

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

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

N° d'ordre :  
Série :

**THESE**

**Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences  
Spécialité: Pharmaco-chimie                      Option: Chimie pharmaceutique  
Par**

*Naima BOUAGHANE*

**Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales  
Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum  
macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae)**

**Soutenue publiquement le 29/04/2013 devant le jury :**

**JURY**

|   |                              |
|---|------------------------------|
| <b>Pr. Ahmed KABOUCHE, U. de Constantine 1</b>              | <b>Président</b>             |
| <b>Pr. Zahia KABOUCHE, U. de Constantine 1</b>              | <b>Directeur de thèse</b>    |
| <b>Pr. Laurence VOUTQUENNE, U. Champagne-Ardenne -Reims</b> | <b>Co-Directeur de thèse</b> |
| <b>Pr. Salah AKKAL, U. de Constantine 1</b>                 | <b>Examineur</b>             |
| <b>Pr. Nouredine AOUF, U. Badji-Mokhtar -Annaba</b>         | <b>Examineur</b>             |
| <b>Pr. Amar ZELLAGUI, U. Larbi Benmhidi- Oum El-Bouaghi</b> | <b>Examineur</b>             |

## *Remerciements*

*Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Constantine 1, sous la direction du Professeur Zahia KABOUCHÉ, et le Laboratoire de Pharmacognosie, groupe Isolement et Structure, Faculté de Pharmacie de l'Université de Reims, sous la direction du Professeur Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO.*

*A l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.*

*Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Madame le Professeure Zahia KABOUCHÉ pour m'avoir fait confiance, m'avoir conseillée tout au long de la réalisation de ce travail. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Madame le Professeure Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Pharmacognosie et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions que soient. Merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique et merci pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit. Vous avez toujours su vous montrer disponible quand j'en avais vraiment besoin, les remerciements exprimés ici donc ne seront jamais à la hauteur de votre implication dans la réalisation de ce travail de thèse.*

*J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur Ahmed KABOUCHÉ pour le temps qu'il a pu consacrer à la lecture de ce manuscrit. Merci d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur N. AOUF, de l'Université Badji-Mokhtar (Annaba), Monsieur le Professeur S. AKKAL de l'Université de Constantine 1 et Monsieur le Professeur A. ZELLAGUI de l'Université Larbi Ben M'hidi (OEB), d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie en particulier Monsieur Abdulmagid ALABDUL MAGID pour s'être montré disponible à chaque fois que je l'ai sollicité pour avoir un avis avisé en RMN, pour sa grande générosité et son amitié.*

*Je remercie de même Monsieur Alain SIMON du Laboratoire de Chimie Physique Minérale de l'Université de Limoges, pour la réalisation des tests de l'activité antiproliférative.*

*Mes remerciements vont également à Madame le Professeure Yousria Ahmed MAKLAD (NRC, Le Caire, Egypte), pour m'avoir bien accueillie dans son laboratoire et de m'avoir appris avec rigueur les tests de l'activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-ulcéreuse.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire de pharmacognosie de Reims pour les facilités accordées pour la réalisation de ce travail : Madame le professeur Catherine LAVAUD, Bernard RICHARD, Agathe MARTINEZ, Charlotte SAYAGH et Nicolas BORJE.*

*Je remercie mes amis de Reims Sarah et Samir qui ont rendu cette belle aventure plus agréable. Un grand merci pour les bons moments partagés, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre aide et soutien moral.*

*Je remercie Melle Dima MUHAMMAD pour les échanges scientifiques et personnels qu'on a pu partager et pour tous les moments passés ensemble au sein ou en dehors du laboratoire.*

*Je ne voudrais pas oublier tous mes collègues que j'ai côtoyé au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Reims ainsi qu'au Laboratoire LOST de l'Université de Constantine1, notamment Diane, Nassima, Mahmoud, Michael, Assia Zeghib, Assia, Nedjwa, Wassila, Wissem et bien d'autres encore....*

*Enfin, Je tiens à remercier le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien, pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre du PNE 2009/2010 afin de finaliser ma thèse.*

## Liste d'abréviations

### Solvants et réactifs :

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| AcOEt                          | acétate d'éthyle                                  |
| AlCl <sub>3</sub>              | chlorure d'aluminium                              |
| BuOH                           | butanol   |
| CD <sub>3</sub> OD             | méthanol deutéré                                  |
| CHCl <sub>3</sub>              | chloroforme                                       |
| CDCl <sub>3</sub>              | chloroforme deutéré                               |
| DMSO-d <sub>6</sub>            | diméthylsulfoxyde deutéré                         |
| D <sub>2</sub> O               | eau deutérée                                      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | Acide borique                                     |
| HCl                            | Acide chlorhydrique                               |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | acide sulfurique                                  |
| isoPro                         | isopropanol                                       |
| MeCN                           | acétonitrile                                      |
| MeCOEt                         | méthyléthylcétone                                 |
| MeOH :                         | méthanol  |
| M-H                            | Mueller-Hinton                                    |
| MTT                            | tetrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)]       |
| NaOAc                          | acétate de sodium                                 |
| NaOH                           | Hydroxide de sodium                               |
| PBS                            | Phosphate Buffer Saline, (tampon phosphate salin) |
| SDS                            | Sodium-Dodecyl-Sulfate                            |
| TFA                            | acide trifluoroacétique                           |

### Technique chromatographique :

|                  |   |
|------------------|---|
| CCM              | Chromatographie sur Couche Mince                            |
| CC               | Chromatographie sur Colonne ouverte de silice               |
| CLHP             | Chromatographie Liquide Haute Performance                   |
| CPP              | Chromatographie sur Plaque Préparative                      |
| GC               | Chromatographie Gazeuse                                     |
| GC-MS            | Chromatographie Gazeuse Coupleé à la Spectrométrie de Masse |
| C <sub>18</sub>  | Silice greffée  |
| l                | litre   |
| ml               | millilitre  |
| min              | minute  |
| SiO <sub>2</sub> | silice normale  |
| <i>tr</i>        | temps de retention  |
| VLC              | chromatographie liquide sous vide                           |

## Détermination structurale

|                     |   |
|---------------------|---|
| Api                 | $\beta$ -D-apiose                                     |
| Ara                 | $\alpha$ -L-arabinose                                 |
| Gal                 | $\beta$ -D-galactopyranose                            |
| Glc                 | $\beta$ -D-glucopyranose                              |
| GlcA                | acide $\beta$ -D-glucuronopyranosique                 |
| Rha                 | $\alpha$ -L-rhamnopyranose                            |
| ax                  | axial   |
| COSY                | COrelated SpectroscopY                                |
| <i>d</i>            | doublet   |
| <i>dd</i>           | doublet de doublets                                   |
| <i>ddd</i>          | doublet de doublets de doublet                        |
| <i>dl</i>           | doublet large   |
| <i>dm</i>           | doublet de multiplet                                  |
| <i>dq</i>           | doublet de quadruplet                                 |
| <i>dt</i>           | doublet de triplet                                    |
| eq                  | équatorial  |
| HMBC                | Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity           |
| HSQC                | Heteronuclear Single Quantum Connectivity             |
| J (Hz)              | constante de couplage exprimée en Hertz               |
| <i>m</i>            | multiplet   |
| ppm                 | parties par million                                   |
| <i>qt</i>           | quintuplet  |
| RMN                 | Résonance Magnétique Nucléaire                        |
| RMN <sup>13</sup> C | Résonance Magnétique Nucléaire du carbone             |
| RMN <sup>1</sup> H  | Résonance Magnétique Nucléaire du proton              |
| rOe                 | rotation Overhauser effect                            |
| ROESY               | ROtating Overhauser Effect SpectroscopY               |
| <i>s</i>            | singulet  |
| <i>sl</i>           | singulet large  |
| <i>t</i>            | triplet   |
| <i>td</i>           | triplet de doublet                                    |
| TOCSY               | TOal Correlation SpectroscopY                         |
| $\delta_C$          | Déplacement chimique du carbone en ppm                |
| $\delta_H$          | Déplacement chimique du carbone en ppm                |
| ESI                 | ElectroSpray Ionization (ionisation par électrospray) |

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| HR               | haute résolution         |
| $m/z$            | masse/charge d'un ion    |
| SM               | Spectrométrie de Masse   |
| UV               | Ultra-Violet             |
| $\lambda_{\max}$ | longueur d'onde maximale |
| $[\alpha]_D$     | Pouvoir rotatoire        |

### **Activité biologique**

|              |   |
|--------------|---|
| AINS         | Les antiinflammatoires non stéroïdiens              |
| ATCC         | American type culture collection                    |
| CI50 :       | Concentration Inhibitrice à 50%                     |
| COX          | Cyclo-Oxygénase                                     |
| CMI          | Concentration Minimale Inhibitrice                  |
| DL50         | Dose Léthale 50                                     |
| NCCLS        | National committee for clinical laboratory standard |
| PG           | Prostaglandine                                      |
| SNC          | Système Nerveux Central                             |
| TNF $\alpha$ | Tumor Necrosis Factor-alpha                         |

## Tables de Matières

### CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

|  |    |
|--|----|
| I.1. L'ordre de Fabales.....   | 15 |
| I.1.1. Les Fabaceae .....  | 15 |
| I.1.2. Description botanique .....   | 15 |
| I.1.3. Répartition géographique des Fabaceae .....                             | 16 |
| I.1.4. Position systématique de la famille des Fabaceae.....                   | 16 |
| I.1.5. Présentation du genre <i>Genista</i> .....                              | 20 |
| I.1.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle .....                          | 21 |
| I.1.5.2. Quelques activités biologiques reconnues .....                        | 21 |
| I.1.5.3. Métabolites isolés du genre <i>Genista</i> .....                      | 22 |
| I.2. L'ordre des Asterales.....  | 27 |
| I.2.1. Les Asteraceae.....   | 27 |
| I.2.2. Description botanique.....  | 27 |
| I.2.3. Position systématique de la famille des Asteraceae d'après APG III..... | 29 |
| I.2.4. Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae.....                | 31 |
| I.2.5. Présentation du genre <i>Chrysanthemum</i> .....                        | 31 |
| I.2.5. 1. Description botanique.....   | 31 |
| I.2.5. 2. Répartition Géographique .....                                       | 32 |
| I.2.5. 3. Utilisation en médecine traditionnelle .....                         | 32 |
| I.2.5. 4. Quelques activités biologiques reconnues.....                        | 33 |
| I.2.5. 5. Métabolites isolés du genre <i>Chrysanthemum</i> .....               | 34 |

### CHAPITRE 2 : II.1 PRÉSENTATION DES FLAVONOÏDES

#### II.2 PRÉSENTATION DES TRITERPENOÏDES ET DES SAPONOSIDES

|   |    |
|---|----|
| II.1. Présentation des flavonoïdes.....                 | 41 |
| II.1.1. Généralités.....                                | 41 |
| II.1.2. Classification.....                             | 41 |
| II.1.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....     | 43 |
| II.2. Présentation des triterpènes et saponosides ..... | 45 |
| II.2.1. Généralités.....                                | 45 |
| II.2.2. Classification des saponosides .....            | 45 |

|   |    |
|---|----|
| II.2.3. Extraction et purification des saponosides..... | 52 |
| II.2.4. Détermination structurale .....                 | 54 |
| II.2.5. Propriétés biologiques des triterpènes .....    | 57 |
| II.2.6. Propriétés biologiques des saponosides .....    | 58 |

**CHAPITRE3** : Investigation chimique et biologique de *Genista ulicina* Spach.

|  |     |
|--|-----|
| III.1.Rappels botaniques.....                                      | 64  |
| III.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....                 | 64  |
| III.3.Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Genista ulicina</i> ..... | 64  |
| III.4. Chimie extractive.....                                      | 65  |
| III.4.1. Extraction.....   | 65  |
| III.4.2. Purification.....   | 65  |
| III.4.3. Détermination structurale des saponosides obtenus.....    | 70  |
| III.4.3.1 Détermination structurale du composé 1.....              | 70  |
| III.4.3.2 Détermination structurale du composé 2.....              | 80  |
| III.4.3.3 Détermination structurale du composé 3.....              | 83  |
| III.4.3.4 Détermination structurale du composé 4.....              | 86  |
| III.4.3.5 Détermination structurale du composé 5.....              | 89  |
| III.4.3.6 Détermination structurale du composé 6.....              | 94  |
| III.4.3.7 Détermination structurale du composé 7.....              | 98  |
| III.4.3.8 Détermination structurale du composé 8.....              | 104 |
| III.4.3.9 Détermination structurale du composé 9.....              | 109 |
| III.4.3.10 Détermination structurale du composé 10.....            | 113 |
| III.4.3.11 Détermination structurale du composé 11.....            | 118 |
| III.4.3.12 Détermination structurale du composé 12.....            | 121 |
| III.4.3.13 Détermination structurale du composé 13.....            | 125 |
| III.4.3.14. Détermination structurale du composé 14.....           | 129 |
| III.4.3.15. Conclusion.....  | 132 |
| III.4.4. Détermination structurale des flavonoïdes obtenus.....    | 134 |
| III.4.4.1. Détermination structurale du composé 15.....            | 134 |
| III.4.4.2. Détermination structurale du composé 16.....            | 138 |
| III.4.4.3. Détermination structurale du composé 17.....            | 142 |



|   |     |
|---|-----|
| III.4.4.4. Détermination structurale du composé 18..... | 149 |
| III.4.4.5. Détermination structurale du composé 19..... | 151 |
| III.4.4.6. Détermination structurale du composé 20..... | 154 |
| III.4.4.7. Conclusion.....                              | 156 |

**CHAPITRE IV : Investigation chimique et biologique de *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt.**

|   |     |
|---|-----|
| IV.1. Rappels botaniques.....   | 158 |
| IV.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....   | 158 |
| IV.3.Travaux antérieurs sur l'espèce.....   | 158 |
| IV.4. Chimie extractive.....  | 158 |
| IV.4.1. Extraction .....  | 158 |
| IV.4.2. Purification.....   | 160 |
| IV.4.2. 1. A partir de la fraction chloroformique.....  | 160 |
| IV.4.2. 2. A partir de la fraction acétate d'éthyle.....  | 161 |
| IV.4.3. Détermination structurale des composés obtenus à partir de la fraction chloroformique.....    | 161 |
| IV.4.3. 1. Détermination structurale du composé 21.....   | 162 |
| IV.4.3. 2. Détermination structurale du composé 22.....   | 166 |
| IV.4.3. 3. Détermination structurale du composé 23.....   | 170 |
| IV.4.3. 4. Détermination structurale du composé 24.....   | 173 |
| IV.4.3. 5. Détermination structurale du composé 25.....   | 177 |
| IV.4.3. 6. Détermination structurale des composés 26 et 27.....                                       | 179 |
| IV.4.3. 7. conclusion .....   | 181 |
| IV.4.4. Détermination structurale des composés obtenus à partir de la fraction acétate d'éthyle ..... | 182 |
| IV.4.4. 1. Détermination structurale du composé 28.....   | 182 |
| IV.4.4. 2. Détermination structurale du composé 29.....   | 184 |
| IV.4.4. 3. Détermination structurale du composé 30.....   | 185 |
| IV.4.4. 4. Détermination structurale du composé 31.....   | 188 |
| IV.4.4. 5. Détermination structurale du composé 32.....   | 190 |
| IV.4.4. 6. Détermination structurale du composé 33.....   | 193 |
| IV.4.4. 7. Détermination structurale du composé 34.....   | 194 |

|   |     |
|---|-----|
| IV.4.4. 8. Détermination structurale du composé 35.....             | 196 |
| IV.4.4. 9. Détermination structurale du composé 36.....             | 200 |
| IV.4.5. Conclusion.....   | 202 |
| IV.4.6. Identification des constituants de l'huile essentielle..... | 203 |

#### Activités biologiques de *Chrysanthemum macrocarpum*

|  |     |
|--|-----|
| IV.4.7. Evaluation de l'activité antibactérienne.....                                  | 205 |
| IV.4.7. 1. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme).....                | 205 |
| IV.4.7. 2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....           | 205 |
| IV.4.7. 3. Résultats et discussion.....  | 206 |
| IV.4.8. Evaluation de l'activité antiproliférative.....                                | 207 |
| IV.4.8.1. Le test de viabilité.....  | 207 |
| IV.4.8.2. Résultats et discussion.....   | 208 |
| IV.4.9. Évaluation de l'activité analgésique, anti-inflammatoire et antiulcéreuse..... | 209 |
| IV.4.9. 1. Etude de la toxicité aiguë: Détermination de la (DL <sub>50</sub> ).....    | 211 |
| IV.4.9. 2. Évaluation de l'activité analgésique.....                                   | 211 |
| IV.4.9. 2. 1. Test de writhing.....  | 211 |
| IV.4.9. 3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....                            | 211 |
| IV.4.9. 4. Détermination de l'activité antiulcéreuse.....                              | 211 |
| IV.4.9.5. Résultats et discussion.....   | 211 |
|  | 216 |

#### Conclusion générale

### CHAPITRE V : Partie expérimentale

|   |     |
|---|-----|
| V.1. Matériel et méthodes.....                                  | 219 |
| V.1.1. Matériel végétal et extraction.....                      | 219 |
| V.1.2. Matériel chromatographique.....                          | 219 |
| V.1.2. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....           | 219 |
| V.1.2. 2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....         | 220 |
| IV.1.2. 3. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....         | 220 |
| V.1.2. 4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)..... | 220 |
| V.1.3. Méthodes physico-chimiques.....                          | 221 |
| V.1.3. 1. Spectrophotométrie UV-visible.....                    | 221 |

|   |     |
|---|-----|
| V.1.3. 2. Spectrométrie de masse.....   | 221 |
| V.1.3. 3. Spectroscopie de RMN.....   | 221 |
| V.1.3. 4. Analyses GC et GC/MS.....   | 221 |
| V.1.3. 5. Pouvoir rotatoire.....  | 222 |
| V.2. Etude de l'espèce <i>Genista ulicina</i> .....   | 223 |
| V.2.1. Extraction des parties aériennes de <i>G. ulicina</i> Spach.....                                       | 223 |
| V.2.2. Fractionnement et purification de la fraction butanolique de l'espèce <i>G. ulicina</i> ...            | 223 |
| V.2.3. Composés isolés de l'espèce <i>Genista ulicina</i> .....   | 230 |
| V.3. Etude de l'espèce <i>Chrysanthemum macrocarpum</i> (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt                     | 235 |
| V.3.1. Extraction des parties aériennes de <i>C. macrocarpum</i> .....  | 235 |
| V.3.2. Fractionnement et purification de la fraction CHCl <sub>3</sub> de l'espèce <i>C. macrocarpum</i> ..   | 235 |
| V.3.3. Fractionnement et purification de la fraction acétate d'éthyle de l'espèce <i>C. macrocarpum</i> ..... | 238 |
| V.3.4. Extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>C. macrocarpum</i> .....                 | 241 |
| V.3.5. Composés isolés à partir de l'extrait chloroformique de <i>C. macrocarpum</i> .....                    | 243 |
| V.4. Etude de l'activité antibactérienne.....   | 245 |
| V.5. Évaluation de l'activité antiproliférative.....  | 248 |
| V.6. Evaluation de l'activité analgésique, anti-inflammatoire et antiulcéreuse.....                           | 250 |
| Références bibliographiques.....  | 254 |

## *Introduction générale*

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir de ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux.

Au cours du temps, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale.

De nos jours, malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations, notamment celle des pays en voie de développement, ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants lors de leur utilisation.

Ces plantes médicinales sont devenues par la suite une source principale de découverte de nouveaux principes actifs, déjà environ 170000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes. A titre d'exemple, on peut citer la quinine, la digitaline, la morphine, la colchicine, l'artémisinine et le taxol..., pourtant, moins de la moitié des plantes ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques.

La flore algérienne compte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques [1]. Ce potentiel floristique, constitué de plantes médicinales toxiques et condimentaires, reste très peu exploré sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

Le présent travail s'insère dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire, destiné à la valorisation de la flore du Nord et du Sahara algérien, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques.

La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phytochimique et biologique.

C'est dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de :

1. l'espèce *Genista ulicina* Spach, appartenant à la famille des *Légumineuses* (Fabaceae), sous famille de *Papilionaceae* (Faboideae). Les diverses investigations phytochimiques menées sur cette famille et plus particulièrement sur le genre *Genista* ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires comme les alcaloïdes [2,3] et les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes [4,5].

Le sol algérien compte 16 espèces de ce genre dont 11 endémiques [1], nos recherches bibliographiques ont montré que l'espèce *G. ulicina* n'a pas fait l'objet d'une étude phytochimique ni pharmacologique.

2. l'espèce *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt., plante saharienne endémique, appartenant à la famille des *Asteraceae* [6].

En effet, les études chimiques réalisées sur le genre ont mis en évidence la présence des flavonoïdes, sesquiterpènes lactones, de triterpènes et de coumarines [7-10].

La recherche bibliographique exhaustive effectuée sur cette espèce a montré que jusqu'à ce jour, elle n'a pas fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique.

Notre travail sera divisé en cinq chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique des plantes étudiées et en particulier des genres *Genista* et *Chrysanthemum* portant sur l'aspect botanique, l'utilisation en médecine traditionnelle, les activités biologiques et les différentes classes de métabolites antérieurement isolés.

Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude des flavonoïdes, triterpénoïdes et des saponosides tout en présentant leurs définitions, classifications et propriétés biologiques.

Les troisième et quatrième chapitres seront consacrés aux travaux personnels avec les résultats des études phytochimiques et biologiques sur les deux espèces *Genista ulicina* et

*Chrysanthemum macrocarpum*. Nous présenterons les étapes d'extraction, d'isolement, de détermination des structures et des tests biologiques effectués sur les extraits et les composés isolés.

Enfin le cinquième chapitre apporte tous les détails expérimentaux entrepris tout au long de ce travail de recherche.

*CHAPITRE I*  
*SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

## **I.1. L'ordre de Fabales**

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 19 000 espèces. Les familles principales sont les Fabaceae, les Polygalaceae, les Surianaceae. Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Genista ulicina* que nous avons étudiée [11].

### **I.1.1. Les Fabaceae**

#### **I.1.2. Description botanique**

Les plantes Fabaceae sont généralement de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*). Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques. La longueur des poils est variable et les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Elles sont entières à parfois dentées-serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Ces plantes sont constituées de renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines. Les Inflorescences sont presque toujours indéterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires.

Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement au nombre de 5, libres ou soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différent par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs étant souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10, abritées dans le périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes. Les grains de pollen sont tricolporés, tricolpés, ou triporés, généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle est souvent unique, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore. L'ovaire est supère, à placentation pariétale. Le fruit est généralement une gousse,



parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscente, un akène, une drupe ou une baie [12].

### **I.1.3. Répartition géographique des Fabaceae**

Les Fabaceae constituent la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (figure 1). Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles.



**Figure 1:** Carte de répartition géographique des Fabaceae d'après Heywood [13].

### **I.1.4. Position systématique de la famille des Fabaceae**

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques. Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabaceae : 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 (tableau 1), 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) [11, 14].

Tableau 1: Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique

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

#### I.1.4.1. La sous-famille des Papilionoideae

Les Fabaceae étant une famille extrêmement vaste, pour la suite de cette discussion nous allons nous intéresser plus particulièrement à la sous-famille des Papilionoideae qui comprend 440 à 500 genres, dont *Genista*, et plus de 12000 espèces.

On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées, à celui de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses [15]. Traditionnellement, les Papilionoideae ont été caractérisées par des traits qui sont considérés maintenant comme des synapomorphies 5 de la sous-famille [16]. Ces caractéristiques incluent la présence de bois avec un parenchyme prédominant axial paratrachéal qui est assez rare, des vaisseaux avec des trous alternés et de simples perforations plates, l'absence de feuilles bipennées [16].

Les éléments les plus caractéristiques concernent la fleur des Papilionoideae : la préfloraison est descendante (vexillaire). Les **fleurs** sont cyclisées, hermaphrodites et fortement zygomorphes par la corolle.

La **corolle**, à symétrie bilatérale, présente une forme dite « papilionacée » c'est à dire qu'elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon (figure 2). Le pétale dorsal (appelé aussi vexillum ou plus couramment étendard), recouvre les deux pétales latéraux ou ailes. Ces derniers recouvrent à leur tour, les deux pétales inférieurs, libres ou unis par leur bord interne sur une certaine longueur. Ces deux pièces inférieures constituent ensemble la carène qui renferme l'androcée et le gynécée.



**Figure 2:** *Lathyrus odoratus*. à vue générale de la fleur papilionacée ; b : calice ; c : vue de face montrant l'étendard (flèche) ; d et d' : les 2 ailes ; e : la carène ; f : les 10 étamines soudées par leur base ; g : les étamines entourant le style ; h : détail d'une anthère avec les grains de pollen ; i : le style qui se termine par le stigmate ; k : gousse mûre [17].

L'**androcée** compte dix étamines qui peuvent être libres ou soudées. Elles s'unissent le plus souvent par leurs filets, formant un tube autour du carpelle (genre *Sophora*). Elles peuvent aussi être soudées entre elles et l'androcée est alors monadelphie (genre *Cytisus*). L'androcée est diadelphie quand neuf étamines sont unies en un tube ouvert en arrière et que l'étamine postérieure reste libre (genre *Vicia* et genre *Derris*).

#### **I.1.4.2. Intérêts économiques et thérapeutique des Papilionoideae**

Les Fabaceae, et plus particulièrement la sous-famille des Papilionoideae, ne seraient dépassées que par les Poaceae dans un classement des familles par importance économique.

De nombreuses plantes alimentaires, mais aussi des plantes fourragères, ornementales ou encore médicinales de premier ordre appartiennent à cette sous-famille. Il est néanmoins important de noter que de nombreux genres sont hautement toxiques.

L'intérêt agronomique des Fabaceae provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiaceae), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* », 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 dites plantes améliorantes.

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

Certains genres font parties des plantes ornementales les plus prisées autant dans les pays tempérés que tropicaux. Les plus connus étant *Cytisus* (les gènes), *Laburnum anagyroides* Medik. (la pluie d'or ou Cytise à grappes), *Lathyrus* (les gesses), *Lupinus* (les lupins), *Wisteria* (les glycines) et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes, *Genista tinctoria* L. ou genêt des teinturiers, de même que certaines espèces d'*Indigofera* dont est tirée la teinture d'indigo [13, 16]. De nombreuses Faboideae ont joué, un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique. Dans la majeure partie des cas, non pas pour leur utilisation en tant que médicaments, mais comme source de matière première (par ex. lécithines de *Glycine max* Merr.), de molécules actives, de molécules pour l'hémisynthèse de médicaments (par ex. phytostérols de *Glycine max* Merr. ou des saponines de *Trigonella foenum-graecum* L.) ou encore d'excipients divers (par ex. baume du Pérou de *Myroxylon balsamum* Harms. ou gomme adragante d'*Astragalus gummifer* Labill).

Actuellement, plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses espèces de Faboideae : la spartéine, un alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolée de *Cytisus scoparius* L. Link, la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolée de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigma*

*venenosum* Balf. Cette dernière est un inhibiteur réversible des cholinestérases, utilisée comme antidote de l'intoxication par les parasympatholytiques et testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Elle n'est pas utilisée dans cette dernière indication, mais a permis la préparation d'analogues synthétiques potentiellement très prometteurs [18].

### **I.1.5. Présentation du genre *Genista***

Parmi les 700 genres de la famille des Fabaceae, en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espèces [1]. Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Genista* qui compte environ 150 espèces réparties en Europe et en région méditerranéenne [18]. D'après la bibliographie, ce genre montre une richesse en composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille des Papilionaceae et à la tribu des genisteae [19]. Quezel et Santa, en 1963, comptent pour ce genre 23 espèces en Algérie dont 11 endémiques [19].

*Genista* est d'une façon générale un arbuste à calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, plus rarement le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit, les 10 étamines sont monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscence, variable. Les arbrisseaux sont épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Les feuilles sont composées de 1 à 3 paires de folioles stipulées ou non [1].



**Figure 3 : Les différentes parties de *Genista pilosa* [20]**

### **I.1.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle**

Certaines espèces du genre *Genista* sont utilisées en médecine traditionnelle populaire pour guérir bon nombre de maladies, On citera par exemple :

*Genista tenera* : l'infusion des parties aériennes de cette espèce est utilisée dans la médecine traditionnelle Portugaise pour traiter le diabète [21].

*G. anglica* et *G. germanica* : ses deux plantes sont préconisées en tant que diurétiques pour le traitement de néphrolithiase et encore contre la goutte [22, 23].

### **I.1.5. 2. Quelques activités biologiques reconnues**

Le genre *Genista* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. La majorité d'entre elles concernent surtout des effets antiglycémiant, antiinflammatoire, antiulcère, spasmolytique, antioxydant et anti-prolifératifs (anti-tumoral, apoptotique, cytotoxique) [21].

L'extrait butanolique des parties aériennes de *G. tenera*, a montré une activité antihyperglycémiant [21]. Les résultats ont révélé que l'extrait butanolique provoque une diminution de la concentration de glucose à 62.5% chez les rats traités par une dose de 200 mg/Kg, dès le 7<sup>ème</sup> jour de traitement. L'extrait butanolique a montré aussi une grande activité antioxydante et antiacetylcholinesterase.

L'extrait méthanolique de *G. tinctoria* et *G. sessilifolia* a subi une investigation biologique en vue de mettre en évidence d'éventuelles propriétés cytotoxiques [24]. Les résultats ont montré que l'extrait est capable de nuire à la croissance des cellules de mélanomes humains M14.

La toute première étude biologique ayant concerné les deux espèces *G. tinctoria* et *G. sessilifolia* [25], a révélé que les extraits flavoniques des deux plantes ne sont pas toxiques à des doses  $\leq 2000$  mg/Kg, et 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 [26], 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.

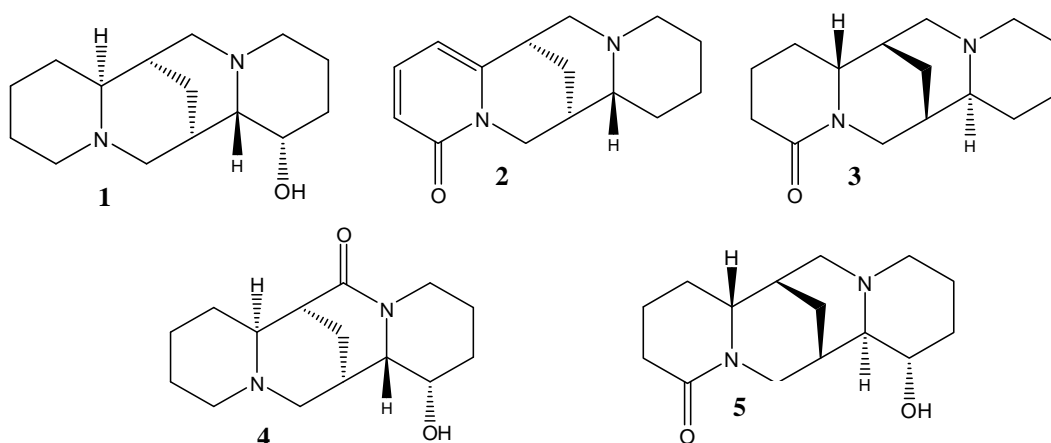
### I.1.5.3. Métabolites isolés du genre *Genista*

Les plantes du genre *Genista* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Il ressort de ces investigations que les principaux métabolites secondaires du genre sont constitués d'alcaloïdes et de flavonoïdes. Les pages qui suivent tracent un aperçu non exhaustif, pour ne pas tomber dans le fastidieux, des différents composés rencontrés dans le genre *Genista*.

#### ➤ Les alcaloïdes

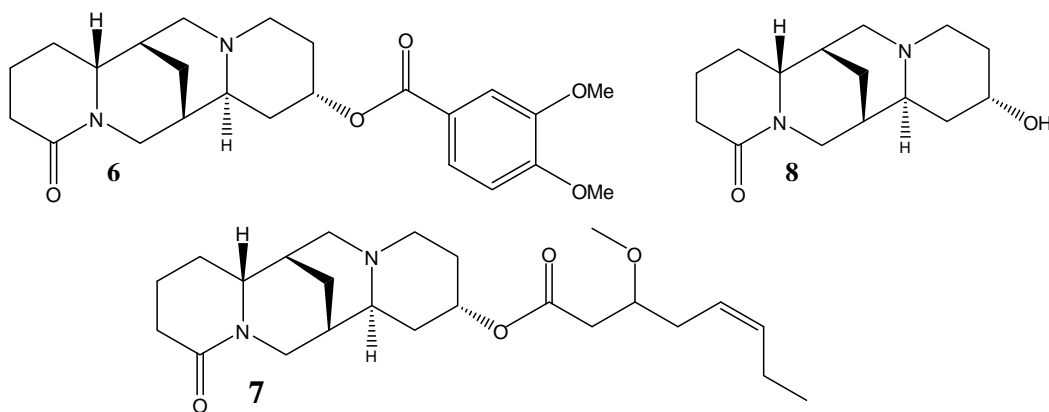
Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes [18]. En fait, les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue de la structure et des propriétés chimiques que des effets biologiques qu'ils manifestent. Les espèces du genre *Genista* comptent un bon nombre de squelette quinolizidine.

L'investigation phytochimique de la plante *G. ephedroides* [3] a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes quinolizidine (figure 4) : Retamine (1), Anagryne (2), Lupanine (3), 17-oxoretamine (4), 12- $\alpha$ -hydroxylupanine (5). Leurs structures ont été identifiées par la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse GC/MS.



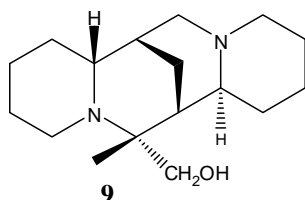
**Figure 4:** Structures des alcaloïdes isolés de *G. ephedroides* [3].

Dans une étude réalisée sur l'espèce *G. cinerea* Rensen [27], a pu caractériser deux alcaloïdes esters (figure 5) : Cineverine (6), Cineractine (7), en plus d'un 13 $\alpha$ -hydroxylupanine (8).



**Figure 5 :** Structures des alcaloïdes isolés de *G. cenerea* [27].

Un autre dérivé de lupanine (figure 6) a été isolé des parties aériennes de *G. sessilifolia* [28]. Il s'agit du 10 $\alpha$ -hydroxyméthyl sparteine (**9**).



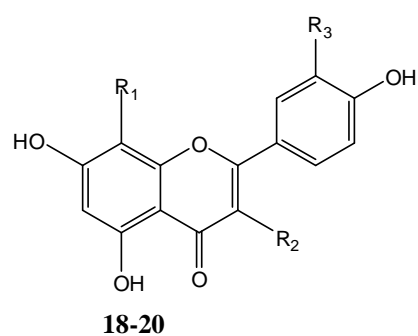
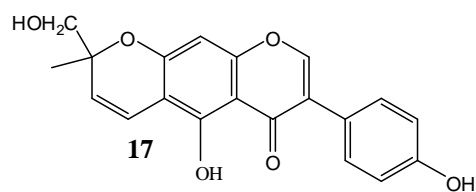
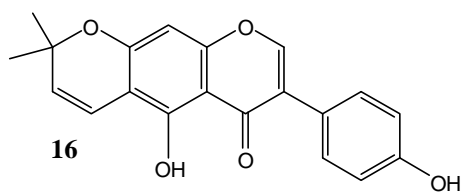
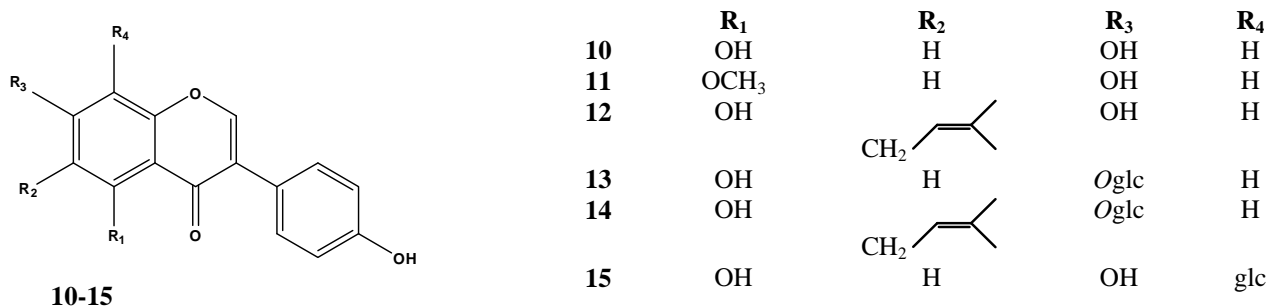
**Figure 6:** Structures de 10 $\alpha$ -hydroxyméthyl sparteine isolé de *G. sessilifolia* [28]

### ➤ Les flavonoïdes:

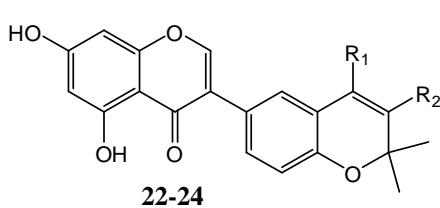
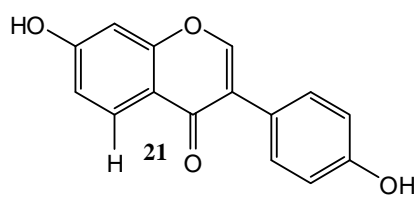
Les flavonoïdes sont des composés largement répandus dans le genre *Genista*, ce sont des marqueurs chimiotaxonomiques, leur importance biologique a été largement démontrée.

Pistelli dans la recherche systématique des flavonoïdes du genre *Genista*, a étudié les espèces *G. ephedroides* [4], *G. corsica* [5] et *G. pichisermolliana* [29]. Ces investigations ont abouti à l'isolement de: Génistéine (**10**), Isoprunétine (**11**), Wighteone (**12**), Génistéine (**13**), Génistéone (**14**), 8-*C*-glucoside génistéine (**15**), Alpinumisoflavone (**16**), Hydroxyalpinumisoflavone (**17**), Apigénine (**18**), Ephedroïdine (**19**), Isokaempféride (**20**), Daidzéine (**21**), Isoderrone (**22**), Ficusoflavone (**23**), Dihydroisoderrondiol (**24**), Lutéoline (**25**), 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl lutéoline (**26**), 4'-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl lutéoline (**27**), Toxifoline (**28**), 5-Méthoxytoxifoline (**29**), 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl génistéine (**30**), 8-*C*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl orobole (**31**), 8-*C*-glucopyranosyl 3'-*O*-méthyl orobole (**32**), 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl isorhamnétine (**33**), 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl isorhamnétine (**34**), 3-*O*- $\beta$ -robinoside isorhamnétine (**35**), 4'-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl alpinumisoflavone (**36**) (figure 7).

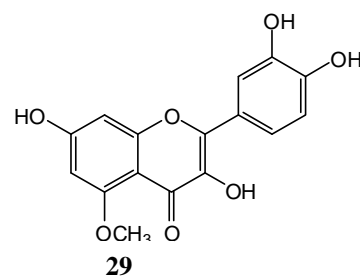
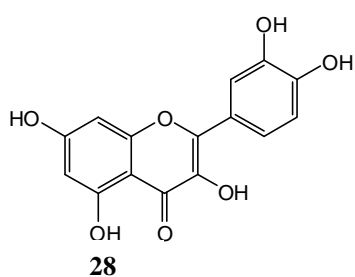
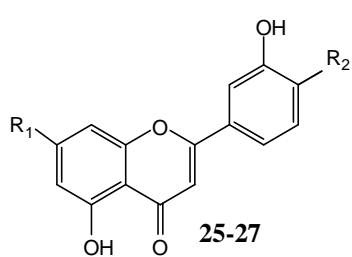




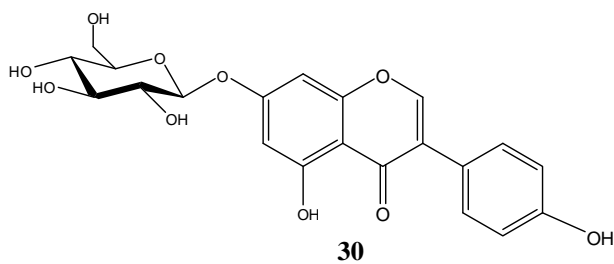
|           |                      |                      |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>18</b> | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b> | <b>R<sub>3</sub></b> |
|           | H                    | H                    | H                    |
| <b>19</b> | CH <sub>2</sub>      | H                    | H                    |
|           |                      | H                    | H                    |
| <b>20</b> | H                    | OCH <sub>3</sub>     | OH                   |

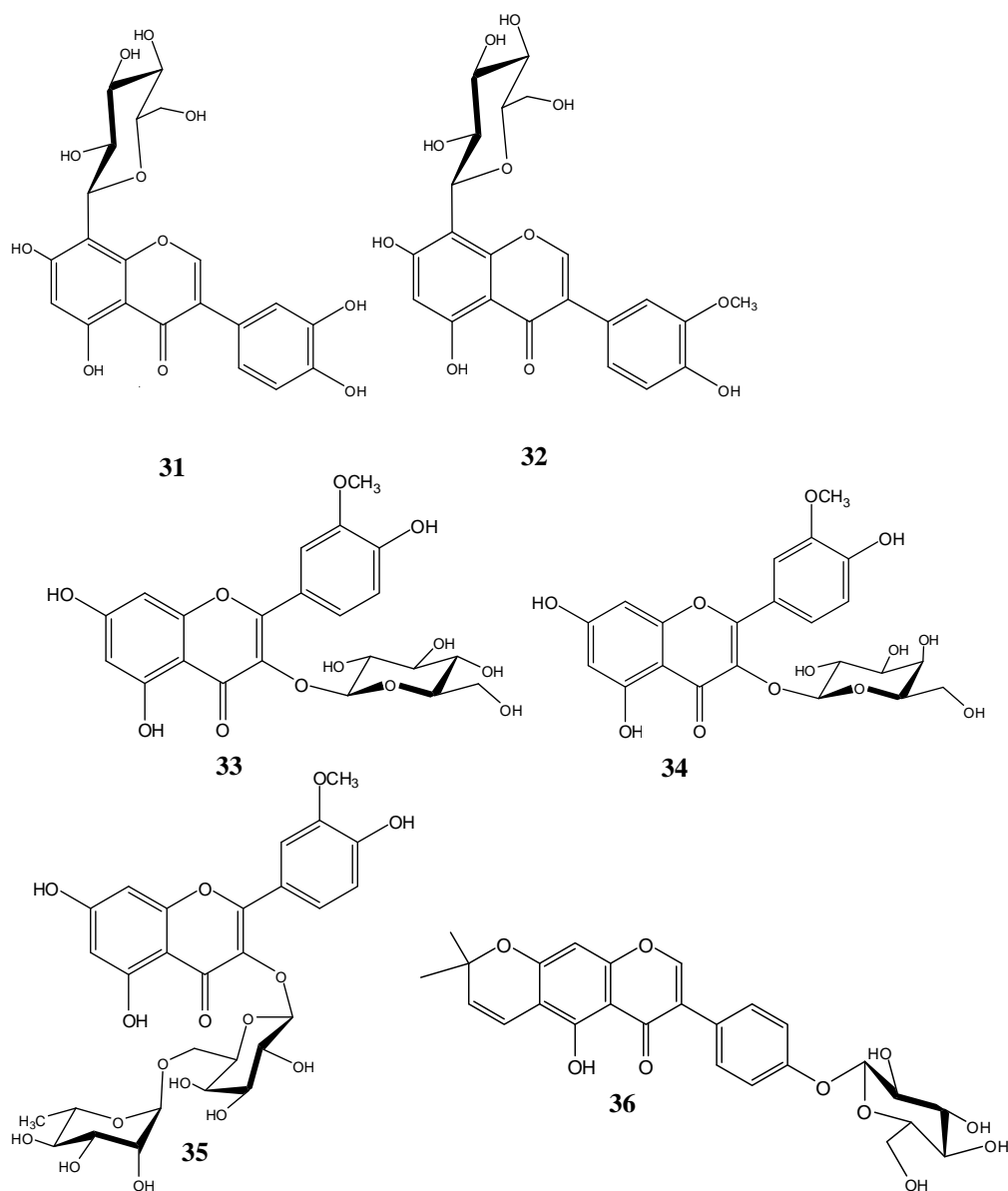


|           |                      |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|
| <b>22</b> | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b> |
|           | H                    | H                    |
| <b>23</b> | H                    | OH                   |
| <b>24</b> | OH                   | OH                   |



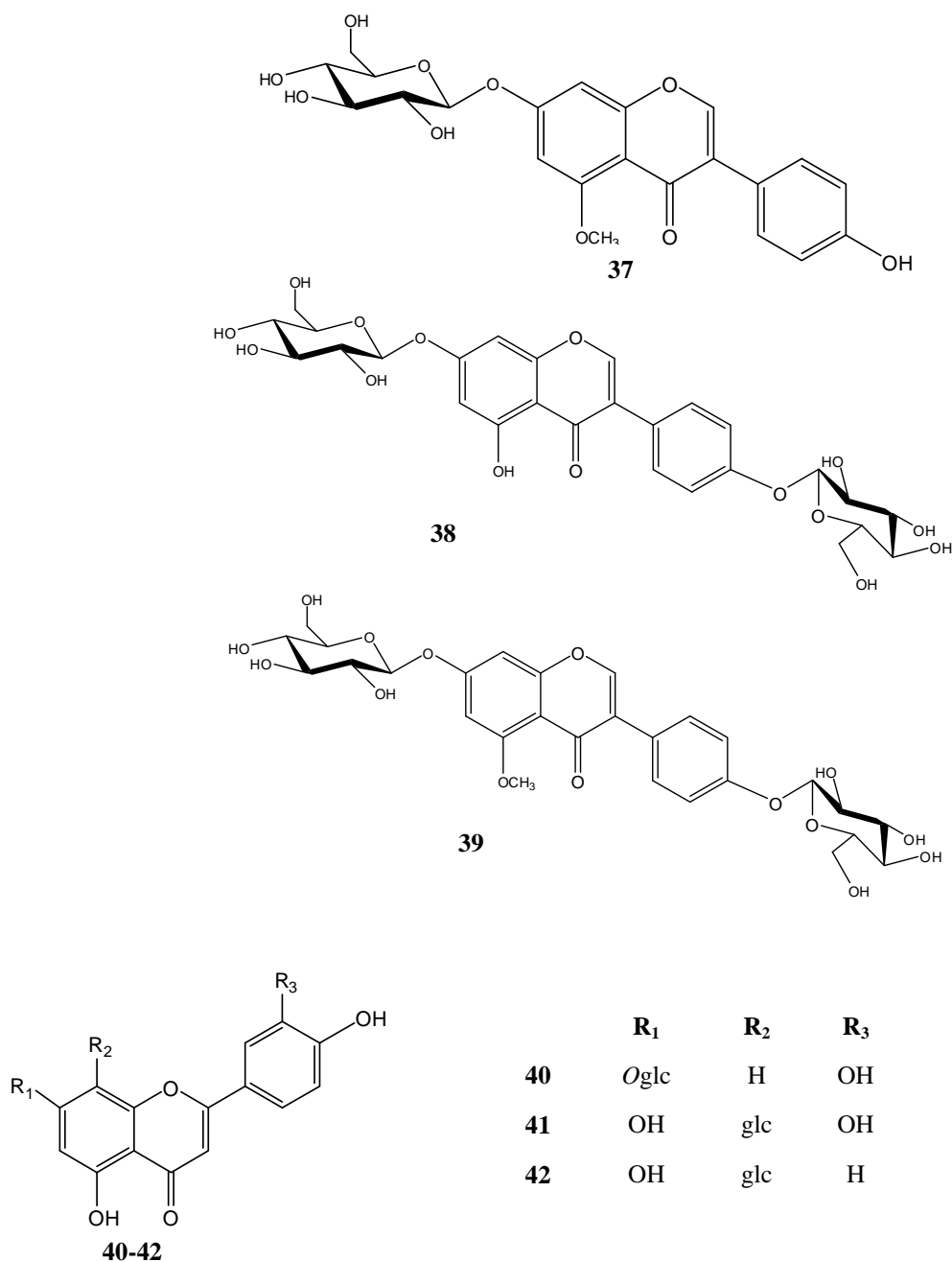
|           |                      |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|
| <b>25</b> | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b> |
| <b>26</b> | OH                   | OH                   |
| <b>27</b> | Oglc                 | OH                   |
|           | OH                   | Oglc                 |





**Figure 7:** Structures des flavonoides et des isoflavonoides isolés de *G. ephedroides*, *corsica* et *G. pichisermolliana* [4], [5] et [29].

L'investigation chimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *G. morisii* [30] a abouti à l'isolement de 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside isoprunétine (**37**), 7,4'-di-*O*-β-*D*-glucopyranoside genistéine (**38**), 7,4'-di-*O*-β-*D*-glucopyranoside isoprunétine (**39**), Orientine (**40**), Vitexine (**41**) et Eriodictyol (**42**) (figure 8).



**Figure 8:** Structures des flavonoides et des isoflavonoides isolés de *G. morisii* [30].

La recherche bibliographique réalisée montre bien la richesse du genre *Genista* en composés flavoniques notamment les isoflavones. Il est important de souligner que les isoflavonoides du type génistéine, daidzéine et isoprunitine s'y trouvent majoritairement dans ce genre [31].

## **I.2. L'ordre des Asterales**

L'ordre des Asterales renferme 11 familles selon la classification phylogénétique APG III (2009). Les familles principales sont : les Alseuosmiaceae, les Argophyllaceae, les Asteraceae, les Calyceraceae, les Campanulaceae, les Goodeniaceae, les Menyanthaceae, les Pentaphragmataceae, les Phellinaceae, les Rouseaceae, les Stylidiaceae. Nous traiterons ici la famille des Asteraceae qui renferme l'espèce végétale *Chrysanthemum macrocarpum* que nous avons travaillée.

### **I.2.1. Les Asteraceae**

La famille des Asteraceae ou est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1500 genres [32]. Le sol algérien compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [1].

Les Asteraceae connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes [32].

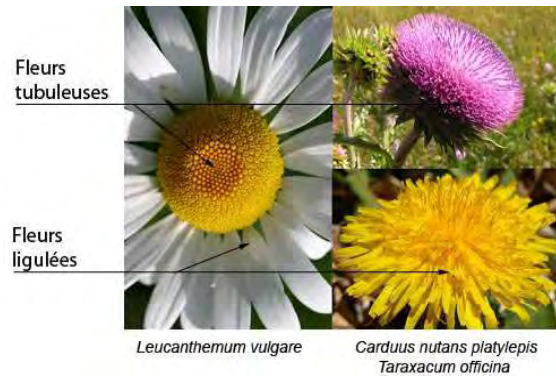
### **I.2.2. Description botanique**

Les Asteraceae ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules c'est -à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige ou entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre [33].

La fleur des Asteraceae est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen". Ceci est adapté à un mode de pollinisation «à piston». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut considérer qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées soutenu par un involucre de bractées disposées sur un à plusieurs rangs (figure 9). Les bractées

peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre.



**Figure 9:** Types de fleurs des Asteraceae [34].

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus (figure 10) qui favorise la dispersion des graines par le vent [35].



**Figure 10:** Le fruit de *Taraxacum campylodes* (Asteraceae) [36].

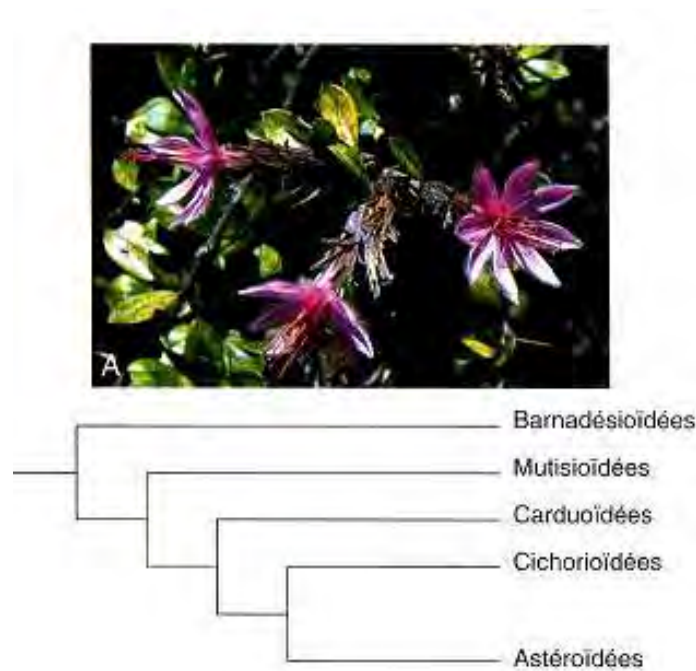
Les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette) [35].

Pour déterminer la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défleuris, portant des fruits mûrs ou au moins déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante.

### I.2.3. Position systématique de la famille des Asteraceae d'après APG III

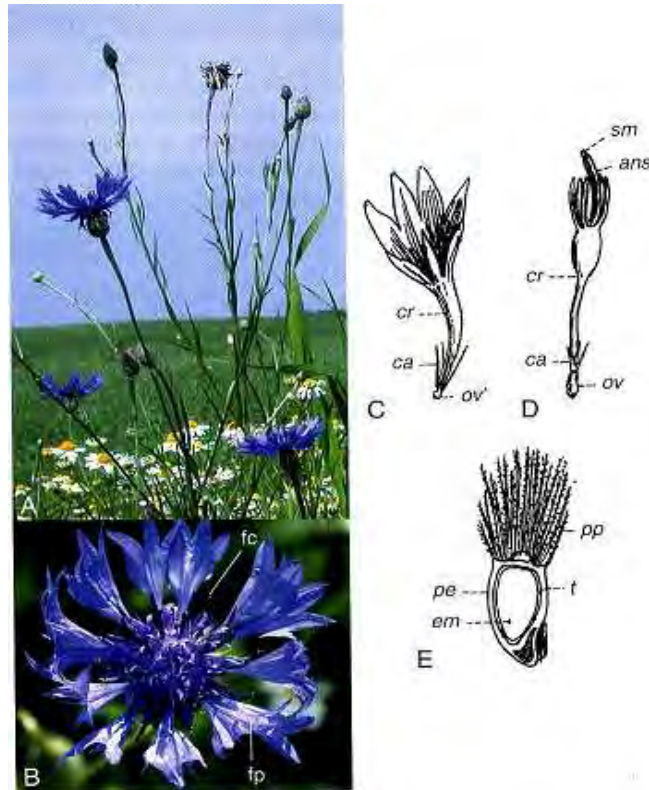
On peut subdiviser l'immense famille des Asteraceae en cinq sous-familles principale (figure 11) :

- ❖ Les Barnadesioïdées et Mutisioïdées sont des arbustes ou des plantes herbacées poussant principalement en Amérique du Sud. Il s'agit de formes archaïques d'astéracées, dont les fleurs sont à corolle zygomorphe bilabiée 1/4 (Barnadesioïdées) ou bilabiée 2/3 (Mutisioïdées), cette dernière comprenant le Gerbera, plante sud africaine cultivée pour ses beaux capitules en forme de marguerite [15].



**Figure 11** : Classification des Asteraceae d'après APG, simplifiée, en photo, *Barnadesia*, arbuste représente les Asteraceae primitives [15].

- ❖ Les Carduoides possèdent des fleurs typiquement roses, bleues ou pourpres, toutes en tube, comme celles du capitule du Bleuet (figure12). Les Chardons, les Cirses et beaucoup d'Astéracées épineuses méditerranéennes se trouvent dans cette sous-famille.



**Figure 12** : Bleuet : A : port de la plante, B capitule, C périphérique, D : fleur centrale, E : coupe longitudinale de l'akène, fc ; fleur centrale, fp : fleur périphérique, b : bractée de l'inlucre, ca : calice, cr : corolle, ans : anthères soudées, ov : ovaire, ov' ovaire avorté, sm : stigmate, pp : pappus, pe péricarpe, t : tégument séminal, em : embryon [15].

- ❖ Les Cichorioidées correspondent à des Astéracées à latex, dont le nom est évoqué dans les espèces comme *Lactuca*, Laitue, Laiteron. Les capitules ne portent que des fleurs ligulées terminées par 5 dents, formant une languette typiquement jaune, parfois bleue.
- ❖ Les Astéroïdées, avec 16000 espèces, forment l'essentiel des Astéracées. Ce groupe diversifié caractérisé par ses capitules «radiés», comportant au centre, des fleurs tubulées généralement jaunes et à la périphérie des fleurs ligulées terminées par 3 dents, blanches comme chez la marguerite. Dans ce groupe on inclut aussi des espèces ayant perdu secondairement leurs fleurs ligulées comme les Armoises.

Les Astéroïdes sont elles mêmes divisées en nombreuses tribus dont les plus les importantes sont : les Anthémidées, les Astérées, les sénécionées et les Hélianthées [15].

#### **I.2.4. Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae :**

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antennaria Djioca* Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.). Certains comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi [37].

#### **I.2.5. Présentation du genre *Chrysanthemum***

Il y a plus de 2000 ans, les chinois savaient le cultiver. Dans la Chine et le Japon anciens, le chrysanthème avait une valeur symbolique importante (*Chrysanthemum hortorum*, par exemple) (chrysanthème des fleuristes). Ses fleurs ont pour signification, l'amitié, la paix, la joie, la santé et l'optimisme. Vers la fin du XIXème siècle, les chinois et les japonais en connaissaient environ 3000 variétés. Le genre a également des représentants qui poussent dans nos régions [1].

##### **I.2.5. 1. Description botanique**

Les chrysanthèmes sont des plantes annuelles vivaces originaires des zones tempérées et subtropicales de l'hémisphère, de 20 à 120 cm de haut, à tiges dressées. Les feuilles sont divisées en lanières étroites un peu charnues, les capitules sont à fleurs centrales jaunes et agrandis et à fleurs ligulées jaunes, blanches, orangés ou pourprés. L'involucre de bractée possède des écailles à marge membraneuses très larges, à chaînes de deux sortes, les extrêmes différentes de celles du centre du capitule. Les fruits sont des akènes de 2-3 mm munis de 5-10 côtes [1].





**Figure 13:** Types de fleurs de *Chrysanthemum* [38].

### **I.2.5. 2. Répartition Géographique**

Le *Chrysanthemum* est largement répandu dans le monde entier à cause de ses propriétés ornementales et cosmopolites, il est souvent cultivé dans les jardins pour ses qualités décoratives en variétés de couleurs. L'origine géographique du genre *Chrysanthemum* est imputée à l'Europe et l'Asie mais celui-ci est également largement distribué en Afrique [39]. En Algérie, on peut rencontrer principalement les espèces suivantes [1] : *C. clausonis* (Pomel) Batt., *C. coronarium* L., *C. deserticum* (Murb.) Batt. et Trab., *C. fontanesii* (Boiss. et Reut.) Q. et S., *C. fuscatum* Desf., *C. grandiflorum* (L.) Batt., *C. gyanum*, *C. macrocarpum* Coss. et Kral., *C. macrotum* (D. R.) Ball., *C. maesii*, *C. multicaulis*, *C. myconis* L., *C. segetum* L., *C. trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab., *C. viscido-hirtum*.

### **I.2.5. 3. Utilisation en médecine traditionnelle**

Plusieurs espèces du genre *Chrysanthemum* sont largement utilisées en médecine traditionnelle: à titre d'exemple :

L'espèce *C. indicum* est utilisée pour traiter plusieurs maladies infectieuses et les troubles d'hypertension en médecine Coréenne et Chinoise, elle est utilisée aussi en tant que remède antibactérien et anti-inflammatoire [40].

Dans la médecine traditionnelle Tunisienne [41], l'infusion des feuilles de *C. trifurcatum* est utilisée pour soigner les problèmes de transit intestinal, la constipation et comme régulatrice des désordres du cycle menstruel.

*C. morifolium* Ramat est utilisée en médecine Chinoise comme complément alimentaire ou tisane. Elle est considérée comme un aliment de santé par de nombreux consommateurs. Afin d'établir une assise scientifique à cette pratique, l'investigation des activités antioxydante [42], antitumorale [43] et protection cardiovasculaire [44] a été mise en œuvre.

Au Maroc, *C. Segetum* est utilisée pour traiter des maladies hépatiques et les troubles de la vésicule biliaire [41].

Dans la médecine traditionnelle Coréenne, l'infusion des fleurs et des feuilles de *C. boreale* est utilisée contre les maladies oculaires et les vertiges [45]. Par contre l'infusion des fleurs de *C. zawadskii* est préconisée pour combattre les diverses formes des bronchites, les infections pulmonaires et les troubles gastro-intestinaux [46].

#### **I.2.5. 4. Quelques activités biologiques reconnues**

L'extrait hexanique de *C. cinerariifolium* a subi une investigation biologique en vue de mettre en évidence d'éventuelles propriétés antiprotozoaires. Les tests ont concerné : *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* et *Trypanosoma cruzi*. Les résultats ont révélé que l'extrait a manifesté une activité intéressante vis-à-vis de *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Plasmodium falciparum* avec des pourcentages d'inhibition de (99%) et (87%), respectivement [47].

La cytotoxicité du guaianolide : 8-acétoxy-4,10-dihydroxy-2,11(13)-guaiadène-12,6-olide isolé à partir des parties aériennes de *C. boreale* a été évaluée sur cinq lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les résultats ont montré que ce guaianolide possède une cytotoxicité très forte vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées ( $4.15 \leq IC_{50} \leq 1.08 \mu\text{g/ml}$ ) [48].

Afin d'aborder de plus près l'aspect « mécanisme d'action de l'activité anti-inflammatoire » de l'extrait des feuilles de *C. zawadskii*, l'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la production des nitrites (NO) a été étudiée. Les résultats ont révélé que l'extrait de *C. zawadskii* est capable d'inhiber la production de (NO) et l'expression de (NOS) par l'inhibition de mARN [49].

L'extrait méthanolique des fleurs de *C. indicum* a montré également une activité anti-inflammatoire exprimée par l'inhibition de la production d'oxyde nitrique dans différents cas

de stimulation tels que les interleukines 1 $\beta$ - et lipopolysaccharides dans différentes cellules (macrophages, cellules endothéliale). Une autre étude pharmacologique a confirmé que l'extrait aqueux de *C. indicum* exerce diverses activités : antioxydante, antimicrobienne et antivirale [50].

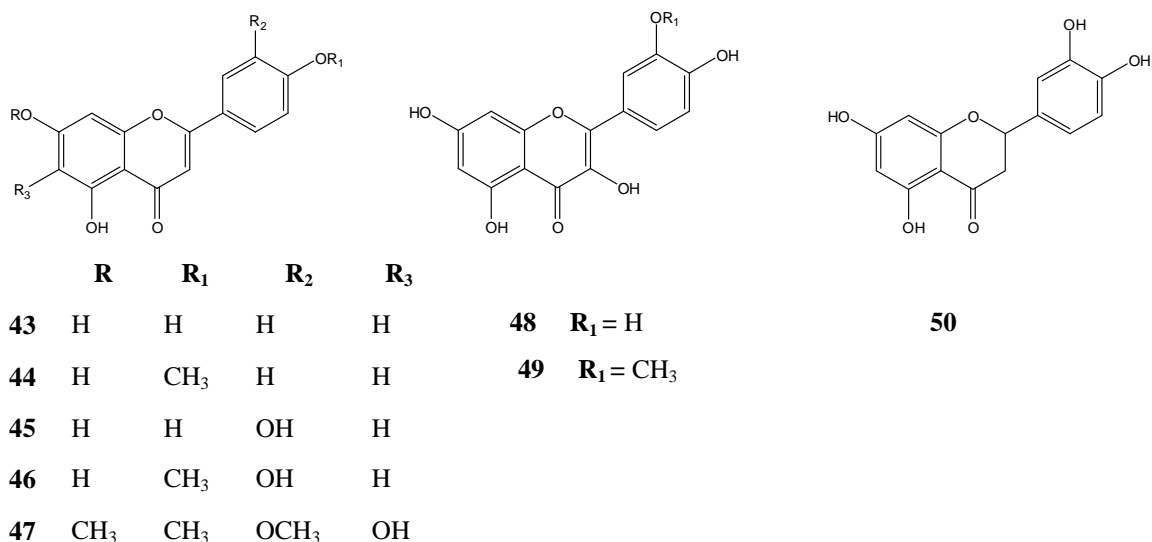
### **I.2.5. 5. Métabolites isolés du genre *Chrysanthemum***

L'étude phytochimique des plantes du genre *Chrysanthemum* a largement été étudiée ces dernières années faisant l'objet de plusieurs publications. L'ensemble des composés isolés et identifiés est très hétérogène. Ainsi, les constituants les plus rencontrés sont des flavonoïdes, des acides phénoliques [51], des coumarines [52], des huiles essentielles [53], des dérivés sesquiterpéniques [48] et des triterpènes [54] dont nous allons donner quelques exemples de structures.

#### **➤ Flavonoïdes**

Les flavonoïdes décrits à ce jour pour le genre *Chrysanthemum* sont quasiment toujours des flavones substituées par des groupements hydroxyles, méthoxyles et/ou glycosyles, des flavonols et rarement des flavanones. L'espèce la plus étudiée de ce genre est sans doute *C. morifolium* Ramat pour ses diverses propriétés thérapeutiques. D'après Lin, ces effets seraient dus à la présence d'une grande quantité de flavonoïdes dans les fleurs.

Il a pu identifier et caractériser plus d'une cinquantaine de flavonoïdes (figure 14) parmi lesquels des flavones à squelette Apigénine (**43**), Acacétine (**44**), Lutéoline (**45**), Diosmétine (**46**), Eupatorine (**47**) et ses dérivés 7- *O*-glycosylés et *C*- glycosylés, des flavonols de type Quercétine (**48**), Isorhamnetine (**49**) et ses dérivés glycosylés aussi et des flavanones comme Eriodictyol (**50**) [51].

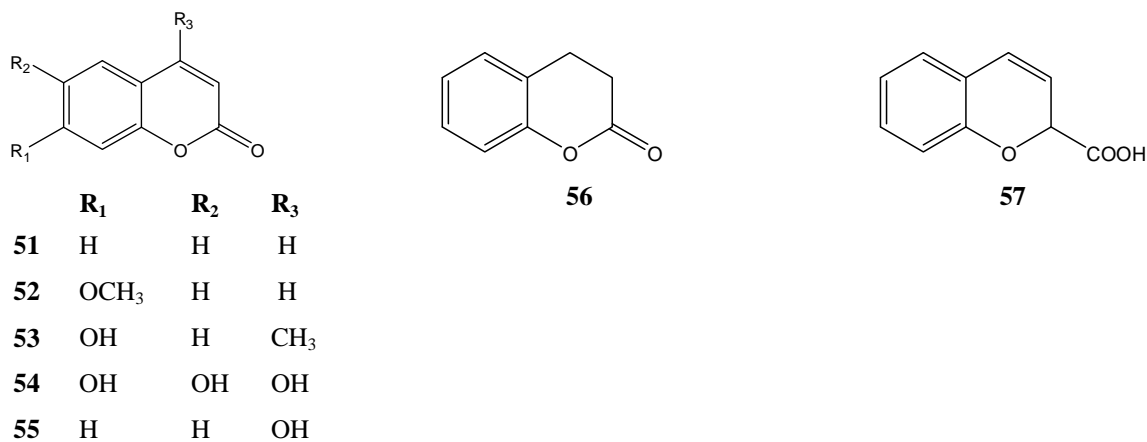


**Figure 14:** Structures des principaux flavonoïdes identifiés dans l'espèce *C. morifolium* Ramat [51].

### ➤ Les coumarines

Les coumarines sont des produits naturels très actifs. Ils ont des propriétés phototoxique, antibiotique, spasmolytique, antifongique et anticancéreuse [55]. Les structures coumariniques les plus courantes dans le genre *Chrysanthemum* sont dérivées de la coumarine.

L'investigation chimique réalisée sur les parties aériennes ainsi que les racines de l'espèce *C. segetum* L a abouti à l'isolement de 7 coumarines (figure 15) appelées : Coumarine (**51**), Herniarine (**52**), Umbelliférone (**53**), Aesculetine (**54**), 4-Hydroxycoumarine (**55**), Dihydrocoumarine (**56**) et l'acide coumarinique (**57**). L'identification de ces composés a été réalisée par électrophorèse capillaire [52].



**Figure 15:** Structures de coumarines isolées de l'espèce *C. segetum* L [52].

➤ **Huiles essentielles**

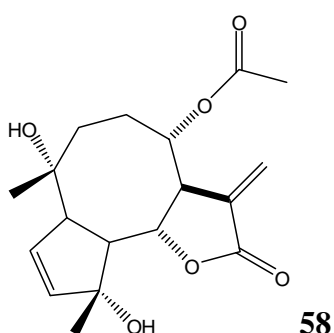
La composition générale de l'huile essentielle des représentants du genre *Chrysanthemum* est un mélange de monoterpènes, sesquiterpènes [53] et de hydroalcanes aliphatiques [56]. A titre d'exemple les principaux composants des huiles essentielles de *C. vscidehirtum* [53] ont été recensés dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Composition de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. vscidehirtum* [53]

| Principaux composants | Pourcentage | Principaux composants             | Pourcentage |
|-----------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
| $\alpha$ -Pinène      | 0.5         | $\beta$ -Elemène                  | 2.5         |
| Sabinene              | 3.9         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0.5         |
| Mycènes               | 0.8         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0.4         |
| $\beta$ -Pinène       | 0.6         | $\beta$ -Farnesène                | 25.0        |
| Octénal               | 0.2         | $\alpha$ -Humulène                | 0.3         |
| $\Delta^3$ Carène     | 0.9         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0.7         |
| <i>p</i> -Cymène      | 0.9         | $\delta$ -Cadinène                | 1.8         |
| Limonène              | 21.8        | Calamenène                        | 0.3         |
| <i>o</i> -Cymène Z    | 0.2         | Spathulénol                       | 1.3         |
| $\gamma$ -Terpinene   | 0.5         | Caryophyllène oxide               | 2.4         |
| Linalol               | 1.2         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O | 0.9         |
| Terpinèn-4-ol         | 1.3         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O | 0.2         |
| <i>p</i> -Cymène-8-ol | 0.4         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O | 1.5         |
| $\alpha$ -Terpinéol   | 0.8         | Humulène oxide                    | 0.6         |
| Linalyl acétate       | 0.6         | T-Cadinol                         | 0.8         |
| Géranol               | 3.1         | T-Muurolol                        | 1.4         |
| Cinnamaldéhyde        | 0.7         | $\alpha$ -Cadinol                 | 1.5         |
| Thymol                | 0.3         | Non identifie                     | 0.3         |
| Citronellyl acétate   | 0.6         | -                                 |             |

### ➤ Les sesquiterpènes lactones

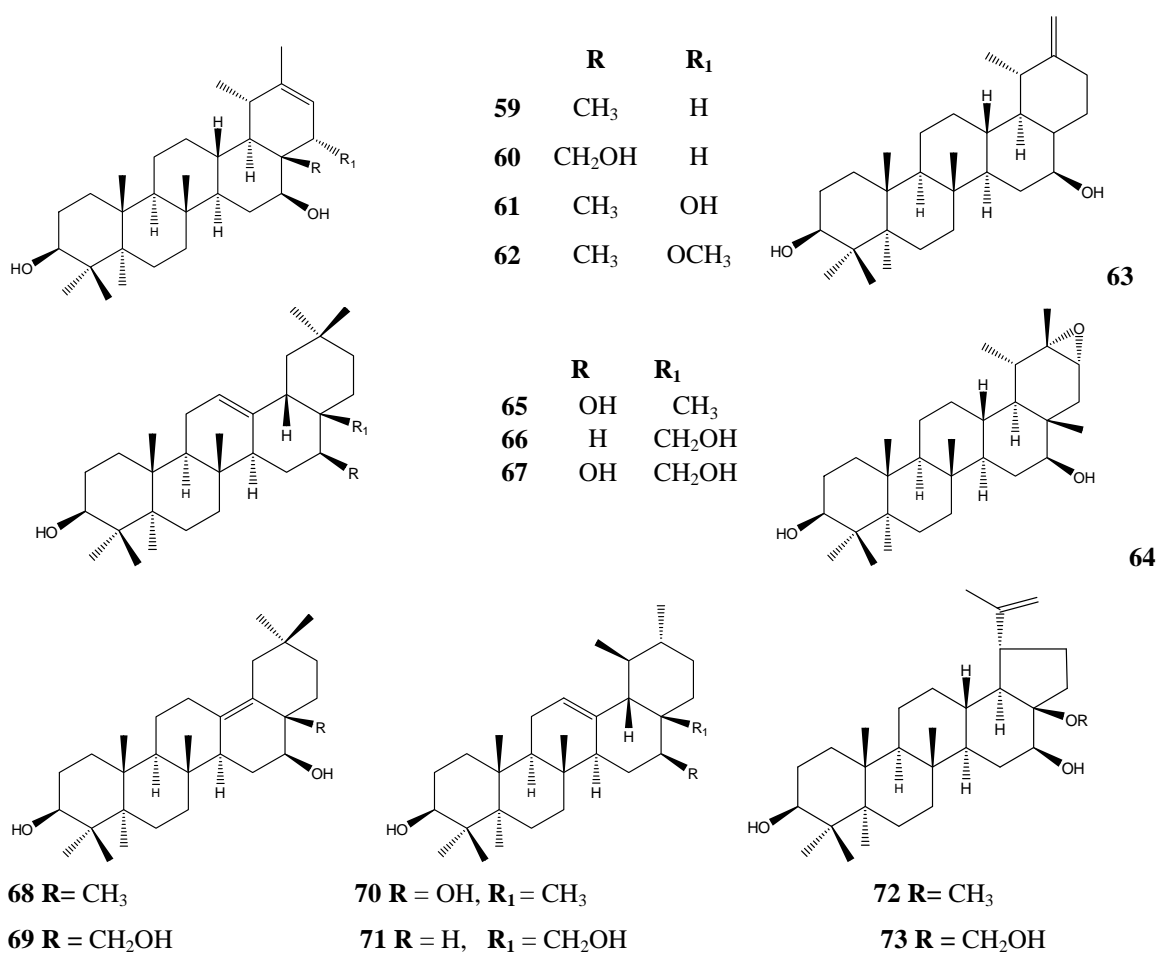
Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe de produits naturels très importants dans la famille des Astéracées. Ces molécules sont douées d'activités multiples : neurotoxique, anti-inflammatoire, antileucémique, antifongique, anti-tumorale [57, 58]. Les sesquiterpènes lactones présents dans le genre *Chrysanthemum* sont essentiellement des guaianolides et des germacranolides. L'étude phytochimique effectuée sur l'espèce *C. boreale* a abouti à l'isolement d'un nouveau guaianolide (figure 16). Il s'agit de : 8-Acetoxy-4,10-dihydroxy-2,11(13)-guaiadène-12,6-olide [48].



**Figure 16:** structure de guaianolide isolé de *C. boreale*.

### • Les triterpènes

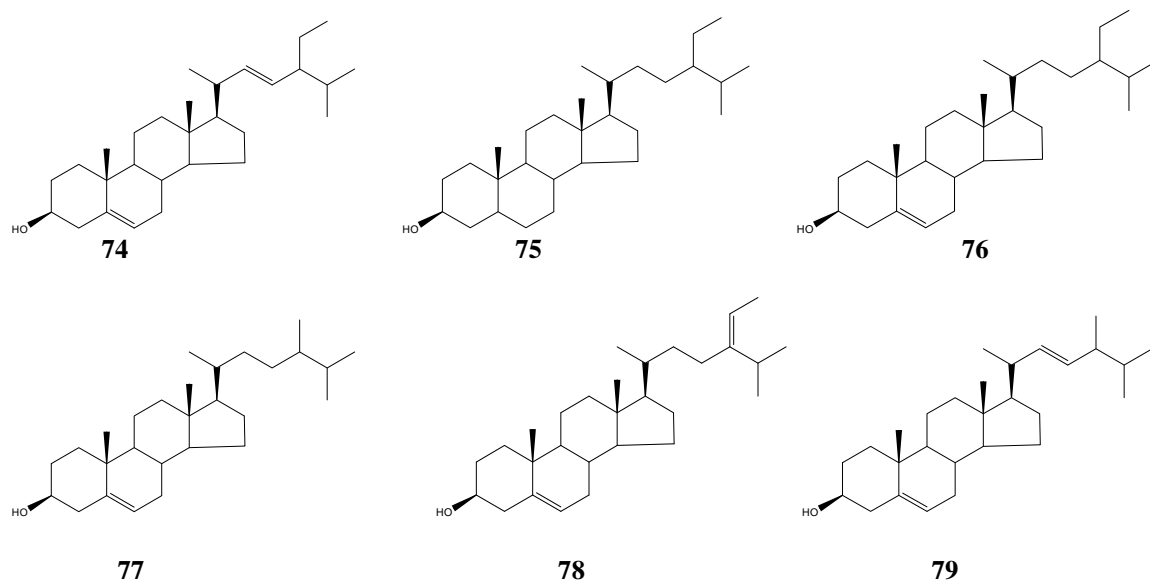
Les espèces du genre *Chrysanthemum* renferment des triterpénoïdes en particulier à squelette pentacyclique de type taraxastane, oleanane, ursane et lupane. A partir de l'extrait méthanolique des fleurs de l'espèce *C. morifolium* Ramat [54], 15 triterpènes pentacycliques ont été mis en évidence (figure 17). Il s'agit de: Faradiol (**59**), Heliantriol B (**60**), Héliantriol C (**61**), 22- $\alpha$ -Méthoxyfaradiol (**62**), Arnidiol (**63**), Faradiol- $\alpha$ -époxyde (**64**), Maniladiol (**65**), Erythrodiol (**66**), Ongispinogénin (**67**), Coflodiol (**68**), Héliantriol A1(**69**), Brein (**70**), Uvaol (**71**), Calenduladiol (**72**), Héiantriol B (**73**).



**Figure 17:** Structures chimiques des principaux triterpénoïdes identifiés dans l'espèce *C. morifolium* Ramat [54].

- **Les phytostérols**

Les phytostérols sont des molécules présentes chez la plupart des plantes supérieures. On peut citer le stigmastérol (74), le Stigmastanol (75), le  $\beta$ -sitostérol (76), le Campesterol (77), le Fucostérol (78) et l'Ergostérol (79) qui sont isolés du genre *Chrysanthemum* (figure 18) [59].



**Figure 18 :** Structures des stérols identifiés dans l'espèce *C. parthenium* [59].

A l'issue de cet inventaire des métabolites secondaires isolés du genre *Chrysanthemum*, il faut souligner la grande variété structurale (flavonoïdes, coumarines, sesquiterpènes et triterpènes acides phénoliques).



## *CHAPITRE II*

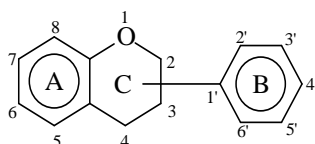
### *PRESENTATION DES FLAVONOIDES, DES TRITERPENOIDES ET DES SAPONOSIDES*

## II.1. Présentation des flavonoïdes

### II.1.1. Généralités

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes [60].

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure19).



**Figure 19 :** Structure de base des flavonoïdes.

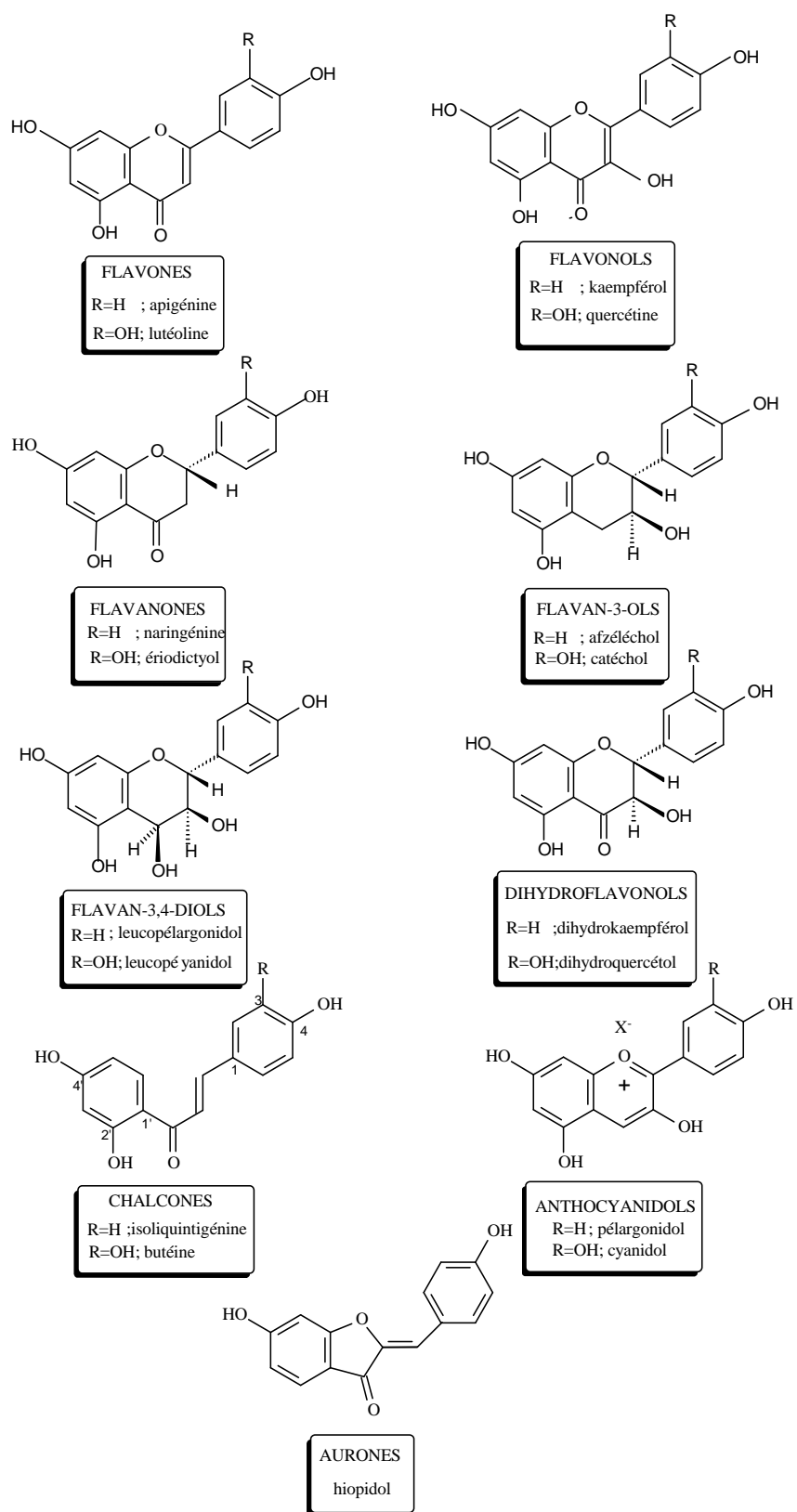
C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) [18].

### II.1.2. Classification

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (figure 20), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols [61].

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que

pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [18].



**Figure 20:** différentes classes de flavonoïdes

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le *D*-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le *D*-galactose et le *D*-mannose, ainsi que des pentoses, le *D*-xylose, le *L*-arabinose et le *D*-apiose sont fréquents avec le *L*-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide *D*-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate [62].

### **II.1.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes :**

Connus pour leurs multiples rôles, les composés flavoniques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins).

#### **Activité anti-oxydante des flavonoïdes :**

La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

- **Piégeage de radicaux**

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène [63].

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

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce

fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses [64]. De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardio-vasculaires.

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

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [63]. Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques ( $OH^{\bullet}$ ). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer [65].

- Les flavonoïdes possèdent en plus de leur pouvoir antioxydant des propriétés :

Oestrogénique (isoflavones), anti-hépatotoxique, antispasmodique, antidiarrhéique et anticancérogène et inhibitrice de la croissance des cellules tumorales *in vitro*. Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux [66].

## **II.2.Présentation des triterpènes et saponosides :**

### **II.2.1. Généralités**

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique).

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant [67]. Les chaînes oligosaccharidiques greffées sur l'aglycone sont soit linéaires, soit branchées et peuvent renfermer jusqu'à 11 monosaccharides.

La partie osidique est le plus souvent inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie. La partie sucre et l'aglycone sont normalement liées par une fonction éther ou ester.

### **II.2.2. Classification des saponosides :**

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit triterpéniques, soit stéroïdiques. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (liaison des sucres en C-3 ou en C-28 de l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques (liaison des sucres en C-3 et en C-28. Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dix dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques (quatre chaînes) [68].

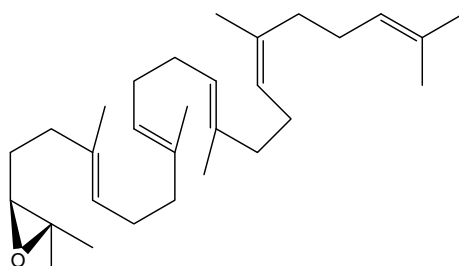
La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des géniens peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

### II.2.2.1. Les aglycones triterpéniques:

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

Les triterpènes sont une classe de métabolites secondaires composés de 30 atomes de carbones comportant habituellement cinq ou moins fréquemment quatre cycles.

Au niveau biosynthétique, les 200 différents squelettes connus jusqu'à ce jour et isolés de sources naturelles proviennent de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3-dihydro-squalène (figure 21) et quelquefois du squalène lui-même. Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3, étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. L'origine biosynthétique de ces triterpènes a été démontrée à l'aide d'expériences utilisant des groupements acétates doublement marqués au  $^{13}\text{C}$  ou par des réactions biomimétiques *in vitro* en milieu acide. Les modifications supplémentaires sur le squelette sont assez limitées. En effet, les hydroxylations, oléfinations, méthylations et lactonisations sont les réactions enzymatiques les plus courantes [18].

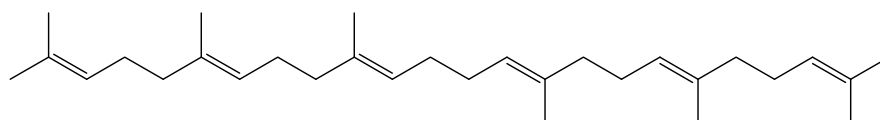


**Figure 21** : Structure du 2,3-époxydosqualène.

Les triterpènes peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique, pentacyclique [18].

- **Composés aliphatiques (acycliques) :**

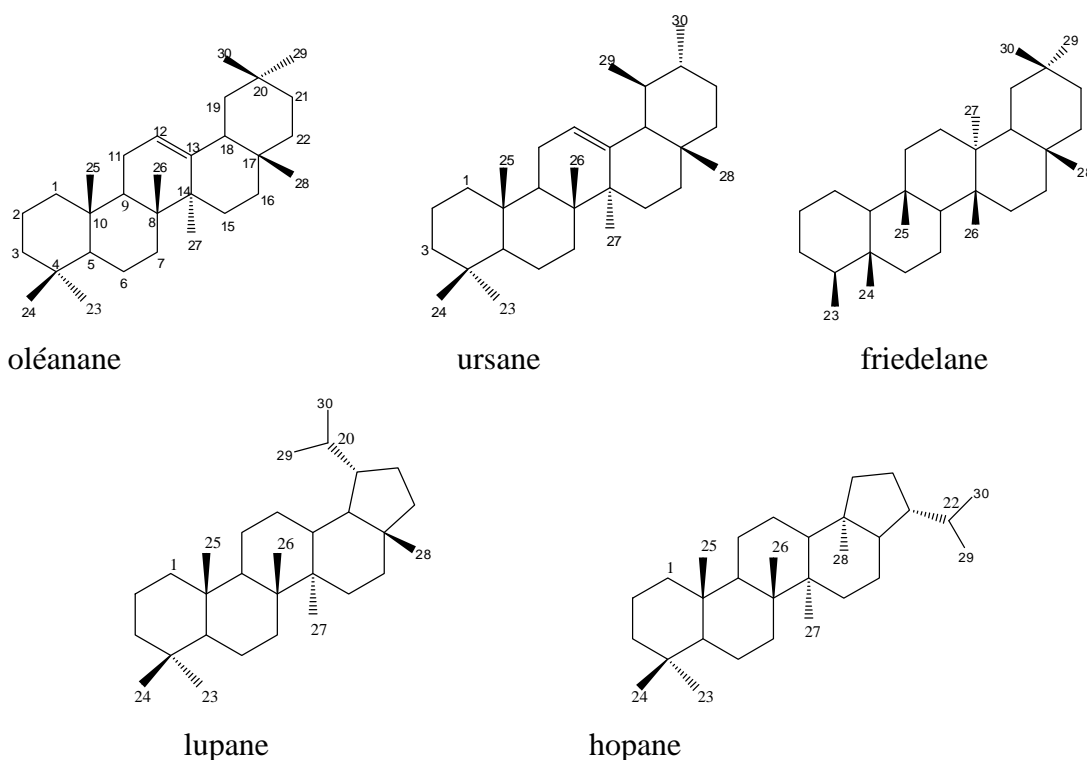
Tel que le squalène (figure 22), surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogénèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.



**Figure 22 :** Structure de squalène.

- **Composés pentacycliques :**

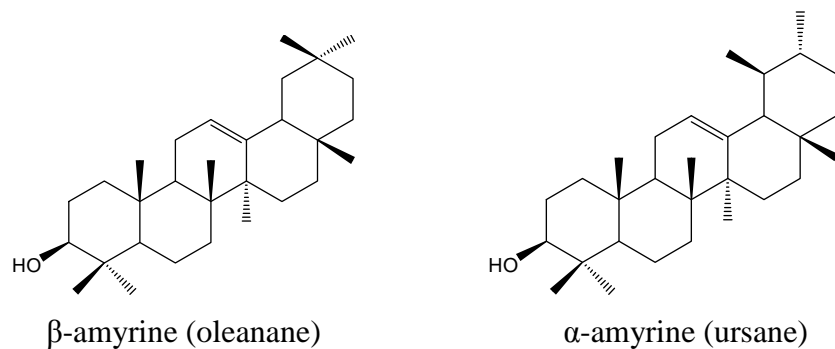
Les sapogénines pentacycliques sont issues des squelettes oléanane, ursane, lupane, friedelane et hopane (figure 23) [69].



**Figure 23:** Les différents squelettes pentacycliques triterpéniques rencontrés.

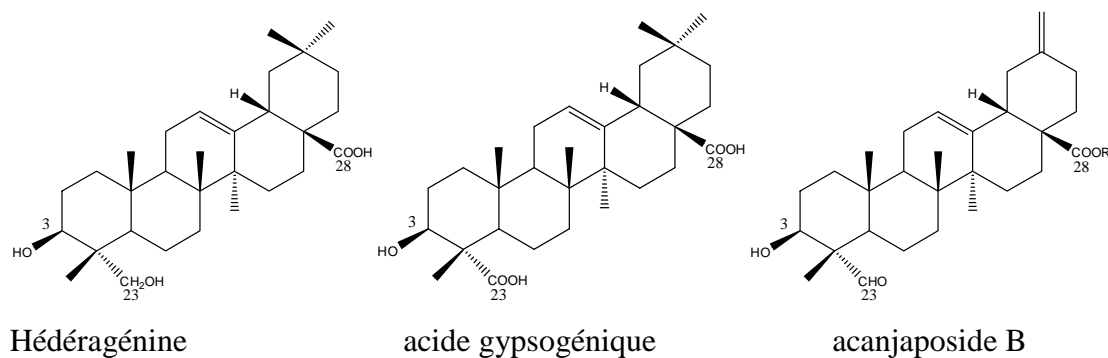
Ils sont le plus souvent hydroxylés en position 3. Les triterpènes libres très fréquents chez les plantes sont l' $\alpha$ - amyrine et la  $\beta$ - amyrine (figure 24).



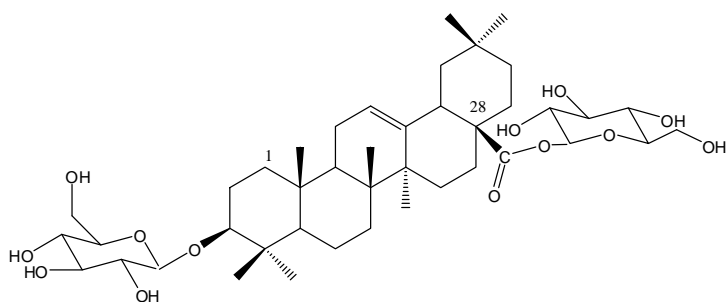


**Figure 24:** Triterpène pentacyclique.

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



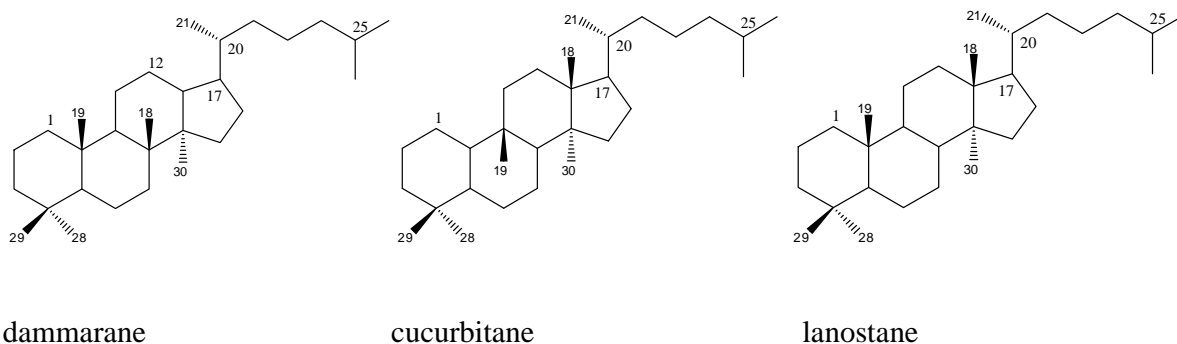
Les saponosides bidesmosidiques possèdent généralement leur seconde chaîne osidique sur l'acide carboxylique en C-28 (figure 25).



**Figure 25 :** 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléanolique -28-O-  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

## ▪ Composés tétracycliques :

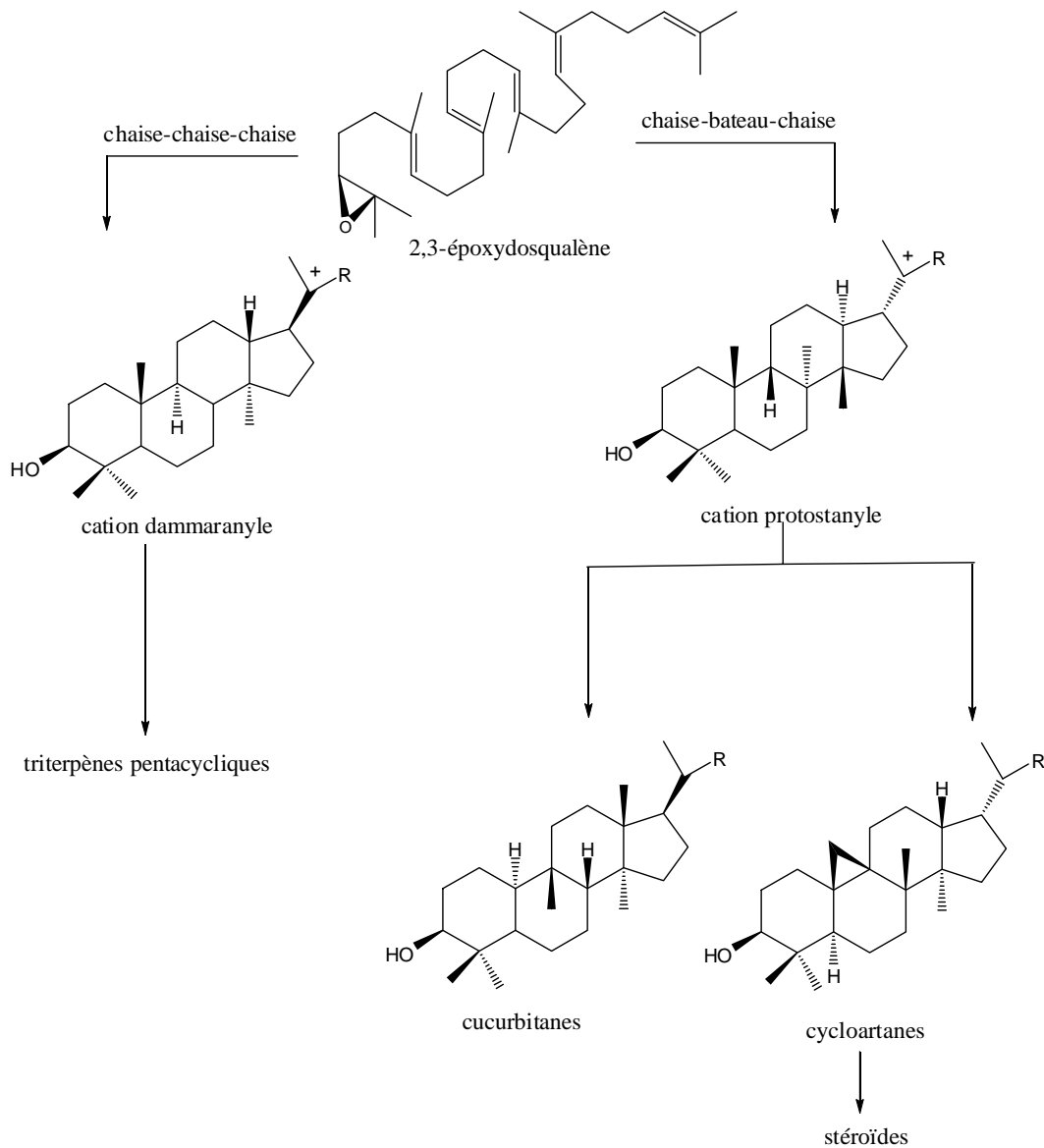
Les sapogénines tétracycliques dérivent de trois squelettes principaux : dammarane, cucurbitane et lanostane (figure 26).



**Figure 26 :** Les différents squelettes tétracycliques de saponosides rencontrés.

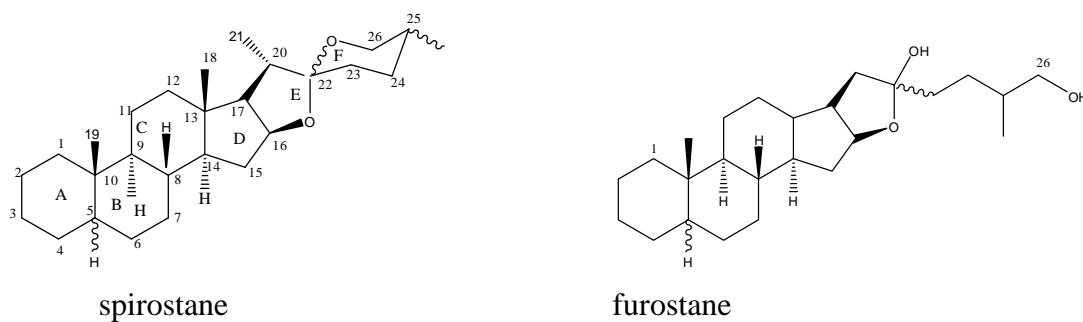
### II.2.2.2 Les aglycones stéroïdiques :

Les saponosides stéroïdiques sont présents chez les Monocotylédones [Liliaceae (asperge), Dioscoraceae (*Dioscorea villosa*),...] La structure chimique des génines stéroïdiques est similaire à celle de nombreuses hormones humaines. Elles possèdent un squelette à 27 atomes de carbone, issu de la cyclisation de l'époxysqualène qui adopte la conformation chaise-bateau-chaise, pour donner un cation protostanyle [70,71]. Ce dernier peut subir ultérieurement des réarrangements conduisant à la formation de stéroïdes (figure 27).



**Figure 27 :** Schéma de biogenèse des stéroïdes [70, 71].

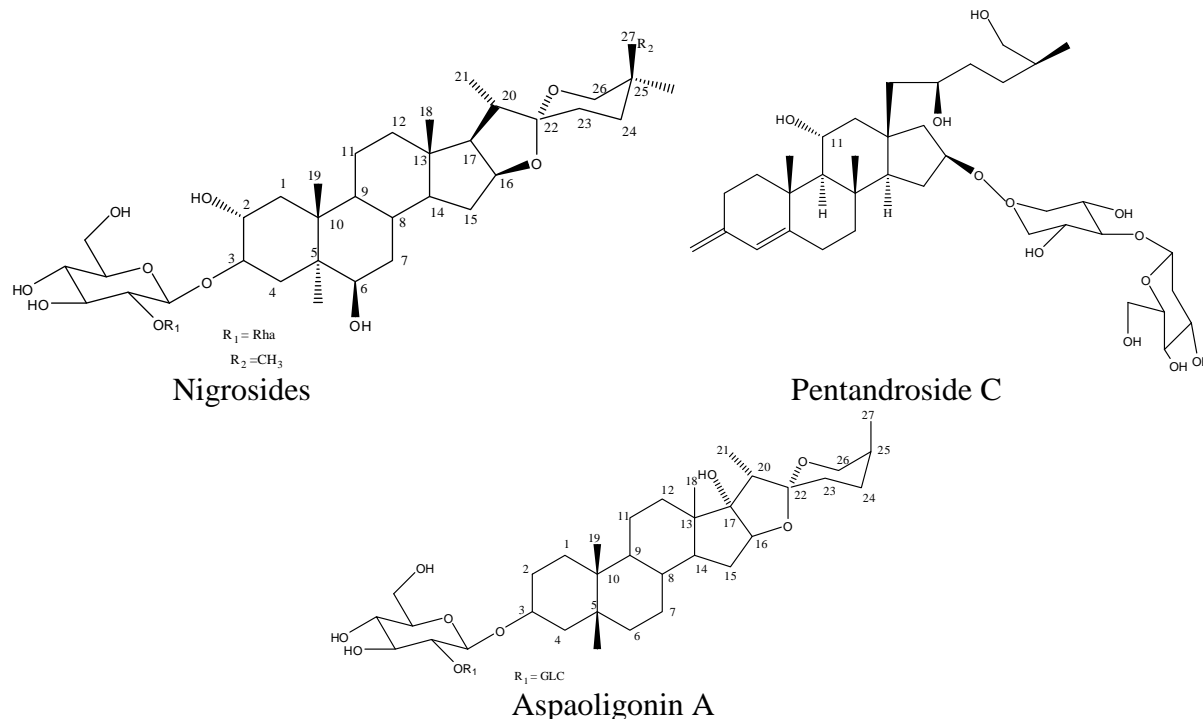
Deux principaux types existent, hexacyclique (spirostane) ou pentacyclique : (furostane) (figure 28) [18].



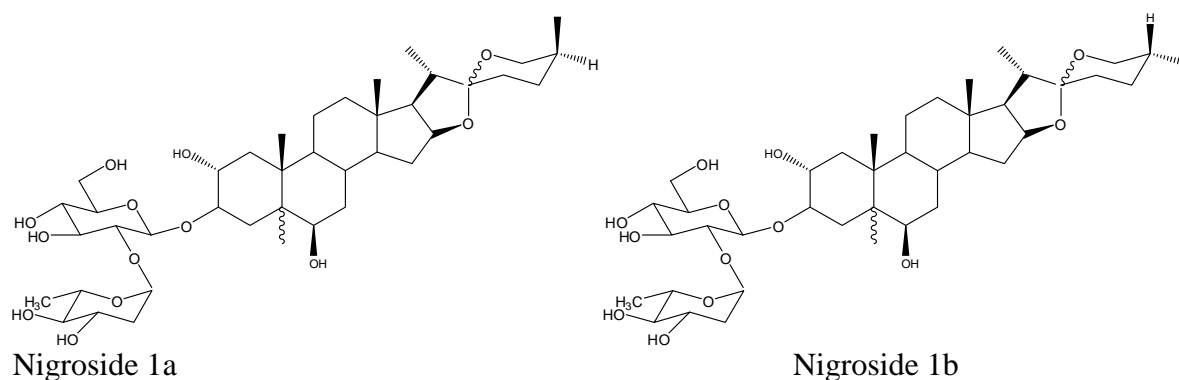
**Figure 28 :** Principaux squelettes stéroïdiques.

La chaîne osidique des saponosides stéroïdiques est généralement liée en position 3.

Les génines stéroïdiques possèdent généralement un hydroxyle en position 3. D'autres hydroxyles peuvent être présents sur ce squelette, en positions 2, 6 (nigroside), 11 (pentandroside C) [18, 69], et 17 (aspaoligonin A) ...etc.



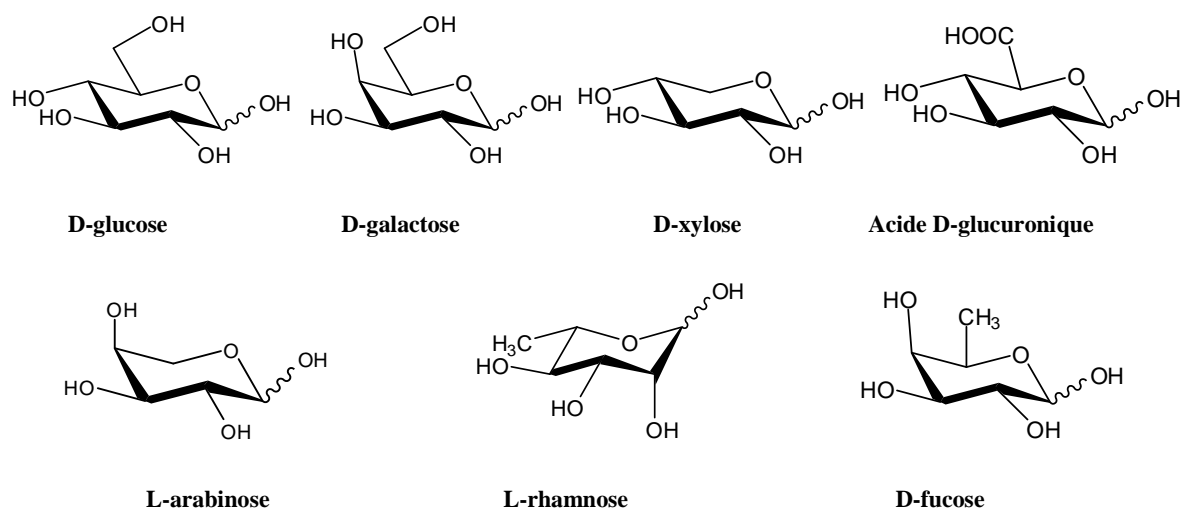
La configuration du carbone C-25 peut varier, donnant ainsi deux séries [18], celle des néosapogénines (nigroside 1a) et celle des isosapogénines (Nigroside 1b).



Pour les deux principaux squelettes, en l'absence de double liaison 5(6) la fusion des cycles A et B peut être *cis* ou *trans*.

### II.2.2.3 Les sucres :

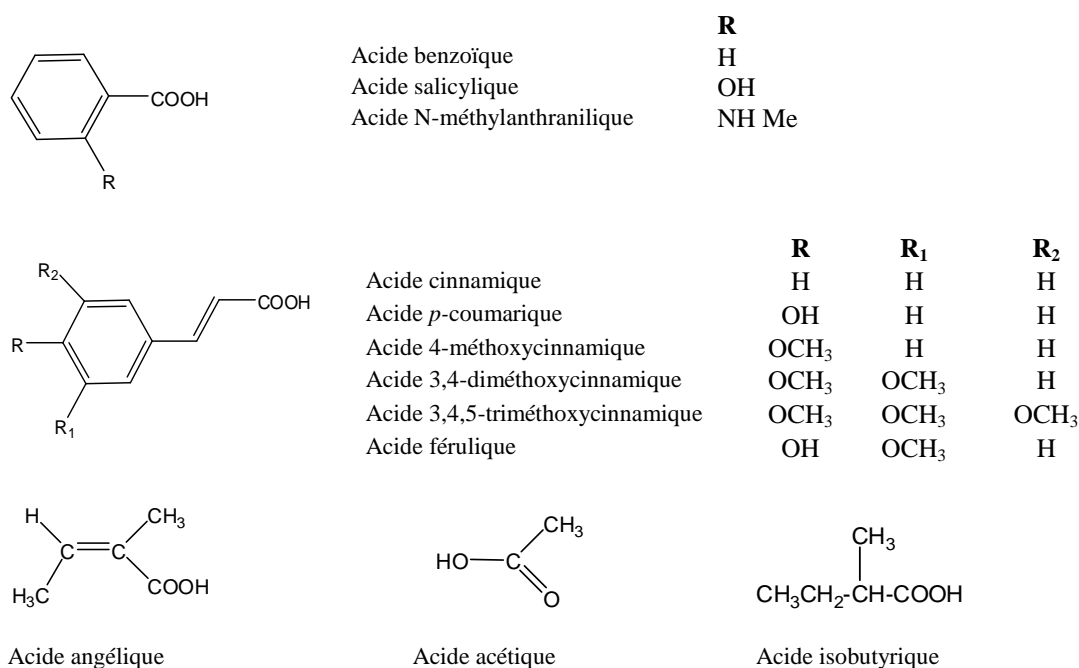
Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique (figure 29) sont les oses les plus fréquemment rencontrés dans la structure des saponosides.



**Figure 29** : les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides

### II.2.2.4 Les acides organiques :

Divers acides peuvent estérifier les saponosides au niveau de l'aglycone ou au niveau des sucres (figure 30). Ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés sont les suivants [69] :

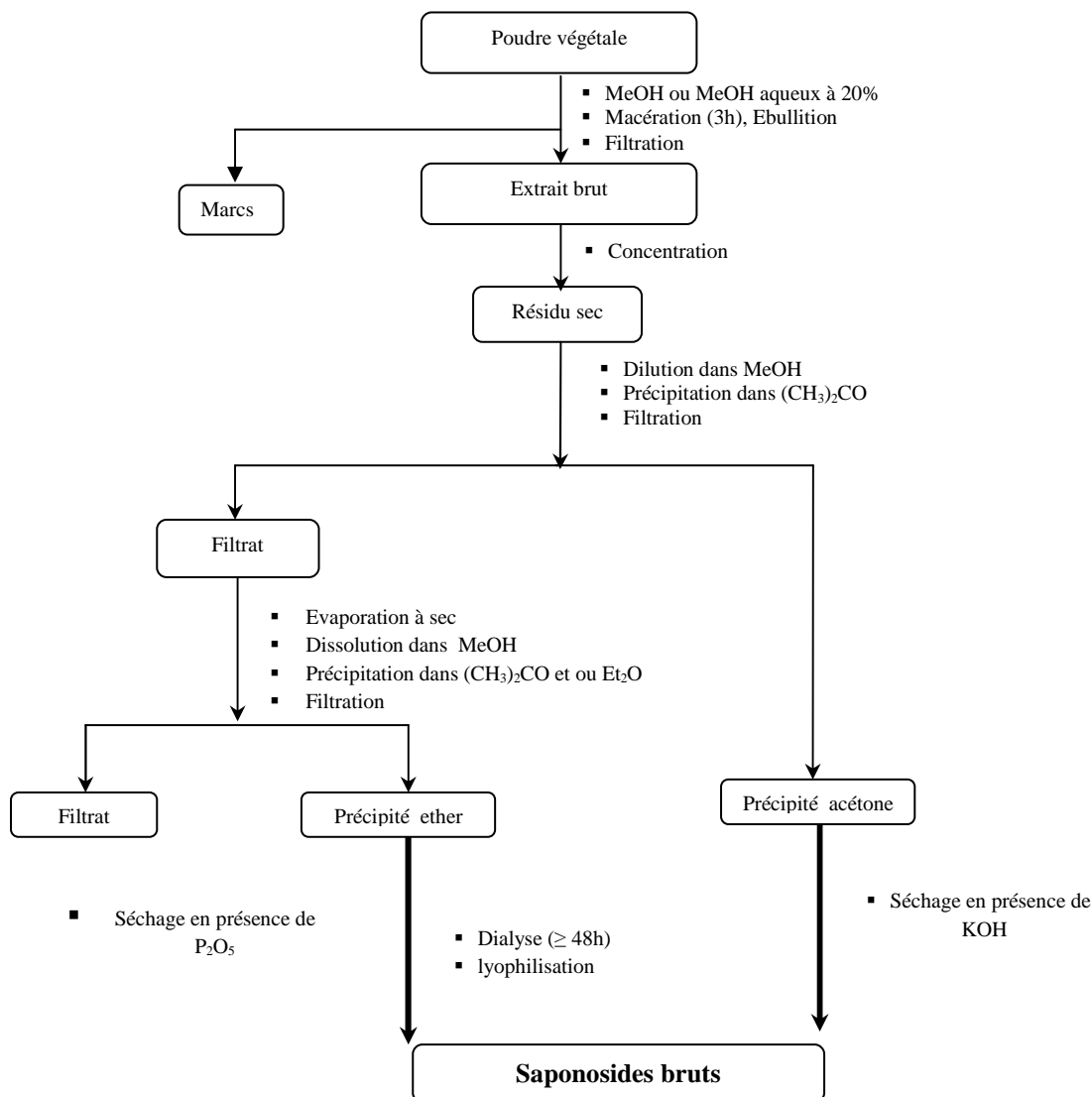


**Figure 30** : les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides.

### II.2.3. Extraction et purification des saponosides

Les saponosides sont des composés difficiles à séparer par les techniques classiques. Cependant, l'amélioration des méthodes de purification, notamment la chromatographie

liquide sur colonne ainsi que l'amélioration des supports de séparation ces dernières années permettent d'obtenir d'excellents résultats. La figure 31 montre un schéma général d'extraction des saponosides.



**Figure 31** : Schéma général d'extraction des saponosides [72-75].

Une fois le totum brut obtenu, la purification finale des saponosides, pour conduire à des échantillons analysables par les méthodes spectroscopiques, est réalisée à l'aide de différentes techniques chromatographiques, en phase normale sur gel de silice ou en phase inverse sur silice greffée: chromatographie liquide sous vide (VLC), chromatographie liquide à pression atmosphérique (CC), chromatographie sur plaque préparative (CPP), flash chromatographie, chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) et chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Les solvants sont variés et mettent en jeu la plupart du temps des mélanges

de chloroforme – méthanol – eau sur silice et des mélanges méthanol – eau sur silice en phase inverse.

#### **II.2.4. Détermination structurale**

Elle est basée sur la combinaison des techniques spectroscopiques de RMN mono- et bidimensionnelle et spectrométrie de masse.

##### **II.2.4.1 Spectroscopie de RMN**

Les RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont actuellement les méthodes les plus efficaces dans l'étude structurale des saponosides. Leur intérêt s'est accru grâce aux progrès techniques permettant l'enregistrement des spectres à haut champ et l'élaboration de séquences impulsionnelles mono ou bidimensionnelles. Elles apportent des informations sur tous les éléments structuraux : la nature de l'aglycone, la nature des sucres, les liaisons hétérosidiques ainsi que la configuration des sucres [76].

##### **RMN monodimensionnelle :**

- **RMN  $^1\text{H}$  :**

Avec la RMN  $^1\text{H}$ , les informations sont apportées, non seulement, par les déplacements chimiques mais aussi par la multiplicité des signaux et les constantes de couplage. Cette technique est particulièrement précieuse pour la détermination de la configuration des sucres. La difficulté majeure réside dans la détermination des chaînes osidiques. En effet, les signaux relatifs aux sucres sont situés dans un intervalle restreint entre 3 ppm et 6 ppm [76]. Pour des saponosides possédant plusieurs sucres, l'utilisation d'une séquence multiimpulsionnelle peut pallier aux limites imposées par le spectre monodimensionnel.

- **RMN  $^{13}\text{C}$**

Il s'agit aussi de la méthode la plus utilisée dans l'étude structurale des saponosides. Elle est particulièrement précieuse pour la détermination des liaisons interglycosidiques, la configuration et la conformation des sucres. Ces éléments sont obtenus grâce aux spectres

totale­ment découplés et à la séquence monodimensionnelle DEPT qui précise sans équivoque le nombre de CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> [77, 78].

## **RMN à deux dimensions**

Les séquences multi-impulsionnelles aboutissent à l'obtention de figures de corrélation qui favorisent une interprétation sans équivoque des spectres monodimensionnels et qui permettent l'établissement de la séquence de la chaîne osidique et de la position des liaisons hétérosidiques [78]. Parmi ces procédés, nous distinguons : Les couplages <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H (2D) (HMBC et HSQC) et les couplages <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H (2D) (COSY, TOCSY, ROESY et NOESY). Nous illustrons à titre d'exemples les différentes expériences de RMN bidimensionnelle utilisées.

### **RMN bidimensionnelle homonucléaire**

- **COSY (CORrelated SpectroscopY)**

L'expérience COSY homonucléaire <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H est la plus simple et la plus utilisée des expériences bidimensionnelles. Cette expérience permet donc de mettre en évidence les couplages (<sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> et <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>) et de les distinguer d'après l'orientation des taches de corrélation vis-à-vis de la diagonale. L'expérience COSY n'apporte aucune information sur l'enchaînement des sucres et leur position sur la génine [79, 80].

- **HOHAHA ou TOCSY (TTotal Correlation SpectroscopY)**

Cette expérience permet de mettre en évidence les couplages <sup>5</sup>J [81] et de relier tous les protons couplés mutuellement dans un même système de spins. Elle permet aussi de s'assurer des corrélations des protons établies par COSY. De façon pratique, pour un sucre, il suffit de pouvoir observer le proton anomérique pour identifier les autres protons de cette unité osidique. Comme dans le cas de l'expérience COSY, la TOCSY n'apporte aucune information sur l'enchaînement des sucres et leur position sur l'aglycone.

- **ROESY (ROtational Overhauser Enhancement SpectroscopY) ou CAMELSPIN**



L'expérience ROESY consiste à observer des effets Overhauser dans le référentiel tournant, c'est-à-dire les couplages des protons à travers l'espace, ce qui permet l'établissement précis d'une séquence hétérosidique en visualisant le couplage entre les protons osidiques impliqués dans la liaison. Elle apporte également la confirmation de certaines attributions de résonance et de configuration des sucres [80]. Les spectres ROESY permettent donc de trouver la proximité spatiale de certaines parties de la molécule et, par conséquent, d'en déduire des informations sur sa structure tridimensionnelle.

- **NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)**

L'expérience NOESY mesure également les effets Overhauser et apporte les mêmes informations que la ROESY, avec comme seule différence que la NOESY est utilisée pour des molécules de haut poids moléculaire telles que des protéines ou pour des petites molécules comme les flavonoïdes [79].

#### **RMN bidimensionnelle hétéronucléaire**

- **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)**

L'expérience HSQC permet de mettre en évidence le couplage  $^1J$   $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  et d'attribuer sans ambiguïté à partir du spectre proton la majorité des carbones protonés du saponoside et des unités osidiques.

- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)**

L'expérience HMBC permet de mettre en évidence le couplage hétéronucléaires  $^2J$  et  $^3J$   $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  [82]. Cette technique complète très bien l'expérience COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule. Elle permet en outre l'attribution des carbones quaternaires de la génine.

#### **II.2.4.2. Spectrométrie de masse**

C'est une technique très répandue dans les domaines nécessitant une détermination structurale. La spectrométrie de masse permet de donner des informations telles que le poids

moléculaire du composé ainsi que des informations sur la fragmentation de molécules. Les progrès de la spectrométrie de masse ont été extrêmement rapides durant la dernière décennie : production, séparation et détection d'ions, acquisition et réduction des données résultantes ont conduit au développement d'instruments entièrement nouveaux [83].

### **II.2.5. Propriétés biologiques des triterpènes :**

Les triterpènes, composés largement répandus dans la nature, sont principalement connus pour être des principes actifs de plantes jouissant d'un usage non négligeable en phytothérapie. On citera pour cela :

- **La bétuline**

L'étude de l'activité d'un extrait méthanolique des rhizomes de *Nelumbo nucifera*, ainsi que de la bétuline et de l'acide bétulinique a montré une inhibition marquée de l'oedème induit par la carragénine et de la sérotonine qui était comparable à celle des agents anti-inflammatoires le phénylbutazone et le dexaméthasone. Les auteurs de cette étude ont conclu que les dérivés lupanes ont une affinité pour les récepteurs corticoïdes [84]. Ce mécanisme d'action a été confirmé par une autre étude sur quatre triterpènes isolés de la *Diospyrosleucomelas* : bétuline, acide bétulinique [85], acide ursolique et oléanolique [86].

- **L'uvaol**

On le trouve dans plusieurs espèces en particulier dans l'olivier où il a été isolé avec l'acide oléanolique. L'uvaol administré à une dose de 40 mg/kg confère une activité anti-dysrythmique significative sur l'ischémie et la reperfusion arythmique.

Sur la base des effets vaso-dépresseur, cardiotonique et antidysrythmique de ces composés, il a été conclu que l'acide oléanolique et l'uvaol des feuilles de l'olivier africain peuvent offrir des traitements contre l'hypertension et les déficiences cardiaques à des prix abordables [87].

- **Le lupéol**

Le lupéol a une très faible toxicité, l'administration d'une dose de lupéol de 2g/kg à des rats et souris ne produit pas d'effet indésirable et ne provoque aucune mortalité après 96h d'observations. Il a une activité anti-inflammatoire dans le cas d'inflammations chroniques

aigües chez les rats et les souris [88]. Une action anti-inflammatoire remarquable a été observée sur un modèle d'arthrite chronique où l'effet était comparable à celui de l'acide acétylsalicylique à une dose de 100mg/kg.

Une étude récente [89] a démontré l'effet modulateur du lupéol sur les altérations de la prolifération cellulaire induite par le diméthylbenzanthracène (DMBA) chez des souris albinos. Le traitement au lupéol a montré un effet préventif significatif ( $p < 0.01$ ) et un potentiel anti prolifératif et apoptotique ce qui est très prometteur pour la lutte contre le cancer de la peau.

Toutefois, une autre étude a identifié le lupéol comme composé actif des feuilles de *Dendropanax cf. querceti*. Les résultats indiquent une activité anticancéreuse *in vitro* sur le carcinome hépatocellulaire humain (Hep-G2,  $IC_{50} = 77 \mu M$ ) [90].

Aratanechemuge a démontré que le lupéol pouvait induire l'apoptose des cellules leucémiques humaines (HL-60). Des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose ont été observés lorsque ces cellules étaient traitées avec le lupéol.

- **Les amyrines**

Des études ont prouvé l'activité anti-inflammatoire et gastro-protectrice chez les rats et les souris. Une autre étude a montré l'effet protecteur de l' $\alpha$  et  $\beta$ -amyrine contre les lésions hépatiques provoquées par le paracétamol chez la souris [91]. L'effet analgésiant des  $\alpha$  et  $\beta$ -amyrines est la résultante de la participation des kinases A et C [92]. On rajoute à cet effet un effet anxiolytique et antidépresseur [93].

## **II.2.6. Propriétés biologiques des saponosides :**

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique [94]. En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles que: activités expectorante, anti-inflammatoire, anti-tumorale, chimiopréventive, antidiabétique, analgésique ainsi que des effets hépatoprotecteurs, neuroprotecteurs, antituberculeux [95] ou encore inhibiteurs de l'aggrégation plaquettaire [96].

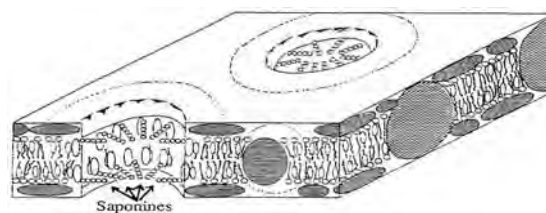
Le nombre d'effets biologiques attribués aux saponosides ne fait qu'accroître d'année en année. Cependant, certaines propriétés mises en évidence dans le cas de certains saponosides, comme des propriétés immuno-adjuvante, immunostimulante ou anti-cancéreuse [67,69, 97] attirent particulièrement l'attention. En particulier, nous pouvons citer le cas des saponosides ayant des propriétés immuno-adjuvantes rencontrées chez *Quillaja saponaria*. L'adjuvant est une substance ou un mélange de substances qui augmentent l'immunogénicité des antigènes. Ces molécules immuno-adjuvantes pourraient alors être utilisées dans la formulation de nouveaux vaccins.

Nous limiterons donc notre étude bibliographique aux propriétés principales c'est-à-dire le pouvoir hémolytique, cytotoxique et immunomodulateur.

### ➤ **Activité Hémolytique :**

Depuis longtemps, les saponines sont reconnues pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes) [98]. Cette propriété a amené la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection des saponines dans les extraits de plantes [99]. Toutefois, la forte activité hémolytique de la plupart des saponines a freiné considérablement leur développement clinique en raison de leur toxicité potentielle lors de traitements donnés sous la forme d'injections intraveineuses. Le mécanisme exact par lequel les saponines entraînent la rupture de la membrane des érythrocytes n'est pas encore parfaitement établi [94].

De par leurs structures chimiques très variées, tous les saponosides ne semblent pas posséder le même mécanisme d'actions. Certains auteurs ont posé l'hypothèse selon laquelle les saponines interagissent avec la couche lipidique des membranes cellulaires [100] pour former des complexes insolubles avec le cholestérol (figure 32) menant à la perméabilisation des cellules et à la perte subséquente de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire.



**Figure 32 :** Représentation du réarrangement supposé des constituants membranaires. La chaîne osidique des saponosides étant située vers l'intérieur du port et la partie génine associée avec le cholestérol membranaire [100].

Pour démontrer ce phénomène des études ont été réalisées avec d'autres membranes comme celles de liposomes. Elles ont montrés que certains saponosides (Saikosaponosides) sont capables d'induire des changements de perméabilité uniquement avec des liposomes contenant du cholestérol. Le cholestérol et plus largement les stérols, seraient donc le site principal d'adsorption des saponosides. En revanche, une étude a mis en évidence un mécanisme différent dans lequel l'hémolyse des globules rouges serait causée par l'interaction des saponines avec l'aquaporine CHIP28 (protéine de transport de l'eau) des membranes érythrocytaires, altérant ce pore et permettant le passage de molécules plus grosses que l'eau. Dans ces conditions, l'osmolarité des ions sodium et chlorure n'est plus la même et la pression osmotique colloïdale fait gonfler la cellule qui se lyse [101].

D'après des études variées, le phénomène d'hémolyse passerait donc par :

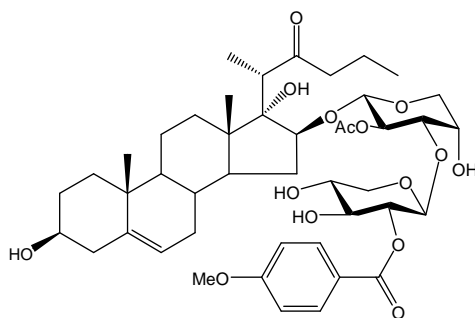
- une adsorption très rapide du saponoside sur la membrane érythrocytaire : cette adsorption se ferait par complexation du saponoside avec les stérols membranaires.
- une organisation du complexe stérol/saponoside en "micelle" aboutissant à la formation de puits et/ou de trous transmembranaires.
- le complexe micellaire favoriserait le passage des ions et/ou de molécules du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, aboutissant à la rupture de la membrane cellulaire.

Ce mécanisme par complexation aux stérols membranaires n'est vraisemblablement pas unique et certains saponosides doivent aussi être adsorbés sur la membrane par l'intermédiaire des lipides ou posséder des interactions spécifiques avec des protéines membranaires telles que l'inhibition de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase favorisant l'hémolyse.

#### ➤ **Activités Cytotoxique et Antitumorale :**

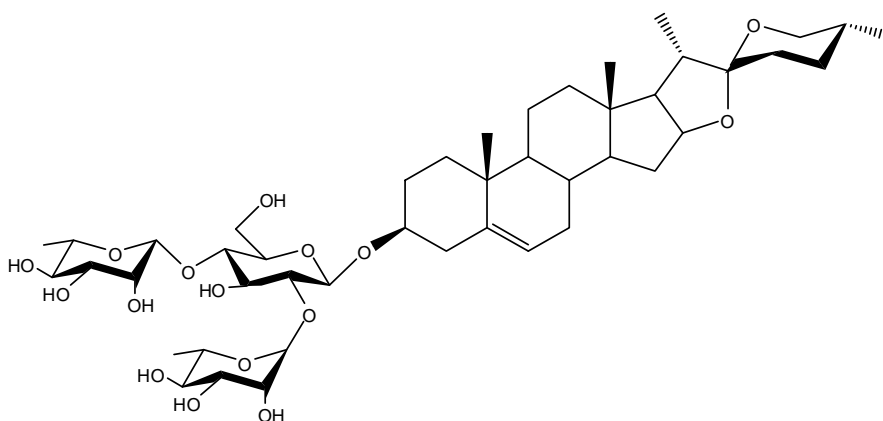
De nombreuses saponines possèdent une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 ng/ml à 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire [67]. OSW-1 ou  $3\beta,16\beta,17\alpha$ -trihydroxycholest-5-en-22-one-16-*O*-[(2-*O*-(4-méthoxybenzoyl)- $\beta$ -*D*-xylopyranosyl)-(1→3)-2-*O*-acétyl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside] (figure 33), un cholestane acétylé isolé de *Ornithogalum saundersiae*, est l'une des saponines stéroïdiques les plus cytotoxiques connues jusqu'à ce jour Son  $\text{IC}_{50}$  inférieure à 1 nM en fait un agent anticancéreux environ 10 à 100 fois plus puissant que ceux actuellement utilisés en phase clinique comme le taxol, la camptothécine et la mitomycine C. Des études ont montré que les

effets cytotoxiques d'OSW-1 pouvaient être causés par une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses. De surcroît, cette saponine n'a exercé qu'une faible toxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires saines humaines [102].



**Figure 33** : la structure d'OSW-1

Une autre saponine stéroïdique, la dioscine (figure 34), a attiré l'attention des chercheurs. Cette saponine isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce un vaste spectre d'activités biologiques (antitumorale, antivirale, antifongique et antiinflammatoire) [103]. La structure de la section osidique (chacotriose) de cette saponine est très particulière. Elle consiste en une section D-glucose substituée aux positions O-2' et O-4' par des sucres de type L-rhamnose. Une étude a mis en évidence que les fonctions hydroxyles aux positions 6 et 8 du L-rhamnose en H-4' représentent les groupements polaires clés responsables de l'activité antitumorale de la dioscine [104]. Le potentiel cytotoxique de la dioscine et ces dérivés s'est révélé être en lien direct avec leur capacité à diffuser à l'intérieur des cellules cancéreuses. Il est très intéressant de noter qu'aucune interaction prolongée avec la membrane lipidique n'a été montrée lors de cette étude.



**Figure 34** : la structure de la dioscine

Au niveau des saponines avec génine triterpénique, la Virgaureasaponine E a exercé une activité anticancéreuse *in vivo* significative sur des souris porteuses d'un fibrosarcome. Dans cette expérience, la réduction de la taille de la tumeur était proportionnelle à la dose de saponine administrée d'une manière intrapéritonéale trois fois par semaines pendant 30 jours. Les résultats les plus probants ont montré une inhibition significative de 60 % de la croissance de la tumeur à une concentration de 0,1 mg/kg. Cet effet pourrait être d  à une activité immunostimulante telle que l'envoi du *Tumor Necrosis Factor a* ou TNF-a [105].

#### ➤ **Activité immunomodulatrice**

Actuellement, de nombreux nouveaux vaccins sont en cours de développement parallèlement à l'amélioration des vaccins déjà existants en vue de diminuer le nombre d'injections ainsi que les doses injectées. Il est donc nécessaire d'effectuer des recherches en vue de découvrir de nouvelles molécules qui auront un pouvoir immunostimulant plus important que leurs prédécesseurs. Parmi ces nouvelles molécules, les saponosides semblent être promis à un bel avenir. Nous citerons ici un rappel bibliographique sur les saponosides immunostimulants découverts [106].

Certains saponosides ont montré une activité immunostimulante sur divers types cellulaires. Ainsi, des auteurs ont mis en évidence le rôle immunostimulant *in vitro* des saponosides isolés de *Randia dumetorum*, qui augmente la prolifération *in vitro* de lymphocytes humains.

L'extrait brut de saponosides de *Q. saponaria*, la Quillayanine, Quil-A et l'acide glycyrrhizique ont tous montré la capacité à stimuler la prolifération des splénocytes de souris. Un effet sélectif a été mis en évidence sur les deux types cellulaires, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les saponosides isolés à partir des racines d'*Acanthophyllum squarrosum* ont montré un rôle immunomodulateur *in vitro* [107] et lymphoprolifératif sur cellules leucémiques humaines [108].

## *CHAPITRE III*

*INVESTIGATION CHIMIQUE ET  
BIOLOGIQUE DE *Genista ulicina* Spach.*



### III.1.Rappels botaniques

D'après Quezel et Santa (1963) [1], *Genista ulicina* Spach est une plante endémique, très épineuse à port herbacé, très ramifié, de 10 à 15 divisions au moins sur la tige principale. Ses feuilles sont unifoliolées et les épines sont grêles. L'inflorescence en grappes florifères est située à l'extrémité des rameaux feuillés, à fleurs orangées, assez grandes. Elle présente également des gousses laineuses, rostrées, à bec ascendant, noir foncé.



Figure 35 : Espèce *Genista ulicina* Spach.

### III. 2. Utilisation en médecine traditionnelle

On ne connaît pas d'usage en médecine traditionnelle de *Genista ulicina* Spach.

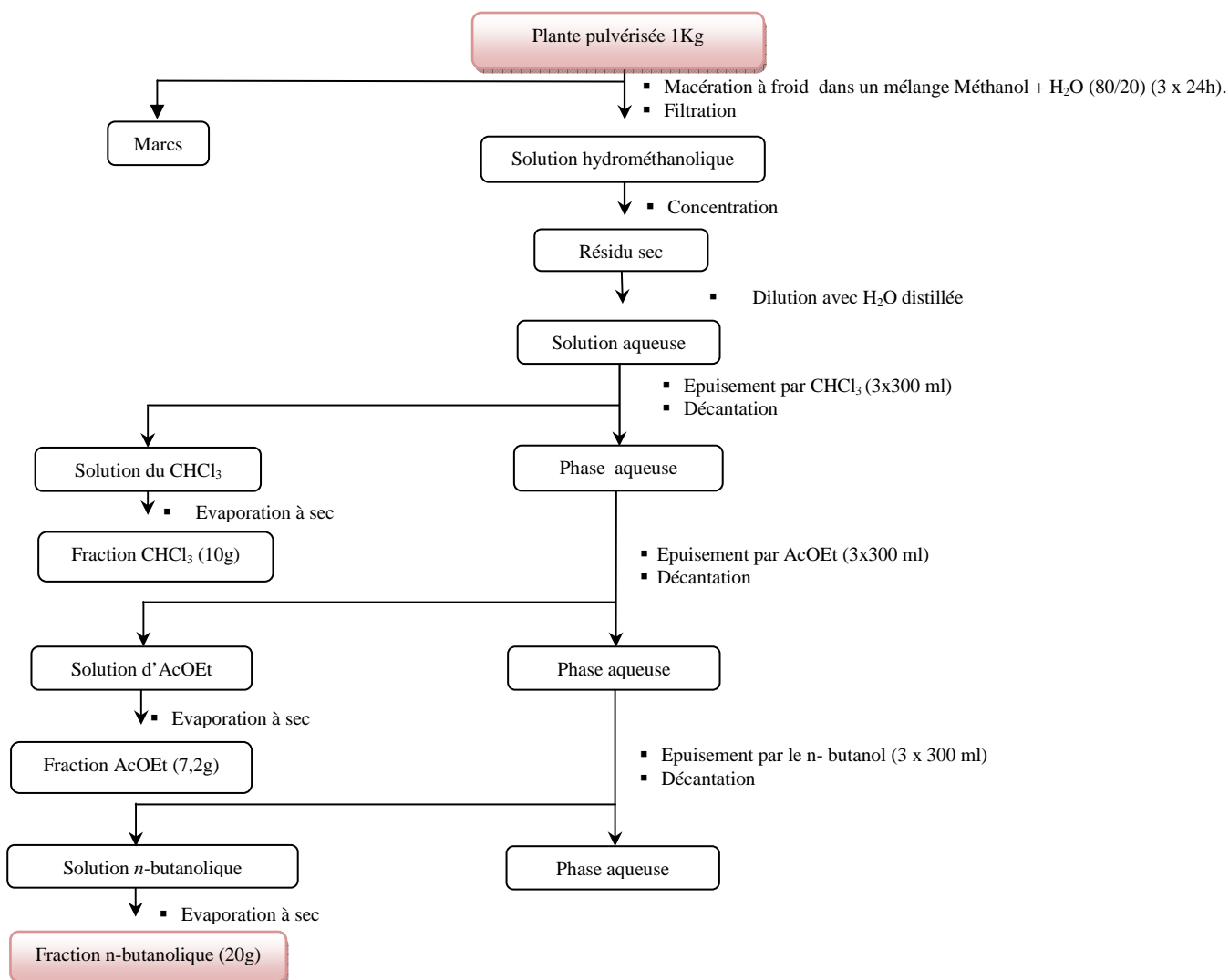
### III. 3.Travaux antérieurs sur l'espèce *Genista ulicina*

*Genista ulicina* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique, à notre connaissance. Les travaux présentés ici ont consisté en l'isolement et l'identification de vingt composés à partir des parties aériennes de *G. ulicina* Spach.

### III.4. Chimie extractive

#### III.4.1. Extraction

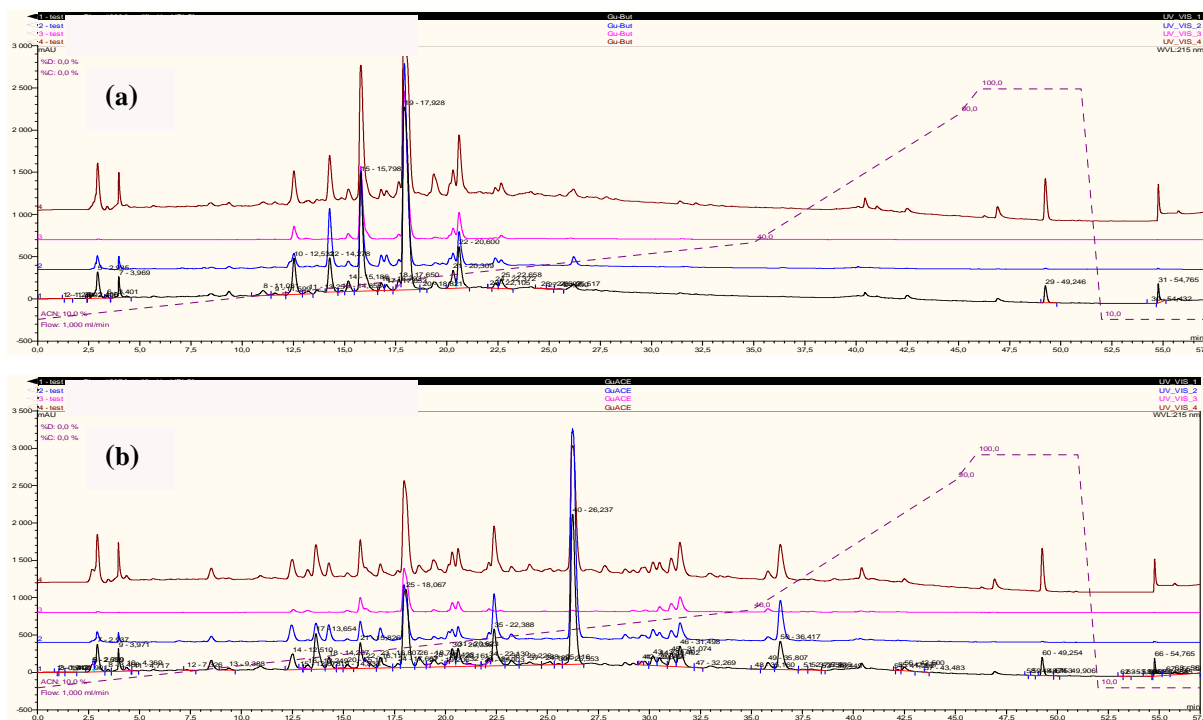
Les parties aériennes (1 kg) déséchées ont été macérées à température ambiante par un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V), puis fractionnées par extraction liquide/liquide successives au chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol, selon la figure 36.



**Figure 36** : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Genista ulicina*.

#### III.4.2. Purification

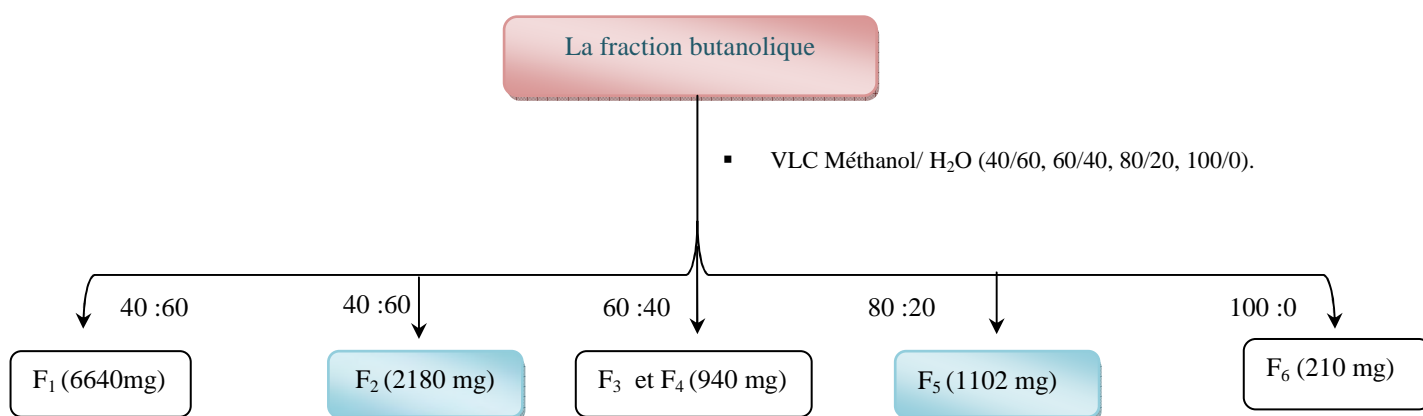
Chaque extrait a été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique (figure 37) afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier.



**Figure 37 :** Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 40% à 90% MeCN/H<sub>2</sub>O) de la fraction butanolique (a) et la fraction acétate éthylique (b) des parties aériennes de *G. ulicina*.

Notre choix s'est porté sur l'extrait butanolique, riche en saponosides et flavonoïdes.

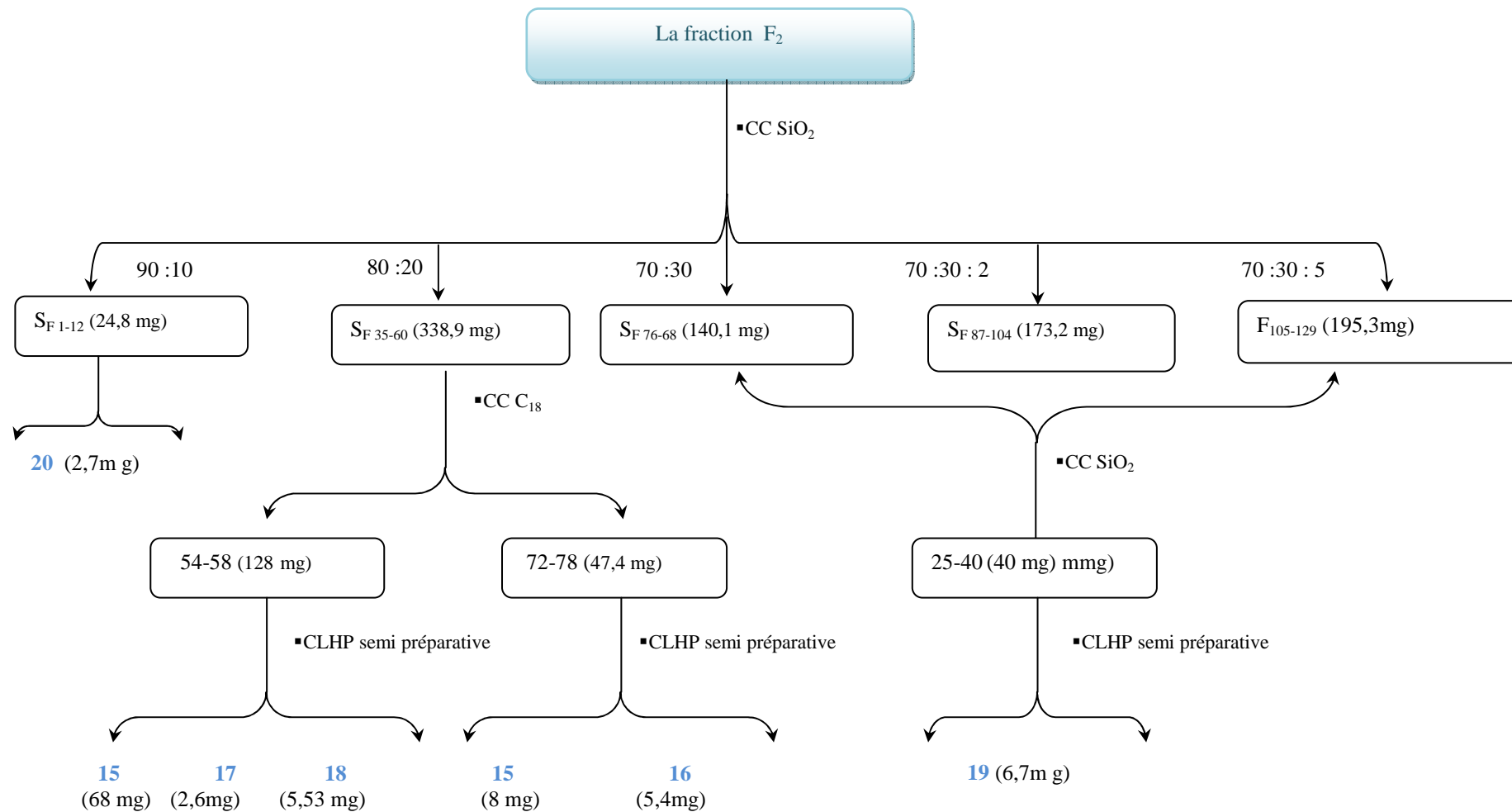
Un premier fractionnement de l'extrait butanolique (12 g) a été réalisé par l'utilisation de la chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice greffée C<sub>18</sub>, avec le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (60/40, 40/60, 20/80, 0/100), pour donner 6 fractions (figure 38).



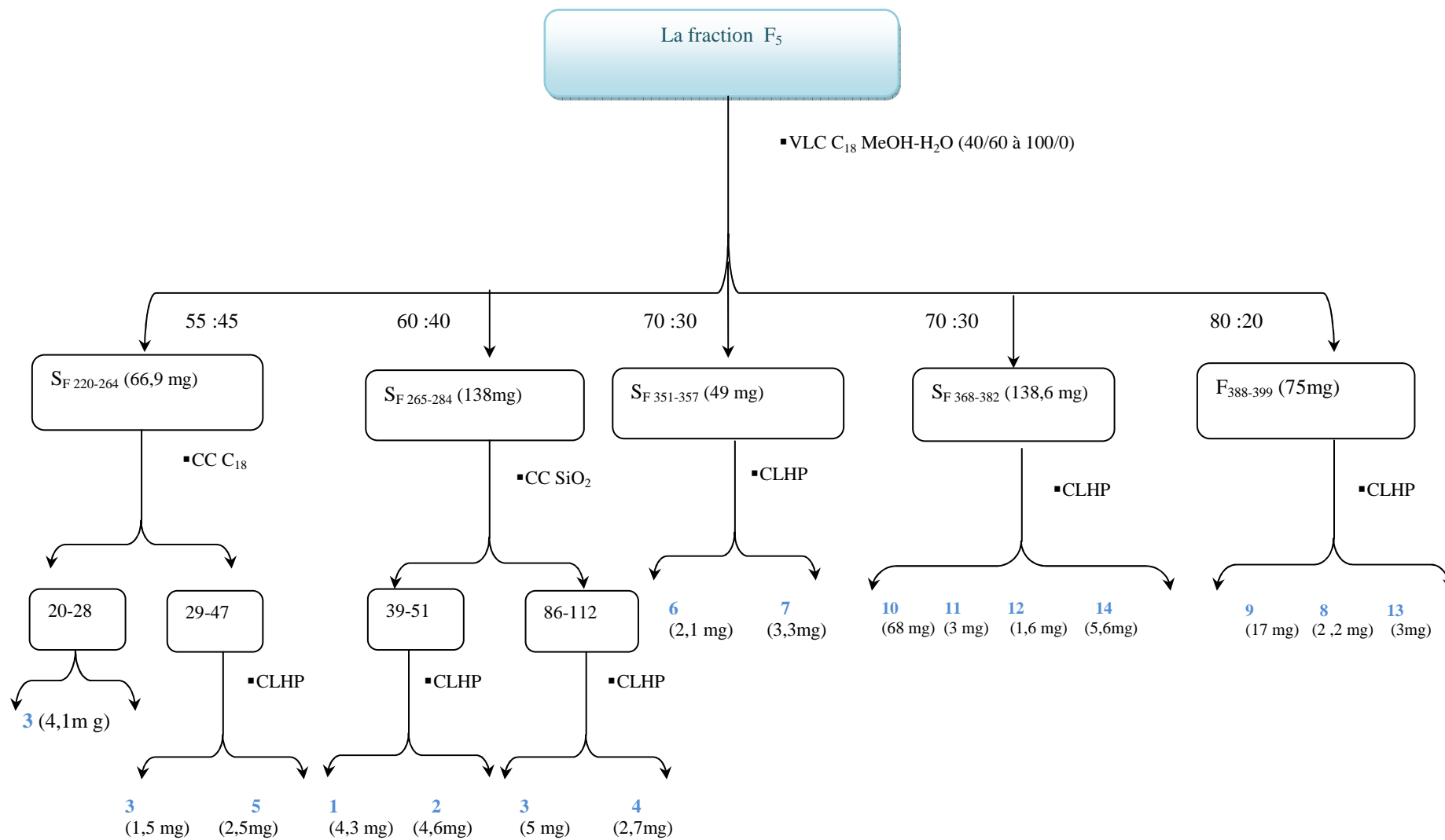
**Figure 38:** Schéma de fractionnement de la fraction butanolique de *G. ulicina*.

Les fractions F<sub>2</sub> (figure 39) et F<sub>5</sub> (figure 40), sont soumises par la suite à des opérations de purification en utilisant différentes méthodes chromatographiques en phase normale sur gel de silice ou en phase inverse sur silice greffée C<sub>18</sub> : chromatographie liquide sous vide (VLC), chromatographie sur colonne de gel de silice normale (CC), CLHP semi-préparative.

Ainsi, 20 composés (14 saponosides et 6 flavonoïdes) ont été isolés, selon les schémas suivants :



**Figure 39:** Schéma de purification des flavonoïdes de la fraction F<sub>2</sub>.



**Figure 40:** Schéma de purification des saponosides de la fraction F

### III.4.3. Détermination structurale des saponosides obtenus

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton  $^1\text{H}$  et du carbone  $^{13}\text{C}$  à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, et hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, aussi par spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI, par la mesure du pouvoir rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

#### III.4.3.1 Détermination structurale du composé 1

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif (figure 41), montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  659,4141  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 636,4 correspondant à une formule brute en  $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_9$ .

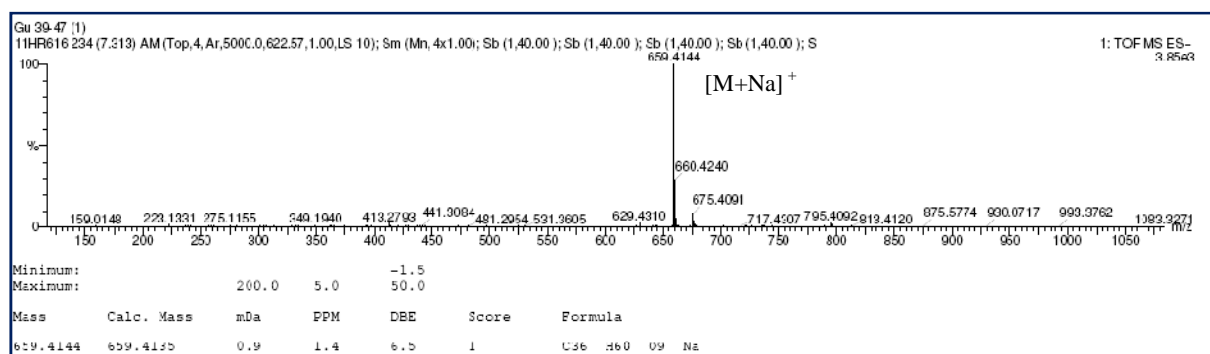
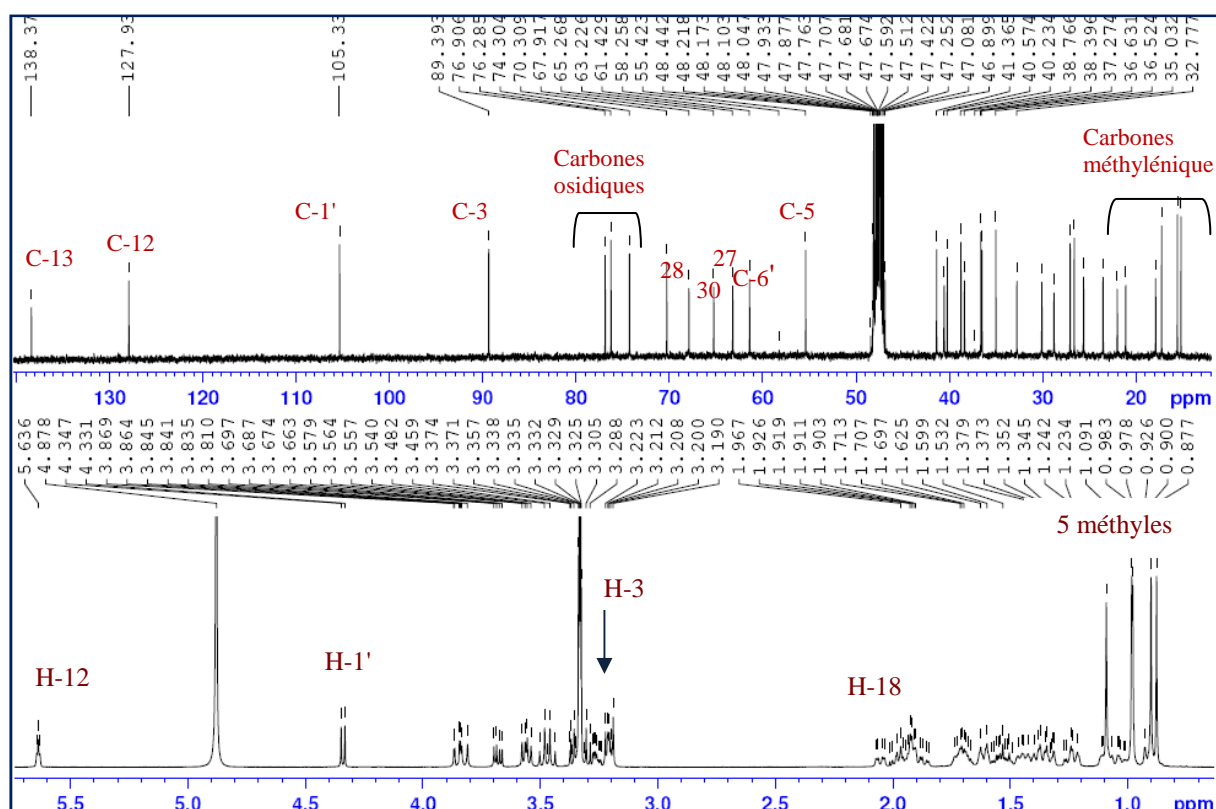


Figure 41 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 42) révèle clairement la présence de :

- signaux caractéristiques d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à 4,34 ppm (d,  $J = 7,8$  Hz).
- cinq signaux singulets dans la région blindée entre 0,88 et 1,09 ppm, intégrant pour trois protons chacun, correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,09 (H-23), 0,88 (H-24), 0,98 (H-25), 0,98 (H-26), 0,90 (H-29).
- un massif de protons résonant entre 0,91 et 2,05 ppm correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles.

- un signal déblindé sous forme d'un triplet à  $\delta_H$  5,64 (t,  $J=3,3$ Hz, H-12) attribuable à un proton éthylénique, signe d'une insaturation dans la molécule.
  - un doublet de doublets à environ 2,05 ppm attribuable au proton H-18.
- D'autres signaux sont enregistrés dans la zone des protons osidiques, entre 3 et 4,5 ppm indiquant des fonctions oxygénées sur la génine :
- un proton H-3 résonnant sous la forme de doublet de doublets ( $dd$ ,  $J=11,3 - 5,3$  Hz).
  - trois systèmes AB résonnant à 3,55 et 3,82 ppm ( $d$ ,  $J=12,3$  Hz), 3,20 et 3,55 ( $d$ ,  $J=11,1$  Hz) et 3,45 et 3,49 ( $d$ ,  $J=11,1$  Hz).



**Figure 42** : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **1**

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 42) indique la présence de 36 carbones dont 30 sont attribués à la génine et 6 au sucre. On distingue quelques carbones caractéristiques :

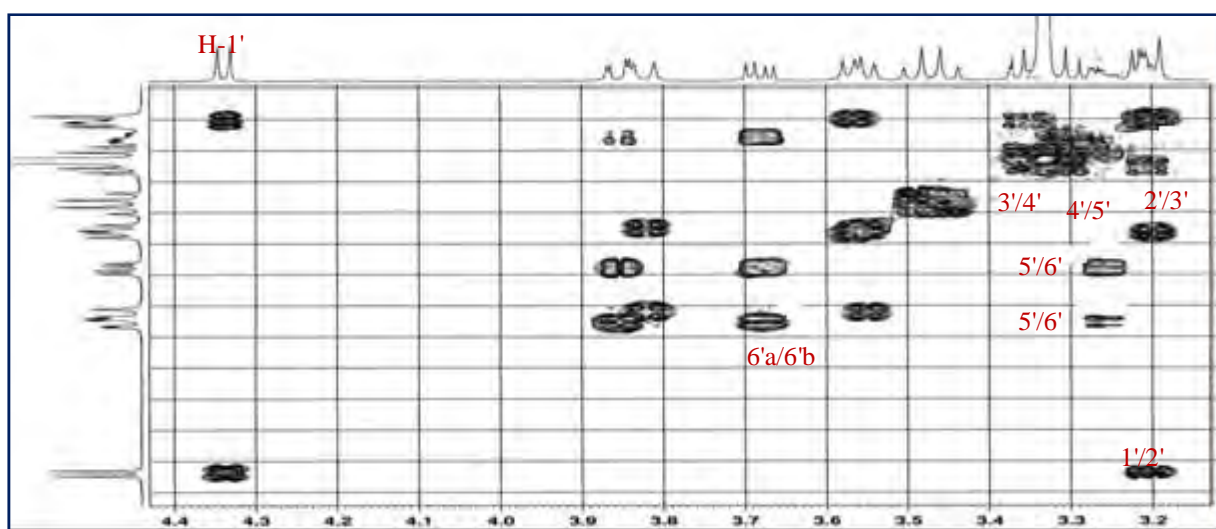
- cinq carbones méthylénique résonants entre  $\delta_C$  15,2 et 27,1 ppm.
- un ensemble de carbones résonants entre  $\delta_C$  17,9 et 55,4 ppm, attribuables aux  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  et  $\text{C}$  quaternaires.
- deux carbones éthyléniques à  $\delta_C$  127,9 ppm et 138,4 ppm.
- un carbone anomérique à 105,3 ppm.



- quatre carbones à  $\delta_C$  61,4, 63,2, 65,3 et 67,9 ppm indiquant quatre méthylènes oxydés ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) dont un appartenant à un hexose.
- cinq carbones de méthynes oxydés ( $\text{CHOH}$ ) dont 4 appartiennent au sucre.

Ce premier constat permet de déduire que le composé **1** est constitué d'une génine triterpénique à squelette oléanène tetrahydroxylé et substituée par un hexose.

A partir du proton anomérique à 4,34 ppm (d,  $J = 7,8$  Hz), l'expérience COSY (figure 43) permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose. Les constantes de couplage vicinales, mesurées à partir du spectre de RMN  $^1\text{H}$ , entre les protons H-1' et H-2' ( $J=7,8$  Hz), H-2' et H-3' ( $J=8,6$  Hz), H-3' et H-4' ( $J = 8,5$  Hz) et H-4' et H-5' ( $J = 9,4$  Hz) sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont tous trans-diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un  $\beta$ -D-glucopyranose.



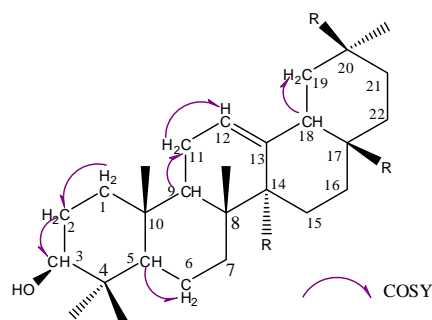
**Figure 43** : Spectre COSY de la partie osidique du composé **1**

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones correspondants, établies après analyse de l'expérience HSQC, sont en accord avec celles d'un  $\beta$ -D-glucopyranose terminal (tableau 3) [110, 111].

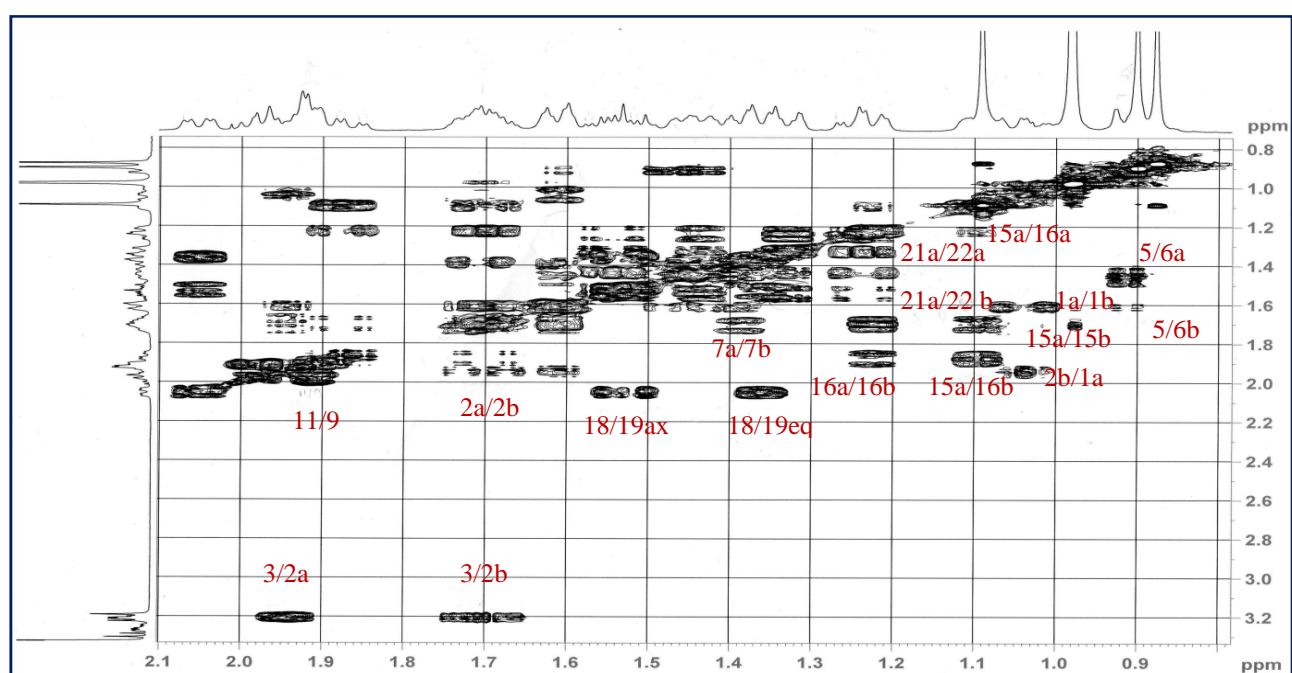
A partir des protons caractéristiques individualisés et identifiés précédemment, l'expérience COSY (figures 43 et 44) permet d'identifier la plupart des protons non analysables directement sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  résonant entre 0,91 et 2,05 ppm :

- les protons H-2 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-3.
- les deux protons H-11 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-12.

- le proton H-9 vicinal aux protons H-11.
- les deux protons H-19 vicinaux au proton H-18.

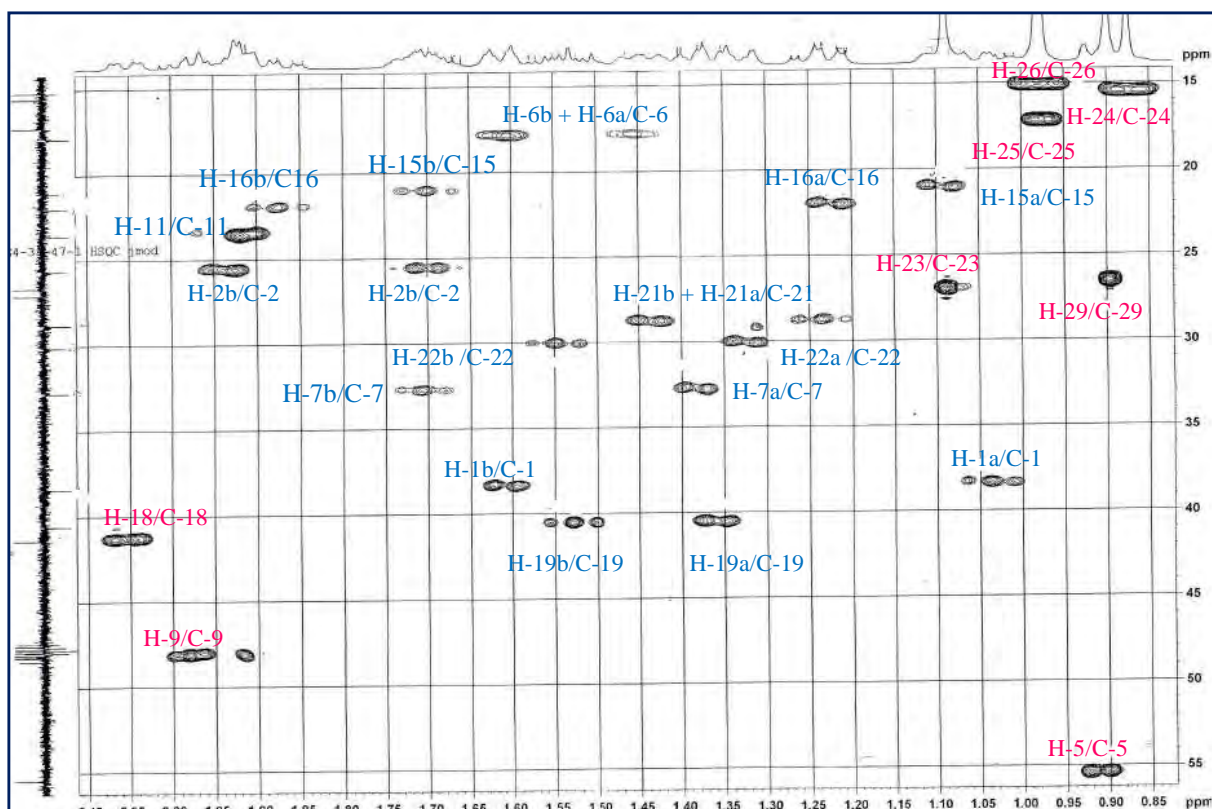


**Figure 44:** Corrélations  $^2J_{H-H}$  observées sur le spectre COSY du composé **1**



**Figure 45 :** Spectre COSY de la partie génine du composé **1**

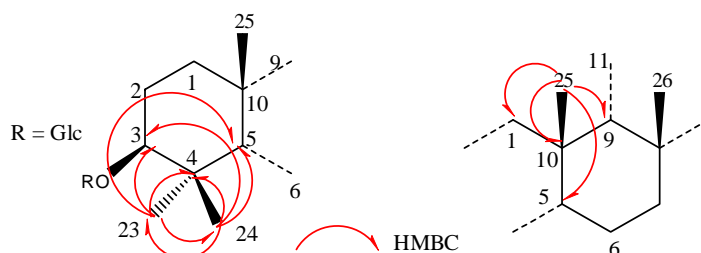
L'analyse des couplages hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  visualisés sur le spectre HSQC  $J$ -modulé (figure 46) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (tableau 3) qui les portent (C-2, C-3, C-9, C-11, C-12, C-18, C-19).



**Figure 46 :** Spectre HSQC *J*-modulé de la partie génine du composé **1**

L'analyse de l'expérience HMBC (figure 47), qui visualise les couplages entre protons et carbones distants de deux ou trois liaisons ( $^2J_{H-C}$ ,  $^3J_{H-C}$ ), permet l'attribution des méthyles et les autres carbones de la génine.

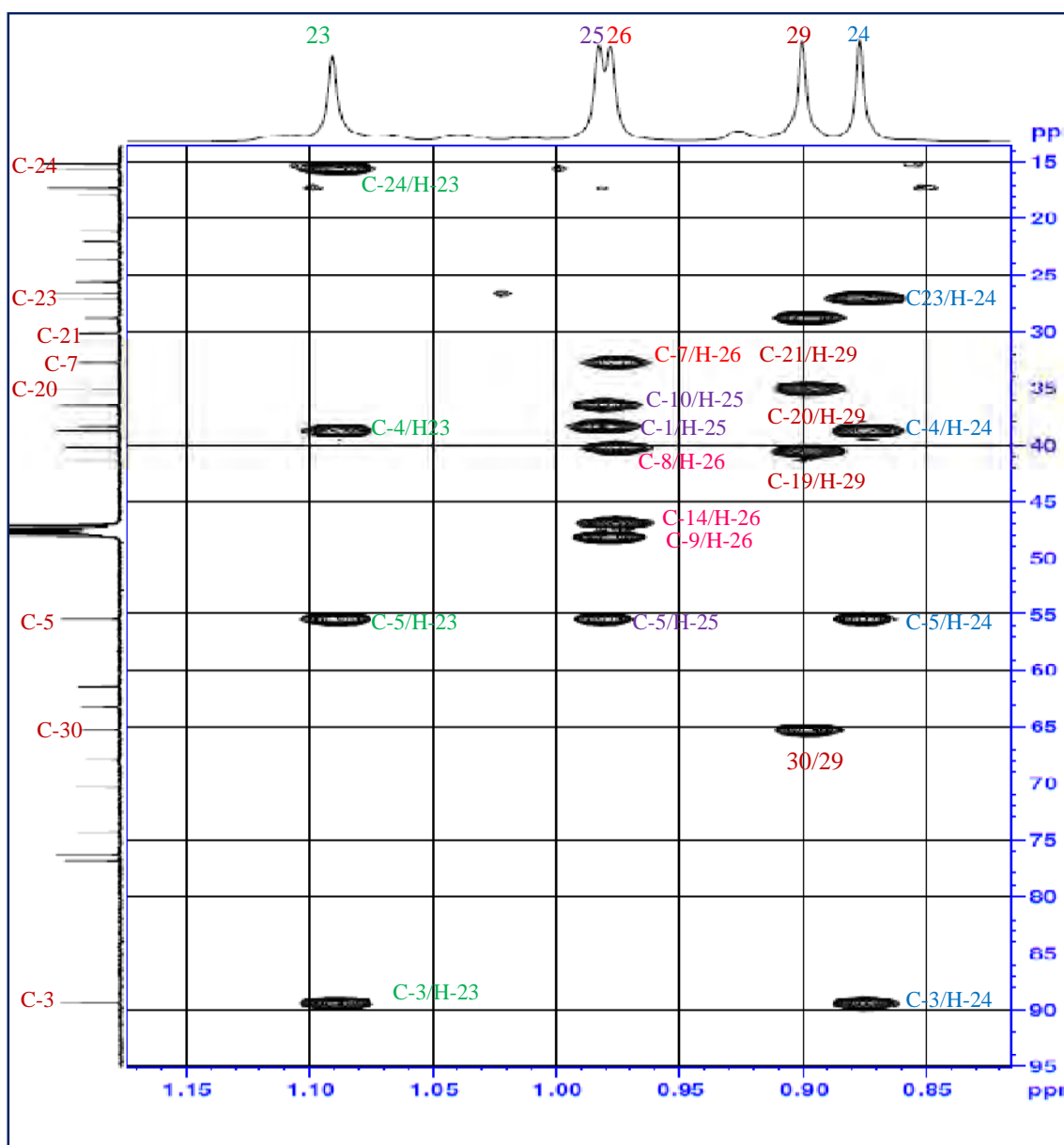
Dans cette expérience, les protons méthyléniques corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. Ainsi les méthyles 23 et 24 corréleront avec le carbone C-3. Ces méthyles couplent également avec le carbone quaternaire C-4 (38,8 ppm), le carbone C-5 (55,4 ppm) qui corréle aussi avec les protons méthyliques en 25 (figure 47 et 48). Le carbone C-5 corréle sur le spectre HSQC avec son proton H-5 qui permet de localiser les protons H-6 et H-7 sur le spectre COSY et leurs carbones respectifs.



**Figure 47 :** Correlations  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  des protons 23 et 24 observés sur le spectre HMBC.

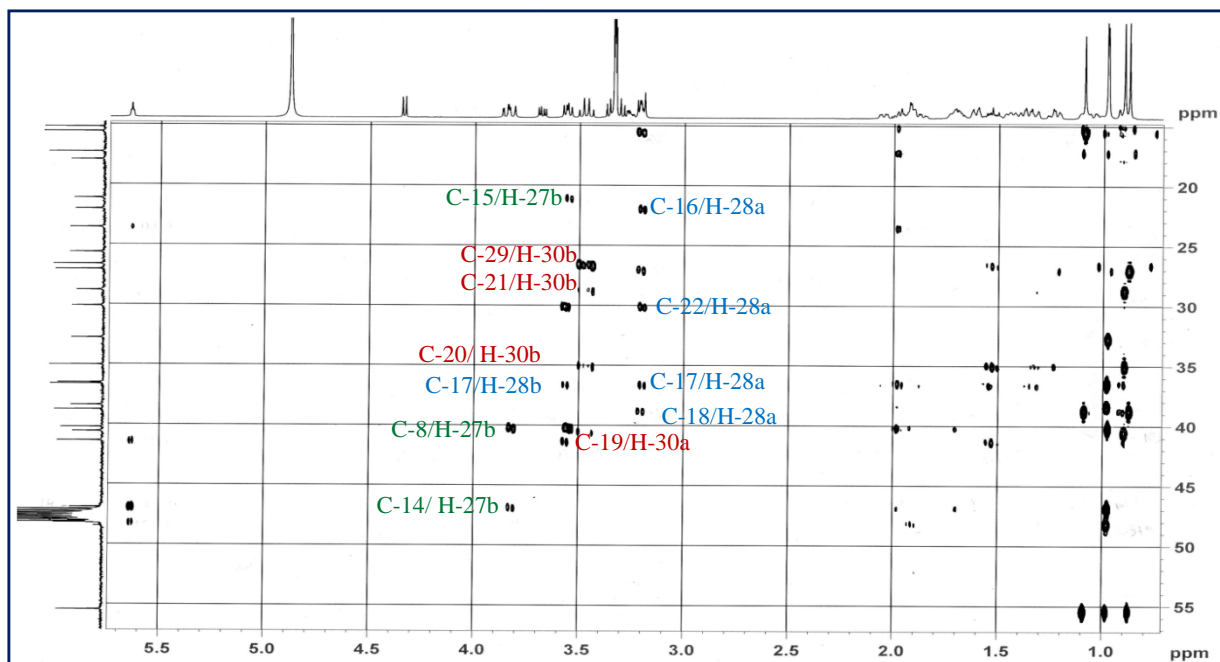
Le méthyle 25 couple avec les carbones C-1 (38,4 ppm), C-10 (36,6 ppm) et C-9 (48,4 ppm). La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée toujours sur le spectre HMBC entre le proton H- 9 résonant à 1,98 ppm et le carbone éthylénique C-12 résonant à 127,9 ppm permet de confirmer la localisation de la double liaison en C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>.

Le méthyle-26 couple avec le carbone C-9, le carbone C-7 (32,8 ppm) et les carbones quaternaires C-8 (40,2 ppm) et C-14 (46,9 ppm). La distinction entre ces deux derniers carbones est possible du fait de la corrélation  $^3J_{H-C}$  du carbone C-14 avec le proton éthylénique H-12. Les carbones C-8 et C-14 déjà identifiés couplent avec deux protons résonant à 3.55 ppm (d,  $J=12,3$  Hz) et 3.82 ppm (d,  $J=12,3$  Hz) attribués aux protons H-27, eux même corrélant avec le deuxième carbone éthylénique quaternaire résonant à 138,4 ppm attribué au carbone C-13 et avec le C-15. L'analyse du spectre HSQC  $J$ -modulé permet à partir du carbone C-15 d'attribuer les protons H-15 et l'expérience COSY permet de localiser les protons H-16 puis leur carbone C-16 correspondant par analyse de leur corrélation sur le spectre HSQC  $J$ -modulé.



**Figure 48** : Spectre HMBC de la partie génine (zone méthyles) du composé **1**

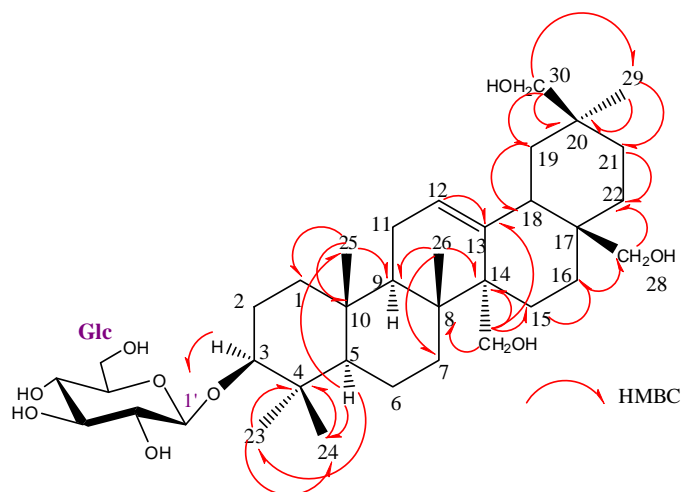
L'expérience HMBC montre les corrélations du carbone C-16 avec deux protons résonant à 3,20 ppm ( $d, J= 11,1$  Hz) et 3,57 ppm ( $d, J= 11,1$  Hz) attribués aux protons H-28 (figure 49), eux même corrélant avec un carbone quaternaire résonant à 36,5 ppm attribué au carbone C-17 et un carbone à 30,1 ppm attribué au carbone C-22. Le proton H-28b résonant à 3,57 ppm, montre également une tache de corrélation avec un carbone résonant à 41,4 ppm attribué au carbone C-18. Les protons H-22 sont attribués par l'analyse de leur corrélation sur le spectre HSQC  $J$ -modulé avec le carbone C-22.



**Figure 49** : Spectre HMBC du composé **1**

Ces protons corrént sur l'expérience COSY avec les protons H-21 et l'expérience HSQC *J*-modulé conduit au carbone C-21 correspondant.

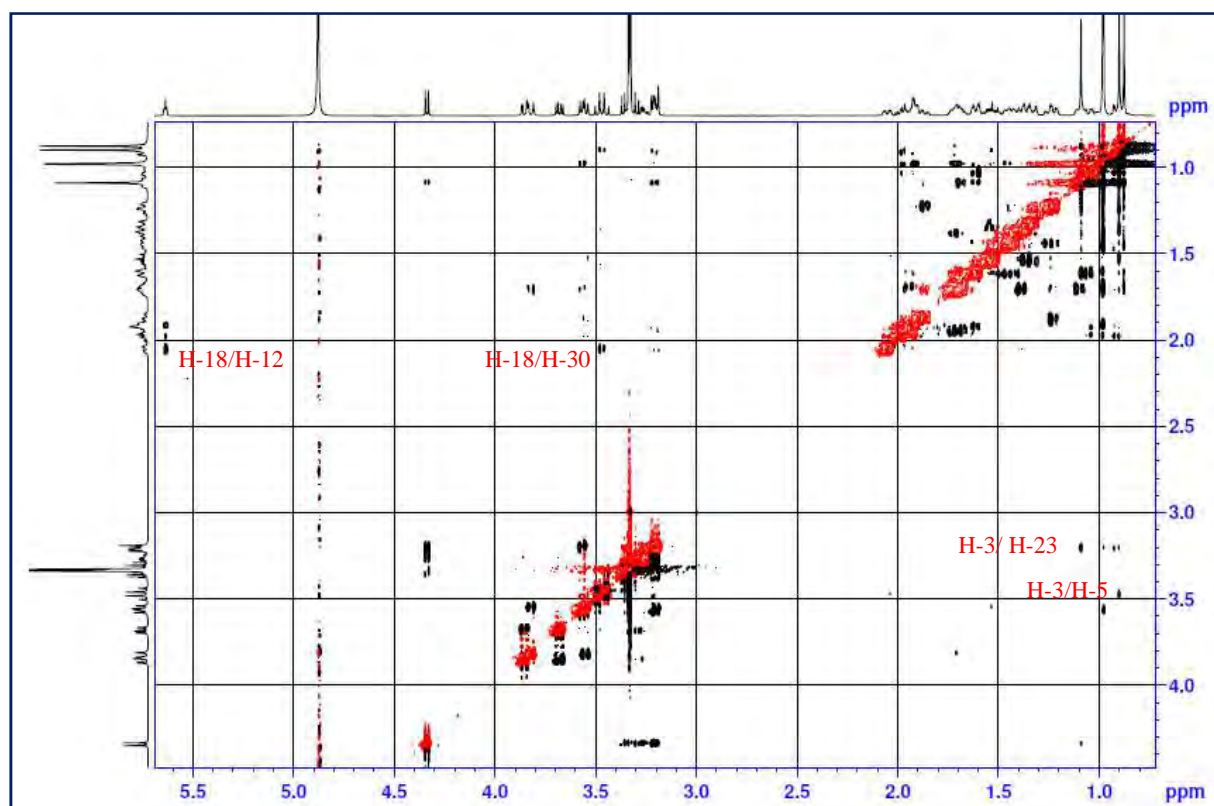
Les protons du méthyle 29 résonant à 0,90 ppm, donnent des couplages avec les carbones C-20 (35,0 ppm), C-21 (28,8 ppm) déjà identifié, C-19 (40,6 ppm) et C-30 (65,3 ppm) (figure 50), le déblindage du carbone 30 indique que le CH<sub>3</sub>-30 est oxydé en alcool primaire.



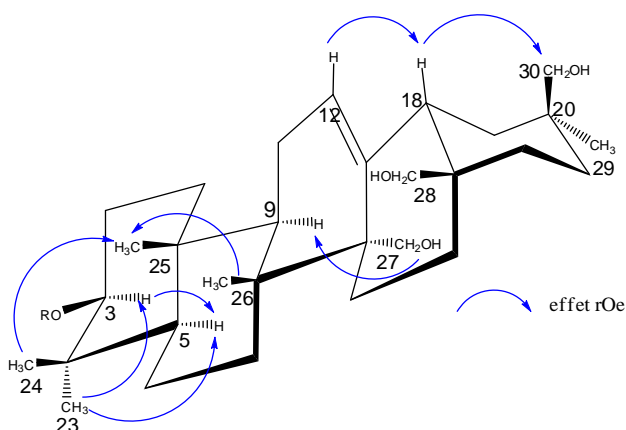
**Figure 50** : Importantes corrélations  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  observées pour le composé **1**

Les effets rOe observés sur le spectre ROESY (figure 51) entre les protons : H-18/H-12 et CH<sub>2</sub>-30 confirment l'orientation  $\beta$ -axiale de ces protons.

De même, l'orientation  $\alpha$ -axiale du proton H-3 est établie par l'observation d'effet rOe entre les protons H-3/H-5 et H-3/H-23 (figure 51).



**Figure 51 :** Spectre ROESY du composé **1**.



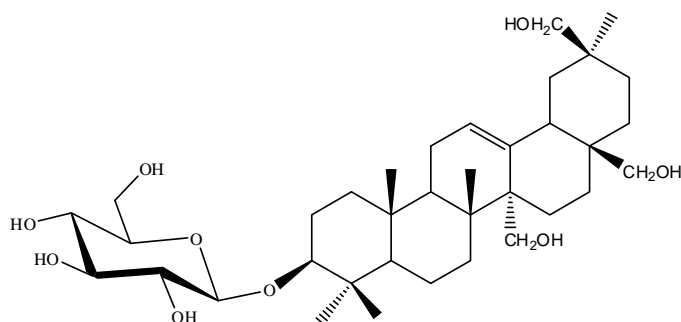
**Figure 52 :** Importants effets rOe observés pour le composé **1**

La génine est donc identifiée comme étant un dérivé oxydé de l'érythrodiol, l'oléan-12-ène - 3 $\beta$ ,27,28,30-tétraol ou 27,30-dihydroxyérythrodiol substitué en position 3 comme le suggère le déblindage du carbone C-3[109].

La corrélation  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3, ceci est confirmé par l'effet rOe observé entre le proton H-1' et le proton H-3 de la génine.

L'expérience ROESY permet de confirmer la forme pyranose du glucose par les effets rOe observés entre les protons axiaux H-1'/H-3' et H-1'/H-5'.

Toutes ces données nous permettent de proposer pour ce composé, la structure nouvelle suivante : 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,30-tétraol. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal.



3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,30-tétraol. (1)

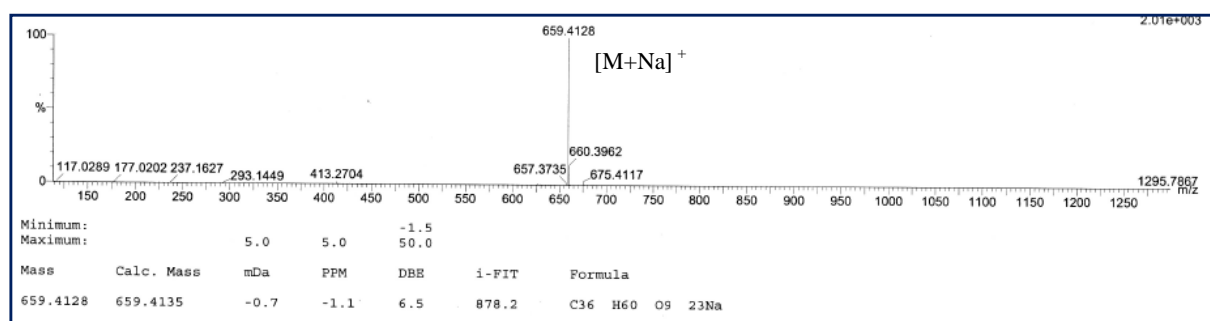


**Tableau 3** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **1** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)             | N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                   |
|----|---------------------|---|--------------|---------------------|---|
| 1  | 38,4                | 1,04 td (11,9 - 3,3), 1,61 dm (11,9)      | 20           | 35,0                | -   |
| 2  | 25,6                | 1,71 m, 1,94 m                            | 21           | 28,8                | 1,24 td (13,7- 3,8),<br>1,44 dm (13,7)          |
| 3  | 89,4                | 3,20 dd ( 11,3 - 5,3)                     | 22           | 30,1                | 1,33 dm (13,5),<br>1,56 td (13,5 - 4,3)         |
| 4  | 38,8                | -   | 23           | 27,1                | 1,09 s  |
| 5  | 55,4                | 0,91 dm (12,8)                            | 24           | 15,6                | 0,88 s  |
| 6  | 17,9                | 1,45 td (11,8 - 2,6), 1,61 dm (11,9)      | 25           | 15,2                | 0,98 s  |
| 7  | 32,8                | 1,39 dm (11,3), 1,71 m                    | 26           | 17,3                | 0,98 s  |
| 8  | 40,2                | -   | 27           | 63,2                | 3,55 d (12,3), 3,82 d (12,3)                    |
| 9  | 48,4                | 1,98 dd (9,7-7,6)                         | 28           | 67,9                | 3,20 d (11,1), 3,57 d (11,1)                    |
| 10 | 36,6                | -   | 29           | 26,6                | 0,90 s  |
| 11 | 23,5                | 1,91, m                                   | 30           | 65,3                | 3,45 d (11,1), 3,49 d (11,1)                    |
| 12 | 127,9               | 5,64 t (3,3)                              | Glc (en C-3) |                     |   |
| 13 | 138,4               | -   |              |                     |   |
| 14 | 46,9                | -   | 1'           | 105,3               | 4,34 d (7,8)                                    |
| 15 | 21,1                | 1,10 m, 1,68 m                            | 2'           | 74,3                | 3,21 dd (8,6 - 7,8)                             |
| 16 | 22,0                | 1,23 dd (13,7 - 3,8), 1,83 td (14,1- 4,7) | 3'           | 76,9                | 3,36 t (8,6)                                    |
| 17 | 36,5                | -   | 4'           | 70,3                | 3,31 t (8,5)                                    |
| 18 | 41,4                | 2,05 dd (13,8 - 4,2)                      | 5'           | 76,3                | 3,26 ddd (9,4 - 5,3 - 2,3)                      |
| 19 | 40,6                | 1,36 dm (13,7), 1,53 t (13,7)             | 6'           | 61,4                | 3,68, dd (11,9 - 2,3),<br>3,85, dd (11,9 - 5,3) |

### III.4.3.2 Détermination structurale du composé **2**

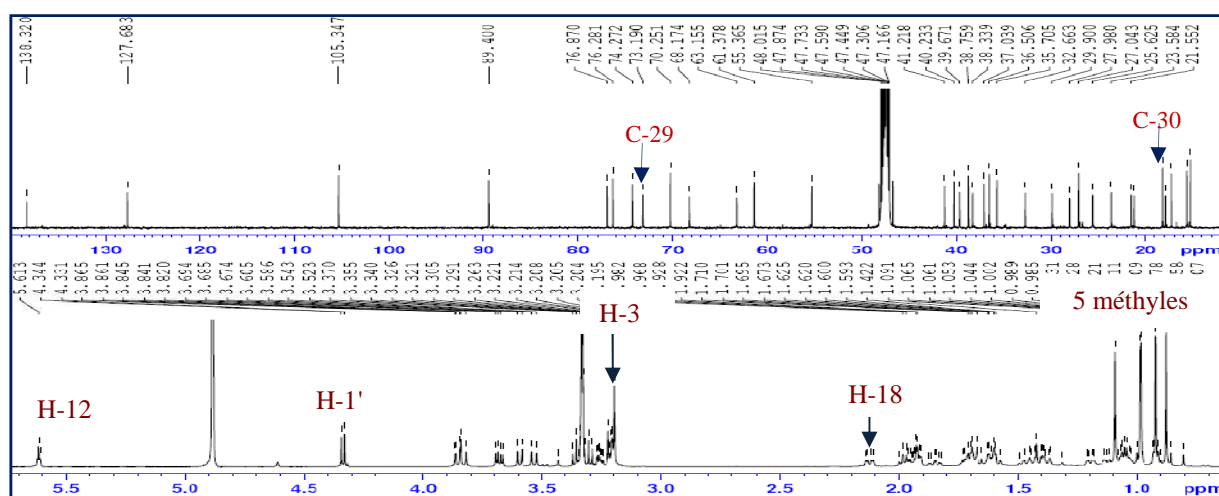
Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 53) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  659,4128  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculé 659,4135), correspondant à la formule brute  $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_9\text{Na}$ .



**Figure 53** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **2**

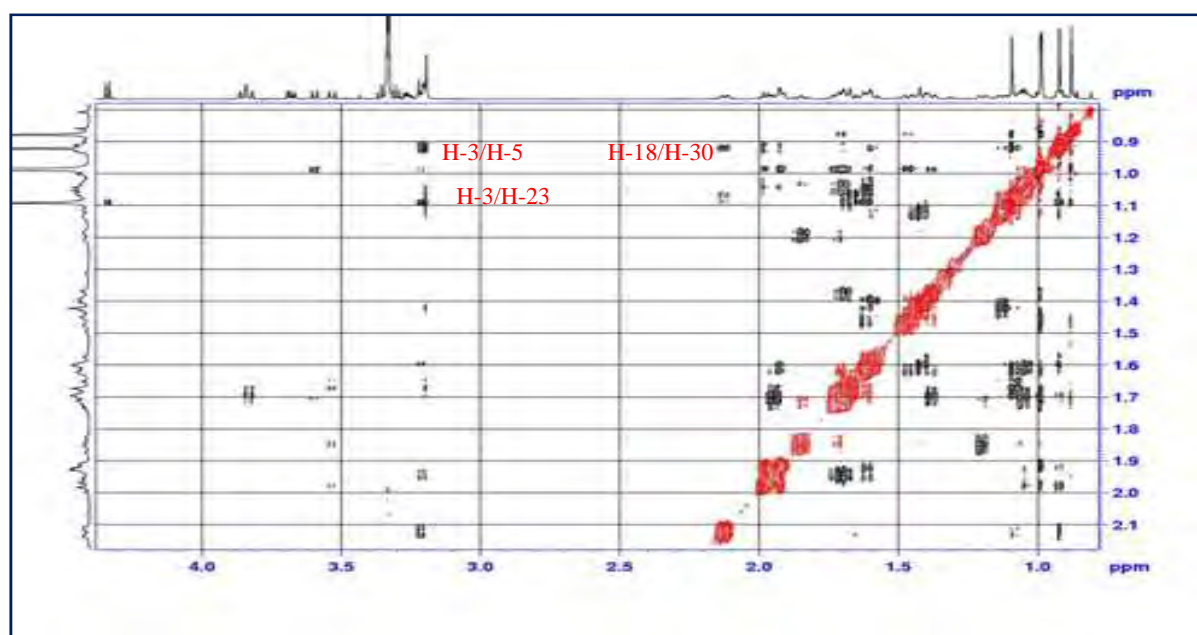
Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  de composé **2** (figure 54) est très proche de celui du composé **1**. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé **1**: les signaux de 5 méthyles singulets,

le signal du proton oléfinique et on observe aussi trois systèmes AB correspondant aux trois alcools primaires. Le spectre de RMN<sup>1</sup>H montre également les signaux des protons du glucose.



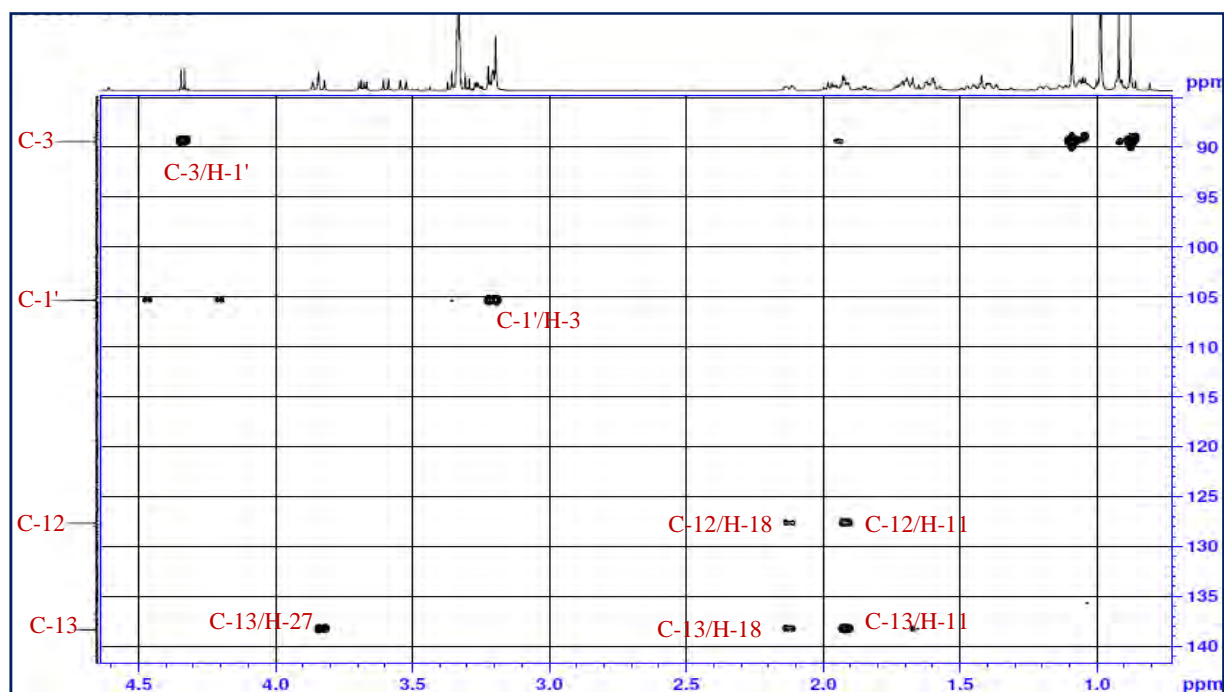
**Figure 54 :** Spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé 2

Cependant, la disparition du signal du méthyle 29 à 26,6 ppm et l'apparition d'un signal à 18,2 ppm (tableau 4) ainsi que le déblindage du signal à 73,2 ppm pour le méthyle oxygéné suggère cette fois l'oxydation du méthyle 29 au lieu du méthyle 30. Cette hypothèse est confirmée par l'observation d'effet rOe entre les protons du méthyle 30 et H-18 (figure 55).



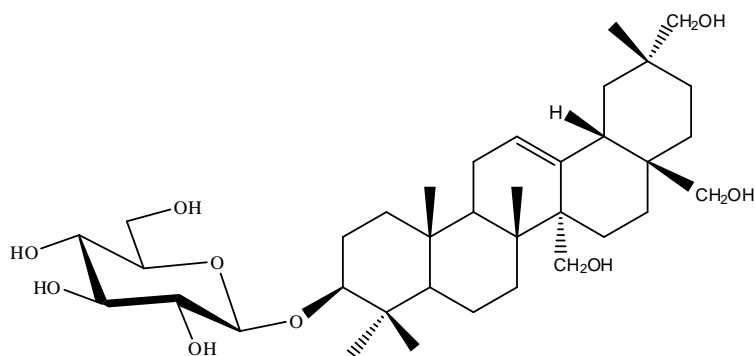
**Figure 55 :** Spectre ROESY du composé 2

La corrélation  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (figure 56) entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3. Ceci est confirmé par l'effet rOe observé entre le proton H-1' et le proton H-3 de la génine.



**Figure 56 :** Spectre HMBC du composé **2**

L'ensemble des données précédentes nous permet ainsi d'établir la structure du composé **2** comme étant le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol ou 27,29-dihydroxyérythrodiol, nouveau composé naturel.



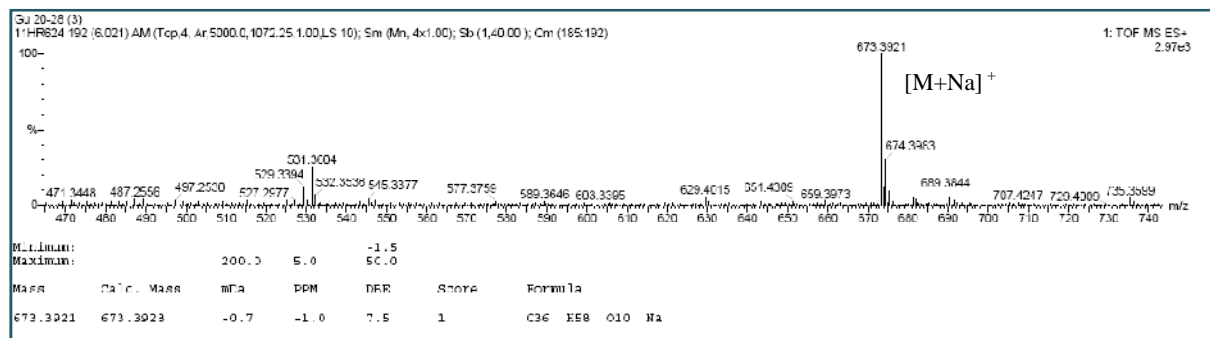
3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol (**2**).

**Tableau 4** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) du composé **2** dans CD<sub>3</sub>OD.

| N° | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)              | N°           | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)                     |
|----|----------------|---------------------------------------|--------------|----------------|--|
| 1  | 38,3           | 1,03 m, 1,51 m                        | 20           | 35,7           | -  |
| 2  | 25,6           | 1,70 m, 1,95 m                        | 21           | 28,0           | 1,13 dm (137), 1,41 m                        |
| 3  | 89,4           | 3,20 dd (11,9, 4,1)                   | 22           | 29,9           | 1,41 dm (14,3), 1,60 m                       |
| 4  | 38,8           | -                                     | 23           | 27,0           | 1,09 s                                       |
| 5  | 55,4           | 0,92 m                                | 24           | 15,6           | 0,88 s                                       |
| 6  | 17,9           | 1,47 td (13,2 - 3,7), 1,61 m          | 25           | 15,2           | 0,99 s                                       |
| 7  | 32,7           | 1,38 td (13,2 - 2,8), 1,70 m          | 26           | 17,3           | 0,99 s                                       |
| 8  | 40,2           | -                                     | 27           | 63,2           | 3,53, d (12,2), 3,83, d (12,6)               |
| 9  | 48,1           | 1,98 t (8,2)                          | 28           | 68,2           | 3,21 d (11,1), 3,60 d (11,1)                 |
| 10 | 36,5           | -                                     | 29           | 73,2           | 3,20 sl                                      |
| 11 | 23,6           | 1,92 m                                | 30           | 18,2           | 0,92 s                                       |
| 12 | 127,7          | 5,61 t (3,4)                          | Glc (en C-3) |                |  |
| 13 | 138,3          | -                                     |              |                |  |
| 14 | 46,9           | -                                     | 1'           | 105,4          | 4, 34 d (7,8)                                |
| 15 | 21,2           | 1,04 m, 1,71, td (13,7 - 4,9)         | 2'           | 74,3           | 3,21 dd (8,9 - 7,8)                          |
| 16 | 21,6           | 1,20 dm (13,7), 1,85, td (13,7 - 4,7) | 3'           | 76,9           | 3,36 t (8,9)                                 |
| 17 | 37,0           | -                                     | 4'           | 70,3           | 3,31 t (8,6)                                 |
| 18 | 41,2           | 2,12 dd (13,6 - 4,0)                  | 5'           | 76,3           | 3,25 ddd (9,5 - 5,3 - 2,3)                   |
| 19 | 39,7           | 1,08 m, 1,67 t (13,5)                 | 6'           | 61,4           | 3,68 dd (11,9 - 5,5)<br>3,85 dd (11,9 - 2,3) |

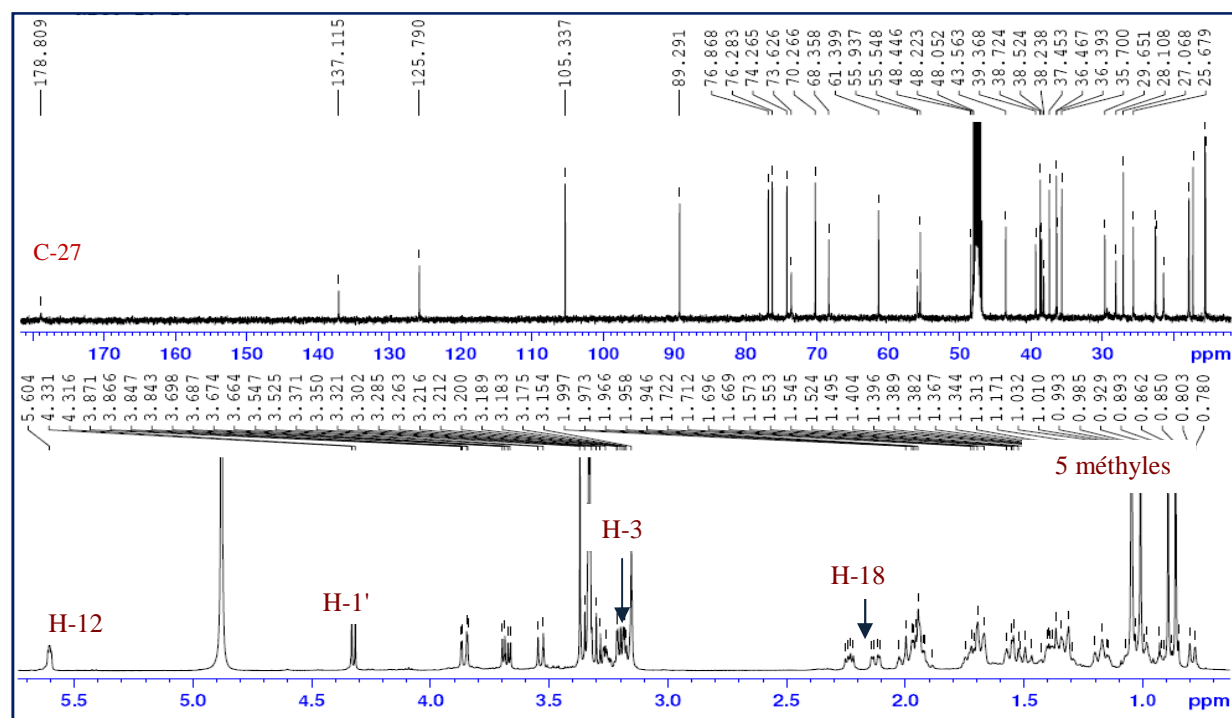
### III.4.3.3 Détermination structurale du composé **3**

La formule moléculaire brute C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub> du composé a été déduite à partir du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS enregistré en mode positif (figure 57). Il montre en effet un pic de l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  673,3921 [M+Na]<sup>+</sup>, soit un gain de 14 *uma* par rapport à **2**.



**Figure 57** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **3**

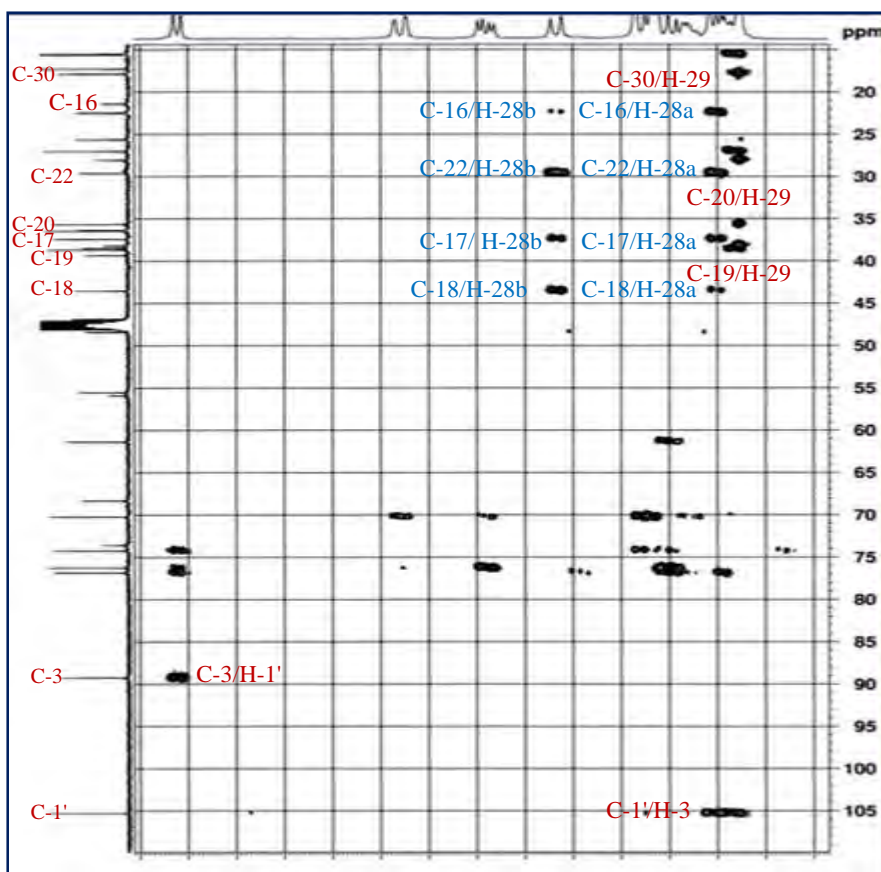
Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 58) révèle la présence de 36 carbones parmi eux, un résonant à 178,8 ppm indique la présence d'une fonction acide (carbonyle). Une comparaison avec le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **2** décrit précédemment montre que le C-14 est fortement déblindé à 55,9 ppm (tableau 5), de même pour le C-7 déblindé à 36,5 ppm au lieu de 32,7 ppm à cause du cône d'anisotropie du carbonyle. Le déblindage de ces deux derniers suggère que le C-14 est substitué par un carbonyle.



**Figure 58:** Spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **3**

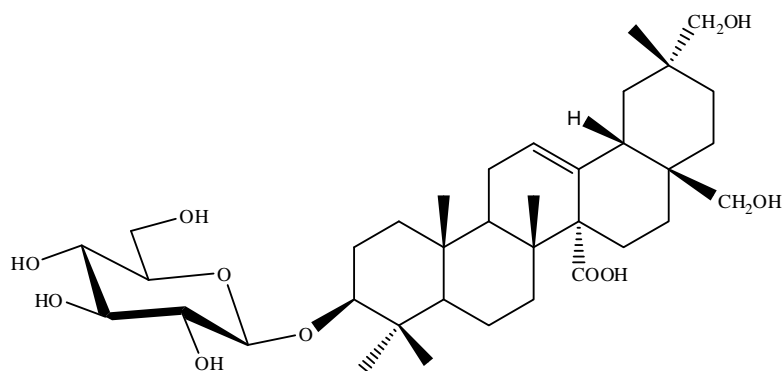
Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 58) du composé **3** est très proche de celui du composé **2**. En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine et du glucose, la seule différence notable se réside au niveau de la génine et cela par la disparition des signaux de deux protons résonants à 3,53 ppm et 3,83 ppm attribués aux protons H-27, confirmant ainsi que le groupement carbonyle est porté par le carbone C-14.

L'analyse conjuguée des spectres HSQC et HMBC, permet de caractériser tous les protons et les carbones de cette molécule. La corrélation en  $^3J_{\text{H-C}}$  observée toujours sur le spectre HMBC (figure 59) entre le proton anomérique H-1' résonnant à 4,32 ppm et le carbone C-3 de la génine montre que ce glucose est attaché à l'hydroxyle en position 3 de cette génine, ceci est confirmé par l'effet rOe entre le proton H -1' et le proton H-3 de la génine.



**Figure 59** : Spectre HMBC, partie osidique du composé **3**.

La structure du composé **3** a pu être établie comme étant l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,28,29-triol-27-carboxylique. Ce produit n'a fait l'objet d'aucune citation antérieure.



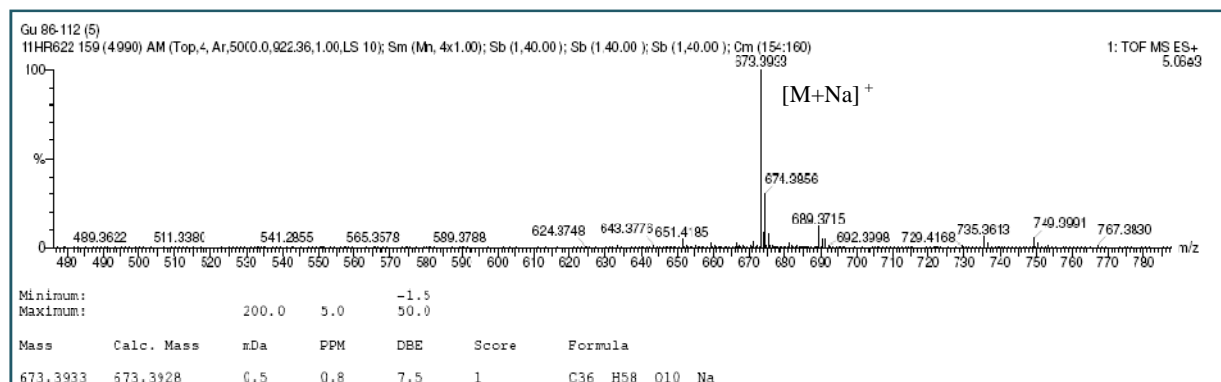
acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,28,29-triol-27-carboxylique (**3**).

**Tableau 5** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **3** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|----|---------------------|-------------------------------|--------------|---------------------|--|
| 1  | 38,5                | 1,03 m, 1,68 d (13,4)         | 20           | 35,7                | -  |
| 2  | 25,7                | 1,70 tm (13,4), 1,95 m        | 21           | 28,1                | 1,16 dm (13,2), 1,35 tm (13,2)             |
| 3  | 89,3                | 3,16 m                        | 22           | 29,7                | 1,38 m, 1,55 td (15,3 - 5,0)               |
| 4  | 38,7                | -                             | 23           | 27,1                | 1,05 s                                     |
| 5  | 55,6                | 0,79 dm (11,6)                | 24           | 15,6                | 0,87 s                                     |
| 6  | 17,9                | 1,40 m, 1,56 m                | 25           | 15,5                | 1,08 s                                     |
| 7  | 36,5                | 1,32 m, 1,68 dm (13,4)        | 26           | 17,3                | 1,05 s                                     |
| 8  | 39,4                | -                             | 27           | 178,8               | -  |
| 9  | 46,9                | 2,24 dd (10,7 - 6,0)          | 28           | 68,4                | 3,20 d (11,0), 3,54 d (11,0)               |
| 10 | 36,4                | -                             | 29           | 73,0                | 3,15 sl                                    |
| 11 | 21,4                | 1,94 m                        | 30           | 17,9                | 0,90 s                                     |
| 12 | 125,8               | 5,60 t (3,0)                  | Glc (en C-3) |                     |  |
| 13 | 137,1               | -                             |              |                     |  |
| 14 | 55,9                | -                             | 1'           | 105,3               | 4,32 d (7,8)                               |
| 15 | 21,4                | 1,72 t (12,8), 2,01 dm (12,4) | 2'           | 74,3                | 3,20 dd (8,7 - 7,8)                        |
| 16 | 22,6                | 1,19 dm (15,0), 1,97 m        | 3'           | 76,9                | 3,35 t (8,8)                               |
| 17 | 37,5                | -                             | 4'           | 70,3                | 3,30 t (8,5)                               |
| 18 | 43,6                | 2,13 dd (13,5 - 4,0)          | 5'           | 76,3                | 3,26 ddd (8,5 - 5,3 - 2,2)                 |
| 19 | 38,2                | 1,00 m, 1,50 t (13,5)         | 6'           | 61,4                | 3,68 dd (11,9 - 5,3), 3,86, dd (11,9- 2,2) |

### III. 4.3.4. Détermination structurale du composé 4

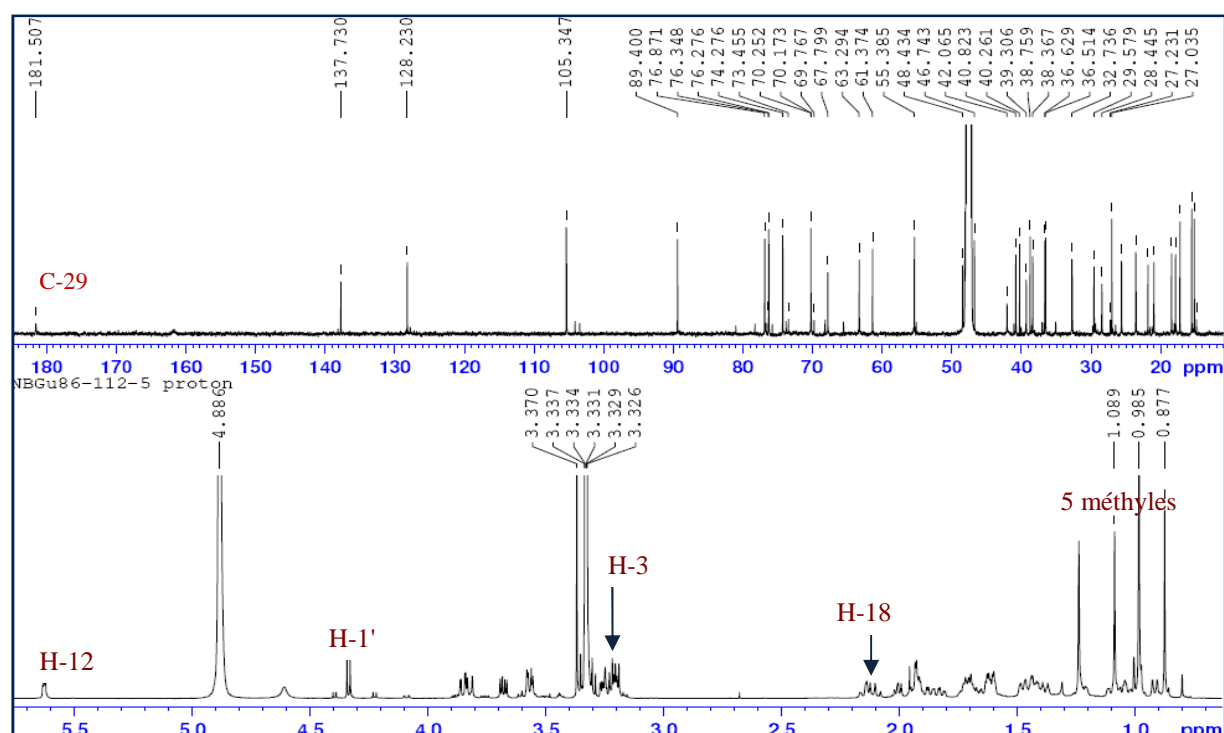
Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé **4** (figure 60), présente un pic pour l'ion pseudo- moléculaire à  $m/z$  673,3933  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculé 673,3928), correspondant à la formule brute  $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}\text{Na}$ .



**Figure 60** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **4**

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , et HSQC de ce composé présentent de fortes similitudes avec celui du composé **3**. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 61) présente 5 signaux résonant entre 0,88 et 1,24 ppm attribuable aux 5 méthyles, un signal du proton oléfinique (*t*,  $J = 3,8\text{Hz}$ , H-12), deux systèmes AB dont l'un résonne à 3,56 ppm ( $d$ ,  $J = 11,9\text{Hz}$ ) et 3,82 ppm ( $d$ ,  $J = 11,9\text{Hz}$ ) et l'autre à 3,24 ppm ( $d$ ,  $J = 10,9\text{Hz}$ ) et 3,57 ppm ( $d$ ,  $J = 10,9\text{Hz}$ ) correspondants à deux alcools primaires.

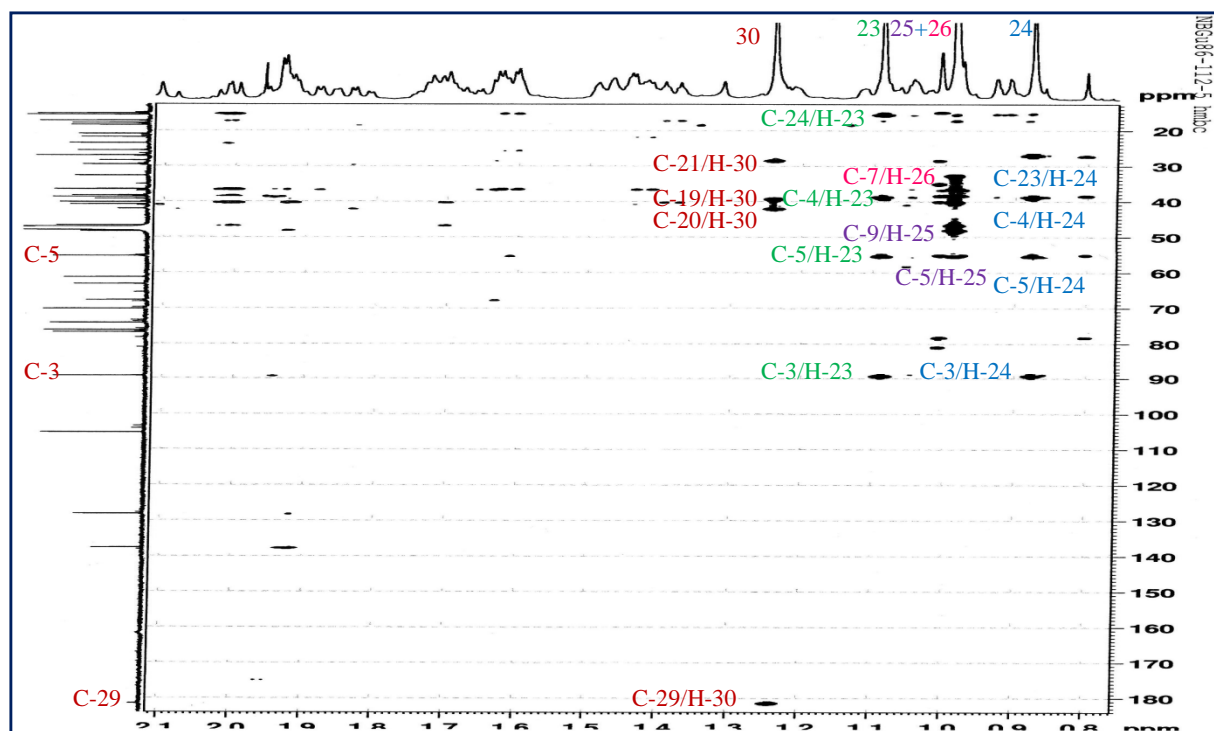
Le déblindage des protons H-19 dont les signaux sortent à 1,43 et 2,13 ppm, H-21 sortant à 1,48 et 1,83 ppm et des protons du méthyle H-30 sortant à 1,24 ppm (tableau 6), illustre bien la présence d'un carbonyle libre en C-20.



**Figure 61** : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **4**.

Cette attribution est confirmée d'une part par le déblindage du C-20 résonant à 42,1 ppm et d'autre part par le spectre HMBC (figure 62) qui montre une tache de corrélation entre les protons du méthyle H-30 et le carbone C-29 résonant à 181,5 ppm.





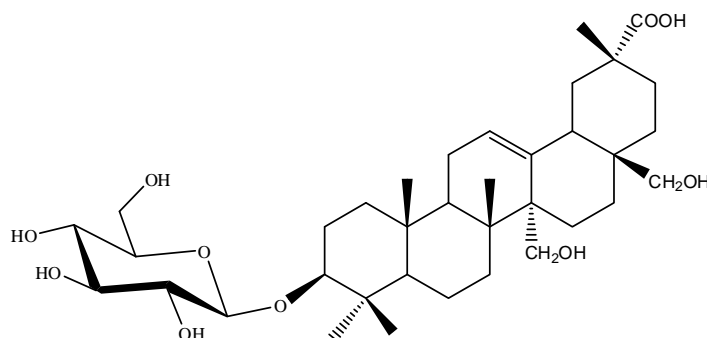
**Figure 62** : Spectre HMBC du composé **4** (zone génine) dans CD<sub>3</sub>OD

L'attribution complète des signaux observés en RMN <sup>13</sup>C confirmant la structure proposée, est établie conjointement par l'analyse des expériences de corrélations hétéronucléaire HSQC et HMBC.

La partie osidique de ce composé, s'avère identique à celle du composé **2** comme l'indiquent les valeurs des  $\delta_C$  et  $\delta_H$  (tableau 6). La substitution en position C-3 de la génine par un glucose est indiquée par la visualisation de l'effet rOe entre le H-1' du glucose et le proton H-3 de la génine et par la présence d'une tache de corrélation  $^3J_{H-C}$  entre H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine observée sur le spectre HMBC.

La stéréochimie de ce composé est établie par l'analyse du spectre ROESY. En effet il présente des corrélations entre H-3 $\alpha$ /H-5, H-3 $\alpha$ /H-23 et H-5 $\alpha$ /H-23, il montre également des corrélations H-18 $\beta$  /H-30 et H-18 $\beta$  /H-12.

L'analyse des spectres de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC et ROESY permet d'identifier le composé **4** comme étant l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28-triol-29-carboxylique. A notre connaissance, ce composé n'a jusqu'à présent jamais été décrit dans le règne végétal.



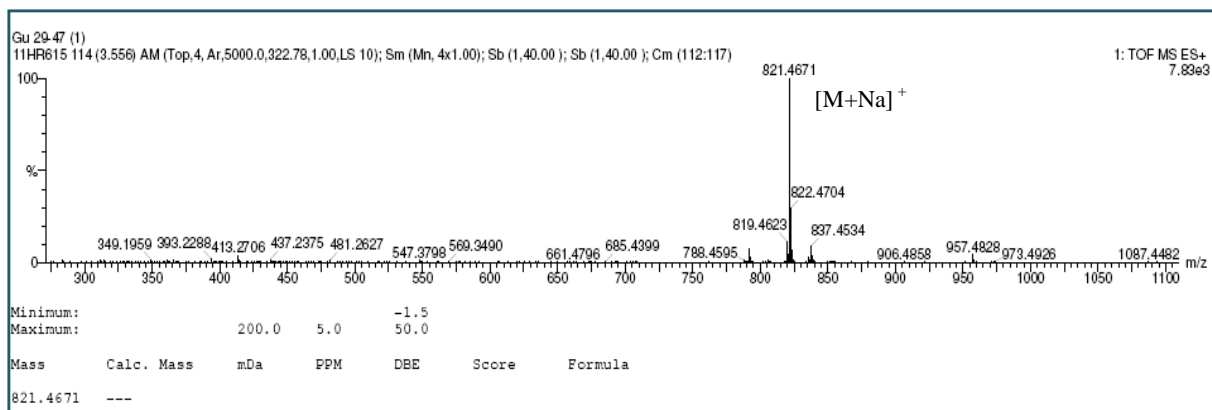
acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28, triol-29- carboxylique (**4**).

**Tableau 6** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **4** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)        | N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|----|---------------------|--------------------------------------|--------------|---------------------|--|
| 1  | 38,4                | 1,04 tm (15,4), 1,61 m               | 20           | 42,1                | -  |
| 2  | 25,6                | 1,71 m, 1,94 m                       | 21           | 28,5                | 1,48 dm (12,1), 1,83 td (14,6 - 4,6)       |
| 3  | 89,4                | 3,21 dd (11,7- 4,2)                  | 22           | 29,6                | 1,42 m, 1,63 m                             |
| 4  | 38,8                | -                                    | 23           | 27,1                | 1,09 s                                     |
| 5  | 55,4                | 0,92 dm (13,4)                       | 24           | 15,6                | 0,88 s                                     |
| 6  | 17,9                | 1,45 d (12,1), 1,61 m                | 25           | 15,2                | 0,98 s                                     |
| 7  | 32,7                | 1,38 dm (13,1), 1,72 m               | 26           | 17,2                | 0,98 s                                     |
| 8  | 40,3                | -                                    | 27           | 63,3                | 3,56 d (11,9), 3,82 d (11,9)               |
| 9  | 48,1                | 2,01 dd (9,9 - 8,8)                  | 28           | 67,8                | 3,24 d (10,9), 3,57 d (10,9)               |
| 10 | 36,6                | -                                    | 29           | 181,5               | -  |
| 11 | 23,6                | 1,92 m                               | 30           | 18,4                | 1,24 s                                     |
| 12 | 128,2               | 5,63 t (3,8)                         | Glc (en C-3) |                     |  |
| 13 | 137,7               | -                                    | 1'           | 105,4               | 4,34 d (7,8)                               |
| 14 | 46,7                | -                                    | 2'           | 74,3                | 3,21 dd (9,2 - 7,8)                        |
| 15 | 21,0                | 1,10 dm (13,9), 1,70 td (13,9 - 5,2) | 3'           | 76,9                | 3,26 t (8,6)                               |
| 16 | 21,8                | 1,22 dm (14,6), 1,87 td (14,6 - 5,6) | 4'           | 70,3                | 3,31 t (8,6)                               |
| 17 | 36,5                | -                                    | 5'           | 76,3                | 3,26 ddd (8,6 - 5,3 - 3,0)                 |
| 18 | 40,8                | 2,15 dm (13,7)                       | 6'           | 61,4                | 3,68 dd (11,9 - 5,3), 3,85, d (11,9 - 2,7) |
| 19 | 39,3                | 1,43 dm (13,7), 2,13 t (13,7)        |              |                     |  |

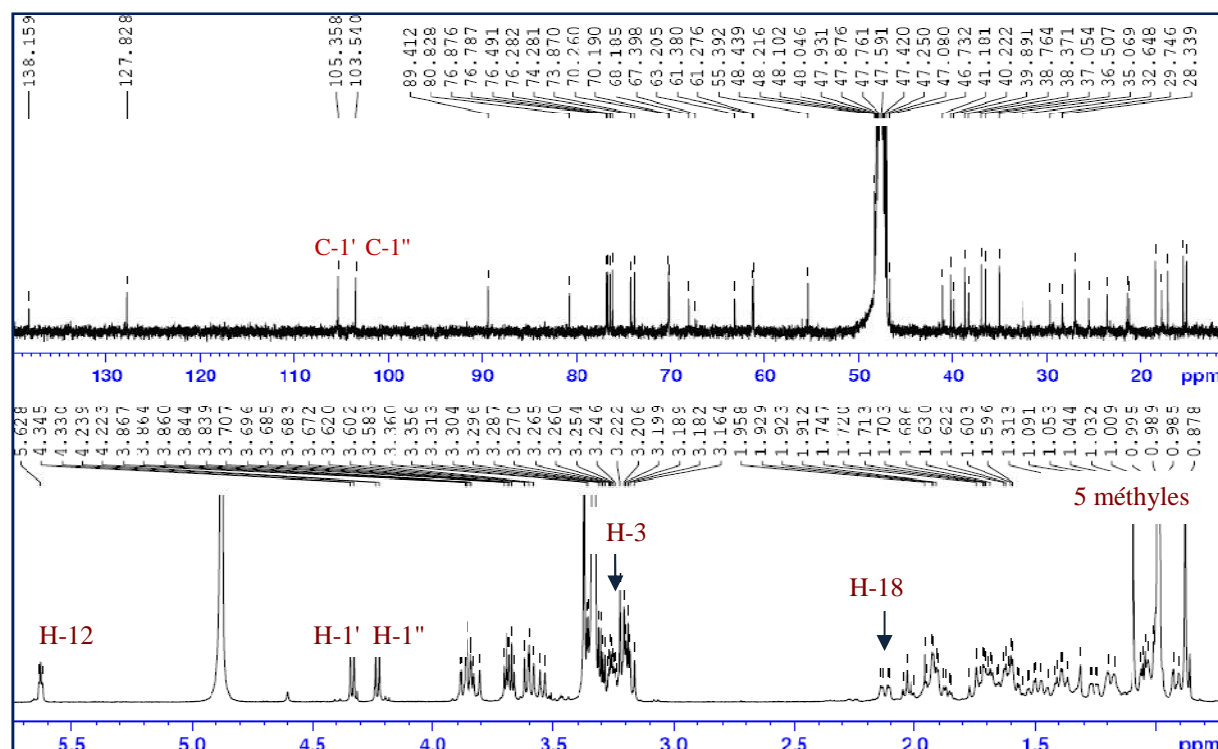
### III.4.3.5. Détermination structurale du composé **5**

Le composé **5** présente une formule moléculaire en  $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$ . Cette formule est déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS obtenu en mode positif qui présente un pic pour l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  821,4671  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (figure 63), correspondant à une masse moléculaire égale à 798, soit un gain de 162uma, ce qui suggère la présence d'un hexose supplémentaire par rapport au composé **2**.



**Figure 63:** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **5**

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 64) du composé **5** rappelle sans ambiguïté celui de **2**. Il permet de reconnaître quasiment tous les signaux du composé **2**.



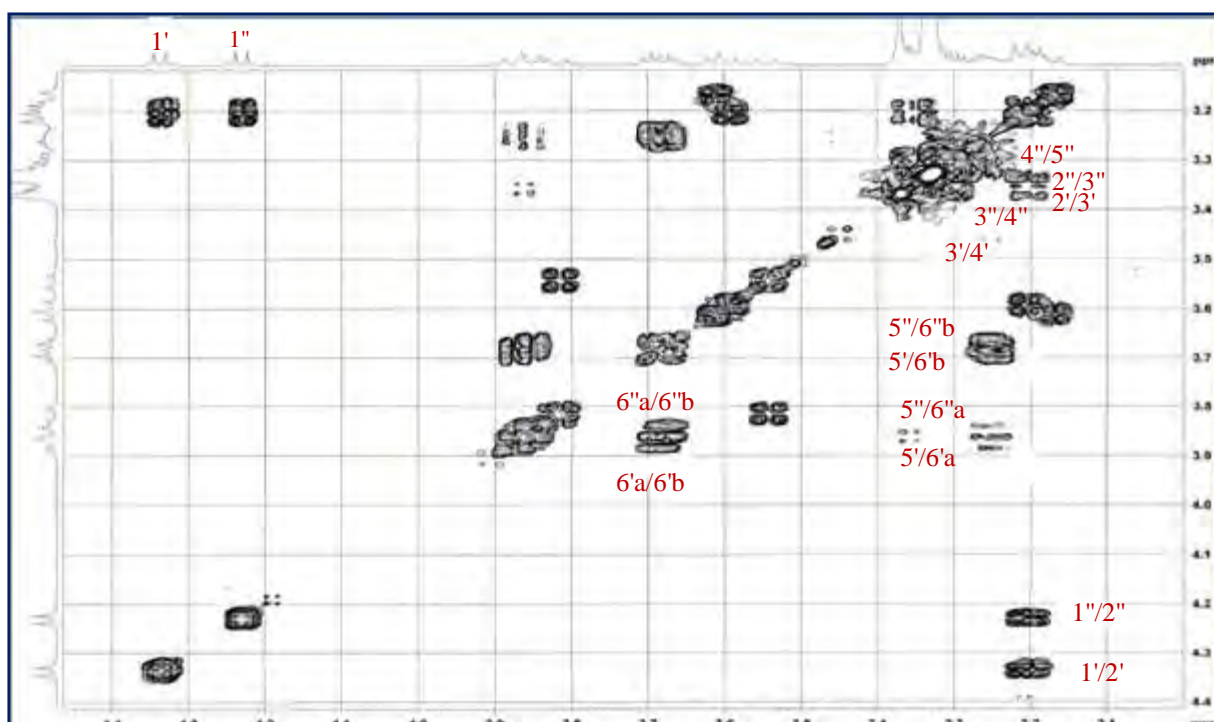
**Figure 64:** Spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **5** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

La différence réside au niveau de la partie osidique et cela par l'apparition des signaux de deux protons anomériques résonant à 4,23 ppm (d,  $J=7,8$  Hz) et 4,34 ppm (d,  $J=7,8$  Hz). Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC, résonant à 103,5 et 105,4 ppm.

A partir du proton anomérique à 4,34 ppm et l'analyse du spectre COSY, sont attribués sept protons d'un hexose. Les grandes valeurs des constantes de couplage ( $> 7$  Hz) montrent qu'il s'agit comme pour les saponosides précédents, d'un  $\beta$ -D-glucopyranose (tableau 7).

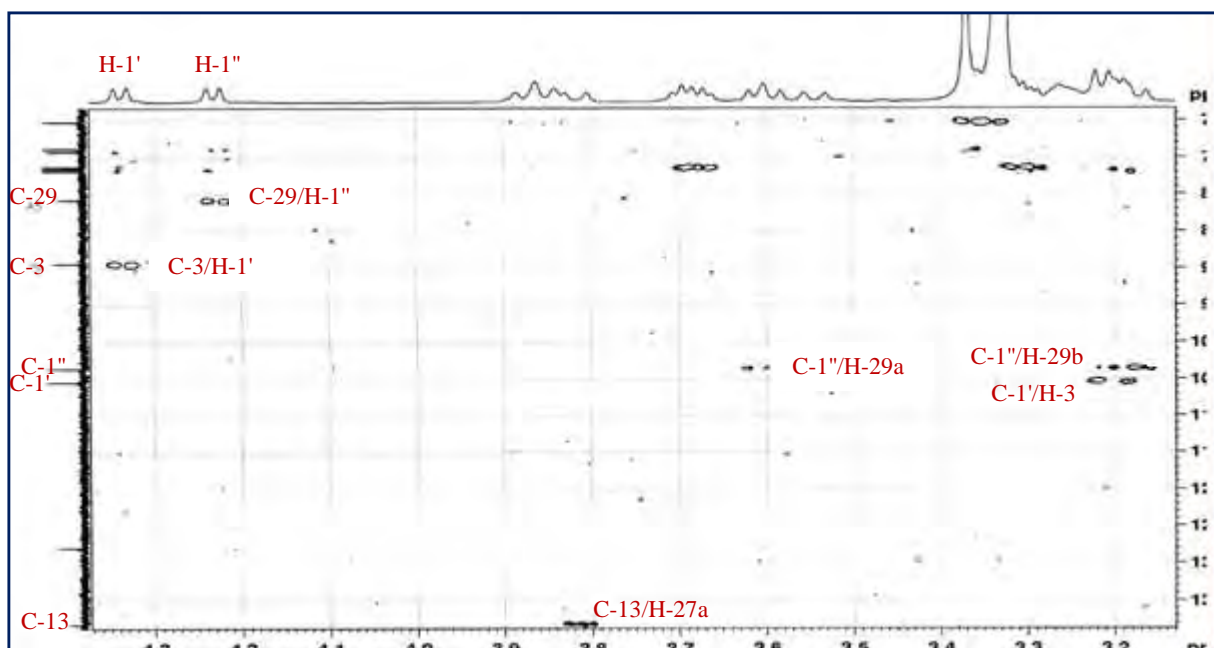
La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée toujours sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1' résonnant à 4,34 ppm et le carbone C-3 de la génine montre que ce glucose est attaché à l'hydroxyle en position 3 de cette génine, ceci est confirmé par l'effet rOe entre le proton H-1' et le proton H-3 de la génine.

A partir du second anomère, résonnant à 4,23 ppm, l'expérience COSY (figure 65) permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un second hexose. Les constantes de couplage vicinales entre les protons vicinaux H-1'' (d,  $J=7,8$  Hz), H-2'' (t,  $J = 7,9$  Hz), H-3'' (t,  $J = 8,8$  Hz) et H-4'' (t,  $J = 8,7$  Hz) toutes supérieures à 7Hz, révèlent qu'ils sont tous axiaux, caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucopyranose. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones sont en accord avec celles d'un  $\beta$ -D-glucopyranose terminal (tableau 7) [110, 111].



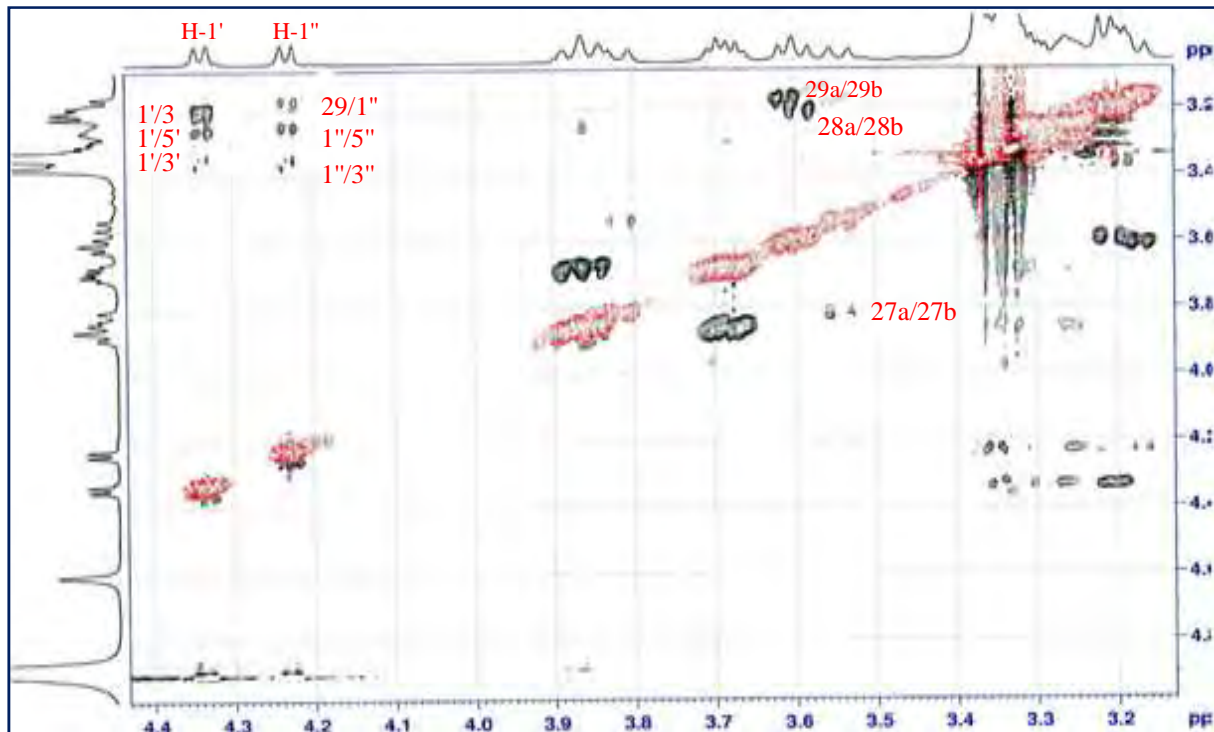
**Figure 65** : Spectre COSY, partie osidique du composé **5** dans le  $CD_3OD$

La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (figure 66) entre le proton anomérique H-1'' du deuxième glucose et le carbone C-29 de la génine, montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 29.



**Figure 66** : Spectre HMBC, partie osidique du composé **5** dans le CD<sub>3</sub>OD

L'analyse du spectre ROESY (figure 67) permet de confirmer cette attribution par la visualisation d'effets rOe entre les protons H-1'' et H-29.

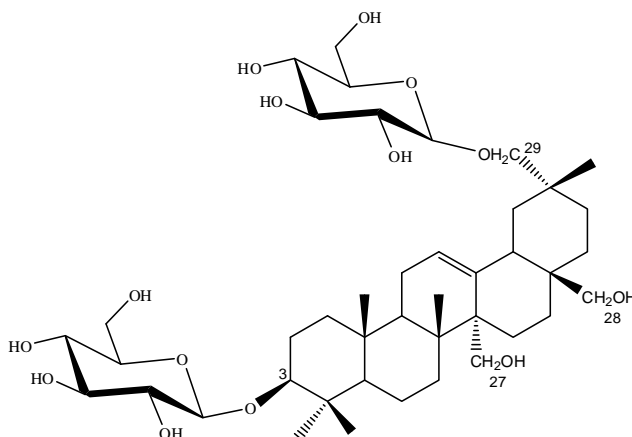


**Figure 67** : Spectre ROESY, partie osidique du composé **5** dans CD<sub>3</sub>OD

L'expérience ROESY permet de visualiser d'autres corrélations entre :

- H-1'/ H-3, H-1'/H-3' et H-1'/ H-5'.
- H-1"/H-3", H-1"/ H-5".
- H-30/H-18, H-12/ H-18.

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure nouvelle suivante au composé **5**: 3-*O*-β-D-glucopyranosyl, 29-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol .



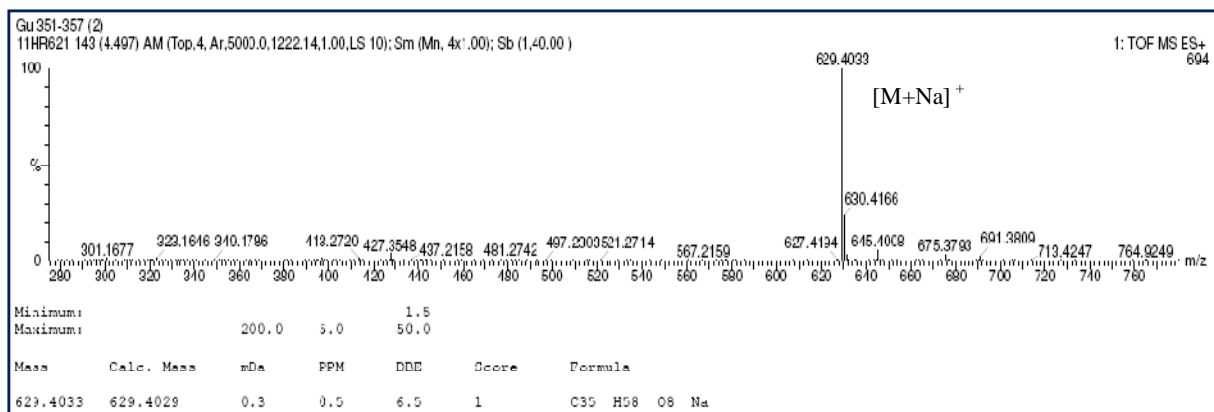
3-*O*-β-D-glucopyranosyl, 29-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol (**5**).

**Tableau 7** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **5** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)        | N°            | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|----|---------------------|--------------------------------------|---------------|---------------------|--|
| 1  | 38,4                | 1,02 td (14,2 - 3,8), 1,63 dm (14,2) | 23            | 27,1                | 1,09 s                                     |
| 2  | 25,6                | 1,71 td (13,6, 3,4), 1,95 m          | 24            | 15,6                | 0,88 s                                     |
| 3  | 89,4                | 3,20 m                               | 25            | 15,2                | 0,99 s                                     |
| 4  | 38,8                | -                                    | 26            | 17,3                | 1,00 s                                     |
| 5  | 55,4                | 0,91, dm (10,4)                      | 27            | 63,2                | 3,55 d (12,1), 3,82 d (12,2)               |
| 6  | 17,9                | 1,46 dm (14,2), 1,63 m               | 28            | 68,2                | 3,20 d (9,4), 3,59 d (9,4)                 |
| 7  | 32,7                | 1,38 d (13,1), 1,68, td (12,8 - 4,9) | 29            | 80,8                | 3,17 d (9,1), 3,61 d (9,1)                 |
| 8  | 40,2                | -                                    | 30            | 18,5                | 1,00 s                                     |
| 9  | 48,1                | 2,03 t (8,6)                         | Glc (en C-3)  |                     |  |
| 10 | 36,5                | -                                    | 1'            | 105,4               | 4,34 d (7,8)                               |
| 11 | 23,6                | 1,92 m                               | 2'            | 74,3                | 3,20 t (7,9)                               |
| 12 | 127,8               | 5,63 t (3,4)                         | 3'            | 76,9                | 3,36 t (8,8)                               |
| 13 | 138,3               | -                                    | 4'            | 70,2                | 3,32 t (8,7)                               |
| 14 | 46,7                | -                                    | 5'            | 76,3                | 3,25 m                                     |
| 15 | 21,4                | 1,00 m 1,72 td (13,6 - 3,4)          | 6'            | 61,3                | 3,69 dd (11,0 - 5,5), 3,86 dd (10,6 - 2,1) |
| 16 | 21,5                | 1,19 dm (12,8), 1,88 td (13,5 - 4,7) | Glc (en C-29) |                     |  |
| 17 | 37,1                | -                                    | 1"            | 103,5               | 4,23 d (7,8)                               |
| 18 | 41,2                | 2,12 dd (13,5 - 4,8)                 | 2"            | 73,9                | 3,20 t (7,9)                               |
| 19 | 39,9                | 1,26 dd (13,5, 3,8), 1,75 t(13,5)    | 3"            | 76,5                | 3,36 t (8,8)                               |
| 20 | 35,1                | -                                    | 4"            | 70,3                | 3,31 t (8,7)                               |
| 21 | 28,3                | 1,19 dm (12,8), 1,51 dd (13,2 - 3,2) | 5"            | 76,5                | 3,25 m                                     |
| 22 | 29,8                | 1,41 dm (13,3), 1,60 td (13,3, 3.8)  | 6"            | 61,4                | 3,68 dd (10,5 - 5,6), 3,87 dd (10,5 - 2,1) |

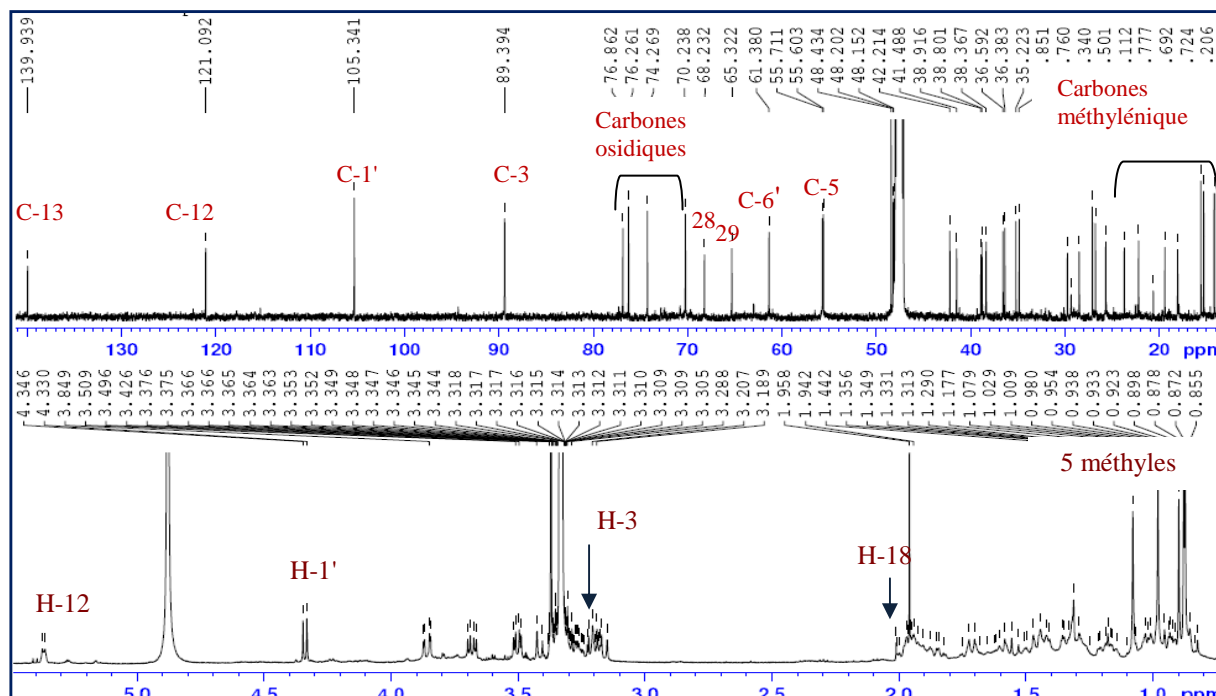
#### III.4.3.6. Détermination structurale du composé **6**

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 68), montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  629,4033 (calculé 629,4029), correspondant à la formule brute  $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_8\text{Na}$ , soit 31 *uma* de moins par rapport au composé **1** correspondant à la perte d'un groupement hydroxy méthylène.



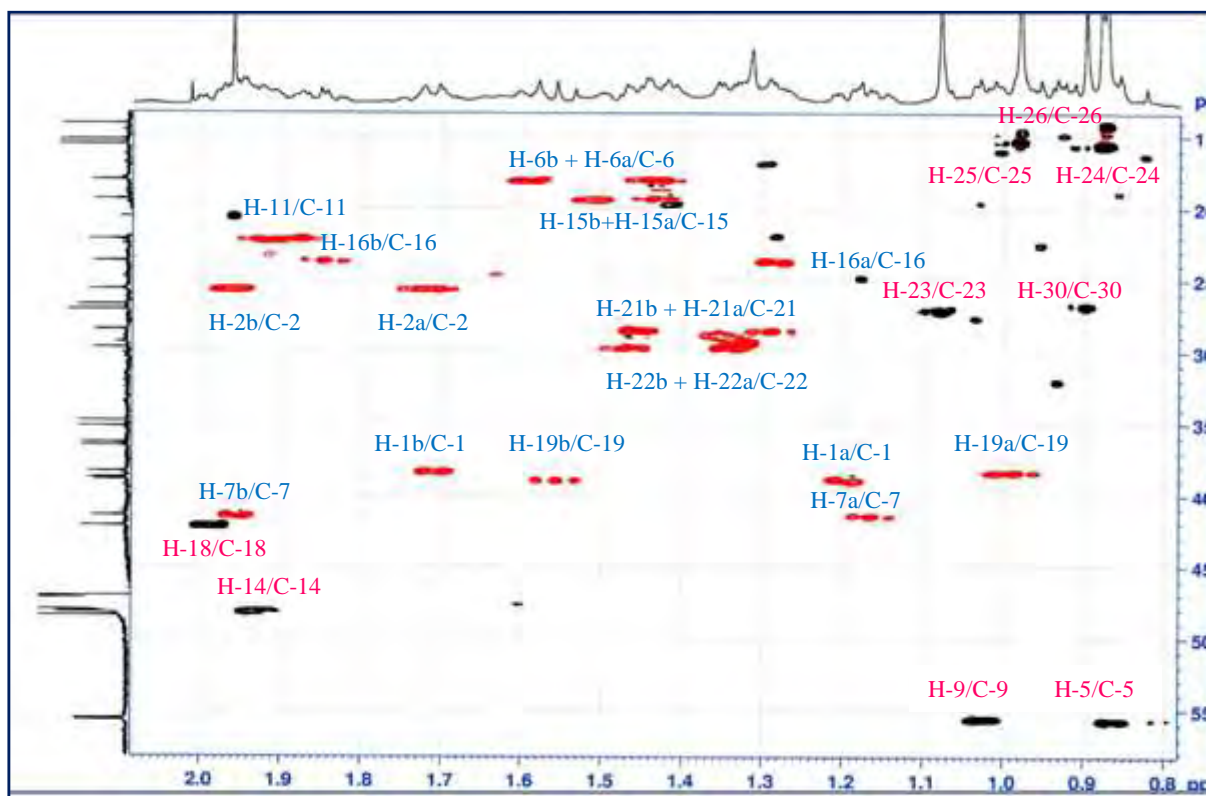
**Figure 68** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **6**

Les spectres de RMN<sup>1</sup>H (figure 69) et HSQC (figures 70 et 71) montrent de grandes ressemblances avec le composé **2**. En effet le spectre de RMN<sup>1</sup>H montre le signal du proton anomérique, les cinq groupements méthyliques résonants à champ fort entre 0,87 et 1,08 ppm, le signal du proton résonant à 5,37 ppm (brd,  $J = 5,3$  Hz, H-12) et on identifie aussi deux systèmes AB dont l'un résonne à 3,16 ppm (d,  $J = 11,1$  Hz) et 3,50 ppm (d,  $J = 11,1$  Hz) et l'autre à 3,41 ppm (d,  $J = 10,9$  Hz) et 3,51 ppm (d,  $J = 10,9$  Hz), correspondant aux deux alcools primaires en C-28 et C-29.

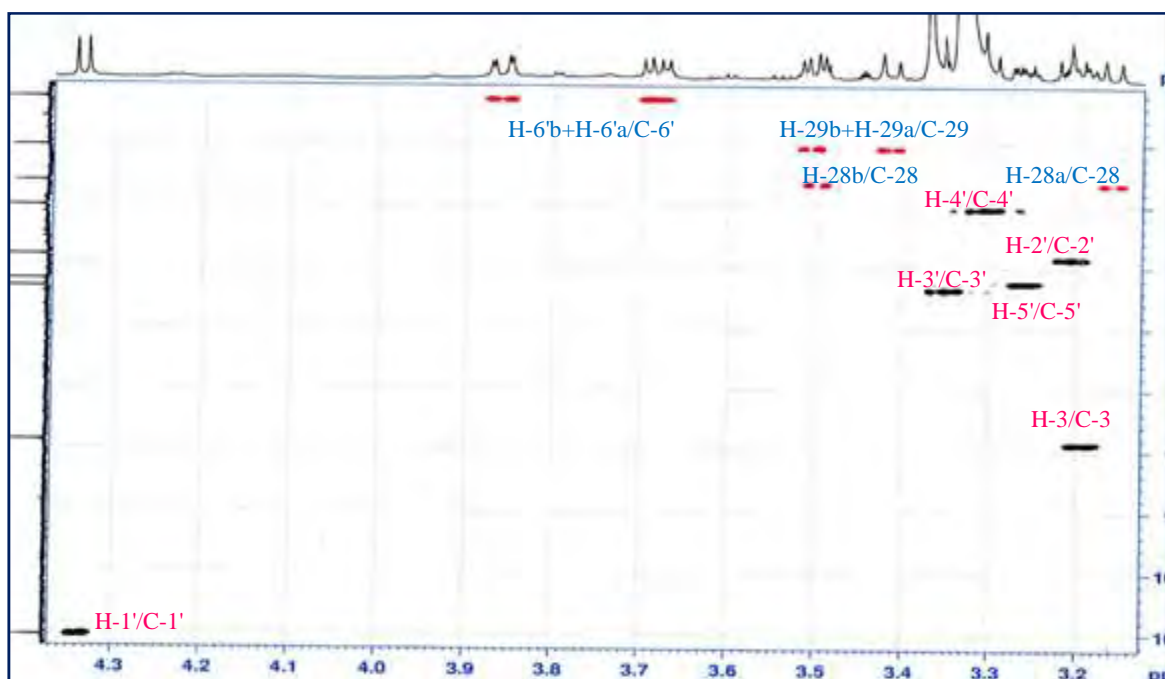


**Figure 69** : Spectres de RMN<sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H du composé **6** dans CD<sub>3</sub>OD.





**Figure 70** : Spectre HSQC du composé **6** (zone génine) dans CD<sub>3</sub>OD



**Figure 71** : Spectre HSQC du composé **6** (zone osidique) dans CD<sub>3</sub>OD

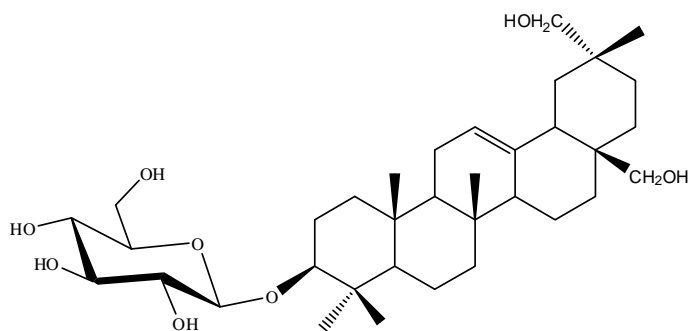
L'analyse combinée des spectres de RMN<sup>13</sup>C et HSQC permet de compter 35 atomes de carbone se répartissant en cinq méthyles, deux méthylènes oxygénés, dix méthylènes, six méthines, six carbones quaternaire et deux carbones éthyléniques, confirmant ainsi la présence du squelette oléanène.

Le nombre de méthylènes oxygénés réduit suggère qu'il s'agit du composé **2** amputé d'un groupement hydroxy méthylène, ceci est déduit par l'expérience COSY. En effet les deux protons méthyléniques H-15a et H-15b résonants à  $\delta_H$  1,44 et 1,52 corréleront non seulement avec les deux protons H-16 mais aussi avec un autre proton méthinique résonant à  $\delta_H$  1,93, qui ne peut être que le proton H-14 indiquant ainsi la disparition du groupement méthylène oxygéné porté habituellement par le carbone C-14.

Cette disparition est confirmée aussi par l'absence des corrélations entre les protons H-27 portés habituellement par le carbone C-14 et les carbones typiques en C-13, C-8 et C-15.

L'analyse des spectres COSY, HSQC et ROESY permet comme précédemment d'attribuer les protons et les carbones de glucopyranose.

Les expériences HSQC, COSY et HMBC combinées nous permettent d'assigner sans ambiguïté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones. L'analyse des spectres HMBC et ROESY permettent de placer le glucose en position 3 et de proposer pour ce composé, la structure nouvelle suivante : 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-14-*H*-27-nor-olean-12-ene-28,29-diol.



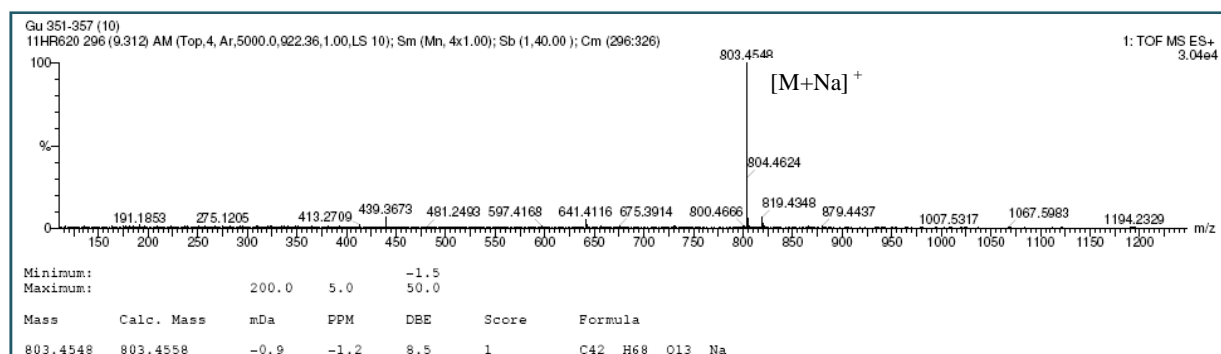
3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-14-*H*-27-nor-olean-12-ene-3 $\beta$ ,28,29-triol (**6**).

**Tableau 8** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **6** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)  | N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|----|---------------------|--------------------------------|--------------|---------------------|--|
| 1  | 38,4                | 0,99 tm (14,2), 1,71 m         | 20           | 34,9                | -  |
| 2  | 25,7                | 1,74 m, 1,96 m                 | 21           | 28,5                | 1,29 m, 1,45 m                             |
| 3  | 89,4                | 3,19 dd (11,8, 4,6,)           | 22           | 29,8                | 1,34 dm (12,8), 1,47 tm (12,8)             |
| 4  | 38,8                | -                              | 23           | 27,1                | 1,08, s                                    |
| 5  | 55,7                | 0,86 m                         | 24           | 15,6                | 0,87, s                                    |
| 6  | 18,1                | 1,43 m, 1,59 dm (13,6)         | 25           | 15,3                | 0,98, s                                    |
| 7  | 41,5                | 1,16 td (13,8 - 2,7), 1,96 m   | 26           | 14,2                | 0,88, s                                    |
| 8  | 35,2                | -                              | 27           | -                   | -  |
| 9  | 55,6                | 1,03 dd (10,4 - 4,7)           | 28           | 68,2                | 3,16 d (11,1), 3,50 d (11,1)               |
| 10 | 36,4                | -                              | 29           | 65,3                | 3,41, d (10,9), 3,51 d (10,9)              |
| 11 | 22,2                | 1,90 m                         | 30           | 26,8                | 0,90 s                                     |
| 12 | 121,1               | 5,37 brd (5,3)                 | Glc (en C-3) |                     |  |
| 13 | 139,9               | -                              |              |                     |  |
| 14 | 48,2                | 1,93 m                         | 1            | 105,3               | 4,34 d (7,8)                               |
| 15 | 19,4                | 1,44 tm (14,2), 1,52 dm (15,0) | 2            | 74,3                | 3,21 dd (8,7 - 7,8)                        |
| 16 | 23,7                | 1,28 m, 1,85 td (13,0 - 4,3)   | 3            | 76,9                | 3,35 t (8,7)                               |
| 17 | 36,6                | -                              | 4            | 70,3                | 3,31 t (8,7)                               |
| 18 | 42,2                | 1,99 dm (13,6)                 | 5            | 76,2                | 3,26 ddd (9,4 - 5,5 - 2,3)                 |
| 19 | 38,9                | 1,20 dm (13,6), 1,56 t (13,6)  | 6            | 61,4                | 3,68 dd (11,9 - 5,5), 3,86 dd (11,9 - 2,3) |

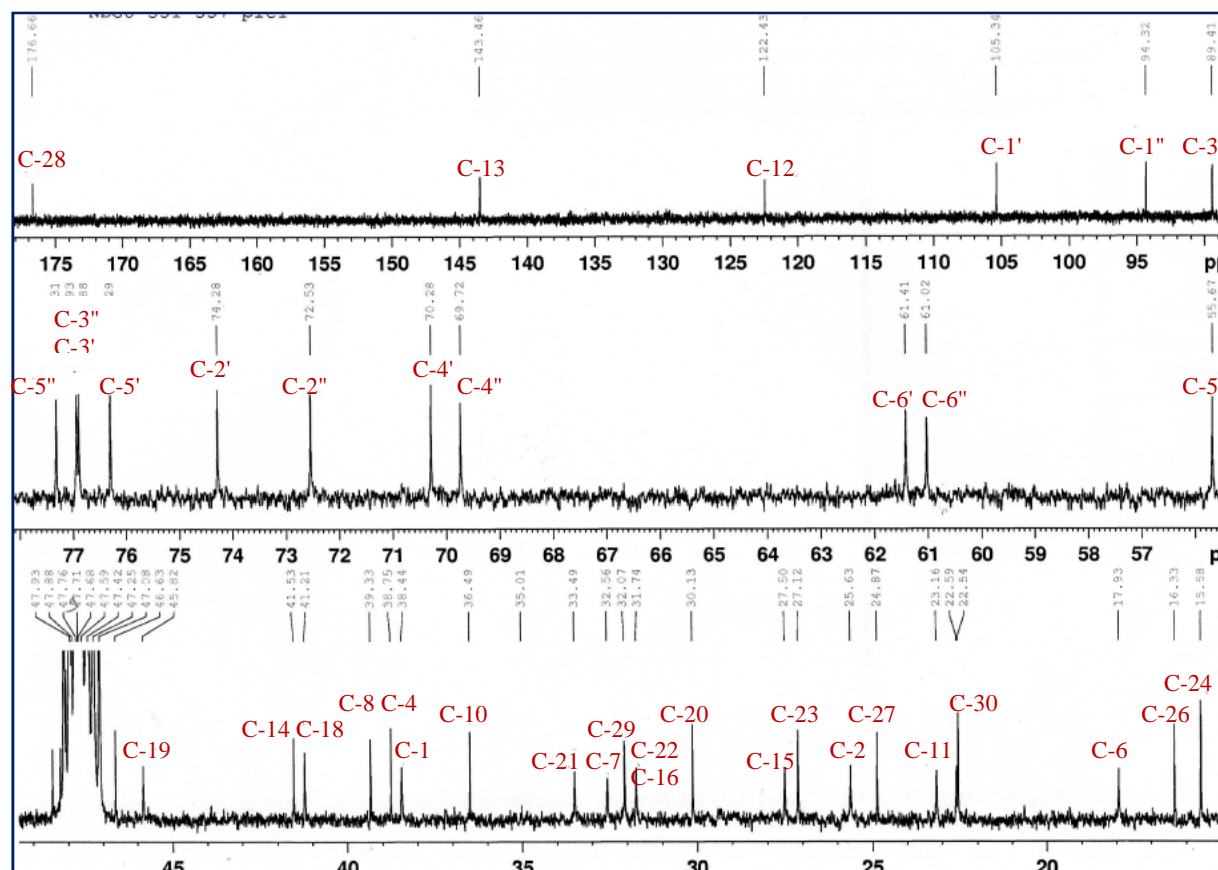
### III.4.3.7. Détermination structurale du composé 7

Le composé **7** présente une formule moléculaire en  $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$ . Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 72) qui montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  803,4548 (calculé 803,4558) correspondant à une masse moléculaire égale à 780.



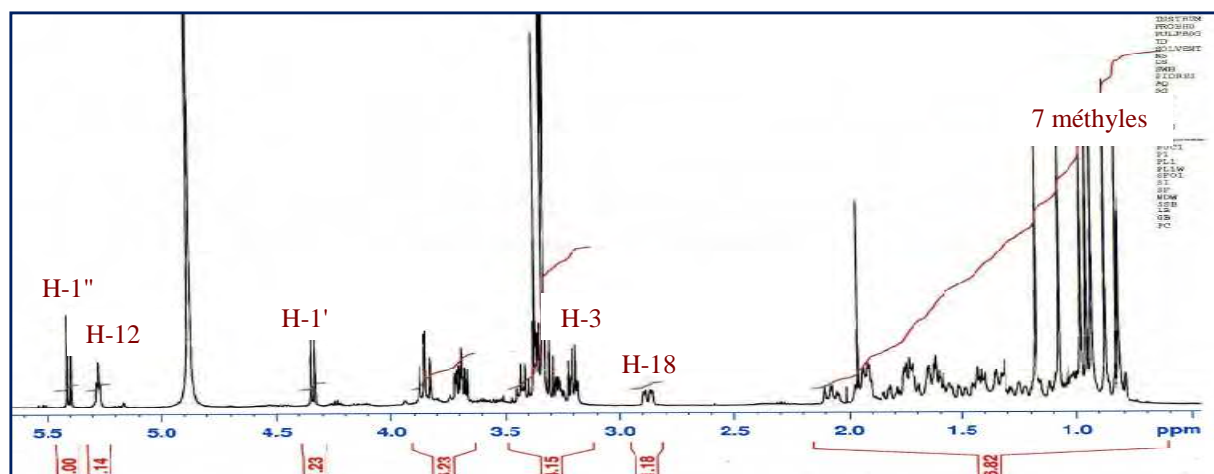
**Figure 72** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **7**

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 73) montre 42 carbones répartis comme suit : un groupement carbonyle, deux carbones éthyléniques, sept méthyles, dix méthylènes, quatre méthines et six quaternaires, ce qui suggère la présence d'un triterpène substitué par deux hexoses.



**Figure 73 :** Spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **7** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 74) montre la présence de sept fins singulets correspondant aux sept méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,07 (H-23), 0,87 (H-24), 0,98 (H-25), 0,82 (H-26), 1,18 (H-27), 0,93 (H-29) et 0,95 (H-30). Il révèle également un proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  5,27 (*t*,  $J=3,6$  Hz).



**Figure 74** : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  du composé **7** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

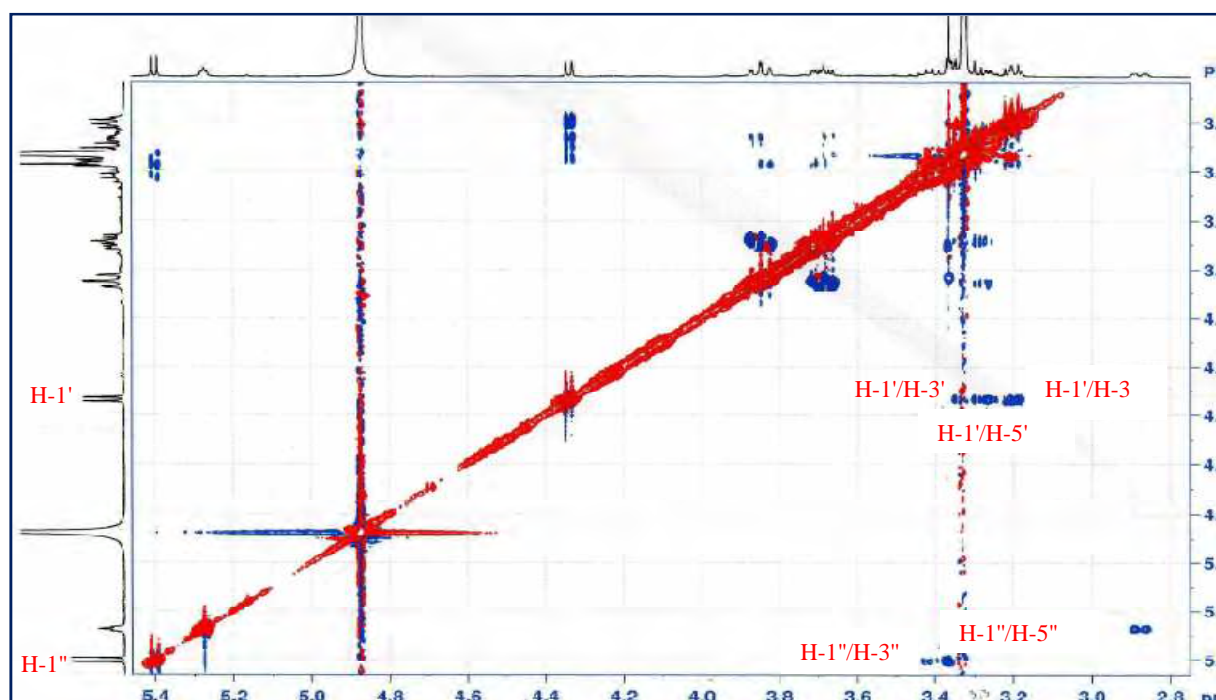
Par ailleurs les données du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  confirment la présence d'une double liaison éthylénique correspondante aux carbones C-12 et C-13 à  $\delta_{\text{C}}$  122,4 et 143,5 ppm respectivement, ce qui est en faveur encore d'un triterpène de type oléanène.

L'analyse combinée des spectres COSY, HSQC  $J$ -mod et HMBC permet d'identifier sans ambiguïté la génine comme étant l'acide oléanolique ou acide  $3\beta$ -hydroxyoléan-12-ène-28-oïque [109]. Le déblindage du carbone C-3 à 89,4 ppm et le blindage du carbonyle C-28 à 176,7 ppm suggère que cette génine éthérifiée en 3 et estérifiée en 28.

Sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$ , deux protons anomériques sont repérés à 4,34 ppm ( $d$ ,  $J = 7,8$  Hz) et 5,40 ppm ( $d$ ,  $J = 8,2$  Hz). Leurs carbones respectifs attribués à l'aide du spectre HSQC résonent à 105,3 et 94,3 ppm (tableau 9).

Le spectre COSY H-H permet d'identifier sept protons d'un hexose en partant du proton anomérique H-1' à 4,34 ppm. Le proton H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,21,  $dd$ ,  $J = 9,0 - 7,9$  Hz) est couplé au proton H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  3,34,  $dd$ ,  $J = 9,0 - 3,3$  Hz), lui-même couplé au proton H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3,36,  $dd$ ,  $J = 3,2 - 0,9$  Hz). La faible constante de couplage entre ces deux protons ( $J_{\text{H-3'-H-4'}} = 3,3$  Hz) indique d'emblée que le proton H-4' est en position équatoriale. Le proton H-5' est localisé sur le spectre ROESY par sa corrélation avec le proton H-1'. Il couple, sur le spectre COSY avec les deux protons H-6'a et H-6'b.

Les effets rOe (figure 75) observés entre les protons H-1'/ H-3' et H-1'/H-5' et les constantes de couplage entre tous les protons de cet unité osidique sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-galactopyranose.



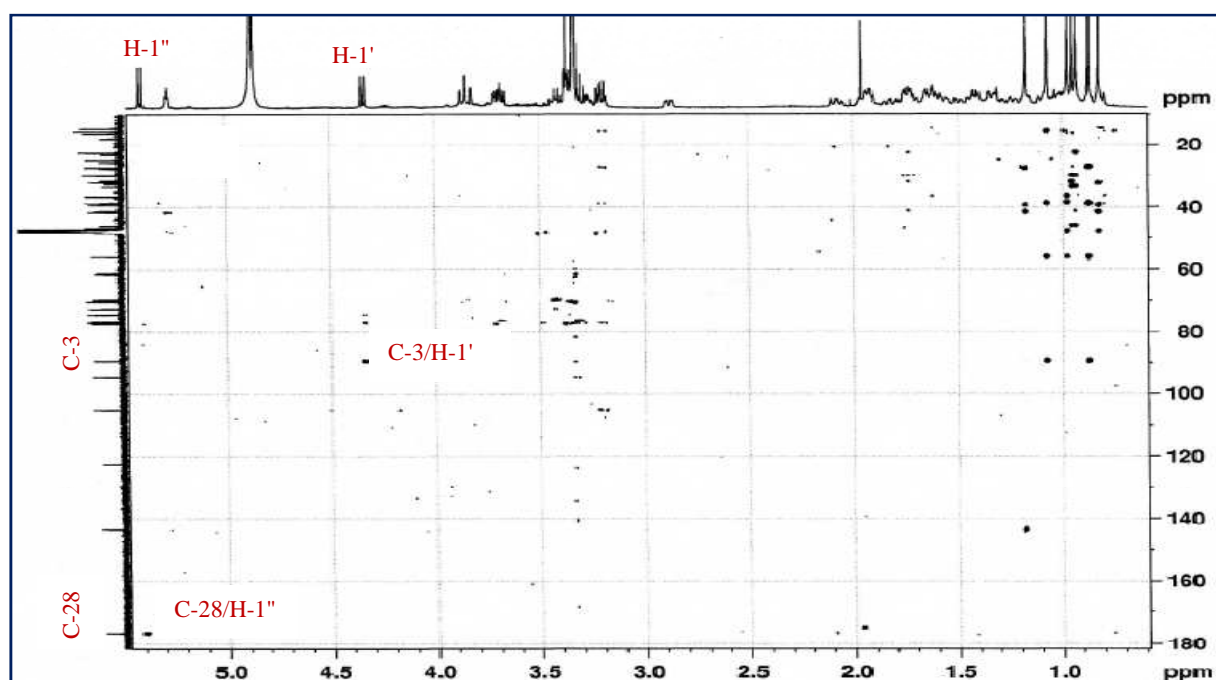
**Figure 75** : Spectre ROESY du composé **7** dans CD<sub>3</sub>OD

Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones attribués après analyse du spectre HSQC sont en accord avec celles d'un  $\beta$ -D-galactopyranose terminal [110, 111].

A partir du second proton anomérique résonant à 5,40 ppm on relie sept protons correspondant à un deuxième hexose. Les grandes valeurs de constante de couplages montrent que tous ces protons sont transdiaxiaux. On identifie ainsi un glucopyranose de configuration  $\beta$   $\square$  comme l'indique la constante de couplage ( $J_{H-1''-H-2''} = 8,2$  Hz). Les valeurs déblindées du H-1'' et blindées du C-1'' sont caractéristiques d'un glucose impliquée dans une liaison ester avec le carbone C-28 de la génine [110].

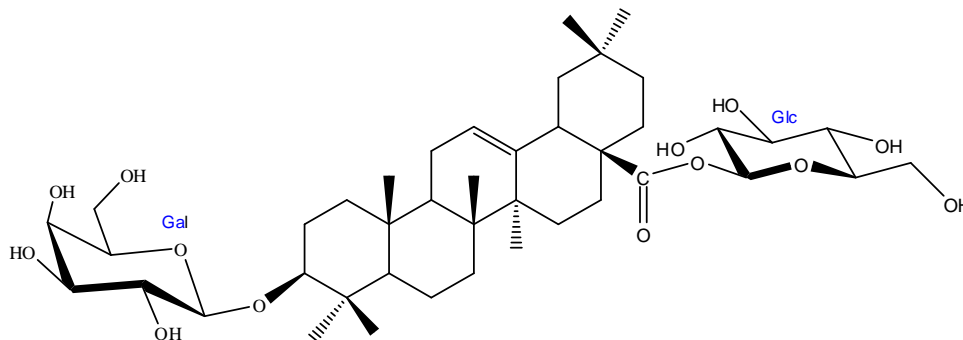
Le spectre HMBC (figure 76) permet d'établir les points de branchement entre ces deux sucres et la génine et cela par l'observation des couplages  $^3J_{H-C}$  suivants entre :

- Le proton anomère H-1' du galactose et le carbone C-3 de la génine.
- Le proton anomère H-1'' du glucose et le carbone C-28 de la génine.



**Figure 76 :** Spectre HMBC du composé **7** dans le CD<sub>3</sub>OD

Le saponoside **7** est donc identifié comme un saponoside bidesmosidique de l'acide oléanolique de structure : 3-*O*-β-D-galactopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-28-oic ester.



3-*O*-β-D-galactopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosyl-12-ène-28-oic ester (**7**).

Ce composé est de structure connue, précédemment isolé d'*Ilex paraguariensis*. [112] Les données de RMN sont en accord avec ceux de la littérature [112, 113].

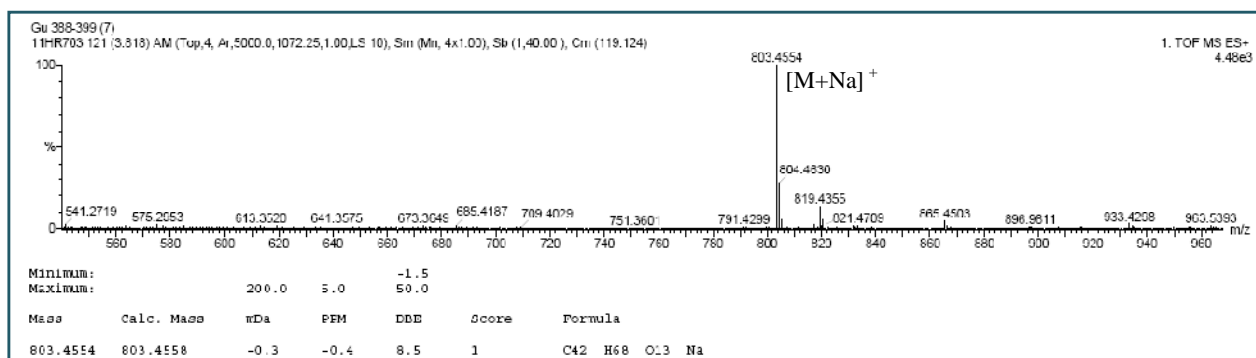
**Tableau 9** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **7** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)   | N°            | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)               |
|----|---------------------|---------------------------------|---------------|---------------------|---|
| 1  | 38,4                | 1,01 m, 1,64 m                  | 23            | 27,1                | 1,07 s                                      |
| 2  | 25,6                | 1,70 m, 1,94 m                  | 24            | 15,6                | 0,87 s                                      |
| 3  | 89,4                | 3,19, m                         | 25            | 14,9                | 0,98 s                                      |
| 4  | 38,7                | -                               | 26            | 16,3                | 0,82 s                                      |
| 5  | 55,7                | 0,82 dm (12,9)                  | 27            | 24,9                | 1,18 s                                      |
| 6  | 17,9                | 1,41 td (12,6 - 3,8),<br>1,56 m | 28            | 176,7               | -   |
| 7  | 32,6                | 1,33 dm (11,8), 1,50 m          | 29            | 32,1                | 0,93 s                                      |
| 8  | 39,3                | -                               | 30            | 22,6                | 0,95 s                                      |
| 9  | 47,7                | 1,60 t (3,2)                    | Gal (en C-3)  |                     |   |
| 10 | 36,5                | -                               | 1             | 105,3               | 4,34 d (7,8)                                |
| 11 | 23,2                | 1,92 dd (10,8 - 4,0)            | 2             | 74,3                | 3,21 dd (9,0, 7,9)                          |
| 12 | 122,4               | 5,27 t (3,6)                    | 3             | 76,9                | 3,34 dd (9,0 - 3,3)                         |
| 13 | 143,5               | -                               | 4             | 70,3                | 3,36 dd (3,2-0,9)                           |
| 14 | 41,5                | -                               | 5             | 76,3                | 3,26 m                                      |
| 15 | 27,5                | 1,11 m<br>1,82 m                | 6             | 61,4                | 3,67 dd (11,7- 5,3),<br>3,86 dd (11,7-2)    |
| 16 | 31,7                | 1,75 m                          | Glc (en C-28) |                     |   |
| 17 | -                   | -                               | 1             | 94,3                | 5,40 d (8,2)                                |
| 18 | 41,2                | 2,60 dd (13,7 - 4,2)            | 2             | 72,5                | 3,34 t (8, 0)                               |
| 19 | 45,8                | 1,17, m, 1,73 tm (11,5)         | 3             | 76,9                | 3,43 t (8,3)                                |
| 20 | 30,1                | -                               | 4             | 69,7                | 3,30 t (8,5)                                |
| 21 | 33,5                | 1,23 m, 1,42 tm (11)            | 5             | 77,3                | 3,36 m                                      |
| 22 | 31,7                | 1,63 m                          | 6             | 61,0                | 3,70 dd (11,9 - 5,3)<br>3,83 dd (11,8 -1,3) |



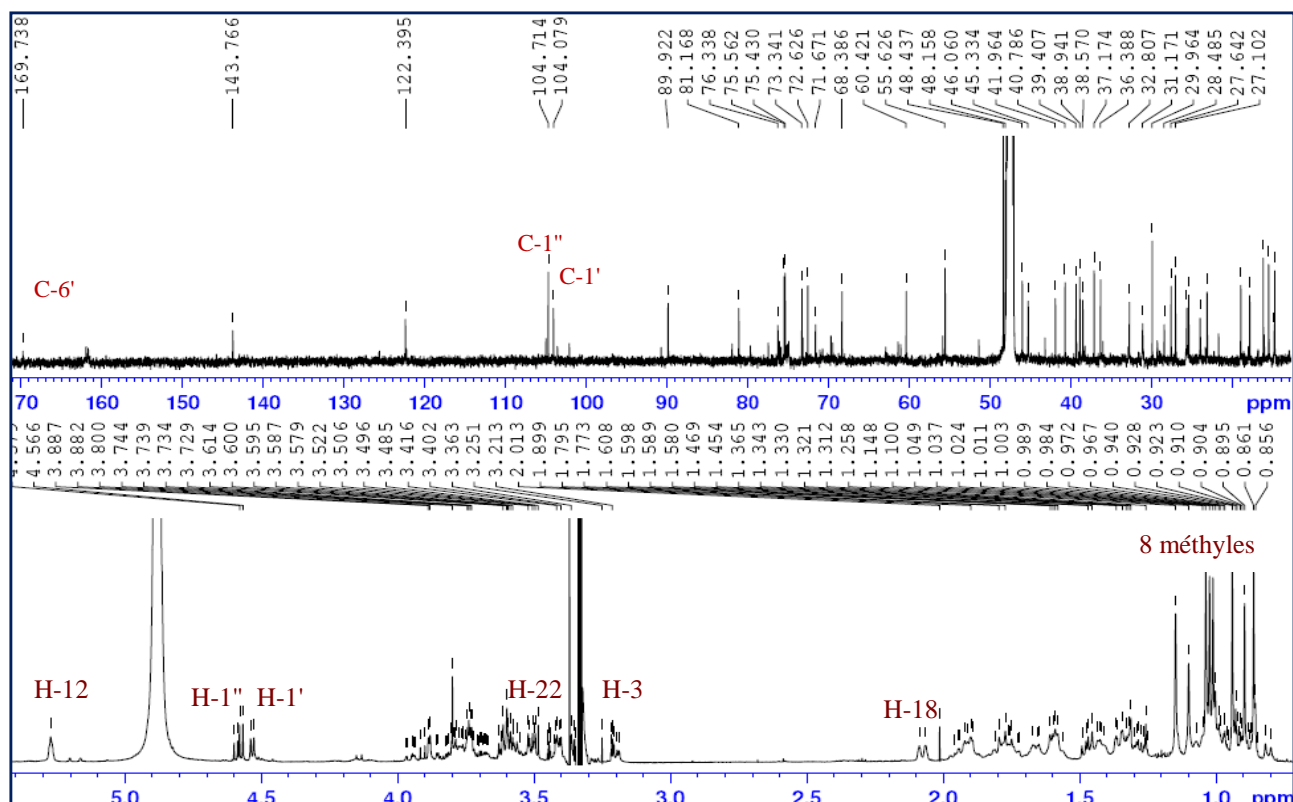
### III. 4.3.8. Détermination structurale du composé **8**

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 77), montre un pic pour l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  803,4554  $[M+Na]^+$  (calculé 803,4558), soit une masse moléculaire égale à 780 *uma* et correspondant à une formule brute de  $C_{42}H_{68}O_{13}$ .



**Figure 77** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **8**.

L'observation du spectre de RMN  $^1H$  (figure 78) du composé **8** permet d'indiquer sa nature triterpénique, par la présence de certains signaux caractéristiques cités précédemment. En effet, on observe huit signaux singulets fins attribuables aux groupements méthyles, un massif de protons résonants entre 0,81 et 2,07 ppm, correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles, un proton éthylénique à 5,27 ppm, il montre aussi deux signaux déblindés correspondant à des CH oxygénés dont l'un résonne à 3,41 ppm (*dd*,  $J = 8,8- 3,3$  Hz) et l'autre à 3,20 ppm (*dd*,  $J = 11,7- 4,4$  Hz).



**Figure 78:** Spectres de RMN $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  du composé **8**.

L'expérience HSQC permet de détecter leurs carbones respectifs à 75,6 et 89,9 ppm. Ces observations nous orientent cette fois vers une génine triterpénique à squelette oléan-12-ène, porteuse de deux groupements hydroxyle (OH).

L'analyse COSY H-H (figure 79) montre une tache de corrélation entre les deux protons H-21 résonants à 1,36 et 1,47 ppm et le proton résonant à 3,41 ppm ce qui laisse logiquement déduire que l'un des groupements OH est fixé au carbone C-22.

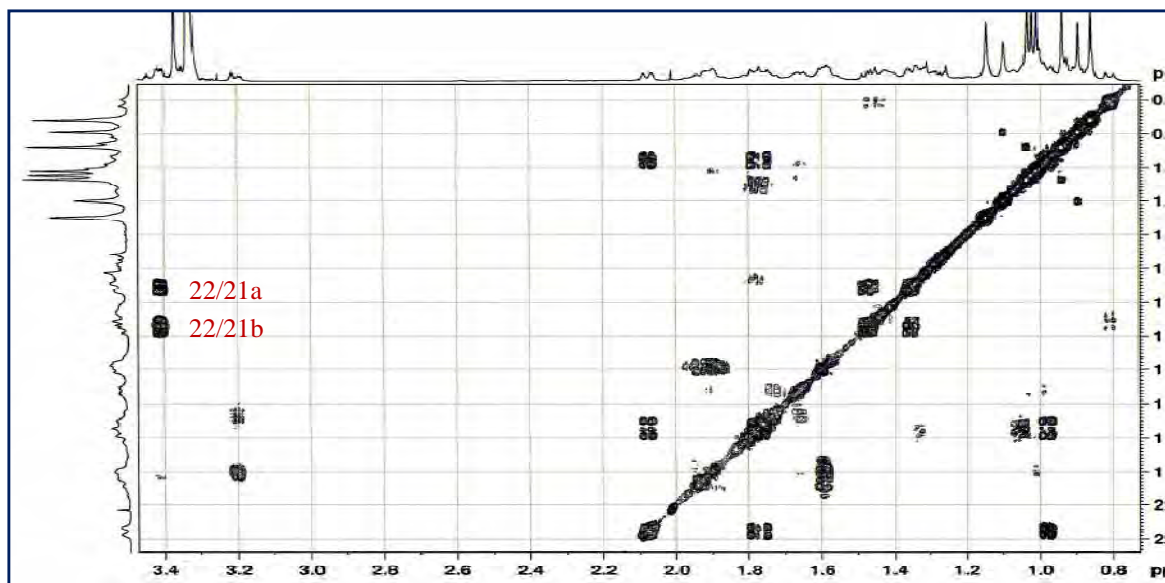


Figure 79 : Spectre COSY du composé **8** dans le CD<sub>3</sub>OD.

Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC (figure 80) qui montre des corrélations  $^3J_{H-C}$  entre les protons du méthyle 28 et le carbone C-22.

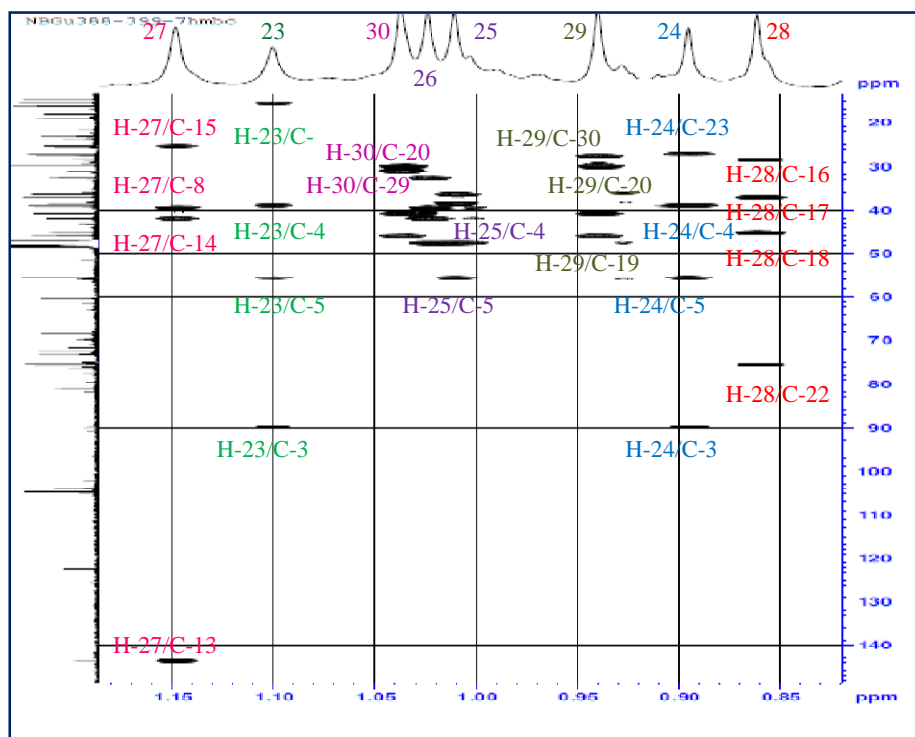


Figure 80 : Spectre HMBC du composé **8** dans le CD<sub>3</sub>OD.

L'autre groupement OH est fixé en position C-3 par la présence de corrélations en COSY entre le proton H-3 à 3,20 ppm et les deux protons H-2 et par la corrélation HMBC entre ce proton H-3 est les deux méthyles C-23 et C-24. L'orientation  $\alpha$  axiale des protons H-3 et H-22 est établie par les effets rOe qu'ils présentent, respectivement, avec les protons du méthyle CH<sub>3</sub>-23 et du méthyle CH<sub>3</sub>-29 en position  $\alpha$  équatoriale. La génine est donc identifiée comme le sophoradiol [109], génine connue pour être présente dans la famille des Fabaceae [114, 115].

Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H, deux protons anomériques sont repérés à 4,53 (d,  $J = 7,1$  Hz) et 4,57 ppm (d,  $J = 7,7$  Hz). Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC, résonnent à 103,6 et 104,7 ppm.

L'analyse du spectre COSY révèle que le proton anomérique à 4,53 ppm fait parti d'un système à cinq spins couplés. Les constantes de couplage entre les protons H-2' et H-3', H-3' et H-4', H-4' et H-5' sont toutes supérieures à 8 Hz indiquant une position trans diaxiale de ces protons. Le spectre HMBC visualise un carbonyle à 170 ppm couplé au proton H-5' indiquant un acide uronique. Les déplacements chimiques des carbones déterminés à partir du spectre HSQC et les grandes valeurs des constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosique (Glc A) [110,111, 116].

A partir du deuxième proton anomérique à 4,57 ppm est identifié à l'aide des spectres COSY, HSQC et ROESY, un  $\beta$ -D-galactopyranose caractérisé par son proton H-4'' en position équatoriale. D'après les valeurs  $\delta_H$  et  $\delta_C$  (tableau 10), ce galactopyranose est en position terminale [110].

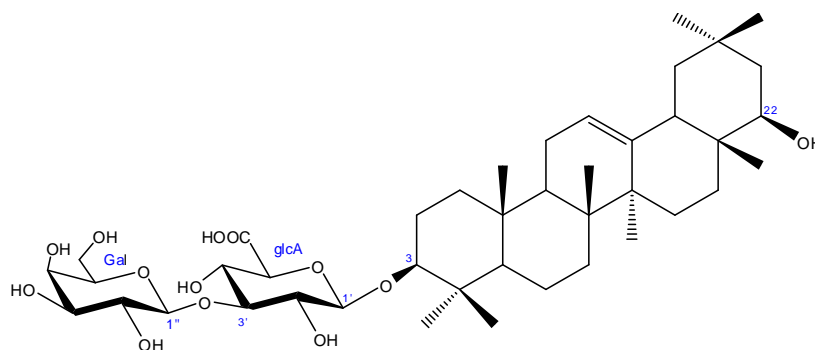
Le déblindage des carbones C-3 de la génine et C-3' de l'acide glucuronique permettent de supposer une chaîne diosidique [ $\beta$ -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcA] attachée sur l'hydroxyle en position 3 de la génine.

Les corrélations <sup>3</sup> $J_{H-C}$  visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-3 de la génine et le carbone C-1' de l'acide glucuronique et entre le proton H-1'' du galactose et le C-3' de l'acide glucuronique confirment le séquençage du disaccharide.

L'analyse du spectre ROESY (figure 81) permet de confirmer cet enchaînement par la visualisation d'effets rOe entre les H-1'' Gal/H-3' GlcA et H-1'GlcA/H-3 de la génine.

Toutes ces données nous permettent de proposer pour le composé **8**, la structure suivante :

3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl sophoradiol.



3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl sophoradiol (**8**).

Ce composé **8** est de structure nouvelle, de par son enchainement osidique en 3 de l'acide glucuronique et non en position 2 comme dans le cas de kaikasaponin III [114, 117].

**Tableau 10** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **8** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , J Hz) | N°            | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , J Hz) |
|----|---------------------|--|---------------|---------------------|--|
| 1  | 38,3                | 1,01 m, 1,66, dt (13,0 - 3,0)          | 23            | 27,1                | 1,10 s                                 |
| 2  | 25,7                | 1,75 tm (13,9), 1,91 m                 | 24            | 15,6                | 0,89 s                                 |
| 3  | 89,9                | 3,20 dd (11,7- 4,4)                    | 25            | 16,3                | 1,01 s                                 |
| 4  | 38,9                | -                                      | 26            | 14,8                | 1,02 s                                 |
| 5  | 55,6                | 0,81 dm (11,8)                         | 27            | 24,1                | 1,15 s                                 |
| 6  | 17,9                | 1,46 t (12,5), 1,60 m                  | 28            | 19,0                | 0,86 s                                 |
| 7  | 32,8                | 1,42 m, 1,58 m                         | 29            | 31,2                | 0,94 s                                 |
| 8  | 39,4                | -                                      | 30            | 27,6                | 1,04 s                                 |
| 9  | 47,9                | 1,59 dd (11,5 - 6,4)                   | GlcA (en C-3) |                     |  |
| 10 | 36,4                | -                                      | 1             | 103,6               | 4,53 d (7,1)                           |
| 11 | 23,2                | 1,92 m                                 | 2             | 76,3                | 3,61 t (8,2)                           |
| 12 | 122,4               | 5,27 brs                               | 3             | 81,2                | 3,58 t (9,6 - 8,2)                     |
| 13 | 143,8               | -                                      | 4             | 71,7                | 3,56 t (9,6)                           |
| 14 | 41,9                | -                                      | 5             | 75,2                | 3,78 m                                 |
| 15 | 25,5                | 1,06 dm (14,0), 1,81 m                 | 6             | 170,0               | -                                      |
| 16 | 28,5                | 1,33 m, 1,76 m                         | Gal (en C-3') |                     |  |
| 17 | 37,2                | -                                      | 1             | 104,7               | 4,57 d (7,7)                           |
| 18 | 45,3                | 2,08 dm (13,7)                         | 2             | 72,6                | 3,62 dd (9,5 - 7,7)                    |
| 19 | 46,1                | 0,98 dd (10,7 - 2,7), 1,77 t (13,4)    | 3             | 73,3                | 3,51 dd (9,7- 3,4)                     |
| 20 | 29,9                | -                                      | 4             | 68,4                | 3,88 d (3,1)                           |
| 21 | 40,8                | 1,36 dm (13,3), 1,47 m                 | 5             | 75,4                | 3,49 t (6,6)                           |
| 22 | 75,6                | 3,41 dd (8,8 - 3,3)                    | 6             | 60,4                | 3,74 dd (6,2 - 3,1)                    |

### III.4.3.9. Détermination structurale du composé 9

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 82), engendre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  949,5134  $[M+Na]^+$  (calculé 949,5137), correspondant à la formule brute  $C_{48}H_{78}O_{17}Na$ , soit une masse moléculaire égale à 926, indiquant que le composé 9 possède un désoxyhexose supplémentaire par rapport au saponoside 8 (+ 146 *uma*).

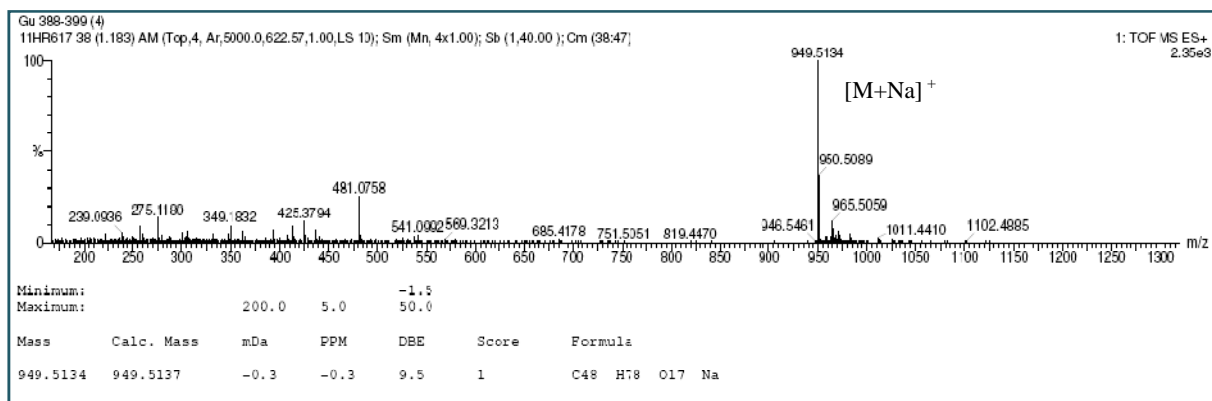


Figure 82: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 9.

Les spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (figure 83 et 84) du composé 9 montrent de grandes ressemblances avec le composé 8 décrit précédemment. Ils permettent d'observer tous les signaux de la génine et des unités osidiques, la seule différence notable réside au niveau de la partie osidique et cela par l'apparition d'un proton anomérique supplémentaire déblindé à 5,20 ppm.

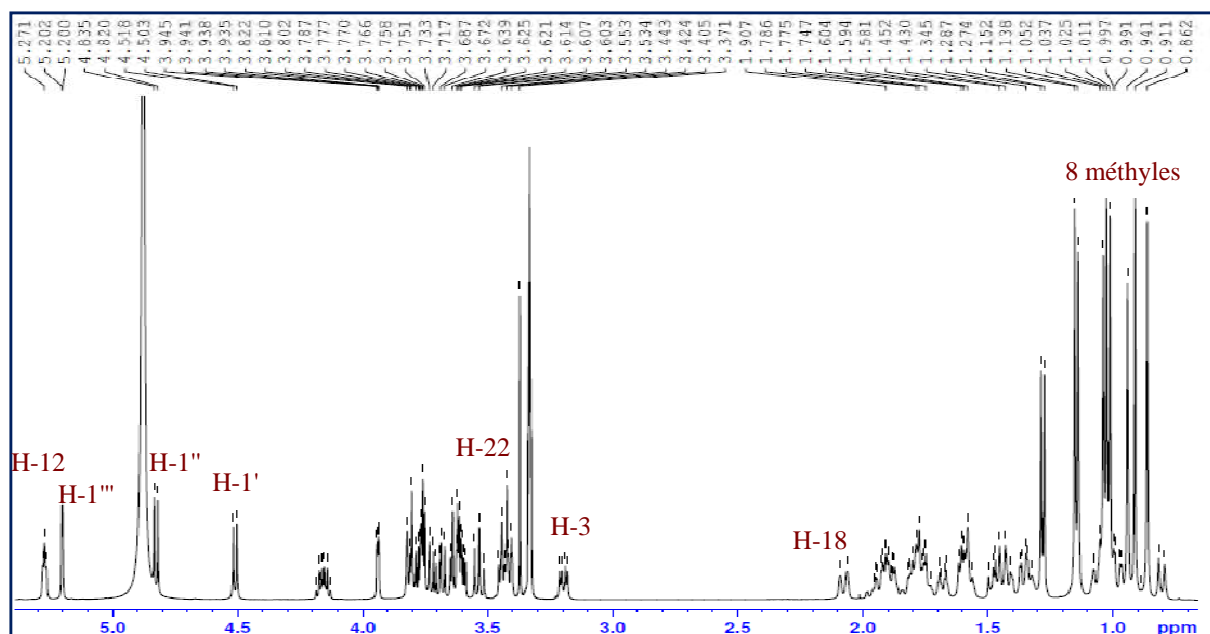


Figure 83: Spectre de RMN<sup>1</sup>H du composé **9**.

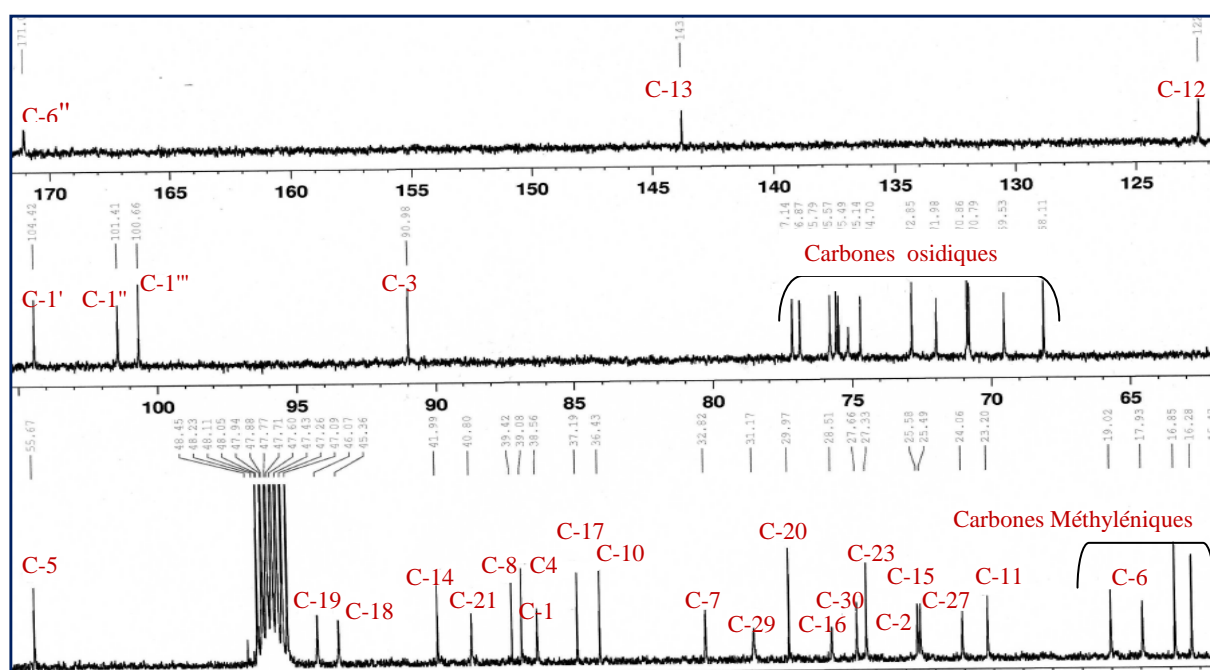


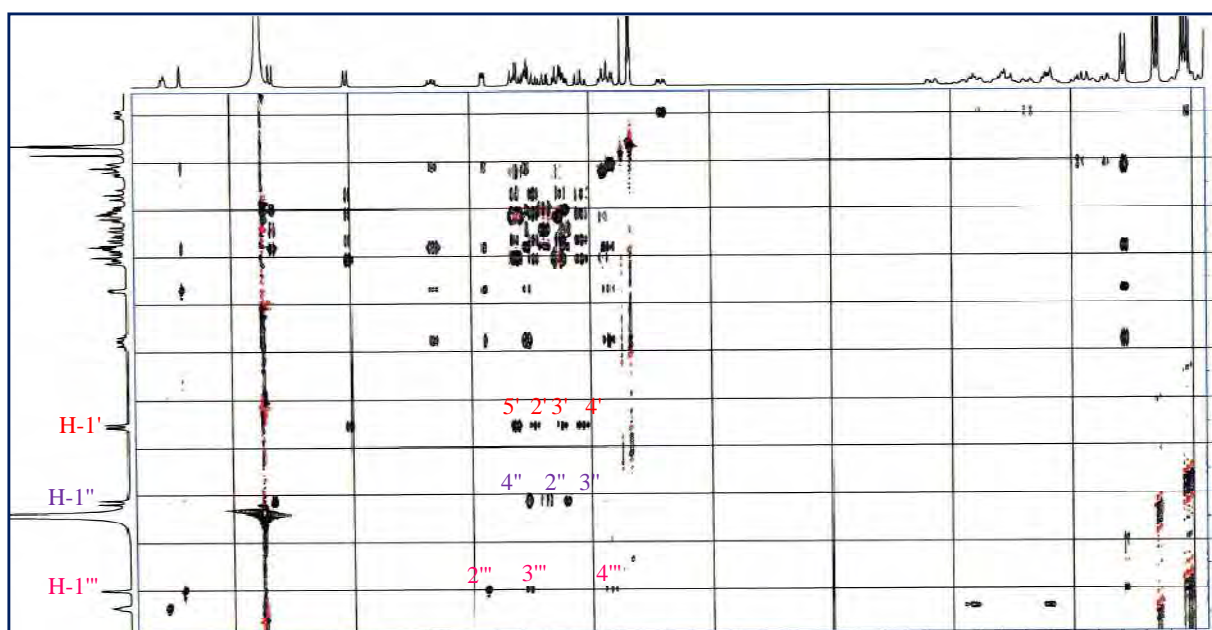
Figure 84: Spectre de RMN<sup>13</sup>C du composé **9**.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC permet d'identifier les deux sucres communs avec le composé **8** soit :

- un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosique à partir de l'anomère à 4,51 ppm (H-1')
- un  $\beta$ -D-galactopyranose à partir de l'anomère à 4,82 ppm (H-1'').

A partir du proton anomérique supplémentaire résonnant à 5,20 ppm, l'analyse des spectres COSY et TOCSY (figure 85) permet de relier tous les protons d'un désoxy-6-hexose, à travers leurs taches de corrélation. En effet, elle met en évidence les couplages entre :

- le proton H-1''' (*d*,  $J = 1,6$  Hz) et le proton H-2''' (*dd*,  $J = 3,3 - 1,6$  Hz), lui-même corrélé au proton H-3''' résonnant sous forme d'un doublet de doublets à 3,76 ppm (*dd*,  $J = 9,4 - 3,5$  Hz). La petite valeur de la constante de couplage  $J_{H-2'''-H-3'''} = 3,5$  Hz indique que le proton H-2''' est en position équatoriale, alors que la grande constante de couplage  $J_{H-3'''-H-4'''} = 9,4$  Hz révèle une position axiale du proton H-3'''.
- le proton H-4''', couplé aux protons H-3''' et H-5''', résonne sous la forme d'un triplet à 3,42 ppm dont la constante de couplage ( $J = 9,4$  Hz) atteste d'une position trans-diaxiale des protons H-4''' et H-5'''.
- le proton H-5''' corrèle avec les protons du méthyle H-6''' (*d*,  $J = 6,2$  Hz) à 1,27 ppm. Ces corrélations permettent ainsi d'identifier un désoxy-6-hexose, il s'agit d'un rhamnose.



**Figure 85:** Spectre TOCSY du composé **9**.

Sur le spectre ROESY, l'absence des effets rOe entre le proton H-1''' et les protons H-3''' et H-5''' et la présence d'un effet rOe entre le proton H-1''' et H-2''', indiquent une configuration  $\alpha$  pour l'anomère. Ceci est vérifié par les déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  des carbones C-3''' et C-5''', déterminés à partir du spectre HSQC, qui sont en accord avec un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose en position terminale [110, 111].



Après l'identification des 3 unités osidiques, il faut maintenant déterminer leurs points de branchements. Le déblindage des carbones C-2' GlcA (77,1 ppm) et C-2'' Gal (75,5 ppm), laisse suggérer des substitutions à ces niveaux par des sucres.

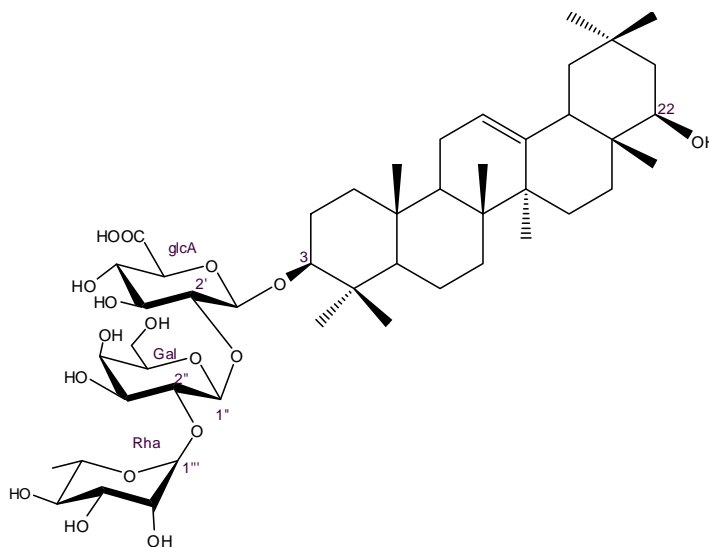
Le spectre HMBC permet d'établir la séquence des sucres ainsi que les points d'ancrage par l'observation des couplages suivants entre :

- H-1' GlcA / C-3 de la génine.
- H-1'' Gal / C-2' GlcA.
- H-1''' Rha / C-2''Gal.

Le spectre ROESY confirme l'enchaînement 3-O-[Rha (1→2) Gal (1→2) GlcA] sophoradiol par la présence des effets rOe entre H-1'' Gal / H-2'GlcA et H-1' GlcA / H-3 de la génine.

Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé :

3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl] 3β,22β-dihydroxyoléan-12-ène. Ce saponoside connu sous le nom de kaikasaponin III, a été isolé antérieurement à partir des parties aériennes d'*Abrus cantoniensis* [117] et *Sophora subprostrata* [114].



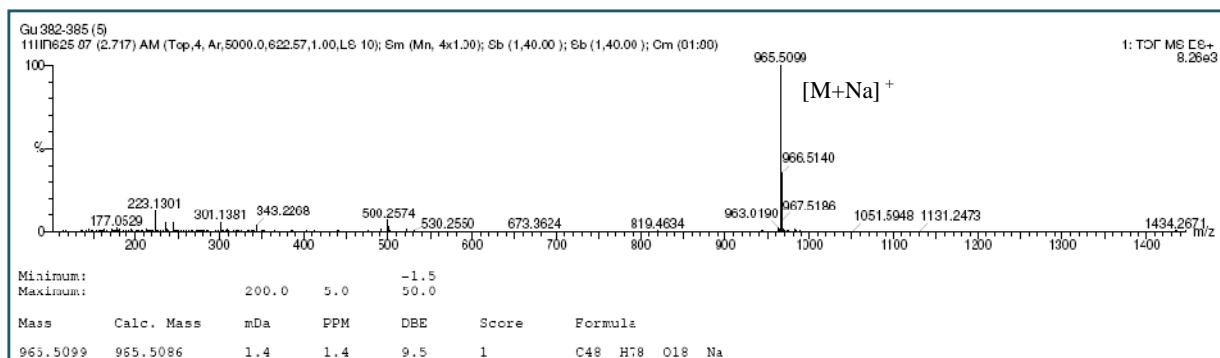
3-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2) -β-D-glucuronopyranosyl]-22-β-hydroxy-oléan-12-ène (**9**).

**Tableau 11** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **9** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)       | N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) |
|----|---------------------|-------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------|
| 1  | 38,6                | 1,02m, 1,67, td (13,2 - 3,2)        | 27             | 24,1                | 1,14 s                        |
| 2  | 25,6                | 1,88 m                              | 28             | 19,0                | 0,85 s                        |
| 3  | 90,9                | 3,19 dd, ( 11,7 - 4,5)              | 29             | 31,2                | 0,93 s                        |
| 4  | 39,1                | -                                   | 30             | 27,7                | 1,03 s                        |
| 5  | 55,7                | 0,80 dm, (11,1)                     | Glc A (en C-3) |                     |                               |
| 6  | 17,9                | 1,43 dm (11,1), 1,59 dm(11,8)       |                |                     |                               |
| 7  | 32,9                | 1,41 dm (10,6), 1,58 dm, (9,4)      | 1'             | 101,1               | 4,51 d (7,6)                  |
| 8  | 39,4                | -                                   | 2'             | 77,1                | 3,72 t (8,9)                  |
| 9  | 47,9                | 1,60 t (7,0)                        | 3'             | 76,9                | 3,62 t (9,2)                  |
| 10 | 36,4                | -                                   | 4'             | 71,9                | 3,53 t (9,3)                  |
| 11 | 23,2                | 1,92 ddd (14,7 - 5,3 - 2,6)         | 5'             | 75,1                | 3, 81 d (9,8)                 |
| 12 | 122,4               | 5,27 t (3,4)                        | 6'             | 171,1               | -                             |
| 13 | 143,8               | -                                   | Gal            |                     |                               |
| 14 | 41,9                | -                                   | 1''            | 104,4               | 4,82 d (7,6)                  |
| 15 | 25,5                | 1,06 m, 1,75, d (11,6)              | 2''            | 75,5                | 3,67 dd (9,5 -7,4)            |
| 16 | 28,5                | 1,33 dd (10,6 - 3,0), 1,77 d (11,6) | 3''            | 74,7                | 3,60 dd (9,5 - 3,5)           |
| 17 | 37,2                | -                                   | 4''            | 69,5                | 3,76 d (3,5)                  |
| 18 | 45,4                | 2,07 dm (14,4)                      | 5''            | 75,6                | 3,42, dd (5,2- 4,6)           |
| 19 | 46,1                | 0,97 dd (13,5 - 3,0), 1,77 t (13,8) | 6''a           | 61,5                | 3,62 dd (11,7 - 4,6)          |
|    |                     |                                     | 6''b           |                     | 3,80 dd (11,3 - 5,2)          |
| 20 | 29,9                | -                                   | Rha            |                     |                               |
| 21 | 40,8                | 1,35 dd (13,3 - 3,0), 1,47 t (11,1) | 1'''           | 100,6               | 5,20 d (1,6)                  |
| 22 | 75,8                | 3,42 dd (11,2 - 6,6)                | 2'''           | 70,8                | 3,93 dd (3,3 - 1,6)           |
| 23 | 27,3                | 1,12 s                              | 3'''           | 70,9                | 3,76 dd (9,4 - 3,5)           |
| 24 | 15,5                | 0,91 s                              | 4'''           | 72,9                | 3,42 t (9,4)                  |
| 25 | 14,8                | 0,99 s                              | 5'''           | 68,1                | 4,15 dq (9,5 - 6,2)           |
| 26 | 16,3                | 1,02 s                              | 6'''           | 16,9                | 1,27d (6,2)                   |

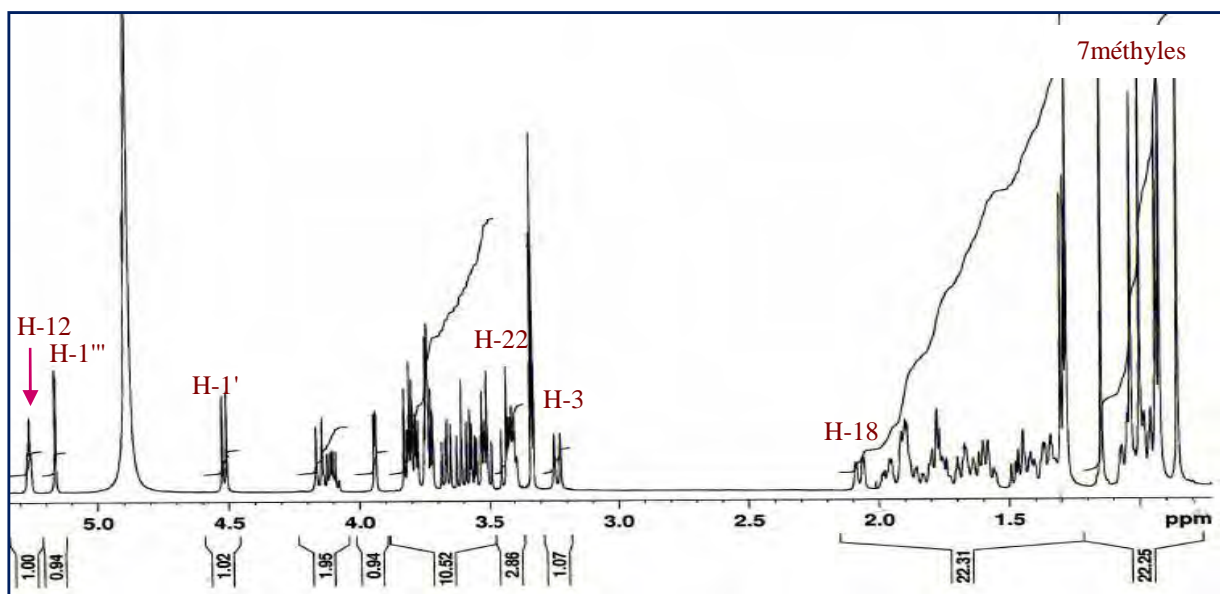
#### III.4.3.10. Détermination structurale du composé 10

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 86), montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  965,5099  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculé 965.5086) qui correspond à la formule brute en  $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}\text{Na}$  et donc une masse moléculaire supérieure à celle du composé **9** de 16 unités, soit un atome d'oxygène en plus.

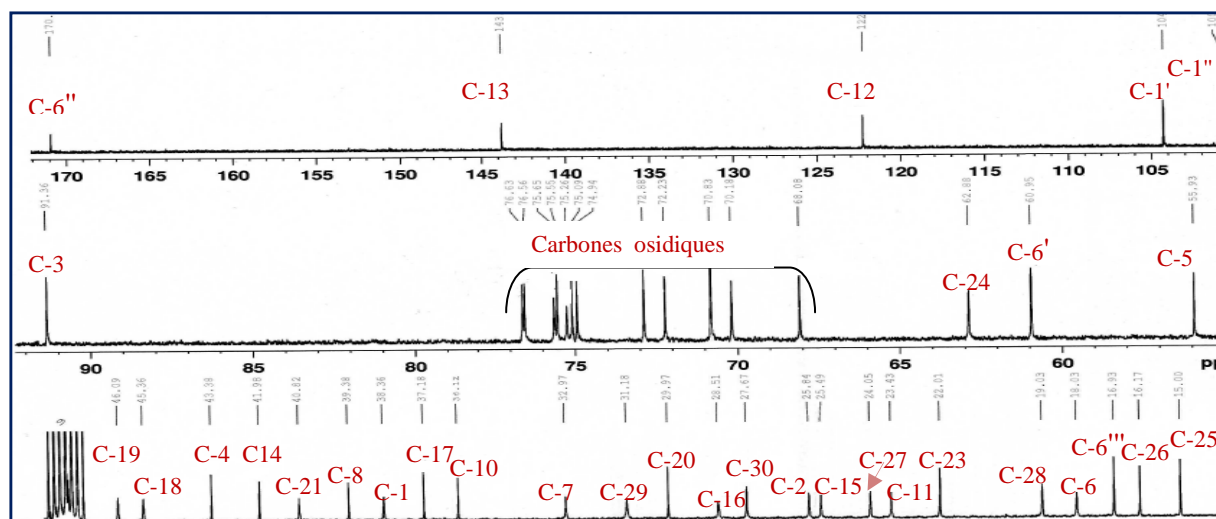


**Figure 86 :** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **10**

L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **10** (figure 87 et 88), montre comme pour le composé précédent, la présence d'une génine triterpénique à squelette  $\beta$ -amyrine, porteuse d'un groupement hydroxyle en position C-22 et de trois unités osidiques. L'identification de ces 3 unités osidiques indique la présence des mêmes sucres que ceux rencontrés dans le saponoside **9** : un acide  $\beta$ -D-glucuronique, un  $\beta$ -D-galactose et un  $\alpha$ -L-rhamnose terminal (tableau 12).



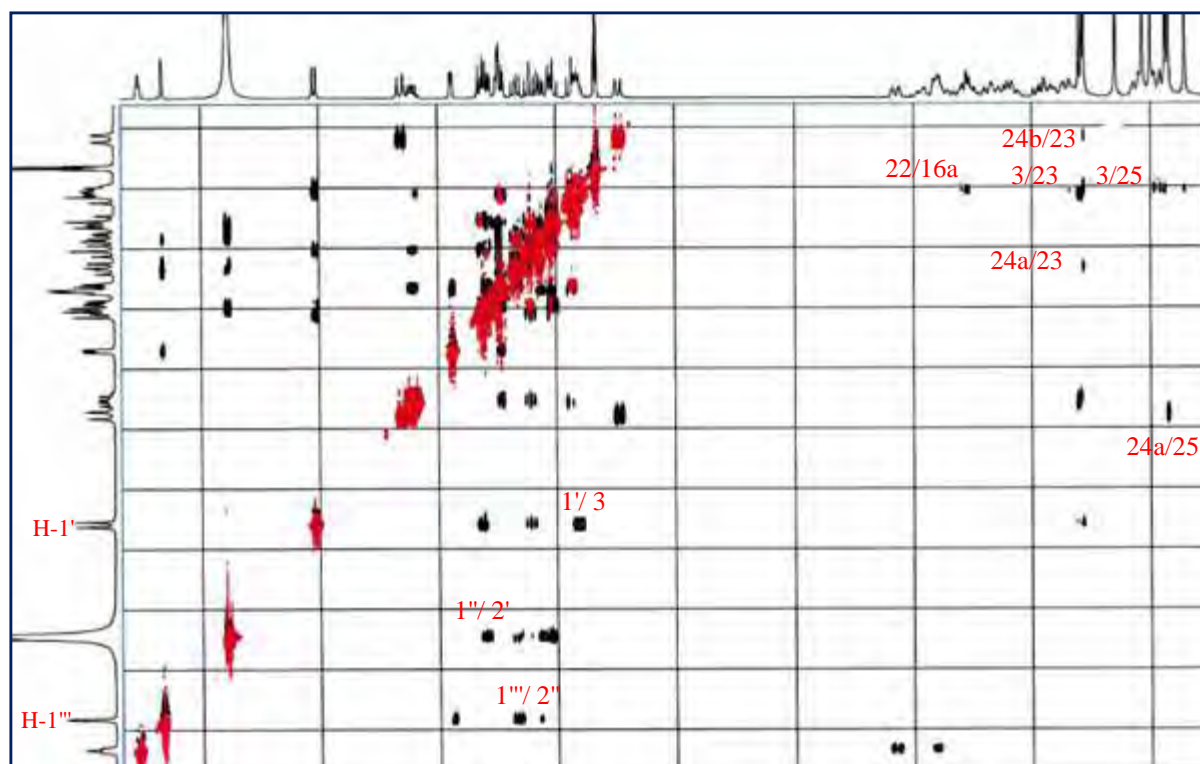
**Figure 87:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **10**.



**Figure 88:** Spectre de RMN<sup>13</sup>C du composé **10**

La différence notable entre ce composé et le composé **9** se situe au niveau de la génine et cela par la disparition du signal du méthyle 24 et l'apparition du signal de deux protons géminés (H-24) à  $\delta_H$  3,24 et 4,15 (*d*,  $J = 11,5$  Hz) portés par un carbone oxydé vers  $\delta_C$  62,9. Ces deux protons corrélerent sur le spectre HMBC avec les carbones C-3, C-4, C-5 et C-23, confirmant ainsi la localisation de la fonction CH<sub>2</sub>OH en C-24.

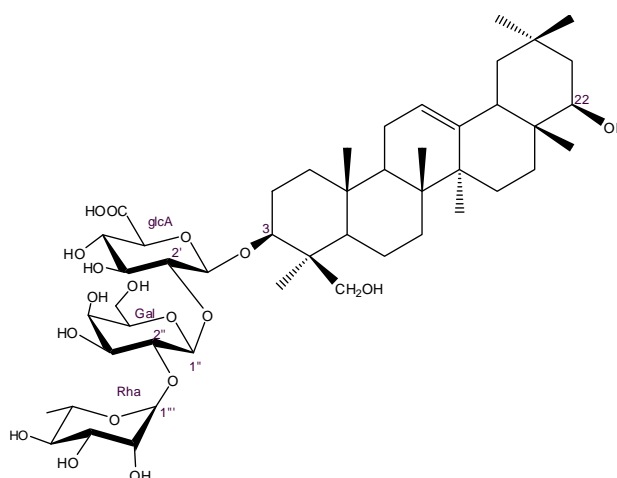
L'analyse du spectre ROESY (figure 89) permet de confirmer cette attribution par la visualisation d'effets rOe entre : H-3/H-23 et H-24 H-25. Les données de RMN sont en accord avec le soyasapogenol B [109, 114].



**Figure 89** : Spectre ROESY du composé **10** dans CD<sub>3</sub>OD

Cette analyse spectrale permet d'assigner la structure suivante pour le composé **10** :

3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] 3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,24-trihydroxyoléan-12-ène, appelé aussi Soyasaponin I. Ce composé a été antérieurement isolé à partir des racines de *Hedysarum polybotrys* [118], de *Rothia trifoliata* [119] et des graines de *Glycine max* L [120], *Sophora subprostrata* [114] et *Impatiens seculifer* [121].



3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-  
3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,24-trihydroxy-oléan-12-ène (Soyasaponine I) (**10**).

**Tableau 12** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **10** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)             | N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) |
|----|---------------------|---|----------------|---------------------|-------------------------------|
| 1  | 38,4                | 1,04 m, 1,68 td (13,1 - 3,4)              | 27             | 24,1                | 1,15 s                        |
| 2  | 25,8                | 1,86 m, 1,99 dd (9,9 - 4,2)               | 28             | 19,0                | 0,86 s                        |
| 3  | 91,4                | 3,41 dd, ( 8,6 - 3,4)                     | 29             | 31,2                | 0,94 s                        |
| 4  | 43,4                | -   | 30             | 27,7                | 1,03 s                        |
| 5  | 55,9                | 0,97 dm (10,2)                            | Glc A (en C-3) |                     |                               |
| 6  | 18,0                | 1,40 m, 1,66, m                           | 1'             | 104,3               | 4,51 d (7,9)                  |
| 7  | 32,9                | 1,44 m, 1,58, dm (11,6)                   | 2'             | 75,5                | 3,79 t (8,1)                  |
| 8  | 39,4                | -   | 3'             | 76,6                | 3,61 t (9,3)                  |
| 9  | 47,5                | 1,60 m                                    | 4'             | 72,2                | 3,52 t (9,3)                  |
| 10 | 36,1                | -   | 5'             | 74,9                | 3,82 d (9,0)                  |
| 11 | 23,4                | 1,91 m                                    | 6'             | 170,9               | -                             |
| 12 | 122,3               | 5,26 t (3,4)                              | Gal            |                     |                               |
| 13 | 143,8               | -   | 1''            | 101,9               | 4,89 nd*                      |
| 14 | 43,4                | -   | 2''            | 76,6                | 3,67 dd (9,6 - 7,5)           |
| 15 | 25,5                | 1,06 dm (10,5), 1,79 d (8,3)              | 3''            | 74,9                | 3,56 dd (9,6 - 3,4)           |
| 16 | 28,5                | 1,34 dm (10,7), 1,76 m                    | 4''            | 70,2                | 3,74 d (3,3)                  |
| 17 | 37,2                | -   | 5''            | 75,1                | 3,52 m                        |
| 18 | 45,4                | 2,07 dm (13,7)                            | 6''a           | 60,9                | 3,74 dd (9,5 - 3,6)           |
|    |                     |   | 6''b           |                     | 3,88 dd (11,7 - 3,7)          |
| 19 | 46,1                | 0,98 m, 1,78 t (13,7)                     | Rha            |                     |                               |
| 20 | 29,9                | -   | 1'''           | 100,8               | 5,17 d (1,6)                  |
| 21 | 40,8                | 1,35 dd (13,5 - 3,2), 1,47 dd (13, - 4,7) | 2'''           | 70,8                | 3,94 dd (3,4 - 1,8)           |
| 22 | 75,7                | 3,41 dd (11,7 - 6,7)                      | 3'''           | 70,8                | 3,73 dd (9,1 - 3,4)           |
| 23 | 22,0                | 1,28 s                                    | 4'''           | 72,8                | 3,43 t (9,6)                  |
| 24 | 62,9                | 3,24 d (11,5), 4,15 d (11,5)              | 5'''           | 68,1                | 4,11 dq (9,6 - 6,2)           |
| 25 | 15,0                | 0,92 s                                    | 6'''           | 16,8                | 1,30 d (6,2)                  |
| 26 | 16,2                | 1,00 s                                    |                |                     |                               |

\*nd, signal non détecté, sous le pic de HDO.

### III.4.3.11. Détermination structurale du composé 11

Le spectre de masse HR-ESI-MS du composé **11** (figure 90) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  963,4920  $[M+Na]^+$  (calculé 963,4929) qui correspond à la formule brute en  $C_{48}H_{76}O_{18}Na$ , soit une masse moléculaire de 940.

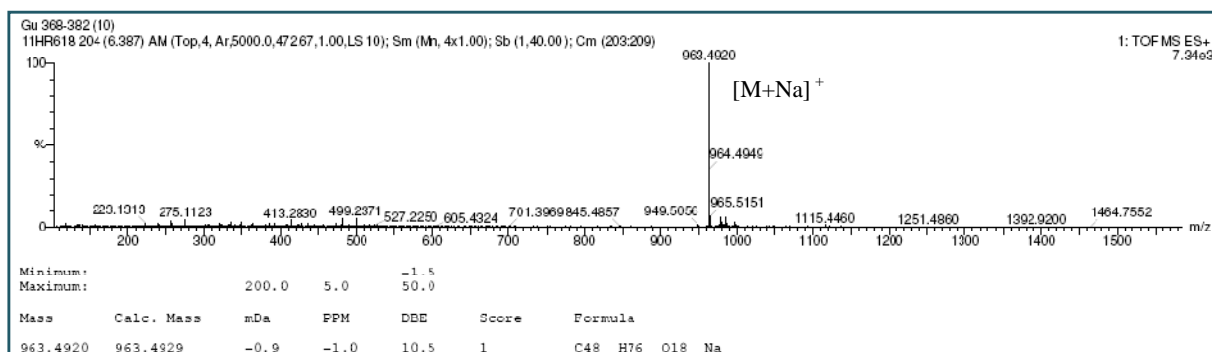


Figure 90: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **11**

Le spectre de RMN  $^{13}C$  (figure 91) du composé **11** permet de reconnaître la plupart des attributions des carbones du composé **10** à savoir trois unités osidiques et une génine triterpénique avec 7 méthyles. La différence entre ces deux composés, réside au niveau de la génine et cela par l'oxydation du groupement OH lié au carbone C-22 en une fonction cétone.

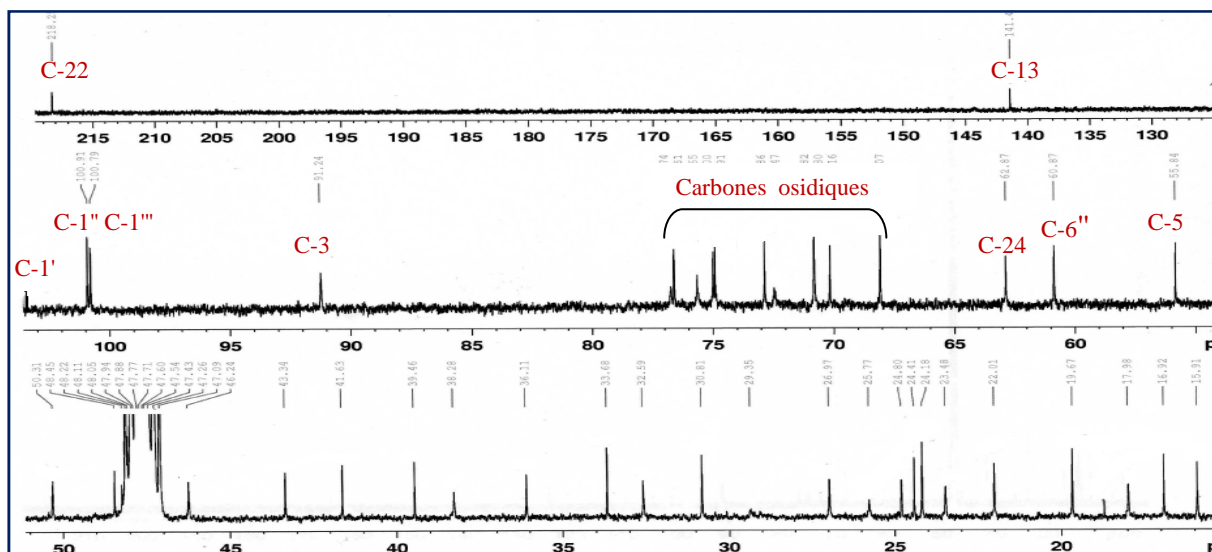
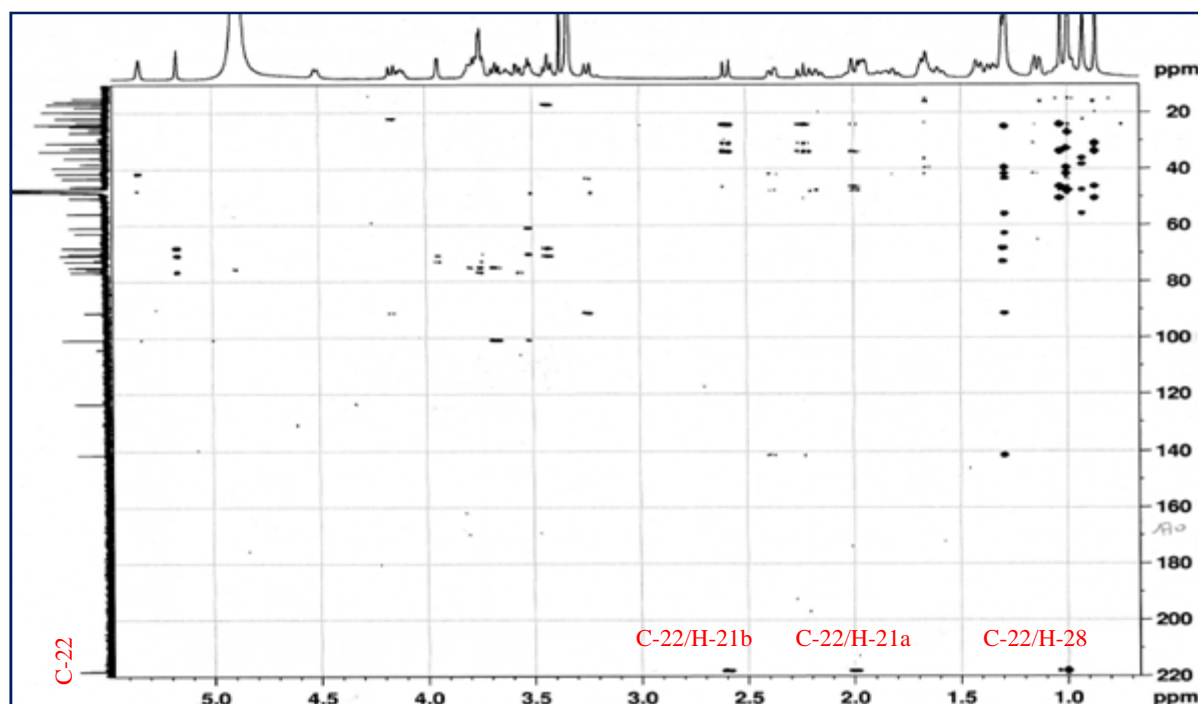


Figure 91: Spectre de RMN $^{13}C$  du composé **11**.

La présence de cette fonction est justifiée par l'apparition d'un signal extrêmement déblindé résonant à  $\delta_C$  218,3 ppm. La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (figure 92) entre le carbone résonant à 218,3 ppm et les protons du méthyle 28 confirme bien la substitution du carbone C-22 par une cétone. Cette génine est le soyasapogénol E [109].

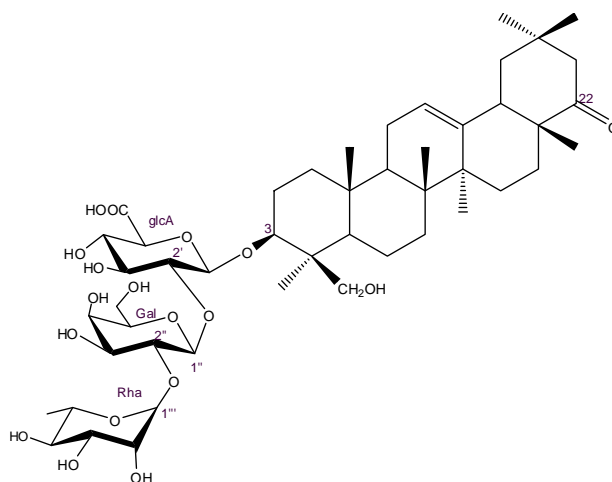


**Figure 92 :** Spectre HMBC du composé **11**.

L'analyse conjuguée des spectres COSY, HSQC, HMBC et ROESY a permis de déterminer sans ambiguïté la nature des 3 unités osidiques ainsi que leurs points de branchement. Ces derniers se sont avérés similaires à ceux établis pour les composés **9** et **10** décrits précédemment.

Cette molécule **11**, identifiée comme le 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogénol E, se révèle en tout point identique à la Dehydrosoyasaponine I, isolée à partir des parties aériennes de *Abrus cantoniensis* [117], et *Radix Hedysari* [122].





3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-oxo-oléan-12-ène-3- $\beta$ -24-diol (**11**).

**Tableau 13** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **11** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , J Hz)      | N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , J Hz) |
|----|---------------------|---|----------------|---------------------|--|
| 1  | 38,3                | 1,05 m, 1,67 m                              | 27             | 22,0                | 1,28 s                                 |
| 2  | 25,8                | 1,85 m, 2,01 m                              | 28             | 19,7                | 0,99 s                                 |
| 3  | 91,2                | 3,41 m                                      | 29             | 30,8                | 1,02 s                                 |
| 4  | 43,3                | -   | 30             | 24,2                | 0,87 s                                 |
| 5  | 55,8                | 0,98 m                                      | Glc A (en C-3) |                     |  |
| 6  | 17,9                | 1,40 m, 1,67 m                              | 1'             | 104,3               | 4,50 d (7,3)                           |
| 7  | 32,6                | 1,41 m, 1,60 m                              | 2'             | 75,6                | 3,78 t (9,7)                           |
| 8  | 39,5                | -   | 3'             | 76,7                | 3,62 t (10,3)                          |
| 9  | 47,4                | 1,65 m                                      | 4'             | 72,5                | 3,50 m                                 |
| 10 | 36,1                | -   | 5'             | 72,9                | 3,73 m                                 |
| 11 | 23,5                | 1,94 m                                      | 6'             | -                   | -                                      |
| 12 | 123,7               | 5,34 sl                                     | Gal            |                     |  |
| 13 | 143,8               | -   | 1''            | 100,9               | 4,89 nd*                               |
| 14 | 41,6                | -   | 2''            | 76,6                | 3,66 dd (9,7 - 6,8)                    |
| 15 | 24,8                | 1,14 dm (12,8), 1,82 ddd (13,3 - 3,8 - 3,5) | 3''            | 74,9                | 3,55 dd (9,5 - 4,6)                    |
| 16 | 26,9                | 1,14 dm (12,8), 2,15 ddd (13,3 - 9,5 - 3,6) | 4''            | 70,2                | 3,74 d (3,5)                           |
| 17 | 18,9                | -   | 5''            | 75,0                | 3,50 m                                 |
| 18 | 47,6                | 2,36 dd (13,2 - 3,4)                        | 6''a           | 60,9                | -                                      |
| 19 | 46,2                | 1,35 dm (12,8), 2,21 t (13,8)               | 6''b           |                     | 3,75 dd (12,5 - 3,3)                   |
| 20 | 33,1                | -   | Rha            |                     |  |
| 21 | 50,3                | 1,99 dd (11,2 - 3,3), 2,57 dl (14,1)        | 1'''           | 100,8               | 5,18 sl                                |
| 22 | 218,3               | -   | 2'''           | 70,8                | 3,93 dl                                |
| 23 | 24,4                | 1,28 s                                      | 3'''           | 70,8                | 3,72 dd (9,7 - 3,3)                    |
| 24 | 62,9                | 3,24 d (12,2), 4,15 d (11,3)                | 4'''           | 72,9                | 3,42 t (9,5)                           |
| 25 | 14,9                | 0,92 s                                      | 5'''           | 68,1                | 4,10 dq (9,7 - 6,1)                    |
| 26 | 15,9                | 1,00 s                                      | 6'''           | 16,9                | 1,29 d (6,2)                           |

\*nd, signal non détecté, sous le pic de HDO.

### III.4.3.12. Détermination structurale du composé 12

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 93), indique un pic pour l'ion pseudo- moléculaire à  $m/z$  979,4668  $[M+K]^+$  (calculé 979,4669), correspondant à une formule brute en  $C_{48}H_{76}O_{18}K$ .

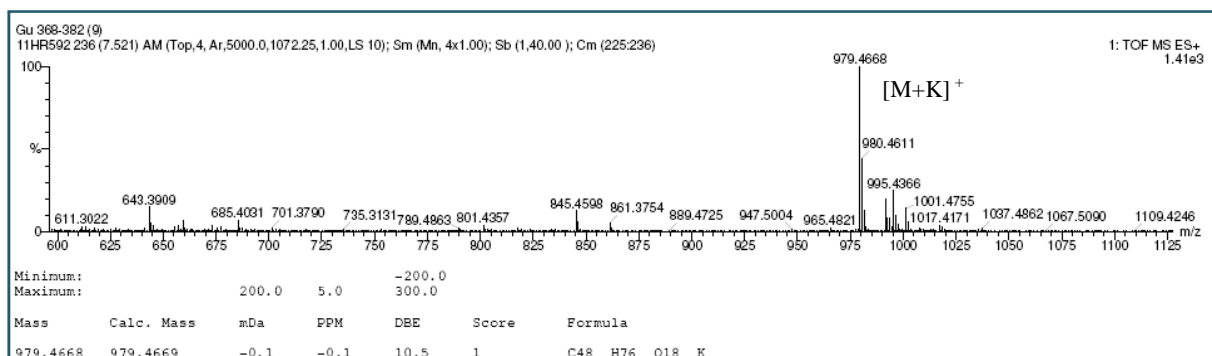


Figure 93 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 12

L'analyse des spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , HSQC, HMBC et ROESY montre que le saponoside 12 possède une génine commune avec le composé 11, le soyasapogénol, sur laquelle se greffe une chaîne triosidique en position 3.

Sur le spectre de RMN  $^1H$  (figure 94) du composé 12, trois doublets anomériques sont observés à 4,55, 4,61 et 4,85 ppm et leurs carbones respectifs, obtenus par l'analyse du spectre HSQC, résonnent à 103,4, 105,0 et 102,3 ppm.

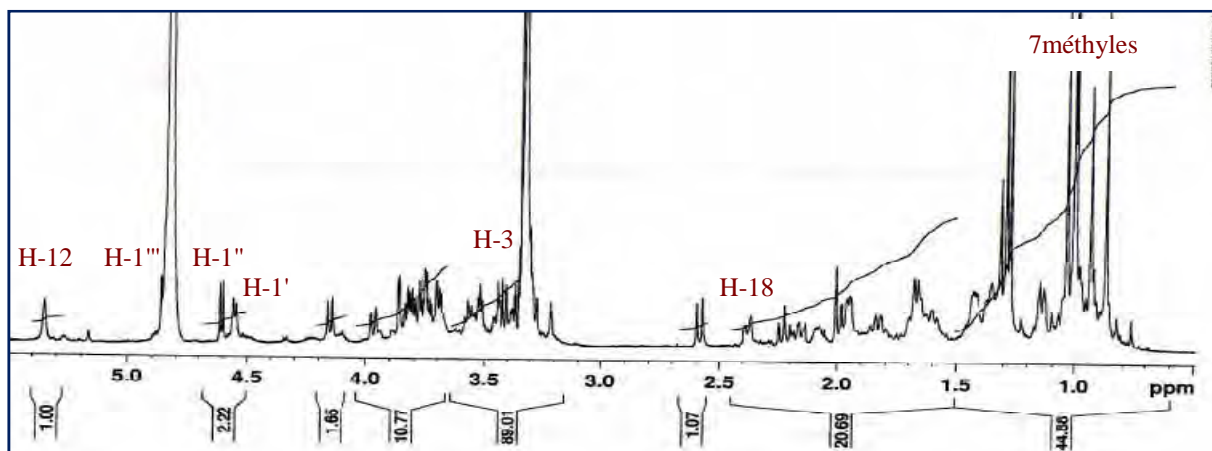
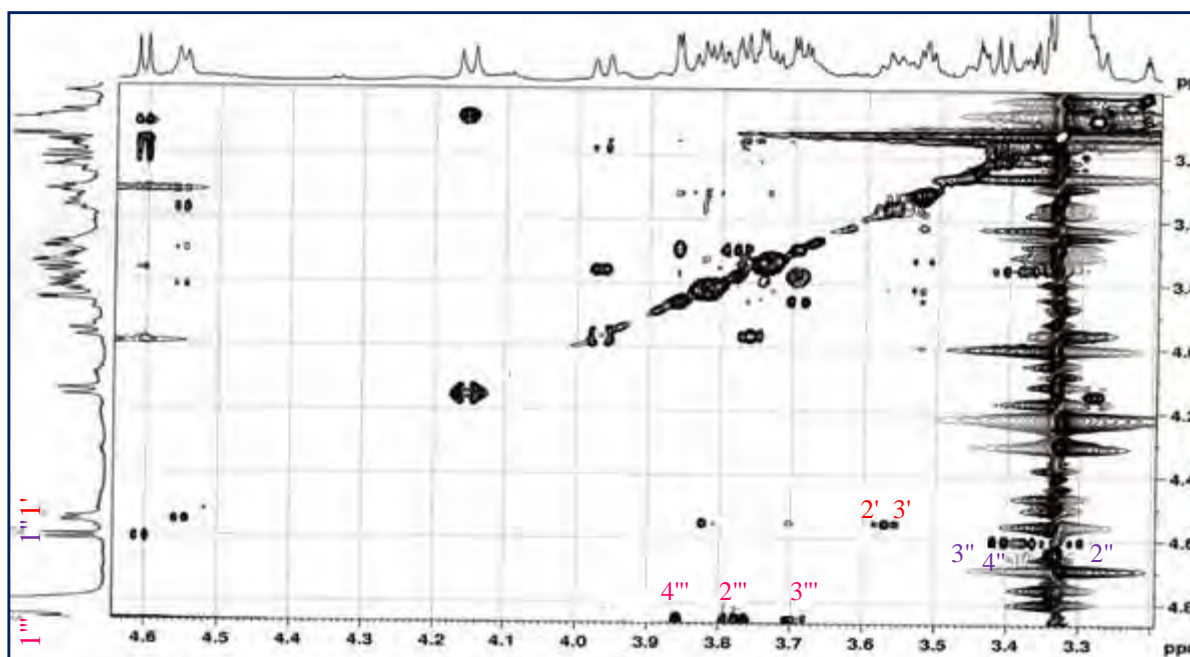


Figure 94: Spectre de RMN  $^1H$  du composé 12.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC permet d'identifier les deux sucres communs avec le composé **11** soit :

- un acide  $\beta$ -D-glucopyranosique à partir de l'anomère à 4,55 ppm (H-1')
  - un  $\beta$ -D-galactose à partir de l'anomère à 4,85 ppm (H-1''').
  - Le troisième sucre est identifié à partir du proton anomérique résonnant à 4,61 ppm.
- L'analyse des spectres COSY et TOCSY (figure 95) révèle que ce proton anomérique fait partie d'un système de sept spins couplés appartenant à un hexose.



**Figure 95:** Spectre TOCSY du composé **12**.

Les déplacements chimiques des carbones attribués par l'analyse du spectre HSQC et les grandes constantes de couplage entre tous les protons indiquent qu'il s'agit d'un  $\beta$ -D-glucopyranose [110].

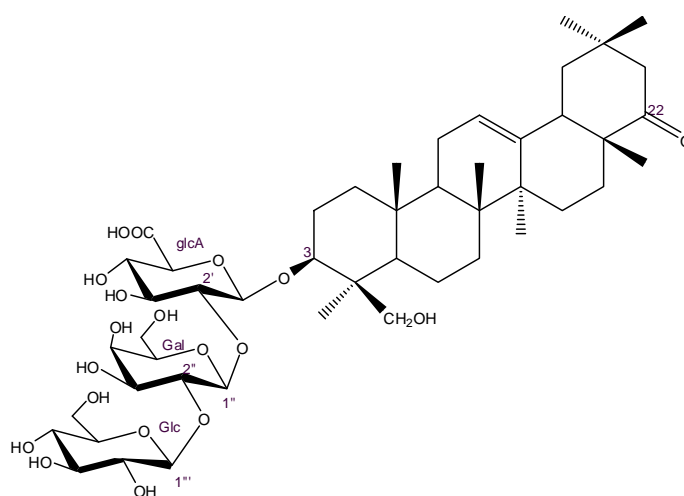
Les corrélations  $^3J_{H-C}$  visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-3 de la génine et le carbone C-1' de l'acide glucuronique, entre le proton H-1'' du galactose et le C-2' de l'acide glucuronique et entre le H-2'' et C-1''' confirment le séquençage du trisaccharide.

Le spectre ROESY confirme aussi cet enchaînement par la présence des effets rOe entre :

- H-1' GlcA / H-3 de la génine.
- H-1''' Gal / H-2' GlcA.
- H-1'' Glc / H-2''' Gal.
- 

L'ensemble des données spectroscopiques nous conduit à proposer pour ce composé, la structure suivante: 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl] soyasapogénol E.

Cette molécule est également identifiée sous le nom de Sandosaponin A isolée déjà de *Phaseolus vulgaris* L. [123].



3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]  
22-oxo-oléan-12-ène-3-β-24-diol (**12**).

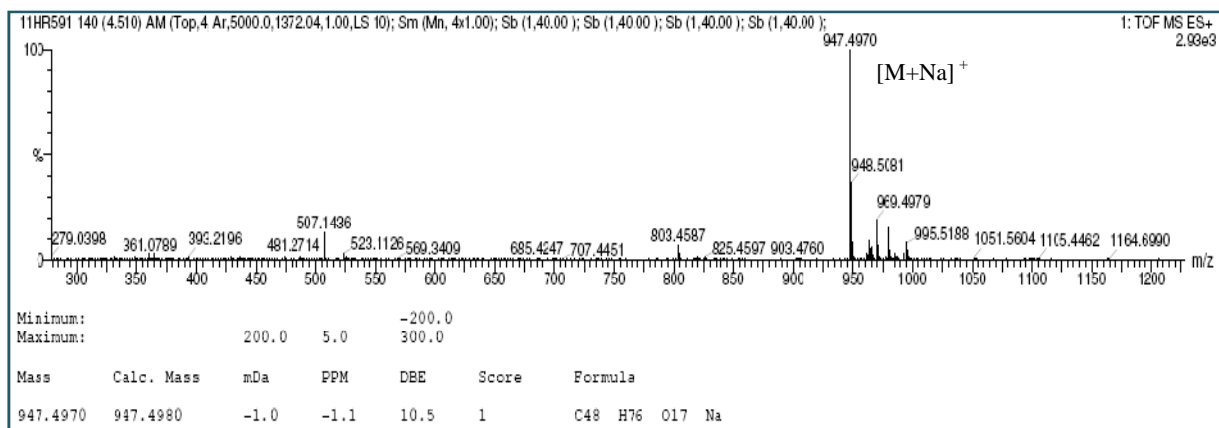
**Tableau 14** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **12** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)  | N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                 |
|----|---------------------|--------------------------------|----------------|---------------------|---|
| 1  | 38,3                | 1,04 m, 1,66 m                 | 27             | 24,4                | 1,29 s  |
| 2  | 26,9                | 1,14 m, 2,15 m                 | 28             | 19,7                | 1,00 s  |
| 3  | 90,6                | 3,45 m                         | 29             | 30,8                | 1,03 s  |
| 4  | 43,2                | -                              | 30             | 24,2                | 0,87 s  |
| 5  | 55,9                | 0,99 m                         | Glc A (en C-3) |                     |   |
| 6  | 18,1                | 1,42 m, 1,68 m                 |                |                     |   |
| 7  | 32,6                | 1,41 m, 1,60 m                 | 1'             | 103,4               | 4,55 d (7,4)                                  |
| 8  | 39,5                | -                              | 2'             | 80,3                | 3,57 t (8,6)                                  |
| 9  | 47,3                | 1,65 m                         | 3'             | 70,5                | 3,82 t (8,5)                                  |
| 10 | 36,1                | -                              | 4'             | 72,5                | 3,78 m  |
| 11 | 23,5                | 1,94 m                         | 5'             | 72,9                | 3,74 m  |
| 12 | 123,7               | 5,35 sl                        | 6'             | 161,7               | -   |
| 13 | 141,4               | -                              | Glc            |                     |   |
| 14 | 41,6                | -                              | 1''            | 105,0               | 4,61 sl                                       |
| 15 | 24,8                | 1,14 dm (12,7), 1,83 m         | 2''            | 75,8                | 3,30 dl                                       |
| 16 | 25,6                | 1,85 m, 2,08 m                 | 3''            | 76,1                | 3,42 dd (9,7 - 3,3)                           |
| 17 | 18,9                | -                              | 4''            | 69,7                | 3,36 t (9,5)                                  |
| 18 | 47,6                | 2,37 m                         | 5''            | 77,5                | 3,38 dq (9,7 - 6,1)                           |
| 19 | 46,2                | 1,36 d (10,5), 2,22 m          | 6''            | 61,1                | 3,76 dd (11,3 - 5,5),<br>3,96 (11,1)          |
| 20 | 33,7                | -                              | Gal            |                     |   |
| 21 | 50,3                | 1,99 dm (11,4), 2,58 dm (14,1) | 1'''           | 102,3               | 4,85 nd*                                      |
| 22 | 218,3               | -                              | 2'''           | 82,1                | 3,78 dd (9,9 - 7,1)                           |
| 23 | 21,8                | 1,26 s                         | 3'''           | 73,2                | 3,69 dd (10,3 - 3,6)                          |
| 24 | 61,8                | 3,28 d (11,6), 4,15 d (11,4)   | 4'''           | 69,5                | 3,86 d (3,3)                                  |
| 25 | 14,8                | 0,93 s                         | 5'''           | 75,0                | 3,52 t (6,5)                                  |
| 26 | 15,9                | 1,00 s                         | 6'''           | 61,5                | 3,73 dd (11,7 - 6,2),<br>3,81 dd (11,6 - 6,7) |

\*nd, signal non détecté, sous le pic de HDO.

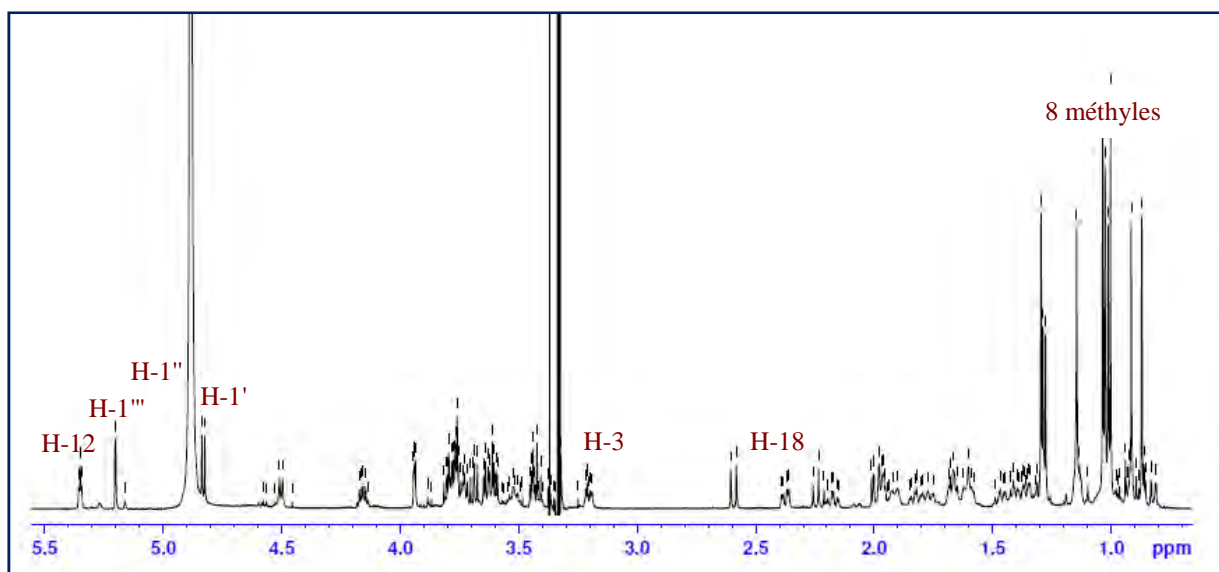
### III.4.3.13. Détermination structurale du composé 13

Le composé **13** présente une formule moléculaire en  $C_{48}H_{78}O_{17}$ , formule déterminée grâce au spectre de masse Haute résolution HR-ESI-MS (figure 96) qui présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  947,4970  $[M+Na]^+$  (calculé 947,4980), correspondant à une masse moléculaire égale à 924 *uma*.

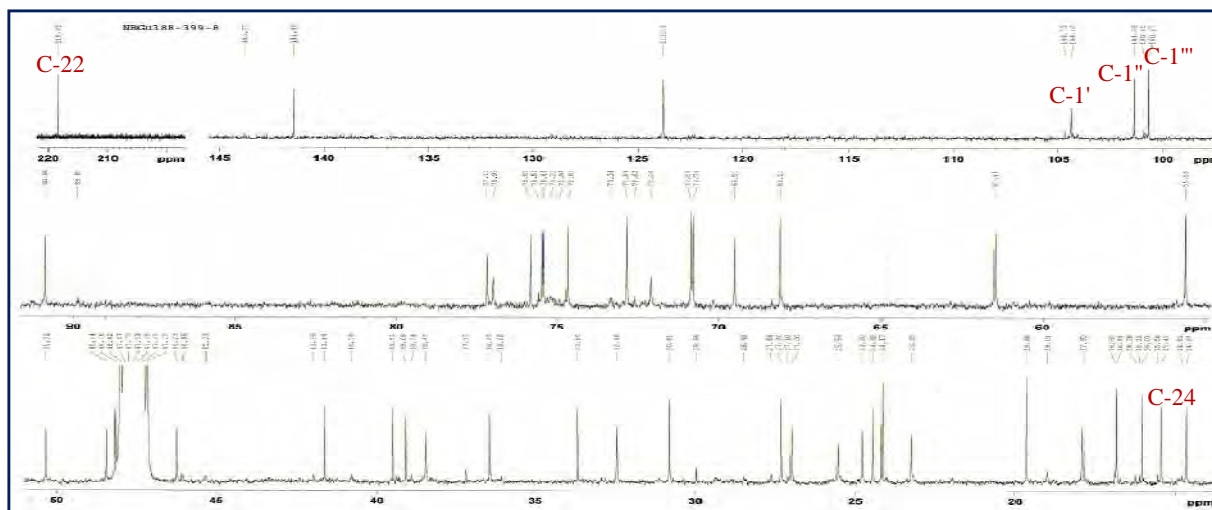


**Figure 96:** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **13**.

Il en ressort, d'après les spectres de RMN  $^1H$  (figure 97) et  $^{13}C$  (figure 98), que le composé **13** possède de grandes similitudes avec le composé **11**.



**Figure 97:** Spectre de RMN  $^1H$  du composé **13**.



**Figure 98:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **13**.

L'analyse conjuguée des spectres COSY, HMBC, HSQC et ROESY a permis de déterminer sans ambiguïté la nature de la génine et des trois unités osidiques ainsi que leurs points de branchement. Les trois sucres se sont avérés similaires à ceux établis pour le composé **11** décrit précédemment à savoir :

- un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosuronique à partir de l'anomère à 4,51 ppm,
- un  $\beta$ -D-galactopyranose à partir de l'anomère à 4,83 ppm,
- un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose à partir de l'anomère à 5,20 ppm.

Cette molécule, se différencie donc uniquement par la structure de la génine, et cela par la perte du groupement hydroxy méthylène en position 24 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), lié au carbone C-4, remplacé par un méthyle (Me-24) (tableau 15). Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC qui montre des corrélations  $^2J_{\text{H-C}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$  entre les méthyles 23 et 24 avec les carbones C-3, C-4 et C-5.

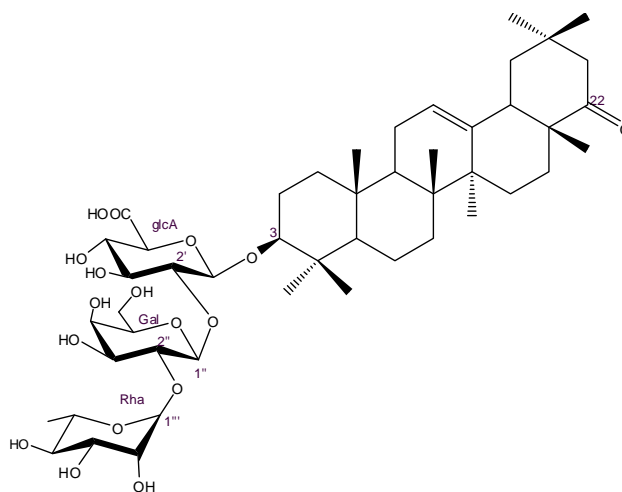
L'enchaînement osidique est établi après l'analyse du spectre HMBC sur lequel sont visualisées les corrélations  $^3J_{\text{H-C}}$  suivantes :

- H-1' GlcA / C-3 de la génine,
- H-1'' Gal / C-2' GlcA,
- H-1''' Rha / C-2'' Gal.

Le spectre ROESY confirme l'enchaînement 3-O-[Rha (1 $\rightarrow$ 2) Gal (1 $\rightarrow$ 2) GlcA] par la présence des effets rOe entre : H-1'' Gal / H-2' GlcA et H-1' GlcA / H-3 de la génine.

Les données spectrales établies nous ont permis de proposer la structure ci-dessous pour le composé **13**:

3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]  
3 $\beta$ -hydroxy-22-oxo-oléan-12-ène. Cette structure s'est avérée identique à celle du phaseoside  
IV isolé à partir d'*Abrus cantoniensis* [117].



3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-3 $\beta$ -  
hydroxy-22-oxo-oléan-12-ène (**13**).



**Tableau 15:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **13** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)      | N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) |
|----|---------------------|------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------|
| 1  | 38,5                | 1,04 m, 1,67 m                     | 27             | 24,5                | 1,29 s                        |
| 2  | 25,5                | 1,77 m, 1,91 dm (12,5)             | 28             | 14,7                | 1,02 s                        |
| 3  | 90,9                | 3,41 dd, (11,5 - 4,7)              | 29             | 30,8                | 1,04 s                        |
| 4  | 39,1                | -                                  | 30             | 24,2                | 0,87 s                        |
| 5  | 50,3                | 0,82 dm, (12,4)                    | Glc A (en C-3) |                     |                               |
| 6  | 17,9                | 1,45 dm (12,5), 1,61 dm (12,6)     |                |                     |                               |
| 7  | 32,4                | 1,40 dm (12,7), 1,61 dm (12,6)     | 1'             | 104,4               | 4,51 d (7,7)                  |
| 8  | 39,5                | -                                  | 2'             | 77,2                | 3,74 dd (9,9 - 7,9)           |
| 9  | 48,0                | 1,66 m                             | 3'             | 72,1                | 3,60 t (9,5)                  |
| 10 | 36,4                | -                                  | 4'             | 74,7                | 3,53 t (9,6)                  |
| 11 | 23,3                | 1,90 m                             | 5'             | 74,9                | 3,78 d (9,7)                  |
| 12 | 123,8               | 5,35 t (3,6)                       | 6'             | 170                 | -                             |
| 13 | 141,4               | -                                  | Gal            |                     |                               |
| 14 | 41,6                | -                                  | 1''            | 101,9               | 4, 83 d (7,7)                 |
| 15 | 24,8                | 1,15 m, 1,84 ddd (13,1- 5,1- 3,9)  | 2''            | 75,8                | 3,68 dd (9,5 -7,7)            |
| 16 | 27,0                | 1,14 m, 2,17 ddd (13,4 - 10,3 - 5) | 3''            | 76,9                | 3,63 dd (7,9 - 3,4)           |
| 17 | 37,2                | -                                  | 4''            | 69,5                | 3,76 d (3,7)                  |
| 18 | 47,9                | 2,37 dd (13,8- 4,5)                | 5''            | 75,4                | 3,45 m                        |
| 19 | 46,1                | 1,53 m, 2,23 t (13,7)              | 6''a           | 61,5                | 3,64 dd (11,6 - 4,5)          |
|    |                     |                                    | 6''b           |                     | 3,80 dd (11,5 - 4,4)          |
| 20 | 33,7                | -                                  | Rha            |                     |                               |
| 21 | 48,4                | 1,99 dd (14,1 - 2,7), 2,59 d (14)  | 1'''           | 100,7               | 5,20 d (1,5)                  |
| 22 | 218,3               | -                                  | 2'''           | 70,9                | 3,95 dd (3,3 - 1,7)           |
| 23 | 27,3                | 1,14 s                             | 3'''           | 70,8                | 3,76 dd (9,5 - 3,5)           |
| 24 | 15,5                | 0,92 s                             | 4'''           | 72,8                | 3,43 t (9)                    |
| 25 | 19,6                | 1,00 s                             | 5'''           | 68,1                | 4,16 dq (9,6 - 6,4)           |
| 26 | 16,0                | 1,03 s                             | 6'''           | 16,8                | 1,27 d (6,5)                  |

### III.4.3.14. Détermination structurale du composé 14

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 99), présente un pic pour l'ion pseudo- moléculaire à  $m/z$ 819,4517  $[M+Na]^+$  (calculé 819,4507), soit une perte de 146 *uma* par rapport au composé **10**. La différence de masse montre que la structure du composé **14** est celle du composé **10** amputé d'un rhamnose.

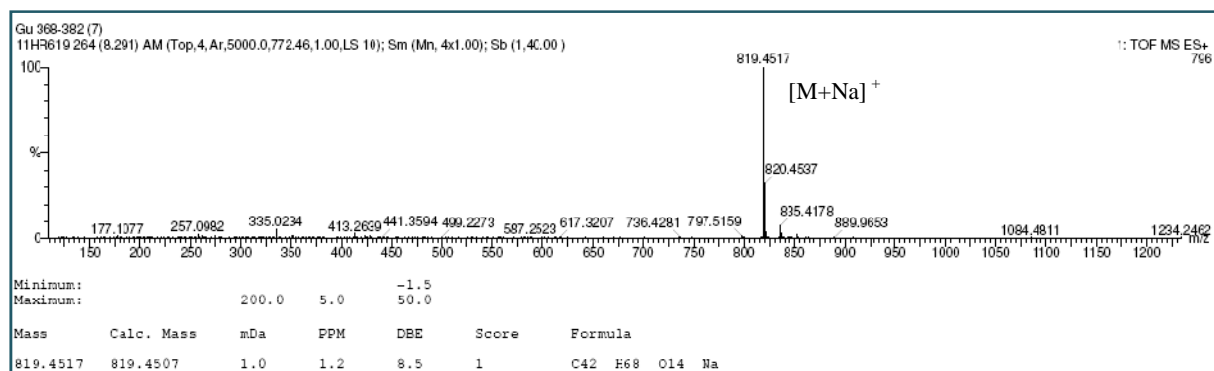


Figure 99 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 14

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D montre que la partie génine du saponoside **14** est identique point par point à la partie génine du saponoside **10**, soit le soyasapogénol B (tableau 16). Sur le spectre de RMN  $^1H$  (figure 100) du composé **14** deux doublets anomériques sont localisés à 4,55 et 4,73 ppm. Leurs carbones respectifs, attribués par l'analyse du spectre HSQC, résonnent à 103,7 et 103,2 ppm.

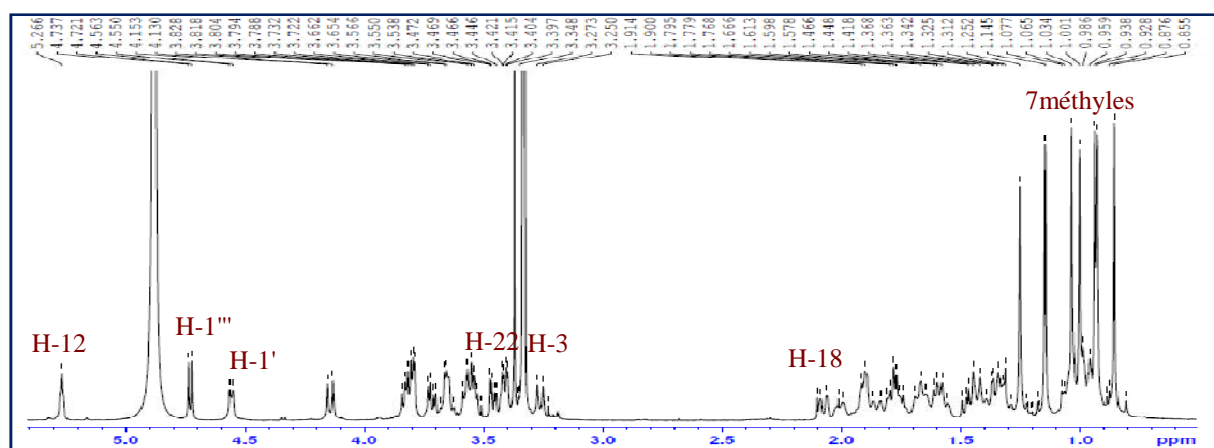


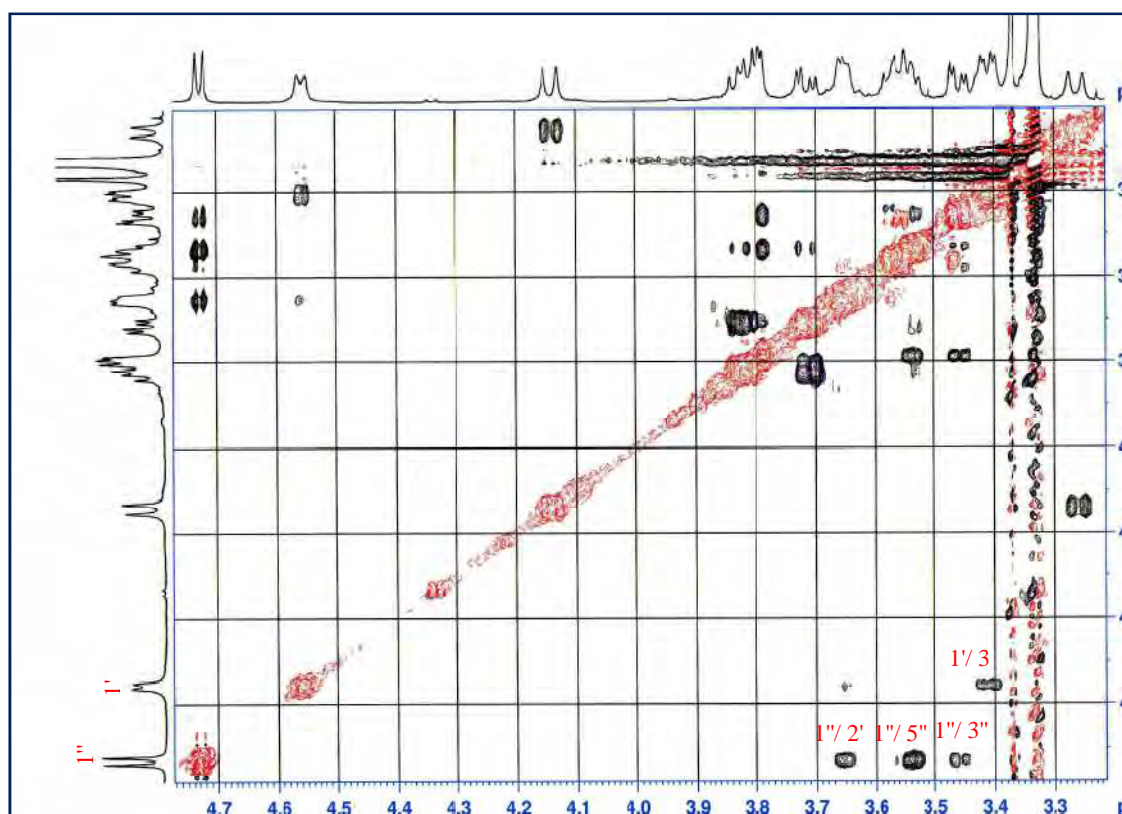
Figure 100: Spectre de RMN  $^1H$  du composé 14

L'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC permet d'identifier :

- un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosurionique substitué en position 2', à partir du proton anomérique à 4,55 ppm.
- un  $\beta$ -D-galactopyranose terminal, à partir du proton anomérique à 4,73 ppm.

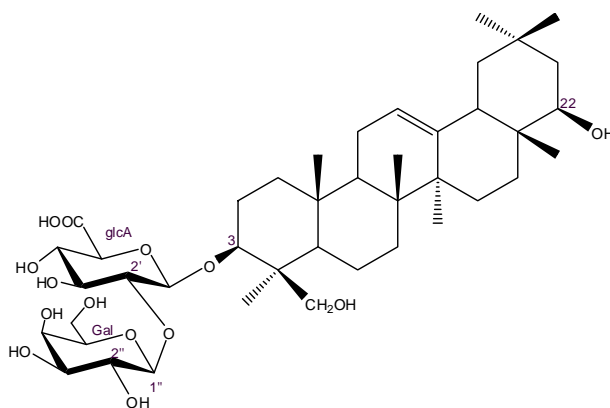
Le spectre ROESY (figure 101) confirme l'enchaînement 3-O-[Gal (1 $\rightarrow$ 2) GlcA] par la présence des effets rOe entre :

- H-1' GlcA / H-3 de la génine,
- H-1'' Gal / H-2' GlcA.



**Figure 101:** Spectre ROESY du composé **14**.

Il en résulte à l'issue de cette analyse que la structure du composé **14** est la suivante : 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogénol. Cette saponine s'est avérée identique à la Soyasaponin III isolée à partir des graines de *Glycine max* L. ou soya jaune [120].



3-*O*-[β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-oléan-12-ène-3β,22β,24-triol (**14**).

**Tableau 16** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **14** dans CD<sub>3</sub>OD.

| N° | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)                   | N°             | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)     |
|----|----------------|--|----------------|----------------|------------------------------|
| 1  | 38,3           | 1,03 m, 1,68 m                             | 23             | 21,6           | 1,24 s                       |
| 2  | 25,8           | 1,85 m, 2,00 m                             | 24             | 62,9           | 3,27 d (11,4), 4,13 d (11,6) |
| 3  | 90,9           | 3,41 dd ( 8,6 - 3,4)                       | 25             | 14,9           | 0,91 s                       |
| 4  | 43,2           | -  | 26             | 16,1           | 1,00 s                       |
| 5  | 55,9           | 0,97 dm (13,8)                             | 27             | 23,4           | 1,14 s                       |
| 6  | 18,1           | 1,42 m, 1,66 m                             | 28             | 19,0           | 0,85 s                       |
| 7  | 32,9           | 1,43 dm (14,9), 1,53 dm (11,9)             | 29             | 31,2           | 0,93 s                       |
| 8  | 39,3           | -  | 30             | 27,6           | 1,03 s                       |
| 9  | 48,1           | 1,99 t (7,6)                               | Glc A (en C-3) |                |                              |
| 10 | 36,1           | -  | 1'             | 103,7          | 4,55 d (7)                   |
| 11 | 24,0           | 1,90 m                                     | 2'             | 78,9           | 3,65 dd (9,5 - 8,8)          |
| 12 | 122,3          | 5,27 t (3,3)                               | 3'             | 76,9           | 3,65 t (9,5)                 |
| 13 | 143,7          | -  | 4'             | 70,3           | 3,55 t (9,5)                 |
| 14 | 41,9           | -  | 5'             | 76,3           | 3,81 d (11,7)                |
| 15 | 25,5           | 1,05 m, 1,79 dm (14,8)                     | 6'             | -              | -                            |
| 16 | 28,5           | 1,33 dm (12,4), 1,77 d (10,8)              | Gal            |                |                              |
| 17 | 37,2           | -  | 1''            | 103,2          | 4, 73 d (7,6)                |
| 18 | 45,3           | 2,07 dm (12,6)                             | 2''            | 71,5           | 3,57 dd (9,8 - 7,8)          |
| 19 | 46,1           | 0,97 dm (13,8), 1,77 t (13,8)              | 3''            | 73,7           | 3,46 dd (8,6 - 3,1)          |
| 20 | 29,7           | -  | 4''            | 69,7           | 3,78 d (3,1)                 |
| 21 | 40,7           | 1,35 dd (13,4 - 3,0), 1,47 dd (13,4 - 3,4) | 5''            | 75,1           | 3,53 dd (7,8 - 5,6)          |
| 22 | 75,6           | 3,40 dd (8,6 - 3,4)                        | 6''a           | 61,3           | 3,72 dd (11,8 - 4,6)         |
|    |                |  | 6''b           |                | 3,82 dd (11,9 - 4,9)         |

### III.4.3.15. Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Genista ulicina* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatorze composés purs dont douze monodesmosides et deux bidesmosides. Parmi lesquels sept possèdent des structures nouvelles.

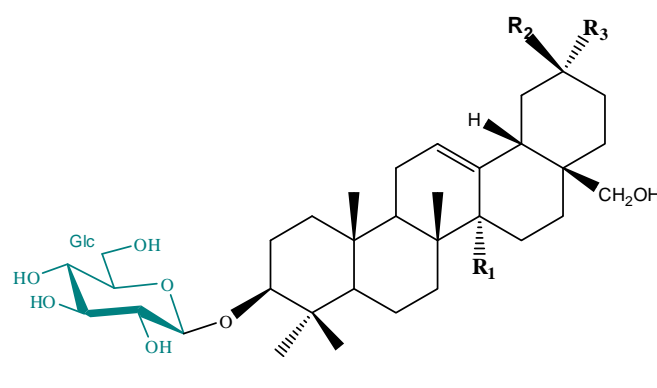
Ces saponosides peuvent être classés en trois groupes selon la nature du sucre directement lié en position 3 de la génine (figure 102) : un *O*- $\beta$ -D-glucose (groupe 1), un acide *O*- $\beta$ -D-glucuronique (groupe 2) et un *O*- $\beta$ -D-galactose (groupe 3). Les composés du premier groupe (**1-6**) sont tous des nouveaux composés et possèdent tous comme aglycone des dérivés de l'érythrodiol, substitué par un hydroxyméthylène, un carboxyle ou par un glucose en position 27,29 ou 30.

Les composés du deuxième groupe (**8-14**) possèdent pour la plupart le même trisaccharide en position 3 de l'aglycone (**9-10-11-13**), à savoir un enchaînement 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] qui est un motif très répandu dans les structures des saponosides de plantes de la famille de Fabaceae [114,117]. Tous ces composés ont montré un pouvoir : anti-inflammatoire, anti prolifératif, antioxydant et hépatoprotecteur [124-126]. Les composés restants possèdent soit l'enchaînement 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] (**12**), soit 3-*O*-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] (**14**) fréquemment rencontré aussi chez les Fabaceae [120, 123].

Le composé (**8**) est de structure nouvelle, de par son enchaînement osidique en 3 de l'acide glucuronique et non en position 2 comme dans le cas de composé (**14**).

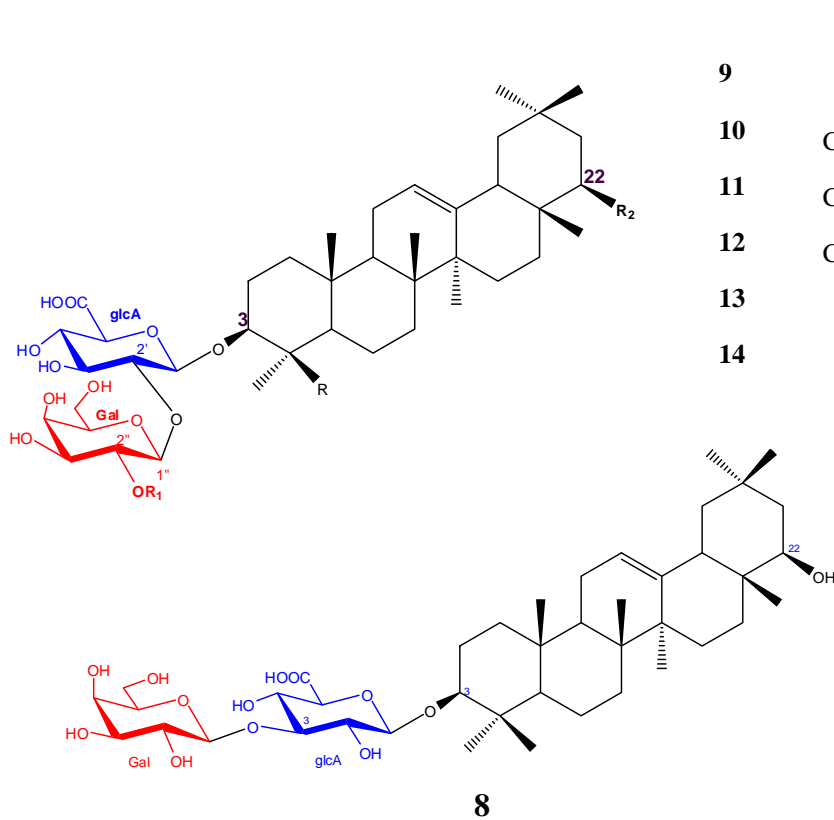
Le troisième groupe est représenté par le composé (**7**), un saponoside bidesmosidique de l'acide oléanolique avec un galactose lié en position 3 et un glucose en position 28 de la génine.

### Le premier groupe



|   | R <sub>1</sub>     | R <sub>2</sub>     | R <sub>3</sub>        |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1 | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>3</sub>       |
| 2 | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>2</sub> OH    |
| 3 | COOH               | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>2</sub> OH    |
| 4 | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>3</sub>    | COOH                  |
| 5 | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>2</sub> O-Glc |
| 6 | H                  | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>2</sub> OH    |

### Le deuxième groupe



|    | R                  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> |
|----|--------------------|----------------|----------------|
| 9  | CH <sub>3</sub>    | Rha            | OH             |
| 10 | CH <sub>2</sub> OH | Rha            | OH             |
| 11 | CH <sub>2</sub> OH | Rha            | O              |
| 12 | CH <sub>2</sub> OH | Glc            | O              |
| 13 | CH <sub>3</sub>    | Rha            | O              |
| 14 | H                  | H              | OH             |

### Le troisième groupe

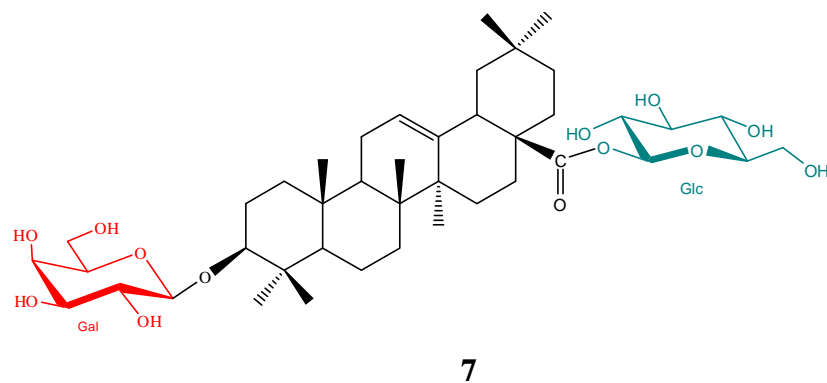


Figure 102 : Structures des saponosides isolés des parties aériennes de *G. ulicina*

### III.4.4. Détermination structurale des flavonoïdes obtenus

#### III.4.4.1. Détermination structurale du composé 15

Le spectre UV du composé **15** (figure 103), enregistré dans le MeOH montre deux maxima à 358 et 257 nm relatifs respectivement à la bande I et II caractéristiques d'un flavonol-3-OR [127], en plus de la coloration violette noire sous la lampe UV.

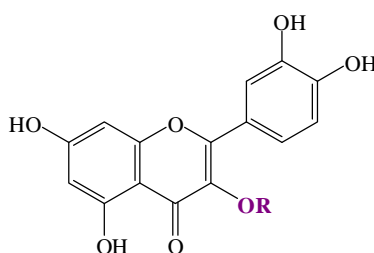
L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de 51 nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre indique la présence d'un OH libre en position 7.

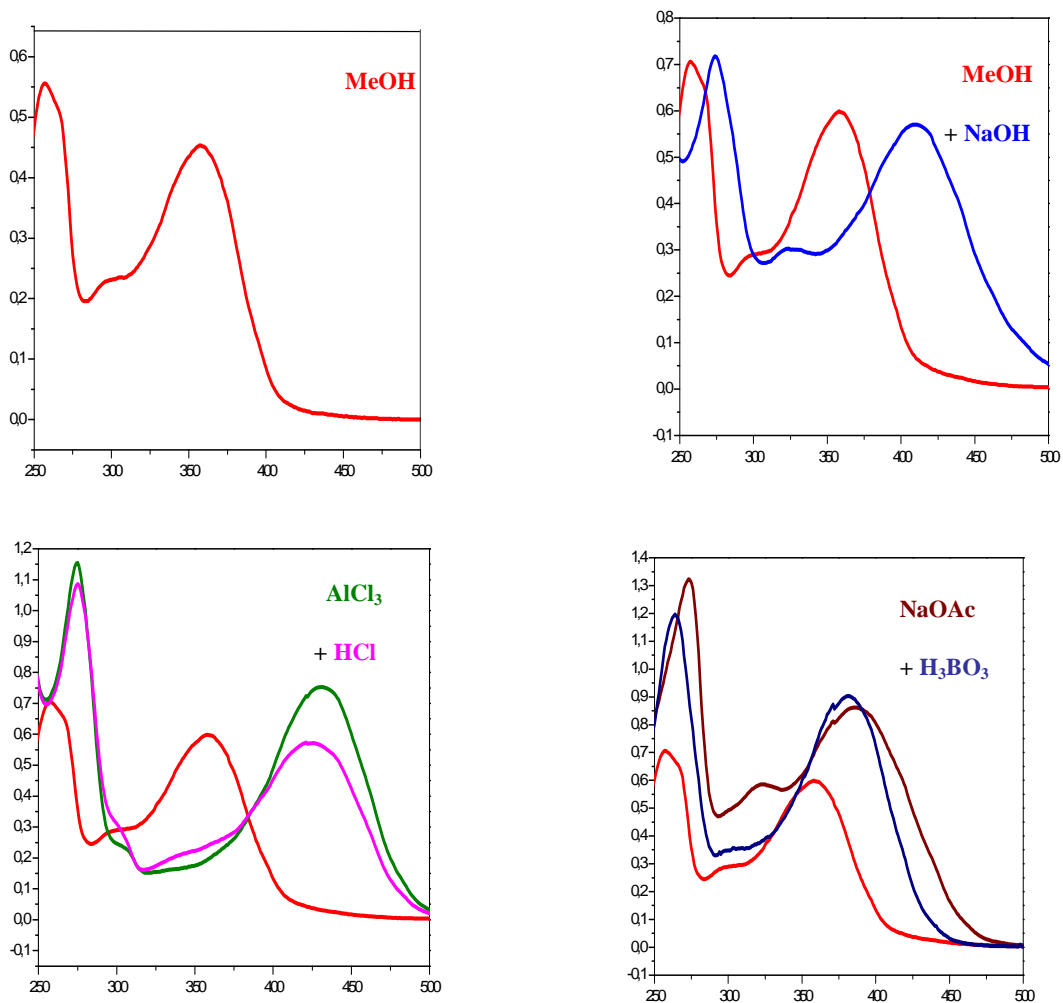
L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II de 16 nm par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochromique de la bande I de 67 nm, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de MeOH+ AlCl<sub>3</sub> comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre, atteste que ce flavonol porte un groupement hydroxyle libre aussi mais cette fois en position 5.

La présence du système orthodihydroxy sur le noyau B est expliquée par le déplacement hypsochrome de la bande I (7nm) en comparant les deux spectres AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+ HCl et par le déplacement bathochrome (23 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH. Ces données spectrales UV sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la quercétine substituée en position 3 [127].

Ces données permettent de proposer au composé **15**, la structure partielle suivante :





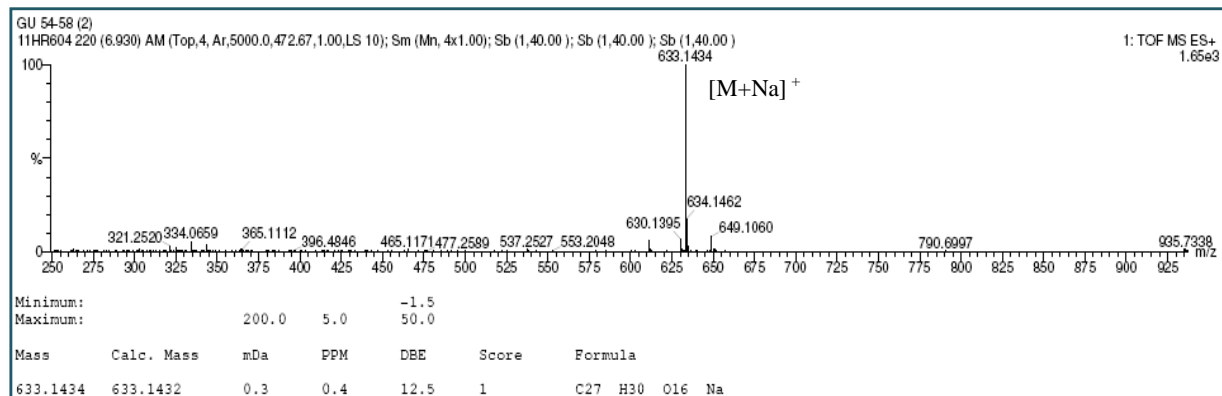
**Figure 103:** la Série spectrale UV du composé 15

**Tableau 17 :** données spectrales UV du composé 15

| Solvants-réactifs                      | $\lambda_{\max}$     |                       |               |
|--|----------------------|-----------------------|---------------|
|  | Bande I (nm) cycle B | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                                   | 358                  | 257                   |               |
| NaOH                                   | 409                  | 274                   | 325           |
| AlCl <sub>3</sub>                      | 432                  | 274                   |               |
| AlCl <sub>3</sub> + HCl                | 425                  | 275                   |               |
| NaOAc                                  | 388                  | 273                   |               |
| NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 381                  | 264                   |               |

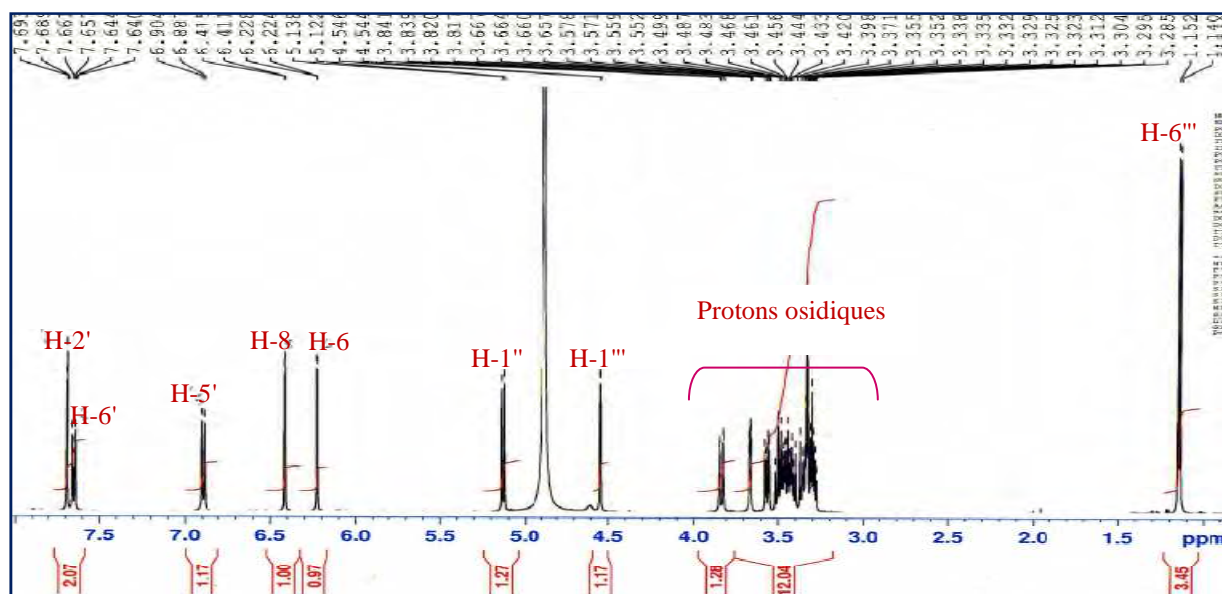


Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé **15** (figure 104), montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  633,1434  $[M+Na]^+$  (calculé 633,1432), correspondant à une masse moléculaire égale à 610 *uma* en accord avec la formule brute  $C_{27}H_{30}O_{16}$ .



**Figure 104** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **15**

Le spectre de RMN  $^1H$  (figure 105) du composé **15** montre les cinq protons aromatiques caractéristiques de la quercétine [128] :



**Figure 105**: Spectre de RMN  $^1H$  du composé **15**.

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_H$  6,2 ( $J= 2,1Hz$ ), le second à  $\delta_H$  6,4 ( $J= 2,1Hz$ ) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, pour le cycle A. En outre, le cycle B est

présenté par des signaux d'un système ABX à  $\delta_H$  6,90, 7,66 et 7,70, caractéristiques respectivement des protons H-5' (*d*,  $J = 8,4$  Hz), H-6' (*dd*,  $J = 8,4 - 2,1$  Hz) et H-2' (*sl*) (tableau 18).

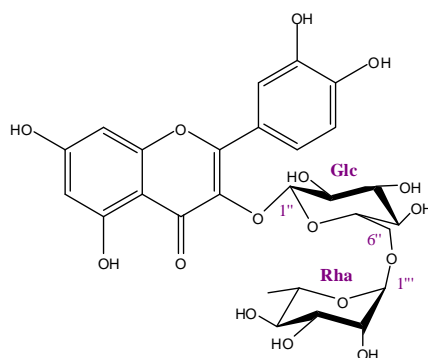
En dehors des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN  $^1H$  permet de repérer deux protons anomériques résonnant à 5,12 (*d*,  $J = 7,7$  Hz) et 4,54 ppm (*d*,  $J = 1,4$  Hz). Ces données suggèrent la présence de deux unités osidiques.

L'analyse des spectres COSY et HSQC permet d'identifier les deux sucres comme étant :

- un  $\beta$ -D-glucopyranose à partir de l'anomère à 5,12 ppm, caractérisé par les protons H-2, H-3, H-4 et H-5 trans-diaxiaux,
- un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose à partir de l'anomère à 4,54 ppm, caractérisées par son méthyl doublet à 1,14 ppm (*d*,  $J = 6,2$  Hz, H- 6").

Le spectre HMBC montre des corrélations H-C entre le proton H-6" du glucose (Glc), et le carbone C-1''' du rhamnose (Rha) et inversement entre le carbone C-6" du glucose (dont le déplacement chimique déblindé à 67,2 ppm indique qu'il porte un substituant OR) et le proton H-1''' du rhamnose (Rha) mettant en évidence la liaison :  $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranosyl (rutinose). Le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1" du glucose.

Le composé **15** a donc été identifié comme étant la quercétine-3-*O*- $\beta$ -rutinoside, aussi appelée rutine [129, 130]. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans *Ruta graveolens* (d'où son nom) et est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones. Elle est également très connue pour ses nombreuses propriétés biologiques notamment antioedémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombotique, anti-hypotensive, spasmolytique et antihémorragique [131].



3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl] quercétine (**15**)

**Tableau 18** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **15** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | N°       | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                 |
|----|---------------------|-------------------------------|----------|---------------------|---|
| 2  | 157,9               | -                             | Glucose  |                     |   |
| 3  | 134,2               | -                             | 1''      | 103,3               | 5,12 d (7,7)                                  |
| 4  | 178,0               | -                             | 2''      | 74,3                | 3,50 t (9,1)                                  |
| 5  | 161,6               | -                             | 3''      | 76,8                | 3,44 t (9,1)                                  |
| 6  | 98,6                | 6,22 d (2,1)                  | 4''      | 70,0                | 3,29 t (8,4)                                  |
| 7  | 164,6               | -                             | 5''      | 75,8                | 3,35 m  |
| 8  | 93,5                | 6,41 d (2,1)                  | 6''      | 67,2                | 3,41 dd (10,95 - 2,1)<br>3,82 dd (11,0 - 4,2) |
| 9  | 104,2               | -                             | Rhamnose |                     |   |
| 10 | 157,1               | -                             |          |                     |   |
| 1' | 121,7               | -                             | 1'''     | 101,0               | 4,54 d (1,4)                                  |
| 2' | 116,3               | 7,70 sl                       | 2'''     | 70,7                | 3,66 dd (3,3 - 1,6)                           |
| 3' | 144,4               | -                             | 3'''     | 70,8                | 3,56 dd (9,5 - 3,4)                           |
| 4' | 148,4               | -                             | 4'''     | 72,5                | 3,30 t (9,4)                                  |
| 5' | 114,7               | 6,9 d (8,4)                   | 5'''     | 68,3                | 3,47 dq (9,3 - 6,8)                           |
| 6' | 122,2               | 7,66 dd (8,4 - 2,1)           | 6'''     | 16,5                | 1,14 d (6,2)                                  |

#### III.4.4.2. Détermination structurale du composé 16

Comme pour le composé **15**, le spectre d'absorption UV (figure 106) du composé **16** montre deux maxima à 254 et 358 nm, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol substitué en 3 [127].

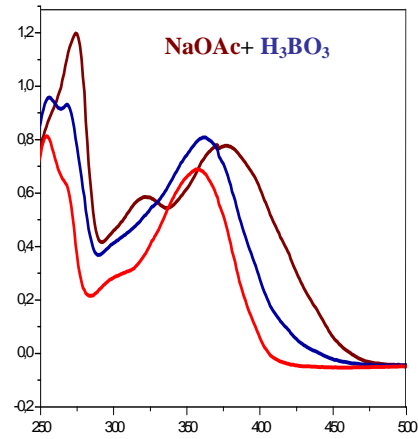
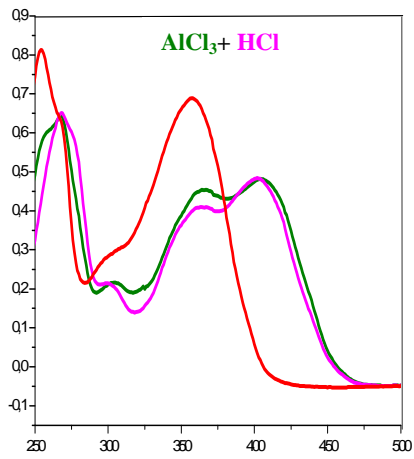
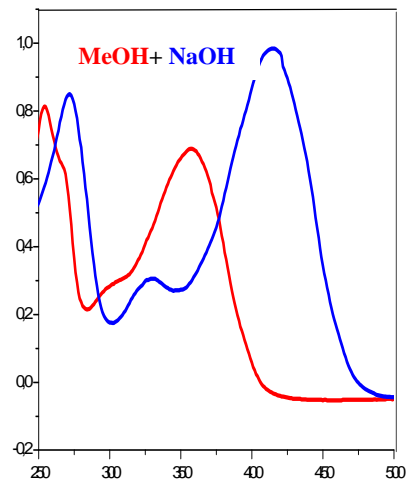
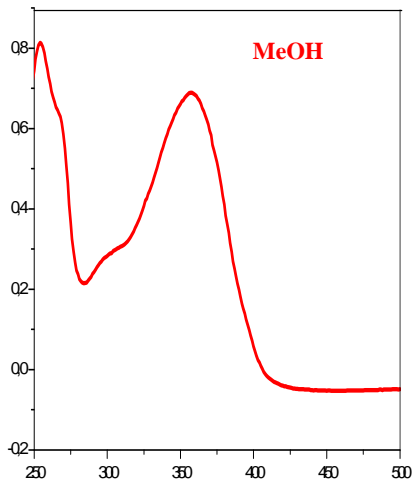
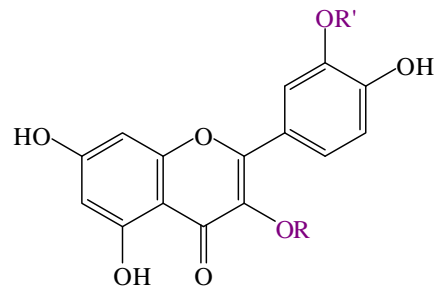
L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de 57 nm pour la bande I avec augmentation de l'intensité lumineuse (tableau 19), indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle la présence d'un OH libre en position 7

L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 20 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7.

Le déplacement bathochrome de 45 nm de la bande I, observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ), indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  par rapport au spectre d' $\text{AlCl}_3$ , laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Ces données permettent de proposer au composé **16**, la structure partielle suivante :

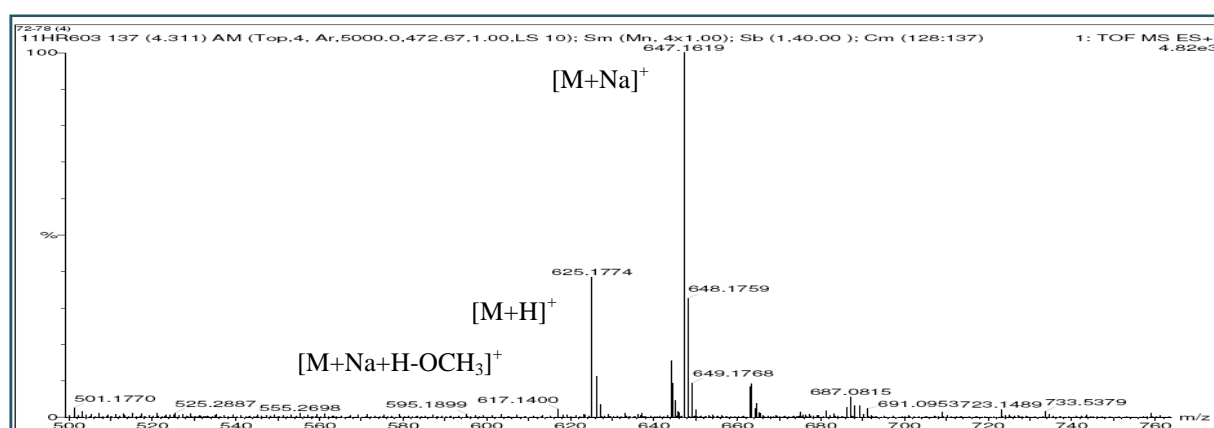


**Figure 106** : la Série spectrale UV du composé **16**

**Tableau 19** : données spectrales UV du composé **16**

| Solvants-réactifs                      | $\lambda_{\max}$     |                       |               |
|--|----------------------|-----------------------|---------------|
|  | Bande I (nm) cycle B | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                                   | 358                  | 254                   |               |
| NaOH                                   | 415                  | 272                   | 328           |
| AlCl <sub>3</sub>                      | 405                  | 267                   |               |
| AlCl <sub>3</sub> + HCl                | 405                  | 268                   |               |
| NaOAc                                  | 376                  | 274                   |               |
| NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 362                  | 267                   |               |

L'analyse du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 107), révèle pour le flavonoïde **16**, deux ions pseudo-moléculaires à  $m/z$  647,1619  $[M+Na]^+$  et  $m/z$  625,1774  $[M+H]^+$ , correspondant à une formule moléculaire en C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>O<sub>16</sub>, et un ion fragment à  $m/z$  617,1400  $[M+Na+H-OCH_3]^+$ , correspondant à la perte d'un groupement methoxy.



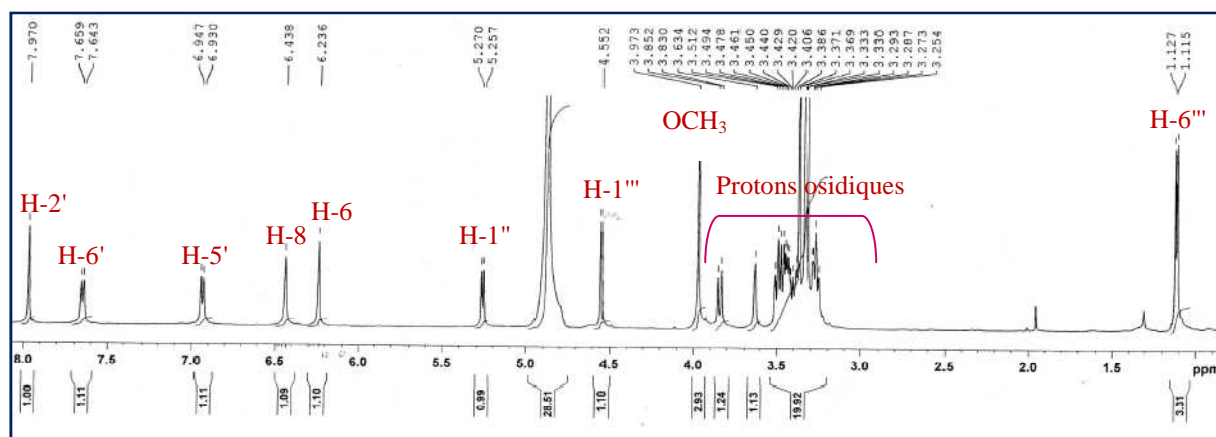
**Figure107** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **16**

Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **16** (figure 108) présente des similitudes avec celui du composé **15**. Il permet de mettre en évidence :

- la présence de substituants hydroxyles en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification des protons H-6 et H-8 du cycle A à  $\delta_H$  6.23 et 6.43 ppm (tableau 20).
- les signaux de trois protons aromatiques à  $\delta_H$  7,97 ppm (sl), 7,64 ppm (*d*,  $J = 8$  Hz), 6,93 ppm (*d*,  $J = 8,5$  Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.

- un singulet intégrant pour 3H à  $\delta_H$  3,97 ppm, caractéristique d'un groupement méthoxyle.

L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC du composé **16** et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN<sup>13</sup>C tous les carbones carbonés correspondant à l'isorhamnétine.



**Figure 108:** Spectre de RMN<sup>1</sup>H du composé **16**.

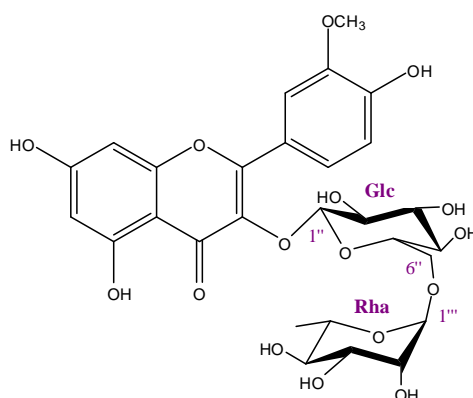
Le spectre de RMN<sup>1</sup>H montre, en plus des signaux de l'isorhamnétine, deux protons anomériques à  $\delta_H$  5,26 ppm (*d*, *J* = 6,5 Hz) et 4,55 ppm (*sl*) révélant la présence de deux unités osidiques.

L'analyse combinée des spectres de RMN COSY, HSQC, HMBC et ROESY du composé **16** permet de retrouver les mêmes signaux osidiques décrits pour la partie osidique du flavonoïde **15**, il s'agit donc d'un  $\beta$ -D-glucopyranose et d'un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose.

L'enchaînement diosidique  $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranosyl en position 3 de la génine, a été établi par l'analyse des expériences HMBC et ROESY.

Le flavonoïde **16** est le : 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl] isorhamnétine.

Cette structure s'est avérée identique à celle de la Narcissine, isolée pour la première fois à partir des fleurs du *Narcissus tazetta* et du pollen de *Lilium auratum* [132, 133].



3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl] isorhamnétine (**16**).

**Tableau 20** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **16** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | N°       | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)           |
|----|---------------------|-------------------------------|----------|---------------------|---|
| 2  | 157,5               | -                             | Glucose  |                     |   |
| 3  | 134,1               | -                             | 1''      | 104,3               | 5,26, d (6,5)                           |
| 4  | 177,9               | -                             | 2''      | 74,5                | 3,48, t (8,0)                           |
| 5  | 161,6               | -                             | 3''      | 76,7                | 3,46, t (8,0)                           |
| 6  | 98,6                | 6,23, sl                      | 4''      | 70,2                | 3,26, t (10,0)                          |
| 7  | 164,6               | -                             | 5''      | 75,9                | 3,38, m                                 |
| 8  | 93,5                | 6,43, sl                      | 6''      | 67,1                | 3,43, dd (11,5 - 4,5)<br>3,83, d (11,0) |
| 9  | 104,3               | -                             | Rhamnose |                     |   |
| 10 | 157,1               | -                             |          |                     |   |
| 1' | 121,6               | -                             | 1'''     | 101,1               | 4,55, sl                                |
| 2' | 113,2               | 7,97, sl                      | 2'''     | 70,7                | 3,62, dl                                |
| 3' | 146,9               | -                             | 3'''     | 70,9                | 3,50, dd (9,0 - 5,5)                    |
| 4' | 149,4               | -                             | 4'''     | 72,4                | 3,43, t (3,0)                           |
| 5' | 114,7               | 6,93, d (8,4)                 | 5'''     | 68,4                | 3,27, dq (10,0 - 5,5)                   |
| 6' | 122,6               | 7,64, dd (8,4 - 2,1)          | 6'''     | 16,5                | 1,14, d (6,0)                           |

### III. 4.4.3. Détermination structurale du composé **17**

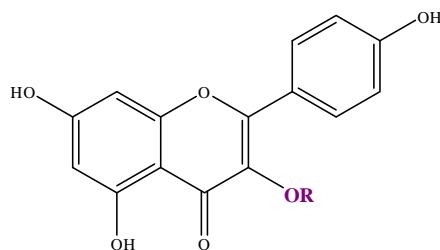
Le spectre UV du composé **17** dans le MeOH présente deux bandes d'absorbances maximales : la bande I à 352 nm et la bande II à 267 nm (figure109) en plus de la coloration violette noire sous la lamp UV, prévoyant soit un flavonol substitué en 3, soit une flavone [127].

L'ajout du NaOH induit un déplacement bathochrome de la bande I de 51 nm avec augmentation de l'intensité lumineuse (tableau 21), indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 325 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7. Le déplacement bathochrome de la bande II de 7 nm, après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol, confirme la présence d'un OH libre en position 7.

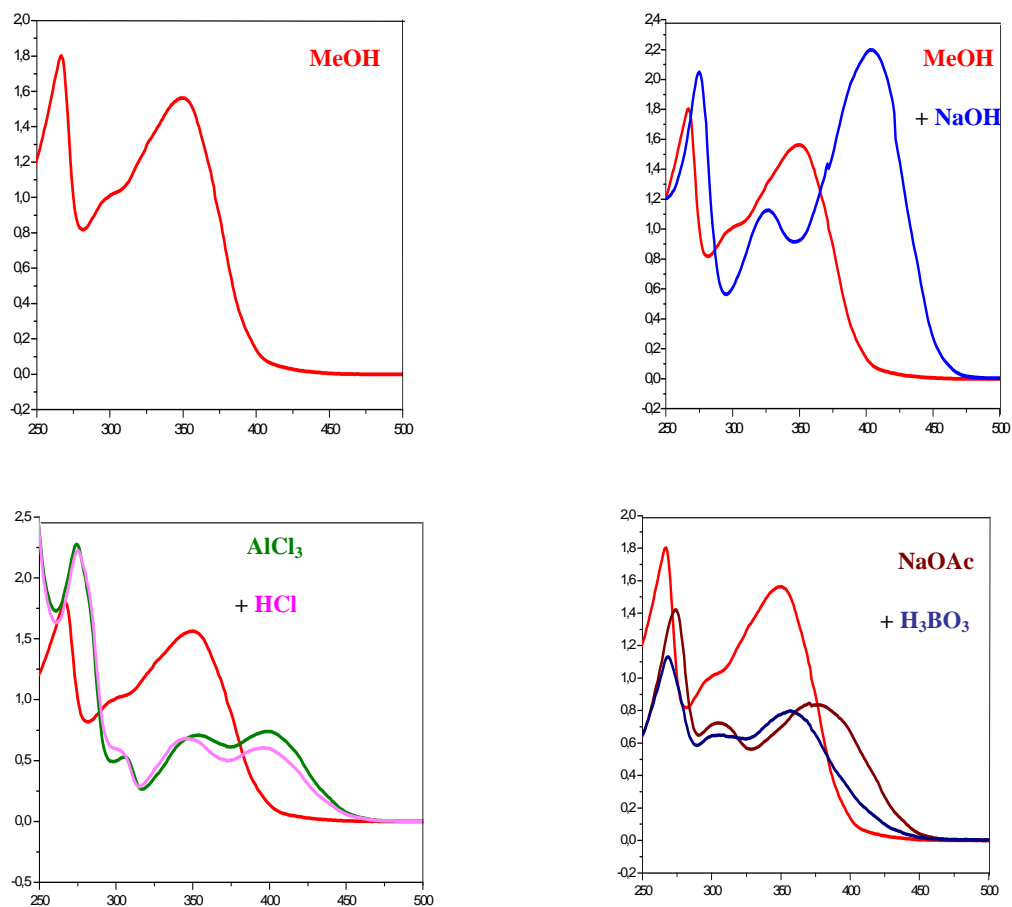
Le déplacement bathochrome de la bande I de 44 nm, observé après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5. Pas de déplacement hypsochrome de la bande I, en comparant les spectres  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  et  $\text{AlCl}_3$ , ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le kaempférol substitué en position 3 [134].



Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 21.



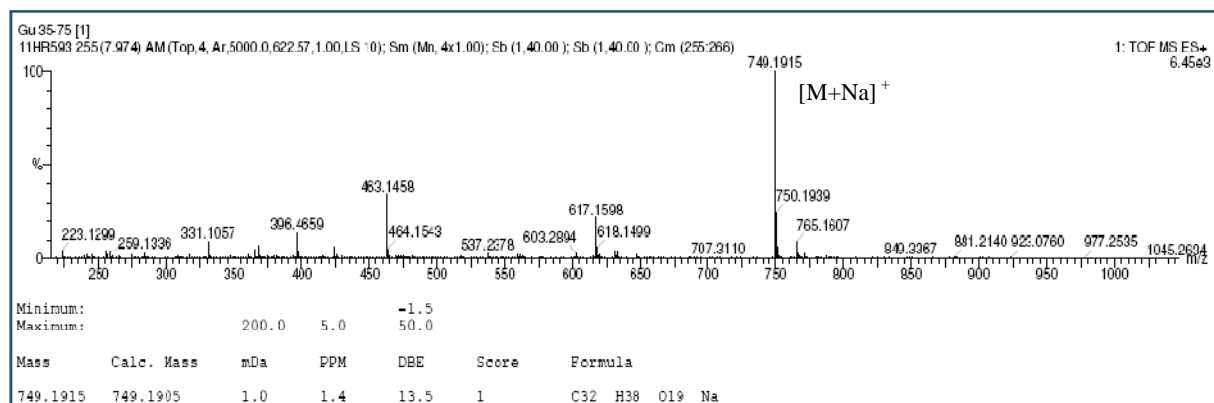


**Figure 109** : la Série spectrale UV du composé **17**.

**Tableau 21** : données spectrales UV du composé **17**

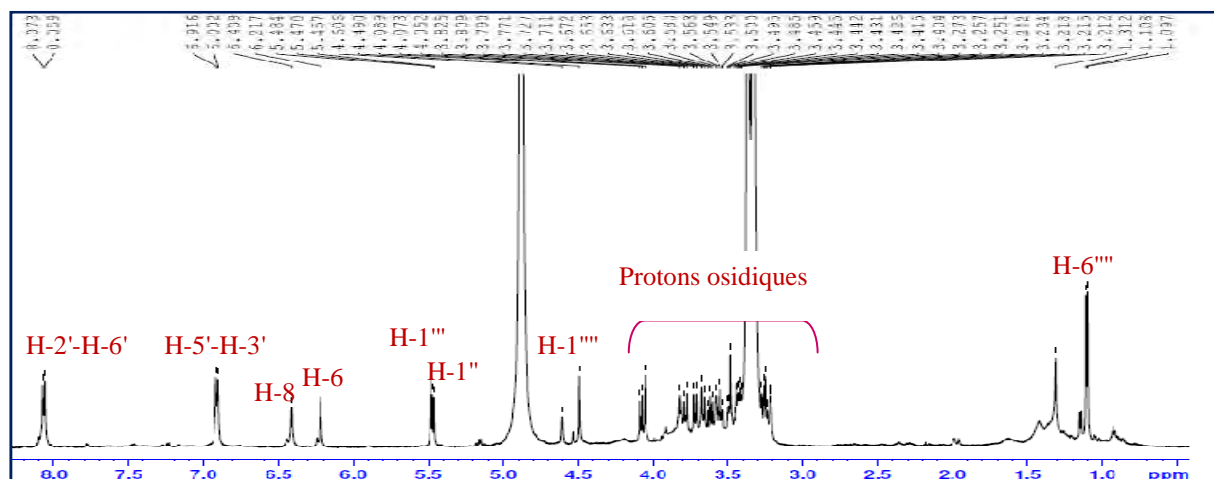
| Solvants-réactifs                      | $\lambda_{\max}$     |                       |               |
|--|----------------------|-----------------------|---------------|
|  | Bande I (nm) cycle B | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                                   | 352                  | 267                   |               |
| NaOH                                   | 403                  | 275                   | 325           |
| AlCl <sub>3</sub>                      | 398                  | 274                   |               |
| AlCl <sub>3</sub> + HCl                | 396                  | 275                   |               |
| NaOAc                                  | 376                  | 274                   |               |
| NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 357                  | 269                   |               |

L'analyse du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 110) permet d'observer un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  749.1915  $[M+Na]^+$ , suggérant une masse moléculaire de 724 *uma*, en accord avec la formule brute en  $C_{32}H_{38}O_{19}$ . D'autres ions-fragments sont observables à  $m/z$  617,1598  $[(M+Na) - 132]^+$  et 603,2894  $[(M+Na) - 146]^+$  correspondant respectivement à la perte d'un pentose et d'un désoxyhexose, suggérant une ramification de la chaîne osidique ou deux embranchements.



**Figure 110 :** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **17**

L'analyse du spectre de RMN<sup>1</sup>H (figure 111) du composé **17** montre la présence de quatres signaux pour six protons aromatiques caractéristiques de la génine kaémpférol :



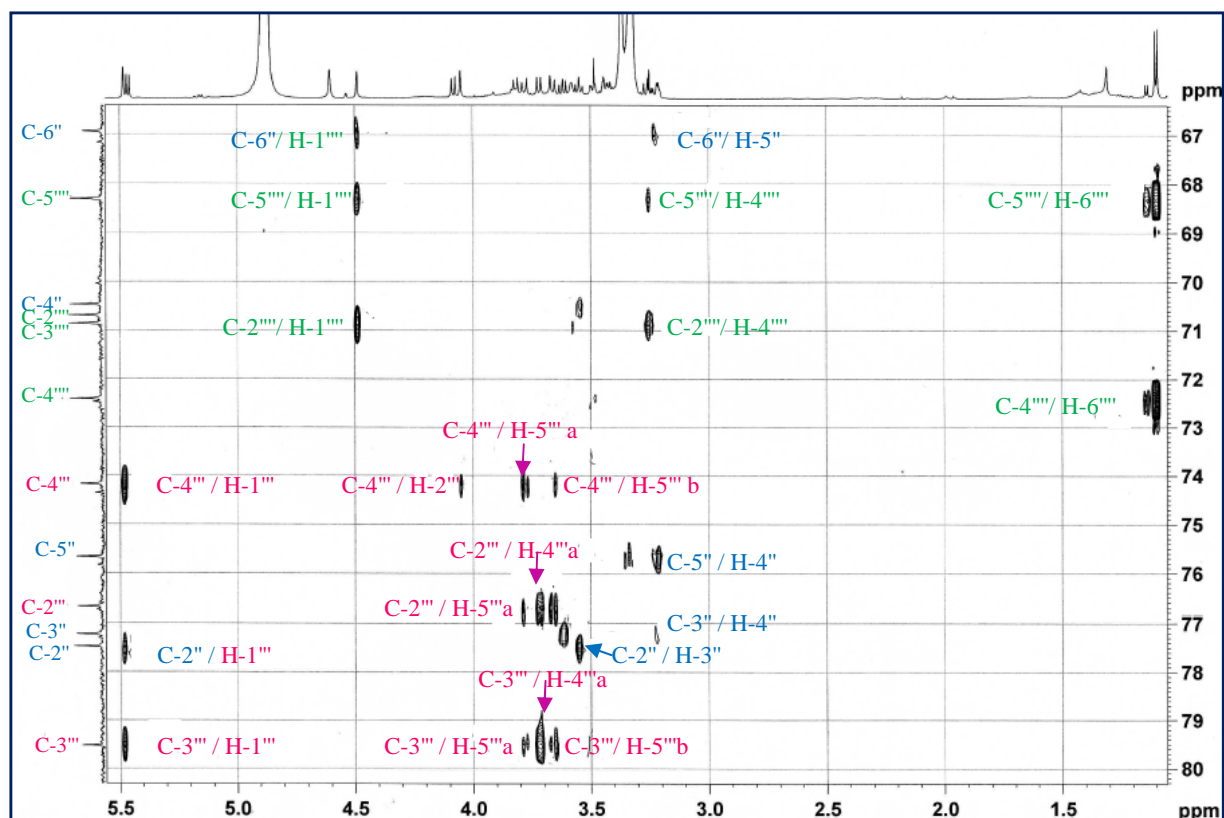
**Figure 111:** Spectre de RMN <sup>1</sup>H du composé **17**.

- Un doublet à 8,07 ppm d'intégration 2H ( $J = 8,5$  Hz) caractéristique des protons en couplage ortho H-2' et H-6'.
- Un doublet à 6,91 ppm d'intégration 2H ( $J = 8,2$  Hz) caractéristique des protons en couplage ortho H-3' et H-5'
- Deux singulets à 6,21 et 6,41 ppm d'intégration 1H chacune, correspondent respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A.

Sur le spectre de RMN<sup>1</sup>H, trois protons anomériques sont repérés à 4,49 ppm *sl*, 5,47 ppm (*d*,  $J = 7,6$ Hz) et 5,48 *sl*. Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC, résonnent à 100,8, 99,4 et 109,2 ppm.

L'analyse des spectres COSY, ROESY et HSQC permet d'identifier les deux sucres communs avec les composés **15** et **16** soit :

- Un β-D-glucopyranose à partir de l'anomère à 5,47 ppm (H-1"). Le déblindage des carbones C-2" et C-6" du glucose à 77,5 ppm et 66,9 ppm, respectivement suggère des substitutions du glucose en ces positions.
- Un α-L- rhamnopyranose terminal à partir de l'anomère à 4,49 ppm
- Un β-D-apiose à partir de l'anomère à 5,48 ppm (H-1'''). Sur le spectre COSY, à partir du proton anomère à 5,48 ppm, on attribue qu'un seul proton, le proton H-2 à 4,05 ppm ce qui suggère un carbone quaternaire en position 3. Deux systèmes AB isolés sont également observés à 3,72 d ( $J = 9,6$  Hz) et 4,08 d ( $J = 9,6$ Hz) et 3,67 d ( $J = 11,5$  Hz) et 3,78 ppm d ( $J = 11,5$  Hz). Leurs carbones respectifs, attribués à partir du spectre HSQC résonnent à 74,6 et 64,9 ppm indiquant deux méthylènes oxydés dont l'un est inclus dans un cycle (74,6, C-4) et l'autre hors du cycle (64,9, C-5) comme dans les pentofuranoses. Le spectre HMBC (figure 112) montre des corrélations entre les protons H-4 et les deux protons CH<sub>2</sub>OH avec un carbone quaternaire à 79,5 ppm attribué au carbone 3.

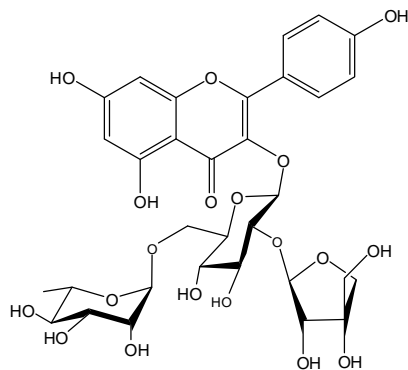


**Figure 112:** Spectre HMBC du composé **17**.

L'enchaînement triosidique est établi après l'analyse du spectre HMBC sur lequel sont visualisées les corrélations  $^3J_{H-C}$  suivantes :

- H-1'' Glc / C-3 de la génine.
- H-1''' Api / C-2'' Glc.
- H-1'''' Rha / C-6'' Glc.

L'analyse des spectres de RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, ROESY de **17** montre que ce composé est identique point par point au 3-O-[β-D-apio-furanosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl] kaempférol, précédemment isolé de *Monnina sylvatica* [135].



3-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]  
kaempférol (**17**)

**Tableau 22** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **17** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N°      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | N°       | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)    |
|---------|---------------------|-------------------------------|----------|---------------------|----------------------------------|
| 2       | 157,1               | -                             | 2''      | 77,5                | 3,62, t (9,1)                    |
| 3       | 133,2               | -                             | 3''      | 77,2                | 3,55, t (9,1)                    |
| 4       | 177,9               | -                             | 4''      | 70,5                | 3,22, m                          |
| 5       | 161,8               | -                             | 5''      | 75,7                | 3, 33, m                         |
| 6       | 98,4                | 6,21                          | 6''      | 66,9                | 3,34, m<br>3,82, d (9,4)         |
| 7       | 164,3               | -                             | Apiose   |                     |                                  |
| 8       | 93,3                | 6,41                          | 1'''     | 109,2               | 5,48, sl                         |
| 9       | 157,6               | -                             | 2'''     | 76,7                | 4,05, sl                         |
| 10      | 104,5               | -                             | 3'''     | 79,5                | -                                |
| 1'      | 121,7               | -                             | 4'''     | 74,6                | 3,72, d (9,6)<br>4,08, d (9,6)   |
| 2'      | 130,8               | 8,07, d (8,5)                 | 5'''     | 64,9                | 3,67, d (11,5)<br>3,78, d (11,5) |
| 3'      | 114,7               | 6,91, d (8,2)                 | Rhamnose |                     |                                  |
| 4'      | 159,9               | -                             | 1''''    | 100,8               | 4,49, sl                         |
| 5'      | 114,7               | 6,91, d (8,2)                 | 2''''    | 70,7                | 3,58, dl (9,9)                   |
| 6'      | 130,8               | 8,07, d (8,5)                 | 3''''    | 70,9                | 3,49, dd (9,4- 3,0)              |
| Glucose |                     |                               | 4''''    | 72,4                | 3,26, t (9,4)                    |
|         |                     |                               | 5''''    | 68,3                | 3,42, dq (6,1- 8,5)              |
| 1''     | 99,4                | 5,47, d (7,6)                 | 6''''    | 16,4                | 1,11, d (6,2)                    |

### III.4.4.4. Détermination structurale du composé 18

L'examen du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 113) montre quatre signaux correspondants aux protons aromatiques :

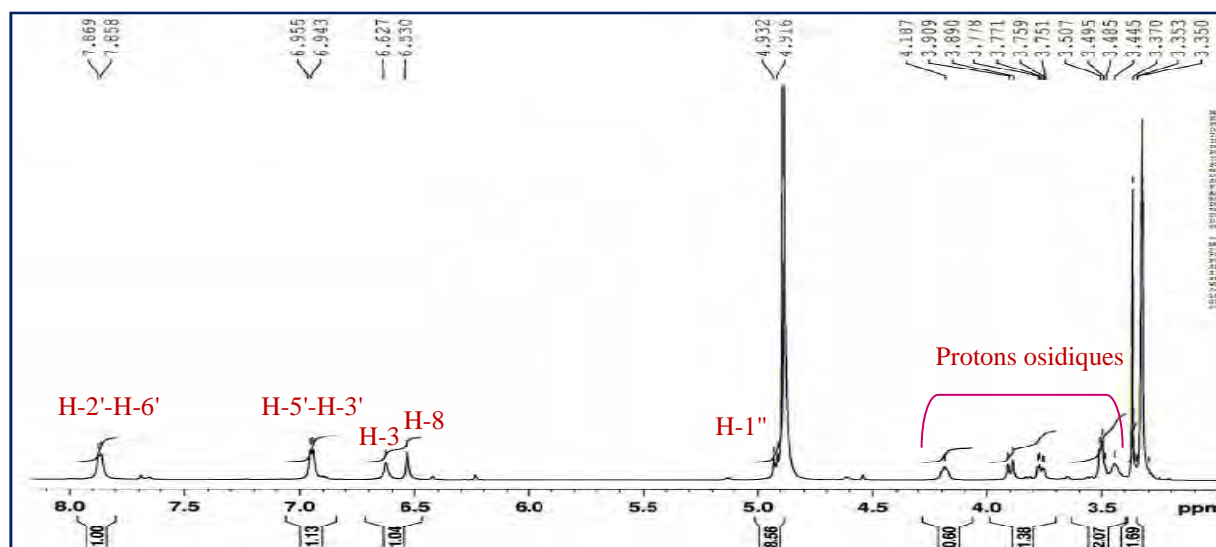
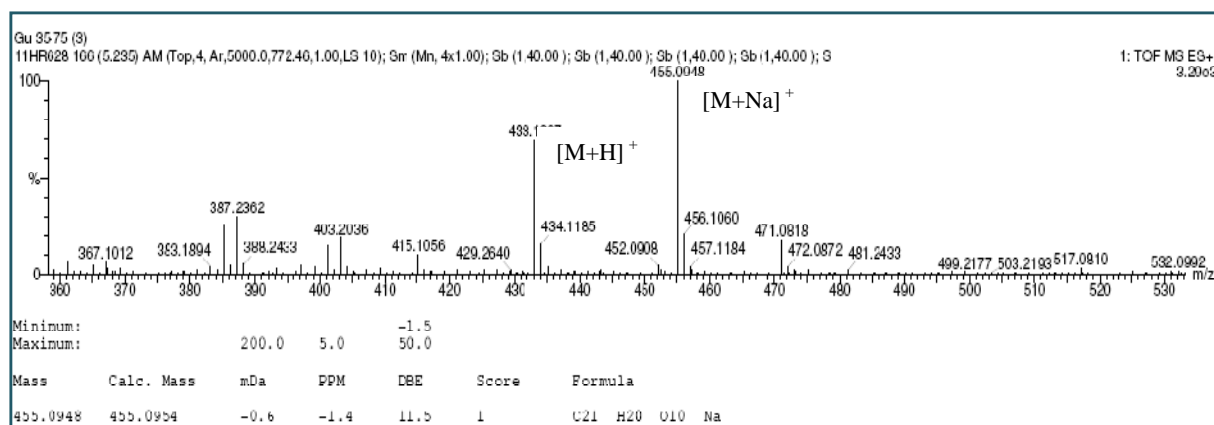


Figure 113: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 18.

- un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  6,53 attribuable soit à H-6 soit à H-8 indiquant ainsi la substitution des positions 5, 6 et 7 ou bien les positions 5, 7 et 8.
- deux doublets d'intégration 2H chacun, à  $\delta_{\text{H}}$  6,95 ( $J = 8,7$  Hz) et à  $\delta_{\text{H}}$  7,86 ( $J = 6,5$  Hz) attribuables à (H-3' et H-5') et (H-2' et H-6'), respectivement, indiquant une substitution para du cycle B.
- un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6,63 attribuable à H-3, ce qui suggère la structure d'une flavone. Les résonances à  $\delta_{\text{H}}$  6,63 (H-3) et 6,52 (H-8) sont en accord avec la structure d'une flavone dont le cycle A est substitué en positions 5 et 7 par un hydroxyle et en 6 par un sucre [136].

L'analyse du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé 18 (figure 114), révèle deux ions pseudo-moléculaires à  $m/z$  455,0948  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculé 455,0954 et  $m/z$  433,1207  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , caractéristiques des flavonoïdes C-glycosides. En soustrayant la masse de l'apigénine (270 *uma*), il reste 162 *uma* soit l'équivalent d'un hexose.



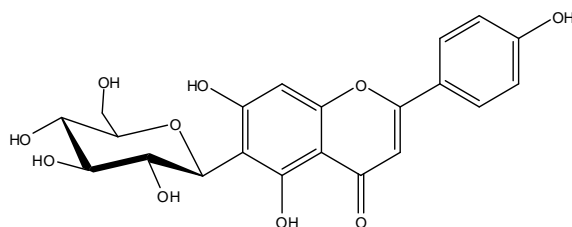
**Figure 114** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **18**

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **18** montre, en plus des signaux de l'apigénine, un signal d'un proton anomérique à 4,92 ppm (*d*,  $J = 9,8$  Hz).

L'analyse de spectre COSY révèle que ce proton anomérique fait partie d'un système de sept spins couplés d'un hexose et la mesure des constantes de couplage permet d'identifier un  $\beta$ -D-glucopyranose. Le déplacement chimique du carbone anomérique, obtenu par analyse de l'expérience HSQC  $J$ -modulé, blindé à 73,9 ppm suggère une liaison de type C-glycoside avec la génine.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton H-8 résonant à 6,53 ppm et les carbones C-7 et C-9 et entre le proton anomérique H-1" et les carbones C-7 et C-5 confirment bien la substitution du carbone C-6 par le glucose via une liaison C-C.

Les expériences HSQC  $J$ -modulé, COSY H-H et HMBC combinées, permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (tableau 23) et d'attribuer sans ambiguïté à ce composé **18**, la structure de l'isovitexine (6-C- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine) [136].



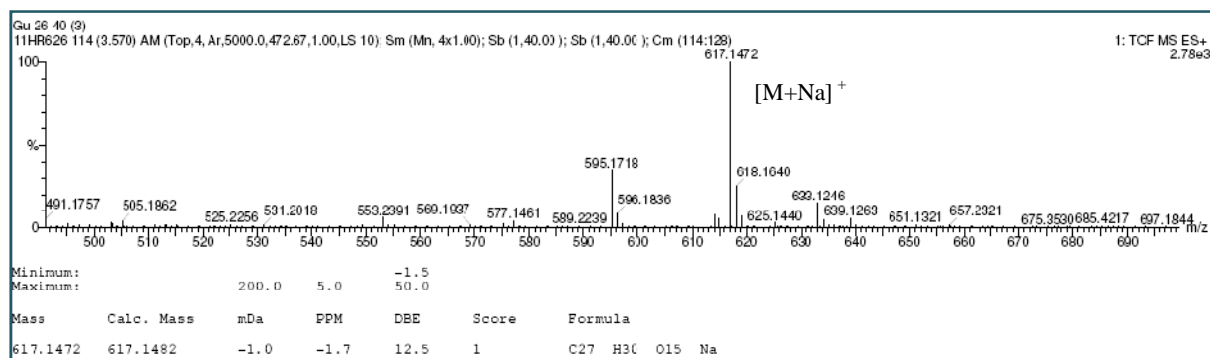
**6-C- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine (18).**

**Tableau 23** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **18** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N°      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)         |
|---------|---------------------|---------------------------------------|
| 2       | 164,8               | -                                     |
| 3       | 102,5               | 6,62, s                               |
| 4       | 182,7               | -                                     |
| 5       | 160,7               | -                                     |
| 6       | 107,8               | -                                     |
| 7       | 163,5               | -                                     |
| 8       | 93,8                | 6,53, s                               |
| 9       | 157,3               | -                                     |
| 10      | 103,8               | -                                     |
| 1'      | 121,7               | -                                     |
| 2'      | 128,1               | 7,86, d (6,5)                         |
| 3'      | 115,6               | 6,94, d (7,1)                         |
| 4'      | 161,4               | -                                     |
| 5'      | 115,6               | 6,94, d (7,1)                         |
| 6'      | 128,1               | 7,86, d (6,5)                         |
| Glucose |                     |                                       |
| 1''     | 73,9                | 4,92, d (9,8)                         |
| 2''     | 71,2                | 4,18, t (11,9)                        |
| 3''     | 70,4                | 3,50, t (8,1)                         |
| 4''     | 81,2                | 3,44, sl                              |
| 5''     | 78,7                | 3, 50, t (8,1)                        |
| 6''     | 61,4                | 3,76, dd (11,9 – 4,7), 3,90, d (11,8) |

#### III.4.4.5 .Détermination structurale du composé **19**

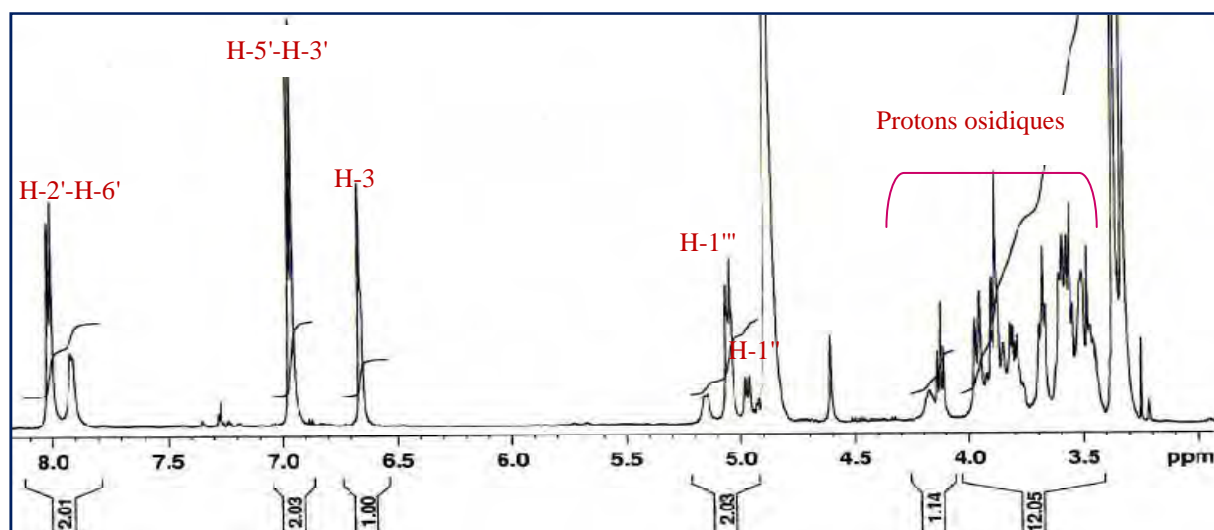
La formule moléculaire brute  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$  du composé **19** a été déduite à partir du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS, enregistré en mode positif (figure 115). Il montre en effet un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  617,1472  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , soit un gain de 162 *uma* par rapport à **18**, révélant la présence d'un deuxième hexose dans cette molécule.



**Figure 115** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **19**



Les spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HSQC de ce composé (tableau 24) sont voisins de ceux du composé **18**. En effet, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 116) présente :



**Figure 116:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **19**.

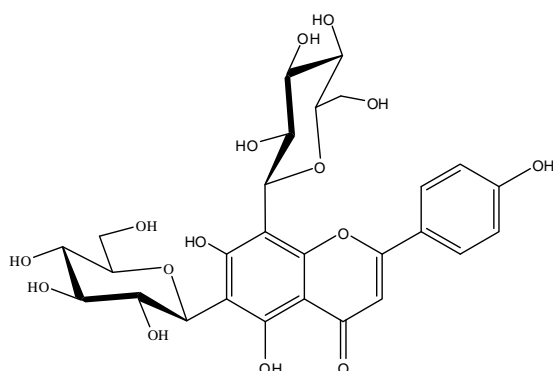
- deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6,95 ( $J = 8,6$  Hz) et 8,01 ( $J = 8,5$  Hz) typiques de quatre protons équivalents (H-3'et H-5') et (H-2'et H-6') du cycle B substitué par un OH en position 4',
- un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6,65 ppm attribuable à H-3, indiquant la structure d'une flavone.
- un proton anomérique à 5,05 ppm (d,  $J = 9,8$  Hz) appartenant comme précédemment à un  $\beta$ -D-glucopyranose impliqué dans une liaison de type C-glycoside.

La seule différence notable entre ce composé et le composé **18** se situe au niveau du cycle A et cela par la disparition du signal du proton H-8 et l'apparition du signal d'un doublet anomérique supplémentaire H-1''' résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,04 ppm (d,  $J = 9,8$  Hz).

L'analyse des spectres COSY et HSQC révèle que ce proton anomérique fait parti d'un système de sept spins couplés d'un second  $\beta$ -D-glucopyranose impliqué lui aussi dans une liaison de type C-glycoside.

Les corrélations  $^2J_{\text{H-C}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$  visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-1''' et les carbones C-8, C-7 et C-9, et le proton H-1'' et les carbones C-6, C-7 et C-5, montrent que ces deux glucoses sont attachés aux carbones C-6 et C-8, respectivement.

Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé **19** : 6,8-di-C- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine isolé de *Rheum rhabarbarum* L. et *Rheum rhaponticum* L [136]



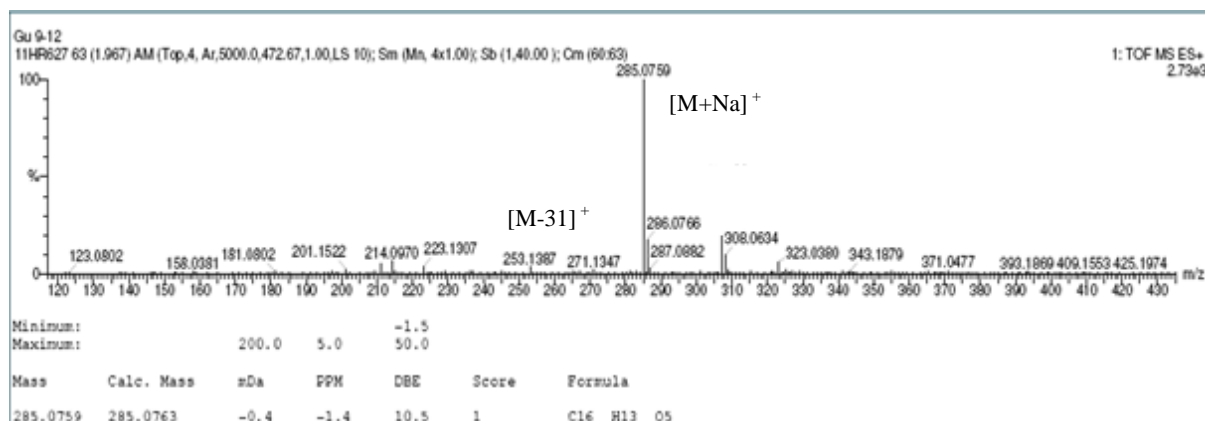
6,8-di-C- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine (**19**).

**Tableau 24:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **19** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)           |
|--------------|---------------------|---|
| 2            | 165,4               | -                                       |
| 3            | 102,4               | 6,65, s                                 |
| 4            | 182,9               | -                                       |
| 5            | 159,2               | -                                       |
| 6            | 103,8               | -                                       |
| 7            | 161,5               | -                                       |
| 8            | 93,8                | -                                       |
| 9            | 156,2               | -                                       |
| 10           | 103,8               | -                                       |
| 1'           | 122,0               | -                                       |
| 2'           | 128,8               | 8,01, d (8,5)                           |
| 3'           | 115,6               | 6,95, d (8,6)                           |
| 4'           | 161,5               | -                                       |
| 5'           | 115,6               | 6,95, d (8,6)                           |
| 6'           | 128,8               | 8,01, d (8,5)                           |
| Glucose en 6 |                     |   |
| 1''          | 73,7                | 5,05, d (9,8)                           |
| 2''          | 71,7                | 4,12, t (9,4)                           |
| 3''          | 78,9                | 3,55, t (8,9)                           |
| 4''          | 70,9                | 3,67, t (9,4)                           |
| 5''          | 81,6                | 3,46, m                                 |
| 6''          | 61,7                | 3,78, dd (12,3 - 5,8)<br>3,97, d (10,9) |
| Glucose en 8 |                     |   |
| 1'''         | 74,8                | 5,04, d (9,8)                           |
| 2'''         | 72,4                | 3,68, t (9,4)                           |
| 3'''         | 77,8                | 3,55, t (8,9)                           |
| 4'''         | 69,6                | 3,59, t (8,9)                           |
| 5'''         | 81,2                | 3,51, m                                 |
| 6'''         | 60,3                | 3,87, d (11,2)                          |

### III.4.4.6. Détermination structurale du composé **20**

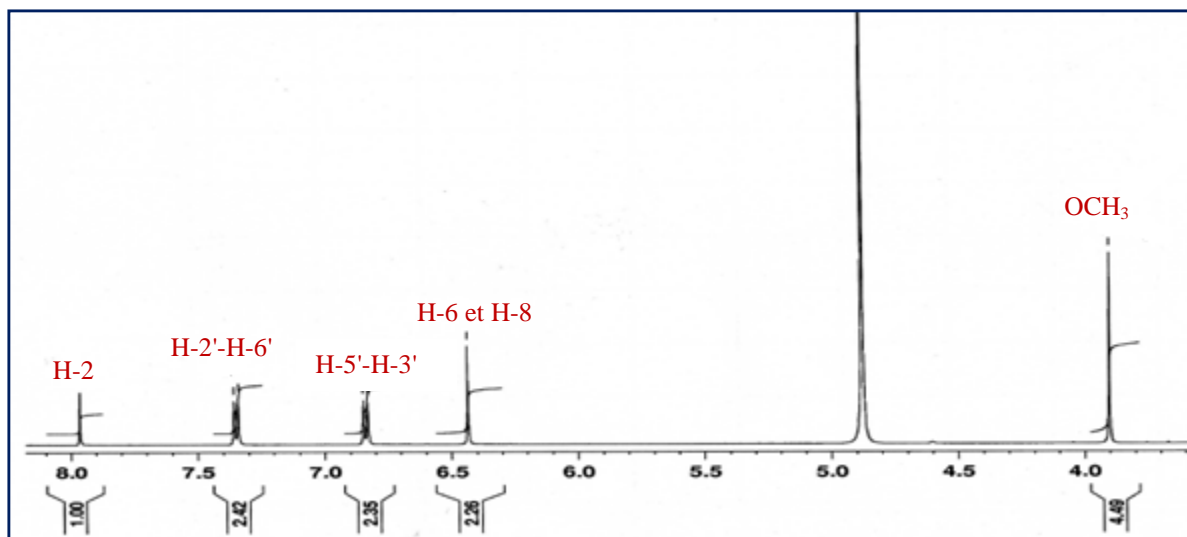
Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-ESI-MS (figure 117) montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  285,0759  $[M+H]^+$  (calculé 285,0763) qui correspond à la formule brute  $C_{16}H_{12}O_5$ . Le spectre montre aussi un ion fragment à  $m/z$  253,1387  $[M-31]^+$  correspondant à la perte d'un groupement méthoxyle.



**Figure 117** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **20**

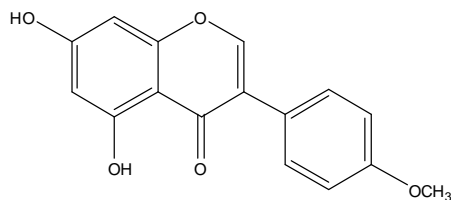
L'analyse du spectre de RMN  $^1H$  (figure 118) du composé **20** montre la présence de :

- un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  7,96 attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_H$  6,94 ( $d$ ,  $J = 7,1$ ), et 7,86 ( $d$ ,  $J = 6,5$ ), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6', respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- un singulet d'intégration 2H à  $\delta_H$  6,53 attribuable à H-6 et H-8 indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.
- un singulet d'intégration 3H à  $\delta_H$  3,58 caractéristique d'un groupement méthoxyle.



**Figure 118:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **20**.

L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  tous les carbones (tableau 25) correspondant à la biochanine A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone) [137].



5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone (**20**)

**Tableau 25** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **20** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| N°             | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) |
|----------------|---------------------|-------------------------------|
| 2              | 164,8               | 7,96                          |
| 3              | 102,5               | 6,62, s                       |
| 4              | 182,7               | -                             |
| 5              | 160,7               | -                             |
| 6              | 107,8               | 6,53, s                       |
| 7              | 163,5               | -                             |
| 8              | 93,8                | 6,53, s                       |
| 9              | 157,3               | -                             |
| 10             | 103,8               | -                             |
| 1'             | 121,7               | -                             |
| 2'             | 128,1               | 7,86, d (6,5)                 |
| 3'             | 115,6               | 6,94, d (7,1)                 |
| 4'             | 161,4               | -                             |
| 5'             | 115,6               | 6,94, d (7,1)                 |
| 6'             | 128,1               | 7,86, d (6,5)                 |
| $\text{OCH}_3$ | 55,0                | 3,58, s                       |

#### III.4.4.7. Conclusion

Six flavonoides connus ont été isolés à partir de la fraction butanolique des parties aériennes de *G. ulicina* dont :

- Trois flavonols à squelette quercétine (**15**), isorhamnetine (**16**) et kaempférol (**20**). Les flavonoides (**15**) et (**16**) sont très répandus dans plusieurs familles de plantes principalement dicotylédones. Ils sont également très connus pour leurs nombreuses propriétés biologiques notamment antioedémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombosique, anti-hypotensive, spasmolytique et antihémorragique [131].
- deux flavones (**18-19**) de type C-glycosides possédant l'apigénine comme génine
- un isoflavonoïde (**20**).

Toutes ces molécules ont été identifiées pour la première fois dans le genre *Genista*

## *CHAPITRE IV*

### *INVESTIGATION CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt.*

## IV.1. Rappels botaniques

L'espèce *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae), a des feuilles un peu charnues, à segments linaires et trifides au sommet. Les tiges sont plus hautes (10-30 cm) et plus ramifiées que les autres espèces existant en Algérie [1]. L'inflorescence est un capitule de fleurs tubulées jaunes au centre et ligulées blanches à la périphérie. (figure119.)



**Figure119:** Espèce *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch.Bip.)Coss.& Kralik ex Batt.

## IV.2. Utilisation en médecine traditionnelle

*Chrysanthemum macrocarpum* est utilisée par les Touaregs pour traiter des douleurs abdominales (coliques) et la fièvre, elle est utilisée également pour aromatiser le thé [41].

## IV.3.Travaux antérieurs sur l'espèce *C. macrocarpum* (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt.

A notre connaissance et à la lumière de la recherche bibliographique exhaustive réalisée, l'espèce *macrocarpum*, n'a fait l'objet d'aucune étude chimique ou pharmacologique. Ceci nous a paru motivant d'apporter notre contribution à l'étude chimique et pharmacologique de cette plante, sachant que le genre *Chrysanthemum* renferme des substances chimiques d'un grand intérêt, à l'instar des flavonoïdes et triterpénoïdes.

## IV.4. Chimie extractive

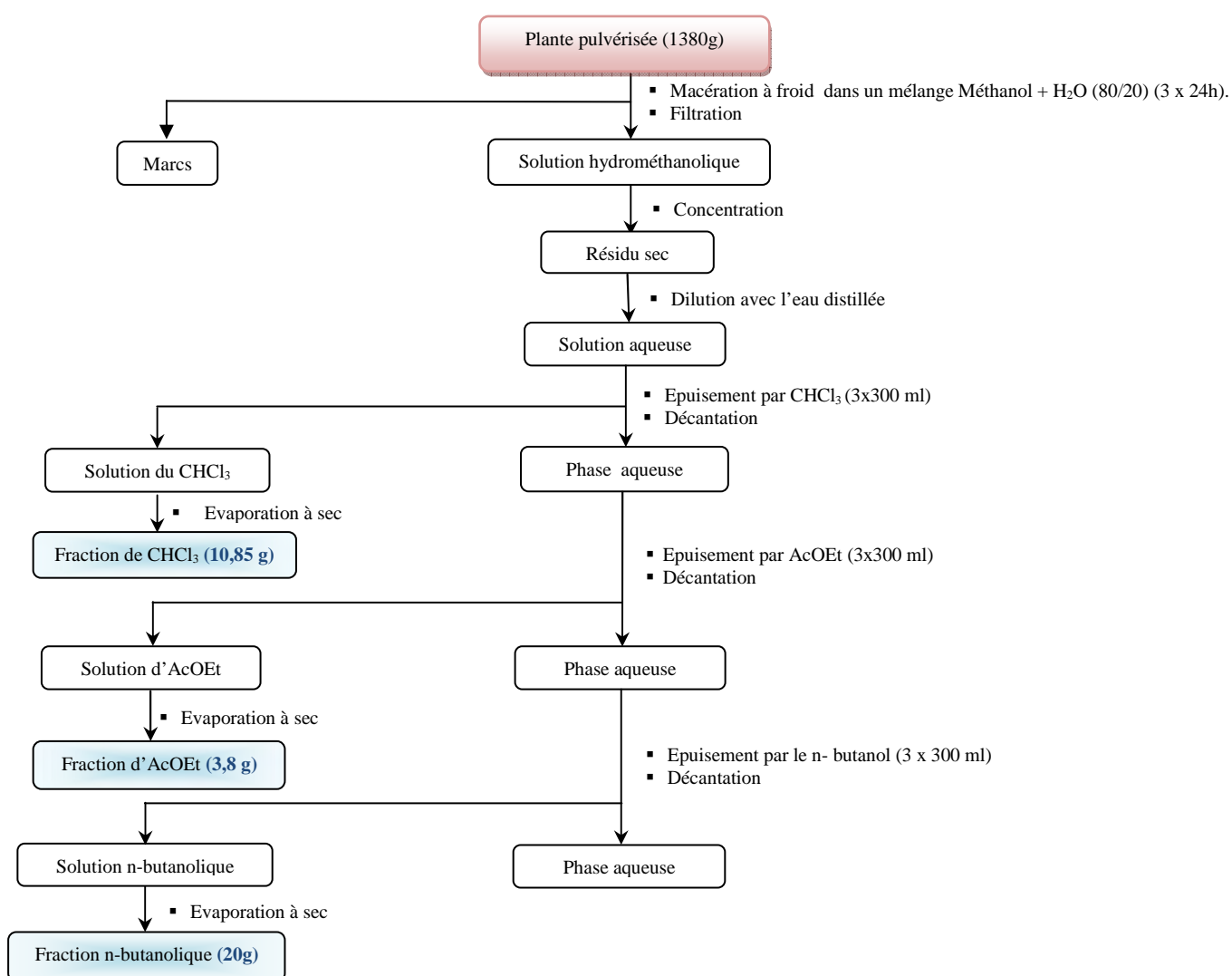
### IV.4.1. Extraction

Les parties aériennes de *Chrysanthemum macrocarpum* ont été récoltées par Mr. Kamel Kabouche dans une station à quelques kilomètres de Ghardaïa. L'espèce a été identifiée par le Professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba).

La quantité de matériel végétal obtenue (1380g) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Methanol/Eau : 80 : 20 : v/v) pendant 48 heures. Le premier extrait récupéré

est concentré sous pression réduite et une température modérée (environ 45 °C). Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant durant 24 à 48 heures à chaque fois. Les trois solutions hydroalcooliques récupérées sont réunies et concentrées. A la solution concentrée obtenue on ajoute de l'eau distillée, cette dernière solution aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

La figure ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction des parties aériennes du *C. macrocarpum*



**Figure 120 :** Différentes étapes d'extraction des parties aériennes de *C. macrocarpum*.

Il est à rappeler qu'une analyse CCM préalable a montré que l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanol présentent des constitutions chimiques similaires.

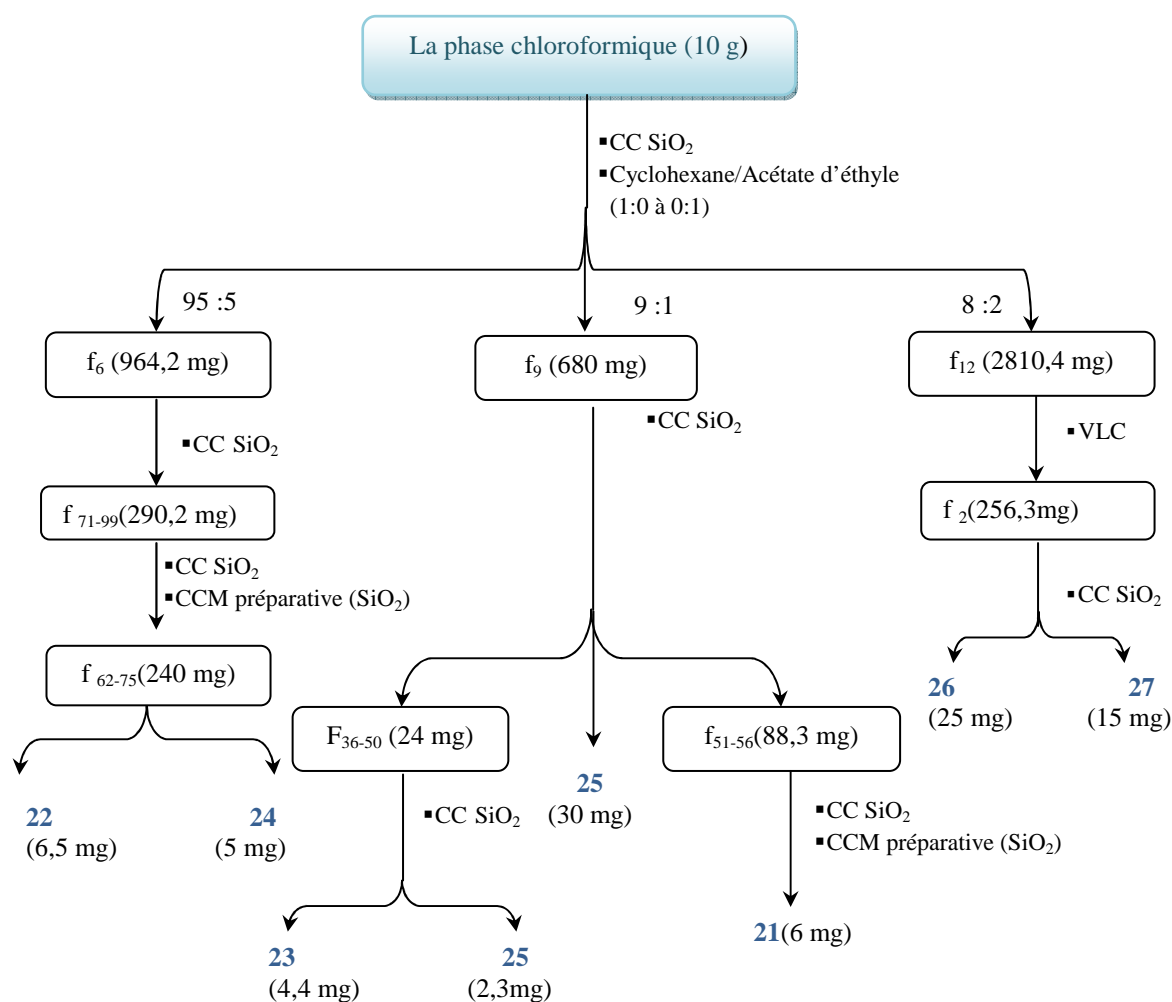


## IV.4.2. Purification

### IV.4.2. 1. A partir de la fraction chloroformique

Le fractionnement de **10 g** de l'extrait chloroformique a été effectué sur une colonne de gel de silice, avec le mélange Cyclohexane/Acétate d'éthyle (1:0 à 0:1). Des fractions de 50 ml sont recueillies pour donner 20 fractions.

Ces dernières sont soumises par la suite à des opérations de purification en utilisant différentes méthodes chromatographiques en phase normale sur gel de silice ou en phase inverse sur silice greffée C<sub>18</sub>: chromatographie liquide sous vide (VLC), chromatographie sur colonne de gel de silice normale (CC), chromatographie sur plaque préparative (CPP). Ainsi, 7 composés ont été isolés, selon le schéma suivant (figure121) :



**Figure 121:** Schéma de purification des terpénoïdes de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*.

#### IV.4.2. 2. A partir de la fraction acétate d'éthyle

3 g de l'extrait acétate d'éthyle sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'éluion  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:0 à 0:1) (tableau, partie expérimentale).

La purification des composés a pu être possible grâce à l'utilisation en alternance des chromatographies sur gel de silice en phase normale et sur silice greffée  $\text{C}_{18}$ . Le recours à la CLHP semi-préparative s'est avéré nécessaire pour certains composés. Ainsi, 9 composés (7 flavonoïdes et 2 cyclitols) ont été isolés, selon le schéma suivant (figure 122) :

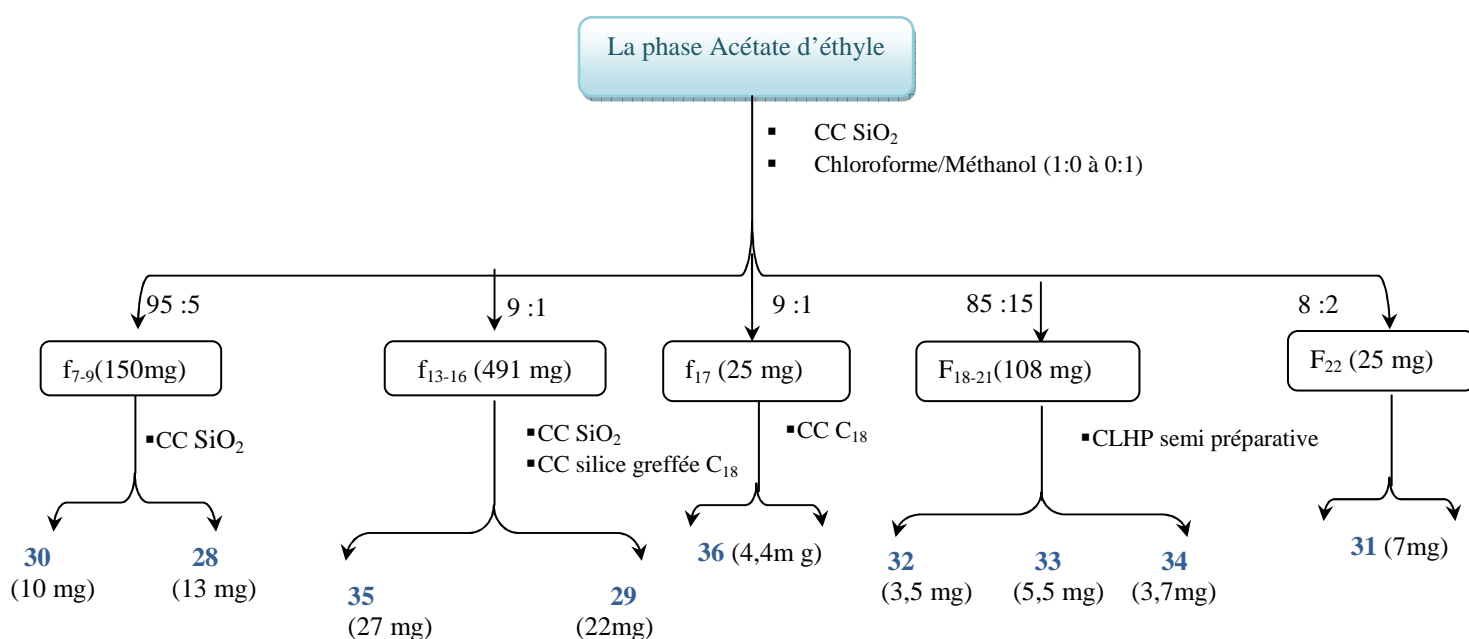


Figure 122: Schéma de purification de la fraction acétate d'éthyle de *C. macrocarpum*

#### IV.4.3. Détermination structurale des composés obtenus à partir de la fraction chloroformique

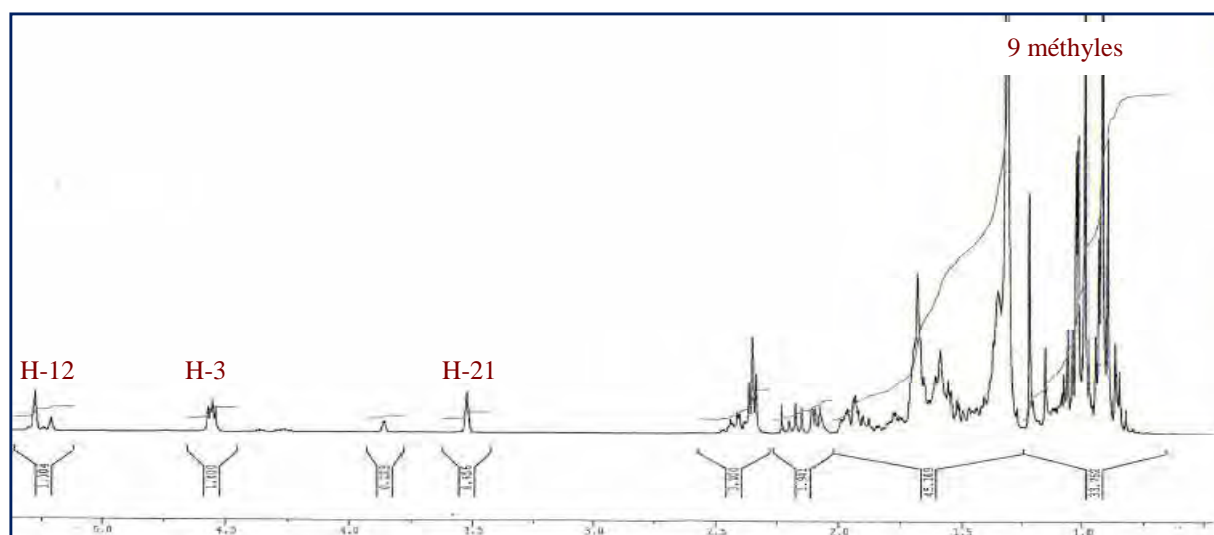
L'élucidation structurale des produits isolés a été réalisée comme pour la première plante grâce à l'analyse des spectres de RMN 1D et 2D, de masse, UV, à la mesure des pouvoirs rotatoires et à la comparaison avec les données de la littérature.

#### IV.4.3. 1. Détermination structurale du composé 21

La formule moléculaire brute  $C_{42}H_{72}O_3$  du composé **21** a été déduite à partir du spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif. Il montre en effet un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  625  $[M+H]^+$ . Il présente également un fragment à  $m/z$  425  $[M+H-(C_{12}H_{24}O_2)]$  correspondant à la perte d'un groupement acyle à 12 carbones.

L'analyse du spectre de RMN  $^1H$  (figure123) montre dans la région blindée allant de 0,90 à 1,22 ppm, huit fins singulets s'intégrant pour trois protons chacun correspondant aux huit méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonant à  $\delta_H$  0,90 (H-28), 0,92 (H-23), 0,92 (H-24), 0,99 (H-29), 0,99 (H-30), 1,01 (H-26), 1,02 (H-25) et 1,22 (H-27).

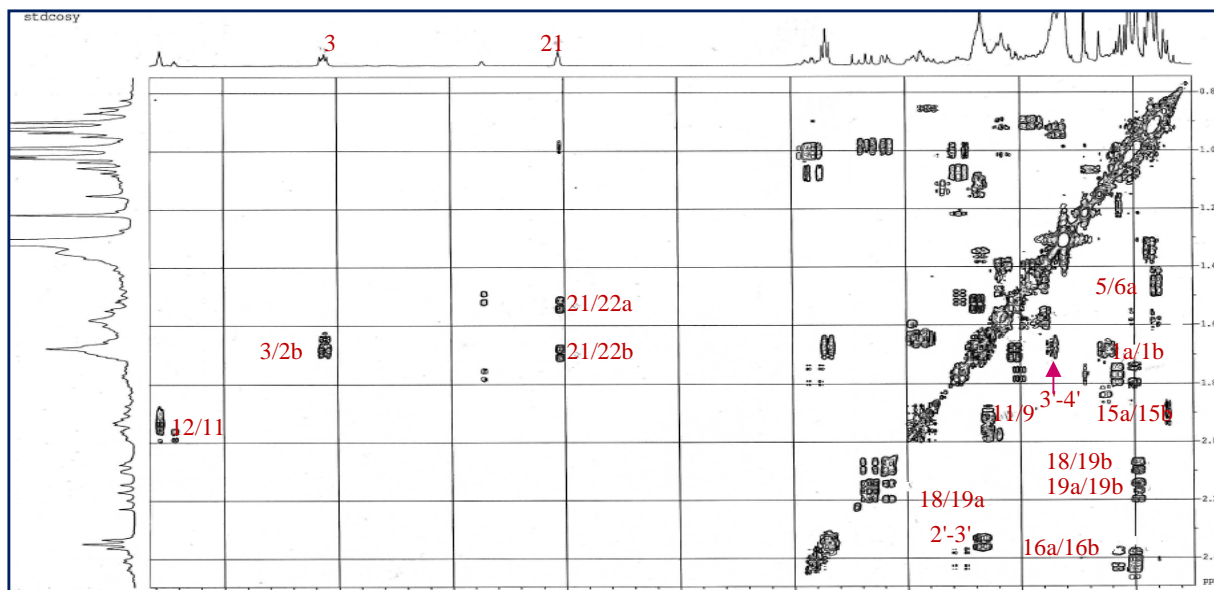
Un massif de protons résonant entre 0,91 et 2,41 ppm correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles. Il montre aussi dans la région déblindée, trois signaux résonant à 5,28 (brt  $J= 3,6$  Hz, H-12,) 4,55 (dd,  $J= 9,4 - 5,6$  Hz, H-3 $\alpha$ ) et 3,52 ppm (brt,  $J= 3,4$  Hz).



**Figure 123:** Spectre de RMN  $^1H$  du composé **21**.

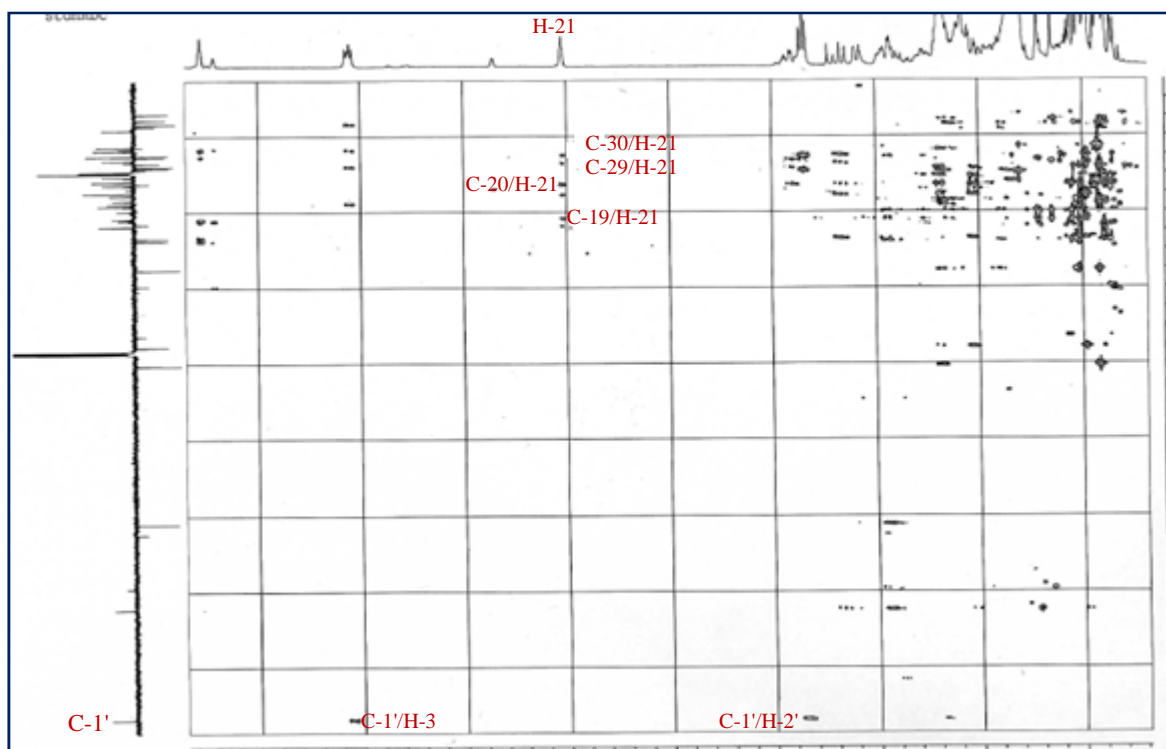
Ces observations suggèrent la présence d'une génine triterpénique à squelette oléan-12-ène, porteuse de deux groupements hydroxyles (OH) dont un en position 3 de la génine, comme dans le cas des composés **8** et **9** de *Genista ulicina*.

Le proton résonant à 3,52 ppm corrèle sur le spectre COSY H-H (figure124) avec deux protons H-22 résonants à 1,55 et 1,69 ppm.



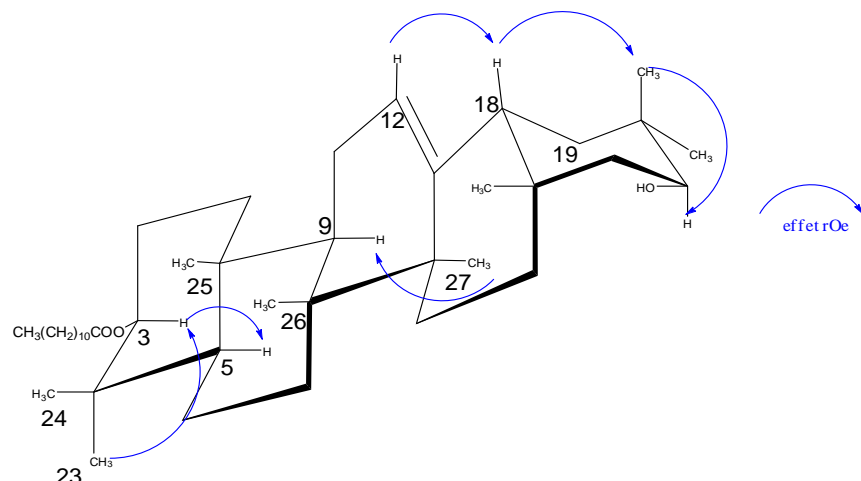
**Figure 124:** Spectre COSY du composé **21**.

La position du groupement OH sur le carbone C-21 est établie à partir de l'expérience HMBC (figure 125) qui montre des corrélations  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  entre le proton H-21 et les carbones : C-17, C-19, C-20, C-22, C-29 et C-30.



**Figure 125:** Spectre HMBC du composé **21**.

L'orientation  $\beta$  axiale du proton H-21 est confirmée d'une part par la petite valeur de constante de couplage et d'autre part par l'effet rOe (figure 126) qu'il présente avec les protons du méthyle 30 en position  $\beta$ -axiale.



**Figure 126:** Importants effets rOe observés pour le composé **21**

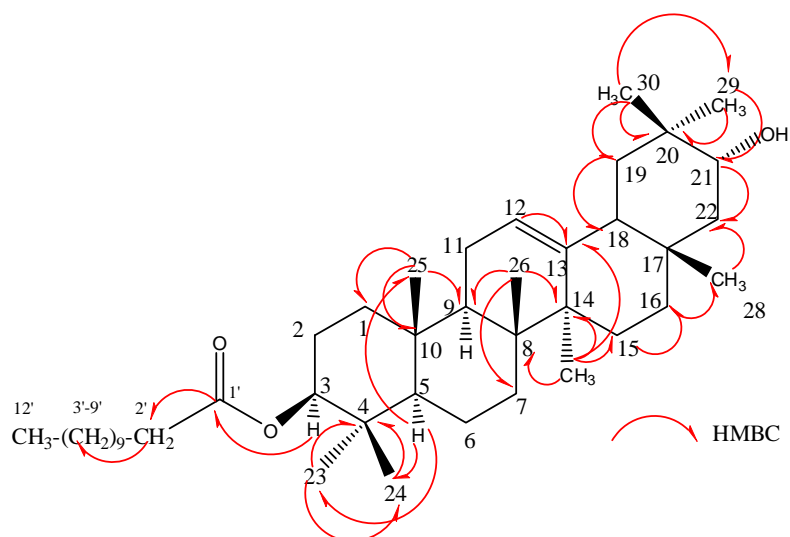
Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  montre des signaux supplémentaires correspondants à la présence d'un acide aliphatique saturée à longue chaîne en plus de la génine :

- un triplet intégrant pour 3H à  $\delta_{\text{H}}$  0,93 (t,  $J = 6,8$  Hz) caractéristique d'un méthyle en position terminale,
- un singulet large à  $\delta_{\text{H}}$  1,31, correspondant au massif des  $\text{CH}_2$  de la chaîne,
- un triplet intégrant pour 2 H à  $\delta_{\text{H}}$  2,35 (t,  $J = 7,5$  Hz), caractéristique de  $\text{CH}_2$  en alpha du carbonyle de l'acide gras.

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  présente en plus des signaux attribuables à un acide gras saturé à longue chaîne et résonant à  $\delta_{\text{C}}$  14,1 (C-12'), 22,7 (C-11'), 25,2 (C-3'), 29,2 - 29,6 (C-4' à C-9'), 31,9 (C-10'), 34,8 (C-2') et 173,7 (C-1'). Leurs protons respectifs attribués à l'aide du spectre HSQC résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  0,93 (t,  $J = 6,8$  Hz, H-12'), 1,31 (sl, H-4' à H-10'), 2,35 (t,  $J = 7,5$  Hz, H-2'), 1,35 (m, H-11') et 1,68 (m, H-3'), caractéristiques du groupement lauryle (tableau 26). Le nombre de carbones de la chaîne était attribué d'après le spectre de masse.

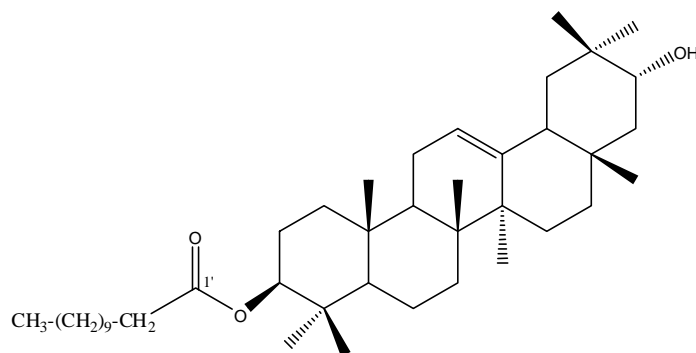
La valeur du déplacement chimique de H-3 suggère une acylation au niveau du carbone C-3 par le groupement lauryle.

La corrélation en  $^3J_{\text{H-C}}$  observée sur le spectre HMBC entre le proton H-3 résonant à 4,55 ppm et le carbonyle résonant à 173,7 ppm attribuable au carbone C-1' confirme que le groupement lauryle est lié au carbone C-3 de la génine.



**Figure 127:** Importantes corrélations  $^2J_{\text{H-C}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$  observées pour le composé **21**

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier ce composé comme nouveau avec la structure suivante : 21 $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amyrinyl-3 $\beta$ -laurate.



21 $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amyrinyl-3 $\beta$ -laurate (**21**)

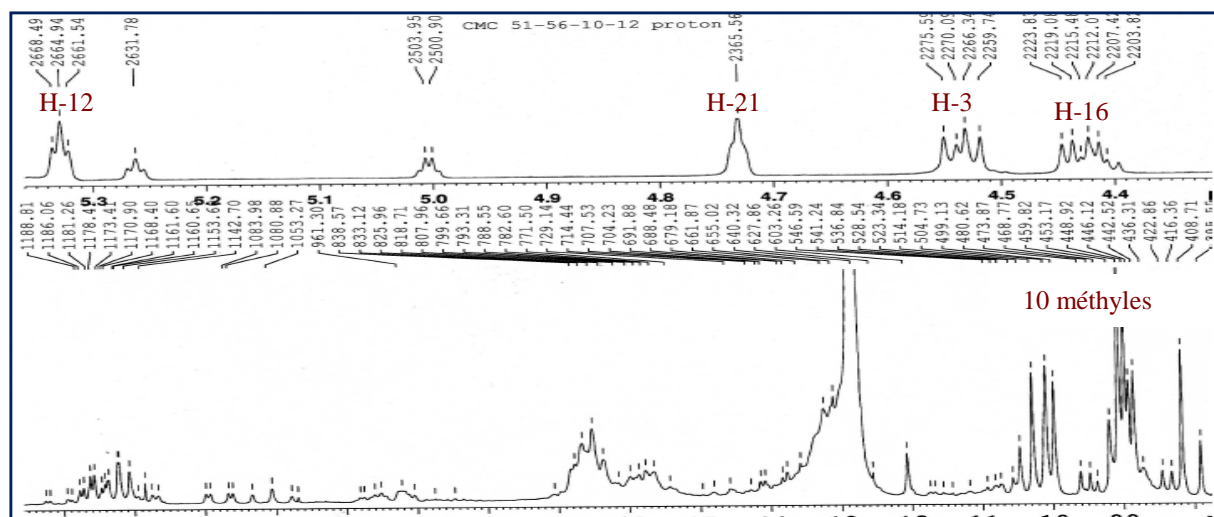
**Tableau 26:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **21** dans  $\text{CDCl}_3$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)  | N°           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)  |
|----|---------------------|--------------------------------|--------------|---------------------|--------------------------------|
| 1  | 38,2                | 1,12, m, 1,70, m               | 20           | 35,5                |                                |
| 2  | 23,6                | 1,68, m, 1,93, dd (7,0 - 3,5)  | 21           | 75,6                | 3,52, brt (3,4)                |
| 3  | 80,6                | 4,55, dd (9,4 - 5,6)           | 22           | 43,7                | 1,53, dd (15,5 - 3,6), 1,69, m |
| 4  | 37,7                | -                              | 23           | 28,0                | 0,92, s                        |
| 5  | 55,3                | 0,91, dm (12)                  | 24           | 16,7                | 0,92, s                        |
| 6  | 18,2                | 1,45, dd (7,3 - 3,5), 1,60, m  | 25           | 15,6                | 1,02, s                        |
| 7  | 32,7                | 1,40, m, 1,58, tm (10,1)       | 26           | 16,8                | 1,01, s                        |
| 8  | 39,6                | -                              | 27           | 25,4                | 1,22, s                        |
| 9  | 47,5                | 1,65, m                        | 28           | 28,3                | 0,90, s                        |
| 10 | 36,8                |                                | 29           | 27,1                | 0,99, s                        |
| 11 | 23,5                | 1,97, m                        | 30           | 25,0                | 0,99, s                        |
| 12 | 122,1               | 5,28, brt (3,6)                | Laurate en 3 |                     |                                |
| 13 | 144,7               | -                              | 1'           | 173,7               |                                |
| 14 | 42,0                | -                              | 2'           | 34,8                | 2,35, t (7,5)                  |
| 15 | 26,2                | 1,01, m, 1,77, td (11,0 - 3,5) | 3'           | 25,2                | 1,68, m                        |
| 16 | 30,5                | 1,08, m, 2,41, td (14,2- 4,0)  | 4'- 9'       | 29,2 - 29,6         | 1,31, sl                       |
| 17 | 32,7                | -                              | 10'          | 31,9                | 1,31, m                        |
| 18 | 46,9                | 2,09, dm (11,6)                | 11'          | 22,7                | 1,35, m                        |
| 19 | 41,6                | 0,99, m, 2,18, t (13,3)        | 12'          | 14,1                | 0,93, t (6,8)                  |

#### IV.4.3. 2. Détermination structurale du composé 22.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  957  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  correspondant à la formule brute  $\text{C}_{62}\text{H}_{110}\text{O}_5$ . Il montre également un fragment à  $m/z$  685  $[\text{M}+\text{Li}-\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2]$ , correspondant à la perte d'un groupement palmitoyle. Le spectre de masse haute résolution HRESIMS ( $m/z = 957,8634$ , calculé.  $\text{C}_{62}\text{H}_{110}\text{O}_5\text{Na}$  957,8653) en apporte la confirmation.

L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  nous permet de retrouver les signaux de la 21 $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amyrine comme pour le composé **21**. L'observation d'un signal déblindé résonant à 4,43 ppm (*dd*,  $J = 11,7$ - 4,7 Hz), sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 128), nous autorise à envisager la présence d'un troisième groupement hydroxyle (OH).



**Figure 128:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **22**.

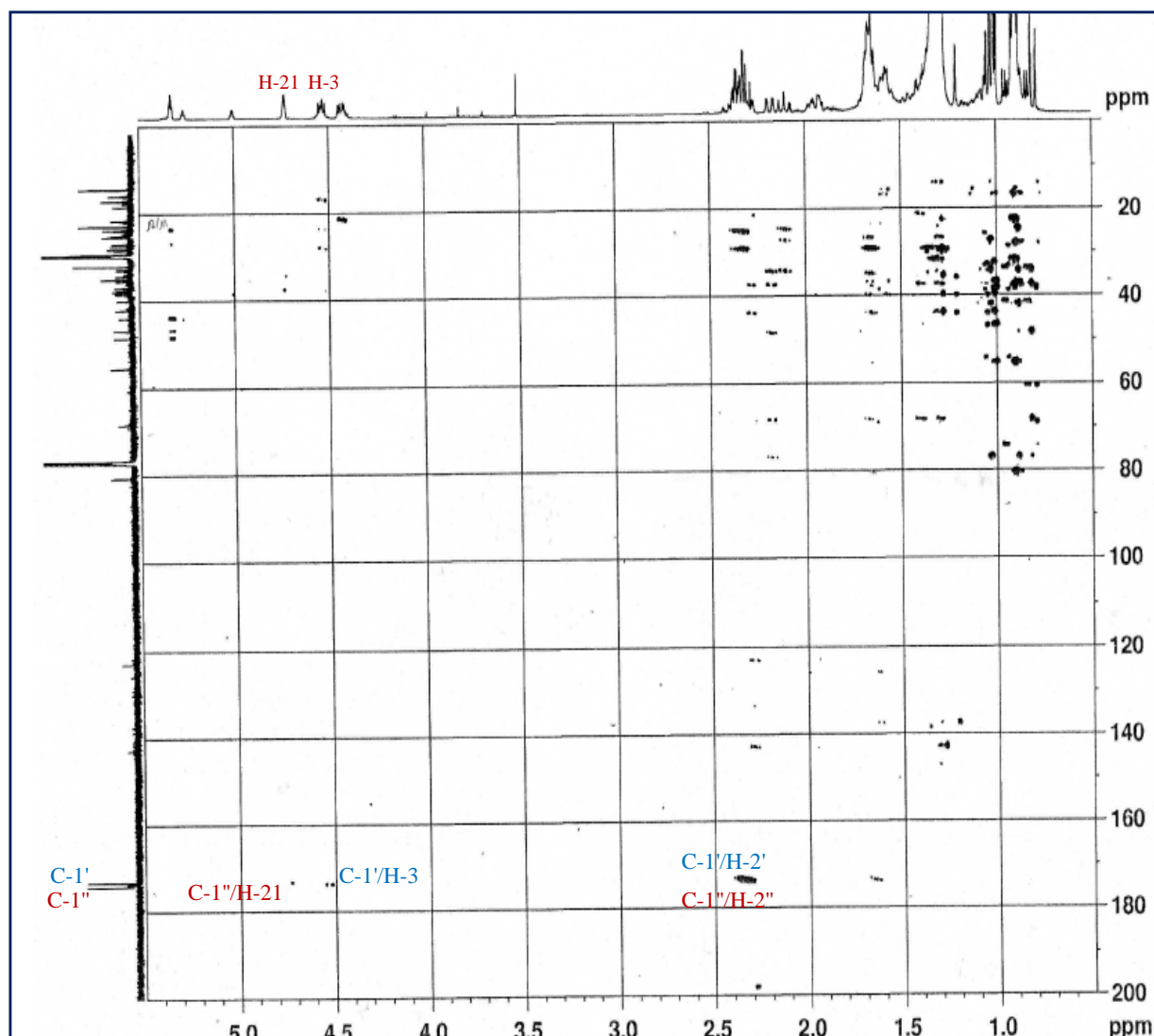
L'expérience HSQC permet de repérer son carbone à 68,3 ppm. Les corrélations HMBC observées entre le proton H-16 et les carbones C-14, C-15, C-17, C-18 et C-28 impliquent que ce groupement est attaché au carbone C-16.

Outre les signaux correspondant à la 16 $\beta$ , 21 $\alpha$ -dihydroxy- $\beta$ -amyrine, le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  présente des signaux attribuables aux deux acides gras saturés à longue chaîne et résonant à  $\delta_{\text{C}}$  14,2 (C-16', C-16''), 22,7 (C-15'- C-15''), 25,2 (C-3', C-3''), 29,1- 29,9 (C-4' à C-13', C-4'' à C-13''), 31,9 (C-14', C-14''), 34,9 (C-2', C-2''), 173,3(C-1') et 173,7 (C-1''). L'analyse combinée des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et HSQC  $J$ -modulé montrent aussi, en plus des signaux de la génine, des protons résonant à  $\delta_{\text{H}}$  0,90 (*t*,  $J = 7,4$  Hz, H-16', H-16''), 1,28 1,28 (*brs*, H-4' à H-13', H-4'' à H-13''), 1,28 (*m*, H-14', H-14''), 1,32 (*m*, H-15', H-15''), 1,65 (*m*, H-3'), 1,67 (*m*, H-3'' à H-13''), 2,32 (*q'd*,  $J = 7,1- 1,0$  Hz, H-2') et 2,36 (*q'd*,  $J = 7,7- 2,7$  Hz, H-2'') et caractéristiques de deux groupements palmitoyle (tableau 27).

Les déplacements vers les champs faibles des protons H-3 à 4,53 (*dd*,  $J = 9,3- 5,5$  Hz) et H-21 à 4,73 ppm (*brt*,  $J = 3,4$  Hz) traduisent des substitutions à ces niveaux par les groupements palmitoyle préalablement identifiés. Ceci est confirmé par expérience HMBC (figure 129) qui montre les corrélations en  $^2J_{\text{C-H}}$  et  $^3J_{\text{C-H}}$  entre :

- les protons H-3 résonant à 4,53 ppm et H-2' résonant à 2,32 ppm avec le carbonyle résonant à 173,3 ppm attribuable au carbone C-1'.
- les protons H-21 résonant à 4,73 ppm et H-2'' résonant à 2,36 ppm avec le carbonyle résonant à 173,7 ppm attribuable au carbone C-1''.



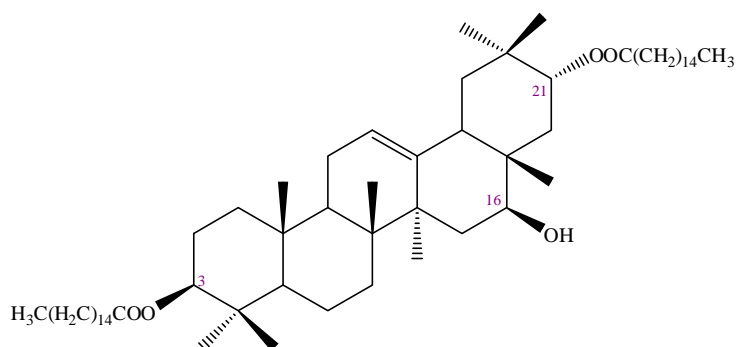


**Figure 129:** Spectre HMBC du composé **22**.

La stéréochimie relative du composé **22** est déduite de l'analyse du spectre ROESY et de la mesure des valeurs des constantes de couplage :

- Le proton H-21 est pris en position  $\beta$ -axiale du fait d'une part de la petite valeur de constante de couplage (*brt*,  $J = 3,4$  Hz) et d'autre part par l'effet rOe qu'il présente avec les protons du méthyle 30 en position  $\beta$ -axiale.
- L'orientation  $\alpha$  axiale des protons H-3 et H-16 est confirmée par l'effet rOe entre le proton H-3 / H-5 $\alpha$ et H-23, le proton H-16/ H-27 $\alpha$ -axial et par les grandes valeurs de constantes de couplage ( $J_{2ax,3} = 9,3$ Hz pour H-3) et  $J_{15ax,16} = 11,7$  Hz pour H-16.

Cette analyse spectrale permet d'attribuer sans ambiguïté, la structure nouvellesuivante pour le composé **22** : 3,21-dipalmitoyloxy-16 $\beta$ , 21 $\alpha$ -dihydroxy- $\beta$ -amyrine.



3,21-dipalmitoyloxy-16 $\beta$ , 21 $\alpha$ -dihydroxy- $\beta$ -amyrine(**22**).

**Tableau 27:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **22** dans  $\text{CDCl}_3$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | N°                   | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)               |
|----|---------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|---|
| 1  | 38,3                | 1,09, m, 1,65, m              | 22                   | 34,1                | 1, 39, dd (15,7- 3,3), 2,17, dd (15,7- 3,1) |
| 2  | 23,6                | 1,66, m, 1,92, m              | 23                   | 28,1                | 0,91, s                                     |
| 3  | 80,5                | 4,53, dd, (9,3 – 5,5)         | 24                   | 16,8                | 0,89, s                                     |
| 4  | 37,8                | -                             | 25                   | 15,6                | 1,00, s                                     |
| 5  | 55,3                | 0,88, m                       | 26                   | 16,8                | 1,01, s                                     |
| 6  | 18,2                | 1,44, m, 1,58, m              | 27                   | 26,7                | 1,27, s                                     |
| 7  | 32,9                | 1,37, m, 1,56, m              | 28                   | 21,4                | 0,81, s                                     |
| 8  | 39,8                | -                             | 29                   | 27,4                | 0,88, s                                     |
| 9  | 46,8                | 1,58, m                       | 30                   | 24,8                | 1,02, s                                     |
| 10 | 36,8                |                               | Palmitate en 3 et 21 |                     |   |
| 11 | 23,6                | 1,97, m                       | 1' en 3              | 173,7               | -   |
| 12 | 122,9               | 5,33, brt (3,5)               | 1" en 21             | 173,3               | -   |
| 13 | 142,9               | -                             | 2'                   | 34,9                | 2,32, qtd (7,1- 1,0)                        |
| 14 | 43,9                | -                             | 2"                   | 34,9                | 2,36, qtd (7,7 – 2,7)                       |
| 15 | 35,4                | 1,65, m, 1,29, m              | 3'                   | 25,2                | 1,65, m                                     |
| 16 | 68,3                | 4,43, dd (11,7- 4,7)          | 3"                   | 25,2                | 1,67, m                                     |
| 17 | 37,4                | -                             | 4' - 13'             | 29,1- 29,9          | 1,28, brs                                   |
| 18 | 48,5                | 2,28, dd (14,1, 4,2)          | 4" - 13"             | 29,1- 29,9          | 1,28, brs                                   |
| 19 | 42,1                | 1,06, m, 2,10, t (13,8)       | 14' - 14"            | 31,9                | 1,28, m                                     |
| 20 | 34,3                | -                             | 15' - 15"            | 22,7                | 1,32, m                                     |
| 21 | 76,5                | 4,73, brt (3,4)               | 16' - 16"            | 14,2                | 0,90, t (7,4)                               |

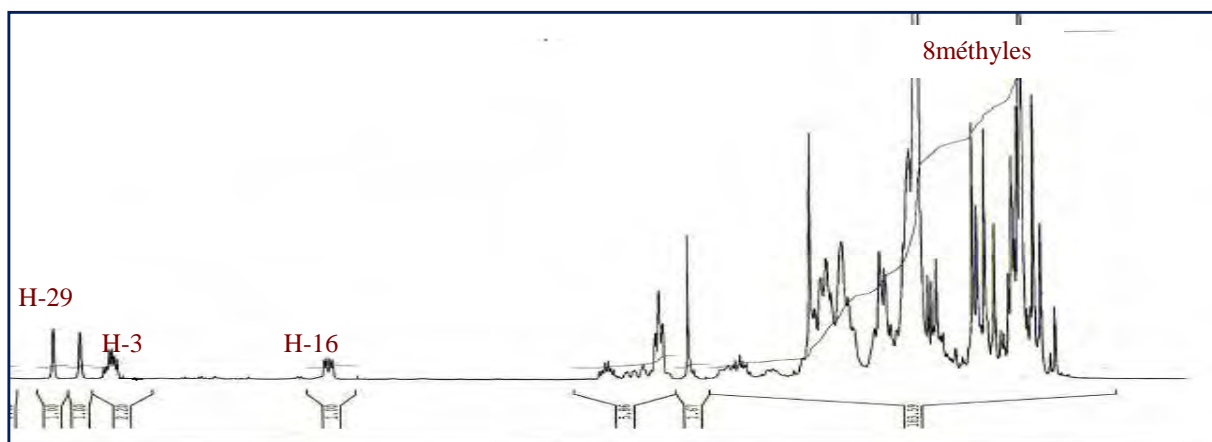
### IV.4.3. 3. Détermination structurale du composé 23.

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 658 [M+Li]^+$ , correspondant à une formule brute en  $C_{44}H_{75}O_3$ .

Le spectre de RMN  $^{13}C$  indique la présence de 44 carbones dont 30 sont attribués à la génine et 14 à un acide gras saturé à longue chaîne et résonant à  $\delta_C$  14,1 (C-14'), 22,7 (C-13'), 25,1(C-3'), 29,2-29,6 (C-4' à C-11'), 31,9 (C-12'), 34,8 (C-2') et 173,7 (C-1').

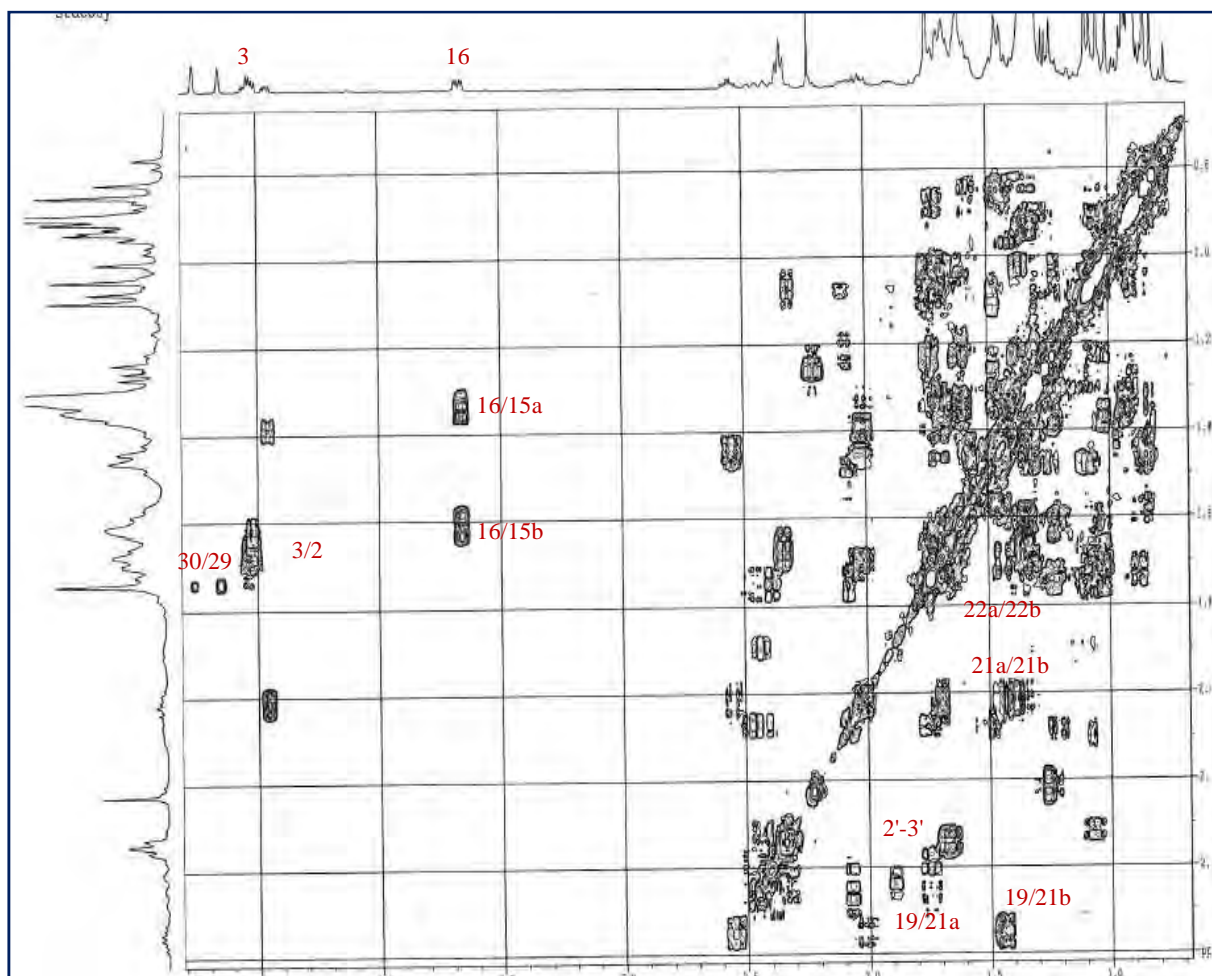
Le spectre de RMN  $^1H$  (figure 130) du produit **23** montre :

- sept signaux entre 0,82 et 1,71 ppm correspondant aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique de type lupane.
- deux signaux sous forme de doublets à 4,62 ppm et 4,73 ppm correspondant à des protons vinyliques caractéristiques d'un groupement isoprène [109]. En effet, les deux protons du  $CH_2$  oléfinique couplent entre eux formant chacun un doublet ( $J = 2,1$  Hz).
- deux signaux déblindés correspondant à des CH oxygénés dont l'un résonne à 3,63, ( $dd, J = 11,1- 4,7$ ) ppm et l'autre à 4,50 ( $dd, J = 10,9- 5,3$ Hz).



**Figure 130** : spectre de RMN  $^1H$  du composé **23**

L'expérience HMBC montre des corrélations  $^2J_{H-C}$ ,  $^3J_{H-C}$  entre le proton résonant à 3,63 ppm et les carbones C-15, C-18, C-22 et C-28 ce qui laisse logiquement déduire que l'un des groupements OH est fixé au carbone C-16. L'analyse COSY H-H (figure 131) montre une tache de corrélation entre les deux protons H-15 résonant à 1,32 et 1,58 ppm et le proton H-16. De la même façon, le proton résonant à 4,50 ppm ( $dd, J = 10,9- 5,3$ Hz) est attribué au proton H-3 ce qui place le second hydroxyle en position 3.

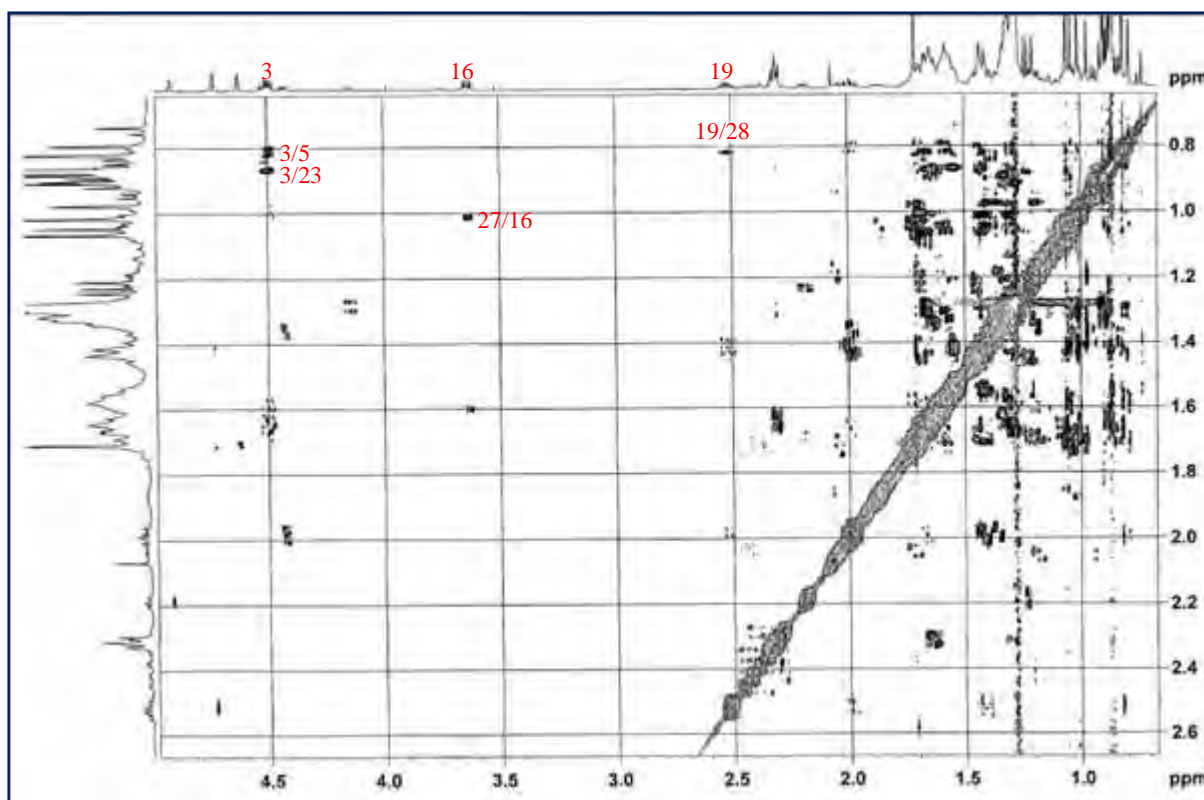


**Figure 131:** Spectre COSY du composé **23**.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  présente également des signaux attribuables à la chaîne de l'acide gras saturé et résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,28 (*sl*, H-4' to H-11'), 1,31 (*m*, H-12'), 1,34 (*m*, H-13'), 2,32 (*t*,  $J = 7,9$  Hz, H-2') et un méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  0,93 (*t*,  $J = 7,0$  Hz, H-14') caractéristiques du groupement myristoyl (tableau 28).

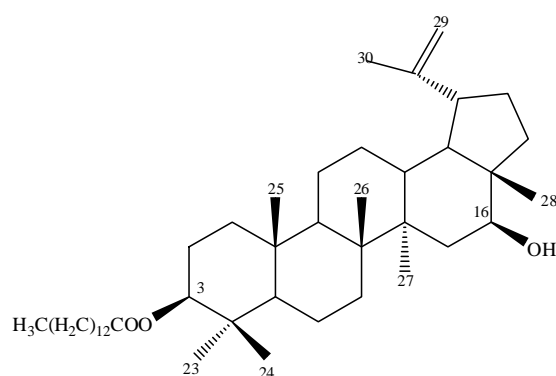
Les corrélations  $^3J_{\text{H-C}}$  visualisées sur le spectre HMBC entre les protons H-3 résonant à 4,50 ppm et H-2' ( $J = 7,9$  Hz) avec le carbonyle résonant à 173,7 ppm attribuable au carbone C-1 attestent de la présence du groupement myristoyl lié au carbone C-3 de la génine.

La stéréochimie relative de ce composé a été établie par analyse du spectre ROESY (figure 132). En effet, il présente les corrélations H-3 $\alpha$ /H-5 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ /Me-23, Me-27 $\alpha$ /H-16 $\alpha$  et Me-28 $\beta$ /H-19 $\beta$ .



**Figure 132:** Spectre ROESY du composé **23**.

L'ensemble des données spectrales de RMN permet d'assigner la structure suivante pour le composé **23** : Calenduladiol-3-*O*-myristate connue pour être présent dans la famille des Asteraceae [10, 54].



Calenduladiol-3-*O*-myristate (**23**)

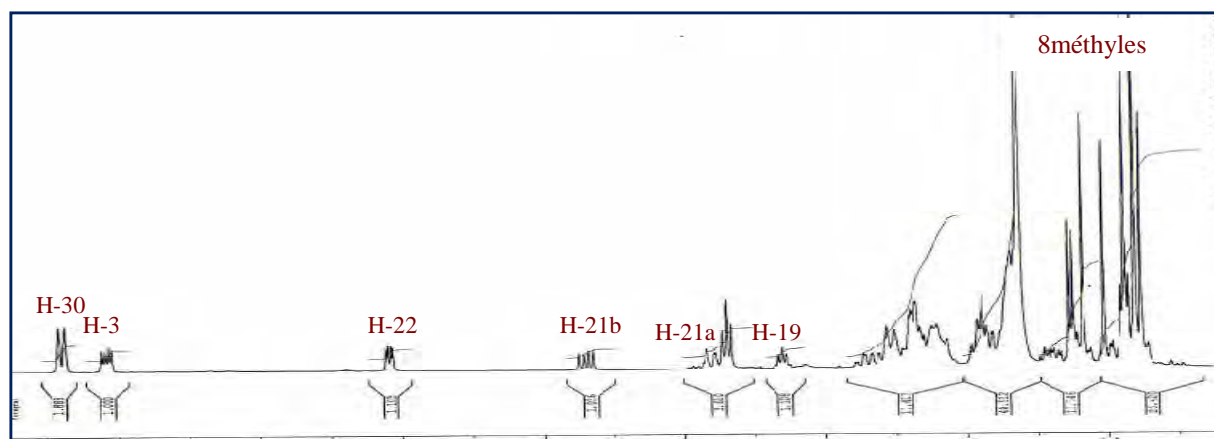
**Tableau 28:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **23** dans  $\text{CDCl}_3$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)       | N°        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)  |
|----|---------------------|-------------------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| 1  | 38,4                | 1,03, m, 1,70, m                    | 20        | 156,6               | -                              |
| 2  | 23,7                | 1,65, dd (11,8 – 3,1)               | 21        | 29,9                | 1,42, t (9,7), 1,99, t (8,9)   |
| 3  | 80,5                | 4,50, dd (10,9 - 5,3)               | 22        | 37,8                | 1,32, t (10,3), 1,66, t (10,0) |
| 4  | 37,7                |                                     | 23        | 27,9                | 0,87, s                        |
| 5  | 55,4                | 0,82, m                             | 24        | 16,6                | 0,87, s                        |
| 6  | 18,9                | 1,44, t (9,6), 1,55, dm (11,1)      | 25        | 14,1                | 0,91, s                        |
| 7  | 34,8                | 1,42, d (10,2)                      | 26        | 16,2                | 1,04, s                        |
| 8  | 40,9                | -                                   | 27        | 16,3                | 1,01, s                        |
| 9  | 49,3                | 1,33, m                             | 28        | 11,7                | 0,82, s                        |
| 10 | 35,7                | -                                   | 29        | 109,8               | 4,62, d (2,1), 4,73 (2,1)      |
| 11 | 22,6                | 0,91, m, 1,31, m                    | 30        | 19,3                | 1,71, s                        |
| 12 | 25,1                | 1,64, dd (11,8 – 3,1)               | myristate |                     |                                |
| 13 | 38,6                | 1,58, m                             | 1'        | 173,7               |                                |
| 14 | 44,1                | -                                   | 2'        | 34,8                | 2,32, t (7,9)                  |
| 15 | 36,9                | 1,32, dd (10,3- 4,4) 1,58, t (12,0) | 3'        | 25,1                | 1,64 m                         |
| 16 | 77,1                | 3,63, dd (11,1- 4,7)                | 4'-11'    | 29,2-29,7           | 1,28, sl                       |
| 17 | 37,3                | -                                   | 12'       | 31,9                | 1,31, m                        |
| 18 | 47,7                | 1,41, t (9,7)                       | 13'       | 22,7                | 1,34, m                        |
| 19 | 47,6                | 2,52, m                             | 14'       | 14,1                | 0,93, t (7,0)                  |

#### IV.4.3. 4. Détermination structurale du composé **24**.

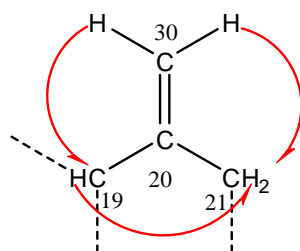
Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  658  $[\text{M} + \text{Li} - \text{H}]^+$  correspondant à la formule brute  $\text{C}_{44}\text{H}_{75}\text{O}_3\text{Li}$ .

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **24** (figure 133) est très proche de celui du composé **23**. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé **23**: les signaux de 7 méthyles singlets, un massif de protons résonant entre 0,86 et 2,84 ppm correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles, deux signaux déblindés correspondant à des CH oxygénés dont l'un résonne à 3,55, (*dd*,  $J = 8,4- 3,4$  Hz) ppm et l'autre à 4,54 (*dd*,  $J = 11,1- 5,4$  Hz). Il montre aussi les signaux caractéristiques du groupement myristoylé à 14 carbones. La différence notable entre ce composé et le composé **23** concerne la disparition des signaux du groupement isoprényle et l'apparition d'un signal sous forme d'un doublet large (*d*,  $J = 10,2$ ) attribuable aux protons éthyléniques d'un groupement méthylène exocyclique.



**Figure 133** : spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **24**

Le spectre HSQC permet de déterminer le déplacement chimique de leur carbone à  $\delta_{\text{C}}108,3$  (C-30). Les protons géminés du groupement méthylène corrèlent en HMBC (figure 134) avec C-19 et C-21.

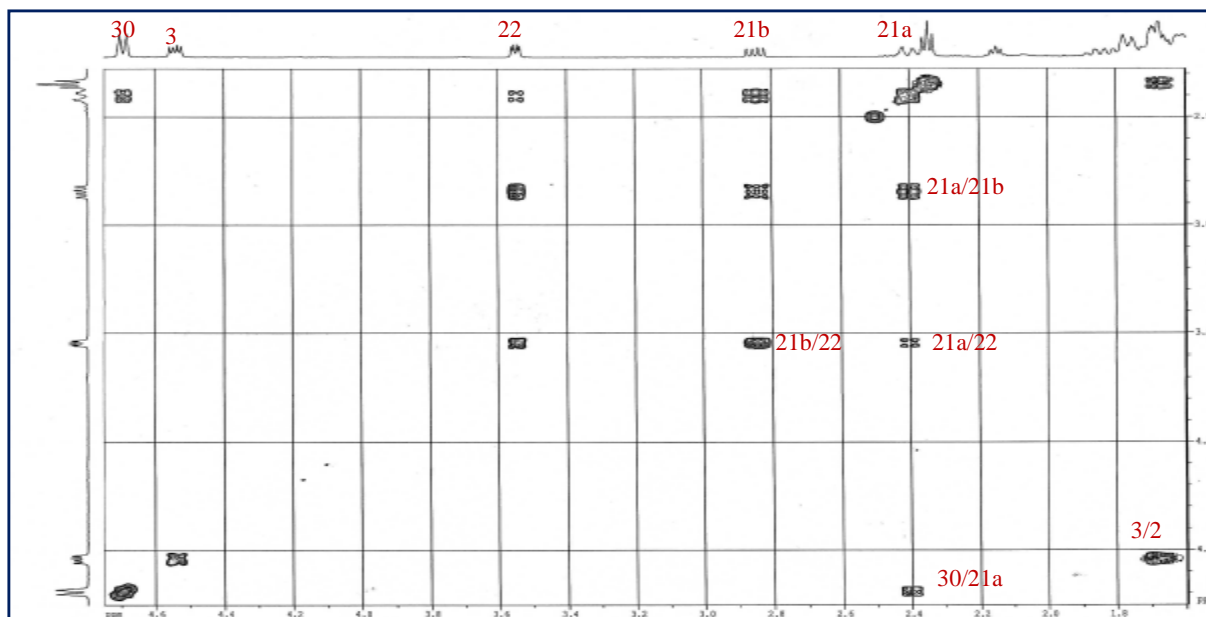


**Figure 134** : corrélation HMBC des protons éthylniques géminés.

L'expérience HSQC permet de détecter leurs protons respectifs à 2,15, (*qt*,  $J = 7,0$  Hz, H-19), 2,40, (*dq*,  $J = 16,0 - 2,6$  Hz, H-21 a) et 2,84 (*dd*,  $J = 16,0 - 8,4$  Hz, H-21b).

La multiplicité du proton H-19 sous forme de quintuplet avec  $J = 7,0$  Hz indique qu'il est couplé avec 4 protons dont 3 du groupement méthyle H-29 à  $\delta_{\text{H}} 1,13$  (*d*,  $J = 6,8$  Hz) et un du groupement méthine H-18 à  $\delta_{\text{H}} 1,46$ , (*t*,  $J = 10,0$  Hz).

Les protons H-21 corrèlent en COSY (figure 135) avec un proton résonant à  $\delta_{\text{H}} 3,55$  ppm attribué au proton H-22. L'expérience HSQC permet de repérer son carbone C-22 à  $\delta_{\text{C}} 75,8$  ppm, cette valeur illustre bien qu'il est porteur du groupement hydroxyle.



**Figure 135:** Spectre COSY du composé **24**.

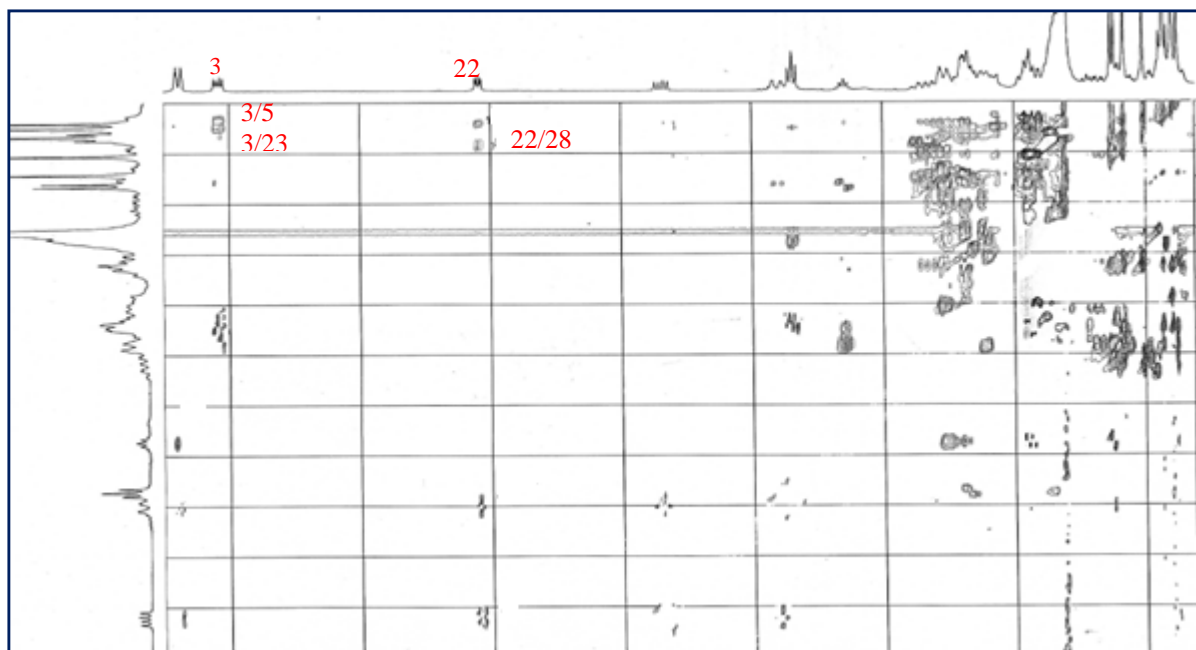
Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC qui montre des corrélations  $^3J_{H-C}$  entre le proton H-22 et les carbones C-18, C-20.

Comme précédemment, le second hydroxyle est positionné en position 3 de la génine. Les corrélations  $^3J_{H-C}$  visualisées sur le spectre HMBC entre les protons H-3 résonant à 4,54 ppm (*dd*,  $J = 11,1 - 5,4$  Hz) et H-2' résonant à 2,34 ppm (*t*,  $J = 7,2$  Hz) avec le carbonyle résonant à 173,7 ppm attribuable au carbone C-1' attestent de la présence du groupement myristoyl lié au carbone C-3 de la génine.

L'expérience ROESY (figure 136) permet de visualiser des corrélations entre:

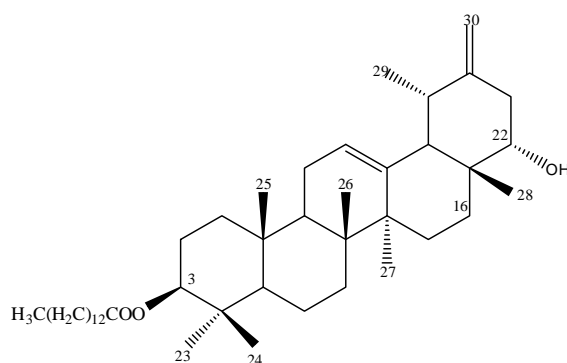
- le proton H-3 d'orientation  $\alpha$  et les protons H-5 $\alpha$  et du groupement méthyle Me-23  $\alpha$ -équatorial.
- les protons du Me-28 $\beta$ -équatorial et le proton H-22 ce qui permet de placer l'hydroxyle en position alpha.





**Figure 136:** Spectre ROESY du composé **24**

Les expériences HSQC, COSY et HMBC combinées nous permettent d'assigner sans ambiguïté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones et de proposer pour ce composé, la structure nouvelle suivante : 3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihydroxytaraxast-20(30)-ène-3-myristate.



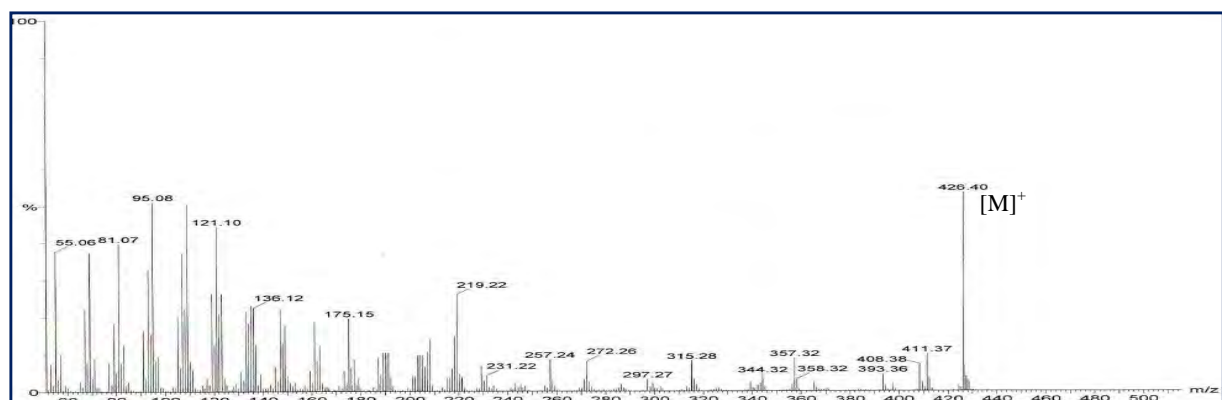
3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihydroxy-taraxast-20(30)ène-3-myristate (**24**).

**Tableau 29:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **24** dans  $\text{CDCl}_3$ .

| N° | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)          | N°        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                   |
|----|---------------------|--|-----------|---------------------|---|
| 1  | 38,4                | 1,10, m, 1,76, m                       | 20        | 152,2               | -   |
| 2a | 23,7                | 1,69, m                                | 21        | 37,4                | 2,40, dq (16,0 - 2,6),<br>2,84, dd (16,0 - 8,4) |
| 3  | 80,6                | 4,54, dd (11,1- 5,4)                   | 22        | 75,8                | 3,55, dd (8,4 - 3,4)                            |
| 4  | 37,8                | -                                      | 23        | 27,9                | 0,90, s   |
| 5  | 55,4                | 0,86, m                                | 24        | 16,5                | 0,90, s   |
| 6  | 18,1                | 1,45, m, 1,57, m                       | 25        | 16,3                | 0,93, s   |
| 7  | 34,0                | 1,46, m                                | 26        | 15,9                | 1,08, s   |
| 8  | 40,9                | -                                      | 27        | 14,8                | 1,01, s   |
| 9  | 50,3                | 1,41, dd (9,1- 2,1)                    | 28        | 18,3                | 0,88, s   |
| 10 | 37,0                | -                                      | 29        | 25,0                | 1,13, d (6,8)                                   |
| 11 | 21,4                | 1,62, m                                | 30        | 108,3               | 4,69, d (10,2)                                  |
| 12 | 26,2                | 1,19, dd (12,7- 4,6), 1,76, dm (13)    | myristate |                     |   |
| 13 | 39,1                | 1,69, m                                | 1'        | 173,7               |   |
| 14 | 41,9                | -                                      | 2'        | 34,8                | 2,34, t (7,2)                                   |
| 15 | 26,2                | 1,13, m, 1,79, td (12,5 - 3,1)         | 3'        | 25,1                | 1,67 m  |
| 16 | 30,8                | 0,98, dm (13,4), 1,87, td (13,4 - 3,2) | 4'-11'    | 29,2-29,6           | 1,31, sl  |
| 17 | 39,3                | -                                      | 12'       | 31,9                | 1,31, m   |
| 18 | 41,4                | 1,46, t (10,0)                         | 13'       | 31,9                | 1,34, m   |
| 19 | 39,0                | 2,15, qt (7,0)                         | 14'       | 14,1                | 0,93, t (7,0)                                   |

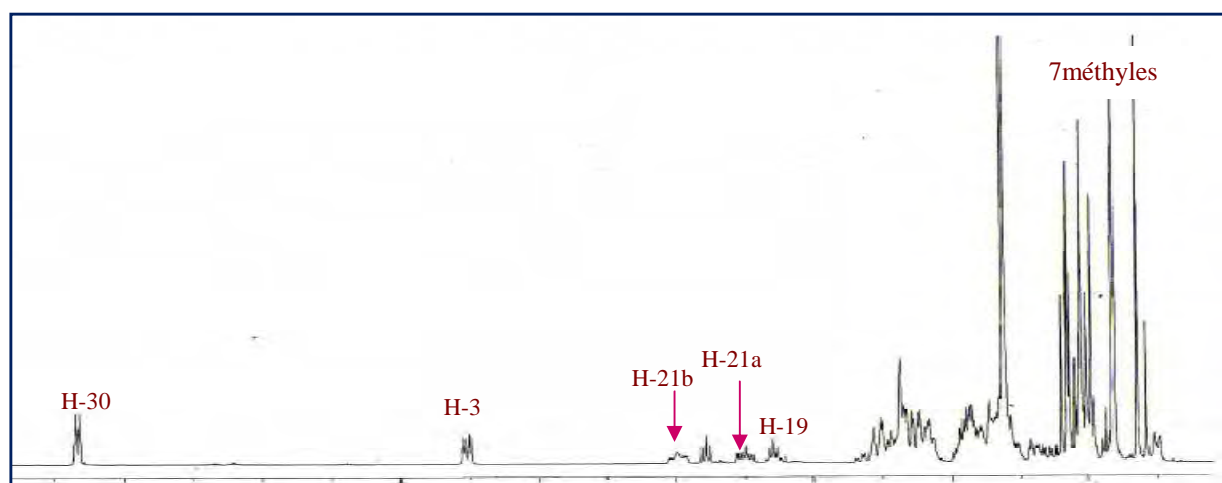
#### IV.4.3. 5. Détermination structurale du composé **25**.

Le composé **25** présente une formule moléculaire en  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ , formule déterminée grâce au spectre de masse EI-MS (figure 137) qui présente un pic d'ion moléculaire à  $m/z$  426,4  $[\text{M}]^+$ , correspondant à une masse moléculaire égale à 426 *uma*, soit une perte de 224 *uma* par rapport au composé **24**. La différence de masse montre que la structure du composé **25** est celle du composé **24**, amputé d'un groupement hydroxyle et de la chaîne grasse.



**Figure 137:** Spectre de masse EI-MS du composé **25**.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 138) du composé **25** présente de fortes similitudes avec celui du composé **24**. On identifie ainsi les signaux de sept méthyles, le signal du groupement hydroxyméthine en position 3 et le signal du groupement méthylène exocyclique. La différence réside en la disparition:

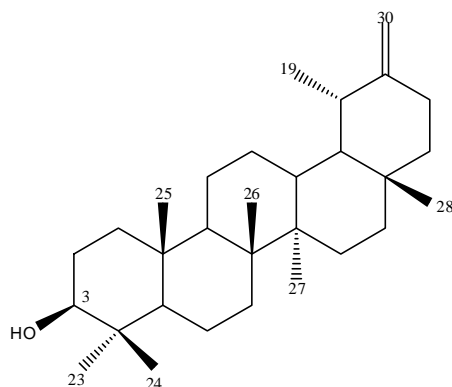


**Figure 138 :** spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **25**

- des signaux du groupement myristoyl lié au carbone C-3.
- le signal du groupement hydroxyle lié au carbone C-22.

Les déplacements chimiques des protons et carbones (tableau 30) du composé **25**, assignés conjointement par l'analyse des expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, permettent d'identifier ce dernier au taraxastérol ou  $3\beta,18\alpha,19\alpha$ -urs-20(30)-en-3-ol, un triterpène pentacyclique très présent dans la famille des Asteraceae, isolé pour la première fois de

*Taraxacum officinalis* (Asteraceae) [138] et il possède plusieurs activités : antibactérienne, antitumorale [139-141] et anti-inflammatoire [142].



3β,18α,19α-urs-20(30)-en-3-ol (**25**)

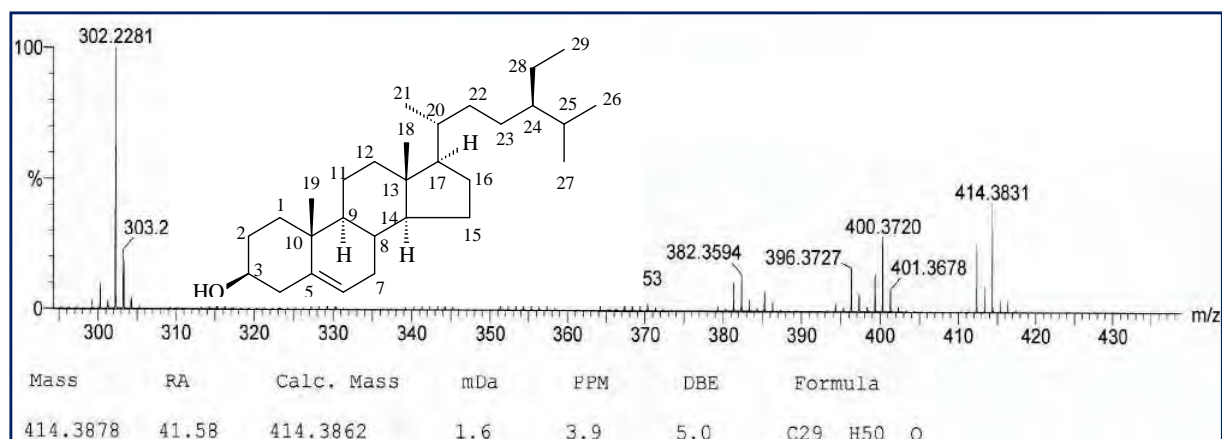
**Tableau 30:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **25** dans CDCl<sub>3</sub>.

| N° | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)                     | N° | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (m, J Hz)              |
|----|----------------|--|----|----------------|---------------------------------------|
| 1  | 38,7           | 1,01, m, 1,77, m                             | 16 | 38,3           | 1,20, dd (9,1– 3,0), 1,28, m          |
| 2  | 27,4           | 1,63, dd (11,6 – 3,6), 1,69, m               | 17 | 33,7           | -                                     |
| 3  | 79,0           | 3,26, dd (11,4 – 4,9)                        | 18 | 48,6           | 1,02, m                               |
| 4  | 38,8           | -  | 19 | 39,4           | 2,15, t (6,9)                         |
| 5  | 55,3           | 0,73, dm (10,7)                              | 20 | 154,6          | -                                     |
| 6  | 18,3           | 1,44, m, 1,59, td (11,1- 2,0)                | 21 | 25, 6          | 2,25, dq (15,4 – 5,3), 2,50, tq (7,6) |
| 7  | 34,0           | 1,44, m                                      | 22 | 38,8           | 1,44, m                               |
| 8  | 40,9           | -  | 23 | 27,0           | 1,02, s                               |
| 9  | 50,5           | 1,38, m                                      | 24 | 15,4           | 0,82, s                               |
| 10 | 37,1           | -  | 25 | 16,3           | 0, 91, s                              |
| 11 | 21,4           | 1,33, m, 1,61, dd (13,3 – 3,3)               | 26 | 15,9           | 1,07, s                               |
| 12 | 26,2           | 1,15, dd (12,7 – 4,3), 1,72, dd (12,6 – 4,2) | 27 | 14,7           | 0,98, s                               |
| 13 | 39,1           | 1,64, ddd (12,7 – 3,4 – 2,6)                 | 28 | 19,5           | 0,91, s                               |
| 14 | 42,0           | -  | 29 | 25,5           | 1,06, s                               |
| 15 | 26,6           | 1,01, m, 1,73, dd (12,6 – 4,2)               | 30 | 107,1          | 4,67, d (10,2)                        |

#### IV.4.3. 6. Détermination structurale des composés **26** et **27**

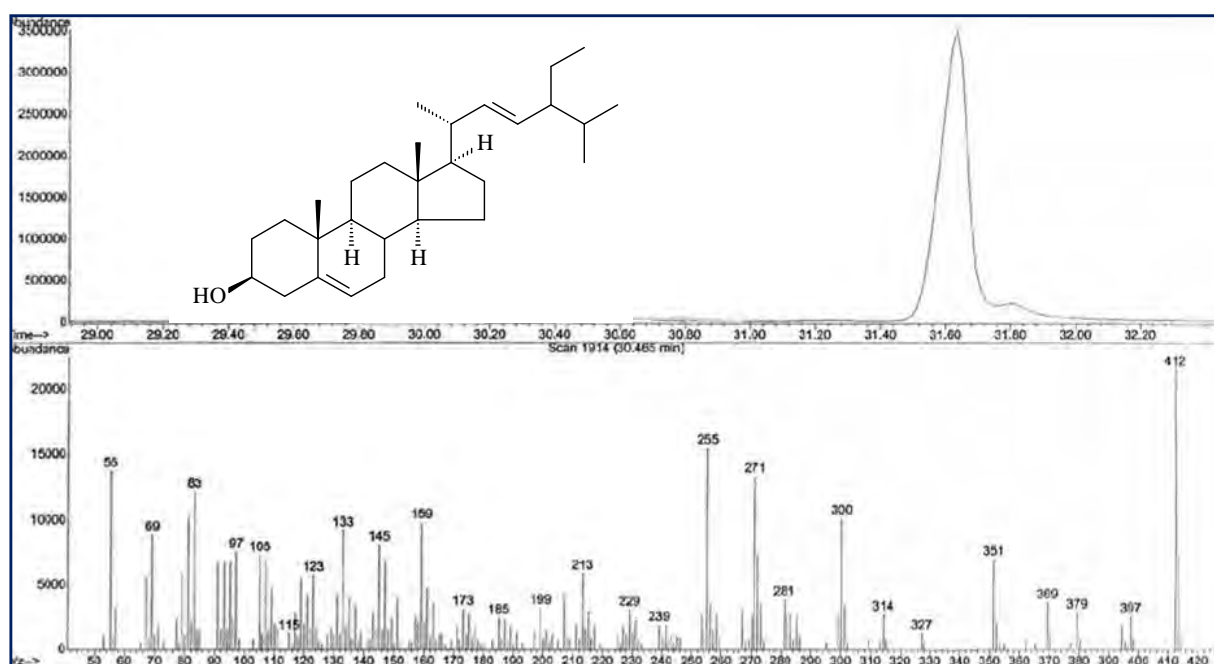
Les composés **26** et **27** ont été identifiés par GC/MS comme étant le β-sitostérol et le stigmastérol.

Le spectre de masse haute résolution obtenu par impact électronique HR-ESI-MS (figure 139) du composé **26** montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  414,3831 [M]<sup>+</sup> (calculé 414,3862) qui correspond à la formule brute C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O.



**Figure 139** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **26**.

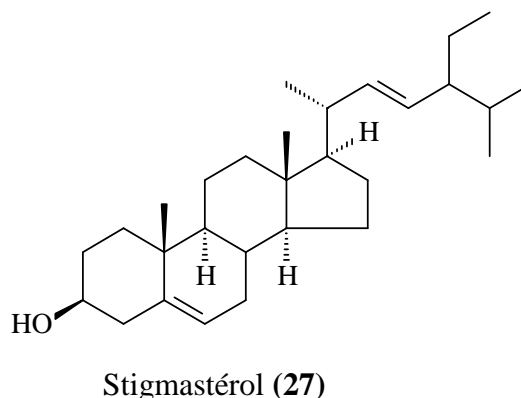
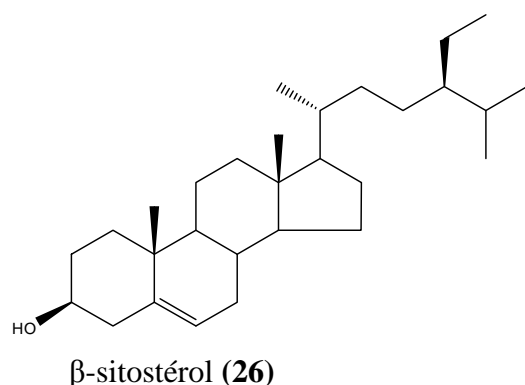
Le spectre GC/MS (figure 140) du composé **27** montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  412  $[M]^+$ . Indiquant une formule moléculaire C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O



**Figure 140** : Spectre GC/MS du composé **27**

Les données de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C *J*-modulé et la comparaison avec les données de la littérature, en apportent la confirmation [143]. Ces deux produits (**26**, **27**) communs à toutes les plantes, ont été isolés de plusieurs espèces du genre *Chrysanthemum* [109].

Le  $\beta$ -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés antibactérienne, antitumorale [140-142], antipyrétique, immunomodulatrice et anti-inflammatoire [144]. ,



#### IV.4.3.7. conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur la fraction chloroformique de l'espèce *Chrysanthemum macrocarpum* a abouti à l'isolement et la caractérisation de :

- ✓ 5 triterpènes dont trois de structures nouvelles (**21**, **22** et **24**) avec des acides gras saturés à longues chaînes attachés en position 3 et/ ou 21 de la génine.
- ✓ 2 stérols (**26-27**).

L'isolement de ces composés a été effectué à l'aide de méthodes chromatographiques. L'élucidation des structures a été surtout réalisée grâce à des moyens spectroscopiques (RMN et SM) et par comparaison avec les données de la littérature.

Sur le plan chimiotaxonomique, la constitution chimique est tout à fait en accord avec les plantes du genre *Chrysanthemum* et de la famille des Asteraceae.

#### IV.4.4. Détermination structurale des composés obtenus à partir de la fraction acétate d'éthyle

##### IV.4.4. 1. Détermination structurale du composé 28

Le spectre UV du composé **28** dans le MeOH présente deux bandes d'absorbance maximales : la bande I à 334 nm et la bande II à 269 nm (figure 141) en plus de la coloration violette sous la lampe UV, prévoyant une flavone [127].

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de  $\Delta\lambda = 57$  nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une bande supplémentaire dans le même spectre à environ 310 nm indique la présence d'un OH libre en position 7.

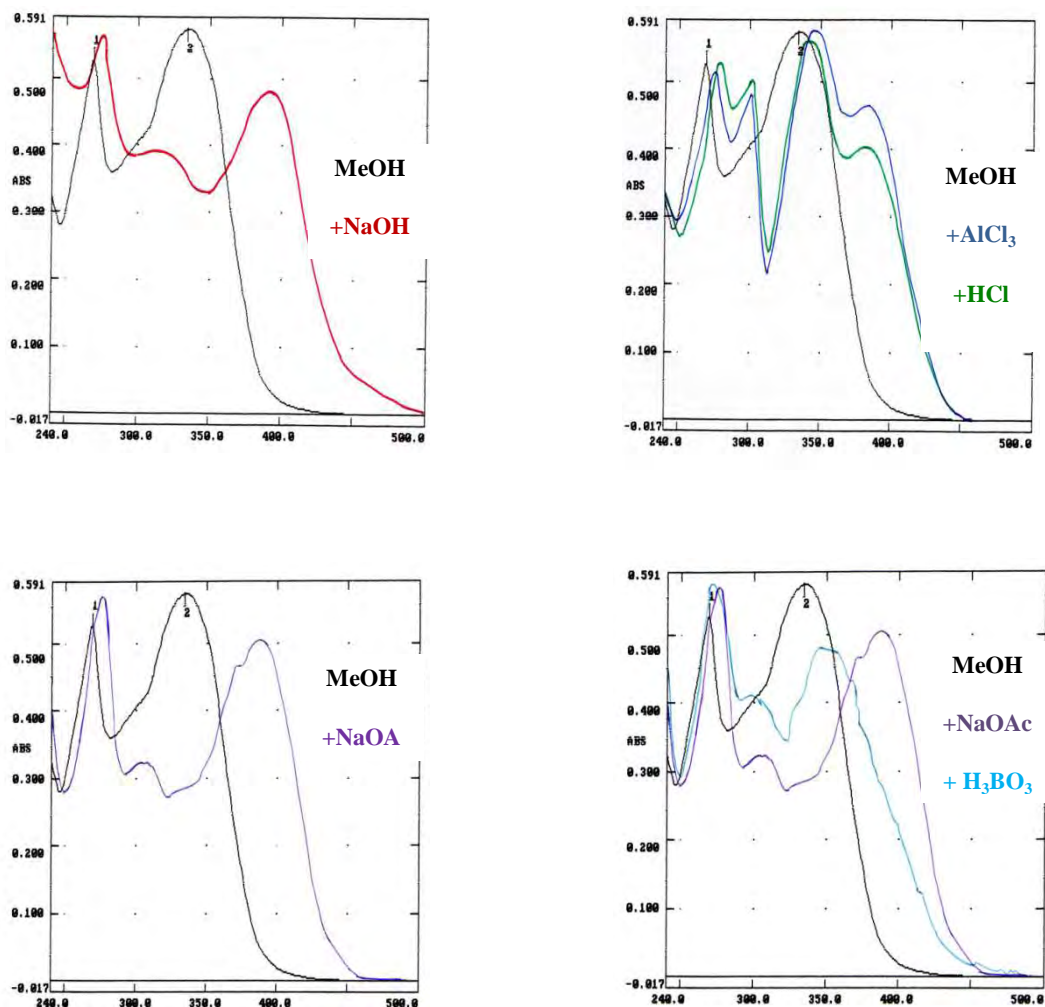
L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II de  $\Delta\lambda = 6$  nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7. Le déplacement bathochrome de la bande I de 48 nm, observé après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en 5.

L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système (MeOH +  $\text{AlCl}_3$ ) suggère l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I, après addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  au système (MeOH + NaOAc). Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour l'apigénine [127].

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 31.

**Tableau 31:** données spectrales UV du composé **28**

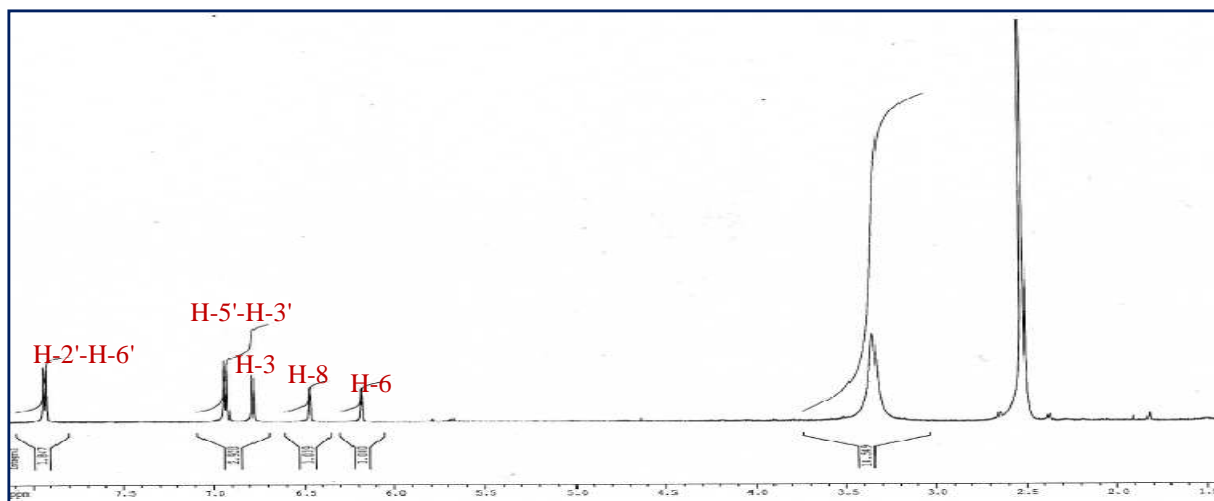
| Solvants-réactifs               | $\lambda_{\text{max}}$ |                       |               |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------|
|                                 | Bande I (nm) cycle B   | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                            | 334                    | 269                   |               |
| NaOH                            | 391                    | 275                   | 310           |
| $\text{AlCl}_3$                 | 382                    | 276                   |               |
| $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$    | 382                    | 278                   |               |
| NaOAc                           | 384                    | 275                   |               |
| NaOAc + $\text{H}_3\text{BO}_3$ | 347                    | 271                   |               |



**Figure 141** : Série spectrale UV du composé **28**

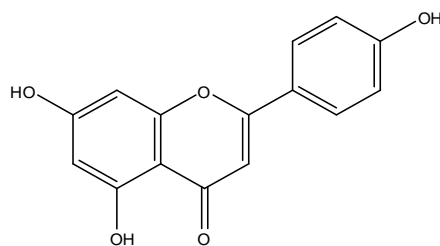
Le spectre de RMN du proton (figure 142) enregistré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  confirme le squelette flavonique monosubstitué en 4'. En effet, il montre la présence de deux signaux, respectivement à 6,18 et 6,47 ppm, caractéristiques de deux protons H-6 et H-8, un singulet à 6,78 ppm, attribué à H-3 et deux doublets pour 4 protons, respectivement à 6,94 ( $J = 8,7$  Hz) et 7,92 ppm ( $J = 8,7$  Hz), caractéristiques des protons H-3', H5' et H-2', H 6' (figure 142), ce qui confirme que le produit **28** est l'apigénine [145].





**Figure 142** : spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **28**

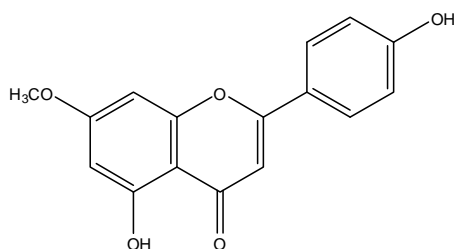
Les déplacements chimiques des carbones obtenus après analyse du spectre HMBC (tableau 33) confirment cette structure.



Apigénine (**28**)

#### IV.4.4. 2. Détermination structurale du composé **29**

Il s'agit du 7-méthoxyapigénine (Genkwanin) identifié par l'analyse combinée des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 33), HSQC, COSY et HMBC et par comparaison avec les données spectroscopiques trouvées dans la littérature [146].



7-méthoxyapigénine (**29**)

#### IV.4.4. 3. Détermination structurale du composé 30

Le spectre UV du composé **30** montre dans le méthanol deux maxima d'absorption : la bande I à 334 nm correspondant au cycle B et la bande II à 269 nm correspondant au cycle A (tableau 32).

L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ( $\Delta\lambda = + 55$  nm) indiquant la présence d'un groupement OH libre en 4' (figure 143). L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique la présence d'un OH substitué en 7. L'ajout de la base faible n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II, ce qui signifie que c'est le groupe hydroxyle en position 7 qui est glycosylé. L'effet bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = 58$  nm) observé après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  à la solution méthanolique indique la présence d'un groupement OH libre en 5. L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système (MeOH +  $\text{AlCl}_3$ ) suggère l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I, après addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  au système (MeOH + NaOAc).

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 32.

Tableau 32 : données spectrales UV du composé **30**.

| Solvants-réactifs               | $\lambda_{\text{max}}$ |                       |               |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------|
|                                 | Bande I (nm) cycle B   | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                            | 334                    | 269                   |               |
| NaOH                            | 389                    | 270                   | -             |
| $\text{AlCl}_3$                 | 390                    | 274                   |               |
| $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$    | 392                    | 274                   |               |
| NaOAc                           | 387                    | 268                   |               |
| NaOAc + $\text{H}_3\text{BO}_3$ | 338                    | 269                   |               |

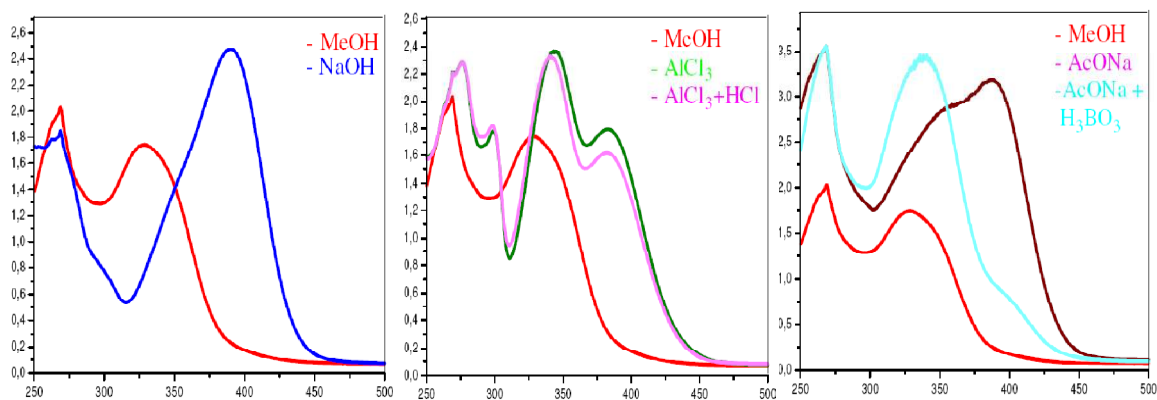


Figure 143: Série spectrale UV du composé **30**

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-ESI-MS (figure 144) montre un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  455,0956  $[M+Na]^+$  (calculé 455,0954) qui correspond à la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{10}$ .

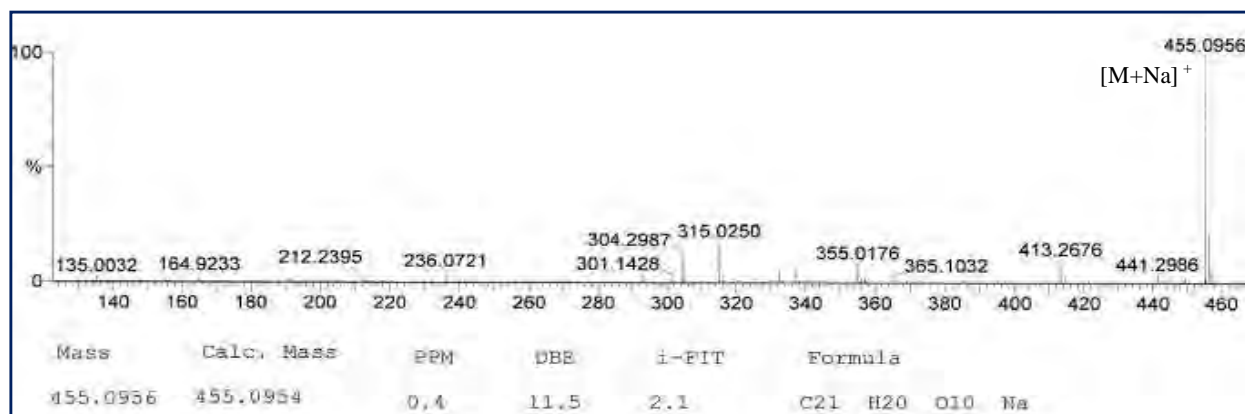


Figure 144 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **30**.

Le spectre de RMN  $^1H$  (figure 145) du composé **30** montre les cinq signaux des sept protons caractéristiques de l'apigénine (tableau 33) :

- deux doublets (couplage ortho :  $J= 8,8$  Hz), intégrant chacun pour deux protons à 6,95 (H-3' et H-5') et 7,97 ppm (H-2' et H-6').
- deux doublets (couplage méta :  $J=1,9$  Hz), intégrant chacun pour un proton à 6,45 (H-6) et 6,41 (H-8) ppm.
- un singulet à 6,98 ppm, attribué à H-3.

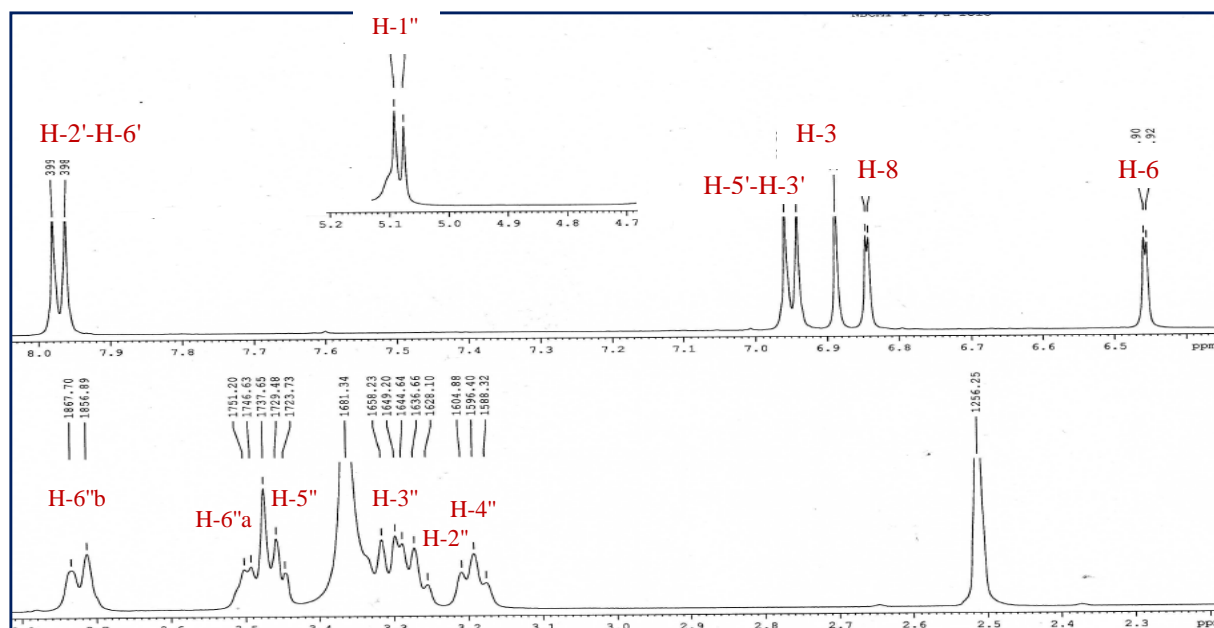


Figure 145 : spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **30**

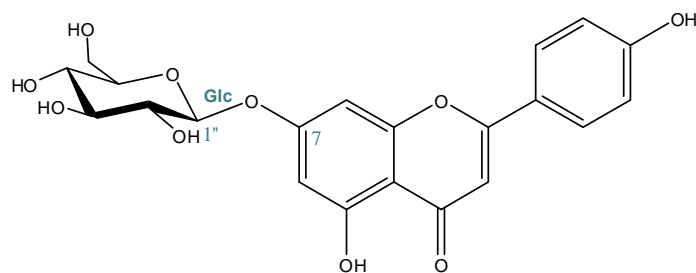
L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC du composé **30** et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  tous les carbones correspondant à l'apigénine [145].

En plus des signaux caractéristiques de l'apigénine le spectre de RMN  $^1\text{H}$  montre la présence des signaux caractéristiques d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à 5,08 ppm ( $d, J = 7,4$  Hz).

L'expérience COSY permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose. Les constantes de couplage vicinales, mesurées à partir du spectre de RMN  $^1\text{H}$  sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont tous trans-diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un  $\beta$ -D-glucopyranose.

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique et le carbone C-7 confirme bien la substitution du carbone C-7 par le glucose.

Les expériences HSQC  $J$ -modulé, COSY H-H et HMBC combinées, permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (tableau 33) et d'attribuer à ce composé **30**, la structure de 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine [145].



7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylapigénine (30).

#### IV.4.4. 4. Détermination structurale du composé 31

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 146) montre trois signaux correspondants aux protons aromatiques :

- deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6,97 ( $J = 8,6$  Hz) et 8,02 ( $J = 8,5$  Hz) typiques de quatre protons équivalents (H-3' et H-5') et (H-2' et H-6') du cycle B substitué par un OH en position 4',
- un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6,66 ppm attribuable à H-3, indiquant la structure d'une flavone. Les valeurs de déplacements chimiques sont en accord avec la structure d'une apigénine dont le cycle A est substitué en positions 5 et 7 par un hydroxyle et en position 6 et 8 par des sucres [136].

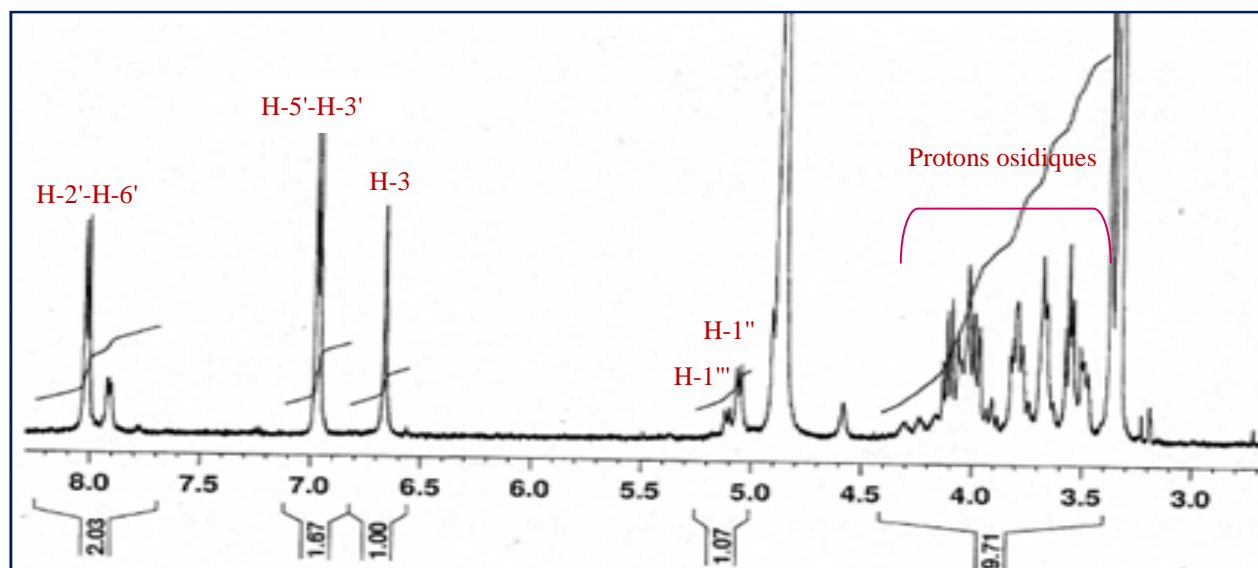


Figure 146 : spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé 31.

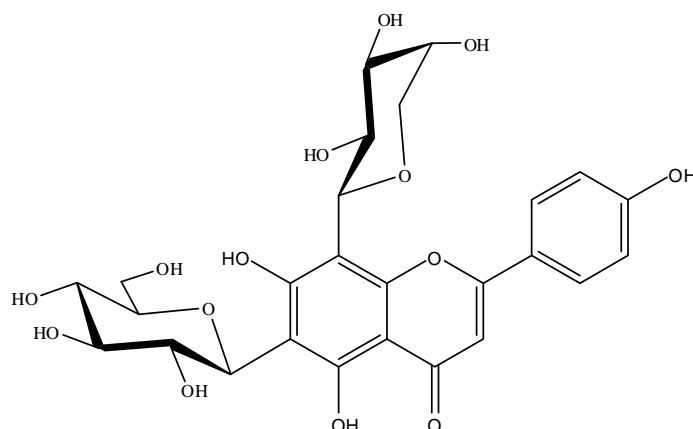
Sur le spectre de RMN<sup>1</sup>H, deux protons anomériques sont repérés à 5,05 ppm (*d*, *J* = 9,8 Hz), 4,90 ppm (*d*, *J* = 9,6 Hz) Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC (figure), résonnent à 73,7 et 75,2 ppm confirmant une liaison C-glycosidique pour les deux unités osidiques.

L'analyse des spectres COSY et HSQC permet d'identifier à partir de l'anomère à 5,05 ppm (H-1'') un β-D-glucopyranose.

- La seconde unité osidique dont l'anomère résonne à 4,90 ppm est identifiée comme étant un pentose qui possède un système ABX formé par les protons H-4 (*sl*, 4,02 ppm) et les deux protons géminés H-5 a 3,78 (*dd*, *J*=12,1-1,2 Hz) et H-5b 4,07(*d*, *J*=12,1Hz). La constante de couplage *J*<sub>1,2</sub> de 9,6 Hz indique un proton anomère axial et celle *J*<sub>4,5 ax</sub> égale à 1,2 Hz indique un H-4 équatorial. Les déplacements chimiques des carbones les portant attribués par l'analyse du spectre HSQC, laissent supposer qu'il s'agit d'un α-L-arabinopyranose. Cette hypothèse est confirmée par comparaison des déplacements chimiques des carbones osidiques à ceux donnés de la littérature [110, 111].

Les corrélations <sup>2</sup>*J*<sub>H-C</sub> et <sup>3</sup>*J*<sub>H-C</sub> visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-1'' et les carbones C-6, C-7 et C-5, et le proton H-1''' et les carbones C-8, C-7 et C-9, montrent que c'est le glucose qui est attaché au carbone C-6 et l'arabinose qui est attaché au carbone C-8, respectivement.

L'analyse des spectres de RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, (tableau 33) HSQC, HMBC de **31** montre que ce composé est identique point par point au 6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-arabinopyranosylapigénine, précédemment isolé à partir des parties aériennes de *Chrysanthemum morifolium* Ramat [9].



6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-arabinopyranosylapigénine (**31**)

**Tableau 33** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **28**, **29**, **30** et **31** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

| Composé <b>28</b> |                     |                               | Composé <b>29</b>   |                               | Composé <b>30</b>   |                                      | Composé <b>31</b>   |  |
|-------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------|--|
| N°                | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)            |
| 2                 | 164,0               | -                             | 164,1               | -                             | 164,6               | -                                    | 165,4               | -  |
| 3                 | 103,2               | 6,78, s                       | 103,9               | 6,58, s                       | 103,5               | 6,98,s                               | 102,4               | 6,66, s                                  |
| 4                 | 182,1               | -                             | 182,5               | -                             | 182,4               | -                                    | 182,9               | -  |
| 5                 | 161,8               | -                             | 161,2               | -                             | 161,5               | -                                    | 159,2               | -  |
| 6                 | 99,3                | 6,18, s                       | 99,3                | 6,42, d (1,8)                 | 99,9                | 6,45 d (1,9)                         | 107,6               |  |
| 7                 | 163,5               | -                             | 163,5               | -                             | 163,3               | -                                    | 161,5               | -  |
| 8                 | 94,4                | 6,47, s                       | 94,0                | 6,18, d (1,8)                 | 95,2                | 6,41 d (1,9)                         | 104,1               |  |
| 9                 | 157,7               | -                             | 157,2               | -                             | 157,3               | -                                    | 156,2               | -  |
| 10                | 103,9               | -                             | 104,9               | -                             | 105,7               | -                                    | 103,8               | -  |
| 1'                | 121,5               | -                             | 122,1               | -                             | 121,4               | -                                    | 122,0               | -  |
| 2'                | 128,9               | 7,92, d (8,7)                 | 128,6               | 7,86, d (8,8)                 | 129,0               | 7,97d (8,8)                          | 128,8               | 8,02, d (8,5)                            |
| 3'                | 116,3               | 6,94, d (8,7)                 | 115,1               | 6,95, d (8,9)                 | 116,4               | 6,95d (8,8)                          | 115,6               | 6,97, d (8,6)                            |
| 4'                | 161,6               | -                             | 161,7               | -                             | 161,7               | -                                    | 161,5               | -  |
| 5'                | 116,3               | 6,94, d (8,7)                 | 115,1               | 6,95, d (8,9)                 | 116,4               | 6,95 d (8,4)                         | 115,6               | 6,97, d (8,6)                            |
| 6'                | 128,9               | 7,92, d (8,7)                 | 128,6               | 7,86, d (8,8)                 | 129,0               | 7,97 d (8,8)                         | 128,8               | 8,02, d (8,5)                            |
| OMe               |                     |                               | 55,0                | 3,32, s                       | Glc en (7)          |                                      | Glc en (6)          |  |
| 1''               |                     |                               |                     |                               | 100,2               | 5,08 d (7,4)                         | 73,7                | 5,05, d (9,8)                            |
| 2''               |                     |                               |                     |                               | 73,5                | 3,27 t (8,7)                         | 71,7                | 4,11, t(9,4)                             |
| 3''               |                     |                               |                     |                               | 76,8                | 3,31 t (9,0)                         | 78,9                | 3,56, t (8,3)                            |
| 4''               |                     |                               |                     |                               | 69,9                | 3,19 t (8,1)                         | 71,0                | 3,68, t (8,4)                            |
| 5''               |                     |                               |                     |                               | 77,6                | 3,46 dd (9,0 - 5,7)                  | 81,6                | 3,49, m                                  |
| 6''               |                     |                               |                     |                               | 60,9                | 3,48 dd (9,0 - 4,5)<br>3,72 d (10,8) | 61,7                | 3,81, dd (12,2 - 5,7)<br>3,98, d (11,8)  |
|                   |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | Ara en (8)          |  |
| 1'''              |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | 75,2                | 4,90, d (9,6)                            |
| 2'''              |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | 69,8                | 4,00, m                                  |
| 3'''              |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | 73,9                | 3,67, dl (8,4)                           |
| 4'''              |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | 69,1                | 4,02, sl                                 |
| 5'''              |                     |                               |                     |                               |                     |                                      | 70,6                | 3,78, dd (12,1 - 1,2),<br>4,07, d (12,1) |

#### IV.4.4. 5. Détermination structurale du composé **32**

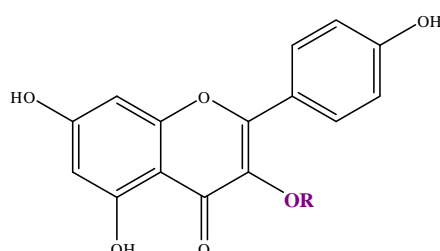
Le spectre UV enregistré dans le méthanol (figure 147) montre deux bandes d'absorption, une à 356 nm et l'autre à 265 nm, prévoyant soit un flavonol substitué en 3, soit une flavone.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 58$  nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse, indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 329 nm révèle la présence d'un

OH libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 45$  nm), enregistré après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5. Pas de déplacement hypsochrome de la bande I, en comparant les spectres  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  et  $\text{AlCl}_3$ , ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = + 12$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol, confirme la présence d'un OH libre en position 7. Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le kaempférol substitué en position 3 [134].

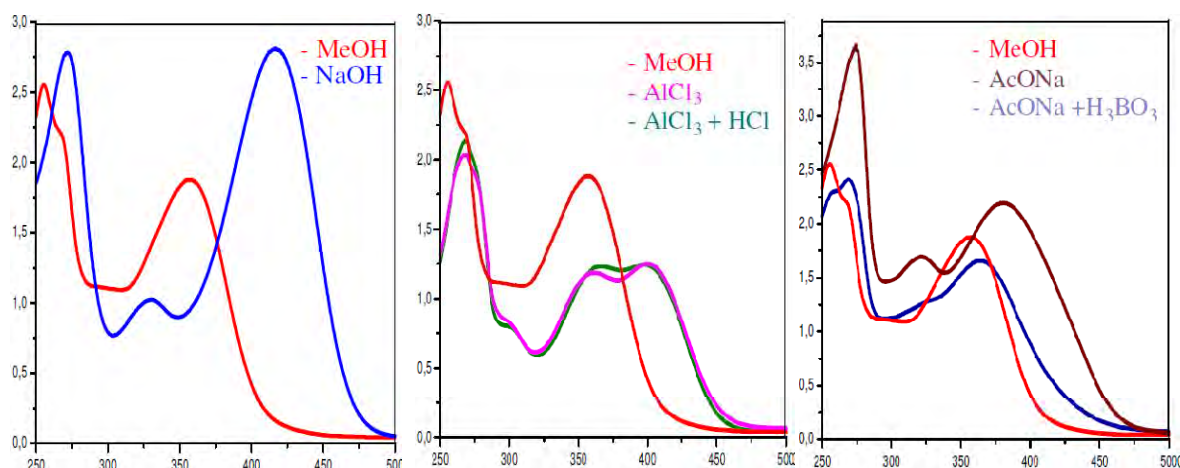


Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 34

**Tableau 34:** données spectrales UV du composé **32**

| Solvants-réactifs               | $\lambda_{\text{max}}$ |                       |               |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------|
|                                 | Bande I (nm) cycle B   | Bande II (nm) cycle A | Autres bandes |
| MeOH                            | 356                    | 265                   |               |
| NaOH                            | 414                    | 271                   | 329           |
| $\text{AlCl}_3$                 | 402                    | 273                   |               |
| $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$    | 401                    | 271                   |               |
| NaOAc                           | 380                    | 277                   |               |
| NaOAc + $\text{H}_3\text{BO}_3$ | 367                    | 269                   |               |

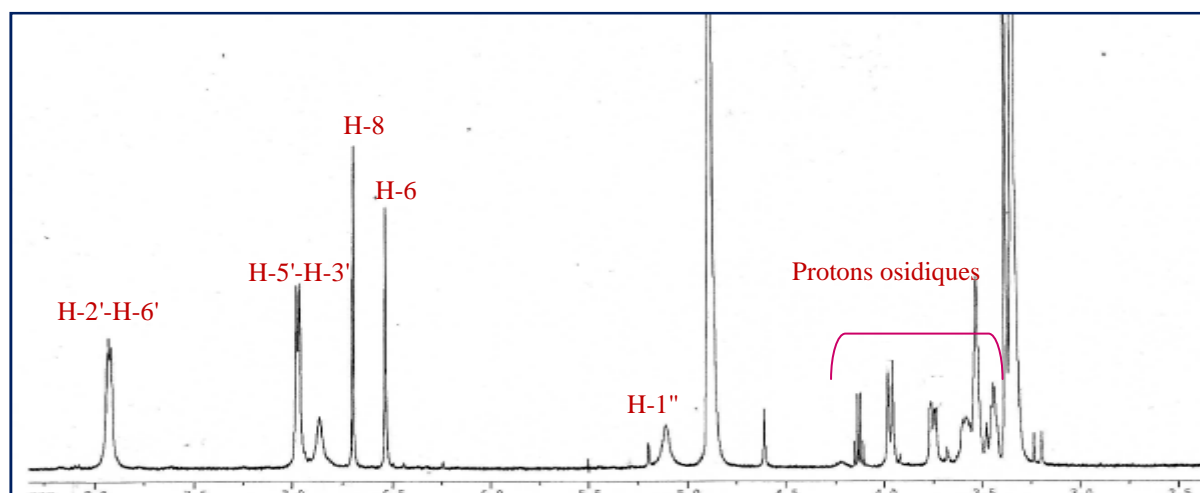




**Figure 147** : Série spectrale UV du composé **32**

Le spectre de RMN<sup>1</sup>H du composé **32** (figure 148) montre les quatre signaux des six protons aromatiques caractéristiques du kaempférol (tableau 35) :

- deux doublets (couplage ortho :  $J = 8,0$  Hz), intégrant chacun pour deux protons à 6,97 (H-3' et H-5') et 7,92 ppm (H-2' et H-6'),
- deux singlets à 6,69 et 6,53 ppm d'intégration 1H chacun, correspondant respectivement aux protons H-8 et H-6 du cycle A.



**Figure 148** : spectre de RMN<sup>1</sup>H du composé **32**

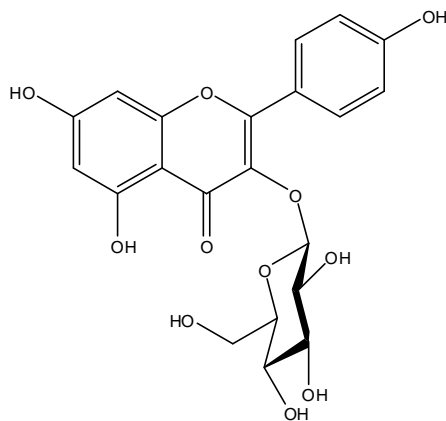
Sur le spectre de RMN<sup>1</sup>H, un proton anomérique est repéré à 5,11 ppm. Son carbone respectif, attribué à l'aide du spectre HSQC, résonne à 100,8 ppm (tableau 35).

A partir du proton anomérique, l'analyse de l'expérience COSY permet d'attribuer les sept protons d'un glucopyranose.

La corrélation  $^3J_{\text{H-C}}$  observée sur les spectres HMBC entre le proton anomérique H-1'' du glucose et le carbone C-3 du kaempférol montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3.

Il en résulte, à l'issue de cette analyse que la structure du composé **32** est la suivante :

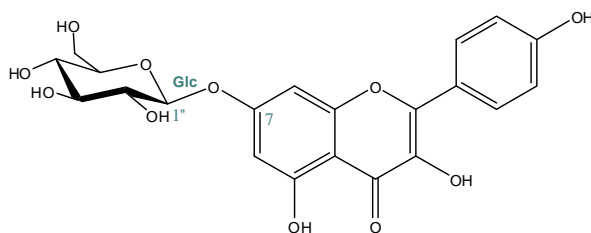
3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl kaempférol (**32**) [147].



3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl kaempférol (**32**)

#### IV.4.4. 6. Détermination structurale du composé 33

Il s'agit du 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl kaempférol identifié par l'analyse combinée des spectres de RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, HSQC, COSY, HMBC et ROESY et par comparaison avec les données spectroscopiques trouvées dans la littérature [147].



7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl kaempférol (**33**)

**Tableau 35** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **32** et **33** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

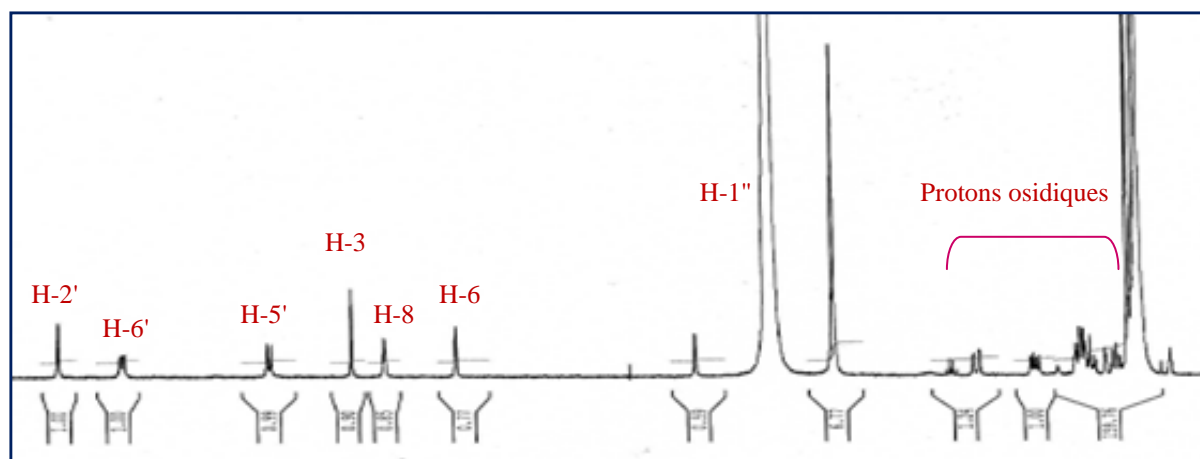
| Composé <b>32</b> |                     |  | Composé <b>33</b>   |  |
|-------------------|---------------------|--|---------------------|--|
| N°                | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)          | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
| 2                 | 159,4               | -                                      | 159,4               | -  |
| 3                 | 133,2               | -                                      | 133,2               | -  |
| 4                 | 179,4               | -                                      | 179,4               | -  |
| 5                 | 162,9               | -                                      | 162,9               | -  |
| 6                 | 100,2               | 6,53, s                                | 99,3                | 6,32, s                                    |
| 7                 | 165,9               | -                                      | 169,0               | -  |
| 8                 | 103,2               | 6,69, s                                | 102,4               | 6,68, s                                    |
| 9                 | 158,5               | -                                      | 159,4               | -  |
| 10                | 106,1               | -                                      | 106,1               | -  |
| 1'                | 123,4               | -                                      | 123,4               | -  |
| 2'                | 128,7               | 7,92, d (8,0)                          | 129,2               | 8,16, d (8,6)                              |
| 3'                | 116,1               | 6,97, d (8,0)                          | 116,0               | 6,98, d (8,6)                              |
| 4'                | 161,5               | -                                      | 161,5               | -  |
| 5'                | 116,1               | 6,97, d (8,0)                          | 116,0               | 6,98, d (8,6)                              |
| 6'                | 128,7               | 7,92, d (8,0)                          | 129,2               | 8,16, d (8,6)                              |
| Glc en (3)        |                     |  | Glc en (7)          |  |
| 1''               | 100,8               | 5,11, m                                | 104,9               | 4,76 d (7,4)                               |
| 2''               | 73,7                | 3,53, m                                | 74,4                | 3,25dd (8,9- 7,5                           |
| 3''               | 76,9                | 3,53, m                                | 76,9                | 3,50t (9,6)                                |
| 4''               | 70,3                | 3,44, t (8,4)                          | 69,8                | 3,60t (9,3)                                |
| 5''               | 77,5                | 3,58, m                                | 77,5                | 3,35 m                                     |
| 6''               | 61,5                | 3,75, dd (11,9- 3,8)<br>3,95, d (11,9) | 61,0                | 3,81 dd (11,8 - 4,1)<br>3,85d (11,8 - 2,1) |

#### IV.4.4. 7. Détermination structurale du composé **34**

L'analyse du spectre de RMN $^1\text{H}$  (figure 149) du composé **34** montre :

- la présence de substituants en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification des protons H-6 et H-8 du cycle A à  $\delta_{\text{H}}$  6,24 et 6,54 ppm (tableau 36).

-les signaux de trois protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  7,93 ppm (*d*,  $J = 1,9$  Hz), 7,65 ppm (*dd*,  $J = 8,5-1,8\text{Hz}$ ), 7,03 ppm (*d*,  $J = 8,5$  Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.



**Figure 149** : spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **34**

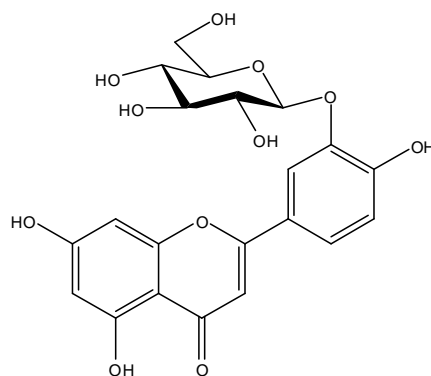
L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC du composé **34** et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN $^{13}\text{C}$  tous les carbones correspondant à la lutéoline [148].

En plus des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  permet de repérer un proton anomérique résonnant à 4,92 ppm. Ces données suggèrent la présence d'une seule unité osidique.

L'analyse combinée des spectres de RMN COSY, HSQC, HMBC et ROESY du composé **34** permet de retrouver les mêmes signaux osidiques décrits pour la partie osidique du flavonoïde **33**, il s'agit donc d'un  $\beta$ -D-glucopyranose.

La corrélation  $^3J_{\text{H-C}}$  observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' du glucose et le carbone C-3' de génine montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3' de la génine.

Cette structure s'est avérée identique à celle de la 3'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl lutéoline, isolée pour la première fois à partir des parties aériennes du *Reseda luteola* [149].



3'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl lutéoline (**34**).

**Tableau 36** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **34** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

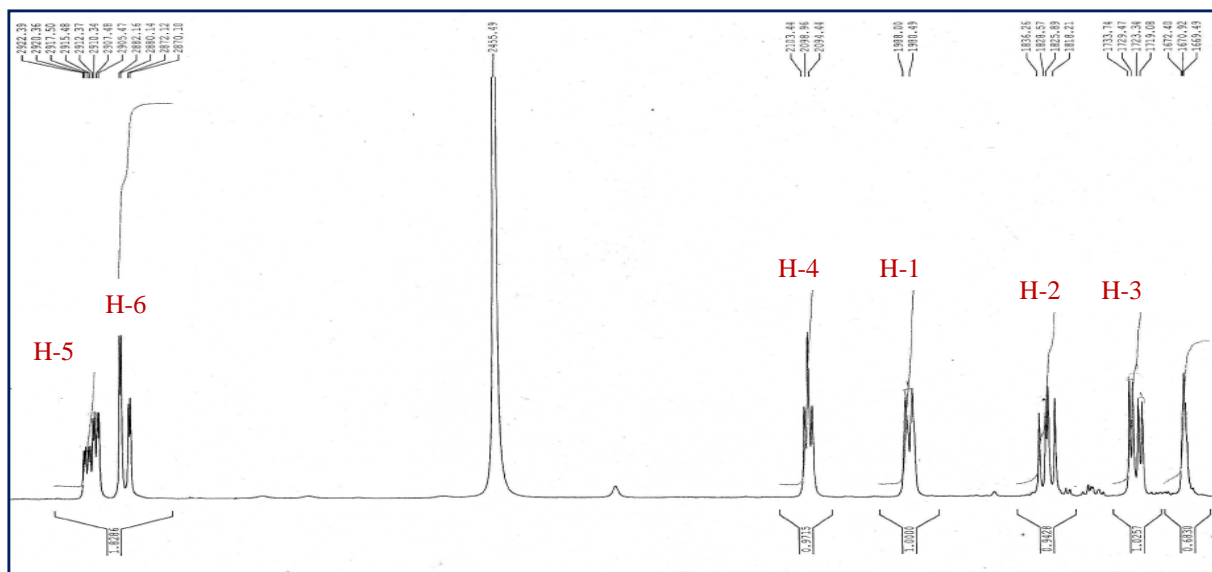
| N°      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|---------|---------------------|--|
| 2       | 164,4               | -  |
| 3       | 102,9               | 6,68, s                                    |
| 4       | 182,5               | -  |
| 5       | 161,8               | -  |
| 6       | 99,2                | 6,24, d (1,8)                              |
| 7       | 164,8               | -  |
| 8       | 94,1                | 6,54, d (1,8)                              |
| 9       | 158,0               | -  |
| 10      | 102,9               | -  |
| 1'      | 122,3               | -  |
| 2'      | 116,1               | 7,93, d (1,9)                              |
| 3'      | 146,0               | -  |
| 4'      | 151,1               | -  |
| 5'      | 116,4               | 7,03, d (8,5)                              |
| 6'      | 122,7               | 7,65, dd (8,5 - 1,9)                       |
| Glucose |                     |  |
| 1''     | 103,4               | 4,92, d (7,6)                              |
| 2''     | 73,9                | 3,58,t (7,6)                               |
| 3''     | 76,6                | 3,54,t (8,8)                               |
| 4''     | 70,6                | 3,43,t (9,1)                               |
| 5''     | 77,7                | 3,58, m                                    |
| 6''     | 61,6                | 3,78dd (12,0 - 6,6)<br>4,02 d (12,0 - 2,2) |

#### IV.4.4. 8. Détermination structurale du composé **35**

Le spectre de masse de **35**, montre un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  169  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  correspondant à une formule brute en  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{Na}$ .

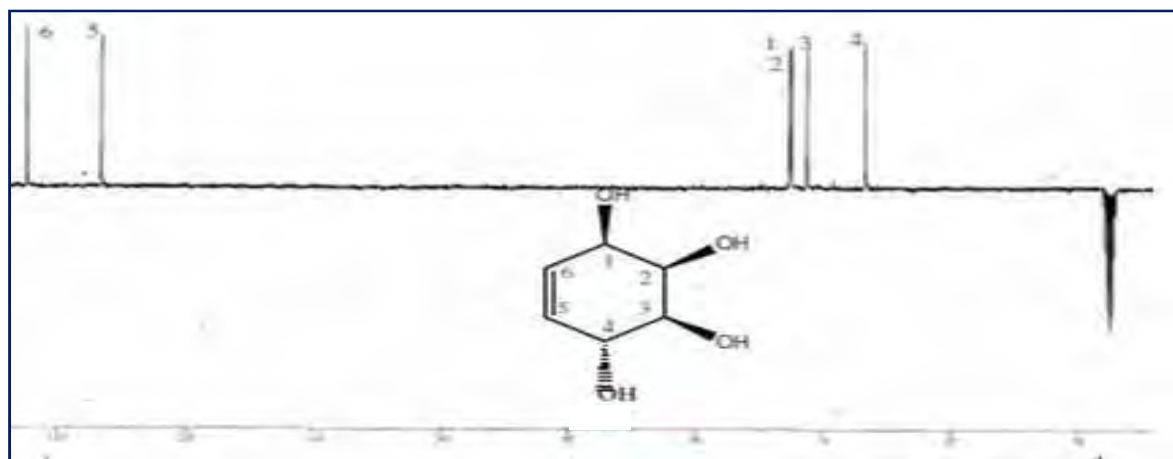
Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 150) révèle clairement la présence de :

- trois doublets de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  3,43 (dd,  $J= 10,4 - 4,5\text{Hz}$ ), 3,64 (dd,  $J= 10,4 - 7,7\text{Hz}$ ) et 5,75 (dd,  $J= 10,0 - 2,0\text{ Hz}$ ).
- un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  3,95 (d,  $J= 7,5\text{ Hz}$ ).
- un triplet  $\delta_{\text{H}}$  4,20 (t,  $J= 4,5\text{Hz}$ ).
- un doublet de doublets de doublets à 5,83 ppm (ddd,  $J= 10,0- 4,5- 2,0\text{ Hz}$ ).



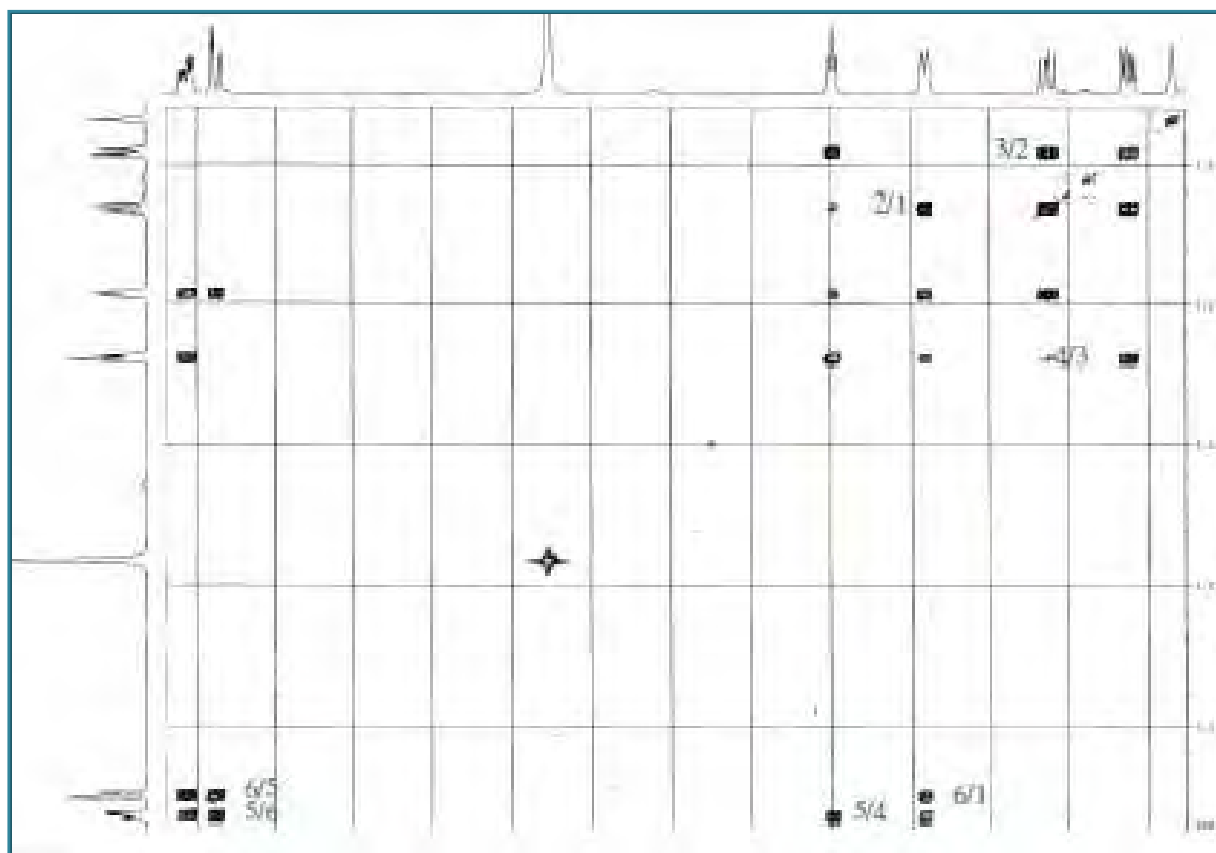
**Figure 150:** spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé **35**

Sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (figure 151) du composé **35** sont visualisés 6 signaux correspondants à 6 carbones, quatre carbones oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  66,6 71,2, 72,4 et 72,5 ppm et deux carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  126,6 et 132.



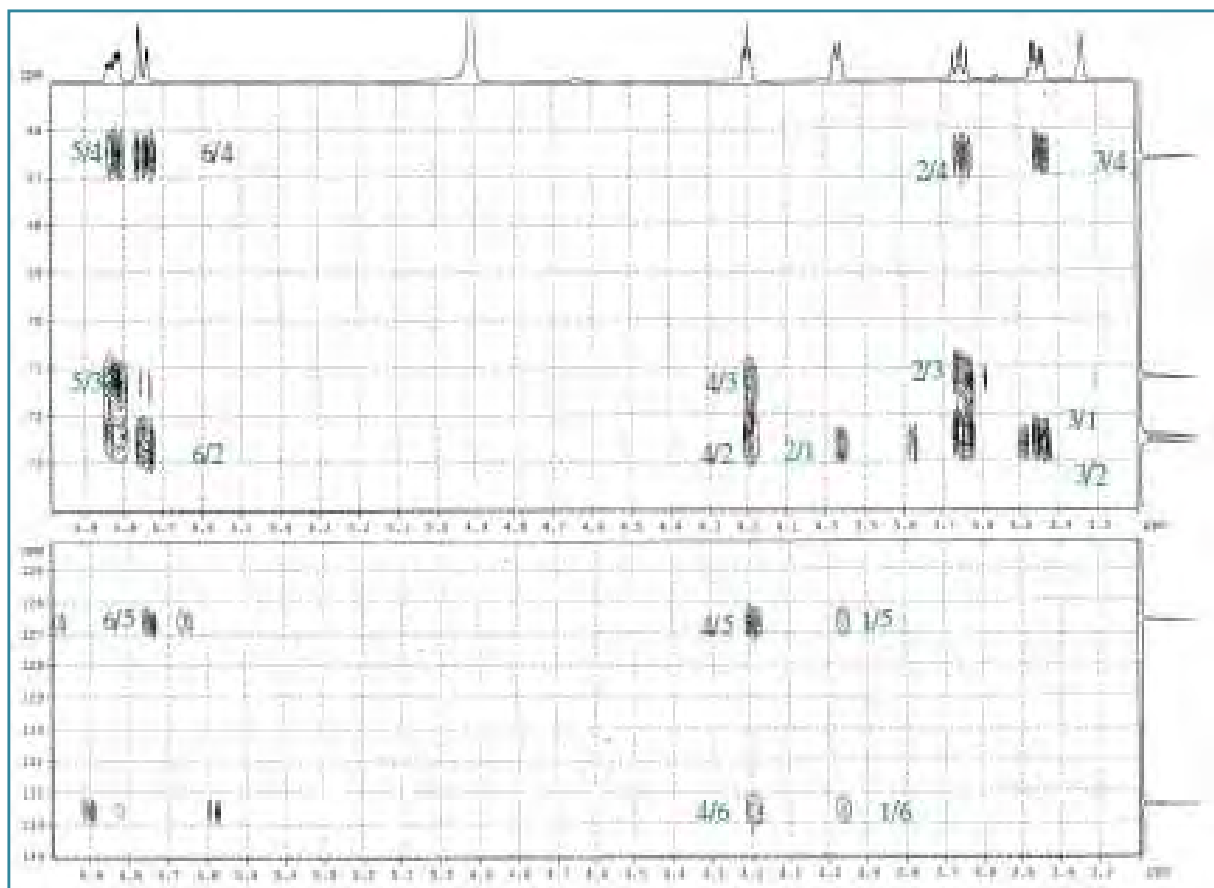
**Figure 151 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **35** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Sur le spectre COSY (figure 152), les deux protons oléfiniques H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  5,83) et H-6 à ( $\delta_{\text{H}}$  5,75) corrélent avec les deux protons H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4,20) et H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  3,95). Ces deux protons couplent également avec les protons H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3,43) et H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  3,64) respectivement et ce dernier couple aussi avec le proton H-3, suggérant la présence d'un cyclohexenetétraol.



**Figure 152 :** Spectre COSY du composé **35** dans le CD<sub>3</sub>OD

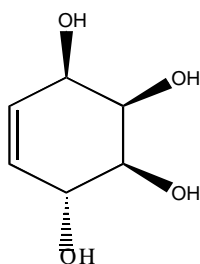
Les corrélations HMBC (figure 153) entre les protons H-1 et H-4 et les deux carbones éthyléniques C-5 et C-6 permettent de placer la double liaison en position C-5 (6).



**Figure 153 :** Spectre HMBC du composé **35** dans le CD<sub>3</sub>OD.

L'orientation  $\alpha$  axiale de l'hydroxyle attaché au C-4 est établie par la petite valeur de la constante de couplage du proton H-4 (t,  $J = 4,5$  Hz, H-4), alors que les grandes constantes de couplages (supérieurs à 7 Hz) des protons : H-1, H-2 et H-3 attestent de l'orientation  $\beta$  des trois hydroxyles qui restent.

Les données spectrales établies nous ont permis de proposer la structure ci-dessous pour le composé **35**: Cyclohexa-5-ène-1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -tétraol, aussi appelée condiritol C isolé ici pour la première fois par voie naturelle [150, 151].



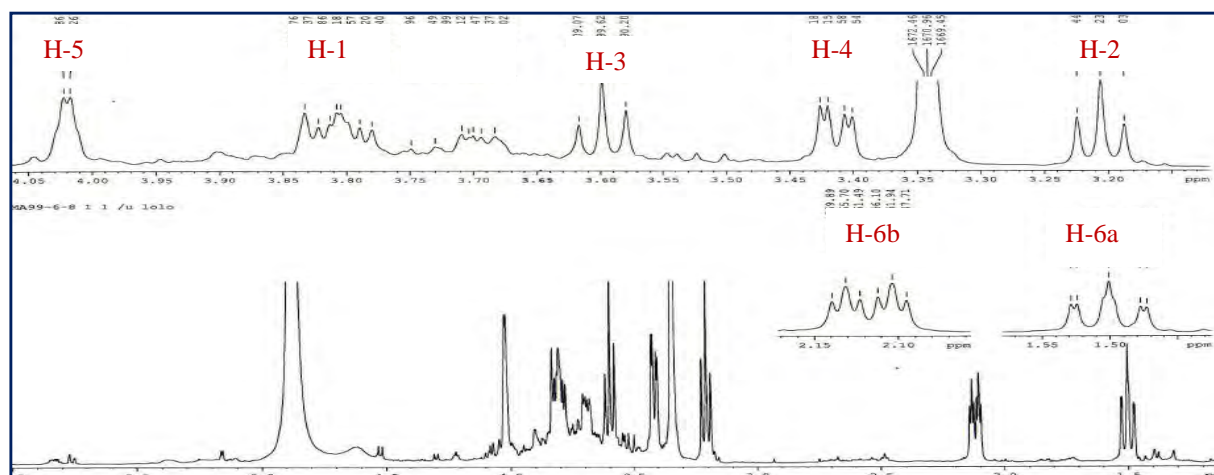
Cyclohexa-5-ène-1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -tétraol (**35**).



#### IV.4.4. 9. Détermination structurale du composé 36

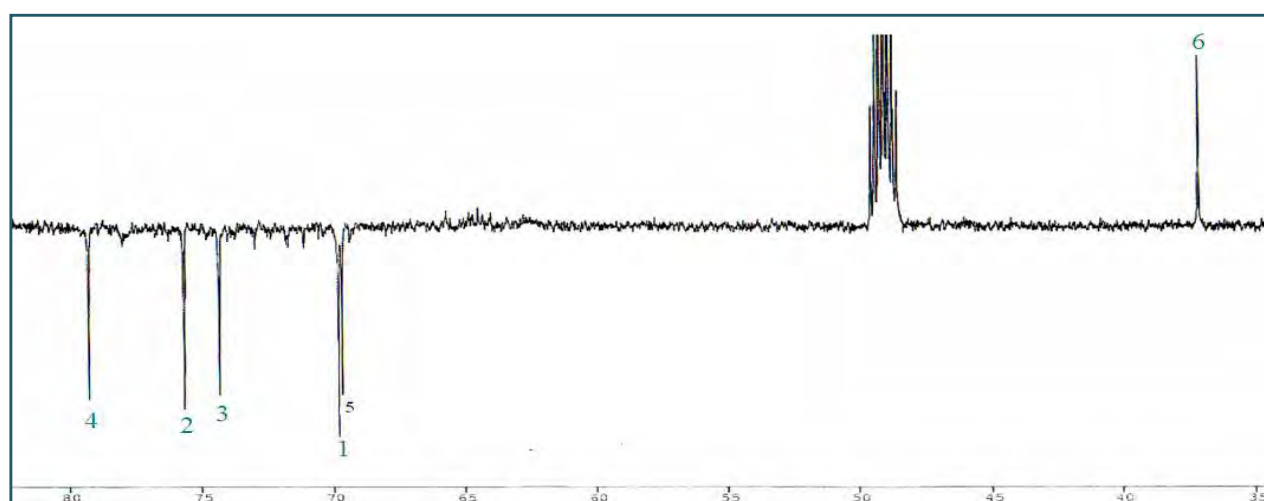
Le spectre de masse de **36**, montre un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  187  $[M+Na]^+$  correspondant à une formule brute en  $C_6H_{12}O_5Na$ , soit un gain de 18 *uma* par rapport au composé **35**.

Les spectres de RMN  $^1H$  (figure 154), et  $^{13}C$  (figure 155), de ce composé présentent de fortes similitudes avec celui du composé **35**.



**Figure 154:** spectre de RMN  $^1H$  du composé **36**

En effet, le spectre de RMN  $^{13}C$  (figure 155) présente 6 signaux résonants entre 37,1 et 79,3 ppm attribuable aux 6 carbones. La différence notable consiste en la disparition de deux signaux de deux carbones éthyléniques et l'apparition de deux carbones blindés dont l'un résonne à 37,1 et l'autre à 69,3 ppm (tableau 37).



**Figure 155 :** Spectre de RMN  $^{13}C$  J-modulé du composé **36** dans le  $CD_3OD$ .

L'expérience COSY montre des corrélations entre :

- le proton H-5 à  $\delta_H$  4,02 et les deux protons H-6a  $\delta_H$  1,50 et H-6b  $\delta_H$  2,10 et le proton H-4.
- le proton H-4 ( $\delta_H$  3,42) et les protons H-3 et H-5.
- le proton H-3 ( $\delta_H$  3,60) et les protons H-2 et H-4.
- le proton H-2 ( $\delta_H$  3,20) et les protons H-1 et H-3.
- le proton H-1 ( $\delta_H$  3,81) et les protons H-2 et H-6

Ce qui suggère la présence d'un cyclohexanepentaol.

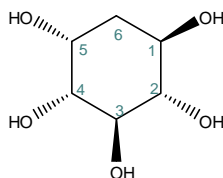
Les couplages HMBC entre le carbone C-1 et les protons H-2, H-6a et H-6b, confirme bien cette hypothèse. Le spectre HMBC montre également des corrélations entre :

- le carbone C-4 et les protons H-3, H-5 et H-6a.
- le carbone C-2 et les protons H-3, H-4, H-6a et H-6b.

Les valeurs des constantes de couplages des protons indiquent une configuration  $\alpha$  pour les hydroxyles en position 2, 4, 5 et une configuration  $\beta$  pour les hydroxyles en position 1 et 3.

L'ensemble des données spectroscopiques nous conduit à proposer pour ce composé, la structure suivante: Cyclohexa-1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -pentaol.

Cette molécule est également identifiée sous le nom de Viburnitol [152].



Cyclohexa-1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -pentaol (**36**).

Tableau **37**: Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **35** et **36** dans  $\text{CDCl}_3$ .

| Composé <b>35</b> |            |                              | Composé <b>36</b> |                                       |
|-------------------|------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| N°                | $\delta_C$ | $\delta_H$ (m, J Hz)         | $\delta_C$        | $\delta_H$ (m, J Hz)                  |
| 1                 | 66,6       | 3,95, d (7,5)                | 69,8              | 3,81, ddd (14,6-4,8-2,7)              |
| 2                 | 71,2       | 3,64, dd (10,4 - 7,7)        | 75,6              | 3,20, t(9,3)                          |
| 3                 | 72,5       | 3,43, dd (10,4 - 4,4)        | 74,3              | 3,60, t (9,4)                         |
| 4                 | 72,4       | 4,20, t (4,5)                | 79,3              | 3,42, dd (9,6-3,0)                    |
| 5                 | 126,6      | 5,83, ddd (10,0 - 4,5 - 2,0) | 69,6              | 4,02, d (2,6)                         |
| 6                 | 132,4      | 5,75, dd (10,0 - 2,0)        | 37,1              | 1,50, ddd (10,0 - 2,0), 2,10dt (14,4) |

#### IV.4.5. Conclusion

L'étude phytochimique portée sur la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes de *Chrysanthemum macrocarpum* a conduit à l'isolement et l'identification de :

- 7 flavonoïdes dont 4 possédant l'apigénine (**28**, **29**, **30** et **31**) comme génine, deux le kaempférol (**32**, **33**) et une lutéoline substituée en position 3' par un glucose (**34**) isolé pour la première fois du genre *Chrysanthemum*.
- 2 cyclitols il s'agit de viburnitol (**36**) et du conduritol C (**35**). A notre connaissance, cette dernière molécule est isolée pour la première fois, par voie naturelle.

#### IV.4.6. Identification des constituants de l'huile essentielle

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (HE). Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires.

Les résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse GC/MS de la composition chimique de l'HE sont présentés dans le tableau 38, dans lequel les composés identifiés sont listés suivant l'ordre des indices de rétention.

**Tableau 38 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *C. macrocarpum*.

| Composés                            | IR   | %          | %                                    | IR   | %           |
|-------------------------------------|------|------------|--------------------------------------|------|-------------|
| <i>n</i> -Octane                    | 800  | 0,5        | <b>Oxide de caryophyllène</b>        | 1582 | <b>6,5</b>  |
| 2,4-Di méthylhéptane                | 920  | 1,0        | Salvial-4(14)-en-one                 | 1590 | 2,5         |
| $\alpha$ -Fenchène                  | 953  | 0,2        | Oxide de isoaromadendrène            | 1695 | 0,9         |
| $\beta$ -Phéllandrène               | 1030 | 0,8        | Hexadécane                           | 1600 | 1,0         |
| Undecane                            | 1100 | 2,1        | <b><i>T</i>-Cadinol</b>              | 1608 | <b>19,6</b> |
| Acétate d'octényl                   | 1106 | 2,4        | <b><math>\alpha</math>-Cadinol</b>   | 1616 | <b>5,6</b>  |
| Oxide de Linalool                   | 1178 | 1,0        | Valéranone                           | 1639 | 1,0         |
| Safranal                            | 1197 | 0,5        | <b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b> | 1659 | <b>3,0</b>  |
| Dodécane                            | 1200 | 1,4        | <b><i>trans</i>-Longipinocarvéol</b> | 1688 | <b>3,5</b>  |
| Hexyl isovalerate                   | 1243 | 0,2        | 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecane      | 1770 | 2,2         |
| <b>Thymol</b>                       | 1266 | <b>4,0</b> | Bicyclic [3.3.1]nona-2,6-diol        | 1820 | 1,5         |
| décanoate Méthyle                   | 1290 | 1,7        | Nonadecane                           | 1900 | 1,0         |
| $\alpha$ -Copaène                   | 1376 | 0,5        | Méthyle hexasadécanoate              | 1908 | 0,8         |
| <i>n</i> -Tétradécane               | 1400 | 1,0        | <i>n</i> -Eicosane                   | 2000 | 1,0         |
| $\beta$ -Caryophyllène              | 1416 | 0,2        | Héneicosane                          | 2100 | 0,6         |
| ( <i>E</i> )- $\alpha$ -Ionone      | 1433 | 0,7        | Acid oleic                           | 2105 | 0,1         |
| ( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesène    | 1458 | 2,3        | Acid linoleic                        | 2197 | 1,0         |
| <b><math>\delta</math>-Cadinène</b> | 1524 | <b>3,9</b> | Tricosane                            | 2300 | 2,0         |
| Spathuléol                          | 1577 | 12,5       | <i>n</i> -Octacosane                 | 2800 | 1,0         |

Au total, 38 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 93,8 % par rapport à l'ensemble des constituants isolés. Le *T*-cadinol apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (19,6%), suivi du spathuléol (12,5%), l'oxyde de caryophyllène (6,5%), et le  $\alpha$ -cadinol (5,6%) accompagnés d'autres composés à des teneurs relativement faibles comme: lethymol (4,0%), le  $\delta$ -cadinène (3,9%), le *trans*-longipinocarvéol (3,5%) et le  $\alpha$ -bisabolol (3,0%). Peu de compositions d'huiles essentielles d'espèces appartenant au genre *Chrysanthemum* ont été rapportées à ce jour. L'essence de *C. coronarium* [153] est dominée majoritairement par l' $\alpha$ -pinène (14,8%), le  $\beta$ -pinène (9,5%), le camphre (29,2%) et l'acétate de l'iriatyle (9,8%). Par ailleurs une étude réalisée également sur l'espèce *C. yoshinaganthum* [154] a donné des résultats différents avec la dominance du myrténol (54,8%), de l'acétate de bornyle (10,8%), du germacrène D (10,6%) et du 1,8-cinéole (6,8%). Le  $\beta$ -farnésène (25%) et le limonène (21,8%) sont désignés les composés majeurs de l'huile essentielle de *C. indicum* [155].

En conclusion, les différentes compositions chimiques entre les HE du genre *Chrysanthemum* pourraient être corrélées avec l'origine géographique des plantes et des conditions écologiques tels que la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc... Ces facteurs influencent les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent la proportion relative des composés principaux caractéristiques [156, 157]. Cela conduit à l'existence de chémotypes différents qui distinguent les HE de différentes origines.

## *Activités biologiques de C. macrocarpum*

### **IV.4.7. Evaluation de l'activité antibactérienne**

La découverte des antibiotiques constituait une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotiques, ont accéléré la sélection de bactéries multirésistantes, constituant actuellement, un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème, sont sérieuses du fait que la plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves, sont de plus en plus difficiles à traiter [158].

Le recours aux ressources naturelles, en général, et aux plantes médicinales en particulier, devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer, pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces [159].

Parmi les plantes médicinales ayant un intérêt thérapeutique important figure le chrysanthème. Dans la dernière décennie, le chrysanthème a été étudié pour une potentielle utilisation dans : l'immunomodulation, les infections bactériennes et fongiques, ainsi que les infections à protozoaires [47, 50]. L'objectif de notre étude, consiste à évaluer l'effet antibactérien de la fraction chloroformique de *Chrysanthemum macrocarpum*.

#### **IV.4.7. 1. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)**

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique de *C. macrocarpum* a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose (Mueller-Hinton).

L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en millimètres tout autour des disques.

#### **IV.4.7. 2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La détermination des CMI des extraits de plantes, vis-à-vis des souches bactériennes, est réalisée selon la méthode standardisée de macro-dilution NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) en milieu solide.

### IV.4.7. 3. Résultats et discussion

Les résultats de l'activité antibactérienne de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*, sont regroupés dans le tableau 39. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

**Tableau 39:** Zones d'inhibition en mm et CMI de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*

| Microorganismes                | Diamètres d'inhibitions (mm) |             | CMI, ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |             |
|--------------------------------|------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|
|                                | Fraction $\text{CHCl}_3$     | Ampicilline | Fraction $\text{CHCl}_3$         | Ampicilline |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923    | 24                           | 30          | 128                              | 5           |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212  | <b>30</b>                    | 16          | 128                              | 16          |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922      | <b>24</b>                    | 18          | <b>8</b>                         | 10          |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | <b>30</b>                    | -           | <b>0,5</b>                       | -           |
| <i>K. pneumoniae</i>           | 18                           | 14          | <b>4</b>                         | 32          |

La fraction chloroformique a montré un effet inhibiteur important sur la croissance des bactéries Gram négatif *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition de 30, 24 et 18 mm, respectivement et des CMI de 0,5, 8 et 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivement. Une activité antibactérienne modérée, a été observée vis-à-vis des souches Gram positif *S. aureus* et *E. faecalis*, avec des zones d'inhibition de 24 et 30 mm, respectivement et de CMI à valeur commune de 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Par ailleurs, l'antibiotique «Ampicilline », a remarquablement inhibé la croissance des souches bactériennes *S. aureus* (30 mm), *E. coli* (18 mm), *E. faecalis* (16 mm) et *K. pneumoniae* (14 mm). Toutefois, cet antibiotique n'exerce aucun effet pour les doses testées sur la souche bactérienne *P. aeruginosa*.

L'activité antibactérienne de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* pourrait être due à la richesse de cette dernière en composés terpéniques, notamment en taraxastérol et  $\beta$ -sitostérol dont les pouvoirs antibactériens ont été déjà démontrés [140-142]. Cependant, tout cela n'empêche pas qu'un effet synergique entre plusieurs constituants de la fraction pourrait aussi être pris en compte dans cette activité.

À l'issu de ce travail, nous déduisons que la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* possède une activité antibactérienne très importante (des diamètres d'inhibition élevés et des CMI faibles) sur les germes pathogènes étudiés. Cette étude, d'une part, confirme l'efficacité et rationalise l'usage des feuilles et fleurs de *C. macrocarpum* en médecine traditionnelle et, d'autre part, elle prépare le chemin pour prévoir l'élaboration de nouveaux produits antibactériens.

#### **IV.4.8. Evaluation de l'activité antiproliférative**

Le cancer est devenu un véritable problème de santé de par le monde : il représente la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité dans les pays développés et devient également un problème majeur de santé dans les pays en développement. Ces derniers ont dès lors recours à la médecine traditionnelle, qui utilise largement des recettes à base de plante. En s'appuyant sur les données ethno-phytothérapeutiques et/ou ethnopharmacologiques, les chercheurs ont pensé à isoler puis identifier diverses substances d'origine naturelle possédant des propriétés pharmacologiques intéressantes et ce dans bien des domaines.

S'agissant du cancer, les produits naturels ont été à la base de bien des progrès dans les traitements appliqués. C'est notamment le cas de la Pervenche de Madagascar, de l'If et de la Pomme de mai. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative de *C. macrocarpum* surtout que la littérature scientifique suggère que le genre *Chrysanthemum* contient des composés terpéniques anticancéreux.

##### **IV.4.8.1. Le test de viabilité**

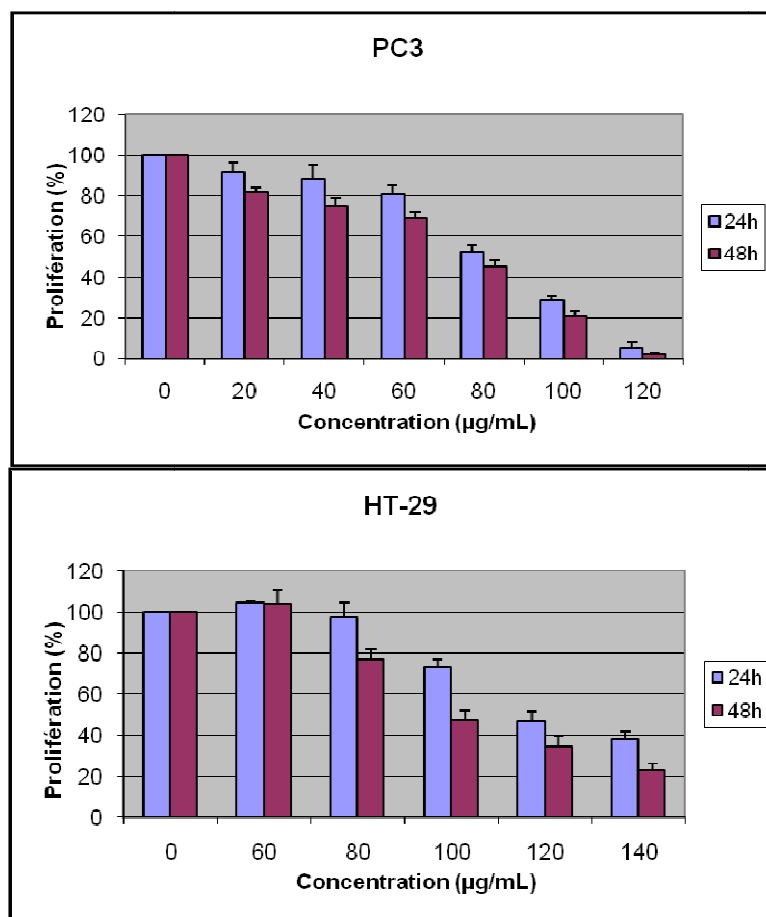
Afin d'évaluer l'activité antiproliférative de l'extrait chloroformique de *C. macrocarpum* un test de viabilité des cellules est réalisé. Le test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-diphényltétrazolium bromure, Sigma) est un test colorimétrique basé sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules à réduire, via la succinate déshydrogénase [160], le produit MTT en cristaux de formazan détectables en spectrométrie visible après leur dissolution dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Il permet alors d'évaluer les effets des traitements étudiés sur la croissance globale d'une population cellulaire donnée, en déterminant le nombre de cellules vivantes restant au sein de la culture cellulaire analysée.



#### IV.4.8.2. Résultats et discussion

L'inhibition de la prolifération des cellules HT-29 et PC-3 a été évaluée par le test MTT décrit dans la partie Matériels et Méthodes, (page 248). Le test a été réalisé en triplicate et les résultats obtenus sont représentés ci-dessous sous forme de graphique où nous avons en abscisse les concentrations de la fraction à tester et en ordonnée le pourcentage de prolifération des cellules traitées par rapport à celle des cellules de contrôle (100%) (figure156).

La fraction chloroformique de *C. macrocarpum* présente un effet inhibiteur de la prolifération dose et temps dépendants vis-à-vis des deux lignées cellulaires cancéreuses humaines et en particulier les cellules du cancer de la prostate PC-3 avec un pourcentage d'inhibition de 97% à la concentration de 120 µg/ml après 48 h. Ce pourcentage est plus faible lorsqu'il s'agit des cellules HT-29 où il est réduit à 65,6%. Ces résultats suggèrent l'existence d'une sélectivité d'action de la fraction chloroformique sur les deux lignées cellulaires. En accord avec nos résultats Park et al, ont déjà observé que la fraction chloroformique de *C. boreale*, et les guaianolides isolés à partir de cette fraction avaient montrés une forte activité antiproliférative et une sélectivité contre les cellules du cancer de la prostate PC-3 [48].



**Figure 156 :** Effet de la fraction chloroformique sur la prolifération des lignes cellulaires du cancer humain du colon HT-29 et de prostate PC-3.

#### IV.4.9. Évaluation de l'activité analgésique, anti-inflammatoire et antiulcéreuse :

L'inflammation peut être définie comme un processus général réactionnel de tout ou partie de l'organisme à une agression, qu'elle soit chimique, physique, bactérienne, virale ou parasitaire. Elle se traduit ordinairement par des symptômes cardinaux : chaleur, rougeur et douleur.

L'inflammation ainsi définie se déroule en trois phases :

- une première phase précoce, elle se caractérise par une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité capillaire et se traduit par les signes suivants : chaleur, œdème et douleur. On note également une migration de leucocytes des vaisseaux vers les tissus lésés et une libération de facteurs tissulaires à savoir l'histamine, la sérotonine, les kinines, les prostaglandines.

- une deuxième phase dite du « granulome » caractérisée par l'introduction dans l'infiltrat cellulaire de polynucléaires, faisant place à des cellules mononuclées (lymphocytes, plasmocytes), aux macrophages qui phagocytent les agents agressifs et aux fibroblastes. Il s'en suit une libération d'enzymes protéolytiques qui entretiennent l'inflammation.
- une troisième phase, c'est la phase ultime ou de réparation. La cellule dominante est le fibroblaste qui synthétise les fibres de collagène et les mucopolysaccharides aboutissant à la constitution d'un nouveau tissu conjonctif. Ce tissu a pour rôle de former une barrière. Le tissu fibreux néoformé entourant le foyer infectueux peut empêcher les antibiotiques d'agir au niveau des articulations conduisant à une diminution de la mobilité et parfois un blocage. Au niveau du système nerveux central la réaction inflammatoire empêche le déplacement du liquide céphalorachidien et entraîne une compression du SNC. Tous ces inconvénients expliquent la nécessité d'utiliser des produits qui peuvent empêcher l'inflammation.

Les antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement prescrits en raison de leurs efficacités dans la prise en charge de la douleur, de la fièvre, de l'inflammation et des troubles rhumatismaux. Cependant, leurs utilisations thérapeutiques à long cours est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale [161].

Ces effets indésirables sont généralement liés à l'inhibition des enzymes cyclo-oxygénases (COX<sub>1</sub> et COX<sub>2</sub>) par les AINS classiques. La COX<sub>1</sub> est constitutive et joue un rôle physiologique en maintenant l'intégrité des tissus, tandis que la COX<sub>2</sub> est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF  $\alpha$  et l'interleukine 1.

L'apparition des AINS sélectifs de la COX<sub>2</sub> appelés coxibs vient réduire les effets secondaires gastrointestinaux, mais ils induisent un risque cardiovasculaire [162]. Dans ce contexte, le recours aux ressources naturelles et plus particulièrement aux plantes médicinales devient une importante voie alternative à explorer afin de découvrir des médicaments efficaces à moindre effets secondaires.

Avant d'effectuer les tests d'activité analgésique et anti-inflammatoire *in vivo*, nous avons d'abord déterminé la dose léthale 50 par voie orale.

#### **IV.4.9. 1. Etude de la toxicité aiguë: Détermination de la (DL<sub>50</sub>)**

Étude de la toxicité générale aiguë de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*, a été menée suivant la méthode décrite par Behrens et Kerber (1935) [163]. Elle consiste à déterminer la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>), c'est à dire la dose capable de tuer, par la voie d'administration choisie, la moitié des animaux mis en expérience.

#### **IV.4.9. 2. Évaluation de l'activité analgésique**

##### **IV.4.9. 2. 1. Test du writhing**

L'effet analgésique de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*, a été évalué suivant le nombre de torsions abdominales induites par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique (2%) suivant la méthode décrite Koster et al [164]. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

#### **IV.4.9. 3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* a été évaluée par la méthode de Winter *et al* [165]. Elle consiste à vérifier l'action inhibitrice d'un extrait sur l'œdème provoqué par l'injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte d'un rat.

#### **IV.4.9. 4. Détermination de l'activité antiulcéreuse**

L'activité antiulcéreuse a été évaluée par la méthode de Correll et al [166].

#### **IV.4.9.5. Résultats et discussion**

- **La toxicité aiguë : dose létale 50 (DL<sub>50</sub>)**

L'administration orale des différentes doses (de 500 à 10000 mg/kg) de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* aux souris, n'a pas changé le comportement des animaux et il n'y a pas eu de mort après les 24 heures d'administration et les quinze jours d'observation.

La fraction chloroformique n'est donc pas toxique par voie orale en une prise unique.

- **l'activité analgésique (Test du writhing)**

Le tableau 40 représente les effets de l'acide acétylsalicylique et de la fraction chloroformique sur le nombre de torsions provoquées par l'injection de l'acide acétique (2%). La fraction chloroformique, exerce un effet protecteur dose-dépendante, vis à vis de la douleur chimique. Le pourcentage de protection atteint son maximum à la dose 10,000 mg/kg, soit 93,15 %. Elle présente donc un pouvoir analgésique périphérique supérieur à celui de l'acide acétylsalicylique à la dose de 200 mg/kg.

**Tableau 40:** Activité analgésique de la fraction chloroformique vis-à-vis de la douleur provoquée par l'acide acétique.

| lots                           | Dose (mg/kg) | Nombre de torsions <sup>b</sup> X ± DS | % d'inhibition |
|--------------------------------|--------------|--|----------------|
| <b>Contrôle</b>                | -            | 24.33 <sup>a</sup> ± 1,86              | -              |
| <b>Acide acétylsalicylique</b> | 200          | 6,57* ± 0,87                           | 72,99          |
| <b>Fraction chloroformique</b> | 5,000        | 3,83* <sup>a</sup> ± 1,28              | 84,25          |
|                                | 10,000       | 1,67* <sup>a</sup> ± 0,62              | <b>93,15</b>   |

\*Différence significative entre la fraction chloroformique et l'acide acétylsalicylique (200mg/kg) à  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> Différence significative entre la fraction chloroformique et le contrôle à  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup> Chaque valeur représente la moyenne (le nombre de torsions) ± DS du nombre d'animaux dans chaque groupe (n = 6).

- **L'activité anti-inflammatoire**

Le lot essai traité oralement par la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* (5,000 mg/Kg) a montré une inhibition significative de l'œdème de la patte induit par l'injection de la carragénine avec un pourcentage d'inhibition de 72,66%. Pour le lot de référence

l'indométacine (5 mg/kg) a réduit le volume l'augmentation de la patte avec un pourcentage d'inhibition de 83,36 %. Les résultats sont exprimés dans le tableau 41.

**Tableau 41:** Activité anti-inflammatoire la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* 4 heures après l'induction de l'oedème à la carragénine.

| lots                    | Dose (mg/Kg) | % d'augmentation de volume <sup>b</sup> des pattes X ± DS | % d'inhibition |
|-------------------------|--------------|---|----------------|
| Contrôle                | -            | 71,94 <sup>a</sup> ± 3,28                                 | -              |
| Indométhacine           | 5            | 11,97* ± 3,23   | 83,36          |
| Fraction chloroformique | 5000         | 19,67* ± 4,03   | <b>72,66</b>   |

\* Différence significative entre l'indométacine et fraction chloroformique à  $p < 0,05$ .

<sup>a</sup> Différence significative entre fraction chloroformique et le contrôle à  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Chaque valeur représente la moyenne (% d'augmentation du volume) ± DS du nombre d'animaux dans chaque groupe (n = 6).

#### ▪ L'activité d'anti-ulcéreuse

Après l'administration de 5000 mg/kg de la fraction chloroformique pendant quatre jours consécutifs aucun ulcère n'a été détecté contrairement à l'indométhacine (5mg/kg) utilisé comme le médicament de référence.

L'objectif de notre travail était d'établir une base scientifique de l'utilisation de *C. macrocarpum* en médecine traditionnelle. La présente étude a démontré que la fraction chloroformique possède des propriétés pharmacologiques telles que l'activité analgésique, anti-inflammatoire et anti-ulcéreuse est considéré comme une substance non toxique selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner [167], car la DL<sub>50</sub> est supérieure à 10000 mg/kg de poids corporel.

L'oedème induit par l'injection de la carragénine est un modèle animal largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des substances. L'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale qui dure environ une heure est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est

libérée au cours de la seconde phase (1,5 –3 heures) et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure [168].

Pour la fraction chloroformique, la forte inhibition de l'œdème a été observée à la quatrième heure. Cela suggère que l'action inhibitrice de la fraction chloroformique s'exercerait davantage sur les cyclo-oxygénases qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines. Les contractions induites par l'injection i.p. de l'acide acétique est une méthode utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique d'une substance. La douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine, et des prostaglandines (PGE<sub>2α</sub>, PGF<sub>2α</sub>). Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire [169].

La fraction chloroformique a inhibé les contractions abdominales de manière significative. Cet effet analgésique pourrait être lié à l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques. Notre étude phytochimique sur la fraction chloroformique a permis de mettre en évidence la présence des triterpènes et stéroïdes. Des études antérieures ont montré qu'ils sont de puissants inhibiteurs des prostaglandines [170].

Les résultats significatifs obtenus au cours de cette étude ont montré que la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* a un potentiel intéressant comme nouvelle agent anti-inflammatoire et analgésique.

### *Activités biologiques de Genista*

L'activité antibactérienne de la fraction butanolique de *G. ulicina* et des composés **(9)**, **(10)**, **(15)** et **(16)** a été évaluée également pour son activité antibactérienne, en utilisant le même protocole, sur des souches: *E. coli*, *S. aureus*, *P.aeruginosa* et *E. faecalis*. Aucune des molécules testées, ni la fraction butanolique n'a montré d'activité antibactérienne.

Les mêmes fractions n'ont pas montré d'activité antiproliférative sur les cellules HT-29 (CI<sub>50</sub>>100μg).

## *Conclusion générale*



## Conclusion générale

Au cours du présent travail deux espèces végétales Algériennes ont été, pour la première fois investiguées chimiquement et biologiquement. Il s'agit d'une Fabaceae (*Genista ulicina*) et d'une Asteraceae (*Chrysanthemum macrocarpum*). A l'issue de cette investigation, 36 composés dont **10** nouveaux, ont été isolés et caractérisés.

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Genista ulicina* a permis d'isoler, par diverses méthodes chromatographiques, 20 composés naturels répartis en deux classes de métabolites secondaires :

- ✓ 14 Saponosides dont **sept** de structures nouvelles.
- ✓ 6 flavonoides dont deux C-glucosylés et une isoflavone.

Il est important de signaler que les saponosides sont décrits pour la première fois dans le genre *Genista*. La majorité des saponosides isolés sont des monodesmosides avec soit du  $\beta$ -D-glucose, l'acide  $\beta$ -D-glucuronique ou bien du  $\beta$ -D-galactose.

L'étude phytochimique de la fraction chloroformique et acétate d'éthyle des parties aériennes de *Chrysanthemum macrocarpum* a conduit à l'isolement et l'identification de 16 molécules :

- ✓ 2 cyclitols,
- ✓ 7 flavonoides,
- ✓ 7 triterpènes dont **trois** originaux. Il s'agit de 3 triterpènes pentacycliques acylés en position 3 et/ou 21.

L'huile essentielle de l'espèce *C.macrocarpum*, obtenue à partir de l'hydrodistillation des parties aériennes a été caractérisée pour la première fois. 38 composés organiques volatils ont été identifiés et constituent 93,8 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle.

Cette huile est majoritairement composée de *T*-cadinol (19,6%), suivi du spathuléol (12,5%), d'oxide de caryophyllène (6,5%), et de  $\alpha$ -cadinol (5,6%).

D'un point de vue chimiotaxonomique, la composition chimique de l'espèce *C.macrocarpum* est en parfait accord avec les plantes du genre *Chrysanthemum*.

L'isolement de tous ces composés a été effectué à l'aide de méthodes chromatographiques : chromatographie sur colonne de gel de silice normale (CC), chromatographie sur colonne de silice greffée C<sub>18</sub>, chromatographie sur plaques préparatives de silice normale (CPP) et chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, TOCSY et ROESY), par UV, par la spectrométrie de masse (MS), par la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antibactérienne de la fraction butanolique de *G. ulicina* et des composés **(9)**, **(10)**, **(15)** et **(16)** a été évaluée sur des souches: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis*.

Aucune des molécules testées, ni la fraction butanolique n'a montré d'activité antibactérienne. Ils n'ont pas montré également d'activité antiproliférative sur les cellules HT-29 ( $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g}$ ).

La fraction chloroformique de *C. macrocarpum* possède une activité antibactérienne très importante (des diamètres d'inhibition élevés et des CMI faibles) sur les souches bactériennes étudiées.

Elle montre une activité plus importante sur les souches gram négatif avec des CMI comprises entre 0,5 et 8  $\mu\text{g/ml}$ , nettement inférieures à celles de l'ampiciline utilisée comme référence.

Les résultats d'activité antiproliférative de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* sur les deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, HT-29 (dérivant du carcinome colorectal) et PC-3 (dérivant du carcinome de la prostate), montre que la fraction chloroformique présente un effet inhibiteur de la prolifération sur les deux lignées à la concentration de 120  $\mu\text{g/ml}$  après 48 h.

Les résultats significatifs obtenus après l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-ulcéreuse, ont montré que la fraction chloroformique de *C. macrocarpum* possède des propriétés anti-inflammatoire et analgésique très importantes à la dose de 5,000 mg/kg.

Ces résultats constituent une base scientifique qui justifie l'utilisation traditionnelle de *C. macrocarpum*.

## *Chapitre V*

### *PARTIE EXPERIMENTALE*

## **V.1. Matériel et méthodes**

### **V.1.1. Matériel végétal et extraction**

*Genista ulicina* a été récoltée en Mai 2009 dans la région d'El Aouana, Jijel (Nord-Est Algérien) et *Chrysanthemum macrocarpum* a été récolté en Avril 2005 dans une station à quelques kilomètres de Ghardaïa (Sud-Est Algérien). L'identification botanique de ces deux espèces a été réalisée par le Professeur Gérard De Bélair (Université d'Annaba). Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont broyées. Les drogues séchées et broyées ont été extraites par une méthode d'extraction de routine (figure 36). Les extraits secs obtenus sont ensuite stockés à température ambiante, à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

### **V.1.2. Matériel chromatographique**

#### **V.1.2. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Utilisés à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Nous avons utilisé essentiellement des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium ou en verre (Merck) : en phase normale, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm et en phase inverse, RP 18 F<sub>254S</sub>, 200 µm Merck.

Les plaques utilisées pour la réalisation des chromatographies sur plaques préparatives sont en verre recouvertes de silice Kieselgel 60F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant la révélation par un révélateur à base d'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

### **V.1.2. 2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mises en oeuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier.

Les phases stationnaires utilisées sont :

- en phase normale, une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.
- en phase inverse, une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63  $\mu\text{m}$ ), en utilisant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier, et dans ce cas l'élution est effectuée à l'aide d'air comprimé.

### **IV.1.2. 3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)**

La chromatographie liquide sous vide (VLC) est une technique rapide permettant de réaliser une première séparation d'extraits bruts. La silice (en phase normale) Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200  $\mu\text{m}$ ) ou la silice greffée (phase inverse) Lichroprep RP-18 Merck (40-63  $\mu\text{m}$ ) est conditionnée dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté N° 4. Le volume de silice utilisé correspond à 10 fois le poids de l'échantillon.

### **V.1.2. 4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)**

Les analyses CLHP ont été effectuées à l'aide d'une chaîne chromatographique Dionex, munie d'une pompe P580 A quaternaire, à gradient basse pression avec dégazeur intégré et d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes 170S/340S, d'une colonne thermostatée par un four STH 585. L'ensemble est piloté par le logiciel Chromeleon® version 1 et 2. Nous avons travaillé avec plusieurs colonnes, toutes de type C<sub>18</sub> (phase inverse) :

- Colonne Dionex C<sub>18</sub> 201 SP, 4,6 x 250 mm, de granulométrie 5 $\mu$ , de porosité 90 Å, pour analytiques
- Colonne Dionex C<sub>18</sub> 201 SP, 10 x 250 mm, 5 $\mu$ , 90 Å - Pour CLHP semi-préparatives.
- Colonne Thermo Electron corporation hyperprep HS C<sub>18</sub> 21,2x 250 mm, 10 $\mu$ , 90 Å - Pour CLHP préparatives.

Que ce soit pour des analyses isocratiques (composition du mélange identique pendant toute l'analyse) ou en gradient, nous avons toujours travaillé avec des mélanges Méthanol/ Eau+ TFA (0,025%) ou Acétonitrile/ Eau+ TFA (0,025%), éventuellement.

### **V.1.3. Méthodes physico-chimiques**

#### **V.1.3. 1. Spectrophotométrie UV-visible**

Les spectres UV-visible des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre.

#### **V.1.3. 2. Spectrométrie de masse**

Les spectres ESIMS et HRESIMS ont été enregistrés mode positif et négatif sur un spectromètre Micromass Q-TOF (MANCHESTER, UK).

#### **V.1.3. 3. Spectroscopie de RMN**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-500 ou à 600 et 150 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-600 équipé d'une cryoplateforme. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données Topspin 2.1 sont appliqués.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> et CD<sub>3</sub>OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

#### **V.1.3. 4. Analyses GC et GC/MS**

##### **V.1.3. 4. 1. Analyses GC**

L'analyse GC a été effectuées sur un chromatographe Finnigan SSQ 7000 équipé d'une colonne de silice de type DB-5 (5% méthylphénylpolysiloxane) de (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25  $\mu$ m). La température du four étant programmée de 40 à 250°C à une

vitesse de 3° C min<sup>-1</sup>, avec une température d'injection et détection de 280°C, et un volume injecté de 0,1 µl. Le gaz vecteur étant l'Hélium avec un débit de 1 ml/min.

#### **V.1.3. 4. 2. Analyse GC/MS**

L'analyse GC/MS ont été effectuée sur un appareil Finnigan SSQ 7000 muni d'un détecteur masse couplé du type thermo trace GC 2000, équipé d'une colonne de silice du type DB-5 (5 % méthylphénylpolysiloxane), de (30 m x 0.25 mm i.d. épaisseur de film 0.25 µm). Les conditions opératoires sont les mêmes pour les analyses GC, la température de four étant programmée de 40°C (3 min), puis à une vitesse de 3°C/min lorsque la température atteint 250°C.

Les paramètres MS étant :

Température de trappe d'ions : 200°C

- Rapport split : 1 :10
- Potentiel d'ionisation : 70 ev
- Bande de scans : 40- 400 u
- Temps de scan : 5s
- Résolution : 1000.

Les différents constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés des bases de données Wiley et NIST, du spectromètre de masse CPG/SM et ceux de base de données spectrales Adams. L'identification des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature. Les indices de rétention des composés ont été calculés grâce aux temps de rétention d'une série *n*-alcanes C<sub>9</sub>-C<sub>17</sub> avec une interpolation linéaire.

#### **V.1.3. 5. Pouvoir rotatoire**

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm) dans une cuve de 10 cm à 20°C. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$ , exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 100.\alpha /c$$

$\alpha$  : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre.

l : longueur de la cuve de mesure.

c : concentration de la molécule en solution en g/100 ml.

## V.2. Etude de l'espèce *Genista ulicina*

### V.2.1. Extraction des parties aériennes de *G. ulicina* Spach

Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (1 kg) sont broyées et mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V). Cette macération est répétée 3 fois (3×24 h). Après filtration puis concentration à une température n'excédant pas 45°C, on ajoute de l'eau distillée. Cette dernière solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. La figure 36 montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *Genista ulicina*. Les trois extraits sont évaporés à sec, puis pesés.

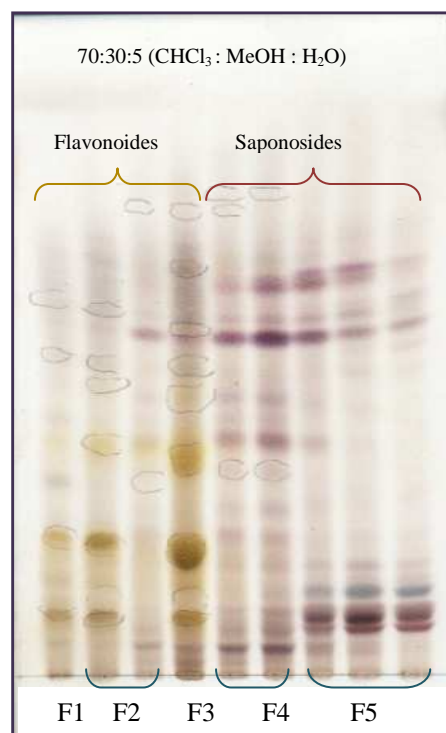
### V.2.2. Fractionnement et purification de la fraction butanolique de l'espèce *G. ulicina*

12 g de la fraction butanolique des parties aériennes de *G. ulicina* ont été fractionnés par VLC en phase inverse C<sub>18</sub> avec l'éluant H<sub>2</sub>O-MeOH (60/40, 40/60, 20/80, 0/100). Des fractions de 250 ml (\*3) sont recueillies pour chaque mélange et analysées par chromatographie sur couche mince. Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le système 70:30:5 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O). Les CCM ont été examinées à la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique à 50% puis chauffées à 100 °C. 6 fractions (figure157) ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes (tableau 42).

**Tableau 42** : VLC sur C<sub>18</sub> de l'extrait butanolique des parties aériennes de l'espèce *G. ulicina*.

| Eluant: MeOH – H <sub>2</sub> O | Fractions collectées | Masse (mg) |
|---------------------------------|----------------------|------------|
| 40 : 60                         | F1                   | 6640       |
|                                 | F2                   | 2180       |
| 60 :40                          | F3                   | 450        |
|                                 | F4                   | 490        |
| 80 :20                          | F5                   | 1102       |
| 100 :0                          | F6                   | 210        |





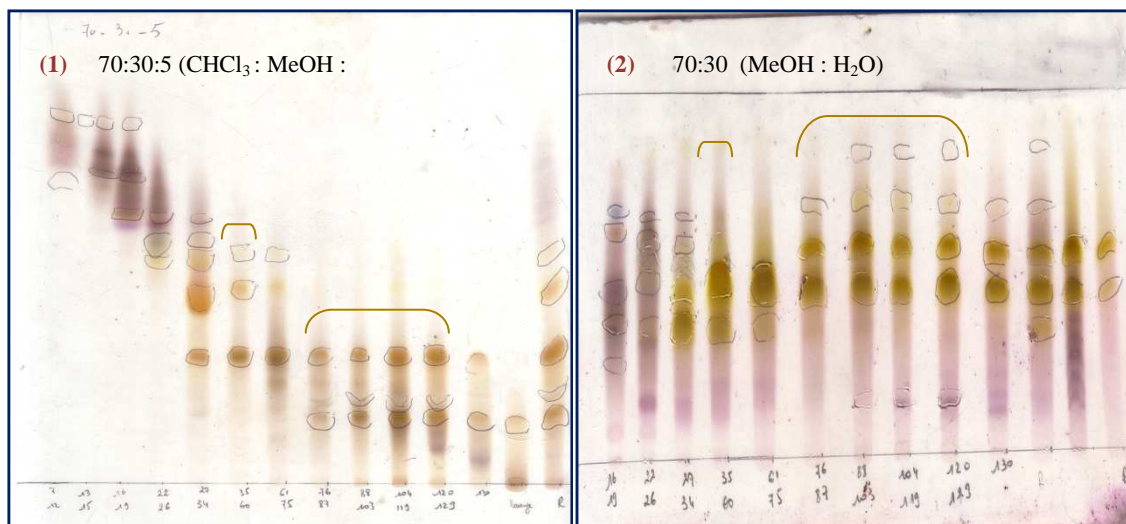
**Figure 157:** Profils CCM sur gel de silice de l'extrait butanolique.

- La fraction F2 :

La fraction F2 (2,138g) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale éluee avec un gradient de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  [90:10:0 à 40:60:7]. Des fractions de 50 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM (figure 158) en phase normale réalisée dans le  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  [70:30:5] pour donner 12 sous fractions (tableau 43).

**Tableau 43:** Fractionnement de la sous fraction F2 sur colonne de gel de silice normale.

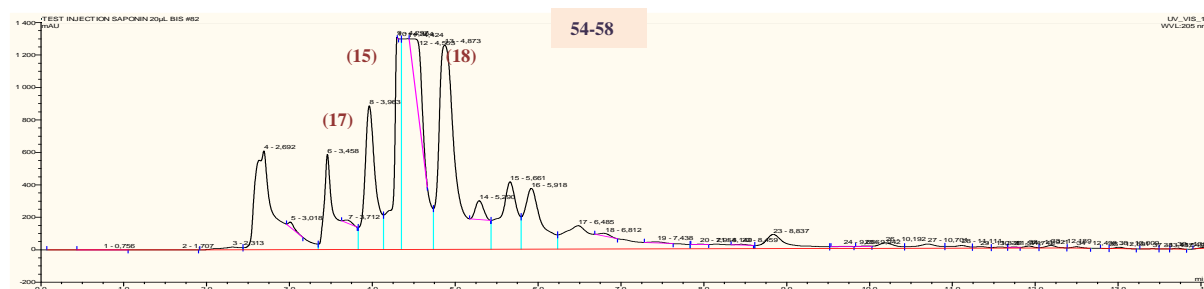
| Eluant: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ | Sous fractions collectées   | Masse (mg)           |
|---|---|----------------------|
| 90: 10  | S <sub>F</sub> 1-12<br>S <sub>F</sub> 13-15<br>S <sub>F</sub> 16-19 | 24,8<br>36,9<br>67,5 |
| 85:15   | S <sub>F</sub> 22-26<br>S <sub>F</sub> 27-34                        | 179,7<br>225,2       |
| 80:20   | <b>S<sub>F</sub> 35-60</b>  | 338,9                |
| 75:25   | S <sub>F</sub> 61-75  | 173,1                |
| 70 :30  | <b>S<sub>F</sub> 76-86</b>  | 140,1                |
| 70 :30: 2                                       | <b>S<sub>F</sub> 87-104</b>   | 173,2                |
| 70 :30:5  | <b>S<sub>F</sub> 105-129</b>  | 195,3                |
| 60 :40:7  | S <sub>F</sub> 130-144  | 232,2                |
| MeOH  | S <sub>F</sub> 145  | 95,4                 |



**Figure 158:** Profils CCM sur gel de silice normale (1) et sur silice greffée C<sub>18</sub> (2) de la fraction 2.

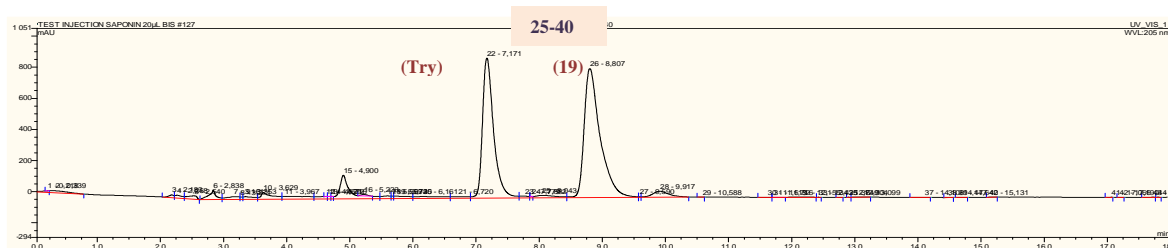
La sous-fraction [1-12] contient le composé **20** (2,7 mg) à l'état pur.

- La sous fraction [35-60] (388,9 mg) a été chromatographiée sur une colonne de silice greffée C<sub>18</sub> avec un gradient d'éluant MeOH-H<sub>2</sub>O [20 :40 à 50 :50]. La purification de la sous fraction [54-58] (128 mg), élue avec le mélange MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40), par CLHP semi-préparative en utilisant comme éluant le mélange de solvant (ACN/H<sub>2</sub>O+TFA0.025%) en isocratique à 22% a permis d'obtenir 3 produits : **15** (68 mg,  $t_r = 4,4$  min), **17** (2,6 mg,  $t_r = 3,9$  min) et **18** (5,5 mg,  $t_r = 4,8$  min) (figure159). La sous fraction [72-78] (47,3mg) est purifiée par CLHP semi-préparative élue par un mélange de solvant (ACN/H<sub>2</sub>O) en isocratique à 20%, pour donner 8 mg du composé **15** ( $t_r = 13,7$  min) et 5,4 mg du composé **16** ( $t_r = 14,3$  min).



**Figure159 :** Profil CLHP (205nm) des produits purs isolés à partir des sous fractions [54-58].

- La sous fraction [76-129] (508,6 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec comme éluant un gradient EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10:0 à 60:40:7) pour donner la fraction [25-40]. Cette dernière est purifiée par CLHP semi-préparative élue par un mélange de solvant (ACN/H<sub>2</sub>O+TFA0.025%) en isocratique à 15% conduisant à 6,7 mg du composé **19** ( $t_r = 8,8$ ) et l'acide aminé tryptophane (Try) (figure160).



**Figure160** : Profil CLHP (205 nm) des produits purs isolés à partir des sous fractions [25-40].

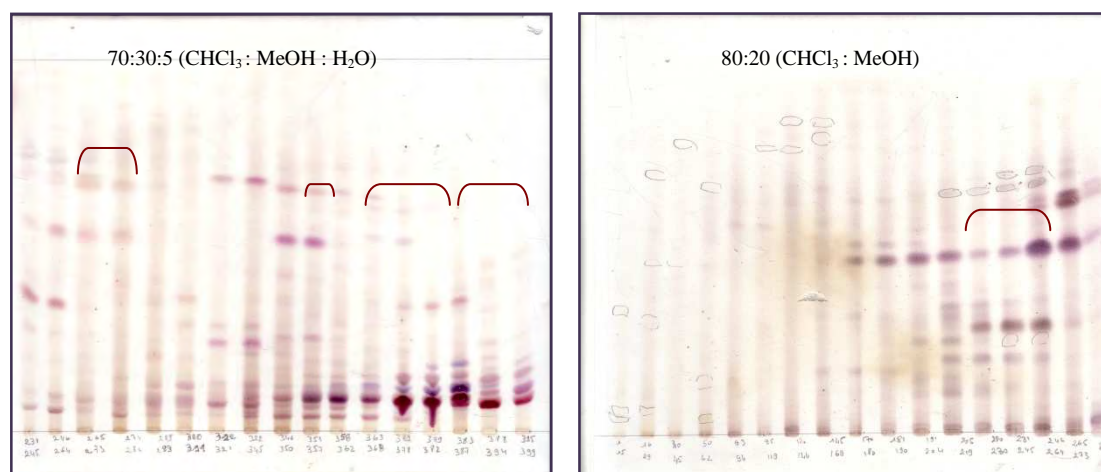
- La fraction F5:

1,1019 g de cette fraction sont séparés par chromatographie sur silice greffée C<sub>18</sub> en utilisant le gradient de solvant MeOH-H<sub>2</sub>O (40/60 à 0/100). Des fractions de 20 ml sont recueillies (tableau 44).

**Tableau 44**: Fractionnement de la sous fraction F5 sur colonne de silice greffée C<sub>18</sub>.

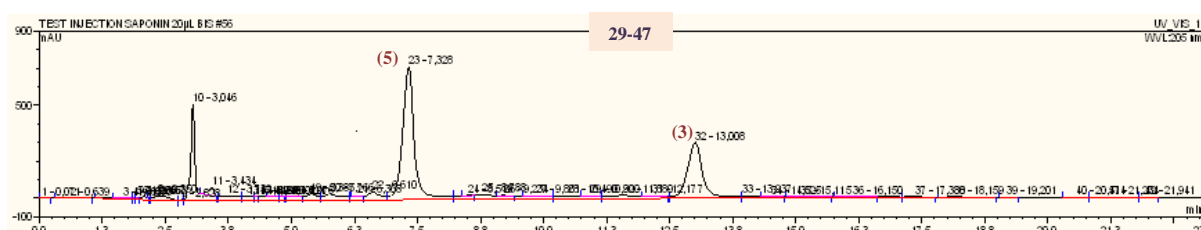
| Eluant: MeOH-H <sub>2</sub> O | Sous fractions collectées | Masse (mg) |
|-------------------------------|---------------------------|------------|
| 40: 60                        | S <sub>F</sub> 1-15       | 4          |
|                               | S <sub>F</sub> 16-29      | 5,3        |
|                               | S <sub>F</sub> 30-45      | 6          |
|                               | S <sub>F</sub> 46-62      | 15,2       |
| 45:55                         | S <sub>F</sub> 63-94      | 9          |
|                               | S <sub>F</sub> 95-119     | 7,4        |
|                               | SF120-144                 | 11,7       |
| 50:50                         | S <sub>F</sub> 145-169    | 18,4       |
|                               | S <sub>F</sub> 170-180    | 7,5        |
|                               | S <sub>F</sub> 181-190    | 7          |
|                               | S <sub>F</sub> 191-204    | 9,3        |
|                               | S <sub>F</sub> 205-219    | 11,4       |
| 55:45                         | S <sub>F</sub> 220-230    | 15,2       |
|                               | S <sub>F</sub> 231-245    | 19         |
|                               | S <sub>F</sub> 246-264    | 32,7       |
| 60 :40                        | S <sub>F</sub> 265-273    | 68,9       |
|                               | S <sub>F</sub> 274-284    | 70         |
|                               | S <sub>F</sub> 285-299    | 54         |
|                               | S <sub>F</sub> 300-311    | 36         |
|                               | S <sub>F</sub> 312-321    | 15,7       |
| 70 :30                        | S <sub>F</sub> 322-345    | 32         |
|                               | S <sub>F</sub> 346-350    | 31,6       |
|                               | S <sub>F</sub> 351-357    | 49         |
|                               | S <sub>F</sub> 358-362    | 15,8       |
|                               | S <sub>F</sub> 363-367    | 13,7       |
|                               | S <sub>F</sub> 368-378    | 94         |
| 80 :20                        | S <sub>F</sub> 379-382    | 44,6       |
|                               | S <sub>F</sub> 383-387    | 42,6       |
|                               | S <sub>F</sub> 388- 390   | 21         |
|                               | S <sub>F</sub> 391-394    | 28         |
| MeOH                          | S <sub>F</sub> 395-399    | 26         |
|                               | S <sub>F</sub> 400-420    | 21,5       |

Les profils CCM en phase normale (figure161) montrent bien la richesse de cette fraction en saponosides.



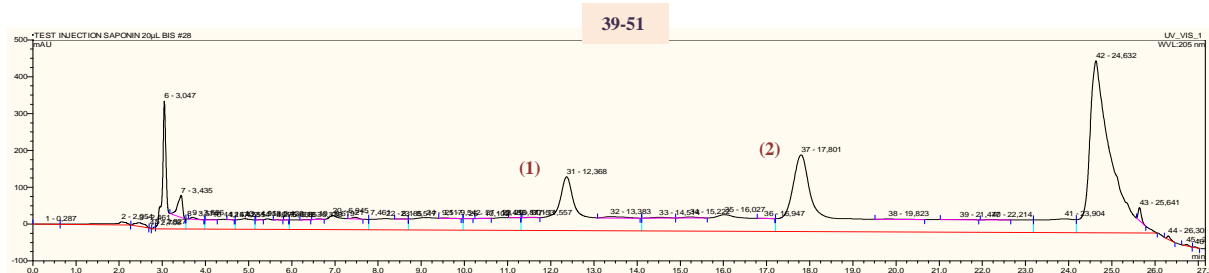
**Figure161** : Profils CCM sur gel de silice normale de la fraction 5.

- La fraction 220-264 (66,9 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne de silice normale avec éluant  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [95:15 à 80:20], des fractions de 10 ml sont recueillies. La sous-fraction [20-28] contient le produit **3** (4,1 mg). La sous fraction [29-47] (21 mg) éluee avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [85:15] a été ensuite purifiée par CLHP semi-préparative en utilisant le système ( $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}+\text{TFA}$  0,025%) à 30% en isocratique, permettant ainsi d'obtenir les composés **3** (1,5 mg,  $t_r = 13,0$  min) et **5** (2,5 mg,  $t_r = 7,3$  min) à l'état pur (figure162).



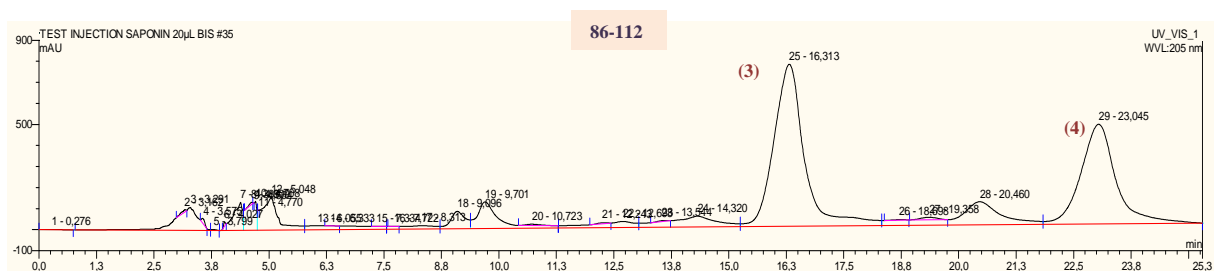
**Figure 162**: Profil CLHP (205nm) des produits purs isolés à partir de la fraction 220-264.

- La fraction 265-284 (138 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale, avec le gradient d'éluant  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [95:5 à 85:15]. Les sous fractions [39-47] et [48-51] éluees avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [90:10] ont été purifiées par CLHP semi-préparative avec le système binaire [ $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}+\text{TFA}$ 0.025%] en isocratique à 30% permettant d'obtenir les deux composés : **1** (4,3 mg,  $t_r = 12,3$  min) et **2** (4,6 mg,  $t_r = 12,8$  min) à l'état pur (figure163).



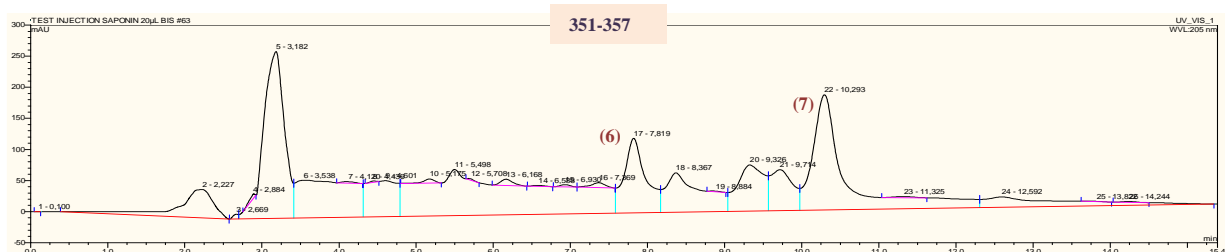
**Figure163** : Profil CLHP (205nm) des produits purs isolés à partir des sous fractions [39-47] et [48-51].

La sous fraction [86-112] (18.8 mg) éluée avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [85:15] est ensuite purifiée sur CLHP semi-préparative [ACN / $\text{H}_2\text{O}$ + TFA 0,025%) isocratique à 30%] pour fournir les composés : **3** (5mg,  $t_r = 13,6$  min) et **4** (2,7 mg,  $t_r = 23,0$  min) (figure164).



**Figure164** : Profil CLHP (205nm) des produits purs isolés à partir de la fraction [86-112]

- La sous fraction [351-357] (49 mg) éluée avec le mélange  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  [70:30] a fait l'objet d'une purification par CLHP semi-préparative dans le système de solvant [ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ +TFA0.025%] isocratique à 20% (figure 165). Elle a permis l'isolement des deux composés **6** (2,1 mg,  $t_r = 7,8$  min) et **7** (3,3 mg,  $t_r = 10,3$  min).



**Figure165** : Profil CLHP (205nm) des produits purs isolés à partir de la sous fraction [351-357].

La purification de la fraction 368-382 (138,6 mg) a été effectuée par CLHP préparative dans le système de solvant [Acétonitrile/H<sub>2</sub>O +TFA 0,025% ] en isocratique à 45% pour conduire à 4 composés purs : **10** (68 mg,  $t_r = 10,5$  min), **11** (3 mg,  $t_r = 18,8$  min), **12** (1,5 mg,  $t_r = 15,3$  min), **14** (5,6 mg,  $t_r = 12,6$  min).

La fraction 388-399 (75mg) a été séparée par CLPH préparative en utilisant le mélange [Acétonitrile/H<sub>2</sub>O+TFA 0,025%] à 45% en isocratique, cette purification à abouti a l'isolement de 3 produits : **8** (2,2 mg), **9** (3,8 mg), **13** (3 mg).

### V.2.3. Composés isolés de l'espèce *Genista ulicina*

#### Composé 1

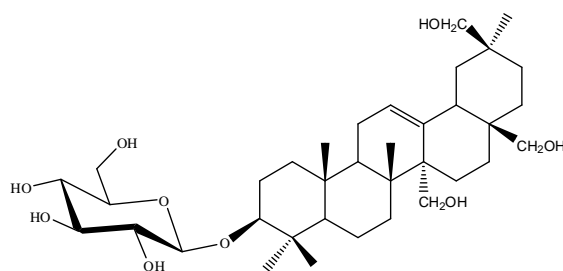
3-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,30-tétraol.

**Formule brute** : C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>

**[α]<sub>D</sub>** + 18.9° (*c* 0.28, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 659.4144 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 3, page 80).



#### Composé 2

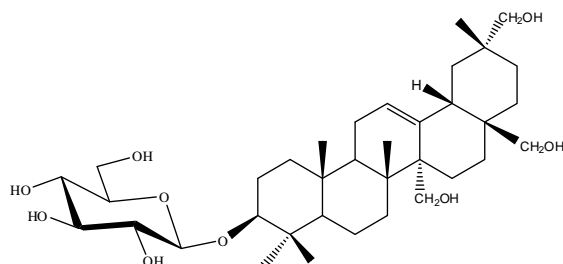
-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.

**Formule brute** : C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>

**[α]<sub>D</sub>** + 18.6° (*c* 0.57, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 659.4128 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 4, page 83).



#### Composé 3

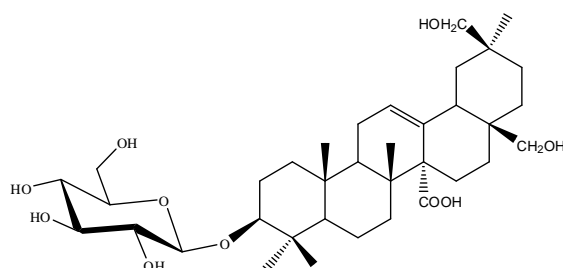
l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27-carboxylique

**Formule brute** : C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>

**[α]<sub>D</sub>** + 24° (*c* 0.75, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 673.3921 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 5, page 85).



#### Composé 4

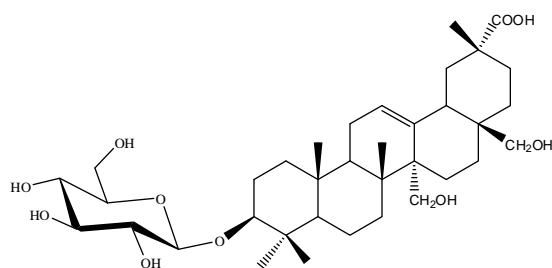
acide 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28, triol-29- carboxylique

**Formule brute** : C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>

**[α]<sub>D</sub>** + 6,3° (*c* 0,25, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 673,9333 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 6, page 89).



### Composé 5

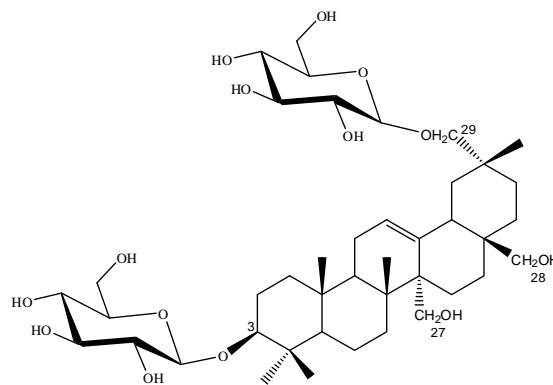
3-*O*-β-D-glucopyranosyl, 29-*O*-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol

**Formule brute** : C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>

[α]<sub>D</sub><sup>+</sup> 14,8° (*c* 0,25, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 821,4671 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 7, page 94).



### Composé 6

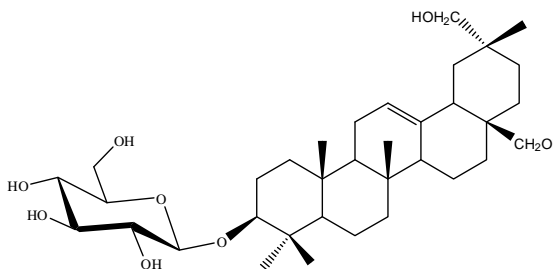
3-*O*-β-D-glucopyranosyl-14-*H*-27-nor-olean-12-ène-28,29-diol. Nouveau composé naturel.

**Formule brute** : C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>8</sub>

[α]<sub>D</sub><sup>+</sup> 15,8° (*c* 0,19, MeOH)

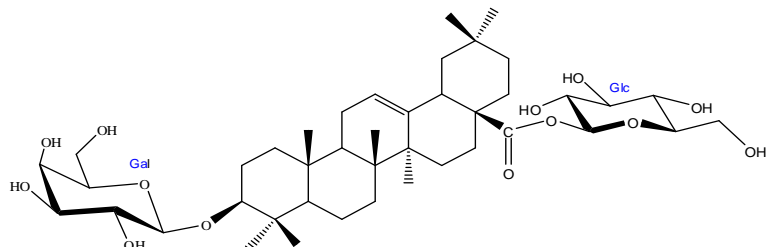
**HR-ESI-SM**: *m/z* 629,4033 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 8, page98).



### Composé 7

Acide 3-*O*-β-D-galactopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosyl oleanolique.



**Formule brute** : C<sub>42</sub>H<sub>68</sub>O<sub>13</sub>

**SM**: *m/z* 803,4554 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 9, page103).

### Composé 8

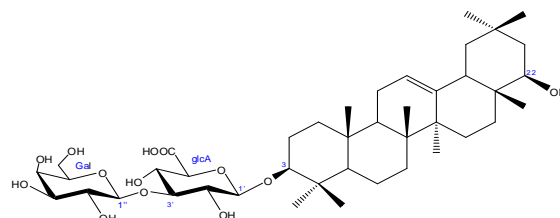
3-*O*-[β-D-galactopyranosyl- (1→3)- β-D-glucuronopyranosyl]-22-β-hydroxyoléan-12-ène

**Formule brute** : C<sub>42</sub>H<sub>68</sub>O<sub>13</sub>

[α]<sub>D</sub> -5,3 (*c* 0,15, MeOH)

**HR-ESI-SM**: *m/z* 803,4554 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 10, page108)





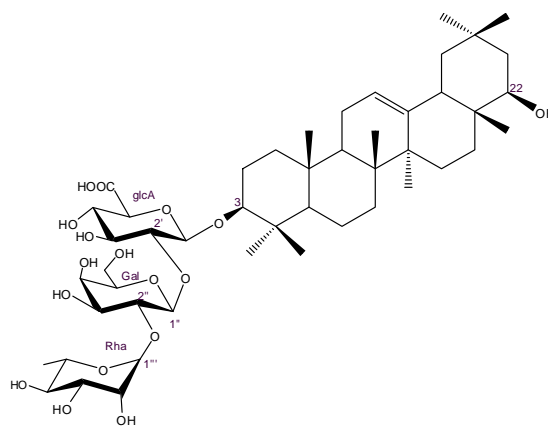
### Composé 9

3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-3 $\beta$ ,22 $\beta$ -dihydroxy-oléan-12-

**Formule brute** : C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>17</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 949,5137 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 11, page113).



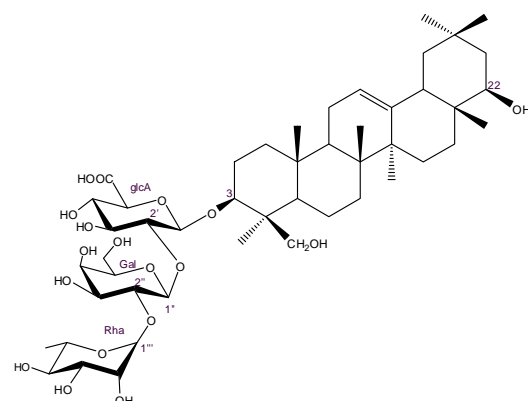
### Composé 10

3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]- 3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,24-trihydroxy-oléan-12-ène

**Formule brute** : C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>18</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 965,5099 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 12, page117).



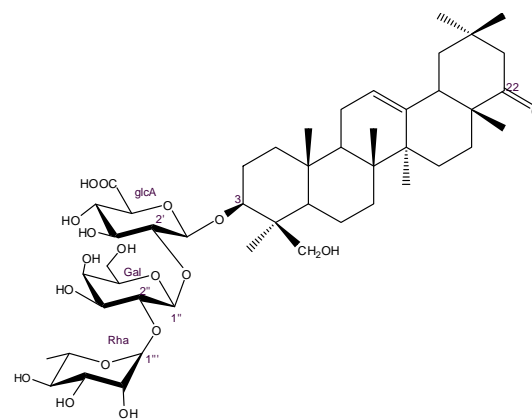
### Composé 11

3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-oxo-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,24-diol

**Formule brute** : C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>O<sub>18</sub>

**HR-ESI-SM**: à *m/z* 963,4920 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 13, page120).



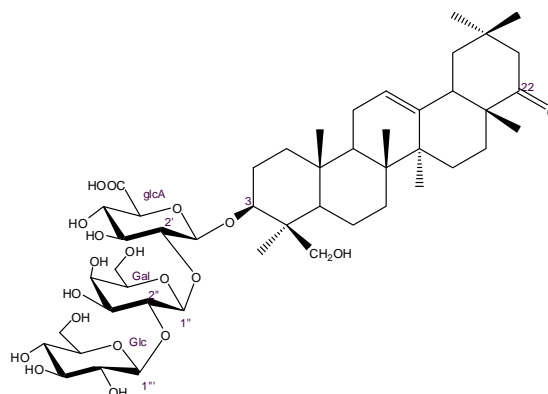
### Composé 12

3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] 22-oxo-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,24-diol.

**Formule brute** : C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>O<sub>18</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 979,4668 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (150 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD)  
(tableau 14, page124).



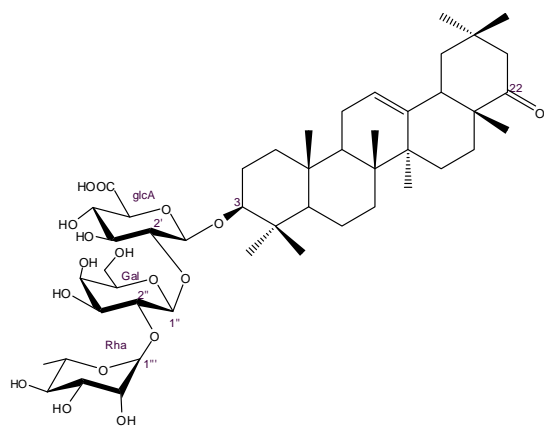
### Composé 13

3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-3 $\beta$ -hydroxy-22-oxo-oléan-12-ène

**Formule brute** : C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>17</sub>

**HR-ESI-SM**:  $m/z$  947,4970 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 15, page128).



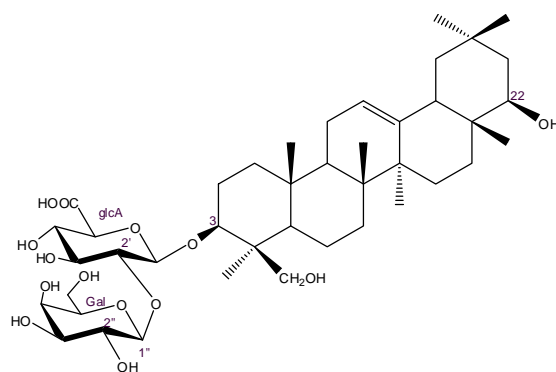
### Composé 14

3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,24-triol

**Formule brute** : C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>8</sub>

**HR-ESI-SM**:  $m/z$  819,4517 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 16, page132).



### Composé 15

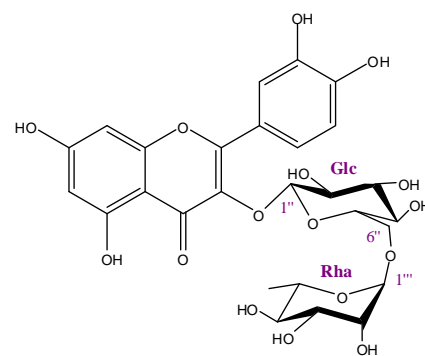
3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl] quercétine

**Formule brute** : C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

**HR-ESI-SM**:  $m/z$  633,1432 [M+Na]<sup>+</sup>

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 257, 358 nm

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 18, page138).



### Composé 16

3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]

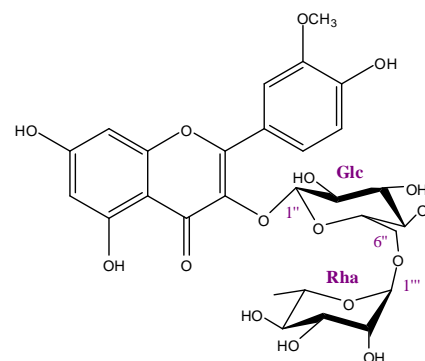
isorhamnetine

**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>O<sub>16</sub>.

**HR-ESI-SM**:  $m/z$  647,1619 [M+Na]<sup>+</sup>

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 254, 358 nm

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 20, page142).



### Composé 17

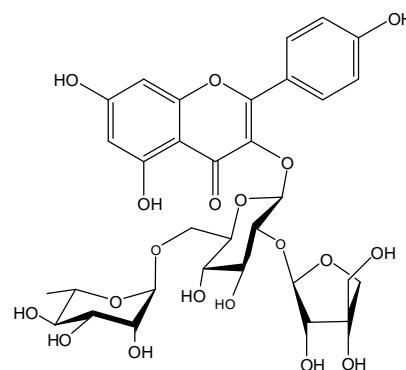
3-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl] kaempférol

**Formule brute** : C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 749,1915 [M+Na]<sup>+</sup>

**UV** : λ<sub>max</sub> (MeOH) 267, 352 nm

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 22, page148).



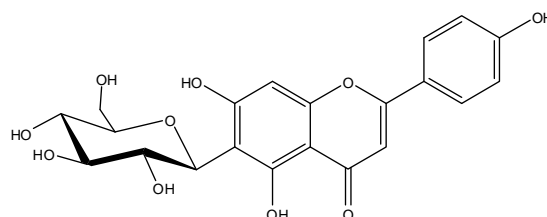
### Composé 18

6-C-β-D-glucopyranosylapigénine

**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 455,0948 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 23, page151).



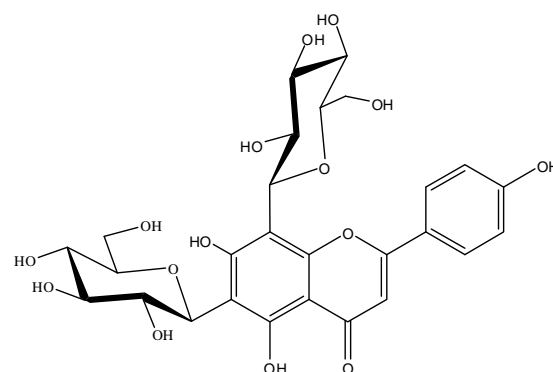
### Composé 19

6,8-di-C-β-D-glucopyranosylapigénine

**Formule brute** : C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 617,1472 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 24, page153).



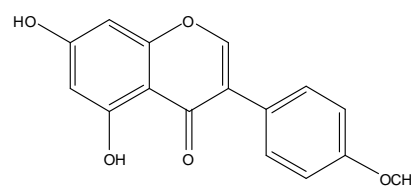
### Composé 20

5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone

**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

**HR-ESI-SM**: *m/z* 285,0759 [M+H]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 25, page156).



### **V.3. Etude de l'espèce *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt**

#### **V.3.1. Extraction des parties aériennes de *C. macrocarpum***

Les parties aériennes de *Chrysanthemum macrocarpum* ont été récoltées par Mr. Kamel Kabouche dans une station à quelques kilomètres de Ghardaïa. L'espèce a été identifiée par le Professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba).

Le matériel est mis à sécher à l'ombre, à l'abri de la chaleur et de l'humidité. Les parties aériennes séchées (1380g) sont pulvérisées et mises à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V).

Cette macération est répétée 3 fois (3×24 h). Après filtration puis concentration à une température n'excédant pas 45°C, on ajoute de l'eau distillée. Cette dernière solution a subi des extractions successives liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. La figure 120 montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *Chrysanthemum macrocarpum*. Les trois extraits sont évaporés à sec, puis pesés.

#### **V.3.2. Fractionnement et purification de la fraction chloroformique de l'espèce *C. macrocarpum***

10 g de la fraction chloroformique des parties aériennes de *C. macrocarpum* sont chromatographiés sur une colonne de silice avec un gradient d'élution Cyclohexane/Acétate d'éthyle [1:0 à 0:1]. Des fractions de 50 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM pour donner 20 fractions (tableau 45).

**Tableau 45:** Fractionnement de la fraction chloroformique sur colonne de gel de silice normale

| Eluant: Cyclohexane/Acétate | Fractions collectées  | Masse (mg)           |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|
| 100 :0                      | F1-F4                 | 397                  |
| 98:2                        | F5                    | 336,8                |
| 95:5                        | <b>F6</b><br>F7<br>F8 | 964<br>1739<br>248,7 |
| 90:10                       | <b>F9</b><br>F10      | 680<br>595,1         |
| 85 :15                      | F11                   | 1299                 |
| 80 :20                      | <b>F12</b>            | 2810,4               |
| 70 :30                      | F13<br>F14            | 1833,4<br>142,3      |
| 60 :40                      | F15                   | 49,3                 |
| 50 :50                      | F16                   | 56,7                 |
| 40 :60                      | F17                   | 112,6                |
| 20 :80                      | F18                   | 24                   |
| 0 :100                      | F19<br>F20            | 85,3<br>102          |

- **La fraction f<sub>6</sub> :**

La fraction f<sub>6</sub> (964 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'élution cyclohexane/CHCl<sub>3</sub> [1:0 à 8:2]. Les sous fractions [71-99] (290 mg) éluées avec le mélange cyclohexane/CHCl<sub>3</sub> (9:1) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le toluène 100 % comme éluant, ensuite les sous fractions [62-75] (141 mg) sont purifiées par CCM préparative en phase normale dans le gradient de solvant toluène-acétone (98:2) pour fournir les composés **22** (6,5 mg) et **24** (5mg).

**Tableau 46:** Fractionnement de la sous fraction F6 sur colonne de gel de silice normale.

| Eluant: cyclohexane-CHCl <sub>3</sub> | Sous fractions collectées  | Masse (mg)                |
|---------------------------------------|--|---------------------------|
| 100                                   | S <sub>F</sub> 1-2<br>S <sub>F</sub> 3-9<br>S <sub>F</sub> 10-12                                   | 107,3<br>70<br>0,5        |
| 98:2                                  | S <sub>F</sub> 13-15<br>S <sub>F</sub> 16-18   | 0,2<br>0,1                |
| 95:5                                  | S <sub>F</sub> 19-27<br>S <sub>F</sub> 28<br>S <sub>F</sub> 29-32<br>S <sub>F</sub> 33-34          | 0,8<br>1,4<br>7,3<br>2,8  |
| 90:10                                 | S <sub>F</sub> 35-39<br>S <sub>F</sub> 40-49<br>S <sub>F</sub> 50-70<br><b>S<sub>F</sub> 71-99</b> | 3,7<br>11,5<br>9,3<br>290 |
| 80:20                                 | S <sub>F</sub> 100   | 1117,8                    |

- **La fraction f<sub>9</sub> :**

La fraction f<sub>9</sub> (680 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'élution toluène-acétone [1:0 à 8:2] pour isoler le composé **25** (30 mg).

**Tableau 47:** Fractionnement de la sous fraction F<sub>9</sub> sur colonne de gel de silice normale.

| Eluant: toluène-acétone | Sous fractions collectées  | Masse (mg)          |
|-------------------------|--|---------------------|
| 100                     | S <sub>F</sub> 1-4<br>S <sub>F</sub> 5-6<br>S <sub>F</sub> 7-9             | 48,3<br>27,6<br>8,7 |
| 98:2                    | S <sub>F</sub> 12-14<br>S <sub>F</sub> 15-35<br><b>S<sub>F</sub> 36-50</b> | 5<br>25,2<br>24     |
| 95:5                    | <b>S<sub>F</sub> 51-54</b> }<br><b>S<sub>F</sub> 55-56</b> }               | 10<br>78,3          |
| 90:10                   | S <sub>F</sub> 57-59   | 15                  |
| 85 :15                  | S <sub>F</sub> 60-61   | 9,3                 |
| 80 :20                  | S <sub>F</sub> 70-71<br>S <sub>F</sub> 72-74                               | 52,2<br>18,4        |

Les sous fractions [36-50] (24 mg) éluées avec le mélange toluène-acétone (98:2) sont purifiées par CCM préparative en phase normale en utilisant le gradient de solvant toluène-acétone (96:4) pour fournir les composés **25** (2,3 mg) et **23** (8 mg).

Les sous fractions [51-56] (88,3 mg) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice normale avec un gradient d'élution toluène-acétone [1:0 à 9:1], ensuite les sous fractions [13-20] (35,3 mg) sont purifiées par CCM préparative en phase normale dans le système toluène-acétone (98:2) pour fournir le composé **21** (6mg).

- **La fraction f<sub>12</sub> :**

La fraction f<sub>12</sub> est filtrée sur silice normale par chromatographie liquide sous vide (VLC) avec l'éluant cyclohexane/AcOEt [9:1, 8 :2, 6 :4]. Des fractions de 150 ml sont réunies en fonction de leur profil en CCM en phase normale en utilisant le mélange de cyclohexane/ AcOEt (8:2). A l'issue de ce fractionnement primaire, 7 fractions sont recueillies (tableau).

**Tableau 48 :** VLC de la fraction f12

| Eluant: cyclohexane/AcOEt | Fractions collectées | Masse (mg) |
|---------------------------|----------------------|------------|
| 90 : 10                   | F1                   | 920,3      |
|                           | <b>F2</b>            | 256,3      |
|                           | F3                   | 51,5       |
| 80 :20                    | F4                   | 121,1      |
|                           | F5                   | 59,4       |
|                           | F6                   | 51,9       |
| 60 :20                    | F7                   | 22,3       |

La sous fraction f<sub>2</sub> (256,3 mg) est ensuite chromatographiée sur une colonne de silice en phase normale éluee par l'éther de pétrole/AcOEt (1:0 à 8:2) pour donner les composés **26** (25 mg) et **27** (15mg).

### **V.3.3. Fractionnement et purification de la fraction acétate d'éthyle de l'espèce *C. macrocarpum***

3,8 g de la fraction chloroformique des parties aériennes de *C. macrocarpum* sont chromatographiés sur une colonne de silice avec un gradient d'élution CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:0 à 0:1) pour donner 18 fractions. Le suivi de cette séparation est effectué par CCM dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:2). Les fractions de 50 ml sont réunies en fonction de leur profil en CCM.

**Tableau 49:** Fractionnement de la fraction acétate d'éthyle sur colonne de gel de silice normale

| Eluant: CHCl <sub>3</sub> /MeOH | Fractions collectées                  | Masse (mg)                     |
|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 100 :0                          | F1<br>F2                              | 32,9<br>668,2                  |
| 98:2                            | F3<br>F4<br>F5<br>F6                  | 423,7<br>127,8<br>96,5<br>22,6 |
| 95:5                            | <b>F7</b><br><b>F8</b><br><b>F9</b>   | 110,4<br>23,9<br>15,7          |
| 90:10                           | F11-12<br><b>F13-16</b><br><b>F17</b> | 113,7<br>491<br>25             |
| 85 :15                          | <b>F18-21</b>                         | 108                            |
| 80 :20                          | <b>F22</b><br>F23-27<br>F28-32        | 25<br>15<br>13,2               |
| 50 :50                          | F33-35<br>F36-44<br>F45-60            | 153<br>38<br>12                |
| 0: 100                          | F61                                   | 270                            |

- **Les fractions f<sub>7,9</sub> :**

Les fractions f<sub>7,9</sub> (150 mg) éluées avec le solvant CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice normale avec un gradient d'élution AcOEt /MeOH [99:1 à 8:2] pour isoler les composés **28** (13 mg) et **30** (10 mg).

- **Les fractions f<sub>13-16</sub> :**

Les fractions f<sub>13-16</sub> (491 mg) éluées avec le solvant CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice normale avec un gradient d'élution AcOEt /MeOH (1:0 à 6:4) pour donner 15 sous fractions. Les sous fractions [14-16] éluées avec le solvant AcOEt/MeOH (85:15) sont chromatographiées sur une colonne de silice greffée C<sub>18</sub> avec un gradient d'élution MeOH-H<sub>2</sub>O [6:4 à 1:0] pour donner 27 mg du composé **35** et 22 mg du composé **29**.

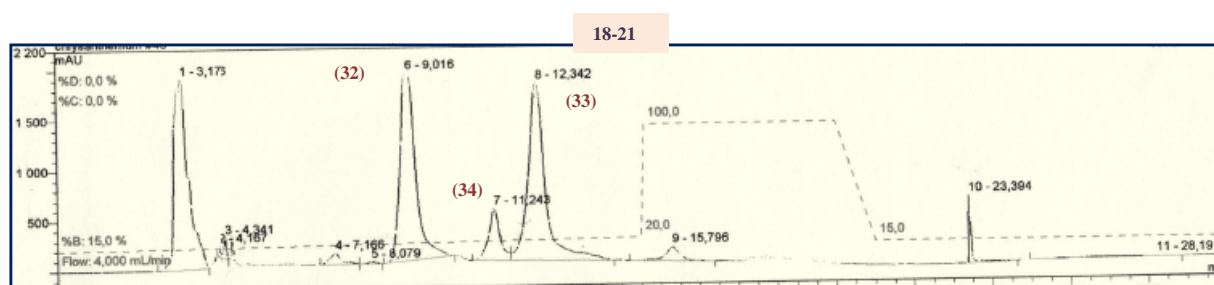


- La fraction  $f_{17}$  :

La fraction  $f_{17}$  (25 mg) éluée aussi avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) contient (4,4 mg) du composé **36**.

- Les fractions  $f_{18-21}$  :

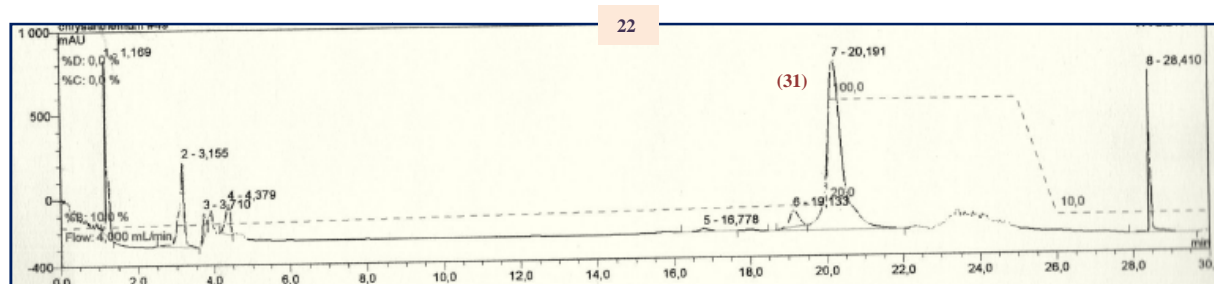
La sous fraction [18-21] (108 mg) éluée avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (85:15) a fait l'objet d'une purification par CLHP semi-préparative dans un gradient de 15% à 20%  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  pendant 20 min (figure166). Elle a permis l'isolement des trois composés **32** (3,5 mg,  $t_r = 9,01$  min), **33** (5,5 mg,  $t_r = 12,34$  min) et **34** (3,7 mg,  $t_r = 11,24$  min).



**Figure166** : Profil CLHP (254 nm) des produits purs isolés à partir des sous fractions [18-21]

- La fraction  $f_{22}$  :

La fraction  $f_{22}$  (25 mg) éluée avec le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (8:2) est purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 7 mg du composé **31** ( $t_r = 20,19$  min), éluant B : de 10% à 20% en 22 min (figure167).



**Figure167** : Profil CLHP (254 nm) des produits purs isolés à partir de la sous fraction [22].

### V.3.4. Extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. macrocarpum*

Une fraction (100g) des parties aériennes de *C. macrocarpum* sont hydrodistillées dans un Clevenger, durant 3 heures. L'huile essentielle obtenue, de couleur jaune et d'odeur très agréable, est conservée à +4°C jusqu'à son analyse GC et GC/MS.

### V.3.5. Composés isolés à partir de l'extrait chloroformique de *C. macrocarpum*

#### Composé 21

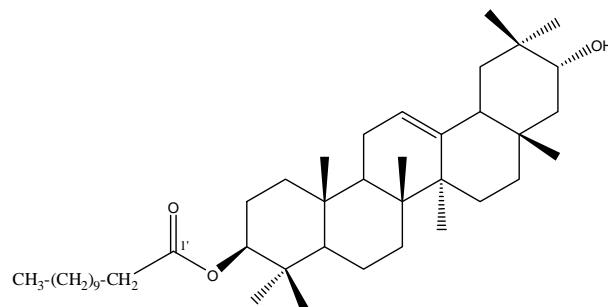
21- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amyrynyl-3- $\beta$ -laurate.

**Formule brute** : C<sub>42</sub>H<sub>76</sub>O<sub>3</sub>

$[\alpha]_D +15.5^\circ$  (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>)

**SM**:  $m/z$  652 [M+H]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>)  
(tableau 26, page166).



#### Composé 22

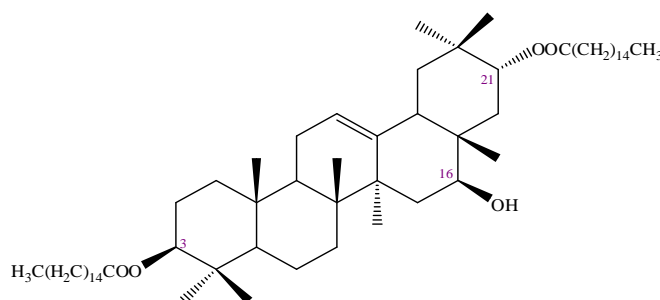
3,21-dipalmitoyloxy-16 $\beta$ , 21 $\alpha$ -dihydroxy- $\beta$ -amyryne.

**Formule brute** : C<sub>62</sub>H<sub>110</sub>O<sub>5</sub>

$[\alpha]_D +11.5^\circ$  (c 0.76, CHCl<sub>3</sub>)

**SM**:  $m/z$  957 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans  
(CDCl<sub>3</sub>) (tableau 27, page169).



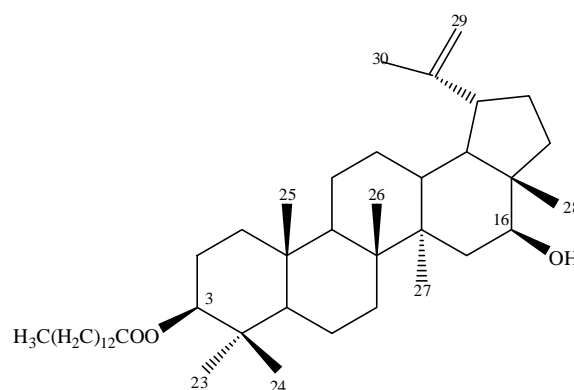
#### Composé 23

calenduladiol-3-*O*-myristate

**Formule brute** : C<sub>44</sub>H<sub>75</sub>O<sub>3</sub>

**SM**:  $m/z$  = 658 [M+ Li]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>)  
(tableau 28, page173).



### Composé 24

3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihydroxy-taraxast 20(30) $\eta$ -3-myristate

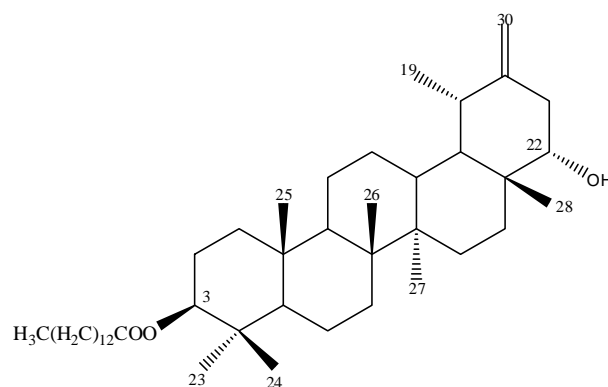
**Formule brute** : C<sub>44</sub>H<sub>75</sub>O<sub>3</sub>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +31.1° (c 0.18, CHCl<sub>3</sub>)

**SM**: *m/z* 658 [M + Li - H]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>)

(tableau 29, page177).



### Composé 25

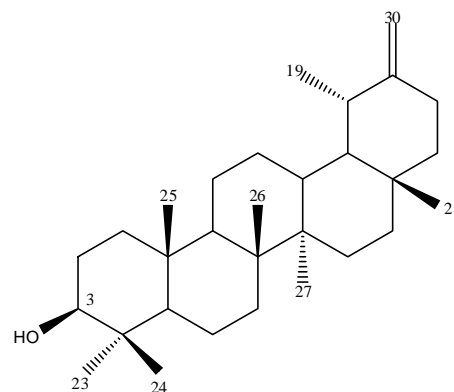
Taraxastérol

**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O

**SM**: *m/z* 426,40 [M]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CDCl<sub>3</sub>)

(tableau 30, page179).

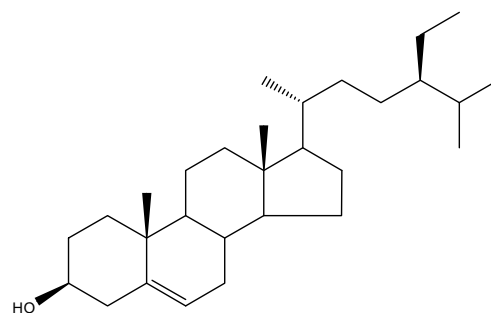


### Composé 26

$\beta$ -sitostérol

**Formule brute** : C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O

**SM**: *m/z* 414,3831 [M]<sup>+</sup>.

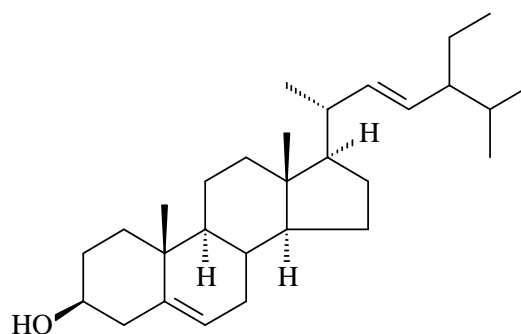


### Composé 27

stigmastérol

**Formule brute** : C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O

**SM**: *m/z* 412 [M]<sup>+</sup>.



### V.3.6. Composés isolés à partir de la fraction acétate d'éthyle de *C. macrocarpum*

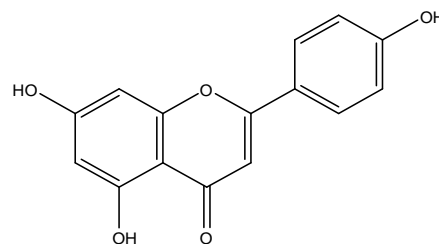
#### Composé 28

Apigénine

Formule brute :  $C_{15}H_{10}O_5$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 269, 334 nm

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 33, page190).



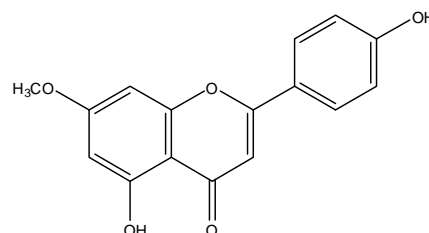
#### Composé 29

7-méthoxy-apigénine (Genkwanine)

Formule brute :  $C_{27}H_{30}O_{15}$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 268, 334 nm

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 33, page190).



#### Composé 30

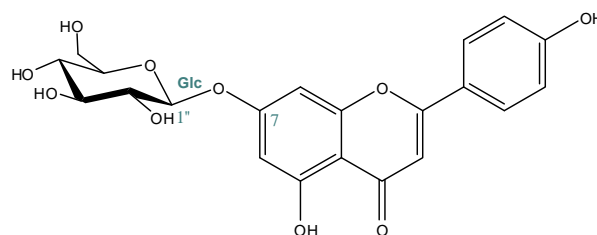
7-O-β-D-glucopyranosylapigénine

Formule brute :  $C_{21}H_{20}O_{10}$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 269, 334 nm

SM:  $m/z$  455,0948 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD) (tableau 33, page190).



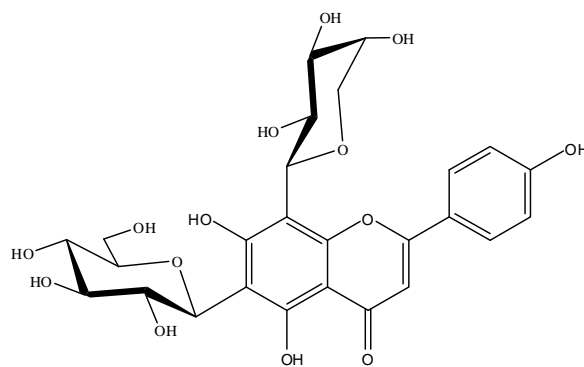
#### Composé 31

6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-arabinopyranosylapigénine

Formule brute :  $C_{16}H_{12}O_5$

SM:  $m/z$  285,0759 [M+H]<sup>+</sup>

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 33, page190).



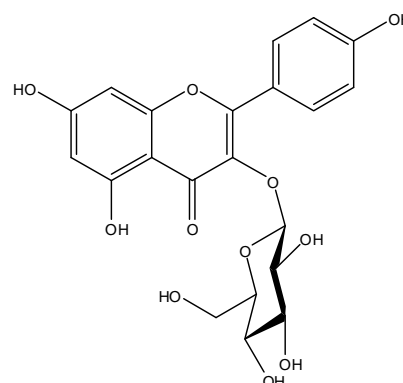
#### Composé 32

3-O-β-D-glucopyranosyl kaempférol

Formule brute :  $C_{20}H_{20}O_{11}$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH) 265, 356 nm

RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 35, page194).



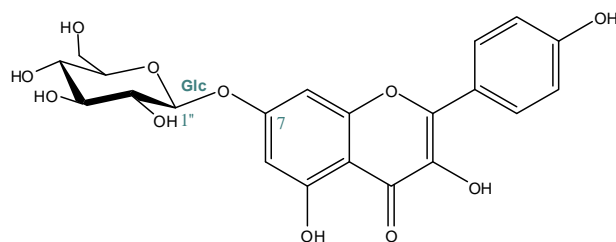
### Composé 33

7-*O*-β-D-glucopyranosyl kaempférol

**Formule brute :** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**UV :** λ<sub>max</sub> (MeOH) 265, 356 nm

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 35, page194).

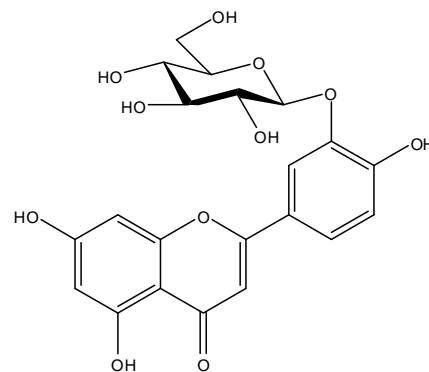


### Composé 34

3'-*O*-β-D-glucopyranosyl lutéoline

**Formule brute :** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 36, page196).



### Composé 35

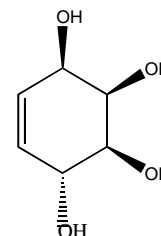
5-cyclohexène 1β,2β,3β,4αtétrahol

**Formule brute :** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

[α]<sub>D</sub> -209.5° (c 0.27, MeOH)

**SM:** m/z 169 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 37, page 201).



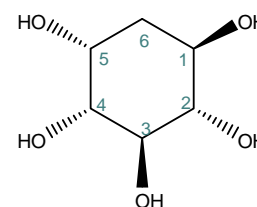
### Composé 36

Viburnitol

**Formule brute** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

**SM:** m/z 187 [M+Na]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) dans (CD<sub>3</sub>OD) (tableau 37, page 201)



## V.4. Etude de l'activité antibactérienne

### V.4. 1. Les souches bactériennes

Les microorganismes, qui ont été testés pour évaluer l'activité antibactérienne de la fraction chloroformique de *Chrysanthemum.macrocarpum*, sont les suivants.

- ✓ Quatre souches bactériennes de collection internationale ATCC (American type culture collection) fournies par l'institut Pasteur d'Alger :
  - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),
  - *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),
  - *Escherichia coli* (ATCC 25922),
  - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).
- ✓ Une souche bactérienne clinique isolée à partir d'un patient hospitalisé au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Constantine : *Klebsiella pneumoniae*.

### V.4. 2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont comme suit :

- La gélose Héктоen pour l'isolement des souches *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis*.
- La gélose Chapman pour l'isolement de *S. aureus*.
- La gélose Nutritive pour l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller-Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries à la fraction chloroformique de *Chrysanthemum.macrocarpum*.

### V.4. 3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'une culture bactérienne de 18 à 24 heures, cultivée sur milieu gélosé et incubée à 37°C. Deux à trois colonies de chaque bactérie, sont ensuite prélevées de la gélose et transférées dans 9 ml d'une solution saline (0,9 % de NaCl), ajustée à une turbidité de 0,5 par la méthode de Mac Farland standard [171].

#### **V.4. 4. Évaluation de l'activité antibactérienne de la fraction chloroformique de *C.macrocarpum***

##### **V.4. 4.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)**

L'activité antibactérienne de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum*, est mise en évidence par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton [172, 173]. Des disques stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés de 10 µl d'une concentration de 128 mg/ml à partir d'une solution mère de la fraction chloroformique (soit 128 µg pour chaque disque).

A l'aide d'une pince stérile, ces disques sont déposés délicatement sur l'agarensemencé, préalablement, avec une suspension bactérienne des souches de références ATCC et de la souche clinique.

Des disques imprégnés d'Ampicilline (10 µg/ml) servant de témoin positif, ont été aussi déposés sur la surface de la gélose inoculée. Après 20 minutes de prédiffusion des solutions, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 18 heures.

Après incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

##### **V.4. 4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de macro-dilution NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) en milieu solide. Il s'agit ici, de déterminer les plus petites concentrations, auxquelles la fraction présente encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu, après un temps d'incubation de 18 à 24 heures.

###### **▪ Préparation de l'inoculum**

L'inoculum est préparé à partir d'une culture en phase stationnaire de la bactérie à étudier en repiquant 0,1 ml (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*) et 0,3 ml (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) de la culture de 18 heures dans 10 ml de bouillon MH. Cette culture est ensuite placée au bain-marie, avec agitation à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence (environ  $5 \times 10^7$  bactéries/ ml). Le bouillon ainsi

obtenu, est dilué en mélangeant 1 ml de ce dernier à 10 ml de bouillon MH, préalablement chauffé à 37°C.

- **Préparation de la gamme de concentration de la fraction chloroformique de *C. macrocarpum***

Une solution mère de la fraction chloroformique est obtenue en éthanol (d'une concentration finale de 512 µg/ ml). Par la suite, une série de dilutions de raison géométrique 1/2, est réalisée extemporanément en bouillon MH à partir de la solution mère, allant de 128 à 0,5 µg/ ml (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5). Deux millilitres de chaque dilution de la fraction, sont alors incorporés à 18 mL de gélose MH. Les mélanges sont immédiatement répartis dans des boîtes de pétri, à raison de 20 ml de milieu par boîte. Les boîtes de pétri sont laissées quelques minutes sur la paillasse, pour solidifier la gélose, puis séchées pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C (boîtes ouvertes).

Après solidification, l'inoculation bactérienne des géloses MH contenant la fraction (essai) ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de stries à l'aide d'une pipette rodée ou une anse de platine. Enfin, les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C.

- **La lecture**

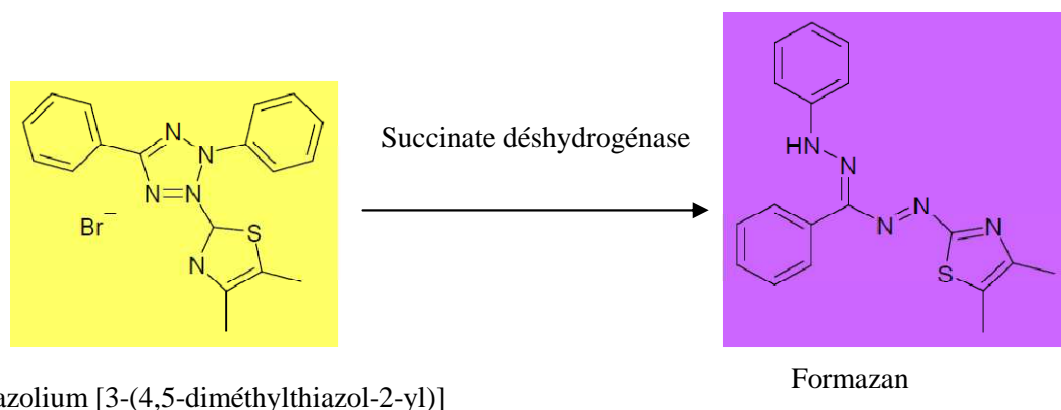
Après incubation à 37 °C pendant 18 heures, la CMI est définie comme étant la plus petite concentration de la fraction d'étude pour laquelle aucune croissance n'est visible, comparativement au témoin sans fraction.



## V.5. Évaluation de l'activité antiproliférative

### V.5. 1. Test de viabilité :

Afin d'évaluer l'activité antiproliférative de la fraction chloroformique, un test de viabilité des cellules est réalisé. Ce test est basé sur la transformation d'un sel de tetrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique (figure 168)



**Figure 168 :** Réaction mise en jeu lors du test de viabilité cellulaire au MTT.

#### V.5. 1.1. Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées

Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées pour évaluer l'activité antiproliférative sont des cellules cancéreuses adhérentes humaines :

- ✓ HT-29 dérivant du carcinome colorectal.
- ✓ PC-3 dérivant du carcinome de la prostate.

#### V.5. 1.2. Mode opératoire

Les cellules HT-29 et PC-3 sontensemencées dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup>, et après 24 à 48 h d'incubation, les tapis cellulaires alors confluents sont soumis à l'action de la trypsine pour individualiser les cellules. Deux plaques de 96 puits, pour les deux temps d'incubation qui seront testés (24 h et 48 h), sontensemencées à 10<sup>4</sup> cellules/puits, chaque puits recevant 100 µl de suspension cellulaire. Les plaques sont ensuite remises à l'étuve pendant 24 heures afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. Pour chaque plaque, une série de puits est remplie uniquement de milieu de culture afin de servir de négatif.

Une solution mère est préparée dans le DMSO puis diluée dans du milieu de culture pour obtenir différentes concentrations (20-140 µg/ml). Après 24 h de prolifération, le surnageant

est retiré et les cellules en phase exponentielle de croissance sont traitées soit par 100 µl des concentrations croissantes de la fraction à tester ou par 100 µl du DMSO.

La solution de produits à tester ne représente pas plus de 1% du volume final du milieu dans chacun des puits, car le DMSO a une action cytotoxique trop importante sur les cellules à des concentrations supérieures. Chacune des plaques contient des puits dans lesquels le mélange milieu de culture/échantillon a été remplacé par un mélange milieu de culture/solvant afin de servir de témoin positif (figure169). Pour chaque temps étudié, 10 µl de la solution MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits analysé. Après 4 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100 µl d'une solution de lyse (SDS : 10% ; HCl : 0,01 N) sont ajoutés par puits de la plaque d'analyse, afin de solubiliser les cristaux de colorant formé, de lyser les cellules et d'éliminer les interférences potentielles que pourraient occasionner la présence de ces cellules dans le milieu lors de la lecture des résultats. A l'issue de ces 4 h, les mesures spectrophotométriques sont effectuées sur un lecteur de plaques ELISA à la longueur d'onde de 540 nm.

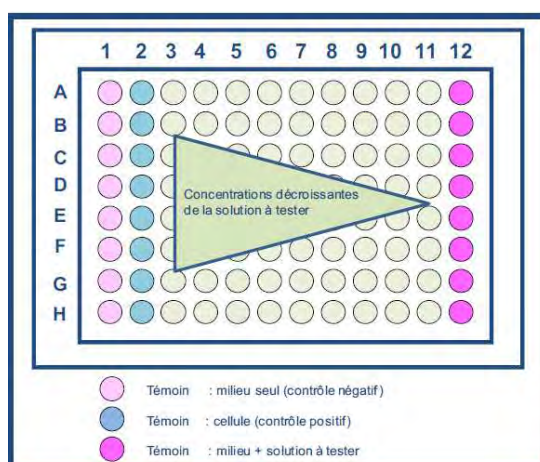
Les pourcentages de viabilité des cellules en présence des molécules à tester sont alors calculés grâce à la formule suivante :

$$\text{Pourcentages de viabilité \%} = \frac{(T^+ - \text{fraction})}{(T^+ - T^-)}$$

**T<sup>+</sup>** : la valeur moyenne de l'absorbance du témoin positif.

**fraction** : la valeur moyenne de l'absorbance correspondant à la mesure des puits contenant des cellules et le mélange milieu de culture/échantillon.

**T<sup>-</sup>** : représente la valeur moyenne de l'absorbance du témoin négatif.



**Figure169** : Schéma des plaques 96 puits dans le test MTT.

## **V.6. Evaluation de l'activité analgésique, anti-inflammatoire et anti-ulcéreuse**

### **V.6.1. Réactifs et produits chimiques**

Indométacine (Sigma, USA), acide acétylsalicylique (El Vasr Co., l'Egypte), carraghénine (BDH, l'Angleterre), Tween 80(Sigma, l'Allemagne), Eau physiologique (saline) (Sigma, l'Allemagne).

### **V.6.2. Animaux**

Les animaux ont été fournis par l'animalerie du Centre National de Recherche (N.R.C), Le Caire, Egypte.

Les essais de toxicité aiguë, l'étude analgésique périphérique et l'étude anti-inflammatoire et anti-ulcère ont été réalisés selon les Directives du Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE) [9], sur des souris albinos (la souche Swiss NMRI), adultes des deux sexes pesant de (20-25g) et des rats albinos (la souche Wistar) mâles adultes pesant de (120-150g). Les animaux ont été gardés dans les conditions normales de laboratoire : l'humidité, la température ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) et la lumière (15 jours : 15 nuits) et accès libre à l'eau de robinet et nourriture.

### **V.6.3. Préparation de la fraction chloroformique**

La fraction chloroformique de *C .macrocarpum* a été dissoute dans le Tween-80 (solution aqueuse de 7%) comme véhicule.

### **V.6.4. La toxicité aiguë : dose létale 50 (DL<sub>50</sub>)**

Les animaux ont été maintenus à jeun 18 h avant le début de chaque expérimentation. Pour la détermination de la DL<sub>50</sub> des groupes de 5 souris des deux sexes (20-25g) ont été utilisés, un groupe injecté par un volume correspondant à 0,2 ml du véhicule (Tween 80) a servi pour le contrôle. La fraction chloroformique a été administrée par gavage gastrique (voie orale) à des doses croissantes de 500-10000 mg/kg masse corporelle. Les animaux ont été observés et les taux de mortalité ont été enregistrés dans les premières 24 heures après l'administration de la

fraction chloroformique. La  $DL_{50}$  a été déterminée selon la méthode de Behrens et Kerbers [163]:

$$DL_{50} = D_m - \frac{\sum (z \times d)}{n}$$

$D_m$  = la plus haute dose tuant tous les animaux.

$z$  = la moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives.

$d$  = la différence entre deux doses consécutives.

$n$  = nombre d'animaux utilisés par lot

Les animaux sont gardés en observation pendant 15 jours, au cours desquels sont notées les variations de poids corporel, les signes de toxicité et le taux de mortalité.

### V.6.5. Évaluation de l'activité analgésique

Le test de Koster, utilisé pour la recherche d'activité analgésique périphérique, consiste à détecter une éventuelle protection vis-a-vis des crampes et torsions abdominales provoquées par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique 2 %. Six lots ont été constitués, soit :

- ✓ Un lot témoin recevant par voie orale 0,1 ml de l'eau physiologique servant de contrôle.
- ✓ Trois lots expérimentaux de 6 souris chacun recevant par voie orale la fraction chloroformique à des doses de 500-10000 mg/Kg masse corporelle.
- ✓ Deux lots de 6 souris ont reçu par la même voie une solution de l'acide acétylsalicylique (200mg/kg) (médicament de référence).

30 minutes après l'administration des différents traitements. Les animaux ont reçu par voie intrapéritonéale une solution fraîche à 2% d'acide acétique (2 % P/v dans l'eau physiologique; pH = 2.7; 10ml/kg. Masse corporelle) dans l'eau physiologique.

Les animaux ont été alors placés immédiatement dans des cages à l'individu, cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de torsion a été compté chez chaque souris durant 20 minutes.

L'effet analgésique a été évalué selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \left[ 1 - \frac{W_t}{W_b} \right] \times 100$$

$W_t$  représente la moyenne du nombre de torsions des souris du lot témoin traité

$W_b$  représente la moyenne du nombre de torsions des souris du lot témoin blanc.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (M) des torsions effectuées dans chaque groupe  $\pm$  déviation standard (DS).

#### V.6.6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'étude sur l'activité anti-inflammatoire a été menée suivant la méthode décrite par Winter et al. [165]. L'inflammation aiguë a été induite par l'injection de 0,1ml d'une suspension de 1% de carragénine dans l'eau physiologique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. Un volume égal de l'eau physiologique a été injecté dans l'autre patte, servant de contrôle. Les mesures du volume de la patte ont été effectuées avant l'injection de la carragénine et 4 heures après.

Une heure avant l'injection de la carragénine, les différents lots de rats ont reçu, par voie orale, les différents traitements:

- ✓ Le lot témoin de 6 rats a reçu 0,1ml de l'eau physiologique.
- ✓ Trois lots expérimentaux de 6 rats chacun a reçu la fraction chloroformique à la dose de 5000 mg/Kg de masse corporelle.
- ✓ Deux lots de 6 rats ont reçu par voie orale l'indométacine comme produit de référence à la dose de 5 mg/kg.

Quatre heures après les différents traitements, les rats ont été sacrifiés et la patte était rapidement excisée. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en pourcentage de réduction de l'œdème chez des rats traités par rapport aux témoins blancs selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A représente la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des rats du lot témoin blanc.

B représente la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des rats des lots traités.

### **V.6.7. Évaluation de l'activité anti-ulcéreuse**

Trois lots de rats masculins adultes de six animaux chacun (110-150g), ont reçu par voie orale et pendant quatre jours consécutifs la dose de 5000mg/kg de poids corporel de la fraction chloroformique.

Quatre heures après le dernier dosage, les animaux ont été sacrifiés, leur estomac a été excisé et le nombre d'ulcères a été déterminé selon la méthode de Correll et al [166].

### **V.6.7. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  DS, la comparaison statistique entre des différents groupes ont été faites par l'analyse des variations (ANOVA) suivie par des essais comparatifs multiples (Post hoc Dunnett's). Les différences sont considérées comme significatives si  $p$  est inférieur à 0,05 comparativement au témoin.

## Références bibliographiques

- [1] **Quezel, P., Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
- [2] **Tosun, F., Tanker, M., Ozden, T., Tosun, A. (1987).** Alkaloids of *Genista involucrata* and *Genista albida*. *Planta Medica*, 58, 499-505.
- [3] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Morelli, I., Rubiolo, P., Bicchi, C. (2001).** Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 137-141.
- [4] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., and Manumata, A. (1998).** Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Product*, 61 (11), 1404-1406.
- [5] **Pistelli, L., Giachi, I., Potenza, D., Morelli, I. (2000).** A New Isoflavone from *Genista corsica*. *Journal of Natural Product*, 63, 504–506.
- [6] **Ozenda, P. (1977).** Flore du Sahara, 2<sup>ème</sup> édition, Centre national de la recherche scientifique, Paris, p 437.
- [7] **Lee, J., Kim, H., & Lee, Y. (2003).** New anti-HIV flavonoid glucuronid from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Medica*, 69, 859–861.
- [8] **Khallouki, F., Hmamouchi, M., Younos, C., Soulimani, R., Essassi, E.M. (2000).** A new flavonoid from the aerial parts of *Chrysanthemum "iscidehirtum*. *Fitoterapia*, 71, p 413-416.
- [9] **Long-Ze ,Lin., James M, Harnly L. (2010).** Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower *Chrysanthemum morifolium Ramat*. *Food Chemistry*, 120, 319–326.
- [10] **Yasukawa K., Akihisa T., Kasahara Y., Ukiya M., Kumaki K., Tamura T., Yamanouchi S., Takido M. (1998).** Inhibitory effect of heliantriol C; a component of edible *Chrysanthemum*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Phytomedicine*, 5, 215-218.
- [11] **Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. Stevens P. (2002).** Botanique systématique. Une perspective phyllogénétique. Paris, Bruxelles, De Boek Université, 282.
- [12] **Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmoned D. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH - Lausanne.

- [13] **Heywood, V.H. (1996).** Flowering Plants of the World. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152.
- [14] **Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. Jeanmonod, D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 202-211.
- [15] **Dupont F. Guignard J.L. (2012).** Abrégé de Botanique 15ème édition. Editions Masson, Paris.
- [16] **Wojciechowski M.F., Lavin M. Sanderson M.J. (2004).** A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany, 11, 1846-2004.
- [17] Gardens Ablaze. *Lathyrus oderatus* [consulté le 08/12/2012]. Disponible à partir de : [http:// www.botanique.org](http://www.botanique.org).
- [18] **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.
- [19] **Maire, R. (1987).** La flore de l’Afrique du Nord. Les légumineuses, Le chevalier Ed. Paris XVI.
- [20] - Les Fabaceae  
*Genista pilosa* [consulté le 08/12/2012].  
Disponible à partir de : [http://www.herbierimages.be/index\\_fichiers/fabaceae.html](http://www.herbierimages.be/index_fichiers/fabaceae.html).
- [21] **Rauter, A. P., Martins, Al., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro,L. M., Araujo, M., Borges, C., Justino, J., Silva, F., Goulart, M., Thomas-Oates., Rodrigues, J. A., Edwards, E., Noronha, J., Helder Mota-Filipe, R. P. (2009).** Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. Journal of Ethnopharmacology, 122, 384–393.
- [22] **Adams, M., Berset, C., Kessler, M., Hamburger, M. (2009).** Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders. A survey of European herbals from the 16th and 17th century. Journal of Ethnopharmacology, 121, 343–359.
- [23] **Guarrera, P.M., Leporatti, M.L. (2007).** Ethnobotanical remarks on Central and Southern Italy. Journal of. Ethnobiology. Ethnomedicine, 3, 23.
- [24] **Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldinic, M. T, Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., Senatore, F. (2009).** *Genista sessilifolia*, and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. Chémico-Biological Interactions, 18, 211–219.



- [25] **Harionov, I. (1988).** Pharmacologic effects on the reproductive system and anti-inflammatory action of the Total flavonoides mixtures contained in *G.tinctoria* and *G. sessilifolia*. Farmatsiya , 38, 47-51.
- [26] **Korpachov, V. V., Lifvinenko, O. O. and Paster, I. P. (1995).** Effect of *Genista tinctoria* extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism Ukraine, farmatsevtichnii zhurnal (Kiev), 5, 82-86.
- [27] **Rensen, I. V., Wray, V., Witte, L., Canto, P., Greinwald, R., Veen, G., Veit, M., Czygan, F.C. (1993).** Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. Phytochemistry, 35, 421-424.
- [28] **Nasution, M.P., Hussain, R.A., Kinghorn, A.D. (1991).** 10 $\alpha$ -Hydroxymethyl sparteine, A new type of Quinolizidine alkaloid from *Genista sessilifolia*. Tetrahedron Letters, 132, 5915-5918.
- [29] **Noccioli, C., Meini, L., Cecilia Loi, M., Potenza, D., Pistelli, L. (2011).** A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. Phytochemistry Letters, 4, 342-344.
- [30] **Giachi, I., Manunta, A., Morelli, I., and Pistelli, L. (2002).** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. Biochemical Systematics and Ecology, 30, 801-803.
- [31] **Harborne, J.B., Turner, B.L. (1984).** Plant Chemosystematics, Academic Press, London.
- [32] **Bremer K. (1994).** Asteraceae, Cladistics and Classification. (Timber Press), pp. 752, Portland, Oregon.
- [33] **Barkely, T.M., Brouillet, L., Strother, J.L. (2006).** Flora of North America- Asteraceae 19, 3-69.
- [34] Herbar numérique *Leucanthemum vulgare*, [Taraxacum officinale](#), [Carduus nutans](#) [consulté le 22/07/2012]. Disponible à partir de : <http://www.herbier-a3v.org/herbiernum/familles.php>
- [35] **Usher, G. (1966).** A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics constable & Co Ltd, London.
- [36] herbar numérique *Taraxacum campylodes* [consulté le 22/07/2012]. Disponible à partir de : <http://sequoia.tela-botanica.org/herbiera/herbiernum/fiche.php>
- [37] **Gaussen, H., Leroy, F. (1982).** Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2<sup>ème</sup> édition, 424- 426.

- [38] L'encyclopédie des arbres et des jardins Les Chrysanthème [consulté le 08/12/2012]. Disponible à partir de : <http://www.joomlart.com/>
- [39] **Kumar, A., Singh, S. P., Bhakuni, R. S. (2005).** Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities, current science, 89, 1489.
- [40] **Cheng, W., Li, J., You, T., Hu, C. (2005).** Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. Journal of Ethnopharmacology, 101, 334–337.
- [41] **Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology, 35, 123.
- [42] **Kim, H.J., Lee, Y.S. (2005).** Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. Planta Medica, 71, 871–876.
- [43] **Miyazawa, M., Hisama, M. (2003).** Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67, 2091–2099.
- [44] **Jiang, H., Xia, Q., Xu, W., Zheng, M. (2004).** *Chrysanthemum morifolium* attenuated the reduction of contraction of isolated rat heart and cardiomyocytes induced by ischemia/reperfusion. Farmazie, 59, 565–567.
- [45] **Choi, Y.J. (1992).** Korean Traditional Herbal Plants. Academic Press, Seoul, Korea, p. 53.
- [46] **Kwon, H. S., Ha, T. J., Hwang, S. W., Jin, Y. M., Nam, S. H., Park, K. H., Yang, M. S. (2006).** Cytotoxic flavonoids from the whole plants of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura. Korean Journal of Life Science, 16, 746–749.
- [47] **Hata, Y., Zimmermann, S., Quitschau, M., Kaiser, M., Hamburger, M and Adams, M. (2011).** Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of pyrethrins and pyrethroids Journal of Agricultural. Food Chemistry, 59, 9172–9176.
- [48] **Park, K.H., Yang, M. S., Park, M.K., Kim, S.C., Yang C.H., Park, S. J., Lee, J.R. (2009).** A new cytotoxic guaianolide from *Chrysanthemum boreale*. Fitoterapia, 80, 54–56.
- [49] **Kim, Y., Han, J., Sung, J., Sung, M., Choi, Y., Jeong, H.S., Lee, J. (2012).** Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* leaf extract through haem oxygenase-1 induction. Journal of Functional Food, 4, 474 – 479.
- [50] **Yoshikawa, M., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S., Matsuda, H. (2000).** Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type, sesquiterpenes, Kikkanols D, D Monoacetate, E, F and F Monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. Chemical Pharmaceutical. Bulletin, 48, 651–656.

- [51] **Lin, L.Z., Harnly, J. M. (2010).** Identification of the phenolic components of *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Food Chemistry, 120, 319–326.
- [52] **Ochocka, R. J., Rajzer, D., Kowalski, P., Lamparczyk H. (1995).** Coumarins from *Chrysanthemum segetum*, Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 709, 197-202.
- [53] **Khallouki, F., Hmamouchi, M., Younos, C., Soulimani, R., Bessiere, J. M., Essassi. E. M. (2000).** Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Chrysanthemum viscidhirtum*. Fitoterapia, 71, 544–546.
- [54] **Motohiko, U., Toshihiro, A., Harukuni, T., Hiroyukis, S., Hoyoku, N. (2002).** Constituents of Compositae plants III. Anti tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpen diols from edible *Chrysanthemum* flowers. Cancer letters, 177, 7-12.
- [55] **Hagmar B. (1969).** European Journal of Pathology, 4, 283.
- [56] **Boutaghane, N., Kabouche, A., El-Azzouny, A. M., Kabouche, Z. (2008).** Composition of the essential oil of *Chrysanthemum macrocarpum* from Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 44, 817- 818.
- [57] **Robles, M., Aregullin, M., West, J., Rodriguez, E. (1995).** Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. Planta Medica, 61, 199-203.
- [58] **Picman, A. K. (1986).** Biological activities of sesquiterpene lactones. Biochemical Systematics and Ecology, 14, 255-281.
- [59] **Wilkomirski, B., Dubielecka, B. (1996).** Sterol content as a similarity marker of different organs of two varieties of *Chrysanthemum parthenium*. Phytochemistry, 42, 1603-1604.
- [60] **Agrawal, P.K., Markham, K.R. (1989).** Introduction in Carbon-13 NMR of flavonoids. Agrawal P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam. pp 1-31.
- [61] **Harborne, J.B. (1988).** The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall. London.
- [62] **Hollman, P.C.H., Arts I.C.W. (2000).** Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1081-1093.
- [63] **Pietta, P. (2000).** Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 1035-1042.

- [64] **Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000).** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
- [65] **Magnania, L., Gaydoua, E.M., Hubaudb, J.C. (2000).** Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, 411, 209-216
- [66] **Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353.
- [67] **Lacaille-Dubois, M. A. (2000).** Biologically and Pharmacologically active saponins from plants : recent advances in Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal plants. Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, pp 205.
- [68] **Kaipnazarov, T.N., Uteniyazov, K.K., Saatov, Z. (2004).** The structure of cyclostipuloside E from *tragacantha stipulosa* Boriss. In: International conference on saponins. Phytochemistry and application of plant saponins. Pulaway: Institute of soil science and plant cultivation, pp 82.
- [69] **Hostettmann, K., Marston, A. (1995).** Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins. Cambridge University Press, 117.
- [70] **Dey, P.M., Harborne J.B. (1991).** Methods in plant biochemistry. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
- [71] **Manitto, P. (1981).** Biosynthesis of natural products. John willey et sons. New york.
- [72] **Voutquenne, L. (1997).** saponines et activité hémolytique. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae.Th 3 cycle: Pharm, 208.
- [73] **Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Delaude, C. (1998).** saponins from *Harpullia cupanioides*. *Phytochemistry*, 49, 2081-2085.
- [74] **Voutquenne, L. Kokougan, C., Lavaud, C., Pouny, I., Litaudon, M. (2002).** Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austro-caledonica*. *Phytochemistry*, 59, 825-832.
- [75] **Voutquenne, L., Guinot, P., Thoison, O., Sevenet, T., Lavaud, C. (2003).** Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. *Phytochemistry*, 64, 781-789.
- [76] **Mahato, S.B, Ganguly, A.N., Sahu, N.P. (1982).** Steroid saponins. *Phytochemistry*, 21, 959-78.
- [77] **Lanzetta, R., Laonigro, G., Parilli, M., Breitmaier, E. (1984).** Glycosides from *Muscaricomosum*. 6. Use of homo- and heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic

resonance spectroscopy for the structure determination of the novel glycoside muscaroside C. Canadian journal of Chemistry, 62, 2874-8.

[78] **Sadler, I.H. (1988)**. The use of N.M.R. spectroscopy in the structure determination of natural products: one-dimensional methods. Natural Product Rep, 5, 101-27.

[79] **Günther, H. (1996)**. La spectroscopie de RMN : principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie. Paris, Masson

[80] **Massiot, G., Lavaud, C., Le Men-Olivier, L., Van Binst, G., Miller, S.F., Fales, H.M. (1988)**. Structural elucidation of alfalfa root saponins by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis. Journal of the Chemical Society Perkin Transaction 1, 3071-79.

[81] **Yoshikawa, K., Shimono, N., Arihara, S. (1992)**. Antisweet natural products. VI. Jujubasaponins IV, V and VI from *Zizyphus jujuba* MILL. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 40, 2275-8.

[82] **Bax, A., Summers, M.F. (1986)**. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. Journal of the American Chemical Society, 108, 2093-2094.

[83] **De Hoffmann, E., Charrette, J. et Stroobant V. (1994)**. Spectrométrie de masse. Paris, Masson.

[84] **Mukherjee, P. K., Saha, K., Das, J. Pal, M. and Saha B. P. (1997)**. Anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera* Planta Medica, 63, 367-369.

[85] **Recio, C. M., Giner, R. M., Manez, S., Gueho, J., Julien H.R., Hostettmann, K., Rios, J. (1995)**. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. Planta Medica, 61, 9-12.

[86] **Najid, A., Simon, A., Cook, J., Chable-Rabinobitch, H., Delage, C., Chulia, A., Riguid, M. (1992)**. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. , FEBS Letter, 299, 213-217.

[87] **Somova, L. I., Shode, F.O. Mipando, M. (2004)**. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. Phytomedicine, 11, 121-129.

[88] **Geetha, T., Varalakshmi, P. (1998)**. Anti inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant induced arthritis, Fitoterapia, 69, 13-19.

- [89] **Nigam, N., Prasad, S., George, J., Shukla, Y. (2009).** Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 253-258.
- [90] **Moriarity, D. M., Huang, J., Yancey, C. A., Zhang, P., Setzer, W. N., Lawton, R. O., Bates, R. B., Caldera, S. (1998).** Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. *Planta Medica*, 64, 370-372.
- [91] **Oliveira F. A., Gerardo M. Vieira-Júnior, Vietla S. N. Rao. (2004).** Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats, *Pharmacological Research*, 49, 105-111.
- [92] **Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Rosendo A., Yunes, João C. (2001).** Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*, *Life Sciences*, 69, 2225-2236.
- [93] **Aragao, G. F., Carneiro, L.M.V., Junior, A.P.F., Vieira, L.C., Bandeira, P.N., Lemos, T.L.G., de B. Viana G.S. (2006).** A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and behavior* 85, 827-834.
- [94] **Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2002).** The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587-605.
- [95] **Wachter, G. A., Valcic, S., Franzblau, S. G., Suarez, E. et Timmermann B. N. (2001).** Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *Journal of Natural Products*, 64, 37.
- [96] **Zhang, J., Meng, Z., Zhang, M., Ma, D., Xu, S., Kodama, H. (1999).** Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clinica Chimica Acta*, 289, 79.
- [97] **Lacaille-Dubois, M. A., Hanquet, B., Cui, Z. H., Lou Z. C., Wagner, H. (1999).** A new biologically active acylated triterpene saponin from *Silene fortunei*. *Journal of Natural Products*, 62, 133.
- [98] **Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Le Men-Olivier, L. (2002).** Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical Biology*., 40, 253-262.
- [99] **Sparg, S. G., Light, M. E., van Staden, J. (2004).** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- [100] **Melzig, M. F., Bader, G., Loose, R. (2001).** Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica*. 67, 43-48.

- [101] **Winter, W. P. (1994)**. Mechanism of saponin induced red cell hemolysis: Evidence for the involvement of aquaporin CHIP28. *Blood*, 84, suppl. 1 à 10, abstr. 445.
- [102] **Deng, S., Yu, B.; Xie, J., Hui, Y. (1999)**. Highly efficient glycosylation of sapogenins. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 7265-7266.
- [103] **Yui S., Ubukata K., Hodono K., Kitahara M., Mimaki Y., Kuroda M., Sashida Y. et Yamazaki M. (2001)**. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *International Immunopharmacology*, 1, 1989.
- [104] **Li, M., Han, X., Yu, B. (2003)**. Synthesis of monomethylated dioscin derivatives and their antitumor activities. *Carbohydrate, Research*, 338, 117-121.
- [105] **Plohmman, B., Bader, G., Hiller, K., Franz, G. (1997)**. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins, *Pharmazie*, 52, 953-957.
- [106] **Lacaille-Dubois, M. A. (1999)**. Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner H, editor. *Immunomodulatory agents from plants*. Switzerland (Basel): Birkhäuser Verlag, 1 243-272.
- [107] **Lacaille-Dubois, M. A., Hanque,t B., Rustaiyan A., Wagner H. (1993)**. Squarroside A, a biologically active triterpene saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Phytochemistry*, 34, 489.
- [108] **Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., Laurens V. et Lacaille-Dubois M. A. (2000)**. Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *Journal of Natural Products*, 63, 1497.
- [109] **Mahato, S.B., Kundu, A.P. (1994)**. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37, 1517–1575.
- [110] **Agrawal, PK. (1992)**. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10), 3307-30.
- [111] **Bock, K., Pedersen, C. (1983)**, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 41, 27- 49.
- [112] **Pires, S., Guillaume, D., Gosmann, G., Schenkel, E. P. (1997)**. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-mate´ (*Ilex paraguariensis*) Adulterating Plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1027-1031.
- [113] **Sha, Y., Yan, M. C., Liu, J., Liu, Y., Cheng, M. S. (2008)**. Facile synthesis of oleanolic acid monoglycosides and diglycosides. *Molecules*, 13, 1472–1486.
- [114] **Sakamoto S., Kuroyanagi, M., Ueno, A., Sekita, S. (1992)**. Triterpenoid saponins from *Sophora subprostrata*. *Phytochemistry*. 31, 1339–1342.

- [115] **Udayama, M., Kinjo, J., Nohara, T. (1998).** Triterpenoidal saponins from *Baptisia australis*. *Phytochemistry*, 48, 1232–1235.
- [116] **Tan, N., Zhou, J., Zhao, S. (1999).** Advances in structural elucidation of glucuronides oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-*O*-bidismosides (1962–1997). *Phytochemistry*, 52, 153-192.
- [117] **Miyao, H., Sakai, Y., Takeshita, T., Kinjo, J., Nohara, T. (1996).** Triterpene saponins from *Abrus cantoniensis* (Leguminosae). I. Isolation and characterization of four new saponins and a new sapogenol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44, 1222–1227.
- [118] **Liu, Y., Zhang, Q.Y., Zhao, Y. Y., Wang, B., Hai, L. Q., Ying, Y. P., Chen, H. B. (2007).** Saponins from the roots of *Hedysarum polybotrys*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 389 – 391.
- [119] **Rao, G.V., Rao, P.S., Tomimori, T., Kizu H. (1985).** Soyasaponin I from *Rothia trifoliata*. *Journal of Natural Products*, 48, 135 -138.
- [120] **Kudou, S., Masahide, T., Tsukamoto, C., Sakabe, T., Tamura, N., Okubo K. (1993).** Isolation and structural elucidation of DDMP conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 57, 546–550.
- [121] **Wei, L., Xueyan, B., Kun, W., Dongxia, L., Tadaaki, S., Kazuo, K. (2009).** Triterpenoid saponins from *Impatiens siculifer*. *Phytochemistry*, 70, 816-821.
- [122] **Liu, Y., Zhao, Y., Chen, H., Wang, B., Zhang, Q. (2009).** Structure elucidation and complete NMR spectral assignment of two triterpenoid saponins from *Radix Hedysari*. *Fitoterapia*, 80, 127–129.
- [123] **Yoshikawa, M., Shimada, H., Komatsu, H., Sakurama, T., Nishida, N., Yamahara, J. Shimoda H., Matsuda H., Tani T. (1997).** Medicinal foodstuffs. VI. Histamine release inhibitors from kidney bean, the seeds of *Phaseolus vulgaris* L: chemical structures of sandosaponins A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 877–882.
- [124] **Mei, D., Xiangjiu, H., Rui, H. L. (2007).** Phytochemicals of Black Bean Seed Coats: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6044-6051.
- [125] **Zha, L.y., Mao, L.M., Lu, X.C., Deng, H., Ye, J.f., Chu, X.W., Sun, S.X., Luo H.J. (2011).** Anti-inflammatory effect of soyasaponins through suppressing nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by attenuation of NF-κB-mediated nitric oxide synthase expression. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2415–2418.



- [126] **Yang, X., Dong, C., Ren G. (2011).** Effect of Soyasaponins-Rich Extract from Soybean on Acute Alcohol-Induced Hepatotoxicity in Mice. *J. Agric. Food Chem*, 59, 1138-1144.
- [127] **Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer- Verlag. Berlin.
- [128] **Markham, K.R. (1982).** Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. London.
- [129] **Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O., Dini, A. (1995).** Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) Seeds. Isolation and Characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(8), 2020-2024.
- [130] **Bourama N., Byung-Hun U., Lobstein A., Weniger B., Koné M., Anton R. (2004).** Flavonoides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendus de Chimie*. 7, 993–996.
- [131] **Davis, B.D., Needs, P.W., Kroon, P.A., Brodbelt, J.S. (2006).** Identification of isomeric flavonoid glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 41(7), 911-920.
- [132] **Kotake, M., Arakawa, H. (1956).** Narcissin (Isorhamnetin-3-rutinosid) aus den Pollen von *Lilium auratum* Lindle. *Die Naturwissenschaften*, 43(14), 327-328.
- [133] **Shibano, M., Matsumoto, Y., Kusano, G., Shibata T. (1996).** Researches of *Glycyrrhiza* species grown at medicinal plant gardens in Japan and basic studies for selection of pharmaceutically fine races. 1. Comparative studies by HPLC patterns and constituents of aerial parts. *Journal of Natural Medicine*. 50, 273–283.
- [134] **Ternai, B., Markham K.R. (1976).** Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I: Flavones and flavonols. *Tetrahedron* 32(5), 565-569.
- [135] **Piccinelli, A., Veneziano, A., Passi S., Simone, F., Rastrelli L. (2007).** Flavonol glycosides from whole cottonseed by-product. *Food Chemistry*. 100, 344-349.
- [136] **Krafczyk, N., Kötke, M., Lehnert, N., Glomb, M. (2008).** Phenolic composition of rhubarb. *Journal European Food Research and Technology*. 228, 187-196.
- [137] **Santos, S.A., Carvalho, M.G. (1995).** Unambiguous <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR-assignments of isoflavones from *Viola caducifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 4, 349-352.
- [138] **Power, F.B., Browning, H. J. (1912).** Constituents of *Taraxacum* Root. *Journal of chemical society*. 101, 2411-2429.
- [139] **Dain, J., Zhao, C., Zhang, Q., Liu, Z.L., Zheng, R., Yang, L. (2001).** Taraxastane-type triterpenoids from *Saussurea petrovii*. *Phytochemistry*. 58, 1107-1111.

- [140] **Singh, B., Dubey, M. (2001).** Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen ex. Retz. *in vivo* and *in vitro*. I. Antimicrobial screening. *Phytotherapy Research* 15, 231–234.
- [141] **Villarreal, M.L., Alvarez, L., Alonso, D., Navarro, V., Garcia, P., Delgado, G. (1994).** Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, 42, 25-9.
- [142] **Singh, B., Sahuand, P.M., Sharma, M.K. (2002).** Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. *Phytomedicine* 9, 355–359.
- [143] **Akihisa, T., Shimizu, N., Ghosh, P., Thakur, S., Rosenstein, F.U., Tamura, T., Matsumoto, T. (1987).** Sterols of the Cucurbitaceae. *Phytochemistry* 26, 1693-1706.
- [144] **Dae-sup, P., Choi S.Z., Ran, K.K., Mee L.S., Ro, L.K. (2004).** Immunomodulatory activity of triterpnes and phenolic of compounds from *Viscum album* L. *Journal of applied pharmacology*, 11, 1-4.
- [145] **Bennini, B., Chulia, A., Kaouadji, M., Thomasson, F. (1992).** Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry* 31, 2483–248.
- [146] **Seyyed, A., Ayatollahi, A., ShojaiiFarzad, K., Mahdi, M., Muhammad I. C. (2009).** Two Flavones from *Salvia leriaefolia*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3, 179-184.
- [147] **Mi-Yeon, K., Young-Chan, K., Shin-kyo, C. (2005).** Identification and *in vitro* biological activities of flavonols in garlic leaf and shool: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 633–640.
- [148] **Haag-berrurier, M., Duquenois, P. (1962).** Extraction and physicochemical characterization of the luteolin in the flowers of the hawkweed *Hieracium pilosella*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*. 7(254), 3419-3421.
- [149] **Moiteiro, M., Gaspar, H., Rodrigues, A., Lopes, J., Carnide, V. (2008).** HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola* L. from Portugal. *Journal of Separation Science*, 31, 3683–3687.
- [150] **Hiroki, Y., Jan-E, B. (1998).** Efficient synthesis of (+), and (-) conduritol C via Palladium (II) catalyzed 1,4-Diacetoxylation in combination with enzymatic hydrolysis. *Journal of Organic Chemistry*, 63, 9339–9341.
- [151] **Metin, B., Yasar, S., Hasan, S. (1990).** Conduritol and related compounds. *Tetrahedron*, 46, 3715–3742.

- [152] **Kindl, H., Hoffmann-Ostenhof, O. (1966).** Untersuchungen über die biosynthese der cyclite-XIII: Vorkommen and biosynthese von cycliten in Asclepiadaceae. *Phytochemistry*, 5, 1091.
- [153] **Alvarez-Castellanos, P. P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobos, M. J. (2001).** Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57, 99.
- [154] **Uchio, Y, Tomosue, K, Nakayama, M, Yamamura, A, Waki, T. (1981).** Constituents of the essential oils from three tetraploid species of *Chrysanthemum*. *Phytochemistry*, 20, 2691.
- [155] **Shunying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y., Guolin, Z. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum* *Journal Ethnopharmacology*, 96, 151.
- [156] **Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J M., Viano, J. (2006).** Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4364-70.
- [157] **Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V. (2003).** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7115-21.
- [158] **OMS. (2005).** La résistance aux antimicrobiens : une menace pour la sécurité sanitaire mondiale. A58/14, 1–6.
- [159] **Wright, G.D., Sutherland, A.D. (2007).** New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 13 (6) 260–7.
- [160] **Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- [161] **Corrado, B., Marco T., Colucci, R. (2009).** Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharmaceutical Research*, 59, 90-100.
- [162] **Zeilhofer, H.U. (2007).** Prostanoids in nociception and pain. *Biochemical Pharmacology*, 73, 165-74.
- [163] **Behrens, B., Kerber J. (1935).** Wie sind reihenversuche für biologische auswertungen am zweckmassigsten anzwordnen. *J. Arch. Exp. Pathol. Parmako*, 177, 379-388.
- [164] **Koster, R., Anderson, M., De Bee,r E.J. (1959).** Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18, 412–417.

- [165] **Winter, C.A., Ristey, E.A., Nuss, G.W. (1962).** Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, 544–547.
- [166] **Correl, T., Jensen, K.M., Splawinski, J. (1979).** Interaction of salicylates and other non-steroidal anti-inflammatory agents in rats as shown by gastro-ulcerogenic and anti-inflammatory activities, and plasma concentrations. *Acta Pharmacologica et Toxicologica.*, 45, 225-231.
- [167] **Hodge, HC., Sterner, JH. (1948).** Determination of substances acute toxicity by DL<sub>50</sub>. *Hygiene Association Journal*, 10, 93.
- [168] **Wantana, R., Tassanee, N., Subhadhirasakul, S. (2009).** Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *Nature Medicine*, 63, 90- 96.
- [169] **Frederico, AV, Higor, FL, Elson, AC. (2009).** Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L., *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 437- 442.
- [170] **Bose, A, Mondal S, Jayanta K. (2007).** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*, 78, 515–520.
- [171] **Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. (1996).** Technical recommendations for in vitro susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 2(1), 11–25.
- [172] **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 6th ed. Approved standard. M2-A6, Wayne, PA.
- [173] **Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urveg, S. (1993).** In: Monograph of the IFS-NAPRECA Workshop on Bioassays, Antananarivo, Madagascar, 72–79.

## الملخص:

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية للنبتين الطبيتين (*Genista ulicina* spach (Fabaceae) و *Chrysanthemum macrocarpum* Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae)، حيث تم عزل وتحديد 36 مركب منها 10 مركبات جديدة.

تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المعزولة بالاعتماد على تقنية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية البعد، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الكتلة، التدوير الضوئي والمقارنة مع المعطيات البيولوجرافية.

بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي GC وكروماتوغرافيا الطور الغازي المتزاوجة مع مطيافية الكتلة GC/MS للزيت الطيار للنوع *C. macrocarpum* بأنه يحتوي على المركبات الأساسية *T-cadinol* (19,6%), *spatulénol* (12,5%), *l'oxide de caryophyllène* (6,5%), *α-cadinol* (5,6%). أظهر المستخلص الكلوروفورمي فعالية مضادة للبكتيريا جيدة ضد السلالات *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis* et *K. pneumoniae*. كما أظهر قدرته الممتازة على تثبيط نمو وتكاثر نوعين من الخلايا السرطانية للإنسان HT-29 و PC-3، المضادة للالتهاب، المسكنة للألم والمضادة للقرحة المعدية.

لم يظهر المسخلص البوتانولي والمركبات المفصولة من النوع *G. ulicina* أي فعالية مضادة للبكتيريا أو مثبطة للنمو وتكاثر الخلايا السرطانية.

### كلمات مفتاحية

Fabaceae, Asteraceae, *Genista ulicina*, *Chrysanthemum macrocarpum*, cyclitols الصابونين، الفلافونيدات، الزيوت الطيارة، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي، أحادية وثنائية البعد، مطيافية الكتلة.

## *Abstract*

This report is concerning the phytochemical study of two Algerian plants belonging to the Fabaceae family (*Genista ulicina* Spach) and Asteraceae family (*Chrysanthemum macrocarpum* Coss. & Kralik ex Batt). This study led to the isolation and identification of 36 compounds from which 10 compounds are new.

The structures of isolated compounds were established particularly by the use of NMR high-field 1D and 2D technics ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulated, COSY H-H, HSQC *J*-modulated, HMBC and NOESY), high resolution mass spectrometry (ESI-MS and HR-ESI-MS), measurement of rotatory power and comparison with literature data.

GC and GC / MS analyses of the essential oil of *C. macrocarpum* showed that it was mainly represented by: *T*-cadinol (19.6%), spathulenol (12.5%), caryophyllene oxide (6.5%), and  $\alpha$ -cadinol (5.6%).

The chloroform fraction of *C. macrocarpum* showed a weak antibacterial activity against: *E. coli*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. faecalis* and *K. pneumoniae*.

The same chloroform fraction was evaluated for its antiproliferative activity against human cancer HT-29 cells and human PC3 cells. The results indicate that the chloroform fraction inhibited cell proliferation of both HT-29 and PC-3 cells,

The chloroform fraction showed an excellent analgesic, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities.

The butanolic fraction of *G. ulicina* and isolated compounds were investigated for their antibacterial and antiproliferative growth inhibition, but no significant activities were observed.

### **Keywords:**

Fabaceae, Asteraceae, *Genista ulicina*, *Chrysanthemum macrocarpum*, cyclitols, Saponins, Flavonoids, essential oil, biological activities, NMR 1D and 2D, mass spectroscopy.

## Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales Algériennes une Fabaceae (*Genista ulicina* spach) et une Asteraceae (*Chrysanthemum macrocarpum* Coss. & Kralik ex Batt). Cette étude a permis d'isoler et d'identifier 36 composés dont 10 correspondent à de nouvelles structures.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   $J$  modulé, COSY H-H, HSQC  $J$ -modulé, HMBC et ROESY), par la spectrométrie de masse haute résolution (ESI-MS et HR-ESI-MS), par la mesure des pouvoirs rotatoires et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'analyse GC et GC/MS de huile essentielle de l'espèce *C. macrocarpum*, a montré que cette huile est majoritairement composée: de *T*-cadinol (19,6%), suivi du spathuléol (12,5%), l'oxide de caryophyllène (6,5%), et le  $\alpha$ -cadinol (5,6%).

La fraction chloroformique de *C. macrocarpum* a montré une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis de souches : *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *K. pneumoniae*. L'activité antiproliférative a été testée sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, HT-29 et PC-3 et montre que cette fraction inhibe la prolifération de deux lignées. Elle montre aussi une excellente activité anti-inflammatoire, antalgique et anti-ulcéreuse.

Aucune activité antibactérienne ni antiproliférative n'a été observée pour la fraction butanolique et les composés testés de *G. ulicina*.

**Mots clés :** Fabaceae, Asteraceae, *Genista ulicina*, *Chrysanthemum macrocarpum*, cyclitols, Saponines, flavonoïdes, Huile essentielle, activités biologiques, RMN 1D et 2D et Spectrométrie de masse.