

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

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

N° d'ordre :73/D3C/2018

Série: 12/Ch/2018

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle (LMD)
Spécialité : Chimie pharmaceutique
Option : Analyse physicochimique, contrôle de la qualité et synthèse de substances
bioactives**

Par

Mme BENCHERCHAR Ilhem

**Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires
de deux espèces appartenant à la famille Fabaceae : *Lotus roudairei*
et *Genista ferox*- Evaluation de l'activité biologique**

Devant le jury

Pr. Ouahiba BOUMAZA	Université des frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Pr. Ratiba MEKKIOU	Université des frères Mentouri, Constantine 1	Rapporteure Directrice de thèse
Pr. Ibrahim DEMIRTAS	Université Karatekin, Çankiri, Turquie	Co-rapporteur Co-directeur de thèse
Pr. Hamama BOURICHE	Université Sétif 1	Examinatrice
Pr. Mohamed BOUHROUM	Université des frères Mentouri, Constantine 1	Examineur

03 Juillet 2018

Remerciements

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

Cette thèse de Doctorat est le résultat d'un travail de collaboration entre deux laboratoires; l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes université des Frères Mentouri Constantine 1, sous la direction du professeur **MEKKIOU Ratiba**, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses conseils, ses commentaires aussi sa bienveillance et son humour qui m'ont été fort utiles.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer la grande partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de chimie de l'université de karatekin, Çankiri, Turquie sous la direction de monsieur le professeur **DEMIRTAS Ibrahim**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je tien à remercier le professeur **BENAYACHE Samir** de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de l'Unité de Recherche (VARENBIOMOL) et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans les meilleures conditions.

Mes vifs remerciements vont également à Madame le professeur **BENAYACHE Fadila** pour sa gentillesse, ses efforts et ses encouragements tout au long de ma recherche.

Je remercie Madame **Ouahiba BOUMAZA**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à Madame **Hamama BOURICHE**, professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, pour son aide durant toute la période de ma bourse en Turquie ainsi que pour avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Mohamed BOUHROUM**, de l'université des frères Mentouri, Constantine 1 d'avoir accepté de juger ce travail.

Je suis aussi très reconnaissante à toute l'équipe de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de l'Université Mentouri, Constantine. Toute l'équipe de laboratoire de chimie de l'Université de Karatekin, Çankiri, Turquie pour la gentillesse et l'aide.

Mes remerciements les plus forts reviennent également à ma famille qui m'a soutenu et qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire, je citerai mes parents, mes sœurs et mon frère et notamment mon mari pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents
qui m'ont soutenu et encouragé durant toute la
période de mes études et à qui je souhaite une
longue et heureuse vie,*

À mon cher mari Youcef qui m'a tant soutenu

À mes chères sœurs: Soumia, Bouteina et Roufeida

À mon cher frère Zakaria

À ma famille

À tous mes amis et collègues

Ilhem

Liste des abréviations

CDCl ₃ -d ₆	Chloroforme deu téré
MeOH	Methanol
H ₂ O	Eau distillée
DMSO	Diméthylsulfoxyde
APG	Angiosperm Phylogeny Group
APGL	Angiosperm Phylogeny Group of lugumineuse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CG/SM	Chromatographie gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse
HPLC-TOF/MS	La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse munie d'un analyseur à temps de vol
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
COSY	Correlated Spectroscopy
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
J (Hz)	Constante de couplage exprimée en Hertz
ppm	Partie par million
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
δ _C	Déplacement chimique du carbone en ppm
δ _H	Déplacement chimique du proton en ppm
ESI	ElectroSpray Ionization (ionisation par électronubélisation)
HR	Haute résolution
m/z	Masse/charge
SM	Spectrométrie de Masse
UV	Ultra-Violet
λ max	Longueur d'onde maximale
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
s	singulet

<i>d</i>	doublet
<i>t</i>	triplet
<i>q</i>	quintuplet
<i>dd</i>	doublet de doublet
<i>m</i>	multiplrt
EAG	Equivalents d'acide gallique
EQ	Equivalents de quercétine
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
BHA	Butylated hydroxyanisole

Listes de figures

Partie I: Aperçu bibliographique

Figure I.1: Distribution géographique de la famille Fabaceae.	6
Figure I.2: La nouvelle classification selon APGL de la famille Fabaceae.	7
Figure I.3: Structures des composés flavoniques isolés du genre <i>Lotus</i>	13
Figure I.4: Structures des composés isolés du genre <i>Lotus</i> .	16
Figure I.5: Similitudes structurelles entre génistéine et 17- β -oestradiol.	20
Figure I.6: Isoflavonoïdes isolés du genre <i>Genista</i> .	21
Figure I.7: Flavonoïdes isolés du genre <i>Genista</i> .	23

Partie II: Travaux personnels

Figure II.1: Image de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> Bonnet.	32
Figure II.2: Organigramme de l'extraction à froid de <i>L.roudairei</i> .	37
Figure II.3: Organigramme de l'hydrodistillation de <i>L. roudairei</i> .	38
Figure II.4: Colonne de fractionnement de l'extrait CH ₁ .	40
Figure II.5: Plaque CCM de la sous fraction S ₄ visualisé sous la lampe UV (365 nm).	44
Figure II.6: Plaque CCM des produits PC ₂₄₋₁ , PC ₂₄₋₂ et PC ₂₄₋₃ purifiés et visualisés sous la lampe UV (254 nm).	45
Figure II.7: Schéma récapitulatif des étapes de séparation et de purification des produits issus de l'extrait CH ₁ de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> .	46
Figure II.8: Flash chromatographique (modèle : COMBIFLASH RF200 UV/VIS, Serial : 210M20115).	47
Figure II.9: Schéma de séparation et purification des produits issus de l'extrait AE ₁ de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> .	53
Figure II.10: Schéma de séparation et purification des produits issus de l'extrait BU ₁ de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> Bonnet.	58
Figure II.11: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	61
Figure II.12: Courbe d'étalonnage de la quercétine.	62

Partie III: Résultats et discussions

Figure III.1: Structures des acides phénoliques identifiés dans les extraits de <i>L.roudairei</i> par HPLC-TOF/MS.	84
--	----

Figure III.2: Structures des flavonoïdes identifiés dans les extraits de <i>L.roudairei</i> par HPLC-TOF/MS.	85
Figure III.3: Spectres de masse des composés 1, 2 et 3 selon la banque de données NIST.	90
Figure III.4: Spectres de masse des composés 4, 5 et 6 selon la banque de données NIST.	91
Figure III.5: Spectres de masse des composés 8, 9 et 10 selon la banque de données NIST.	92
Figure III.6: Spectres de masse des composés 12, 13 et 15 selon la banque de données NIST.	93
Figure III.7: Spectres de masse des composés 17, 18 et 19 selon la banque de données NIST.	94
Figure III.8: Spectres de masse des composés 20, 22 et 25 la banque de données NIST.	95
Figure III.9: Spectres de masse des composés 26, 27 et 28 selon la banque de données NIST.	96
Figure III.10: Spectre de masse de composé 29 selon la banque de données NIST.	97
Figure III.11: Chromatogramme CG/SM du mélange des composés PC ₁₃₋₁ , PC ₁₃₋₂ et PC ₁₃₋₃ .	98
Figure III.12: A. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₁ .	99
A'. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₁ comparé avec la banque des données NIST.	
Figure III.13: B. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₂ .	100
B'. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₂ comparé avec la banque des données NIST.	
Figure III.14: C. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₃ .	101
C'. Spectre de masse IE du composé PC ₁₃₋₃ comparé avec la banque des données NIST.	
Figure III.15: Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ -d ₁ , 600 MHz) du mélange des composés PC ₁₃₋₁ , PC ₁₃₋₂ et PC ₁₃₋₃ .	102
Figure III.16: Structures de campésterol, stigmastérol et γ-sitostérol.	102
Figure III.17: Spectre RMN ¹³ C (CDCl ₃ -d ₁ , 150 MHz) du composé PC ₁₆ .	103
Figure III.18: Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ -d ₁ , 600 MHz) du composé PC ₁₆ .	104
Figure III.19: Spectre COSY du composé PC ₁₆ .	105
Figure III.20: Spectre HSQC du composé PC ₁₆ .	406
Figure III.21: Spectre HMBC du composé PC ₁₆ .	107
Figure III.21a: Spectre HMBC étalé du composé PC ₁₆ .	107

Figure III.22: Structure de l'acide pentadécanoïque.	108
Figure III.23: Chromatogramme CG/ SM du composé PC ₁₈ .	109
Figure III.24: Spectre de masse IE du composé PC ₁₈ comparé avec la banque des données.	109
Figure III.25: Spectre RMN ¹³ C (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁ , 150 MHz) du composé PC ₁₈ .	110
Figure III.26: Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁ , 600 MHz) du composé PC ₁₈ .	111
Figure III.27: Spectre HSQC du composé PC ₁₈ .	112
Figure III.28: Spectre COSY du composé PC ₁₈ .	113
Figure III.29: Spectre HMBC du composé PC ₁₈ .	114
Figure III.29a: Spectre HMBC étalé du composé PC ₁₈ .	114
Figure III.30: Structure de l'acide palmitique.	115
Figure III.31: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PC ₂₄₋₂ .	116
Figure III.32: Spectre de RMN ¹ H (acétone- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PC ₂₄₋₂ .	117
Figure III.33: Spectre HSQC du composé PC ₂₄₋₂ .	118
Figure III.34: Structure partielle du composé PC ₂₄₋₂ .	118
Figure III.35: Spectre de RMN ¹³ C (acétone- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PC ₂₄₋₂ .	119
Figure III.36: Spectre HMBC du composé PC ₂₄₋₂ .	120
Figure III.36a: Spectre HMBC étalé du composé PC ₂₄₋₂ .	120
Figure III.36b: Spectre HMBC étalé du composé PC ₂₄₋₂ .	121
Figure III.37: Structure de Pratenséine.	122
Figure III.38: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PC ₂₄₋₃ .	122
Figure III.39: Spectre de RMN ¹ H (acétone- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PC ₂₄₋₃ .	123
Figure III.40: Spectre HSQC du composé PC ₂₄₋₃ .	124
Figure III.41: Structure partielle du composé PC ₂₄₋₃ .	124
Figure III.42: Spectre de RMN ¹³ C (acétone- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PC ₂₄₋₃ .	125
Figure III.43a: Spectre HMBC étalé du composé PC ₂₄₋₃ .	126
Figure III.43b: Spectre HMBC étalé du composé PC ₂₄₋₃ .	126
Figure III.44: Structure de la génistéine.	127
Figure III.45: Spectre RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PC ₃₄ .	128
Figure III.45a: Spectre RMN ¹ H étalé (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PC ₃₄ .	129
Figure III.46a: Spectre COSY de la partie glucose du composé PC ₃₄ .	130
Figure III.46b: Spectre COSY étalé de la partie glucose du composé PC ₃₄ .	130

Figure III.47: Spectre HSQC du composé PC ₃₄ .	131
Figure III.47a: Spectre HSQC étalé du composé PC ₃₄ .	131
Figure III.48: Spectre RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PC ₃₄ .	132
Figure III.49: Spectre HMBC du composé PC ₃₄ .	132
Figure III.50: Structure de Daucostérol.	134
Figure III.45b: Spectre RMN ¹ H étalé (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du mélange PC ₃₄ et PC ₃₄₋₁ .	135
Figure III.48a: Spectre RMN ¹³ C étalé (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du mélange PC ₃₄ et PC ₃₄₋₁ .	135
Figure III.51: Structure de 3-O-β- glucopyranosyl Stigmastérol.	136
Figure III.52: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA ₈ .	136
Figure III.53: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA ₈ .	137
Figure III.54: Spectre de RMN ¹³ C (acétone- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PA ₈ .	137
Figure III.55: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA ₁₂₋₁ .	138
Figure III.56: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA ₁₂₋₁ .	139
Figure III.57: Série spectrale UV du produit PA ₁₂₋₁ .	140
Figure III.58: Structure partielle du composé PA ₁₂₋₁ .	140
Figure III.59: Spectre RMN ¹ H (acétone- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PA ₁₂₋₁ .	142
Figure III.60: Spectre HSQC du composé PA ₁₂₋₁ .	142
Figure III.61: Spectre COSY du composé PA ₁₂₋₁ .	143
Figure III.62: Spectre de RMN ¹³ C (acétone- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PA ₁₂₋₁ .	143
Figure III.63a: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₂₋₁ .	144
Figure III.63b: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₂₋₁ .	145
Figure III.64: Structure de l'isoprunetine.	146
Figure III.65: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA ₁₂₋₂ .	146
Figure III.66: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA ₁₂₋₂ .	147
Figure III.67: Spectre RMN ¹ H (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PA ₁₂₋₂ .	148
Figure III.68: Spectre HSQC du composé PA ₁₂₋₂ .	148
Figure III.69: Spectre COSY du composé PA ₁₂₋₂ .	149
Figure III.70: Spectre HMBC du composé PA ₁₂₋₂ .	150
Figure III.70a: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₂₋₂ .	150
Figure III.70b: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₂₋₂ .	151
Figure III.71: Structure de la quercétine.	152

Figure III.72: Spectre RMN ^1H (acétone- d_6 , 600 MHz) du composé PA ₁₃ .	152
Figure III.73: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA ₁₄₋₁ .	153
Figure III.74: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA ₁₄₋₁ .	154
Figure III.75: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA ₁₄₋₁ .	156
Figure III.75a: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	156
Figure III.75b: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA ₁₄₋₁ (partie osidique).	156
Figure III.76: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	157
Figure III.76a: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	157
Figure III.76b: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	157
Figure III.77: Spectre COSY du composé PA ₁₄₋₁ .	158
Figure III.76c: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	159
Figure III.76d: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	159
Figure III.78: Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) du composé PA ₁₄₋₁ .	160
Figure III.79: Spectre HMBC du composé PA ₁₄₋₁ .	161
Figure III.79a: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₄₋₁ .	162
Figure III.80: Structure de la Génistéine-7-O- β -glucoside.	163,208
Figure III.81: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA ₁₄₋₂ .	164
Figure III.81a: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	165
Figure III.81b: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA ₁₄₋₂ . (partie osidique).	165
Figure III.82: Spectre HSQC du composé PA ₁₄₋₂ .	165
Figure III.82a: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	166
Figure III.83: Spectre COSY du composé PA ₁₄₋₂ .	167
Figure III.83a: Spectre COSY étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	167
Figure III.82b: Spectre HSQC étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	168
Figure III.84: Spectre de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) du composé PA ₁₄₋₂ .	169
Figure III.85a: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	170
Figure III.85b: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	170
Figure III.85c: Spectre HMBC étalé du composé PA ₁₄₋₂ .	171
Figure III.86: Structure de quercétine-3-O- β -glucopyranoside.	172

Figure III.87: Chromatogramme d'analyse par HPLC-TOF/MS du composé PB ₂₇₋₁ .	172
Figure III.88: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PB ₂₇₋₁ .	173
Figure III.89: Spectre RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PB ₂₇₋₁	173
Figure III.90: Spectre RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PB ₂₇₋₁ .	175
Figure III.91: Spectre HSQC du composé PB ₂₇₋₁ .	175
Figure III.92: Spectre RMN ¹ H (Méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB ₂₇₋₁ .	178
Figure III.93: Spectre COSY du composé PB ₂₇₋₁ .	178
Figure III.94: Spectre COSY du composé PB ₂₇₋₁ .	179
Figure III.95: Structure de D-pinitol.	179,211
Figure III.96: Spectre TOF/MS en mode négatif du produit PB ₂₇₋₂ .	180
Figure III.97: Spectre RMN ¹³ C (méthanol- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) du composé PB ₂₇₋₂ .	181
Figure III.98: Spectre RMN ¹ H (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB ₂₇₋₂ .	182
Figure III.99: Spectre HSQC du composé PB ₂₇₋₂ .	182
Figure III.100: Structure partielle du composé PB ₂₇₋₂ .	183
Figure III.98a: Spectre RMN ¹ H (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB ₂₇₋₂ .	183
Figure III.101: Spectre COSY du composé PB ₂₇₋₂ .	184
Figure III.99a: Spectre HSQC du composé PB ₂₇₋₂ .	185
Figure III.97: Spectre RMN ¹³ C (méthanol- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) du composé PB ₂₇₋₂ .	185
Figure III.102a: Spectre HMBC étalé du composé PB ₂₇₋₂ .	187
Figure III.102b: spectre HMBC étalé du composé PB ₂₇₋₂ .	187
Figure III.103: Structure de 5-méthoxy Genistéine-7-O-Glucoside.	188,201
Figure III.104: courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits CH ₁ , AE ₁ et le standard BHA en fonction de la concentration.	190
Figure III.105: courbes représentant la cinétique de blanchiment du β-carotène des extraits CH ₁ , AE ₁ et le standard BHA en fonction du temps.	191
Figure III.106: Activité antioxydante relative des extraits CH ₁ , AE ₁ et du BHA dans le système acide linoléique/β-carotène.	192
Figure III.107: l'activité antiproliférative des extraits CH ₁ , AE ₁ , BU ₁ et ME ₁ contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) à différentes concentrations (50, 100, 250 µg/ml).	194
Figure III.108: Chromatogramme d'analyse par HPLC-TOF/MS du composé PB _{T-16-1} .	199

Figure III.109: Spectre TOF-MS en mode négatif du composé PB_{T-16-1} .	200
Figure III.110: Spectre RMN ¹³ C (méthanol- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) du composé PB_{T-16-1} .	200
Figure III.111: Spectre RMN ¹ H (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB_{T-16-1} .	201
Figure III.112: Spectre TOF-MS en mode négatif du produit PB_{T-16-3} .	202
Figure III.113: Spectre RMN ¹ H (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB_{T-16-3} .	203
Figure III.114: Spectre HSQC du composé PB_{T-16-3} .	203
Figure III.115: Structure partielle du composé PB_{T-16-3} .	204
Figure III.116: Spectre RMN COSY du produit B_{T-16-3} .	205
Figure III.114a: Spectre HSQC étalé du composé PB_{T-16-3} .	206
Figure III.117: Spectre RMN ¹³ C (méthanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) du composé PB_{T-16-3} .	206
Figure III.118: Spectre RMN HMBC du produit PB_{T-16-3} .	207
Figure III.119: Chromatogramme d'analyse par HPLC/TOF-MS du produit PB_{T-18} .	209
Figure III.120: Spectre TOF-MS en mode négatif du produit PB_{T-18} .	210
Figure III.121: Spectre RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) du composé PB_{T-18} .	210
Figure III.122: Spectre RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) du composé PB_{T-18} .	211
Figure III.123: courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de <i>G. ferox</i> et l'acide ascorbique comme standard en fonction de la concentration.	213
Figure III.124: L'activité antiproliférative des extraits de <i>G. ferox</i> contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) à différentes concentrations (50, 100, 250 µg/ml).	214

Liste des tableaux

Partie I: Aperçu bibliographique

Tableau I.1: Composés flavoniques isolés du genre <i>Lotus</i> .	12
Tableau I.2: Autres composés identifiés dans le genre <i>Lotus</i> .	15
Tableau I.3: Isoflavonoïdes isolés du genre <i>Genista</i> .	21
Tableau I.4: Flavonoïdes isolés du genre <i>Genista</i> .	23

Partie II: Travaux personnels

Tableau II.1: Masses et rendements des extraits de l'espèce <i>L. roudairei</i>	38
Tableau II.2: Programme de la phase mobile A et B.	39
Tableau II.3: Résultats de la séparation de l'extrait CH ₁ de <i>L. roudairei</i> par chromatographie sur colonne.	40
Tableau II.4: Résultats de la séparation de la fraction C ₁₈ sur colonne de Sephadex LH-20.	43
Tableau II.5: Résultats de la séparation de la fraction C ₂₄ sur colonne de Sephadex.	44
Tableau II.6: Résultats de la séparation de la fraction C ₃₄ sur colonne de Sephadex LH-20.	45
Tableau II.7: Progression de la séparation de l'extrait AE ₁ par flash chromatographie.	47
Tableau II.8: Résultat du regroupement des tubes résultants du fractionnement de l'extrait AE ₁ .	48
Tableau II.9: Résultat de séparation de la fraction A ₈ sur colonne de Sephadex.	49
Tableau II.10 : Séparation de la phase soluble de la fraction A ₁₂ sur Colonne de Sephadex.	50
Tableau II.11 : Séparation de la fraction A ₁₃ sur Colonne de Sephadex LH-20.	50
Tableau II.12: Résultat de la séparation de la fraction A ₁₄ sur colonne de Sephadex LH-20.	51
Tableau II.13 : Séparation de la fraction A ₁₇ sur Colonne de Sephadex LH-20.	52
Tableau II.14: Résultat du fractionnement de l'extrait BU ₁ .	54
Tableau II.15: Résultats de la séparation de la fraction B ₂₃ sur colonne de Sephadex LH-20.	55
Tableau II.16: Résultats de la séparation de la fraction B ₂₅ sur colonne de Sephadex LH-20.	56
Tableau II.17: Résultats de la séparation de la fraction B ₂₇ sur colonne de polyamide.	57
Tableau II.18: Masses et rendements des extraits de l'espèce <i>G. ferox</i> .	69
Tableau II.19: Résultat de fractionnement de l'extrait BU _T sur colonne de gel de silice.	71
Tableau II.20: Résultats de la séparation de la fraction B _{T-16} sur colonne de Sephadex.	72

Tableau II.21: Résultats de la séparation de B _{T-19} sur colonne de Sephadex LH-20.	73
Tableau II.22: Résultats de la séparation de B _{T-20} sur colonne de Sephadex LH-20.	74
Parties III : Résultats et discussions	
Tableau III.1: Résultats globaux du screening chimique de l'espèce <i>L. roudairei</i> .	81
Tableau III.2: Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits CH ₁ , EA ₁ , BU ₁ et ME ₁ de l'espèce <i>L. roudairei</i> par HPLC-TOF/MS.	82
Tableau III.3: Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits EA ₂ et BU ₁ de l'espèce <i>L. roudairei</i> par HPLC-TOF/MS.	83
Tableau III.4: Résultats de l'analyse de la fraction C ₄ par CG/SM.	86
Tableau III.5: Résultats de l'analyse de la fraction C ₆ par CG/SM.	87
Tableau III.6: Résultats de l'analyse de la fraction C ₇ par CG/SM.	87
Tableau III.7: Résultats de l'analyse de la fraction C ₈ par CG/SM.	88
Tableau III.8: Résultats de l'analyse de la fraction C ₁₀ par CG/SM.	89
Tableau III.9: Données des spectres RMN ¹ H et ¹³ C du composé PC ₁₆ .	108
Tableau III.10: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PC ₁₈ .	115
Tableau III.11: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PC ₂₄₋₂ .	121
Tableau III.12: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PC ₂₄₋₃ .	127
Tableau III.13: Données du spectre RMN ¹³ C et RMN ¹ H du produit PC ₃₄ .	133
Tableau III.14: Données de la série spectrale UV du composé PA ₁₂₋₁ .	141
Tableau III.15: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PA ₁₂₋₁ .	145
Tableau III.16: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PA ₁₂₋₂ .	151
Tableau III.17: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PA ₁₄₋₁ .	162
Tableau III.18: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PA ₁₄₋₂ .	171
Tableau III.19: Données des spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du composé PB ₂₇₋₁ .	179
Tableau III.20: données de RMN (¹ H et ¹³ C) du composé PB ₂₇₋₂ .	188
Tableau III.21: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> Bonnet.	189
Tableau III.22: Les valeurs des IC ₅₀ des extraits CH ₁ et AE ₁ et du standard BHA.	190
Tableau III.23: Résultats globaux du screening chimique de l'espèce <i>G.ferox</i> .	196
Tableau III.24: Résultats Quantitative des acides organiques et phénolique dans les extraits de la plante <i>Genista ferox</i> exprimés en (mg phénolique/ kg plante).	197

Tableau III.25: Résultats quantitative des composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits de la plante <i>Genista ferox</i> exprimés en (mg phénolique/ kg plant).	198
Tableau III.26: Données relatives aux spectres RMN (¹ H, ¹³ C) du produit PB _{T16-3} .	208
Tableau III.27: Les teneurs en polyphenols et flavonoïdes des extraits de <i>G.ferox</i> .	212
Tableau III.28: Les valeurs des CI ₅₀ de tous les extraits et du standard.	213

Table des matières

Introduction générale	1
Références bibliographiques	4

Partie I: Aperçu bibliographique

I.1 Introduction.....	5
I.2 Description botanique des fabacées.....	5
I.3 Distribution géographique.....	6
I.4 Classification des Fabacées.....	6
I.5 Intérêt thérapeutique des Fabacées.....	7
I.5.1 Intérêt dans la médecine contemporaine.....	8
I.6 Toxicité des Fabacées.....	9
I.7 La sous famille Papilionoideae DC.....	10
I.7.1 Généralités.....	10
I.7.2 Description botanique de la sous famille Papilionoideae DC.....	10
I.8 Le genre <i>Lotus</i>	10
I.8.1 Généralités sur le genre.....	10
I.8.2 Description botanique du genre <i>Lotus</i>	11
I.8.3 Utilisations des espèces du genre <i>Lotus</i> en médecine traditionnelle.....	11
I.8.4 Principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Lotus</i>	11
I.9 Le genre <i>Genista</i>	18
I.9.1 Généralités sur le genre.....	18
I.9.2 Description botanique du genre <i>Genista</i>	19
I.9.3 Activités biologiques du genre <i>Genista</i>	19
I.9.4 Principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Genista</i>	20
I.10 Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	27

Partie II: Travaux personnels

Introduction.....	30
Objectifs	30

Chapitre II.1: Etude phytochimique et évaluation de l'activité biologique de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet (Fabaceae)

Investigation phytochimique

II.1.1 Choix du matériel végétal.....	31
II.1.2 Classification dans la systématique botanique.....	31
II.1.3 Nom vernaculaire.....	31
II.1.4 Synonymes.....	31
II.1.5 Description botanique	31
II.1.6 Distribution géographique	32
II.1.7 Usages traditionnels	32
II.1.8 Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Lotus roudairei</i> Bonnet.....	32
II.1.9 Travaux personnels	32
II.1.9.1 Récolte.....	32
II.1.9.2 Screening phytochimique	32
II.1.9.2.a Recherche des alcaloïdes.....	33
II.1.9.2.b Recherche des coumarines.....	33
II.1.9.2.c Recherche des triterpènes, stérols et terpènes.....	34
II.1.9.2.d Recherche des substances polyphénoliques (tanins)	34
II.1.9.2.e Recherche des flavonoïdes et des leucoanthocyanes.....	35
II.1.9.2.f Recherche des saponines.....	35
II.1.9.2.g Recherche des anthocyanes.....	35
II.1.9.2.h Recherche des quinones.....	36
II.1.9.3 Extraction.....	36
II.1.9.3.a Macération à froid.....	36
II.1.9.3.b Hydrodistillation.....	37
II.1.9.4 Analyse qualitative et quantitative des extraits	38
II.1.9.4.a Préparation des échantillons Pour l'analyse HPLC-TOF/MS.....	38
II.1.9.4.b Conditions opératoires.....	39
II.1.10 Etudes des extraits.....	39
II.1.10.1 Fractionnement de l'extrait CH ₁	40
II.1.10.1.a Séparation et purification des fractions issues de l'extrait CH ₁	42
II.1.10.2 Fractionnement de l'extrait AE ₁	46
II.1.10.2.a Séparation et purification des fractions de l'extrait AE ₁	49

II.1.10.3 Fractionnement de l'extrait BU ₁	53
II.1.10.3.a Séparation et purification des fractions de l'extrait BU ₁	55
Etude des activités biologiques	
II.1.11 L'activité antioxydante.....	59
II.1.11.1 Généralités sur les antioxydants.....	59
II.1.11.2 Catégories des antioxydants.....	59
II.1.11.3 Sources des antioxydants.....	60
II.1.11.3.1 Les antioxydants phénoliques.....	60
II.1.11.3.1.a Les flavonoïdes.....	60
II.1.11.3.1.b Les acides phénoliques.....	60
II.1.11.4 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	60
II.1.11.4.a Dosage des polyphénols totaux.....	60
II.1.11.4.b Dosage des flavonoïdes totaux.....	61
II.1.11.5 Evaluation du pouvoir antioxydant.....	62
II.1.11.5.a Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH.....	62
II.1.11.5.b Test de blanchissement ou de décoloration de β-carotène.....	63
II.1.12 l'activité antiproliférative.....	64
II.1.12.1 Généralités.....	64
II.1.12.2 Activité antiproliférative utilisant le système xCELLigence.....	64
II.1.12.2.a Définition du système.....	64
II.1.12.2.b Evaluation de l'activité antiproliférative.....	64
Chapitre II.2: Etude phytochimique et évaluation des l'activité biologique de l'espèce	
<i>Genista ferox</i> Poirret (Fabaceae)	
Investigation phytochimique	
II.2.1 Le choix de matériel végétal.....	66
II.2.2 Classification dans la systématique botanique.....	66
II.2.3 Nom vernaculaire.....	66
II.2.4 Synonymes.....	66
II.2.5 Description botanique.....	66
II.2.6 Distribution géographique.....	67
II.2.7 Usages traditionnels.....	67

II.2.8 Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Genista ferox</i>	67
II.2.9 Travaux personnels.....	67
II.2.9.1 Récolte.....	67
II.2.9.2 Screening phytochimique.....	67
II.2.9.3 Extraction.....	68
II.2.9.3.a Extraction à froid des tiges.....	68
II.2.9.3.b Extraction à froid des parties Feuilles.....	68
II.2.9.4 analyse qualitative et quantitative des extraits.....	70
II.2.10 Etude des extraits.....	70
II.2.10.1 Fractionnement de l'extrait BU _T	70
II.2.10.1.a Séparation et purification des fractions de l'extrait BU _T	72
Etude des activités biologiques	
II.2.11 l'activité antioxydante.....	76
II.2.11.1 Dosage des polyphénols totaux.....	76
II.2.11.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	76
II.2.11.3 Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH.....	76
II.2.12 l'activité antiproliférative.....	76
conclusion.....	77
Références bibliographiques.....	78

Partie III: Résultats et discussions

Introduction.....	80
Chapitre III.1: Résultats de l'étude phytochimique et de l'activité biologique de l'espèce <i>Lotus roudairei</i> Bonnet (Fabaceae) Résultats de l'étude phytochimique	
III.1.1 Résultat du screening phytochimique.....	81
III.1.2 Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS.....	81
III.1.3 Identification du contenu en métabolites secondaires par CG/SM.....	86
III.1.4 Elucidation structurale des composés isolés.....	87
III.1.4.1 Elucidation structurale du mélange PC ₁₃ (1, 2 et 3)	87
III.1.4.2 Elucidation structurale du composé PC ₁₆ (4)	103
III.1.4.3 Elucidation structurale du composé PC ₁₈ (5)	108

III.1.4.4 Elucidation structurale du composé PC ₂₄₋₂ (6)	115
III.1.4.5 Elucidation structurale du composé PC ₂₄₋₃ (7)	122
III.1.4.6 Elucidation structurale du composé PC ₃₄ (8 et 9)	128
III.1.4.7 Elucidation structurale du composé PA ₈ (7)	136
III.1.4.8 Elucidation structurale du composé PA ₁₂₋₁ (10)	138
III.1.4.9 Elucidation structurale du composé PA ₁₂₋₂ (11)	146
III.1.4.10 Elucidation structurale du composé PA ₁₃ (10)	152
III.1.4.11 Elucidation structurale du composé PA ₁₄₋₁ (12)	153
III.1.4.12 Elucidation structurale du composé PA ₁₄₋₂ (13)	163
III.1.4.13 Elucidation structurale du composé PB ₂₇₋₁ (14)	172
III.1.4.14 Elucidation structurale du composé PB ₂₇₋₂ (15)	180
Résultats des activités biologiques	
III.1.5 Dosages des polyphenols et des flavonoïdes totaux.....	189
III.1.6 Evaluation de l'activité antioxydante.....	189
III.1.6.1 Test de DPPH.....	189
III.1.6.2 Test de blanchissement de β-carotène.....	191
III.1.7 Evaluation de l'activité antiproliférative.....	193
Conclusion.....	195
Chapitre III.2: Résultats de l'étude phytochimique et de l'activité biologique de l'espèce	
<i>Genista ferox</i> Poirret (Fabaceae)	
Résultats de l'étude phytochimique	
III.2.1 Résultat de screening (criblage) phytochimique.....	196
III.2.2 Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS.....	196
III.2.3 Elucidation structural des composés isolés.....	199
III.2.3.1 Détermination de la structure du produit PB _{T-16-1}	199
III.2.3.2 Détermination de la structure du composé PB _{T-16-3}	201
III.2.3.3 Détermination de la structure du composé PB _{T-18}	209
Résultats des activités biologiques	
III.2.4 Dosages des polyphenols et des flavonoïdes totaux.....	212
III.2.5 Evaluation de l'activité antioxydante.....	212

III.2.5.1 Test de DPPH.....	212
III.2.6 Evaluation de l'activité antiproliférative.....	214
Conclusion.....	215
Références bibliographiques.....	216
Conclusion générale.....	218
Résumé.....	220
Abstract.....	221
ملخص.....	222

A decorative blue scroll frame with a light blue shadow, containing the text "Introduction générale".

Introduction générale

Introduction générale

La phytothérapie a été développée à partir d'extraits de plantes en se basant sur des méthodes traditionnelles de guérison. Selon les idées modernes de l'étiologie, de la pathogénèse des maladies et grâce à l'évolution de la science, la phytothérapie a exempté de l'utilisation essentiellement empirique de la médecine des plantes [1].

Le terme botanique, herb, fait référence à des plantes productrices de graines avec des tiges non ligneuses qui meurent à la fin de la saison de croissance [2]. En phytothérapie, le terme herbe désigne non seulement les plantes herbacées, mais aussi l'écorce, les racines, les feuilles, les graines, les fleurs et les fruits des arbres, arbustes et vignes ligneuses. Les herbes ont été cultivées et utilisées à des fins culinaires et médicinales depuis l'antiquité. Le bassin méditerranéen a été distingué à travers les générations avec un riche inventaire d'herbes médicinales.

Dans le passé, on ne connaissait pas le mode exact d'activité des plantes et leurs propriétés curatives enregistrées empiriquement. Ces propriétés ont suscité l'intérêt des chercheurs à mener de nombreuses études afin de vérifier ces observations et de déterminer la substance responsable de ces propriétés. On sait aujourd'hui que les propriétés des plantes médicinales appartiennent aux composés chimiques qu'elles contiennent appelées phytochimiques. Aujourd'hui, une grande partie de la recherche scientifique s'est concentrée sur l'étude de l'utilisation possible de plantes médicinales pour la prévention, la guérison et / ou le traitement d'appoint de maladies chroniques telles que le cancer.

Plusieurs plantes couramment utilisées ont été identifiées par l'institut National du Cancer comme possédant des propriétés de prévention du cancer [3]. De nombreuses études ont montré que de nombreux composés phytochimiques d'herbes du bassin méditerranéen, ont acquis le titre "anticancérogènes alimentaires". Ces substances bénéfiques agissent comme antioxydants et pièges électrophiles, stimulent le système immunitaire, inhibent la nitrosation et la formation d'adduits à l'ADN avec des cancérogènes, induisent des enzymes de détoxification de phase I ou II, agissent sur les molécules du réseau de signalisation intracellulaire impliquées dans l'initiation et / ou la promotion du cancer, interrompre ainsi ou inverser le processus de cancérogenèse [4, 5].

Certaines herbes sont sans danger en quantités modestes, mais elles peuvent devenir toxiques à des doses plus élevées. Dans l'ensemble, lorsque les herbes sont prescrites de façon appropriée, la sécurité des médicaments traditionnels à base de plantes est élevée. Toutes les parties de plantes utilisées ou prescrites par les ethnopharmacologues doivent être testées pour leur innocuité avant d'être recommandées pour l'usage humain [6].

L'Algérie, un pays connu pour ces ressources naturelles, a une flore particulièrement riche et variée. Il y a environ 3000 espèces de plantes, 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques [7].

Dans le but de valoriser les plantes algériennes utilisées en médecine traditionnelle, notre travail a été réalisé sur deux espèces de la famille des fabacées : l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet appartient au genre *Lotus* et l'espèce *Genista ferox* Poirret appartient au genre *Genista*.

Ce travail de recherche porte sur l'investigation phytochimique des deux espèces et l'évaluation de leurs activités biologiques est reporté dans ce manuscrit sous forme de trois parties:

- La 1^{ère} partie est consacrée à l'étude bibliographique de la famille des fabacées et des deux genres *Lotus* et *Genista*.

-La 2^{ème} partie est consacrée aux travaux réalisés sur les deux espèces, elle comporte deux chapitres:

- Le 1^{er} chapitre renferme tous les travaux effectués sur l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet en débutant par un screening phytochimique sur les différents organes du matériel végétal, suivi de l'extraction de ce dernier par différents solvants, cette dernière a été réalisée par deux méthodes. Ensuite, ces extraits ont été analysés par HPLC –TOF/MS puis soumis à des séparations chromatographiques afin d'obtenir des produits purs. Ce chapitre est terminé par l'étude de l'activité antioxydante en utilisant la méthode du DPPH et celle du blanchissement du β -carotène et l'étude de l'activité antiproliférative sur des cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa).

- Le 2^{ème} chapitre renferme tous les travaux effectués sur l'espèce *Genista ferox* Poirret en passant par un screening phytochimique, extraction des feuilles et des tiges, l'analyse par HPLC-TOF/MS de ces extraits et enfin la séparation et la purification des composants de l'extrait *n*-butanol. De même que précédemment, ces extraits ont été soumis à l'étude des activités antioxydantes et antiproliférative sur des cellules humaines de cancer du col de l'utérus (HeLa).

-La 3^{ème} partie est consacrée à la discussion des résultats phytochimiques et biologiques obtenus sur les deux espèces.

Le manuscrit est terminé par une conclusion générale et perspectives.

Références bibliographiques

- [1] Szyszkowska.A, Koper.J, Szczerba.J, Puławska.M and Zajdel.D. (2010) The use of medicinal plants in dental treatment. *Herba Polonica*, **56**, 97-107.
- [2] Craig.W. J. (1999) Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 491s-499s.
- [3] Caragay.A.B. (1992) Cancer-preventative foods and ingredients. *Food Technology*, **46**, 65-68.
- [4] Ramos.S. (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, **52**, 507-526
- [5] Johnson.I.T. (2007) Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, **66**, 207-215
- [6] Nwabichie.C.C, Washali.A.Y A, Aisha.A.A, Mawia.M.A, Suriani.I and Rosliza.A.M. (2017) The use of herbal medicine in arab countries: A review. *International Journal of Public Health and Clinical Sciences*, **4**, 1-14.
- [7] Lakehal.S, Meliani.A, Benmimoune.S, Bensouna.S.N, Benrebiha.F.Z and Chaouia.C. (2016) Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba alba* Asso Grown in Algeria. *Medicinal chemistry*, **6**, 435-439.



Partie I

Aperçu bibliographique

I.1 Introduction

La famille Fabaceae ou Légumineusae est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs après la famille Orchidaceae et la famille Asteraceae, avec 730 genres et plus de 19 400 espèces. Elle regroupe de très nombreuses plantes qui poussent dans le monde entier. Leur emploi est très développé dans divers secteurs économiques: pharmaceutiques, agricoles, agroalimentaires, paysagers et horticoles [1].

Selon les jardins botaniques royaux, les plus grands genres présents dans cette famille sont le genre *Astragalus* avec plus de 2000 espèces, le genre *Acacia* avec plus de 900 espèces, le genre *Indigofera* avec environ 700 espèces, le genre *Crotalaria* avec 600 espèces et le genre *Mimosa* avec 500 espèces [2].

I.2 Description botanique des fabacées

Les Fabacées sont des arbres, des arbustes ou des lianes ligneuses, caduques ou persistantes, ou encore des herbes annuelles, vivaces ou pluriannuelles. Quelques espèces tropicales sont épiphytes et d'autres, grimpantes, elles développent des tiges vrillées, tournant généralement dans le sens des aiguilles d'une montre, plus rarement dans le sens inverse (*Phaseolus*, *Wisteria*), ou des vrilles axillaires, ou encore des crochets. Quelquefois, les feuilles sont réduites, les fonctions photosynthétiques étant transférées aux tiges, ou modifiées en phyllodes [3].

- Les feuilles sont bien développées , généralement alternes mais parfois opposées à verticillées comme chez les Mirbelieae, spiralées ou distiques. Pulvinées ou non, elles sont très majoritairement stipulées, les stipules étant intrapétiolaires, caduques ou persistantes, souvent libres, parfois concrescentes ou transformées en écailles, en épines ou développant des glandes.
- Les fleurs sont solitaires ou rassemblées en panicules, en fascicules, en racèmes, en épis ou en têtes axillaires et terminales ou opposées aux feuilles comme chez certains membres des Bossiaecae .
- Le fruit est un légume charnu ou non, déhiscent ou plus rarement indéhiscent, parfois lomentacées. La déhiscence est double: ventrale, le long de la ligne de suture du carpelle, et dorsale, au niveau de la nervure principale de la feuille carpellaire. La gousse peut, chez certaines espèces, se transformer secondairement [4].

I.3 Distribution géographique

La famille Fabaceae est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes comme en Afrique du Sud ou le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées (figure I.1) [5].

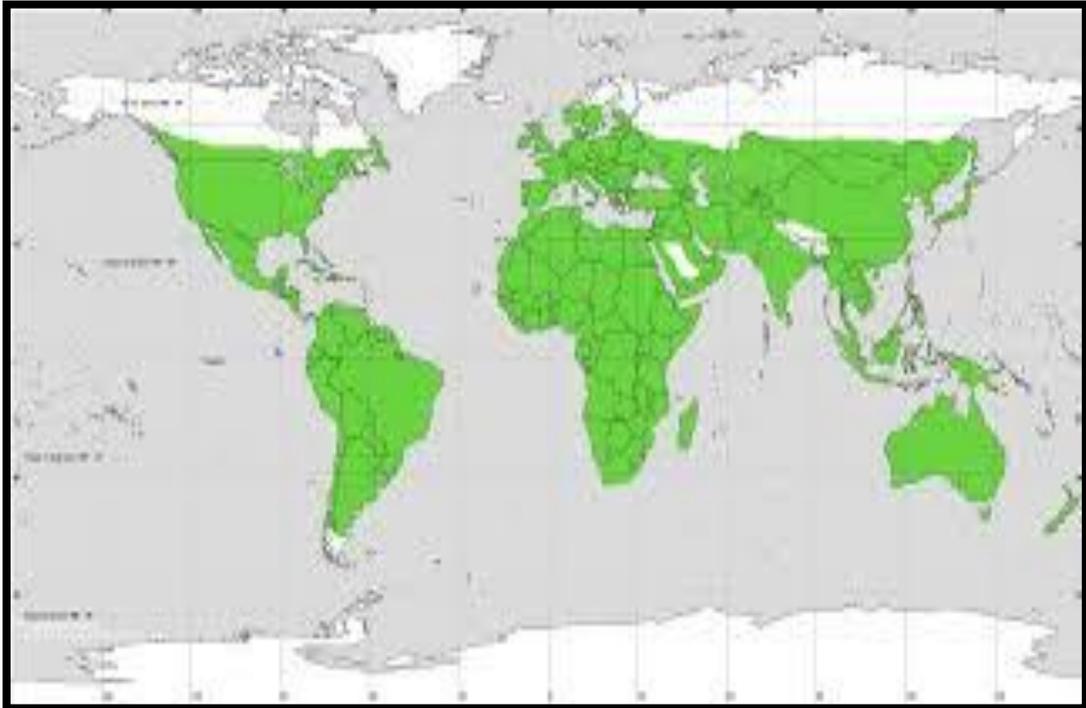


Figure I.1: Distribution géographique de la famille Fabaceae.

I.4 Classification des Fabacées

Selon la classification précédente APGIII des angiospermes, les Fabacées ont été placés dans l'ordre des Fabales. Ils comportent trois sous-familles: Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae. La nouvelle classification selon APGL de la famille Fabaceae montre leur division en six sous-familles (figures I.2): Cercidoideae avec 12 genres et 335 espèces, Detarioideae avec 84 genres et 760 espèces, Duparquetioideae avec 1 genre et 1 espèce, Dialioideae avec 17 genres et 85 espèces, Caesalpinioideae avec 148 genres et 4400 espèces et Papilionoidea avec 503 genres et 14000 espèces [6].

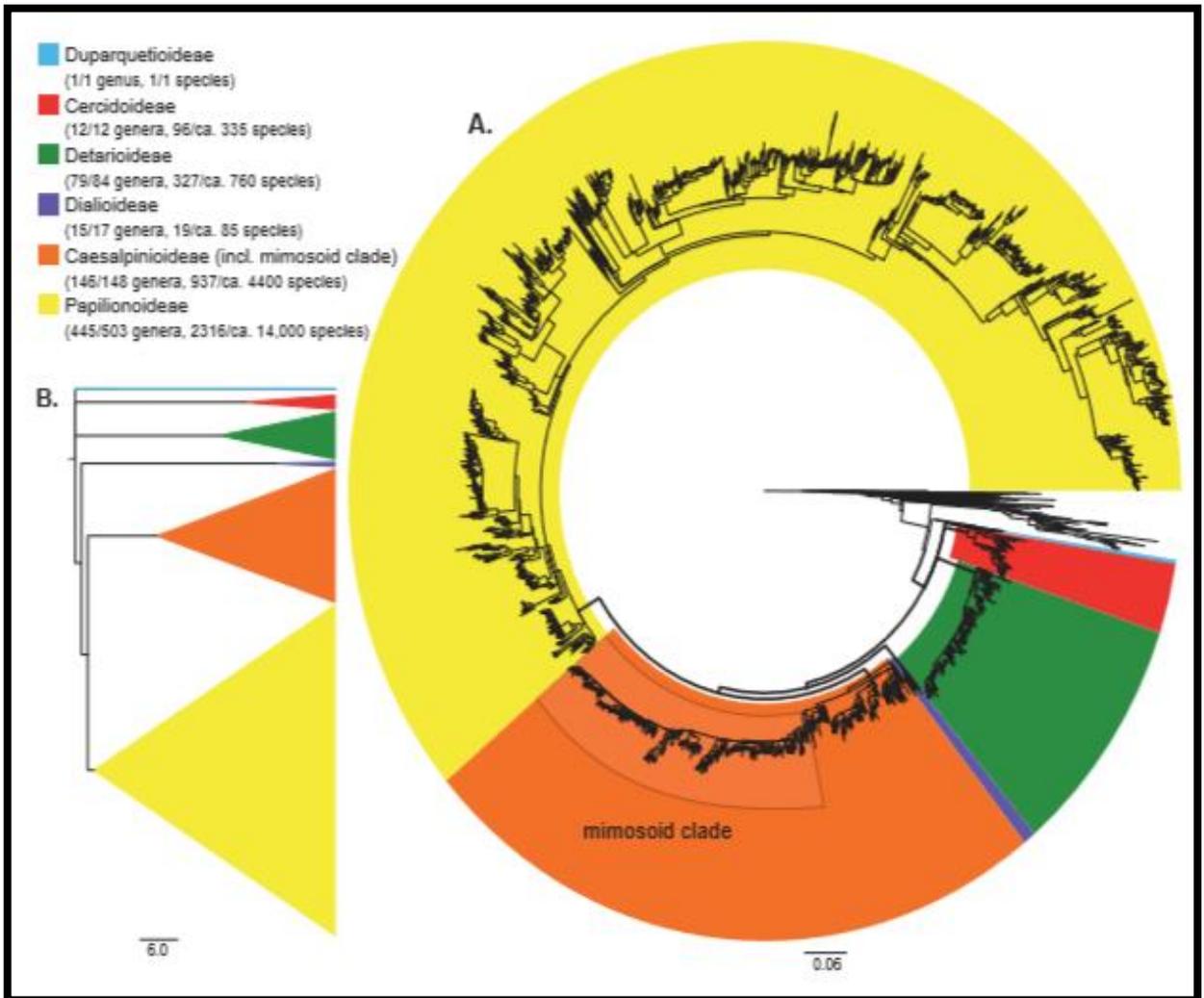


Figure I.2: La nouvelle classification selon APGL de la famille Fabaceae.

I.5 Intérêt thérapeutique des Fabacées

De nombreuses espèces appartenant à la famille des fabacées possèdent des propriétés thérapeutiques. Les exemples suivants peuvent nous faire prendre conscience de l'utilité des Fabacées dans des domaines d'applications thérapeutiques. Dans ce qui suit, on citera quelques exemples de Fabacées ayant un usage thérapeutique traditionnel [7-12]:

- Les graines de fenugrec, riches en mucilages et en tannins, ont longtemps été employées pour la confection de cataplasmes émoullissants et pour prendre du poids.
- la gomme extraite du caroubier est employée comme adjuvant des régimes amincissants car, tout en ayant un fort caractère épaississant, il est totalement dénué de pouvoir nutritif.
- Les Sénéés (fruits et folioles) produits à partir de *Cassia acutifolia* et *C. angustifolia* ont des propriétés laxatives dues à des dérivés anthracéniques.
- La pulpe de tamarin, aux mêmes propriétés mais aux constituants différents, a la même utilisation.

- L'oléorésine de *Copaifera*, servant à la confection du baume de Copahu, a longtemps eu une réputation internationale dans le traitement de la gonorrhée.
- Le baume du Pérou est employé en usage externe comme cicatrisant et antiseptique ; il contient 6 à 8% de benzoates et près de 60% de « cinnaméine » (mélange de benzoates et de cinnamates de benzyle et de cinnamyle). Il est très employé dans la fabrication de cosmétiques et de produits d'hygiène.
- Le baume de Tolu renferme sensiblement les mêmes composés; il est employé en usage interne comme antiseptique et expectorant.
- Les rameaux de *Cytisus scoparius* contiennent un alcaloïde, la spartéine, qui présente des activités analeptique et cardiaque. La plante renferme aussi des amines aromatiques dont l'hydroxytyramine aux propriétés vasoconstrictrice et hypertensive.
- La racine de la réglisse, *Glycyrrhiza glabra*, contient des saponosides et des flavonoïdes et présente des activités anti-inflammatoire, expectorante et antispasmodique; plus récemment, une activité œstrogénique a été mise à jour.

I.5.1 Intérêt dans la médecine contemporaine

Les composés d'origine végétale possédant des propriétés comparables à celles exercées par les œstrogènes, sont qualifiés de «phytoœstrogènes». Ces propriétés ouvrent la perspective d'applications thérapeutiques ou curatives pour les dérèglements hormonaux, les traitements de substitution hormonale ou encore les cancers hormono-dépendants. Des investigations phytochimiques menées sur les végétaux ont montré que les phytoœstrogènes, notamment les isoflavones, sont essentiellement contenues dans les Fabacées [13, 14].

Le soja est certainement l'exemple sur lequel on a fait le plus de publicité dernièrement. Très récemment, divers extraits de Fabacées ont été évalués pour leurs propriétés œstrogéniques [15] sur une lignée cellulaire tumorale œstrogénodépendante, la lignée MCF-7. Il est apparu que les extraits de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Vigna radiata*, *Pueraria lobata* et *Trifolium pratense* présentent une affinité préférentielle *vis-à-vis* des récepteurs ER-œstrogéniques, les deux derniers extraits présentent les résultats les plus probants. Les substances actives ont été identifiées comme étant la daidzéine, la génistéine et la génistine, et les résultats confortent donc les propriétés déjà reconnues de ces isoflavones.

I.6 Toxicité des Fabacées

Des intoxications se produisent de façon directe ou indirecte par certains métabolites secondaires présents dans certaines espèces de la famille Fabaceae [16].

- Des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans des espèces du genre *Crotalaria*, en particulier *Crotalaria retusa*, suite à la consommation de céréales contaminées par les graines, ou suite à l'utilisation de ces plantes pour soigner des troubles grippaux ou asthmatiques.
- Certains acides aminés non constitutifs, nombreux dans les Fabacées, et qui sont fournis par les bactéries fixatrices d'azote, perturbent gravement les chaînes métaboliques, provoquant les troubles du lathyrisme, qui se produisent à la suite de la consommation d'espèces du genre *Lathyrus*. Cela se traduit chez l'homme par une paralysie progressive des muscles. De véritables « épidémies » ont eu lieu lors de périodes de famines en France en 1700-1701 puis en 1856, lorsque la farine de « jarousse » (*Lathyrus sativus*) a remplacé la farine de blé.
- Contamination suite à la présence de champignons du type *Aspergillus* développés sur les graines en cas d'humidité, et qui élaborent des aflatoxines cancérogènes.
- La principale allergie alimentaire est celle à l'arachide (*Arachis hypogaea*) à cause des allergènes présents dans les graines (cacahuètes), mais aussi dans l'huile et le beurre d'arachide.
- Maladie du favisme, maladie génétique, affectant les populations après absorption de fèves, graines de *Vicia faba*, se traduisant par des troubles neurologiques et hématologiques. Cela est dû au manque d'une enzyme, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase qui joue un rôle de détoxification.
- La glycyrrhizine de la réglisse, présente une action minéralo-corticoïde, qui se traduit par une rétention de sodium et d'eau, accompagnée d'une perte de potassium. Cela provoque un œdème au niveau de la face, des anomalies cardiaques, d'où un risque d'hypertension.

I.7 La sous famille Papilionoideae DC

I.7.1 Généralités

Les Faboideae ou Papilionoideae constituent une vaste sous-famille avec 503 genres et 14 000 espèces à répartition cosmopolite. Elle rassemble de nombreuses espèces importantes dans les domaines alimentaire, médicinal, industriel, ornemental et horticole mais certaines sont toxiques.

Cette sous-famille est représentée dans les régions tempérées, ces espèces sont surtout herbacées mais également buissonnantes ou arborescentes [6].

I.7.2 Description botanique de la sous famille Papilionoideae DC

Comprenant des herbes et de petits arbustes, elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tempérées et tropicales. Cette sous famille inclut les légumineuses à grain tels que les haricots, les pois et les lentilles [17].

Les fleurs sont sous forme de papillon avec 5 pétales (l'étandard, 2 ailes et carène composé de 2 pétales), calice à 5 sépales soudés, les fruits sont des gousses bivalves. Les fleurs sont zygomorphes (à symétrie radiale), les 10 étamines sont incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil.

Cette famille peut se diviser en 2 groupes, les viciées qui comportent les papilionacées à vrille avec les quelles elles grimpent et les lotées ou papilionacées sans vrilles [18].

I.8 Le genre *Lotus*

I.8.1 Généralités sur le genre

Le genre *Lotus* est le genre le plus important et le plus représentatif de la tribu des Loteae (DC) avec 120-130 espèces [19].

Ce genre est largement distribué autour de la Méditerranée. En Algérie, le genre *Lotus* est représenté par 26 taxons qui se rencontrent en majorité et fréquemment au niveau de la frange littorale et les hauts-plateaux du pays sous des régimes climatiques allant du semi-aride à l'humide en allant d'Ouest en Est. Cependant, certains taxons se retrouvent au niveau des secteurs arides et hyperarides du pays comme c'est le cas de *Lotus arabicus* L. et de *Lotus jolyi* Batt. qui sont des espèces sahariennes [20].

I.8.2 Description botanique du genre *Lotus*

le genre *Lotus* comprend des plantes annuelles et vivaces avec une racine pivotante ramifiée forte. Il est représenté en Algérie par 15 espèces: *Lotus conimbricensis* Brot, *L. glinoides* Del, *L. edulis* L, *L. drepanacarpus* Dur, *L. ornithopodioides* L, ***L. roudairei* Bonnet**, *L. jolyi* Batt, *L. creticus* L, *L. pedunculatus* Cav, *L. palustris* Willd, *L. corniculatus* L, *L. parviflorus* Desf, *L. hispidus* Desf, *L. pusillus* Medik. et *Lotus angustissimus* L [20].

Il possède les caractères suivants:

- Calice à 5 dents presque égales ou à 2 lèvres. Etamines diadelphes (9-1), à filets alternativement dilatés à l'apex. Ovaire multiovulé. Gousse oblongue ou linéaire, déhiscente, non ailée sur les sutures. Graines non arillées. Feuilles trifoliolées et stipulées, à stipules foliacées et libres. Fleurs jaunes, blanchâtres ou rosées.
- Feuilles et calice hérissés de poils raides et épars longs de 1,5-2 cm.
- Fleurs roses ou blanches.

I.8.3 Utilisations des espèces du genre *Lotus* en médecine traditionnelle

Traditionnellement, les espèces du genre *Lotus* ont été utilisées comme contraceptifs, pour la prophylaxie et le traitement des infections sexuellement transmissibles. Ils ont été également utilisés pour le traitement des ulcères peptiques [21]. Il ont des propriétés antispasmodique et anti-diarrhéique [22].

Plusieurs activités biologiques ont été signalés pour les espèces de ce genre, y compris les activités anticancéreuses, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, activités d'agrégation œstrogénique et anti-plaquettes [21].

I.8.4 Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Lotus*

Les investigations phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Lotus* ont révélé que ce dernier est riche en composés flavoniques : flavones, isoflavones, isoflavanes.... Le tableau I.1 et la figure I.3 rassemblent quelques métabolites isolés du genre *Lotus*.

Tableau I.1: Composés flavoniques isolés du genre *Lotus*.

N°	Composés	Espèces	Références
1	Lupinalbine B	<i>L. pusillus</i> Medik	[23]
2	Kaempférol	<i>L. lalambensis</i>	[24, 25]
3	Kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranoside		
4	Kaempférol-3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside		
5	Kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside		
6	Kaempférol-3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl (1 ^{'''} \rightarrow 2 ^{'''})- α -L-rhamnopyranoside]-7-O- α -L-rhamnopyranoside		
7	Kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside-7-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 ^{'''} \rightarrow 2 ^{''})- α -L-rhamnopyranoside]		
8	Véstitol		
9	Lotisoflavane		
10	4'-O-Méthylerrone	<i>L. polyphyllos</i>	[26]
11	Quercétine		
12	Kaempféritine	<i>L. ornithopodioides</i>	[27]
13	Deméthylvéstitol (7,2',4' trihydroxyisoflavane)	<i>L. hispidus</i>	[28]
14	Véstitol (7,2'-dihydroxy-4'- methoxyisoflavan)		
15	Sativane (7-hydroxy-2',4'-dimethoxyisoflavan)		

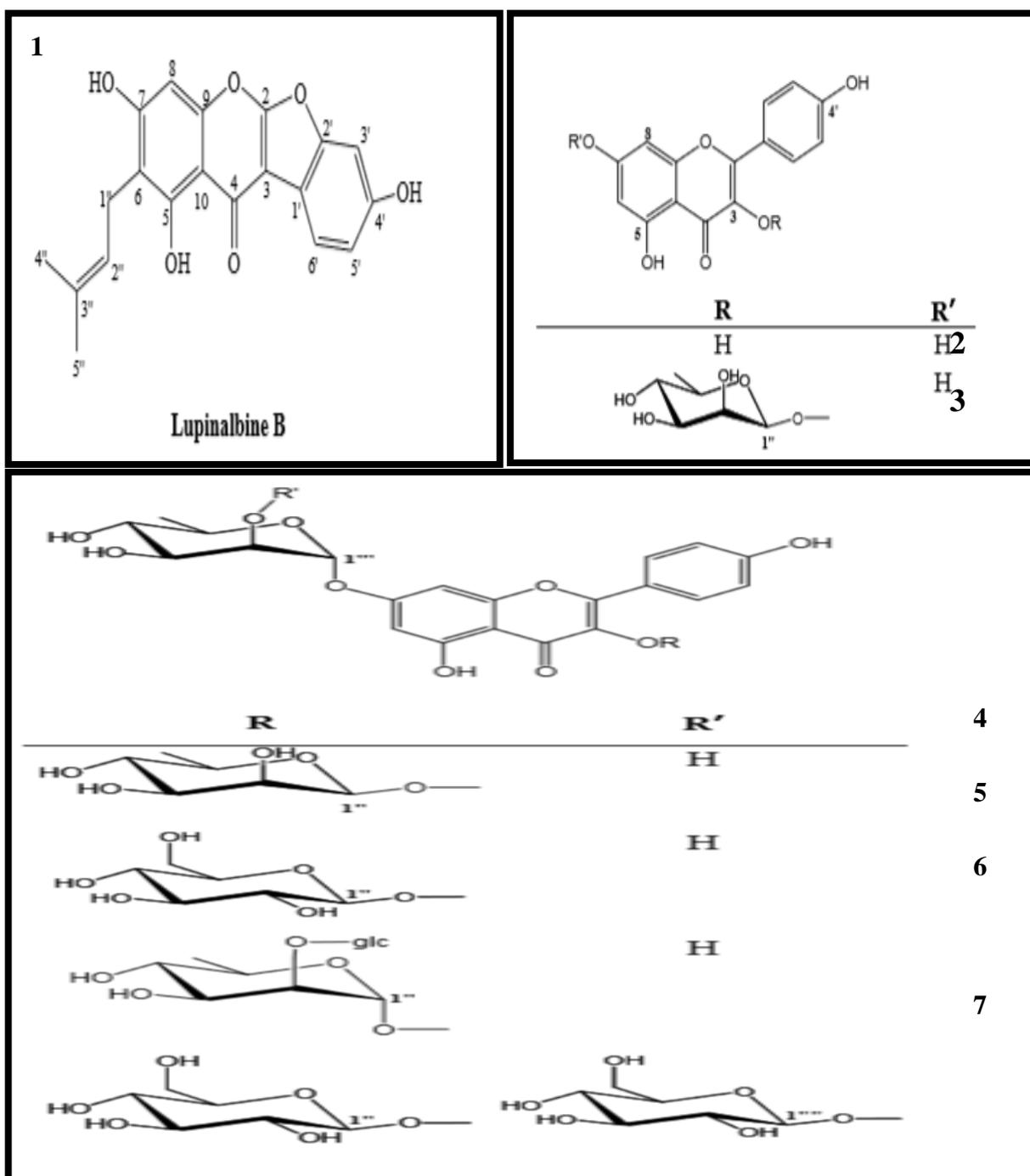


Figure I.3: Structures des composés flavoniques isolés du genre *Lotus*.

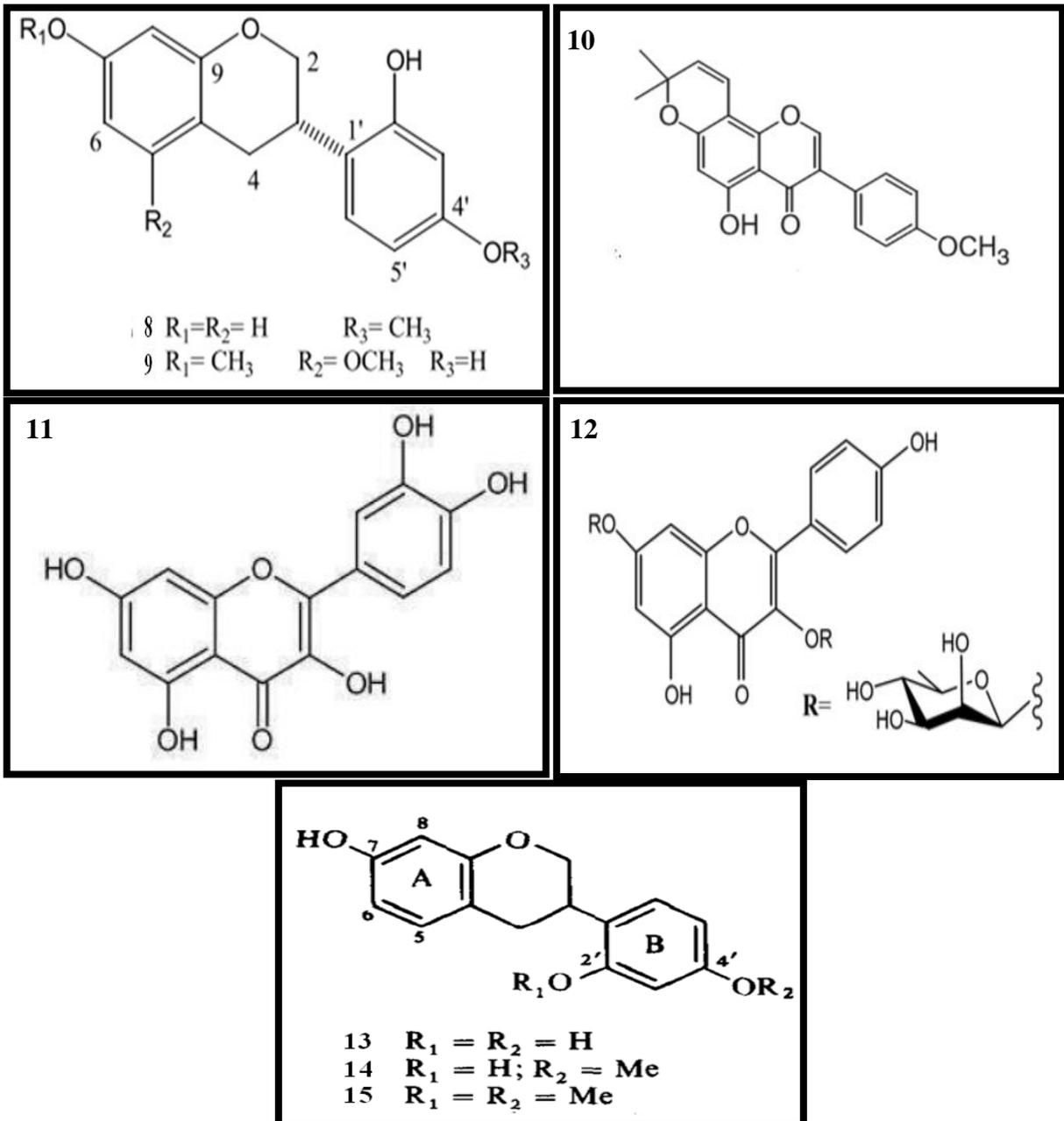


Figure I.3: Structures des composés flavoniques isolés du genre *Lotus* (suite).

D'autres composés, issus de diverses classes de substances naturelles, ont été identifiés dans le genre (tableau I.2 et figure I.4).

Tableau I.2: Autres composés identifiés dans le genre *Lotus*.

N°	Composés	Espèces	Références
16	18 α ,19 α -Urs-20(30)-èn-3 β -ol	<i>L. pusillus Medik</i>	[23]
17	β -Sitostérol(24-éthylcholest-5-èn-3-ol)		
18	β -Sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside		
19	β -Sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate		
20	Acide (3 β)-3-hydroxyoléan-12-én-28-oïque ou Acide oléanolique		
21	2-Hydroxybenzyl β -D-glucopyranoside		
22	Maltol 3-O-[6-O-benzoyl]- β -D-glucopyranoside		
23	3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -Dglucuronopyranosyl]- 22 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène		
24	3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -Dglucuronopyranosyl]-22 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène		
25	Lotaustraline	<i>L. lalambensis</i>	[24,25]
26	Epilotaustraline		
27	Linamarine		
28	Ethyl-O- β -D-glucopyranoside		
29	Butyl-O- α -L-rhamnopyranoside		
30	Methyl-O- α -L-rhamnopyranoside		
31	Methyl-O- β -L-rhamnopyranoside		
32	Myo-inositol (+) D-pinitol		
33	4', 6'-Dihydroxy-7, 20-dimethoxy-3-arylcoumarine	<i>L. polyphyllos</i>	[26]

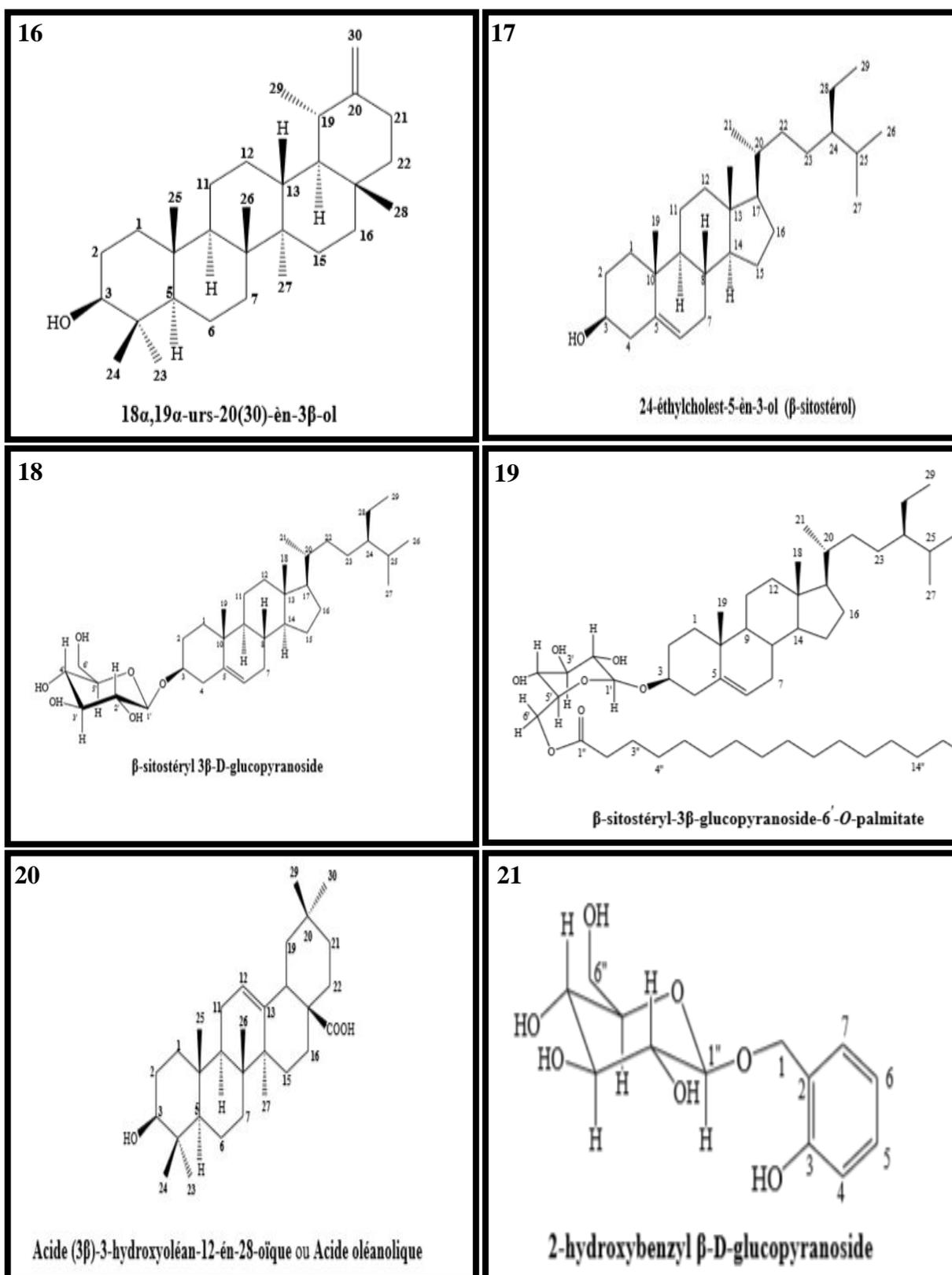


Figure I.4: Structures des composés isolés du genre *Lotus*.

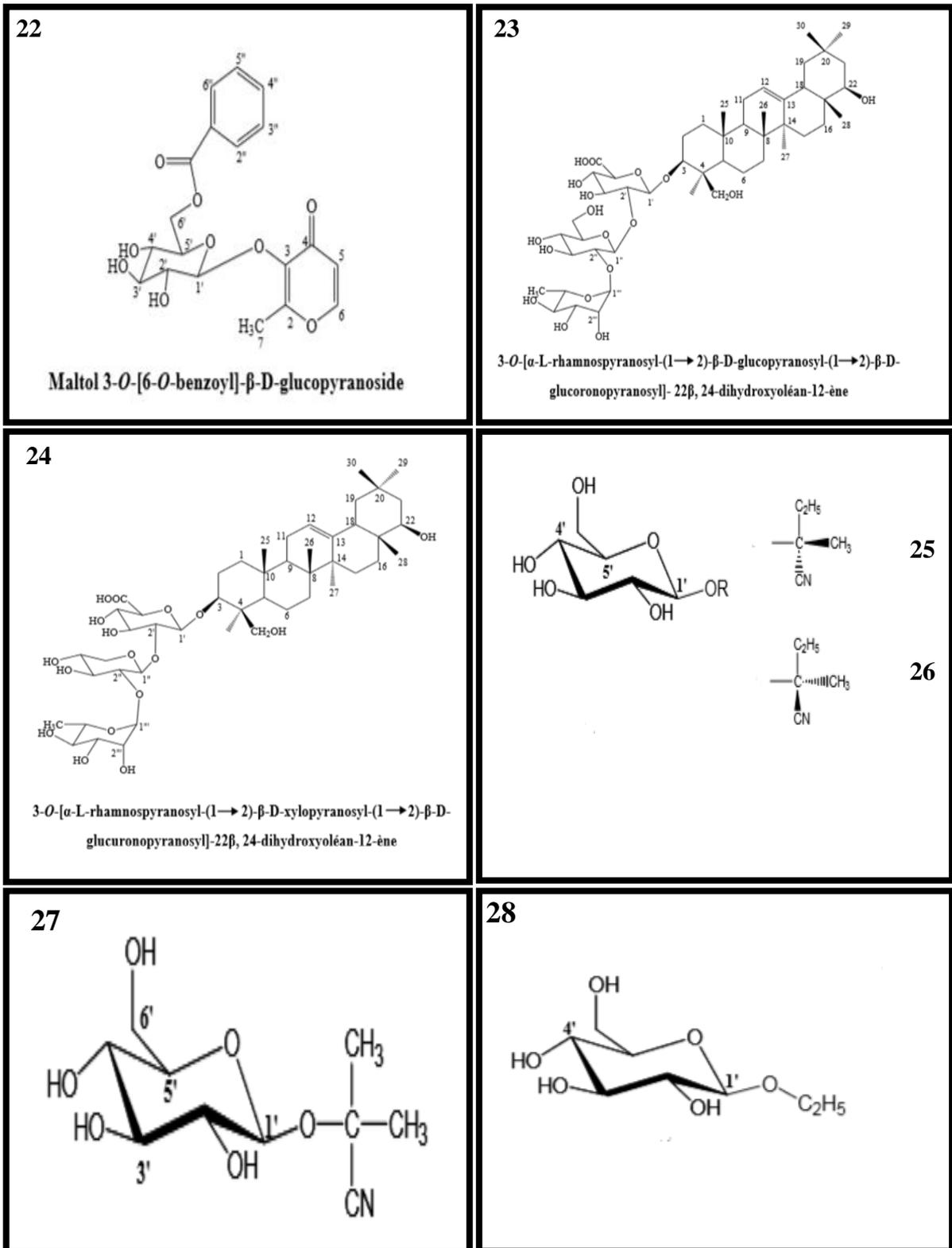


Figure I.4: Structures des composés isolés du genre *Lotus* (suite).

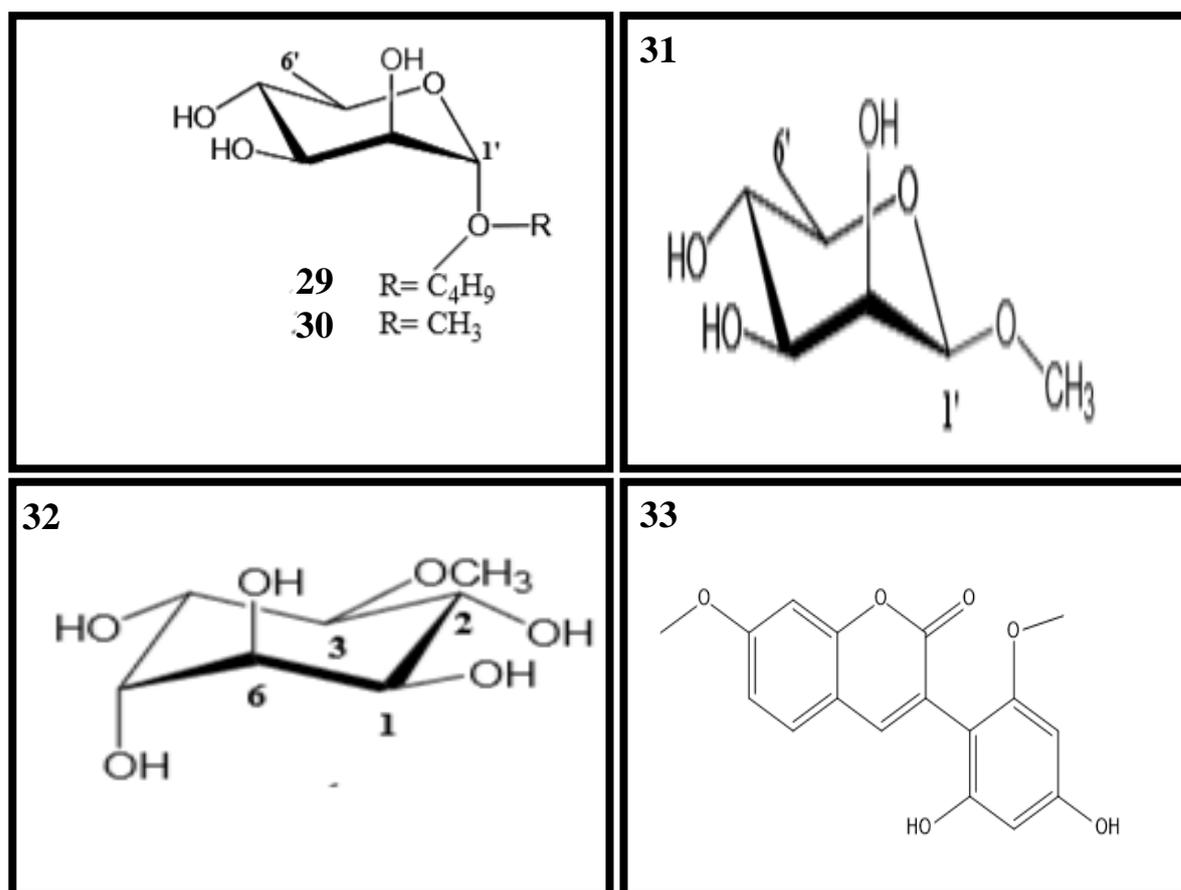


Figure I.4: Structures des composés isolés du genre *Lotus* (suite).

I.9 Le genre *Genista*

I.9.1 Généralités sur le genre

Le genre *Genista* dont le nom dérive du mot latin *genesta* qui signifie arbuste, appartient à la famille des Fabaceae et à la sous-famille cosmopolite des Faboideae [29]. Le genre *Genista*, compte environ 200 espèces de genêts distribuées dans tous les points du globe mais principalement dans la région méditerranéenne [30].

L'aire de distribution du genre *Genista* est circum-méditerranéen et s'étend jusqu'au nord-est de l'Europe. Le genre est également très répandu à l'ouest de la Russie, en Turquie, en Syrie et au Caucase [31]. Les espèces du genre ont une grande plasticité écologique, elles sont présentes dans des territoires soumis à des conditions bioclimatiques très différentes, depuis les zones semi-arides jusqu'aux zones très humides [32]. En Afrique du Nord, la concentration des plantes de ce genre est observée en Algérie et au Maroc. En effet, l'Algérie est représentée par 23 espèces, parmi lesquelles 11 sont endémiques [20].

I.9.2 Description botanique du genre *Genista*

Les plantes du genre *Genista*, sont des arbrisseaux épineux ou parfois inermes et junciformes, caractérisées par des feuilles mono à tri-foliolées, stipulées ou non. Le calice est à 5 segments, les 2 supérieurs libres ou soudés, les 3 inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes. Plus rarement, le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, dressée, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit. Les 10 étamines (5 longues et 5 courtes) sont monadelphes, en tube non fendu. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscente et variable. Les graines sont non arillées [20].

I.9.3 Activités biologiques du genre *Genista*

Beaucoup de plantes appartenant au genre *Genista* sont connues pour posséder des propriétés antioxydantes et bien d'autres propriétés biologiques telles que ulcéro-protectrices [33], anti-diabétiques [34], œstrogénique [35] et antiproliférative [36].

Des études phytochimiques ont indiqué que les plantes du genre *Genista*, riches en alcaloïdes quinolizidiniques, ont été utilisées en médecine traditionnelle, spécialement *G. tinctoria* connue pour ses propriétés diurétique, laxative, purgative, émétique et sudorifique [31].

De nombreuses études ont montré que ce genre est une bonne source de composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes, qui sont connus pour leurs diverses activités biologiques. Parmi les exemples cités: la génistéine isolée de *G. tinctoria* [37] est reportée comme étant un "phyto-œstrogène" étudié comme molécule alternative aux composés synthétiques oestradiol et éthynyl-oestradiol qui jouent un rôle dans le développement normal des voies reproductives chez les humains et sont impliqués dans le cancer de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme [38].

D'autre part, la génistéine *in vitro*, est l'inhibiteur le plus efficace de l'activité excessive de la 5 α -réductase qui catalyse la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, un androgène puissant qui est considéré comme un facteur de risque du cancer de la prostate [39]. Comparée au 17- β -oestradiol, la génistéine présente de grandes similitudes structurelles (figure I.5), particulièrement le poids moléculaire, le noyau phénolique A et les hydroxyles en positions C-7 et C-4'. L'hydroxyle en position C-7 est nécessaire pour lier la génistéine au récepteur œstrogène (ER) en mimant le noyau A de l'œstrogène stéroïdique (17- β -oestradiol) [40].

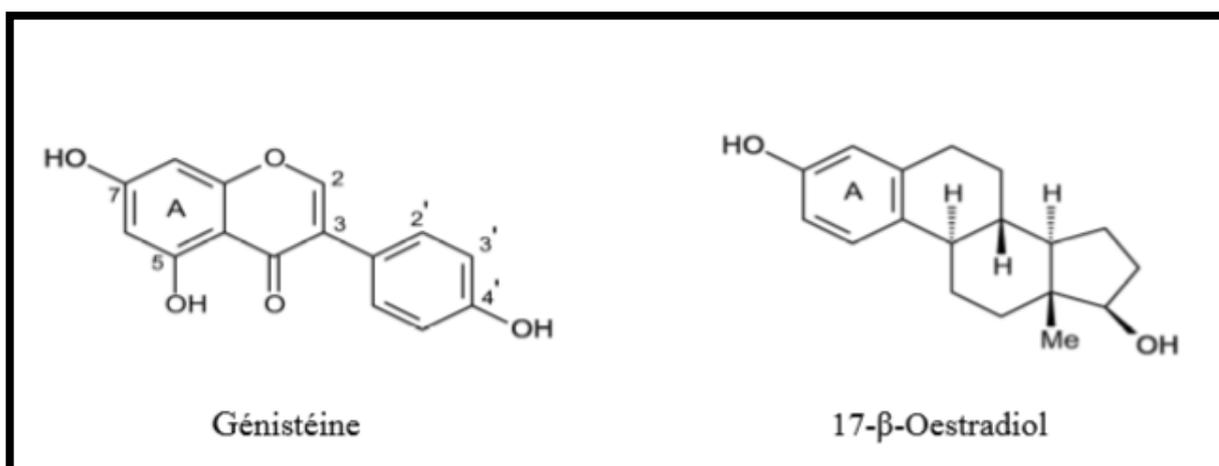


Figure I.5: Similitudes structurales entre génistéine et 17-β-oestradiol.

Une étude comparative sur l'évaluation de l'activité œstrogénique in vitro sur les composés flavoniques aglycones et leurs molécules glycosylées a montré des comportements différents chez les molécules flavoniques et isoflavoniques [35]:

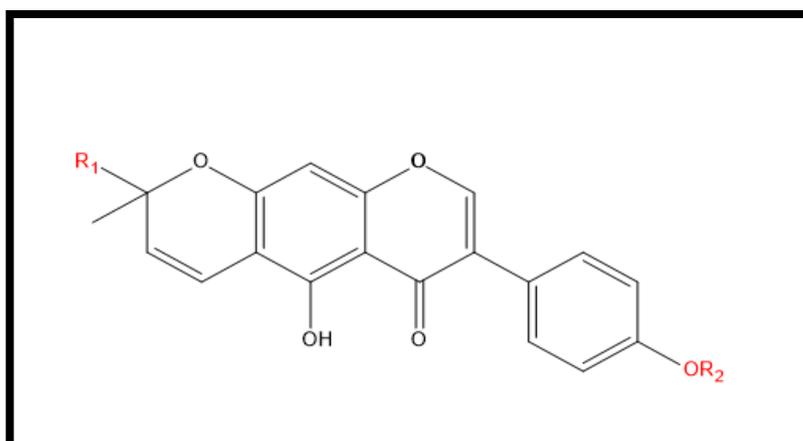
- les aglycones isoflavoniques libres génistéine et isoprunétine se montrent plus actives que les formes glycosylées correspondantes comme les hétérosides 7-O-glucoside génistéine et 4',7-di-O-glucoside isoprunétine.
- les hétérosides flavoniques 7-O-glucoside lutéoline et 4'-O-glucoside lutéoline sont plus actifs que la génine lutéoline. En plus, la glycosylation en position C-4' pour la lutéoline est plus favorable pour l'activité œstrogénique que celle en position C-7.

I.9.4 Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Genista*

Les Légumineuses sont réputées pour être extraordinairement riches, qualitativement et quantitativement, en flavonoïdes [41]. Dans le genre *Genista*, une grande série de molécules flavoniques ont été isolées, parmi les quelles les isoflavones peuvent être considérées comme des marqueurs chimio-taxonomiques de ce genre.. Les isoflavones constituent un groupe de bio-flavonoïdes naturels. La plupart sont synthétisées par les plantes de la famille des Légumineuses et sont principalement limitées à la sous-famille des Papilionoideae (= Faboideae) [40]. De plus, quelques isoflavones originales ont été reportées dans ce genre. Le tableau I.3 et la figure I.6 présentent Quelques isoflanoïdes isolés du genre *Genista*.

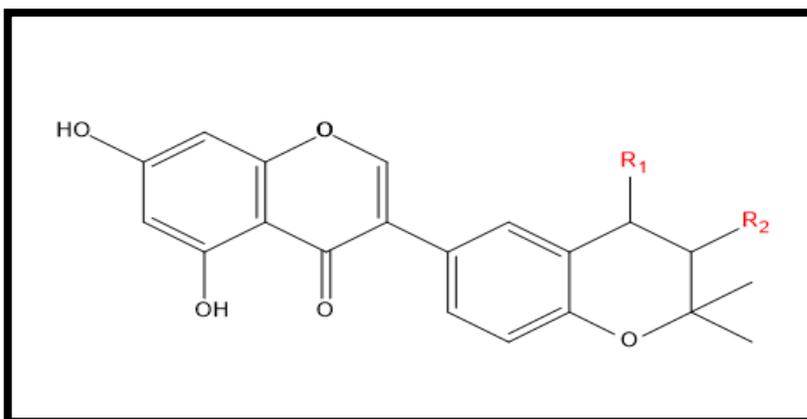
Tableau I.3: Isoflavonoïdes isolés du genre *Genista*.

N°	Composés	Espèces	Références
1	Alpinumisoflavone	<i>G. tenera</i>	[42]
2	Hydroxyalpinumisoflavone	<i>G. ephedroides</i>	[43]
3	4'-O-Glucopyranoside alpinumisoflavone	<i>G. pichisermolliana</i>	[44]
4	Isoderrone	<i>G. corsica</i>	[45]
5	Ficuisoflavone		
6	Dihydroisoderrondiol		
7	7-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine	<i>G. morisii</i>	[46]
8	7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside genistéine		
9	7,4'-di-O-β-D-glucopyranoside isoprunétine		
10	daidzéine		
11	genistéine		
12	isoprunétine	<i>G. cilentina</i>	[47]
13	biochanine A		
14	4'-O-methylorobol		
15	biochanine A 7-O-β-D-glucoside	<i>G. tricuspidata</i>	[48]
16	4'-glucosyl génisteine (sophoricoside)		
17	5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone	<i>G. ulicina</i>	[49]

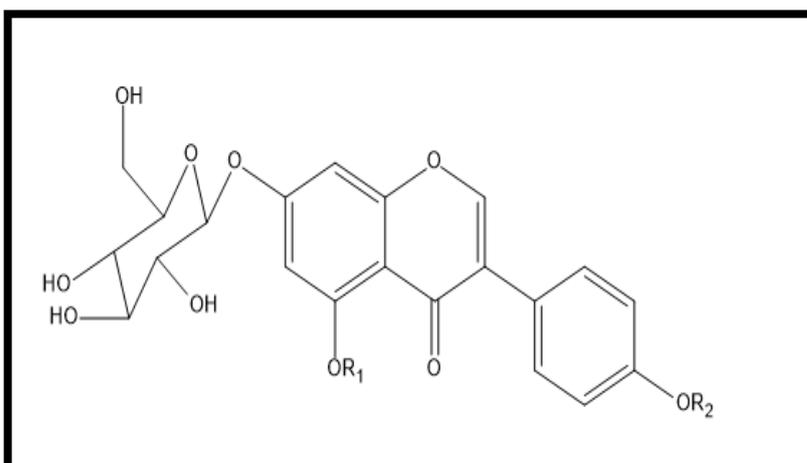


- 1 R₁= CH₃, R₂= H.
 2 R₁= CH₂OH, R₂= H.
 3 R₁= CH₃, R₂= Glu.

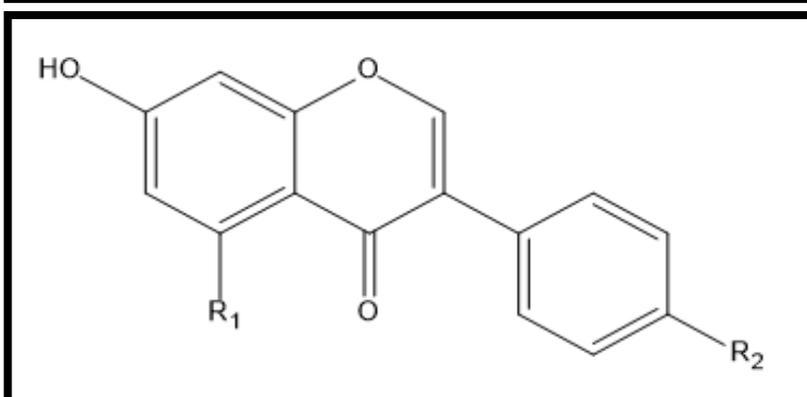
Figure I.6: Isoflavonoïdes isolés du genre *Genista*.



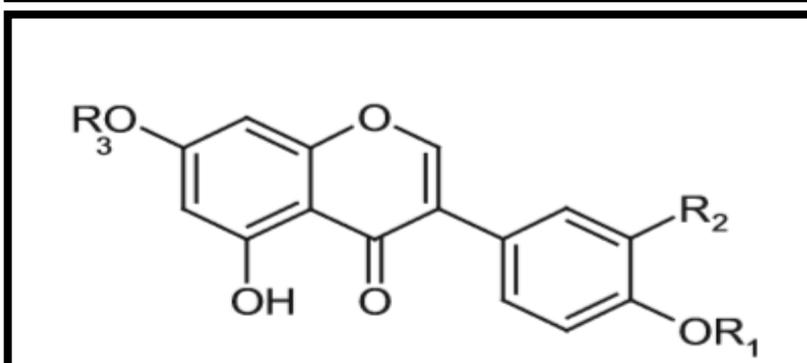
- 4 $R_1 = R_2 = H$.
 5 $R_1 = H, R_2 = OH$.
 6 $R_1 = R_2 = OH$.



- 7 $R_1 = OCH_3, R_2 = H$.
 8 $R_1 = H, R_2 = Glu$.
 9 $R_1 = OCH_3, R_2 = Glu$.



- 10 $R_1 = H, R_2 = OH$.
 11 $R_1 = OH, R_2 = OH$.
 12 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$.
 16 $R_1 = OH, R_2 = O-Glu$.
 17 $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$.



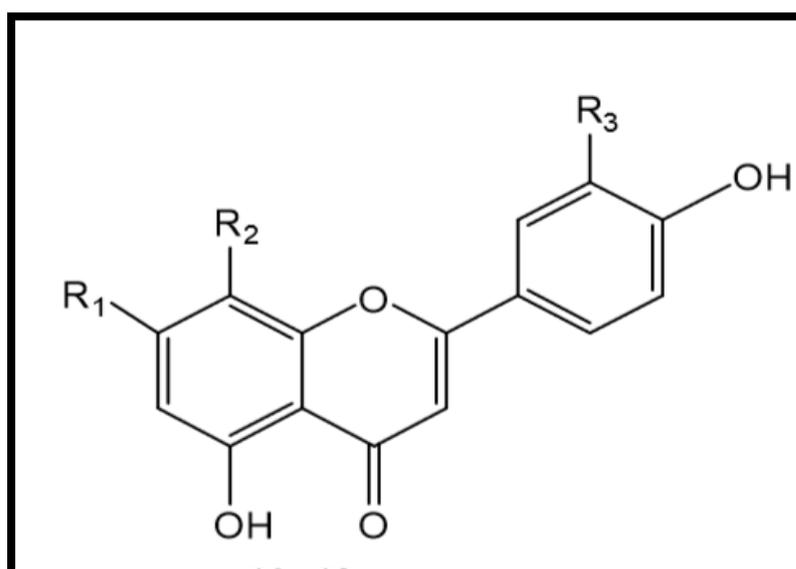
- 13 $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H$.
 14 $R_1 = CH_3, R_2 = OH, R_3 = H$.
 15 $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = \beta-D-Glu$.

Figure I.6: Isoflavonoïdes isolés du genre *Genista* (suite).

Par ailleurs, quelques molécules flavoniques de type flavanonols, flavanones et isoflavanes ont été reportées dans le genre *Genista* (tableau I.4 et figure I.7).

Tableau I.4: Flavonoïdes isolés du genre *Genista*.

N°	Composés	Espèces	Références
18	Orientine	<i>G. morisii</i>	[46]
19	Vitéxine		
20	Eriodictyol		
21	lutéoline	<i>G. cilentina</i>	[47]
22	apigénine		
23	3,7-bis- α -L-rhamnopyranosyl-aromadendrine		
24	Quercétrine	<i>G. tricuspidata</i>	[48]
25	4', 5, 7-trihydroxy-3'-methoxy-3-O-glucosylflavone (isorhamnétine 3-glucoside)		
26	4', 5, 7-trihydroxy-3', 8-dimethoxy-3-O-glucosylflavone		
27	4', 5, 7-trihydroxy-3', 8-dimethoxy-3-O-rhamnoglucosylflavone	<i>G. ulicina</i>	[49]
28	3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] quercétine		
29	3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] isorhamnétine		
30	3-O-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] kaempférol		
31	6-C- β -D-glucopyranosylapigénine		
32	6,8-di-C- β -D-glucopyranosylapigénine		



18 R₁= O-glu, R₂= H, R₃= OH.

19 R₁= OH, R₂=glu, R₃= OH.

20 R₁= OH, R₂= glu, R₃= H.

Figure I.7: Flavonoïdes isolés du genre *Genista*.

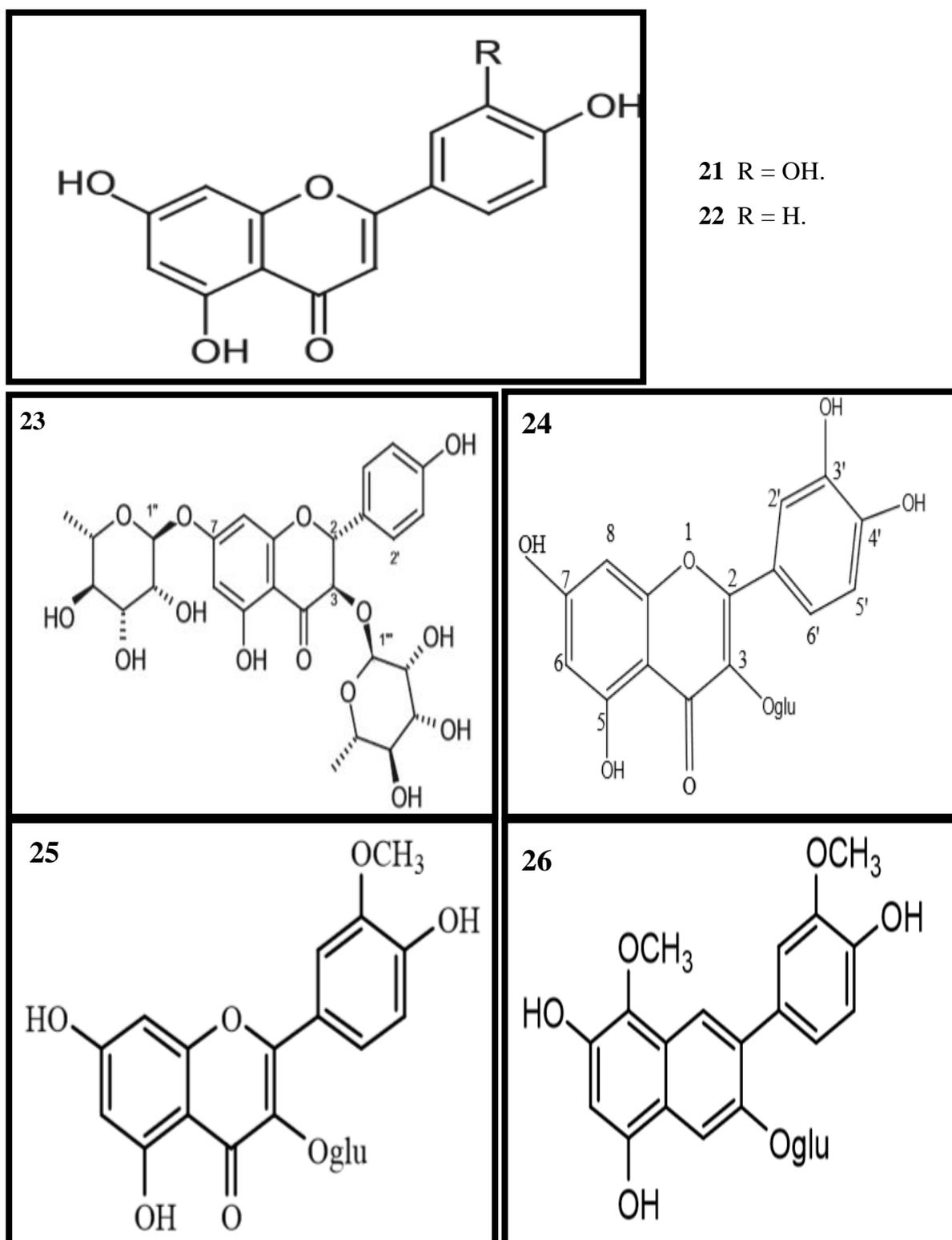


Figure I.7: Flavonoïdes isolés du genre *Genista* (suite).

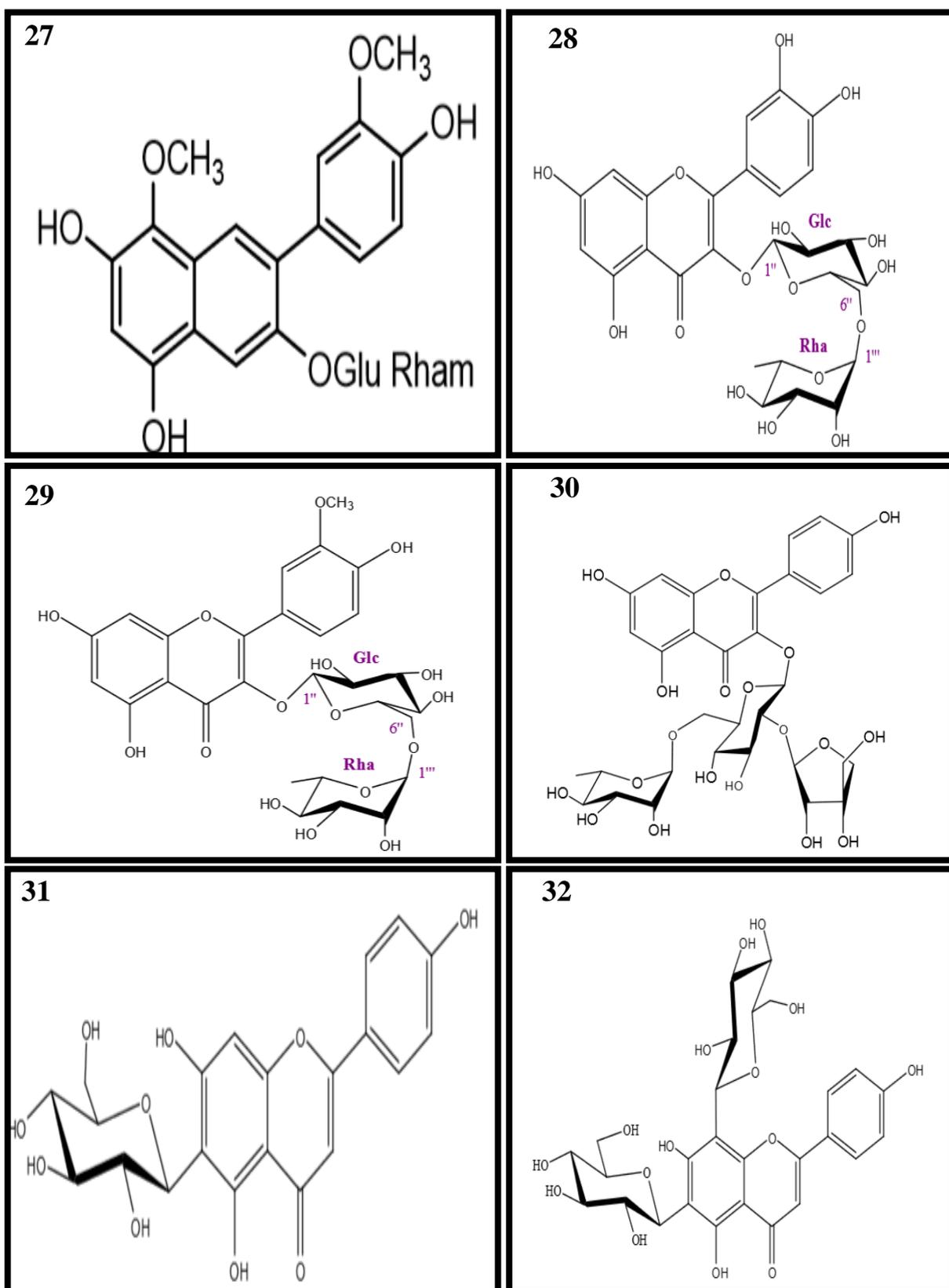


Figure I.7: Flavonoïdes isolés du genre *Genista* (suite).

I.10 Conclusion

L'étude bibliographique réalisée sur la composition chimique des espèces du genre *Lotus* et du genre *Genista* montre la richesse de ces deux genres en métabolites secondaires de type flavonoïde et isoflavonoïde qui sont bien connues pour leur grande importance en activités biologiques. Les résultats de cette étude nous ont incités à entreprendre l'investigation phytochimique de deux espèces endémiques: *Genista ferox* Poirret appartenant au genre *Genista* et *Lotus roudairei* Bonnet appartenant au genre *Lotus* qui n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant.

Références bibliographiques

- [1] Lewis.G.P, Schrire.B.D, Mackinder.B.A, Rico.L and Clark.R. (2013) A tool for collections management and taxon sampling *South African journal of botany*, 76–84.
- [2] Pullaiah T. (1987) Encyclopedia of world medicinal plants. **4th Edn.** , 2042- 2049.
- [3] WIT.H D. (1963) Les plantes du monde. P. R. R. e. M. H (Ed.), 308-323
- [4] Lindl FF. (1836) Systematic Botany. 148.
- [5] Heywood.V.H. (1996) Flowering Plants of the World. P. Oxford University, Oxford (Ed.), 141-145, 149-152.
- [6] Azani.N and al a. (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *TAXON, LPWG*, **1**, 44–77.
- [7] Spichiger.R.E, Savolainen.V.V and Figeat.M.Lausanne. (2000) Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. *Polytechniques et Universitaires Romandes. Ed. Presses* **25**, 29, 56, 85, 182-187.
- [8] Moyse.H.R.R. (1967) Précis de Matière Médicale. 239-243, 335-336, 346.
- [9] Manceau P (1946) Précis de Matière Médicale. Paris, **Ed. Maloine**, 1092-1093, 1286.
- [10] Guignard.J.L. (1996) *Abrégés de Biochimie végétale*.
- [11] Bruneton.J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. E. T. D. P. Paris (Ed.), 661-709.
- [12] Blondel.R. (1887) Manuel de matière médicale avec 358 figures dans le texte. Paris, *Ed. Octave Doin*, 121.
- [13] Tham.D.M, Gardner.C.D and Haskell.W.L. (1998) Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens,A Review of The Clinical; Epidemiological; and Mechanistic Evidence. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **83**, 2223- 2235.
- [14] Murkies.A L, Wilcox.G and Davis.S.R. (1998) Phytoestrogens. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **83**, 297-303.
- [15] Boué.S.M, Wiese.T.E, Nehls.S, Burow.M.E, Elliott.S, Carter-Wientjes.C.H, Shih.B.Y, McLachlan.J.A and Cleveland.T.E. (2003) Evaluation of The Estrogenic Effects of Legume Extracts Containing Phytoestrogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2193-2199.
- [16] Botineau.M. (2010) Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs. L. TEC & DOC (Ed.), 597-639.
- [17] Ferchichi.A. (2006) Workshop International « diversité des fabaceae fourragères et de leurs symbiotes ». *Alger-Academic Publication*, **39**, 51-75.
- [18] Maxted.N and Bennett.S. J. (2001) Legume diversity in the mediterranean region. Plant genetic resources of legumes in the mediterranean. *PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands,kluwer academic publication*, **39**, 51-75.
- [19] Djouadi.S, Amrani.S, Bouherama.A, Ezzaman.N N and Aïd.F. (2017) Nature des Rhizobia associés à 15 espèces du genre *Lotus* en Algérie. *Botany*, **95**, 879-888.
- [20] Quezel.P and Santa.S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C. N. R. S. Paris (Ed.), 491-496
- [21] Osman.Samir.M, El-Khalik.Soad.M A, Saadeldeen.Amr.M and Wink.Mahmoud.A KM. (2015) Activity Guided Phytochemical Study of Egyptian *Lotus polyphyllus* E.D.

- Clarke (Fabaceae) *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **8**, 18-26
- [22] Ould Mohamed vall HMEYADA A. (2009) contribution à l'étude des plantes médicinales de mauritanie. *Ann. Univ. Lomé (Togo), série Sciences*, **Tome XVII**, 9-27.
- [23] Golea.L, Haba.H, Lavaud.C, Long.CH and Benkhaled.M. (2012) Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik. *Biochemical Systematics and Ecology*, **45**, 12-15.
- [24] El-Youssef.H.M, Brian.T.M, Amer.M.E, .S.Abdel-Kader M and Kingston.D.J.I a. (2008) Phytochemical and biological study of the aerial parts of *Lotus lalambensis* growing in SAUDI ARABIA *Saudi Pharmaceutical Journal*, **16**.
- [25] Mahmoud ZF, Amer, M. E, Abdel Kader, M. S. and Abdel-Salam, N. A. (1990) A coumestan from *Lotus creticus*. *Phytochemistry*, **29**, 355-356.
- [26] Abdel-Kader MS, Basudan.Omer.A, Parveen.Mehtab and Masouda.E.Amer. (2008) A new 3-arylcoumarin from the roots of an Egyptian collection of *Lotus polyphyllus* *Natural Product Research*, **22**, 449-453.
- [27] Maged.S.Abdel-Kader, Basudan.Omer.A, Alqasoumi.Saleh.I and Abou-Shoer.Mohamed.I. (2007) Phytochemical Study of *Lotus ornithopodioides* L. *Natural Product Sciences*, **13**, 317-321.
- [28] Ingham.John.L and Dewick.Paul.M. (1979) A new isoflavan phytoalexin from leaflets of *Lotus hispidus*. *Phytochemistry*, **18**, 1711-1714.
- [29] Lewis.G, Schrire.B, Mackinder.B and Lock.M. (2005) Legumes of the world. U. K. R. B. G. Richmond, Kew (Ed.).
- [30] Marino.P, Guarino.R and Bazan.G. (2012) The Sicilian taxa of *Genista* sect. *Voglera* and their phytosociological framework. *Flora Mediterranea*, **22**, 169-190.
- [31] Gibbs.P.E. (1966) A revision of the genus *Genista* L. *Notes Royal Botanic Garden, Edinburgh*, **27**, 11-99.
- [32] Azzoui.O, ES-Sgaouri.A and Fennane.M. (2000) Valeur écologique et biogéographique du genre *Genista* L. du Maroc. *Lagasalia*, **21**, 263-278.
- [33] Rainova.L, Nakov.N, Bogdanova.S, Minkov.E and Staneva-Stoytcheva.D (1988) Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel. *Phytotherapy research*, 137-139.
- [34] Rauter.A.P, Martins.A, Lopes.R, Ferreira.J, Serralheiro.L.M, Araújo.M.E, Borges.C, Justino.J, Silva.F.V, Goulart.M and al. (2009) Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of ethnopharmacology*, **122**, 384-393.
- [35] Garritano.S, Pinto.B, Giachi.I, Pistelli.L and Reali.D. (2005) Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an in vitro short-term test. *Phytomedicine*, **12**, 143-147.
- [36] Rigano.D, Cardile.V, Formisano.C, Maldini.M.T, Piacente.S, Bevelacqua.J and Russo. (2009) A. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-biological interactions*, **180**, 211-219.
- [37] Perkins A.G. NFG. (1899) The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). *Journal of the Chemical Society*, **75**, 830-839.

- [38] Akiyama.T, Ishida.J, Nakagawa.S, Ogawara.H, Watanabe.S and Itoh.N. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 5592-5595.
- [39] Evans.B.A.J, Griffiths.K and Morton.M.S. (1995) Inhibition of 5 α -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *Journal of Endocrinology*, **147**, 295-302.
- [40] Dixon.R.A and Ferreira.D. (2002) Molecule of interest, genistein. *Phytochemistry*, **60**, 205-211.
- [41] Harborne.J.B. (1969) Chemosystematics of the Leguminosae flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteeae*. *Phytochemistry*, **8**, 1449-1456.
- [42] Martins.A, M.A A-F, Borges.C, Rauter.A.P, Brum-Bousquet.M, Tillequin.F, Gonzalez.A.G and Bermejo.J. (2002) Flavonoids from *Genista tenera*. *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, 111-117.
- [43] Pistelli.L, Bertoli.A, Giach.I and Manumata.A. (1998) Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Product*, **61**, 1404-1406.
- [44] Noccioli.C, Meini.L, Loi.M.C, Potenza.D and Pistelli.L. (2011) A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. *Phytochemistry Letters*, **4**, 342-344.
- [45] Pistelli.L, Giachi.I, Potenza.D and Morelli.I. (2000) A New Isoflavone from *Genista corsica*. *Journal of Natural Product*, **63**, 504-506.
- [46] Giachi.I, Manunta.A, Morelli.I and Pistelli.L. (2002) Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 801-803.
- [47] Venditti.A, Frezza.C, Foddai.S, Serafini.M and Bianco.A. (2016) A rare bis-rhamnopyranosyl-aromadendrin derivative and other flavonoids from the flowers of *Genista cilentina* Vals, an endemic species of southern Italy. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [48] Boumaza.O, Mekkiou.R, Seghiri.R, Sarri.D, Benayache.S, Garcia.P.V, Bermejo.J and Benayache.F. (2006) Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42**, 730-731.
- [49] Boutaghane.N, Voutquenne-Nazabadioko.L, Harakat.D, Simon.A and Kabouche.Z. (2013) Triterpene saponins of *Genista ulicina* Spach. *Phytochemistry*, **93**, 176-181.



Partie II

Travaux personnels

Introduction

Cette partie comporte deux chapitres, le premier comprend la présentation de toute la partie expérimentale qui concerne l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique de l'espèce *Lotus roduairei* Bonnet (Fabaceae) et le second comporte également l'exposition de toute la partie expérimentale de l'étude phytochimique et de l'évaluation de l'activité biologique de l'espèce *Genista ferox* Poirret (Fabaceae).

Objectifs

Les objectifs de ce travail sont les suivants:

- Identifier les différents groupes chimiques présents dans les différents organes des deux espèces.
- Identifier et quantifier les composés phénoliques présents dans les différents extraits des deux espèces.
- Isolement et détermination structurale des métabolites des différents extraits des deux espèces.
- Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits des deux espèces.
- Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits des deux espèces contre des cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa).

Chapitre II.1

Etude phytochimique et évaluation de

l'activité biologique de l'espèce

Lotus roudairei **Bonnet**

Investigation phytochimique

II.1.1 Choix du matériel végétal

La sélection de cette plante a été basée sur plusieurs critères:

- Son endémisme et son origine saharien.
- Aucune investigation phytochimique n'a été abordée sur celle-ci jusqu'à ce jour.
- Sa distribution au Sahara connu avec ses conditions climatiques difficiles (insuffisance hydrique et stress oxydatif) ce qui permet à ces dernières d'accumuler de métabolites secondaires spécifiques pour survivre et se développer.

II.1.2 Classification dans la systématique botanique

Embranchement	—————→	Spermaphytes
Sous-embranchement	—————→	Angiospermes
Classe	—————→	Dicotylédones
Ordre	—————→	Rosales
Famille	—————→	Fabales (Légumineuses)
Sous famille	—————→	Papilionacées (Fabacées)
Tribu	—————→	Lotier
Genre	—————→	<i>Lotus</i>
Espèce	—————→	<i>Lotus Roudairei</i> Bonnet

II.1.3 Nom vernaculaire

Son nom commun au Sahara Algérienne est Nedjem [1].

II.1.4 Synonymes

Kebirita roudairei (Bonnet) [2].

II.1.5 Description botanique

Plantes annuelles. Fleurs jaunes, petites (5-8 mm). Fleurs isolées à l'aisselle des feuilles sur un pédoncule très court. Feuilles à pétioles bien développés. Folioles ovales-cunéiformes moins de 2 fois plus longues que larges (figure II.1) [1].

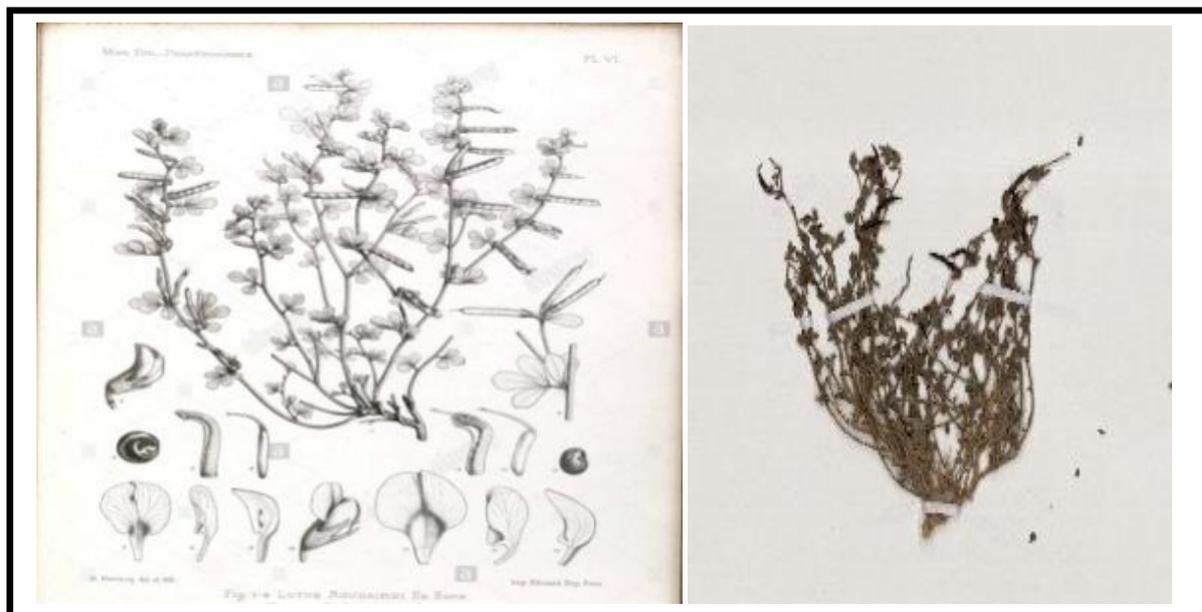


Figure II.1: Image de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet.

II.1.6 Distribution géographique

Endémique au Sahara-Sahara septentrional et central [1].

II.1.7 Usages traditionnels

Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle comme antispasmodique et anti-diarrhéique [3].

II.1.8 Travaux antérieurs sur l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet

La recherche bibliographique que nous avons menée sur l'espèce *Lotus roudairei* a montré que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant.

II.1.9 Travaux personnels

II.1.9.1 Récolte

La plante a été récoltée au mois d'avril 2013 dans les environs de la wilaya de Béchar (Algérie) et a été authentifiée par Mr. Benabdelhakem (Directeur de l'agence Nationale de Préservation des Ressources Naturelles, Béchar, Algérie). Un spécimen a été déposé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL-Université des Frères Mentouri-Constantine sous le code FLR 04/2013.

II.1.9.2 Screening phytochimique

Est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et / ou de colorations. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de métabolites secondaires tels que les coumarines, les saponines, les quinones, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les anthocyanines et les tannins dans les différents organes (feuilles, tiges et fruits) de la plante.

II.1.9.2.a Recherche des alcaloïdes

Une quantité de 5 g de la poudre végétale a été dissous dans 25 ml d'acide sulfurique dilué à 10 % dans un Erlen Meyer, laisser macérer pendant 24 heures puis filtrer et laver à l'eau distillée de manière à obtenir 25 ml du filtrat.

le test est réalisé par l'introduction de 1ml du filtrat dans un tube à essai et l'ajout de 3 gouttes du réactif de Dragendorff [4].

➤ Caractérisation

Réaction de précipitation : la présence d'alcaloïdes est caractérisée par l'apparition d'un précipité.

II.1.9.2.b Recherche des coumarines

Une quantité de 1g de la poudre végétale a été additionnée par 20 ml de l'éther diéthylique avec agitation puis Laisser macérer pendant 24 heures. Après Filtration, le filtrat est compléter jusqu'à 20 ml. La solution ainsi obtenu a été évaporée à l'air libre jusqu'à 5 ml. Un volume de 2 ml d'eau distillé chaude est additionné à l'extrait obtenu.

La solution a été partagée entre deux tubes à essai. L'un des tubes est additionné avec par l'ammoniaque à 25 % ; mélanger et observer la fluorescence sous UV à 366 nm. Le deuxième tube est utilisé comme témoin [5].

➤ Caractérisation

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

II.1.9.2.c Recherche des triterpènes, stérols et terpènes

La matière végétale (5g) a été macérée dans 50 ml de solution d'un mélange méthanol/eau distillée (v/v ; 80:20) pendant 24 heures puis filtrée et évaporée à sec. L'ajout de 20 ml de l'éther diéthylique après refroidissement est nécessaire pour dissoudre les composés apolaires.

❖ Identification des terpènes et stérols

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

- La première partie: utiliser comme témoin
 - La deuxième partie: à cette solution on a rajouté 3 ml d'anhydre acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré [6].
- **Caractérisation** : un changement de couleur rapide est en faveur de la présence de composés stéroïdiens saturés. Si la couleur devenait vert foncé ceci indique la présence des terpènes.
- La troisième partie: à cette partie on rajoute quelques gouttes d'acide sulfurique.
- **Caractérisation** : L'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des stérols insaturés.

❖ Identification des triterpènes

Un volume de 10 ml d'extrait hydro-alcoolique est évaporé à sec, le résidu obtenu est dissous dans 0,5 ml d'anhydre acétique et 0,5 ml de chloroforme. la solution ainsi obtenue est transférée dans un tube sec avec une pipette pasteur on rajoute (1 à 2 ml) d'acide sulfurique concentré au fond du tube [7].

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

II.1.9.2.d Recherche des substances polyphénoliques (tanins)

Une masse de 5 g de matière végétale a été infusée dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes.

❖ Tanins catéchiques

Un volume de 2 ml de l'infusé a été placé dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 % [8].

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

❖ Tanins galliques

Prélever 2 ml de l'infusé précédent et le mettre dans un tube à essai, saturé en acétate de sodium, puis rajouter quelques gouttes de chlorure ferrique à 1% [7].

- **Caractérisation:** La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

II.1.9.2.e Recherche des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été infusée dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes. Après filtration, 6 ml du filtrat a été partagé dans 3 tubes, chacun contient 2 ml puis on ajoute dans:

-1^{ier} tube: 1 ml de NaOH.

-2^{ème} tube: 1 ml d'eau distillée.

-3^{ème} tube: 1 ml de HCl concentré et des copeaux de magnésium [9].

- **Caractérisation :** En présence des flavonoïdes les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge violacé, rouge foncé ou violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.

La coloration rouge au 3^{ème} tube confirme la présence des leuco anthocyanes.

II.1.9.2.f Recherche des saponines

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été infusée dans 50 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, le solution obtenu après filtration est agitée pendant quelques minutes [10].

- **Caractérisation :** L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

II.1.9.2.g Recherche des anthocyanes

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été macérée dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 mn. Après Filtration, le filtrat est complété avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml

puis additionné avec de 5 ml d'acide sulfurique dilué à 10 % et 5 ml d'ammoniaque à 10 % [11].

➤ **Caractérisation** : La coloration bleu-violacée indique la présence d'anthocyanes.

II.1.9.2.h Recherche des quinones

Une quantité de 5 g de la matière végétale a été humectée par quelques gouttes de HCl et Mettre à macérer dans un Erlen contenant 10 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. Après Filtration, 2 ml du filtrat a été placée dans un tube à essai et additionnée avec de 2 ml de NaOH 10 % [12].

➤ **Caractérisation** : La coloration rouge –violet indique la présence des quinones.

II.1.9.3 Extraction

Deux méthodes d'extraction ont été adoptées dans ce travail, la première consiste en une macération du matériel végétal à froid, alors que la seconde a été faite à chaud (eau bouillante à 90 °C) afin d'établir une différence du contenu métabolique par l'analyse des extraits par la méthode HPLC-TOF/MS.

II.1.9.3.a Macération à froid

Les parties aériennes de *Lotus roudairei* (1000 g) ont été mises à macérer dans un système hydro-alcoolique (Méthanol/Eau distillée ; v/v : 80/20) pendant 3x48 heures.

Les solutions récupérées ont été évaporées à sec sous pression réduite, les marcs ont été additionnées avec 400 ml d'eau distillée et après une nuit de repos, la solution a été filtrée. Le filtrat a été ensuite soumis à une extraction liquide-liquide avec différents solvants, en commençant par l'éther de pétrole pour éliminer la chlorophylle puis par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et en dernier par le *n*-butanol. La partie non soluble dans l'eau a été solubilisée dans le méthanol formant ainsi l'extrait méthanolique.

La concentration des phases organiques à sec a permis l'obtention des extraits suivants :

- Ether de pétrole nommé **EP₁** (0,3 g).
- Chloroforme nommé **CH₁** (2,68 g).
- Acétate d'éthyle nommé **AE₁** (3,75 g).
- *n*-Butanol nommé **BU₁** (16 g).
- Méthanol nommé **ME₁** (12 g).

La figure II.2 résume les étapes de l'extraction à froid de *L. roudairei*.

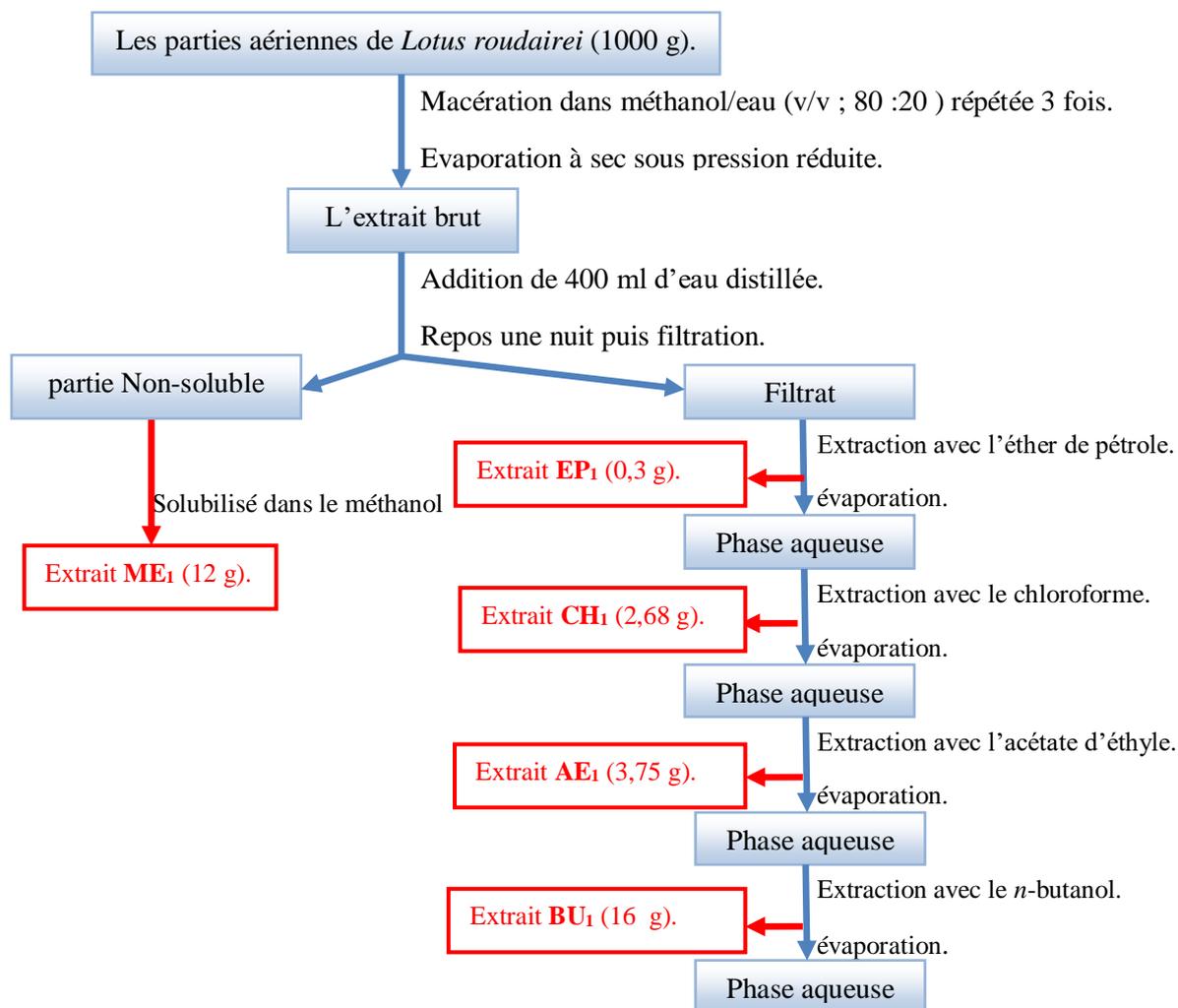


Figure II.2: Organigramme de l'extraction à froid de *L.roudairi*.

II.1.9.3.b Hydrodistillation

Les parties aériennes de la même plante (300 g) ont été bouillies dans de l'eau distillée à 90°C pendant 3 heures (hydrodistillation). La solution ainsi obtenue a été filtrée puis mise à une extraction avec l'acétate d'éthyle puis avec le *n*-butanol. Les phases organiques sont concentrées à sec donnant l'extrait acétate d'éthyle nommé **AE**₂ de masse 0,3 g et l'extrait *n*-butanol nommé **BU**₂ de masse 1g. (figure II.3).

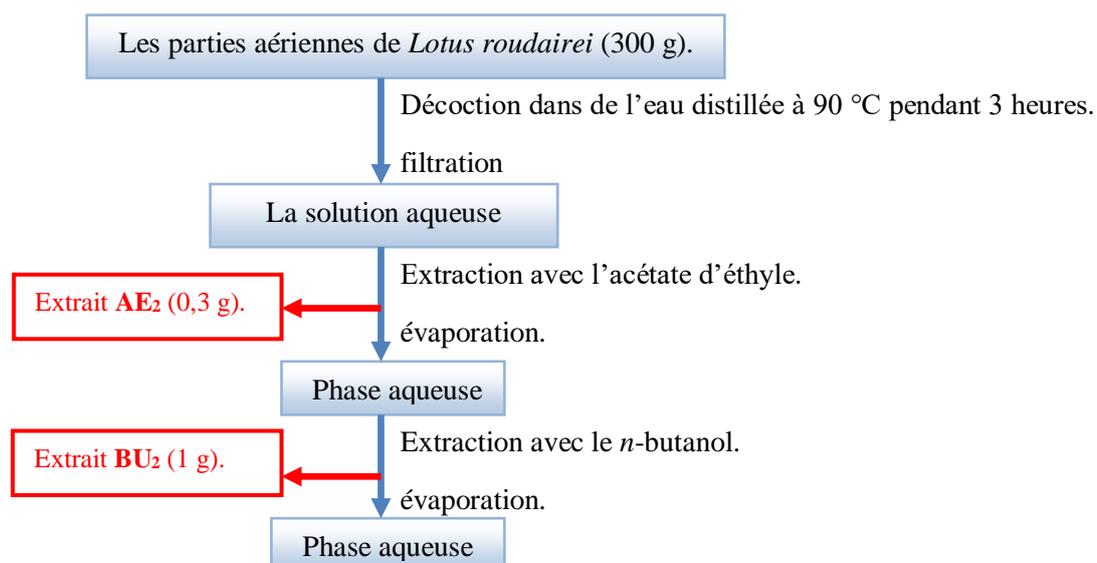


Figure II.3: Organigramme de l'hydrodistillation de *L. roudairei*.

Le tableau II.1 représente les masses et les rendements des deux méthodes d'extraction de *L. roudairei*.

Tableau II.1: masses et rendements des extraits de l'espèce *L. roudairei*

Matériel végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement (%)
Hydrodistillation (300 g)	AE ₂	00,30	0,10
	BU ₂	01,00	0,33
Macération à froid (1000 g)	EP ₁	00,30	0,003
	CH ₁	02,68	0,03
	AE ₁	03,75	0,04
	BU ₁	16,00	0,16
	ME ₁	12,00	0,12

II.1.9.4 Analyse qualitative et quantitative des extraits

L'identification ainsi que la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans les extraits : CH₁, AE₁, BU₁, ME₁, AE₂ et BU₂ de l'espèce *Lotus roudairei* ont été réalisées grâce à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse munie d'un analyseur à temps de vol (HPLC-TOF/MS).

II.1.9.4.a Préparation des échantillons Pour l'analyse HPLC-TOF/MS

Les extraits (200 ppm) ont été dissous dans le méthanol à température ambiante, puis filtrés à travers un filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène (0,45 µm) [13].

II.1.9.4.b Conditions opératoires

Les conditions opératoires de la HPLC sont comme suit :

- Agilent Technologie 1260 Infinity LC, 6210 TOF-MS.
- Volume d'injection: 10 µl
- Température de la colonne: 35 °C
- Modèle de la colonne: ZORBAX SB-C18 (4,6x100mm, 3,5 µm)
- Débit: 0,6 ml /min
- Ionisation: Dual-ESI
- La température de l'azote: 325 °C
- Débit du gaz: 10 ml / min
- Tension de Fragmenteur: 175 V
- Phase mobile: Cette phase est constituée de deux solvants :
 - ❖ Solvant A: Eau ultra-pure acidifiée avec de l'acide formique à 0,1%
 - ❖ Solvant B: Acétonitrile.

Le tableau II.2 résume le programme d'élution de la colonne.

Tableau II.2: Programme de la phase mobile A et B.

	Temps (min)	H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique	acétonitrile %
1	0-1	90	10
2	1-20	90	10
3	20-23	50	50
4	23-25	20	80
5	25-30	10	90

II.1.10 Etude des extraits

Pour avoir une idée sur la richesse des différents extraits et choisir les meilleurs systèmes de séparation, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium en utilisant différents systèmes d'élution.

II.1.10.1. Fractionnement de l'extrait CH₁

Une masse de 2,68 g de l'extrait CH₁ a été fractionnée sur une colonne de gel de silice éluée par le système Hexane/Acétate d'éthyle/Méthanol en gradient de polarité (figure II.4). La colonne a été confectionnée avec 88g de gel de silice (type 60, 230-400 Mesh) préparée dans l'hexane. Le fractionnement a été fait tous les 100 ml.

Les lots ont été regroupés selon leur profil chromatographique sur les plaques CCM.

Le regroupement des lots est présenté dans le tableau II.3.



Figure II.4: Colonne de fractionnement de l'extrait CH₁.

Tableau II.3: Résultats de la séparation de l'extrait CH₁ de *L. roudairei* par chromatographie sur colonne.

Lots	N° de la fraction	Système d'élution (%)			Poids de fraction (mg)	Observations
		hexane	Acétate d'éthyle	méthanol		
1-8	C ₁	100	00	-	0,8	Traces
9	C ₂	95	5	-	0,9	Traces
10	C ₃	90	10	-	0,5	Traces
11	C ₄	90	10	-	5,2	Mélange sous forme huileuse
12	C ₅	90	10	-	4,6	Mélange complexe
13	C ₆	90	10	-	1,7	Mélange complexe
14-15	C ₇	90	10	-	6,3	Mélange complexe
16	C ₈	90	10	-	3,0	Mélange complexe
17	C ₉	90	10	-	7,8	Mélange complexe
18	C ₁₀	90	10	-	11,9	Mélange complexe
19-23	C ₁₁	85	15	-	10,1	Mélange complexe

Tableau II.3: Résultats de la séparation de l'extrait CH₁ de *L. roudairei* par chromatographie sur colonne (suite).

Lots	N° de la fraction	Système d'élution (%)			Poids de fraction (mg)	Observations
		hexane	Acétate d'éthyle	méthanol		
24	C ₁₂	85	15	-	5,5	Mélange complexe
25-28	C₁₃	85	15	-	20,0	Mélange+ précipité
29-36	C ₁₄	80	20	-	9,5	Mélange complexe
37-40	C ₁₅	80	20	-	6,9	Mélange complexe
41-44	C₁₆	80	20	-	20,1	Mélange+ précipité
45-47	C ₁₇	75	25	-	10,3	Mélange complexe
48-52	C₁₈	75	25	-	101,2	Mélange+ précipité
53-54	C ₁₉	75	25	-	24,0	Mélange complexe
55-56	C ₂₀	70	30	-	31,0	Mélange complexe
57-61	C ₂₁	70	30	-	38,3	Mélange complexe
62-65	C ₂₂	70	30	-	48,8	Mélange complexe
66-69	C ₂₃	65	35	-	105,4	Mélange complexe
70-76	C₂₄	65	35	-	128,7	Mélange+ précipité
77-78	C ₂₅	60	40	-	53,2	Mélange complexe
79-80	C ₂₆	60	40	-	54,6	Mélange complexe
81-82	C ₂₇	55	45	-	68,0	Mélange complexe
83-88	C ₂₈	55	45	-	76,7	Mélange complexe
89	C ₂₉	50	50	-	30,1	Mélange complexe
90	C ₃₀	50	50	-	20,9	Mélange complexe
91	C ₃₁	40	60	-	44,1	Mélange complexe
92-96	C ₃₂	40	60	-	59,4	Mélange complexe
97	C ₃₃	30	70	-	60,0	Mélange complexe
98-102	C₃₄	30	70	-	88,5	Mélange séparable
103	C ₃₅	30	70	-	48,6	Mélange complexe

Tableau II.3: Résultats de la séparation de l'extrait CH₁ de *L. roudairei* par chromatographie sur colonne (suite).

Lots	N° de la fraction	Système d'élution (%)			Poids de fraction (mg)	Observations
		hexane	Acétate d'éthyle	méthanol		
104-110	C ₃₆	20	80	-	43,1	Mélange complexe
111-113	C ₃₇	20	80	-	66,1	Mélange complexe
114-118	C ₃₈	10	80	10	40,8	Mélange complexe
119-121	C ₃₉	10	80	10	208,1	Mélange complexe
122-126	C ₄₀	00	80	20	120,4	Mélange complexe
127-129	C ₄₁	00	80	20	125,7	Mélange complexe
130	C ₄₂	00	80	20	112 ,0	Mélange complexe
131-137	C ₄₃	00	70	30	201,2	Mélange complexe
138-140	C ₄₅	00	70	30	149,8	Mélange complexe
141-146	C ₄₆	00	60	40	139,1	Mélange complexe
147-151	C ₄₇	00	50	50	131,1	Mélange complexe
152-164	C ₄₈	00	0	100	116,5	Mélange complexe

II.1.10.1.a Séparation et purification des fractions issues de l'extrait CH₁

Les fractions obtenues ont été soumises à une analyse sur plaques CCM pour choisir celles dont le profil chromatographique permet d'effectuer d'éventuelles séparations.

➤ Etude de la fraction C₄

La fraction C₄ de masse 5,2 mg a été obtenue sous forme d'une phase huileuse et a subi une analyse par CG/SM.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées avec un système CPG modèle 7890 A, MSD inerte 5975C avec détecteur à trois axes, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire HP5-ms équipée d'un spectromètre de masse (30 mx) 0,25 mm et 0,25 m ID. L'énergie d'ionisation était de 70 eV. Le gaz porteur était de l'hélium (1,0 ml / min) et les échantillons ont été dilués au 1/10. La température du four a été élevée de 60 °C à 240 °C à une vitesse de 4 °C/min. La température de l'injecteur a été

réglée à 250 °C. La banque NIST a été utilisée pour identifier la structure des composés en le comparant avec celles de la bibliothèque [14].

➤ **Etude des fractions C₆, C₇, C₈ et C₁₀**

Les quatre fractions C₆ (1,7 mg), C₇ (6,3 mg), C₈ (3 mg) et C₁₀ (11,9 mg) ont été solubilisées dans le chloroforme puis elles ont subi une analyse par CPG selon la même méthode que précédemment.

➤ **Etude de la fraction C₁₃**

Le tube comportant la fraction C₁₃ (20 mg) renferme un précipité blanc. Après filtration, ce précipité a été purifié par un rinçage au méthanol et a permis l'obtention du produit **PC₁₃** de masse 13 mg.

➤ **Etude de la fraction C₁₆**

Le précipité blanc formé dans cette fraction a été purifié par plusieurs lavages avec le méthanol pour obtenir le produit **PC₁₆** à l'état pur de masse 8 mg.

➤ **Etudes de la fraction C₁₈**

La fraction C₁₈ (101,2 mg) a subi une séparation par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Séphadex LH-20 élué par le système chloroforme/méthanol (v/v ; 65/35), 7 sous fractions (S₁ à S₇) ont été récupérées. Les résultats du suivi de cette colonne sont rassemblés dans le tableau II.4.

Tableau II.4: Résultats de la séparation de la fraction C₁₈ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-6	S ₁	11,5	Mélange complexe
7-12	S ₂	11,2	Mélange complexe
13-14	S ₃	05,4	Mélange complexe
15-16	S ₄	08,3	Mélange complexe
17-18	S ₅	17,0	Mélange complexe
19	S₆	27,0	Mélange + précipité
20-23	S ₇	20,0	Mélange complexe

La sous fraction S₆ (27 mg) renferme un précipité blanc, ce dernier a été purifié par un lavage successif au méthanol pour donner le produit **PC₁₈** de masse 5 mg.

➤ **Etude de la fraction C₂₄**

La fraction C₂₄ (128 mg) a subi un premier fractionnement sur colonne chromatographique de Sephadex LH-20 élué par le méthanol, 8 sous fractions (S₁ à S₈) ont été récupérées et l'ensemble des résultats est reportés dans le tableau II.5.

Tableau II.5: Résultats de la séparation de la fraction C₂₄ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observations
1-5	S ₁	05,0	Mélange complexe
6-12	S ₂	06,2	Mélange complexe
13-18	S ₃	13,4	Mélange complexe
19-22	S₄	41,8	Mélange séparable
23-24	S ₅	04,6	Mélange complexe
25-26	S ₆	20,6	Mélange complexe
27-28	S ₇	21,0	Mélange complexe
29-30	S ₈	15,0	Mélange complexe

Le traitement de la sous-fraction S₄ (41,8 mg) sur des plaques CCM de gel de silice élué 3 fois dans le système toluène/chloroforme/acétone (8/2/1; v/v) et visualisé sous la lampe UV (365 nm) a conduit à la séparation de trois produits PC₂₄₋₁ de masse 5 mg, PC₂₄₋₂ de masse 11 mg et PC₂₄₋₃ de masse 15 mg comme le montre la figure II.5.

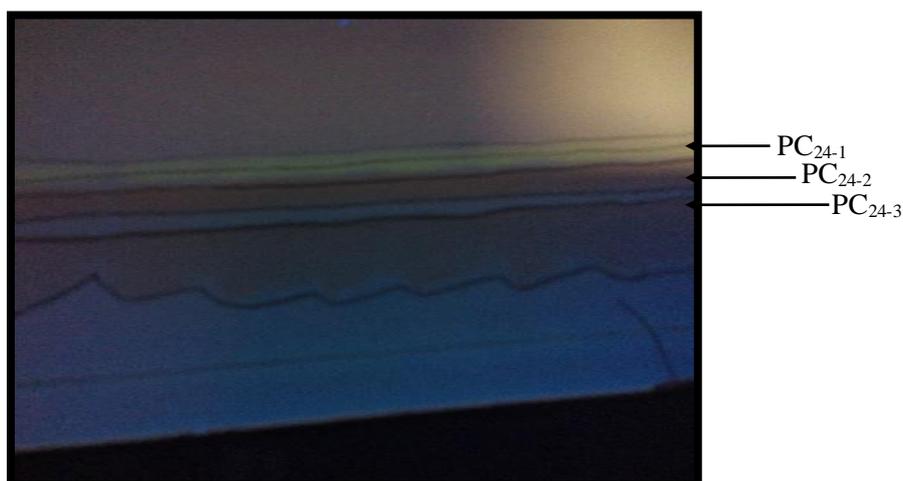


Figure II.5: Plaques CCM de la sous fraction S₄ visualisé sous la lampe UV (365 nm).

Les trois produits ont subi des purifications sur colonne de Sephadex LH-20 élué avec du méthanol. La figure II.6 montre les trois produits obtenus après l'étape de purification.

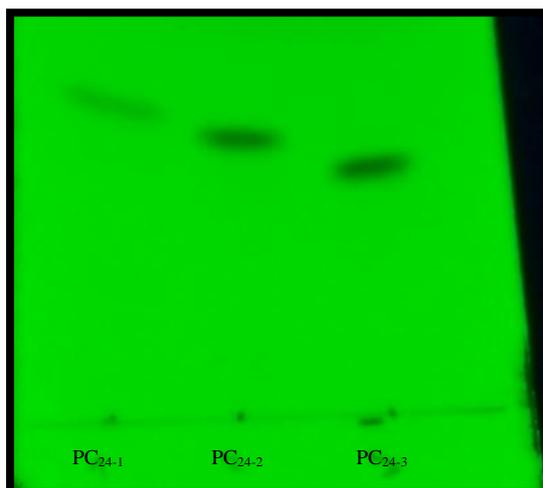


Figure II.6: Plaqué CCM des produits PC₂₄₋₁, PC₂₄₋₂ et PC₂₄₋₃ purifiés et visualisés sous la lampe UV (254 nm).

➤ **Etude de la fraction C₃₄**

La fraction C₃₄ (208,1 mg) a subi une séparation sur colonne de Sephadex LH-20 élué avec le système chloroforme/méthanol (65/35 ; v/v). Les résultats de la séparation sont regroupés dans le tableau II.6.

Tableau II.6: Résultats de la séparation de la fraction C₃₄ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-4	S ₁	01,8	Traces
5-8	S ₂	06,0	Mélange complexe
9-10	S ₃	12,0	Mélange complexe
11-15	S ₄	14,0	Mélange complexe
16-18	S ₅	18,1	Mélange complexe
19-24	S₆	43,6	Mélange +précipité
25-34	S ₇	10,0	Mélange complexe
35-38	S ₈	49,3	Mélange complexe
39-41	S ₉	30,2	Mélange complexe
42-44	S ₁₀	22,5	Mélange complexe

La sous fraction S₆ renferme un précipité blanc, ce dernier a subi une purification par lavage successif avec du méthanol pour obtenir le produit PC₃₄ de masse 12 mg.

L'étude phytochimique de l'extrait CH₁ nous a permis d'isoler 7 produits purs. Le protocole de fractionnement, séparation et purification des produits issus de l'extrait CH₁ de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet est représentée dans la figure II.7.

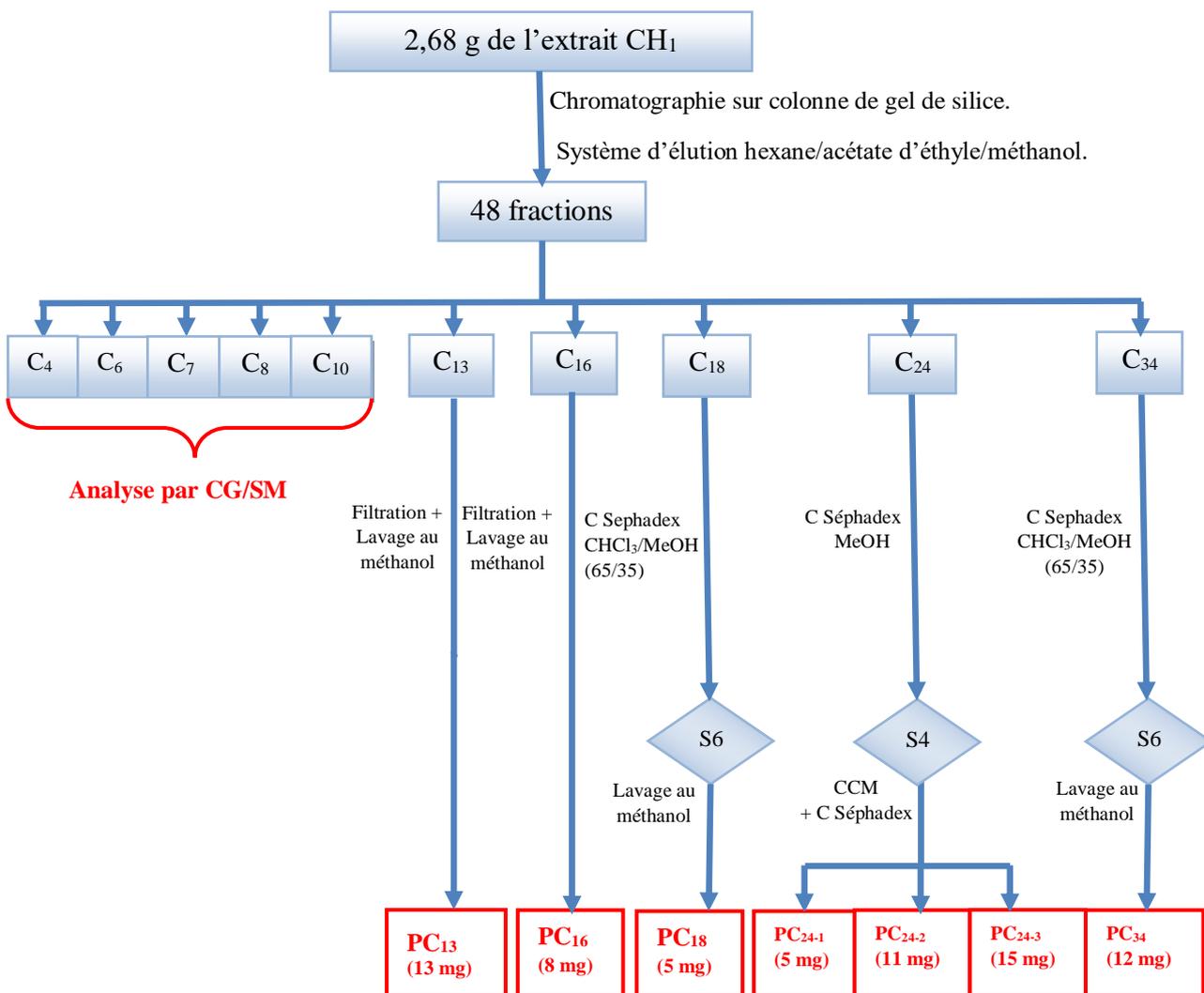


Figure II.7: Schéma récapitulatif des étapes de séparation et de purification des produits issus de l'extrait CH₁ de l'espèce *Lotus roudairei*.

II.1.10.2 Fractionnement de l'extrait AE₁

Le fractionnement de l'extrait AE₁ a été fait par l'utilisation d'un flash chromatographique (modèle : COMBIFLASH RF200 UV/VIS, Serial : 210M20115). La phase stationnaire utilisée est le gel de silice normale.

Une masse de 3,7 g de l'extrait AE₁ a été pulvérisé en poudre fine puis placé dans une petite colonne positionnée en haut d'une autre colonne de la phase stationnaire. L'éluant a été effectué avec le système hexane/chloroforme/méthanol en gradient de polarité et suivi d'une détection UV fixée dans la gamme des longueurs d'ondes de 230 à 420 nm. Le volume réuni dans chaque tube est de 20 ml (figure II.8).



Figure II.8: flash chromatographique (modèle : COMBIFLASH RF200 UV/VIS, Serial : 210M20115).

La progression de cette séparation est rassemblée dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Progression de la séparation de l'extrait AE₁ par flash chromatographie.

tubes	Système d'éluion		
	% Hexane	% Chloroforme	% Méthanol
1-12	90	10	-
13-72	80	20	-
73-100	30	70	-
101-123	40	60	-
124-142	50	50	-
143-225	30	70	-
226-338	0	100	-
339-416	0	90	10
417-424	0	80	20
425-444	0	70	30
445-480	0	50	50
481-499	0	40	60
500-525	0	0	100

Le regroupement de ces tubes a été fait à l'aide d'une analyse chromatographique sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous la lumière UV

(254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique dilué et chauffées à 100 °C pendant 3 min. Le résultat de ce regroupement est représenté dans le tableau II.8.

Tableau II.8: Résultat du regroupement des tubes résultants du fractionnement de l'extrait AE₁.

N° de la fraction	tubes	Poids de fraction (mg)	observation
A ₁	1-75	8,4	Mélange à Faible quantité
A ₂	76-150	27,3	Mélange complexe
A ₃	151-154	39,0	Mélange complexe
A ₄	155-179	45,2	Mélange complexe
A ₅	180-194	111,0	Mélange complexe
A ₆	195-225	121,9	Mélange complexe
A ₇	226	31,0	Mélange complexe
A₈	227-245	320,0	Mélange séparable
A ₉	246-249	96,4	Mélange complexe
A ₁₀	250-300	266,0	Mélange complexe
A ₁₁	301-319	151,5	Mélange complexe
A₁₂	320-340	297,6	Mélange + précipité
A₁₃	341-344	147,5	Mélange séparable
A₁₄	345-354	102,5	Mélange séparable
A ₁₅	355-362	110,0	Mélange complexe
A₁₆	363-375	170,0	Mélange + précipité
A₁₇	376-395	230,0	Mélange séparable
A ₁₈	396-404	91,2	Mélange complexe
A ₁₉	405-408	68,5	Mélange complexe
A ₂₀	409-453	442,1	Mélange complexe
A ₂₁	454-499	900,0	Mélange complexe

Parmi les 21 fractions obtenues, 6 fractions ont été étudiés (A_8 , A_{12} , A_{13} , A_{14} , A_{16} et A_{17}). La séparation de ces dernières est basée sur leur profil chromatographique sur plaques CCM ainsi que leur poids relativement important.

II.1.10.2.a Séparation et purification des fractions issues de l'extrait AE_1

➤ Etude de la fraction A_8

La fraction A_8 (320 mg) a été séparé sur une colonne de Sephadex LH-20 et élué par le système chloroforme/méthanol (70/30; v/v). Le tableau II.9 rassemble le résultat de cette séparation.

Tableau II.9: Résultat de séparation de la fraction A_8 sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-7	S ₁	15,8	Mélange à faible quantité
8-11	S ₂	28,6	Mélange complexe
12-14	S ₃	39,0	Mélange complexe
15-16	S ₄	55,4	Mélange complexe
17-19	S ₅	60,0	Mélange complexe
20	S₆	70,0	Mélange + précipité
21-23	S ₇	50,0	Mélange complexe

Un précipité blanc a été formé dans la sous fraction S_6 (70 mg). Ce dernier a subi une filtration puis une purification par lavage au méthanol pour obtenir un produit PA_8 de masse 8 mg.

➤ Etude de la fraction A_{12}

Cette fraction (297,6 mg) contient un précipité blanc insoluble dans le méthanol. Il a été séparé du surnageant par une simple filtration sur papier Wattman N°1. Ce précipité a été purifié par plusieurs lavages au méthanol pour obtenir le produit pur PA_{12-1} de masse 27 mg.

Le surnageant a subi une séparation sur colonne de Sephadex LH-20 élué avec le méthanol distillé. Le résultat de cette séparation est reporté dans le tableau II.10.

Tableau II.10 : Séparation de la phase soluble de la fraction A₁₂ sur Colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-4	S ₁	04	Traces
5-9	S ₂	16	Mélange complexe
10-14	S ₃	30	Mélange complexe
15-18	S ₄	45	Mélange complexe
19	S₅	15	Produit pur
20-24	S ₆	55	Mélange complexe
25-28	S ₇	93	Mélange complexe

La sous fraction S₅ contient un produit sous forme d'une mono tâche sous UV (254 et 365 nm) et a été évaporé à sec puis pesé pour donner le produit **PA₁₂₋₂** de masse 15 mg.

➤ **Etude de la fraction A₁₃**

La fraction A₁₃ de masse 147,5 mg a été séparé sur colonne de Sephadex LH-20 et élué par le système chloroforme/méthanol (65/35 ; v/v). La progression de cette séparation est reportée dans le tableau II.11 ci-dessous.

Tableau II.11 : Séparation de la fraction A₁₃ sur Colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-6	S ₁	4.3	Trace
7-13	S ₂	16	Mélange complexe
14-19	S ₃	44,6	Mélange complexe
20	S₄	21	Mélange +précipité
21-25	S ₅	18,6	Mélange complexe
26-28	S ₆	19	Mélange complexe
29-38	S ₇	22	Mélange séparable

La sous fraction S₄ renferme un précipité blanc insoluble dans le méthanol. Sa purification a été faite par un lavage avec du méthanol distillé pour donner le produit **PA₁₃** de masse 7 mg.

➤ **Etude de la fraction A₁₄**

La séparation de la fraction A₁₄ (102,5 mg) a été réalisée sur une colonne de Sephadex LH-20 élué par le méthanol distillé. Le suivi de la séparation est représenté dans le tableau II.12.

Tableau II.12: Résultat de la séparation de la fraction A₁₄ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-5	S ₁	2.1	Trace
6-8	S ₂	3.9	Trace
9-17	S ₃	6	Mélange à faible quantité
18-20	S ₄	8,2	Mélange à faible quantité
21-23	S₅	9	Produit pur
24-25	S ₆	13	Mélange complexe
26-28	S ₇	10	Mélange complexe
29-32	S ₈	10.5	Mélange complexe
33-36	S ₉	17	Mélange complexe
37-38	S ₁₀	10,4	Mélange complexe
39-40	S₁₁	11	Produit pur

L'analyse des deux sous fractions S₅ et S₁₁ sur plaque CCM a montré la présence d'une seule tache sous UV (254 et 365 nm), ceci a conduit après l'évaporation sous pression réduite aux deux produits **PA₁₄₋₁** de masse 8 mg et **PA₁₄₋₂** de masse 10 mg respectivement.

➤ **Etude de la fraction A₁₆**

La formation d'un précipité jaune a été observée sur les parois du tube de cette fraction de masse 170 mg. Une fois récupéré par filtration, ce précipité a subi une purification sur colonne de Sephadex LH-20 élué par le méthanol distillé pour donner le produit pur **PA₁₆** de masse 9 mg.

➤ **Etude de la fraction A₁₇**

La fraction A₁₇ (230 mg) a subi une séparation suivie d'une purification sur une colonne de Sephadex LH-20 élué par le méthanol distillé. Le résultat de cette séparation est représenté dans le tableau II.13.

Tableau II.13 : Séparation de la fraction A₁₇ sur Colonne de Sephadex LH-20.

Lots	N° de la sous fraction	Poids (mg)	observation
1-5	S ₁	11	Mélange à faible quantité
6-10	S ₂	19	Mélange complexe
14-18	S ₃	28	Mélange complexe
19-22	S ₄	29	Mélange complexe
23-28	S ₅	43	Mélange complexe
29-31	S ₆	41	Mélange complexe
32-33	S ₇	23	Mélange complexe
34-36	S₈	14	Produit pur
37-38	S ₉	20	Mélange complexe

L'analyse de la sous-fraction S₈ sur une plaque CCM a montré la présence d'une seule tache sous UV (254 et 365 nm), le solvant a été évaporé à sec pour donner le produit **PA₁₇** de masse 5 mg.

L'étude phytochimique de l'extrait AE₁ nous a permis d'isoler 8 produits purs. Les étapes de fractionnement, séparation et purification des produits issus de l'extrait AE₁ de l'espèce *Lotus roudairei* est représenté dans la figure II.9.

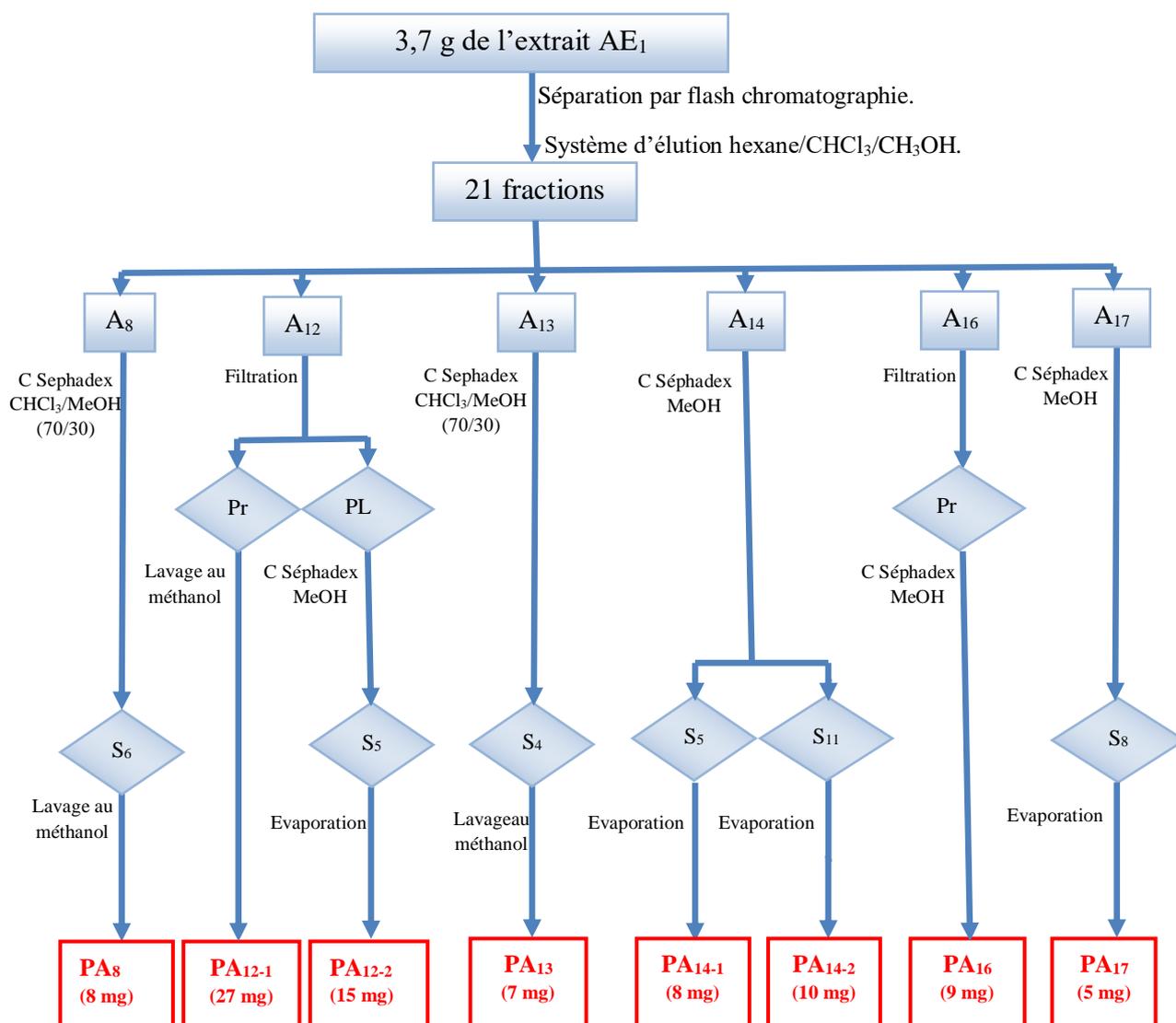


Figure II.9: Schéma de séparation et purification des produits issus de l'extrait AE₁ de l'espèce *Lotus roudairei*.

II.1.10.3 Fractionnement de l'extrait BU₁

Une masse de 12 g de l'extrait BU₁ a été dissoute dans le méthanol puis mélangée à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble a été séché et pulvérisé pour obtenir une poudre homogène. Cette dernière a été déposée sur une colonne confectionnée avec 396 g de gel de silice (type 60, 230-400 Mesh) préparée dans le dichlorométhane. L'éluant a été réalisé par le système dichlorométhane/méthanol en gradient de polarité en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par le méthanol pur. Des fractions de 100 ml ont été recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques ont été visualisées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées par l'acide sulfurique dilué et chauffées à 100 °C pendant 3 min. Les lots sont regroupés selon leur profil chromatographique sur couche mince. Le résultat de ce regroupement est représenté dans le tableau II.14.

Tableau II.14: Résultat du fractionnement de l'extrait BU₁.

Lots	N° de la fraction	Système d'élution		Poids de la fraction (mg)	observation
		% CH ₂ Cl ₂	% CH ₃ OH		
1-8	B ₁	100	-	8,4	Mélange à faible quantité
9	B ₂	100	-	5,2	Traces
10	B ₃	100	-	3,6	Traces
11	B ₄	100	-	13,9	Mélange à faible quantité
12	B ₅	100	-	15,0	Mélange à faible quantité
13	B ₆	100	-	15,3	Mélange à faible quantité
14-16	B ₇	100	-	28,0	Mélange complexe
17	B ₈	100	-	18,0	Mélange à faible quantité
18	B ₉	100	-	12,1	Mélange complexe
19-40	B ₁₀	98	2	75,8	Mélange complexe
41	B ₁₁	98	2	20,6	Mélange complexe
42-48	B ₁₂	96	4	83,0	Mélange complexe
49-65	B₁₃	96	4	102,0	Mélange + précipité
66	B ₁₄	96	4	22,0	Mélange complexe
67-97	B ₁₅	96	4	88,9	Mélange séparable
98-102	B ₁₆	94	6	59,3	Mélange complexe
103-121	B₁₇	94	6	250,0	Mélange + précipité
122-143	B ₁₈	94	6	320,0	Mélange complexe
144-153	B ₁₉	92	8	175,1	Mélange complexe
154-159	B ₂₀	92	8	177,8	Mélange complexe
160-169	B ₂₁	92	8	106,1	Mélange complexe
170-181	B ₂₂	92	8	327,8	Mélange complexe
182-204	B₂₃	90	10	290,0	Mélange séparable
205-249	B₂₄	90	10	630,0	Mélange + précipité
250-285	B₂₅	88	12	560,0	Mélange séparable
286-335	B ₂₆	86	14	744,6	Mélange complexe
336-430	B₂₇	82	18	1145,6	Mélange séparable
431-468	B ₂₈	78	22	725,0	Mélange complexe
469-485	B ₂₉	74	26	300,8	Mélange complexe
486-506	B ₃₀	70	30	141,6	Mélange complexe
507-531	B ₃₁	65	35	624,2	Mélange complexe
532-557	B ₃₂	30	70	404,8	Mélange complexe
558-560	B ₃₃	15	85	116,7	Mélange complexe
561-567	B ₃₄	0	100	188,2	Mélange complexe
568-596	B ₃₅	0	100	3200,0	Mélange complexe

Parmi les 35 fractions obtenues, 6 fractions ont été étudiées (B₁₃, B₁₇, B₂₃, B₂₄, B₂₅ et B₂₇). La séparation de ces dernières a été basée sur leur simplicité ainsi que sur leurs poids relativement importants.

II.1.10.3.a Séparation et purification des fractions issues de l'extrait BU₁

➤ Etude de la fraction B₁₃

La fraction B₁₃ (102 mg) contenant un précipité blanc a été purifiée par plusieurs lavages successifs avec du méthanol pour obtenir le produit pur **PB₁₃** de masse 11 mg.

➤ Etude de la fraction B₁₇

La fraction B₁₇ de masse 250 mg contenant un précipité blanc insoluble dans le méthanol. Après filtration, ce dernier a subi un lavage par le méthanol pour donner le produit pur **PB₁₇** de masse 25 mg.

➤ Etude de la fraction B₂₃

La fraction B₂₃ (290 mg) a été séparée sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant le système CHCl₃/CH₃OH (65/35). Les résultats de la séparation de cette fraction sont regroupés dans le tableau II.15.

Tableau II.15: Résultats de la séparation de la fraction B₂₃ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	sous-fraction	Poids (mg)	Observation
1-5	S ₁	05,8	Traces
6-10	S ₂	20,3	Mélange complexe
11	S ₃	12,0	Mélange à faible quantité
12-16	S ₄	150,0	Mélange complexe
17-19	S ₅	45,5	Mélange complexe
20	S₆	22,0	Mélange séparable+précipité
21	S ₇	30,0	Mélange complexe

La sous fraction **S₆** (22 mg) renferme un précipité blanc. Ce dernier a été filtré puis il a subi un lavage avec l'acétone pour donner le produit **PB₂₃** de masse 5 mg.

➤ **Etude de la fraction B₂₄**

Cette fraction de masse 630 mg contient un précipité, il a été récupéré par une simple filtration et a subi une purification par lavage avec l'acétone pour donner le produit **PB₂₄** de masse 23 mg.

➤ **Etude de la fraction B₂₅**

La fraction **B₂₅** (560 mg) a subi une séparation sur une colonne de Sephadex LH-20 et éluee par le système CHCl₃/CH₃OH (65/35). Le résultat de cette séparation est regroupé dans le tableau II.16.

Tableau II.16: Résultats de la séparation de la fraction B₂₅ sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	Sous-fraction	Poids (mg)	observation
1-6	S ₁	04,9	Traces
7-12	S ₂	28,0	Mélange complexe
13-20	S ₃	65,0	Mélange complexe
21-23	S ₄	26,0	Mélange complexe
24-33	S₅	201,0	Mélange séparable
34-38	S ₆	41,0	Mélange complexe
39-42	S ₇	39,1	Mélange complexe
43-47	S ₈	55,0	Mélange complexe
48-50	S ₉	24,0	Mélange complexe
51-54	S ₁₀	40,0	Mélange complexe
55-58	S ₁₁	34,2	Mélange complexe

La sous-fraction S₅ (201 mg) a subi une séparation suivie d'une purification sur colonne de Séphadex LH-20 en utilisant le méthanol distillé comme éluant pour donner le produit **PB₂₅** de masse 18 mg.

➤ **Etude de la fraction B₂₇**

La fraction B₂₇ de masse relativement importante (1145,6 mg) a été soumise à plusieurs tests chromatographiques en vu de choisir la méthode et le système qui donneraient une meilleure séparation. L'ensemble des systèmes d'élution testé n'ont pas donné un résultat satisfaisant avec le gel de silice comme support chromatographique. Ce dernier a été donc remplacé donc par le gel de polyamide.

La séparation de cette fraction a été donc faite sur une colonne de gel de polyamide élué par le système Toluène /Méthanol. La colonne a été préparée dans le toluène pur et additionnée avec de la fraction séchée et pulvérisée. L'élution a été débutée avec le toluène pur. L'augmentation de la polarité a été réalisée par l'addition du méthanol jusqu'à 100%. Tous les lots de 50 ml ont été testés sur plaques CCM et regroupés selon leur profil chromatographique. Le résultat de la séparation et du regroupement des sous fractions est reporté dans le tableau II.17.

Tableau II.17: Résultats de la séparation de la fraction B₂₇ sur colonne de polyamide.

lots	Sous fraction	Système d'élution		Poids de sous fraction (mg)	observation
		% toluène	% CH ₃ OH		
1-14	S ₁	100	-	002,8	Traces
15-22	S ₂	97.5	2.5	009,0	Mélange à faible quantité
23-36	S ₃	95	5	035,0	Mélange complexe
37-48	S ₄	90	10	043,4	Mélange complexe
49-56	S ₅	90	10	044,6	Mélange complexe
57-63	S ₆	85	15	034,8	Mélange complexe
64-70	S₇	85	15	077,6	Mélange + cristaux
71-77	S ₈	85	15	017,5	Mélange complexe
78-97	S₉	80	20	133,7	Mélange + précipité
98-101	S ₁₀	75	25	039,3	Mélange complexe
102-104	S ₁₁	75	25	015,0	Mélange complexe
105-109	S ₁₂	75	25	013,1	Mélange complexe
110-112	S ₁₃	75	25	018,0	Mélange complexe
113-124	S ₁₄	70	30	043,2	Mélange complexe
125-133	S ₁₅	70	30	027,3	Mélange complexe
134-146	S ₁₆	65	35	032,4	Mélange complexe
147-154	S ₁₇	60	40	046,0	Mélange complexe
155-169	S ₁₈	60	40	096,9	Mélange complexe
170-174	S ₁₉	55	45	023,4	Mélange complexe
175-188	S ₂₀	55	45	037,1	Mélange complexe
189-202	S ₂₁	50	50	087,9	Mélange complexe
203-212	S ₂₂	50	50	032,5	Mélange complexe
213-221	S ₂₃	40	60	035,5	Mélange complexe
222-224	S ₂₄	40	60	022,6	Mélange complexe
225-231	S ₂₅	20	80	066,9	Mélange complexe
232-240	S ₂₆	0	100	078,9	Mélange complexe

La sous fraction S₇ (77,6 mg) comporte des cristaux, ces derniers ont été récupérés puis purifiés par lavage avec du chloroforme pour obtenir le produit **PB₂₇₋₁** de masse 10 mg.

La sous fraction S₉ contenant un précipité blanc, a été purifié par lavage successif avec l'acétone pour obtenir le produit **PB₂₇₋₂** de masse 8,2 mg.

L'étude phytochimique de l'extrait BU₁ nous a permis d'isoler 7 produits purs. Les étapes de fractionnement, séparation et purification des produits issus de l'extrait BU₁ de l'espèce *Lotus roudairei* est représentée dans la figure II.10.

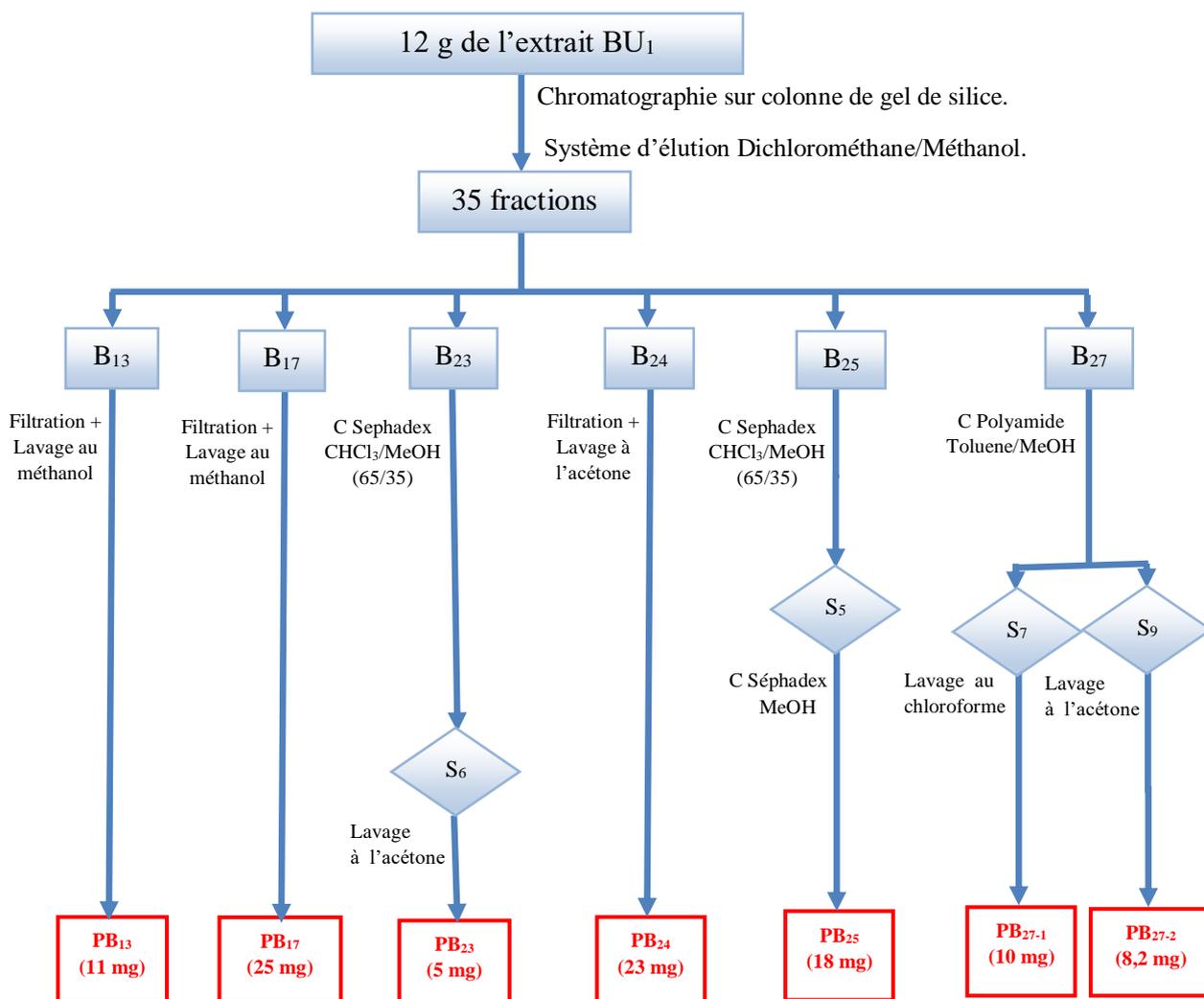


Figure II.10: Schéma de séparation et purification des produits issus de l'extrait BU₁ de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet.

Etude des activités biologiques

II.1.11 L'activité antioxydante

II.1.11.1 Généralités sur les antioxydants

L'oxygène comme molécule indispensable pour la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivées oxygénées actives telles que les radicaux libres, est encore mal perçu dans le milieu médical. Pourtant, de très nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré le rôle de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse. l'organisme pour se protéger à cet oxygène a développé des systèmes de défense antioxydants qui ont la capacité de réguler la production des ERO. Ils sont composés de protéines (la ferritine), de vitamines (A, C, E), d'oligo-éléments (le sélénium) et d'enzymes (le glutathion peroxydase). Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie (par exemple: le tabagisme), ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit. Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient donc un sujet de priorité en matière de prévention de maladies. Ceci se justifie sur la base de très nombreuses études montrant que les personnes ayant des concentrations sanguines faibles en antioxydants (vitamines A, C ou E) ou des concentrations élevées en marqueurs d'oxydation des lipides ou de l'ADN, ont plus de risques de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer que des personnes ayant un bilan antioxydant normal [15].

Les antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention de certaines maladies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires.

II.1.11.2 Catégories des antioxydants

On distingue au niveau des cellules deux catégories des antioxydants:

- **Les antioxydants endogènes:** Constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx).

- **Les antioxydants exogènes:** De nombreuses molécules issues de notre alimentation comme les vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants.

II.1.11.3 Sources des antioxydants

De nombreux aliments sont source d'antioxydants (comme la vitamine C ou bien l'acide ascorbique et le β -carotène). Les plantes sont des sources potentielles d'antioxydants naturels à cause de leurs compositions en métabolites secondaires comme les flavonoïdes (Morine) et les phénols (Resvératrol).

II.1.11.3.1 Les antioxydants phénoliques

Les phénols simples, les acides phénoliques et les flavonoïdes jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines. Les décès dus aux infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont associés au taux élevé des cholestérols de type LDL circulant dans le sang [16, 17].

II.1.11.3.1.a Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. Ce sont des composés naturels répartis en plusieurs familles parmi lesquelles les isoflavones qui permettent de réduire le taux du mauvais cholestérol [18, 19].

II.1.11.3.1.b Les acides phénoliques

Une très grande gamme des acides phénoliques comme l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique, qui sont les acides les plus fréquents, démontrent une activité antioxydante intéressante [20, 21].

II.1.11.4 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

II.1.11.4.a Dosage des polyphénols totaux

- **Principe :** Le taux de polyphénols a été déterminé, par spectrophotométrie, selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Ce réactif est réduit en un complexe d'oxyde de tungstène et de molybdène en présence des polyphénols donnant ainsi une couleur bleue. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [22].
- **Mode opératoire**
 - Une solution mère d'acide gallique a été préparée avec une concentration de 1mg/ml (1000 μ g/ml) à partir de laquelle une série de solutions filles de concentrations (10, 50, 150, 300, 500 μ g/ml) a été préparé. Une courbe d'étalonnage standard a été établie à partir de ces solutions filles d'acide gallique.

- 0,5 ml de chaque solution fille a été introduit dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu 1N.
- Après un repos de 5 min à l'obscurité, 5 ml de Na_2CO_3 (20 %) ont été additionné suivi de repos de 120 min dans l'obscurité à T ambiante.
- Les extraits à doser (CH_1 , AE_1 et BU_1) ont été préparé de la même manière que la courbe d'étalonnage et dans les mêmes conditions, chaque concentration est répétée trois fois et la lecture de l'absorbance a été faite à 765 nm sur un spectrophotomètre Thermo électron corporation (Evolution 300). Les concentrations sont exprimées en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) [23].

La figure II.11 présente la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

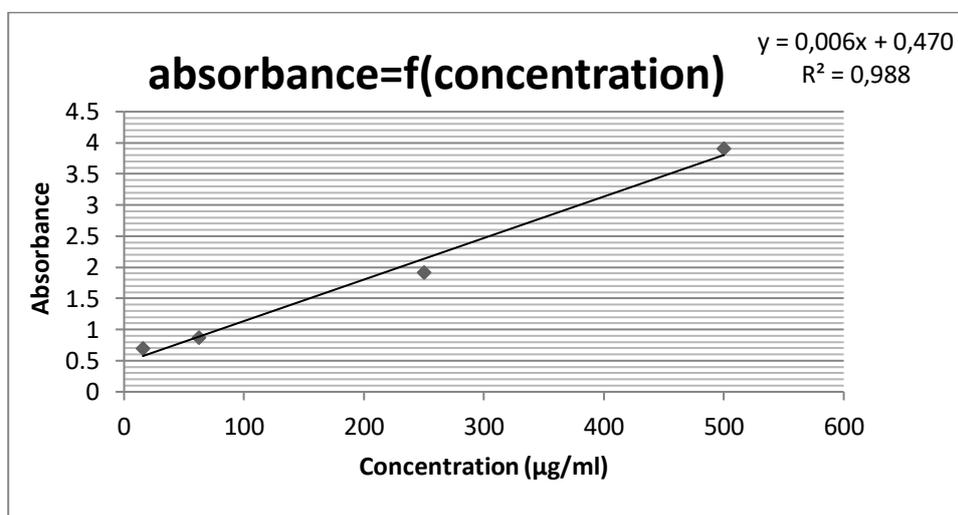


Figure II.11: Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique.

II.1.11.4.b Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes constituent la classe la plus importante des polyphénols. Pour les quantifier dans les extraits CH_1 , AE_1 et BU_1 , nous avons adopté la méthode au trichlorure d'aluminium [24]. Les étapes à suivre sont:

- La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine de différentes concentrations (10, 50, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait).
- 1 ml d'échantillon ou de standard (préparé dans le méthanol) additionnée de 5 ml d'eau distillée et 0,3 ml de NaNO_2 (5 %).
- Après 5 minutes de réaction, 0,6 ml d' AlCl_3 ont été ajouté suivi de repos de 5 min
- Addition de 2 ml de NaOH (1N) et compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

- De même, pour les échantillons, la lecture a été faite au moyen du spectrophotomètre à 430 nm. Chaque valeur est la moyenne de trois lectures.

La figure II.12 présente la courbe d'étalonnage de la quercétine.

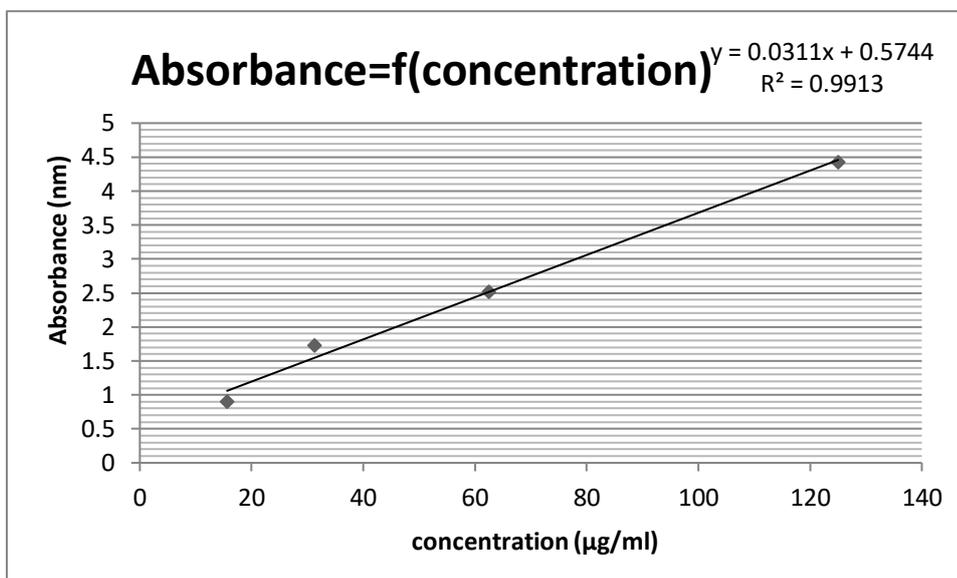


Figure II.12: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

II.1.11.5 Evaluation du pouvoir antioxydant

La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux [25].

II.1.11.5.a Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

➤ Principe

Le DPPH est un radical libre stable de coloration violette en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [26].

Ce test peut poser des difficultés d'interprétation car le DPPH• n'est soluble que dans des solvants organiques, en particulier les alcools, et non en milieu aqueux ; ce qui empêche toute analyse d'antioxydants hydrophiles.

La détermination de la CI_{50} , définie comme étant la concentration en substrat entraînant une diminution de 50 % de l'absorption. A cette concentration, 50 % du DPPH est sous forme réduite. Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et coll. plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant. La CI_{50} (ou IC_{50} en anglais) est exprimée en μM .

➤ Mode opératoire

Dans ce travail, le protocole décrit par Sanchez-Moreno [26] a été adopté. Brièvement, une solution de DPPH a été préparée en dissolvant 2,4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. 50 μl des solutions des extraits CH_1 , AE_1 et du standard (BHA) pour les différentes concentrations (0,97- 2000 $\mu g/ml$) ont été ajoutés à 1,95 ml de DPPH préparée, les mélanges ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 517 nm. L'activité de piégeage a été calculée en utilisant l'équation.

$$\%(\text{AA}) = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{contrôle}}] \times 100.$$

Ou $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon) et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance des extraits ou de la référence.

II.1.11.5.b Test de blanchissement ou de décoloration de β -carotène

➤ Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

➤ Mode opératoire

La méthode décrite par Wanasundara et al. [27] avec de légères modifications a été utilisée. Une solution de β -carotène a été préparée en dissolvant 0,5 mg de β -carotène dans 2 ml de chloroforme. 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de Tween40 ont été ajoutés. Après l'évaporation du chloroforme à 40 °C et à pression réduite, 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés dans le ballon, l'émulsion résultante a été agitée vigoureusement. Ensuite, un volume de 3,5 ml de cette émulsion a été transféré dans une série de tubes contenant 500 μl d'extraits (2 mg/ml), le BHA a été utilisé comme standard.

L'absorbance à T_0 est mesurée dès l'ajout de l'émulsion sur l'échantillon à 490 nm, puis la lecture de l'absorbance a été enregistrée à chaque fois avec un intervalle de 20 min, le blanc

utilisé est sans β -carotène. Finalement, on calcule le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\beta\text{-carotène après 48 heures de dosage}} * 100) / A_{\beta\text{-carotène initiale}}).$$

Où $A_{\beta\text{-carotène après 48 heures d'essai}}$ est l'absorbance du β -carotène après 48 h d'essai restant dans les échantillons et $A_{\beta\text{-carotène initiale}}$ est l'absorbance du β -carotène initiale au début de l'expérience. Tous les tests ont été effectués en duplicate.

II.1.12 l'activité antiproliférative

II.1.12.1 Généralités

Des cancers étaient déjà décrits dans des textes égyptiens vers 3500 avant notre ère. C'est Hippocrate qui donna la première définition de la maladie, appelée alors «carcinome» ou «squirre» : une tumeur (gonflement), dure non inflammatoire, ayant tendance à récidiver et à se généraliser jusqu'à la mort [28].

Le cancer est une maladie caractérisée par une croissance et une propagation incontrôlées de cellules anormales (clone cellulaire original) pouvant affecter quasiment n'importe quel tissu. C'est un phénomène biologique appelé oncogenèse ou carcinogenèse [28].

Il existe 3 étapes dans le développement du cancer dont les deux premières sont inévitablement successives sinon le processus cancéreux ne peut aboutir : l'initiation, la promotion tissulaire et la progression.

II.1.12.2 Activité antiproliférative utilisant le système xCELLigence

II.1.12.2.a Définition du système

Le système xCELLigence est un système de biocapteurs microélectroniques pour les tests cellulaires, fournissant une analyse cellulaire dynamique, en temps réel et sans étiquette pour une variété d'applications de recherche en développement de médicaments, toxicologie, cancer, microbiologie médicale et virologie. Cette technologie pionnière permet aux chercheurs d'augmenter la productivité et de dépasser les limites de l'analyse des points de terminaison en capturant des données tout au long du déroulement d'une expérience et en obtenant des données plus pertinentes sur le plan physiologique.

II.1.12.2.b Evaluation de l'activité antiproliférative [13]

L'instrument xCELLigence (Real Time Cell Analyzer-Single Plate (RTCA-SP)) a été utilisé pour visualiser les effets antiprolifératifs des extraits de la plante *Lotus roduairei* Bonnet sur des cellules humaines de cancer du col de l'utérus (HeLa).

➤ Conditions de la culture cellulaire

Les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) ont été cultivées régulièrement dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂ à 37 °C et dans un milieu de culture eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma). Ce milieu de culture doit contenir 10 % (v/v) du sérum de veau fœtal (SVF, Sigma, Allemagne) et 2 % de pénicilline-streptomycine (Sigma, Allemagne).

Dans le flacon de culture, des cellules HeLa ont été détachées du fond du flacon avec 10 ml de solution de trypsine-EDTA. Après le détachement, 10 ml de milieu ont été ajoutés dans le ballon et est homogénéisé délicatement. Cette suspension a été transférée dans des tubes Falcon. Après la centrifugation (600 rpm, 5 minutes) 5 ml de milieu ont été ajoutés au surnageant. La concentration des cellules du surnageant a été évaluée par le compteur de cellules CEDEX HiRes en utilisant le bleu de Trypan.

➤ Préparation de la solution d'extrait

Les extraits CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁ de l'espèce *Lotus roudaiei* ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une concentration de 20 mg/ml. 25 µl de ces solutions ont été mélangées avec 475 µl de milieu.

➤ Préparation de la plaque à 96-puits

50 µl de milieu ont été ajoutés dans chaque puits d'une plaque de 96 qui a été laissée dans une chambre stérile pendant 15 min, puis dans un incubateur pour 15 minutes. Après cette période, une mesure de fond a été effectuée. 100 µl de la suspension des cellules (2,5x10⁴ cellules /100 µl) ont été ajoutés dans les puits et en laissant les trois derniers comme témoins, puis déposés sous la hotte durant 30 min. La mesure a été effectuée pendant 80 min dans le système xCELLigence. Les concentrations 50, 100, 250 µg/ml d'échantillons ont été ajoutés et la dernière mesure a duré 70 heures.

Chapitre II.2

Etude phytochimique et évaluation

de l'activité biologique de l'espèce

Genista ferox Poirret

Investigation phytochimique

II.2.1 Choix de matériel végétal

Le choix de l'espèce *Genista ferox* Poirret est guidé par plusieurs critères:

- L'endémisme de la plante à l'Algérie et la Tunisie.
- L'utilisation des parties aériennes en médecine traditionnelle comme substance cicatrisante dans la région d'El-Kala.
- Compléter une étude entreprise auparavant dans notre laboratoire sur cette espèce.

II.2.2 Classification dans la systématique botanique

Embranchement	—————→	Spermaphytes
Sous-embranchement	—————→	Angiospermes
Classe	—————→	Dicotylédones
Ordre	—————→	Rosales
Famille	—————→	Fabales (Légumineuses)
Sous famille	—————→	Papilionacées (Fabacées)
Tribu	—————→	Genisteae
Genre	—————→	<i>Genista</i>
Espèce	—————→	<i>Genista ferox</i> Poirret

II.2.3 Nom vernaculaire

Guendoul dans la région d'El- Kala, ainsi que Taguendla dans d'autres régions [1].

II.2.4 Synonymes

G. salditana Pomel [1, 29].

II.2.5 Description botanique

Calice presque glabre, caduc en entier ou en partie sur la gousse, se coupant circulairement au-dessus de la base, celle-ci longue de 3-4 cm, folioles ovales larges de 3 à 4 mm. Arbuste 3 m. Vieux rameaux transformés en énormes épines très vulnérantes. Feuilles stipulées à stipules transformées en petits aiguillons (figure II.13)[1].

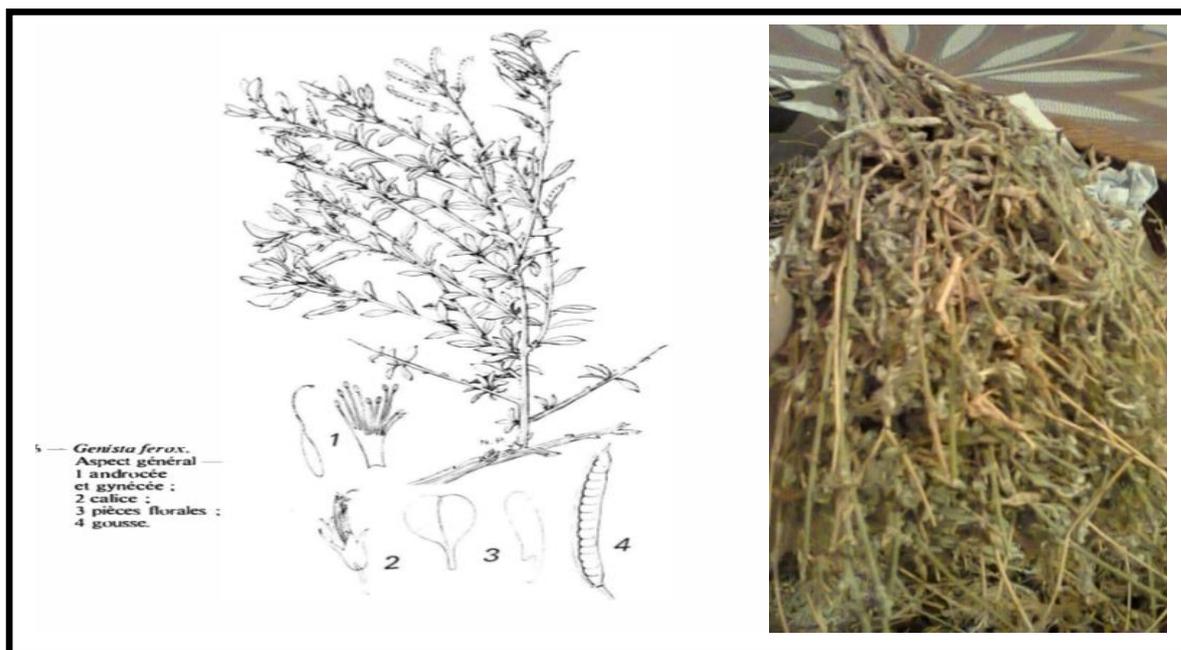


Figure II.13: Image de l'espèce *Genista ferox* Poirret.

II.2.6 Distribution géographique

Endémique à l'Algérie et la Tunisie[1].

II.2.7 Usages traditionnels

Utilisée comme substance cicatrisante dans l'est de l'Algérie [30].

II.2.8 Travaux antérieurs sur l'espèce *Genista ferox* Poirret

La recherche bibliographique menée sur l'espèce *Genista ferox* Poirret, montre qu'il y a deux résultats publiés sur l'étude phytochimique des métabolites secondaires de cette plante [30, 31].

II.2.9 Travaux personnels

II.2.9.1 Récolte

La plante a été récoltée au mois de mai 2014 de l'est algérien (la région d'El-Kala). Elle a été authentifiée par Dr. Sarri et a été déposée sous le code 05/2014/FGF dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL-Université des Frères Mentouri-Constantine.

II.2.9.2 Screening phytochimique

Une quantité de 50 g de trois organes (feuilles, tiges et fruits) de la plante a été pulvérisée puis soumise à un screening phytochimique pour les différents métabolites secondaires comme les:

coumarines, saponines, quinones, flavonoïdes, alcaloïdes, anthocyanines et tannins. Les tests de présence sont réalisés selon les procédures standards [4-12].

II.2.9.3 Extraction

II.2.9.3.a Extraction à froid des tiges

Les tiges de l'espèce *Genista ferox* de masse 1075 g ont été macérées dans un système hydro-alcoolique Ethanol/Eau distillée (70/30; v/v) pendant 3x48 h. Les solutions recueillies ont été évaporées à sec sous pression réduite, les marcs ont été additionnés de 430 ml d'eau distillée, après une nuit de repos, la solution a été filtrée. Le filtrat a été soumis à une extraction liquide-liquide avec différents solvants de polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole pour éliminer la chlorophylle puis par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et en terminant par le *n*-butanol. La partie insoluble dans l'eau a été solubilisée dans le méthanol formant ainsi l'extrait méthanolique.

Les phases organiques ont été concentrées à sec donnant les extraits :

- Ether de pétrole nommé **EP_T** (0,3 g).
- Chloroforme nommé **CH_T** (1,4 g).
- Acétate d'éthyle nommé **AE_T** (4,7 g).
- *n*-Butanol nommé **BU_T** (46 g).
- Méthanol nommé **ME_T** (49 g).

NB : l'indice _T correspond à la première lettre de Tiges.

II.2.9.3.b Extraction à froid des parties Feuilles

Une masse de 700 g des feuilles de la même espèce a été macérée de la même manière que précédemment pour donner les extraits suivants :

- Ether de pétrole **EP_F** (0,4 g).
- Chloroforme **CH_F** (0,7 g).
- Acétate d'éthyle **AE_F** (2,6 g).
- *n*-Butanol **BU_F** (13 g).
- Méthanol **ME_F** (20 g).

NB : l'indice _F correspond à la première lettre de Feuilles.

La figure II.14 résume les étapes de l'extraction des parties tiges et des feuilles de l'espèce *G. ferox*.

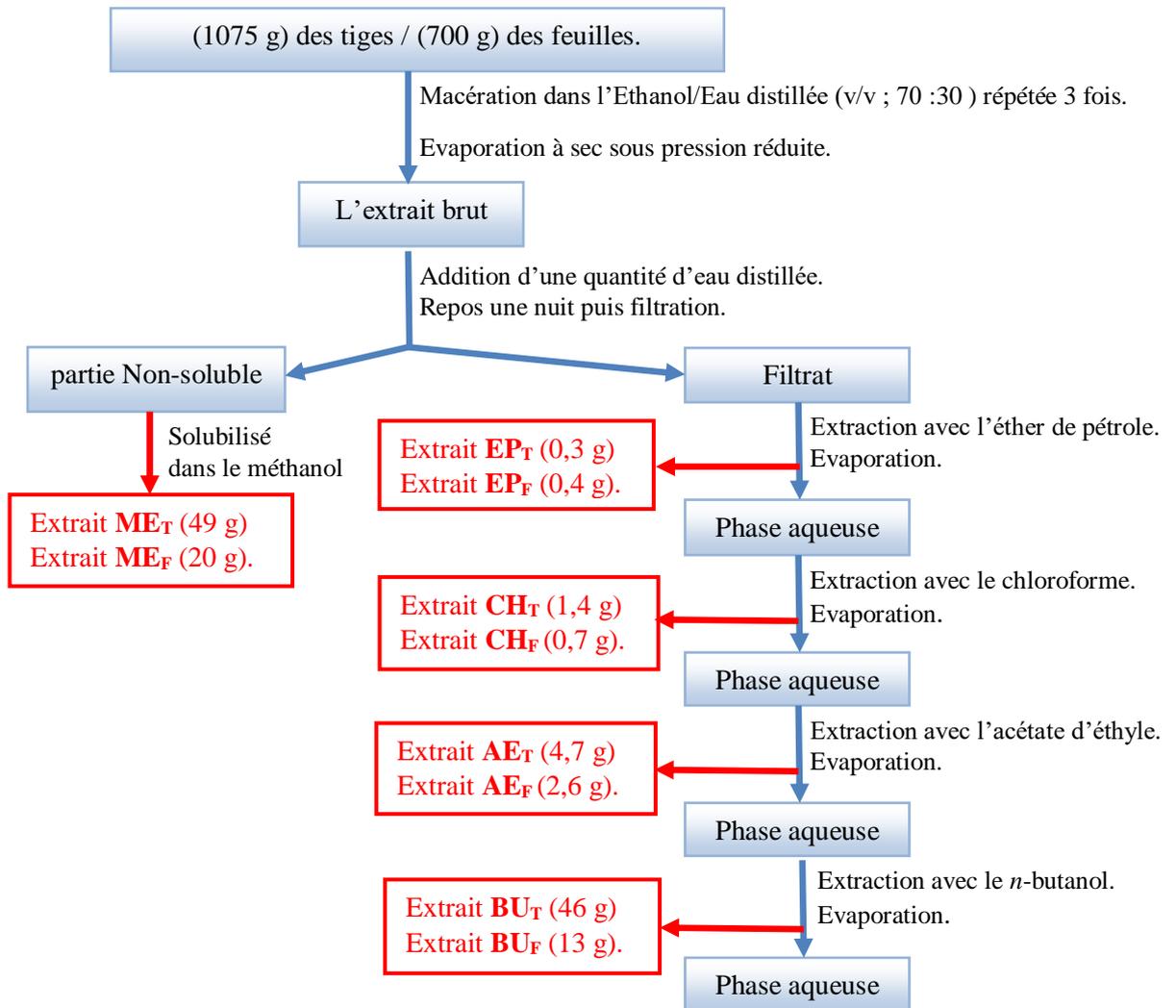


Figure II.14: Schéma de l'extraction des tiges et des feuilles de l'espèce *Genista ferox*.

Le tableau II.18 représente les masses et les rendements d'extraction des tiges et des feuilles de l'espèce *Genista ferox*.

Tableau II.18: Masses et rendements des extraits de l'espèce *G. ferox*.

Matériel végétal	Extraits	Masse (g)	Rendement en %
Tiges (1075 g)	EP _T	0,3	0,027
	CH _T	1,4	0,130
	AE _T	4,7	0,437
	BU _T	46,0	4,279
	ME _T	49,0	4,558
Feuilles (700 g)	EP _F	0,4	0,057
	CH _F	0,7	0,100
	AE _F	2,6	0,371
	BU _F	13,0	1,857
	ME _F	20,0	2,857

II.2.9.4 analyse qualitative et quantitative des extraits

L'identification ainsi que la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans les extraits CH_F, AE_F, BU_F, ME_F, CH_T, AE_T, BU_T et ME_T des deux organes de l'espèce *G. ferox* ont été réalisées par la méthode HPLC/TOF-MS décrite dans le chapitre précédent [13].

II.2.10 Etude des extraits

Une analyse chromatographique sur couche mince a été réalisée sur les deux extraits BU_T et BU_F en utilisant plusieurs systèmes d'élution afin de choisir celui qui donne la meilleure séparation.

Le résultat de cette analyse nous a permis de choisir l'extrait BU_T à cause de sa composition plus riche par rapport à l'extrait BU_F. Le système Dichlorométhane/Méthanol a été choisi comme meilleur système pour la séparation.

II.2.10.1 Fractionnement de l'extrait BU_T

Une masse de 10 g de cet extrait a été dissous dans un petit volume de méthanol puis mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché puis pulvérisé donnant une poudre homogène. Cette dernière a été déposée sur une colonne confectionnée avec 330 g de gel de silice (type 60, 230-400 mesh) préparée dans le Dichlorométhane (CH₂Cl₂). L'élution a été réalisée par un gradient de polarité en commençant par le CH₂Cl₂ pur et en terminant par le méthanol pur. Des fractions de 100 ml ont été recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques ont été examinées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées par l'acide sulfurique dilué et chauffées à 100 °C pendant 3 min.

Les lots ont été regroupés selon leur profil chromatographique sur couche mince. Le résultat de ce regroupement est présenté dans le tableau II.19.

Tableau II.19: Résultat de fractionnement de l'extrait BU_T sur colonne de gel de silice.

Lots	N° de la fraction	Système d'élution		Poids de fraction (mg)	Observations
		% CH ₂ Cl ₂	% CH ₃ OH		
1-12	B _{T-1}	100	0	023,3	Mélange à faible quantité
13-31	B _{T-2}	99	1	048,6	Mélange complexe
32-39	B _{T-3}	99	1	084,0	Mélange complexe
40-52	B _{T-4}	99	1	128,0	Mélange complexe
53-71	B _{T-5}	98	2	122,0	Mélange complexe
72-89	B _{T-6}	97	3	113,5	Mélange complexe
90-101	B _{T-7}	97	3	055,0	Mélange complexe
102-124	B _{T-8}	95	5	124,3	Mélange complexe
125-132	B _{T-9}	95	5	200,1	Mélange complexe
133-138	B _{T-10}	95	5	133,1	Mélange complexe
139-145	B _{T-11}	94	6	139,6	Mélange complexe
146-149	B _{T-12}	94	6	123,1	Mélange complexe
150-165	B _{T-13}	93	7	332,5	Mélange complexe
166-194	B _{T-14}	92	8	648,8	Mélange complexe
195-208	B _{T-15}	92	8	350,7	Mélange complexe
209-240	B_{T-16}	90	10	1053,7	Mélange séparable
241-265	B _{T-17}	85	15	686,6	Mélange complexe
266-289	B_{T-18}	80	20	835,4	Mélange + précipité
290-296	B_{T-19}	75	25	419,6	Mélange séparable
297-330	B_{T-20}	65	35	928,0	Mélange séparable
331-367	B _{T-21}	55	45	894,0	Mélange complexe
368-409	B _{T-22}	40	60	834,6	Mélange complexe
410-425	B _{T-23}	20	80	734,7	Mélange complexe
426-427	B _{T-24}	0	100	160,3	Mélange complexe
428-432	B _{T-25}	0	100	424,2	Mélange complexe

Une analyse par chromatographie sur couche mince a été établie pour l'ensemble des fractions, ceci a permis le choix de 4 fractions (B_{T-16} , B_{T-18} , B_{T-19} et B_{T-20}) pour des éventuelles séparations et purifications.

II.2.10.1.a Séparation et purification des fractions de l'extrait B_{UT}

➤ Etude de la fraction B_{T-16}

La fraction B_{T-16} (1053,7 mg) a subi une séparation sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant le système $CHCl_3/CH_3OH$ (65/35;v/v). La progression de cette colonne est reportée dans le tableau II.20.

Tableau II.20: Résultats de la séparation de la fraction B_{T-16} sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	Sous-fraction	Poids (mg)	observation
1-8	S ₁	10,9	Mélange à faible quantité
9-10	S ₂	28,8	Mélange complexe
11-12	S ₃	39,0	Mélange complexe
13-15	S ₄	31,0	Mélange complexe
16	S ₅	25,0	Mélange complexe
17-18	S ₆	60,0	Mélange complexe
19	S ₇	53,8	Mélange complexe
20-21	S₈	150,0	Mélange + précipité
22	S₉	15,0	Produit pur
23-24	S ₁₀	170,0	Mélange complexe
25	S ₁₁	84,0	Mélange séparable
26-29	S ₁₂	290,0	Mélange séparable
30	S₁₃	94,0	Mélange + précipité

- La sous-fraction **S₈** renferme un précipité blanc qui a été filtré puis purifié par plusieurs lavages successifs avec l'acétone pour donner le produit pur **PB_{T-16-1}** de masse 8 mg.
- La sous fraction **S₉** montre une seule tache sous UV (254 et 365 nm) et a été purifié sur colonne de Sephadex donnant le produit **PB_{T-16-2}** de masse 6 mg.
- La sous fraction **S₁₃** comporte un précipité, la purification de ce dernier par lavage avec de l'acétone a mené au produit pur **PB_{T-16-3}** de masse 11 mg.

➤ **Etude de la fraction B_{T-18}**

Dans le tube de cette fraction apparait un précipité blanc. Ce dernier a subi une purification sur colonne de Sephadex LH-20 pour donner le produit **PB_{T-18}** de masse 4,3 mg.

➤ **Etude de la fraction B_{T-19}**

La fraction B_{T-19} (419,6 mg) a subi une séparation, également sur une colonne de Sephadex LH-20 et élué par le système CHCl₃/CH₃OH (65/35;v/v). Le tableau II.21 rassemble le résultat de cette séparation.

Tableau II.21: Résultats de la séparation de B_{T-19} sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	Sous-fraction	Poids (mg)	observation
1-3	S ₁	12	Mélange à faible quantité
4-5	S ₂	37.5	Mélange complexe
6-7	S ₃	42.8	Mélange complexe
8-14	S ₄	168.1	Mélange complexe
15-16	S ₅	89	Mélange complexe
17	S₆	15	Produit pur
18-19	S ₇	54.2	Mélange complexe

La sous fraction S₆ a été obtenu sous forme d'un produit pur nommé **PB_{T-19}** de masse 12 mg.

➤ **Etude de la fraction B_{T-20}**

La fraction B_{T-20} (928 mg) a subi une séparation sur une colonne de Sephadex LH-20 élué avec le système CHCl₃/CH₃OH (65/35; v/v). Les résultats sont dressés dans le tableau II.22.

Tableau II.22: Résultats de la séparation de B_{T-20} sur colonne de Sephadex LH-20.

Lots	Sous-fraction	Poids (mg)	observation
1-2	S ₁	3,2	Traces
3-7	S ₂	14,8	Mélange à faible quantité
8-13	S₃	85,5	Mélange + cristaux
14-16	S ₄	10,5	Mélange complexe
18-21	S ₅	125,8	Mélange complexe
22-26	S ₆	210,0	Mélange complexe
27-29	S ₇	99,4	Mélange complexe
30-32	S ₈	96,7	Mélange complexe
33-35	S ₉	183,6	Mélange complexe

La sous-fraction **S₃** renferme des cristaux blancs, ces cristaux ont subi une filtration suivie d'un lavage au méthanol pour donner le produit pur **PB_{T-20}** de masse 6,8 mg.

L'étude phytochimique de l'extrait BU_T nous a permis d'isoler 6 produits purs. Le protocole présenté dans la figure II.15 résume les travaux de fractionnement, séparation et purification des produits issus de l'extrait BU_T de l'espèce *Genista ferox*.

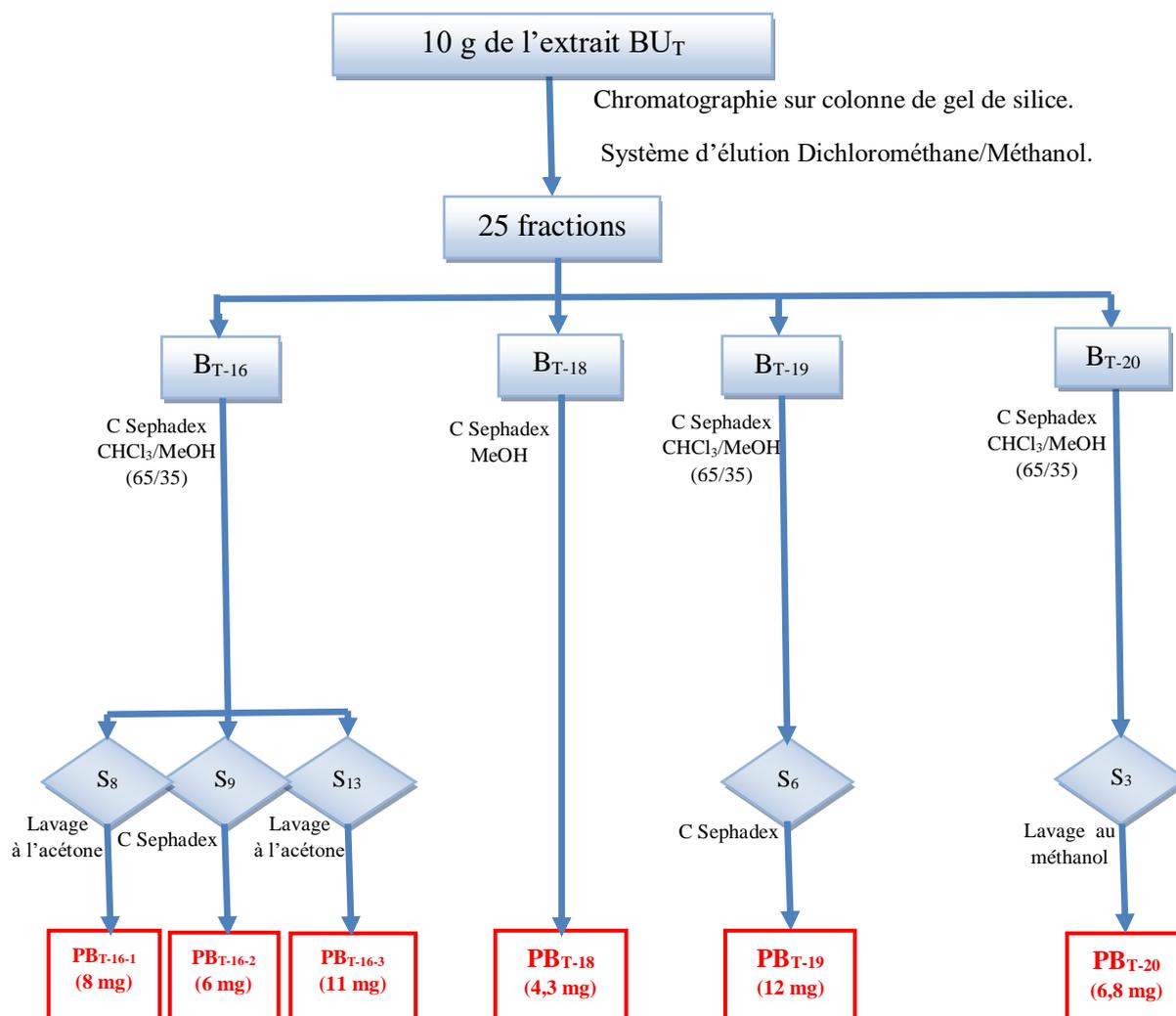


Figure II.15: Schéma de séparation et purification des produits issus de l'extrait BU_T de l'espèce *Genista ferox*.

Etude des activités biologiques

II.2.11 L'activité antioxydante

Le but de cette analyse est l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH des différents extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Genista ferox* Poirret.

II.2.11.1 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

II.2.11.1.a Dosage des polyphénols totaux

Le taux des polyphénols dans les extraits de l'espèce *Genista ferox* a été déterminé selon la méthode de Folin-Ciocalteu par spectrophotométrie de la même manière que pour les extraits de l'espèce *Lotus roduairei* [23].

II.2.11.1.b Dosage des flavonoïdes totaux

Le taux des flavonoïdes dans les extraits de l'espèce *Genista ferox* a été déterminé selon la méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ de la même manière que celle utilisé pour les extraits de l'espèce *Lotus roduairei* [24].

II.2.11.2 Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

La détermination du pouvoir antioxydant des extraits de l'espèce *Genista ferox* a été effectuée selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno en suivant les mêmes étapes que celles utilisées pour les extraits de l'espèce *Lotus roduairei* avec le changement du standard BHA par l'acide ascorbique [26].

II.2.12 L'activité anti proliférative

Les effets antiprolifératifs des extraits de *Genista ferox* sur les cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa) ont été déterminés par le système xCELLigence en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA-SP (Real Time Cell Analyzer-Single Plate), système à plaque unique.

La préparation des extraits et la détermination de l'activité antiproliférative a été faite de la même manière que celle utilisée pour les extraits de l'espèce *Lotus roduairei* [13].

Conclusion

Les travaux menés sur les deux espèces sélectionnées, *L. roudairei* et *G. ferox* appartenant à la famille Fabaceae, ont montré la richesse de ces deux espèces en métabolites secondaires notamment en composés flavoniques et isoflavoniques.

L'étude phytochimique des deux espèces nous a permis d'isoler 22 produits de l'espèce *L. roudairei* et 6 produits de l'espèce *G. ferox*. L'élucidation de leur structure sera présentée dans le chapitre résultats et discussions.

L'activité antioxydante des extraits CH₁ et AE₁ de *L. roudairei* a été évaluée par la méthode de DPPH et le blanchissement de β -carotène. Alors que celle des extraits CH_T, CH_F, AE_T, AE_F, BU_T et BU_F de *G. ferox* a été évaluée par la méthode de DPPH.

L'activité antiproliférative des différents extraits de deux espèces contre les cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa) a été déterminée par le système xCELLigence.

Références bibliographiques

- [1] Quezel.P and Santa.S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C. N. R. S. Paris (Ed.), 491-496.
- [2] Graeme.S, Arnoldo.S.Guerra and Dmitry.D.Sokoloff. (2006) A new combination in *Lotus* section *Pedrosia* (Leguminosae, Loteae). **13**, 93 –95.
- [3] Ould Mohamed vall HMEYADA A. (2009) Contribution a l'étude des plantes médicinales de mauritanie,. Ann. Univ , érie Sciences, Lomé (Togo), 9-27.
- [4] Hladik.Claude M, Simmen.Bruno, Ramasiarisoa.P and Hladik.Annette. (2000) Rôle des produits secondaires (tannins et alcaloïdes) des espèces forestières de l'Est de Madagascar face aux populations animales. *Diversity and Endemism in Madagascar*, 105-114.
- [5] Koudougou.K. (2000) Étude de la chimie et de l'activité antimycosique des extraits de *Biophytum petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae). *université de Ouagadougou-DEA*, 16.
- [6] Bekro.Y.A, J.A MB, Boua.B.B, Bi.F.H T and Éhilé.E.E. (2007) Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) *Herend et Zarucchi* (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, **4**, 220.
- [7] Mibindzou.M.A. (2004) Screening phytochimique de deux espèces de plantes: *Crotalaria retusa* L(Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata* Aubrev. & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon. 62.
- [8] Kongo-Nzuzi.Y. (2009) *Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de candidas albicans*, ISTM Kinshasa.
- [9] Bouquet.A. (1972) Plantes médicinales de Congo Brazzaville. Travaux et documents O.R.S.T.O.M paris, 9.
- [10] Lokadi.L.P. (2008) *Etude Chimique de l'espèce Jacobinia Carnea*, Université de Lubumbashi.
- [11] Dohou.N, Yamini.K, Tahrouch.S, Hassani.L.M I, Badoc.A and Gmira.N. (2003) Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, thymelaea lythroides. *Bulletin de la Société Pharmacie Bordeaux*, 66.
- [12] Najjaa.H, Zouari.S, Arnault.I, Auger.J.E, Ammar.R and Neffati.M. (2011) Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Botanica. Gallica*, **158**, 111-123.
- [13] Koldaş.S, Demirtas.I, Ozen.T, Demirci.M.A and Behçet.L. (2015) Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 786-798.
- [14] Abay.G, Altun.M, Koldaş.S, Tüfekçi.A.R and Demirtas.I. (2015) Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta), . *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **18**, 453-463.
- [15] Pincemail.J, Bonjeana.K, Cayeux.K and Defraigne.J.O. (2002) Nutrition et stress oxydant. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydantePhysiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** 233-239.

- [16] Manach.C, Mazur.A and Scalbert.A. (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16**, 77-84.
- [17] Kaliora.A.C, Dedoussis.G.V and Schmidt.H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **187**, 1-17.
- [18] Crozier.A, Jaganath.I.B and Clifford.M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, **26**, 1001-1043.
- [19] Anderson.J.W, Johnstone.B.M and Cook-Newell.M.E. (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*, **333**, 276-282.
- [20] Bertuglia.S, Malandrino.S and Colantuoni.A. (1995) Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Pharmacological Research*, **31**, 183-187.
- [21] Gülçin.I. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, 213-220.
- [22] Boizot.N and Charpentier.J.P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier In *Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques* Le Cahier des Techniques de l'INRA, numéro spécial 79-82.
- [23] Singleton.V.L, Orthofer.R and Lamuela-Raventós.R.M. (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, Academic Press, 152-178.
- [24] Bahorun.T, Gressier.B, Trotin.F, Brunet.C, Dine.T, Luyckx.M, Vasseur.J, Cazin.M, Cazin.J.C and Pinkas.M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, **46**, 1086-1089.
- [25] Belkheiri.N. (2010) Derives phenoliques a activites antiatherogenes. U. T. III (Ed.).
- [26] Sánchez-Moreno.C. (2002) Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, **8** 121-137.
- [27] Wanasundara.P.K.J.P.D and Shahidi.F. (2005) Antioxidants. *Science Technology and Applications, Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, **6**, 431-489.
- [28] CONGO.M.Y M. (2012) Etudedes proprietes antiradicalaire et des proprietes antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *salvadora persica l.* (salvadoraceae). In *Unité de formation et de recherche en sciences de la sante (UFR/SDS), Section pharmacie* Universite de Ouagadougou, Burkina Faso
- [29] Yahi.N, Véla.E, Benhouhou.S, Belair.G d and Gharzouli.R. (2012) Identifying Important Plants Areas (Key Biodiversity Areas for Plants) in northern Algeria. *Journal of Threatened Taxa*, **4**, 2753-2765.
- [30] Mekkiou.R, Seghiri.R, Boumaza.O, Sarri.Dj, Chebbah.K, Benayache.S, Bermejo.J and Benayache.F. (2012) Secondary metabolites from *Genista ferox*. *Chemistry of Natural Compounds*, **48**, 710-711.
- [31] Faugeras.G and René.R. (1966) The alkaloids content of some *Genista* species and other legumes. *Klasse fuer Chemie, Geologie und Biologie*, **3**, 235-236.

A decorative border resembling a scroll, with a blue outline and grey shading on the top and bottom edges. The scroll is open at the top and bottom, with the top edge curving upwards and the bottom edge curving downwards. The text is centered within the scroll.

Partie III

Résultats et discussions

Introduction

Cette partie renferme la discussion des résultats des travaux phytochimiques et biologiques effectués sur les deux espèces: *Lotus roudairei* Bonnet et *Genista ferox* Poirret.

Le 1^{er} chapitre renferme la discussion des résultats des travaux réalisés sur l'espèce *L. roudairei*:

- Criblage phytochimique des différentes familles de métabolites secondaires.
- La qualification et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans les différents extraits par HPLC-TOF/MS.
- La détermination structurale des métabolites secondaires présents dans les extraits CH₁, AE₁ et BU₁ par CG/SM, RMN 1D et 2D, SM et par spectroscopie UV.
- Les différentes activités biologiques : antioxydant par les méthodes DPPH et β-Carotène et antiproliférative contre les cellules du col de l'utérus (HeLa).

Le 2^{ème} chapitre renferme la discussion des résultats des travaux effectués sur l'espèce *G.ferox*:

- Criblage phytochimique des différentes familles des métabolites secondaires présentent dans deux différents parties organes; tiges et feuilles.
- La qualification et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes présentent dans les différents extraits des tiges et des feuilles par HPLC-TOF/MS.
- La détermination structurale des métabolites secondaires isolés de l'extrait BU_T par RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse.
- Les différentes activités biologiques : antioxydant par la méthode du DPPH et antiproliférative contre les cellules du col de l'utérus (HeLa).

Chapitre III.1

*Résultats de l'étude phytochimique et de
l'activité biologique de l'espèce Lotus
roudairei Bonnet (Fabaceae)*

Résultats de l'étude phytochimique

III.1.1 Résultat du screening phytochimique

Le screening phytochimique est basé essentiellement sur des réactions de précipitation et des réactions de coloration spécifiques aux différents métabolites secondaires.

Le tableau III.1 rassemble les résultats globaux du screening chimique de trois organes de l'espèce *L. roudairei*, sachant que:

- La présence de la substance est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -

Tableau III.1: Résultats globaux du screening chimique de l'espèce *L. roudairei*.

Groupes chimiques	fruits	Tiges	Feuilles
Alcaloïdes	+	+	+
Terpènes	+	+	+
Stérols insaturés	+	+	+
Triterpènes	+	+	+
Saponines	+	+	+
Quinones	-	-	-
Coumarines	+	+	+
Tanins	+	+	+
Flavonoïdes	++	++	++
Anthocyanes	+	+	+

Sur l'ensemble des réactions en tubes, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols insaturés, les triterpènes, les saponines, les coumarines, les tanins, les flavonoïdes et les anthocyanes ont donné des réactions positives pour les trois organes de la plante. Les résultats obtenus montrent une richesse diversifiée en groupes chimiques actifs notamment les flavonoïdes, mais ceci reste un résultat très préliminaire et nécessite d'autres travaux afin d'isoler et d'identifier des molécules bioactives.

III.1.2 Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS

Tous les extraits de *Lotus roudairei* CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁ obtenus par l'extraction à froid dans le système hydroalcoolique MeOH/H₂O (v : v ; 80/20) et les extraits AE₂ et BU₂ obtenu par extraction à chaud dans de l'eau bouillante à 90 °C ont été analysés par la méthode HPLC-TOF/MS en mode négatif.

Les tableaux III.2 et III.3 présentent les quantités des acides phénoliques et des flavonoïdes individuels présents dans les différents extraits. Leur identification a été effectuée par

comparaison de leurs temps de rétention et de leur spectre de masse avec ceux de différents standards. Cette analyse a montré une richesse plus ou moins importante des quatre extraits (CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁) et des deux extraits (AE₂ et BU₂) en acides phénoliques et en flavonoïdes.

Tableau III.2: Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits CH₁, EA₁, BU₁ et ME₁ de l'espèce *L. roudairei* par HPLC-TOF/MS.

N°	Acides Phénoliques	T _R (min)	Concentration en (mg composé phénolique/kg de matière sèche)			
			CH ₁	AE ₁	BU ₁	ME ₁
1	Acide gallique	2,40	0,045	0,292	0,222	0,310
2	Acide gentisique	4,50	0,028	3,403	0,618	0,322
3	Acide 4- hydroxybenzoïque	7,00	0,257	1,654	0,312	0,729
4	Acide protocatéchique	7,10	ND	0,108	ND	ND
5	Acide caféique	7,60	ND	0,609	ND	ND
6	Acide vanillique	7,90	ND	3,106	ND	ND
7	Acide <i>p</i> -coumarique	12,10	ND	2,175	ND	ND
8	Acide chicorique	9,98	ND	0,078	2,871	ND
9	Acide férulique	10,60	0,023	1,031	ND	ND
10	Acide chlorogénique	5,50	ND	ND	5,749	ND
11	4-Hydroxybenzaldéhyde	9,40	0,003	ND	ND	ND
Flavonoïdes						
15	Rutine	9,20	0,006	0,282	3,842	0,276
16	Apigénine-7-glucoside	10,9	ND	0,165	1,51	1,154
17	Quercétine	14,0	0,033	ND	ND	0,143

ND: Non détecté

Tableau III.3: Acides phénoliques et flavonoïdes identifiés dans les extraits EA₂ et BU₁ de l'espèce *L. roudairei* par HPLC-TOF/MS.

N°	Acides Phénoliques	T _R (min)	Concentration en (mg composé phénolique / kg de matière sèche)	
			AE ₂	BU ₂
2	Acide gentisique	4,50	0,077	0,824
3	Acide 4- hydroxybenzoïque	7,00	ND	0,03
4	Acide protocatéchique	7,10	0,166	ND
6	Acide vanillique	7,90	ND	1,012
9	Acide férulique	10,6	ND	4,403
10	Acide chlorogénique	5,50	0,06	ND
12	Acide fumarique	3,20	5,521	ND
13	Acide sinapique	10,50	ND	5,08
14	Acide cinnamique	15,2	ND	0,26
Flavonoïds				
18	Catéchine	5,8	0,11	0,294
19	Scutellarine	9,70	0,04	ND
20	Naringine	10,50	0,02	0,3
21	Diosmine	10,60	0,31	ND
22	Morine	13,0	ND	0,36
23	Diosmétine	16,1	ND	6,88

ND: Non détecté

D'après les deux tableaux, les acides phénoliques ont été identifiés comme étant l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, l'acide chicorique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzaldéhyde acide fumarique, acide sinapique et acide cinnamique dont les structures sont reportées dans la figure III.1. Alors que les flavonoïdes ont été déterminés comme étant la rutine, l'apigénine-7-O-glucoside, la quercétine, la catéchine, la scutellarine, la naringine, la diosmine, la morine et la diosmétine dans les différents extraits (figure III.2). L'acide gentisique, l'acide vanillique et l'acide p-coumarique étaient les plus présents dans l'extrait EA₁ avec des concentrations respectives de 3,4, 3,1 et 2,17 mg/kg. De plus, l'acide chlorogénique était le plus présent dans l'extrait de BU₁ avec une concentration de

5,75 mg/kg suivi de l'acide chicoriqué avec une quantité de 2,87 mg/kg. Enfin, les extraits CH₁ et ME₁ ont montré les plus faibles teneurs en acides phénoliques.

De plus, la rutine s'est révélée être le flavonoïde le plus présent dans les extraits EA₁, BU₁ et ME₁ avec la valeur la plus élevée (3,84 mg/kg) dans l'extrait BU₁.

La teneur des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits EA₂ et BU₂ obtenus par la seconde méthode d'extraction (Tableau III.2), était moins importante que celle des extraits EA₁ et BU₁ obtenus par la première méthode d'extraction. Il est important de noter que les acides les plus présents sont l'acide fumarique présent dans l'extrait EA₂ avec une quantité de 5,521 mg/kg et l'acide sinapique présent dans l'extrait BU₂ avec une quantité de 5,08 mg/kg. Les deux acides phénoliques étaient totalement absents dans tous les extraits issus de la première méthode d'extraction. Cependant, la diosmétine semble être le flavonoïde le plus important présent dans l'extrait BU₂.

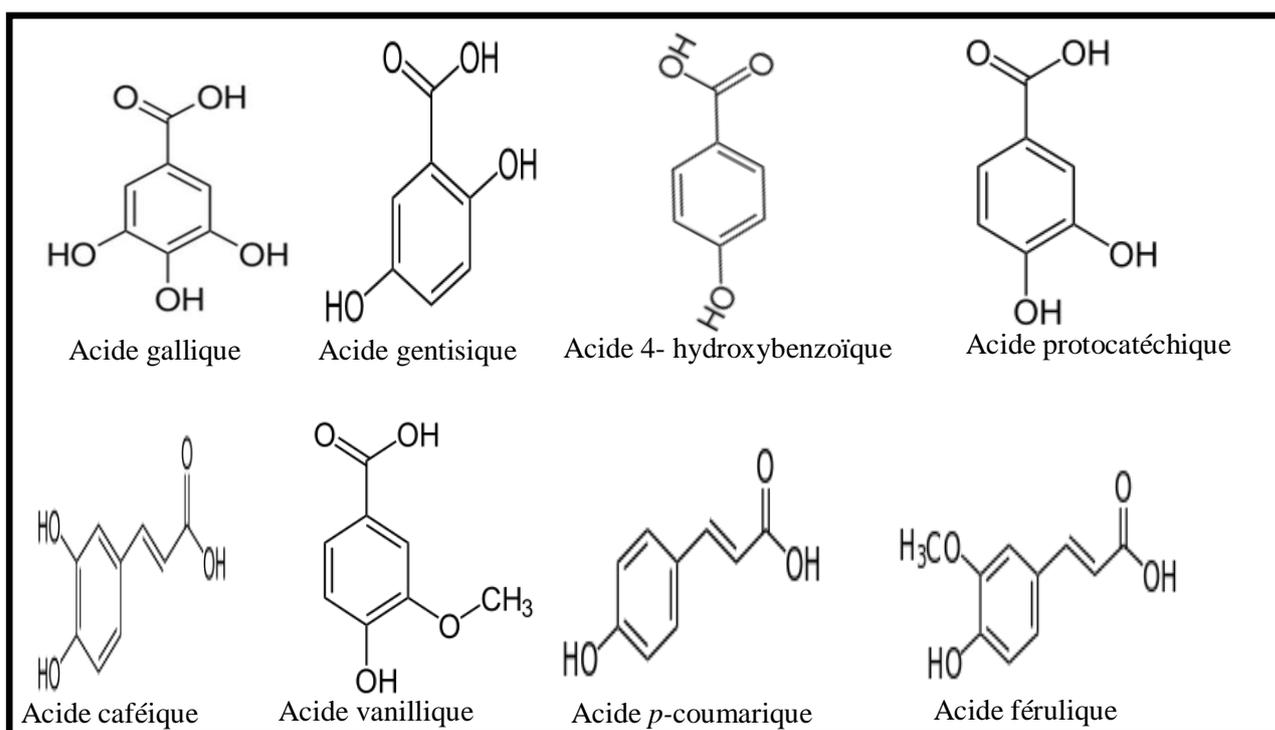


Figure III.1: Structures des acides phénoliques identifiés dans les extraits de *L.roudairi* par HPLC-TOF/MS.

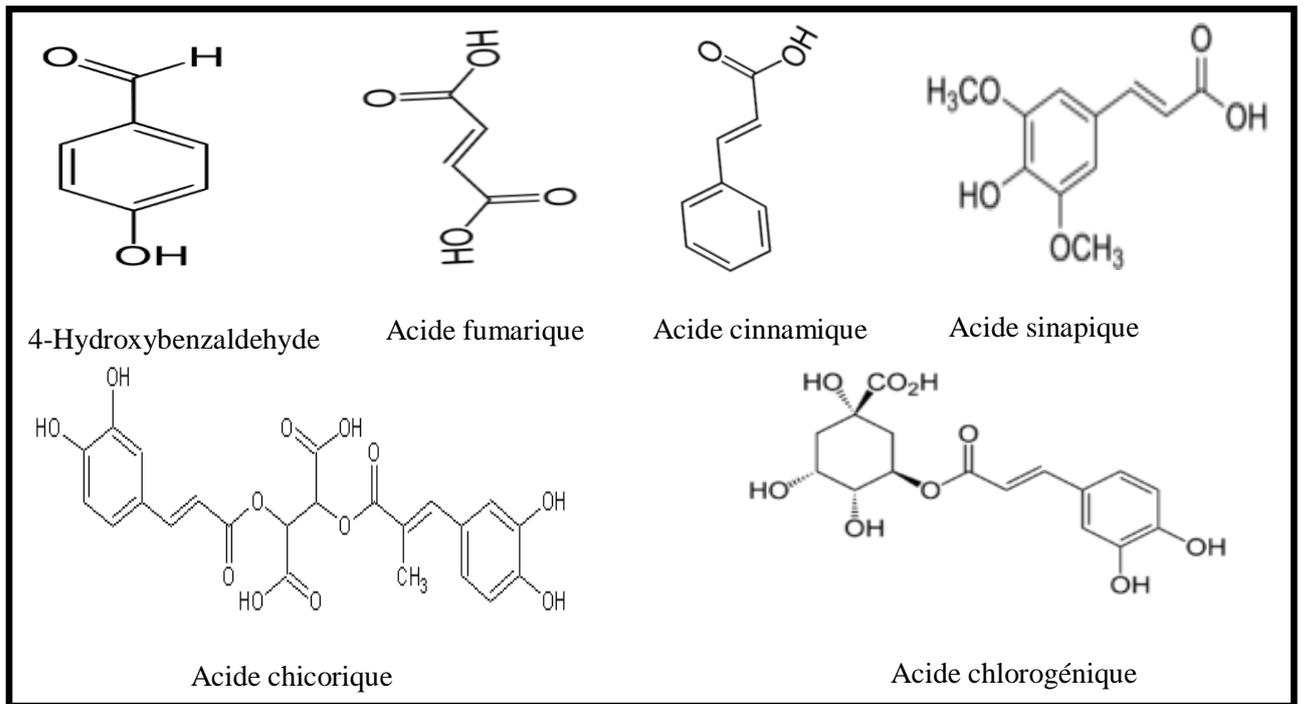


Figure III.1: Structures des acides phénoliques identifiés dans les extraits de *L.roudairi* par HPLC-TOF/MS (suite).

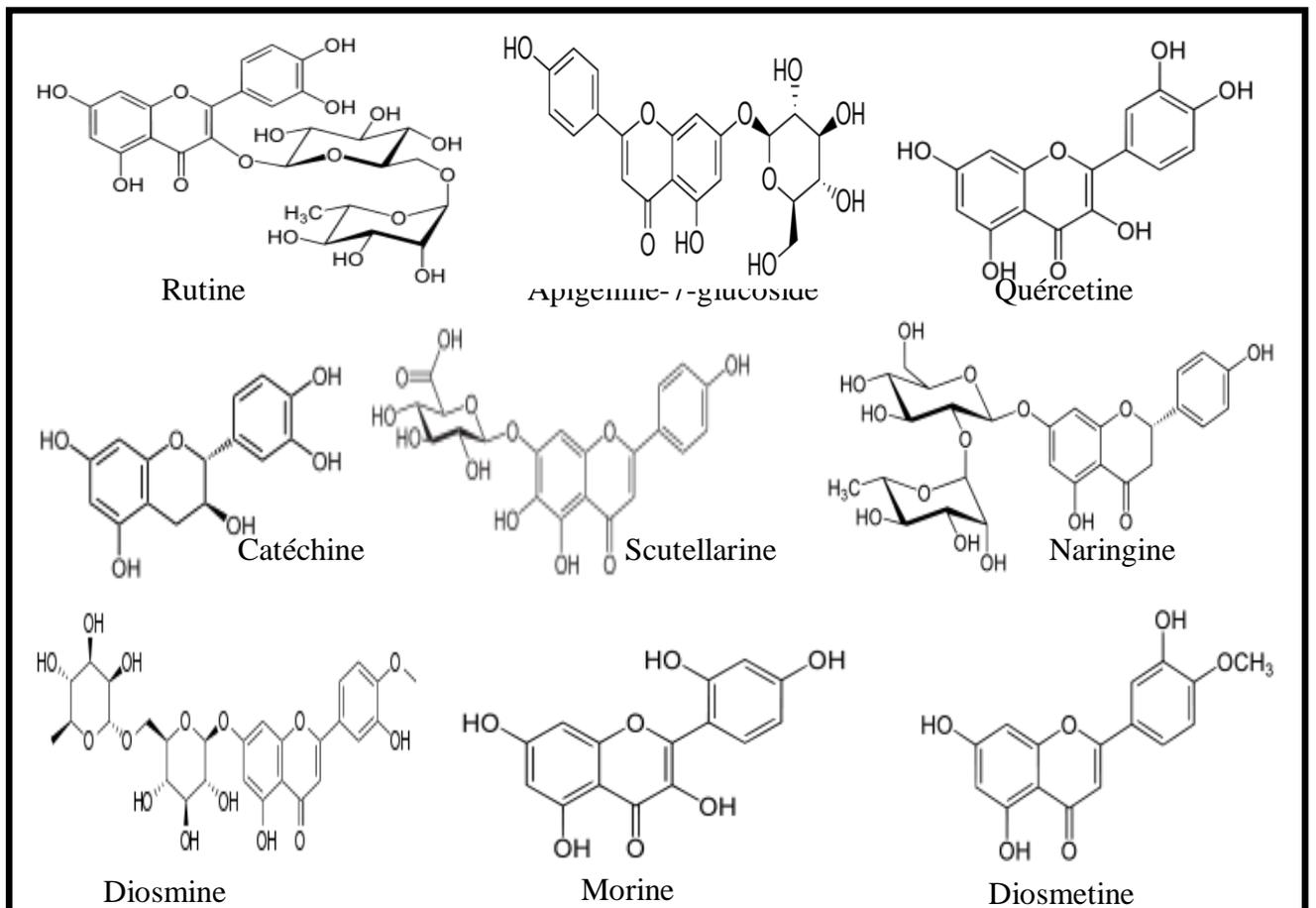


Figure III.2: Structures des flavonoïdes identifiés dans les extraits de *L.roudairi* par HPLC-TOF/MS.

III.1.3 Identification du contenu en métabolites secondaires par CG/SM

L'identification du contenu en métabolites secondaires des fractions C₄, C₆, C₇, C₈ et C₁₀ a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CG/SM). La détermination des structures des composés a été réalisée par la comparaison de leur masse avec celle des banques de données WILEY et NIST.

➤ La fraction C₄

La fraction C₄ a été obtenue sous forme d'une phase huileuse. Le tableau III.4 présente le résultat de l'analyse par CG/SM de cette fraction.

Tableau III.4: Résultats de l'analyse de la fraction C₄ par CG/SM.

N°	Composés identifiés	T _R (min)	%	m/z	Formule
1	2,6,6-Triméthyl-1,3-Cyclohexadiene-1-carboxaldéhyde (safranale)	2,802	7,03	150,2207	C ₁₀ H ₁₄ O
2	Dihydroedulane	25,131	2,47	194,3132	C ₁₃ H ₂₂ O
3	β-Ionone	31,133	4,99	192,2973	C ₁₃ H ₂₀ O
4	5,8-Diméthyl dodécane	36,871	3,31	226,4421	C ₁₆ H ₃₄
5	3,7,11,15-Tétraméthyl-2-hexadécen-1-ol	40,598	6,51	296,5310	C ₂₀ H ₄₀ O
6	Héxahydrofarnesyl acétone	40,79	44,90	268,4778	C ₁₈ H ₃₆ O
7	Inconnu	42,764	20,38	-	-
8	Phytol	43,344	6,82	296,5310	C ₂₀ H ₄₀ O

Cette analyse montre la présence de 8 composés dans la fraction C₄. Le composé majoritaire étant l'héxahydrofarnesyl acétone avec un pourcentage de 44,90% suivi par le composé apparaissant au temps de rétention T_R= 42,764 min avec un pourcentage de 20,38% est inconnu par la banque des données. Cette constatation peut nous inciter à entreprendre, dans le futur son isolement puis la détermination de sa structure. Le composé minoritaire dans cette fraction est le Dihydroédulane avec un pourcentage de 2,47%.

➤ La fraction C₆

L'analyse de la fraction C₆ par CG/SM montre la présence de six composés. Le tableau III.5 donne le temps de rétention, la masse, la formule brute et le nom du composé ainsi que son pourcentage.

Tableau III.5: Résultats de l'analyse de la fraction C₆ par CG/SM.

N°	Composés identifiés	T _R (min)	%	m/z	Formule
9	2,4-Di-tert-butylphénol	30,59	11,32	206,3239	C ₁₄ H ₂₂ O
10	1,6-Dioxacyclododécane-7,12-dione	31,959	8,64	200,232	C ₁₀ H ₁₆ O ₄
11	Acide Phthalique, butyl hex-3-yl ester	42,776	16,54	306,3966	C ₁₈ H ₂₆ O ₄
12	Acide Palmitique, éthyl ester	43,273	27,49	284,4772	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
13	Acide Linoléique	46,877	24,94	278,4296	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
14	Inconnu	47,23	11,07	-	-

D'après ce tableau, il se trouve que d'une part, l'acide Linoléique et l'acide Palmitique éthyl ester sont les deux composés majoritaires avec les pourcentages 27,49% et 24,9% respectivement et d'autre part le composé apparaissant au temps de rétention égale à 47,23 min avec un pourcentage de 11,07% est inconnu par la banque des données. Cette constatation peut nous inciter à entreprendre, dans le futur son isolement puis la détermination de sa structure.

➤ La fraction C₇

De même que les deux fractions précédentes, la fraction C₇ a subi une analyse par CG/SM montrant ainsi la présence de huit composés dont les données sont résumées dans le tableau III.6. Parmi ces composés l'acide palmitique éthyl ester (28,38%), le 2,4- di-tert-butylphénol (27,70%) et l'acide Linoléique, ethyl ester (20,71%) se trouvent être les plus majoritaires de la fraction C₇. Le 1-Heptadecene (2,08%) et le Citronellyl acétone (2,63%) sont minoritaires dans cette fraction.

Tableau III.6: Résultats de l'analyse de la fraction C₇ par CG/SM.

N°	Composés identifiés	T _R (min)	%	m/z	Formule
9	2,4-di-tert-butylphénol	30,59	27,70	206,3239	C ₁₄ H ₂₂ O
15	1-Heptadecene	38,259	2,08	238,4519	C ₁₇ H ₃₄
16	Citronellyl acétone	39,671	2,63	196,3291	C ₁₃ H ₂₄ O
17	9-Tétradécenal	41,336	4,61	210,3556	C ₁₄ H ₂₆ O
18	acide palmitique, méthyl ester	41,628	5,44	270,4507	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
12	acide palmitique, éthyl ester	43,26	28,38	284,4772	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
19	acide linoléique, éthyl ester	46,866	20,71	306,4828	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
20	acide stéarique, éthyl ester	47,222	8,45	312,5304	C ₂₀ H ₄₀ O ₂

➤ **La fraction C₈**

La fraction C₈ a été également analysée par CG/SM. Son chromatogramme montre la présence de quatre composés dont le temps de rétention, la masse, la formule brute, le nom et le pourcentage sont reportés dans le tableau III.7. L'anhydride 2-Dodécen-1-yl(-) succinique est le composé majoritaire présent dans cette fraction avec un pourcentage de 57,18% suivis du 3-dodécyl-2,5-Furandione (29,66%), Alors que le composé minoritaire est le 2,4-di-tert-butylphénol avec un pourcentage de 2,37%.

Tableau III.7: Résultats de l'analyse de la fraction C₈ par CG/SM.

N°	Composés identifiés	T _R (min)	%	m/z	Formule
9	2,4-di-tert-butylphénol	30,59	2,37	206,3239	C ₁₄ H ₂₂ O
12	Acide Palmitique, ethyl ester	43,26	10,80	284,4772	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
21	3-dodécyl-2,5-furandione	49,55	29,66	266,37600	C ₁₆ H ₂₆ O ₃
22	Anhydride 2-dodécen-1-yl(-)succinique	50,52	57,18	266,381	C ₁₆ H ₂₆ O ₃

➤ **La fraction C₁₀**

L'analyse de la fraction C₁₀ par CG/SM montre la présence de 10 composés. Le composé majoritaire étant le phytol avec un pourcentage de 49,09%. Le composé minoritaire dans cette fraction est le 3,7,11,15-Tétraméthylhexadéc-1-yn-3-ol avec un pourcentage de 1,25%.

Tableau III.8: Résultats de l'analyse de la fraction C₁₀ par CG/SM.

N°	Composés identifiés	T _R (min)	%	m/z	Formule
6	Héxahydrofarnesyl acétone	24,428	2,91	268,4778	C ₁₈ H ₃₆ O
8	Phytol	26,282	3,12	296,5310	C ₂₀ H ₄₀ O
23	???	31,256	3,25	-	-
24	???	31,592	3,80	-	-
8	Phytol	31,969	49,09	296,5310	C ₂₀ H ₄₀ O
25	3,7,11,15-Tétraméthylhexadéc-1-yn-3-ol	32,246	1,25	294,523	C ₂₀ H ₃₈ O
19	Acide linolénique, ethyl ester	32,557	1,52	308,4986	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
8	Phytol	33,605	4,42	296,5310	C ₂₀ H ₄₀ O
26	Alcool béhénique	33,84	2,61	326,6000	C ₂₂ H ₄₆ O
26	Alcool béhénique	36,08	6,95	326,6000	C ₂₂ H ₄₆ O
27	1-Tétracosanol	38,823	3,18	354,6532	C ₂₄ H ₅₀ O
28	β-Amyrine	61,313	3,92	426,7174	C ₃₀ H ₅₀ O
29	Lupéol	64,475	12,02	426,7174	C ₃₀ H ₅₀ O
29	Lupéol	70,884	1,50	426,7174	C ₃₀ H ₅₀ O

L'étude comparative des cinq fractions C₄, C₆, C₇, C₈ et C₁₀ monte la présence de 29 produits dont leurs structures sont représentés dans les figures (III.3 et III.10). D'après cette analyse on peut marquer quelques observations:

- ✓ Le composé 2,4-di-tert-butylphénol est commun pour les fractions C₆, C₇ et C₈ avec différentes concentration (11,32 %, 27,70 % et 2,37 %).
- ✓ Le phytol est commun pour les deux fractions C₄ et C₁₀ avec des concentrations très variées.
- ✓ L'acide Palmitique, éthyl ester est présent dans les trois fractions C₆, C₇ et C₈ avec des concentrations majoritaires pour les deux premières fractions C₆ et C₇.
- ✓ L'acide Linoléique, éthyl ester est présent dans les deux fractions C₇ et C₁₀.
- ✓ Hexahydrofarnesyl acétone est présent dans les deux fractions C₄ et C₁₀.

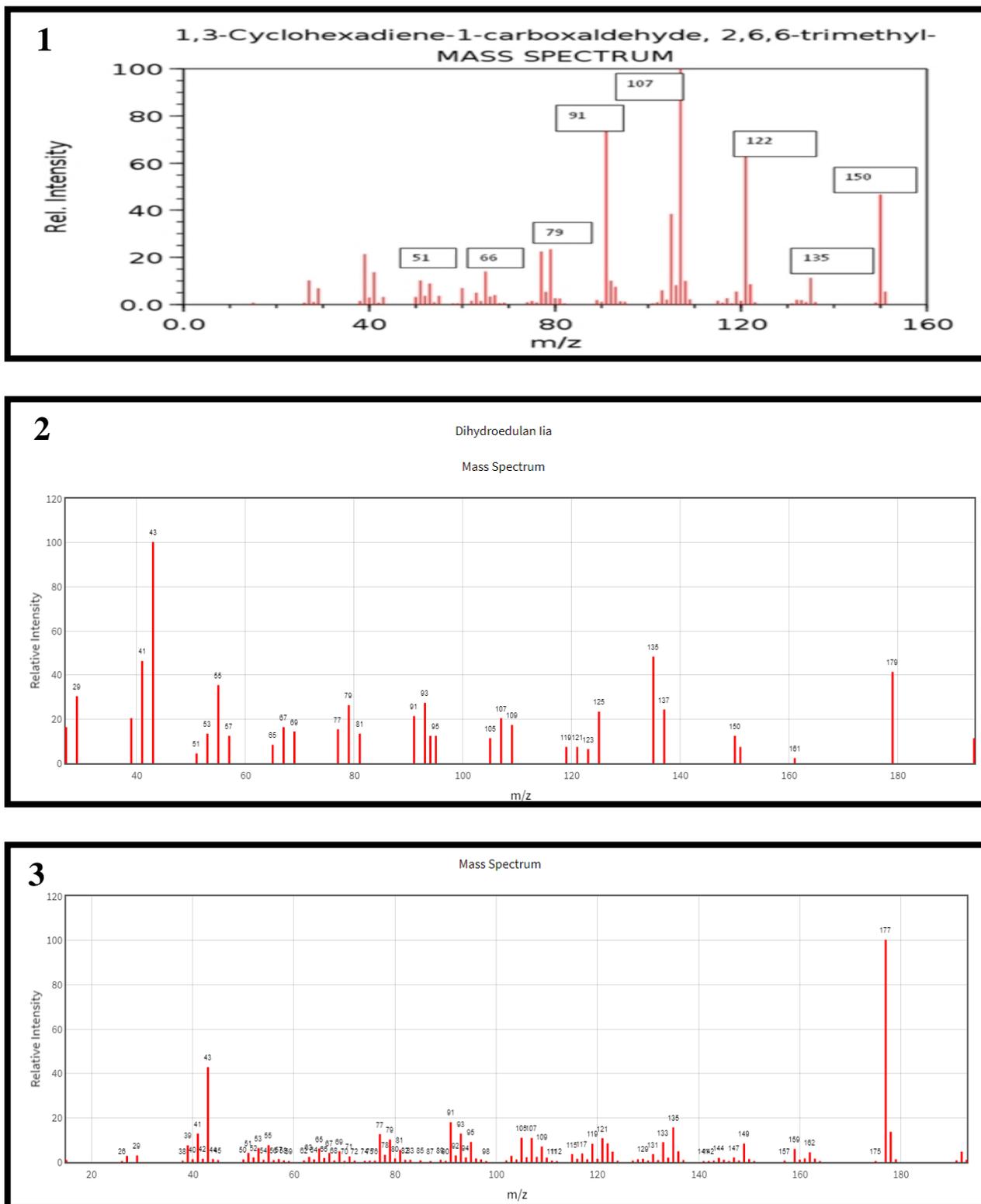


Figure III.3: Spectres de masse des composés 1, 2 et 3 selon la banque de données NIST.

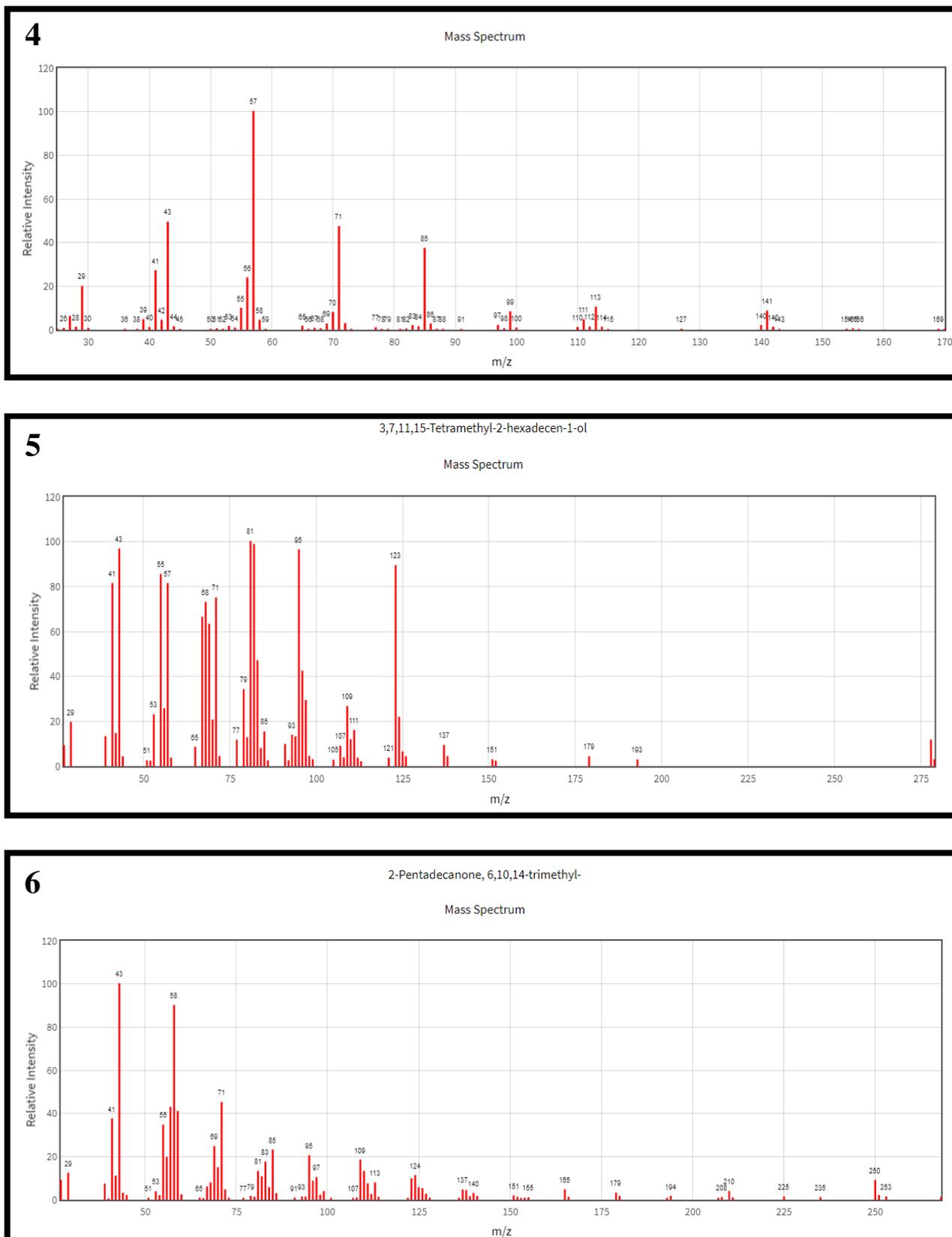


Figure III.4: Spectres de masse des composés 4, 5 et 6 selon la banque de données NIST.

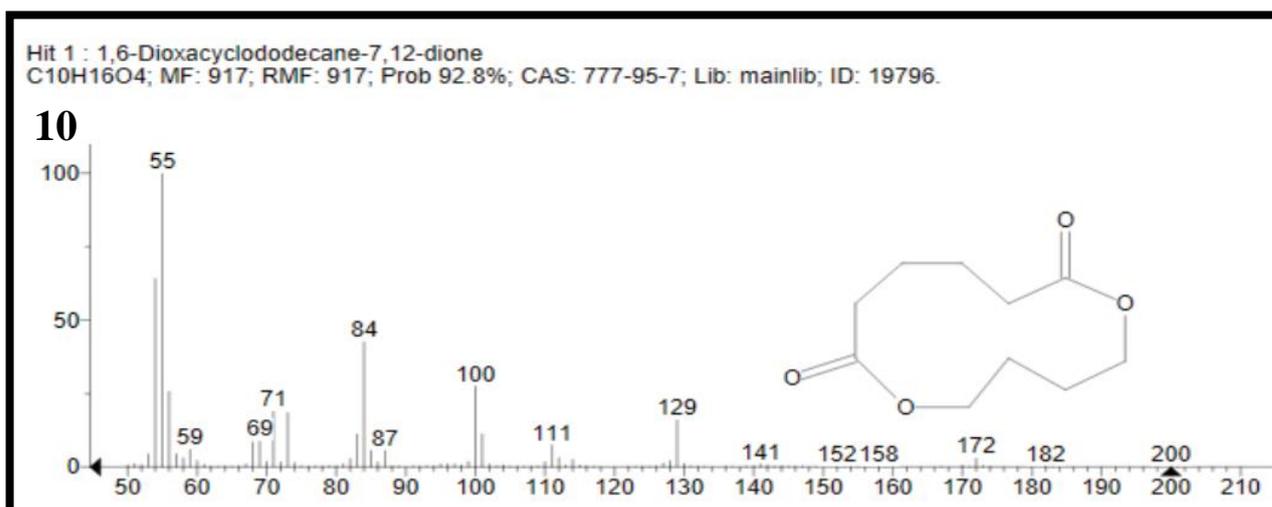
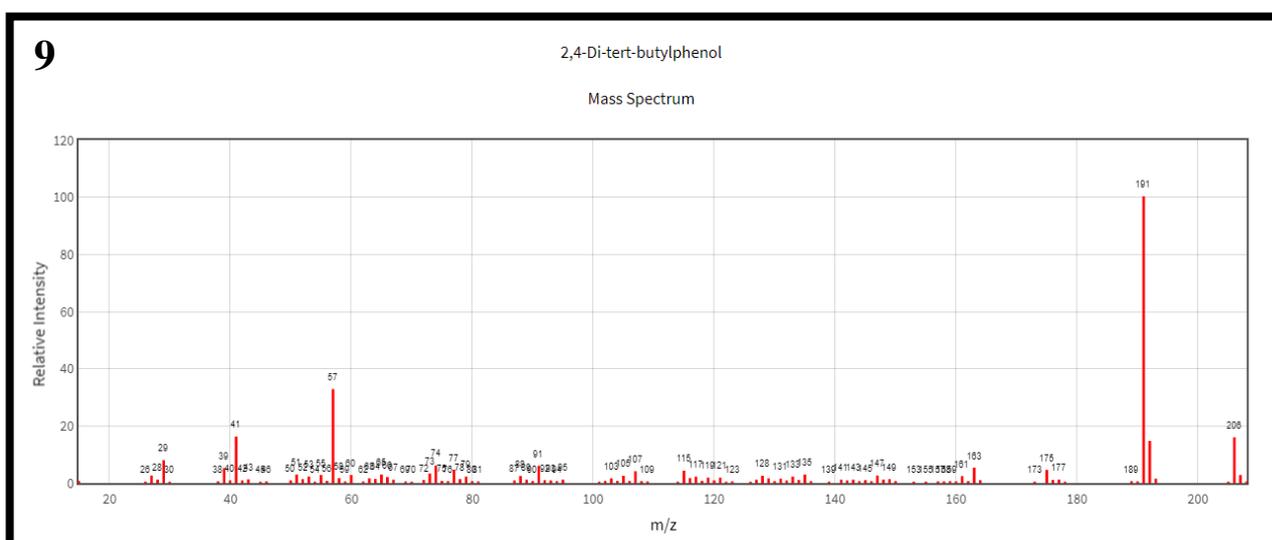
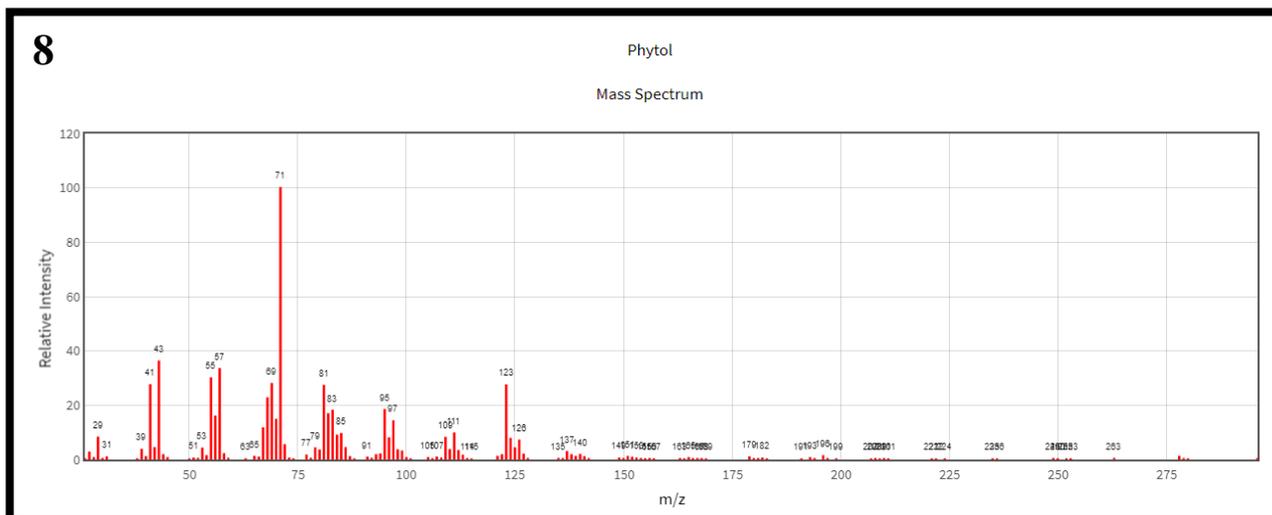


Figure III.5: Spectres de masse des composés 8,9 et10 selon la banque de données NIST.

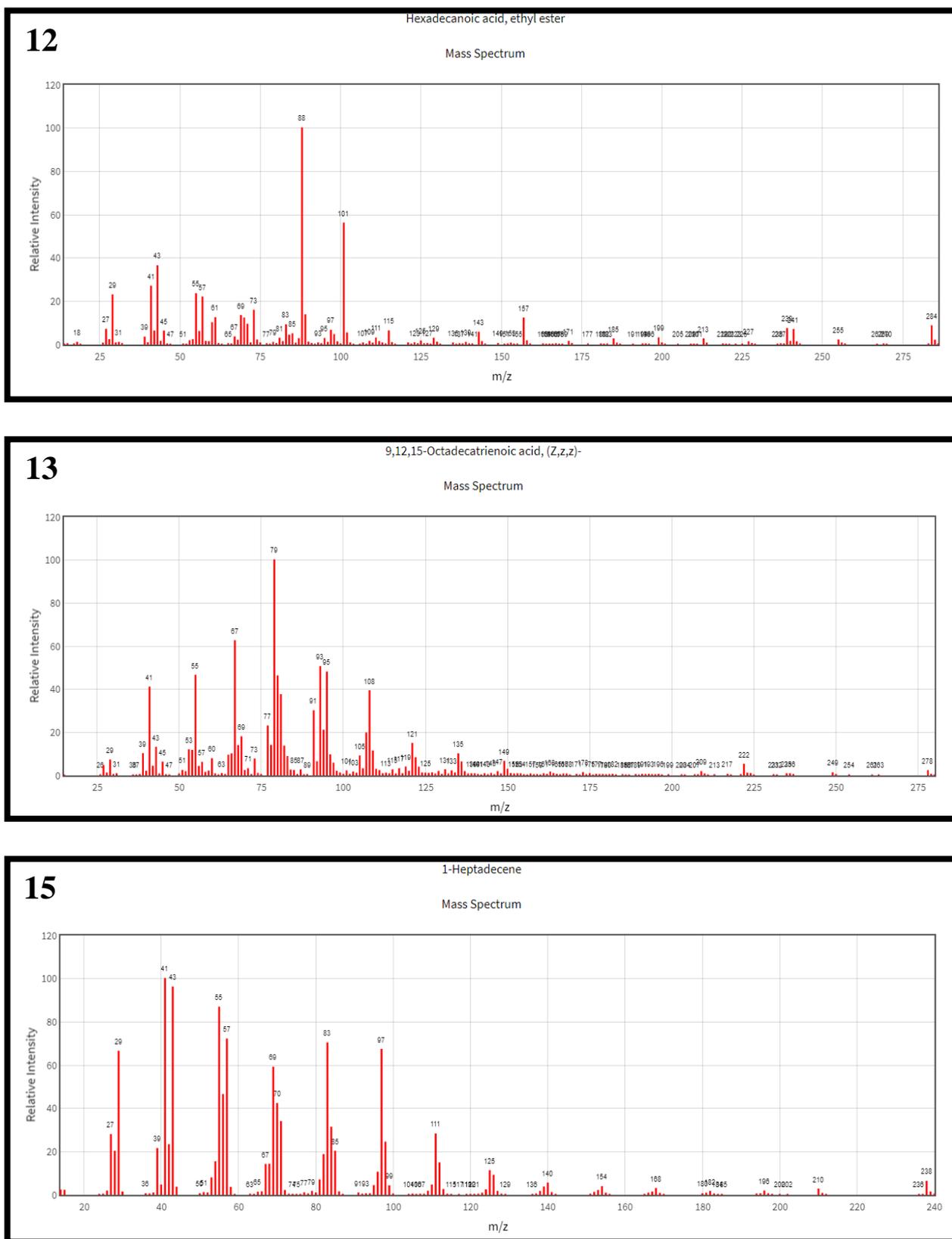


Figure III.6: Spectres de masse des composés 12, 13 et 15 selon la banque de données NIST.

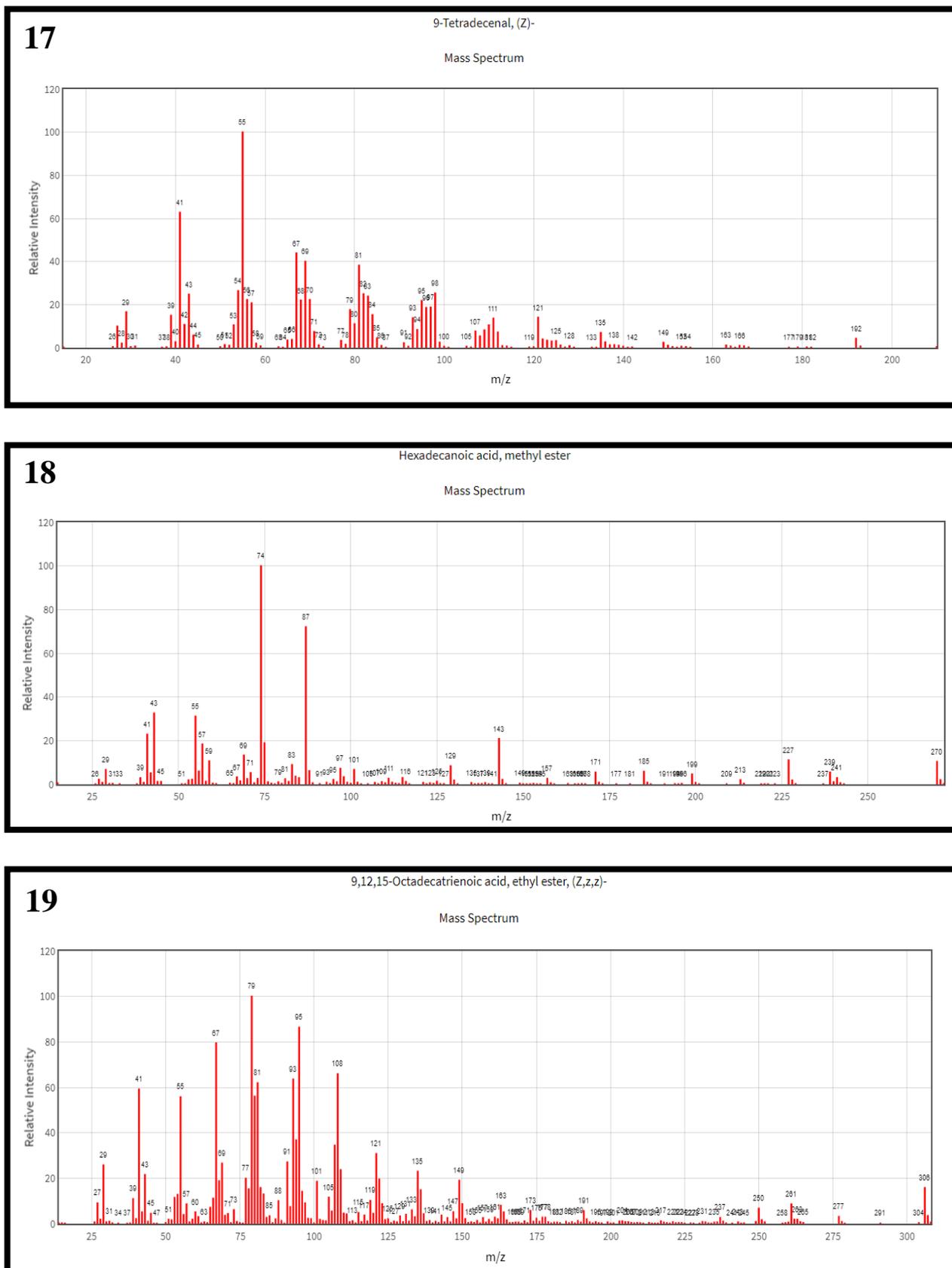


Figure III.7: Spectres de masse des composés 17, 18 et 19 selon la banque de données NIST.

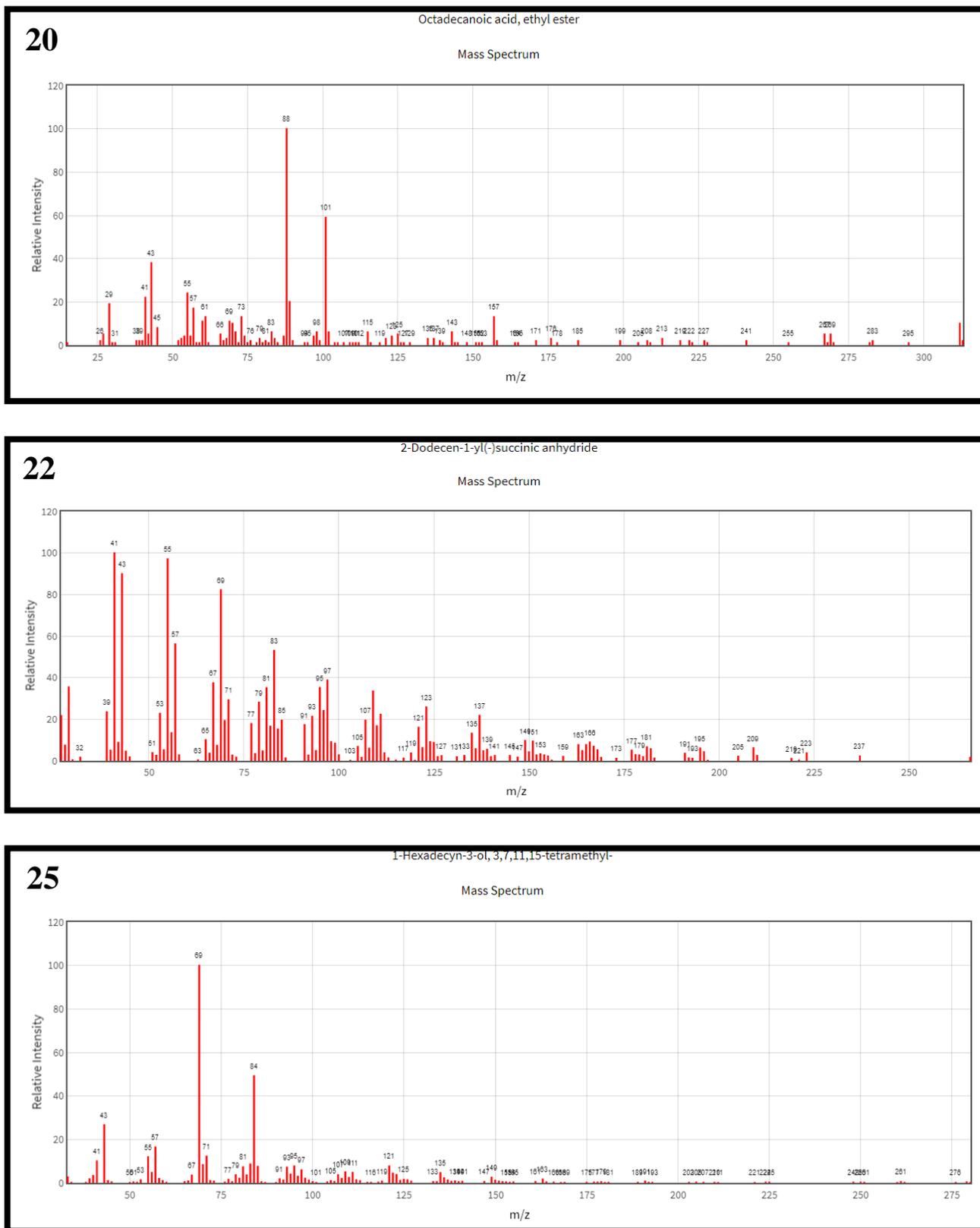


Figure III.8: Spectres de masse des composés 20, 22 et 25 la banque de données NIST.

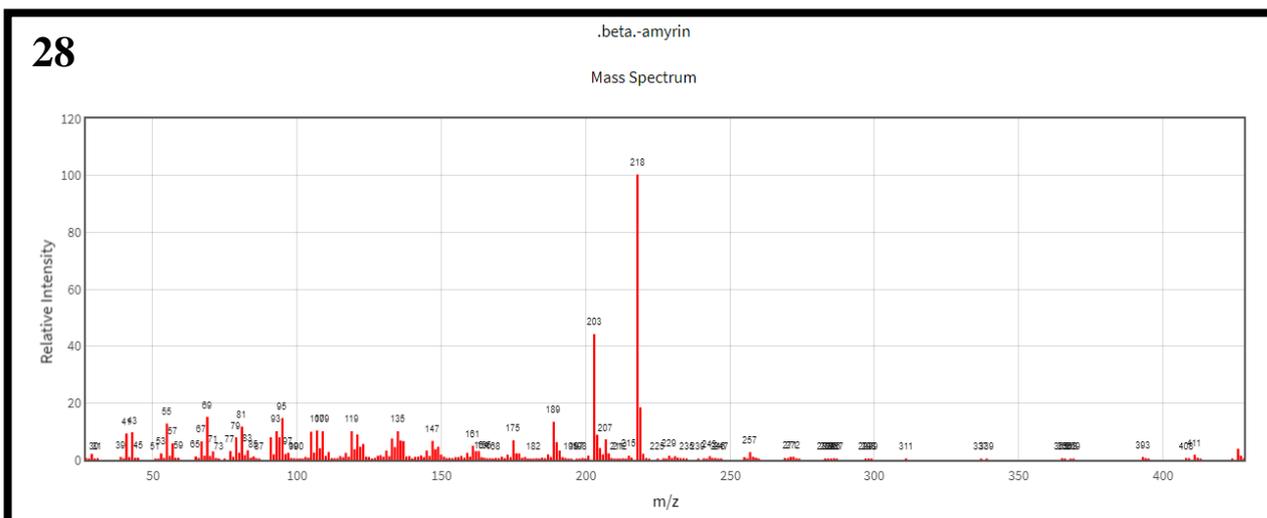
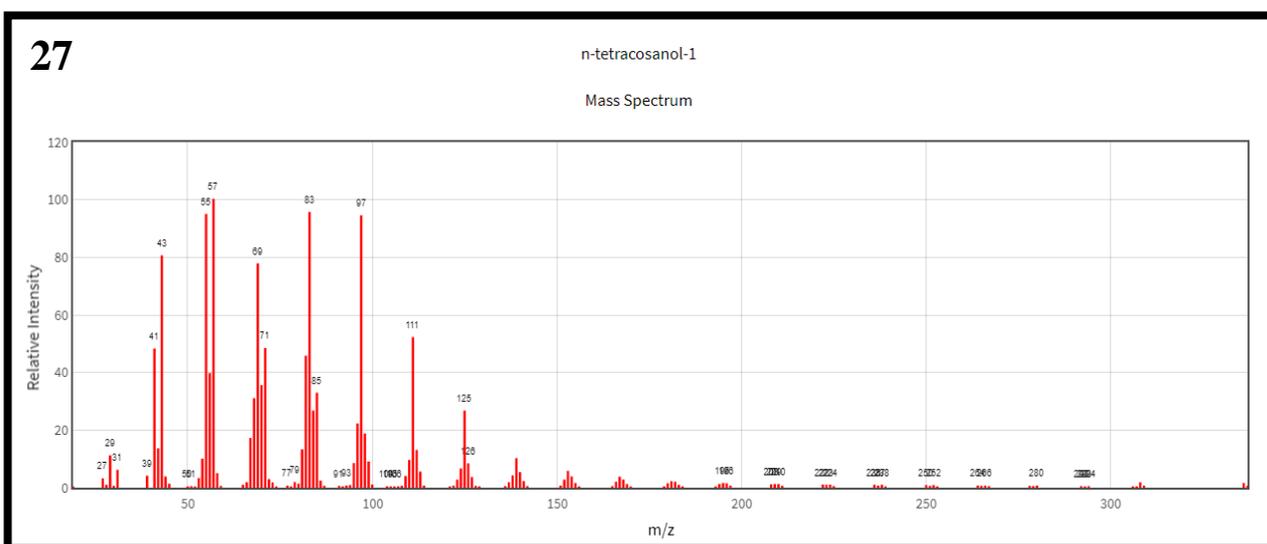
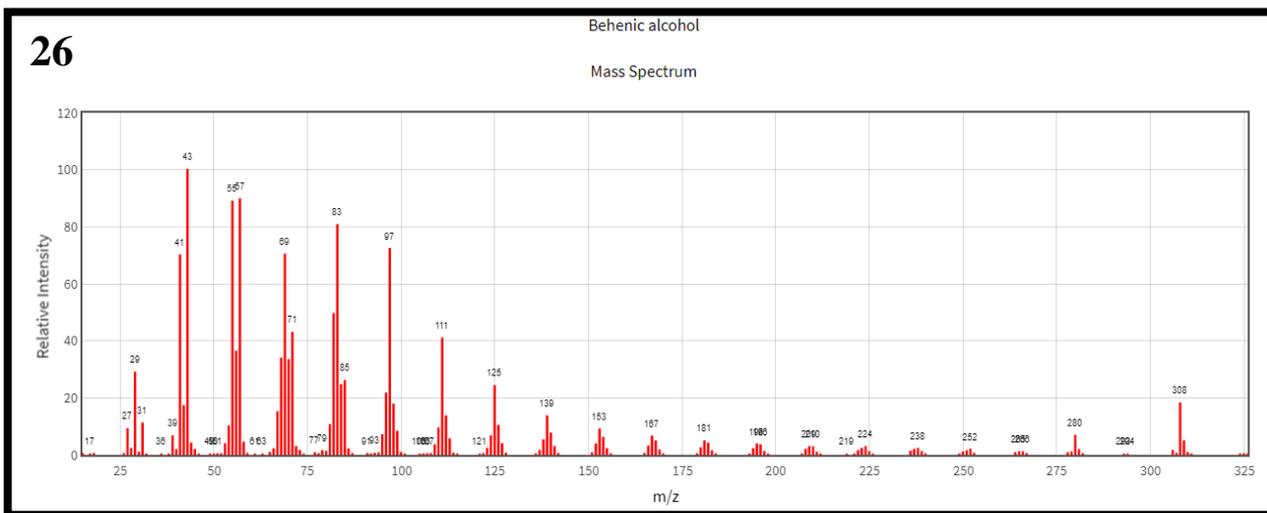


Figure III.9: Spectres de masse des composés 26, 27 et 28 selon la banque de données NIST.

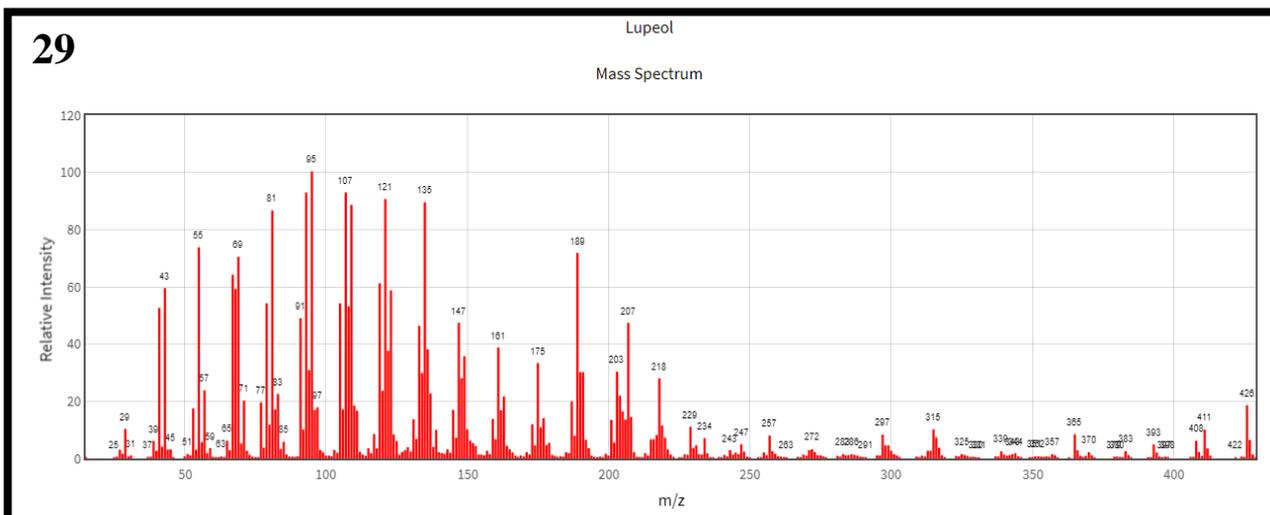


Figure III.10: Spectre de masse de composé 29 selon la banque de données NIST.

III.1.4 Elucidation structurale des composés isolés

Les structures des produits isolés de l'espèce *Lotus roudairei* ont été établies par la combinaison des différentes méthodes d'analyses spectroscopiques telles que la RMN 1D (^1H et ^{13}C), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HSQC, HMBC), HPLC-TOF/MS, CG/SM et par comparaison avec les données de la littérature.

III.1.4.1 Elucidation structurale du mélange PC₁₃ (1, 2 et 3)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le mélange PC₁₃ a été obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le chloroforme. Sur CCM, il présente une coloration violette après révélation au réactif à l'acide sulfurique dilué.

➤ Données spectroscopiques

Le composé PC₁₃ a été identifié par CG/SM et son chromatogramme (figure III.11) montre qu'il s'agit d'un mélange de trois produits PC₁₃₋₁ (1), PC₁₃₋₂ (2) et PC₁₃₋₃ (3). Les constituants de ce mélange ont été identifiés comme étant le **Campésterol** (13,29%), le **Stigmastérol** (24,39%) et le **γ -Sitostérol** (62,33%) par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque des données NIST.

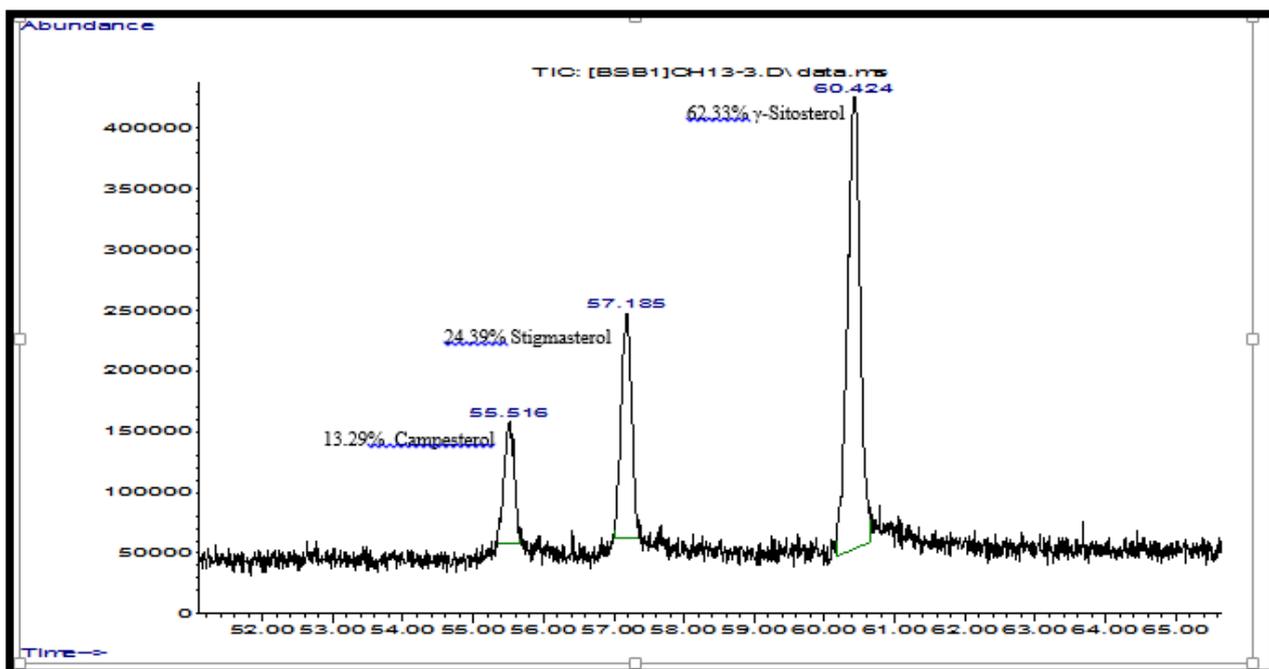


Figure III.11: Chromatogramme CG/SM du mélange des composés PC₁₃₋₁, PC₁₃₋₂ et PC₁₃₋₃.

Les spectres de masse (figure III.12, figure III.13 et figure III.14) réalisés en mode impact électronique (IE) donnent les fragments caractéristiques de chaque composé.

PC₁₃₋₁: Campésterol (13,29%)

Dans le spectre de masse (figure III.12), le pic moléculaire $[M]^+$ à m/z 400 Da indiquant la formule moléculaire C₂₈H₄₈O. De plus, le fragment à m/z 382 Da est caractéristique de la perte d'une molécule d'eau $[M^+ - 18]$.

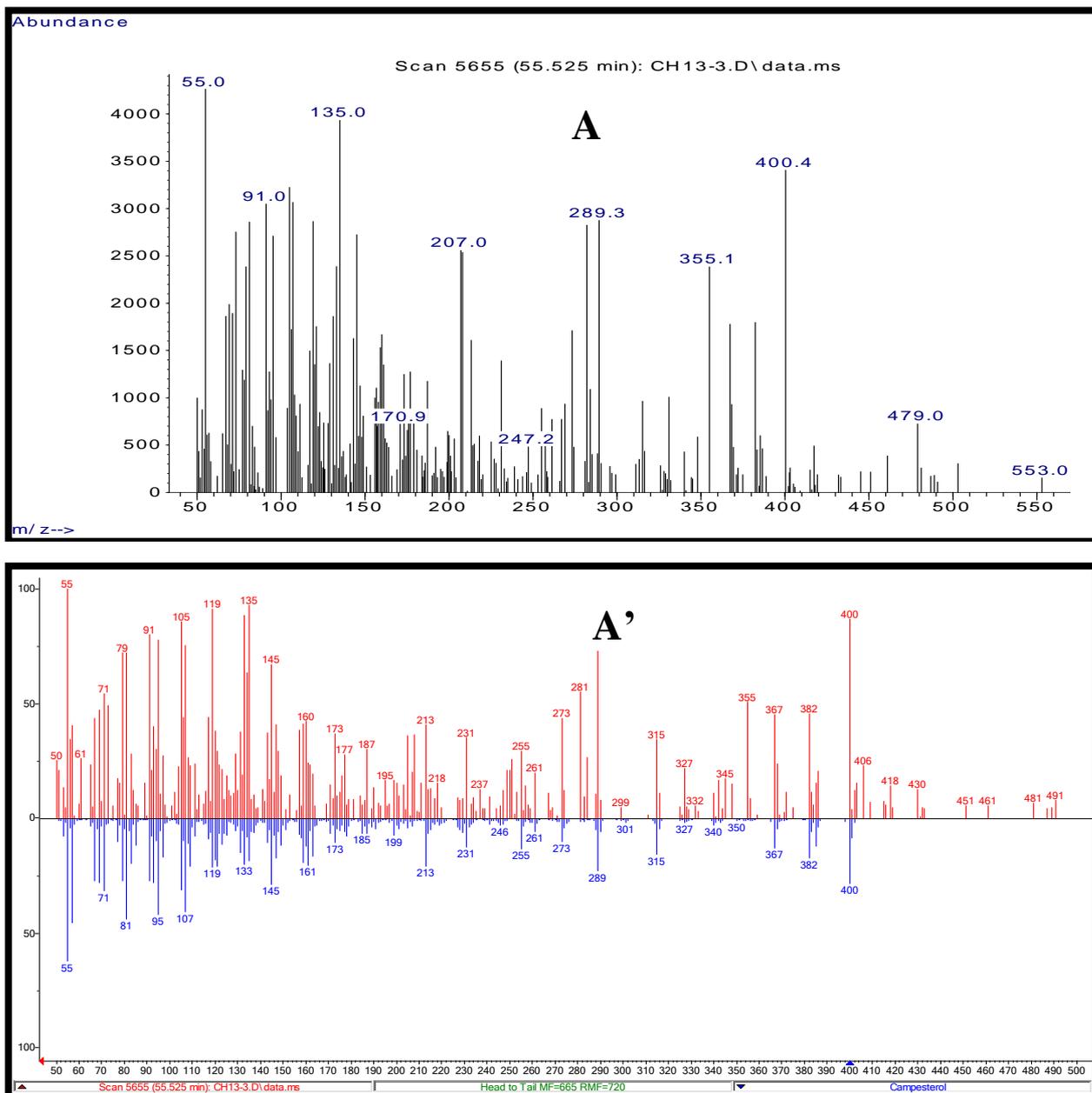


Figure III.12: A. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₁.

A'. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₁ comparé avec la banque des données NIST.

PC₁₃₋₂: **Stigmastérol (24,39%)** dont les fragmentations principales sont caractéristiques des fragmentations des stérols telles que : m/z 412 Da [$M^{+\circ}$], 379 Da correspondant à [$M^{+\circ}$ -15-18], 255 Da correspondant à [$M^{+\circ}$ -18-C₁₀H₁₉] et autres (figure III.13).

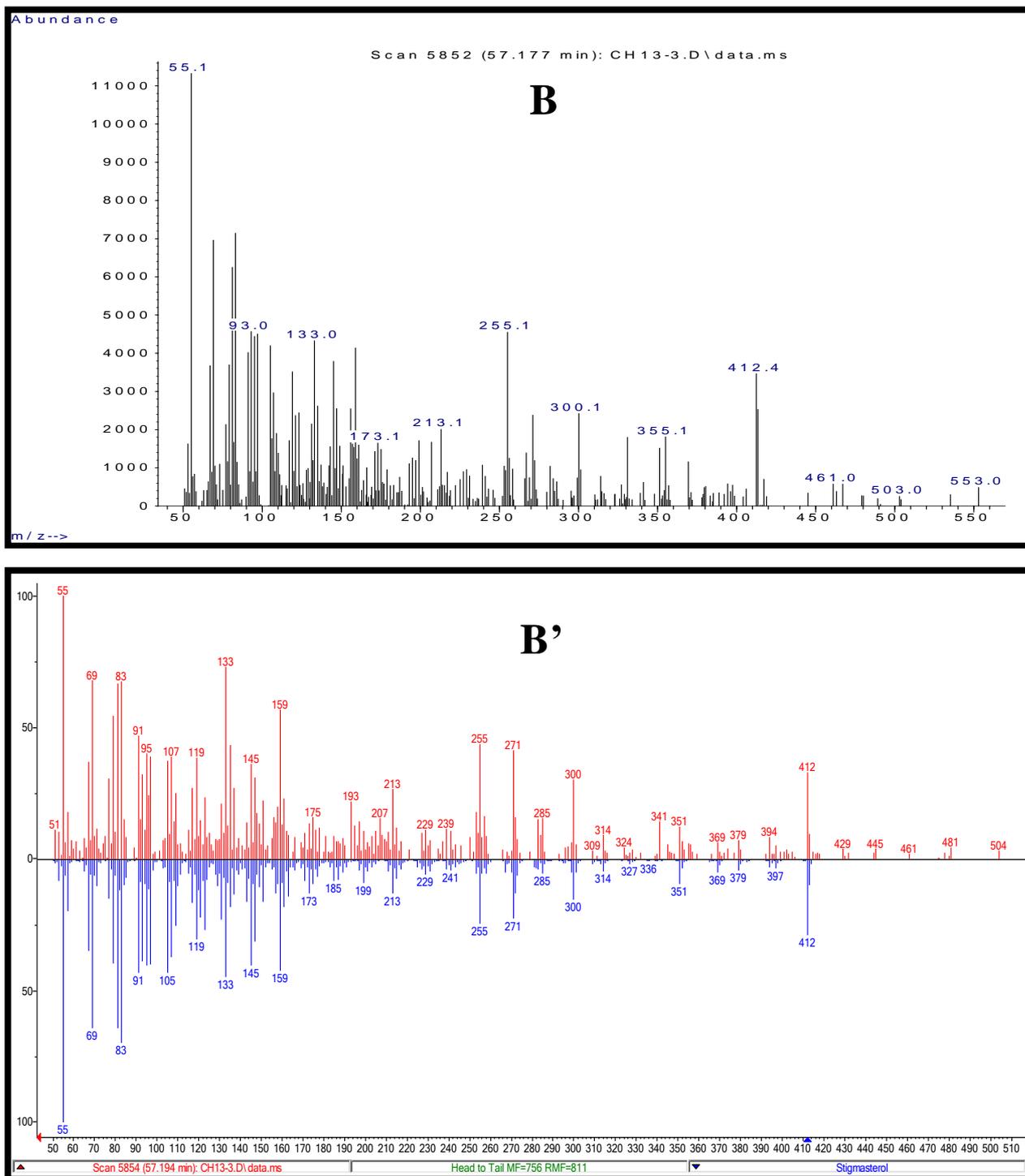


Figure III.13: B. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₂.

B'. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₂ comparé avec la banque des données NIST.

PC₁₃₋₃: γ -Sitostérol (62,33%).

Le pic moléculaire m/z 414 Da indiquant une formule moléculaire C₂₉H₅₀O. Ce spectre (figure III.14) montre également la présence d'un ion à m/z 396 Da correspondant au départ par réarrangement d'une molécule d'eau confirmant la présence d'un groupement hydroxyle dans la molécule. Cet ion se fragmente à son tour pour donner un pic à m/z 381 Da correspondant au départ d'un radical méthyle, ce qui est attendu pour les stérols.

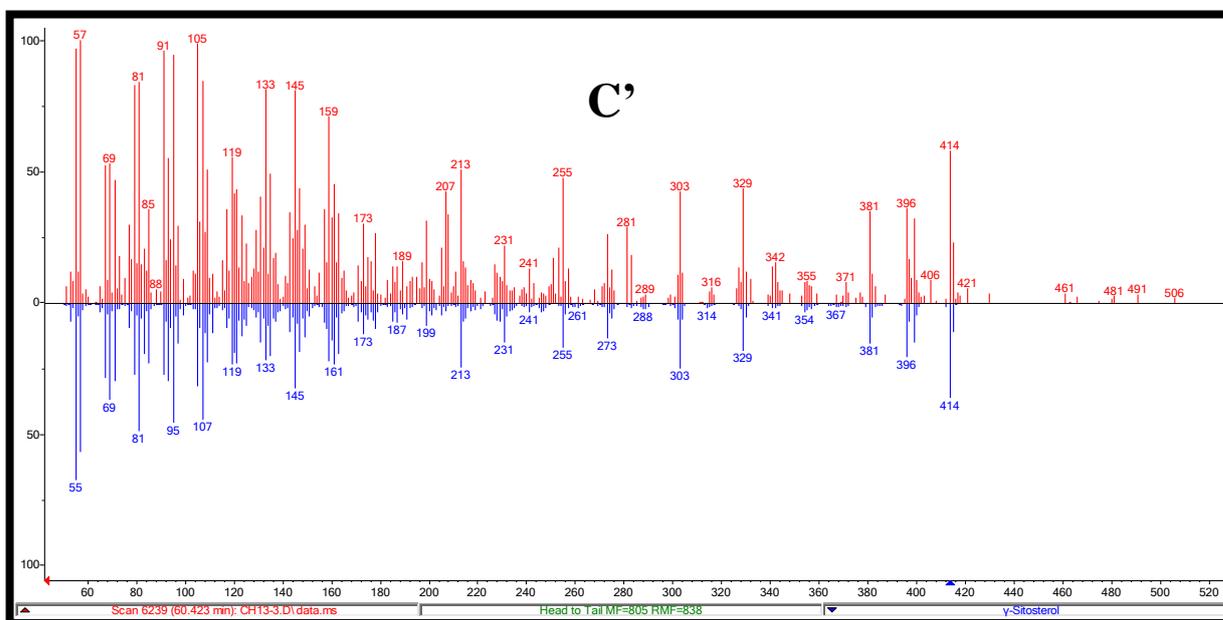
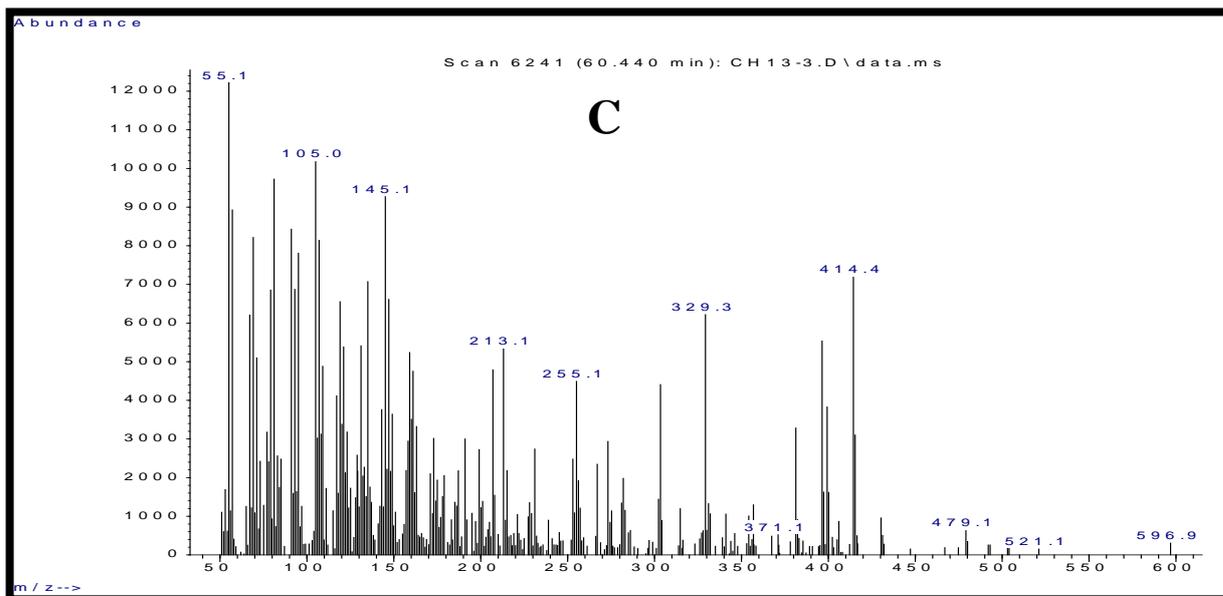


Figure III.14: C. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₃.

C'. Spectre de masse IE du composé PC₁₃₋₃ comparé avec la banque des données NIST.

Le spectre RMN ¹H enregistré dans le CDCl₃ (figure III.15) présente un ensemble de signaux allant de 0,68 à 5,35 ppm confirmant le squelette stéroïdien. En effet, on peut distinguer:

- ✓ une série de pics très denses dans l'intervalle 0,68 - 2,30 ppm indiquant la présence de protons aliphatiques caractéristiques des dérivés stéroïdiens.
- ✓ Un multiplet à δ_H 3,51 ppm correspondant à un proton porté par un carbone oxygéné attribuable au proton H-3.
- ✓ Un singulet large éthylénique à δ_H 5,35 ppm attribuable au proton H-6. En plus, le même spectre montre la présence de deux protons éthyléniques à δ_H 5,15 et 5,02 ppm sous forme de deux multiplets qui ne peuvent être attribués qu'aux protons H-

22 et H-23 du stigmasterol respectivement.

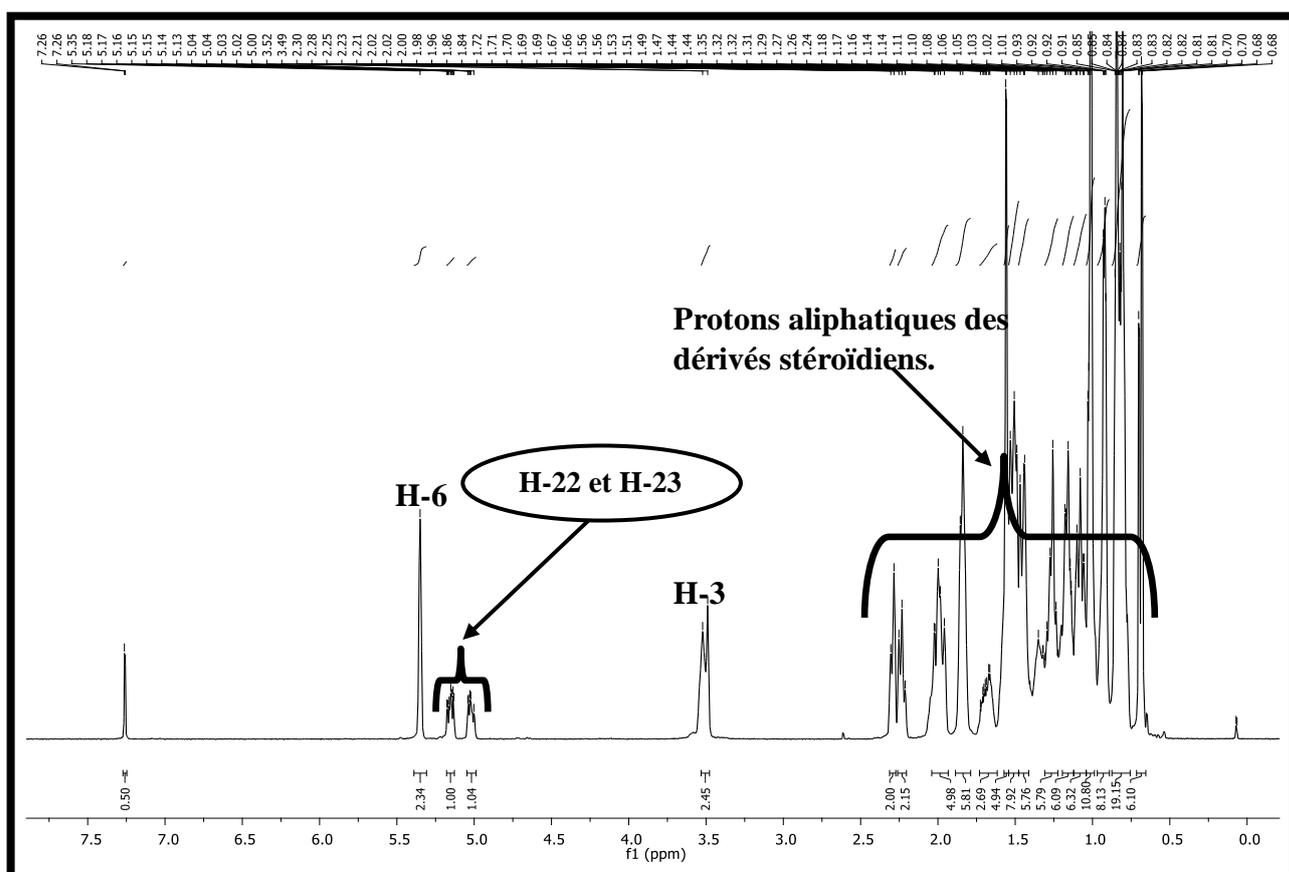


Figure III.15: Spectre RMN ^1H (CDCl $_3$ - d_1 , 600 MHz) du mélange des composés PC $_{13-1}$, PC $_{13-2}$ et PC $_{13-3}$.

Les phytostérols (figure III.16) inhibent la production de cancérigènes, la croissance des cellules cancéreuses, l'invasion et la métastase, et favorisent l'apoptose des cellules cancéreuses. Ces propriétés impliquent que les phytostérols peuvent être utiles dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du cancer [1].

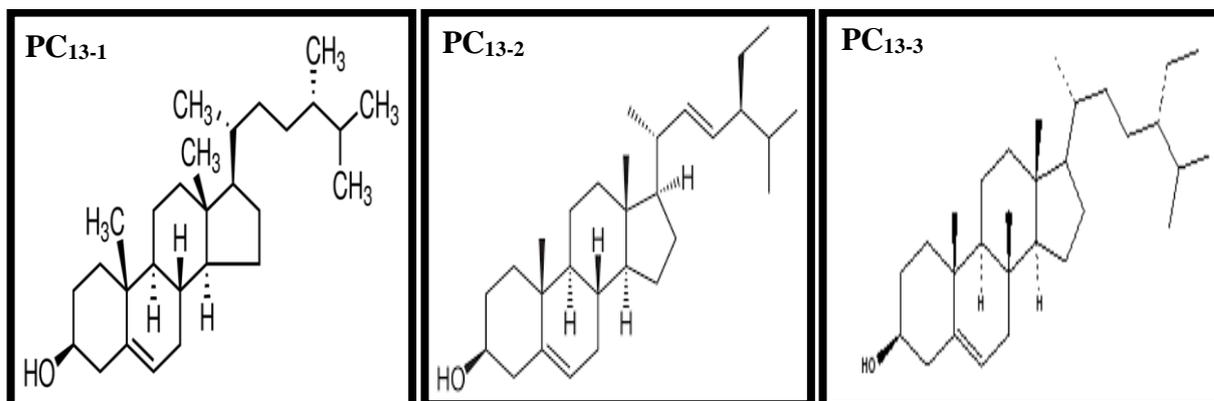


Figure III.16: Structures de campésterol, stigmasterol et γ -sitostérol.

III.1.4.2 Elucidation structurale du composé PC₁₆ (4)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PC₁₆ a été obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme.

➤ Données spectroscopiques

Le spectre RMN ¹³C du composé PC₁₆ (figure III.17) montre la présence de 15 atomes de carbones dont le pic à δ_C 178,6 ppm correspond au C quaternaire d'un carbonyle caractéristique d'une fonction acide, d'après la valeur de son déplacement chimique. Le reste des signaux se trouve dans la zone entre 29 et 33 ppm indiquant la nature aliphatique du composé.

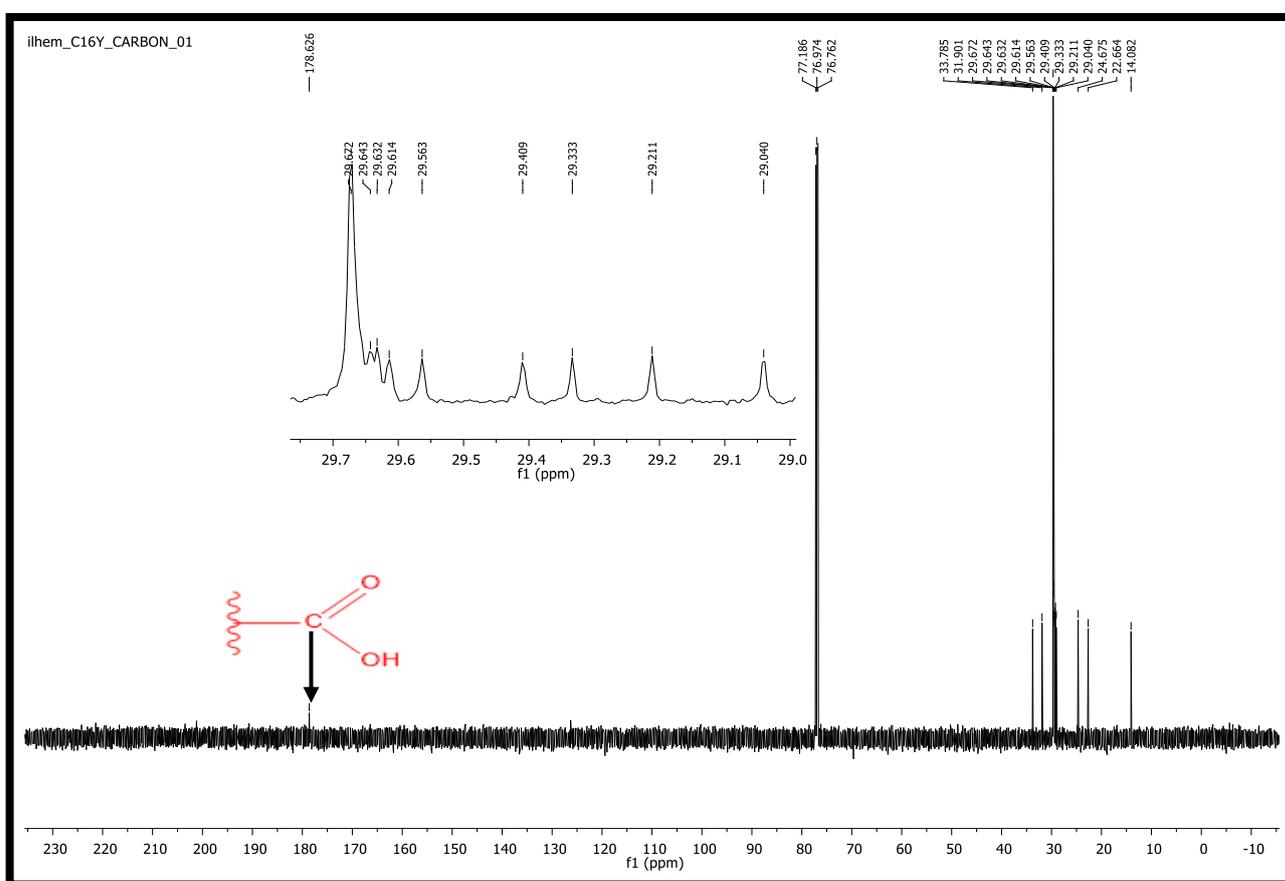


Figure III.17: Spectre RMN ¹³C (CDCl₃-d₁, 150 MHz) du composé PC₁₆.

L'étude du spectre RMN ¹H (figure III.18) montre la présence des signaux suivants:

- ✓ Un triplet ($J= 7,2$ Hz) à δ_H 2,35 ppm d'intégration 2H correspondant aux deux protons du groupement CH₂ en position alpha de la fonction acide que nous nous numérotions (H₂-2).
- ✓ Un quintuplet ($J= 7,2$ Hz) à δ_H 1,63 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons du groupement CH₂ se trouvant en position bêta de la fonction acide (H₂-3) vu sa multiplicité.

- ✓ Les autres protons des groupements CH₂ de la chaîne linéaire sont observés entre δ_H 1,29 et 1,25 ppm sous forme d'un multiplet d'intégration 22H (H₂-4 à H₂-14).
- ✓ Un triplet ($J= 6,6$ Hz) à δ_H 0,88 ppm d'intégration 3H correspondant aux protons du groupement méthyle se trouvant en fin de la chaîne linéaire (H₃-15).

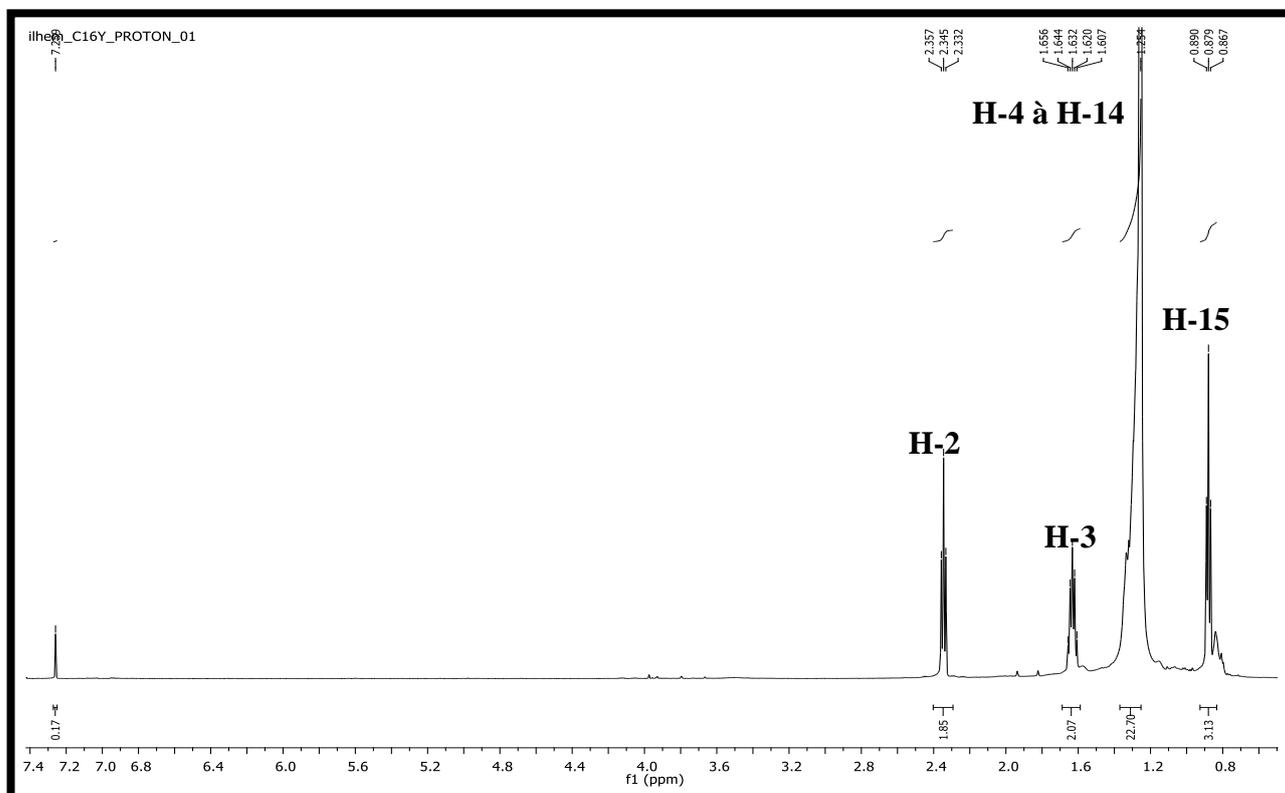


Figure III.18: Spectre RMN ¹H (CDCl₃-d₁, 600 MHz) du composé PC₁₆.

L'analyse du spectre de l'expérience homonucléaire COSY (figure III.19) permet de repérer les taches de corrélations entre les protons adjacents comme suit:

- ✓ Entre les protons du triplet à δ_H 2,35 ppm et les protons du quintuplet à δ_H 1,63 ppm, cette corrélation permet de placer les deux atomes de carbone qui les portent en position voisine.
- ✓ Entre les protons du quintuplet à δ_H 1,63 ppm et les signaux des groupements CH₂ de la chaîne linéaire entre δ_H 1,29 et 1,25 ppm.
- ✓ Entre les protons du triplet à δ_H 0,88 ppm et les signaux des groupements CH₂ de la chaîne linéaire (δ_H 1,29 et 1,25 ppm), ceci permet de placer le groupement méthyle à la fin de la chaîne linéaire (H₃-15).

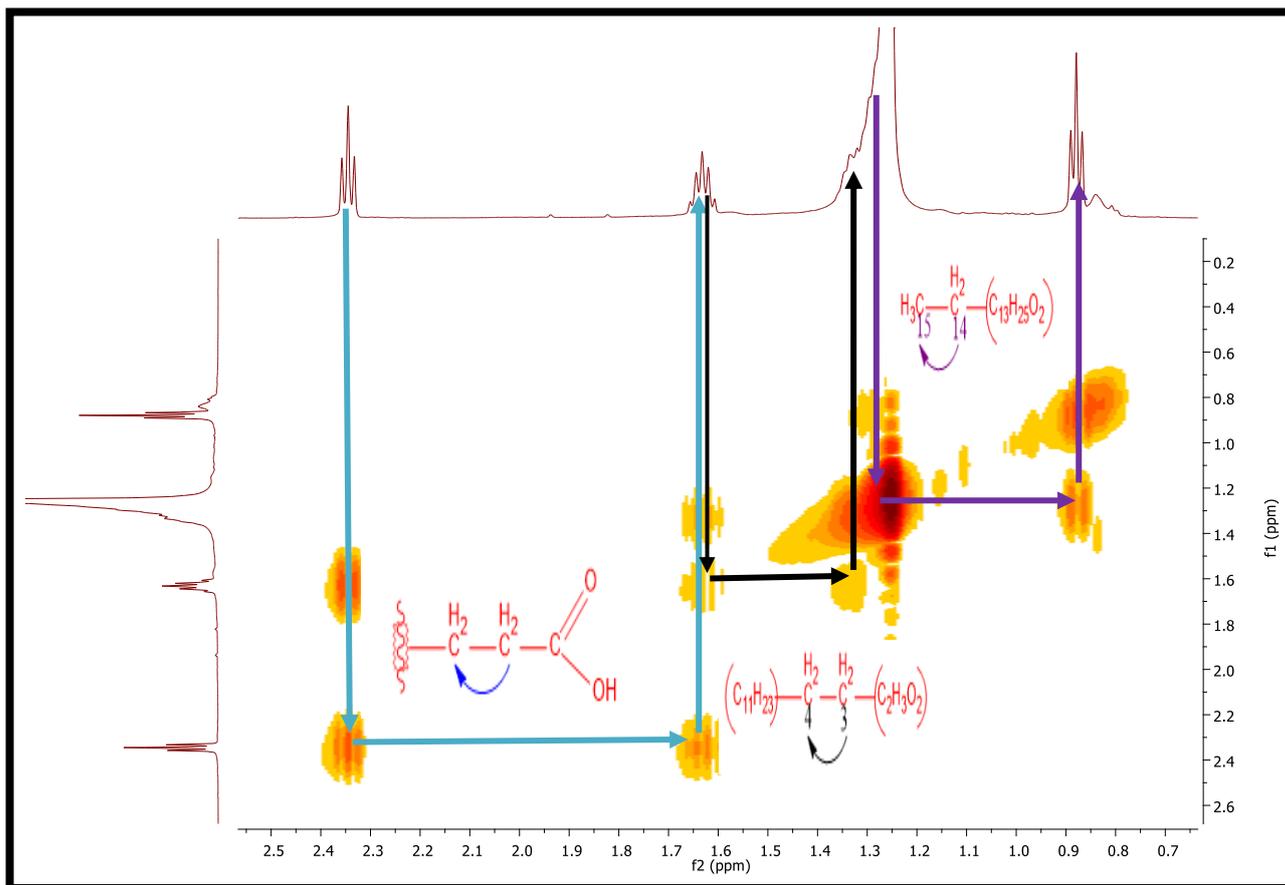


Figure III.19: Spectre COSY du composé PC₁₆.

L'étude du spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.20) permet de repérer les corrélations entre les protons et leurs carbones correspondants comme suit:

- ✓ Les H du groupement méthyle corrélerent avec le carbone à δ_C 14,1 ppm attribuable au C-15 de la chaîne linéaire.
- ✓ le groupement CH₂ à δ_H 1,63 ppm avec son carbone à δ_C 24,7 ppm attribuable à C-3.
- ✓ le groupement CH₂ à δ_H 2,35 ppm avec son carbone à δ_C 33,8 ppm attribuable à C-2.
- ✓ les protons des groupements (CH₂) de la chaîne (H-4 à H-14) corrélerent avec les signaux apparaissant entre δ_C 31,9 et 22,7 ppm attribuables aux carbones C-4 jusqu'aux C-14.

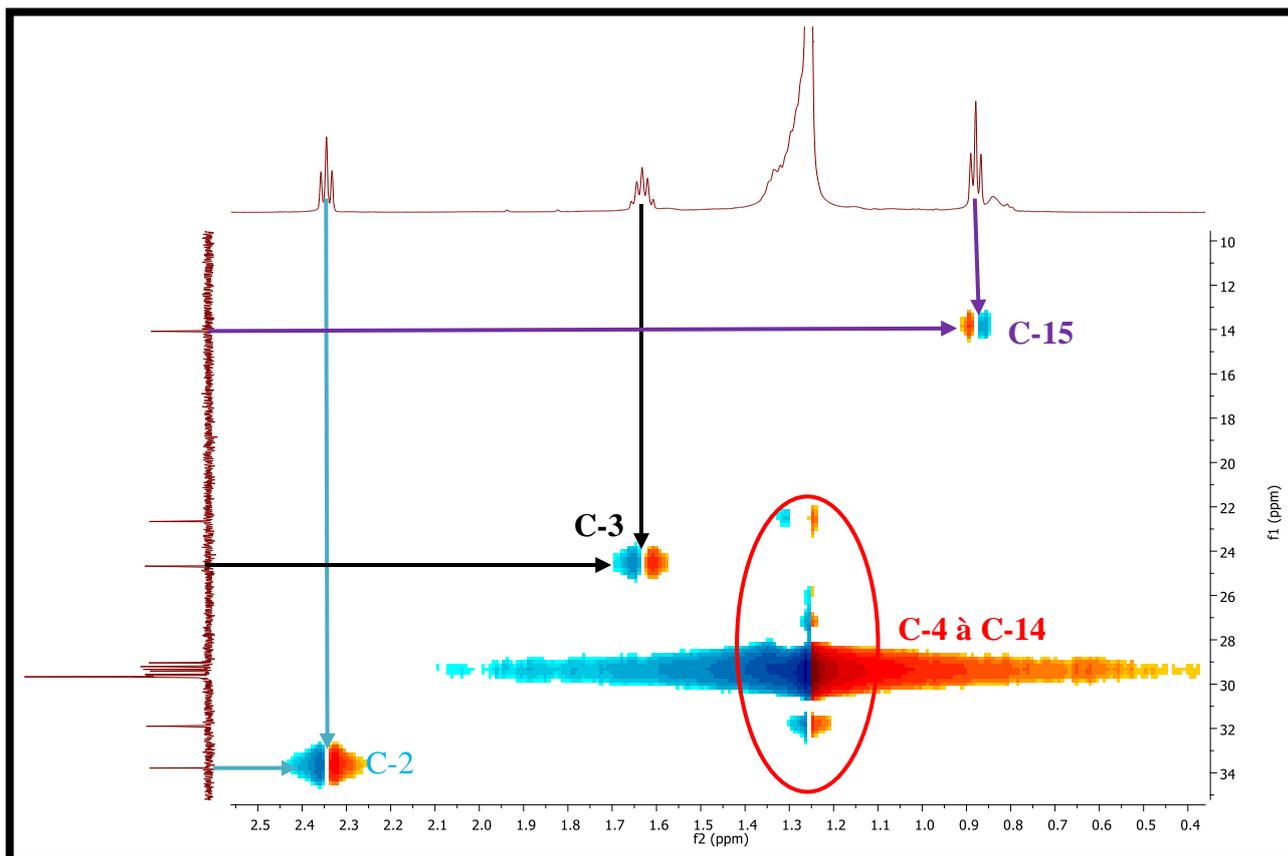
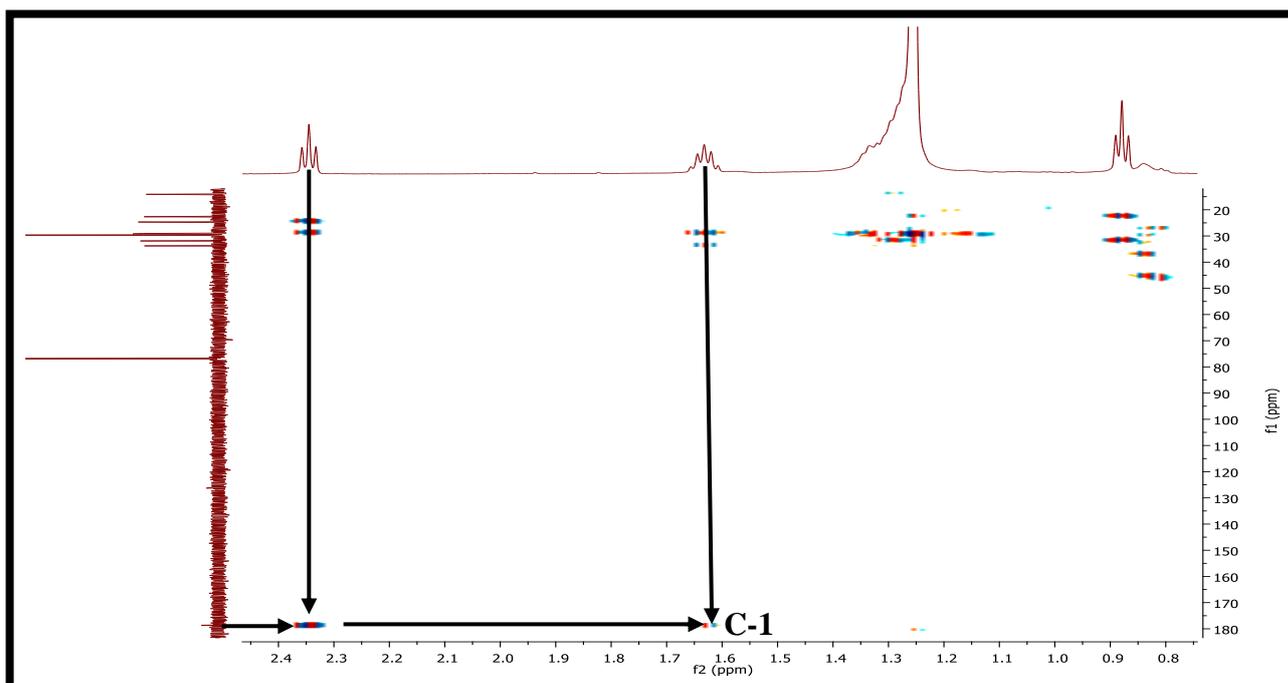
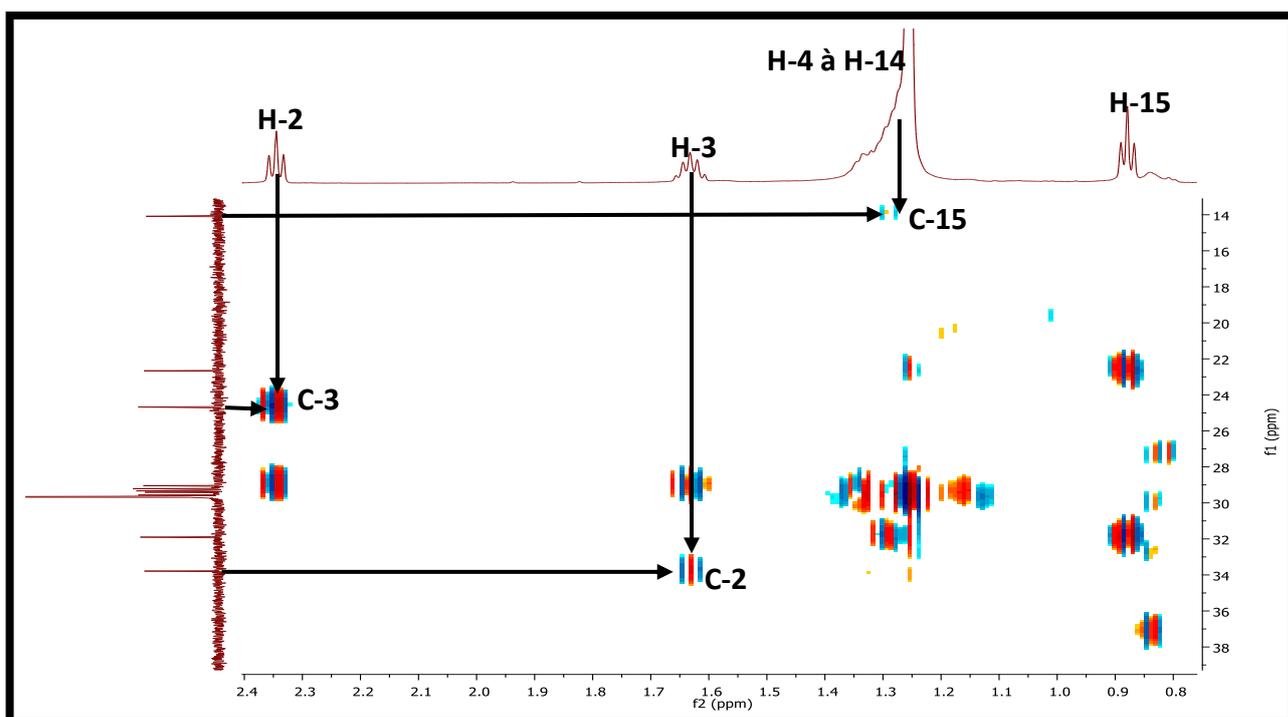


Figure III.20: Spectre HSQC du composé PC₁₆.

Le spectre de l'expérience hétéronucléaire HMBC (figure III.21 et figure III.21a) montre des taches de corrélations entre les protons de la molécule et les atomes de carbone à longue distance ($2J$ et $3J$) comme suit:

- ✓ une tache de corrélation entre le carbone portant de la fonction acide (C-1) et les deux protons H₂-2 ($2J$) et H-3 ($3J$) ce qui confirme leurs positions.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H₂-2 et le carbone à δ_C 24,7 ppm attribué précédemment à C-3.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H₂-3 et le carbone à δ_C 33,8 ppm attribué précédemment à C-2.
- ✓ Une tache de corrélation entre le carbone C-15 et les protons de la chaîne linéaire (H₂-4 à H₂-14), cela confirme la position de ce carbone à la fin de la chaîne.

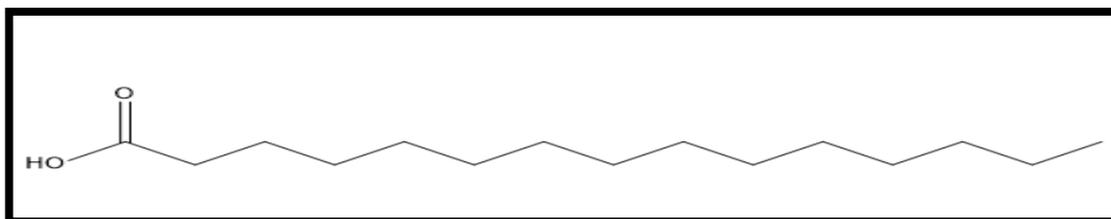
Figure III.21: Spectre HMBC du composé PC₁₆.Figure III.21a: Spectre HMBC étalé du composé PC₁₆.

Le tableau III.9 rassemble les données spectroscopiques RMN ¹H et ¹³C du composé PC₁₆.

Tableau III.9: Données des spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé PC_{16} .

Numérotation de la chaîne	δ_{H} (ppm)	Intégration m, J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	178,6
2	2,35	2H, <i>t</i> (7,2)	33,8
3	1,63	2H, <i>q</i> (7,2)	24,7
4 à 14	1,29 et 1,25	24H, <i>m</i>	31,9 à 22,7
15	0,88	3H, <i>t</i> (6,6)	14,1

Les résultats de cette analyse comparés avec ceux de la littérature [2] permettent d'identifier le composé PC_{16} comme étant l'**acide pentadécanoïque** dont la structure est représentée dans la figure III.22.

**Figure III.22:** Structure de l'acide pentadécanoïque.

III.1.4.3 Elucidation structurale du composé PC_{18} (5)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PC_{18} se présente sous forme de poudre blanche, soluble dans le chloroforme.

➤ Données spectroscopiques

L'analyse de ce produit par CG/SM (figure III.23) montre son apparition à un temps de rétention égale à 27,331 min. la comparaison de son spectre de masse avec celui de la bibliothèque des données NIST (figure III.24) permet son identification comme étant l'**Acide hexadécanoïque**.

Le spectre de masse montre un pic quasi-moléculaire à m/z 256 Da oriente vers la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ appartenant ainsi à la série $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ des acide gras (**acide hexadécanoïque**). Les pics observés à m/z 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 87 et 73 Da suggèrent ainsi un clivage en série des groupes méthylènes dans la molécule.

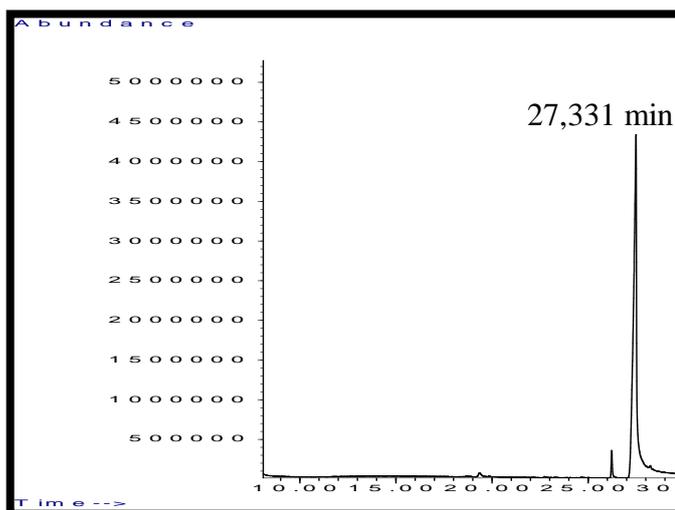


Figure III.23: Chromatogramme CG/ SM du composé PC₁₈.

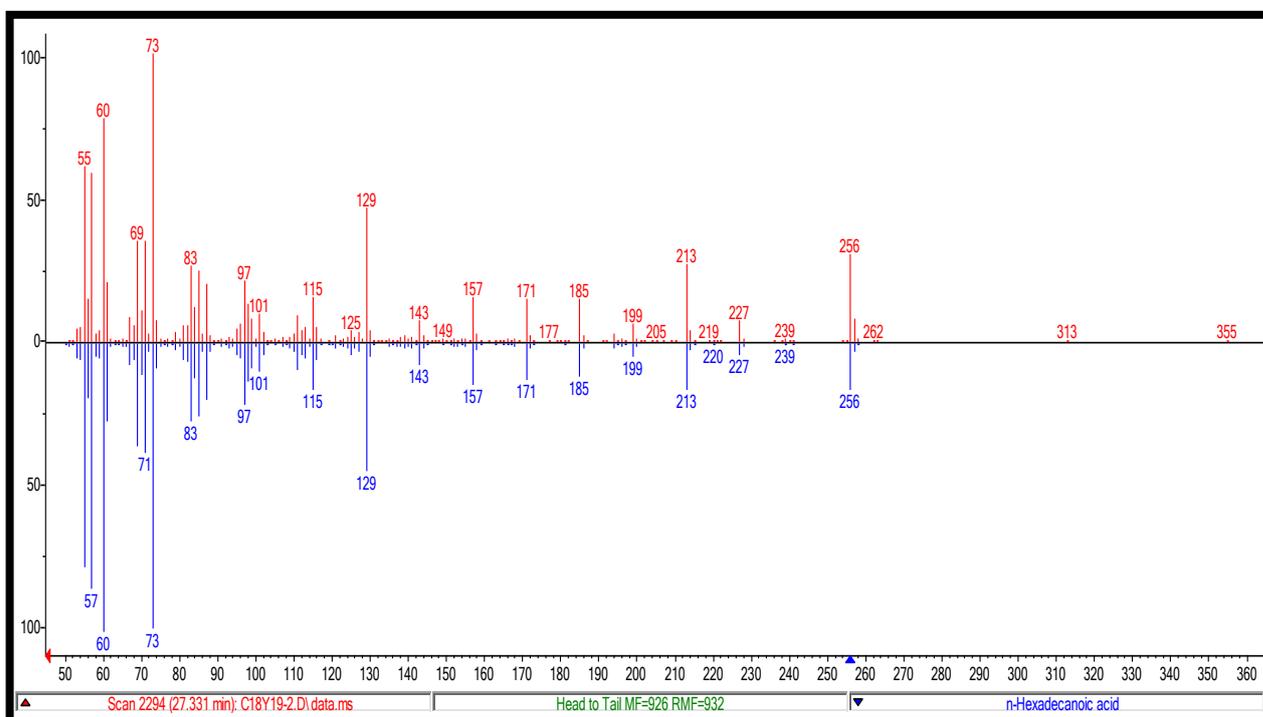


Figure III.24: Spectre de masse IE du composé PC₁₈ comparé avec la banque des données.

L'étude du spectre RMN ¹³C de ce composé (figure III.25) montre la présence de 16 atomes de carbone. Le pic à δ_C 179,7 ppm correspond au C quaternaire caractéristique du carbonyle de la fonction acide et un ensemble de signaux dans l'intervalle 14-33ppm indiquant un caractère aliphatique de la molécule.

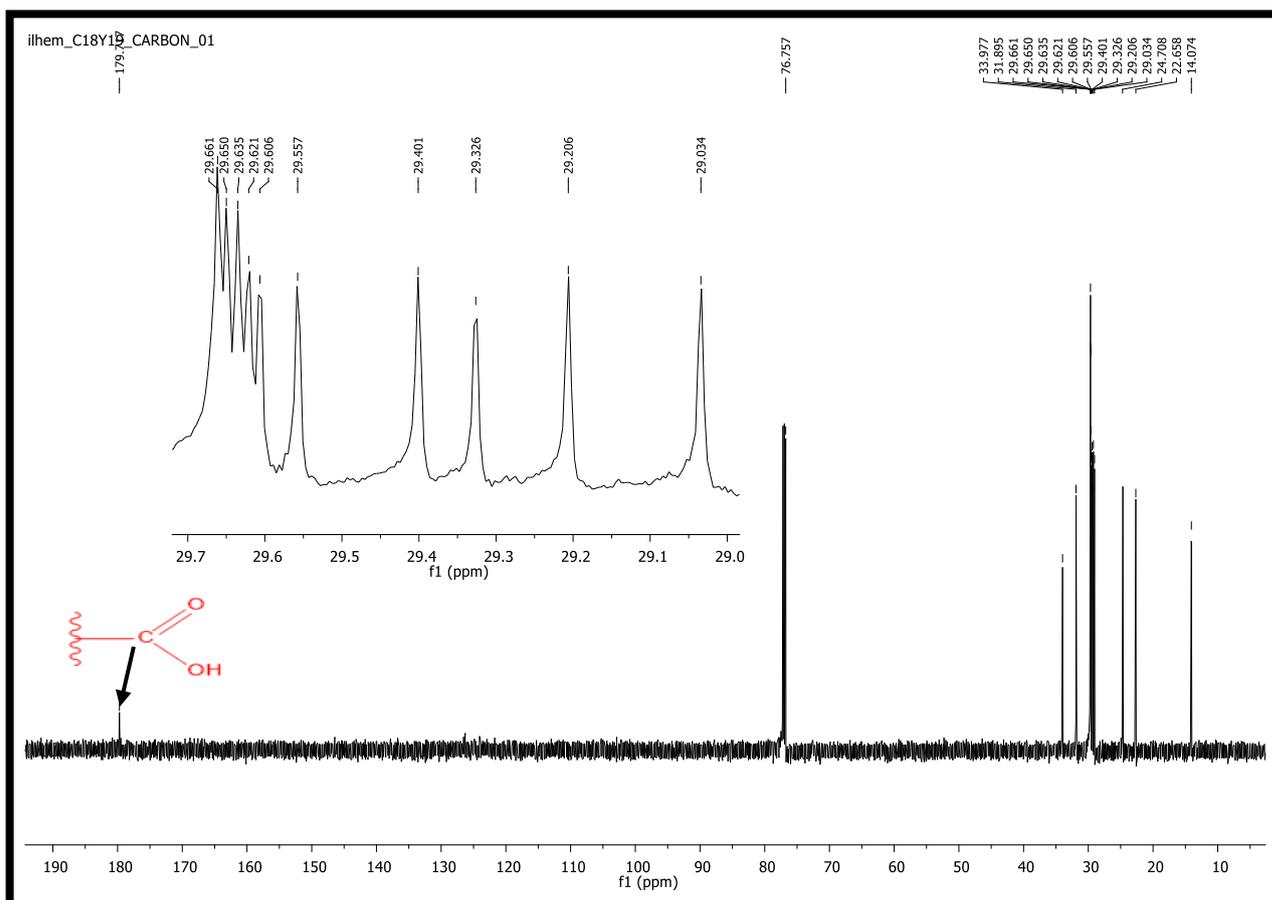
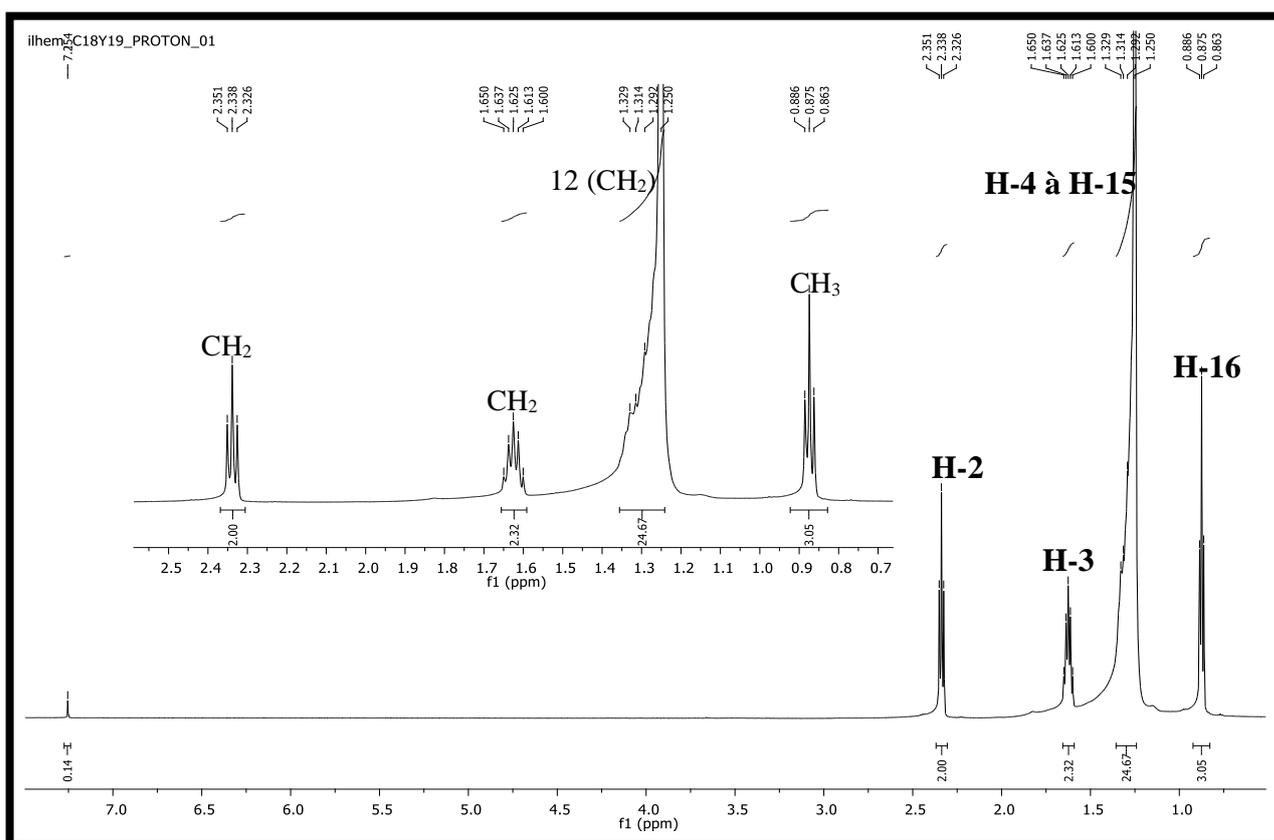


Figure III.25: Spectre RMN ^{13}C (CDCl₃-d₁, 150 MHz) du composé PC₁₈.

L'analyse simultanée du spectre RMN ^1H (figure III.26) et du spectre HSQC (figure III.27) du composé PC₁₈ montre la présence des signaux qui peuvent être attribués comme suit :

- ✓ Un triplet ($J = 7,8$ Hz) à δ_{H} 2,39 ppm d'intégration 2H correspondant aux deux protons du groupement CH₂ en position alpha de la fonction acide (H₂-2). Ce signal montre sur le spectre HSQC une tache de corrélation avec le signal à δ_{C} 34 ppm attribuable au carbone de la position 2 (C-2) de la chaîne.
- ✓ Un quintuplet ($J = 7,8$ Hz) à δ_{H} 1,63 ppm d'intégration 2H correspondant aux protons du groupement CH₂ en position bêta de la fonction acide (H₂-3). Celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à δ_{C} 24,8 ppm attribuable au carbone de la position 3 de la chaîne.
- ✓ Les autres protons des groupements CH₂ de la chaîne linéaire sont observés entre δ_{H} 1,33 et 1,25 ppm sous forme d'un multiplet d'intégration 24H (12CH₂ de H₂-4 à H₂-15). Ces protons corréleront, sur le spectre HSQC avec les signaux apparaissant entre δ_{C} 31,7 et 22,7 ppm attribuable aux carbones C-4 à C-15.
- ✓ Un triplet ($J = 6,6$ Hz) à δ_{H} 0,88 ppm d'intégration 3H correspondant aux protons du groupement méthyle se trouvant à la fin de la chaîne linéaire (H₃-16) et corrèle avec le

carbone à δ_C 14,1 ppm attribuable au C-16 de la chaîne (spectre HSQC).



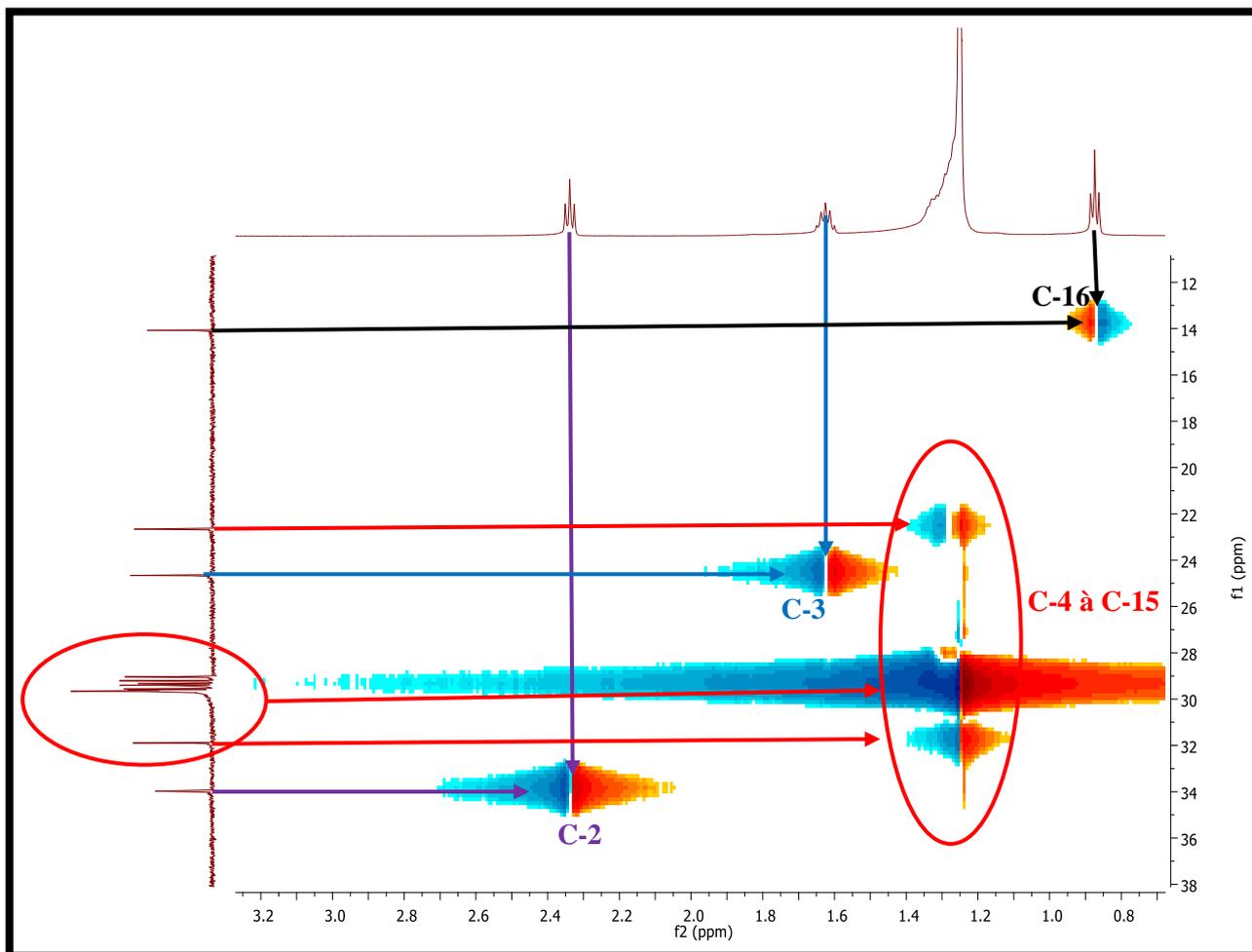


Figure III.27: Spectre HSQC du composé PC₁₈.

L'analyse du spectre de l'expérience homonucléaire COSY (figure III.28) permet de repérer les taches de corrélations entre les protons adjacents comme suit:

- ✓ Entre les protons du triplet à δ_H 2,39 ppm et les protons du quintuplet à δ_H 1,63 ppm, cette corrélation permet de placer les deux atomes de carbone qui les portent en position voisine.
- ✓ Entre les protons du quintuplet à δ_H 1,63 ppm et les signaux des groupements CH₂ de la chaîne linéaire entre δ_H 1,33 et 1,25 ppm.
- ✓ Entre les protons du triplet à δ_H 0,88 ppm et les signaux des groupements CH₂ de la chaîne linéaire entre δ_H 1,33 et 1,25 ppm, ceci permet de placer le groupement méthyle à la fin de la chaîne linéaire (H₃-16).

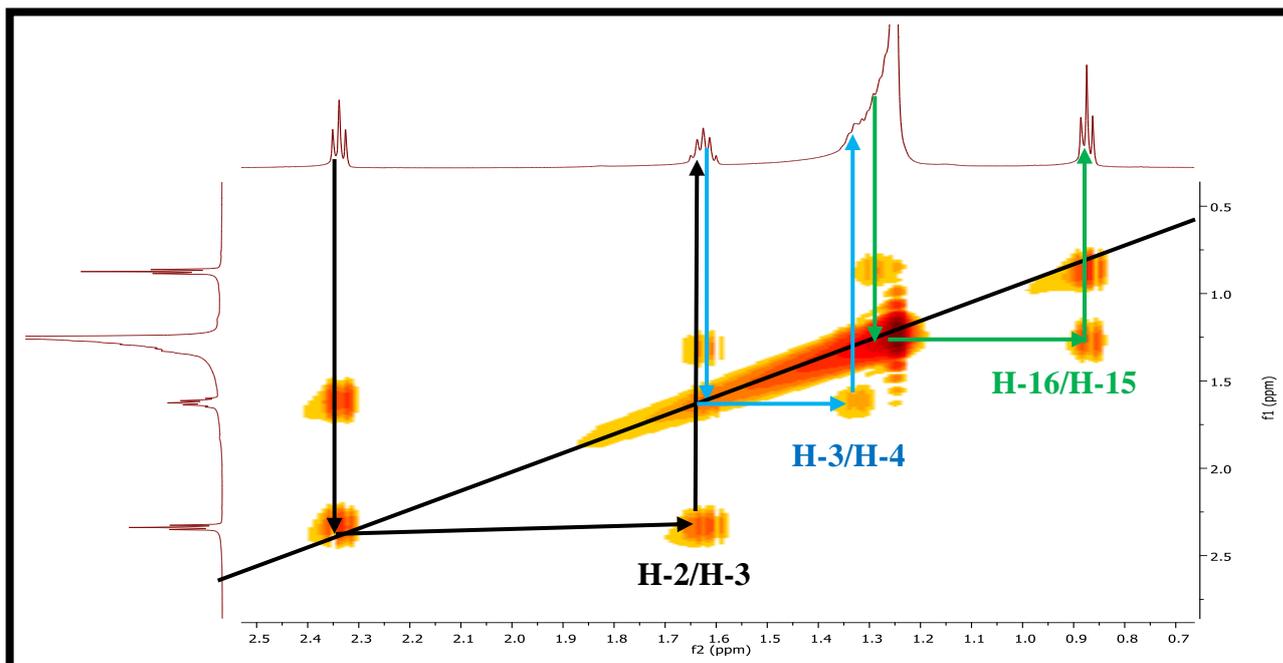
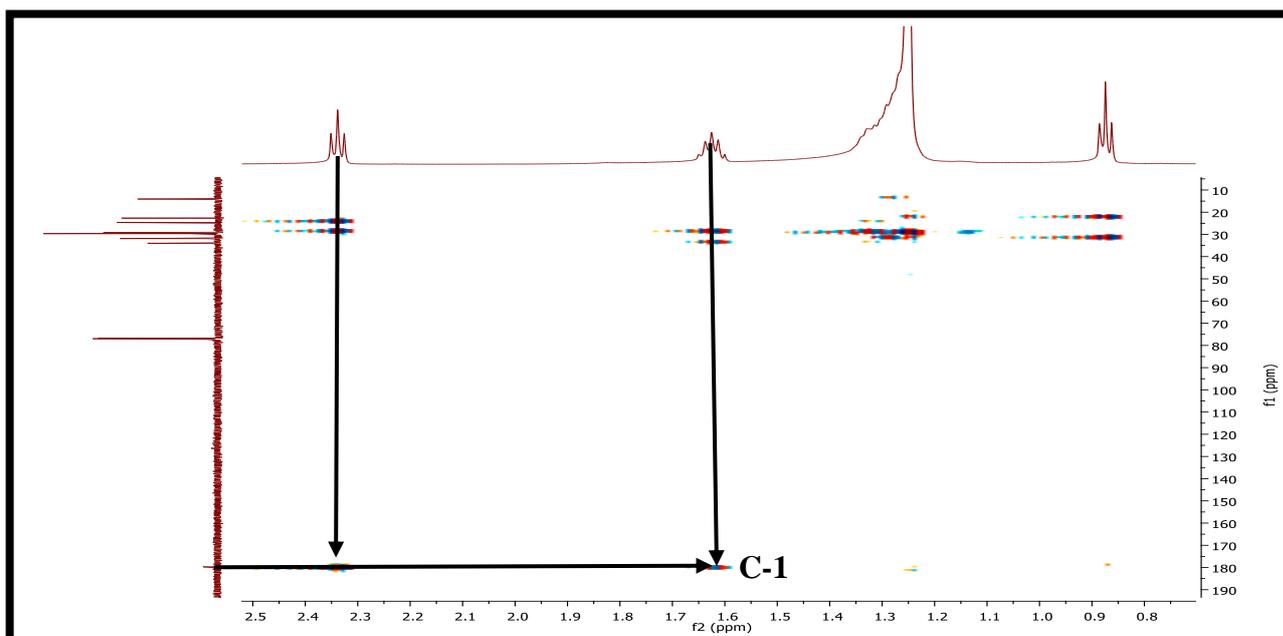
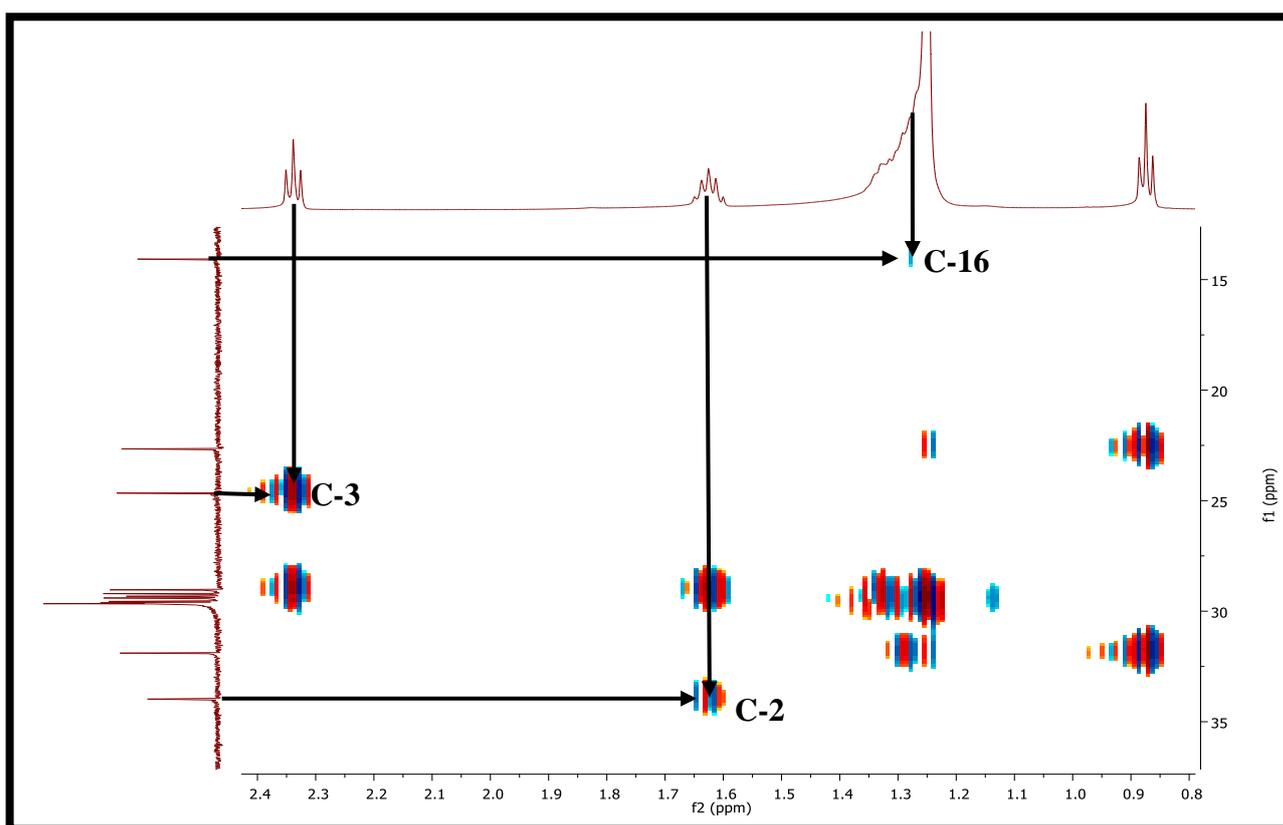


Figure III.28: Spectre COSY du composé PC₁₈.

Le spectre de l'expérience hétéronucléaire HMBC (figure III.29 et figure III.29a) montre des taches de corrélations entre les protons de la molécule et les carbones voisins (corrélation à longue distance ($2J$ et $3J$) comme suit:

- ✓ une tache de corrélation entre le carbone portant la fonction acide (C-1) et les deux protons H₂-2 ($2J$) et H₂-3 ($3J$) ce qui confirme leurs positions.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H₂-2 et le carbone à δ_C 24,7 ppm attribué précédemment à C-3.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H₂-3 et le carbone à δ_C 34 ppm attribué précédemment à C-2.
- ✓ Une tache de corrélation entre le carbone C-16 à δ_C 14,1 ppm et les protons de la chaîne linéaire (H₂-4 à H₂-15) cela confirme la position de ce carbone à la fin de la chaîne.

Figure III.29: Spectre HMBC du composé PC₁₈.Figure III.29a: Spectre HMBC étalé du composé PC₁₈.

Le tableau III.10 rassemble les données spectroscopiques RMN ¹H et ¹³C du composé PC₁₈.

Tableau III.10: Données des spectres RMN (^1H , ^{13}C) du composé PC_{18} .

Numérotation de la chaîne	δ_{H} (ppm)	Intégration m, J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	179,7
2	2,32	2H, <i>t</i> (7,8)	34
3	1,63	2H, <i>q</i> (7,8)	24,7
4 à 15	1,33 à 1,25	24H, <i>m</i>	31,9 à 22,7
16	0,88	3H, <i>t</i> (6,6)	14,1

Ces résultats comparés avec ceux de la littérature [3] permettent d'identifier le composé PC_{18} comme étant l'**acide hexadécanoïque** connu sous le nom d'**acide palmitique** comme le montre la figure III.30.

**Figure III.30:** Structure de l'acide palmitique.

L'acide palmitique pourrait fonctionner comme un agent anti-inflammatoire [4].

III.1.4.4 Elucidation structurale du composé PC_{24-2} (6)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PC_{24-2} est soluble dans l'acétone. Son analyse sur plaque CCM de gel de silice montre l'apparition d'une tache jaune orangé sous UV (365 nm) orientant ainsi vers une structure de type isoflavone.

➤ Données spectroscopiques

Le spectre de masse de ce composé (figure III.31) enregistré en mode électronébulisation négatif MS HR(ESI (-)) montre un pic quasi moléculaire à m/z 299,0573 Da correspondant à $[\text{M-H}]^-$ et permettant de déduire une masse de 300 Da indiquant ainsi la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ avec un nombre d'insaturation de 11. Le deuxième pic à m/z 599,1208 Da correspond à l'ion $[2\text{M-H}]^-$.

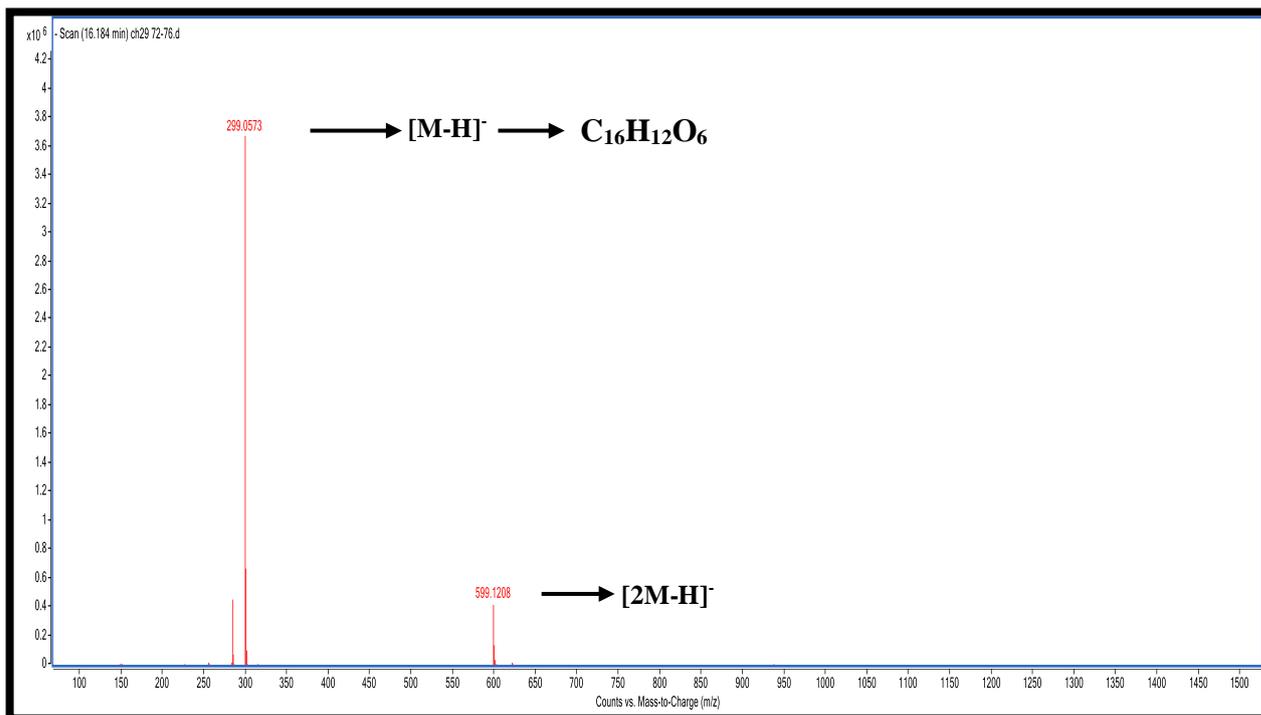


Figure III.31: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PC₂₄₋₂.

L'analyse simultanée du spectre RMN ¹H (figure III.32) et le spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.33) enregistré dans l'acétone montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type isoflavone reconnaissable par:

- ✓ Un singulet à δ_H 8,22 ppm d'intégration 1H caractéristique du proton H-2 de l'isoflavone, celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 153,5 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,9$ Hz) à δ_H 7,25 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-2' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 112,8 ppm.
- ✓ Un doublet de doublet ($J= 8,2; 1,9$ Hz) à δ_H 7,07 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-6' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 122 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 8,2$ Hz) à δ_H 6,88 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-5' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 114,7 ppm.

La présence de ces trois signaux permettent de déduire que le cycle B du squelette est substitué en positions 3' et 4'.

- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 6,42 ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 du cycle A et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 93,7 ppm.
- ✓ Un doublet ($J=1,8$ Hz) à δ_H 6,29 ppm d'intégration 1H attribuable à H-6 du cycle A et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 98,9 ppm.

La présence de ces deux signaux indique la substitution des positions 5 et 7 du cycle A.

- ✓ La substitution de la position 5 du cycle A est confirmée par la présence du singulet à

δ_H 13,04 ppm d'intégration 1H caractéristique du proton du groupement hydroxyle formant une chélation avec l'oxygène du carbonyle C-4.

- ✓ Un dernier signal apparaît à δ_H 3,88 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 3H, celui-ci corrélé sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 55,5 ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

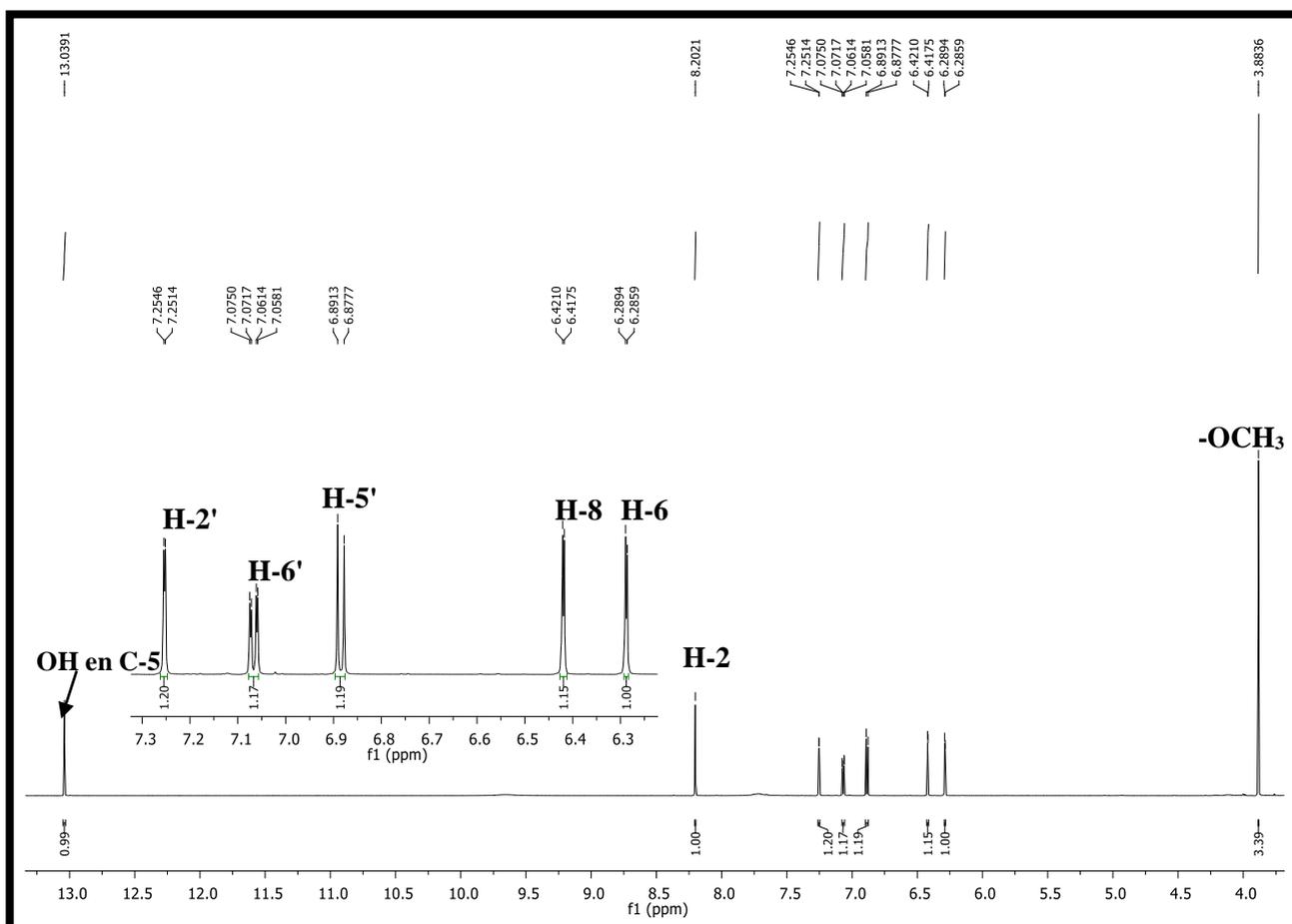


Figure III.32: Spectre de RMN 1H (acétone- d_6 , 600 MHz) du composé PC₂₄₋₂.

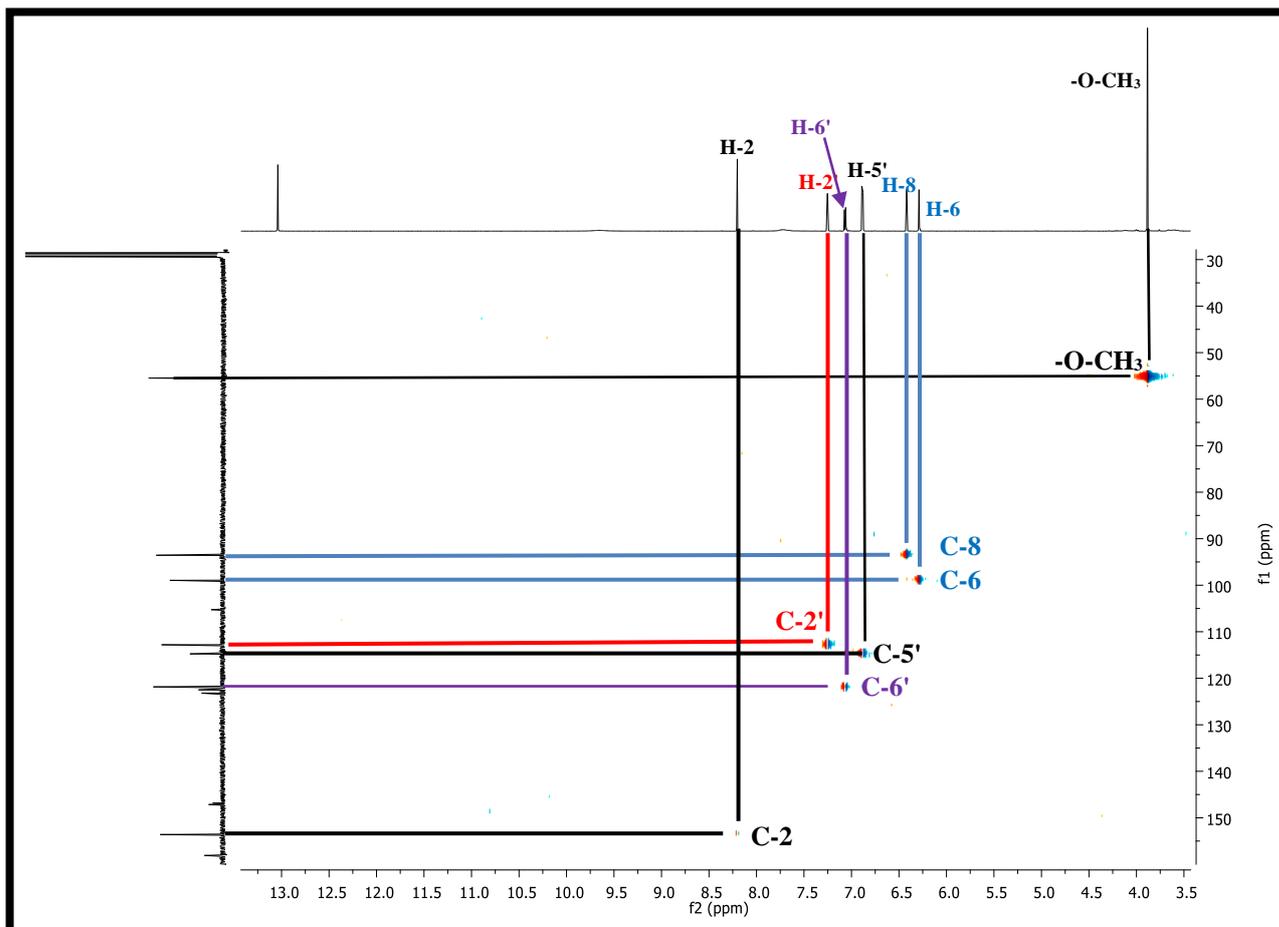


Figure III.33: Spectre HSQC du composé PC₂₄₋₂.

L'ensemble de cette première analyse permet de déduire la structure partielle représentée dans la figure III.34.

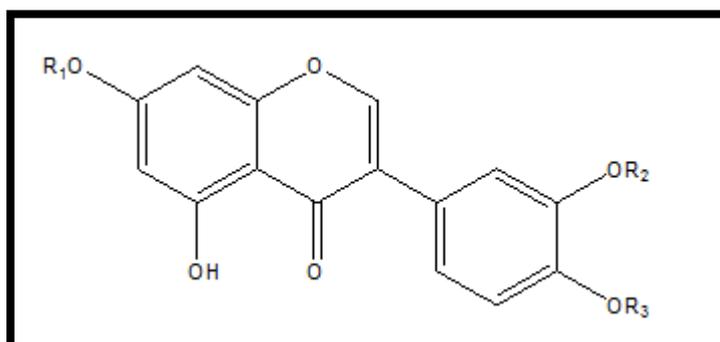


Figure III.34: Structure partielle du composé PC₂₄₋₂.

L'étude du spectre RMN ¹³C (figure III.35) montre la présence de 16 atomes de carbone. Par abstraction des CH et du groupement OCH₃ indiqué précédemment, il reste 9 C quaternaires. Ces derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre de l'expérience bidimensionnelle HMBC.

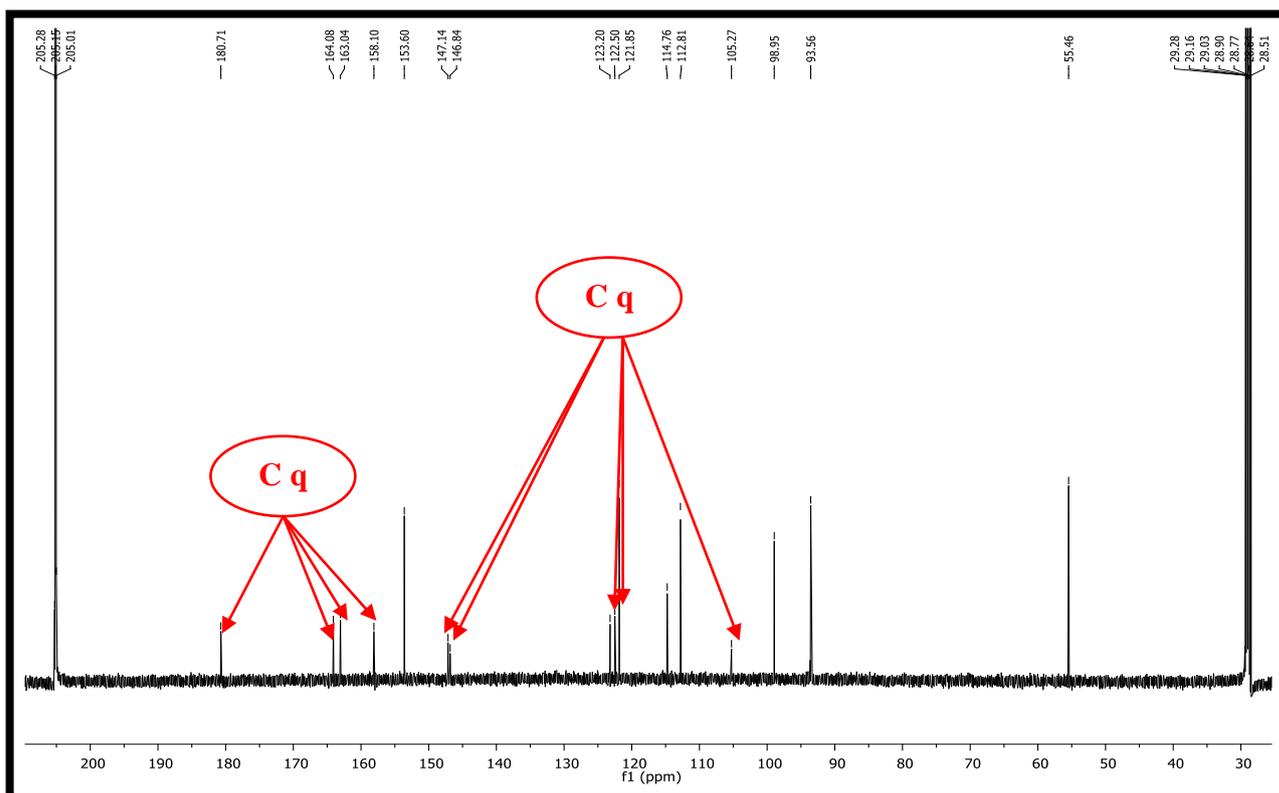


Figure III.35: Spectre de RMN ^{13}C (acétone- d_6 , 150 MHz) du composé PC₂₄₋₂.

En effet, l'analyse du spectre HMBC (figure III.36, figure III.36a et figure III.36b) permet l'attribution des carbones quaternaires et en même temps de positionner le groupement méthoxyle à l'aide des taches de corrélation comme suit:

1/ Le proton du groupement hydroxyle en position 5 avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 105,3 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ le carbone à δ_{C} 163,1 ppm attribuable à C-5.

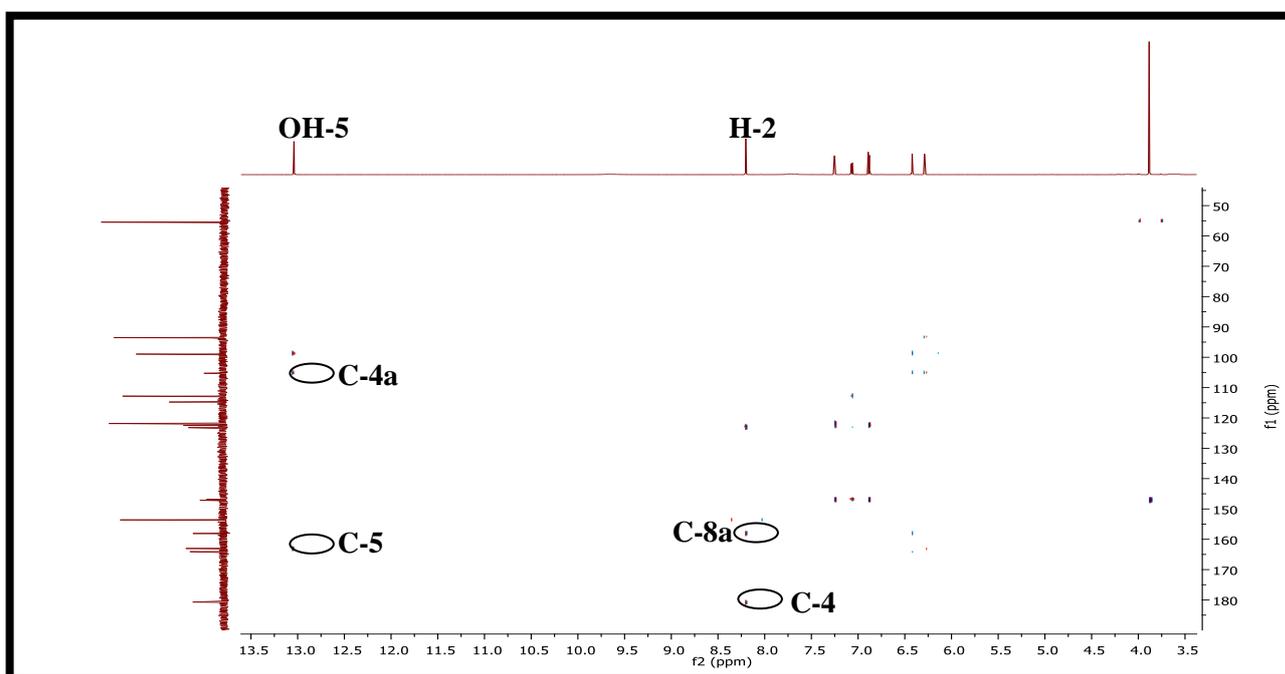
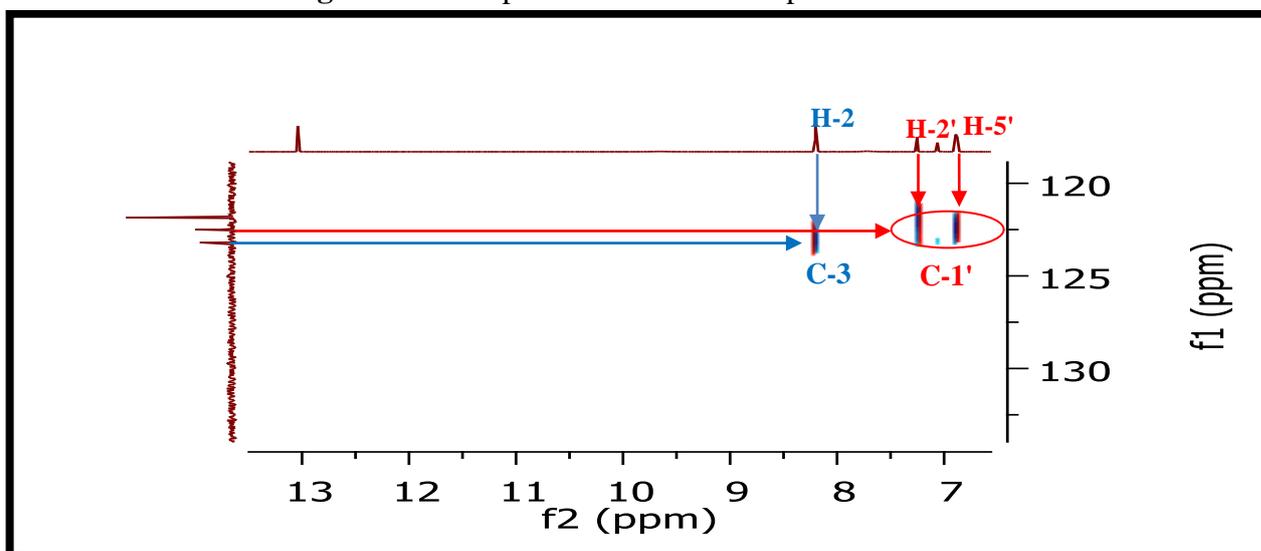
2/ Le proton H-2 présente des taches de corrélation avec:

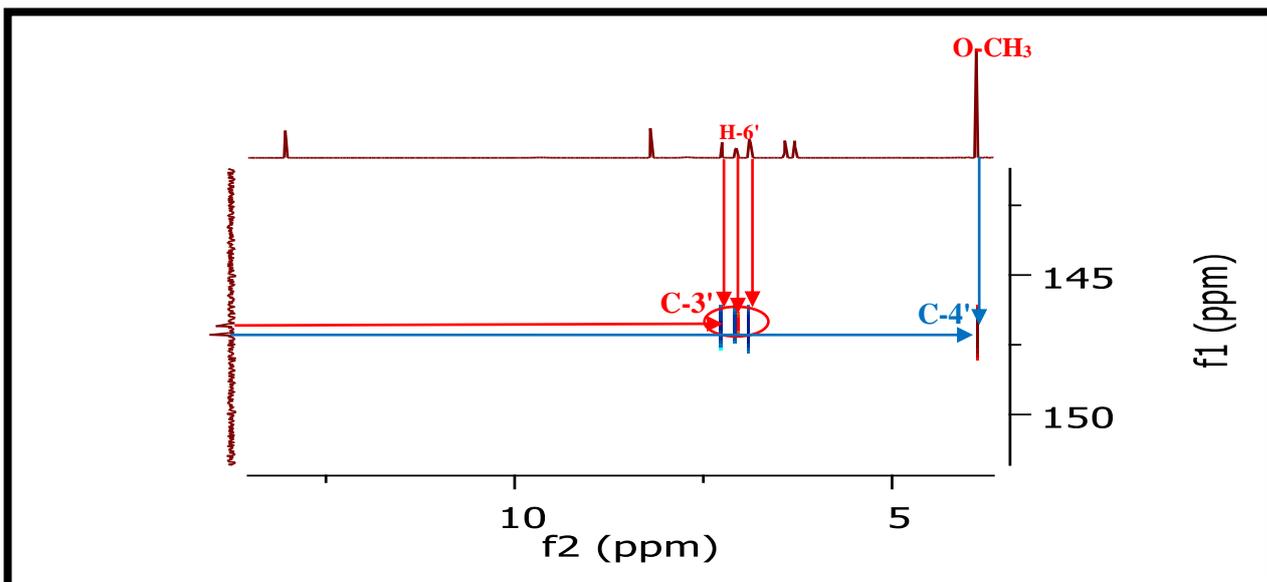
- ✓ le carbone à δ_{C} 123,2 ppm attribuable à C-3.
- ✓ le carbone à δ_{C} 158,1 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ le carbone à δ_{C} 180,7 ppm caractéristique d'un carbonyle attribuable à C-4.

3/ Le proton H-2' à δ_{H} 7,25 ppm corréle avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 122,5 ppm, celui-ci ne peut être que le carbone C-1'.
- ✓ Le carbone à δ_{C} 123,2 ppm attribuable à C-3.
- ✓ Le carbone à δ_{C} 146,8 ppm attribuable à C-3', la valeur de son déplacement chimique indique qu'il est oxygéné.
- ✓ Le carbone à δ_{C} 147,15 ppm attribuable à C-4' également oxygéné vu la valeur de son déplacement chimique.

- 4/ Le proton H-6' à δ_H 7,06 ppm corrèle avec les deux carbones quaternaires oxygénés C-3' (δ_C 146,8 ppm) et C-4' (δ_C 147,1 ppm).
- 5/ Le proton H-5' à δ_H 6,88 ppm corrèle avec les carbones à δ_C 122,5 ppm (C-1'), δ_C 146,8 ppm (C-3') et δ_C 147,1 ppm (C-4').
- 6/ Le proton H-8 corrèle avec, en plus des carbones C-4a (δ_C 105,3 ppm) et C-8a (δ_C 158,1 ppm), le carbone à δ_C 164,2 ppm qui ne peut être que le carbone C-7.
- 7/ Le proton H-6 ppm corrèle avec les carbones à δ_C 105,3 ppm (C-4a) et δ_C 163,1 ppm (C-5).
- 8/ la tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone à δ_C 147,1 ppm attribué précédemment à C-4' permet de positionner ce groupement sur le carbone C-4' et donc le groupement hydroxyle restant se trouve sans nul doute sur le carbone C-3'.

Figure III.36: Spectre HMBC du composé PC₂₄₋₂.Figure III.36a: Spectre HMBC étalé du composé PC₂₄₋₂.

Figure III.36b: Spectre HMBC étalé du composé PC₂₄₋₂.

Les valeurs des déplacements chimiques du ¹H et du ¹³C sont regroupées dans le tableau III.11.

Tableau III.11: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PC₂₄₋₂.

Numérotation de la chaîne	δ_H (ppm)	Intégration, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
C-2	8,20	1H, <i>s</i>	153,5
C-3	-	-	123,2
C-4	-	-	180,7
C-4a	-	-	105,4
C-5	13,04	1H, <i>s</i>	163,1
C-6	6,29	1H, <i>d</i> (1,8)	98,9
C-7	9,66	-	164,2
C-8	6,42	1H, <i>d</i> (1,8)	93,6
C-8a	-	-	158,1
C-1'	-	-	122,5
C-2'	7,25	1H, <i>d</i> (1,9)	112,8
C-3'	7,71	-	146,8
C-4'	-	-	147,2
C-5'	6,88	1H, <i>d</i> (8,2)	114,8
C-6'	7,07	1H, <i>dd</i> (8,2; 1,9)	121,9
O-CH ₃	3,88	3H, <i>s</i>	55,5

La combinaison de l'ensemble des données spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature mènent au composé **5, 7, 3'-trihydroxy-4'-méthoxyisoflavone** connu sous le nom de **Pratenséine** [5], représentée dans la figure III.37.

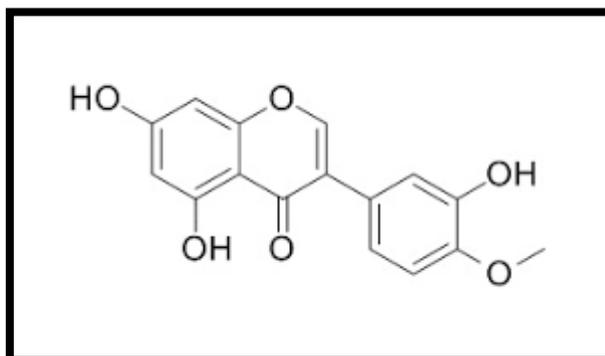


Figure III.37: Structure de Pratenséine.

III.1.4.5 Elucidation structurale du composé PC₂₄₋₃ (7)

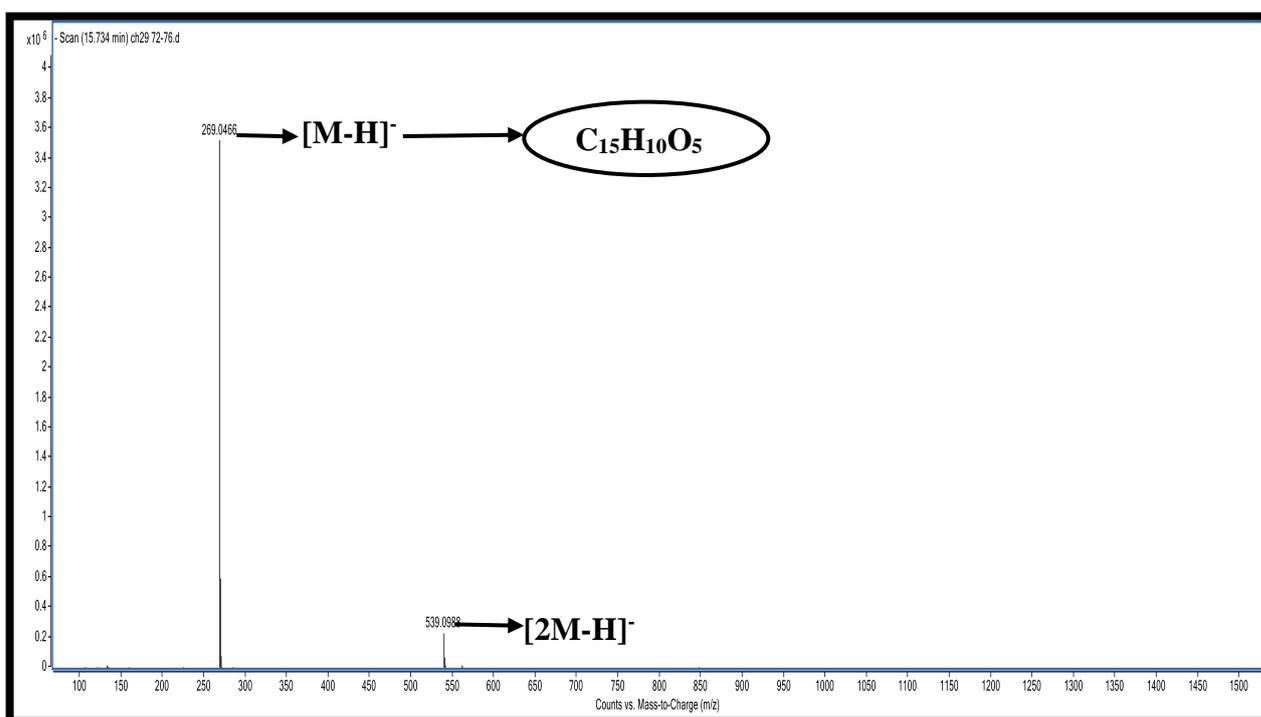
➤ Propriétés physico-chimiques

Le produit PC₂₄₋₃ se présente sous forme de cristaux de coloration blanche, soluble dans l'acétone.

La couleur jaune orangé sous lumière de Wood (365 nm) oriente vers une structure de type isoflavone.

➤ Données spectroscopiques

Le spectre de masse de ce composé (figure III.38) enregistré en mode électronébulisation négatif HR (ESI (-)) montre un pic quasi moléculaire à m/z 269,0466 Da correspondant à $[M-H]^-$ permettant de déduire une masse de 270 Da indiquant la formule brute C₁₅H₁₀O₅ avec un nombre d'insaturation de 11. Le deuxième pic à m/z 539,0988 Da correspond à l'ion $[2M-H]^-$.

Figure III.38: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PC₂₄₋₃.

L'analyse simultanée du spectre RMN ^1H (figure III.39) et le spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.40) enregistré dans l'acétone montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type isoflavone reconnaissable par:

- ✓ Un singulet à δ_{H} 13,02 ppm d'intégration 1H caractéristique du H du groupement hydroxyle se trouvant sur le carbone C-5.
- ✓ Un singulet à δ_{H} 8,17 ppm d'intégration 1H caractéristique du proton H-2 de l'isoflavone, celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 153,4 ppm.
- ✓ Un doublet ($J = 8,5$ Hz) à δ_{H} 7,45 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-2' et H-6' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 130,2 ppm.
- ✓ Un doublet ($J = 8,5$ Hz) à δ_{H} 6,90 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-3' et H-5' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 115,2 ppm.

La présence de ces deux signaux avec cette multiplicité oriente vers un cycle B parasubstitué.

- Un doublet ($J = 2$ Hz) à δ_{H} 6,42 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-8 du cycle A et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 93,5 ppm.
- Un doublet ($J = 2$ Hz) à δ_{H} 6,28 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-6 du cycle A et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 99 ppm.

La présence de ces deux signaux indique que le cycle A est substitué en C-5 et C-7.

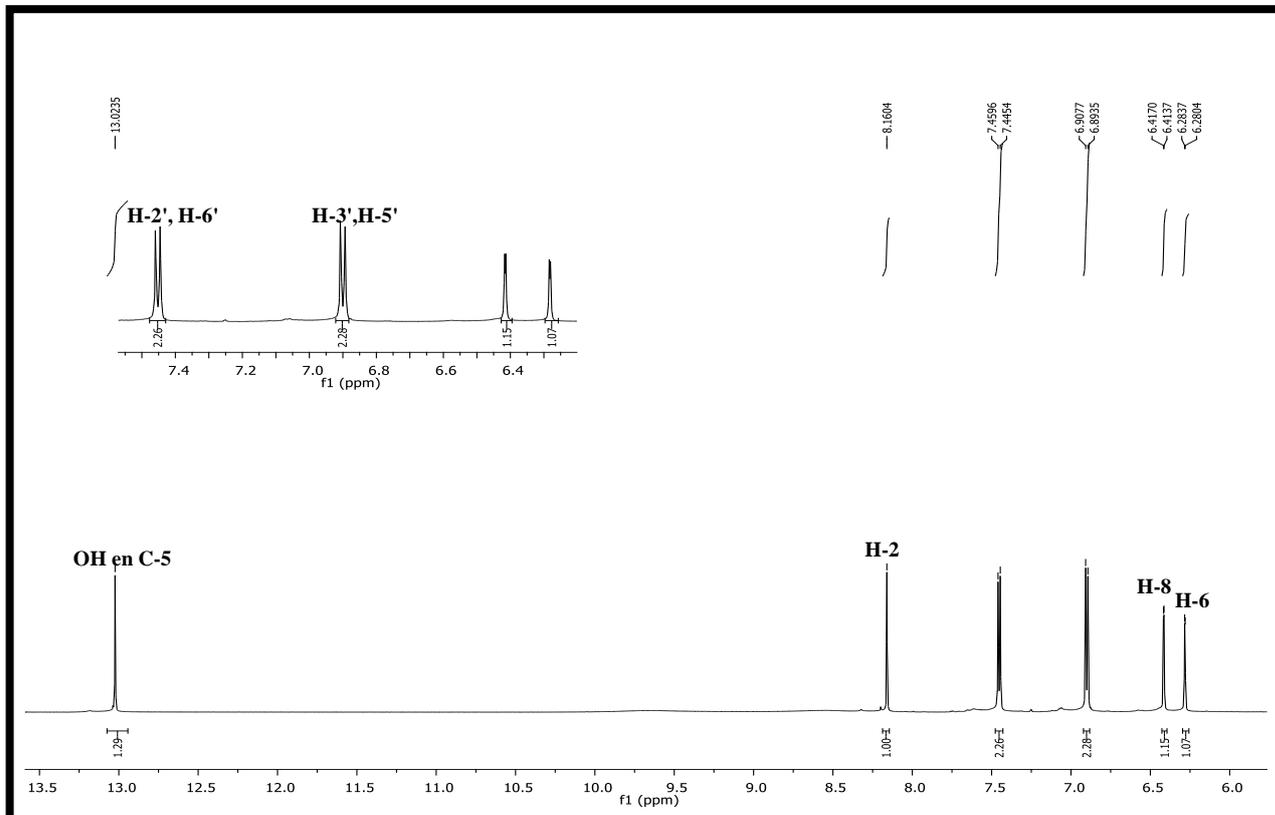


Figure III.39: Spectre de RMN ^1H (acétone- d_6 , 600 MHz) du composé PC₂₄₋₃.

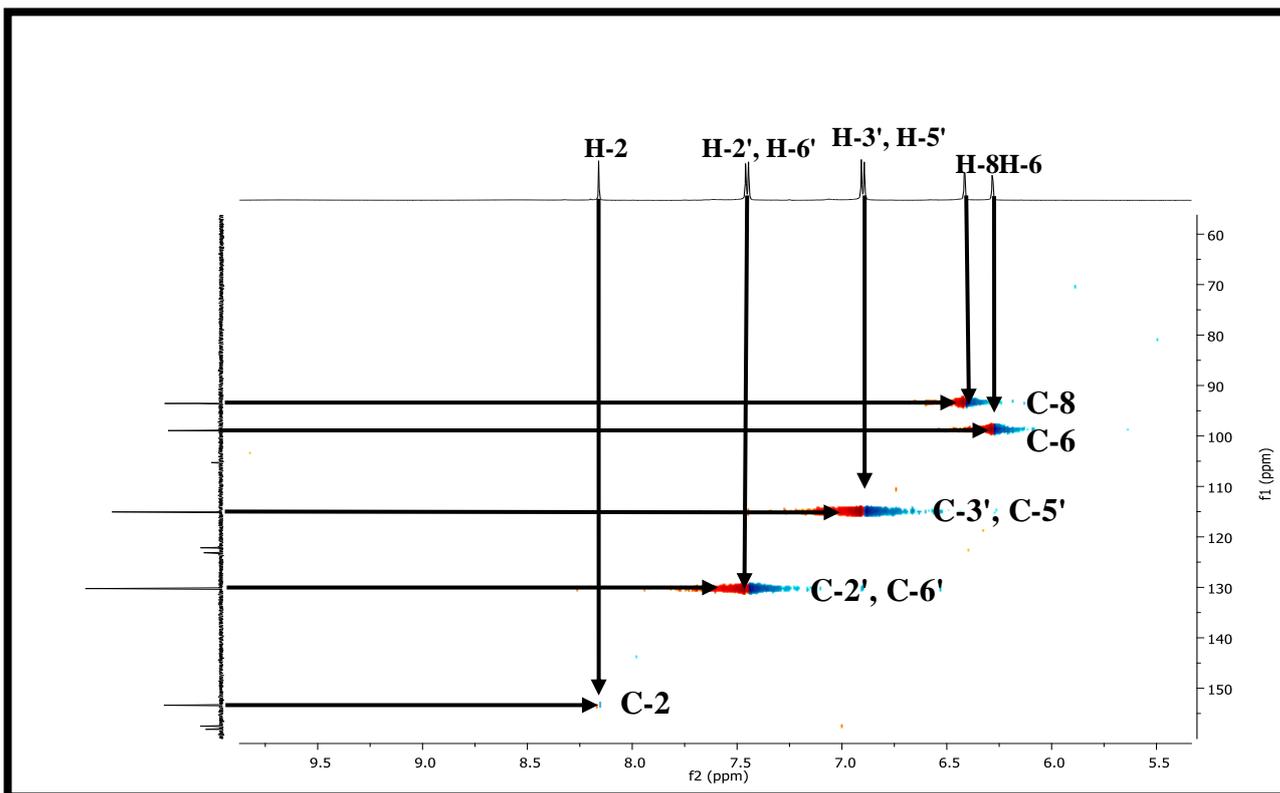


Figure III.40: Spectre HSQC du composé PC₂₄₋₃.

L'ensemble de cette première analyse permet de proposer la structure partielle représentée dans la figure III.41

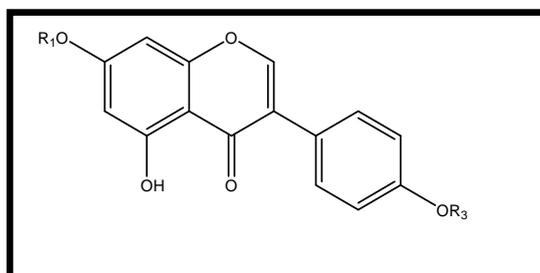


Figure III.41: Structure partielle du composé PC₂₄₋₃.

L'étude du spectre RMN ¹³C (figure III.42) montre la présence de 15 atomes de carbone. Par abstraction des CH indiqué précédemment, il reste 8 C quaternaires. Ces derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre de l'expérience bidimensionnelle HMBC.

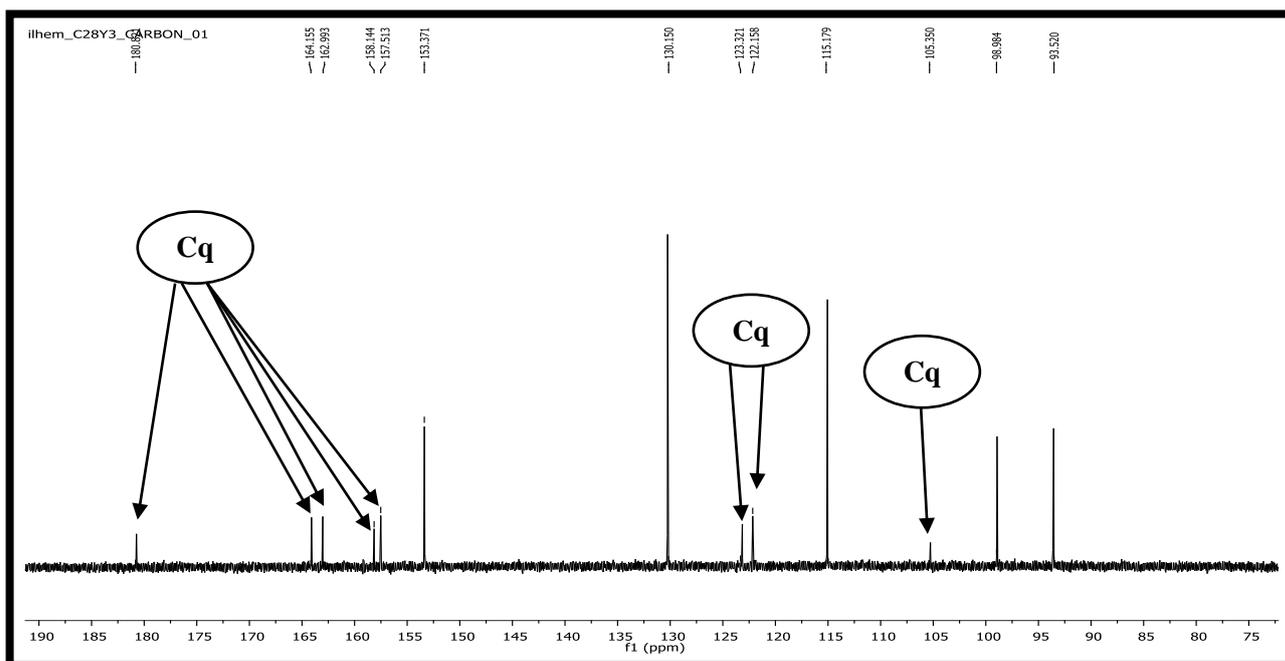


Figure III.42: Spectre de RMN ^{13}C (acétone- d_6 , 150 MHz) du composé PC₂₄₋₃.

En effet, l'analyse du spectre bidimensionnelle HMBC (figure III.43a et figure III.43b) permet l'attribution des carbones quaternaires à l'aide des taches de corrélation comme suit:

1/ Le proton du groupement hydroxyle se trouvant sur le carbone C-5 corrèle avec les carbones:

- ✓ à δ_{C} 105,4 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ à δ_{C} 163 ppm attribuable à C-5.

2/ Le proton H-2 présente des taches de corrélations avec les carbones:

- ✓ à δ_{C} 122,2 ppm attribuable à C-1'.
- ✓ à δ_{C} 123,3 ppm attribuable à C-3.
- ✓ à δ_{C} 158,1 ppm attribuable à C-8a,
- ✓ à δ_{C} 180,8 ppm attribuable à C-4.

3/ Les deux protons H-2' et H-6' corrélient avec les carbones:

- ✓ à δ_{C} 123,3 ppm attribuable à C-3
- ✓ à δ_{C} 157,5 ppm attribuable à C-4'. Vu la valeur du déplacement chimique, ce carbone ne peut être qu'oxygéné.

4/ Les deux protons H-3' et H-5' corrélient avec les carbones:

- ✓ à δ_{C} 122,2 ppm attribuable à C-1'.
- ✓ à δ_{C} 157,5 ppm attribuable à C-4'. La valeur de placement chimique de ce carbone indique qu'il est oxygéné.

5/ Le proton H-8 corrèle avec les carbones:

- ✓ à δ_C 105,4 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ à δ_C 158,1 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ à δ_C 164,2 ppm attribuable à C-7.

6/ Le proton H-6 corrèle avec les carbones:

- ✓ à δ_C 105,4 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ à δ_C 163 ppm attribuable à C-5.

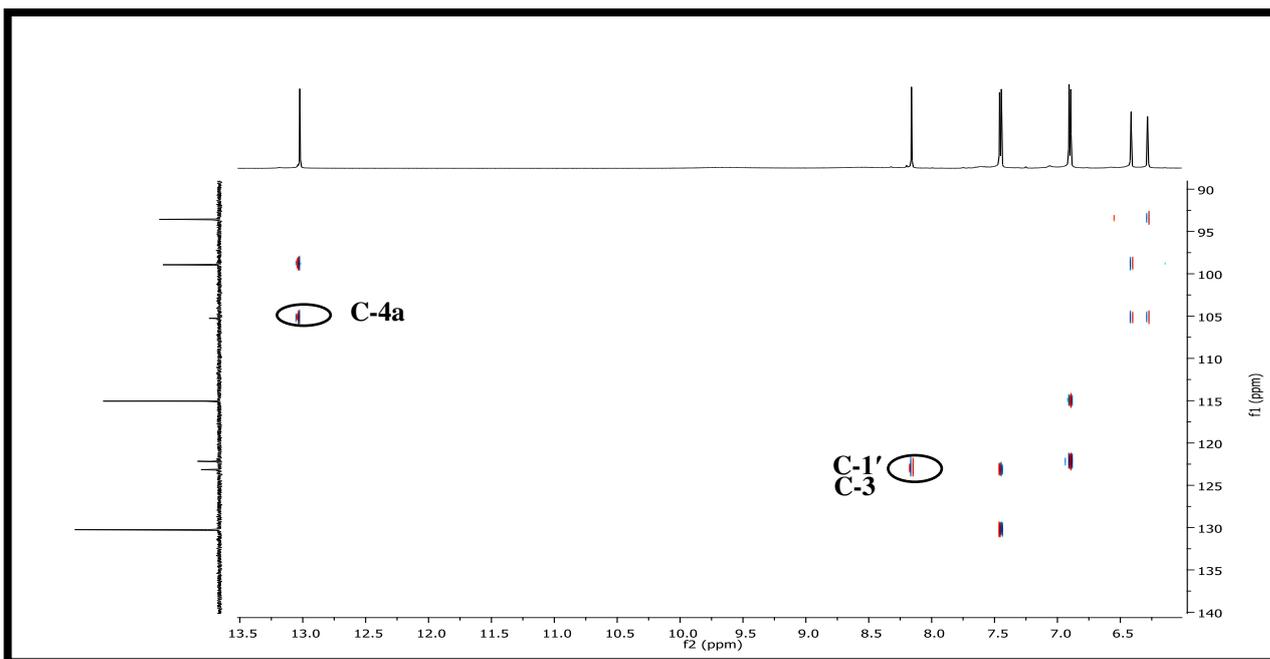


Figure III.43a: Spectre HMBC étalé du composé PC₂₄₋₃.

Par abstraction de l'ensemble de ces signaux de la formule brute, il ne reste que deux protons non attribués. Ces derniers ne peuvent être portés que par les atomes d'oxygène des positions C-7 et C-4'.

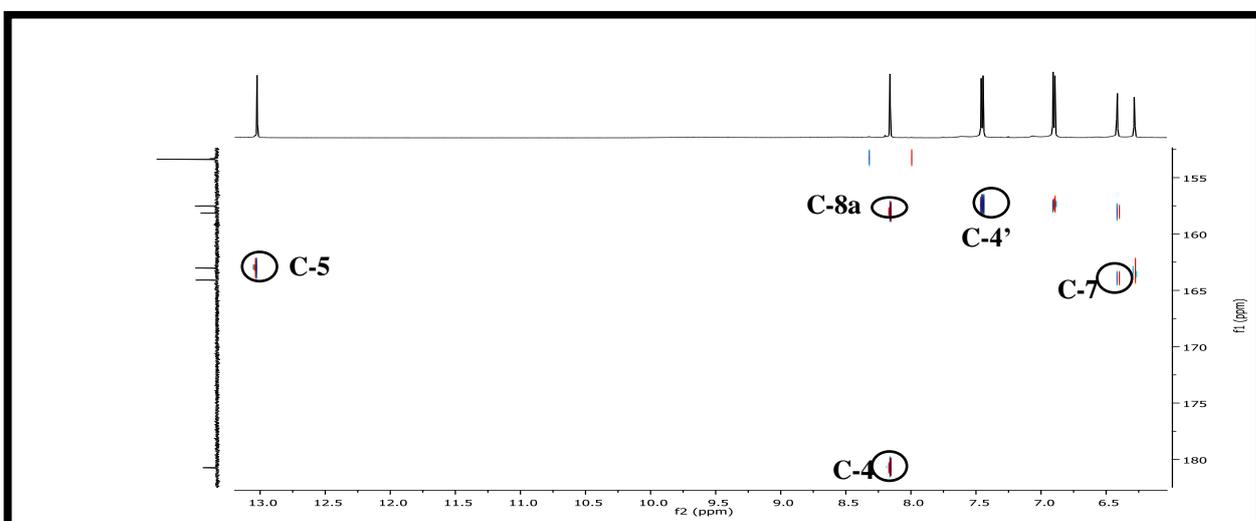


Figure III.43b: Spectre HMBC étalé du composé PC₂₄₋₃.

Les données spectroscopiques du composé PC₂₄₋₃ (déplacements chimiques du ¹H et du ¹³C) sont regroupées dans le tableau suivant (tableau III.12).

Tableau III.12: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PC₂₄₋₃.

Numérotation de la chaîne	δ _H (ppm)	Intégration, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)
C-2	8,17	1H, <i>s</i>	153,4
C-3	-	-	123,3
C-4	-	-	180,8
C-4a	-	-	105,4
C-5	13,02	1H, <i>s</i>	163
C-6	6,28	1H, <i>d</i> , 2	99
C-7	-	-	164,2
C-8	6,42	1H, <i>d</i> , 2	93,5
C-8a	-	-	158,1
C-1'	-	-	122,2
C-2' et C-6'	7,45	2H, <i>d</i> , 8,5	130,2
C-3' et C-5'	6,90	2H, <i>d</i> , 8,5	115,2
C-4'	-	-	157,5

L'ensemble des données RMN 1D (¹H et ¹³C), RMN 2D (HSQC et HMBC) et spectrométrie de masse confortés aux données de la littérature [6, 7] mènent à la structure de **5,7,4'-trihydroxyisoflavone** connu sous le nom de **Génistéine** comme le montre la figure III.44.

La Génistéine a été isolée pour la première fois de *Genista tinctoria* en 1899 par Perkin et Newbury. Plusieurs études ont été menées sur ce composé, montrant leur activité antiproliférative [8].

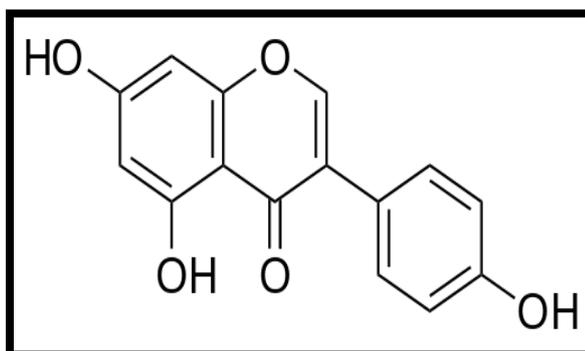


Figure III.44: Structure de la génistéine.

III.1.4.7 Elucidation structurale du composé PC₃₄ (8 et 9)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PC₃₄ obtenu sous forme d'une poudre blanche

➤ Données spectroscopiques

L'examen du spectre RMN ¹H (figure III.45) et le spectre RMN ¹³C étalé (figure III.45a) enregistrés dans le DMSO montre des signaux caractéristiques des stérols qu'on peut identifier aisément par:

- ✓ L'ensemble des signaux résonant à champ fort entre δ_H 0,63-2,33 ppm, indiquant la présence des groupements méthyles, méthylènes et méthynes.
- ✓ Un signal sous forme d'un multiplet à δ_H 3,45 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxygéné typique du proton H-3 d'un stérol. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 77,4 ppm sur le spectre HSQC.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à δ_H 5,31 ppm indiquant la présence d'un proton éthylénique. Celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 121,7 ppm. Les déplacements chimiques de ce proton et de son carbone sont très caractéristiques de la position 6 d'un stérol.
- ✓ En outre, l'observation d'un ensemble de signaux entre δ_H 2,87 et 4 ppm et d'un signal sous forme d'un doublet ($J = 7,8$ Hz) d'intégration 1H localisé à δ_H 4,20 ppm suggère l'existence d'une entité osidique dans la molécule.

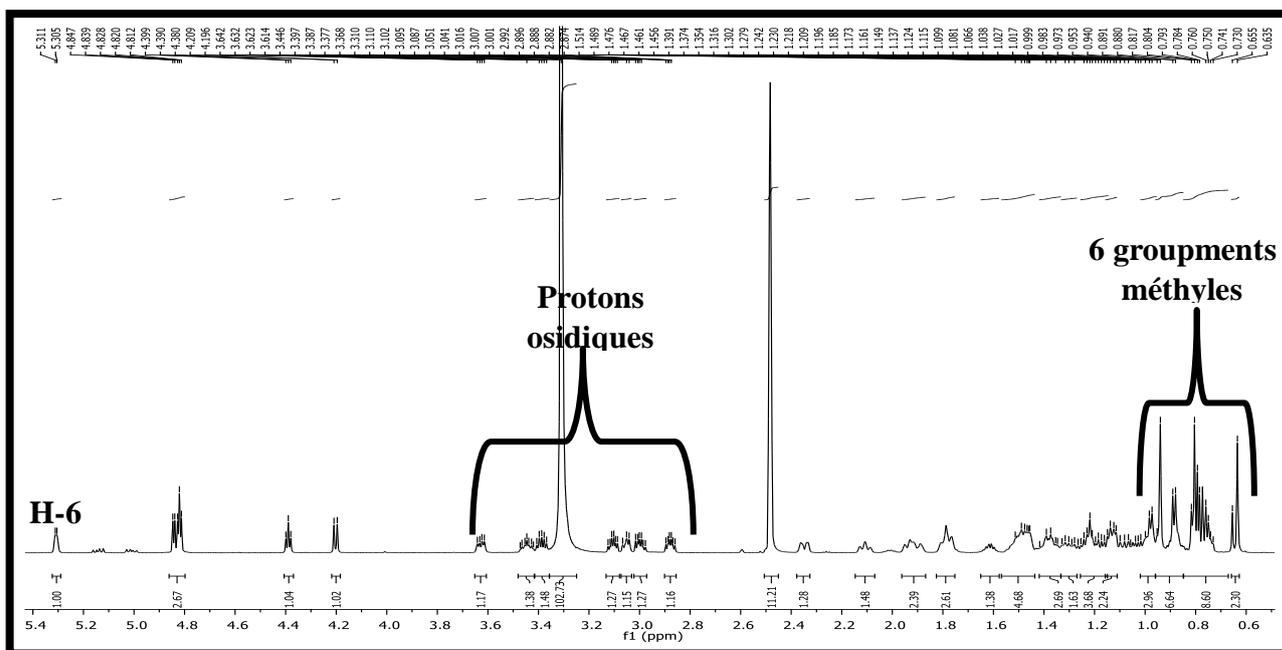


Figure III.45: Spectre RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) du composé PC₃₄.

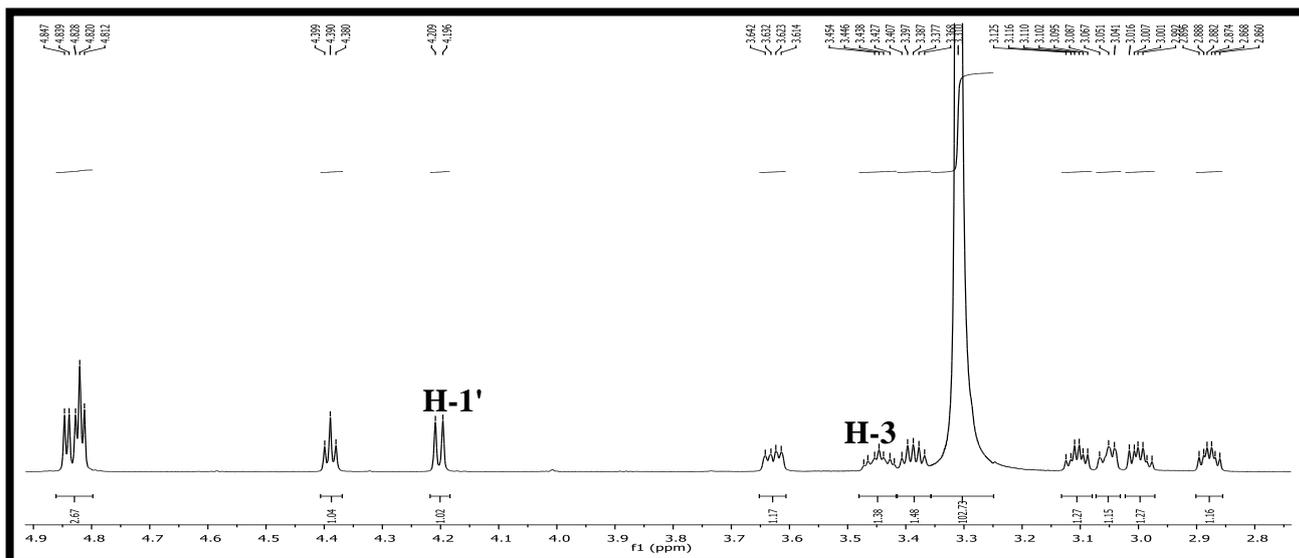


Figure III.45a: Spectre RMN ^1H étalé (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PC₃₄.

Le spectre de l'expérience COSY H-H (figure III.46a et figure III.46b) permet l'identification de l'unité osidique.

A partir du proton anomérique repéré à δ_{H} 4,20 ppm, on relie sept protons d'un hexose H-2' (2,87 ppm, *m*), H-3' (3,11 ppm, *m*), H-5' (3,05 ppm, *m*), H-4' (3,00 ppm, *m*) et H-6' ((3,63 H-6'a et 3,38 H-6'b), *dd* (5,4 ; 11,4 Hz)). L'entité osidique est un glucose ou un galactose avec une configuration β comme l'indique la valeur de la constante de couplage $J_{1'-2'} = 7,8$ Hz du proton H1' avec son voisin.

En plus sur les mêmes spectres de RMN de ^1H et COSY H-H, on peut identifier les OH de l'unité osidique.

OH-3' (4,85 ppm *d* ($J = 4,8$ Hz)), OH-2' (4,82 ppm *d* ($J = 4,8$ Hz)), OH-4' (4,83 ppm *d* ($J = 4,8$ Hz)) et OH-6' (4,39 ppm, *t* ($J = 5,4$ Hz))

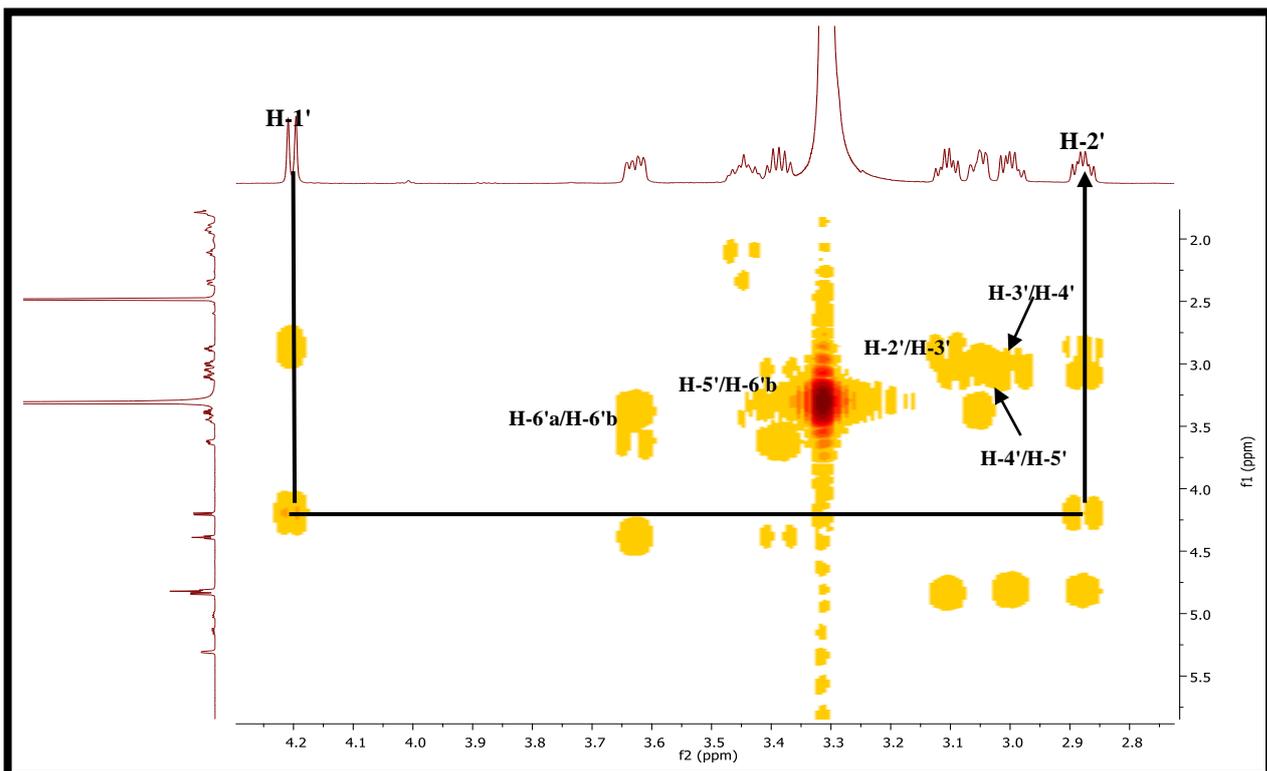


Figure III.46a: Spectre COSY de la partie glucose du composé PC₃₄.

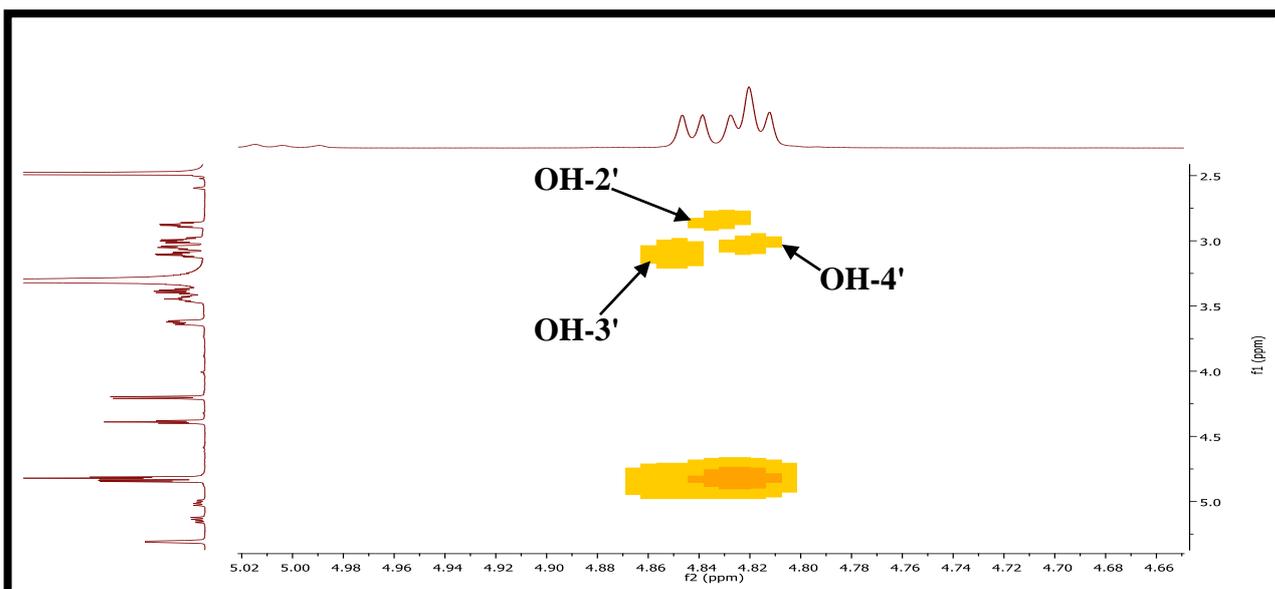
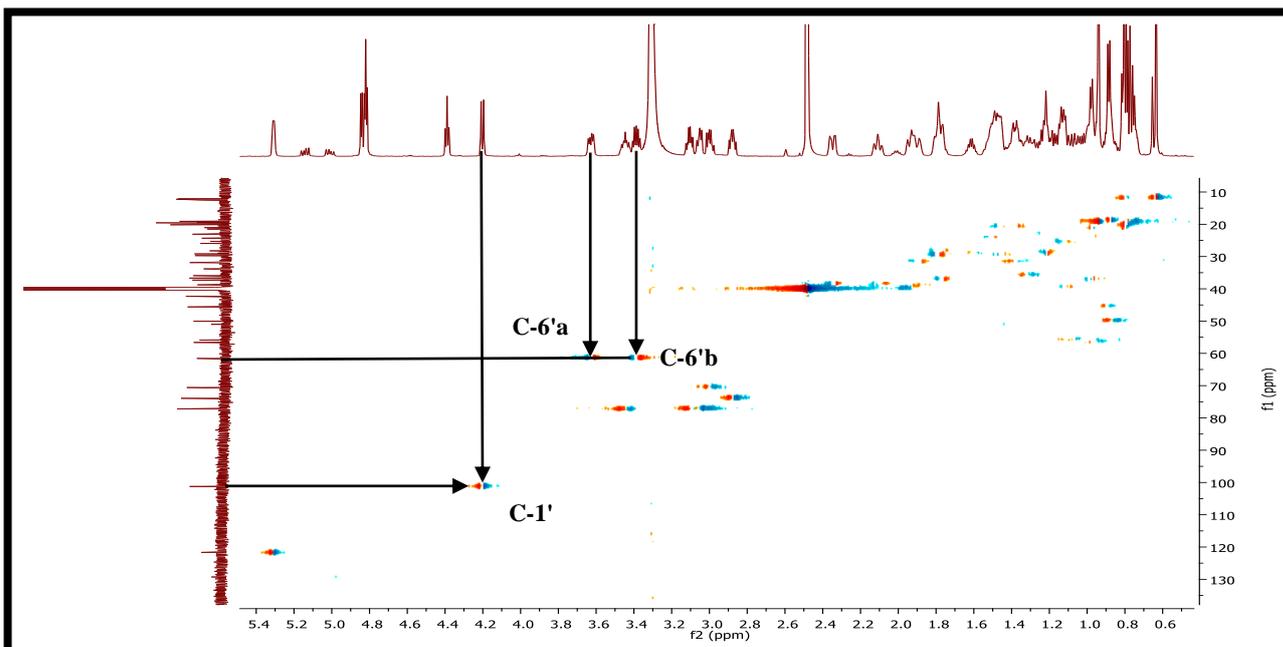
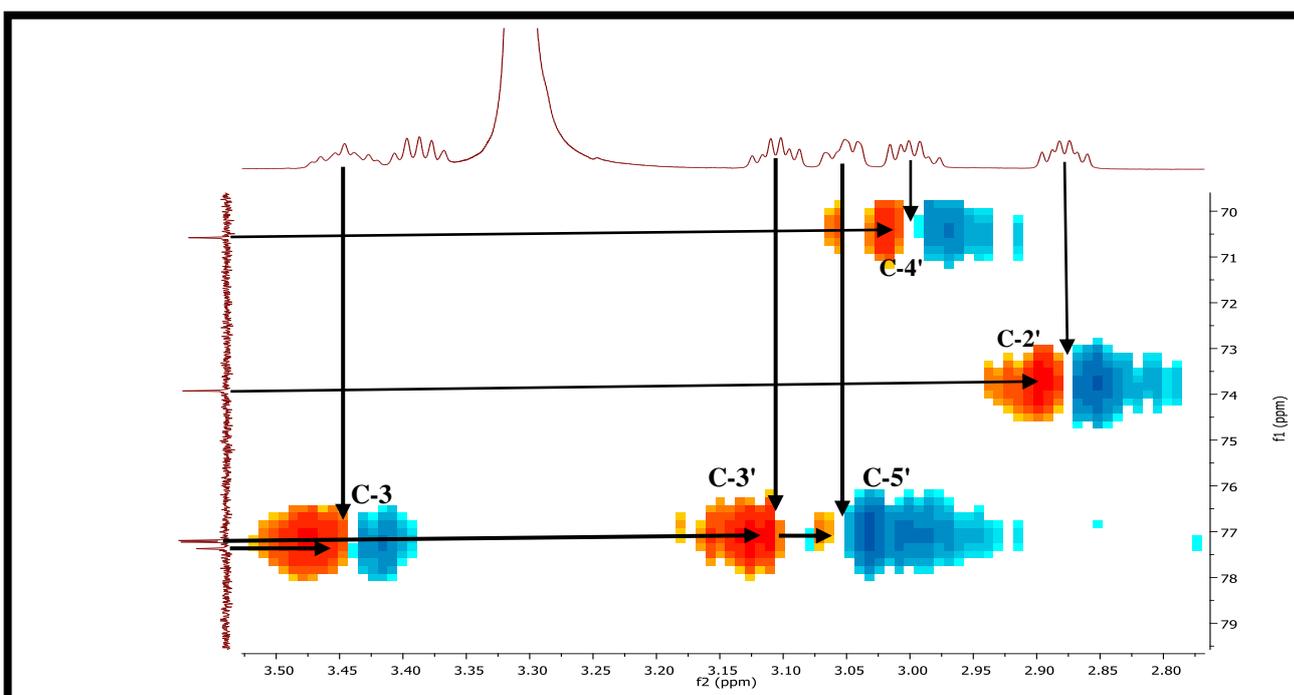


Figure III.46b: Spectre COSY étalé de la partie glucose du composé PC₃₄.

L'expérience HSQC (figure III.47 et III.47a) permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose à δ_c 101,1 ppm (C-1'), δ_c 74 ppm (C-2'), δ_c 77,2 ppm (C-3'), δ_c 77,2 ppm (C-5'), δ_c 70,6 ppm (C-4'), et δ_c 61,5 ppm (C-6'). D'après la valeur de déplacement chimique du C-3' (δ_c 77,2 ppm) [9], l'entité osidique est définie comme étant le O- β -glucose.

Figure III.47: Spectre HSQC du composé PC₃₄.Figure III.47a: Spectre HSQC étalé du composé PC₃₄.

Le spectre RMN ¹³C (figure III.48) montre la présence de deux carbones éthyléniques, le premier correspondant à un CH à δ_c 121,7 ppm et le second à un atome de carbone quaternaire à δ_c 141,1 ppm sont caractéristiques des positions C-6 et C-5 d'un stérol et vu l'absence d'autres carbone éthylénique sur le spectre, cela suppose que ces deux atomes de carbone délimitent la même double liaison.

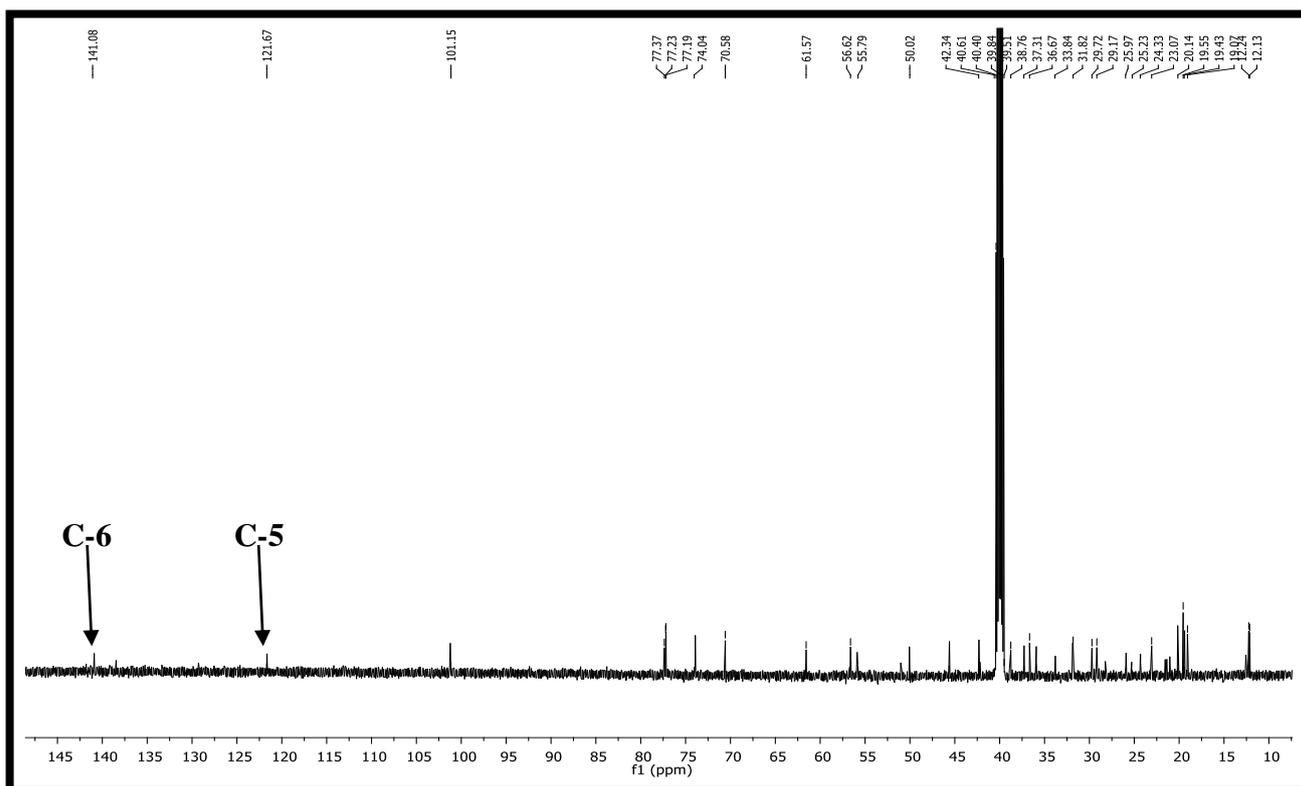


Figure III.48: Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) du composé PC $_{34}$.

La corrélation H-C ($3J$) observée sur le spectre HMBC (figure III.49) entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-3, montre que ce sucre est attaché en position C-3.

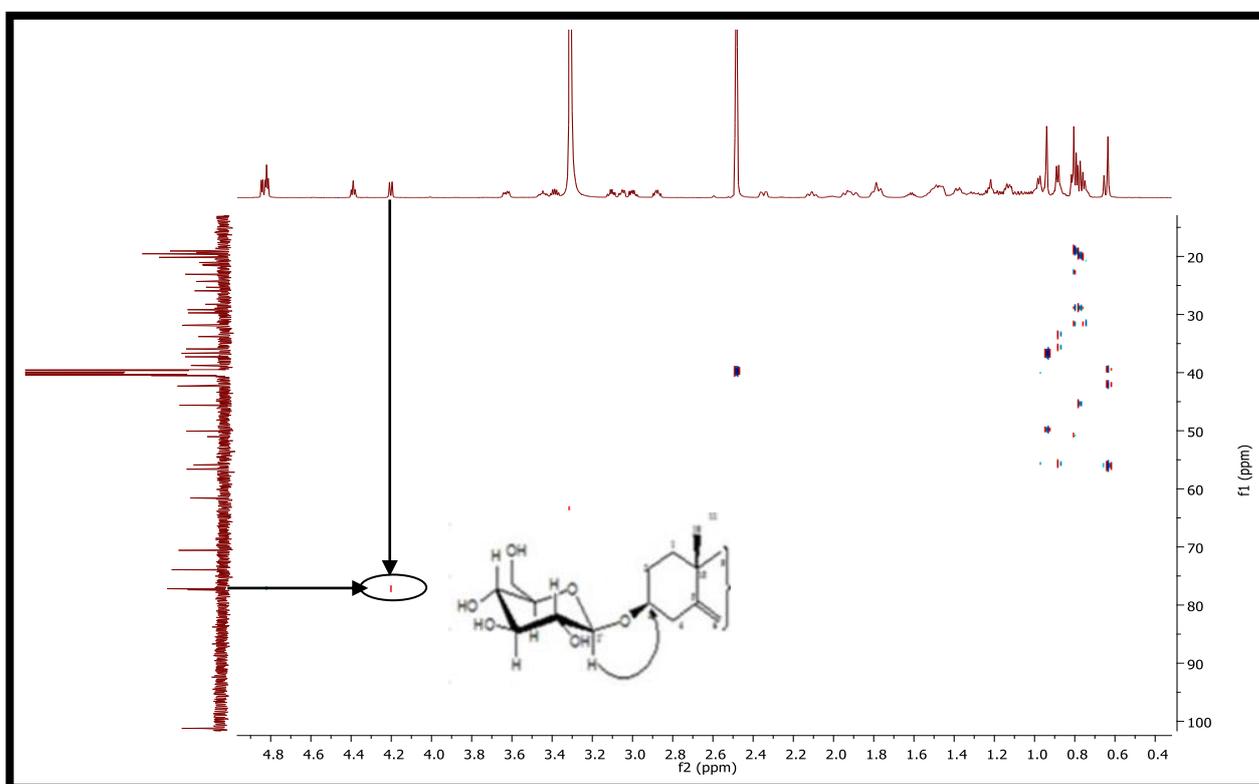


Figure III.49: Spectre HMBC du composé PC $_{34}$.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé PC₃₄ sont représentées dans le tableau III.13.

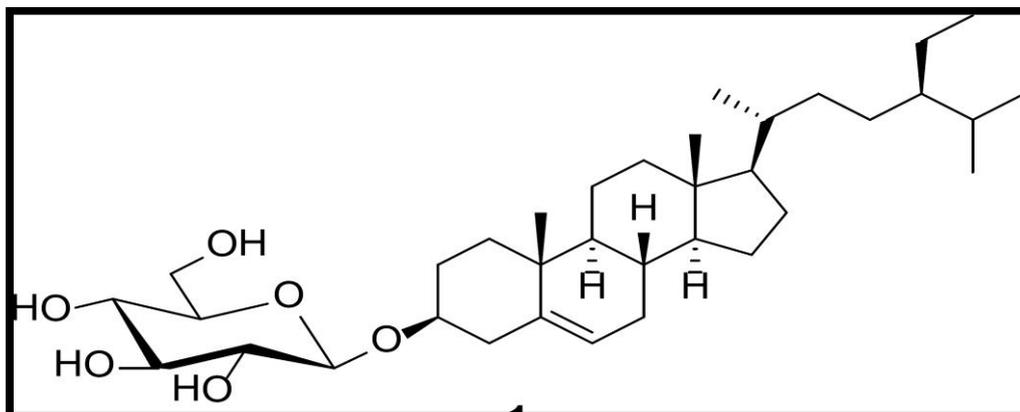
Tableau III.13: Données du spectre RMN ¹³C et RMN ¹H du produit PC₃₄.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	1,78	37,3
2	1,90	31,8
3	3,45	77,4
4	2,37	38,8
5	-	141,1
6	5,31	121,7
7	1,21	28,2
8	1,41	31,9
9	0,87	50,1
10	-	36,7
11	1,47	21,1
12	1,95	40,1
13	-	42,3
14	0,98	56,6
15	1,09	24,3
16	1,46	29,7
17	1,07	55,9
18	0,82	12,2
19	0,96	19,6
20	1,32	35,9
21	0,90	19,4
22	1,26	33,8
23	1,19	25,9
24	0,82	45,5
25	1,24	29,2
26	0,81	20,2
27	0,91	19,1
28	1,25	23,1
29	0,65	12,1

Tableau III.13: Données du spectre RMN ^{13}C et RMN ^1H du produit PC_{34} .

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
Glucose		
1'	4,20	101,2
2'	2,87	74
3'	3,11	77,2
4'	3,00	70,6
5'	3,05	77,2
6'	3,63-3,38	61,5
OH-2'	4,83	-
OH-3'	4,85	-
OH-4'	4,82	-
OH-6'	4,39	-

Les données des expériences RMN 1D (^1H et ^{13}C), RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et la spectrométrie de masse ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [7] ont permis d'identifier le composé PC_{34} comme étant le **3-O- β -glucopyranosyl β -Sitostérol**, connu sous le nom de **Daucostérol** représenté ci-dessous (figure III.50).

**Figure III.50:** Structure de Daucostérol.

Une deuxième lecture attentive du spectre RMN ^1H (Figure III.45b) montre la présence de deux signaux résonant à δ_{H} 5,01 et 5,14 ppm sous forme de doublet de doublet ($J=15$; 8,4 Hz) caractéristiques des deux protons oléfiniques H-22 et H-23 du stigmastérol respectivement.

Cette observation permet de déduire qu'on est en présence d'un mélange de stigmastérol glucosylé (PC_{34-1}) et le β -Sitostérol glucosylé (PC_{34}).

Un simple calcul mené sur les intégrales des signaux des protons montre qu'il s'agit d'un mélange d'environ 45-55 % en faveur du β -Sitostérol glucosylé (PC_{34}).

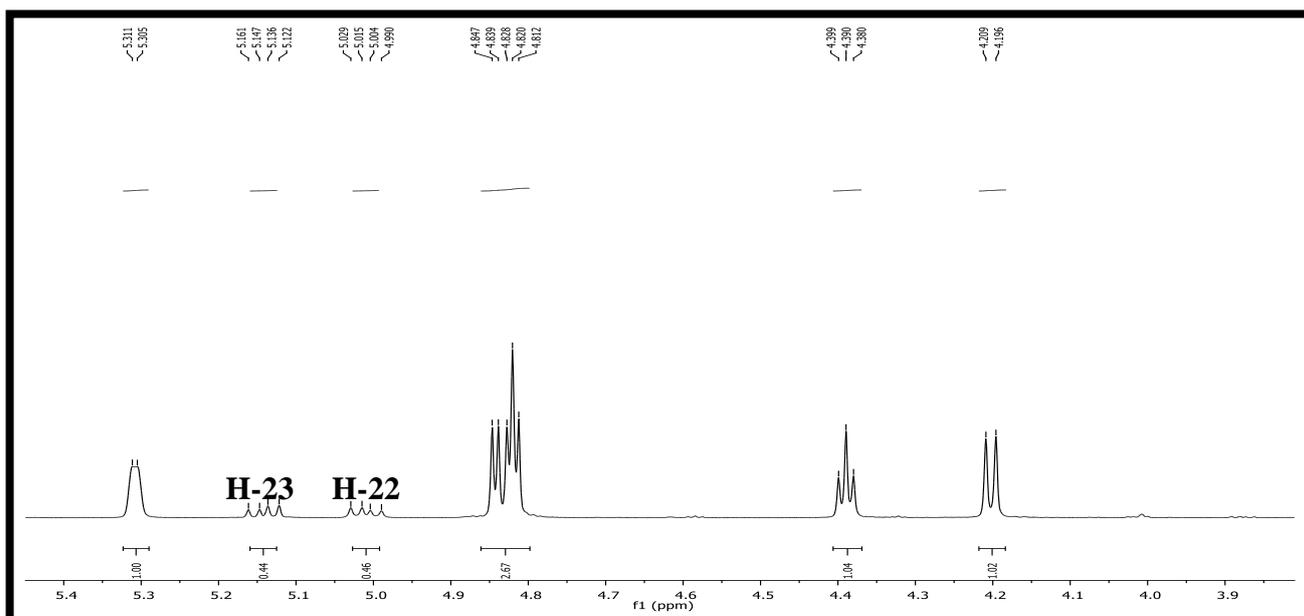


Figure III.45b: Spectre RMN ^1H étalé (DMSO- d_6 , 600 MHz) du mélange PC₃₄ et PC₃₄₋₁.

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III.64) montre clairement tous les signaux des carbones du 3-O- β -glucopyranosyl β -Sitostérol discuté précédemment, et confirme la présence du stigmastérol par la présence des signaux de deux atomes de carbone éthyléniques résonant à δ_{C} 129,2 et 138,5 ppm attribuable à C-22 et C-23 respectivement.

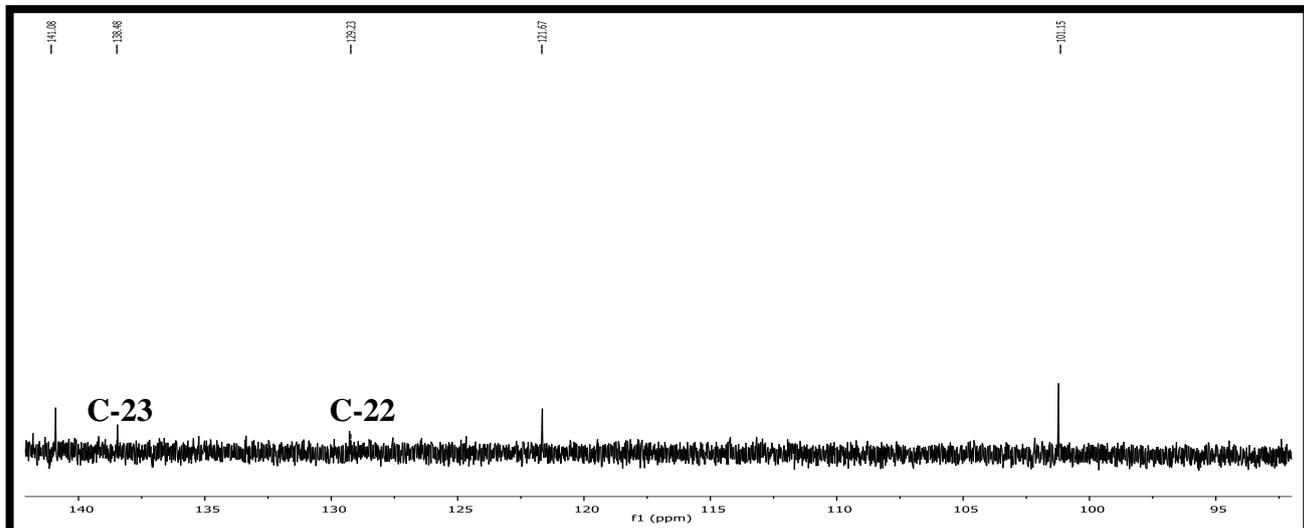


Figure III.48a: Spectre RMN ^{13}C étalé (DMSO- d_6 , 150 MHz) du mélange PC₃₄ et PC₃₄₋₁.

L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec la littérature [10] orientent vers la structure de 3-O- β -glucopyranosyl Stigmastérol (PC₃₄₋₁) reporté dans la figure III.51.

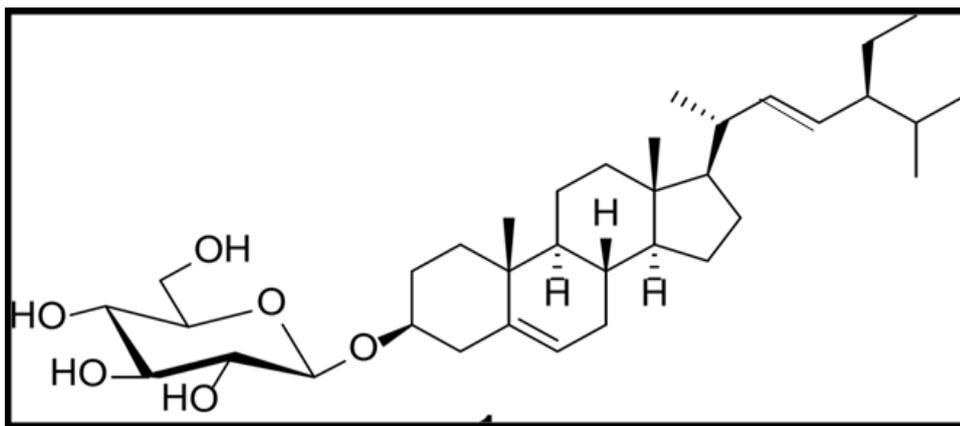


Figure III.51: Structure de 3-O- β - glucopyranosyl Stigmastérol.

III.1.4.7 Elucidation structurale du composé PA₈ (7)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le produit PA₈ se présente sous forme de cristaux de coloration blanche, soluble dans l'acétone.

La couleur jaune orangé sous lumière de Wood (365 nm) oriente vers une structure de type isoflavone.

➤ Données spectroscopiques

Le chromatogramme présenté dans la figure III.52, montre un pic au temps de rétention $T_R = 15,541$ min.

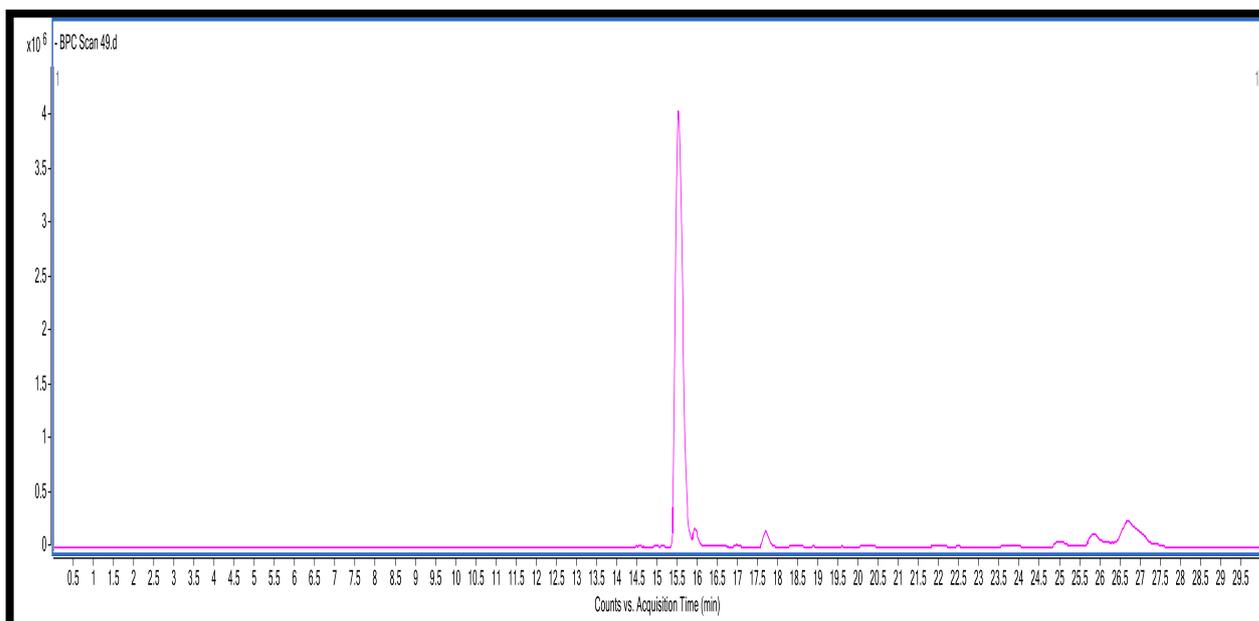


Figure III.52: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA₈.

Le spectre de masse de ce composé (figure III.53) enregistré en mode électro-nébulisation négatif (ESI (-)) montre un pic quasi moléculaire à m/z 269,0466 Da correspondant à $[M-H]^-$

permettant de déduire une masse de 270 Da indiquant une formule brute $C_{15}H_{10}O_5$ avec un nombre d'insaturation de 11. Le deuxième pic à m/z 539,0988 Da correspond à l'ion $[2M-H]^-$.

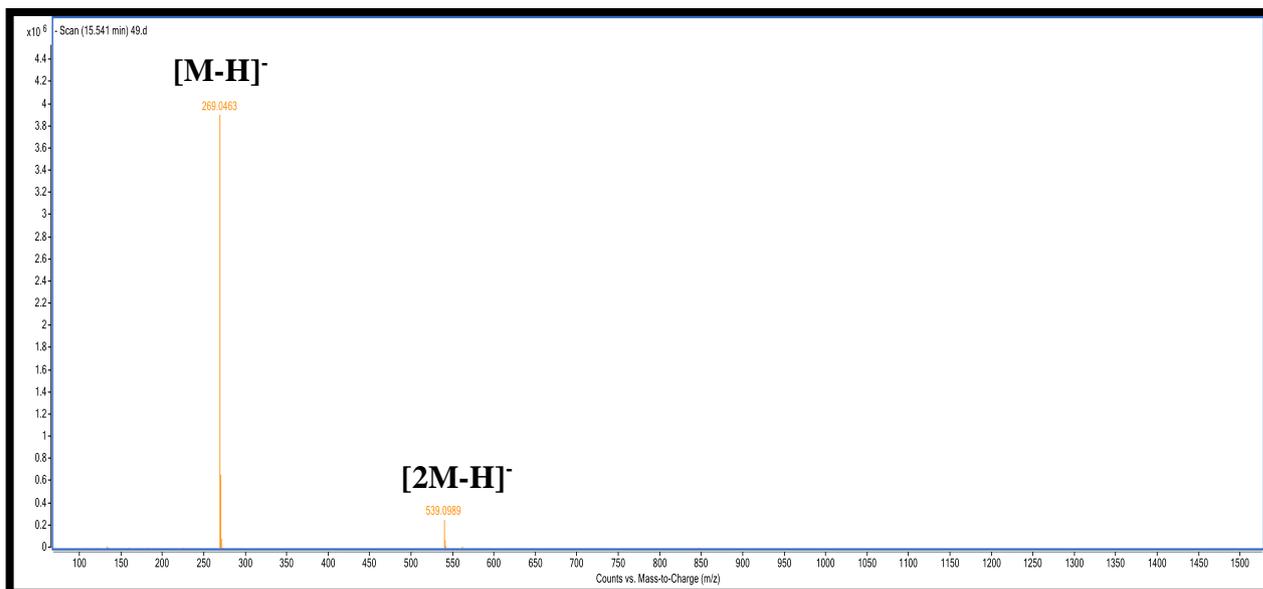


Figure III.53: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA₈.

Après consultation du spectre RMN 1H (figures III.54) de ce composé, nous avons constaté une ressemblance avec le composé PC₂₄₋₃ dont l'interprétation a été donnée précédemment, nous avons alors procédé à une co-chromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes pour les deux composés. Il s'est avéré que c'est bien le même produit connu sous le nom de **Génisteine** et dont la structure est reportée dans la figure III.44.

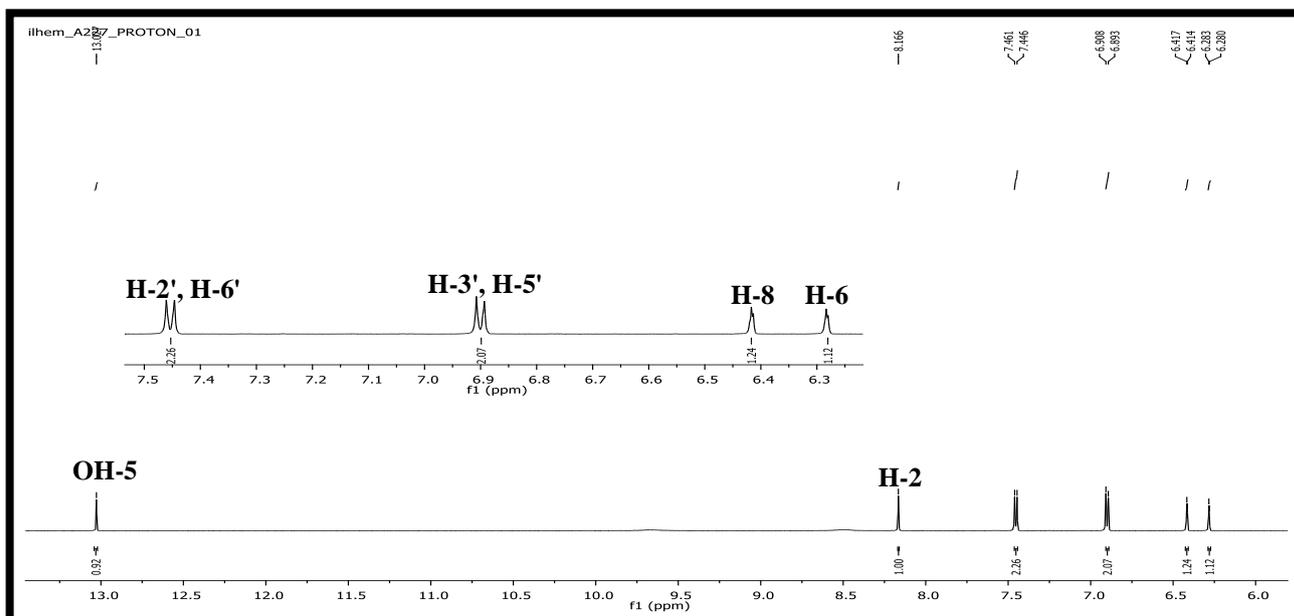


Figure III.54: Spectre de RMN ^{13}C (acétone- d_6 , 150 MHz) du composé PA₈.

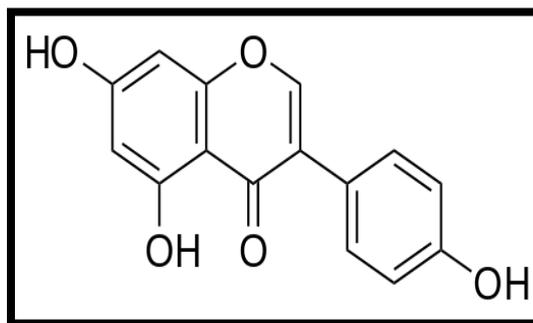


Figure III.44: Structure de la génistéine.

III.1.4.8 Elucidation structurale du composé PA₁₂₋₁ (10)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PA₁₂₋₁ se présente sous forme de cristaux de coloration blanche, soluble dans l'acétone. La couleur jaune orangé sous lumière de Wood (365 nm) oriente vers une structure de type isoflavone.

➤ Données spectroscopiques

L'analyse HPLC-TOF du composé PA₁₂₋₁ (figure III.55) a montré que ce composé est apparu au temps de rétention $T_R = 12,337$ min.

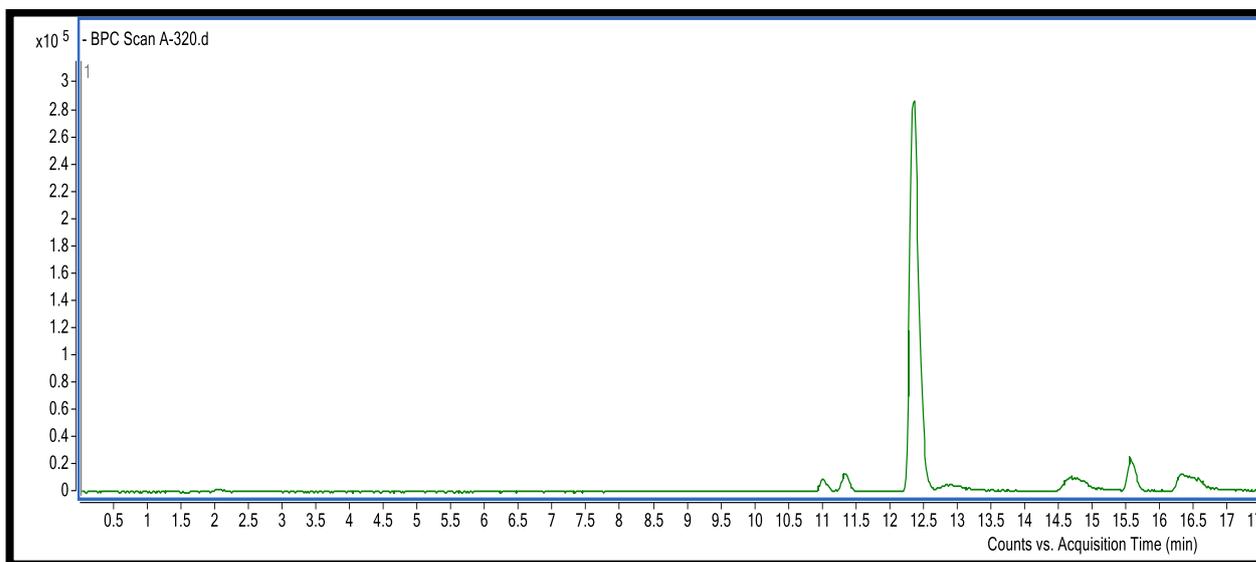


Figure III.55: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA₁₂₋₁.

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électrobulbion négatif (TOF-HR ESI-MS négative), (figure III.56) montre la présence d'un ion quasi moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 283,0633 Da et un autre à m/z 567,1305 Da correspondant à l'ion $[2M-H]^-$. Ces données permettent de déduire la formule brute $C_{16}H_{12}O_5$ pour cette molécule soit une structure comportant 11 insaturations.

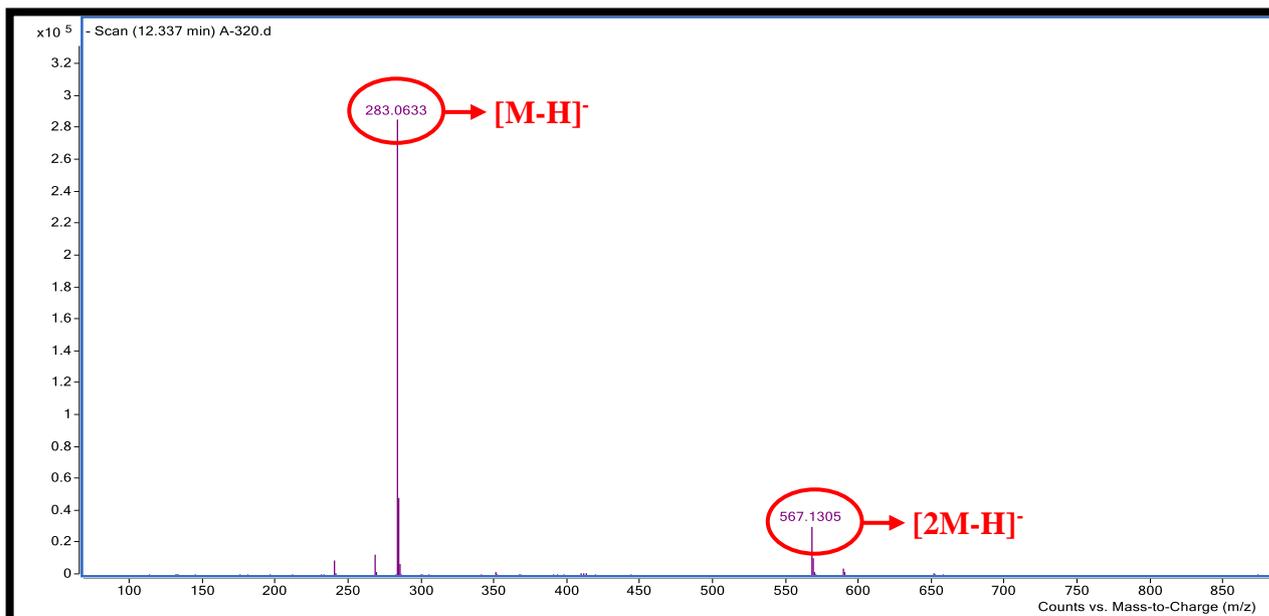


Figure III.56: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA₁₂₋₁.

➤ **Analyse de la série spectrale UV-Vis du composé PA₁₂₋₁:**

Le spectre enregistré dans le méthanol de ce composé (figure III.57) montre deux bandes d'absorption:

- ✓ une première bande I à 319 nm sous forme d'un épaulement et une deuxième bande II à 255 nm confirmant le squelette de type isoflavone.
- ✓ L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda$ II = + 9 nm) par rapport au spectre MeOH indiquant ainsi l'existence d'un OH libre en position 7.
- ✓ La stabilité du spectre enregistré dans le MeOH après addition de AlCl₃, montre l'absence de l'effet bathochrome de la bande I et indique l'absence de chélation entre l'hydroxyle en position C-5 et le groupement carbonyle en C-4 et donc l'absence du OH libre en C-5.
- ✓ Le spectre enregistré en présence d'AlCl₃ + HCl ne montre aucun changement significatif comparativement à celui enregistré dans le méthanol révélant ainsi la présence d'un OR en position 5.

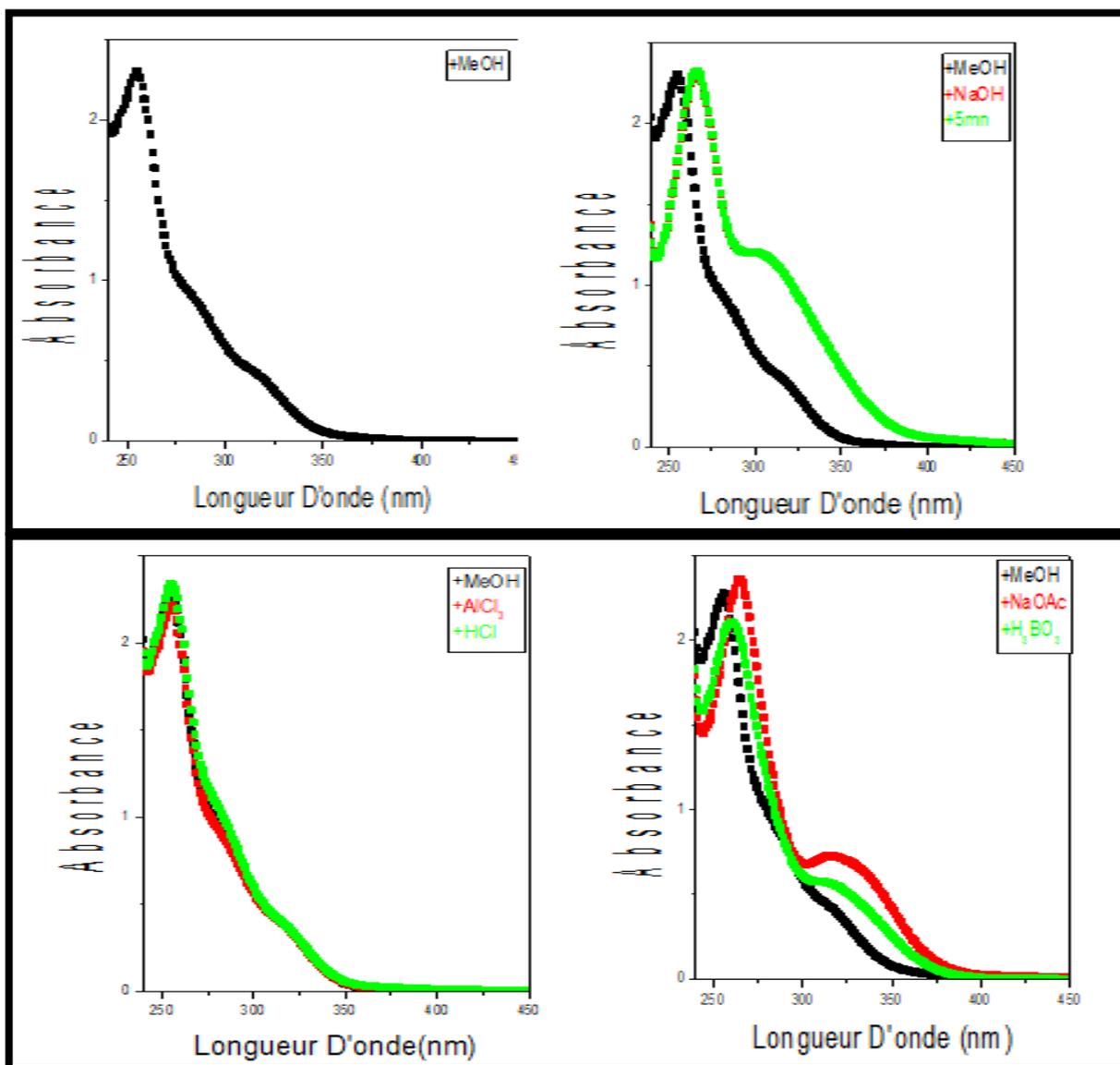


Figure III.57: Série spectrale UV du produit PA₁₂₋₁.

L'ensemble des données UV permet de proposer la structure partielle suivante (figure III.58).

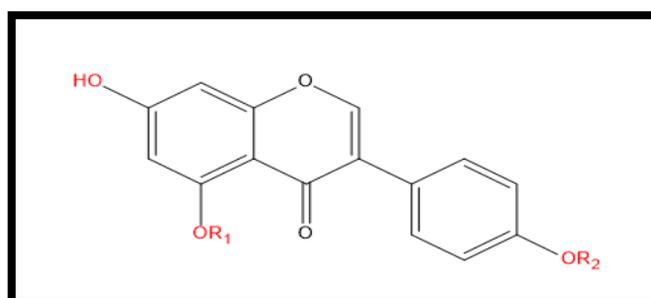


Figure III.58: Structure partielle du composé PA₁₂₋₁.

Les données de la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau III.14.

Tableau III.14: Données de la série spectrale UV du composé PA₁₂₋₁.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	319 Ep.	/	255	Isoflavone
MeOH +NaOH	306 Ep.	/	266	/
MeOH +AlCl ₃	318 Ep.	/	255	Pas d'OH libre en 5 pas de ortho di-OH sur le cycle B
MeOH +AlCl ₃ /HCl	318 Ep.	/	255	
MeOH +NaOAc	317 Ep.	/	264	OH libre en 7
MeOH +NaOAc/H ₃ BO ₃	313 Ep.	/	260	/
Spectre stable avec NaOH après 5 min				

L'analyse simultanée du spectre RMN ¹H (figure III.59) et le spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.60) enregistré dans l'acétone montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type isoflavone reconnaissable par:

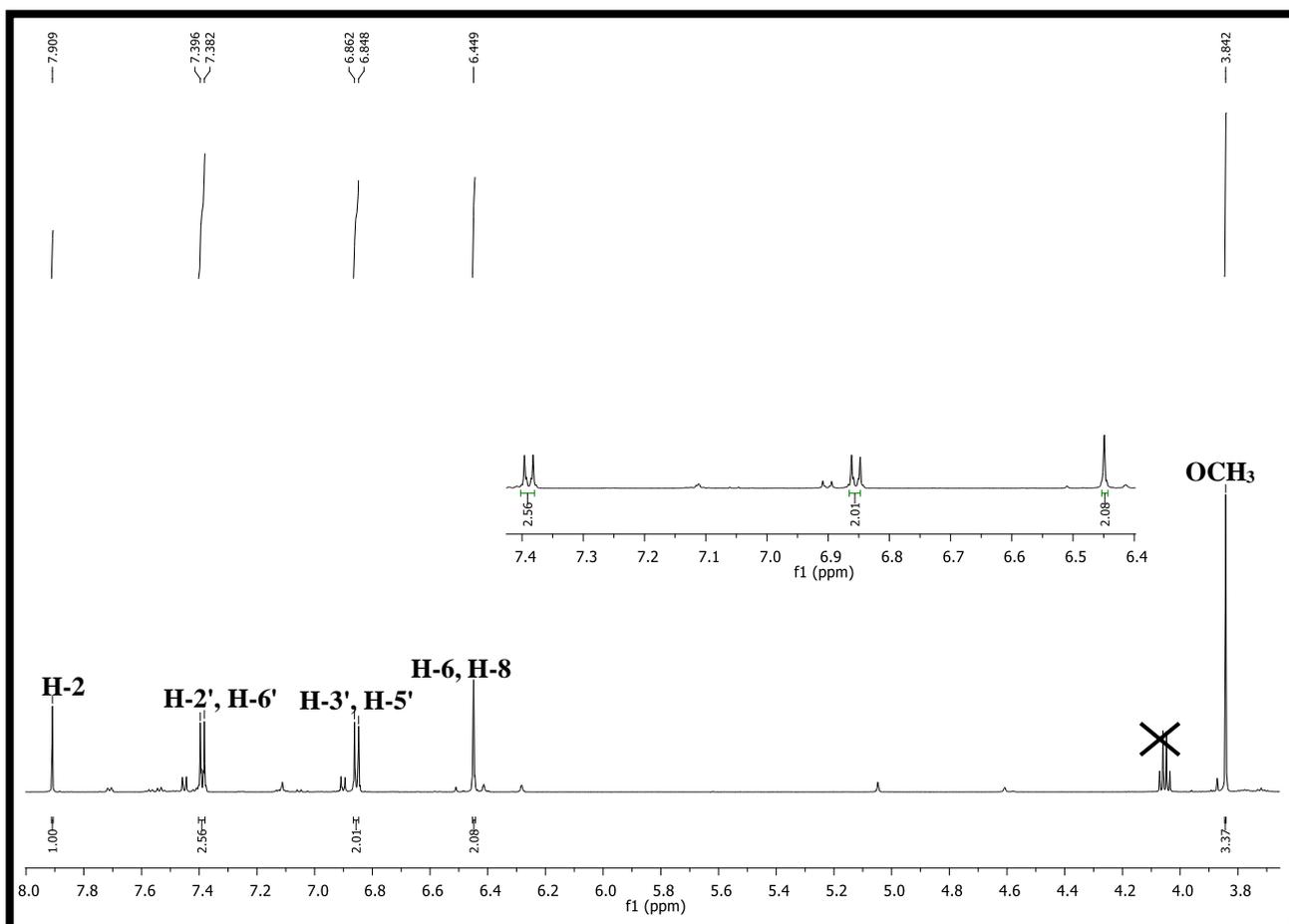
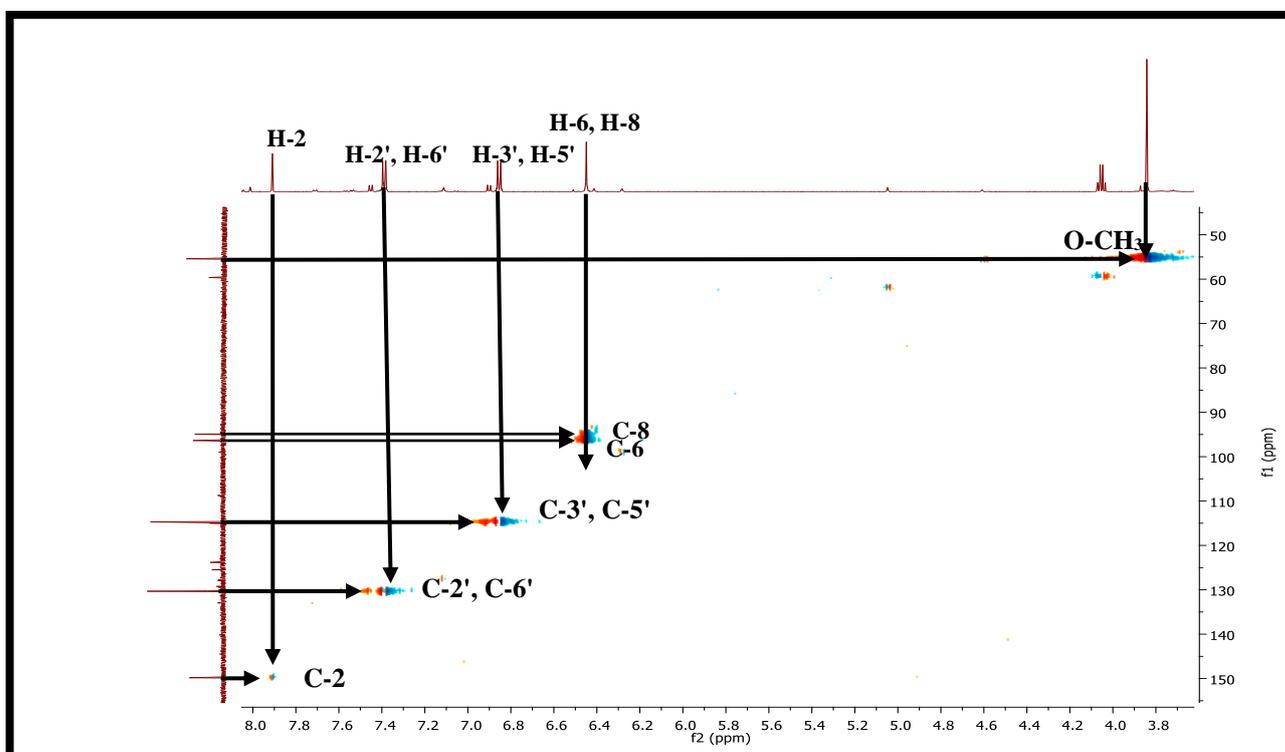
- ✓ La présence d'un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_H 7,91 ppm attribuable à H-2 confirmant ainsi le squelette d'isoflavone. celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 150 ppm.
- ✓ Un signal à δ_H 7,39 ppm sous forme d'un doublet montrant un couplage ortho ($J= 8,4$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons du cycle B. ces deux protons montrent sur le spectre

HSQC une tache de corrélation avec le signal à δ_C 130,4 ppm attribuable à C-2' et C-6'.

- ✓ Un signal à δ_H 6,85 ppm sous forme également d'un doublet et montrant un couplage ortho ($J= 8,4$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons H-3' et H-5' du cycle B. ces protons corrélerent sur le spectre HSQC avec le signal à δ_C 114,6 ppm attribuable à C-3' et C-5'.

Ces deux signaux indiquant clairement que le cycle B est para substitué.

- ✓ Un singulet à δ_H 6,45 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-6 et H-8 du cycle A et corrèle sur le spectre HSQC avec les carbone à δ_C 96,4 et 95 ppm respectivement.
- ✓ Un singulet à δ_H 3,84 ppm d'intégration 3H. la multiplicité de ce signal ainsi que son déplacement chimique laisse déduire la présence d'un groupement O-CH₃. Ces protons corrélerent sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 55,4 ppm.

Figure III.59: Spectre RMN ¹H (acétone-*d*₆, 600 MHz) du composé PA₁₂₋₁.Figure III.60: Spectre HSQC du composé PA₁₂₋₁.

L'analyse du spectre COSY (figure III.61) montre une tache de corrélation entre le doublet à δ_H 7,39 ppm et le doublet à δ_H 6,85 ppm du cycle B se qui confirme la position ortho de ces protons.

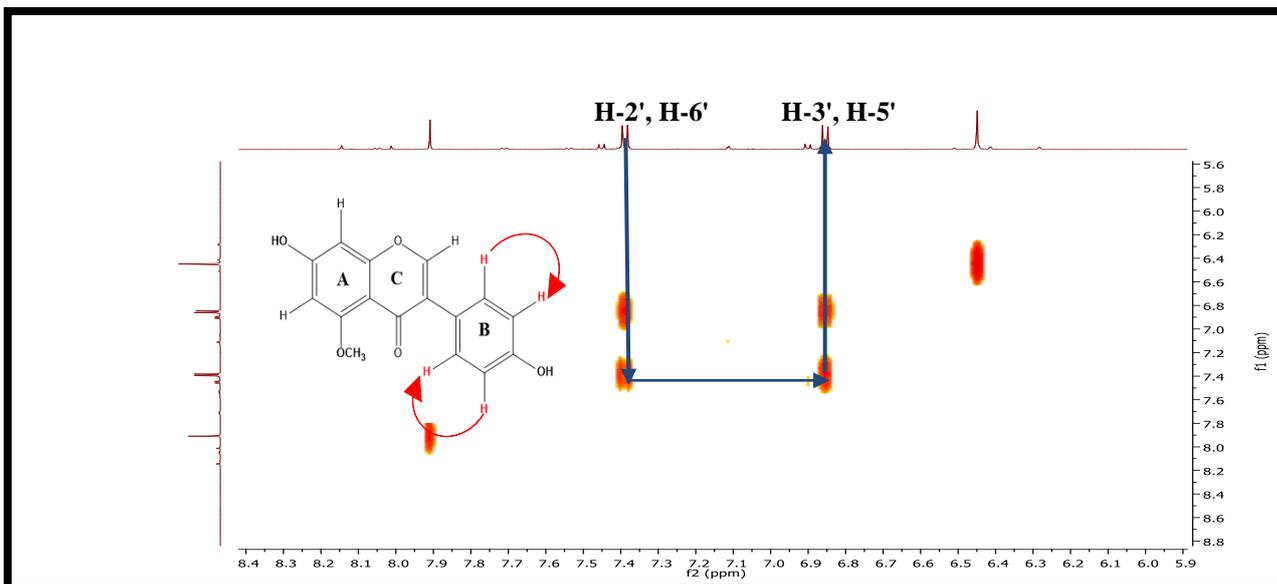


Figure III.61: Spectre COSY du composé PA₁₂₋₁.

L'étude du spectre RMN ¹³C (figure III.62) montre la présence de 16 atomes de carbone. Par abstraction des CH et du groupement O-CH₃ indiqué précédemment, il reste 8 Carbones quaternaires. Ces derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre de l'expérience HMBC.

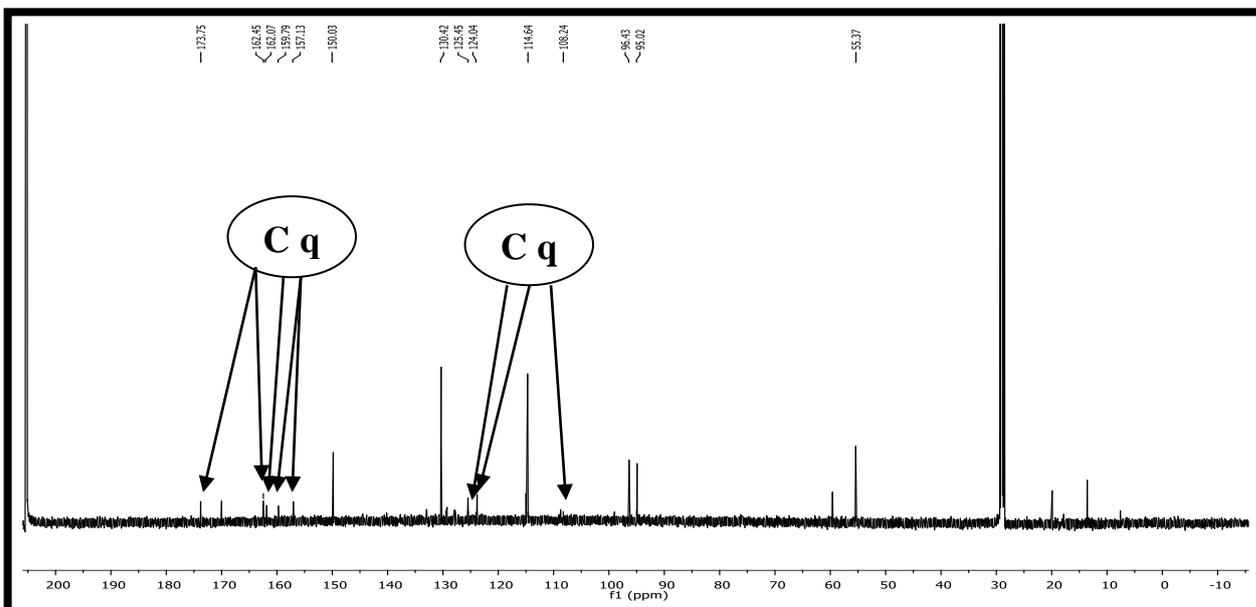


Figure III.62: Spectre de RMN ¹³C (acétone-*d*₆, 150 MHz) du composé PA₁₂₋₁.

L'analyse du spectre HMBC (figure III.63a et figure III.63b) permet l'attribution des carbones quaternaires comme suit:

1/ Le proton H-2 corrèle avec les carbones à:

- ✓ δ_C 125,5 ppm attribuable à C-3.
- ✓ δ_C 159,8 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ δ_C 173,8 ppm attribuable à C-4.

2/ Les deux protons H-2' et H-6' corrélient avec les carbones à:

- ✓ δ_C 125,5 ppm (C-3).
- ✓ δ_C 157,1 ppm attribuable à C-4'.

3/ Les deux protons H-3' et H-5' corrélient avec le carbone à δ_C 124 ppm attribuable à C-1'.

4/ Les deux protons H-6 et H-8 corrélient avec les carbones à:

- ✓ δ_C 108,2 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ δ_C 162,5 ppm attribuable à C-7.
- ✓ δ_C 162,1 ppm attribuable à C-5.

5/ La tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone à δ_C 162,1 ppm attribuable précédemment à C-5 est permet de positionner ce groupement sur le carbone C-5.

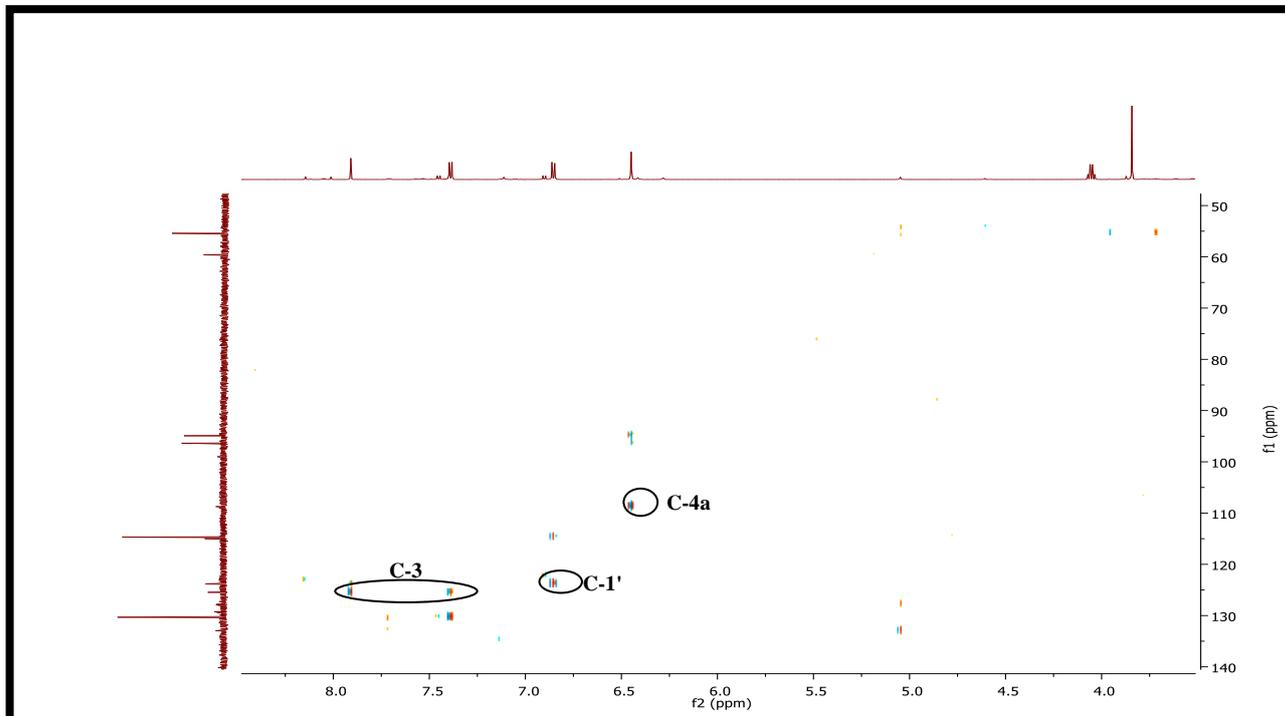
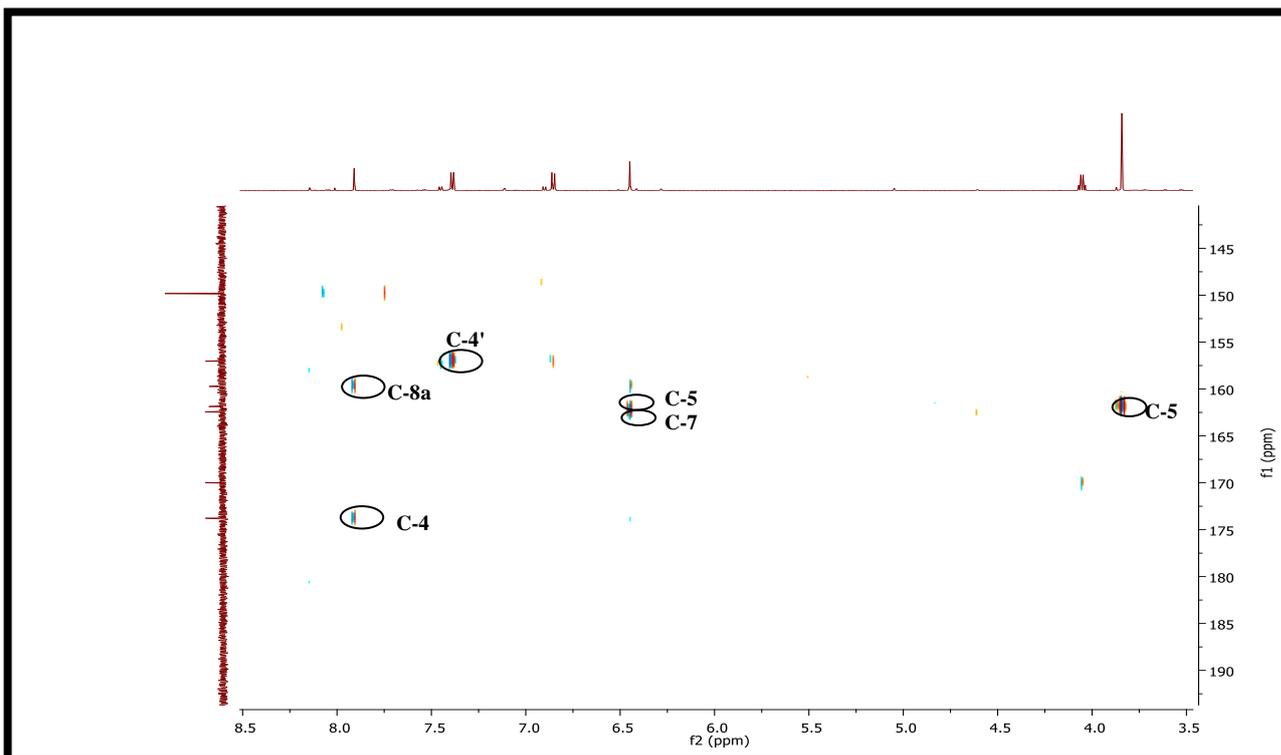


Figure III.63a: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₂₋₁.

Figure III.63b: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₂₋₁.

Les valeurs des déplacements chimiques de RMN ¹H et ¹³C sont regroupées dans le tableau suivant (tableau III.15).

Tableau III.15: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PA₁₂₋₁.

Numérotation de la chaîne	δ _H (ppm)	Intégration, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)
C-2	7,91	1H, <i>s</i>	150
C-3	-	-	125,5
C-4	-	-	173,8
C-4a	-	-	108,2
C-5	-	-	162,1
C-6	6,45	1H, <i>s</i>	96,4
C-7	-	-	162,5
C-8	6,45	1H, <i>s</i>	95
C-8a	-	-	159,8
C-1'	-	-	124
C-2' et C-6'	7,39	2H, <i>d</i> , (8,4)	130,4
C-3' et C-5'	6,85	2H, <i>d</i> , (8,4)	114,6
C-4'	-	-	157,1
O-CH ₃	3,84	3H, <i>s</i>	55,4

L'ensemble des données RMN 1D (¹H et ¹³C), RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et la spectrométrie de masse ainsi que la comparaison avec la littérature [11] mènent au composé

4',7-dihydroxy-5-méthoxyisoflavone (Génisteine 5-méthyl éther) connu sous le nom de l'**isoprune** représenté dans la figure III.64.

Cette molécule est isolé de plusieurs espèces de la famille fabaceae [6] et pour la première fois du genre *Lotus*.

Des études antérieures ont montré l'activité ostrogénique et antioxydant de ce composé [12, 13].

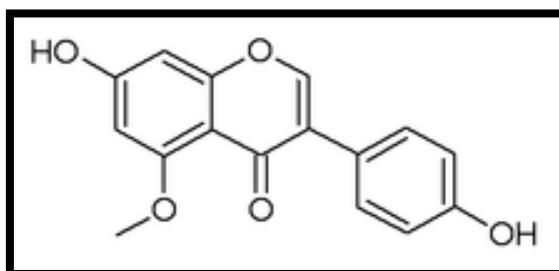


Figure III.64: Structure de l'isoprune.

III.1.4.9 Elucidation structurale du composé PA₁₂₋₂ (11)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PA₁₂₋₂ se présente sous forme d'une poudre jaune, soluble dans le méthanol.

➤ Données spectroscopiques

Le temps de rétention du composé PA₁₂₋₁ est T_R= 13,868 min grâce à l'analyse HPLC-TOF (figure III.65).

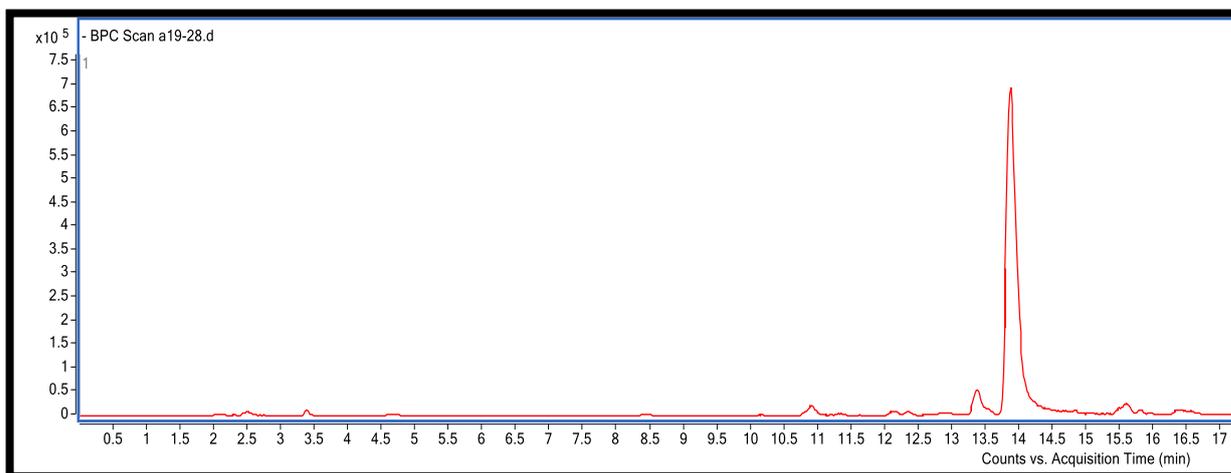


Figure III.65: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA₁₂₋₂.

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électro-nébulisation négatif (ESI-MS négative), (figure III.66) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ à m/z 301,0388 Da et un autre à m/z 603,0820 Da correspondant à l'ion [2M-H]⁻. Ces données

permettent de déduire la formule brute $C_{16}H_{12}O_5$ pour cette molécule soit une structure comportant 11 insaturations.

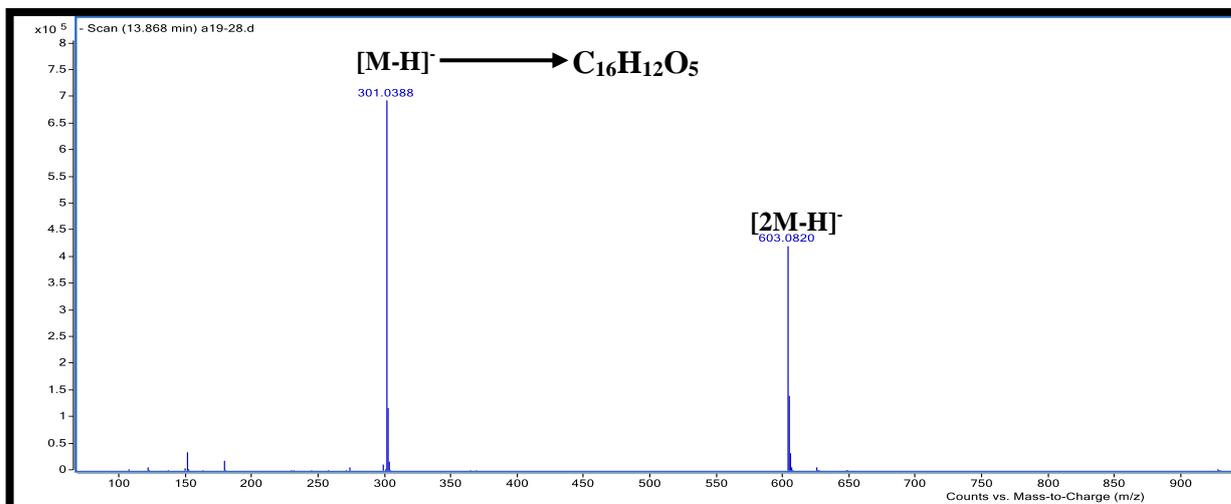


Figure III.66: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA₁₂₋₂.

L'analyse simultanée du spectre RMN 1H (figure III.67) et le spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.68) enregistré dans le CD_3OD-d_4 montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonol caractérisé par:

- ✓ Un singlet à δ_H 12,16 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC, ce proton est attribué au groupement hydroxyle en position C-5.
- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 7,82 ppm d'intégration 1H attribuable à H-2' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 114,8 ppm.
- ✓ Un doublet de doublet ($J= 8,4; 1,8$ Hz) à δ_H 7,69 ppm d'intégration 1H attribuable à H-6' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 120,5 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 8,4$ Hz) à δ_H 7,00 ppm d'intégration 1H attribuable à H-5' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 115,3 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,9$ Hz) à δ_H 6,53 ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 93,5 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,9$ Hz) à δ_H 6,27 ppm d'intégration 1H attribuable à H-6 et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 98,1 ppm.

L'ensemble de ces signaux indiquent clairement un flavonoïde substitué en Position 5 et 7 du cycle A, en position 3' et 4' du cycle B et en position 3 du cycle C soit un squelette quercétine.

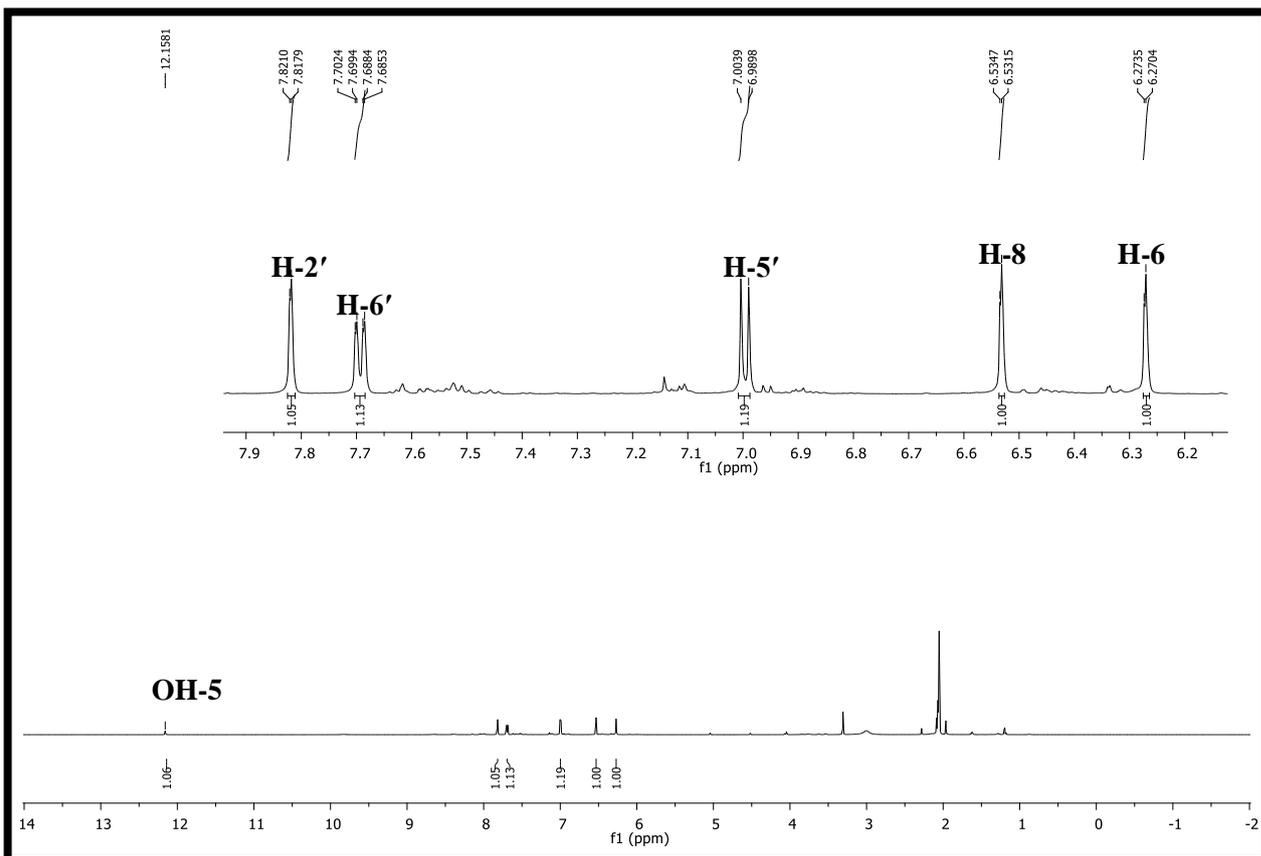


Figure III.67: Spectre RMN ^1H (méthanol- d_4 , 600 MHz) du composé PA₁₂₋₂.

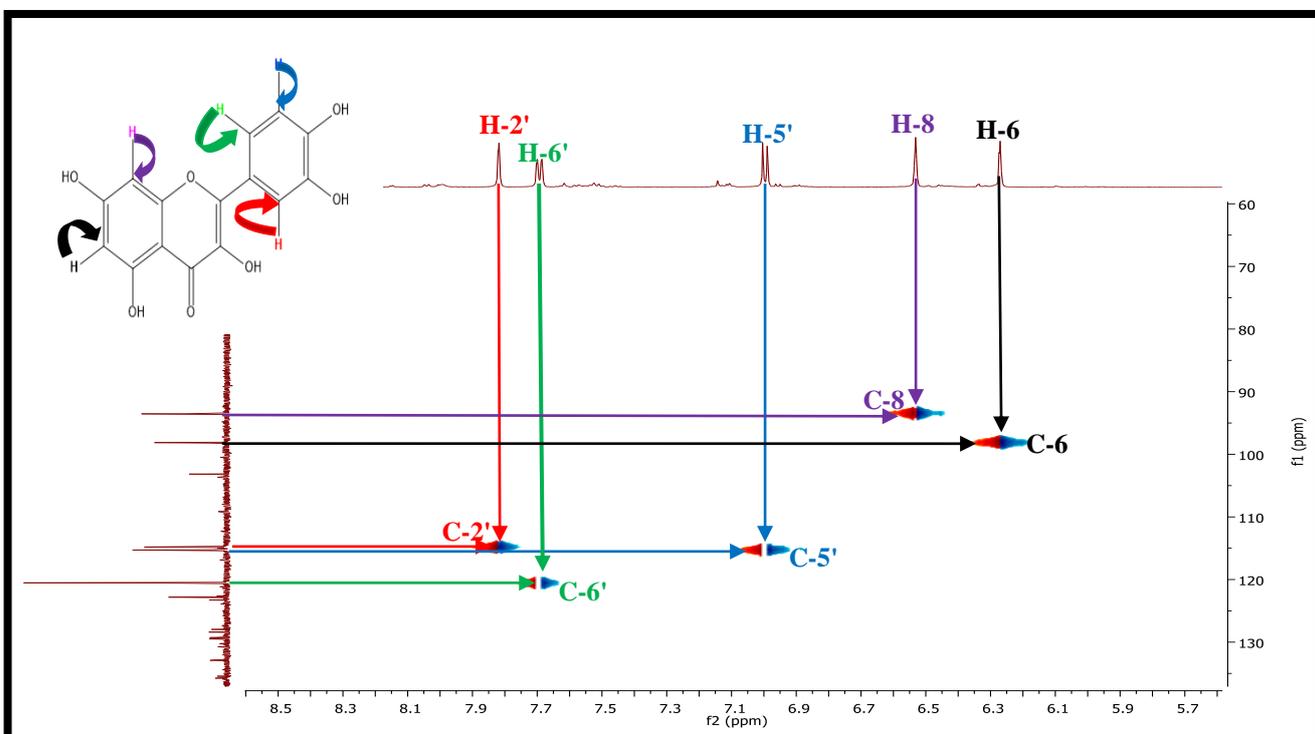


Figure III.68: Spectre HSQC du composé PA₁₂₋₂.

L'analyse du spectre COSY (figure III.69) montre une tache de corrélation entre les deux protons H-6' et H-5' confirmant ainsi leurs attributions en position ortho.

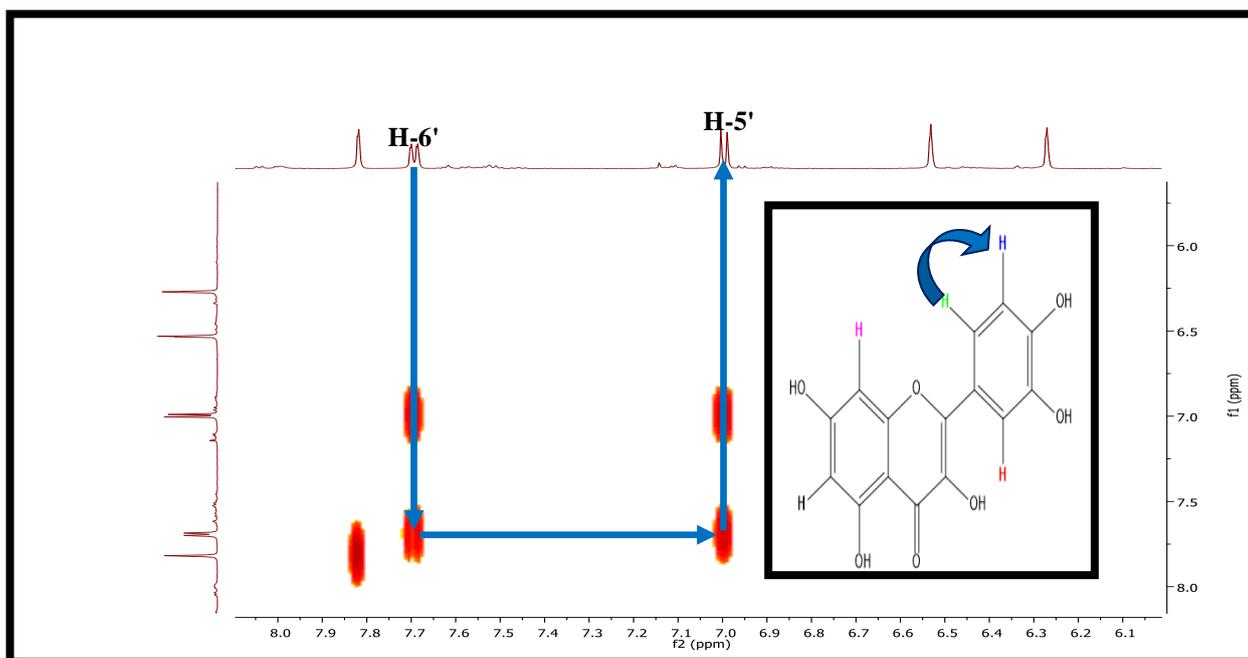


Figure III.69: Spectre COSY du composé PA₁₂₋₂.

En effet, l'analyse du spectre HMBC (figure III.70, figure III.70a et figure III.70b) permet l'attribution des carbones quaternaires à l'aide des taches de corrélation comme suit:

1/ Le proton du groupement hydroxyle à δ_H 12,16 ppm corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_C 103,3 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ le carbone à δ_C 161,3 ppm attribuable à C-5.

2/ Le proton H-2' corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_C 144,9 ppm attribuable à C-3'.
- ✓ le carbone à δ_C 145,9 ppm attribuable à C-2.
- ✓ le carbone à δ_C 147,3 ppm attribuable à C-4'.

3/ Le proton H-6' corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_C 145,9 ppm attribuable à C-2.
- ✓ le carbone à δ_C 147,3 ppm attribuable à C-4'.

4/ Le proton H-5' corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_C 122,9 ppm attribuable à C-1'.
- ✓ le carbone à δ_C 144,9 ppm attribuable à C-3'.
- ✓ le carbone à δ_C 147,3 ppm attribuable à C-4'.

5/ Le proton H-8 corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_C 103,3 ppm (C-4a).
- ✓ le carbone à δ_C 156,8 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ le carbone à δ_C 164 ppm attribuable à C-7.

✓ le carbone à δ_C 175,8 ppm attribuable à C-4.

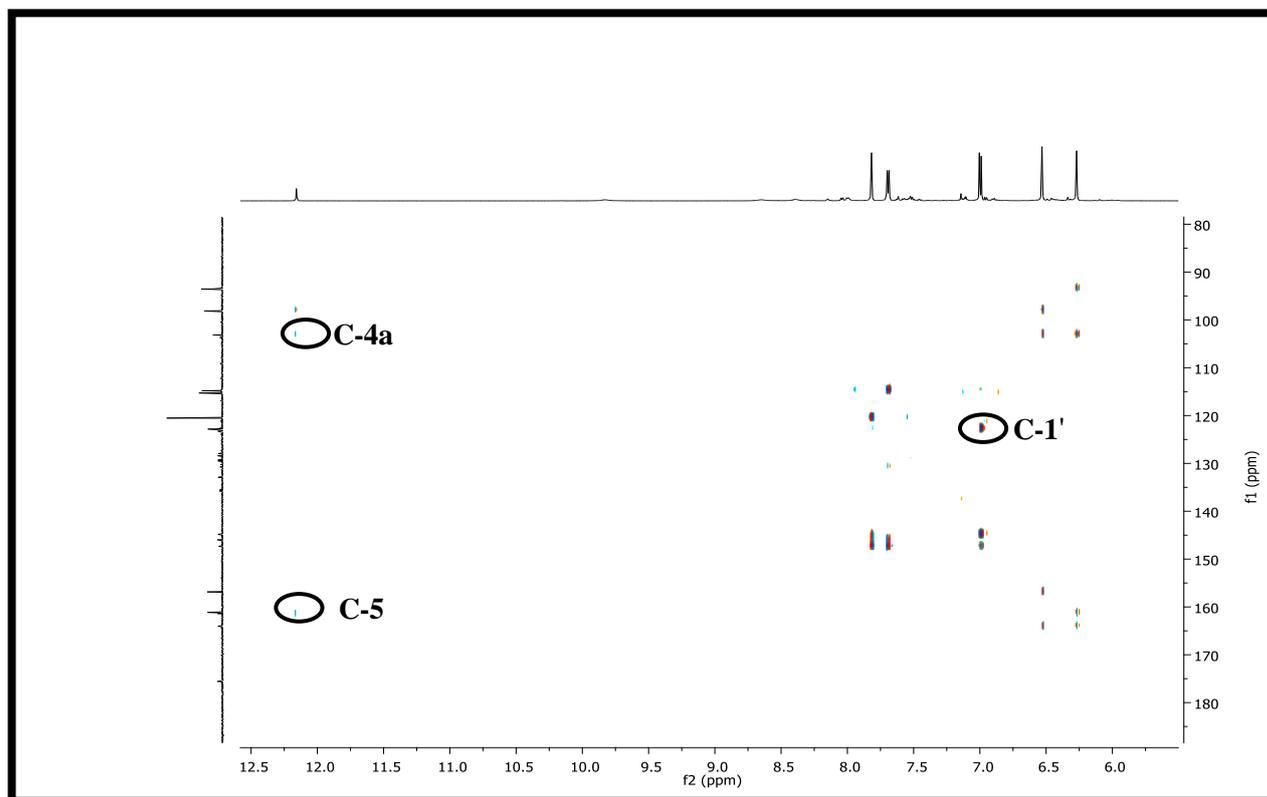


Figure III.70: Spectre HMBC du composé PA₁₂₋₂.

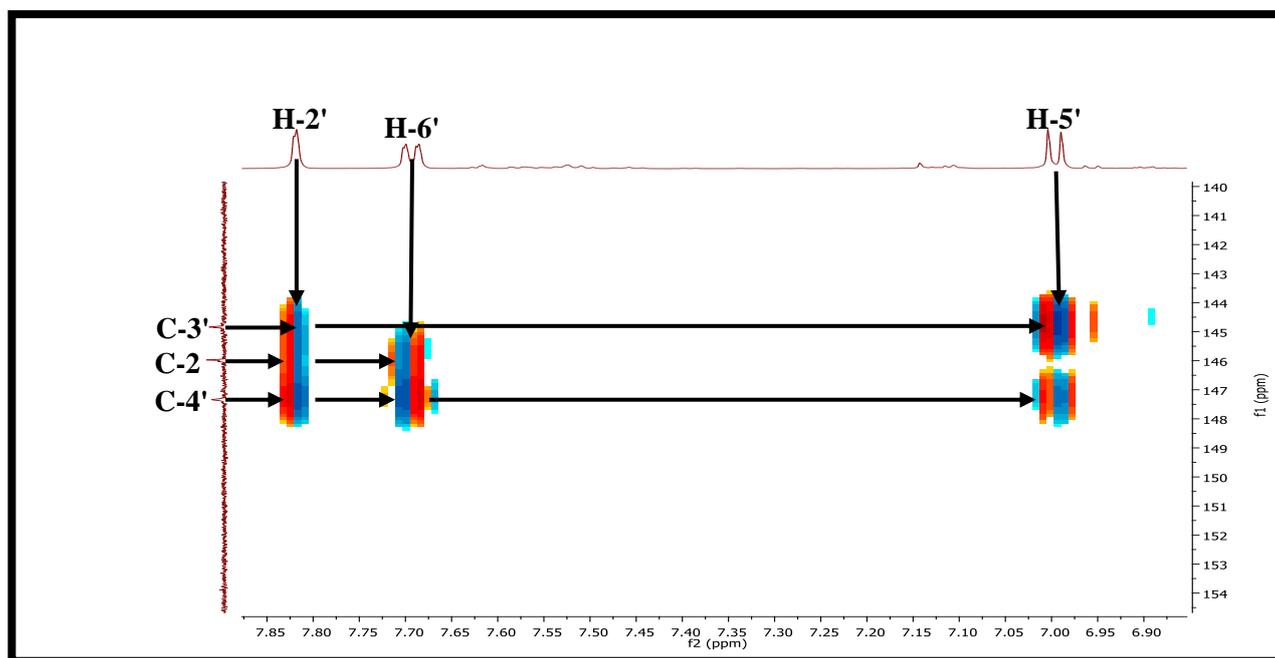


Figure III.70a: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₂₋₂.

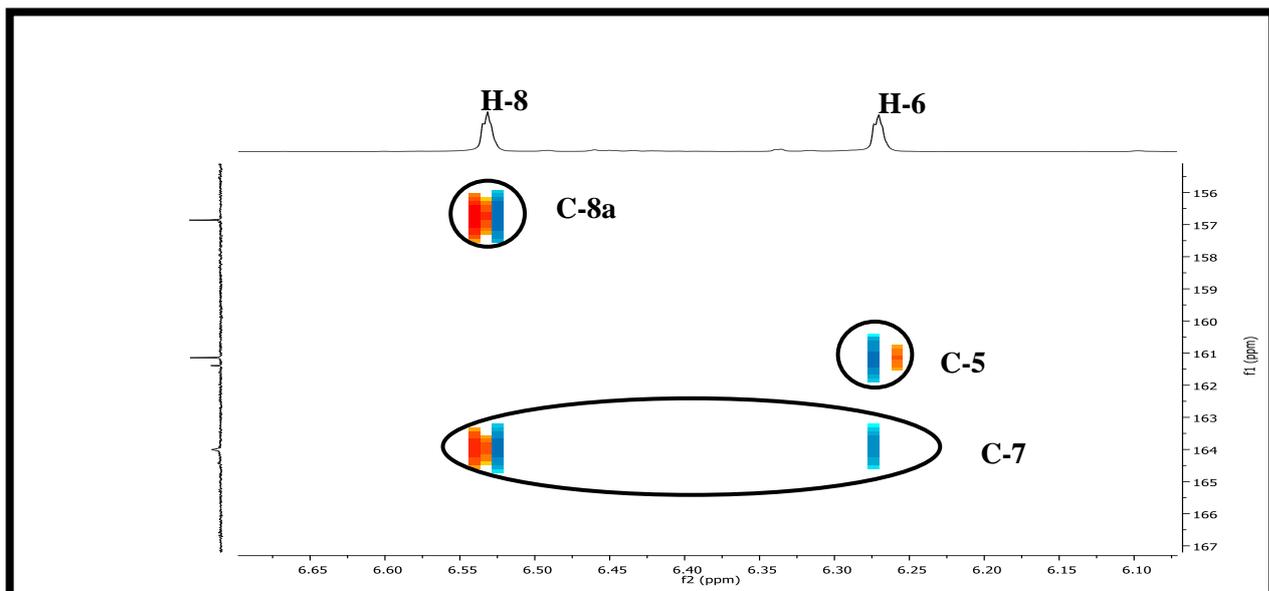


Figure III.70b: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₂₋₂.

Les valeurs des déplacements chimiques du ¹H et du ¹³C sont regroupées dans le tableau III.16.

Tableau III.16: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PA₁₂₋₂.

Numérotation de la chaîne	δ _H (ppm)	Intégration, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)
C-2	-	-	145,9
C-3	-	-	132,7
C-4	-	-	175,8
C-4a	-	-	103,3
C-5	-	-	161,3
C-6	6,27	1H, <i>d</i> (2,4)	98,1
C-7	-	-	164
C-8	6,53	1H, <i>d</i> (1,8)	93,5
C-8a	-	-	156,8
C-1'	-	-	122,9
C-2'	7,82	1H, <i>d</i> (1,8)	114,8
C-3'	-	-	144,9
C-4'	-	-	147,3
C-5'	7,00	1H, <i>d</i> (1,8)	115,3
C-6'	7,69	1H, <i>dd</i> (8,4; 1,8)	120,5

La combinaison de l'ensemble des données spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature mènent au composé : 3,3',4',5,7 – pentahydroxyflavanone connu sous le nom de quercétine [14]représentée dans la figure III.71.

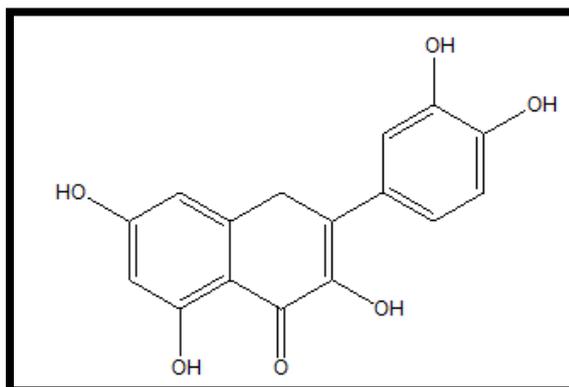


Figure III.71: Structure de la quercétine.

La quercétine a fait l'objet de douzaines de rapports scientifiques au cours de ces trente dernières années. Elle semble avoir de multiples effets bénéfiques sur la santé de l'homme tels que son utilisation comme antioxydant, anticancéreux et neuroprotecteur [15].

III.1.4.10 Elucidation structurale du composé PA₁₃ (10)

Après consultation de spectre RMN ¹H (figure III.72) et UV de ce composé, nous avons constaté une ressemblance avec le composé PA₁₂₋₁ dont l'interprétation a été donnée précédemment, nous avons alors procédé à une Co-chromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes pour les deux composés. Il s'est avéré que c'est bien le même produit connu sous le nom de **Pisoprunetine** et dont la structure est présentée dans la figure III.64.

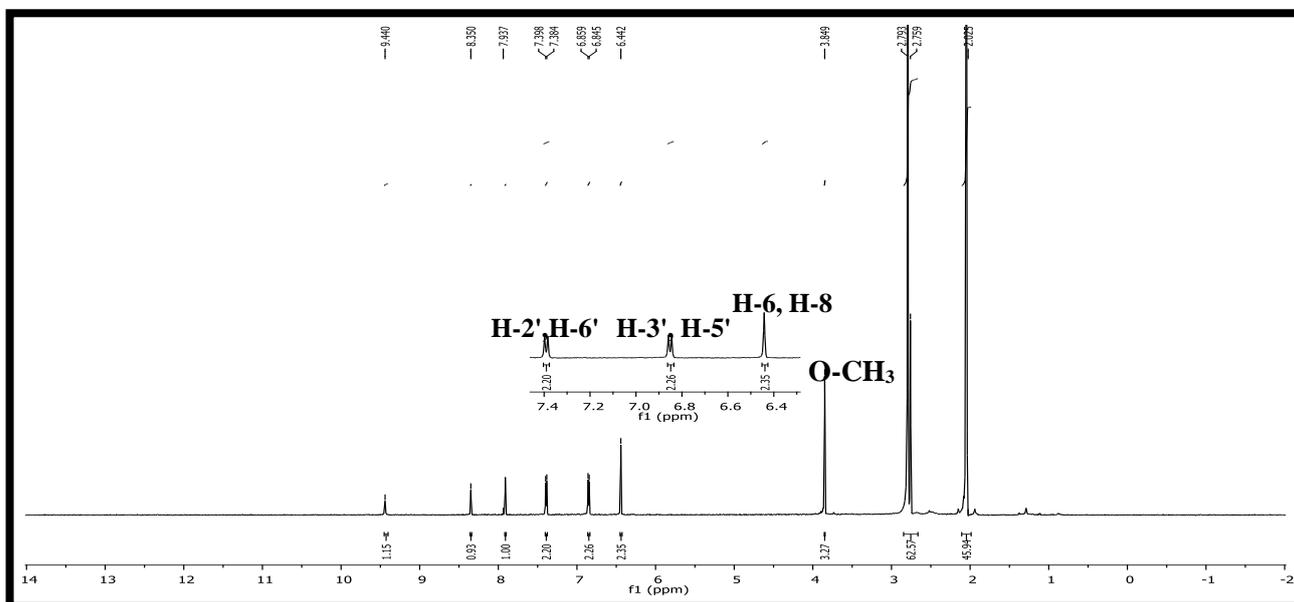


Figure III.72: Spectre RMN ¹H (acétone-*d*₆, 600 MHz) du composé PA₁₃.

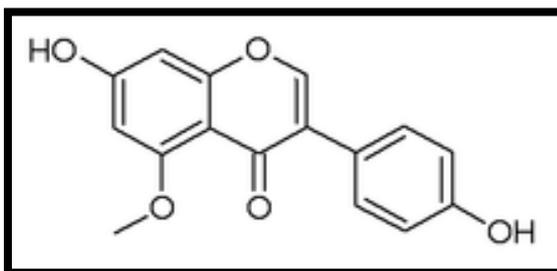


Figure III.64: Structure de l'isoprunetine.

III.1.4.11 Elucidation structurale du composé PA₁₄₋₁ (12)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PA₁₄₋₁ a été isolé sous forme d'une poudre blanche.

➤ Données spectroscopiques

D'après le chromatogramme obtenu par analyse HPLC-TOF, le composé PA₁₄₋₁ (figure III.73) apparaît au temps de rétention $T_R = 10,168$ min.

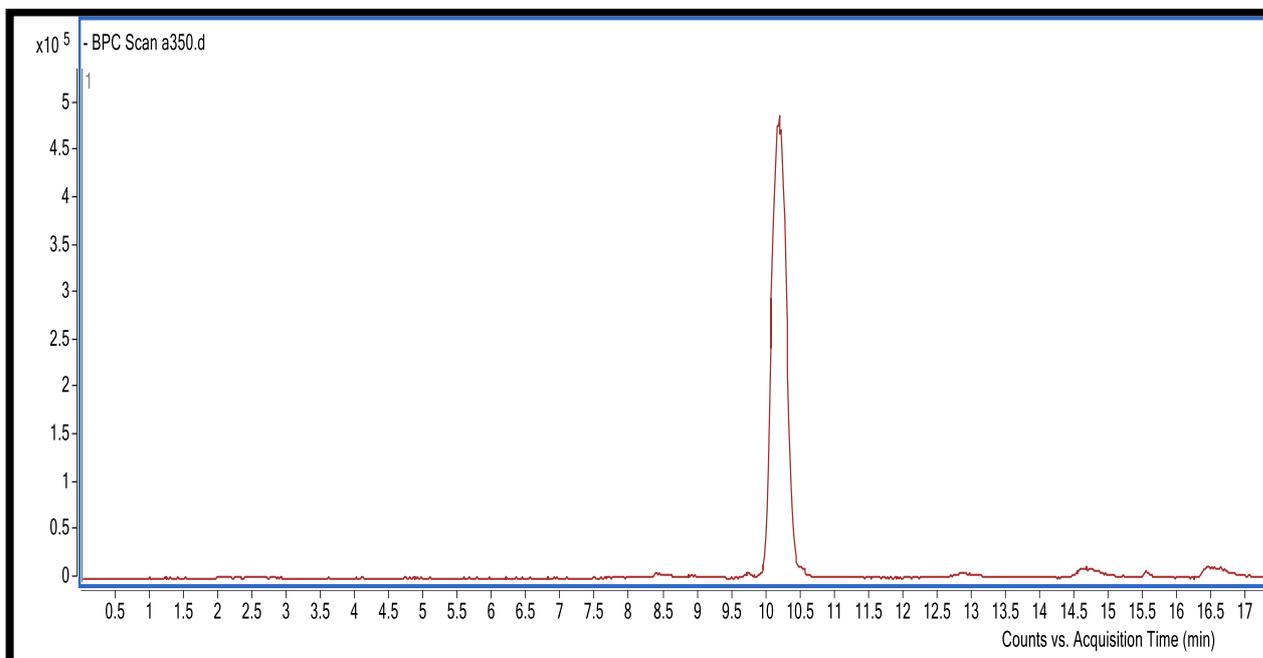


Figure III.73: Chromatogramme HPLC-TOF/MS du composé PA₁₄₋₁.

Le spectre de masse de ce composé (figure III.74) enregistré en mode électrobulisaison négatif (ESI (-)) montre un pic quasi-moléculaire à m/z 477,1071 Da correspondant à $[M-H-CH_2O_2]^-$ et un autre à m/z 431,1008 Da correspondant à $[M-H]^-$ permettant de déduire une masse de 432 Da indiquant la formule brute $C_{21}H_{20}O_{10}$ avec un nombre d'insaturation de 12.

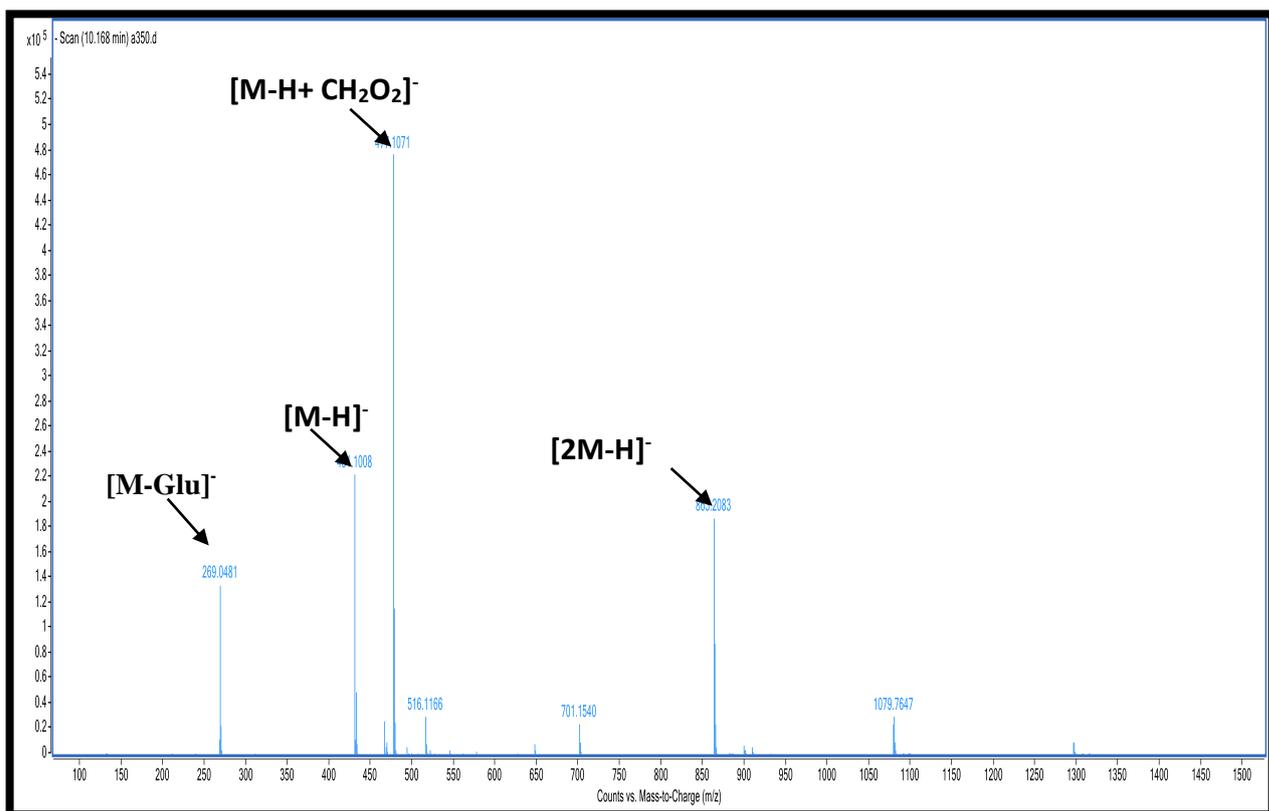


Figure III.74: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PA₁₄₋₁.

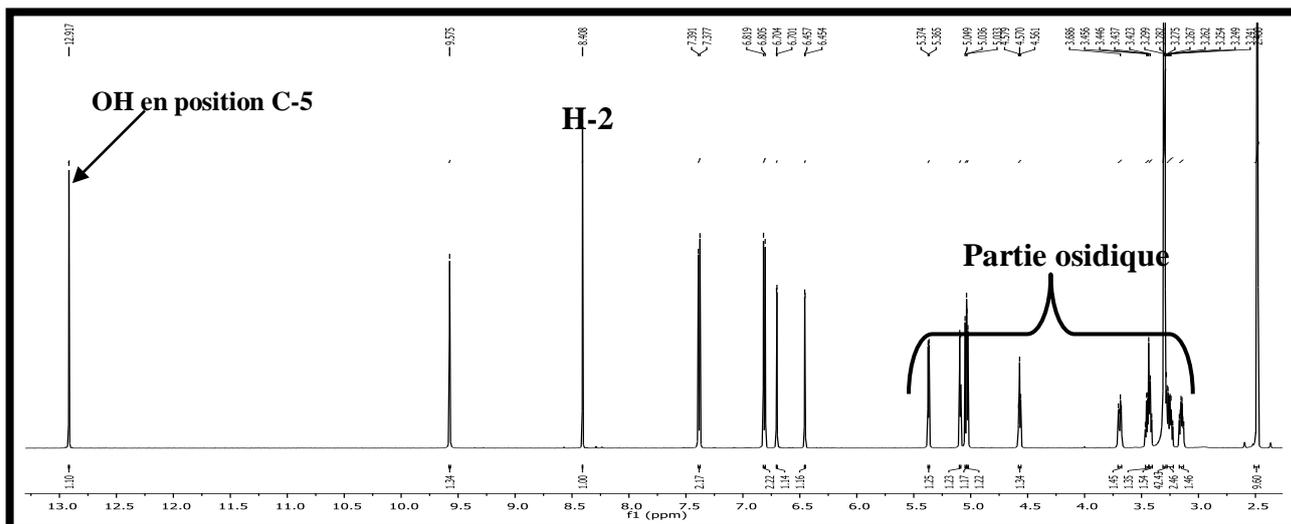
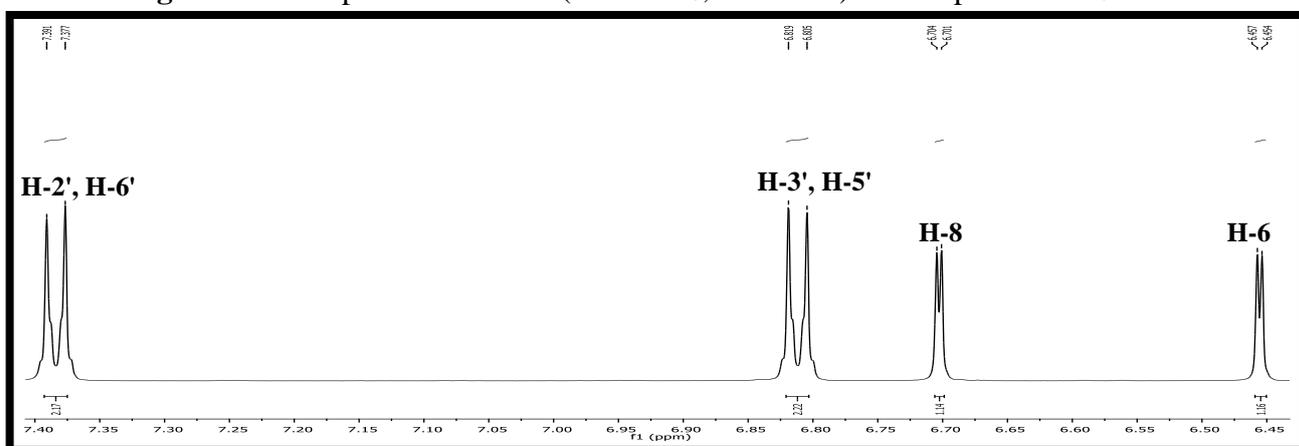
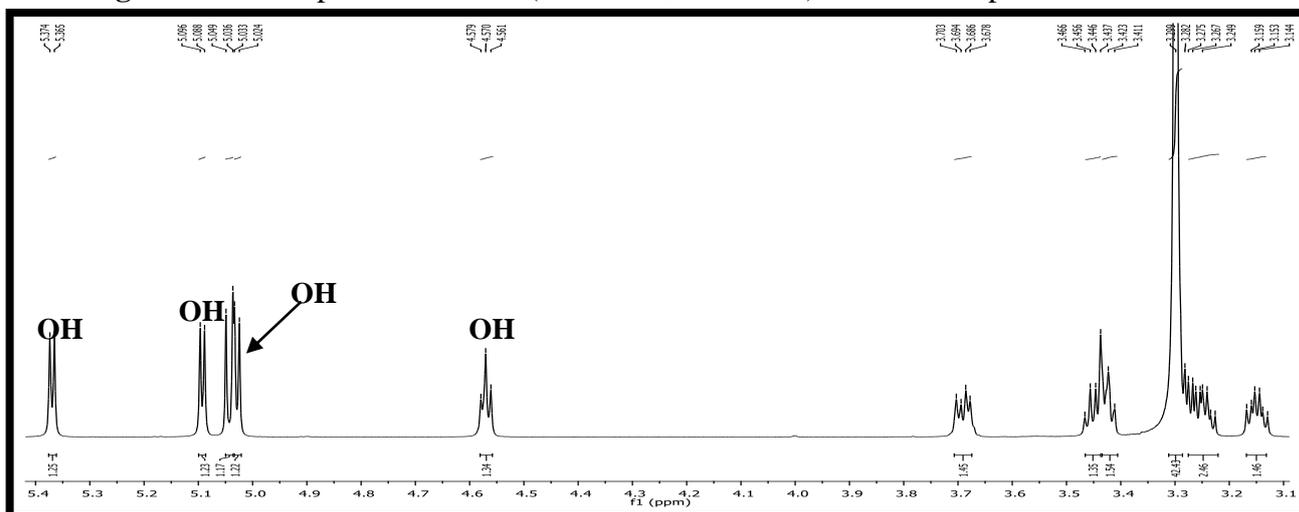
L'analyse simultanée des spectres RMN ¹H (figure III.75, figure III.75a et figure III.75b) et HSQC (figure III.76 figure III.76a et figure III.76b) enregistré dans le méthanol montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type isoflavone reconnaissable par:

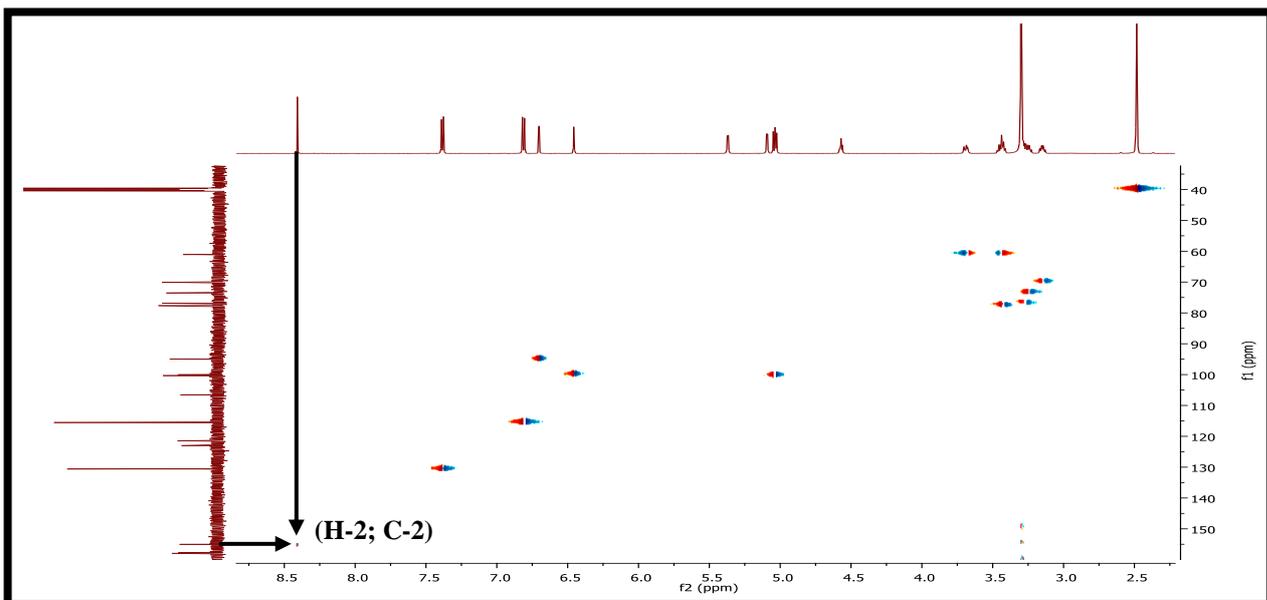
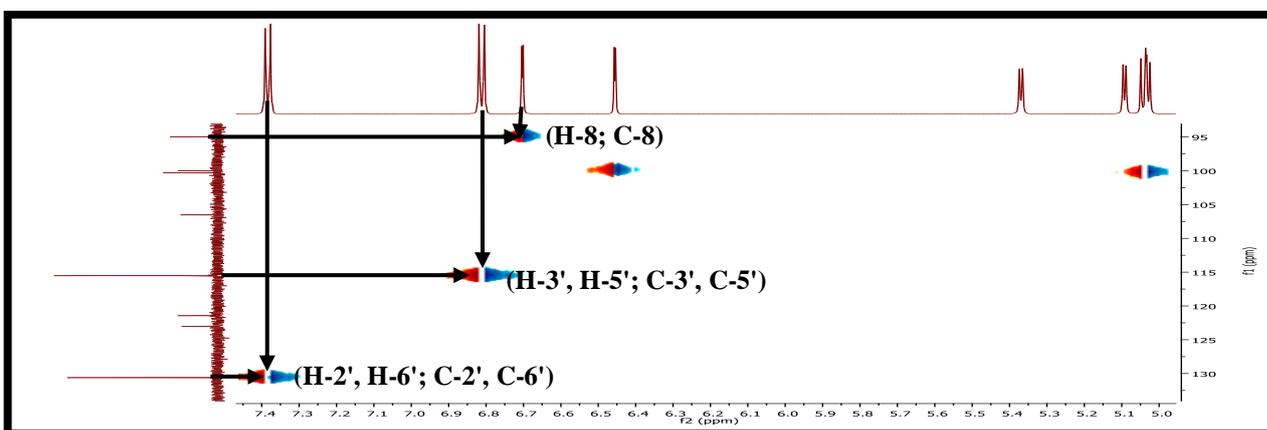
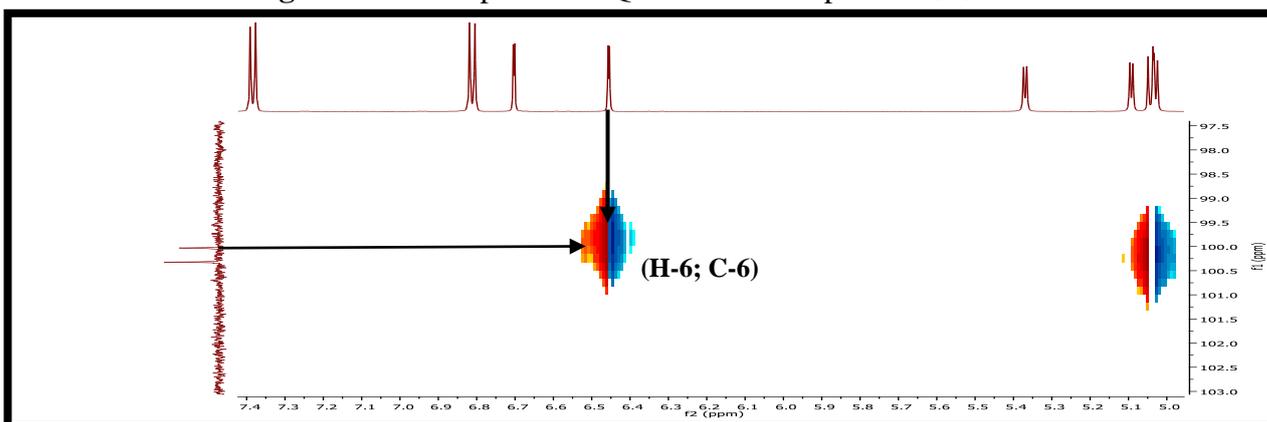
- ✓ Un singulet à δ_H 12,92 ppm caractéristique du H du OH en position C-5.
- ✓ Un singulet à δ_H 9,58 ppm ne corrèle pas sur le spectre HSQC, indiquant ainsi qu'il s'agit d'un H d'un groupement hydroxyle.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_H 8,41 ppm caractéristique du H-2 d'une isoflavone. celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 155 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 8,4$ Hz) à δ_H 7,38 ppm d'intégration 2H attribuable à H-2'et H-6' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 130,8 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 8,4$ Hz) à δ_H 6,81 ppm d'intégration 2H attribuable à H-3'et H-5' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 115,5 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 6,70 ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 95 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 6,45 ppm d'intégration 1H attribuable à H-6 corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 100 ppm.

L'ensemble de ces données indique une substitution des positions 5, 7 et 4' des cycles A et B du squelette de l'isoflavone.

Le spectre RMN ^1H montre également:

- ✓ Un signal sous forme d'un doublet ($J = 7,8$ Hz) à δ_{H} 5,04 ppm caractéristique du proton anomérique H-1" d'une entité glycosidique. Les valeurs des déplacements chimiques du proton ainsi que celle de son carbone indique que cette entité est relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ($J = 7,8$ Hz), cette entité pourrait dériver soit d'un groupement glucosyle soit d'un groupement galactosyle avec une configuration β de la liaison reliant le sucre à l'aglycone. L'ensemble de ces données mène à une structure de type isoflavone substitué en position C-5, C-7 et C-4'.
- ✓ Trois doublets d'intégration 1H chacun à δ_{H} 5,37 ppm ($J = 5,4$ Hz), δ_{H} 5,09 ppm ($J = 4,7$ Hz) et δ_{H} 5,03 ppm ($J = 5,4$ Hz) et un signal d'intégration 1H à δ_{H} 4,57 ppm sous forme d'un triplet ($J = 5,4$ Hz). Les valeurs des constantes de couplage de ces noyaux sont caractéristiques de couplages vicinaux de protons de groupements hydroxyles avec des groupements CH. Ces observations orientent vers la présence de quatre groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

Figure III.75: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA₁₄₋₁.Figure III.75a: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) étalé du composé PA₁₄₋₁.Figure III.75b: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA₁₄₋₁ (partie osidique).

Figure III.76: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₁.Figure III.76a: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₁.Figure III.76b: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₁.

Les corrélations sur le spectre COSY (figures III.77) permettent la localisation des CH et des groupements hydroxyles de la partie osidique comme suit:

- ✓ Le signal à δ_H 3,24 sous forme d'un multiplet est attribuable au proton H-2'' du sucre ppm grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1''. Cette attribution de H-2''

permet la localisation de OH-2" à δ_{H} 5,37 ppm (*d*) ($J= 5,4$ Hz) et H-3" à δ_{H} 3,27 ppm sous forme de (*m*).

- ✓ L'attribution du proton H-3" permet de localiser celle de OH-3" à δ_{H} 5,09 ppm (*d*) ($J= 4,8$ Hz) et celle de H-4" à δ_{H} 3,15 ppm sous forme d'un multiplet.
- ✓ Toujours sur le même spectre, H-4" permet de localiser OH-4" sous forme de (*d*) à δ_{H} 5,03 ppm ($J= 5,3$ Hz) et H-5" sous forme de (*m*).
- ✓ deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à δ_{H} 3,69 ppm ($J=10,3 ; 5,4$ Hz) et δ_{H} 3,45 ppm ($J=12 ; 6$ Hz) attribuables aux deux protons H-6"a, H-6"b du sucre. Cette attribution de H-6"a, H-6"b permet la localisation de OH-6" sous forme de (*t*) à δ_{H} 4,57 ppm ($J= 5,4$ Hz).

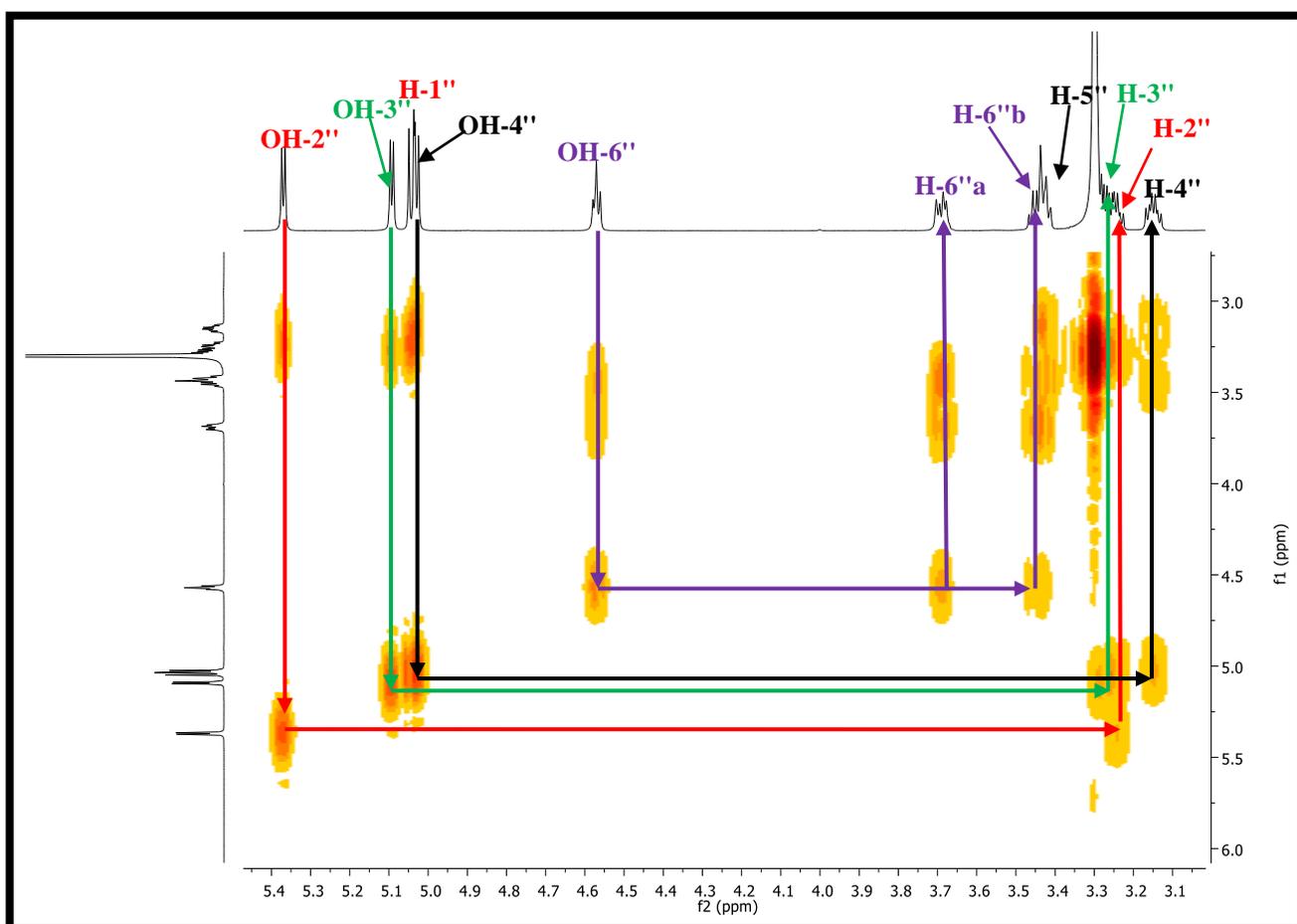


Figure III.77: Spectre COSY du composé PA₁₄₋₁.

Les corrélations des protons de la partie osidique sur le spectre HSQC (figure III.76c et figure III.76d) permet d'attribuer leurs carbones comme suit:

- ✓ Une tache de corrélation entre les deux protons H-6"a et H-6"b avec le carbone à δ_{C} 61,1 ppm attribuable à C-6".
- ✓ Le proton H-5" corrèle avec le carbone à δ_{C} 77,6 ppm attribuable à C-5".

- ✓ Le proton H-3'' corrèle avec le carbone à δ_C 76,9 ppm attribuable à C-3''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-2'' et le carbone à δ_C 73,5 ppm attribuable à C-2''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-4'' et le carbone à δ_C 70,1 ppm attribuable à C-4''.

Pour déduire la nature de l'entité osidique, une comparaison des déplacements chimiques de ses carbones avec la littérature a été établie. Cependant, l'entité osidique est déduite D-glucose par comparaison de la valeur du déplacement chimique du carbone C-3'' qui est de 76,9 ppm [9]. En effet dans le cas du galactose le C-3 est plus blindé ($\delta_C \sim 73,5$ ppm).

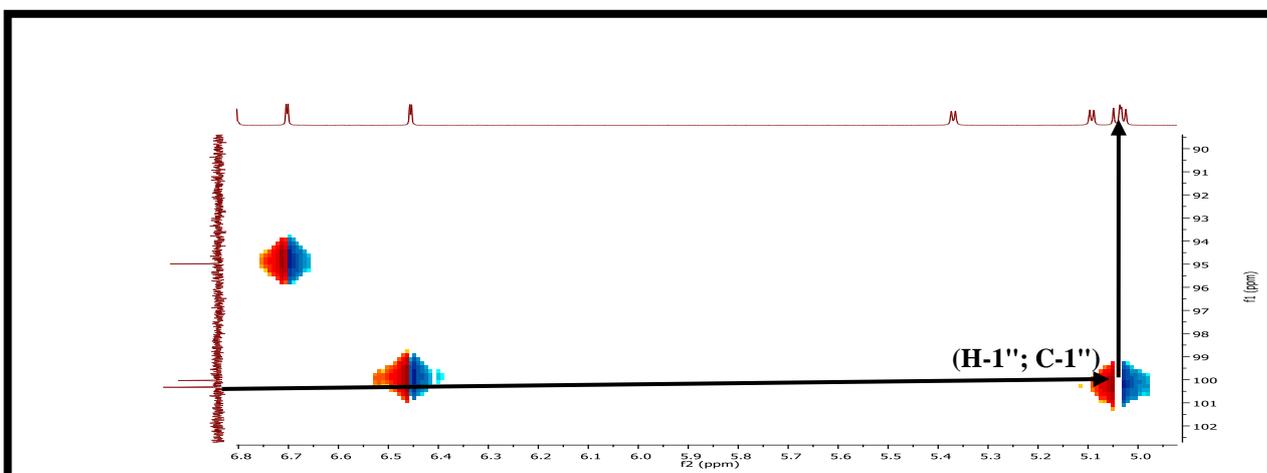


Figure III.76c: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₁.

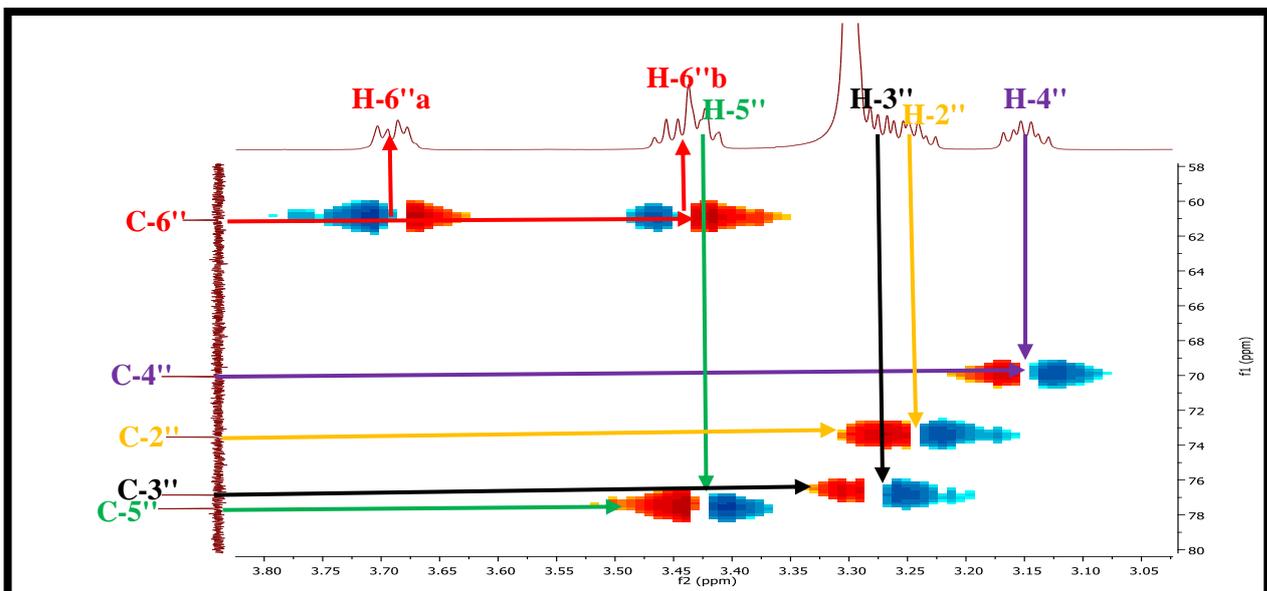


Figure III.76d: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₁.

L'étude du spectre RMN ^{13}C (figure III.78) montre la présence de 21 atomes de carbone. Par abstraction des CH et du groupement CH_2 indiqué précédemment, il reste 8C quaternaires. Ces

derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre de l'expérience bidimensionnelle HMBC.

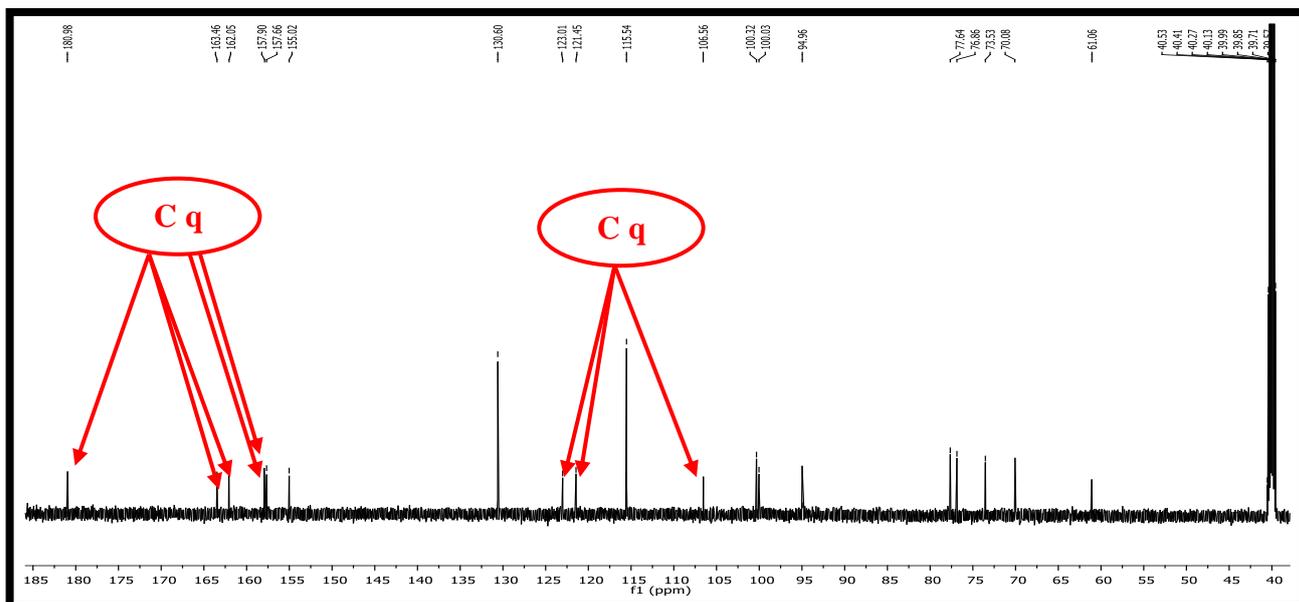


Figure III.78: Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) du composé PA₁₄₋₁.

L'analyse du spectre bidimensionnelle HMBC (figure III.79 et figure III.79a) permet d'attribuer les carbones quaternaires à leurs signaux et de positionner l'entité osidique à l'aide de la corrélation H-C à longue distance ($2J$, $3J$ et $4J$) comme suit:

1/ Le proton du groupement hydroxyle en position 5 corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 106,6 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ le carbone à δ_{C} 162,1 ppm attribuable à C-5.

2/ le deuxième groupement hydroxyle présent dans la molécule montre une tache de corrélation avec les deux carbone à δ_{C} 115,5 ppm attribué précédemment aux deux protons H-3' et H-5', cela permet de positionner ce groupement sur le carbone C-4'.

3/ Le proton H-2 présente des taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 123 ppm attribuable à C-3.
- ✓ le carbone à δ_{C} 121,5 ppm attribuable à C-1'.
- ✓ le carbone à δ_{C} 157,8 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ le carbone à δ_{C} 181 ppm attribuable à C-4.

4/ les deux protons H-2' et H-6' corrèlent avec les deux carbones à δ_{C} 158 ppm attribuable à C-4' et à δ_{C} 123 ppm (C-3).

5/ les deux protons H-3' et H-5' corrèlent avec les deux carbones à δ_{C} 158 ppm attribuable à C-4' et à δ_{C} 121,5 ppm (C-1').

6/ le proton H-8 montre des taches de corrélation avec les carbones à δ_C 163,5 ppm attribuable à C-7, à δ_C 106,6 ppm (C-4a) et à δ_C 157,8 ppm (C-8a).

7/ le proton H-6 montre des taches de corrélation avec les deux carbones à δ_C 162,1 ppm (C-5) et à δ_C 106,6 ppm (C-4a).

8/ le proton H-1'' montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 163,5 ppm attribué précédemment au C-7, cela permet de positionner l'entité osidique sur le carbone C-7

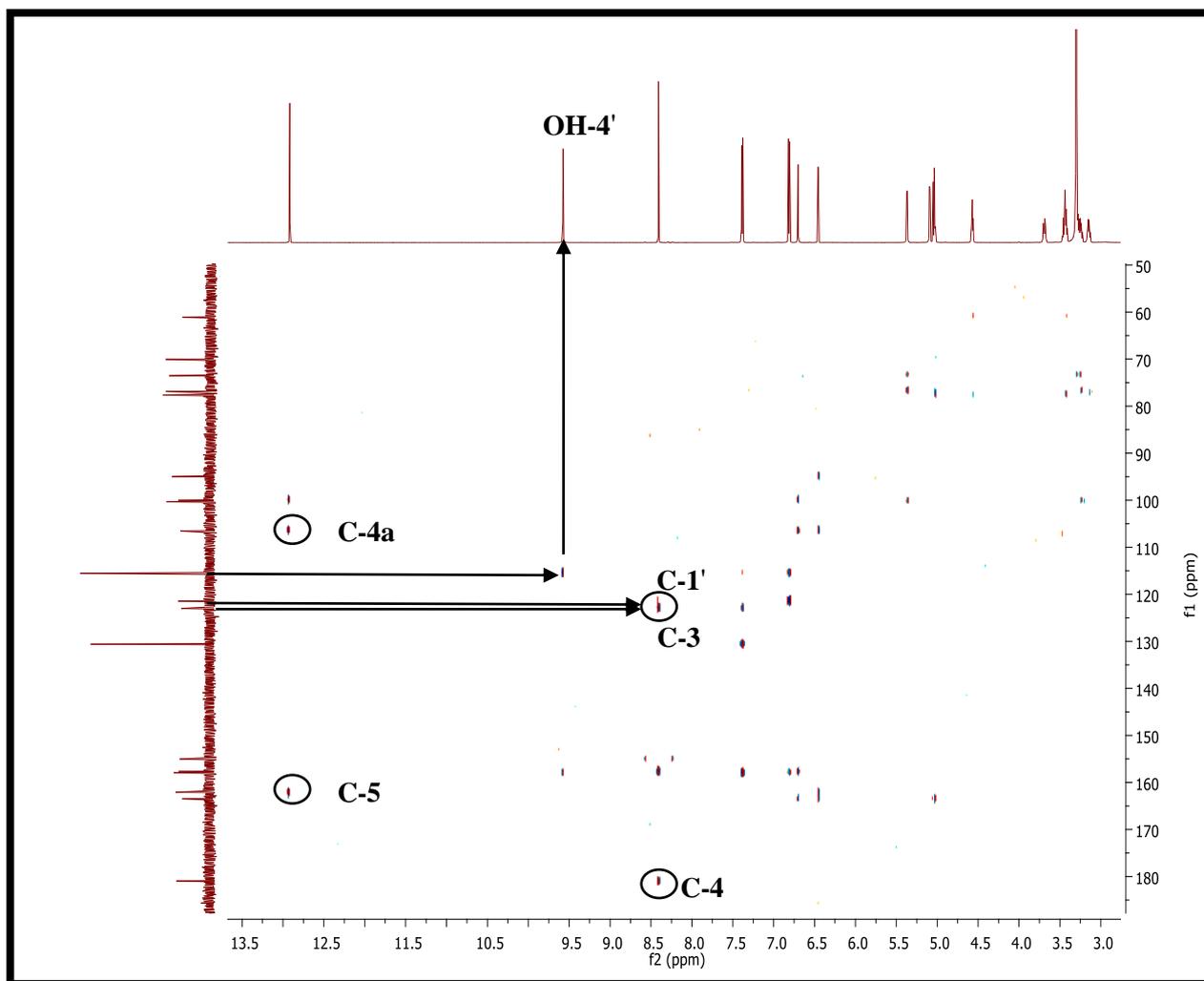
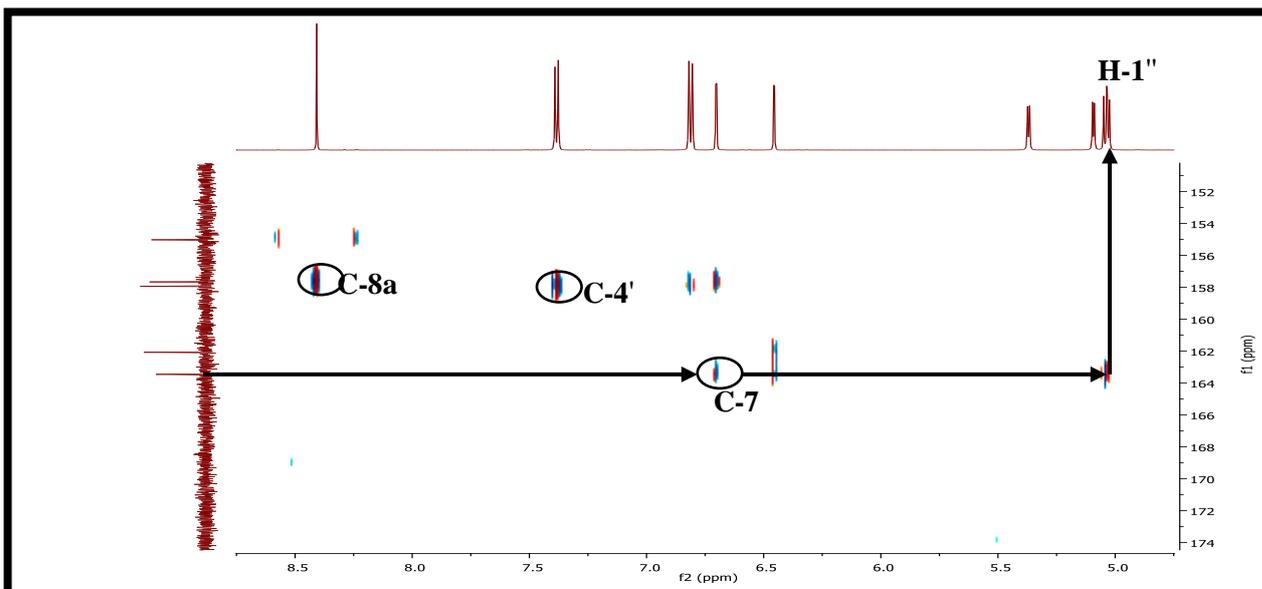


Figure III.79: Spectre HMBC du composé PA₁₄₋₁.

Figure III.79a: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₄₋₁.

Les valeurs des déplacements chimiques du ¹H et du ¹³C sont regroupées dans le tableau III.17.

Tableau III.17: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PA₁₄₋₁.

Numérotation de la chaîne	δ_H (ppm)	Intégration, m, J (Hz)	δ_C (ppm)
C-2	8,41	1H, <i>s</i>	155
C-3	-	-	123
C-4	-	-	181
C-4a	-	-	106,6
C-5	12,92 (OH)	1H, <i>s</i>	162,1
C-6	6,45	1H, <i>d</i> (1,8)	100
C-7	-	-	163,5
C-8	6,7	1H, <i>d</i> (1,8)	95
C-8a	-	-	157,8
C-1'	-	-	121,5
C-2', C-6'	7,38	2H, <i>d</i> (8,4)	130,8
C-3', C-5'	6,81	2H, <i>d</i> (8,4)	115,5
C-4'	9,58 (OH)	-	158
C-1''	5,04	1H, <i>d</i> (7,8)	100,3
C-2''	3,24	1H, <i>m</i>	73,5
C-3''	3,27	1H, <i>m</i>	76,9
C-4''	3,14	1H, <i>m</i>	70,1
C-5''	3,43	1H, <i>m</i>	77,6
C-6''a	3,69	1H, <i>dd</i> (10,3; 5,4)	61,1
C-6''b	3,45	1H, <i>dd</i> (12; 6)	61,1
OH-2''	5,37	1H, <i>d</i> (5,4)	-
OH-3''	5,09	1H, <i>d</i> (4,8)	-
OH-4''	5,03	1H, <i>d</i> (5,3)	-
OH-6''	4,57	1H, <i>t</i> (5,4)	-

La combinaison de l'ensemble des données spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature mènent au composé Génistéine-7-O- β -glucoside connu sous le nom de génistine [16] représentée dans la figure III.80

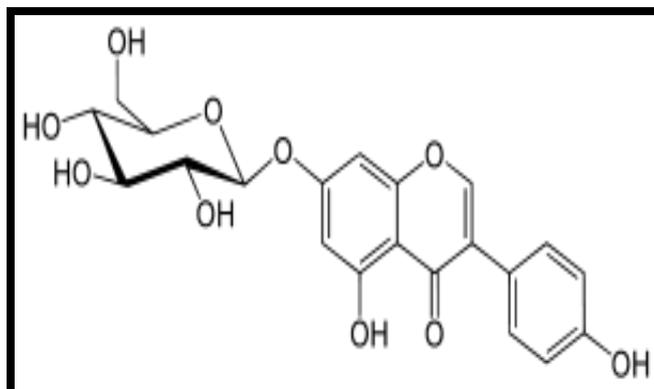


Figure III.80: Structure de composé PA₁₄₋₁.

III.1.4.12 Elucidation structurale du composé PA₁₄₋₂ (13)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé PA₁₄₋₂ se présente sous forme d'une poudre jaune.

➤ Données spectroscopiques

Une observation des signaux des spectres RMN ¹H et ¹³C orientent vers une structure de type flavonoïde glycosylé pour le composé PA₁₄₋₂.

L'analyse simultanée du spectre RMN ¹H (figure III.81, figure III.81a et figure III.81b) et le spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.82 et figure III.82a) enregistré dans DMSO montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonol reconnaissable par:

- ✓ Un singulet à δ_H 12,61 ppm, attribuable à un OH en position C-5.
- ✓ Trois singulets larges à δ_H 10,80 ppm, 9,66 ppm et 9,18 ppm d'intégration 1H chacun et ne présentent aucune corrélation sur le spectre HSQC, cela permet d'attribuer ces protons à trois groupements hydroxyles présents dans la molécule.
- ✓ Un doublet ($J=2,4$ Hz) à δ_H 6,38 ppm d'intégration 1H et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 93,9 ppm attribuables à H-8 et C-8 respectivement.
- ✓ Un doublet ($J=2,4$ Hz) à δ_H 6,18 ppm d'intégration 1H et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 99 ppm attribuable à H-6 et C-6 respectivement.
- ✓ Un multiplet à δ_H 7,56 ppm d'intégration 2H. ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les deux carbones à δ_C 122 ppm et 116,6 ppm. Cela permet de dire que ces deux protons sont des protons aromatiques portés par deux carbones différents.
- ✓ Un doublet ($J=9$ Hz) à δ_H 6,82 ppm d'intégration 1H et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 115,6 ppm. La constante de couplage de ce proton montre qu'il

sagit d'un couplage ortho. Cette remarque est confirmée par la tache de corrélation de ce proton avec l'un des deux protons du multiplet à δ_H 7,56 ppm sur le spectre homonucléaire COSY.

Les trois derniers protons sont en faveur d'un cycle B tri-substitué en 1', 3' et 4'.

A ce stade de cette analyse, la structure de la molécule est déduite comme étant un flavonol de type quercétine substitué en position 3.

Le spectre RMN 1H montre également:

- ✓ Un signal sous forme d'un doublet ($J= 7,2$ Hz) à δ_H 5,44 ppm attribuable au proton anomérique H-1" d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. La valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique avec son voisin oriente vers une entité qui pourrait dériver soit d'un glucosyle soit d'un galactosyle avec une configuration β de la liaison reliant le sucre à l'aglycone.
- ✓ quatre singulets larges d'intégration 1H chacun à δ_H 5,24 ppm, 5,02 ppm, 4,90 ppm et 4,22 ppm. Ces protons ne corrélient pas sur le spectre HSQC ce qui permet de déduire la présence de quatre groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

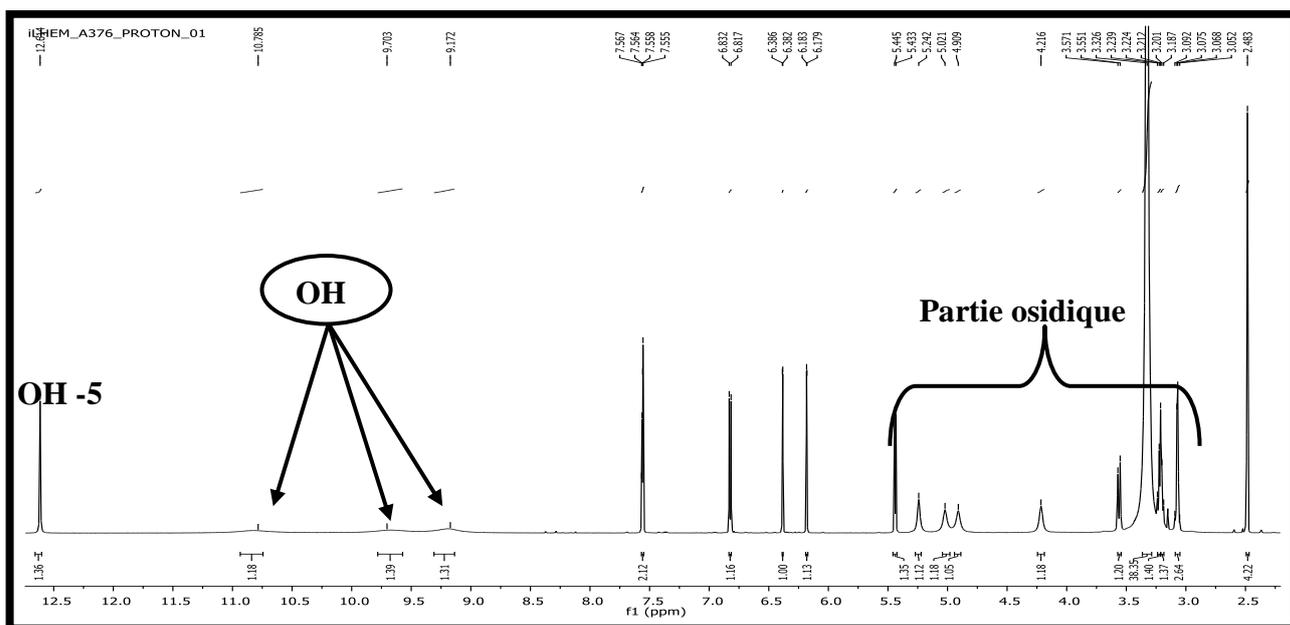


Figure III.81: Spectre RMN 1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA₁₄₋₂.

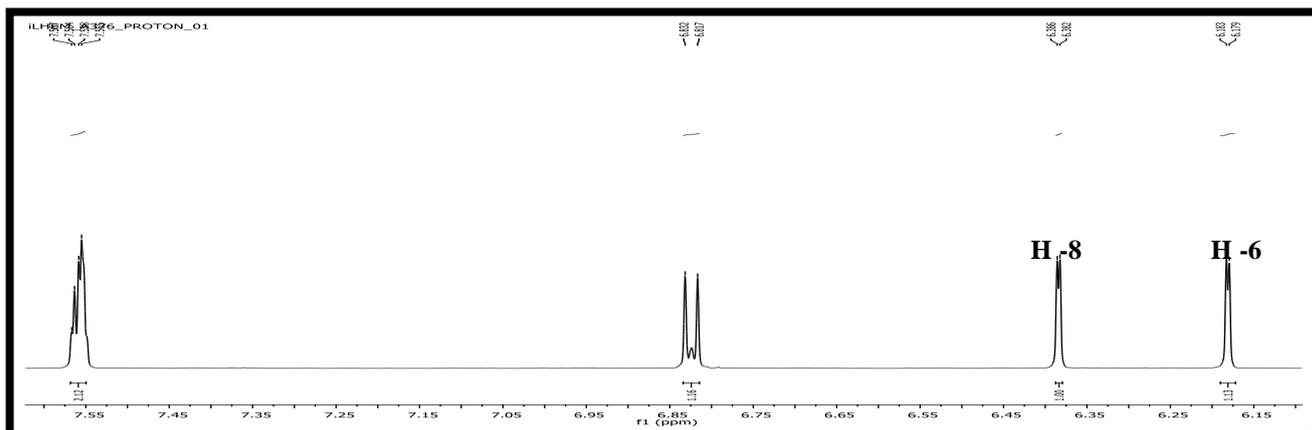


Figure III.81a: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) étalé du composé PA $_{14-2}$.

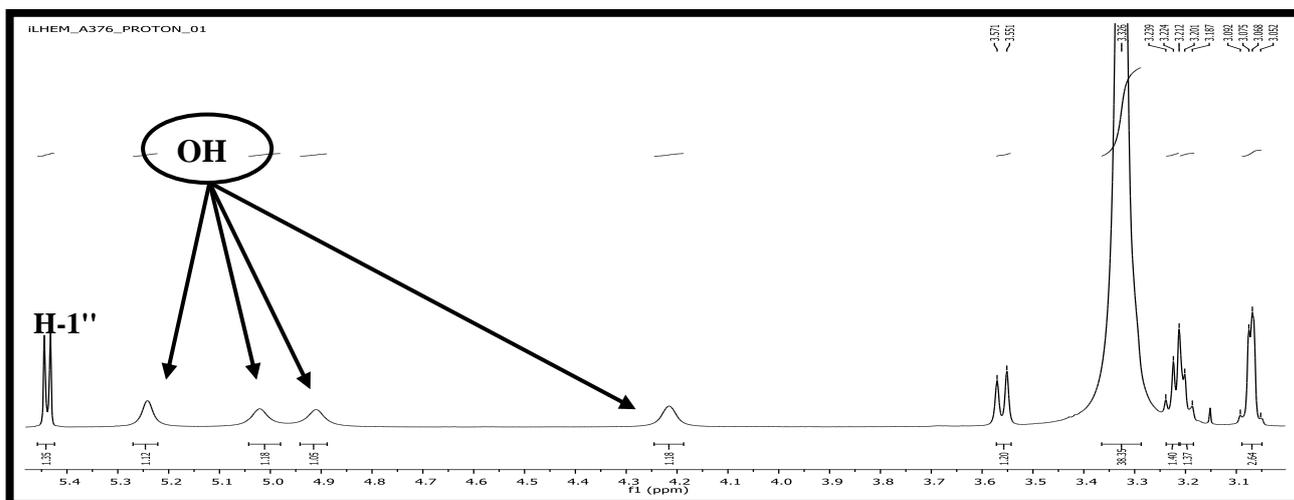


Figure III.81b: Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) du composé PA $_{14-2}$. (partie osidique).

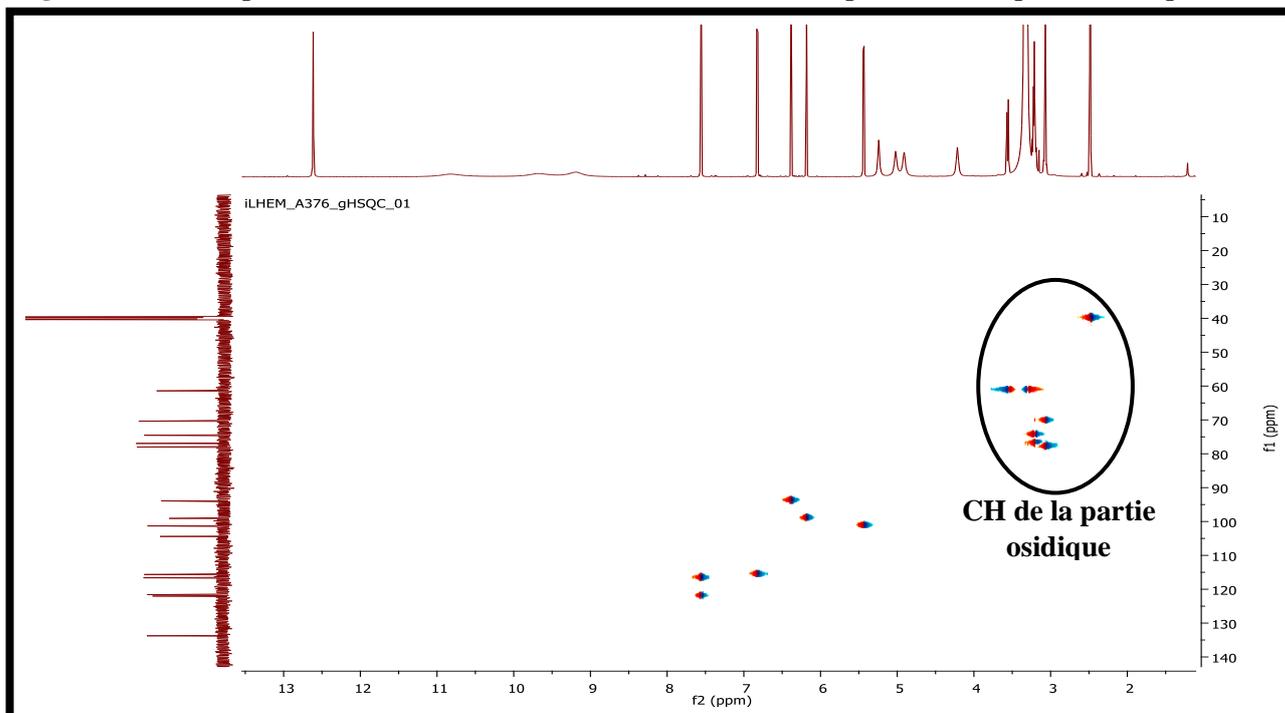


Figure III.82: Spectre HSQC du composé PA $_{14-2}$.

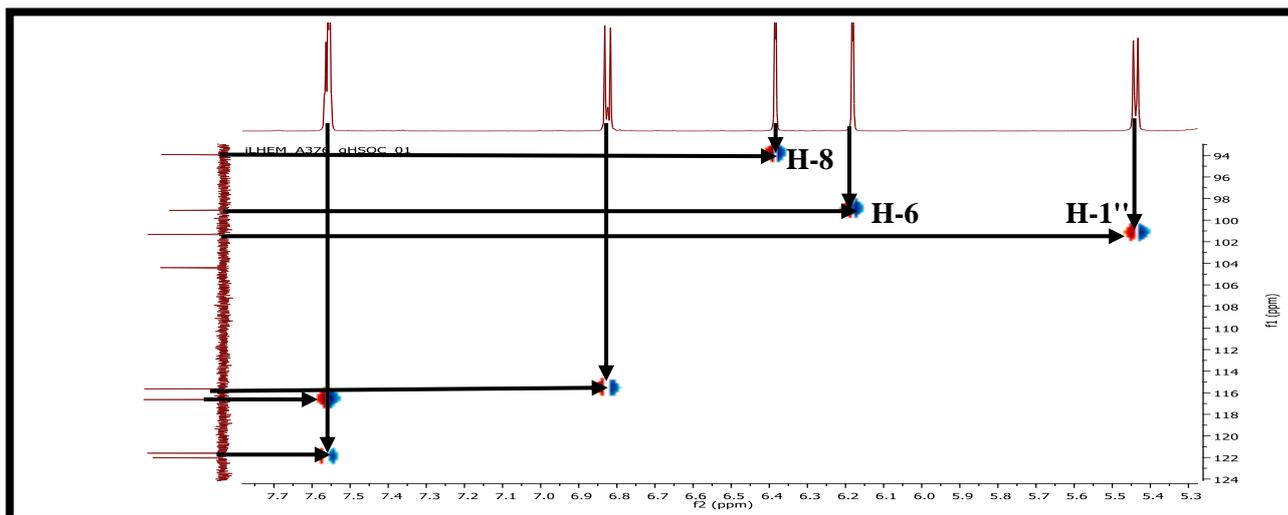
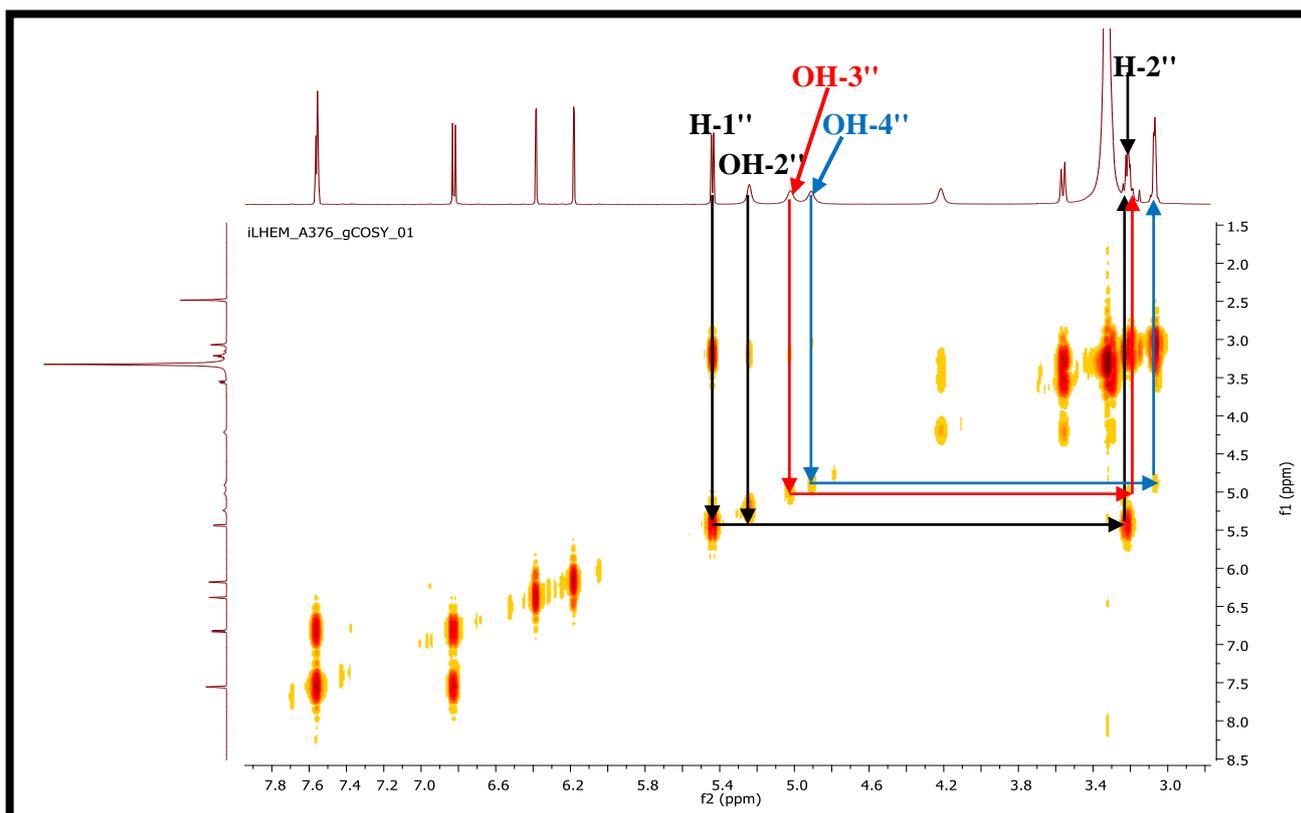
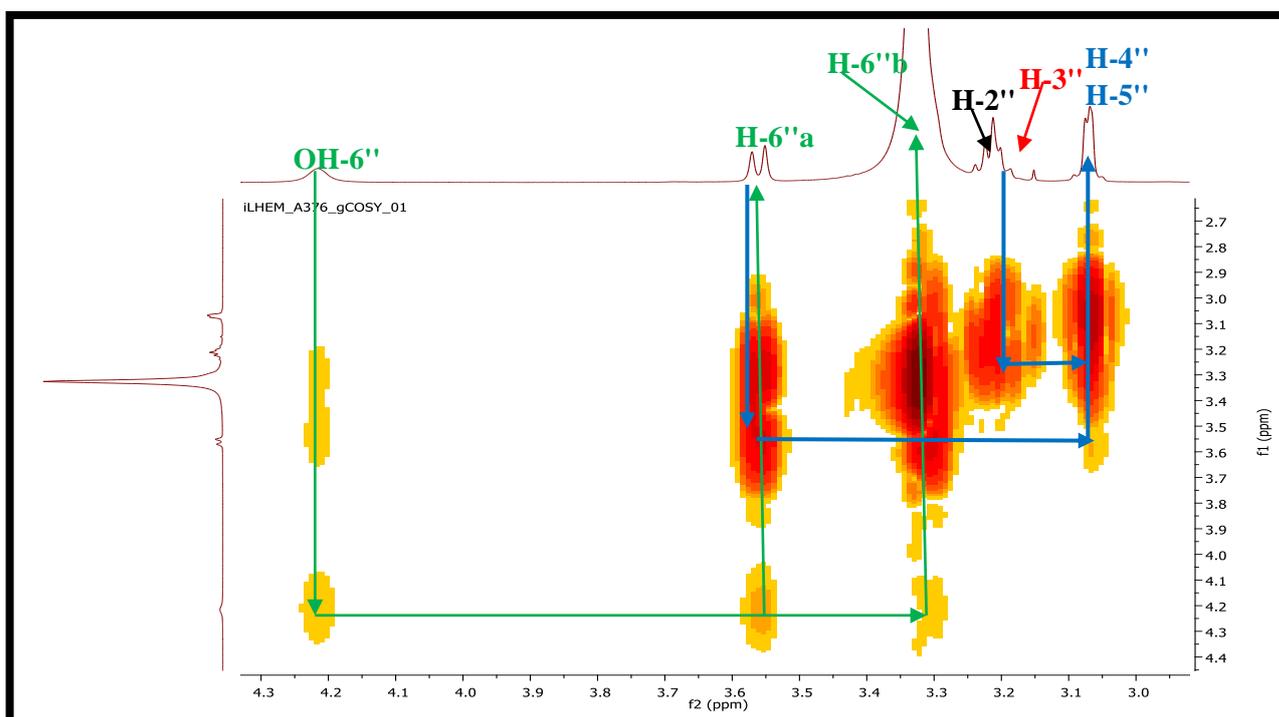


Figure III.82a: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₂.

Les corrélations sur le spectre COSY (figure III.83 et figure III.83a) permet la localisation des CH et des groupements hydroxyles de la partie osidique ainsi que les CH aromatiques du cycle B comme suit:

- ✓ le proton sous forme d'un doublet à δ_H 6,82 ppm montre une tache de corrélation avec l'un des deux protons sous forme d'un multiplet à δ_H 7,56 ppm ce qui permet d'attribuer ce proton au C-5' et les deux protons à C-2' et C-6'.
- ✓ le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec le proton sous forme d'un triplet ($J = 7,8$ Hz) à δ_H 3,22 ppm attribuable à H-2''. Cette attribution permet la localisation de OH-2'' (s) à δ_H 5,24 ppm
- ✓ le proton H-2'' montre une tache de corrélation avec le proton sous forme d'un triplet ($J = 7,8$ Hz) à δ_H 3,20 ppm attribuable à H-3''. L'attribution de proton H-3'' permet de localiser celle de OH-3'' (s) à δ_H 5,02 ppm.
- ✓ le proton H-3'' montre une tache de corrélation avec l'un des deux protons sous forme d'un doublet ($J = 4,2$ Hz) à δ_H 3,07 ppm attribuable à H-4''. L'attribution ce proton permet de localiser celle de OH-4'' (s) à δ_H 4,91 ppm. Le deuxième proton est attribuable à H-5''.
- ✓ Le proton à δ_H 3,56 ppm sous forme d'un doublet ($J = 11,5$ Hz) montre une tache de corrélation avec le proton H-5''. Donc on peut attribuer ce proton à H-6''a.
- ✓ Ce dernier (H-6''a) montre une tache de corrélation avec le proton à δ_H 4,22 ppm attribuable à OH-6''. Le signal du proton H-6''b est recouvert par les signaux du solvant à δ_H 3,33 ppm

Les grandes valeurs des constantes de couplage des protons osidiques indiquent que l'entité sucre n'est autre que le glucose.

Figure III.83: Spectre COSY du composé PA₁₄₋₂.Figure III.83a: Spectre COSY étalé du composé PA₁₄₋₂.

Les corrélations des protons de la partie osidique sur le spectre HSQC (figure III.102c) permet d'attribuer leurs carbones comme suit:

- ✓ Une tache de corrélation entre les deux protons H-6''a et H-6''b et le carbone à δ_C 61,4 ppm attribuable à C-6''.
- ✓ Le proton H-5'' corrèle avec le carbone à δ_C 78 ppm attribuable à C-5''.
- ✓ Le proton H-3'' corrèle avec le carbone à δ_C 77 ppm attribuable à C-3''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-2'' et le carbone à δ_C 74,5 ppm attribuable à C-2''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-4'' et le carbone à δ_C 70,4 ppm attribuable à C-4''.

D'après la valeur de déplacement chimique du carbone C-3'' (δ_C 77 ppm) avec la littérature [9], l'entité osidique est définie comme étant le O- β -glucose.

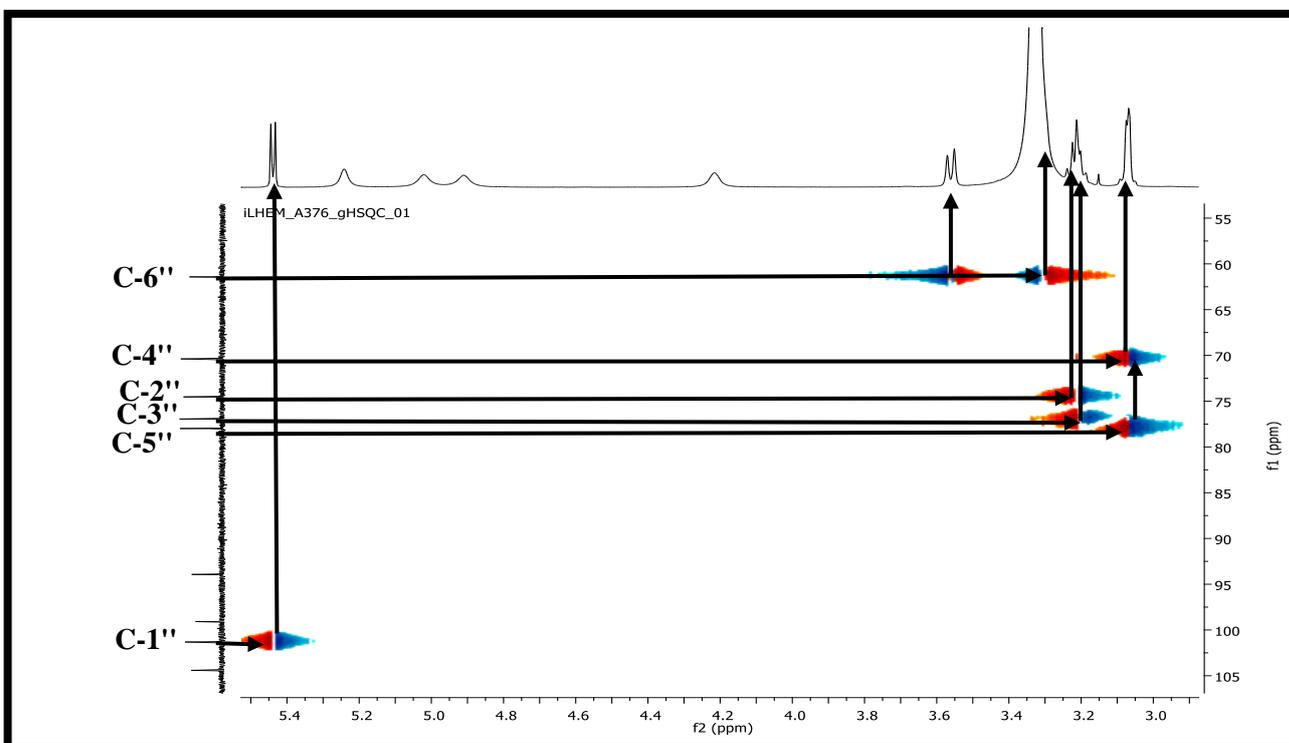


Figure III.82b: Spectre HSQC étalé du composé PA₁₄₋₂.

L'étude du spectre RMN ^{13}C (figure III.84) montre la présence de 21 atomes de carbone parmi lesquelles les 6 C osidiques sont facilement repérer dont 5C se trouvent dans la zone 60-77 ppm en plus du carbone anomérique à δ_C 101,3 ppm. Par abstraction des CH et de la génine indiqué précédemment, il reste 10 C quaternaires. Ces derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre HMBC.

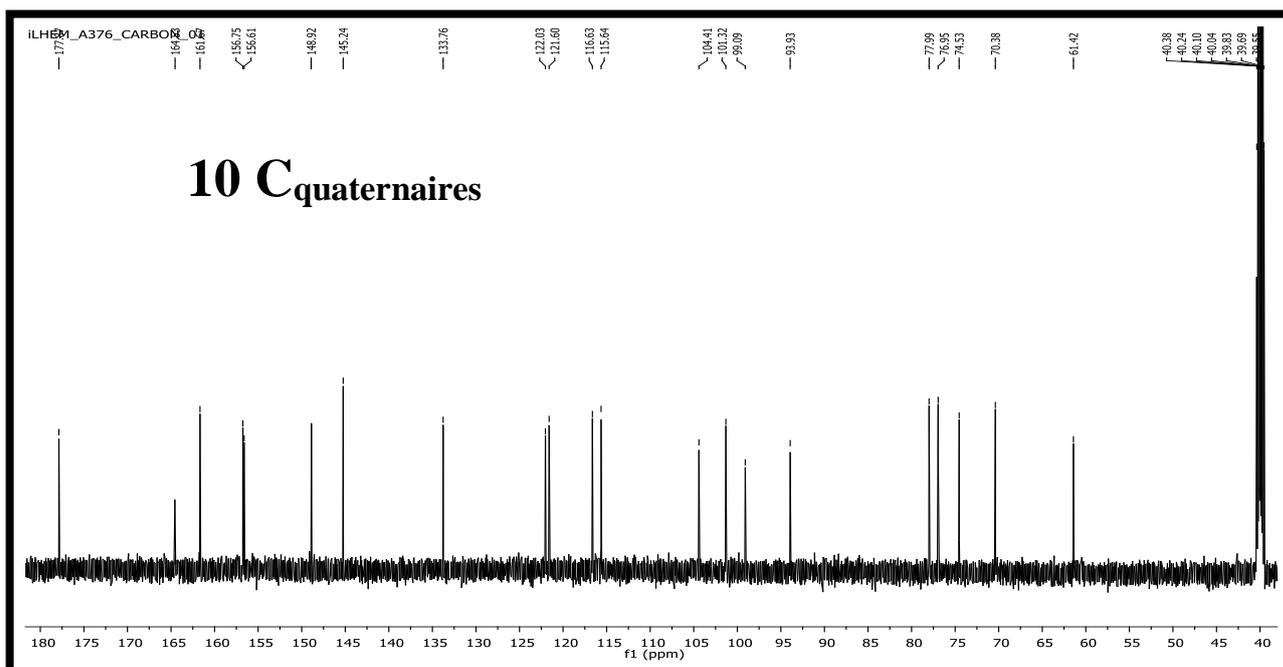


Figure III.84: Spectre de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) du composé PA₁₄₋₂.

L'analyse du spectre RMN bidimensionnelle HMBC (figure III.85a, figure III.85b et figure III.85c) permet d'attribuer les carbones quaternaires à leurs déplacements chimiques et de positionner l'entité osidique à l'aide de la corrélation H-C à longue distance ($3J$ et $4J$) comme suit:

1/ Le proton du groupement hydroxyle en position 5 corrèle avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 104,4 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ le carbone à δ_{C} 161,6 ppm attribuable à C-5.

2/ Les deux protons H-2' et H-6' présente les taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 145,2 ppm attribuable à C-3'.
- ✓ le carbone à δ_{C} 148,9 ppm attribuable à C-4'.
- ✓ le carbone à δ_{C} 156,6 ppm attribuable à C-2.

3/ Le proton H-5' présente les taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 121,6 ppm attribuable à C-1'.
- ✓ le carbone à δ_{C} 145,2 ppm (C-3').
- ✓ le carbone à δ_{C} 148,9 ppm (C-4').

4/ le proton H-8 montre les taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_{C} 156,8 ppm attribuable à (C-8a).
- ✓ le carbone à δ_{C} 104,4 ppm (C-4a).
- ✓ le carbone à δ_{C} 164,5 ppm attribuable à C-7.
- ✓ le carbone à δ_{C} 177,9 ppm attribuable à C-4.

5/ le proton H-6 montre des taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_C 161,6 ppm (C-5).
- ✓ le carbone à δ_C 104,4 ppm (C-4a).
- ✓ le carbone à δ_C 164,5 ppm (C-7).

6/ le proton H-1" montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 133,8 ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3, cela permet de lier la partie osidique au carbone C-3.

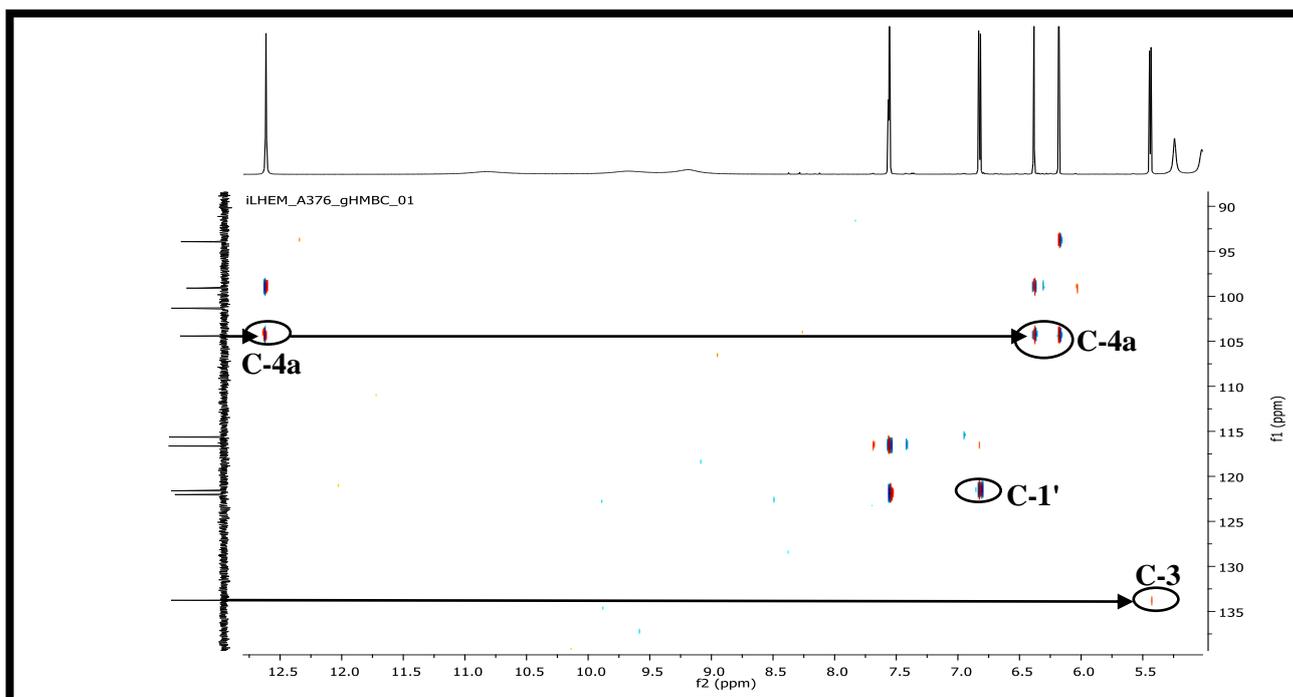


Figure III.85a: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₄₋₂.

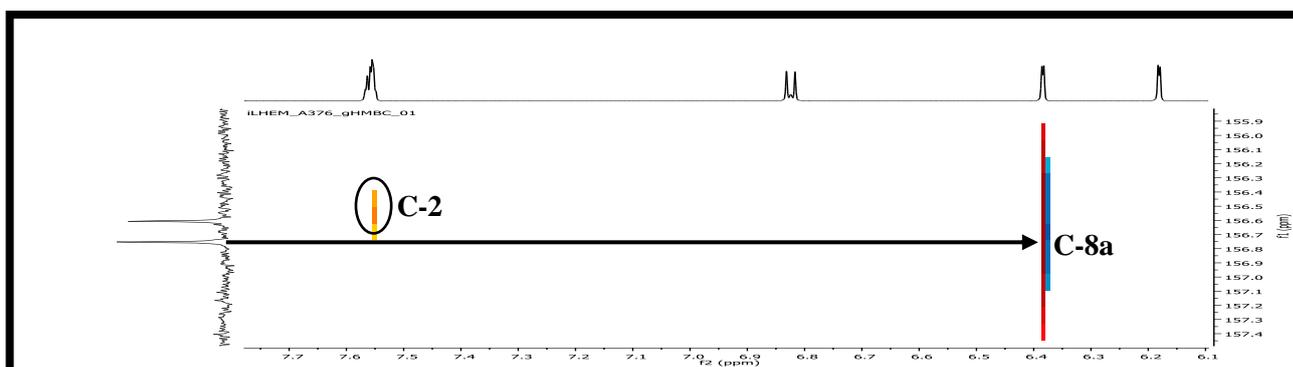
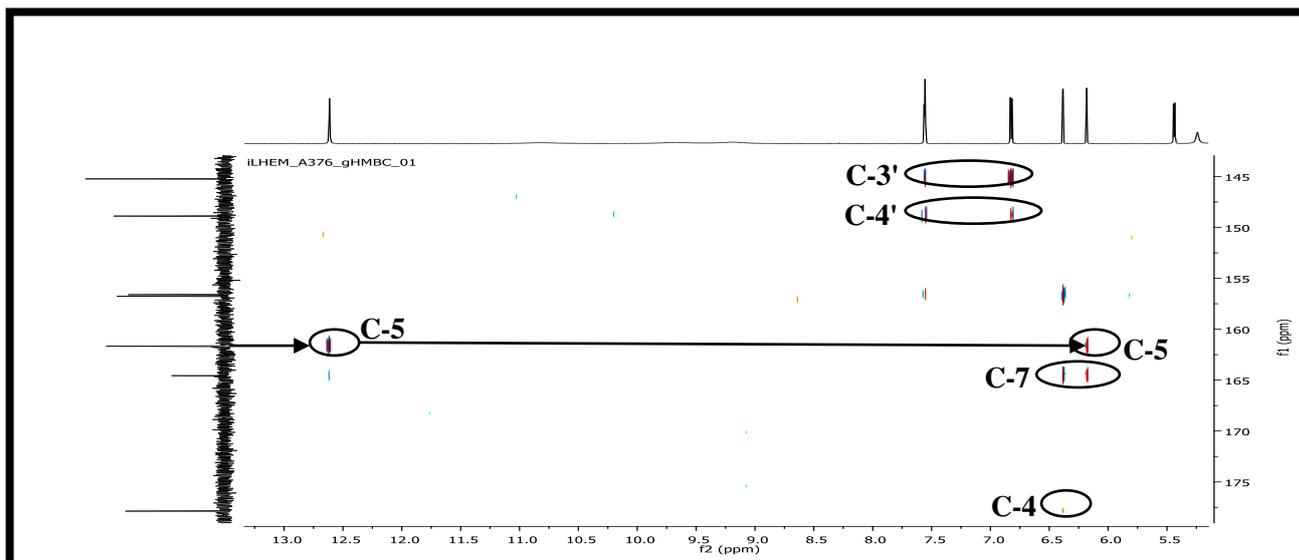


Figure III.85b: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₄₋₂.

Figure III.85c: Spectre HMBC étalé du composé PA₁₄₋₂.

Les valeurs des déplacements chimiques du ¹H et du ¹³C sont regroupées dans le tableau III.18.

Tableau III.18: Données des spectres RMN (¹H, ¹³C) du composé PA₁₄₋₂.

Numérotation de la chaîne	δ_H (ppm)	Intégration, <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
C-2	-	-	156,6
C-3	-	-	133,8
C-4	-	-	177,9
C-4a	-	-	104,,4
C-5	12,61	1H, <i>s</i>	161,6
C-6	6,18	1H, <i>d</i> , (2,4)	99,1
C-7	-	-	164,5
C-8	6,38	1H, <i>d</i> , (2,4)	93,9
C-8a	-	-	156,8
C-1'	-	-	121,6
C-2', C-6'	7,56	2H, <i>m</i>	122; 116,6
C-3'	-	-	145,2
C-4'	-	-	148,9
C-5'	6,82	1H, <i>d</i> , (9)	115,6
C-1''	5,44	1H, <i>d</i> , (7,2)	101,3
C-2''	3,22	1H, <i>t</i> , (7,8)	74,5
C-3''	3,20	1H, <i>t</i> , (7,8)	77
C-4''	3,07	1H, <i>dd</i> , (14; 4,2)	70,4
C-5''	3,07	1H, <i>dd</i> , (14; 4,2)	78
C-6''a	3,56	1H, <i>d</i> , (12)	61,4
C-6''b	3,33	-	61,4
OH-2''	5,24	1H, <i>s</i>	-
OH-3''	5,02	1H, <i>s</i>	-
OH-4''	4,91	1H, <i>s</i>	-
OH-6''	4,22	1H, <i>s</i>	-

La combinaison de l'ensemble des données spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature mènent au composé quercétine-3-O- β -glucopyranoside connu sous le nom d'isoquercitrine [17] représentée dans la figure III.86.

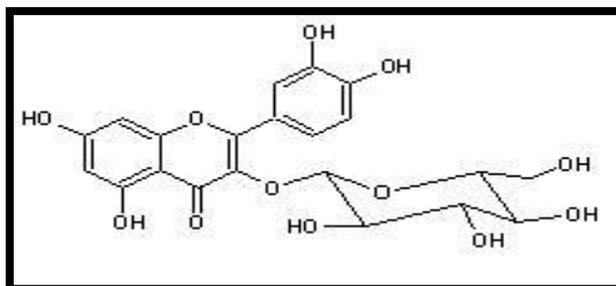


Figure III.86: Structure de composé PA₂₄₋₂.

III.1.4.13 Elucidation structurale du composé PB₂₇₋₁ (14)

➤ Propriétés physico-chimiques

Le produit a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol.

➤ Données spectroscopiques

D'après le chromatogramme obtenu par analyse HPLC-TOF, le composé PB₂₇₋₁ (figure III.87) apparaît au temps de rétention $T_R = 2,208$ min.

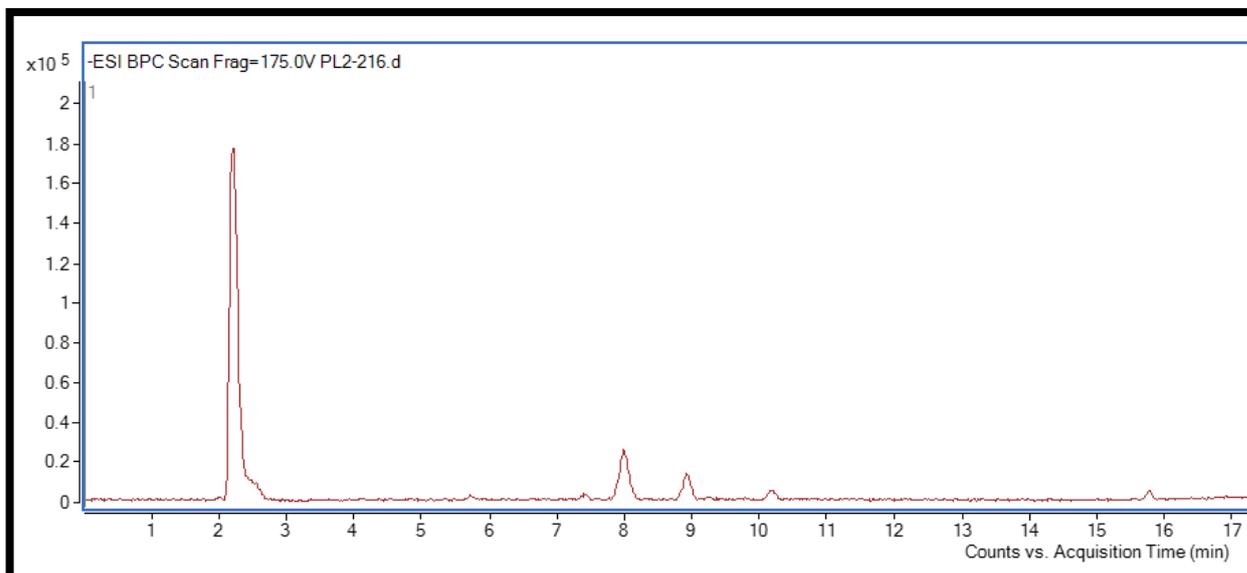


Figure III.87: Chromatogramme d'analyse par HPLC-TOF/MS du composé PB₂₇₋₁.

Le spectre de masse à haute résolution (figure III.88) enregistré en mode électronébulisation négatif (SM-HR ESI (-)) montre un pic quasi-moléculaire à m/z 193,0681 Da correspondant à $[M-H]^-$. Ceci permet de déduire une masse de 194 Da correspondant à la formule brute $C_7H_{14}O_6$ indiquant une structure avec 1 insaturation. Le pic quasi-moléculaire à m/z 387,1457

correspond à $[2M-H]^-$, Alors que la présence d'un pic quasi-moléculaire à m/z 161,0421 indique la perte d'un groupement méthoxyle.

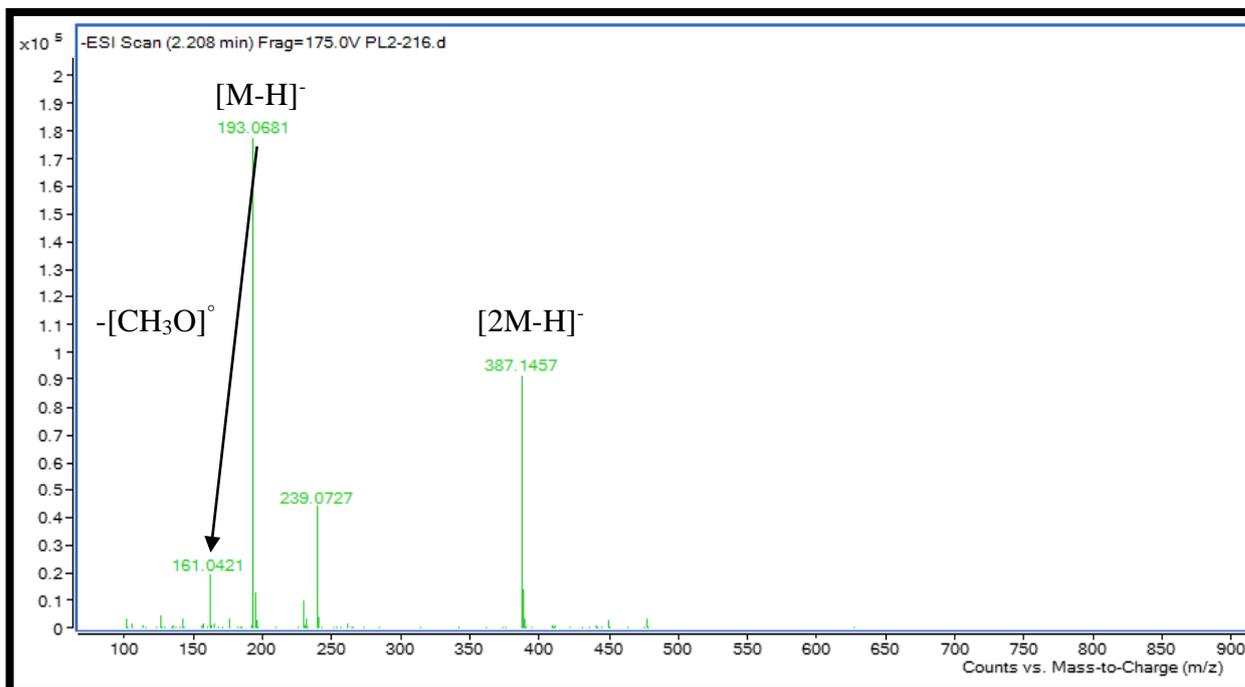


Figure III.88: Spectre TOF/MS en mode négatif du composé PB₂₇₋₁.

Le spectre RMN ¹³C enregistré dans le DMSO (figure III.89), confirme la présence de 7 atomes de carbones qui peuvent être répartis comme suit:

- ✓ cinq signaux à δ_C 73, 72,9, 72,4, 71,4 et 70,5 ppm très caractéristiques des CH oxygénés d'un hexose cyclique.
- ✓ Un signal à δ_C 60,1 ppm indique la présence d'un groupement CH₃ oxygéné.
- ✓ Un signal à δ_C 84,24 ppm.

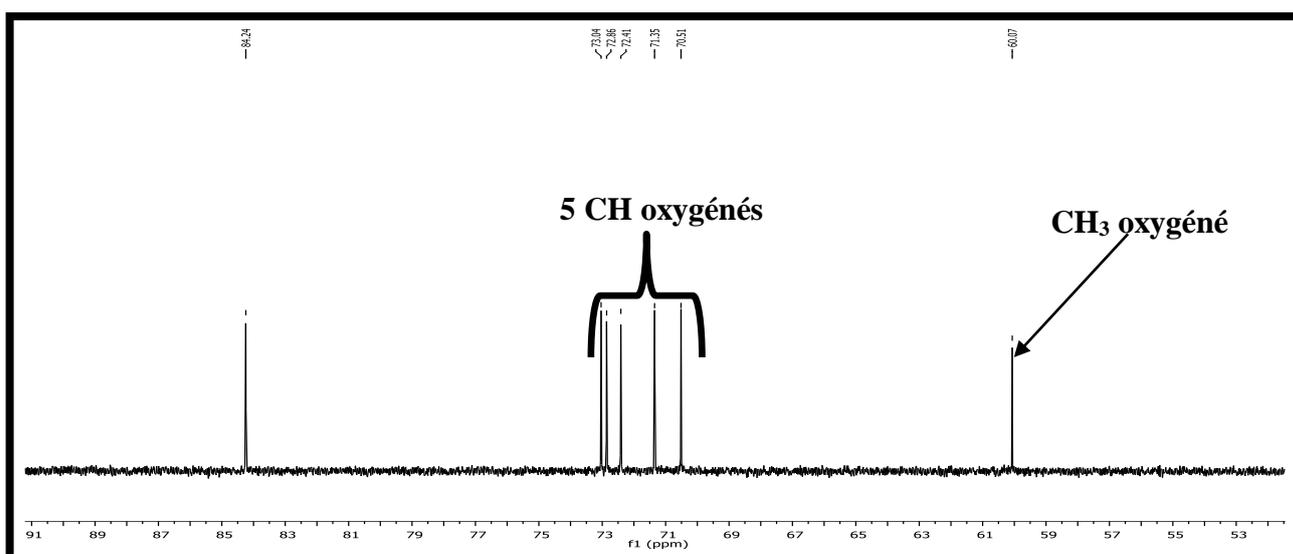


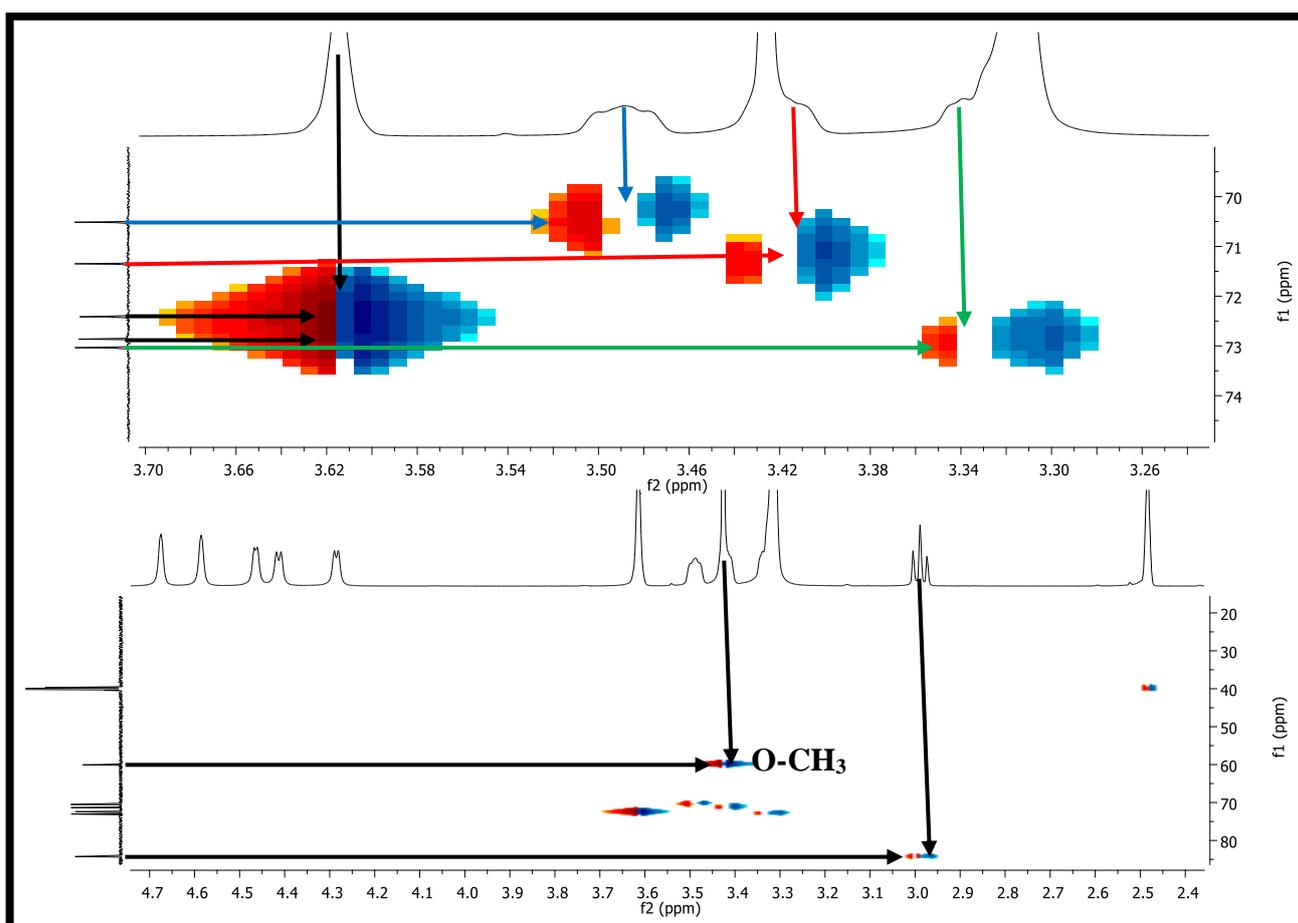
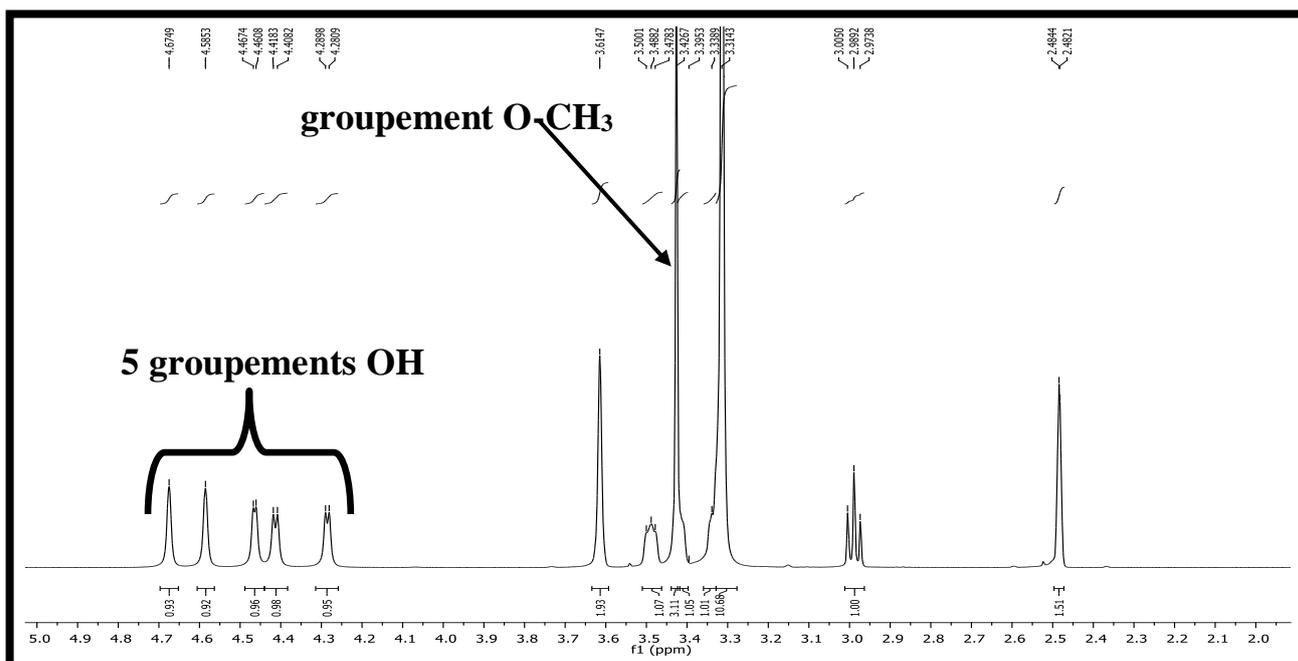
Figure III.89: Spectre RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz) du composé PB₂₇₋₁.

L'analyse simultanée du spectre RMN ^1H (figure III.90) et le spectre de l'expérience hétéro-nucléaire HSQC (figure III.91) enregistré dans le DMSO montre les signaux suivants:

- ✓ Un singulet large à δ_{H} 4,68 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune corrélation sur le spectre HSQC.
- ✓ Un singulet large à δ_{H} 4,59 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune corrélation sur le spectre HSQC.
- ✓ Un doublet ($J= 4$ Hz) à δ_{H} 4,47 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC.
- ✓ Un doublet ($J= 6,1$ Hz) à δ_{H} 4,41 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC.
- ✓ Un doublet ($J= 5,3$ Hz) à δ_{H} 4,28 ppm d'intégration 1H et ne présente aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC.

Les valeurs des déplacements chimiques de ces signaux, les multiplicités ainsi que le fait qu'ils ne corrélaient pas sur le spectre HSQC, orientent vers la présence de cinq groupements hydroxyles dans la molécule. La présence de ces groupements hydroxyles confirment la présence de 5 groupements CH oxygénés déduite des données de la RMN ^{13}C .

- ✓ Un singulet large à δ_{H} 3,62 ppm d'intégration 2H et corréle sur le spectre HSQC avec les deux carbones à δ_{C} 72,9 ppm et δ_{C} 72,4 ppm.
- ✓ Un triplet ($J= 6,5$ Hz) à δ_{H} 3,49 ppm d'intégration 1H et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 70,5 ppm.
- ✓ Un singulet à δ_{H} 3,43 ppm d'intégration 3H et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 60,1 ppm attribuable au groupement méthoxyle.
- ✓ Un triplet ($J= 4$ Hz) à δ_{H} 3,43 ppm d'intégration 1H partiellement recouvert par le signal du groupement méthoxyle et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 71,4 ppm
- ✓ Un triplet ($J= 4$ Hz) à δ_{H} 3,34 ppm d'intégration 1H partiellement recouvert par le signal du solvant et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 73 ppm.
- ✓ Un triplet ($J= 9,4$ Hz) à δ_{H} 2,99 ppm d'intégration 1H et corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 84,2 ppm.



Tenant compte de la formule brute $C_7H_{14}O_6$ (1 insaturation) et des données de la RMN 1H et ^{13}C , il se trouve dans cette molécule, 6 groupements CH oxygénés, 5 groupements hydroxyles et un groupement méthoxyle. L'ensemble de ces données oriente vers la présence d'un squelette cyclohexane substitué par cinq groupements OH et un groupement OCH_3 .

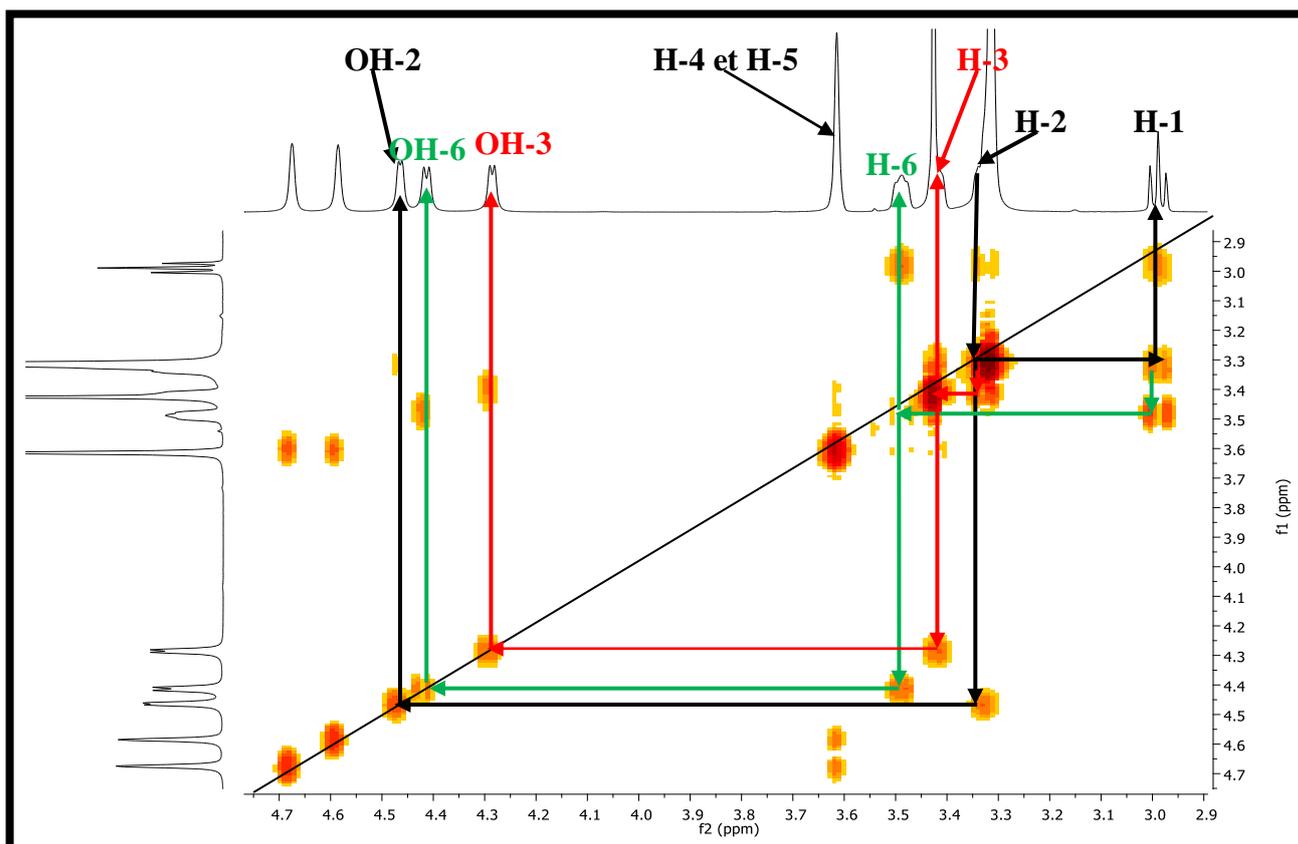
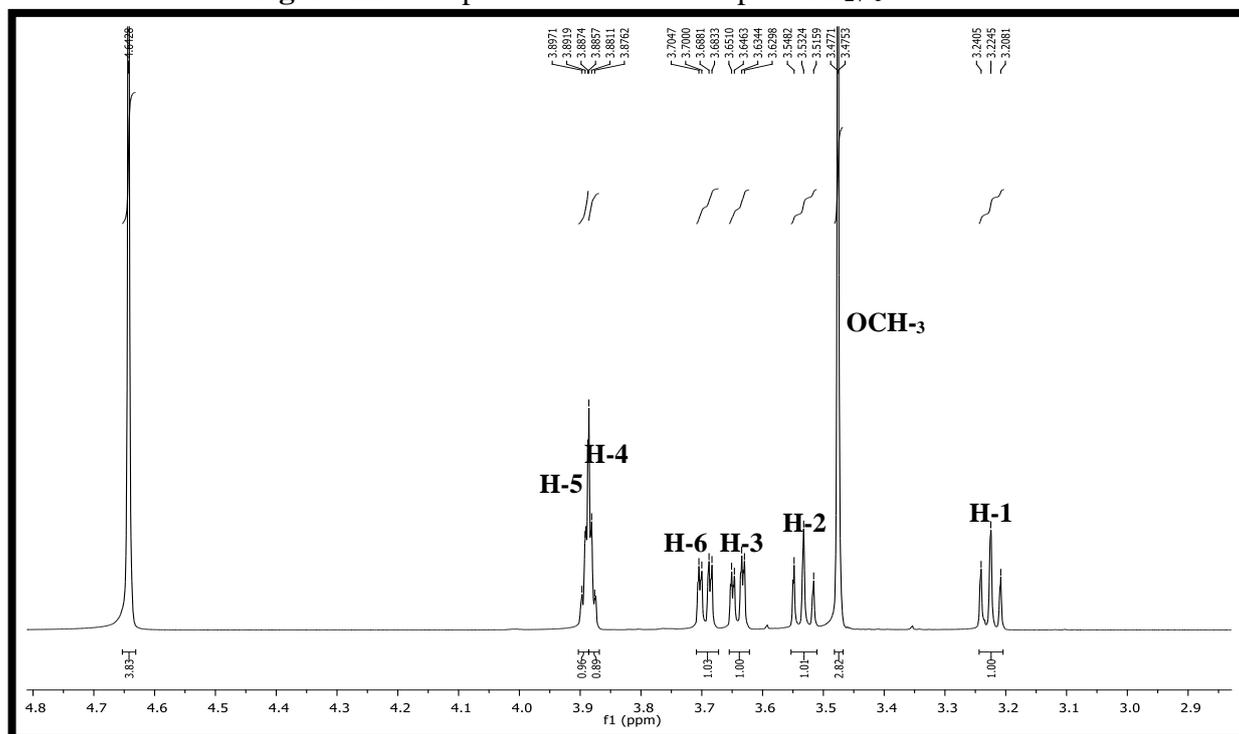
Le fait qu'il y ait des signaux recouverts par le signal du solvant (DMSO) complique l'analyse de la multiplicité des protons et, par conséquent, l'attribution de la stéréochimie relative. Ceci nous a incités à obtenir un autre spectre en utilisant le méthanol- d_4 comme solvant (figure III.92). Sur ce dernier spectre, nous avons pu distinguer la multiplicité des protons CH et celle des protons des hydroxyles et qu'on peut répartir grâce à l'analyse du spectre COSY (figure III.93) qui permet de relier les protons portés par des carbones voisins d'une part et les protons des hydroxyles portés par le même carbone d'autre part, en effet:

- ✓ Le proton à δ_H 2,99 ppm (DMSO) apparaît sur le spectre enregistré dans le méthanol deutéré à δ_H 3,23 ppm (t ; 9,6 Hz), ne présente aucune tache de corrélation avec les groupements hydroxyles de la molécule et leur carbone porteur et est le plus déblindé (δ_C 84,2 ppm), ceci permet de déduire que ce carbone est porteur du groupement méthoxyle. Cette déduction est vite confirmée par la tache de corrélation observée sur le spectre HMBC (figure III.94) entre les protons du groupement méthoxyle et le carbone à δ_C 84,2 ppm, ce carbone sera numéroté C-1 (H-1). La multiplicité ainsi que la constante de couplage de ce proton indiquent une position *trans-diaxiale* par rapport aux deux protons voisins.
- ✓ Sur le spectre COSY, le proton H-1 montre une tache de corrélation avec le proton à δ_H 3,34 ppm (DMSO), celui-ci résonne sur le spectre enregistré dans le méthanol deutéré à δ_H 3,53 ppm sous forme d'un triplet ($J= 9,6$ Hz) attribuable au groupement CH en position vicinale qui ne peut être que H-2 (C-2 à δ_C 73 ppm). Les valeurs des deux constantes de couplage indiquent des interactions *trans-diaxiales* avec le proton précédent H-1 et l'autre proton qui n'est autre que H-3.
- ✓ Sur le même spectre COSY (DMSO), le proton H-2 (δ_H 3,34 ppm ; δ_C 73 ppm) montre deux taches de corrélations, la première avec le groupement hydroxyle à δ_H 4,47 ppm attribuable au groupement OH porté par le même carbone et la deuxième avec le proton à δ_H 3,43 ppm attribuable à H-3. Ce H-3 résonne, sur le spectre enregistré dans le méthanol deutéré, à δ_H 3,64 ppm sous forme *dd* ($J= 9,6$ et 2,8 Hz) montrant deux couplages différents, l'un *trans-diaxial* avec le H-2 (δ_H 3,34 ppm) et l'autre *axial-équatorial* avec le suivant.

- ✓ Le proton H-3 (δ_{H} 3,43 ppm DMSO, δ_{C} 71,4 ppm) montre deux taches de corrélation, une première avec le groupement hydroxyle à δ_{H} 4,41 ppm attribuable au groupement hydroxyle porté par le même carbone et une deuxième avec l'un des deux protons à δ_{H} 3,62 ppm attribuable au groupement CH en position vicinal de celui-ci qui ne peut être que le H-4 (δ_{H} 3,62 ppm ; C-4 δ_{C} 72,9 ppm). Celui-ci résonne à δ_{H} 3,88 ppm (CD₃OD) sous forme d'un *dd* ($J= 2,9 ; 3,5$ Hz) montrant un couplage *équatorial-axial* avec H-3 et un couplage *trans-diequatorial* avec H-5.
- ✓ Ce H-5 (δ_{H} 3,62 ppm ; C-5 δ_{C} 72,4 ppm) montre deux taches de corrélation, une première avec le groupement hydroxyle à δ_{H} 4,68 ppm attribuable au groupement hydroxyle porté par le même carbone (C-5) et une deuxième, avec le proton à δ_{H} 3,49 ppm (δ_{C} 70,5 ppm) qui ne peut être que le proton H-6. Ce H-5 résonne sous forme d'un *dd* ($J= 2,8 ; 3, 5$ Hz) montrant un couplage *équatorial-axial* avec H-6 et un couplage *trans-diequatorial* avec H-4.
- ✓ Ce H-6 (δ_{H} 3,69 ppm dans méthanol deutéré) apparaît sous forme d'un doublet de doublet ($J= 9,6$ et $2,8$ Hz) indiquant ainsi une interaction *axiale* avec le H-1 et une interaction *équatoriale* avec le H-5. La corrélation entre le H-6 et le H-1 permet la fermeture du cycle.

L'ensemble de ces données spectroscopiques (RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC) ainsi que le spectre de masse oriente vers le composé 1-méthoxy-2, 3, 4, 5, 6-pentahydroxy cyclohexane.

La multiplicité de l'ensemble des protons ainsi que les valeurs des constantes de couplage confortées avec les données de la littérature oriente vers le **D-pinitol** [18]. La structure de ce composé est représentée dans la figure III.95.

Figure III.93: Spectre COSY du composé PB₂₇₋₁.Figure III.92: Spectre RMN ¹H (Méthanol-*d*₄, 600 MHz) du composé PB₂₇₋₁.

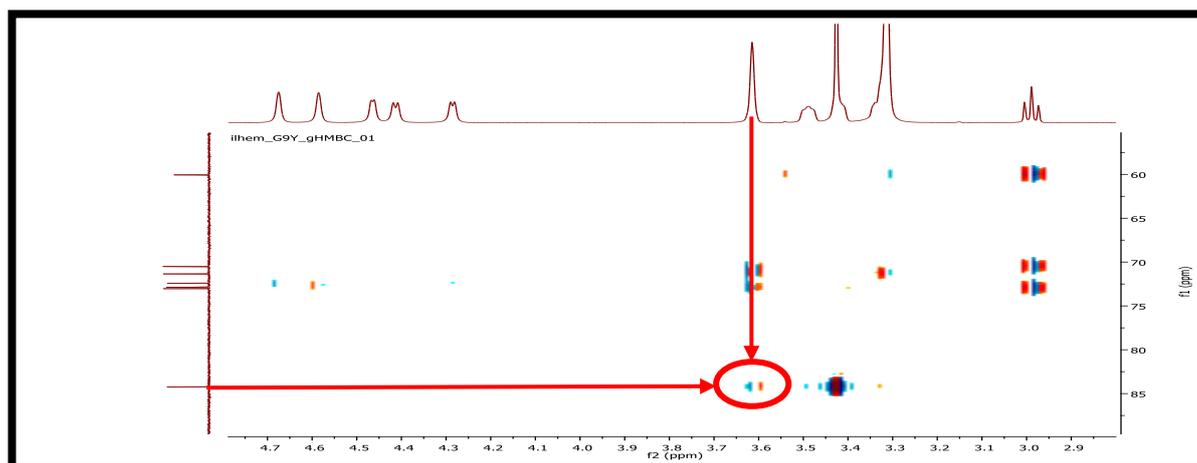
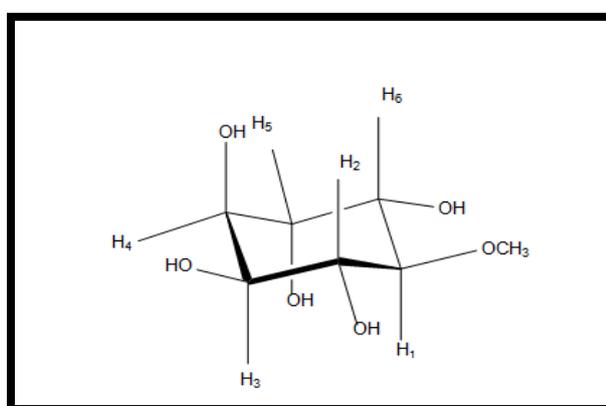
Figure III.94: Spectre COSY du composé PB₂₇₋₁.

Figure III.95: structure de D-pinitol..

Les valeurs des déplacements chimiques du ^1H et du ^{13}C sont regroupées dans le tableau III.19.

Tableau III.19: Données des spectres RMN (^1H , ^{13}C) du composé PB₂₇₋₁.

Positions	δ_{H} (ppm) dans DMSO	Intégration, m, J (Hz)	δ_{H} (ppm) dans CD ₃ OD	Intégration, m, J (Hz)	δ_{C} (ppm) dans DMSO
1	2,99	1H, <i>t</i> , (9,4)	3,23	1H, <i>t</i> , (9,6)	84,2
2	3,34	1H, <i>t</i> , (4)	3,53	1H, <i>t</i> , (9,6)	73
3	3,43	1H, <i>t</i> , (4)	3,64	1H, <i>dd</i> , (9,6; 2,8)	71,4
4	3,62	1H, <i>s</i>	3,88	1H, <i>dd</i> , (2,9; 3,5)	72,9
5	3,62	1H, <i>s</i>	3,89	1H, <i>dd</i> , (2,9; 3,5)	72,4
6	3,49	1H, <i>t</i> , (6,5)	3,69	1H, <i>dd</i> , (9,6; 2,8)	70,5
O-CH₃	3,43	3H, <i>s</i>	3,47	3H, <i>s</i>	60,1
OH-2	4,47	1H, <i>d</i> , (4)	-	-	-
OH-3	4,28	1H, <i>d</i> , (5,3)	-	-	-
OH-4	4,59	1H, <i>s</i>	-	-	-
OH-5	4,68	1H, <i>sl</i>	-	-	-
OH-6	4,41	1H, <i>d</i> , (6,1)	-	-	-

III.1.4.14 Elucidation structurale du composé PB₂₇₋₂ (15)

➤ Propriétés physico-chimiques

Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol.

➤ Données spectroscopiques

L'examen du spectre de masse haute résolution enregistré en mode électro-nébulisation négatif (HRESIMS (-)) (figure III.96) du produit PB₂₇₋₂ montre un pic quasi-moléculaire à m/z 491,1121 Da correspondant à $[M-H+CH_2O_2]^-$ et un pic quasi-moléculaire à m/z 445,1064 Da correspondant à $[M-H]^-$ oriente vers une formule brute C₂₂H₂₂O₁₀ comportant 12 insaturations.

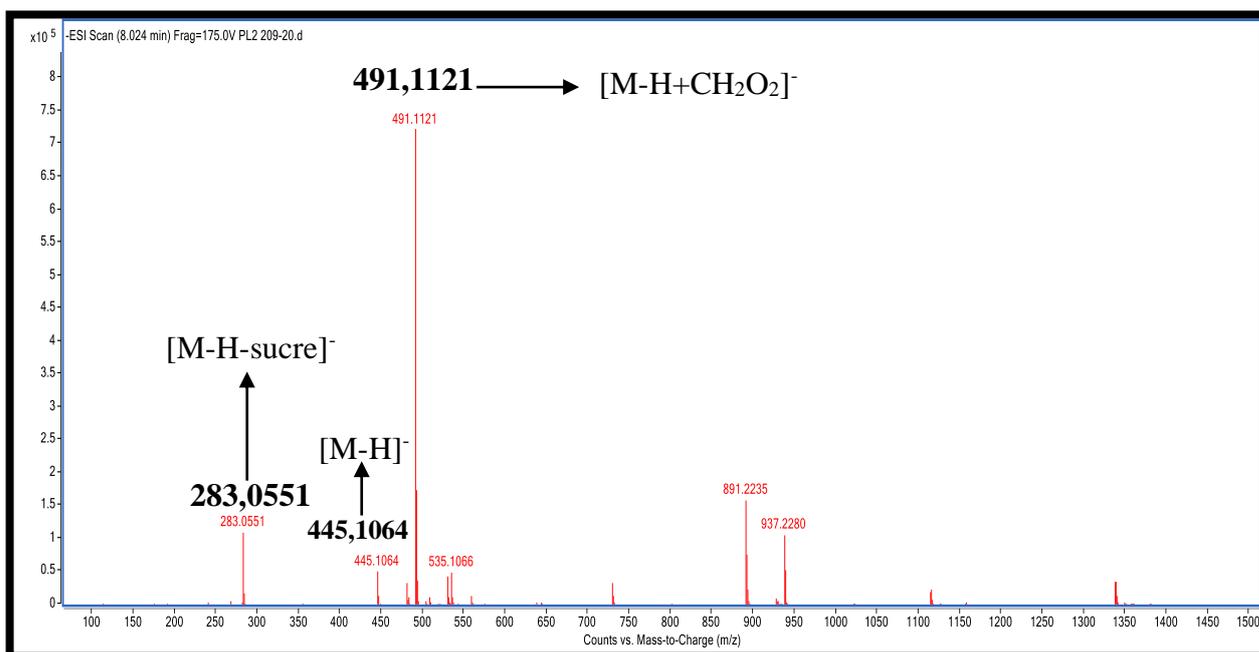


Figure III.96: Spectre TOF/MS en mode négatif du produit PB₂₇₋₂.

L'analyse du spectre RMN ¹³C figure III.97 du composé PB₂₇₋₂ confirme la présence de 22 atomes de carbone.

Les 5 signaux dans l'intervalle des déplacements chimiques δ_C 61,2 à 77,1 ppm avec le signal à δ_C 100,4 ppm confirment la présence d'une partie osidique.

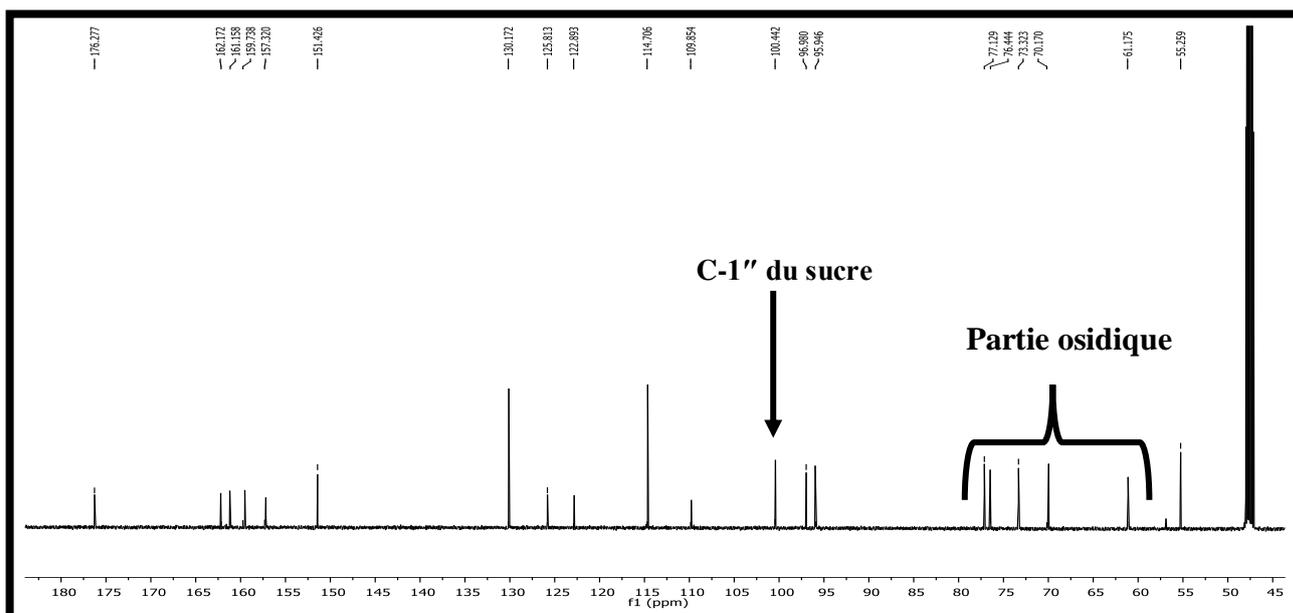


Figure III.97: Spectre RMN ^{13}C (méthanol- d_4 , 150 MHz) du composé PB₂₇₋₂.

L'analyse simultanée du spectre RMN ^1H (figure III.98) et le spectre HSQC (figure III.99) de ce produit, montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type isoflavone caractérisé par:

- ✓ Un singulet à δ_{H} 8 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-2 et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 151,4 ppm attribuable au carbone C-2.
- ✓ Un doublet ($J= 8,4$ Hz) à δ_{H} 7,33 ppm d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 130,2 ppm attribuable à C-2' et C-6'.
- ✓ Un doublet ($J= 8,4$ Hz) à δ_{H} 6,81 ppm d'intégration 2H attribuable à H-3' et H-5' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 114,7 ppm attribuable à C-3' et C-5'.

Ces deux derniers signaux montrent la substitution sur le carbone C-4' du cycle B de l'isoflavone.

- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_{H} 6,77 ppm d'intégration 1H attribuable au H-8 et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 96 ppm attribuable à C-8.
- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_{H} 6,7 ppm d'intégration 1H attribuable au H-6 et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 97 ppm attribuable à C-6.

Ces deux signaux montrent la substitution en positions C-5 et C-7 du cycle A.

- ✓ Un singulet à δ_{H} 3,91 ppm d'intégration 3H attribuable au groupement O-CH₃ et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 55,3 ppm attribuable au groupement méthoxyle.
- ✓ Un doublet ($J= 7,4$ Hz) à δ_{H} 5,06 ppm d'intégration 1H attribuable à H-1'' et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 100,4 ppm attribuable au C-1''. La valeur de déplacement chimique du proton et du son carbone, indique que l'entité sucre est liée à

l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique avec son voisin, cette entité pourrait dériver soit d'un glucosyle soit d'un galactosyle avec une configuration β de la liaison reliant le sucre à l'aglycone.

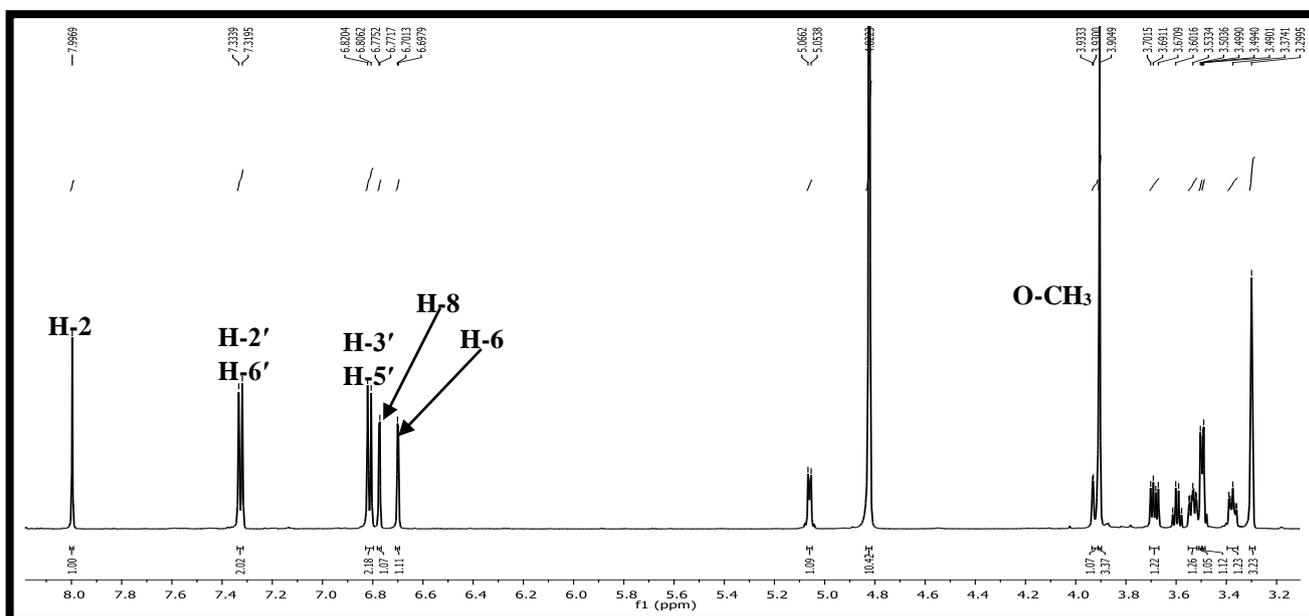


Figure III.98: Spectre RMN ^1H (méthanol- d_4 , 600 MHz) du composé PB₂₇₋₂.

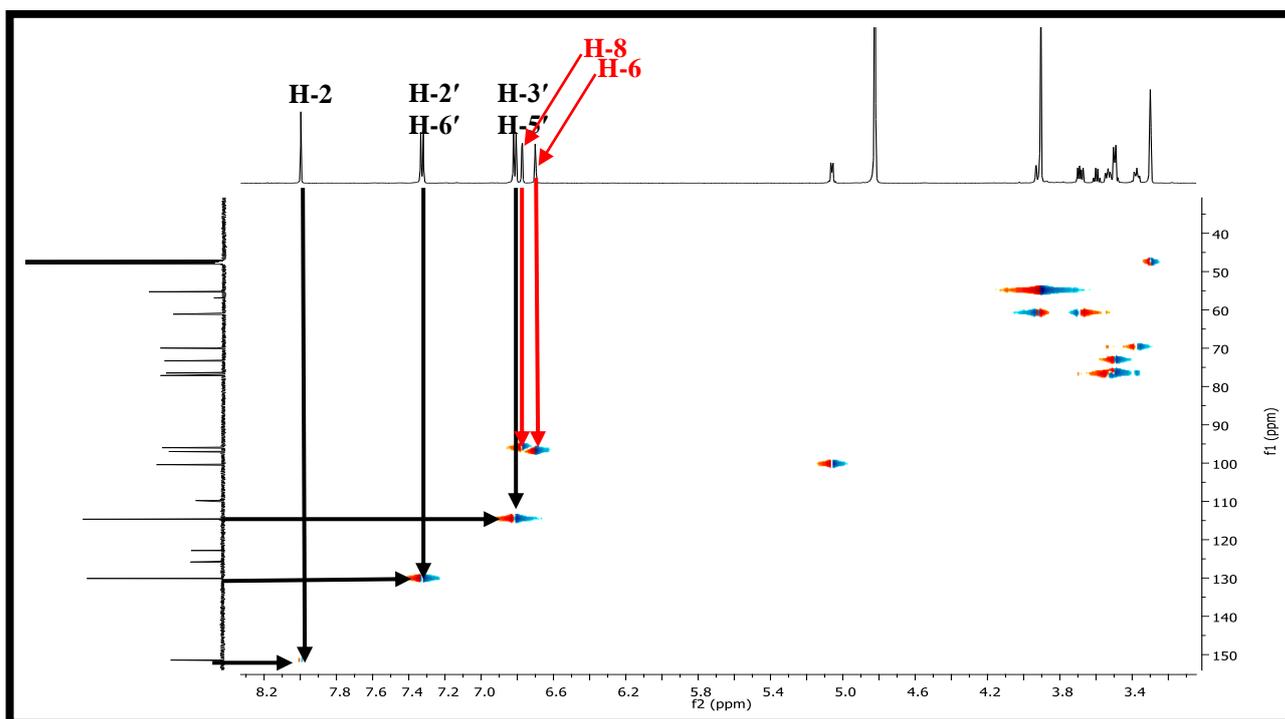


Figure III.99: Spectre HSQC du composé PB₂₇₋₂.

Ces observations mènent à la structure partielle représentée dans la figure III.100.

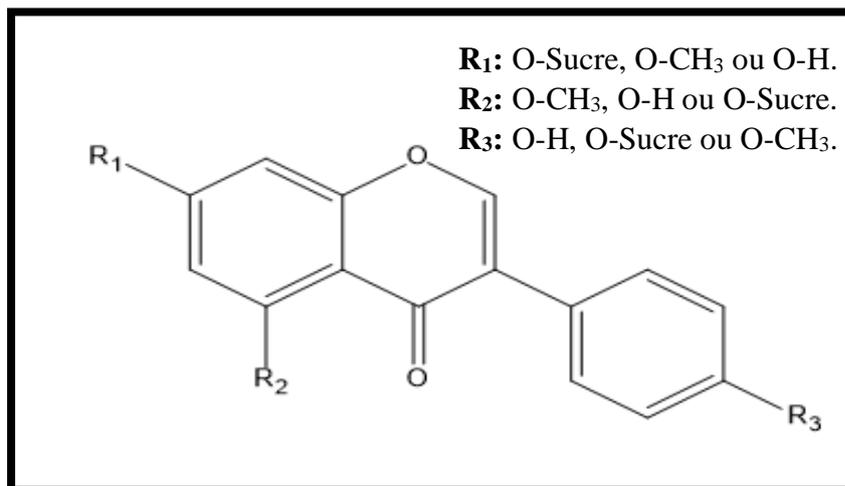


Figure III.100: Structure partielle du composé PB₂₇₋₂.

Toujours grâce au spectre RMN ¹H figure III.98a (Spectre étalé de la partie osidique), Les protons de la partie osidique apparaissent dans la gamme des déplacements chimiques (δ_H 3,92 ppm et δ_H 3,38 ppm) comme suit:

- ✓ Un doublet de doublet ($J= 12; 1,8$ Hz) à δ_H 3,92 ppm d'intégration 1H.
- ✓ Un doublet de doublet ($J= 12; 6$ Hz) à δ_H 3,69 ppm d'intégration 1H.
- ✓ Un multiplet à δ_H 3,54 ppm d'intégration 1H.
- ✓ Un doublet ($J= 5,8$ Hz) à δ_H 3,5 ppm d'intégration 1H.
- ✓ Un doublet ($J= 6,8$ Hz) à δ_H 3,49 ppm d'intégration 1H.
- ✓ Un multiplet à δ_H 3,38 ppm d'intégration 1H.

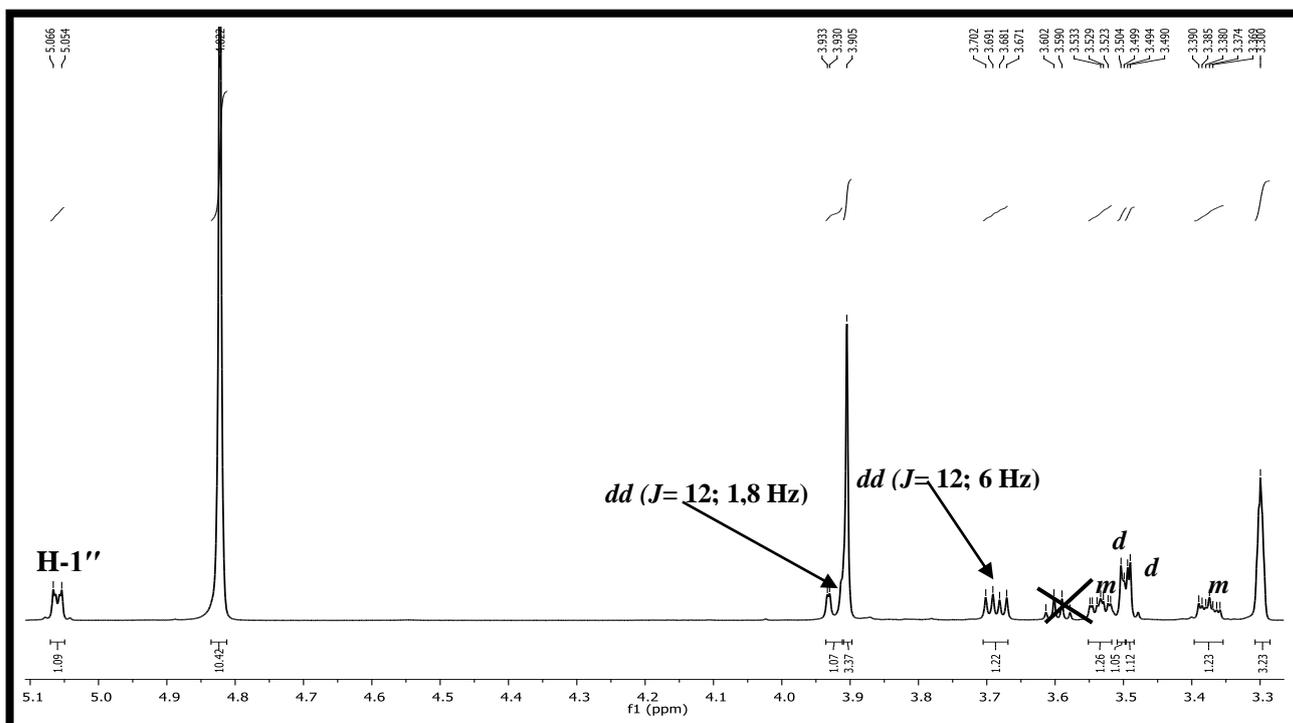


Figure III.98a: Spectre RMN ¹H (méthanol-*d*₄, 600 MHz) du composé PB₂₇₋₂.

L'attribution des protons de la partie osidique ce fait à l'aide de leurs corrélations sur le spectre COSY figure III.101 comme suit:

- ✓ Le proton H-1'' corrèle avec le proton à δ_H 3,49 ppm attribuable à H-2''.
- ✓ Le proton H-2'' corrèle avec le proton à δ_H 3,5 ppm attribuable à H-3''.
- ✓ Le proton H-3'' corrèle avec le proton à δ_H 3,38 ppm attribuable à H-4''.
- ✓ Le proton H-4'' corrèle avec le proton à δ_H 3,54 ppm attribuable à H-5''.
- ✓ Le proton H-5'' corrèle avec les deux protons à (δ_H 3,92 ppm et δ_H 3,69 ppm) attribuable à H-6''a et H-6''b.

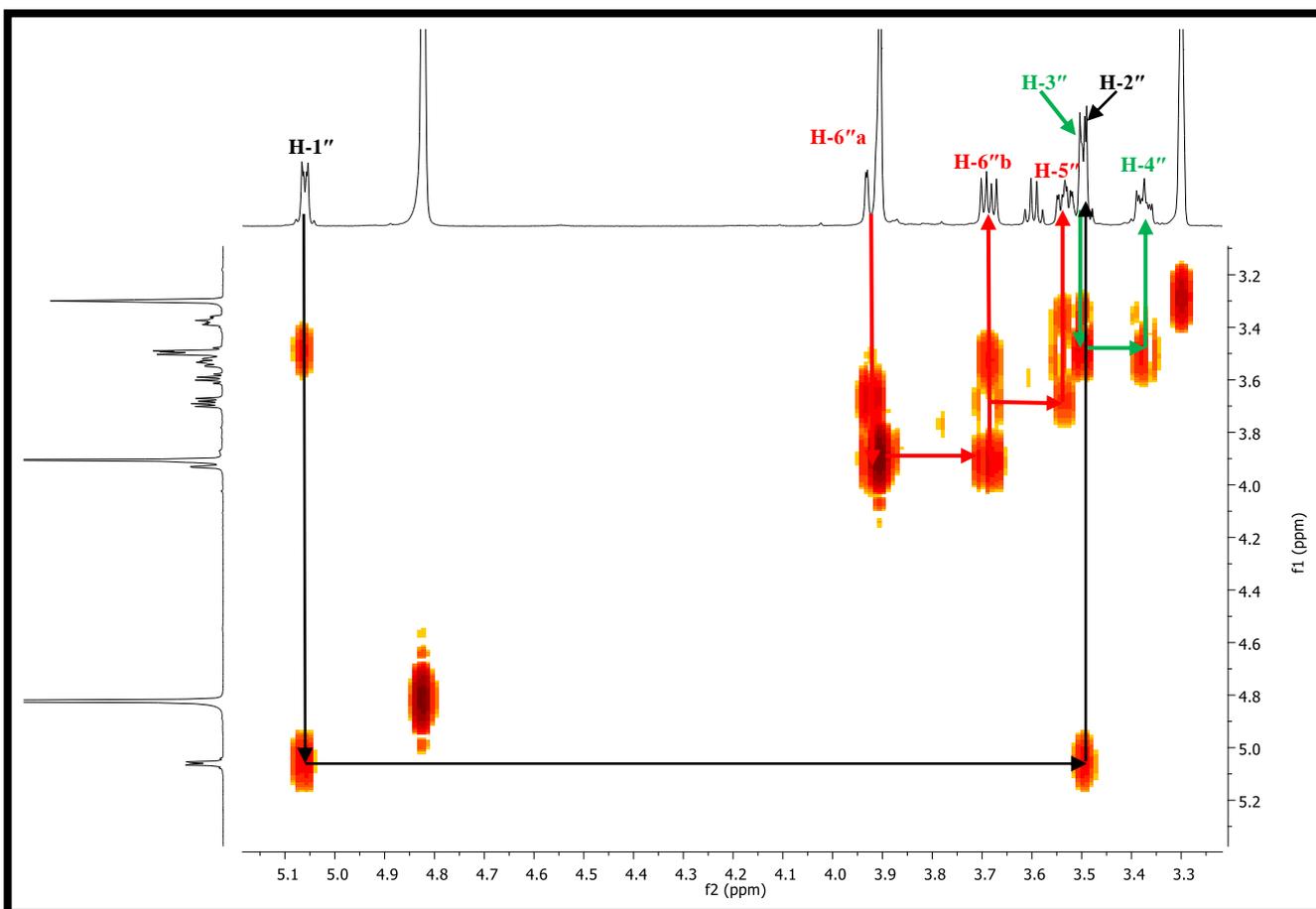


Figure III.101: Spectre COSY du composé PB₂₇₋₂.

L'analyse du spectre HSQC étalé (figure III.99a) permet d'attribuer les carbones de la partie osidique comme suit:

- ✓ Le proton H-2'' corrèle avec le carbone à δ_C 73,3 ppm attribuable à C-2''.
- ✓ Le proton H-3'' corrèle avec le carbone à δ_C 76,5 ppm attribuable à C-3''.
- ✓ Le proton H-4'' corrèle avec le carbone à δ_C 70 ppm attribuable à C-4''.
- ✓ Le proton H-5'' corrèle avec le carbone à δ_C 77,1 ppm attribuable à C-5''.
- ✓ Les deux protons H-6''a et H-6''b corrélerent avec le carbone à δ_C 61,1 ppm

attribuable à C-6''.

D'après la valeur de déplacement chimique du carbone C-3'' et en comparaison avec la littérature [9], nous pouvons définir l'entité osidique comme étant le O- β -glucose.

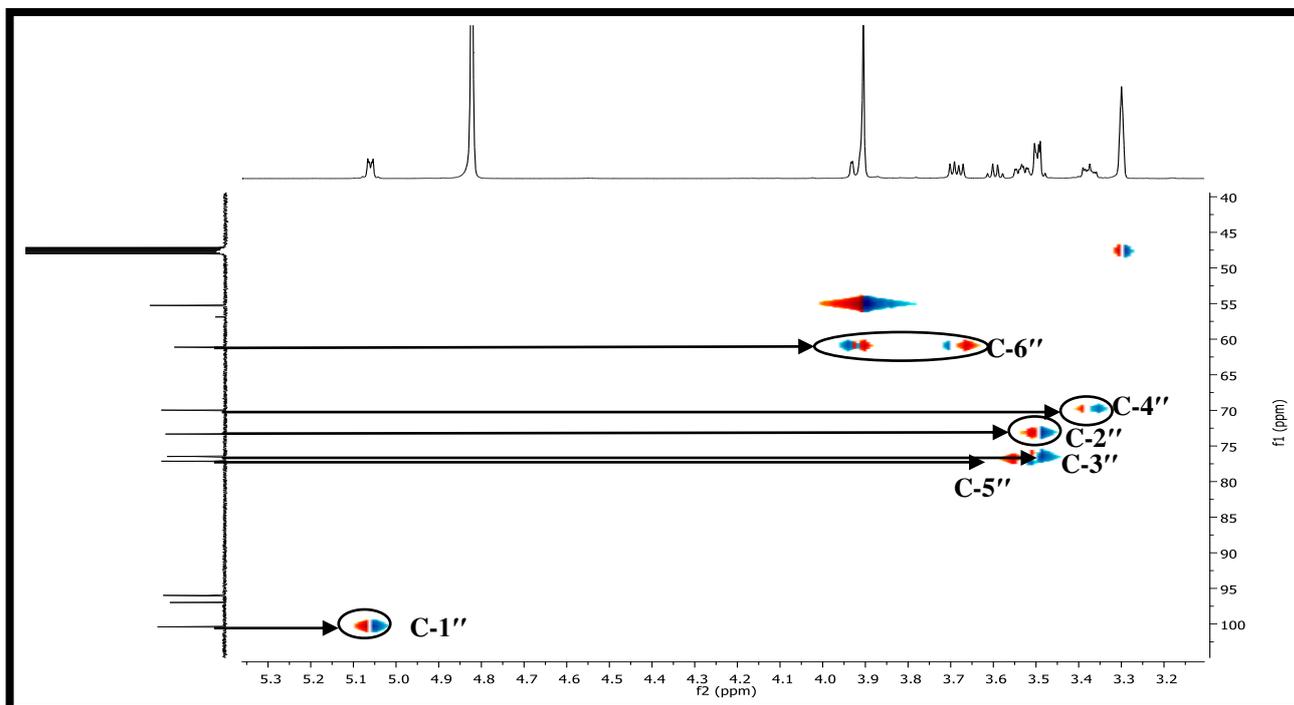


Figure III.99a: Spectre HSQC du composé PB₂₇₋₂.

L'étude de spectre RMN ¹³C (figure III.97) montre la présence de 22 atomes de carbone. Par abstraction des CH, du groupement CH₂ et du groupement O-CH₃ indiqué précédemment. Il reste 8 carbones quaternaires qui sont attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC.

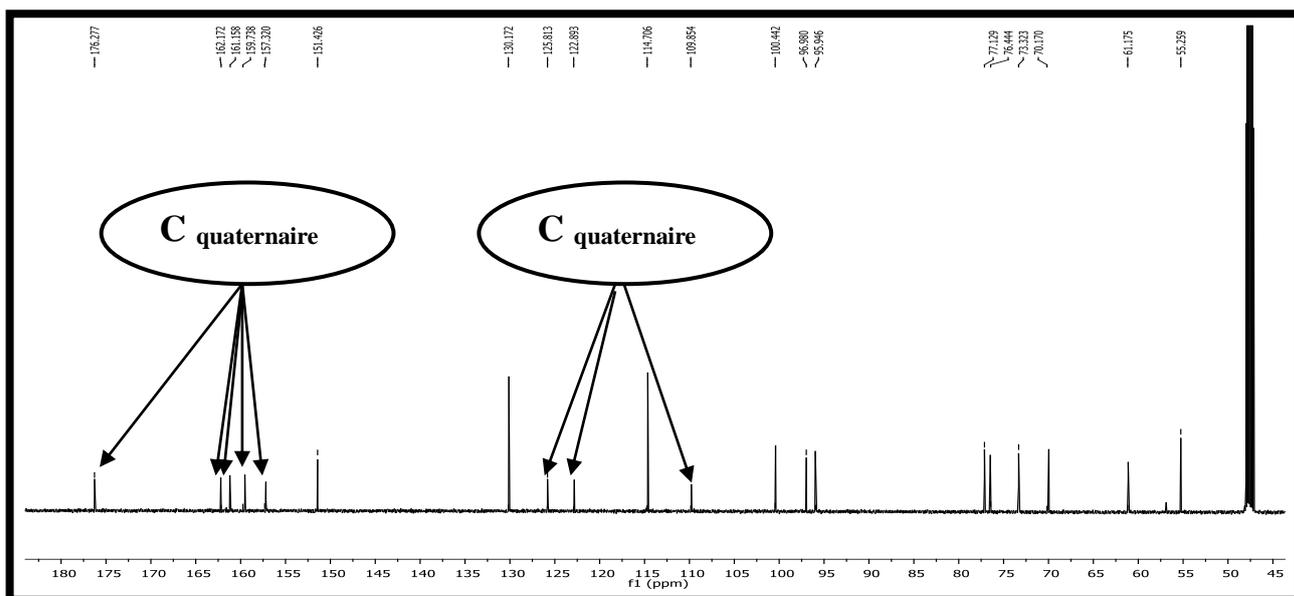


Figure III.97: Spectre RMN ¹³C (méthanol-*d*₄, 150 MHz) du composé PB₂₇₋₂.

L'analyse du spectre HMBC (figure III.102a et figure III.102b) du composé PB₂₇₋₂ a permis d'attribuer les carbones quaternaires et de positionner l'entité osidique à l'aide des corrélations H-C longue distances ($3J$ et $4J$) comme suit:

1/ Le proton H-2 montre des taches de corrélation avec:

- ✓ Le carbone à δ_C 176,3 ppm attribuable à C-4.
- ✓ Le carbone à δ_C 159,7 ppm attribuable à C-8a.
- ✓ Le carbone à δ_C 125,8 ppm attribuable à C-3.
- ✓ Le carbone à δ_C 122,9 ppm attribuable à C-1'.

2/ Les protons H-2' et H-6' montrent deux taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_C 157,3 ppm attribuable à C-4'.
- ✓ le carbone à δ_C 125,8 ppm (C-3).

3/ Les protons H-2', H-6', H-3' et H-5' montrent deux taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_C 157,3 ppm (C-4').
- ✓ Le carbone à δ_C 122,9 ppm attribuable à C-1'.

4/ Le proton H-6 montre des taches de corrélation avec:

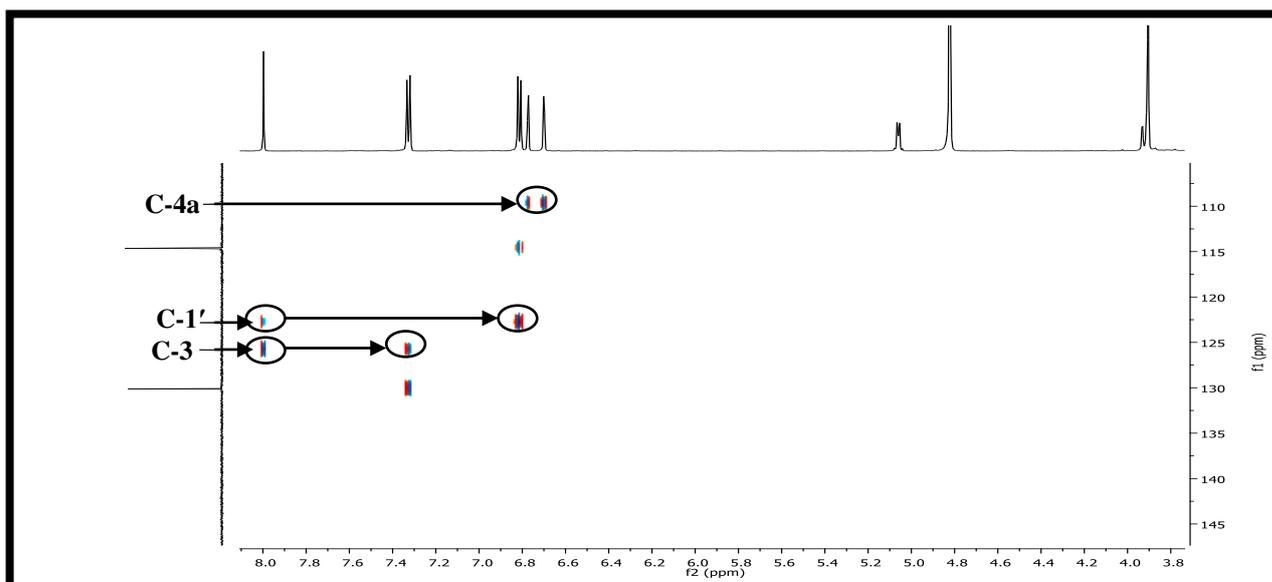
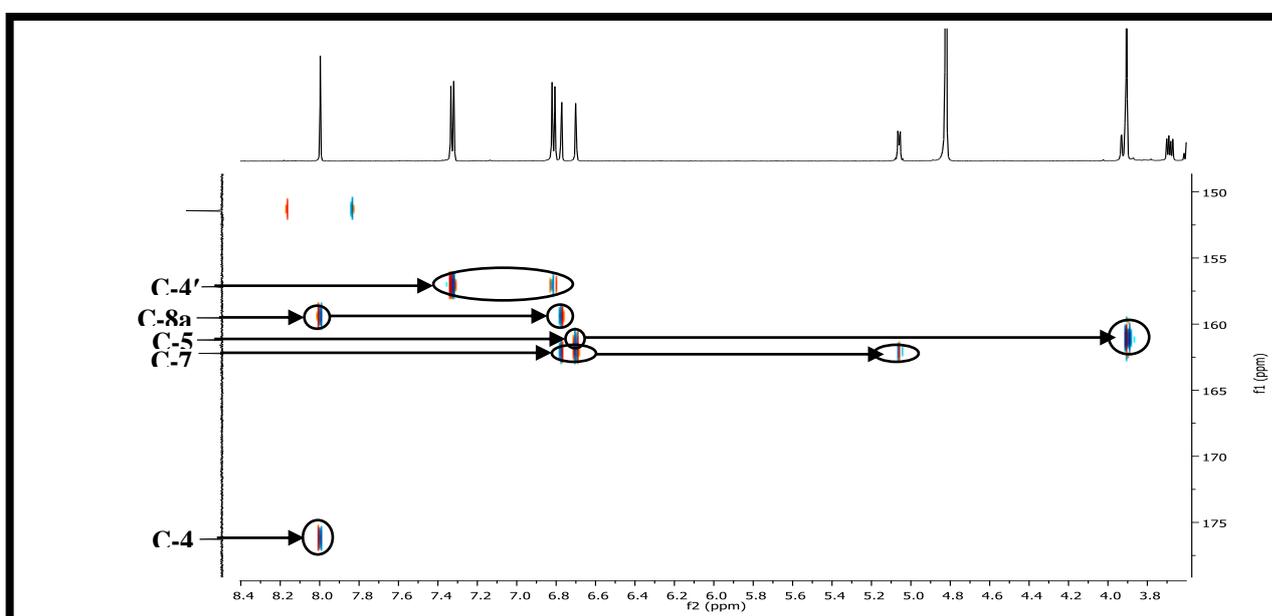
- ✓ le carbone à δ_C 109,9 ppm attribuable à C-4a.
- ✓ le carbone à δ_C 161,2 ppm attribuable à C-5.
- ✓ le carbone à δ_C 162,2 ppm attribuable à C-7.

5/ Le proton H-8 montre des taches de corrélation avec:

- ✓ le carbone à δ_C 162,2 ppm (C-7).
- ✓ le carbone à δ_C 159,8 ppm (C-8a).
- ✓ le carbone à δ_C 109,8 ppm (C-4a).

6/ le proton H-1'' du sucre montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 162,2 ppm attribué précédemment à C-7. Cela permet de positionner l'entité osidique sur le carbone C-7.

7/ les protons du groupement méthoxyle montrent une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 161,2 ppm attribué précédemment à C-5. Donc le groupement méthoxyle est sur le carbone C-5.

Figure III.102a: Spectre HMBC étalé du composé PB₂₇₋₂.Figure III.102b: spectre HMBC étalé du composé PB₂₇₋₂.

Les valeurs des déplacements chimiques du ¹H et ¹³C de cette molécule sont présentés dans le tableau III.20.

Tableau III.20: données de RMN (^1H et ^{13}C) du composé PB₂₇₋₂.

Numérotation de la chaîne	δ_{H} (ppm)	Intégration, m, J (Hz)	δ_{C} (ppm)
C-2	8	1H, <i>s</i>	151,4
C-3	-	-	125,8
C-4	-	-	176,3
C-4a	-	-	109,9
C-5	-	-	161,2
C-6	6,7	1H, <i>d</i> , (1,8)	97
C-7	-	-	162,2
C-8	6,77	1H, <i>d</i> , (1,8)	96
C-8a	-	-	159,7
C-1'	-	-	122,9
C-2' et C-6'	7,33	1H, <i>d</i> , (8,4)	130,1
C-3' et C-5'	6,81	1H, <i>d</i> , (8,4)	114,6
C-4'	-	-	157,3
C-1''	5,06	1H, <i>d</i> , (7,4)	100,4
C-2''	3,49	1H, <i>d</i> , (6,8)	73,3
C-3''	3,5	1H, <i>d</i> , (5,8)	76,5
C-4''	3,38	1H, <i>m</i>	70
C-5''	3,54	1H, <i>m</i>	77,1
C-6''a	3,92	1H, <i>dd</i> , (12; 1,8)	61,1
C-6''b	3,69	1H, <i>dd</i> , (12; 6)	61,1
O-CH ₃	3,91	3H, <i>s</i>	55,3

La combinaison de l'ensemble des données de RMN (1D et 2D) et la spectrométrie de masse et la comparaison avec les données de la littérature [19] mènent à la structure de **5-méthoxy Genistéine-7-O-Glucoside** représenté dans la figure III.103. Cette molécule est isolée pour la première fois du genre *Lotus*.

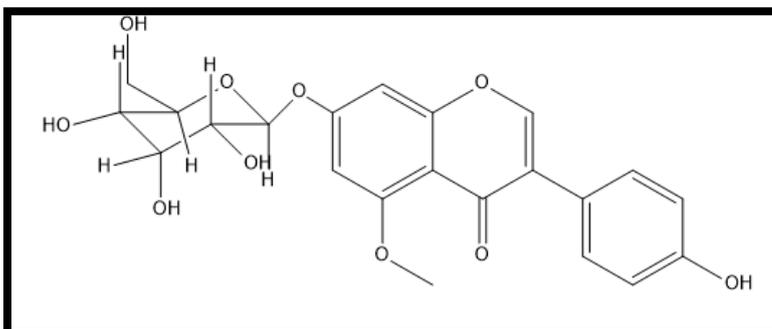


Figure III.103: Structure de 5-méthoxy Genistéine-7-O-Glucoside.

Résultats des activités biologiques

III.1.5 Dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits CH₁, AE₁ et BU₁ de la plante ont été exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait) pour les flavonoïdes et ils sont reportés dans le tableau III.21.

Tableau III.21: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet.

Extracts	Polyphénols (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)
CH ₁	97,3 ± 1,92	10,78 ± 0,99
AE ₁	167,59 ± 0,52	79,52 ± 0,82
BU ₁	137,18 ± 1,72	91,03 ± 1,05

Le résultat obtenu a révélé que l'extrait AE₁ avait la plus grande quantité de composés phénoliques (167,59 ± 0,52 mg EAG/g d'extrait), suivi de l'extrait de BU₁ (137,18 ± 1,72 mg EAG/g d'extrait). Alors que, l'extrait BU₁ avait la plus grande quantité des flavonoïdes (91,03 ± 1,05 mg EQ/g d'extrait) suivi de l'extrait AE₁ (79,52 ± 0,82 mg EQ/g d'extrait). Enfin, la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait CH₁ est apparemment la plus faible avec les taux de (97,3 ± 1,92 mg EAG/g d'extrait) et (10,78 ± 0,99 mg EQ/g d'extrait) respectivement.

III.1.6 Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.2.1 Test de DPPH

L'activité oxydante des extraits CH₁ et AE₁ de l'espèce *Lotus roudairei* Bonnet a été évalué par la méthode de DPPH, mesurée à 517 nm. Le standard utilisé est le BHA. Le résultat a été illustré dans la figure III.104.

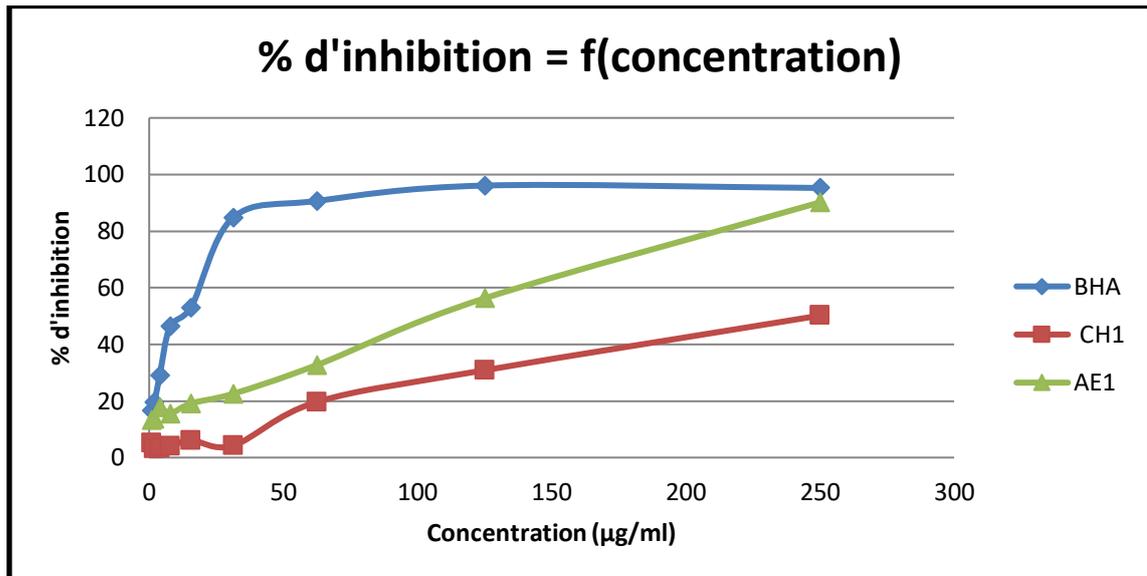


Figure III.104: courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits CH₁, AE₁ et le standard BHA en fonction de la concentration.

Selon la figure précédente, nous observons que les courbes ont la même allure ce qui implique la même interprétation: Plus la concentration est élevée, plus l'activité anti-radicalaire est élevée jusqu'à atteindre un plateau. Au-delà de cette limite, l'activité reste constante.

Les extraits CH₁ et EA₁ ont réagi positivement au test du DPPH mais à différents degrés. La figure montre que l'extrait AE₁ présente le meilleur pourcentage d'inhibition de 90,17% à concentration de 250 µg/ml. Alors que l'extrait CH₁ à la même concentration, présente un pourcentage d'inhibition de 50,17%. Ceci peut s'expliquer par la richesse de l'extrait AE₁ en composés phénoliques signalé précédemment par son taux élevé en polyphénols.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH (CI₅₀) est représentée dans le tableau III.22.

Tableau III.22: Les valeurs des CI₅₀ des extraits CH₁ et AE₁ et du standard BHA.

	BHA	CH ₁	EA ₁
CI ₅₀ (µg/ml)	5,278 ± 1,23	237,21 ± 8,31	107,67 ± 0,71

D'après les résultats des valeurs de CI₅₀ mentionnées dans le tableau III.22, l'extrait EA₁ semble avoir un effet inhibiteur modéré sur le radical DPPH avec une CI₅₀=107,67 ± 0,71 µg/ml comparativement à la CI₅₀ de la solution standard du BHA qui est de 5,278 ± 1,23 µg/ml. Alors que l'extrait CH₁ semble être le moins actif avec une CI₅₀= 237,21 ± 8,31 µg/ml.

Ce résultat est en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux qui montrent une richesse remarquable de l'extrait EA₁ comparativement à l'extrait CH₁. Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui ont pu établir une relation étroite entre le contenu en composés phénoliques des extraits et leur capacité à piéger les radicaux libres [20].

III.1.6.2 Test de blanchissement du β -carotène

La méthode de blanchissement du β -carotène a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits CH₁ et AE₁ de l'espèce *Lotus roudairei*.

La cinétique de blanchissement du β -carotène en fonction de la présence ou de l'absence des composés phénoliques dans les extraits CH₁, AE₁ et celle du standard BHA est montrée dans la figure III.105.

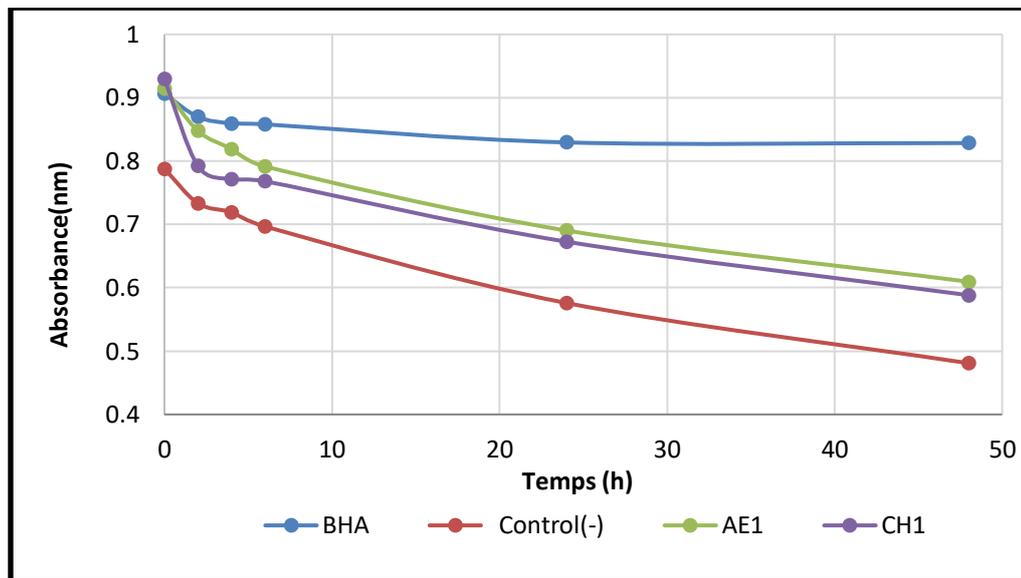


Figure III.105: courbes représentant la cinétique de blanchissement du β -carotène des extraits CH₁, AE₁ et le standard BHA en fonction du temps.

Comme le montre la figure III.105, les courbes ont la même allure. En effet, à l'instant t_0 les valeurs des absorbances des extraits CH₁, AE₁ ainsi que celle du standard sont très proches et ayant un seuil d'absorbance d'environ 1. Cela s'explique par le fait qu'à ce moment, il n'y a pas de radical qui a été formé dans le milieu réactionnel.

Après 2 heures de réaction, l'absorbance des extraits CH₁, AE₁, du standard ainsi que celle du contrôle négatif commence à diminuer progressivement indiquant le début de la formation des radicaux libres dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la dégradation des doubles liaisons par le tween 40.

L'étude de la cinétique de blanchissement du β -carotène montre qu'elle diminue progressivement avec le temps, atteignant un état d'équilibre après 48 heures car le nombre de radicaux libres devient important. Après cette période, la diminution de l'absorbance reste constante indiquant que toutes les doubles liaisons présentes dans le β -carotène sont dégradées, ce qui se termine par l'épuisement irréversible du jaune par la transformation en une couleur blanche. C'est le blanchissement total du β -carotène.

Les résultats de blanchiment du β -carotène (figure III.106) indiquent que les extraits AE₁ et CH₁ possèdent une activité très similaire avec des % d'inhibition de 66,63% et 63,31% respectivement mais très modérée comparativement à celle du BHA qui montre un % d'inhibition beaucoup plus important (91,42%).

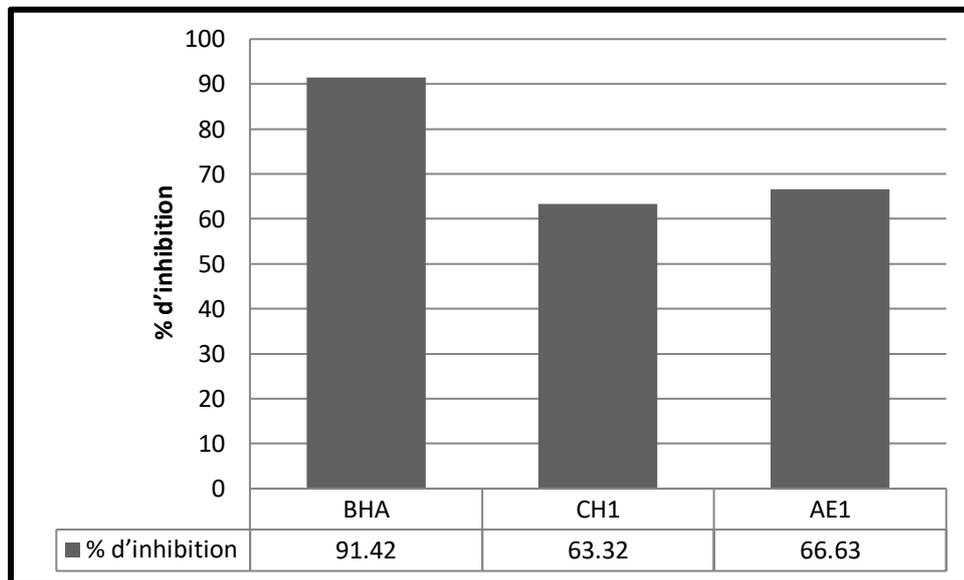


Figure III.106: Activité antioxydante relative des extraits CH₁, AE₁ et du BHA dans le système acide linoléique/ β -carotène.

L'ensemble des résultats obtenus par le test au DPPH et la méthode de blanchissement du β -carotène indique que l'extrait AE₁ montre un effet antioxydant plus important que l'extrait CH₁, il semble que ce résultat corrèle bien avec leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, il a été reporté que les composés phénoliques, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les groupes les plus importants de métabolites secondaires et de composés bioactifs que comportent les plantes. Ils ont été signalés avoir de multiples effets biologiques, y compris l'activité antioxydant [20, 21].

Le pouvoir antioxydant de l'extrait AE₁ de *L. roudairei* pourrait être dû à un ou plusieurs constituants chimiques mentionnés dans la partie III.1.2 (analyse par HPLC-TOF/MS) qui agissent de manière synergique. La différence entre les deux extraits CH₁ et AE₁ peuvent être

expliquée par la présence de plusieurs substances actives dans l'extrait AE₁ qui est caractérisé par la présence dominante de l'acide gentsique considéré comme l'un des antioxydants les plus puissants, il montre une activité similaire au celle du α -tocophérol en utilisant la méthode du *piégeage* des radicaux libres (DPPH)[22] . Cette activité pourrait être également, due à la présence en concentrations remarquables de l'acide vanillique et de l'acide *p*-coumarique qui sont totalement absents de l'extrait CH₁.

III.1.7 Evaluation de l'activité antiproliférative

La figure III.107 montre les résultats de la surveillance en temps réel par le système xCELLigence de la prolifération des cellules HeLa traitées avec des extraits CH₁, AE₁, BU₁ et de ME₁.

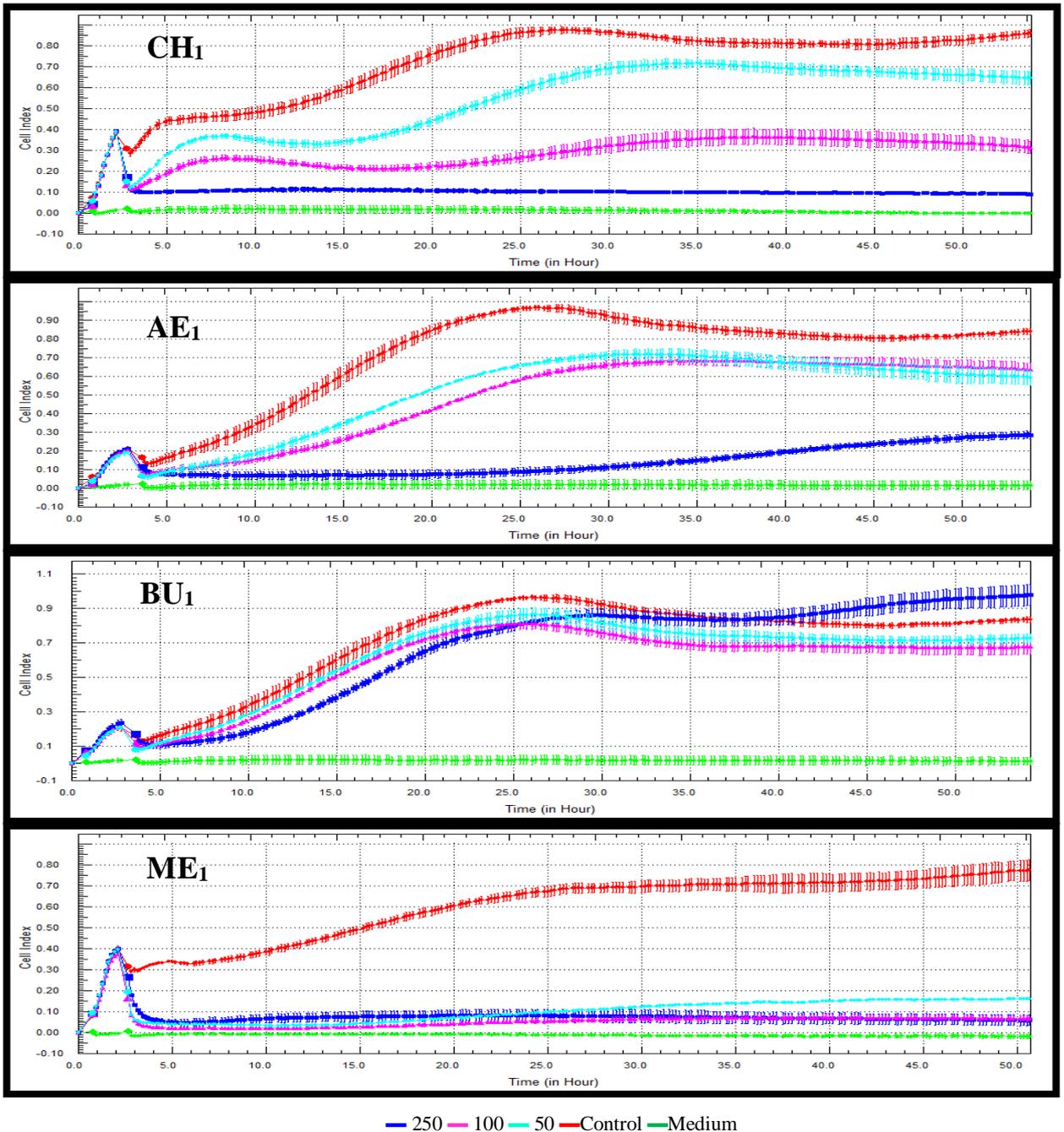


Figure III.107: l'activité antiproliférative des extraits CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁ contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) à différentes concentrations (50, 100, 250 µg/ml).

La figure III.107 montre les résultats de l'évaluation de la prolifération des cellules HeLa traitées pendant 70 heures avec les extraits CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁ de *L.roudairi* en utilisant l'instrument xCELLigence.

Nous remarquons d'après ces graphes qu'au cours des deux premières heures, les cellules non traitées par les extraits ont montré une croissance normale. Ensuite, les échantillons ont été ajoutés dans le milieu de culture cellulaire de chaque puits de la plaque E-96.

Les graphes présentés dans la figure III.107 indiquent clairement que les extraits testés n'ont pas montrés la même réponse à différentes concentrations. Effectivement, l'extrait ME₁ semble avoir la meilleure réponse pour les trois concentrations testées. Cependant cet effet est pratiquement identique aux concentrations de 250 et 100 µg/ml comparativement à la concentration de 50 µg/ml et ce au cours de toute la durée de l'expérimentation. L'extrait CH₁ montre des effets inhibiteurs élevés à concentration de 250 µg/ml. Cet effet a diminué à la concentration de 100 µg/ml et il devient plus faible à la concentration de 50 µg/ml. De même, l'extrait AE₁ présente un effet inhibiteur prononcé à la concentration de 250 µg/ml, alors que cet effet est très faible aux concentrations 100 et 50 µg/ml dès les premières heures de l'expérimentation. Alors que l'extrait BU₁ montre l'activité la plus faible aux différentes concentrations (50, 100 et 250 µg / ml).

Ces différences entre les extraits dépendent de leur composition phytochimique. Les travaux phytochimiques menés sur ces extraits ont permis l'isolement et l'identification structurale de plusieurs types de métabolites secondaires. L'analyse par HPLC a mis en évidence la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans les extraits ME₁ et CH₁. Les composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes donnent des effets sur les lignées de cellules cancéreuses humaines et ont également été étudiés de manière approfondie. Un nombre important d'études sur la culture cellulaire, les modèles animaux et les essais cliniques ont suggéré un effet protecteur des composés phénoliques contre différents types de cancers; Cependant, le mécanisme d'action varie selon la nature de ces composés phénoliques [23, 24].

Conclusion

Les résultats de cette étude menés sur les extraits de l'espèce *L.roudairi* indiquent que l'extrait AE₁ possède des propriétés de piégeage des radicaux libres remarquables *in vitro* et sont confirmés par le contenu élevés en polyphénols et en flavonoïdes. Les quatre extraits de *L.roudairi* ont été testés *vis à vis* des cellules HeLa pour évaluer leur activité antiproliférative, seul l'extrait ME₁ semble avoir une réponse positive à différentes concentrations.

Chapitre III.2

*Résultats de l'étude phytochimique et de
l'activité biologique de l'espèce **Genista
ferox** Poirret (Fabaceae)*

Résultats de l'étude phytochimique

III.2.1 Résultat de screening (criblage) phytochimique

Le screening phytochimique est basé essentiellement sur des réactions de précipitation et des réactions de coloration spécifique aux différents métabolites secondaire.

Le tableau III.23 rassemble les résultats globaux du screening chimique des trois parties de l'espèce *G.ferox*, sachant que:

- ✓ La présence de la substance est représentée par : +
- ✓ L'absence de la substance est représenté par : -

Tableau III.23: Résultats globaux du screening chimique de l'espèce *G.ferox*.

Groupes chimiques	fruits	Tiges	Feuilles
Alcaloïdes	+	+	+
Terpènes	+	+	+
Stérols insaturés	+	+	+
Triterpènes	+	+	+
Saponines	+	+	+
Quinones	-	-	-
Coumarines	+	+	+
Tanins	+	+	+
Flavonoïdes	+++	+++	+++
Anthocyanes	-	-	-

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des trois organes de la plante (feuilles, fruits et tiges) a permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes, des terpènes, des stérols insaturés, des triterpènes, des saponines, des coumarines, des tanins et surtout la présence prédominante des flavonoïdes. Les résultats de cette étude donnent une motivation orientant vers la séparation des composés flavoniques possédant des propriétés biologiques intéressantes.

III.2.2 Résultat de l'analyse par HPLC-TOF/MS

Les extraits des parties des tiges (CH_T, AE_T, BU_T et ME_T) ainsi que les extraits des feuilles (CH_F, AE_F, BU_F et ME_F) de la plante *Genista ferox* ont été analysés par la méthode HPLC-TOF/MS.

L'identification des acides phénoliques et des flavonoïdes a été effectuée sur la base de leurs temps de rétention et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des standards. Les résultats ont montré la présence de 44 composés comprenant 17 acides organiques et phénoliques (tableau III.24), 27 flavonoïdes et composés phénoliques (tableau III.25). Certains de ces composés étaient présents en très petite quantité et n'ont pas atteint la limite de détection (trace).

Tableau III.24: Résultats Quantitative des acides organiques et phénolique dans les extraits de la plante *G. ferox* exprimés en (mg phénolique/ kg plante).

N°	Acides organique et phénoliques	T _R (min)	Concentration en (mg composé phénolique/kg de matière sèche)							
			CH _F	AE _F	BU _F	ME _F	CH _T	AE _T	BU _T	ME _T
1	Acide gallique	2,40	Trace	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	Trace	Trace
12	Acide fumarique	3,20	Trace	Trace	12,8	2,2	Trace	6,6	78,6	Trace
2	Acide gentisique	4,50	0	0,7	1,6	0,8	0,1	2,5	11,3	3,5
10	Acide chlorogénique	5,50	0	ND	0,3	ND	0,1	ND	ND	ND
3	Acide 4-Hydroxybenzoïque	7,00	0	3,2	1,6	1,0	0,5	6,5	5,0	3,2
4	Acide protocatéchuique	7,10	0,1	0,3	2,1	2,3	0,2	0,7	11,0	7,2
5	Acide caféique	7,60	Trace	0,3	Trace	Trace	Trace	0,7	0,1	Trace
6	Acide vanillique	7,90	0,5	3,3	3,1	ND	1,3	7,8	10,8	ND
25	Acide syringique	8,10	0,1	0,4	1,4	ND	0,4	1,0	8,6	ND
11	4-Hydroxybenzaldéhyde	9,40	0,1	0,1	Trace	Trace	1,0	0,0	Trace	Trace
26	Acide ellagique	9,70	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	ND
13	Acide sinapique	10,50	Trace	Trace	Trace	Trace	0,0	0,1	Trace	Trace
9	Acide férulique	10,60	0,5	5,2	ND	ND	3,6	8,9	ND	ND
7	Acide p-coumarique	12,10	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
27	Acide protocatéchuique éthyl ester	12,80	Trace	Trace	Trace	Trace	0,0	Trace	Trace	Trace
28	Acide salicylique	13,10	Trace	0,9	1,7	Trace	0,5	2,7	5,5	Trace
14	Acide cinnamique	15,20	0,6	0,1	0,5	0,9	0,4	ND	ND	3,6
	Total		1,9	14,5	25,1	7,2	8,1	37,5	130,9	17,5

ND: Non Détecté

Trace: le composé est présent en très faible concentration (inférieur à la limite de détection de l'appareil).

Tableau III.25: Résultats quantitative des composés phénolique et flavonoïdes dans les extraits de la plante *Genista ferox* exprimés en (mg phénolique/ kg plant).

N°	Flavonoïdes	T _R (min)	Concentration en (mg composé phénolique/kg de matière sèche)							
			CH _F	AE _F	BU _F	ME _F	CH _T	AE _T	BU _T	ME _T
19	Catéchine	5,80	ND	ND	0,7	ND	0,1	ND	ND	ND
15	Rutine	9,20	Trace	0,0	0,1	3,2	Trace	0,1	0,0	0,4
29	Polydatine	9,60	Trace	0,9	2,9	Trace	0,2	0,9	Trace	Trace
20	Scutellarine	9,70	ND	1,0	0,3	Trace	Trace	5,6	66,1	5,8
30	Quercetine-3-β-D-glucoside	9,80	ND	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	14,0	Trace
21	Naringine	10,50	0,0	0,1	0,6	0,2	0,2	0,3	6,2	0,5
22	Diosmine	10,60	0,1	0,5	2,5	ND	0,4	1,0	13,6	ND
31	Taxifoline	10,60	Trace	0,3	ND	Trace	Trace	1,0	Trace	Trace
16	Hespéridine	10,80	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0,0	Trace	Trace
17	Apigétrine	10,90	Trace	0,7	Trace	Trace	Trace	3,3	16,1	1,1
32	Néohespéridine	11,10	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
33	Myricétine	11,90	Trace	Trace	ND	Trace	0,2	Trace	Trace	Trace
34	Baicaline	12,00	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	ND
35	Fisétine	12,10	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0,8	Trace	Trace
23	Morine	13,00	0,1	0,2	0,8	1,5	0,1	1,2	5,0	6,4
36	Resvératrol	13,00	Trace	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	Trace	ND
18	Quercétine	14,00	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
37	Silibinine	15,10	Trace	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	ND	ND
38	Apigénine	15,60	1,7	11,8	0,0	59,6	18,9	43,8	62,5	343,1
39	Naringinine	15,70	Trace	0,1	Trace	Trace	1,1	0,2	Trace	Trace
40	Kaempférol	15,70	Trace	0,1	ND	Trace	0,2	0,7	Trace	2,5
24	Diosmétine	16,10	0,0	0,1	ND	6,7	0,2	0,9	ND	51,7
41	Neochanin	17,70	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	Trace	ND	Trace
42	Eupatorine	18,90	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	ND	ND	Trace
43	Wogonine	19,80	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	ND	Trace
44	Galangine	20,50	Trace	Trace	ND	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
45	Biochanine A	17,10	ND	Trace	ND	Trace	ND	Trace	Trace	Trace
	Total		1,9	15,8	7,9	71,2	21,6	59,8	183,5	411,5

Une lecture étendue des résultats reportés dans les tableaux III.24 et III.25 permet de mettre en évidence les observations suivantes:

- ✓ L'extrait BU_T présente la concentration la plus élevée en acides organiques et

phénoliques (130,9 mg /kg) suivi par l'extrait AE_T (37,5 mg /kg). Alors que l'extrait CH_F présente la concentration la plus faible (1,9 mg /kg).

- ✓ L'acide gentisique, l'acide 4-Hydroxybenzoïque et l'acide protocatéchuique sont présents dans tous les extraits avec des concentrations plus ou moins importantes.
- ✓ L'acide fumarique présent dans les deux extraits BU_T et BU_F avec les concentrations les plus élevées (78,6 et 12,8 mg /kg) respectivement.
- ✓ Les trois flavonoïdes (naringine, morine et apigénine) sont présents dans tous les extraits avec des concentrations allant de 0,1 mg /kg à 343,1 mg /kg.
- ✓ La teneur la plus élevée en composés phénoliques et flavoniques a été observé dans l'extrait ME_T (411,5 mg /kg).

III.2.3 Elucidation structurale des composés isolés

III.2.3.1 Détermination de la structure du composé PB_{T-16-1}

✓ Propriétés physico-chimiques

Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol.

✓ Données spectroscopiques

L'analyse par HPLC du composé PB_{T-16-1} (figure III.108) montre la présence d'un pic au temps de rétention T_R = 8,229 min.

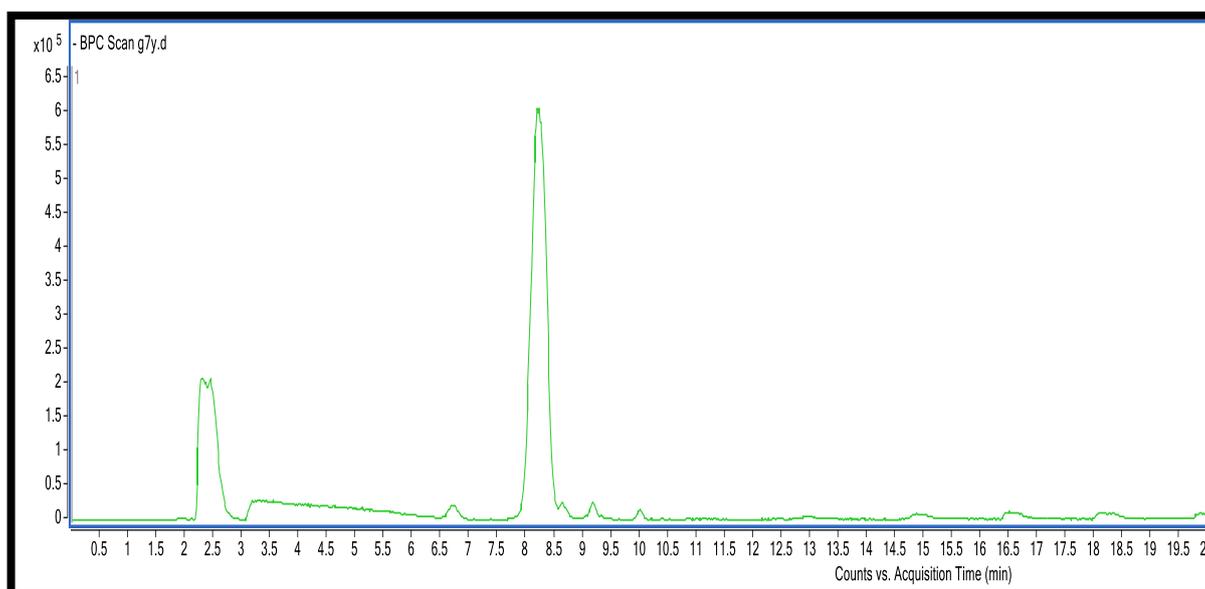


Figure III.108: Chromatogramme d'analyse par HPLC-TOF/MS du composé PB_{T-16-1}.

L'examen du spectre de masse haute résolution enregistré en mode électrobulisaison négatif TOF-HR-ESI-MS (-) (figure III.109) du composé PB_{T-16-1} montre un pic quasi-moléculaire à m/z 491,1186 Da correspondant à $[M-H+CH_2O_2]^-$ et un pic quasi-

moléculaire à m/z 445,1122 Da correspondant à $[M-H]^-$ oriente vers la formule brute: $C_{22}H_{22}O_{10}$ avec 12 insaturations.

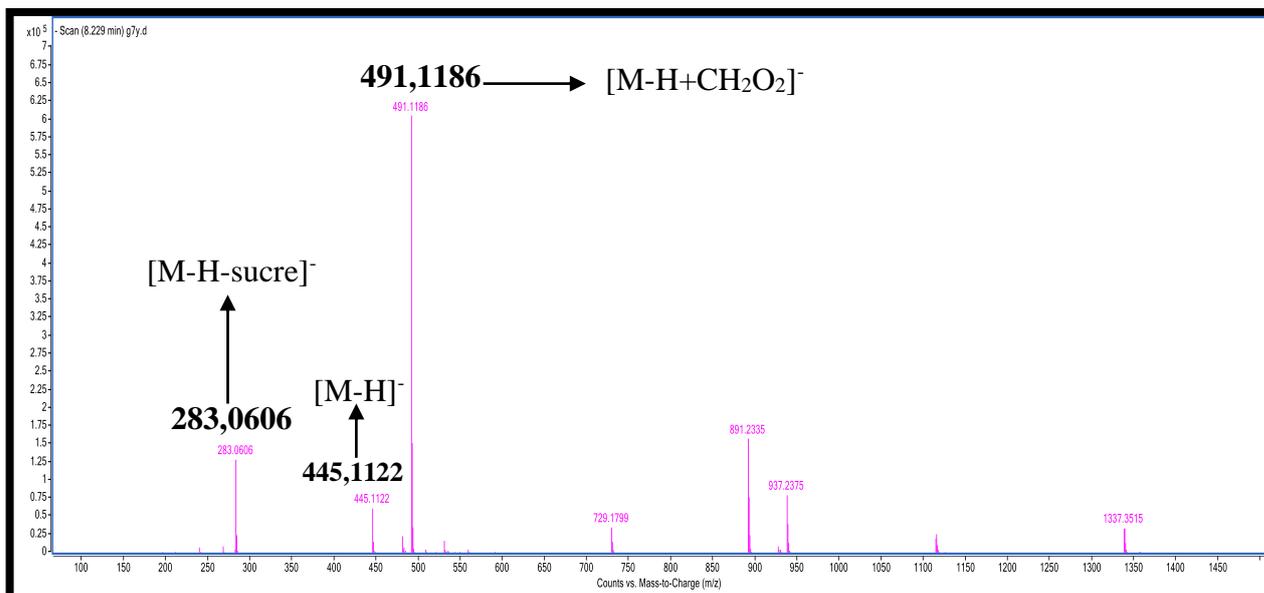


Figure III.109: Spectre TOF-MS en mode négatif du composé PB_{T-16-1} .

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (figure III.110) du composé PB_{T-16-1} Confirme la présence de 22 atomes de carbone.

Les 5 signaux dans l'intervalle des déplacements chimiques δ_C 61,2 à 77,1 ppm avec le signal à δ_C 100,4 ppm renseignent sur la présence d'une entité osidique dans la molécule.

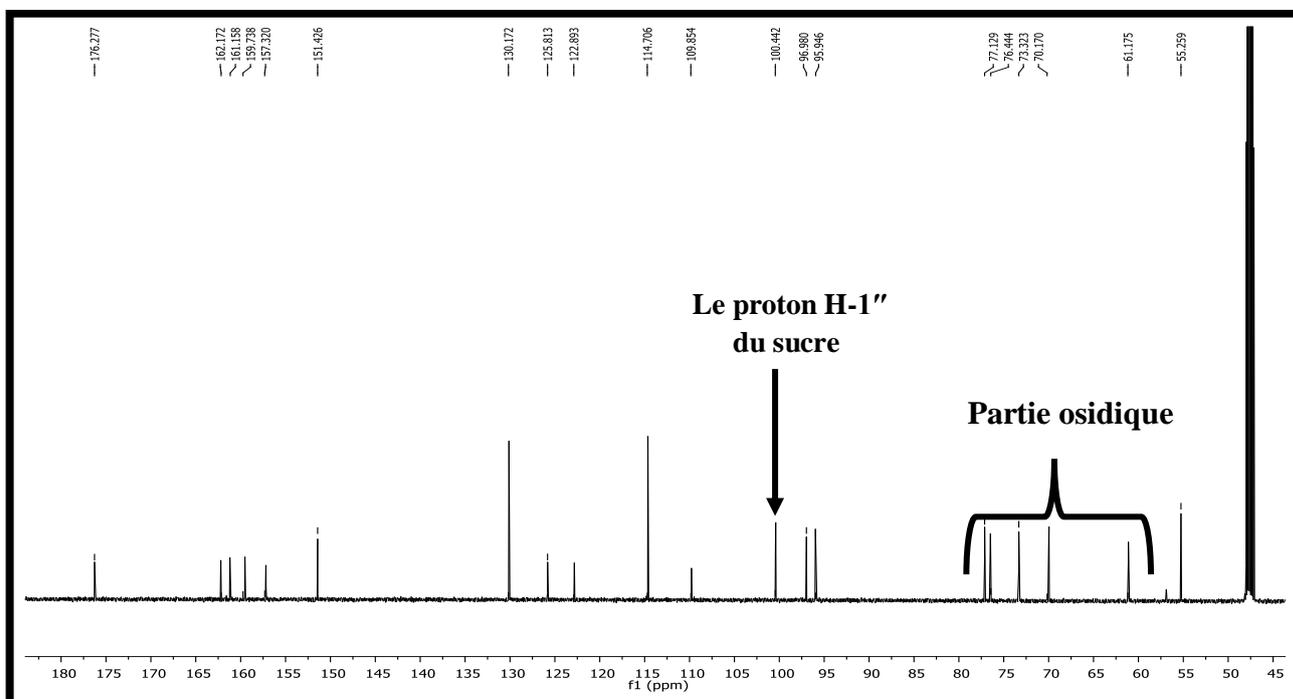


Figure III.110: Spectre RMN ^{13}C (méthanol- d_4 , 150 MHz) du composé PB_{T-16-1} .

Après consultation du spectre TOF-MS en mode négatif (figure III.109) et les deux spectres RMN ^{13}C (figure III.110) et ^1H (figure III.111) de ce composé, nous avons constaté une ressemblance avec le composé PB₂₇₋₂ dont l'interprétation a été donnée précédemment, nous avons alors procédé à une co-chromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes pour les deux composés. Il s'est avéré que c'est bien le même produit connu sous le nom de **5-méthoxy Genistéine-7-O-Glucoside** et dont la structure est présentée dans la figure III.103.

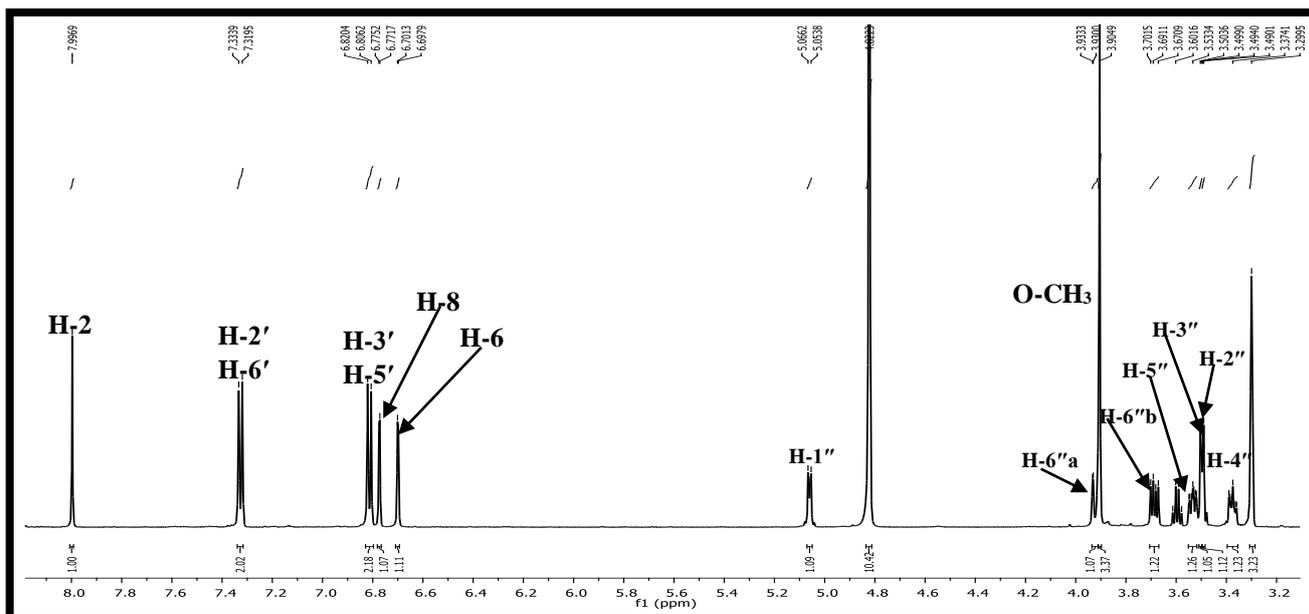


Figure III.111: Spectre RMN ^1H (méthanol- d_4 , 600 MHz) du composé PB_{T-16-1}.

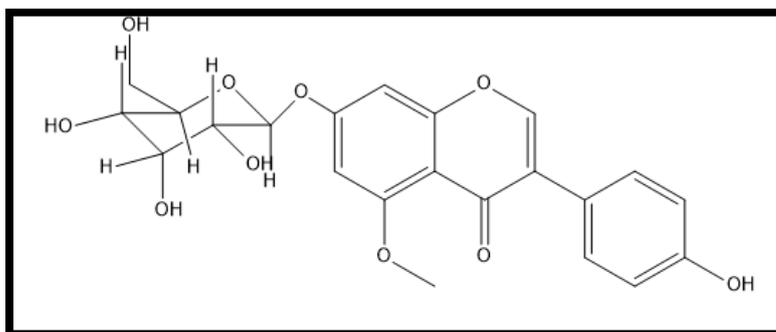


Figure III.103: Structure de 5-méthoxy Genistéine-7-O-Glucoside.

III.2.3.2 Détermination de la structure du composé PB_{T-16-3}

✓ Propriétés physico-chimiques

Le produit B_{T16-3} se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le méthanol.

✓ Données spectroscopiques

Le spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électro-nébulisation négatif TOF-HRESI-MS (-) (figure III.112) du composé PB_{T-16-3} montre un pic quasi-moléculaire

à m/z 477,0965 Da correspondant à $[M-H+CH_2O_2]^-$ et un autre à m/z 431,0906 Da correspondant à $[M-H]^-$ permettant de déduire une masse de 432 Da indiquant la formule brute $C_{21}H_{20}O_{10}$ comportant 12 insaturations.

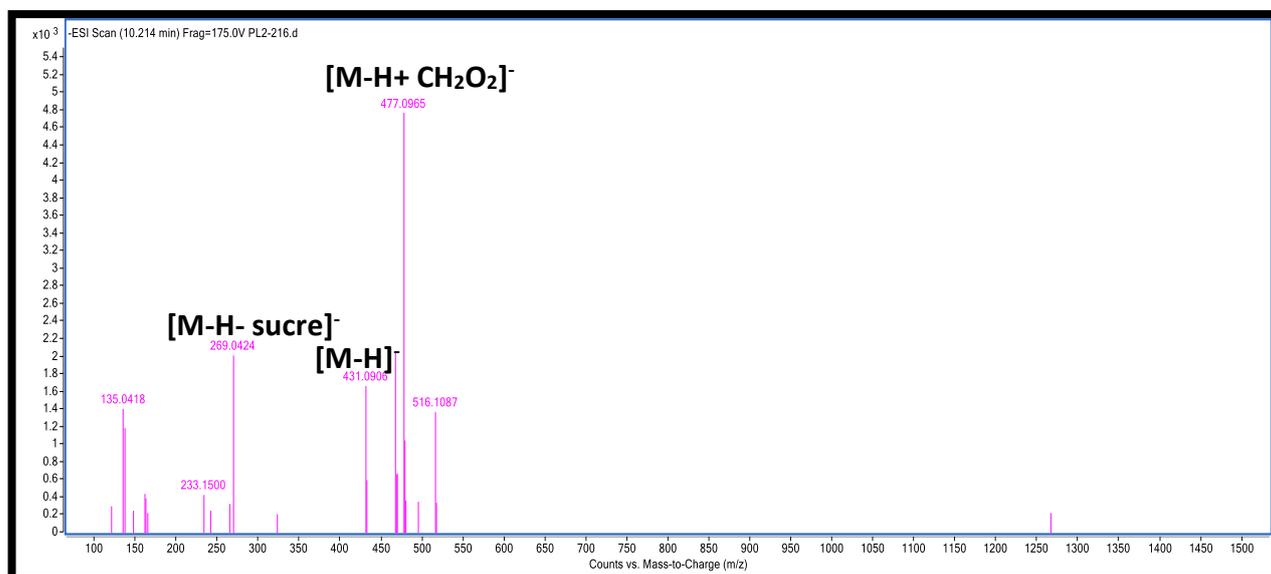


Figure III.112: Spectre TOF-MS en mode négatif du produit PB_T-16-3 .

L'analyse simultanée du spectre RMN 1H (figure III.113) et du spectre de l'expérience hétéronucléaire HSQC (figure III.114) montre les signaux caractéristiques d'un squelette de type isoflavone reconnaissable par:

- ✓ Un singulet à δ_H 8,13 ppm d'intégration 1H caractéristique du H-2 de l'isoflavone et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 154 ppm.
- ✓ Le signal à δ_H 7,38 ppm sous forme de doublet ($J= 8,5$ Hz) d'intégration 2H attribuable aux protons H-2' et H-6' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 130 ppm (C-2' et C-6').
- ✓ Un doublet ($J= 8,5$ Hz) à δ_H 6,84 ppm d'intégration 2H attribuable à H-3' et H-5' du cycle B et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 115 ppm.

Ces deux signaux montrent qu'on est en présence d'un cycle B substitué en para.

- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 6,7 ppm d'intégration 1H attribuable à H-8 corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 94,5 ppm.
- ✓ Un doublet ($J= 1,8$ Hz) à δ_H 6,51 ppm d'intégration 1H attribuable à H-6 corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 99,6 ppm.

La présence de ces deux signaux sur le spectre, indique une substitution des positions 5 et 7 du cycle A.

- ✓ Un doublet ($J= 7,2$ Hz) à δ_H 5,04 ppm d'intégration 1H caractéristique du proton

anomérique H-1'' d'un sucre, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 100,3 ppm. La valeur du déplacement chimique du proton et du son carbone, indique que l'entité sucre est liée à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage de ce proton avec son voisin, cette entité pourrait dériver soit d'un glucosyle soit d'un galactosyle avec une configuration β de la liaison reliant le sucre à la génine. L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans la figure III.115.

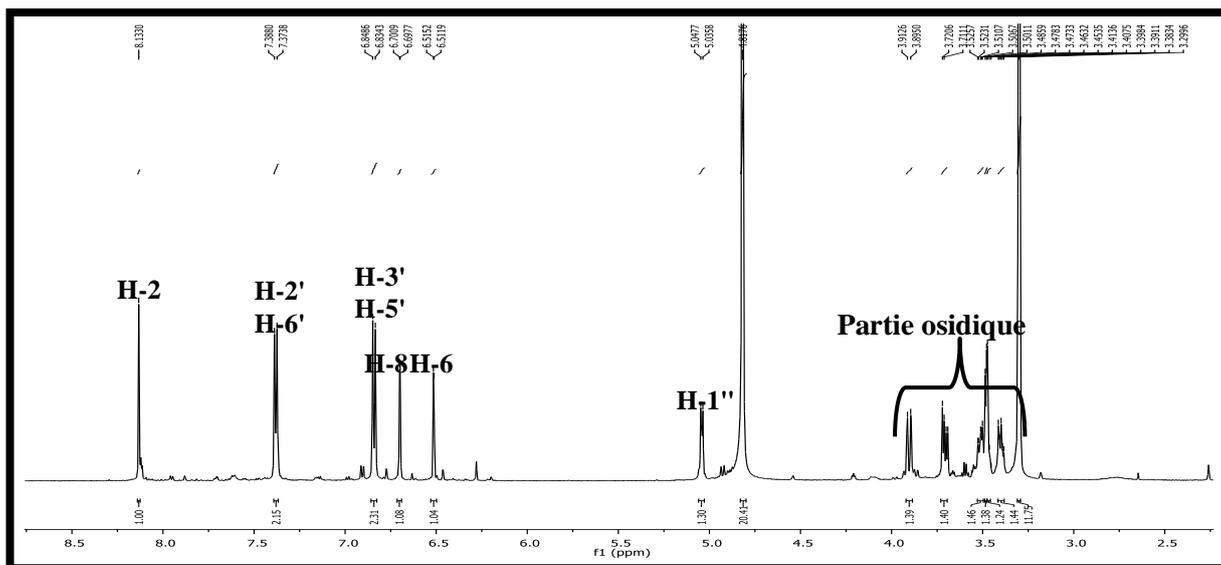


Figure III.113: Spectre RMN ^1H (méthanol- d_4 , 600 MHz) du composé PB_T-16-3.

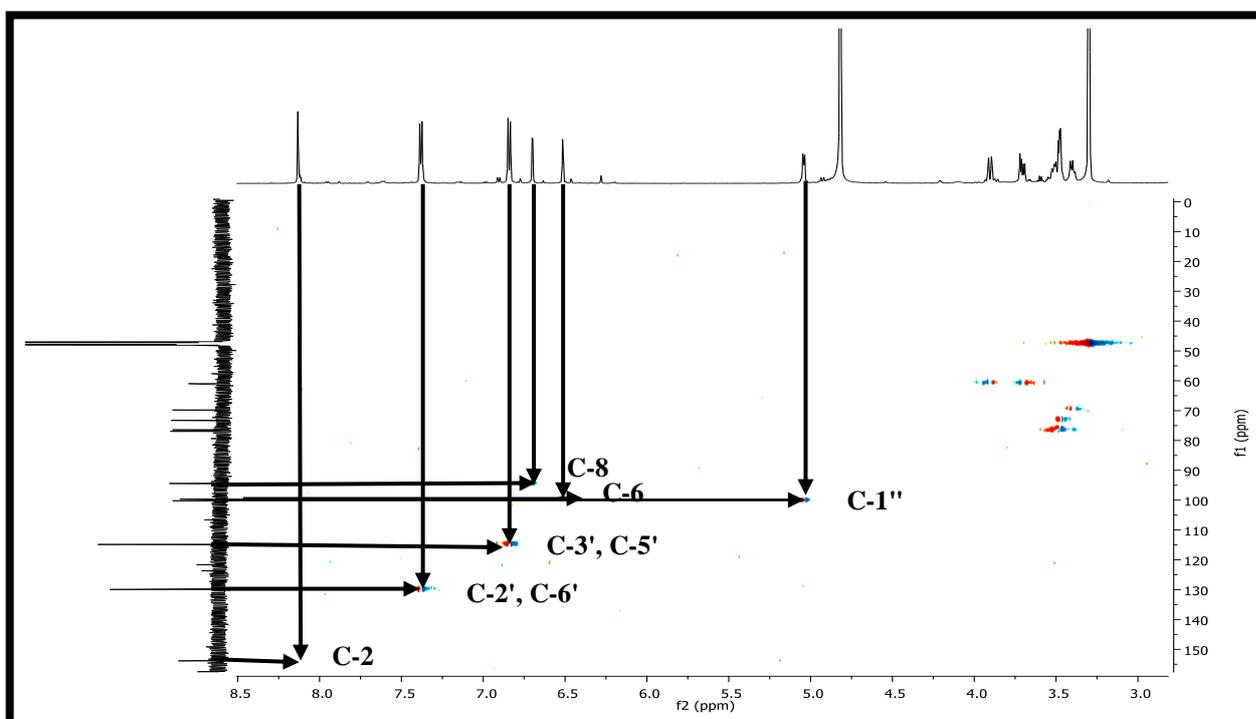


Figure III.114: Spectre HSQC du composé PB_T-16-3.

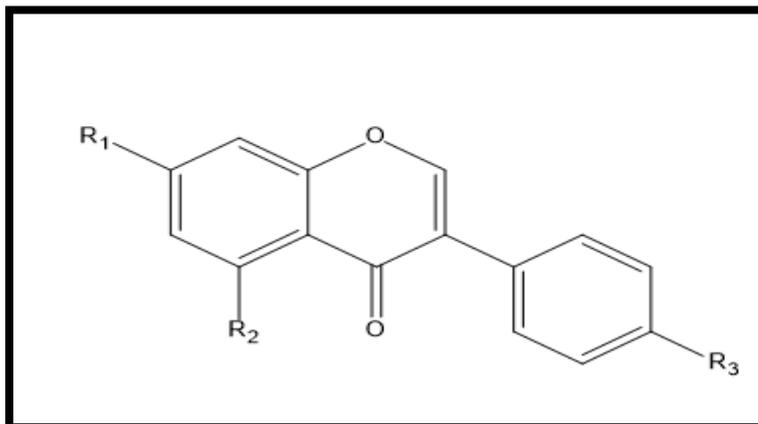


Figure III.115: Structure partielle du composé PB_{T-16-3}.

L'analyse simultanée des spectres COSY (figures III.116) et HSQC (figures III.114a) permet la localisation des protons et des carbones de la partie osidique grâce aux taches de corrélations comme suit:

- ✓ Le signal à δ_H 3,46 ppm sous forme d'un triplet ($J= 7,6$ Hz) d'intégration 1H attribuable au proton H-2" du sucre ppm grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1". Cette attribution de H-2" permet la localisation de H-3" à δ_H 3,47 ppm sous forme de triplet ($J= 7,6$ Hz).
- ✓ L'attribution du proton H-3" permet de localiser celle de H-4" à δ_H 3,41 ppm sous forme d'un multiplet.
- ✓ Toujours sur le même spectre, H-4" permet de localiser le H-5" sous forme de multiplet à δ_H 3,51 ppm.
- ✓ L'attribution du proton H-5" permet de localiser celle de H-6"b à δ_H 3,71 ppm sous forme d'un *dd* ($J_1= 12; 5,7$ Hz).
- ✓ L'attribution du proton H-6"b permet de localiser celle de H-6"a à δ_H 3,9 ppm sous forme d'un doublet ($J= 10,7$ Hz).

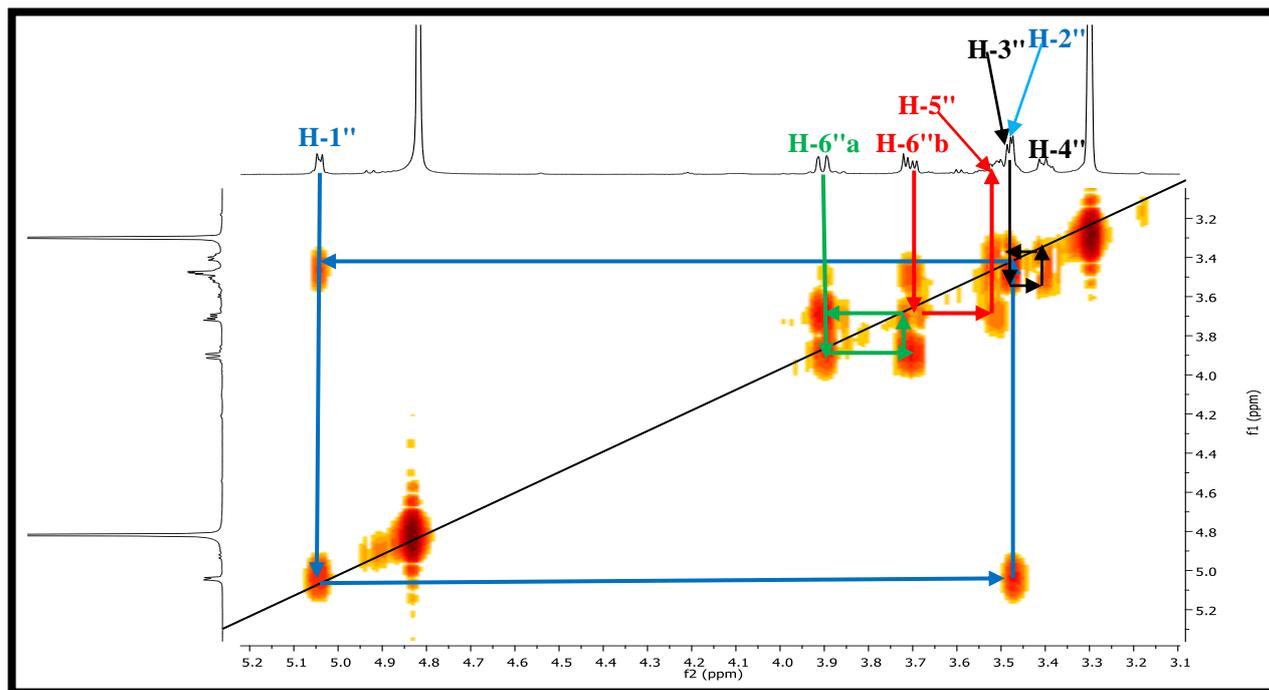


Figure III.116: Spectre RMN COSY du produit B_{T16-3}.

Les corrélations des protons de la partie osidique sur le spectre HSQC (figure III.114a) permet d'attribuer leurs carbones comme suit:

- ✓ Une tache de corrélation entre les deux protons H-6''a et H-6''b avec le carbone à δ_C 61,2 ppm attribuable à C-6''.
- ✓ Le proton H-5'' corrèle avec le carbone à δ_C 77 ppm attribuable à C-5''.
- ✓ Le proton H-3'' corrèle avec le carbone à δ_C 76,5 ppm attribuable à C-3''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-2'' et le carbone à δ_C 73,2 ppm attribuable à C-2''.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-4'' et le carbone à δ_C 69,9 ppm attribuable à C-4''.

D'après la valeur de déplacement chimique du carbone C-3'' et en comparaison avec la littérature [9], nous pouvons définir l'entité osidique comme étant le O- β -glucose.

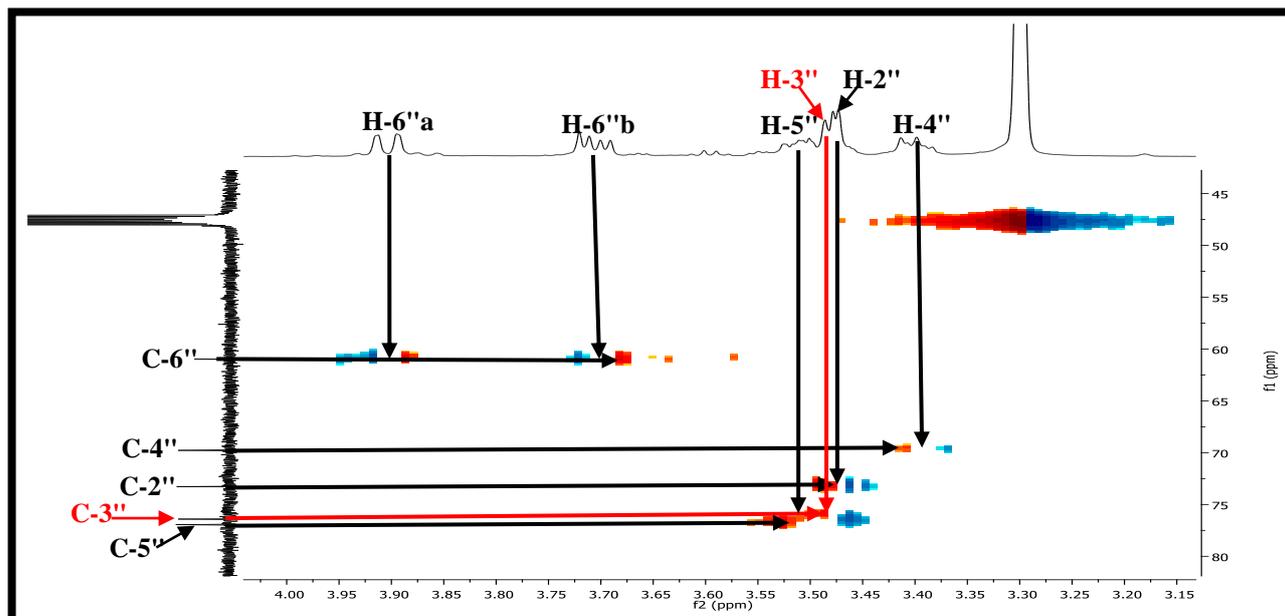


Figure III.114a: Spectre HSQC étalé du composé PB_T-16-3.

L'étude du spectre RMN ¹³C (figure III.117) montre la présence de 21 atomes de carbone. Par abstraction des CH et du groupement CH₂ indiqué précédemment, il reste 8C quaternaires. Ces derniers sont déduits sur la base de l'étude du spectre de l'expérience bidimensionnelle HMBC.

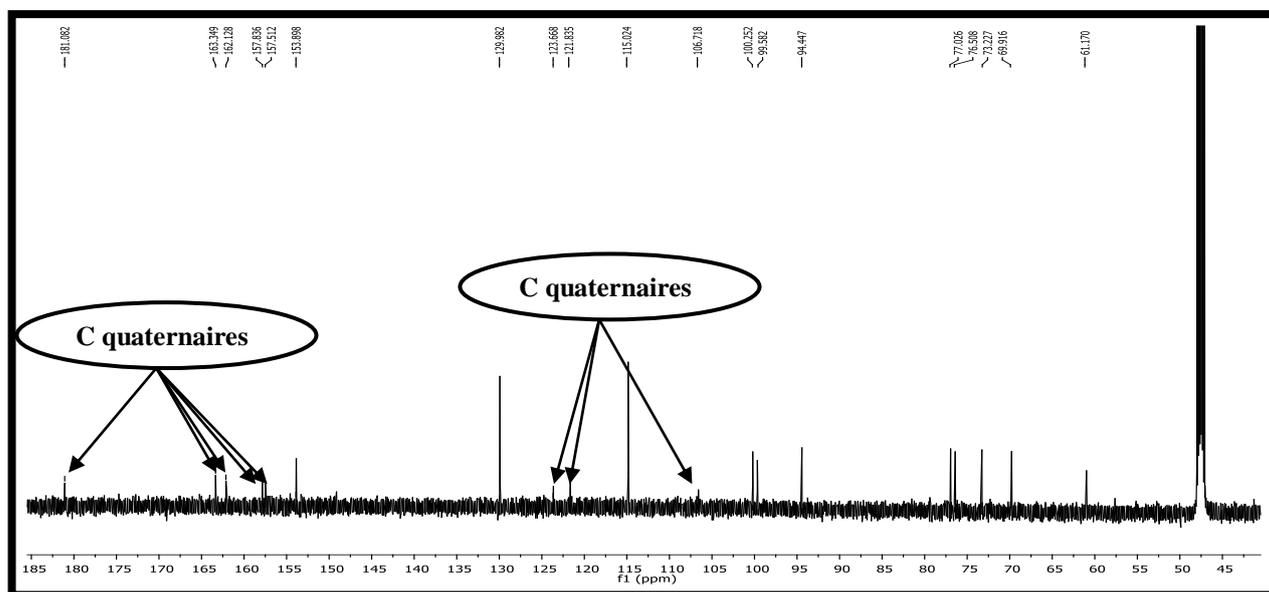


Figure III.117: Spectre RMN ¹³C (méthanol-*d*₄, 600 MHz) du composé PB_T-16-3.

L'analyse du spectre HMBC figure III.118 permet d'attribuer les carbones quaternaires à leurs signaux respectifs et de positionner l'entité osidique à l'aide de la corrélation H-C à longue distance (*2J*, *3J* et *4J*) comme suit:

- ✓ Le carbone à δ_C 121,8 ppm montre une tache de corrélation avec les protons H-3' et H-5'. ce carbone est attribuable au C-1'.

- ✓ Le carbone à δ_C 123,7 ppm montre deux taches de corrélation, la première avec les protons H-2' et H-6', et la deuxième avec le proton H-2, ce carbone est attribuable au C-3.
- ✓ Le carbone à δ_C 157,8 ppm montre une tache de corrélation avec les protons H-2 et H-8. Celui-ci ne peut être que le carbone C-8a.
- ✓ Le carbone à δ_C 157,5 ppm montre une tache de corrélation avec les protons H-2' et H-6', ce carbone est attribuable au C-4'.
- ✓ Le carbone à δ_C 181,1 ppm montre une tache de corrélation avec le proton H-2, ce carbone est attribuable au C-4.
- ✓ le proton H-6 montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 162,1 ppm attribuable à C-5
- ✓ le proton H-1" montre une tache de corrélation avec le carbone à δ_C 163,3 ppm attribuable au C-7, cela permet de positionner l'entité osidique sur le carbone C-7

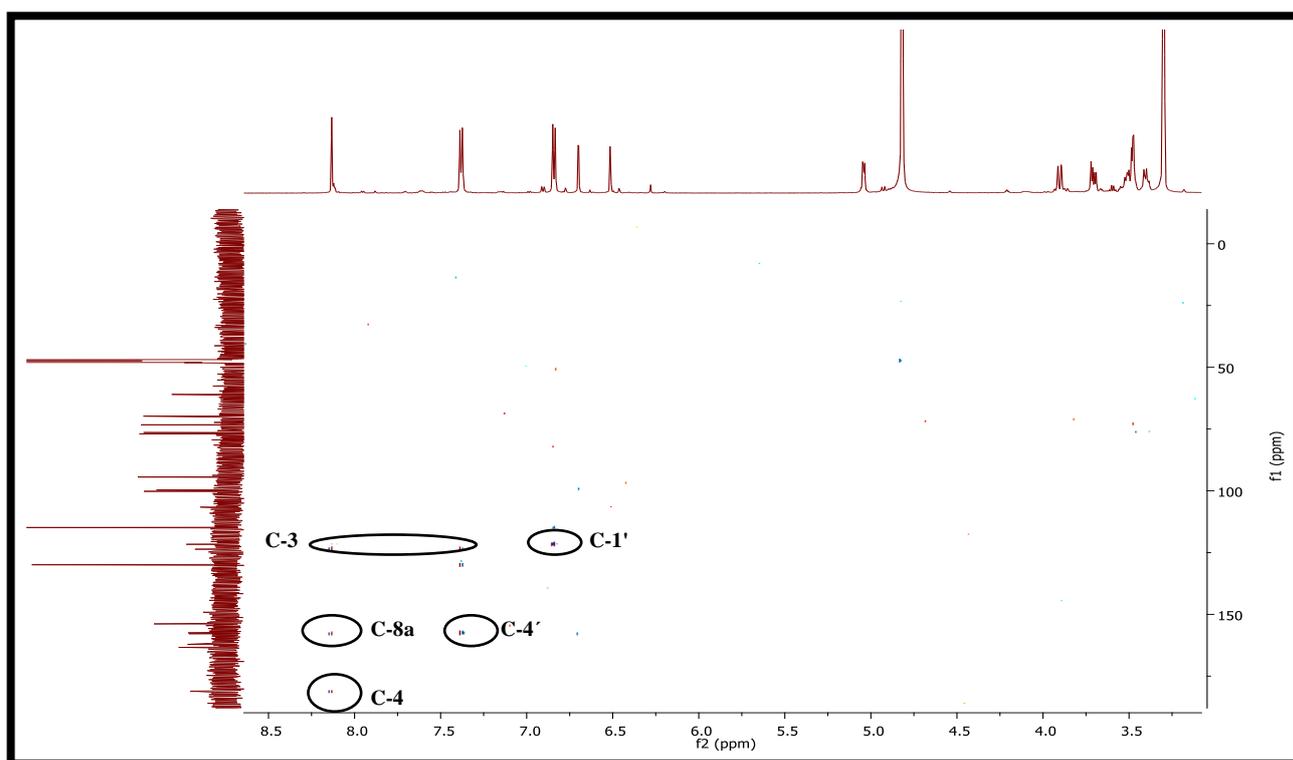


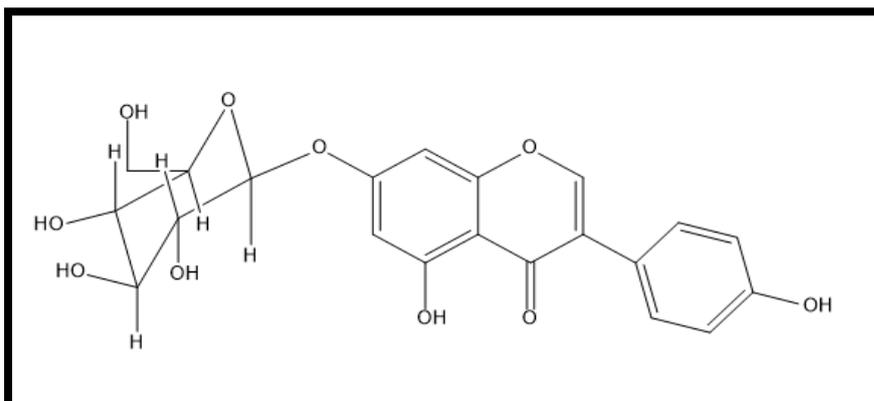
Figure III.118: Spectre RMN HMBC du produit PB_{T-16-3} .

Les données relatives aux spectres RMN (1H et ^{13}C) ont été reportées dans le tableau III.26.

Tableau III.26: Données relatives aux spectres RMN (^1H , ^{13}C) du composé $\text{PB}_{\text{T-16-3}}$.

Numérotation de la chaîne	δ_{H} (ppm)	Intégration, m , J (Hz)	δ_{C} (ppm)
C-2	8,13	1H, <i>s</i>	154
C-3	-	-	123,7
C-4	-	-	181,1
C-4a	-	-	106,7
C-5	-	-	162,1
C-6	6,51	1H, <i>d</i> , (1,8)	99,6
C-7	-	-	163,3
C-8	6,70	1H, <i>d</i> , (1,8)	94,5
C-8a	-	-	157,8
C-1'	-	-	121,8
C-2' et C-6'	7,38	1H, <i>d</i> , (8,5)	130
C-3' et C-5'	6,84	1H, <i>d</i> , (8,5)	115
C-4'	-	-	157,5
C-1''	5,04	1H, <i>d</i> , (7,2)	100,3
C-2''	3,46	1H, <i>t</i> , (7,6)	73,2
C-3''	3,47	1H, <i>t</i> , (7,6)	76,5
C-4''	3,41	1H, <i>m</i>	69,9
C-5''	3,51	1H, <i>m</i>	77
C-6''a	3,90	1H, <i>d</i> , (10,7)	61,2
C-6''b	3,71	1H, <i>dd</i> , (12; 5,7)	61,2

La combinaison de l'ensemble des données spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature mènent au composé Génistéine-7-O- β -glucoside connu sous le nom de génistéine isolé de l'extrait AE_1 de l'espèce *L.roudairi* [16] représentée dans la figure III.80

**Figure III.80:** Structure de la Génistéine-7-O- β -glucoside.

III.2.3.3 Détermination de la structure du composé PB_{T-18}

✓ **Propriétés physico-chimiques**

Le produit se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol.

✓ **Données spectroscopiques**

L'analyse par HPLC du composé B_{T-18} (figure III.119) montre la présence d'un pic au temps de rétention $T_R = 2,142$ min.

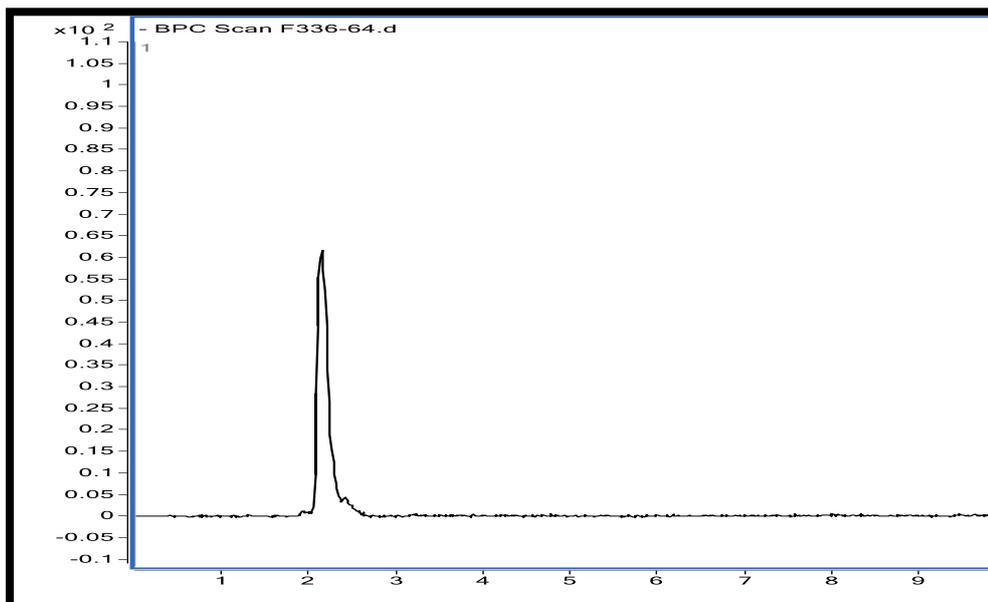


Figure III.119: Chromatogramme d'analyse par HPLC/TOF-MS du produit PB_{T-18}.

Le spectre de masse haute résolution (figure III.120) enregistré en mode électrobulisaison négatif (SMHR ESI (-)) montre un pic quasi-moléculaire à m/z 193,0733 Da correspondant à $[M-H]^-$. Ceci permet de déduire une masse de 194 Da correspondant à la formule brute $C_7H_{14}O_6$ indiquant une structure avec 1 insaturation. Le pic quasi-moléculaire à m/z 387,1552 Da correspond à $[2M-H]^-$, alors que la présence d'un pic quasi-moléculaire à m/z 161,0460 Da indique la perte d'un groupement méthoxyle.

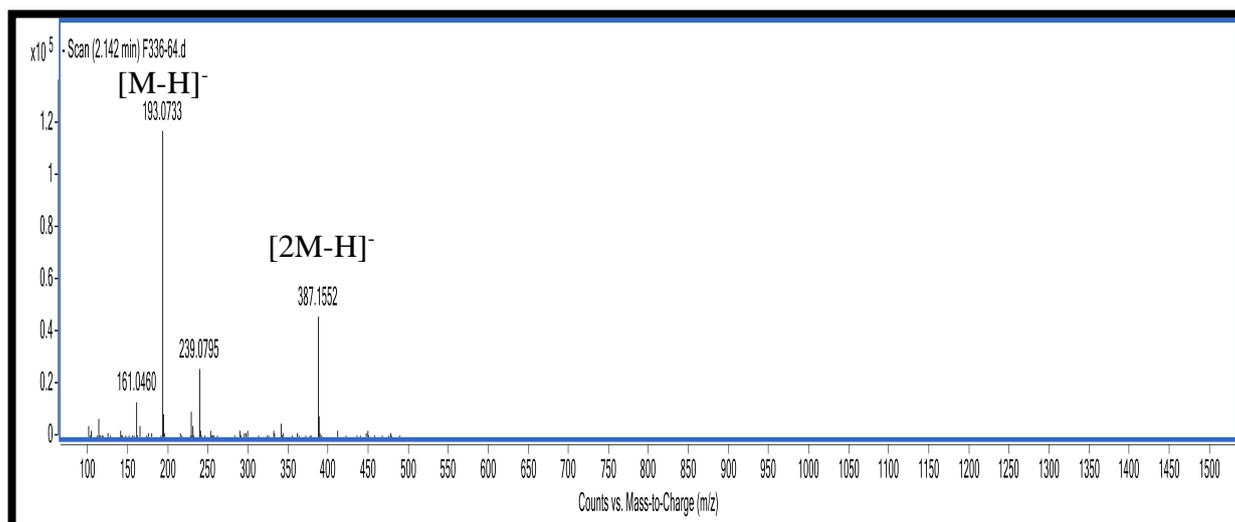


Figure III.120: Spectre TOF-MS en mode négatif du produit PB_{T-18}.

Après consultation du spectre TOF-MS en mode négatif (figure III.120) et les deux spectres RMN ¹³C (figure III.121) et ¹H (figure III.122) de ce composé, nous avons constaté une ressemblance avec le composé PB₂₇₋₁ dont l'interprétation a été donné précédemment, nous avons alors procédé à une co-chromatographie sur plaque de gel de silice dans plusieurs systèmes pour les deux composés. Il s'est avéré que c'est bien le même produit connu sous le nom de **D-pinitol** [18] et dont la structure est présentée dans la figure III.95.

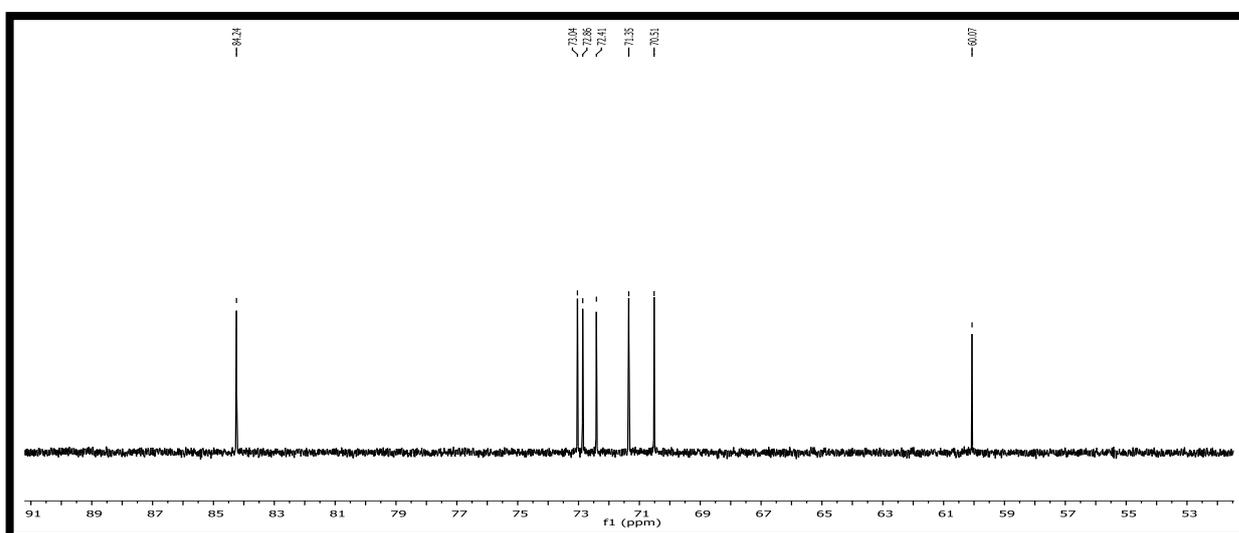


Figure III.121: Spectre RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz) du composé PB_{T-18}.

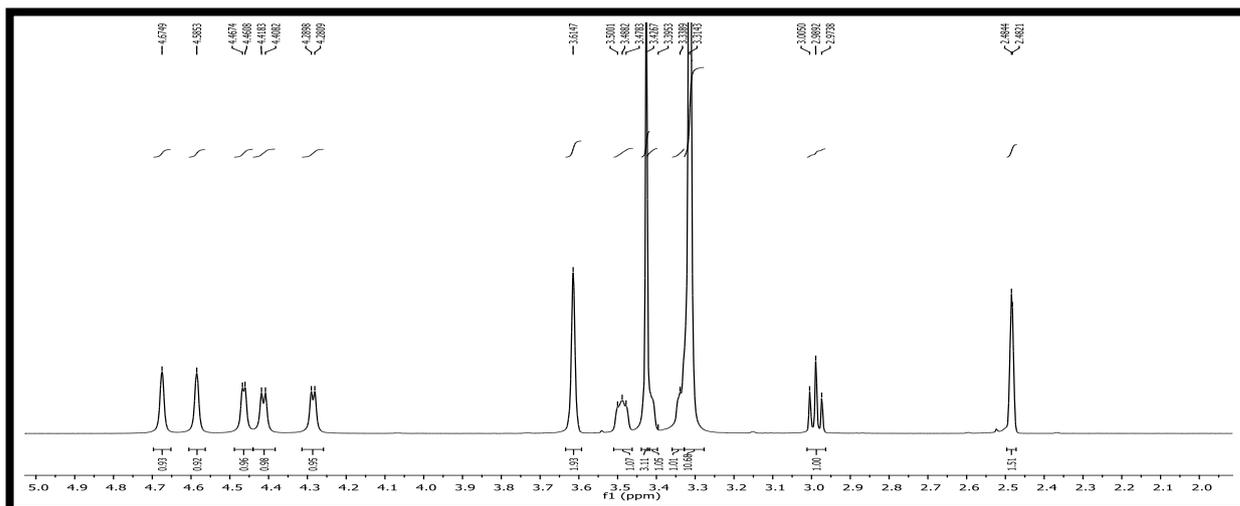


Figure III.122: Spectre RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) du composé $\text{PB}_{\text{T-18}}$.

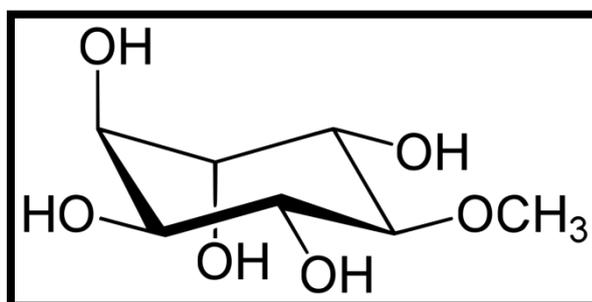


Figure III.95: Structure de D-pinitol.

Résultats des activités biologiques

III.2.4 Dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux

La teneur en composés phénoliques et flavonoïdes mesurés par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium varie considérablement de $105,2 \pm 0,6$ à $308,5 \pm 5,7$ mg EAG/ g d'extrait pour les polyphénols et de $8,1 \pm 0,1$ à $124,0 \pm 0,7$ mg EQ/ g d'extrait pour les flavonoïdes (Tableau III.27).

Tableau III.27: les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *G. ferox*.

Extraits	Taux en polyphénols (mg EAG/g)	Taux en flavonoïdes (mg EQ/g)
CH _F	$172,1 \pm 0,5$	$48,5 \pm 0,2$
CH _T	$190,6 \pm 5,9$	$30,7 \pm 0,4$
AE _F	$182,9 \pm 0,8$	$124,0 \pm 0,7$
AE _T	$308,5 \pm 5,7$	$92,2 \pm 0,1$
BU _F	$105,2 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,1$
BU _T	$144,3 \pm 0,02$	$11,6 \pm 0,1$

Comme le montre le tableau ci-dessus, les concentrations les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes ont été déterminées dans les extraits AE_T et AE_F respectivement suivi par les extraits CH_T et CH_F. Alors que les concentrations les plus faibles ont été déterminées dans les extraits BU_T et BU_F. Ces résultats sont en accord avec beaucoup d'autres études qui montre une richesse particulière de l'extrait acétate d'éthyle en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

III.2.5 Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.5.1 Test de DPPH

Les courbes montrant le % d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de tous les extraits et du standard (acide ascorbique) sont représentées dans la figure III.123.

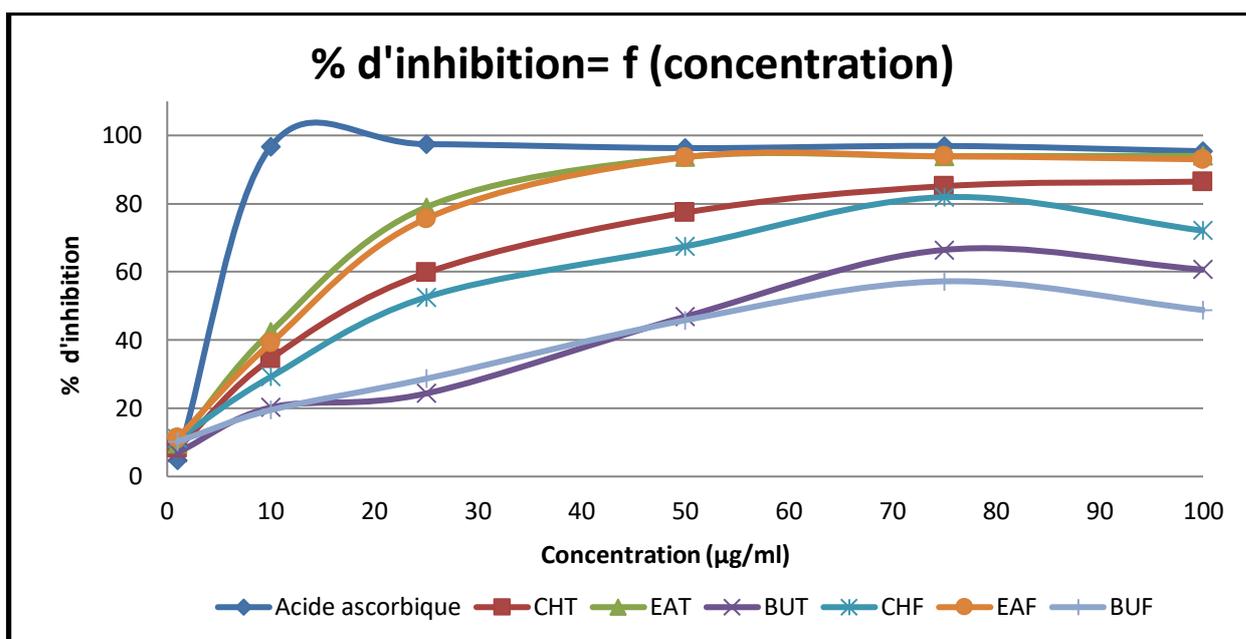


Figure III.123: courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits de *G.ferox* et l'acide ascorbique comme standard en fonction de la concentration.

Ces courbes montrent que tous les extraits réduisent de manière dose dépendante le radical DPPH comparativement à l'acide ascorbique. D'après ces courbes, le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à un seuil ou il se stabilise même avec l'élévation de la concentration.

Tous les extraits ont réagi positivement au test anti-radicalaire avec le DPPH mais à différents degrés. La figure III.152 montre que les extraits AE_T et AE_F présentent des pourcentages d'inhibition importants (93,90% et 93,87% respectivement) comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard (96,92%) et ce à partir de la concentration de 50 µg/ml. Ceci peut s'expliquer par la richesse de ces extraits en composés phénoliques signalés précédemment.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH (CI₅₀) est calculée graphiquement à partir des droites de régression pour chaque extrait et sont illustrées dans le tableau III.28.

Tableau III.28: Les valeurs des CI₅₀ de tous les extraits et du standard.

	Acide ascorbique	CH _T	CH _F	AE _F	AE _T	BU _T	BU _F
CI ₅₀ (µg/ml)	5,417± 0,02	19,559± 0,06	22,91± 0,19	14,948 ± 0,06	14,217± 0,02	52,493± 0,97	55,456± 0,22

Les extraits EA_T et AE_F montrent l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH avec des CI₅₀= 14,217± 0,02 et 14,948 ± 0,06 (µg/ml) respectivement, suivi de l'extrait CH_T avec une CI₅₀= 19,559 ± 0,06 (µg/ml) et l'extrait CH_F avec une CI₅₀= 22,91± 0,19 µg/ml. En dernier, les extraits BU_T et BU_F présentent l'effet inhibiteur le plus faible avec des CI₅₀= 52,493± 0,97 et 55,456± 0,22 µg/ml sachant que la CI₅₀ de la solution standard est de 5,417± 0,02 µg/ml. Ce résultat est en bon accord avec les données du dosage des polyphénols totaux qui montrent une richesse remarquable des extraits AE_T et AE_F comparativement aux autres extraits.

III.2.6 Evaluation de l'activité antiprolifératives

La figure III.124 montre les résultats de la surveillance en temps réel (avec le système xCELLigence) de la prolifération de cellules HeLa traitées par les différents extraits de *G. ferox*.

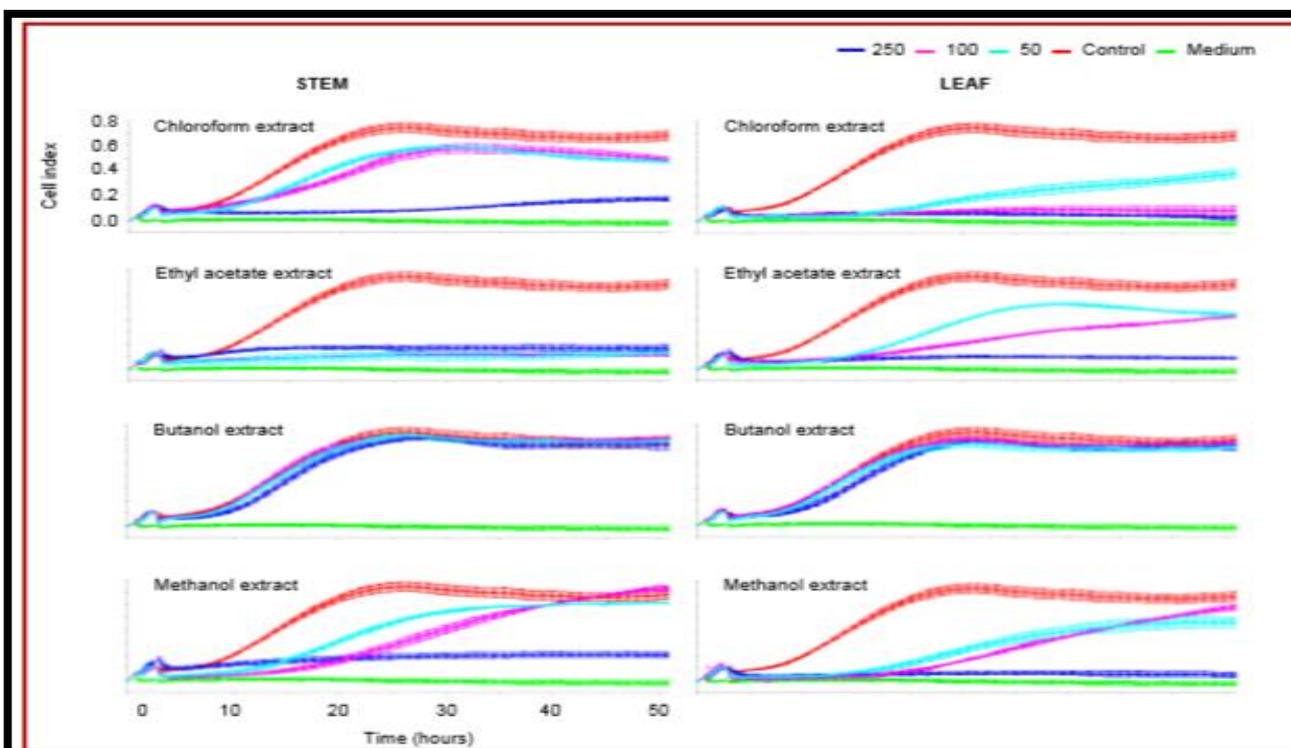


Figure III.124: L'activité antiproliférative des extraits de *G.ferox* contre les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) à différentes concentrations (50, 100, 250 µg/ml).

D'après les courbes présentés dans la figure III.124, il a été clair que tous les extraits ont une activité *vis-à-vis* des cellules HeLa à différentes concentrations, sauf les deux extraits BU_T et BU_F qui sont totalement inactifs à toutes les concentrations testées.

L'analyse approfondie des courbes reportées dans la figure III.124 permet de mettre en évidence les observations suivantes:

- ✓ Les extraits CH_T, AE_T, ME_T et ME_F montrent une activité élevée à la concentration de 250 µg/ml.
- ✓ L'extrait CH_F montre une activité élevée à partir de la concentration de 100 µg/ml. Cette activité a augmenté à la concentration de 250 µg/ml.
- ✓ L'extrait AE_T montre une forte activité à partir des concentrations faibles (50 et 100 µg/ml).

D'après ces observations, il semble que l'extrait AE_T est le plus actif *vis-à-vis* des cellules HeLa.

Le résultat de l'activité antiproliférative est en bon accord avec le résultat de l'activité antioxydant qui montre une activité élevée de l'extrait AE_T avec une CI₅₀ faible (14,217 ± 0,02 µg/ml) comparativement au standard. Ces résultats sont confirmés par le contenu élevé de cet extrait en polyphénols (308,5 ± 5,7 mg EAG/g).

Les composés phénoliques qui sont présent en grande proportion dans l'extrait AE_T est l'apégénine avec une concentration de 43,8 mg phénolique/Kg de plante. L'activité antioxydante et antiproliférative de l'extrait AE_T Peut être attribuée à l'existence de ce composé qui a de nombreuses propriétés biologiques, notamment l'activité antioxydante et antiproliférative [25].

Conclusion

Les résultats de cette étude indiquent que l'extrait AE_T de l'espèce *G. ferox* possède des propriétés antioxydantes puissantes *in vitro*. Ils sont confirmés par le contenu élevés des polyphénols. L'analyse par HPLC-TOF/MS révèle la présence de l'acide férulique et de l'apégénine. Tous les extraits de *G. ferox* ont été testés *vis à vis* des cellules HeLa pour évaluer leurs activité antiproliférative, seul l'extrait AE_T semble avoir une réponse positive à toutes les concentrations testées.

Références bibliographiques

- [1] Woyengo.T.A, Ramprasath.V.R and Jones.P.J.H. (2009) Anticancer effects of phytosterols *European Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 813-820.
- [2] Pandey.R, Verma.R.K and Gupta.M.M. (2006) Pentadecanoic acid β -D-glucoside from *Clerodendrum inerme*. *Indian Journal of Chemistry*, **45B**, 2161-2163.
- [3] Yff.B.T.S, Lindsey.K.L, Taylor.M.B, Erasmus.D.G and Jäger.A.K. (2002) The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *Journal of ethnopharmacology*, **79** 101-107.
- [4] Vasudevan.A, Kalarickal.V.D, Pradeep.K.M, Ponnuraj.K, Chittalakkottu.S and Madathilkovilakathu.H. (2012) Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chemical biology & drug design*, **80**, 434-439.
- [5] Kaleab.A, Paolo.M, O'Neill MJ and Phillipson.J D. (1985) Isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus* (Bolus) Harms Leguminosae. *Zeitschrift für Naturforschung*, **40**, 617-620
- [6] Boumaza.O, Mekkiou.R, Seghiri.R, Sarri.D, Benayache.S, Garcia.P.V, Bermejo.J and Benayache.F. (2006) Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42**, 730-731.
- [7] Pistelli.L, Bertoli.A, Giach.I and Manumata.A a. (1998) Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Product*, **61** 1404-1406.
- [8] Li.F, Zhu.Y.F, Chen.J.Y, Zhou.J, He.Y.Q and Yu.X.P. (2016) Gein sten inhibits the proliferation of VCaP castration-resistant prostate cancer cells. *Zhonghua Nan Ke Xue*, **22**, 1065-1070.
- [9] Agrawal.K.P. (1992) Nmr-Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, **31**, 3307-3330.
- [10] Khatun.M, Billah.M and Quader.M.A. (2012) Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka University Journal of Science*, **60**, 5-10.
- [11] Haruna.K, Mina.K, Shun.S, Masaya.I, Manabu.K, Yoko.Y, Isao.M and Kazuoshi.S. (2016) Biological activities of unique isoflavones prepared from *Apios americana* Medik. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1347-6947.
- [12] Garritano.S, Pinto.B, Giachi.I and al e. (2005) Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an in vitro short-term test *Phytomedicine*, **12**, 143-147.
- [13] Utkina.N.K and Kulesh.N. (2012) Antioxidant activity of polyphenols and polyphenol complex from the far-eastern tree *Maackia amurensis*. *Pharmaceutical chemistry journal*, **46**, 488-491.
- [14] Eleni.K, Alexandra.P, Pantelis.C, Maria.K, Ioannis.P.G, Haralambos.S and Andreas.G.T. (2012) Unexpected Enzyme-Catalyzed Regioselective Acylation of Flavonoid Aglycones. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2-25.
- [15] Dajas.F. (2012) Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of ethnopharmacology*, **143**, 383-396.

- [16] Lopez.L.M, Martin-Cordero.C, Iglesias-Guerra.F and González.M.J A. (1998) An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry*, **48**, 401-402.
- [17] Yindi.Z, Yue.L, Ying.Z, Lin.L, Yajuan.Xu, Tunhai.Xu and Tonghua.L. (2013) Preparative Isolation and Purification of Five Flavonoid Glycosides and One Benzophenone Galloyl Glycoside from *Psidium guajava* by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC). *Molecules*, **18**, 15648-15661.
- [18] Narda.B, Yonny.F and Giovanna.R.A. (2008) Secondary metabolites from *senna versicolor*. *Revista Boliviana de Química*, **25**, 36-42.
- [19] Marina.I, Erina.F, Saki/M, Jun-ichiro.H, Norihiko.M, Shun.S, Takahiro.F, Masaya.I and Kazutoshi.S. (2013) Novel Isoflavone Glucosides in Groundnut (*Apios americana* Medik) and Their Antiandrogenic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 2183–2187.
- [20] Nijveldt.R.J, Nood.E, Hoorn.D.E, Boelens.P.G, Norren.K and Leeuwen.P. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **74**, 418-425.
- [21] Mamta.S, Jyoti.S and Alka.P. (2012) Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **16**, 130-134.
- [22] OSHI.R J, ANGABHAGIRATHI.R G, VENU.S, ADHIKARI.S and MUKHERJEE.T. (2012) Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: in-vitro and pulse radiolysis studies. *Free Radical Research*, **46**, 11-20.
- [23] Yağlıoğlu.M.Ş, Gökhan.A, Demirtas.I and Yağlıoğlu.A.Ş. (2017) Phytochemical screening, antiproliferative and cytotoxic activities of the mosses *Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. and *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. *Anatolian Bryol*, **3**, 31-42.
- [24] M OS, El-Khalik.S.M. A, Saadeldeen.A.M., Koheil.M.A and Wink.M. (2015) Activity Guided Phytochemical Study of Egyptian *Lotus polyphyllus* E.D. Clarke (Fabaceae) *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **8**, 18-26.
- [25] XiangZ., Feng.W, Ruijun.Z, Xiuming.S and Meilin.X. (2017) Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry*, **41**, e12376.



Conclusion générale

Conclusion générale

Le besoin humain d'utiliser des plantes dans divers traitements ne cesse d'augmenter, ce qui a conduit les chercheurs à approfondir et développer la recherche sur ces ressources naturelles et à découvrir l'importance et les utilisations de chacun.

Dans ce présent travail, ayant pour objectif l'identification des métabolites isolés de plantes médicinales et évaluation de leur activité biologique, deux espèces de la famille Fabaceae, endémiques au nord africain ont été sélectionnés, l'espèce *G. ferox* et l'espèce *L. roudairei* qui n'a jamais fait objet d'investigations phytochimique ni biologique.

Les travaux de séparation et de purification des composés des divers extraits organiques ont été réalisés par des méthodes chromatographiques, notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice ou de gel de polyamide, la chromatographie sur plaques analytiques de gel de silice, la séparation sur flash chromatographie en support de gel de silice et la purification sur colonne de sephadex LH-20.

Les élucidations structurales des composés obtenus ont été réalisées par diverses méthodes d'analyse à savoir la RMN ¹D et ²D (¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC), la HPLC-TOF/MS et la GC/MS ainsi que la spectroscopie UV.

L'investigation phytochimique de l'espèce *L. roudairei* a permis l'isolement de 22 produits, parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle, la structure de 15 d'entre eux, à savoir:

- 3 phytosterols: **Campesterol, Stigmastérol et γ -Sitostérol.**
- 2 β -Sitostérols glucosylés: **3-O- β -glucopyranosyl β -Sitostérol et 3-O- β -glucopyranosyl Stigmastérol**
- 2 acides gras: **l'acide pentadécanoïque et l'acide hexadécanoïque (acide palmitique).**
- 3 isoflavonoïdes: **Génistéine, Pratenséine et Isoprunitéine.**
- 1 flavonoïde: **Quercétine.**
- 2 isoflavonoïdes glycosylés: **Génistéine-7-O- β -glucoside et 5- méthoxy Génistéine-7-O-Glucoside.**
- 1 flavonoïde glycosylé: **Quercétine-3- O- β -D-glucopyranoside.**
- 1 cyclitol: **D-pinitol.**

D'autre part, l'investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *G. ferox* a permis l'isolement de 6 produits, parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle, la structure de 3 d'entre eux:

- 2 isoflavonoïdes : **Génistéine-7-O-Glucoside** et **5-méthoxy-Génistéine-7-O-Glucoside**.
- 1 cyclitol : **D-Pinitol**.

La détermination et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes des extraits des deux espèces *Lotus roudairei* et *Genista ferox* ont été réalisés par HPLC-TOF/MS. Le résultat de cette analyse a révélé la présence de 13 acides phénoliques et 10 flavonoïdes dans la première espèce et de 44 composés comprenant 17 acides organiques et phénoliques et 27 flavonoïdes dans la deuxième espèce.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de blanchissement du β -Carotène des extraits CH₁ et AE₁ de *L. roudairei* a montré que l'extrait AE₁ possède un pouvoir antioxydant plus important que l'extrait CH₁ et ce comparativement au BHA utilisé comme standard. Cependant, le même test (DPPH) effectué sur les extraits CH_T, AE_T, BU_T et ME_T des tiges et les extraits CH_F, AE_F, BU_F et ME_F des feuilles de *G. ferox* a montré que les extraits AE_T et AE_F possèdent une activité antioxydante plus importante par rapport aux autres extraits et en comparaison avec l'acide ascorbique comme standard.

L'évaluation préliminaire de l'activité antiproliférative des extraits CH_T, AE_T, BU_T et ME_T des tiges et les extraits CH_F, AE_F, BU_F et ME_F des feuilles de *G. ferox* ainsi que CH₁, AE₁, BU₁ et ME₁ de *L. roudairei vis-à-vis* des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) a montré une bonne activité pour les extraits ME₁ et AE_T comparativement aux autres extraits de la même espèce. Cependant les extraits BU₁, BU_T et BU_F ont montré l'activité antiproliférative la plus faible *vis-à-vis* des cellules HeLa comparativement aux autres extraits de la même espèce.

L'ensemble de ces résultats ne peut qu'encourager à continuer les investigations sur les deux espèces afin de rechercher de nouvelles molécules et l'évaluation d'autres activités biologiques.

Enfin, nous espérons que ce travail apportera une modeste contribution au développement de la recherche sur les plantes algériennes qui sont encore à explorer.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux espèces, *Lotus roudairei* Bonnet et *Genista ferox* Poirret, appartenant aux genres *Lotus* et *Genista* respectivement de la famille Fabaceae. L'espèce *Lotus* n'a jamais fait objet d'étude phytochimique ni biologique auparavant.

L'objectif du présent travail est l'isolement et la détermination des structures des produits isolés à partir des différents extraits, ainsi que l'évaluation *in-vitro* de l'activité anti-oxydante et de l'activité antiproliférative contre des cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa) des extraits de deux espèces.

L'investigation chimique des extraits CH₁, AE₁ et BU₁ des parties aériennes *L. roudairei* a conduit à l'isolement et la caractérisation de 15 composés appartenant à divers squelette: stéroïdes, acides, flavonoïdes et isoflavonoïdes. L'extrait *n*-butanol de l'espèce *G. ferox* a donné 3 composés.

L'isolement et la purification des composés ont été effectués par la combinaison des méthodes chromatographiques. La détermination structurale a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques spectroscopiques, à savoir la spectroscopie UV, la RMN 1D (¹H, ¹³C), la RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC), HPLC-TOF/MS et la CG/SM et par comparaison avec les données de la littérature.

La quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes des extraits a été réalisée par HPLC-TOF/MS. Le résultat a révélé la présence de 13 acides phénoliques et 10 flavonoïdes dans la première espèce et de 44 composés renfermant 17 acides organiques et phénoliques et 27 flavonoïdes dans la deuxième espèce.

L'activité antioxydante des extraits CH₁ et AE₁ de l'espèce *L. roudairei* a été évaluée par les méthodes du DPPH et celle de blanchissement du β-Carotène. L'extrait AE₁ a présenté une activité antioxydante plus importante comparativement au standard (BHA). L'activité antioxydante des extraits CH_T, AE_T, BU_T et ME_T des tiges et les extraits CH_F, AE_F, BU_F et ME_F des feuilles de l'espèce *G. ferox* a été évaluée uniquement par la méthode du DPPH. Les extraits AE_T et AE_F ont montré une activité plus ou moins importante comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard.

Concernant l'activité antiproliférative, les résultats ont montré que l'extrait BU₁ de l'espèce *L. roudairei* et les deux extraits BU_T et BU_F de l'espèce *G. ferox* ont montré l'activité la plus faible *vis-à-vis* des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain), alors que l'extrait ME₁ de *L. roudairei* et l'extrait AE_T de *G. ferox* ont montré l'activité la plus élevée *vis-à-vis* des mêmes cellules.

Mots clés: *Lotus roudairei*, *Genista ferox*, Fabaceae, Phytochimie, RMN 1D et 2D, HPLC/TOF-MS, CG/SM, Activité antioxydante, Activité antiproliférative, cellules HeLa.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical study of two species, *Lotus roudairei* Bonnet and *Genista ferox* Poiret belonging to *Lotus* and *Genista* genus respectively of the Fabaceae family. *Lotus roudairei* specie has never been subject of a phytochemical or a biological study.

The aim of the present work is isolation and structural determination of the isolated products from different extracts belonging to the mentioned species, as well as the *in-vitro* evaluation of the antioxidant activity and the antiproliferative activity against Human cancer cells (HeLa) of extracts from both species.

The chemical investigation of CH₁, AE₁ et BU₁ extracts of the aerial parts of *Lotus roudairei* led to the isolation and characterization of 15 compounds of various skeletons: steroids, acids, flavonoids and isoflavonoids. The *n*-butanol extract of *Genista ferox* gave 3 compounds.

The isolation and purification of isolated compounds were carried out by combining different chromatographic methods. Their structural determination was achieved through the use of spectroscopic techniques, such as UV spectroscopy, 1D NMR (¹H, ¹³C), 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC), HPLC/TOF-MS and GC/MS and by comparison with literature data.

The quantification of phenolic acids and flavonoids in extracts of both species was performed by HPLC-TOF/MS. The results revealed the presence of 13 phenolic acids and 10 flavonoids in *Lotus roudairei* and 44 compounds comprising 17 organic and phenolic acids and 27 flavonoids and phenolic compounds in *Genista ferox*.

The antioxidant activity of CH₁ and AE₁ extracts of *Lotus roudairei* was estimated by the DPPH test and β-Carotene bleaching assay. The AE₁ extract exhibited the most important antioxidant activity compared to BHA used as standard. The antioxidant activity of CH_T, AE_T, BU_T and ME_T extracts from stems and CH_F, AE_F, BU_F and ME_F extracts from leaves of *Genista ferox* was evaluated by the DPPH test. The AE_T and AE_F extracts showed significant antioxidant activity compared with ascorbic acid used as standard.

Concerning the antiproliferative activity, the results showed that the BU₁ extract of *Lotus roudairei* and the two extracts BU_T and BU_F of *Genista ferox* showed the lowest activity against HeLa cells (carcinoma of the human uterine cervix), while the ME₁ extract of *L.roudairei* and the AE_T extract of *G.ferox* showed the highest activity against HeLa cells.

Key words: : *Lotus roudairei*, *Genista ferox*, Fabaceae, Phytochemistry, NMR 1D et 2D, HPLC/TOF-MS, GC/MS, Antioxydant activity, antiproléférate activity, HeLa cells.

ملخص

هذا العمل مكرس لدراسة الكيمياء النباتية لصنفين *Lotus roudairei* Bonnet و *Genista ferox* Poiret، تنتميان للجنسين *Lotus* و *Genista* على الترتيب من عائلة Fabaceae (Leguminosae). الصنف *Lotus* لم يحظ من قبل لا بدراسة كيميائية نباتية ولا حيوية.

الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد بنيات لمواد معزولة من مستخلصات مختلفة، بالإضافة إلى التقييم المخبري للنشاط ضد تأكسدي والنشاط ضد تكاثري في الخلايا البشرية لسرطان عنق الرحم (HeLa) لهذين الجنسين.

التحريات الكيميائية للمستخلصات CH_1 , AE_1 et BU_1 لـ *L. roudairei* خلصت إلى عزل 15 مركب تنتمي إلى هياكل مختلفة: stéroïdes, acides, flavonoïdes et isoflavonoïdes. مستخلص البيتانول من الجنس *G. ferox* أعطى 3 مركبات:

تمت العزلة وتصفية المركبات من خلال الجمع بين الأساليب الكروماتوغرافية. وجرى التحديد الهيكلي من خلال استخدام التقنيات الطيفية (1H , ^{13}C), la RMN 1D (COSY, HSQC et la RMN 2D (HPLC-TOF/MS et la GC/MS, HMBC) بالإضافة إلى مقارنة النتائج مع مختلف المراجع..

تم إجراء القياس الكمي للأحماض الفينولية والفلافونويدات من المستخلصات بواسطة HPLC-TOF/MS. أظهرت النتائج وجود 13 حمض فينولي و 10 فلافونويد في النوع الأول و 44 مركب يحتوي على 17 حمض عضوي وفينولي و 27 فلافونويد في النوع الثاني.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات CH_1 و AE_1 من *Lotus roudairei* بواسطة طرق DPPH و تلك الخاصة بتبييض β -Carotène. أظهر استخراج AE_1 المزيد من النشاط المضاد للأكسدة مقارنة مع معيار (BHA). النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات ME_T , CH_T , AE_T , BU_T للسيفان و مستخلصات ME_F , AE_F , BU_F , CH_F للاوراق من *Genista ferox* قيم فقط من خلال طريقة DPPH. وأظهرت مستخلصات AE_T و AE_F نشاطا كبيرا بالمقارنة مع حمض الاسكوربيك المستخدم كمعيار.

وفيما يتعلق بالنشاط اللا تكاثري، أظهرت النتائج أن المستخلص BU_1 من النوع *Lotus roudairei* وكلا المستخلصان BU_T و BU_F من النوع *Genista ferox* أظهروا النشاط الأدنى اتجاه خلايا HeLa (سرطان عنق الرحم البشري)، في حين أن المستخلص ME_1 من النوع *Lotus roudairei* ومستخلص AE_T من النوع *Genista ferox* أظهروا نشاطا أعلى اتجاه نفس الخلايا.

الكلمات المفتاحية :

Lotus roudairei, *Genista ferox*, Fabaceae, Phytochimie, RMN 1D et 2D, HPLC/TOF-MS, GC/MS, Activité antioxydante, Activité antiproléferative, HeLa.

HPLC analysis, anti-oxidant activity of *Genista ferox* and its anti-proliferative effect in HeLa cell line

Ilhem Bencherchar¹, Ibrahim Demirtas¹, Muhammed Altun¹, Fatih Gül¹, Djamel Sarri², Fadila Benayache², Samir Benayache² and Ratiba Mekkiou²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Cankırı Karatekin University, Cankırı, Turkey; ²Valorization of Natural Resources, Bioactive Molecules and Biological Analysis Unit, Department of Chemistry, University of Mentouri Constantine 1, Constantine 25000, Algeria.

Article Info

Received: 24 April 2017
Accepted: 20 June 2017
Available Online: 20 July 2017
DOI: 10.3329/bjp.v12i3.32310

Cite this article:

Bencherchar I, Demirtas I, Altun M, Gül F, Sarri D, Benayache F, Benayache S, Mekkiou S. HPLC analysis, anti-oxidant activity of *Genista ferox* and its anti-proliferative effect in HeLa cell line. Bangladesh J Pharmacol. 2017; 12: 260-67.

Abstract

The prevention and treatment of the cancer using plants have attracted increasing interest. The present study was aimed to determine the phenolic compounds of *Genista ferox* using HPLC-TOF/MS and the anti-oxidant activity associated with anti-cancer activity against human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell line. Total anti-oxidant capacities of different extracts of *G. ferox* were assessed by DPPH assay, and their total phenolic and flavonoids contents measured by Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride assays. The amounts of total phenolic ($105.2 \pm 0.6 - 308.5 \pm 5.7$ mg/g) of extract measured as gallic acid equivalent and flavonoids ($8.1 \pm 0.1 - 124.0 \pm 0.7$ mg/g) of extract measured as quercetin equivalent varied from chloroform to *n*-butanol extract of the two parts of the plant (leaf and stem). The ethyl acetate extract of *G. ferox* exhibited the most powerful effect on the DPPH scavenging activity with 94% from the leaf and 93% from the stem, while the chloroform extract from the leaf exhibited the most effective anti-proliferative activity against HeLa cell lines.

Introduction

Plants used in ancient times as medicines to alleviate symptoms of various ailments (Saeed et al., 2012). In spite of the great progress in modern medicine in recent decades, but the herbal medicine still make an important contribution in the health care. Many medicinal and aromatic plants contain huge amounts of anti-oxidants such as polyphenols. These substances can have an important role in the absorption and neutralize free radicals, and the extinction of the singlet and triplet oxygen or peroxide decomposing. Many of these phytochemicals have anti-oxidant capabilities so they contribute significantly to the fight against many human diseases and thus contribute to the reduction of mortality (Djeridane et al., 2006). Phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids have different

biological effects, such as the effects of anti-atherosclerotic, anti-inflammatory and anti-cancer, as a result of the anti-oxidant activity (Krishnaiah et al., 2011).

The Fabaceae family contains approximately 700 genera, in Algeria there are about 53 genera and 337 species (Quezel and Santa, 1963). *Genista* genus has about 150 species in Europe and the Mediterranean region (RE, 1987). A literature survey shows that this genus is a good source of phenolic compounds, in particular isoflavonoids, which are known for their diverse biological activities. The recent studies on the species of the *Genista* genus showed pharmacological interest (Belle et al., 1995; Herrera et al., 1992).

In the present study, the qualitative and quantitative analysis, the identification and quantification of phenolic acids and flavonoids in chloroform, ethyl



acetate, *n*-butanol and methanol extracts of *Genista ferox* using HPLC-TOF/MS were reported. All extracts were subjected to DPPH radical scavenging activity assay to evaluate the anti-oxidant activity as well as the estimation of anti-proliferative activity against HeLa cell lines.

Materials and Methods

Plant material

G. ferox was harvested from the region of El-kala (eastern Algeria) in May 2014 and identified by Dr. Djamel Sarri from the Department of Biology, M'Sila University. A voucher specimen had been deposited in the VARENBIOMOL research unit with the identification number 05/2014/FGF.

Phytochemical screening

Three organs of the plant material (fruit, leaf and stem) were separated and screened for different chemical constituents such as coumarins, saponins, quinone, flavonoids, alkaloids, anthocyanin and tannins using standard procedures (Ciulel, 1982; Linga Rao and Savithramma, 2011; Obasi Nnamdi et al., 2010).

Extraction procedures

The stems (1,075 g) of *G. ferox* was macerated at room temperature with a mixture of ethanol:water (70:30, v/v) for 48 hours. The process was repeated thrice. After filtration, the filtrates were concentrated and finally dissolved in 430 mL of water which gave soluble and non-soluble parts in water. The aqueous phase (soluble part) was extracted successively with chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. The organic layers were concentrated in vacuum at room temperature to obtain the extracts. While, the non-soluble part was dissolved in the methanol to give the methanol extract.

A quantity of 700 g of leaves of *G. ferox* were macerate by the same manner as previously to obtain chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and methanol extracts.

The yields of different extracts of *G. ferox* were calculated using the formula:

Yield % (w/w) = (Amount (g) of extract/Amount (g) of plant) × 100

Quantitative analysis by HPLC-TOF/MS

The quantification of flavonoids, phenolics and phenolic acids in all extracts was carried out using 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technology) coupled with TOF (6210 Time of Flight) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4.6 × 100 mm, 3.5 μm) column. The mobile phase consisted of solvent mixtures (A) water (ultra-pure) with 0.1% formic acid and (B) acetonitrile, respectively. Flow rate and column temperature were 0.6 mL/min and 35°C, respectively. The solvent program was as follow: 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B;

20-23 min 80% B; 23-30 min 10% B. The injection volume was 10 μL. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative mode and operated with a nitrogen gas at 325°C, and gas flow of 10.0 L/min, nebulizer of 40 psi, capillary voltage of 3500 V and finally, fragmentor voltage of 175 V. The crude extracts (200 ppm) were dissolved in methanol at room temperature. The particulates of the samples were removed using a PVDF (0.45 μm) filter (Demirtas et al., 2013). The limits of detection were found to be between 25 and 2500 ppb using HPLC-TOF/MS.

Determination of anti-oxidant activity

Estimation of total phenolic content

The total phenolic content was determined by the method of Folin-Ciocalteu using gallic acid as a standard (Singleton and Rossi, 1965). 0.5 mL of gallic acid (1 mg/mL) of different concentrations was mixed with 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1 N) and allowed to stand at room temperature for 5 min. 5 mL of Na₂CO₃ (20%) was added. The mixture was mixed and allowed to stand at room temperature in the dark for 2 hours. 0.5 mL of each extract (1 mg/mL) was prepared by the same manner as gallic acid. The absorbance was read at 765 nm and the result expressed as gallic acid equivalent (mg GAE/g of extract).

Estimation of total flavonoid content

The total flavonoid content was determined by the method of aluminum trichloride using quercetin as a standard (Ordonez et al., 2006). 1 mL of each extract (1 mg/mL) was mixed with 1 mL of 2% methanolic aluminum trichloride solution. The absorbance read at 420 nm after 1 hour. The absorption of quercetin standard solutions measured under the same conditions. The results are expressed as equivalent quercetin (mg QE/g of extract).

DPPH radical scavenging

Different dilutions (1-100 μg/mL) of extracts were prepared and a solution of DPPH was prepared by dissolving 2.4 mg of DPPH in 100 mL methanol. Then, 50 μL of each dilution was added to the test tubes containing 1.95 mL of the prepared DPPH solution. The negative control (sample) was prepared by adding 50 μL of methanol in 1.95 mL of the prepared DPPH solution. Ascorbic acid was used as standard. The mixture was allowed to stand in the dark for 30 min. Absorbance was measured spectrophotometrically at 517 nm. The scavenging activity was calculated using the equation.

$$RSA = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

Where, A_{blank} and A_{sample} are the absorbance of the negative control (blank) and the sample, respectively

The IC₅₀ value is defined as the concentration of anti-oxidant necessary to inhibit DPPH radical formation by

50%. The synthetic anti-oxidant reagent, ascorbic acid was used as a positive control (Takao et al., 1994).

Anti-proliferative activity

Preparation of cell suspension

Human cervix carcinoma cells (HeLa) were grown at 37°C in a CO₂ incubator (5% CO₂ and 95% humidified atmosphere). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM, Sigma, Germany) including 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, Germany) and 2% (v/v) streptomycin-penicillin (Sigma, Germany) was used as medium.

10 mL trypsin-EDTA solution was added to culture flask to detach HeLa cells from bottom of the culture flask. The cells were incubated for 2-3 min at 37°C in a CO₂ incubator. Thus, HeLa cells were removed from the surface. After detachment, the flask was removed from the incubator and 10 µL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) was added into the flask to neutralize the medium. The cell suspension was transferred to 15 mL falcon tubes in equal amounts and centrifuged for 5 min at 600 rpm.

After removing the supernatant, 3 mL DMEM was added onto the cell pellets and resuspended carefully with a sterile pipette. The quantity of live cells of this cell suspension was measured automatically with cell counting device (CEDEX HiRes Innovatis, Roche). The cell counting device tagged the dead cells with trypan blue solution (Demirtas et al., 2013).

Cell proliferation assay

Anti-proliferative activity measurements were performed according to the method described elsewhere (Abay et al., 2015; Ökten et al., 2015). 50 µL DMEM were added into each well of E-Plate 96. The plate was incubated in the steril cabinet for 15 min and in the CO₂ incubator for 15 min to reach a thermal equilibrium. After this period, the plate was inserted to the xCELLigence RTCA device and a background impedance measurement was performed in the incubator (Step 1). This step continued 1 min. Then E-plate 96 was rejected from xCELLigence SP station and 100 µL HeLa cells suspension (2.5 × 10⁴ cells/100 µL) were added to each wells, except the last 3 wells. Only 100 µL of medium (DMEM) was added to these 3 wells. Three wells were left blank to check if there would be an increase due to the culture medium.

The plate was left in the sterile cabinet at room temperature for 30 min. After this stage, E-Plate 96 was inserted to xCELLigence RTCA SP station in the CO₂ incubator. A measurement was performed for 80 min (Step 2). In this step, the cancer cells were accommodated to medium and attached to the microelectrodes at the wells bottom. During this period, the cells conditions were measured every 10 min.

The extracts were dissolved in sterile DMSO (20 mg/mL). This sample solutions were diluted with DMEM in sterile tubes (25 µL sample/475 µL DMEM). Final DMSO concentration is below 1% in all tests.

After Step 2, E-Plate 96 was recaptured to sterile cabinet and the extract solutions were added into the wells in different concentrations (10, 20 and 50 µL equivalent to 50, 100 and 250 µg/mL concentrations, respectively). The final volumes of the wells were completed to 200 µL with DMEM. Each dose of the samples was repeated 3 times. No extract solution was added into the control and the medium wells. Then E-Plate 96 was inserted to xCELLigence RTCA device for the last step. The measurement was launched for 48 hours (Step 3). The cells conditions measured every 10 min during this step.

Results

Yield of the extracts

Table I represent the amount and yield of chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and methanol extracts of the two parts (leaf and stem) of *G. ferox*. Methanol and *n*-butanol extract showed high yield.

	Extract	Amount (g)	Yield% (w/w)
Leaves	Chloroform	00.7	0.001
	Ethyl acetate	02.6	0.004
	Butanol	13.0	0.019
	Methanol	20.0	0.029
Stems	Chloroform	01.4	0.001
	Ethyl acetate	04.7	0.004
	Butanol	46.0	0.043
	Methanol	49.0	0.046

Phytochemical screening

The qualitative screening of *G. ferox* showed the presence of alkaloids, saponins, coumarins, tannins and flavonoids (Table II).

Composition of aerial parts by HPLC-TOF/MS

Different extracts of *G. ferox* were analyzed by HPLC-TOF/MS method. The identification had been performed on the basis of their retention times and mass spectrometry by comparison with those of different standards. The results showed the presence of 44 compounds including 17 organic and phenolic acids (Table III), 27 flavonoids and phenolics (Table IV). Some of these compounds were present in very small quantity and it did not reach to the detection limits

Table II			
Phytochemicals of <i>G. ferox</i>			
Chemical groups	Fruit	Stem	Leaf
Alkaloids	+	+	+
Saponins	+	+	+
Quinones	-	-	-
Coumarin	+	+	+
Tannins	+	+	+
Flavonoids	+	+	+
Anthocyanins	-	-	-
Methanol extract of stem	49.0	0.1	

(trace) so their concentrations did not appear. The main constituents of *G. ferox* were obtained as fumaric acid, diosmetin, apigenin, scutellarin and apigenin-7-glucoside.

The apigenin (contain the highest concentration in methanol extract) was the main component of other extracts except butanol. Fumaric acid was the major compound of *n*-butanol extracts. Ethyl acetate extract

contained the highest concentration of apigenin, ferulic acid, vanillic acid, 4-hydroxybenzoic acid and scutellarin. In total, methanol and *n*-butanol extract of stem had highest concentrations in phenolic quantities.

Determination of anti-oxidant activity

Total polyphenol and flavonoid contents

The amount of total phenolic and flavonoid contents measured by Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride methods, varied considerably between different extracts and ranged from 105.2 ± 0.6 to 308.5 ± 5.7 mg GAE/g for total phenolic and from 8.1 ± 0.1 to 124.0 ± 0.7 mg QE/g for flavonoids (Table V). The highest concentrations of both total phenolic and flavonoids were found in ethyl acetate extract of both stem and leaf, respectively.

DPPH radical scavenging

The most effective DPPH radical scavenging was shown by both ethyl acetate extracts of leaf and stem compared to ascorbic acid used as a standard (Figure 1). Similarly, highest total phenolic content was found in ethyl acetate extract from the stem.

Ethyl acetate extract of both leaf and stem exhibited the highest anti-oxidant activity with an IC_{50} (14.2 ± 0.02

Table III									
Quantitative results of organic and phenolic acids in plant extracts (mg phenolic/ kg plant)									
Organic and phenolic acids	RT (min)	Leaf				Stem			
		Butanol	Chloroform	Methanol	Ethyl acetate	Butanol	Chloroform	Methanol	Ethyl acetate
Gallic acid	2.4	Trace	Trace	nd	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Fumaric acid	3.2	12.8	Trace	2.2	Trace	78.6	Trace	Trace	6.6
Gentisic acid	4.5	1.6	0.0	0.8	0.7	11.3	0.1	3.5	2.5
Chlorogenic acid	5.5	0.3	0.0	nd	nd	nd	0.1	nd	nd
4-Hydroxybenzoic acid	7.0	1.6	0.0	1.0	3.2	5.0	0.5	3.2	6.5
Protocatechuic acid	7.1	2.1	0.1	2.3	0.3	11.0	0.2	7.2	0.7
Caffeic acid	7.6	Trace	Trace	Trace	0.3	0.1	Trace	Trace	0.7
Vanillic acid	7.9	3.1	0.5	nd	3.3	10.8	1.3	nd	7.8
Syringic acid	8.1	1.4	0.1	nd	0.4	8.6	0.4	nd	1.0
4-Hydroxybenzaldehyde	9.4	Trace	0.1	Trace	0.1	Trace	1.0	Trace	0.0
Ellagic acid	9.7	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	nd	Trace
Sinapic acid	10.5	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0.0	Trace	0.1
Ferulic acid	10.6	nd	0.5	nd	5.2	nd	3.6	nd	8.9
<i>p</i> -Coumaric acid	12.1	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Protocatechuic acid ethyl ester	12.8	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0.0	Trace	Trace
Salicylic acid	13.1	1.7	Trace	Trace	0.9	5.5	0.5	Trace	2.7
Cinnamic acid	15.2	0.5	0.6	0.9	0.1	nd	0.4	3.6	nd
Total organic and phenolic acids		25.1	1.9	7.2	14.5	130.9	8.1	17.5	37.5

Table IV									
Quantitative results of flavonoids and phenolics in plant extracts (mg phenolic/ kg plant)									
Flavonoids and phenolics	RT (min)	Leaf				Stem			
		Butanol	Chloroform	Methanol	Ethyl acetate	Butanol	Chloroform	Methanol	Ethyl acetate
Catechin	5.8	0.7	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd
Rutin	9.2	0.1	Trace	3.2	0.0	0.0	Trace	0.4	0.1
Polydatin	9.6	2.9	Trace	Trace	0.9	Trace	0.2	Trace	0.9
Scutellarin	9.7	0.3	nd	Trace	1.0	66.1	Trace	5.8	5.6
Quercetin-3-β-D-glucoside	9.8	Trace	nd	Trace	Trace	14.0	Trace	Trace	Trace
Naringin	10.5	0.6	0.0	0.2	0.1	6.2	0.2	0.5	0.3
Diosmin	10.6	2.5	0.1	nd	0.5	13.6	0.4	nd	1.0
Taxifolin	10.6	nd	Trace	Trace	0.3	Trace	Trace	Trace	1.0
Hesperidin	10.8	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0.0
Apigenin	10.9	Trace	Trace	Trace	0.7	16.1	Trace	1.1	3.3
Neohesperidin	11.1	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Myricetin	11.9	nd	Trace	Trace	Trace	Trace	0.2	Trace	Trace
Baicalin	12.0	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	nd	Trace
Fisetin	12.1	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0.8
Morin	13.0	0.8	0.1	1.5	0.2	5.0	0.1	6.4	1.2
Resveratrol	13.0	Trace	Trace	nd	Trace	Trace	Trace	nd	Trace
Quercetin	14.0	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Silibinin	15.1	Trace	Trace	nd	trace	nd	Trace	nd	Trace
Apigenin	15.6	0.0	1.7	59.6	11.8	62.5	18.9	343.1	43.8
Naringenin	15.7	Trace	Trace	Trace	0.1	Trace	1.1	Trace	0.2
Kaempferol	15.7	nd	Trace	Trace	0.1	Trace	0.2	2.5	0.7
Diosmetin	16.1	nd	0.0	6.7	0.1	nd	0.2	51.7	0.9
Neochanin	17.7	nd	Trace	Trace	Trace	nd	Trace	Trace	Trace
Eupatorin	18.9	nd	Trace	Trace	Trace	nd	Trace	Trace	nd
Wogonin	19.8	Trace	Trace	Trace	Trace	nd	Trace	Trace	Trace
Galangin	20.5	nd	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Biochanin A		nd	nd	Trace	Trace	Trace	nd	trace	trace
Total flavonoids and phenolics		7.9	1.9	71.2	15.8	183.5	21.6	411.5	59.8

Table V			
Total phenolic and flavonoid values of <i>G. ferox</i>			
Extract		Total phenolic content (mg GAE/g)	Flavonoid content (mg QE/g)
Chloroform	Leaf	172.1 ± 0.5	48.5 ± 0.2
	Stem	190.6 ± 5.9	30.7 ± 0.4
Ethyl acetate	Leaf	182.9 ± 0.8	124.0 ± 0.7
	Stem	308.5 ± 5.7	92.2 ± 0.1
<i>n</i> -Butanol	Leaf	105.2 ± 0.6	8.1 ± 0.1
	Stem	144.3 ± 0.02	11.6 ± 0.1

and 14.9 ± 0.1) µg/mL, respectively. On the other hand, *n*-butanol extract exhibited the lowest anti-oxidant activity with an IC₅₀ of 55.5 ± 0.2 and 52.5 ± 1.0 µg/mL, respectively.

Anti-proliferative activity

Figure 2 shows the results of real-time monitoring (xCELLigence RTCA SP, ACEABIO) of the proliferation of HeLa cells treated with different solvent extracts obtained from *G. ferox*. These anti-proliferative activity results are different due to the phytochemical composition of several solvent extracts of *G. ferox*. The cell index results provide a clear evidence that the anti-proliferative activities of all solvent extracts were

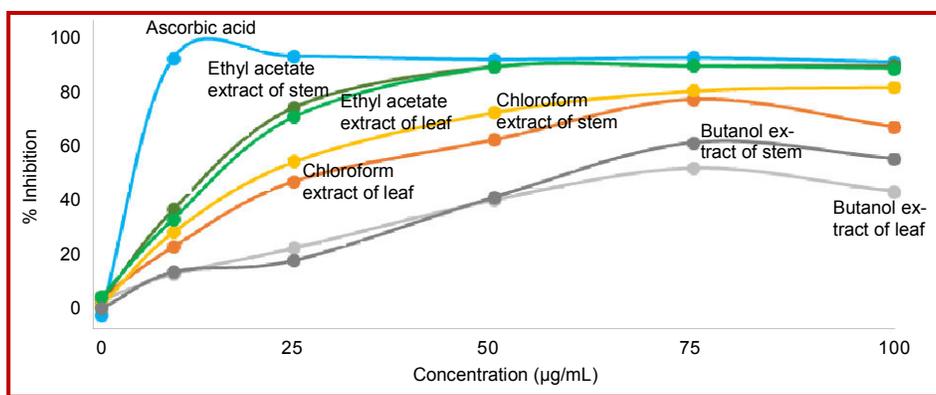


Figure 1: DPPH scavenging activity of different extracts of *Genista ferox* and ascorbic acid as a standard

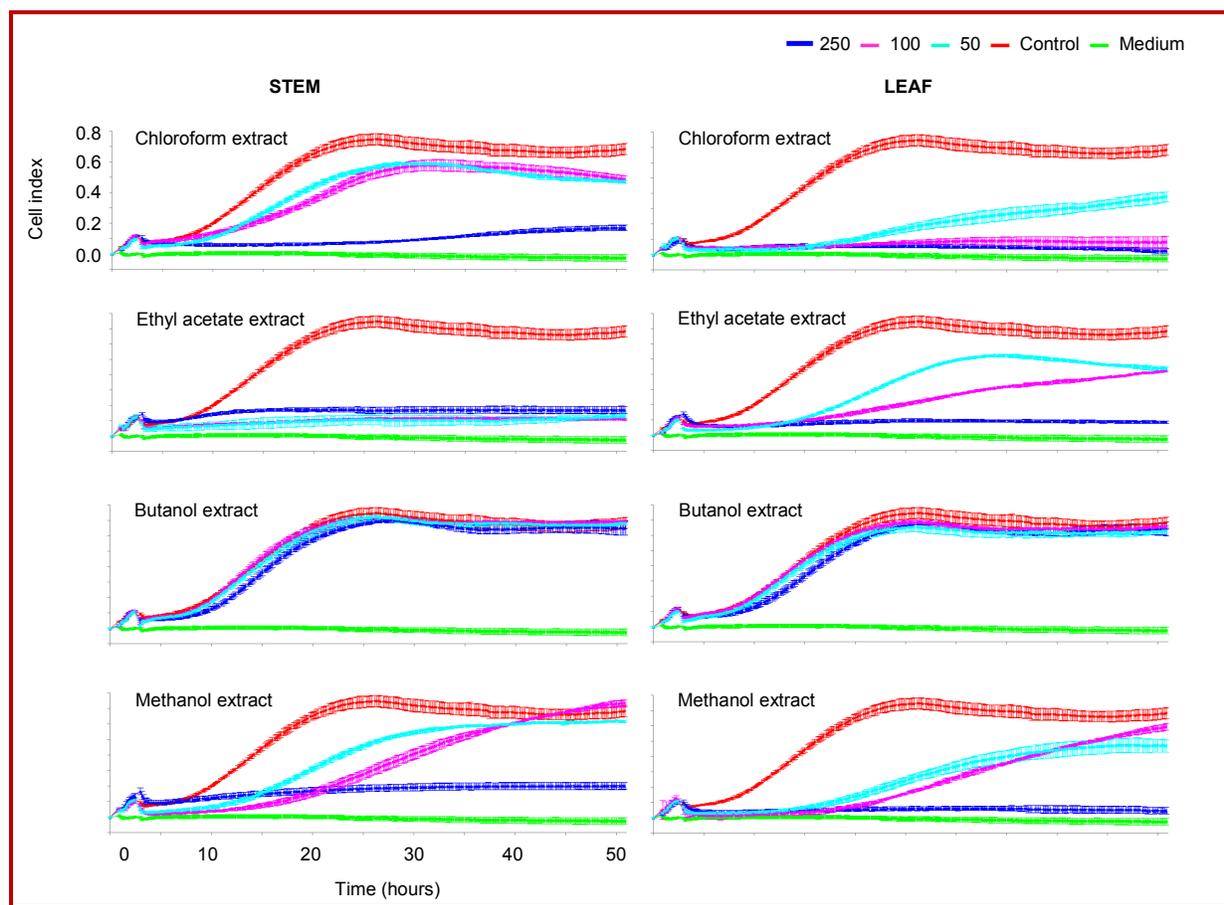


Figure 2: Proliferation assays of stem (left column) and leaf (right column) extracts at various concentrations (µg/mL)

similar, except for *n*-butanol extracts, which are inactive. HeLa cells were inhibited by chloroform, ethyl acetate and methanol extracts at high concentration (250 µg/mL), while low activities were obtained at 100 and 50 µg/mL concentrations of these extracts in a time-dependent manner. Although the anti-proliferative activity of ethyl acetate extract of stem and chloroform extract of leaf increased at concentrations of 100 and 250 µg/mL. Higher activities were obtained only at 250 µg/mL for chloroform (stem), methanol (stem), ethyl

acetate (leaf) and methanol (leaf) extracts. *n*-Butanol extracts of stem and leaf showed no activity at any concentrations. Apigenin is the major component for methanol (stem), *n*-butanol (stem) and ethyl acetate (leaf) extracts (Table IV). Diosmetin was the major component for methanol extracts. According to the quantitative results, *n*-butanol extract of stem had high phenolic standards. It had no anti-oxidant and anti-proliferative activities. In addition, although ethyl acetate extract of stem had low phenolic standards. It

had highest anti-oxidant and anti-proliferative activities.

Discussion

The phytochemical studies of *G. ferox* revealed the presence of phenolic compounds synthesized in the secondary metabolism of the plant are known by their active substance; for that reason the anti-oxidant and anti-proliferative activities were studied for extracts of *G. ferox*. The results confirmed that chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and methanol extracts of leaf and stem did not demonstrated the similar activities. Ethyl acetate extracts exhibited the highest anti-oxidant activities whereas *n*-butanol extracts exhibited the lowest anti-oxidant activities.

The strong positive correlations between DPPH radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents were obtained. The results of ethyl acetate extracts showed the highest anti-oxidant activities. The anti-oxidant activity may be due to one or more of these compounds and there are several studies in recent years about the anti-oxidant activities of phenolic acids (Fukumoto and Mazza, 2000; Villa^{no} et al., 2005). EAS have low phenolic standards; it has highest anti-oxidant and anti-proliferative activities. As the reason for this, it may be due to the unknown compounds.

The coordination between anti-cancer activity and phenolic compounds seems to depend on the chemical properties of the natural products and the cancer cells. Many secondary metabolites as polyphenols and flavonoids have been reported to retain proliferation and angiogenesis of cancer cells *in vitro*. The anti-carcinogenic activity of *G. ferox* may be due to synergistic effects of these bioactive compounds.

Conclusion

G. ferox possesses significant anti-oxidant and anti-proliferative activities in some solvent extracts, establishing the ethnopharmacological basis for the use of this plant in traditional medicine. The cell index results of *G. ferox* extracts provide clear evidence that the anti-proliferative activities of all solvent extracts are higher, except for *n*-butanol extracts of leaf and stem against HeLa cells.

Acknowledgement

This study was supported by grants the Algerian Ministry of Higher Education, Turkish State Planning Organization (DPT2010K120720) and Çankırı Karatekin University.

Conflict of Interest

All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form and declare no support from any organization for the submitted work.

References

- Abay G, Altun M, Koldas S, Tufekci AR, Demirtas I. Determination of anti-proliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of dicranumscoparium (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb Chem High T Scr.* 2015; 18: 453-63.
- Belle R, Barrachina MD, Martinez-Cuesta MA, Esplugues J. Pharmacological screening of the methanol and dichloro-methanol extracts of *Genista patens*. *Phytotherapy Res.* 1995; 9: 495-99.
- Ciulel I. Methodology for analysis of vegetable drugs. Romania, 1982.
- Demirtas I, Gecibesler IH, Yaglioglu AS. Anti-proliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from stachysbyzantina. *Phytochem Lett.* 2013; 6: 209-14.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Anti-oxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006; 97: 654-60.
- Dzoyem JP, McGaw, LJ, Eloff JN. *In vitro* antibacterial, anti-oxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complement Altern Med.* 2014.
- Erbil N, Duzguner V, Durmuskahya C, Alan Y. Antimicrobial and anti-oxidant effects of some Turkish fodder plants belongs to Fabaceae family (*viciavillosa*, *trifoliumochroleucum* and *onobrychisaltissima*). *Orient J Chem.* 2015; 31: 53-58.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing anti-oxidant and pro-oxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 3597-604.
- Herrera MD, Marhuenda E, Gibson A. Effects of genistein, an isoflavone isolated from *genista tridentata*, on isolated guinea-pig ileum and guinea-pig hepatic myenteric plexus. *Planta Med.* 1992.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the anti-oxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing.* 2011; 217-33.
- LingaRao M, Savithamma N. Phytochemical studies of *svensoniahyderabadensis* (Walp.) Mold: A rare medicinal plant. *Pharm Lett.* 2011; 3: 51-55.
- Obasi Nnamdi L, Egbuonu A, Ukoha P, Ejikeme P. Comparative phytochemical and antimicrobial screening of some solvent extracts of *samaneasaman* (Fabaceae or mimosaceae) pods. *Afr J Pure Appl Chem.* 2010; 4: 206-12.
- Ordenez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Anti-oxidant activities of *sechiumedule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food*

- Chem. 2006; 97: 452-58.
- Okten S, Erenler R, Köprülü TK, Tekin Ş. *In vitro* anti-proliferative/cytotoxic activity of 2,3'-biindole against various cancer cell lines. Turk J Biol. 2015; 39: 15-22.
- Quezel PS, Santa S. New flora of Algeria and the southern desert regions. Vol 2. Paris, Tela Botanical Association, 1963 (In French).
- Re RM. Flore De Lafraque Du Nord.1987; 16.
- Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Anti-oxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. BMC Complement Altern Med. 2012; 12: 221.
- Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult. 1965; 16: 144-58.
- Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for anti-oxidants and isolation of several anti-oxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish. Biosci Biotech Bioch. 1994; 58: 1780-83.
- Villaño De, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Comparison of anti-oxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. Anal Chim Acta. 2005; 538: 391-98.
-

Author Info

Ibrahim Demirtas (Principal contact)

e-mail: ibdemirtas@gmail.com