

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DEL'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :  
Série :

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences  
Spécialité : Chimie organique

Option : Phytochimie

Par

**BENAYACHE Feryal**

Intitulé

**Etude phytochimique et évaluation biologique d'une  
plante endémique du genre *Genista* (Fabaceae) :  
*Genista numidica* Spach.**

Devant le jury:

Dr. BICHA Sabrina	U. Frères Mentouri, Constantine 1.	Présidente
Pr. BENAYACHE Samir	U. Frères Mentouri, Constantine 1.	Directeur de thèse
Pr. BENAYACHE Fadila	U. Frères Mentouri, Constantine 1.	Rapporteuse
Pr. DE TOMMASI Nunziatina	U. Salerno, Italie.	Examinatrice
Pr. LEGSEIR Belgacem	U. Badji Mokhtar, Annaba.	Examinateur
Dr. SEGUENI Narimane	U. Constantine 3.	Examinatrice

**18 Avril 2019**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ  
صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

## *Dédicaces*

*En préambule, louange et gratitude à Dieu le Clément et Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, le courage et la patience de mener à bien ce modeste travail.*

*Je dédie cette thèse avec grand amour*

♥ *À la mémoire de mon père, qui serait très heureux s'il était là, que Dieu lui accorde son pardon et sa grande miséricorde.*

♥ *À ma chère mère, source de tendresse et de confiance qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance avec mes vœux de bonne santé et de longue vie.*

♥ *À mes chers oncles Saïd et Ahmed.*

♥ *À mes chers frères et sœurs pour leur amour.*

♥ *À toute ma famille et mes amis.*

## *Remerciements*

**J**e tiens à exprimer mes sincères et vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Samir BENAYACHE** mon directeur de thèse pour m'avoir accueillie dans l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée dans la réalisation de ce travail, sa disponibilité, ses conseils éclairés et son concours constant dans cette thèse.

**J'**adresse chaleureusement mes remerciements à madame la Professeure **Fadila BENAYACHE** rapporteure pour la soutenance, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, ses encouragements pour finir ce manuscrit, sa gentillesse, ses judicieux conseils, son aide, sa disponibilité pour tous ceux qui en exprime le besoin. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

**J'**adresse également mes remerciements à madame **Sabrina BICHA** maître de conférence à l'université Frères Mentouri (Constantine 1) pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

**J'**ai eu la chance et le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire des substances naturelles bioactives, département de pharmacie à l'Université de Salerno-Italie sous la direction du Professeur **Nunziatina DE TOMMASI**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

**J**e tiens également à remercier Monsieur le professeur **Belgacem LEGSEIR** de l'université d'Annaba qui m'honore en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

**J'**aimerais également remercier le docteur **Narimane SEGUENI** maître de conférences de l'Université Salah Boubnider (Constantine 3) qui m'honore en acceptant de juger ce travail.

**J**e tiens à remercier tout particulièrement les membres du laboratoire des substances naturelles bioactives à l'Université de Salerno-Italie je cite : **Nicola MALAFRONTÉ, Massimiliano D'AMBOLA** et **Roberta COTUGNO** pour leur soutien et également pour la disponibilité des moyens et équipements nécessaires dans la réalisation de ce travail.

**J**e voudrais exprimer ma gratitude à madame la Professeure **Alessandra BRACA** de l'université de Pisa –Italie, pour sa contribution dans la réalisation des activités biologiques.

**J**e tiens à remercier tous les membres de notre unité de recherche VARENBIOMOL pour les bons moments qu'on a passé ensemble, je remercie en particulier ma chère amie **Wassila** pour sa bonne humeur, et mes amies: **Hanane, Halima, Samira, Massika et Widad.**

**J**e remercie également Monsieur **Imad KASHI** docteur au Centre de recherche en biotechnologie- Constantine, pour la réalisation de l'activité antioxydante.

**F**inalement je remercie **ma mère** que dieu la garde et la protège, et mes frères et sœurs pour leur patience.

# Abréviations et symboles

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

## ***Solvants et réactifs***

AcOEt	Acétate d'éthyle.
BAW	<i>n</i> -butanol / Acide acétique/ Eau.
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme.
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutéré.
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Diméthyl sulfoxyde deutéré.

## ***Techniques de chromatographie***

CC	Chromatographie sur Colonne ouverte.
C <sub>18</sub> et C <sub>8</sub>	Silice greffée.
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance.
t <sub>R</sub>	Temps de rétention.
RP	Phase inverse.

## ***Détermination structurale***

COSY	COrelated SpectroscopY.
Hz	Hertz.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity.
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire.
RMN <sup>13</sup> C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13.
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy.
UV	Ultra Violet.
[α] <sub>D</sub>	Pouvoir rotatoire spécifique.
δ	Déplacement chimique.
<i>d</i>	Doublet.
<i>dd</i>	Doublet de doublets.

<i>J</i>	Constantes de couplage.
<i>m</i>	Multiplet.
<i>s</i>	Singulet.
<i>sl</i>	Singulet large.
<i>t</i>	Triplet.
<i>q</i>	Quadruplet.
qt	Quintuplet.
<i>m/z</i>	masse/charge électrique.
ppm	Parties par million.

### ***Activités biologiques***

ATCC	American Type Cell Culture.
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle.
DMEM	Dubelco's Modified Eagle's Medium.
HeLa	Cellules provenant d'une tumeur du col utérin.
IC <sub>50</sub>	Inhibition Concentration (Concentration inhibitrice à 50%).
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7.
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.
μM	Micromolaire.

# Lexique botanique

***rbcL*** : gène chloroplastique qui code pour la grande sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco). Cette enzyme clé de la photosynthèse, qui fixe le CO<sub>2</sub>, est de loin la protéine la plus abondante sur la Terre, représentant près de 50 % des protéines foliaires. Du fait de son taux d'évolution assez lent, le séquençage en particulier du gène *rbcL*, permet de retracer l'évolution des grandes familles de plantes, à l'aide de reconstructions phylogénétiques.

***trnL-F*** : région chloroplastique du gène *trnL*.

***matK*** : gènes de l'ADN chloroplastique codant pour une tyrosine kinase.

**Carènes** : pétales inférieurs des fabacées plus ou moins soudés entre eux en forme de carène de navire. Également saillie longitudinale à section triangulaire ou à angle marqué que présente le dos de certains organes (organe caréné).

**Diadelphie** (androcée): adjectif désignant une fleur dont les étamines sont assemblées en deux groupes.

**Monophylétique** : se dit d'une groupe d'organismes dérivant, soit les uns des autres, soit d'un ancêtre commun, n'ayant donc jamais constitué qu'un seul phylum. En conséquence, le groupe possède en commun un ou plusieurs caractères (morphologiques, physiologiques, écologiques, éthologiques...). Par extension, se dit de deux ou plusieurs séquences d'ADN qui dérivent d'une seule séquence d'ADN ancestrale commune.

**Préfloraison vexillaire (=descendante)** : se dit d'une préfloraison dans laquelle l'étendard recouvre les ailes, qui elles-mêmes recouvrent la carène.

**Synapomorphies** : un caractère synapomorphique, ou synapomorphie est un caractère dérivé ou apomorphique partagé par deux ou plusieurs taxons.

**Zygomorphe** : se dit d'une fleur dont les différentes pièces de chaque verticille (sépal, pétales, étamines) sont disposées symétriquement par rapport à un plan (plan axe/bractée).

## SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

### **Partie 1 : Synthèse Bibliographique**

#### **Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur le genre *Genista***

1. La famille des Fabaceae.....	3
1.1. Caractères botaniques.....	3
1.2. Classification systématique.....	4
1.3. Distribution géographique.....	5
1.4. La sous-famille des papilionacées.....	5
1.4.1. Caractères botaniques.....	6
1.4.2. Phylogénie.....	7
1.5. Intérêt écologique et économique des Fabaceae.....	8
1.6. Toxicité des Fabaceae.....	9
1.7. Aspect pharmacologique des Fabaceae.....	9
2. Présentation du genre <i>Genista</i> .....	10
2.1. Description botanique du genre <i>Genista</i> .....	11
2.2. Distribution du genre <i>Genista</i> .....	11
2.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Genista</i> .....	11
2.4. Quelques activités biologiques reconnues du genre <i>Genista</i> .....	12
2.5. Principaux métabolites secondaires isolés de genre <i>Genista</i> .....	14

#### **Chapitre 2 : Etude des composés phénoliques et saponines**

1. Introduction.....	30
2. Les composés phénoliques.....	30
2.1. Classification des composés phénoliques.....	32
3. Les acides phénoliques.....	32
3.1. Propriétés chimiques majeures.....	33
3.2. Les propriétés biologiques des acides phénoliques.....	34
4. Les flavonoïdes.....	36
4.1. Classification.....	37
4.2. Les activités biologiques des flavonoïdes.....	40
4.3. Applications industrielles des flavonoïdes.....	41
5. Les lignanes.....	42



5.1. Introduction.....	42
5.2. La biosynthèse des lignanes.....	43
5.3. Classification.....	44
5.4. Distribution botanique .....	46
5.5. Intérêt biologique des lignanes.....	46
6. Les terpènes.....	48
7. Les saponines.....	49
7.1. Généralités.....	49
7.2. Structure des saponines.....	50
7.3. Les activités biologiques des saponines.....	53
8. Conclusion.....	54

## **Partie 2 : méthodes et analyse**

### **Chapitre 1 : extraction, séparations et analyses**

1. Investigation phytochimique de <i>Genista numidica</i> Spach.....	55
1.1. Introduction.....	55
1.2. Les critères de choix de l'espèce.....	55
1.3. Description botanique et classification dans la systématique.....	55
1.4. Les travaux antérieurs sur <i>G. numidica</i> .....	57
1.5. Matériel végétal.....	60
1.5.1. Récolte de la plante.....	60
1.6. Extraction.....	61
1.7. Séparation de l'extrait chloroforme.....	63
1.7.1. Chromatographie sur colonne ouverte CC.....	63
1.7.2. Purification des fractions.....	66
1.8. Séparation de la phase acétate d'éthyle.....	70
1.8.1. Chromatographie sur colonne ouverte CC.....	70
1.8.2. Purification des fractions.....	73
2. Analyse .....	76
2.1. Révélateur.....	76
2.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM).....	76
2.3. Séparation par Chromatographie liquide à haute performance.....	77
2.4. Pouvoir rotatoire.....	77
2.5. Spectrophotométrie UV-Visible.....	77

2.6. Spectroscopie de RMN.....	77
2.7. Hydrolyse acide.....	78
3. Conclusion .....	78

## **Chapitre 2 : Identification des produits isolés de *Genista numidica***

1. Identification des produits isolés de l'extrait CHCl <sub>3</sub> de <i>G. numidica</i> .....	79
1.1. Elucidation structurale du composé P1 .....	79
1.2. Elucidation structurale du composé P2.....	82
1.3. Elucidation structurale du composé P3.....	85
1.4. Elucidation structurale du composé P4.....	93
2. Identification des produits obtenus de l'extrait AcOEt de <i>G. numidica</i> .....	98
2.1. Elucidation structurale du composé P5.....	98
2.2. Elucidation structurale du composé P6.....	101
2.3. Elucidation structurale du composé P7.....	103
2.4. Elucidation structurale du composé P8.....	105
2.5. Elucidation structurale du composé P9.....	111
2.6. Elucidation structurale du composé P10.....	113
2.7. Elucidation structurale du composé P11.....	124
2.8. Elucidation structurale du composé P12.....	130
2.9. Elucidation structurale du composé P13.....	137
3. conclusion.....	143

## **Chapitre 3 : activités biologiques**

1. Introduction.....	148
2. L'activité antioxydante.....	148
2.1. Les antioxydants.....	148
2.2. Les radicaux libres.....	148
2.3. Mécanismes d'action des espèces réactives radicalaires.....	149
2.4. Les sources d'antioxydants.....	149
2.4.1. Antioxydants naturels.....	149
2.4.2. Les antioxydants de synthèse.....	150
2.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	151
2.5.1. Test du DPPH.....	152
2.5.2. Exploitation des résultats.....	153
3. L'activité antiproliférative.....	156
3.1. Biologie de cycle cellulaire.....	156

3.1.1. Généralité.....	156
3.1.2. Le cycle cellulaire.....	157
3.1.3. La progression du cycle.....	160
3.1.4. La réponse du cycle cellulaire aux dommages sur l'ADN.....	160
3.2. Partie expérimentale.....	161
3.3. Résultats obtenus .....	162
3.4. L'activité sur le mécanisme d'action.....	165
3.4.1. Résultats obtenus.....	167
4. Conclusion.....	168
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>170</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>172</b>

# **Introduction générale**

# Introduction générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle pour la découverte de nouveaux médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 350.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans chimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents ( Marston et Hosttemann 2003).

L'Algérie est très connue par sa biodiversité, disposant de plantes toxiques et médicinales. Sa flore comporte de milliers d'espèces présentant, dans une certaine mesure, une matière pour la recherche scientifique.

Le sol algérien compte 23 espèces de genre *Genista* dont 11 endémiques (Quezel et Santa 1962), nos recherches bibliographiques ont montré que l'espèce *G. numidica* a fait l'objet d'un nombre restreint des screening phytochimiques, et une étude de la composition chimique de ses huiles essentielles (Lograda *et al*, 2009), ce peu de travaux menés sur cette espèce et la diversité du genre *Genista* et de la famille des légumineuses, nous a encouragé à étudier cette espèce (Boumaza *et al*, 2006, Mekkiou *et al*, 2012, Giachi *et al*, 2002).

Dans ce contexte on présente ici l'étude phytochimique et biologique d'une espèce endémique du genre *Genista*.

Le présent travail consiste à effectuer :

- L'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires de la plante *Genista numidica*.
- Les activités biologiques de l'espèce *G. numidica*.

Ce travail a été réalisé entre l'unité de recherche (VARENBIOMOL) à l'Université Frères Mentouri-Constantine, et le laboratoire des substances naturelles bioactives, département de pharmacie à l'Université de Salerno-Italie. Il s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles substances naturelles à intérêt thérapeutique.

Les travaux reportés dans ce manuscrit sont présentés dans deux parties :

- Une première partie bibliographique, comportant deux chapitres dont :
  - Le premier chapitre a été consacré à des généralités et données bibliographiques, comportant une présentation botanique de la famille des fabacées, et du genre *Genista*.
  - Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des métabolites secondaires, on y distingue en particulier les saponines et les composés phénoliques, du côté structure chimique, biosynthèse, distribution, classification et Propriétés biologiques.
- Une deuxième partie expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels, comportant trois chapitres :
  - Le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées dans nos travaux d'extraction, d'isolement et de purification des métabolites secondaires de l'espèce *G. numidica*.
  - Le deuxième chapitre comprend les résultats obtenus ainsi que les discussions liées à la détermination structurale des différents métabolites secondaires isolés, basée sur diverses expériences de résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, 1-D TOCSY) et de la spectrométrie de masse (SM).
  - Dans le dernier chapitre nous présenterons nos travaux expérimentaux pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits  $\text{CHCl}_3$ , acétate d'éthyle et *n*-butanol par la méthode du DPPH et les tests d'activité antiproliférative des composés isolés.

Et nous finirons le tout par une conclusion générale qui essayera de faire le point sur les principaux résultats.

# **PARTIE 1**

## ***Synthèse bibliographique***

# Chapitre 1

## *Aperçu bibliographique sur le genre Genista*



## 1. La famille des Fabaceae

La famille des Fabacées (**Fabaceae**) ou Légumineuses (**Leguminosae**) appartient à l'ordre des Fabales. Son nom est tiré du mot latin (*Faba*, fève).

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Wojciechowski *et al.*, 2004). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont *et al.*, 2007).

Les fabaceae possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*). Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques.

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie.

### 1.1. Caractères botaniques

Les Fabacées sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Les espèces de cette famille sont des plantes à fleurs généralement hermaphrodites régulières ou irrégulières. Le périanthe est généralement double. Le calice est caduc ou persistant, tubuleux ou en cloches, à 5 sépales constituant parfois deux lèvres. La corolle zygomorphe est le plus souvent constituée de 5 pétales.

Les étamines sont au nombre de 5-10 ou très nombreuses, très souvent à filets soudés en un tube staminal, contenant l'ovaire et lui-même contenu dans la carène. Les filets sont monadelphes (tous soudés entre eux), diadelphes (9 soudés et un libre) ou complètement libres.

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

Le gynécée est supère, sessile, constitué d'un seul carpelle. Le style est terminal et variable. Le fruit est variable, le plus souvent sec et capsulaire (gousse ou légume). Les feuilles sont simples ou composées, ordinairement alternes et stipulées, parfois plus ou moins entièrement transformées en vrilles (Quezel et Santa 1962).

**1.2. Classification systématique**

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques (Tableau 1). Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabaceae : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (= Papilionoideae). Le concept « Leguminosae » est utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques. Ces deux termes sont considérés comme des synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) (Judd *et al*, 2002 ; Spichiger *et al*, 2004).

**Tableau 1:** Position systématique des Fabacées selon différentes approches phylogénétique ou morphologique.

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

### 1.3. Distribution géographique

La famille des Fabaceae est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes (Figure1). Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées (Heywood, 1996).



**Figure 1:** Carte de répartition géographique des Fabaceae d'après Heywood (1996).

### 1.4. La sous-famille des Papilionacées

La sous-famille des Papilionacées est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille (476 genres) (Wojciechowski *et al.*, 2004). On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

Elle est subdivisée en nombreuses tribus d'après la nature de l'androcée, les caractères des gousses, des feuilles, etc. Ces tribus sont à leur tour subdivisées en plusieurs genres.

### 1.4.1. Caractères botaniques

Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées, à celui de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses (Dupont *et al.*, 2007).

Traditionnellement, les Papilionoideae ont été caractérisés par des traits qui sont considérés maintenant comme des synapomorphies de la sous-famille (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Les éléments les plus caractéristiques concernent la fleur des Papilionoideae :

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



**Figure 2:** Type de fleurs des Papilionoideae : *Lathyrus odoratus*.

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

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

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

**1.4.2. Phylogénie**

Du point de vue phylogénétique, la sous-famille des Papilionoideae a été étudiée à partir du locus *rbcL* et la région *trnL-F*, puis à partir du gène *matK* (Wojciechowski *et al.*, 2004), ce qui a confirmé l'origine monophylétique des Papilionoideae.

Les Papilionoideae peuvent être divisées en 7 clades selon les relations phylogénétiques établies à partir du gène plastidique *matK* (Wojciechowski *et al.*, 2004).

- Les Génistoïdes *lato sensu* (au sens large) dans lequel on retrouve des plantes contenant des alcaloïdes quinolizidiniques, composés de défense contre les herbivores, comme les genêts (*Genista*) et les lupins (*Lupinus*).
- Les Dalbergioïdes *lato sensu* qui comprend principalement des bois tropicaux, mais aussi des plantes avec une grande importance en agriculture, comme l'arachide (*Arachis*) et les plantes fourragères du genre *Stylosanthes*.
- Les Millettioïdes : ce clade (groupement de plusieurs embranchements de plantes) comprend les tribus Millettieae, Abreae, Phaseoleae, Psoraleae et Desmodieae.
- Les Mirbelioïdes : ce groupement représente une importance écologique en Australie avec 31 genres et 750 espèces. Il ne contient pas d'importantes espèces cultivées.
- Les Robinoïdes comprennent des arbres des zones tempérées et tropicales, comme le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*) et le genre *Gliricidia*.
- Les IRLC (pour Inverted Repeat-Lacking Clade) : ce clade inclut le groupe économiquement important des *Vicia*, en particulier les vesces (*Vicia*), les lentilles

### *Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

(*Lens*), les pois (*Pisum*). Les IRLC incluent également quelques plantes boiseuses comme *Wisteria*, et des plantes herbacées comme la réglisse (*Glycyrrhiza*).

- Les Cladrastis : ce clade comprend des arbres à bois jaunes. Il s'agit d'un petit groupe reconnu récemment, qui a divergé assez tôt des autres Papilionoideae (Cronk *et al.*, 2006).

## **1.5. Intérêt écologique et économique des Fabaceae**

C'est une famille qui a une grande importance économique, les légumineuses riches en graines (jusqu'à 70% du poids sec) représentent une source de protéines végétales pour l'alimentation humaine : *Phaseolus* (haricots), *Pisum sativum* (pois), *Lens culinaris* (lentilles), *Vicia faba* (fève), *Glycine max* (soja). Un certain nombre d'espèces à graines oléagineuses comme l'*Arachis hypogaea* L., donnent des huiles telles que l'huile d'arachide par exemple. On en consomme aussi les graines, qui sont les cacahuètes. Le Soja : *Glycine max* (L.) Merr. donne une huile qui est de plus en plus consommée. Par ailleurs, beaucoup de Fabacées sont cultivées comme plantes fourragères, destinées à l'alimentation animale. On trouve également, des prairies « naturelles » à *Trifolium repens* (trèfles) et des prairies cultivées de *Lotus* (*Onobrychis viciifolia* Scop, Sainfoin) ou de *Medicago sativa* (luzernes) (Spichiger *et al.*, 2004; Botineau, 2010).

Certaines espèces (*Spartium junceum*, *Crotalaria juncea*, ou chanvre du Bengale) fournissent des fibres textiles. D'autre part, les copals (résines) provenant en particulier du *Hymenaea courbaril* L., source du copal du Brésil, et de *H. verrucosa* Gaertn, de l'Est de l'Afrique, source du copal de Madagascar, sont utilisés dans l'industrie des vernis (Botineau, 2010).

Par ailleurs, il a été cité que la gomme arabique, obtenue à partir de l'espèce *Acacia senegal* (L.) Willd. , est utilisée comme stabilisant et émulsionnant [E414], alors que, la gomme adragante issue d'un sous-arbrisseau très épineux, *Astragalus gummifer* Labillardiere, est utilisée comme épaississant [E413] (Botineau, 2010).

## Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

De plus, l'agriculture utilise très largement les Fabacées dans la rotation culturale du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à leurs nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azotes (rhizobiums) (Judd *et al.*, 2002).

### 1.6. Toxicité des Fabaceae

La présence de certains métabolites secondaires dans les Fabacées peut entraîner des intoxications de façon directe ou indirecte :

- Certains acides aminés non constitutifs, et qui sont fournis par les bactéries de l'utilisation 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 (Botineau, 2010).
- Des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sont survenues lors de l'utilisation d'espèces du genre *Crotalaria*, en particulier *Crotalaria retusa*, pour soigner des troubles grippaux ou asthmatiques, et suite à la consommation de céréales contaminées par les graines de ces espèces. (Botineau, 2010).
- 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 (Botineau, 2010).

### 1.7. Aspect pharmacologique des Fabaceae

Plusieurs espèces appartenant à la famille des Fabacées sont plutôt médicinales (Spichiger *et al.*, 2004; Botineau, 2010):

- Le baume de tolu du Pérou du genre *Myroxylon*, est utilisé comme antispasmodique, expectorant et antiseptique.

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

- La racine de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), est utilisée comme expectorant, anti-inflammatoire, contre les coliques et les brûlures gastriques.
- Les tanins du cachou (*Acacia catechu*) sont utilisés comme anti-diarrhéique.
- Les gousses et feuilles de la cassie (*Cassia angustifolia*), sont utilisées comme laxatif et purgatif.
- La gomme du tamarin (*Tamarindus indica*), riche en pectine, sucres simples ainsi qu'en acides organiques (tartrique, malique, citrique), est utilisée comme laxatif doux.
- Le mélilotoside (hétéroside) des feuilles de Mélilot (*Melilotus officinalis*), présente des propriétés sédatives et anti-inflammatoires oculaires.
- L'écorce de l' «Arbre de peau » ou Tepescohuite (*Mimosa tenuiflora*) est utilisée depuis la civilisation des Mayas au Mexique pour le traitement des affections dermatologiques, en particulier dans le cas de brûlures.

*Mimosa tenuiflora**Tamarindus indica**Melilotus officinalis***Figure 3** : Quelques plantes médicinales des fabacées.**2. Présentation du genre *Genista***

Le genre *Genista*, compte environ 200 espèces de genets distribuées dans tous les points du globe mais principalement dans la région méditerranéenne (Marino *et al*, 2012). 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*.



## *Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

Cette sous-famille compte 478 genres, 28 tribus et 13800 espèces (Lewiset *al*, 2005). Les genres les plus importants sont: *Genista* (200 ) espèces, *Astragalus* (2000 ssp.), *Indigofera* (700), *Tephrosia* (400), *Trifolium* (300), *Lupinus* (200) (Judd *et al*, 2002; Spichiger *et al*, 2004).

### **2.1. Description botanique du genre *Genista***

Le genre *Genista* est d'une façon générale un arbuste à calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, plus rarement le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit, les 10 étamines sont monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscente, variable. Les arbrisseaux sont épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Les feuilles sont composées de 1 à 3 paires de folioles stipulées ou non (Quezel et Santa 1963).

### **2.2. Distribution du genre *Genista***

L'aire de distribution du genre *Genista* se situe dans le pourtour méditerranéen et se poursuit 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 (Gibbs, 1966). 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 (Azzoui *et al*, 2000). En Afrique du Nord, la concentration des plantes du genre est observée en Algérie et au Maroc. En effet, l'Algérie abrite 23 espèces, parmi lesquelles 11 sont endémiques (Quezel, 1962), alors que le Maroc compte 26 espèces dont cinq sont endémiques et toutes liées aux zones montagneuses.

### **2.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Genista***

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

### *Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

- *Genista tenera* dont l'infusion des parties aériennes est utilisée dans la médecine traditionnelle Portugaise pour traiter le diabète (Rauter *et al*, 2009).
- *G. anglica* et *G. germanica* sont préconisées en tant que diurétiques pour le traitement de néphrolithiase et encore contre la goutte (Adams *et al*, 2009, Guarrera *et al*, 2007).

#### **2.4. Quelques activités biologiques reconnues du genre *Genista***

Le genre *Genista* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. La majorité d'entre elles concernent surtout des effets anti-hyperglycémiant, anti-inflammatoire, antiulcère, spasmolytique, antioxydant et anti-prolifératifs (anti-tumoral, apoptotique, cytotoxique) (Rauter *et al*, 2009).

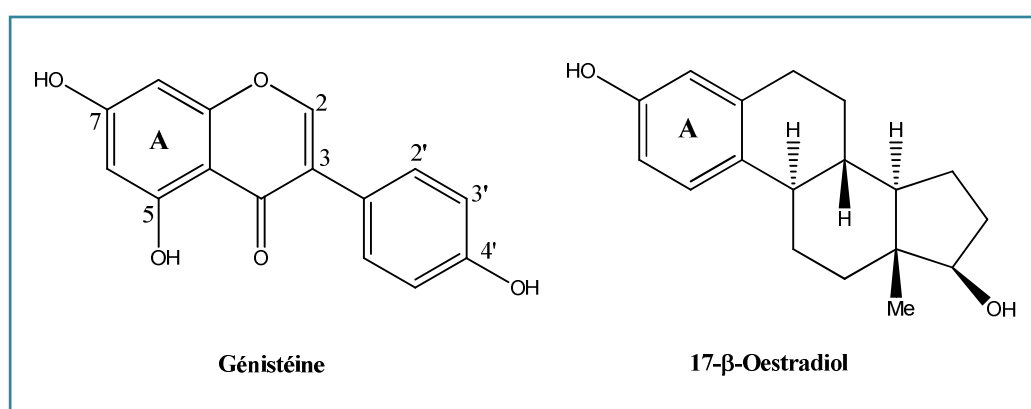
Il a été reporté que les extraits alcaloïdiques des plantes du genre *Genista* montrent essentiellement des activités antimicrobiennes et antifongiques. *G. vuralii* révèle une activité antimicrobienne contre les bactéries *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* aussi bien qu'une activité antifongique envers *Candida krusei*, avec des concentrations inhibitrices minimales (MIC) de 62,5 µg /mL (Erdemoglu *et al*, 2009), alors que *G. microcephala* a été reportée avoir une valeur (MIC) de 2 mg / mL contre les bactéries *Proteus mirabilis* et *Enterobacter* sp. (Zellagui *et al*, 2004). D'autre part, *G. sandrasica* a montré une activité significative contre les bactéries *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* avec des valeurs (MIC) respectives de 31,25 et 62,5 µg /mL (Kucukboyaci *et al*, 2012).

Les flavonoïdes, en raison de leur structure polyphénolique, jouent un rôle dans les chaînes d'oxydoréduction de certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogenèse et sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzyme. A cet effet, il a été reporté que les isoflavones génistéine et daidzéine inhibent la formation et la prolifération des tumeurs cancérogènes du sein chez la femme (Matsumura *et al*, 2005).

D'autre part, la génistéine *in vitro*, est l'inhibiteur le plus efficace de l'activité excessive de la 5α- réductase qui catalyse la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, un androgène puissant qui est considéré comme un facteur de

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

risque du cancer de la prostate (Evans *et al*, 1995). Comparée au 17- $\beta$ -œstradiol, la génistéine présente de grandes similitudes structurales, particulièrement le poids moléculaire, le noyau phénolique A et les hydroxyles en positions C-7 et C-4' (Dixon et Ferreira, 2002). 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- $\beta$ -œstradiol). Par ailleurs, la distance ( $\sim 11.5 \text{ \AA}$ ) entre les hydroxyles phénoliques en C-7 et C-4' (Figure 4), permet une liaison optimale de la génistéine aux récepteurs œstrogéniques (Paves *et al*, 2010).



**Figure 4** : Similitude structurales entre génistéine et 17- $\beta$ -oestradiol.

Par ailleurs, une étude visant l'évaluation de l'activité œstrogénique menée *in vitro* sur les aglycones flavoniques libres et leurs molécules glycosylées a montré des comportements différents chez les molécules flavoniques et isoflavoniques. D'une part, les aglycones isoflavoniques libres génistéine et isoprunitine se montrent plus actives que les formes glycosylées correspondantes comme les hétérosides 7-*O*-glucoside génistéine et 4',7-di-*O*-glucoside isoprunitine. D'autre part, les hétérosides flavoniques 7-*O*-glucoside lutéoline et 4'-*O*-glucoside lutéoline sont plus actifs que la génistéine 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 (Garritano *et al*, 2005).

Dans le genre *Genista* on cite une activité antimicrobienne significative liée aux huiles essentielles, en se basant sur des tests menés sur les trois souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité a

### *Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

été reportée dans les espèces algériennes: *G. microcephala*, *G. saharae*, ainsi que *G. ulicina* et *G. vepres* (Lograda *et al*, 2009; 2010; 2012). D'autre part, on rapporte également une activité antiproliférative et cytotoxique sur des cellules malignes humaines de type mélanome M14, des huiles essentielles extraites de *G. sessilifolia* et *G. tinctoria* (Rigano *et al*, 2010).

L'extrait butanolique des parties aériennes de *G. tenera*, a montré des activités : anti-hyperglycémiant, antioxydante et anti-acétylcholinestérase. (Rauter *et al*, 2009).

## **2.5. Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Genista***

L'étude bibliographique menée sur les espèces du genre *Genista* a montré que les travaux phytochimiques effectués ont permis, essentiellement l'isolement de flavonoïdes, notamment les isoflavonoïdes ( Pistelli *et al*, 2001), et les alcaloïdes (Rensen *et al*, 1994). De plus des saponines originales ont été reportées dans ce genre (Boutaghane *et al*, 2013).

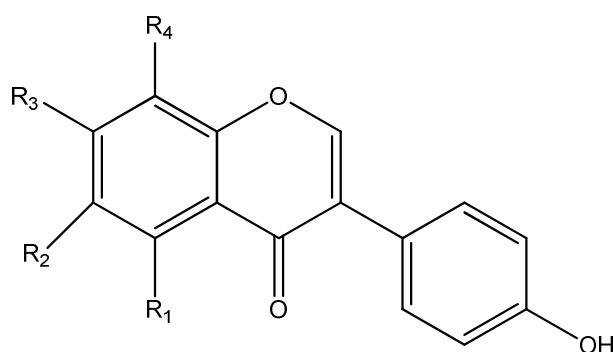
### **❖ *Les flavonoïdes***

Les Légumineuses sont réputées pour être riches, qualitativement et quantitativement, en flavonoïdes (Harborne, 1969). Dans le genre *Genista*, une grande série de molécules flavoniques ont été isolées, parmi lesquelles les isoflavones peuvent être considérées comme des bio-marqueurs pour le genre. La plupart sont synthétisées par les plantes de la famille des *Leguminosae* et sont principalement limitées à la sous-famille des Papilionoideae (Dixon et Ferreira, 2002). Une liste d'isoflavones, reportée dans la littérature jusqu'à la fin 2004, indique 1600 structures connues (Anderson, 2006), alors que 423 nouvelles isoflavones ont été décrites, majoritairement originaires de la sous-famille des Papilionoideae (Veitch, 2007).

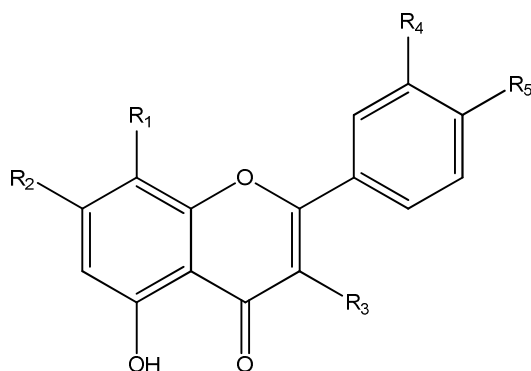
Pistelli dans la recherche systématique des flavonoïdes du genre *Genista*, a étudié les espèces *G. ephedroides* (Pistelli *et al*, 1998), *G. corsica* ( Pistelli *et al*, 2000) et *G. pichisermolliana* (Noccioli *et al*, 2011). Ces investigations ont abouti à l'isolement de plusieurs molécules flavoniques : Génistéine (1), Isoprunétine (2), Wighteone (3), Génistine (4), Génisteone (5), 8-C-glucopyranosyl génistéine (6), Daidzéine (7), 7-O-

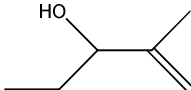
*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

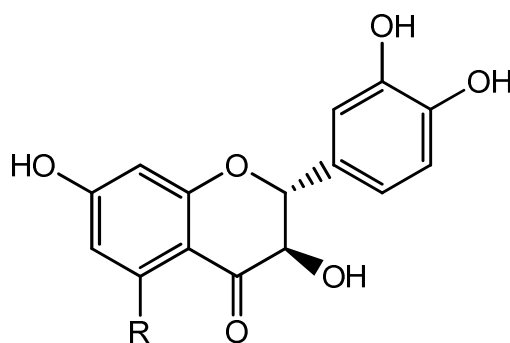
$\beta$ -D-glucopyranosyl génistéine (**8**), Apigénine (**9**), Ephedroïdine (**10**), Isokaempféride (**11**), Lutéoline (**12**), 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl lutéoline (**13**), 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl lutéoline (**14**), Taxifoline (**15**), 5-Methoxytaxifoline (**16**), 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl orobole (**17**), 8-C-glucopyranosyl 3'-O-methyl orobol (**18**), 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl isorhamnetine (**19**), 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl isorhamnetine (**20**), 3-O- $\beta$ -robinoside isorhamnetine (**21**), Alpinum isoflavone (**22**), Hydroxyalpinumisoflavone (**23**), 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl alpinumisoflavone (**24**), Isoderrone (**25**), Ficusoflavone (**26**), Dihydroisoderrondiol (**27**).



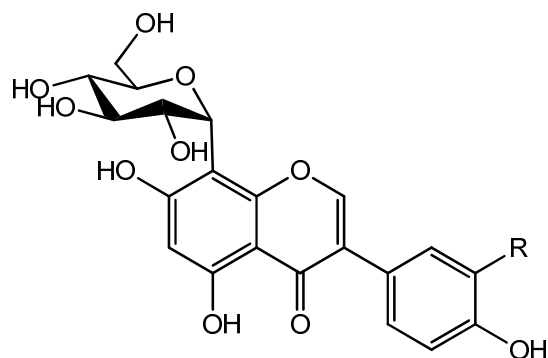
N°	R1	R2	R3	R4	
<u>1</u>	OH	H	OH	H	Génistéine
<u>2</u>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	Isoprunétine
<u>3</u>	OH		OH	H	Wighteone
<u>4</u>	OH	H	OGlc	H	Génistine
<u>5</u>	OH		OGlc	H	Génisteone
<u>6</u>	OH	H	OH	Glc	8-C-glucopyranosyl génistéine
<u>7</u>	H	H	OH	H	Daidzéine
<u>8</u>	OH	H	OGlc	H	7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl génistéine

Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

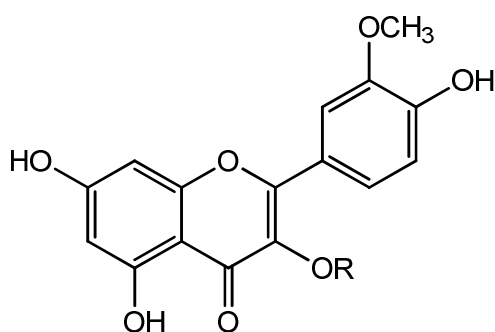
N°	R1	R2	R3	R4	R5	
<u>9</u>	H	OH	H	H	OH	Apigénine
<u>10</u>		OH	H	H	OH	Ephedroïdine
<u>11</u>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Isokaempféride
<u>12</u>	H	OH	H	OH	OH	Lutéoline
<u>13</u>	H	OGlc	H	OH	OH	7-O-β-D-glucopyranosyl lutéoline
<u>14</u>	H	OH	H	OH	OGlc	4'-O-β-D-glucopyranosyl lutéoline



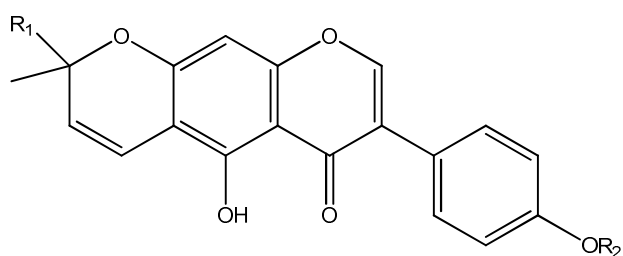
N°	R	
<u>15</u>	OH	Taxifoline
<u>16</u>	OCH <sub>3</sub>	5-Methoxytaxifoline

Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

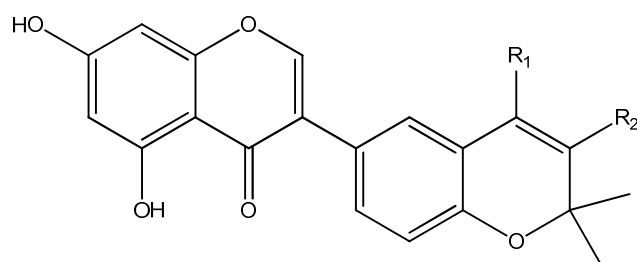
N°	R	
<u>17</u>	OH	8-C-β-D-glucopyranosyl orobol
<u>18</u>	OCH <sub>3</sub>	8-C-β-D-glucopyranosyl 3'-O-methyl orobol



N°	R	
<u>19</u>	Glc	3-O-β-D-glucopyranosyl isorhamnetine
<u>20</u>	Gal	3-O-β-D-galactopyranosyl isorhamnetine
<u>21</u>	Gal-Rha	3-O-β-robinoside isorhamnetine



N°	R1	R2	
<u>22</u>	CH <sub>3</sub>	H	Alpinum isoflavone
<u>23</u>	CH <sub>2</sub> OH	H	Hydroxyalpinum isoflavone
<u>24</u>	CH <sub>3</sub>	Glc	4'-O-β-D-glucopyranosyl alpinum isoflavone

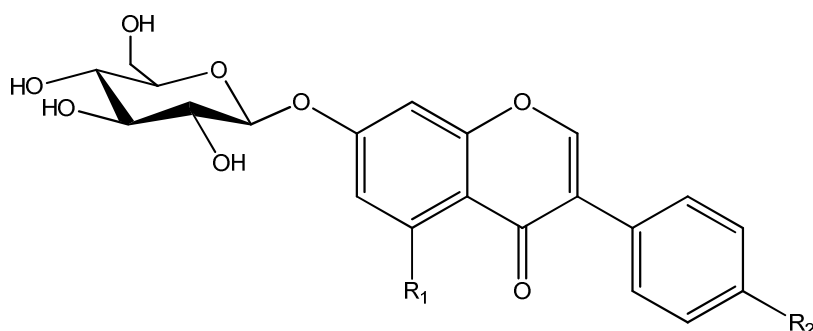
Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

N°	R1	R2	
<u>25</u>	H	H	Isoderrone
<u>26</u>	H	OH	Ficuisoflavone
<u>27</u>	OH	OH	Dihydroisoderrondiol

Une étude chimique réalisée sur l'extrait chloroformique de *G. microcephala* a permis d'isoler alpinum isoflavone (**7**) (Bouakaz *et al*, 2015).

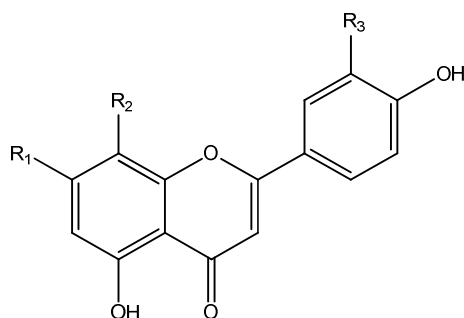
L'investigation chimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *G. morisii* a abouti à l'isolement de 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl isoprune $\acute{t}$ ine (**28**), 7,4'-di-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl genistéine (**29**), 7,4'-di-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl isoprune $\acute{t}$ ine (**30**), Orientine (**31**), Vitexine (**32**) et Eriodictyol (**33**) (Giachi *et al*, 2002).

L'espèce *Genista ferox* fait l'objet d'une investigation chimique qui a abouti à l'isolement de: Génistéine (**1**), Apigénine (**9**), Lutéoline (**12**) et 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl apigénine (**34**) (Mekkiou *et al*, 2012).



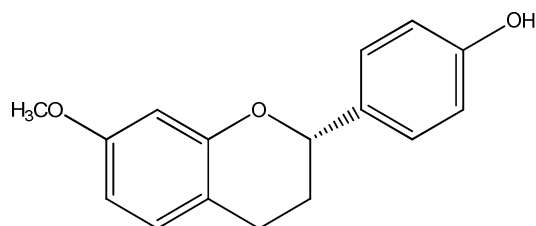
N°	R1	R2	
<u>28</u>	OCH <sub>3</sub>	OH	7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl isoprune $\acute{t}$ ine
<u>29</u>	OH	OGlc	7,4'-di- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl genistéine
<u>30</u>	OCH <sub>3</sub>	OGlc	7,4'-di- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl isoprune $\acute{t}$ ine



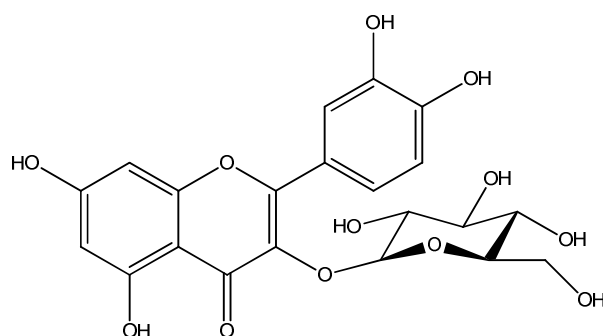
Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

N°	R1	R2	R3	
<u>31</u>	OGlc	H	OH	Orientine
<u>32</u>	OH	Glc	OH	Vitexine
<u>33</u>	OH	Glc	H	Eriodictyol
<u>34</u>	OGlc	H	H	7-O-β-D-glucopyranosyl apigénine

L'espèce *G. tricuspidata* Desf. a également fait l'objet d'une investigation chimique qui a abouti à l'isolement de : 7-methoxy-4'-hydroxyflavane (**35**) et isoquercitrine (**36**) (Boumaza *et al*, 2011).



**35** 7-methoxy-4'-hydroxyflavane

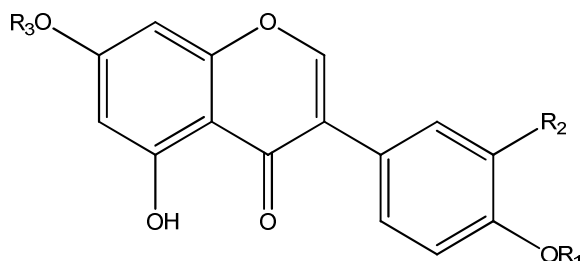


**36** isoquercitrine

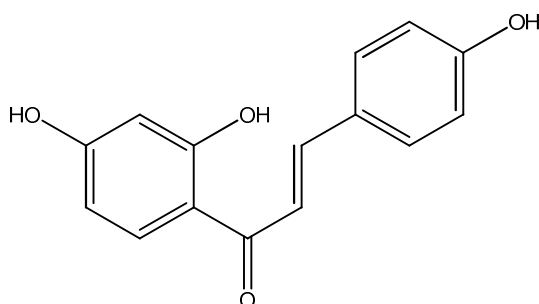
L'investigation chimique menée sur les fleurs de l'espèce endémique italienne *G. cilentina* a abouti à l'isolement de génistéine (**1**), apigénine (**9**), lutéoline (**12**), biochanin A (**37**), biochanin A 7-O-β-glucoside (**38**), 4'-O-methyl orobol (**39**),

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

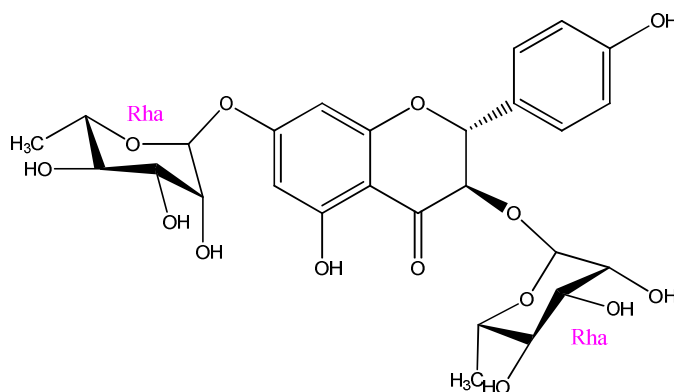
isoliquiritigenine (**40**), 3,7-bis- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl aromadendrine (**41**) ( Venditti *et al.*, 2016).



N°	R1	R2	R3	
<u>37</u>	CH3	H	H	biochanin A
<u>38</u>	CH3	H	Glc	biochanin A 7-O- $\beta$ -glucoside
<u>39</u>	CH3	OH	H	4'-O-methyl orobol



**40** isoliquiritigenine



**41** 3,7-bis- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl aromadendrine

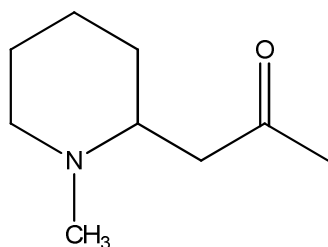
### ❖ *Les alcaloïdes*

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique. Depuis l'identification du premier alcaloïde en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes (Bruneton 1999). En fait, les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue de la structure et des propriétés chimiques que des effets biologiques qu'ils manifestent.

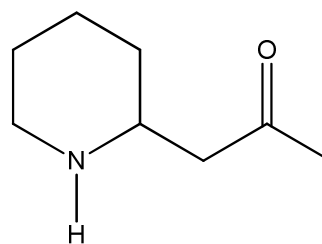
Les alcaloïdes les plus rencontrés dans les espèces du genre *Genista* sont les dérivés de la lysine. Dans ce groupe on trouve les composés pipéridiniques et quinolizidiniques.

L'investigation phytochimique de la plante *G. quadriflora* Munby a conduit à l'isolement de 5 alcaloïdes de pipéridine et 13 alcaloïdes quinolizidiniques : *N*-Methylpelletierine (**42**), Pelletierine (**43**), *N*-Methylanabasine (**44**), Hystrine (**45**), *N*-Methylammodendrine (**46**), Dehydroepilupinine (**47**),  $\alpha$ -Isospartéine (**48**), Spartéine (**49**),  $\beta$ -Isospartéine (**50**), *N*-Methyltetrahydrocytisine (**51**), Tetrahydrocytisine (**52**), Lusitanine (**53**), 10 $\alpha$ -Hydroxymethyl spartéine (**54**), Aphyllidine (**55**), Rhombifoline (**56**), Anagyrine (**57**), Pohakuline (**58**), Baptifoline (**59**) (Kassem *et al.*, 2014).

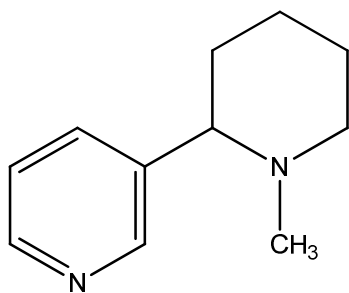
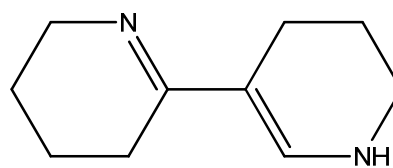
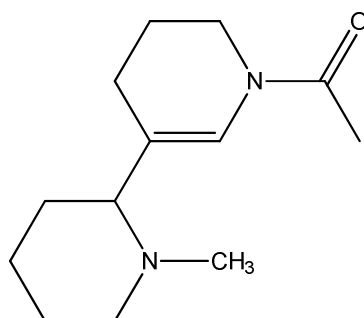
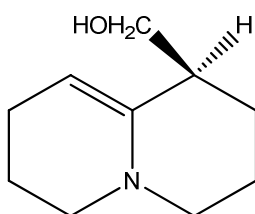
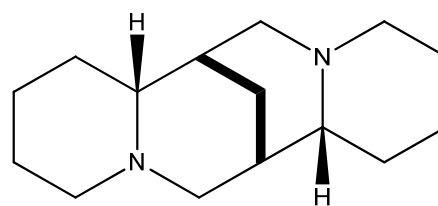
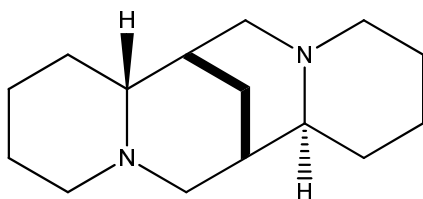
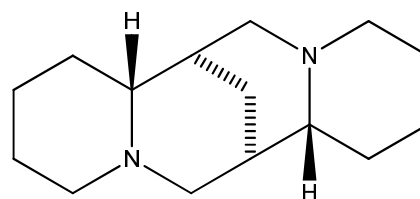
### ✓ *alcaloïdes de pipéridine*

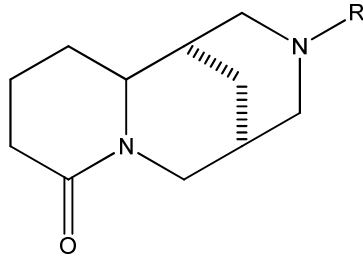


**42** *N*-Methylpelletierine

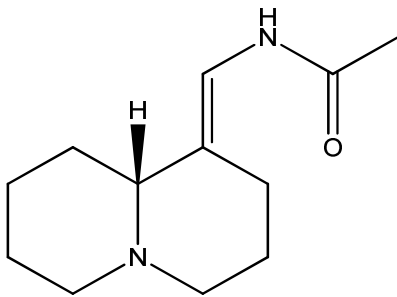
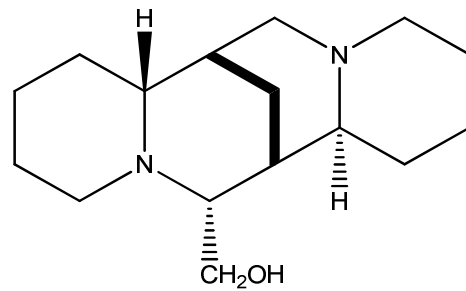
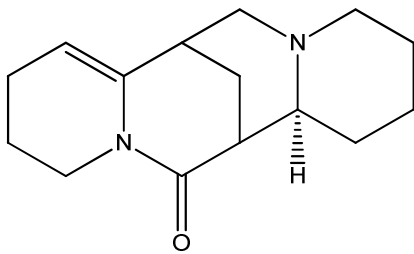
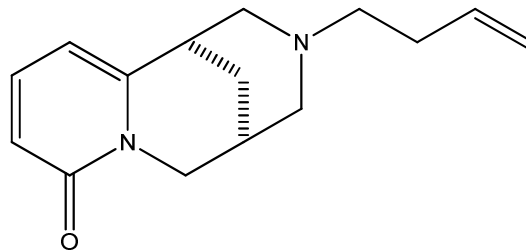
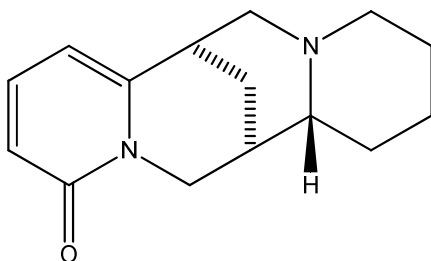
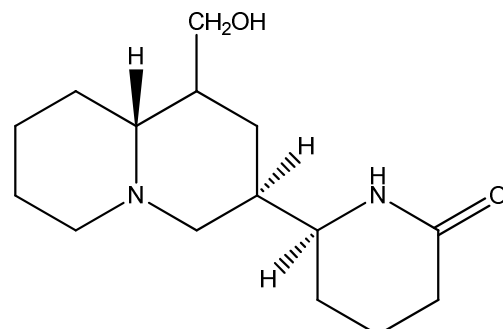


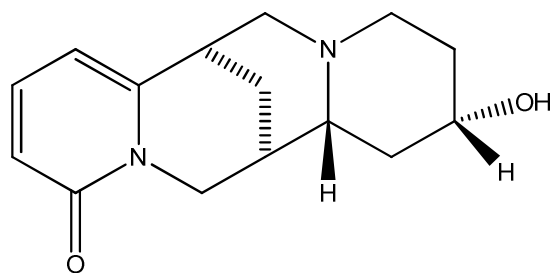
**43** Pelletierine

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista***44** N-Methylanabasine**45** Hystrine**46** N-Methylammodendrine✓ *alcaloïdes quinolizidiniques***47** Dehydroepilupinine**48**  $\alpha$ -Isosparteine**49** Sparteine**50**  $\beta$ -Isosparteine

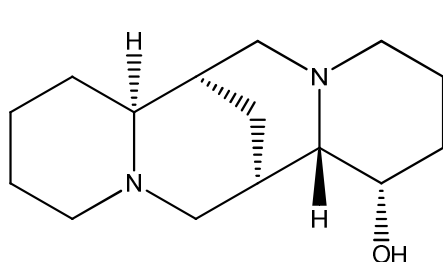
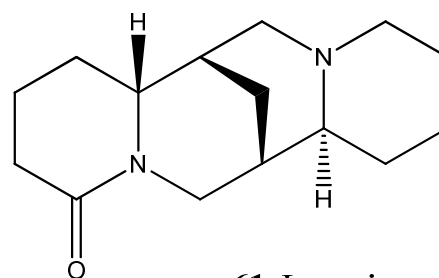
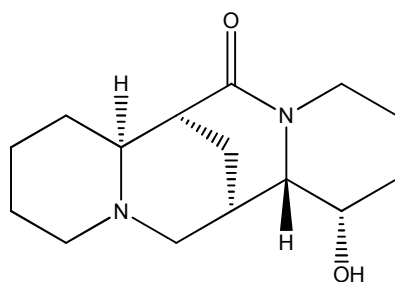
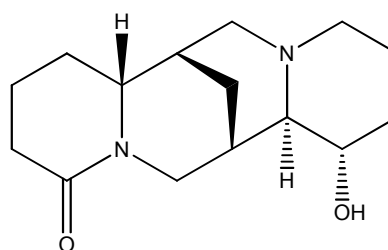
*Aperçu bibliographique sur le genre Genista*

N°	R	
<u>51</u>	CH <sub>3</sub>	N-Methyltetrahydrocytisine
<u>52</u>	H	Tetrahydrocytisine

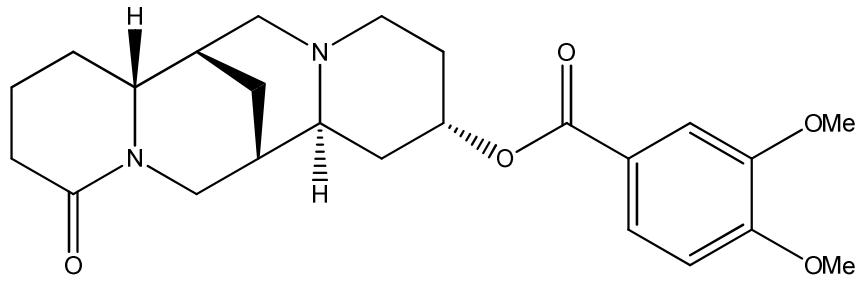
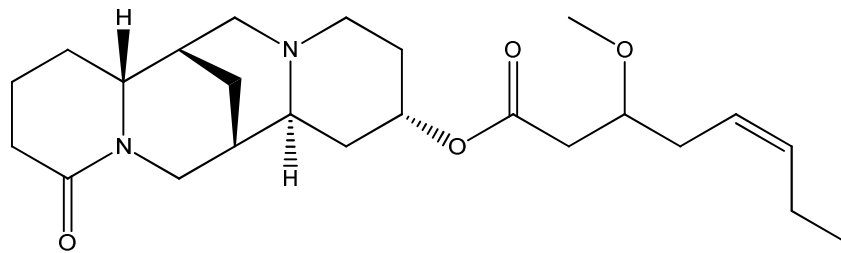
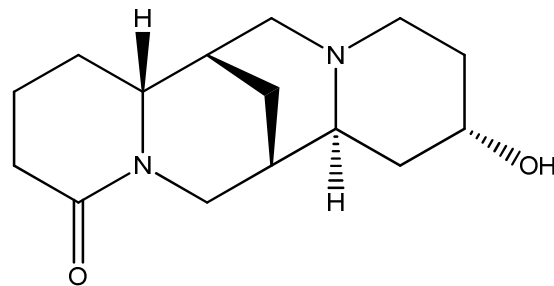
53 Lusitanine54 10 $\alpha$ -Hydroxymethyl spartéine55 Aphyllidine56 Rhombifoline57 Anagryrine58 Pohakuline

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista***59** Baptifoline

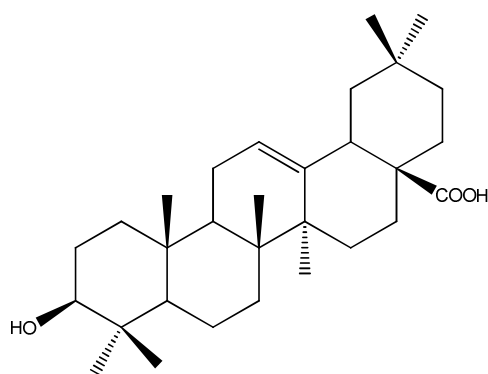
L'investigation phytochimique de la plante *G. ephedroides* (Piselli *et al*, 2001) a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes quinolizidiniques : Anagyrine (**57**), Retamine (**60**), Lupanine (**61**), 17-oxoretamine (**62**) et 12- $\alpha$ -hydroxylupanine (**63**). Leurs structures ont été identifiées par la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse GC/MS.

**60** Retamine**61** Lupanine**62** 17-oxoretamine**63** 12- $\alpha$ -hydroxylupanine

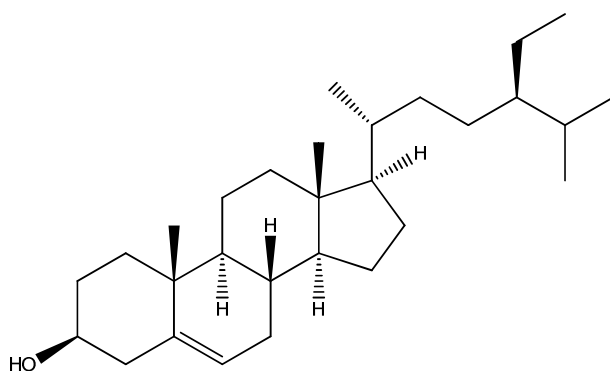
Dans une étude réalisée sur l'espèce *G. cinerea* Rensen *et al*, 1993 a pu caractériser deux alcaloïdes esters : Cineverine (**64**), Cineractine (**65**), en plus d'un 13 $\alpha$ -hydroxylupanine (**66**).

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista***64** Cineverine**65** Cineractine**66** 13  $\alpha$ -hydroxylupanine**❖ Les triterpènes**

Une étude chimique réalisée sur l'extrait chloroformique de *G. microcephala* a permis d'identifier un triterpène : l'acide oléanolique (**67**) (Bouakaz *et al*, 2015).

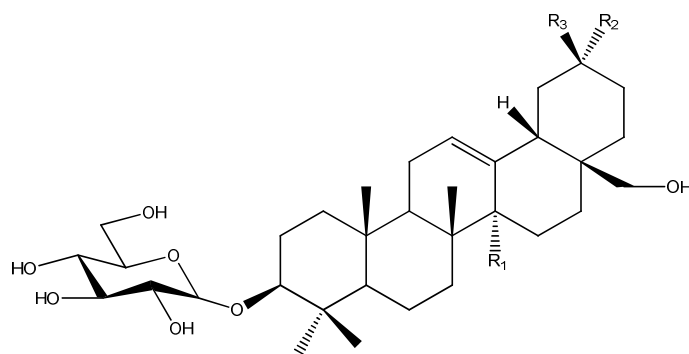
**67** l'acide oléanolique

L'espèce *G. ferox* fait l'objet d'une investigation chimique qui a abouti à l'isolement du  $\beta$ sitostérol (**68**) (Mekkiou *et al*, 2012).

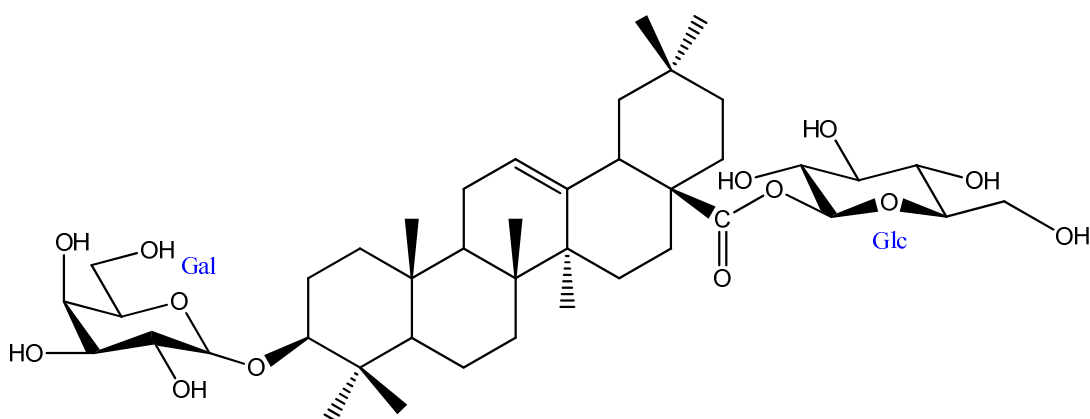
**68**  $\beta$ -sitostérol

Une étude chimique réalisée sur les parties aériennes de *G. ulcina* Spach a permis d'identifier plusieurs saponosides dans le genre *Genista* : le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,30-tétraol (**69**), le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl--oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol (**70**), le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl, 29-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol (**71**), l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,28,29-triol-27-carboxylique (**72**), l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-ene-3 $\beta$ ,27,28-triol-29-carboxylique (**73**), le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-14-*H*-27-nor-olean-12-ene-3 $\beta$ ,28,29-triol (**74**), l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl oléanolique (**75**), le soyasaponin I (**76**), le soyasaponin III (**77**) le sandosaponin A (**78**), le dehydrosoyasaponin I (**79**), la kaikasaponin III (**80**), le phaseoside IV (**81**) (Boutaghane *et al*, 2013).

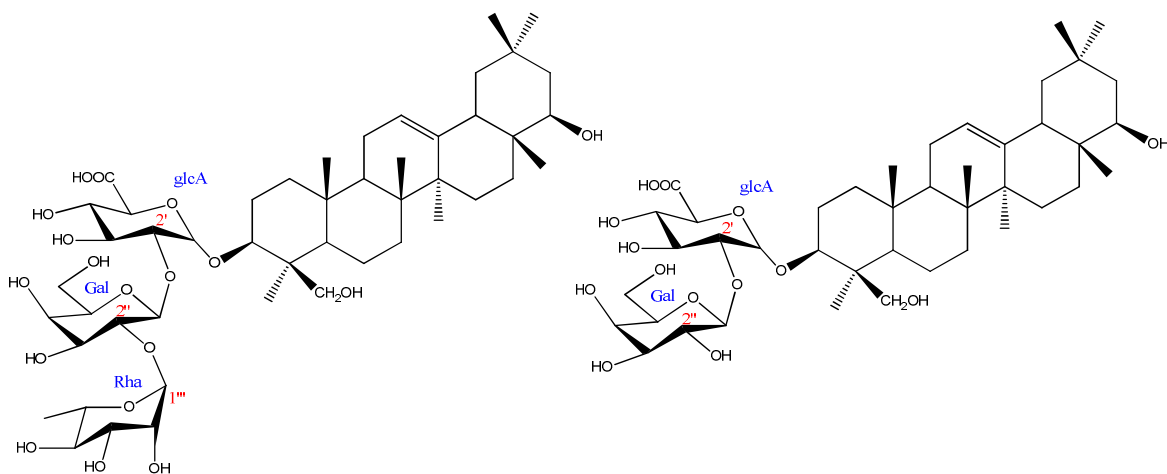
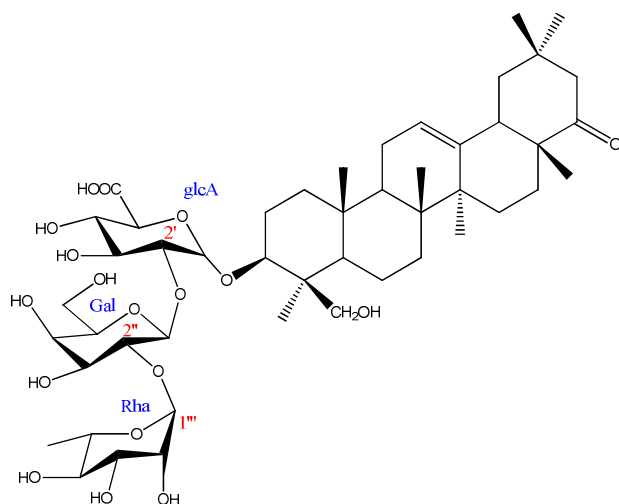
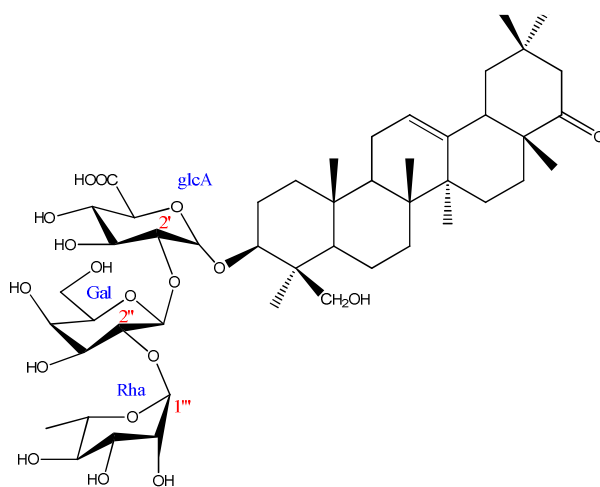


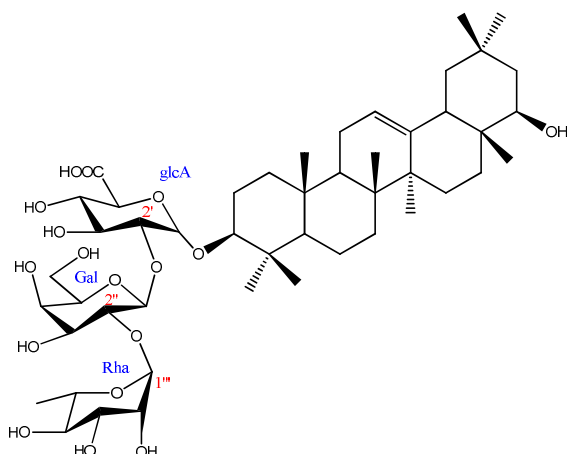
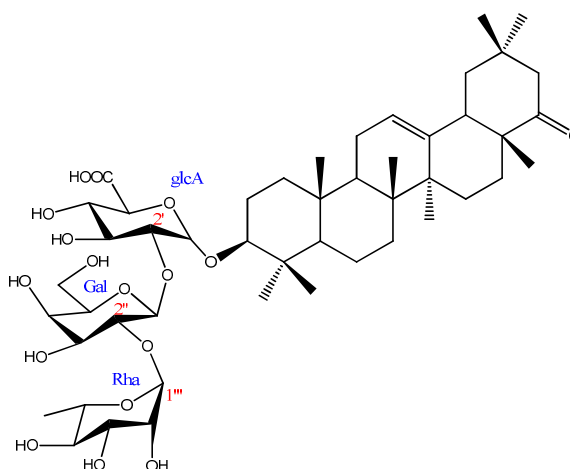
Aperçu bibliographique sur le genre *Genista*

N°	R1	R2	R3	
<u>69</u>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,30-tétraol.
<u>70</u>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl--oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.
<u>71</u>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> O-Glc	CH <sub>3</sub>	3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl, 29- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.
<u>72</u>	COOH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	l'acide 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27-carboxylique.
<u>73</u>	CH <sub>2</sub> OH	COOH	CH <sub>3</sub>	l'acide 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28-triol-29- carboxylique.
<u>74</u>	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-14- <i>H</i> -27-nor-oléan-12-ène-3β,28,29-triol.



75 Acide 3-*O*-β-D-galactopyranosyl-28-*O*-β-D-glucopyranosyl oléanolique.

*Aperçu bibliographique sur le genre Genista***76** Soyasasaponine I**77** Soyasasaponine III**78** Sandosaponine A**79** Dehydrosoyasaponine I

**80** Kaikasaponine III**81** Phaseoside IV

## Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter la famille Fabaceae et les principaux genres constituant cette famille parmi lesquels le genre *Genista* objet de notre étude. Ce travail bibliographique nous a permis de montrer la grande diversité de métabolites secondaires isolés dans le genre *Genista* et les propriétés biologiques de quelques espèces rencontrées dans les différents genres de la famille Fabaceae.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les métabolites secondaires en détail (composés phénoliques et saponines) coté structure, biosynthèse, classification et leurs activités biologiques.

## **Chapitre 2**

*Etude des composés phénoliques,  
et saponines*

## 1. Introduction

Les plantes produisent une gamme impressionnante de substances chimiques. La plupart de ces produits sont basés sur le carbone et connus sous le nom de métabolites primaires et secondaires.

Les métabolites primaires sont communs pour toutes les espèces et peuvent être subdivisés aux protéines, lipides, glucides et acides nucléiques (Sell, 2013).

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante, ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. On trouve ces métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles, cette distribution varie d'une plante à l'autre. Notre plante étudiée appartient au genre *Genista* (Fabaceae), ce genre est connu par sa richesse en composés phénoliques et saponines (Boutaghane *et al.*, 2018).

## 2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes les plus représentés et largement distribués dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2015 ; Šaponjac *et al.*, 2016).

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse:

- La voie des phénylpropanoïdes (C6-C3) ou de l'acide shikimique qui conduit à la synthèse de certains acides aminés aromatiques comme la L-phénylalanine et/ou la L-tyrosine, puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés comme les coumarines.

### Étude des composés phénoliques et saponines

- La voie des flavonoïdes, combinant la voie des phenylpropanoïdes et celle de l'acide acétique conduisant aux polyacétates. Les acides benzoïques, composés en C6-C1, sont issus de la dégradation oxydante des acides cinnamiques ou *p*-hydroxycinnamiques ce qui conduit à la formation d'acides hydroxybenzoïques. L'élaboration du squelette flavonoïde en C6-C3-C6 est effectuée par la chalcone synthase. Pour que cette enzyme soit fonctionnelle, il faut que l'acide *p*-coumarique soit actif sous la forme d'acide *p*-coumarique-Coenzyme A par une CoA-ligase non spécifique. Le précurseur ainsi activé pourra réagir avec trois molécules de malonyl-CoA. Par la suite, la cyclisation du triacétate s'effectue selon la réaction de Claisen et conduit à la formation d'une chalcone, la 4,2',4',6'-tetrahydroxy chalcone (Bruneton, 2015). Une cyclisation conduira à l'obtention du noyau flavone, intermédiaire de la synthèse des flavonoïdes, des tanins condensés et des anthocyanes (figure 5).

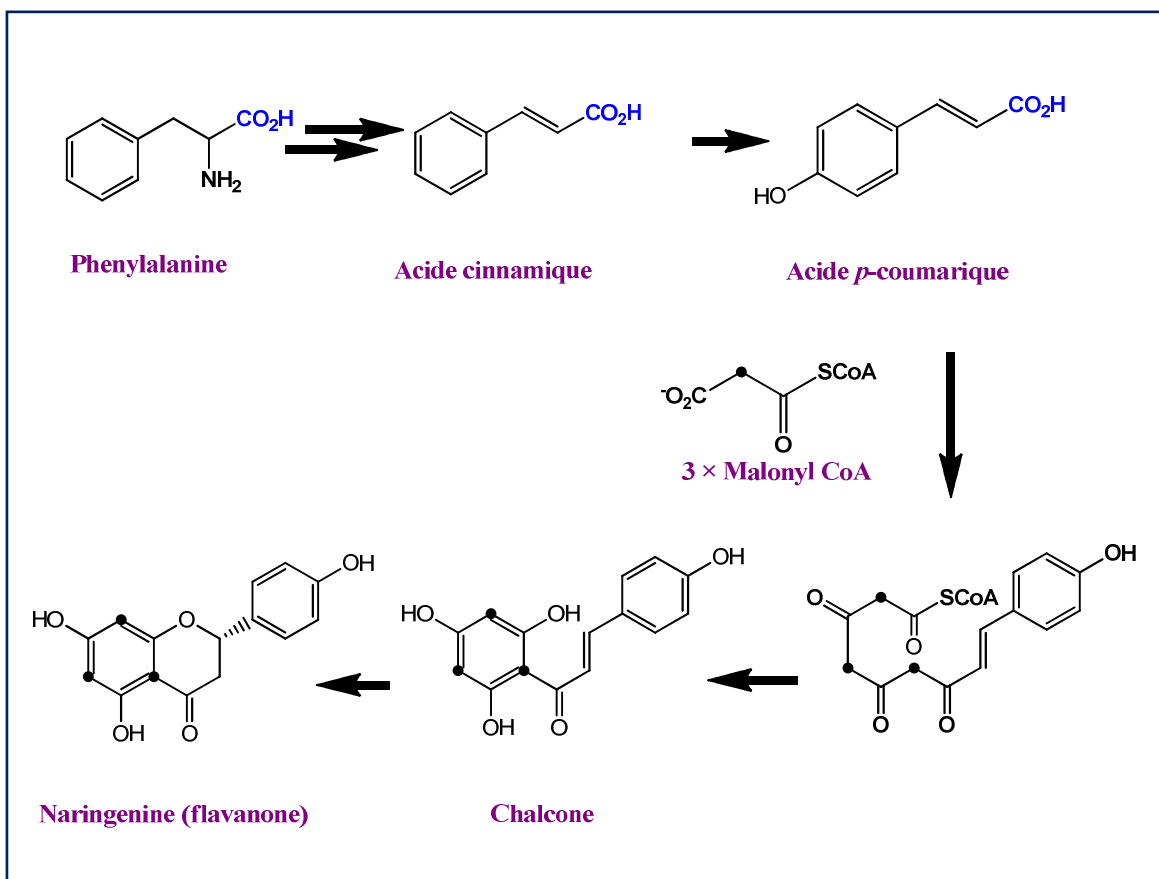


Figure 5 : Voie de biosynthèse simplifiée des flavonoïdes.

## 2.1. Classification des composés phénoliques

Il existe différentes classes de composés phénoliques, on y trouve: les acides phénoliques, anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones et xanthones.

Notre intérêt est essentiellement localisé sur les acides phénoliques, flavonoïdes et les lignanes, substances que nous avons pu isoler de l'espèce du genre *Genista* que nous avons sélectionné pour cette étude.

## 3. Les acides phénoliques

Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Ignat *et al.*, 2011). Ils sont représentés par deux sous-classes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

### ➤ Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Ils dérivent de l'acide benzoïque et ont une structure de base de type C6-C1 (Ignat *et al.*, 2011). Ces acides hydroxybenzoïques sont très communs, aussi bien sous forme libre que sous forme d'esters ou d'hétérosides (Bruneton, 2015).

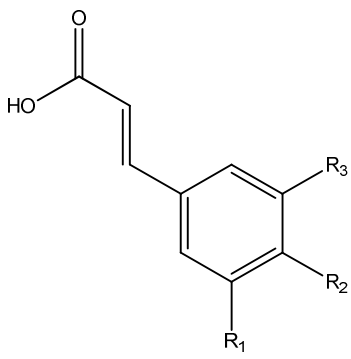
**Tableau 2:** Les principaux acides hydroxybenzoïque

Nom du composé	R1	R2	R3	R4	Structure chimique
<b>Acide benzoïque (non phénolique).</b>	H	H	H	H	
<b>Acide p-hydroxybenzoïque</b>	H	H	OH	H	
<b>Acide protocatéchique</b>	H	OH	OH	H	
<b>Acide vanillique</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<b>Acide gallique</b>	H	OH	OH	OH	
<b>Acide syringique</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
<b>Acide salicylique</b>	OH	H	H	H	
<b>Acide gentisique</b>	OH	H	H	OH	

➤ **Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique**

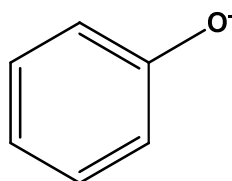
Ils ont une structure de base de type C6-C3 (Ignat *et al.*, 2011). Les fonctions phénols (OH) de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (Tableau 3).

**Tableau 3:** Les principaux acides hydroxycinnamique.

Nom du composé	R1	R2	R3	Structure chimique
Acide cinnamique	H	H	H	
Acide p-coumarique	H	OH	H	
Acide caféique	OH	OH	H	
Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

### 3.1. Propriétés chimiques majeures

Une propriété importante des groupements hydroxyles des polyphénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anion phénoxyde (Figure 6) stabilisés par résonance. Cet anion a la possibilité de perdre un électron pour former un radical (Sartori-Thiel, 2003) ; l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical (Leopoldini *et al.*, 2011). Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre (Korkina *et al.*, 2012).



**Figure 6 :** structure chimique de l'ion phénoxyde.



### 3.2. Les propriétés biologiques des acides phénoliques

Les acides phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques :

#### ➤ *Activité antibactérienne*

Cho et al (1998) ont signalé que les acides 4-hydroxybenzoïque et -4-hydroxy cinnamique isolés à partir de riz avaient une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries Gram + et certains bactéries *Gram -*.

Anthony (2009) et Merkl et al (2010) ont signalé que les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, connus sous le nom de parabènes ou conservateurs d'acide, présentent également une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Aspergillus niger*, en raison de la présence d'un groupe hydroxyle.

L'acide orsellinique, présente également une activité antimicrobienne contre un certain nombre de micro-organismes, selon Robbins (2003).

Une série d'acides phénoliques tels que l'acide syringique, l'acide caféique et l'acide 4-hydroxybenzoïque isolés à partir de l'huile des racines de palmier possèdent *in vitro* des activités antimicrobiennes et fongicides contre *Ganoderma boninense*, comme indiqué par Chong et al (2009).

#### ➤ *Activité anti-drépanocytose*

La drépanocytose, également appelée anémie falciforme, est une maladie génétique résultant d'une mutation sur le gène codant l'hémoglobine. Cette affection peut notamment occasionner un retard du développement de l'enfant, des manifestations vaso-occlusives, une prédisposition aux infections bactériennes et une anémie hémolytique.

Qin et al. (2008) ont rapporté que l'acide vanillique, possède une activité anti-drépanocytose. En outre, ce dérivé exerce également une activité anthelminthique, supprime la fibrose hépatique en cas d'atteinte hépatique chronique, et possèdent une

*Etude des composés phénoliques et saponines*

action protectrice contre l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité produites par l'acétaminophène.

➤ ***Activité anticancéreuse***

Birsovaa et al (2005) ont étudié l'effet anticancéreux des acides caféique, vanillique, ellagique, chlorogénique et férulique et ont constaté que tous ces acides phénoliques possèdent une activité anticancéreuse par l'inhibition de 4-nitroquinoléine-1-oxyde qui induit à son tour le cancer de la langue chez le rat.

➤ ***Activité estrogénique***

La détection de l'activité estrogénique, est très importante, en particulier lorsqu'elle est liée à l'industrie alimentaire. Ge et Chang (2006); Lemini et al. (1997, 2003) ont reporté que des dérivés d'esters de l'acide p-hydroxybenzoïque (parabènes) dont la structure est similaire à celle du 17-bêta-estradiol présentaient des propriétés semblables à celles de l'estrogène *in vivo*.

➤ ***Activité antivirale***

Les dérivés esters de l'acide hydroxybenzoïque seraient largement utilisés pour traiter les infections causées par le virus de l'hépatite B, papillome humain, virus de l'herpès simplex, condylome acuminé, cervicite et érosions cervicales chez l'homme et les animaux. L'acide gallique, présent dans les vins et le thé vert, aurait également un effet antiviral. L'activité antivirale d'un ester d'acide hydroxybenzoïque est supérieure à celle de son acide correspondant. Par exemple, l'activité antivirale du gallate de propyle est supérieure à celle de l'acide gallique (Ximenes *et al.*, 2010).

➤ ***activité anti-inflammatoire***

Luecha et al., 2009 ont rapporté que l'acide 4-hydroxybenzoïque isolé de l'extrait éthanolique de *Vitex glabrata* (Verbenaceae), possède une activité anti-inflammatoire.

### ➤ activité antioxydante

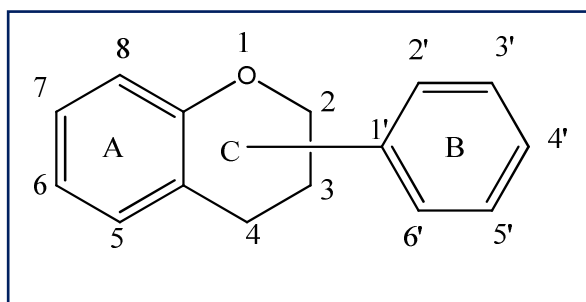
Merkl et al (2010) ont signalé que les acides phénoliques et leurs esters, à savoir l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide gentisique, l'acide férulique, l'acide isoférulique, l'acide gallique, l'acide salicylique, l'acide sinapique, l'acide coumarique, l'acide vanillique, l'acide protocatéchique et l'acide syringique possèdent un bon effet antioxydant.

## 4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Bruneton, 2015).

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes (Stöckigt *et al.*, 2002) et leur nombre ne cesse de s'accroître.

Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure en C6-C3-C6 du diphenylpropane (Figure 7), les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (De Rijke *et al.*, 2006).



**Figure 7** : Structure de base des flavonoïdes

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façons très générales localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) (Bruneton 1999).

## 4.1. Classification

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B (figure 8).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylée ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines.

Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituant sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique (s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Bruneton 1999).

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apiose sont fréquents avec le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique).

On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants: le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (Hollman 2000).

## Étude des composés phénoliques et saponines

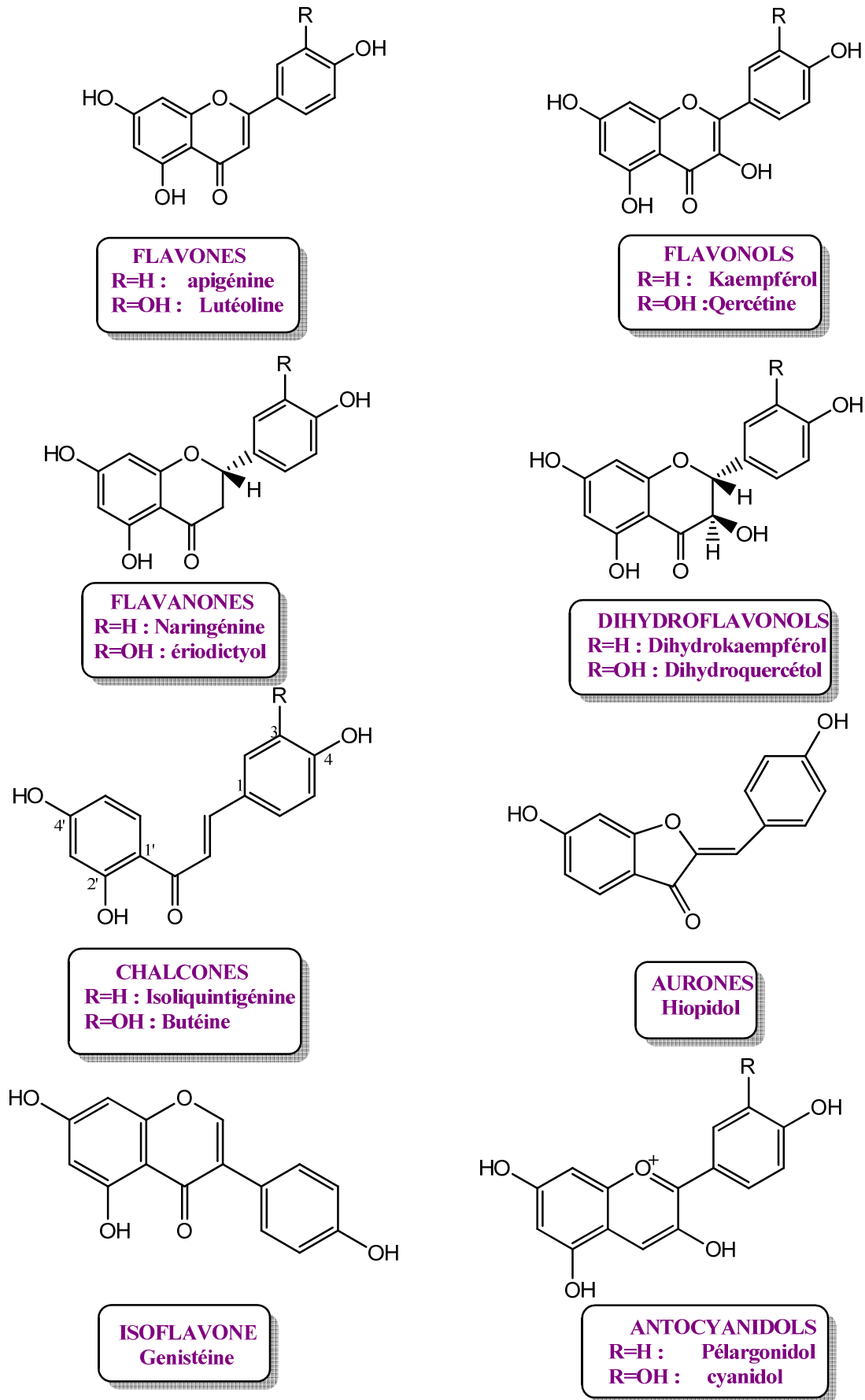


Figure 8: différentes classes de flavonoïdes.

*Etude des composés phénoliques et saponines*

Parmi les différentes classes de flavonoïdes, nous citerons les principales : flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, chalcones, auronnes et isoflavones.

➤ ***Flavones, flavonols***

Il s'agit des composés les plus nombreux de ce groupe. Dans ces molécules, le cycle A est dans 90% des cas substitué à deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C4', les substituants sont des groupes –OH ou –OCH<sub>3</sub> (Bruneton, 2015). Les flavones et les flavonols, ainsi que leurs hétérosides est universelle, mais certains schémas de substitution sont spécifiques à certaines familles.

➤ ***Flavanones et dihydroflavonols***

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et par la présence de centres d'asymétrie (Bruneton, 2015). Chez les flavanones naturelles, le C2 est de configuration 2S, alors que les dihydroflavonols sont de configuration 2R, 3R, le phényle et l'hydroxyle étant en position *trans*.

➤ ***Chalcones, auronnes***

Les chalcones dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique,  $\alpha,\beta$ -insaturé (Ferrazzano *et al.*, 2011). Si les substitutions sur le noyau A sont souvent identiques à celles des autres flavonoïdes, le noyau B est fréquemment monosubstitué ou non substitué. Les auronnes sont caractérisées par une structure de 2-benzylidènocoumaranone.

➤ ***isoflavonoïdes***

Ces composés sont moins répandus taxonomiquement que les précédents et se retrouvent principalement chez les Fabacées où ils sont très actifs en tant que

phytoalexines synthétisées par exemple en réponse à une attaque par un pathogène (Ferrazzano *et al.*, 2011). Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavone) au 3-phénylchromone (isoflavone) (Bruneton, 2015). Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les isoflavones glycosylées quant à elles, existent mais sont plus rares.

## 4.2. Les activités biologiques des flavonoïdes

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

### ➤ *Activité antioxydante*

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols, et, en particulier, les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ( $O_2^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$  et  $ROO^{\bullet}$ ) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives (Quideau *et al.*, 2011).

### ➤ *Activités antibactérienne, antifongique et antivirale*

Il a été reporté que le raisin *Vitis vinifera* possède des propriétés pharmacologiques importantes, et en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de flavanols, de flavonols, et de tanins (Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009).

*Étude des composés phénoliques et saponines*

Les possibilités de guérison qu'offrent les flavonoïdes sont exploitées de longue date. Hippocrate prescrivait un baume de propolis contre les plaies et les ulcères. Des siècles plus tard, les propriétés antimicrobiennes de la propolis ont été attribuées aux composés de la catégorie des flavonols et flavanones. En effet, avec leur aptitude à inhiber la germination des spores de plantes pathogènes, ils sont d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme (Cushnie et Lamb, 2005).

Les flavonols issus de fractions de propolis ont également montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 ou HSV-2, sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur de haut risque pour la transmission du VIH (Khan *et al.*, 2005).

➤ ***Activité anti-inflammatoire***

L'action des flavonoïdes d'un extrait de citron sur la perméabilité membranaire fut le premier effet pharmacologique connu de ces composés, il y a plus de 50 ans (Sartori-Thiel, 2003).

Les études sur les flavonoïdes issus de plantes utilisées traditionnellement restent encore très répandues car, bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (Benavente-Garcia et Castillo, 2008; Conforti *et al.*, 2008).

### **4.3. Applications industrielles des flavonoïdes**

Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains flavonoïdes comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012).



La capacité antioxydante de flavonoïdes est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (Moure *et al.*, 2001).

Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA (Sartori-Thiel, 2003).

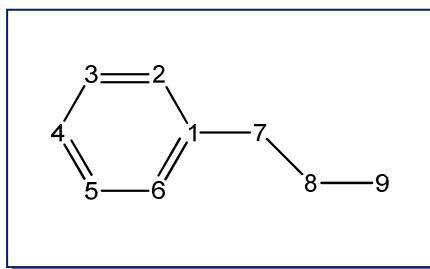
## 5. Les lignanes

### 5.1. Introduction

Le terme lignane a été introduit par Haworth (1936) pour décrire un groupe de dimères de phénylpropanoïdes dont les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) du groupement propane de leur chaîne latérale. Les phénylpropanoïdes (C6-C3) doivent leur nom à leur structure dérivée de la phénylalanine : un noyau aromatique (C6) avec une chaîne propane (C3) (figure 9).

En 1969, Mc Credie *et al.*, proposent d'étendre le terme afin d'inclure tous les composés naturels de faible poids moléculaire dérivant du couplage oxydatif d'unités hydroxyphénylpropènes, puis Gottlieb, en 1972, introduit le terme néolignane pour décrire des composés de deux phénylpropanes liés autrement que par une liaison 8-8'. Ces deux définitions des lignanes de Harworth (1936) et des néo-lignanes de Gottlieb (1972) ont été adoptées par les recommandations IUPAC (Moss, 2000).

Par exemple, des lignanes composés de trois ou quatre unités phénylpropanes sont couramment appelés sesquiliglanes ou dilignanes respectivement (Umezawa, 2000), alors que les recommandations IUPAC proposent les termes sesquinéolignanes et dinéolignanes.



**Figure 9** : Structure générale d'un phénylpropanoïde.

Les lignanes constituent une classe abondante de métabolites secondaires, qui suscitent un intérêt croissant, en raison de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Lewis et Davin, 1999). Ils sont largement représentés chez les plantes vasculaires, en 1990, Ayres et Loike, mentionnaient 308 espèces différentes accumulant des lignanes.

## 5.2. La biosynthèse des lignanes

La voie de biosynthèse des lignanes est étroitement liée à celle des autres phénylpropanoïdes.

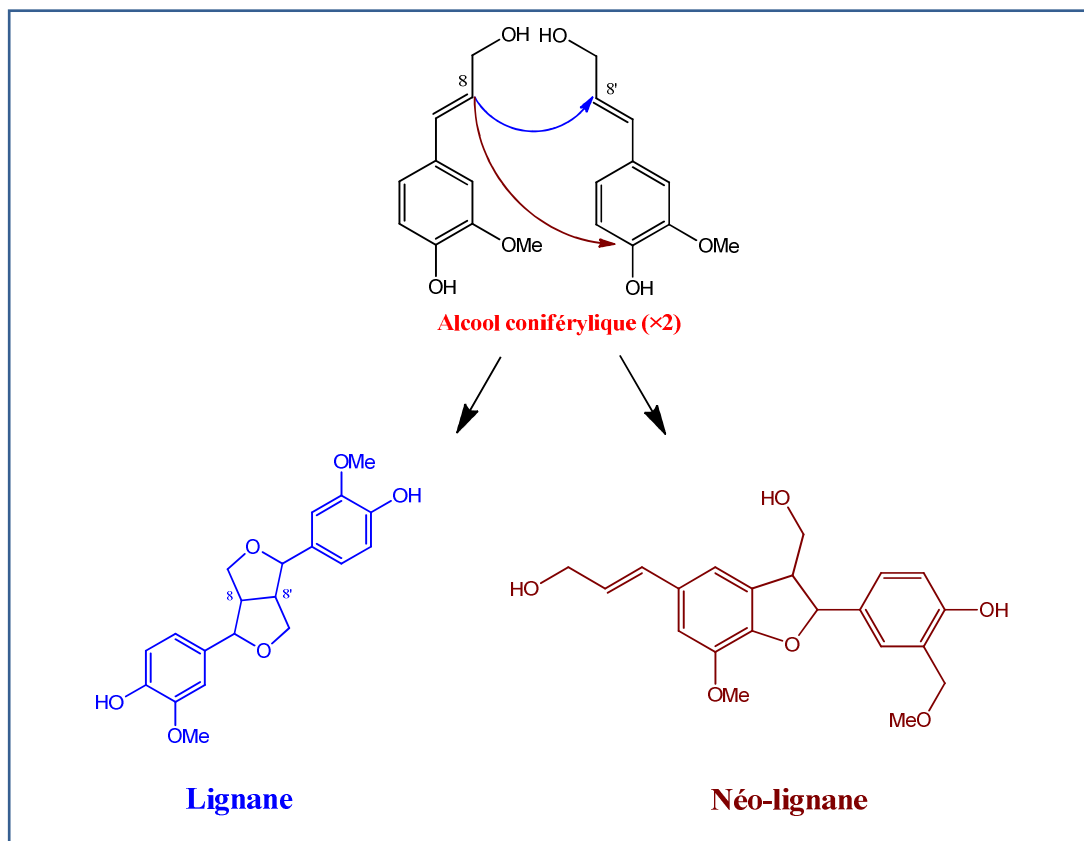
Les lignanes étant optiquement actifs, ils résultent d'un couplage stéréospécifique des carbones C-8. Des protéines particulières appelées « protéines dirigeantes », sans activité enzymatique et indépendantes des oxydases prennent en charge les monomères oxydés sous forme radicalaire en assurant, dans le cas présent, le couplage 8-8'. Que deux protéines portant chacune une unité en C6-C3 sous forme radicalaire s'associent ou -comme proposé récemment - qu'un même site actif au sein d'une même protéine puisse accueillir deux radicaux libres, le résultat est un rapprochement spatial dans un environnement chiral permettant la formation de la liaison carbone-carbone de façon stéréo sélective. La double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furano-furaniques.

### ➤ *Biosynthèse des néolignanes*

Chez les néolignanes les nombreuses possibilités de couplage se traduisent par une plus grande diversité structurale. Ce sont également des produits de condensation d'unités phényl-propaniques, dimères d'allyl-ou de propénylphénols dont la liaison,

*Etude des composés phénoliques et saponines*

variable, n'implique au maximum qu'un seul carbone C-8 (liaison 8-3' : dihydrophénanthrènes; 8-1' : octahydrobenzofuranes; 3-3' :biaryles; 8-O-4' : benzodioxine, etc.). Beaucoup de ces dernières structures sont le résultat de cyclisations complémentaires, conséquence d'un couplage radicalaire supplémentaire (par ex. 2-4') (Bruneton 2009).



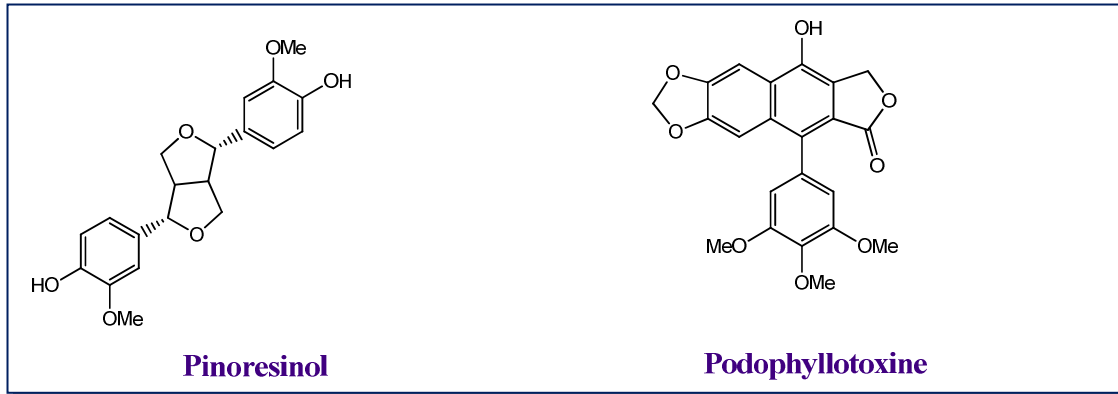
**Figure 10** : principaux dérivés issus de couplages oxydatifs de l'alcool coniférylique.

### 5.3. Classification

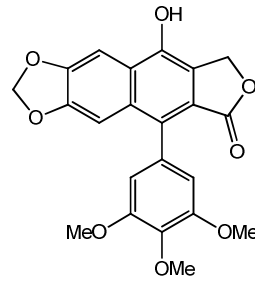
Les lignanes sont répartis en huit groupes structuraux (illustrés figure 11), classés selon le mode d'incorporation du (ou des) atome(s) d'oxygène dans le squelette carboné et selon le type de cyclisation (Umezawa, 2003).

## Etude des composés phénoliques et saponines

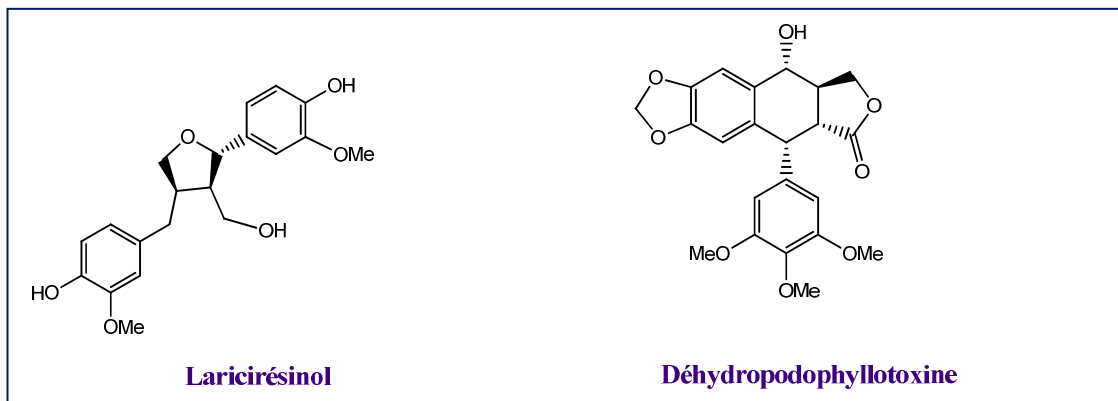
-Les furanofuranes



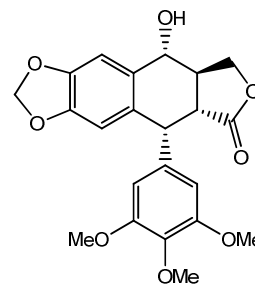
- les aryltétralines



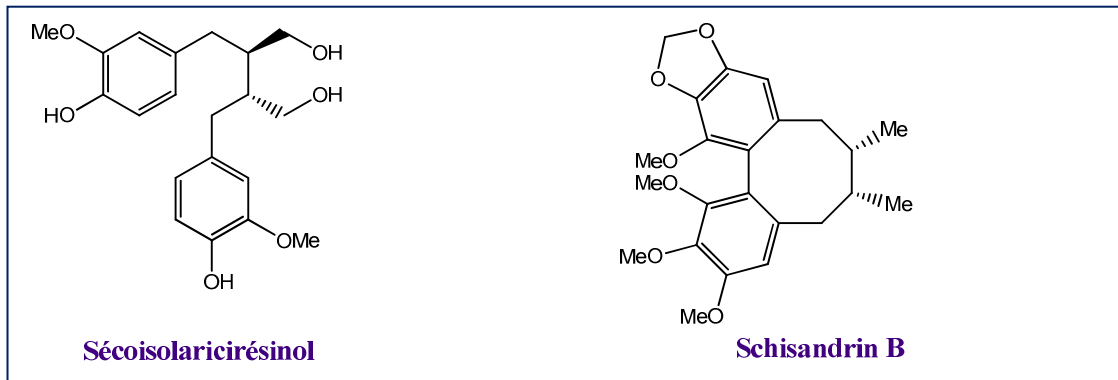
- Les furanes



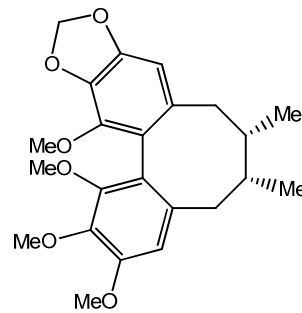
- les arylnaphtalènes



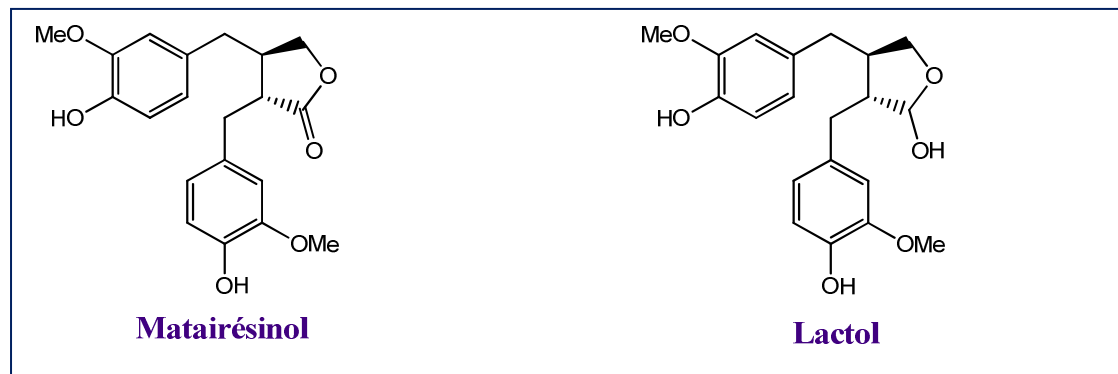
- les dibenzylbutanes



- les dibenzocyclooctadiènes



- les dibenzylbutyrolactones



- les dibenzylbutyrolactols

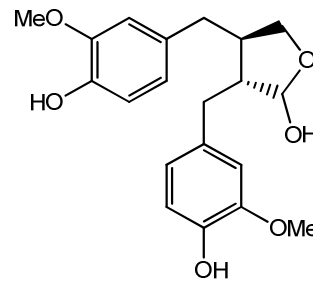


Figure 11 : les huit groupes structuraux de lignanes.

## 5.4. Distribution botanique

La distribution botanique des lignanes est large. Chez les Gymnospermes (Acrogymnospermae), ils sont rencontrés dans les bois alors que chez les Angiospermes (Magnoliophyta) ils ont été identifiés dans tous les tissus (racines, bois, feuilles, fleurs, fruits, graines). Les néolignanes semblent avoir une distribution plus restreinte; ils sont fréquents chez les Magnoliidae (Bruneton 2009)

## 5.5. Intérêt biologiques des lignanes

Chez les plantes, les lignanes et néolignanes jouent un rôle encore assez mal connu, mais sans aucun doute important pour leur défense : des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe.

### ➤ *Les lignanes phytoestrogènes*

Bien qu'il existe des milliers de lignanes différents (Umezawa, 2003), seuls quelques-uns sont actuellement crédités d'un rôle préventif et protecteur vis-à-vis de certains cancers, notamment les cancers hormono-dépendants (Lamblin *et al*, 2008). Il a été constaté qu'une administration du lignane phytoestrogène sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG) par voie orale avait des effets d'inhibition des premiers stades de cancérogenèse chez le rat. L'ingestion de SDG purifié à des doses de 1,5 mg / jour pendant vingt semaines, débutant une semaine après traitement par un agent cancérogène (le diméthyl-benzanthracène), réduit de manière significative (de 37 à 46 %) le nombre de tumeurs chez le rat (Thomson *et al*, 1996).

### ➤ *Études épidémiologiques*

Des études épidémiologiques ont en effet montré une excrétion urinaire plus faible d'entérolignanes (marqueur de leur production dans le colon) chez les populations de patientes atteintes ou présentant de forts risques (non-végétariennes) de cancers du sein que chez les populations présentant de faibles risques (végétariennes) (Thompson

*Étude des composés phénoliques et saponines*

*et al*, 1996 ; Adlercreutz, 2002). Mc Cann *et al* (2009) indiquent que l'absorption de grandes quantités de lignanes pourrait être associée à une amélioration de la survie des femmes ménopausées atteinte d'un cancer du sein.

Mais d'autres études, concernant les lignanes phytoestrogènes (Kuijsten *et al*, 2008) indiquent que l'on ne peut pas relier la concentration des lignanes dans le plasma sanguin au risque de cancer colorectal, Velentzis *et al* (2009) précisent que les lignanes pourraient être associé à une petite réduction du risque de cancer du sein, mais suggèrent que d'autres études confirmant cette tendance sont nécessaires pour pouvoir l'affirmer.

D'autres études épidémiologiques remettent en doute l'effet de ces lignanes : Johnsen *et al* (2010) ont démontré que l'entérolactone permettait de diminuer les risques de cancer du côlon chez la femme, mais que cela les augmentait chez l'homme ; Ward *et al* (2010) quant à eux, ont trouvé que les lignanes phytoestrogènes pourraient contribuer à l'apparition de cancer colorectal chez la femme et à l'apparition de cancer de la prostate chez l'homme. D'une manière générale, les études épidémiologiques sur les lignanes phytoestrogènes, ne sont pas affirmatives.

➤ ***Activités antioxydantes***

Le sécoisolaricirésinol ainsi que l'entérodiol et l'entérolactone (les entérolignanes qui en dérivent) possèdent des propriétés antioxydantes, le sécoisolaricirésinol diglucoside est capable de piéger les formes radicalaires de l'oxygène (Prasad *et al*, 2000, Kitts *et al*, 1999).

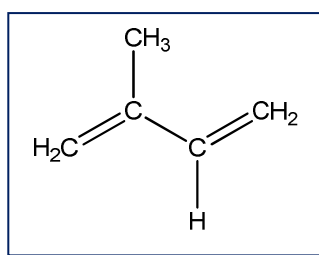
Le sécoisolaricirésinol sous sa forme di-glucoside a lui aussi des propriétés antioxydantes, comparables à celle de la vitamine E, mais il est moins antioxydant que sa forme déglucosylée (Hosseinian *et al*, 2007). De plus, l'hinokinine, également présente bien qu'en moindre quantité chez le lin (Bayindir *et al*, 2008), a aussi été recensée comme possédant des propriétés antioxydantes (Medola *et al.*, 2007).

### ➤ *Activité antivirale et antifongique*

Les lignanes et néolignanes, offrent des potentialités intéressantes dans divers domaines : activité antivirale de dérivés de l'acide nordihydroguaiarétique, de l'arctigénine, de l'arctine ou des lignanes de *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. et de *Streblus asper* Lour.; activité antifongique des lignanes des racines de *Sambucus williamsii* Hance; activité trypanosomicide de l'hinokinine de divers *Zanthoxylum* et *Bursera*; potentialisation de l'action insecticide des pyréthrine par les furanofuranes de l'insaponifiable de l'huile de sésame (Bruneton 2015).

## 6. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte, largement répandus dans le règne végétal, provenant de la voie de l'acide mévalonique. Leur particularité structurale est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) (Figure 12).



**Figure 12** : Structure de l'unité isoprénique

Les terpènes sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en :

- ✓ Monoterpènes : formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ).
- ✓ Sesquiterpènes : formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ).
- ✓ Diterpènes : formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ).
- ✓ Triterpènes : formés de six isoprènes ( $C_{30}H_{48}$ ).
- ✓ Tétraterpènes : formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes.
- ✓ Polyterpènes : formés de ( $C_5H_8$ ) n, ou, (n de 9 à 30).

On cite ici en particulier les triterpènes notamment les saponines qui sont présent dans le genre *Genista*.

## 7. Les saponines

### 7.1. Généralités

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken *et al.*, 2007). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante. C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) (Bruneton, 2009).

Il est intéressant de noter que des organismes marins comme le concombre de mer contiennent des saponines, par exemple le frondoside A isolé de *Cucumaria frondosa*, l'eximisoside A isolé de *Psolus eximius*, les thyonosides A et B isolés de *Thyone aurea*, et le neothyonidioside isolé de *Stichopus mollis* (Girard *et al.*, 1990 ; Kalinin *et al.*, 1997 ; Bonnard et Rinehart, 2004 ; Moraes *et al.*, 2004).

Comme les flavonoïdes et les alcaloïdes pour en nommer seulement certains, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. De nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne (Hostettman et Marston, 1995 ; Osbourn, 1996<sup>a,b</sup>).

Les propriétés biologiques de ces métabolites secondaires ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle, comme les racines de *Bupleurum falcatum* L. (Fujioka *et al.*, 2003) et de *Panax ginseng* C. A. Meyer (Kim *et al.*, 1995 ; Park *et al.*, 2005), pour ne citer que quelques exemples.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie.



*Etude des composés phénoliques et saponines*

Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante, les sources les plus importantes étant l'arbre *Quillaja saponaria* Molina et *Yucca schidigera*, et l'arbuste du Sud-Est asiatique *Camellia sinensis*, connue sous le nom de « tea plant » (Kobayashi *et al.*, 2006 ; Wojciechowski, 2013). Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, avec utilisation pour l'assainissement des sols (Chen *et al.*, 2008) et pesticides naturels (Chapagain *et al.*, 2007).

## 7.2. Structure des saponines

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides, très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leur capacité à engendrer de la mousse en solution aqueuse après agitation. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la génine) et hydrophile (la partie osidique).

Un saponoside se compose de deux à trois parties distinctes : la génine ou aglycone, une, deux, voire plus rarement trois ou quatre chaînes osidiques, et un ou plusieurs groupements acylants aromatiques ou aliphatiques qui peuvent acyler les fonctions hydroxylées de la partie aglycone et/ou de la partie osidique.

Le grand nombre de structures décrites dérive d'un nombre réduit de génines. La variabilité des structures est essentiellement due aux nombreuses combinaisons possibles des unités osidiques, acylées ou non.

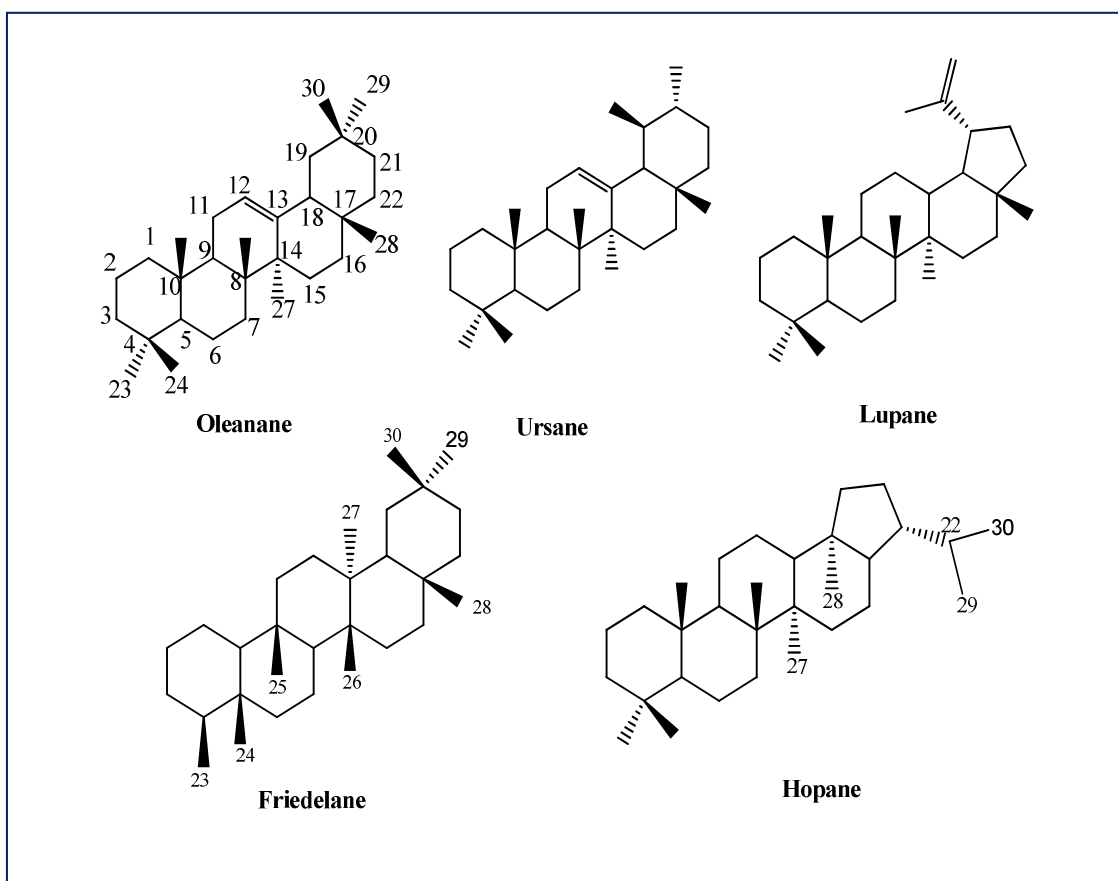
### ➤ *Partie aglycone*

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la structure de la génine : saponosides stéroïdiques et saponosides triterpéniques. Certains auteurs distinguent une troisième catégorie, les saponosides aux génines aminées stéroïdiques qui sont traitées par d'autres comme des alcaloïdes stéroïdiques.

Plus de 360 génines triterpéniques sont décrites dans la littérature. Elles possèdent un squelette à 30 carbones comportant habituellement cinq ou moins fréquemment quatre cycles.

*Etude des composés phénoliques et saponines*

Les sapogénines tétracycliques sont issues des squelettes dammarane, cucurbitane et lanostane. Les sapogénines pentacycliques dérivent de cinq squelettes principaux : les oléananes, les ursanes, les lupanes, friedelanes et les hopanes (figure 13).



**Figure 13** : Structures des principaux squelettes pentacycliques des génines triterpéniques.

➤ **Partie osidique**

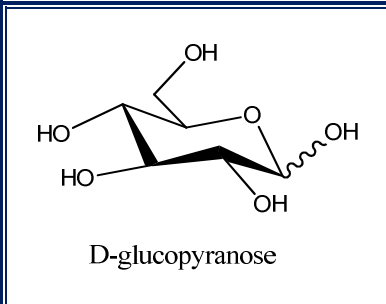
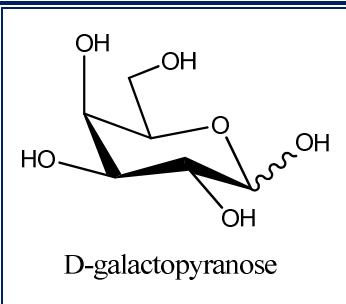
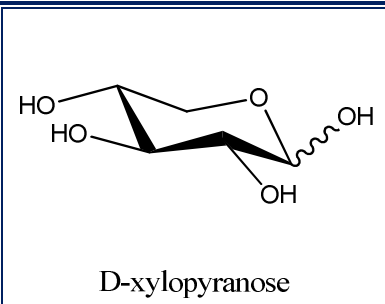
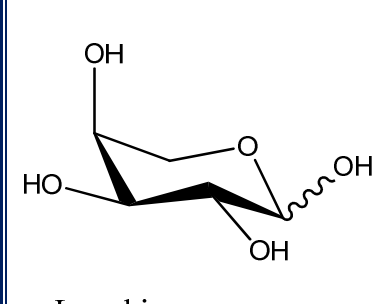
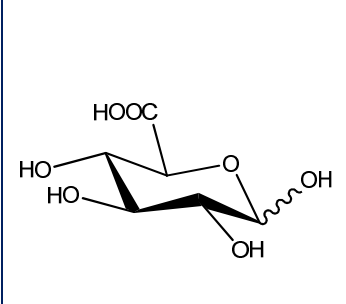
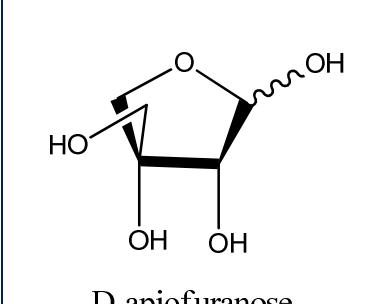
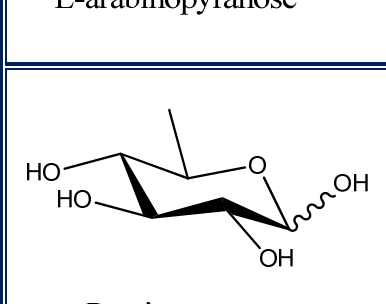
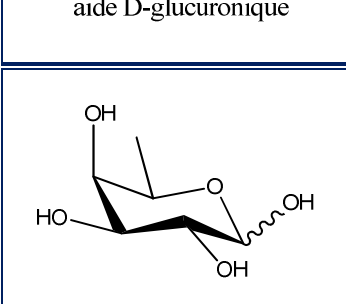
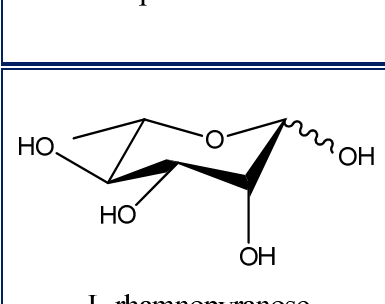
Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les saponines stéroïdiques, ainsi que triterpéniques sont souvent des saponines monodesmosidiques en général C-3 par la fixation d'une unique chaîne de sucres. Des saponines bidesmosidiques sont rencontrées parmi les saponines triterpéniques de type oléanane avec une liaison en C-3 et C-28 et pour les saponines stéroïdiques de type furostane avec une fixation en C-

*Etude des composés phénoliques et saponines*

3 et C-26. Parmi les saponines triterpéniques de type cycloartane on peut trouver des structures tridesmosidiques, les chaînes de sucres sont fixés en C-3, C-6, C-16, C-24 et C-25 dans la plupart des cas (Bedir *et al.*, 1999<sup>a,b</sup> ; Polat *et al.*, 2009), et même des saponines tétradesmosidiques ont été décrites mais semblent être très rares (Perrone *et al.*, 2008 ; Linnek *et al.*, 2011).

Le tableau ci-dessous regroupe les sucres les plus fréquemment rencontrés dans les saponines:

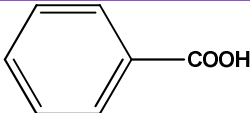
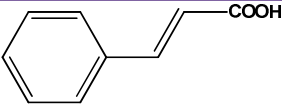
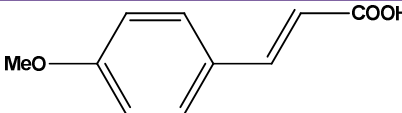
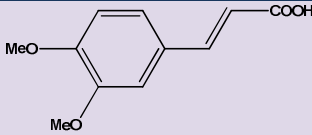
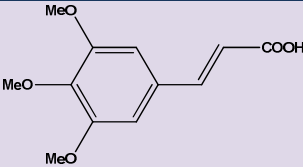
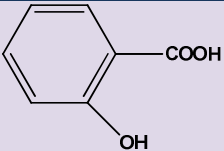
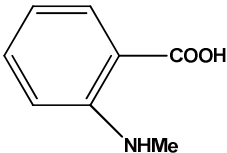
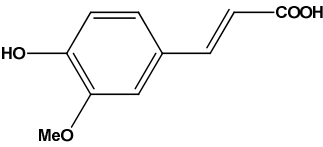
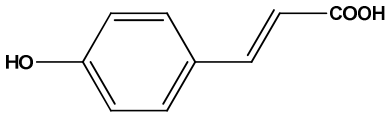
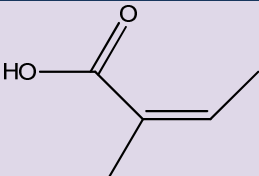
**Tableau 4.** Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines.

 <p>D-glucopyranose</p>	 <p>D-galactopyranose</p>	 <p>D-xylopyranose</p>
 <p>L-arabinopyranose</p>	 <p>aide D-glucuronique</p>	 <p>D-apiofuranose</p>
 <p>D-quinovopyranose</p>	 <p>D-fucopyranose</p>	 <p>L-rhamnopyranose</p>

### ➤ Les acides organiques

Des acides organiques peuvent être fixés au niveau de la génine ou des sucres par une liaison ester (Hostettmann et Marston, 1995 ; Dinda *et al.*, 2010). Les structures les plus souvent rencontrées sont récapitulées dans le Tableau 5.

**Tableau 5:** Les principaux acides organiques rencontrés dans les saponines.

		
<b>Acide benzoïque</b>	<b>Acide cinnamique</b>	<b>Acide 4-méthoxycinnamique</b>
		
<b>Acide 3,4-diméthoxycinnamique</b>	<b>Acide 3,4,5-méthoxycinnamique</b>	<b>Acide salicylique</b>
		
<b>Acide N-méthylanthranilique</b>	<b>acide férulique</b>	<b>Acide p-coumarique</b>
	<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	<b>HCOOH</b>
<b>Acide angélique</b>	<b>Acide acétique</b>	<b>Acide formique</b>

### 7.3. Les activités biologiques des saponines

Les saponines présentent des activités biologiques et pharmacologiques variées, principalement dans les domaines de l'immunologie, la cancérologie et la microbiologie (Lacaille-Dubois et Wagner, 2000 ; Lacaille-Dubois, 2005<sup>a,b</sup>, 2013 ; Lacaille-Dubois *et al.*, 2013).

*Étude des composés phénoliques et saponines*

Les saponines sont connues pour leurs activités anti-tumorales (Lacaille-Dubois, 2005c ; Sautour *et al.*, 2007b ; Podolak *et al.*, 2010), anti-inflammatoires (Adao *et al.*, 2011), immunostimulants et immunoadjuvants (Lacaille-Dubois, 1999), molluscicides (Chen *et al.*, 2012 ; Diab *et al.*, 2012), anti-microbiennes (Vermeersch *et al.*, 2009), pour n'en citer que quelques-unes.

Ces activités biologiques s'expliquent par leurs caractéristiques physicochimiques, et notamment par leurs structures. En effet, les travaux de Wang *et al.* 2007 indiquent que l'hémolyse et la cytotoxicité des saponines stéroïdes sont dépendantes de leurs structures, en particulier de la nature, du nombre et la séquence des sucres dans les saponines. Il est important de noter que le mécanisme d'action des saponines dans les activités biologiques empruntent différentes voies (Chwalek *et al.*, 2006 ; Wang *et al.* 2007).

Une étude réalisée par Bottger *et al.*, 2013 confirme cette relation structure-activité, ils décrivent qu'il y a une amélioration de la synergie entre la cytotoxicité des RIP-I (Ribosome-Inactivating Proteins type I) et la structure des saponines. L'activité cytotoxique naturellement faible de RIP-I peut être augmentée jusqu'à 100 000 fois, si elles sont appliquées en combinaison avec des saponines structurellement appropriées.

## 8. Conclusion

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement. Ce chapitre a été consacré aux métabolites secondaires principalement les composés phénoliques, et saponines, en mettant en valeur des données bibliographiques issues de leur intérêts biologiques.

Ainsi, l'objectif de cette étude est la recherche des produits naturels à intérêt thérapeutique. En vue de l'étude phytochimique et pharmacologique de l'espèce *G. numidica* (Fabaceae), le chapitre suivant présente la partie expérimentale de l'extraction des métabolites secondaire des différents extraits.

# **PARTIE 2**

## *Méthodes et analyses*

# **Chapitre 1**

*Extractions, séparations et analyses*

## **1. Investigation phytochimique de *Genista numidica* Spach**

### **1.1. Introduction**

Parmi les 700 genres de la famille des Fabacées, en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espèces (Quezel et santa, 1963). Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail à une espèce du genre *Genista* répartie en Europe et en région méditerranéenne notamment en Algérie (Marino *et al*, 2012). Le présent travail a pour but l'investigation phytochimique des parties aériennes de l'espèce *G. numidica* Spach. Cette étude chimique sera complétée par une évaluation des activités antioxydante et antiproliférative.

### **1.2. Les critères de choix de l'espèce**

Le genre *Genista* à fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, ces travaux ont permis d'isoler des alcaloïdes de façon majoritaire (Pistelli *et al*, 2001), les saponines (Boutaghane *et al*, 2013 ) ainsi que les composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes (Boumaza *et al*, 2006, Mekkiou *et al*, 2012, Giachi *et al*, 2002).

Nos investigations bibliographiques, ont montré que très peu d'études ont été menées sur l'espèce *G. numidica* Spach. Une étude a porté sur l'extrait méthanoïque des fleurs et des feuilles, et l'évaluation de leurs activités antioxydantes (Ati *et al.*, 2017). Une autre étude a été consacrée à la composition de l'huile essentielle des parties aériennes de cette espèce (Lograda *et al.*, 2009). Ceci nous a encouragé à entreprendre cette étude consacrée à une investigation phytochimique approfondie de cette espèce.

### **1.3. Description botanique et classification dans la systématique**

*G. numidica* Spach est une espèce endémique en Algérie (Quezel et Santa 1963). C'est un arbrisseau ou un arbuste de 0,6 - 2,5 m de hauteur, dressé, buissonnant, vert, à rameaux cylindriques et dressés. Le calice fortement bilabié, lèvre supérieure à deux dents triangulaires, l'inférieure à trois dents sétacées, les tiges à feuilles persistantes les inférieures trifoliolées de 18-12 mm. La corolle est marcescente, la carène est de 10 - 11 mm de long, droite, et dressée. Les étamines sont concrecentes en gaine fermée (Figure 13).



- ★ **Floraison** : Elle fleurie du mois de Mai au mois de Juin.
- ★ **Répartition géographique** : Rare dans les Sahels littoraux oranais, assez commun en Numidie et dans l'atlas Tellien algérois.



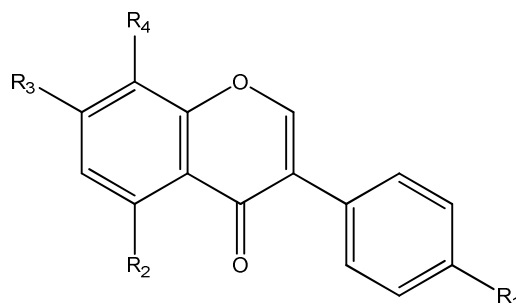
**Figure 13:** L'espèce de *Genista numidica* Spach (Boutaghane *et al.*, 2018).

#### ❖ Classification de l'espèce

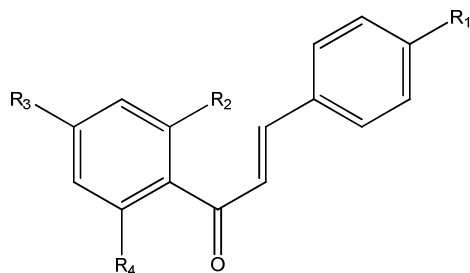
Règne	→	<b>Plantes</b>
Division	→	<b>Spermaphytes</b>
Subdivision	→	<b>Angiospermes</b>
Classe	→	<b>Dicotylédone</b>
Ordre	→	<b>Fabales</b>
Famille	→	<b>Fabaceae</b>
Sous-famille	→	<b>Papilionaceae</b>
Genre	→	<b><i>Genista</i></b>
Espèce	→	<b><i>Numidica</i> Spach</b>

### 1.4. Les travaux antérieurs sur *G. numidica*

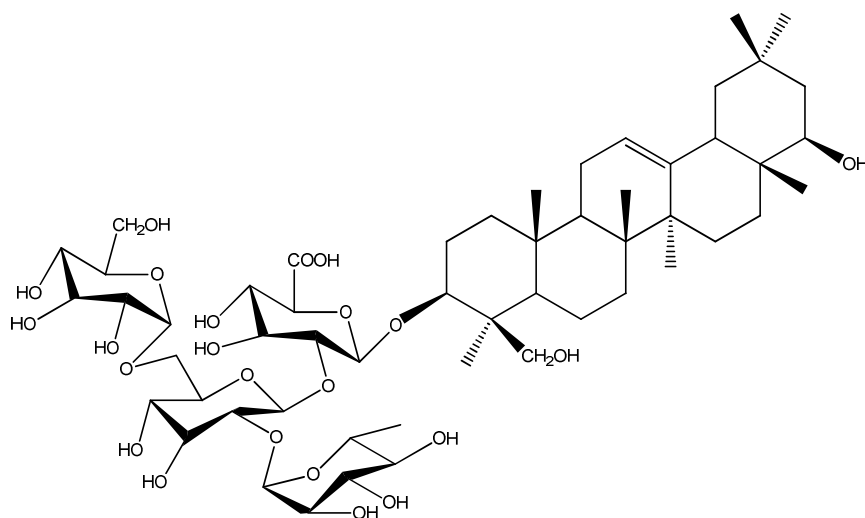
Une étude récente sur l'espèce *G. numidica* a montré qu'à partir des parties aériennes de cette plante 30 composés ont été isolés et identifiés : Génistéine (**1**) Génistine (**4**), 8-*C*-glucopyranosyl-genistéine (**6**), 8-*C*- $\beta$ -d-glucopyranosyl-orobole (**17**), 7-*O*- $\beta$ -d-glucopyranosyl apigénine (**34**), 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl lutéoline (**13**), 4',7-di-*O*- $\beta$ -d-glucopyranosyl-génistéine (**29**), Isoliquiritigénine (**40**), 3,7-bis- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-aromadendrine (**41**), Soyasaponine I (**76**), Dehydrosoyasaponine I (**79**), Kaikasaponine III (**80**), Phaseoside IV (**81**), Daidzine (**82**), Sissotrin (**83**), 4',7-di-*O*- $\beta$ -d-glucopyranosyl-5-*O*-methylgénistéine (**84**), 4'-*O*- $\beta$ -d-glucopyranosyl,8-*C*- $\beta$ -d-glucopyranosyl-génistéine (**85**), Neoisoliquiritigénine (**86**), Isoliquiritine (**87**), 4,4'-di-*O*- $\beta$ -d-glucopyranosyl-isoliquiritigénine (**88**), Isosalipurpol (**89**), 3-*O*-[ $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -d-glucuronopyranosyl]-sophoradiol (**90**), Sophoraflavoside II (**91**), Kudzusaponine B1 (**92**), Baptisiasaponine I (**93**), kakkasaponine III (**94**), Neoliquiritine (**95**), Licoagroside B (**96**), Koaburaside (**97**), Tyramine (**98**) (Boutaghane *et al*, 2018).



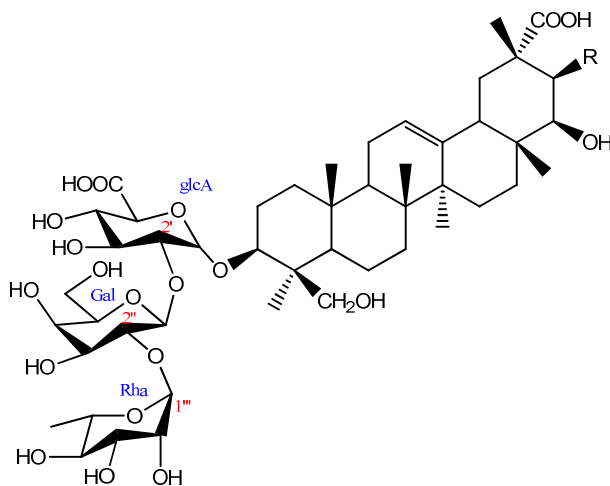
N°	R1	R2	R3	R4	
<b>82</b>	OH	H	OGlc	H	Daidzine
<b>83</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OGlc	H	Sissotrine
<b>84</b>	OGlc	OCH <sub>3</sub>	OGlc	H	4',7-di- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-5- <i>O</i> -methylgénistéine
<b>85</b>	OGlc	OH	OH	C-Glc	4'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl 8- <i>C</i> - $\beta$ -d-glucopyranosyl-génistéine



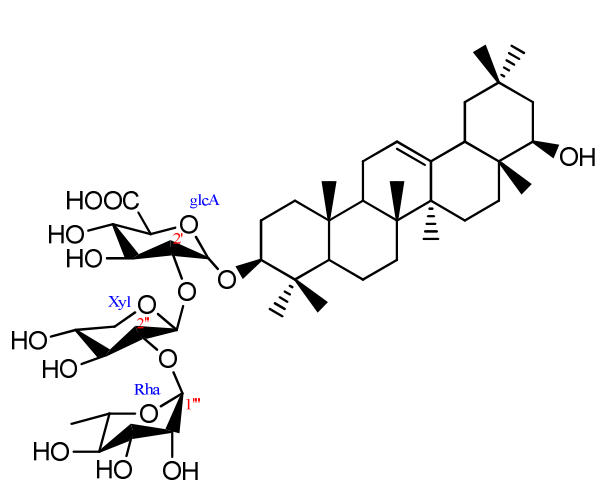
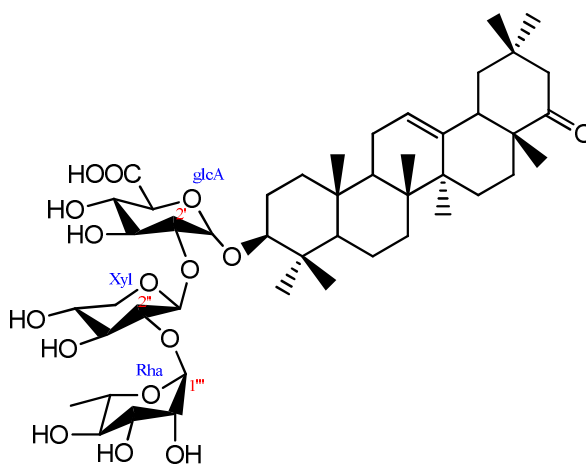
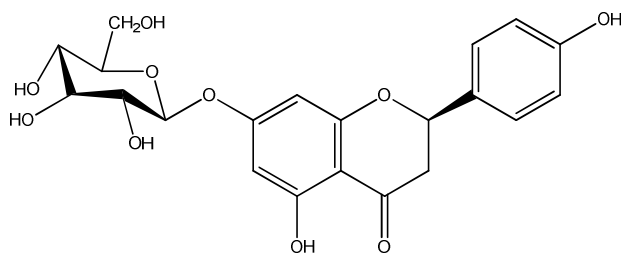
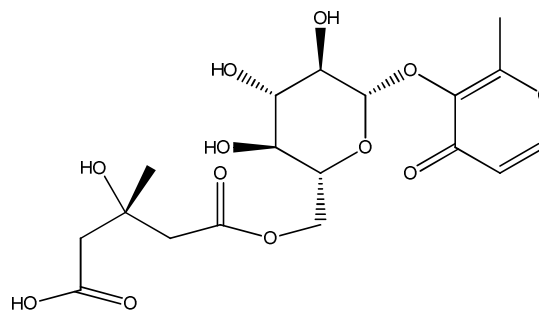
N°	R1	R2	R3	R4	
<b>86</b>	OH	H	OGlc	OH	Neoisoliquiritigénine
<b>87</b>	OGlc	H	OH	OH	Isoliquiritine
<b>88</b>	OGlc	H	OGlc	H	4,4'-di- <i>O</i> - $\beta$ -D-gluco-pyranosyl-isoliquiritigénine
<b>89</b>	OH	OH	OH	OH	Isosalipurpol

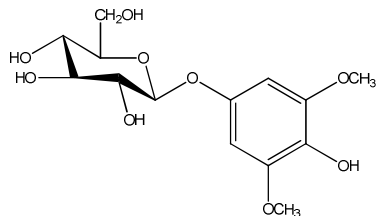


**90** 3-*O*-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\beta$ -D-gluco-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-} $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-sophoradiol.

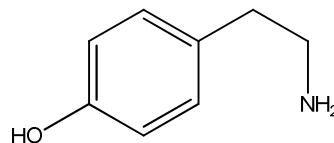


N°	R	
<u>91</u>	H	Sophoraflavoside II
<u>92</u>	OH	Kudzusaponine B1

93 Baptisiasaponine I94 kakkasaponine III95 Neoliquiritine96 Licoagroside B



**97** Koaburaside



**98** Tyramine

### ▪ L'Étude antérieure sur l'huile essentielle de *G. numidica*

L'analyse de l'huile essentielle de cette espèce révèle la présence d'un pourcentage élevé des acides gras de l'ordre de 45,9 % avec seulement 9 composés, dont les produits majoritaires sont l'acide palmitique (15,34 %) et l'acide myristique (13,49%). Les aldéhydes représentent 17,73 % de l'H.E suivi par les monoterpènes avec un pourcentage de 5,49 %, contrairement aux sesquiterpènes qui sont moins représentés avec 0,82 % dont 0,52% pour l'oxyde de caryophyllène. Les diterpènes sont représentés par le trans-phytol avec 2,6 %. Les alcools non terpéniques représentent un taux de 4,57 %, dont le composant majoritaire et l'oct-1-en-3-ol avec 2,6 % ( Lograda *et al*, 2009).

Les huiles essentielles de cette espèce, ont été testées sur trois souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Saphylococcus aureus*. Les bactéries testées ont montré une activité très faible à nulle ( Lograda *et al*, 2009).

## 1.5. Matériel végétal

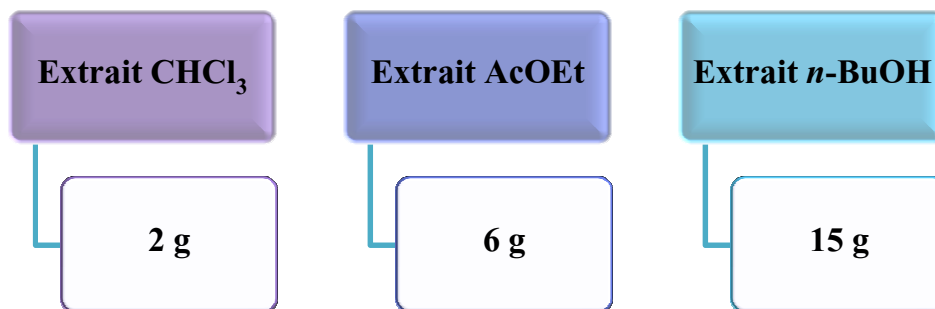
### 1.5.1. Récolte de la plante

La plante *Genista numidica* a été récoltée au mois de juin de l'année 2013 de Djebel El Ouahch à Constantine. Un spécimen (GN78/06/2013) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université frères Mentouri-Constantine. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées.

## 1.6. Extraction

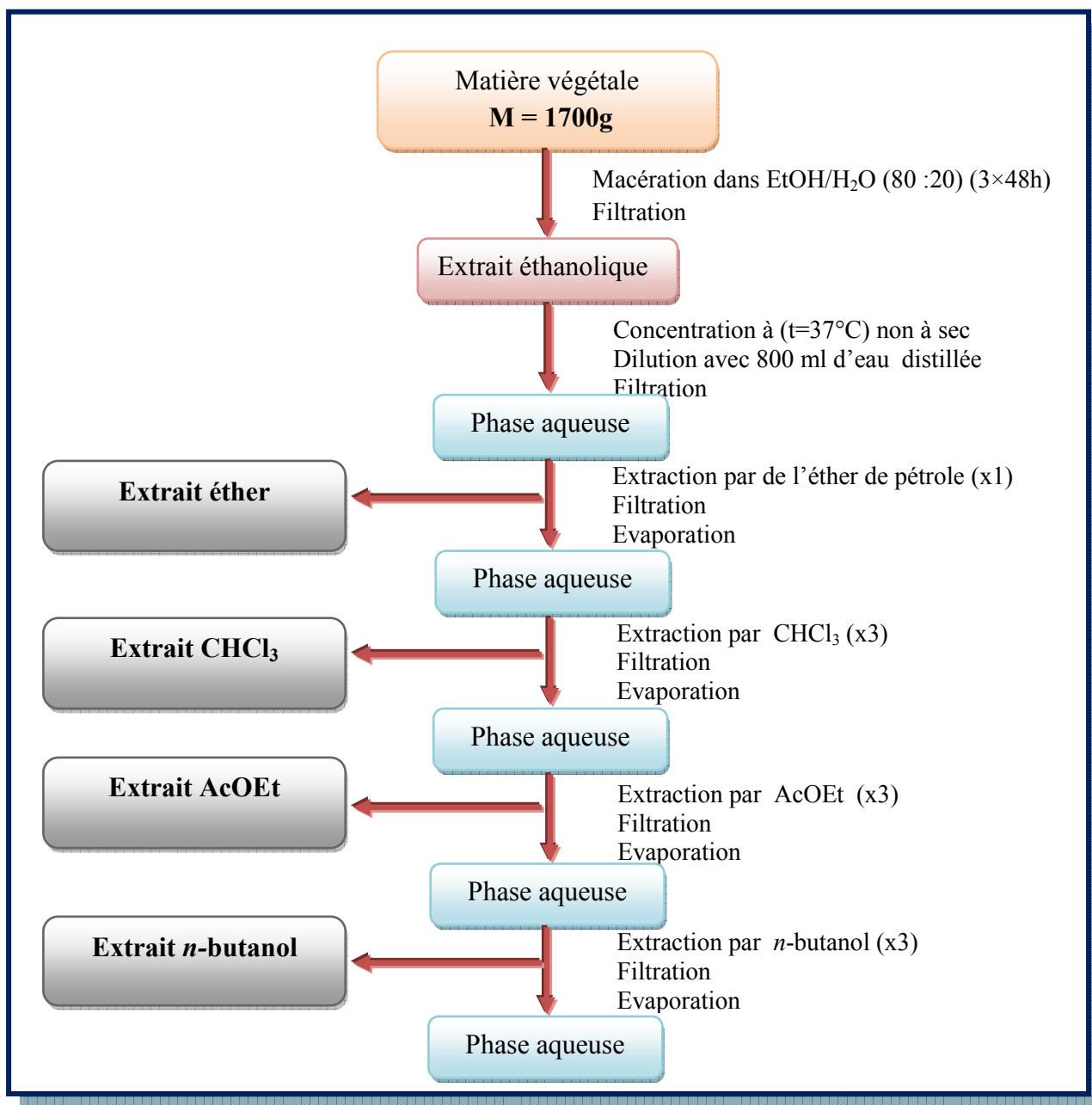
Les parties aériennes de la plante de masse 1700 g sont mises à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (EtOH / H<sub>2</sub>O, 80 : 20, V/V), en répétant cette opération 3 fois avec renouvellement du solvant (24 à 48 heures). L'extrait récupéré après filtration est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 40°C, puis dilué avec de l'eau distillée 800 ml.

Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (les chlorophylles, les cires, les résines etc...). La solution ainsi décantée subit une filtration pour obtenir une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi des extractions de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées (figure 14).



**Figure 14** : La masse des extraits obtenus de *G. numidica*

Le processus d'extraction est représenté dans la Figure 15.



**Figure 15:** Extraction de l'espèce *G. numidica*.

Chaque extrait a subi une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur les produits à isoler et choisir l'extrait à étudier.

Notre choix d'étudier les extraits  $\text{CHCl}_3$  et acétate d'éthyle a été justifiée par la comparaison des profils CCM en phase normale des trois extraits obtenus précédemment dans différents systèmes d'élution, qui confirme bien la richesse des extraits en métabolites secondaires.

## 1.7. Séparation de l'extrait chloroforme

### 1.7.1. Chromatographie sur colonne ouverte CC

Environ 2 g de l'extrait chloroformique a été déposé sur une colonne de gel de silice préparée dans l'hexane dont la masse de la phase stationnaire est de 30 fois le poids de l'extrait déposé. L'élution a été réalisée avec un gradient de polarité de systèmes *n*-hexane/ Acétate d'éthyle ensuite un gradient de polarité du système CHCl<sub>3</sub> /MeOH en commençant par l'hexane pur et en terminant par le MeOH pur, le choix du deuxième système était pour l'obtention des fractions polaires.

Des fractions de 100 ml sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince sur des plaques de gel de silice (60 F<sub>254</sub> sur feuilles d'aluminium), révélées à l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau suivant :

**Tableau 6:** fractionnement de l'extrait CHCl<sub>3</sub>.

Fraction	Erlen	Poids (mg)	System d'élution	
			<i>n</i> -hexane %	AcOEt %
1	1-4	5	100	0
2	5-7	29,1	95	5
3	8-11	56	90	10
4	12-16	52	85	15
5	17-21	40	82	18
6	22-26	57	80	20
7	27-30	39,1	78	22
8	31-35	35,6	75	25
9	36-40	51,3	73	27
10	41-45	65,5	70	30
11	46-48	41	67	33
12	49-51	20	65	35
13	52-55	14,8	63	37
14	56-59	94,2	60	40
15	60-63	77	50	50
16	64-67	96	40	60
17	68-71	57,2		



Tableau 6 : fractionnement de l'extrait  $\text{CHCl}_3$  (suite)

18	72-75	81	35	65
19	76-79	61		
20	80-83	91	30	70
21	84-87	149,8	0	100
			$\text{CHCl}_3$ %	MeOH %
22	88-91	176,1	90	10
23	92-95	160	85	15
24	96-99	60,4	80	20
25	100-103	99,3	60	40
26	104-107	50	40	60
27	108-110	49,5	0	100

- Profil chromatographique de l'extrait Chloroformique

La plaque a été éluée dans le système  $\text{CHCl}_3$  100 % et révélée avec  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  et chauffées pendant 3 mn à  $100^\circ\text{C}$ .

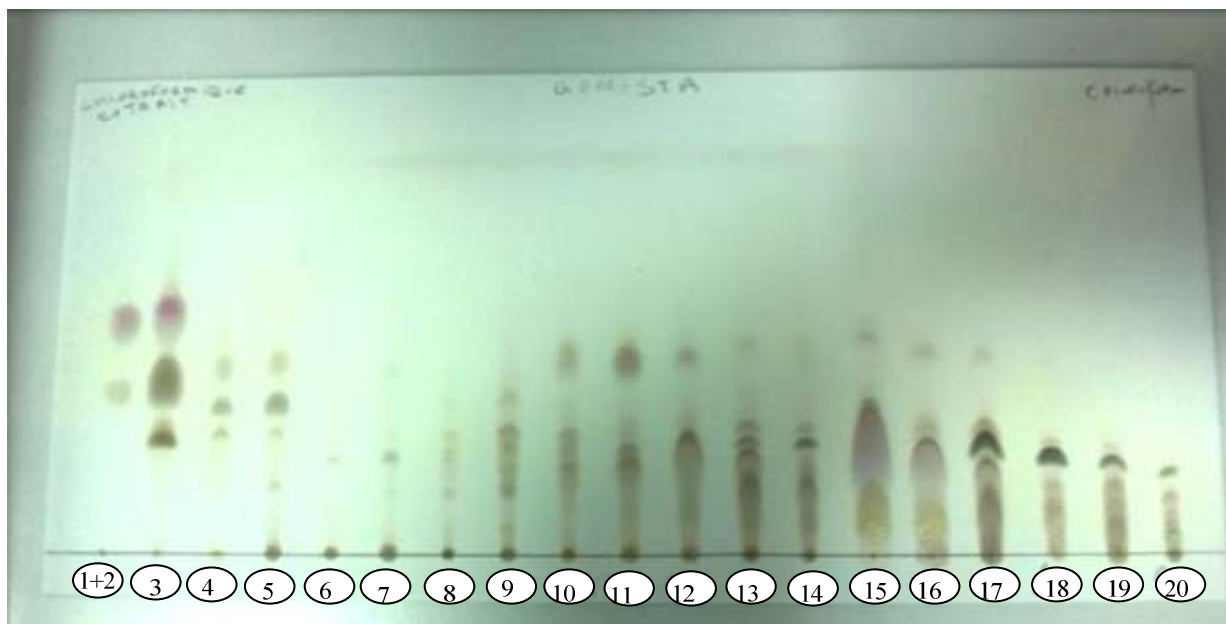
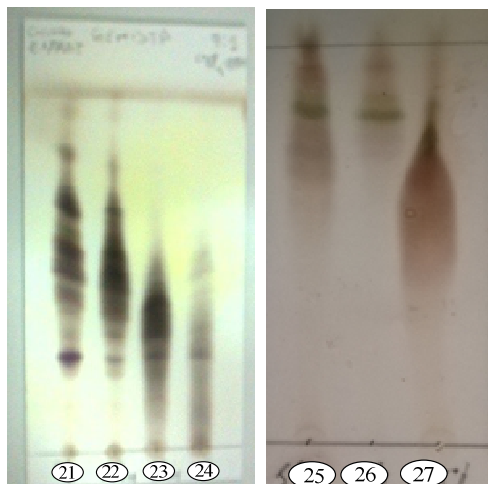


Figure 16: Profil CCM sur gel de silice normale des fractions de l'extrait Chloroformique.



**Figure 17:** plaques CCM des fractions (22-27) révélées.

Les fractions présentant la même composition selon leur profil chromatographique sur CCM sont réunies donnant ainsi 13 fractions que nous représentons dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait chloroforme.

N° des fractions	Nouvelles fractions	Observations
f1-f2	A	Faible quantité
f3	B	Mélange complexe
f4-f5	C	Mélange séparable
f6-f9	D	Mélange complexe
f10-f12	F	Mélange complexe
f13-f15	G	Mélange séparable
f16-f17	H	Mélange complexe
f18-f19	I	Mélange complexe
f20	J	Mélange séparable
f21	K	Mélange séparable
f22-f23	L	Mélange complexe
f24-f26	M	Mélange complexe
f27	N	Mélange complexe

### 1.7.2. Purification des fractions

Les fractions ont subi une séparation par HPLC préparative en phase inverse. Parmi les 13 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions C, G, J et K. Ce choix est basé sur leur richesse en produits ainsi que sur leur poids relativement important.

Les deux premières fractions ont une faible quantité et ne sont pas solubles dans le MeOH. C'est la raison pour laquelle, elles n'ont été pas traitées par HPLC, il en est de même pour les dernières fractions (mélange complexe).

#### ▪ Etude de la fraction C

Une partie de la fraction C (92 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative (C<sub>18</sub>) en utilisant comme éluant le mélange MeOH / H<sub>2</sub>O dans les proportions (45:55) avec 4 injections et 12 min comme temps total, permettant d'obtenir un composé à l'état pur : **P1** (3 mg,  $t_R = 5\text{min}$ ).

Les conditions de séparation chromatographique sont les suivantes :

- Colonne et injecteur : Shimadzu C<sub>18</sub>  $\mu$ -bondapak (30 cm×7,8 mm, 10  $\mu\text{m}$  d'eau, 2,0ml min<sup>-1</sup>) (phase inverse)
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- Pompe : Shimadzu LC-20AT.
- Débit : 2 ml / min.
- Le volume injecté : 100 $\mu\text{l}$ .
- La concentration de la fraction : 100 mg/ml (dans le MeOH).
- Nombre d'injection: 4
- Le temps total : 12 min.
- Phase mobile : MeOH / H<sub>2</sub>O (45:55, v/v)

Le chromatogramme est représenté dans la **figure 17**:

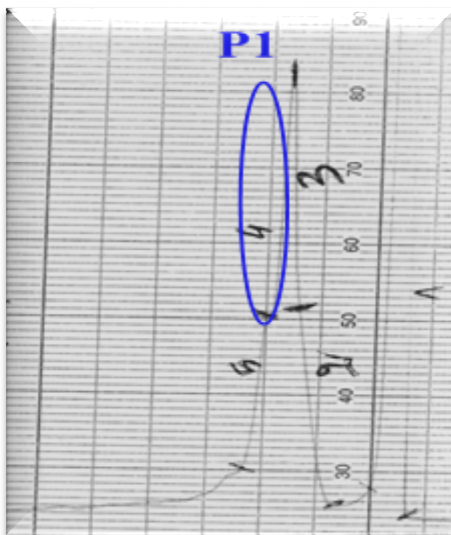


Figure 17: Chromatogramme de la fraction C.

▪ **Etude de la fraction G**

La fraction G (186 mg) a subi une séparation par RP-HPLC en phase inverse, sur une colonne C<sub>8</sub> (25 cm x 10 mm, 10 μm, Phenomenex) en utilisant comme éluant le mélange MeOH / H<sub>2</sub>O dans les proportions (3:7) avec 7 injections et 50 min comme temps total, pour donner un composé à l'état pur: **P2** (2 mg,  $t_R = 40$  min). Le chromatogramme est représenté dans la **figure 18**.

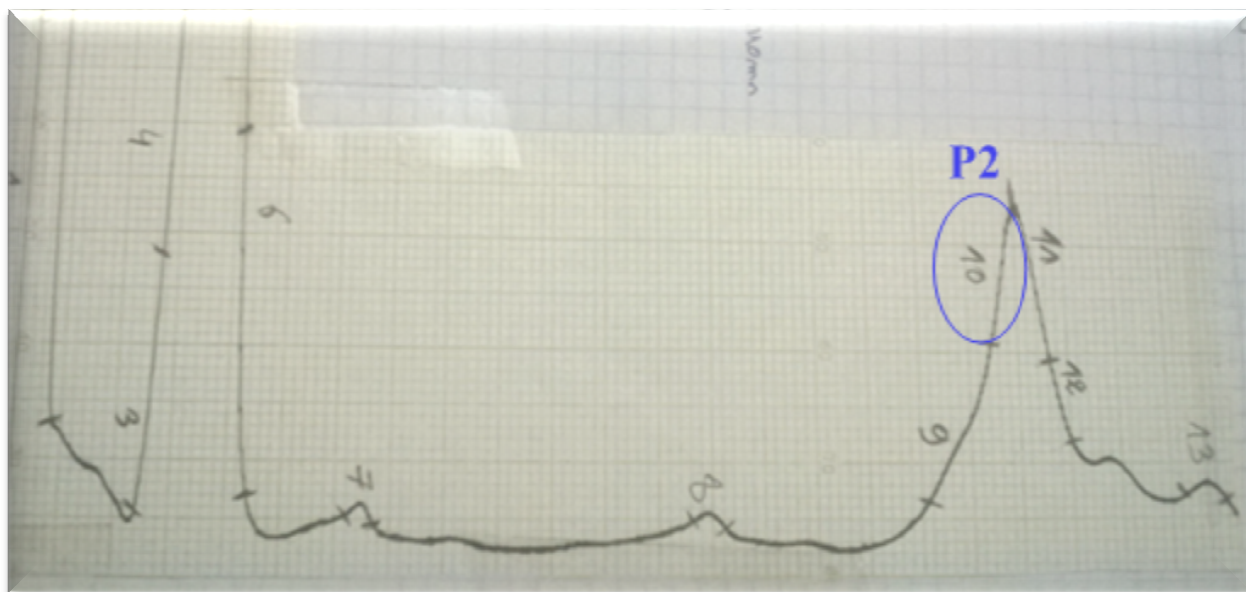
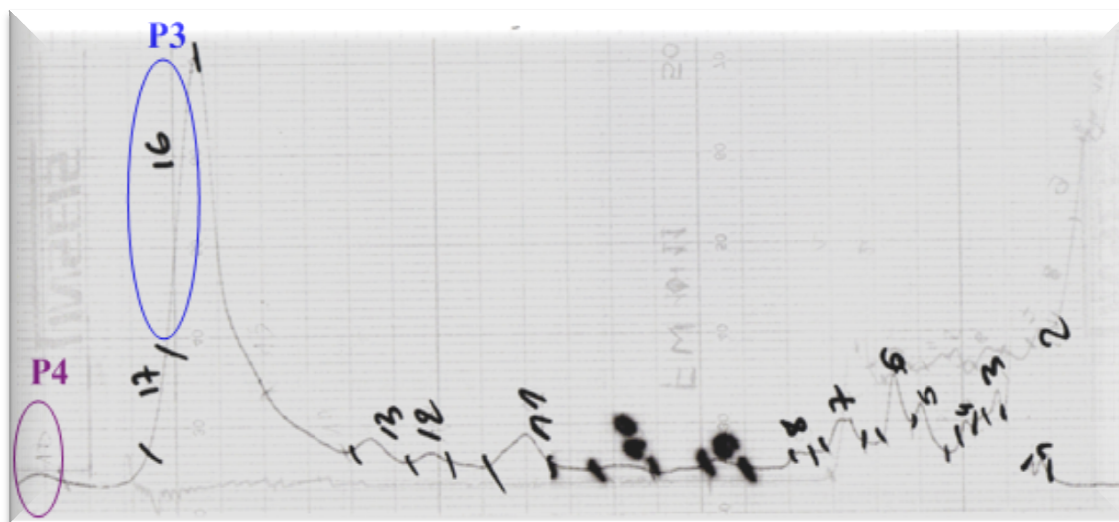


Figure 18: chromatogramme de la fraction G.

- **Etude de la fraction J**

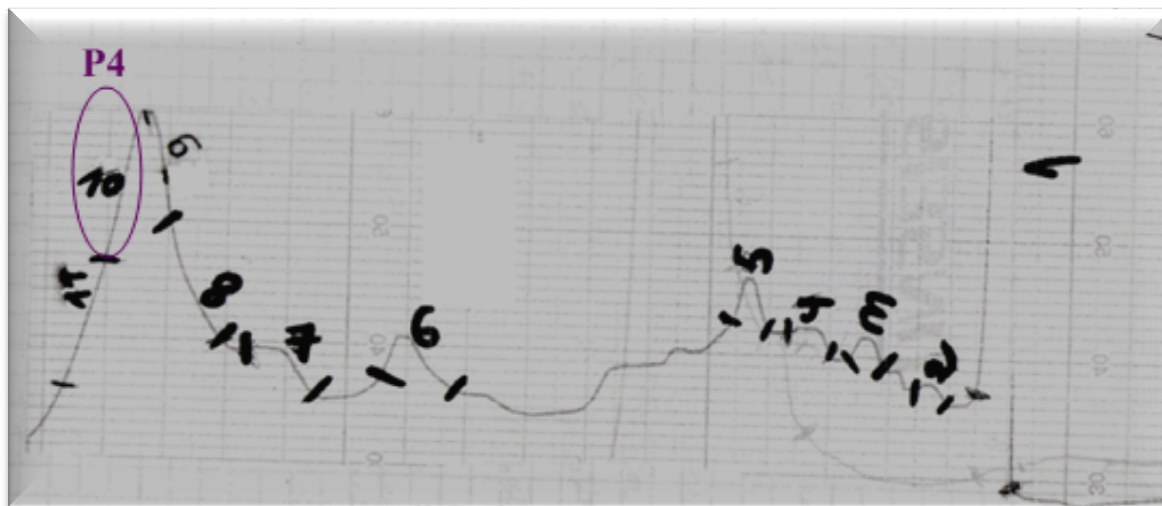
La fraction J (91 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative ( $C_8$ ) en utilisant comme éluant le mélange MeOH / H<sub>2</sub>O dans les proportions (2:3) avec 5 injections et 46 min comme un temps total, permettant d'obtenir deux produits à l'état pur : **P3** et **P4**.



**Figure 19:** chromatogramme de la fraction J.

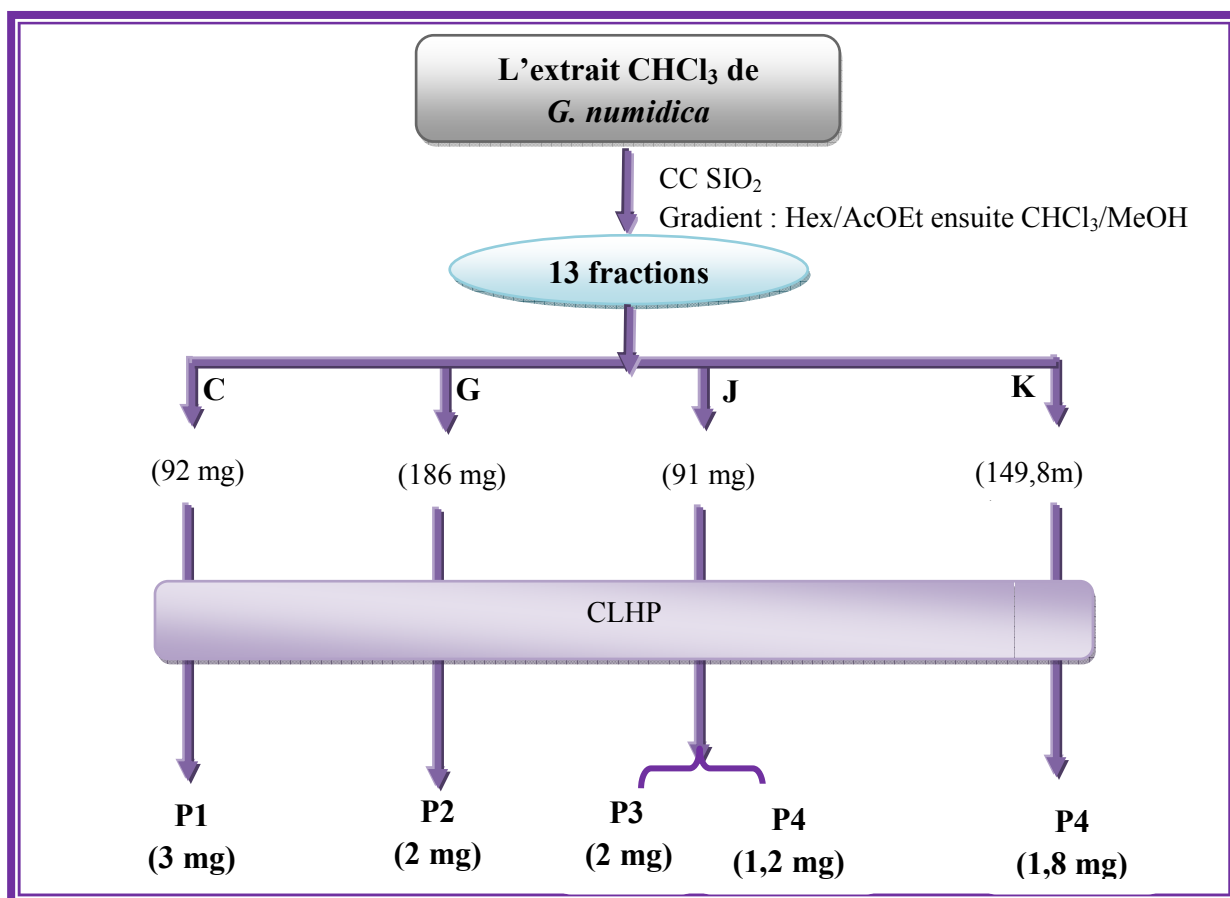
- **Etude de la fraction K**

La fraction K (149,8 mg) a subi une séparation par CLHP semi-préparative ( $C_{18}$ ) en utilisant comme éluant le mélange MeOH / H<sub>2</sub>O dans les proportions (2:3) avec 5 injections et 50 min comme un temps total pour donner un composé à l'état pur, ce dernier s'est révélé identique à **P4** après analyse.



**Figure 20:** chromatogramme de la fraction K.

Quatre fractions ont été purifiées. Ces dernières ont mené à l'obtention de 5 composés à l'état pur (figure 21). Les travaux de séparation de l'extrait chloroformique sont résumés dans la figure suivante :



**Figure 21 :** Isolement des composés de l'extrait  $\text{CHCl}_3$  de l'espèce *G. numidica*.

## 1.8. Séparation de la phase acétate d'éthyle

### 1.8.1. Chromatographie sur colonne ouverte CC

5,5 g de l'extrait acétate d'éthyle a été déposé sur une colonne de gel de silice préparée dans le dichloromethane, dont la masse de la phase stationnaire est de 30 fois le poids de l'extrait déposé.

L'élution a été effectuée par le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et un gradient de polarité avec l'acétone (0% -100%) suivi par un gradient de polarité de MeOH (entre 10% - 80%) avec un fractionnement tous les 100 ml. Les fractions sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (C.C.M). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365nm), puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 10 mn à 100°C.

Les pots présentant la même composition sont réunis donnant ainsi 35 fractions. Les résultats de l'opération sont regroupés dans le Tableau 8.

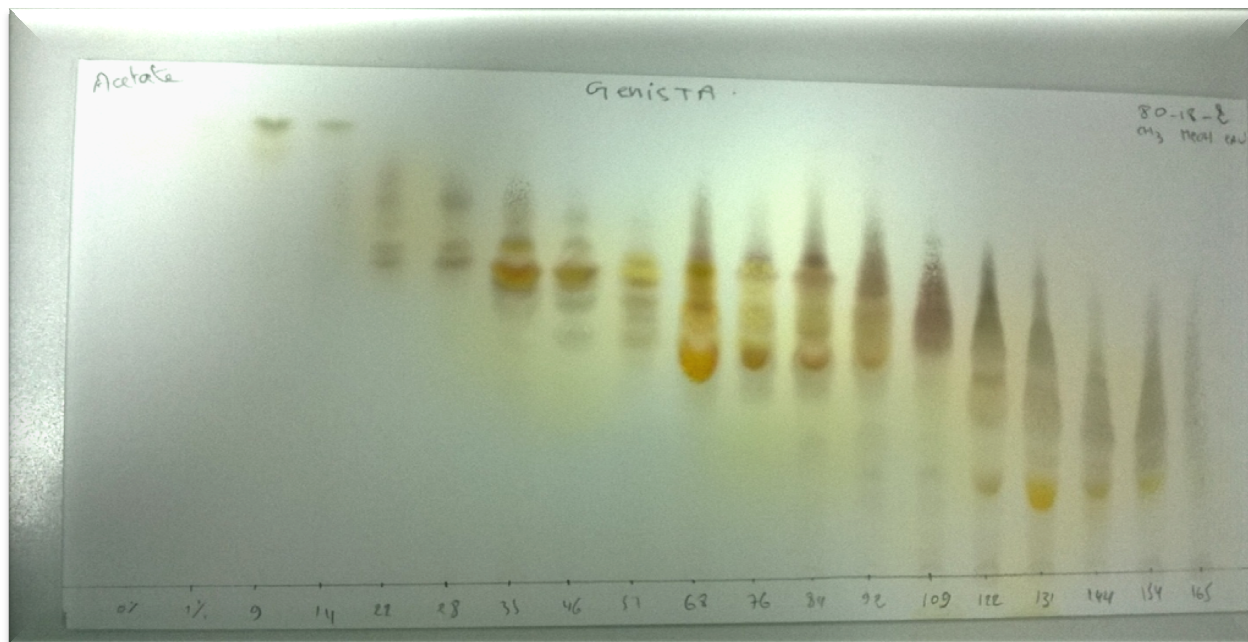
**Tableau 8:** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt.

Fraction	Erlen	Volume de pots (ml)	Poids (mg)	System d'éluion		
				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> %	acétone %	MeOH
1	1-5	100	6,9	100	0	-
2	6-8	100	10,5	99	1	-
3	9-13	100	6,6	98	2	-
4	14-21	100	19,7	97	3	-
5	22-27	100	8,6			
<b>6</b>	<b>28-34</b>	<b>100</b>	<b>20</b>			
<b>7</b>	<b>35-45</b>	<b>100</b>	<b>80,5</b>	<b>95</b>	<b>5</b>	-
<b>8</b>	<b>46-56</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>91</b>	<b>9</b>	-
9	57-67	100	116,1	88	12	-
<b>10</b>	<b>68-75</b>	<b>100</b>	<b>108</b>	<b>84</b>	<b>16</b>	-
11	76-83	100	157	80	20	-
<b>12</b>	<b>84-91</b>	<b>100</b>	<b>146,2</b>	<b>75</b>	<b>25</b>	-
13	92-107	100	285	70	30	-
14	108-121	100	518,3	50	50	-
15	122-130	100	457	40	60	-
<b>16</b>	<b>131-143</b>	<b>100</b>	<b>430</b>	<b>35</b>	<b>65</b>	-
17	144-153	100	296,3	<b>25</b>	<b>75</b>	-
<b>18</b>	<b>154-165</b>	<b>100</b>	<b>339,6</b>			
19	166-169	100	115,1			
20	170-174	100	130,3	15	85	-
21	175-179	100	213,1	0	100	-
22	180-191	100	182,5	90	-	10
23	192-199	100	219,2	84	-	16
24	200-204	100	267	82	-	18
25	205-210	100	282,1	80	-	20
26	211-214	100	184			
27	215-221	100	96,2			
28	22-229	100	112	75	-	25
29	230-240	100	106,3	70	-	30
30	241-249	100	59	60	-	40
31	250-259	100	26,2	50	-	50
32	260-264	100	15			
33	265-268	100	44,2	40	-	60
34	269-279	100	20	30	-	70
35	280-290	100	86	20	-	80



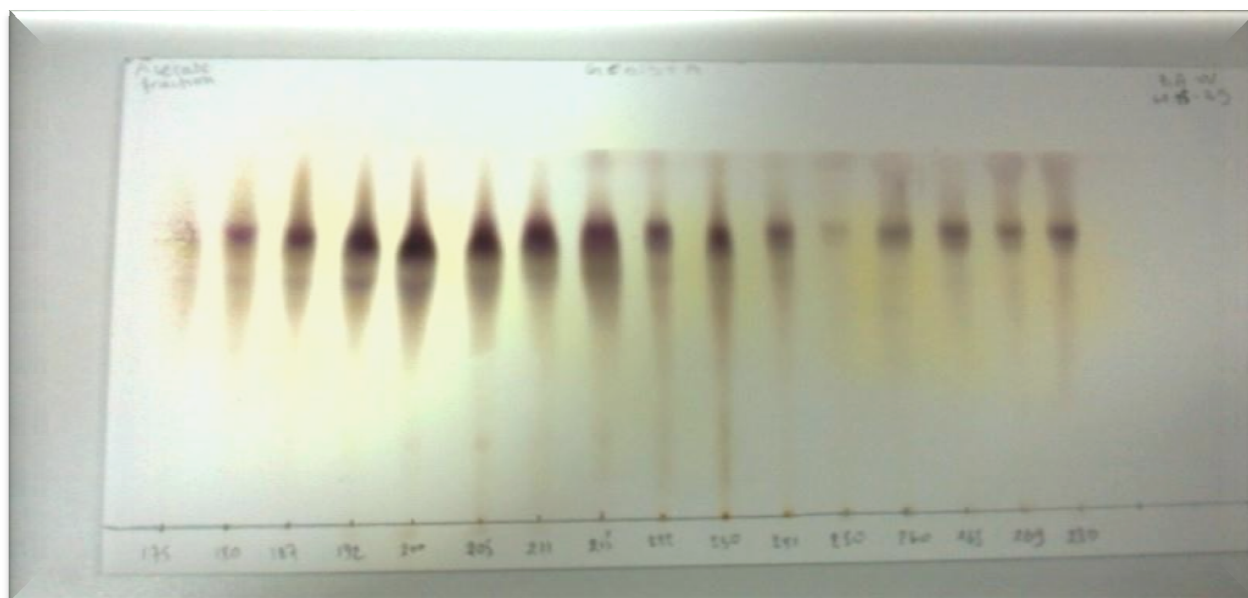
- Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle :

La plaque a été éluée dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (80/18/2) et révélée avec le  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  et chauffées pendant 3mn à  $100^\circ\text{C}$ .



**Figure 22 :** Profils chromatographiques des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (1-19).

La plaque a été éluée dans le système BAW (60:15:25 v/v/v) et révélée par  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ .

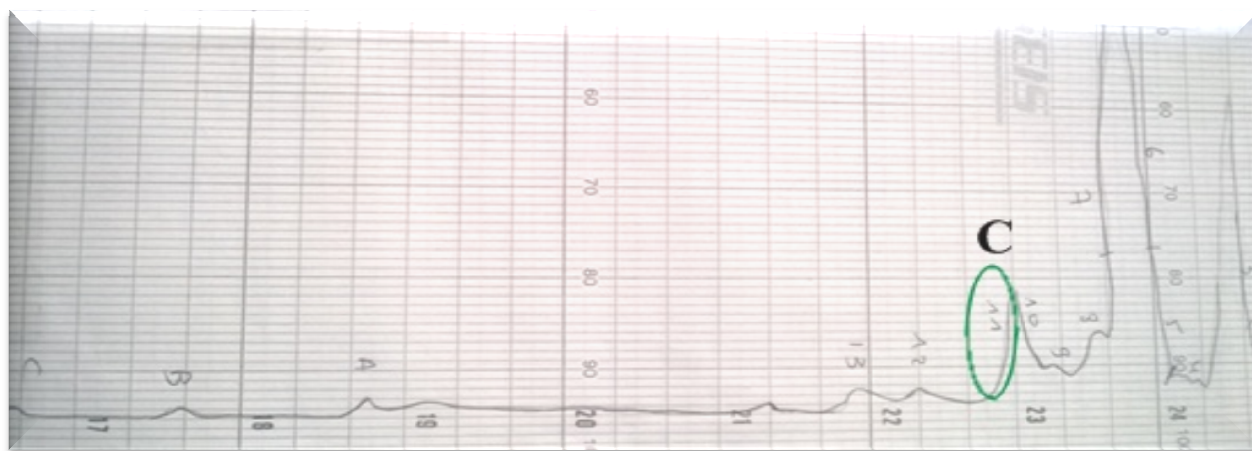


**Figure 23 :** Profils chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (20-35)

### 1.8.2. Purification des fractions

- **Etude de la fraction F<sub>6</sub>+F<sub>7</sub>**

Cette fraction de masse (100,5 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative (C<sub>8</sub>) en utilisant comme éluant le système MeOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions (3:7) avec 4 injections et 48 min comme temps total, permettant d'obtenir un composé à l'état pur non identifié (produit C). La Figure 24 montre les résultats de cette séparation.



**Figure 24:** Chromatogramme de la fraction F<sub>6</sub>+F<sub>7</sub>.

- **Etude de la fraction F<sub>8</sub>**

La fraction F<sub>8</sub> (60 mg) contient un précipité jaune, on a pu l'obtenir à l'état pur après plusieurs lavages au MeOH, c'est le composé **P5** (8 mg).

- **Etude de la fraction F<sub>10</sub>**

La fraction F<sub>10</sub> (108 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative (C<sub>8</sub>) en utilisant comme éluant le système MeOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions (3:7) avec 4 injections et 12 min comme temps total, permettant d'obtenir deux composés à l'état pur : **P6** et **P7**. La Figure 25 montre les résultats de cette séparation.

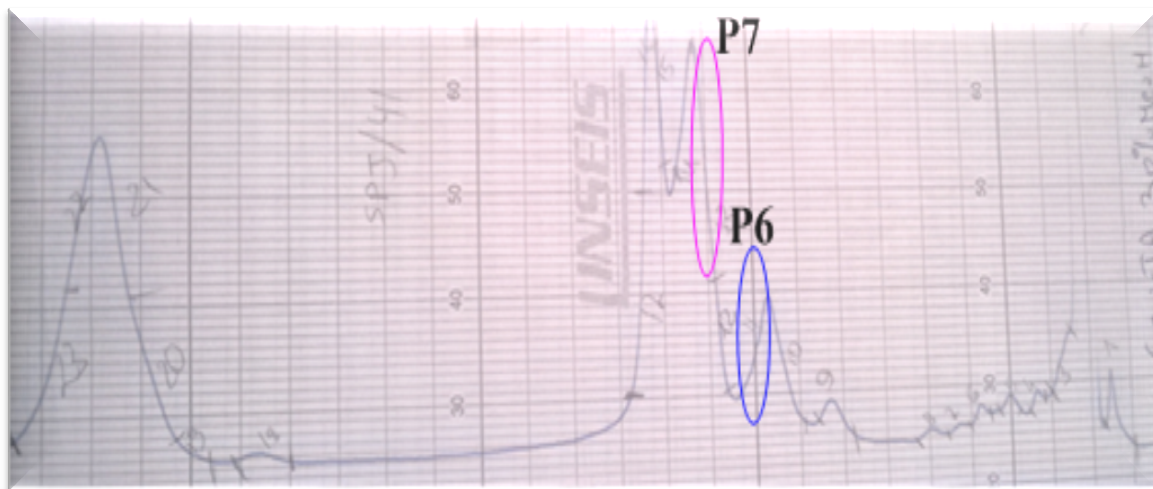


Figure 25 : chromatogramme de la fraction F<sub>10</sub>.

▪ **Etude de la fraction F<sub>12</sub>**

La fraction F<sub>12</sub> (146 mg) contenant un produit majoritaire sous forme de précipité jaune, a été purifiée par lavage dans le MeOH, pour obtenir le composé **P8** à l'état pur.

▪ **Etude de la fraction F<sub>16</sub>**

La fraction F<sub>16</sub> (430 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative (C<sub>18</sub>) en utilisant comme éluant le système MeOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions (2:3) avec 5 injections et 50 min comme temps total, permettant d'obtenir un composé à l'état pur : **P9**. Les autres produits issus de cette séparation, sont sous forme de mélange.

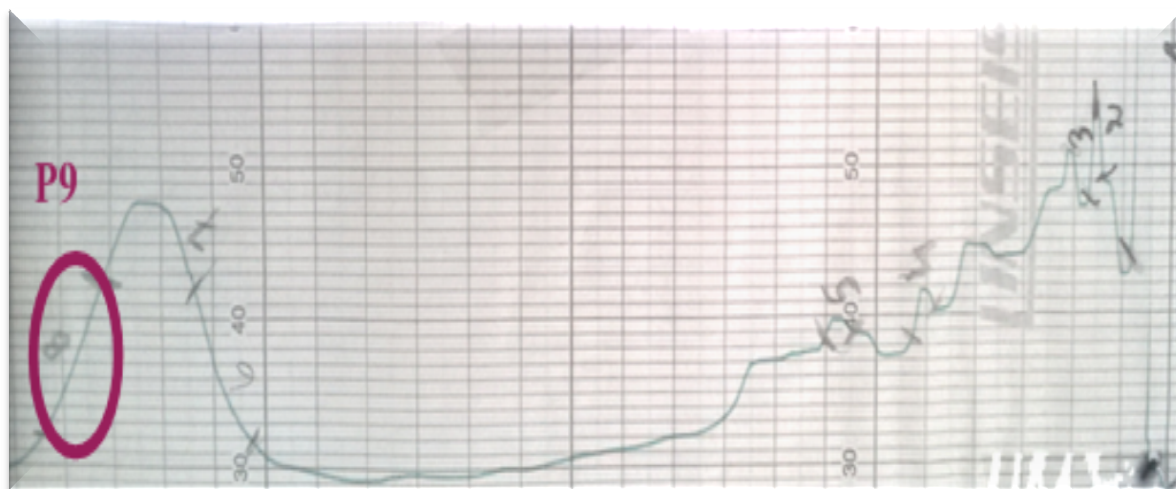
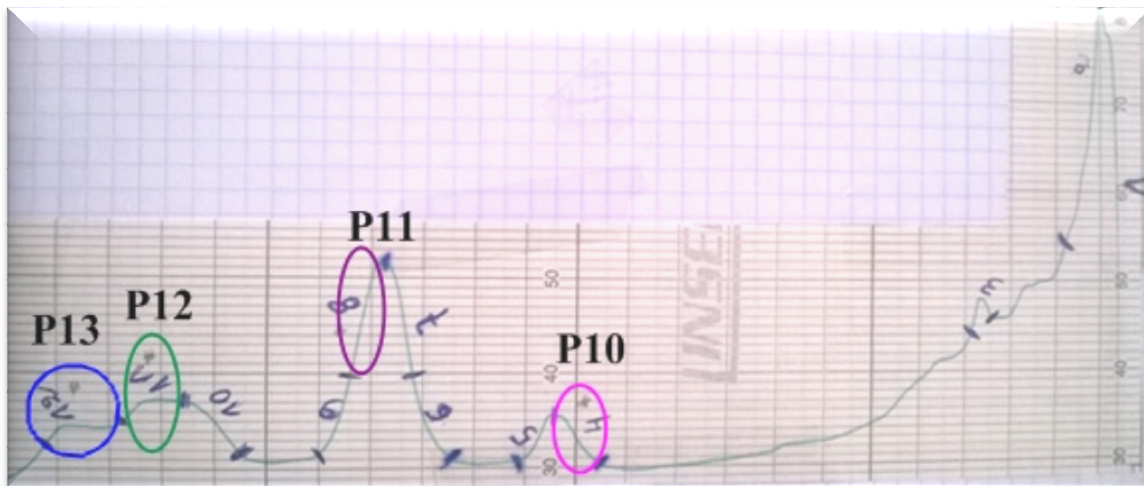


Figure 26: Chromatogramme de la fraction F<sub>16</sub>

- **Etude de la fraction F<sub>18</sub>**

La fraction F<sub>18</sub> (339 mg) a subi une séparation par CLHP semi-préparative (C<sub>18</sub>) en utilisant comme éluant le système MeOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions (57:43) avec 7 injections et 50 min comme temps total pour donner quatre composés à l'état pur: **P10**, **P11**, **P12**, **P13**.



**Figure 27:** Chromatogramme de la fraction F<sub>18</sub>

Cix fractions ont été purifiées. Ces dernières ont mené à l'obtention de 10 composés à l'état pur (figure 28).

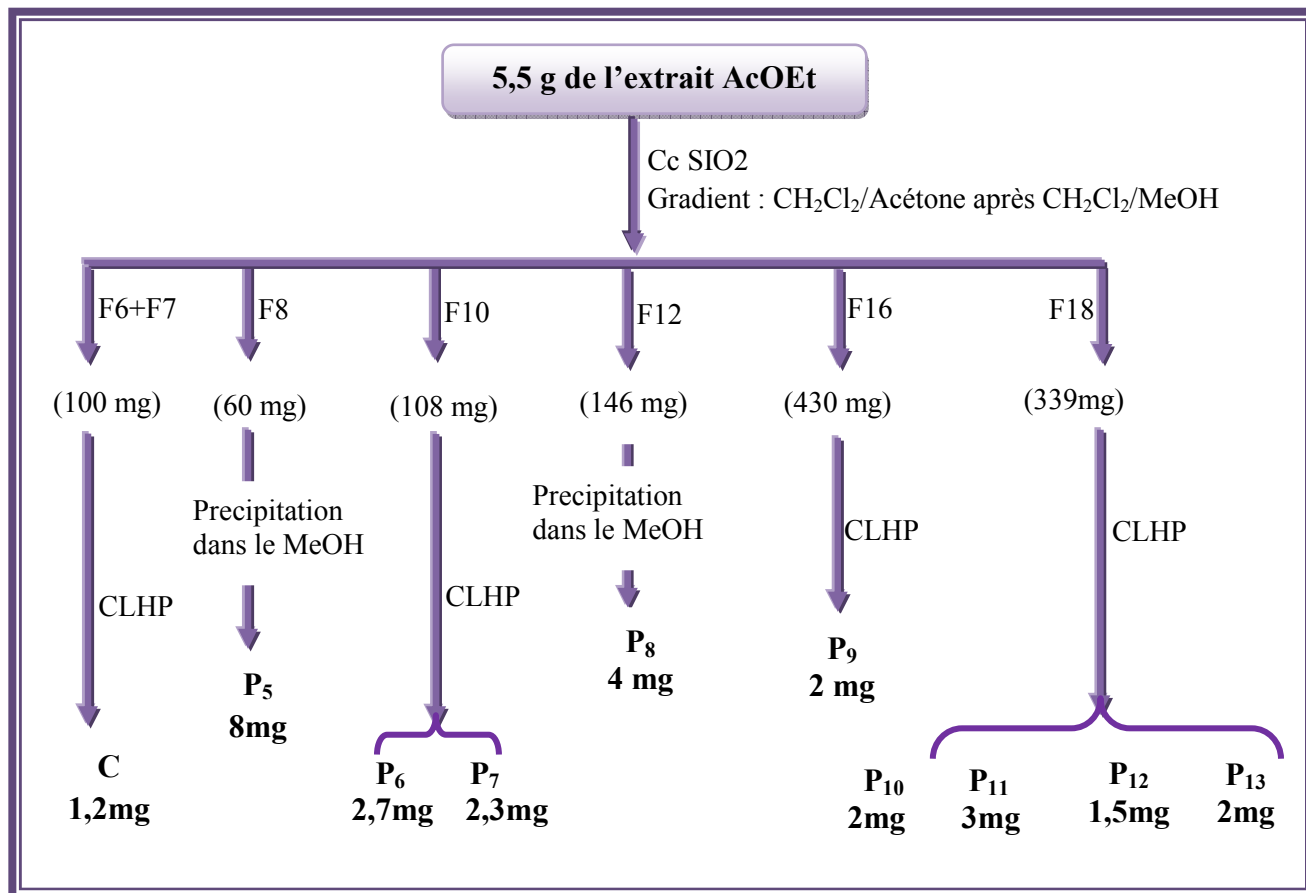


Figure 28 : Isolement des composés de l'extrait AcOEt de l'espèce *G. numidica*

## 2. Analyse

### 2.1. Révélateur

La révélation a été réalisée avec l'anisaldéhyde et  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### 2.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

Les tests analytiques des extraits, des fractions et des produits isolés, ont été effectués sur plaques CCM avec la silice comme phase stationnaire, le type de plaques est 60 GF254 Merck, sur support d'aluminium ou en verre.

### 2.3. Séparation par Chromatographie liquide à haute performance

La purification des fractions obtenues a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative en phase inverse en utilisant le mélange MeOH/ H<sub>2</sub>O comme phase mobile à différentes proportions et plusieurs injections avec les caractéristiques suivantes

- Injecteur : Shimadzu.
- Colonne : C<sub>18</sub>  $\mu$ -bondapak (30 cm×7,8 mm, 10  $\mu$ m eau, 2,0ml min<sup>-1</sup>) (phase inverse)
- Colonne: C<sub>8</sub> luna PREP (25cm×10mm, Phenomenex).
- Détecteur : Shimadzu RID-10A.
- phase mobile : MeOH/ Eau
- Pompe : Shimadzu LC-20AT.
- Débit : 2 ml/min.

### 2.4. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre Rudolph Research Analytical Autopol IV, à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm) et une cellule de 1 dm de long. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$ , exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 100 \cdot \alpha / l \cdot c$$

$\alpha$  : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre.

l : longueur de la cuve de mesure.

### 2.5. Spectrophotométrie UV-Visible

Les spectres UV-Visible des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 2.6. Spectroscopie RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) ont été enregistrés à 600 MHz et 150 MHz respectivement sur un appareil BRUKER DRX-600 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) équipé d'une cryosonde de type Bruker 5 mm TCI à 300 K.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés DMSO- $d_6$  et CD<sub>3</sub>OD (99,95%, Sigma-Aldrich).

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

### 2.7. Hydrolyse acide

Une solution du composé 10 (2,0mg) dans HCl 1N (1 ml) a été agitée à 80° C dans un flacon de réaction bouchée pendant 4 h. Après refroidissement, la solution a été évaporée sous un flux de N<sub>2</sub>. Le résidu a été dissous dans le 1- (triméthylsilyl)-imidazole et la pyridine (0,2 ml), ensuite la solution a été agitée à 60°C pendant 5 min. Après séchage de la solution, le résidu était partitionné entre H<sub>2</sub>O et CHCl<sub>3</sub>.

La couche de CHCl<sub>3</sub> a été analysée par GC en utilisant une colonne L-CP-Chirasil-Val (0.32 mm x 25 m). La température de l'injecteur et du détecteur était de 200 ° C

Un système de gradient de température a été utilisé pour le four, à partir de 100° C pendant 1 min et en augmentant la température jusqu' à 180°C à une vitesse de 5° C / min. Le pic de l'hydrolysate a été détecté par comparaison avec les temps de rétention d'échantillons authentiques de *D*-glucose (Sigma Aldrich) après traitement avec le 1- (triméthylsilyl) imidazole dans la pyridine.

### 3. Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions des extraits CHCl<sub>3</sub> et AcOEt des parties aériennes de *G. numidica* a mené à la séparation et la purification de 14 produits et la détermination de structure de 13 d'entre eux, alors que le produit restant (composé C) est en cours d'identification (probablement un alcaloïde). Les travaux relatifs à l'analyse structurale de ces composés sont reportés et détaillés dans le chapitre suivant.

## **Chapitre 2**

### ***Identification des produits isolés de Genista numidica***



## 1. Identification des produits isolés de l'extrait $\text{CHCl}_3$ de *Genista numidica*

Les produits isolés de l'extrait  $\text{CHCl}_3$  des parties aériennes de la plante *G. numidica* ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN 1D, 1-D TOCSY et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), et par comparaison avec les données de la littérature. Cette étude a abouti à l'identification de 4 composés.

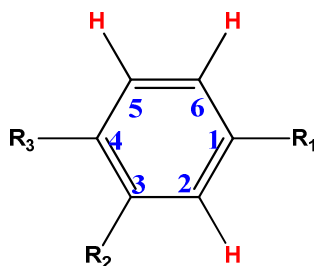
### 1.1. Elucidation structurale du composé P1

Le composé **P1** est isolé sous forme d'une huile marron. Il a été identifié comme l'**aldéhyde ferulique** en comparant les données spectrales avec celle de la littérature (Xian *et al*, 2015).

L'observation du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 1) indique la présence d'un noyau aromatique. En effet, il présente :

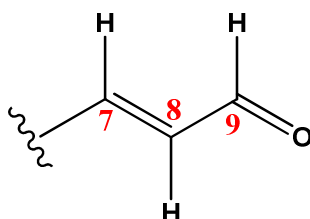
- ✓ un signal à  $\delta_{\text{H}} = 7,74$  ppm correspondant à deux protons superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet correspond à un proton aromatique couplant en méta ( $J=2$  Hz), et le deuxième sous forme d'un doublet avec un couplage vicinal éthylénique trans ( $J=14$  Hz).
- ✓ un doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}} = 7,42$  ppm correspondant a un proton aromatique couplant en ortho et en méta ( $J= 8,1- 2$  Hz).
- ✓ Un signal à  $\delta_{\text{H}} = 6,92$  ppm correspondant à deux protons superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet couplant en ortho ( $J= 8,1\text{Hz}$ ), et l'autre sous forme d'un doublet de doublets avec un couplage vicinal éthylénique trans ( $J = 14 - 7,9$  Hz). Ce dernier corrèle avec un proton aldéhydique à 9,6 ppm.

Ces données sont compatibles avec la présence d'un noyau aromatique trisubstitué représenté comme suit :



### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

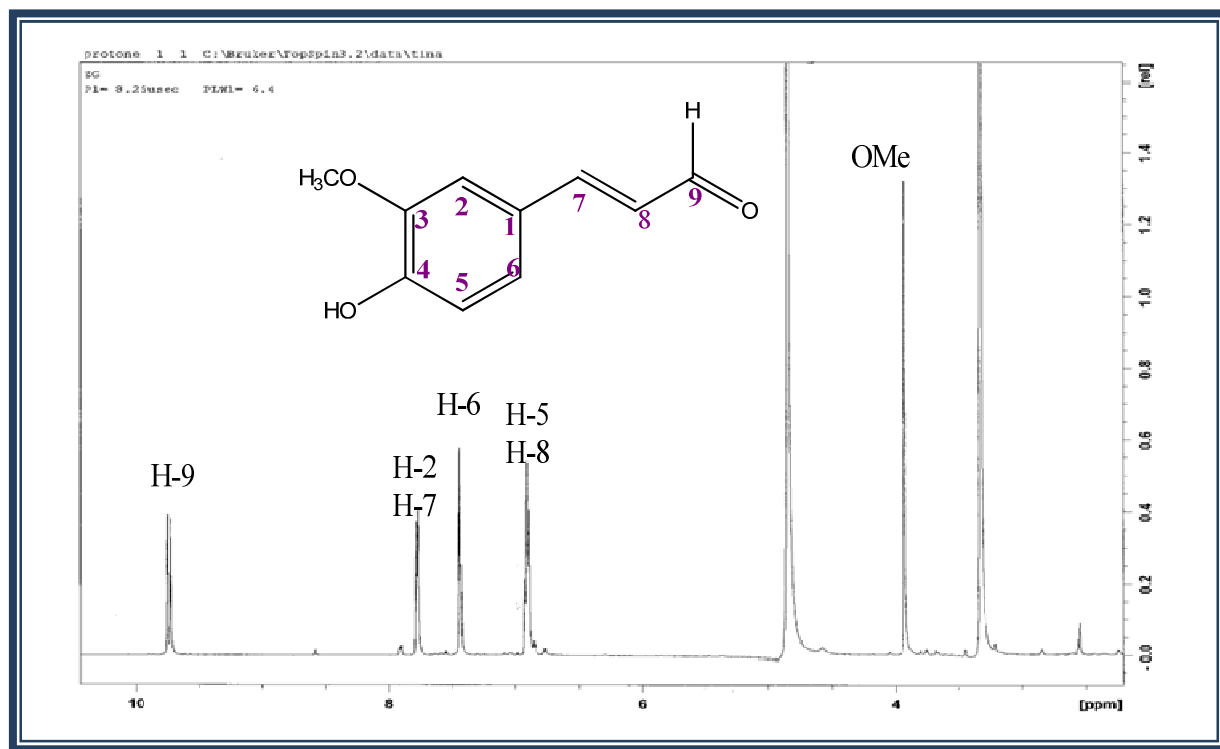
Les données spectrales sont compatibles également avec un groupement cinnamique avec la présence de deux groupements CH éthyléniques trans conjugués avec un groupement aldéhydique, ce qui donne l'enchaînement suivant :



Le spectre RMN  $^1\text{H}$  présente également :

- ✓ un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}} = 3,94$  ppm correspondant à un groupement méthoxyle.

L'ensemble de ces données indique que le noyau aromatique est substitué par un méthoxyle et un hydroxyle. Les données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  relatives à cette molécule sont rassemblées dans (Tableau 9).



**Spectre1:** Spectre de RMN $^1\text{H}$ , ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P1**.

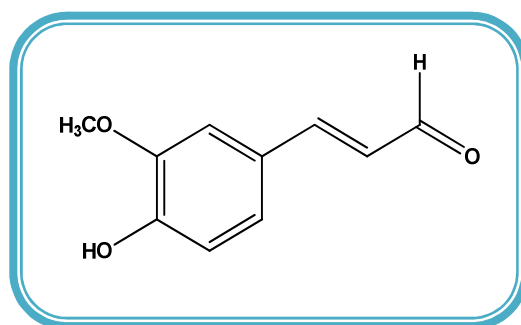
*Identification des produits isolés de Genista numidica*

**Tableau 9** : Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé **P1**.

Attribution	$\delta_H$ (ppm), <i>J</i> (Hz)	Littérature (Xian <i>et al</i> , 2015)
H-7	7,74 (d ; 14)	7,41 (d ; 15,6)
H-2	7,74 (d ; 2,0)	7,07 (d ; 1,2)
H-6	7,42 (dd; 8,1 - 2,0)	7,12 (dd; 8,4 - 1,2)
H-8	6,92 (dd; 14 - 7,9)	6,60 (dd ; 16,2 - 7,8)
H-5	6,92 (d; 8,1)	6,96 (d ; 8,4)
H-9	9,69 (d; 7,9)	9,63 (d ; 7,8)
O-CH <sub>3</sub>	3,94 s	3,94 s

L'ensemble de ces données (Tableau 9) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature (Xian *et al*, 2015) conduisent à l'identification du composé **P1** comme étant : **4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde**, connu sous le nom : **L'aldéhyde férulique**. Ce produit a été isolé antérieurement de plusieurs espèces telles que : *Gleditsia sinensis* (Fabaceae) (Xian *et al*, 2015) et *Canarium schweinfurthii* (Burseraceae) (Tamboue *et al*, 2000.)

L'aldéhyde férulique pourrait être utilisé comme agent protecteur contre les UV en cosmétologie (Zhang *et al.*, 2010). Il possède des activités antiradicalaire (Dizhbite *et al.*, 2004), antioxydante (Karamać *et al*, 2017) et anti-mutagène (Miyazawa *et al.*, 2003).



Composé **P1** : l'aldéhyde férulique.

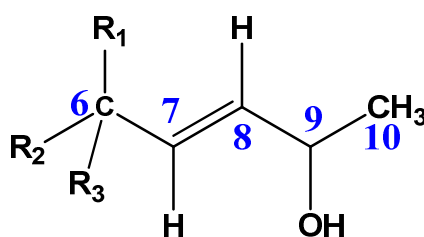
## 1.2. Elucidation structurale du composé P2

Le composé **P2** se présente sous forme d'un précipité, il a été identifié comme le **Vomifoliol**. Ses données spectrales sont conformes avec celle de la littérature (Oksuz *et al*, 2002).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 2) montre quatre signaux de méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,01 ; 1,07 ; 1,27 et 1,93 ppm.

Le signal à  $\delta_{\text{H}} = 1,27$  ppm apparaissant sous forme d'un doublet ( $J = 6$  Hz) correspond à un méthyle que nous noterons H-10 voisin d'un CH justifié par la présence d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}} = 4,34$  ppm correspondant à H-9, en effet ce déplacement est caractéristique d'un carbone oxygéné.

Le spectre montre également un signal à  $\delta_{\text{H}} = 5,81$  ppm correspondant à deux protons éthyléniques superposés l'un d'eux sous forme d'un doublet dédoublé correspondant à H-8 ( $J = 14 - 5,9$  Hz) et l'autre sous forme d'un doublet attribuable à H-7 ( $J = 14$  Hz). L'examen des valeurs des déplacements chimiques et leurs comparaisons avec les résultats de la littérature (Oksuz *et al*, 2002) indiquent la présence d'une double liaison délimitée par deux CH dont l'un est substitué par carbone quaternaire (C-6). Ces données supposent l'enchaînement suivant :

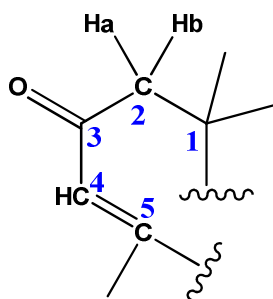


Le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre également :

- ✓ deux doublets à  $\delta_{\text{H}} = 2,20$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 2,51$  ppm avec une constante de couplage ( $J = 17$  Hz) correspondant à deux protons d'un groupement  $\text{CH}_2$  non équivalents formant un système AB.
- ✓ un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 5,90$  ppm attribuable à H-4 indique la présence d'une double liaison substituée par deux carbones quaternaires (Calis *et al*, 2002).

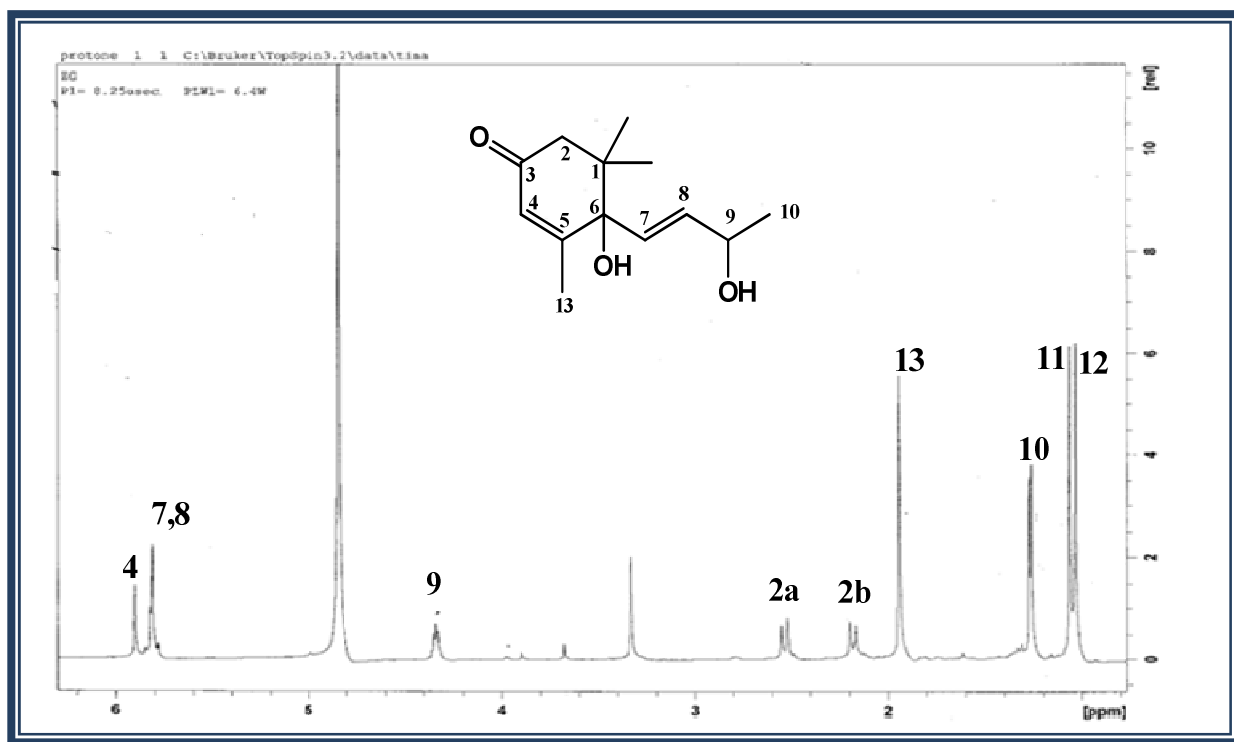
### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Ces observations ajoutées à la valeur du déplacement chimique du groupement CH<sub>2</sub> suggère le voisinage de ce dernier (CH<sub>2</sub>) à un carbonyle conjugué. L'analyse de ces données conduit à l'enchaînement suivant :



En effet l'examen du modèle moléculaire permet d'attribuer le signal à  $\delta_H = 2,20$  ppm au H-2 pseudo équatoriale à cause de sa position par rapport à la zone positivante du cône d'anisotropie de la double liaison du carbonyle ce qui abaisse relativement son déplacement chimique. Par contre le signal à  $\delta_H = 2,51$  ppm sera attribué à H-2 pseudo axiale (Calis *et al*, 2002).

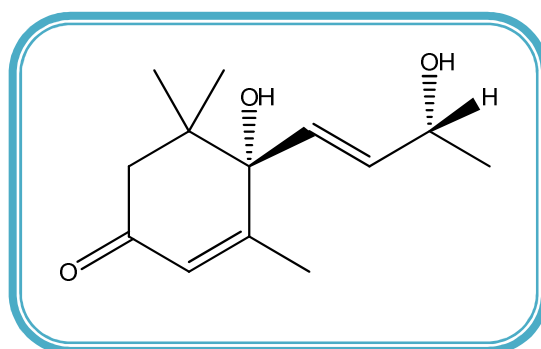
La combinaison des deux entités permet l'établissement d'un cycle à 6 chaînons dont la fermeture du cycle sera au niveau du carbone quaternaire (C-6) du 1<sup>er</sup> enchaînement.



**Spectre 2:** Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé P2.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé : **6-hydroxy-3-oxo- $\alpha$ -ionol** appelé également **Vomifoliol**. Les déplacements chimiques des protons (Tableau 10), ont été déterminés par comparaison avec celle de la littérature (Oksuz *et al*, 2002). Ce produit a été isolé des espèces : *Capparis spinosa* (Calis *et al*, 2002), *Euphorbia heteradena* (Oksuz *et al*, 2002), *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) (Takasugi *et al*, 1973). Le **vomifoliol** dérivé des megastigmanes identifié pour la première fois dans le genre *Genista*, possède des propriétés antiprolifératives, anticancéreuses et cytotoxiques (Maria *et al*, 2013).

Composé **P2** : Vomifoliol**Tableau 10** : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  du composé **P2**.

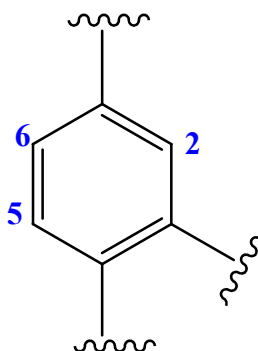
Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) $J$ (Hz)	Littérature (Oksuz <i>et al</i> , 2002)
H-2 (pseudo axiale)	2,51(d; 17)	2,47 ( d;17 )
H-2 (pseudo équatoriale)	2,20 (d;17)	2,24 (d; 17)
4	5,90 s	5,90 s
7	5,81(d ;14)	5,85 (d; 14)
8	5,81(dd ; 14 – 5,9)	5,81 (dd; 14- 5)
9	4,34 m	4,38 (dq; 5- 6)
10	1,27 (d ; 6)	1,31 (d ; 6)
11	1,07 s	1,08 s
12	1,01 s	1,00 s
13	1,93 s	1.90 (d; 1,5)

### 1.3. Elucidation structurale du composé P3

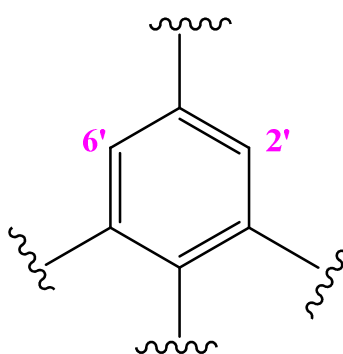
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 3) du produit **P3** se compose d'une région aromatique et une région aliphatique.

Dans l'intervalle 6,6 – 7 ppm on observe la présence de deux cycles aromatiques :

- Au niveau du premier cycle, on observe un doublet de doublets à  $\delta_{\text{H}} = 6,85$  ppm (dd ;  $J = 8,2 - 2$  Hz) révélant la présence d'un proton couplant en ortho avec un proton à  $\delta_{\text{H}} = 6,79$  ppm (d ;  $J = 8,2$  Hz) et un couplage méta avec un proton à  $\delta_{\text{H}} = 6,97$  ppm (d ;  $J = 2$  Hz) formant un système AMX.



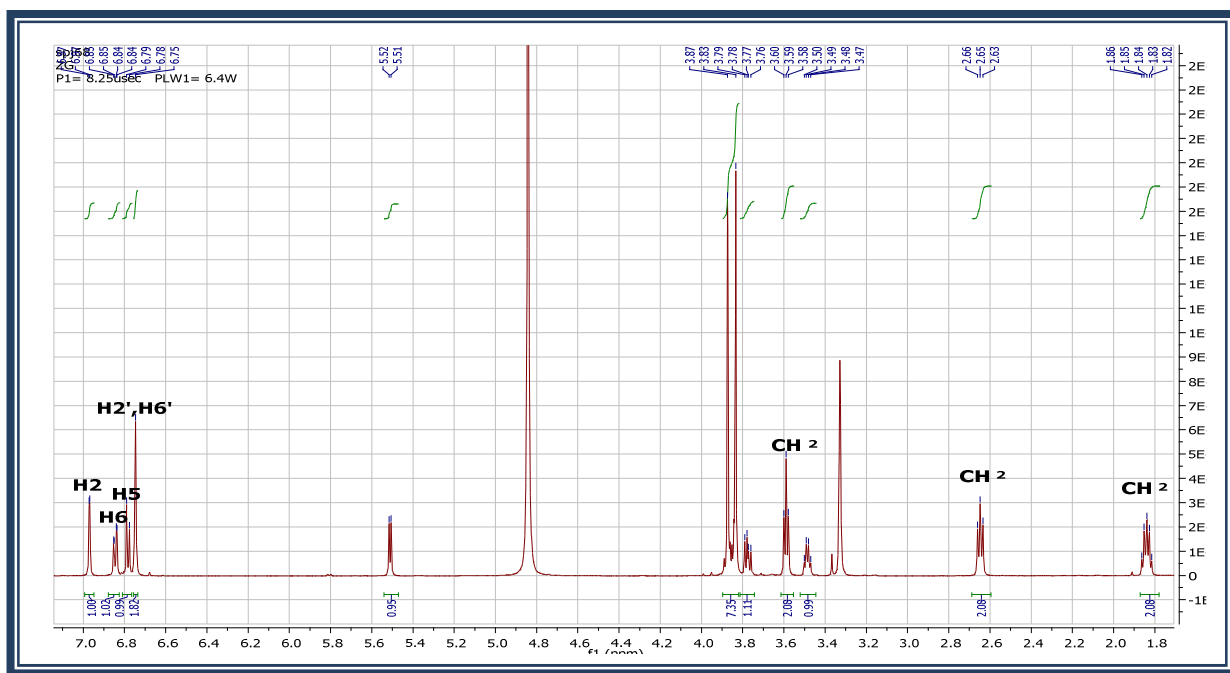
- Au niveau du deuxième cycle, un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 6,75$  ppm d'intégration 2H, (d ;  $J = 1,8$  Hz), correspondant à deux protons en position méta que nous noterons H-2', H-6' d'un noyau aromatique tétra-substitué.



Dans la région aliphatique et en particulier, dans l'intervalle 1,5–5,6 ppm on observe :

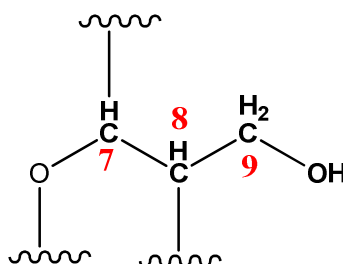
### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

- ✓ Deux singulets d'intégration 3H pour chacun, correspondant à deux groupements méthoxyles à  $\delta_H = 3,83$  et  $3,87$  ppm.
- ✓ Trois groupement  $CH_2$  à ( $\delta_H = 1,84 ; 2,65 ; 3,59$  ppm) et un  $CH_2$  oxygéné constitué par deux protons magnétiquement non équivalents à ( $\delta_H = 3,77$  et  $3,85$  ppm).
- ✓ Un proton à  $\delta_H = 5,52$  ppm apparaissant sous forme d'un doublet ( $J = 6,3$  Hz) correspondant à un groupement CH oxygéné.
- ✓ Un groupement CH hybridé  $Sp^3$  sous forme de quadruplet, à  $\delta_H = 3,49$  ppm.



**Spectre 3** : spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 600 MHz) du composé **P3**.

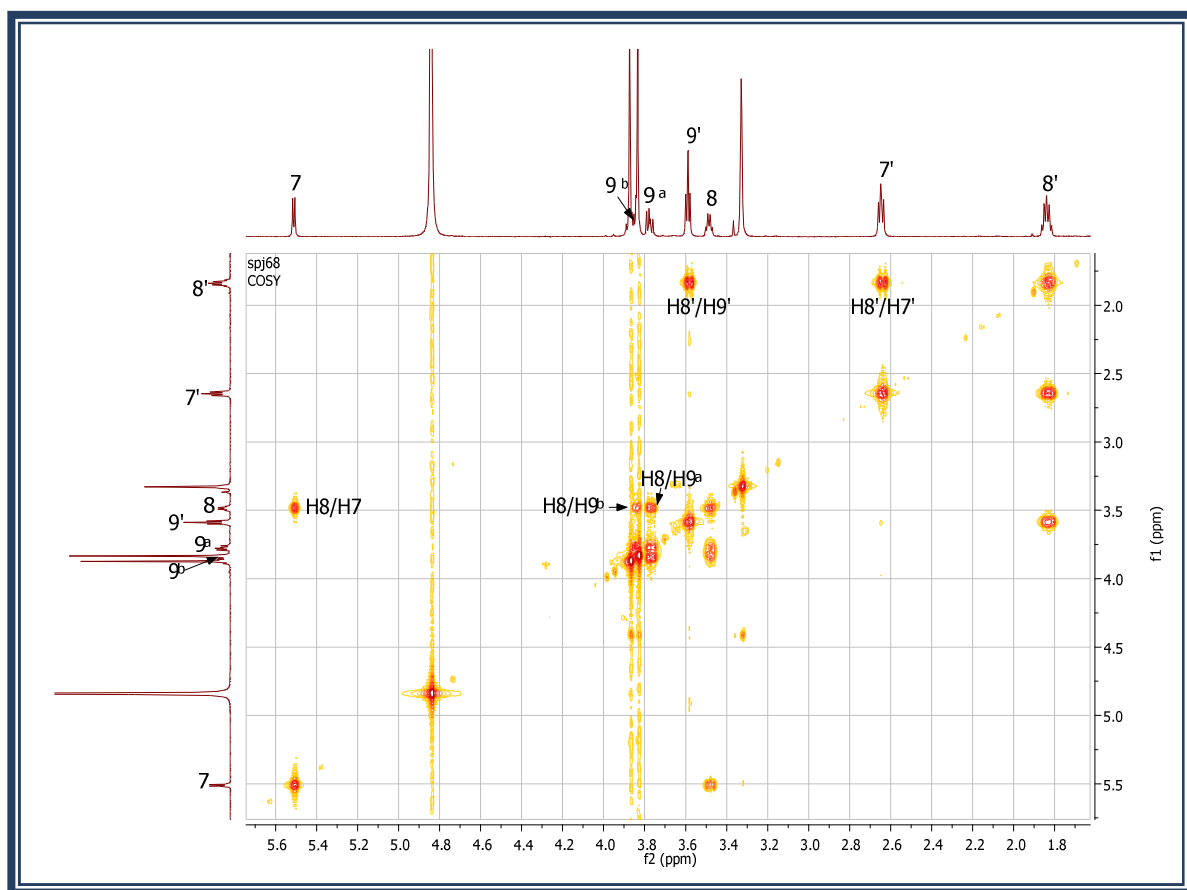
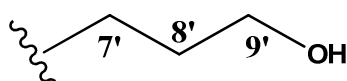
Sur le spectre COSY (spectre 4) le proton à  $\delta_H = 5,52$  ppm (CH oxygéné,  $\delta_C = 78,48$  ppm) que nous notons H-7, montre une corrélation avec le proton voisin H-8 à  $\delta_H = 3,49$  ppm (CH non oxygéné,  $\delta_C = 53,93$  ppm) résonant sous forme d'un quadruplet large ( $J = 6,1$  Hz), ce dernier corrèle à son tour avec les deux protons du groupement  $CH_2$  oxygéné à  $\delta_H 3,77$  et  $3,85$  ppm (H-9). L'ensemble de ces données mène à l'enchaînement:





### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

L'expérience COSY (spectre 4) montre également un voisinage entre deux groupements  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{H}} = 2,65$  ppm et à  $\delta_{\text{H}} = 1,84$  ppm le premier apparaissant sous forme de triplet et le second sous forme de quintuplé que nous noterons H-7' et H-8' respectivement. Ce dernier est voisin d'un groupement  $\text{CH}_2$  oxygéné (H-9') à  $\delta_{\text{H}} 3,59$  /  $\delta_{\text{C}} 60,71$  ppm. Ceci est confirmé par la corrélation des protons du groupement  $\text{CH}_2$  oxygéné (H-9') résonnant sous forme de triplet ( $J = 6,9$  Hz) avec les protons (H-8'), ce qui permet de déduire que la molécule comporte un substituant identifié par une chaîne à trois atomes de carbones. Ces données mènent à l'enchaînement suivant :

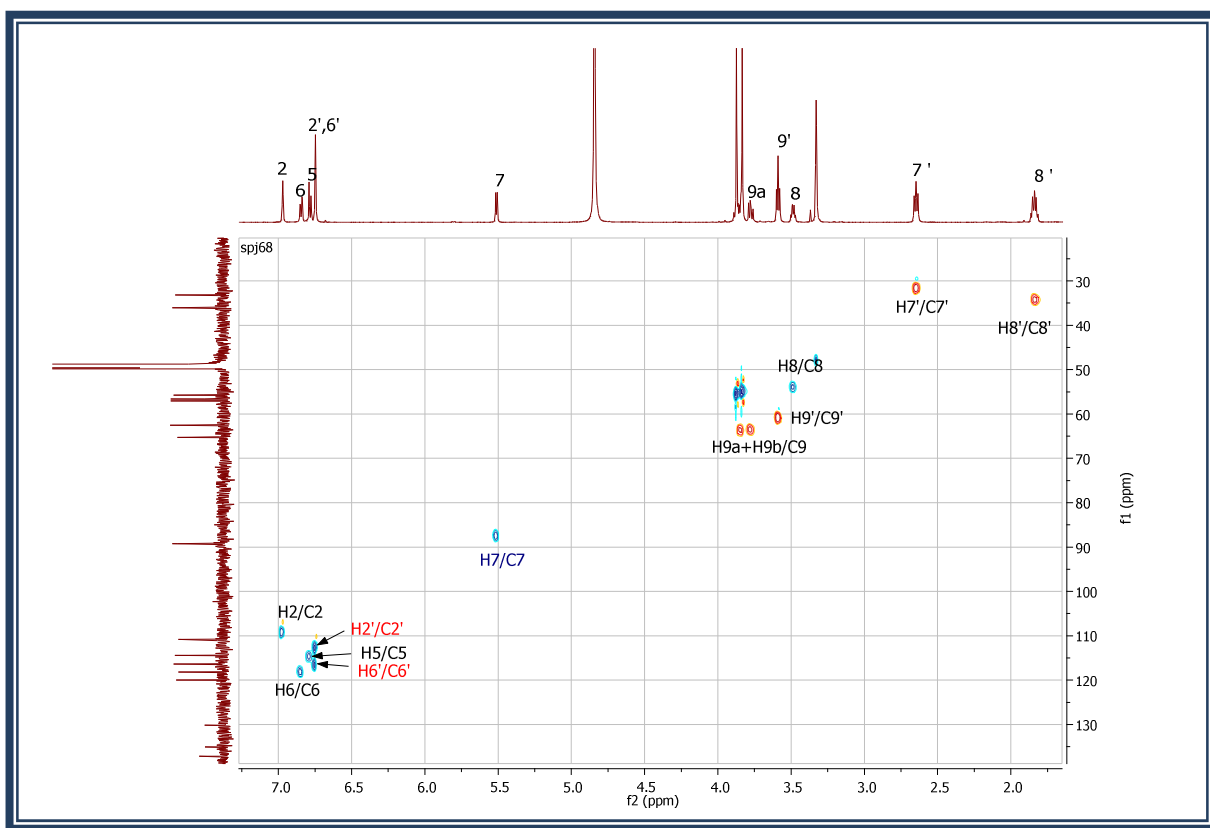


**Figure 29** : Les corrélations COSY de deux entités dans le composé **P3**.

L'analyse des couplages hétéronucléaires  $^1J_{\text{C-H}}$  visualisés sur le spectre HSQC (spectre 5) permet de localiser :

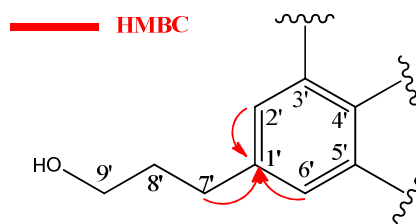
*Identification des produits isolés de Genista numidica*

- ✓ Les carbones des deux noyaux aromatiques : C-2 à  $\delta_C = 109,12$  ppm ; C-5 à  $\delta_C = 114,63$  ppm, C-6 à  $\delta_C = 118,20$  ppm; C-2' à  $\delta_C = 112,34$  ppm; C-6' à  $\delta_C = 116,53$  ppm.
- ✓ Les carbones des groupements méthoxyyles à  $\delta_C = 54,91$  ppm et à  $\delta_C = 55,35$  ppm.
- ✓ Les carbones du groupement  $\text{CH}_2$ , à  $\delta_C = 31,54$  ppm (C-7') et  $\delta_C = 34,27$  ppm (C-8'), et  $\text{CH}_2$  oxygéné à  $\delta_C = 60,71$  ppm (C-9') et  $\delta_C = 63,43$  ppm (C-9).
- ✓ Les carbones des groupements : CH à  $\delta_C = 53,93$  ppm (C-8) et CH oxygéné à  $\delta_C = 87,48$  ppm (C-7).



**Spectre 5:** Spectre HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P3**.

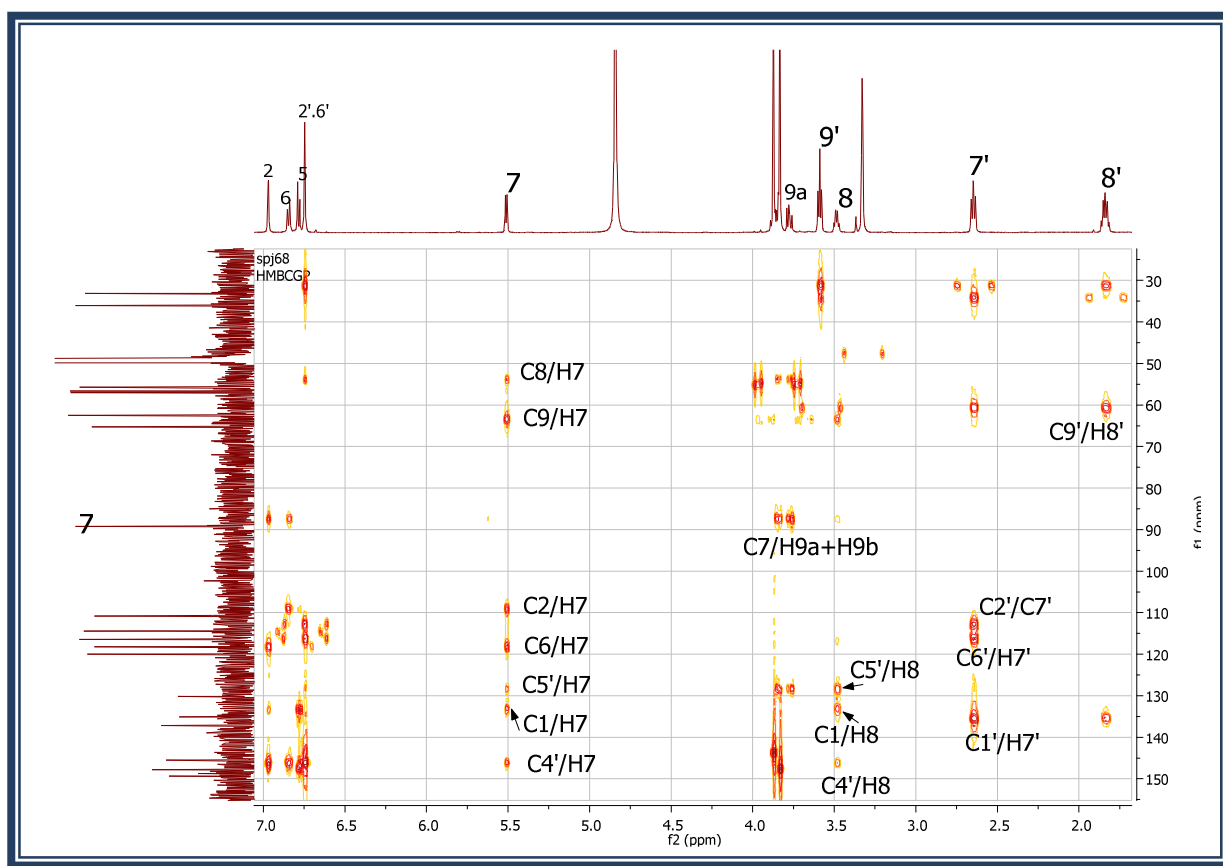
L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 6) révèle la corrélation entre les protons du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_H = 2,65$  ppm (H-7') et les carbones du noyau aromatique à  $\delta_C = 134,5$  ; 112,34 et 116,53 ppm attribuables à C-1', C-2' et C-6' respectivement, signifiant que ce groupement  $\text{CH}_2$  est directement attaché au 2<sup>ème</sup> cycle aromatique. Ce qui donne l'enchaînement suivant :

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Figure 30** : corrélations HMBC du 2<sup>ème</sup> noyau aromatique.

Ce spectre montre également une corrélation nette :

Entre le proton du groupement CH oxygéné (H-7) et le carbone C-1 à  $\delta_C = 133,01$  ppm du 1<sup>er</sup> noyau aromatique. La localisation du carbone C-1 est confirmée par la corrélation observée entre ce noyau et les protons H-2 et H-6, ceci laisse envisager que C-7 est directement lié au 1<sup>er</sup> cycle aromatique.



**Spectre 6** : Spectre HMBC ( $CD_3OD$ , 600 MHz) du composé **P3**.

Sur le même spectre, le H-7 montre des taches de corrélation avec les carbones C-5' à  $\delta_C = 128,39$  ppm et C-4' à  $\delta_C = 146,01$  ppm, la valeur du déplacement chimique de ce dernier

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

carbone révèle l'oxygénation de cet atome (C-4'). La localisation de C-4' et C-5' est déduite de leurs corrélations avec les protons H-2' et H-6' dans le spectre HMBC.

D'autre part le spectre HMBC montre clairement des taches de corrélation entre le proton H-8 et les carbones C-4' et C-5' du 2<sup>ème</sup> noyau aromatique identifiés précédemment, celui-ci est donc lié directement au second noyau aromatique. Ces données laissent envisager la présence d'un noyau **furanne** d'où la structure partielle est reportée sur (la figure 31).

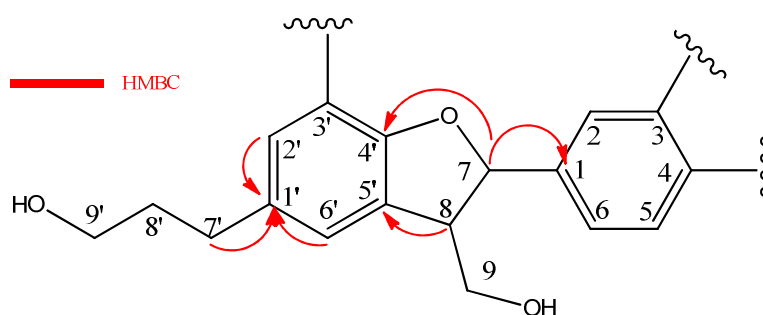
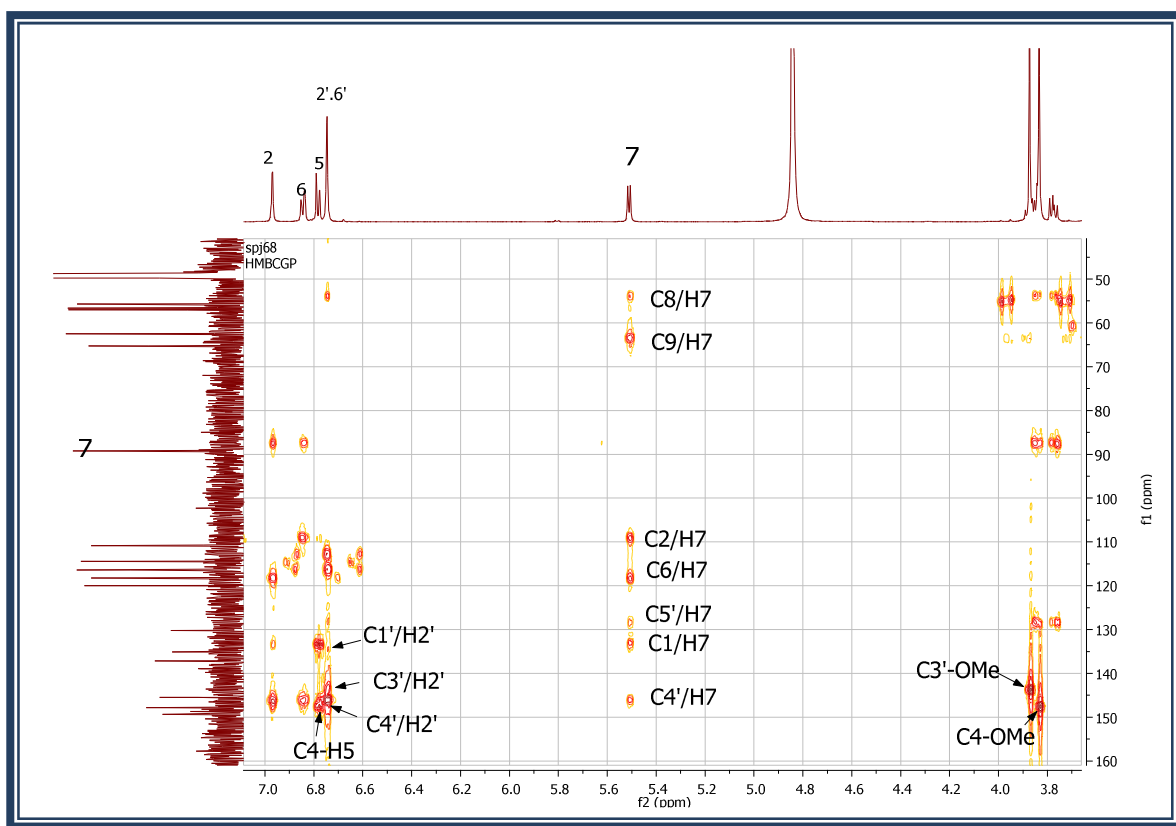


Figure 31 : Corrélations HMBC du composé **P3**.

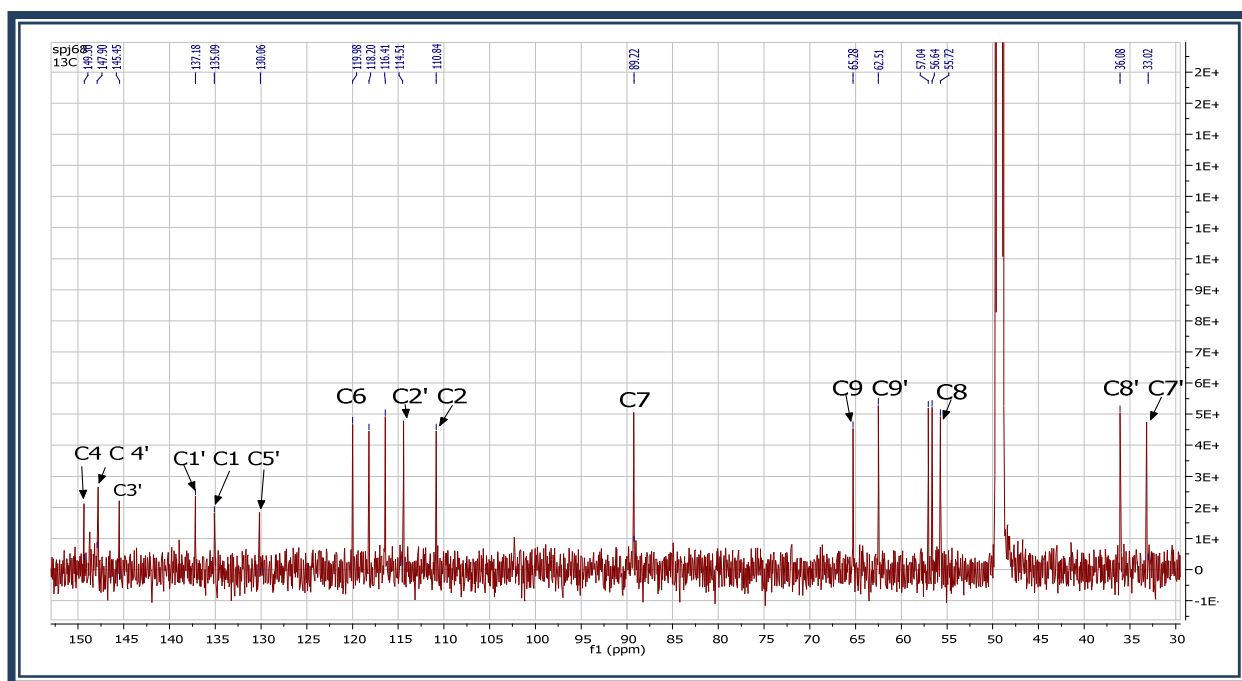


Spectre 6-1 : Spectre HMBC étalé (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P3**.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

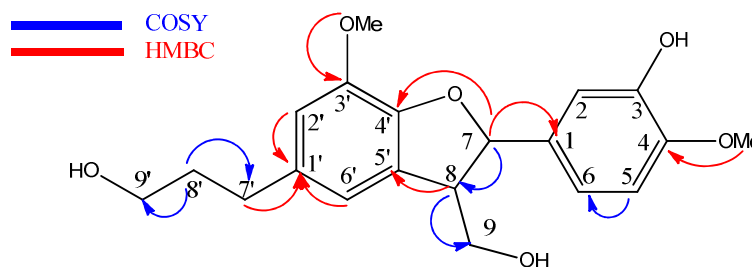
Pour placer les groupements méthoxyles nous avons réexaminé le spectre HMBC, lequel montre une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle à  $\delta_H = 3,87$  ppm et le carbone C-3'  $\delta_C = 143,71$  ppm, ce dernier fait lui-même une corrélation avec le proton H-2', ceci indique que le méthoxyle est porté par le carbone C-3'. De même le proton H-5 mène à la localisation de C-4 à  $\delta = 147,43$  ppm, ce dernier corréle avec les protons du groupement méthoxyle à  $\delta_H = 3,83$  ppm, ce qui permet de placer ce groupement en position 4 dans le 1<sup>er</sup> noyau aromatique.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre 7) confirme la présence de deux noyaux aromatiques et les atomes relatifs à un neolignane.



**Spectre 7:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé **P3**.

L'ensemble des données spectroscopiques RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  de cette molécule sont reportées dans le (Tableau11) dont la structure plane est la suivante :



**Figure 32:** structure plane du composé **P3**.

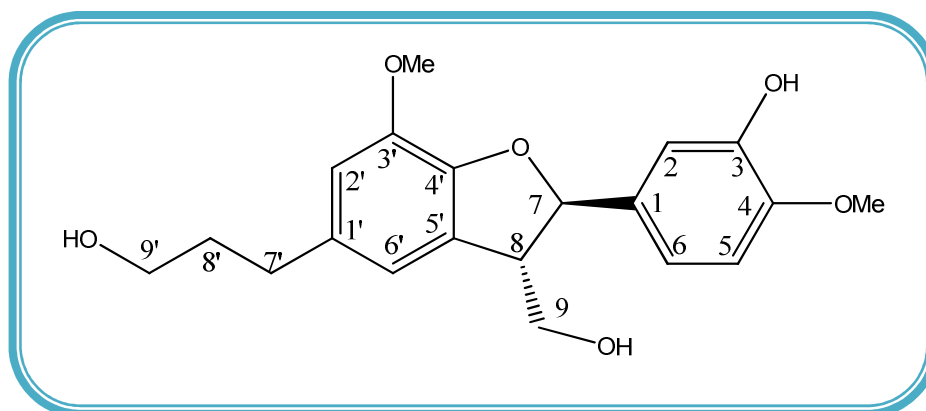
*Identification des produits isolés de Genista numidica***Tableau 11:** Les résultats RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  du composé **P3**.

Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	133,01
2	6,97 d (2 Hz)	109,12
3	-	147,0
4	-	147,43
5	6,79 d (8,2Hz)	114,63
6	6,85 dd (8,2 – 2Hz)	118,20
7	5,52 (d ; 6,2)	87,48
8	3,49 q	53,93
9	3,77 ; 3,85	63,43
1'	-	134,5
2', 6'	6,75 (d; 1,8)	112,34- 116,53
3'	-	143,7
4'	-	146,01
5'	-	128,39
7'	2,65 t (7,1Hz)	31,54
8'	1,84 qt	34,27
9'	3,59 t (6,9 Hz)	60,71
3'-OMe	3,87 s	55,35
4-OMe	3,83 s	54,91

La stéréochimie de cette molécule a été établie par la comparaison avec les données de la littérature (Van Dyck *et al*, 2000) ce qui permet de déduire l'orientation alpha pour H-7 et béta pour H-8.

Ces données mènent à la structure finale suivante : **Dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol**. Ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Genista*.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

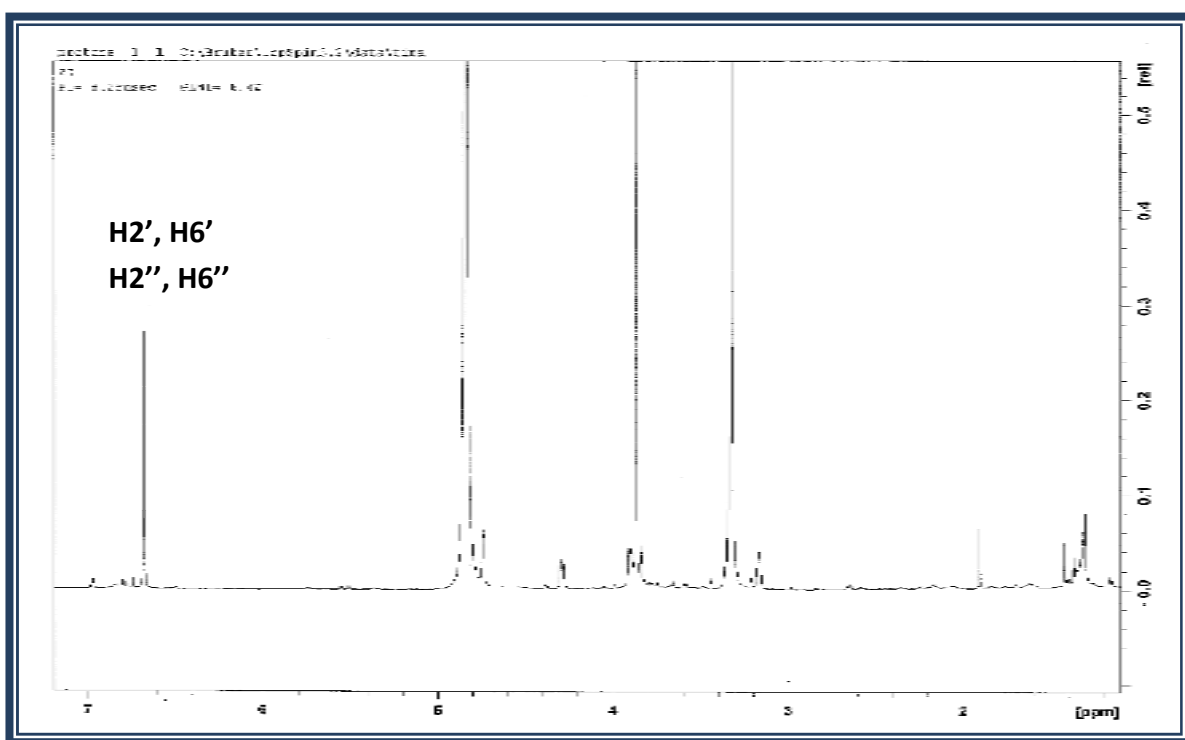


Composé **P3** : Dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol.

### 1.4. Elucidation structurale du composé **P4**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre 8) du composé **P4** montre la présence de :

- ✓ Un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 6,68$  ppm, d'intégration 4 H, caractéristique de quatre protons aromatiques magnétiquement équivalents, ce qui indique la présence de deux cycles aromatiques 1,3,4,5 tétra-substitués.
- ✓ Un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 3,90$  ppm correspond à quatre groupements méthoxyles.



Spectre 8 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz,) du composé **P4**.

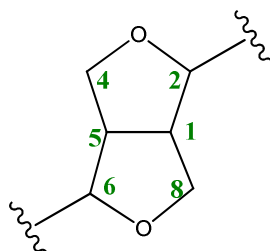
*Identification des produits isolés de Genista numidica*

Le spectre 1-D TOCSY (spectre 9) montre :

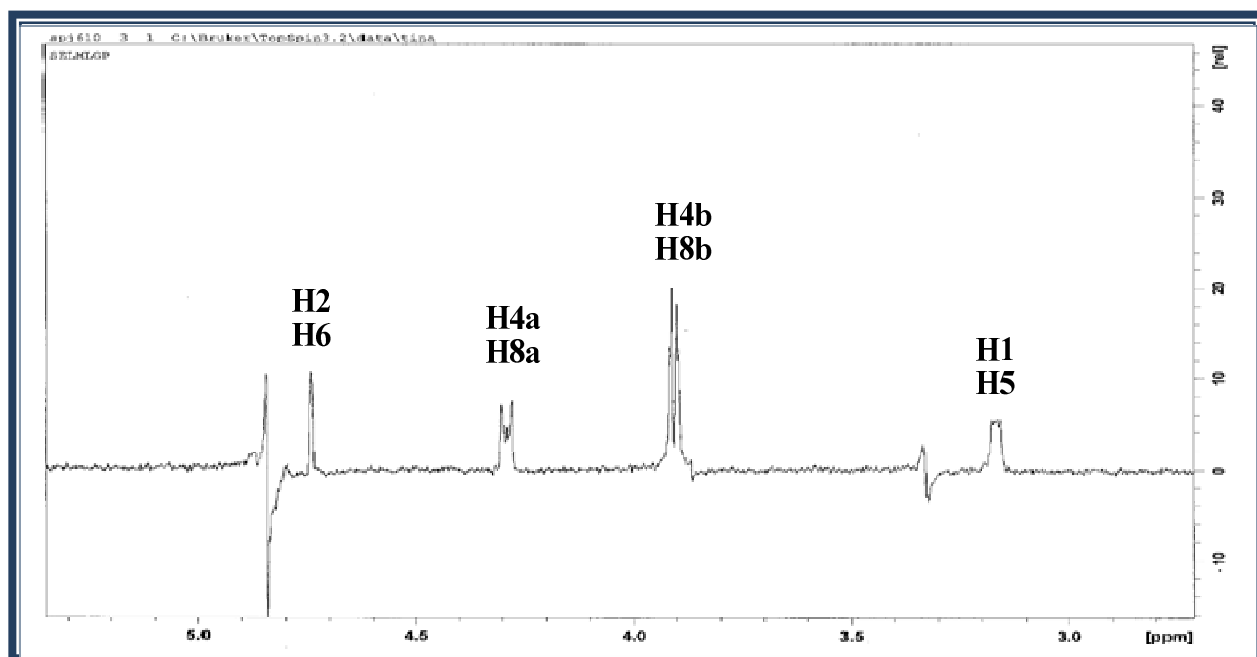
- ✓ un multiplet large à  $\delta_H = 3,16$  ppm, d'intégration 2H.
- ✓ un signal à  $\delta_H = 4,76$  ppm, d'intégration 2H correspond à deux groupements CH oxygénés.
- ✓ deux signaux à  $\delta_H = 3,92$  et  $4,32$  ppm d'intégration 2H pour chacun, correspondant aux protons de deux groupements CH<sub>2</sub> oxygénés.

Le fait que le spectre RMN <sup>1</sup>H ne présente que 6 signaux signifie une symétrie dans cette molécule. Tous ces signaux sont en faveur d'un squelette de type **furofurano** lignane (wisit *et al*, 2011).

La construction du noyau tétrahydrofuro [3,4-*c*]furane a été réalisée à l'aide des expériences HSQC (spectre 10) et HMBC (spectre 11), en suivant les corrélations proton-carbones. Ceci est caractéristique de l'entité représenté dans la figure suivante :



**Figure 33:** noyau tétrahydrofuro [3,4-*c*] furane.



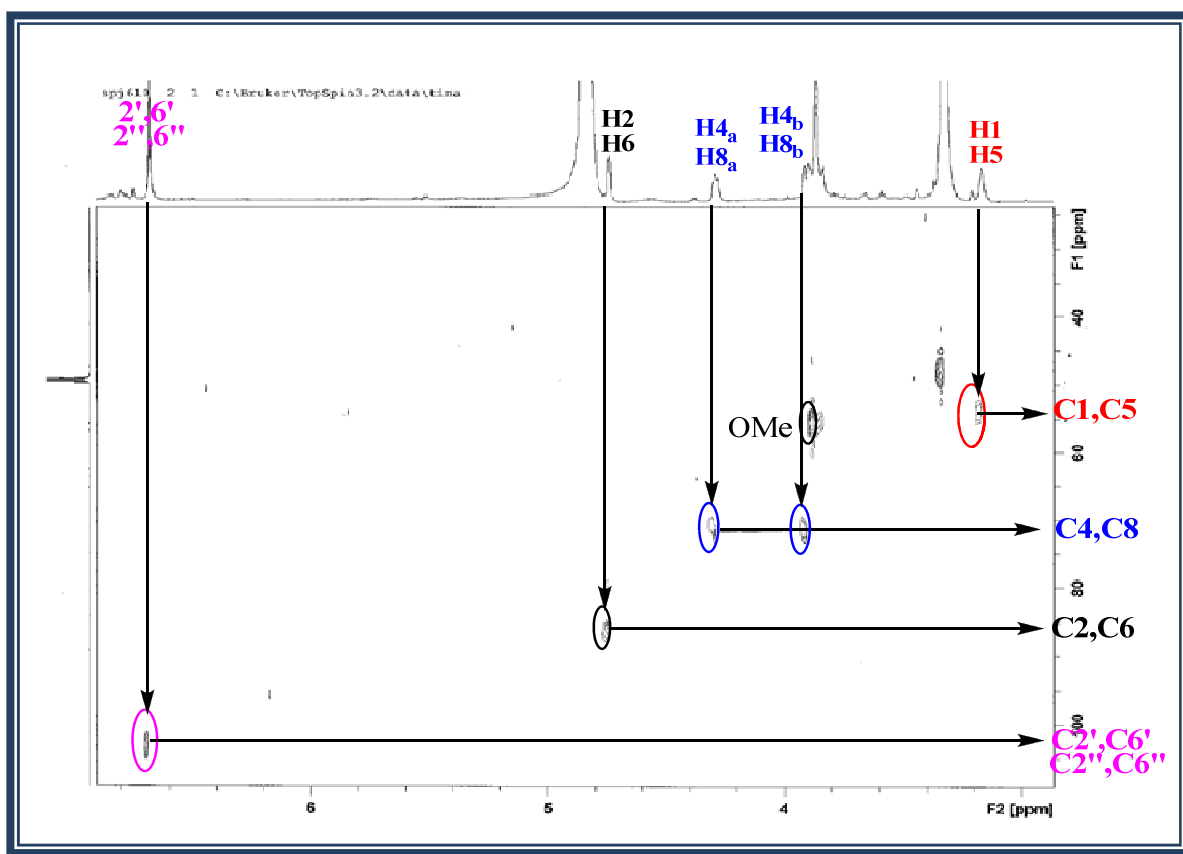
**Spectre 9 :** Spectre 1-D TOCSY (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé P4.



### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

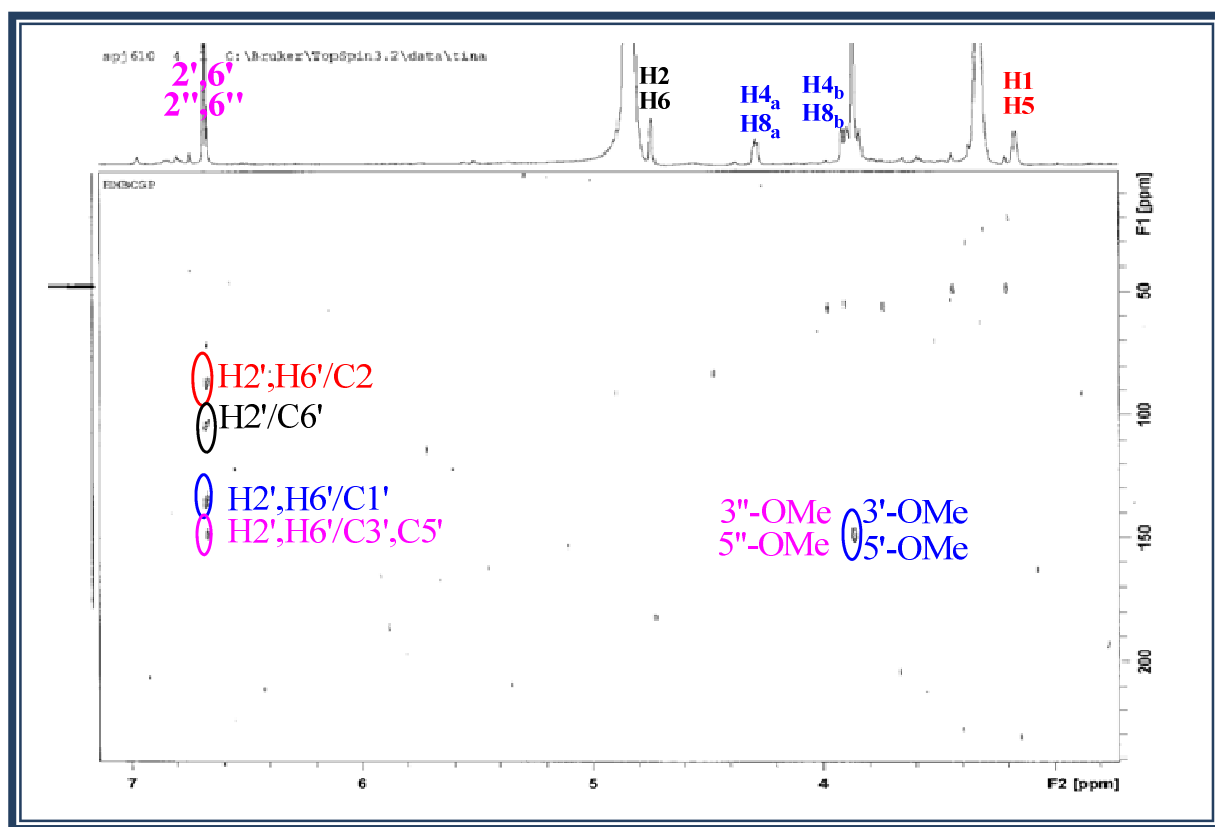
L'expérience HSQC (spectre 10) permet de localiser :

- ✓ les carbones des groupements CH hybridés sp<sup>3</sup> à  $\delta_C = 53,5$  ppm attribuable à C-1, C-5
- ✓ les carbones des groupements CH hybridés sp<sup>3</sup> oxygénés à  $\delta_C = 87,1$  ppm correspondent à C-2 et C-6.
- ✓ les carbones des groupements CH<sub>2</sub> oxygénés à  $\delta_C = 74$  ppm, correspondent à C-4 et C-8.
- ✓ les carbones des groupements méthoxyles à  $\delta_C = 55,5$  ppm.
- ✓ les carbones des deux noyaux aromatiques : C-2', C-6' à  $\delta_C = 104$  ppm, pour le 1<sup>er</sup> cycle aromatique et C-2'', C-6'' à  $\delta_C = 104$  ppm, pour le 2<sup>ème</sup> cycle aromatique.



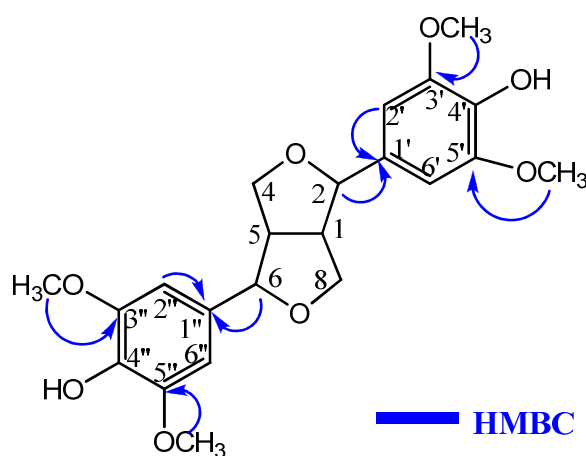
**Spectre 10:** Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P4**.

Les deux systèmes aromatiques 1,3,4,5-tétra-substitués ont été reliés au noyau furofurannique en se basant sur l'analyse des corrélations hétéronucléaires HMBC. La corrélation observée entre les protons H-2' et H-6' et les carbones C-1' à  $\delta_C = 135$  ppm et C-2 à  $\delta_C = 87,1$  ppm permet de placer le premier noyau aromatique en C-2. Le second noyau aromatique a été localisé en C-6 par l'intermédiaire de la corrélation observée entre les protons H-2'' et H-6'' et le carbone C-6.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 11** : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P4**.

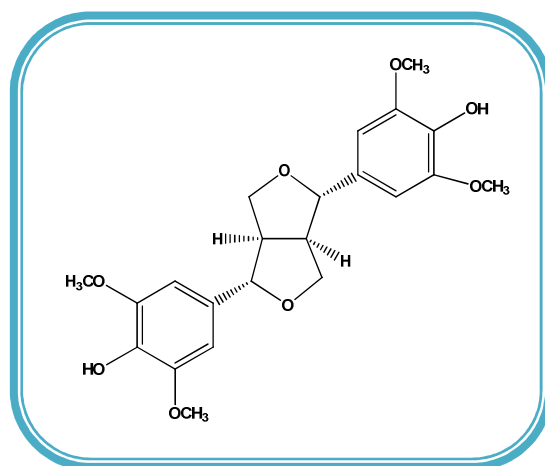
Enfin les quatre groupements méthoxyles ont pu être reliés aux groupements aromatiques par les corrélations HMBC observées entre les protons à  $\delta_{\text{H}} = 3,90$  ppm et les carbones porteurs C-3', C-5' à  $\delta_{\text{C}} = 149,5$  ppm, ainsi les carbones C-3'', C-5'' à  $\delta_{\text{C}} = 149,5$  ppm. L'ensemble de ces analyses permet de déduire que les substituants en C-4' et C-4'' sont des OH.



**Figure 34**: Corrélations HMBC du composé **P4**.

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

La comparaison des données spectroscopiques avec celles de la littérature (wisit *et al.*, 2011) montre qu'il s'agit du (+) **Syringaresinol**. Ce composé a été isolé de l'espèce: *Magnolia Thailandica* (Magnoliaceae) (wisitet *al.*, 2011). Ce composé a été caractérisé pour la première fois dans le genre *Genista* et il possède des activités antifongique (Kokpol *et al.*, 1993), anti-inflammatoire (Cho *et al.*, 2001), antipaludiques (Zhang *etal.*,2001) et antileucémique (Badawi *et al.*, 1983).



Composé **P4** : (+)-Syringaresinol

Les données relatives aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont reportées dans le Tableau 12 :

**Tableau 12:** Données de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **P4**.

Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1; 5	3,16 m	53,5
2 ; 6	4,76	87,1
4a ; 8a	4,32	74,0
4b ; 8b	3,92	74,0
1' ; 1''	-	135,0
2' ; 2''	6,68	104,0
3' ; 3''	-	149,5
5'; 5''	-	149,5
6'; 6''	6,68	104,0
3'-5'-OMe	3,9	55,5
3''-5''-OMe	3,9	55,5

## 2. Identification des produits obtenus de l'extrait acétate d'éthyle de *Genista numidica*

Les structures des produits isolés de l'extrait AcOEt de *G. numidica* ont été établies en utilisant les méthodes d'analyses spectroscopiques UV -visible, RMN 1D, 1-D TOCSY et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), et par comparaison avec la littérature. Cette étude a abouti à l'identification de 9 composés.

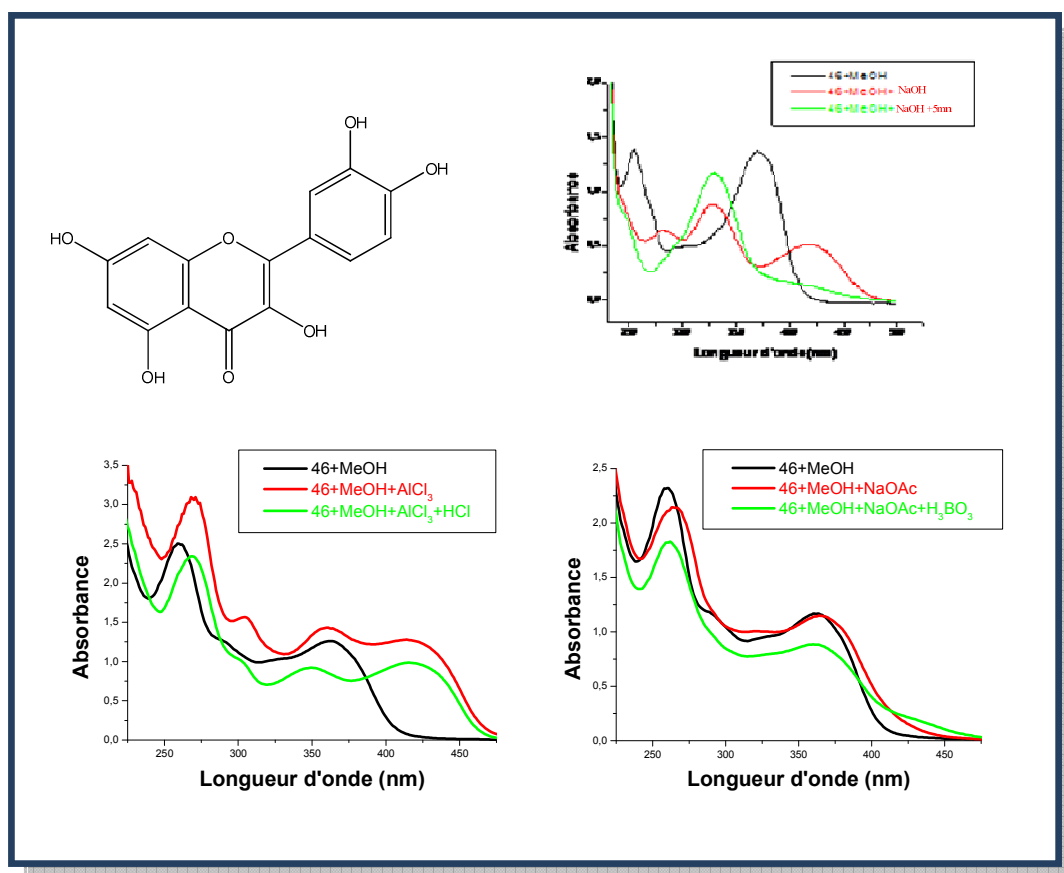
### 2.1. Elucidation structurale du composé P5

Le composé **P5** est obtenu sous forme de précipité jaune. La fluorescence jaune de ce produit sous la lumière ultra-violette (366 nm) laisse supposer la structure d'un flavonol.

- Les  $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption de la bande I à 362 nm et la bande II à 260 nm indique une structure de type flavonol.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 45$  nm) par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm indique l'existence d'un OH libre en 7.
- L'effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  ( $\Delta\lambda = + 53$  nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH indiquent la présence d'un OH libre en 5.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = + 6$  nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.
- 

**Tableau 13:** Données de la série spectrale UV ( $\lambda_{\text{max}}$  nm) du composé **P5**.

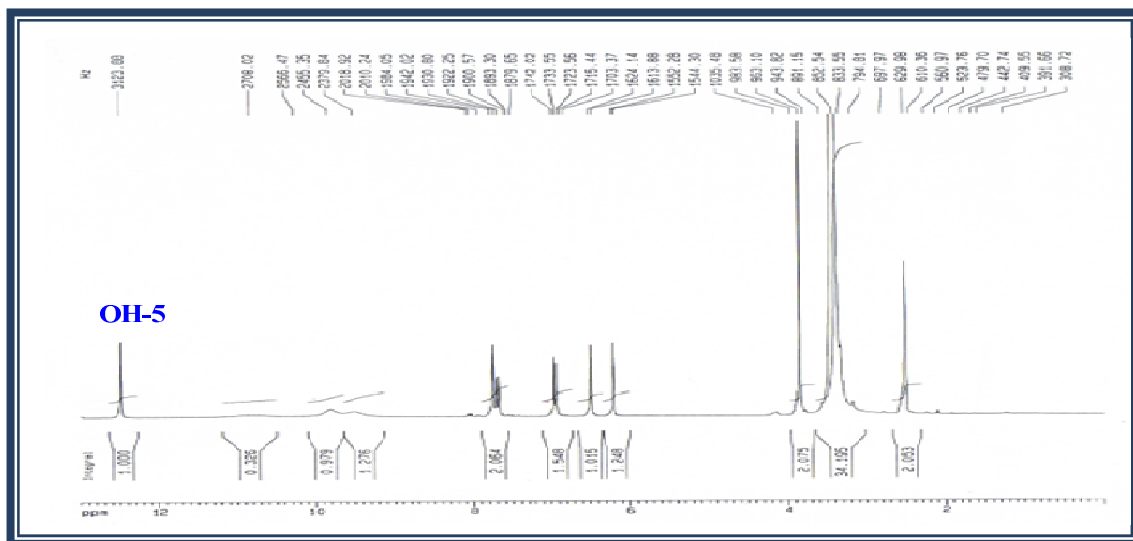
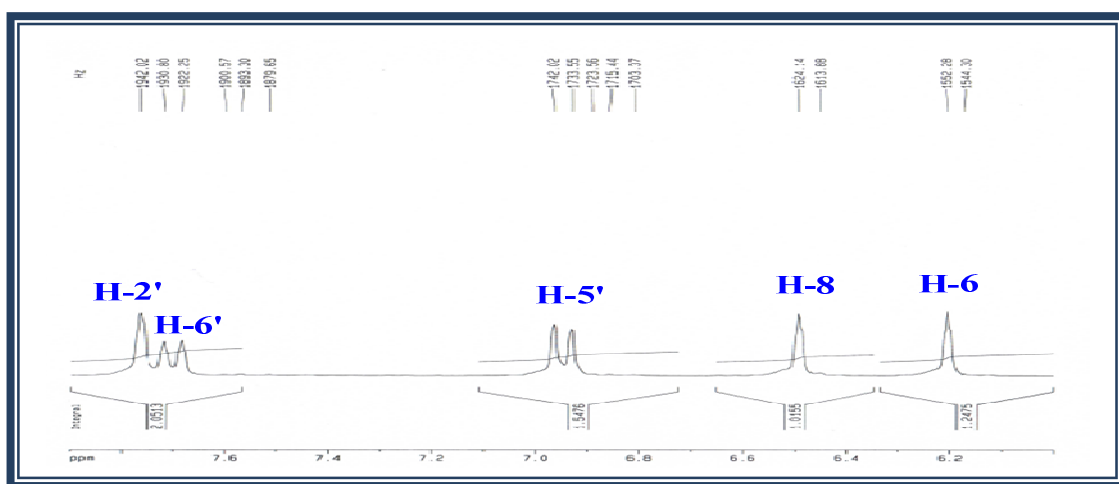
Réactifs	Bande I	Autres bandes		Bande II
<b>MeOH</b>	<b>362</b>	/		<b>260</b>
<b>+ NaOH</b>	<b>407</b>	<b>325</b>		<b>276</b>
<b>+AlCl<sub>3</sub></b>	<b>419</b>	<b>305</b>	<b>360</b>	<b>270</b>
<b>+AlCl<sub>3</sub>/HCl</b>	<b>415</b>	<b>305</b>	<b>350</b>	<b>270</b>
<b>+NaOAc</b>	<b>367</b>	/		<b>266</b>
<b>+NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>362</b>	/		<b>261</b>

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 13** : Spectre UV du composé **P5**.

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre 12) et son étalement (spectre 12-1) de ce composé, enregistré dans le DMSO- $d_6$  montre :

- ✓ Un singulet large à  $\delta_{\text{H}} = 12,49$  ppm, attribuable à OH en C-5 d'un flavonoïde.
- ✓ Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,68$  ppm ( $J = 2,2\text{Hz}$ ) attribuable à H-2'.
- ✓ Un doublet dédoublé d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,67$  ppm ( $J = 8,4 - 2,2\text{Hz}$ ) attribuable à H-6'.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,9$  ppm ( $J = 8,4$  Hz) attribuable à H-5'. Ces observations orientent vers un noyau B substitué en positions 3' et 4'.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,43$  ppm ( $J = 2,2$  Hz) attribuable à H-8.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,18$  ppm, ( $J = 2,2\text{Hz}$ ) attribuable à H-6.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*Spectre 12 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 250 MHz) du composé **P5**.Spectre 12-1 : étalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 250 MHz) du composé **P5**.

Le tableau (n° 14) rassemble les données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  relatives à cette molécule.

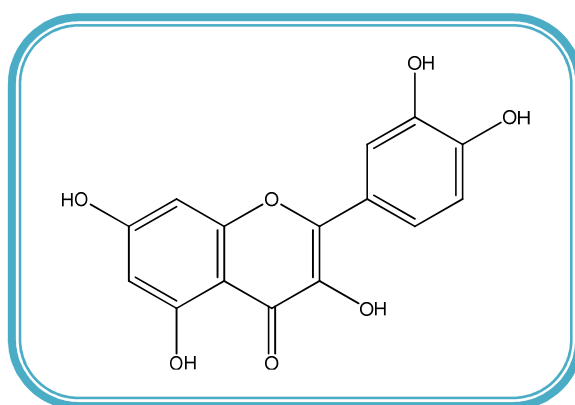
Tableau14: Résultats du RMN $^1\text{H}$  du composé **P5**.

Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) $J$ (Hz)
5	12,49 s
2'	7,68 d ( 2,2 Hz)
6'	7,67dd (8,4 – 2,2 Hz)
5'	6,9 d ( $J = 8,4$ Hz)
8	6,43 d (2,2 Hz)
6	6,18 d (2,2 Hz)

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

L'ensemble des données de RMN<sup>1</sup>H et UV-Visible, mènent à la structure de **la quercétine**. Ce produit est majoritaire dans cette espèce. Il a été isolé antérieurement du *G. sagittalis* (Hanganuet *al*, 2016).

La quercétine a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques, Ce flavonoïde est connu pour ses activités, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antiallergique, antidiabétique, antiviral, protection cardio-vasculaire, anti-ulcère, immuno-modulateur, gastroprotective, antihypertensive (Lakhanpalet *al*, 2007, Victor *et al*, 2016).



Composé **P5** : Quercétine

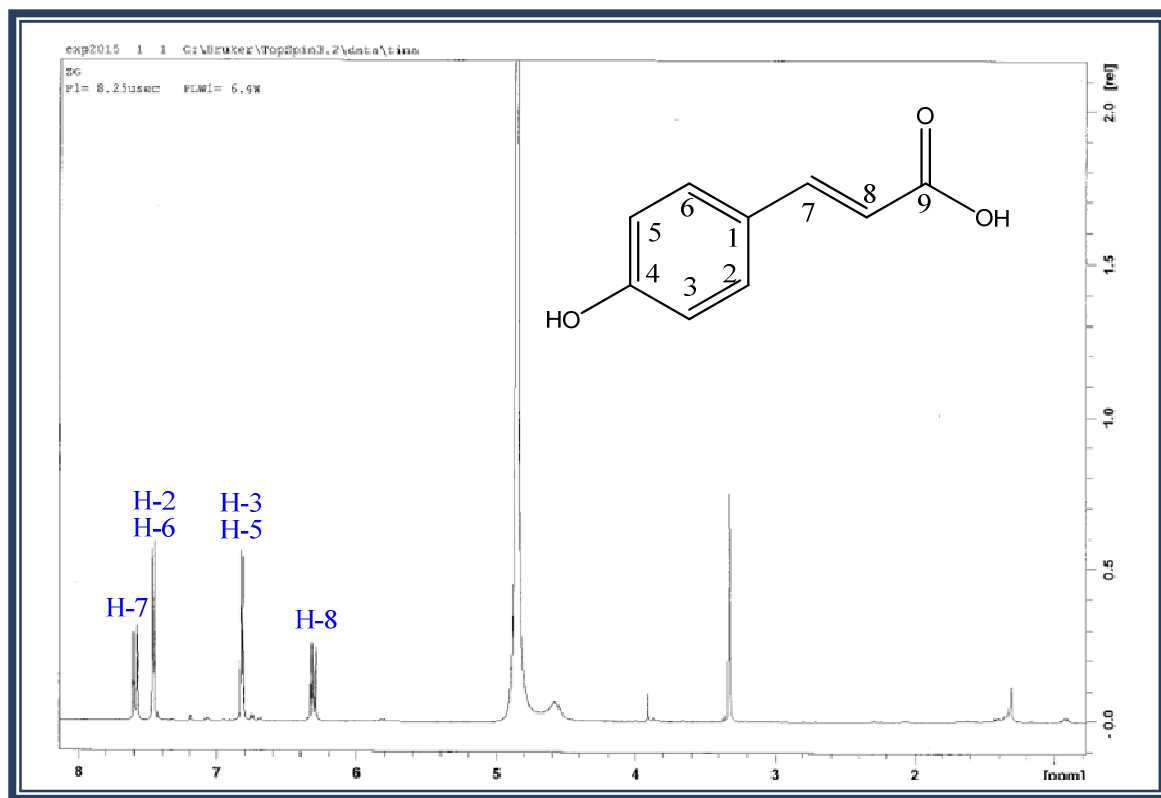
## 2.2. Elucidation structurale du composé P6

Le composé **P6** est isolé sous forme d'une huile de couleur marron. Il a été identifié comme **l'acide p-coumarique**, en comparant les données spectrales avec celle de la littérature (Mohamadi *et al*, 2015).

L'observation du spectre RMN <sup>1</sup>H (spectre 14) indique la présence d'un noyau aromatique para disubstitué.

En effet, les quatre protons de ce cycle aromatique résonnent sous forme de deux doublets de même intensité à  $\delta_H = 7,44$  et  $\delta_H = 6,81$  ppm correspondant à un couplage ortho ( $J = 8,4$  Hz).

Ce spectre montre également la présence d'un système AX à  $\delta_H = 7,61$  et  $\delta_H = 6,28$  ppm avec un couplage vicinal éthylénique (CH=CH) de configuration trans ( $J = 15$  Hz).

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 14:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P6**.

Les deux groupements CH éthyléniques ont une stéréochimie trans déterminée grâce à la grande constante de couplage et les données de la littérature (Lim *et al*, 2005). Les résultats de la résonance magnétique nucléaire sont reportés dans le (Tableau 15).

**Tableau 15:** Données de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz) du composé **P6**.

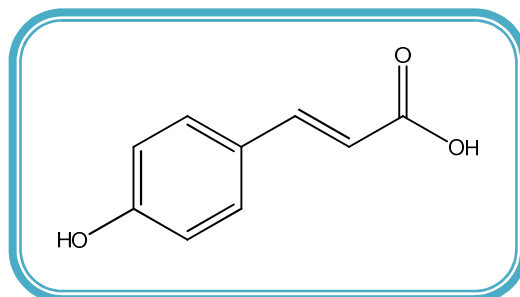
Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)	Littérature (Mohamadi <i>et al</i> , 2015)
H-7	7,61 (d ;15 Hz)	7,57 (d ;15,9 Hz)
H-2 ; H-6	7,44 (d ; 8,4 Hz)	7,88 ( d ; 8,7 Hz)
H-3 ; H-5	6,81 (d ;8,4 Hz)	6,81(d ; 8,9 Hz)
H-8	6,28 (d ;15 Hz)	6,28 (d; 15,9)

L'ensemble de ces données (Tableau 15) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature (Mohamadi *et al*, 2015), conduisent à l'identification du composé **P6** comme étant l'**acide p-coumarique**. Ce composé a été isolé de plusieurs espèces du genre *Genista* telles que *G. sulcitana* (Noccioliet *al*, 2012) et *G. tinctoria* (Hanganu *et al*, 2016). Il est connu pour



*Identification des produits isolés de Genista numidica*

ses activités antibactérienne, antioxydante (pei *et al*, 2016), antifongique (Zabka *et al*,2013), anti-tumeur (Kong *et al*,2013), anti-inflammatoire et atténuation du diabète, (Bahaduran *et al*, 2013).



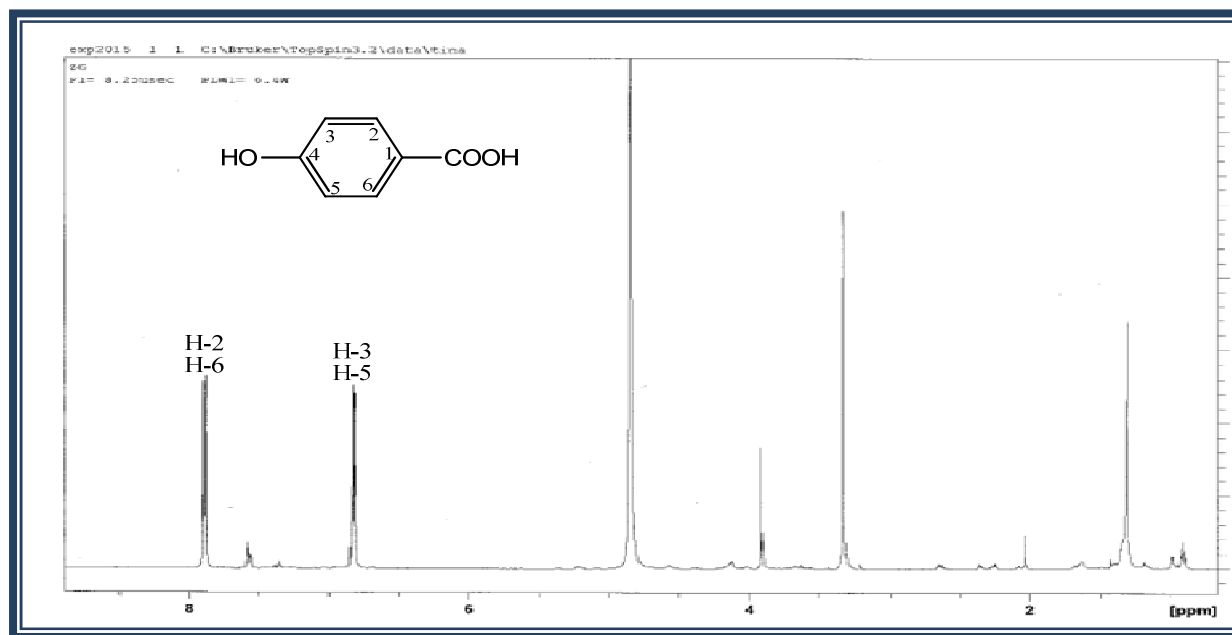
Composé **P6** : L'acide p- coumarique.

### 2.3. Elucidation structurale du composé P7

Le composé **P7** se présente sous forme de précipité. L'observation du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **P7** (spectre 15) révèle une grande parenté avec le composé **P6** (l'acide p-coumarique). On note la présence de:

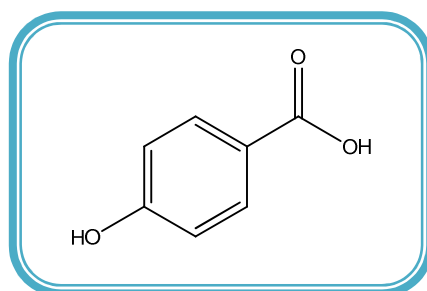
- ✓ un doublet d'intégration 2H ( $J=8,8\text{Hz}$ ) à  $\delta_{\text{H}}=7,95$  ppm.
- ✓ un doublet d'intégration 2H ( $J=8,8\text{Hz}$ ) à  $\delta_{\text{H}}=6,92$  ppm.

Ces données nous orientent vers un composé aromatique dont le cycle benzénique est para-disubstitué. Les données de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  sont regroupées dans (**Tableau 16**).

Identification des produits isolés de *Genista numidica*Spectre15 : RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P7**.Tableau 16: Données de la spectroscopie RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P7**.

Attribution	$\delta_H$ (ppm), $J$ (Hz)	Littérature (Wang <i>et al</i> , 2010)
H-2 ; H-6	7,95 (d ; 8,8 Hz)	7,92 (d ; 8,9 Hz)
H-3 ; H-5	6,92 (d ; 8,8 Hz)	6,92 (d ; 8,9 Hz)

Ce composé a été identifié comme étant l'**acide 4-hydroxybenzoïque** (Tableau 16) en comparant ses données de RMN <sup>1</sup>H à celles de la littérature (Wang *et al*, 2010). Ce composé a été identifié dans l'espèce *G. ferox* (Bencherchar *et al*, 2017). Cet acide est largement utilisé comme conservateur dans les cosmétiques, les préparations pharmaceutiques et dans les aliments. Il est connu pour ses activités antifongiques, antimutagène et oestrogénique (oksana *et al*, 2012).

Composé **P7**: l'acide p-hydroxy benzoïque.

## 2.4. Elucidation structurale du composé P8

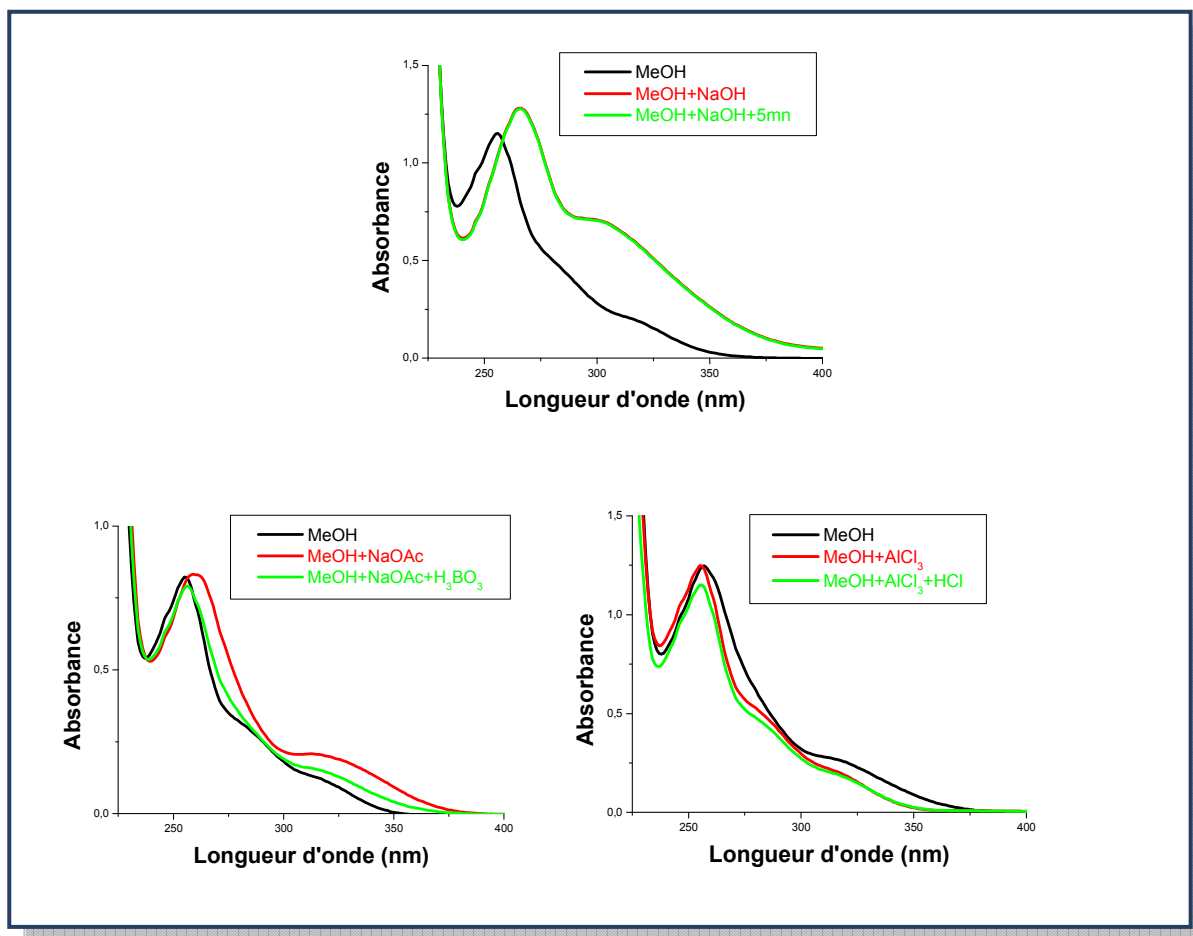
### ➤ Spectroscopie UV

Les données de la série spectrale UV (Tableau17, spectre16) montrent :

- Une bande I sous forme d'un épaulement à environ 317 nm et une bande II à 254 nm ainsi qu'une fluorescence orange sous lumière de Wood indiquant une structure de type isoflavone.
- L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = +6$  nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de  $\text{AlCl}_3$  ne montre aucun effet sur le spectre d'absorption comparativement à celui enregistré dans le MeOH ce qui indique l'absence d'un OH libre en 5 et également l'absence d'un système ortho dihydroxylé dans la structure.
- La stabilité du spectre après addition de NaOH avec le temps comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

**Tableau 17:** Données de la série spectrale UV du composé **P8**.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II
<b>MeOH</b>	<b>317</b>	/	<b>254</b>
<b>+ NaOH</b>	<b>308</b>	/	<b>266</b>
<b>+AlCl<sub>3</sub></b>	<b>317</b>	<b>286</b>	<b>255</b>
<b>+AlCl<sub>3</sub>/HCl</b>	<b>317</b>	<b>286</b>	<b>255</b>
<b>+NaOAc</b>	<b>320</b>	/	<b>260</b>
<b>+NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>320</b>	/	<b>255</b>
<b>Spectre stable avec NaOH après 5 mn</b>			

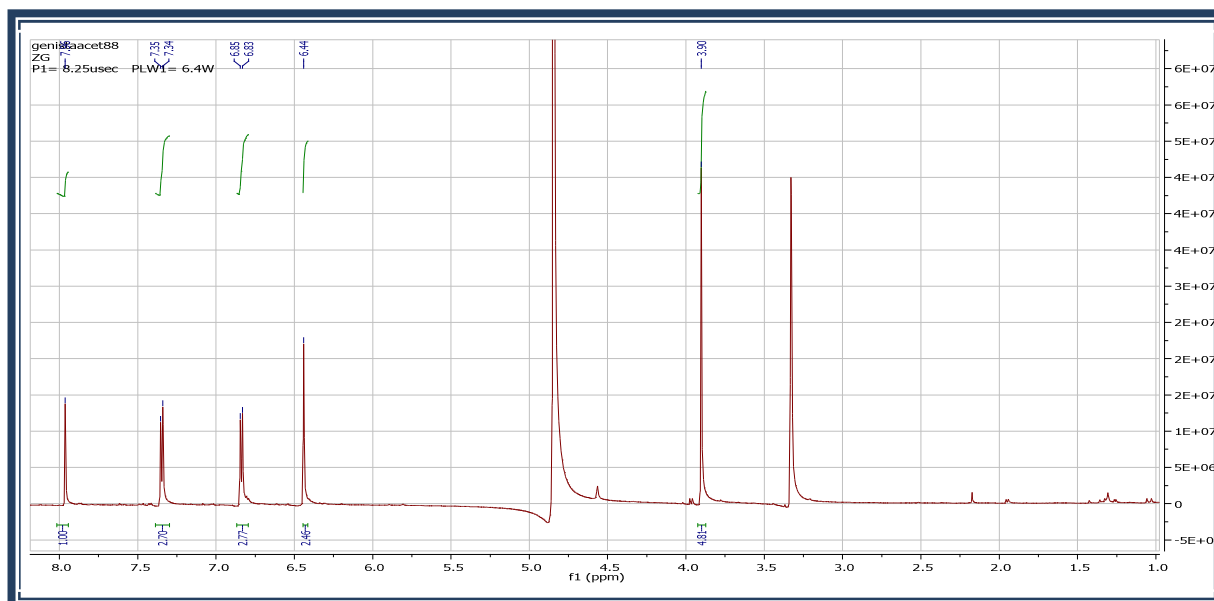
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 16:** Série spectrale UV du composé **P8**.

### ➤ Spectroscopie RMN

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Spectre17**) montre la présence d'un ensemble de signaux confirmant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

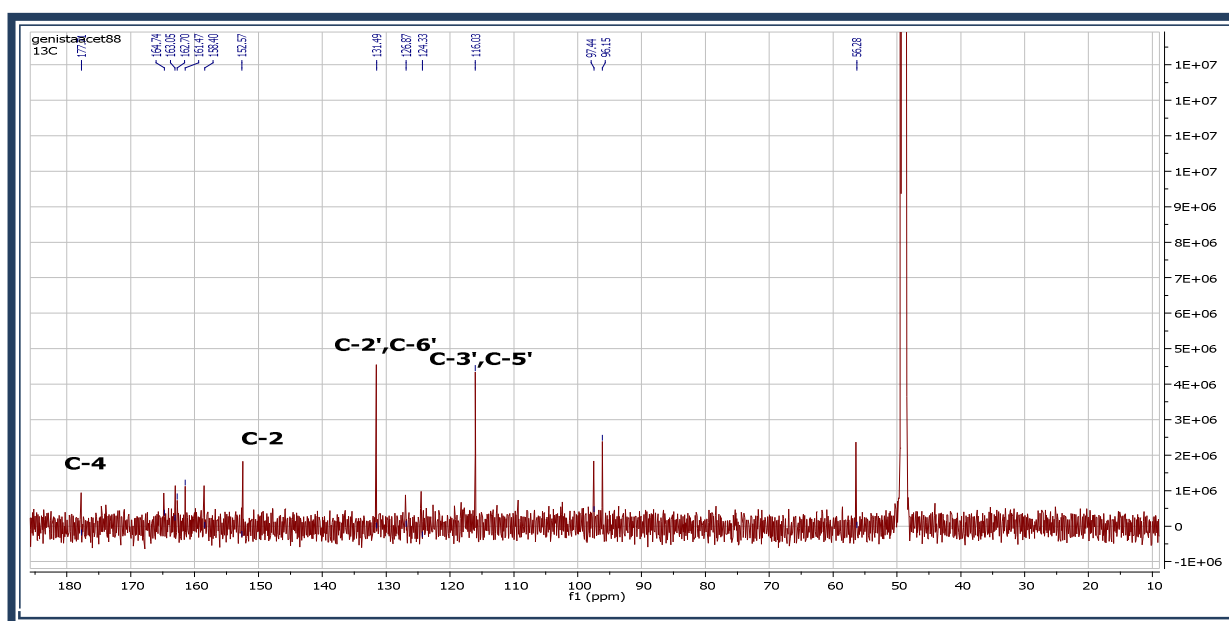
- ✓ Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,96$  ppm caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- ✓ Deux doublets d'intégration 2H pour chacun ( $J = 8,4$  Hz), à  $\delta_{\text{H}} = 6,85$  ppm et  $\delta_{\text{H}} = 7,35$  ppm correspondant respectivement aux protons H-5', H-3' et H-2', H-6' du cycle B.
- ✓ un singulet d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 6,44$  ppm correspondant aux protons H-6 et H-8.
- ✓ Un singulet à  $\delta_{\text{H}} = 3,90$  ppm d'intégration 3H correspond à un groupement méthoxyle.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Spectre 17: Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz) du composé **P8**.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre 18) confirme la présence des 16 atomes de carbone caractéristique d'une isoflavone substituée par un méthoxyle que nous pouvons répartir comme suit :

- ✓ 8 carbones quaternaires parmi lesquels un carbonyle de cétone à  $\delta_{\text{C}} = 177,71$  ppm correspondant au carbone C-4 d'un flavonoïde.
- ✓ 7 groupements CH parmi lesquels 6 aromatiques et 1 correspondant à C-2 d'une isoflavone à  $\delta_{\text{C}} = 152,57$  ppm.
- ✓ Un groupement méthoxyle à  $\delta_{\text{C}} = 56,28$  ppm.

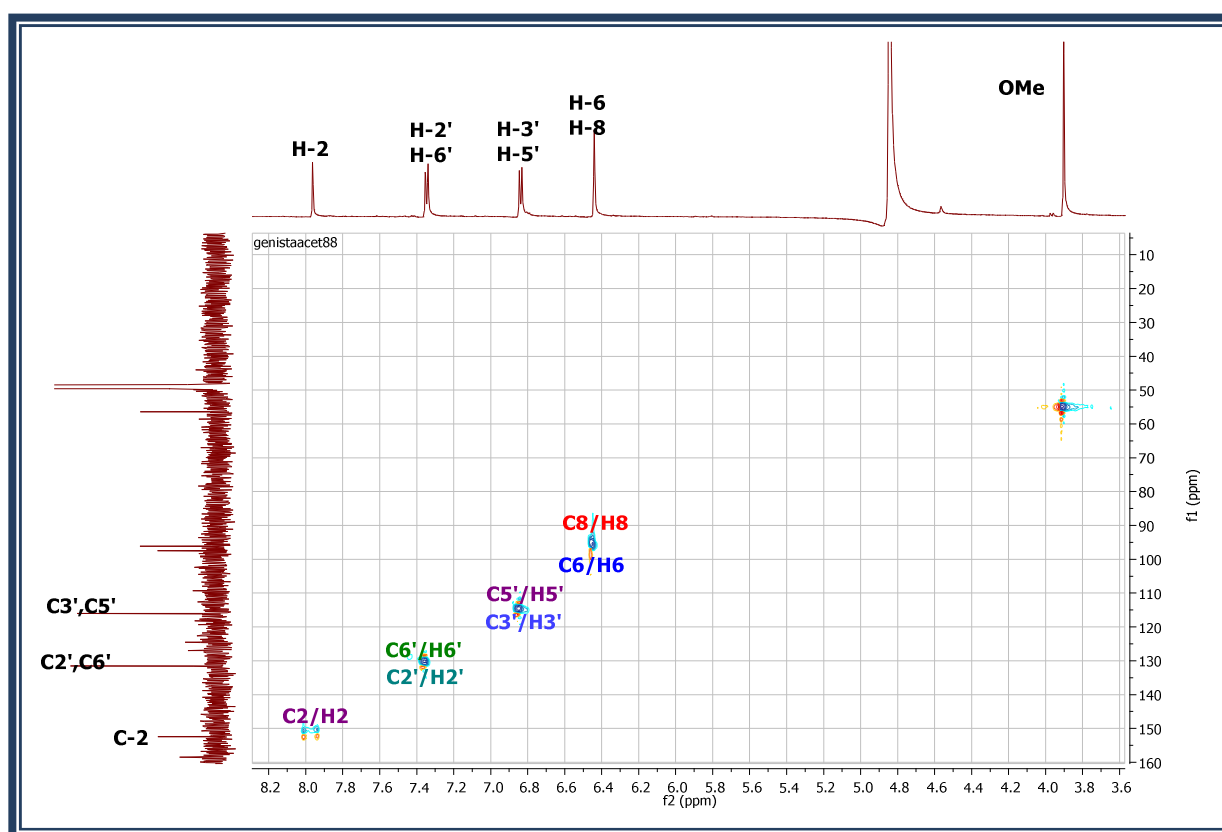


Spectre 18 : RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz) du composé **P8**.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

Le spectre HSQC (spectre 19) permet d'attribuer les carbones du noyau flavonique, on observe :

- ✓ une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant leur localisation à  $\delta_C = 130,16$  ppm.
- ✓ une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à  $\delta_C = 114,76$  ppm.
- ✓ une tache de corrélation entre H-6, H-8 et les atomes de carbone correspondants à  $\delta_C = 95,77$  et  $94,86$  ppm respectivement.



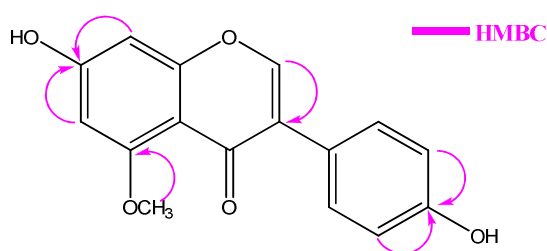
**Spectre 19:** Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) du composé **P8**.

Le spectre HMBC (spectre 20) montre :

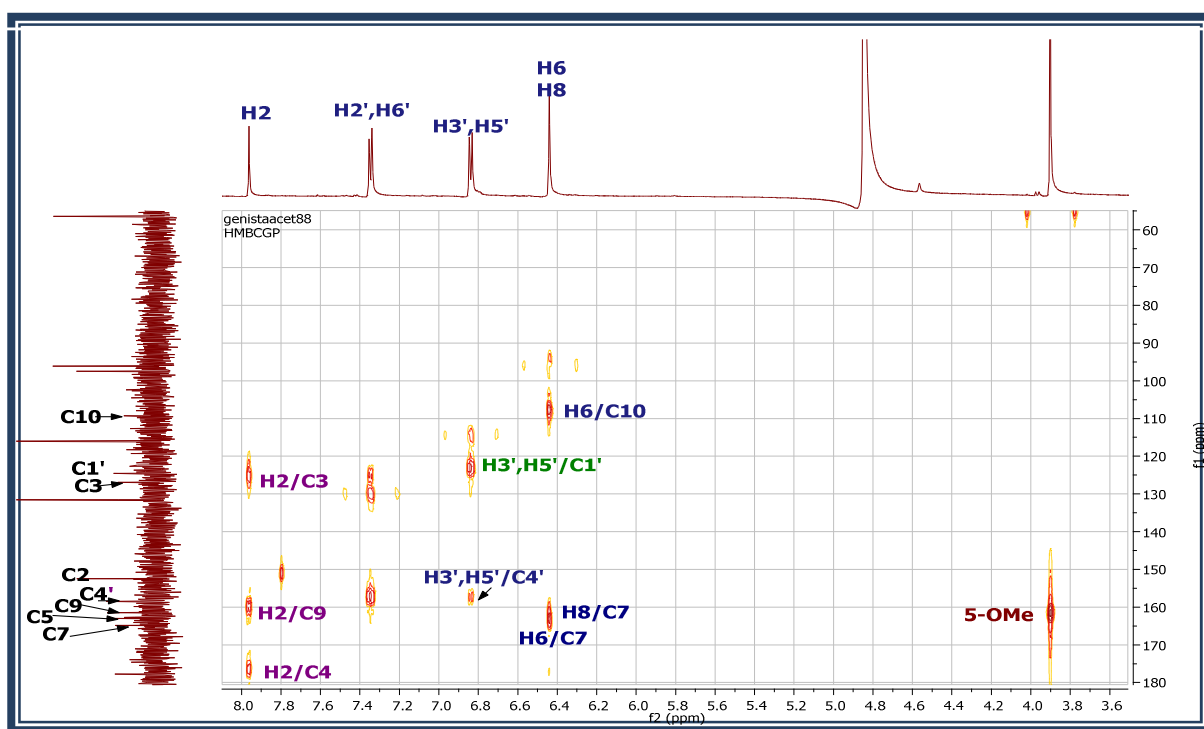
- ✓ une tache de corrélation entre H-2 et les atomes de carbone à  $\delta_C = (123,11$  et  $125)$  ppm, attribuables à C-1' et C-3 respectivement. Ce même proton montre également une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 159,79$  ppm attribuable à C-9.

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

- ✓ les protons H-2', H-6' et H-3', H-5' mènent à la localisation de C-4' à  $\delta_C = 157,61$  ppm et confirment la localisation de C-1' à  $\delta_C = 123,11$  ppm.
- ✓ une tache de corrélation entre H-6, H-8 et le carbone oxygéné à  $\delta_C = 162,73$  ppm attribuables à C-7. Ces protons montrent également une corrélation avec le carbone à  $\delta_C = 108,2$  ppm qui ne peut être que C-10.
- ✓ une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à  $\delta_C = 161,42$  ppm attribuable à C-5. Ceci permet de placer le méthoxyle sur le carbone C-5.



**Figure 35:** corrélations HMBC du composé **P8**.



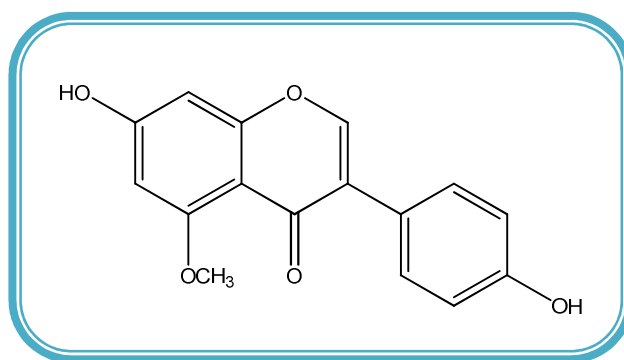
**Spectre 20:** Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) du composé **P8**.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **P8** sont résumés dans le (Tableau 18).

Identification des produits isolés de *Genista numidica*Tableau18: Données de la RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  du composé **P8**.

Attribution	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	7,96	152,57
3	-	125
4	-	177,71
5	-	161,42
6	6,44 s	95,77
7	-	162,73
8	6,44 s	94,86
9	-	159,79
10	-	108,2
2', 6'	7,35 d (8,4Hz)	130,16
3', 5'	6,85 d (8,4Hz)	114,76
4'	-	157,61
1'	-	123,11
5-OMe	3,90 s	56,28

L'ensemble des données RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), RMN 2D (HSQC et HMBC), UV-Vis mènent à la structure finale du composé **P8** qui est le : **4',7-dihydroxy-5-méthoxyisoflavone (Génisteine 5-méthyl éther)** connu sous le nom de **Isoprunétine**. Cette molécule a été antérieurement isolée des espèces suivantes: *G. quadriflora* (Boukaabeche *et al*, 2013) et *G. tricuspidata* (Boumaaza *et al*, 2006), et elle possède des activités antibactérienne et antioxydante (Ndjateu *et al*, 2014).

Composé **P8** : Isoprunétine.



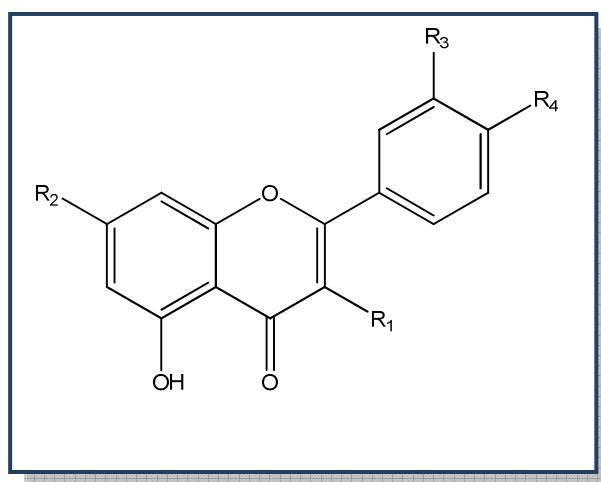
## 2.5. Elucidation structurale du composé P9

Le composé **P9** est obtenu sous forme de précipité jaune.

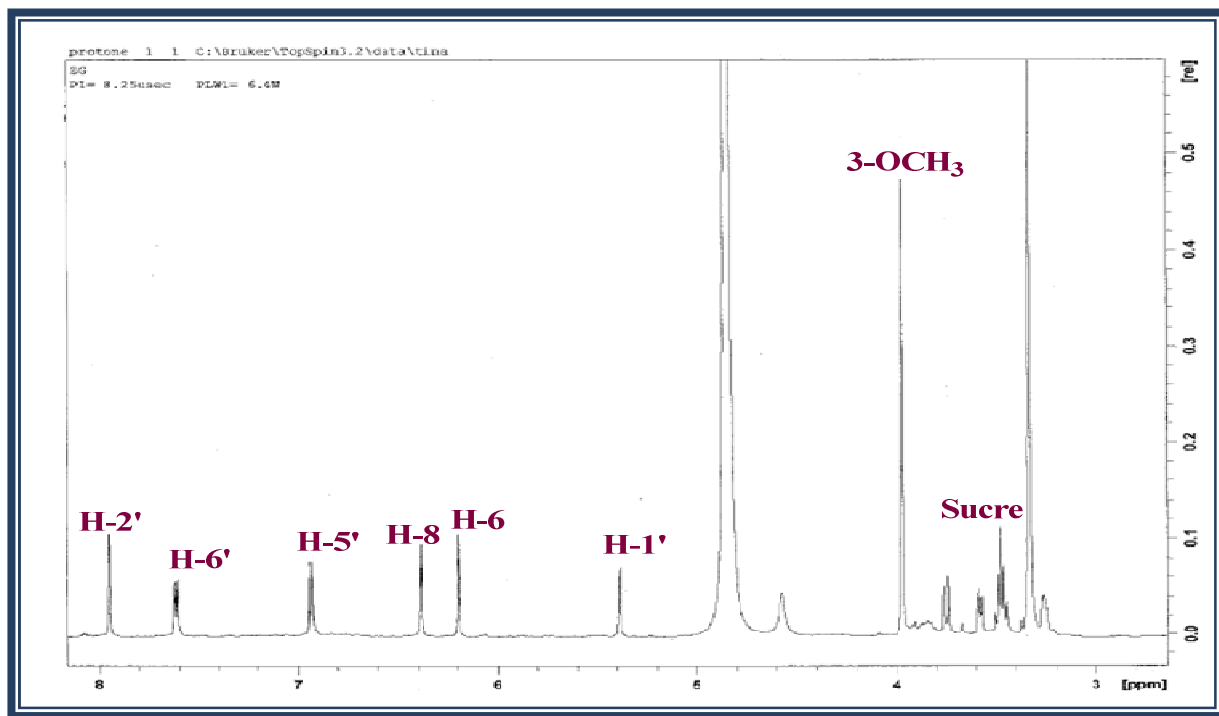
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre 21) montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type hétéroside. On observe sur le spectre :

- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,9$  ppm ( $J = 2,1$ Hz) attribuable à H-2'.
- ✓ un doublet dédoublé d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,61$  ppm ( $J = 8,8 - 2,1$ Hz) attribuable à H-6'.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,92$  ppm ( $J = 8,8$  Hz) attribuable à H-5'. Ces observations orientent vers un noyau B substitué en positions 3' et 4'.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,42$  ppm ( $J = 2,1$  Hz) attribuable à H-8.
- ✓ un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,22$  ppm, ( $J = 2,1$ Hz) attribuable à H-6.
- ✓ un doublet à  $\delta_{\text{H}} = 5,40$  ppm ( $J = 7,5$  Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone, d'après la valeur de son déplacement chimique, par un pont oxygène avec une configuration  $\beta$  du carbone anomérique.
- ✓ un singulet d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}} = 3,90$  ppm correspondant à un groupement méthoxy.
- ✓ un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,42 – 3,91 ppm attribuable par conséquent aux protons du substituant sucre.

L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans le schéma qui est un flavonoïde sucré :



**Figure 36:** Structure partielle du composé **P9**.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 21:** Spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) du composé **P9**

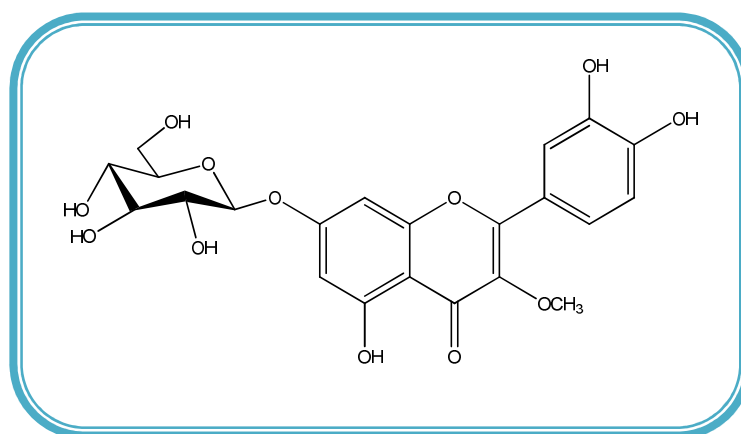
Les données spectroscopiques RMN <sup>1</sup>H de cette molécule sont reportées dans (Tableau 19). L'attribution des autres signaux a été faite par comparaison avec des structures similaires (dans le même solvant CD<sub>3</sub>OD), ( Alqasoumi 2009), la comparaison avec la littérature nous oriente vers une entité sucre de type glucose, dont le substituant sucre sera attaché au carbone C-7 et le groupement méthoxyle lié au carbone C-3.

**Tableau19:** Données de la RMN <sup>1</sup>H du composé **P9**.

Attribution	$\delta_H$ (ppm) $J$ (Hz)	Littérature (Alqasoumi 2009)
2'	7,9 (d ; 2,1)	7,64 (d; $J = 2,0$ Hz).
6'	7,61 (dd ; 8,8 – 2,1)	7,53 (dd; $J = 8,0 - 2,0$ Hz)
5'	6,92 (d ; 8,8)	6,91 (d; $J = 8$ Hz)
8	6,42(d ; 2,1)	6,39 (d; $J = 2,0$ Hz)
6	6,22(d ; 2,1)	6,20 (d ; $J = 2,0$ Hz)
3-OMe	3,90 s	3,79
1''	5,40 ( d ; 7,5)	5,08 (d; $J = 7,5$ Hz)
Protons de Sucre	3,39– 3,70	3,39 m

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

Les données relatives à ce produit comparées avec celles de la littérature ( Alqasoumi 2009), conduisent à l'identification du composé **P9** comme étant : **3-methoxy- 7-O-β-glucopyranosyl quercetine** connu sous le nom **Transiline**. Ce composé a également été isolé de *Lepisorus contortus* (Yang *et al*, 2011), et *Inula viscosa* (Oksuz, 1977). Les études antérieures ont montré qu'il possède des propriétés antiradicalaire, antimicrobienne et antipaludique (Duck, 2011).



Composé **P9** : Transiline.

## 2.6. Elucidation structurale du composé **P10**

Quatre saponosides isolés de l'extrait acétate d'éthyle (**P10-P13**) ont été analysés par RMN 1D & 2D, ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI en mode négatif et par la mesure du pouvoir rotatoire. Ce sont des dérivés avec un squelette oléan-ène (**Figure 37**) caractérisés par une double liaison en C-12.

Pour faciliter l'élucidation structurale nous avons bien détaillé la structure du composé **P10**, ensuite nous traiterons les composés (**P11- P13**).

Le composé **P10** est isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ses données de spectroscopie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) en mode négatif montre un ion quasi-moléculaire à  $m/z = 649,3926[M-H]^-$ , soit une masse moléculaire égale à 650 correspondant à une formule brute  $C_{36}H_{58}O_{10}$ .

Le spectre RMN<sup>1</sup>H (spectre 22) du composé **P10** montre :

- ✓ six signaux méthyles à  $\delta_H$  0,84 ; 0,86 ; 0,92 ; 0,98 ; 1,01 et 1,06 (3H chacun, s) caractéristiques de saponines de type triterpène.

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

- ✓ des signaux caractéristiques d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à 4,32 ppm (d ;  $J=7,8$  Hz, H-1').
- ✓ un proton oléfinique à  $\delta_H=5,56$  (1H, sl, H-12), caractéristiques grâce à sa corrélation dans le spectre HSQC ( $\delta_C=125,5$  ppm) d'un squelette triterpénique pentacyclique de type oléanène.
- ✓ un massif de protons résonant entre 0,9 - 2,37 ppm correspondant aux -CH et -CH<sub>2</sub> des cinq cycles.
- ✓ un proton résonant à  $\delta_H=3,17$ ppm, (dd,  $J=11,7-3,8$ Hz) correspond à H-3.
- ✓ une paire de protons d'un méthylène oxygénés à  $\delta_H$  3,2 et 3,5 (2H ; d ;  $J=11$  Hz).

Ce premier constat permet de déduire que ce composé est constitué d'une génine triterpénique à squelette oléanène substituée par un sucre.

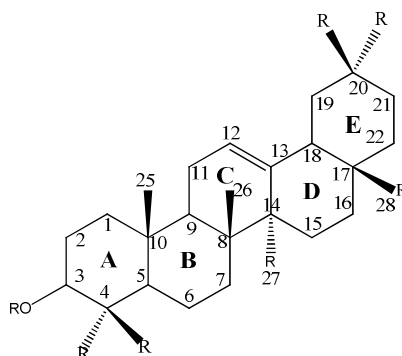
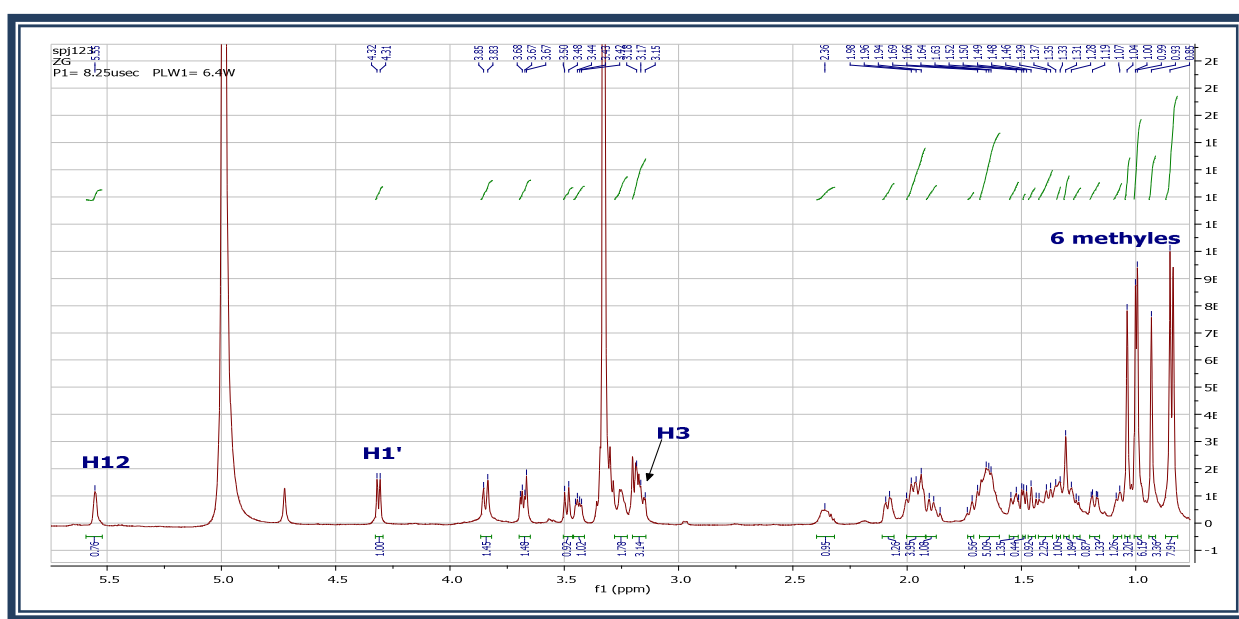


Figure 37: Squelette oléanène.

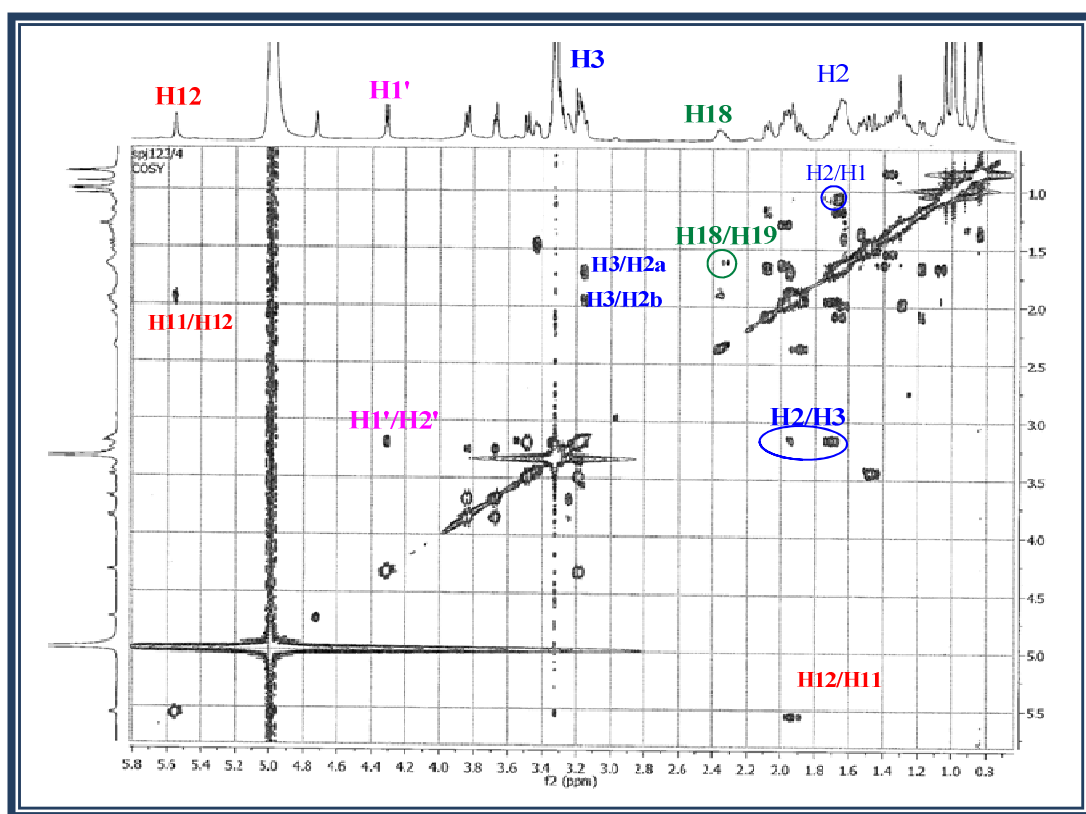


Spectre 22: Spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé P10.

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

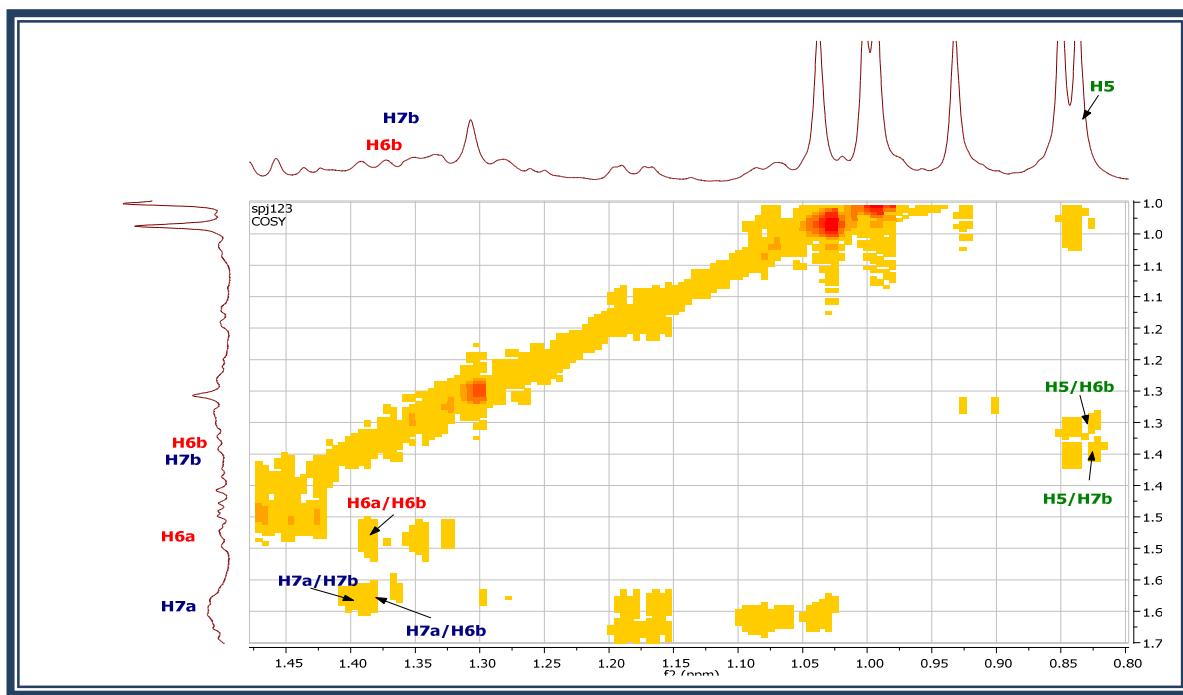
A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY (spectre 23) permet de localiser les résonances de plusieurs protons du squelette triterpénique pentacyclique. On reconnaît entre autres:

- ✓ Les protons H-2 ( $\delta_H=1,70$  ; 1,96) à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-3.
- ✓ Les protons H-1 ( $\delta_H = 1,06$  ; 1,68 ppm) à partir de leurs corrélations avec les protons vicinaux H-2.
- ✓ Les deux protons H-11 ( $\delta_H$  1,92 ; 1,95) à partir de leurs couplages avec le proton éthylénique H-12.
- ✓ Le proton H-9 à  $\delta_H= 2,08$  corrélant avec les protons H-11.
- ✓ Le proton H-18 à  $\delta_H= 2,37$  couplant avec les protons H-19.



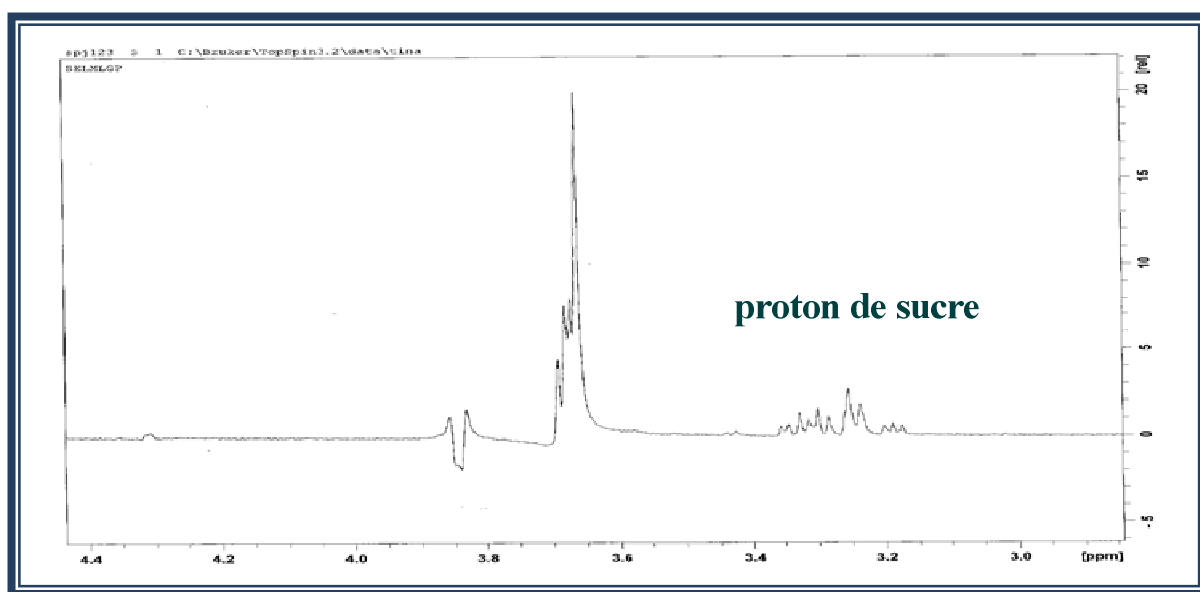
**Spectre 23:** Spectre COSY (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P10**.

A partir du proton H-5 à  $\delta_H=0,84$  ppm l'étalement du spectre COSY (spectre 23-1) montre les corrélations entre le proton H-5 et le proton H-6b ( $\delta_H=1,37$ ). Ce dernier corrèle à son tour avec le proton géminé H-6a et le proton voisin H-7b résonant à  $\delta_H=1,43$  ppm, dont les carbones sont assignés à  $\delta_C= 18$  ppm (C-6) et 36,5 ppm (C-7) selon le spectre HSQC.

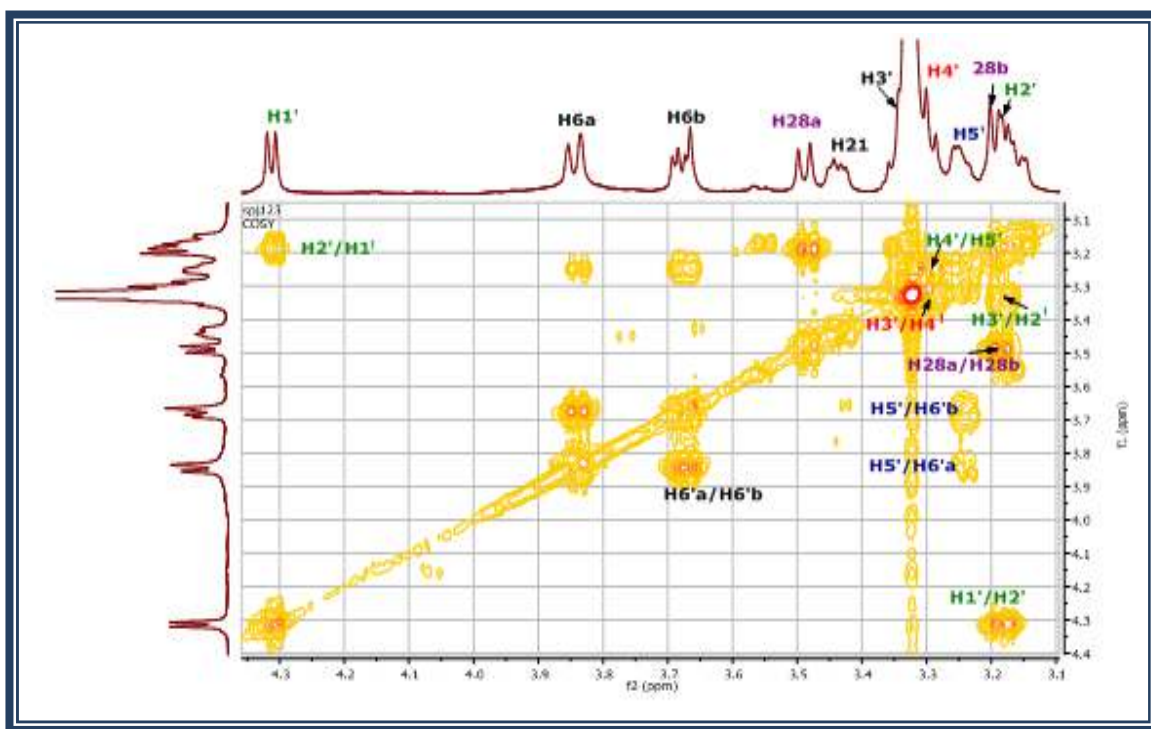
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Spectre 23-1 : étalement du spectre COSY de la partie génine du composé **P10**.

L'étalement du spectre COSY (Spectre 23-2) et l'expérience 1D-TOCSY (Spectre 24) permettent d'identifier les protons de sucre à partir du proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} = 4,32$  ppm. Les constantes de couplage vicinaux, H-1' et H-2' ( $J = 7,8$  Hz), H-2' et H-3' ( $J = 9,0$  Hz), H-3' et H-4' ( $J = 9,0$  Hz) et H-4' et H-5' ( $J = 9,0$  Hz) sont toutes supérieures à 7 Hz, révèlent qu'ils sont tous axiaux, caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucopyranose.

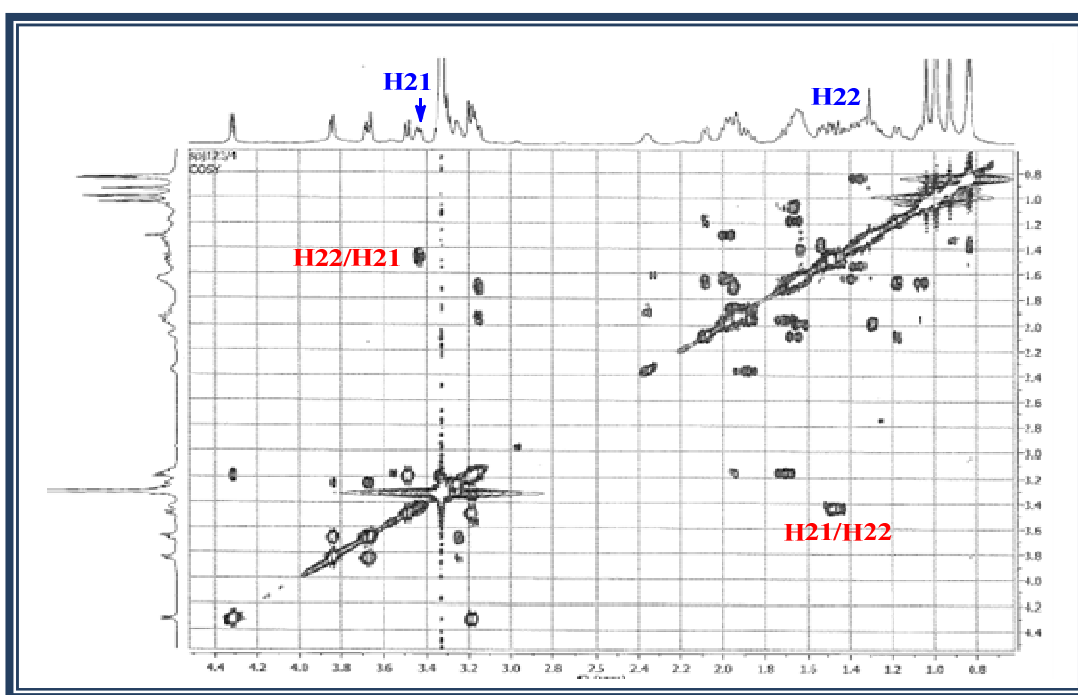


Spectre 24 : Spectre 1D-TOCSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P10**.

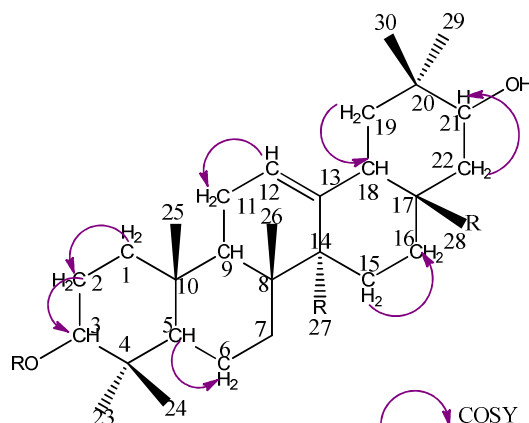
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Spectre 23-2 : étalement du spectre COSY de la partie osidique du composé P10.

L'étalement du spectre COSY (spectre 23-3) montre une tache de corrélation entre le proton résonant à  $\delta_H=3,44$  ppm et les protons résonants à  $\delta_H=1,44$  et  $1,47$  ppm, la valeur de déplacements chimiques de ces derniers permet d'attribuer ces protons aux H-22 et laisse supposer qu'un groupement OH est fixé sur le carbone C-21.

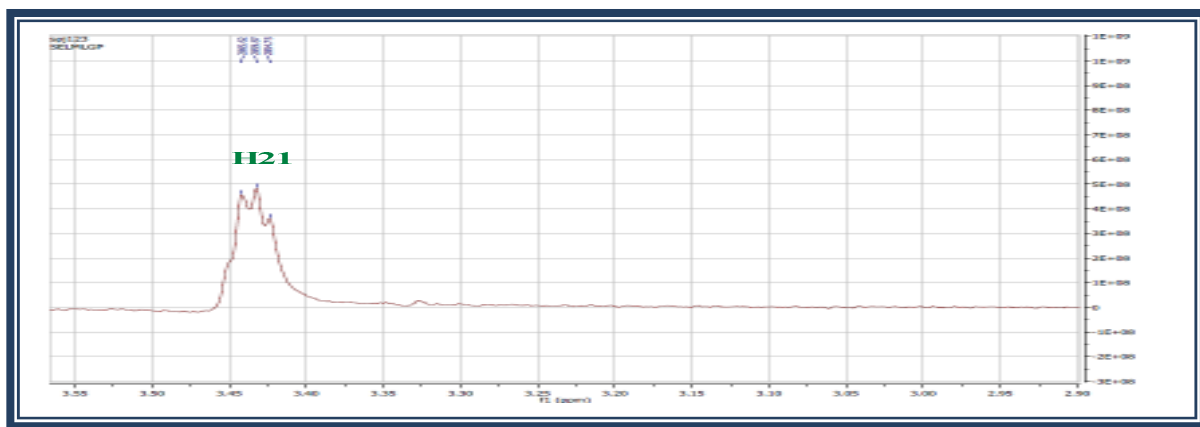


Spectre 23-3 : étalement du spectre COSY du composé P10.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

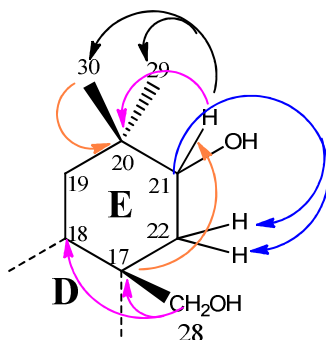
**Figure 38:** Corrélations  $2J_{H-H}$  observées sur le spectre COSY du composé **P10**.

Le spectre 1D-TOCSY (Spectre 25) montre clairement le proton H-21 sous forme d'un doublet dédoublé avec une constante de couplage ( $J = 11,4 - 6$  Hz). Le spectre HSQC (Spectre 27) permet de détecter son carbone correspondant à  $\delta_C = 73,0$  ppm.



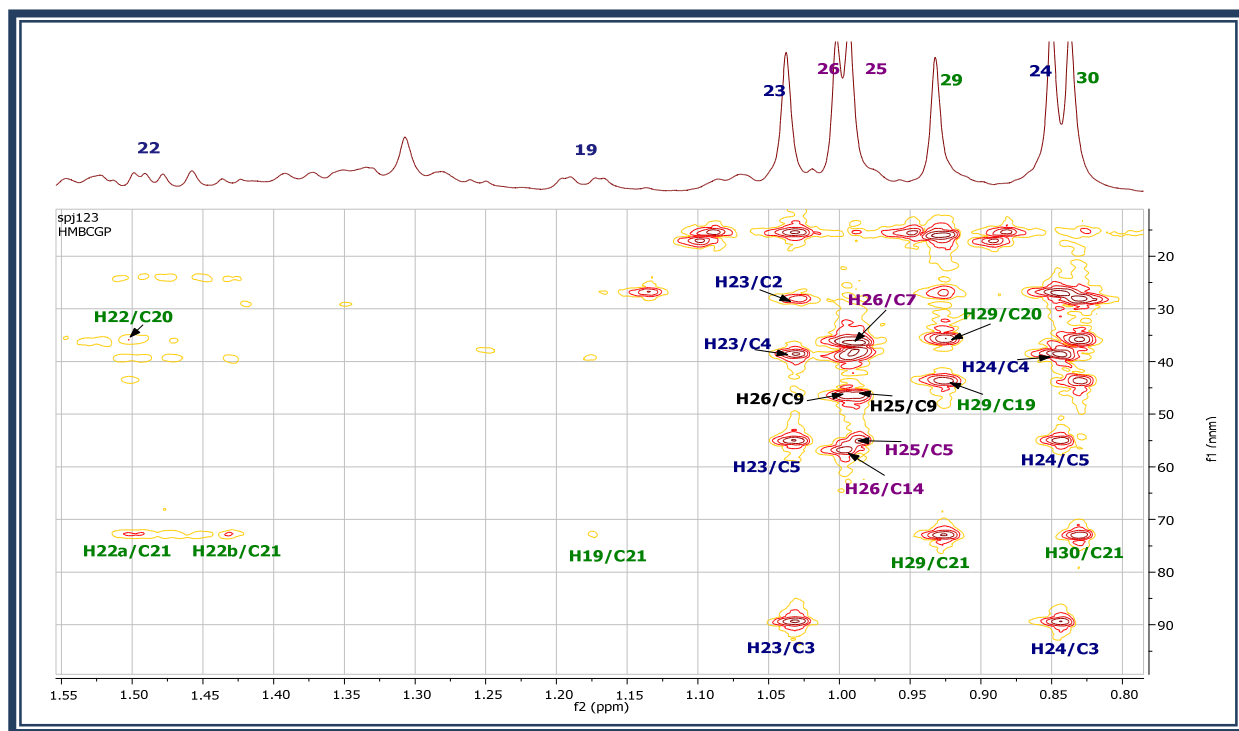
**Spectre 25 :** Spectre 1D-TOCSY ( $CD_3OD$ , 600 MHz) du composé **P10**.

L'expérience HMBC (Spectre 26) confirme la position du groupement OH sur le carbone C-21, par la corrélation observée entre le proton H-21 et les carbones: C-20, C-22, C-29 et C-30 (figure 39).



**Figure 39 :** Corrélations HMBC du cycle E.



Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 26** : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) de la partie génine du composé **P10**.

L'expérience HMBC (Spectre 26-1) montre les corrélations du carbone C-22 ( $\delta_C = 38,0$  ppm) avec deux protons résonants à 3,20 ppm et 3,50 ppm attribuables aux protons H-28. Le proton H-28a résonant à  $\delta_C = 3,50$  ppm, montre également une tache de corrélation avec un carbone résonant à  $\delta_C = 44,0$  ppm attribué au carbone C-17, ce qui permet de placer la fonction alcool primaire (CH<sub>2</sub>-OH) sur le carbone C-17, on observe également le carbone quaternaire à  $\delta_H = 43,7$  ppm corréler avec les méthyles en position 29 et 30 signifiant que ces deux groupements sont portés par ce noyau qui correspond à C-20 (spectre 26).

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre 26), le méthyle-26 couple avec le carbone C-9 (44,6 ppm), le carbone C-7 (36,5 ppm) et les carbones quaternaires C-8 (40 ppm) et C-14 (56,0 ppm). Le déplacement chimique du C-14 est fortement déblindé à 56 ppm, de même pour le C-7 déblindé à  $\delta_C = 36,5$  ppm, ces valeurs sont indicatives de la présence d'une fonction carboxylique en C-27 (Boutaghane *et al*, 2013). (figure 40) (tableau 20).

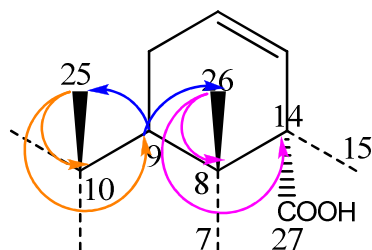
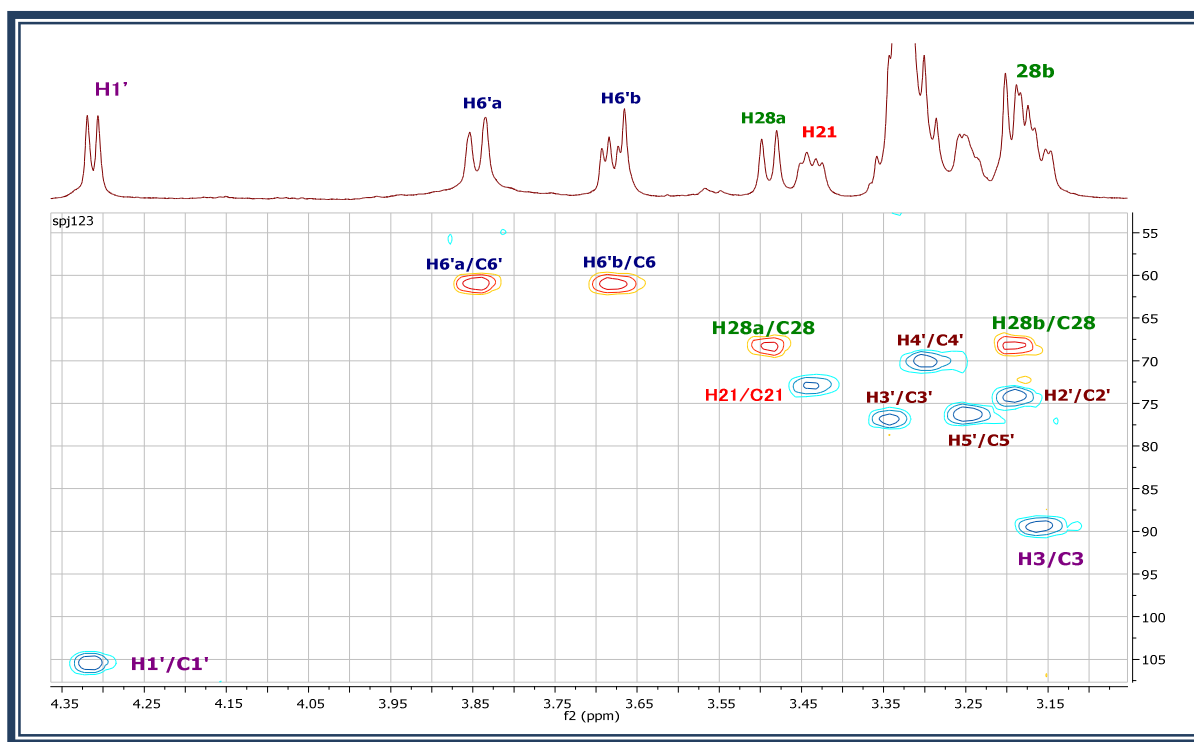
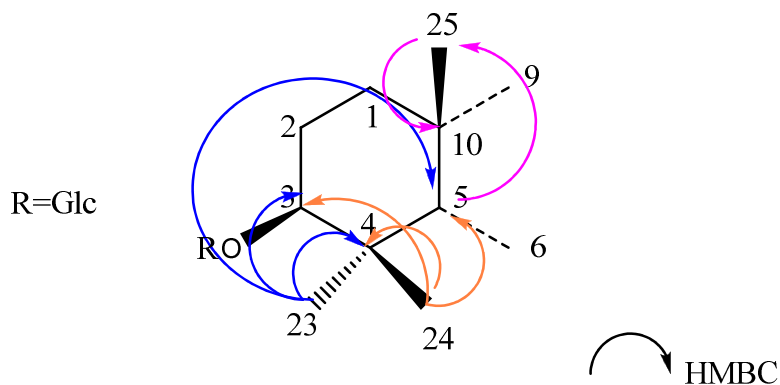
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Figure 40: Corrélations HMBC des protons 25 et 26.

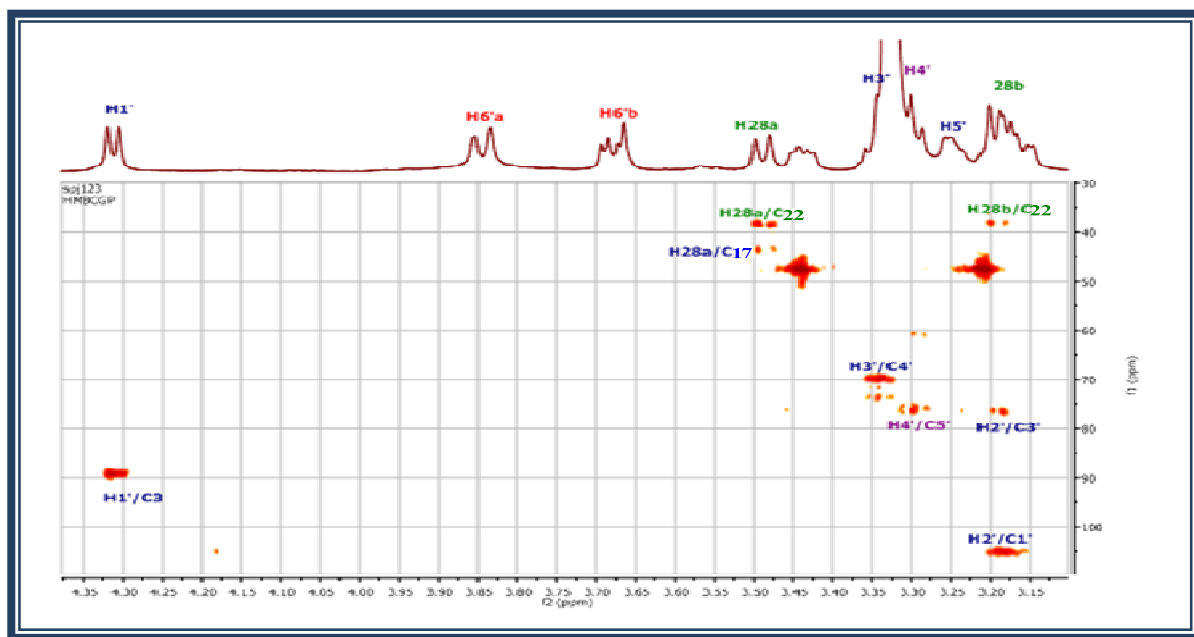
Spectre27 : HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) de la partie osidique du composé **P10**.

On observe sur l'étalement de spectre HMBC (spectre 26) que les méthyles 23 et 24 à  $\delta_{\text{C}} = 1,06$  ppm et  $\delta_{\text{C}} = 0,86$  ppm respectivement corrélient avec le carbone C-3. Ces méthyles couplent également avec le carbone quaternaire C-4 (38,0 ppm) et le carbone C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 55,0$  ppm) qui corrélie aussi avec les protons méthyliques en 25 à  $\delta_{\text{C}} = 0,98$ ppm (figure 41).

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

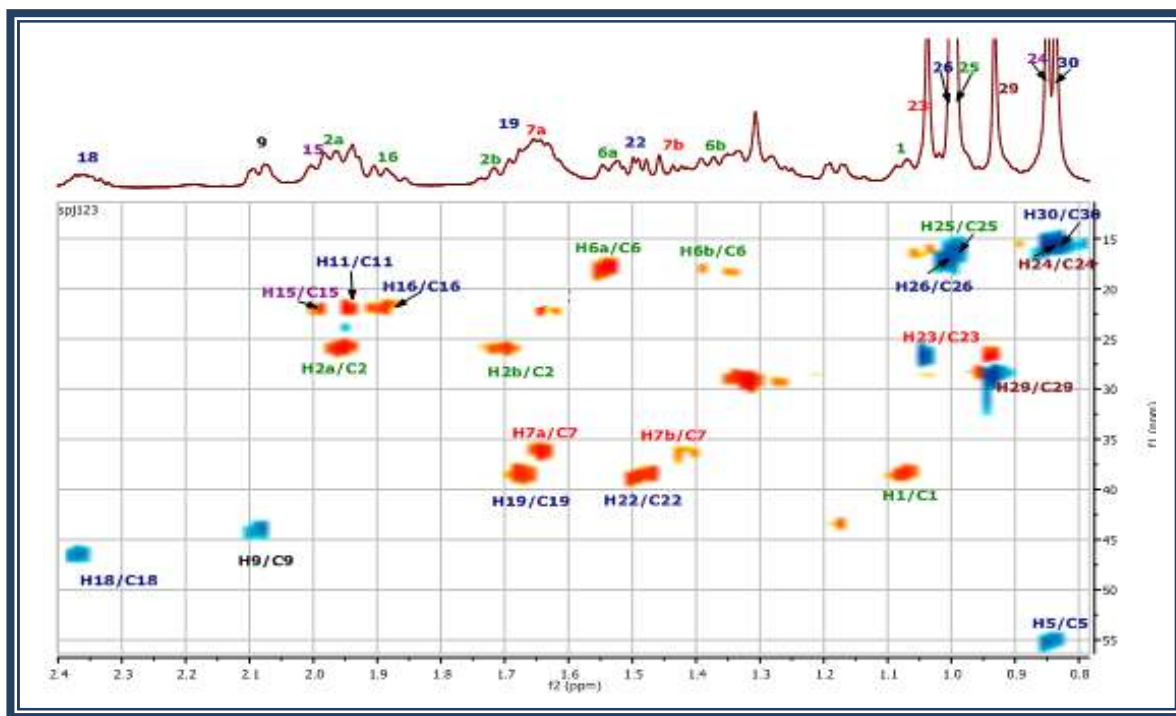
**Figure 41 :** Corrélations  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  des protons 23,24 et 25 observés sur le spectre HMBC.

La corrélation observée sur le spectre HMBC (Spectre 26-1) entre le proton H-1' et le carbone résonant à  $\delta_C = 89,5$  ppm attribuable au carbone C-3 indique que le sucre est lié au carbone C-3 de la génine.



**Spectre 26-1:** Spectre HMBC ( $CD_3OD$ , 600MHz) de la partie osidique du composé **P10**.

L'analyse des couplages hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  visualisés sur le spectre HSQC (Spectre 27-1) permet d'attribuer les carbones (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-9, C-11, C-12, C-15, C-16).



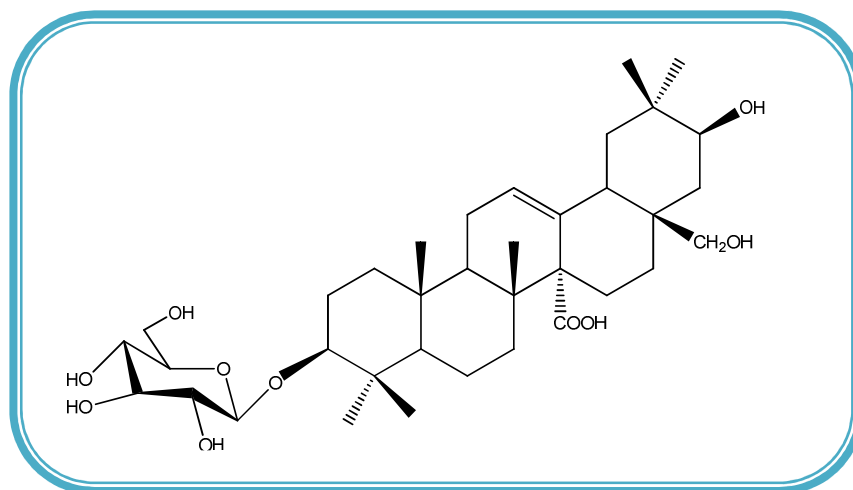
**Spectre 27-1** : spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) de la partie génine du composé **P10**.

La configuration de l'unité D-glucose a été établie par hydrolyse acide du composé **P10** avec HCl (1N). Le pic de l'hydrolysate a été détecté par comparaison avec les temps de rétention d'un échantillon authentique de D-glucose (Sigma Aldrich) après traitement avec le 1- (triméthylsilyl) imidazole dans la pyridine.

La stéréochimie des carbones asymétriques est déterminée par l'analyse des valeurs des constantes de couplage calculées à partir du spectre RMN <sup>1</sup>H. A titre d'exemple la stéréochimie  $\alpha$ -axiale du proton H-3 est établie par la valeur de constante de couplage  $^3J_{3ax-2ax}$  (dd ;  $J=11,7-3,8$  Hz). De même, l'orientation  $\alpha$ -axiale du proton H-21 est déduite de la valeur de la constante de couplage  $^3J_{21ax-22ax}$  (dd,  $J=11,4-6,0$  Hz) ce qui indique que le proton H-21 est orienté axialement et l'hydroxyle est équatorial.

Le pouvoir rotatoire de composé **P10** est :  $[\alpha]_D: +32^\circ$  (c 0,1 ; MeOH).

L'ensemble de ces données reportées dans le tableau 20 ont permis d'attribuer au composé **P10** la structure d'une nouvelle saponine: l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène 3 $\beta$ ,21 $\beta$ ,28-triol-27-carboxylique. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans la littérature.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Composé **P10** : l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,21 $\beta$ ,28-triol-27-carboxylique.

**Tableau 20:** Données de la RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **P10**.

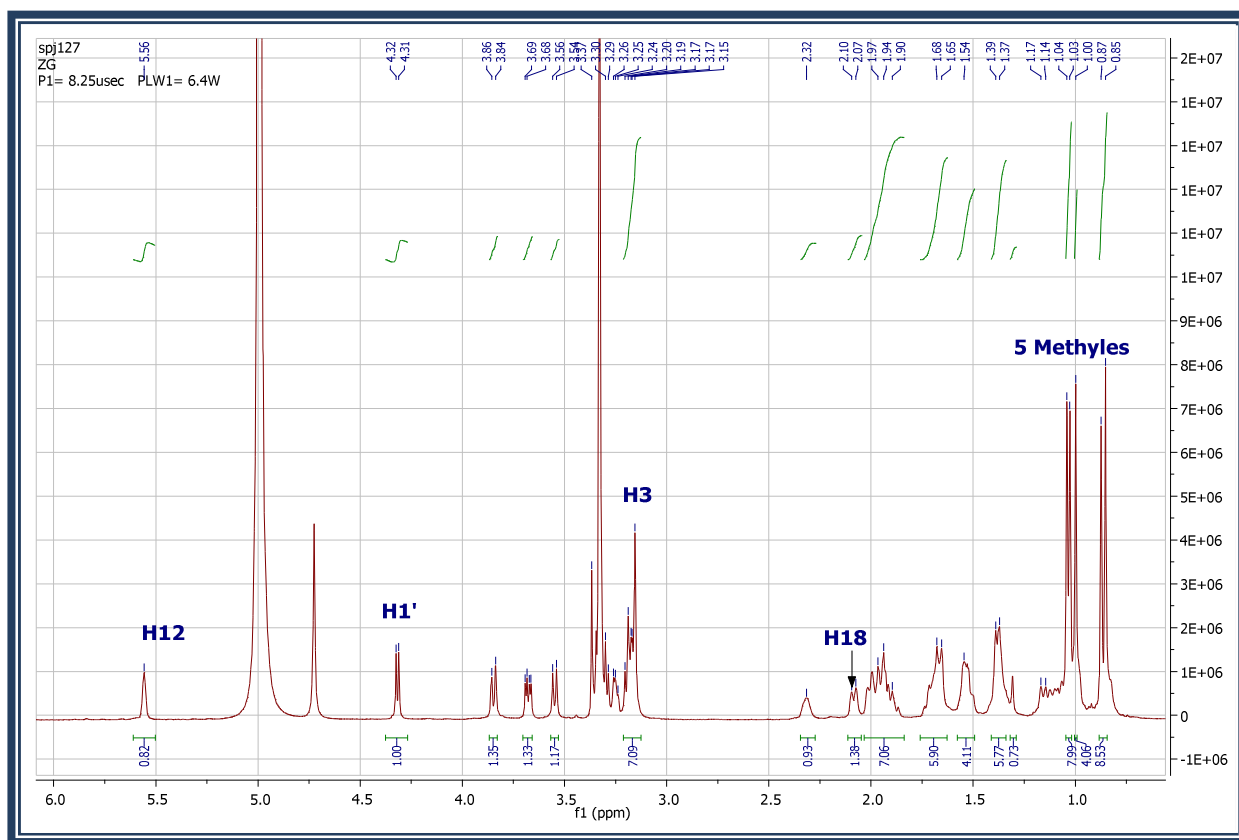
n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)
1	38,6	1,06 dd(10,8 –4,5);1,68	20	43,7	-
2	26,3	1,70 ; 1,96	21	73,0	3,44 dd (11,4 – 6,0)
3	89,5	3,17dd (11,7- 3,8)	22	38,0	1,47 ; 1,44
4	38,0	-	23	27,0	1,06 (s)
5	55,0	0,84	24	15,6	0,86 (s)
6	18,0	1,37 (m) ; 1,54 (m)	25	15,6	0,98 (s)
7	36,5	1,43 ; 1,66	26	16,0	1,01 (s)
8	40,0	-	27	174	-
9	44,6	2,08dd (14,4 - 4,5)	28	68,9	3,2 d (11,0) ; 3,5 d (11,0)
10	38,0	-	29	29,0	0,92 (s)
11	21,9	1,92 -1,95	30	15,6	0,84 (s)
12	125,5	5,56 sl	Glc (en C-3)		
13	150,0	-			
14	56,0	-	1'	105,9	4,32 d ( 7,8)
15	22,4	2,0 ddd(16,0- 14,0-5,0) ;1,64	2'	74,2	3,2 dd (9,0 - 7,8)
16	22,1	1,7; 1,63	3'	76,8	3,35 t (9,0)
17	44,0	-	4'	70,0	3,31 t (9,0)
18	46,8	2,37dd (13,0; 4,0)	5'	76,4	3,25 m
19	38,6	1,50; 1,68	6'	61,0	3,85 dd (12,0 – 3,5) 3,66dd (12- 5,0)

## 2.7. Elucidation structurale du composé P11

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$ , COSY et HSQC de ce composé présentent de fortes similitudes avec celui du composé **P10**.

En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (spectre 28) présente :

- ✓ 5 cinq signaux singulets fins attribuables aux méthyles résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1,04 (*s*, Me-23) ; 0,85 (*s*, Me-24) ; 1,0 (*s*, Me-25) ; 1,03 (*s*, Me-26) et 0,87 (*s*, Me-30) correspondant aux cinq méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.
- ✓ un proton H-3 résonant  $\delta_{\text{H}} = 3,16$  ppm.
- ✓ un proton oléfinique à  $\delta_{\text{H}} = 5,56$  ppm, (*sl*, H-12).
- ✓ un proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} = 4,31$  ppm (*d*,  $J = 7,8$  Hz).

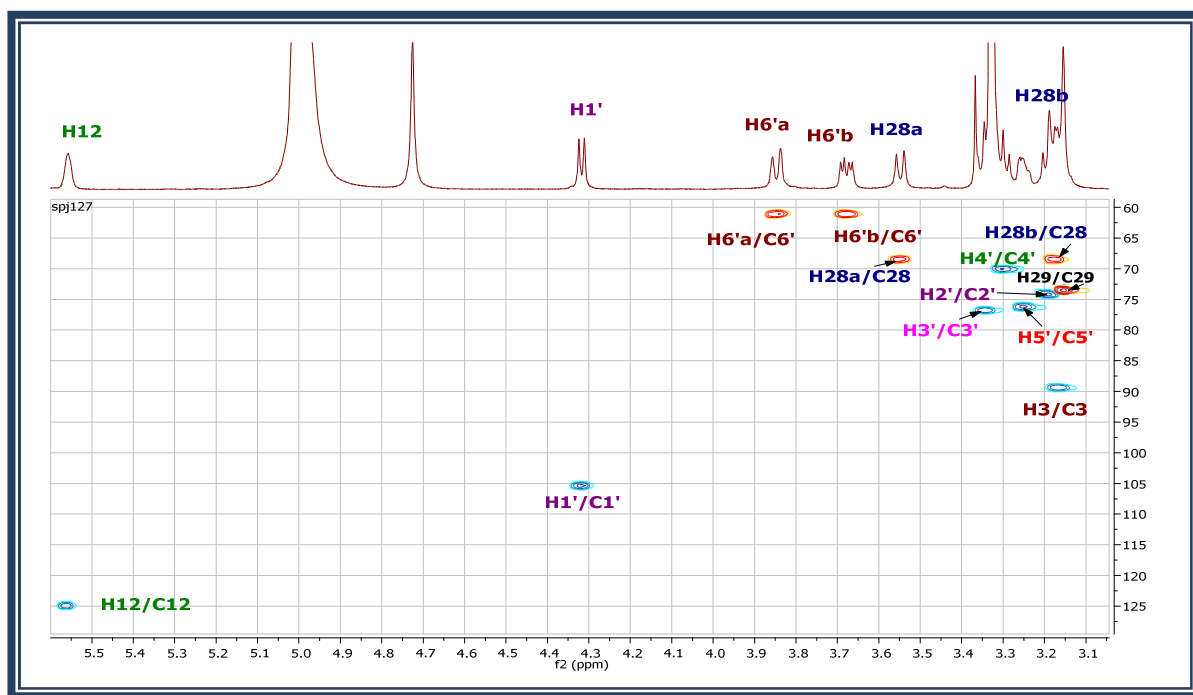


**Spectre 28:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) du composé **P11**.

Une comparaison avec le spectre de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC du composé **P10** décrit précédemment montre la disparition du proton oxyméthine H-21, la disparition du méthyle 29 et l'apparition

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

d'un signal résonnant à  $\delta_H$  3,15/  $\delta_C$  73,5, caractéristique d'une fonction alcoolique primaire porté par le carbone C-29, identifié à l'aide des expériences HSQC et HMBC.



**Spectre 29:** Spectre HSQC ( $CD_3OD$ , 600MHz) de la partie osidique du composé **P11**.

Le spectre HMBC (spectre 30) montre une corrélation entre le carbone à  $\delta_C = 179$  ppm de la fonction  $COOH$  et les protons à  $\delta_H = 1,68$  et  $2,00$  ppm correspondants d'après leur déplacement chimiques aux protons H-15, qui corrént à leur tour avec le (C-14) à  $\delta_C = 56,6$  ppm, le déplacement chimique de ce dernier indique que le groupement carbonyle est porté par le carbone C-14.

Le déblindage du signal à  $\delta_C = 73,56$  ppm (C-29) pour le méthyle oxygéné ainsi les valeurs des déplacements chimiques (Tableau 21) indique l'oxydation du méthyle 29 en alcool primaire, ceci est confirmé par les corrélations HMBC (Spectre 30) entre :

- ✓ Les protons H-29 à  $\delta_H = 3,15$  ppm avec les carbonnes C-20 et C-30.
- ✓ Les protons H-30 à  $\delta_H = 0,87$  ppm avec le carbone C-29.

Les déplacements chimiques des protons méthyliques 23, 24, 25, 26 et 30 résonants sous la forme de cinq fins singulets ne montrent pas de variations significatives au sein des composés **P10** (Tableau 20) et **P11** (Tableau 21).

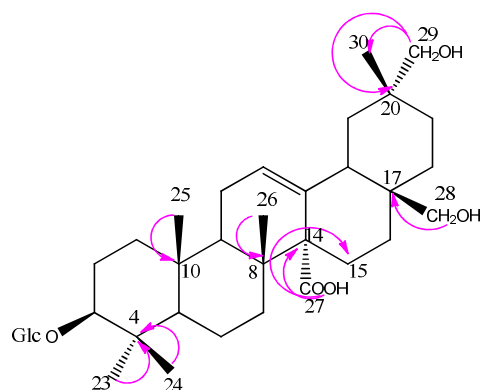
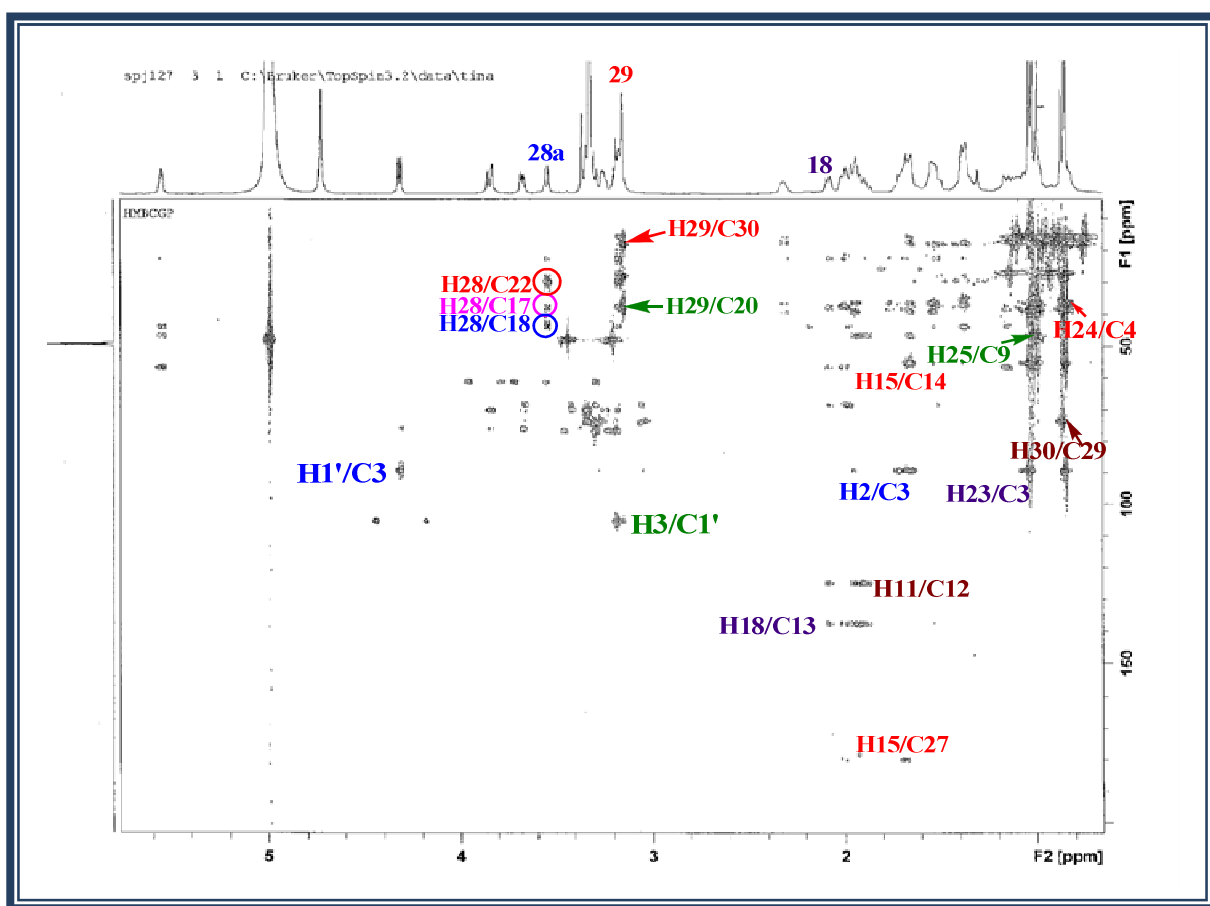
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Figure 42 : Corrélations HMBC du composé P11.

Spectre 30 : spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) du composé P11.➤ *Partie osidique*

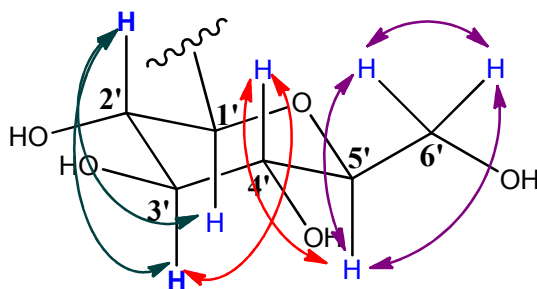
A partir du proton anomérique l'analyse de spectre COSY (spectre 31), permet de repérer un système de spins à sept protons attestant ainsi la présence d'un hexose.



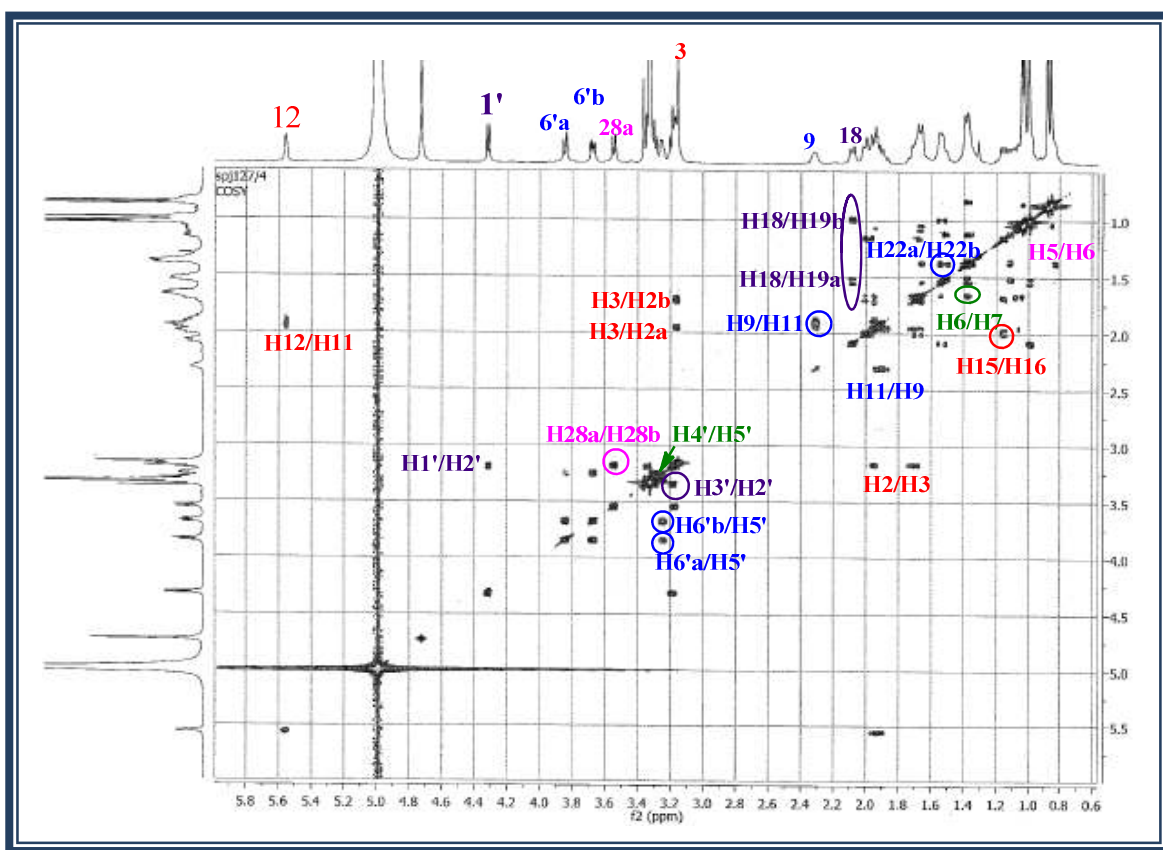
*Identification des produits isolés de Genista numidica*

En effet les couplages entre les protons suivants sont visualisés:

- ✓ H-2' / H-1' et H3'
- ✓ H-4' / H-3' et H5'
- ✓ H5' / H-6'a et H-6'b



**Figure 43:** Corrélations COSY du  $\beta$ -D-glucose.



**Spectre 31:** Spectre COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz) du composé **P11**.

### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

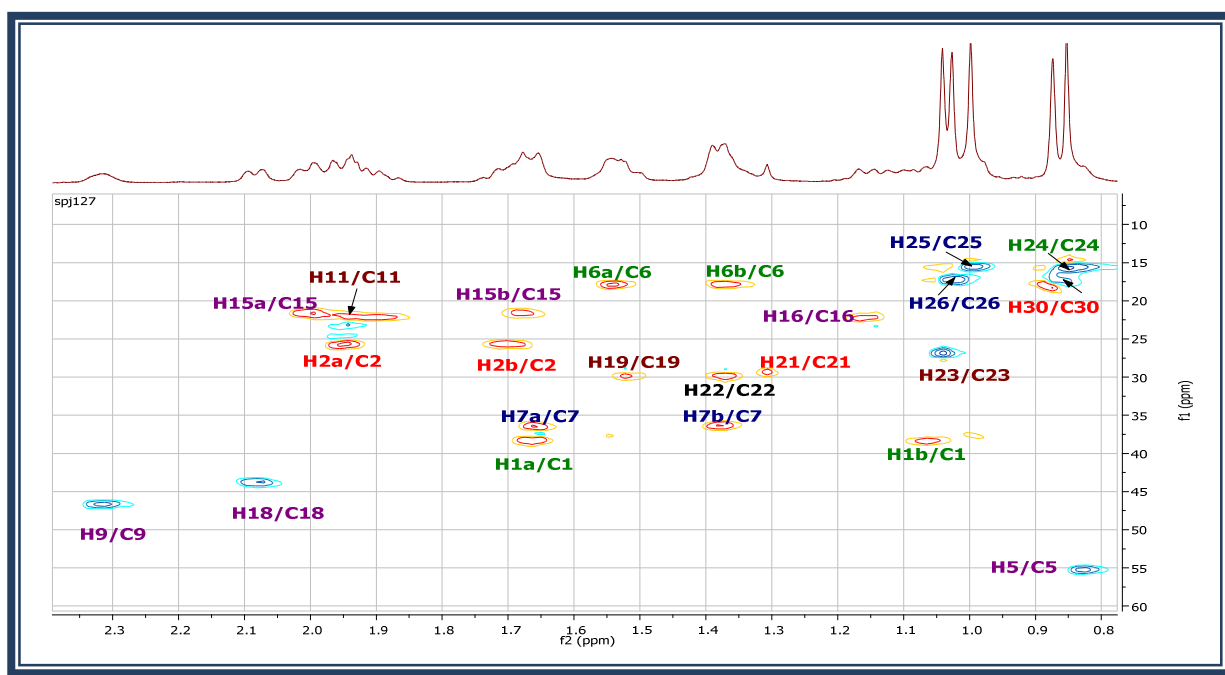
Les atomes de cette entité sucre sont identifiés par analyse des spectres HSQC (Spectre 29) et COSY (Spectre 31) :

- ✓ Le proton H-1' à  $\delta_H = 4,31$  ppm son carbone à  $\delta_C = 105,3$  ppm (C-1').
- ✓ Le proton H-2' à  $\delta_H = 3,20$  ppm son carbone à  $\delta_C = 74,25$  ppm (C-2').
- ✓ Le proton H-3' à  $\delta_H = 3,35$  ppm son carbone à  $\delta_C = 77,0$  ppm (C-3').
- ✓ Le proton H-4' à  $\delta_H = 3,30$  ppm son carbone à  $\delta_C = 70,0$  ppm (C-4').
- ✓ Le proton H-5' à  $\delta_H = 3,25$  ppm son carbone à  $\delta_C = 76,2$  ppm (C-5').
- ✓ Les deux protons H-6' à  $\delta_H = 3,66$  et  $3,84$  ppm, leur carbone à  $\delta_C = 61,2$  ppm (C-6').

Les spectres RMN  $^1H$ , HSQC et COSY montre que la partie osidique de ce composé est identique à celle du composé **P10**. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones sont en accord avec celles d'un  $\beta$ -D-glucopyranose (Tableau 21).

La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (spectre 30) entre le proton anomérique H-1' résonnant à  $4,31$  ppm et le carbone C-3 de la génine indique que l'unité glucose est attachée à l'hydroxyle en position 3 de la génine.

L'expérience HSQC (Spectre 29-1) permet de détecter les protons portés par ses carbones apparaissant à  $\delta_H 1,37$  ppm (H-22) ;  $1,3$  ppm (H-21), ainsi que les carbones C-3 ( $\delta_C = 89,36$  ppm), C-12 ( $\delta_C = 125$  ppm) et C-18 ( $\delta_C = 44$  ppm).

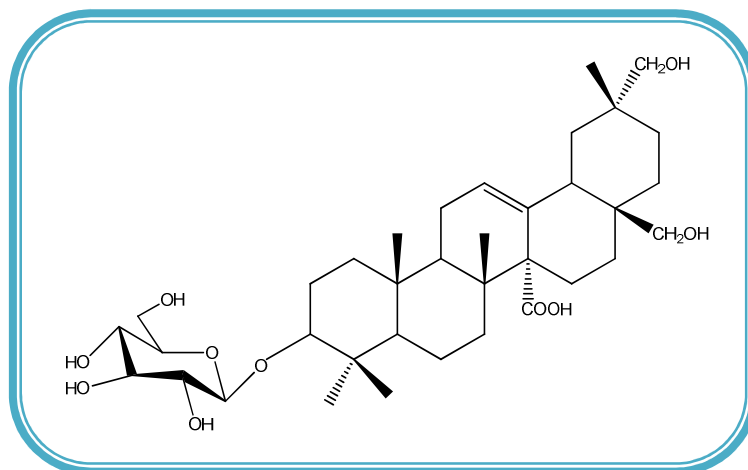


**Spectre 29-1** : Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de la génine du composé **P11**.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*Tableau 21 : Données de la RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P11**.

n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)
1	38,6	1,06 m ; 1,66 m	20	38,0	-
2	26,0	1,70 m ; 1,95 m	21	29,3	1,3sl
3	89,36	3,16 m	22	29,81	1,37 m
4	38,8	-	23	27,05	1,04 s
5	55,4	0,82	24	15,4	0,85 s
6	17,86	1,37 m; 1,54 m	25	15,6	1,00 s
7	36,4	1,36 m ; 1.66 m	26	17,1	1,03 s
8	39,5	-	27	178,0	-
9	46,7	2,31dd (10,1- 6,0)	28	68,4	3,17 ; 3,54 d(11,0)
10	37,0	-	29	73,56	3,15sl
11	22,04	1,9m ; 1,94 m	30	17,6	0,87 s
12	125,0	5,56sl	Glc (en C-3)		
13	137,0	-			
14	56,6	-	1'	105,3	4,31 d (7,8)
15	21,06	1,68 m ; 2,00 m	2'	74,25	3,20
16	22,06	1,16 m	3'	77,0	3,35
17	37,0	-	4'	70,0	3,30
18	44,0	2,07dd (13,1 – 4,1)	5'	76,2	3,25 m
19	29,61	1,09 m - 1,52 m	6'	61,2	3,84 dd (12,0 – 3,5) 3,66 dd (12- 5,0)

La structure du composé **P11** a pu être établie comme étant : l'**acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ , 28,29-triol-27-carboxylique**. Ce composé est de structure connue, précédemment isolé de *Genista ulcina* (Boutaghane *et al.*, 2013). Les données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont en accord avec ceux de la littérature (Boutaghane *et al.*, 2013).



Composé **P11** : l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,28,29-triol-27-carboxylique

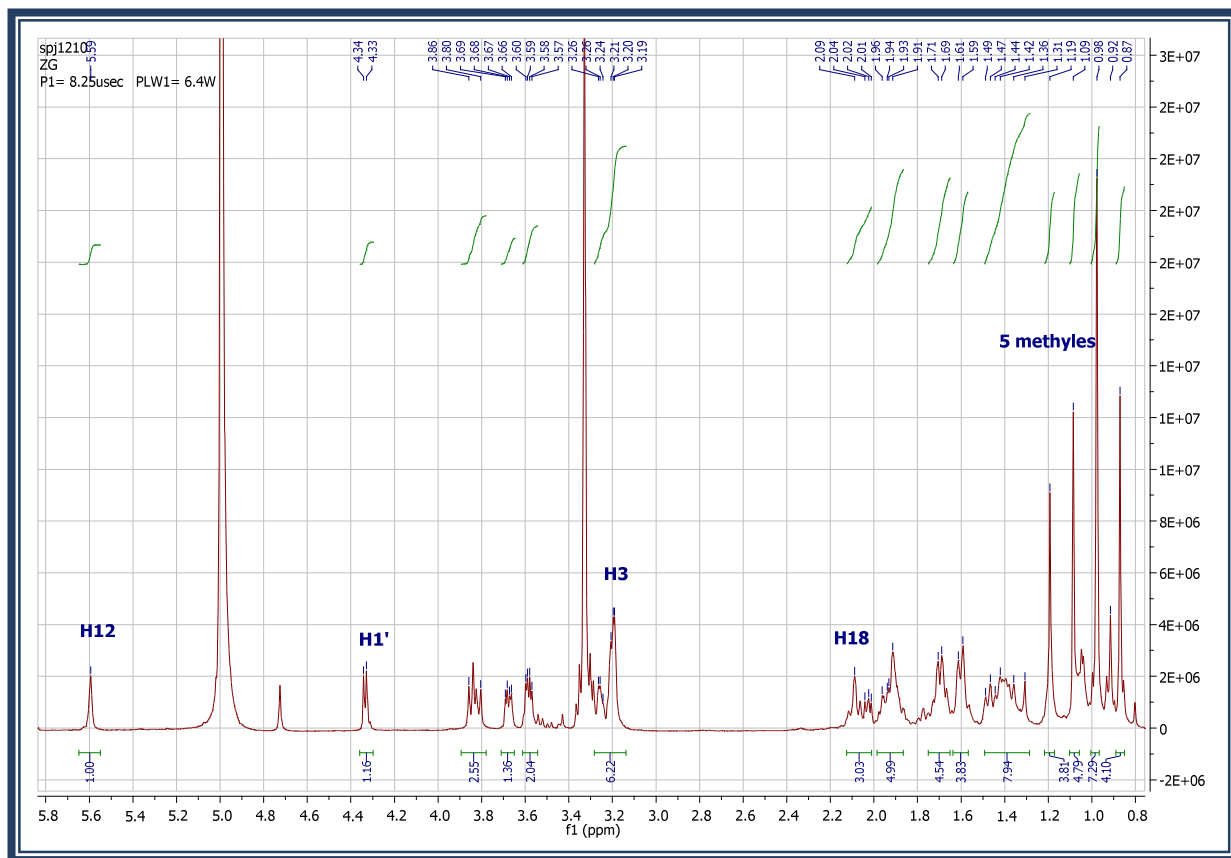
## 2.8. Elucidation structurale du composé P12

Le composé **P12** est obtenu sous forme de poudre blanche soluble dans le méthanol. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HMBC de ce composé est très proche de celui du composé **P11**.

En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine et du glucose, la seule différence notable réside au niveau de la génine et cela par la position du carbonyle.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 32) montre :

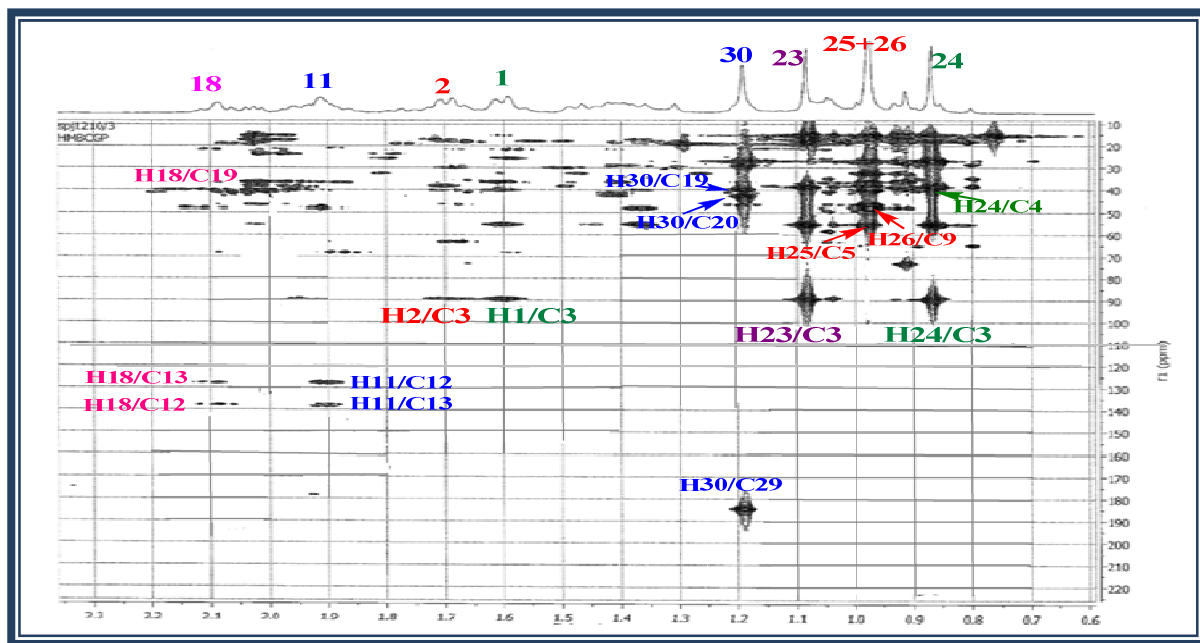
- ✓ un massif de protons repéré entre 0,85 à 2,21 ppm, correspondant aux méthines et méthylènes des cinq cycles.
- ✓ les protons H-3, H-12 et H-18 caractéristique des squelettes triterpéniques pentacycliques résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,20, 5,59 (*sl*) et 2,1(*s*).
- ✓ les méthyles repérés entre 0,8 et 1,2 ppm
- ✓ un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  = 4,34 ppm correspond à un proton anomérique.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 32** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P12**.

Le déblindage des protons H-19 résonants à  $\delta_{\text{H}} = 1,43$  et  $2,09$  ppm, H-21 résonant à  $\delta_{\text{H}} = 1,8$  ppm et des protons du méthyle H -30 résonants à  $\delta_{\text{H}} = 1,20$  ppm sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  indique bien la présence d'un carbonyle libre en C-20. Cette attribution est confirmée par le spectre HMBC (Spectre 33) qui montre une tache de corrélation des protons du méthyle H- 30 avec le carbone C-29 résonant à  $\delta_{\text{C}} = 184,0$  ppm.

Le spectre HSQC (Spectre 34 ) montre également deux systèmes AB dont l'un résonne à  $\delta_{\text{C}} = (3,56$  et  $3,81$  ppm) et l'autre à  $\delta_{\text{H}} = (3,19$  et  $3,57$  ppm) correspondant à deux alcools primaires en C-27 et C-28, ceci est confirmé par les corrélations observé sur le spectre HMBC (Spectre 33-1) entre le carbone C-14 ( $46,9$  ppm) et les protons H-27 d'une part, et la corrélation des protons H-28 avec le C-17 ( $37,0$  ppm) d'une autre part.

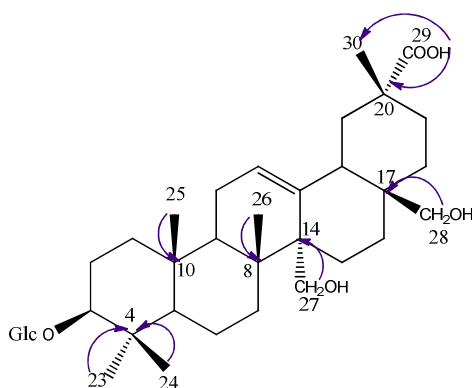
Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 33** : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de la partie génine du composé **P12**.

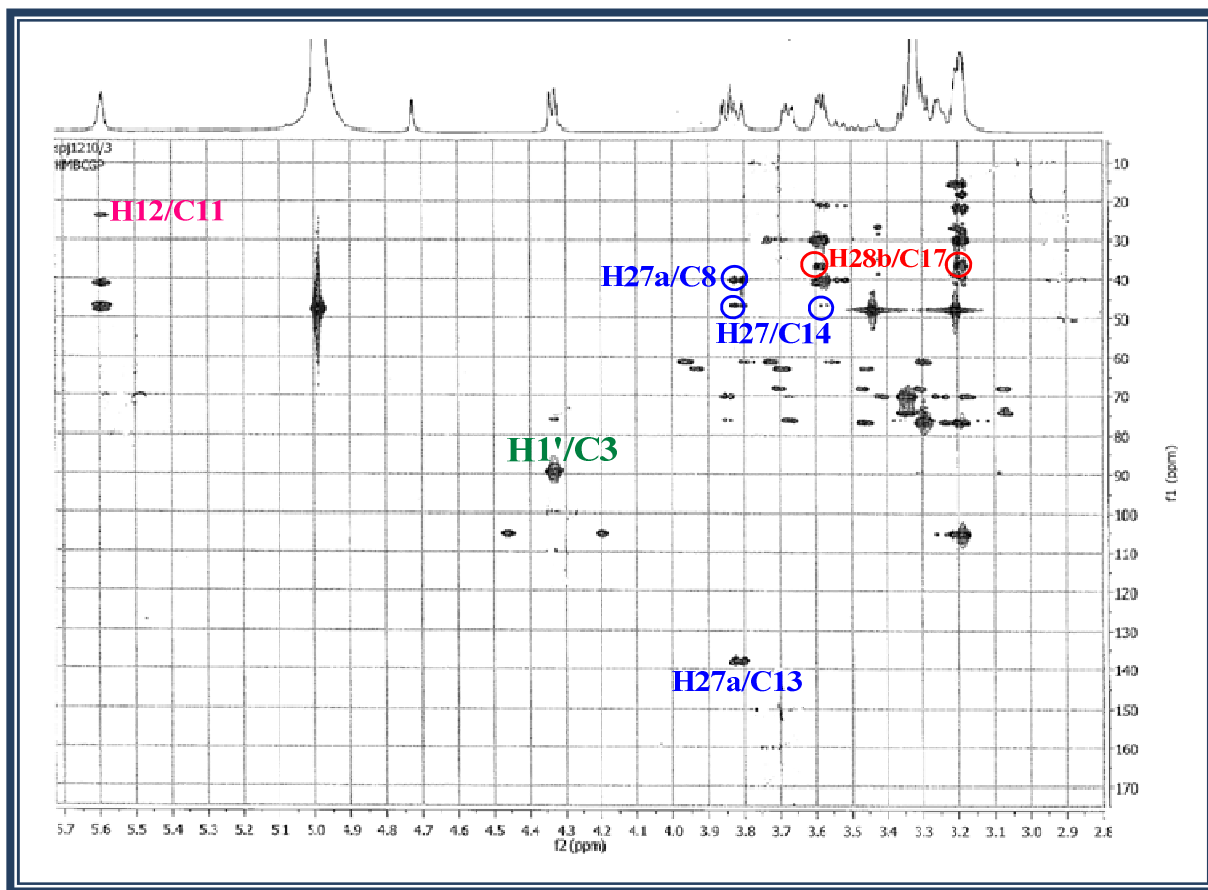
Les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-23 ( $\delta_H = 1,10$  ppm) et CH<sub>3</sub>-24 ( $\delta_H = 0,88$  ppm) sont repérés suite aux corrélations qu'ils présentent sur le spectre HMBC (spectre 33) avec le carbone oxyméthine C-3. Ces méthyles corrént également avec 2 carbones détectés à  $\delta_C = 55,3$  et  $\delta_C = 40,0$  ppm correspondant aux carbones C-5 et C-4 respectivement.

Les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-25 ( $\delta_H = 0,99$  ppm) couplent avec deux autres carbones C-9 ( $\delta_C = 48,0$  ppm) et un quaternaire C-10 ( $\delta_C = 36,5$  ppm) (spectre 33). Le spectre HSQC (Spectre 34-1) permet d'attribuer le proton H-5 à  $\delta_H = 0,92$  ppm

Le CH<sub>3</sub>-26 ( $\delta_H = 0,99$  ppm) est identifié suite aux couplages qu'ils présentent sur le spectre HMBC (Spectre 33) avec le carbone C-9 et deux carbones quaternaires C-8 ( $\delta_C = 40,8$  ppm) et C-14 ( $\delta_C = 46,9$  ppm).



**Figure 44**: Corrélations HMBC du composé **P12**.



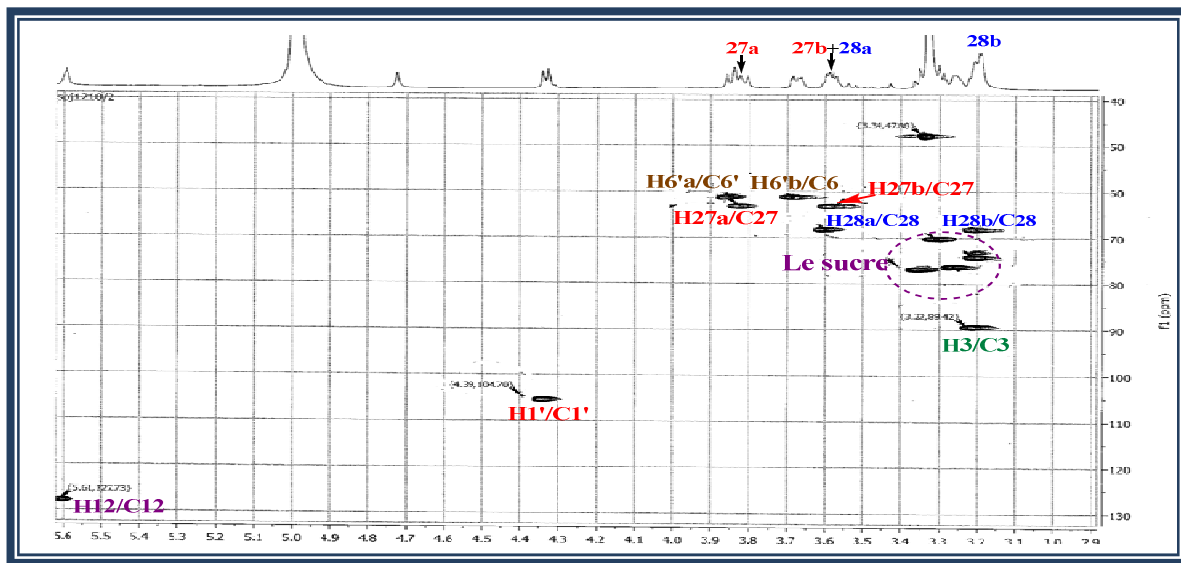
**Spectre 33-1** : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de la partie osidique du composé **P12**.

### ➤ *Partie osidique*

A partir du proton anomérique à  $\delta_C = 4,34$  ppm et l'analyse du spectre COSY (Spectre 35), sept protons d'un hexose sont attribués. Les grandes valeurs des constantes de couplage ( $> 7$  Hz) indiquent qu'il s'agit d'un  $\beta$ -D-glucopyranose (Tableau 22).

La position des carbones sont attribués à partir de l'expérience HSQC (Spectre 34) à :  $\delta_C = 105,0$  ppm (C-1');  $\delta_C = 74,1$  ppm (C-2');  $\delta_C = 76,3$  ppm (C-3');  $\delta_C = 70,2$  ppm (C-4');  $\delta_C = 76,1$  ppm (C-5') ;  $\delta_C = 61,2$  ppm (C-6').

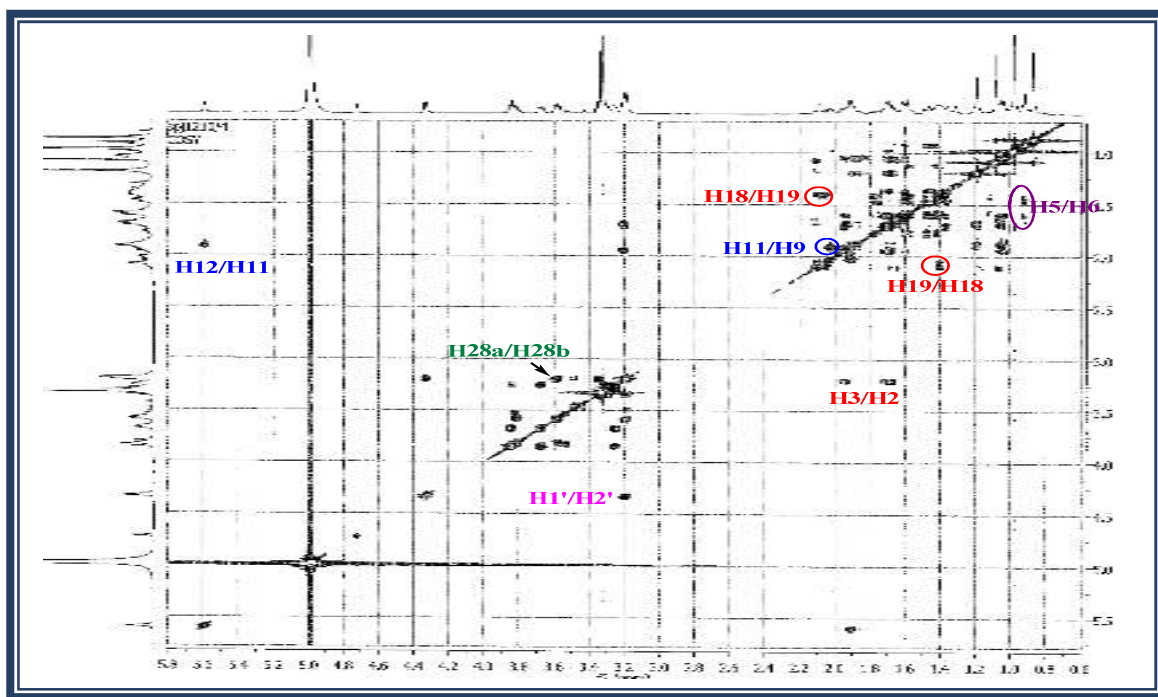
La substitution en position C-3 de la génine par un glucose est établie par la présence d'une tache de corrélation  $^3J_{H-C}$  entre H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine observée sur le spectre HMBC (Spectre 33-1).

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 34** : Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) de la partie osidique du composé **P12**.

A partir des protons caractéristiques individualisés et identifiés précédemment, l'expérience COSY (spectre 35) permet d'identifier la plupart des protons non analysables directement sur le spectre de RMN 1H résonant entre 0,91 et 2,20 ppm :

- ✓ les protons H-2 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-3.
- ✓ les deux protons H-11 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-12.
- ✓ les deux protons H-19 vicinaux avec le proton H-18.
- ✓ les deux protons H-6 vicinaux avec le proton H-5.



**Spectre 35** : Spectre COSY (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P12**.



### Identification des produits isolés de *Genista numidica*

La stéréochimie des centres asymétriques de la partie génine de ce composé a été établie par comparaison avec des données de la littérature (Boutaghane et al, 2013) Cette expérience révèle les mêmes interactions constatées pour les deux saponines P10 et P11.

- ✓ l'orientation  $\alpha$ -axiale du proton H-3.
- ✓ l'orientation  $\beta$ -axiale du proton H18.

L'expérience HSQC (spectre 34-1) permet d'attribuer les carbones C-1, C-2, C-9, C-11 et C-19

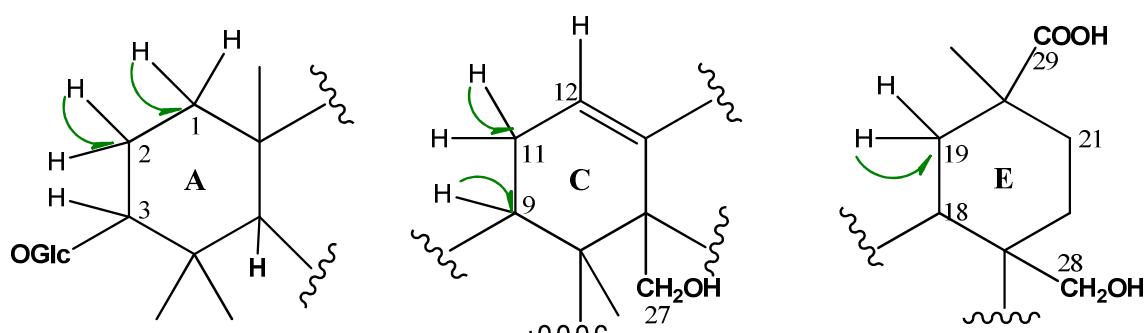
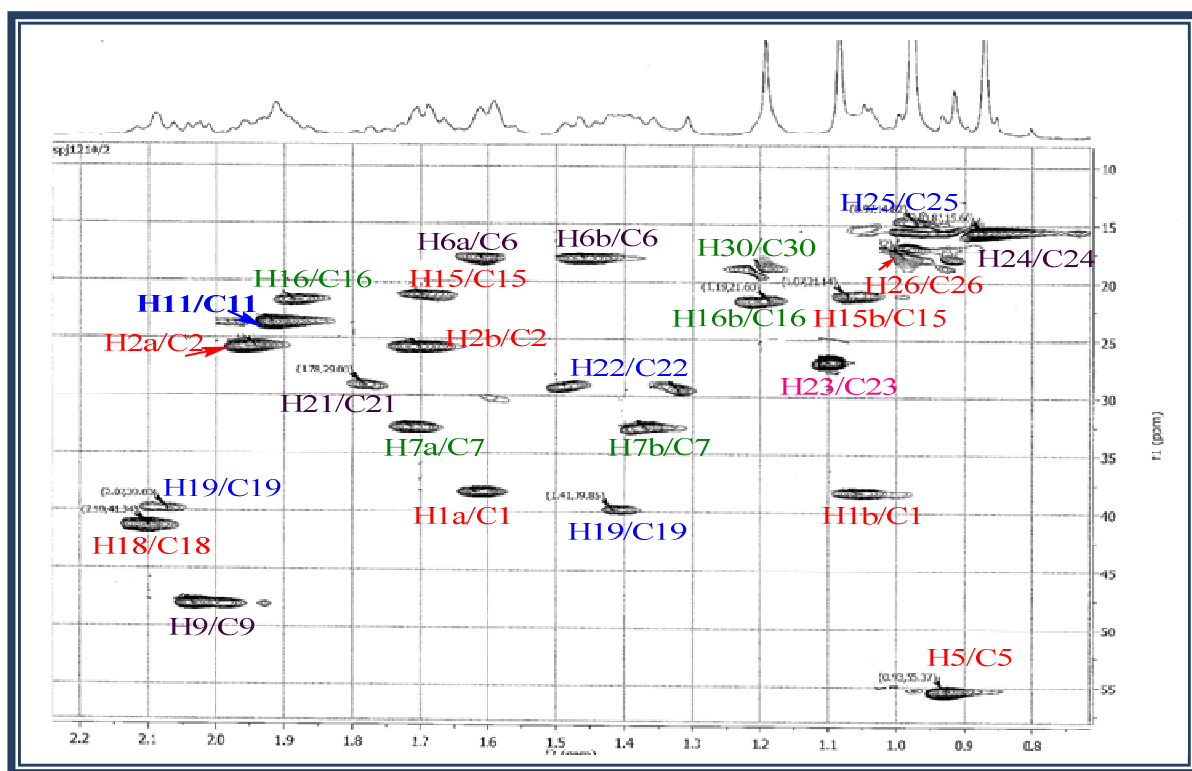


Figure 45: Corrélations HSQC du composé P12.

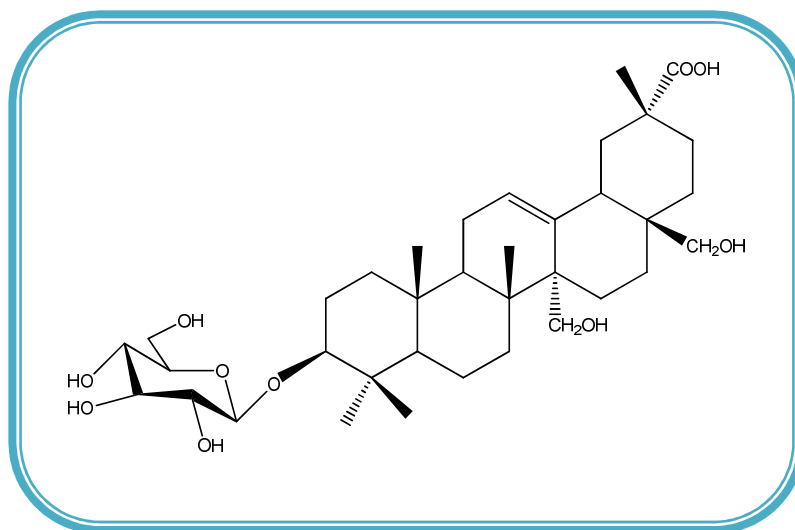


Spectre 34-1 : Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) de la génine du composé P12.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*Tableau 22: Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé P12.

n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)	n°	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)
1	36,0	1,07m ; 1,62m	20	42,0	-
2	25,0	1,70m ; 1,95m	21	28,5	1,8 (m)
3	89,0	3,20 dd (11,7 - 4,2)	22	29,6	1,50 d (13,5) ; 1,32m
4	40,0	-	23	27,0	1,10 s
5	55,3	0,92dm (13,2)	24	15,2	0,88 s
6	17,0	1,48 ; 1,62 m	25	15,2	0,99 s
7	33,0	1,39m ; 1,71m	26	17,3	0,99 s
8	40,8	-	27	63,1	3,56 d (11,9); 3,82 d (11,9)
9	48,0	2,01dd (9,9 - 8,8)	28	68,5	3,19 d (10,9); 3,57 d (10,9)
10	36,5	-	29	184,0	-
11	23,9	1,92 m	30	18,4	1, 20 s
12	127,0	5,59 sl	Glc (en C-3)		
13	138,0	-			
14	46,9	-			
15	21,2	1,7 d(11,1) ; 1,09 m	1'	105,0	4,34 d (7,8)
16	21,6	1,20 ; 1,90 m	2'	74,1	3,20 t (8,7)
17	37,0	-	3'	76,3	3,35 t (8,7)
18	41,5	2,10 m	4'	70,2	3,30 t (8,7)
19	40,0	1,43m ; 2,09t (13)	5'	76,1	3,25m
			6'	61,2	3,70 dd (11,9 – 5,3), 3,85 d (11,9 – 2,7)

L'ensemble de ces données (Tableau 22) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature, permettent l'identification du composé P12 comme étant : l'acide **3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28-triol-29-carboxylique**. Cet acide a été isolé de l'espèce *Genista ulcina* (Boutaghanet *al*, 2013).



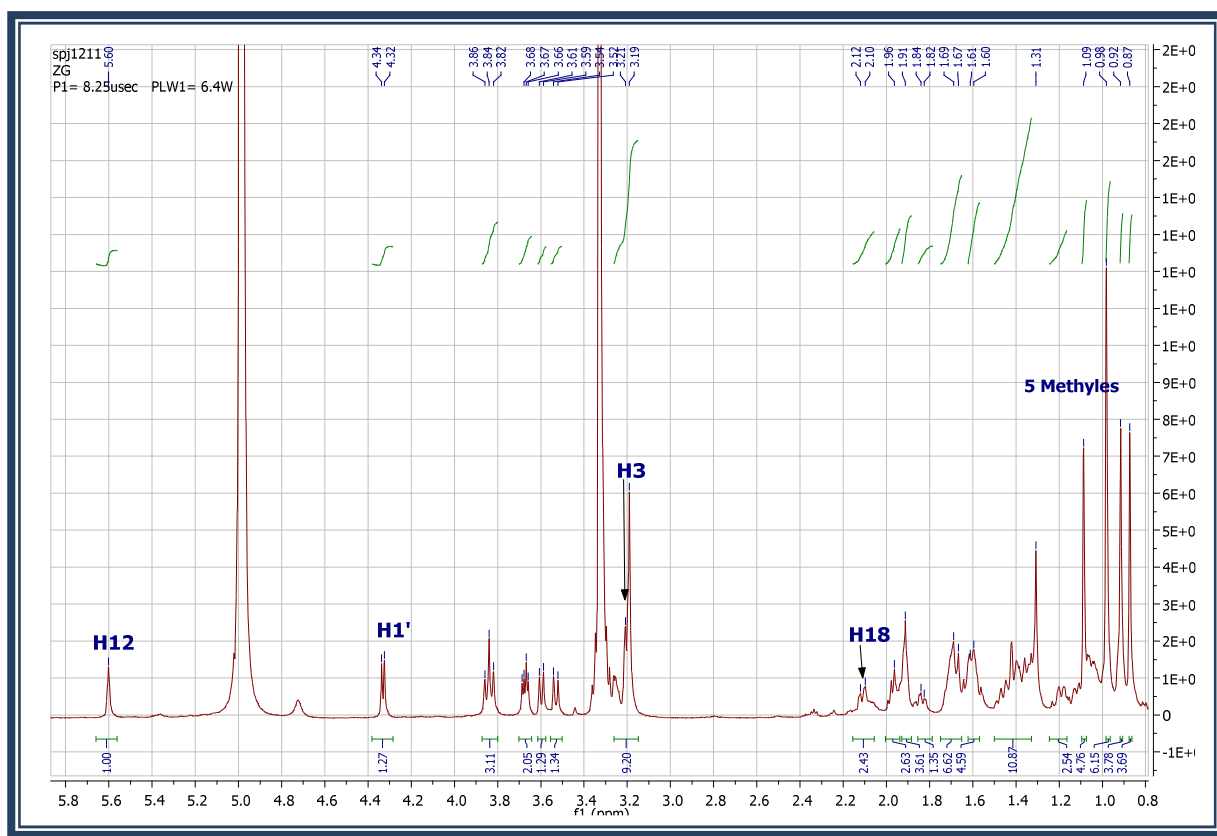
Composé **P12** : l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,triol-29-carboxylique.

## 2.9. Elucidation structurale du composé P13

Le composé **P13** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, il est invisible sous la lampe UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre 36) montre dans la région blindée cinq singulets fins, s'intégrant pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,09 (CH<sub>3</sub>-23) ; 0,86 (CH<sub>3</sub>-24) ; 0,98 (CH<sub>3</sub>-25) ; 0,98 (CH<sub>3</sub>-26), et 0,91 (CH<sub>3</sub>-30) correspondant aux cinq méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

De plus, on observe un massif de protons résonant entre 0,84 à 2,30 ppm correspondant aux CH et CH<sub>2</sub>, et trois signaux à  $\delta_{\text{H}}$  5,61 (1H, *sl*), 3,20 (1H, *t*,  $J=11,8$  Hz) et 2,11 (1H, *dd*,  $J=12,4$  –4,0Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18, caractéristiques des triterpènes de type oléan-12-ène.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

**Spectre 36:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P13**.

La différence notable entre le composé **P13** et les saponines **P11** et **P12** réside dans la génine.

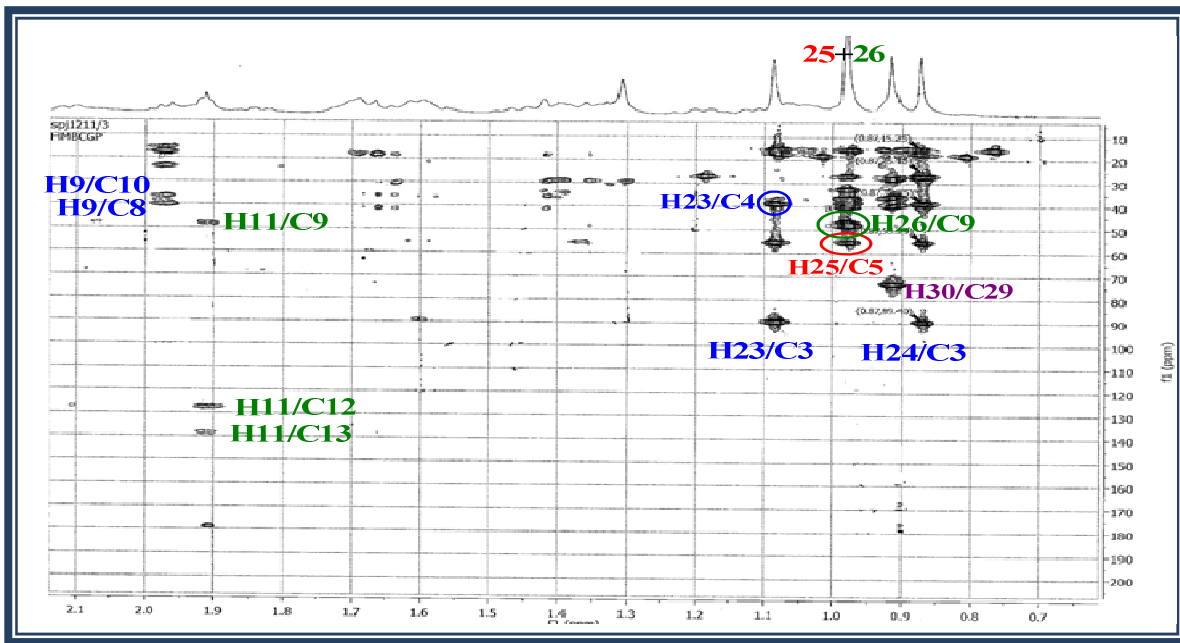
Dans les génines **P11** et **P12** on trouve deux fonctions  $\text{CH}_2\text{OH}$  et une fonction  $\text{COOH}$ , par contre cette fois les expériences RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC montre la présence de trois systèmes AB correspondant à trois alcools primaires et la disparition de la fonction acide.

L'expérience HMBC (spectre 37, spectre 37-1) permet de localiser les trois fonctions  $\text{CH}_2\text{OH}$ , on trouve en effet:

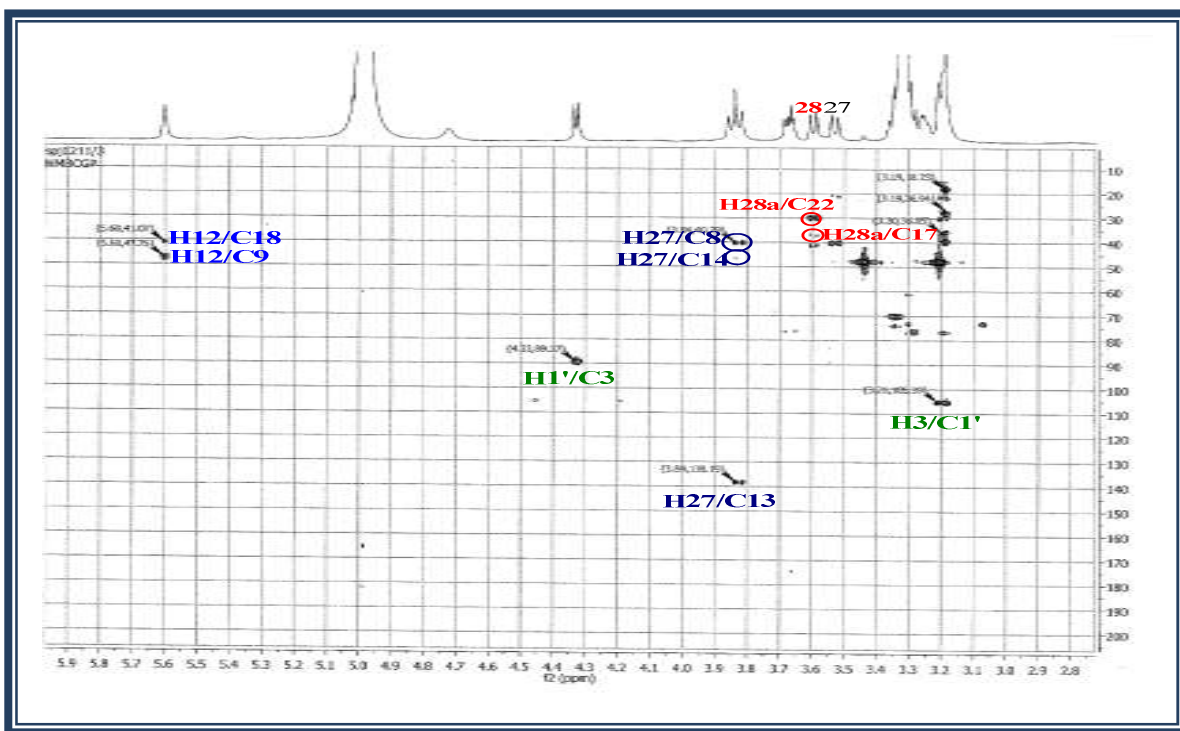
- ✓ Les protons méthyliques  $\text{CH}_3$ -30 ( $\delta_{\text{H}}$  0,91) corrèlent avec le carbone C-20 et un autre carbone à  $\delta_{\text{C}} = 73,01\text{ppm}$ , ce qui permet de déduire qu'une fonction  $\text{CH}_2\text{OH}$  est portée par le carbone C-20, ainsi que le carbone C-29 est oxydé en alcool primaire.
- ✓ Les protons résonants à 3,20 ppm et 3,60 ppm corrèlent avec deux carbones résonants à 37,0 ppm et 30,0 ppm correspondants aux carbones C-17 et C-22 respectivement, ce qui permet d'attribuer ces protons à H-28, et déduire que c'est le carbone C-17 qui porte la fonction  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

- ✓ Les corrélations de protons résonants à 3,53 ppm et 3,83 ppm avec les carbones C-13 (138,3 ppm) et C-14 (46,0 ppm) permettent de localiser la troisième fonction CH<sub>2</sub>OH sur le carbone C-14.



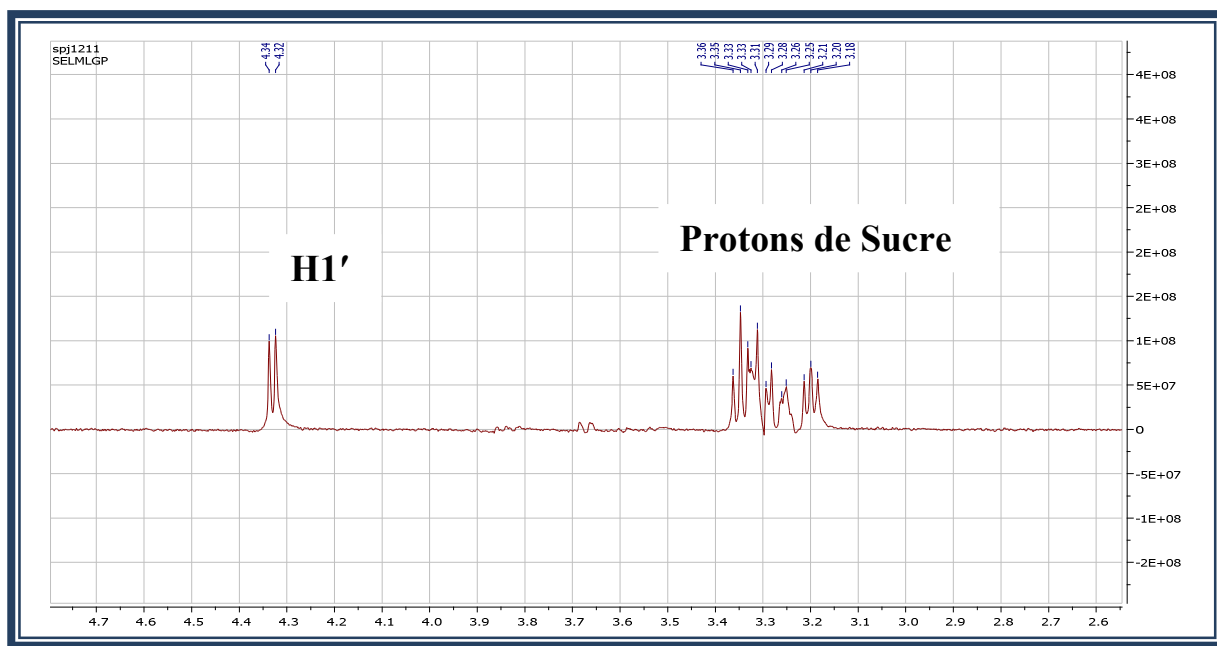
Spectre 37 : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de la génine du composé **P13**.



Spectre 37-1 : Spectre HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de la partie osidique du composé **P13**.

➤ **Partie osidique**

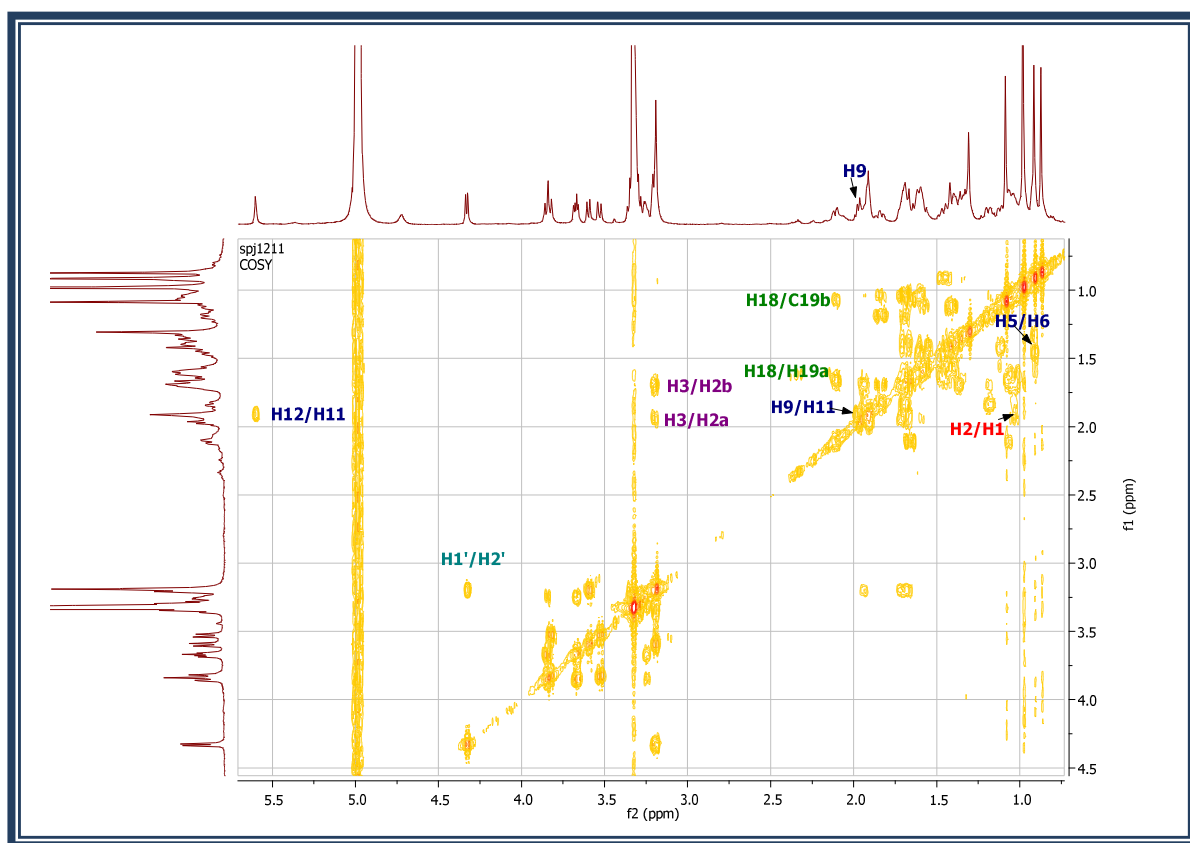
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (spectre 36) et 1D-TOCSY (spectre 38) montrent un proton anomérique, résonnant sous forme d'un doublet à grande constante de couplage ( $J_{\text{H1}'\text{-H2}'}=7,8$  Hz) à 4,33 ppm. Ce proton montre des corrélations  $J_{\text{H-C}}$  sur le spectre HSQC avec le carbone anomérique à 105,6ppm (spectre 40).



**Spectre 38** : Spectre 1D-TOCSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **P13**.

L'analyse des spectres COSY (spectre 39) et 1D-TOCSY (spectre 38) permet d'identifier un système de spins à six protons à partir du proton anomérique H-1' ( $\delta_{\text{H}} 4,33$ ). Le proton osidique H-2' résonne sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}} 3,20$  ( $J = 8,9$  Hz) montrant une position *trans*-diaxiale des protons H-1', H-2' et H-3'. Ce dernier corrèle avec le proton H-4' à  $\delta_{\text{H}} 3,35$  (*t*,  $J = 8,9$  HZ). Le proton H-5' résonne sous forme d'un triplet de doublet à  $\delta_{\text{H}} 3,25$  ( $J = 8,1 - 2$  Hz), les valeurs des constantes de couplage supérieur à 7 Hz est caractéristique d'un  $\beta$ -D-glucose.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*



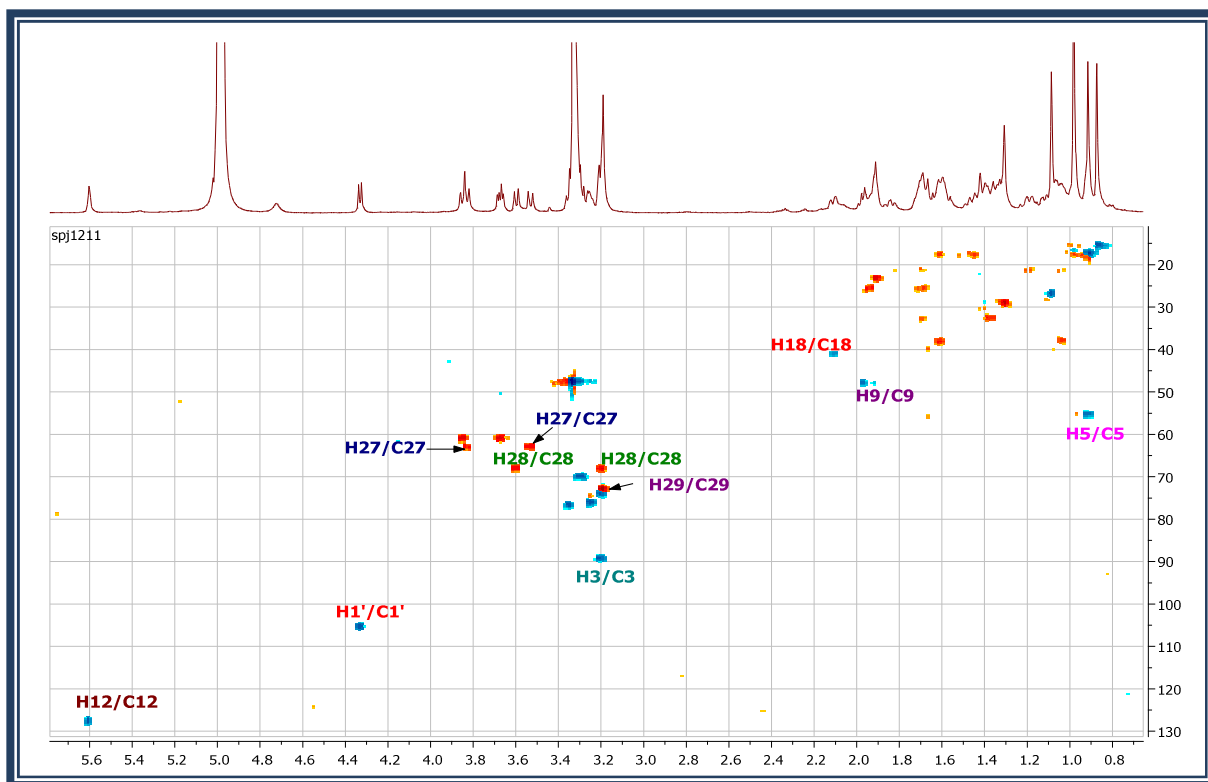
**Spectre 39:** Spectre COSY (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P13**.

Un retour à l'expérience HMBC (Spectre 37) permet de confirmer les attributions des méthyles :

- ✓ Les méthyles 23 ( $\delta_H$  1,09) et 24 (0,86 ppm) corrélient avec C-4 (38,8) et C-5 (55,24 ppm), le carbone C-5 corréle à son tour avec les protons méthyliques en 25 (0,98)
- ✓ Le méthyle-26 (0,98) couple avec le carbone C-9 (48,05 ppm) et les carbones quaternaires C-8 (40,2 ppm) et C-14 (46,0 ppm).

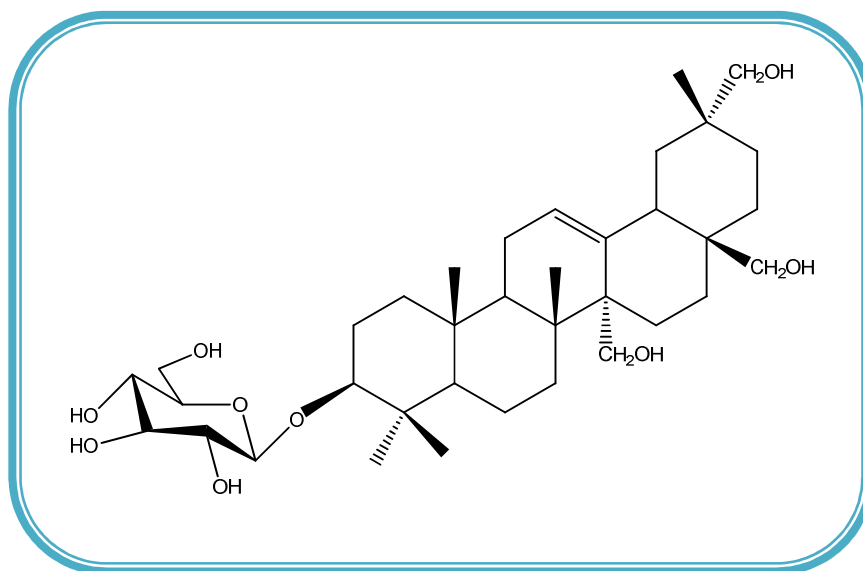
La génine est donc identifiée comme étant un dérivé oxydé de l'érythrodiol, l'oléan-12-ène - 3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol, Le spectre HSQC (spectre 40) montre les atomes de la génine érythrodiol substitué par un sucre.

La corrélation  $3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (spectre 37-1) entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine montre que le sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3.

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

Spectre40 : Spectre HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé **P13**.

L'analyse combinée des différents spectres COSY, HSQC et HMBC, permet d'assigner les déplacements chimiques (**Tableau 23**) de tous les protons et carbones de ce composé qui est identifié comme étant : **3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol**, ou **27,29-dihydroxyérythrodiol**. Ce produit a été isolé antérieurement de l'espèce *Genista ulcina* (Boutaghanet *al.*, 2013).



Composé **P13** : 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.



*Identification des produits isolés de Genista numidica***Tableau 23** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C du composé **P13**.

n°	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (m, J Hz)	n°	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (m, J Hz)
1	38,32	1,04 m ; 1,60m	20	36,0	-
2	25,79	1,70 m ; 1,94m	21	29,46	1,31 m
3	89,29	3,20t (11,8)	22	30,0	1,41 m
4	38,8	-	23	27,0	1,09 s
5	55,24	0,91m	24	15,49	0,86 s
6	18,01	1,44m ; 1,60 m	25	16,6	0,98 s
7	32,7	1,37 m; 1,70 m	26	16,6	0,98 s
8	40,2	-	27	62,66	3,53d(12,3) ; 3,83 d(12,3)
9	48,05	1,97dd (9,9 - 8,8)	28	68,13	3,20d (10,1) ; 3,60d (12,3)
10	35,6	-	29	73,01	3,19sl
11	23,52	1,91m	30	17,65	0,91s
12	127,8	5,61sl	Glc (en C-3)		
13	138,3	-			
14	46,0	-	1'	105,6	4,33 d (7,8)
15	21,25	1,05 m; 1,70 m	2'	74,24	3,20t (8,9)
16	21,5	1,20 m ; 1,82 m	3'	76,74	3,35t (8,9)
17	37,0	-	4'	70,24	3,31 t (8,6)
18	41,55	2,11dd(12,4 – 4,0)	5'	76,23	3,25 td( 8,1 – 2)
19	40,15	1,08 m; 1,67 m	6'	61,08	3,68 dd (11,9 - 5,5) 3,85 d(12,3)

### 3. Conclusion

Ce travail reporte l'investigation chimique de l'espèce *Genista numidica* Spach plante endémique appartenant à la famille des Fabaceae.

Cette étude effectuée sur les extraits chloroformique et acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *G. numidica* a mené à l'identification de 13 métabolites secondaires dont un nouveau.

*Identification des produits isolés de Genista numidica*

Ces composés se répartissent en :

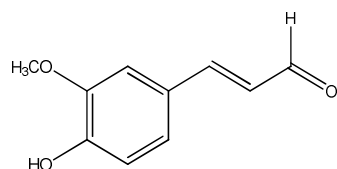
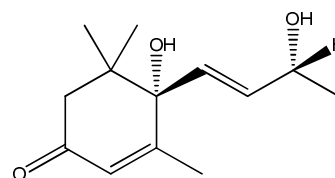
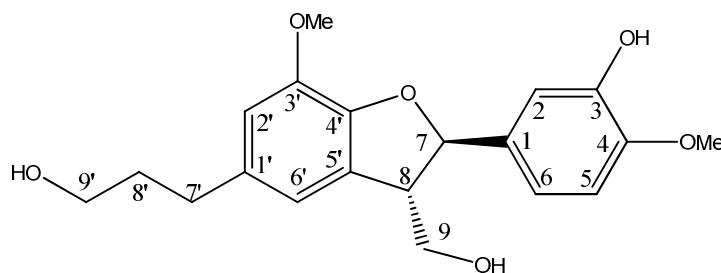
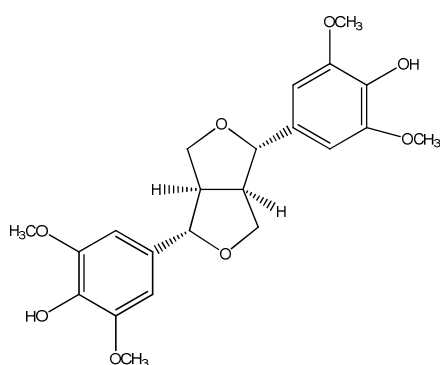
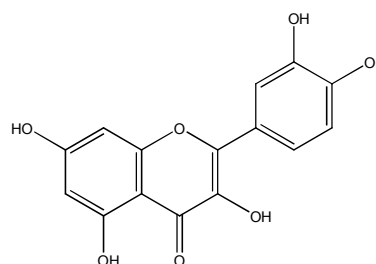
- **Un aldéhyde phénolique :**
  - ✓ L'aldéhyde ferulique
- **Un ionol :**
  - ✓ (Vomifoliol) (isolé pour la première fois dans le genre *Genista*)
- **Deux lignanes :**
  - ✓ Dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol (isolé pour la première fois dans le genre *Genista*)
  - ✓ (+)-Syringaresinol (isolé pour la première fois dans le genre *Genista*)
- **Deux acides phénoliques :**
  - ✓ L'acide p- coumarique
  - ✓ Acide p-hydroxybenzoïque
- **Trois flavonoïdes :**
  - ✓ Quercetine
  - ✓ Génisteine 5- méthyl éther
  - ✓ Transiline
- **Quatre triterpènes pentacycliques à squelette oléanane :**
  - ✓ Acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,21β,28-triol-27-carboxylique.(nouvelle molécule).
  - ✓ Acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27-carboxylique.
  - ✓ Acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28-triol-29-carboxylique.
  - ✓ 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.

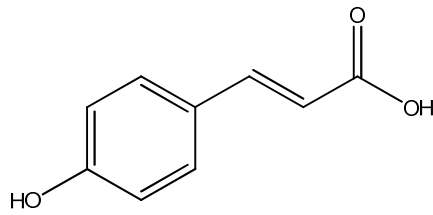
La méthodologie de séparation, isolement et purification de ces composés a été faite à l'aide de la combinaison de différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide haute performance CLHP en phase inverse

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés **P1-P13** a été réalisée grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D,

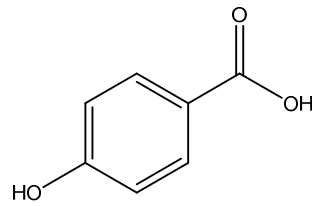
*Identification des produits isolés de Genista numidica*

1-D TOCSY et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) et la spectrométrie de masse haute résolution (HR-ESI-MS), la spectroscopie UV et la mesure du pouvoir rotatoire ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

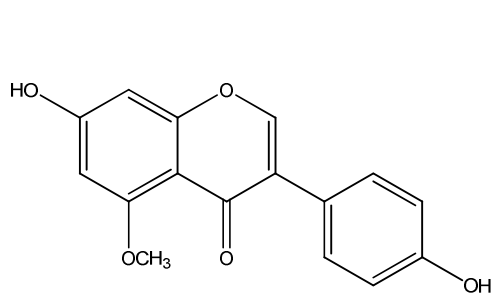
L'aldéhyde ferulique (**P1**)Vomifoliol (**P2**)Dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol (**P3**)(+)-Syringaresinol (**P4**)Quercetine (**P5**)

Identification des produits isolés de *Genista numidica*

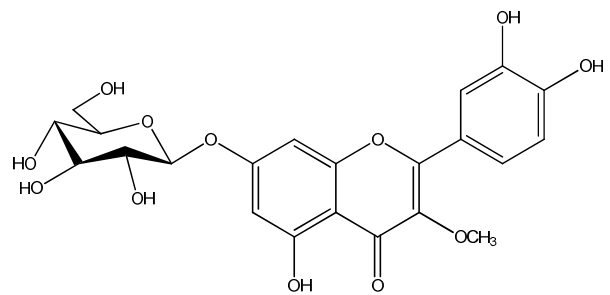
L'acide p-coumarique (P6)



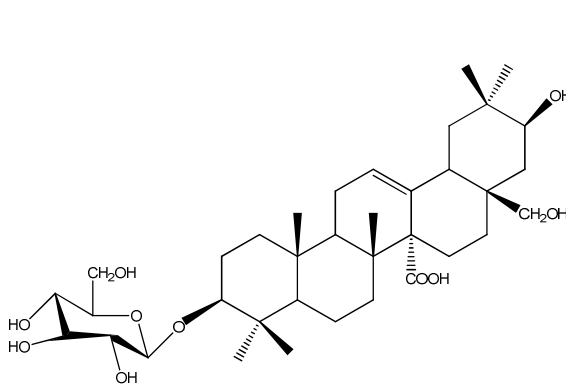
Acide p-hydroxy benzoïque (P7)



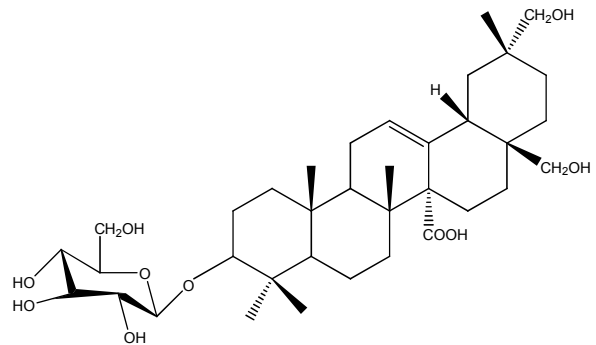
Génisteine 5- méthyl éther (P8)



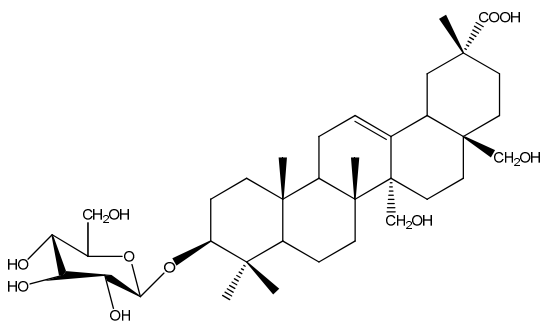
Transilone (P9)



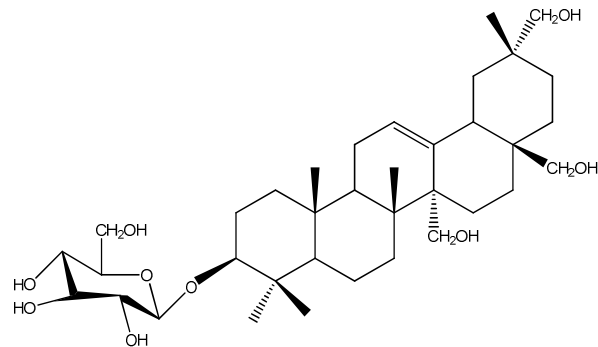
L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,21β,28-triol-27- carboxylique (P10)



L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27- carboxylique (P11)



L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28-triol-29- carboxylique (P12)



3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol (P13)

---

*Identification des produits isolés de *Genista numidica**

Tous ces composés naturels ont été identifiés pour la première fois dans l'espèce *G. numidica*.

Cette étude est complétée par une étude biologique reportée dans le chapitre suivant concerne l'activité antioxydante des différents extraits de l'espèce étudiée et l'activité antiproliférative des produits isolé (lignanes et saponines).

## **Chapitre 3**

### ***Activités biologiques***

## 1. Introduction

Les produits antioxydants jouent un rôle très important dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (Cole *et al.*, 2005; Liu, 2003). Dans ce contexte on reporte dans cette partie l'activité antioxydante des extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique de l'espèce *G. numidica* en utilisant la méthode du DPPH. Ces tests ont été réalisés au Centre de Recherche de Biotechnologie de Constantine.

Nous présentons également les résultats des tests cytotoxiques de quelques molécules que nous avons isolées. Ces tests ont été réalisés dans le laboratoire (Bioactive Natural Molecules) au département de pharmacie à Salerno-Italie. Ainsi, trois lignées cellulaires cancéreuses ont été utilisées pour déterminer la cytotoxicité des saponines et lignanes pures isolées.

## 2. L'activité antioxydante

### 2.1. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées (Goudable et Favier, 1997).

### 2.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une entité chimique (atome, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud *et al.*, 2006). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes). Il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple :  $\cdot\text{OH}$ ) (Goto *et al.*, 2008).

### 2.3. Mécanismes d'action des espèces réactives radicalaires

Les espèces oxygénées réactives radicalaires (ERO) sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'elles peuvent être à la fois nocives mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants:

- ✓ Bénéfiques, lorsqu'elles sont impliquées dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire (Valko *et al.*, 2004).
- ✓ Nocives, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : c'est le stress oxydant (Evans et Halliwell, 1999).

### 2.4. Les sources d'antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants.

La présence d'antioxydants dans les aliments permet d'éviter le rancissement dû à l'oxydation causée par l'oxygène, la lumière, la chaleur ou le contact de certains métaux ( Moure et Cruz 2001).

#### 2.4.1. Antioxydants naturels

Certains aliments sont particulièrement riches en composés qui possèdent des activités antioxydantes. Ces antioxydants sont :

➤ *Vitamine E*

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé qui joue un rôle important dans l'organisme par son action antioxydante au niveau cellulaire. Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes.



➤ **Vitamine A**

La vitamine A est une vitamine liposoluble, elle existe sous deux formes : le rétinol et ses dérivés d'origine animale et les caroténoïdes d'origine végétale (Wolinsky 1998). Le bêta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants.

➤ **Vitamine C**

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes.

les études *in vivo* de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant *in vitro* de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton ( Seon Hwa *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2006).

➤ **Les composés phénoliques**

la capacité antioxydante des composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroeter *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2011).

### 2.4.2. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse les plus connus sont les composés phénoliques tels que: Hydroxyanisole butylé (BHA), Hydroxytoluène butylé (BHT), *tert* Butylhydroquinone (THBQ) et Gallate de propyle (GP) (**Figure 11**). Les antioxydants synthétiques sont toujours substitués par un alkyle pour améliorer leur solubilité dans les graisses et les huiles (Hudson, 1990).

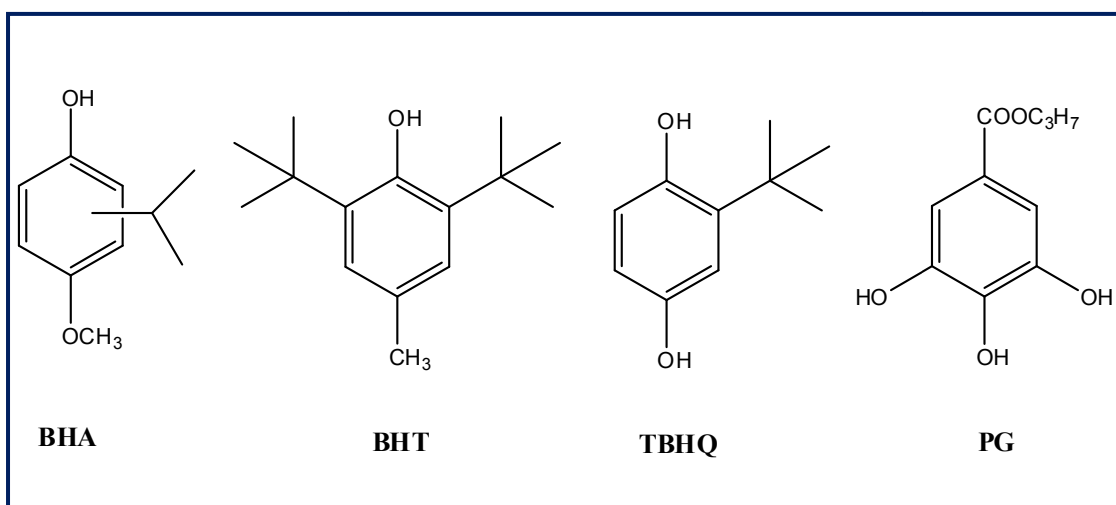


Figure 46 : structure des antioxydants synthétiques.

## 2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

L'approche appliquée pour l'évaluation de l'activité antioxydante est celle de la détermination de la réduction relative du radical (DPPH<sup>•</sup>).

L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger Activity), ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant. L'activité est calculée selon l'équation :

$$\text{RSA (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100\%$$

$A_{\text{Contrôle}}$  est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

$A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C),  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) et les antioxydants synthétiques BHT et BHA (Molyneux, 2004).

L'indice relatif %RSA montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux libres, dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno et al, 1998).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective  $IC_{50}$  de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH<sup>•</sup> dans le milieu réactionnel.

Les  $IC_{50}$  sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, en pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

### **2.5.1. Test du DPPH**

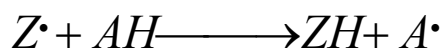
#### Principe du test

Le radical libre stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques ( Blois 1958, Brand-Williams 1995).

La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux. D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

Le principe du test est le suivant : l'addition du radical DPPH<sup>•</sup> à une solution contenant un composé antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH.

Si nous représentons le radical DPPH par Z $\cdot$  et la molécule donneuse d'hydrogène par AH, la réaction peut s'écrire de la façon suivante :



ZH : est la forme réduite A $\cdot$  : le radical produit.

### Mode opératoire

Un volume de 40  $\mu$ L de différentes concentrations de chaque extrait ainsi que les antioxydants standards (BHT, BHA), sont déposés en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 160  $\mu$ L d'une solution méthanolique de DPPH 0,4 mM.

Le contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 40  $\mu$ L du méthanol avec 160  $\mu$ L d'une solution méthanolique de DPPH, à la même concentration utilisée. Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorption à 517nm.

Durant cette étude, nous avons testé l'activité antioxydante des extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-butanol de *G. numidica*.

### **2.5.2. Exploitation des résultats**

Les pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de chaque extrait testé avec les standards sont présentés dans le tableau 24.

**Tableau 24** : L'effet scavenger des extraits étudiés de *G. numidica* et les standards.

% Inhibition in DPPH							
Extraits	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg
Acetat	19,40±2,09	36,73±1,71	59,41±4,52	80,47±2,73	88,03±0,43	88,23±0,54	88,37±0,25
<i>n</i> -BuOH	6,91± 3,95	8,44± 0,71	17,77±1,30	31,41±1,09	55,39±2,54	78,17±1,72	85,98±0,36
CHCl <sub>3</sub>	9,25± 1,97	19,88±1,76	31,99±0,92	43,24±1,95	60,23±2,14	73,10±1,91	82,91±1,66
BHT	56,93±1,84	72,83±1,23	78,46±1,01	79,48±0,31	80,03±1,62	80,10±0,66	80,71±0,42
BHA	31,73±1,22	54,89±3,60	67,60±1,13	76,77±0,54	78,67±1,31	79,01±0,89	79,14±0,66

Nous avons déterminé la IC<sub>50</sub> de ces extraits et comparer leurs activités avec les molécules de référence, BHT et la BHA.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> exprimées en µg/ml calculées graphiquement sont représentées dans le tableau 25.

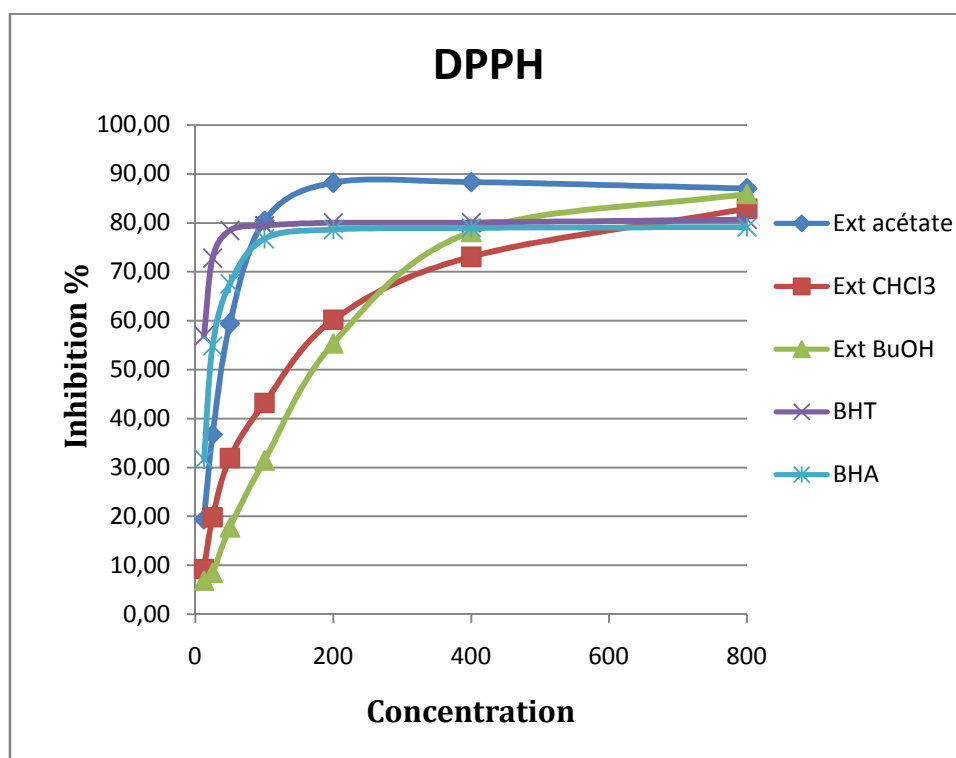
**Tableau 25** : Les IC<sub>50</sub> des extraits et standards.

Extraits	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
CHCl <sub>3</sub>	137,19 ± 1,18
AcOET	40,43 ± 3,09
<i>n</i> -BuOH	173,71 ± 0,59
BHT	< 3,12
BHA	6,82 ± 0,49

Dans cette étude, les différents extraits de *G. numidica* ont présenté un pourcentage (%) de l'effet de scavenger dépendant de la concentration d'extrait. Les activités anti scavenger vis-à-vis du DPPH des extraits chloroformique et *n*-butanol sont relativement élevées avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 137,19± 1,18 et 173,71 ± 0,59 µg / ml respectivement.

L'extrait acétate d'éthyle possède l'effet le plus important ( $IC_{50} = 40,34 \pm 3,09$   $\mu\text{g/mL}$ ) comparativement aux autres extraits, cet effet augmente jusqu'à atteindre un maximum de pourcentage d'inhibition de 88,37% à la concentration de 800  $\mu\text{g/ml}$ .

Ces résultats permettent de déduire que l'activité antiradicalaire modérée de cette phase, serait dû à la présence de composés polyphénoliques présents dans cette phase qui sont des acides phénoliques tels que l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique, les flavonoïdes de type flavones et isoflavones comme la quercétine et la génistéine 5- méthyléther qui sont majoritaires dans cette phase, et les saponines.



**Figure 47:** Activités de piégeage DPPH des extraits de *G.numidica* et standard.

Le BHT utilisé comme standard présente l'effet de piégeage le plus élevé, on note à la concentration de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , un pourcentage de 56,93% d'inhibition du DPPH. L'extrait n-BuOH est doté d'un pouvoir antioxydant très faible de 6,91% à la même concentration (Tableau 24).

### 3. L'activité antiproliférative

Le cancer est défini comme une prolifération anormale de cellules saines ayant subi des altérations spécifiques sur leurs génomes, les conduisant à acquérir les capacités nécessaires pour échapper à la régulation homéostatique de la division cellulaire, envahir les tissus voisins et générer des métastases vers des sites plus éloignés dans le corps humain.

Un thème central dans les efforts pour contrôler et éliminer les cancers est de promouvoir la recherche en science fondamentale afin de mieux comprendre la biologie du cancer avec l'espoir de générer de nouvelles interventions thérapeutiques qui pourraient être transformées en traitements cliniques contre le cancer.

Les produits naturels ont été depuis toujours une source inépuisable d'entités curatives sur lesquelles repose la majorité des traitements appliqués. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative des produits isolés (lignanes et saponines) de *G. numidica* en utilisant trois lignées cellulaires et développer le mécanisme d'action des produits actifs.

#### 3.1. Biologie de cycle cellulaire

##### 3.1.1. Généralité

« *Omnis cellula e cellula* » ; ce célèbre adage énoncé en 1858 par le physiologiste allemand Rudolf Virchow résume la théorie cellulaire sous sa forme définitive : « Là où apparaît une cellule, il doit y avoir eu une autre cellule auparavant ».

Le cycle de division cellulaire est le processus biologique fondamental par lequel une cellule mère aboutit à deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Il peut être résumé schématiquement en deux temps : une phase de division appelée la mitose et une phase de croissance, l'interphase, qui sépare deux divisions successives.

Découverte il y a plus de 150 ans, la division cellulaire a fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental à toute vie. Grâce à ce processus, les cellules vont se multiplier, permettant à l'embryon de se développer à

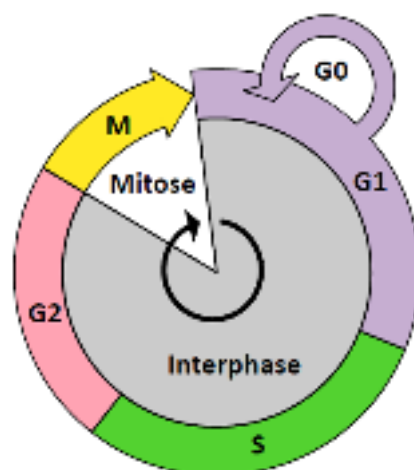
partir d'une cellule oeuf unique, ou encore à l'organisme de grandir et de régénérer les tissus pendant la vie adulte.

Les mécanismes de surveillance, appelés également « checkpoints », s'ajoutent à la régulation de la succession des quatre phases du cycle par les Cdk. ces mécanismes assurent le « contrôle qualité » du cycle cellulaire en bloquant la division si des anomalies sont constatées (lésions ou anomalies de réplication de l'ADN, chromosomes non attachés au fuseau mitotique par exemple) (Kastan et Bartek, 2004; Musacchio, 2011). Cet arrêt de la division est suivi de la mise en place de mécanismes capables de réparer la lésion cellulaire et ainsi de permettre à la division de se poursuivre.

Lorsque les dommages sont trop importants pour être réparés, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) est déclenchée (Kastan et Bartek, 2004).

### 3.1.2. Le cycle cellulaire

Le *cycle cellulaire* est l'ensemble des phases que connaît une cellule entre deux divisions cellulaires. Il consiste en un ensemble ordonné d'événements qui mènent à la croissance cellulaire et à la division en deux cellules filles. Les étapes sont G1-S-G2-M, avec G1 et G2 pour intervalle, S pour synthèse et M pour mitose (figure 48).



**Figure 48:** Les phases de cycle cellulaire.



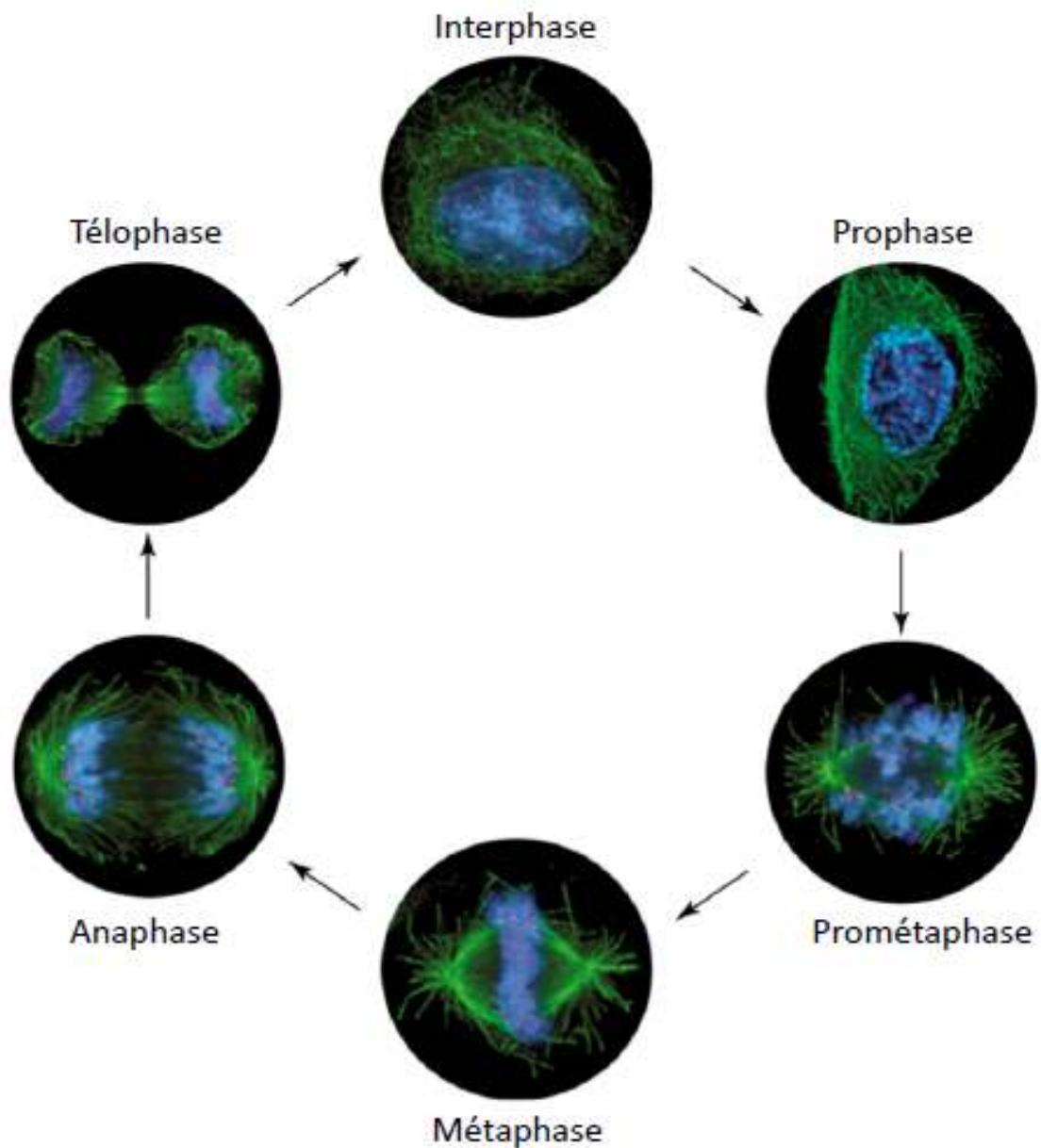
Le cycle cellulaire se décompose en quelques étapes de division, ou phases :

- ✓ **la phase G<sub>1</sub>** (Gap 1) ou phase de croissance cytoplasmique.
- ✓ **la phase S** (Synthèse) ou phase de duplication de l'ADN, qui représente la "synthèse" dans laquelle se produit la réplication de l'ADN.
- ✓ **la phase G<sub>2</sub>** (Gap 2) ou phase de préparation à la division cellulaire, c'est une phase de croissance pendant laquelle la cellule synthétise la plupart des protéines nécessaires à l'entrée en mitose.
- ✓ **la phase M**: mitose ou méiose (distribution du matériel génétique nucléaire) et la cytokinèse (division du cytoplasme).

Les phases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et S constituent l'interphase (I) qui peut être rallongée de la phase G<sub>0</sub>. Les cellules qui sont dans le cycle cellulaire sont appelées "proliférantes" et celles qui sont dans la phase G<sub>0</sub> (Gap 0) sont appelées cellules "quiescentes", en repos.

➤ **La mitose**

La mitose se divise en cinq étapes de la prophase à la télophase (Figures 49).



**Figure 49:** Les différentes étapes de la mitose.

Ces photos d'immunofluorescence montrent la localisation de l'ADN (bleu), des Microtubules (vert) et des kinétochores (rouge) au cours des différents stades de la Division cellulaire (Adapté de Cheeseman et Desai, 2008).

### 3.1.3. La progression du cycle

- ✓ le complexe CDK3-Cycline C permette aux cellules de sortir de (G<sub>0</sub>) et assure le retour des cellules à l'état prolifératif lors de la transition **G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>** (Ren et Rollins, 2004).
- ✓ La transition **G<sub>1</sub>/S** est stimulée par le complexe CDK2-Cycline E ce qui déclenche l'initiation de la réplication de l'ADN (Hwang et Clurman, 2005).
- ✓ A la fin de la phase **S** la Cycline A s'associe avec CDK1 et assure la transition progression tout au long de la phase **G<sub>2</sub>** (Hwang et Clurman, 2005).
- ✓ CDK1 s'associe avec la Cycline B, ce complexe, essentiel à la transition **G<sub>2</sub>/M** (Malumbres et Barbacid, 2005).

### 3.1.4. La réponse du cycle cellulaire aux dommages sur l'ADN

#### Les points de contrôle

Les points de contrôle sont des voies de signalisation qui ont pour but, lors de la réponse cellulaire aux dommages sur l'ADN, d'aboutir à l'arrêt du cycle cellulaire, à la réparation des dommages et, dans le cas de dommages trop sévères, à la mort cellulaire par apoptose.

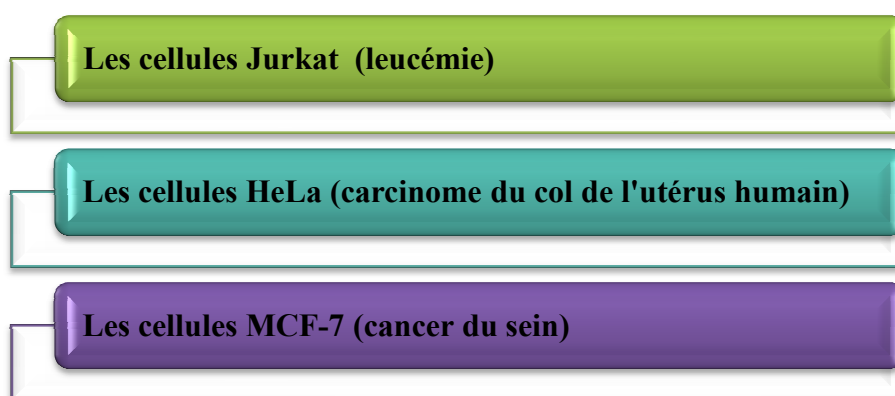
La cellule peut employer différents mécanismes de surveillance en réponse aux signaux externes (radiations, génotoxiques...) ou internes à la cellule (radicaux oxygénés, erreurs de réplication...):

- ✓ Ainsi le point de contrôle G<sub>1</sub>/S conduit à l'inactivation de la transition G<sub>1</sub>/S et permet d'empêcher la réplication d'erreurs en phase S.
- ✓ Plusieurs points de contrôle en phase S surveillent les arrêts des fourches de réplication et les dommages.
- ✓ Le point de contrôle G<sub>2</sub>/M bloque la progression des cellules de la phase G<sub>2</sub> vers la mitose et permet d'empêcher la dissémination des erreurs et des dommages sur l'ADN.

### 3.2. Partie expérimentale

Six composés purs isolés de *G. numidica* ont été testés pour leurs propriétés cytotoxiques *in vitro*, il s'agit des deux lignanes et des quatre saponines.

L'activité antiproliférative des molécules pures a été évaluée vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses suivantes :



#### Préparation des cellules

Les cellules Jurkat (leucémie), HeLa (cancer du col de l'utérus) et MCF-7 (cancer du sein) ont été obtenues de la banque des cellules ATCC (the American Type Cell Culture .Rockville, MD, USA).

Les cellules ont été maintenues dans du DMEM (HeLa et MCF-7) ou du RPMI 1640 (Jurkat), complété par 10% de FBS (sérum fœtal bovin), 100 mg/L de streptomycine et 100 UI / mL de pénicilline à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub>. Pour assurer une croissance logarithmique, les cellules ont été sous-cultivées tous les 2 jours. Des solutions mères (50 mM) des produits isolés (lignanes et saponines) dans du DMSO ont été conservées à l'obscurité à 4° C.

Des dilutions appropriées ont été préparées dans un milieu de culture immédiatement avant l'utilisation. Dans toutes les expériences, la concentration finale de DMSO n'a pas dépassé 0,15% (v / v).

### Viabilité cellulaire

Les cellules ont été réparties sur une plaque à 96 puits avec différentes concentrations, les cellules Jurkat, HeLa et MCF-7 ont étéensemencées à une densité cellulaire de  $1 \times 10^4$ / puits, la veille du traitement. Le nombre des cellules viables a été quantifié par le test MTT qui est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Il utilise le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) qui forme un précipité dans la mitochondrie des cellules de couleur violette, puis avec un simple dosage de la densité optique à 550 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Lab Systems, Vienna, VA, USA), la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement est reconnue.

Dans certaines expériences, la viabilité cellulaire a également été vérifiée par le test d'exclusion de trypan blue en utilisant une chambre de comptage Bürker, le bleu Trypan qui est un colorant vital qui colore seulement les cellules mortes.

Les valeurs  $IC_{50}$  ont été calculées à partir de la dose de viabilité cellulaire et ont été définies comme la concentration entraînant une inhibition de 50% de la survie cellulaire par rapport aux témoins. L'Etoposide a été utilisé comme témoin positif. Chaque condition expérimentale a été testée une fois en quatre exemplaires.

Des courbes dose-réponse (concentration en fonction du pourcentage d'inhibition) sont réalisées par le logiciel PRISM (Graph Pad 5.0) pour chaque produit sur les trois lignées cellulaires. Ces courbes nous ont permis de calculer  $IC_{50}$  de chaque produit.

### **3.3. Résultats obtenus**

Les résultats des tests de cytotoxicité des composés (**P3, P4, P10, P11, P12, P13**) effectués sur les trois lignées cellulaires Jurkat, HeLa et MCF-7 après une incubation de 48 h sont présenté dans le tableau 26.

Les résultats ont montré que seule le produit **P13**(saponine) a un effet antiprolifératif vis-à-vis les trois lignées cellulaires, en particulier les cellules HeLa, il montre des valeurs  $IC_{50}$  de  $37 \pm 2,3$  ;  $35 \pm 1,7$  et  $50 \pm 3,6$   $\mu$ M respectivement, les autres produits sont inactifs ( $IC_{50} > 100\mu$ M).

**Table 26:** IC<sub>50</sub> des produits purs (μM) dans des variétés de cellules humaines de cancer.

Composé	Lignées cellulaires cancéreuses		
	Jurkat	Hela	MCF7
<b>P3</b>	NA	NA	NA
<b>P4</b>	NA	NA	NA
<b>P10</b>	NA	NA	NA
<b>P11</b>	NA	NA	NA
<b>P12</b>	NA	NA	NA
<b>P13</b>	37 ± 2.3 <sup>a</sup>	35 ± 1.7 <sup>a</sup>	50 ± 3.6 <sup>a</sup>

NA: non actif (IC<sub>50</sub> > 100μM).

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> ± écart-type (données de trois expériences en triple).

**P3** : Dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol.

**P4** :(+)-Syringaresinol.

**P10** :L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,21β,28-triol-27- carboxylique.

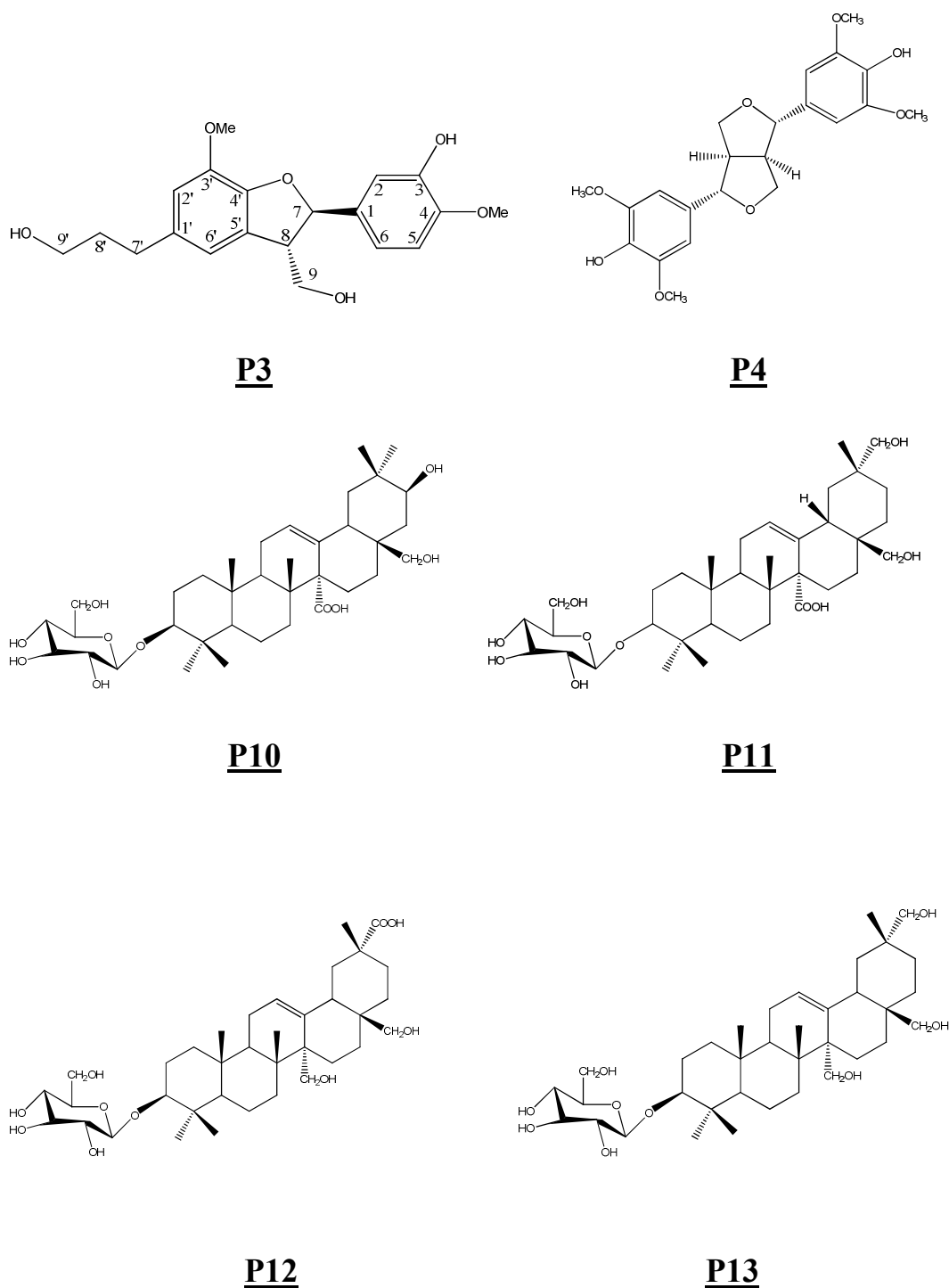
**P11** :L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27- carboxylique.

**P12**:L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28-triol-29- carboxylique.

**P13** :3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.

### Interprétation des résultats

Les lignanes **P3** et **P4** (figure 50) n'ont pas une activité antiproliférative sur les trois cellules cancéreuses (IC<sub>50</sub> > 100μM). Par ailleurs, il a été reporté que (+)-Syringaresinol **P4** isolé de *Styrax camporum* a présenté une activité faible dans les cellules cancéreuse HeLa (Helder et al, 2005) et un effet cytoprotecteur sur des cellules MCF-7 stressées par du peroxyde d'hydrogène (Chin *et al.*, 2008). L'activité cytotoxique de **P3** n'a jamais été reportée.



**Figure 50:** Les produits testés.

A notre connaissance l'activité cytotoxique des saponines (figure 50) n'a jamais été reportée. Les résultats ont montré que les saponines testées présentent une seule activité déterminée par le produit **P13** sur les trois lignées cellulaires. D'un point de vue structural, les quatre saponines ont la même fraction saccharidique, la différence se situe dans la structure de l'aglycone. **P13** ne possède pas une fonction carboxylique.

Par conséquent la présence d'une fonction carboxylique en C-27 ou C-28 fait perdre l'activité cytotoxique à la saponine de type oléanène.

Le composé **P13** a montré un bon effet antiprolifératif vis-à-vis des trois lignées cellulaires, il nous a semblé intéressant d'élargir les tests de cytotoxicité afin d'établir son mécanisme d'action.

### **3.4. L'activité sur le mécanisme d'action**

Le mécanisme d'action de l'effet antiprolifératif de **P13** a été étudié sur les cellules HeLa.

Pour rechercher si **P13** réduit le nombre de cellules en affectant la progression du cycle cellulaire ou en induisant la mort cellulaire (apoptose), on a exposé les cellules HeLa à des concentrations proches de leur valeur de  $CI_{50}$ , 15 et 40  $\mu$ M, pendant 48 h.

#### Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire a été évalué par coloration PI (l'iodure de propidium) de cellules perméabilisées selon le protocole disponible et la cytométrie en flux (cytomètre en flux BD FACS Calibur, Becton Dickinson) (Jimenez-Usuga et al, 2016). Les données de 5000 événements par échantillon ont été collectés. Les pourcentages des éléments dans la région hypodiploïde (Sub G0/G1) et dans les phases du cycle cellulaire G0/G1, S et G2/M ont été calculés en utilisant les Logiciels CellQuest et MODFIT, respectivement.





**Figure 51 :** Le système BD FACS Calibur est constitué d'un cytomètre en flux et de la station de travail BD FAC Station

La cytométrie en flux est une technique utilisée pour :

- Analyse ADN/Cycle Cellulaire
- Viabilité cellulaire
- Prolifération cellulaire

### Fragmentation de l'ADN

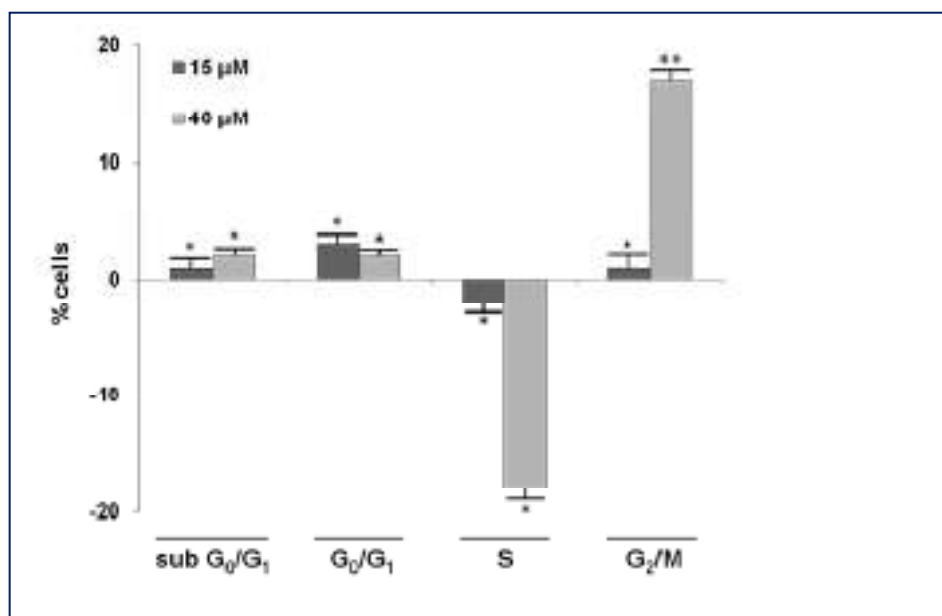
Techniquement, la caractéristique la plus facile à détecter des cellules apoptotiques est la perte d'ADN de cellules perméabilisées due à la fragmentation de l'ADN. Lorsque les cellules sont perméabilisées, les multimères d'ADN fragmentés s'échappent de la cellule. Le résultat est une population de cellules à teneur réduite en ADN. Si les cellules sont ensuite colorées avec un colorant intercalant à l'ADN tel que PI, un profil d'ADN représentant les cellules en G1, en phase S et en G2/M sera observé, les cellules apoptotiques étant représentées par une population sub G0 / G1 vue à gauche de Pic G0 / G1 sur l'écran.

### 3.4.1. Résultats obtenus

La figure 52 représente l'effet de **P13** sur la prolifération des cellules HeLa. C'est l'évaluation cytométrique en flux du contenu en ADN des cellules HeLa exposées pendant 48 h au composé avec des concentrations (15 et 40  $\mu\text{M}$ ) et au témoin. Les données sont présentées comme étant augmentation / diminution des pourcentages de cellules traitées ayant une teneur spécifique en ADN, par rapport aux valeurs de contrôle :

- ✓ cellules de contrôle
- ✓ sub G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub>;  $\leq 2\%$ .
- ✓ G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub>;  $62 \pm 2,1\%$ .
- ✓ S;  $31 \pm 1,5\%$ .
- ✓ G<sub>2</sub> / M;  $6 \pm 0,3\%$ .

Tous les résultats sont des valeurs moyennes  $\pm$  écart-type d'au moins trois expériences effectuées en double (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,001).



**Figure 52:** L'effet de 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol sur la prolifération des cellules HeLa.

Le contenu en ADN a été évalué par analyse de noyaux colorés à l'iodure de propidium (PI) par cytométrie en flux.

### Analyses statistiques

Les données reportées sur la figure 52 sont les valeurs moyennes  $\pm$  écart-type d'au moins trois expériences, effectuées en double, montrant des résultats similaires. Les différences entre les groupes de traitement ont été analysées par le test t de Student. Un seuil  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

### Interprétation des résultats

Les résultats montrent, que **P13** à une concentration légèrement supérieure à  $IC_{50}$  ( $40\mu\text{M}$ ) a entraîné une augmentation de la population cellulaire en phase G2/M du cycle cellulaire 48h après le traitement, au détriment des cellules en phase S sans aucune augmentation significative du nombre de cellules hypodiploïdes en phase subG0/G1 (apoptotiques), ce qui permet de déduire que **P13** a induit l'arrêt du cycle cellulaire G2/M.

## 4. Conclusion

Ce chapitre reporte les résultats de nos travaux de recherche d'activités *in vitro* de l'activité antioxydante des déférents extraits des parties aériennes de *G. numidica* et l'activité cytotoxique de certains produits purs isolés.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, *n*-BuOH selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait acétate d'éthyle possède la meilleure activité antioxydante ( $IC_{50} = 40,34 \pm 3,09 \mu\text{g/mL}$ ) comparativement au extrait chloroformique et butanolique.

Les produits isolés (**P3, P4, P10, P11, P12, P13**) sont mis à l'étude de l'activité antiproliférative, en utilisant trois lignées cellulaires : Jurkat (leucémie), HeLa (cancer du col de l'utérus) et MCF-7 (cancer du sein).

Les tests de cytotoxicité ont montré que seul le produit **P13** a un effet antiprolifératif vis-à-vis des trois lignées cellulaires, en particulier les cellules HeLa, ils montrent des valeurs des  $IC_{50}$  de:  $37 \pm 2,3$  ;  $35 \pm 1,7$  et  $50 \pm 3,6$   $\mu\text{M}$ , pour les trois lignées Jurkat, HeLa et MCF-7 respectivement.

Le mécanisme d'action de l'effet antiprolifératif de **P13** (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol) sur les cellules HeLa a été étudié. Les résultats ont mis en évidence que le composé **P13** entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, en bloquant des cellules à la transition G2/M.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'investigation phytochimique des parties aériennes d'une espèce endémique algérienne : *Genista numidica* Spach (Fabacées) a permis d'isoler **14** composés par des techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), **13** composés ont été caractérisés appartenant à différentes classes chimiques.

4 composés ont été isolés de l'extrait CHCl<sub>3</sub> :

- ★ l'aldéhyde ferulique
- ★ le Vomifoliol (isolé pour la première fois du genre *Genista*)
- ★ le dihydro-3'-methoxy-8-hydroxymethyl-7-(3-hydroxy-4-methoxy phenyl)-1'-benzofuranpropanol. (isolé pour la première fois du genre *Genista*)
- ★ le (+)-Syringaresinol (isolé pour la première fois du genre *Genista*)

9 composés ont été isolés de l'extrait acétate d'éthyle dont un nouveau:

- ★ la quercetine
- ★ l'acide p- coumarique
- ★ l'acide p-hydroxy benzoïque
- ★ la génisteine 5- méthyl éther
- ★ la transiline
- ★ l'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,21β,28-triol-27-carboxylique. (Nouvelle molécule).
- ★ l'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27-carboxylique.
- ★ L'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28-triol-29-carboxylique.
- ★ Le 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol.

## Conclusion générale

---

L'ensemble de ces structures a été déterminé principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , TOCSY) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), UV, la spectrométrie de masse (HRESI-MS), et par la comparaison avec les données de la littérature. Tous les composés isolés sont décrits pour la première fois dans cette espèce.

L'étude de l'activité antioxydante relevée sur les trois extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et *n*-BuOH de *G. numidica* en utilisant la méthode de DPPH a montré que l'extrait acétate d'éthyle possède la meilleure activité, avec une valeur de  $\text{CI}_{50} : 40,43 \pm 3,09 \mu\text{g/ml}$ , comparativement aux autres extraits et qu'il constitue une bonne source de composés antioxydants naturels.

En outre les tests de cytotoxicité des lignanes (**P3** ; **P4**) et des saponines isolées (**P10** ; **P11** ; **P12** ; **P13**) effectués sur les trois lignées cellulaires Jurkat (leucémie), HeLa (cancer du col de l'utérus) et MCF-7 (cancer du sein) ont montré que seul le produit **P13** a un effet inhibiteur de la prolifération vis-à-vis les trois lignées cellulaires avec des valeurs de  $\text{CI}_{50} : 37 \pm 2,3 ; 35 \pm 1,7$  et  $50 \pm 3,6 \mu\text{M}$ , respectivement pour les trois lignées Jurkat, HeLa et MCF-7 .

Le mécanisme d'action de l'effet antiprolifératif de **P13** a été étudié sur les cellules HeLa. Les résultats ont montré cette saponine a induit l'arrêt du cycle cellulaire **G2/M**.

# **Références bibliographiques**



## Références bibliographique

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Adams M., Berset C., Kessler M., Hamburger M. (2009).** Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**: 343-359.

**Adao CR., De Silva BP., Parente JP. (2011).** A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. *porrum* with antiinflammatory and gastroprotective effects. *Phytochemistry Letters*, **4**:306–10.

**Adlercreutz H. (2002).** Phyto-oestrogens and cancer. *The Lancet Oncology*. **3(6)**: 364-373.

**Alqasoumi S. (2009).** Phytochemical Study of the Aerial Parts of *Conyza discoridis* Growing in Saudi Arabia . *Natural Product Sciences*. **15(2)**: 66-70.

**Angiosperm Phylogeny Group . (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**: 105–121.

**Anderson OM. (2006).** Chemistry, biochemistry and applications, in: Flavonoids. Andersen, O.M., & Markham, K.R. (Ed.). *CRC Press, Boca Raton*, pp. 1129-1197.

**Anthony CD. (2009).** The internal and external use of medicinal plants, *Clinics in dermatology*, **27**: 148-158.

**Ati S, Bennadja S, Boumaraf W. (2017).** Phytochemical study of three endemic brooms in Algeria: *Genista numidica* Spach, *Genista ferox* Poiret and *Genista tricuspidata* Desf. *International Journal of Biosciences* **11**:178–183.

**Ayres D.C et Loïke JD. (1990).** Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties, pages 402. Cambridge University Press, United Kingdom.

**Azzioui, O., ES-Sgaouri A., Fennane M. (2000).** Valeur écologique et biogéographique du genre *Genista* L. du Maroc. *Lagasalia*, **21(2)**: 263-278.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Badawi MM., Handa SS., Kinghorn AD., Cordell GA., Farnsworth NR, (1983).** Plant anticancer agents XXVII: Antileukemic and cytotoxic constituents of *Dirca occidentalis* (thymelaeaceae). *J. Pharmaceutical. Sciences.*, **72**: 1285-1287.

**Bahadoran Z, Mirmiran P and Azizi F. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes. *J Diabetes Metabolism Disorders*. **12**:1–9.

## Références bibliographiques

---

**Bayindir Ü, Alfermann AW., Fuss E. (2008).** Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb. *Plant Journal*. **55**(5): 810-820.

**Bedir E., Alis I., Aquino R., Piacente S., Pizza, C. (1999a).** Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*. *Journal of Natural Products*, **62**: 563–8.

**Bedir E., Alis I., Aquino R., Piacente S., Pizza C. (1999b).** Trojanoside H : a cycloartane-type glycoside from the aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry*, **51**:1017–20.

**Benavente-Garcia O. et Castillo J. (2008).** "Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**(15): 6185-6205.

**Bencherchar I., Demirtas I., Altun M., Gül1 F., Sarri D., Benayache F., Benayache S., Mekkiou R. (2017).** HPLC analysis, anti-oxidant activity of *Genista ferox* and its antiproliferative effect in HeLa cell line. *Bangladesh J Pharmacol*. **12**: 260-267.

**Birsova L, Mikulasova M, Vaverkovab S. (2005).** Antimutagenic of Phenolic Acids, *Czech Repub*. **149**: 489–91.

**Blois M.S. (1958)** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. **181**: 1199-1200.

**Bonnard I., Rinehart K. L. (2004).** Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*. *Tetrahedron*, **60**:2987–92.

**Botineau M. (2010).** Botanique systematique et applique des plantes à fleurs. Editions TEC & DOC, *Lavoisier*, pp. 597-639.

**Bottger S., Westhof E., Siems K., Melzig MF. (2013).** Structure–activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). *Toxicon*, **73**:144–50.

**Bouakaz I., Beggour L., Dibi A., Massiot G., Haba H. (2015).** Isoflavone and triterpenoid isolated from an endemic plant *Genista microcephala* Coss et Dur . *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, **3**(1): 1-5.

**Boukaabache R., Boubekri N., Boumaza O., Mekkiou R., Seghiri R., Sarri D., Zama D., Benayache F. and Benayache S. (2013).** *Der Pharmacia Lettre*; **5**(6):56-59.

**Boumaza O., Mekkiou R., Seghiri R., Sarri D., Benayache S., Garcia VP., Bermejo J. and Benayache F. (2006)** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42**: 730-731.

**Boumaza R., Mekkiou R., Seghiri S., Benayache S., Garcia V P., Bermejo J. and Benayache F. (2011).** Secondary metabolites from chloroform extract of *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol **47**, No. 2.

**Boutaghane N, Voutquenne-Nazabadioko L, Harakat D, Simon A, Kabouche Z. (2013)** Triterpene saponins of *Genista ulicina* Spach. *Phytochemistry*, **93**, 176-181.

**Boutaghane N., Alabdul Magid, A., Abedini A., Cafolla A., Djeghim H., Gangloff S., Voutquenne-Nazabadioko L., Kabouche Z. (2018).** Chemical constituents of *Genista numidica* Spach aerial parts and their antimicrobial, antioxidant and antityrosinase activities. *Natural Product Research*. 1-7.

**Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. **28**: 25-30.

**Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.

**Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec &Doc, Médicales internationales (Eds.), 4e édition.

**Bruneton J. (2015).** Pharmacognosie (5<sup>e</sup> Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, *Tec and Doc, Lavoisier, Paris*. 1504pp.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Cals I., Kuruuzum-Uz A., Lorenzetto PA., Ruedib P. (2002).** (6S)-Hydroxy-3-oxo-a-ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits. *Phytochemistry* **59**: 451–457.

**Chapagain BP., Wiesman Z., Tsrer (Lahkim) L. (2007).** *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, **26**:109–15.

**Cheeseman IM, Desai A. (2008).** Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Natural Reviews Molecular . Cell Biology.*; **9(1)**:33–46.

**Chen WJ., Hsiao LC., Chen KK. (2008).** Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. *Process Biochemistry*, **43**:488–98.

**Chen YQ., Xu QM., Liu YL., Li XR., Yang, SL., Zhuge HX. (2012).** Laboratory evaluation of the molluscicidal activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins against the snail *Oncomelania hupensis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, **25**:224–9.

**Chin YW., Chai HB., Keller WJ. and Kinghorn AD. (2008).** "Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and

cytoprotective activities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**(17): 7759-7764.

**Cho JY., Moon JH., Seong KY., Park KH. (1998).** Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull, *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* , **62**:2273-2276.

**Cho JY., Kim AR., Park MH. (2001).** Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Medica.*, **67**: 312-316.

**Chong KP., Rossall S. , Atong M. (2011).** HPLC Fingerprints and *In vitro* Antimicrobial Activity of Syringic Acid, Caffeic Acid and 4- hydroxybenzoic Acid against *Ganoderma boninense*", *Journal of Applied Sciences*. **11**: 2284-2291.

**Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Ple K., Voutquenne-Nazabadioko L. (2006).** Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1760**: 1418–1427.

**Cole GM., Lim GP., Yang F., Teter B., Begum A., Ma Q., Harris-White MC., Frautschy A., (2005).** Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiology of Aging*, **26**: 133 –136.

**Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti GA., Uzunov D., Tubaro A. and Loggia RD. (2008).** "In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants." *Journal of Ethnopharmacology*. **116**(1): 144-151.

**Cronk Q., Ojeda I., Pennington RT.( 2006)** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology*. **9**: 99-103.

**Cushnie TPT. and Lamb AJ. (2005).** "Antimicrobial activity of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**(5): 343-356.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Daglia M. (2012).** "Polyphenols as antimicrobial agents." *Current Opinion in Biotechnology* **23**(2): 174-181.

**Jimenez-Usuga Ndel S, Malafrente N, Cotugno R, De Leo M, Osorio E, De Tommasi N. (2016).** New sesquiterpene lactones from *Ambrosia cumanensis* Kunth *Fitoterapia* .**113**: 170–174.

**De Rijke E., Out P, Niessen WMA, Ariese F., Gooijer C., Brinkman UAT. (2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, **1112**: 31 – 63.

## Références bibliographiques

---

**Diab Y., Ioannou E., Emam A., Vagias C., Roussis V. (2012).** Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*, **77**: 686–690.

**Dinda B., Debnath S., Mohanta BC., Harigaya Y. (2010).** Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry and Biodiversity*, **7**: 2327–581.

**Dixon RA., Ferreira D. (2002).** Molecule of interest, genistein. *Phytochemistry*. **60**: 205-211.

**Dizhbite T., Telysheva G., Jurkjane V., Viesturs U. (2004).** Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants. *Bioresource Technology*. **95**:309-317.

**Dupont F., Guignard JL. (2007).** Abrégé de Botanique 14ème édition Editions Masson, Paris; 285 p.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Erdemoglu N., Ozkan S., Duran A., Tosun F. (2009).** GC-MS analysis and antimicrobial activity of alkaloid extract from *Genista vuralii*. *Pharmaceutical Biology*. **47**(1): 81-85.

**Evans BAJ, Griffiths K., Morton MS. (1995).** Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *Journal of Endocrinology*. **147** (2): 295-302.

**Evans P., Halliwell B.. (1999).** "Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria." *Annals of the New York Academy of Sciences*. **884**: 19-40.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Ferrazzano G F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G., Pollio A. (2011).** Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review, *Molecules*. **16**:1486-1507.

**Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006).** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*. **36** (4): 327-58.

**Fujioka T., Yoshida K., Fujil H., Nagao T., Okabe H., Mihashi, K. (2003).** Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VI. New ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **51**: 365–72.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Garritano S., Pinto B., Giachi I., Pistelli L., Reali D. (2005).** Assessment of oestrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in Vitro* short-term test. *Phytomedicine*. **12**: 143-147.

**Ge JH., Chang B. (2006).** Estrogenic activities of parabens, *Wei Sheng Yan Jiu.* **35:** 650–652.

**Guarrera PM, Leporatti ML. (2007),** Ethnobotanical remarks on Central and Southern Italy, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* **3:** 23.

**Giachi I., Manunta A., Morelli I., and Pistelli L. (2002).** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology.* **30:** 801-803.

**Gibbs P.E. (1966).** A revision of the genus *Genista* L. *Notes Royal Botanic Garden, Edinburgh.* **27(1):** 11-99.

**Girard M., Belanger J., Apsimon J. W., Garneau FX., Harvey C., Brisson, JR. (1990).** Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*. *Canadian Journal of Chemistry.* **68:** 11–18.

**Gottlieb OR. (1972).** «Chemosystematics of the lauraceae.» *Phytochemistry* **11:** 1537-1570.

**Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K. (2008).** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* **45:** 1318–1325.

**Goudable J., Favier, A. (1997).** Oxidative free radicals and antioxidants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* **11(2):** 115–120.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Hanganu D, Olah NK, Benedec D, Mocan A, Crisan G, Vlase L, Popica I, Oniga I. (2016).** Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (Fabaceae). *Pakistan Journal of Pharmamacological Sciences.* **29 :** 301-7.

**Harborne JB. (1969).** Chemosystematics of the Leguminosae flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteeae*. *Phytochemistry.* **8:** 1449-1456.

**Harworth RD. (1936).** «Natural resins.» *Annual Report on the Progress of Chemistry.* **33:** 266-279.

**Teles HL., Hemerly JP., Pauleti MP., Pandolfi JRC., , Araújo AR., Valentini SR., CM., Young MCM., Bolzani V Da S., Silva DAS.. (2005).** Cytotoxic lignans from the stems of *Styrax camporum* (Styracaceae) *Natural Product Research.* **19:** 319–323.

## Références bibliographiques

---

**Heywood, V.H. (1996).** Flowering Plants of the World. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-152.

**Hollman PCH., Arts ICW. (2000).** Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**: 1081- 1093.

**Hosseinian FS, Muir AD, Westcott ND et Krol ES. (2007).** AAPH-mediated antioxidant reactions of secoisolariciresinol and SDG. *Organic Biomolecular Chemistry*. **5**(4): 644.

**Hostettmann K., Marston A. (1995).** Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products). Cambridge : Cambridge University Press.

**Hudson JF., (1990).** Food antioxidants. *Elsevier Applied Science*, London

**Hwang H.C., Clurman B.E. (2005).** Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*. **24**: 2776-2786.

*ABCDEFGHIJKLMN OPQRSTUVWXYZ*

**Ignat I., Volf I., Popa VI. (2011).** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, **126**: 1821-1835.

*ABCDEFGHIJKLMN OPQRSTUVWXYZ*

**Johnsen NF., Olsen A., Thomsen BL., Christensen J., Egeberg R., Bach Fnuksen KE., Loft S., Overvad K. and Tjommeland A. (2009).** Plasma enterolactone and risk of colon and rectal cancer in a case-cohort study of Danish men and women. *Cancer Causes Control*. **21**(1): 153-162.

**Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA. Stevens P. (2002).** Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. Paris, Bruxelles, De Boek Université, 282.

*ABCDEFGHIJKLMN OPQRSTUVWXYZ*

**Kacem N., Goossens, JF., Duhail N., Roumy V., Hennebelle T., Christen P., Hostettmann K., Rhouati S.(2014).** Determination of alkaloids in endemic *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae). *biochemical systematic and ecology*. **56**: 83-87.

**Khan MTH., Ather A., Thompson KD. and Gambari R.. (2005).** "Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses." *Antiviral Research* **67**(2): 107-119.

**Kalinin VI., Avilov SA., Kalinina EY., Korolkova O G., Kalinovsky AI., Stonik V A., Riguera R., Jimnez C. (1997).** Structure of Eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-Eastern sea cucumber *Psolus eximius*. *Journal of Natural Products*, **60**:817-19.

**Karamać M, Koleva L, Kancheva VD, Amarowicz R. (2017).** The Structure-Antioxidant Activity Relationship of Ferulates. *Molecules*. **40**: 22-25.

**Kastan MB, Bartek J. (2004).** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. **432**(7015):316–23.

**Kim DS., Chang YJ., Zedk U., Zhao P., Liu YQ., Yang, CR. (1995).** Dammarane saponins from *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, **40**: 1493-7.

**Kitts DD., Yuan YV., Wijewickreme AN., Thompson LU. (1999).** Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular Cell Biochemistry*. **202**(1-2): 91-100.

**Kobayashi K., Teruya T., Suenaga K., Matsui Y., Masuda H., Kigoshi H. (2006).** Isotheasaponins B1–B3 from *Camellia sinensis* var. *sinensis* tea leaves. *Phytochemistry* **67**:1385–9.

**Kokpol U., Chavasiri W., Chittawong V., Bruce M., Cunningham GN. (1993).** Long chain aliphatic alcohols and saturated carboxylic acids from heartwood of *Rhizophora apiculata*. *Phytochemistry*, **33**: 1129-1131.

**Kong CS., Jeong CH., Choi JS., Kim KJ., Jeong JW. (2013).** Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. *Phytotherapy Research*. **27**:317–323.

**Korkina L., De Luca C. and Pastore S.. (2012).** Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1259**: 77-86.

**Krenn L., Miron A., Pemp E., Petr U., Kopp B. (2003).** Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift fuer Naturforschung (C: Journal of Biosciences)* **58**: 11-16.

**Kucukboyaci N., Ozkan S., Tosun F. (2012).** Gas chromatographic determination of quinolizidine alkaloids in *Genista sandrasica* and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*, **6**(1): 71-74.

**Kuijsten A., Holman PCH., Boshuizen HC., Buijsman MNCP., Van't Veer P., Kok FJ., Arts ICW. and Bas Bueno-de-Mesquita H. (2008).** Plasma Enterolignan Concentrations and Colorectal Cancer Risk in a Nested Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* . **167**(6): 734-742.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Lacaille-Dubois MA. (1999).** Saponins as immunostimulants and immunoadjuvants in: Immunomodulatory agents from plants, H. Wagner, Basel, Boston, Berlin (Eds.). *Birkhuser Verlag AG*, pp 243–72.



**Lacaille-Dubois MA., Wagner, H. (2000).** Bioactive saponins from plants:an update in: Studies in Natural Products Chemistry Series, Atta-Ur-Rahman (Eds.), *Elsevier Science*. **21**: 633–87.

**Lacaille Dubois MA. (2005a).** Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: Recent developments, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Studies innatural products chemistry series. *Elsevier, Amsterdam*. **32**: 209–46.

**Lacaille-Dubois MA. (2005b).** Bioactive saponins from plants: recent developments in "Handbook of Medicinal Plants", Yaniv Z., Bachrach, U. (Eds.).Food Products Press (FPP). The Haworth Medical Press (HMP): New York, Chapter 19, pp 399–428.

**Lacaille-Dubois MA. (2005c).** Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments in: Studies in Natural Products Chemistry Series, Atta-Ur-Rahman (Eds.). *Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands* . **32**: 209–46.

**Lacaille-Dubois MA., Delaude C., Mitaine-Offer AC. (2013).** Triterpenoid saponins: a focus on Polygalaceae in Handbook of Natural Products, K. G. Ramawat, J. M. Mérillon (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 104, pp 3205–32.

**Lakhanpal P. and Rai DK. (2007).** Quercetin: A versatile flavonoid. *International Journal of Medicine Update*. **2**: 22–37.

**Lamblin F., Hano C., Fliniaux O., Mesnard F., Fliniaux MA et Lainé E. (2008).** Interest of lignans in prevention and treatment of cancers. *Medicinal Sciences* . **24**: 511–520.

**Lemini C., Silva G, Timossi C, Luque D, Valverde A., Gonzalez-Martinez M., Hernandez A., Rubio-Poo C., Chavez Lara B.,Valenzuela F. (1997).** Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice, *Environmental Research* **75**: 130-134.

**Lemini C., Jaimez R., Avila ME., Franco Y., Larrea F., Lemus AE. (2003).** *In vivo* and *in vitro* estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicology and Industrial Health*. **19**: 69-79.

**Leopoldini M., Russo N and Toscano M. (2011).** "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." *Food Chemistry* **125**(2): 288-306.

**Lewis NG., Davin LB. (1999).** Lignans: biosynthesis and function. *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Oxford). 639-712.

**Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. (2005).** Legumes of the world. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.

**Lim EK, Jackson RG., Bowles DJ. (2005.)** Identification and characterisation of Arabidopsis glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *FEBS Letters*. **579**: 2802–2806.

**Linnek J., Mitaine-Offer AC., Miyamoto T., Tanaka C., Paululat T., Avunduk S., Alankus-Caliskan O., Lacaille-Dubois MA. (2011).** Cycloartane glycosides from three species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta*, **94**: 230–237.

**Liu RH. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**: 517–520.

**Lograda T., Chaker AN., Chalard P., Ramdani M., Chalchat JC., Silini H., Figueredo G. (2009).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et Dur. *Asian Journal of Plant Science*. **8**(7): 495-499.

**Luecha P., Umehara K., Miyase T., Noguchi H. (2009).** Antiestrogenic Constituents of the Thai Medicinal Plants *Capparis flavicans* and *Vitex glabrata*, *Journal of Natural Products* . **72**: 1954-1959.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Malumbres M., Barbacid M. (2005).** Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**: 630-641

**Maria S., Islam F., Qais N., Hasan CM. (2013).** Isolation of Vomifoliol: A Megastigmane from Leaves of *Antidesma ghaesembilla*. *Asian Journal of Chemistry* **25**( 6) : 3533-3534.

**Marino P., Guarino R., Bazan G. (2012).** The Sicilian taxa of *Genista* sect. *Voglera* and their phytosociological framework. *Flora Mediterranea*. **22**: 169-190.

**Matsumura A., Ghosh A., Pope G.S., Darbre P.D. (2005).** Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. **94**. 431-443.

**Marston A. L. M. and Hosttemann K. (2003).** Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*. *Fitoterapia* **74**: 237 - 241.

**McCann SE., Thompson LU., Nie J., Dorn J., Trevisan M., Shields PG., Ambrosone CB., Edge SB., Li HF., Kasprzak C. and Freudenheim JL. (2009).** Dietary lignan intakes in relation to survival among women with breast cancer: the Western New York Exposures and Breast cancer (WEB) Study. *Breast Cancer Research* . **122**(1): 229-235.

**McCredie RS., Ritchie E. and Taylor WC. (1969).** Constituents of *Eupomatia* species. The structure and synthesis of eupomatene, a lignan of novel type from *Eupomatia laurina* R. *Br. Aust. J. Chem.* **22**(6): 1011-1032.

**Medola JF., Cintra VP., Pesqueira E Silva EP., de Andrade Royo V., da Silva R., Saraiva J., Albuquerque S., Bastos JK., Andrade E Silva ML. and Tavares DC. (2007).** (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* **45**(4): 638-642.

**Mekkiou R., Seghiri R., Boumaza O., Sarri D., Chebbah K., Benayache, S., Bermejo J., Benayache. F. (2012).** Secondary metabolites from *Genista ferox* *Chemistry of Natural Compounds, Vol. 48:* No. 4.

**Merkl R, Hradkova I, Filip V, Smi Drkal J. (2010).** Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters, *Czech Journal of Food Sciences* **28:** 275-279.

**Miyazawa M. and Hisama M. (2003).** Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **51:** 6413-6422.

**Mohamadi S, Zhao M., Amrani A., Marchioni E., Zama, D Benayache F., Benayache S. (2015).** On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Industrial Crops and Products.* **76:** 910–919.

**Molyneux P. (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* **26** (2): 211-219.

**Moraes G., Norhcote PC., Kalinin VI., Avilov S A., Silchenko A S., Dmitrenok PS., Stonik VA., Levin VS. (2004).** Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology.* **32:**637–650.

**Moss GP. (2000).** Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* **72**(7): 1493-1523.

**Moure A., Cruz JM., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez MJ., Parajos JC., (2001).** "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry.* **72**(2): 145-171.

**Musacchio A. Spindle. (2011).** assembly checkpoint: the third decade. *Philosophical Transaction of Royale Society of London Series B , Biological Sciences.* **366** (1584): 3595–604.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Nassiri-Asl M., Hosseinzadeh H. (2009).** "Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds." *Phytotherapy Research* **23**(9): 1197-1204.

## Références bibliographiques

---

**Noccioli C., Meini L., Cecilia Loi M., Potenza D., Pistelli L. (2011).** A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. *Phytochemistry Letters*, **4**: 342-344.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Oksuz S. (1977).** Flavonoidal compounds of *Inula viscosa*. Part II. *Planta Med.* **31**: 270-273.

**Oksuz S, Ulubelen A., Barla A., (2002).** Terpenoids and Aromatic Compounds from *Euphorbia heteradena* *Turkish Journal of Chemistry* . **26**: 457 -463.

**Osborn AE. (1996a).** Saponins and plant defence—a soap story. *Trends Plant Sciences*. **1**: 4–9.

**Oksana S., Marian B., Mahendra R. and Hong Bo S., . (2012).** Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production, *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**: 2526-2539.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Park JD., Rhee DK., Lee YH. (2005).** Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Phytochemistry Reviews*. **4**:159–75.

**Prasad K. (2000).** Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *The International Journal of Angiology*. **9**(4): 220-225.

**Pavese JM., Farmer RL., Bergan RC. (2010).** Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Review*. **29**: 465-482.

**Perrone A., Masullo M., Bassarello C., Bloise E., Hamed A., Nigro P., Pizza C., Piacente S. (2008).** Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. *Tetrahedron*. **64**: 5061–71.

**Pistelli L., Bertoli A., Giachi I., and Manumata A. (1998).** Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Product*. **61** (11): 1404-1406.

**Pistelli L., Giachi I., Potenza D., Morelli I. (2000).** A New Isoflavone from *Genista corsica*. *Journal of Natural Product*. **63**: 504–506.

**Pistelli L., Bertoli A., Giachi I., Morelli I., Rubiolo P., Bicchi C. (2001).** Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **29**: 137-141.

**Podolak I., Galanty A., Sobolewska, D. (2010).** Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, **9**: 425–74.

## Références bibliographiques

---

**Polat E., Caliskan-Alankus O., Perrone A., Piacente S., Bedir E. (2009).** Cycloartane-type glycosides from *Astragalus amblolepis*. *Phytochemistry*, **70**: 628–34.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Qin YM., Xing Qian Y., Fang ZX., Chen JC., Gui Hua X., Liu LDH. (2008).** Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of *Satsuma Mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.) peels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56** : 5682-5690.

**Quezel P. and Santa S. (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, tome 2, 752–759, CNRS, Paris.

**Quideau S., Deffieux DC., Douat-Casassus C. and Pouységu L. (2011).** "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - International Edition* **50**(3): 586-621.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Rauter AP., Martins Al., Lopes R., Ferreira J., Serralheiro LM., Araujo M., Borges C., Justino J., Silva F., Goulart M., Thomas-Oates J., Rodrigues JA., Edwards E., Noronha JP., Pinto R. and Mota-Filipe H (2009).** Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 384–393.

**Ren S., Rollins B.J. (2004).** Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* **117**: 239-251.

**Rensen I V., Wray V., Witte L., Canto P., Greinwald R., Veen G., Veit M., Czygan F.C. (1993).** Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. *Phytochemistry*. **35** : 421-424.

**Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G.. (1996).** "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology and Medicine*. **20**(7): 933-956.

**Rigano D., Russo A., Formisano C., Cardile V., Senatore F. (2010).** Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria*. *Natural Product Communications*. **5**(7): 1127-1132.

**Robbins RJ. (2003).** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agr. Food Chem.* **51**: 2866-2887.

## Références bibliographiques

---

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F.(1998)** . A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**(2): 270-276.

**Šaponjac VT., Canadanovic-Brunet J., Cetkovic G., Djilas S. (2016)**. Chapter 6: Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. *Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland*.

**Sartori-Thiel A. (2003)**. "Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols." *Science et Agronomie ED 380. Doctorat*: 177.

**Sautour M., Mitaine-Offer AC., Lacaille-Dubois MA. (2007b)**.The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *Journal of Natural Medicines*. **61**:91–101.

**Schroeter H., Boyd C., Spencer JPE., Williams RJ., Cadenas E. and Rice-Evans C. (2002)**. "MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiology of Aging*. **23**(5): 861-880.

**Sell C. (2003)**. A fragrant introduction to terpenoid chemistry The Royal Society of Chemistry. *Thomas Graham House, Scientific Park, Milton Road, Cambridge, UK*, 410.

**Lee SH., Oe T. and Blair I. A.. (2001)**. "Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins." *Science*. **292**(5524): 2083-2086.

**Spichiger RE., Savolainen VV., Figeat M. Jeanmonod D. (2004)**. Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 202-211.

**Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D. (2002)**. Highperformance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A*. **967**: 85-113.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

**Tamboue H., Fotso S., Bonaventure TN., Dongo E. and Berhanu M. (2000)**. A phenolic metabolites from the seeds of *Canarium Schweinfurthi*. *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia* , **14**(2): 155-159.

**Thompson LU., Seidl MM., Rickard SE., Orcheson LJ., Fong HH. (1996)**. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutrition and Cancer*. **26**(2): 159-165.

## Références bibliographiques

---

**Thorne RF. (1992).** An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*, **13**: 365-389.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Umezawa T. (2003).** Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2**(3): 371-390.

*A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

**Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C J. and Telser J. (2004).** "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry.* **266**(1-2): 37-56.

**Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. (2006).** "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions.* **160**(1): 1-40.

**Van Rensen I., Wrey V., Witte L., Canto P., Grenwald R., Veen G., Veit M., Czygan FC. (1994).** Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*, *Phytochem.* **95**(2): 421-424.

**Veitch NC. (2007).** Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports.* **24**: 417-464.

**Velentzis LS., Cantwell MM., Cardwell C., Keshtgar MR., Leathem AJ., Woodside JV. (2009).** Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women: meta-analyses of observational studies. *British Journal of Cancer.* **100**(9): 1492-1498.

**Venditti A, Frezza C., Foddai S., Serafini M., 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.* doi.2016.02.012.

**Vermeersch M., Foubert K., Da Luz RI., Puyvelde LV., Pieters L., Cos P., Maes, L. (2009).** Selective antileishmania activity of 13,28-epoxyoleanane and related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy research,* **23**:1404–10.

**Victor A., Anand D , Radhakrishnan A., Parasuraman, S. (2016).** Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Review.* **10**(20): 84–89.

**Vincken JP., Heng L., De Groot A., Gruppen H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry,* **68**:275–297.

## Références bibliographiques

---

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Wang Y., Zhan Y., Zhu Z., Zhu S., Li Y., Li M., Yu B. (2007).** Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **15**: 2528–32.

**Ward HA., Kuhnle GG., Mulligan AA., Lentjes MA., Luben RN., Khaw KT. (2010).** Breast, colorectal, and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition–Norfolk in relation to phytoestrogen intake derived from an improved database. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**(2): 440-448.

**Wisit M, Siripit P, Narong N., Wilart P. (2011).** (+)-Syringaresinol Lignan from New Species *Magnolia Thailandica* *American Journal of Applied Sciences*. **8** (12): 1268-1271.

**Wojciechowski MF., Lavin M. and Sanderson MJ. (2004).** A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. **11**: 1846-1850.

**Wolinsky I. (1998).** Nutrition in Exercise and Sport. 3th edition. New York: *CRC Press*

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Xian YX., Zhou HL., Wang X., Yu JQ., Zhen ZJ and Yang BT. (2015).** Chemical constituents of *Gledistia sinensis* Thorns. *Asian Journal of Chemistry*. **27**(3): 1063-1065.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Zabka M and Pavela R. (2013).** Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* **93**:1051–1056.

**Zhang HJ., Tamez PA., Hoang VD., Tan GT., Hung NV. (2001).** Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. *Journal of Natural Product*. **64**:772-777.

**Zhang LW., Al-Suwayeh SA., Hsieh PW., Fang JY. (2010).** A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. *International Journal of Pharmaceutics* **399**: 44-51.

**Zellagui, A., Rhouati S., Creche J., Toth G., Ahmed AA., Pare W. (2004).** Antimicrobial activity of the alkaloid extract of *Genista microcephala*: isolation and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts assignments of lupanine and S-calycotomine. *Revista Latinoamericana de Quimica*, **32**(3), 109-114.



A New Triterpene Glucoside from *Genista numidica*Feryal Benayache<sup>a,b</sup>, Massimiliano D'Ambola<sup>b</sup>, Roberta Cotugno<sup>b</sup>, Massika Chaouche<sup>a</sup>, Samir Benayache<sup>a</sup>, Fadila Benayache<sup>a</sup>, Alessandra Braca<sup>c,\*</sup> and Nunziatina De Tommasi<sup>b</sup><sup>a</sup>Department of Chemistry, Research Unit, Development of Natural Resources, Bioactive Molecules and Physicochemical and Biological Analysis, University of Constantine 1, Algeria<sup>b</sup>Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Salerno, via Giovanni Paolo II 132, 84084 Fisciano (SA), Italy<sup>c</sup>Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy

alessandra.braca@unipi.it

Received: February 7<sup>th</sup>, 2018; Accepted: March 23<sup>rd</sup>, 2018

A new oleanolic acid triterpene glucoside, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-3β,21β,28-trihydroxy-olean-12-en-27-oic acid (**1**), has been isolated together with twelve known compounds from the chloroform and ethyl acetate extracts of *Genista numidica* Spach (Fabaceae) aerial parts. The structures were elucidated by spectroscopic and spectrometric analyses, mainly 1D-, 2D-NMR and MS data, and comparison with the literature. The antiproliferative activity of isolates was investigated on Jurkat, HeLa, and MCF7 cell lines. The most active triterpene, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-olean-12-en-3β,27,28,29-tetraol, showed activity in all cell lines. Further studies revealed that this compound induced in HeLa cells a cytostatic response.

**Keywords:** *Genista numidica*, Fabaceae, Triterpenoid glucoside, Cytotoxic activity.

The genus *Genista* (Fabaceae family) includes about 90 species of shrubs or small trees in the Mediterranean area and in Western Asia, of which 23 grow in Algeria [1]. This genus is known as a good source of active secondary metabolites like essential oils [2-4], saponins [5], quinolizidine alkaloids [6], and flavonoids [7]. A wide range of biological and pharmacological properties has been reported for this genus, such as antimicrobial [8], antioxidant [9], and antiproliferative activities [10]. In the course of our studies on Algerian medicinal plants [11,12], herein the isolation and structural characterization of a new oleanolic acid triterpene glucoside (**1**) along with twelve known compounds, are reported from the chloroform and ethyl acetate extracts of *G. numidica* Spach aerial parts, an endemic trifoliolate Algerian species, growing on moist forest floors commonly called Teqtaq. To date only the chemical composition and antimicrobial activity of *G. numidica* essential oil were reported [13], but no phytochemical investigation has never been carried out.

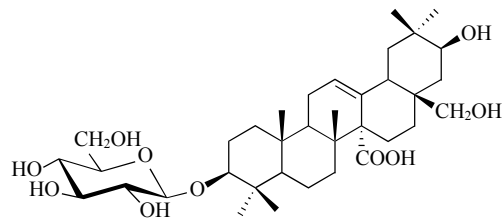


Figure 1: Compound 1.

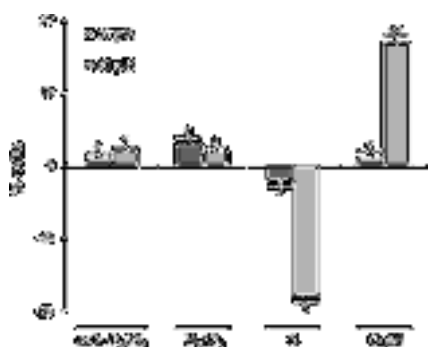
Compound **1** (Figure 1) was obtained as an amorphous powder. Its HRESIMS spectrum showed a deprotonated molecular ion peak at  $m/z$  649.3926 [M-H]<sup>-</sup> allowing the assignment of the molecular formula C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** (Table 1) showed six tertiary methyl groups at δ<sub>H</sub> 0.84, 0.86, 0.89, 0.92, 1.01, and 1.06, one olefinic proton at δ<sub>H</sub> 5.56 (br s), one hydroxymethine at δ<sub>H</sub> 3.44, and one hydroxymethylene at δ<sub>H</sub> 3.50, 3.20 indicating the presence of an oleanane triterpenoid skeleton[5].

Table 1: <sup>1</sup>H (600 MHz) and <sup>13</sup>C (150 MHz) NMR data of **1** (*J* in Hz, CD<sub>3</sub>OD)<sup>a</sup>.

position	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
1a	1.68 <sup>b</sup>	38.6
1b	1.06 dd (10.8, 4.5)	
2a	1.96 <sup>b</sup>	26.3
2b	1.70 <sup>b</sup>	
3	3.17 dd (11.7, 3.8)	89.5
4		38.0
5	0.84 <sup>b</sup>	55.0
6a	1.54 m	18.0
6b	1.37 m	
7a	1.66 <sup>b</sup>	36.5
7b	1.43 <sup>b</sup>	
8		40.0
9	2.08 dd (14.4, 4.5)	44.6
10		38.0
11a	1.95 <sup>b</sup>	21.9
11b	1.92 <sup>b</sup>	
12	5.56 br s	125.5
13		150.0
14		55.0
15a	2.00 ddd (16.0, 14.0, 5.0)	22.4
15b	1.64 <sup>b</sup>	
16a	1.70 <sup>b</sup>	22.1
16b	1.63 <sup>b</sup>	
17		44.0
18	2.37 dd (13.0, 4.0)	46.8
19a	1.68 <sup>b</sup>	38.6
19b	1.50 <sup>b</sup>	
20		43.7
21	3.44 dd (11.4, 6.0)	73.0
22a	1.47 <sup>b</sup>	38.0
22b	1.44 <sup>b</sup>	
23	1.06 s	27.0
24	0.86 s	15.6
25	0.89 s	15.6
26	1.01 s	16.0
27		174.0
28a	3.50 d (11.0)	68.9
28b	3.20 d (11.0)	
29	0.92 s	29.0
30	0.84 s	15.6
1'	4.32 d (7.8)	105.9
2'	3.20 dd (9.0, 7.8)	74.2
3'	3.35 t (9.0)	76.8
4'	3.31 t (9.0)	70.0
5'	3.25 m	76.4
6'a	3.85 dd (12.0, 3.5)	61.0
6'b	3.66 dd (12.0, 5.0)	

<sup>a</sup>Chemical shifts in ppm; assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. <sup>b</sup>overlapped signal.

Additionally, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** showed the presence of one anomeric proton ( $\delta_{\text{H}}$  4.32, 1H, d,  $J = 7.8$  Hz). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (Table 1) confirmed the presence of an oleanane triterpene glycoside with one  $\beta$ -glucopyranose sugar unit. The complete assignments of all protons and carbons were based on the analysis of HSQC, COSY, and HMBC data, indicating the presence of two oxygenated methines at  $\delta_{\text{H}}$  3.17/ $\delta_{\text{C}}$  89.5 and  $\delta_{\text{H}}$  3.44/ $\delta_{\text{C}}$  73.0, and one primary alcoholic function at  $\delta_{\text{H}}$  3.20, 3.50/ $\delta_{\text{C}}$  68.9. Furthermore, basing on HMBC correlations between protons at  $\delta_{\text{H}}$  3.20 and 3.50 (H<sub>2</sub>-28) and  $\delta_{\text{C}}$  38.0 (C-22), 44.0 (C-17), and 46.8 (C-18), the primary alcoholic function was assigned at C-28 position. The position of the two hydroxymethines was suggested by HMBC correlations between the two angular methyls at  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (Me-29) and 0.84 (Me-30) with 73.0 ppm (C-21), which correlated in the HSQC spectrum to the deshielded signal at  $\delta_{\text{H}}$  3.44 (1H, dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz, H-21), and by cross peaks between  $\delta_{\text{H}}$  1.06 (Me-23) and  $\delta_{\text{C}}$  89.5 (C-3) and  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (Me-24) and  $\delta_{\text{C}}$  89.5 (C-3). The chemical shifts of C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  55.0) and C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  36.5) indicated that compound **1** had a carboxylic function at C-27 position [5]. The location of the glucopyranose moiety was obtained on the basis of the HMBC correlation between the proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  4.32 (H-1') and C-3 of the aglycon. The configuration of the glucose unit was assigned as D after hydrolysis of **1** with 1 N HCl. The hydrolyzate was trimethylsilylated, and GC retention time of the sugar was compared with that of authentic sample. The analysis of H-3 (dd,  $J = 11.7, 3.8$  Hz) and H-21 (dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz) protons coupling constant showed an axial orientation, indicating therefore the  $\beta$ -configuration of both OH group at C-3 and C-21 [14]. The structure of **1** was therefore elucidated as 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,21 $\beta$ ,28-trihydroxy-olean-12-en-27-oic acid. Known compounds were identified by NMR and MS data and comparison with literature data as 4-hydroxy-3-methoxy cinnamaldehyde [15], vomifoliol [16], 4-*O*-methylcedrusin [17], syringaresinol [18], quercetin [19], *p*-coumaric acid [20], *p*-hydroxybenzoic acid [21], prunetin [22], 3-methoxyquercetin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside [23], 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,28,29-trihydroxy-olean-12-en-27-oic acid [5], 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,27,28-trihydroxy-olean-12-en-29-oic acid [5], and 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol [5].



**Figure 2:** Effect of 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol on proliferation of HeLa cells. Flow cytometric evaluation of DNA content in HeLa cells exposed for 48 h to compound (15 and 40  $\mu\text{M}$ ) or vehicle alone (controls). Data are presented as increase/decrease in percentages of treated cells with a specific DNA content, in respect to control values (control cells, subG0/G1,  $\leq 2\%$ ; G0/G1,  $62 \pm 2.1\%$ ; S,  $31 \pm 1.5\%$ ; G2M,  $6 \pm 0.3\%$ ). All results are mean values  $\pm$  SD from at least three experiments performed in duplicate (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ).

The antiproliferative activity of triterpene glucosides and lignans was evaluated in Jurkat, HeLa, and MCF7 cancer cell lines. Cells were exposed to increased concentrations of compounds and cell viability was evaluated at 48 h by MTT assay. Half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values, obtained from dose-response curves, showed that only 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-

3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol has an interesting antiproliferative activity with similar potency in all cell lines. In particular, it displayed in Jurkat, HeLa, and MCF-7 cells an  $\text{IC}_{50}$  value of  $37 \pm 2.3$ ,  $35 \pm 1.7$  and  $50 \pm 3.6$   $\mu\text{M}$ , respectively. The mechanism underlying its antiproliferative effect was further investigated in HeLa cells. To investigate whether 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol reduced cells number by affecting cell cycle progression and/or by inducing cell death, HeLa cells were exposed for 48 h at concentrations close to its  $\text{IC}_{50}$  value, 15 and 40  $\mu\text{M}$ ; DNA content was evaluated by flow cytometry analysis of propidium iodide (PI) stained nuclei. As shown in Figure 2, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol induced a robust G<sub>2</sub>/M block without any significant increase of hypodiploid cells.

## Experimental

**General experimental procedures:** Optical rotations were measured on a Rudolph Research Analytical Autopol IV polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1 dm microcell. NMR experiments were performed on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe at 300 K. All 2D NMR spectra were acquired in CD<sub>3</sub>OD (99.95%, Sigma-Aldrich), and standard pulse sequences and phase cycling were used for DQF-COSY, HSQC, and HMBC spectra. TLC were performed on precoated Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck); compounds were detected by spraying with Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. Column chromatography was performed over silica gel (70–220 mesh, Merck); reversed-phase (RP) HPLC separations were conducted on a Shimadzu LC-20AT series pumping system equipped with a Shimadzu RID10A refractive index detector and a Shimadzu injector, using a C<sub>18</sub>  $\mu$ -Bondapak column (30 cm x 7.8 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Waters–Milford), C<sub>8</sub> Luna PREP column (25 cm x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Phenomenex) and mobile phases consisting of MeOH-H<sub>2</sub>O mixtures at a flow rate of 2 ml/min.

**Plant material:** The aerial parts of *G. numidica* Spach were collected during the flowering stage at Djebel el Ouahech park (Constantine, Algeria) in June 2013. A voucher specimen (n° GN78/06/2013) has been deposited at the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University of Constantine 1.

**Extraction and Isolation:** Air-dried aerial parts of *G. numidica* (1.7 Kg) were macerated at room temperature with EtOH-H<sub>2</sub>O (8:2, v/v). The extract was concentrated to dryness, and the residue was suspended in H<sub>2</sub>O, and partitioned successively with CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH, to yield a CHCl<sub>3</sub> (2 g), EtOAc (6 g), and *n*-BuOH fraction (15 g), respectively.

The CHCl<sub>3</sub> extract (2 g) was subjected to Silica gel column chromatography and eluted with *n*-hexane and a gradient of EtOAc up to 100%, then eluted with CHCl<sub>3</sub> and gradient of MeOH (10%, 15%, 20%, 40%, 60%, 100%) to yield 27 fractions. Each fraction was monitored on TLC and similar fractions were combined. Fractions 4 (52 mg) and 5 (40 mg), eluted with *n*-hexane-EtOAc (85:15-82:18), were purified by RP-HPLC (C<sub>18</sub>) using MeOH-H<sub>2</sub>O (45:55) to give 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (3 mg,  $t_{\text{R}} = 5$  min). Fractions 13-15 (186 mg), eluted with *n*-hexane-EtOAc (3:2-1:1), were purified by RP-HPLC (C<sub>8</sub>) using MeOH-H<sub>2</sub>O (3:7) to give vomifoliol (2 mg,  $t_{\text{R}} = 40$  min). Fraction 20 (91 mg), eluted with *n*-hexane-EtOAc (3:7), was purified by RP-HPLC (C<sub>8</sub>) using MeOH-H<sub>2</sub>O (2:3) to afford 4-*O*-methylcedrusin (2 mg,  $t_{\text{R}} = 45$  min) and syringaresinol (1.2 mg,  $t_{\text{R}} = 52$  min).

5.5 g of the EtOAc extract was subjected to silica gel column chromatography and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and a gradient of acetone up to 100%, and then followed by increasing concentrations of

MeOH (between 10% and 80%) to yield 35 fractions. Fraction 8 (60 mg) gave a yellow precipitate that was washed with  $\text{CHCl}_3$  to give quercetin (8 mg). Fraction 10 (108 mg) was purified by RP-HPLC ( $C_8$ ) using MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (3:7) to give *p*-coumaric acid (2.7 mg,  $t_R$  18 min) and *p*-hydroxybenzoic acid (2.3 mg,  $t_R$  23 min). Fraction 12 (146 mg) contained a major product as yellow precipitate which was washed with  $\text{CHCl}_3$  to give prunetin (4 mg). Fraction 16 (430 mg) was purified by RP-HPLC ( $C_{18}$ ) using MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (2:3) to give 3-methoxyquercetin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (1.8 mg,  $t_R$  40 min). Fraction 18 (339 mg) was purified by RP-HPLC ( $C_{18}$ ) using MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (57:43) to give compound **1** (1.2 mg,  $t_R$  25 min), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,28,29-trihydroxy-olean-12-en-27-oic acid (3 mg,  $t_R$  32 min), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,27,28-trihydroxy-olean-12-en-29-oic acid (1.5 mg,  $t_R$  39 min) and 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-ene-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol (2 mg,  $t_R$  44 min).

### 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,21 $\beta$ ,28-trihydroxy-olean-12-en-27-oic acid (**1**)

$[\alpha]_D$ : + 32.0 (*c* 0.1, MeOH).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR: Table 1.

ESI-MS: *m/z* 649 [M-H] $^-$ , 605 [M-H-44] $^-$ , 425 [M-H-44-18-162] $^-$ .

HRESIMS: *m/z* 649.3926 [M-H] $^-$  (calculated for  $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_{10}$ , 649.3952).

**Acid hydrolysis of compound 1:** A solution of compound **1** (2.0 mg) in 1 N HCl (1 mL) was stirred at 80°C in a stoppered reaction vial for 4 h. After cooling, the solution was evaporated under a stream of  $\text{N}_2$ . The residue was dissolved in 1-(trimethylsilyl)-imidazole and pyridine (0.2 mL), and the solution was stirred at 60°C for 5 min. After drying the solution, the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The  $\text{CHCl}_3$  layer was analyzed by GC using a L-CP-Chirasil-Val column (0.32 mm x 25 m). Temperatures of both the injector and detector was 200°C. A temperature gradient system was used for the oven, starting at 100°C for 1 min and increasing up to 180°C at a rate of 5°C/min. Peak of the hydrolysate was detected by comparison with retention

times of authentic samples of D-glucose (Sigma Aldrich) after treatment with 1-(trimethylsilyl)imidazole in pyridine.

**Cell cultures:** Jurkat, HeLa, and MCF-7 cell lines were obtained from the American Type Cell Culture (ATCC). Cells were maintained in DMEM (HeLa and MCF-7) or RPMI 1640 (Jurkat), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 mg/L streptomycin and penicillin 100 IU/mL at 37°C in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . To ensure logarithmic growth, cells were subcultured every two days. Stock solutions (50 mM) of isolates in DMSO were stored in the dark at 4°C. Appropriate dilutions were prepared in culture medium immediately prior to use. In all experiments, the final concentration of DMSO did not exceed 0.15%(v/v).

**Cell viability and cell cycle:** The number of viable cells was quantified by MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]) assay. Absorption at 550 nm was assessed using a microplate reader (LabSystems, Vienna, VA, USA). In some experiments cell viability was also checked by Trypan Blue exclusion assay using a Bürker counting chamber.  $\text{IC}_{50}$  values were calculated from cell viability dose-response curves and compared to etoposide, used as positive control. Each experimental condition was tested once in quadruplicate.

Cell cycle was evaluated by PI staining of permeabilized cells according to the available protocol and flow cytometry (BD FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson) [24]. Data from 5000 events per sample were collected. The percentages of the elements in the hypodiploid region and in  $G_0/G_1$ , S and  $G_2/M$  phases of the cell cycle were calculated using the CellQuest or MODFIT software, respectively.

**Statistical analysis:** Data reported in Figure 2 are the mean values  $\pm$  SD from at least three experiments, performed in duplicate, showing similar results. Differences between treatment groups were analyzed by Student's t-test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## References

- Noccioli C, Meini L, Cecilia Loi M, Potenza D, Pistelli L. (2011) A new alpinum isoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. *Phytochemistry Letters*, 4,342-344.
- Lograda T, Chaker AN, Chalchat JC, Ramdani M, Figueredo G. (2011) Composition of the essential oil of *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46,992-994.
- Lograda T, Chaker AN, Chalchat JC, Ramdani M, Silini H, Figueredo G, Chalard P. (2010) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Genista ulicina* and *G. vepres*. *Natural Product Communications*, 5,835-838.
- Rigano D, Russo A, Formisano C, Cardile V, Senatore F. (2010) Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria*. *Natural Product Communications*, 5,1127-1132.
- Boutaghane N, Voutquenne-Nazabadioko L, Harakat D, Simon A, Kabouche Z. (2013) Triterpenesaponins of *Genista ulicina* Spach. *Phytochemistry*, 93, 176-181.
- Martins A, Wink M, Tei A, Brum-Bousquet M, Tillequin F, Rauter AP. (2005) A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 16,264-266.
- Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Benayache S, Garcia VP, Bermejo J, Benayache F. (2006) Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42,730-731.
- Küçükbayacı N, Özkan S, Tosun F. (2012) Gas Chromatographic determination of quinolizidine alkaloids in *Genista sandrasica* and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*, 6,71-74.
- Rauter AP, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro LM, Araujo ME, Borges C, Justino J, Silva FV, Goulart M, Thomas-Oates J, Rodrigues JA, Edwards E, Noronha JP, Pinto R, Mota-Filipe H. (2009) Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122,384-393.
- Bencherchar I, Demirtas I, Altun M, Gul F, Sarri D, Benayache F, Benayache S, Mekkiou R. (2017) HPLC analysis, anti-oxidant activity of *Genista ferox* and its anti-proliferative effect in HeLa cell line. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 260-267.
- Beladjila KA, Cotugno R, Berrehal D, Kabouche Z, De Tommasi N, Braca A, De Leo M. (2017) Cytotoxic triterpenes from *Salviabuchananii* roots. *Natural Products Research*, 32, 2015-20130.
- Belaabed S, Beghidja N, Ayoub K, D'Ambola M, De Leo M, Cotugno R, Marzocco S, De Tommasi N. (2017) Phytochemical study and antioxidant activity of *Calligonum azei* Maire and *Calligonum comosum* L'Her. *Natural Product Communications*, 12,1901-1904.
- Lograda T, Chaker AN, Chalard P, Ramdani M, Chalchat JC, Silini H, Figueredo G. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et Dur. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8,495-499.
- Jung DY, Ha H, Lee HY, Kim C, Lee JH, Bae K, Kim JS, Kang SS. (2008) Triterpenoid saponins from the seeds of *Pharbitis nil*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56,203-206.

- [15] Kim H, Ralph J. (2003) NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehyde into lignins. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **1**, 268-281.
- [16] Calis I, Kuruuzum-Uz A, Lorenzetto, PA, Ruedi P. (2002) (6S)-Hydroxy-3-oxo--ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits. *Phytochemistry*, **59**, 451-457.
- [17] Van Dyck SMO, Lemièrè GLF, Jonckers THM, Dommissie R. (2000) Synthesis of 4-O-methylcedrusin. Selective protection of catechols with diphenyl carbonate. *Molecules*, **5**, 153-161.
- [18] Monthong W, Pitchuanom S, Nuntasae N, Pompimon W. (2011) (+)-Syringaresinol lignan from new species *Magnolia thailandic*. *American Journal of Applied Sciences*, **8**, 1268-1271.
- [19] Agrawal PK. (1989) Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier, Amsterdam, 154.
- [20] Ochocka RJ, Rajzer D, Kowalski P, Lamparczyk, H. (1995) Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **709**, 197-202.
- [21] Sokłowska-Woznik A, Szewczyk K, Nowak R. (2003) Phenolic acids from the herb of *Linaria vulgaris* (L), Mill. *Herba Polonica Journal*, **49**, 161-165.
- [22] De Almeida JGL, Silveira ER, Pessoa ODL. (2008) NMR spectral assignments of a new [C O C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **46**, 103-106.
- [23] Krenn L, Miron A, Pemp E, Petr U, Kopp B. (2003) Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift für Naturforschung*, **58**, 11-16.
- [24] Jimenez-Usuga N, Malafronte N, Cotugno R, De Leo M, Osorio E, De Tommasi N. (2016) New sesquiterpene lactones from *Ambrosia cumanensis* Kunth. *Fitoterapia*, **113**, 170-174.

# Résumé

Le présent travail concerne l'étude phytochimique et biologique d'une espèce endémique appartenant à la famille des Fabacées : *Genista numidica* Spach qui a été récoltée de la région de Constantine.

Nos travaux d'extraction des parties aériennes de *G. numidica* suivis de séparation chromatographiques nous ont permis d'isoler 14 métabolites secondaires des extraits chloroforme et acétate d'éthyle, et l'identification structurales de 13 d'entre eux parmi lesquels un triterpène nouveau.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , TOCSY-1D, COSY, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'évaluation de l'activité antioxydante réalisée sur les extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et *n*-BuOH de *G. numidica*, par la méthode de DPPH a montré que l'extrait acétate d'éthyle a un bon effet scavenging vis-à-vis du radical DPPH *in vitro* ( $\text{CI}_{50} = 40,43 \pm 3,09 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

L'activité antiproliférative des produits purs isolés (lignanes et saponines) a été effectuée sur trois lignées cellulaires Jurkat (leucémie), HeLa (cancer du col de l'utérus) et MCF-7 (cancer du sein). Le triterpène le plus actif, le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,27,28,29-tétraol, a présenté un effet cytotoxique sur toutes les lignées cellulaires avec des valeurs de  $\text{IC}_{50} = 37 \pm 2,3 \mu\text{M}$  (Jurkat);  $35 \pm 1,7 \mu\text{M}$  (HeLa) et  $50 \pm 3,6 \mu\text{M}$  (MCF-7). D'autres études sur le mécanisme d'action de ce produit effectuées sur les cellules HeLa ont révélé que ce composé a induit l'arrêt du cycle cellulaire G2/M.

**Mots clés** : Fabacées, *Genista numidica*, lignanes, triterpènes, activité antioxydante, activité cytotoxique, RMN 1D et 2D.

# Abstract

The present work concerns the phytochemical and biological study of an endemic species belonging to the Fabaceae family: *Genista numidica* Spach which has been collected from the region of Constantine.

Our work on the extraction of the aerial parts of *G. numidica* followed by the chromatographic separation permitted the isolation of 14 secondary metabolites from the chloroformic and ethyl acetate extracts. The structures of 13 were identified and fully described, including a new triterpene.

The molecular structures of isolated compounds were established mainly by the use of NMR 1D and 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , TOCSY-1D, COSY, HSQC and HMBC), high resolution mass spectrometry (HRESI-MS) and by comparison with the literature Data.

The antioxidant activity of  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc and *n*-BuOH extracts of *G.numidica* has been investigated by DPPH test, the results showed that the ethyl acetate extract has a good scavenging effect *in vitro* against the DPPH radical ( $\text{IC}_{50} = 40.43 \pm 3.09 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

The antiproliferative activity of isolates (lignans and saponins) was investigated on Jurkat, HeLa and MCF-7 cell lines. The most active component, the triterpene, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-olean-12-en-3 $\beta$ ,27,28,29-tetraol, showed activity in all cell lines, an  $\text{IC}_{50}$  value of  $37 \pm 2.3 \mu\text{M}$  (Jurkat),  $35 \pm 1.7 \mu\text{M}$  (HeLa) and  $50 \pm 3.6 \mu\text{M}$  (MCF-7) respectively.

The mechanism underlying its antiproliferative effect was investigated in HeLa cells. The results showed that this compound affect the cell cycle progression by inducing a robust G2/M bloc in HeLa cells.

**Keywords:** Fabaceae, *Genista numidica*, lignans, Triterpenoid, antioxidant activity, Cytotoxic activity, NMR 1D and 2D.

# ملخص

يتمحور هذا البحث حول الدراسة الفيتو كيميائية والبيولوجية لنبتة أصلية تنتمي الى عائلة Fabaceae:

*Genista numidica* Spach و التي تم قطفها من منطقة قسنطينة .

مكننا الاستخلاص و العزل الكروماتوغرافي لمستخلصات الطبقة الهوائية من عزل 14 مركب من مستخلصات الكلوروفورم و خلات الايثيل تم تحديد البنية التركيبية لثلاثة عشرة مركب من بينهم مركب جديد من نوع تربينات الثلاثية.

تم التعرف على بنية المركبات المفصولة بواسطة مختلف الطرق المطيافية كالكثلة عالية الدقة (ESI-MS) , الرنين النووي المغناطيسي NMR و تطبيقاته وكذا بمقارنة النتائج مع معطيات المراجع.

تم تقييم النشاط المضاد للاكسدة لجميع المستخلصات على طريقة DPPH حيث اظهرت النتائج ان مستخلص اسيتات الايثيل له فعالية ممتازة ضد الاكسدة ( $IC_{50} = 40,43 \pm 3,09 \mu\text{g/ml}$ ).

تم دراسة النشاط المضاد للتكاثر لبعض المركبات حيث اظهرت النتائج المحصل عليها ان المركب : 3-O-β-D- glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol له قدرة ممتازة في تثبيط نمو و تكاثر ثلاثة انواع من الخلايا السرطانية للانسان HeLa, Jurkat و MCF-7 وكشفت دراسات أخرى عن آلية عمل هذا المنتج على خلايا هيللا أن هذا المركب يسبب استجابة تثبيط الخلايا.

## كلمات مفتاحية :

*Fabaceae*, *Genista numidica*, تربينات, النشاط المضاد الأكسدة , النشاط السام للخلايا, الرنين النووي المغناطيسي.