

République Algérienne Démocratique Et Populaire

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR
BATNA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

MEMOIRE
Pour l'obtention du diplôme de
MAGISTER

Spécialité : Chimie Organique

Présenté par :
MOKHTARI MOUNA

THEME

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE

CALYCOTOME SPINOSA.Link

DEVANT LE JURY

DIBI AmmarPr. Université de Batna

Président

ABERKANE Med CherifM.C Université de Batna Rapporteur

EL-HILLOU Malek Rasoul YacinePr. Université d'Oum El Bouaghi

Examineur

HARKAT Hassina M.C Université de Batna Examinatrice

BITAM Fatima M.C.B Université de Batna Invitée

Année Universitaire : 2011-2012

Remerciements

*Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement, au département de chimie, à la faculté des sciences de l'université de Batna, sous la direction de monsieur **Med cherif Aberkane**, maître de conférences à l'université de Batna.*

Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le professeur **AmarDIBI** (Université de Batna) d'avoir aimablement accepté de présider le jury de cettethèse.*

*Je remercie vivement Monsieur le professeur **Malek Rasoul Yacine EL-HILLOU** (Université d'Oum El Bouaghi) d'avoir bien voulu juger ce travail.*

*Je remercie mademoiselle **Hassina HARKAT** maître de conférences de l'université de Batna, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail.*

*Je remercie mademoiselle **Fatima BITAM** maître de conférences de l'université de Batna, d'avoir accepté notre invitation pour participer à ce jury de thèse.*

*J'exprime mes sincères remerciements à monsieur **Paul Mosset** professeur de ENSC de l'université de Renne pour son aide et sa disponibilité en me permettant la réalisation des spectres.*

*Merci à **Sonia CHABANI** de m'avoir aidé durant les moments difficiles...*

*Mes remerciements vont également à tout mes amis, particulièrement **Sawsen, Najet, Ouasila, Siham, Amira, Badra, Soria, Wasila** et tous les autres car trop nombreux pour les nommer tous.*

*Merci à mes proches notamment **mes parents, mon mari**, mes deux enfants **Anfel** et **Akram**, mes sœurs **Warda, Selma** et **Asma**, mes frères **Yahya, Lotfi** et **Ilyes**.*

Sans vous, rien n'aurait possible, merci de votre soutien moral et de votre amour...

Dédicace

CETTE THÈSE REPRÉSENTE L'ABOUTISSEMENT DU SOUTIEN ET DES ENCOURAGEMENTS QUE MES PARENTS M'ONT PRODIGUÉS TOUT AU LONG DE MA SCOLARITÉ.

LA PATIENCE ET L'ENCOURAGEMENT DE MON MARI M'ONT AIDÉ À SURMONTER TOUTES LES DIFFICULTÉS RENCONTRÉES AU COURS DE CETTE THÈSE.

A MES DEUX ENFANTS ANFEL ET AKRAM.

A MES FRÈRES YAHYA, LOTFI, ILYES.

A MES SŒURS WARDA, SELMA, ASMA.

A MES NEVEUX FADI ET ASSIL.

ABREVIATIONS UTILISEES

°C :Degré Celsius

δ :Déplacement chimique

1D : monodimensionnelle

2D :bidimensionnelle

AcOEt :Acétate d'éthyle

CC :Chromatographie sur colonne

CCM :Chromatographie sur couche mince

CHCl₃ :Chloroforme

COSY :Spectroscopie de Corrélation H-H

d :doublet

dd :doublet de doublet

s :singulet

tl :triplet large

t :triplet

HMBC :Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC :Heteronuclear Single-Quantum Correlation

Hz :Hertz

IR :Infra- Rouge

J :constantes de couplage (RMN)

m:multiplet

Me :Méthyle

DMSO-d₆ :Diméthylsulfoxyde deutéré

Acétone-d₆acétone deutéré

MeOH :méthanol

MS :spectrométrie de masse

ppm :partie par million

R_f :facteur de rétention

RMN :résonance magnétique nucléaire

TMS:Tetramethylsilane

UV: Ultraviolet

Sommaire

Introduction.....	8
-------------------	---

Chapitre I: Rappel bibliographique

I.1. Description de la plante étudiée.....	11
I.1.1.La famille des Fabaceae.....	10
❖ Caractères botaniques de la famille.....	11
❖ Appareil végétatif.....	12
❖ Appareil reproducteur.....	12
❖ Phylogénie.....	13
I.1.2. La sous-famille des Papilionoideae.....	13
❖ Caractères botaniques.....	13
I.1. 3 Le genre <i>Calycotom</i>	14
❖ Origine du nom.....	14
❖ Utilisation.....	15
❖ Classification scientifique de <i>C. spinosa</i>	15
I.1.4 Etudes chimiques sur la famille des Fabaceae.....	17
I.1.5 Les travaux antérieurs sur la phytochimie du genre <i>calycotome</i>	17

Chapitre II: Les composés flavonoidique

II.1 Les Flavonoides.....	21
II.2. Classes des Flavonoides.....	22
-Flavones, Flavonols.....	23
-Flavanones.....	25
-Isoflavones.....	26
-Chalcones, aurones.....	26
-Biflavonoïdes.....	27

-Les anthocyanidines.....	27
-Hétérosides flavonoïdiques.....	28
II.3. Biosynthèse des Flavonoides.....	27
II.4. Le Rôle Bioactif des Flavonoides.....	31
II.5. Etude Chimique des Flavonoïdes.....	34
II.5.1. Chromatographie.....	34
II. 5.2. Spectroscopie UV.....	34
II. 5.3. Spectrométrie de Masse.....	34

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1 Introduction.....	38
III.2 Extraction.....	38
III.2.1 Macération.....	38
❖ Protocole.....	39
III.2.2 Séparation.....	40
A-Extrait chloroformique.....	40
B- Extrait butanolique.....	40
III.2.3 Purification.....	41
A- Extrait chloroformique.....	41
B- Extrait butanolique.....	42
III.3 Détermination de structure des composés isolés.....	42
III.3.1 Identification du produit M1.....	43
III.3.2 Identification du produit M2.....	54
III.3.2 Identification du produit M3.....	67
III.3.2 Identification du produit M4.....	79
Conclusion.....	86

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV.1 Introduction.....	91
IV.2 Matériel Végétal.....	91
IV.3 Méthodes Physico-chimiques.....	91
IV.3.1 Spectres de Masse (MS).....	91
IV.3.2 Spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	91
IV.3.3 Spectroscopie Infrarouge (IR).....	91
IV.3.4 Chromatographies.....	91
IV.3.4.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).....	91
IV.3.4.2 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE (CC).....	92
IV.4 Méthodes de fractionnement et de Purification.....	92
IV.4.1 Extrait chloroformique.....	92
VI.4.1.1. Purification.....	95
➤ Etude de (A-3+A-4).....	95
VI.4.2 Extrait méthanolique.....	95
VI.2.1. Purification.....	100
➤ Etude de C-12.....	100
VI.4.3. Composés isolés de l'espèce <i>Calycotome spinosa</i>	101
VI.4.3.1. Composé M1.....	101
VI.4.3.2. Composé M2.....	103
VI.4.3.3. Composé M3.....	104
VI.4.3.4. Composé M4.....	106
Références bibliographiques.....	108
Résumé.....	112

Introduction

Depuis toujours, l'homme a utilisé son environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle[1]: obtenus par hémi-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification d'un produit naturel, composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique.

De plus, sur les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques[2] ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale, stéréospécificité...) est souvent impossible à réaliser.

Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. Il en résulte une urgence à connaître et protéger ces espèces et les savoirs qui leur sont associés.

Particulièrement en Algérie, les marchés regorgent de centaines de plantes médicinales différentes, sauvages ou cultivées localement. Certaines sont prescrites comme remèdes à usage domestique. D'autres sont mastiquées pour combattre la fatigue.

Tout en encourageant la recherche et l'étude des substances actives dans les plantes, leur structure, leur distribution, leur modification et les processus de transformation qui se produisent au cours de leur vie, la revalorisation de la phytochimie en Algérie pourrait aboutir à l'homologation de nouveaux médicaments à base de plantes qui sont très riches en métabolites secondaires.

Inscrit dans ce contexte général, ce travail de thèse a pour objectif de caractériser chimiquement les tiges et les feuilles d'une Légumineuse (Fabaceae) : *Calycotome spinosum*. Link.

Après une présentation botanique de *C. spinosum* et de sa place dans les classifications scientifiques, une synthèse bibliographique permettra de décrire les métabolites

secondaires principaux dans ce genre : les flavonoïdes. Puis, les principales études phytochimiques antérieures relatives aux espèces du même genre seront présentées afin d'introduire la partie principale de ce travail. Cette partie concerne en effet la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de l'étude phytochimique des tiges et des feuilles de *C. spinosum*. Le dernier volet est consacré à la présentation des techniques chromatographiques et d'analyse structurales utilisées.

Chapitre I

Rappel bibliographique

I.1. Description de la plante étudiée

I.1.1. La famille des Fabacées

La grande famille des Fabacées (de *faba*, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue.

Les Fabacées constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [3]. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées [4].

Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-*rhizobium* permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme [3].

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 [3].

❖ Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabacées possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe « se dit d'une fleur dont les différentes pièces de chaque verticille (sépal, pétale, étamine) sont disposées symétriquement par rapport à un plan (plan axe/bractée) ». Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique.

❖ Appareil végétatif

Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à *rhizobium* qui se forment si le sol est pauvre en azote[4].

Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées.

Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin).

❖ Appareil reproducteur

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées.

Les Fabacées les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Toutes les Fabacées possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations.

Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscente), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres.

Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, exalbuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja).

❖ Phylogénie

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL4*, confirmant l'origine monophylétique de cette famille[3]. Les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles selon l'APG III (2009):

- la sous-famille de Bauhinioïdes, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- la sous-famille des Mimosoïdées
- la sous-famille des Caesalpinioïdées
- la sous-famille des Papilionoïdées ou Faboïdées comprenant le genre *Calycotome*.

I.1.2. La sous-famille des Papilionoïdées

La sous-famille des Papilionoïdées est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille, 476 genres et 13 860 espèces[3]. On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

❖ 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[4].

Traditionnellement, les Papilionoïdées ont été caractérisées par des traits qui sont considérés maintenant comme des synapomorphies « caractère dérivé ou apomorphique partagé par deux ou plusieurs taxons » de la sous-famille[3]. Ces caractéristiques incluent la présence de bois avec un parenchyme prédominant axial para trachéal qui est assez rare ; des vaisseaux avec des trous alternés et de simples perforations plates ; l'absence de feuilles bipennées[3].

Les éléments les plus caractéristiques concernent la fleur des Papilionoïdées :

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. Le pétale dorsal (appelé aussi vexillum ou plus couramment étendard), recouvre les deux pétales latéraux ou ailes. Ces derniers recouvrent à leur tour, les deux pétales inférieurs, libres ou unis par leur bord interne sur une certaine longueur. Ces deux pièces inférieures constituent ensemble la carène qui renferme l'androcée et le gynécée.

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 monadelph (genre *Cytisus*). L'androcée est didelphe quand neuf étamines sont unies en un tube ouvert en arrière et que l'étamine postérieure reste libre (genre *Vicia* et genre *Derris*).

I.1. 3 Le genre *Calycotome*

❖ Origine du nom

Du grec calyx, calice, temnô, je coupe : le calice se rompt circulairement et paraît, comme coupé après la floraison[5].

Le genre *Calycotome* est caractérisée par la fleur dont le calice ovoïde, couronné par 5 petites dents, complètement clos dans le bourgeon et se rompant circulairement par le milieu au moment de la floraison ; étendard dressé, carène recourbée ; style arqué ; gousse comprimée, à suture ventrale élargie et étroitement ailée de chaque côté, à graines non caroncules[6].

Les plantes de ce genre sont très-épineuse, à feuilles 3 folioles, à fleurs jaunes. L'espèce *spinosa*, sujet de notre travail, est un arbrisseau de 1 à 2 mètres, à tige dressé, à rameaux épineux, divariqués, fortement striés, glabrescents; feuilles noircissant par la dessiccation, à folioles subsessiles, obovales, obtuses, glabres en dessus, à poils appliqués en dessous; stipules très petites ; fleurs solitaires ou fasciculées par 2-4; pédicelles 2-3 fois plus longs que le calice, portant au sommet une bractée bi-trifide ordinairement plus longue que large; carène aiguë; gousse de 30-40

mm, sur 6-8, glabre, luisante et noire à la maturité, à suture supérieure seule un peu ailée, à bord droit ; 3-8 graines. Lieux arides, surtout siliceux et montriueux de la région méditerranéenne ; Corse ; très commun en Algérie[7].

❖ Utilisation

Les genêts sont capables grâce aux nodosités sur leur racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines [5].

❖ Classification scientifique [8]

Royaume	Plante
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Papilionoideae (Faboideae)

Genre	<i>Calycotome</i>
Espèces	<i>C.spinosa</i>

Fruit de *Calycotome spinosa*



Figure I.1 : Photographie de *Calycotome spinosa*(L.) Link

- ✓ Nous notons que cette espèce se rattache beaucoup à la deuxième et la seule plante du même genre dite : *Calycotome villosa* (voir figure I.2 et I.3).



Figure I.2 :*Calycotome villosa***Figure I.3 :***Calycotome spinosa*

I.1.4 Etudes chimiques sur la famille des *Fabacées*

La famille des Fabaceae est extrêmement riche en flavonoïdes, et celle des Papilionacées est caractérisée par la présence d'isoflavones, de rétinoides d'anthocyanines et de flavonol glycosylés[9].

I.1.5 Les travaux antérieurs sur la phytochimie du genre *Calycotome*

Un très peu d'étude de l'extrait chloroformique des parties aériennes de *Calycotome spinosa*, a permis de décrire deux flavonoïdes [10] (figures I.4 et I.5)

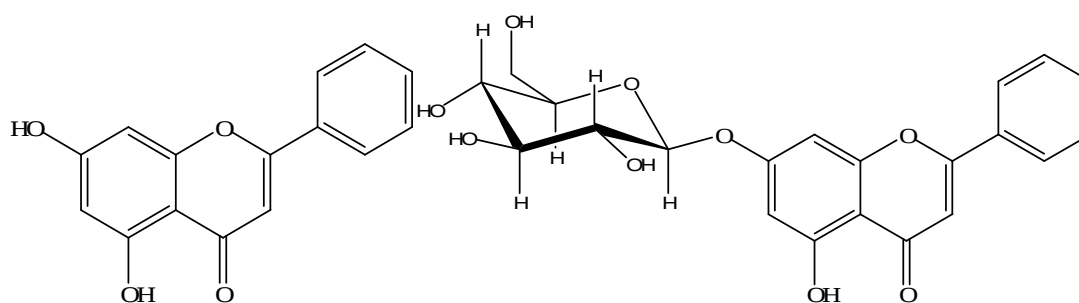


Figure I.4 :Chrysin **Figure I.5 :**7-O-(β-D-glucopyranoside)chrysin

Calycotome villosa : est une espèce voisine du *Calycotome spinosa*. C'est un arbuste épineux 30-150 cm affichant fleurs jaunes au printemps qui pousse surtout dans le nord de l'Afrique et l'Espagne [11].

L'étude de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Calycotome villosa*, a permis de décrire trois composés dont deux flavonoïdes glycosides, et le 1-Hydroxyméthyl-6,7-diméthoxyisoquinoline-N-oxide [12] (figures I.6, I.7 et I.8).

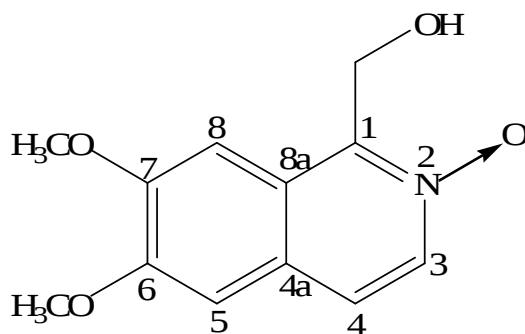


Figure I.6 : 1-Hydroxyméthyl-6,7diméthoxyisoquinoline-N-oxide

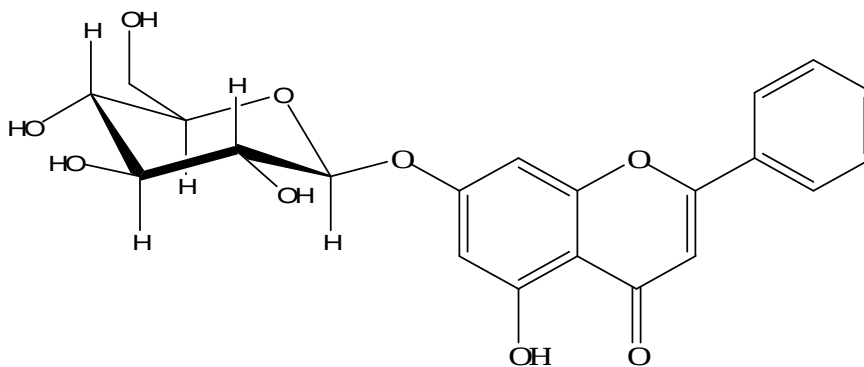


Figure I.5 : 7-O-(β-D-glucopyranosyl)chrysin

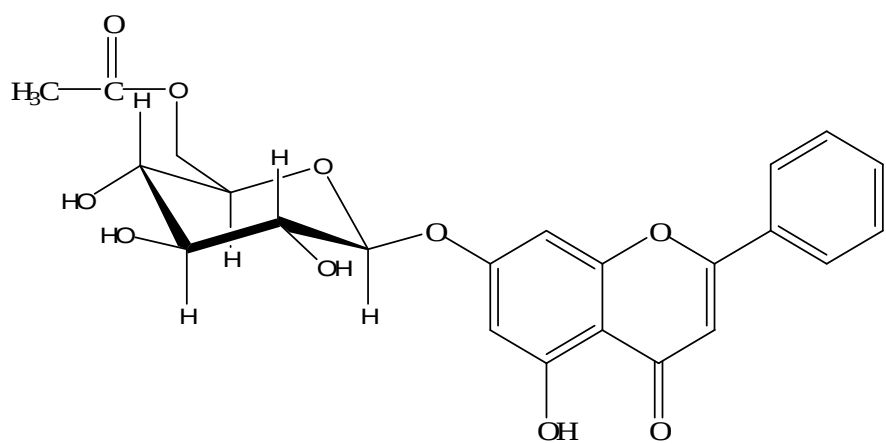


Figure I.7:7-O-β-D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]chrysin

Chapitre II

Les composés flavonoïdiques

II.1 Les Flavonoïdes

Le terme flavonoïde est dérivé du mot grec «flavus »qui veut dire jaune [13]. Il rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, leur fonction principale semble être la coloration des plantes (voir tableau II.1).

Ils sont surtout abondants chez les plantes supérieures particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées, mais ils peuvent également se trouver dans le règne animal, les glandes à sécrétion odoriférante du castor, le propolis des abeilles (la Chrysine, la Quercétine, la Galangine) et dans les ailes des papillons [14, 15].

Les flavonoïdes sont présents dans les vacuoles sous forme d'hétérosides, dont la partie osidique est fréquemment le glucose ou le Rhamnose [16]. Ils jouent un rôle important dans les processus biologiques. Ils règlent la croissance de la plante par inhibition d'acide acétique de l'Auxin Indolyl Excytosis, et par énumération d'expression du gène, et ils peuvent influencer également et de manière différente sur d'autres cellules biologiques.

La concentration en flavonoïdes est maximale dans les organes jeunes et dans les tissus externes et aériens car la lumière stimule leur biosynthèse.

Tableau II.1: La couleur de quelques classes des flavonoïdes

Flavonoïdes	Couleur	Références
Flavones, flavonols	Jaune	[14, 15]
Flavonones	Incolore Jaune	[14, 15]
Flavononols	Ivoire	[14, 15]
Isoflavones	Ne prennent pas une seule couleur	[15]
Chalcones et Aurones	Jaune	[14, 15]
Anthocyanidines	Rouge en milieu acide Bleu en milieu alcalin Violette, mauve, rose	[17]

Dans l'industrie pharmaceutique, la recherche de nouvelles herbes médicinales contenant des composés flavonoidiques a beaucoup servi comme point de départ pour le développement de dérivés intéressants [18].

Les flavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques, avec des structures chimiques diversifiées et caractéristiques. Plus de 4000 flavonoïdes différents appartiennent à des classes flavonoïdes incluant les flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidines, isoflavones, dihydroflavonols, et chalcones [19, 20]. Les flavonoïdes font partie de l'alimentation humaine: nous les retrouvons dans les fruits (citron), les légumes et les boissons (thé, café, etc.) [20].

II.3.1 Classes des Flavonoïdes

On a déjà recensé plus de 4000 flavonoïdes différents, essentiellement dans les fruits et les légumes (voir tableau II.2) [21]. Les six classes des flavonoïdes (flavanones, flavones, flavonols, isoflavones, anthocyanines et flavanes) varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (voir tableau II.3) [22].

Types d'aliments	Flavonoïdes /100 g
Fruits : Cerise, raisin, pomme, pêche	20-30 mg
Légumes : Epinards, laitue, céleri, chou	10-20 mg
Légumes secs : Fève, haricot, pois colorés	0,5-1 mg
Autres aliments : Cacao (fève de Calabar), thé, gland, châtaigne	20-30 mg
Plantes médicinales : Thym, origan, menthe, romarin	10-20 mg

Tableau II.2 : Principales sources des flavonoïdes

Flavones, Flavonols : Ils représentent 80% des flavonoïdes connus, le noyau A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et C-7 libres ou estérifiés. Le noyau

B est dans 80% des cas substitué en 4' ou di substitué en 3' et 4' ou encore tri substitué en 3', 4' et 5'. Les positions 2', 6' ne sont qu'exceptionnellement substitués [24]. Les substituants sont des groupes –OH ou –OCH₃ [23]. La différence essentielle entre les flavones et les flavonols est la présence d'une oxygénation en C-3 dans les flavonols (voir figure II. 9) [14].

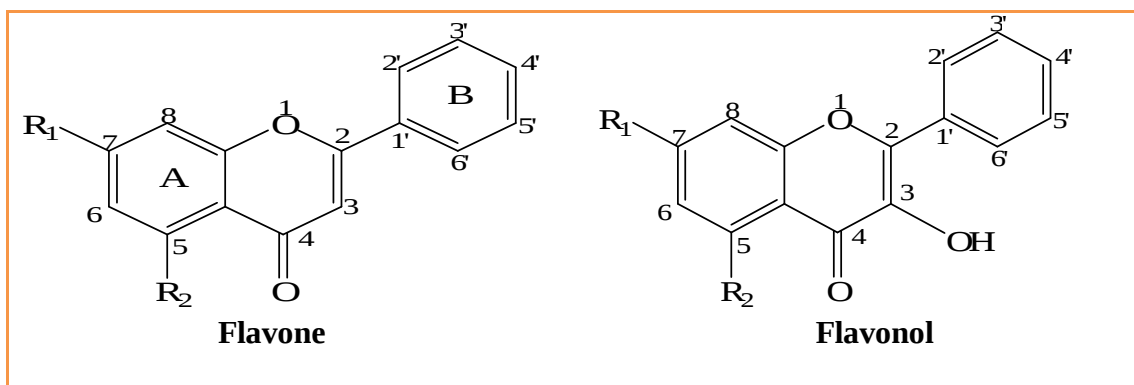


Figure II.9: Flavone, Flavonol

Tableau II.3: Différentes classes des flavonoïdes

Flavonoïdes	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
<u>Flavones</u>										
Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Diosmétine	H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	H	H
Lutéoline	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
<u>Flavonols</u>										
Fisétine	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Morine	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H	H
Myricétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H
Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
<u>Isoflavones</u>										
Dadzéine	H	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Genstéine	H	OH	H	OHO	H	H	H	OH	H	H
Orobol	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	H	H
<u>Flavanones</u>										
Hespérétine	H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	H	H
Liquiritgénine	H	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Naringénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
<u>Flavanols</u>										
Taxifoline	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H

<u>Anthocyanidines</u>										
Cyanidine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
Delphinidine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H
MalvidinePelargonidine	OH	OH	H	OH	H	H	OMe	OMe	OMe	H
	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H
<u>Chalcones</u>										
Buteine	OH	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H
Okonine	OH	H	H	H	H	OH	OH	OH	H	H
<u>Aurones</u>										
Maritimetine	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	H
Leptosidine	H	H	OH	OMe	H	H	OH	OH	H	H
<u>Biflavonoïdes</u>										
Amentoflavone	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
<u>Hétérosides flavoniques</u>										
Lecontine	O-glu	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Cytiside	H	OH	H	OH	C-glu	H	H	OMe	H	H

Il y a deux flavones communes, l'apigénine et la lutéoline (et leur dérivés) schématisés dans la figure II.10, ils peuvent être reconnus sur le chromatogramme du forestal comme tâches marron sombres qui virent au jaune vert ou jaunissent en employant le gaz ammoniac fumant comme agent de révélation.

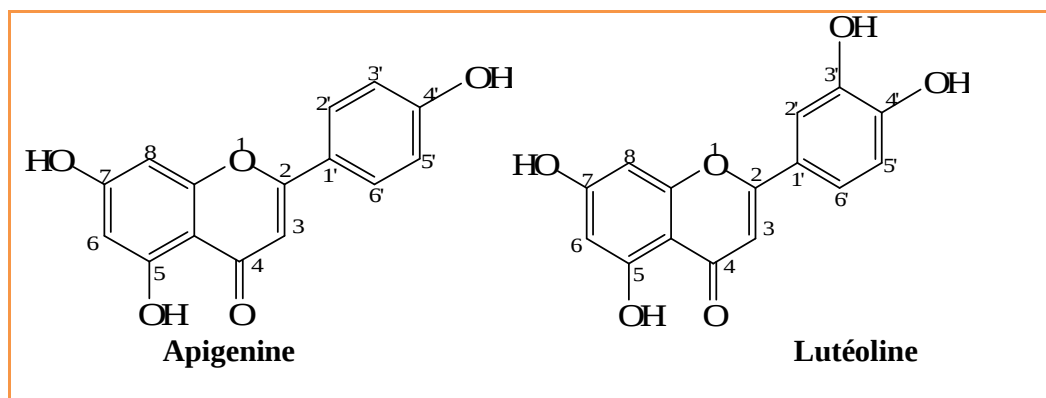


Figure II. 10 : Les flavones : Apigenine et Luteoline

Il y a environ 34 flavones rares qui peuvent être convenablement répartis en cinq classes dont les représentants sont : 5-hydroxyflavone, Baicalein, 2'-hydroxyflavone, C-methylflavone, 5, 6, 7, 8-tetrahydroxyflavone. La plupart d'entre

elles ont des spectres d'absorption U.V. caractéristiques [14]. Une condensation de l'acétate malonate et l'acide cinnamique est l'étape clé de la biosynthèse de certains composés flavoniques [24, 26].

Flavanones (figure II. 11) : Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2-C3 et par la présence d'un centre d'asymétrie, elle ne comporte pas le groupement OH en position C3 [24].

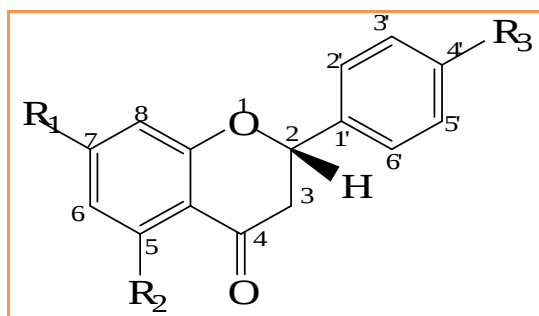


Figure II. 11 : Flavanone

Isoflavones (figure II. 12) : elles sont considérées comme des dérivés des flavones, elles ont le squelette du 3-phénylchromane comme la Génisteine 5, 7, 4'-trisubstitués. Les substituants sont des groupements OH [14]. Les isoflavonoïdes représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Ils ont une distribution très limitée dans le royaume des plantes et ils sont restreints à la sous-famille Papilionoïdée des légumineuses[27].

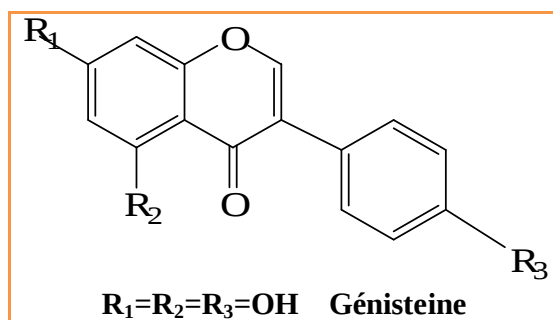


Figure II. 12 : Isoflavone

Chalcones, aurones (figure II. 13) : Les chalcones sont dépourvues de l'hétérocycle central. Elles sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné cétonique.

Le noyau B est assez fréquemment non substitué. Les Aurones sont caractérisés par une structure de 2-benzylidène-coumaranone [23].

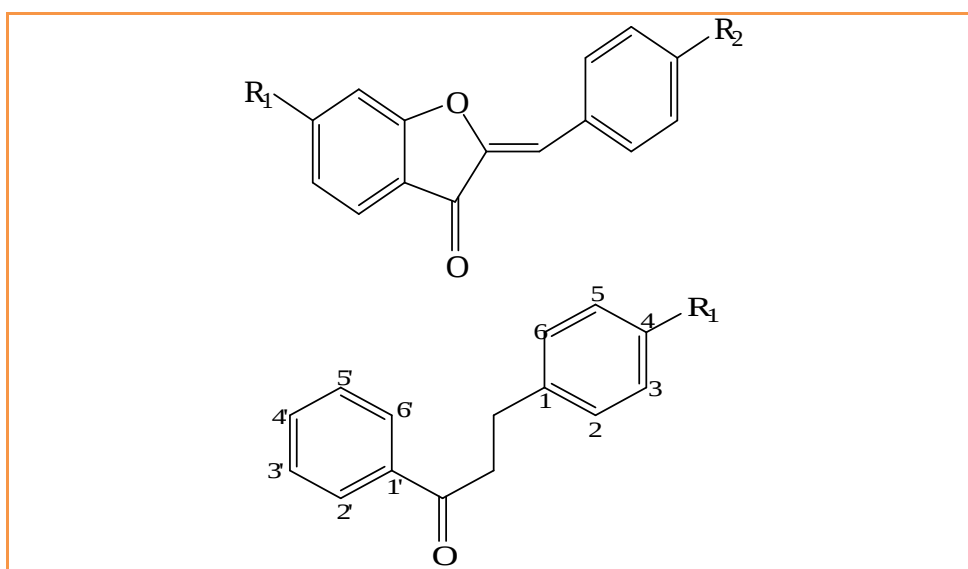


Figure II. 13 : Chalcone, Aurone

Biflavonoïdes : Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones, 6 ou 8 ils se forment alors un dimère, un biflavonoïde. La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavanones, par exemple l'amentoflavone (figure II. 14). Les deux unités en question peuvent être ou non du même type (biflavones, biflavanones, flavone, flavonone) [23].

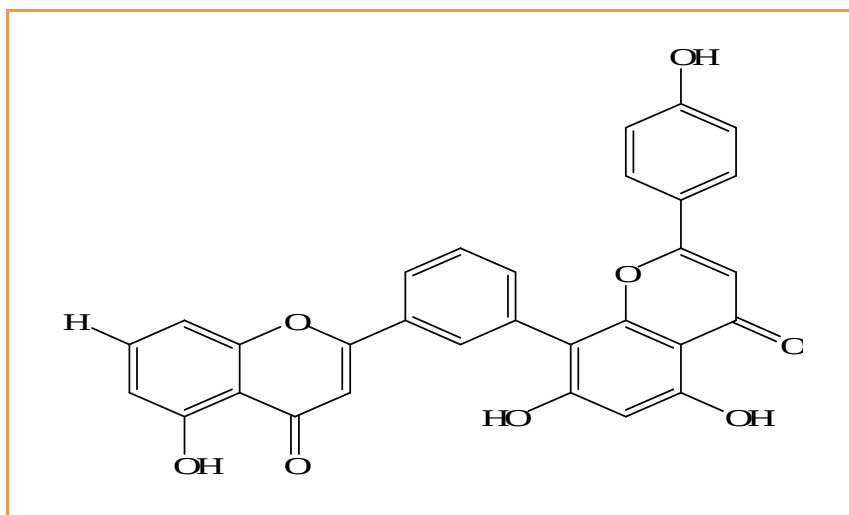


Figure II. 14 : Amentoflavone

Les anthocyanidines : Leur structure commune est caractérisée par le cation flavylum (figure II.15) (2-phenylbenzo-pyrylium) portant des fonctions hydroxyles et/ou méthoxyles [23]. Les sucres sont pratiquement toujours fixés en position 3 ce qui est indispensable à la stabilité de la molécule. Les anthocyanidines naturels peuvent être classées en trois sous groupes : Pelargonidine, cyanidine et delphinidine [23].

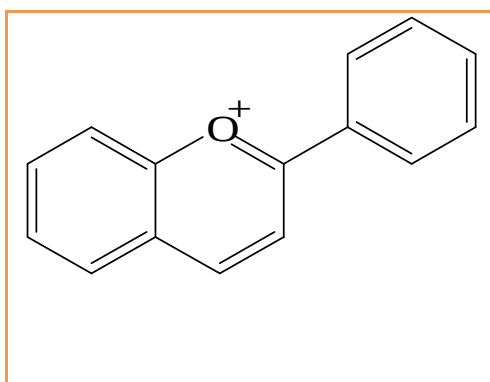


Figure II.15 : Ion flavylum

Hétérosides flavonoïdiques (figure II.16) : La partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. Les monosaccharides sont formés avec le D-glucose, mais aussi avec le D-galactose, avec des pentoses ou avec des acides D-glucuroniques et Dgalacturonique.

Les liaisons entre la génine et l'ose peuvent se faire par l'un des hydroxyles phénoliques de la génine. Mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxylé en 7 des flavones et l'hydroxylé en 3 des flavonols qui sont impliqués [23].

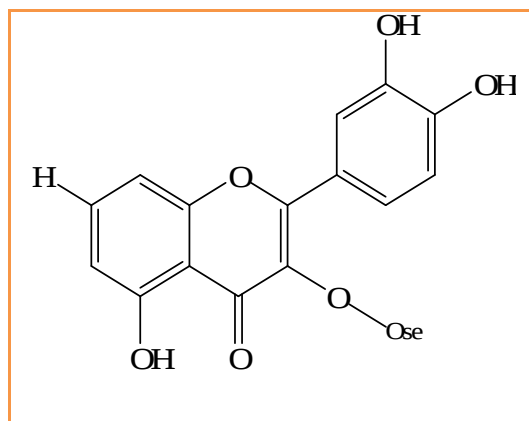


Figure II.16 : Hétéroside flavonoïdique

II.3.2 Biosynthèse des Flavonoides

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (par exemple, éther, ester, etc.).

Les composés phénoliques végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- 1- la voie la plus courante (voir figure II.17) est celle qui, via le Shikimate (l'acide Shikimique), conduit à l'acide Benzoïque, Lignanes, Coumarines, flavonoides, etc.;
- 2- l'autre voie part de l'acétate-malonate et conduit par condensation répétée à des systèmes aromatiques (par exemple, Chromones, Isocoumarines, Quinones, etc.);

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du Shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoides, Stilbènes, Xanthones, etc.) [24].

Les flavonoides sont des pigments de la plante issus du métabolisme secondaire qui sont synthétisés à partir de la phénylalanine. La biosynthèse de ces derniers présente

un intermédiaire commun (figure II.18), une tétrahydroxychalcone à partir de laquelle se différencient plusieurs types de composés dont les plus importants sont les anthocyanes et les flavones [28]. Par ailleurs, la 4, 2',4',6'-tétrahydroxychalcone, formée par la chalcone synthase à partir du malonyl-CoA, un précurseur de la voie acétate-malonate, et du 4-coumaroyl-CoA, issu de la voie Shikimate (figure II.18). Les flavonoïdes peuvent ensuite être modifiés par des réactions d'hydroxylation, méthylation, glycosylation et acylation [28].

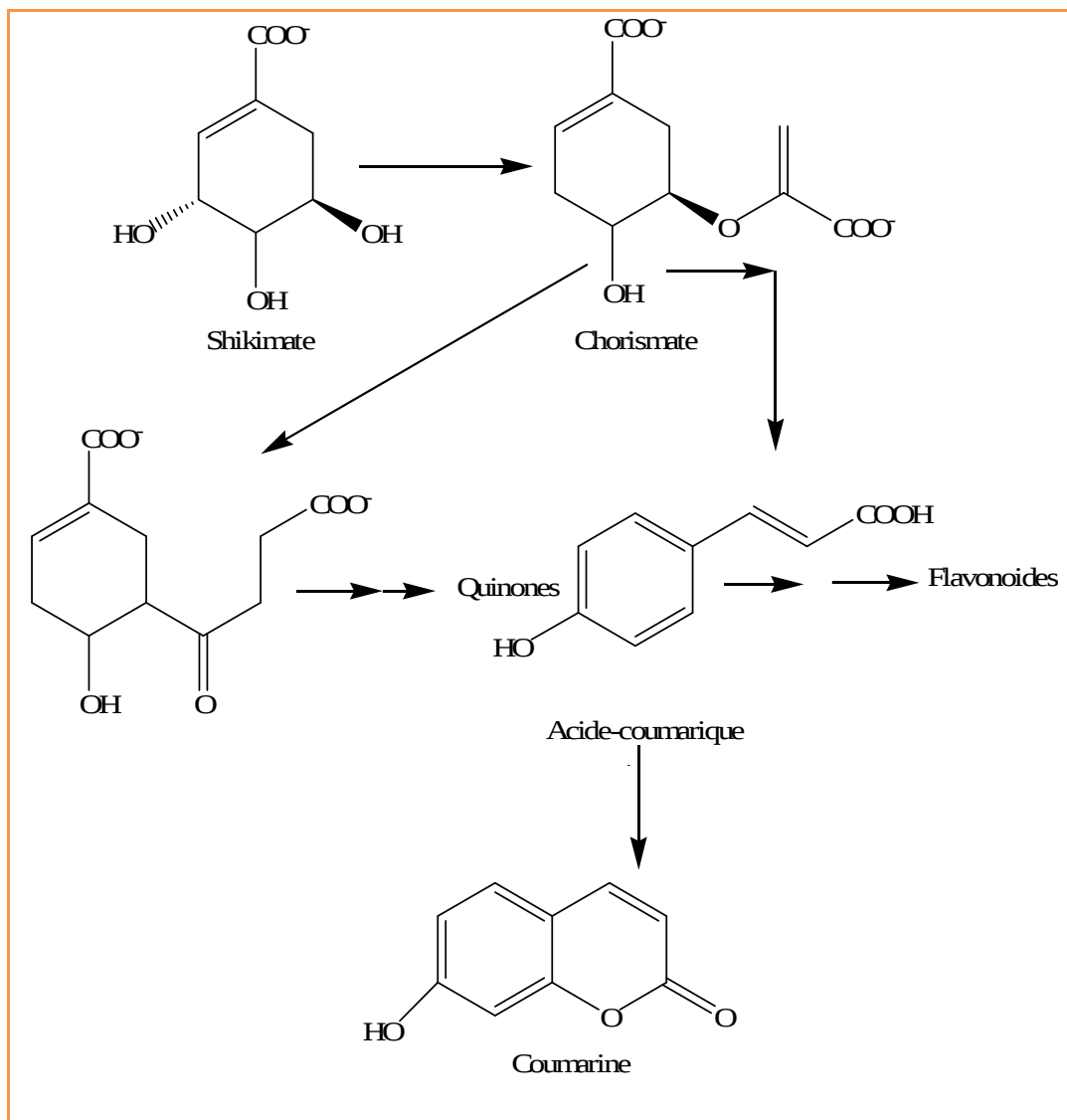


Figure II.17 : Voie Shikimate de la biosynthèse des composés Phénoliques

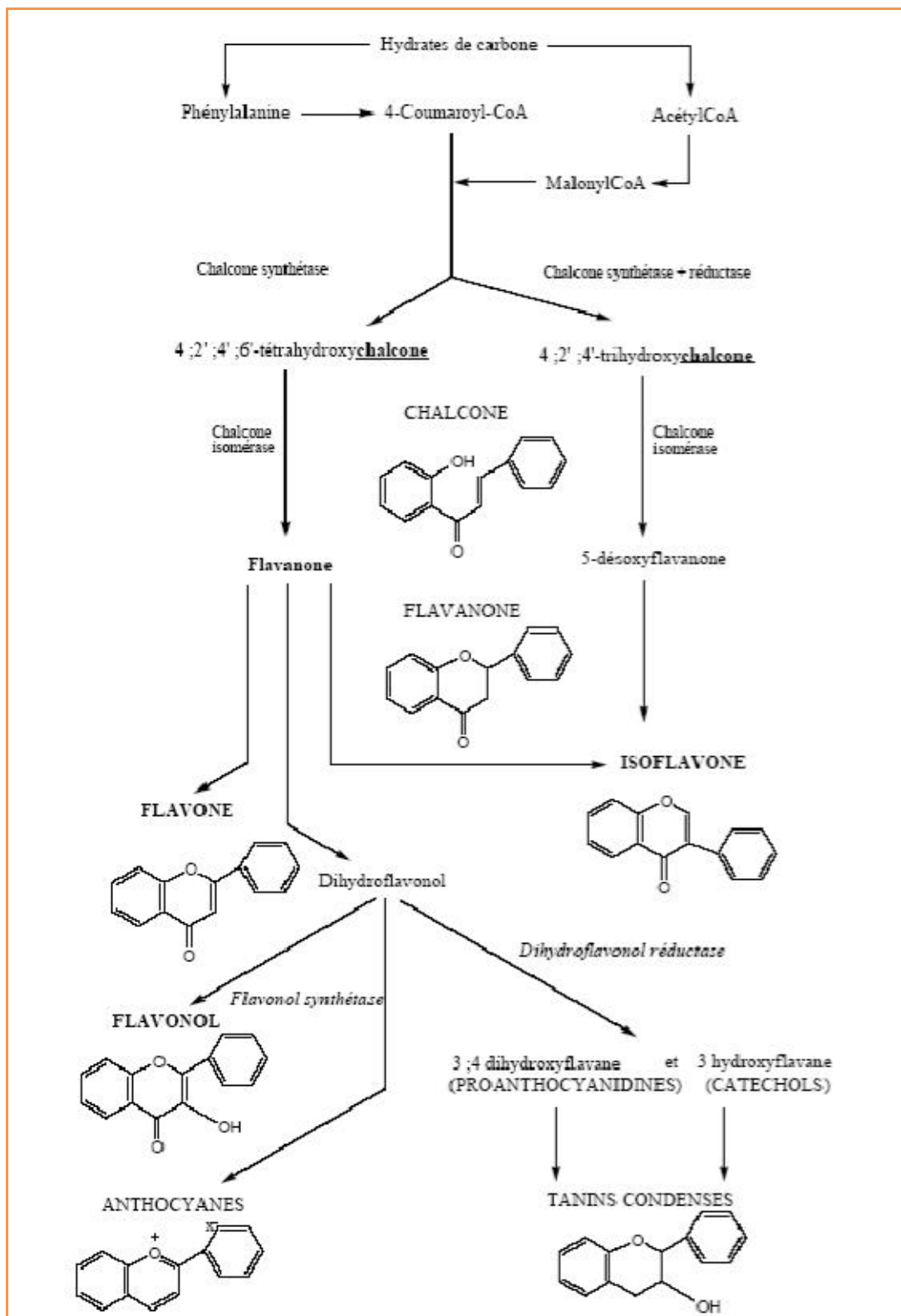


Figure II.18 : Biosynthèse des Flavonoïdes [29]

II.3.3 Le Rôle Bioactif des Flavonoïdes

Le rôle des flavonoïdes dans le monde végétal s'inscrit dans un contexte très large de relations entre une plante et son environnement assurées par des métabolites secondaires.

Leur rôle attractif ou répulsif des pollinisateurs est attribué à la couleur, la forme, l'odeur et le goût des fleurs. Les flavonoïdes sont avec les chlorophylles et les caroténoïdes les principaux facteurs de la coloration des plantes, et des ailes des papillons car ils agissent comme co-pigments.

Actuellement, il y a un intérêt général pour les effets diététiques des polyphénols sur la santé humaine. Ils jouent un rôle important pour piéger les radicaux libres qui sont responsables d'un grand nombre de maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson) [30] mais également dans les mécanismes liés à l'apparition du cancer [30, 31]. En plus de la forte activité antioxydante in vitro de beaucoup de ces composés (4-oxo-flavones, anthocyanes, flavanes), ils semblent pouvoir jouer un rôle intéressant dans la prévention des maladies cardio-vasculaires : rôle des polyphénols associés aux fibres dans l'élimination du cholestérol, oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), circulation sanguine [32, 33].

Les voies d'élimination du cholestérol dans l'organisme sont très particulières, puisque ce composé est éliminé par la voie fécale sous forme de stérols neutres ou acides (sels biliaires). Une ingestion suffisante de fibres alimentaires favorise l'élimination. En plus, les catéchines du thé ou les tanins du raisin inhibent l'absorption intestinale du cholestérol. Il a été aussi démontré que la rutine augmentait significativement l'excrétion fécale de l'acide biliaire [32].

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées. En fait, leur activité anti radicalaire nécessite :

- ✓ La structure ortho-diphénolique du cycle **B**, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé;
- ✓ La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, qui est responsable de la délocalisation d'électrons stabilisant le radical aroxy;
- ✓ Les hydroxyles en positions C-3 et C-5 dans le cycle **A**, qui permettent une activité anti radicalaire maximale.

Les trois éléments de structure décrits ci-dessus, sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes particulièrement impliqués dans la peroxydase lipidique. Les L.D.L. oxydées déclenchent la prolifération des cellules de la paroi artérielle et attirent des cellules sanguines (monocytes qui se transforment en macrophages). La modification oxydative qui touche au départ les acides gras (peroxydase), peuvent aussi altérer les apoprotéines des L.D.L. Les flavonoïdes possèdent un caractère antioxydant qui peut chelater les métaux et moduler l'activité de nombreuses enzymes, en protégeant les L.D.L. vis à vis de l'oxydation ainsi qu'en intervenant au niveau des plaquettes et de la cholestérolémie [32].

Les flavonoïdes pourraient avoir un rôle bénéfique sur divers paramètres de la circulation sanguine. Etant donné le rôle des plaquettes dans le développement de l'athérosclérose et dans l'initiation de la thrombose, il est intéressant de noter que les flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'adhésion, l'agrégation et de la sécrétion plaquettaires. Un autre aspect important concerne le rôle des flavonoïdes sur la résistance et la perméabilité vasculaire [32].

L'impact des flavonoïdes sur les parois vasculaires, ainsi que leurs propriétés anti-inflammatoires, sont à l'origine de l'utilisation en thérapeutique, comme vasculoprotecteurs et veino-toniques des diverses flavonoïdes naturels ou de synthèse [32].

Les études réalisées *in vitro* ou *in vivo* sur l'animal suggèrent que les flavonoïdes pourraient agir à tous les stades de la cancérogenèse. Au cours de la phase d'initiation, ils pourraient empêcher l'établissement de la lésion génotoxique par divers mécanismes : par une inhibition des mono oxygénases hépatiques impliquées dans l'activation des métaboliques des pro carcinogènes et /ou une activation des enzymes de conjugaison du foie qui sont responsables de la détoxification des xéno biotiques, par un piégeage direct du carcinogène, ou encore par une stimulation de l'éjection des carcinogènes hors de la cellule [32]. D'autre part, les flavonoides inhibent la croissance des lignées cellulaires cancéreuses en interférant avec les mécanismes de transduction des signaux mitogènes ou par d'autres mécanismes. [32].

Donc, les flavonoïdes sont des composés biologiquement actifs, possédant une activité chimio-préventive potentielle contre une large variété de maladies chroniques

[31-34]. Citons par exemple l'apigénine qui est un flavonoïde diététique présent de façon abondante dans les fruits et les légumes et possédant une prévention thérapeutique contre plusieurs maladies cardiovasculaires ainsi que le cancer [35].

D'autres flavonoïdes comme l'*Eriodictyol*, le *Kaempférol*, la *Lutéoline*, la *rutine* et la *Taxifoline* sont bénéfiques pour les cellules des neurones contre le stress oxydatif [36-37].

Certains flavonoïdes (*Quercétine*, *Genistéine*, etc.) présentent des effets anti-tumeurs *in vitro* et inhibent le développement du cancer chimio-induit chez l'animal. C'est pourquoi leur participation dans la prévention des cancers avec d'autres micronutriments pourrait expliquer les effets protecteurs des fruits et des légumes [16, 36, 38]. Les isoflavones et flavones pourraient être plus particulièrement impliqués dans la prévention du cancer [16, 30, 39].

II.3.4 Etude Chimique des Flavonoïdes

II.3.4.1 Chromatographie

Les flavonoïdes sont présents dans la partie aérienne de la plante. La séparation des ces composés est réalisée par les méthodes chromatographiques telles que :

- ✓ Chromatographie sur colonne : Cette méthode reste la technique la plus utilisée pour la séparation des produits isolés première purification et la séparation des produits isolés.

Les supports utilisés communément pour la séparation des flavonoïdes sont le gel de silice, l'alumine, la cellulose, le polyamide, le sephadex, etc. Ces adsorbants sont utilisés selon la spécificité des produits flavonoidiques.

- ✓ Chromatographie sur papier (Whatman) : C'est une technique qui convient pour la séparation des mélanges complexes de tous les types de flavonoïdes et leurs glycosides.
- ✓ Chromatographie préparative sur couches minces : C'est une technique voisine de la chromatographie sur papier, elle est également utilisée pour la séparation et la purification, son avantage est la rapidité et la sensibilité.

II.3.4.2 Spectroscopie UV

La spectroscopie de l'absorption U.V. [40, 41] est largement utilisée dans l'analyse structurale des flavonoïdes. Ses avantages majeurs sont:

- ✓ seulement une toute petite quantité de matière est exigée pour l'analyse.
- ✓ le matériel est disponible dans la plupart des laboratoires.
- ✓ un grand taux d'information structuralement utile est produit.
- ✓ la plupart des flavones et flavonoles expose deux bandes d'absorption majeures: la première bande -I est produite dans le rang 320-385 nm, la seconde bande -II dans le rang 250-285 nm.

II.3.4.3 Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse (EI) des flavonoïdes (aglycones) est un outil valide qui sert à la détermination de leurs structures [41-42]. La plupart des flavonoïdes donnent des fragments d'ions moléculaires intenses. Généralement, les flavonoïdes aglycones montrent un pic majeur de $[M-H]^+$ et $[M-CH_3]^+$ lorsqu'il est méthoxylé. La fragmentation la plus empruntée pour l'identification du flavonoïde est celle qui implique la rupture du cycle A et cycle B (voir figure II.19).

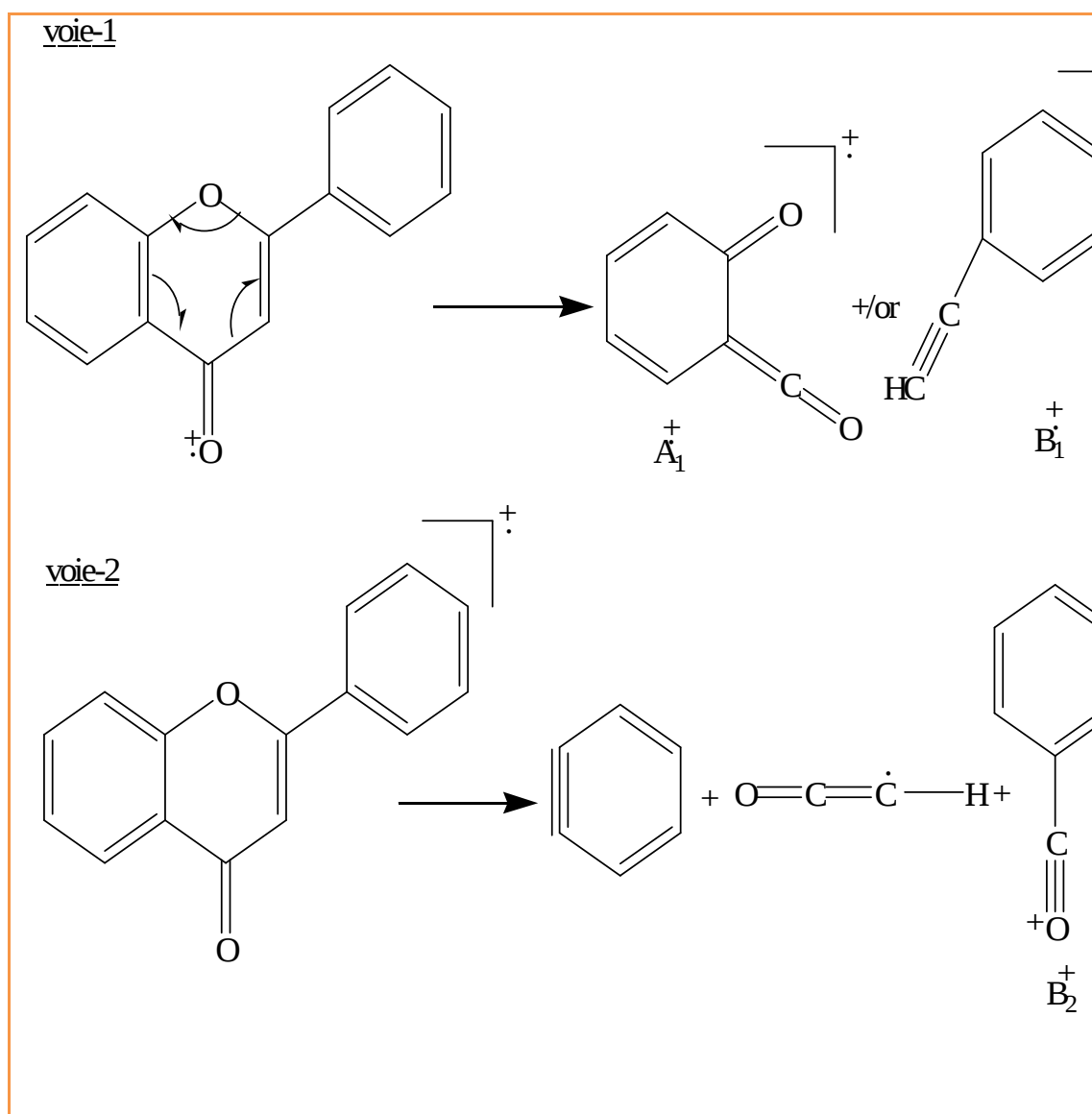


Figure II.19 : Fragmentation des Flavones

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Introduction

Les méthodes spectroscopiques sont utilisées pour la caractérisation des produits chimiques. Parmi les techniques utilisées pour les composés organiques, la spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les plus fréquentes ainsi que la spectroscopie Infrarouge (IR).

Dans ce chapitre, nous présentons les protocoles expérimentaux et déterminons les structures des composés isolés.

Les composés et les protocoles expérimentaux sont classés par ordre croissant par rapport au numéro que nous leur attribuons dans le chapitre suivant.

III.2 Extraction

La plante *Calycotome spinosaa* a été récoltée entre les mois de mai et de juin, la plante a été séchée à l'abri du soleil.

III.2.1 Macération

Un poids de 1 Kg de la plante sèche a subi durant 24h. Une macération et lixiviation dans un système de solvant (MeOH/ H₂O, 80/20: v/v) à température ambiante. La solution obtenue après filtration et concentration en ajoutant de l'eau distillée (300ml) a subi une extraction liquide- liquide avec des solvants organiques suivants:

- L'éther de pétrole (3x500 ml), après concentration à sec, l'extrait brut obtenu a eu une masse de 3g.
- Le chloroforme (3x500 ml), après concentration à sec, l'extrait brut obtenu est d'une masse de 17g.
- Le n-butanol (3x500 ml), après concentration à sec, l'extrait brut obtenu est de 30g.

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure III.20.

❖ **Protocole:**

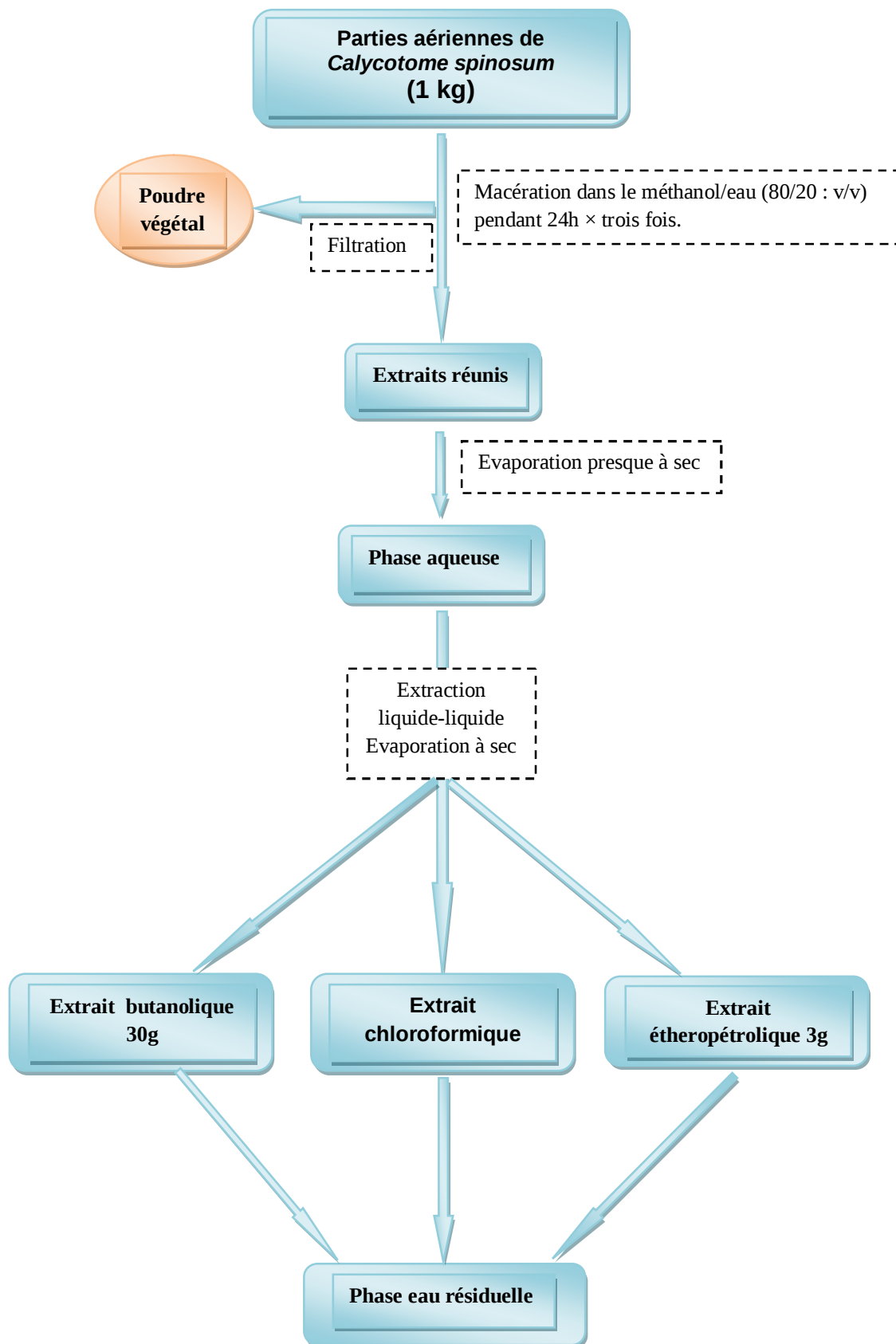


Figure III.20: Extraction des parties aériennes de *Calycotome spinosa*

III.2.2 Séparation

Des colonnes ouvertes sur gel de silice ont été utilisées dans la première et la seconde étape de fractionnement des extraits chloroformique et butanolique.

Les systèmes d'élution utilisés étaient composés de gradients Ether de pétrole/Acétate d'éthyle et Chloroforme/Méthanol pour l'extrait chloroformique et Chloroforme/Méthanol pour l'extrait butanolique dans des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation.

A-Extrait chloroformique :

Une colonne chromatographique a été utilisée pour la séparation de 10g de la phase chloroformique avec le système d'élution Chloroforme/Méthanol. Elle a conduit à 12 fractions de A1 jusqu'à A12. Les 2 fractions concernées par notre étude ont été obtenu avec un systèmes d'élution de 5% et 10% comme l'indique la figure III.21.

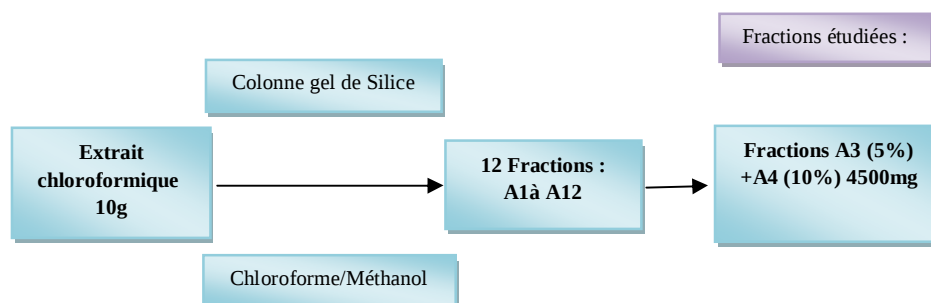


Figure III.21 : Etude de l'extrait chloroformique

B- Extrait butanolique :

Une colonne chromatographique a été utilisée pour la séparation de 10g de la phase butanolique avec le système d'élution Chloroforme/Méthanol donnant naissance à 13 fractions (de C1 jusqu'à C13, voir figure III.22).

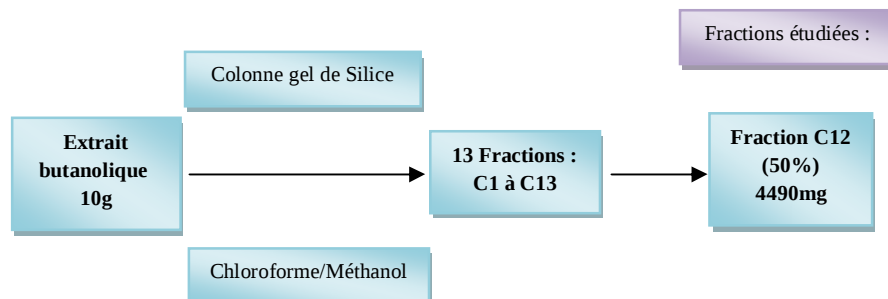


Figure III.22 : Etude de l'extrait butanolique

III.2.3 Purification

Les analyses par chromatographie sur couches minces (CCM) sont effectuées avec des plaques de gel de silice. Après développement, les plaques sont observées sous lampe UV à 254 et 366 nm. Pour le cas de l'extrait chloroformique.

Les plaques sont ensuite révélées par la vanilline sulfurique et chauffées jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs. Notons que la purification de certaines fractions a nécessité d'autres colonnes chromatographiques de gel de silice. Les détails de cette phase concernant les deux extraits sont présentés dans ce qui suit :

A- Extrait chloroformique :

Les fractions A3 et A4 (4500mg) ont été séparées sur colonne de gel de silice avec le mélange Ether de pétrole/Acétate d'Ethyle comme éluant pour la première fois, elle donne les sous-fractions A'1 à A'17. Les fractions A'13, A'14, A'15 et A'16 montrant les mêmes taches au vu de l'analyse CCM et de masse égale à 650mg, ont été rassemblées puis soumises à une seconde chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution réalisée avec un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol des différents gradients, a permis d'obtenir 9 fractions (B1 à B9).

Une précipitation dans le mélange Ether de pétrole/ Acétate d'Ethyle (50/50) de la fraction B8 a permis d'obtenir le composé **M2** à l'état pur (6,3 mg).

La fraction B5 a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice dans le système d'élution dichlorométhane/méthanol (93/7) et a abouti au composé **M3** de poids 5mg. Une deuxième précipitation dans le mélange Ether de pétrole/ Acétate d'Ethyle (50/50) de la fraction B6 a permis d'obtenir le composé **M4** à l'état pur (5,4 mg).

B- Extrait butanolique :

La fraction C12 (4,49g) est séparée sur colonne en utilisant le système d'élution chloroforme/méthanol pour obtenir les sous fraction (C'1 à C'6).

Une précipitation de la fraction C'5 dans le Méthanol a donné le composé **M1** à l'état pur (11 mg).

III.3 Détermination de structure des composés isolés

III.3.1 Identification du produit M1 :

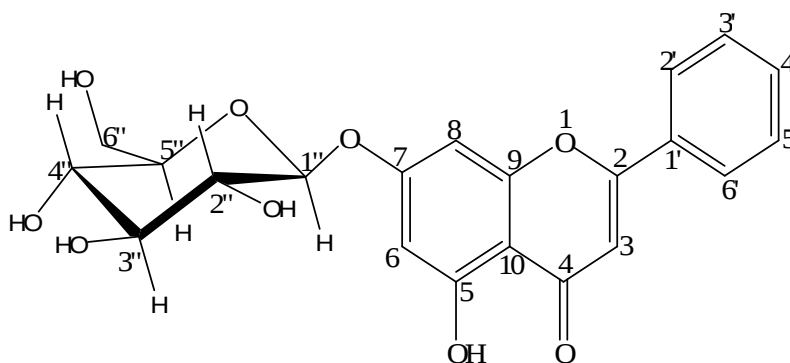


Figure III.23 : 7-O-(β-D-glucopyranosyl)chrysin

Spectre IR :

Le spectre IR indique la présence de groupement hydroxyle (3400 cm^{-1}), carbonyle (1600 cm^{-1}) et aromatique entre (1400 et 1500 cm^{-1}).

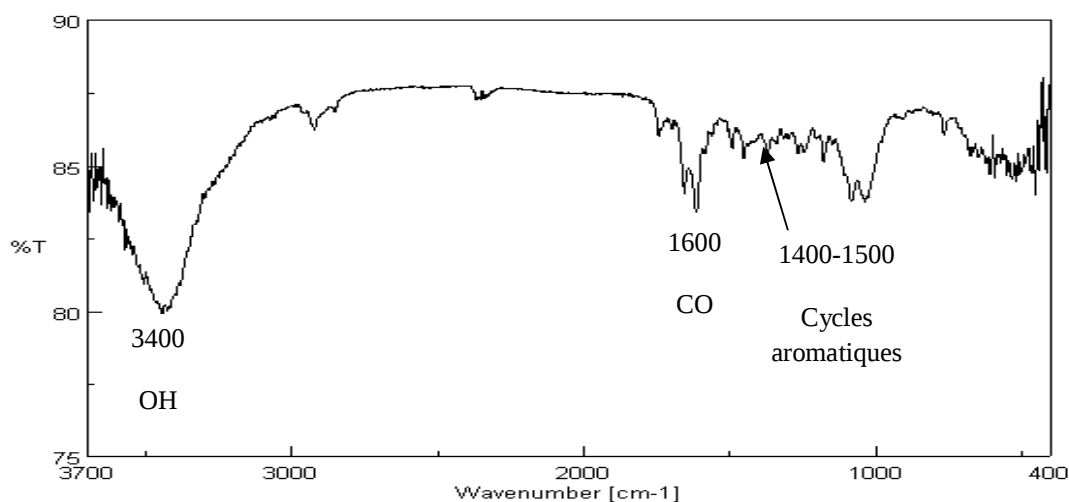


Figure III.24 :Spectre IR du composé M1

La détermination de la structure du composé isolé M1, en se basant sur les spectres RMN-1H, RMN-13C et Dept135, indiquent la présence de 21 atomes de carbones (voir tableau III.4).

L'analyse du spectre RMN-13C (figure III.26) montre :

- Six signaux CH à δ_C 95.45 (C-8), 100.15 (C-6), 129.64 (C-3',5') et 126.98 (C-2',6'), caractéristiques d'un squelette flavonol,
- Cinq signaux CH à δ_C 100.31 (C-1''), 73.54 (C-2''), 77.63 (C-3''), 69.98 (C-4''), 76.87 (C-5'') et un CH₂ à 61.03 ppm (C-6'') caractéristiques des carbones du glucose,
- Un autre signal à $\delta = 182.66$ ppm (C-4), caractéristique d'un carbone carbonyle,
- Deux signaux à δ_C 161.57 (C-5) et 163.65 (C-7) caractéristiques des carbones oxygénées.

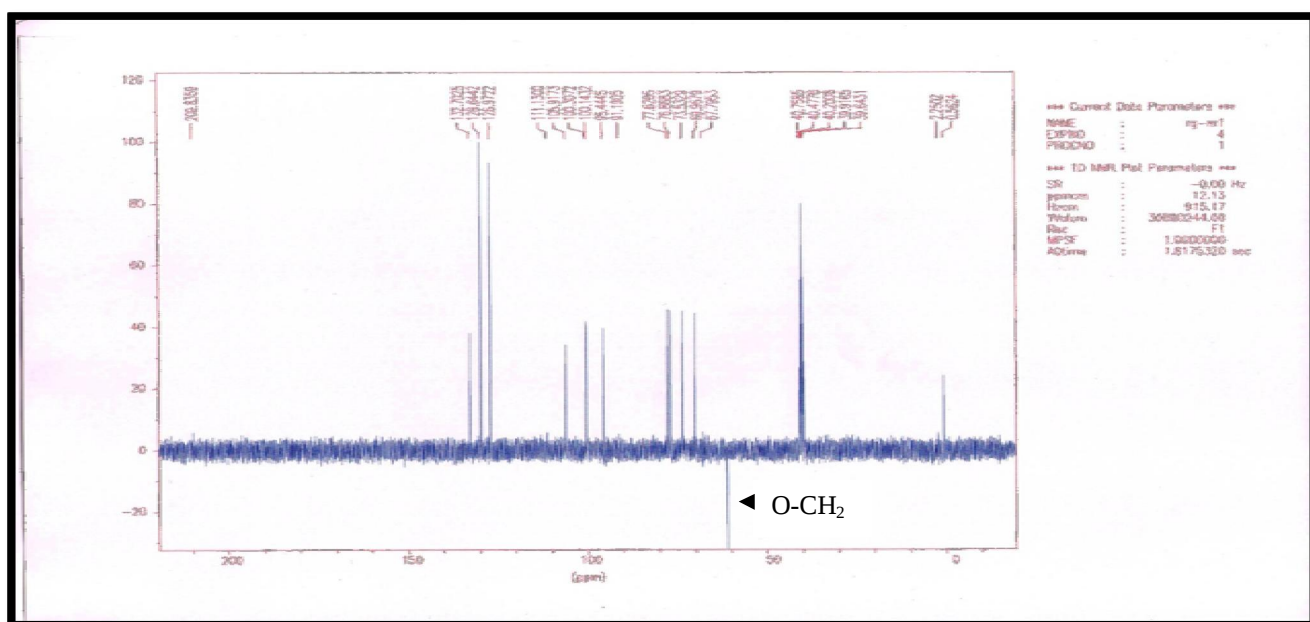


Figure III.25: Spectre RMN¹³C J-modulé du composé M-1

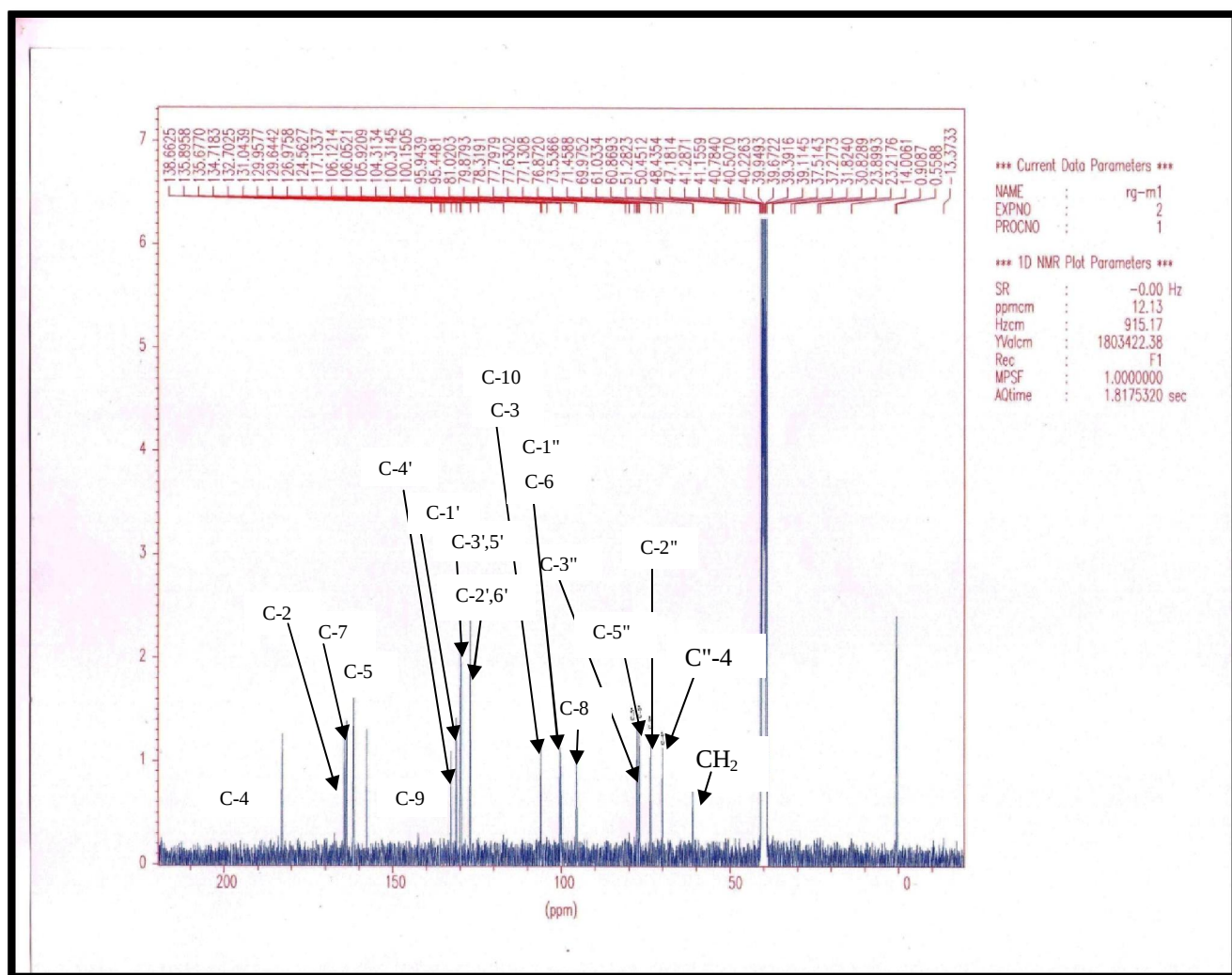


Figure III.26: Spectre RMN¹³C du composé M-1

L'étude du spectre RMN-1H du composé **M1** (Tableau III.4, Figure III.27) a permis de mettre en évidence la présence de:

- D'un flavonoïde et a montré des signaux à δ 7.06 (1H, s) 6.87 (1H, d) et 6.47 (1H, d) typique de C-3, C-8 et C-6 protons d'un squelette flavone,
- Les déplacements chimiques de 8,08 (d, H2', H6'), 7.6 (m, H3',H5') et 7.66 (H4') suggère qu'il n'ya pas de substitution dans le noyau B du flavonoïde
- Un proton comme singulet à δ = 12.8ppm a été attribué au C-5 hydroxyle,
- Quatre protons entre 3.17 et 3.47ppm à indiqué la présence d'un fragment de glucose,
- Le signal à 5.08 ppm été affecté au proton anomère avec une constante de couplage (J 8 Hz) indiquant une configuration β . [43]

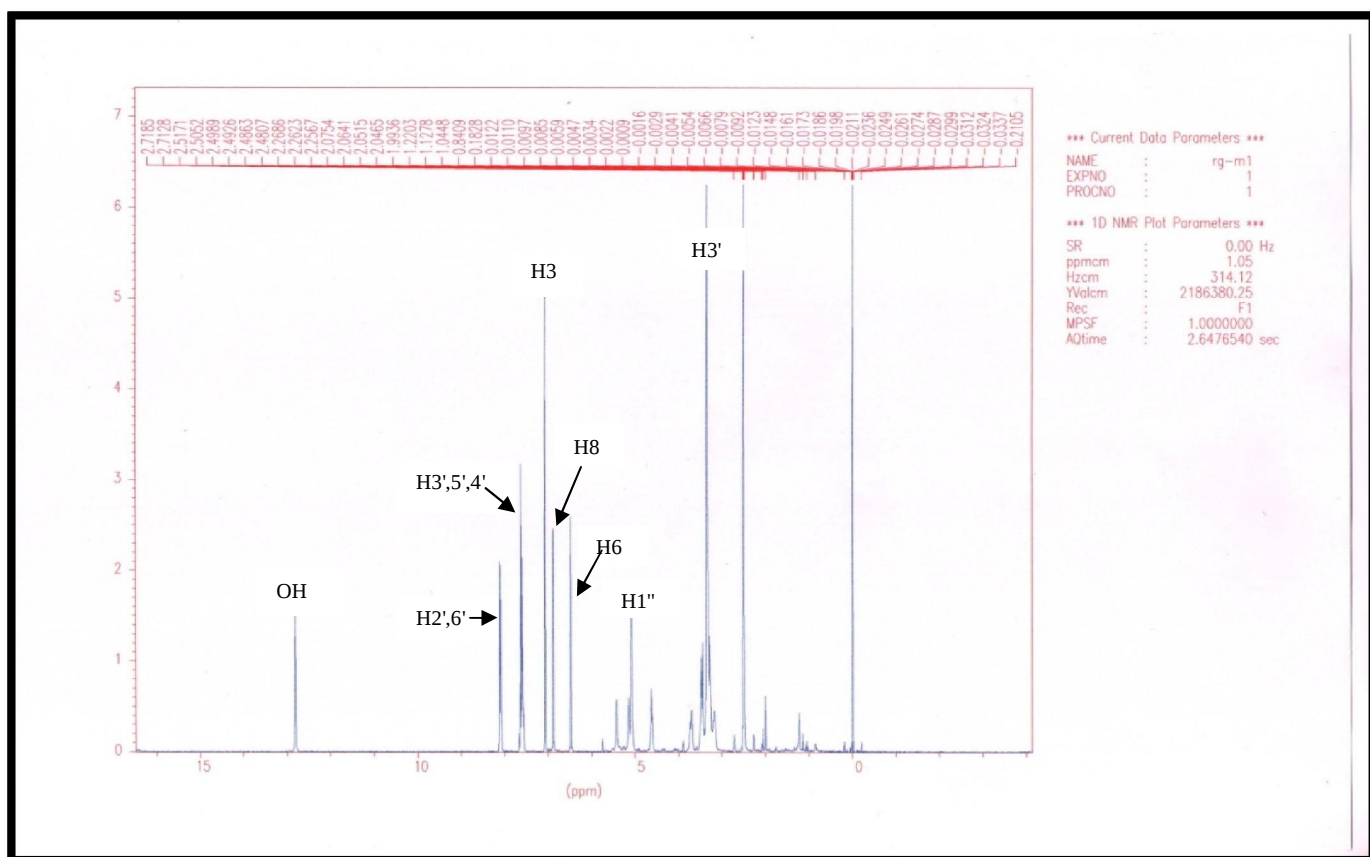


Figure III.27: Spectre RMN¹H du composé M-1

Tableau III.4 : Les résultats RMN 1H, 13C et Dept de M1

Position	RMN ¹ H δ ppm	Multiplicité	RMN 13C δ ppm	Dept
C-2	---	---	164.16	C
C-3	7.06	s	105.92	CH
C-4	---	---	182.66	C
C-5	---	---	161.57	C

C-6	6.47	d ($J = 4$ Hz)	100.15	CH
C-7	---	---	163.65	C
C-8	6.87	d ($J = 4$ Hz)	95.45	CH
C-9	---	---	157.57	C
C-10	---	---	106.05	C
C-1'	---	---	131.04	C
C-2'	8.08	d ($J = 12$ Hz)	126.98	CH
C-3'	7.6	m	129.64	CH
C-4'	7.66	m	132.7	CH
C-5'	7.6	m	129.64	CH
C-6'	8.08	d ($J = 12$ Hz)	126.97	CH
C-1''	5.08	d ($J = 8$ Hz)	100.31	CH
C-2''	3.28	m	73.54	CH
C-3''	3.44	m	77.63	CH
C-4''	3.17	tl ($J = 12$ Hz)	69.98	CH
C-5''	3.47	m	75.87	CH
C-6''	Ha: 3.73 Hb: 4.60	m	61.03	CH ₂

Par ailleurs, le spectre COSY ^1H - ^1H (figure III.28) montre l'existence des corrélations suivantes :

- Le proton H-6 ($\delta = 6.47$ ppm) et le proton H-8 ($\delta = 6.87$ ppm).
- Les deux protons H-3', H-5' ($\delta = 7.6$ ppm) et les protons H-2', H-6' ($\delta = 8.08$ ppm).
- Le proton anomère H-1'' ($\delta = 5.08$ ppm) et les protons H-2'' (3.28 ppm).
- Le proton H-6''a (3.47 ppm) et le proton H-6''b (3.73 ppm).

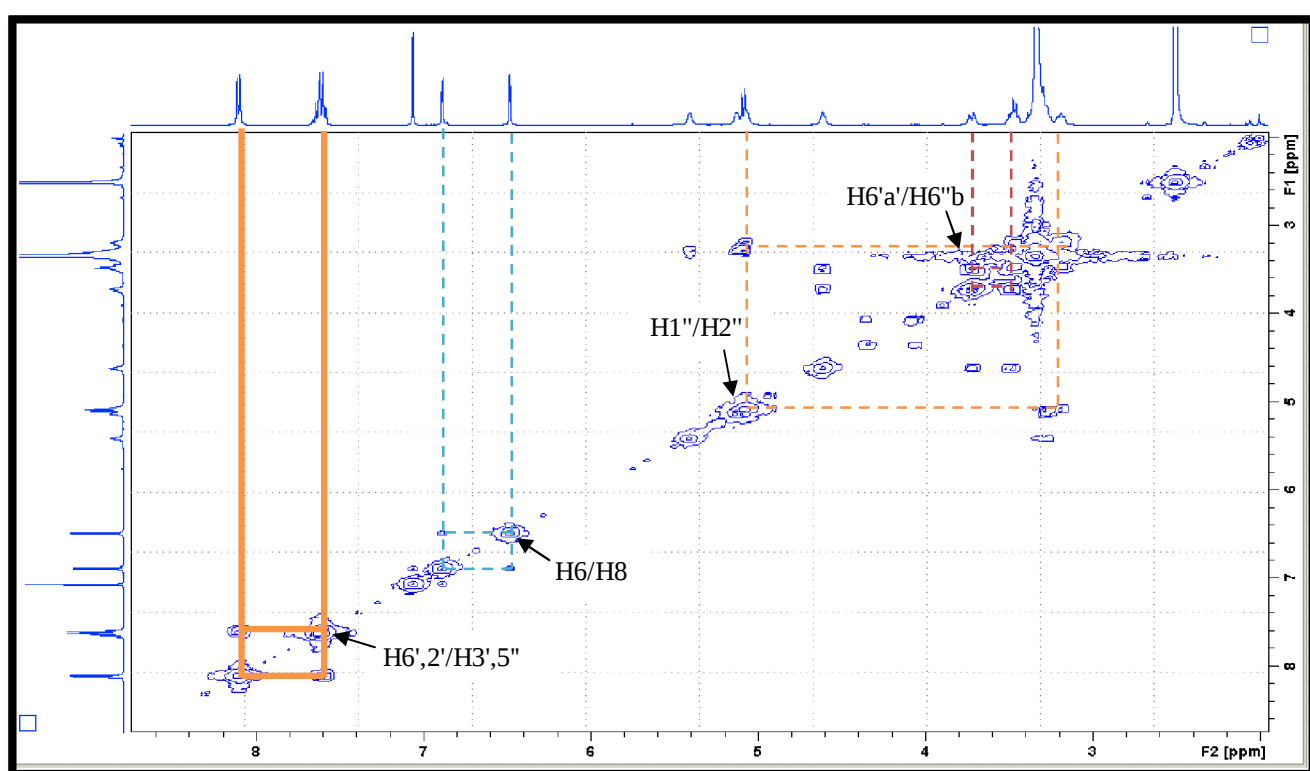


Figure III.28: Spectre COSY H-H du composé M1

L'étude du spectre de corrélation hétéro nucléaire HSQC (Figure III.29 et 30) a conduit à l'établissement des connections géminales RMN- ^1H - ^{13}C du composé M1 et ainsi pu être démontré que les protons méthyléniques localisés à $\delta = 3.73$ ppm et $\delta = 4.60$ ppm sont liés au carbone situé à $\delta = 61.03$ ppm. Le spectre a montré également une corrélation entre le proton à $\delta = 5.08$ ppm et le carbone situé à $\delta = 100.31$ ppm permettant le positionnement de ce carbone en C1''. Il a ainsi pu être démontré que les

protons H2'', H3'', H4'' et H5'' ont liés respectivement aux carbones C2'' (73.54ppm), C3'' (77.63ppm), C4'' (69.98ppm) et C5'' (75.87ppm).

Le spectre a montré respectivement des corrélations entre les protons H3, H6 et H8 et les carbones C3 (105.92ppm), C6 (100.15ppm) et C8 (95.45ppm).

Le spectre a montré des couplages directs entre:

- les protons H-2', H-6' et leur carbones C-2' (126.98ppm), C-6' (126.98ppm).
- Les protons H-3', H-5' et leur carbones C-3' C-5' résonant à $\delta = 126.64$ ppm.
- Le proton H4' et son carbon C4' résonant à $\delta = 132.7$ ppm.

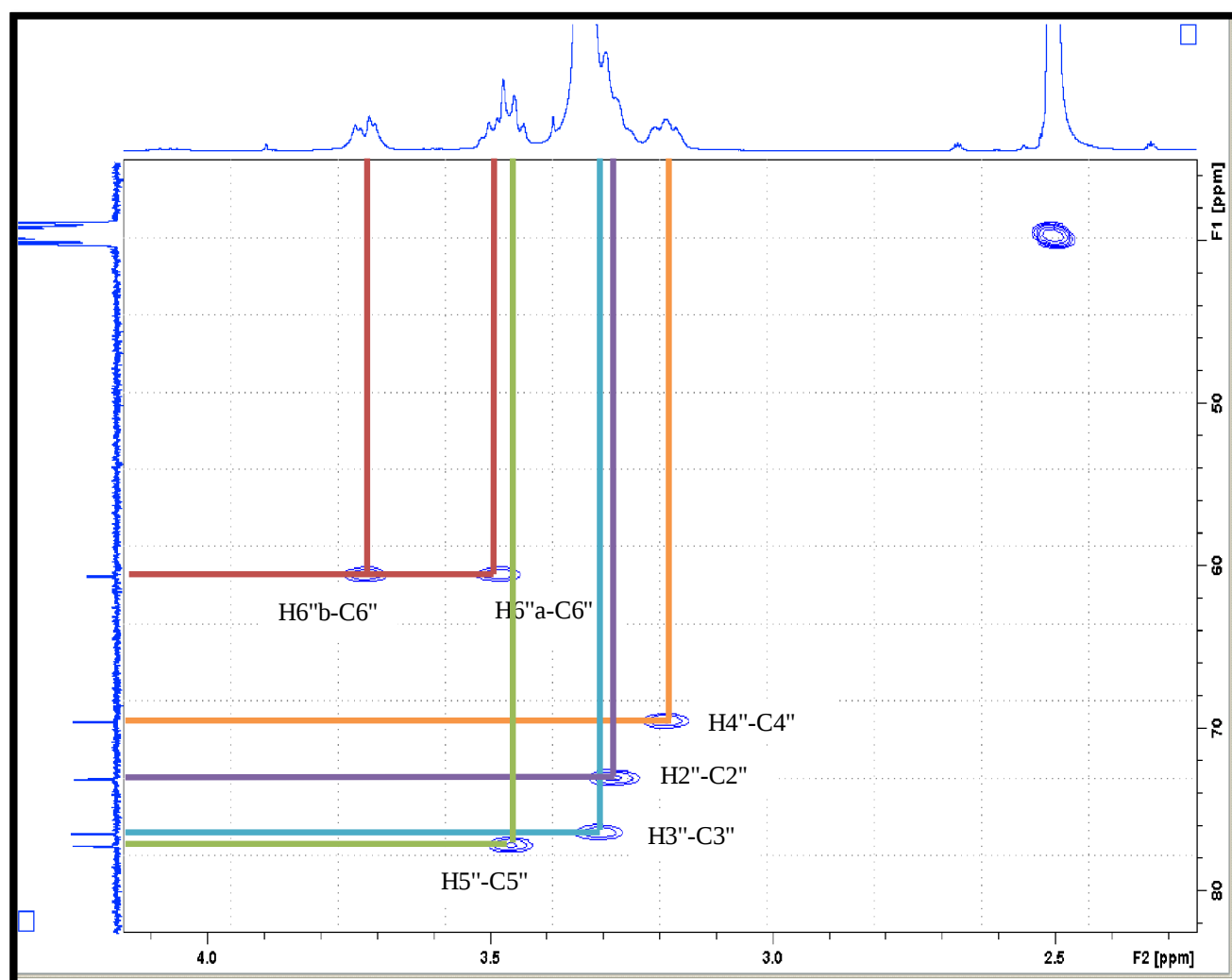


Figure III.29: Spectre HSQC du composé M1 (partie glucose)

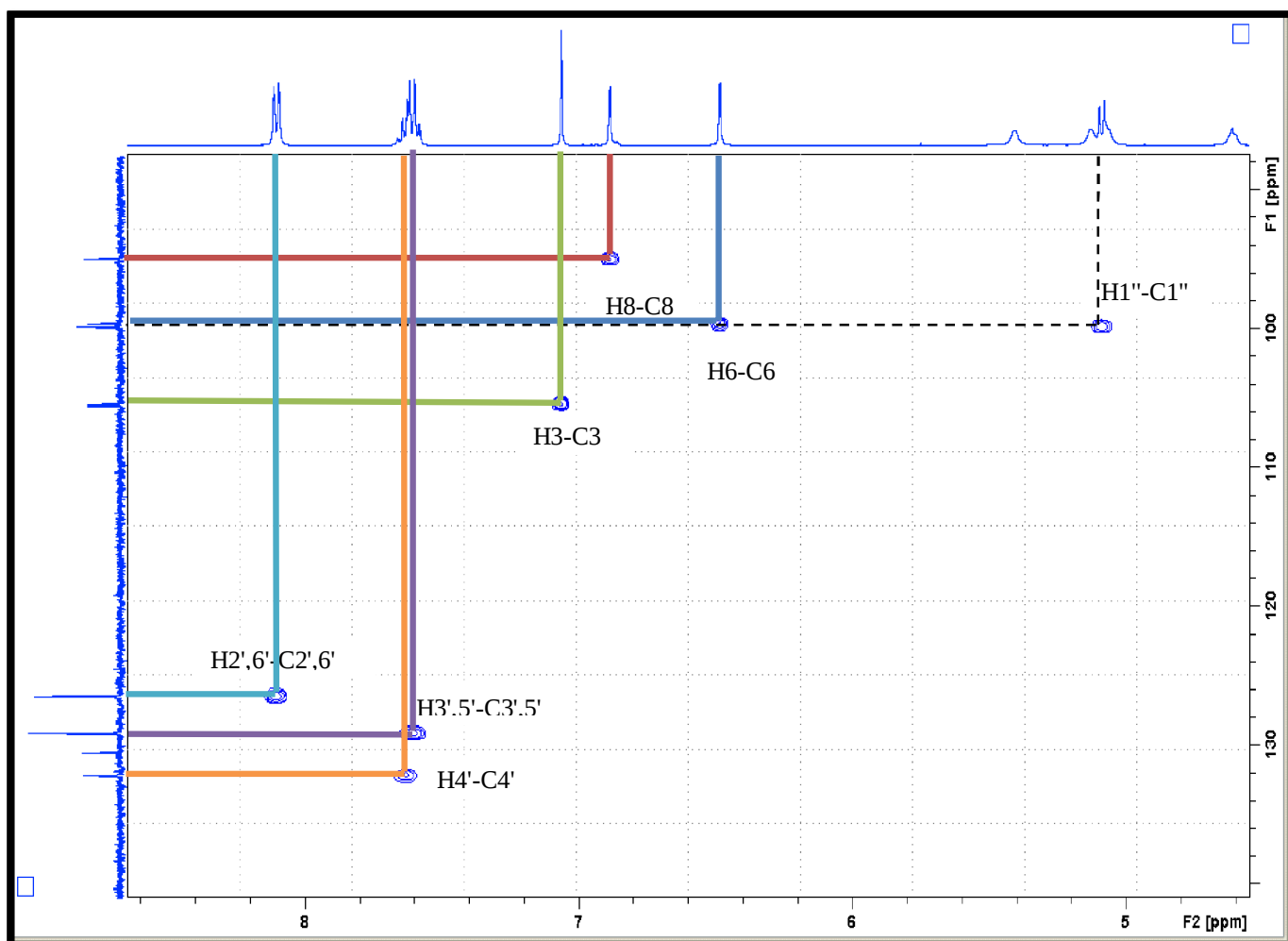


Figure III.30: Spectre HSQC du composé M1 (partie flavone)

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire observées à longue distance HMBC (Figure III.31, 32, 33) a montré la corrélation entre le proton à $\delta = 5.08\text{ppm}$ (H1''), et le carbone situé à $\delta = 163.65\text{ppm}$ (C7) confirmant que le glucose est attaché au carbone C7 , les corrélations entre le proton à $\delta = 7.06\text{ppm}$ et les carbone C1' (131.04ppm), C2 (164.16ppm) et C4 (182.66ppm), ainsi que les corrélations entre le proton à $\delta = 6.87\text{ppm}$ (H8) et les carbone situé à $\delta = 100.31\text{ppm}$ (C1''), $\delta = 157.57\text{ppm}$ (C9) et $\delta = 163.65$ (C7). Une autre corrélation des protons à $\delta = 8.08\text{ppm}$ avec le carbone C2 à $\delta = 164.16\text{ppm}$ (Voir tableau III.5)

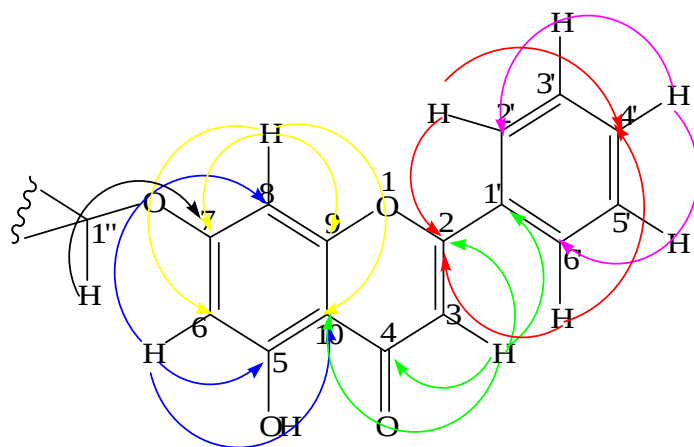
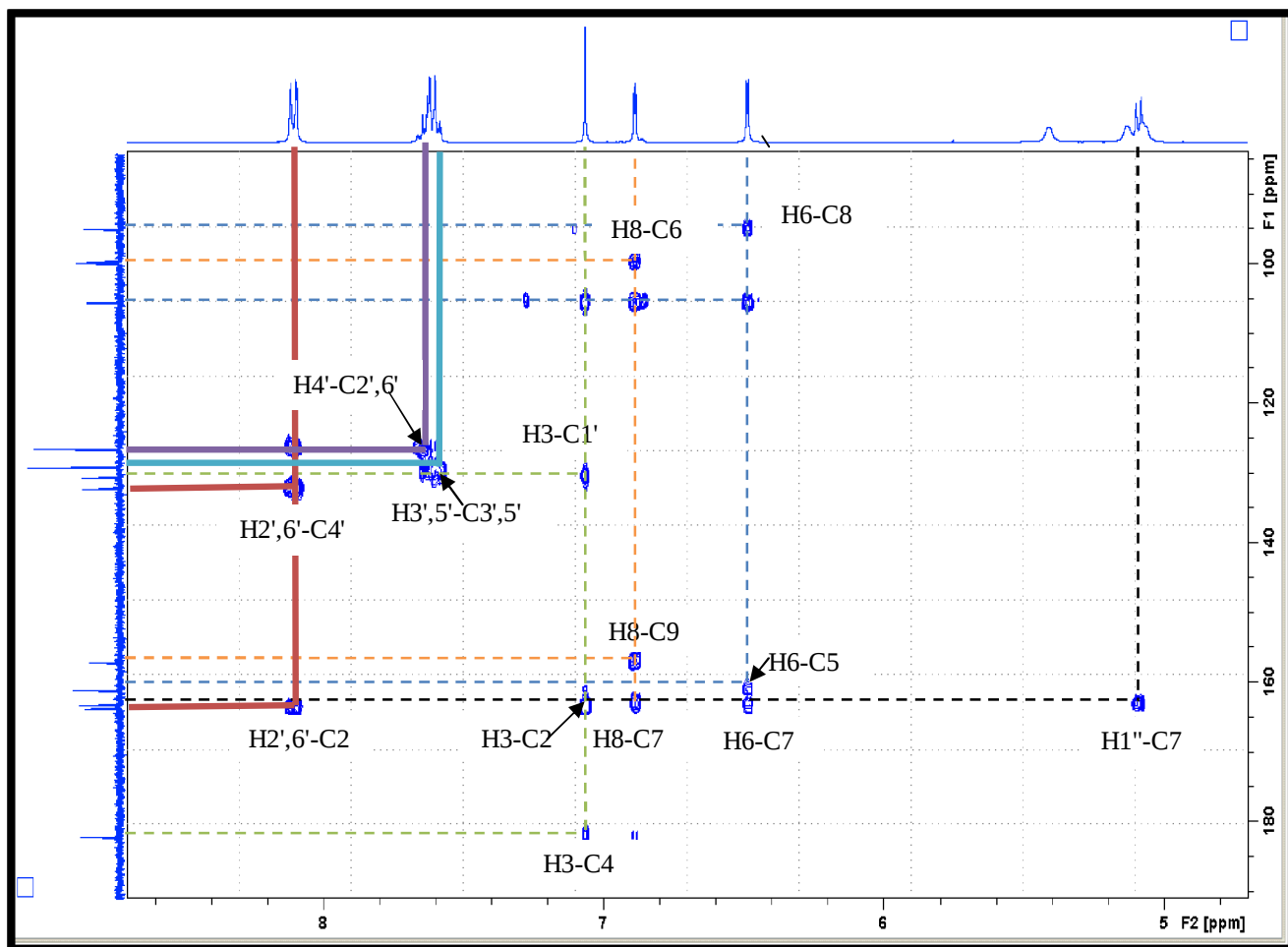


Figure III.31: Spectre HMBC du composé M1(partie flavone)

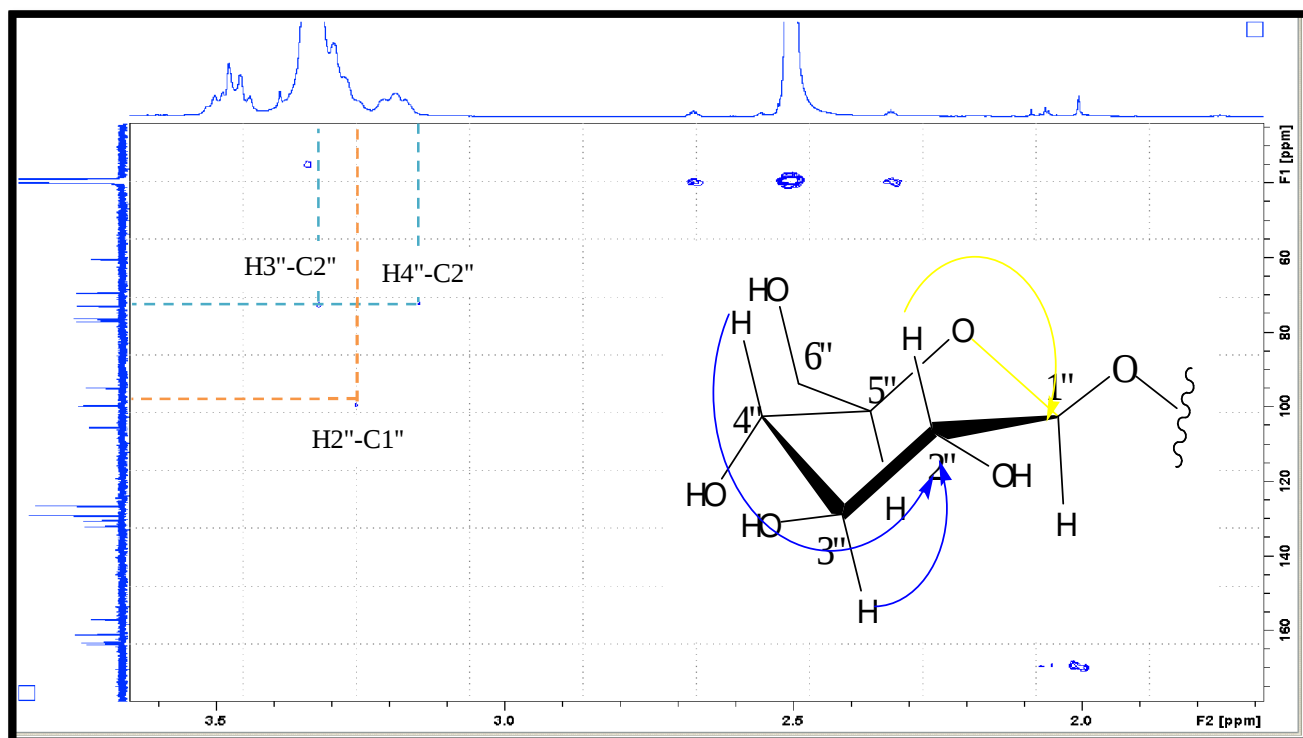


Figure III.32: Spectre HMBC du composé M1 (partie glucose)

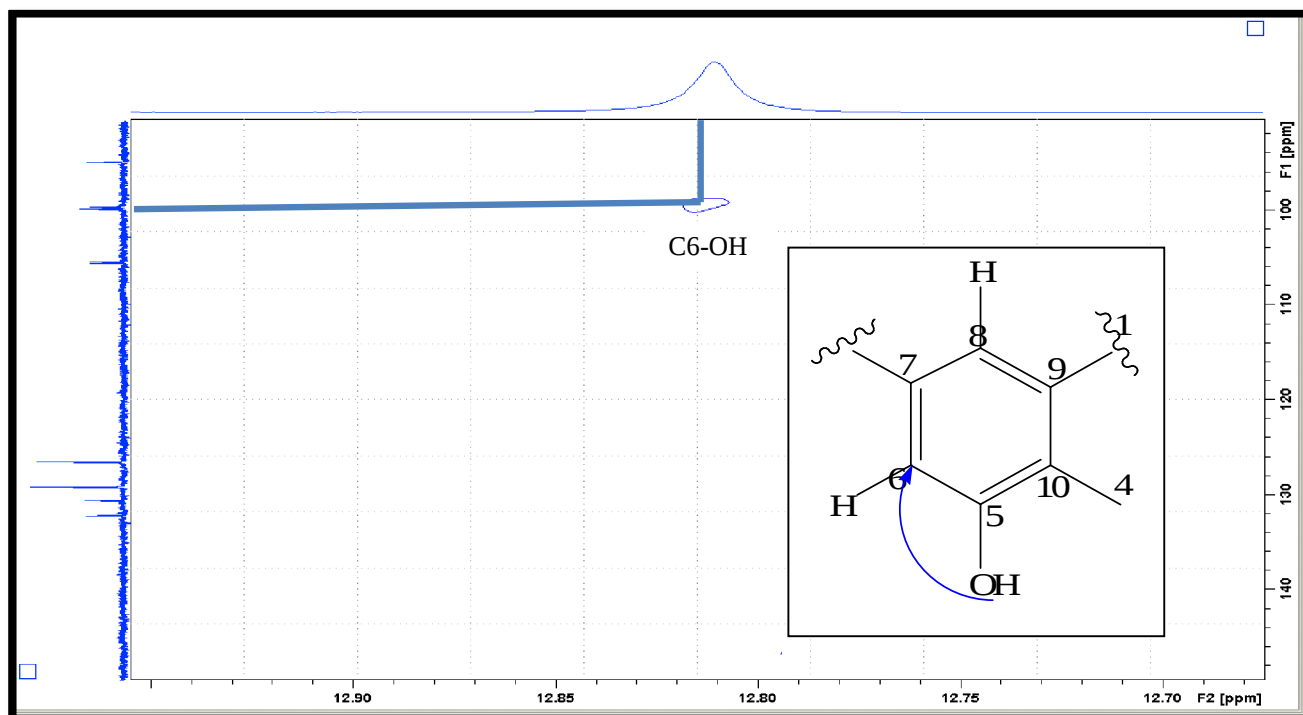


Figure III.33: Spectre HMBC du composé M1 (partie flavone)

Tableau III.5: Corrélation HMBC et COSY (400MHz, DMSO)

Proton	HMBC	COSY
H6	C5, C7, C8	H6, H8
H8	C1'', C7, C9	H6, H8
H2', 6'	C2, C4'	H2', H6', H3', H5'
H3', 5'	C3', C5'	H2', H6', H3', H5'
H4'	C2', C6'	---
H1''	C7	H1'', H2''
H2''	C1''	H1'', H2''
H3''	C2''	---
H4''	C2''	---
H5''	---	---
H6''a	---	H6''a, H6''b
H6''b	---	H6''a, H6''b

Ainsi, les spectres RMN-1H et RMN-13C ont suggéré que le composé **M1** est un aglycone Chrysin. De plus la corrélation entre H-1'' ($\delta=5.08$) et le carbone C-7 ($\delta=163.6$) dans le spectre HMBC confirme que la glucosylation a lieu dans la position 7.

Sur la base des données ci-dessus et la comparaison avec les valeurs de la littérature pour les composés analogues, la structure de M1 a été établie comme un flavonoïde connu 7-O-(β -D-glucopyranosyl)chrysin (figure III.23). Ses caractéristiques sont en bon accord avec ceux rapportés dans la littérature sur un échantillon isolé à partir des fleurs de *Spartium junceum* [44] et un échantillon synthétisé par Dangles et al. [45]

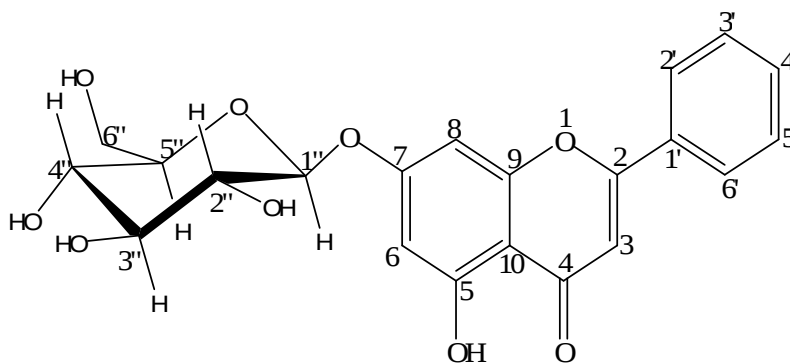


Figure III.23 : 7-O-(β -D-glucopyranosyl)chrysin

III.3.2 Identification du produit M2

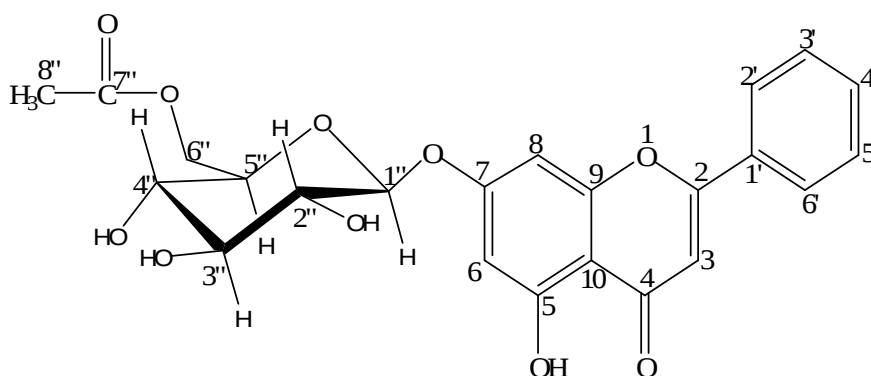


Figure III.35 : 7-O- β -D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]chrysin

Spectre IR :

Les données spectrales en IR sont identiques au composé M1. La différence entre les deux spectres c'est la présence d'une fonction ester (1700 cm^{-1}).

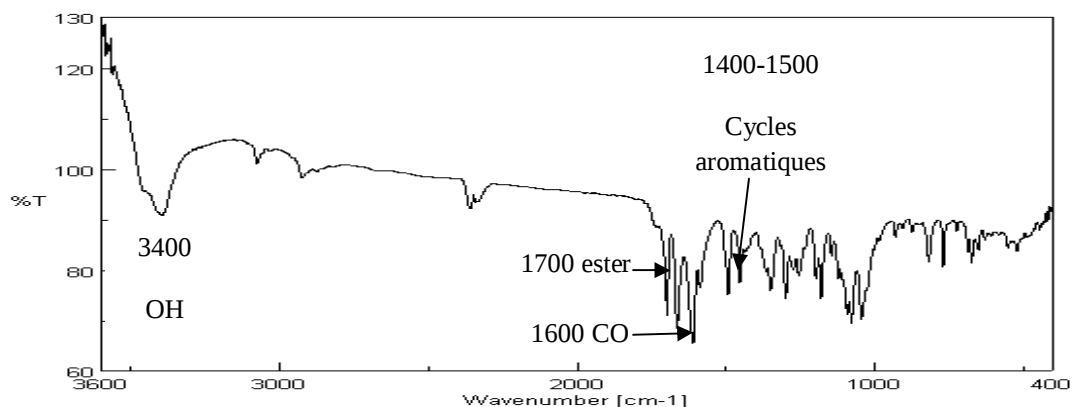


Figure III.36 : Spectre IR du composé M2

La détermination de la structure du composé isolé M2, en se basant sur les specters RMN- ^1H , RMN- ^{13}C et Dept135, indiquent la présence de 23 atomes de carbones dont (Voir le tableau III.6)

L'analyse du spectre RMN- ^{13}C (figure III.37) montre :

- Six signaux CH à δ_{C} 95.48 (C-8), 100 (C-6), 129.63 (C-3',5') et 126.93 (C-2',6'), caractéristiques d'un squelette flavonol,
- Cinq signaux CH à δ_{C} 100.14 (C-1''), 73.43 (C-2''), 76.63 (C-3''), 70.22 (C-4''), 74.31 (C-5'') et un CH_2 à 63.81 ppm (C-6'') caractéristiques des carbones du glucose,
- Un autre signal à $\delta = 182.68\text{ ppm}$ (C-4), caractéristique d'un carbone carbonyle,
- Deux signaux à δ_{C} 161.55 (C-5) et 163.37 (C-7) caractéristiques des carbones oxygénés,
- Deux signaux à $\delta = 21.03\text{ ppm}$ (CH_3) et $\delta = 170.65$ (CO) caractéristiques d'un groupement acétyle.

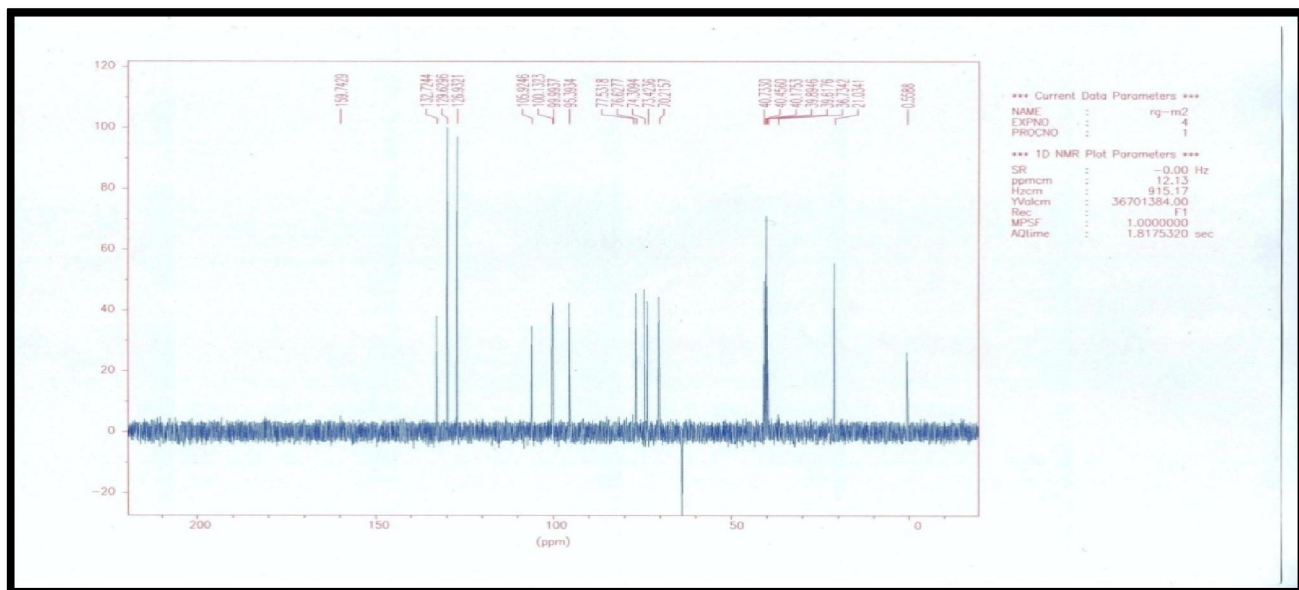
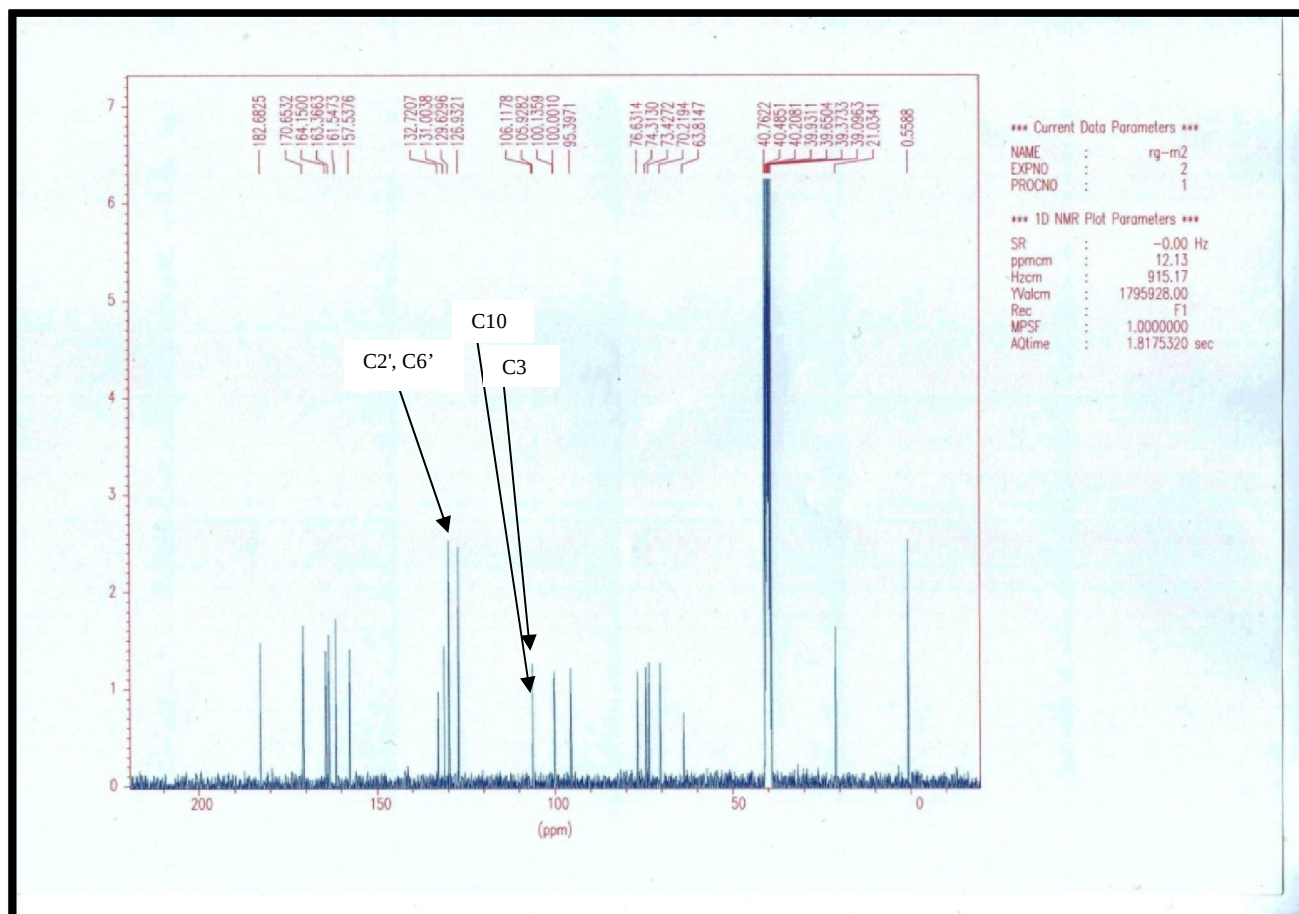


Figure III.36: Spectre RMN¹³C J-modulé du composé M2



L'étude du spectre RMN-1H du composé **M2** (Tableau III.6, Figure III.38) a permis de mettre en évidence la présence de:

- le spectre RMN-1H exposé un modèle de flavonoïdes et a montré des signaux à δ 7.07 (1H, s) 6.85 (1H, d) et 6.46 (1H, d) typique de C-3, C-8 et C-6 protons d'un squelette flavone,
- Les déplacements chimiques de 8,08 (d, H2', H6') et 7.6 (m, H3', H4', H5') suggère qu'il n'ya pas de substitution sur le noyau B du flavonoïde
- Un proton comme singulet à $\delta = 12.81$ ppm a été attribué au C-5 hydroxyle,
- Quatre protons comme doublet à $\delta = 4.36$ ppm indiquent la présence d'un fragment de glucose,
- Le signal à 5.36 ppm est affecté à C-1' avec un constante de couplage ($J = 8$ Hz) indiquant une configuration [3],
- Trois protons comme singulet à $\delta = 1.99$ ppm à indiqué la présence d'un groupement CH_3 .

Figure III.38: Spectre RMN¹H du composé M2

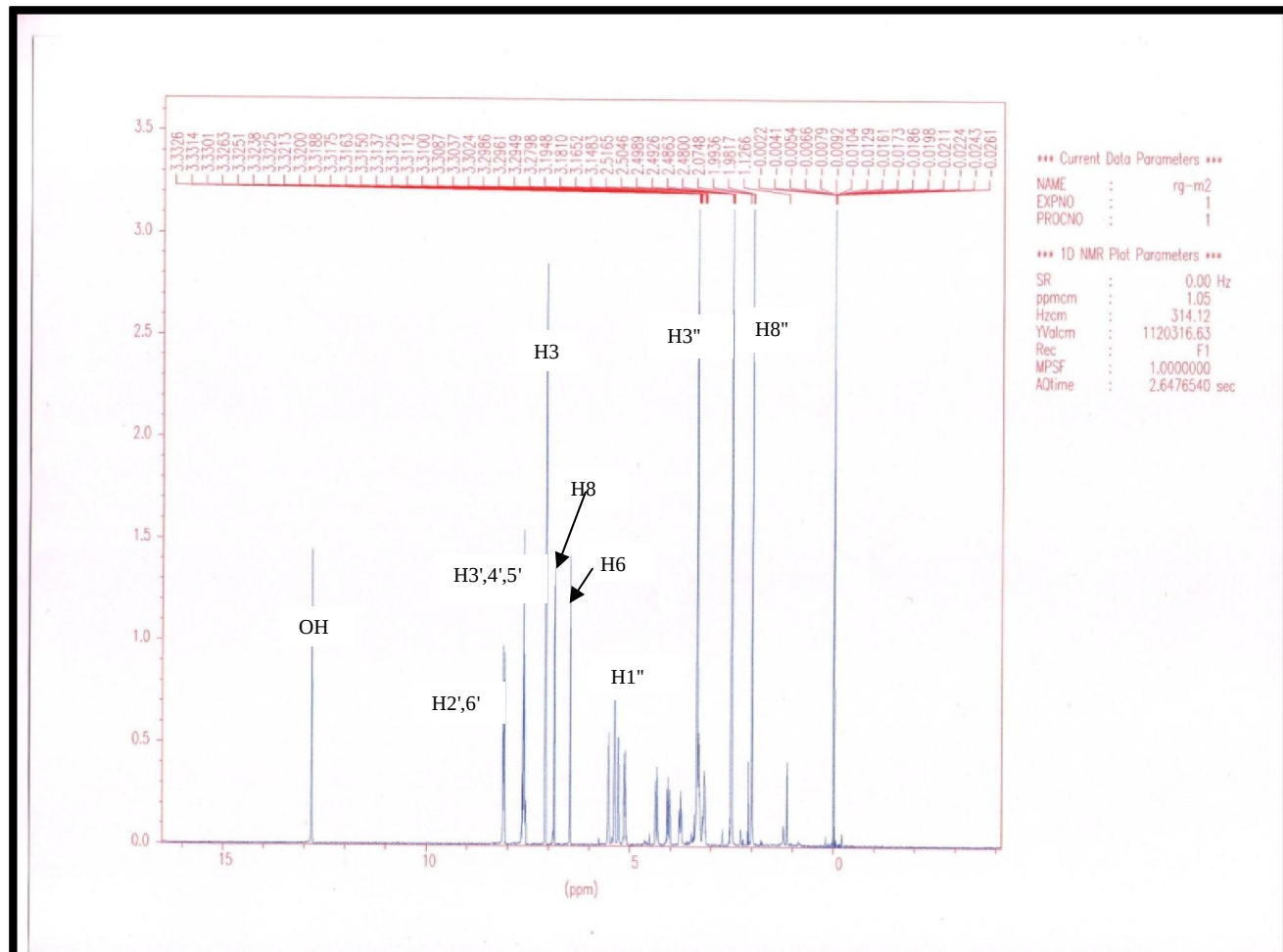


Tableau III.6 : Les résultats RMN ¹H, ¹³C et Dept de M2

Position	RMN ¹ H δ ppm	Multiplicité	RMN ¹³ C δ ppm	Dept
C-2	---	---	164.15	C
C-3	7.07	s	105.93	CH
C-4	---	---	182.68	C
C-5	---	---	161.55	C
C-6	6.46	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	100	CH
C-7	---	---	163.37	C
C-8	6.85	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	95.48	CH
C-9	---	---	157.54	C
C-10	---	---	106.12	C
C-1'	---	---	131	C
C-2'	8.08	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	126.93	CH
C-3'	7.6	<i>m</i>	129.63	CH
C-4'	7.64	<i>m</i>	132.72	CH
C-5'	7.6	<i>m</i>	129.63	CH
C-6'	8.08	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	126.93	CH
C-1''	5.36	<i>d</i> (<i>J</i> = 8 Hz)	100.14	CH
C-2''	3.31	<i>m</i>	73.43	CH
C-3''	3.33	<i>m</i>	76.63	CH
C-4''	3.17	<i>m</i>	70.22	CH

C-5"	3.74	<i>tl</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	74.31	CH
C-6"	H _a : 4.08 H _b : 4.36	<i>dd</i> (<i>J</i> = 12 Hz) <i>dd</i> (<i>J</i> = 12 Hz)	63.81	CH ₂
C-7"	---	---	170.65	C
C-8"	1.99	<i>s</i>	21.03	CH ₃

Par ailleurs, le spectre COSY ^1H - ^1H (figure III.39, 40) montre l'existence des corrélations suivantes :

- Le proton H-6 (δ = 6.46 ppm) et le proton H-8 (δ = 6.85 ppm),
- Les deux protons H-3', H-5' (δ = 7.6 ppm) et les protons H -2', H-6' (δ = 8.08 ppm),
- Le proton anomère H-1" (δ =5.36ppm) et les protons H-2" (3.31ppm),
- Le proton H-6"a (4.08ppm) et le proton H-6"b (4.36ppm),
- Le proton H5" à (3.74ppm) et les deux protons H6"a et H6"b.

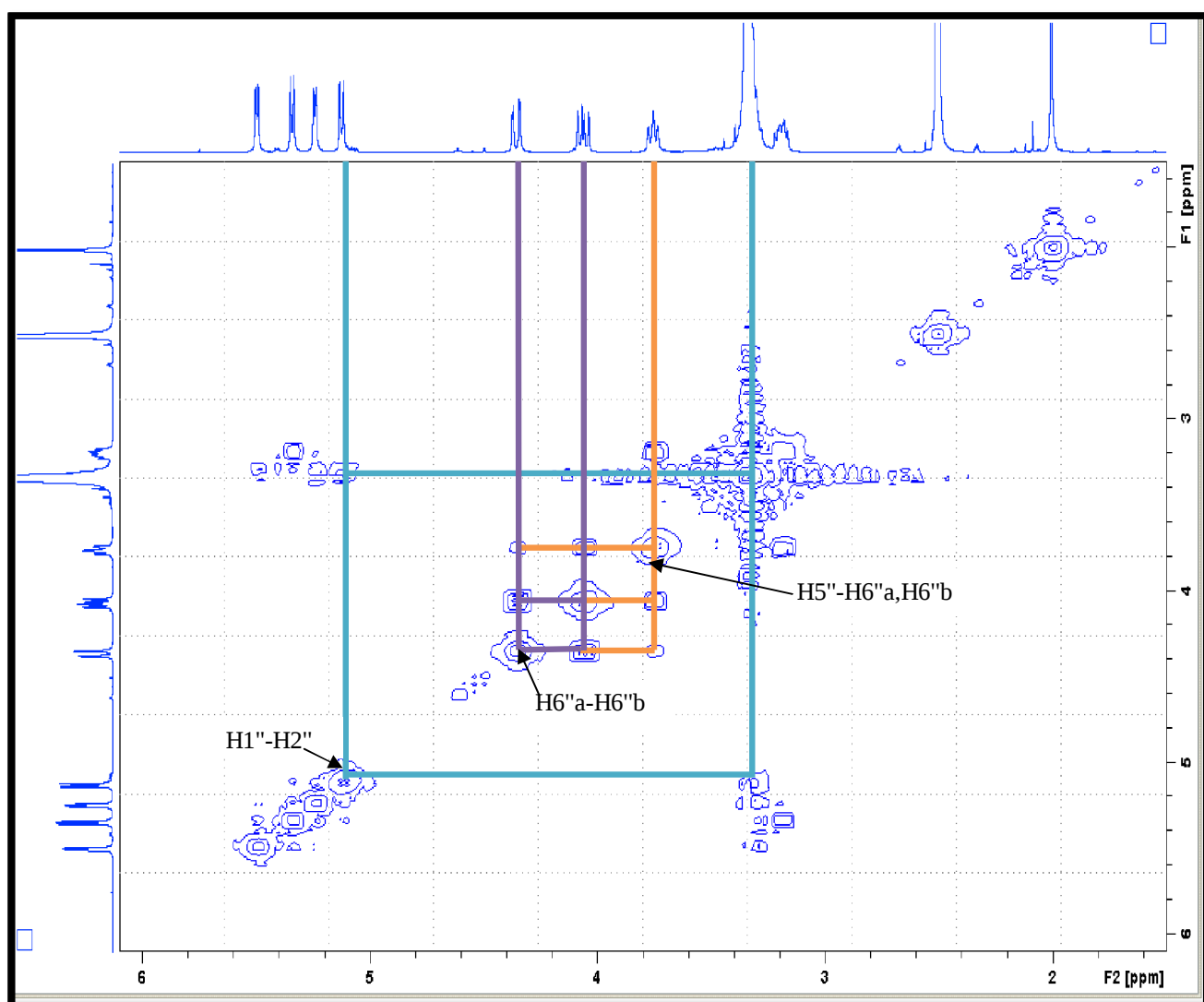


Figure III.39: spectre COSY du compose M2(partie glucose)

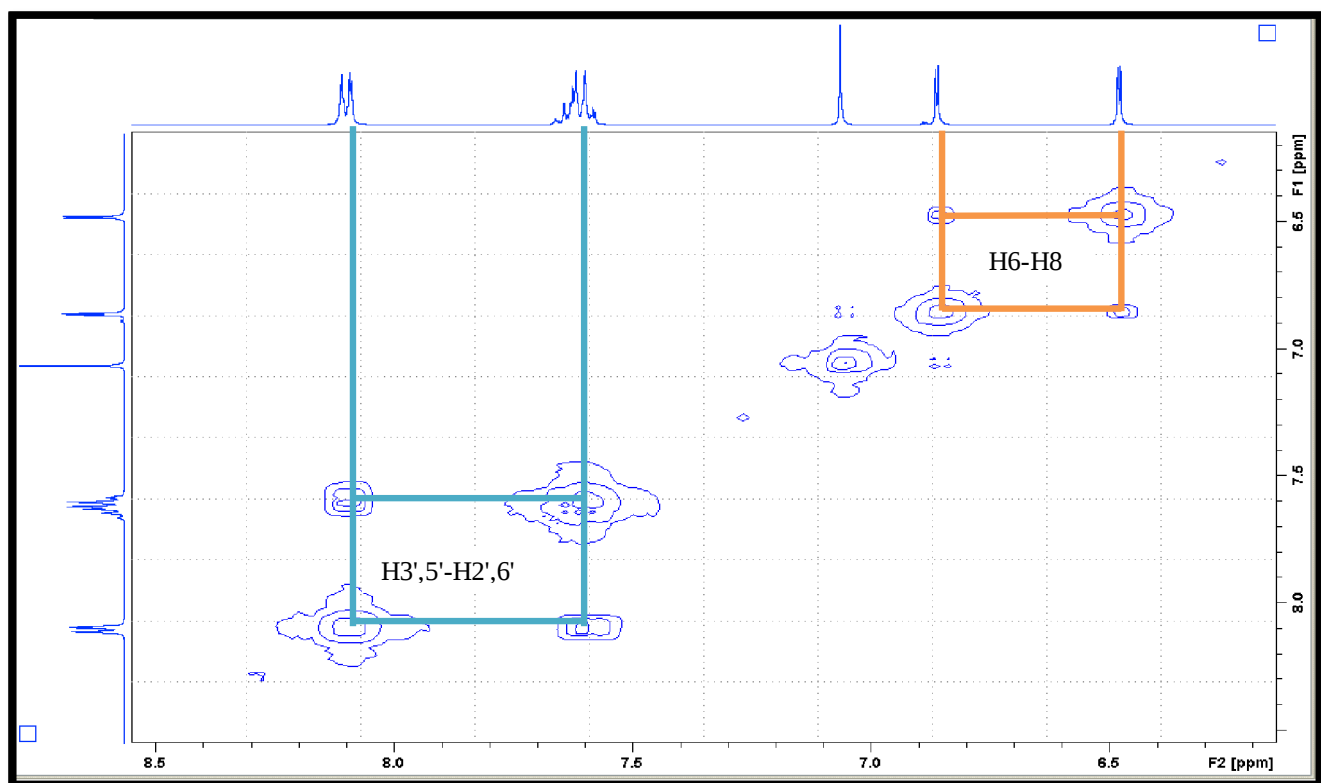


Figure III.40: spectre COSY du compose M2(partie flavone)

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire HSQC (Figure III.41 et 342) a conduit à l'établissement des connections géminales RMN- ^1H - ^{13}C du composé M2 a ainsi pu être démontré que les protons méthyléniques localisés à $\delta = 4.08$ ppm et $\delta = 4.36$ ppm ont liés au carbone $\delta = 63.81$ ppm. Le spectre a montré également une corrélation entre le proton à $\delta = 5.36$ ppm et le carbone $\delta = 100.14$ ppm permettant le positionnement de ce carbone en C1". Il a ainsi pu être démontré que les protons H2", H3", H4" et H5" ont liés respectivement aux carbones C2" (73.43ppm), C3" (76.63ppm), C4" (70.22ppm) et C5" (74.31ppm).

Le spectre a montré respectivement des corrélations entre les protons H3, H6 et H8 et les carbones C3 (105.93ppm), C6 (100ppm) et C8 (95.48ppm).

Le spectre a montré les couplages directs entre:

- Les protons H-2', H-6' et leur carbones C-2' (126.93ppm), C-6' (126.93ppm).
- Les protons H-3', H-5' et leur carbones C-3' C-5' localisés à $\delta = 129.63$ ppm.
- Le proton H4' et son carbone C4' résonant à $\delta = 132.72$ ppm.

-Les trios protons à $\delta = 1.99\text{ppm}$ étaient attachés au carbone situé à $\delta = 21.03\text{ppm}$ permettant le positionnement de ce carbone en C8".

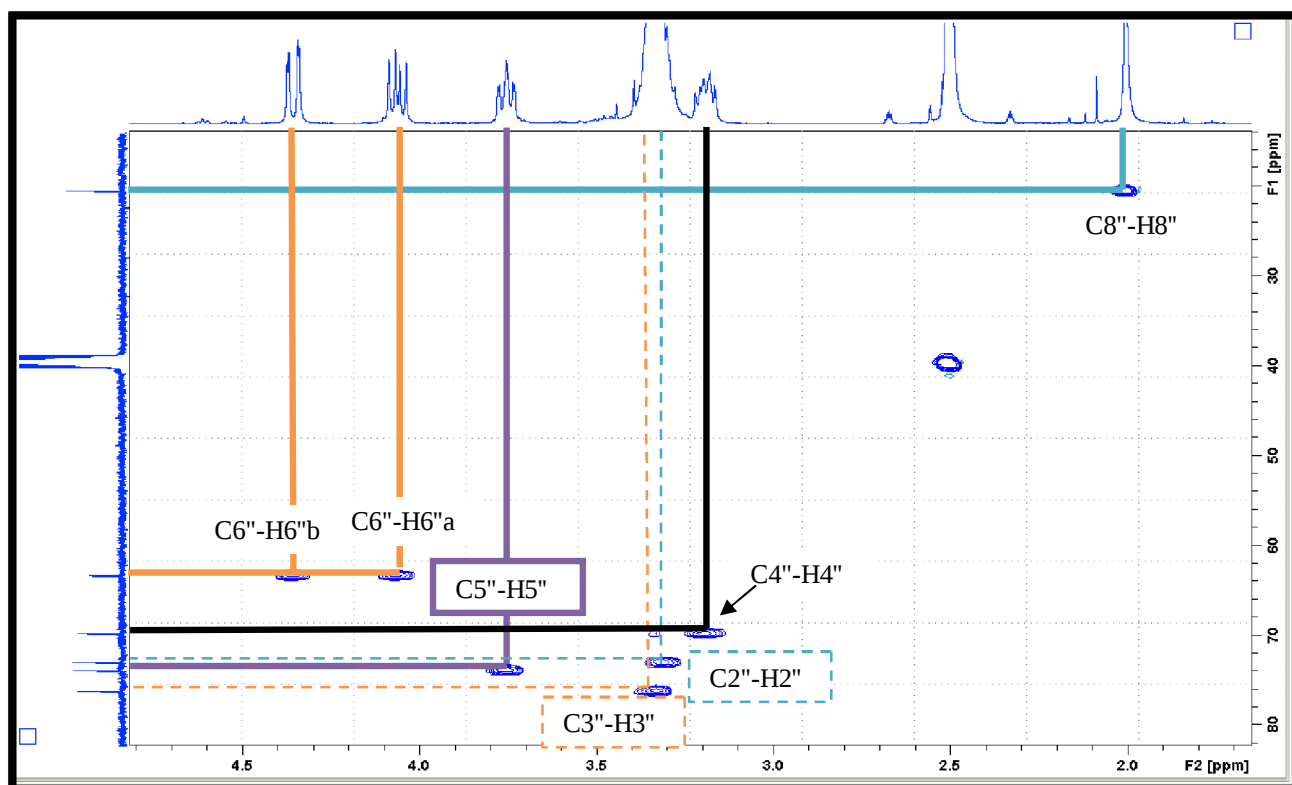


Figure III.41: spectre HSQC du composé M2 (partie glucose)

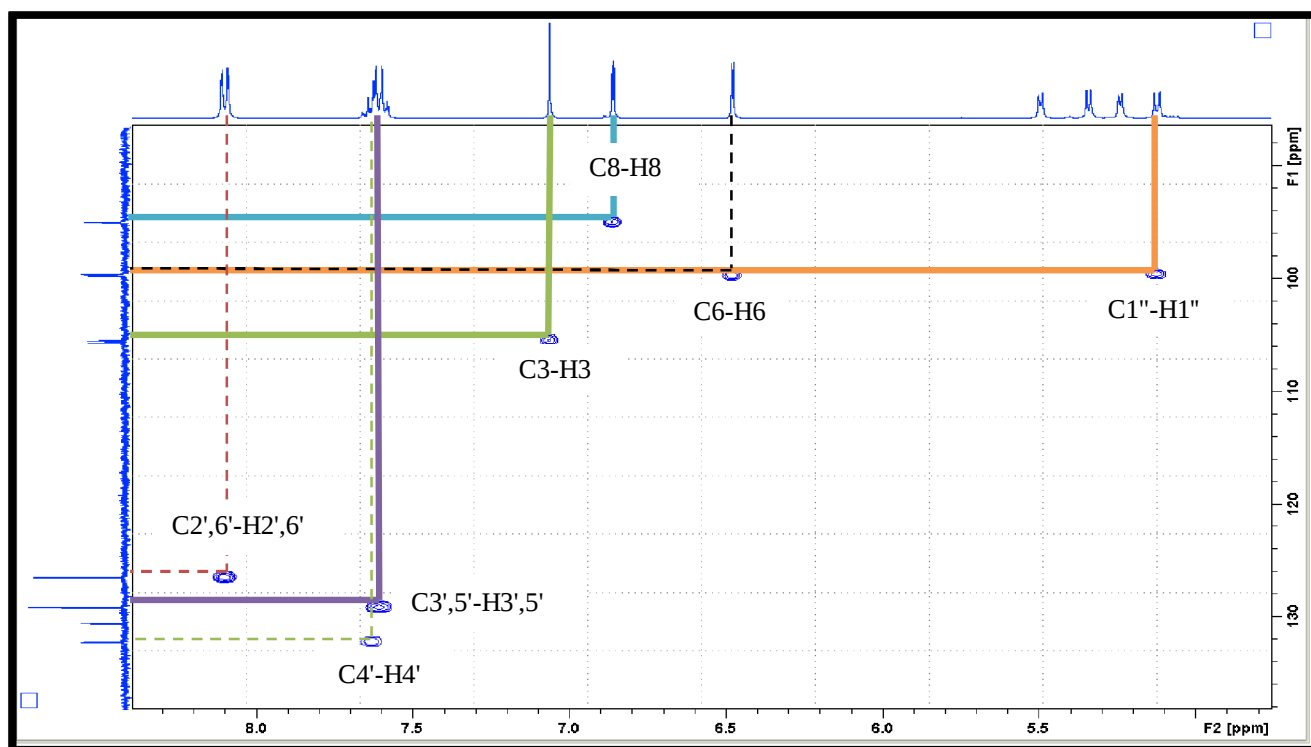


Figure III.42: spectre HSQC du composé M2(partie flavone)

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire observées à longue distance HMBC (Figure III.43,44, 45) a montré la corrélation entre le proton à $\delta = 5.12\text{ppm}$ (H1''), et le carbone situé à $\delta = 163.65\text{ppm}$ (C7) confirmé que le glucose est lié au carbone C7 , la corrélation entre les protons à $\delta = 1.99\text{ppm}$ et le carbone situé à $\delta = 170.65\text{ppm}$ confirmé la présence d'un ester, ce dernier est corréler avec les deux protons à $\delta = 4.08\text{ppm}$ (H6''a) et $\delta = 4.36\text{ppm}$ (H6''b) confirmé que le groupement ester est lié au carbone C6'' du glucose. Les corrélations entre le proton à $\delta = 7.06\text{ppm}$ et les carbone C1' (131ppm), C2 (164.15ppm) et C4 (182.68ppm), ainsi que les corrélations entre le proton à $\delta = 6.85\text{ppm}$ (H8) et les carbones $\delta = 100.14\text{ppm}$ (C1''), $\delta = 157.54\text{ppm}$ (C9) et $\delta = 163.37$ (C7). Une autre corrélation des protons à $\delta = 8.08\text{ppm}$ avec le carbone C2 à $\delta = 164.15\text{ppm}$. La corrélation entre le proton à $\delta = 12.81$ (OH) et les carbones C6 (100ppm), C7 (163.37ppm) et C10 (106.12ppm) (Voir tableau III.7)

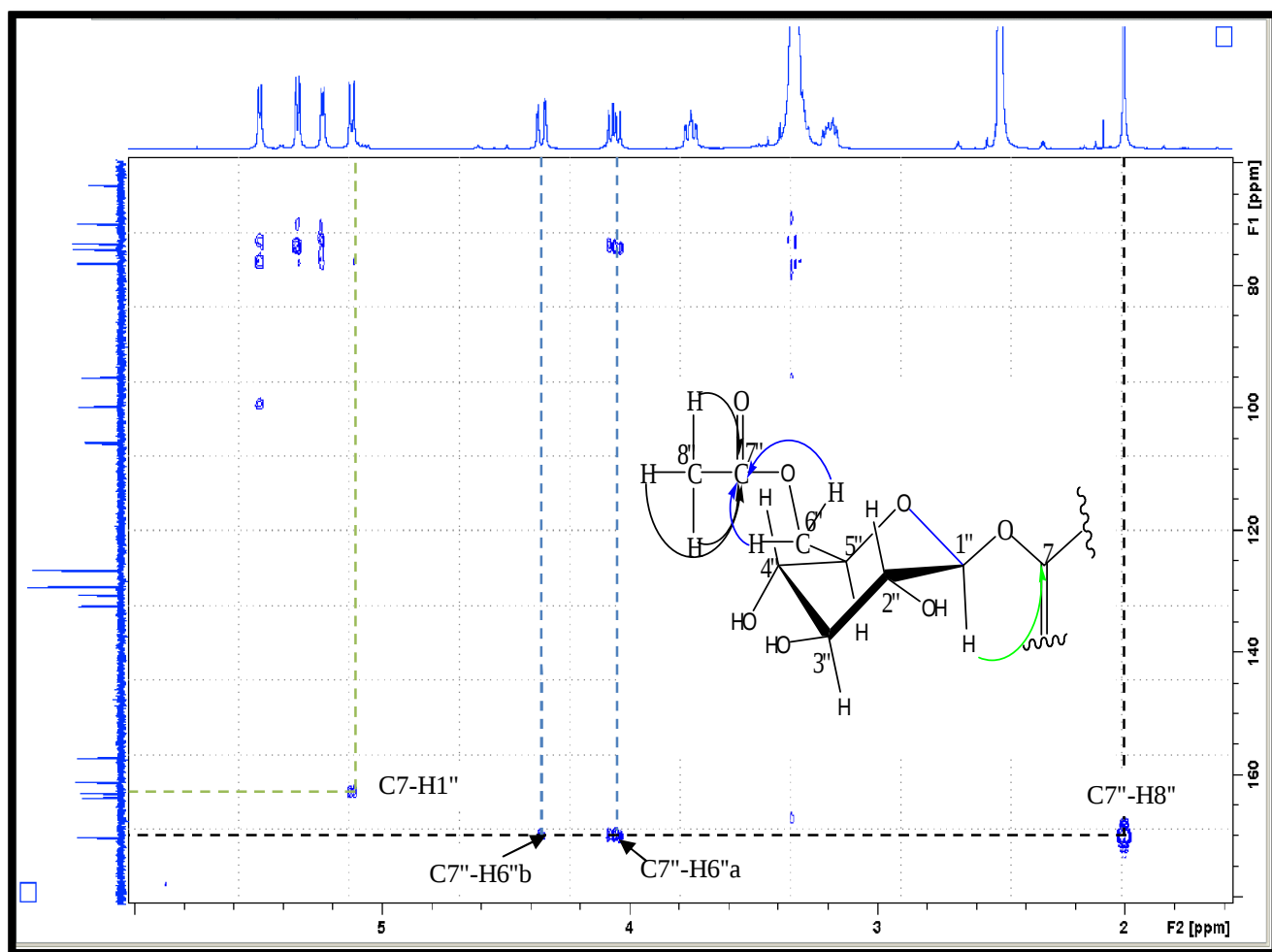


Figure III.43: spectre HMBC du composé M2(partie glucose)

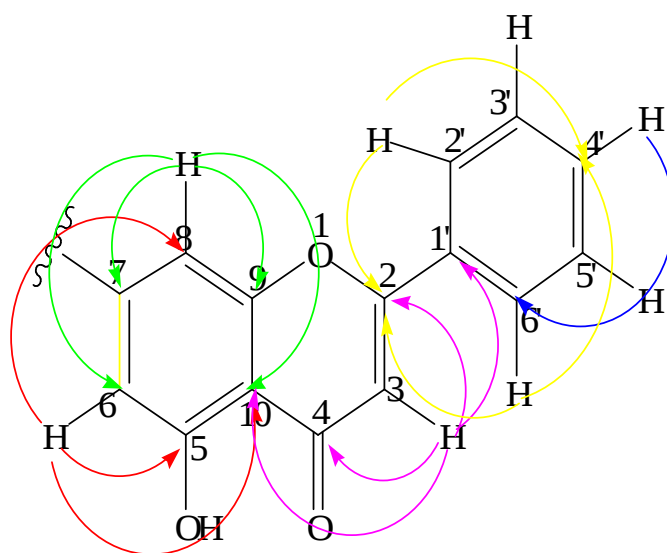
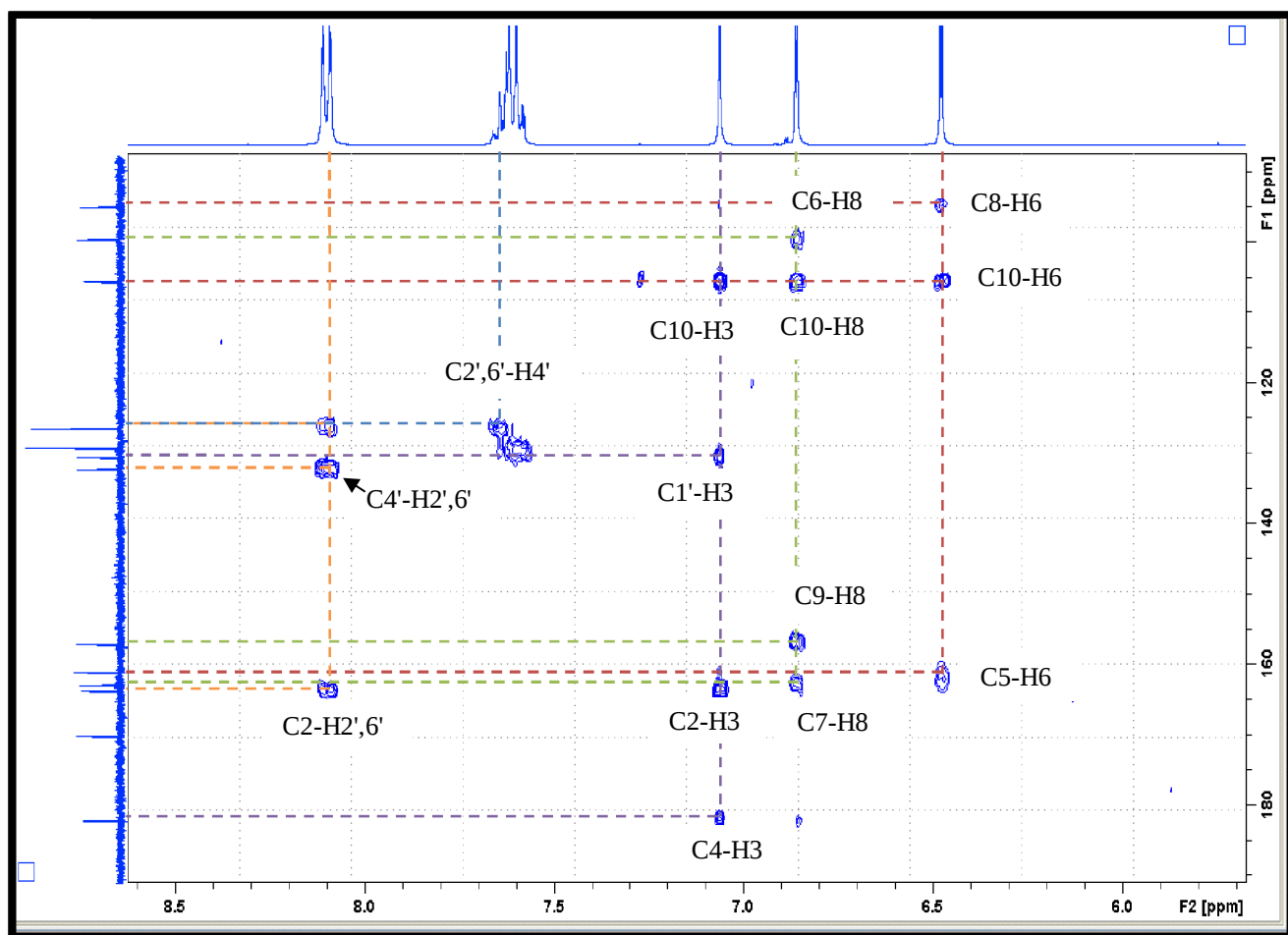


Figure III.44: spectre HMBC du composé M2(partie flavone)

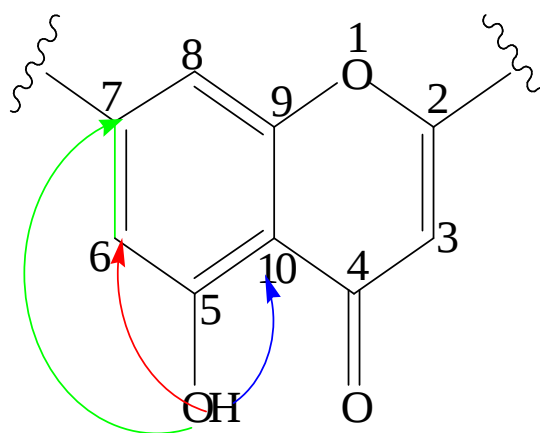
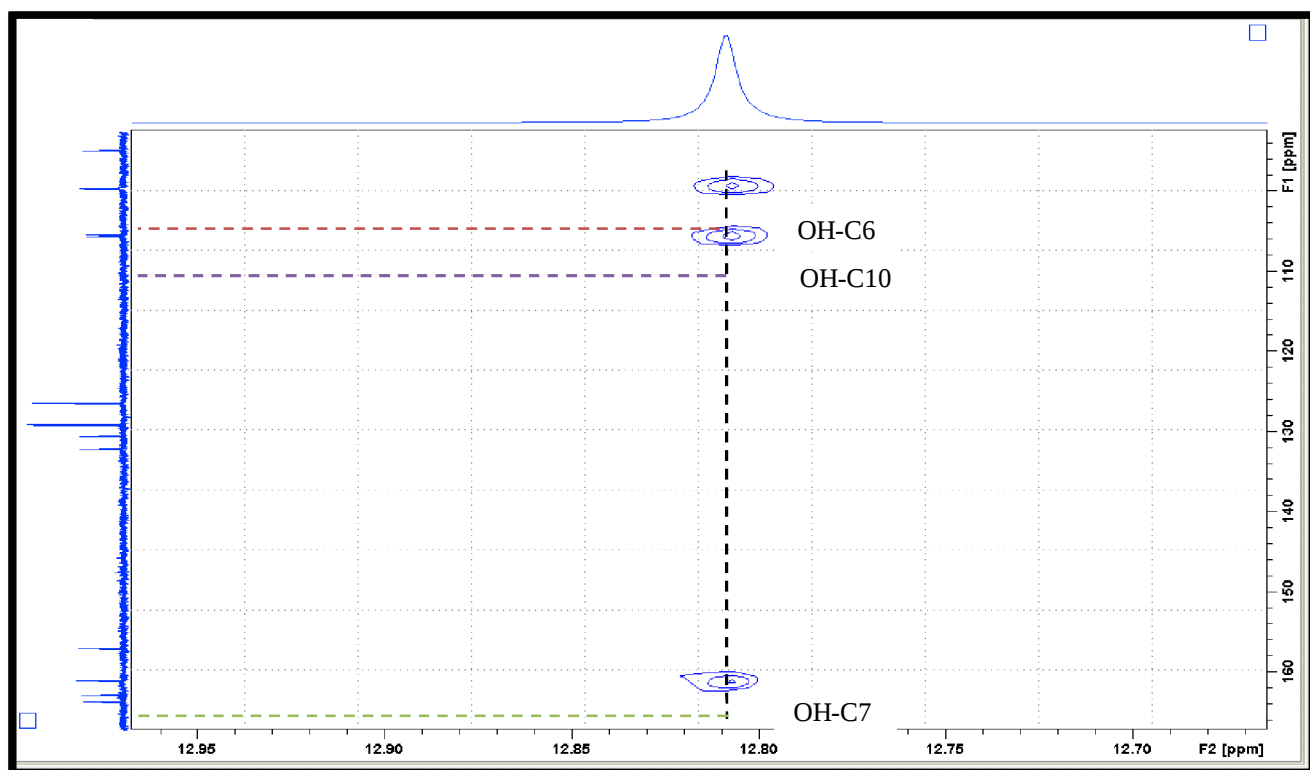


Figure III.45: spectre HMBC du composé M2(partie flavone)

Tableau III.7: Corrélation HMBC et COSY (400MHz, DMSO)

Proton	HMBC	COSY
H-3	C-2, C-4, C-10, C-1'	---
H-6	C-5, C-8, C-10	H-6, H-8
H-8	C-6, C-7, C-9, C-10	H-6, H-8
H-2'	C-2, C-4'	H-2', H-3', H-5', H-6
H-3'	---	H-2', H-3', H-5', H-6
H-4'	C2'; C6'	---
H-5'	---	H-2', H-3', H-5', H-6
H-6'	C-2, C-4'	H-2', H-3', H-5', H-6
H-1''	C-7	H-1'', H-2''
H-2''	---	H-1'', H-2''
H-3''	---	---
H-4''	---	---
H-5''	---	H-5'', H-6''a, H-6''b
H-6''a	C-7''	H-6''a, H-6''b
H-6''b	C-7''	H-6''a, H-6''b
H-8''	C-7''	---

Sur la base de ces résultats, nous attribuons donc à ce composé la structure de la figure III.43 qui celle du 7-O-β-D-[(6''-actyl)glucopyranosyl]chrysin

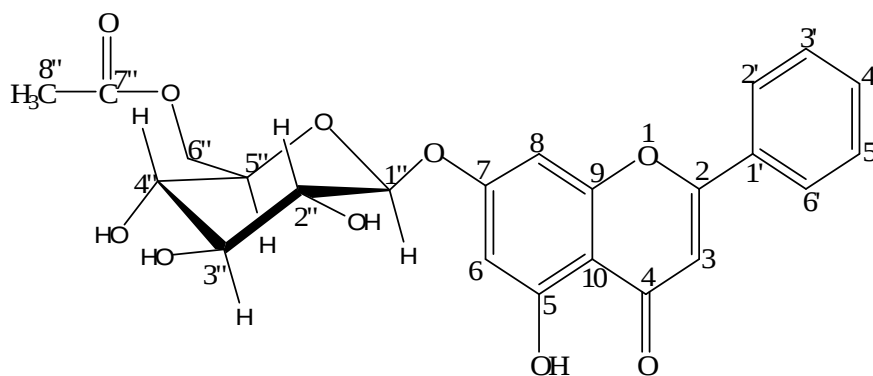


Figure III.35 : 7-O-β-D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]chrysin

III.3.3 Identification du produit M3

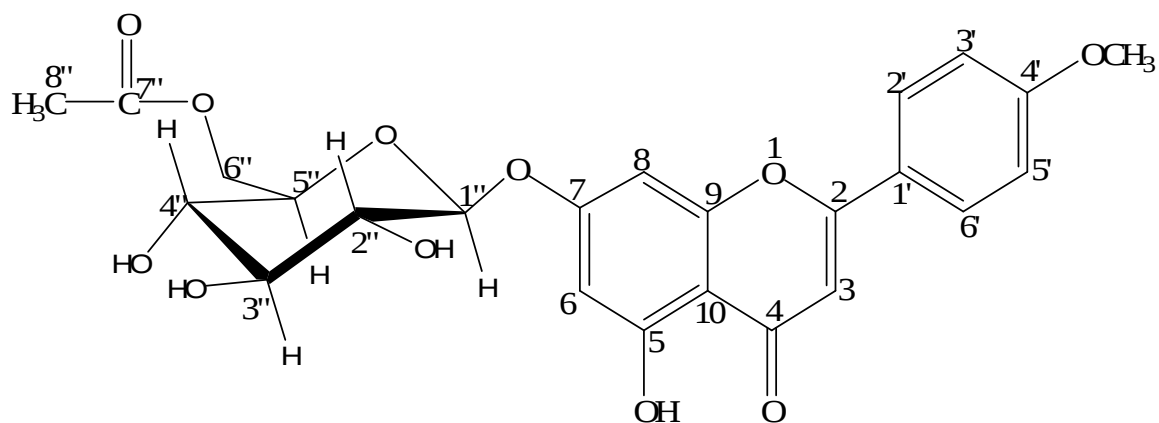


Figure III.46 : 7-O-β-D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]acacetin

Spectre IR :

Le composé M3 présente les mêmes caractéristiques spectrales que le composé M2.

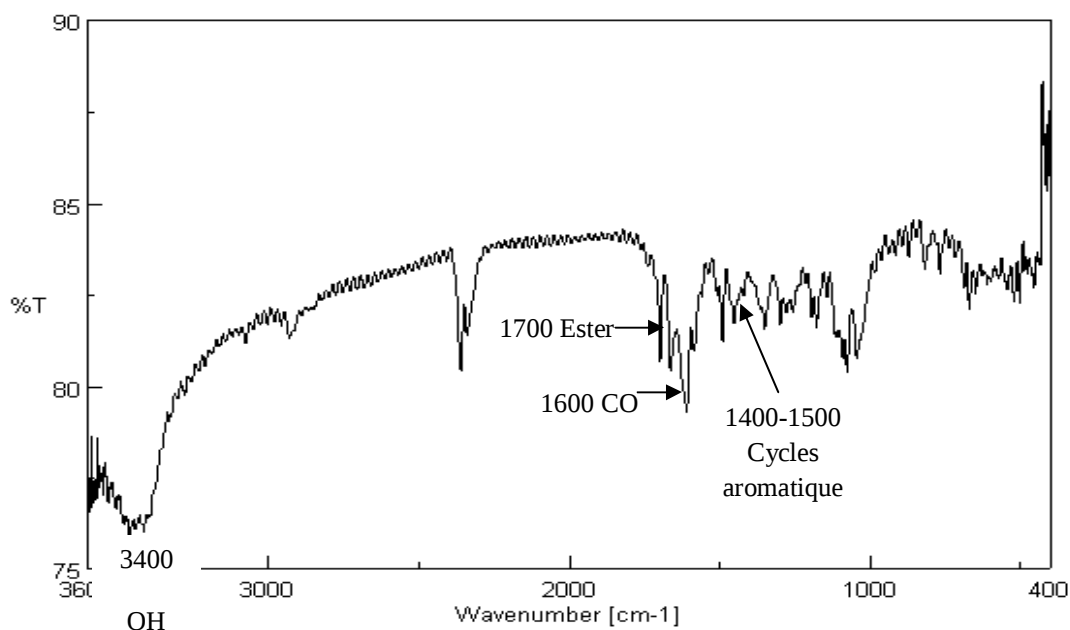


Figure III.47 :Spectre IR du composé M3

Les spectres RMN- ^1H , RMN- ^{13}C et Dept135 du composé M-3, indiquent la présence d'un mélange de trois produits.

L'analyse des spectres de proton et de carbone-13 du composé M3 indique une similitude structurale avec le composé M2 au niveau des cycles A, C, et le glucose.

Le spectre RMN ^{13}C (figure III.50) révèle la présence de :

Sept carbones quaternaires dont trois oxygénés et deux groupement carbonyle à $\delta=170.93$ ppm et $\delta= 183.44$ ppm,

- Sept signaux CH aromatique,
- Le Dept indique la présence d'un carbone méthylène et un méthyle (figure III.43),
- Cinq signaux CH entre 64.31 et 101.32 indiquent la présence d'un glucose,
- Un CH_3 à $\delta= 20.76$ ppm

L'analyse du spectre RMN-13C (figure III.49, 50) montre :

- Six signaux CH à δ_C 94.00 (C-8), 95.91 (C-6), 130.08 (C-3',5') et 127.37 (C-2',6'), caractéristiques d'un squelette flavone,
- Cinq signaux CH à δ_C 101.31 (C-1''), 74.53 (C-2''), 77.80 (C-3''), 71.26 (C-4''), 75.26 (C-5'') et un CH_2 à 64.31 ppm (C-6'') caractéristiques des carbones du glucose,
- Un autre signal à $\delta = 183.44$ ppm (C-4), caractéristique d'un carbone carbonylé,
- Trois signaux à δ_C 162.84 (C-5), 164.44 (C-7) et 163.69 (C4') caractéristiques des carbones oxygénées,
- Deux signaux à $\delta = 20.77$ ppm (CH_3) et $\delta = 170.93$ (CO) caractéristiques d'un groupement acétyle.

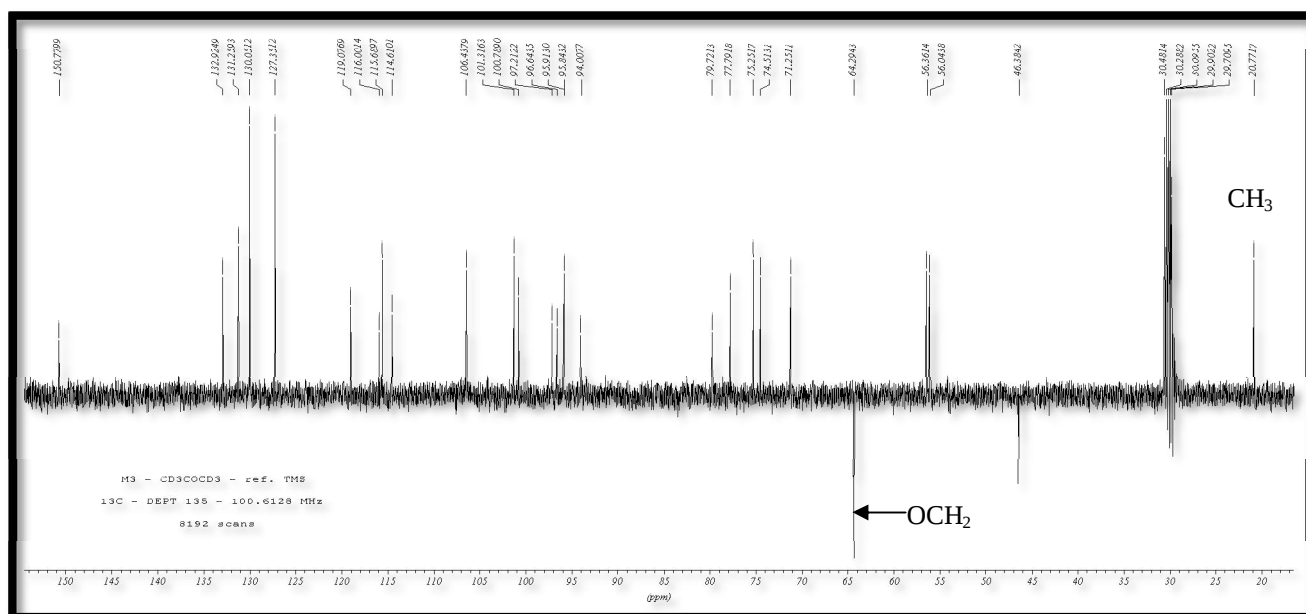


Figure III.48: Spectre RMN¹³C J-modulé du composé M-3

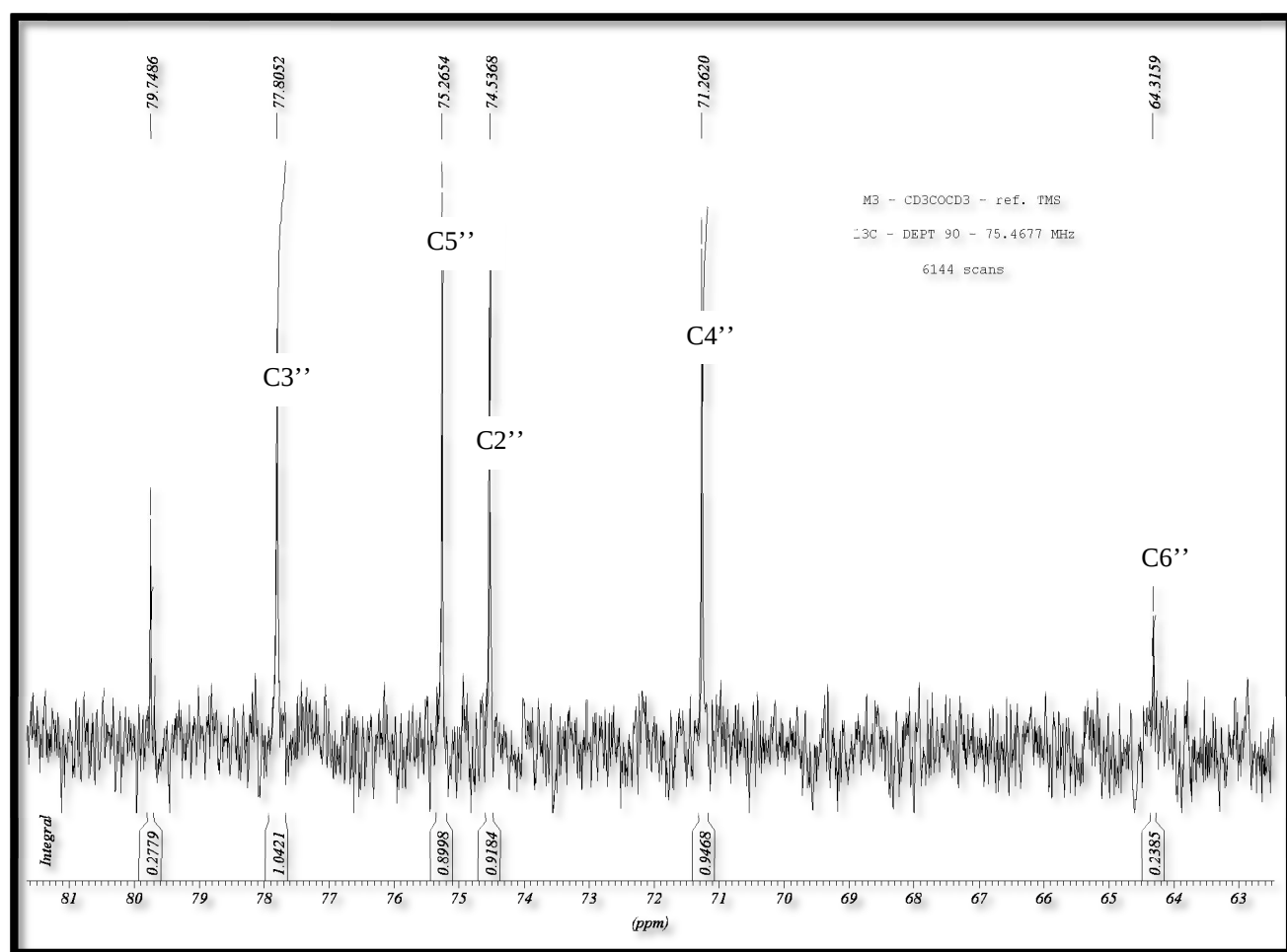


Figure III.49: Spectre RMN¹³C (partie glucose) du composé M-3

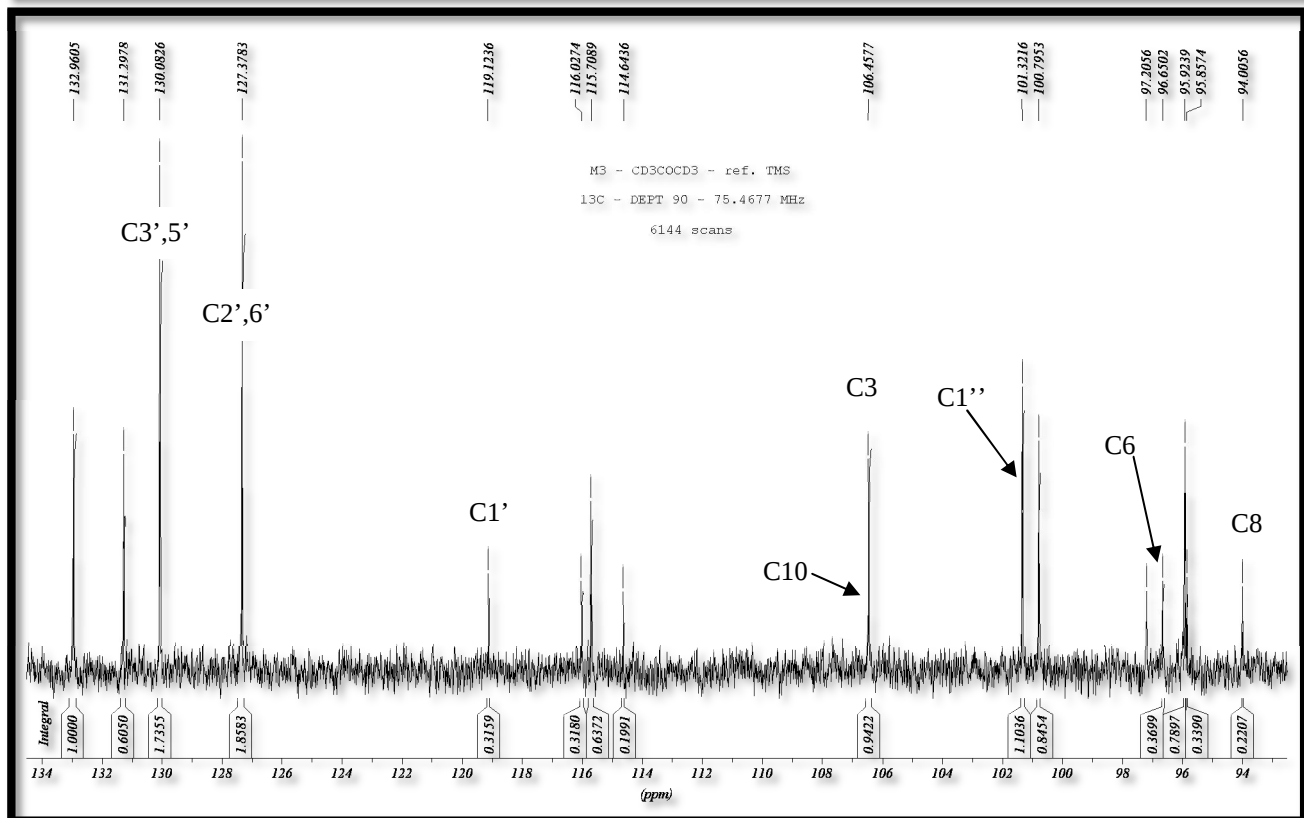
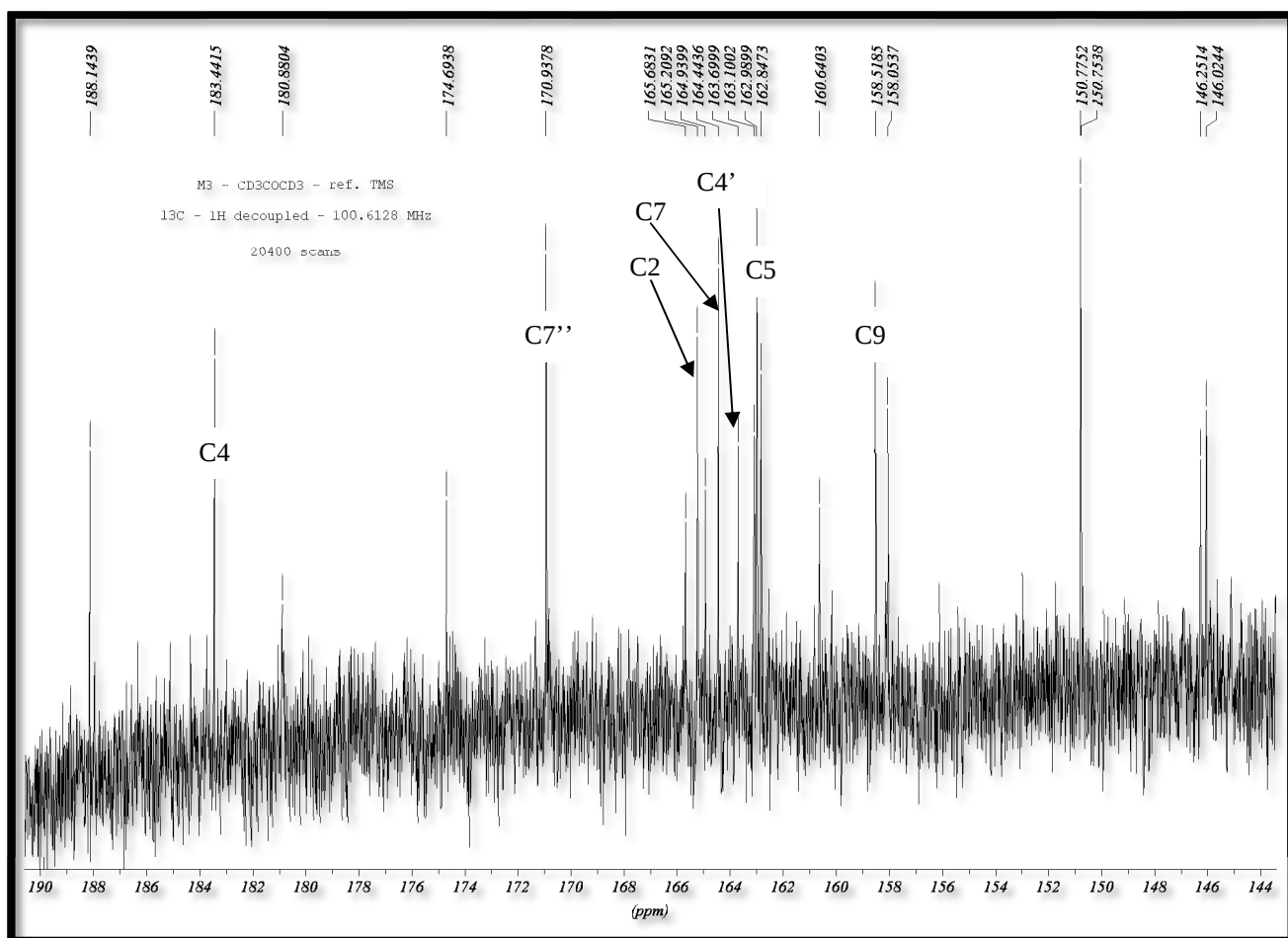


Figure III.50: Spectre RMN¹³C (partie flavone) du composé M-3
L'étude du spectre RMN-1H du composé M3 (Tableau III.8, Figure III.51, 52) a permis de mettre en évidence la présence de:

- D'un flavonoïde et a montré des signaux à δ 6.48 (1H, s) 6.11 (1H, d) et 6.04 (1H, d) typique de C-3, C-8 et C-6 protons d'un squelette flavone,
- Les déplacements chimiques de 8,09 (d, H2', H6') et 7.63 (m, H3', H5') suggère qu'il ya une substitution sur le noyau B du flavonoïde
- Un proton comme singulet à δ = 12.85ppm a été attribué au C-5 hydroxyle,
- Quatre protons entre 3.55 et 4.48ppm ont indiquant la présence d'un fragment de glucose,
- Le signal à 5.16 ppm été affecté au proton anomère avec un constante de couplage (J 8 Hz) indiquant une configuration β . [43],
- Trois protons comme singulet à δ = 2.08 ppm à indiqué la présence d'un groupement CH₃.

Figure III.51: Spectre RMN¹H (partie glucose) du composé M-3

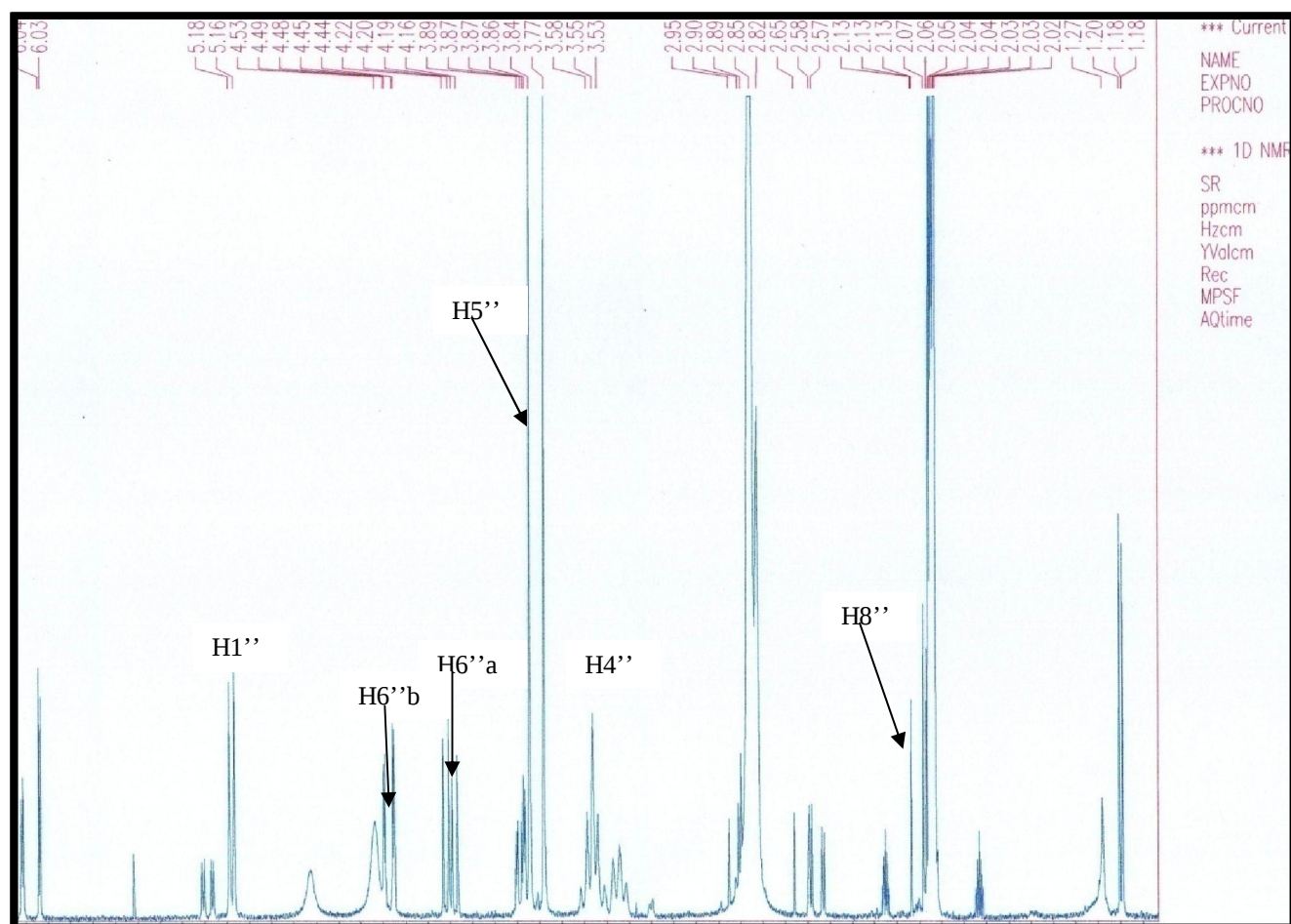


Figure III.52: Spectre RMN¹H (partie flavone) du composé M-3

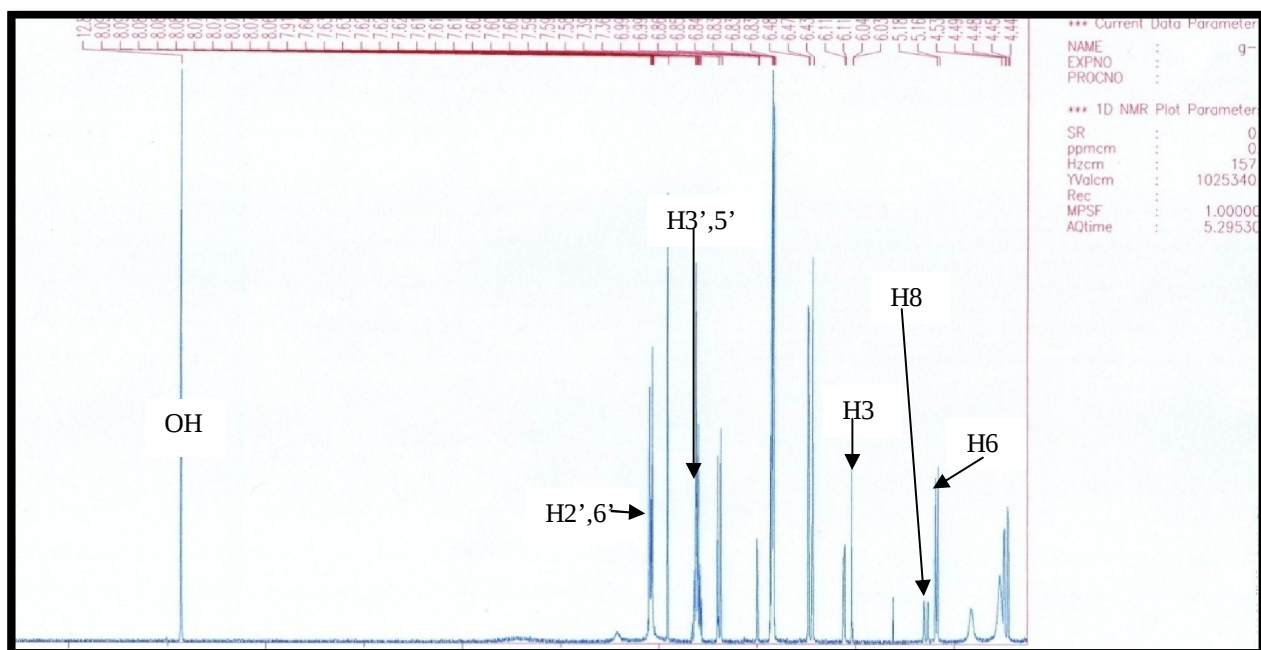


Tableau III.8: Les résultats RMN 1H, 13C et Dept de M3

Position	RMN ¹ H δ ppm	Multiplicité	RMN 13C δ ppm	Dept
C-2	---	---	163.69	C
C-3	6.48	s	106.43	CH
C-4	---	---	183.44	C
C-5	---	---	162.98	C
C-6	6.03	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	95.91	CH
C-7	---	---	164.44	C
C-8	6.11	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	94.00	CH
C-9	---	---	158.51	C
C-10	---	---	107.06	C
C-1'	---	---	119.08	C
C-2'	8.07	<i>d</i> (<i>J</i> = 8Hz)	127.37	CH

C-3'	7.36	<i>d</i> (<i>J</i> = 8Hz)	115.68	CH
C-4'	---	---	163.69	C
C-5'	7.36	<i>d</i> (<i>J</i> = 8Hz)	115.68	CH
C-6'	8.07	<i>d</i> (<i>J</i> = 8 Hz)	127.37	CH
C-1''	5.16	<i>d</i> (<i>J</i> = 8 Hz)	101.32	CH
C-2''	3.55	<i>m</i>	74.53	CH
C-3''	3.58	<i>m</i>	77.80	CH
C-4''	3.53	<i>m</i>	71.20	CH
C-5''	3.89	<i>m</i>	75.26	CH
C-6''	H _a : 4.19 H _b : 4.48	<i>d</i> (<i>J</i> = 4Hz) <i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	64.31	CH ₂
C-7''	---	---	170.65	C
C-8''	2.08	<i>s</i>	20.77	CH ₃

Par ailleurs, le spectre COSY ^1H - ^1H (figure III.53) montre l'existence des corrélations suivantes :

- Les deux protons H-3', H-5' ($\delta = 7.63$ ppm) et les protons H-2', H-6' ($\delta = 8.09$ ppm),
- Le proton anomère H-1'' ($\delta = 5.16$ ppm) et les protons H-2'' (3.55 ppm),
- Le proton H-6''a (4.19 ppm) et le proton H-6''b (4.48 ppm),
- Le proton H-5'' à (3.89 ppm) et les deux protons H-6''a et H-6''b.

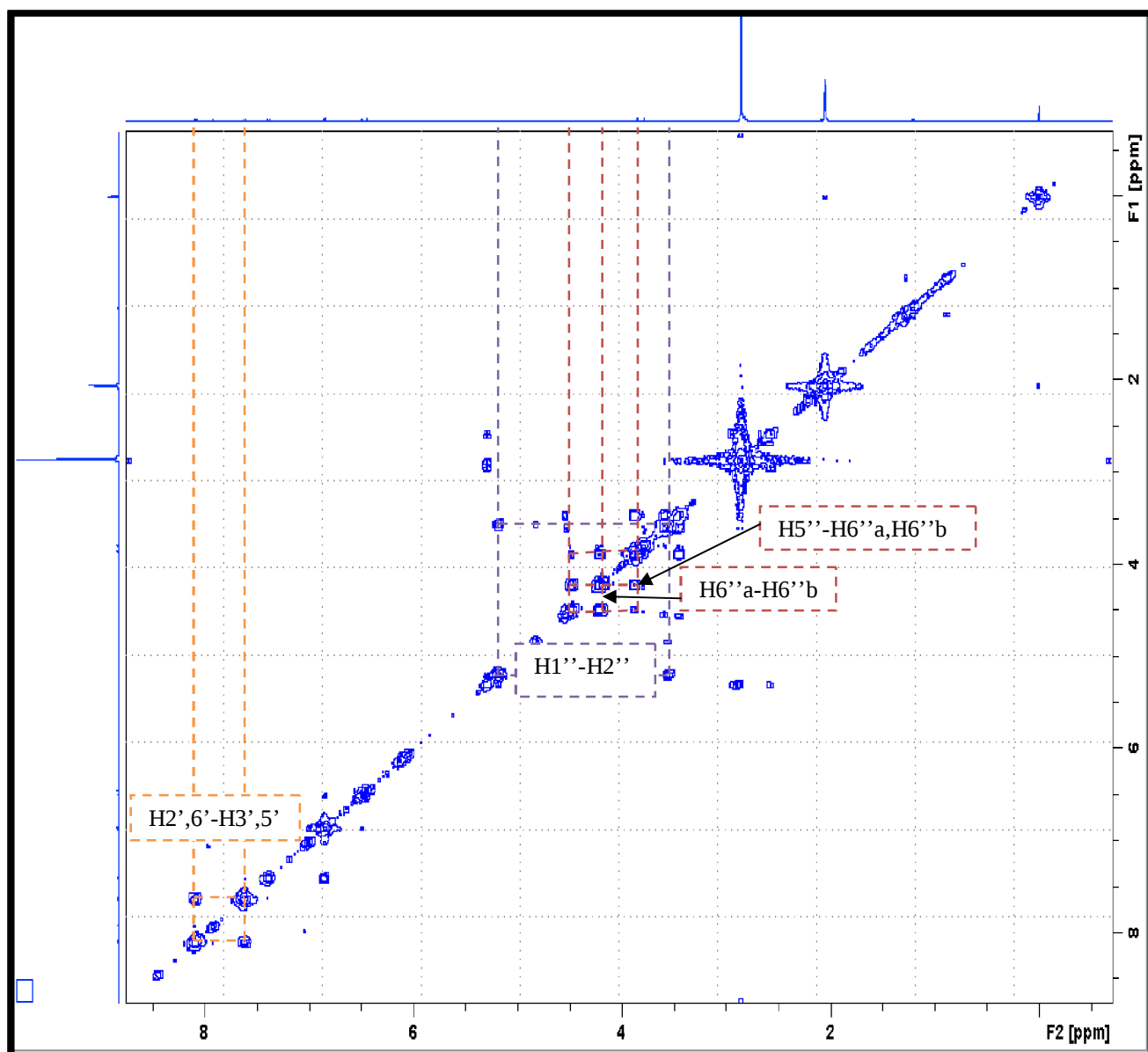


Figure III.53: spectre COSY du compose M-3

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire HSQC (Figure III.54, 55) a conduit à l'établissement des connections géminales RMN- ^1H - ^{13}C du composé M3 a ainsi pu être démontré que les protons méthyléniques localisés à $\delta = 4.19$ ppm et $\delta = 4.48$ ppm ont liés au carbone $\delta = 64.31$ ppm. Le spectre a montré également une corrélation entre le proton à $\delta = 5.16$ ppm et le carbone $\delta = 101.32$ ppm permettant le positionnement de ce carbone en C1". Il a ainsi pu être démontré que les protons H2", H3", H4" et H5" ont liés respectivement aux carbones C2" (74.53ppm), C3" (77.80ppm), C4" (71.20ppm) et C5" (75.26ppm).

Le spectre a montré respectivement des corrélations entre les protons H3, H6 et H8 et les carbones C3 (100.71ppm), C6 (95.91ppm) et C8 (94.00ppm).

Le spectre a montré les couplages directs entre:

- Les protons H-2', H-6' et leur carbones C-2' (127.37ppm), C-6' (127.37ppm).
- Les protons H-3', H-5' et leur carbones C-3' C-5' localisés à $\delta = 130.08$ ppm.

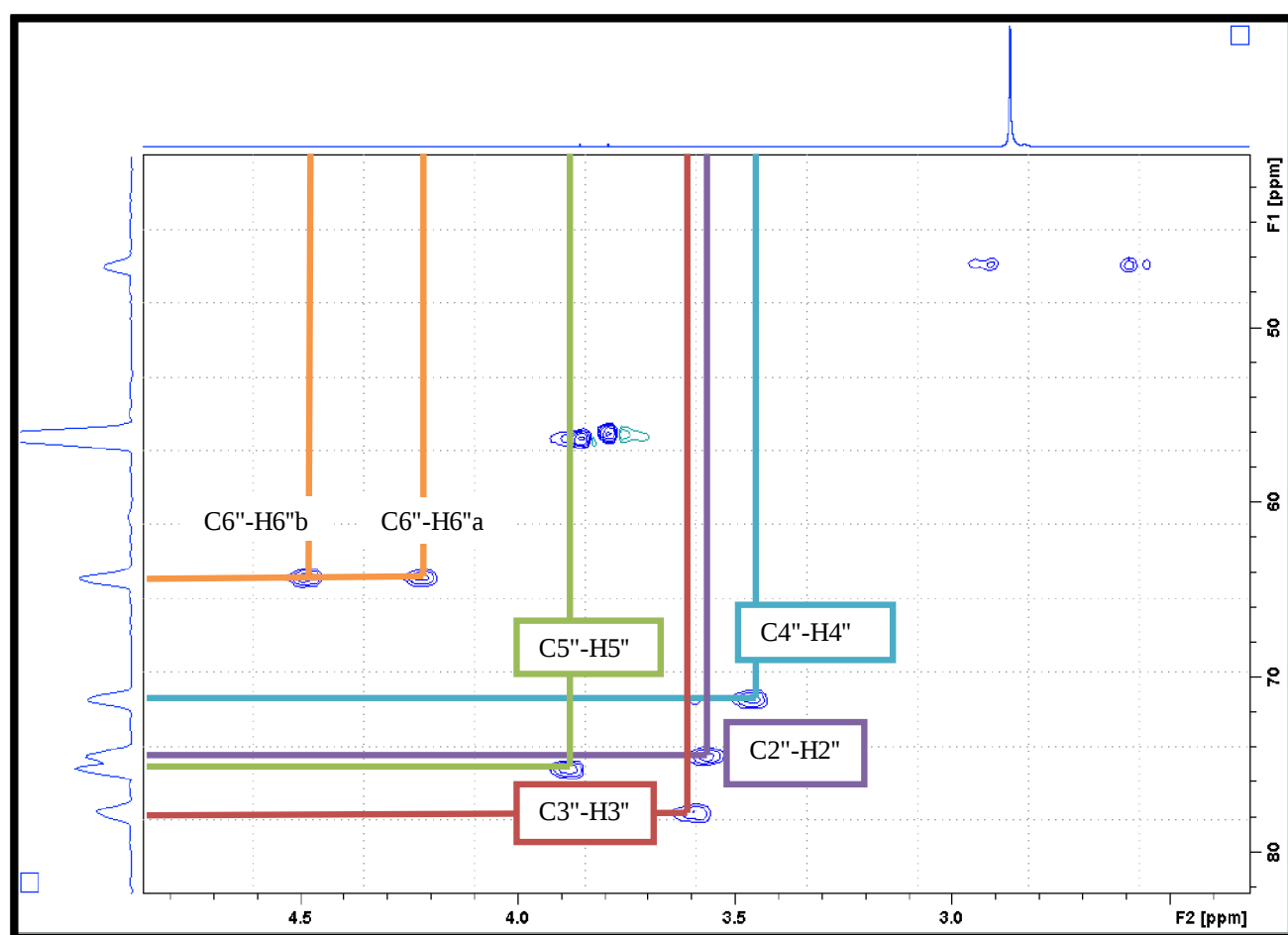


Figure III.54: spectre HSQC (partie glucose) du composé M-3

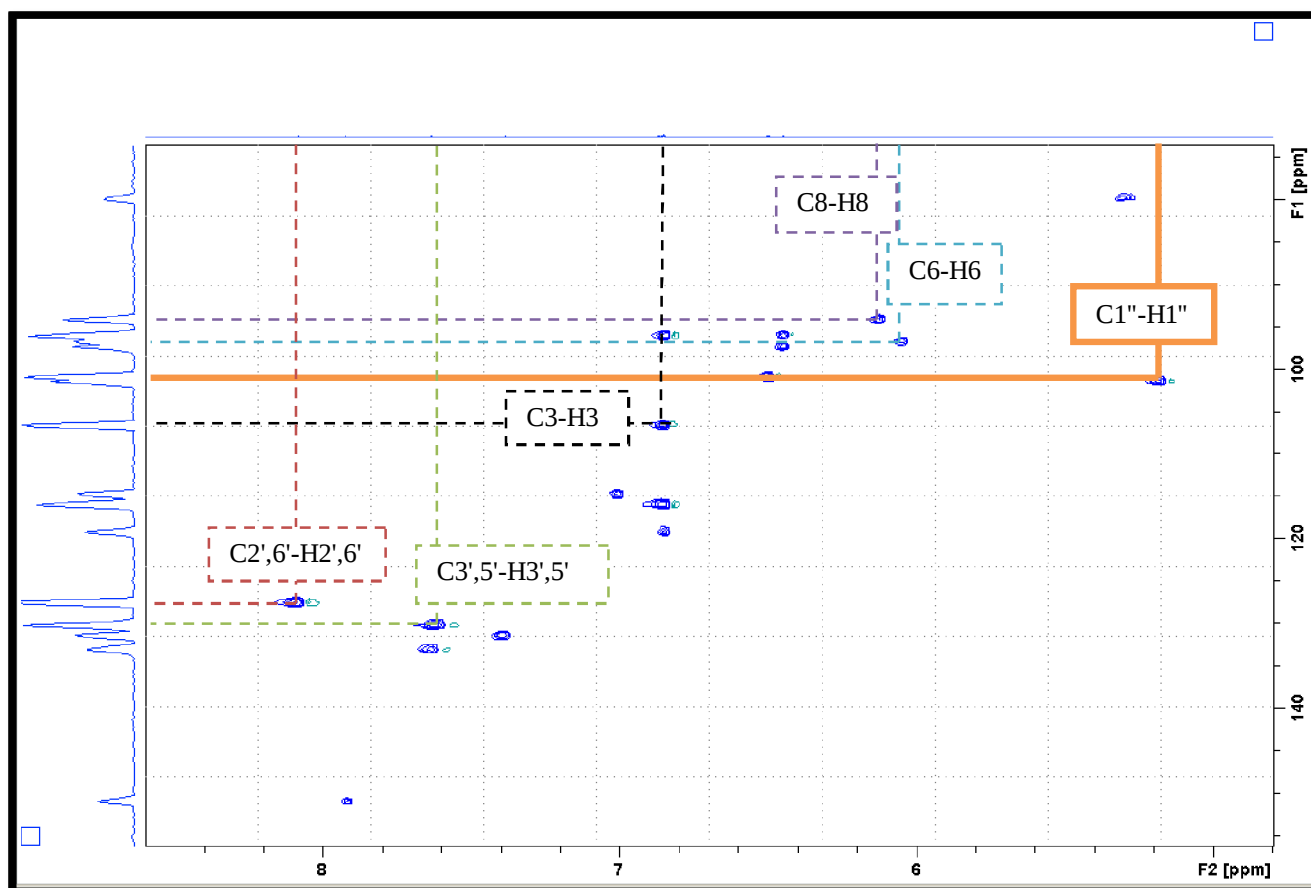


Figure III.55: spectre HSQC (partie flavone) du composé M-3

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire observées à longue distance HMBC (Figure III.56,57) a montré la corrélation entre le proton à $\delta = 5.16\text{ppm}$ (H1''), et le carbone situé à $\delta = 164.44\text{ppm}$ (C7) confirmé que le glucose est lié au carbone C7 , la corrélation entre les protons à $\delta = 2.08\text{ppm}$ et le carbone situé à $\delta = 170.93\text{ppm}$ confirmé la présence d'un ester, ce dernier est corrélé avec le proton à $\delta = 4.19\text{ppm}$ (H6''a) confirmé que le groupement ester est lié au carbone C6'' du glucose. Les corrélations entre le proton à $\delta = 7.36\text{ppm}$ et les deux carbones C2' et C6' (127.37ppm), ainsi que les corrélations entre les protons à $\delta = 8.07\text{ppm}$ (H2' , H6') et le carbone $\delta = 165.20\text{ppm}$ (C2).

Le carbone quaternaire oxygéné C4' à 163.69 ppm présente sur le spectre HMBC (Figure III.51) une grande tache de corrélation (3J) avec les protons à 3.84ppm dont le carbone à 56.37 (OMe) selon le spectre HSQC.

La valeur $J=0.8$ de constante de couplage permet de placer le méthoxy en C4' correspondant à une *para*-substitution.

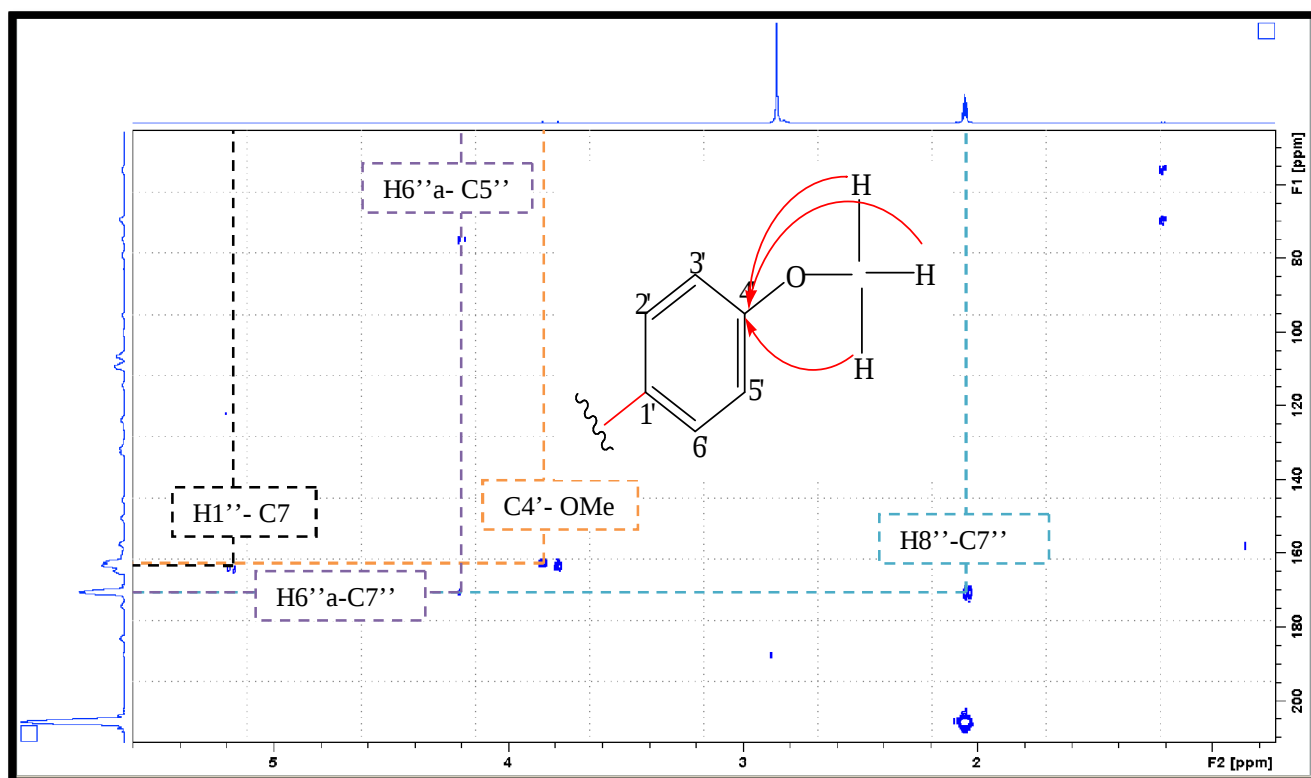


Figure III.56: spectre HMBC (partie glucose) du composé M-3

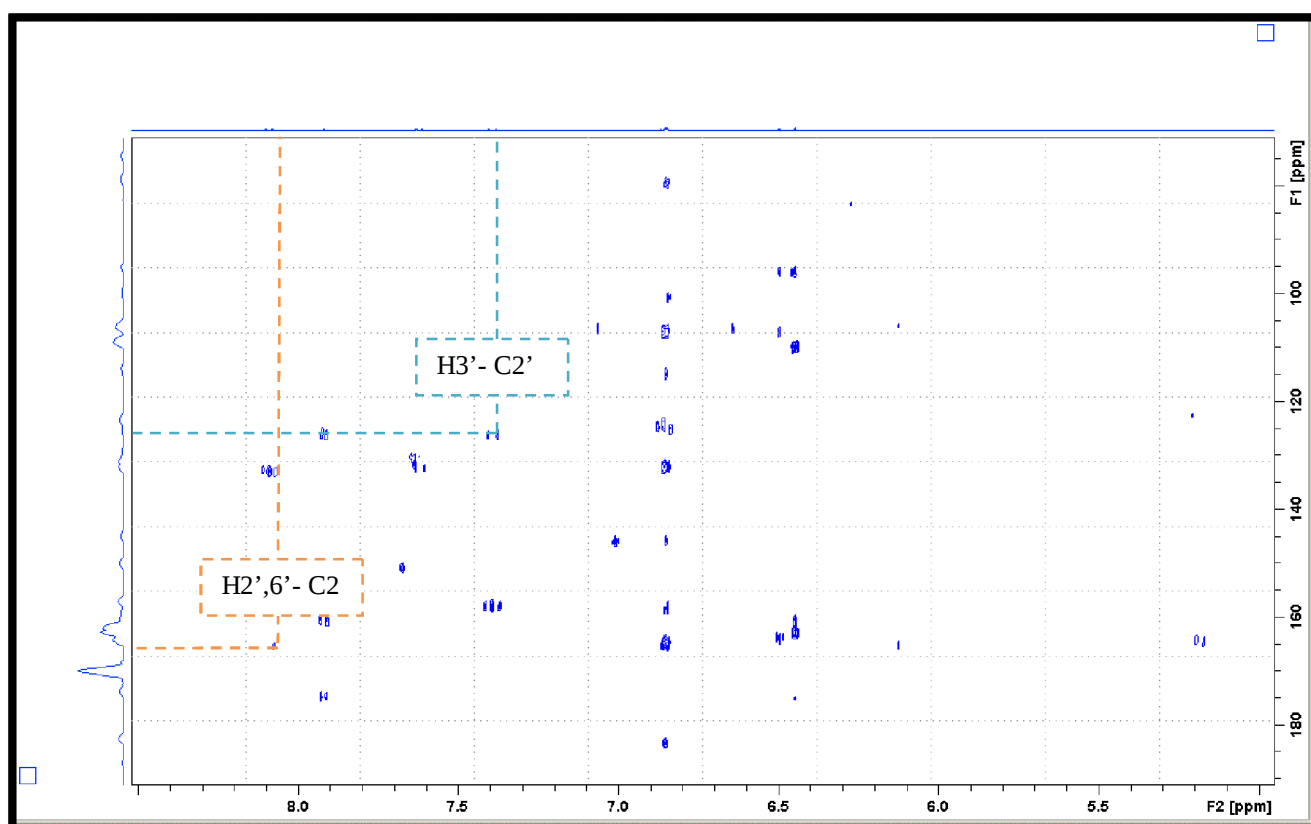


Figure III.57: spectre HMBC (partie flavone) du composé M-3

L'ensemble de ces observations conduit à la structure du 7-O- β -D[(6''acetyl)glucopyranosyl]acacetin confirmée par ailleurs par les comparaisons avec les données de la littérature pour ce composé. [45-46,47] (figure III.46).

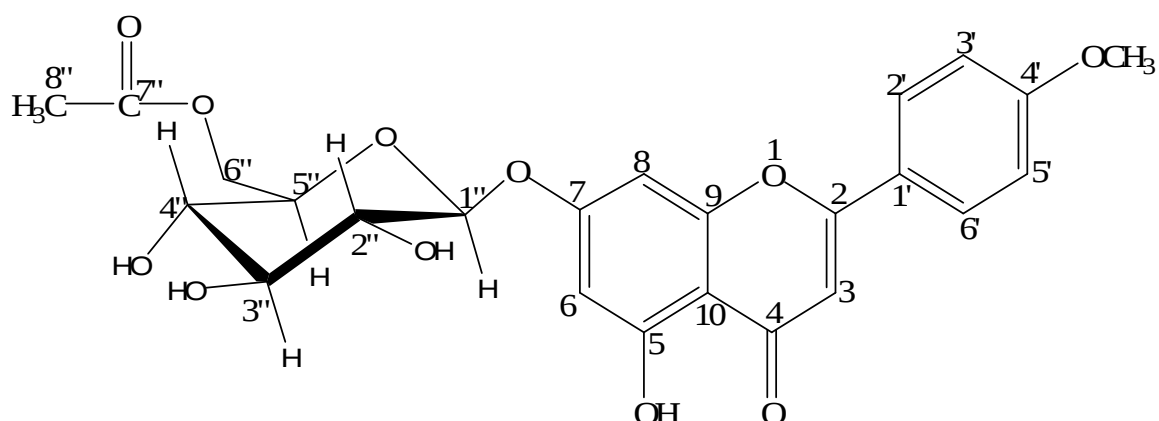


Figure III.46 : 7-O- β -D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]acacetin

III.3.4 Identification du produit M4:

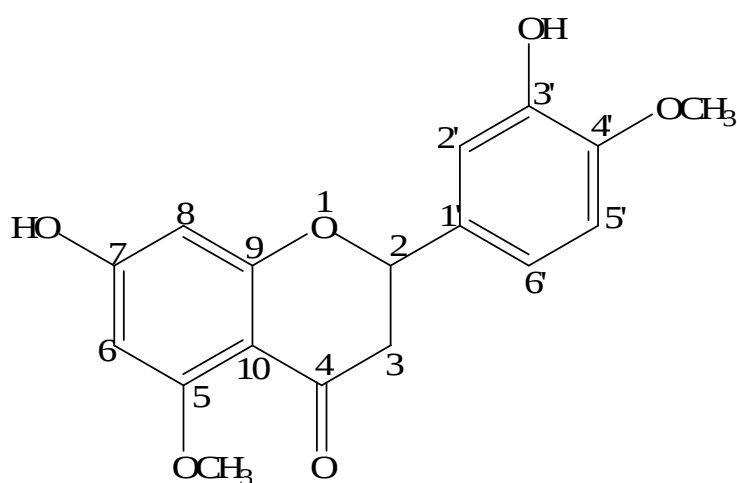


Figure III.58 : 7-3'-dihydroxy-5,4'-diméthoxyflavanone

La détermination de la structure du composé isolé M4, en se basant sur les spectres RMN-¹H, RMN-¹³C et Dept, indiquent la présence de 17 atomes de carbones dont (Voir le tableau III.9):

- Huit signaux carbones quaternaires dont quatre oxygénés et un groupement carbonyle ppm et $\delta = 188.09$ ppm,
- Six signaux CH aromatique,
- Le Dept indique la présence d'un CH₂ et deux OMe (figure III.59).

L'analyse du spectre RMN-¹³C (figure III.60) montre :

- Six signaux CH à δ_C 96.70 (C-8), 94.11 (C-6), 115.71 (C-5') et 120.37 (C-6') caractéristiques d'un squelette flavone,
- Un signal à $\delta = 188.09$ ppm (C-4), caractéristique d'un carbone carbonylé,
- Un autre signal à $\delta = 46.50$ ppm (C-3), caractéristique d'un squelette flavanone,
- Quatre signaux à δ_C 163.75 (C-5), 165.72 (C-7), 147.81 (C-3') et 148.45 (C-4') caractéristiques des carbones oxygénés.

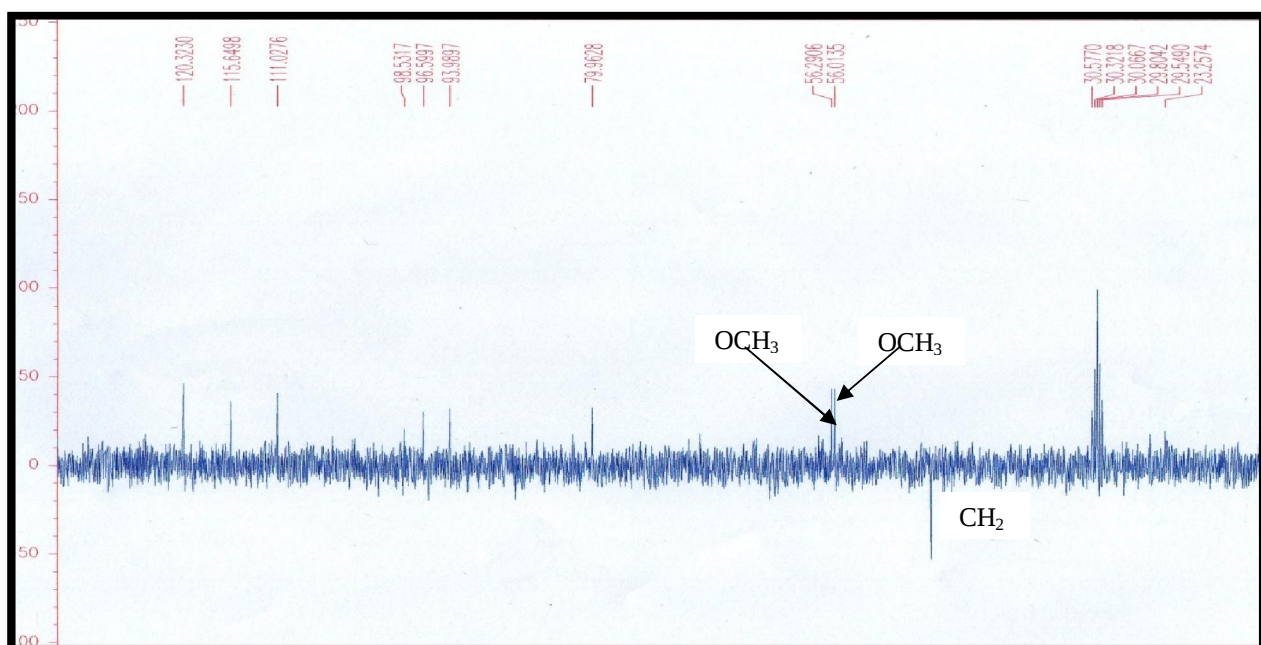


Figure III.59: Spectre RMN¹³C J-modulé du composé M-4

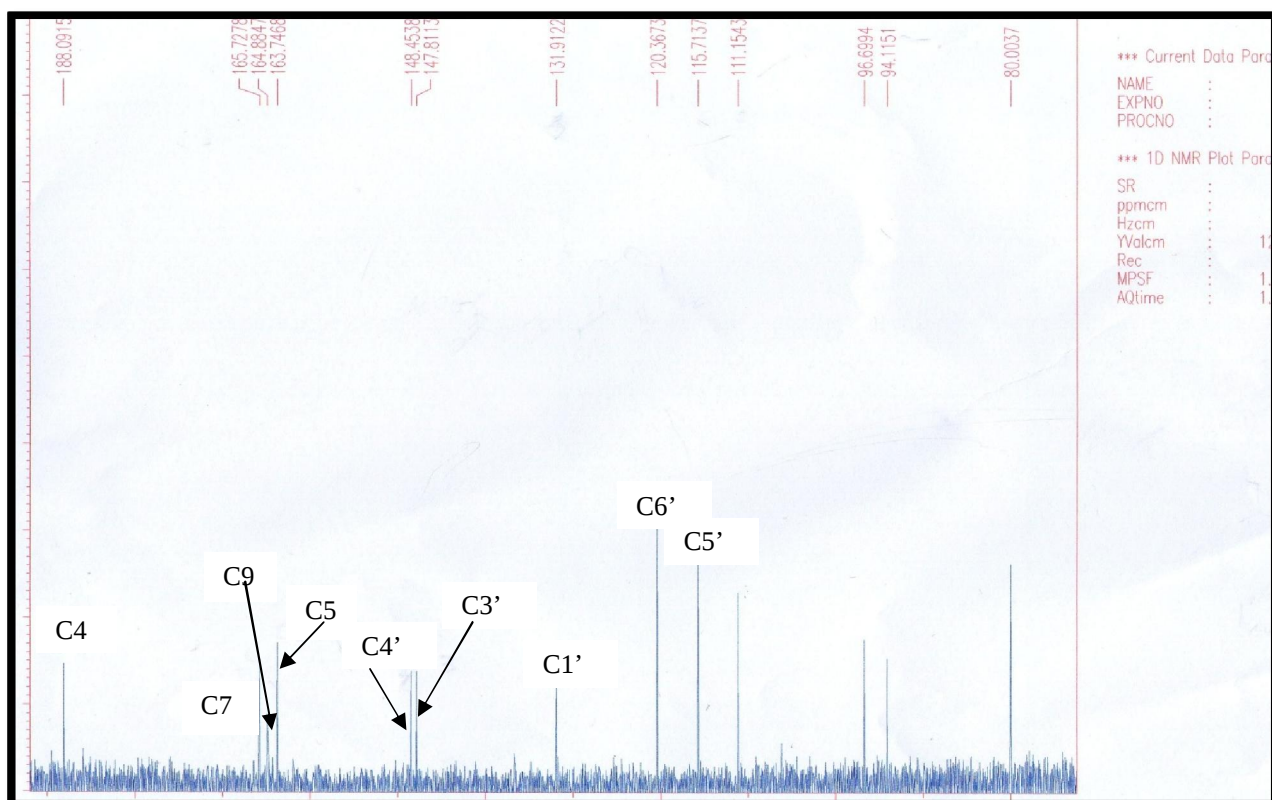
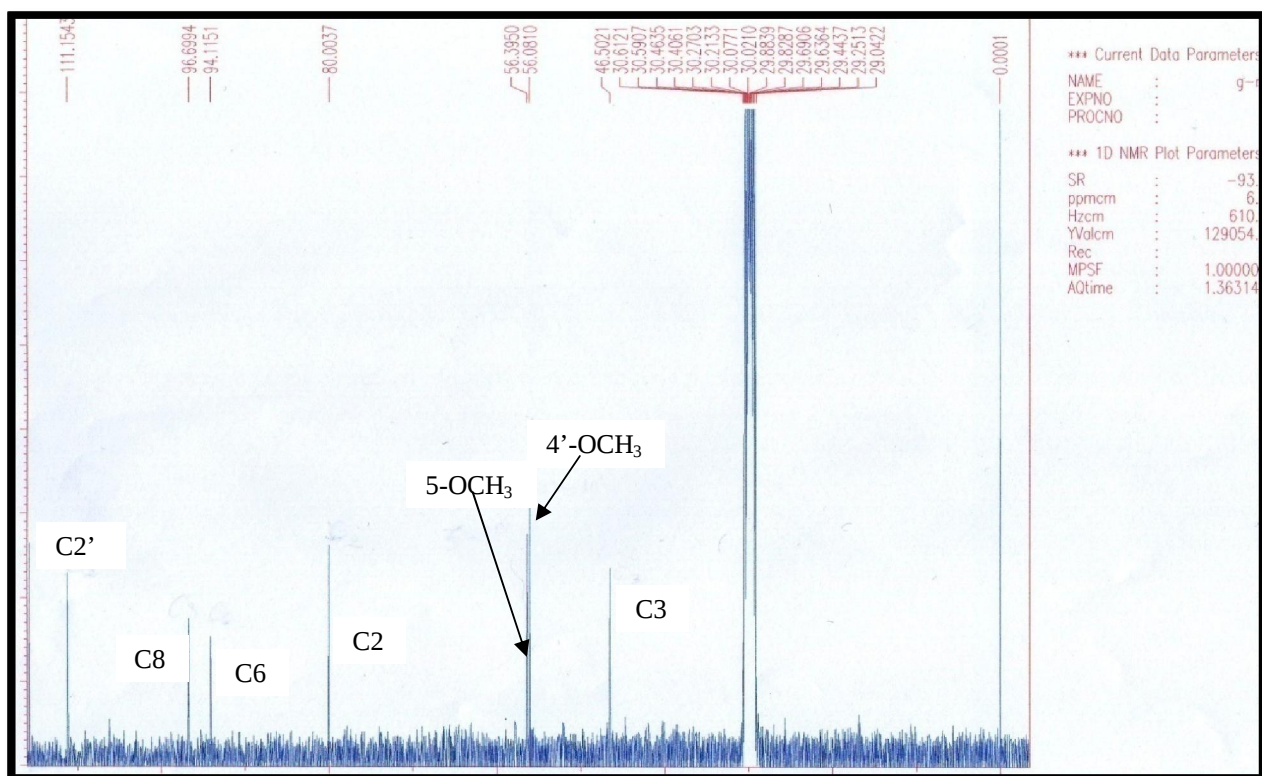


Figure III.60: Spectres RMN¹³C du composé M-4

L'étude du spectre RMN-1H du composé **M4** (Tableau III.9, Figure III.61, 62) a permis de mettre en évidence la présence de:

- D'un flavonoïde et a montré des signaux à δ 2.58 et 2.99 (2H, dd), 6.06 (1H,d) et 6.14 (1H, d) typique de C-3, C-8 et C-6 protons d'un squelette flavanone,
- Six protons comme singulet à δ 3.80 et 3.88 ppm ont indiquant la présence de deux groupements OCH_3 .
- Les déplacements chimiques de 6.98 (ddd, H6'), 6.86 (d, H5') et 7.16 (d,H2') suggère qu'il y a des substitution sur le noyau B du flavonoïde.

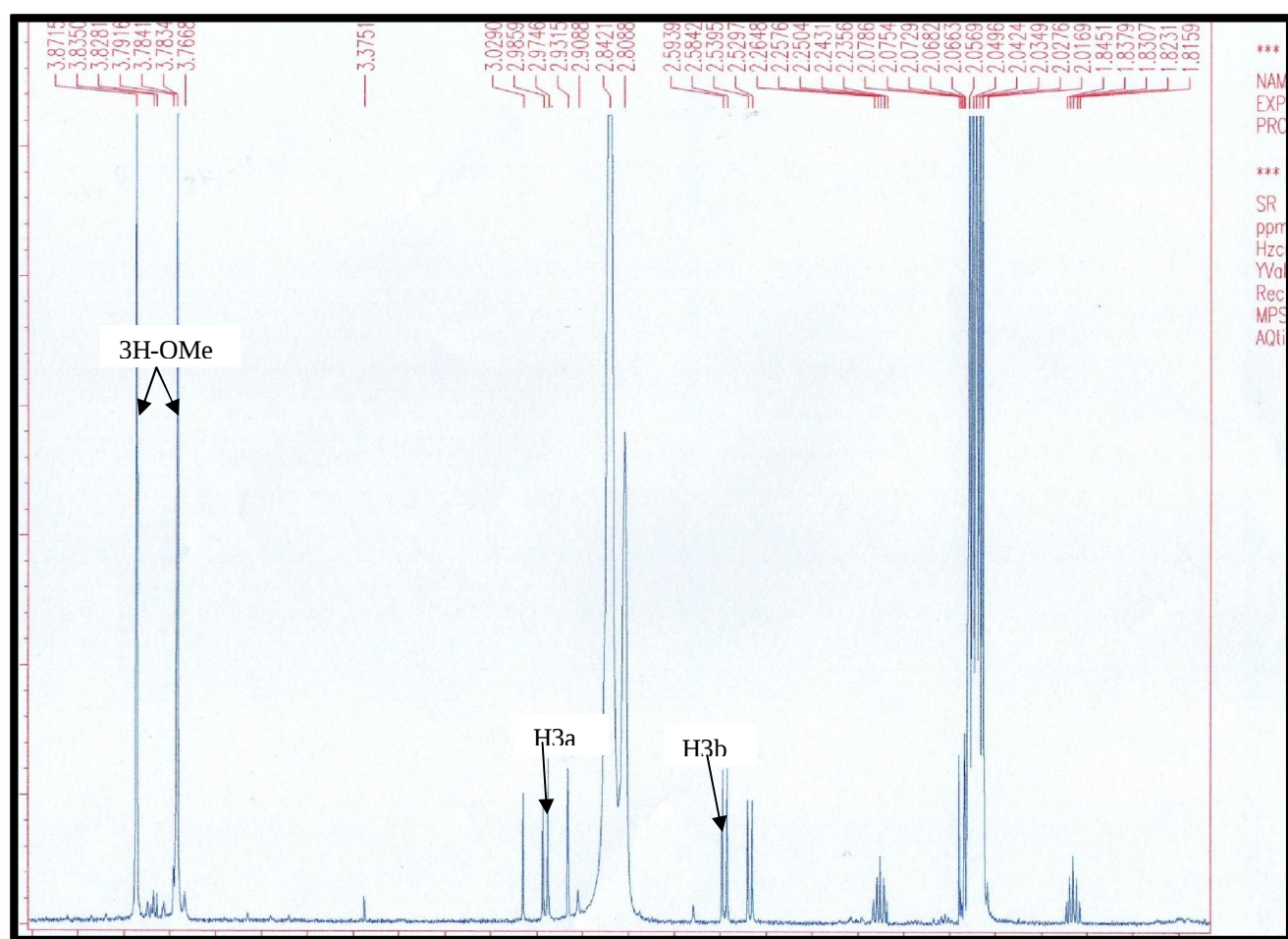


Figure III.61: Spectres RMN¹H du composé M-4

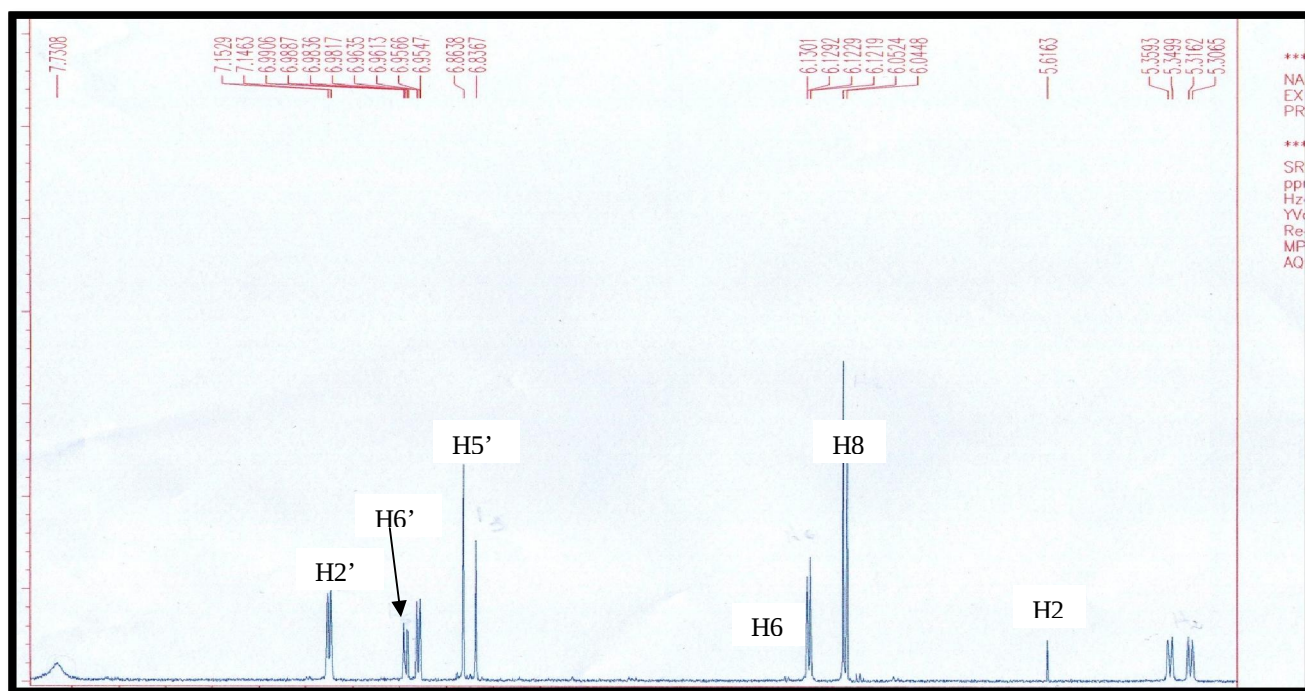


Figure III.62: Spectres RMN¹H du composé M-4

Tableau III.9: Les résultats RMN 1H, 13C et Dept de M4

Position	RMN ¹ H δ ppm	Multiplicité	RMN 13C δ ppm	Dept
C-2	5.34	<i>dd</i> (<i>J</i> =13.0, 2.9Hz)	80.00	CH
C-3	H _a : 2.99	<i>dd</i> (<i>J</i> = 16.3, 13 Hz)	46.50	CH ₂
	H _b : 2.58	<i>dd</i> (<i>J</i> = 16.3, 2.9 Hz)		
C-4	---	---	188.09	C
C-5	---	---	163.75	C
C-6	6.14	<i>d</i> (<i>J</i> = 2.2 Hz)	94.11	CH
C-7	---	---	165.72	C
C-8	6.06	<i>d</i> (<i>J</i> = 4 Hz)	96.70	CH
C-9	---	---	164.89	C
C-1'	---	---	131.91	C

C-2'	7.16	<i>d</i> (<i>J</i> =2 Hz)	111.15	CH
C-3'	---	---	147.81	C
C-4'	---	---	148.45	C
C-5'	6.86	<i>d</i> (<i>J</i> = 8.1 Hz)	115.71	CH
C-6'	6.98	<i>ddd</i> (<i>J</i> =8.1,2,0.5 Hz)	120.37	CH
5-OMe	3.88	<i>s</i>	56.39	CH ₃
4'-OMe	3.80	<i>s</i>	56.08	CH ₃

Par ailleurs, le spectre COSY ¹H-¹H (figure III.63) montre l'existence des corrélations suivantes :

- Le proton H-3a (δ = 2.99 ppm) et le proton H-3b (δ = 2.58 ppm),
- Le proton H-3a (δ = 2.99 ppm) et le proton H-2 (δ = 5.34 ppm),
- Le proton H-6 (δ = 6.14 ppm) et le proton H-8 (δ = 6.06 ppm),
- Le proton H-5' (δ = 6.86 ppm) et le proton H-6' (δ = 6.98 ppm),

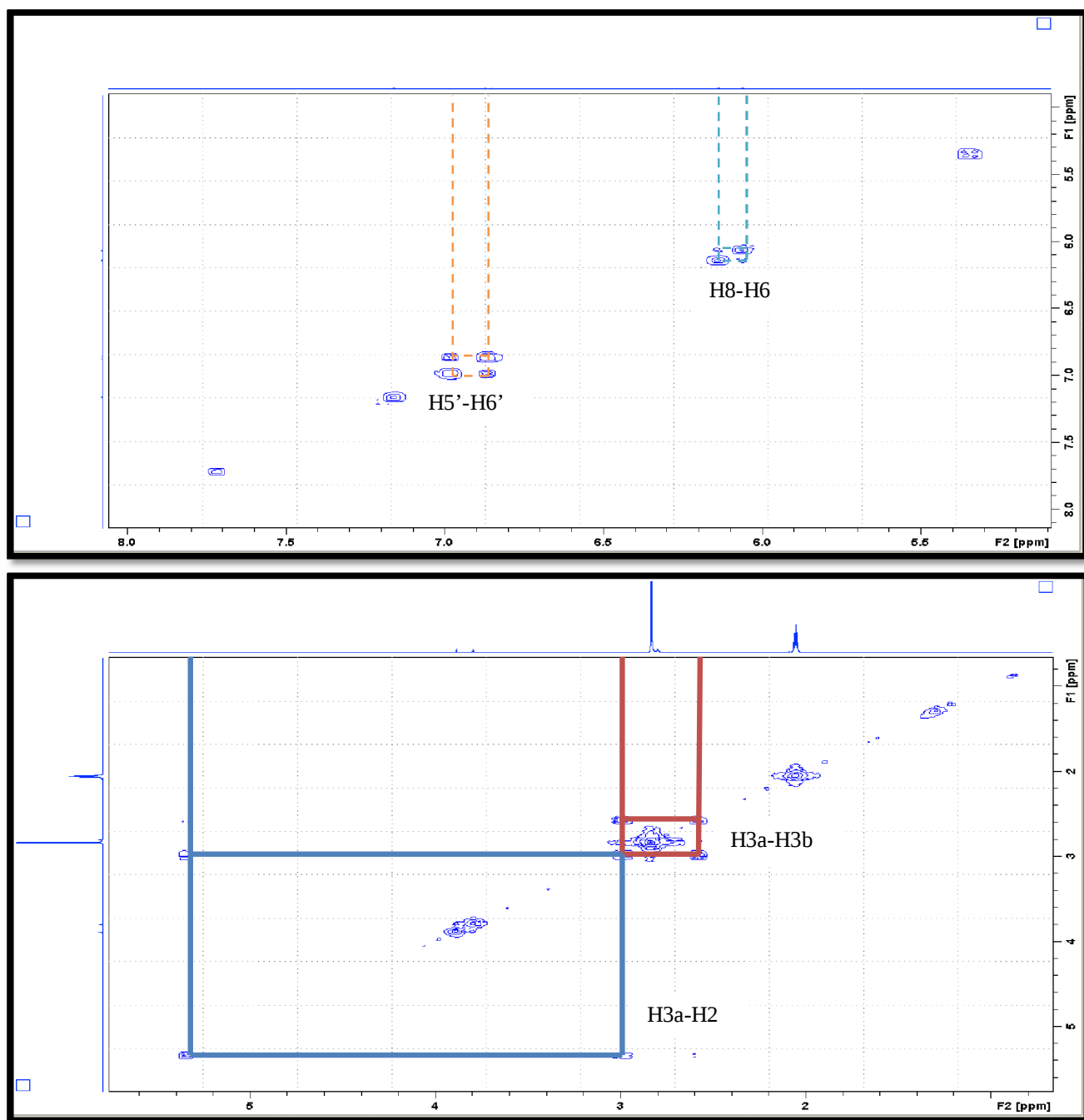


Figure III.63: spectres COSY du compose M-4

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire HSQC (Figure III.64, 65) a conduit à l'établissement des connections géminales RMN- ^1H - ^{13}C du composé M4 a ainsi pu être démontré que les protons méthyléniques localisés à $\delta = 2.58$ ppm et $\delta = 2.99$ ppm est liés au carbone $\delta = 46.50$ ppm. Le spectre a montré également une corrélation entre le proton à $\delta = 5.34$ ppm et le carbone $\delta = 80$ ppm. Il a ainsi pu

êtredémontré que les protons H2', H5', et H6'ont liésrespectivement aux carbones C2' (111.15ppm), C5' (115.71ppm), et C6' (120.37ppm).

Le spectre a montré respectivement des corrélations entre les protons, H6 et H8 et les carbones C6 (94.11ppm) et C8 (96.70ppm).

Le spectre a montre les couplages directes entre:

Les trios protons à $\delta = 3.80\text{ppm}$ étaient attachés au carbone situé à $\delta = 56.08\text{ ppm}$. Les

trios protons à $\delta = 3.88\text{ppm}$ étaient attachés au carbone situé à $\delta = 56.39\text{ ppm}$.

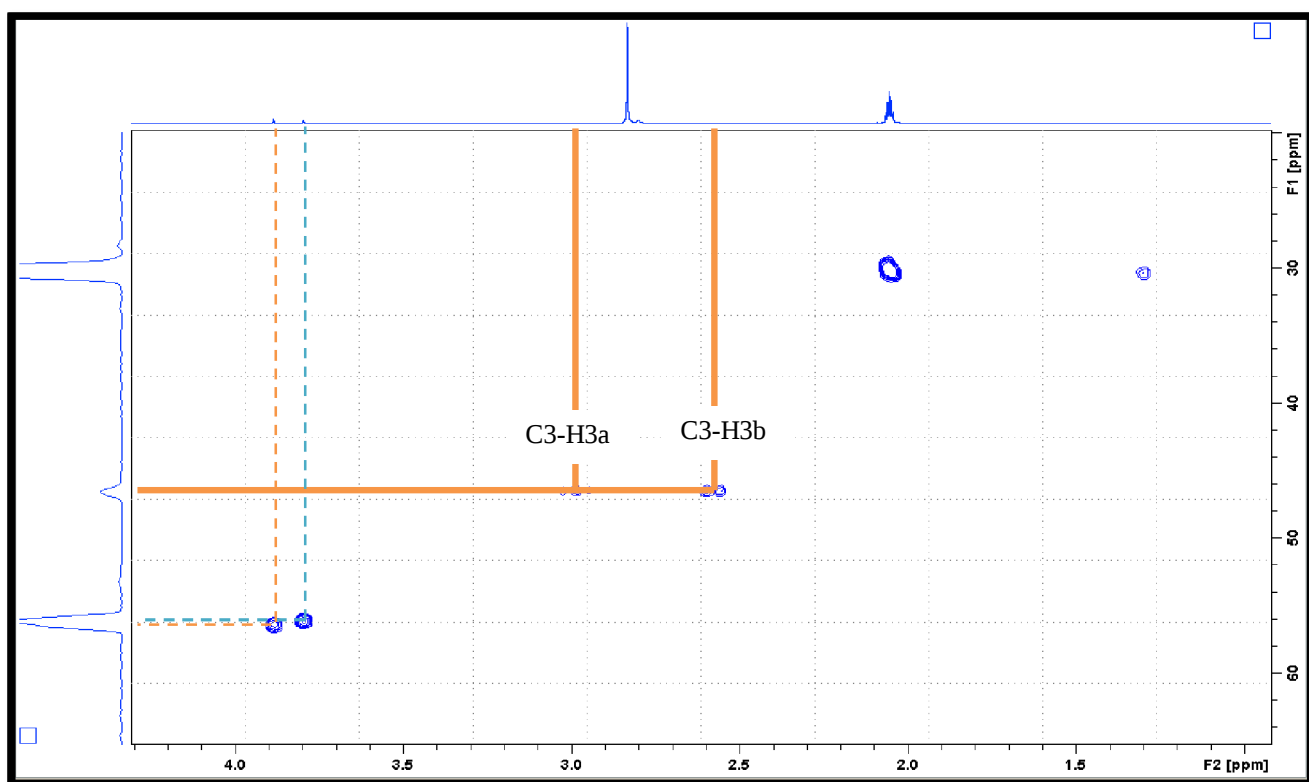


Figure III.64: spectre HSQC du composé M-4

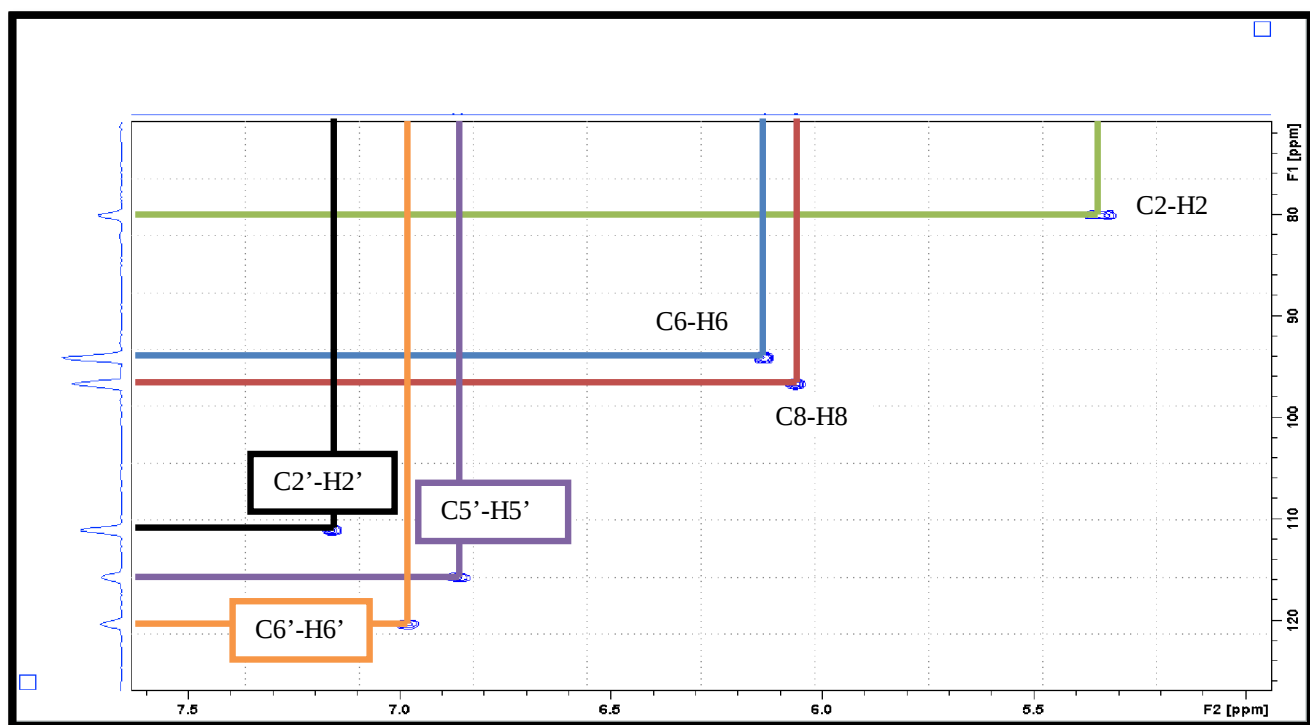


Figure III.65: spectre HSQC du composé M-4

L'étude de spectre de corrélation hétéro nucléaire observées à longue distance HMBC (Figure III.66) a montré la corrélation entre le proton à $\delta = 2.99\text{ppm}$ (H3a), et le carbone situé à $\delta = 131.91\text{ppm}$ (C1'), la corrélation entre les protons à $\delta = 3.80\text{ppm}$ et 3.88ppm et les carbones situés à $\delta = 163.75\text{ppm}$ et 148.45ppm confirmé que les deux méthoxy liées aux carbones C5 et C4', ainsi que les corrélations entre le proton à $\delta = 6.86\text{ppm}$ (H5') et les carbones $\delta = 131.91\text{ppm}$ (C1'), $\delta = 148.45\text{ppm}$ (C4'). (Voir tableau III.10)

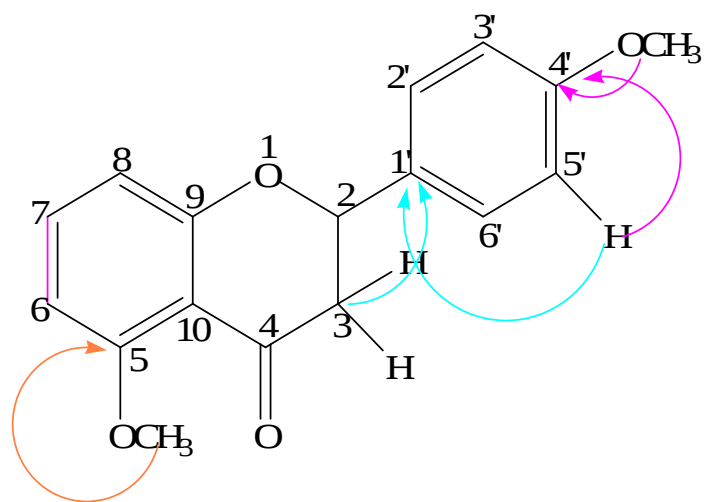
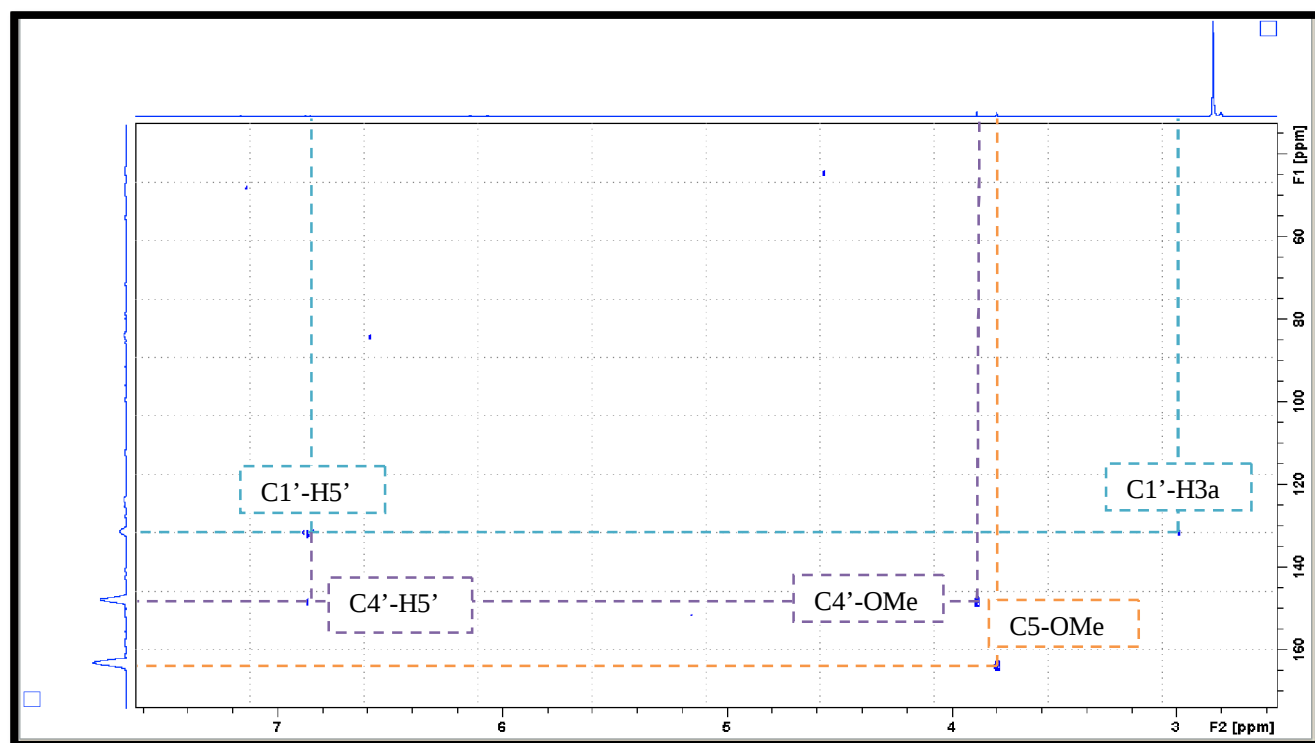


Figure III.66: spectre HMBC du composé M4

Tableau III.10: Corrélation HMBC et COSY (400MHz, Acétone-d6)de M4

Proton	HMBC	COSY
H-3a	C-1'	H-3a, H-3b
H3b	---	H-3a, H-3b
H-2	---	H-2, H-3a
H-6	---	H-6, H-8
H-8	---	H-6, H-8
H-5'	C1', C4'	H-5', H-6'
H-6'	---	H-5', H-6'

Sur la base de ces résultats, nous attribuons donc à ce composé la structure de la figure III.58 qui celle du 7-5'-dihydroxy-5,4'-diméthoxyflavanone. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature [48, 49, 50]

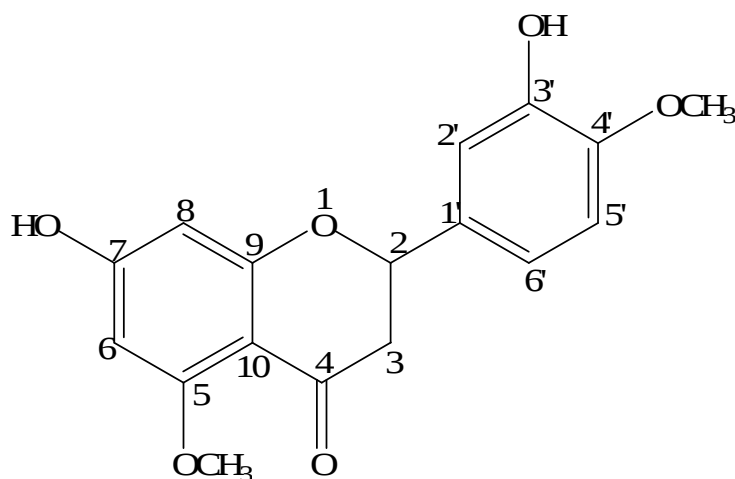


Figure III.58 : 7-3'-dihydroxy-5,4'-diméthoxyflavanone

Chapitre III

Résultats et discussion

IV.1 Introduction

L'analyse de la composition des extraits bruts, des différentes fractions et sous-fractions a été réalisée par les techniques chromatographiques usuelles (CCM, CC). De la même façon, l'identification structurale des composés isolés s'appuie pour l'essentiel sur les techniques spectroscopiques suivantes: IR, RMN, SM.

IV.2 Matériel Végétal

La plante *Calycotome spinosaa* été récoltée durant le mois de mai 2007. la plante a été suspendue pour séchage pendant plusieurs jours à l'extérieur, mais à l'abri de la lumière directe du soleil. La plante a été identifié par le professeur Bachir Oudjehih de l'institut d'Agronomie et vétérinaires de Batna.

IV.3 Méthodes Physico-chimiques

IV.3.1 Spectres de Masse (MS)

Les spectres de masse des produits isolés ont été enregistrés sur un spectromètre de masse (waters Q-TOF2), du centre de recherche école nationale supérieure de chimie de RENNES Avenue du général Leclerc Campus de Beaulieu France.

IV.3.2 Spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés à 400 MHz (1H) et 100 MHz (13C) avec des spectromètres : Avance 400 du modèle Bruker AMX-400.

Le spectre DEPT, ainsi que les expériences bidimensionnelles COSY,HSQC, HMBC et HMQC, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionnelles spécifiques fournies par Bruker. Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés DMSO-D6 ou Acétone-D6. Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.

IVI.3.4 Chromatographies

IV.3.4.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur) avec gel de silice 60 F254 indicateur de fluorescence sur aluminium (Merck) ou sur verre. Après élution dans le solvant donné, et selon les cas, les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm et/ou 366 nm) puis par révélation à l'aide de la vanilline sulfurique. Les plaques sont ensuite chauffées jusqu'à apparition de tâches de diverses couleurs sur la plaque CCM.

IV.3.4.2 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE (CC)

Des colonnes ouvertes sur gel de silice (60-230mesh) ont été utilisées dans la première ou seconde étape de fractionnement de l'extrait chloroformique et n-butanolique. La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM.

IV.4 Méthodes de fractionnement et de Purification

Après avoir séché la plante à l'air libre, la partie aérienne est extraite pour leur faire subir initialement la phase de macération et lixiviation dans laquelle nous procédons à la préparation des extraits bruts de plante. Ensuite, dans un deuxième temps, les extraits bruts sont fractionnés par des méthodes chromatographiques puis éventuellement purifiés.

IV.4.1 Extrait chloroformique

L'extrait chloroformique (10g), a été préfractionné sur colonne de silice (CHCl_3 100% à 100% MeOH). Après analyse sur CCM, 12 fractions ont été obtenues.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.9 : Fractionnement de l'extrait chloroformique de
*C.spinosa***

Fractions	Eluant de colonne	Observation sur CCM
1	Chloroforme	Néant
2	//	//
	Chloroforme/Méthanol	
3	99/1	//
4	//	//
5	97/3	//
6	//	//
7	95/5	//
8	//	//
9	90/10	Une tache
10	//	//
11	80/20	2 taches
12	//	//
13	70/30	//
14	//	//
15	60/40	//
16	//	Une tache
17	//	//

18	//	//
19	50/50	//
20	//	//
21	//	//
22	30/70	//
23	//	Trainée
24	//	//
25	//	//
26	90/10	//
27	//	//
28	Méthanol	//

Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 12 fractions notées A-1 à A-12 selon le tableau suivant :

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
-----------	----------------------	-------------	---------------------

A-1	1-2	337.2	Néant
A-2	3-6	1000	Plusieurs taches
A-3	7-8	2500	//
A-4	9-10	2000	//
A-5	11-12	1023	//
A-6	13-14	541.1	//
A-7	15	299.3	//
A-8	16	462	//
A-9	17-22	200	//
A-10	23-26	332.5	//
A-11	27	261	//
A-12	2	538	3 taches

Tableau IV.10 : Rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique

IV.4.1.1. Purification

➤ Etude de (A-3+A-4)

Une séparation par colonne normale de gel de silice a été réalisée sur le mélange des deux fractions A-3 et A-4 (4500mg) (EP 100% à AcOEt 100%), puis par méthanol 100%.

17 sous-fractions (A'1 à A'17) ont été obtenues selon le tableau suivant :

Sous-fractions	Eluant (colonne)	Poids mg	Observation sur CCM
A'1	Ether de pétrole		Néant
A'2	//		//
	EP/AcOEt		
A'3	97/3		//
A'4	95/5		//
A'5	90/10		Une tache
A'6	//		Plusieurs taches
A'7	80/20		Une tache
A'8	70/30		Néant
A'9	65/35		Plusieurs taches
A'10	//		//
A'11	55/45		//
A'12	30/70		//
A'13	//		//
A'14	Acétate d'éthyle		//
A'15	//		//
A'16	Méthanol		//
A'17	//		Plusieurs taches + trainée

Tableau IV.11 : fractionnement de (A-3 +A-4)

Les quatre fractions (A'13, A'14, A'15 et A'16) montrant les mêmes taches au vu de l'analyse CCM et de masse égale à 650mg, ont été rassemblées puis soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution réalisée par un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol de différents gradients, a permis d'obtenir 9 fractions (Tableau IV.12).

Fractions	Eluant	Poids (mg)	Observation sur CCM
B-1	Dichlorométhane		Néant
B-2	//		//
B-3	//		//
	Dichlorométhane/méthanol		
B-4	99.5/0.5		//
B-5	//		2 taches
B-6	//		4 taches
B-7	99/1		3 taches
B-8	98/2		//
B-9	Méthanol		3 taches + trainée

Tableau IV.12 : fractionnement de (A'13, A'14, A'15 et A'16)

Une précipitation dans le mélange Ether de pétrole/ Acétate d'Ethyle (50/50) de la fraction B8 a permis d'obtenir le composé **M2** à l'état pur (6,3 mg). La CCM de ce

dernier montre la présence d'une tache visible à 254nm se révélant en couleur jaune à l'acide sulfurique et après chauffage.

La fraction B5 soumise à une purification sur plaques préparatives de gel de silice normale dans le système d'élution (CH₂Cl₂/MeOH: 93/7) a abouti à l'isolement de produit **M3** de masse 5 mg. L'examen CCM montre la présence d'une tache visible à 254nm se révélant en couleur jaune à la vanilline sulfurique et après chauffage.

Une précipitation dans le mélange Ether de pétrole/ Acétate d'Ethyle (50/50) de la fraction B6 a permis d'obtenir le composé **M4** à l'état pur (5,4 mg). La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache visible à 254nm se révélant en couleur jaune à la vanilline sulfurique et après chauffage.

VI.4.2 Extrait butanolique

Une colonne chromatographique a été utilisée pour la séparation de 10g de la phase butanolique avec le système d'élution Chloroforme/Méthanol donnant naissance à 27 fractions (voir le tableau IV.13).

Tableau IV.13 : fractionnement de l'extrait butanolique

Fractions	Eluant de colonne	Observation sur CCM
1	Chloroforme	Néant
2	//	4 taches
	Chloroforme/Méthanol	
3	99/1	3 taches
4	//	2 taches
5	97/3	Une tache
6	//	2 taches+ trainée
7	95/5	Trainée

8	//	//
9	90/10	//
10	//	//
11	80/20	Une tache + trainée
12	//	//
13	70/30	Néant
14	//	Trainée
15	60/40	//
16	//	//
17	//	//
18	//	//
19	50/50	//
20	//	//
21	//	//
22	30/70	//
23	//	//
24	//	Une tache +trainée
25	//	//
26	90/10	Néant
27	Méthanol	//

Les fractions qui montrent les mêmes taches au vu de l'analyse CCM, ont été rassemblées donnant naissance à 13 fractions (de C1 jusqu'à C13, voir tableau IV.14).

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
C-1	1-2	62.4	Néant
C-2	3-5	50	4 taches
C-3	6-8	125.2	2 taches
C-4	9-10	368.8	Trainée
C-5	11	646.2	//
C-6	12	724.6	//
C-7	13	1466	//
C-8	14-15	1634	//
C-9	16-19	1528	//
C-10	20-21	626.7	//
C-11	22-24	1022	Une tache + trainée
C-12	25	4494	//
C-13	26-27	7	Néant

Tableau IV.14 : Rassemblement des fractions de l'extrait butanolique

IV.2.1. Purification

➤ Etude de C-12

La fraction C-12 (4494 mg) est séparée sur colonne de gel de silice en utilisant le système d'élution chloroforme/méthanol (10% CHCl₃/MeOH à 100% MeOH) pour obtenir les sous fraction (C'1à C'6) selon le tableau suivant :

Fractions	Eluant de colonne	Masse en mg	Observation sur CCM
	CHCl ₃ /MeOH		
C'1	90/10	13.9	Néant
C'2	80/20	34.9	//
C'3	70/30	205.8	Trainée
C'4	//	141.9	//
C'5	//	116	Une tache + trainée
C'6	Méthanol	48.9	Néant

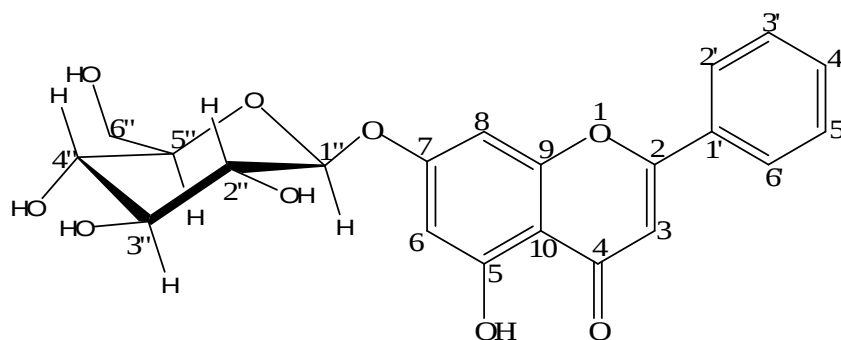
Tableau IV.15 : fractionnement de C-12

Une précipitation de la fraction C'5 dans le Méthanol a donné le composé **M1** à l'état pur (11 mg). La CCM de ce dernier montre la présence d'une tache visible à 254nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage.

IV.4.3. Composés isolés de l'espèce *Calycotome spinosa*

IV.4.3.1. Composé M1

Formule brute: C₂₁H₂₀O₉



Nom systématique: 7-O-(β-D-glucopyranosyl)chrysin

Poids du produit: 6,3 mg

Comportement chromatographique :

- R_f = 0,5 (système d'élution : CHCl₃-MeOH 85-15 v/v)
- Visible sous la lumière UV
- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune
- P_f = 213-215°C
- Aspect: poudre jaune

Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, TMS):

- 7.06 (1H, s, H-3)
- 6.47 (1H, d, H-6)
- 6.87 (1H, d, H-8)
- 8.08 (2H, d, H-2', H-6')
- 7.6 (2H, m, H-3', H-5')
- 7.66 (1H, m, H-4')
- 5.08 (1H, d, H-1'')
- 3.28 (1H, m, H-2'')
- 3.34 (1H, m, H-3'')
- 3.17 (1H, tl, H-4'')
- 3.42 (1H, m, H-5'')

3.51 (1H, m, H-6''a)

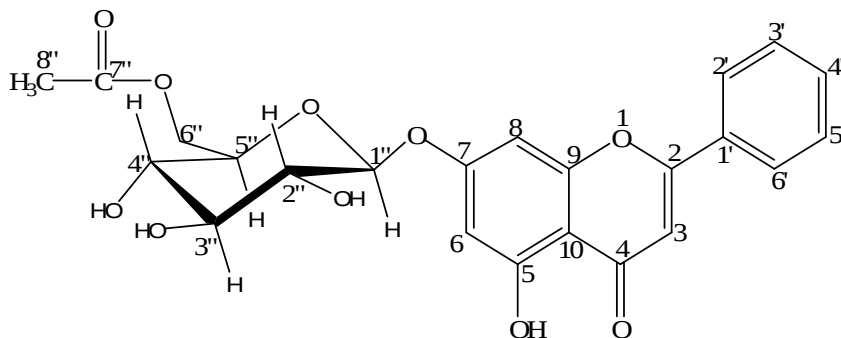
3.73 (1H, m, H-6''b)

Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO, TMS)

164.16 (C-2); 105.92 (C-3); 182.66 (C-4); 161.57 (C-5); 100.15 (C-6); 163.65 (C-7); 95.45 (C-8); 157.57 (C-9); 106.05 (C-10); 131.04 (C-1'); 126.98 (C-2', C-6'); 129.64 (C-3', C-5'); 132.7 (C-4'); 100.31 (C-1''); 73.54 (C-2''); 77.63 (C-3''); 69.98 (C-4''); 76.87 (C-5''); 61.03 (C-6'').

IV.4.3.2. Composé M2

Formule brute: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$



Nom systématique: 7-O- β -D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]chrysin

Poids du produit: 11mg

Comportement chromatographique :

- $R_f = 0,4$ (système d'élution : CH_2Cl_2 -MeOH 93-7 v/v)
- Visible sous la lumière UV

- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune

- Pf= 229-231°C

-Aspect: poudre jaune

Spectre RMN ^1H :(400 MHz, CD_3OD , TMS):

7.07 (1H, s, H-3)

6.46 (1H, d, H-6)

6.85 (1H, d, H-8)

8.08 (1H, d, H-2', H-6')

7.6 (1H, m, H-3', H-5')

7.66 (1H, m, H-4')

5.36 (1H, d, H-1'')

3.31 (1H, m, H-2'')

3.33 (1H, m, H-3'')

3.17 (1H, m, H-4'')

3.74 (1H, t, H-5'')

4.08 (1H, dd, H-6''a)

4.36 (1H, dd, H-6''b)

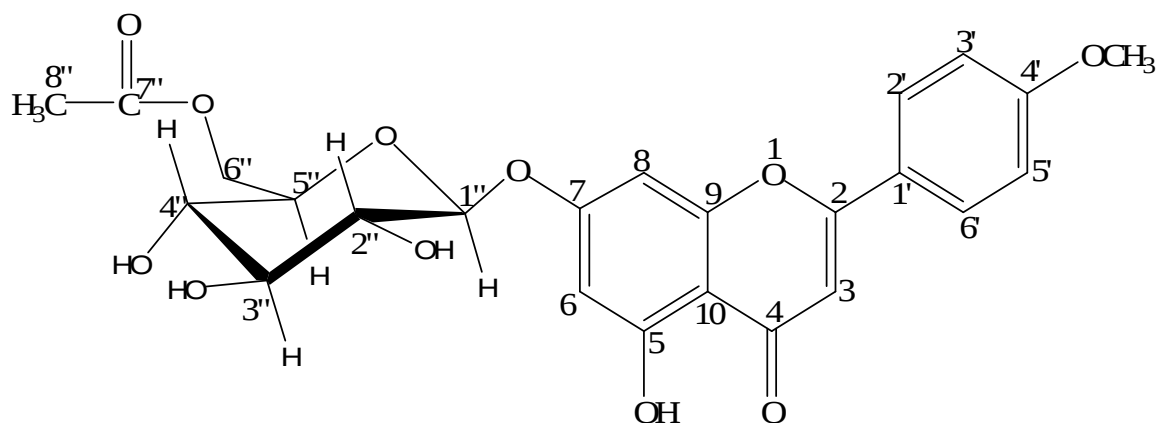
1.99 (3H, s, H-8'')

Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO, TMS)

164.15 (C-2); 105.93 (C-3); 182.68 (C-4); 161.55 (C-5); 100 (C-6); 163.37 (C-7); 95.48 (C-8); 157.54 (C-9); 106.12 (C-10); 131 (C-1'); 126.93 (C-2', C-6'); 129.63 (C-3', C-5'); 132.72 (C-4'); 100.14 (C-1''); 73.43 (C-2''); 76.63 (C-3''); 70.22 (C-4''); 74.31 (C-5''); 63.81 (C-6''); 170.65 (C-7''); 21.03 (C-8'').

IV.4.3.3. Composé M3

Formule brute: $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$



Nom systématique: 7-O- β -D-[(6''-acetyl)glucopyranosyl]acacetin

Poids du produit: 5mg

Comportement chromatographique :

- R_f = 0,5 (système d'élution : CH₂Cl₂-MeOH 93-7 v/v)

- Visible sous la lumière UV

- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune

-Aspect: poudre jaune

Spectre RMN ¹H :(400 MHz, Acétone-d₆, TMS):

6.48 (1H, s, H-3)

6.03 (1H, d, H-6)

6.11 (1H, d, H-8)

8.07 (1H, d, H-2', H-6')

7.36 (1H, m, H-3', H-5')

5.16 (1H, d, H-1'')

3.55 (1H, m, H-2'')

3.58 (1H, m, H-3'')

3.53 (1H, m, H-4'')

3.89 (1H, H-5'')

4.19 (1H, d, H-6''a)

4.48 (1H, d, H-6''b)

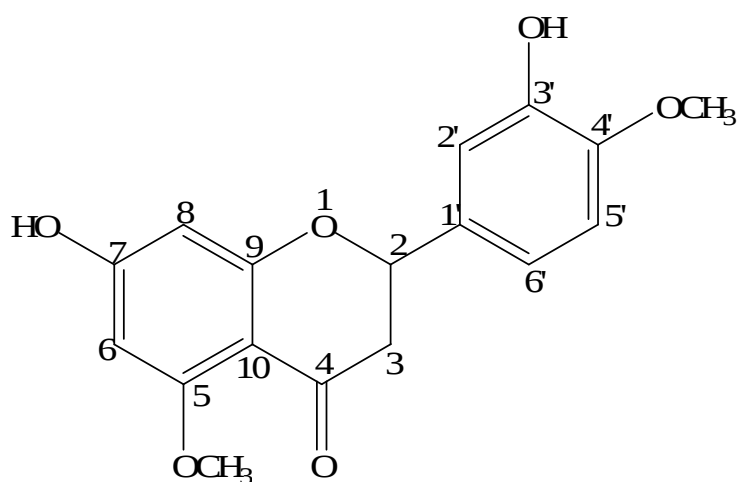
2.08 (3H, s, H-8'')

Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone- d_6 , TMS)

165.20(C-2); 106.43 (C-3); 183.44 (C-4); 162.98 (C-5); 96.91 (C-6); 164.44 (C-7); 94.00 (C-8); 158.51 (C-9); 107.06 (C-10); 119.08 (C-1'); 127.37 (C-2', C-6'); 115.68 (C-3', C-5'); 163.69 (C-4'); 101.32 (C-1''); 74.53 (C-2''); 77.80 (C-3''); 71.20 (C-4''); 75.26 (C-5''); 64.31 (C-6''); 170.93 (C-7''); 20.77 (C-8''); 56.37 (4'-OMe).

IV.4.3.4. Composé M4

Formule brute: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$



Nom systématique: 7,5'-dihydroxy-5,4'-diméthoxyflavanone

Poids du produit:5.4mg

Comportement chromatographique :

- Rf = 0,3 (système d'élution : CH₂Cl₂-MeOH 93-7 v/v)
- Visible sous la lumière UV
- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune
- Aspect: poudre jaune

Spectre RMN ¹H :(400 MHz, Acetone-d6, TMS):

5.34 (1H, dd, H-2)

2.99 (1H, dd, H-3a)

2.58 (1H, dd, H-3b)

6.14 (1H, d, H-6)

6.06 (1H, d, H-8)

7.16 (1H, d, H-2')

6.86 (1H, d, H-5')

6.98 (1H, ddd, H-6')

3.80 (3H, s, 4'-OMe)

3.88 (3H, s, 5-OMe)

Spectre RMN ¹³C (100 MHz, Acétone-d6, TMS)

80.00 (C-2); 46.50 (C-3); 188.09 (C-4); 163.75 (C-5); 94.11 (C-6); 165.72 (C-7);
96.70 (C-8); 164.89 (C-9); 131.91 (C-1'); 111.15 (C-2'); 147.81 (C-3'); 148.45 (C-4');
115.71 (C-5'); 120.37 (C-6); 56.08 (4'-OCH₃); 56.39 (5-OCH₃).

Résumé

Les vertus médicinales attribuées aux plantes orientent les chercheurs sur la présence de principes actifs. Ces molécules qui proviennent du métabolisme secondaire des plantes, sont utilisées par l'homme dans son arsenal thérapeutique. Dans ce contexte, la phytochimie aborde la biogenèse des constituants actifs, leur isolement, et l'étude de leur structure chimique. Les recherches menées autour de cette thèse rentrent dans ce cadre et s'intéressent particulièrement à l'étude phytochimique de l'espèce *Calycotome spinosa* qui peut avoir une utilisation thérapeutique. L'objectif du présent travail est la détermination des structures des molécules isolées à partir de cette plante.

Dans le premier chapitre de cette thèse, une description botanique de la plante, est donnée en se rattachant surtout à leur composition chimique. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des caractéristiques biosynthétiques des principaux composés flavonoidiques qu'on retrouve dans la plante étudiée. La synthèse de plusieurs données bibliographiques concernant ces produits naturels a constitué une partie importante de ce chapitre. Le troisième chapitre concerne l'identification et la

détermination des structures de certains composés isolés en utilisant des techniques spectrales de pointe, telles que la RMN- ¹H, RMN-¹³C, etc. Dans le quatrième chapitre sont reportés les protocoles et les techniques d'analyses utilisés et toutes les caractéristiques spectrales des produits isolés.

L'investigation phytochimique des extraits chloroformique et butanolique de la plante *Calycotome spinosaa* été entreprise. L'étude effectuée a abouti à l'isolement de quatre composés, dont la structure a été établie au moyen de méthodes spectrales (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, etc.). Des références bibliographiques ont été requises pour la confirmation des structures déterminées.

Mots clés : phytochimie, *Calycotome spinosa*, composés flavoniques, RMN- ¹H, RMN-¹³C.

ABSTRACT

The medicinal properties attributed to the plants orient the researchers to the presence of active principles. These molecules originate from secondary plants metabolism, are used by man in his arsenal therapeutic. In this context, phytochemistry deals with the biogenesis of active constituents, their isolation and the study of their chemical structure. Researches conducted around this thesis fit into this framework and are particularly interested in the phytochemical study of the species *Calycotome spinosa* which may have a therapeutic use. The objective of this work is the determination of the structures of molecules isolated from this plant.

In the first chapter of this thesis, a botanical description of the plant is given mainly by relating to their chemical compositions. The second chapter is devoted to presenting the main biosynthetic characteristics of flavonoid compounds found in the studied plant. The synthesis of several bibliographic information on these natural products has been an important part of this chapter. The third chapter concerns with the identification and structure determination of some isolated compounds using advanced spectral techniques such as ¹H NMR, ¹³C NMR, etc. In the fourth chapter protocols and analysis techniques used and all the spectral characteristics of the isolated products are reported.

The phytochemical investigation of chloroform and butanol extracts of the plant *Calycotome spinosa* has been undertaken. The study has led to the isolation of four compounds, whose structure was established by spectral methods (¹H NMR, ¹³C NMR, etc.) Bibliographic references were required for confirmation of determined structures.

Keywords: Phytochemistry, *Calycotome spinosa*, flavonoid compounds, ¹H-NMR, ¹³C NMR.

الملخص

الخصائص الطبية للنباتات التي توجه الباحثين إلى وجود مكونات نشطة، أو بعبارة أخرى الجزيئات التي تنتمي إلى فئة كيميائية معينة. هذه الجزيئات تنشأ من عملية الأيض الثانوي للنباتات، استخدمت من طرف الإنسان في أسلحته الطبية.

في هذا السياق، كيمياء النباتات تتعرض للمكونات الفعالة بيولوجيا، إلى فصلها ودراستها أو البحث عن الصيغ الكيميائية لها.

الأبحاث التي أجريت حول هذه الأطروحة تدخل في هذا الباب و تهتم خصوصا بالدراسة الكيميائية النباتية للنوع الهدف من هذه الدراسة *Calycotome spinosa* و التي يمكن أن يكون لها استخدام طبي. هو تحديد صيغ المركبات المفصولة من النبتة المذكورة سابقا.

في الفصل الأول من هذه الأطروحة، نعطي وصفا من منظور علم النبات للنبتة، يتعلق أساسا بتركيبها الكيميائية.

الفصل الثاني كرس لتقديم الخواص الاصطناعية الحيوية للفلافونيدات وكذا التخليق الحيوي لها الذي يشكل جزءا هاما من هذا الفصل.

الفصل الثالث يهتم بتعيين وتحديد صيغ المركبات المفصولة باستعمال التقنيات الطيفية مثل طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون، والكربون،¹³C... الخ.

في الفصل الرابع قدمت خطط و تقنيات التحليل المستعملة و الخواص الطيفية للمركبات المفصولة. لقد أجريت دراسة كيمياء النبات للمستخلص الكلوروفورمي و البوتانولي للنبتة *Calycotome spinosa*.

الدراسة المنجزة أدت إلى فصل 4 مركبات تم تحديد صيغها باستعمال الطرق الطيفية (¹³C-RMN

¹H-RMN... الخ) مع الأخذ بالمراجع لتأكيد المركبات المعينة.

كلمات البحث : كيمياء النبات، *Calycotome spinosa*، المركبات الفلافونية، طيف الرنين النووي

المغناطيسي للبروتون، والكربون،¹³C.