même spectre, on remarque la présence de deux signaux d'intégration 1H chacun à $\delta = 4,67$ ppm et $\delta = 4,64$ ppm qui peuvent correspondre à des protons éthyléniques. Un autre signal à $\delta = 4,33$ ppm d'intégration 1H est sous forme de triplet ($J = 5,5$ Hz), deux signaux d'intégration 1H chacun sous forme de doublet de doublets ($J = 10,5$ et $5,5$ Hz) à $2,85$ ppm et $2,77$ ppm. Enfin un dernier signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta = 1,78$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthyle dans la structure. Toutes ces données laissent présager la présence d'une entité de type (2''-hydroxy-3''-methyl-3''-butenyl) dans cette molécule.



Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N°9**) et ses étalements spectraux (**Spectre N°10 et 11**) montre :

Des taches de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,40$ ppm et $\delta = 6,85$ ppm confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'. Des taches de corrélation entre les protons de l'entité (2''-hydroxy-3''-methyl-3''-butenyl) qui confirme bien la présence de ce substituant dans la molécule: H-2'' à $\delta = 4,33$ ppm, H-1'' α /H-1'' β à $\delta = 2,77$ ppm et à $\delta = 2,85$ ppm et H-5'' à $\delta = 1,78$ ppm.

Le spectre HMBC étalé (**Spectre N°12**) montre la présence de trois taches de corrélations entre le proton du OH en position 5 et les atomes de carbone à $\delta = 104,09$, $108,94$ et $159,64$ ppm correspondant à C-10, C-6 et C-5 respectivement.

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N°14**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à $\delta = 153,64$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 130,15$ ppm.

De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 115,01$ ppm.

Une tache de corrélation avec le proton à $\delta = 6,45$ ppm et le carbone à $\delta = 92,88$ ppm, qui permet l'attribution de C-8 donc la position 8 est hydrogénée, de là on peut conclure que le substituant (2"-hydroxy-3"-methyl-3"-butenyl) est placé en C-6.

Sur le même spectre, nous avons une tache de corrélation entre l'hydrogène H-4'' α /H-4'' β et l'atome de carbone à $\delta = 104,09$ ppm qui ne peut être que le C-4''. Une tache de corrélation entre H-2'' et un atome de carbone à $\delta = 73,27$ ppm qui est le C-2''. Une autre tâche de corrélation entre H-1'' α /H-1'' β et un atome de carbone à $\delta = 28,77$ ppm qui est le C-1''.

Enfin, ce même spectre permet l'attribution au carbone du méthyle, soit le signal à $\delta = 17,15$ ppm.

Les attributions des carbones restants sont complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire a longue distance HMBC (**Spectre N° 13**). Sur ce spectre nous constatons :

Une tache de corrélation entre H-2 et les atomes de carbone résonant à $\delta = 180,19$, $153,64$ et $122,14$ ppm attribuables à C-4, C-2 et C-1' respectivement. Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone oxygéné à $\delta = 155,45$ ppm qui ne peut être que le C-9.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et le carbone oxygéné à $\delta = 157,33$ ppm qui ne peut être que C-4'.

Le H-8 donne deux taches de corrélation avec deux atomes de carbone oxygénés autres que le C-5, par conséquent ce sont les carbones en C-9 et C-7, ce proton n'est d'autre que le H-8 .qui est porté par le C-8 ($\delta = 92,88$ ppm).

En effet, les deux protons H-1'' α et H-1'' β montrent sur ce spectre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 159,64$ ppm qui ne peut être que le C-5 vu la valeur de

son déplacement chimique, Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone oxygéné

($\delta = 162,70$ ppm) qui ne peut être que le C-7. Donc le substitué : (2''-hydroxy-3''-methyl-3''-butenyl) est bien placé dans la position 6.

Les données de la RMN ^1H , la COSY, la HSQC et la HMBC rassemblées avec celles de la série spectrale UV et la S.M. permettent de proposer la structure suivante :

5,7-dihydroxy-6-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one. Ce composé est connu, sous le nom de Laburnetine^[1].

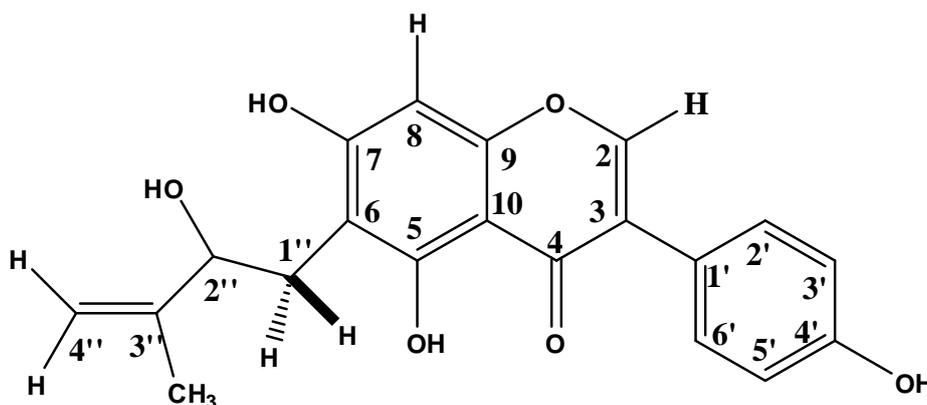


Figure IV.1: Laburnetine

Les données relatives à l'UV, la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT ainsi que la RMN 2D : HSQ C, HMBC, COSY sont regroupées dans les tableaux IV.1 ; IV.2 ; IV.3 ; IV.4 et IV.5 respectivement.

Tableau IV.1: Données de la série spectrale UV du composé G1

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	333	264		Isoflavone
+ NaOH	333	276		
+AlCl ₃	333	264		
+AlCl ₃ /HCl	333	264		
+NaOAc	337	271		OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	337	266		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.2 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G1

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
8.29	1H	s	H-2
7.40	2H	d (6.8)	H-2', H-6'
6.85	2H	d (6.8)	H-3', H-5'
6.45	1H	s	H-6
4.67	1H	s	H-4''a
4.64	1H	s	H-4''b
4.33	1H	t (5.5)	H-2''
2.85	1H	d.d (10.5-5.5)	H-1'' α
2.77	1H	d.d (10.5-5.5)	H-1'' β
1.78	3H	s	H-5''

Tableau IV.3 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C du composé G1

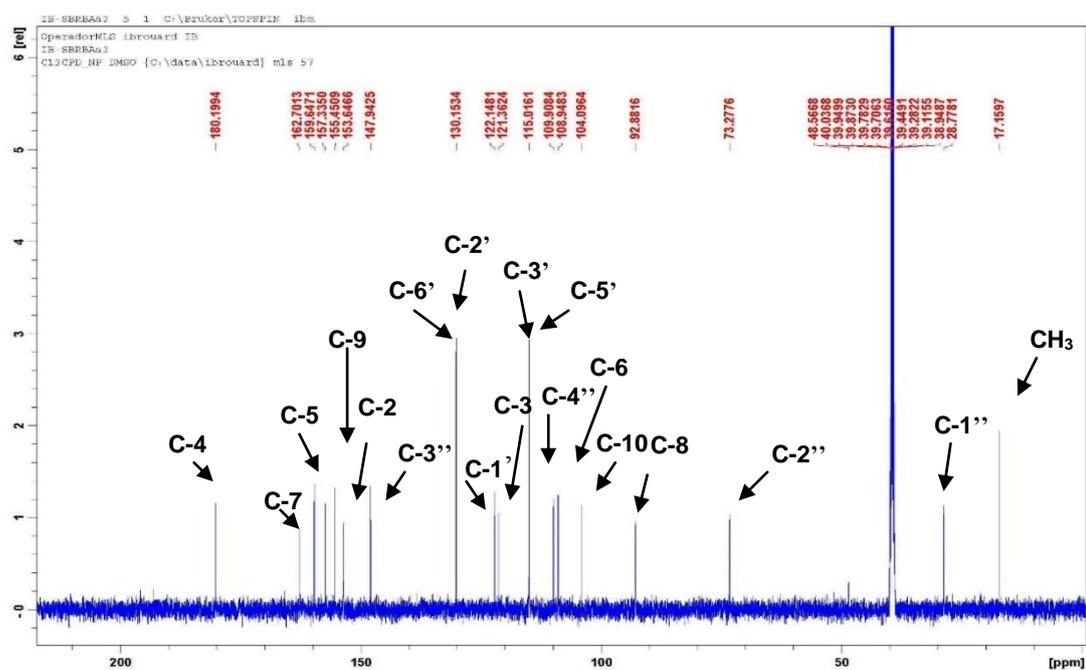
Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135	DEPT 90
2	153.64	CH	CH
3	121.36		
4	180.19		
5	159.64		
6	108.94	CH	CH
7	162.70		
8	92.88		
9	155.45		
10	104.09		
1'	122.14		
2'	130.15	CH	CH
3'	115.01	CH	CH
4'	157.33		
5'	115.01	CH	CH
6'	130.15	CH	CH
1''	28.77	CH ₂	CH ₂
2''	73.27	CH	CH
3''	147.94		
4''	109.90	CH ₂	CH ₂
CH ₃	17.15	CH ₃	CH ₃

Tableau IV.4 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G1

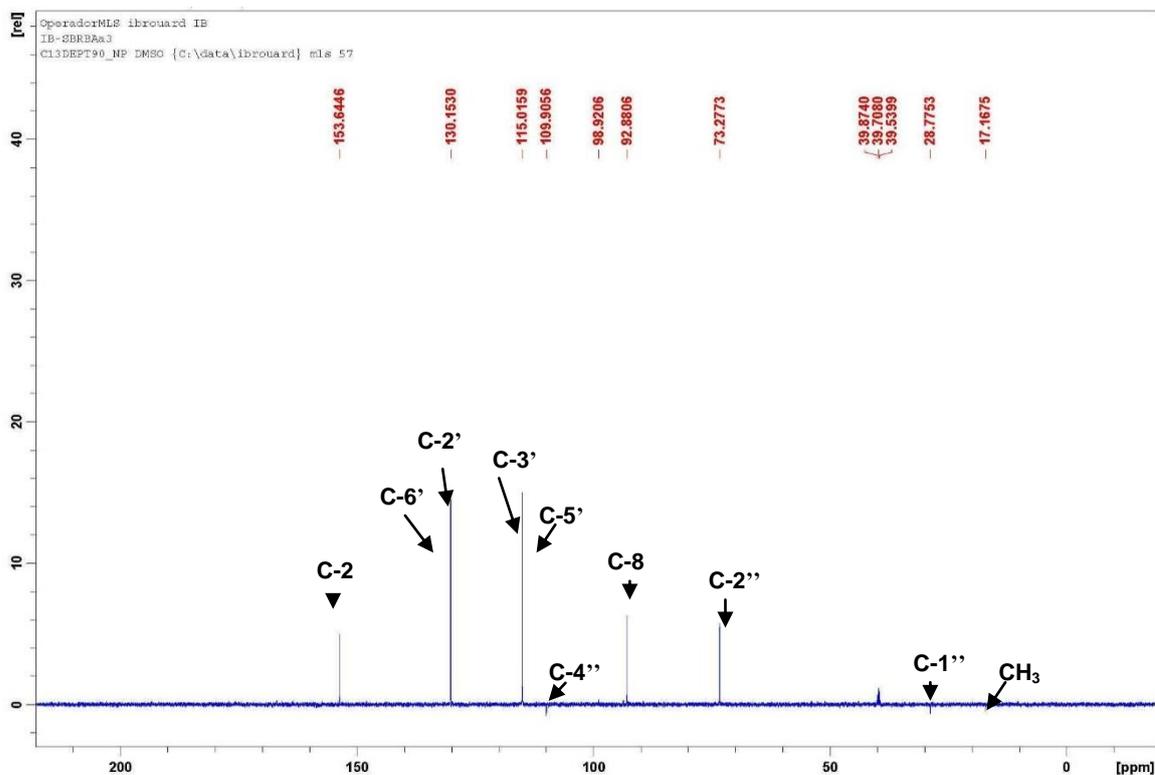
¹ H	δ (ppm)	¹³ C/HSQC	HMBC
H-2	8.29	153.64	C-1' (122.14) ; C9 (155.45) ; C-4 (180.19).
H-2' , H-6'	7.40	130.15	C-2';C-6' (130.15) ; C-4' (157.33) ; C-1' (122.14) C-3';C-5'(115.01).
H-3' , H-5'	6.85	115.01	C-3';C-5'(115.01) ; C-1' (122.14) C-4' (157.33).
H-8	6.45	92.88	C-6(108.94) ; C-9 (155.45) ; C-7 (162.70) ; C-10 (104.09) ; C-4 (180.19) .
H-4''a, H4''b	4.64 ; 4.67	109.90	C-5'' (17.15) ; C-2'' (73.27) ; C-3'' (147.94).
H-2''	4.33	73.27	C-5'' (17.15);C-1'' (28.77) ; C-3'' (147.94) ; C-4'' (109.90).
H-1''α, H-1''β	2.77 ; 2.85	28.77	C-4'' (109.90) ; C-2'' (73.27) ; C-7 (162.70).
H-5''	1.78	17.15	C-4'' (109.90) ; C-3'' (147.94); C-2'' (73.27).

Tableau IV.5 : Données de la spectroscopie COSY et NOESY du composé G1

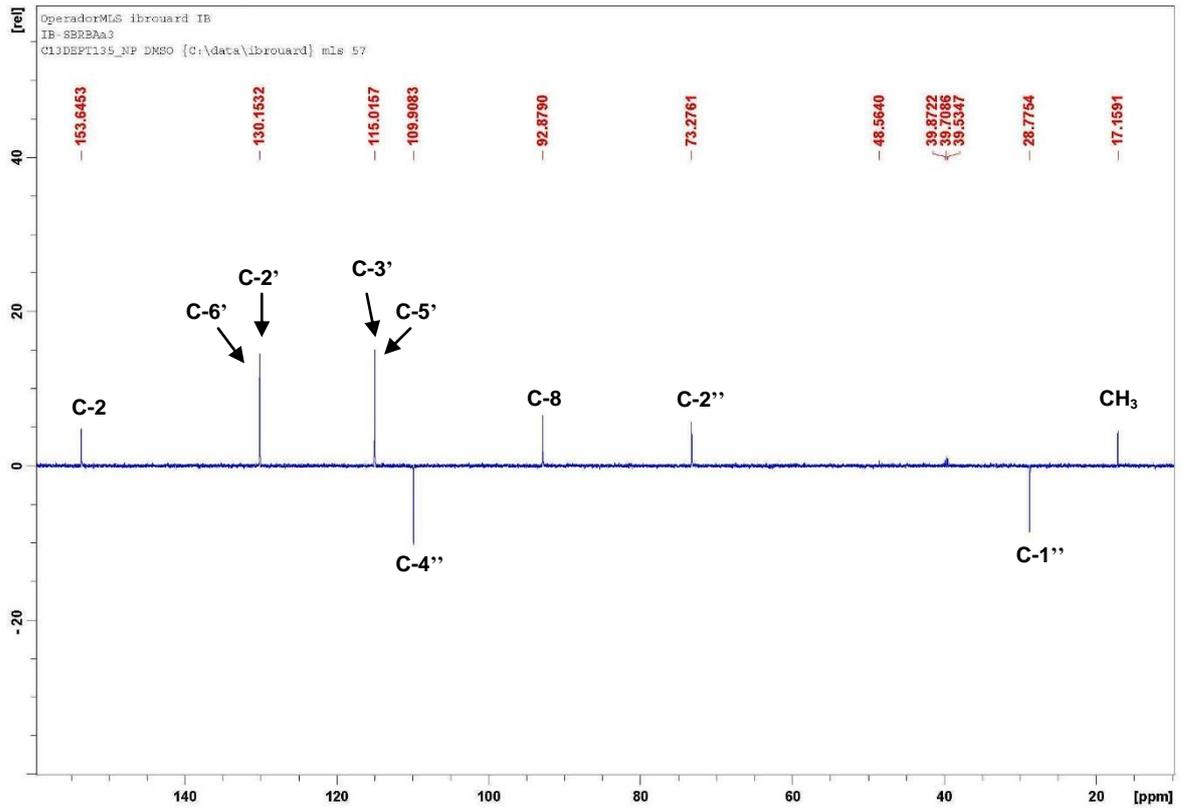
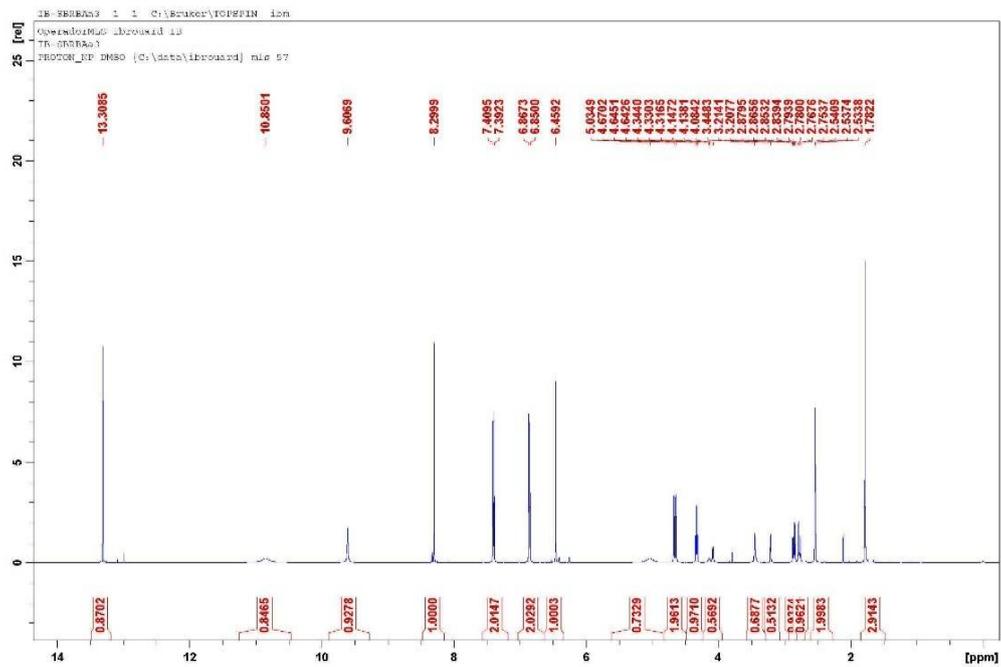
¹ H	δ (ppm)	COSY ¹ H- ¹ H	NOESY ¹ H- ¹ H
H-2	8.29	/	/
H-2' , H-6'	7.40	H-3' ; H-5'.	/
H-3' , H-5'	6.85	H-2' ; H-6'.	/
H-8	6.45	/	/
H-1''α , H-1''β	2.77;2.85	H-4''a-H-4''b; H-1''α , H-1''β ; H-2''.	/
H-2''	4.33	H-4''a-H-4''b; H-1''α, H-1''β ;H-2'';H-5''(CH ₃).	H-2''; H-4''; CH ₃ .
H-4''a, H-4''b	4.64 ;4.67	H-4''a-H-4''b; H-1''α, H-1''β	H-1'';H-4''; H-2''; H-6''; H-5'' (CH ₃).
H-5''(CH ₃)	1.78	/	H-1'';H-2'' ;H-2''; H-2; H-3'; H-5'' (CH ₃).

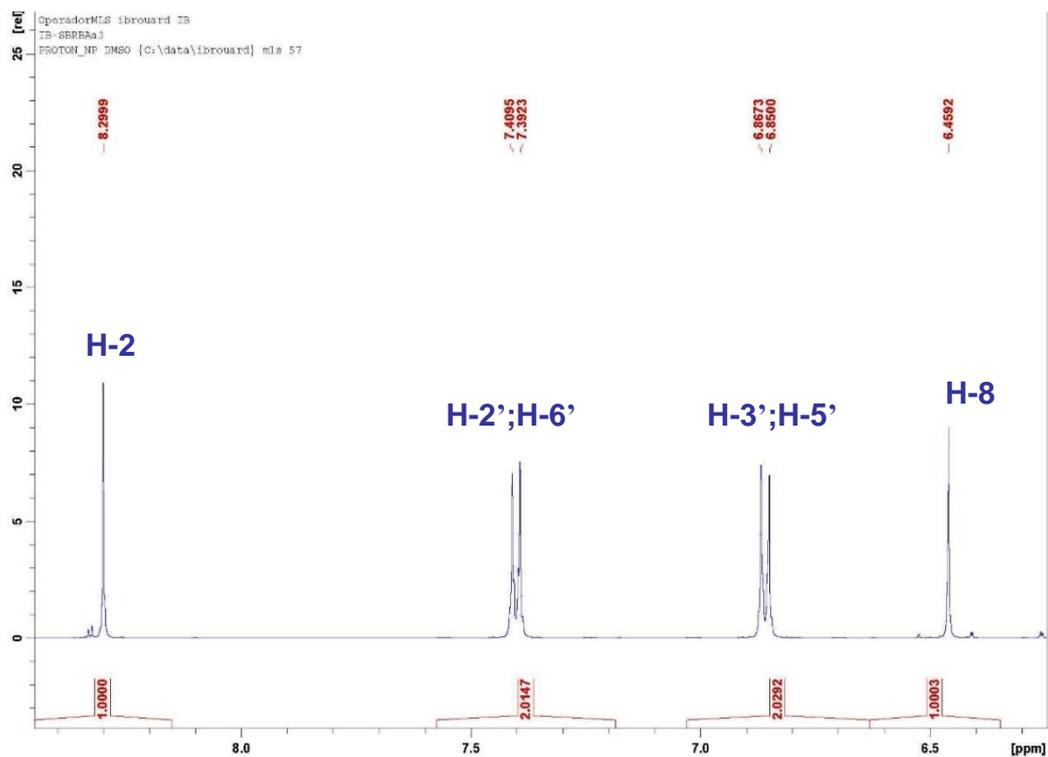


Spectre N°2: RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G1

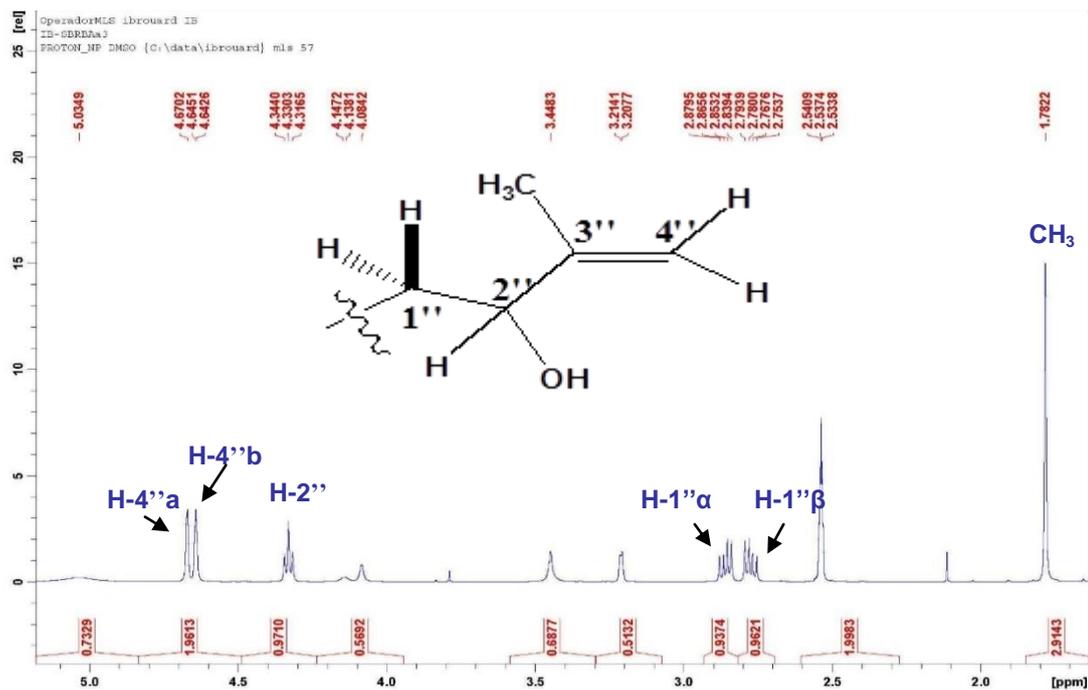


Spectre N°3: DPET 90(100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G1

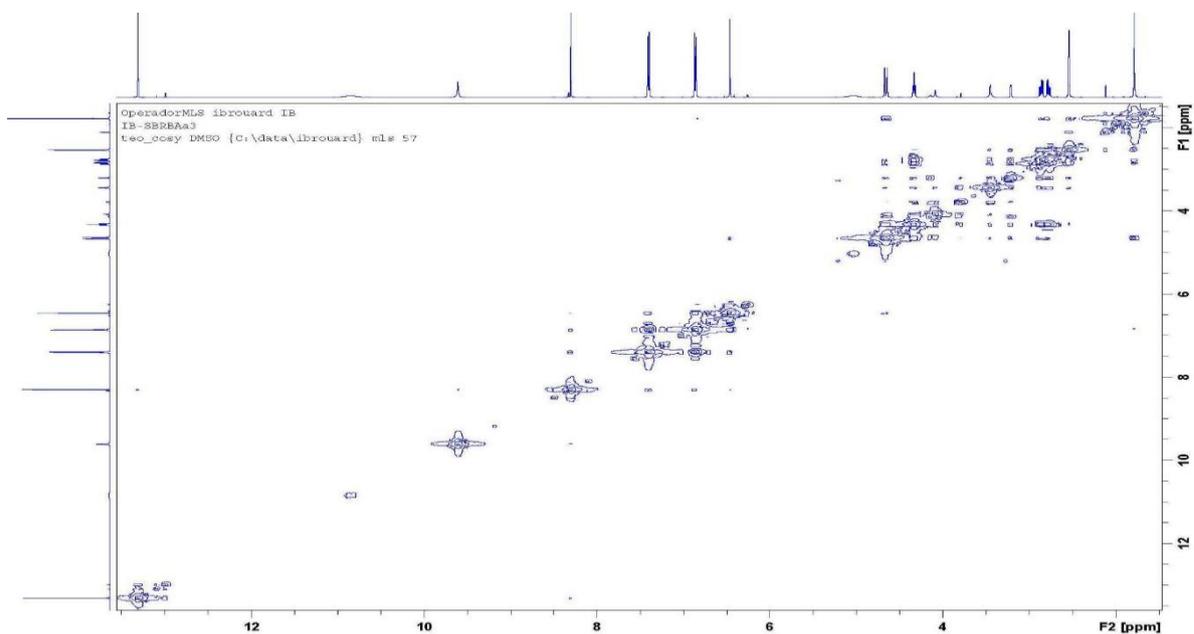
Spectre N°4: DPET 135(100 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G1Spectre N°6: RMN ¹H (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G1



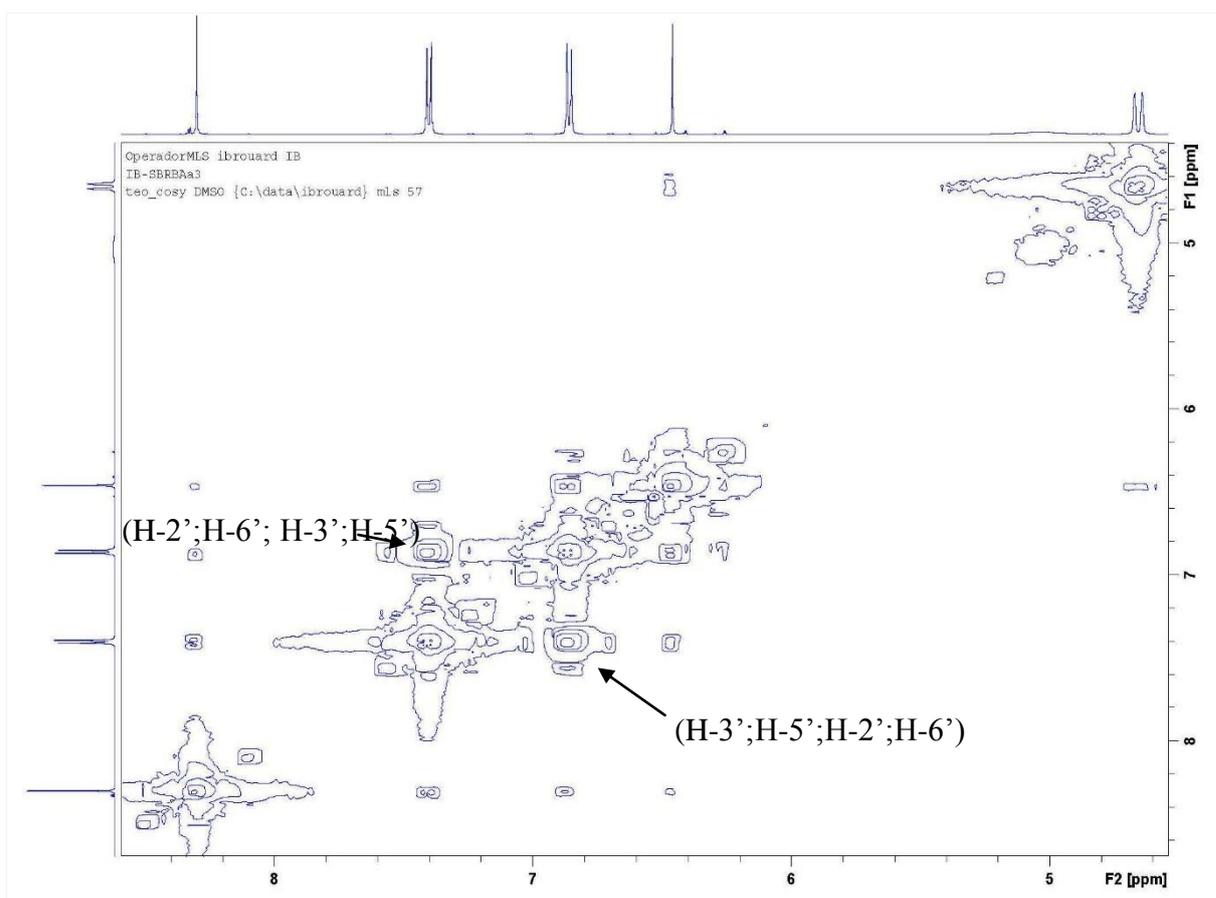
Spectre N°7: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) étalé (6 à 8.5 ppm) du composé G1



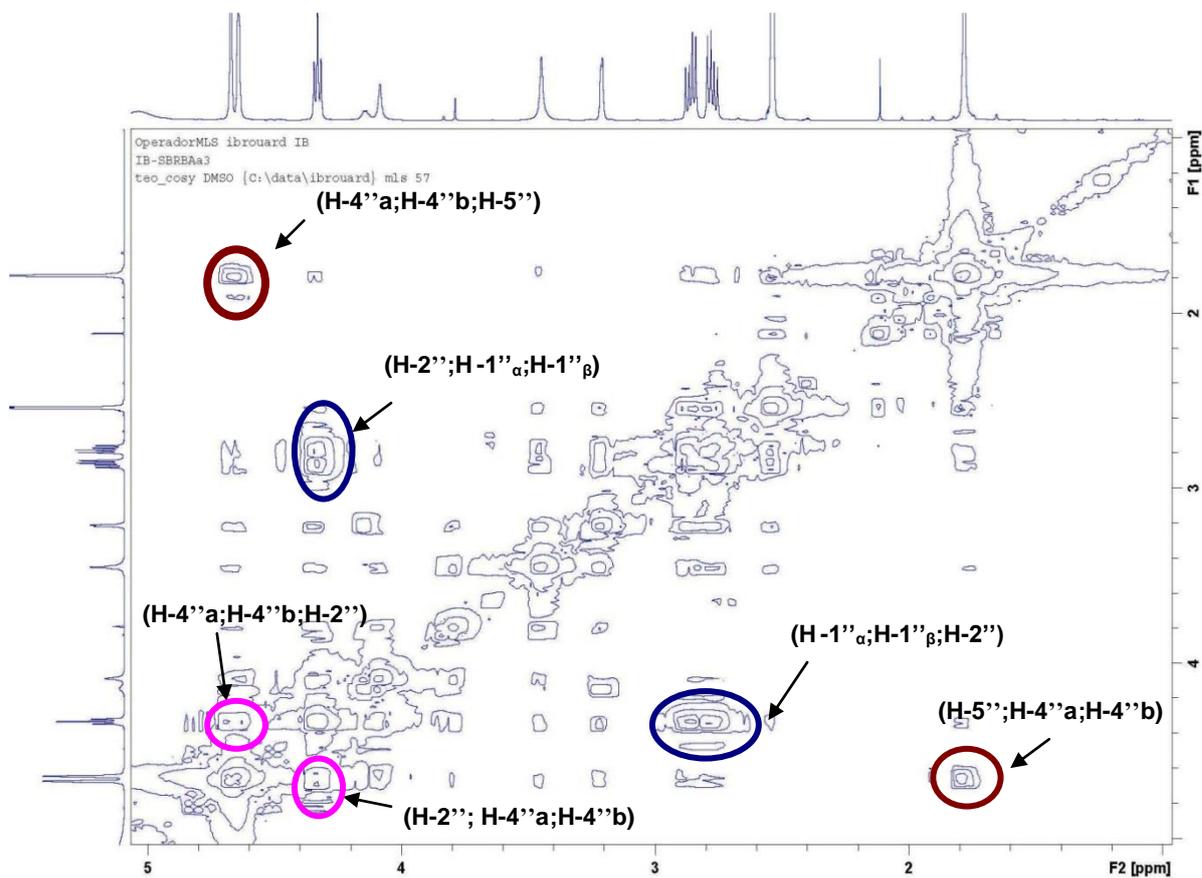
Spectre N°8: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) étalé (1 à 5 ppm) du composé G1



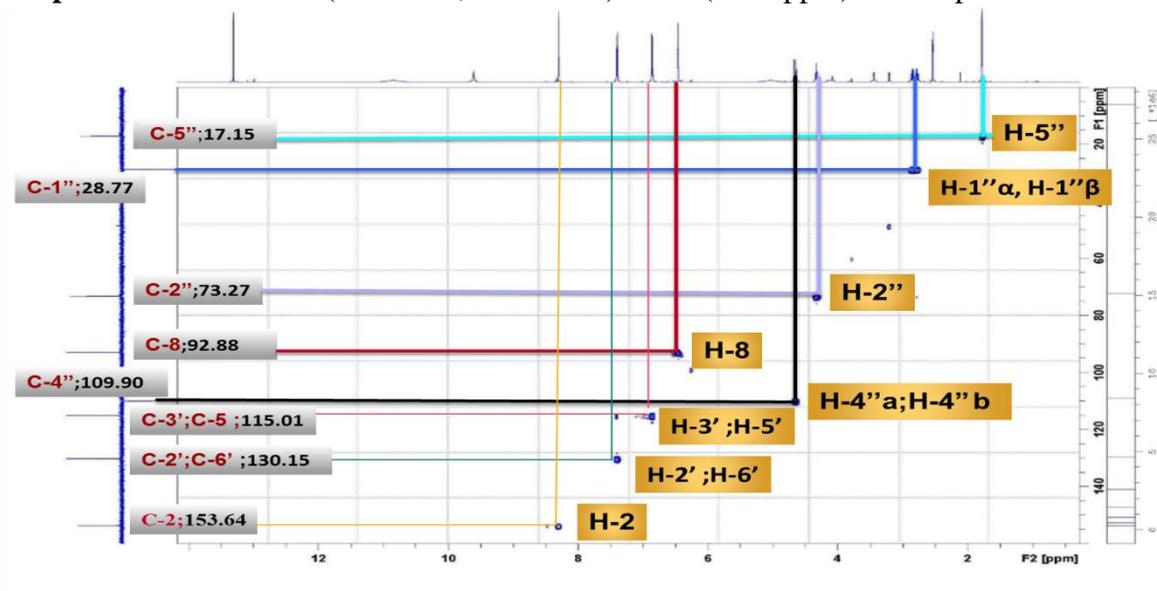
Spectre N°9: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G1



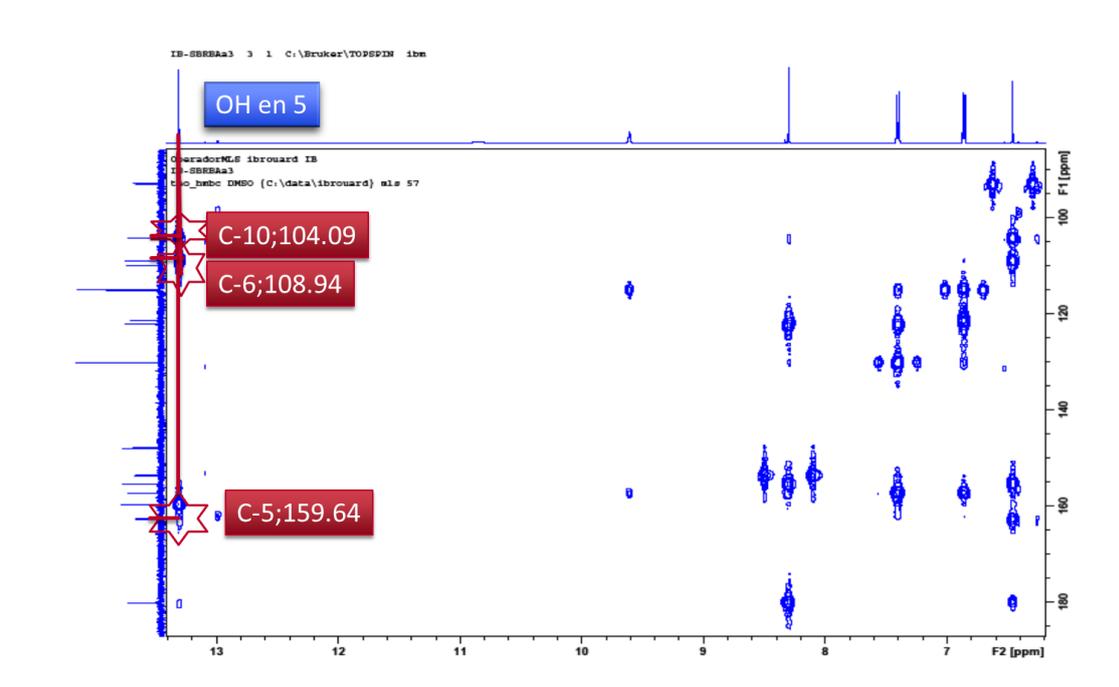
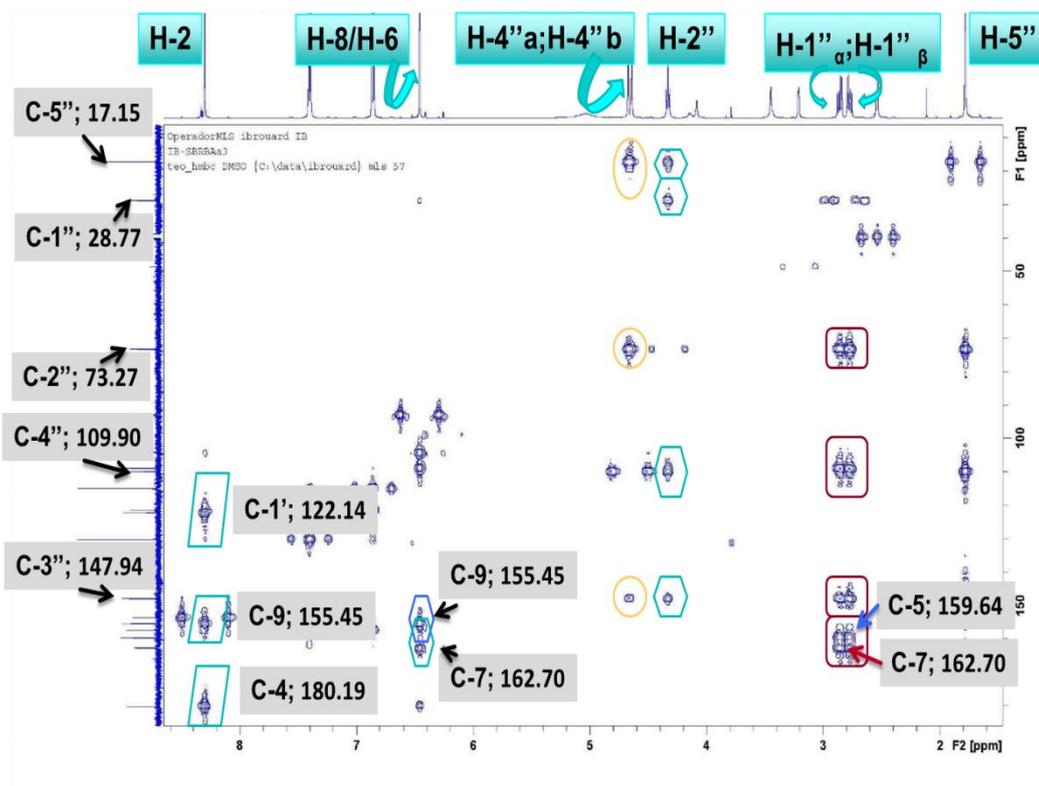
Spectre N°10: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (6 à 8.5 ppm) du composé G1



Spectre N°11: COSY (400 MHz, *DMSO-d*₆) étalé (1 à 5 ppm) du composé G1



Spectre N°12: HSQC (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G1

Spectre N°13: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G1Spectre N°14: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G1

IV.2.1.2 Elucidation du Composé G2

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre N°15**) et son étalement (**Spectre N°16**) indiquent que ce composé est un mélange de trois produits et que nous pouvons identifier le produit majoritaire grâce à l'ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique :

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets ($J = 7,5\text{Hz}$) à $\delta = 7,93\text{ ppm}$ et $\delta = 6,95\text{ ppm}$ d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Deux autres signaux sous forme d'un doublet chacune à $\delta = 6,15\text{ ppm}$ ($J = 1,6\text{ Hz}$) et à $\delta = 6,38\text{ ppm}$ ($J = 1,6\text{ Hz}$) d'intégration 1H attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.

Un dernier signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,78\text{ ppm}$ d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N°19**) et son étalement (**Spectre N°20**) montrent :

Une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,93$ et $6,95\text{ ppm}$ confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'.

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N°21**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 130,09\text{ ppm}$. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 115,64\text{ ppm}$.

Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 98,96\text{ ppm}$ qui est le C-6.

Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à $\delta = 93,88\text{ ppm}$ permettant de localiser le C-8.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 59,93\text{ ppm}$ qui ne peut être que le carbone du méthoxyle .

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC sur ce spectre (**spectre N° 22**) nous avons :

Les protons H-6 et H-8 montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta = 165.87$ ppm, ce qui permet l'attribution de ce dernier au C-7. Par ailleurs et toujours sur le même spectre, le proton H-8 montre une autre tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 156.47$ ppm qui ne peut être que C-9 et le proton H-6 mène à la localisation de C-5 à $\delta = 161.90$ ppm. Les protons H-3', H-5', H-2' et H-6' mènent à la localisation de C-4' à $\delta = 161.16$ ppm.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 137.42$ ppm attribuable à C-3.

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°23**) montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 323.0526$ calculé pour $C_{16}H_{12}O_6Na$, orientant vers la formule brute $C_{16}H_{12}O_6$. La structure du composé G2 est donc établie comme étant le kaempferol 3 méthyle éther. Ce composé est connu, sous le nom de Isokaempferide^[2].

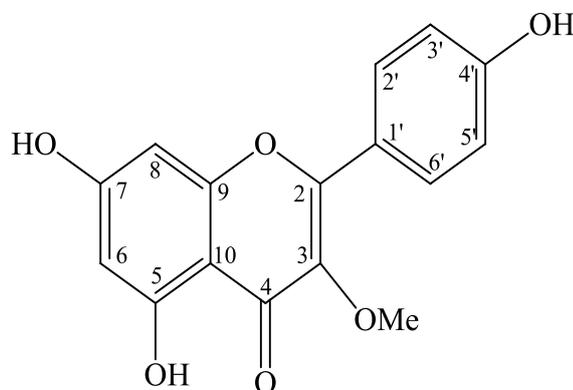


Figure IV.2 : Isokaempferide

Les données relatives à la RMN 1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D, HSQC, HMBC sont regroupées dans les tableaux IV.6, IV.7 et IV.8 respectivement.

Tableau IV.6: Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G2

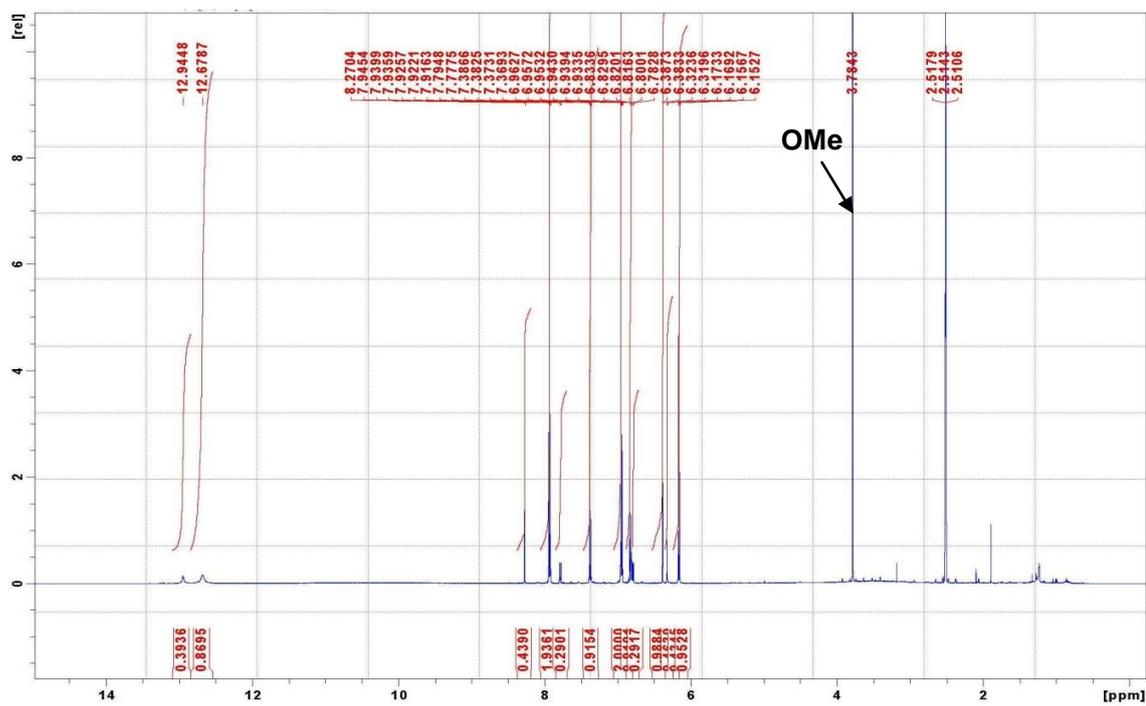
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7.93	2H	d (7.5)	H-2' ; H-6'
6.95	2H	d (7.5)	H-3' ; H-5'
6.38	1H	d (1.6)	H-8
6.15	1H	d (1.6)	H-6
3.78	3H	s	OCH ₃

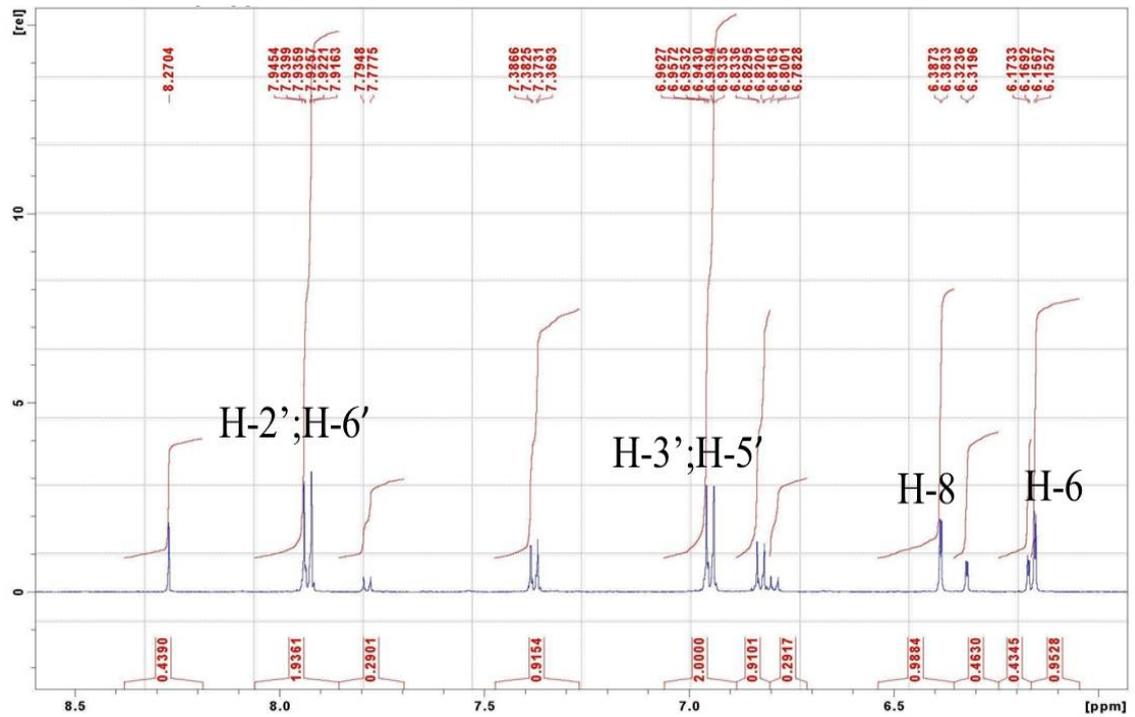
Tableau IV.7: Données de la spectroscopie ^{13}C et DEPT 135et DPET 90 du composé G2

Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135	DEPT 90
2	155.25		
3	137.42		
4	179.86		
5	161.90		
6	98.96	CH	CH
7	165.87		
8	93.88	CH	CH
9	156.47		
10	103.53		
1'	120.49		
2'	130.09	CH	CH
3'	115.64	CH	CH
4'	161.16		
5'	115.64	CH	CH
6'	130.09	CH	CH
OCH ₃	59.93	CH ₃	

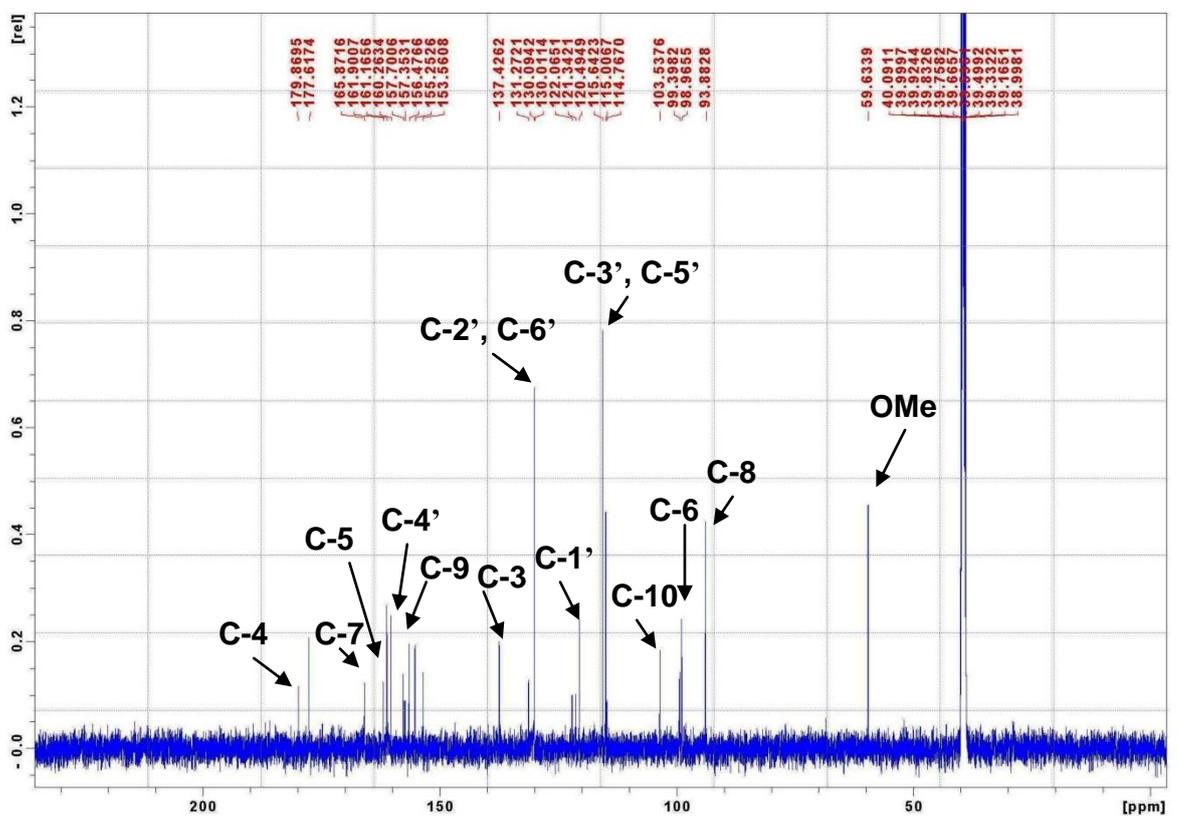
Tableau IV. 8: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G2

^1H	δ (ppm)	^{13}C /HSQC	HMBC
H-2' ; H-6'	7.93	130.09	C-2';C-6' (130.09);C-3';C-5' (115.64) ; C-2 (155.25); C-4' (161.16).
H-3' ; H-5'	6.95	115.64	C-3';C-5' (115.64); C-1' (120.49) ; C-4' (161.16).
H-8	6.38	93.88	C-6 (98.96); C-10 (103.53) ; C-9 (156.47); C-7 (165.87); C-4 (179.86).
H-6	6.15	98.96	C-8 (93.88); C-10 (103.53); C-5 (161.90); C-7 (165.87).
OCH ₃	3.78	59.93	C-3 (137.42).

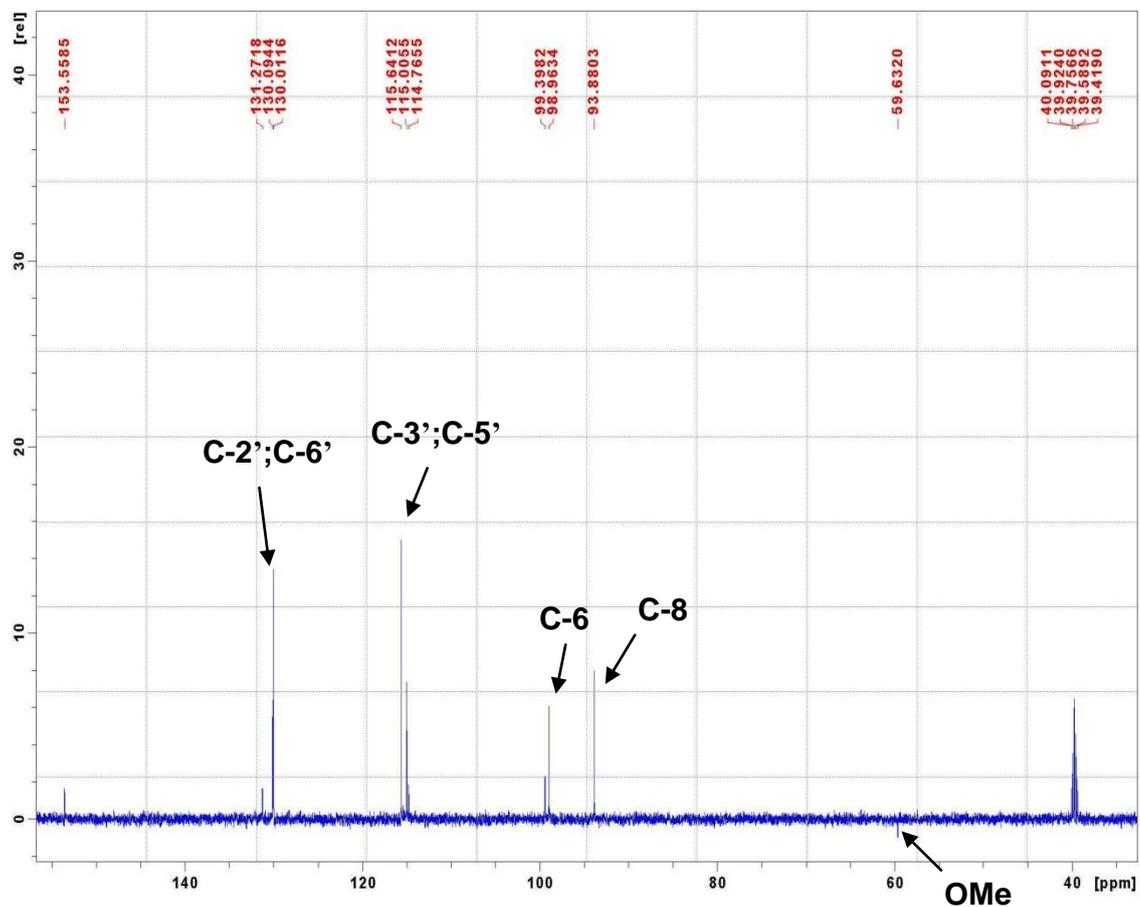




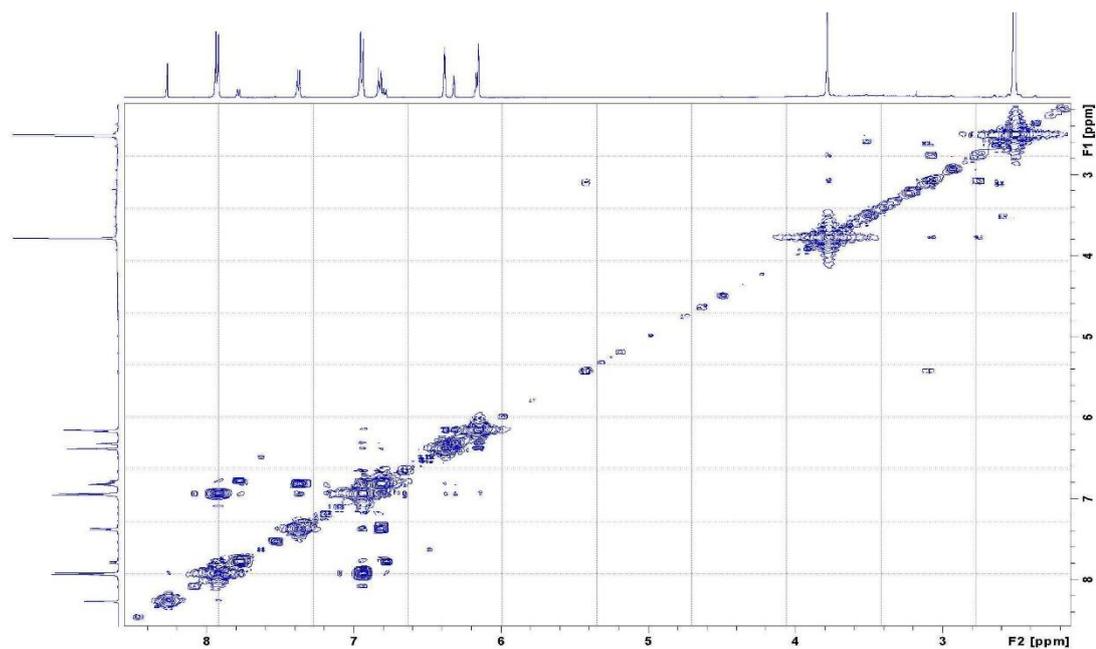
Spectre N°16: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) étalé (5 à 8.5 ppm) du composé G2



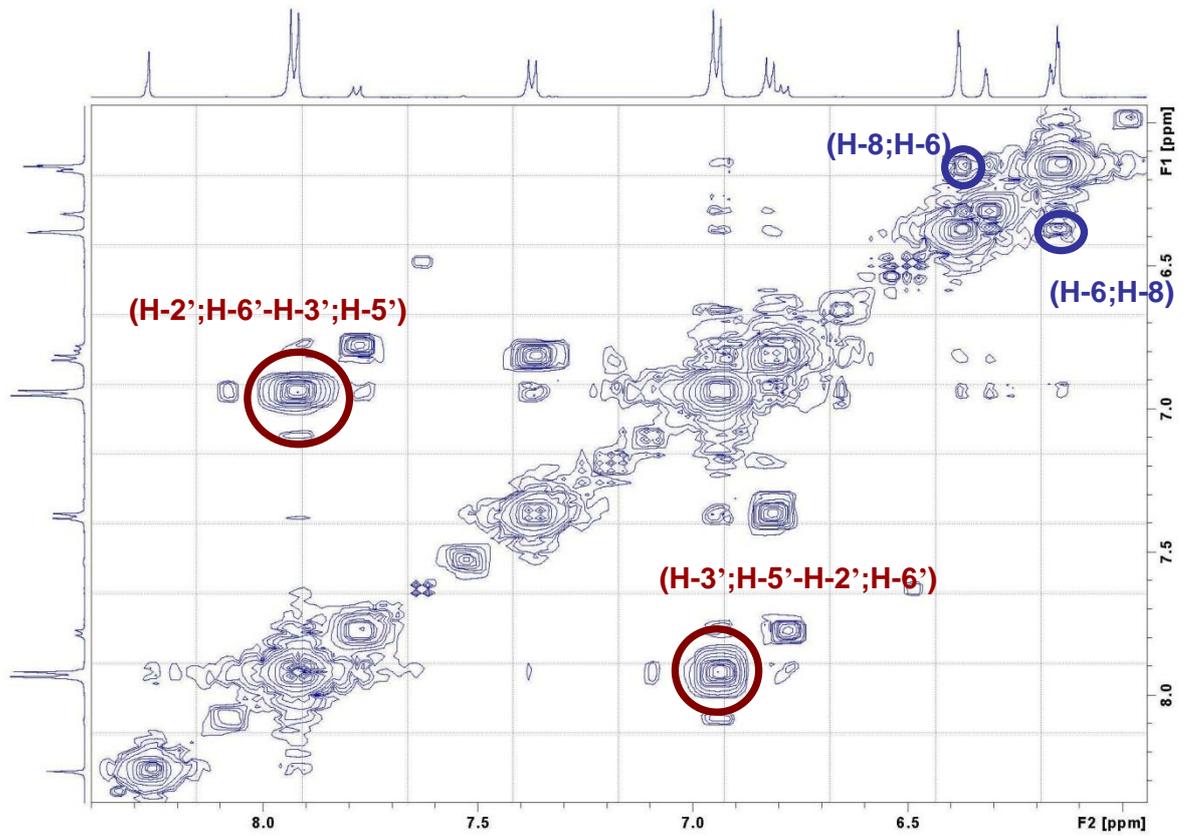
Spectre N°17: RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) du composé G2



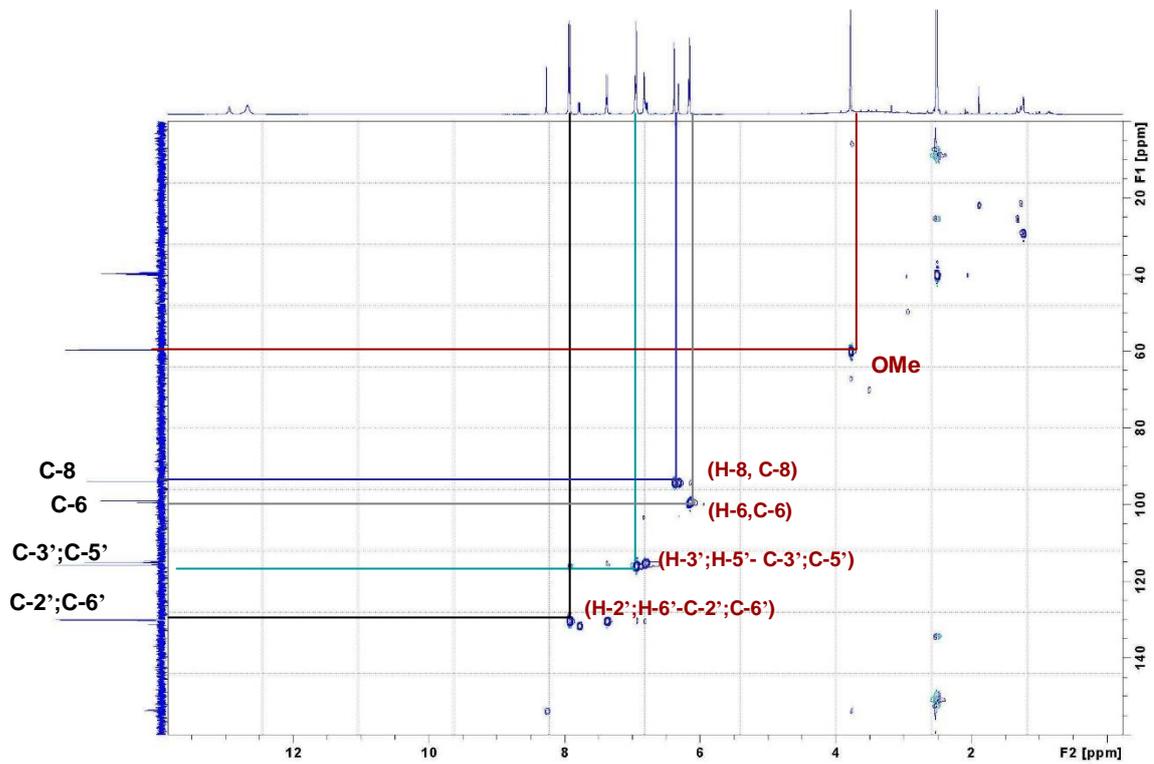
Spectre N°18: DPET 135(100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G2



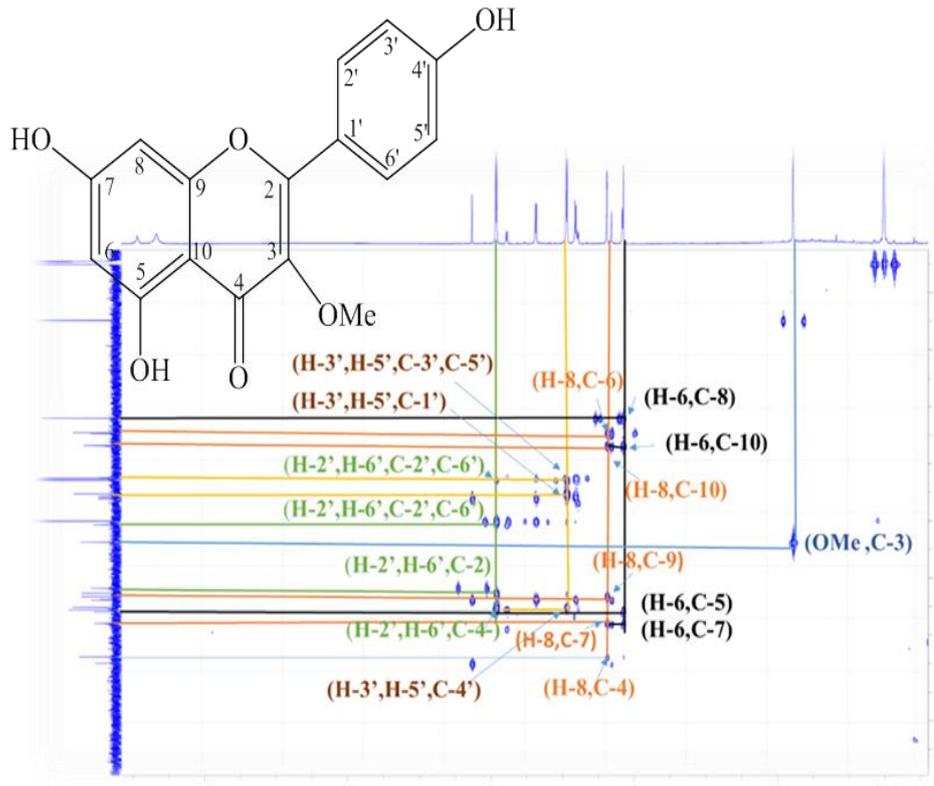
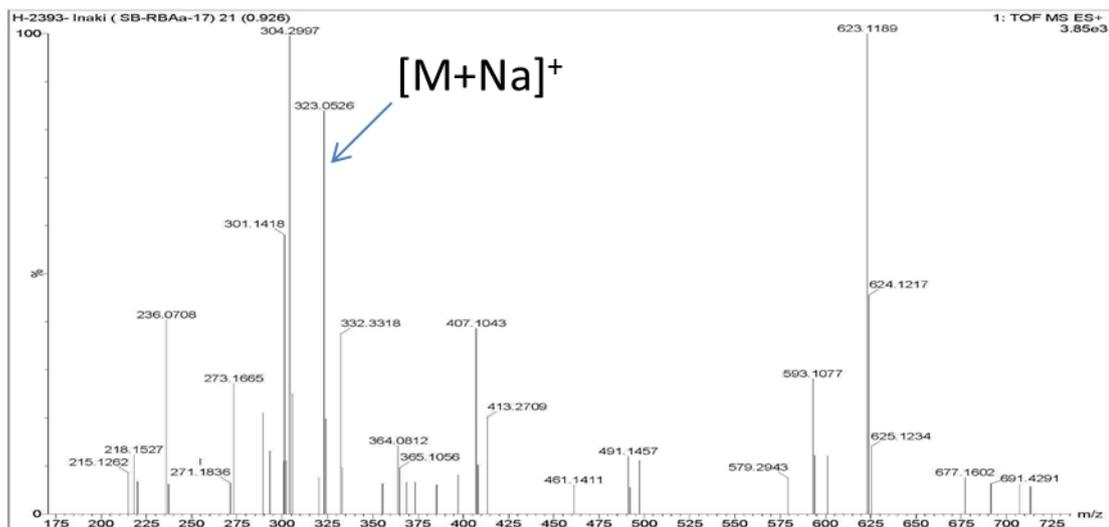
Spectre N°19: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G2



Spectre N°20: COSY (400 MHz, *DMSO-d*₆) étalé (5 à 8.5 ppm) du composé G2



Spectre N°21: HSQC (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G2

Spectre N°22: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G2

Spectre N°23: Masse en mode électrospray du composé G2

IV.2.1.3 Elucidation du Composé G3

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°24**) montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+H_2O+Na]^+$ à $m/z=397.0899$ calculé pour $C_{19}H_{18}O_8 Na$, orientant vers la formule brute $C_{19}H_{16}O_7$ soit une molécule comportant 12 insaturations.

L'examen du spectre RMN 1H (**Spectre N°25**) et son étalement (**Spectre N°26**) montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,49$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.

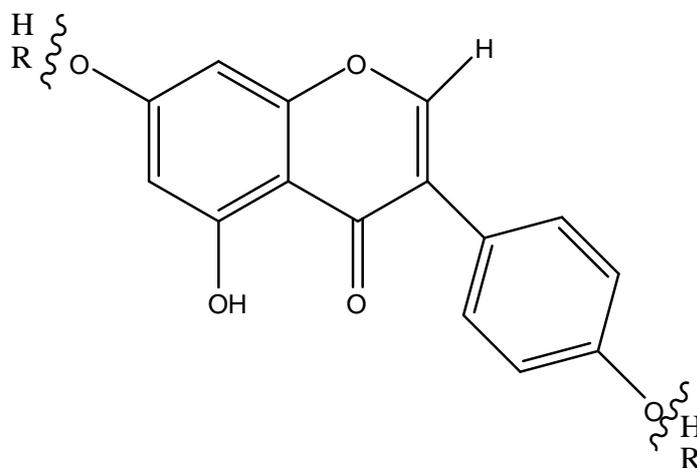
Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 7,40$ ppm et à $\delta = 6,80$ ppm ($J = 8,5$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Deux autres signaux sous forme d'un singulet à $\delta = 6,78$ ppm et à $\delta = 7,38$ ppm d'intégration 1H chacun attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.

Un signal sous forme d'un singulet large chacun à $\delta = 1,54$ ppm d'intégration 6H indiquant la présence de deux groupements méthyles dans la molécule.

Un dernier signal à $\delta = 13,72$ ppm d'intégration 1H caractéristique d'un OH en position 5.

Les données de la RMN 1H prévoient la structure partielle suivante :



La COSY (**Spectre N°29**) confirme les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' par une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta=7,40$ ppm et $\delta = 6,80$ ppm.

Le spectre HSQC (**Spectre N°30**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre le H-2 et le carbone à $\delta = 155,05$ ppm qui permet l'attribution de C-2.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone à $\delta = 130,21$ ppm permettant ainsi la localisation de C-2' et C-6'. De même pour la tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone à $\delta = 115,08$ ppm localisant ainsi C-3' et C-5'.

Une tache de corrélation entre le H-6 et un atome de carbone à $\delta = 97,14$ ppm qui permet l'attribution de C-6.

Une tache de corrélation entre le H-8 et un atome de carbone à $\delta = 90,67$ ppm permet l'attribution de C-8.

Une tache de corrélation entre les protons des méthyles et un atome de carbone à $\delta = 28,72$ ppm qui ne peut être que les carbones des deux méthyles.

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC. En effet sur ce spectre (**Spectre N°31**) et son étalement (**Spectre N°32**) nous avons :

Une tache de corrélation entre H-2 et les atomes de carbone à $\delta = 121,54$ ppm, et à $\delta = 182,10$ ppm attribuables à C-1' et C-4 respectivement. Ce même proton montre également une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 153,40$ ppm qui ne peut être que le C-9.

Les protons H-2', H-6' et H-3', le H-5' mènent à la localisation de C-4' à $\delta = 157,72$ ppm et à la localisation de C-1' à $\delta = 121,54$ ppm.

Le proton H-6 montre trois taches de corrélation :

- Une tache de corrélation entre le H-6 et le C à $\delta = 114,0$ ppm qu'on attribue à C-10.
- Une tache de corrélation entre le H-6 et le C à $\delta = 165,08$ ppm qu'on attribue à C-7.
- Une tache de corrélation entre le H-6 et le C à $\delta = 158,01$ ppm qu'on attribue à C-5.

Le proton H-8 montre trois taches de corrélation :

- Une tache de corrélation entre le H-8 et le C à $\delta = 90,97$ ppm qu'on attribue à C-8.

- Une tache de corrélation entre le H-8 et le C à $\delta = 158,01$ ppm qu'on attribue à C-5.

Trois taches de corrélation entre les protons des méthyles et le premier carbone qui a un déplacement chimique $\delta = 67.39$ ppm attribuable à C-2'' le deuxième à $\delta = 28.72$ ppm qui est le C-3'' ainsi que le troisième atome de carbone à $\delta = 165.08$ ppm qui est attribuable à C-1''.

Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de cette molécule: 7-(2-hydroxyisobutyrate) génistéine.

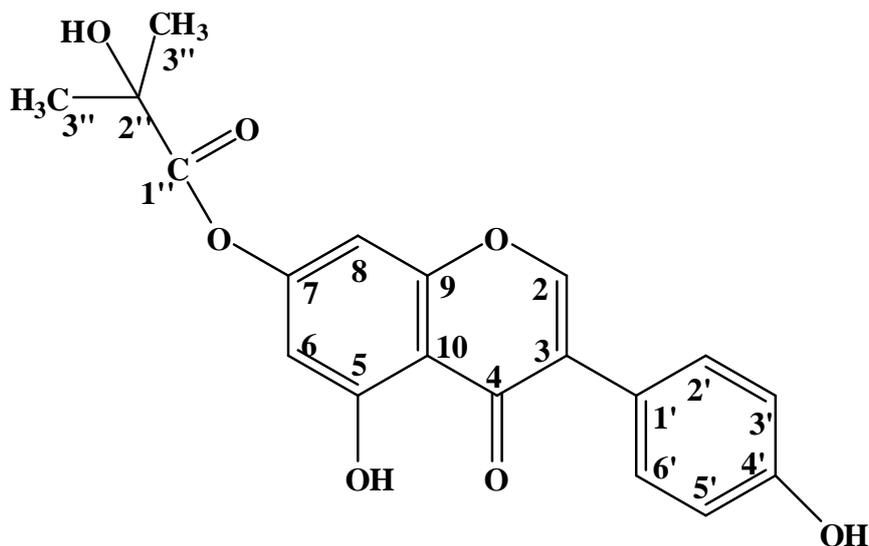


Figure IV.3: Composé G3

D'après une recherche bibliographique cette molécule est nouvelle.

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D, HSQC, HMBC sont regroupées dans les tableaux IV.9; IV.10 et IV.11 respectivement.

Tableau IV.9 : Données de la spectroscopie RMN ¹H du composé G3

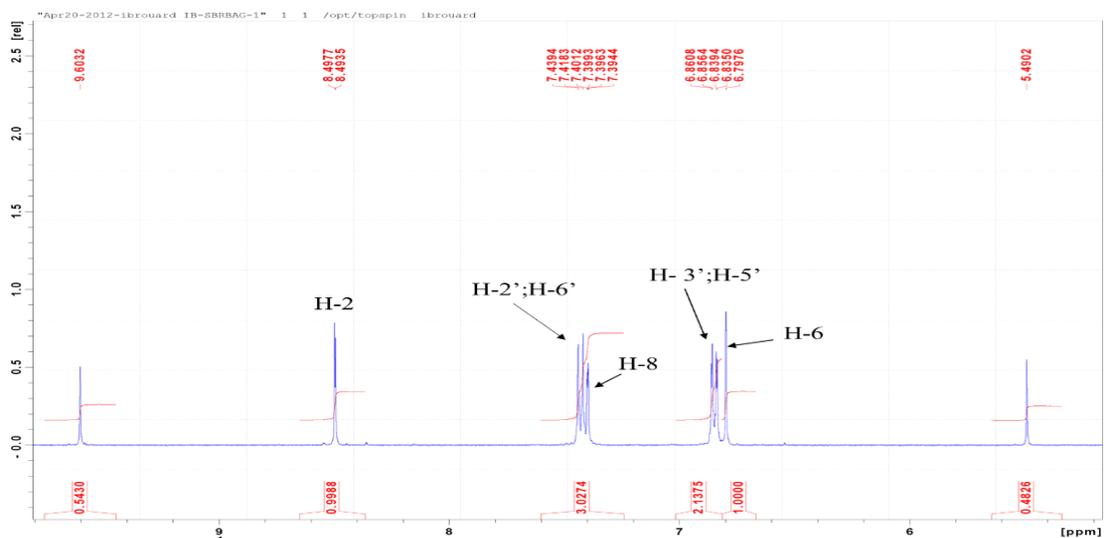
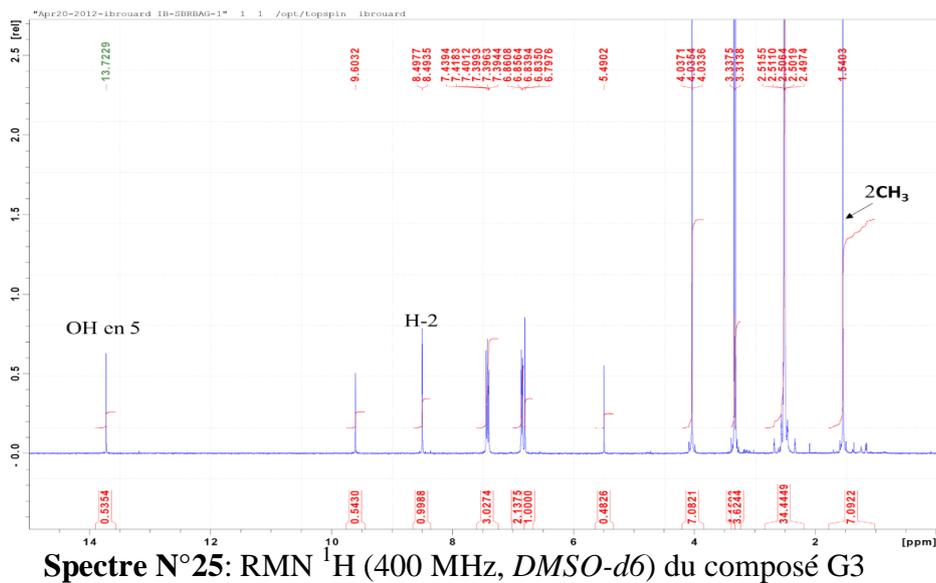
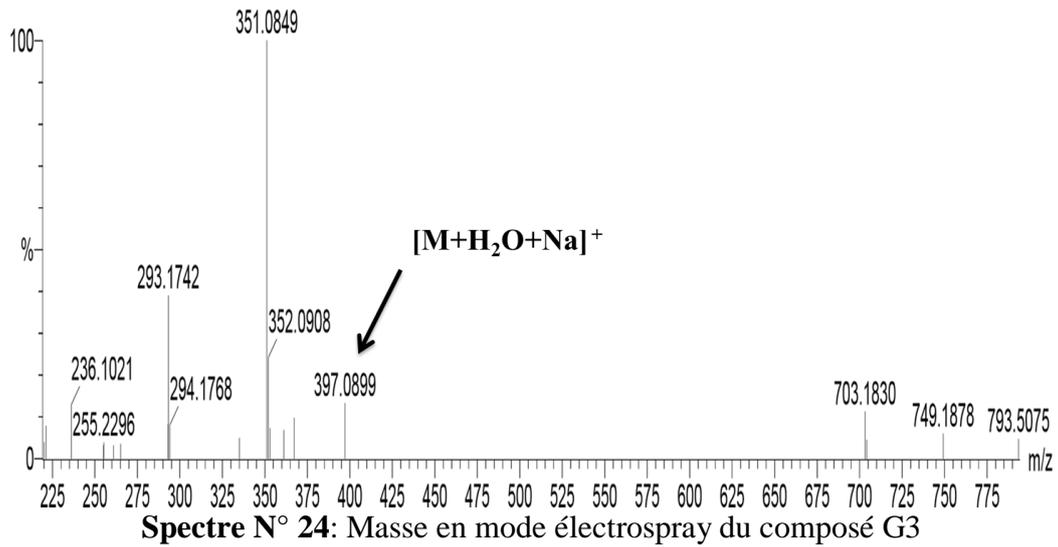
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
13.72	1H	s	OH en 5
08.49	1H	s	H-2
07.40	2H	d (8.5)	H-2',H-6'
07.38	1H	s	H-8
06.80	2H	d (8.5)	H-3',H-5'
06.78	1H	s	H-6
01.54	6H	s	2CH ₃

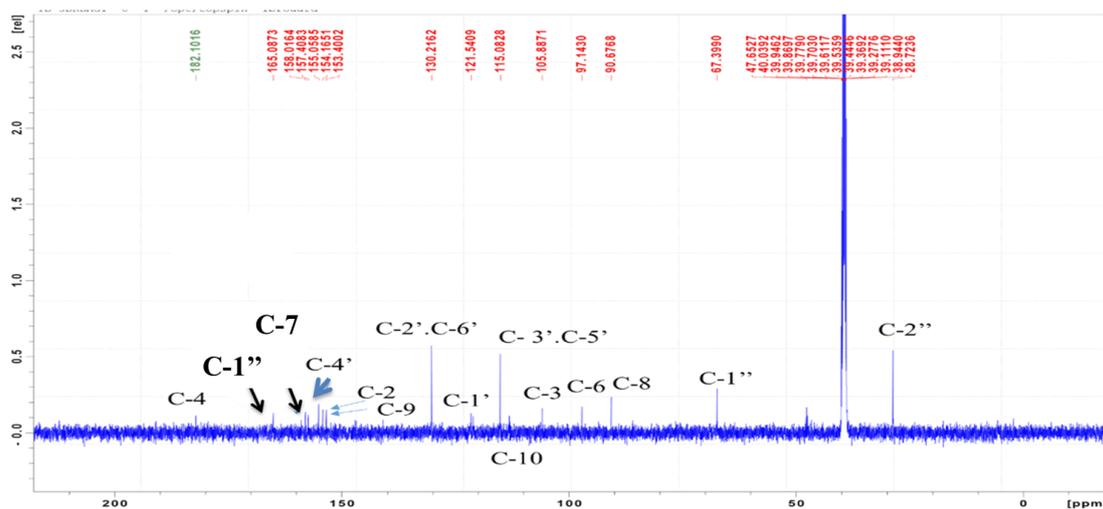
Tableau IV.10 : Données de la spectroscopie ¹³C et DEPT 135 du composé G3

Position de ¹³ C	δ (ppm)	DEPT 135
2	154.16	CH
3	105.88	/
4	182.10	/
5	/	/
6	97.14	CH
7	158.01	/
8	90.67	CH
9	153.40	/
10	114,00	/
1'	121.54	/
2'	130.21	CH
3'	115.08	CH
4'	157.40	/
5'	115.08	CH
6'	130.21	CH
1''	165.08	/
2''	67.39	CH ₃
3''	28.72	CH ₃
3''	28.72	CH ₃

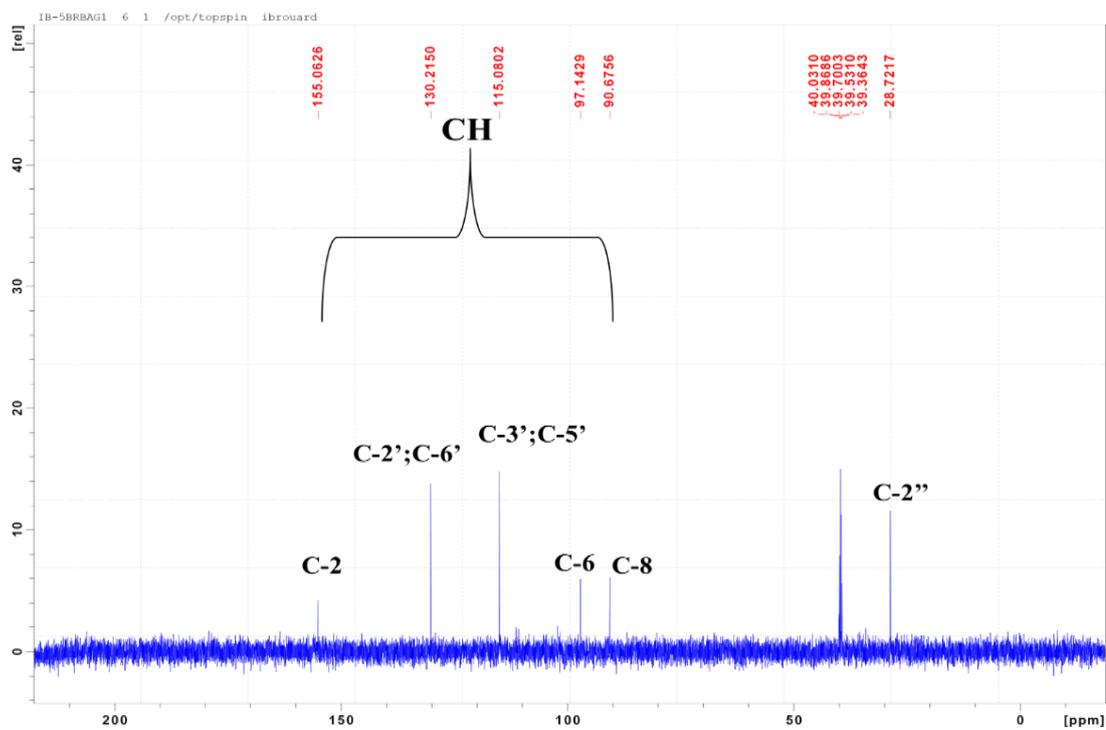
Tableau IV.11 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G3

H ¹	δ (ppm)	C ¹³ /HSQC	HMBC
H-2	08.49	155.05	C-1' (121.54) ; C-9(153.40) ; C-4 (182.10).
H-2';H-6'	07.40	130.21	C-1' (121.54) ; C-2';C-6' (130.21);C-4'(157.40).
H-8	07.38	90.67	C-10(114) ; C-9(153.40) ; C-7 (158.01).
H-3';H-5'	06.80	115.08	C-3';C-5'(115.08); C-1' (121.54) ; C-4' (157.40).
H- 6	06.78	97.14	C-10 (114) ; C-7 (158.01) ; C-1'' (165.08).
H-2''	01.54	28.72	C-2'' (67.39) ; C-3'' (28.72) ; C-1'' (165.08).

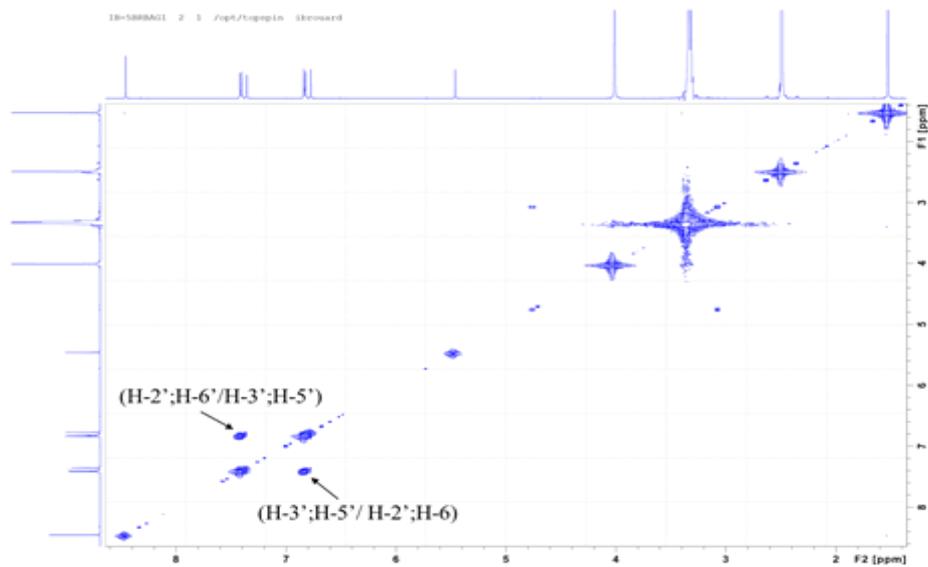




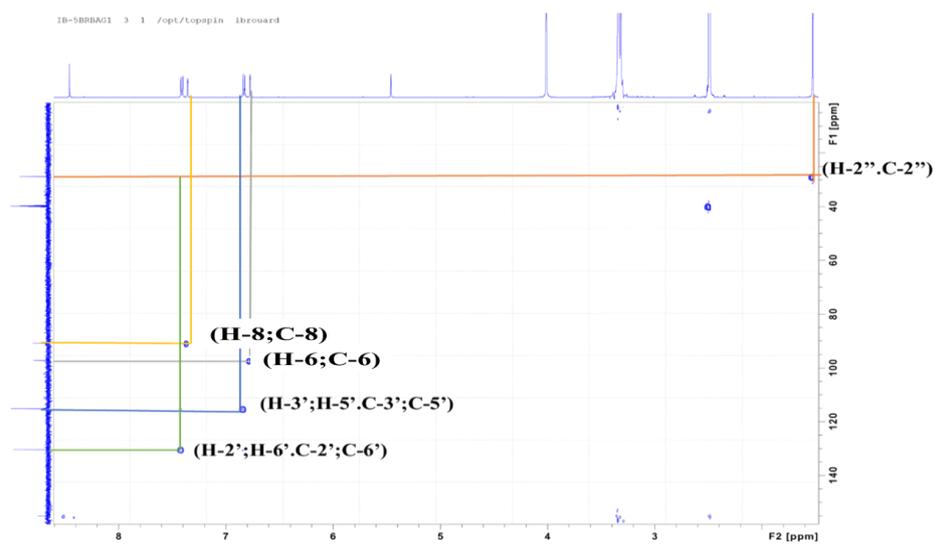
Spectre N°27: RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G3



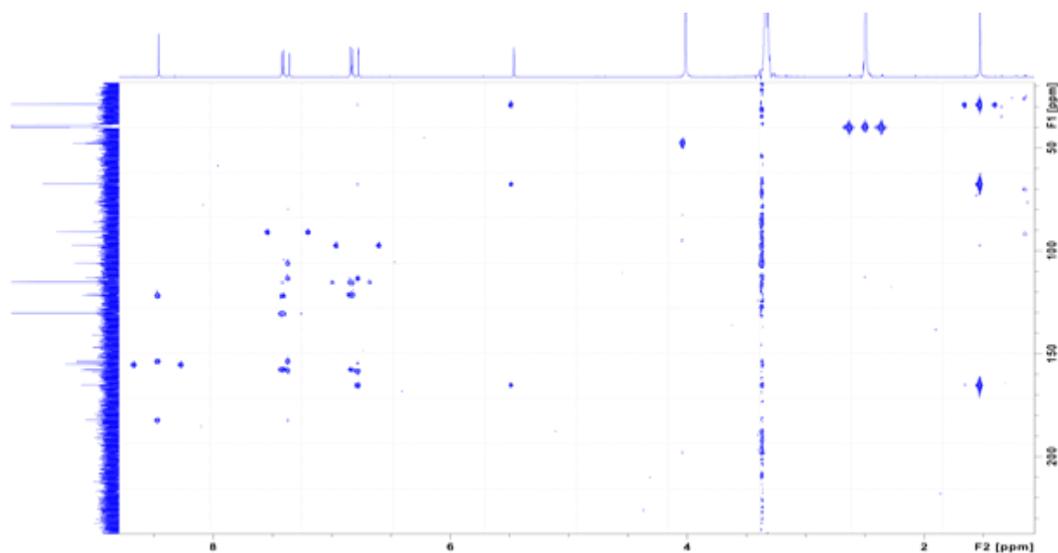
Spectre N°28: DPET 135(100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G3



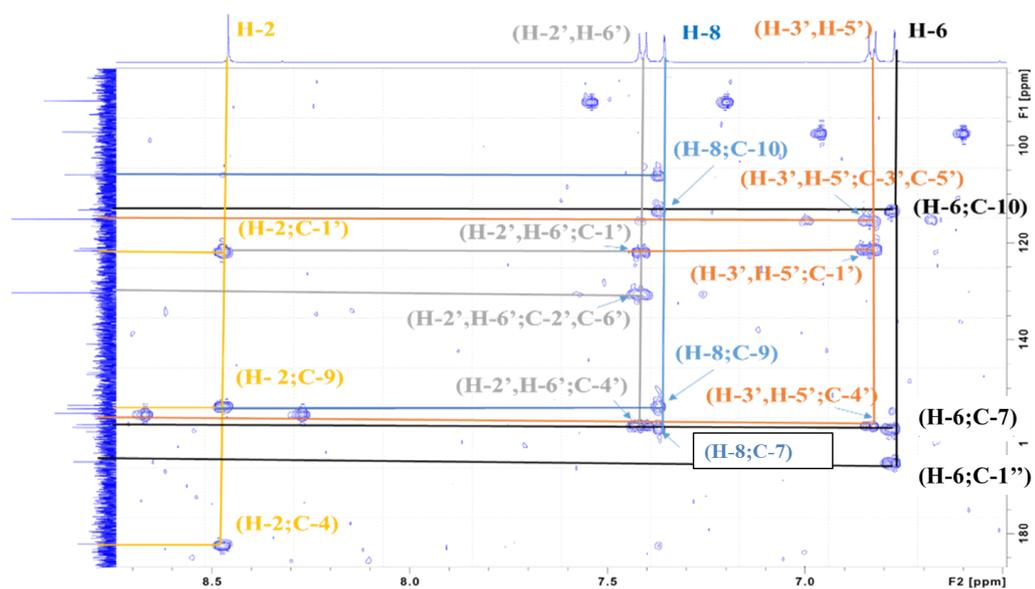
Spectre N°29: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G3



Spectre N°30 : HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G3



Spectre N°31: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G3



Spectre N°32: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (6 à 8.5 ppm) du composé G3

IV.2.1.4 Elucidation du Composé G4

La fluorescence noire violette de ce composé sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'une flavonol ou flavone substitué en C-3.

L'examen de la série spectrale UV (**Spectre N° 33**) donne les indications suivantes :

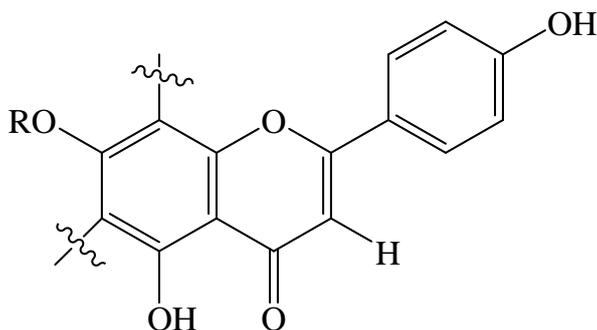
La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 328 nm laisse supposer la structure de type flavone.

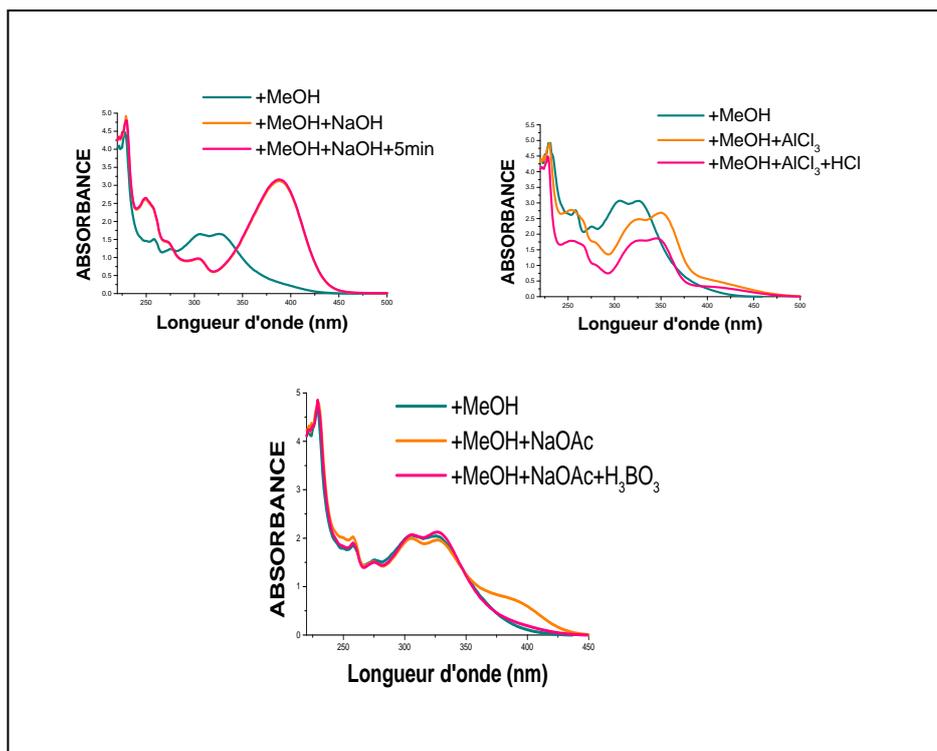
Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu (AlCl₃+HCl) ($\Delta\lambda = + 20$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en C-5.

La comparaison de la bande I après l'ajout de HCl et celle en présence de AlCl₃ ne montre aucun effet hypsochrome indiquant l'inexistence du système ortho di OH sur le cycle A (pas de ortho di-OH en 6,7 ou 7,8) ni sur le noyau B.

L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II révélant la présence d'un OR sur C-7.

L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 60$ nm) avec augmentation de l'intensité optique indiquant ainsi la présence d'un OH en position C-4'. L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans le schéma suivant :





Spectre N°33 : Série spectrale UV du composé G4

Les données relatives à la série spectrale UV sont regroupées dans le tableau IV.12

Tableau IV.12 : Données de la série spectrale UV du composé G4

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	328	258		Flavone
+ NaOH	388	258		OH libre en4'
+AlCl ₃	351	258		
+AlCl ₃ /HCl	348	258		OH libre en5
+NaOAc	328	258		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	328	258	390	
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN ¹H (**Spectre N° 34**) et son étalement (**Spectre N° 35**) donne les indications suivantes :

Un signal sous forme de doublet ($J = 7$ Hz) à $\delta = 8,08$ ppm d'intégration 2H attribuable à H-2', H-6'.

Un signal à $\delta = 6,96$ ppm sous forme de doublet ($J = 7$ Hz) d'intégration 2H attribuable à H-3', H-5'.

Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 7,14$ ppm attribuable à H-3.

Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,98$ ppm attribuable à H-6 ou H-8.

On remarque un singulet à $\delta = 6,98$ ppm d'intégration 1H qu'on peut attribuer à un proton éthylénique.

Un singulet d'intégration 6H à $\delta = 1,56$ ppm révélant la présence de deux groupements méthyle dans la molécule.

Un singulet d'intégration 1H confirme la présence d'un groupement OH chélaté en position 5 à $\delta = 12,97$ ppm.

L'examen du spectre RMN 2D, COSY étalé (6.5 à 8.5 ppm) (**Spectre N°36**) montre :

Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 8,08$ et $6,96$ ppm confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'.

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray négatif de ce composé (**Spectre N°37**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 351.0868$, calculé pour $C_{20}H_{16}O_6Na$, orientant vers la formule brute $C_{20}H_{16}O_6$ soit une molécule comportant 13 insaturations. .

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre N°38**) et ses séquences DEPT (**Spectre N°39**) décomptent 20 atomes de carbone :

- ✓ 2 CH_3 à $\delta = 29,16$ ppm et $29,22$ ppm.
- ✓ 7 CH dont six caractéristiques d'une flavone.
- ✓ Il n'y a pas de CH_2 dans la molécule.
- ✓ On déduit que les 11 atomes restants sont des carbones quaternaires.

Les données relatives aux spectres RMN 1H et RMN ^{13}C avec son DEPT et la S.M. nous laissent envisager une prénylation cyclique du type furane caractéristique d'un H-3'' à $\delta = 6,98$ ppm avec deux méthyles qui apparaissent isochrones à $\delta = 1,56$ ppm.

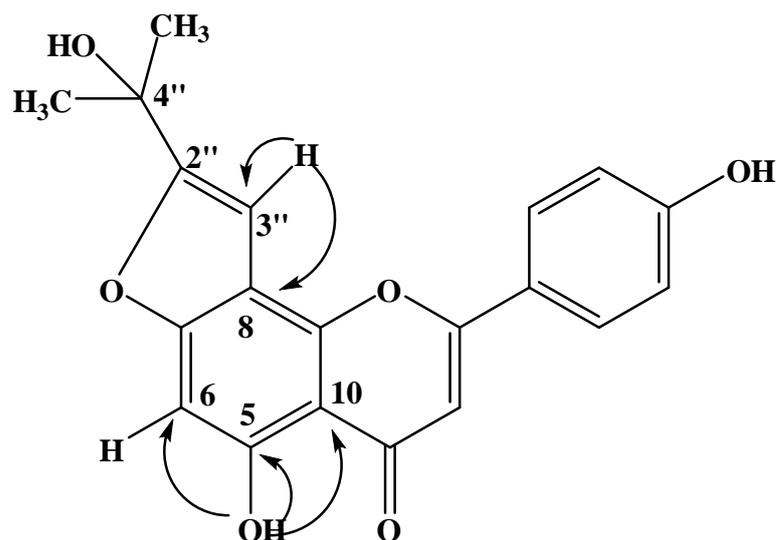
On remarque sur le spectre HMBC (**Spectre N°42**) que le proton à $\delta = 6,98$ ppm H-3'' corrèle avec le carbone à $\delta = 106,85$ ppm C-8 et cette corrélation permet de positionner le cycle furanique sur les carbones C-7 et C-8.

Le proton du groupement OH en 5 donne 3 taches de corrélation :

La première avec l'atome de carbone à $\delta = 94,99$ ppm attribuable à C-6. Ceci prouve l'hydrogénation de la position 6.

- La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 109,46$ ppm attribuable à C-10.
- La troisième tache à $\delta = 158,53$ ppm attribuable à C-5.

Toutes ces informations permettent d'écrire la structure suivante :



Ceux-ci est confirmée par les taches de corrélation relatives aux spectres HSQC et HMBC du composé.

L'examen des spectres HSQC (**Spectre N°40**) permet l'attribution des carbones suivants :

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et un atome de carbone à $\delta = 129,09$ ppm attribuable à C-2', C-6'.

Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et un atome de carbone à $\delta = 116,40$ ppm attribuable à C-3' et C-5'.

Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 94,99$ ppm qui est le C-6.

Une tache de corrélation entre H-3 et un atome de carbone à $\delta = 97,63$ ppm qui est le C-3.

Une tache de corrélation entre H-3'' et un atome de carbone à $\delta = 103,96$ ppm qui est le C-3''.

Une tache de corrélation entre les protons du méthyle et un atome de carbone à $\delta = 29,22$ ppm.

Une tache de corrélation entre les protons du méthyle et un atome de carbone à $\delta = 29,16$ ppm.

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (**Spectre N°41**) qui sont :

Trois taches de corrélation entre le H-2', H-6' et trois atomes de carbone, le premier à un déplacement chimique à $\delta = 129.09$ ppm attribuable à C-2' ; C-6', le deuxième à $\delta = 116.40$ ppm qui est le C-3' , C-5' et le troisième atome à $\delta = 164.19$ ppm attribuable à C-2.

Deux taches de corrélation entre le H-3', le H-5' et le premier atome de carbone à $\delta = 116,40$ ppm qui est attribuable à C-3'et le C-5', le deuxième atome de carbone à $\delta = 121,20$ ppm qui est le C-1'.

Deux taches de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 164.14$ ppm qui est attribuable à C-7 et à $\delta = 183.07$ ppm qui est attribuable à C-4.

Deux taches de corrélation entre le H-3 et le carbone du carbonyle à $\delta = 109.46$ ppm C-10 et le carbone C-2 à $\delta = 164.52$ ppm.

Une tache de corrélation entre le H-3'' et un atome de carbone à $\delta = 157,72$ ppm qui ne peut être que le C-9.

On constate des taches de corrélation entre les atomes de carbone à $\delta = 67.75$ ppm et $\delta = 29.16$ ppm attribuables à C-4'' et C-5'' respectivement avec les protons de méthyle H-5''.

Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de cette molécule : 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-isopropyl-4H-furo[2,3-h] chromen-4-one.

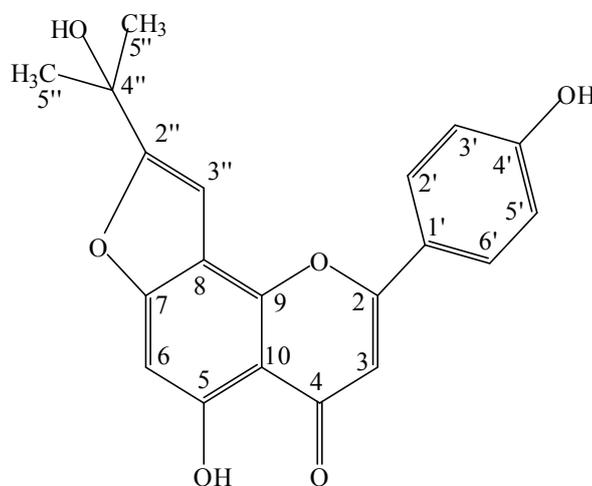


Figure IV.4 : Composé G4

Une recherche bibliographique approfondie a montré qu'il s'agit d'une molécule nouvelle.

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D COSY, HSQC sont regroupées dans les tableaux IV.13, IV.14 et IV.15 respectivement.

Tableau IV.13 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G4

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
12.97	1H	s	OH-5
10.42	1H	s	OH-4'
8.08	2H	d (7)	H-2' , H-6'
7.14	1H	s	H-3
6.96	2H	d (7)	H-3' , H-5'
6.98	2H	s	H-6 , H-3''
5.47	1H	s	OH-4''
1.56	6H	s	2CH ₃ (H-5'')

Tableau IV.14: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G4

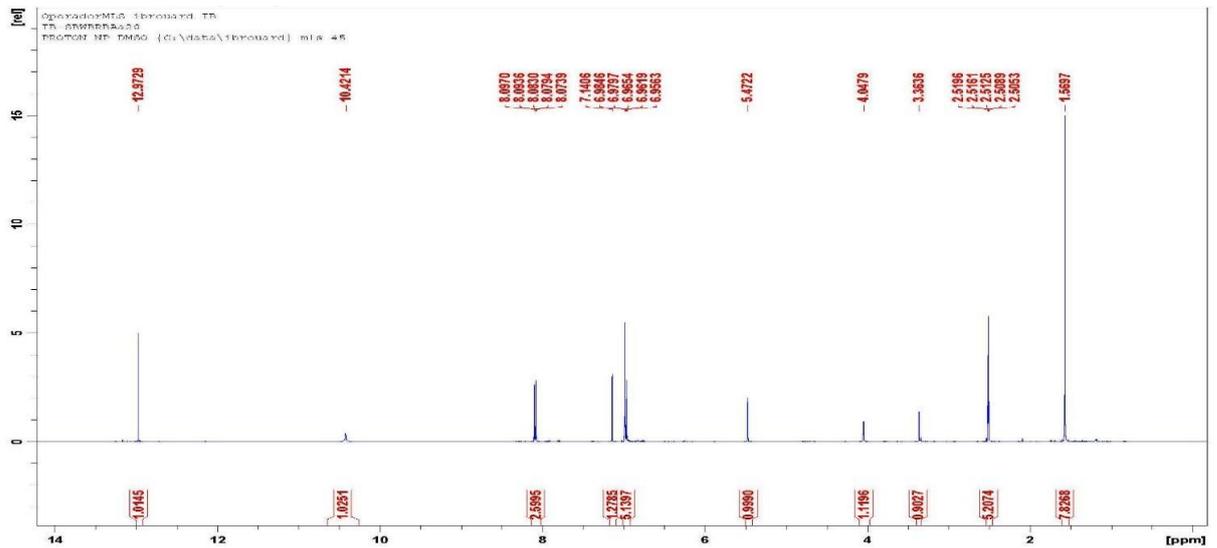
^1H	δ (ppm)	^{13}C /HSQC	HMBC
H-2' ; H-6'	8.08	129.09	C-2' ; C-6' ;C-3' ;C-5'(116.40) ; C-4'(161.80) ;C-2(164.14).
H-3	7.14	97.63	C-10(109.46) ;C-2(164.14) C-9(157.72).
H-6	6.98	94.99	C-7(164.14).;C-4(183.07).
H-3''	6.98	103.96	C-8(106.85) ;C-9(157.72).
H-3' ; H-5'	6.96	116.40	C-3' ; C-5'(116.40);C-1' (121.20).
OH-4''	5.47	/	C-5'' (29.16) ; C-4'' (67.75) C-2'' (164.00).
CH ₃ (H-5'')	1.56	29.22	C-4'' (67.75) ; C-5'' (29.16) ; C-2'' (164.00).
CH ₃ (H-5'')	1.56	29.16	C-4'' (67.75) ; C-5'' (29.16) ; C-2'' (164.00).

Tableau IV.15 : Données de la spectroscopie ^{13}C et DEPT 135 du composé G4

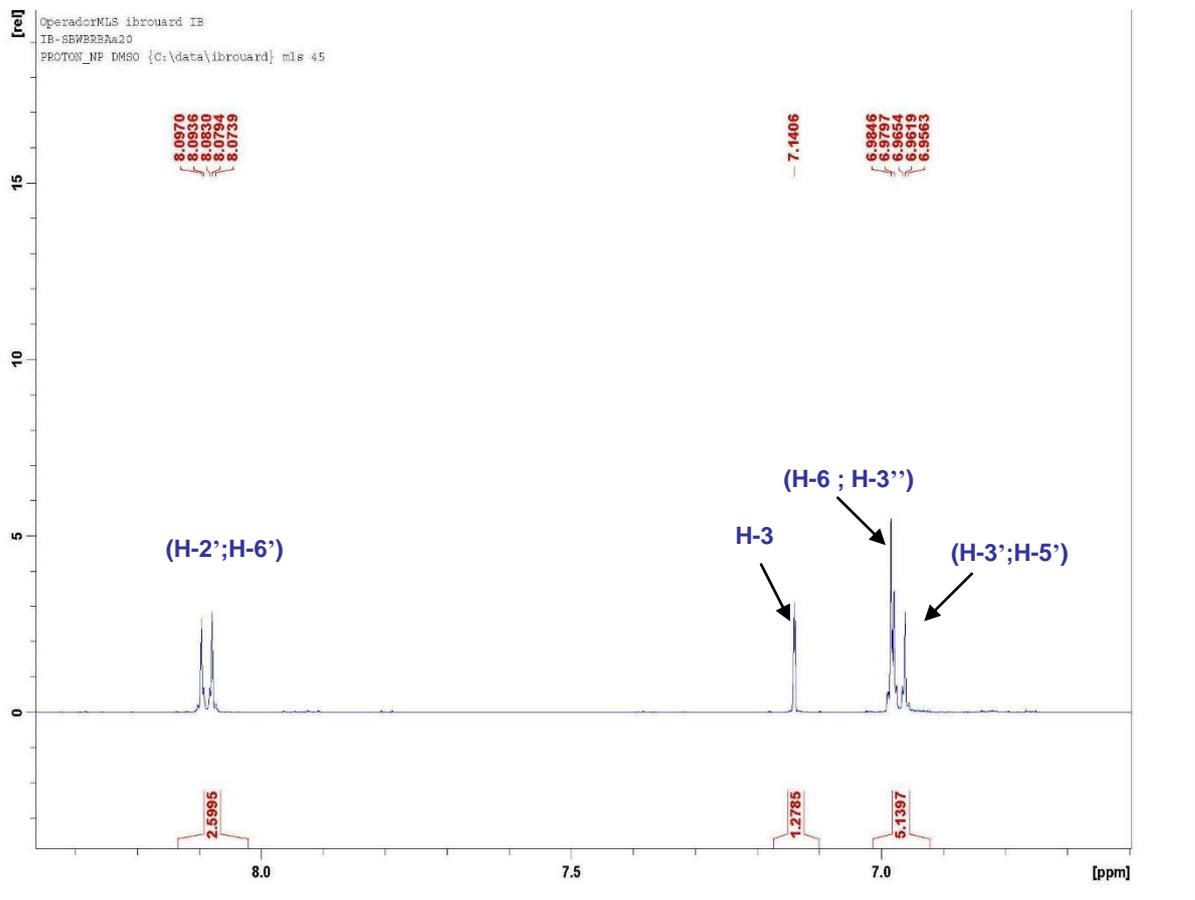
Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135
2	164.52	
3	97.63	CH
4	183.07	
5	158.53	
6	94.99	CH
7	164.14	
8	106.85	
9	157.72	
10	109.46	
1'	121.20	
2'	129.09	CH
3'	116.40	CH
4'	161.80	
5'	116.40	CH
6'	129.09	CH
3''	103.96	CH
2''	164.00	
4''	67.75	
5''	29.16	CH ₃
5''	29.22	CH ₃

Tableau IV.16 : Données de la spectroscopie COSY et NOESY du composé G4

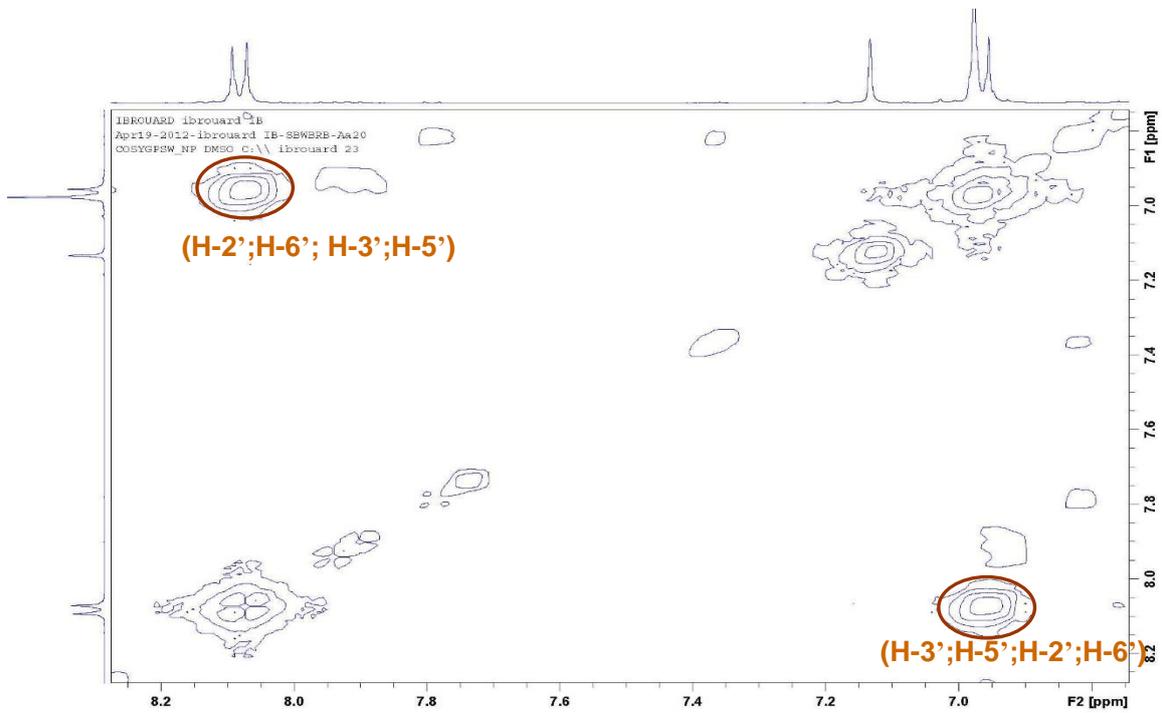
^1H	δ (ppm)	COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$	NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$
H-2' ; H-6'	8.08	H-3' ; H-5'	H-3
H-3	7.14	/	H-2'; H-6'; H-3'; H-5'.
H-6	6.98	/	/
H-3''	6.98	/	H-5''.
H-3' ; H-5'	6.96	H-2' ; H-6'	H-3.
CH ₃ (H-5'')	1.56	/	H-3''; H-6.
CH ₃ (H-5'')	1.56	/	H-3''; H-6.



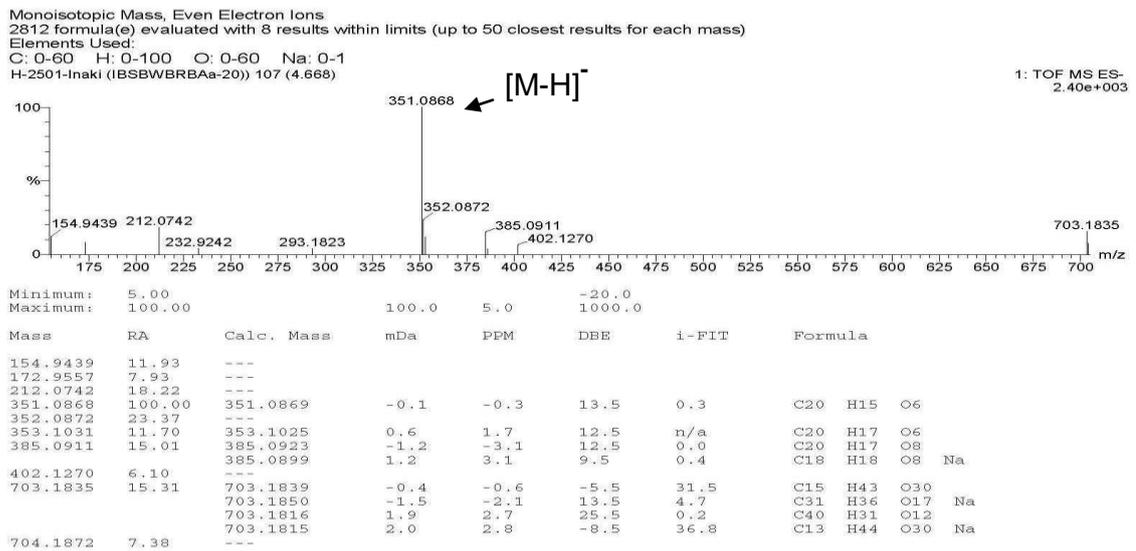
Spectre N°34: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé G4



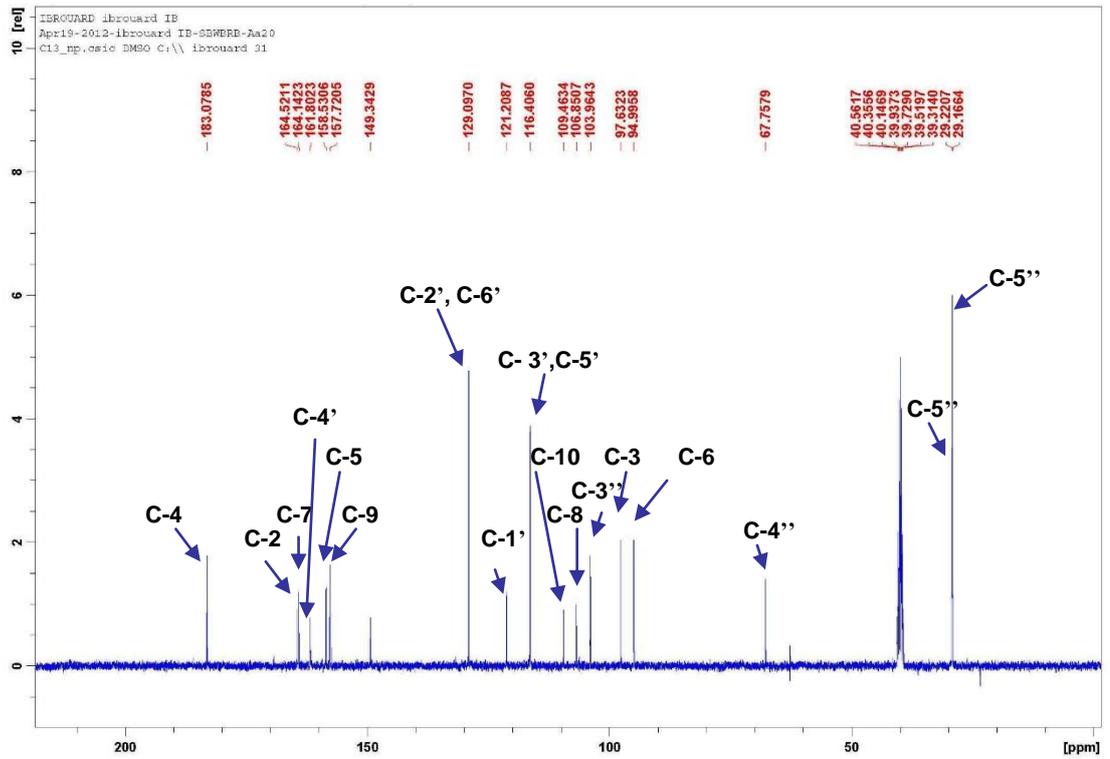
Spectre N°35: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) étalé (6.5 à 8.5 ppm) du composé G4



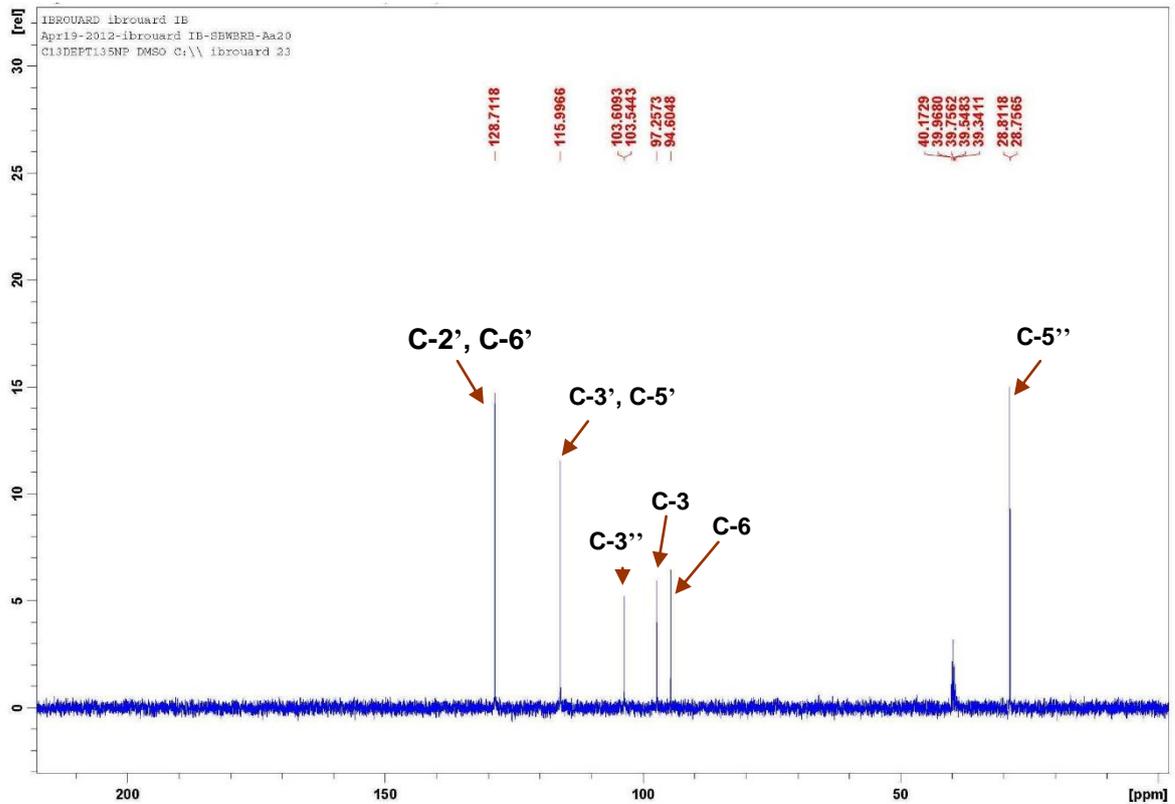
Spectre N°36: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (6.5 à 8.5 ppm) du composé G4



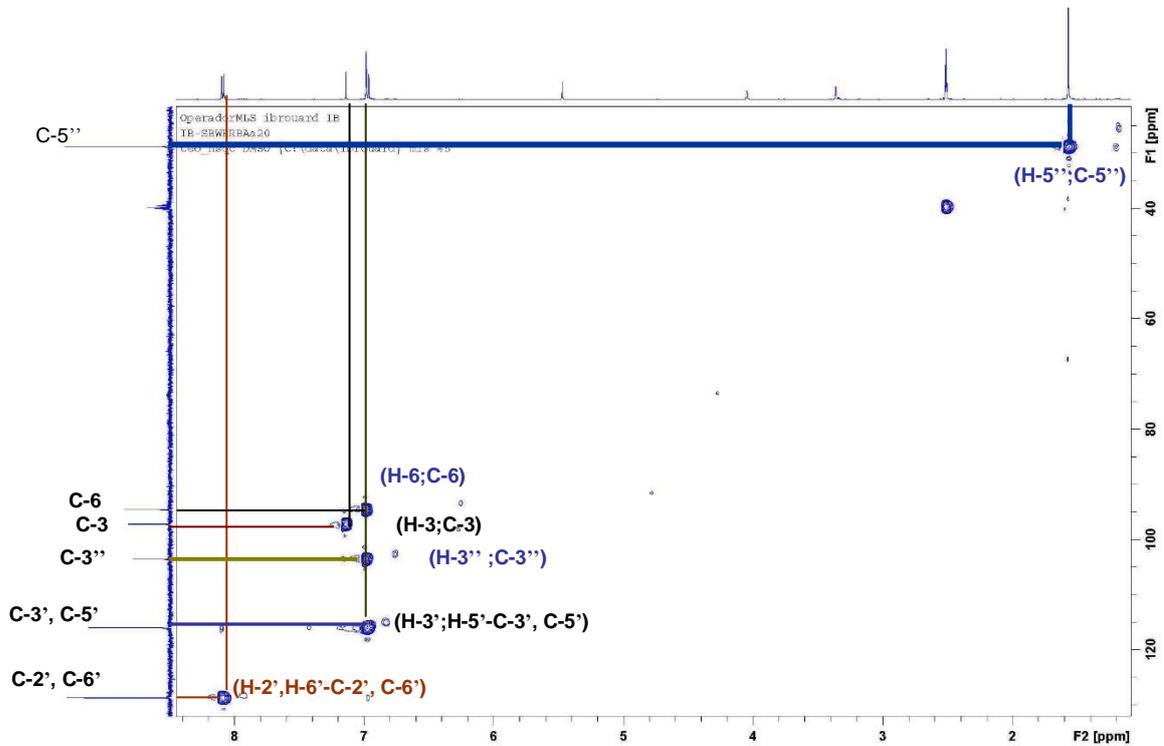
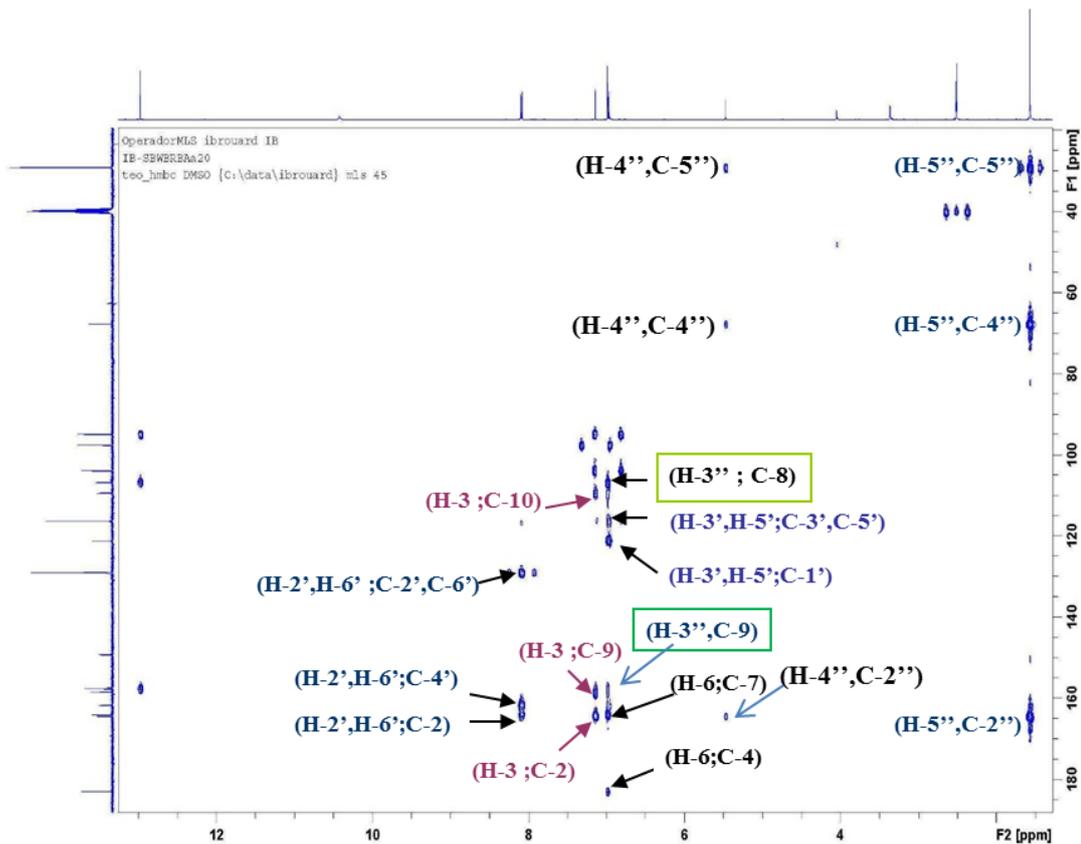
Spectre N° 37: Masse en mode électrospray du composé G4

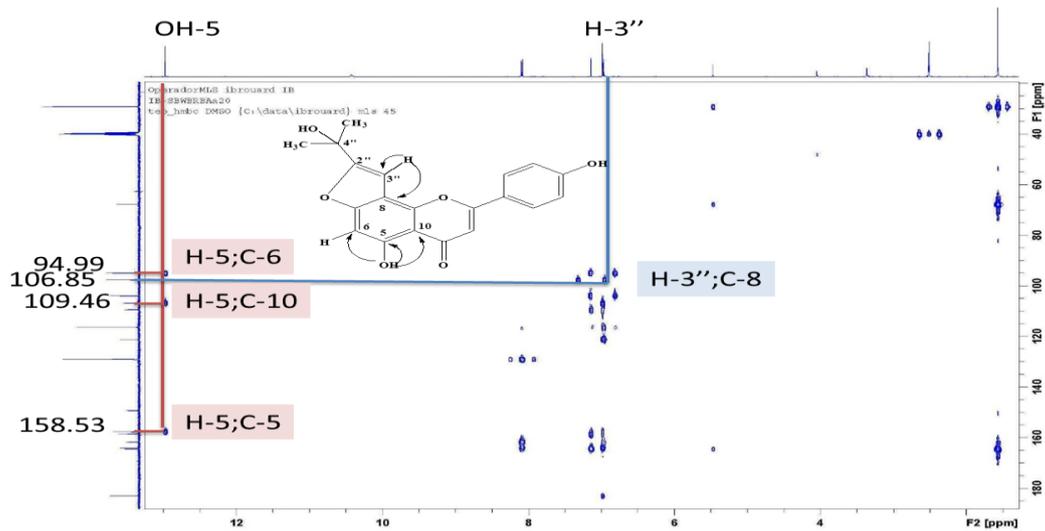
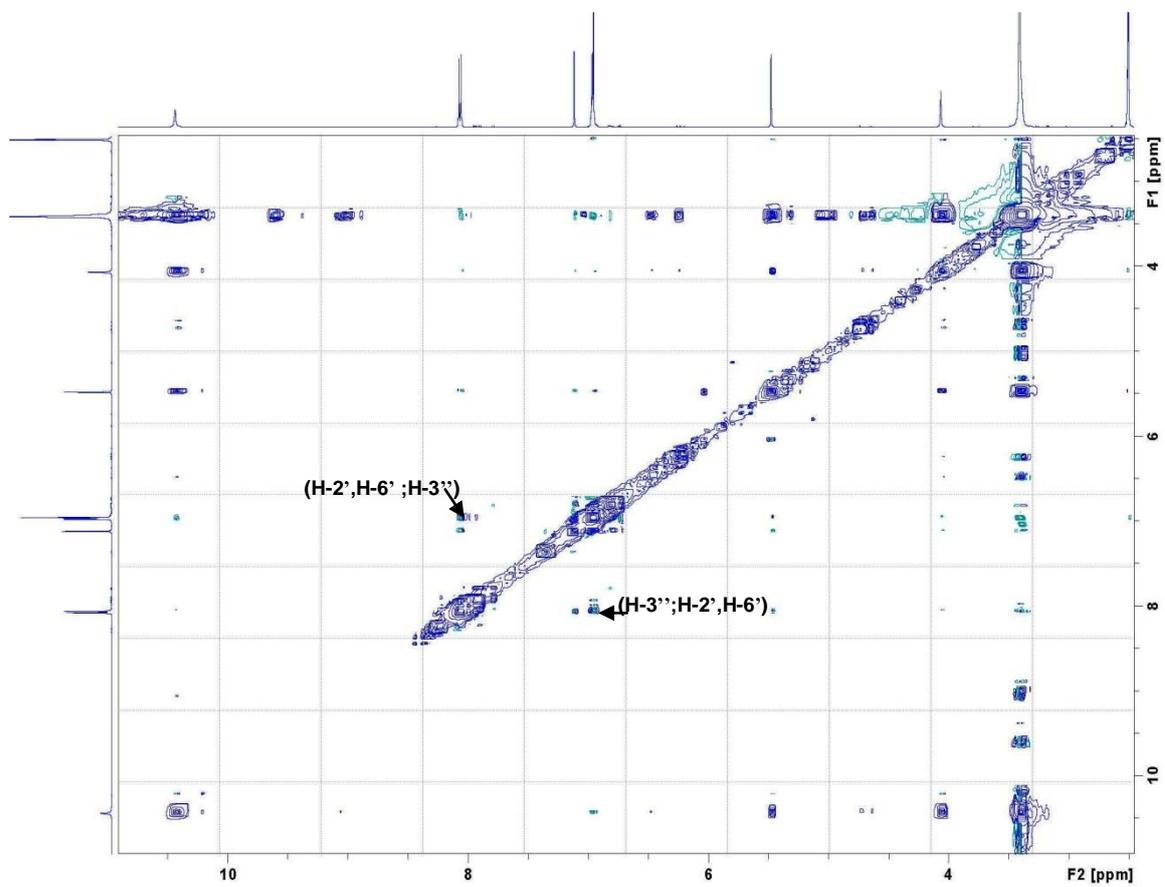


Spectre N°38:RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G4



Spectre N°39: DEPT 135 (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G4

Spectre N°40: HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G4Spectre N°41: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G4

Spectre N°42: HMBC (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G4Spectre N°43: NOESY (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé G4

IV.2.1.5 Elucidation du Composé G6

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°44**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 309.0732$ calculé pour $C_{16}H_{14}O_5Na$, orientant vers la formule brute $C_{16}H_{14}O_5$ soit une molécule comportant 10 insaturations.

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre N°49**) et ses séquences DEPT 135 (**Spectre N°50**) révèlent la présence de 16 atomes de carbone :

- ✓ 1 CH_3 oxygéné à $\delta = 55,5$ ppm.
- ✓ 6 groupements CH aromatiques caractéristiques des cycles A et B des flavonoïdes.
- ✓ 1 groupement CH oxygéné à $\delta = 78,01$ ppm.
- ✓ 1 groupement CH_2 à $\delta = 44,71$ ppm.
- ✓ 1 carbonyle à $\delta = 187,75$ ppm.
- ✓ 6 carbones quaternaires.

L'analyse du spectre RMN 1H (**Spectre N° 45**) et son étalement (**Spectre N° 46 et 47**) réalisé dans le *DMSO-d6* indiquent :

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 7,30$ ppm et à $\delta = 6,70$ ppm ($J = 7,0$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Deux autres signaux sous forme d'un doublet à $\delta = 6,00$ ppm ($J = 1,7$ Hz) et à $\delta = 5,96$ ppm ($J = 1,7$ Hz) d'intégration 1H chacun attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.

Sur le même spectre, on remarque la présence de signaux à 5,34ppm (dd ; $J = 10,1$ et 2,2 Hz) et à 3,00 ppm (dd ; $J = 13,0$ et 10,1 Hz) et à 2,55 ppm un signal sous forme doublet (d ; $J = 2,3$ Hz) partiellement recouvert par le signal du solvant correspondant respectivement aux protons en position 2 et 3 d'une flavanone.

Un dernier signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,70$ ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N° 51**) montre :

Une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,30$ ppm et $\delta = 6,70$ ppm confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'. Sur le même spectre COSY on constate une tache de corrélation entre le H-2 $_{\beta}$

et le H-3_α et une tache de corrélation entre le H-3_β et les signaux à 5,34 ppm, 3,00 ppm et 2,55 ppm respectivement, qui sont attribuables aux protons 2 et 3 de la flavanone.

L'examen des spectres HSQC (**Spectre N° 52**) permet l'attribution des carbones qui portent des protons suivants :

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et un atome de carbone à $\delta = 128,09$ ppm attribuable à C-2', C-6'.

Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et un atome de carbone à $\delta = 115,06$ ppm attribuable à C-3', C-5'.

Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 95,53$ ppm qui est le C-6.

Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à $\delta = 93,14$ ppm qui est le C-8.

Une tache de corrélation entre H-2_β et un atome de carbone à $\delta = 78,01$ ppm qui est le C-2.

Une tache de corrélation entre H-3_α et un atome de carbone à $\delta = 44,71$ ppm qui est le C-3.

Une tache de corrélation entre H-3_β et un atome de carbone à $\delta = 44,71$ ppm qui est le C-3.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 55,55$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle .

Les attributions des carbones restants ont été complétés par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (**Spectre N°58**) qui sont :

Quatre taches de corrélation entre le H-2', H-6' et quatre atomes de carbone, le premier à un déplacement chimique à $\delta = 128,09$ ppm attribuable à C-2', C-6', le deuxième à $\delta = 115,06$ ppm qui est le C-3', C-5', le troisième atome à $\delta = 78,01$ ppm attribuable à C-2 et le quatrième atome à $\delta = 157,48$ ppm attribuable à C-4'.

Trois taches de corrélation entre le H-3' et le H-5', le premier atome de carbone à $\delta = 115,06$ ppm qui est attribuable à C-3' et le C-5', le deuxième atome de carbone à $\delta = 128,09$ ppm qui est le C-2', C-6' et le troisième atome à $\delta = 157,48$ ppm attribuable à C-4'.

Une tache de corrélation entre H-8 et les carbones oxygéné à $\delta = 162,15$ ppm et à $\delta = 164,19$ ppm attribuables à C-7 et C-5 respectivement. Ce même proton montre

également une corrélation avec les carbones à $\delta = 95.53$ ppm et à $\delta = 104.41$ ppm attribuables à C-6 et le C-10 respectivement.

Une tache de corrélation entre H-6 et le carbone oxygéné à $\delta = 164.19$ ppm attribuables à C-5. Ce même proton montre également une corrélation avec les carbones à $\delta = 93.14$ ppm et à $\delta = 104.41$ ppm qui ne peuvent être que le C-8 et C-10 respectivement.

Deux taches de corrélation entre H-2 β et un atome de carbone à $\delta = 128.09$ ppm qui est attribuable à C-2', C-6' et à $\delta = 187.75$ ppm qui est attribuable à C-4.

Trois taches de corrélation entre le H-3 α et les carbones à $\delta = 78.01$ ppm, $\delta = 129.30$ ppm et à $\delta = 187.75$ ppm attribuables à C-2, C-1' et C-4 respectivement.

Trois taches de corrélation entre le H-3 β et les carbones à $\delta = 104.41$ ppm, $\delta = 129.30$ ppm et à $\delta = 187.75$ ppm attribuables à C-10, C-1' et C-4 respectivement.

Deux taches de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 162.15$ ppm qui est attribuable à C-7 permettant ainsi l'attribution du méthoxyle sur la position 7, et à $\delta = 95.53$ ppm qui est attribuable à C-6.

L'examen du spectre ROESY (**Spectre N° 54**) montre une corrélation de type NOE entre les protons du méthoxyle avec les protons H-6 et H-8 à $\delta = 5.96$ ppm et $\delta = 6.00$ ppm respectivement confirmant ainsi la substitution du méthoxyle en position C-7.

Nous pouvons alors identifier le composé comme étant la 5,4'-dihydroxy-7-méthoxy flavanone ou plus communément appelée sakuranetine déjà isolée des *Artemisia campestris*, ssp. *glutinosa* [3].

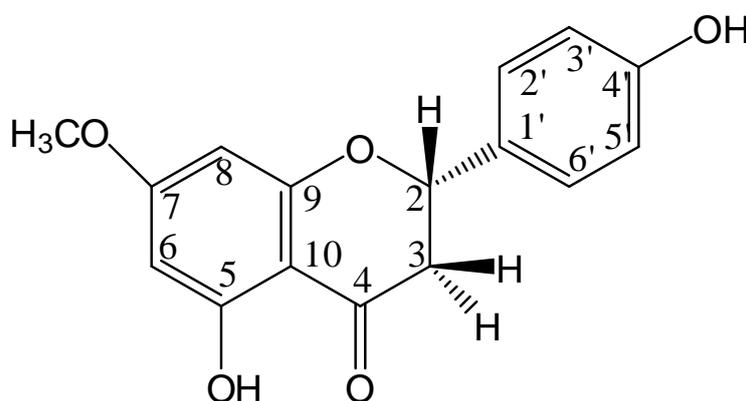


Figure IV.5 : Sakuranetine

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D COSY, HSQC sont regroupées dans les tableaux IV.17, IV.18, IV.19 respectivement.

Tableau IV.17 : Données de la spectroscopie RMN ¹H du composé G 6

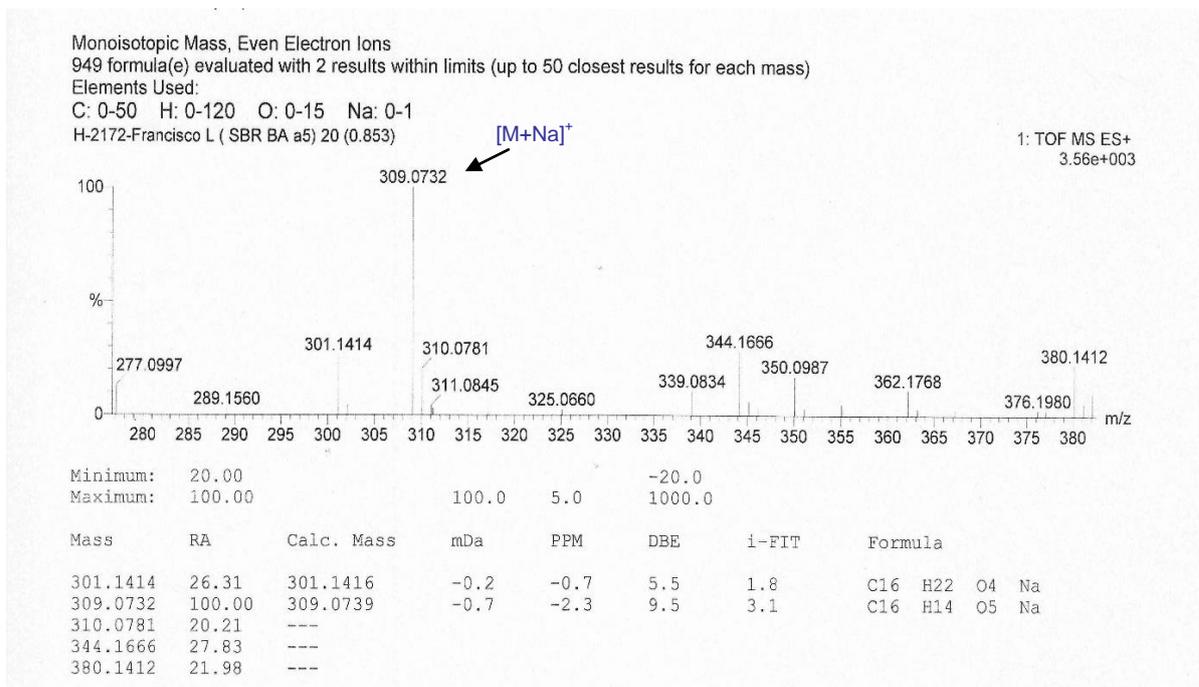
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7.30	2H	d (7)	H-2' , H-6'
6.70	2H	d (7)	H-3' , H-5'
6.00	1H	d(1.7)	H-8
5.96	1H	d(1.7)	H-6
5.34	1H	dd(10.1; 2.2)	H-2 _{β}
3.70	3H	s	OMe
3.00	1H	dd(13.0;10.1)	H-3 _{α}
2.55	1H	d(2.2)	H-3 _{β}

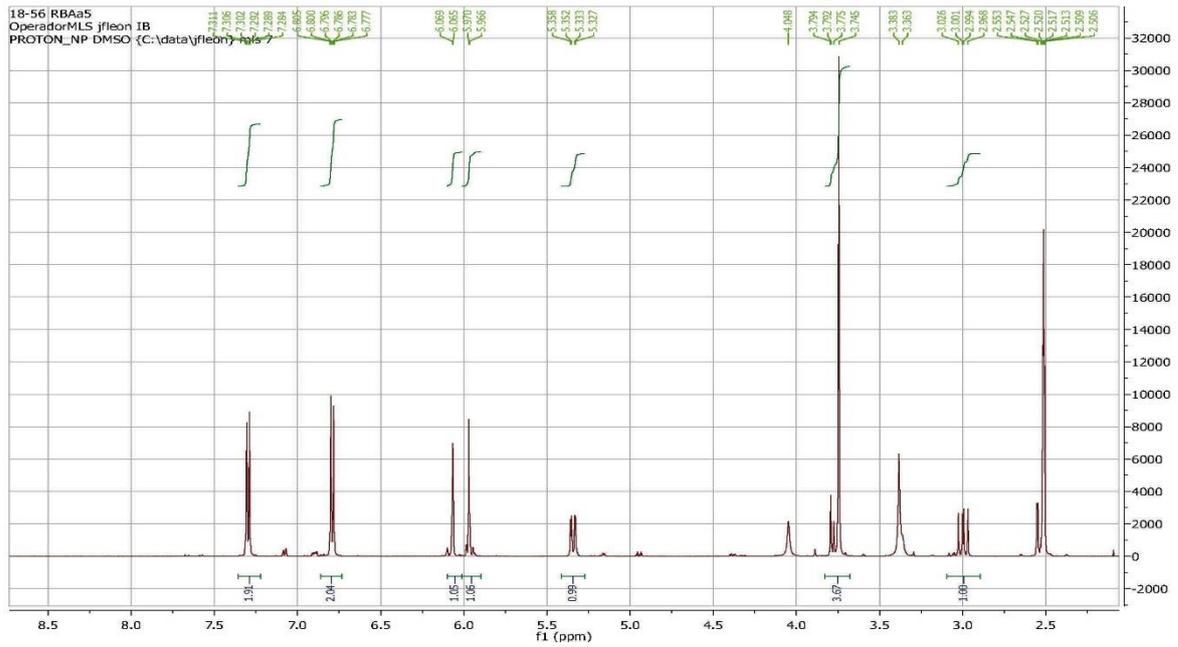
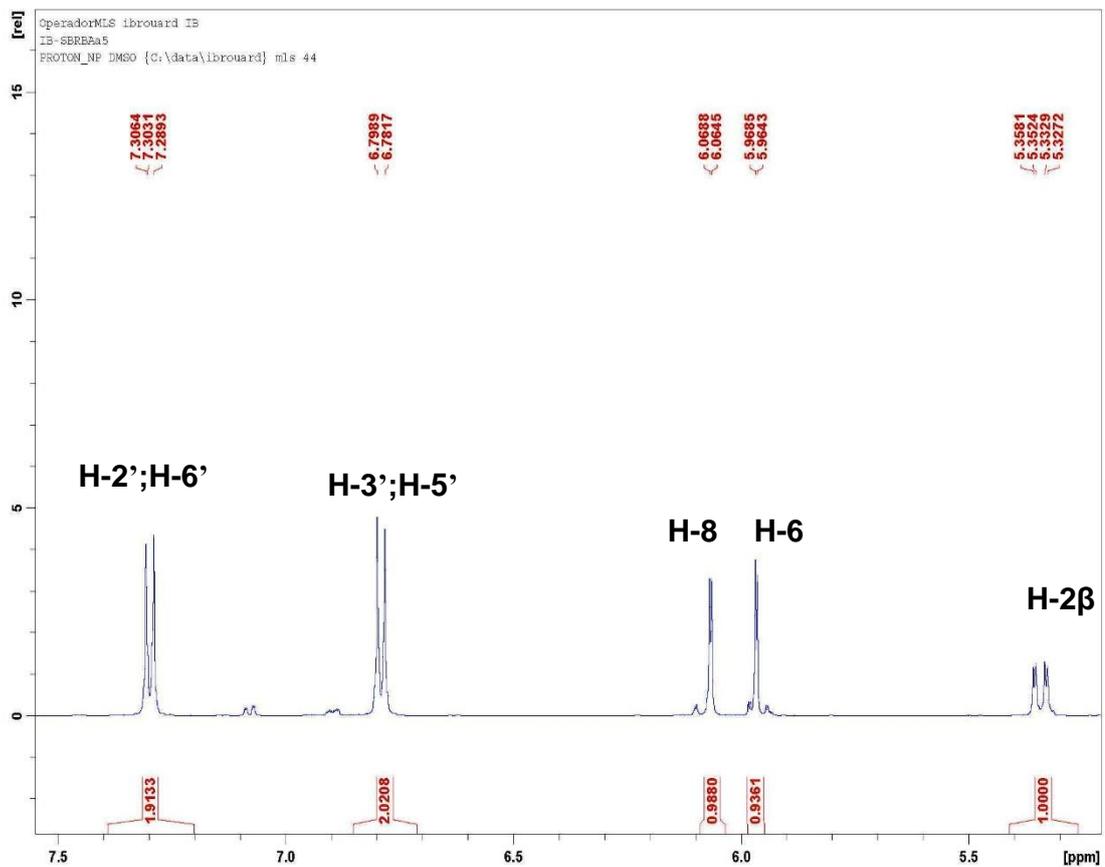
Tableau IV.18 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G6

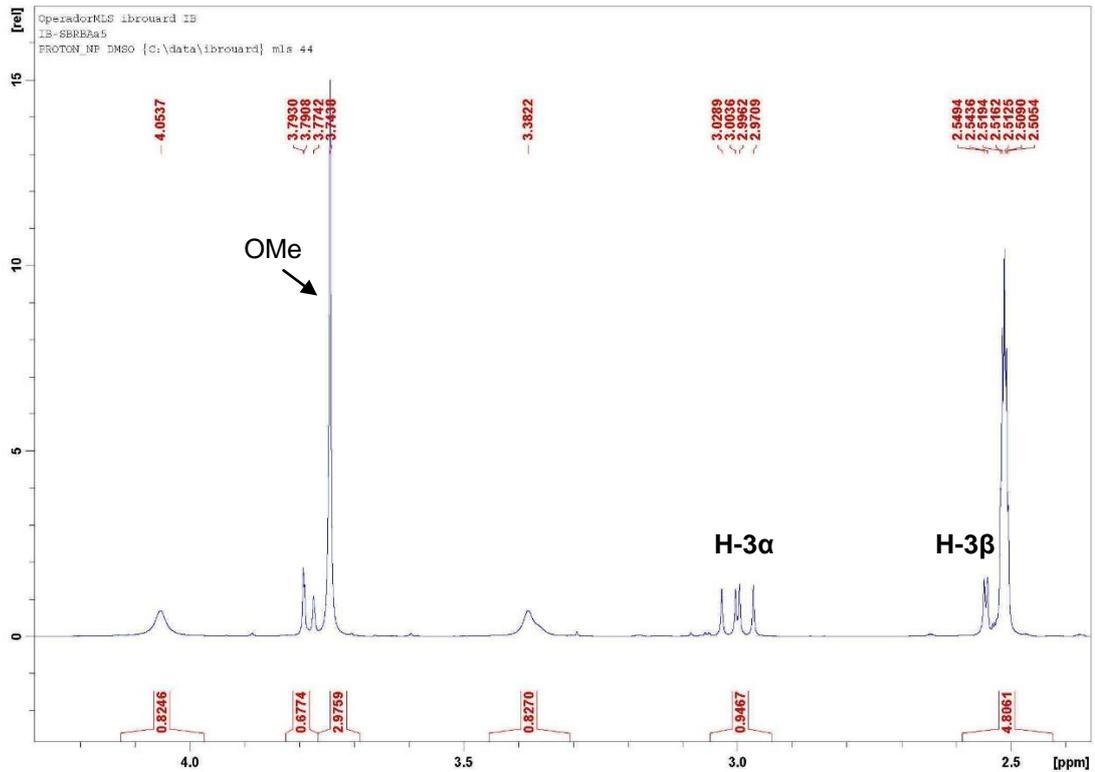
¹ H	δ (ppm)	¹³ C/HSQC	HMBC
H-2' ; H-6'	7.30	128.09	C-2' ; C-6' ; C-2(78.01) ; C-3' ; C-5' (115.06) ; C-4' (157.48).
H-3' ; H-5'	6.70	115.06	C-2' ; C-6' (128.09); C-3' ; C-5'; C-4' (157.48).
H-8	6.00	93.14	C-6 (95.53);C-10(104.41) ; C-7(162.15) ; C-5(164.19).
H-6	5.96	95.53	C-8(93.14) ; C-10(104.41); C-5(164.19).
H-2 _{β}	5.34	78.01	C-2' ;C-6'(128.09);C-4 (187.75) .
OMe	3.70	55.55	C-7(162.15) ; C-6(95.53).
H-3 _{α}	3.00	44.71	C-2(78.01) ;C-1'(129.30) ; C-4(187.75).
H-3 _{β}	2.55	44.71	C-10(104.41) ; C-1' (129.30) ; C-4(187.75).

Tableau IV.19 : Données de la spectroscopie ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 du composé G6

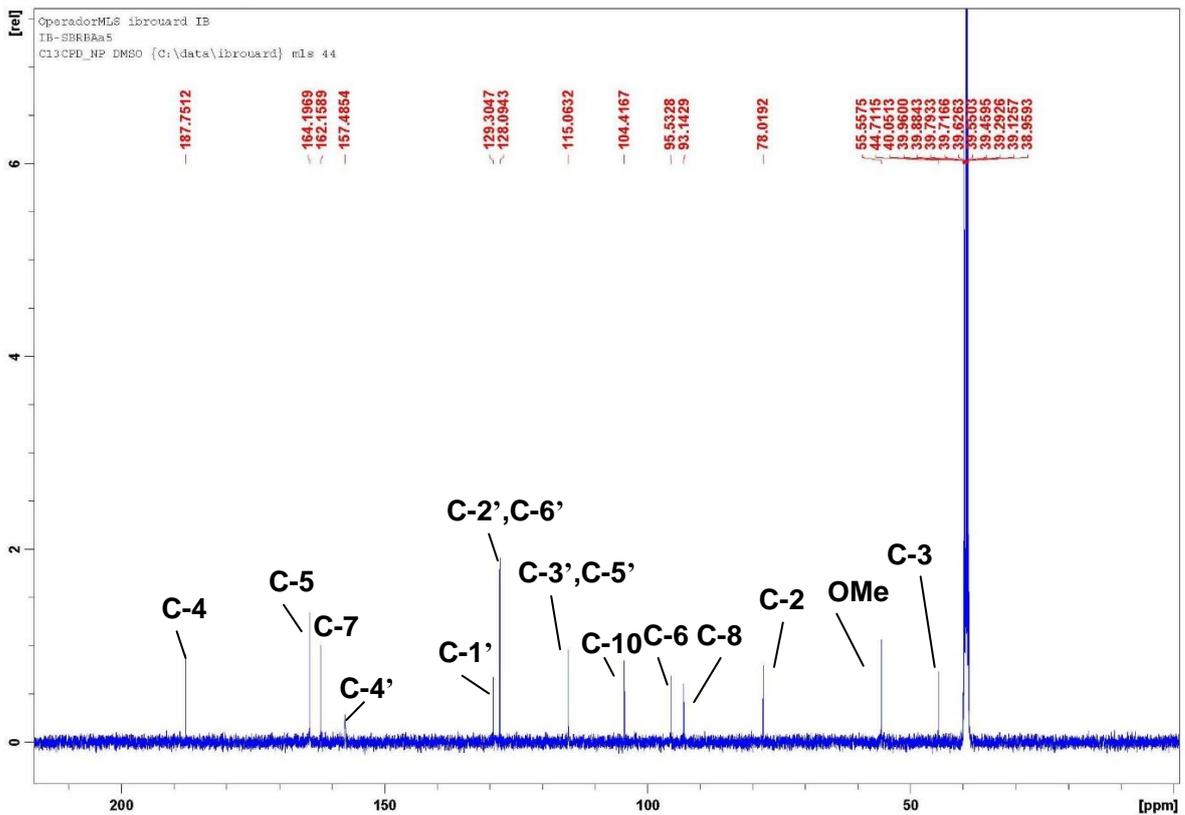
Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135	DEPT 90
2	78.01	CH	CH
3	44.71	CH ₂	
4	187.75		
5	164.19		
6	95.53	CH	CH
7	162.15		
8	93.14	CH	CH
9	/		
10	104.41		
1'	129.30		
2'	128.09	CH	CH
3'	115.06	CH	CH
4'	157.48		
5'	115.06	CH	CH
6'	128.09	CH	CH
OCH ₃	55.55	CH ₃	

**Spectre N°44**: Masse en mode électrospray du composé G6

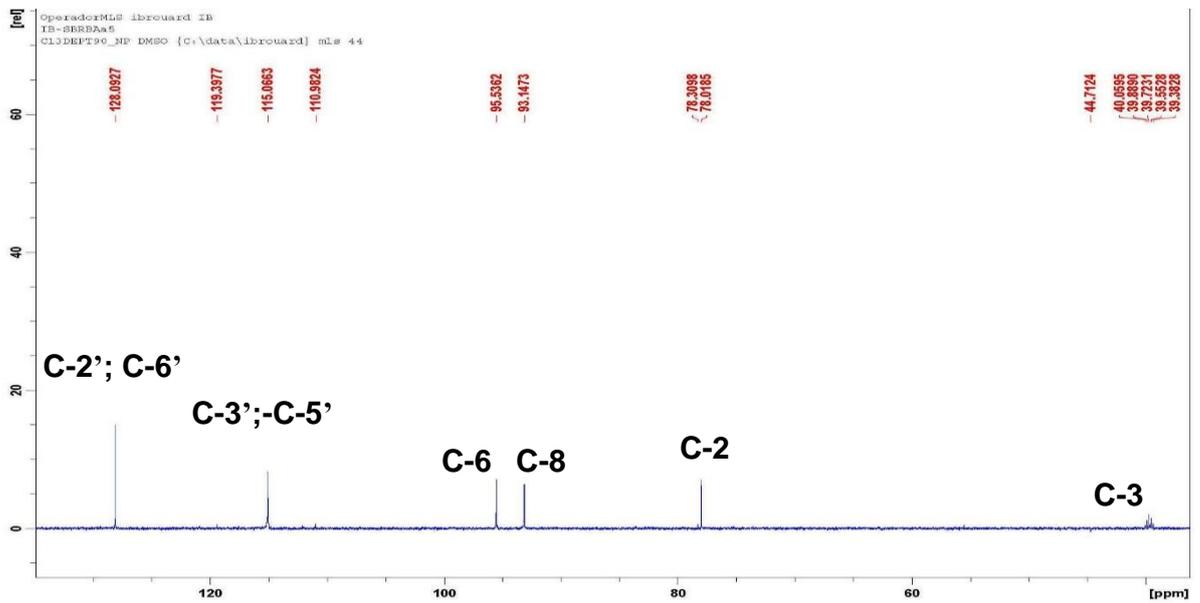
Spectre N°45: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé G6Spectre N°46: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) étalé (4.5 à 7.5 ppm) du composé G6



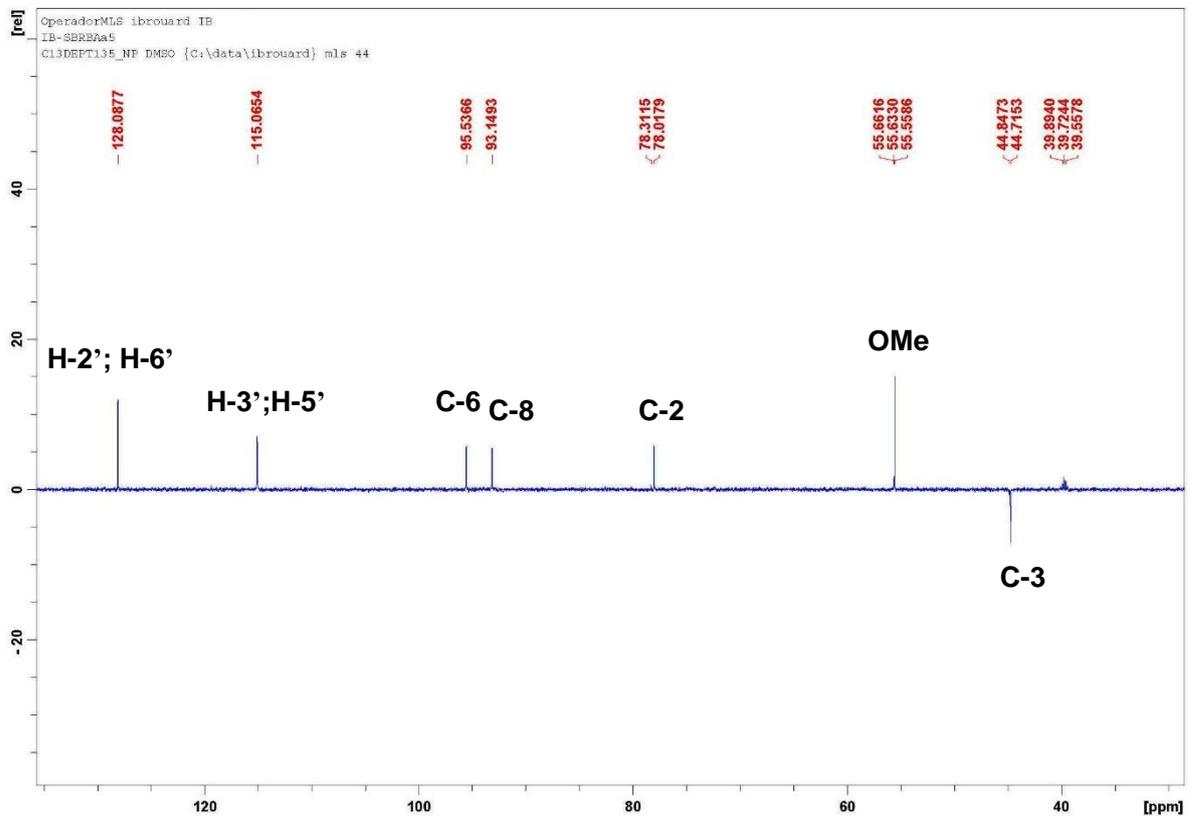
Spectre N°47: RMN ^1H (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (2 à 4.5 ppm) du composé G6



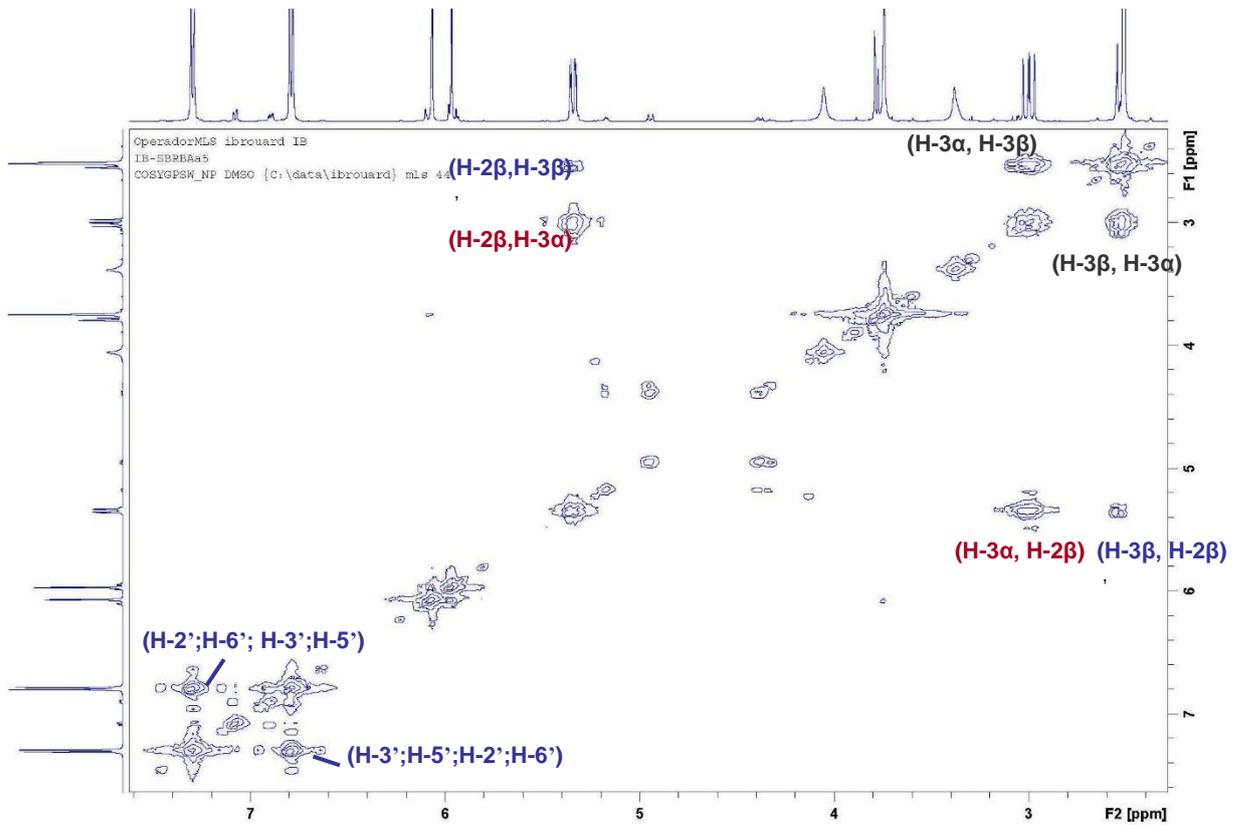
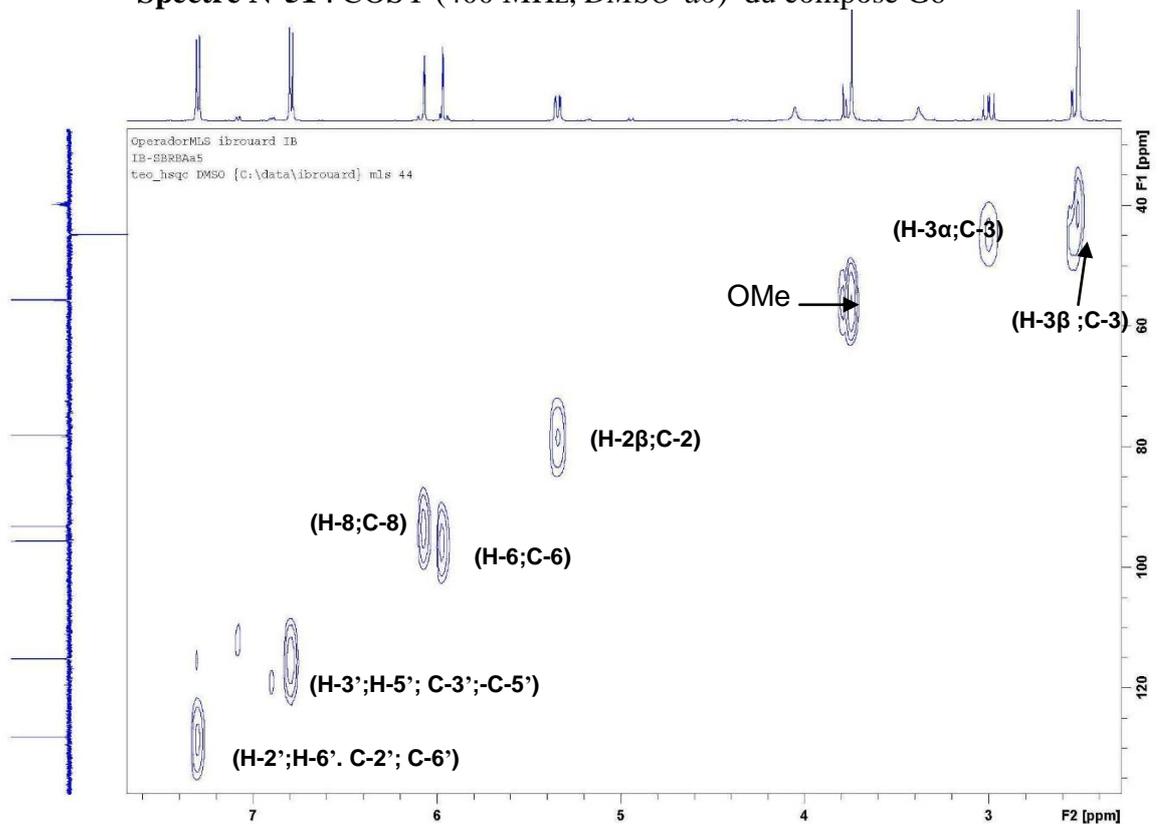
Spectre N°48 : RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G6

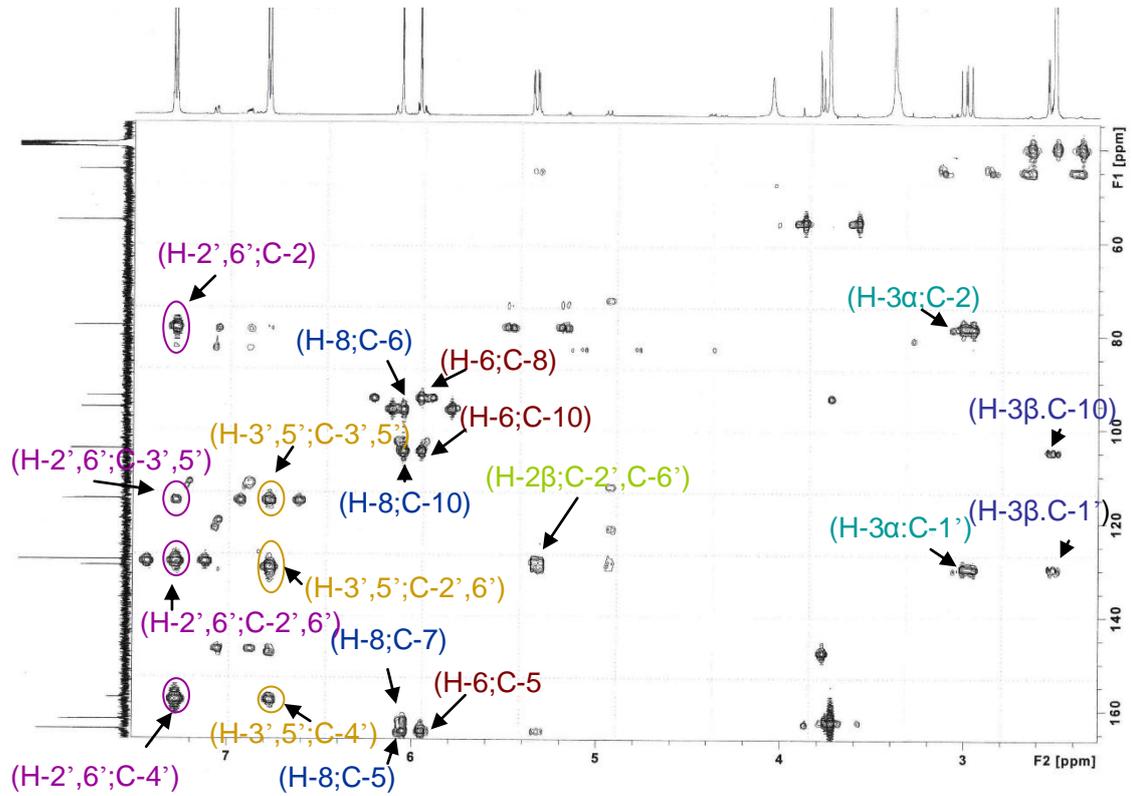
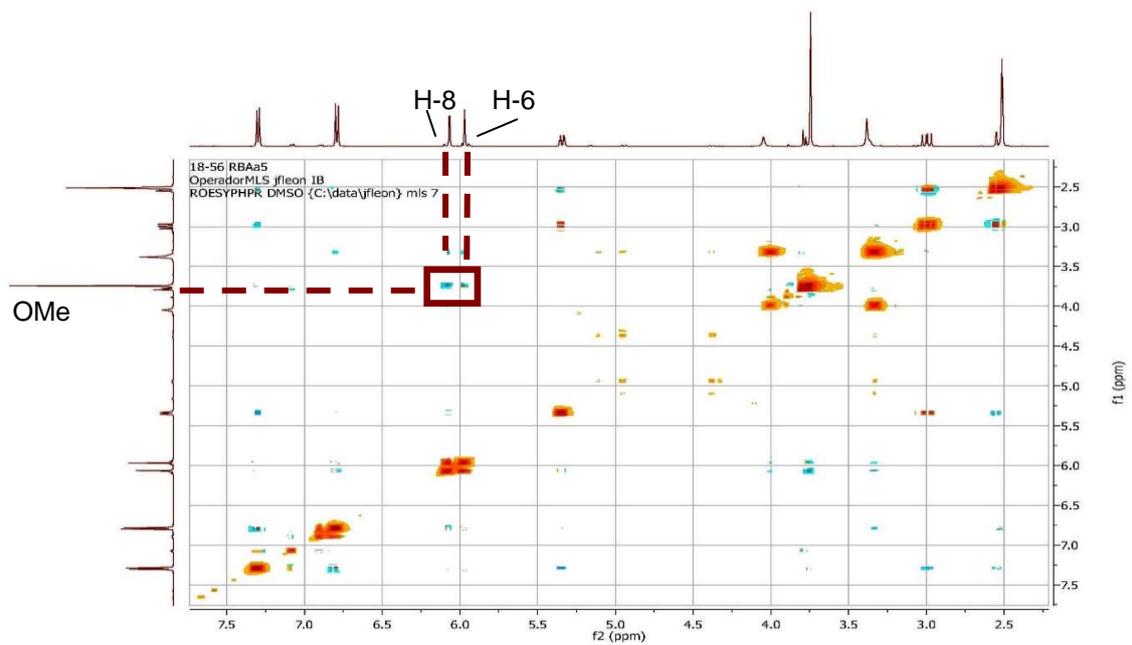


Spectre N°49 : RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) étalé (6.5 à 8.5 ppm) du composé G6



Spectre N°50 : DEPT 135(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé G6

Spectre N°51 : COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G6Spectre N°52: HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G6

Spectre N°53: HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G6Spectre N°54: ROESY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G6

IV.2.1.6 Elucidation du Composé G7

Le spectre UV (**Spectre N°55**) enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 315 nm sous forme d'un épaulement et une bande II à 257 nm laissant présager la structure d'une isoflavone.

L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +7$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre N°56**) et ses étalements (**Spectre N°57**) montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,06$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 7,30$ ppm et à $\delta = 6,78$ ppm ($J = 7,0\text{Hz}$) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Deux autres signaux sous forme d'un doublet à $\delta = 6,39$ ppm ($J = 1,7$ Hz) et à $\delta = 6,40$ ppm ($J = 1,7$ Hz) d'intégration 1H chacun attribuables à H-6 et H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.

Un dernier signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,80$ ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N°59**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à $\delta = 150,29$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 130,16$ ppm. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 114,76$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 96,49$ ppm qui est le C-6.

Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à $\delta = 94,76$ ppm qui est le C-8.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 55.86$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle .

Les attributions des carbones restants sont complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (**Spectre N°60**) sur ce spectre nous avons :

Une tache de corrélation entre le H-2 et les atomes de carbone à $\delta = 122.79$ ppm, et 124.64 ppm, et à $\delta = 173.71$ ppm attribuables à C-3, C-1' et C-4' respectivement. Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone oxygéné à $\delta = 159.10$ ppm qui ne peut être que le C-9.

Les protons H-3', H-5', H-2' et H-6' mènent à la localisation de C-4' à $\delta = 156.79$ ppm.

Une tache de corrélation entre le H-8 et le carbone oxygéné à $\delta = 159.10$ ppm attribuable à C-9.

Une tache de corrélation entre H-6 et le carbone oxygéné à $\delta = 162.33$ ppm attribuables à C-7. Ce même proton montre également une corrélation avec les carbones à $\delta = 94.76$ ppm et à $\delta = 107.87$ ppm qui ne peuvent être que le C-8 et C-10 respectivement.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 161.17$ ppm qui est attribuable à C-5.

L'examen du spectre ROESY (**Spectre N°61**) montre une seule corrélation de type NOE entre les protons du méthoxyle et le proton à $\delta = 6.39$ ppm qui n'est d'autre que le H-6 confirmant ainsi la position de OMe en C-5.

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°62**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 377.1003$ calculé pour $C_{16}H_{12}O_5Na$, orientant vers la formule brute $C_{16}H_{12}O_5$.

Toutes ces données sont en accord avec celles indiquées dans la littérature et mènent à la structure suivante: 5-O-Méthyl génisteine ou Isopruneine^[4-5]

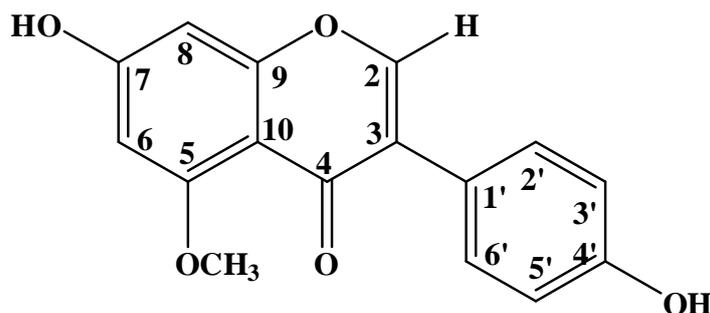


Figure IV.6 : Isopruneine

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D COSY, HSQC sont regroupées dans les tableaux IV.21, IV.22 et IV.23 respectivement.

Tableau IV.20: Données de la série spectrale UV du composé G7

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	315	257		Isoflavone
+ NaOH	304	267	306	
+AlCl ₃	315	257		
+AlCl ₃ /HCl	315	257		
+NaOAc	315	262		OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	315	257		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.21 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G7

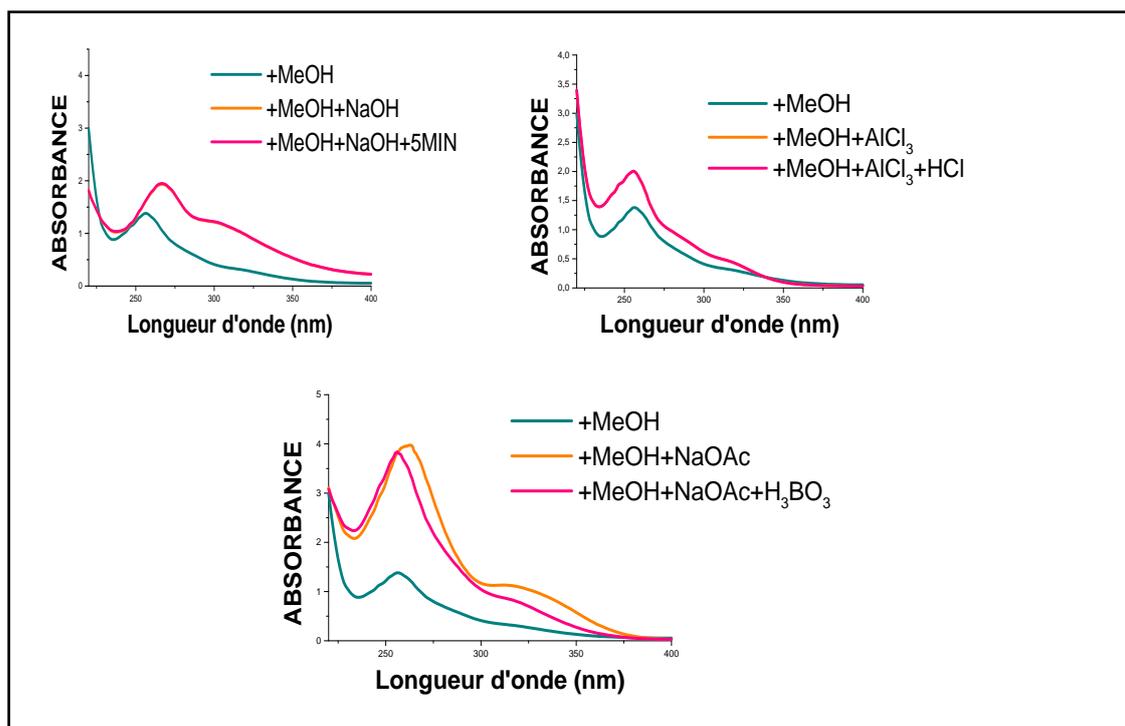
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
8.06	1H	s	H-2
7.30	2H	d (7.0)	H-2' ; H-6'
6.78	2H	d (7.0)	H-3' ; H-5'
6.40	1H	d (1.7)	H-8
6.39	1H	d (1.7)	H-6
3.80	3H	s	OMe

Tableau IV.22: Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G7

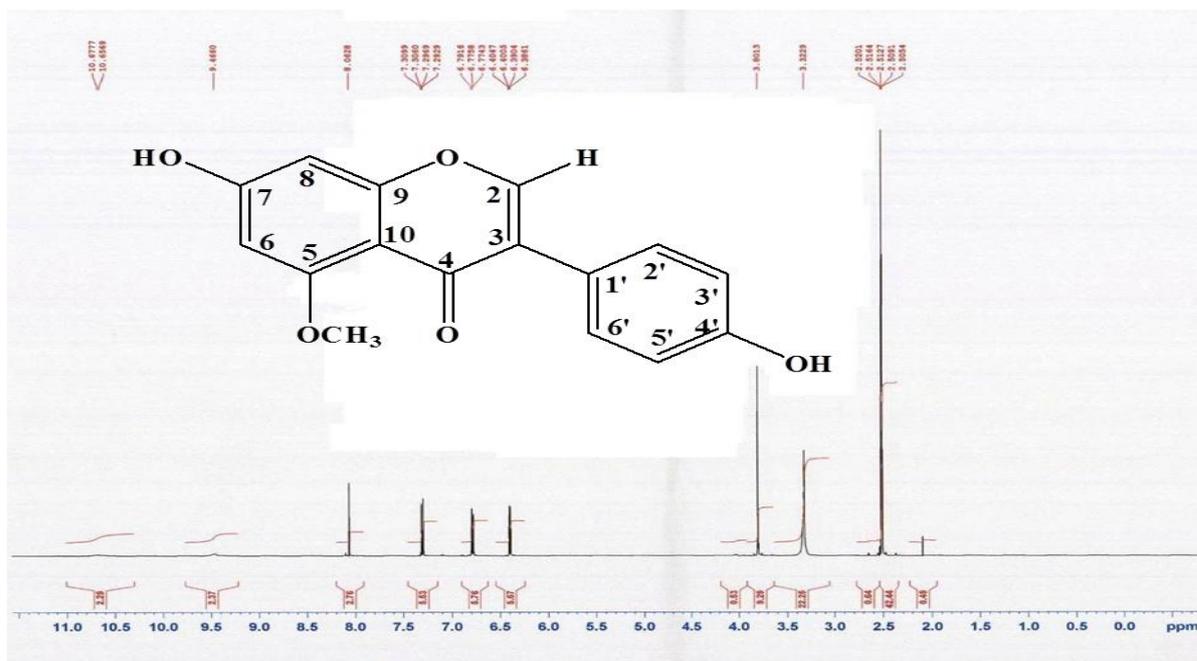
^1H	δ (ppm)	^{13}C /HSQC	HMBC
H-2	8.06	150.29	C-3(122.79) ; C-1'(124.64) ; C-9(159.10) ; C-4(173.71).
H-2' ; H-6'	7.30	130.16	C-3' ; C-5'(114.76) ; C-3 (122.79) ; C-2' ; C-6'(130.16) ; C-4'(156.79).
H-3' ; H-5'	6.78	114.76	C-3' ; C-5'(114.76) ; C-1'(124.64) ; C-4'(156.79).
H-8	6.40	94.76	C-9(159.10) .
H-6	6.39	96.49	C-8(94.76) ; C-10 (107.87) ; C-5 (161.17).
OMe	3.80	55.86	C-5(161.17).

Tableau IV.23 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C du composé G7

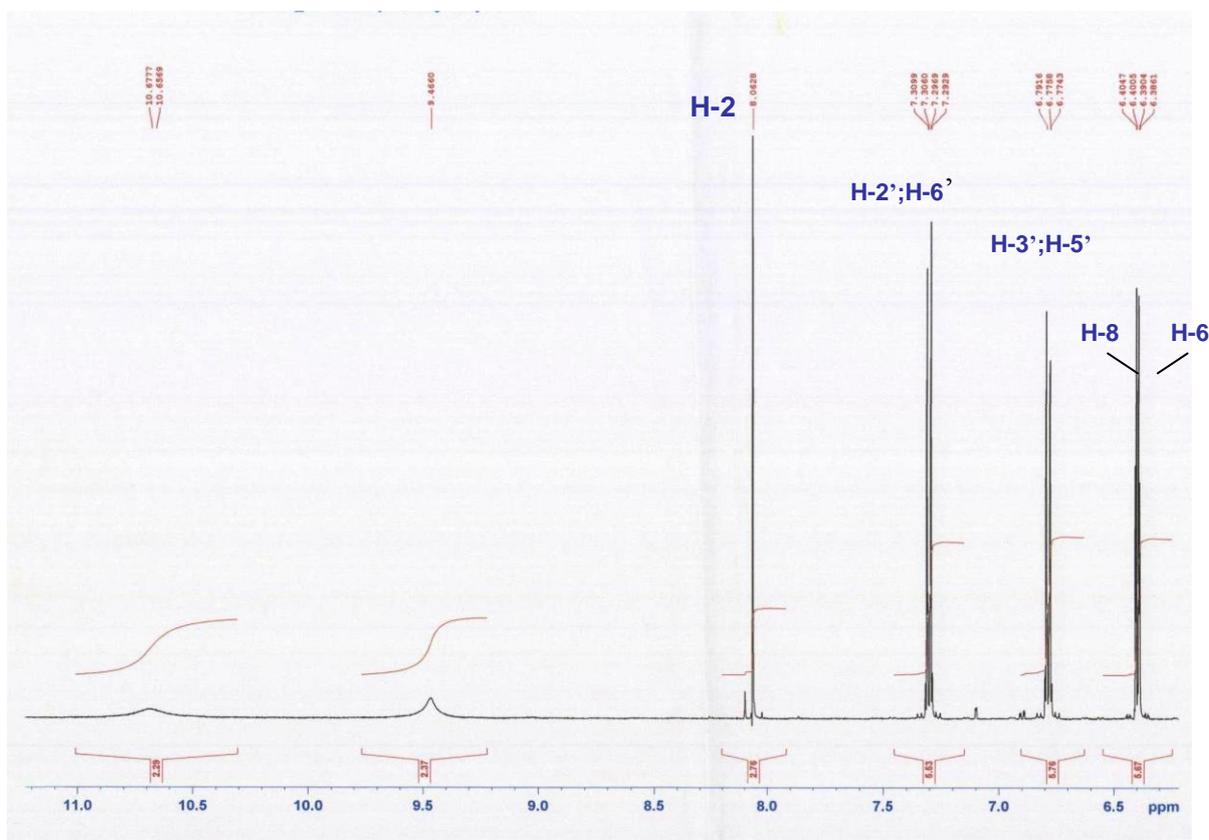
Position de ^{13}C	δ (ppm)
2	150.29
3	122.79
4	173.71
5	161.17
6	96.49
7	162.33
8	94.76
9	159.10
10	107.87
1'	124.64
2'	130.16
3'	114.76
4'	156.97
5'	114.76
6'	130.16
OCH ₃	55.86



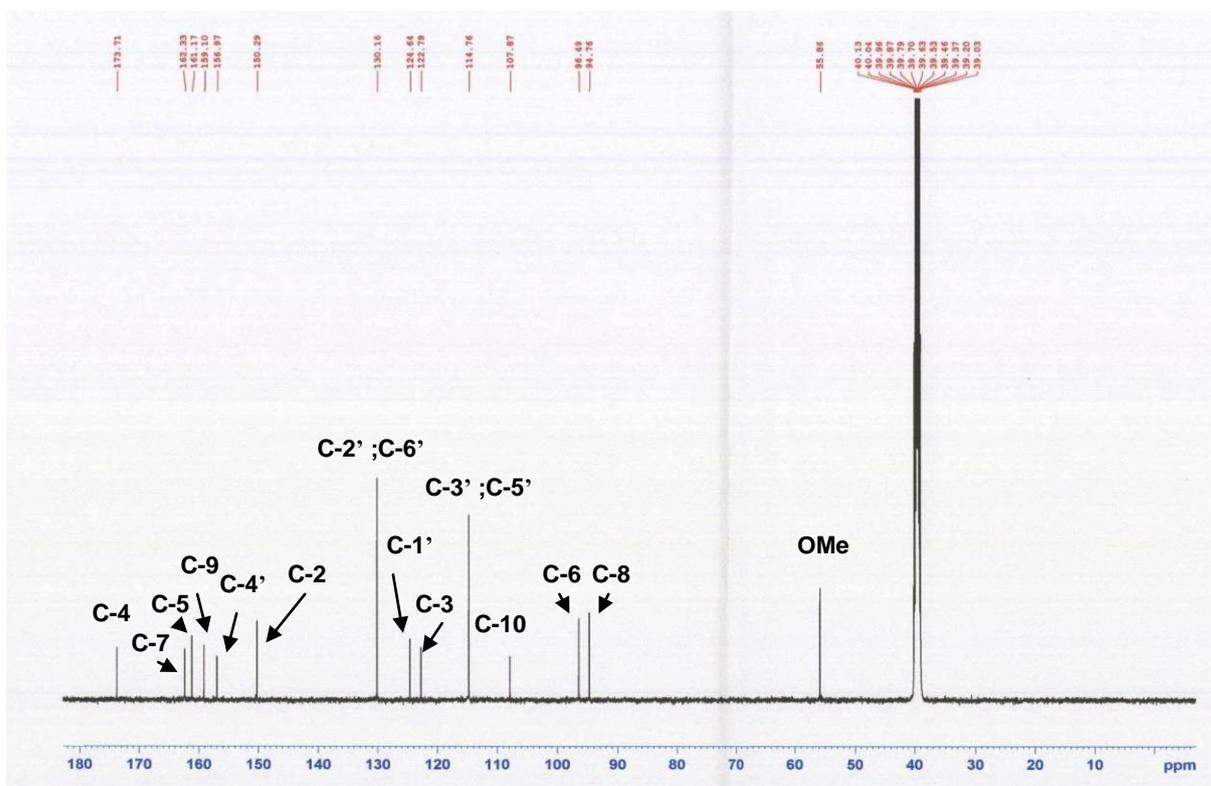
Spectre N°55 : Série spectrale UV du composé G7



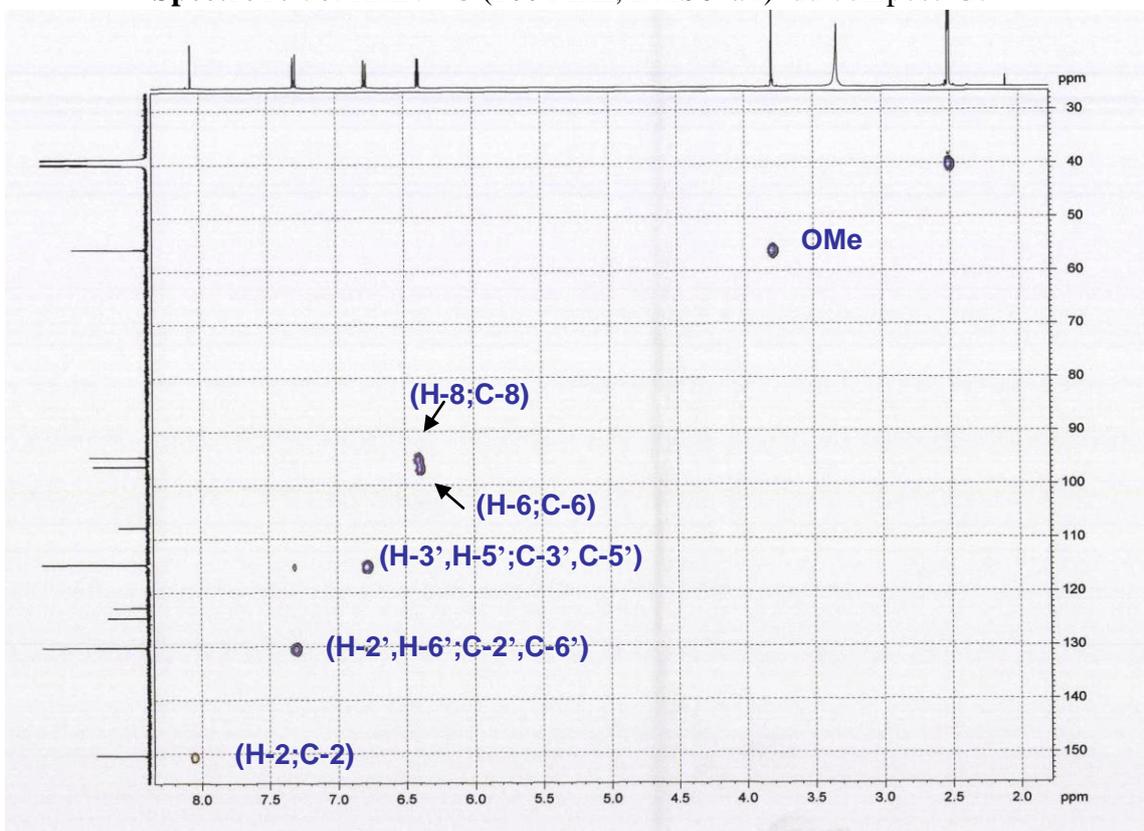
Spectre N°56: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé G7



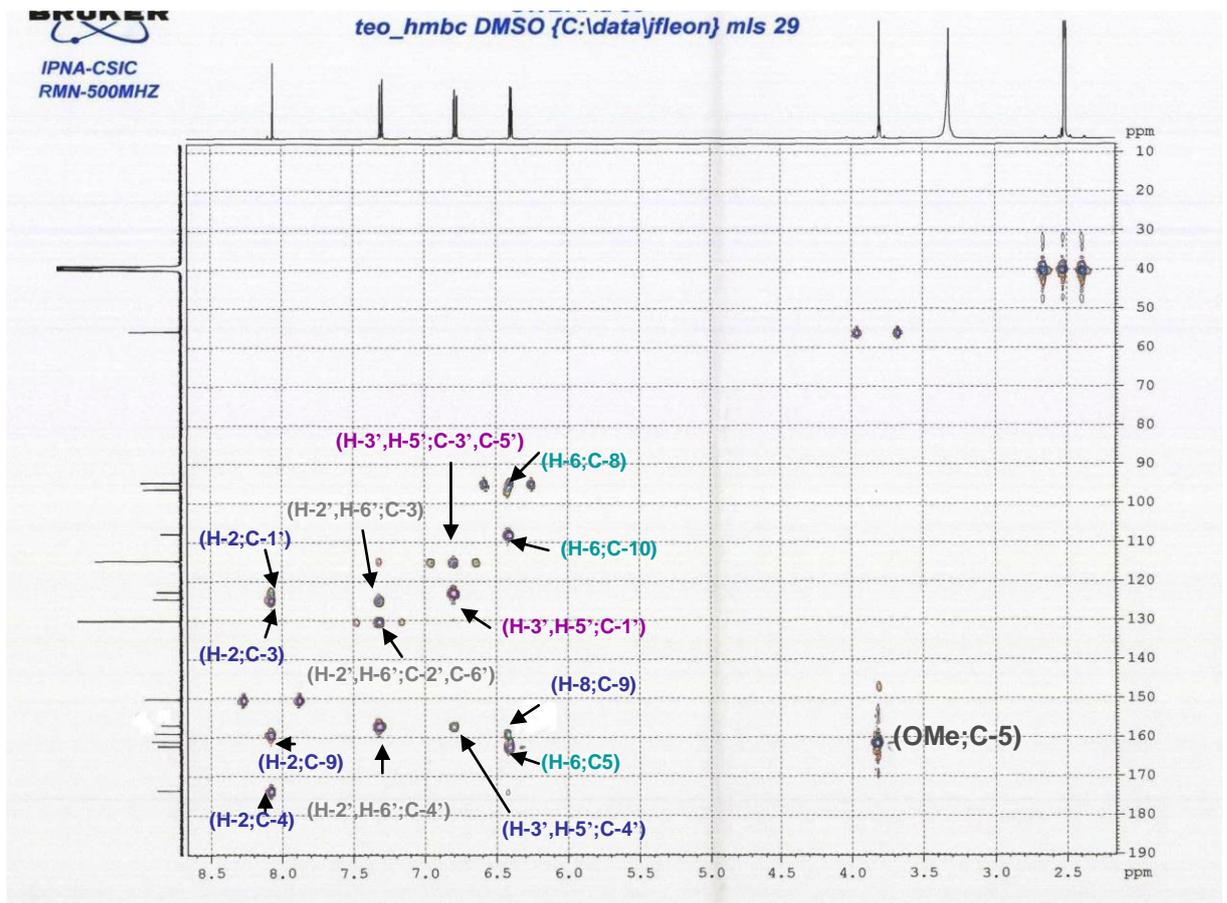
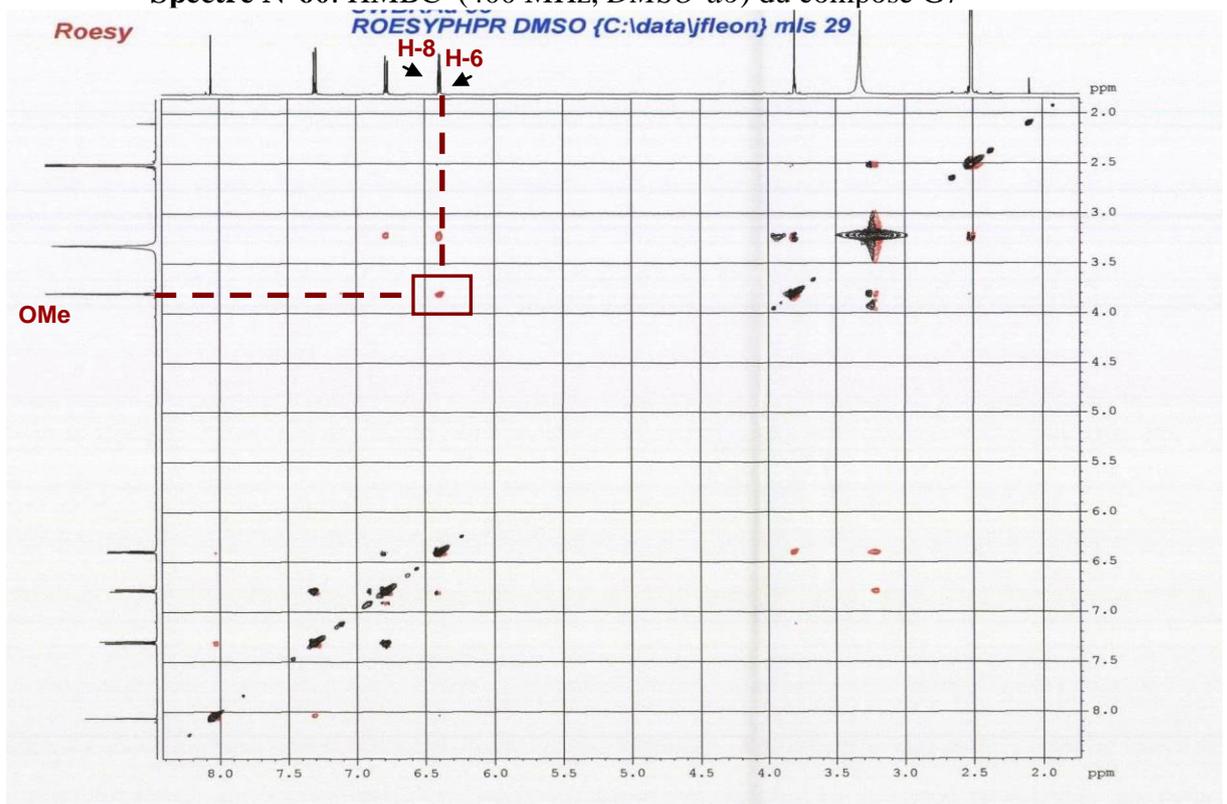
Spectre N°57: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) étalé (6 à 8.5 ppm) du composé G7

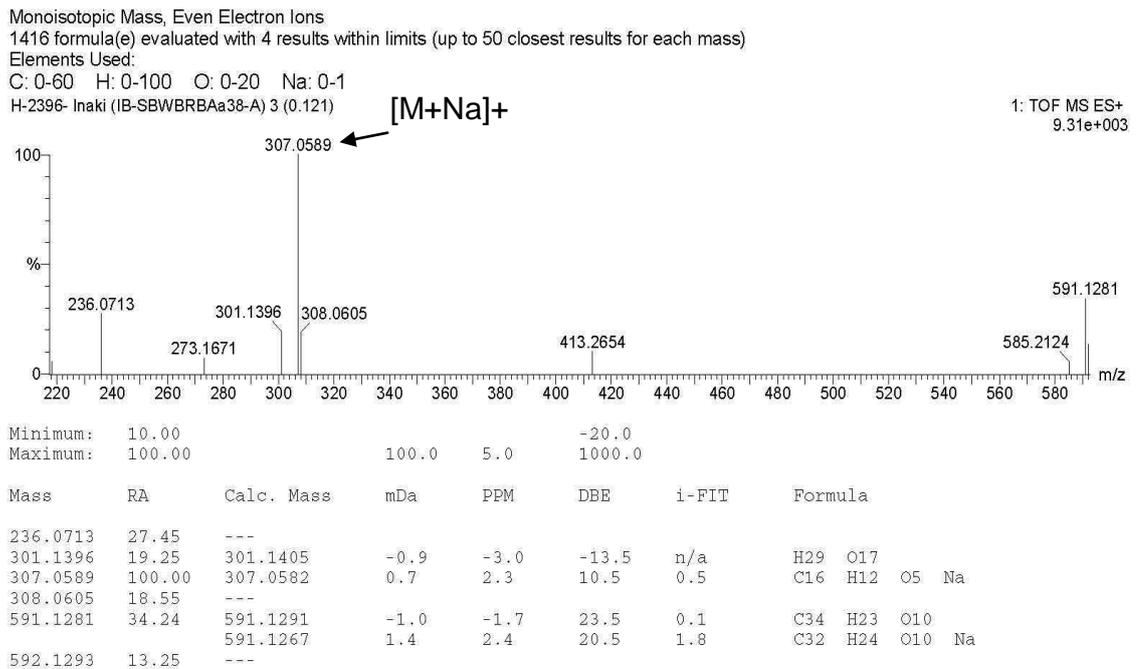


Spectre N°58: RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé G7



Spectre N°59: HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé G7

Spectre N°60: HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé G7Spectre N°61: ROESY (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé G7



Spectre N°62: Masse en mode électrospray du composé G7

IV.2.1.7 Elucidation du Composé G8

L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre N°63) et ses étalements (Spectre N°64 et 65) montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

Un singulet à $\delta = 12.93$ ppm, attribuable à un OH en C-5.

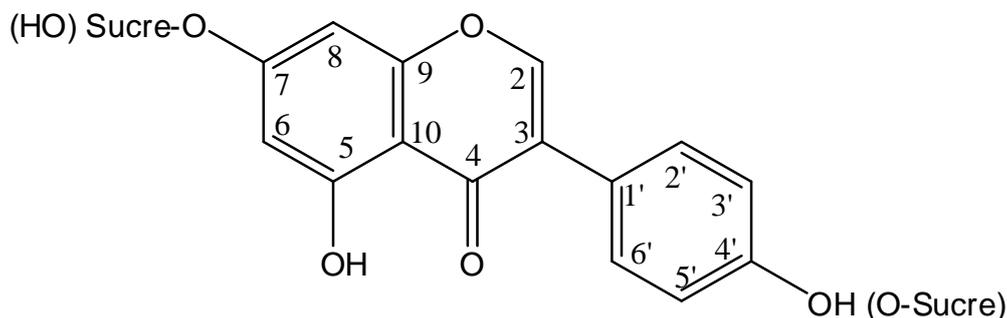
Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,42$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 7,40$ ppm et à $\delta = 6,84$ ppm ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Un autre signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,70$ ppm ($J = 2,2$ Hz) d'intégration 1H attribuable à H-8 et autre signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,45$ ppm ($J = 2,2$ Hz) d'intégration 1H attribuable à H-6.

Sur le même spectre, on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 5,06$ ppm ($J = 7,5$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, d'après la valeur de son déplacement chimique, par un pont oxygène.

D'après la valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique avec son voisin en C-2'', cette entité pourrait dériver soit d'un glucosyle soit d'un galactosyle avec une configuration β du carbone anomérique. L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans le schéma suivant :



Ce spectre montre également:

Trois doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 5,36$ ppm ($J = 4,9$ Hz), $\delta = 5,07$ ppm ($J = 4,7$ Hz) et $\delta = 5,03$ ppm ($J = 5,3$ Hz) et un signal d'intégration 1H à $\delta = 4,58$ ppm sous forme doublets de doublets ($J = 5,4-6,0$ Hz). Les valeurs des constantes de couplage de ces noyaux sont caractéristiques de couplages vicinaux de protons de groupements hydroxyles avec des groupements CH. Ces observations orientent vers la présence de quatre groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

Le spectre du ^{13}C (**Spectre N° 67**) et le spectre DEPT 135 (**Spectre N° 68**) permettent notamment l'observation d'un signal à $\delta = 99,84$ ppm correspondant au proton anomérique d'un sucre. La présence de cinq carbones en RMN ^{13}C à $\delta = 73,07$ ppm (C-2''), $\delta = 76,39$ ppm (C-3''), $\delta = 69,62$ ppm (C-4''), $\delta = 77,18$ ppm (C-5'') et $\delta = 60,63$ ppm (C-6''), permet de confirmer la présence d'un sucre notamment le glucose ^[6]

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N°69**) permet la localisation H-2'' du sucre (ddd) à $\delta = 3,27$ ppm ($J = 8,9; 7,5; 4,9$ Hz), grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1''. Cette attribution de H-2'' permet la localisation de OH-2'' (d) à $\delta = 5,36$ ppm ($J = 4,9$ Hz) et H-3'' (td) à $\delta = 3,32$ ppm ($J = 8,9; 4,7$ Hz). L'attribution de ce dernier noyau permet de localiser celle de OH-3'' (d) à $\delta = 5,07$ ppm ($J = 4,7$ Hz) et celle de H-4'' (ddd) à $\delta = 3,18$ ppm ($J = 9,0; 8,9; 5,3$ Hz). Toujours sur le même spectre, H-4'' permet de localiser OH-4'' sous forme de (d) à $\delta = 5,03$ ppm ($J = 5,3$ Hz) et deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 3,73$ ppm ($J = 10,1; 5,4$ Hz) et $\delta = 3,47$ ppm ($J = 12,0; 6$ Hz), ils sont attribuables aux deux protons Ha-6'', Hb-6'' du sucre. Cette attribution de H-6''a, H-6''b permet la

localisation de OH-6'' sous forme de (t) à $\delta = 4,58$ ppm ($J = 5,4-6$ Hz). Cette observation oriente vers une entité sucre dérivée du glucose.

Une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,40$ ppm et $\delta = 6,84$ ppm confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'.

Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 6,70$ ppm et $\delta = 6,45$ ppm confirmant les attributions de H-8 et H-6 donc une substitution du noyau A en 7 et 5.

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N° 70**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à $\delta = 154,56$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 130,13$ ppm. De même une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 115,07$ ppm.

Une tache de corrélation avec H-6 et H-8 permet l'attribution de C-6 et C-8 à $\delta = 99,58$ ppm et $\delta = 94,51$ ppm.

Une tache de corrélation entre l'hydrogène anomérique et l'atome de carbone C-1'' du sucre, permettant ainsi sa localisation à $\delta = 99,84$ ppm.

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (**Spectre N°71**) met en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, et permet de tirer les indications suivantes :

✓ Le proton H-2 en C-2 donne trois taches de corrélation :

La première avec l'atome de carbone à $\delta = 120,97$ ppm attribuable à C-1'.

La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 122,54$ ppm qui ne peut être que le C-3.

La troisième avec l'atome de carbone à $\delta = 154,56$ ppm qui ne peut être attribué qu'à C-2. Sur le même spectre, d'autres informations peuvent être tirées comme suit :

✓ Les protons H-2' et H-6' montrent:

Trois taches de corrélation avec le même atome de carbone à $\delta = 154,56$ ppm qui ne peut être attribué qu'au carbone C-2, à $\delta = 122,54$ ppm qui ne peut être attribué qu'au carbone C-3 et $\delta = 130,13$ ppm qui ne peut être attribué qu'aux carbones C-2' ; C-6'.

✓ Le proton H-3' et H-5' montre trois taches de corrélation :

La première avec l'atome de carbone à $\delta = 120,97$ ppm attribuable à C-1'.

La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 115,07$ ppm attribuable à C-3' et C-5'.

✓ Le proton attribué à H-8 montre quatre autres taches de corrélation :

La première confirme le C-10 à $\delta = 106.06$ ppm.

La deuxième confirme le C-7 à $\delta = 162.99$ ppm.

La troisième confirme le C-6 à $\delta = 99.58$ ppm, avec un autre atome de carbone représenté par le signal à $\delta = 154,56$ ppm qui ne peut être que le C-2.

✓ Le proton attribué à H-6 montre quatre autres taches de corrélation :

La première confirme le C-10 à $\delta = 106.06$ ppm.

La deuxième confirme le C-7 à $\delta = 162.99$ ppm.

La troisième avec un atome de carbone oxygéné à $\delta = 154.56$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-5.

La quatrième confirme le C-8 à $\delta = 94.51$ ppm.

En effet, le proton anomérique H-1'' montre sur ce spectre une corrélation avec le carbone à $\delta = 76.39$ ppm qui ne peut être que le C-3'', Ce proton anomérique (H-1'') montre également une corrélation avec un carbone oxygéné ($\delta = 162.99$ ppm) qui ne peut être que le C-7.

L'examen du spectre ROESY (**Spectre N°72**) montre une corrélation de type NOE de proton anomérique H-1'' avec le proton H-6 et H-8 à $\delta = 6.45$ ppm et $\delta = 6.70$ ppm respectivement confirmant la position de glucose en C-7.

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray négatif du composé G8 (**Spectre N°73**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 431.0988$, suggérant une masse moléculaire de 430.0988, cette masse est compatible avec la formule brute $C_{21}H_{20}O_{10}$, $m/z = 269.0510$, correspondant au fragment $[M\text{-glucose}]^-$. Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de G8 il s'agit : Génisteine-7-O- β -glucoside^[7].

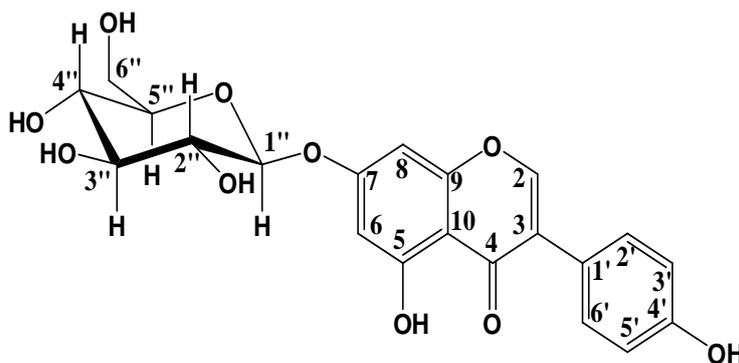


Figure IV.7 : Génisteine -7-O- β -glucoside

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D COSY, HSQC sont regroupées dans les tableaux IV.24, IV.25 et IV.26 respectivement.

Tableau IV.24: Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé G8

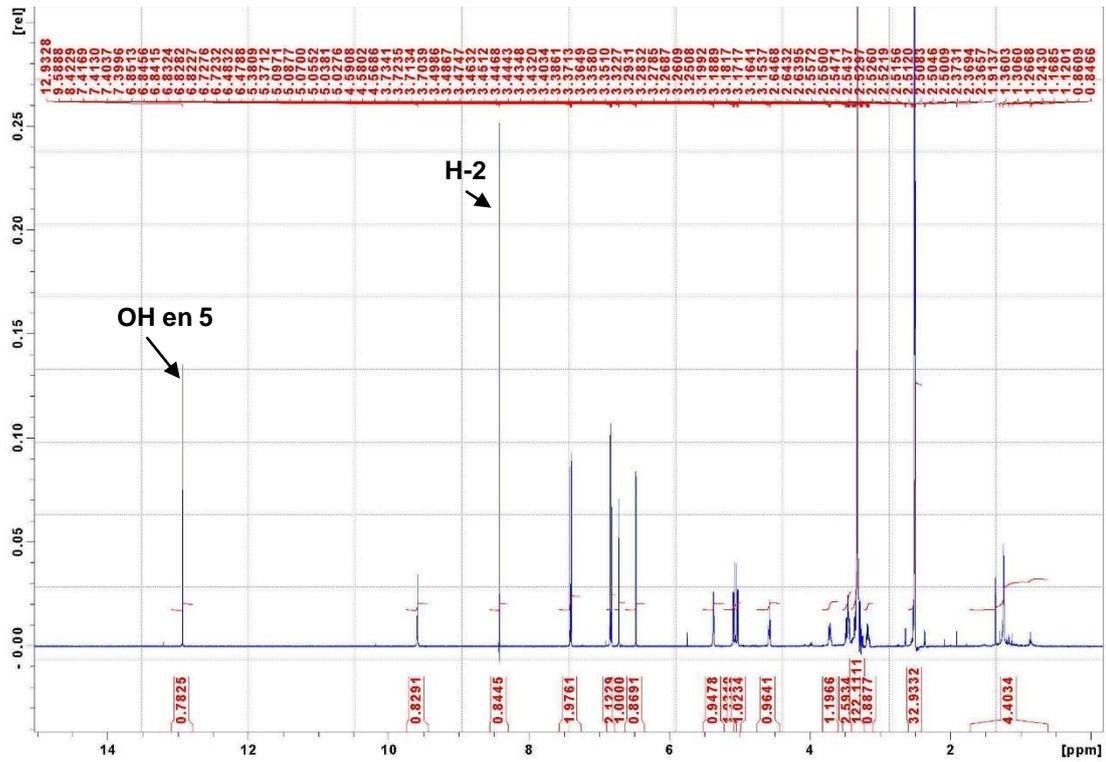
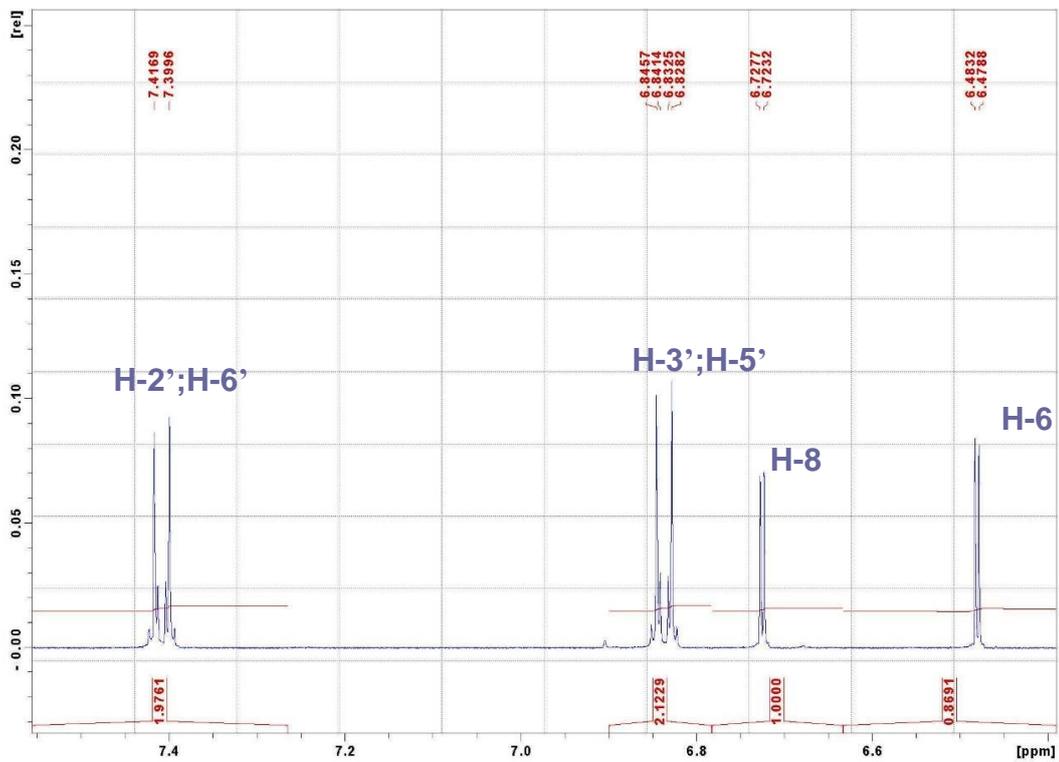
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
12.93	1H	s	OH-5
8.42	1H	s	H-2
7.40	2H	d (8.7)	H-2' ;H-6'
6.84	2H	d (8.7)	H-3' ;H-5'
6.70	1H	d (2.2)	H-8
6.45	1H	d (2.2)	H-6
5.36	1H	d (4.9)	OH-2''
5.07	1H	d (4.7)	OH-3''
5.06	1H	d (7.5)	H-1''
5.03	1H	d (5.3)	OH-4''
4.58	1H	dd (5.4-6.0)	OH-6''
3.73	1H	dd (10.1-5.4)	H-6''a
3.47	1H	dd (12.0-6.0)	H-6''b
3.45	1H	ddd (9-8,9-5.3)	H-4''
3.32	1H	td (8.9-4.7)	H3''
3.27	1H	ddd (8.9-7.5-4.9)	H-2''
3.18	1H	m	H-5''

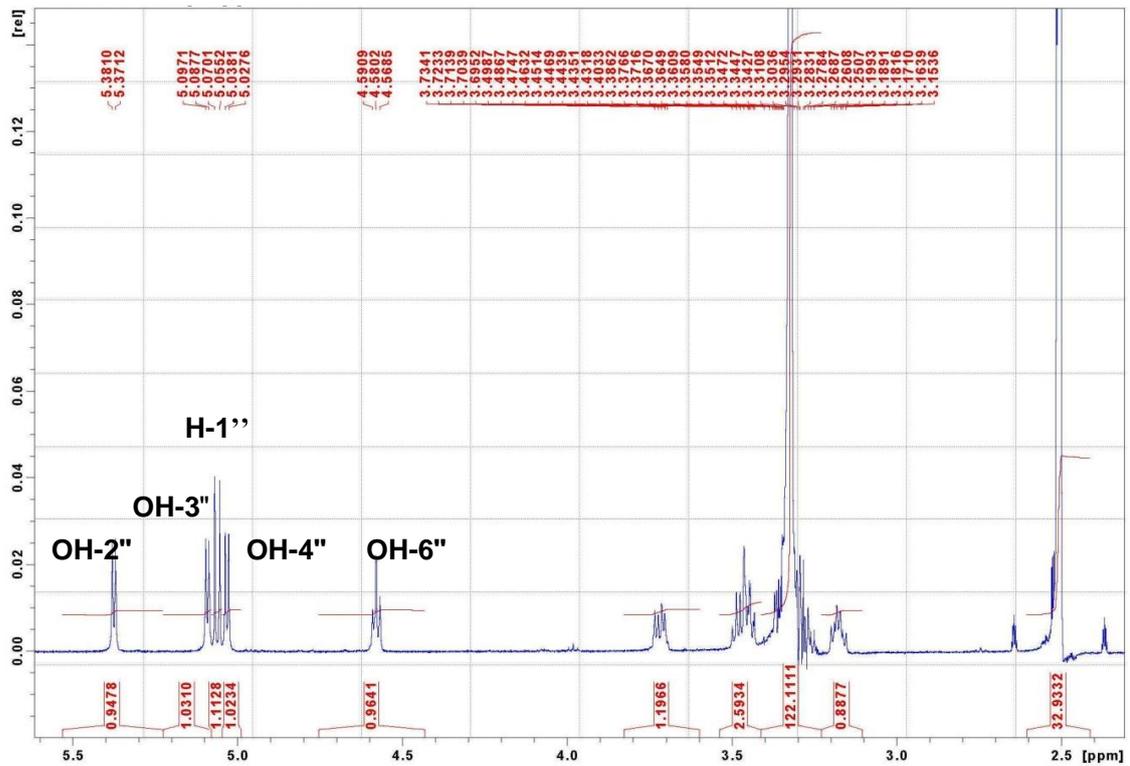
Tableau IV.25 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé G8

^1H	δ (ppm)	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	HMBC
H-2	8.42	154.56	C-1' (120.97);C-3(122.54) ; C-2 (154.56).
H-2' ;H-6'	7.40	130.13	C-2' ; C-6';C-3(122.54) ; C-2 (154.56).
H-3' ;H-5'	6.84	115.07	C-3' ; C-5' ; C-1' (120.97); C-2 (154.56).
H-8	6.70	94.51	C-6 (99.58) ; C-10 (106.06) ; C-2 (154.56) ; C-7(162.99).
H-6	6.45	99.58	C-8 (94.51) ; C-10 (106.06) ; C-5 (161.61) ; C-7(162.99).
H-1''	5.06	99.84	C-3'' (76.39) ; C-7(162.99).

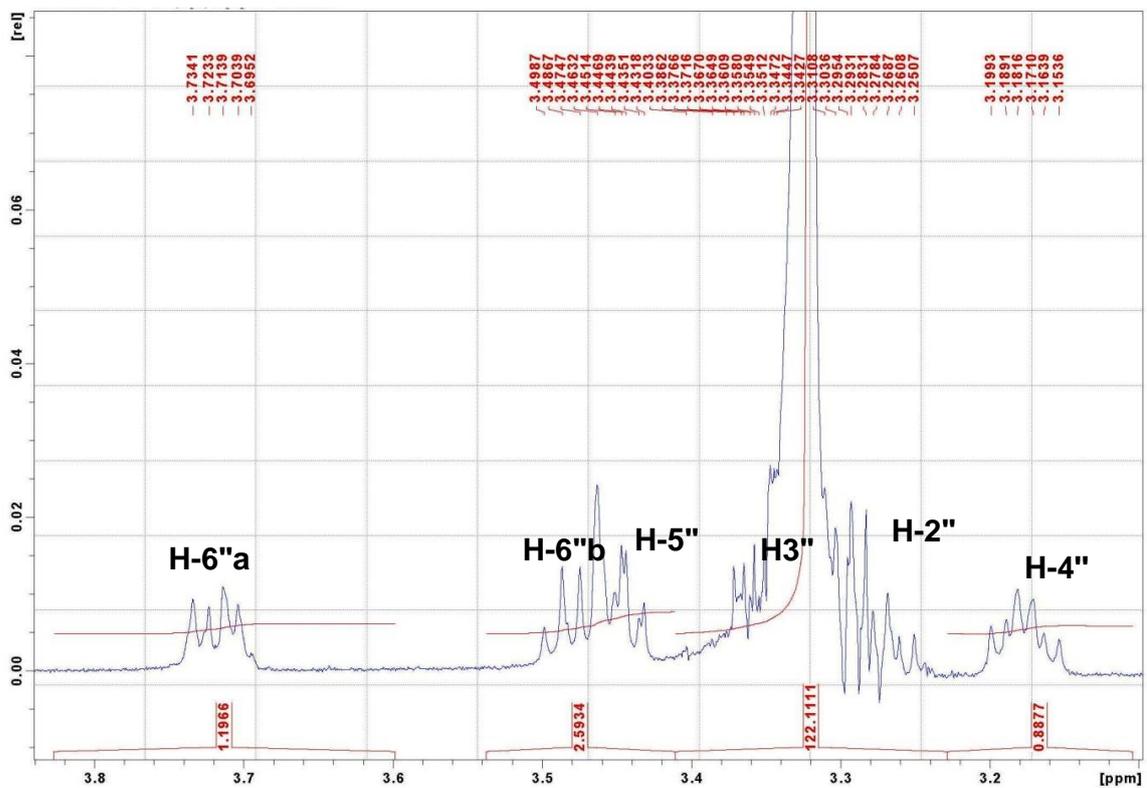
Tableau IV.26 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C et DEPT 90 du composé G8

Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 90
2	154.56	CH
3	122.54	
4	180.54	
5	161.61	
6	99.56	CH
7	162.99	
8	94.56	CH
9	157.58	
10	106.06	
1'	120.97	
2'	130.14	CH
3'	115.06	CH
4'	157.19	
5'	115.06	CH
6'	130.14	CH
1''	99.84	CH
2''	73.07	CH
3''	76.39	CH
4''	69.62	CH
5''	77.18	CH
6''	60.63	CH ₂

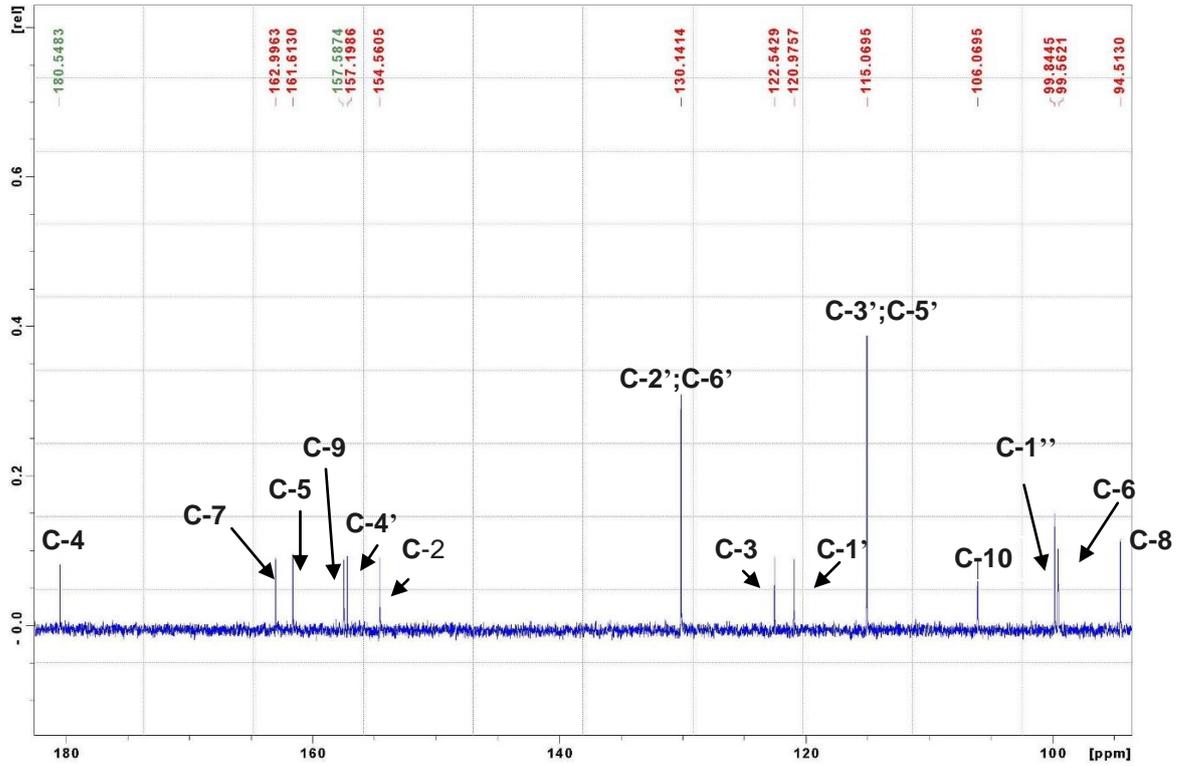
Spectre N°63: RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) du composé G8Spectre N°64: RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) étalé (6 à 8 ppm) du composé G8



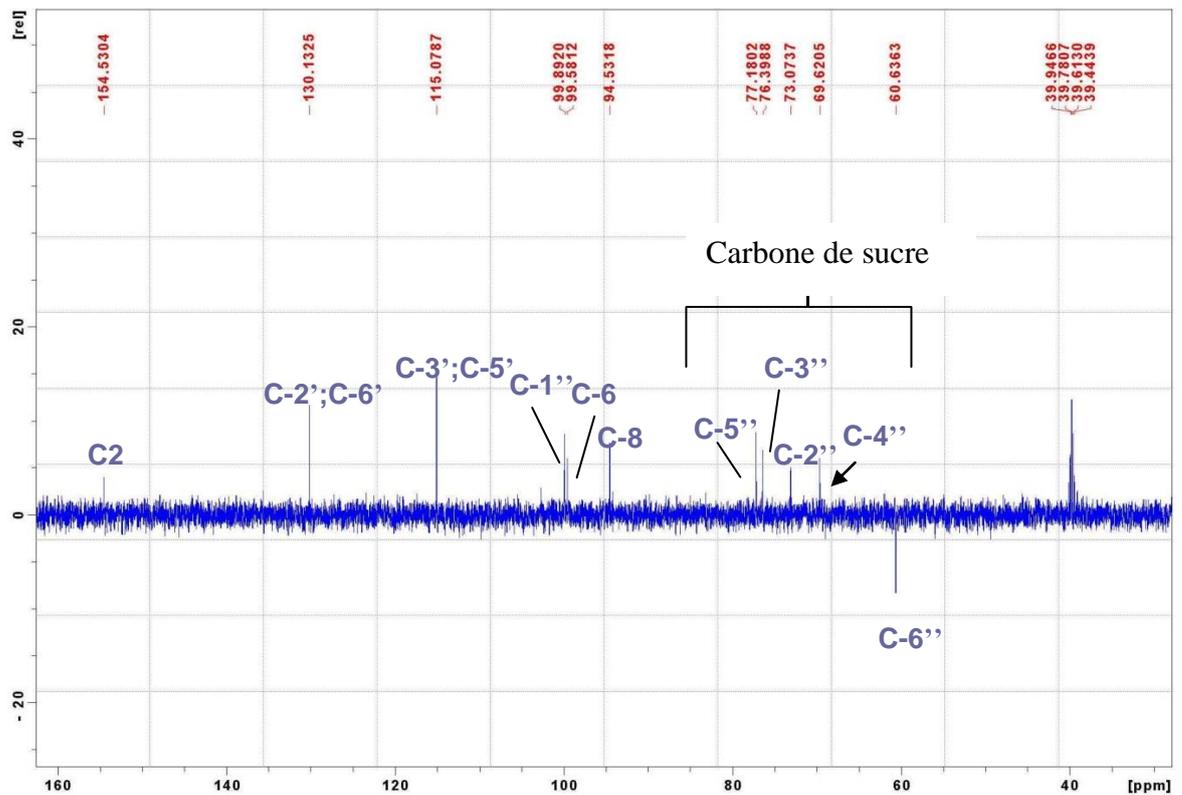
Spectre N°65: RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) étalé (3 à 6 ppm) du composé G8



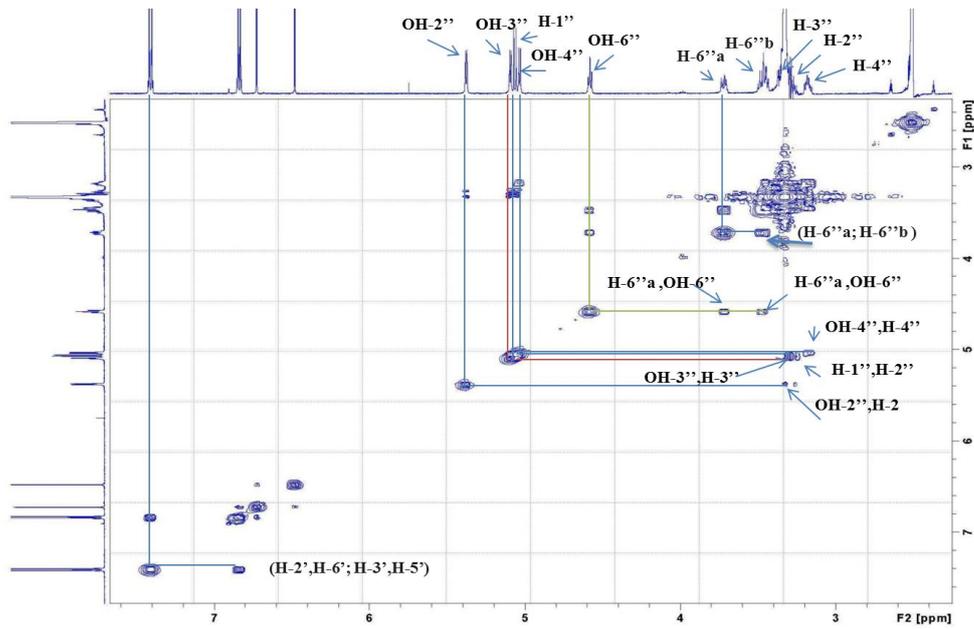
Spectre N° 66: RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) les protons du sucre étalé (3 à 4 ppm) du composé G8



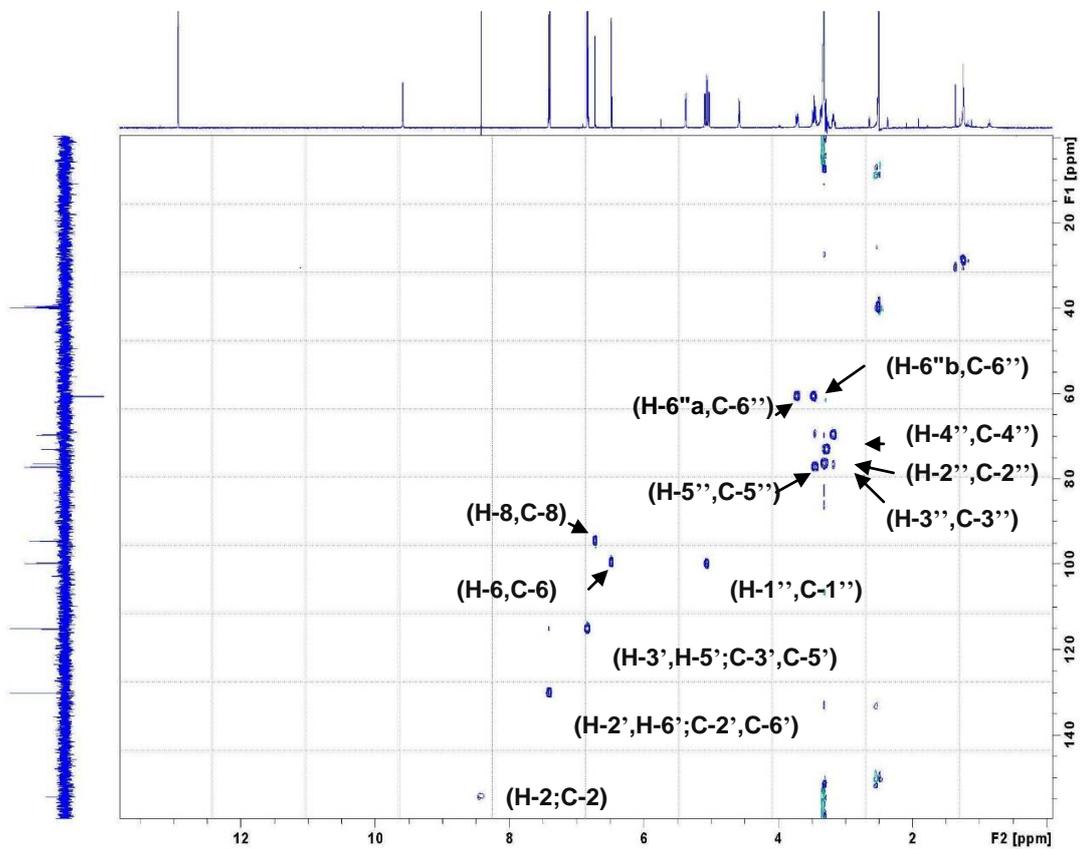
Spectre N° 67 : RMN ^{13}C (125 MHz, *DMSO-d6*) étalé (90 à 180 ppm) du composé G8



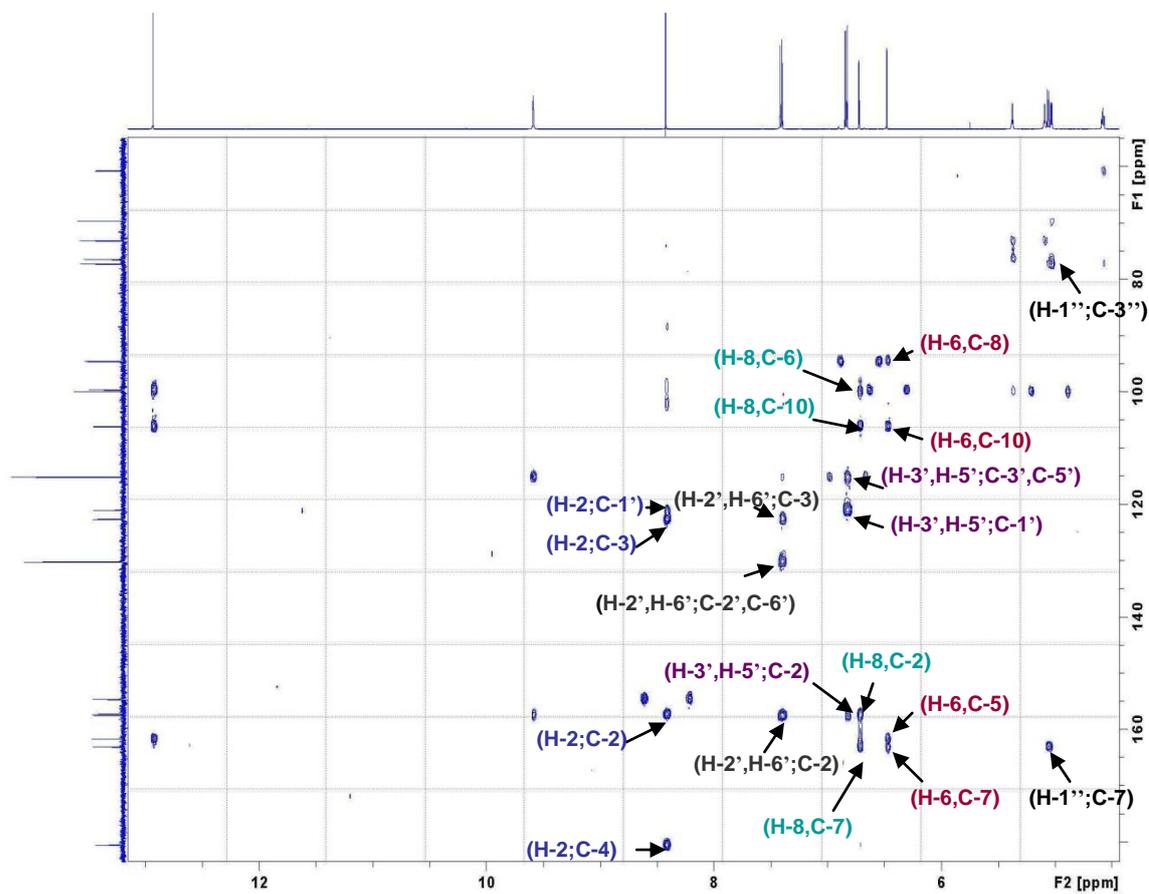
Spectre N°68: DEPT 135(125 MHz, *DMSO-d6*) du composé G8



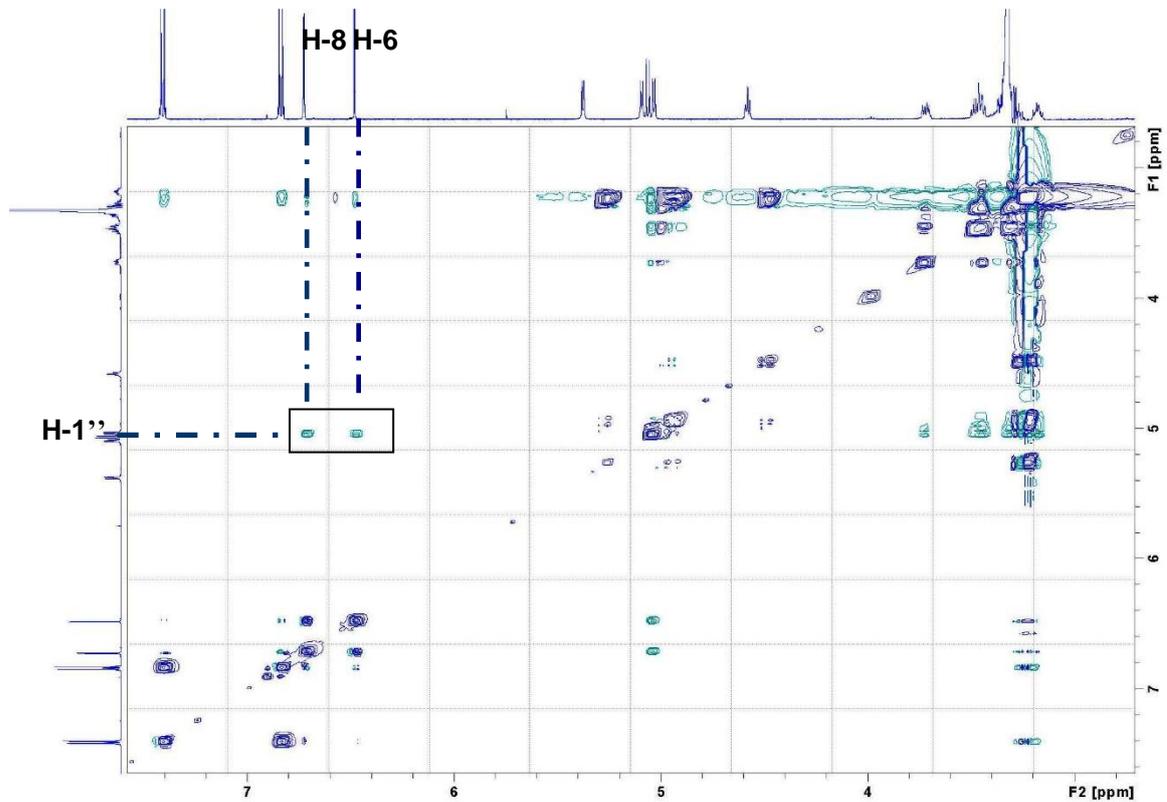
Spectre N°69: COSY (500 MHz, *DMSO-d6*) du composé G8



Spectre N°70: HSQC (500 MHz, *DMSO-d6*) du composé G8



Spectre N°71: HMBC (500 MHz, *DMSO-d6*) du composé G-8

Spectre N°72 : ROSEY (500 MHz, *DMSO-d6*) du composé G8**Multiple Mass Analysis: 5 mass(es) processed**

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

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

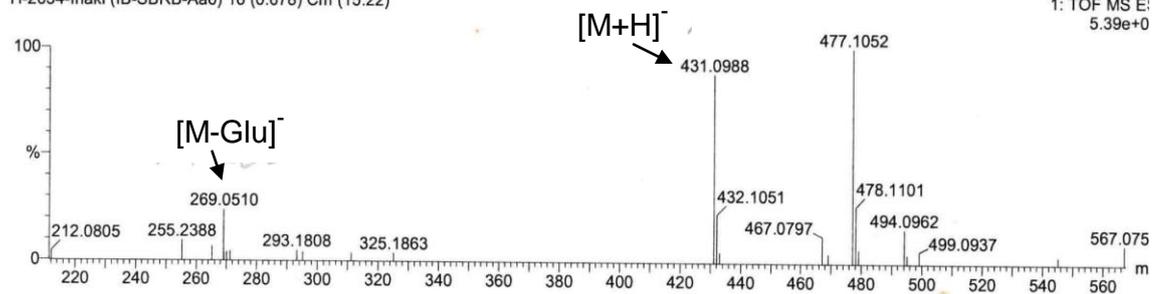
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

3864 formula(e) evaluated with 12 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-120 N: 0-1 O: 0-20 Na: 0-2

H-2634-Inaki (IB-SBRB-Aa6) 16 (0.678) Cm (15:22)

1: TOF MS E:
5.39e+0

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
269.0510	23.66	269.0509	0.1	0.4	2.5	187.7	C8 H13 O10
431.0988	87.85	431.0989	-0.1	-0.2	-2.5	1559.4	C10 H25 O15 Na2
		431.0978	1.0	2.3	12.5	16.9	C21 H19 O10
432.1051	22.27	432.1048	0.3	0.7	-5.5	489.3	C6 H26 N O20
		432.1059	-0.8	-1.9	13.5	29.4	C22 H19 N O7 Na
		432.1035	1.6	3.7	10.5	5.6	C20 H20 N O7 Na2

Spectre N°73: Masse du composé G8

IV.2.2 Identification des produits isolés de la phase Chloroforme

IV.2.2.1 Elucidation du Composé K1

L'examen du spectre RMN ^1H (**spectre N°75**) montre la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,78$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.

Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 8,06$ ppm et à $\delta = 7,51$ ppm ($J = 8\text{Hz}$) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Un autre signal sous forme d'un singulet à $\delta = 6,97$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-6 ou H-8.

Deux doublets à $\delta = 7,28$ et $6,37$ ppm ($J = 10,00$ Hz) caractéristique d'un cycle pyranique di substitué en position 2''. Ces deux substitutions sont en fait deux groupements méthyles dont le signal apparait sous forme de singulet d'intégration 6 H à $\delta = 2,07$ ppm.

On remarque aussi sur le spectre d'étalement (**Spectre N° 75**) un signal sous forme de singule à $\delta = 3,53$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Enfin un signal à $\delta = 14,04$ ppm attribuables à 1OH en position 5.

Les données relatives à la RMN ^1H sont reportées dans le tableau IV.28

Cette structure isoflavonique est confirmée par l'étude de la série spectrale UV

(**Spectre N°74**) de laquelle on peut tirer les indications suivantes:

La bande I sous forme d'épaulement à environ 283 nm et la bande II à 261 nm ainsi que la fluorescence orange sous lumière de Wood de ce produit confirme bien le squelette isoflavone.

L'addition de AlCl_3 ne montre aucun effet sur le spectre d'absorption comparativement à celui enregistré dans le MeOH ce qui prouve l'absence d'un système orthodihydroxyle dans la structure.

Le spectre RMN ^{13}C J modulé (**Spectre N° 78**) permet les attributions suivantes :

10 atomes de carbone quaternaire dont :

1 carbonylé à $\delta = 181,86$ ppm ;

5 carbones oxygénés à $\delta = 158,17$; $158,51$; $157,79$; $160,29$ et $78,86$ ppm ;

4 carbones éthyléniques.

On remarque aussi sur le spectre 2 CH₃ et 8 atomes de carbone de type CH.

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N°79**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à $\delta = 154.67$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 131.20$ ppm. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 116.30$ ppm.

Une tache de corrélation avec le H-6 permet l'attribution de C-6 à $\delta = 95.42$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-3'' et un atome de carbone à $\delta = 129.42$ ppm qui est le C-3''.

Une tache de corrélation entre H-4'' et un atome de carbone à $\delta = 115.10$ ppm qui est le C-4''.

Sur le spectre HMBC (**Spectre N°80**) on remarque que :

Les protons à $\delta = 7,28$ et $6,37$ ppm corrélient avec le carbone oxygéné à $\delta = 158.51$ ppm attribuables à C-7. Ces mêmes protons montrent également une corrélation avec les carbones à $\delta = 104.00$ ppm qui ne peut être que le C-8 et à $\delta = 78.86$ ppm attribuable à C-2''. Ces corrélations permettent de positionner les prénylations en position 7 et 8.

Une tache de corrélation entre H-2 et les atomes de carbone à $\delta = 181.86$ ppm, à $\delta = 154.67$ ppm et à $\delta = 124.10$ ppm attribuables à C-4, C-2 et C-1' respectivement.

Trois taches de corrélation entre le H-2' et le H-6' et le premier atome de carbone à $\delta = 131.20$ ppm qui est attribuable à C-2' et le C-6', le deuxième atome de carbone à $\delta = 154.67$ ppm qui est le C-2 et le troisième atome à $\delta = 124.10$ ppm attribuable à C-1'.

Trois taches de corrélation entre le H-3' et le H-5', le premier atome de carbone à $\delta = 116.30$ ppm qui est attribuable à C-3' et le C-5', le deuxième atome de carbone à $\delta = 154.67$ ppm qui est le C-2 et le troisième atome à $\delta = 124.10$ ppm attribuable à C-1'.

Une tache de corrélation entre H-6 et le carbone oxygéné à $\delta = 158.51$ ppm attribuables à C-7. Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone à $\delta = 104.00$ ppm qui ne peut être que le C-8.

Les données relatives de spectres RMN¹³C ; HSQC et HMBC sont toutes regroupées dans les tableaux IV.29 et IV.30 respectivement.

La combinaison de tous ces résultats permet de localiser le groupement méthoxyle en position 4'. D'où la structure suivante : 4'-O-Methylderrone^[8].

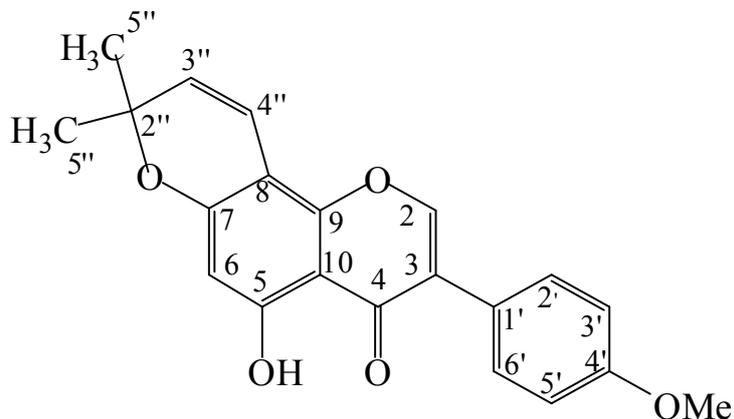


Figure IV.8 : 4'-O-Methylderrone

Tableau IV.27 : Données de la série spectrale UV du composé K1

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	283	261		Isoflavone
+ NaOH	292	261		
+AlCl ₃	283	261		
+AlCl ₃ /HCl	283	261		
+NaOAc	283	261		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	283	261		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.28 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du Composé K1

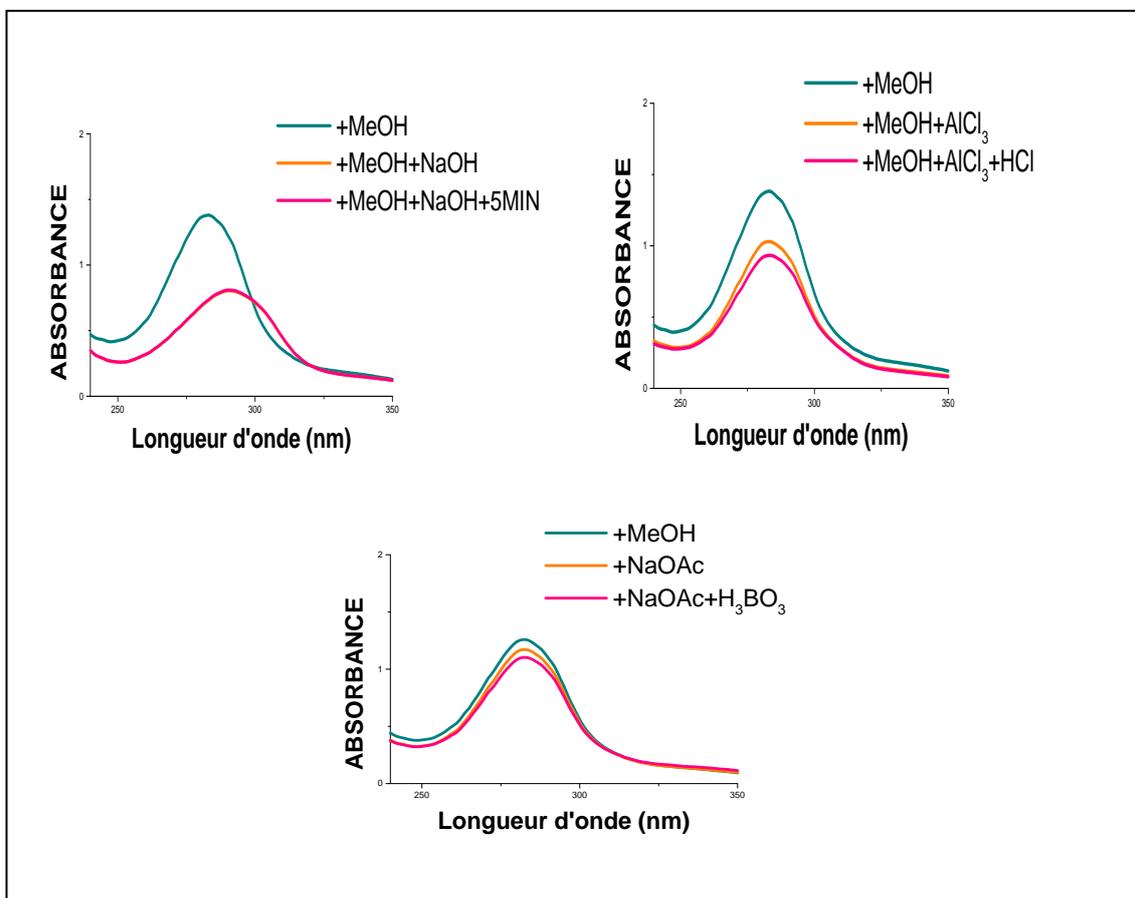
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
14.04	1H	s	OH-5
8.78	1H	s	H-2
8.06	2H	d (8)	H-2' ;H-6'
7.51	2H	d (8)	H-3' ;H-5'
7.28	1H	d (10.00)	H-3''
6.97	1H	s	H-6
6.37	1H	d (10.00)	H-4 ''
3.53	3H	s	OCH ₃
2.07	6H	s	2CH ₃

Tableau IV.29 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du Composé K1

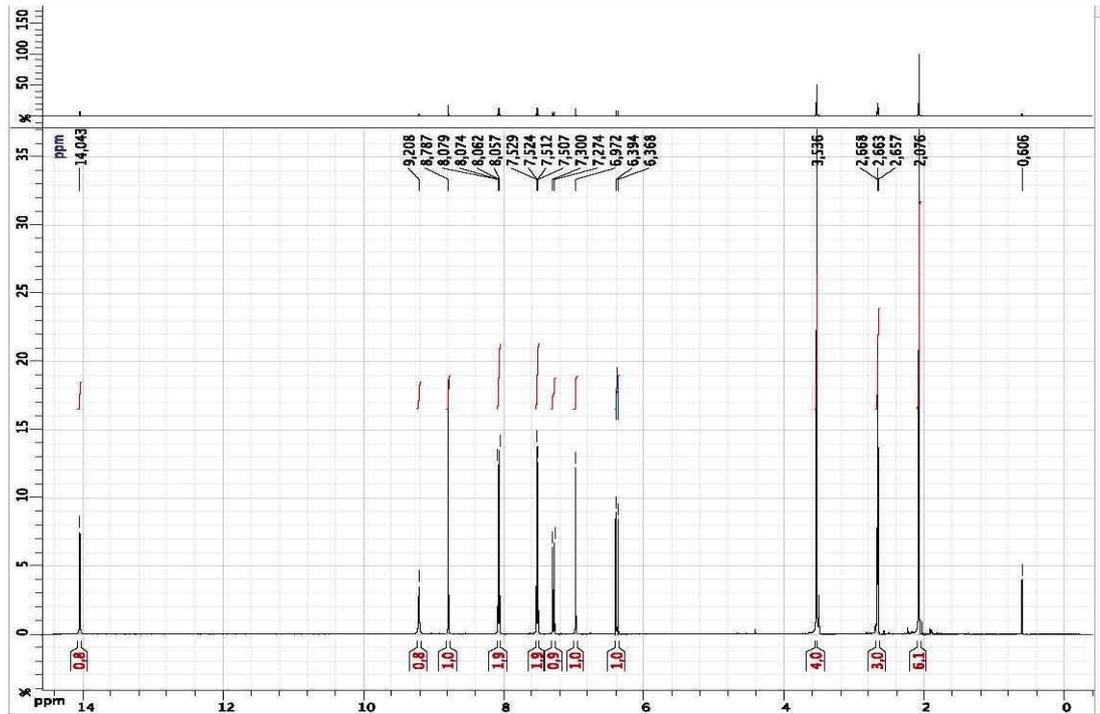
^1H	δ (ppm)	^{13}C /HSQC	HMBC
H-2	8.78	154.67	C-2(154.67) ;C-1'(124.10) ; C-4(181.86) .
H-2' ;H-6'	8.06	131.20	C-2(154.67) ;C-1'(124.10) ;C-2' ; C-6'(131.20).
H-3' ;H-5'	7.51	116.30	C-2(154.67) ;C-1'(124.10) ; C-3' ; C-5'(116.30) .
H-3''	7.28	129.42	C-2'' (78.86) ;C-8 (104.00) ;C-7 (158.51).
H-6	6.97	95.42	C-8 (104.00) ; C-7 (158.51), C-4(181.86).
H-4 ''	6.37	115.10	C-2'' (78.86) ;C-8 (104.00) ;C-7 (158.51).

Tableau IV.30 : Données de la spectroscopie ^{13}C du Composé K1

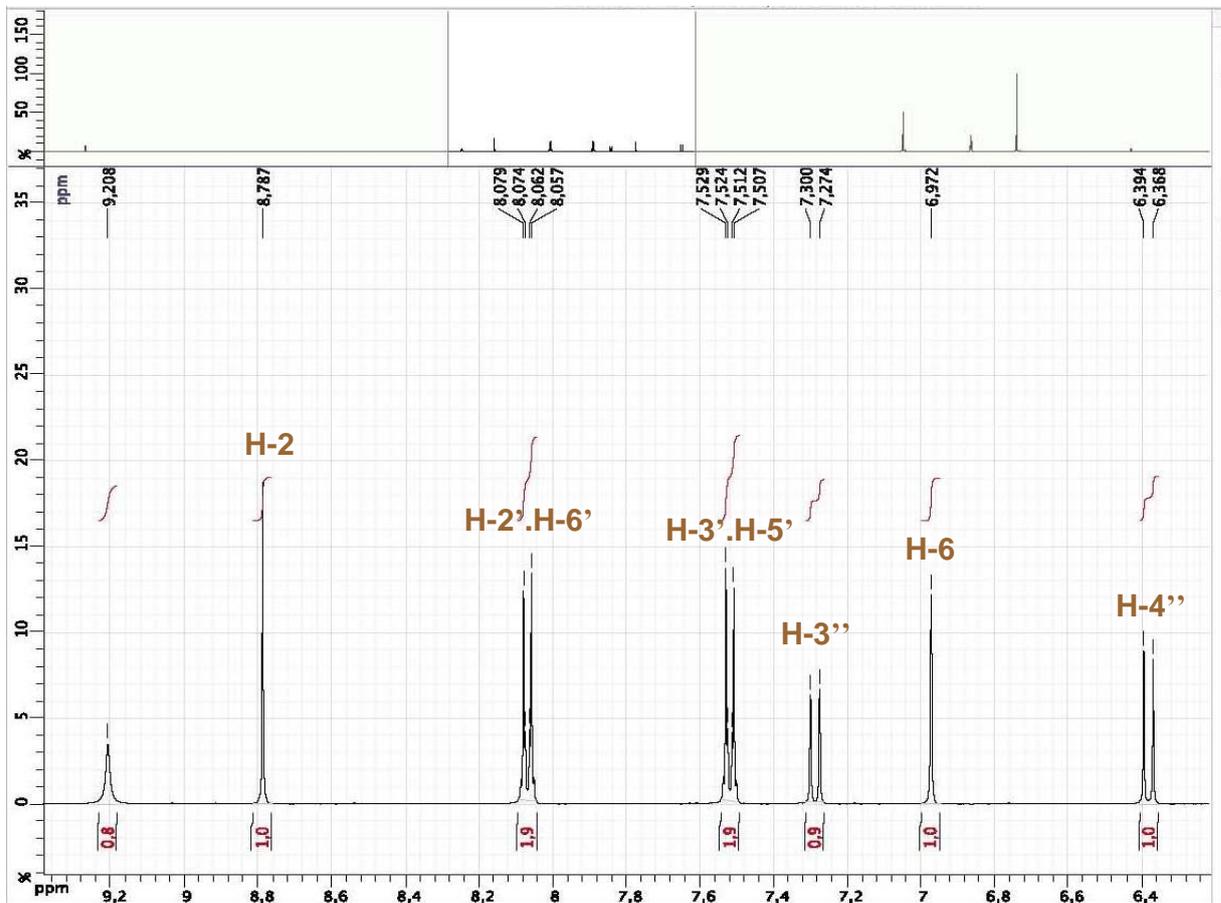
Position de ^{13}C	δ (ppm)
2	154.67
3	122.90
4	181.86
5	158.17
6	95.42
7	158.51
8	104.00
9	157.79
10	106.76
1'	124.10
2'	131.20
3'	116.30
4'	160.29
5'	116.30
6'	131.20
2''	78.86
3''	129.42
4''	115.10
5'' (CH ₃)	28.44



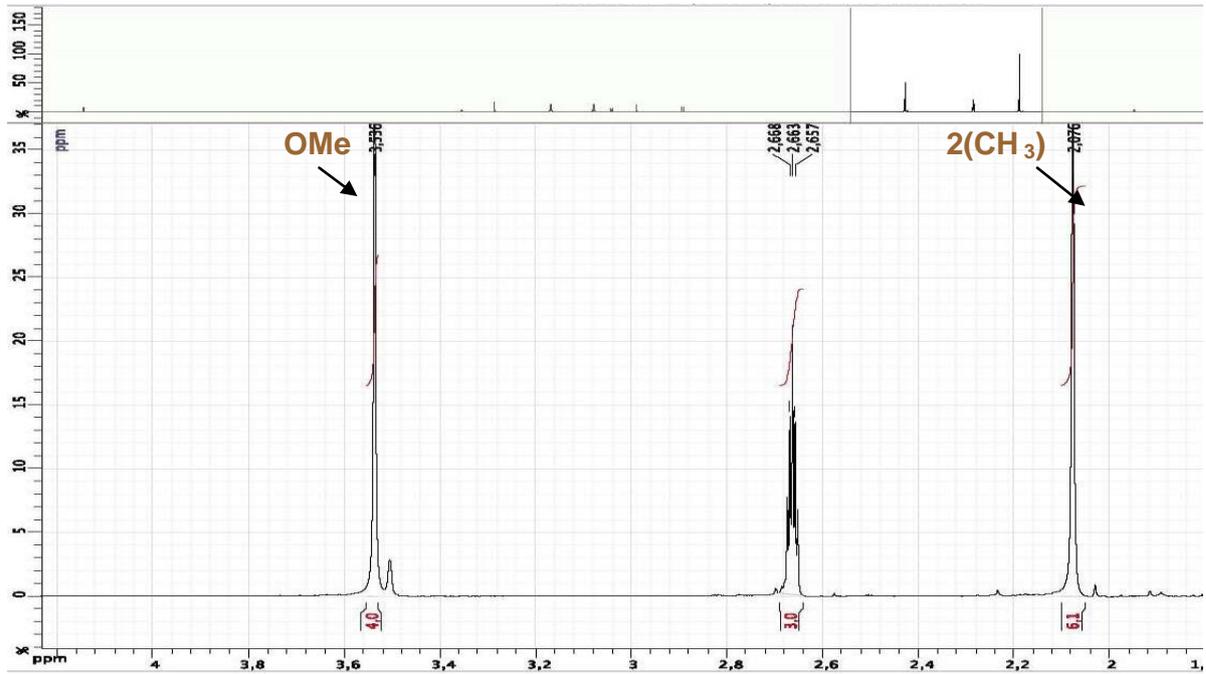
Spectre N°74 : Série spectrale UV du composé K1



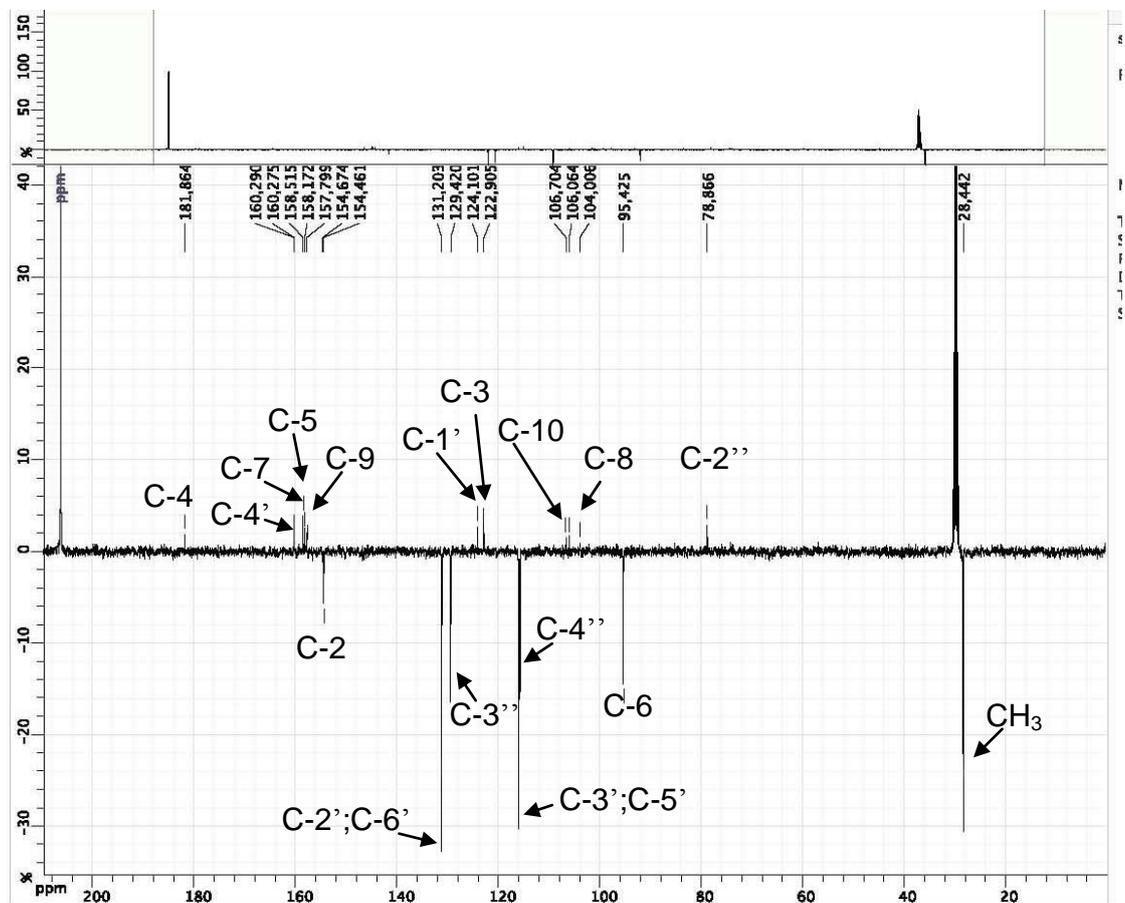
Spectre N°75 : RMN ^1H (400 MHz, Acétone- d_6) du composé K1



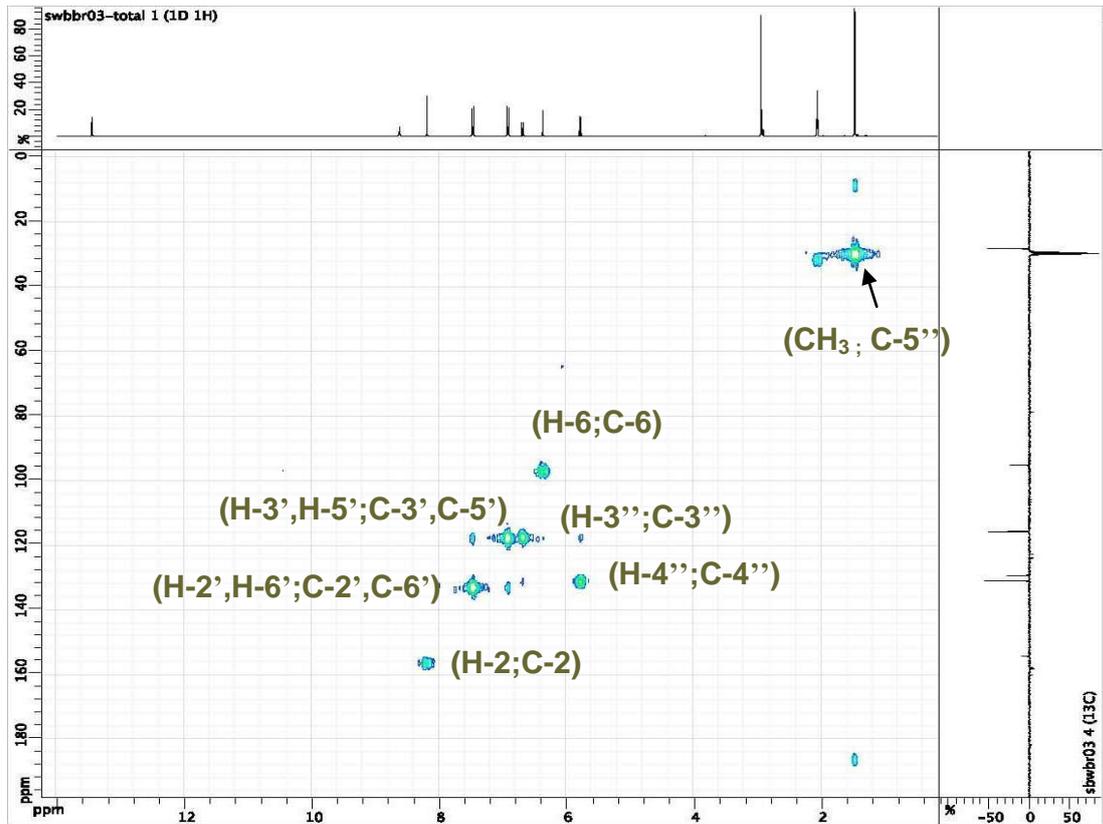
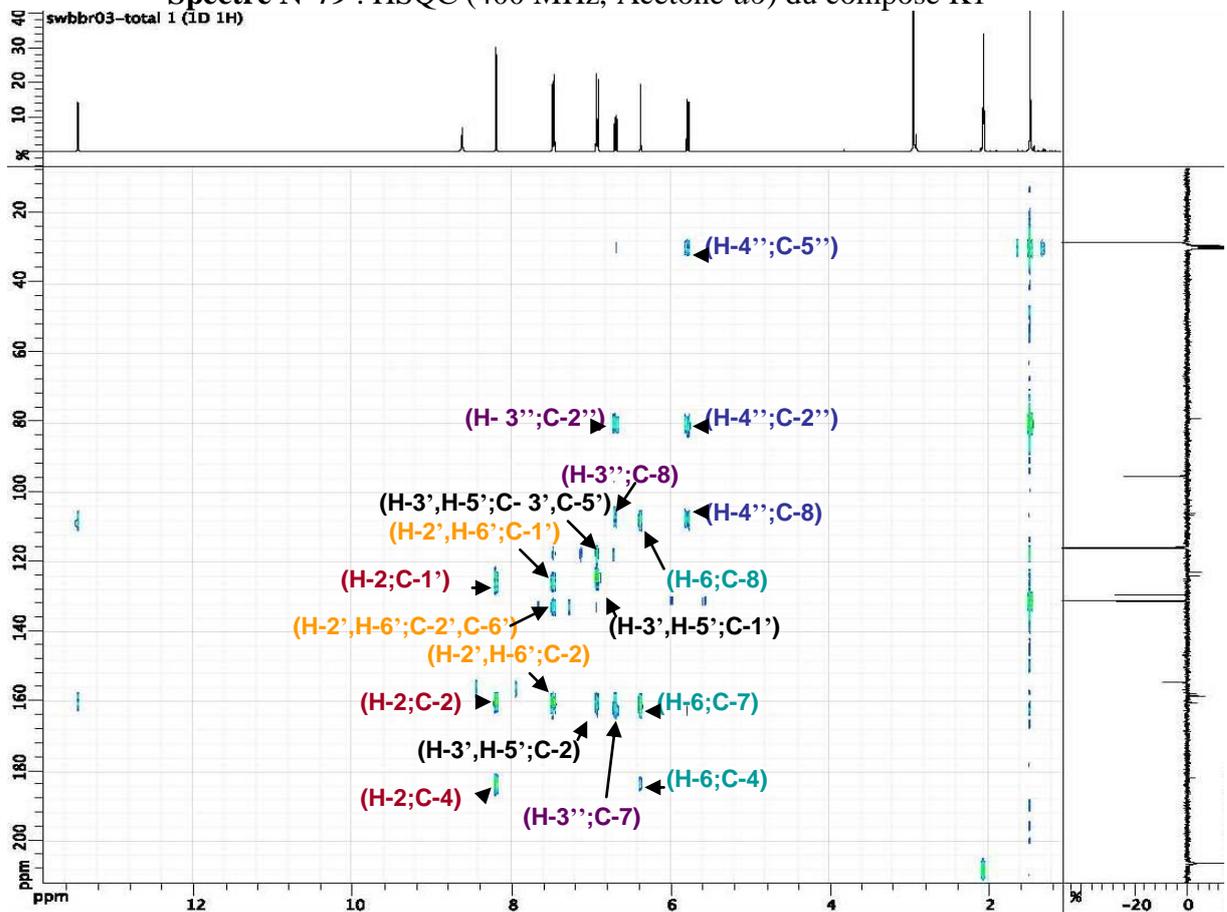
Spectre N°76 : RMN ^1H (400 MHz, Acétone- d_6) étalé (6 à 9 ppm) du composé K1



Spectre N°77 : RMN ¹H (400 MHz, Acétone-*d*₆) étalé (2 à 4 ppm) du composé K1



Spectre N°78 : RMN J -Mod (100 MHz, Acétone-*d*₆) du composé K1

Spectre N°79 : HSQC (400 MHz, Acétone-*d*₆) du composé K1Spectre N°80: HMBC (400 MHz, Acétone-*d*₆) du composé K1

IV.2.2.2 Elucidation du Composé K6

Le spectre RMN ^1H , réalisé dans *DMSO-d6* (**Spectre N°81**) et ses étalements (**Spectres N°82 et 83**) indiquent la présence des signaux suivants :

Un signal à 5,32 ppm sous forme de dd ($J = 10,2$ et $2,2$ Hz) et à 3,00 ppm un dd ($J = 13,1$ et $10,2$ Hz) et à 2,50 ppm un signal sous forme doublet d ($J = 2,2$ Hz) partiellement recouvert par le signal du solvant correspondant respectivement aux protons en position 2 et 3 d'une flavanone.

On remarque aussi deux signaux d'intégration 3H chacun à $\delta = 3.74$ et 3.78 ppm sous forme de singulet attribuables à deux groupements méthoxyles.

Enfin dans la région des protons aromatiques on a :

Un doublet à $\delta = 7.06$ ppm ($J = 1,5$ Hz) d'intégration 1H indiquant un couplage méta.

Un doublet dédoublé à $\delta = 6,88$ ppm ($J = 6,5 ; 1.5$ Hz) d'intégration 1H, indiquant un couplage ortho et méta.

Un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,77$ ppm avec ($J = 6,5$ Hz) d'intégration 1H indiquant un couplage ortho. Ces trois signaux orientent vers une di substitution du noyau B.

Sur le même spectre on constate aussi :

Deux signaux à $\delta = 6.06$ et 5.97 ppm sous forme de doublet ($J = 1,7$ Hz) d'intégration 1H chacun attribuables à H-8 et H-6 respectivement indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7 et en 5.

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N°86**) montre :

Une tache de corrélation entre le H-2 $_{\beta}$ et le H-3 $_{\alpha}$ et une tache de corrélation entre le H-3 $_{\beta}$ et les signaux à 5,32 ppm, 3,00 ppm et 2,50 ppm respectivement, qui sont attribuables aux protons 2 et 3 de la flavanone

L'examen des spectres HSQC (**Spectre N°87**) permet l'attribution des carbones porteurs des protons suivants :

Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone à $\delta = 111.02$ ppm attribuable à C-2'.

Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone à $\delta = 119.39$ ppm attribuable à C-6'.

Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à $\delta = 115.14$ ppm qui est le C-5'.

Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à $\delta = 93.20$ ppm qui est le C-8.

Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 95.58$ ppm qui est le C-6.

Une tache de corrélation entre H-2 $_{\beta}$ et un atome de carbone à $\delta = 78.29$ ppm qui est le C-2.

Une tache de corrélation entre H-3 $_{\alpha}$ et un atome de carbone à $\delta = 44.83$ ppm qui est le C-3.

Une tache de corrélation entre H-3 $_{\beta}$ et un atome de carbone à $\delta = 44.83$ ppm qui est le C-3.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 55.66$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 55.57$ ppm qui ne peut être que le carbone du deuxième méthoxyle.

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude des spectres de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (**Spectres N°88 et 89**) qui montre :

Deux taches de corrélation entre le H-2' et le H-6' et un atome de carbone à $\delta = 146.74$ ppm, Ce même atome de carbone corrèle avec les protons du méthoxyle à $\delta = 3,78$ ppm ($\delta = 55,66$) ce qui impose la substitution de cet atome de carbone par le groupement méthoxyle d'où la substitution de la position C-3'.

Sur le même spectre nous avons :

Deux taches de corrélation entre le H-2' et deux atomes de carbone à $\delta = 129.85$ ppm et $\delta = 119.39$ ppm qui ne peuvent être que le C-1' et le C-6' respectivement.

Deux taches de corrélation entre le H-2' et le H-6' et un atome de carbone oxygéné à $\delta = 78.29$ ppm qui est attribuable à C-2.

Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone à $\delta = 111.02$ ppm qui ne peut être que le C-2'.

Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à $\delta = 129.85$ ppm qui ne peut être que le C-1'.

Une tache de corrélation entre H-5' et le carbone oxygéné à $\delta = 147.48$ ppm attribuable à C-4'.

On a aussi quatre taches de corrélation entre le H-8 et quatre atomes de carbone, le premier à un déplacement chimique $\delta = 104,42$ ppm attribuable à C-10 ; le deuxième à $\delta = 95,58$ ppm qui est le C-6, le troisième et le quatrième sont oxygénés et ont des déplacements chimiques plus élevés à $\delta = 162,16$ ppm et $\delta = 164,19$ ppm et sont donc attribuables à C-7 et C-5 respectivement.

Une tache de corrélation entre H-6 et le carbone oxygéné à $\delta = 164,19$ ppm attribuable à C-5. Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone à $\delta = 93,20$ ppm et à $\delta = 104,42$ ppm attribuables à C-8 et C-10 respectivement.

✓ Nous relevons aussi sur ce spectre :

Quatre taches de corrélation entre H-2 α et les atomes de carbone à $\delta = 111,02$ ppm, $\delta = 119,39$ ppm et $\delta = 129,85$ ppm qui sont attribués à C-2', C-6' et C-1' respectivement. La dernière tache à $\delta = 187,77$ ppm est attribuable à C-4.

Trois taches de corrélation entre le H-3 α et les carbones à $\delta = 78,29$ ppm, $\delta = 129,85$ ppm et à $\delta = 187,77$ ppm attribuables à C-2, C-1' et C-4 respectivement.

Deux taches de corrélation entre le H-3 β et les carbones à $\delta = 104,42$ ppm et à $\delta = 187,77$ ppm attribuables à C-10 et C-4 respectivement.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 146,74$ ppm qui est attribuable à C-3'.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 162,16$ ppm qui est attribuable à C-7. D'où la substitution de la position 7 par un méthoxyle. Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de cette molécule: 5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavanone (Eriodictyol 7,3'-diméthyl ether)^[9].

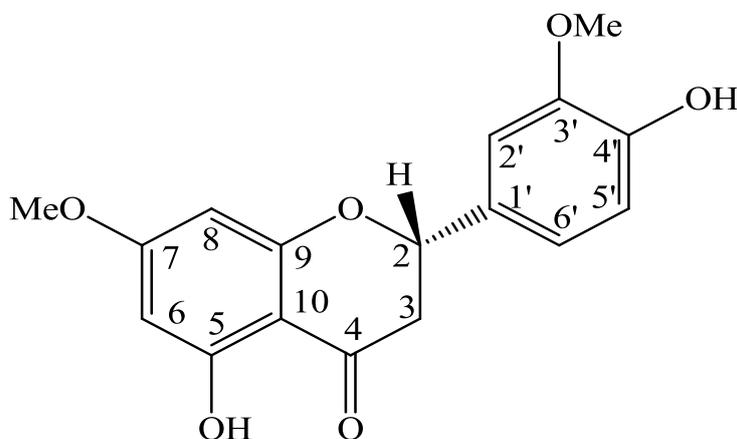


Figure IV.9: Eriodictyol 7, 3'-diméthyl ether

Les données relatives de spectres RMN ^1H ; RMN ^{13}C ; HSQC et HMBC sont toutes regroupées dans les tableaux IV.31, IV.32, IV.33 et IV.34 respectivement.

Tableau IV.31 : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé K6

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7.06	1H	d (1.5)	H-2'
6.88	1H	dd (6.5-1.5)	H-6'
6.77	1H	d (6.5)	H-5'
6.06	1H	d (1.7)	H-8
5.97	1H	d (1.7)	H-6
5.32	1H	dd (2.2-10.2)	H-2 β
3.78	3H	s	OMe
3.74	3H	s	OMe
3	1H	dd (10.2-13.1)	H-3 α
2.5	1H	d (2.2)	H-3 β

Tableau IV.32 : Données de la spectroscopie HSQC et HMBC du composé K6

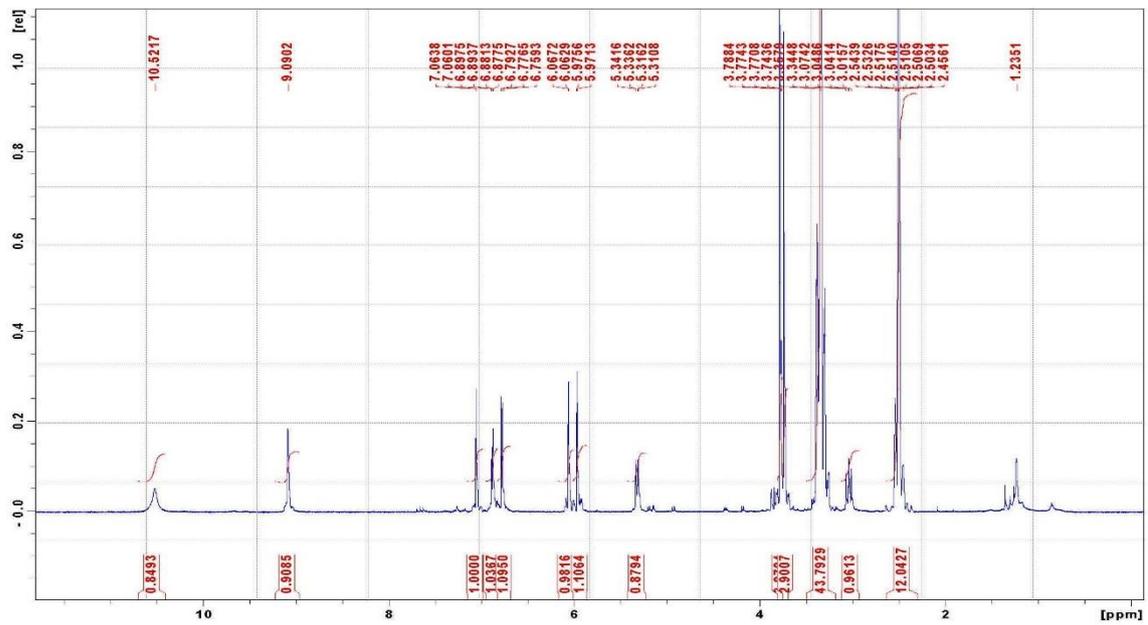
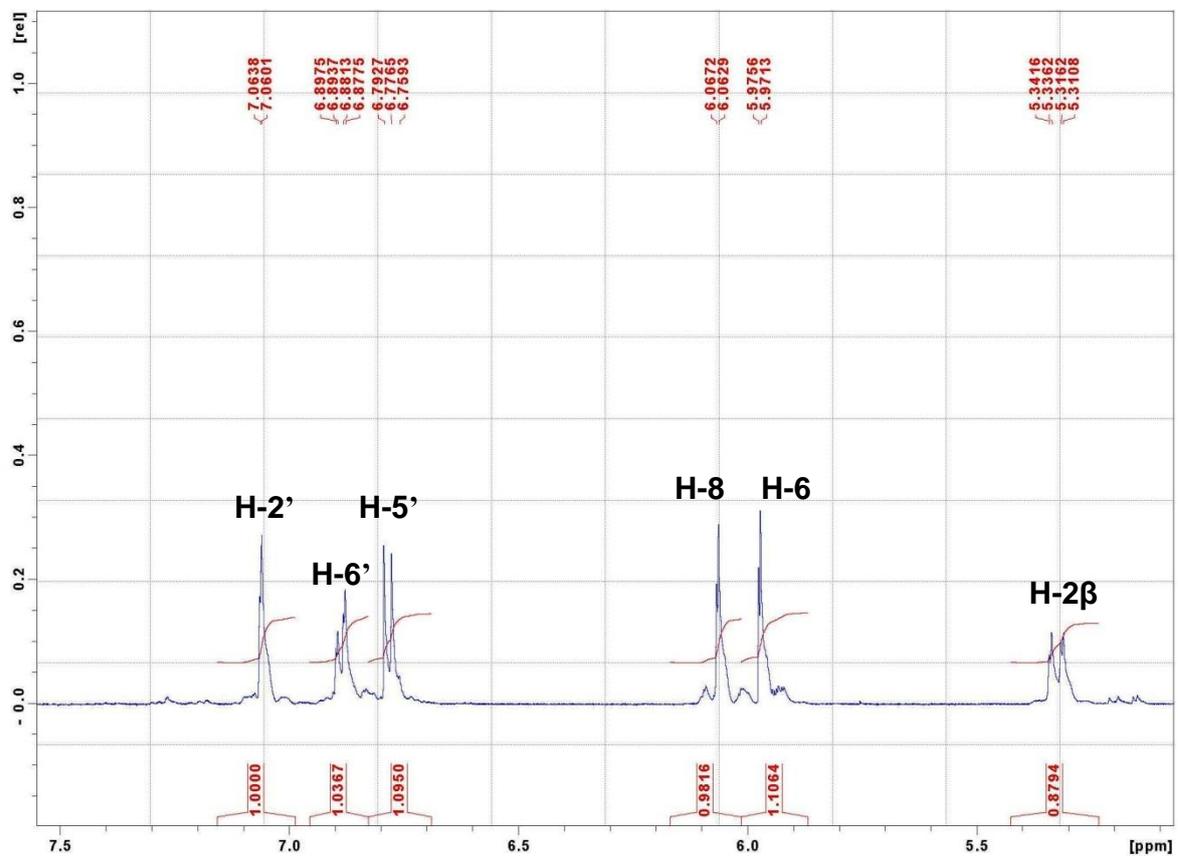
^1H	δ (ppm)	^{13}C /HSQC	HMBC
H-2'	7.06	111.02	C-2(78.29) ;C-6'(119.39) ; C-1'(129.85) ;C-3'(146.74).
H-6'	6.88	119.39	C-2(78.29) ;C-2'(111.02) ; C-3'(146.74).
H-5'	6.77	115.14	C-1'(129.85) ;C-4'(147.48).
H-8	6.06	93.20	C-6(95.58) ;C-10(104.42) ; C-5 (164.19) ;C-7(162.16).
H-6	5.97	95.58	C-8(93.20) ;C-10(104.42) ; C-7(162.16).
H-2 β	5.32	78.29	C-2'(111.02);C-6'(119.39) ; C-1'(129.85) ;C-4(187.77) .
OMe	3.78	55.66	C-3'(146.74).
OMe	3.74	55.57	C-7(162.16).
H-3 α	3	44.83	C-2(78.29) ;C-1'(129.85) ; C-4(187.77).
H-3 β	2.5	44.83	C-10(104.42) ; C-4(187.77).

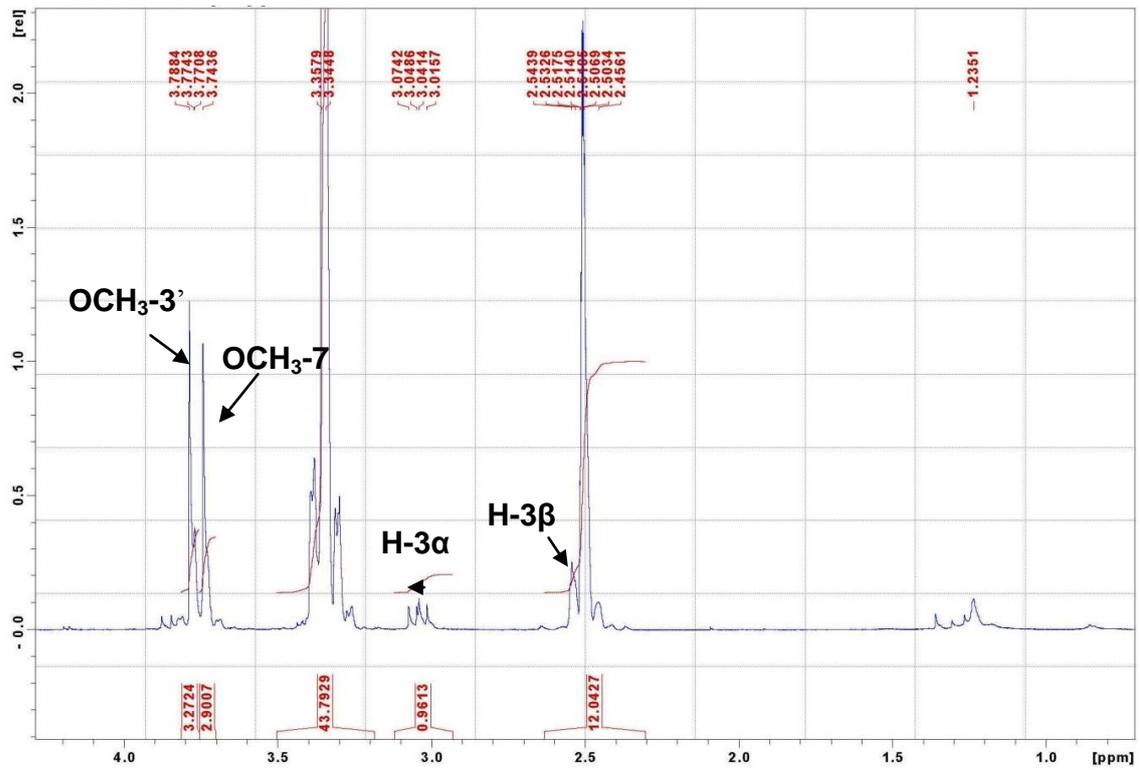
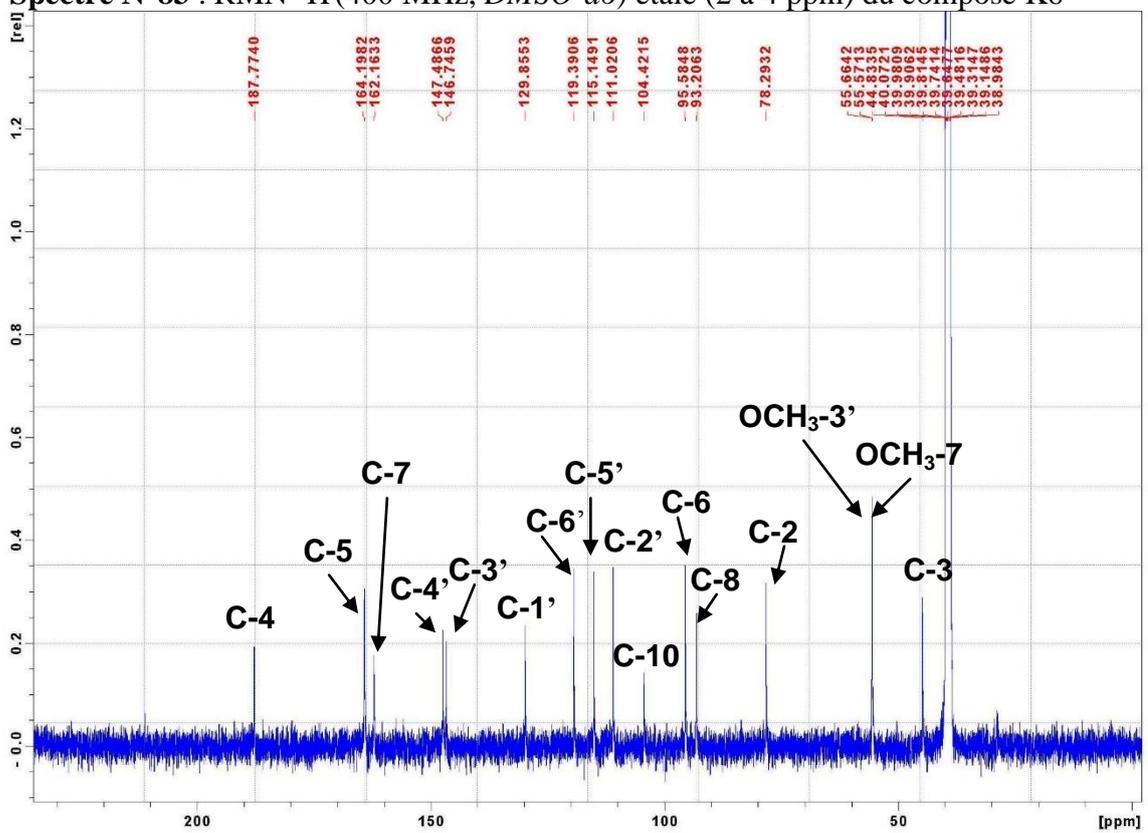
Tableau IV.33 : Données de la spectroscopie ^{13}C : DEPT 135et DEPT 90 du composé K6

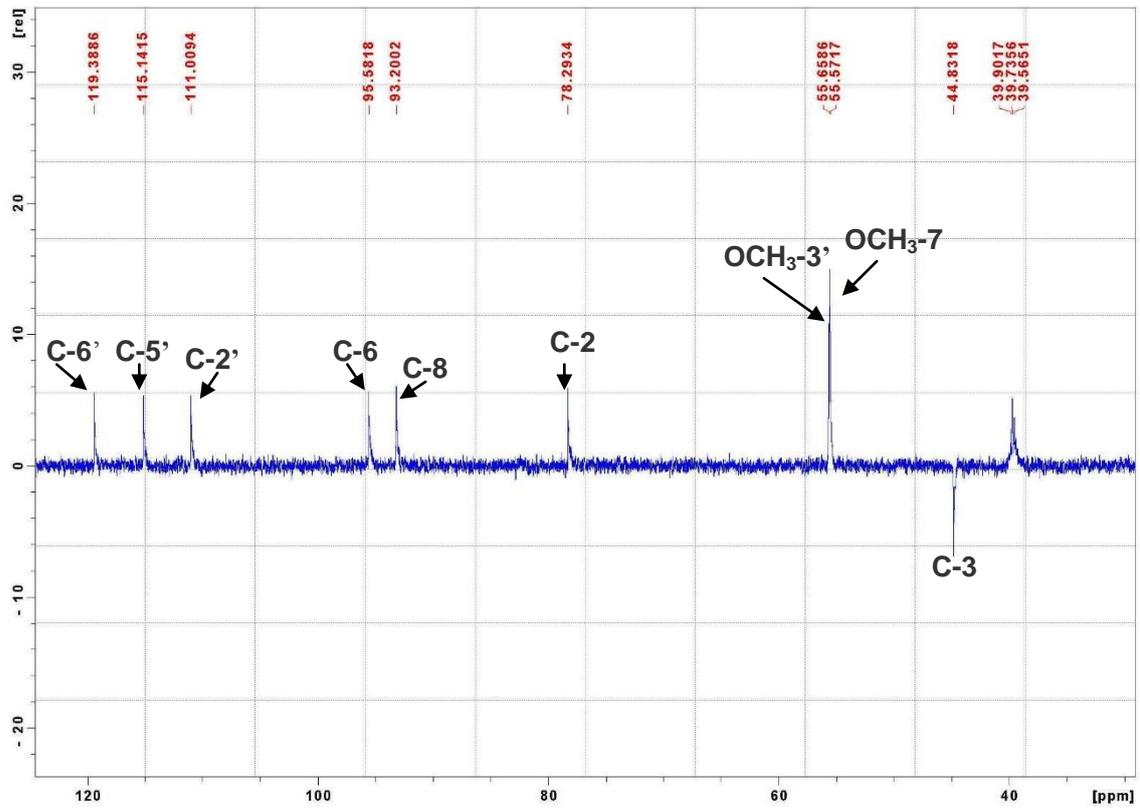
Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135	DEPT 90
2	78.29	CH	CH
3	44.83	CH ₂	
4	187.77		
5	164.19		
6	95.58	CH	CH
7	162.16		
8	93.20	CH	CH
9	/		
10	104.42		
1'	129.85		
2'	111.02	CH	CH
3'	146.74		
4'	147.48		
5'	115.14	CH	CH
6'	119.39	CH	CH
OCH ₃ -3'	55.66	CH ₃	
OCH ₃ -7	55.57	CH ₃	

Tableau IV.34: Données de la spectroscopie COSY et NOESY du composé K6

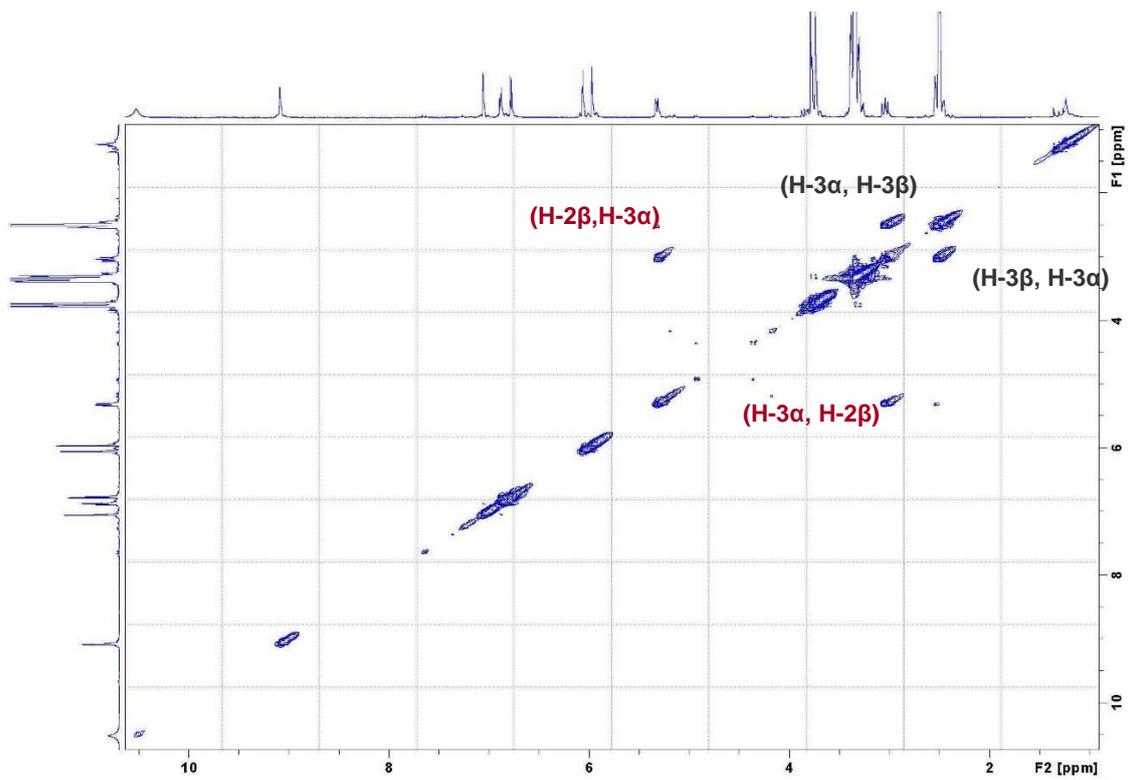
^1H	δ (ppm)	COSY ^1H - ^1H	NOESY ^1H - ^1H
H-2'	7.06	/	H-3 β ,H-3 α ,H-2 β ,OMe-3'.
H-6'	6.88	/	H-3 β . H-3 α . H-2 β .
H-5'	6.77	/	/
H-8	6.06	/	OMe-7.
H-6	5.97	/	/
H-2 β	5.32	H-3 α	H-2',H-3 β ,H-3 α . H-2 β , OMe-3'.
OMe-3'	3.78	/	H-2'.
OMe-7	3.74	/	H-8.
H-3 α	3	H-2 β ; H-3 β	H-2', H-6', H-2 β .
H-3 β	2.5	H-3 α	H-2', H-6', H-2 β .

Spectre N°81 : RMN ^1H (400 MHz, *DMSO-d*₆) du composé K6Spectre N°82 : RMN ^1H (400 MHz, *DMSO-d*₆) étalé (5 à 7.5 ppm) du composé K6

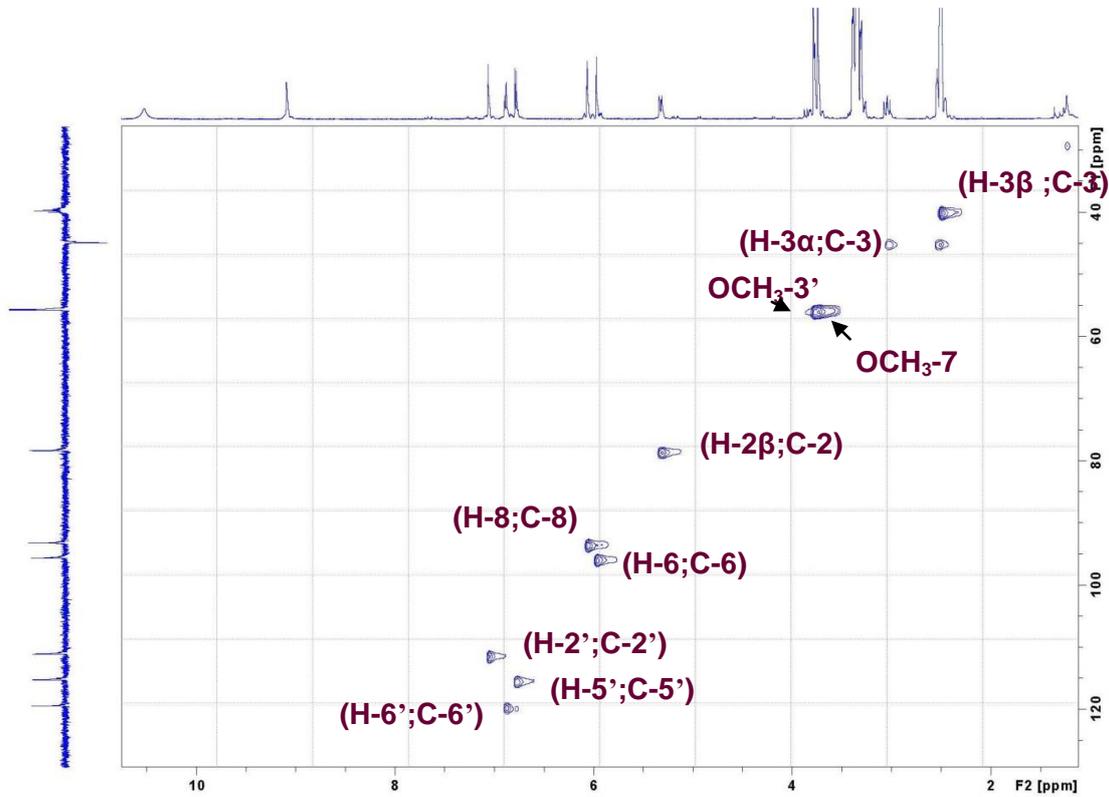
Spectre N°83 : RMN ^1H (400 MHz, *DMSO-d*₆) étalé (2 à 4 ppm) du composé K6Spectre N°84 : RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d*₆) du composé K6



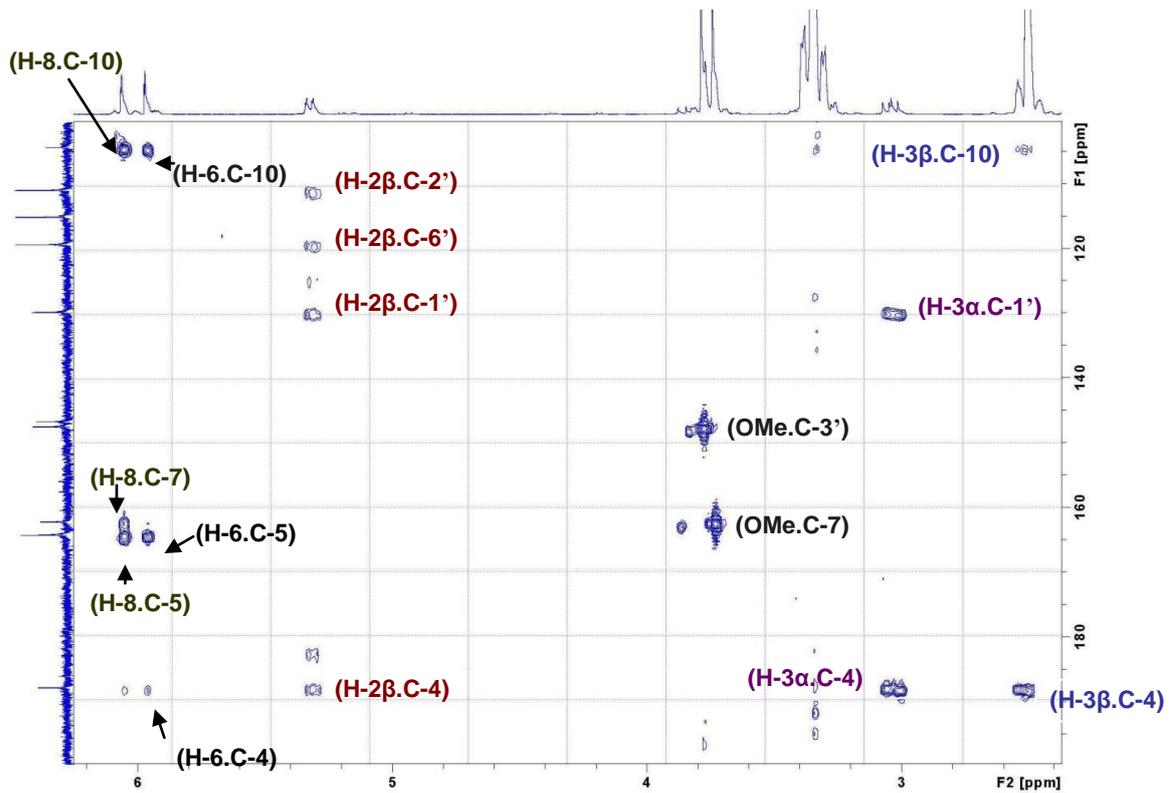
Spectre N°85: DEPT 135(100 MHz, *DMSO-d6*) du composé K6



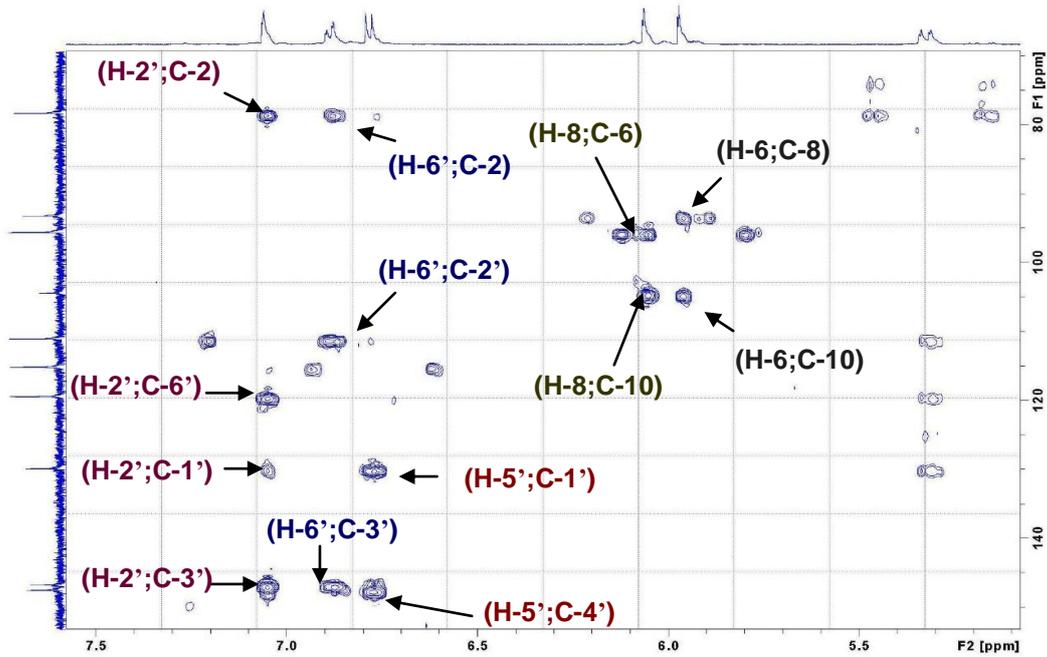
Spectre N°86 : COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé K6



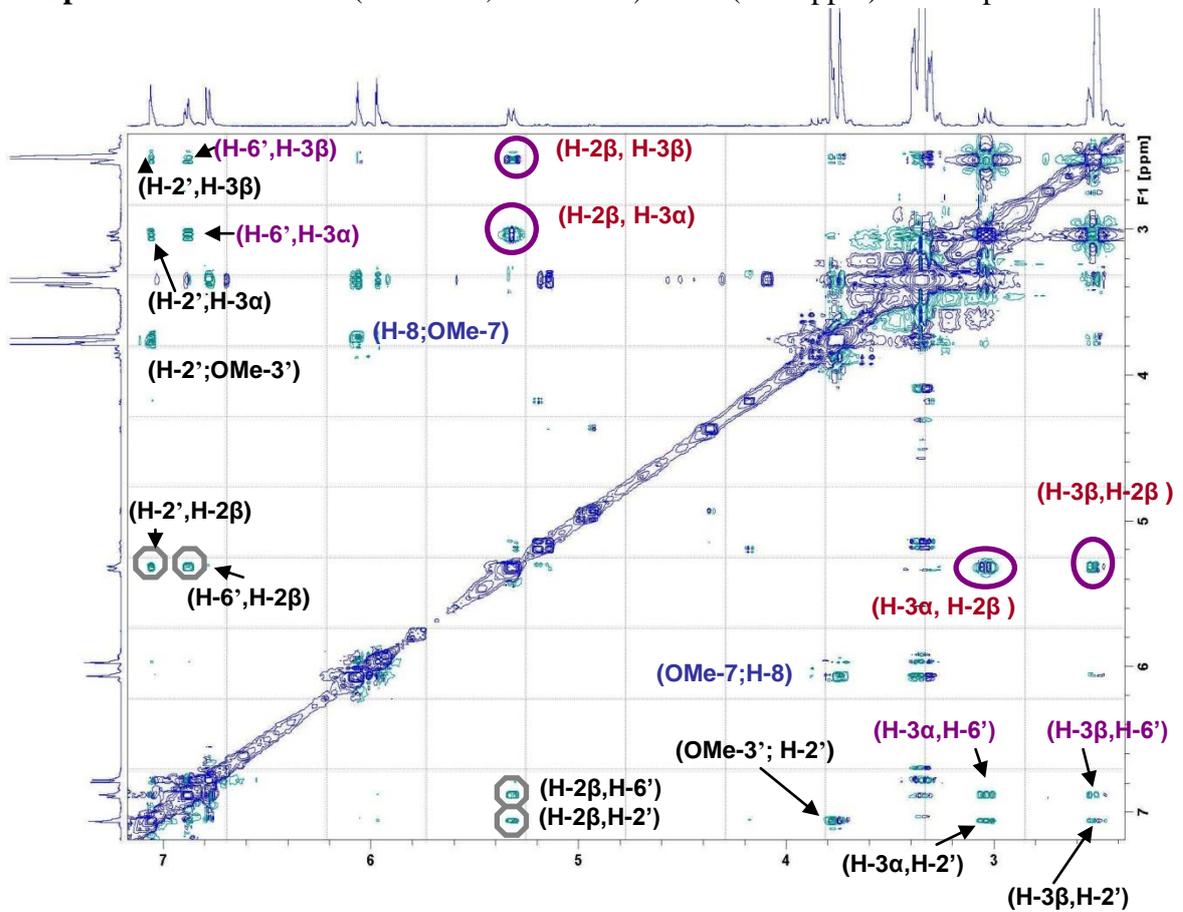
Spectre N°87: HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé K6



Spectre N°88 : HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (2 à 6 ppm) du composé K6



Spectre N°89 : HMBC (400 MHz, *DMSO-d6*) étalé (5 à 8 ppm) du composé K6



Spectre N°90 : NOESY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé K6

IV.3 Identification des produits isolés de *Genista quadriflora* Munby

IV.3.1 Identification des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle

IV.3.1.1 Elucidation du Composé A4-1

Les données de la série spectrale UV (**Spectre N°91**) montrent les indications suivantes :

Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 349 nm et une bande II à 266 nm indiquant ainsi la structure d'une flavone ou flavonol substitué en C-3.

L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 58$ nm) avec augmentation de l'intensité qui révèle la présence d'un OH libre en position C-4'. La présence d'une nouvelle bande à 310 nm confirme cette hydroxylation.

Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +9$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.

L'addition de ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) ne montre aucun effet sur le spectre d'absorption comparativement à celui enregistré dans le MeOH ce qui prouve l'absence d'un OH libre en 5.

Le fait qu'il n'y est pas de changement de la bande I en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et AlCl_3 , laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet bathochrome faible ($\Delta\lambda = + 1$ nm) de la même bande par rapport au spectre enregistré dans le méthanol.

Le spectre de RMN ^1H , et son étalement réalisé dans CD_3OD (**Spectre N°92**) et son étalement (**Spectre N°93**) montrent :

Un singulet présent à $\delta = 6,67$ ppm intégrant pour 1H est caractéristique du proton en position 3 des flavones. On remarque aussi deux doublets à $\delta = 7,57$ et $6,97$ ppm, intégrant pour 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, ils sont sous forme de doublets avec une constante de couplage $J = 8,2$ Hz, et qui sont caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B.

On a deux doublets à $\delta = 6,50$ et $6,24$ ppm ($J = 2,1$ Hz) d'intégration 1H chacun qui sont associés à deux protons aromatiques H-8 et H-6 respectivement en *mé*ta sur le cycle A. On note aussi la présence d'un groupement méthoxyle à $\delta = 3,90$ ppm.

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ^1H et la série spectrale UV permet de localiser le groupement méthoxyle en position 5 ce qui mène à la structure suivante : Apigenine 5-méthyl éther (thetvetiaflavone) ^[10].

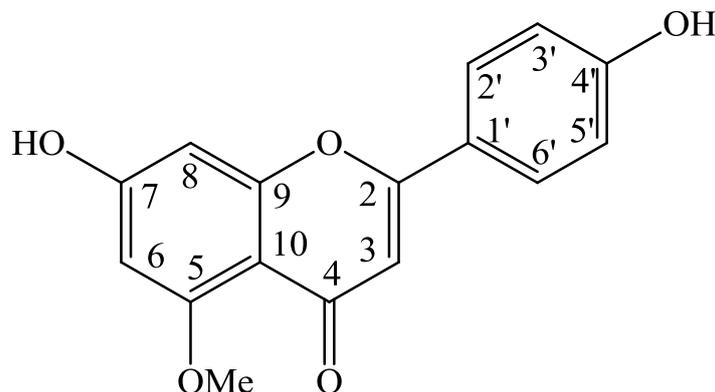


Figure IV.10 : Thetvetiaflavone

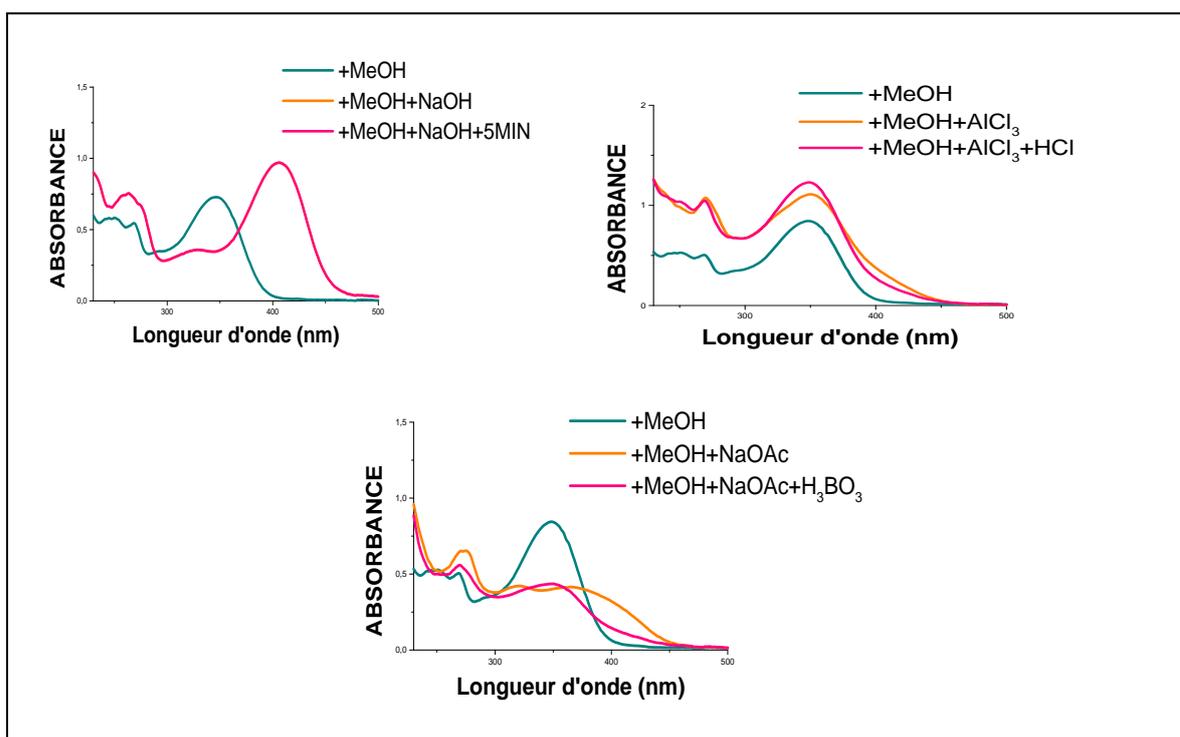
Les données relatives à la série spectrale UV du composé A4-1 ainsi que les données relatives à la RMN ^1H sont reportées dans les tableaux IV.35 et IV.36 respectivement.

Tableau IV.35 : Données de la série spectrale UV du composé A4-1

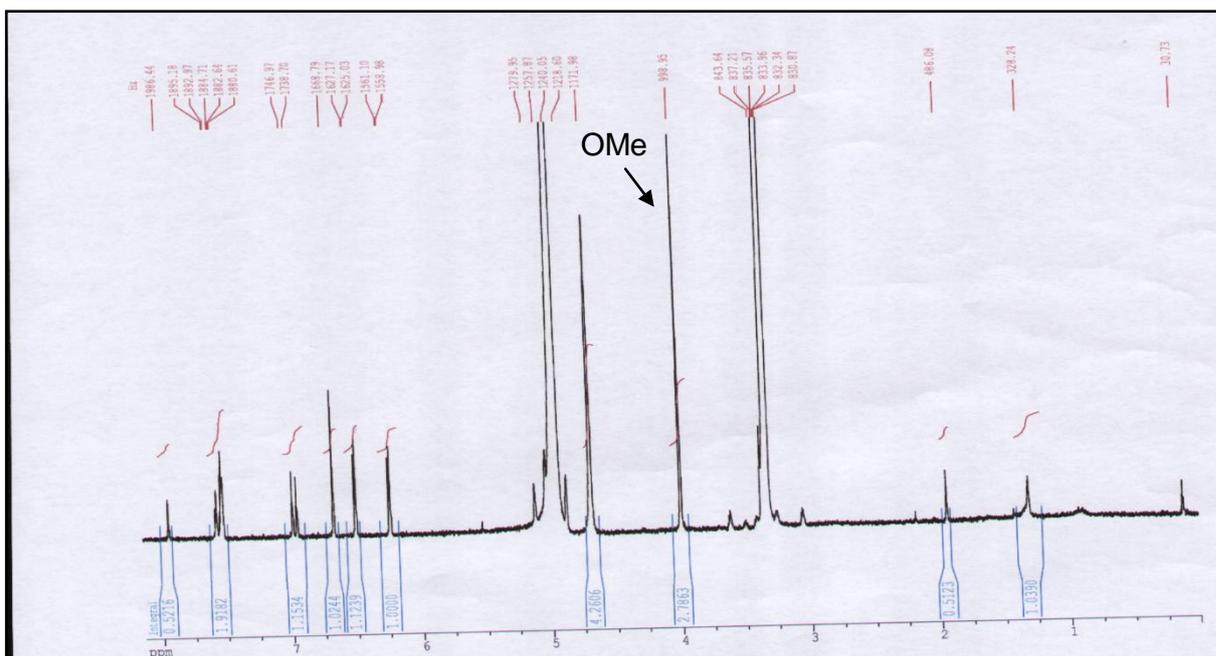
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	349	266		Flavone
+ NaOH	407	263	310	OH libre en 4'
+AlCl ₃	350	270		
+AlCl ₃ /HCl	350	270	306	
+NaOAc	378	275		OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	351	269		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.36 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ , ppm, J/Hz) du composé A4-1

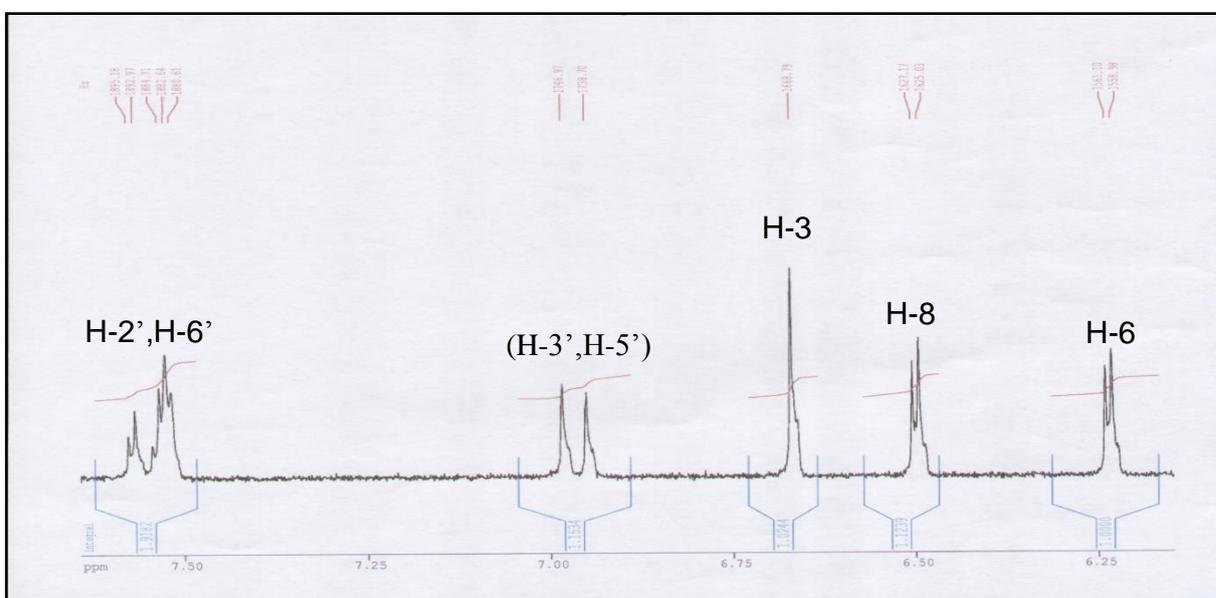
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7.57	2H	d (8.2)	H-2' , H-6'
6.97	2H	d (8.2)	H-3' , H-5'
6.67	1H	s	H-3
6.50	1H	d (2.1)	H-8
6.24	1H	d (2.1)	H-6
3.90	3H	s	OCH_3



Spectre N°91 : Série spectrale UV du composé A4-1



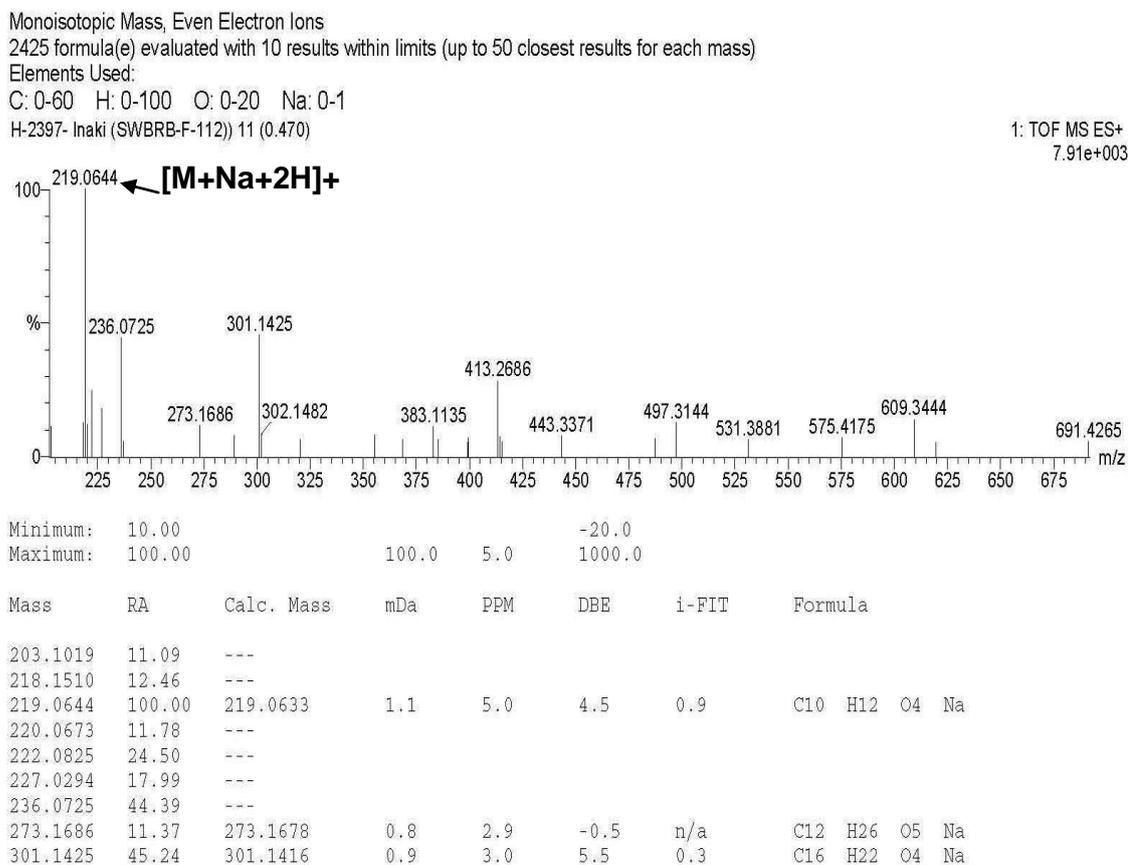
Spectre N°92 : RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d₆) du composé A4-1



Spectre N°93 : RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d₆) étalé à (6 à 8 ppm) du composé A4-1

IV.3.1.2 Elucidation du Composé A4-2

L'analyse du spectre de masse réalisé en mode électrospray positif de ce composé (**Spectre N°94**), montre la présence d'un pic pseudomoléculaire $[M+Na+2H]^+$ à $m/z=219.0644$ calculé pour $C_{10}H_{10}O_4Na$, orientant vers la formule brute $C_{10}H_{10}O_4$ soit une molécule comportant 6 insaturations.



Spectre N°94: Masse en mode électrospray du composé A4-2

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre N°95**) et le spectre relatif aux conséquences DEPT (**Spectre N°96**) confirment la présence de 10 atomes de carbone parmi lesquels on a : Un groupement CH_3 oxygéné à $\delta = 51,25$ ppm. Un groupement CH_2 oxygéné à $\delta = 39,77$ ppm. Cinq types de groupements CH dont 4 aromatiques et un hybridé sp^3 oxygéné à $\delta = 71,55$ ppm. Deux groupements quaternaires aromatiques dont un oxygéné à $\delta = 155,83$ ppm. Enfin un groupement carbonyle à $\delta = 174,00$ ppm.

L'examen du spectre RMN 1H (**Spectre N°97**) et son étalement (**Spectre N°98**), montrent qu'il s'agit d'un composé aromatique para substitué, ainsi les deux signaux

sous forme de doublets ($J = 7,5$ Hz) d'intégration 2H à $\delta = 6,97$ et $6,65$ ppm respectivement indiquent la para substitution des noyaux aromatiques.

Sur les mêmes spectres on constate aussi :

Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 6,2 ; 4,2$ Hz) qu'on peut attribuer à 1 H oxygéné à $\delta = 4,15$ ppm couplé avec 1H en α et un autre en β .

Un autre signal sous forme de doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta = 2,80$ ppm ($J = 11 ; 4,2$ Hz) attribuable à H-1 α .

Un signal à $\delta = 2,70$ ppm sous forme de doublet de doublet ($J = 11 ; 6,2$ Hz) qu'on attribue à H-1 β . Ce qui confirme la présence du système oxiran dans la structure.

Enfin un singulet d'intégration 3 H à $\delta = 3,44$ ppm, indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH_3) dans la molécule.

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (**Spectre N° 99**) montre :

Une tache corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 6,97$ ppm et $\delta = 6,65$ ppm confirmant ainsi les attributions de protons aromatiques.

Une tache de corrélation entre le H à $\delta = 4,15$ ppm et les 2 H à $\delta = 2,80$ ppm et $2,70$ ppm indiquant l'attribution de H-1 α ; H-1 β d'un CH_2 respectivement et confirmant ainsi la substitution dans la molécule.

Une tache de corrélation entre le H-1 α à $\delta = 2,80$ ppm et les signaux à $\delta = 2,70$ ppm et à $\delta = 4,15$ ppm confirmant les attributions de H-1 β , H-2.

Une tache de corrélation entre le H-1 β à $\delta = 2,70$ ppm et les signaux à $\delta = 2,80$ ppm et à $\delta = 4,15$ ppm confirmant les attributions de H-1 α ; H-2.

La combinaison des données relatives aux spectres RMN ^1H , S.M, COSY et RMN ^{13}C laissent suggérer la structure suivante :

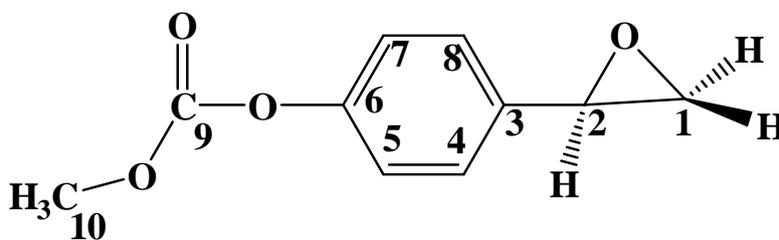


Figure IV.11 : Méthyl 4-(oxiran-2-yl) phenyl carbonate

L'étude du spectre de corrélation HSQC (**Spectre N°100**) permet d'effectuer les attributions suivantes :

Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone à $\delta = 71.55$ ppm qui ne peut être que C-2.

Une tache de corrélation entre H-4, H-8 et les atomes de carbone C-4 et C-8 permettant ainsi leur localisation à $\delta = 130.15$ ppm. De même, une tache de corrélation entre H-5, H-7 et les atomes de carbone C-5 et C-7 permettant leur localisation à $\delta = 114.84$ ppm.

Une tache de corrélation entre H-1 α ; H-1 β et un atome de carbone à $\delta = 39.77$ ppm qui est le C-1.

Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 51.25$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle .

Les données relatives à la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et ses séquences DEPT et la RMN 2D COSY, HSQC sont regroupées dans les tableaux IV.37, IV.38 et IV.39 respectivement.

Tableau IV.37 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2

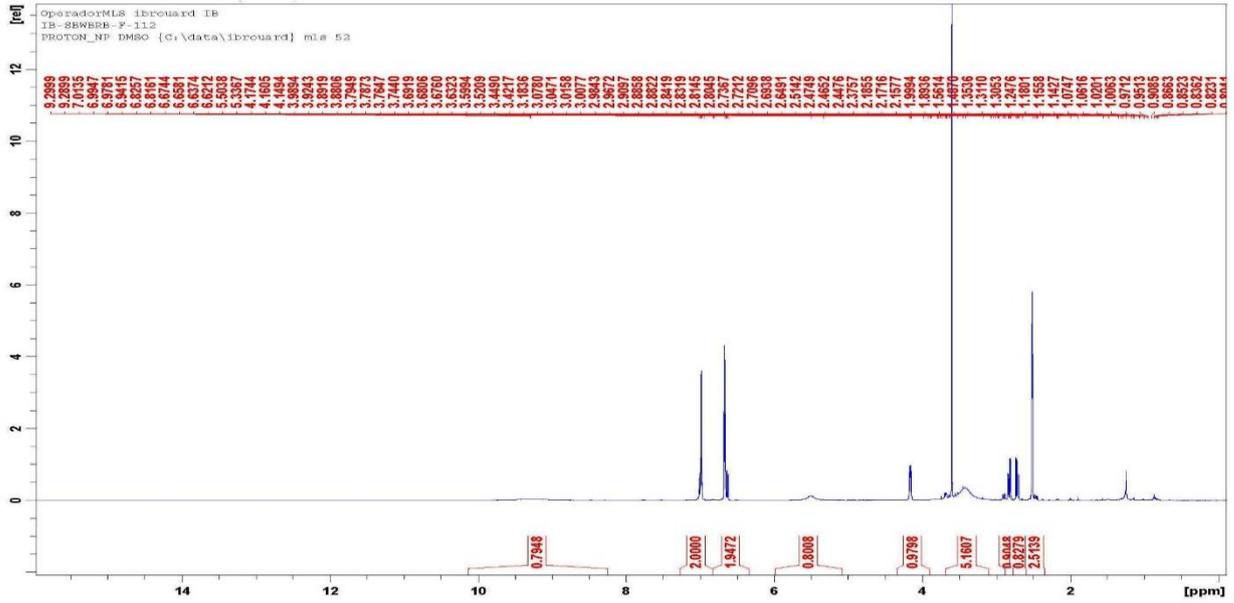
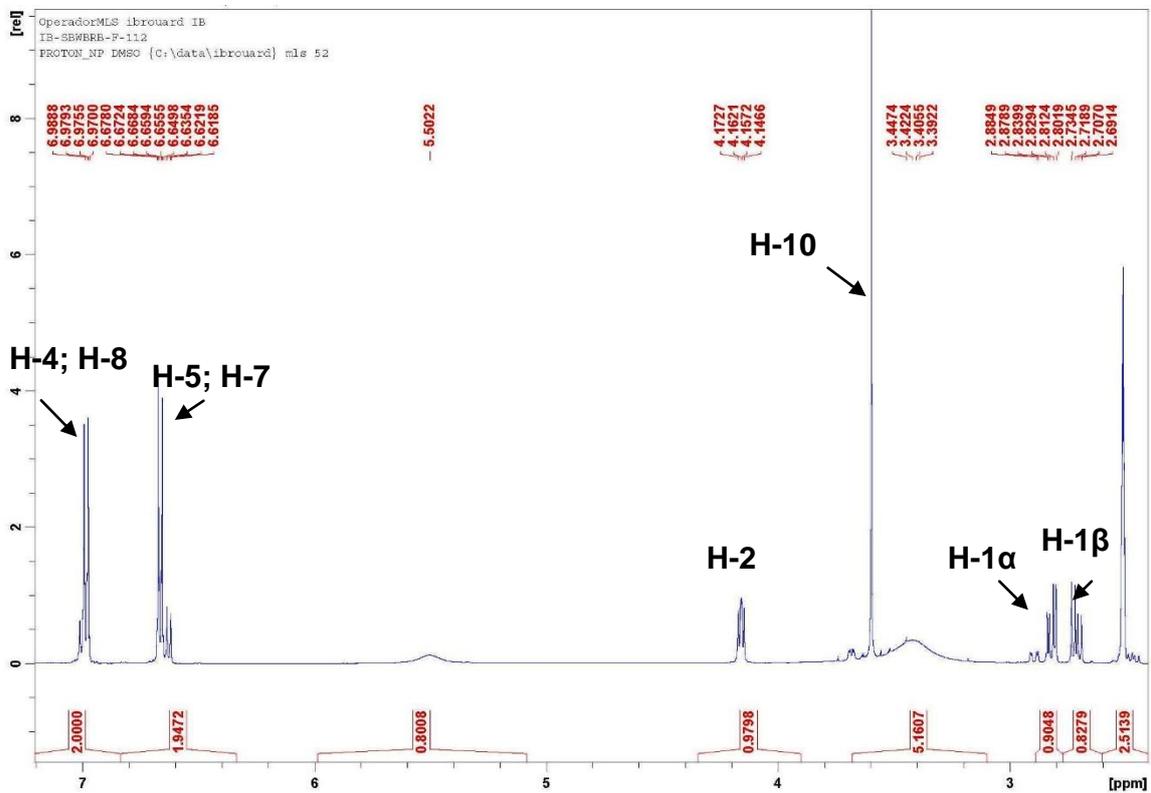
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
6.97	2H	d (7.5)	H-4;H-8
6.65	2H	d (7.5)	H-5;H-7
4.15	1H	dd (6.2 -4.2)	H-2
3.44	3H	s	H-10
2.80	1H	dd (11-4.2)	H-1 α
2.70	1H	dd (11 -6.2)	H-1 β

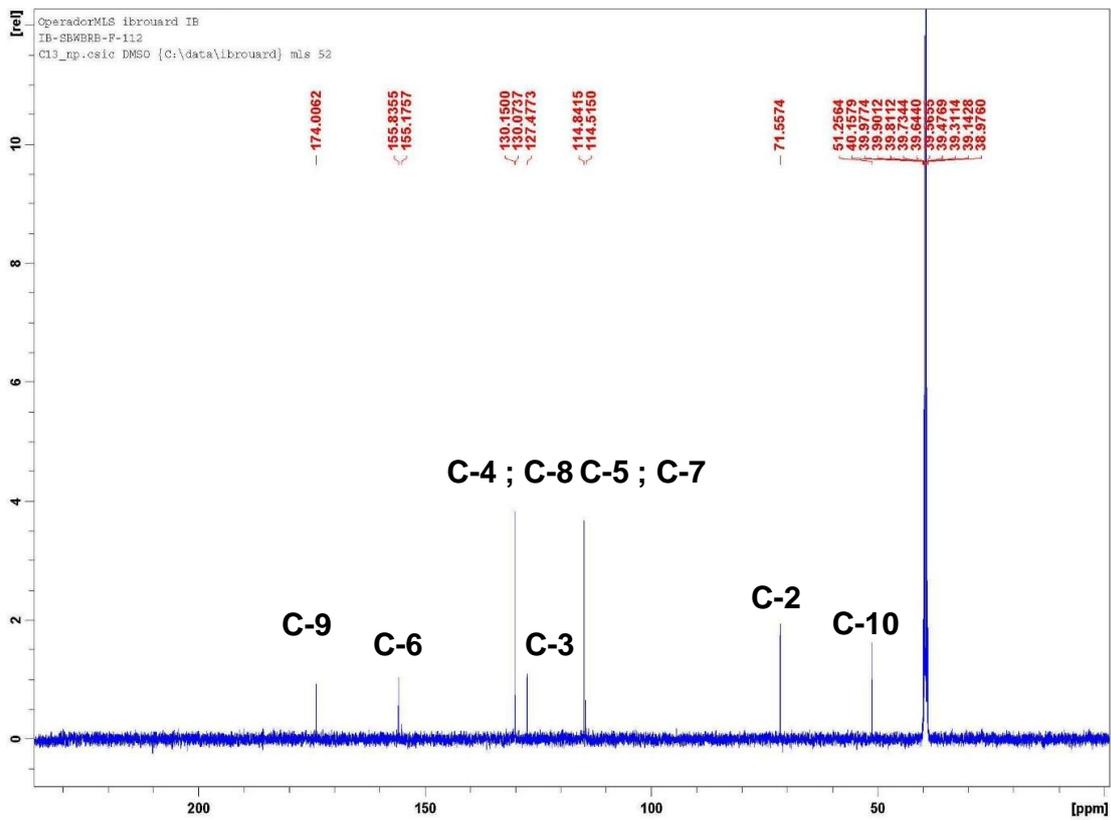
Tableau IV.38 : Données de la spectroscopie HSQC et COSY (400 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2

^1H	$\delta(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$
H-4;H-8	6.97	130.15	H-5;H-7
H-5;H-7	6.65	114.84	H-4;H-8
H-2	4.15	71.55	H-1 α ; H-1 β
H-10	3.44	51.25	/
H-1 α	2.80	39.77	H-1 β ; H-2
H-1 β	2.70	39.77	H-1 α ; H-2

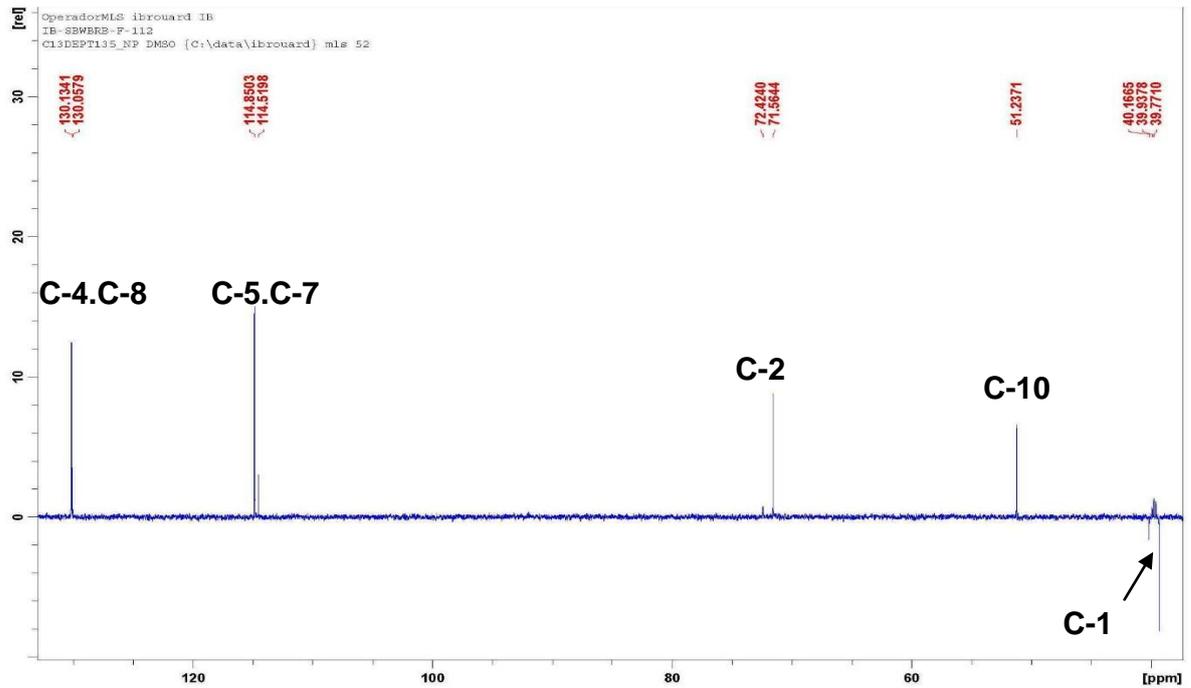
Tableau IV.39 : Données de la spectroscopie DEPT135 et DEPT 90 (100 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm, J/Hz) du composé A4-2

Position de ^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135	DEPT 90
1	39.77	CH ₂	
2	71.55	CH	CH
3	127.47		CH
4	130.15	CH	CH
5	114.84	CH	
6	155.83		CH
7	114.84	CH	CH
8	130.15	CH	
9	174.00		
10	51.25	CH ₃	CH ₃

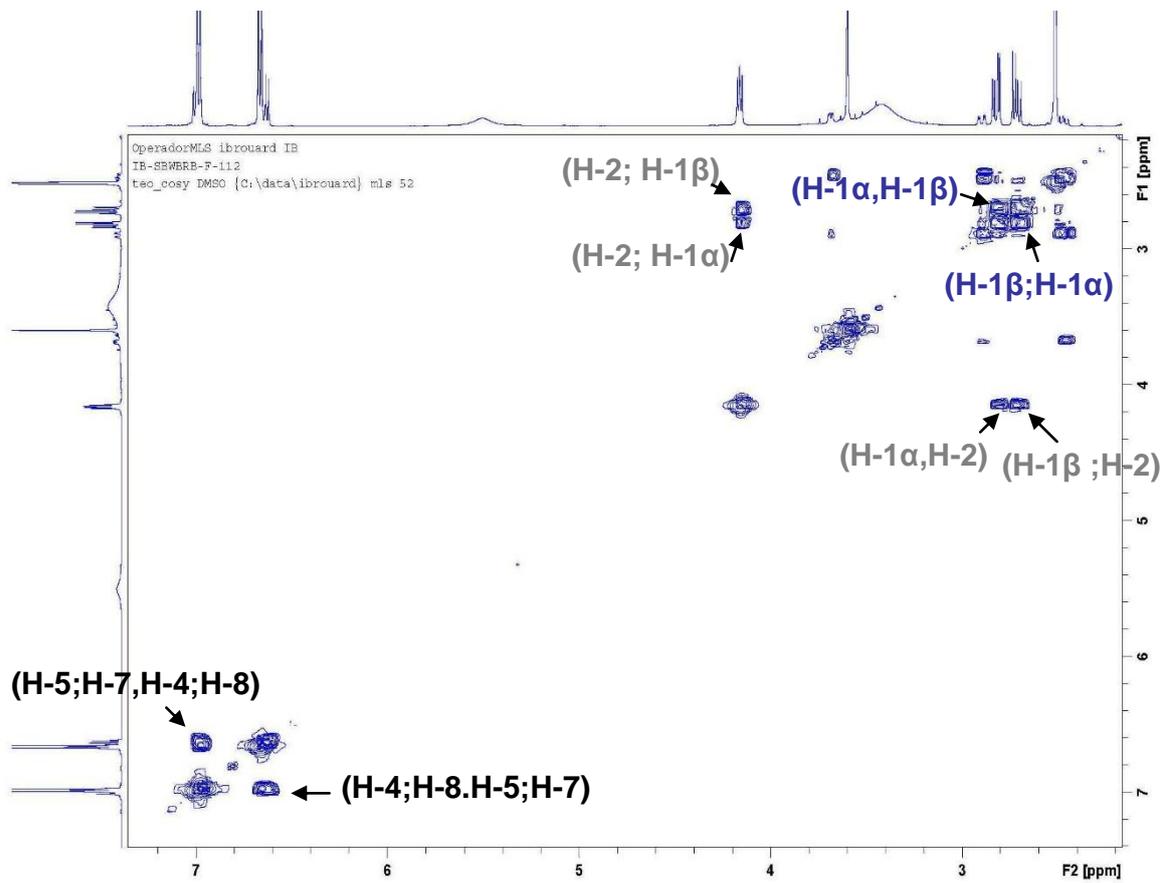
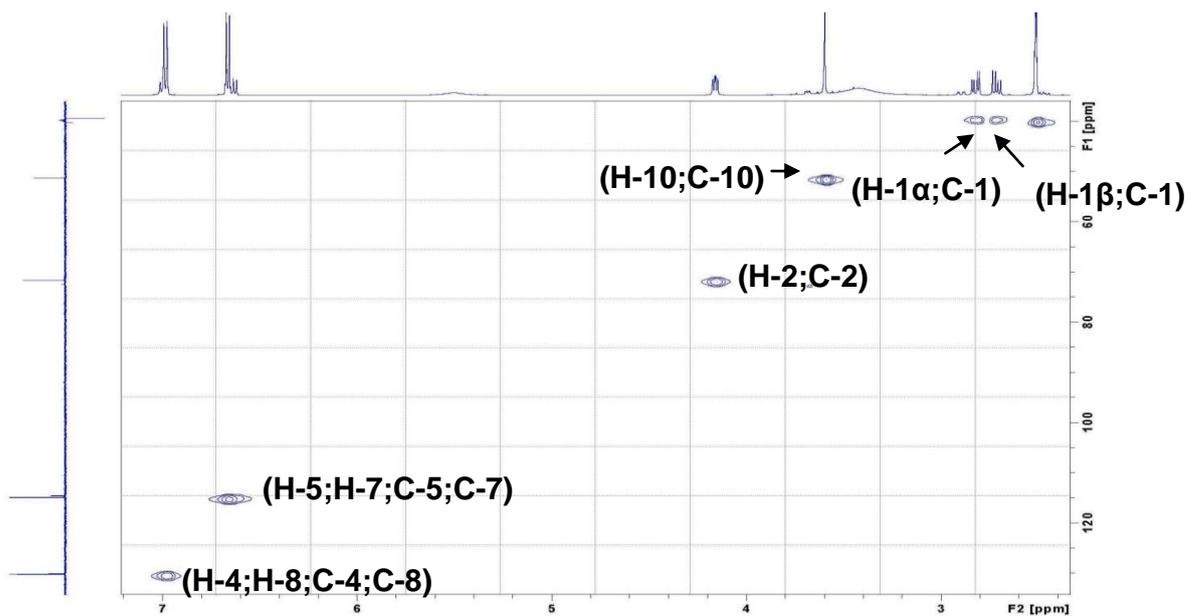
Spectre N°95 : RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé A4-2Spectre N°96 : RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) étalé (2 à 7 ppm) du composé A4-2



Spectre N°97 : RMN ^{13}C (100 MHz, *DMSO-d6*) du composé A4-2



Spectre N°98 : DEPT 135(100 MHz, *DMSO-d6*) du composé A4-2

Spectre N°99: COSY (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé A4-2Spectre N°100: HSQC (400 MHz, *DMSO-d6*) du composé A4-2

IV.3.1.3 Elucidation du Composé A7-1

La fluorescence orange de ce composé sous lumière de Wood laisse supposer un squelette isoflavonidique.

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre N° 102**) et son étalement (**Spectre N°103**) montrent :

Un singulet à $\delta = 7,90$ ppm intégrant pour 1H, caractérise le proton en position 2 d'un isoflavonoïde.

Deux doublets ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H chacun à $\delta = 6,85$ et $7,35$ ppm attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une oxygénation du cycle B en position 4'.

Deux doublets à $\delta = 6,10$ et $6,06$ ppm, intégrant chacun pour 1H et liés par une constante de couplage ($J = 2,1$ Hz) caractérisant les protons H-8 et H-6 respectivement et montrent ainsi la substitution des positions 5 et 7.

L'absence d'autres signaux sur le spectre RMN ^1H laisse supposer la présence des OH libre en position 4', 5,7.

Les données spectrales du spectre U-V visible (**Spectre N°101**) qui montrent :

Une bande I sous forme d'un épaulement à environ 323 nm confirme le squelette de type isoflavone.

Le déplacement bathochrome de la bande II après l'ajout de NaOAc ($\Delta\lambda = +8$ nm) comparativement à celui qui est enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de la bande II enregistré après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ($\Delta\lambda = +9$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 5.

Les données du spectre UV et RMN ^1H sont reportés dans les tableaux IV.40 et IV.41 respectivement et mènent à la structure de la Génisteine ^[1].

Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Genista tinctoria* en 1899 par Perkin et Newbury ^[10].

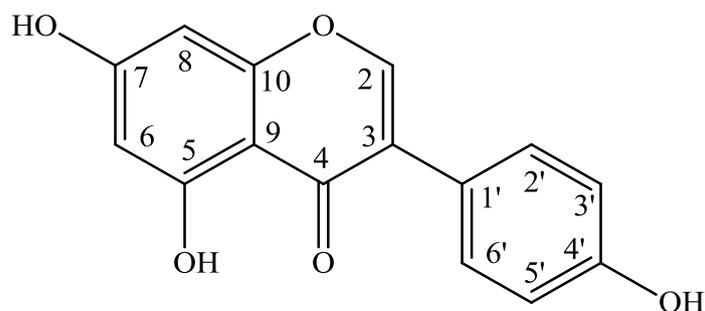


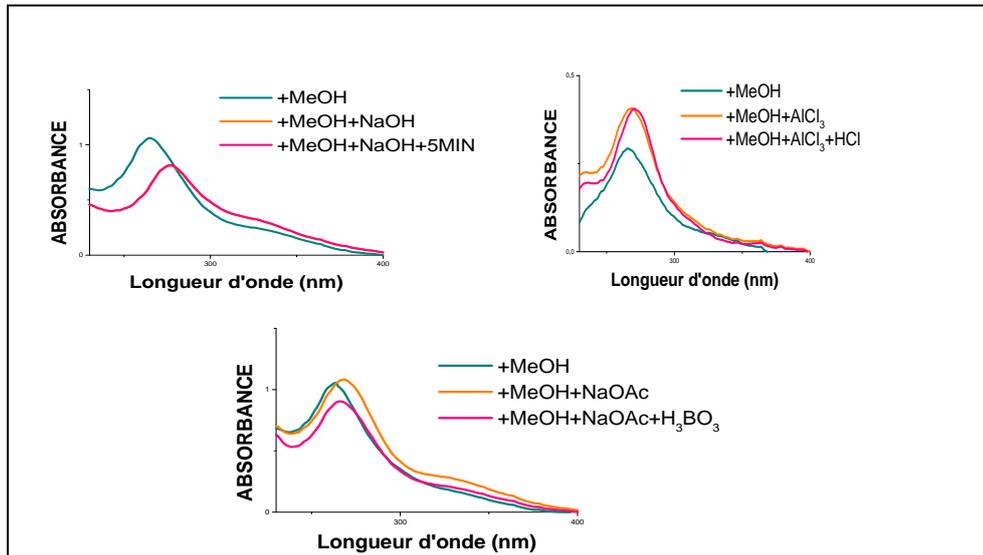
Figure IV.12 : Génisteine

Tableau IV.40 : Données de la série spectrale UV du composé A7-1

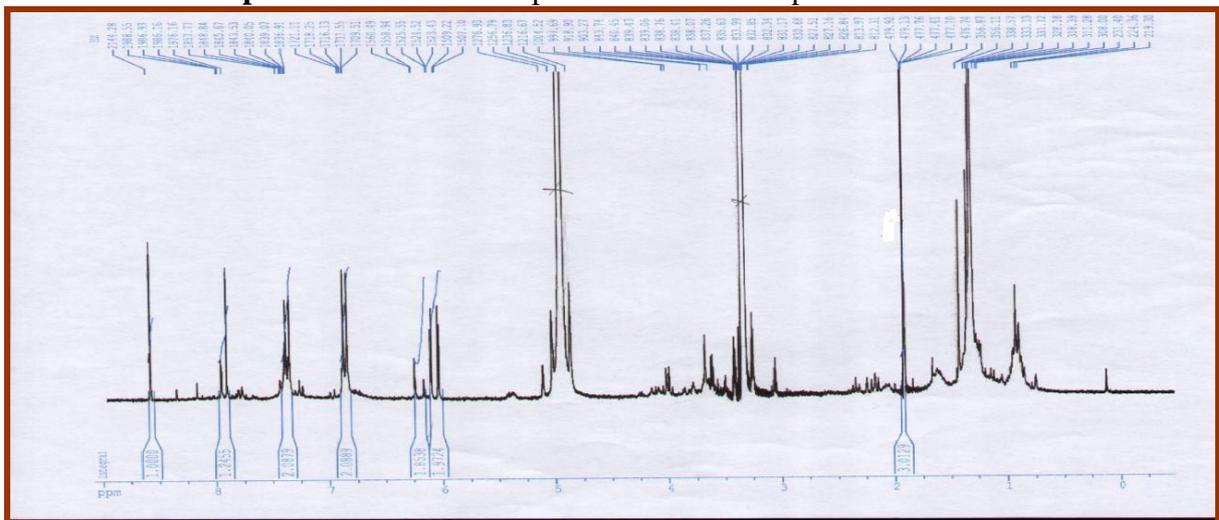
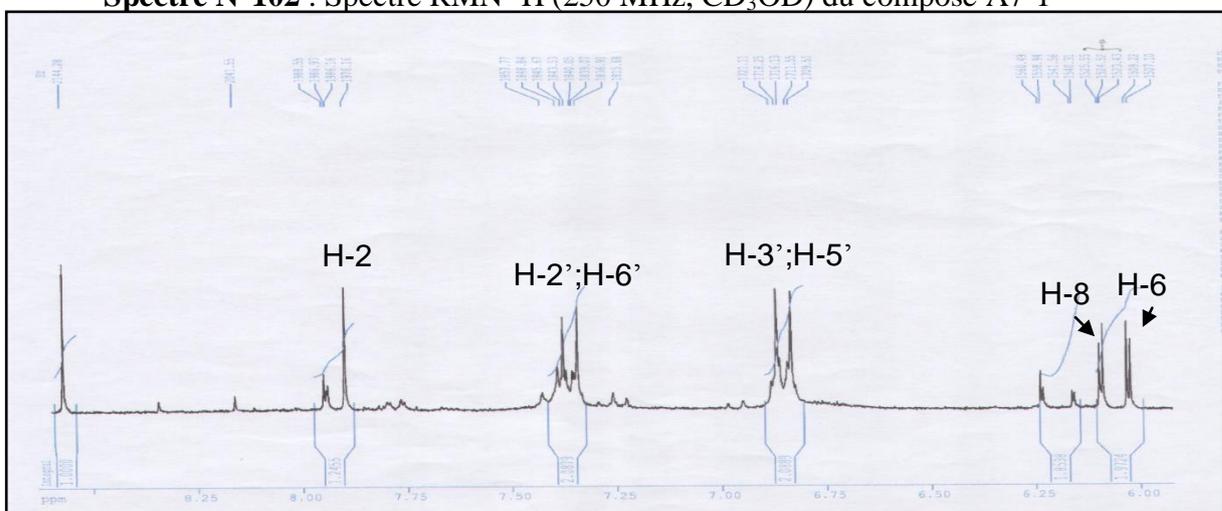
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	323(sh)	261		Isoflavone
+ NaOH	321(sh)	278		
+AlCl ₃	306(sh)	270		
+AlCl ₃ /HCl	306(sh)	270		
+NaOAc	328(sh)	269		OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	323(sh)	266		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.41 : Données de la spectroscopie RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ,ppm, J/Hz) du composé A7-1

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7.90	1H	s	H-2
7.35	2H	d (8.7)	H-2', H-6'
6.85	2H	d (8.7)	H-3', H-5'
6.10	1H	d (2.1)	H-8
6.07	1H	d (2.1)	H-6



Spectre N°101 : Série spectrale UV du composé A7-1

Spectre N°102 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) du composé A7-1Spectre N°103 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) étalé (6 à 9 ppm) du composé A7-1

IV.3.1.4 Elucidation du Composé A11-1

Les données de la série spectrales UV (**Spectre N°104**) de ce composé montrent :

Un épaulement de la bande I à 318 nm qui nous oriente vers un squelette isoflavone et qui est caractérisé d'une couleur orange sous lumière de Wood.

Le déplacement bathochrome de la bande II après l'addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +6$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.

Le spectre enregistré en présence d' AlCl_3/HCl ne montre aucun changement significatif comparativement à celui enregistré dans le MeOH révélant ainsi la présence d'un O-R en position 5.

Les données relatives de la série spectrale UV de ce composé sont regroupées dans le tableau IV.42.

Le spectre RMN ^1H (**Spectre N° 105**) et son étalement (**Spectre N° 106**) montrent :

Un singlet d'intégration 1H à $\delta = 7,95$ ppm caractéristique du H-2 d'un squelette de type isoflavonoïdes.

Deux doublets d'intégration 2 H chacun à $\delta = 6,85$ et $7,34$ ppm ($J = 8,7$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Un singlet à $\delta = 6,40$ ppm d'intégration 2H et montrant un couplage méta ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-6 et H-8.

Un singlet d'intégration 3 H à $\delta = 3,90$ ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle sur la molécule.

Les données relatives au spectre RMN ^1H sont regroupées dans le tableau IV.43.

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ^1H et la série spectrale UV permet de localiser le groupement méthoxyle en position 5. Ce que mène à la structure suivante :

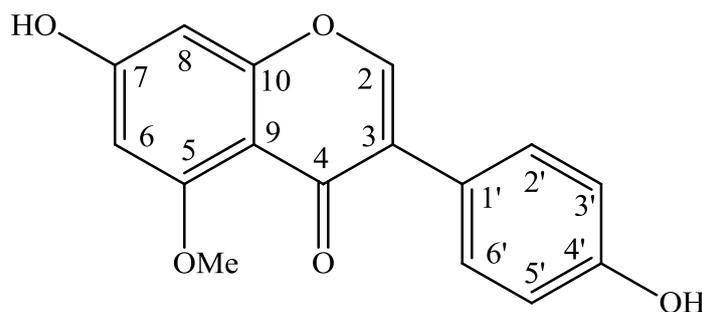


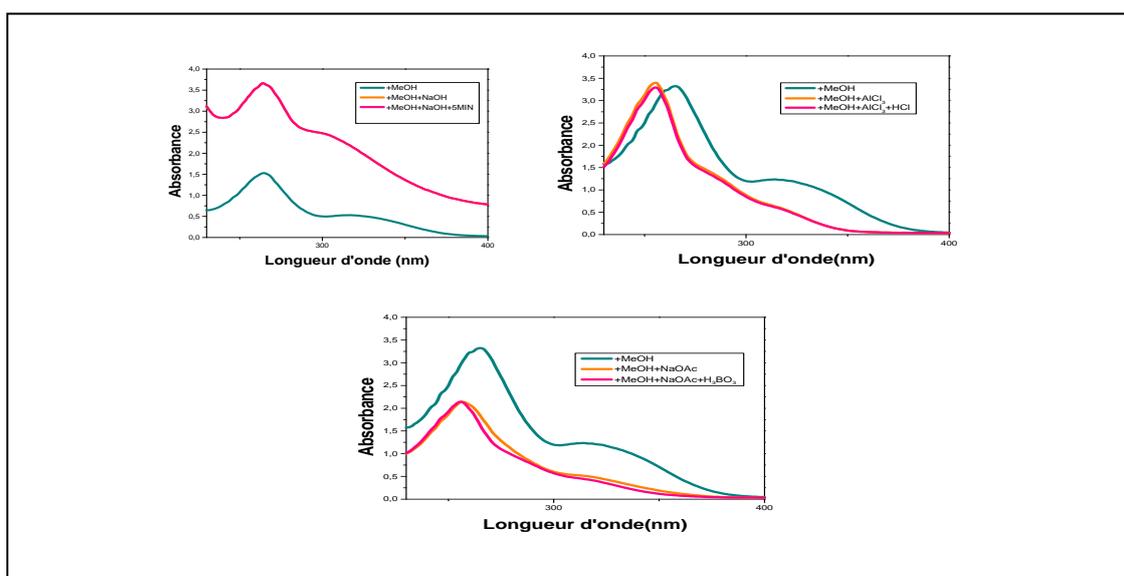
Figure IV.13 : Génisteine 5- méthyl éther (Isoprunitine) ^[4-5].

Tableau IV.42 : Données de la série spectrale UV du composé A11-1

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	318(sh)	257		Isoflavone
+ NaOH	318(sh)	266		
+AlCl ₃	318(sh)	254		
+AlCl ₃ /HCl	318(sh)	260		
+NaOAc	318(sh)	263		OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	318(sh)	257		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.43 : Données de la spectroscopie RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ ppm, J/Hz) du composé A11-1 :

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
7.95	1H	s	H-2
7.34	2H	d (8.7)	H-2', H-6'
6.85	2H	d (8.7)	H-3', H-5'
6.40	2H	d (2.2)	H-6, H-8
3.90	3H	s	OCH ₃



Spectre N°104 : Série spectrale UV du composé A11-1

IV.3.1.5 Elucidation du Composé A11-2

Les données de la série spectrale UV (**Spectre N° 107**) montrent :

Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 318 sous forme d'un épaulement et une bande II à 256 nm laissant présager la structure d'une isoflavone. Ce squelette est confirmé par la couleur orange de ce produit sous lumière de Wood.

Le déplacement bathochrome de la bande II après l'addition de NaOAc ($\Delta\lambda = + 5$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH nous oriente vers la présence d'un OH libre en position 7. Les données de la série spectrale UV sont représentées dans le tableau IV.44

Tableau IV.44 : Données de la série spectrale UV du composé A11-2

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	318(sh)	256		Isoflavone
+ NaO	318(sh)	258		
+AlCl	318(sh)	253		
+AlCl ₃ /HCl	318(sh)	253		
+NaOAc	318(sh)	261		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	318(sh)	257		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Le spectre RMN ¹H (**Spectre N°108**) et son étalement (**Spectre N°109**) montrent :

Un singulet présent à $\delta = 7,98$ ppm intégrant pour 1H est caractéristique du proton en position 2 des isoflavonoïdes. On remarque deux doublets à $\delta = 6,85$ et $7,36$ ppm, chacun intégrant pour 2 H, avec une constante de couplage $J = 8,7$ Hz chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.

Un singulet à $\delta = 6,45$ ppm intégrant pour 2 H et montrant un couplage méta ($J = 2.2$ Hz) attribuable à H-6 et H-8.

Caractérise le proton en position 6 et 8 sur le cycle A. On note la présence d'un groupement méthoxyle à $\delta = 3,90$ ppm.

Les données relatives à la RMN ¹H représentées dans le tableau IV.45.

Tableau IV.45 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ , ppm, J/Hz) du composé A11-2

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
7.98	1H	s	H-2
7.36	2H	d (8.7)	H-2', H-6'
6.85	2H	d (8.7)	H-3', H-5'
6.45	2H	d (2.2)	H-6, H-8
3.90	3H	s	OCH_3

La combinaison des résultats de la RMN ^1H ainsi que ceux du spectre UV permet de localiser le groupement méthoxyle en position 4'. Ce qui mène à la structure suivante : Génisteine 4'-méthyl éther, biochanine A^[11].

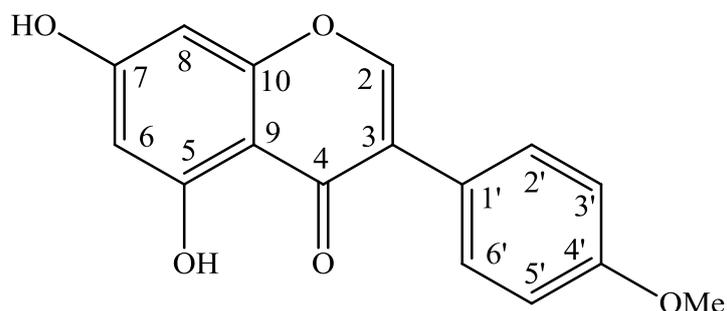


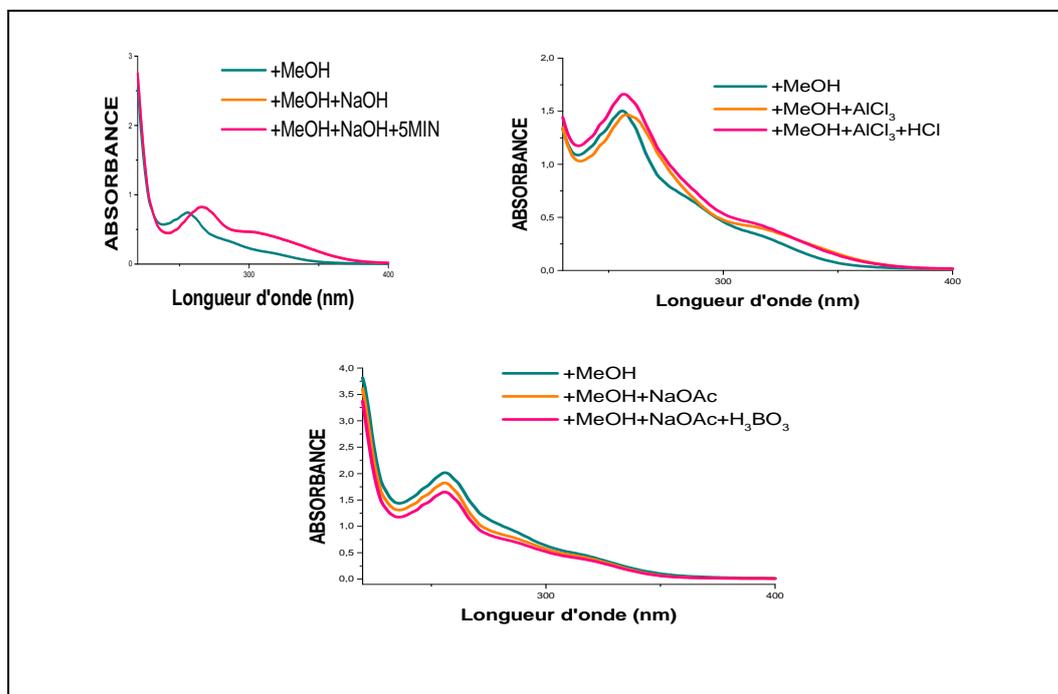
Figure IV.14 : Biochanine A.

Cette structure est confirmée par la comparaison du spectre RMN ^{13}C (Spectre N°116) de ce produit avec celui de la littérature^[12].

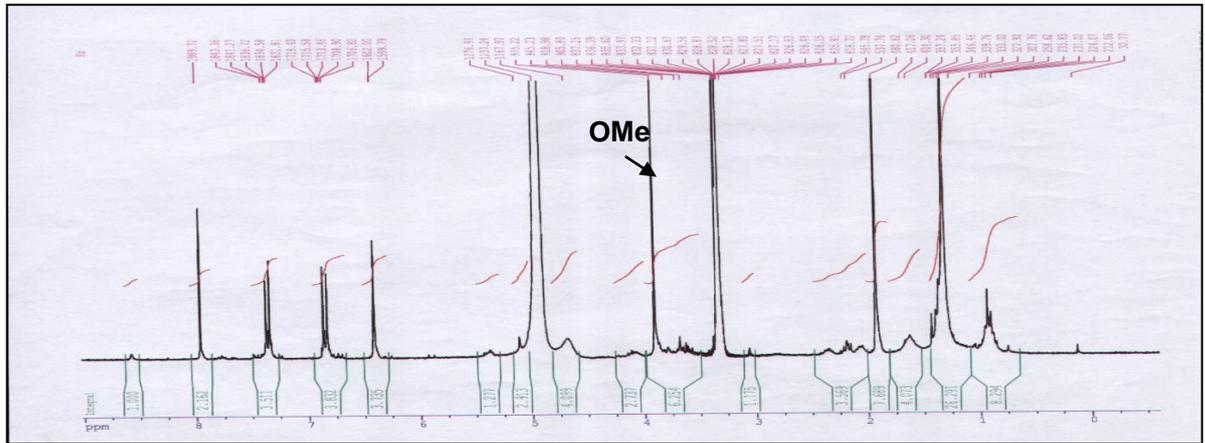
Les données de la spectroscopie RMN ^{13}C sont regroupées dans le tableau IV.46.

Tableau IV.46 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C (63, MHz, CD_3OD , δ , ppm, J/Hz) du composé A11-2

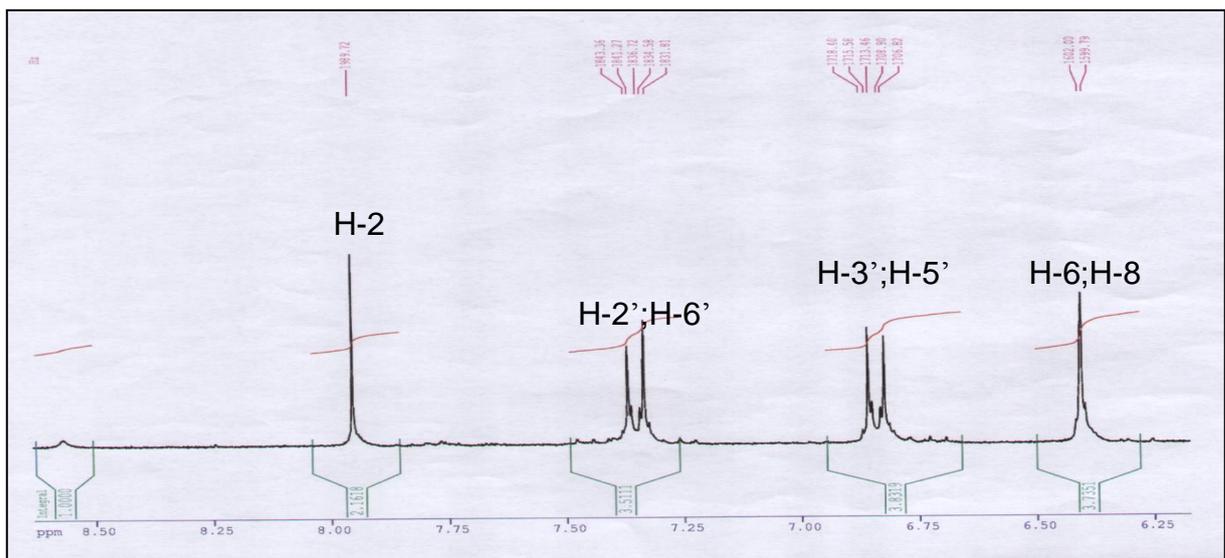
Position de C^{13}	Composé A11-2 δ (ppm)	Biochanine A
2	150.95	154.50
3	123.20	124.10
4	176.35	181.60
5	160.20	163.90
6	96.77	99.90
7	165.00	165.00
8	95.15	94.50
9	157.02	159.00
10	/	106.20
1'	125.33	123.80
2'	130.16	131.10
3'	114.58	114.50
4'	161.47	161.70
5'	114.58	114.50
6'	130.16	131.10
OMe	54.92	55.60



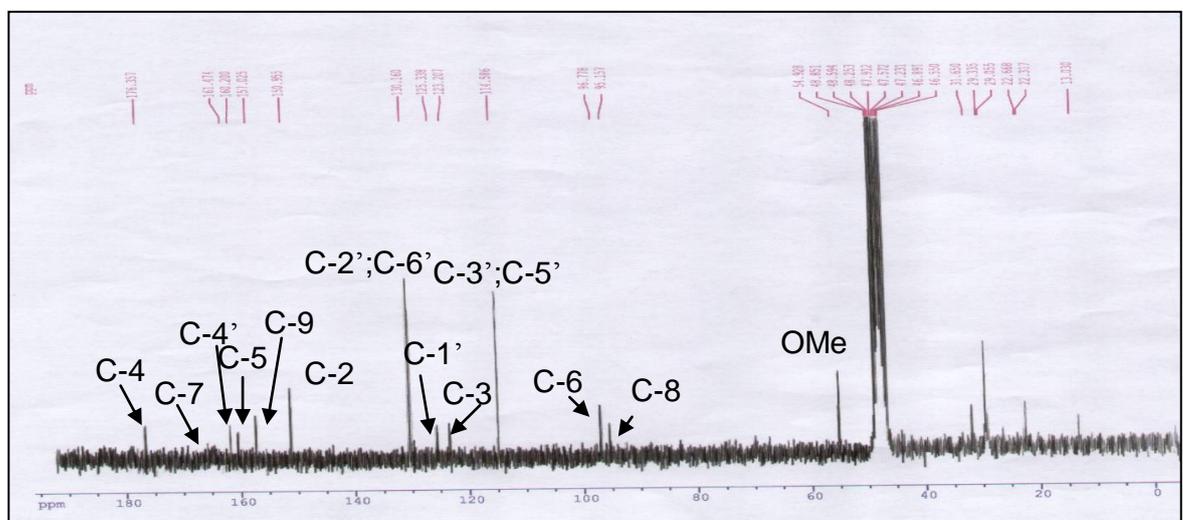
Spectre N°107 : Série spectrale UV du composé A11-2



Spectre N°108: RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) du composé A11-2



Spectre N°109: RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) étalé (6 à 9 ppm) du composé A11-2



Spectre N°110 : RMN ¹³C (63. MHz, CD₃OD) du composé A11-2

IV.3.2 Identification des produits isolés de la phase Chloroforme

IV.3.2.1 Elucidation du Composé L5-1

Les données de la série spectrale UV (**Spectre N°111**) montrent : La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 343 nm laisse supposer la structure de type flavone ou flavonol substituée en C-3.

Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu (AlCl₃+HCl) ($\Delta\lambda = + 53$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH indiquant la présence d'un OH libre en C-5.

L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II révélant la présence d'un OR sur C-7.

L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 48$ nm) avec augmentation de l'intensité révèle la présence d'un OH en position C-4'. Les données relatives au spectre UV sont regroupées dans le tableau IV.47.

Tableau IV.47: Données de la série spectrale UV du composé L5-1

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	343	276		Flavone
+ NaOH	405	324		OH libre en 4'
+AlCl ₃	396	277		
+AlCl ₃ /HCl	396	276		OH libre en 5
+NaOAc	319	276		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	345	276		
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Le spectre de RMN ¹H (**Spectre N°112**) et son étalement (**Spectre N°113**) montrent : La présence d'un groupement OH chélaté en position 5 (singulet à $\delta = 13,03$ ppm) ainsi que cinq signaux dans la région propre aux protons aromatiques. Le singulet présent à $\delta = 6,72$ ppm intégrant pour 1H et caractéristique du proton en position 3 des flavones. On remarque deux doublets à $\delta = 7,03$ et $7,63$ ppm, chacun intégrant pour 2 H, avec une constante de couplage $J = 8,1$ Hz, qui ne peut être positionné que sur le cycle B. Deux doublets à $\delta = 6,56$ et $6,27$ ppm ($J = 2,1$ Hz) sont associés à deux protons aromatiques en *mé*ta sur le cycle A. On note la présence d'un groupement méthoxyle à $\delta = 4,01$ ppm. Les données de la spectroscopie RMN ¹H sont regroupées dans le tableau IV.48.

Tableau IV.48 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) du composé L5-1

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité $J(\text{Hz})$	Attribution
13.03	1H	s	OH-5
7.63	2H	d 8.1	H-2', H-6'
7.03	2H	d (8.1)	H-5', H-3'
6.72	1H	s	H-3
6.56	1H	d (2.1)	H-8
6.27	1H	d (2.1)	H-6
4.01	3H	s	OCH₃

La combinaison des résultats de la RMN ^1H ainsi que ceux du spectre UV permettent de positionner le groupement méthoxyle en 7. Ainsi on aura la structure suivante :

Apigénine 7-méthyl éther (Genkwanine) ^[13].

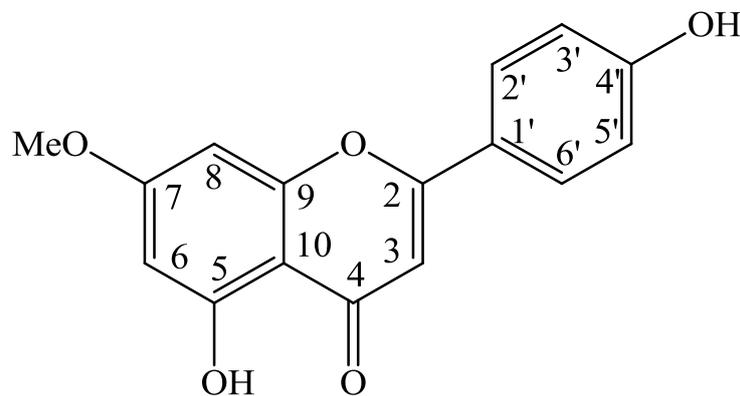
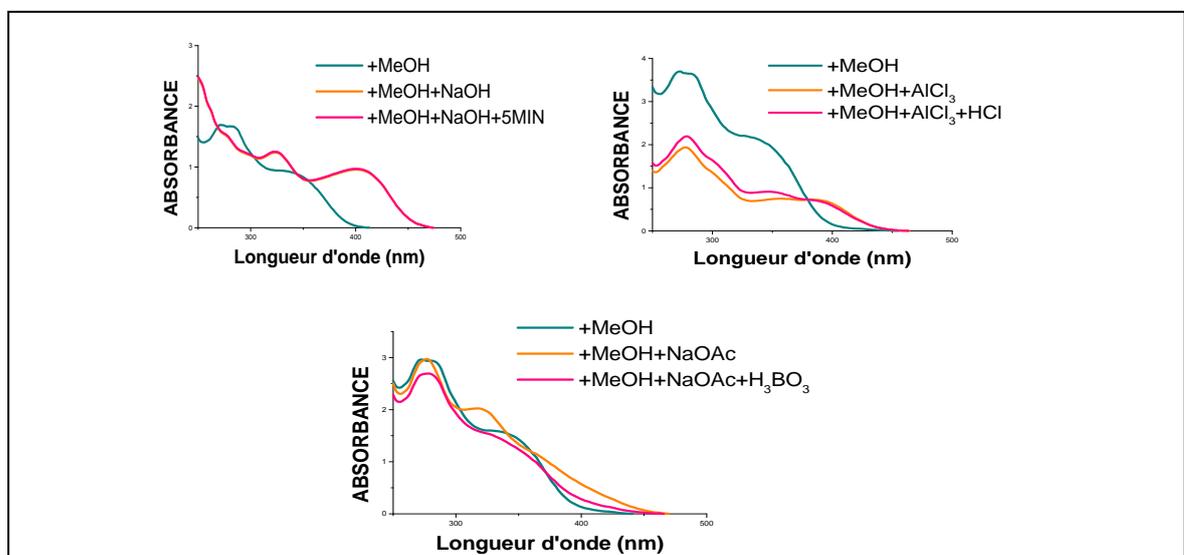
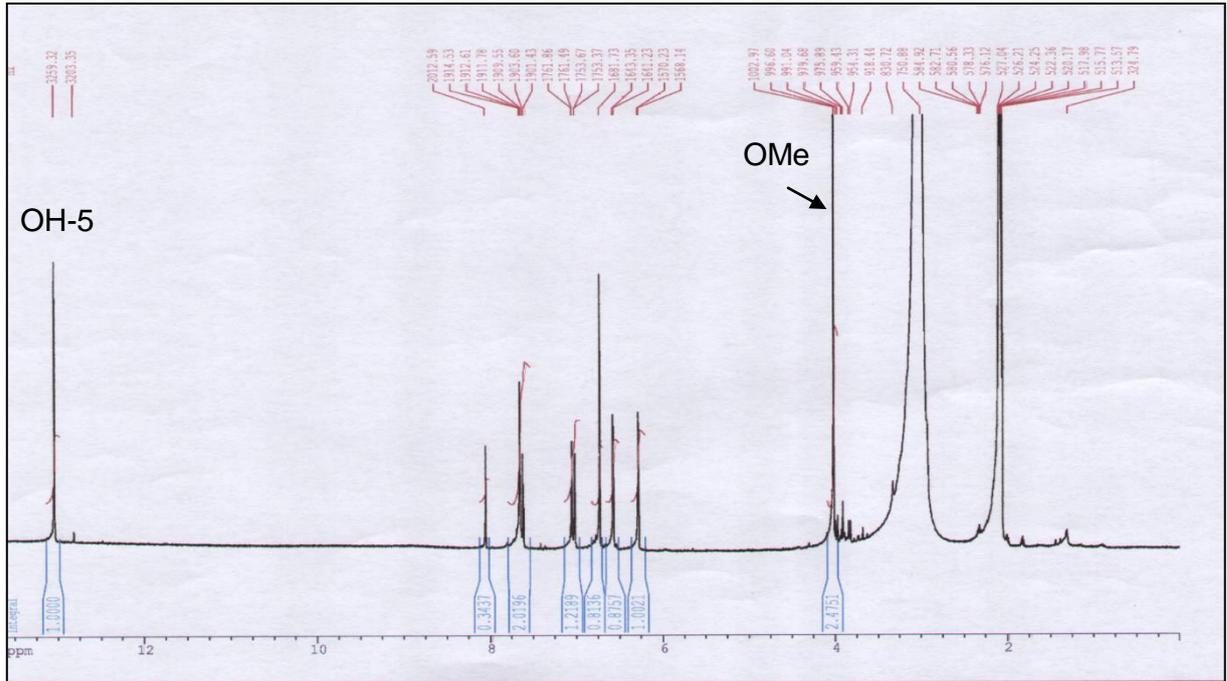


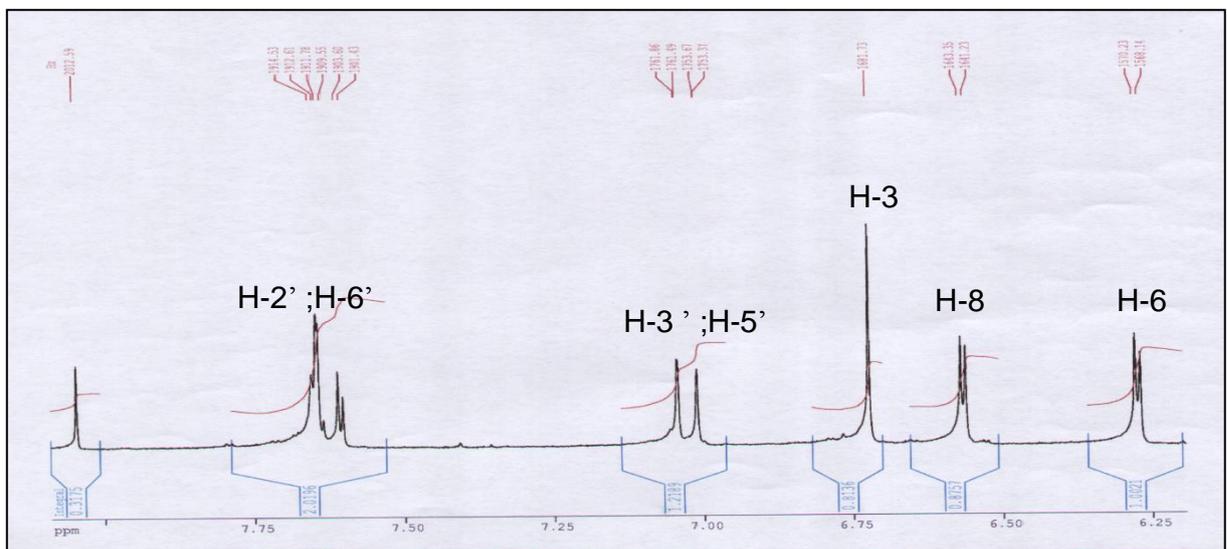
Figure IV.15 : Genkwanine



Spectre N°111 : Série spectrale UV du composé L5-1



Spectre N°112 : RMN¹H (250 MHz, CD_3OD) du composé L5-1



Spectre N°113 : RMN¹H (250 MHz, CD_3OD) étalé (6 à 8 ppm) du composé L5-1

Références Bibliographiques

- [1]- Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Manunta A, *Journal of Natural Products*, **1998**; 61(11), pp 1404-1406.
- [2]-Flamini G, Antognoli E, Morelli I, *Phytochemistry*, **2001**; 57, pp 559–564.
- [3]-Hurabielle M, Eberle J, Paris M. Flavonoids of *Artemisia campestris*, ssp. *glutinosa*. *Planta Medica*, **1982**; 46(2),pp 124-5.
- [4]- Kerkatou M, Menad A, Sarri D, León F, Brouard I, Bouldjedj R, Chalard P, Ameddah S, Benayache S, Benayache F, *Der Pharmacia Lettre*, **2013**; 5(5), pp 285-289.
- [5]-Paris RR. C. R. National *Academy* of Sciences, Paris, **1965**.
- [6]-Agrawal P.K ,Carbon-13 NMR of flavonoid .Central institute of Medical and Aromatic Plants ,India.Edition *Elsevier*,New York, **198**; 39(6), pp 287–293.
- [7]- Lopez Lazaro M, Martin-Cordero C, Iglesias-Guerra F, and Ayuso Gonzàlez M.J, An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry*, **1998** ; 48(2), pp 401-402.
- [8]- Mizuo M, Toshiyuki T, Koh-Ichi T, Nobuyasu M, Munekazu I, Chamlong P. *Phytochemistry*,**1990**; 29, pp 2663-2665.
- [9]- Ganapaty S *et al.* / *Journal of Natural Remedies*, **2008**; 8(1), pp 57- 60.
- [10]- Voigtlander HW, Balsam G, *Archiv der Pharmazie*, **1970**; 303, pp 792-797.
- [11] -Perkin A.G and Newbury FG, *Journal of the Chemical Society*, **1899**; 75, pp 830-839.
- [12]-Agrawal PK and Bansal MC. Isoflavonoids in Carbon-13 NMR of Flavonoids, *Elsevier*, **1989**; p 183.
- [13]-Komiya T, Naruse Y, Oshio H, *Yakugaku zasshi*, **1976**; 96 (7), pp 855-862.

Chapitre V

L'ACTIVITE BIOLOGIQUE

CHAPITRE V. L'ACTIVITE BIOLOGIQUE

V.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

V.1.1. INTRODUCTION

L'oxygène (O_2) est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie ^[1]. Par contre l' O_2^{\bullet} est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (oxydant) ^[2,3]. Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels ^[4] et à des dégâts cellulaires irréversibles ^[5] ». Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires ^[6-8]. Un antioxydant est une molécule qui possède une capacité à capter ou à piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant ^[9].

V.1.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se rapatrier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. Ils sont produits dans notre organisme sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, ou au cours des réactions enzymatiques. Ce mécanisme peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaire avant d'être neutralisés ^[10]. 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 hydroxy phénoliques dans leurs structures et les Propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) et superoxydes (O_2^{\bullet}) ^[11-14].

V.1.3. Les polyphénols antioxydants

Les phénols simples, acides phénoliques et les flavonoïdes jouent un rôle capital dans l'élimination et la détoxification des radicaux libres, et permettent d'augmenter la résistance des LDL à l'oxydation et d'inhiber la peroxydation des lipides. Par ailleurs, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antihémorragiques, des propriétés antibactériennes et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Les flavonoïdes tend à ce que des polyphénols présentent de nombreuses activités : anti oxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes, et préventives des maladies cardiovasculaires. Pharmacologiquement, les aglycones sont particulièrement efficaces. Certains ont des activités hépatoprotectrices, diurétiques, vasodilatatrices, antibactériennes, inhibitrices de l'aldolase réductase et antiallergiques [15-17].

V.1.4. Principe du test au radical libre DPPH•

• Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant

Le composé chimique 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [18,19]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, 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 violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm. Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est de piéger des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• pour les transformer en une molécule stable DPPHH [20] :



V.1.5. Matériels et méthodes

L'activité antiradicalaire a été évaluée, in vitro, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH• (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 3ml d'extrait méthanolique a été incubé avec 0.004% d'une solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 min, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées [21].

Les résultats obtenus pour l'extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus avec l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH• par l'extrait de *G. quadriflora* Munby et *G. aspalathoides* Lamk ssp. *erinaceoides* (Lois). a été calculé comme suit :

$$I\% = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon-l'extrait)

V.1.6. Résultats et discussions

Dans la présente étude, la capacité de piéger des radicaux DPPH• de différents extraits de *G. quadriflora* Munby et *G. aspalathoides* Lamk ssp. *erinaceoides* (Lois.) ont été évalué de manière de dose-dépendante. Différents extraits des deux espèces se sont avérés être un capteur efficace des radicaux DPPH• par rapport à l'acide ascorbique utilisé comme référence. L'effet de balayage des échantillons sur le radical DPPH diminué dans l'ordre de l'acide ascorbique > extrait chloroforme > extrait d'acétate d'éthyle pour *G. quadriflora* Munby (Tableau V.1 et Figure V.1) donc il est dépendant de la concentration, les valeurs de CI50 des extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle de cette plante ont montré une activité antioxydante modérée à la comparaison avec l'acide ascorbique utilisé comme standard.

Tableau V.1. L'activité antioxydante des extraits *G. quadriflora* Munby

DPPH CI50 (µg/ml)	
Extrait chloroforme	58,97
Extrait acétate d'éthyle	61,64
L'acide ascorbique	05,18

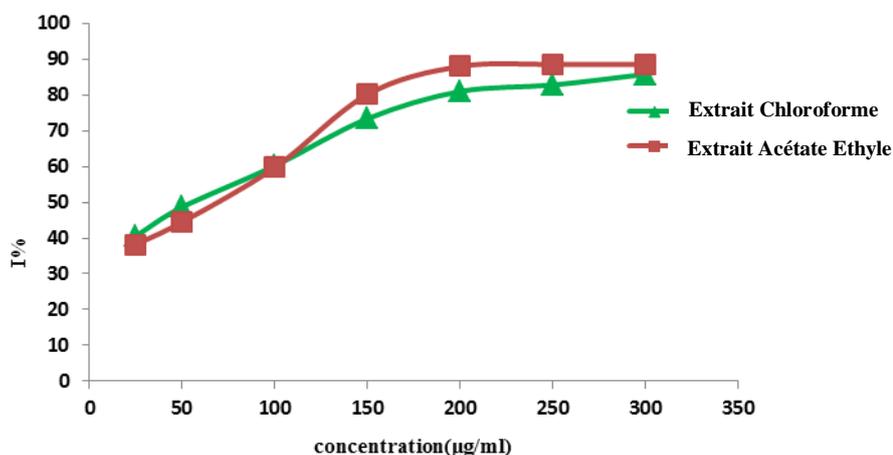


Figure V.1: % DPPH effet de balayage des échantillons testés.

Et à propos de *G. aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides* (Lois.) l'effet de balayage des échantillons sur le radical DPPH a diminué de l'ordre de l'acide ascorbique > extrait d'acétate d'éthyle > extrait de chloroforme, il est aussi dépendant de la concentration. La valeur CI50 de l'acide ascorbique et de plusieurs constituants sont les suivants: 5,18 µg / ml, 79,53 µg / ml et 121,49 µg / ml, respectivement (Tableau V.2 et Figure V.2).

Tableau V.2. L'activité antioxydante des extraits *G. aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides* (Lois.)

DPPH CI50 (µg/ml)	
Extrait chloroforme	121.49
Extrait acétate d'éthyle	79.53
L'acide ascorbique	05,18

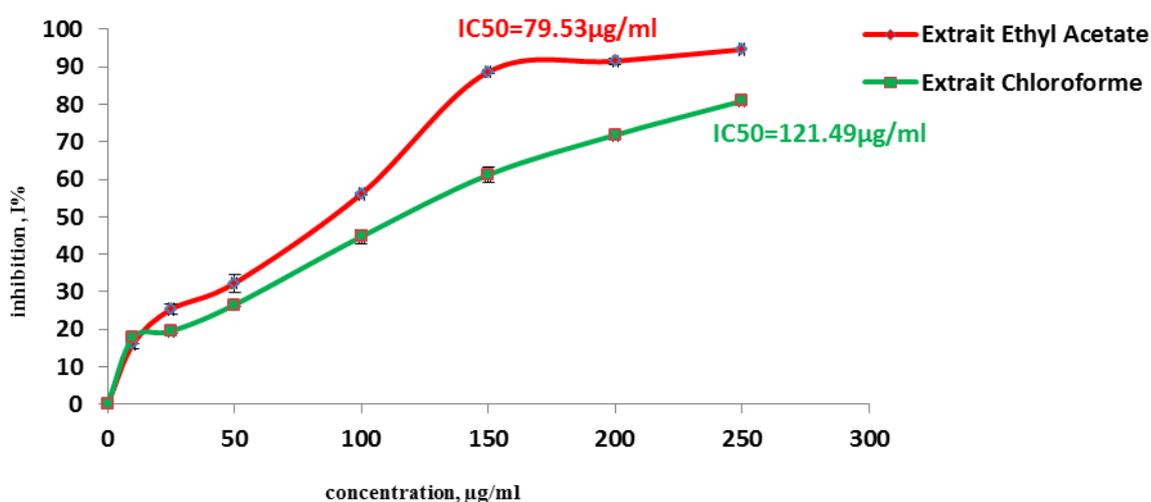


Figure V.2: % DPPH effet de balayage des échantillons testés.

CONCLUSION :

Les résultats des différents extraits (chloroforme et acétate d'éthyle) des deux espèces *Genista* confirment que la meilleure activité est celle de la phase acétate d'éthyle de *G. aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides* (Lois.) avec une IC₅₀=79.53 µg/ml. Et pour *G. quadriflora Munby* meilleure activité est celle de la phase chloroforme avec une IC₅₀=58,97µg/ml.

Donc L'importance de l'activité antioxydante de ces extraits se concentre sur la richesse en molécules à haut potentiel antioxydant tel que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Tous ces résultats ont été signalés pour la première fois de *G. quadriflora Munby* et *G. aspalathoides Lamk ssp. erinaceoides* (Lois.).

Références bibliographiques

- [1]- Namiki M, Antioxidants/Antimutagens in Food. *CRC critical reviews in food science and nutrition*, **1990**; 29, pp 273-300.
- [2]- Dalton D.A, Antioxidant defences of plants and fungi. *Ed. Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*, **1995**; pp 298-355.
- [3]- Garcia-Plazaola J.I, Becerril J.M, A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochemical Analysis*, **1999**; 10, pp 307-313.
- [4]- Durackova Z, Djrolo F, HOUNGBE H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M, Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. Gvozdzjakova, **2008**; pp 19-43.
- [5]- Abuja P.M and Albertini R, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, **2001**; 306, pp 1-17.
- [6]- Sanchez MC, Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, **2002**; 8 (3), pp 121-137.
- [7]- Marc Fr, Davin A, Deglène B. L, Ferrand C, Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, **2004** ; 20(4), pp 458-463.
- [8]- Huang D, Prior R.L, The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**; 53, pp 1841-1856.
- [9]-Zaabat N, Thèse de doctorat, Université Mentouri- Constantine, **2011**.
- [10]-Marfak A, Thèse de doctorat, Université de limoges, **2003**.
- [11]-Rice E.C.A, Miller N.J, Bolwell P.G, Bramley P.M, Pridham J.B, The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **1995**; 22, pp 375-383.
- [12]-Burda S, Oleszek W, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**; 49, pp 2774-2779.
- [13]-Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity *Analyst*, **2002**; 127, pp 183-198.
- [14]-Bartosz G, Generation of reactive oxygen species in biological systems, *Comments on Toxicology*, **2003**; 9, pp 5-21.

- [15]-Sharma B, Viswanath G, Salunke R, Roy P, Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) , carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, **2008**; 110, pp 697-705.
- [16]-Mercader A.G, Duchowicz P.R, Frandez F. M, Castro E. A, Bennardi, D.O, Autino J.C, Romanelli G. P, QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**; 16, pp 7470-7476.
- [17]-Cushine T.T.P, Lamb A.J, Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2005**; 26, pp 343-356.
- [18]-Blois M.S, Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, **1958**; 181, pp 1199-1200.
- [19]-Brand W.W, Cuvelier M.E, Berset C, use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 1995; 28, pp 25-30.
- [20]-Molyneux P, The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **2004**; 26(2), pp 211-219.
- [21]-Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K, A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1994**; 8, pp 1780-1783.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification des métabolites secondaires de type flavonoïdes issus de deux plantes appartenant à la flore algérienne. L'attention que nous avons donnée à ces plantes est justifiée par le fait qu'elles appartiennent au genre *Genista*, genre connu par sa richesse en composés phénoliques notamment les isoflavonoïdes qui sont doués de plusieurs activités biologiques.

*Le screening chimique de deux espèces étudiées *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby a relevé la présence des flavonoïdes, tanins, stérols, alcaloïdes, triterpènes, saponines, et des leucoanthocyanes.

*L'extraction hydro alcoolique des parties aériennes de ces deux espèces suivies par les affrontements successifs au CHCl_3 , AcOEt et n-butanol, ont permis l'obtention de différents extraits qui ont été traités par les différentes méthodes de séparation et de purification telles que la chromatographie sur colonne et couche mince de gel de silice.

* Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN et ses séquences, bidimensionnelle COSY ^1H - ^1H , HSQC, HMBC ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution.

* Les fractions chloroformiques et Acétate d'éthyle de l'espèce *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) ont permis l'obtention de 14 composés, parmi lesquelles, nous avons établi la structure de 9 d'entre eux il s'agit de :

G1=5,7-dihydroxy-6-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one. Laburnetine

G2= 3-Methoxyapigenin (Isokaempferide)

G3=7-(2-hydroxyisobutyrate) génistéine. **Molécule nouvelle.**

G4=5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-isopropyl-4H-furo[2,3-h]chromen-4-one.

Molécule nouvelle.

G6= 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone (Sakuranetine)

G7= 5-O-Methylgenistein (Isoprunitin)

G8= Genistein-7-O- β -glucoside

K1= 4'-O-Methylderrone

K6= 5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavanone (Eriodictyol 7, 3'-diméthyl ether)

Ces deux molécules (K1 et K6) sont obtenues pour la première fois dans le genre *Genista*. De même l'étude phytochimique de la composante apolaire et semi-polaire menée sur *G. quadriflora* Munby a permis l'isolement de 7 produits et la détermination de 6 d'entre eux :

A4-1 = Apigénine 5-méthyl éther (Thevetiaflavone)

A4-2 = Méthyl 4-(oxiran-2-yl) phényle carbonate . **Molécule nouvelle.**

A7-1= Génistéine

A11-1= Génistéine 5- méthyl éther (Isopruneatine)

A11-2= Biochanine A

L5-1 = Apigénine 7-méthyl éther (Genkwanine)

L'ensemble de ces résultats indique que les composés phénoliques notamment les isoflavones sont une classe très répandue dans le genre *Genista* appartenant à la famille des fabacées et constituent donc de bons marqueurs chimiotaxonomiques.

En ce qui concerne la partie biologique de cette étude, le test de l'activité antioxydante (test au DPPH) sur les deux espèces s'est très moyenné.

Cependant, il faut signaler que plusieurs tests et en particulier l'étude de l'activité anti-inflammatoire et antidiabétique sont en cours de réalisation.

L'ensemble de ces résultats montrent que les produits d'origine naturelle sont en liaison étroite avec la pharmacologie et la médecine, ce qui permet de développer l'industrie phytothérapeutique. Enfin les résultats obtenus de cette étude ont fait l'objet de plusieurs publications et communications internationales.

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes algériennes de la famille des Fabacées. Les flavonoïdes sont des substances naturelles qui jouent un rôle protecteur, vu leurs activités biologiques. De ce fait, nos travaux sont orientés vers l'extraction, la séparation, la purification et la détermination de structure des composés flavonoïdiques de deux espèces du genre *Genista*: *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby. Le screening phytochimique effectué sur ces deux espèces a permis la mise en évidence de plusieurs groupes chimiques notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes. L'accomplissement de ce travail a nécessité l'utilisation de toute la batterie chromatographique en phase liquide ainsi que le recours aux méthodes modernes d'analyses physico chimique les plus performante notamment, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnelle (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC), la spectroscopie d'absorption ultraviolette et la spectroscopie de masse à haute résolution. Toutes ces méthodes nous ont permis d'établir les structures isolées de la phase acétate d'éthyle et la phase chloroforme de l'extrait hydro alcoolique des deux espèces étudiées. Enfin, les résultats des tests biologiques effectués sur les deux espèces *G. quadriflora* Munby et *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides*, notamment le test sur l'activité antioxydante (test au DPPH) ont été satisfaisants. L'originalité de ce travail est couronnée par plusieurs publications dans des revues internationales.

Mots-clés : Fabaceae, *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois), *G. quadriflora* Munby, Screening, Flavonoïdes.

Abstract

This work is a part of our research program on the Algerian plants of the family Fabaceae. Flavonoids are natural substances that play a protective role, due to their biological activities. Therefore, our work is oriented to the extraction, the separation, the purification and the structure determination of the flavonoid compounds of two species of the kind Genista : *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois) And *G. quadriflora* Munby. The phytochemical screening performed on these two species allowed to the identification of several chemical groups in particular flavonoids and isoflavonoids. The fulfillment of this work required the use all liquid-phase chromatography battery and the use of the most successful modern methods of phsiycal and chemical analysis, in particular, the mono and bidimensional spectroscopy of nuclear magnetic resonance (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC), the spectroscopy of ultraviolet absorption and the high resolution mass spectroscopy. All these methods allowed us to establish the isolated structures of the ethyl acetate phase and the chloroform phase of the hydro alcoholic extract of the two studied species. Finally, the results of biological tests performed on both species *G. quadriflora* Munby and *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides*, in particular the test on the antioxidant activity (DPPH test) were satisfactory. The originality of this work is crowned by several publications in international reviews.

Keywords : Fabaceae, *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois), *G. quadriflora* Munby, Screening, Flavonoids.

المخلص

هذا العمل هو جزء من برنامج البحوث الذي قمنا به على النباتات الجزائرية في الفصيلة البقولية. وباعتبار الفلافونيدات المنتجات الطبيعية المؤهلة للدور الوقائي و العلاجي لما تتميز به من فعالية بيولوجية ، بحثنا موجه نحو تحديد البنى الهيكلية للمركبات الفلافونيدية بالاعتماد على طرق الاستخلاص والفصل والتنقية لنوعين من جنس :

Genista: G. aspalathoides Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby

ادت الفحوص الكيميائية التي اجريت على هذين النوعين ، الى الكشف على وجود مجموعات كيميائية عديدة مثل الفلافونيدات و الإيزوفلافونات وغيرها . اما الدراسة الكروماتوغرافية لطور خلات الايثيل والطور الكلورفورمي للنوعين والتحليل البنوي للمركبات المعزولة فقد تم بالاعتماد على تجمع معطيات اطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون و اطياف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بالإضافة الى مطيافية الكتلة و اطياف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية. حيث سمحت لنا هذه الاخيرة من معرفة معظم المركبات الفلافونيدات و الإيزوفلافونات ، و تبع هذا العمل باختبار النشاط المضاد للأكسدة لطور خلات الايثيل والطور الكلورفورمي للنوعين :

G. aspalathoides Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby

حيث اظهر كل من الطورين فعالية بيولوجية متواضعة، و كل هذه نتائج درست للمرة الاولى مما سمحت لنا بالنشر في العديد من المجالات العالمية.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2013, 5 (6):56-59
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae)

R. Boukaabache¹, N. Boubekri¹, O. Boumaza^{1*}, R. Mekkiou¹, R. Seghiri¹,
D. Sarri², D. Zama¹, F. Benayache¹ and S. Benayache¹

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie.

²Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, 28000, M'Sila, Algérie.

ABSTRACT

This study concerned a chemical screening of the aerial parts of *Genista quadriflora* Munby (endemic species in Algeria and Morocco), in which the presence of several chemical groups was revealed (flavonoids, isoflavonoids, triterpens and others). The chromatographic study on silica gel of the ethyl acetate soluble part of the aqueous-MeOH extract of the aerial parts of this plant, allowed the isolation and the structural elucidation of five known compounds: thevetiaflavone (1), genkwanin (2), genistein (3), biochanin A (4) and isoprunein (5). The structures were established on the basis of physical and spectroscopic analysis, and by comparison with the literature data. Antioxidant properties were assayed in terms of antioxidant activity of chloroform and ethyl acetate soluble parts. The scavenging ability on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), is determined with spectrophotometric method.

Keywords: Isoflavonoid; Flavonoid; Antioxidant activity; *Genista quadriflora*

INTRODUCTION

Genista species contain a variety of secondary metabolites of various types, especially isoflavonoids, which have been shown to be biologically active [1-2]. The genus *Genista* (Fabaceae) is represented by 25 species and subspecies in Algeria from which 11 are endemic. These species are distributed in particular, in the eastern and southeastern parts of the country [3]. In continuation of our phytochemical and biological works on Algerian *Genista* [4-8], we report here the chemical screening of *Genista quadriflora* Munby which has not been previously investigated, the structures of isolated flavonoids and isoflavonoids from the ethyl acetate extract and the evaluation of antioxidant activity of the chloroform and the ethyl acetate extracts.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Aerial parts of *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae) were collected during the flowering phase in May 2009 in eastern Algeria and authenticated by Dr. D. Sarri on the basis of Quezel and Santa [3].

A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University of Constantine 1 under N° 05/2009/GQ.

Phytochemical analysis

The phytochemical screening of both flowers and stems of *G. Quadriflora* was performed using standard procedures based on the colorimetric method [9]. This study showed the presence of several chemical groups. The symbols like ++, + and – denote present, moderately present and not present respectively.

Extraction and isolation

Dried aerial parts of *Genista quadriflora* (1130 g) were macerated with MeOH–H₂O (80:20, v/v) for 24 hours three times. The crude extract was concentrated at room temp. and diluted with 500 ml H₂O. The remaining aqueous solution was successively extracted with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. The ethyl acetate extract (3.5g) was chromatographed on silica gel column using CHCl₃-MeOH with increasing polarities, as eluent, to give 16 fractions (F₁-F₁₆). Compounds **1** (thevetiaflavone) (106 mg) and **2** (genkwanin) (56mg) were obtained from fraction F₄ (272.2 mg) (CHCl₃-MeOH, 99.4:0.6), which was chromatographed on preparative silica gel 60 GF₂₅₄ plates (*n*-hexane/EtOAc, 30:70). Compound **3** (genistein) (87 mg) was obtained from fraction F₇ (138.2mg) (CHCl₃-MeOH, 98.5:1.5), after purification on preparative silica gel 60 GF₂₅₄ plates (*n*-hexane/EtOAc, 30:70). Compound **4** (biochanin A) (60mg) was obtained as white powder from fraction F₁₁ (CHCl₃/MeOH, 80:20) after filtration. The mother liquor of this fraction was chromatographed on preparative silica gel 60 GF₂₅₄ plates (*n*-hexane/EtOAc, 30:70), to give compound **5** (isopruneitin) (18 mg).

Antioxydant activity

Radical scavenging activity using DPPH method

The model of scavenging DPPH radical is a widely used method to evaluate the free radical scavenging activities of antioxidants. This assay uses stable 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical as a reagent. Various concentrations of the samples in methanol were added to 3ml of a 0.004% methanol solution of DPPH. After a 30 mn incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm using spectrophotometer.

Inhibition of DPPH free radical in percent (I %) was calculated in following way:

$$I \% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

Where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A_{sample} is the absorbance of the test compound.

Extract concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the graph plotting inhibition percentage against extract concentration. Tests were carried out in triplicate [10].

RESULTS AND DISCUSSION

The stems and flowers were screened for the presence or absence of different phytochemical groups (Table 1).

Table 1: Phytochemical screening of *G. Quadriflora*

Chemical Groups	Flowers	stems
Leucoanthocyanins	-	-
Saponins	+	+
Quinones	-	-
Anthocyanins	-	-
Alkaloids	+	+
Coumarins	+	+
Sterols	+	+
Triterpenes	++	++
Terpenes	+	+
Flavonoids	++	++
Tannins	-	-

Isolated and identified compounds

Compound 1. C₁₆H₁₂O₅, UV (MeOH, λ_{max}, nm): 266, 345; +NaOH: 263, 407; +AlCl₃: 270, 350; + AlCl₃/HCl: 270, 306, 350; +NaOAc: 275, 378; + NaOAc/H₃BO₃: 269, 351; ¹HNMR (250 MHz, CD₃OD, δ, ppm, J/Hz): 7.57(2H, d, J=8.2, H-2'&H6'), 6.97 (2H, d, J=8.2, H-3'&H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, J=2.1, H-8), 6.24 (1H, d, J=2.1, H-6), 3.90 (3H, s, OCH₃). Characterized as apigenin 5-methyl ether (thevetiaflavone) [11].

Compound 2. C₁₆H₁₂O₅, UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 276, 343; +NaOH: 324, 405; +AlCl₃: 277,396; + AlCl₃/HCl: 279,396; +NaOAc: 276, 319; + NaOAc/H₃BO₃: 276, 345; ¹HNMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.63(2H, d, J=8.1, H-2'&H6'), 7.03 (2H, d, J=8.1, H-3'& H-5'), 6.72 (1H, s,H-3), 6.56 (1H, d, J=2.1, H-8), 6.27 (1H, d, J=2.1, H-6), 4.01 (3H, s, OCH₃). Characterized as apigenin7-methyl ether (genkwanin)[12].

Compound 3. C₁₅H₁₀O₅, UV (MeOH, λ_{\max} , nm):261, 323(sh); +NaOH: 278, 321 (sh); +AlCl₃: 270, 306(sh); + AlCl₃/HCl: 270,306(sh); +NaOAc: 269, 328 (sh); + NaOAc/H₃BO₃: 266, 323 (sh); ¹HNMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.90 (1H, s, H-2), 7.35 (2H, d, J=8.7, H-2'& H-6'), 6.85 (2H, d, J=8.7, H-3'& H-5'), 6.10 (1H, d, J=2.1, H-8), 6.07 (1H, d, J=2.1, H-6). Identified as 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (genistein)[13].

Compound 4. C₁₆H₁₂O₅, UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 257, 318(sh); +NaOH: 258, 318 (sh); +AlCl₃: 255, 318(sh); + AlCl₃/HCl: 255,319(sh); +NaOAc: 258, 318 (sh); + NaOAc/H₃BO₃: 257, 318 (sh); ¹HNMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.95 (1H, s, H-2), 7.34 (2H, d, J=8.7, H-2'&H-6'), 6.85 (2H, d, J=8.7, H-3'& H-5'), 6.40 (2H, brs, H-8, H-6), 3.90 (3H, s, OCH₃). Identified as genistein 4'-methyl ether (biochanin A)[14].

Compound 5. C₁₆H₁₂O₅, UV (MeOH, λ_{\max} , nm): 257, 318(sh); +NaOH: 266, 318 (sh); +AlCl₃: 254, 318(sh); + AlCl₃/HCl: 263,319(sh); +NaOAc: 263, 318 (sh); + NaOAc/H₃BO₃: 257, 318 (sh); ¹HNMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.95 (1H, s, H-2), 7.34 (2H, d, J=8.7, H-2'& H-6'), 6.85 (2H, d, J=8.7, H-3'& H-5'), 6.40 (2H, brs, H-8, H-6), 3.90 (3H, s, OCH₃). Identified as genistein5- methyl ether (isopruneitin)[15].

The structures of these compounds were elucidated by the use of combined spectral methods (UV-Vis, ¹H NMR) as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature[16, 17].

Antioxydant activity

The DPPH radical accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule with a different color. Thus, the degree of its discoloration from purple to yellow is attributed to the hydrogen donating ability of the added compound. The DPPH scavenging activities of antioxidants are attributed to their hydrogen donating abilities which is indicative of its radical scavenging potential [18].

In the present study, the DPPH radical scavenging ability of different extracts of *G. quadriflora* was evaluated in a dose-dependent manner. Different extracts of *G. quadriflora* proved to be an effective scavenger of DPPH radicals compared to ascorbic acid used as reference. The scavenging effect of the samples on the DPPH radical decreased in the order of ascorbic acid > chloroform extract > ethyl acetate extract, and was concentration-dependent. From table 2, the IC₅₀ values of chloroform and ethyl acetate extracts of this plant showed moderate antioxidant activity in comparison with ascorbic acid used as standard.

Table 2. Antioxidant activity of chloroform and ethyl acetate extracts

IC ₅₀ DPPH (µg/ml)	
Chloroform extract	58.97
Ethylacetate extract	61.64
Ascorbic acid	5.18

CONCLUSION

The present study depicts the presence of different phytoconstituents such as alkaloids, flavonoids, saponins, coumarins, sterols and terpenoids in both the flowers and stems of *G. quadriflora*. Five flavonoids namely, thevetiaflavone (1); genkwanin (2); genistein (3); biochanin A (4); isopruneitin (5) have been isolated from the ethyl acetate extract. The Chloroform and ethyl acetate extracts of this plant were examined for their *in vitro* antioxidant properties using DPPH test. The results showed that both extracts had moderate antioxidant activity *in vitro*. All These results were reported for the first time from *Genista Quadriflora* Munby.

Acknowledgments

We are grateful to MESRS (DGRSDT) Algeria for financial supports.

REFERENCES

- [1] RA Dixon, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2004**, 55, 225-261.
- [2] HM Gordon, *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, 13 (4), 265-273.
- [3] P Quezel and S Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Editions du C.N.R.S, Paris, **1962**, Tome I ; pp.470-475.

- [4] R Mekkiou, H Touahar, MG Dijoux-Franca, AM Mariotte, S Benayache, F Benayache, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2005**, 33 (6), 635-638.
- [5] O Boumaza, R Mekkiou, R Seghiri, D Sarri, S Benayache, VP Garcia, J Bermejo, F Benayache, *Chem. Nat. Comp.*, **2006**, 42(6), 730-731.
- [6] O Boumaza, R Mekkiou, R Seghiri, D Sarri, S Benayache, V P Garcia, J Bermejo, F Benayache, *Chem. Nat. Comp.*, **2011**, 47(2), 277-278
- [7] R Mekkiou, R Seghiri, O Boumaza, D Sarri, K Chebbah, S Benayache, J Bermejo, F Benayache, *Chem. Nat. Comp.*, **2012**, 48(4), 710-711.
- [8] M Kerkatou, A Menad, D Sarri, F León, I Brouard, R Bouldjedj, P Chalard, S Ameddah, S Benayache, F Benayache, *Der Pharmacia Lettre*, **2013**, 5(5), 285-289.
- [9] K N'guessan, BKadja, GZirih, D Traoré, LAké-Assi, *Science Naturel*, **2009**, 6(1), pp. 1-15.
- [10] C Sarikurku, B Tepe, DK Semiz, MHS Bekas, *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48, pp. 1230-1233.
- [11] HW Voigtlander, G Balsam, *Arch. Pharm.*, **1970**, 303, pp. 792-797.
- [12] T Komiya, Y Naruse, H Oshio, *Yakugakuzasshi*, **1976**, 96(7), pp. 855-862
- [13] L Pistelli, ABertoli, I Giachi, A Manunta, *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61 (11), pp. 1404-1406.
- [14] PK Agrawal and MC Bansal. *Isoflavonoids in carbon-13 NMR of Flavonoids*, PK. Agrawal, ed., Elsevier, Amsterdam, **1989**, PP. 183.
- [15] RR Paris. C. R. Acad. Sci., Paris, **1965**.
- [16] KR Markham, *Techniques of flavonoid identification*, Academic press, London, **1982**
- [17] TJ Mabry, KR Markham, MB Thomas. *The systematic identification of flavonoids*, Springer, New York, **1970**.
- [18] HC Ting, YW Hsu, CFTsai, FJLu, MCChou, WK Chen, *Food Chem.*, **2011**, 125, pp. 652-659.

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

Preliminary Phytochemical Analysis and Chemical Constituents from *Genista aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. (Fabaceae).

Rabiaa Boukaabache, Ouahiba Boumaza*, Ratiba Mekkiou, Ramdane Seghiri,
Fadila Benayache and Samir Benayache.

Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Algérie.

ABSTRACT

The preliminary phytochemical screening of the aerial parts of *Genista aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. showed the presence of alkaloids, sterols, triterpenoids, terpenoids, saponins and flavonoids. The presence of these secondary metabolites signified the potential of this plant as a source of therapeutic agent. Therefore, it was of interest to investigate the chemical constituents of this species. The chromatographic study on silica gel of chloroform extract allowed us to isolate and identify 2 secondary metabolites: derrone 4'-methyl ether **1** and 5, 4'-dihydroxy-7, 3'-dimethoxyflavanone (eriodictyol 7, 3'-dimethyl ether) **2**. The structures were established by the combination of their spectroscopic data, notably the analysis of UV, ¹H, ¹³C and 2D-NMR. All these results were described for the first time from this species. Compounds **1** and **2** are new for the genus *Genista*.

Keywords: Phytochemical screening; Isoflavonoid; Flavanone; *Genista aspalathoides*.

*Corresponding author

INTRODUCTION

The genus *Genista* (Fabaceae) consisting in about 100 species predominately distributed in the Mediterranean area [1], this genus is present in Algeria with 25 species and sub-species [2]. Many species of this genus showed important biological activities [3] and a remarkable wealth of bioactive secondary metabolites in particular isoflavonoids and flavonoids [4-6]. In continuation of our phytochemical study on Algerian genus *Genista* [7-11], we report here the chemical screening of the aerial parts of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. and the structures of isolated compounds from the chloroform extract. Knowing that this subspecies has not been previously investigated.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. were collected during the flowering phase in May 2009 near M'Sila in the eastern Algeria and authenticated by Dr. D. Sarri on the basis of Quezel and Santa [2]. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL unit research, University of Constantine1 under n° 05/2009/GA.

Phytochemical analysis

The phytochemical screening of aerial parts of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. was performed using standard procedures based on the colorimetric method [12]. This study showed the presence of several chemical groups. The symbols like + and – denote present, and not present respectively in Table 1.

Extraction and isolation

Air-dried aerial parts 2700 g of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. were macerated at room temperature with (EtOH/H₂O; 80:20; v/v) for 72 h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in H₂O (800 ml) under magnetic stirring. The resulting solution was filtered and successively extracted with CHCl₃, EtOAc and *n*-butanol. The organic layers were dried with Na₂SO₄, giving after removal of solvents under reduced pressure the following extracts: chloroform (4.0 g), EtOAc (14.0 g) and *n*-butanol (80.0 g). The chloroform extract was fractionated by column chromatography (silica gel; Petroleum ether/ethyl acetate step gradients) to yield 6 fractions (K1-K6) obtained by combining the eluates on the basis of TLC analysis. Compound **1** (71 mg) was obtained from fraction K1 (118 mg) and purified by crystallization in chloroform and a little amount of MeOH. Compound **2** (21 mg) was obtained from fraction K6 (120 mg) after purification on preparative plates of silica gel 60 GF₂₅₄ eluted with CHCl₃/MeOH (90:10).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1: Phytochemical screening of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M.

Chemical Groups	Aerial parts
Alkaloids	+
Coumarins	-
Sterols	+
Triterpenes	+
Terpenes	+
Flavonoids	+
Leucoanthocyanins	-
Tannins	-
Saponins	+
Quinones	-
Anthocyanins	-

The results of the screened aerial parts from *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. are shown in the Table 1.

Isolated and identified compounds

Compound 1. $C_{21}H_{18}O_5$, UV (MeOH, λ_{max} , nm): 283; +NaOH: 292; + $AlCl_3$: 283; + $AlCl_3/HCl$: 283; +NaOAc: 283; +NaOAc/ H_3BO_3 : 283; 1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6 , δ (ppm), J (Hz): 8.78 (1H, s, H-2), 8.06 (2H, d, J = 8.0, H-2' & H-6'), 7.51 (2H, d, J = 8.0, H-3' & H-5'), 7.28 (1H, d, J = 10.0, H-3''), 6.97 (1H, s, H-6), 6.37 (1H, d, J = 10.0, H-4''), 3.53 (3H, s, OCH_3), 1.48 (6H, s, $2CH_3$). ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6): δ (ppm) = 181.86 (C-4), 158.51 (C-7), 158.17 (C-5), 160.29 (C-4'), 157.79 (C-9), 154.67 (C-2), 131.20 (C-2' & C-6'), 122.90 (C-3), 124.10 (C-1'), 115.03 (C-3' & C-5'), 106.76 (C-10), 104.00 (C-8), 95.42 (C-6), 27.49 (C-5''), 129.42 (C-3''), 78.86 (C-2''), 115.10 (C-4''). This compound was identified as **derrone 4'-O-methyl ether** [13].

Compound 2. $C_{17}H_{16}O_6$, 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , (ppm), J (Hz): 7.06 (1H, d, J =1.5, H-2'), 6.88 (1H, dd, J =6.5; 1.5, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 6.5, H-5'), 6.06 (1H, d, J = 1.7, H-8), 5.97 (1H, d, J = 1.7, H-6), 5.32 (1H, dd, J = 10.2; 2.2, H-2 β), 3.3 (1H, dd, J =13.1; 10.2, H-3 β), 3.0 (1H, dd, J =13.1; 2.2, H-3 β partially obscured by the signal of the water of the solvent, deduced from COSY spectrum), 3.78 (3H, s, OCH_3), 3.74 (3H, s, OCH_3). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)= 78.29 (C-2), 44.83 (C-3), 93.20 (C-8), 119.39 (C-6'), 129.85 (C-1'), 146.74 (C-3'), 111.02 (C-2'), 115.14 (C-5'), 147.48 (C-4'), 95.58 (C-6), 104.42 (C-10), 162.16 (C-5), 164.19 (C-7), 187.77 (C-4), 55.66 (OCH_3 -3'), 55.57 (OCH_3 -7).

This compound was identified as **5, 4'-dihydroxy-7, 3'-dimethoxyflavanone (eriodictyol 7, 3'-dimethyl ether)** [14].

The structures of the compounds were established by chemical and spectral analysis, mainly UV, 1H , ^{13}C and 2D-NMR as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature (Figure 1).

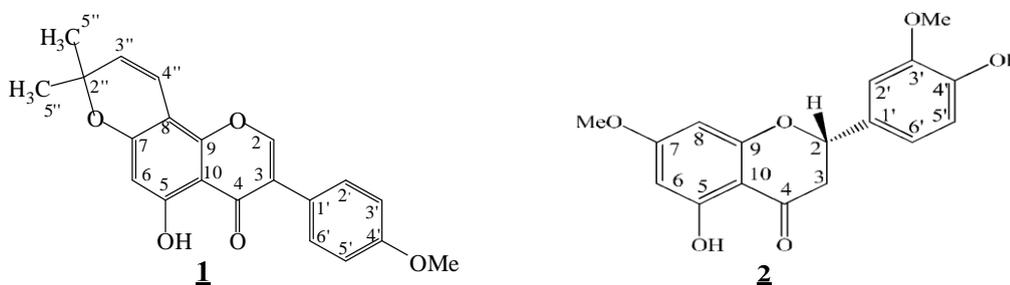


Figure1: Structures of compounds **1** and **2**

CONCLUSION

The present study depicts the presence of different phytoconstituents such as alkaloids, sterols, triterpenoids, terpenoids, saponins and flavonoids in the aerial parts of *G. aspalathoides* (Lamk) ssp. *erinaceoides* (Lois.) M. Two flavonoids namely derrone 4'-O-methyl ether **1** and 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavanone (eriodictyol 7,3'-dimethyl ether) **2**, have been isolated from the chloroform extract of this species for the first time and to the best of our knowledge, they are also described for the first time from the genus *Genista*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Algerian CNEPRU (E00920110045) program.

REFERENCES

- [1] Noccioli C, Meini L, Loi M Cecilia, Potenza D, Pistelli L. *Phytochem Lett* 2011; 4: 342–344.
- [2] Quezel P and Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Editions du CNRS. 1962; Tome I: 470-475.
- [3] Rauter A P, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro L M, Araujo M E, Borges C, Justino J, Silva F V, Goulart M, Thomas-Oates J, Rodrigues J A, Edwards E, Noronha J P, Pinto R, Mota-Filipe H. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 384–393.
- [4] Luczkiewicz M, Glod D. *Plant Sci* 2003; 165: 1101–1108.
- [5] Rainova L, Nakov N, Bogdanova S, Minkov E, Staneva-Stoicheva D. *Phytother Res* 1988; 2: 137–139.
- [6] Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Morelli I, Rubiolo P, Bicchi C. *Biochem Syst Ecol* 2001; 29: 137–141.
- [7] Mekkiou R, Touahar H, Dijoux-Franca M G, Mariotte A M, Benayache S, Benayache F. *Biochem Syst Ecol* 2005; 33(6): 635.
- [8] Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Benayache S, GarciaV P, Bermejo J and Benayache F. *Chem Nat Comp* 2006; 42(6): 730.
- [9] Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Benayache S, GarciaV P, Bermejo J and Benayache F. *Chem Nat Comp* 2011; 47(2): 277.
- [10] Mekkiou R, Seghiri R, Boumaza O, Sarri D, Chebbah K, Benayache S, Bermejo J and Benayache F. *Chem Nat Comp* 2012; 48(4): 710.
- [11] Boukaabache R, Boubekri N, Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Zama D, Benayache F and Benayache S. *Der Pharmacia Lettre* 2013; 5(6):56-59.
- [12] N'guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, LAKé-Assi L. *Sci Nat* 2009; 6(1): 1-15.
- [13] Mizuo M, Toshiyuki T, Koh-Ichi T, Nobuyasu M, Munekazu I, Chamlong P. *Phytochem* 1990; 29(8): 2663-2665.
- [14] Schmidt T J, Willuhn G. *Biochem Syst Ecol* 2000; 28: 133-142.

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *GENISTA QUADRIFLORA* MUNBY EXTRACT AGAINST ETHANOL INDUCED TOXICITY

BOUBEKRI^{1,2*} N., BOUKAABACHE¹ R., AMRANI^{1,2} A., BELFARHI² L., ZAMA¹ D., BOUMAZA¹ O., BENAYACHE¹ F., BENAYACHE¹ S.

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, Route de Ain., ²Laboratoire de physiologie animale; département de Biologie; Animale Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1 Algérie. Email: boubekrinassima@yahoo.fr

Received: 21 January 2014, Revised and Accepted: 7 February 2014

ABSTRACT

Objective: Excessive ethanol intake induces severe tissue damage particularly in the liver through the generation of reactive oxygen species. This study was designed to examine the effect of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* for its protective potentials against ethanol induced toxicity. **Methods:** The effect of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* at a dose of 200 mg/kg was studied on ethanol induced hepatic damage (40% v/v, 3 g/kg per oral every 12 hours for 3 doses) in *Wistar Albino* rats. Serum transaminases, cholesterol, triglycerides, lipid peroxidation (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and catalase were estimated to assess liver damage. A histological study was determined. **Results:** It was found that combined *Genista quadriflora* (200mg/kg) extract and ethanol treatment decreased significantly TBARS level and increased reduced glutathione, glutathione peroxidase, and catalase activities compared to the ethanol group ($p < 0.01$). Treatment with ethanol altered liver architecture, whereas the extract pretreatment could be a protective factor for this organ. **Conclusions:** Results of *in vivo* experiments showed that the *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* inhibited lipid peroxidation, protected the experimental animals from hepatic toxicity and maintained the levels of antioxidant enzymes.

Keywords: *Genista quadriflora*, ethanol, Antioxidant activities, lipid peroxidation, hepatoprotective effect.

INTRODUCTION

The liver as a vital organ in the body is primarily responsible for the metabolism of endogenous and exogenous agents. It plays an important role in drug elimination and detoxification [1,2]. Alcoholic liver disease is one of the major causes of morbidity and mortality among alcoholics in the world [3]. Excessive consumption of ethanol is shown to lead to serious health problems. Ethanol molecule is small and soluble in both water and lipids; it permeates all tissues of the body and affects most vital functions of virtually all organs including liver, kidney, brain, heart and pancreas [4]. Several studies have shown that free radical mediated mechanisms are involved in ethanol-induced liver damage. Excessive reactive oxygen species ROS generation has been shown to induce lipid peroxidation, protein oxidation and fault elements of the antioxidant system leading to the eventual loss of the structure and function of cells [5]. Therefore inhibition of free radicals generation is important in providing protection against hepatic damage [4].

Scientific research in herbal medicine with hepatoprotective activity may be a great benefit as an alternative therapy in alcohol induced liver disease [6]. For a long period of time, plants have been a valuable source of natural product for maintaining human health and nowadays, many therapeutic studies are devoted to plants since plants are a natural source of antioxidants and hence reduce oxidative stress [4,7]. Therefore, the present study aims to investigate the hepatoprotective potentials of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* against alcohol induced toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Genista quadriflora Munby (Fabaceae), an endemic species of North Africa (Algeria and Morocco) [8] was collected during the flowering phase in May 2008 from the area of El Kala, in the East of Algeria and authenticated by Dr. D. Sarri (Biology department, University of M'Sila - Algeria). A voucher specimen has been

deposited in the Herbarium of the Department of Nature and Life Science, Constantine 1 University.

Extraction

Air-dried aerial parts (1130 g) of *Genista quadriflora* were macerated at room temperature with MeOH-H₂O (80:20, v/v) for 24h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in H₂O (500 ml) under magnetic agitation. The resulting solution was filtered and successively extracted with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-butanol. The organic phases were dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo at room temperature to obtain the following extracts: petroleum ether (0.25g), chloroform (3g), EtOAc (4g) and *n*-butanol (50g).

Experimental animals

Female *Wistar Albino* rats weighing (200-250g) were used in the present study. The animals were kept in 12h light/dark cycles and maintained in an air-conditioned room at 22 to 25 °C, with free access to food and water *ad libitum* for two weeks. The general guidelines for the use and care of living animals in scientific investigations were designed according to the ethical standards for animals use and approved by the local ethical committee of animal use and followed [9]. The animals were divided into 4 groups, consisting of 6 animals each. All treatments were administered orally to rats (by gavage).

Group T: Control group (the untreated rats).

Group EtOH: Received 3 g/kg ethanol every 12 hours for 3 doses (ethanol diluted with normal saline 40% v/v) [4].

Group Ext.200: Received extract at the dose 200mg/kg.

Group ETOH-Ext.200: Received 200mg/kg extract and ethanol at the same dose mentioned earlier (the extract was administered half an hour before ethanol treatment).

After treatment, the rats were sacrificed by cervical dislocation and livers were isolated to measure the levels of antioxidant enzymes, MDA and for histopathological studies. The blood is collected through the retro-orbital sinus at the eye of rats for analysis of biochemical parameters. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol and triglycerides were estimated using commercial kits (Spinreact, SPAIN).

Estimation of lipid peroxidation

Lipid peroxidation in the liver is evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) according to the method of Uchiyama and Mihara, 1978 [10]. MDA is one of the end products of the decomposition of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as a result of lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) at 100°C temperature and in acidic environment (pH 2-3). A molecule of MDA is condensed with two molecules of thiobarbituric (TBA) to form a colored complex in pink (reading at 532 nm).

Estimation of glutathione (GSH) level

The determination of GSH is based on the colorimetric method of Ellman, 1959 [11]. The glutathione assay is based on the oxidation reaction of GSH with acid 5,5'-dithiobis-2 nitro benzoic acid (DTNB) freeing the thionitrobenzoic acid (TNB) which absorbs at 412 nm.

Evaluation of Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured by the method described by Flohe and Gunzler, 1984 [12]. Briefly, reaction mixture containing 0.4ml GSH (0.1 mM), 0.2ml TBS solution (Tris 50mM, NaCl 150mM PH 7.4) and 0.2 ml of tissue homogenate. After 5 min incubation at 25 °C, 0.2 ml of H₂O₂ (1.3mM) was added in the mixture. The content was incubated at 37°C for 10 min. the reaction was stopped by 1 ml of 1% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged. Absorbance was recorded at 412 nm, and GPx activity was expressed as units/mg protein.

Measurement of catalase activity

Liver catalase activity was determined by the method of Claiborne, 1985 [13]. The homogenate was centrifuged at 2000 rpm for 15 min at 4° C. The supernatant was centrifuged at 9600 rpm for 30 min at 4° C (centrifuge SIGMA) and the final supernatant is the source used for the evaluation of the enzyme activity (catalase).

Histological studies

Immediately after sacrifice of rats, liver samples were removed and fixed in 10% formalin. The tissues were kept in the fixative for 12 h, dehydrated with serial ethanol cycles (70% to absolute), and then embedded in paraffin. The paraffin-embedded tissue was cut into 5 µm sections.

Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under light microscopy [14].

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD. Differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical interferences were based on student's test for mean values comparing control and treated animals. Differences were considered significant at P < 0.05.

RESULTS

Effect of *Genista quadriflora* on serum biochemical parameters

Ethanol caused significant increases in serum AST, ALT, total cholesterol and triglycerides levels (p<0.01; p<0.05) Compared to the control group indicated cell liver damage. While 200mg/kg of *n*-butanol extract administration caused a significant reductions (P< 0.05) in these parameters compared to EtOH group (Fig.1 and

2). So, the *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* (200mg/kg) protects the liver against toxicity caused by ethanol.

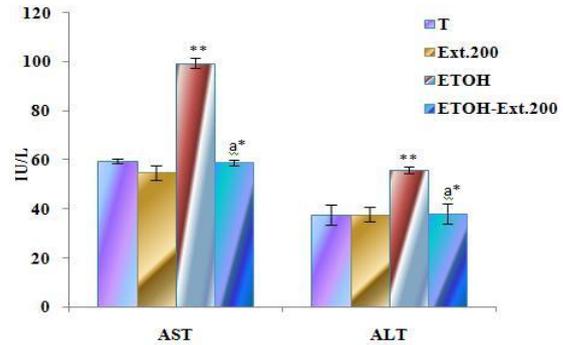


Fig.1: Effects of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in serum AST and ALT.

*P<0.05; **P<0.01, compared to control group. a: compared to EtOH group; T: the untreated rats; EtOH: ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; ETOH-Ext.200: ethanol+ extract (200mg/kg)

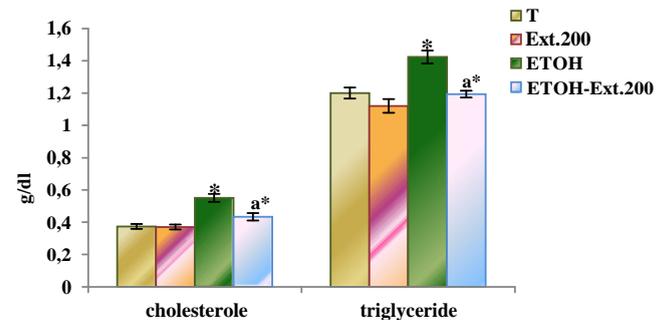


Fig.2: Effects of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in serum cholesterol and triglyceride.

*P<0.05; **P<0.01, compared to control group. a: compared to EtOH ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; ETOH-Ext.200: ethanol+ extract (200mg/kg).

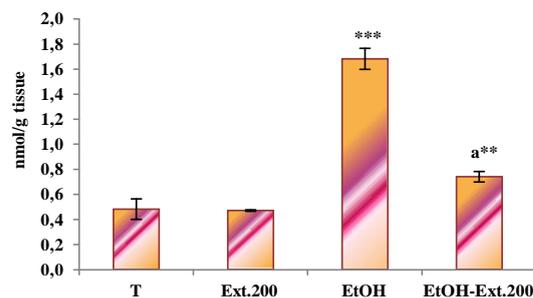


Fig.3: Effects of *n*-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in MDA level.

P<0.01; *P<0.001, compared to control group. a: compared to EtOH ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; ETOH-Ext.200: ethanol+ extract (200mg/kg).

In vivo antioxidant effect and MDA level of *Genista quadriflora*

Oxidative stress induced by ethanol caused significant ($P < 0.001$) alterations in hepatic antioxidant defense system as GSH, GPx, CAT, and LPO levels compared to controls (Fig. 3,4,5,6). A significant change was observed in MDA level in rats treated with EtOH+extract (200mg/kg) ($p < 0.01$). Extract treatment increased the level of reduced glutathione (GSH) and normalized the value of MDA compared to the EtOH group. The activity of the antioxidant system is maintained at normal levels in rats pretreated with the extract.

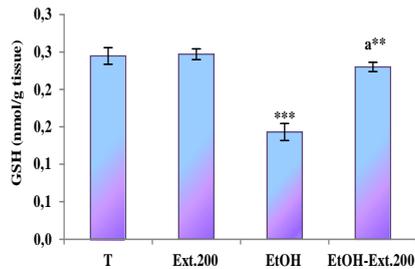


Fig.4: Effects of n-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in GSH level.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared to control group. a: compared to EtOH group; T: the untreated rats; EtOH: ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; EtOH- Ext.200: ethanol+ extract (200mg/kg)

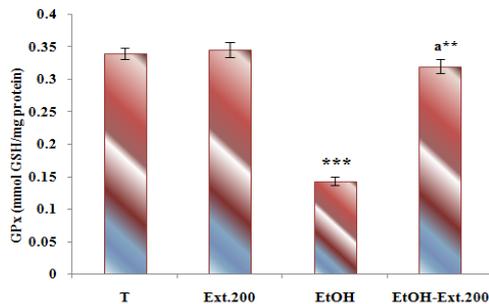


Fig.5: Effects of n-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in GPx level.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared to control group. a: compared to EtOH group; T: the untreated rats; EtOH: ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; EtOH-Ext.200: ethanol+extract (200mg/kg)

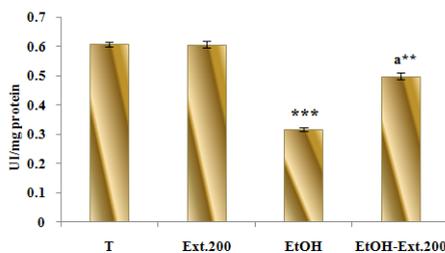


Fig.6: Effects of n-butanol extract of *Genista quadriflora* and ethanol in Catalase level.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared to control group. a: compared to EtOH group; T: the untreated rats; EtOH: ethanol group; Ext.200: extract at the dose 200mg/kg; EtOH-

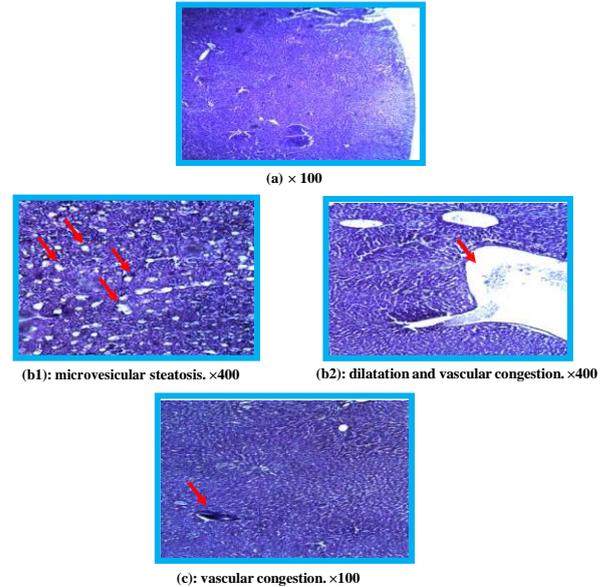


Fig. 7: Histological sections of livers from untreated and treated groups. (a): histology of normal control rat liver; (b1 and b2): histopathological seen in rats treated with ethanol; (c): liver of rats pretreated with n-butanol extract of *Genista quadriflora* (200mg/kg).

Histology study

As shown in Figure 7 (a) the histological, features of the normal liver indicated a normal liver lobular architecture and cell structure. In liver sections of ethanol-treated group; showed dilatation and vascular congestion and microvesicular steatosis (Figure 7 b1 and b2). n-butanol extract of *Genista quadriflora*, showed protective effect on the hepatocellular steatosis, just occurrence of congestion of some vascular. (Figure 7 c)

DISCUSSION

In the liver, the ethanol is oxidized to cytotoxic acetaldehyde by alcohol dehydrogenase and then to acetate by aldehyde dehydrogenase or xanthine oxidase [15]. This metabolism is accompanied by generation of free radical like ethyl and hydroxyl ethyl radicals. Ethanol inducible cytochrome CYP2E1 has high rate of NADPH oxidase activity that leads to the production of both superoxide anion and hydrogen peroxide at very high rate [16, 17].

In the present study the results were shown that the administration of ethanol caused severe acute liver damage in rats, as evidenced by the significant increase ($p < 0.001$) in the MDA levels compared to the control group [18]. These results are in agreement with [4, 19]. Inhibition of LPO has been observed in *Genista quadriflora* extract treated groups due to their antioxidant and free radical scavenging activities through re-establishment of bio-membranes of hepatic parenchyma cells. The depletion of GSH induced generation of reactive oxygen species and oxidative stress with cascade of effects thereby affecting functional as well as structural integrity of cell and organelle membranes [20]. The elevated level of GSH with *Genista quadriflora* extract protected cellular proteins against oxidation through glutathione redox cycle and also directly detoxified reactive oxygen species and/or neutralized reactive intermediate species generated from exposure to ethanol.

Reactive oxygen species and free radicals are involved in oxidative stress-induced liver injury by ethanol. The restoration of the levels of decreased antioxidant profiles GPx and CAT by *Genista quadriflora* extract may be attributed to the biological significance in eliminating reactive free radicals that may affect the normal function of cells [21]. *Genista quadriflora* extract

significantly decreased ($P < 0.05$) the activities of serum ALT and AST, which are biochemical markers of liver damage. This suggested a hepatoprotective activity of the extract against the acute toxicity of ethanol, these results concord with the results of Chaturvedi *et al.*, 2011 [3]. ALT enzymes (alanine transaminase) are abundant in cytosol of hepatic parenchymal cells, while, aspartate transaminase (AST) is found in cytosol and mitochondria of hepatocytes [22]. It is also distributed in cardiac muscle, skeletal muscle, pancreas and kidney. Hence, ALT measurement liver is more specific to determine liver damage [23]. Increased ALT enzymes in ethanol-induced liver toxicity were due to the loss of structural integrity of liver. Since this enzyme is localized in the cytoplasm, it will be released into the blood circulation after cellular damage resulting in the elevation [24]. Increase of AST enzymes indicated that alcohol ingestion to rats causes both plasma membrane and organelle membrane (mitochondria) damage [6]. The benefits of n-butanol extract of *Genista quadriflora* has been further confirmed by histopathological observations. It was well established that overdoses of ethanol lead to microvesicular steatosis with ballooning of hepatic cells (fatty liver). The three main mechanisms which may play a role in the development of alcoholic fatty liver which increased substrate supply for fatty acid esterification, direct stimulation of the esterification pathway and decreased export from the liver of triglyceride as Very-Low-Density Lipoproteins (VLDL) [25]. These effects have been significantly reduced with the pretreatment of n-butanol extract of *Genista quadriflora*.

CONCLUSION

In the present study, hepatoprotective effect of *Genista quadriflora* Munby extract against ethanol induced toxicity has been investigated. The protective effect of *Genista quadriflora* could be attributed to antioxidant, particularly phenols. n-butanol extract of *Genista quadriflora* scavenged free radicals and thus boosts the antioxidant capacity of organism.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to ATRSS and MESRS (DGRSDT) for financial support.

REFERENCES

- Mroueh M, Saab Y, Rizkallah R. Hepatoprotective activity of Centaureum erythraea on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 2004; 18: 431-433.
- Yesmin F., Rahman Z., Dewan J. F., Mazid Helali A., A Rahman N. I., Ahmed G. Alattraqchi, Ahmed A., Yousuf R., Salam A., Haque M. Hepato-protective role of the aqueous and n-hexane extracts of *Nigella sativa* linn. in experimental liver damage in rats. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6, Suppl 3: 205-209.
- Chaturvedi P, Pipedi-Tshekiso M, Moseki B and Kwape T E. Hepatoprotective potentials of water extract of *Bauhinia purpurea* bark against alcohol induced toxicity. *Sci Res Essays.* 2011; 6: 4347-4353.
- Esra Betül K, Betül E, Seval D, Gül Özdemirler E, Müjdat U, Necla k, Ak-toker. Effect of binge ethanol treatment on prooxidant-antioxidant balance in rat heart tissue. *Pathophysiology.* 2012; 19: 49-53.
- Tirapelli LF, Batalhão ME, Jacob-Ferreira AL, Tirapelli DP, Carnio EC, Tanus-Santosa JE, Queiroz RH, Uyemura SA, Padovan CM, Tirapelli CR. Chronic ethanol consumption induces histopathological changes and increases nitric oxide generation in the rat liver. *Tissue and Cell.* 2011; 43: 384- 391.
- Sutha D, Sabariah I, Surash R, Santhini M and Yam Mun F. Evaluation of the hepatoprotective activity of standardized ethanolic extract of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *J. Med. Plant. Res.* 2010; 4: 2512-2517.
- Thenmozhi M., Dhanalakshmi M., Manjula Devi K., Sushila K., Thenmozhi S. Evaluation of hepatoprotective activity of leucas aspera hydroalcoholic leaf extract during exposure to lead acetate in male albino wistar rats. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6, Suppl 1: 78-81.
- Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, ed. CNRS, Paris, 1962 p. 470.
- Concil of European Communities. Offic. J. Eur. Communities, 1986, (JO 86/609/CEE), L356:1-18.
- Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 1978; 86: 271-278.
- Ellman G. L. Plasma antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70- 77.
- Flohe L, Gunzler W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-121.
- Clairborne A. Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL, 1985; 283-284.
- Habbu PV, Shastry, RA, Mahadevan KM, Joshi H, Das SK. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Argyrea speciosa* in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2008; 5, 158-164.
- Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Pharmacol.* 1997; 38: 601-628.
- Leiber CS. Metabolic consequences of ethanol. *Endocrinologist.* 1994; 4: 127-139.
- Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol related disease. *J. Biomed. Sci.* 2001; 8: 59-70.
- Shokunbi OS, Odetola AA. Gastroprotective and antioxidant activities of *Phyllanthus amarus* extracts on absolute ethanol induced ulcer in albino rats. *J. Med. Plant. Res.* 2008; 2: 261-267.
- Wilson JI, Emonido OF, Akpulu SP, Igbigbi PS. Effect of ethanol and sialidase activities on the developing kidney of Wistar rats. *JCAB.* 2011; 5: 200-205.
- De Leve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatology.* 1996; 23: 589-599.
- Singh RP, Padmanathi B, Rao AR. Modulatory influence of *Adhatoda vesica* leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in Mice. *Mol Cell Biochem.* 2000; 213: 99-109
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 1499-1506.
- Shyamal S, Latha PG, Shine VJ, Suja SR, Rajasekharan S, Devi TG. Hepatoprotective effects of *Pittosporum neelgherrense* Wight & Arn, a popular Indian ethnomedicine. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 107:151-155.
- Sallie R, Tredger JM, William R. Drugs and the liver. *Biopharm Drug Dispos.* 1991; 12: 251-259.
- Salaspuro MP, Shaw S, Jayatileke E, Ross, WA, Lieber CS. Attenuation of the ethanol-induced hepatic redox change after chronic alcohol consumption in baboons: Metabolic consequences in vivo and in vitro. *Hepatology.* 1981; 1: 33-38.

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes algériennes de la famille des Fabacées. Les flavonoïdes sont des substances naturelles qui jouent un rôle protecteur, vu leurs activités biologiques. De ce fait, nos travaux sont orientés vers l'extraction, la séparation, la purification et la détermination de structure des composés flavonoïdiques de deux espèces du genre *Genista*: *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois.) et *G. quadriflora* Munby. Le screening phytochimique effectué sur ces deux espèces a permis la mise en évidence de plusieurs groupes chimiques notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes. L'accomplissement de ce travail a nécessité l'utilisation de toute la batterie chromatographique en phase liquide ainsi que le recours aux méthodes modernes d'analyses physico chimique les plus performante notamment, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnelle (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC), la spectroscopie d'absorption ultraviolette et la spectroscopie de masse à haute résolution. Toutes ces méthodes nous ont permis d'établir les structures isolées de la phase acétate d'éthyle et la phase chloroforme de l'extrait hydro alcoolique des deux espèces étudiées. Enfin, les résultats des tests biologiques effectués sur les deux espèces *G. quadriflora* Munby et *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides*, notamment le test sur l'activité antioxydante (test au DPPH) ont été satisfaisants. L'originalité de ce travail est couronnée par plusieurs publications dans des revues internationales.

Mots-clés : Fabaceae, *G. aspalathoides* Lamk. ssp. *erinaceoides* (Lois),
G. quadriflora Munby, Screening, Flavonoïdes.